



(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 I595006 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 08 月 11 日

(21)申請案號：104140158

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 12 月 01 日

(51)Int. Cl. : C07K16/24 (2006.01) A61K39/395 (2006.01)

(30)優先權：2014/12/09 美國 62/089,658

2015/10/16 美國 62/242,750

2015/11/06 美國 62/251,973

(71)申請人：禮納特神經系統科學公司(美國) RINAT NEUROSCIENCE CORP. (US)
美國

(72)發明人：艾比迪奇 亞斯米納 ABDICHE, YASMINA NOUBIA (GB)；趙 海倫 CHO, HELEN KIM (US)；何 維賢 HO, WEIHSIEN (US)；宙斯 柯林 JOOSS, KARIN UTE (DE)；拉傑帕 亞溫德 RAJPAL, ARVIND (US)；由希夫 蘇珊 YOUSSEF, SAWSAN (IL)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

US 2011/0243932A1

US 2011/0305711A1

WO 2014/179664A2

審查人員：陳逸霖

申請專利範圍項數：42 項 圖式數：4 共 285 頁

(54)名稱

抗 P D－1 抗體類和使用彼等之方法

ANTI-PD-1 ANTIBODIES AND METHODS OF USE THEREOF

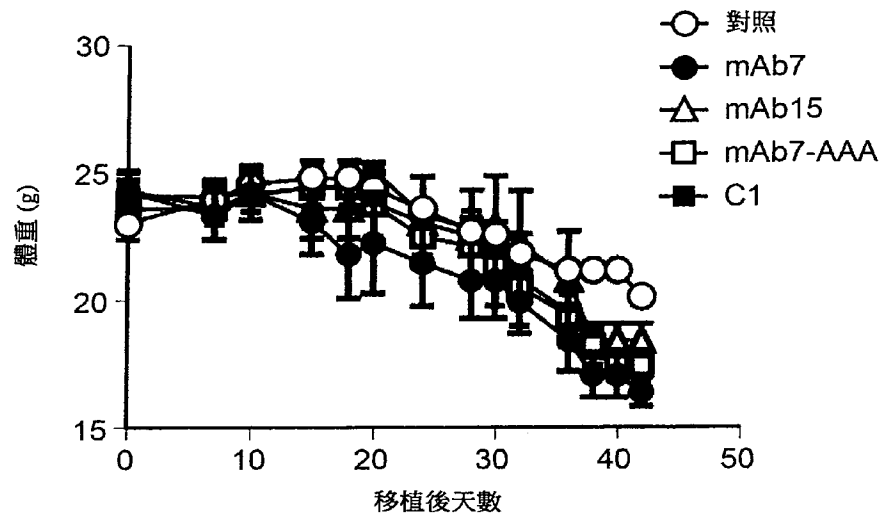
(57)摘要

本發明提供結合計畫性細胞死亡蛋白 1(programmed cell death protein 1；PD-1)之拮抗性抗體類和使用彼等之方法。該抗 PD-1 抗體類可治療上單獨或與其他治療劑組合以用於治療癌症及其他疾病。

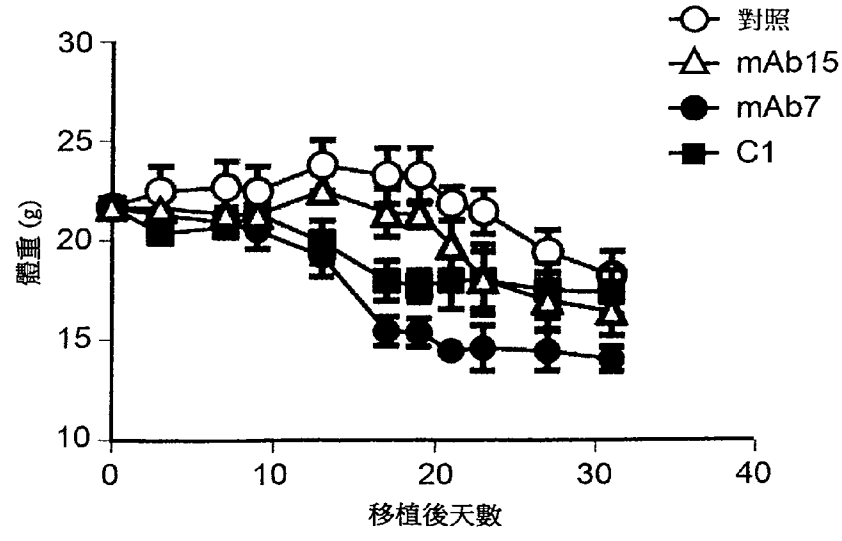
The present invention provides antagonizing antibodies that bind to programmed cell death protein 1 (PD-1) and methods of using same. The anti-PD-1 antibodies can be used therapeutically alone or in combination with other therapeutics to treat cancer and other diseases.

指定代表圖：

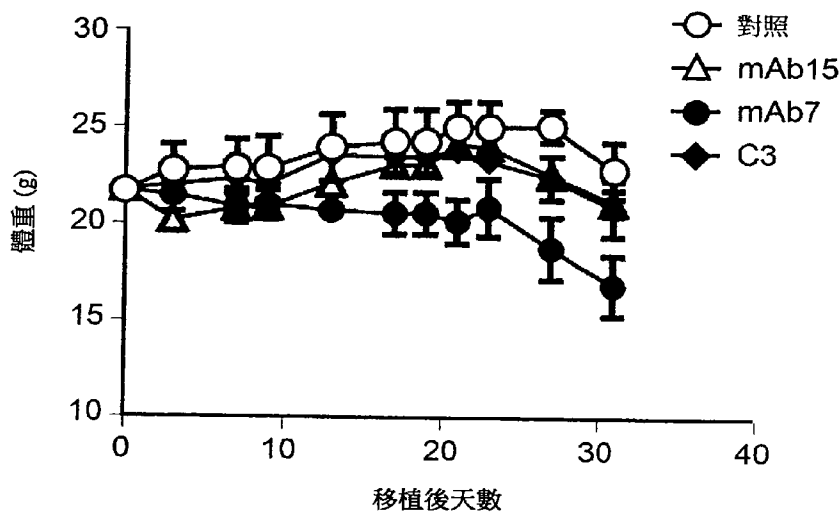
第 1A 圖



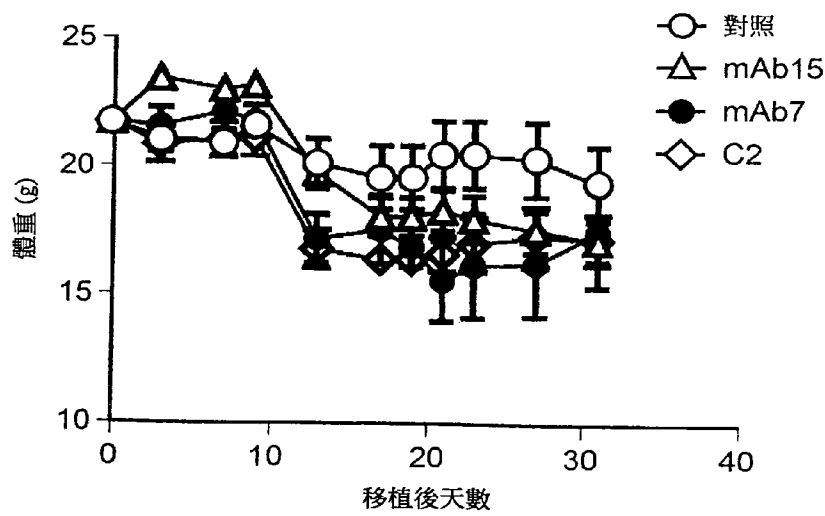
第 1B 圖



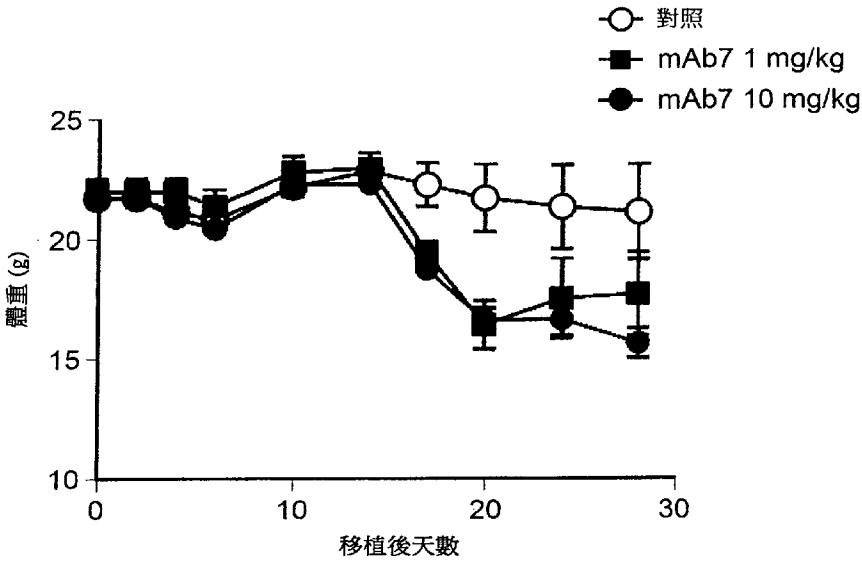
第 1C 圖



第 1D 圖



第 1E 圖



公告本

發明摘要

※申請案號：104140158

※申請日：104 年 12 月 01 日

※IPC 分類：C07K 16/54 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

抗 PD-1 抗體類和使用彼等之方法

Anti-PD-1 antibodies and methods of use thereof

【中文】

本發明提供結合計畫性細胞死亡蛋白 1 (programmed cell death protein 1 ; PD-1)之拮抗性抗體類和使用彼等之方法。該抗 PD-1 抗體類可治療上單獨或與其他治療劑組合以用於治療癌症及其他疾病。

【英文】

The present invention provides antagonizing antibodies that bind to programmed cell death protein 1 (PD-1) and methods of using same. The anti-PD-1 antibodies can be used therapeutically alone or in combination with other therapeutics to treat cancer and other diseases.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第(1)圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

抗 PD-1 抗體類和使用彼等之方法

Anti-PD-1 antibodies and methods of use thereof

【技術領域】

本發明關於抗體類，例如結合 PD-1 之全長抗體類。本發明進一步關於包含抗 PD-1 抗體類之組成物及使用抗 PD-1 抗體類作為藥劑之方法。某些具體態樣關於使用抗 PD-1 抗體類於各式疾病之治療、預防及/或診斷之方法，該疾病包括過度增生疾病，諸如癌症。

【先前技術】

PD-1 係 50 至 55kDa 之第 I 型跨膜受體，其起初係在經歷活化誘導之細胞凋亡的 T 細胞系中被識別。PD-1 係表現於 T 細胞、B 細胞及巨噬細胞上。PD-1 之配體係 B7 家族成員 PD-L1(B7-H1)及 PD-L2(B7-DC)。

PD-1 係免疫球蛋白(Ig)超家族之成員，該超家族在其胞外區含有單個 Ig V-樣結構域。PD-1 細胞質結構域含有二個酪胺酸，具有最接近於膜的酪胺酸(小鼠 PD-1 中的 VAYEEL)位於 ITIM(免疫受體酪胺酸基底抑制模體)內。PD-1 上 ITIM 的存在表明此分子功能為藉由召集細胞質磷酸酶而削弱抗原受體的傳信(signaling)。人類和鼠類 PD-1

蛋白共享大約 60% 的胺基酸一致性，具有保守之四個潛在的 N-糖基化位點，及定義 Ig-V 結構域的殘基。細胞質區中的 ITIM 及羧基末端酪胺酸周圍的 ITIM-樣模體在人類和鼠類進化同源物(orthologue)之間亦是保守的。

癌症免疫療法已傳統上涉及使用細胞與經個體化且費時之製劑的複雜方法。最近，基於遞送至適應免疫系統之壓抑信號的中斷的單克隆抗體基底癌症免疫療法，已顯示於臨床中現有全身性免疫療法之設定內有希望。然而，本領域對於獲得癌症之更安全且更有效之治療有持續需求。

【發明內容】

本發明提供選擇性地與 PD-1 交互作用之抗體類。已證明某些抗 PD-1 抗體係有效於活體內預防及/或治療癌症。有利地，本文中所提供之抗 PD-1 抗體類結合人類、馬來猴及小鼠之 PD-1。亦有利地，本文中所提供之抗 PD-1 抗體類有效於活體內刺激 T 細胞增生。

本文中提供專一性結合 PD-1 且預防或減少 PD-1 之生物效應之經分離之拮抗劑抗體類。於一些實施態樣中，該拮抗劑抗體可為，舉例來說，人類、人源化或嵌合抗體。本文中所揭示之發明係針對結合 PD-1 之抗體類。

於一種面向中，本發明提供一種經分離之拮抗劑抗體，其專一性結合 PD-1，其中該抗體包含：重鏈可變區 (VH)，其包含該 VH 的 VH 互補決定區 1(CDR1)、VH CDR2 及 VH CDR3，該 VH 具有選自 SEQ ID NO：3、

SEQ ID NO：4、SEQ ID NO：5 及 SEQ ID NO：6 所組成群組之胺基酸序列；及輕鏈可變區(VL)，其包含該 VL 的 VL CDR1、VL CDR2 及 VL CDR3，該 VL 具有選自 SEQ ID NO：2、SEQ ID NO：7、SEQ ID NO：8 及 SEQ ID NO：9 所組成群組之胺基酸序列。

於一些實施態樣中，該 VH 區包含示於 SEQ ID NO：3、4、5 或 6 之胺基酸序列、或彼在非 CDR 內之殘基具有一或數個保守性胺基酸取代之變體及/或該 VL 包含示於 SEQ ID NO：2、7、8 或 9 之胺基酸序列、或彼在非 CDR 內之胺基酸具有一或數個胺基酸取代之變體。於一些實施態樣中，該抗體包含：包含示於 SEQ ID NO：39 之胺基酸序列之輕鏈及/或包含示於 SEQ ID NO：29 或 38 之胺基酸序列之重鏈。於一些實施態樣中，該抗體包含具有 ATCC 登錄號 PTA-121183 之表現載體所產製之 VH 區。於一些實施態樣中，該抗體包含具有 ATCC 登錄號 PTA-121182 之表現載體所產製之 VL 區。

於另一種面向中，本發明提供一種經分離之抗體，其專一性結合 PD-1，其中該抗體包含：包含示於 SEQ ID NO：13、14 或 15 之胺基酸序列之 VH CDR1、包含示於 SEQ ID NO：16、17、24、25、27、28、35 或 36 之胺基酸序列之 VH CDR2、包含示於 SEQ ID NO：18、23、26 或 37 之胺基酸序列之 VH CDR3、包含示於 SEQ ID NO：10、22、30 或 32 之胺基酸序列之 VL CDR1、包含示於 SEQ ID NO：11、20 或 33 之胺基酸序列之 VL CDR2 及包

含示於 SEQ ID NO: 12、21、31 或 34 之胺基酸序列之 VL CDR3。

於一些實施態樣中，該抗體可為人類抗體、人源化抗體或嵌合抗體。於一些實施態樣中，該抗體係單克隆抗體。

於一些實施態樣中，該抗體包含恆定區。於一些實施態樣中，該抗體具有人類 IgG₁、IgG₂、IgG_{2Δa}、IgG₃、IgG₄、IgG_{4Δb}、IgG_{4Δc}、IgG₄ S228P、IgG_{4Δb} S228P 及 IgG_{4Δc} S228P 亞型。於一些實施態樣中，該抗體具有 IgG4 同型且包含經安定絞鏈，例如 S228P。

於另一種面向中，本發明提供一種經分離之抗體，其專一性結合 PD-1 且與如本文中所述之該抗體類競爭及/或結合相同 PD-1 表位。

於一些實施態樣中，本文中所提供之抗 PD-1 抗體促進 T 細胞分泌 IFN γ 及/或 TNF。

於一些實施態樣中，本文中所提供之抗 PD-1 抗體促進 T 細胞增生。

於一些實施態樣中，本文中所提供之抗 PD-1 抗體抑制腫瘤生長。

於一些實施態樣中，本文中所提供之抗 PD-1 抗體結合人類 PD-1 與小鼠 PD-1。

於另一種面向中，本發明提供一種醫藥組成物，其包含治療有效量之 PD-1 抗體及醫藥上可接受之載劑。

於另一種面向中，本發明提供一種經分離之多核苷

酸，其包含編碼如本文中所述之 PD-1 抗體之核苷酸序列。於另一種面向中，本發明提供一種載體，其包含該多核苷酸。

於另一種面向中，本發明提供一種經分離之宿主細胞，其重組產製如本文中所述之 PD-1 抗體。

於另一種面向中，本發明提供一種產製抗 PD-1 拮抗劑抗體之方法，該方法包括：將重組產製如本文中所述之抗體之細胞系培養於其中該抗體被產製之條件下；及回收該抗體。

於另一種面向中，本發明提供一種產製抗 PD-1 拮抗劑抗體之方法，該方法包括：將包含編碼抗體之核酸之細胞系培養於其中該抗體被產製之條件下，其中該抗體包含：包含示於 SEQ ID NO：29 或 38 之胺基酸序列之重鏈及包含示於 SEQ ID NO：39 之胺基酸序列之輕鏈；及回收該抗體。

於一些實施態樣中，該重鏈與輕鏈係編碼在個別載體上。於其他實施態樣中，重鏈與輕鏈係編碼在相同載體上。

於另一種面向中，本發明提供一種用於治療個體之狀況(condition)之方法，其包含對需要彼之個體投予有效量之如本文中所述之醫藥組成物。於一些實施態樣中，該症狀係癌症。於一些實施態樣中，該癌症係選自胃癌、肉瘤、淋巴瘤、白血病、頭部和頸部癌症、胸腺癌、上皮癌、唾液腺癌、肝癌、胃癌、甲狀腺癌、肺癌、卵巢癌、

乳腺癌、前列腺癌、食道癌、胰腺癌、膠質瘤、白血病、多發性骨髓瘤、腎細胞癌、膀胱癌、子宮頸癌、絨毛膜癌、結腸癌、口腔癌、皮膚癌及黑色素瘤所組成群組。於一些實施態樣中，該個體係具有局部晚期或轉移黑色素瘤、鱗狀細胞頭的頸癌(SCHNC)、卵巢惡性腫瘤、肉瘤、或復發或難治的經典霍奇金氏淋巴瘤(cHL)之先前經治療的成人病患。於一些實施態樣中，該癌症可為鉑抗性及/或鉑難治癌症，諸如，例如鉑抗性及/或難治卵巢癌、鉑抗性及/或難治乳腺癌、或鉑抗性及/或難治肺癌。於一些實施態樣中，抗 PD-1 抗體以劑量約 0.5 mg/kg、約 1.0 mg/kg、約 3.0 mg/kg 或約 10 mg/kg 投予。於一些實施態樣中，該抗 PD-1 抗體以每 7、14、21 或 28 天投予一次。於一些實施態樣中，該抗 PD-1 抗體係經靜脈內或皮下投予。

於另一種面向中，本發明提供一種抑制具有腫瘤之個體之腫瘤生長或惡化之方法，其包含對該個體投予有效量之如本文中所述之醫藥組成物。

於另一種面向中，本發明提供一種抑制或預防個體之癌細胞轉移之方法，其包含對需要彼之該個體投予有效量之如本文中所述之醫藥組成物。

於另一種面向中，本發明提供一種誘導具有 PD-1 表現腫瘤之個體之腫瘤緩解之方法，其包含對該個體投予有效量之如本文中所述之醫藥組成物。

於一些實施態樣中，本文中之該抗體可非經腸地投予

至個體。於一些實施態樣中，該個體係人類。

於一些實施態樣中，該方法可進一步包含投予有效量之第二治療劑。於一些實施態樣中，該第二治療劑係，舉例來說，克里唑替尼 (crizotinib)、帕博西尼 (palbociclib)、抗 CTLA4 抗體、抗 4-1BB 抗體、或第二 PD-1 抗體。

也提供者係一種如本文中所述之該抗 PD-1 拮抗劑抗體之任一者於製造在需要彼之個體內用於癌症治療或用於抑制癌症生長或惡化之藥劑之用途。於一些實施態樣中，該抗 PD-1 拮抗劑抗體減少該個體之重量增加。

亦提供者係一種在需要彼之個體內用於癌症治療或用於抑制癌症生長或惡化之抗 PD-1 拮抗劑抗體。於一些實施態樣中，該癌症係，舉例來說但不限於，胃癌、肉瘤、淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、白血病、頭部和頸部癌症、胸腺癌、上皮癌、唾液腺癌、肝癌、胃癌、甲狀腺癌、肺癌 (包括，例如非小細胞肺癌)、卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、食道癌、胰腺癌、膠質瘤、白血病、多發性骨髓瘤、腎細胞癌、膀胱癌、子宮頸癌、絨毛膜癌、結腸癌、口腔癌、皮膚癌及黑色素瘤。

於另一種面向中，本揭露提供一種用於增進用在哺乳動物癌症治療之疫苗的免疫原性效應或治療效應之方法，該哺乳動物特別是人類，該方法包含對接受該疫苗之該哺乳動物投予有效量之本揭露所提供之抗 PD-1 拮抗劑抗體。

於另一種面向中，本揭露提供一種用於治療哺乳動物癌症之方法，該哺乳動物特別是人類，該方法包含對該哺乳動物投予(1)有效量之能引發抗該癌細胞的免疫反應的疫苗及(2)有效量之本揭露所提供之抗 PD-1 拮抗劑抗體。

【圖式簡單說明】

第 1A 圖繪示總結經抗 PD-1 拮抗劑抗體處理之小鼠體重的圖。

第 1B 圖繪示總結經抗 PD-1 拮抗劑抗體處理之小鼠體重的圖。

第 1C 圖繪示總結經抗 PD-1 拮抗劑抗體處理之小鼠體重的圖。

第 1D 圖繪示總結經抗 PD-1 拮抗劑抗體處理之小鼠體重的圖。

第 1E 圖繪示總結經抗 PD-1 拮抗劑抗體處理之小鼠體重的圖。

第 2A 圖繪示總結抗 PD-1 抗體結合初級人類經活化 T 細胞之 EC50 的圖。

第 2B 圖繪示總結抗 PD-1 抗體結合初級馬來猴經活化 T 細胞之 EC50 的圖。

第 3 圖繪示總結所培養之經活化 CD4 T 細胞增生的柱狀圖，該 T 細胞係經如下處理者：(a)無抗體；(b)同型對照；(c)EH12.1；(d)C1；(e)C2；(f)C3；(g)mAb1；(h)mAbX；(i)mAb4；(j)mAb5；(k)mAb6；(l)mAb7；

(m)mAb9 ; (n)mAb10 ; (o)mAb11 ; (p)mAb14 ;
(q)mAb15 ; (r)mAb16 。

第 4 圖繪示總結所培養之經活化 CD8 T 細胞增生的柱狀圖，該 T 細胞係經如下處理者：(a)無抗體；(b)同型對照；(c)EH12.1；(d)C1；(e)C2；(f)C3；(g)mAb1；(h)mAbX；(i)mAb4；(j)mAb5；(k)mAb6；(l)mAb7；(m)mAb9；(n)mAb10；(o)mAb11；(p)mAb14；(q)mAb15；(r)mAb16。

【實施方式】

本文中所揭示者為專一性結合 PD-1 之抗體類。係提供作出抗 PD-1 抗體類之方法、包含這些抗體之組成物及使用這些抗體作為藥劑之方法。抗 PD-1 抗體類可用於抑制腫瘤惡化，及可用於癌症及/或其他疾病之預防及/或治療中。

一般技術

除非另行表明，否則實施本發明將採用分子生物學(包括重組技術)、微生物學、細胞生物學、生物化學及免疫學之習用技術，其係於本領域之通常知識內。此等技術係於文獻中充分解釋，諸如 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harbor Press；Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984)；Methods in Molecular Biology, Humana

Press ; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press ; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987) ; Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press ; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons ; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.) ; Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.) ; Gene Transfer Vectors for Mammalian 細胞 (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987) ; Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) ; PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994) ; Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991) ; Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999) ; Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997) ; Antibodies (P. Finch, 1997) ; Antibodies: a practical approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989) ; Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000) ; Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999) ; The Antibodies (M. Zanetti and J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995) .

定義

除非另行表明，下述用語將理解成具有下述意義：用語「經分離之分子」係指稱憑藉其衍生起源或來源係如下之分子(其中該分子為，例如多肽、多核苷酸或抗體)：(1)係不與在其天然狀態下伴隨其之天然相關成分結合；(2)係實質上不含來自相同來源，例如物種、其係從之表現的細胞、庫、等之其他分子；(3)係被來自不同物種之細胞表現；或(4)係不在天然中發生。因此，經化學合成之分子、或在不同於從之其係天然起源之系統的細胞系統中表現之分子，將與其天然相關成分「分離」。也可藉由使用該領域廣為週知之純化技術的分離，使分子實質上不含天然相關成分。分子純度或同質性(homogeneity)可藉由該領域廣為週知之多種手段檢測。舉例來說，多肽樣品之純度可使用聚丙烯醯胺凝膠電泳與使用該領域廣為週知之技術染色該凝膠，以視覺化該多肽而檢測。為了某些目的，可藉由使用 HPLC 或該領域廣為週知之其他純化手段提供更高解析。

「抗體」係免疫球蛋白分子，其係能透過位在該免疫球蛋白分子之可變區中的至少一個抗原辨認位點專一性結合目標，諸如碳水化合物、多核苷酸、脂質、多肽、等。除非另行具體指明，本文中所使用之該用語不僅涵蓋完整多克隆或單克隆抗體類，也包含與該完整抗體競爭專一性結合之任何彼之抗原結合部份、包含抗原結合部份之融合蛋白及包含抗原辨認位點之免疫球蛋白分子的任何其他經

修飾構形。抗原結合部份包括，舉例來說 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、結構域抗體(dAb，例如鯊魚及駱駝抗體)、包括互補決定區(CDR)之片段、單鏈可變片段抗體(scFv)、大型抗體(maxibodies)、迷你抗體(minibodies)、細胞內抗體(intrabodies)、雙價抗體(diabodies)、三價抗體、四價抗體、v-NAR 及雙-scFv，及含有足以授予該多肽專一性抗原結合之免疫球蛋白的至少一部分之多肽。抗體包括任何類型之抗體，諸如 IgG、IgA 或 IgM(或彼等之亞型)，且該抗體不需要是任何特定類型。取決於其之重鏈恆定區之抗體胺基酸序列，免疫球蛋白可被分派到不同類型中。有五種主要的免疫球蛋白類型：IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM，且這些中的數種可進一步分成亞型(同型)，例如 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁ 及 IgA₂。對應不同類型免疫球蛋白之該等重鏈恆定區分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同類型免疫球蛋白的次單元結構及三維構形係熟知。

抗體之「可變區」係指稱不論是單獨或組合之抗體輕鏈之可變區或抗體重鏈之可變區。如該領域已知，重鏈及輕鏈之可變區各由下列所組成，並有助於形成該抗體之抗原結合位點：藉由三個互補決定區(CDR)連接之四個架構區(FR)，CDR 亦稱為超變異區。若所欲者為個體可變區之變體，特別是在 CDR 區外(亦即，在架構區中)之胺基酸殘基具有取代者，適當之胺基酸取代，較佳地保守性胺基酸取代，可藉由比較該個體可變區與其含有和該個體可變區

相同之典範類型(*canonical class*)中的 CDR1 及 CDR2 序列之其他抗體的可變區而識別出(Chothia and Lesk, *J Mol Biol* 196(4): 901-917, 1987)。

在某些實施態樣中，明確劃定 CDR 及識別包含抗體結合位點的殘基係藉由拆解該抗體之結構及/或拆解該抗體-配體複合物之結構完成。在某些實施態樣中，其可藉由該領域具有通常知識者所知之各式技術中的任一者完成，諸如 X 光結晶學。在某些實施態樣中，各式分析方法可被用於識別或估計該 CDR 區。在某些實施態樣中，各式分析方法可被用於識別或估計該 CDR 區。此等方法之實施例包括但不限於卡巴(Kabat)定義、柯西亞(Chothia)定義、AbM 定義、接觸定義及構形定義。

卡巴定義係用於編號抗體中殘基之標準，且係典型用於識別 CDR 區。見例如 Johnson & Wu, 2000, *Nucleic Acids Res.*, 28: 214-8。柯西亞定義與卡巴定義相似，但柯西亞定義考慮某些結構圈環區之位置。見例如 Chothia et al., 1986, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-17; Chothia et al., 1989, *Nature*, 342: 877-83。AbM 定義使用 Oxford Molecular Group 產製之整合套裝電腦程式，其模型化抗體結構。見例如 Martin et al., 1989, *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 86:9268-9272; “AbM™, A Computer Program for Modeling Variable Regions of Antibodies,” Oxford, UK; Oxford Molecular, Ltd。AbM 定義係使用知識資料庫與全始演算方法之組合，諸如那些由 Samudrala et al., 1999, “Ab Initio

Protein Structure Prediction Using a Combined Hierarchical Approach,”in PROTEINS,Structure,Function and Genetics Suppl.,3 : 194-198 描述者，而自一級序列模型化抗體之三級結構。接觸定義係基於可得複合物結晶結構之分析。見例如 MacCallum et al., 1996, J. Mol. Biol., 5:732-45。於另一種在本文中指稱為 CDR 之「構形定義」的途徑中，CDR 之位置可經識別為對抗原結合作出焓貢獻之殘基。見例如 Makabe et al., 2008, Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166。還有其他 CDR 邊界定義可能不嚴格遵循上述途徑中之一者，但還是將與卡巴 CDR 之至少一部份重疊，雖然它們可能根據特定殘基或殘基群不顯著影響抗原結合之預測或實驗結果而被縮短或延長。本文中所使用之 CDR 可指稱，藉由該領域已知之任何途徑，包括多種途徑之組合所定義之 CDR。本文中所使用之方法可利用根據這些途徑中任一者所定義之 CDR。對於含有超過一種 CDR 之任何給定實施態樣而言，該 CDR 可根據卡巴、柯西亞、延長、AbM、接觸及/或構形定義中任一者加以定義。

如該領域已知者，抗體之「恆定區」係指稱單獨或經組合之抗體輕鏈之恆定區或抗體重鏈之恆定區。

本文中所使用之「單克隆抗體」係指稱自實質上同質之抗體族群獲得之抗體，亦即，除了可能少量出現之可能天然發生之突變以外，組成該族群之個別抗體係完全相同的。單克隆抗體係高度專一性，其係針對單個抗原位點。

再者，與其係典型包括針對不同決定簇(表位)之不同抗體的多克隆抗體製劑相反的是，各單克隆抗體係針對抗原上之單一決定簇。修飾語「單克隆」表明抗體係自實質上同質之抗體族群獲得之特徵，不應被視為需要藉由任何特定之方法產製該抗體。舉例來說，待根據本發明使用之單克隆抗體可藉由最早由 Kohler and Milstein, 1975, Nature 256:495 所描述之融合瘤方法作成，或可藉由重組 DNA 方法諸如美國專利第 4,816,567 號所述者作成。該單克隆抗體亦可自使用，舉例來說，McCafferty et al., 1990, Nature 348: 552-554 描述技術所產生之噬菌體庫分離。本文中所使用之「人源化」抗體係指稱為下述者之非人類(例如鼠類)抗體之形式：含有衍生自非人類免疫球蛋白之最少序列之嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白鏈或彼等之片段(諸如 Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或抗體之其他抗原結合子序列)。較佳地，人源化抗體係人類免疫球蛋白(接受者抗體)，其中來自接受者之 CDR 的殘基被來自非人類物種(捐贈者抗體)諸如具有所欲專一性、親和性及能力之小鼠、大鼠或兔等之 CDR 的殘基置換。該人源化抗體可包含既不在接受者抗體也不在經導入之 CDR 或架構序列中找到，但卻被包括以進一步改進及最佳化抗體表現之殘基。

「人類抗體」係一種其具有對應由人類產製之抗體的胺基酸序列及/或已使用如本文中所揭示之用於作成人類抗體之技術的任一者所作成者。這個人類抗體的定義具體排除包含非人類抗原結合殘基之人源化抗體。

用語「嵌合抗體」係意欲指稱其中可變區序列係衍生自一個物種且恆定區序列係衍生自另一個物種之抗體，諸如其中可變區序列係衍生自小鼠抗體且恆定區序列係衍生自人類抗體之抗體。

用語「表位」係指稱分子中能被抗體在該抗體之一或多個抗原結合區所辨認且被結合的部份。表位經常由分子諸如胺基酸或糖側鏈之表面集合所組成，且具有特定三維結構特徵及特定帶電特徵。於一些實施態樣中，表位可為蛋白表位。蛋白表位可為線性或構形。在線性表位中，在蛋白與交互作用分子(諸如抗體)之間的所有交互作用點係沿著該蛋白之一級胺基酸序列線性發生。「非線性表位」或「構形表位」包含對該表位具專一性之抗體所結合之抗原性蛋白內之不連續多肽(或胺基酸)。本文中所使用之用語「抗原性表位」係定義為可被抗體專一性結合之抗原的部份，該結合藉由該領域熟知之任何方法，例如藉由習用之免疫檢測法決定。一旦決定在抗原上之所欲表位，可產生針對該表位之抗體，例如使用本說明書中所述之技術。替代地，在發現期間，抗體之產生及特徵化可闡釋有關所欲表位之資訊。由此資訊即有可能競爭性地篩選結合相同表位之抗體。一種達成此之途徑係進行競爭及交叉競爭研究，以找到彼此競爭或交叉競爭結合 PD-1 之抗體，例如競爭結合抗原之抗體。

本文中所使用之用語「PD-1」係指稱任何形式之 PD-1 及彼等之變體，該變體係保留至少部份 PD-1 活性。除

非不同地表明，諸如藉由具體提及人類 PD-1，否則 PD-1 包括所有哺乳動物物種之天然序列 PD-1，例如人類、犬、貓、馬及牛。一種例示性人類 PD-1 係發現為 Uniprot 登錄號 Q15116(SEQ ID NO: 1)。

用語「促效劑」係指稱其係促進(亦即，誘導、造成、增進或增加)另一種分子之生物活性或效應之物質。該用語促效劑涵蓋其係結合受體諸如抗體之物質，及其係促進受體功能但不結合受體(例如藉由活化經相關蛋白)之物質。

用語「拮抗劑」或「抑制劑」係指稱預防、阻斷、抑制、中和或減少另一種分子，諸如受體之生物活性或效應之物質。

用語「拮抗抗體」係指稱結合目標且預防或減少該目標之生物效應之抗體。於一些實施態樣中，該用語可表示抗體預防止其所結合之目標，例如 PD-1 施行生物功能

本文中所使用之「抗 PD-1 拮抗劑抗體」係指稱能抑制 PD-1 生物活性及/或 PD-1 媒介之一或多個下游事件之抗體。抗 PD-1 拮抗劑抗體涵蓋阻斷、拮抗、壓抑或減少(至任何程度，包括顯著地)PD-1 生物活性之抗體，該生物活性包括 PD-1 媒介之下游事件、此 PD-L1 結合及下游傳信、PD-L2 結合及下游傳信、T 細胞增生之抑制、T 細胞活化之抑制、IFN 分泌之抑制、IL-2 分泌之抑制、TNF 分泌之抑制、IL-10 之誘導及抗腫瘤免疫反應之抑制。就本發明之目的而言，將明確理解用語「抗 PD-1 拮抗劑抗

體」(可交換使用之用語「拮抗劑 PD-1 抗體」、「拮抗劑抗 PD-1 抗體」、或「PD-1 拮抗劑抗體」)涵蓋藉以實質上廢止、降低或中和任何有意義程度之 PD-1 本身、PD-1 生物活性或該生物活性之後果之所有先前識別之用語、名稱、功能狀態及功能特徵。於一些實施態樣中，抗 PD-1 拮抗劑抗體結合 PD-1 且上調抗腫瘤免疫反應。抗 PD-1 拮抗劑抗體之實施例係提供於本文中。

在本文中可交換使用之用語「多肽」、「寡肽」、「肽」及「蛋白」，係指稱任何長度之胺基酸鏈。該鏈可為線性或分支，其可包含經修飾之胺基酸及/或可能被非胺基酸中斷。該等用語亦涵蓋經天然或干預修飾之胺基酸鏈；舉例來說，雙硫鍵形成、糖基化、脂質化、乙醯化、磷酸化或任何其他操縱或修飾，諸如與標籤成份共軛。也包括在該定義內者為，舉例來說，含有一或多個胺基酸類似物(包括舉例來說非天然胺基酸等)之多肽，及含有該領域習知之其他修飾之多肽。應理解的是該多肽可以單個鏈或經相關鏈存在。

如該領域已知，本文中可交換使用之「多核苷酸」或「核酸」，係指稱任何長度之核苷酸鏈，且包括 DNA 及 RNA。該核苷酸可為去氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、經修飾之核苷酸或鹼基及/或他們的類似物，或任何可藉由 DNA 或 RNA 聚合酶納入鏈中之基質。多核苷酸可包含經修飾之核苷酸，諸如甲基化核苷酸及他們的類似物。若出現的話，對核苷酸結構之修飾可在該鏈組裝之前或之後授

予。核苷酸之序列可被非核苷酸成份中斷。多核苷酸在聚合之後可進一步被修飾，諸如藉由與標籤成份共軛而被修飾。其它種類之修飾包括，例如「加蓋(cap)」，以類似物取代一或多個天然發生之核苷酸、核苷酸間修飾諸如，舉例來說那些具有不帶電鏈結(例如甲基膦酸酯、磷酸三酯、磷酸醯胺化物、胺基甲酸酯等)及帶電鏈結(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)者、那些含有側基團(moieties)者，諸如例如蛋白(例如核酸酶、毒素、抗體、信號肽、聚-L-離胺酸等)、那些具有嵌入劑(intercalator)者(例如吡啶、補骨脂素等)、那些含有螯合劑者(例如金屬、放射性金屬、硼、氧化性金屬等)、那些含有烷化劑者、那些具有經修飾之鏈結者(例如 α 異位性核酸等)及該(等)多核苷酸之未經修飾形式。另外，原本出現於糖類中之羥基的任一者可能被，舉例來說膦酸基、磷酸基置換；被標準保護基保護或被活化以製備與其他核苷酸之額外鏈結；或可能共軛至固體支持物。該 5' 及 3' 端 OH 可被磷酸化或被胺類或自 1 至 20 個碳原子之有機加蓋基團取代。其他羥基亦可被衍生成為標準保護基。多核苷酸亦可包含該領域一般已知之核糖或去氧核糖糖類之類似形式，包括舉例來說 2'-O-甲基-核糖、2'-O-烯丙基核糖、2'-氟代-核糖、2'-疊氮基-核糖、碳環糖類似物、 α 或 β 異位性糖類、差向異構體糖類諸如阿拉伯糖、木糖或來蘇糖、吡喃糖糖類、呋喃糖糖類、景天酮庚糖、非環類似物及無鹼基核苷類似物諸如甲基核糖苷。一或多個磷酸二酯鏈結可被替代性鏈結基

置換。這些替代性鏈結基包括但不限於其中磷酸鹽被 $P(O)S$ (「硫代鹽」)、 $P(S)S$ (「二硫代鹽」)、 $(O)NR_2$ (「醯胺化物」)、 $P(O)R$ 、 $P(O)OR'$ 、 CO 或 CH_2 (「甲縮醛」)置換之實施態樣，其中各 R 或 R' 係獨立地 H 或經取代或未經取代之烷基(1 至 20 個碳)，該烷基可視需要地含有醚(-O-)鏈結、芳基、烯基、環烷基、環烯基或芳烷基。多核苷酸中之所有鏈結不需要完全相同。前面的敘述適用於本文中所提及之所有多核苷酸，包括 RNA 及 DNA。

如本文中所使用，當藉由本文中之實施例 7 所揭示之方法測量之平衡解離常數係等於或小於 20 nM、較佳地小於約 6 nM、更佳地小於約 1 nM、最佳地小於約 0.2 nM 時，抗體係與 PD-1「交互作用」。

「優先結合」或「專一性結合」(在本文中可互換使用)至表位之抗體，係該領域理解清楚之用語，且決定此種專一性或優先結合之方法也為該領域熟知。若分子與特定細胞或物質反應或結合係與其與替代性細胞或物質反應或結合相比更頻繁、更快速、有更長持續時間及/或有更高親和性，則該分子被稱為展現「專一性結合」或「優先結合」。若抗體與目標之結合係與其結合其他物質相比有更高親和性、親合力(avidity)、更快速及/或有更長持續時間，則該抗體係「專一性結合」或「優先結合」至目標。舉例來說，專一性或優先地結合 PD-1 表位之抗體，係以與其結合其他 PD-1 表位或非 PD-1 表位相比更高之親和性、親合力、更快速及/或有更長持續時間結合此表位之

抗體。藉由閱讀此定義也可理解，舉例來說，專一性或優先結合第一目標之抗體(或基團或表位)可能會或可能不會專一性或優先結合第二目標。因此，「專一性結合」或「優先結合」不一定需要(雖然其可包括)排他性結合。一般來說，但不必然，提及結合係意指優先結合。

本文中所使用之「實質上純的」係指稱其為至少 50% 純的(亦即不含污染物)，更佳地至少 90%純的，更佳地至少 95%純的，甚至更佳地至少 98%純的，且最佳地至少 99%純的物質。

「宿主細胞」包括可以是或已經是一或多種用以納入多核苷酸插入物之載體的接受者之個別細胞或細胞培養物。宿主細胞包括單一宿主細胞之後代，且該後代可能由於天然、意外或蓄意突變而不一定與原始親代細胞(在形態學或基因學 DNA 互補上)完全相同。宿主細胞包括以一或多個本發明之多核苷酸在活體內轉染之細胞。

如該領域已知，用語「Fc 區」係用於定義免疫球蛋白重鏈之 C 端區。該「Fc 區」可能為天然序列 Fc 區或變體 Fc 區。雖然免疫球蛋白重鏈之 Fc 區的邊界可有變化，人類 IgG 重鏈 Fc 區通常被定義為從 Cys226 或 Pro230 位置之胺基酸殘基伸出至彼之羧基端。Fc 區中之殘基編號係如卡巴所述之 EU 指數(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991)。免疫球蛋白之 Fc 區一般包含二個恆定結構域，

CH2 及 CH3。如該領域已知，Fc 區可呈二聚體或單體形式出現。

該領域所使用之「Fc 受體」或「FcR」描述結合抗體之 Fc 區之受體。較佳之 FcR 係天然序列人類 FcR。另外，較佳之 FcR 係一種其係結合 IgG 抗體(γ 受體)且包括 Fc γ RI、Fc γ RII 及 Fc γ RIII 亞型，包括這些受體之等位基因變體及替代性地經剪切形式之受體。Fc γ RII 受體包括 Fc γ RIIA(「活化受體」)及 Fc γ RIIB(「抑制受體」)，其等具有相似之胺基酸序列但主要差異在彼等之細胞質結構域。FcR 係於 Ravetch and Kinet, 1991, *Ann. Rev. Immunol.*, 9:457-92; Capel et al., 1994, *Immunomethods*, 4:25-34; 及 de Haas et al., 1995, *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 中回顧。「FcR」也包括新生兒受體 FcRn，其負責轉運母體 IgG 至胎兒(Guyer et al., 1976, *J. Immunol.*, 117:587; 及 Kim et al., 1994, *J. Immunol.*, 24:249)。

本文中關於抗體所使用之用語「競爭」，意指第一抗體或彼之抗原結合部份係以充份相似於第二抗體或彼之抗原結合部分之結合的方式結合表位，而使得第一抗體與其之同源表位在第二抗體存在下之結合結果與該第一抗體在第二抗體不存在下之結合相比可偵測地降低。替代情況可以是但不一定是，其中該第二抗體與其之表位之結合也因第一抗體之存在而可偵測地降低。也就是說，第一抗體可抑制第二抗體與第二抗體之表位之結合，而不會有第二抗體抑制該第一抗體與第一抗體之表位之結合。然而，當各

抗體不論以相同、較高或較低程度可偵測地抑制另一個抗體與其之同源表位或配體結合時，該等抗體被稱為彼此「交叉競爭」結合他們分別之一或多個表位。本發明涵蓋競爭抗體及交叉競爭抗體二者。不論此種競爭或交叉競爭所藉以發生之機轉為何(例如空間位阻、構形改變或結合共同表位或彼之部分)，本領域具有通常知識者將了解，基於本文中所提供之教示，本教示係涵蓋此種競爭及/或交叉競爭抗體且其等可有用於本文所揭示之方法。

「功能性 Fc 區」具有天然序列 Fc 區之至少一種效應子功能。例示性「效應子功能」包括 C1q 結合；補體依賴性細胞毒性；Fc 受體結合；抗體依賴性細胞媒介之細胞毒性；吞噬作用；細胞表面受體(例如 B 細胞受體)之下調等。此等效應子功能一般需要該 Fc 區與結合結構域(例如抗體可變結構域)組合，且可使用該領域已知之各式用於評價此等抗體效應子功能之檢測法評估。

「天然序列 Fc 區」包含與在天然中發現之 Fc 區的胺基酸序列完全相同之胺基酸序列。「變體 Fc 區」包含其憑藉至少一個胺基酸修飾而與天然序列 Fc 區有差異，但仍保留該天然序列 Fc 區之至少一種效應子功能的胺基酸序列。較佳地，該變體 Fc 區與天然序列 Fc 區或親代多肽之 Fc 區相比具有至少一個胺基酸取代，例如在天然序列 Fc 區或親代多肽之 Fc 區中自約 1 至約 10 個胺基酸取代，且較佳地自約 1 至約 5 個胺基酸取代。本文中之變體 Fc 區將較佳地具有與天然序列 Fc 區及/或與親代多肽之

Fc 區至少約 80%之序列一致性，最佳地與彼具有至少約 90%之序列一致性，更佳地與彼具有至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%、至少約 99%之序列一致性。

本文中所使用之「治療」係用於獲得有益或所欲臨床結果之途徑。就本發明之目的而言，有益或所欲之臨床結果包括但不限於下列之一或多者：減少腫瘤細胞或癌細胞增生(或摧毀腫瘤細胞或癌細胞)、抑制腫瘤細胞轉移、縮小或降低腫瘤體積、緩解癌症、降低癌症所導致之症狀(symptom)、增加患有癌症者的生活品質、降低治療癌症所需之其他藥劑之劑量、延緩癌症之惡化、治癒癌症及/或延長具有癌症之病患的存活。

「改善」意指與未投予抗 PD-1 拮抗劑抗體相比有減輕或改進一或多種症狀。「改善」也包括縮短或減少症狀之持續時間。

本文中所使用之藥物、化合物或醫藥組成物之「有效劑量」或「有效量」係足以致效任何一或多種有益或所欲結果之量。於更特定之面向中，有效量預防、緩和或改善疾病之症狀，及/或延長經治療個體的存活。就預防性用途而言，有益或所欲結果包括消除或減少風險、減輕嚴重性或延遲疾病之開始，包括疾病之生化學、組織學及/或行為學之症狀、其之併發症及在疾病發展期間所出現之中間病理學表現型。就治療性用途而言，有益或所欲結果包括臨床結果諸如減少疾病之一或多種症狀，該疾病諸如舉

例來說癌症，該癌症包括舉例來說但不限於胃癌、肉瘤、淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、白血病、頭部和頸部癌症、鱗狀細胞頭的頸癌、胸腺癌、上皮癌、唾液腺癌、肝癌、胃癌、甲狀腺癌、肺癌、卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、食道癌、胰腺癌、膠質瘤、白血病、多發性骨髓瘤、腎細胞癌、膀胱癌、子宮頸癌、絨毛膜癌、結腸癌、口腔癌、皮膚癌及黑色素瘤；降低治療該疾病所需之其他藥劑之劑量；增進另一種藥劑之效應；及/或延緩病患之該癌症之惡化。有效劑量可採一或多次投予。就本發明之目的而言，藥物、化合物或醫藥組成物之有效劑量係足以直接或間接完成預防性或治療性治療之量。如在臨床上所理解的，藥物、化合物或醫藥組成物之有效劑量可與或不可與另一藥物、化合物或醫藥組成物組合達成。因此，「有效劑量」可在投予一或多種治療劑之情況中被考慮，且可考慮給予有效量之單一劑，若與一或多種其他劑組合時可能或會達成所欲之結果。

「個體(individual)」或「個體(subject)」係哺乳動物，更佳者係人類。哺乳動物也包括但不限於農場動物(例如，牛、豬、馬、雞等)、競賽動物、寵物、靈長動物、馬、狗、貓、小鼠及大鼠。

本文中所使用之「載體」係指建構體，其能在宿主細胞中遞送及較佳地表現一或多種感興趣之基因或序列。載體之實施例包括但不限於病毒性載體、裸 DNA 或 RNA 表現載體、質體載體、黏質體載體、噬菌體載體、與陽離子

性縮合劑有關之 DNA 或 RNA 表現載體、包封於脂質體中之 DNA 或 RNA 表現載體及某些真核細胞諸如產製者細胞。

本文中使用的「表現控制序列」意指引導核酸轉錄之核酸序列。表現控制序列可為啟動子，諸如組成性或誘導性啟動子或增強子。表現控制序列係可操作地鏈結待轉錄之核酸序列。

本文中所使用之「醫藥上可接受之載劑」或「醫藥上可接受之賦形劑」包括任何當其與活性組分組合時允許該組分保留生物活性且不與個體之免疫系統反應之任何物質。實施例包括但不限於任何標準醫藥載劑諸如磷酸鹽緩衝鹽水溶液、水、乳液諸如油/水乳液及各式種類之潤濕劑。較佳之用於氣霧劑或非經腸投予之稀釋劑係磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)或生理(0.9%)鹽水。包含此等載劑之組成物係由眾所週知之習知方法調製(見例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; 及 Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 2000)。

本文中所使用之用語「 k_{on} 」係指稱抗體與抗原結合之速率常數。具體地，該等速率常數(k_{on} 及 k_{off})及平衡解離常數係利用全長抗體及/或 Fab 抗體片段(即單價)與 PD-1 測量。

本文中所使用之用語「 k_{off} 」係指稱抗體自抗體/抗原

複合物解離之速率常數。

本文中所使用之用語「 K_D 」係指稱抗體-抗原交互作用之平衡解離常數。

在本文中提及「約」某數值或參數時，包括(且描述)針對該數值或參數本身之實施態樣。舉例來說，提及「約 X」之敘述包括對「X」之敘述。數值範圍包含定義該範圍之上下限數字。

用語「免疫效應子細胞之增進子」或「IEC 增進子」，係指稱能增加或增進哺乳動物中一或多個種類的免疫效應子細胞之數目、品質或功能之物質。免疫效應子細胞之實施例包括細胞溶解性 CD8 T 細胞、CD4 T 細胞、NK 細胞及 B 細胞。

用語「免疫調節劑」係指稱能改變(例如，抑制、降低、增加、增進或刺激)宿主哺乳動物之天生、體液或細胞性免疫系統的任何成分的免疫反應(如本文中所定義)或工作之物質。因此，用語「免疫調節劑」涵蓋如本文中所定義之「免疫效應子細胞之增進子」及如本文中所定義之「免疫壓抑細胞之抑制劑」，及影響哺乳動物免疫系統的其他成分之物質。

用語「免疫反應」係指稱宿主哺乳動物之免疫系統抗特定物質(諸如抗原或免疫源)之任何可偵測反應，諸如天生免疫反應(例如，鐸(Toll)受體傳信級聯)、細胞媒介之免疫反應(例如 T 細胞媒介之反應，諸如免疫系統之抗原專一性 T 細胞及非專一性細胞)及體液免疫反應(例如，B

細胞媒介之反應，諸如產生及分泌抗體至細胞質、淋巴及/或組織液中)。

用語「免疫源性」，係指稱在佐劑存在下或沒有佐劑，不論是單獨或當鏈結載劑之物質對特定抗原造成、引發、刺激或誘導免疫反應；或改進、增進、增加或延長預先存在之免疫反應的能力。

用語「免疫壓抑細胞之抑制劑」或「ISC 抑制劑」，係指稱能減少或壓抑哺乳動物免疫壓抑細胞之數目或功能之物質。免疫壓抑細胞之實施例包括調控型 T 細胞(「T reg」)、骨髓衍生壓抑細胞及腫瘤相關巨噬細胞。

於投予物質至包括人類之哺乳動物之內文中，用語「皮內投予」或「皮內地投予」，係指稱遞送該物質至該哺乳動物皮膚之真皮層中。哺乳動物皮膚係由表皮層、真皮層及皮下層所組成。表皮層是皮膚的外層。真皮，係皮膚的中間層，含有神經末梢、汗腺與油脂(皮脂)腺、毛囊及血管。皮下層是由脂肪及容置較大血管及神經之結締組織所作成。與皮內投予對比，「皮下投予」係指稱投予物質至皮下層中，而「外用投予」係指稱投予物質至皮膚表面上。

用語「腫瘤病症」，係指稱其中細胞以不正常地高且不受控之速率增生之狀況，該速率超出且不同步於周圍正常組織所具者。其通常導致實體病變或稱為「腫瘤」之塊。此用語涵蓋良性及惡性腫瘤病症。用語「惡性腫瘤病症」，於本揭露中其係與用語「癌症」可交換使用，係指

稱以腫瘤細胞擴散至身體中其他位置之能力(稱為「轉移」)為特徵之腫瘤病症。用語「良性腫瘤病症」，係指稱其中腫瘤細胞缺乏發生轉移之能力之腫瘤病症。

用語「預防(preventing)」或「預防(prevent)」，係指稱(a)使病症免於發生或(b)延緩病症開始或延緩病症之症狀開始。

用語「腫瘤相關抗原」或「TAA」，係指稱其係被腫瘤細胞專一性表現或被腫瘤細胞以與相同組織種類之非腫瘤細胞相比較高頻率或密度表現之抗原。腫瘤相關抗原可為正常不被宿主表現之抗原；他們可經突變、截短、錯誤折疊、或正常被宿主表現之分子的其他方式不正常表現；他們可與正常表現之分子完全相同但以不正常水平表現；或他們可以在不正常之情況或環境中表現。腫瘤相關抗原可為，舉例而言，蛋白或蛋白片段、複合碳水化合物、神經節苷脂、半抗原、核酸、或這些或其他生物分子之組合。

用語「疫苗」係指稱用於投予至哺乳動物之免疫源性組成物，其係用於於哺乳動物中引發抗特定抗原之免疫反應。疫苗典型含有相似於或衍生自該免疫反應之目標之劑，該目標諸如造成疾病微生物或腫瘤細胞。意圖用於腫瘤諸如癌症之治療之疫苗，係典型含有衍生自目標腫瘤上所發現之 TAA 且能引發對目標腫瘤上的 TAA 之免疫原性的抗原。

用語「疫苗基底免疫療法方案」係指稱其中疫苗係與

一或多種免疫調節劑組合投予之治療方案。疫苗與免疫調節劑可在單一調製劑中一起投予或個別投予。

可理解本文中只要以文字「包含(comprising)」描述實施態樣，亦提供用語「由…所組成」及/或「基本上由…所組成」所描述之其他方式類似實施態樣。

於本發明之面向或實施態樣以馬庫西群組或其他替代物群組描述處，本發明不僅涵蓋作為整體之整個所列示群組，亦包含個別之該群組之各成員及該主要群組中的所有可能亞群，且亦涵蓋沒有該群組成員中之一或多者的該主要群組。本發明亦設想明確排除所請求發明中任何該群組成員之一或多者。

除非另行定義，本文中所使用之所有技術及科學用語具有相同於技術領域具有通常知識者通常理解之意義。若發生衝突，以本說明書，包括定義為主。遍及本說明書及申請專利範圍中，用語「包含(comprise)」或變化用語諸如「包含(comprises)」或「包含(comprising)」將被理解為意指包括所指整數或整數之群，但不排除任何其他整數或整數之群。除非上下文以其他方式要求，單數用語應包括複數意義且複數用語應包括單數意義。任何在用語「例如」或「舉例而言」之後的實施例並不具窮舉或限制之意。

雖然與本文中所述的那些方法及材料相似或相等者亦可被用於實施或測試本發明，係於本文中描述例示性方法及材料。該等材料、方法及實施例僅為例示而非意圖限

制。

抗 PD-1 拮抗劑抗體

本文中所提供者為抗 PD-1 拮抗劑抗體，其阻斷、壓抑或減少(包括顯著地減少)PD-1 生物活性，包括 PD-1 媒介之下游事件。抗 PD-1 拮抗劑抗體應展現下述特徵之任一者或多者：(a)結合 PD-1 且阻斷下游傳信事件；(b)阻斷 PD-L1 結合 PD-1；(c)上調 T 細胞媒介之免疫反應；(d)刺激 IFN γ 分泌；(e)刺激 TNF 分泌；(f)增加 T 細胞增生；及 (g)減少透過 PD-1 之抑制信號轉導 (signal transduction)。

為了本發明之目的，抗體較佳地以抑制 PD-1 傳信功能之方式與 PD-1 反應。於一些實施態樣中，該抗 PD-1 拮抗劑抗體專一性結合靈長動物 PD-1。

有用於本發明之抗體可涵蓋單克隆抗體、多克隆抗體、抗體片段(例如 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fc、等)、嵌合抗體、雙專一性抗體、異源共軛抗體、單鏈(ScFv)、彼等之突變物、包含抗體部份之融合蛋白(例如結構域抗體)、人源化抗體及包含該所需專一性之抗原辨認區的免疫球蛋白分子之任何其他經修飾之構形，包括抗體之糖基化變體、抗體之胺基酸序列變體及經共價修飾之抗體。該抗體可為小鼠、大鼠、人類或任何其他起源(包括嵌合或人源化抗體)。於一些實施態樣中，該抗 PD-1 拮抗劑抗體係單克隆抗體。於一些實施態樣中，該抗體係人類或人源

化抗體。

抗 PD-1 拮抗劑抗體可藉由領域已知之任何方法作出。用於產製人類及小鼠抗體之一般技術係為領域已知及/或描述於本文中。

抗 PD-1 拮抗劑抗體可使用領域已知之方法識別或特徵化，藉此偵測及/或測量到 PD-1 生物活性之減少、改善、或中和。於一些實施態樣中，抗 PD-1 拮抗劑抗體係藉由培養候選物與 PD-1 並監測結合及/或隨之而來的 PD-1 生物活性之減少或中和而識別。該結合檢測法可使用，例如經純化之 PD-1 多肽進行，或使用天然表現(例如，各式株)或經轉染以表現 PD-1 多肽之細胞進行。在一種實施態樣中，該結合檢測法係競爭性結合檢測法，其中候選抗體與已知之抗 PD-1 拮抗劑抗體競爭與 PD-1 結合之能力係經評價。該檢測法可以各式格式進行，包括 ELISA 格式。於一些實施態樣中，抗 PD-1 拮抗劑抗體係藉由以 PD-1 培養候選抗體並監測結合而識別。

在初步識別之後，候選抗 PD-1 拮抗劑抗體之活性可藉由生物檢測法進一步確認及精細化，生物檢測法係已知用於測試經靶向生物活性。於一些實施態樣中，活體外細胞檢測法係用於進一步特徵化候選抗 PD-1 拮抗劑抗體。舉例來說，候選抗體以初級人類 T 細胞培養，且添加 PD-L1，並監測 IFN γ 分泌。替代地，生物檢測法可被用來直接篩選候選物。

本發明之抗 PD-1 拮抗劑抗體展現下述特徵之一者或

多者：結合 PD-1 且阻斷下游傳信事件；(b)阻斷 PD-L1 結合 PD-1；(c)上調 T 細胞媒介之免疫反應；(d)刺激 IFN γ 分泌；(e)刺激 TNF 分泌；(f)增加 T 細胞增生；(g)減少透過 PD-1 之抑制信號轉導；及(h)阻斷 PD-L2 結合 PD-1。較佳地，抗 PD-1 抗體具這些特徵之二者或更多者。更佳地，該抗體具這些特徵之三者或更多者。更佳地，該抗體具這些特徵之四者或更多者。更佳地，該抗體具這些特徵之五者或更多者。更佳地，該抗體具這些特徵之六者或更多者。更佳地，該抗體具這些特徵之七者或更多者。最佳地，該抗體具所有八個特徵。

抗 PD-1 拮抗劑抗體可使用該領域已知之方法特徵化。舉例來說，一種方法係識別其所結合之表位，或稱「表位定位(epitope mapping)」。該領域有許多已知之用於定位及特徵化蛋白上表位位置之方法，包括拆解抗體-抗原複合物之晶體結構、競爭檢測法、基因片段表現檢測法及合成性肽基底檢測法，如描述於，舉例來說 Harlow and Lane, *Using Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999 第 11 章。在一種額外實施例中，表位定位可被用於決定抗 PD-1 拮抗劑抗體所結合之序列。表位定位可自各式商業來源獲得，舉例來說 Pepscan 系統 (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, The Netherlands)。該表位可為線性表位(亦即於單一伸展胺基酸含有)，或藉由不一定於單一伸展含有之胺基酸的三維交互作用所形成之構

形表位。具變化長度之肽(例如至少 4 至 6 個胺基酸長)可經分離或合成(例如重組地)，且用於抗 PD-1 拮抗劑抗體之結合檢測法。在另一種實施例中，抗 PD-1 拮抗劑抗體所結合之表位可於系統化篩選決定，該篩選藉由使用衍生自 PD-1 序列之重疊肽並決定抗 PD-1 拮抗劑抗體之結合。根據基因片段表現檢測法，編碼 PD-1 之開放閱讀框係經隨機分段或按特定基因建構體分段，且 PD-1 之該表現片段與待測試抗體之反應性被決定。該基因片段可能，舉例來說藉由 PCR 產製，且接著於活體外在放射性胺基酸存在下被轉錄及轉譯成蛋白。該抗體與該經放射性標籤之 PD-1 片段之結合接著藉由免疫沉澱及凝膠電泳決定。某些表位亦可藉由使用噬菌體粒子或酵母菌表面所展示之隨機肽序列的大型庫(噬菌體庫或酵母展示)加以識別。替代地，可於簡單結合檢測法中測試經定義之重疊肽片段庫對經測試抗體之結合。在一個額外實施例中，可施行抗原之突變形成、結構域交換實驗及丙胺酸掃描突變形成以識別表位結合所需、足夠及/或必要之殘基。舉例來說，丙胺酸掃描突變形成實驗可使用突變物 PD-1 施行，其中 PD-1 多肽之各式殘基已被丙胺酸置換。藉由評估該抗體對該突變物 PD-1 之結合力，可評估特定 PD-1 殘基對抗體結合之重要性。

又另一種方法，其可用於特徵化抗 PD-1 拮抗劑抗體，係使用與已知結合相同抗原(亦即 PD-1 之各式片段)之其他抗體的競爭檢測法，以決定該抗 PD-1 拮抗劑抗體

否和其他抗體一樣與相同之表位結合。競爭檢測法為該領域具有通常知識者熟知，包括 ELISA 格式。

抗 PD-1 拮抗劑抗體對 PD-1 之結合親和性(K_D)可為約 0.001 至約 200 nM。於一些實施態樣中，該結合親和性係下列之任一者：約 200 nM、約 100 nM、約 50 nM、約 10 nM、約 1 nM、約 500 pM、約 100 pM、約 60 pM、約 50 pM、約 20 pM、約 15 pM、約 10 pM、約 5 pM、約 2 pM 或約 1 pM。於一些實施態樣中，該結合親和性係小於下列之任一者：約 250 nM、約 200 nM、約 100 nM、約 50 nM、約 10 nM、約 1 nM、約 500 pM、約 100 pM、約 50 pM、約 20 pM、約 10 pM、約 5 pM 或約 2 pM。

據此，本發明提供下列之任一者、或包含抗體或彼之變體之組成物(包括醫藥組成物)，該抗體具有如表 1 中所找到的一部份輕鏈序列及一部份重鏈序列。於表 1 中，有畫底線序列係 CDR 序列。除非另行表明，於表 1 中， K_D 表明對人類 PD-1 之親合性，係使用表面電漿共振於 25°C 下測量者。

表1：抗PD-1拮抗劑抗體之可變區序列

mAb	輕鏈	重鏈	KD (nM)
mAb1	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLWDSGNQKNF <u>LTWYQQKPGQPPKLLIYWT</u> <u>STRE</u> SGVPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYCQ <u>NDYFYPLTFGGG</u> TKVEIK (SEQ ID NO : 2)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWINWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSSLTNYN <u>EKF</u> KNRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARLLTGTF <u>AYWGQ</u> GT LVT VSS (SEQ ID NO : 3)	64.24
mAb2	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLWDSGNQKNF <u>LTWYQQKPGQPPKLLIYWT</u> <u>SYRE</u> SGVPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYCQ <u>NDYFYPLTFGGG</u> TKVEIK (SEQ ID NO : 7)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWINWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSSLTNYN <u>EKF</u> KNRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARLLTGTF <u>AYWGQ</u> GT LVT VSS (SEQ ID NO : 3)	2.22
mAb3	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLWDSGNQKNF <u>LTWYQQKPGQPPKLLIYWT</u> <u>SYRE</u> SGVPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYCQ <u>NDYFY</u> PHTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO : 8)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWINWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSSLTNYN <u>EKF</u> KNRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARLLTGTF <u>AYWGQ</u> GT LVT VSS (SEQ ID NO : 3)	1.43
mAb4	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLWDSTNQKNF <u>LTWYQQKPGQPPKLLIYWT</u> <u>STRE</u> SGVPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYCQ <u>NDYFYPLTFGGG</u> TKVEIK (SEQ ID NO : 9)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWINWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSSLTNYN <u>EKF</u> KNRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARLLTGTF <u>AYWGQ</u> GT LVT VSS (SEQ ID NO : 3)	89 (在 37° C)
mAb5	DIVMTQSPDSLAVSLGERA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS	12.82

mAb	輕鏈	重鏈	KD (nM)
	<u>TINCKSSQSLWDSGNQKNF</u> <u>LTWYQQKPGQPPKLLIYWT</u> <u>STRESGVPDRFSGSGSGT</u> <u>DFTLTISLQAEDVAVYYCQ</u> <u>NDYFYPLTFGGGTKVEIK</u> (SEQ ID NO : 2)	<u>CKASGYTFTSYWINWVRQAP</u> <u>GQGLEWMGNIYPGSSLTNYN</u> <u>EKFKNRVTMTRDTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSEDVAVYYCARLSTGTF</u> <u>AYWGQGTLVTVSS</u> (SEQ ID NO : 4)	
mAb6	DIVMTQSPDSLAVSLGERA <u>TINCKSSQSLWDSGNQKNF</u> <u>LTWYQQKPGQPPKLLIYWT</u> <u>SYRESGVPDRFSGSGSGT</u> <u>DFTLTISLQAEDVAVYYCQ</u> <u>NDYFYPLTFGGGTKVEIK</u> (SEQ ID NO : 7)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS <u>CKASGYTFTSYWINWVRQAP</u> <u>GQGLEWMGNIYPGSSLTNYN</u> <u>EKFKNRVTMTRDTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSEDVAVYYCARLSTGTF</u> <u>AYWGQGTLVTVSS</u> (SEQ ID NO : 4)	1.16
mAb7	DIVMTQSPDSLAVSLGERA <u>TINCKSSQSLWDSGNQKNF</u> <u>LTWYQQKPGQPPKLLIYWT</u> <u>SYRESGVPDRFSGSGSGT</u> <u>DFTLTISLQAEDVAVYYCQ</u> <u>NDYFYPHTFGGGTKVEIK</u> (SEQ ID NO : 8)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS <u>CKASGYTFTSYWINWVRQAP</u> <u>GQGLEWMGNIYPGSSLTNYN</u> <u>EKFKNRVTMTRDTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSEDVAVYYCARLSTGTF</u> <u>AYWGQGTLVTVSS</u> (SEQ ID NO : 4)	0.73
mAb8	DIVMTQSPDSLAVSLGERA <u>TINCKSSQSLWDSTNQKNF</u> <u>LTWYQQKPGQPPKLLIYWT</u> <u>STRESGVPDRFSGSGSGT</u> <u>DFTLTISLQAEDVAVYYCQ</u> <u>NDYFYPLTFGGGTKVEIK</u> (SEQ ID NO : 9)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS <u>CKASGYTFTSYWINWVRQAP</u> <u>GQGLEWMGNIYPGSSLTNYN</u> <u>EKFKNRVTMTRDTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSEDVAVYYCARLSTGTF</u> <u>AYWGQGTLVTVSS</u> (SEQ ID NO : 4)	17.35
mAb9	DIVMTQSPDSLAVSLGERA <u>TINCKSSQSLWDSGNQKNF</u> <u>LTWYQQKPGQPPKLLIYWT</u> <u>STRESGVPDRFSGSGSGT</u>	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS <u>CKASGYTFTSYWINWVRQAP</u> <u>GQGLEWMGNIYPGSSITNYNE</u> <u>KFKNRVTMTRDTSTSTVYMEL</u>	13.54

mAb	輕鏈	重鏈	KD (nM)
	DFTLTISLQAEDVAVYYCQ NDYFYPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO : 2)	SSLRSEDVAVYYCARLTTGTF AYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO : 5)	
mAb10	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLWDSGNQKNF LTWYQQKPGQPPKLLIYWT SYRESGVPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYCQ NDYFYPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO : 7)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWINWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSSITNYNE KFKNRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDVAVYYCARLTTGTF AYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO : 5)	0.98
mAb11	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLWDSGNQKNF LTWYQQKPGQPPKLLIYWT SYRESGVPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYCQ NDYFYPHTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO : 8)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWINWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSSITNYNE KFKNRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDVAVYYCARLTTGTF AYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO : 5)	0.93
mAb12	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLWDSTNQNKF LTWYQQKPGQPPKLLIYWT STRESGVPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYCQ NDYFYPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO : 9)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWINWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSSITNYNE KFKNRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDVAVYYCARLTTGTF AYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO : 5)	17.27
mAb13	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLWDSGNQKNF LTWYQQKPGQPPKLLIYWT STRESGVPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYCQ NDYFYPLTFGGGTKVEIK	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWINWVRQAP GQGLEWMGNIWPGSSLTNYN EKFKNRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDVAVYYCARLLTGTF AYWGQGTLLTVSS	5.87

mAb	輕鏈	重鏈	KD (nM)
	(SEQ ID NO : 2)	(SEQ ID NO : 6)	
mAb14	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLWDSGNQKNF <u>LTWYQQKPGQPPKLLIYWT</u> <u>SYRESGVPDRFSGSGSGT</u> DFTLTISSLQAEDVAVYYCQ <u>NDYFYPLTFGGG</u> TKVEIK (SEQ ID NO : 7)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWINWVRQAP GQGLEWMGNIWPGSSLTNYN <u>EKFKNRVTMTRDTSTSTVYME</u> LSSLRSEDTAVYYCARLLTGTF <u>AYWGQGT</u> LVTVSS (SEQ ID NO : 6)	0.6
mAb15	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLWDSGNQKNF <u>LTWYQQKPGQPPKLLIYWT</u> <u>SYRESGVPDRFSGSGSGT</u> DFTLTISSLQAEDVAVYYCQ <u>NDYFYPH</u> TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO : 8)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWINWVRQAP GQGLEWMGNIWPGSSLTNYN <u>EKFKNRVTMTRDTSTSTVYME</u> LSSLRSEDTAVYYCARLLTGTF <u>AYWGQGT</u> LVTVSS (SEQ ID NO : 6)	0.49
mAb16	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLWDSTNQKNF <u>LTWYQQKPGQPPKLLIYWT</u> <u>STRESGVPDRFSGSGSGT</u> DFTLTISSLQAEDVAVYYCQ <u>NDYFYPLTFGGG</u> TKVEIK (SEQ ID NO : 9)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWINWVRQAP GQGLEWMGNIWPGSSLTNYN <u>EKFKNRVTMTRDTSTSTVYME</u> LSSLRSEDTAVYYCARLLTGTF <u>AYWGQGT</u> LVTVSS (SEQ ID NO : 6)	7.51

本發明也提供抗 PD-1 抗體之 CDR 部份。CDR 區的決定係屬於該領域所熟知之技藝。應理解，於一些實施態樣中，CDR 可以是卡巴及柯西亞 CDR 之組合(也稱為「組合 CDR」或「延伸 CDR」)。在另一種途徑中，本文中指稱為 CDR 之「構形定義」，CDR 之位置可經識別為對抗原結合作出焓貢獻之殘基。見例如 Makabe et al., 2008, Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166。一般，

「構形 CDR」包括卡巴 CDR 中之殘基位置及游標區，該游標區係經受限以維持該抗體之適當圈環結構以與特定抗原結合。構形 CDR 之決定係屬於該領域所熟知之通常知識。於一些實施態樣中，該 CDR 係卡巴 CDR。在其他實施態樣中，該 CDR 係柯西亞 CDR。在其他實施態樣中，該 CDR 係延伸 CDR、AbM CDR、構形 CDR、或接觸 CDR。換句話說，在具有超過一個 CDR 之實施態樣中，該 CDR 可為卡巴 CDR、柯西亞 CDR、延伸 CDR、AbM CDR、構形 CDR、接觸 CDR 或彼等之組合。

於一些實施態樣中，該抗體包含表 1 中所示之重鏈可變區之任一者的三個 CDR。於一些實施態樣中，該抗體包含表 1 中所示之輕鏈可變區之任一者的三個 CDR。於一些實施態樣中，該抗體包含表 1 中所示之重鏈可變區之任一者的三個 CDR，及表 1 中所示之輕鏈可變區之任一者的三個 CDR。

表 2 提供本文中所提供之抗 PD-1 拮抗劑抗體之 CDR 序列的實施例。

表2.抗PD-1拮抗劑抗體(mAb)及它們
根據卡巴(有畫底線)及柯西亞(粗體)的抗原結合CDR序列

mAb		CDR1	CDR2	CDR3
mAb1	L	<u>KSSQSLWDSGNQKN</u> <u>FLT</u> (SEQ ID NO : 10)	<u>WTSTRES</u> (SEQ ID NO : 11)	<u>QNDYFYPLT</u> (SEQ ID NO : 12)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (SEQ ID NO : 13(整個)、 14 及 <u>15</u>)	<u>NIYPGSSLTNYNEKFK</u> <u>N</u> (SEQ ID NO : 16 及 <u>17</u>)	<u>LLTGTFAY</u> (SEQ ID NO : 18)
mAb2	L	<u>KSSQSLWDSGNQKN</u> <u>FLT</u> (SEQ ID NO : 10)	<u>WTSYRES</u> (SEQ ID NO : 20)	<u>QNDYFYPLT</u> (SEQ ID NO : 12)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (SEQ ID NO : 13(整個)、 14 及 <u>15</u>)	<u>NIYPGSSLTNYNEKFK</u> <u>N</u> (SEQ ID NO : 16 及 <u>17</u>)	<u>LLTGTFAY</u> (SEQ ID NO : 18)
mAb3	L	<u>KSSQSLWDSGNQKN</u> <u>FLT</u> (SEQ ID NO : 10)	<u>WTSYRES</u> (SEQ ID NO : 20)	<u>QNDYFYPHT</u> (SEQ ID NO : 21)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (SEQ ID NO : 13(整個)、 14 及 <u>15</u>)	<u>NIYPGSSLTNYNEKFK</u> <u>N</u> (SEQ ID NO : 16 及 <u>17</u>)	<u>LLTGTFAY</u> (SEQ ID NO : 18)
mAb4	L	<u>KSSQSLWDSTNQKNF</u>	<u>WTSTRES</u> (SEQ ID	<u>QNDYFYPLT</u>

mAb		CDR1	CDR2	CDR3
		<u>LT</u> (SEQ ID NO : 22)	NO : 11)	(SEQ ID NO : 12)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (SEQ ID NO : 13(整個)、 14 及 15)	<u>NIYPGSSLTNYNEKFK</u> <u>N</u> (SEQ ID NO : 16 及 17)	<u>LLTGTFAY</u> (SEQ ID NO : 18)
mAb5	L	<u>KSSQSLWDSGNQKN</u> <u>FLT</u> (SEQ ID NO : 10)	<u>WTSTRES</u> (SEQ ID NO : 11)	<u>QNDYFYPLT</u> (SEQ ID NO : 12)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (SEQ ID NO : 13(整個)、 14 及 15)	<u>NIYPGSSLTNYNEKFK</u> <u>N</u> (SEQ ID NO : 16 及 17)	<u>LSTGTFAY</u> (SEQ ID NO : 23)
mAb6	L	<u>KSSQSLWDSGNQKN</u> <u>FLT</u> (SEQ ID NO : 10)	<u>WSYRES</u> (SEQ ID NO : 20)	<u>QNDYFYPLT</u> (SEQ ID NO : 12)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (SEQ ID NO : 13(整個)、 14 及 15)	<u>NIYPGSSLTNYNEKFK</u> <u>N</u> (SEQ ID NO : 16 及 17)	<u>LSTGTFAY</u> (SEQ ID NO : 23)
mAb7	L	<u>KSSQSLWDSGNQKN</u> <u>FLT</u> (SEQ ID NO : 10)	<u>WSYRES</u> (SEQ ID NO : 20)	<u>QNDYFYPHT</u> (SEQ ID NO : 21)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (SEQ ID NO : 13(整個)、 14 及 15)	<u>NIYPGSSLTNYNEKFK</u> <u>N</u> (SEQ ID NO : 16 及 17)	<u>LSTGTFAY</u> (SEQ ID NO : 23)
mAb8	L	<u>KSSQSLWDSTNQKNF</u> <u>LT</u> (SEQ ID NO : 22)	<u>WTSTRES</u> (SEQ ID NO : 11)	<u>QNDYFYPLT</u> (SEQ ID NO : 12)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (SEQ ID NO : 13(整個)、 14 及 15)	<u>NIYPGSSLTNYNEKFK</u> <u>N</u> (SEQ ID NO : 16 及 17)	<u>LSTGTFAY</u> (SEQ ID NO : 23)
mAb9	L	<u>KSSQSLWDSGNQKN</u> <u>FLT</u> (SEQ ID NO : 10)	<u>WTSTRES</u> (SEQ ID NO : 11)	<u>QNDYFYPLT</u> (SEQ ID NO : 12)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (SEQ ID NO : 13(整個)、 14 及 15)	<u>NIYPGSSITNYNEKFKN</u>	<u>LTTGTFAY</u> (SEQ ID NO : 23)

mAb		CDR1	CDR2	CDR3
		NO : 13(整個)、 14 及 <u>15</u>)	(SEQ ID NO : 24 及 25)	ID NO : 26)
mAb10	L	<u>KSSQSLWDSGNQKN</u> <u>FLT</u> (SEQ ID NO : 10)	<u>WTSYRES</u> (SEQ ID NO : 20)	<u>QNDYFYPLT</u> (SEQ ID NO : 12)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (SEQ ID NO : 13(整個)、 14 及 <u>15</u>)	<u>NIYPGSSITNYNEKFKN</u> (SEQ ID NO : 24 及 25)	<u>LTTGTFAY</u> (SEQ ID NO : 26)
mAb11	L	<u>KSSQSLWDSGNQKN</u> <u>FLT</u> (SEQ ID NO : 10)	<u>WTSYRES</u> (SEQ ID NO : 20)	<u>QNDYFYPH</u> (SEQ ID NO : 21)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (SEQ ID NO : 13(整個)、 14 及 <u>15</u>)	<u>NIYPGSSITNYNEKFKN</u> (SEQ ID NO : 24 及 25)	<u>LTTGTFAY</u> (SEQ ID NO : 26)
mAb12	L	<u>KSSQSLWDSTNQKNF</u> <u>LT</u> (SEQ ID NO : 22)	<u>WTSTRES</u> (SEQ ID NO : 11)	<u>QNDYFYPLT</u> (SEQ ID NO : 12)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (SEQ ID NO : 13(整個)、 14 及 <u>15</u>)	<u>NIYPGSSITNYNEKFKN</u> (SEQ ID NO : 24 及 25)	<u>LTTGTFAY</u> (SEQ ID NO : 26)
mAb13	L	<u>KSSQSLWDSGNQKN</u> <u>FLT</u> (SEQ ID NO : 10)	<u>WTSTRES</u> (SEQ ID NO : 11)	<u>QNDYFYPLT</u> (SEQ ID NO : 12)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (SEQ ID NO : 13(整個)、 14 及 <u>15</u>)	<u>NIWPGSSLTNYNEKFK</u> <u>N</u> (SEQ ID NO : 27 及 28)	<u>LLTGTFAY</u> (SEQ ID NO : 18)
mAb14	L	<u>KSSQSLWDSGNQKN</u> <u>FLT</u> (SEQ ID NO : 10)	<u>WTSYRES</u> (SEQ ID NO : 20)	<u>QNDYFYPLT</u> (SEQ ID NO : 12)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (SEQ ID NO : 13(整個)、 14 及 <u>15</u>)	<u>NIWPGSSLTNYNEKFK</u> <u>N</u> (SEQ ID NO : 27 及 28)	<u>LLTGTFAY</u> (SEQ ID NO : 18)
mAb15	L	<u>KSSQSLWDSGNQKN</u>	<u>WTSYRES</u> (SEQ ID	<u>QNDYFYPH</u>

mAb		CDR1	CDR2	CDR3
		<u>FLT</u> (SEQ ID NO : 10)	NO : 20)	(SEQ ID NO : 21)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (SEQ ID NO : 13(整個)、 14 及 <u>15</u>)	<u>NIWPGSSLTNYNEKFK</u> <u>N</u> (SEQ ID NO : 27 及 28)	<u>LLTGTFAY</u> (SEQ ID NO : 18)
mAb16	L	<u>KSSQSLWDSTNQKNF</u> <u>LT</u> (SEQ ID NO : 22)	<u>WTSTRES</u> (SEQ ID NO : 11)	<u>QNDYFYPLT</u> (SEQ ID NO : 12)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (SEQ ID NO : 13(整個)、 14 及 <u>15</u>)	<u>NIWPGSSLTNYNEKFK</u> <u>N</u> (SEQ ID NO : 27 及 28)	<u>LLTGTFAY</u> (SEQ ID NO : 18)

於一些實施態樣中，該抗體包含來自表 2 的三個輕鏈 CDR 及三個重鏈 CDR。

於表 3 中提供來自抗 PD-1 抗體類之輕鏈 CDR 之排比。可變殘基顯示成粗體。在表 3 之最後一列顯示一致輕鏈 CDR 序列。

表3.抗PD-1輕鏈CDR之排比

mAb	VL CDR1	SEQ ID NO :	VL CDR2	SEQ ID NO :	VL CDR3	SEQ ID NO :
1、5、 9、13	KSSQSLWDSGNQK NFLT	10	WTSTRES	11	QNDYFYPLT	12
2、6、 10、14	KSSQSLWDSGNQK NFLT	10	WTSYRES	20	QNDYFYPLT	12
3、7、 11、15	KSSQSLWDSGNQK NFLT	10	WTSYRES	20	QNDYFYPHT	21
4、8、 12、16	KSSQSLWDSTNQK NFLT	22	WTSTRES	11	QNDYFYPLT	12
17	KSSQSLLDSGNQKN FLT	30	WTSTRES	11	QNDYSYPLT	31
	KSSQSLX ₁ DSX ₂ NQK NFLT，其中X ₁ 係W 或L，且X ₂ 係G或T	32	WTSX ₁ RE S，其中X ₁ 係T或Y	33	QNDY X ₁ YP X ₂ T，其中X ₁ 係F 或S，且X ₂ 係L或 H	34

於表 4 中提供來自抗 PD-1 抗體類之重鏈 CDR 之排比。可變殘基顯示成粗體。在表 4 之最後一列顯示一致重鏈 CDR 序列。

表4.抗PD-1重鏈CDR之排比

mAb	VH CDR1	SEQ ID NO :	VH CDR2	SEQ ID NO :	VH CDR3	SEQ ID NO :
1至4	GYTFTSYWIN	13	NIYPGSSLTNYNEKFKN	17	LLTGTFAY	18
5至8	GYTFTSYWIN	13	NIYPGSSLTNYNEKFKN	17	LSTGTFAY	23
9至12	GYTFTSYWIN	13	NIYPGSSITNYNEKFKN	25	LTTGTFAY	26
13至16	GYTFTSYWIN	13	NIWPGSSLTNYNEKFKN	28	LLTGTFAY	18
17	GYTFTSYWIN	13	NIYPGSSSTNYNEKFKN	35	LLTGTFAY	18
	GYTFTSYWIN	13	NIX ₁ PGSSX ₂ TNYNEKFKN ，其中X ₁ 係Y或W，且X ₂ 係L、I、或S	36	LX ₁ TGTFAY ，其中X ₁ 係L或S	37

於一些實施態樣中，該抗體包含來自表 3 的三個輕鏈 CDR 及來自表 4 的三個重鏈 CDR。

於一些實施態樣中，該抗體包含全長重鏈，具有或不具有 C-端離胺酸，及/或抗 PD-1 拮抗劑抗體 mAb7 或 mAb15 的全長輕鏈。mAb7 全長重鏈之胺基酸序列 (SEQ ID NO：29)係顯示如下：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYWINWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSSLTNYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARLSTGTFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVERESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO：29)

不具有 C-端離胺酸之 mAb7 全長重鏈 (SEQ ID NO：38)之胺基酸序列係顯示如下：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWINWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSS
LTNYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARLSTGTFAFWGQGTLV
TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPA
PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLGLG(SEQ ID NO : 38)

mAb7 全長輕鏈 (SEQ ID NO : 39) 之胺基酸序列係顯示
如下：

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLWDSGNQKNFLTWYQQKPGQPPKLLIYWT
SYRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYFYPHTFGGGTKVEIKRG
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID
NO : 39)

本發明也提供產生、選擇及作成抗 PD-1 拮抗劑抗體
之方法。本發明之抗體可藉由該領域已知之程序作成。於
一些實施態樣中，抗體可重組作成且使用任何該領域已知
之方法表現。

於一些實施態樣中，抗體可藉由噬菌體展示技術製備
及選擇。見舉例來說，美國專利第 5,565,332、
5,580,717、5,733,743 及 6,265,150 號；及 Winter et al.,
Annu. Rev. Immunol. 12:433-455, 1994。替代地，噬菌體
展示技術(McCafferty et al., Nature 348:552-553, 1990)可
被用於自未經免疫接種之捐贈者的免疫球蛋白可變(V)結
構域基因譜系(repertoire)活體外產製人類抗體及抗體片
段。根據此項技術，抗體 V 結構域基因被符合讀框地(in-
frame)克隆至絲狀噬菌體(諸如 M13 或 fd)之主要或次要外

套蛋白基因中，且呈功能性抗體片段被展示於該噬菌體粒子之表面。由於該絲狀粒子含有該噬菌體基因組之單股 DNA 副本，因此基於該抗體功能性質之選擇也導致對編碼展現該等性質抗體之基因的選擇。因此，該噬菌體模擬 B 細胞之一些性質。噬菌體展示可呈各式格式施行；回顧文獻見例如 Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571, 1993。有數個 V 基因區段來源可用於噬菌體展示。Clackson et al., *Nature* 352:624-628, 1991，從衍生自經免疫接種小鼠脾臟之 V 基因的小且隨機組合庫分離出抗多樣噁唑啉酮抗體陣列。基本上可遵循 Mark et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991 或 Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734, 1993 所述之技術，而建構來自人類捐贈者的 V 基因譜系，及分離抗多樣抗原陣列(包括自體抗原)之抗體。在天然免疫反應中，抗體基因以高的速率累積突變(體細胞超突變)。一些所導入改變將授予更高之親和性，且展示高親和性表面免疫球蛋白之 B 細胞在後續抗原挑戰期間會優先複製及分化。此天然程序可藉由採用被稱為「鏈替換(chain shuffling)」之技術模擬(Marks et al., *Bio/Technol.* 10:779-783, 1992)。在此方法中，藉由噬菌體展示獲得之「初級」人類抗體的親和性，可藉由以自未經免疫接種之捐贈者獲得的 V 結構域基因天然發生變體(譜系)之譜系順序置換重鏈及輕鏈 V 區基因而改進。此技術允許產製具有親和性係於 pM 至 nM 之抗體及抗體片段。用於作出非常大的噬菌體抗體譜

系(亦稱為「萬眾之母庫(the mother-of-all libraries)」)之策略已由 Waterhouse et al., Nucl. Acids Res. 21:2265-2266, 1993 描述。基因替換亦可被用於自鼠類抗體衍生人類抗體，其中該人類抗體具有與該起始鼠類抗體相似之親和性及專一性。根據此方法(其又指稱為「表位印記」)，藉由噬菌體展示技術獲得之鼠類抗體的重鏈或輕鏈 V 區基因被人類 V 結構域基因譜系置換，而產生鼠類-人類嵌合體。對於抗原之選擇係導致分離出能恢復功能性抗原結合位點之人類可變區，亦即表位主宰(印記)夥伴之選擇。當重複該程序以置換剩餘之鼠類 V 結構域時，會獲得到人類抗體(見 PCT 公開號 WO 93/06213)。與傳統藉由 CDR 接枝將鼠抗體人源化不同的是，此技術提供完全人類抗體，其不具鼠類起源之架構殘基或 CDR 殘基。

於一些實施態樣中，抗體可使用融合瘤技術作成。可考慮任何哺乳動物個體包括人類或來自彼之產製抗體細胞可經操縱以作為產製製哺乳動物，包括人類之融合瘤細胞系之基礎。免疫接種宿主動物之路徑及時程一般與已建立及習用之抗體刺激與產製技術一致。典型地，宿主動物係經腹膜內、肌肉內、經口、皮下、腳掌內及/或皮內接種一定量免疫原，包括如本文中所述。

融合瘤可自淋巴細胞及永生化之骨髓瘤細胞製備，其使用 Kohler, B. and Milstein, C., 1975, Nature 256:495-497 之一般體細胞雜交技術或由 Buck, D. W., et al., In Vitro, 18:377-381, 1982 所修飾技術。可得骨髓瘤細胞

系，包括但不限於 X63-Ag8.653 及那些來自美國加州聖地牙哥沙克研究所細胞分布中心 (Salk Institute, Cell Distribution Center) 之細胞可被用於雜交。一般，該技術涉及使用促融劑諸如聚乙二醇或藉由該領域具有通常知識者所週知之電性手段將骨髓瘤細胞與淋巴樣細胞融合。在融合後，使細胞與融合培養基分離並生長在選擇性生長培養基諸如次黃嘌呤-胺喋呤-胸苷 (HAT) 培養基中以消除未雜交之親代細胞。任何本文中所描述之補充有或未補充血清的培養基皆可被用於培養分泌單克隆抗體之融合瘤。作為另一種替代細胞融合技術之技術，EBV 永生化 B 細胞可用於產製本標的發明之 PD-1 單克隆抗體。若為所欲，該等融合瘤或其他永生化 B 細胞係經擴增及次克隆，且藉由習用免疫檢測程序 (例如放射性免疫檢測法、酵素免疫檢測法或螢光免疫檢測法) 來檢測上清液之抗免疫原活性。

可被用來作為抗體來源之融合瘤涵蓋所有產製抗 PD-1 之專一性單克隆抗體之親代融合瘤的衍生物、繼代細胞、或彼等之部份。

產製此種抗體之融合瘤可使用已知程序在活體外或活體內生長。若為所欲，單克隆抗體可藉由習用免疫球蛋白純化程序諸如硫酸銨沉澱、凝膠電泳、透析、色層分析及超過濾自培養基或體液中分離出。可移除非所欲活性 (若出現的話)，例如藉由使該製劑運行通過由附接至固相之免疫原所製吸附物，及自該免疫原洗脫或釋放該所欲抗

體。以 PD-1 多肽、或共軛至蛋白之含有目標胺基酸序列之片段來免疫接種宿主動物可產出抗體族群(例如單克隆抗體)，該蛋白在待免疫接種之物種中為免疫源性，例如鑰孔狀帽貝血藍素、血清白蛋白、牛甲狀腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制劑，該共軛係利用雙功能劑或衍生劑進行，例如順丁烯二亞胺基苯甲醯基磺酸基琥珀醯亞胺基酯(經由半胱胺酸殘基共軛)、N-羥琥珀二醯亞胺(經由離胺酸殘基)、戊二醛、琥珀酐、 SOCl_2 或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ ，其中 R 和 R^1 係不同的烷基)。

若為所欲，可對該感興趣 PD-1 拮抗劑抗體(單克隆或多克隆)定序，及接著該具核苷酸序列可克隆至載體以供表現或增殖。於宿主細胞，編碼該感興趣抗體的序列可維持於載體中，接著該宿主細胞可被擴增及冷凍以供將來使用。在細胞培養中產製重組單克隆抗體可透過該領域已知手段自 B 細胞克隆抗體基因進行。見例如 Tiller et al., 2008, J. Immunol. Methods 329, 112；及美國專利第 7,314,622 號。

於一些實施態樣中，該多核苷酸序列可用於基因操縱以「人源化」該抗體或改進該抗體之親和性或其他特徵。該等抗體也可經客製用於，舉例來說狗、貓、靈長動物、馬或牛。

於一些實施態樣中，全人類抗體可藉由使用市售小鼠獲得，該市售小鼠經工程化以表現特定人免疫球蛋白蛋白。經設計以產生更為所欲(例如全人類抗體)或更強烈之

免疫反應的基因轉殖動物亦可被用於產生人源化抗體或人類抗體。此種技術之實施例係購自加州費利蒙市 (Fremont, CA) 艾比基因公司 (Abgenix, Inc.) 之異種小鼠™ (Xenomouse™) 及購自紐澤西州普林斯頓美德列斯公司 (Medarex, Inc.) 之 HuMAb-Mouse® 及 TC Mouse™。

可重組作成抗體，此係藉由先自宿主動物分離抗體及產製抗體細胞、獲得該基因序列，及使用該基因序列於宿主細胞 (例如 CHO 細胞) 中重組表現該抗體。另一種可採用的方法係在植物 (例如菸草) 或基因轉殖乳中表現該抗體序列。在植物或乳中重組表現抗體之方法已被揭示。見舉例來說，Peeters, et al. Vaccine 19:2756, 2001; Lonberg, N. and D. Huszar Int. Rev. Immunol 13:65, 1995 及 Pollock, et al., J Immunol Methods 231:147, 1999。用於作成抗體衍生物，例如結構域、單鏈等之方法係為該領域已知。

免疫檢測法及流式細胞分選技術諸如螢光激活細胞分選 (FACS) 亦可採用來分離對 PD-1 具專一性之抗體。

編碼單克隆抗體之 DNA 係使用習用程序輕易地分離及定序 (例如藉由使用能專一性結合編碼該等單克隆抗體重鏈及輕鏈基因之寡核苷酸探針) 之。融合瘤細胞係作為此等 DNA 之較佳來源。一旦分離，該 DNA 可被置入表現載體中 (諸如 PCT 公開號 WO 87/04462 所揭示之表現載體)，及其接著被轉染至不另行產製免疫球蛋白蛋白之宿主細胞諸如大腸桿菌細胞、類人猿 COS 細胞、中國倉鼠

卵巢(CHO)細胞或骨髓瘤細胞，以在該等重組宿主細胞中獲得單克隆抗體合成。見例如 PCT 公開號 WO 87/04462。該等 DNA 亦可經修飾，舉例來說藉由以人類重鏈及輕鏈恆定結構域之編碼序列置換同源小鼠序列(Morrison et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851, 1984)，或藉由共價連結所有或部分之非免疫球蛋白多肽之編碼序列至該免疫球蛋白編碼序列。以此方式，製備具有本文中所述之 PD-1 單克隆抗體結合專一性之「嵌合」或「雜交」抗體。

可藉由抗體之蛋白水解或其他降解方式、藉由如上所述之重組方法(亦即單一或融合多肽)或藉由化學合成而產製抗體片段。該等抗體之多肽，尤其是最高約 50 個胺基酸之較短多肽，係方便地藉由化學合成作成。化學合成方法係該領域已知且係市售者。舉例來說，抗體可藉由採用固相方法之自動多肽合成儀產製。亦見美國專利第 5,807,715、4,816,567 及 6,331,415 號。

於一些實施態樣中，多核苷酸包含編碼下列抗體之重鏈及 / 或輕鏈可變區之序列：mAb1、mAb2、mAb3、mAb4、mAb5、mAb6、mAb7、mAb8、mAb9、mAb10、mAb11、mAb12、mAb13、mAb14、mAb15 或 mAb16。於宿主細胞，編碼該感興趣抗體的序列可維持於載體中，及接著該宿主細胞可被擴增及冷凍以供將來使用。於本文中進一步描述載體(包括表現載體)及宿主細胞。

本發明包括親和性成熟之實施態樣。舉例來說，親和性成熟抗體可藉由該領域已知之程序產製(Marks et al.,

1992, Bio/Technology, 10:779-783 ; Barbas et al., 1994, Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 ; Schier et al., 1995, Gene, 169:147-155 ; Yelton et al., 1995, J. Immunol., 155:1994-2004 ; Jackson et al., 1995, J. Immunol., 154(7):3310-9 ; Hawkins et al., 1992, J. Mol. Biol., 226:889-896 ; 及 PCT 公開號 WO2004/058184)。

下列方法可被用於調整抗體之親和性及用於特徵化 CDR。一種特徵化抗體之 CDR 及/或改變(諸如改進)多肽諸如抗體之結合親和性之方式被稱為「庫掃描突變形成」。一般，庫掃描突變形成係如下工作。使用該領域已認知方法將 CDR 中之一或多個胺基酸位置以二或多個(諸如 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 個)胺基酸置換。這會產生小的克隆庫(在一些實施態樣中，每個經分析之胺基酸位置有一個克隆)，各具有二或多個成員之複雜性(若每個位置以二或多種胺基酸取代)。一般，該庫亦包括包含天然(未經取代之)胺基酸之克隆。來自各庫之少量克隆，例如約 20 至 80 個克隆(取決於該庫之複雜性而定)係篩選其對目標多肽(或其他結合目標)之結合親和性，且識別出具有增加之結合、相同之結合、降低之結合或不具結合之候選物。決定結合親和性之方法係該領域廣為週知。結合親和性可使用，舉例來說 Biacore™ 表面電漿共振分析，其偵測約 2 倍或更高之結合親和性差異、Kinexa® 生物感測器、鄰近閃爍檢測法、ELISA、ORIGEN® 免疫檢測法、螢光淬熄、

螢光轉移及/或酵母菌展示決定。結合親和性亦可利用適當之生物檢測法篩選。當起始抗體已以相當高之親和性，例如約 10 nM 或更低之 K_D 結合時，Biacore™係特別有用。

於一些實施態樣中，使用該領域認知之突變形成方法(該等突變形成方法的一些係於本文中描述)，將 CDR 中之每個胺基酸位置(於一些實施態樣中一次一個位置)以所有 20 種天然胺基酸置換。這會產生小的克隆庫(在一些實施態樣中，每個經分析之胺基酸位置有一個克隆)，各具有 20 個成員之複雜性(若每個位置以所有 20 種胺基酸取代)。

於一些實施態樣中，該待篩選之庫包含在二或多個位置之取代，該二或多個位置可能在相同 CDR 中或在二或多個 CDR 中。因此，該庫可能包含在一個 CDR 中的二或多個位置之取代。該庫可能包含在二或多個 CDR 中的二或多個位置之取代。該庫可能包含在 3、4、5 或多個位置之取代，該等位置見於二、三、四、五或六個 CDR 中。該取代可使用低多餘性密碼子製備。見例如 Balint et al., 1993, Gene 137(1):109-18 之表 2。

該 CDR 可為重鏈可變區(VH)CDRH3 及/或輕鏈可變區(VL)CDRL3。該 CDR 可為 VH CDRL1、VH CDRL2、VH CDRL3、VL CDRH1、VL CDRH2 及/或 VL CDRH3 之一或多者。該 CDR 可為卡巴 CDR、柯西亞 CDR、延伸 CDR、AbM CDR、接觸 CDR 或構形 CDR。

可定序具有改進之結合的候選物，從而識別導致改進之親和性的 CDR 取代突變物(亦稱為「改進之」取代)。亦定序會結合之候選物，從而識別其保留結合之 CDR 取代。

可進行多次篩選。舉例來說，具有改進之結合的候選物(各包含在一或多個 CDR 之一或多個位置的胺基酸取代)亦有用於設計第二庫，該第二庫在各經改進之 CDR 位置(亦即在該位置取代突變物顯示改進之結合的該 CDR 中之胺基酸位置)含有至少該原始及經取代之胺基酸。此庫之製備、篩選及選擇係於下進一步討論。

庫掃描突變形成亦提供用於特徵化 CDR 之手段，就具有改進之結合、相同之結合、降低之結合或不具結合之克隆的頻率亦提供有關各胺基酸位置對抗體-抗原複合物安定性之重要性的資訊來說。舉例來說，若 CDR 的一個位置當被改變成所有 20 種胺基酸時仍保留結合，該位置經識別為不可能是抗原結合所需之位置。相反地，若 CDR 的一個位置只有在小百分比之該等取代會保留結合，該位置經識別為是對 CDR 功能重要之位置。因此，庫掃描突變形成方法產生有關下列位置的資訊：CDR 中可被改變成許多不同胺基酸(包括所有 20 種胺基酸)之位置及 CDR 中其不可被改變或其僅能被改變成少數幾種胺基酸之位置。

具有改進之親和性的候選物可組合於第二庫中，該第二庫在該位置包括改進之胺基酸及原始胺基酸，且可能進一步包括在該位置之額外取代，此係取決於所欲之該庫複

雜性或使用所欲篩選或選擇方法所允許之該庫複雜性。此外，若為所欲，相鄰胺基酸位置可被隨機化成至少二或多種胺基酸。相鄰胺基酸之隨機化可能允許該突變物 CDR 之額外構形可塑性，其可能進而允許或促進導入更大數量之改善突變。該庫亦可包含在第一次篩選時不顯示改善之親和性的位置取代。

該第二庫係使用該領域已知之任何方法篩選或選擇具有改進及/或改變之結合親和性之庫成員，包括使用 Kinexa™ 生物感測器分析篩選，及使用該領域已知之任何用於選擇之方法選擇，包括噬菌體展示、酵母菌展示及核糖體展示。

為了表現本發明之抗 PD-1 抗體類，編碼 VH 及 VL 區之 DNA 片段可先使用上述之任何方法獲得。各式修飾例如突變、刪除及/或添加亦可使用該領域具有通常知識者已知之標準方法導入該 DNA 序列中。舉例來說，可使用標準方法進行突變形成，諸如 PCR 媒介之突變形成，其中經突變核苷酸被納入 PCR 引子中而使得該 PCR 產物含有所欲突變或位點定向(site-directed)突變形成。

本發明涵蓋對表 1 所示之可變區及表 2、3 或 4 所示之 CDR 的修飾。舉例來說，本發明包括包含功能相等性可變區及不會顯著影響它們性質之 CDR 的抗體及具有增進之或降低之活性及/或親和性之變體。舉例來說，該基酸序列可能經突變以獲得對 PD-1 具有所欲結合親和性之抗體。多肽之修飾係該領域例行操作，不須於本文中詳細

描述。經修飾多肽之實施例包括具有下列之多肽：保守性取代之胺基酸殘基、一或多個不顯著有害地改變該功能活性之胺基酸刪除或添加、一或多個使該多肽對其配體之親和性成熟(增進)之胺基酸刪除或添加、或使用化學類似物。

胺基酸序列插入包括長度從一個殘基至含有一百或更多個殘基之多肽的胺基端及/或羧基端融合，也包括在序列內插入單一或多個胺基酸殘基。末端插入之實施例包括具有 N 端甲硫胺醯基殘基之抗體或融合至表位標誌之抗體。抗體分子之其它插入變體包括在抗體之 N 端或 C 端融合有酵素或多肽以增加該抗體於血液循環中之半衰期。

取代變體係具有該抗體分子中之至少一個胺基酸殘基被移除且在其之位置插入不同之殘基。最感興趣之取代性突變形成之位點包括超變異區，但亦可考慮架構之改變。保守性取代係顯示於表 5 中標題「保守性取代」下。若此等取代導致生物活性改變，則更實質改變(表 5 中稱為「例示性取代」)或如下參照胺基酸分類進一步描述者可被導入，然後篩選產品。

表 5：胺基酸取代

原始殘基	保守性取代	例示性取代
Ala (A)	Val	Val ; Leu ; Ile
Arg (R)	Lys	Lys ; Gln ; Asn
Asn (N)	Gln	Gln ; His ; Asp 、 Lys ; Arg
Asp (D)	Glu	Glu ; Asn
Cys (C)	Ser	Ser ; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn ; Glu
Glu (E)	Asp	Asp ; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn ; Gln ; Lys ; Arg
Ile (I)	Leu	Leu ; Val ; Met ; Ala ; Phe ; 正白胺酸
Leu (L)	Ile	Norleucine ; Ile ; Val ; Met ; Ala ; Phe
Lys (K)	Arg	Arg ; Gln ; Asn
Met (M)	Leu	Leu ; Phe ; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu ; Val ; Ile ; Ala ; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr ; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp ; Phe ; Thr ; Ser
Val (V)	Leu	Ile ; Leu ; Met ; Phe ; Ala ; 正白胺酸

抗體生物性質的實質修飾係藉由選擇其等在維持下列者之效果上有顯著差異之取代完成：(a)取代區之多肽骨架結構，舉例來說，呈 β -板或螺旋構型、(b)分子在目標位點的帶電或疏水性、或(c)側鏈之主體。基於常見側鏈性質將天然發生胺基酸殘基分成下列群組：

(1)非極性：正白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

(2)極性不帶電：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

(3)酸性(帶負電)：Asp、Glu；

(4)鹼性(帶正電)：Lys、Arg；

(5)影響鏈方向性之殘基：Gly、Pro；及

(6)芳香族：Trp、Tyr、Phe、His。

非保守性取代係藉由將這些分類中的一個分類的成員交換成另一分類作成。

舉例來說，一種可作出之取代係改變抗體中一或多個半胱胺酸，其可能係化學反應性，成另一個殘基諸如但不限於丙胺酸或絲胺酸。舉例來說，可能有非典型半胱胺酸之取代。該取代可在抗體之可變結構域之 CDR 或架構區中或在抗體之恆定區中作出。於一些實施態樣中，該半胱胺酸係典型半胱胺酸。任何不涉及維持適當抗體構形之半胱胺酸也可經取代，一般以絲胺酸取代，以改進該分子之氧化安定性及防止異常交聯。相反地，半胱氨酸鍵可被添加到抗體，以提高其安定性，特別是在抗體是抗體片段諸如 Fv 片段時。

亦可在，例如重鏈及/或輕鏈之可變結構域修飾抗體，以例如改變該抗體之結合性質。於可變區之改變可改變結合親和性及/或專一性。於一些實施態樣中，不超過一至五個保守性胺基酸取代係在 CDR 結構域內作出。於其他實施態樣中，不超過一至三個保守性胺基酸取代係在 CDR 結構域內作出。舉例來說，可在一或多個 CDR 區中作出突變，以增加或降低該抗體對 PD-1 之 K_D 、增加或降

低 k_{off} 、或改變該抗體之結合專一性。位點定向突變形成之技術係該領域熟知。見例如 Sambrook et al.及 Ausubel et al.(同上)。

修飾或突變亦可於架構區或恆定區作出以增加抗 PD-1 抗體之半衰期。見例如 PCT 公開號 WO 00/09560。亦可在架構區或恆定區做出突變，以改變該抗體之免疫原性、以提供用於共價或非共價結合另一分子之位點、或以改變像是補體固定、FcR 結合及抗體依賴性細胞媒介之細胞毒性等之性質。於一些實施態樣中，不超過一至五個保守性胺基酸取代係在架構區或恆定區內作出。於其他實施態樣中，不超過一至三個保守性胺基酸取代係在架構區或恆定區內作出。根據本發明，單一抗體可在可變區之 CDR 或架構區之任一或多個中或在恆定區中具有突變。

修飾亦包括糖基化及非糖基化多肽，也包括具有其他轉譯後修飾之多肽，諸如舉例來說以不同之糖糖基化、乙醯化及磷酸化。抗體係於它們恆定區中的保守位置經糖基化(Jefferis and Lund, 1997, Chem. Immunol. 65:111-128; Wright and Morrison, 1997, TibTECH 15:26-32)。免疫球蛋白之寡糖側鏈會影響該蛋白之功能(Boyd et al., 1996, Mol. Immunol. 32:1311-1318; Wittwe and Howard, 1990, Biochem. 29:4175-4180)及該糖蛋白之部份之間的分子內交互作用，其可影響該糖蛋白之構形及所呈現之三維表面(Jefferis and Lund, 同上; Wyss and Wagner, 1996, Current Opin. Biotech. 7:409-416)。基於特定辨認結構，

寡糖亦可用來將給定糖蛋白靶向至某些分子。也有報告指出抗體之糖基化會影響抗體依賴性細胞性細胞毒性 (ADCC)。尤其，經四環素調節表現 $\beta(1,4)$ -N-乙醯葡萄糖胺基轉移酶 III (GnTIII，一種催化平分型 GlcNAc 形成之糖基轉移酶) 之 CHO 細胞被報告具有改進之 ADCC 活性 (Umana et al., 1999, Nature Biotech. 17:176-180)。

抗體之糖基化典型為 N-鏈結或 O-鏈結。N-鏈結係指碳水化合物基團附接至天冬醯胺酸殘基之側鏈。三肽序列天冬醯胺酸-X-絲胺酸、天冬醯胺酸-X-蘇胺酸及天冬醯胺酸-X-半胱胺酸係供碳水化合物基團酵素性附接至天冬醯胺酸側鏈之辨識序列，其中 X 係除脯胺酸以外之任何胺基酸。因此，該等三肽序列之任一者存在於多肽中會產生潛在糖基化位點。O-鏈結糖基化係指附接糖類 N-乙醯半乳糖胺、半乳糖或木糖之一者至羥基胺基酸，最常見為絲胺酸或蘇胺酸，不過 5-羥基脯胺酸或 5-羥基離胺酸亦可被使用。

在抗體中加入糖基化位點可藉由改變胺基酸序列而使得其包含上述之三肽序列之一或多者(供 N-鏈結糖基化位點)而方便地完成。該改變亦可藉由在原始抗體之序列加入或取代一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基作出(供 O-鏈結糖基化位點)。

抗體之糖基化模式亦可在不改變基礎核苷酸序列下經改變。糖基化大多取決於用來表現該抗體之宿主細胞。由於用來表現重組糖蛋白，例如抗體作為潛在治療劑之細胞

種類鮮少為天然細胞，因此抗體之糖基化模式的變化可被預期(見例如 Hse et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:9062-9070)。

除了宿主細胞之選擇以外，在重組產製抗體期間影響糖基化之因素包括生長模式、培養基配方、培養密度、氧化、pH、純化方案及類似因素。有各式方法被提出，以改變在特定宿主生物體中達成之糖基化模式，包括導入或過度表現某些涉及寡糖產製之酵素(美國專利第 5,047,335、5,510,261 及 5,278,299 號)。糖基化、或某些種類之糖基化可藉由自糖蛋白酵素移除，舉例來說利用內切糖苷酶 H(Endo H)、N-糖苷酶 F、內切糖苷酶 F1、內切糖苷酶 F2、內切糖苷酶 F3。此外，該重組宿主細胞可經基因工程化成在加工某些種類多醣有缺陷者。這些及類似之技術係該領域熟知。

其他修飾方法包括使用該領域已知之偶合技術，包括但不限於酵素手段、氧化性取代及螯合。修飾可用於，舉例來說用來附接用於免疫檢測法之標籤。經修飾多肽係使用該領域已建立之程序作成，且可使用該領域已知之標準檢測法篩選，它們中的一些係於下面及實施例中描述。

於一些實施態樣中，該 Fc 可係人類 IgG₂ 或人類 IgG₄。於一些實施態樣中，該抗體包含 IgG₄ 恆定區，其包含下列修飾：E233F234L235 至 P233V234A235(Armour et al., 2003, Molecular Immunology 40 585-593) (IgG_{4Δc})，其中編號係參照野生型 IgG₄。於又另一種實施態樣中，該

Fc 係人類 IgG₄ E233F234L235 至 P233V234A235 具有刪除 G236 (IgG_{4Δb})。於一些實施態樣中，該 Fc 係含有安定絞鏈之突變 S228 至 P228 之任何人類 IgG₄ Fc(IgG₄、IgG_{4Δb} 或 IgG_{4Δc})(Aalberse et al., 2002, Immunology 105, 9-19)。

在其他實施態樣中，該 Fc 可為含有突變 A330P331 至 S330S331 之人類 IgG₂(IgG_{2Δa})，其中胺基酸殘基係參照野生型 IgG₂ 序列編號(Eur. J. Immunol., 1999, 29:2613-2624)。

於一些實施態樣中，該抗體包含經修飾恆定區，該經修飾恆定區係對人類 Fcγ 受體具有增加之或降低之親和性；係免疫惰性或部分惰性，例如不引發補體媒介之溶解、係不刺激抗體依賴性細胞媒介之細胞毒性(ADCC)、或係不活化小神經膠質細胞；或在下列任一或多者中具有減少之活性(與未經修飾之抗體相比)：引發補體媒介之溶解、刺激 ADCC、或活化小神經膠質細胞。可使用恆定區之不同修飾達到效應子功能之最佳水平及/或組合。見舉例來說，Morgan et al., Immunology 86:319-324, 1995；Lund et al., J. Immunology 157:4963-9 157:4963-4969, 1996；Idusogie et al., J. Immunology 164:4178-4184, 2000；Tao et al., J. Immunology 143: 2595-2601, 1989；及 Jefferis et al., Immunological Reviews 163:59-76, 1998。於一些實施態樣中，該恆定區係如 Eur. J. Immunol., 1999, 29:2613-2624；PCT 公開案 WO99/058572 所述般經修飾。

於一些實施態樣中，抗體恆定區可經修飾以避免與 Fc γ 受體與補體及免疫系統交互作用。用於此類抗體之製劑的技術係描述於 WO 99/58572。舉例來說，若抗體用於人類臨床試驗及治療時，該恆定區可經工程化以更類似於人類恆定區，而避免免疫反應。見例如美國專利第 5,997,867 及 5,866,692 號。

於又其他實施態樣中，該恆定區係無 N-鏈結糖基化。在一些實施態樣中，該恆定區係藉由使該恆定區中為 N-糖基化辨認序列之部份的附接殘基及/或側翼殘基突變而無 N-鏈結糖基化。舉例來說，N 糖基化位點 N297 可經突變成，例如 A、Q、K 或 H。見 Tao et al., J. Immunology 143: 2595-2601, 1989；及 Jefferis et al., Immunological Reviews 163:59-76, 1998。於一些實施態樣中，該恆定區係無 N-鏈結糖基化。該恆定區可經酵素(諸如藉由酵素 PNGase 移除碳水化合物)無 N-鏈結糖基化，或藉由在糖基化缺陷宿主細胞中表現而無 N-鏈結糖基化。

其他抗體修飾包括如 PCT 公開號 WO 99/58572 所述經修飾之抗體。這些抗體除了包含針對目標分子之結合結構域，還包含具有實質上與人類免疫球蛋白重鏈之所有或部分恆定區同源之胺基酸序列的效應子結構域。這些抗體能與目標分子結合但不引發顯著之補體依賴性溶解或細胞媒介之目標破壞。於一些實施態樣中，該效應子結構域能與 FcRn 及/或 Fc γ RIIb 專一性結合。這些典型是基於衍生

自二或多種人類免疫球蛋白重鏈 CH2 結構域之嵌合性結構域。以此方式修飾之抗體特別適用於慢性抗體療法，以避免習用抗體療法所致發炎及其他不良反應。

於一些實施態樣中，該抗體包含經修飾恆定區，該經修飾恆定區具有與未經修飾抗體相比之對 FcRn 增加之結合親和性及/或增加之血清半衰期。

在稱為「種系化(germlining)」之程序中，在 VH 及 VL 序列中之某些胺基酸可經突變以匹配在種系 VH 及 VL 序列中天然發現之胺基酸。尤其是在 VH 及 VL 序列中之架構區的胺基酸序列可經突變成匹配種系序列，以降低該抗體在投予時之免疫原性風險。人類 VH 及 VL 基因之種系 DNA 序列係該領域已知(見例如「Vbase」人類種系序列資料庫；亦見 Kabat, E. A., et al., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242；Tomlinson et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 227:776-798；及 Cox et al., 1994, *Eur. J. Immunol.* 24:827-836)。

另一種可作出之胺基酸取代係移除抗體中潛在之蛋白水解位點。此類位點置可能發生在抗體可變區之 CDR 或架構區中或在抗體恆定區中。取代半胱胺酸殘基及移除蛋白水解位點可能降低抗體產品之異質性之風險，因此增加其之同質性。另一種胺基酸取代係消除天冬醯胺酸-甘胺酸對，其藉由改變該等殘基之一或兩者以形成潛在之脫醯

胺位點。在另一種實施例中，本發明抗 PD-1 抗體之重鏈的 C 端離胺酸可被切掉。在本發明之各式實施態樣中，抗 PD-1 抗體類之重鏈及輕鏈可視需要包括信號序列。

一旦獲得編碼本發明之 VH 及 VL 區段之 DNA 片段後，可進一步藉由標準重組 DNA 技術操縱這些 DNA 片段，舉例來說，轉換該可變區基因成為全長抗體鏈基因、成為 Fab 片段基因或成為 scFv 基因。在這些操縱中，編碼 VL 或 VH 之 DNA 片段係可操作地鏈結至編碼另一種蛋白之另一種 DNA 片段，該另一種蛋白諸如抗體恆定區或可彎折之鏈結子。在此內文所使用之用語「可操作地鏈結」係意圖指兩個 DNA 片段係經連接而使得由該兩個 DNA 片段所編碼之胺基酸序列維持符合讀框。

編碼 VH 區之經分離之 DNA 可藉由可操作地鏈結該編碼 VH 之 DNA 至另一種編碼重鏈恆定區(CH1、CH2 及 CH3)之 DNA 分子，而轉換成全長重鏈基因。人類重鏈恆定區基因之序列係該領域已知(見例如 Kabat, E. A., et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)且涵蓋這些區之 DNA 片段可藉由標準 PCR 擴增獲得。該重鏈恆定區可為 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA、IgE、IgM 或 IgD 恆定區，但最佳的是 IgG₁ 或 IgG₂ 恆定區。IgG 恆定區序列可為已知發生在不同個體之各式等位基因或同種異型之任一者，諸如 Gm(1)、Gm(2)、Gm(3)及 Gm(17)。這些同種異

型代表在 IgG1 恆定區中天然發生之胺基酸取代。就 Fab 片段重鏈基因而言，該編碼 VH 之 DNA 可操作地鏈結至另一種僅編碼重鏈 CH1 恆定區之 DNA 分子。該 CH1 重鏈恆定區可衍生自該等重鏈基因之任一者。

編碼 VL 區之經分離之 DNA 可藉由可操作地鏈結該編碼 VL 之 DNA 至另一種編碼輕鏈恆定區(CL)之 DNA 分子，而轉換成全長輕鏈基因(及 Fab 輕鏈基因)。人類輕鏈恆定區基因之序列係該領域已知(見例如 Kabat, E. A., et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)且涵蓋這些區之 DNA 片段可藉由標準 PCR 擴增獲得。該輕鏈恆定區可為 κ 或 λ 恆定區。 κ 恆定區序列可為已知發生在不同個體之各式等位基因之任一者，諸如 Inv(1)、Inv(2)及 Inv(3)。該 λ 恆定區可衍生自三個 λ 基因中之任一者。

為了產製製 scFv 基因，編碼 VH 之 DNA 片段及 VL 之 DNA 片段係可操作性鏈結至另一種編碼可彎折鏈結子之片段，而使得該 VH 及 VL 序列可被表現為連續單鏈蛋白，且該 VL 及 VH 區藉由可彎折之鏈結子連接(見例如 Bird et al., 1988, Science 242:423-426 ; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 ; McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554)。鏈結肽的一個實施例是(GGGGS)₃ (SEQ ID NO : 19)，其在一可變區之羧基端與另一個可變區之胺基酸端之間橋接約 3.5 nm。已

設計並使用其他序列之鏈結子 (Bird et al., 1988, 同上)。進而鏈結子可為了額外功能，諸如藥物附接或附接至固體支持物而經修飾。若僅使用單一 VH 及 VL，該單鏈抗體可為單價；若使用二個 VH 及 VL，該單鏈抗體可為雙價；若使用超過二個 VH 及 VL，或該單鏈抗體可為多價。可產生雙專一性或多價抗體以與 PD-1 及另一個分子專一性結合。該單鏈變體可經重組或合成產製。就 scFv 之合成產製而言，可使用自動化合成儀。就 scFv 之重組產製而言，含有編碼該 scFv 之多核苷酸之適當質體可被導入適當之宿主細胞中，宿主細胞係真核細胞諸如酵母菌、植物、昆蟲或哺乳動物細胞，或是原核細胞諸如大腸桿菌。編碼感興趣之 scFv 之多核苷酸可藉由例行操縱作出，諸如黏合(ligation)多核苷酸。所得 scFv 可使用該領域已知之標準蛋白純化技術分離。

其他形式之單鏈抗體諸如雙價抗體亦涵蓋於本發明中。雙價抗體係雙價且雙專一性之抗體，其中 VH 及 VL 係表現於單一多肽鏈上，但使用過短而允許在同一鏈上的兩個結構域之間無法配對之鏈結子，藉此強迫該等結構域與另一鏈之互補結構域配對並產生兩個抗原結合位點(見例如 Holliger, P., et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 ; Poljak, R. J., et al., 1994, Structure 2:1121-1123)。

包含兩個共價連接抗體之異源共軛抗體亦屬於本發明之範疇內。此等抗體已用於將免疫系統細胞靶向至非所欲

之細胞(美國專利第 4,676,980 號)及用於治療 HIV 感染(PCT 公開號 WO 91/00360 及 WO 92/200373 ; EP 03089)。異源共軛抗體可使用任何方便之交聯方法作成。適當之交聯劑及技術係該領域熟知且描述於美國專利第 4,676,980 號。

嵌合或雜交抗體亦可使用已知之合成蛋白化學方法於活體外製備，包括那些涉及交聯劑者。舉例來說，免疫毒素可使用雙硫交換反應或藉由形成硫醚鍵而建構。為達此目的之適合試劑實施例包括亞胺基硫醇鹽及甲基-4-巰基丁亞胺酸酯。

本發明也涵蓋包含來自本文所述抗體之一或多個片段或區的融合蛋白。於一些實施態樣中，可作出融合抗體，其包含鏈結至另一個多肽之所有或部份之本發明之抗 PD-1 抗體。於另一種實施態樣中，僅抗 PD-1 抗體之可變結構域係鏈結至該多肽。於另一種實施態樣中，抗 PD-1 抗體之 VH 結構域係鏈結至第一多肽，同時抗 PD-1 抗體之 VL 結構域係鏈結至第二多肽，該第二多肽與第一多肽係以使得該 VH 及 VL 結構域可彼此交互作用而形成抗原結合位點之方式結合。於另一種較佳之實施態樣中，該 VH 結構域與 VL 結構域被鏈結子分開，而使得該 VH 及 VL 結構域可彼此交互作用。該 VH-鏈結子-VL 抗體接著鏈結至感興趣之多肽。此外，可產生融合抗體，其中兩個(或多個)單鏈抗體係彼此鏈結。若吾人想在單一多鏈上產生雙或多價抗體、或若吾人想產生雙專一性抗體，此係有

用。

於一些實施態樣中，提供一種融合多肽，該融合多肽包含如 SEQ ID NO：2、7、8 或 9 所示之可變輕鏈區之至少 10 個連續胺基酸，及/或如 SEQ ID NO：3、4、5 或 6 所示之可變重鏈區之至少 10 個連續胺基酸。在其他實施態樣中，提供一種融合多肽，其包含該可變輕鏈區之至少約 10 個、至少約 15 個、至少約 20 個、至少約 25 個或至少約 30 個連續胺基酸及/或該可變重鏈區之至少約 10 個、至少約 15 個、至少約 20 個、至少約 25 個或至少約 30 個連續胺基酸。在另一實施態樣中，該融合多肽包含輕鏈可變區及/或重鏈可變區，如選自 SEQ ID NO：2 及 3、7 及 3、8 及 3、8 9 及 3、2 及 4、7 及 4、8 及 4、9 及 4、2 及 5、7 及 5、8 及 5、9 及 5、2 及 6、7 及 6、8 及 6 及 9 及 6 中序列對之任一者所示。於另一種實施態樣中，該融合多肽包含一或多個 CDR。在又其他實施態樣中，該融合多肽包含 VH CDR3 及/或 VL CDR3。就本發明之目的而言，融合蛋白含有一或多種抗體及在天然分子中未附接至其上之另一種胺基酸序列，例如異源序列或來自另一區之同源序列。例示性異源序列包括但不限於「標誌」諸如 FLAG 標誌或 6His 標誌。標誌係該領域熟知。

融合多肽可藉由該領域已知之方法產生，舉例來說合成或重組產生。典型，本發明之融合蛋白係藉由，使用本文中所描述之重組方法製備及表現編碼它們的多核苷酸所作成，不過它們亦可藉由該領域已知之其他方法製備，包

括舉例來說化學合成。

在其他實施態樣中，其他經修飾之抗體可使用編碼抗 PD-1 抗體之核酸分子製備。舉例來說，「 κ 抗體」(Ill et al., 1997, Protein Eng. 10:949-57)、「迷你抗體」(Martin et al., 1994, EMBO J. 13:5303-9)、「雙價抗體」(Holliger et al., 同上)或「傑魯斯抗體 (Janusins)」(Traunecker et al., 1991, EMBO J. 10:3655-3659 及 Traunecker et al., 1992, Int. J. Cancer (增刊) 7:51-52)可遵循本說明書教示使用標準分子生物技術製備。

舉例來說，雙專一性抗體(對至少兩種不同之抗原具有結合專一性之單克隆抗體)可使用本文中所述之抗體製備。作出雙專一性抗體之方法係該領域已知(見例如 Suresh et al., 1986, Methods in Enzymology 121:210)。舉例來說，雙專一性抗體或抗原結合片段可藉由融合融合瘤或鏈結 Fab' 片段產製。見例如 Songsivilai & Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321, Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553。傳統上，重組產製雙專一性抗體係基於兩個免疫球蛋白重鏈-輕鏈對之共表現，其中該兩個重鏈具有不同之專一性(Millstein and Cuello, 1983, Nature 305, 537-539)。此外，雙專一性抗體可形成為「雙價抗體」或「傑魯斯抗體」。於一些實施態樣中，該雙專一性抗體結合 PD-1 的兩種不同的表位。於一些實施態樣中，該上述經修飾之抗體係使用來自本文中所提供之抗 PD-1 抗體的一或多個可變結構域或 CDR 區製備。

根據一種作成雙專一性抗體之途徑，具有所欲結合專一性之抗體可變區(抗體-抗原結合位點)係融合至免疫球蛋白恆定區序列。該融合較佳地係與免疫球蛋白重鏈恆定區，包含至少部分之絞鏈區、CH2 區及 CH3 區。較佳地是使第一重鏈恆定區(CH1)(其含有輕鏈結合所需之位點)出現於該等融合之至少一者中。編碼免疫球蛋白重鏈融合及免疫球蛋白輕鏈(若為所欲)之 DNA 被插入個別表現載體中，並被共轉染至適當之宿主生物體中。這會在當建構體中所使用的三個多肽鏈的不等比例提供最佳產量之實施態樣中，提供調整三個多肽片段之相互比例的高度靈活性。然而，當以相等比例表現至少兩個多肽鏈導致高產量時，或當該比例不具特別顯著性時，有可能在一個表現載體中插入兩個或所有三個多肽鏈之編碼序列。

在一種途徑中，該雙專一性抗體係由一臂具有第一結合專一性之雜交免疫球蛋白重鏈及另一臂為雜交免疫球蛋白重鏈-輕鏈對(提供第二結合專一性)所組成。此種免疫球蛋白輕鏈僅位於該雙專一性分子之一半的不對稱結構，促進所欲之雙專一性化合物與非所欲之免疫球蛋白鏈組合分離。此途徑係描述於 PCT 公開號 WO 94/04690。

本發明亦提供組成物，其包含共軛(例如鏈結)至促進與固相支持物(諸如生物素或抗生物素蛋白)偶合之劑之抗體。為了簡單起見，大致將以抗體為例，但應理解這些方法施用至本文中所述之任何 PD-1 結合及/或拮抗劑實施態樣之任一者。共軛一般係指如本文中所述鏈結該等成分。

該鏈結(其一般以近距離結合固定該等成分以至少供投予)可以任何數目方式達成。舉例來說，當劑與抗體各具有能與彼此反應之取代基時，兩者間之直接反應係可能的。舉例來說，於一者上之親核基團，諸如胺基或氫硫基可能與另一者上之含羰基基，諸如酐或酸鹵化物反應，或與含好的離去基(例如鹵化物)之烷基反應。

該抗體可與許多不同載劑結合。載劑可為活性及/或惰性。廣為週知之載劑實施例包括聚丙烯、聚苯乙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龍、澱粉酶、玻璃、天然纖維素、經改質纖維素、聚丙醯胺、洋菜糖及磁鐵礦。就本發明之目的而言，該載劑之本性可為可溶性或不可溶性。該領域中具有通常知識者知道其他用於結合抗體之適當載劑，或將能使用例行實驗加以確認。於一些實施態樣中，該載劑包含靶向肺臟、心臟或心臟瓣膜之基團。

本發明之抗體或多肽可鏈結至標籤劑，諸如螢光分子、放射性分子或任何其他該領域已知標籤。標籤係該領域已知，其一般提供(直接或間接)信號。

多核苷酸、載體及宿主細胞

本發明也提供編碼本文中所述之該等抗體，包括抗體片段及經修飾抗體之任一者之多核苷酸，諸如例如具有不健全效應子功能之抗體。於另一種面向中，本發明提供一種作成本文中所述之該等多核苷酸的任一者之方法。可藉由該領域已知程序作出及表現多核苷酸。據此，本發明提

供多核苷酸或包括多核苷酸之組成物，包括醫藥組成物，該多核苷酸編碼下列之任一者：抗體 mAb1、mAb2、mAb3、mAb4、mAb5、mAb6、mAb7、mAb8、mAb9、mAb10、mAb11、mAb12、mAb13、mAb14、mAb15、mAb16 及 mAb17 或彼之任何具有拮抗 PD-1 能力的片段或部分。

與任何此等序列互補之多核苷酸也涵蓋於本發明。多核苷酸可以是單股(編碼或反義)或雙股，且可為 DNA(基因組、cDNA 或合成)或 RNA 分子。RNA 分子包括 HnRNA 分子及 mRNA 分子，該 HnRNA 分子含有內含子且以一對一之方式對應 DNA 分子，該 mRNA 分子不包含內含子。額外之編碼或非編碼序列可但不一定出現於本發明之多核苷酸內，且多核苷酸可但不一定鏈結至其他分子及/或支持物材料。

多核苷酸可包含天然序列(亦即編碼抗體或彼之片段之內源性序列)或可包含此一序列之變體。多核苷酸變體含有一或多個取代、添加、刪除及/或插入，而使得該經編碼多肽之免疫反應性相對於天然免疫反應性分子不被減少。此對該經編碼多肽免疫反應性之影響一般係如本文中所述評估。變體較佳地展現與編碼天然抗體或彼之片段之多核苷酸序列至少約 70%之一致性，更佳地至少約 80%之一致性，甚至更佳地至少約 90%之一致性及最佳地至少約 95%之一致性。

若在二個多核苷酸或多肽序列中的核苷酸或胺基酸序

列當於如下所述用以得到最高對應性排比時係相同，則該二個序列被稱為「完全相同」。兩序列之間的比較典型藉由在比較窗上比較序列，以識別及比較具有序列相似性之局部區域而施行。本文中所使用之「比較窗」係指至少約 20 個、通常 30 個至約 75 個或 40 個至約 50 個連續位置之區段，其中序列可與具有相同連續位置數目之參考序列係在該二個序列經最佳排比後比較。

供比較之序列的最佳排比可使用雷斯基(Lasergene[®])生物資訊套裝軟體中之邁佳來(MegAlign[®])程式(威斯康辛州麥迪遜市，DNASTAR[®], Inc.)以內建參數進行。此程式具體化下列文獻中描述之數種排比法方案：Dayhoff, M.O., 1978, A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358 ; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenesis pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA ; Higgins, D.G. and Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153 ; Myers, E.W. and Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17 ; Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11:105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406-425 ; Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical

Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA ; Wilbur, W.J. and Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730。

較佳地，「序列一致性之百分比」係藉由在至少 20 個位置之比較窗上比較二個經最佳排比之序列而決定，其中在比較窗中多核苷酸或多肽序列之部份當與供二個序列最佳排比之參考序列(其不包含添加或刪除)相比可能包含 20%或更低、通常 5%至 15%或 10%至 12%之添加或刪除(即缺口)。百分比之計算係藉由決定在該位置二個序列中出現完全相同之核酸鹼基或胺基酸殘基之位置的數目，以產出匹配位置數目，將該匹配位置數目除以參考序列之位置總數(亦即窗之大小)，並將該結果乘以 100 以得到序列一致性百分比。

變體亦可能或替代性地與天然基因或彼之部份或互補物實質上同源。此等多核苷酸變體能在中度嚴謹度條件下與編碼天然抗體之天然發生之 DNA 序列(或互補序列)雜交。

適當之「中度嚴謹度條件」包括在 5 倍 SSC、0.5% SDS、1.0 mM EDTA(pH 8.0)之溶液中預先清洗；於 50℃ 至 60℃ 之 5 倍 SSC 中雜交隔夜；接著於 65℃ 中以含有 0.1% SDS 之 2 倍、0.5 倍及 0.2 倍 SSC 之各者清洗 20 分鐘兩次。

本文中所使用之「高度嚴謹度條件」或「高嚴謹條件」係那些：(1)採用低離子強度及高溫清洗，舉例來說

於 50℃ 之 0.015 M 氯化鈉/0.0015 M 檸檬酸鈉/0.1%十二基硫酸鈉；(2)在 42℃ 之雜交期間採用變性劑，諸如甲醯胺，舉例來說具有 0.1%牛血清白蛋白/0.1%聚蔗糖(Ficoll)/0.1%聚乙烷基吡咯烷酮/含有 750 mM 氯化鈉、75 mM 檸檬酸鈉之 pH 6.5 之 50 mM 磷酸鈉緩衝液之 50%(體積/體積)甲醯胺；或(3)於 42℃ 採用 50%甲醯胺、5 倍 SSC(0.75 M NaCl、0.075 M 檸檬酸鈉)、50 mM 磷酸鈉(pH 6.8)、0.1%焦磷酸鈉、5 倍丹哈德(Denhardt's)溶液、經超音波化之鮭魚精子 DNA(50 μ g/ml)、0.1% SDS 及 10%硫酸葡聚糖，並於 42℃ 以 0.2 倍 SSC(氯化鈉/檸檬酸鈉)清洗及於 55℃ 以 50%甲醯胺清洗，之後於 55℃ 以含有 EDTA 之 0.1 倍 SSC 進行高嚴謹度清洗。該領域中具有通常知識者將認知當有需要時如何調整溫度、離子強度等條件以配合諸如探針長度及類似因子。

該領域具有通常知識者將了解的是，由於基因密碼簡併之結果，有許多核苷酸序列編碼本文中所描述之多肽。這些多核苷酸中的一些帶有對任何天然基因之核苷酸序列之最小同源。然而，本發明特別考慮由於使用不同的密碼子而有所變化之多核苷酸。再者，包含本文中所提供之多核苷酸序列之基因的等位基因係屬於本發明之範疇內。等位基因係作為一或多個突變，諸如核苷酸之刪除、添加及/或取代之結果而被改變之內源性基因。所得 mRNA 及蛋白可能但不一定具有經改變之結構或功能。等位基因可使用標準技術(諸如雜交、擴增及/或數據庫序列比較)加以識

別。

本發明之多核苷酸可使用化學合成、重組方法或 PCR 獲得。化學多核苷酸合成之方法係該領域熟知，不須於本文中詳細說明。該領域中具有通常知識者可使用本文中所提供之序列及商用 DNA 合成儀產製所欲之 DNA 序列。

在使用重組方法製備多核苷酸時，包含所欲序列之多核苷酸可被插入適合之載體中，該載體進而可被導入適合之宿主細胞以供複製及擴增，如在下面進一步討論。多核苷酸可藉由該領域已知之任何方法被插入宿主細胞中。細胞係藉由直接攝取、胞飲作用、轉染、F 交配 (F-mating) 或電穿孔導入外源性多核苷酸而轉形。一旦導入後，該外源性多核苷酸可呈非整合性載體(諸如質體)維持於該細胞內或被整合至該宿主細胞之基因組中。如是擴增之多核苷酸可使用該領域所熟知之方法自該宿主細胞分離出。見例如 Sambrook et al., 1989。

替代地，PCR 允許複製 DNA 序列。PCR 技術係該領域熟知者，且係於美國專利第 4,683,195、4,800,159、4,754,065 及 4,683,202 號及 PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis et al. eds., Birkauser Press, Boston, 1994 中描述。

RNA 可藉由使用在適當載體中之該經分離之 DNA 且將其插入適合之宿主細胞中獲得。當細胞複製且該 DNA 被轉錄成為 RNA 時，接著該 RNA 可使用該領域中具有通常知識者熟知之方法分離，舉例來說如於 Sambrook et

al.,1989(同上)中所述者。

適合之克隆載體可根據標準技術建構，或可選自該領域之大量可用克隆載體。雖然該經選擇之克隆載體可能因意圖使用之宿主細胞有變化，有用之克隆載體將一般具有自我複製之能力、可具有用於特定限制內切酶之單一目標及/或可能帶有可用於選擇含有該載體之克隆的標記之基因。適合實施例包括質體及細菌性病毒，例如 pUC18、pUC19、Bluescript(例如 pBS SK+)及其衍生物、mp18、mp19、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4、噬菌體 DNA 及穿梭載體諸如 pSA3 及 pAT28。這些及許多其他克隆載體可得自商業販售商諸如伯樂(BioRad)公司、斯壯特基(Stratagene)公司及英維特基(Invitrogen)公司。

進一步提供表現載體。表現載體一般是可複製之多核苷酸建構物，其含有根據本發明之多核苷酸。這暗示表現載體必需在宿主細胞中呈附加體或呈染色體 DNA 之一體部分而可複製。適合之表現載體包括但不限於質體；病毒載體，包括腺病毒、腺病毒相關病毒、反轉錄病毒；黏質體及 PCT 公開號 WO 87/04462 中所揭示之表現載體。載體成份一般可包括但不限於下列一或多者：信號序列、複製起點、一或多種標記基因、適合之轉錄控制元件(諸如啟動子、增強子及終止子)。就表現(即轉譯)而言，通常也需要一或多種轉譯控制元件，諸如核糖體結合位點、轉譯起始位點及終止密碼子。

含有感興趣之多核苷酸之載體可藉由大量適合手段之

任一者導入宿主細胞，包括電穿孔；採用氯化鈣、氯化鉀、磷酸鈣、DEAE-葡聚糖或其他物質之轉染；微彈撞擊；脂質體轉染；及感染(例如其中該載體為感染性劑諸如牛痘病毒者)。導入載體或多核苷酸之選擇經常將取決於該宿主細胞之特徵而定。

本發明亦提供包含本文中所述之多核苷酸之任一者的宿主細胞。任何能過度表現異源性 DNA 之宿主細胞可用於分離編碼該感興趣之抗體、多肽或蛋白之基因的目的。哺乳動物宿主細胞之非限制性實施例包括但不限於 COS、HeLa 及 CHO 細胞。亦見 PCT 公開號 WO 87/04462。適合之非哺乳動物宿主細胞包括原核生物(諸如大腸桿菌或枯草桿菌)及酵母菌(諸如釀酒酵母菌；分裂酵母(*S. pombe*)；或乳酸克魯維酵母菌(*K. lactis*))。較佳地，該宿主細胞以與感興趣之對應內源性抗體或蛋白(若存在)相比於宿主細胞中高出約 5 倍、更佳為高出 10 倍、甚至更佳為高出 20 倍之水平表現 cDNA。篩選專一性結合 PD-1 或 PD-1 結構域之宿主細胞係藉由免疫檢定法或 FACS 致效。過度表現感興趣之抗體或蛋白之細胞可被識別。

表現載體可被用於直接表現抗 PD-1 拮抗劑抗體。該領域中具有通常知識者熟習投予表現載體以於活體內獲得外源性蛋白之表現。見例如美國專利第 6,436,908、6,413,942 及 6,376,471 號。表現載體之投予包括局部或全身性投予，包括注射、經口投予、粒子槍或經導管投予及外用投予。在另一種實施態樣中，該表現載體係直接投予

至交感神經幹或神經節，或投予至冠狀動脈、心房、心室或心包膜中。

亦可被使用靶向遞送含有表現載體或次基因組多核苷酸之治療性組成物。受體媒介之 DNA 遞送技術係描述於，舉例來說 Findeis et al., Trends Biotechnol., 1993, 11:202 ; Chiou et al., Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer, J.A. Wolff, ed., 1994 ; Wu et al., J. Biol. Chem., 1988, 263:621 ; Wu et al., J. Biol. Chem., 1994, 269:542 ; Zenke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87:3655 ; Wu et al., J. Biol. Chem., 1991, 266:338。基因療法計畫中，對於局部投予，含有多核苷酸之治療性組成物係以約 100 ng 至約 200 mg 之 DNA 範圍投予。約 500 ng 至約 50 mg、約 1 μ g 至約 2 mg、約 5 μ g 至約 500 μ g 及約 20 μ g 至約 100 μ g 之 DNA 濃度範圍亦可於基因療法計畫期間使用。治療性多核苷酸及多肽可使用基因遞送載具遞送。該基因遞送載具可為病毒性或非病毒性起源(一般參考 Jolly, Cancer Gene Therapy, 1994, 1:51 ; Kimura, Human Gene Therapy, 1994, 5:845 ; Connelly, Human Gene Therapy, 1995, 1:185 ; 及 Kaplitt, Nature Genetics, 1994, 6:148)。該等編碼序列之表現可使用內源性哺乳動物或異源啟動子誘導。編碼序列之表現可為組成性或經調節的。

用於遞送所欲之多核苷酸且在所欲細胞中表現之病毒基底載體係該領域所熟知。例示性病毒基底載具包括但不

限於重組反轉錄病毒(見例如 PCT 公開號 WO 90/07936 ; WO 94/03622 ; WO 93/25698 ; WO 93/25234 ; WO 93/11230 ; WO 93/10218 ; WO 91/02805 ; 美國專利第 5,219,740 及 4,777,127 號 ; GB 專利第 2,200,651 號及 EP 專利第 0 345 242 號)、阿爾法病毒基底載體(例如辛德比(Sindbis)病毒載體、塞姆利基森林病毒(Semliki forest virus)(ATCC VR-67 ; ATCC VR-1247)、羅斯河病毒(Ross River virus)(ATCC VR-373 ; ATCC VR-1246)及委內瑞拉馬腦炎病毒(Venezuelan equine encephalitis virus)(ATCC VR-923 ; ATCC VR-1250 ; ATCC VR 1249 ; ATCC VR-532))及腺病毒相關病毒(AAV)載體(見例如 PCT 公開號 WO 94/12649 、 WO 93/03769 ; WO 93/19191 ; WO 94/28938 ; WO 95/11984 及 WO 95/00655)。投予如 Curiel, Hum. Gene Ther., 1992, 3:147 所述之鏈結至死腺病毒之 DNA 亦可被採用。

亦可採用非病毒性遞送載具及方法，包括但不限於單獨之鏈結至或未鏈結至死腺病毒之經聚陽離子性縮合之 DNA(見例如 Curiel, Hum. Gene Ther., 1992, 3:147)；鏈結配體 DNA(見例如 Wu, J. Biol. Chem., 1989, 264:16985)；真核細胞遞送載具細胞(見例如美國專利第 5,814,482 號；PCT 公開號 WO 95/07994；WO 96/17072；WO 95/30763 及 WO 97/42338)及核電荷中和或與細胞膜融合。亦可採用裸 DNA。例示性裸 DNA 導入方法係於 PCT 公開號 WO 90/11092 及美國專利第 5,580,859 號中描述。可作用如基

因遞送載具之脂質體係描述於美國專利第 5,422,120 號；PCT 公開號 WO 95/13796；WO 94/23697；WO 91/14445 及 EP 0524968。其他途徑係描述於 Philip, Mol. Cell Biol., 1994, 14:2411 及 Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci., 1994, 91:1581 中。

組成物

本發明也提供醫藥組成物，其包含有效量之本文所述之抗 PD-1 抗體。此等組成物之實施例及如何調製也被描述本文中。於一些實施態樣中，該組成物包含一或多種 PD-1 抗體。於其他實施態樣中，抗 PD-1 抗體辨認 PD-1。於其他實施態樣中，該抗 PD-1 抗體係人類抗體。於其他實施態樣中，該抗 PD-1 抗體係人源化抗體。於一些實施態樣中，該抗 PD-1 抗體包含能觸發所欲之免疫反應(諸如抗體媒介之溶解或 ADCC)之恆定區。在其他實施態樣中，該抗 PD-1 抗體包含不觸發非所需或非所欲之免疫反應(諸如抗體媒介之溶解或 ADCC)之恆定區。在其他實施態樣中，該抗 PD-1 抗體包含該抗體之一或多個 CDR(諸如一、二、三、四、五個或在一些實施態樣中，所有六個 CDR)。

應理解該等組成物可包含超過一種抗 PD-1 抗體(例如辨認 PD-1 之不同表位之 PD-1 抗體之混合物)。其他例示性組成物包含超過一種辨識相同的一或多個表位之抗 PD-1 抗體，或結合不同 PD-1 表位之不同物種的抗 PD-1 抗體

類。於一些實施態樣中，該組成物包含辨認 PD-1 之不同變體之抗 PD-1 抗體類之混合物。

本發明所使用之組成物可進一步包含醫藥上可接受之載劑、賦形劑或安定劑 (Remington: The Science and practice of Pharmacy 20th Ed., 2000, Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover)，呈冷凍乾燥調製劑或水性溶液之形式。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所施用該劑量及濃度下對接受者不具毒性，且可包括緩衝劑諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑包括抗壞血酸及甲硫胺酸；保存劑(諸如十八基二甲基苄基氯化銨、氯化六甲雙銨；氯化苯甲烴銨、氯化苄乙氧銨；酚、丁基或苄基醇；烷基對羥苯甲酸酯類諸如對羥苯甲酸甲酯或對羥苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇及間甲酚)；低分子量(小於約 10 個殘基)多肽；蛋白諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物諸如聚乙烷基吡咯烷酮；胺基酸諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺酸、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣及其他碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖或葡聚糖；螯合劑諸如 EDTA；糖類諸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；形成鹽相對離子諸如鈉；金屬複合物(例如鋅蛋白複合物)；及/或非離子性界面活性劑諸如 TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。醫藥上可接受之賦形劑進一步於本文中說明。

該抗 PD-1 抗體及彼之組成物也可用於與其他劑一起使用、或個別、同時、或順序投予，該其他劑用以增進及

/或補充該等劑之有效性。

本發明也提供包含本發明之該多核苷酸之組成物，包含醫藥組成物。於一些實施態樣中，該組成物包含表現載體，該表現載體包含編碼如本文所述之抗體的多核苷酸。於其他實施態樣中，該組成物包含表現載體，該表現載體包含編碼如本文所述之抗體之任一者的多核苷酸。

預防治療或 PD-1 媒介之狀況之方法

本發明之抗體及抗體共軛物係有用於各式應用，包括但不限於治療性治療方法及診斷性治療方法。

於一種面向中，本發明提供一種治療癌症之方法。於一些實施態樣中，該治療個體之癌症之方法包含對需要彼之該個體投予有效量之包含如本文中所述之該 PD-1 抗體之任一者的組成物(例如，醫藥組成物)。如本文中所使用，癌症包括但不限於膀胱癌、乳腺癌、子宮頸癌、絨毛膜癌、結腸癌、食道癌、胃癌、神經膠母細胞瘤、膠質瘤、腦腫瘤、頭部和頸部癌症、腎癌(kidney cancer)、肺癌、口腔癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肝癌、子宮癌、骨癌、白血病、淋巴瘤、肉瘤、血癌、甲狀腺癌、胸腺癌、眼癌及皮膚癌。於一些實施態樣中，所提供者係一種抑制個體之腫瘤生長或惡化之方法，其包含對需要彼之該個體投予有效量之包含如本文中所述之該 PD-1 抗體或該 PD-1 抗體共軛物的組成物。於一些實施態樣中，該癌症係表現 PD-L1 腫瘤。於其他實施態樣中，該腫瘤不表現

PD-L1。於其他實施態樣中，所提供者係一種抑制個體之癌細胞轉移之方法，其包含對需要彼之該個體投予有效量之包含如本文中所述之該 PD-1 抗體之任一者的組成物。於其他實施態樣中，所提供者係一種誘導個體之腫瘤緩解之方法，其包含對需要彼之該個體投予有效量之包含如本文中所述之該 PD-1 抗體之任一者的組成物。

於另一種面向中，所提供者係一種偵測、診斷及/或監測癌症之方法。舉例來說，本文中所述之 PD-1 抗體可經可偵測之基團標籤，諸如成像劑及酵素-受質標籤。本文中所述之抗體亦可被用於活體內診斷性檢測法，諸如活體內成像(例如 PET 或 SPECT))或染色試劑。

於一些實施態樣中，本文中描述之方法進一步包含以額外形式之療法治療個體之步驟。於一些實施態樣中，該額外形式之療法係額外抗癌療法，包括但不限於化學療法、放射、手術、荷爾蒙療法及/或額外免疫療法。

對於所有本文中所述之方法，當提及抗 PD-1 拮抗劑抗體，也包括包含一或多種額外劑之組成物。這些組成物可進一步包含適合賦形劑，諸如醫藥上可接受之賦形劑包括緩衝劑，其係該領域所熟知。本發明可單獨或與其他治療方法組合使用。

該抗 PD-1 拮抗劑抗體可經由任何適合途徑投予至個體。對該領域中具有通常知識者顯而易見的是，本文中所描述之實施例不意圖限制而是可用技術之說明。據此，於一些實施態樣中，該抗 PD-1 拮抗劑抗體係根據已知方法

投予至個體，諸如靜脈內投予例如呈快速濃注或藉由在一段時間連續輸注、藉由肌肉內、腹膜內、腦脊髓內、經皮、皮下、關節內、舌下、滑膜內、經噴入、脊椎鞘內、經口、吸入或外用途徑。投予可為全身性例如靜脈內投予、或局部投予。市售液體調製劑用噴霧器包括噴射噴霧器及超音波噴霧器可有用於投予。液體調製劑可直接噴霧化，且冷凍乾燥之粉末可在重構後噴霧化。替代地，抗 PD-1 拮抗劑抗體可使用氟碳調製劑及定量吸入器氣霧化或呈經冷凍乾燥及磨細粉末之形式吸入。

於一些實施態樣中，抗 PD-1 拮抗劑抗體係經由位點專一性或靶向性局部遞送技術投予。位點專一性或靶向性局部遞送技術之實施例包括各式抗 PD-1 拮抗劑抗體之植入式貯劑來源或局部遞送導管，諸如輸注導管、留置導管、或針頭導管、合成性移植物、外膜層包覆、分流器及支架或其他植入式裝置、位點專一性載劑、直接注射或直接施用。見例如 PCT 公開號 WO 00/53211 及美國專利第 5,981,568 號。

抗 PD-1 拮抗劑抗體之各式調製劑可用於投予。於一些實施態樣中，該抗 PD-1 拮抗劑抗體可淨投予。於一些實施態樣中，該抗 PD-1 拮抗劑抗體及醫藥上可接受之賦形劑可於各式調製劑中。醫藥上可接受之賦形劑係為該領域已知，且係有助於投予藥理有效物質之相對惰性物質。舉例來說，賦形劑可給予外形或稠度，或作用為稀釋劑。適合之賦形劑包括但不限於安定劑、潤濕及乳化劑、用於

改變滲透性之鹽類、包封劑、緩衝劑及皮膚穿透增進劑。用於非經腸及經腸藥物遞送之賦形劑及調製劑係闡述於 Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 2000。

於一些實施態樣中，這些劑係經調製為供注射投予(例如腹膜內、靜脈內、皮下、肌肉內等)。據此，這些劑可與醫藥上可接受之載具(諸如鹽水、林格(Ringer)氏液、葡萄糖溶液及類似物)組合。特定給藥方案(即劑量、時間及重複性)將依特定個體及該個體之醫學病史而定。

抗 PD-1 拮抗劑抗體可使用任何適合之方法投予，包括藉由注射(例如腹膜內注射、靜脈內注射、皮下內注射、肌肉內注射等)。本文中所述，抗 PD-1 抗體類亦可外用投予或經吸入投予。一般，對於投予抗 PD-1 抗體類，初始候選劑量可為約 2 mg/kg。就本發明之目的而言，取決於上述因子，典型之每日劑量可於自約 3 μ g/kg 至 30 μ g/kg、至 300 μ g/kg、至 3 mg/kg、至 30 mg/kg、至 100 mg/kg 或至 100 mg/kg 或更多之任一範圍內。舉例來說，可使用約 1 mg/kg、約 2.5 mg/kg、約 5 mg/kg、約 10 mg/kg 及約 25 mg/kg 之劑量。對於在數天或更久期間內重複投予，取決於狀況，該治療係持續進行直到發生所欲之症狀壓抑或達成足夠之治療水平，舉例來說減少癌症相關症狀。此療法之進展可輕易藉由習用技術與檢測法監測。給藥方案(包括所此用之抗 PD-1 拮抗劑抗體)可隨時間變化。

就本發明之目的而言，抗 PD-1 拮抗劑抗體之適合劑量將取決於所採用之抗 PD-1 拮抗劑抗體(或彼之組成物)、所欲治療之症狀的種類及嚴重性、該劑是否以預防性或治療性目的投予、先前療法、該病患之臨床病史及對該劑之反應、該病患清除該經投予之劑之速率及主治醫師之考量。典型臨床醫師將投予抗 PD-1 拮抗劑抗體直到到達達成所欲結果之劑量。劑量及/或頻率可隨治療療程變化。經驗性考量諸如半衰期，一般將促成該劑量之決定。舉例來說，可相容於人類免疫系統之抗體，諸如人源化抗體或全人類抗體可用於延長該抗體之半衰期及防止該抗體被宿主之免疫系統攻擊。投予頻率可隨療法之療程決定及調整，且一般但不必然基於症狀之治療及/或壓抑及/或改善及/或延緩。替代地，抗 PD-1 拮抗劑抗體之持續性連續釋放調製劑可為適當。各式用於達成持續性釋放之調製劑及裝置係該領域已知。

於一種實施態樣中，在已給予一或多次拮抗劑抗體投予之個體中，該拮抗劑抗體之劑量可能憑經驗決定。個體係經給予漸增劑量之抗 PD-1 拮抗劑抗體。為了評估療效，可追蹤疾病之指標。

根據本發明之方法投予抗 PD-1 拮抗劑抗體可為連續性或間歇性，取決於，舉例來說接受者之生理狀況、投予之目的是否係治療性或預防性及該領域中具有通常知識者所知之其他因素而定。抗 PD-1 拮抗劑抗體之投予可為基本上連續一段預先選定之時間，或可為一系列間隔劑量。

於一些實施態樣中，可能出現超過一種抗 PD-1 拮抗劑抗體。可能出現至少一種、至少兩種、至少三種、至少四種、至少五種不同或更多種拮抗劑抗體。一般，這些抗 PD-1 拮抗劑抗體可能具有彼此不會有不良影響之互補活性。抗 PD-1 拮抗劑抗體也可用於與其他抗體及/或其他療法一起使用。抗 PD-1 拮抗劑抗體也可用於與其他劑一起使用，該其他劑用以增進及/或互補該等劑之有效性。

於一些實施態樣中，該抗 PD-1 拮抗劑抗體也可與投予一或多種額外治療劑組合投予。這些包括但不限於，投予化學治療劑；疫苗；CAR-T 細胞基底療法；放射療法；細胞介素療法；疫苗；抗 PD-1 雙專一性抗體；其他免疫壓抑路徑之抑制劑；血管生成抑制劑；T 細胞活化劑；代謝路徑抑制劑；mTOR 抑制劑；腺苷路徑抑制劑；酪胺酸激酶抑制劑，包括但不限於英立達(inlyta)、ALK 抑制劑及書尼替尼(sunitinib)；BRAF 抑制劑；外顯遺傳修飾劑；調控型 T(Treg)細胞及/或骨髓衍生壓抑細胞之抑制劑或耗盡劑；JAK 抑制劑；STAT 抑制劑；週期素依賴性激酶抑制劑；生物治療劑(包括但不限於抗 VEGF、VEGFR、EGFR、Her2/neu、其他生長因子受體、CD20、CD40、CD-40L、CTLA-4、OX-40、4-1BB 及 ICOS 之抗體)；免疫源性劑(舉例來說，削弱癌細胞、腫瘤抗原、抗原呈現細胞諸如以腫瘤衍生抗原或核酸致敏之樹突細胞、免疫刺激性細胞介素(舉例來說，IL-2、IFN α 2、GM-CSF)及經編碼免疫刺激細胞介素諸如但不限於 GM-CSF 之基因轉染之

細胞)。化學治療劑之實施例包括烷化劑諸如塞替派(thiotepa)和環磷醯胺；磺酸烷基酯諸如硫酸布他卡因(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和呱泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶類諸如苯佐替派(benzodopa)、卡波醯(carboquone)、美妥替派(meturedopa)和烏瑞替派(uredopa)；乙烯亞胺和甲基蜜胺，包括六甲蜜胺、三伸乙基蜜胺、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺和三羥甲基蜜胺；番荔枝內酯(acetogenin)(尤其是布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone))；喜樹碱(包括合成的類似物托泊替康(topotecan))；苔蘚蟲素；海綿多聚乙醯(callystatin)；CC-1065(包括其之合成類似物阿多來新(adozelesin)、卡澤來新(carzelesin)和比澤來新(bizelesin))；念珠藻素(尤其是念珠藻素 1 和念珠藻素 8)；朵拉司他汀(dolastatin)；多卡米星(duocarmycin)(包括合成類似物 KW-2189 和 CBI-TMI)；艾榴塞洛素(eleutherobin)；水鬼蕉鹼(pancratistatin)；匍枝珊瑚醇(sarcodictyin)；海綿素(spongistatin)；氮芥類諸如氮芥苯丁酸、萘氮芥、氯磷醯胺(cholophosphamide)、雌二醇氮芥、依弗醯胺(ifosfamide)、甲基二(氯乙基)胺、鹽酸甲基二(氯乙基)胺氧化物、美法侖(melphalan)、新氮芥、膽固醇苯乙酸氮芥、潑尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥；硝基脲類諸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲黴素、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)、雷莫司汀

(ranimustine)；抗生素類諸如烯二炔抗生素(例如刺孢黴素，尤其是刺孢黴素 γ 1I 和刺孢黴素 phiI1，見例如 Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)；達內黴素(dynemicin)，包括達內黴素 A；雙膦酸鹽類，諸如氯膦酸鹽；埃斯培拉黴素(esperamicin)；及新抑癌素發色團和有關的色蛋白烯二炔抗生素發色團)、阿克拉黴素(aclacinomycin)、放線菌素、氨茴黴素(authramycin)、偶氮絲氨酸、博來黴素(bleomycin)、放線菌素、卡拉星(carabycin)、洋紅黴素(caminomycin)、嗜癌菌素、色黴素、更生黴素(dactinomycin)、柔紅黴素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-側氧基-L-正白胺酸、多柔比星(doxorubicin)(包括 N-嗎啉基-多柔比星、氰基 N-嗎啉基-多柔比星、2-吡咯啉基-多柔比星和去氧多柔比星)、PEG 化脂質體多柔比星、表柔比星、依索比星(esorubicin)、伊達比星(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素類諸如絲裂黴素 C、麥考酚酸(mycophenolic acid)、諾拉黴素(nogalamycin)、橄欖黴素(olivomycin)、培洛黴素(peplomycin)、泊非黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素(puromycin)、三鐵阿黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑黴素、鏈脲佐菌素(streptozocin)、殺結核菌素、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin)；抗代謝藥諸如甲氨蝶呤和 5-氟尿嘧啶(5-FU)；葉酸類似物諸如二甲葉酸、甲氨蝶呤、蝶羅呤、三甲曲沙；嘌呤類似物諸如氟達

拉濱(fludarabine)、6-巯嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鳥嘌呤(thioguanine)；嘧啶類似物諸如安西他濱(ancitabine)、阿紫胞苷(azacitidine)、6-氮雜尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷、二去氧尿苷、去氧氟尿苷、依諾他濱(enocitabine)、氟尿苷；雄激素類諸如卡魯甾酮、丙酸屈他雄酮、環硫雄醇、美雄烷、甾內酪；抗腎上腺類諸如氨魯米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑諸如亞葉酸(frolic acid)；醋葡醒內酯(aceglatone)；醒磷醯胺糖苷(aldophosphamide glycoside)；氨基酮戊酸；恩尿嘧啶(eniluracil)；安吡啶(amsacrine)；貝斯特拉比瑟爾(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；依達曲沙(edatraxate)；地磷醯胺(defofamine)；秋水仙胺；地吡醌(diaziquone)；艾弗咪辛(elformithine)；依利醋鉍(elliptinium acetate)；埃博黴素(epothilone)；依託格魯(etoglucid)；硝酸鎂；羥基脲；香菇多糖；氯尼達明(lonidamine)；美登木素類(maytansinoids)諸如美坦辛(maytansine)和安絲菌素(ansamitocins)；米托胍脲(mitoguazone)；米托蒽醌(mitoxantrone)；莫呱達醇(mopidamol)；尼曲吡啶(nitracrine)；噴司他丁(pentostatin)；蛋氨酸芥(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醌(losoxantrone)；鬼臼酸(podophyllinic acid)；2-乙基醯肼；丙卡巴肼；雷佐生(razoxane)；根瘤菌素(rhizoxin)；西索菲蘭(sizofuran)；

鍺螺胺(spirogermanium)；替奴佐酸(tenuazonic acid)；三亞胺醌；2,2',2''-三氯三乙胺；新月毒素類(尤其是 T-2 毒素、疣孢菌素(verracurin)A、桿孢菌素 A 和鐮刀菌烯醇(anguidine))；烏拉坦(urethan)；長春地辛(vindesine)；達卡巴嗪(dacarbazine)；甘露莫司汀(mannomustine)；二溴甘露醇；二溴衛矛醇(mitolactol)；呱泊溴燒(pipobroman)；加西托新(gacytosine)；阿糖胞苷("Ara_C")；環磷醯胺；塞替派；紫杉烷類，例如紫杉醇和多西紫杉醇；氮芥苯丁酸；吉西他濱(gemcitabine)；6-硫鳥嘌呤；巯嘌呤；甲氨蝶呤；鉑類似物諸如順鉑和卡鉑；長春城；鉑；依託泊苷(etoposide)(VP-16)；異環磷醯胺；米托蒽醌；長春新城；長春瑞濱(vinorelbine)；諾消靈(novantrone)；替尼泊苷(teniposide)；依達曲沙(edatrexate)；道諾黴素(daunomycin)；氨基蝶呤；希羅達(xeloda)；伊班膦酸鹽(ibandronate)；CPT-11；拓撲異構酶抑制劑 RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸(DMFO)；類視黃醇諸如視黃酸；卡培他濱(capecitabine)；和上述任一者的藥學上可接受的鹽、酸或衍生物。也包括者抗荷爾蒙劑，其作用來調控或抑制荷爾蒙對腫瘤的作用，諸如抗雌激素類和選擇性雌激素受體調節劑(SERM)，包括舉例來說，他莫昔芬(tamoxifen)、雷洛昔芬(raloxifene)、屈洛昔芬(droloxifene)、4-羥基他莫昔芬、曲沃昔芬(trioxifene)、鹽酸雷洛昔芬(keoxifene)、LY117018、奧那司酮(onapristone)和托瑞米芬(Fareston)；抑制酵素芳香酶之芳

香酶抑制劑，酵素芳香酶係在腎上腺中調控雌激素產製，芳香酶抑制劑諸如舉例來說，4(5)-咪唑、胺基魯米特(aminoglutethimide)、醋酸美皆斯妥、依西美坦(exemestane)、福美坦(formestane)、法屈唑(fadrozole)、伏氯唑(vorozole)、來曲唑(letrozole)和阿那曲唑(anastrozole)；和抗雄激素類諸如氟他胺、尼魯米特(nilutamide)、比卡魯胺(bicalutamide)、亮丙瑞林(leuprolide)和戈舍瑞林(goserelin)；和上述任一者的藥學上可接受的鹽、酸或衍生物。

於一些實施態樣中，抗 PD-1 拮抗劑抗體係用於與靶向免疫檢查點調節劑之一或多種其他治療劑一起使用，諸如，舉例來說但不限於靶向 PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG-3、B7-H3、B7-H4、B7-DC(PD-L2)、B7-H5、B7-H6、B7-H8、B7-H2、B7-1、B7-2、ICOS、ICOS-L、TIGIT、CD2、CD47、CD80、CD86、CD48、CD58、CD226、CD155、CD112、LAIR1、2B4、BTLA、CD160、TIM1、TIM-3、TIM4、VISTA(PD-H1)、OX40、OX40L、GITR、GITRL、CD70、CD27、4-1BB、4-BBL、DR3、TL1A、CD40、CD40L、CD30、CD30L、LIGHT、HVEM、SLAM(SLAMF1、CD150)、SLAMF2(CD48)、SLAMF3(CD229)、SLAMF4(2B4、CD244)、SLAMF5(CD84)、SLAMF6(NTB-A)、SLAMCF7(CS1)、SLAMF8(BLAME)、SLAMF9(CD2F)、CD28、CEACAM1(CD66a)、CEACAM3、CEACAM4、CEACAM5、CEACAM6、

CEACAM7、CEACAM8、CEACAM1-3AS CEACAM3C2、CEACAM1-15、PSG1-11、CEACAM1-4C1、CEACAM1-4S、CEACAM1-4L、IDO、TDO、CCR2、CD39-CD73-腺苷路徑(A2AR)、BTK、TIK、CXCR2、CCR4、CCR8、CCR5、VEGF 路徑、CSF-1 之劑、或天生免疫反應調節劑。於一些實施態樣中，抗 PD-1 拮抗劑抗體係用於與下列者一起使用：舉例來說，抗 PD-L1 拮抗劑抗體諸如舉例來說，BMS-936559(MDX-1105)及 MPDL3280A；抗 PD-1 拮抗劑抗體諸如舉例來說，納武單抗(nivolumab)、派姆單抗(pembrolizumab)及皮迪地蘇單抗(pidilizumab)；抗 CTLA-4 拮抗劑抗體諸如舉例來說，易普利單抗(ipilimumab)；抗 LAG-3 拮抗劑抗體諸如 BMS-986016 及 IMP701；抗 TIM-3 拮抗劑抗體；抗 B7-H3 拮抗劑抗體諸如舉例來說，MGA271；抗 VISTA 拮抗劑抗體；抗 TIGIT 拮抗劑抗體；抗 CD28 拮抗劑抗體；抗 CD80 抗體；抗 CD86 抗體；抗 B7-H4 拮抗劑抗體；抗 ICOS 促效劑抗體；抗 CD28 促效劑抗體；天生免疫反應調節劑(例如 TLR、KIR、NKG2A)；及 IDO 抑制劑。於一些實施態樣中，抗 PD-1 拮抗劑抗體係用於與 4-1BB(CD137)促效劑一起使用，諸如舉例來說 PF-05082566 或 BMS-663513。於一些實施態樣中，PD-1 拮抗劑抗體係用於與 OX40 促效劑一起使用，諸如舉例來說抗 OX-40 促效劑抗體。於一些實施態樣中，抗 PD-1 拮抗劑抗體係用於與 GITR 促效劑一起使用，諸如舉例來說抗 GITR 促效劑抗體，諸如舉例

來說但不限於 TRX518。於一些實施態樣中，抗 PD-1 拮抗劑抗體係用於與 IDO 抑制劑一起使用。於一些實施態樣中，抗 PD-1 拮抗劑抗體係用於與細胞介素療法一起使用，諸如舉例來說但不限於 IL-15、CSF-1、MCSF-1 等。

於一些實施態樣中，抗 PD-1 拮抗劑抗體係用於與一或多種其他治療抗體一起使用，諸如舉例來說但不限於靶向 CD19、CD22、CD40、CD52 或 CCR4 之抗體。

於一些實施態樣中，該抗 PD-1 抗體療法可早於或晚於其它劑治療自數分鐘至數週範圍之間隔。於其中該其他劑及/或蛋白或多核苷酸係個別投予之實施態樣中，吾人將一般確保在各遞送之間不會經過一段顯著時間，而使得該劑與本發明之組成物將仍可以在個體上發揮有利組合效果。於此種情況中，考慮吾人可在彼此約 12 至 24 小時(h)內更佳地在彼此的約 6 至 12 小時內，投予二模式。然而，於一些情況中，可能所欲者為顯著地延長投予之時間週期，其中分別之投予之間推延數天(2、3、4、5、6 或 7)至數週(1、2、3、4、5、6、7 或 8)。

於一些實施態樣中，抗 PD-1 拮抗劑抗體組成物包含第二劑，其係選自克里唑替尼，帕博西尼、吉西他濱、環磷醯胺、氟尿嘧啶、FOLFOX、醛葉酸、奧沙利鉑(oxaliplatin)、阿西替尼、舒尼替尼蘋果酸鹽、托法替尼(tofacitinib)、貝伐單抗(bevacizumab)、利妥昔單抗(rituximab)及曲妥珠單抗(trastuzumab)。

於一些實施態樣中，抗 PD-1 抗體組成物係與治療方

案組合，該治療方案進一步包含選自手術、放射療法、化學療法、靶向性療法、免疫療法、荷爾蒙療法、血管生成抑制及姑息療法所組成群組之傳統療法。

PD-1 抗體於用於癌症之疫苗基底免疫療法方案的用途

於一些特定實施態樣中，本揭露提供一種用於增進用在哺乳動物癌症治療之疫苗的免疫原性效應或治療效應之方法，該哺乳動物特別是人類，該方法包含對接受該疫苗之該哺乳動物投予有效量之本揭露所提供之抗 PD-1 拮抗劑抗體。於一些其他特定實施態樣中，本揭露提供一種用於治療哺乳動物癌症之方法，該哺乳動物特別是人類，該方法包含對該哺乳動物投予(1)有效量之能引發抗該癌細胞的免疫反應的疫苗及(2)有效量之本揭露所提供之抗 PD-1 拮抗劑抗體。於上面本文中所述該用於治療哺乳動物腫瘤病症之方法及該用於增進哺乳動物腫瘤病症治療之疫苗的免疫原性效應或治療效應之方法係統稱「用於癌症之疫苗基底免疫療法方案」(或「用於癌症之 VBIR」)。

於該用於癌症之 VBIR 中，疫苗可呈任何形式或調製劑，諸如(i)細胞基底疫苗、(ii)次單元疫苗、(iii)蛋白基底疫苗、(iv)肽基底疫苗、或(v)核酸基底疫苗(諸如 DNA 基底疫苗、RNA 基底疫苗、質體基底疫苗、或病毒載體基底疫苗)。

本揭露所提供之該用於癌症之 VBIR 可應用於任何種類的癌症。特定癌症之實施例包括：小細胞肺癌、非小細

胞肺癌、膠質瘤、胃癌、胃腸道癌、腎癌(renal cancer)、卵巢癌、肝癌、結腸直腸癌、子宮內膜癌症、腎癌、前列腺癌、甲狀腺癌、神經母細胞瘤、胰腺癌、多型性神經膠母細胞瘤、子宮頸癌、膀胱癌、乳腺癌及頭部和頸部癌症。

意圖用於治療癌症之疫苗典型含有能引發抗特定 TAA 的免疫反應之抗原(呈肽、蛋白、細胞成分、整個細胞或編碼肽基底抵抗原之核酸分子之形式)，該 TAA 係在目標腫瘤細胞上表現或被目標腫瘤細胞所表現。許多 TAA 為該領域已知。已知 TAA 之實施例包括：前列腺癌之 PSA、PSCA 及 PSMA；結腸直腸癌之 CEA、MUC-1、Ep-CAM、5T4、hCG-b、K-ras 及 TERT；卵巢癌之 CEA、Muc-1、p53、間皮素、生存素及 NY-ESO-1；非小細胞肺癌之 Muc-1、5T4、WT-1、TERT、CEA、EGF-R 及 MAGE-A3；腎細胞癌之 5T4；及胰腺癌之 Muc-1、間皮素、K-Ras、膜聯蛋白 A2(Annexin A2)、TERT 及 CEA。於一些特定實施態樣中，本揭露所提供之用在該用於癌症之 VBIR 的疫苗係選自下列所組成群組：

(1)能引發抗 TAA 之免疫反應的疫苗，其中該 TAA 係選自 PSA、PSCA、PSMA、CEA、MUC-1、TERT、間皮素、EGF-R、或 MAGE-A3；

(2)含有肽抗原的疫苗，該肽抗原係衍生自選自 PSA、PSCA、PSMA、CEA、MUC-1、TERT、間皮素、EGF-R、或 MAGE-A3 之 TAA；及

(3)含有編碼肽抗原之核酸分子之疫苗，其中該肽抗原係衍生自選自 PSA、PSCA、PSMA、CEA、MUC-1、TERT、間皮素、EGF-R、或 MAGE-A3 之 TAA。

於又其他特定實施態樣中，該疫苗含有編碼一或多種衍生自 PSA 之免疫源性多肽、一或多種衍生自 PSCA 之免疫源性多肽、或一或多種衍生自 PSMA 之免疫源性多肽的核酸分子。

於特定實施態樣中，該核酸分子係選自下列所組成群組：

(1)編碼衍生自示於 SEQ ID NO：42 人類 PSMA 之免疫源性多肽的核酸分子；

(2)編碼包含示於 SEQ ID NO：42 之胺基酸 15 至 750 之免疫源性多肽的核酸分子；

(3)包含示於 SEQ ID NO：43 之核苷酸序列的核酸分子、或彼之降解性變體；

(4)包含示於 SEQ ID NO：44 之核苷酸序列的核酸分子、或彼之降解性變體；

(5)包含示於 SEQ ID NO：45 之核苷酸序列的核酸分子、或彼之降解性變體；

(6)包含示於 SEQ ID NO：46 之核苷酸序列的核酸分子、或彼之降解性變體；

(7)編碼衍生自示於 SEQ ID NO：47 人類 PSA 之免疫源性多肽的核酸分子；

(8)編碼包含示於 SEQ ID NO：47 之胺基酸 25 至 261

之免疫源性多肽的核酸分子；

(9)編碼衍生自示於 SEQ ID NO：48 人類 PSCA 之免疫源性多肽的核酸分子；

(10)編碼(i)衍生自示於 SEQ ID NO：42 人類 PSMA 之免疫源性多肽，(ii)衍生自示於 SEQ ID NO：47 人類 PSA 之免疫源性多肽，及(iii)衍生自示於 SEQ ID NO：48 人類 PSCA 之免疫源性多肽的核酸分子；及

(11)編碼(i)包含示於 SEQ ID NO：42 之胺基酸 15 至 750 之免疫源性多肽，(ii)包含示於 SEQ ID NO：47 之胺基酸 25 至 261 之免疫源性多肽，及(iii)示於 SEQ ID NO：48 之免疫源性多肽的核酸分子。

該編碼一或多種衍生自前列腺相關抗原之免疫源性多肽之核酸分子可呈質體或載體形式。此種質體的一種實施例為示於 SEQ ID NO：46 所建構之核酸(也指稱為質體 458)。表現衍生自人類 PSMA 之免疫源性多肽的載體的核苷酸序列係列於 SEQ ID NO：44 (也指稱為載體 AdC68W)。表現衍生自人類 PSMA 之免疫源性多肽，衍生自人類 PSA 之免疫源性多肽，及衍生自人類 PSCA 之免疫源性多肽的載體的核苷酸序列係列於 SEQ ID NO：45 及載體人類 PSMA(載體 AdC68W-734)。各式衍生自人類 PSMA、PSA 及 PSCA 之免疫源性多肽；編碼此等免疫源性多肽之核酸建構體(包括質體與載體)；及用於製備該等免疫源性多肽及該等核酸建構體，包括質體 458，及載體 AdC68W 及 AdC68W-734 之方法，係揭示於國際申請公開

案號 WO2013/164754 及 WO 2015/063647 中，其之各者藉由參考其整體內容而納入本文中。

於一種面向中，本發明提供一種經分離之拮抗劑抗體，其專一性結合 PD-1，其中該抗體包含：重鏈可變區 (VH)，其包含該 VH 的 VH 互補決定區 1(CDR1)、VH CDR2 及 VH CDR3，該 VH 具有選自 SEQ ID NO：3、SEQ ID NO：4、SEQ ID NO：5 及 SEQ ID NO：6 所組成群組之胺基酸序列；及輕鏈可變區 (VL)，其包含該 VL 的 VL CDR1、VL CDR2 及 VL CDR3，該 VL 具有選自 SEQ ID NO：2、SEQ ID NO：7、SEQ ID NO：8 及 SEQ ID NO：9 所組成群組之胺基酸序列。

任何本揭露所揭示之抗 PD-1 拮抗劑抗體可用在該用於癌症之 VBIR 中。於一些實施態樣中，該抗 PD-1 拮抗劑抗體包含 VH 區及/或 VL 區，其中該 VH 區包含示於 SEQ ID NO：3、4、5 或 6 之胺基酸序列、或彼在非 CDR 內之殘基具有一或數個保守性胺基酸取代之變體，及其中該 VL 包含示於 SEQ ID NO：2、7、8 或 9 之胺基酸序列、或彼在非 CDR 內之胺基酸具有一或數個胺基酸取代之變體。於一些實施態樣中，該抗體包含：包含示於 SEQ ID NO：39 之胺基酸序列之輕鏈及/或包含示於 SEQ ID NO：29 或 38 之胺基酸序列之重鏈。於一些特定實施態樣中，該抗體包含具有 ATCC 登錄號 PTA-121183 之表現載體所產製之 VH 區。於一些實施態樣中，該抗體包含具有 ATCC 登錄號 PTA-121182 之表現載體所產製之 VL 區。

本揭露所提供之該用於癌症之 VBIR 可進一步包含一或多種其他免疫調節劑(除了包含本揭露所提供之該 PD-1 拮抗劑抗體之外還包含的)。該其他免疫調節劑可以是免疫效應子細胞之增進子(「IEC 增進子」)或免疫壓抑細胞之抑制劑(「ISC 抑制劑」)。該額外 IEC 增進子或額外 ISC 抑制劑可單獨或與該用於癌症之 VBIR 組合使用。該額外 IEC 增進子及額外 ISC 抑制劑也可一起與該用於癌症之 VBIR 組合使用。

ISC 抑制劑類別之實施例包括蛋白激酶抑制劑、環加氧酶-2(COX-2)抑制劑、磷酸二酯酶第 5 型(PDE5)抑制劑及 DNA 交聯劑。COX-2 抑制劑之實施例包括塞来昔布(celecoxib)及羅非昔布(rofecoxib)。PDE5 抑制劑之實施例包括阿伐那非(avanafil)、羅地(lodenafil)、米羅那非(miroadenafil)、西地那非(sildenafil)、他達那非(tadalafil)、伐地那非(vardenafil)、烏地那非(udenafil)及紮普司特(zaprinast)。DNA 交聯劑之實施例係環磷醯胺。用語「蛋白激酶抑制劑」係指作用為蛋白激酶之選擇性或非選擇性抑制劑的任何物質。適合用於該用於癌症之 VBIR 中之特定蛋白激酶抑制劑的實施例包括拉帕替尼(Lapatinib)、AZD 2171、ET180CH 3、靛玉紅-3'-脲、NSC-154020、PD 169316、槲皮素、羅斯維汀(Roscovitine)、曲西立濱(Triciribine)、ZD 1839、5-碘殺結核菌素(5-Iodotubercidin)、阿達福斯汀(Adaphostin)、阿洛伊辛(Aloisine)、阿爾斯特隆(Alsterpaullone)、胺基染料

木黃酮 (Aminogenistein) 、 API-2 、 洋元荑黃素 (Apigenin) 、 牛蒡子苷元 (Arctigenin) 、 ARRY-334543 、 阿西替尼 (AG-013736) 、 AY-22989 、 AZD 2171 、 雙吡啶基順丁烯二醯亞胺 IX 、 CC1-779 、 白屈菜紅鹼 (Chelerythrine) 、 DMPQ 、 DRB 、 依地福新 (Edelfosine) 、 ENMD-981693 、 制表菌素類似物 (Erbstatin analog) 、 埃羅替尼 (Erlotinib) 、 法舒地爾 (Fasudil) 、 吉非替尼 (ZD1839) 、 H-7 、 H-8 、 H-89 、 HA-100 、 HA-1004 、 HA-1077 、 HA-1100 、 羥基法舒地爾 (Hydroxyfasudil) 、 肯泡隆 (Kenpaullone) 、 KN-62 、 KY12420 、 LFM-A13 、 葉黃酮 、 LY294002 、 LY-294002 、 粗糠柴毒 (Mallotoxin) 、 ML-9 、 MLN608 、 NSC-226080 、 NSC-231634 、 NSC-664704 、 NSC-680410 、 NU6102 、 奧羅莫星 (Olomoucine) 、 吡啶酮 I 、 PD153035 、 PD 98059 、 根皮酯 、 白皮杉醇 (Piceatannol) 、 苦鬼白脂素 (Picropodophyllin) 、 PKI 、 PP1 、 PP2 、 PTK787/ZK222584 、 PTK787/ZK-222584 、 珀伐拉諾 A (Purvalanol A) 、 雷帕慕恩 (Rapamune) 、 雷帕黴素 (Rapamycin) 、 Ro 31-8220 、 呂宋揪夾粉素 (Rottlerin) 、 SB202190 、 SB203580 、 西羅莫司 (Sirolimus) 、 SL327 、 SP600125 、 星形孢菌素 (Staurosporine) 、 STI-571 、 SU1498 、 SU4312 、 SU5416 、 SU5416 (司馬沙尼 (Semaxanib)) 、 SU 6656 、 SU6668 、 syk 抑制劑 、 TBB 、 TCN 、 酪胺酸磷酸化抑制劑 AG 1024 (Tyrphostin AG 1024) 、 酪胺酸磷酸化抑制劑 AG 490 、 酪胺酸磷酸化抑制

劑 AG 825、酪胺酸磷酸化抑制劑 AG957、U0126、W-7、渥曼青黴素(Wortmannin)、Y-27632、紫克替瑪(Zactima)(ZD6474)、ZM 252868、吉非替尼(gefitinib)(Iressa.RTM.)、舒尼替尼蘋果酸鹽(SUTENT; SU11248)、埃羅替尼(TARCEVA; OSI-1774)、拉帕替尼(GW572016; GW2016)、卡拉替尼(canertinib)(CI 1033)、塞瑪昔布(semaxinib)(SU5416)、瓦他拉尼(vatalanib)(PTK787/ZK222584)、索拉非尼(sorafenib)(BAY 43-9006)、伊馬替尼(imatinib)(Gleevec.RTM.; STI571)、達沙替尼(dasatinib)(BMS-354825)、來氟米特(Ieflunomide)(SU101)、凡德他尼(vandetanib)(ZACTIMA; ZD6474; ZD6474)及尼勒替尼(nilotinib)。

於一些具體實施態樣中，該酪胺酸激酶抑制劑係舒尼替尼蘋果酸鹽、索拉非尼甲苯磺酸鹽、或阿西替尼。舒尼替尼蘋果酸鹽，其係由輝瑞公司(Pfizer Inc.)以商品名SUTENT販售，在化學上描述為(2S)-羥基-丁二酸與N-[2-(二乙基胺基)乙基]-5-[(Z)-(5-氟-1,2-二氫-2-側氧基-3H-吡啶-3-亞基)甲基]-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-甲醯胺化合物(1:1)化合。該化合物、其之合成及特定多晶型物描述於美國專利第6,573,293號。舒尼替尼蘋果酸鹽在美國已被批准用於治療具有不可切除局部晚期或轉移疾病病患的胃腸道基質腫瘤、晚期腎細胞癌及惡化性充分分化型胰臟神經內分泌腫瘤。用於人類胃腸道基質腫瘤(GIST)及晚期腎細胞癌(RCC)，舒尼替尼蘋果酸鹽之建議劑量為50 mg 每日

口服一次，按照治療 4 週隨後停止 2 週之時程(時程 4/2)。用於胰臟神經內分泌腫瘤，舒尼替尼蘋果酸鹽之建議劑量為 37.5 mg 每日口服一次。在用於癌症之 VNIR 中，舒尼替尼蘋果酸鹽可以單一劑量或多劑量經口投予。典型，舒尼替尼蘋果酸鹽遞送二、三、四或更多連續週劑量，隨後為約 1 或 2 週或更多週「停止」期，其中不遞送舒尼替尼蘋果酸鹽。於一種實施態樣中，遞送劑量約 4 週，停止 2 週。經口投予人類舒尼替尼蘋果酸鹽之有效量典型低於每天每人 40 mg，諸如每天每人 37.5、31.25、25、18.75、12.5 或 6.25 mg。於一些實施態樣中，係以每天每人 1 至 25 mg 範圍經口投予舒尼替尼蘋果酸鹽。於一些其它實施態樣中，係以每天每人 6.25、12.5 或 18.75 mg 範圍經口投予舒尼替尼蘋果酸鹽。其它給藥方案及變化為可預見的，且將根據醫師指導來決定。

以商品名 NEXAVAR 販售之索拉非尼甲苯磺酸鹽具有化學名稱為 4-(4-{3-[4-氯-3-(三氟甲基)苯基]脲基}苯氧基)-N-甲基吡啶-2-甲醯胺。其在美國中已被批准用於治療原發性腎癌(晚期腎細胞癌)及晚期原發性肝癌(肝細胞癌)。建議每日劑量為 400 毫克，每日口服兩次。在本揭露所提供之該用於癌症之 VBIR 中，經口投予索拉非尼甲苯磺酸鹽之有效量典型低於每天每人 400 mg。於一些實施態樣中，經口投予索拉非尼甲苯磺酸鹽之有效量在每天每人 10 至 300 mg 範圍。在一些其它實施態樣中，經口投予索拉非尼甲苯磺酸鹽之有效量在每天每人 10 至 200 mg

之間，諸如每天每人 10、20、60、80、100、120、140、160、180 或 200 mg。

以商品名 INLYTA 販售之阿西替尼具有化學名稱為 (*N*-甲基-2-[3-((*E*)-2-吡啶-2-基-乙烯基)-1*H*-吡唑-6-基硫基]-苯甲醯胺。其已被批准用於治療在一次先前全身性療法失敗後之晚期腎細胞癌。起始劑量為 5mg，每日口服兩次。可基於個體安全性及耐受性作出劑量調整。在本揭露所提供之該用於癌症之 VBIR 中，經口投予阿西替尼之有效量典型低於 5 mg，每日兩次。在一些其它實施態樣中，經口投予阿西替尼之有效量在 1 至 5 mg 之間，每日兩次。在一些其它實施態樣中，經口投予阿西替尼之有效量在 1、2、3、4 或 5 mg 之間，每日兩次。

可使用在本揭露所提供之該用於癌症之 VBIR 中之 IEC 增進子的實施例，係包括 TNFR 激動劑、CTLA-4 拮抗劑、TLR 促效劑、其他 PD-1 拮抗劑(諸如 BMS-936558 及抗 PD-1 抗體 CT-011)、計畫性細胞死亡蛋白 1 配體 1(PD-L1)拮抗劑(諸如 BMS-936559)、淋巴細胞活化基因 3(LAG3)拮抗劑及含 T 細胞免疫球蛋白及黏蛋白結構域之分子 3(TIM-3)拮抗劑。TNFR 促效劑之實施例包括 OX40、4-1BB(諸如 BMS-663513)、GITR(諸如 TRX518)及 CD40 之促效劑。下文詳細描述特定 CD40 促效劑之實施例。

於某些其他實施態樣中，該額外免疫調節劑係抗 CD40 促效劑抗體。該抗體可以是人類、人源化或部分人

類嵌合抗 CD40 抗體。特定抗 CD40 單克隆抗體的實施例包括 G28-5、mAb89、EA-5 或 S2C6 單克隆抗體及 CP870893。於一種特定實施態樣中，該抗 CD40 促效劑抗體係 CP870893 或達西株單抗(dacetuzumab)(SGN-40)。

CP-870,893 為全人類促效性 CD40 單克隆抗體，其已於臨床上作為抗腫瘤療法探討。CP-870,893 之結構及製備揭示於 WO2003041070 中，其中抗體 CP870,893 經識別為抗體「21.4.1」。CP-870,893 之重鏈及輕鏈之胺基酸序列分別列在 WO2003040170 之 SEQ ID NO：46 及 SEQ ID NO：48，及表 7 中。在臨床試驗中，CP870,893 藉由靜脈內輸注投予，係於劑量一般在每輸注 0.05 至 0.25 mg/kg 範圍。在本揭露所提供之該用於癌症之 VBIR 中，CP-870,893 可皮內、皮下或外用投予。此方案中待投予之 CP870893 之有效量一般低於 0.2 mg/kg，典型在 0.01 mg 至 0.15 mg/kg 或 0.05 至 0.1 mg/kg 範圍。

達西株單抗(也稱為 SGN-40 或 huS2C6；CAS 編號 88-486-59-9)係另一種抗 CD40 促效劑抗體，其已於頑固性淋巴瘤、彌漫性大 B 細胞淋巴瘤及多發性骨髓瘤之臨床試驗中探討。在本揭露所提供之該用於癌症之 VBIR 中，達西株單抗可皮內、皮下或外用投予。待投予之達西株單抗之有效量一般低於 16 mg/kg，典型在 0.2 mg 至 14 mg/kg、或 0.5 至 8 mg/kg 或 1 至 5 mg/kg 範圍。

於又其他實施態樣中，該額外免疫調節劑係抗 CTLA-4 拮抗劑。適合之抗 CTLA-4 拮抗劑的實施例包括抗

CTLA-4 抗體(諸如人類抗 CTLA-4 抗體、小鼠抗 CTLA-4 抗體、哺乳動物抗 CTLA-4 抗體、人源化抗 CTLA-4 抗體、單克隆抗 CTLA-4 抗體、多克隆抗 CTLA-4 抗體、嵌合抗 CTLA-4 抗體、抗 CTLA-4 結構域抗體類)，及促效共刺激路徑之 CTLA-4 之抑制劑。於一些實施態樣中，該 CTLA-4 抑制劑係易普利單抗或曲美目(Tremelimumab)。

易普利單抗(以 YERVOY 販售，也稱為 MEX-010、MDX-101、或以其之 CAS 註冊編號 477202-00-9 稱之)係 PCT 公開號 WO 01/14424 中作為抗體 10DI 揭示，其藉由參考其整體內容及用於所有目的而納入本文中。包含易普利單抗之醫藥組成物的實施例係提供於 PCT 公開號 WO 2007/67959 中。易普利單抗在美國已被批准用於治療不可切除黑色素瘤或轉移黑色素瘤。在本發明所提供之方法中，易普利單抗可皮內或皮下投予。易普利單抗局部投予之有效量典型在每人 5 至 200 mg/劑之範圍。於一些實施態樣中，易普利單抗之有效量係在每人每劑 10 至 150 mg/劑之範圍。於一些具體實施態樣中，易普利單抗之有效量係約每人 10、25、50、75、100、125、150、175 或 200 mg/劑。

曲美目單抗(亦稱為 CP-675,206)為全人類 IgG2 單克隆抗體且 CAS 編號為 745013-59-6。曲美目單抗在美國專利號 6,682,736 中揭示為抗體 11.2.1，其藉由參考其整體內容及用於所有目的而納入本文中。在本發明所提供之該用於癌症之 VBIR 中，曲美目單抗可經靜脈內、皮內或

皮下投予。皮內或皮下投予之曲美目單抗之有效量典型在每人 5 至 200 mg/劑之範圍。於一些實施態樣中，曲美目單抗之有效量係在每人每劑 10 至 150 mg/劑之範圍。於一些具體實施態樣中，曲美目單抗之有效量係約每人 10、25、50、75、100、125、150、175 或 200mg/劑。

於又其他實施態樣中，該額外免疫調節劑係鐸樣受體 (TLR) 促效劑。用語「鐸樣受體促效劑」或「TLR 促效劑」係指稱作為鐸樣受體 (TLR) 之促效劑的化合物。此包括 TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10 及 TLR11 之促效劑或彼之組合。

有用於本發明之方法之 TLR 促效劑包括小有機分子及大生物分子二者。小有機分子 TLR 促效劑之實施例包括 4-胺基- $\alpha,\alpha,2$ -三甲基-1H-咪唑並[4,5-c]喹啉-1-乙醇、N-(2-{2-[4-胺基-2-(2-甲氧基乙基)-1H-咪唑並[4,5-c]喹啉-1-基]乙氧基-}乙基)-N-甲基嗎啉-4-甲醯胺、1~(2~胺基-2-甲基丙基)-2-(乙氧基甲基)-1H-咪唑並[4,5-c]喹啉-4-胺、N-[4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑並[4,5-c]喹啉-1-基)丁基]甲磺醯胺、N-[4-(4-胺基-2-丙基-1H-咪唑並[4,5-c]喹啉-1-基)丁基]甲磺醯胺及咪喹莫特(imiquimod)。一些尤其有用於本揭露所提供之方法或方案中之 TLR 促效劑係討論於回顧文件：Folkert Steinhagen, et al.: TLR-based immune adjuvants. Vaccine 29 (2011): 3341-3355。於一些實施態樣中，該 TLR 促效劑係 TLR9 促效劑，尤其是 CpG 寡核苷酸(或 CpG.ODN)。CpG 寡核苷酸係含有胞嘧啶及接著藉

由磷酸酯鍵鏈結之鳥嘌呤之短核酸分子，其中該胞嘧啶的嘧啶環未經甲基化。有用於本揭露所提供之方法的特定 CpG 寡核苷酸之實施例包括：

5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT3' (CpG 7909; SEQ ID NO:49);
5' TCGTCGTTTTTCGGTGCTTTT3' (CpG 24555; SEQ ID NO:50); 及
5' TCGTCGTTTTTCGGTCGTTTT3' (CpG 10103; SEQ ID NO:51)。

CpG7909，一種合成之單鏈 24 聚體，已作為單一療法及與化學治療劑組合用於治療癌症，及作為針對癌症及傳染病之疫苗的佐劑而廣泛探討。在本揭露所提供之方法中，CpG7909 可藉由注射至肌肉中或任何其它適合方法投予。為了與核酸基底疫苗諸如 DNA 疫苗之一起使用，可將 CpG 與該疫苗於單一調製劑中共同調製並藉由肌肉內注射偶合電穿孔投予。藉由肌肉內、皮內或皮下投予之 CpG7909 之有效量典型係在 10 µg/劑至 10 mg/劑之範圍。於一些實施態樣中，CpG7909 之有效量係在 0.05 mg 至 14 mg/劑之範圍。於一些具體實施態樣中，CpG7909 之有效量係約 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.5、1 mg/劑。其它 CpG 寡核苷酸，包括 CpG 24555 及 CpG10103，可用類似方式及劑量水平投予。

在該用於癌症之 VBIR 中，該抗 PD-1 拮抗劑、該疫苗及該額外免疫調節劑可同時或順序投予。於一些實施態樣中，疫苗係相對於該抗 PD-1 拮抗劑抗體順序投予，但係相對於一或多種該額外免疫調節劑同時(例如，呈混合物)投予。於其中核酸疫苗係與 CpG 組合投予之例子中，

該疫苗與 CpG 可在單一調製劑中含有且藉由任何適合方法一起投予。於一些實施態樣中，該於共調製劑(混合物)中之核酸疫苗與 CpG 係藉由肌肉內注射組合電穿孔投予。

調製劑

根據本發明所使用之抗 PD-1 拮抗劑抗體之治療調製劑係藉由混合具有所欲程度純度之抗體與視需要之醫藥上可接受之載劑、賦形劑或安定劑(Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 2000)製備以供呈冷凍乾燥調製劑或水性溶液之形式儲存。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所施用該劑量及濃度下對接受者不具毒性，且可包括緩衝劑諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；鹽類諸如氯化鈉；抗氧化劑包括抗壞血酸及甲硫胺酸；保存劑(諸如十八基二甲基苄基氯化銨、氯化六甲雙銨；氯化苯甲烴銨、氯化苄乙氧銨；酚、丁基或苄基醇；烷基對羥苯甲酸酯類諸如對羥苯甲酸甲酯或對羥苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇及間甲酚)；低分子量(小於約 10 個殘基)多肽；蛋白諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物諸如聚乙炔基吡咯烷酮；胺基酸諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺酸、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣及其他碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖或葡聚糖；螯合劑諸如 EDTA；糖類諸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；形成鹽相對離子諸如

鈉；金屬複合物(例如鋅蛋白複合物)；及/或非離子性界面活性劑諸如 TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

含有抗 PD-1 拮抗劑抗體之脂質體係藉由該領域已知之方法製備，諸如 Epstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985)；Hwang, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 77:4030 (1980)；及美國專利第 4,485,045 及 4,544,545 號所述。具有增進之循環時間的脂質體係揭露於美國專利第 5,013,556 號。特別有用之脂質體可藉由逆相蒸發方法使用脂質組成物產生，該脂質組成物包含磷脂醯膽鹼、膽固醇及 PEG 衍生之磷脂醯乙醇胺(PEG-PE)。脂質體被擠壓通過具有經定義孔徑大小之過濾器以產生具有所欲直徑之脂質體。

該活性組分亦可被包封於藉由例如凝聚技術或藉由界面聚合所製備之微膠囊中，舉例來說分別於羥甲基纖維素或明膠微膠囊及聚(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊中、於膠體藥物遞送系統中(例如脂質體、白蛋白微球、微乳液、奈米粒子及奈米微膠囊)或於巨乳化液中。此等技術係揭示於 Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000)。

可製備持續釋放製劑。持續釋放製劑之適合實施例包括含有該抗體之固體疏水性聚合物之半透性基體，該基體係呈經塑形物件之形式，例如膜或微膠囊。持續釋放基體之實施例包括聚酯、水凝膠(舉例來說聚(2-羥乙基-甲基丙烯酸酯)或聚乙烯醇))、聚交酯(美國專利第 3,773,919

號)、L-麩胺酸及 7 乙基-L-麩胺酸鹽之共聚物、不可降解之乙烯-乙酸乙烯酯、可降解之乳酸-乙醇酸共聚物諸如 LUPRON DEPOTTM(由乳酸-乙醇酸共聚物及柳菩林(leuprolide acetate)所組成之可注射微球)、蔗糖乙酸酯異丁酸酯及聚-D-(-)-3-羥基丁酸。

待用於活體內投予之調製劑必須為無菌。此可輕易地藉由，舉例來說過濾通過無菌過濾膜完成。治療性抗 PD-1 拮抗劑抗體組成物一般置放於具有無菌接口之容器中，舉例來說具有可被皮下注射針穿刺之塞子的靜脈內溶液袋或小瓶。

根據本發明之組成物可呈單位劑量形式，諸如錠劑、丸劑、膠囊、粉劑、顆粒劑、溶液、懸浮液或栓劑，以供經口、非經腸或經直腸投予，或藉由吸入或噴入投予。

為了製備固體組成物諸如錠劑，主要活性組份係與醫藥載劑，例如習用之製錠組分諸如玉米澱粉、乳糖、蔗糖、山梨醇、滑石、硬脂酸、硬脂酸鎂、磷酸二鈣或膠；及其他醫藥稀釋劑，例如水混合，以形成含有本發明之化合物或彼之非毒性醫藥上可接受之鹽的均質混合物之固體預調製劑組成物。當提及這些預調製劑組成物係均質時，意指該活性組分係遍及整個該組成物均勻分散於內，而使得該組成物可被輕易地次分成同樣有效之單位劑量形式諸如錠劑、丸劑及膠囊。此固體預調製劑組成物接著被次分成上述種類之單位劑量形式，其含有自約 0.1 至約 500 mg 之本發明之活性組份。該新穎組成物之錠劑或丸劑可經塗

覆或以其他方式複合以提供具有長效優點之劑型。舉例來說，該錠劑或丸劑可包含內部劑量及外部劑量成分，後者係呈前者之包封套之形式。該兩種成分可被腸溶層分開，該腸溶層用來抵抗胃中之崩解，及允許該內部成分完整通過到達十二指腸或被延遲釋放。有各式材料可被用於此種腸溶層或塗覆層，此等材料包括大量的聚合酸及聚合酸與諸如蟲膠、鯨臘醇及醋酸纖維素之材料的混合物。

適合之表面活性劑包括尤其是非離子性劑，諸如聚氧乙烯去水山梨醇(例如 Tween™ 20、40、60、80 或 85)及其他去水山梨醇(例如 Span™ 20、40、60、80 或 85)。含有表面活性劑之組成物將方便地包含在 0.05 至 5% 之間之表面活性劑，且可在 0.1 至 2.5% 之間。將了解若需要的話其他組分可被添加，舉例來說甘露醇或其他醫藥上可接受之載具。

適合之乳液可使用市售脂肪乳液製備，諸如 Intralipid™、Liposyn™、Infonutrol™、Lipofundin™ 及 Lipiphysan™。該活性組分可被溶解於預先混合之乳液組成物中，替代地其可被溶解於油中(例如大豆油、紅花籽油、棉花籽油、芝麻油、玉米油或杏仁油)，及一旦與磷脂(例如卵磷脂、大豆磷脂或大豆卵磷脂)及水混合會形成乳液。將了解的是可添加其他組分，舉例來說甘油或葡萄糖，以調整該乳液之張力。適合之乳液典型將含有最高 20%，舉例來說在 5 至 20% 之間的油。該脂肪乳液可包含在 0.1 與 1.0 μm 之間，尤其是 0.1 與 0.5 μm 之間的脂肪

液滴，且具有在 5.5 至 8.0 之間的 pH。

該乳液組成物可為那些藉由混合抗 PD-1 拮抗劑抗體與 Intralipid™ 或彼之成份(大豆油、卵磷脂、甘油及水)所製備者。

用於吸入或噴入之組成物包括在醫藥上可接受之水性或有機溶劑或彼等之混合物中之溶液及懸浮液，和粉末。該液體或固體組成物可能含有如前述之適合之醫藥上可接受之賦形劑。於一些實施態樣中，為了局部或全身性效應，該組成物係藉由經口或經鼻呼吸路徑投予。在較佳醫藥上可接受之無菌溶劑中之組成物可藉由使用氣體加以噴霧化。經噴霧化之溶液可從噴霧裝置直接吸入，或該霧化裝置可附接至面罩、帷幕或間歇性正壓呼吸器。溶液、懸浮液或粉末組成物可自裝置較佳地經口或經鼻投予，該裝置以適當方式遞送調製劑。

套組

本發明亦提供包含任何或所有本文中所述抗體之套組。本發明之套組包括一或多個包含本文中所述之抗 PD-1 拮抗劑抗體之容器，及根據本文中所述之本發明方法中之任一者所使用之說明。一般，這些說明包含投予用於上述治療性治療之抗 PD-1 拮抗劑抗體的說明。於一些實施態樣中，套組係經提供以供產製單一劑量投予單位。於某些實施態樣中，該套組含有具有乾燥蛋白之第一容器及具有水性調製劑之第二容器二者。於一些實施態樣中，係包

括含有單個或多個艙預先填滿之注射器(例如液體注射器及凍乾劑注射器)之套組。

於一些實施態樣中，該抗體係人類抗體。於一些實施態樣中，該抗體係人源化抗體。於一些實施態樣中，該抗體係單克隆抗體。關於使用抗 PD-1 抗體之儀器一般包括用於該意圖治療之劑量、給藥時程及投予路徑之資訊。該等容器可為單位劑量、大量包裝(例如多劑量包裝)或次單位劑量。提供於本發明之套組中之說明典型為在標籤或包裝仿單上之書面說明(例如包括在套組中之紙)，但亦可接受機器可讀取之說明(例如磁性或光學儲存磁碟上攜帶之說明)。

本發明之套組係經適合包裝。適合之包裝包括但不限於小瓶、瓶子、罐、可彎折之包裝(例如密封之美拉(Mylar)或塑膠袋)及該類似物。亦考慮的是與特定裝置組合使用之包裝，諸如吸入器、經鼻投予裝置(例如霧化器)或輸注裝置諸如小型泵。套組可能具有無菌接口(舉例來說該容器可能為具有可被皮下注射針穿刺之塞子的靜脈內溶液袋或小瓶)。該容器也可能具有無菌接口(舉例來說該容器可能為具有可被皮下注射針穿刺之塞子的靜脈內溶液袋或小瓶)。該組成物中之至少一種活性劑係抗 PD-1 抗體。該容器可能進一步包含第二醫藥活性劑。

套組可能可視需要提供額外成份，諸如緩衝劑及解說資訊。通常，該套組包含容器及在該容器上或與該容器結合之標籤或包裝仿單。

生物寄存

本發明之代表性材料係於 2014 年 4 月 29 寄存於美國菌種保存中心(10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, USA)。具有 ATCC 登錄號 PTA-121182 之載體 msb7-LC 係編碼 mAb7 輕鏈可變區之多核苷酸，及具有 ATCC 登錄號 PTA-121183 之載體 mab7-HC 係編碼 mAb7 重鏈可變區之多核苷酸。寄存係根據布達佩斯條約對於國際承認用於專利程序的微生物寄存之規定和其細則(布達佩斯條約)作出。此確保自寄存日開始 30 年內維持該寄存物為活的培養物。該寄存物將依照布達佩斯條約之規定由 ATCC 提供，且將受限於輝瑞(Pfizer, Inc.)與 ATCC 之合約，該合約確保當簽發相關美國專利或公開任何美國或外國專利申請案時(以先到者為主)，該寄存物之培養子代可永久且不受限制地供公眾使用，且確保由美國專利商標局局長依據 35 U.S.C.122 及該局長所依據之法則(包括 37 C.F.R.1.14，特別參照 886 OG 638)判定有權獲得該子代者之可得性。

本申請案之代理人同意，若該寄存中之材料的培養物在適當條件培養下死亡或遺失或毀損，一經通知應立即以另一相同材料取代該材料。不得將該寄存材料之可得性視為可藉以實施本發明而侵犯由任何政府機關依據該國專利法所授予之權利之許可。

下列實施例僅供說明目的，而不意圖以任何方式限制本發明之範疇。事實上，除了在本文中顯示及描述者外，

本發明之各式修飾將為該領域中具有通常知識者自前述說明所顯而易見且屬於隨附之申請專利範圍之範疇內。

實施例

實施例 1：抗 PD-1 抗體對 IFN γ 與 TNF 分泌之效應

此實施例說明，在混合之淋巴球反應(MLR)檢測法中，抗 PD-1 抗體對 IFN γ 與 TNF 分泌之效應。

自全血(史丹福大學血庫)分離之初級人類 T 細胞，係藉由表現高水平 PD-L1 及 PD-L2 之同種異型樹突細胞(DC)活化，該樹突細胞先前係使用 IL-4 及 GM-CSF 自 CD14+骨髓細胞分化而得。於此研究中，使用下述抗體：同型對照(IgG4 κ 經安定絞鏈)、抗 PD-1 拮抗劑抗體 C1、抗 PD-1 拮抗劑抗體 C2、抗 PD-1 拮抗劑抗體 C3、EH12.1(BD Biosciences 小鼠抗人類抗 PD-1 抗體，小鼠同型 IgG1 κ)、mAb7-G4、mAb15-G4、mAb-AAA、mAb15-AAA(G4=IgG4 經安定絞鏈；AAA=突變體 IgG1，其不會結合 Fc γ R)。在下列濃度測試抗體：0、0.1、1 或 10 μ g/ml)。

用於該 MLR 檢測法，培養物係以測試或對照抗體培養於 96 孔盤中，三重複，以 1：10 比之 DC：T 細胞，且係培養於 37°C 具有 5% CO₂ 之潮濕培養器中。在第 5 天收穫上清液，且根據製造商的步驟使用人類可溶性蛋白非力斯組系統套組(Human Soluble Protein Flex Set System kit)(BD Biosciences，目錄號：558265)，以下列人類分析

物使用細胞儀磁珠陣列法(CBA)測量細胞介素：IFN γ (BD Biosciences，目錄號：558269)，TNF (BD Biosciences，目錄號：558273)。簡言之，96 孔過濾器盤(Millipore，目錄號：MSBVN1250)係以清洗緩衝液(BD Biosciences 專有配方)清洗，且藉由真空歧管吸除。該套組所提供之標準品及樣品係稀釋於檢測稀釋劑(BD Biosciences 專有配方)中且添加至具有捕捉珠之該盤中(捕捉珠係塗覆有抗特定可溶蛋白之抗體，該特定可溶蛋白上塗覆有區別螢光劑)。使用盤震盪器以 500rpm 將盤混合 5 分鐘，且在室溫培養 1 小時。將偵測試劑(藻紅素(PE)-共軛之抗體，由 k 所提供)添加至盤中且將盤混合 5 分鐘。在室溫培養盤 2 小時。接著以清洗緩衝液清洗 5 分鐘，且樣品在 BD Fortessa 平台上取得數據。使用 FCAP 陣列第 3 版(BD)分析數據。MLR 檢測法之結果顯示於下表 6A 及 6B 中。表 6A 顯示 IFN γ 水平(單位 pg/ml)，而表 6B 顯示 TNF 水平(單位 pg/ml)。數據以生物三重複之平均 $\pm$ S.E.M 表示。樣品為一個 MLR 實驗的代表。

表6A：IFN γ 分泌

抗體	IFN γ 水平(pg/ml)							
	抗體濃度(μ g/ml)							
	0		0.1		1		10	
	Ave	SE	Ave	SE	Ave	SE	Ave	SE
同型對照	1190.598	173.4735	3760	367.4262	3693.972	1033.879	3525.655	744.676
EH12.1	1190.598	173.4735	3443.495	749.905	6196.637	576.9022	7111.465	2619.065
mAb15-G4	1190.598	173.4735	4728.295	2.035	8893.595	365.125	7790.95	1700.012
mAb7-G4	1190.598	173.4735	8567.203	2085.826	11876.86	1259.788	11794.82	1827.243
mAb7-AAA	1190.598	173.4735	10978.78	1006.925	10177.68	1907.027	9048.097	2022.583
mAb15-AAA	1190.598	173.4735	9068.905	1332.045	7083.987	2109.455	8644.313	1797.077
C1	1190.598	173.4735	5891.74	583.57	6992.53	338.89	7523.7	1907.073
C2	1190.598	173.4735	3433.687	52.36606	8121.305	195.315	4295.95	3124.257
C3	1190.598	173.4735	9698.06	529.47	11650.97	143.025	8282.573	2332.477

表6B：TNF分泌

抗體	TNF 水平(pg/ml)							
	抗體濃度(μ g/ml)							
	0		0.1		1		10	
	Ave	SE	Ave	SE	Ave	SE	Ave	SE
同型對照	371.3233	17.01197	407.4133	49.58195	486.7167	14.42418	501.17	5.033334
EH12.1	371.3233	17.01197	571.1233	60.43963	667.0033	35.72991	799.3033	7.836955
mAb15-G4	371.3233	17.01197	743.1167	56.75547	686.32	45.63348	798.8533	9.143657
mAb7-G4	371.3233	17.01197	730.47	33.35488	793.05	21.19019	930.6233	16.04937
mAb7-AAA	371.3233	17.01197	795.1133	58.01784	773.32	32.32587	798.68	17.37746
mAb15-AAA	371.3233	17.01197	803.87	34.20712	869.4867	43.04225	731.33	37.8211
C1	371.3233	17.01197	641.5533	58.65366	809.1767	55.78437	656.6467	36.03128
C2	371.3233	17.01197	724.9133	35.53936	769.6367	22.06726	772.5367	49.44021
C3	371.3233	17.01197	692.1067	39.12236	642.25	21.44117	744.0067	49.58307

與同型對照相比，以抗 PD-1 拮抗劑抗體處理經活化 T 細胞導致增加之 IFN γ 水平(表 6A)。舉例來說，以 0.1 μ g/ml mAb15-G4 及 mAb7-G4 處理導致 IFN γ 水平分別為 4728.295 ± 2.035 pg/ml 及 8567.203 ± 2085.826 pg/ml。以 1 μ g/ml mAb15-G4 及 mAb7-G4 處理導致 IFN γ 水平分別為 8893.595 ± 365.125 pg/ml 及 11876.86 ± 1259.788 pg/ml。以 10 μ g/ml mAb15-G4 及 mAb7-G4 處理導致 IFN γ 水平分別為 7790.95 ± 1700.012 pg/ml 及 11794.82 ± 1827.243 pg/ml。相反地，以 0.1、1 或 10 μ g/ml 同型對照處理導致 IFN γ 水平分別為 3760 ± 367.4262 pg/ml、 3693.972 ± 1033.879 pg/ml 及 3525.655 ± 744.676 。

與同型對照相比，以抗 PD-1 拮抗劑抗體處理經活化 T 細胞導致增加之 TNF 水平(表 6 B)。舉例來說，以 0.1 μ g/ml mAb15-G4 及 mAb7-G4 處理導致 TNF 水平分別為 743.1167 ± 56.75547 pg/ml 及 730.47 ± 33.35488 pg/ml。以 1 μ g/ml mAb15-G4 及 mAb7-G4 處理導致 TNF 水平分別為 686.32 ± 45.63348 pg/ml 及 793.05 ± 21.19019 pg/ml。以 10 μ g/ml mAb15-G4 及 mAb7-G4 處理導致 TNF 水平分別為 798.853 ± 9.14366 pg/ml 及 930.623 ± 16.0494 pg/ml。相反地，以 0.1、1 或 10 μ g/ml 同型對照處理導致 TNF 水平分別為 407.4133 ± 49.58195 pg/ml、 486.7167 ± 4.4241 pg/ml 及 501.17 ± 5.033334 pg/ml。

這些結果證實，抗 PD-1 抗體類 mAb7 及 mAb15 刺激 T 細胞分泌 IFN γ 與 TNF 係至少如或好於抗 PD-1 抗體類

C1、C2 及 C3。

進行第二 MLR 研究以測試較低抗體濃度對 T 細胞活化之效應。自全血分離之初級人類 T 細胞，係如上所述般活化。於第二 MLR 研究中，測試下述抗體：mAb7(G4)、mAb15(G4)、C1(G4)、EH12.1 及 G4 同型對照。在下列濃度測試抗體：0.0001、0.001、0.01、0.1、1 及 10 $\mu\text{g/ml}$ 。如上所述般進行 MLR 檢測法。結果總結於下表中 7A 及 7B 中。

表7A：IFN γ 分泌

抗體	IFN γ 水平(pg/ml)					
	抗體濃度($\mu\text{g/ml}$)					
	0.0001	0.001	0.01	0.1	1	10
同型對照	558.9629 $\pm$ 489.4828	753.3767 $\pm$ 291.6092	1074.37 $\pm$ 324.2031	1667.96 $\pm$ 144.7286	1867.96 $\pm$ 282.7461	2501.293 $\pm$ 220.1829
EH12.1	1703.907 $\pm$ 417.5669	2284.153 $\pm$ 408.1215	4384.477 $\pm$ 396.1451	4726.87 $\pm$ 1201.688	9914.05 $\pm$ 1188.064	15110.19 $\pm$ 1864.176
C1	1774.38 $\pm$ 290.6059	2804.017 $\pm$ 598.5177	4148.123 $\pm$ 194.2466	6883.113 $\pm$ 1480.168	9598.413 $\pm$ 617.4762	10283.24 $\pm$ 1008.533
mAb7 (G4)	2082.07 $\pm$ 720.9931	3062.09 $\pm$ 370.2791	5067.823 $\pm$ 111.4903	7082.667 $\pm$ 1336.082	11928.81 $\pm$ 1457.723	11862.13 $\pm$ 800.586
mAb15 (G4)	1678.27 $\pm$ 233.82	1410.758 $\pm$ 439.9474	4734.49 $\pm$ 322.2087	5416 $\pm$ 1054.075	9140.337 $\pm$ 1320.499	10992.13 $\pm$ 1008.533

表7B：TNF分泌

抗體	TNF 水平(pg/ml)					
	抗體濃度(μg/ml)					
	0.0001	0.001	0.01	0.1	1	10
同型對照	452.7133 ± 62.85	282.9287 ± 56.77266	310.9144 ± 21.7811	358.948 ± 81.09122	338.1107 ± 46.88385	331.008 ± 31.35559
EH12.1	752.87 ± 32.81303	687.3733 ± 29.09567	859.0367 ± 89.3586	744.98 ± 131.3658	978.7567 ± 227.9979	1950.73 ± 155.2098
C1	446.98 ± 26.89211	444.7867 ± 59.03216	465.0933 ± 65.75044	1045.45 ± 146.9018	997.6067 ± 79.17846	895.7267 ± 60.92022
mAb7 (G4)	227.6 ± 50.63436	394.4233 ± 30.47005	452.65 ± 30.64335	1089.377 ± 174.7824	1583.52 ± 267.2131	1419.88 ± 108.711
mAb15 (G4)	494.7967 ± 48.18105	489.2333 ± 30.63302	593.34 ± 65.87622	811.16 ± 89.50238	1143.54 ± 136.3954	1109.063 ± 57.70232

與同型對照相比，以抗 PD-1 拮抗劑抗體處理經活化 T 細胞導致增加之 IFN γ 水平(表 7A)。於沒有抗體之培養物中，IFN γ 水平為 901.453 ± 216.472 pg/ml。於給予 0.0001、0.001、0.01、0.1、1 或 10 μg/ml 同型對照抗體之培養物中，IFN γ 水平分別為 558.9629 ± 489.4828 pg/ml、753.3767 ± 291.6092 pg/ml、1074.37 ± 324.2031 pg/ml、1667.96 ± 144.7286 pg/ml、1867.96 ± 282.7461 pg/ml、2501.293 ± 220.1829 pg/ml。相反地，於以 0.0001、0.001、0.01、0.1、1 或 10 μg/ml mAb7 (G4)處理之培養物中，IFN γ 水平分別為 2082.07 ± 720.9931 pg/ml、3062.09 ± 370.2791 pg/ml、5067.823 ± 111.4903 pg/ml、7082.667 ± 1336.082 pg/ml、11928.81 ± 1457.723 pg/ml、11862.13 ± 800.586 pg/ml。於以 0.0001、0.001、0.01、0.1、1 或 10 μg/ml mAb15 (G4) 處理之培養物中，IFN γ 水平分別為 1678.27 ± 233.82 pg/ml、1410.758 ± 439.9474 pg/ml、

4734.49 $\pm$ 322.2087 pg/ml、5416 $\pm$ 1054.075 pg/ml、9140.337 $\pm$ 1320.499 pg/ml 及 10992.13 $\pm$ 1008.533 pg/ml。

與同型對照相比，以抗 PD-1 拮抗劑抗體處理經活化 T 細胞導致增加之 TNF 水平(表 7B)。於沒有抗體之培養物中，TNF 水平為 365.523 $\pm$ 84.6607 pg/ml。於以 0.0001、0.001、0.01、0.1、1 或 10 μ g/ml 同型對照抗體處理之培養物中，TNF 水平分別為 452.7133 $\pm$ 62.85 pg/ml、282.9287 $\pm$ 56.77266 pg/ml、310.9144 $\pm$ 21.7811 pg/ml、358.948 $\pm$ 81.09122 pg/ml、338.1107 $\pm$ 46.88385 pg/ml 及 331.008 $\pm$ 31.35559 pg/ml。相反地，於以 0.0001、0.001、0.01、0.1、1 或 10 μ g/ml mAb7 (G4)處理之培養物中，TNF 水平分別為 227.6 $\pm$ 50.63436 pg/ml、394.4233 $\pm$ 30.47005、452.65 $\pm$ 30.64335 pg/ml、1089.377 $\pm$ 174.7824 pg/ml、1583.52 $\pm$ 267.2131 pg/ml 及 1419.88 $\pm$ 108.711 pg/ml。於給予 0.0001、0.001、0.01、0.1、1 或 10 μ g/ml mAb15 (G4)之培養物中，TNF 水平分別為 494.7967 $\pm$ 48.1810 pg/ml、489.2333 $\pm$ 30.63302 pg/ml、593.34 $\pm$ 65.87622 pg/ml、811.16 $\pm$ 89.50238 pg/ml、1143.54 $\pm$ 136.3954 pg/ml 及 1109.063 $\pm$ 57.70232 pg/ml。

這些結果證實抗 PD-1 抗體類 mAb7 及 mAb15 阻斷 PD-1 傳信且促進初級人類 T 細胞分泌 IFN γ 與 TNF。

實施例 2：抗 PD-1 抗體類對 T 細胞增生之效應

此實施例說明抗 PD-1 抗體類對 T 細胞增生之效應。

於此研究中，T 細胞增生係於 MLR 檢測法中測量，其中 T 細胞在抗 PD-1 拮抗劑或同型對照抗體存在下培養。

用於該 MLR，自全血(自史丹福大學血庫獲得)分離之初級人類 T 細胞，係藉由表現高水平 PD-L1 及 PD-L2 之同種異型樹突細胞(DC)活化，該樹突細胞先前係使用 IL-4 及 GM-CSF 自 CD14+骨髓細胞分化而得。進行兩個實驗。

於第一實驗中，比較 mAb7 (IgG4 κ 經安定絞鏈)、mAb15 (IgG4 κ 經安定絞鏈)、C1、EH12.1 及同型對照。於第二實驗中，比較克隆 mAb7、mAb15、C2、EH12.1 及同型對照。於這二個實驗中，抗體都以下列濃度添加：0、0.0001；0.001；0.01；0.1；1 及 10 $\mu\text{g/ml}$ 。

對於這兩個實驗，培養物都以抗體培養於 96 孔盤中，三重複，以 1：10 比之 DC：T 細胞，且係培養於 37°C 具有 5% CO₂ 之潮濕培養器中。在第 5 天，培養物以每孔 1 μCi 之 [³H]-胸苷在收穫前脈衝 18 h。接著盤係使用 Harvester96 (Tomtec Life Sciences)在 DNA 專一性過濾器紙(Perkin Elmer)上收穫。以 β 閃爍液體(Perkin Elmer)覆蓋經放射性標籤之過濾器且於 Microbeta[®]計數器盤(Perkin Elmer)中讀取。將胸苷納入以每秒計數(CPM)分析。結果以三重複之平均 $\pm$ SEM 顯示。

表8A

抗體濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	胸苷納入(CPM)				
	同型對照	EH12.1	mAb7	mAb15	C1
0	183419.3 $\pm$ 4049.932	183419.3 $\pm$ 4049.932	183419.3 $\pm$ 4049.932	183419.3 $\pm$ 4049.932	183419.3 $\pm$ 4049.932
0.0001	205190 $\pm$ 7769.199	227412.3 $\pm$ 7769.199	226145 $\pm$ 9610.045	217278.7 $\pm$ 24472.76	211881.3 $\pm$ 10119.4
0.001	197943 $\pm$ 13904.69	218722 $\pm$ 13904.69	235367.3 $\pm$ 15199.75	193192 $\pm$ 11885.7	212198.3 $\pm$ 36451.79
0.01	175973.3 $\pm$ 10177.52	253913.3 $\pm$ 10177.52	265654.3 $\pm$ 12087.89	219167.3 $\pm$ 8928.691	232600 $\pm$ 26403.78
0.1	192495.3 $\pm$ 16825.35	248270.7 $\pm$ 16825.35	264057.7 $\pm$ 10339.94	257924 $\pm$ 3376.669	278997.3 $\pm$ 18441.4
1	210104.7 $\pm$ 11484.23	210104.7 $\pm$ 11484.23	298696.7 $\pm$ 6164.177	276531 $\pm$ 3855.779	276141.3 $\pm$ 18516.97
10	206281.7 $\pm$ 16001.33	294602.7 $\pm$ 16001.33	301293 $\pm$ 6313.417	286260.7 $\pm$ 11483.22	264223.7 $\pm$ 9809.792

表8B

抗體濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	胸苷納入(CPM)				
	同型對照	EH12.1	mAb7	mAb15	C2
0	229959 $\pm$ 5794.112	229959 $\pm$ 27771.7	229959 $\pm$ 27771.7	229959 $\pm$ 5794.112	229959 $\pm$ 27771.7
0.0001	299107 $\pm$ 3193	258428.3 $\pm$ 36794.25	280415.3 $\pm$ 14101.94	241112.7 $\pm$ 40486.56	258069.7 $\pm$ 23962.19
0.001	277197 $\pm$ 17518	272289 $\pm$ 29320.04	260183 $\pm$ 24634.25	233184 $\pm$ 28899.06	267117.7 $\pm$ 16388.83
0.01	278072.3 $\pm$ 32671.62	324891.3 $\pm$ 3396.229	365625.3 $\pm$ 30171.07	317377 $\pm$ 31915.29	381936.3 $\pm$ 31901.57
0.1	268939.7 $\pm$ 12332.06	342131.3 $\pm$ 19839.88	380054.3 $\pm$ 9774.328	360226.3 $\pm$ 1802.69	381110.7 $\pm$ 16996.97
1	241164 $\pm$ 13776.81	388757.7 $\pm$ 15684.37	392256.7 $\pm$ 15341.19	421229 $\pm$ 27865.13	401219 $\pm$ 1816.754
10	231897.7 $\pm$ 25865.95	408098 $\pm$ 20237.34	372889.7 $\pm$ 14826.49	323441.3 $\pm$ 64476.55	391925.3 $\pm$ 46054.82

與同型對照相比，以濃度 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 或更高之抗 PD-1 拮抗劑抗體處理經活化 T 細胞，導致顯著增加之 T 細胞增生(表 8A 及 8B)。

舉例來說，以 0.01、0.1、1 或 10 $\mu\text{g/ml}$ mAb7 處理，導致胸苷納入率分別為 365625.3 ± 30171.07 CPM、 380054.3 ± 9774.328 CPM、 392256.7 ± 15341.19 CPM 及 372889.7 ± 14826.49 CPM(表 8B)。以 0.01、0.1、1 或 10 $\mu\text{g/ml}$ 之 mAb15-G4 及 mAb7，導致胸苷納入率分別為 317377 ± 31915.29 CPM、 360226.3 ± 1802.69 CPM、 421229 ± 27865.13 CPM 及 323441.3 ± 64476.55 CPM(表 8B)。相反地，以 0.01、0.1、1、or 10 $\mu\text{g/ml}$ 同型對照處理，導致胸苷納入率分別為 278072.3 ± 32671.62 CPM、 268939.7 ± 12332.06 CPM、 241164 ± 13776.81 CPM 及 231897.7 ± 25865.95 CPM(表 8B)。

這些結果證實抗 PD-1 抗體類 mAb7 及 mAb15 阻斷 PD-1 傳信且促進自初級人類 T 細胞增生。

實施例 3：於 GvHD 小鼠模型中抗 PD-1 抗體類之效應

此實施例說明，於移植物抗宿主疾病(GvHD)小鼠模型中，抗 PD-1 抗體類對 T 細胞增生及體重減輕之效應。

於此研究中，使用 NOD-scid-IL-2 受體 γ 鏈裸(NSG)小鼠，以測試抗 PD-1 拮抗劑抗體於活體內對 T 細胞增生之效應。因為 NSG 小鼠缺乏 T 細胞及 B 細胞，且具有不健全之細胞 NK 細胞，可輕易達成移植人類細胞。當人類 PBMC 移植入這些小鼠中，發生人類 T 細胞增生且誘導 GvHD。該 GvHD 涉及宿主之骨髓部件及人類細胞。於早期階段人類淋巴細胞的大量增生可見於血液中，隨後這些

細胞高浸潤至小鼠器官中，諸如肝、脾、腎、膽等，導致小鼠之體重減輕及皮膚病變、駝背及死亡。該模型的嚴重度取決於捐贈者 PBMC，且可於捐贈者間有不同。

於此研究中，使用下列抗 PD-1 拮抗劑抗體：mAb7(人類 IgG4 經安定絞鏈或 AAA)、mAb15(人類 IgG4 經安定絞鏈)、C1、C2 及 C3。對於負對照，使用同型對照人類 IgG4 經安定絞鏈抗體。使用 Ficoll 梯度，自全血(史丹福大學血庫)分離之初級人類 PBMC。將 10^7 個人類 PBMC 注射入 NSG 小鼠中(母，8 週齡，賈克森實驗室(Jackson Laboratories))。在第 0 天，基於體重將小鼠隨機化，及靜脈內注射 PBMC。對於實驗 1 至 4，在第 2 與第 8 天，以 10 mg/kg 腹膜內投予抗體。對於實驗 5，在第 2 與第 8 天，以 1 mg/kg 或 10 mg/kg 腹膜內投予抗體。表 9 總結各實驗所用抗體。

表9：實驗1至5所用抗體

實驗1	實驗2	實驗3	實驗4	實驗5
同型對照 mAb7 mAb15 mAb7-AAA C1	同型對照 mAb15 mAb7 C1	同型對照 mAb15 mAb7 C3	同型對照 mAb15 mAb7 C2	同型對照 mAb7

週期地測量體重。結果總結於第 1A 至 1E 圖中。對小鼠週期地抽血以評估 T 細胞增生。以抗 PD-1 抗體處理加劇疾病過程，如藉由體重減輕速率所測量者。與對照小鼠相比，以抗 PD-1 拮抗劑抗體處理之小鼠具有更快速體重減輕(第 1A 至 1E 圖)。

人類 T 細胞增生係藉由流式細胞儀測量，該流式細胞

儀係使用 CD45 作為標記(克隆 HI30 ; BD Biosciences) 。
流式細胞儀之結果總結於下表 10 中。於以抗 PD-1 拮抗劑
抗體處理之小鼠中的 T 細胞增生係較高於以同型對照處理
之小鼠中者。較高百分比的 CD45 表明較高水平之 CD45
細胞增生且因此更嚴重的 GvHD 。

於實驗 1 中，於對照小鼠中的 CD45 陽性血液細胞的
百分比為 63.86%(表 10)。相反地，於以抗 PD-1 抗體
mAb7、mAb15、C1、或 mAb7-AA 處理之小鼠中的 CD45
陽性血液細胞的百分比分別為 80.34%、77.62%、77.26%
及 76.9%(表 10)。

表10：藉由以CD45百分比測量之T細胞增生，動物經處理

實驗1：%CD45陽性細胞於血液中，在第17天					
	抗體(10 mg/ml)				
	對照	mAb7	mAb15	C1	mAb7-AAA
	51.5	72.4	70	87.6	66.6
	52	76.8	69	82	81
	74.7	82.5	85.8	64.7	71
	65.3	84	93.3	80	85.883
	75.8	86	70	72	80
平均	63.86	80.34	77.62	77.26	76.8966
SEM	5.892643719	2.80258809	5.608074536	4.48826247	3.937116896

實驗2：%CD45陽性細胞於血液中，在第12天				
	抗體			
	對照	mAb7	C1	mAb15
	59	81	80	78.1
	51	80.078	75	79.3
	66	82.5	78	69.9
	75	84	80	81.8
	66	86	86	83.9
平均	63.4	82.7156	79.8	78.6
SEM	4.480513	1.182785	2.012461	2.678152
實驗3：%CD45陽性細胞於血液中，在第12天				
	抗體(10 mg/ml)			
	對照	mAb7	C3	mAb15
	51.5	72.4	70	72
	66	80	69	74.8
	74.7	82.5	85.8	86.9
	65.3	84	93.3	90.2
	75.8	86	70	79.4
平均	66.66	80.98	77.62	80.66
SEM	4.875269	2.63638	5.608075	3.880013
實驗4：%CD45陽性細胞於血液中，在第12天				
	抗體(10 mg/ml)			
	對照	mAb7	C2	mAb15
	67	92.23	83.1	88.1
	77.98	88.71	82.3	74.8
	78	82.5	85.8	86.9
	90	93	93.3	90.2
	86.8	80.1	90	79.4
平均	79.956	87.308	86.9	83.88
SEM	4.495211	2.890314	2.336932	3.253729

實驗5：%CD45陽性細胞於血液中，在第10天			
	抗體		
	對照	mAb7 (1 mg/kg)	mAb7 (10 mg/kg)
	70	72.4	77
	66	79	77
	74.7	82.5	85.8
	65.3	84	93.3
	70	86	90
平均	69.2	80.78	84.62
SEM	1.887127	2.668895	3.723305

總之，與以同型對照處理之小鼠相比，以抗 PD-1 抗體處理之小鼠具有較快速之體重減輕及增加之 T 細胞增生。這些結果證實以抗 PD-1 抗體處理刺激活體內人類 T 細胞增生。

實施例 4：抗 PD-1 抗體類之結合

此實施例說明在經活化人類 T 細胞及馬來猴(cyno)T 細胞上之抗 PD-1 抗體結合。

根據製造商的步驟(Miltenyi Biotec；130-096-353)，使用人類 PAN T 細胞分離套組自 PBMC(史丹福大學血庫)分離初級人類 T 細胞。Cyno PBMC 係購自(BioreclamationIVT)，而 PAN T 細胞係使用非人類靈長動物 PAN T 細胞分離套組，根據製造商的步驟(Miltenyi Biotec; 130-091-993)分離。人類 T 細胞以用於細胞擴增及活化之 DYNABEADS™ 人類 T-活化劑 CD3/CD28(Life Technologies；11131D)活化 3 天。所用之珠對細胞比分別係 1：1 的珠：T 細胞。Cyno T 細胞係使用 T 細胞活化/擴

增套組，非人類靈長動物，根據製造商的步驟(Miltenyi Biotec; 130-092-919)活化 3 天。所用之珠對細胞比分別係 1 : 1 的珠 : T 細胞。3 天後收穫培養物，且使用磁力將珠與經活化 T 細胞分離。細胞經清洗及以 FACS 緩衝液(包括 2%FBS)及人類 Fc 受體結合抑制劑(Affymetrix eBioscience 目錄號 16-9161-73)培養。對於 cyno 細胞係使用 Fc 阻斷試劑(BD Biosciences 目錄號 564765)。細胞於室溫培養 10 分鐘，且接著以活死色料(LIVE/DEAD®可固定藍色死細胞染色套組(Fixable Blue Dead Cell Stain Kit)，用於 UV 激發；目錄號：A10346))染色再 5 分鐘以排除死細胞。添加抗 PD-1 抗體(在細胞上培養之抗 PD-1 克隆濃度係，以 1:3 序列稀釋比，開始於 10 µg/ml 至 0 µg/ml)，各反應使用 1×10^6 個細胞，總共 100 µl，且細胞在冰上培養 30 分鐘。接著細胞以 FACS 緩衝液清洗，以移除接口一次抗體及以共軛有異藻藍素(APC)之抗人類(AffiniPure F(ab')₂ 片段驢抗人類 IgG (H+L)二次抗體；目錄號 709-136-149)培養。於冰上，將細胞染色 30 分鐘。在冰上清洗及保持細胞直到使用 BD LSRFortessa 細胞分析儀(BD Biosciences，目錄號 647465)讀取。使用 FlowJo™軟體分析數據。結果總結於第 2A 及 2B 圖中。

第 2A 圖顯示抗 PD-1 抗體結合經活化人類細胞所測到之 EC50，而第 2B 圖顯示抗 PD-1 抗體結合經活化 cyno 細胞所測到之 EC50。抗 PD-1 抗體類 mAb7 及 C1 係以相似 EC50 結合經活化 T 細胞(第 2A 及 2C 圖)。

實施例 5：以抗 PD-1 抗體抑制 PD-L1 結合

此實施例說明以抗 PD-1 抗體抑制 PD-1 配體(PD-L1)結合。

使用人類 PAN T 細胞分離套組，根據製造商的步驟(Miltenyi Biotec; 130-096-353)，自 PBMC(史丹福大學血庫)分離初級人類 T 細胞。Cyno PBMC 係購自(BioreclamationIVT)，而 PAN T 細胞係使用非人類靈長動物 PAN T 細胞分離套組，根據製造商的步驟(Miltenyi Biotec; 130-091-993)分離。人類 T 細胞以 DYNABEADS™ 人類 T-活化劑 CD3/CD28(用於細胞擴增及活化，Life Technologies; 11131D)活化 3 天。所用之珠對細胞比分別係 1：1。Cyno T 細胞係使用 T 細胞活化/擴增套組，非人類靈長動物，根據製造商的步驟(Miltenyi Biotec; 130-092-919)活化 3 天。所用之珠對細胞比分別係 1：1。3 天後收穫培養物，且使用磁力將珠與經活化 T 細胞分離。細胞經清洗及以 FACS 緩衝液(包括 2%FBS)及人類 Fc 受體結合抑制劑(Affymetrix eBioscience 目錄號 16-9161-73)培養。對於 cyno 細胞係使用 Fc 阻斷試劑(BD Biosciences 目錄號 564765)。細胞於室溫培養 10 分鐘，且接著以活死色料(LIVE/DEAD® Fixable Blue Dead Cell Stain Kit，用於 UV 激發；目錄號：A10346))染色再 5 分鐘以排除死細胞。以 10 ng/ml 之人類重組 PD-L1 Fc (R&D Systems，目錄號 156-B7)或單獨緩衝劑培養細胞。各配體個別培養且係在冰上培養 30 分鐘。接著細胞經清洗並以抗 PD-1 抗體

(在細胞上培養之抗 PD-1 克隆濃度係，以 1：3 序列稀釋比，開始於 10 $\mu\text{g/ml}$ 至 0 $\mu\text{g/ml}$)培養，各反應使用 1×10^6 個細胞，總共 100 μl ，且細胞在冰上培養 30 分鐘。接著細胞以 FACS 緩衝液清洗，以移除接口一次抗體及以共軛有異藻藍素(APC)之抗人類 κ (Life Technologies；目錄號 MH10515)培養。於冰上，將細胞染色 30 分鐘，接著在冰上清洗及保持細胞直到使用 BD LSRFortessa 細胞分析儀 (BD Biosciences，目錄號 647465)讀取。使用 FlowJo™軟體分析數據，及於 FlowJo™軟體中計算在活的細胞上 APC 染色的平均螢光強度(MFI)及幾何平均數(Geo.M)。在計算 Geo 平均數後，使用 GraphPD Prism 軟體計算 IC50。結果總結於表 11 及 12 中。

表11：抗PD-1阻斷PD-L1結合人類T細胞上PD-1

抗體濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	Geo平均數	
	mAb7	C1
0.0083375	107	143
0.00416875	129	190
0.002084375	162	245
0.001042188	205	327
0.000521094	482	415
0.000260547	358	469
0.000130273	445	484
0.000065137	503	458
0.000032568	450	420
IC50 (μM)	0.001117	0.00224

表12：抗PD-1阻斷PD-L1結合cyno T細胞上PD-1

抗體濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	Geo平均數	
	mAb7	C1
0.0083375	114	108
0.00416875	135	144
0.002084375	174	183
0.001042188	240	264
0.000521094	322	325
0.000260547	440	404
0.000130273	494	469
0.000065137	491	472
0.000032568	410	406
IC50 (μM)	0.00092	0.00108

這些結果證明抗 PD-1 抗體類 mAb7 及 C1 係以相似 IC50 抑制 PD-L1 結合人類及 cyno T 細胞。

實施例 6：抗 PD-1 抗體對 T 細胞增生之效應

此實施例說明抗 PD-1 抗體對 T 細胞增生之效應。

CD4 及 CD8(AllCells, LLC)以 DYNABEADS™人類 T-活化劑 CD3/CD28(或細胞擴增及活化(Life Technologies ; 11131D)活化 2 天。所用之珠對細胞比分別係 1 : 1 以誘導 PD-1。在第 2 天收穫培養物，且使用磁力將珠與經活化 T 細胞分離。接著細胞在表現 PD-L1 樹突細胞上活化且細胞以 1 $\mu\text{g/ml}$ 的不同抗 PD-1 克隆培養於 96 孔盤中，三重複，以 1 : 10 比之 DC : T 細胞，且係培養於 37°C 具有 5% CO₂ 之潮濕培養器中。在第 3 天，培養物以每孔 1 μCi 之 [³H]- 胸苷在收穫前脈衝 18 h。接著盤係使用 Harvester96 (Tomtec Life Sciences)在 DNA 專一性過濾器紙(Perkin Elmer)上收穫。以 β 閃爍液體(Perkin Elmer)覆

蓋經放射性標籤之過濾器且於 Microbeta[®]計數器盤(Perkin Elmer)中讀取。將胸苷納入以每秒計數(CPM)分析。於第 3 及 4 圖中，結果以三重複之平均 $\pm$ SEM 顯示。

實施例 7：決定人類、馬來猴及小鼠 PD-1 與人源化抗 PD-1 抗體類交互作用之動力學及親和性

此實施例說明抗 PD-1 抗體類與人類、馬來猴及小鼠 PD-1 之結合。

除非另行表明，所有交互作用分析係於 25°C 在無標籤生物感測器施行。使用表面電漿共振生物感測器 (ProteOn-XPR[™] 來自 BioRad[™]，及 Biacore 2000[™] 與 Biacore T200[™] 來自 GE Life Sciences) 來研究人類及馬來猴 PD-1，及使用生物層干涉生物感測器 (Octet-Red384, Fortebio/Pall Life Sciences) 來研究小鼠 PD-1。ProteOn 實驗在 PBS，pH 7.4 + 0.01% Tween-20 (PBST) 運行緩衝液中施行。Biacore 實驗在 10 mM Hepes，pH 7.4，150 mM NaCl，0.05% Tween-20 (HBST+) 中施行，及 Octet 實驗在 HBST+ 及 1 g/l BSA 中施行。ProteOn 數據在 ProteOn 經理軟體中處理，Biacore 數據在 Biaevaluation 中處理，及 Octet 數據簡單地對準到對照軟體的零。SPR 數據經雙重參照 (Myszka, 1999, *J Mol Recognit* 12(5):279-284) 且全局擬合至簡單朗繆爾 (Langmuir) 模式，以從動力學速率常數之比決定平衡解離常數 K_D ($K_D = k_d/k_a$)。

免校正濃度分析(CFCA)

在具有不動 IgG 之動力學實驗中用來作為分析物之人類 PD-1(hPD-1)單體 (Sino Biologicals, 目錄號 10377-H08H)的活性濃度係使用 CFCA 檢測法在配備有 CM5 感測晶片之 Biacore T200™上經驗地決定。為了製備這些實驗的表面，高能力(約 12,000 RU)之 mAb15 hIgG4(或於一些實驗中，競爭者抗體 C2-hIgG1)係胺偶合至流動細胞 2 上，讓流動細胞 1 空白(只「經活化且阻斷」，沒有任何 IgG)以提供參考表面。hPD-1 樣品在標稱濃度 0.1、1 及 10 µg/ml 以低(5 µl/分鐘)及高(100 µl/分鐘)流動速率注射 36 秒。以 2:1 v/v 的皮爾斯(Pierce)IgG 洗脫緩衝液(pH 2.8): 4 M NaCl 雞尾酒再生表面。於 T200 軟體中在 CFCA 工具分析數據，以衍生出 hPD-1 分析物之表觀活性值，其係用以修正其之「標稱」蛋白濃度(如藉由以適當消光係數在 280 nm 吸光度所決定者)成「活性」蛋白濃度。一些批次實測為 32%活性，而其他批次為 100%活性。

人類 PD-1(hPD-1)結合經胺偶合 mAb7、mAb15、C1、C2、C3 及 C4 mAb 的動力學分析

使用配備有 GLC 感測晶片(BioRad™, Hercules, CA)之 ProteOn-XPR36 來決定在 PBST 運行緩衝液中，hPD-1 單體結合一組經胺偶合抗 hPD-1 mAb(mAb7、mAb15、C1、C2、C3 及 C4)的動力學及親和性。於三個步驟中製

備用於這些實驗的表面：(1)使用於水中最終 0.8 mM EDC 及 0.2 mM N-羥基硫代琥珀醯亞胺(sulfo-NHS)之新鮮製備活化試劑混合物最低限度地活化配體通道 2 分鐘，(2)於 pH 4.5 之 10 mM 乙酸鈉中，IgG 以 15 µg/ml 偶合 3 分鐘，及(3)以 1 M 乙醇胺 HCl，pH 8.5 阻斷過量反應性酯 3 分鐘。經偶合 IgG 的最終水平在從 400 RU 至 1157 RU 之範圍。沿著「分析物」通道以三倍序列稀釋及頂部「活性」濃度為 30、44 或 36 nM(取決於實驗)，以一步法動力學 (one-shot kinetic) 模式 (Bravman et al., 2006, *Anal Biochem* 358(2):281-288)注射 hPD-1 單體。結合與解離時間分別為 3 分鐘與 20 分鐘，且所有分析物以二重複結合循環注射。以 2 : 1 v/v 的 Pierce IgG 洗脫緩衝液(pH 2.8)：4 M NaCl 雞尾酒再生表面。

表13：hPD-1單體結合經胺偶合IgG的動力學分析

IgG	k_a (1/Ms) $\times 10^5$	k_d (1/s) $\times 10^{-4}$	K_D (pM) 在25°C
mAb7 IgG1 AAA	4.97	<0.43*	<86
mAb7 IgG4	4.53, 4.45	<0.43*	<94, <96 (N=2)
mAb15 IgG1 AAA	8.13	<0.43*	<53
mAb15 IgG4	7.32	<0.43*	<58
C4 hIgG1	5.57, 4.84	5.25, 5.89	943, 1217 (N=2)
C3 hIgG2	4.56	5.21	1143
C3 hIgG4	5.59	4.03	721
C2 hIgG2	4.88	6.07	1244
C2 hIgG4	5.84	4.33	741
C1 hIgG2	14.8	7.55	510
C1	11.1, 8.34	5.57, 5.73	502, 687 (N=2)

hPD-1 單體與 mAb7 及 mAb15 之交互作用顯示，在允許解離相內之結合反應沒有可見衰退，所以在它們 k_d 及 K_D 值上放置上限值，係根據「5%規則」(Katsamba et al,

2008, *Anal Biochem* 352(2):208-221)在它們 k_d 及 K_D 值上施加放置上限值。N=2 係指在兩個不同經片上的兩個獨立實驗。

mAb7 與 mAb15 對馬來猴 PD-1 的交叉反應

使用配備有 CM4 感測晶片之 Biacore 2000™ 及 HBST+運行緩衝液，決定經純化重組 Fab 片段(mAb7 與 mAb15)對 hPD-1-hFc1(R&D systems 目錄號 1086PD)及 cynoPD-1-hFc1(在公司內製備)的結合動力學。抗 hFc 多克隆抗體係胺偶合至該晶片且係用於在流動細胞 2 與 3 上捕捉約 90 RU 之 hPD-1-hFc1 及 125 RU 之 cynoPD-1-hFc1，讓流動細胞 1 空白(裸抗 hFc 捕捉表面)而提供參考通道。經純化重組 Fab 片段作為分析物，以 0、10 及 100 nM 注射 2 分鐘，其流過新鮮捕捉之 PD-1-hFc1 融合蛋白，允許 15 分鐘解離時間。使用 75 mM 磷酸再生捕捉表面及以二重複結合循環注射 mAb7 Fab 樣品。所有 Fab/PD-1 複合物都非常安定，以致沒有一個交互作用顯示在允許解離時間內它們的結合反應有任何可見衰退，所以施加「5%規則」(Katsamba et al, 2008)以在它們 k_d 及 K_D 值上放置上限值。

表14：決定mAb7及mAb15 Fab對hPD-1-hFc1及cynoPD-1-hFc1融合蛋白之親和性

分析物	在晶片上	k_a (1/Ms) $\times 10^5$	$*k_d$ (1/s) $\times 10^{-5}$	K_D (pM)在25°C
mAb7 Fab	hPD-1-hFc1	5.67	<5.7	<101
mAb7 Fab	cynoPD-1-hFc1	5.26	<5.7	<108
mAb15 Fab	hPD-1-hFc1	9.16	<5.7	<62
mAb15 Fab	cynoPD-1-hFc1	8.24	<5.7	<69

hPD-1 對 mAb15、mAb7 及 C3 之結合親和性的溫度依賴性

使用配備有 CM4 感測晶片之 Biacore 2000™來決定 hPD-1 單體結合一組 hIgG4 分子(mAb15、mAb7 及 C3)的動力學及親和性，該等 hIgG4 分子係經由經胺偶合抗 hFc 多克隆抗體以低水平被捕捉。hIgG4 mAb 係以 10 μ g/ml 捕捉在個別流動細胞上，讓流動細胞 1 空白以作為參考表面(裸捕捉表面)。以活性濃度 0、10 及 100 nM 注射 hPD-1，3 分鐘，允許 18 分鐘解離相。在各結合循環後，以 75 mM 磷酸再生捕捉表面。

表15：hPD-1單體作為分析物結合經抗hFc捕捉之hIgG4分子的動力學分析

在晶片上之hIgG4	溫度(25°C)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)
mAb15	25	3.49×10^5	1.71×10^{-4}	0.49
mAb15	37	6.94×10^5	3.73×10^{-4}	0.54
mAb7	25	2.37×10^5	1.73×10^{-4}	0.73
mAb7	37	4.28×10^5	3.63×10^{-4}	0.85
C3	25	2.14×10^5	2.25×10^{-3}	10.5
C3	37	9.70×10^5	1.56×10^{-2}	16.1

mAb7 對小鼠-PD-1 的交叉反應

使用配備有鏈霉抗生物素蛋白感測尖端之 Octet-

Red384 來決定是否小鼠 PD-1 結合 mAb7。選擇親和性-傾向 (avidity-prone) 檢測格式以增加該檢測法之偵測敏感度。感測器以生物素化抗人類 κ 多克隆塗覆且用於以 10 $\mu\text{g/ml}$ 捕捉一組 hIgG4 抗 hPD-1 mAb (mAb7、C1、C2 及 C3)，各 mAb 經捕捉在八個感測器上。作為正對照，八個鏈霉抗生物素蛋白感測器以生物素化 J43(eBioSciences)(一種抗小鼠 PD-1 抗體)塗覆。將各經 mAb 塗覆感測器暴露在下列分析物中：緩衝劑、1 μM 小鼠 PD-1-hFc 結合位點、1 μM hPD-1-hFc 結合位點(正對照)、或 1 μM hGHR-hFc 結合位點(負對照)。所有重組 Fc-融合蛋白係來自 R&D systems。因此在二重複感測器上測試各分析物/mAb 之交互作用。

抗 PD-1 抗體類 C1、C2 及 C3 不會結合小鼠 -PD-1-hFc1(數據未顯示)。抗 PD-1 抗體 mAb7 會弱結合小鼠 -PD-1-hFc1(數據未顯示)。所有經測試抗 PD-1 抗體類會結合 hPD-1-hFc。這些結果證實，mAb7 對小鼠 PD-1 具弱交叉反應性而 C1、C2 及 C3 對小鼠 PD-1 不具交叉反應性。

實施例 8：以抗 PD-1 抗體類治療癌症

這是一個預言實施例，其說明本發明之抗 PD-1 抗體類用於治療癌症之用途。

選擇具有經組織學上確認且先前未經治療之可測量轉移結腸直腸癌的病患，以用於以抗 PD-1 抗體治療。將病患分組到兩個治療群組中的一者中：化學療法加上安慰劑

或化學療法加上 mAb7。利用動態隨機化演算法來達成整體平衡且在下列類別之各者內：研究中心、基線 ECOG 表現狀態 (0 vs. ≥ 1)、原發疾病位點 (結腸 vs. 直腸) 及轉移位點數目 (1 vs. >1)。於各 8 週循環的首 6 週，每週投予化學療法治療。持續化學療法直到研究完成 (96 週) 或疾病惡化。每 2 週投予 5 mg/kg 之 mAb7 或安慰劑。在 mAb7 臂中具有經確認完全反應或體驗到為化學療法治療結果的不可接受毒性之病患，允許其不繼續化學療法且繼續接受單獨 mAb7 作為第一線治療。僅隨機化到 mAb7 群組中之病患可接受 mAb7 作為第二線治療之成分。在完成研究後，每 4 個月追蹤病患的任何後續治療及存活直到死亡、失去追蹤、或研究中止。

病患將在基線及在完成每 8 週循環經歷腫瘤狀態評估，此係使用適當放射圖像技術，典型為螺旋 CT 掃描。利用實體腫瘤之回應評價標準 (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) (Therasse et al. (2000)，藉由研究員及獨立放射機構 (IRF) 決定腫瘤回應、或惡化。IRF 評估的施行將不需要知道治療分組或研究員的評估。此外，在基線及在各治療循環之前，病患將完成第 4 版癌症療法功能性評估—大腸 (Functional Assessment of Cancer Therapy—Colorectal (FACT-C), Version 4)，一種經過驗證用於評估結腸直腸癌病患之生活品質 (QOL) 的工具，直到疾病惡化。Ward et al. (1999) *Qual. Life Res.* 8: 181-195。

從不良事件、實驗室測試結果及生命跡象測量之報告

評估安全性。使用第二版國家癌症機構一般毒標準 (National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (NCI-CTC), Version 2) 分類不良事件及不正上實施驗結果。預先指定之安全性測量包括四個特別感興趣之不良事件(高血壓、蛋白尿、血栓形成、出血)。

主要結果測量係在整個存活期間。次要結果測量包括：無惡化存活、客觀回應率(完全或部分)、回應持續期及在 FACT-C QOL 得分之改變。存活持續期經定義為從隨機化到死亡的時間。對於在分析時點活著的病患，存活持續期將以最後一次接觸日刪減。無惡化存活經定義為從隨機化到疾病惡化早期或於研究時死亡的時間，該於研究時死亡經定義為在最後一劑研究藥物或化學療法的 30 天內因任何原因所致死亡。對於在分析時點活著且沒有疾病惡化的病患，無惡化存活將以它們最後一次腫瘤評估、或當沒有施行基線後評估時以第 1 天(研究治療的第 1 天)刪減。於客觀回應之分析中，沒有腫瘤評估之病患被分類成不回應者。疾病惡化及回應分析係基於 IRF 評估。在生活品質的改變經分析為在 QOL 之惡化(TDQ)時間，其係經定義為從隨機化到最早有從大腸癌專用 FACT-C 次規格得分(CCS)基線降低 ≥ 3 分、疾病惡化、或於研究時死亡的時間長度。也將決定 TOI-C(CCS 之和，物理上與功能上良好)及從基線改變之總 FACT-C 之 TDQ。

實施例 9：以抗 PD-1 抗體類治療癌症

此實施例說明本發明之抗 PD-1 抗體類用於治療癌症之用途。

此實施例中的研究係在具有局部晚期或轉移黑色素瘤、鱗狀細胞頭的頸癌(SCHNC)、卵巢惡性腫瘤、肉瘤、或復發或難治的經典霍奇金氏淋巴瘤(cHL)之先前經治療的成人病患中，靜脈內投予抗 PD-1 單克隆抗體 mAb7 的第 1 期、非盲標籤、多個中心、多個劑量、劑量遞增、安全、PK 且 PD 研究。

表 16

臂	所指派之干預
臂 1：mAb7 0.5 mg/kg，每 21 天	藥物 mAb7 IV，每 21 天
臂 1：mAb7 1.0 mg/kg，每 21 天	藥物 mAb7 IV，每 21 天
臂 1：mAb7 3.0 mg/kg，每 21 天	藥物 mAb7 IV，每 21 天
臂 1：mAb7 10 mg/kg，每 21 天	藥物 mAb7 IV，每 21 天

納入標準：-組織學上和細胞學上診斷有局部晚期或轉移黑色素瘤、SCCHN、卵巢癌、肉瘤、或復發或難治 cHL：-病患應已接受至少 1 次且不超過 5 次用於反覆發生或轉移疾病之先前療法線，包括標準照護及研究性療法。-至少一個第 1.1 版 RECIST(RECIST version 1.1)所定義之可測量病變或(用於 cHL)至少 1 個先前未被照射惡性淋巴瘤之回應標準所定義之氟去氧葡萄糖正子攝影(FDG PET)親和(多維勒(Deauville)4/5)可測量病變 >1.5 cm。-對於第 1B 部分擴增組及所有第 2 部分組：病患已同意經歷治療前及治療中活檢。-充足腎、肝、骨髓功能排除標準-活性腦或軟腦膜轉移。-眼黑色素瘤-活性且已知或懷疑自體

免疫疾病。允許編入具有下列者之病患：白斑症、第 I 型糖尿病、因自體免疫自體免疫狀況只需要更換賀爾蒙之殘留甲狀腺功能低下、不需要全身性治療之牛皮癬、或在沒有外部引發劑的存在下不預期會重複復發生的狀況。先前免疫不全或需要免疫壓抑療法的器官移植植物之診斷，-對於第 2 部分：先前經 PD 1 或 PD L1 抗體治療。-等級 ≥ 3 之免疫媒介之 AE 的病史(包括被視為是與藥物相關之 AST/ALT 伸高及細胞介釋放症候群)，其被視為是與先前免疫調節性療法(例如免疫檢查點抑制劑、共刺激性劑等)相關且需要免疫壓抑療法。

具有 ORR(客觀回應率)之病患數目將在基線且每六週測量直到疾病惡化或最高 24 個月不可接受之毒性。

實施例 9：抗 PD-1 抗體類在人類及馬來猴之初級 T 細胞的拮抗劑活性

此實施例說明抗 PD-1 單克隆抗體在人類及馬來猴之初級 T 細胞的拮抗劑活性。

於此研究中，使用混合之淋巴細胞反應(MLR)，於活體外檢驗抗 PD-1 單克隆抗體 mAb7 的拮抗劑活性。自人類末梢血液單核細胞(PBMC)及馬來猴-末梢血液單核細胞分離初級 T 細胞。在 mAb7 暴露後，使用人類及馬來猴之 MLR 及使用經金黃色葡萄球菌腸毒素 B(SEB)超級抗原活化之馬來猴血液細胞介素釋放檢測法，在不同活化條件下活體外評價細胞增生及細胞介素分泌。

方法

人類 T 淋巴細胞

人類核黃層係購自史丹福大學血液中心 (Stanford, CA)，以磷酸鹽緩衝鹽水 (PBS) 稀釋之並層疊在 Ficoll 上以用於分離 PBMC。hu-PBMC 以 PBS 清洗 4 次，且使用人類專一性 Pan T-細胞分離套組，如製造商的步驟所述般 (Miltenyi Biotec, San Diego, CA) 以負選擇分離 T 淋巴細胞。

馬來猴 T 淋巴細胞

新鮮馬來猴-PBMC 係購自 Bioreclamation IVT (New York, NY)，且以 PBS 清洗兩次。使用非人類靈長動物專一性之 Pan T-細胞分離套組，如製造商的步驟所述般 (Miltenyi Biotec, San Diego, CA) 以負選擇分離 T 淋巴細胞。

產生表現高水平 PD-L1 之人類樹突細胞

人類核黃層係購自史丹福大學血液中心 (Stanford, CA)，以 PBS 稀釋之並層疊在 Ficoll 上以用於分離 hu-PBMC。hu-PBMC 以 PBS 清洗 4 次，且人類專一性 CD14 細胞分離套組，如製造商的步驟所述般 (Miltenyi Biotec, San Diego, CA) 以負選擇分離分化簇 14 (CD14⁺) 單核細胞。接著將細胞以 5×10^5 細胞/mL 接種在補充有 10% 胎牛血清 (FBS) 之完全羅斯維爾公園紀念學院 (Roswell Park

Memorial Institute, RPMI)1640 培養基中 7 天。在第 0、2 及 5 天，對培養物補充重組人類(rh-)IL-4(1000 U/mL) (R&D Systems, Minneapolis, MN)及 rh-顆粒細胞-巨噬細胞集落刺激因子(GM-CSF) (rh-GMCSF) (500 U/mL) (R&D Systems, Minneapolis, MN)。在第 7 天，將未成熟 DC 收穫、清洗並計數。使用經 r-藻紅素(RPE)標籤之抗 hu-PD-L1 (eBioscience/Affymatrix, San Diego, CA)，藉由使用 LSRFortessa™分析儀之(BD Biosciences, San Jose, CA)流式細胞儀，來測試各製劑之樣品的 PD-L1 表現

產生表現高水平 PD-L1 之馬來猴樹突細胞

新鮮馬來猴-PBMC 係購自 Bioreclamation IVT (New York, NY)，且以 PBS 清洗兩次。使用非人類靈長動物專一性之 CD14 細胞分離套組，如製造商的步驟所述般(Miltenyi Biotec, San Diego, CA)以正選擇分離 CD14+單核細胞。接著將細胞以 5×10^5 細胞/mL 接種在補充有 10%胎牛血清(FBS)之完全 RPMI 1640 培養基中 7 天。在第 0、2 及 5 天，對培養物補充 rhIL-4 (1000 U/mL) (R&D Systems, Minneapolis) 及 rh-GMCSF (500 U/mL) (R&D Systems, Minneapolis, MN)。在第 7 天，將未成熟 DC 收穫、清洗並計數。使用經 RPE 標籤之抗 hu-PD-L1 (eBioscience/Affymatrix, San Diego, CA)，藉由使用 LSRFortessa™分析儀之(BD Biosciences, San Jose, CA)流式細胞儀，來測試各製劑之樣品的 PD-L1 表現。

產生表現高水平人類 PD-L1 之 JeKo-1-Luc-綠色螢光蛋白細胞克隆

JeKo-1 細胞系(外套細胞淋巴瘤)係購自美國菌種保存中心(ATCC, Manassas, VA)。JeKo-1-luc-2A-GFP 細胞系是根據製造商的步驟藉由轉導程序在輝瑞(South San Francisco, CA)產製，該轉導程序使用透過具有殺稻瘟菌素標記之雙作用子系統獨立表達螢火蟲發光酶(luc2A)及綠色螢光蛋白(GFP)之慢病毒粒子(AMSBIO, LVP323，每 200 μL 1×10^7 粒子)。產生 JeKo-1 細胞團並以具有 20%FBS 之 RPMI 培養基中稀釋成 1×10^6 細胞/mL。以每 0.5 mL 細胞 50 μL 病毒之比添加慢病毒粒子至經稀釋細胞。為了產生表達 hu-PD-L1 之 JeKo-1 細胞系，藉由 Life Technologies (San Diego, CA)客製合成 hu-PD-L1 cDNA 並克隆到基因表現載體(pcDNA3.1)中。安定表現 hu-PDL-1 之 JeKo-1-Luc-GFP 細胞系是藉由使用 Amaxa® Nucleofector 系統(Lonza, Walkersville, MD)之電穿孔及根據製造商步驟(Lonza, Walkersville, MD)使用之套組 V 在輝瑞(South San Francisco, CA)產製。接著細胞在 250 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素存在下生長 2 週，並藉由使用 BD FACSAria™ II 分選器(BD Biosciences, San Jose, CA)之細胞分選選擇。以直接經異藻藍素(APC)標籤標籤之抗 hu-PD-L1 抗體克隆 MIH-1(Affymetrix/eBioscience, San Diego, CA)傳導經分選細胞。擴增陽性克隆並使用流式細胞儀(LSRFortessa™ 分析儀，BD Biosciences, San Jose,

CA)測試高 PD-L1 表現。係選擇自單一經分選細胞產生且含有高水平 PD-L1 表現之克隆。

產生抗體

使用優良實驗室操作規範 (GLP) 材料 (批次編號 STL0005717) 在 CHO 細胞 (Pharmaceutical Sciences, Pfizer Inc, Saint Louis, MO) 中產生 mAb7 並以在 20 mM 組胺酸、85 mg/mL 蔗糖、0.2 mg/mL 聚山梨醇酯-80、0.05 mg/mL EDTA 二鈉之 pH 5.5 緩衝液中提供之。經測量內毒素為 ≤ 0.01 EU/mg。所有活體外檢測法中使用之對照抗體係克隆到 IgG4-HG 架構 (與 MAB7 相同之架構) 中之抗牛疱疹病毒。對照抗體係在輝瑞 (South San Francisco, CA) 產生，批次編號 4945，具有 ≤ 0.3 EU/mg 內毒素。

自公開於先前專利中的序列產生兩個抗 hu-PD-1 抗體並於類似於 MAB7 所用之 IgG4-HG 架構中表現之。抗體係在輝瑞 (South San Francisco, CA) 產生，且經設計成正對照 1 及正對照 2 (批次編號分別為 5053 與 4255)。經測量內毒素分別為 ≤ 0.13 EU/mg 與 ≤ 0.056 EU/mg。

使用表現高水平人類 PD-L1 之樹突細胞的人類檢測法

摘用 Kruisbeek et al, 2004 之步驟，有進行一些修改。在第 7 天收穫經分化初級 hu-DC，並藉由流式細胞儀驗證高水平 PD-L1 表現及 T-細胞活化所必要之共刺激性信號；標記包括 CD80 及 CD86 (抗體，購自 BD

Bioscience, San Jose, CA)。計數細胞並使用 RS2000 x-光機器(Radsources, Brentwood, TN)以 3000 輻射單位(rad)輻射之，以防止 DC 分泌細胞介素而僅作為 T 細胞的 Ag 呈現支持物。因此，該檢測法之結果僅來自 T 細胞誘導。在第 7 天，從同種異型捐贈者收獲新鮮分離之 hu-T 細胞。在不同濃度 mAb7、負與正對照抗體或單獨培養基(用以評價基線反應)之存在下，使用 10:1 比將 T 細胞與經輻射 DC 裝盤(最佳檢測條件經決定為 2×10^5 個 T 細胞以 2×10^4 個 DC 於 200 μ L 培養物培養)。所有條件裝排在 96 孔平底組織培養經處理盤(Fisher Scientific Pittsburg, PA)。使用無血清 X-vivo15 培養基(Lonza, Walkersville, MD)培養細胞，以避免實驗間之人類血清變化性。培養物在 37°C，5% CO₂ 培養 5 天。在第 5 天，收集上清液且根據製造商的步驟使用細胞儀磁珠陣列法(CBA)(BD Biosciences, San Jose, CA)測量細胞介素濃度。使用流式細胞儀(LSRFortessa™分析儀(BD Biosciences, San Jose, CA)取得數據，且使用 BD FCAP 陣列軟體第 3.0 版(BD Biosciences, San Jose, CA)施行數據分析。在平行培養物中測量增生，此係藉由添加 1 μ Ci 之 3H 甲基-經氘化胸苷(Perkin Elmer, Waltham, MA)至各孔中且進一步培養 16 至 18 小時。接著收獲培養物在去氧核糖核酸(DNA)納入過濾器(Perkin Elmer, Waltham, MA)上，且經氘化胸苷納入係提供使用 MicroBeta2 機器(Perkin Elmer, Waltham, MA)以每分鐘計數 (cpm)測量之細胞增生指標。

使用 JeKo1-PD-L1 表現細胞系之人類檢測法

使用 5:1 比之 T 細胞比 JeKo-1-PD-L1 細胞系施行此檢測法，因為此比提供捕捉第 5 天細胞介素分泌的更理想途徑。因此，各孔採 2×10^5 個 T 細胞與 4×10^4 個 JeKo-1-PD-L1 培養。在第 5 天，收集上清液且根據製造商的步驟使用 CBA(BD Biosciences, San Jose, CA)測量細胞介素濃度。此細胞系表現非常溫和量之共刺激性分子(CD80 及 CD86)，且因此，在抗體處理後，增進之增生係非常和緩。相反地，細胞介素分泌，包括 IL-2 係強烈，從而允許在 mAb7 處理後測量細胞介素分泌而不是 T-細胞增生。

使用表現高水平 PD-L1 樹突細胞之馬來猴檢測法

在第 7 天收獲經分化 DC，並藉由流式細胞儀(使用 LSRFortessa™分析儀，BD Biosciences, San Jose, CA)驗證高水平 PD-L1 表現及 T-細胞活化所必要之共刺激性信號；標記包括 CD80 及 CD86(抗體，購自 BD Bioscience, San Jose, CA)。計數細胞並使用 RS2000 X-光機器(Radsources, Brentwood, TN)以 3000 rad 輻射之。從同種異型捐獻者收獲新鮮分離之馬來猴 T 細胞。在不同濃度 mAb7、負及正對照抗體或單獨培養基(用以評價基線反應)存在下，使用 10:1 之 T 細胞比 DC 比將 T 細胞與經輻射之 DC 裝盤(最佳檢測法係當 2×10^5 個 T 細胞以 2×10^4 個 DC 於 200 μ L 培養物中培養)。將所有條件裝盤在 96 孔平底組織培養經處理盤(Fisher Scientific, Pittsburg, PA)。

使用無血清 X-vivo15 培養基(Lonza, Walkersville, MD)培養細胞，以避免實驗間之血清變化性。培養物在 37°C，5% CO₂ 培養 5 天。在第 5 天，收集上清液及根據製造商的步驟使用 CBA(BD Biosciences, San Jose, CA)測量細胞介素濃度。使用流式細胞儀(LSRFortessa™分析儀，BD Biosciences San Jose, CA)取得數據，且使用 BD FCAP 陣列軟體第 3.0 版(BD Biosciences, San Jose, CA)施行數據分析。同時在相似培養物中，添加 1 μCi 之 3H 甲基-經氙化胸苷(Perkin Elmer, Waltham, MA)至各孔中；進一步培養細胞 16 至 18 小時以測量增生。將培養物收獲在 DNA 納入過濾玻璃印製濾網 A(Glass Printed filtermate A，Perkin Elmer, Waltham, MA)上，經氙化胸苷納入係提供使用 MicroBeta2 機器(Perkin Elmer, Waltham, MA)以 cpm 測量之細胞增生指標。

藉由超級抗原(金黃色葡萄球菌內毒素 B)刺激所誘導之馬來猴血液的細胞介素釋放

收集馬來猴全血；將 225 μL 血液分裝到 96 孔組織培養經處理盤(Fisher Scientific, Pittsburg, PA)中。於 37°C，5% CO₂，在濃度從 0.1 至 100 μg/mL 範圍之 mAb7 或同型匹配負對照抗體存在下，培養樣品，二重複。添加抗體 1 小時後，以 0.1 μg/mL SEB (Toxic Technologies, Sarasota, FL)刺激樣品並將培養物培養 3 天。在第 3 天，收獲血漿、匯集之並冷凍在 -80°C。根據製造商的步驟，

使用 MSD 免疫檢測盤(Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD)及具有 MSD Discovery Workbench 軟體(第 4.0.12 版)之 MSD 讀取器(Model 1200)，測量經解凍血清樣品中之 IFN- γ 、IL-2 及 TNF- α 的濃度，二重複。報告二重複的平均。

結果

mAb7 對人類初級 T 細胞之拮抗劑活性

當初級人類 T 細胞於 MLR 中以表現 PD L1 之同種異型 hu-DC 活化，mAb7 會以劑量依賴性方式增加 T 細胞增生(藉由測量經氘化胸苷納入)及 T-細胞活化(藉由測量促炎性細胞介素分泌)。以 mAb7(10 μ g/mL)處理 T 細胞導致 T 細胞增生之增加最高 2.5 倍高於以負對照抗體(10 μ g/mL)處理者。當與負對照抗體相比，IFN- γ 與 TNF- α 水平分別增加最高 8 與 5 倍。IFN- γ 增加較 TNF- α 增加優異。在這些培養物中沒有偵測到 IL-2 表現。當初級人類 T 細胞於 MLR 中係使用腫瘤細胞系 JeKo 1 PD-L1 作為同種異型表現抗原細胞活化，與負對照抗體相比，mAb7 會誘導劑量依賴性增加之 IFN- γ (最高 2.5 倍)、TNF- α (最高 2 倍)及 IL-2(最高 5 倍)分泌。此檢測法中 mAb7 之效應類似二個正對照抗體所得數據。在這些條件下未觀察到增加之 T 細胞增生。與初級 DC 媒介之 MLR 相比，細胞增生係最小，具有 CD80 與 CD86 所提供之弱信號。在上述所有檢測法中，IL-10、IL-4、IL-17A 及 IL-6 係最小至沒有偵測

到。

mAb7 對馬來猴初級 T 細胞之拮抗劑活性

於動力學排除檢測法中(KinExA)，mAb7 對 hu-PD-1 及馬來猴 PD-1 之溶液中結合親和性係非常相似(人類及馬來猴 PD-1 之 KD 分別=23 及 28 pM)。mAb7 在表現人類 PD-1 及馬來猴 PD-1 之細胞上的 EC50 也非常相似。於使用不同馬來猴分離之 T 細胞及 DC 之 MLR 功能檢測法中，mAb7 以劑量依賴性方式誘導 T 細胞增生及活化(藉由測量經氫化胸苷納入)。此效應也在使用正對照(抗體 1 及抗體 2)中觀察到，但未在使用負對照抗體中觀察到。mAb7 也增進細胞介素分泌(亦即，IFN- γ 及 TNF- α ，與負對照抗體相比，最高 5 倍及 3 倍。在這些培養物中沒有偵測到 IL-2 表現。在使用經 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 之 SEB 超級抗原刺激 3 天之馬來猴全血的不同細胞介素釋放檢測法中，與負對照抗體相比，mAb7(0.1 至 100 $\mu\text{g/mL}$)會誘導較大之 IFN- γ 、IL-2 及 TNF- α 分泌。

MLR 研究係用於產生類似腫瘤微環境之活體外設定，其中在表現 PD-L1 之同種異型 DC 或腫瘤細胞的存在下，T 細胞經活化並表達高水平 PD-1。PD-1/PD-L1 之交互作用會抑制進一步之 T 細胞增生及細胞介素釋放。於這些 MLR 中添加抗 PD-1 抗體類，會恢復 T 細胞活化且增加增生及細胞介素分泌，由其 IFN- γ ，此係由於阻斷 PD-1/PD-L1 軸。

當以表現高水平 PD-L1 同種異型細胞(DC 或 JeKo 1 PD-L1 細胞系)培養時，mAb7 加速人類 T 細胞增生及 IFN- γ 、TNF- α 及 IL-2 分泌。相反地，負對照抗體，其證實與單獨培養基相似，並不會增進這些效應。相似地，在馬來猴-MLR 系統中，mAb7 增進 T 細胞增生，IFN- γ 及 TNF- α 分泌，及增進使用超級抗原 SEB 之馬來猴全血釋放細胞介素。

這些結果證實，抗 PD-1 抗體 mAb7 係增進 T 細胞增生及促炎性細胞介素分泌，包括干擾素- γ (IFN- γ)、腫瘤壞死因子 α (TNF- α)及白介素(IL)-2。這些活性係在初級人類及馬來猴 T 細胞中都觀察到。

實施例 10：抗 PD-1 抗體類於移植物抗宿主疾病中之效應

此實施例說明於活體中抗 PD-1 抗體類對 T 細胞活化與擴增的效應，係使用異種-aGvHD 模型之經轉入有 hu-PBMC 之 NSG 小鼠。

於此研究中，於活體中抗 PD-1 抗體 mAb7 對 T 細胞活化與擴增的效應，係在急性移植物抗宿主疾病(aGvHD)模型中，於使用 hu-末梢血液單核細胞(PBMC)之非肥胖糖尿病型(NOD)重症聯合免疫不全型(SCID)之白介素 2 受體 γ 裸(IL2r γ^{null})(NSG)小鼠中研究。

免疫功能低下 NSG 母小鼠(每群組 5 隻)8 至 10 週齡(正式名稱 NOD, Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ)係購自 Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME)。所有動物根據實驗

動物照護及使用委員會(Institutional Animal Care and Use Committee ; IACUC)關在輝瑞(South San Francisco, CA)的無病原設施中。

人類核黃層係購自史丹福大學血液中心(Stanford, CA)，以磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)稀釋之並層疊在 Ficoll 上以用於分離 PBMC。PBMC 以 PBS 清洗 2 次。紅血球細胞(RBC)使用如製造商之步驟(Life Technologies ; San Diego, CA)所表明之氯化銨鉀(ACK)溶解緩衝液溶解。在 RBC 溶解後，再清洗細胞一次並以 PBS 稀釋成每 mL 有 5×10^7 個細胞。

為了誘導異種-aGvHD，經由尾靜脈以 hu-PBMC 靜脈內注射 NSG 小鼠。各小鼠接受於 200 μ L 之 PBS 中之 1×10^7 個細胞。在所有實驗中，小鼠每週稱重，共 3 次並監測出現異種-aGvHD-樣症候群，包括重量減輕、駝背姿勢、皺皮、減少移動性及在某些例中之腹瀉。在減輕 20% 體重後或在 2 天中減輕 1 g/天後將小鼠安樂死；該時點紀錄為存活時間。mAb7、負對照抗體及正對照抗體係如上面實施例 9 中所述般產生。

NSG 小鼠經負對照抗體、正對照抗體或 mAb7 處理，劑量範圍在每公斤 0.1 至 10 毫克(0.1 至 10mg/kg)之間。使用適當載具，在轉入 hu-PBMC 後的第 2 及 8 天對小鼠投予抗體。抗體投予路徑為腹膜內(ip)投予。

收獲移植有 hu-PBMC 之小鼠的末梢血液、脾及肝。如下製備各器官的單細胞懸浮液：收集末梢血液，及使用

ACK-溶解緩衝液溶解 RBC 並以 PBS 清洗之。使用注射器柱塞的背面將細胞吸通過 70 μ M 過濾器而機械地均質脾及肝，並用 PBS 清洗一次。溶解 RBC 且細胞再清洗 2 次及再次將細胞吸通過 70 μ M 過濾器。在此階段，脾細胞已就緒。為了分離中肝的白血球，使用 30%至 80%之泊可 (Percoll)梯度(Percoll® Plus, GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA)將單細胞懸浮液分層，並經歷高速離心。從中間層收獲白血球並以 PBS 清洗二次。所有單細胞懸浮液經計數且將 1×10^6 個來自各樣品之細胞用於螢光激活細胞分選(FACS)。對於人類細胞介素分泌檢測法，如製造商之步驟(Miltenyi Biotec, San Diego, CA)，使用小鼠專一性 CD45 細胞單離套組藉由正選擇耗盡小鼠 CD45⁺細胞，以確保細胞介素分泌係單獨來自人類免疫細胞。接著，細胞經計數且將 1×10^6 個來自各樣品之細胞用於該檢測法。

自異種-aGvHD 小鼠獲得末梢血液、脾及肝之單細胞懸浮液。於 4°C，避光下，將每個樣品總共 1×10^6 細胞以於 FACS 緩衝液中之適當經螢光標籤單克隆抗體混合物培養 30 分鐘，該 FACS 緩衝液包括含有 2%胎牛血清(FBS)之 1 x PBS，接著以 FACS 緩衝液清洗細胞。對於細胞內染色 Kiel 67 蛋白(Ki67，用於測量增生細胞)，在表面染色後根據製造上的步驟(Affymetrix/eBioscience, San Diego, CA)使用細胞內固定及滲透緩衝液組(Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set)固定細胞。在 4°C

黑暗中施行細胞內染色 30 分鐘。染色後，清洗樣品並使其經歷使用 BD LSR Fortessa™ 細胞分析儀 (BD Biosciences, San Jose, CA) 之多色流式細胞儀。使用 FlowJo 軟體 (FLOWJO LLC, Ashland, OR) 進行數據分析。辨認細胞表面分子之不同組合所用之抗體係：抗 hu-CD45 太平洋藍 (Pacific Blue ; PB) 或 Amcyan、抗小鼠 CD45-亮紫 (Brilliant Violet ; BV)-711、抗 hu-CD3-PerCPCy5.5、抗 hu-CD8 藻紅素-Cy7 (PE-Cy7) 或 BV-786、抗 hu-CD4-螢光素異硫氰酸酯 (FITC) 或 BV-650、抗 hu-PD-1 (克隆 EH12.1) BV-786 或 PE、抗 hu-PD-1 (克隆 MIH-4) PE 或 FITC、抗 hu-Ki67 異藻藍素 (APC) (所有抗體來自 BD Biosciences, San Jose, CA)、抗 hu-PD-L1 (PE-Affymatrix-eBioscience, San Diego, CA) 及活/死染色用藍色螢光反應性染料 (Life Technologies, Grand Island, NY)。

自異種 -aGvHD 小鼠 (在小鼠 CD45 耗盡後) 收獲脾及肝之富含人類 CD45 族群的單細胞懸浮液。於平底組織培養經處理 96 孔盤中 (Fisher Scientific; Pittsburg, PA) 將每個樣品總共 1×10^6 個細胞培養於 200 μ L X-vivo 15 培養基中。接著讓細胞未經刺激或以作為低刺激條件 10 ng/mL 乙酸肉荳蔻酯 (PMA) 及 125 ng/mL 離子黴素 (ionomycin ; iono) 或作為高刺激條件 50 ng/mL 之 PMA 及 1 μ g/mL 離子黴素 (皆購自 Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) 刺激。培養物在 37°C 於 5% CO₂ 中培養 8 小時以確保最大細胞介素分泌。收集上清液並根據製造商的步驟 (BD Biosciences,

San Jose, CA)使用人類細胞介素專一性細胞儀磁珠陣列法(CBA)測量人類細胞介素濃度。使用流式細胞儀(LSRFortessa™分析儀(BD Biosciences, San Jose, CA)取得數據，且使用 FCAP 陣列™軟體第 3.0 版(BD Biosciences, San Jose, CA)施行數據分析。Hu-IFN- γ 、hu-TNF- α 及 hu-IL-2 珠陣列套組係購自 BD Biosciences (San Jose, CA)，且已確認它們不會與小鼠細胞介素交叉作用。

所有分析涉及使用獨立樣品 t-測試或使用 Graphpad Prism 之 2-因子 ANOVA (Graphpad Software, San Diego, CA)之比較手段。將 $p \leq 0.05$ 之值視為統計上顯著。植入數據以包括平均值標準差(sem)之平均濃度描繪。

以抗 PD-1 抗體 mAb7 處理 NSG 免疫低下小鼠會加速體重減輕(表 17)並誘導常見於此模型中的其他疾病徵兆，諸如駝背姿勢、皺皮、降低移動性及在某些例中之腹瀉。於此模型中，體重減輕預期會在轉入後的第 20 天與第 30 天之間加速(見例如 Schroeder and DiPersio, 2011)。因為以 mAb7 及正對照 1 與 2 處理會加速異種-aGvHD 症候群，小鼠必須在較早時點安樂死，而無法獲得存活取線；因此體重減輕為主要結果測量。在第一實驗中，小鼠以 0.1、1 及 10 mg/kg 之 mAb7 或 10 mg/kg 負對照抗體處理。於表 17 中，體重減輕係藉由以在第 23 天經處理群組相對於第 0 天之體重差異標準化而計算。值表明每群組 5 隻小鼠隻平均 $\pm$ sem。

表17

處理群組	體重 第0天	體重 第14天	體重 第23天	每群組 #	體重減輕
負對照 mAb : 10 mg/kg	20.68 ± 0.36	22.00 ± 0.36	20.88 ± 1.11	5	0%
mAb7 : 10 m/kg	20.78 ± 0.36	17.76 ± 0.57	17.74 ± 0.86	5	15%
mAb7 : 1 mg/kg	21.52 ± 0.36	19.26 ± 0.35	17.7 ± 0.58	5	15%
mAb7 : 0.1 mg/kg	20.5 ± 0.78	19.78 ± 1.38	19.22 ± 1.95	5	7.95%

在 hu-PBMC 轉入後的第 2 天及第 8 天，小鼠以所表明抗體處理。雖在 23 天於控制群組中體重減輕變得明顯，從在 hu-PBMC 轉入後的第 10 至 11 天，在所有抗 PD-1 抗體 mAb7 處理群組中之個別小鼠偵測到體重減輕及疾病惡化。當與經負對照處理群組相比，於經 1 mg/kg 及 10 mg/kg 處理群組中，在第 14 至 23 天之間，體重減輕到達顯著 ($p \leq 0.0001$)。在 23 天，於 1 mg/kg 及 10 mg/kg 處理群組中偵測到 15% 體重減輕且於 0.1 mg/kg 處理群組中偵測到 7.9% 體重減輕(表 17)。

末梢血液、肝及脾之 FACS 分析證實，與對照群組相比，於經 mAb7 處理群組中在 hu-CD45 陽性細胞及 hu-CD3 陽性細胞 T 細胞之百分比有增加。脾之代表性數據也顯示，與經負對照抗體處理群組相比，於經 mAb7 處理群組中在 hu-CD8 陽性細胞 T 細胞計數有增加，及在 hu-CD4 陽性細胞 T 細胞計數有增加(但增加到較少程度)。亦於肝與血液之 hu-T 細胞計數中注意到相似增加。為了評估是否 T 細胞之增加係由於透過 mAb7 結合人類 T 細胞而阻斷 PD-1，將細胞以會與 mAb7 競爭結合之市售 PD-1 抗體(克隆 EH12.1)染色。所有器官的經 mAb7 處理淋巴細胞(藉由 FACS 分析)顯示沒有與 EH12.1 結合。為了

確認經 mAb7 處理之 T 細胞仍表現 PD-1，將 T 細胞經不同抗 hu-PD-1 克隆(克隆 MIH4)染色，克隆 MIH4 係部分競爭 mAb7 結合 T 細胞。結果顯示經 mAb7 處理之 T 細胞部分結合有 MIH4；因此指示 PD-1 係表現在經處理 T 細胞尚且顯然 PD-1 被 mAb7 阻斷(數據未顯示，保留輝瑞內部紀錄中)。對於在脾中、在 T 細胞(hu-CD3 陽性)上或在非 hu-T 細胞(hu-CD3 陰性)上之 hu-PD-L1 表現，沒有觀察到可偵測改變。於脾中間組中，與經負對照處理群組相比，為淋巴細胞增生標記之 Ki67 係在經 PF-0681591 處理群組之 hu-CD3 陽性細胞中升高)。相似結果亦見於血液與肝中。

為了檢驗於異種-aGvHD 期間 mAb7 對細胞介素釋放的效應，從小鼠 CD45 陽性細胞中進一步分離出之 hu-CD45 陽性細胞(來自肝與脾)。這些淋巴細胞接著在 37°C 經 PMA 及離子黴素之混合物(在 2 個濃度：低相較於高)處理或未經處理 8 小時。藉由 CBA 測量上清液中細胞介素分泌(表 18)。沒有刺激下，未獲得可偵測細胞介素(表 18)。與對照群組相比，在 mAb7 處理後，自小鼠脾及肝部件分離之人類淋巴細胞中的 hu-IFN- γ 、hu-IL-2 及 hu-TNF- α 升高。在弱活體外刺激條件下，經 mAb7 處理 T 細胞會增加 hu-IFN- γ 分泌至顯著高於自負對照群組分離之 T 細胞所具者之水平($p \leq 0.05$)。在強活體外刺激條件下，所有細胞介素係在所有群組中被誘導，但與自負對照分離之 T 細胞相比，在經 mAb7 處理 T 細胞會進一步增加。表 18

顯示自個群組中 5 隻不同小鼠收集之數據。表 18 中，於比較 mAb7 相對於負對照群組之非成對 t-測試中，*p<0.05，**p<0.01；aGvHD=急性移植物抗宿主疾病；Hu=人類；IFN- γ =干擾素- γ ；IL-2=白介素-2；Ino=離子黴素；N=數目；ns=不顯著；P=P 值；PMA=乙酸肉豆蔻酯；TNF α =腫瘤壞死因子 α ；異種=異種性。

表18

器官-經分離之Hu淋巴細胞	活體外刺激條件 (PMA/Iono) (ng/mL)	Hu-細胞介素 pg/mL	活體內處理		N	統計學非成對t-測試
			mAb7 10 mg/kg	負對照mAb 10 mg/kg		
肝	弱 (10/125 ng/mL)	IFN- γ	414.1 $\pm$ 59.4	163.9 $\pm$ 43.41	5	**P<0.05
脾			2599.96 $\pm$ 863.45	503.9 $\pm$ 111.9	5	*P<0.01
肝		IL-2	783.1 $\pm$ 776.26	19.41 $\pm$ 5.29	5	ns
脾			1813.98 $\pm$ 840.26	14.26 $\pm$ 1.40	5	ns
肝		TNF- α	80.75 $\pm$ 60.45	9.92 $\pm$ 2.55	5	ns
脾			368.81 $\pm$ 209.73	14.1 $\pm$ 2.51	5	ns
肝	強 (50/1000 ng/mL)	IFN- γ	3838.65 $\pm$ 178.84	2931.26 $\pm$ 556.98	5	ns
脾			3084.1 $\pm$ 204.1	2523.9 $\pm$ 141.2	5	ns
肝		IL-2	7759.44 $\pm$ 809.24	4565.26 $\pm$ 1240.8	5	ns
脾			16735.57 $\pm$ 1417	13204.5 $\pm$ 1834.3	5	ns
肝		TNF- α	1611.9 $\pm$ 150.82	758.1 $\pm$ 188.2	5	**P<0.01
脾			2842.6 $\pm$ 224.2	2311.7 $\pm$ 281.36	5	ns
肝	無 (0/0 ng/mL)	IFN- γ	3.1 $\pm$ 1.25	4.6 $\pm$ 0.96	5	ns
脾			3.94 $\pm$ 0.97	4.86 $\pm$ 1.16	5	ns
肝		IL-2	3.9 $\pm$ 0.14	4.66 $\pm$ 0.41	5	ns
脾			3.23 $\pm$ 0.77	4.39 $\pm$ 0.55	5	ns
肝		TNF- α	0.1 $\pm$ 0.09	0.3 $\pm$ 0.2	5	ns
脾			0.4 $\pm$ 0.15	0.27 $\pm$ 0.3	5	ns

這些結果證實，在 NSG 小中，以抗 PD-1 抗體 mAb7 處理異種-aGvHD 會加速異種-aGvHD 發展，如藉由體重減輕、T 細胞增生及增加之細胞介素分泌，包括干擾素-

γ (IFN- γ)及白介素-2(IL-2)所測量者。

實施例 11：特徵化抗 PD-1 抗體類

此實施例說明抗 PD-1 抗體 mAb7 對表現表面受體 PD-1 之細胞的結合親和性、專一性及配體阻斷活性。

mAb7、負對照抗體及正對照抗體係如實施例 9 中所述般產生。經藻紅素(PE)或亮紫(BV)-786 一次標籤之抗 hu-PD-1 抗體克隆 EH12.1 及經相同染料標籤同型對照抗體係購自 BD Biosciences (San Jose, CA)。經 PE 標籤抗小鼠 PD-1 克隆 J43 及抗倉鼠 IgG 同型對照抗體係購自 Affymetrix/eBioscience (San Diego, CA)。生物素化 hu-PD-L1 及生物素化 hu-PD-L2 (CD273)係得自 ACRO Biosystems (Newark, DE)。馬來猴 PD-L1 及 PD-L2 係購自 Creative BioMart®重組蛋白(Shirley, NY)，且皆依照製造商之步驟所指導使用 Alexa Fluor® 647 標籤套組 (LifeTechnologies, San Diego, CA)以 Alexa Fluor® 647 染料在公司標籤之。測試馬來猴 PD-L1 及 PD-L2 對表達馬來猴 PD-1 細胞系之結合。大鼠-PD-L1-Fc-標誌及小鼠-PD-L1-Fc-標誌(人類 IgG1Fc 區在 C-端)係購自 Creative BioMart®重組蛋白(Shirley, NY)。偵測生物素化 PD-L1 及 PD-L2 係使用鏈霉抗生物素蛋白 PE 或異藻藍素(APC) (Affymetrix/eBioscience, San Diego, CA)達成。偵測大鼠-PD-L1 或小鼠-PD-L1 係使用經 APC 標籤 Fc 伽馬(Fc γ)片段專一性驢-抗人類 affiniPure F(ab')₂ IgG (Jackson

ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA)達成。

用於順時轉染之載體

Hu-PD-1 表現質體(於 pCMV6-Entry 載體中)係購自 OriGene Technologies, Inc (Rockville, MD)，目錄號 RC210364/登錄號 NM_005018。

小鼠-PD-1 表現載體(m6 pCMV6-Entry 載體中)係購自 OriGene Technologies, Inc (Rockville, MD)，目錄號 MR227347/登錄號 NM_008798。馬來猴-PD-1 經 Life Technologies (San Diego, CA)密碼子最佳化且由合成，批次號 1482149/登錄號 EF443145。其符合讀框地克隆至具有小鼠 κ 分泌性信號序列之輝瑞專利(San Francisco, CA)巨細胞病毒(CMV)基底表現質體中，該信號序列係添加 C-端 FLAG 標誌至 C-端。

大鼠-PD-1 去氧核糖核酸(DNA)根據來自登錄號 NM_001106927 之序列客製合成並克隆至來自 LifeTechnologies (San Diego, CA)之表現載體 pEF1V5-His 之 BamHI-NotI 位點中，批次號 1598305。

用於安定轉染之 PD-1 表現載體

Hu-PD-1 DNA 根據來自登錄號 NM_005018 之序列客製合成並克隆至 InVitroGen 表現載體 pEF1V5-His B 之 BamHI-NotI 位點中，批次號 513478。

馬來猴-PD-1 DNA 根據來自登錄號 EF443145 之序列

客製合成並克隆至 InVitroGen 表現載體 pEF1V5-His B 之 BamHI-NotI 位點中，批次號 1482149。

小鼠-PD-1 DNA 根據來自登錄號 NM_008798 之序列客製合成並克隆至 InVitroGen 表現載體 pEF1V5-His B 之 BamHI-NotI 位點中，批次號 1513476。

所有載體經 Life Technologies (San Diego, CA)合成並克隆至 InVitroGen 表線載體 pEF1V5-His B 中。所有載體含有完整 PD-1 序列包括胞外結構域、膜結構域及細胞內結構域。所有載體編碼有 V5-6His 表位標誌於 PD-1 之 C-端。於各載體內包括抵抗新黴素基因，以供使用 G418 硫酸鹽抗生素選擇。

使用 HEK-293T 細胞系之瞬時轉染

HEK-293T 細胞係購自美國菌種保存中心(ATCC®, Manassas, VA)，且保持細胞於補充有 10%胎牛血清(FBS)與 1 x 盤尼西林/鏈黴素(Pen/Strep)之經達爾伯克氏修飾之伊格爾氏培養基(Dulbecco's Modified Eagle's medium; DMEM)中(Corning CellGro, Manassas, VA)，且在 37°C，6%二氧化碳(CO₂)中生長。轉染前一天，細胞經胰蛋白處理並以每 T75 燒瓶(Fisher Scientific, Pittsburg, PA)有 4 x 10⁶ 個細胞裝盤。轉染當天，以預先溫熱之無抗生素生長培養基置換舊的培養基，且細胞進一步在 37°C，6% CO₂ 中培養 2 小時。添加表現載體或空載體(10 µg)至 1.5 mL OptiMEM 培養基中(Life Technologies, San Diego,

CA)。接著添加脂質體 (Lipofectamine)2000 試劑 (20 μ l) (Life Technologies, San Diego, CA) 至另一個 1.5 ml OptiMEM 中。接著將質體 OptiMEM 及脂質體 OptiMEM 管混合在一起並載室溫培養 25 分鐘。接著以滴加方式將 OptiMEM 混合物添加至適當培養燒瓶中，且讓燒瓶在 37°C，6% CO₂ 中放置過夜。隔天，從燒瓶移除培養基並置換成完全生長培養基。轉染後四十八(48)小時，使用 StemPro-Accutase (Life Technologies, San Diego, CA)收獲細胞，從而允許輕輕地從培養表面移除細胞而不影響 PD-1 表面表現。接著使細胞經歷抗體結合及螢光激活細胞分選(FACS)分析。

使用 Jurkat 細胞系之安定轉染

使用 Jurkat 細胞系(克隆 E6-1-TIB-152™, ATCC®, Manassas, VA)安定表達 hu-及馬來猴-PD-1。係使用電穿孔經由 Amaxa neclutransfector 系統(Lonza, Walkersville, MD)產生細胞系。依照製造商之步驟所指導(Lonza, Walkersville, MD)使用套組 V 在輝瑞(San Francisco, CA)施行轉染。於 37°C，5% CO₂，以 0.3 至 1.0×10^6 個細胞/ml 之間之密度將細胞維持在補充有 10%胎牛血清(FBS)與 1 x L-麩醯胺酸(LifeTechnologies, San Diego, CA)之羅斯維爾公園紀念學院(Roswell Park Memorial Institute, RPMI)1640 培養基中。對於各載體，使用 2 μ g/mL 轉染 2×10^6 個細胞。轉染後，在 G418 硫酸鹽(600 μ g/mL)存在

下生長細胞 2 週以供選擇及維持經安定轉染細胞。為了防止長時間汙染，添加 1 x Pen/Strep 至培養基中。藉由以稀釋率 1:200 培養細胞(1 個細胞於 200 μ L 補充有硫酸鹽抗生素完全培養基)來選擇單細胞克隆。為了選擇表現高水平 hu- PD-1 或馬來猴 -PD-1 之克隆，於流式細胞儀檢測法中使用經 PE 標籤之抗 hu-PD-1 克隆 EH12.1。使用 BD LSRFortessa™細胞分析儀(BD Biosciences, San Jose, CA)收集樣品。使用 Flowjo 軟體(FLOWJO LLC, Ashland, OR)數據分析及計算平均螢光強度(MFI)。選擇具有高 MFI 之細胞系用於檢測法開發。

在轉染後 48 小時收獲經 hu-PD-1 載體、馬來猴 -PD-1 載體、小鼠 -PD-1 載體或大鼠 -PD-1 載體或空載體轉染之 HEK-293T 細胞。在與 mAb7 結合之前，以市售抗生素或配體測試來自各特定轉染之細胞，以確保適當 PD-1 受體高度表現在細胞表面上。對於人類及馬來猴，使用交叉反應性市售抗 PD-1 抗體(克隆 EH12.1)。對於小鼠，使用市售抗小鼠 -PD-1 抗體(克隆 J43)。對於大鼠，使用市售大鼠 -PD-L1 配體(因為沒有可得市售大鼠交叉反應性抗 PD-1 抗體)。在確認有適當 PD-1 表現後，細胞經計數且將 2×10^5 個細胞以 hu-Fc 受體結合抑制劑功能級混合物(以 $1 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ 個細胞阻斷 Fc- γ 受體，Affymetrix/eBioscience, San Diego, CA)培養 20 分鐘，且添加用於活/死染色之藍色螢光反應性染料(Life Technologies, San Diego, CA)至該混合物中。添加序列稀釋之 mAb7 或負對

照(1 至 0.00001 $\mu\text{g/mL}$)抗體至細胞混合物中且接著允許冰上培養 1 小時。接著清洗細胞及添加經 APC 標籤-驢-抗人類-affiniPure F(ab')₂片段 IgG, Fc γ 專一性(1 : 100 稀釋率)(Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA)至該混合物中, 接著細胞於冰上培養另 30 分鐘。在 BD LSRFortessa™細胞分析儀(BD Biosciences, San Jose, CA)上取得數據並使用 Flowjo 軟體(FLOWJO LLC, Ashland, OR)分析數據。

產生經 hu-PD-1 受體、馬來猴-PD-1 受體或小鼠-PD-1 受體之任一者轉染之安定 Jurka 細胞克隆。為這些檢測法所選之 PD-1 細胞克隆來自表達相似 PD-1 受體量(~400,000 個受體/細胞; 受體係在先前產生細胞系期間定量過)之各物種。在確認有適當 PD-1 表現後, 細胞經計數且將 2×10^5 個細胞以 hu-Fc 受體結合抑制劑功能級混合物(以 1 $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ 個細胞阻斷 Fc- γ 受體, Affymetrix/eBiosciense, San Diego, CA)培養 20 分鐘, 且添加用於活/死染色之藍色螢光反應性染料(Life Technologies, San Diego, CA)至該混合物中。添加序列稀釋(1:3)之 mAb7、正對照 1、正對照 2 或負對照抗體(使用 IgG4 架構)至細胞混合物中且接著允許冰上培養 1 小時。接著清洗細胞及添加經 APC 標籤-驢-抗人類-affiniPure F(ab')₂片段 IgG, Fc γ 專一性(1 : 100 稀釋率)(Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA)至該混合物中, 接著細胞於冰上培養另 30 分鐘。在 BD LSRFortessa™細胞分析

儀 (BD Biosciences, San Jose, CA) 上取得數據。使用 Flowjo 軟體 (FLOWJO LLC, Ashland, OR) 進行分析且計算幾何平均。使用 Graph Pad Prism (對數促效劑性相對於回應[結合]) 計算 EC_{50} 值。

產生經活化之表現高水平 PD-1 受體之 T 細胞。在確認 T 細胞有適當 PD-1 表現後，使用市售試劑 (對於人類及馬來猴，使用抗 hu-PD-1 克隆 EH12.1，對於小鼠-PD-1，使用抗小鼠-PD-1 克隆 J43，而對於大鼠-PD-1，使用大鼠-PD-L1)。細胞經計數且將 1×10^6 個細胞以 hu-Fc 受體結合抑制劑功能級混合物 (以 $1 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ 個細胞阻斷 Fc- γ 受體，Affymetrix/eBioscience, San Diego, CA) 培養 20 分鐘，且添加用於活/死染色之藍色螢光反應性染料 (Life Technologies, San Diego, CA) 至該混合物中。添加序列稀釋之 mAb7(1:3) 至細胞混合物中且接著允許冰上培養 1 小時。接著，在添加經 APC 標籤-驢-抗人類-affiniPure F(ab')₂ 片段 IgG，Fc γ 專一性二次抗體 (1:100 稀釋率) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA) 之前清洗細胞，及允許細胞於冰上培養另 30 分鐘。在 BD LSRFortessa™ 細胞分析儀 (BD Biosciences, San Jose, CA) 上取得數據。使用 Flowjo 軟體 (FLOWJO LLC, Ashland, OR) 進行分析。計數幾何平均且使用 Graph Pad Prism (對數促效劑性相對於回應[結合]) 計算 EC_{50} 值。

為檢測法選擇安定之表現高水平 hu-PD-1 的 Jurkat 細胞克隆。二十 (20) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之生物素化-hu-PD-L1 或生物素

化-hu-PD-L2 會飽和在此細胞系上之所有 PD-1 受體(在預知結合滴定檢測法後)。因此，此濃度於我們的檢測法中經選擇作為最佳濃度。表現 Hu-PD-1 之 Jurkat 細胞 (2×10^5 個) 以 hu-Fc 受體結合抑制劑功能級 (以 $1 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ 個細胞阻斷 Fc- γ 受體，Affymetrix/eBioscience, San Diego, CA) 培養 20 分鐘，且也添加用於活/死染色之藍色螢光反應性染料(Life Technologies, San Diego, CA)至該混合物中。以 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 添加生物素化-hu-PD-L1 或生物素化-hu-PD-L2 至細胞，隨後立刻添加序列稀釋之 mAb7、正對照 1、正對照 2 或負對照抗體(都於 IgG4 架構中且於 1:3 序列稀釋)。允許冰上培養細胞 1 小時。接著清洗細胞及添加 PE 鏈霉抗生物素蛋白(1:100 稀釋率) (Affymetrix/eBioscience, San Diego, CA)，且允許細胞於冰上培養另 30 分鐘。在 BD LSRFortessa™細胞分析儀(BD Biosciences, San Jose, CA)上取得數據，且使用 Flowjo 軟體(FLOWJO LLC, Ashland, OR)進行分析且計算幾何平均。使用 Graph Pad Prism(對數抑制劑相對於回應[結合])計算 EC_{50} 值。

Jurkat 細胞係經安定轉染高水平 hu-PD-1 受體或馬來猴-PD-1 受體。為此檢測法選擇表現馬來猴-PD-1 受體 (~400,000 個受體/細胞)之細胞。使用這些細胞測試馬來猴-PD-L1 及 PD-L2 之結合且結果顯示 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 之馬來猴-PD-L1 或 PD-L2 足夠飽和所有 PD-1 受體，此係基於不同濃度($50 \text{ ng}/\text{mL}$ 至 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$)的這些配體當結合此細胞系

時所測試之幾何平均。表現馬來猴-PD-1 之 Jurkat 細胞 (2×10^5 個) 以 hu-Fc 受體結合抑制劑功能級 (以 $1 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ 個細胞阻斷 Fc- γ 受體, Affymetrix/eBioscience, San Diego, CA) 培養 20 分鐘, 且添加用於活/死染色之藍色螢光反應性染料 (Life Technologies, San Diego, CA) 至該混合物中。添加 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 之 Alexa-Fluor®-647-馬來猴 PD-L1 或 Alexa-Fluor®-647-馬來猴 PD-L2 至細胞, 隨後立即添加不同濃度 mAb7、正對照 1、正對照 2 或負對照抗體 (使用 IgG4 架構, 於 1:3 序列稀釋)。接著允許冰上培養細胞 1 小時。清洗後, 細胞在 BD LSRFortessa™ 細胞分析儀 (BD Biosciences, San Jose, CA) 上取得數據。使用 Flowjo 軟體 (FLOWJO LLC, Ashland, OR) 進行分析且計算幾何平均。使用 Graph Pad Prism (對數抑制劑相對於回應[結合]) 計算 EC_{50} 值。

人類核黃層係購自史丹福大學血液中心 (Stanford, CA), 以 PBS 稀釋之並層疊在 Ficoll 上以用於分離 PBMC。PBMC 以 PBS 清洗 4 次。RBC 使用如製造商之步驟 (Life Technologies; San Diego, CA) 所表明之 ACK 溶解緩衝液溶解。在 RBC 溶解後, 再清洗細胞一次並以 PBS 稀釋成每 mL 有 5×10^7 個細胞。一半的 PBMC 經計數並冷凍於冷凍培養基 (90%FBS 與 10%二甲基亞砷[DMSO]) 中而剩餘細胞經歷 T-細胞純化。

使用 hu-專一性 PAN T 細胞分離套組, 如製造商的步驟所述般 (Miltenyi Biotec; 130-096-353) 以負選擇自剩餘

PBMC 分離 T 淋巴細胞。

對於 ADCC 檢測法，新鮮分離之 T 細胞(目標細胞)經計數，且以每 mL 有 1×10^6 個 T 細胞培養於無血清 X-vivo 15 培養基(Lonza, Walkersville, MD)中並使用經抗 CD3 及抗 CD28 (用於細胞擴增及活化之 Dynabeads®人類 T-活化劑 CD3/CD28(Life Technologies, San Diego, CA)塗覆之珠及 100 U/mL 之重組人類(rh)-IL-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN)刺激。培養物在 37°C，5% CO₂ 培養 72 小時。當 T 細胞活化到達 48 小時時點，解凍 PBMC(衍生自相同捐獻者之效應子細胞)、計數之且接著於具有 10% FBS 之完全 RPMI-1640 培養基中以 rh-IL-2 (50 U/mL 用於 5×10^6 細胞/mL 培養物)刺激總共 18 至 24 小時。在檢測當天，二種細胞種類都經計數且藉由流式細胞儀測試以確保有適當活化。對於 T 細胞，檢驗 PD-1 之高表現，而對於 PBMC，檢驗媒介 ADCC 之受體 CD16、CD32 及 CD64(分別為 Fc-伽馬受體-[FcγR] III [a 及 b]、FcγRIIa、FcγRI)的表現水平。接著以 5:1 效應子對目標比(因為此為最佳比)將細胞裝盤在平底 96 孔組織培養經處理盤(Fisher Scientific, Pittsburg, PA)中，隨後添加抗體：mAb7(IgG4 及 IgG1 架構)及正對照抗體。所有抗體測試於濃度 0.01 至 100 μg/mL(以 1:10 序列稀釋)。添加檢測對照，包括評價最大溶解之單獨目標細胞、單獨效應子細胞及於 5:1 比之效應子對目標但沒有添加抗體。檢測盤在 37°C，5% CO₂ 中培養 4 小時。如製造上之步驟所指導地

使用 CytoTox 96®非放射性細胞毒性檢測法(Promega US, Madison, WI)分析數據。該檢測法定量地測量乳酸去氫酶(LDH)，一種細胞溶解時釋出之安定細胞內酵素。細胞毒性百分比(%)經測量為=100 x (實驗 LDH 釋放[OD490]/最大 LDH 釋放[OD490])。當單獨目標細胞(T細胞)時細胞經化學溶解以獲得最大殺害時，計算最大 LDH 釋放。

使用流式細胞儀(FACS)細胞基底結合檢測法來評價 mAb7 結合 hu-PD-1、馬來猴 - PD-1、小鼠 -PD-1 及大鼠 -PD-1 的能力，該檢測法包括有經瞬時轉染之 HEK-293T 細胞系、初級人類經活化 T 細胞及經安定轉染 hu-PD-1 或馬來猴 -PD-1 及小鼠 -PD-1 之 Jurkat 細胞。mAb7 以高親和性結合 hu-PD-1 及馬來猴 -PD-1 並對這 2 個物種(這些同型的胺基酸序列是所分析之物種中最相似者)顯示相似 EC₅₀ 值。數據係總結於表 19、20 及 21 中。結合小鼠 -PD-1 僅在生物學上不相關之高濃度 mAb7 達成且可能是由於親和性成熟程序所致。對於大鼠 -PD-1，當使用經轉染細胞或經活化 T 細胞時，沒有偵測到 mAb7 結合(表 19)。

表19：藉由FACS之在初級未經活化(Naïve)及經活化T細胞上之mAb7結合

物種	mAb7 (結合%)		負對照(結合%)	
	未經活化	經活化	未經活化	經活化
人類 T 細胞	9.68 ± 4.82	87.95 ± 1.65	3.49 ± 0.59	4.75 ± 0.59
馬來猴 T 細胞	9.21 ± 0.89	84.35 ± 0.75	5.385 ± 0.38	4.67 ± 0.47
小鼠 T 細胞	4.63 ± 0.62	4.14 ± 1.87	0.93 ± 0.07	0.68 ± 0.10
大鼠 T 細胞	3.82 ± 1.72	0.74 ± 0.05	0.82 ± 0.16	4.36 ± 0.34

表20：mAb7結合自個體人類及馬來猴獲得之表達PD-1之經活化T細胞(EC₅₀)

個體	人類 T 細胞(pM)	馬來猴 T 細胞(pM)
個體 1	45.9	73.61
個體 2	56.11	97.07
平均±sem	51.04 ± 5.07	85.34 ± 11.73

表21：mAb7結合經安定轉染人類PD-1或馬來猴PD-1之Jurkat細胞系(EC₅₀)

mAb (IgG4)	重複數目	Jurkat/人類-PD-1 (pM)	Jurkat/馬來猴-PD-1 (pM)
mAb7	1	62.84	181.3
	2	66.61	263.8
	*平均±sem	64.725 ± 1.89	222.55 ± 41.3
正對照 mAb 1	1	54.52	265.2
	2	57.60	267.2
	*平均±sem	56.01 ± 1.55	266.2 ± 1.0
正對照 mAb 2	1	181.6	380.4
	2	179.6	375.9
	*平均±sem	180.6 ± 1.0	378.15 ± 2.5

於表 21 中，各數目表示於單一個實驗中 mAb7 結合之 EC₅₀ 值。*表明平均±sem。mAb (IgG4)= 具有 IgG4 骨架之單克隆抗體；PD-1=計畫性死亡-1；sem=平均值之標準差。

使用不同細胞基底檢測系統來檢驗 mAb7 結合 hu-PD-1 及馬來猴-PD-1。在所有系統中，發現在二個物種中結合都具有高親和性與專一性。使用表現 hu-PD-1 或馬來猴-PD-1 之經瞬時轉染 HEK-293T 細胞系，mAb7 顯示與如 MFI 所表明者相似之結合模式。在經空載體(載具)轉染之親代細胞系中觀察到最小至沒有結合。

在活化後 72 小時，當 PD-1 表現在細胞表面上且細胞生命力為最佳時，決定 mAb7 結合經活化 hu-初級 T 細胞及馬來猴-初級 T 細胞之 EC₅₀ 值(表 19)。計算各物種的 2

個不同捐獻者的 EC_{50} 值(表 20)。於 hu-經活化 T 細胞及馬來猴-經活化 T 細胞中，都獲得低 EC_{50} 值且發現在這 2 個物種之間 EC_{50} 值接近，分別為 51.04 ± 5.07 pM 及 85.34 ± 11.73 pM(平均 $\pm$ 平均值之標準差[sem])。沒有結合觀察到有負對照抗體高於基線值。

最小地表現 hu-PD-1 受體之 Jurkat T 細胞系係用於產生經安定轉染 hu-PD-1、馬來猴-PD-1 及小鼠-PD-1 細胞系。細胞系經次克隆且選擇表現高水平 hu-PD-1 及馬來猴-PD-1 受體之克隆(每個細胞~400,000 個 PD-1 受體為所獲得的最高表現)。於此系統中，mAb7 顯示對 hu-PD-1 及馬來猴-PD-1 受體之高親和性。這兩個物種之 EC_{50} 值係相似於初級經活化 T 細胞之數據(表 21)；對於 hu-PD-1， $EC_{50} = 64.725 \pm 1.89$ ，而對於馬來猴-PD-1， $EC_{50} = 222.55 \pm 41.3$ 。在 2 個實驗運行之間，表現馬來猴-PD-1 細胞之 EC_{50} 值較人類 EC_{50} 值有變化。這兩個物種之數據係相似於使用任何給定重複之正對照抗體所獲得者(表 21)。在實驗重複之任一者中，負對照抗體不展現高於基線值之結合。在經 PD-1 轉染之 Jurkat 細胞系(表現 hu-PD-1 或馬來猴-PD-1)中，檢驗 mAb7 阻斷 PD-L1 及 PD-L2 配體與 PD-1 受體交互作用之能力。於此檢測法中，細胞係以飽和濃度之經標籤配體培養，隨後以不同濃度之未經標籤 mAb7 培養。如表 22 所顯示，mAb7 以劑量依賴方式抑制 PD-L1 及 PD-L2 配體與 PD-1 受體交互作用。PD-1 之正對照抗體顯示可相比擬之抑制。mAb7 之 IC_{50} 在 hu-PD-1

及馬來猴-PD-1 之間係可相比擬(對於 hu-PD-L1 及 hu-PD-L2 分別為 1880.15 ± 289.85 及 1058 ± 355.4 ; 及對於馬來猴-PD-L1 及馬來猴-PD-L2 分別為 942.9 ± 110.1 及 839 ± 89.5)。IC₅₀ 值的總結係提供於表 22 中。於表 22 中，各數目表示於單一個實驗中 mAb7 之 IC₅₀ 值；*表明平均 $\pm$ sem；‡表明括號中重複數目；mAb IgG4=具有 IgG4 骨架之單克隆抗體；PD-1=計畫性死亡-1；PD-L1=計畫性死亡-配體 1；PD-L2=計畫性死亡-配體 2；sem=平均值之標準差。

表22：使用經安定轉染之Jurkat細胞系系統之用於阻斷人類PD-1或馬來猴-PD-1結合PD-L1及PD-L2的抑制濃度 (IC₅₀；pM)

mAb (IgG4)	人類-PD-1/Jurkat		馬來猴-PD-1/Jurkat	
	PD-1/PD-L1 阻斷	PD-1/PD-L2 阻斷	PD-1/PD-L1 阻斷	PD-1/PD-L2 阻斷
mAb7 (1)‡	590.3	703.2	832.8	749.5
(2)‡	1170	1414	1053	928.5
*平均 $\pm$ sem	880.15 ± 289.85	1058 ± 355.4	942.9 ± 110.1	839 ± 89.5
C1 (1)‡	1022	1226	1286	1316
(2)‡	629	811.1	861.8	1289
*平均 $\pm$ sem	825.5 ± 196.5	1081.55 ± 207.45	1073.9 ± 212.1	1302.5 ± 13.5
C2 (1)‡	1715	1972	1809	1961
(2)‡	1597	1560	1881	2111
*平均 $\pm$ sem	1656 ± 59	1766 ± 206	1845 ± 36	2036 ± 75

mAb7 顯示弱結合補體成分 1，q 次成分(C1q)及 CD64。C1q 及 CD64(用於 IgG4 架構)分別被視為補體依賴細胞毒性(CDC)及 ADCC 之潛在代用品。為了進一步於活體外調查 mAb7 缺乏誘導 T 細胞殺害之能力，係以表現高水平 PD-1 受體之經活化 T 細胞(目標細胞)及表現高水平 Fc γ 受體之 PBMC(效應子細胞)施行 ADCC 檢測法。細胞係

選自 2 個健康捐獻者。在二個捐獻者中，mAb7(於其之原始 IgG4 架構中)都顯示最小 ADCC 活性。缺乏 ADCC 活性係與於 IgG4 架構之抗 PD-1 正對照抗體所展現之活性一致，且這二個都相似於負對照 IgG4 抗體。當抗 PD-1(mAb7 或正對照抗 PD-1 抗體)係於人類 IgG1 架構中評估，該架構已知會誘導較強的 ADCC，則抗 PD-1 係誘導 ADCC 最高 4-倍高於當抗體係於 IgG4 架構中者。當單獨目標細胞(T 細胞)時細胞經化學溶解以獲得最大殺害(根據檢測法計算各捐獻者之殺害係預估為 100%溶解)時，計算最大 LDH 釋放。使用 IgG1 架構之 T 細胞溶解係對應經活化 T 細胞上之 PD-1 水平(捐獻者 1 之 PD-1 表現及溶解係高於捐獻者 2 所具者)，確認了該檢測法的正確性。

這些結果證實抗 PD-1 抗體 mAb7 以高親和性結合細胞上所表現之 hu-PD-1 受體及馬來猴-PD-1 受體，具有 EC50 值在範圍 46 至 270 pM 之間，此係取決於測試系統。mAb7 不會以生理濃度結合表現小鼠-PD-1 之細胞或表現大鼠-PD-1 之細胞。mAb7 阻斷 PD-L1 及 PD-L2 配體與細胞表面 PD-1 受體交互作用；IC50 值範圍從 500 至 1000 pM 顯示其之高拮抗劑功能，係阻斷經由配體結合所誘導之 PD-1 功能。mAb7，於其 IgG4 架構，會觸發最小至沒有抗體所誘導之細胞毒性，其與 IgG4 抗體性質一致。

實施例 12：使用無標籤生物感測器及 ELISA 特徵化抗

PD-1 抗體 mAb7 與 PD-1、FcRn、FcγRs 及 C1Q 之結合。

此實施例說明使用 SPR 生物感測器，mAb7 對於自先關於毒性研究之各式物種純化而來之 PD-1 的活體外結合親和性。也藉由 SPR 測試 mAb7 之 Fc 區接合 FCGR 及 FcRn 之能力，以確認其展現與同型匹配之對照所具者一致之性質。藉由 ELISA，檢測 mAb7 與同型匹配之對照與人類 C1q 之結合。也藉由使用無標籤生物感測器，來測試 mAb7 阻斷 PD-1 與其配體 PD-L1 及 PD-L2 之結合交互作用的能力，以支持其之作動機制。

除非另行指明，所有動力學及親和性實驗係在 25°C 之離酸鹽緩衝鹽水(PBS) + 0.01% Tween 20 運行緩衝液中進行。在配備有 NLC(經中性軟白素塗覆(neutravidin-coated))晶片之 SPR ProteOn XPR36 生物感測器(BioRad, Hercules, CA)上施行動力學研究。ProteOn 也經由以 mAb7 滴定作為參考標準，而用於決定 hu-PD-1 及馬來猴-PD-1 分析物之活性濃度品。本文中所用之蛋白分析物之濃度係指「活性」或「標稱」值。人類 Fc 伽馬受體(hu-FCGR) I、人類新生兒 Fc 受體(hu-FcRn)(批次號 R3091)及馬來猴-新生兒 Fc 受體(馬來猴-FcRn)(批次號 JCR)之活性濃度係使用免校正濃度分析(CFCA)實驗在配備有 CM5 感應器晶片之 Biacore T200(GE Life Sciences, Marlborough, MA)上決定。所有其他分析物係以它們標稱濃度使用，如藉由以適當消光係數在 A280 nm 吸光度所決定者。使用配備有自動取樣機之 KinExA 設備 3000 或

3200(Sapidyne)，在室溫(約 23°C)決定溶液親和性。根據製造商之步驟以 DyLight 650 (Pierce Biotechnology, Grand Island, NY.)標籤二次偵測抗體。在等莫耳濃度比之鏈結子：IgG 下，根據製造商之指導使用 EZ-Link™ N-羥基琥珀酰亞胺-LC-LC-生物素(Pierce Biotechnology Grand Island, NY)施行免疫球蛋白 G(IgG)之生物素化。除非另行指明，使用包含 Pierce IgG 洗脫緩衝液(pH 2.8)/4 M 氯化鈉(NaCl)之 2:1 v/v 混合物之「皮爾斯/鹽」雞尾酒再生不動 IgG。

使用 KinExA 方法於 PBS + 0.01% Tween 20 之運行緩衝液及 PBS + 0.01% Tween 20 + 1 g/l 胎牛血清白蛋白(BSA)樣品緩衝液中，決定 hu-PD-1 及馬來猴-PD-1(二者都是經 His 標誌之單體)與 mAb7 之溶液中結合交互作用。採用兩種不同檢測格式。於第一檢測格式，將 mAb7 滴定到固定濃度之 hu-PD-1(標稱 200、400 或 4000 pM)且允許樣品達到平衡。游離 hu-PD-1 被捕將捉到經抗 hu-PD-1 單克隆抗體 mAb7(於非優良實驗室操作規範(GLP)條件下於公司內製備[批次號 R5432])塗覆(藉由吸附)之聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)珠上。接著以 0.5 µg/mL 經 DyLight 標籤之抗 His mAb (R&D Systems, Minneapolis, MN)偵測珠所捕捉之 hu-PD-1。於第二檢測格式中，將 hu-PD-1 或馬來猴-PD-1 滴定到固定濃度之 mAb7(20、50、100 或 500 pM)，且允許這些混合物達到平衡。游離 mAb7 被捕將捉到已吸附有專一性結合游離 mAb7 但不結合經 PD-1-飽和之

mAb7 的阻斷劑抗遺傳型小鼠抗 mAb7 mAb 1699.1 H6 之 PMMA 珠上。接著以 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 經 Dylight 標籤之山羊抗 hu-IgG (H + L) (Jackson ImmunoResearch Inc, West Grove, PA)偵測珠所捕捉之 mAb7。所有滴定經製備為 12-成員 2-倍稀釋系列變化頂部標稱結合位點濃度為落在 1 nM 至 10 nM 之範圍內，取決於實驗。允許樣品最高 48 小時達成平衡且根據實驗調整注射體積，以給出落在 0.7 V 至 1.9 V 範圍內之總信號。所有樣品以二重複循環注射。使用分析軟體中之 N-曲線工具全局地分析來自每個交互作用有最高 4 個獨立實驗之數據且擬合至簡單生物分子模型，其中 mAb7 的濃度係用於作為參考濃度。全局分析報告 K_D 及 PD-1 之表觀活性結合位點濃度的最佳擬合值(及 95%信賴區間)。

當使用 KinExA 檢測法研究時，溶液中 hu-PD-及馬來猴-PD-1 針對 mAb7 之結合親和性彼此不可區分；在 23°C 決定之表觀平衡常數(K_D)值對於 hu-PD-1 為 17 pM 或 23 pM(當於相反檢測方向性研究)及對於馬來猴-PD-1 為 28 pM；這三個值於統計學上係彼此不可區分。這些值藉由表面電漿共振於(SPR)生物檢測器測量扼要重述，SPR 產出下列 K_D 值：在 25°C 對於 hu-PD-1 為 42 pM 及對於馬來猴-PD-1 為 69 pM，及在 37°C 對於 hu-PD-1 為 109 pM 及對於馬來猴-PD-1 為 115 pM。當於 0.5 μM 以 SPR 動力學分析測試時，mAb7 以 K_D 值 0.9 μM 結合小鼠-PD-1 且沒有偵測到對大鼠-PD-1 之結合。無標籤生物感測器係用

於證明 mAb7 阻斷 hu-PD-1 結合其天然配體，人類計畫性死亡-配體 1(hu-PD-L1)及人類計畫性死亡-配體 2(hu-PD-L2)。SPR 進一步用於確認 mAb7 以與同型匹配之對照相同之動力學及專一性結合一範圍來自人類及馬來猴物種二者之可結晶片段(Fc)伽馬受體(FCGR)及新生兒 Fc 受體(FcRn)。藉由 ELISA，mAb7 顯示與補體成分 1，q 次成分(C1q)之可忽略結合，與同型匹配之對照之行為一致。整體來說，mAb7 以高結合親和性及專一性結合 hu-PD-1 及馬來猴-PD-1 二者，但具有對小鼠-PD-1 之低親和性及對大鼠-PD-1 之可忽略結合。

表 23 總結 mAb7 與來自各式物種之 PD-1 之交互作用分析所獲得之動力學及親和性數據。mAb7 以統計上不可區分之表觀親和性結合 hu-PD-1 及馬來猴-PD-1，當使用 KinExA 方法在 23°C 測量這些交互作用於溶液中；明顯 K_D 值對於 hu-PD-1 為 17 pM 及 23 pM(當於兩個相反檢測方向性中研究)及對於馬來猴-PD-1 為 28 pM。KinExA 值藉由以 SPR 施行之動力學測量而印證，SPR 給出在 25°C 之表觀 K_D 值對於 hu-PD-1 為 42 ± 11 pM (n=10)及對於馬來猴-PD-1 為 69 ± 24 pM (n=10)。在 37°C SPR 測量顯示 2 倍較弱於在 25°C 所具者之親和性；在 37°C 決定之 K_D 值對於 hu-PD-1 為 109 ± 8 pM (n=15)及對於馬來猴-PD-1 為 115 ± 15 pM (n=8)。當以 SPR 在 25°C 測量時，mAb7 以表觀 K_D 為 0.9 ± 0.1 μ M (n=5)結合小鼠 PD-1，對應於 20,000-倍較弱於對 hu-PD-1 所具者之親和性。雖然大鼠-

PD-1 蛋白已經經由它們明確結合正對照、小鼠-PD-L1 及小鼠-PD-L2 而確認為活性，當以 0.5 μ M 藉由 SPR 在 25°C 測量時，沒有偵測到對於大鼠 PD-1 之結合。KinExA 測量之 K_D 值表示 N 個獨立實驗之全局分析的最佳擬合及 95%信賴區間，而 SPR 測量之 K_D 值表示在 ProteOn NLC 感應晶片上 n 個獨立實驗之平均 $\pm$ 標準差。於表 23 中，h 或 hu=人類； k_a =結合速率常數； k_d =解離速率常數； K_D =平衡解離常數；KinExA=動力學排除檢測法；mAb=單克隆抗體；Ms=每秒莫耳濃度；n=數目；ND=未決定；PD-1=計畫性死亡-1；s=秒；SPR=表面電漿共振；Temp=溫度；*mAb 之與 hu-PD-17 的交互作用係在如 Bee et al, 2012 所述之兩個相反檢測方向性中進行。

表23：PF 06801591與人類PD-1、馬來猴PD-1及小鼠PD-1交互作用所獲得之動力學及親和性常數的總結

Temp (°C)	方法	PD-1	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)	n
23	KinExA	人類 (滴定 mAb)*	ND	ND	23 (28-18)	3
23	KinExA	人類 (滴定 PD-1)*	ND	ND	17 (24-12)	3
25	SPR	人類	$(4.2 \pm 0.6) \times 10^5$	$(1.8 \pm 0.4) \times 10^{-5}$	42 $\pm$ 11	10
37	SPR	人類	$(8.4 \pm 2.0) \times 10^5$	$(8.5 \pm 1.2) \times 10^{-5}$	109 $\pm$ 28	15
23	KinExA	馬來猴 (滴定 PD-1)	ND	ND	28 (34-23)	4
25	SPR	馬來猴	$(4.3 \pm 1.4) \times 10^5$	$(2.9 \pm 0.4) \times 10^{-5}$	69 $\pm$ 24	10
37	SPR	馬來猴	$(9.8 \pm 1.1) \times 10^5$	$(1.12 \pm 0.07) \times 10^{-4}$	115 $\pm$ 15	8
25	SPR	小鼠	$(6.0 \pm 0.5) \times 10^3$	$(5.2 \pm 0.4) \times 10^{-3}$	$(9.0 \pm 1.0) \times 10^5$	5

表 24 顯示 mAb7 在一範圍的 Fc 受體，包括來自人類及馬來猴之 FCGR 及 FcRn 的結合動力學及專一性係扼要

重述預期於同型匹配之同型對照 hu-IgG4 的那些值。舉例來說，與同型對照之 $177 \pm 71 \text{ pM}$ ($n=4$)相比，mAb7 以在 25°C 為 $146 \pm 42 \text{ pM}$ ($n=14$)之表觀 K_D 值(平均 $\pm$ 標準差)結合 hu-FCGRI。所有其他交互作用係以弱親和性(K_D 值 $\sim 1 \text{ }\mu\text{M}$ 或更高)為特徵。對於 FCGR 以 pH 7.4 及對於 FcRn 以 pH 5.9 在 ProteOn NLC 晶片上施行動力學分析。於表 24 中，CD=分化簇；cy=馬來猴；FCGR=Fc 伽馬受體；FcRn=新生兒 Fc 受體；hu=人類； k_a =結合速率常數； k_d =解離速率常數； K_D =平衡解離常數；=每秒莫耳濃度； n =數目；s=秒。

表24

分析物	mAb7	同型匹配之對照
hu-FCGRI (hu-CD64)	$k_a=(9.1 \pm 1.7) \times 10^6 \text{ (1/Ms)}$ $k_d=(1.3 \pm 0.3) \times 10^{-3} \text{ (1/s)}$ $K_D=146 \pm 42 \text{ pM (n=14)}$	$k_a=(1.0 \pm 0.3) \times 10^6 \text{ (1/Ms)}$ $k_d=(1.8 \pm 0.4) \times 10^{-3} \text{ (1/s)}$ $K_D=177 \pm 71 \text{ pM (n=4)}$
hu-FCGRIIa (hu-CD32a) 131H	3.6 μM	3.9 μM
hu-FCGRIIa (hu-CD32a) 131R	0.8 μM	0.4 μM
hu-FCGRIIb (hu-CD32b)	1.1 μM	0.7 μM
hu-FCGRIIIa (hu-CD16a) 158F	在 5 μM 幾乎沒有結合	在 5 μM 幾乎沒有結合
hu-FCGRIIIa (hu-CD16a) 158V	在 1 μM 幾乎沒有結合	在 1 μM 幾乎沒有結合
hu-FcRn	0.93 μM	$0.82 \pm 0.06 \text{ }\mu\text{M (n=3)}$
馬來猴-FCGRIIa	2.4 μM	$2.6 \pm 0.5 \text{ }\mu\text{M (n=3)}$
馬來猴-FCGRIIIa 42R	2.7 μM	$3.2 \pm 0.1 \text{ }\mu\text{M (n=3)}$
馬來猴-FCGRIIIa 42S	1.6 μM	$1.9 \pm 0.2 \text{ }\mu\text{M (n=3)}$
馬來猴-FcRn	0.61 μM	$0.57 \pm 0.04 \text{ }\mu\text{M (n=3)}$

此外，藉由 ELISAmAb7 幾乎沒有結合 C1q，此與同型匹配之對照 hu-IgG4 之行為一致(數據未顯示)。其之結合甚至低於人類免疫球蛋白 G2(hu-IgG2)之低結合。相反地，正對照 hu-IgG1 及人類免疫球蛋白 G3(hu-IgG3)給出高結和信號。使用 SPR 及 Octet 生物感測器二者及不同檢測格式(預先混合及經典三明治檢測格式)，證實 mAb7 會

阻斷 hu-PD-1 結合其天然配體 hu-PD-L1 與 hu-PD-L2。

這些數據證實 mAb7 以高親和性與高專一性結合 hu-PD-1。當使用 KinExA 方法在 23°C 於溶液中測量時，mAb7 以統計上不可區分之表觀 K_D 值結合 hu-PD-1 及馬來猴-PD-1，對於 hu-PD-1，表觀 K_D 值為 17 pM 及 23 pM(當於交替檢測方向性研究時)而對於馬來猴-PD-1，表觀 K_D 值為 28 pM。mAb7 顯示對小鼠-PD-1 有 20,000-倍較弱之親和性(以 SPR 在 25°C 測量之表觀 K_D 為 0.9 μ M)，且當以 0.5 μ M 測試時，對於大鼠 PD-1 沒有可偵測之結合。當以 SPR 在 25°C 測量時，mAb7 及同型匹配之對照 hu-IgG4 當針對一組 hu-Fc 受體及馬來猴-Fc 受體測試結合時，具有相似動力學及專一性。當以 ELISA 測試時，mAb7 以可忽略信號結合 hu-C1q，這與 hu-IgG4 同型對照一致，且其之結合甚至更低於 hu-IgG2 所具者。已證明 mAb7 阻斷 hu-PD-1 結合其天然配體 hu-PD-L1 與 hu-PD-L2。

實施例 13：以抗 PD-1 抗體與抗 OX40 抗體組合治療

此實施例說明於結腸癌小鼠模型中以抗 PD-1 抗體組合上抗 OX40 抗體治療之效應。

對於此研究，以 5×10^5 個細胞/小鼠之 MC-38 小鼠結腸腫瘤(等級 III 腺瘤)皮下接種 C57B6/J 母小鼠(6 至 8 週齡)。在第 10 天，隨機化小鼠並開始以 10 mg/kg 抗小鼠-PD-1 及 1 mg/kg 抗小鼠-OX-40 處理。處理係在第 10、12 及 14 天 i.p.投予抗 OX40 抗體(1 mg/kg)；及在第 10、

12、14、17、23 及 25 天 i.p. 投予抗 PD-1 抗體 (10 mg/kg)。腫瘤體積每週測量 2 次。在第 34 天結束此研究。使用 2 因子 Anova 施行統計分析以在單一個時點比較各兩群組之間的均線。結果總結於表 25 中。於表 25 中，值表明每組 8 隻小鼠的日平均腫瘤體積 $\pm$ (平均值之標準差)sem；N=每群組數目，mm³=毫米立方。同型對照包括各抗體之適當同型，對於抗 OX40 係 1 mg/kg 而對於抗 PD-1 係 10 mg/kg。

表25.在以抗PD-1抗體及抗OX40抗體處理後於攜有MC38小鼠中的腫瘤體積

處理群組	腫瘤體積(mm ³)				N	無腫瘤小鼠之%
	第 10 天	第 24 天	第 27 天	第 34 天		
同型對照	67 $\pm$ 7.9	832 $\pm$ 139.0	1408 $\pm$ 252.4	1866 $\pm$ 279.0	8	0%
抗 PD-1	67 $\pm$ 8.0	312 $\pm$ 63.2	540 $\pm$ 125.0	939 $\pm$ 169.0	8	0%
抗 OX40	67 $\pm$ 7.5	302 $\pm$ 64.1	370 $\pm$ 77.2	720 $\pm$ 145.0	8	0%
抗 PD-1 +抗 OX40	67 $\pm$ 7.4	190 $\pm$ 38.0	255 $\pm$ 51.2	423.0 $\pm$ 90.0	8	12.5%

在第 24 天開始，當與對照群組相比，所有以抗 PD-1 抗體及/或抗 OX-40 抗體處理之群組顯示顯著較小腫瘤體積(表 25)。在第 24 天，當與對照群組相比，以組合(抗 PD-1 抗體加上抗 OX40 抗體)處理之群組顯示顯著性為 $p \leq 0.0001$ ，而當與對照群組相比，各單一抗體處理顯示顯著性係 $p \leq 0.01$ 。第 34 天，當與對照群組相比，所有經處理群組顯示顯著性係 $p \leq 0.0001$ 。第 34 天，當與以單獨抗 PD-1 抗體處理之群組或以單獨 OX-40 抗體處理之群組相比，以組合處理之群組顯示差異。這些結果證實，當與以單獨抗 PD-1 抗體或以單獨抗 OX40 抗體治療相比，以抗

PD-1 抗體及抗 OX40 抗體二者治療，抗體減緩腫瘤生長。

實施例 14：疫苗對經活化 T 細胞上 PD-1 表現的效應

此實施例說明，在抗 CTLA4 單克隆抗體曲美目單抗(檢查點抑制劑)的存在下，表現人類前列腺專一性膜抗原(PSMA)之 DNA 基底疫苗對 $CD3^+CD4$ 細胞上 PD-1 表現之效應(表 26)及對 $CD3^+CD8T$ 細胞上 PD-1 表現之效應(表 27)。

活體內研究程序。此研究中使用三個中國石蟹獼猴(*Chinese cynomolgus macaques*)群組($n=8$ /群組)。群組 1 與群組 2 中之動物係肌肉內注射含有編碼人類 PSMA 胺基酸 15 至 750 之 AdC68 腺病毒載體(SEQ ID NO: 44)的疫苗(以總劑量為 2×10^{11} VP)，而群組 3 中動物係沒有接受疫苗接種。AdC68 腺病毒載體的完整序列提供在 SEQ ID NO: 44。此外，疫苗接種後立即藉由皮下注射以 50 mg 抗 CTLA4 單克隆抗體曲美目單抗處理群組 2 中之動物。收集來自疫苗接種之前(Pre)與之後在第 9、15 及 29 天各動物的全血樣品並藉由流式細胞儀分析表現 PD-1 之 $CD3^+CD4$ 及 $CD3^+CD8T$ 細胞的頻率。

CD3+ CD4 及 CD8 T 細胞表現型。在新鮮收集之全血上，藉由施行多色流式細胞儀分析找出白血球族群表現型。簡言之，在室溫以含有 CD3-V500(克隆 SP34-2)、CD4-BV605(克隆 L200)、CD8-APC.H7(克隆 SK1)、PD1-AF488(克隆 EH12.2H7, Biolegend)、PDL1-BV421(克隆

MIH1)、Lag3-PE.Cy7(克隆 11E3, Novus)、CD69-PE.德州紅(克隆 TP1.553, Beckman Coulter)、TIM3-APC(克隆 344823, R&D Systems)、CD20-PE.Cy5.5(克隆 2H7, eBioscience)、CD14-AF700(克隆 M5E2)、CD16-PE.Cy5(克隆 3G8)、CD56-PerCP.Cy5.5(克隆 B159)及CD11c-PE(克隆 SHCL3)之抗體雞尾酒將全血染色 20 分鐘。除非另行表明,所有抗體係購自 BD。樣品係以 RBC 溶解緩衝液(BD)處理、清洗並混合 50ml 液體計數珠(BD)且在 LSR Fortessa (BD)上取得數據。使用 FlowJo (Tree Star Inc, USA)分析數據。

於表 26 中呈現 CD3⁺CD4 T 細胞上 PD-1 表現的結果且於表 27 中呈現 CD3⁺CD8 T 細胞上 PD-1 表現的結果。在疫苗接種後第 9 天觀察到誘導 PD-1 且其在疫苗接種後第 29 天分解至未經活化動物中所見之水平(群組 3)。這些結果表明,於非人類靈長動物中,該與抗 CTLA4 抗體一起給予之疫苗載體可引發 CD3⁺ CD4 及 CD8 T 細胞上之 PD-1 表現。

表26.石蟹獼猴中CD3⁺CD4 T細胞上PD-1表現之動力學

時點	群組	PD-1 ⁺ CD3 ⁺ CD4 T 細胞佔總 CD3 ⁺ CD4 T 細胞之個別%							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Pre	1	16.0	7.473	8.275	12.441	12.935	12.481	10.93	12.649
	2	9.757	11.383	7.795	5.943	13.279	24.959	12.112	10.375
	3	11.577	7.577	9.943					
第 9 天	1	18.124	11.72	11.977	18.861	20.657	10.623	11.766	12.792
	2	32.07	29.001	38.593	27.516	25.962	34.568	27.435	28.378
	3	18.608	10.101	13.205					
第 15 天	1	14.87	10.302	8.27	15.742	13.609	8.763	10.407	9.82
	2	16.421	14.578	18.138	15.667	20.927	27.778	16.612	17.583
	3	16.878	10.607	10.878					
第 29 天	1	14.819	9.39	8.412	14.051	14.436	9.576	10.524	11.116
	2	11.594	10.209	12.971	8.293	20.989	26.388	14.126	13.868
	3	14.182	9.098	14.138					

表27.石蟹獼猴中CD3⁺CD8 T細胞上PD-1表現之動力學

時點	群組	PD-1 ⁺ CD3 ⁺ CD8 T細胞細胞佔總 CD3 ⁺ CD4 T細胞之個別%							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Pre	1	10.8	4.9	10.1	5.7	11.9	13.5	7.1	9.6
	2	5.3	19.4	5.0	20.2	16.9	29.8	7.7	8.7
	3	8.8	6.9	4.3					
第 9 天	1	5.3	7.0	12.3	8.1	16.1	13.2	5.8	11.3
	2	15.6	22.5	7.4	29.5	20.7	26.2	11.4	10.2
	3	11.5	5.8	5.7					
第 15 天	1	7.4	6.9	11.7	8.2	16.2	15.4	6.8	14.0
	2	7.6	21.6	10.8	21.8	27.1	25.7	14.2	10.5
	3	12.3	7.4	6.4					
第 29 天	1	9.4	7.5	15.3	9.8	14.7	16.7	5.9	14.7
	2	8.5	20.3	8.0	22.5	26.0	22.4	9.1	9.9
	3	11.6	8.6	8.5					

實施例 15.抗 PD-1 抗體在表現人類 PSMA 之疫苗所誘導抗原專一性 T 細胞回應上的效應

此實施例說明，於石蟹獼猴中之抗 PD1 抗體在含有表達人類 PSMA 之 AdC68 腺病毒載體之疫苗所誘導 IFN γ CD4 及 CD8 T 細胞回應上的效應。

細胞內細胞介素染色(ICS)檢測法。簡言之，來自個別動物之 PBMC 係與來自跨越分別之抗原的整個序列重疊 11 個胺基酸的 15 聚體(15mer)肽庫之肽池共培養，各肽係在 2 μ g/ml。在 37 $^{\circ}$ C，5% CO $_2$ 培養該等盤~16 小時。接著細胞經染色用以偵測 CD8⁺T 細胞之細胞內 IFN γ 表現，並固定之。在流式細胞儀上取得細胞。回應頻率經標準化成每百萬個 CD8⁺T 細胞之 IFN γ CD8⁺T 細胞數目，且減掉不含有肽之二甲基亞砷對照孔中之回應。表中的抗原專一性回應表示對於對應抗原專一性肽池之回應的和。

活體內研究程序。簡言之，五個中國石蟹獼猴群組 (n=8/群組)係以總劑量 2e11 VP 肌肉內注射含有編碼人類

PSMA(hPSMA)胺基酸 15 至 750 之 AdC68 腺病毒載體 (SEQ ID NO：44)的疫苗。於群組 2、4 及 5 中，疫苗接種後立即藉由皮下注射 50 mg 抗 CTLA4 單克隆抗體曲美目單抗及/或皮下(群組 3 及 4)或靜脈內(群組 5)給予 10 mg/kg 抗 PD-1 單克隆抗體 mAb7。自各動物分離 PBMC 並使其經歷 ICCS 檢測法以測量人類 PSMA 專一性 IFN CD4 T 細胞回應(第 9 天或第 29 天)或 CD8 T 細胞回應(第 29 天)。全長人類 PSAM 之胺基酸序列係提供在 SEQ ID NO：42。表現人類 PSMA 胺基酸 15 至 750 之 AdC68 腺病毒載體的序列提供在 SEQ ID NO：44。

結果。於表 29、30 及 37 中呈現結果。數據證實抗 CTLA4 及抗 PD-1 二者個別地都可增加該疫苗所誘導 IFN γ CD4 及 CD8 T 細胞回應之頻率。

表 28.於 ELISpot 及 ICCS 檢測法中用以誘導抗原專一性 IFN γ T 細胞回應之肽池的肽序列資訊。

抗原	肽庫池
人類 PSMA	185 個順序 15mer 肽，重疊 11 個胺基酸，涵蓋整個全長 hPSMA 蛋白序列(胺基酸序列：1 至 750)，呈三個個別池檢測。

表29.第9天該疫苗所誘導之IFN γ CD8 T細胞回應

群組	檢查點抑制劑	MAB7 路徑	個別 hPSMA 專一性 IFN γ CD8 T細胞效價 (IFN γ ⁺ CD8細胞/1e6 個 CD8 T細胞，經背景調整)								Geo 平均 數
			1	2	3	4	5	6	7	8	
1	無	n/a	1072	1	1453	6722	1	1	1055	503	92.91
2	曲美目單抗	n/a	7278	356	423	6009	954	1586 2	935	2511	1977
3	mAb7	SC	2077	6537	3138	449	1302	4063	769	487	1575
4	曲美目單抗 mAb7	SC	222	667	1199	6879	933	1959	4034 9	6901	2235
5	曲美目單抗 mAb7	IV	1037	1735	2371	489	7435	1	2094 7	4613	1052

表30.第9天該疫苗所誘導之IFN γ CD4 T細胞回應

群組	檢查點抑制劑	mAB7 路徑	個別 hPSMA 專一性 IFN γ CD4 T細胞效價 (IFN γ ⁺ CD4細胞/1e6 個 CD4 T細胞，經背景調整)								Geo 平均 數
			1	2	3	4	5	6	7	8	
1	無	n/a	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	曲美目單抗	n/a	665	259	1	1191 4	271	326	1	1747	154
3	mAb7	SC	174	669	457	193	194	1	192	159	125
4	曲美目單抗 + mAb7	SC	1955	1	435	1764	736	1307	1852	471	401
5	曲美目單抗 + mAb7	IV	858	1567	1398	1102	163	705	4938	1029	1024

表31.第29天該疫苗所誘導之IFN γ CD4 T細胞回應

群組	檢查點抑制劑	mAB7 路徑	個別 hPSMA 專一性 IFN γ CD4 T細胞效價 (IFN γ ⁺ CD4細胞/1e6 個 CD4 T細胞，經背景調整)								Geo 平均 數
			1	2	3	4	5	6	7	8	
1	無	n/a	1	506	246	143	504	1	1	1	24
2	曲美目單抗	n/a	175	63	1021	2845	867	662	265	372	230
3	mAb7	SC	129	1	145	1	230	1	97	1	12
4	曲美目單抗 + mAb7	SC	816	107	527	315	168	1084	1131	135	377
5	曲美目單抗 + mAb7	IV	332	1496	559	360	221	361	1164	248	468

實施例 16. 抗 PD-1 抗體在共表現人類前列腺專一性膜抗原 (PSMA)、前列腺幹細胞抗原 (PSCA) 及前列腺專一性抗原 (PSA) 之疫苗所誘導 IFN γ T 細胞回應上的效應

活體內研究程序。簡言之，此研究中使用三個中國石蟹獼猴群組 (n=4/群組)。群組 1 中之動物係肌肉內注射載

具。群組 2 中之動物係皮下投予 20 mg/kg 抗 PD-1 單克隆抗體 mAb7。群組 3 中動物係以總劑量為 6×10^{11} VP 之含有共表現三種人類前列腺相關抗原(PSMA、PSCA 及 PSA)之 AdC68 腺病毒載體(載體 AdC68W-734)的疫苗處理，隨後立即藉由皮下注射 150 mg 抗 CTLA4 單克隆抗體曲美日單抗及 20 mg/kg 抗 PD-1 單克隆抗體 mAb7。注射後 28 天，動物係以載具(群組 1)、抗 PD-1 單克隆抗體 mAb7 皮下 20 mg/kg(群組 2)或藉由電穿孔遞送表現三種人類前列腺癌抗原(PSMA、PSCA 及 PSA)之 DNA 質體(質體 458)隨後立即藉由皮下注射 150 mg 抗 CTLA4 及 20 mg/kg 抗 PD-1 單克隆抗體(群組 3)補強免疫。先發首次注射的四十三天後，自各動物分離 PBMC 並使其經歷 ELISPOT 檢測法，以測量 PSMA、PSCA 及 PSA 專一性之 $\text{IFN}\gamma$ T 細胞回應。

用於此研究之載體 AdC68W-734 的完整序列係提供於本揭露之 SEQ ID NO：45 及國際申請公開號 WO2015/063647 之 SEQ ID NO：63。載體 AdC68W-734 之建構體也描述於 WO2015/063647，其之揭露係藉由參考而納入本文中。AdC68W-734 載體及質體 458 各包含(1)編碼具有示於 SEQ ID NO：42 之人類 PSMA 之胺基酸 15 至 750 的核酸序列，(2)編碼具有示於 SEQ ID NO：47 之人類 PSA 之胺基酸 25 至 261 的核酸序列，及(3)編碼示於 SEQ ID NO：48 之全長人類 PSCA 的核酸序列。

$\text{IFN}\gamma$ ELISPOT 檢測法。簡言之，來自個別動物之末梢血液單核細胞(PBMC)係與來自跨越分別之抗原的整個

序列重疊 11 個胺基酸的 15mer 肽庫之肽池共培養，二重複，各肽係在 2 $\mu\text{g/ml}$ 。在 37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 培養該等盤~16 小時，接著根據製造商之指導清洗並顯影。以 CTL 讀取器計數形成 $\text{IFN}\gamma$ 斑點之細胞(SFC)的數目。計算二重複的平均並減掉不含有肽之負對照孔之回應。接著將 SFC 計數標準化以描述每 1e6 個 PBMC 之回應。表中的抗原專一性回應表示對於對應抗原專一性肽池之回應的和。

結果。於表 33 中呈現之 ELISpot 結果證實，接受該疫苗與皮下抗 PD-1 抗體及抗 CTLA4 抗體之動物展現對於至少一種前列腺癌抗原之 $\text{IFN}\gamma$ T 細胞回應之強烈增加，而在載具群組(群組 1)中或單獨投予抗 PD-1 抗體之群組(群組 2)中，對這些抗原沒有 $\text{IFN}\gamma$ T 細胞回應。

表 32.於 ELISpot 及 ICCS 檢測法中用以誘導抗原專一性 $\text{IFN}\gamma$ T 細胞回應之肽池的肽序列資訊。

抗原	肽庫池
PSMA	185 個順序 15mer 肽，重疊 11 個胺基酸，涵蓋整個全長 PSMA 蛋白序列(胺基酸序列：1 至 750)，呈三個個別池檢測。
PSCA	28 個順序 15mer 肽，重疊 11 個胺基酸，涵蓋整個全長 PSCA 蛋白序列(胺基酸序列：1 至 123)，呈單一個個別池檢測。
PSA	62 個順序 15mer 肽，重疊 11 個胺基酸，涵蓋整個全長 PSA 蛋白序列(胺基酸序列：1 至 246)，呈單一個個別池檢測。

表33.石蟹獼猴中抗PD-1抗體在疫苗所誘導抗原專一性IFN γ ELISpot T細胞回應上之效應。

群組	疫苗	檢查點抑制劑	刺激抗原	個別 IFN γ ELISpot T 細胞效價 (SFC/1e6 個 PBMC，經背景調整)			
1	n/a	n/a	PSMA	2	2	2	4
2	n/a	mAb7		10	1	7	3
3	+	曲美目單抗 + mAb7		1360	1263	2441	3224
1	n/a	n/a	PSCA	0	0	1	1
2	n/a	mAb7		0	0	4	4
3	+	曲美目單抗 + mAb7		91	18	488	416
1	n/a	n/a	PSA	0	0	5	2
2	n/a	mAb7		0	0	3	0
3	+	曲美目單抗 + mAb7		404	[1267]	527	512
在中括號中的值表示下列回應：其中檢測法的至少一個重複高於該檢測法定量上限值 (1333 個 SFC/1e6 個 PBMC)。為了計算幾何平均數，值為 0 之 SFC/1e6 個 PBMC 被 轉換為 1。							

雖然所揭示之教示已藉由參考各式應用、方法、套組及組成物描述，應了解可進行各式改變及修飾而不背離本文之教示及以下所請發明。前述之實施例係為了更佳地說明本發明之教示而提供，並非意圖限制本發明之範疇。雖然本教示已就這些例示性實施態樣描述，該領域具有通常知識者將輕易了解可能針對這些例示性實施態樣進行許多變化及修飾而無須過度實驗。所有此等變化及修飾皆包含在目前教示之範疇內

所有於本文中引述之文獻，包括專利、專利申請案、論文、教科書及類似物，及於彼等中所引述之文獻除非不是業已納入本發明，係藉由參考其整體內容而納入本文中。若一或多篇該等納入文獻及相似材料與本申請案有不同或衝突之處，包括但不限於經定義之用語、用語之使

用、所描述之技術或類似物，以本申請案為主。

前面的描述及實施例係詳細描述本發明之某些特定實施態樣，並描述發明人所考慮之最佳模式。然而應了解的是，不論前面說明得多詳細，本發明可以許多方式實施，且應根據該隨附之申請專利範圍及彼等之任何均等物被解讀。

序列表

<110> 禮納特神經系統科學公司 (RINAT NEUROSCIENCE CORP.)

<120> 抗PD-1抗體類和使用彼等之方法

<140> TW 104140158

<141> 2015-12-01

<150> US 62/089,658

<151> 2014-12-09

<150> US 62/242,750

<151> 2015-10-16

<150> US 62/251,973

<151> 2015-11-06

<160> 51

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 288

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

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> 2
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體序列

<400> 2

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Trp Asp Ser

20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Thr Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

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

Lys

<210> 3
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體序列

<400> 3

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

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

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

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

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

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

859095

Ala Arg Leu Leu Thr Gly Thr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100105110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 4
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗体序列

<400> 4

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

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

Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
354045

Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Ser Leu Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
505560

Lys Asn Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65707580

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
859095

Ala Arg Leu Ser Thr Gly Thr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100105110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 5
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體序列

<400> 5

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

<210> 6
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體序列

<400> 6

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗体序列

<400> 7

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Trp Asp Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Thr Ser Tyr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

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

Lys

<210> 8
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體序列

<400> 8

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

● Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Trp Asp Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Thr Ser Tyr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

● Asp Tyr Phe Tyr Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 9
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體序列

<400> 9

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

Trp Thr Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體序列

<400> 12

Gln Asn Asp Tyr Phe Tyr Pro Leu Thr
1 5

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

<220>
<223> 人源化抗體序列

<400> 13

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn
1 5 10

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體序列

<400> 14

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
1 5

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體序列

<400> 15

Ser Tyr Trp Ile Asn

1 5

<210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體序列

<400> 16

Tyr Pro Gly Ser Ser Leu
1 5

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

<220>
<223> 人源化抗體序列

<400> 17

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

Asn

<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體序列

<400> 18

Leu Leu Thr Gly Thr Phe Ala Tyr
1 5

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成鏈結子

<400> 19

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體序列

<400> 20

Trp Thr Ser Tyr Arg Glu Ser
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體序列

<400> 21

Gln Asn Asp Tyr Phe Tyr Pro His Thr
1 5

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

<220>
<223> 人源化抗體序列

<400> 22

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Trp Asp Ser Thr Asn Gln Lys Asn Phe Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 23
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體序列

<400> 23

Leu Ser Thr Gly Thr Phe Ala Tyr
1 5

<210> 24
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體序列

<400> 24

Tyr Pro Gly Ser Ser Ile
1 5

<210> 25
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體序列

<400> 25

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

Asn

<210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體序列

<400> 26

Leu Thr Thr Gly Thr Phe Ala Tyr
1 5

<210> 27
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體序列

<400> 27

Trp Pro Gly Ser Ser Leu
1 5

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體序列

<400> 28

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

Asn

<210> 29
<211> 444
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體序列

<400> 29

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

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

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

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

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

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

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

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

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

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

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

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

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

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

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

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

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

<220>
<223> 人源化抗體序列

<400> 30

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體序列

<400> 31

Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗體序列

<220>

<221> 變體

<222> (7)..(7)

<223> Xaa為Trp或Leu

<220>

<221> 變體

<222> (10)..(10)

<223> Xaa為Gly或Thr

<400> 32

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Xaa Asp Ser Xaa Asn Gln Lys Asn Phe Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗體序列

<220>

<221> 變體

<222> (4)..(4)

<223> Xaa為Thr或Tyr

<400> 33

Trp Thr Ser Xaa Arg Glu Ser
1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體序列

<220>
<221> 變體
<222> (5)..(5)
<223> Xaa為Phe或Ser

<220>
<221> 變體
<222> (8)..(8)
<223> Xaa為Leu或His

<400> 34

● Gln Asn Asp Tyr Xaa Tyr Pro Xaa Thr
1 5

<210> 35
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體序列

<400> 35

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

● Asn

<210> 36
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體序列

<220>
<221> 變體
<222> (3)..(3)
<223> Xaa is Tyr or Trp

<220>
<221> 變體
<222> (8)..(8)

<223> Xaa is Leu, Ile, or Ser

<400> 36

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

Asn

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗體序列

<220>

<221> 變體

<222> (2)..(2)

<223> Xaa為Leu或Ser

<400> 37

Leu Xaa Thr Gly Thr Phe Ala Tyr
1 5

<210> 38

<211> 443

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗體序列

<400> 38

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

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

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

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

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

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

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

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

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

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

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

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

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

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

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

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440

<210> 39
<211> 221
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體序列

<400> 39

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Trp Asp Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Thr Ser Tyr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

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

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

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
130 135 140

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
145 150 155 160

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
165 170 175

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
180 185 190

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
195 200 205

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

<210> 40
<211> 351
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb7重鏈可變區之DNA序列

<400> 40
cagggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgaa gtgaagaaac caggagccag cgtgaaagtg 60
agttgtaagg catccggcta tacctttacc tcttactgga tcaattgggt gaggcaggca 120

cctggccagg gcctggaatg gatgggaaat atctatcccg gctctagctt gactaactac 180
aatgaaaagt ttaagaatcg cgtgaccatg acccgggaca ctacacctc caccgtgtac 240
atggagctgt cctccctgcg gagcgaggac accgccgtct actattgtgc ccgcctgagt 300
accgggacct ttgcctactg gggacagggt acactgggtca ccgtctcctc a 351

<210> 41
<211> 339
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb7輕鏈可變區之DNA序列

<400> 41
gacatcgtga tgactcagtc tcccgatagc ctggcagtca gcctgggaga gcgggccacc 60
ataaactgca aaagctcgca gtcgctgtgg gacagtggta atcagaagaa tticctgacc 120
tggtaccagc agaagcctgg ccagccaccc aagctgctga tctactggac ctcatatcgg 180
gagtccgggg tgcccacag attctctgga agtggcagcg gtacggactt cacactgacc 240
atatccagtc tgcaagctga ggacgtggct gtttattact gccagaacga ctacttttat 300
cctcacactt tcggaggcgg taccaaggtc gagatcaaa 339

<210> 42
<211> 750
<212> PRT
<213> 智人

<400> 42

Met Trp Asn Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val Ala Thr Ala Arg
1 5 10 15

Arg Pro Arg Trp Leu Cys Ala Gly Ala Leu Val Leu Ala Gly Gly Phe
20 25 30

Phe Leu Leu Gly Phe Leu Phe Gly Trp Phe Ile Lys Ser Ser Asn Glu
35 40 45

Ala Thr Asn Ile Thr Pro Lys His Asn Met Lys Ala Phe Leu Asp Glu
50 55 60

Leu Lys Ala Glu Asn Ile Lys Lys Phe Leu Tyr Asn Phe Thr Gln Ile
65 70 75 80

Pro His Leu Ala Gly Thr Glu Gln Asn Phe Gln Leu Ala Lys Gln Ile
85 90 95

Gln Ser Gln Trp Lys Glu Phe Gly Leu Asp Ser Val Glu Leu Ala His
100 105 110

Tyr Asp Val Leu Leu Ser Tyr Pro Asn Lys Thr His Pro Asn Tyr Ile
115 120 125

Ser Ile Ile Asn Glu Asp Gly Asn Glu Ile Phe Asn Thr Ser Leu Phe
130 135 140

Glu Pro Pro Pro Pro Gly Tyr Glu Asn Val Ser Asp Ile Val Pro Pro
145 150 155 160

Phe Ser Ala Phe Ser Pro Gln Gly Met Pro Glu Gly Asp Leu Val Tyr
165 170 175

Val Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe Lys Leu Glu Arg Asp Met
180 185 190

Lys Ile Asn Cys Ser Gly Lys Ile Val Ile Ala Arg Tyr Gly Lys Val
195 200 205

Phe Arg Gly Asn Lys Val Lys Asn Ala Gln Leu Ala Gly Ala Lys Gly
210 215 220

Val Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe Ala Pro Gly Val Lys
225 230 235 240

Ser Tyr Pro Asp Gly Trp Asn Leu Pro Gly Gly Gly Val Gln Arg Gly
245 250 255

Asn Ile Leu Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro Leu Thr Pro Gly Tyr
260 265 270

Pro Ala Asn Glu Tyr Ala Tyr Arg Arg Gly Ile Ala Glu Ala Val Gly
275 280 285

Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Gly Tyr Tyr Asp Ala Gln Lys
290 295 300

Leu Leu Glu Lys Met Gly Gly Ser Ala Pro Pro Asp Ser Ser Trp Arg

305		310		315		320
Gly Ser Leu Lys	Val Pro Tyr Asn Val	Gly Pro Gly Phe Thr	Gly Asn			
	325		330		335	
Phe Ser Thr Gln	Lys Val Lys Met His	Ile His Ser Thr	Asn Glu Val			
	340		345		350	
Thr Arg Ile Tyr	Asn Val Ile Gly Thr	Leu Arg Gly Ala	Val Glu Pro			
	355		360		365	
Asp Arg Tyr Val	Ile Leu Gly Gly His	Arg Asp Ser Trp	Val Phe Gly			
	370		375		380	
Gly Ile Asp Pro	Gln Ser Gly Ala Ala	Val Val His Glu	Ile Val Arg			
	385		390		395	400
Ser Phe Gly Thr	Leu Lys Lys Glu Gly	Trp Arg Pro Arg	Arg Thr Ile			
	405		410		415	
Leu Phe Ala Ser	Trp Asp Ala Glu Glu	Phe Gly Leu Leu	Gly Ser Thr			
	420		425		430	
Glu Trp Ala Glu	Glu Asn Ser Arg Leu	Leu Gln Glu Arg	Gly Val Ala			
	435		440		445	
Tyr Ile Asn Ala	Asp Ser Ser Ile Glu	Gly Asn Tyr Thr	Leu Arg Val			
	450		455		460	
Asp Cys Thr Pro	Leu Met Tyr Ser Leu	Val His Asn Leu	Thr Lys Glu			
	465		470		475	480
Leu Lys Ser Pro	Asp Glu Gly Phe Glu	Gly Lys Ser Leu	Tyr Glu Ser			
	485		490		495	
Trp Thr Lys Lys	Ser Pro Ser Pro Glu	Phe Ser Gly Met	Pro Arg Ile			
	500		505		510	
Ser Lys Leu Gly	Ser Gly Asn Asp Phe	Glu Val Phe Phe	Gln Arg Leu			
	515		520		525	
Gly Ile Ala Ser	Gly Arg Ala Arg Tyr	Thr Lys Asn Trp	Glu Thr Asn			
	530		535		540	

Lys Phe Ser Gly Tyr Pro Leu Tyr His Ser Val Tyr Glu Thr Tyr Glu
545 550 555 560

Leu Val Glu Lys Phe Tyr Asp Pro Met Phe Lys Tyr His Leu Thr Val
565 570 575

Ala Gln Val Arg Gly Gly Met Val Phe Glu Leu Ala Asn Ser Ile Val
580 585 590

Leu Pro Phe Asp Cys Arg Asp Tyr Ala Val Val Leu Arg Lys Tyr Ala
595 600 605

Asp Lys Ile Tyr Ser Ile Ser Met Lys His Pro Gln Glu Met Lys Thr
610 615 620

Tyr Ser Val Ser Phe Asp Ser Leu Phe Ser Ala Val Lys Asn Phe Thr
625 630 635 640

Glu Ile Ala Ser Lys Phe Ser Glu Arg Leu Gln Asp Phe Asp Lys Ser
645 650 655

Asn Pro Ile Val Leu Arg Met Met Asn Asp Gln Leu Met Phe Leu Glu
660 665 670

Arg Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly Leu Pro Asp Arg Pro Phe Tyr Arg
675 680 685

His Val Ile Tyr Ala Pro Ser Ser His Asn Lys Tyr Ala Gly Glu Ser
690 695 700

Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val Asp
705 710 715 720

Pro Ser Lys Ala Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln Ile Tyr Val Ala Ala
725 730 735

Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ser Glu Val Ala
740 745 750

<210> 43
<211> 2217
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成建構體

<400> 43

atggctagcg ccagacgccc cagatggctg tgtgctggcg ctctggtgct ggctggcggc	60
ttcttccctgc tgggcttcct gttcggctgg ttcatcaagt cctccaacga ggccaccaac	120
atcaccccca agcacaacat gaaggccctt ctggacgagc tgaaggccga gaatatcaag	180
aagttccctgt acaacttcac ccagatcccc cacctggccg gcaccgagca gaacttcag	240
ctggccaagc agatccagtc ccagtggaaa gagttcggcc tggactccgt ggaactggcc	300
cactacgacg tgctgctgtc ctaccccaac aagaccacc ccaactacat ctccatcatc	360
aacgaggacg gcaacgaaat cttcaacacc tccctgttcg agccccacc cccaggctac	420
gagaacgtgt ccgacatcgt gccccattc tccgccttca gtccacaagg catgcccag	480
ggcgacctgg tgtacgtgaa ctacgccagg accgaggact tcttcaagct ggaacgcgac	540
atgaagatca actgctccgg caagatcgtg atcgccagat acggcaaggt gttcaggggc	600
aacaaagtga agaacgcccc gctggctggg gccaaaggcg tgatcctgta ctccgacccc	660
gccgactact tcgccccagg cgtgaagtcc taccgccagc gatggaacct gccaggcggc	720
ggagtgcaga ggggcaacat cctgaacctg aacggcgctg gcgacccccct gaccccagga	780
taccagcca acgagtacgc ctacagaaga ggaatcgccg aggccgtggg cctgccctct	840
atcccagtc accccatcgg ctactacgac gccagaaaac tgctggaaaa gatgggcggc	900
tccgccccac ccgactcctc ttggagaggc tccctgaagg tgccctacaa cgtggggcca	960
ggcttcaccg gcaacttctc caccagaaa gtgaagatgc acatccactc caccaacgaa	1020
gtgaccagga tctacaacgt gatcggcacc ctgagaggcg ccgtggaacc cgacagatac	1080
gtgatcctgg gcggccacag ggacagctgg gtgttcggcg gcacgaccc acagtctggc	1140
gccgctgtgg tgcacgagat cgtgcggtcc ttcggaacct tgaagaaaga gggatggcgc	1200
cccagaagga ccatcctgtt cgccagctgg gacgccgagg aattcggcct gctgggatcc	1260
accgagtggg ccgaggaaaa ctccaggctg ctgcaggaaac gcggcgtcgc ctacatcaac	1320
gccgactcct ccatcgaggg caactacacc ctgagggtgg actgcacccc cctgatgtac	1380
tccctgggtgc acaacctgac caaagagctg aagtcccccg acgagggtt cgagggaag	1440
tccctgtacg agtcctggac caagaagtcc ccatcccccg agttctccgg catgcccagg	1500
atctccaagc tgggctccgg caacgacttc gaggtgttct tccagaggct gggaatcgcc	1560
tccggcaggg ccagatacac caagaactgg gagacaaaca agttctccgg atacccccctg	1620

taccactccg tgtacgaaac ctacgagctg gtggaaaagt tctacgaccc catgttcaag	1680
taccacctga ccgtaggcca agtccgcgga ggcatgggtg tcgagctggc caactccatc	1740
gtgctgccct tcgactgcag agactacgcc gtgggtgctga ggaagtacgc cgacaaaatc	1800
tactccatct ccatgaagca cccccaggaa atgaagacct actccgtgtc cttcgactcc	1860
ctgtttctccg ccgtagaaga ttccaccgag atcgccctcca agttcagcga gaggctgcag	1920
gacttcgaca agtccaaccc aatcgtgctg aggatgatga acgaccagct gatgttcctg	1980
gaaagggcct tcacgacccc cctgggcctg ccagacagac cttctacag gcacgtgatc	2040
tacgccccat cctcccacaa caaatacgcc ggcgagtcct tccccggcat ctacgatgcc	2100
ctgttcgaca tcgagtccaa ggtggacccc tccaaggcct ggggcgaagt gaagaggcaa	2160
atctacgtgg ccgccttcac agtgcaagcc gctgccgaaa ccctgtccga ggtggcc	2217

<210> 44
 <211> 33562
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成建構體

<400> 44	
ccatcttcaa taatatacct caaacttttt gtgcgcgtta atatgcaaat gaggcgtttg	60
aatttgggga ggaagggcgg tgattggtcg agggatgagc gaccgttagg ggcggggcga	120
gtgacgtttt gatgacgtgg ttgcgaggag gagccagttt gcaagtcttc gtgggaaaag	180
tgacgtcaaa cgaggtgtgg ttgaacacg gaaatactca attttccgc gctctctgac	240
aggaaatgag gtgtttctgg gcggatgcaa gtgaaaacgg gccattttcg cgcgaaaact	300
gaatgaggaa gtgaaaatct gagtaatttc gcgtttatgg caggaggagg tatttgccga	360
gggccgagta gactttgacc gattacgtgg gggtttcgat taccgtgttt ttcacctaaa	420
tttccgcgta cgggtgtcaaa gtccggtgtt ttactactg taatagtaat caattacggg	480
gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc	540
gcctggctga ccgcccacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat	600
agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc	660
ccacttgga gtacatcaag tgtatcatai gccaaagtacg cccctattg acgtcaatga	720
cggtaaatgg cccgcctggc attatgccc gtacatgacc ttaatgggact ttcctacttg	780
gcagtacatc tacgtattag tcacgcctat taccatgggtg atgcggtttt ggcagtacat	840

caatgggCGT ggatagCGT ttgactcag gggatttcca agtctccacc ccatfgacgt	900
caatgggagT ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactc	960
cgccccatfg acgcaaattgg gcggtaggcg tgtacgggtgg gaggtctata taagcagagc	1020
tgtccctatc agtgatagag atctccctat cagtgataga gagtttagtg aaccgtcaga	1080
tccgctaggG taccgcgatc accatggcta gcgccagacg ccccagatgg ctgtgtgctg	1140
gcgctctggT gctggctggc ggcttcttcc tgcTgggctt cctgttcggc tggttcatca	1200
agtcttccaa cgaggccacc aacatcaccc ccaagcacaa catgaaggcc tttctggacg	1260
agctgaaggc cgagaatatc aagaagtTcc tgtacaactt caccagatc cccacctgg	1320
ccggcaccga gcagaacttc cagctggcca agcagatcca gtcccagTgg aaagagtTcg	1380
gcctggactc cgtggaactg gccactacg acgtgctgct gtcctacccc aacaagaccc	1440
accccaacta catctccatc atcaacgagg acggcaacga aatcttcaac acctccctgt	1500
tcgagcccc acccccaggc tacgagaacg tgtccgacat cgtgccccca ttctccgcct	1560
tcagtccaca aggcattgcc gagggcgacc tgggtgtacgt gaactacgcc aggaccgagg	1620
acttcttcaa gctggaacgc gacatgaaga tcaactgctc cggcaagatc gtgatcgcca	1680
gatacggcaa ggtgtttcagg ggcaacaaag tgaagaacgc ccagctggct ggggccaagg	1740
gcgtgatcct gtactccgac cccgccgact acttcgcccc aggcgtgaag tccTaccccg	1800
acggatggaa cctgccaggc ggcgaggTgc agagggggcaa catcctgaac ctgaacggcg	1860
ctggcgaccc cctgacccca ggataccag ccaacgagta cgcctacaga agaggaatcg	1920
ccgaggccgt gggcctgccc tctatcccag tgcaccccat cggctactac gacgccaga	1980
aactgctgga aaagatgggc ggctccgccc caccgactc ctcttggaga ggctccctga	2040
aggTgcccta caacgtgggc ccaggcttca ccggcaactt ctccaccag aaagtgaaga	2100
tgcacatcca ctccaccaac gaagtgacca ggatctacaa cgtgatcggc accctgagag	2160
gcgccgtgga acccgacaga tacgtgatcc tgggcggcca cagggacagc tgggtgttcg	2220
gcggcatcga cccacagtct ggccgccgtg tggTgcacga gatcgtgcgg tccttcggaa	2280
ccctgaagaa agagggatgg cgcgccagaa ggaccatcct gtTcgccagc tgggacgccg	2340
aggaattcgg cctgctggga tccaccgagt gggccgagga aaactccagg ctgctgcagg	2400
aacgcggcgt cgcctacatc aacgccgact cctccatcga gggcaactac accctgaggg	2460
tggactgcac ccccctgatg tactccctgg tgcacaacct gaccaaagag ctgaagtccc	2520
ccgacgaggg ctTcgagggc aagtccctgt acgagTcctg gaccaagaag tccccatccc	2580

ccgagttctc cggcatgccc aggatctcca agctgggctc cggcaacgac ttcgaggtgt	2640
tcttccagag gctgggaatc gcctccggca gggccagata caccaagaac tgggagacaa	2700
acaagttctc cggatacccc ctgtaccact ccgtgtacga aacctacgag ctggttgaaa	2760
agttctacga ccccatgttc aagtaccacc tgaccgtggc ccaagtccgc ggaggcatgg	2820
tgttcgagct ggccaactcc atcgtgctgc ctttcgactg cagagactac gccgtggtgc	2880
tgaggaagta cgccgacaaa atctactcca tctccatgaa gcacccccag gaaatgaaga	2940
cctactccgt gtccttcgac tccctgttct ccgccgtgaa gaatttcacc gagatcgctt	3000
ccaagttcag cgagaggctg caggacttcg acaagtccaa cccaatcgtg ctgaggatga	3060
tgaacgacca gctgatgttc ctggaaaggg ctttcacga cccctgggc ctgccagaca	3120
gacctttcta caggcacgtg atctacgccc catcctccca caacaaatac gccggcgagt	3180
ccttccccgg catctacgat gccctgttcg acatcgagtc caaggtggac cctccaagg	3240
cctggggcga agtgaagagg caaatctacg tggccgcctt cacagtgcaa gccgtgccg	3300
aaacctgtc cgaggtggcc tgaatcgac ctcgagattt aaatctgatc ataatcagcc	3360
ataccacatt tgtagagggt ttacttgctt taaaaaacct cccacacctc cccctgaacc	3420
tgaacataa aatgaatgca attgttgttg ttaacttgtt tatgacgct tataatggtt	3480
acaaataaag caatagcatc acaaatttca caaataaagc atttttttca ctgcattcta	3540
gttgttggtt gtccaaactc atcaatgtat cttatatgct ggccaccgta catgtggctt	3600
cccatgctcg caagccctgg ccgagttcg agcacaatgt catgaccagg tgcaatatgc	3660
atctggggtc ccgccgaggc atgttcatgc cctaccagtg caacctgaat tatgtgaagg	3720
tgctgctgga gcccgatgcc atgtccagag tgagcctgac gggggtgttt gacatgaatg	3780
tggaggtgtg gaagattctg agatatgatg aatccaagac caggtgccga gcctgcgagt	3840
gcggagggaa gcatgccagg ttccagcccc tgtgtgtgga tgtgacggag gacctgcgac	3900
ccgatcattt ggtgttgccc tgcaccggga cggagttcgg ttccagcggg gaagaatctg	3960
actagagtga gtagtgttct ggggcggggg aggacctgca tgagggccag aataactgaa	4020
atctgtgctt ttctgtgtgt tgcagcagca tgagcggaag cggctccttt gagggagggg	4080
tattcagccc ttatctgacg gggcgtctcc cctcctgggc gggagtgcgt cagaatgtga	4140
tgggatccac ggtggacggc cggcccgtgc agcccgcgaa ctcttcaacc ctgacctatg	4200
caacctgag ctcttcgtcg ttggacgcag ctgccgccgc agctgctgca tctgccgcca	4260
gcgccgtgcg cggaatggcc atgggcgccg gctactacgg cactctggtg gccaaactga	4320

gttccaccaa taatcccgcc agcctgaacg aggagaagct gttgctgctg atggcccagc	4380
tcgaggccit gaccacgcgc ctgggcgagc tgaccagca ggtggctcag ctgcaggagc	4440
agacgcgggc cgcggttgcc acggtgaaat ccaaataaaa aatgaatcaa taaataaacg	4500
gagacggttg ttgattttta cacagagtct gaatctttat ttgatttttc gcgcgcggta	4560
ggccctggac caccggtctc gatcattgag cacccggtgg atctttttcca ggacccggtg	4620
gaggtgggct tggatgttga ggtacatggg catgagcccc tcccgggggt ggaggtagct	4680
ccattgcagg gcctcgtgct cgggggtggg gttgtaaatc acccagtcac agcaggggagc	4740
cagggcatgg tgttgacaaa tatctttgag gaggagactg atggccacgg gcagcccttt	4800
ggtgttaggtg tttaacaaatc tgttgagctg ggagggatgc atgcgggggg agatgaggtg	4860
catcttggcc tggatcttga gattggcgat gttaccgccc agatccccgc tggggttcat	4920
gttgtgcagg accaccagca cgggtgtatcc ggtgcacttg gggaatttat catgcaactt	4980
ggaaggaag gcgtgaaaga atttggcgac gcctttgtgc ccgcccaggt tttccatgca	5040
ctcatccatg atgatggcga tgggcccgtg ggcggcggcc tgggcaaaga cgtttcgggg	5100
gtcggacaca tcatagtgtt ggtcctgggt gaggatcatca taggccattt taatgaattt	5160
ggggcgagg gtgccgact gggggacaaa ggtaccctcg atccccgggg cgtagtcccc	5220
ctcacagatc tgcattctcc aggccttgag ctccggaggg gggatcatgt ccacctgcgg	5280
ggcgataaag aacacggttt ccggggcggg ggagatgagc tgggccgaaa gcaagtccg	5340
gagcagctgg gacttgccgc agccggtggg gccgtagatg accccgatga ccggctgcag	5400
gtggtagtgt agggagagac agctgccgtc ctcccggagg aggggggcca cctcgttcat	5460
catctcgcgc acgtgcatgt tctcgcgcac cagtccgcc agggaggcgt ctccccccag	5520
ggataggagc tcctggagcg aggcgaagt ttccagcggc ttgagtcgt cggccatggg	5580
cattttggag agggtttgtt gcaagagttc caggcgggtc cagagctcgg tgatgtgctc	5640
tacggcatct cgaiccagca gacctcctcg ttccgcgggt tgggacggct gcgggagtag	5700
ggcaccagac gatgggcgtc cagcgcagcc agggtcgggt ccttccaggg tcgcagcgtc	5760
cgcgtcaggg tggctctcgt cacggtgaag ggggtgcgcgc cgggctgggc gcttgcgagg	5820
gtgcgcttca ggctcatccg gctggtcgaa aaccgctccc gatcggcgcc ctgcgcgtcg	5880
gccaggtagc aattgacat gagttcgtag ttgagcgct cggccgctg gcctttggcg	5940
cggagcttac ctttgaagt ctgcccgcag gcgggacaga ggagggactt gagggcgtag	6000
agcttggggg cgaggaagac ggactcgggg gcgtaggcgt ccgcgccgca gtgggcgcag	6060

acggtctcgc actccacgag ccaggtgagg tcgggctggt cggggtcaaa aaccagtttc	6120
ccgccgttct ttttgatgcg tttcttacct ttggtctcca tgagctcgtg tccccgctgg	6180
gtgacaaaga ggctgtccgt gtccccgtag accgacttta tgggccggtc ctcgagcggc	6240
gtgccgcggc cctcctcgta gaggaacccc gccactccg agacgaaagc ccgggtccag	6300
gccagcacga aggaggccac gtgggacggg tagcggctgt tgtccaccag cgggtccacc	6360
ttttccaggg tatgcaaaca catgtccccc tcgtccacat ccaggaaggt gattggcttg	6420
taagtgtagg ccacgtgacc gggggctccc gccggggggg tataaaaggg tgcgggtccc	6480
tgtctgtcct cactgtcttc cggatcgtg tccaggagcg ccagctgttg gggtaggtat	6540
tccctctcga aggcggggcat gacctcggca ctcaggttgt cagtttctag aaacgaggag	6600
gatttgatat tgacggtgcc ggcggagatg ctttcaaga gccctcgtc catctgggtca	6660
gaaaagacga tctttttgtt gtcgagcttg gtggcgaagg agccgtagag ggcgttgag	6720
aggagcttgg cgatggagcg catggtcttg ttttttccct tgcggcgcg ctccttggcg	6780
gcgatgttga gctgcacgta ctcgcgcgcc acgcacttcc attcggggaa gacggtggc	6840
agctcgtcgg gcacgattct gacctgccag ccccgattat gcagggtgat gaggtccaca	6900
ctggtggcca cctcgccgcg caggggctca ttagtccagc agaggcgtcc gcccttgcgc	6960
gagcagaagg ggggcagggg gtccagcatg acctcgtcgg gggggtcggc atcgatggtg	7020
aagatgccgg gcaggaggtc ggggtcaaag tagctgatgg aagtggccag atcgtccagg	7080
gcagcttggc attcgcgcac ggccagcgcg cgctcgtagg gactgagggg cgtgccccag	7140
ggcatgggat gggtaagcgc ggaggcgtac atgccgcaga tgcgtagac gtagaggggc	7200
tcctcgagga tgccgatgta ggtggggtag cagcgcccc cgcggtgct ggcgcgcacg	7260
tagtcataca gctcgtgcga gggggcgagg agccccgggc ccaggttggg gcgactgggc	7320
ttttcggcgc ggtagacgat ctggcggaat atggcatgcg agttggagga gatggtgggc	7380
ctttggaaga tgttgaagtg ggcgtggggc agtccgaccg agtcgcggat gaagtgggcg	7440
taggagtctt gcagcttggc gacgagctcg gcggtgacta ggacgtccag agcgagtag	7500
tcgaggtct cctggatgat gtcatacttg agctgtccct ttgtttcca cagctcgcgg	7560
ttgagaagga actcttcgcg gtccttcag tactcttcga gggggaacct gtcctgatct	7620
gcacggtaag agcctagcat gtagaactgg ttgacggcct ttaggcgca gcagcccttc	7680
tccacgggga gggcgtaggc ctgggcggcc ttgcgcaggg aggtgtgcgt gagggcgaaa	7740
gtgtccctga ccatgacctt gaggaactgg tgcttgaagt cgatatcgtc gcagcccccc	7800

tgctcccaga gctggaagtc cgtgcgcttc ttgtaggcgg gggtgggcaa agcgaaagta	7860
acatcgttga agaggatctt gcccgcgcgg ggcataaagt tgcgagtgat gcggaaggt	7920
tggggcacct cggcccgggtt gttgatgacc tgggcggcga gcacgatctc gtcgaagccg	7980
ttgatgttgt ggcccacgat gtagagtcc acgaatcgcg gacggccctt gacgtggggc	8040
agtttcttga gtcctcgtg ggtgagctcg tcggggtcgc tgagcccgtg ctgctcgagc	8100
gcccagtcgg cgagatgggg gttggcgcgg aggaaggaag tccagagatc cacggccagg	8160
gcggtttgca gacgggtccc gtactgacgg aactgctgcc cgacggccat ttttcgggg	8220
gtgacgcagt agaaggctcg ggggtccccg tgccagcgat cccatttgag ctggaggggc	8280
agatcgaggg cgagctcgac gagccggtcg tccccggaga gtttcatgac cagcatgaag	8340
gggacgagct gcttgccgaa ggaccccatc cagggttagg tttccacatc gtaggtgagg	8400
aagagccctt cgggtcgagg atgcgagccg atggggaaga actggatctc ctgccaccaa	8460
ttggaggaat ggctgttgat gtgatggaag tagaaatgcc gacggcgcgc cgaacactcg	8520
tgcttgtgtt tatacaagcg gccacagtgc tcgcaacgct gcacgggatg cacgtgctgc	8580
acgagctgta cctgagttcc ttgacgagg aatttcagtg ggaagtggag tcgtggcgcc	8640
tgcattctgt gctgtactac gtcgtggtgg tcggccggc cctcttctgc ctcgatggtg	8700
gtcatgctga cgagcccgcg cgggaggcag gtccagacct cggcgcgagc gggtcggaga	8760
gcgaggacga gggcgcgcag gccggagctg tccagggtcc tgagacgctg cggagtcagg	8820
tcagtgggca gcggcggcgc gcggttgact tgcaggagtt tttccagggc gcgcgggagg	8880
tccagatggt acttgatctc caccgcgcca ttgggtggcga cgtcgatggc ttgcagggtc	8940
ccgtgcccct ggggtgtgac caccgtcccc cgtttcttct tgggcggctg gggcgacggg	9000
ggcgggtgcct cttccatggt tagaagcggc ggcgaggacg cgcgccgggc ggcaggggcg	9060
gctcggggcc cggaggcagg ggcggcaggg gcacgtcggc gccgcgcgcg ggtaggttct	9120
ggtactgcgc ccggagaaga ctggcgtgag cgacgacgcg acggttgacg tcctggatct	9180
gacgcctctg ggtgaaggcc acgggacccg tgagtttgaa cctgaaagag agttcgacag	9240
aatcaatctc ggtatcgttg acggcggcct gccgcaggat ctcttgacg tcgcccagat	9300
tgtcctggta ggcgatctcg gtcatgaact gtcgatctc ctctcttga aggtctccgc	9360
ggccggcgcg ctccacggtg gccgcgaggt cgttggagat gcggcccatg agctgcgaga	9420
aggcgttcat gccgcctcg ttccagacgc ggctgtagac cacgacgcc tcgggatcgc	9480
gggcgcgcat gaccacctgg gcgaggttga gtcacagtgc gcgcgtgaag accgcgtagt	9540

tgcagaggcg ctggttagagg tagttgagcg tggtagcgat gtgctcggtg acgaagaaat	9600
acatgatcca gcggcggagc ggcatctcgc tgacgtcgcc cagcgccctcc aaacgttcca	9660
tggcctcgta aaagtccacg gcgaagtga aaaactggga gttgcgcgcc gagacggtca	9720
actcctcctc cagaagacgg atgagctcgg cgatgggtggc ggcacacctg cgctcgaagg	9780
cccccgggag ttcttccact tctcttctt cctcctccac taacatctct tctacttctt	9840
cctcaggcgg cagtgggtggc gggggagggg gcctgcgtcg ccggcggcgc acgggcagac	9900
ggtcgatgaa gcgctcgatg gtctcgccgc gccggcgctg catgggtctg gtgacggcgc	9960
gcccgtcctc gcggggccgc agcgtgaaga cgccgccgcg catctccagg tggccggggg	10020
gggtccccgtt gggcagggag agggcgctga cgatgcatct tatcaattgc cccgtaggga	10080
ctccgcgcaa ggacctgagc gtctcgagat ccacgggac tgaaaaccgc tgaacgaagg	10140
cttcgagcca gtgcgagtcg caaggtaggc tgagcacggt ttcttctggc gggtcatgtt	10200
ggttgggagc ggggcgggcg atgctgctgg tgatgaagtt gaaataggcg gttctgagac	10260
ggcggatggt ggcgaggagc accaggctct tgggcccggc ttgctggatg cgcagacggt	10320
cggccatgcc ccaggcgtgg tctgacacc tggccaggtc cttgtagtag tctgcatga	10380
gccgtccac gggcacctcc tctcgcccg cgcgcccggt catgcgcgtg agcccgaagc	10440
cgcgctgggg ctggacgagc gccaggctcg cgacgacgcg ctcggcgagg atggcttgct	10500
ggatctgggt gaggggtggtc tggaagtcac caaagtcgac gaagcggtag taggctccgg	10560
tgttgatggt gtaggagcag ttggccatga cggaccagtt gacggctctg tggcccggac	10620
gcacgagctc gtggtacttg aggcgcgagt aggcgcgcgt gtcgaagatg tagtcgttgc	10680
aggtgcgcac caggtacttg tagccgatga ggaagtgcgg cggcggctgg cggtagagcg	10740
gccatcgctc ggtggcgggg gcgccgggcg cgaggctctc gagcatgggt cggtggtagc	10800
cgtagatgta cctggacatc caggtgatgc cggcggcggt ggtggaggcg cgcgggaaact	10860
cgcgacgcg gttccagatg ttgcgcagcg gcaggaagta gtcatgggt ggcacggctt	10920
ggcccgtgag gcgcgcgcag tcgtggatgc tctatacggg caaaaacgaa agcggtcagc	10980
ggctcgactc cgtggccttg aggctaagcg aacgggttgg gctgcgcgtg taccgccgtt	11040
cgaatctcga atcaggcttg agccgcagct aacgtgggtat tggcactccc gtctcgaccc	11100
aagcctgcac caaccctcca ggatacggag gcgggtcggt ttgcaacttt tttttggagg	11160
ccggatgaga ctagtaagcg cggaagcgcg ccgaccgcga tggctcgctg ccgtagtctg	11220
gagaagaatc gccagggttg cgttgcggtg tgccccggtt cgaggccggc cggattccgc	11280

ggctaacgag ggcgtaggctg ccccgtagctt tccaagaccc catagccagc cgacttctcc	11340
agttacggag cgagcccctc ttttgttttg tttgtttttg ccagatgcat cccgtactgc	11400
ggcagatgcg cccccaccac cctccaccgc aacaacagcc ccctccacag ccggcgcttc	11460
tgcccccgcc ccagcagcaa ctccagcca cgaccgccgc ggccgccgtg agcggggctg	11520
gacagagtta tgatcaccag ctggccttgg aagaggggcga ggggctggcg cgcctggggg	11580
cgtagctgcc ggagcggcac ccgcgcgtgc agatgaaaag ggacgctcgc gaggcctacg	11640
tgcccagca gaacctgttc agagacagga gcggcgagga gcccgaggag atgcgcgcgg	11700
cccggttcca cgcggggcgg gagctgcggc gcggcctgga ccgaaagagg gtgctgaggg	11760
acgaggattt cgaggcggac gagctgacgg ggatcagccc cgcgcgcgcg cacgtggccg	11820
cggccaacct ggtcacggcg tacgagcaga ccgtgaagga ggagagcaac ttccaaaaat	11880
ccttcaaca ccacgtgcgc accctgatcg cgcgcgagga ggtgaccctg ggctgatgc	11940
acctgtggga cctgctggag gccatcgtgc agaaccacc cagcaagccg ctgacggcgc	12000
agctgttctt ggtggtgcag catagtcggg acaacgaagc gttcagggag gcgctgctga	12060
atatcaccga gcccgagggc cgctggctcc tggacctggt gaacattctg cagagcatcg	12120
tggtgcagga gcgcgggctg ccgctgtccg agaagctggc ggccatcaac ttctcggtgc	12180
tgagtttggg caagtactac gctaggaaga tctacaagac cccgtacgtg cccatagaca	12240
aggaggtgaa gatcgacggg ttttacctgc gcatgaccct gaaagtgcgtg accctgagcg	12300
acgatctggg ggtgtaccgc aacgacagga tgcaccgtgc ggtgagcgcc agcaggcggc	12360
gcgagctgag cgaccaggag ctgatgcata gtctgcagcg ggccctgacc ggggcccggg	12420
ccgaggggga gagctacttt gacatgggcg cggacctgca ctggcagccc agccgccggg	12480
ccttggaggc ggcggcagga ccctacgtag aagagggtgga cgatgagggtg gacgaggagg	12540
gcgagtacct ggaagactga tggcgcgacc gtatttttgc tagatgcaac aacaacagcc	12600
acctcctgat cccgcgatgc gggcggcgct gcagagccag ccgtccggca ttaactctc	12660
ggacgattgg acccaggcca tgcaacgcat catggcgctg acgaccgcga accccgaagc	12720
ctttagacag cagccccagg ccaaccggct ctcggccatc ctggaggccg tgggtgccctc	12780
gcgctccaac cccacgcacg agaaggctct ggccatcgtg aacgcgctgg tggagaacaa	12840
ggccatccgc ggcgacgagg ccggcctggt gtacaacgcg ctgctggagc gcgtggcccg	12900
ctacaacagc accaacgtgc agaccaacct ggaccgcatg gtgaccgacg tgcgcgaggc	12960
cgtggcccag cgcgagcggg tccaccgcga gtccaacctg ggatccatgg tggcgctgaa	13020

cgcccttcctc agcaccacgc ccgccaacgt gccccggggc caggaggact acaccaactt	13080
catcagcgcc ctgcgcctga tggtagccga ggtgccccag agcgaggtgt accagtccgg	13140
gccggactac ttcttccaga ccagtgcga gggcttgag accgtgaacc tgagccaggc	13200
tttcaagaac ttgcaggggc tgtggggcgt gcaggccccg gtcggggacc gcgcgacggt	13260
gtcgagcctg ctgacgccga actcgcgcct gctgctgctg ctggtggccc cttcacgga	13320
cagcggcagc atcaaccgca actcgtacct gggctacctg attaacctgt accgcgaggc	13380
catcgccag gcgcacgtgg acgagcagac ctaccaggag atcaccacg tgagccgcgc	13440
cctgggccag gacgaccgg gcaacctgga agccacctg aactttttgc tgaccaaccg	13500
gtcgcagaag atcccgcccc agtacgcgt cagcaccgag gaggagcgca tctgcgtta	13560
cgtgcagcag agcgtggggc tgttcctgat gcaggagggg gccaccccca gcgccgcgt	13620
cgacatgacc gcgcgcaaca tggagcccag catgtacgcc agcaaccgcc cgttcatcaa	13680
taaactgatg gactacttgc atcgggcggc cgccatgaac tctgactatt tcaccaacgc	13740
catcctgaat cccactggc tcccgccgcc ggggttctac acgggcgagt acgacatgcc	13800
cgaccccaat gacgggttcc tgtgggacga tgtggacagc agcgtgttct ccccccgacc	13860
gggtgctaac gagcgcccc tgtggaagaa ggaaggcagc gaccgacgcc cgtcctcggc	13920
gctgtccggc cgcgagggtg ctgccgcggc ggtgcccag gccgccagtc ctttcccag	13980
cttgcccttc tgcgtgaaca gtatccgcag cagcgagctg ggcaggatca cgcgcccgcg	14040
cttgctgggc gaagaggagt acttgaatga ctgcgtgtg agacccgagc gggagaagaa	14100
cttccccaat aacgggatag aaagcctggt ggacaagatg agccgctgga agacgtatgc	14160
gcaggagcac agggacgatc cccgggcgtc gcagggggcc acgagccggg gcagcgccgc	14220
ccgtaaacgc cggtagcacg acaggcagcg gggacagatg tgggacgatg aggactccgc	14280
cgacgacagc agcgtgttgg acttgggtgg gagtggtaac ccgttcgctc acctgcgcc	14340
ccgtatcggg cgcatgatgt aagagaaacc gaaaataaat gatactcacc aaggccatgg	14400
cgaccagcgt gcgttcgttt ctctctgtt gttgttgtat ctagtatgat gaggcgtgcg	14460
taccggagg gtcctcctcc ctctacgag agcgtgatgc agcaggcgat ggcggcggcg	14520
gcgatgcagc ccccgctgga ggctccttac gtgccccgc ggtacctggc gcctacggag	14580
gggcggaaca gcattcgta ctcgagctg gcaccttgt acgataccac ccggttgtac	14640
ctggtggaca acaagtcggc ggacatcgcc tgcgtgaact accagaacga ccacagcaac	14700
ttcctgacca ccgtggtgca gaacaatgac ttaccccca cggaggccag caccagacc	14760

atcaactttg acgagcgctc gcggtggggc ggccagctga aaacatcat gcacaccaac	14820
atgccaacg tgaacgagtt catgtacagc aacaagtcca aggcgcgggt gatggtctcc	14880
cgcaagaccc ccaatgggggt gacagtgaac gaggattatg atggtagtca ggatgagctg	14940
aagtatgaat ggggtggaatt tgagctgccc gaaggcaact tctcggtgac catgaccatc	15000
gacctgatga acaacgccat catcgacaat tacttggcgg tggggcggca gaacggggtg	15060
ctggagagcg acatcggcgt gaagtgcgac actaggaact tcaggctggg ctgggacccc	15120
gtgaccgagc tgggtcatgcc cgggggtgac accaacgagg ctttccatcc cgatattgtc	15180
ttgctgcccg gctgcgggggt ggacttcacc gagagccgcc tcagcaacct gctgggcatt	15240
cgcaagaggc agcccttcca ggaaggcttc cagatcatgt acgaggatct ggaggggggc	15300
aacatccccg cgctcctgga tgtcgacgcc tatgagaaaa gcaaggagga tgcagcagct	15360
gaagcaactg cagccgtagc taccgcctct accgaggcca ggggcgataa ttttgcaagc	15420
gccgcagcag tggcagcggc cgaggcggct gaaaccgaaa gtaagatagt cattcagccg	15480
gtggagaagg atagcaagaa caggagctac aacgtactac cggacaagat aaacaccgcc	15540
taccgcagct ggtacctagc ctacaactat ggcgaccccc agaagggcgt gcgctcctgg	15600
acgctgctca ccacctcgga cgtcacctgc ggctgggagc aagtctactg gtcgctgccc	15660
gacatgatgc aagaccgggt caccttccgc tccacgcgtc aagttagcaa ctaccgggtg	15720
gtgggcgccc agctcctgcc cgtctactcc aagagcttct tcaacgagca ggccgtctac	15780
tcgcagcagc tgcgcgcctt cacctcgctt acgcacgtct tcaaccgctt ccccgagaac	15840
cagatcctcg tccgcccgcc cgcgcccacc attaccaccg tcagtgaata cgctcctgct	15900
ctcacagatc acgggaccct gccgctgcgc agcagtatcc ggggagttca gcgcgtgacc	15960
gttactgacg ccagacgccg cacctgcccc tacgtctaca aggccctggg catagtgcgc	16020
ccgcgcgtcc tctcgagccg caccttctaa atgtccattc tcatctcgcc cagtaataac	16080
accggttggg gcctgcgcgc gccagcaag atgtacggag gcgctcgcca acgctccacg	16140
caacaccccc tgcgcgtgcg cgggcacttc cgcgctccct ggggcgccct caagggccgc	16200
gtgcggtcgc gcaccaccgt cgacgacgtg atcgaccagg tggtagccga cgcgcgcaac	16260
tacacccccg ccgcccgcgc cgtctccacc gtggacgccg tcatcgacag cgtggtggcc	16320
gacgcgcgcc ggtacgcccg cgccaagagc cggcggcggc gcatcgcccg gcggcaccgg	16380
agcacccccg ccatgcgcgc ggccgcgagc ttgctgcgca gggccaggcg cacgggacgc	16440
agggccatgc tcaggcgggc cagacgcgcg gcttcaggcg ccagcgccgg caggaccggg	16500

agacgcgcgg ccacggcggc ggcagcggcc atcgccagca tgtcccggcc gcggcgaggg	16560
aacgtgtact ggggtgcgcga cgccgccacc ggtgtgcgcg tgcccgtgcg caccgcggcc	16620
cctcgcactt gaagatgttc acttcgcgat gtgatgtgt cccagcggcg aggaggatgt	16680
ccaagcgcaa attcaaggaa gagatgctcc aggtcatcgc gcctgagatc tacggccctg	16740
cggtggtgaa ggaggaaaga aagccccgca aaatcaagcg ggtcaaaaag gacaaaaagg	16800
aagaagaaag tgatgtggac ggattggtgg agtttgtgcg cgagttcgcc ccccggcggc	16860
gcgtgcagtg gcgcggggcg aagggtgcaac cggtgctgag acccggcacc accgtggtct	16920
tcacgcccgg cgagcgctcc ggcaccgctt ccaagcgctc ctacgacgag gtgtacgggg	16980
atgatgatat tctggagcag gcggccgagc gcctgggcga gtttgcttac ggcaagcgca	17040
gccgttccgc accgaaggaa gaggcgggtgt ccatcccgtt ggaccacggc aacccacgc	17100
cgagcctcaa gcccgtgacc ttgcagcagg tgctgccgac cgcggcggcc cgccgggggt	17160
tcaagcgca gggcgaggat ctgtacccca ccatgcagct gatggtgcc aagcgccaga	17220
agctggaaga cgtgctggag accatgaagg tggaccggga cgtgcagccc gaggtcaagg	17280
tgcgggccat caagcagggt gccccgggcc tgggcgtgca gaccgtggac atcaagattc	17340
ccacggagcc catggaaacg cagaccgagc ccatgatcaa gccagcacc agcaccatgg	17400
aggtgcagac ggatccctgg atgccatcgg ctccatagtc aagaccccg cgcaagtacg	17460
gcgcggccag cctgctgatg cccaactacg cgctgcatcc ttccatcacc cccacgccgg	17520
gctaccgcgg cacgcgcttc taccgcggtc ataccagcag ccgcgcgcg aagaccacca	17580
ctcgccggcc cgctcgccgc accgcgcgtg caaccacccc tgccgccctg gtgcggagag	17640
tgtaccgccg cggccgcgca cctctgacct tgccgcgcgc gcgctaccac ccgagcatcg	17700
ccatttaaac tttgcctgc ttgacagatc aatggccctc acatgccgcc ttgcggttcc	17760
cattacgggc taccgaggaa gaaaaccgcg ccgtagaagg ctggcgggga acgggatgcg	17820
tcgccaccac caccggcggc ggcgcgccat cagcaagcgg ttggggggag gcttcctgcc	17880
cgcgtgatc cccatcatcg ccgcggcgat cggggcgatc cccggcattg cttccgtggc	17940
ggtgcaggcc tctcagcgcc actgagacac acttggaac atcttgtaat aaaccaatgg	18000
actctgacgc tcctggtcct gtgatgtgtt ttcgtagaca gatggaagac atcaattttt	18060
cgtccctggc tccgcgacac ggcacgcggc cgttcatggg cacctggagc gacatcgga	18120
ccagccaact gaacgggggc gccttcaatt ggagcagtc ctggagcggg cttagaatt	18180
tcgggtccac gcttaaaacc tatggcagca aggcgtggaa cagcaccaca gggcaggcgc	18240

tgagggataa gctgaaagag cagaacttcc agcagaaggt ggtcgaatggg ctgccttcgg	18300
gcatcaacgg ggtggtggac ctggccaacc aggccgtgca gcggcagatc aacagccgcc	18360
tggacccggt gccgcccggc ggctccgtgg agatgccgca ggtggaggag gagctgcctc	18420
ccctggacaa gcggggcgag aagcgacccc gcccgatgc ggaggagacg ctgctgacgc	18480
acacggacga gccgccccg tacgaggagg cggtgaaact gggctctgccc accacgcggc	18540
ccatcgcgcc cctggccacc ggggtgctga aaccgaaaa gcccgcgacc ctggacttgc	18600
ctcctcccca gccttcccg ccctctacag tggctaagcc cctgccgccg gtggccgtgg	18660
cccgcgcgcg acccgggggc accgcccgc ctcgatcgaa ctggcagagc actctgaaca	18720
gcatcgtggg tctgggagtg cagagtgtga agcgccgccg ctgctattaa acctaccgta	18780
gcgcttaact tgcctgtctg tgtgtgtatg tattatgtcg ccgccgccg tgtccaccag	18840
aaggaggagt gaagaggcgc gtcgccgagt tgcaagatgg ccaccccatc gatgctgccc	18900
cagtgggcgt acatgcacat cgccggacag gacgcttcgg agtacctgag tccgggtctg	18960
gtgcagtttg cccgcgccac agacacctac ttcagtctgg ggaacaagtt taggaacccc	19020
acggtggcgc ccacgcacga tgtgaccacc gaccgcagcc agcggctgac gctgcgcttc	19080
gtgcccgtgg accgcgagga caacacctac tcgtacaaag tgcgctacac gctggccgtg	19140
ggcgacaacc gcgtgctgga catggccagc acctactttg acatccgcgg cgtgctggat	19200
cggggcccta gcttcaaacc ctactccggc accgcctaca acagtctggc ccccaaggga	19260
gcaccaaca cttgtcagtg gacatataaa gccgatgggtg aaactgccac agaaaaaacc	19320
tatacatatg gaaatgcacc cgtgcagggc attaacatca caaaagatgg tattcaactt	19380
ggaactgaca ccgatgatca gccaatctac gcagataaaa cctatcagcc tgaacctcaa	19440
gtgggtgatg ctgaatggca tgacatcact ggtactgatg aaaagtatgg aggcagagct	19500
cttaagcctg ataccaaaat gaagccttgt tatggttctt ttgccaagcc tactaataaa	19560
gaaggaggtc aggcaaagt gaaaacagga acaggcacta ctaaagaata tgacatagac	19620
atggctttct ttgacaacag aagtgcggct gctgctggcc tagctccaga aattgttttg	19680
tatactgaaa atgtggattt ggaaactcca gatacccata ttgtatacaa agcaggcaca	19740
gatgacagca gctcttctat taatttgggt cagcaagcca tgcccaacag acctaaactac	19800
attggtttca gagacaactt tatcgggctc atgtactaca acagcactgg caatatgggg	19860
gtgctggccg gtcaggcttc tcagctgaat gctgtggttg acttgcaaga cagaaacacc	19920
gagctgtcct accagctctt gcttgactct ctgggtgaca gaaccggta tttcagtatg	19980

tggaatcagg cgggtggacag ctatgatacct gatgtgcgca ttattgaaaa tcatgggtgtg	20040
gaggatgaac ttcccaacta ttgtttccct ctggatgctg ttggcagaac agatacttat	20100
cagggaattt aggctaattg aactgatcaa accacatgga ccaaagatga cagtgtcaat	20160
gatgctaattg agataggcaa gggtaatcca ttcgccatgg aaatcaacat ccaagccaac	20220
ctgtggagga acttcctcta cgccaacgtg gccctgtacc tgcccgactc ttacaagtac	20280
acgccggcca atgttaccct gccaccaac accaacacct acgattacat gaacggccgg	20340
gtgggtggcgc cctcgctggg ggactcctac atcaacatcg gggcgcgctg gtcgctggat	20400
cccatggaca acgtgaacct cttaaccac caccgcaatg cggggctgcg ctaccgctcc	20460
atgctcctgg gcaacgggcg ctacgtgcc ttccacatcc aggtgcccc gaaatttttc	20520
gccatcaaga gcctcctgct cctgcccggg tcttacacct acgagtggaa ctccgcaag	20580
gacgtcaaca tgatcctgca gagctccctc ggcaacgacc tgcgcacgga cggggcctcc	20640
atctccttca ccagcatcaa cctctacgcc accttcttcc ccatggcgca caacacggcc	20700
tccacgctcg aggccatgct gcgcaacgac accaacgacc agtccctcaa cgactacctc	20760
tcggcggcca acatgctcta ccccatcccg gccaacgcca ccaacgtgcc catctccatc	20820
ccctcgcgca actgggcccgc ctcccgcggc tggctccttca cgcgtctcaa gaccaaggag	20880
acgccctcgc tgggctccgg gttegacccc tacttcgtct actcgggctc catcccctac	20940
ctcgacggca ccttctacct caaccacacc ttcaagaagg tctccatcac cttegactcc	21000
tccgtcagct ggcccggcaa cgaccggctc ctgacgcccc acgagttcga aatcaagcgc	21060
accgtcgacg gcgagggcta caacgtggcc cagtgcacaa tgaccaagga ctggttcctg	21120
gtccagatgc tggcccacta caacatcggc taccagggct tctacgtgcc cgagggctac	21180
aaggaccgca tgtactcctt ctccgcaac ttccagccca tgagccgcca ggtgggtggac	21240
gaggtcaact acaaggacta ccaggccgtc accttggcct accagcaca caactcgggc	21300
ttcgtcggct acctcgcgcc caccatgcgc cagggccagc cctaccccgc caactacccc	21360
taccgctca tcggcaagag cgccgtcacc agcgtcacc agaaaaagt cctctgcgac	21420
agggtcatgt ggcgcatccc ctctccagc aacttcatgt ccatgggcgc gctcaccgac	21480
ctcggccaga acatgctcta tgccaactcc gccacgcgc tagacatgaa ttctgaagtc	21540
gaccccatgg atgagtccac cttctctat gtgtcttcg aagtcttcga cgtcgtccga	21600
gtgcaccagc cccaccgagg cgtcatcgag gccgtctacc tgcgcacccc ctctcggcc	21660
ggtaacgcca ccacctaagc tcttgcttct tgcaagccat ggccgcgggc tccggcgagc	21720

aggagctcag ggccatcatc cgcgacctgg gctgcggggc ctacttcctg ggcaccttcg	21780
ataagcgctt cccgggattc atggccccgc acaagctggc ctgcgccatc gtcaacacgg	21840
ccggccgcga gaccgggggc gagcactggc tggccttcgc ctggaaccgc cgctcgaaca	21900
cctgctacct cttcgacccc ttcgggttct cggacgagcg cctcaagcag atctaccagt	21960
tcgagtacga gggcctgctg cgccgcagcg ccttgccac cgaggaccgc tgcgtcacc	22020
tggaaaagtc caccagacc gtgcagggtc cgcgctcggc cgcttcggg ctcttctgct	22080
gcatgttctt gcacgccttc gtgcactggc ccgaccgcc catggacaag aacccacca	22140
tgaacttgct gacgggggtg cccaacggca tgctccagtc gcccaggtg gaaccaccc	22200
tgcgccgcaa ccaggaggcg ctctaccgt tctcaactc ccactccgc tactttcgt	22260
cccaccgcgc gcgcatcgag aaggccaccg ccttcgaccg catgaatcaa gacatgtaa	22320
ccgtgtgtgt atgttaaagt tctttaataa acagcactt catgttacac atgcatctga	22380
gatgatttat ttagaaatcg aaagggttct gccgggtctc ggcatggccc gcgggcaggg	22440
acacgttgcg gaactggtag ttggccagcc acttgaactc ggggatcagc agtttgggca	22500
gcgggggtgtc ggggaaggag tcggtccaca gcttccgcgt cagttgcagg gcgcccagca	22560
ggtcggggcgc ggagatcttg aaatcgcagt tgggacccgc gttctgcgcg cgggagttgc	22620
ggtacacggg gttgcagcac tggaaacca tcagggccgg gtgcttcacg ctgccagca	22680
ccgtcgcgtc ggtgatgtc tccacgtcga ggtcctcggc gttggccatc ccgaaggggg	22740
tcatcttgca ggtctgcctt cccatgggtg gcacgcacc gggcttgttg ttgcaatcg	22800
agtgcagggg gatcagcatc atctgggcct ggtcggcgtt catccccggg tacatggcct	22860
tcatgaaagc ctccaattgc ctgaacgcct gctgggcctt ggctccctcg gtgaagaaga	22920
ccccgcagga cttgctagag aactgggttg tggcgcacc ggcgtcgtgc acgcagcagc	22980
gcgcgtcgtt gttggccagc tgcaccacgc tgcgccccca gcggttcttg gtgatcttg	23040
cccgtcggg gttctccttc agcgcgcgt gcccgttctc gctcgccaca tccatctcga	23100
tcatgtgtc cttctggatc atggtgggtc cgtgcaggca ccgcagctt cctcggcct	23160
cggtgcacc gtgcagccac agcgcgcacc cggtgcactc ccagttcttg tgggcgatct	23220
gggaatgcgc gtgcacgaag ccctgcagga agcgcccat catggtggtc aggttcttgt	23280
tgctagtga ggtcagcgga atgccgcggt gctcctcgtt gatgtacagg tggcagatgc	23340
ggcggtacac ctgccctgc tcgggcatca gctggaagtt ggctttcagg tcggtctcca	23400
cgcggtagcg gtccatcagc atagtcatga ttccataacc ctctcccag gccgagacga	23460

tgggcaggct catagggttc ttcacatca tcttagcgct agcagccgcg gccagggggt	23520
cgctctcgtc caggggtctca aagctccgct tgccgtcctt ctcggtgatc cgcaccgggg	23580
ggtagctgaa gcccacggcc gccagctcct cctcggcctg tctttcgicc tcgctgtcct	23640
ggctgacgtc ctgcaggacc acatgcttgg tcttgcgggg tttcttcttg ggcggcagcg	23700
gcggcggaga tggttgagat ggcgaggggg agcgcgagtt ctcgctcacc actactatct	23760
cttctcttctc ttgggtccgag gccacgcggc ggtaggtatg tctcttcggg ggcagaggcg	23820
gaggcgacgg gctctcgccg ccgcgacttg gcggatggct ggcagagccc cttccgcgtt	23880
cgggggtgcg ctcccggcgg cgctctgact gacttcctcc gcggccggcc attgtgttct	23940
cctagggagg aacaacaagc atggagactc agccatcgcc aacctcgcca tctgccccca	24000
ccgccgacga gaagcagcag cagcagaatg aaagcttaac cgcggccggc cccagccccg	24060
ccacctccga cgcggccgtc ccagacatgc aagagatgga ggaatccatc gagattgacc	24120
tgggctatgt gacgcccgcg gagcacgagg aggagctggc agtgcgcttt tcacaagaag	24180
agatacacca agaacagcca gagcaggaag cagagaatga gcagagtcag gctgggctcg	24240
agcatgacgg cgactacctc cacctgagcg ggggggagga cgcgctcatc aagcatctgg	24300
cccggcaggc caccatcgtc aaggatgcgc tgctcgaccg caccgaggtg cccctcagcg	24360
tggaggagct cagccgcgcc tacgagttga acctcttctc gccgcgcgtg cccccaagc	24420
gccagcccaa tggcacctgc gagcccaacc cgcgcctcaa cttctaccgg gtcttcgcgg	24480
tgcccagggc cctggccacc taccacatct ttttcaagaa ccaaagatc cccgtctcct	24540
gccgcgcaa cgcacccgc gccgacgcc ttttcaacct ggggtccggc gccgcctac	24600
ctgatatcgc ctctttggaa gaggttccca agatcttcca gggctctgggc agcgacgaga	24660
ctcgggcccgc gaacgtcttg caaggagaag gaggagagca tgagcaccac agcgccctgg	24720
tcgagttgga aggcgacaac gcgcggctgg cggtgctcaa acgcacggtc gagctgacct	24780
atttcgccta cccggctctg aacctgcccc ccaaagtcac gagcgcggtc atggaccagg	24840
tgctcatcaa gcgcgcgtcg cccatctccg aggacgaggg catgcaagac tccgaggagg	24900
gcaagcccgt ggtcagcgac gagcagctgg cccggtggct gggtcctaata gctagtcccc	24960
agagtttgga agagcggcgc aaactcatga tggccgtggc cctggtgacc gtggagctgg	25020
agtgcctgcg ccgttcttcc gccgacgcgg agacctgcg caaggctcag gagaacctgc	25080
actacctctt caggcacggg ttcgtgcgcc aggcctgcaa gatctccaac gtggagctga	25140
ccaacctggc ctctacatg ggcatcttgc acgagaaccg cctggggcag aacgtgctgc	25200

acaccaccct gcgcggggag gcccggcgcg actacatccg cgactgcgtc tacctctacc	25260
tctgccacac ctggcagacg ggcatgggag tgtggcagca gtgtctggag gaggagaacc	25320
tgaaagagct ctgcaagctc ctgcagaaga acctcaaggg tctgtggacc gggttcgacg	25380
agcgcaccac cgcctcggac ctggccgacc tcattttccc cgagcgccctc aggcctgacgc	25440
tgcgcaacgg cctgcccagc ttatgatgac aaagcatgtt gcaaaacttt cgctctttca	25500
tcctcgaacg ctccggaatc ctgcccgcga cctgctccgc gctgccctcg gacttcgtgc	25560
cgctgacctt ccgcgagtcg ccccgccgcg tgtggagcca ctgctacctg ctgcgcctgg	25620
ccaactacct ggcttaccac tcggacgtga tcgaggacgt cagcggcgag ggcttgcctg	25680
agtgccactg ccgctgcaac ctctgcacgc cgcaccgctc cctggcctgc aacccccagc	25740
tgttgagcga gaccagatc atcggcacct tcgagttgca agggcccagc gaaggcgagg	25800
gttcagccgc caaggggggt ctgaaactca ccccggggct gtggacctcg gcctacttgc	25860
gcaagtctgt gcccgaggac taccatccct tcgagatcag gttctacgag gaccaatccc	25920
atccgcccga ggccgagctg tcggcctgcg tcatcaccca gggggcgatc ctggcccga	25980
tgcaagccat ccagaaatcc cgccaagaat tcttgctgaa aaaggccgcg ggggtctacc	26040
tcgacccccca gaccggtgag gagctcaacc ccggttccc ccaggatgcc ccaggaaac	26100
aagaagctga aagtggagct gccgcccgtg gaggatttgg aggaagactg ggagaacagc	26160
agtcaggcag aggaggagga gatggaggaa gactgggaca gcactcaggc agaggaggac	26220
agcctgcaag acagtctgga ggaagacgag gaggaggcag aggaggaggt ggaagaagca	26280
gccgcccga gaccgtcgtc ctgggcgggg gagaaagcaa gcagcacgga taccatctcc	26340
gctccgggtc ggggtcccgc tcgaccacac agtagatggg acgagaccgg acgattccc	26400
aacccccacca ccagaccgg taagaaggag cggcagggat acaagtcctg gcgggggcac	26460
aaaaacgcca tcgtctcctg ctgacaggcc tgcgggggca acatctcctt caccggcg	26520
tacctgtctt tccaccgagg ggtgaacttt ccccgcaaca tcttgatta ctaccgtcac	26580
ctccacagcc cctactactt ccaagaagag gcagcagcag cagaaaaaga ccagcagaaa	26640
accagcagct agaaaaatcca cagcggcggc agcaggctga ctgaggatcg cggcgaacga	26700
gccggcgcaa acccgggagc tgaggaaccg gatctttccc accctctatg ccatcttcca	26760
gcagagtcgg gggcaggagc aggaactgaa agtcaagaac cgttctctgc gctcgctcac	26820
ccgcagttgt ctgtatcaca agagcgaaga ccaacttcag cgcactctcg aggacgccga	26880
ggctctcttc aacaagtact gcgcgctcac tcttaaagag tagcccgcg cggcccgatc	26940

gcagaaaaag gcggaatta cgtcacctgt gcccttcgcc ctagccgcct ccacccatca	27000
tcatgagcaa agagattccc acgccttaca tgtggagcta ccagccccag atgggcctgg	27060
ccgccggtgc cgcccaggac tactccaccc gcatgaattg gctcagcgcc gggcccgca	27120
tgatctcacg ggtgaatgac atccgcgccc accgaaacca gatactccta gaacagtcag	27180
cgctcaccgc cagccccgc aatcacctca atccgcgtaa ttggcccgcc gccctggtgt	27240
accaggaaat tccccagccc acgaccgtac tacttccgcg agacgccag gccgaagtcc	27300
agctgactaa ctccaggtgtc cagctggcgg gcggcgccac cctgtgtcgt caccgccccg	27360
ctcagggtat aaagcggctg gtgatccggg gcagaggcac acagctcaac gacgaggtgg	27420
tgagctcttc gctgggtctg cgacctgacg gagtcttcca actcgccgga tcggggagat	27480
cttctctcac gccctgtcag gccgtcctga ctttggagag ttcgtcctcg cagccccgt	27540
cggttgcat cggcactctc cagttcgtgg aggagttcac tccctcggtc tacttcaacc	27600
ccttctccgg ctcccccggc cactaccggg acgagttcat cccgaacttc gacgccatca	27660
gcgagtcggt ggacggctac gattgaatgt cccatgggtg gcgagctgac ctagctcggc	27720
ttcgacacct ggaccactgc cgccgcttcc gctgcttcgc tcgggatctc gccgagtttg	27780
cctactttga gctgcccag gagcaccctc agggcccgcc ccacggagtg cggatcgtcg	27840
tcgaaggggg cctcgactcc cactgcttc ggatcttcag ccagcgtccg atcctggtcg	27900
agcgcgagca aggacagacc cttctgactc tgtactgcat ctgcaaccac cccggcctgc	27960
atgaaagtct ttgttgtctg ctgtgtactg agtataataa aagctgagat cagcgactac	28020
tccggacttc cgtgtgttcc tgaatccatc aaccagtctt tgttcttcac cggaacgag	28080
accgagctcc agctccagtg taagccccac aagaagtacc tcacctggct gttccagggc	28140
tccccgatcg ccgttgtcaa cactgcgac aacgacggag tctgtctgag cgccctgcc	28200
aaccttactt ttccaccgg cagaagcaag ctccagctct tccaaccctt cctccccggg	28260
acctatcagt gcgtctcggg accttgccat cacaccttc acctgatccc gaataccaca	28320
gcgtcgctcc ccgtactaa caacaaaact aacctccacc aacgccaccg tcgctaggcc	28380
acaatacatg cccatattag actatgaggc cgagccacag cgacccatgc tccccgtat	28440
tagttacttc aatctaaccg gcggagatga ctgacctact ggccaacaac aacgtcaacg	28500
accttctcct ggacatggac ggccgcgcct cggagcagcg actcgcccaa ctccgcatc	28560
gccagcagca ggagagagcc gtcaaggagc tgcaggatgc ggtggccatc caccagtgc	28620
agagaggcat cttctgcctg gtgaaacagg ccaagatctc ctacgaggtc actccaaacg	28680

accatgcct ctcctacgag ctccctgcagc agcgccagaa gttcacctgc ctggtcggag	28740
tcaaccccat cgtcatcacc cagcagtcctg gcgataccaa ggggtgcatc cactgctcct	28800
gcgactcccc cgactgcgtc cacactctga tcaagaccct ctgcggcctc cgcgacctcc	28860
tccccatgaa ctaatcaccc ccttatccag tgaataaag atcatattga tgatgatttt	28920
acagaaataa aaaataatca tttagattga aataaagata caatcatatt gatgatttga	28980
gtttaacaaa aaaataaaga atcacttact tgaaatctga taccaggtct ctgtccatgt	29040
tttctgccaa caccacttca ctcccccttt cccagctctg gtactgcagg ccccggcggg	29100
ctgcaaacct cctccacacg ctgaaggga tgtcaaattc ctccctgtccc tcaatcttca	29160
ttttatcttc tatcagatgt ccaaaaagcg cgtccgggtg gatgatgact tcgaccccg	29220
ctacccctac gatgcagaca acgcaccgac cgtgcccttc atcaaccccc cttcgtctc	29280
ttcagatgga ttccaagaga agccccctggg ggtgttgtcc ctgcgactgg ccgaccccg	29340
caccaccaag aacgggggaaa tcacctcaa gctgggagag ggggtggacc tcgattcctc	29400
gggaaaactc atctccaaca cggccaccaa ggccgccgcc cctctcagtt ttccaacaa	29460
caccatttcc cttaacatgg atcacccctt ttacactaaa gatggaaaat tatccttaca	29520
agtttctcca ccattaaata tactgagaac aagcattcta aacacactag ctttaggttt	29580
tggatcaggt ttaggactcc gtggctctgc ctgggcagta cagttagtct ctccacttac	29640
atttgatact gatggaaaca taaagcttac cttagacaga ggtttgcatg ttacaacagg	29700
agatgcaatt gaaagcaaca taagctgggc taaaggttta aaatttgaag atggagccat	29760
agcaaccaac atttggaatg ggtagagtt tggaagcagt agtacagaaa caggtgttga	29820
tgatgcttac ccaatccaag ttaaaacttg atctggcctt agctttgaca gtacaggagc	29880
cataatggct ggtaacaaag aagacgataa actcactttg tggacaacac ctgatccatc	29940
accaaactgt caaatactcg cagaaaatga tgcaaaacta acactttgct tgactaaatg	30000
tggtagtcaa atactggcca ctgtgtcagt cttagttgta ggaagtggaa acctaaaccc	30060
cattactggc accgtaagca gtgctcaggt gtttctacgt tttagatgcaa acggtgttct	30120
tttaacagaa cattctacac taaaaaata ctgggggtat aggcaggagg atagcataga	30180
tggcactcca tataccaatg ctgtaggatt catgccaat ttaaaagctt atccaaagtc	30240
acaaagttct actactaaaa ataatatagt agggcaagta tacatgaatg gagatgttct	30300
aaaacctatg cttctcacta taacctcaa tggtagtgat gacagcaaca gtacatattc	30360
aatgtcattt tcatacacct ggactaatgg aagctatgtt ggagcaacat ttggggctaa	30420

ctcttataacc ttctcataca tcgcccaga atgaacactg tatcccaccc tgcatgccaa	30480
cccttcccac cccactctgt ggaacaaact ctgaaacaca aaataaaata aagttcaagt	30540
gttttattga ttcaacagtt ttacaggatt cgagcagtta tttttcctcc accctcccag	30600
gacatggaat acaccaccct ctccccccgc acagccttga acatctgaat gccattggtg	30660
atggacatgc ttttgggtctc cacgttccac acagtttcag agcgagccag tctcgggtcg	30720
gtcagggaga tgaaaccctc cgggcactcc cgcacttgca cctcacagct caacagctga	30780
ggattgtcct cgggtggtcgg gatcacggtt atctggaaga agcagaagag cggcgggtgg	30840
aatcatagtc cgcgaacggg atcggccggt ggtgtcgcat caggccccgc agcagtcgct	30900
gccgccgccg ctccgtcaag ctgctgctca gggggtccgg gtccaggagac tccctcagca	30960
tgatgccac ggccctcagc atcagtcgtc tgggtcggcg ggcgagcag cgcattcgga	31020
tctcgctcag gtcgctgcag tacgtgcaac acagaaccac caggttggtc aacagtccat	31080
agttcaacac gctccagccg aaactcatcg cgggaaggat gctaccacg tggccgtcgt	31140
accagatcct caggtaaact aagtgggtgcc ccctccagaa cacgctgccc acgtacatga	31200
tctccttggg catgtggcgg ttaccacct cccggtacca catcacctc tggttgaaca	31260
tgcagccccg gatgatcctg cggaaccaca gggccagcac cgccccgcc gccatgcagc	31320
gaagagaccc cgggtccccg caatggcaat ggaggacca ccgctcgtac ccgtggatca	31380
tctgggagct gaacaagtct atgttggcac agcacaggca tatgctcatg catctctca	31440
gcactctcaa ctctcgggg gtcaaaacca tatcccaggg cacggggaac tcttcagga	31500
cagcgaaccc cgcagaacag ggcaatcctc gcacagaact tacattgtgc atggacaggg	31560
tatcgcaatc aggcagcacc ggggtgatcct ccaccagaga agcgcgggtc tcgggtcct	31620
cacagcgtgg taagggggcc ggccgatacg ggtgatggcg ggacgcggct gatcgtgttc	31680
gcgaccgtgt catgatgcag ttgctttcgg acattttcgt acttgctgta gcagaacctg	31740
gtccgggccc tgcacaccga tcgccggcgg cggctctcggc gcttggaaac ctcggtgttg	31800
aaattgtaaa acagccactc tctcagaccg tgcagcagat ctagggcctc aggagtgatg	31860
aagatcccat catgcctgat ggctctgata acatcgacca ccgtggaatg ggccagaccc	31920
agccagatga tgcaattttg ttgggtttcg gtgacggcgg gggagggaag aacaggaaga	31980
accatgatta acttttaatc caaacgggtct cggagtactt caaaatgaag atcgcggaga	32040
tggcacctct cgccccgct gtgttgggtgg aaaataacag ccagggtcaaa ggtgatacgg	32100
ttctcgagat gttccacggt ggcttccagc aaagcctcca cgcgcacatc cagaaacaag	32160

acaatagcga aagcgggagg gttctcta	atccatca tcatgttaca ctctgcacc	32220
atccccagat aattttcatt tttccagcct	tgaatgattc gaactagttc ctgaggtaaa	32280
tccaagccag ccatgataaa gagctcgcg	cagagcgccct ccaccggcat tcttaagcac	32340
accctcataa ttccaagata ttctgctcct	ggttcacctg cagcagattg acaagcggaa	32400
tatcaaaatc tctgccgcga tccctgagct	cctccctcag caataactgt aagtactctt	32460
tcatatcctc tccgaaattt ttagccatag	gaccaccagg aataagatta gggcaagcca	32520
cagtacagat aaaccgaagt cctccccagt	gagcattgcc aaatgcaaga ctgctataag	32580
catgctggct agacccggtg atatcttcca	gataactgga cagaaaaatcg cccaggcaat	32640
ttttaagaaa atcaacaaaa gaaaaatcct	ccagggtggac gtttagagcc tcgggaacaa	32700
cgatgaagta aatgcaagcg gtgcgttcca	gcatgggttag ttagctgata ttagaaaaa	32760
acaaaaatga acattaaacc atgctagcct	ggcgaacagg tgggtaaata gtctcttcca	32820
gcaccaggca ggccacgggg tctccggcg	cagccctcgt aaaaattgtcg ctatgattga	32880
aaaccatcac agagagacgt tcccggtggc	cggcgtgaat gattcgacaa gatgaataca	32940
cccccggaac attggcgctc gcgagtga	aaaagcgccc gaggaagcaa taaggcacta	33000
caatgctcag tctcaagtcc agcaaagcga	tgccatgcgg atgaagcaca aaattctcag	33060
gtgcgtacaa aatgtaatta ctccccctct	gcacaggcag caaagcccc gatccctcca	33120
ggtacacata caaagcctca gcgtccatag	cttaccgagc agcagcacac aacaggcgca	33180
agagtcagag aaaggctgag ctctaacctg	tccaccgct ctctgctcaa tatatagccc	33240
agatctacac tgacgtaaag gccaaagtct	aaaaataccc gccaaataat cacacacgcc	33300
cagcacacgc ccagaaaccg gtgacacact	caaaaaata cgcgcacttc ctcaaagcc	33360
caaaactgcc gtcattttccg ggttcccacg	ctacgtcacc aaaacacgac ttccaattc	33420
cgtcgaccgt taaaaacgtc acccgccccg	cccctaacgg tcgcccgtct ctgagccaat	33480
cagcgccccg catccccaaa ttcaaacacc	tcatgtgcat attaacgcgc acaaaaagtt	33540
tgagggtatat tattgatgat gg		33562

<210> 45
 <211> 34803
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成建構體

<400> 45

ccatcttcaa taatatacct caaacftttt gtgcgcgtta atatgcaa at gaggcgtttg	60
aatttgggga ggaagggcgg tgattggtcg agggatgagc gaccgttagg ggcggggcga	120
gtgacgtttt gatgacgtgg ttgcgaggag gagccagttt gcaagtcttc gtgggaaaag	180
tgacgtcaaa cgagggtgtg tttgaacacg gaaatactca attttcccgc gctctctgac	240
aggaaatgag gtgtttctgg gcggatgcaa gtgaaaacgg gccattttcg cgcgaaaact	300
gaatgaggaa gtgaaaatct gagtaatttc gcgtttatgg cagggaggag tatttgccga	360
gggccgagta gactttgacc gattacgtgg gggtttcgat taccgtgttt ttcacctaaa	420
tttccgcgta cgggtgtcaaa gtccgggtgtt ttactactg taatagtaat caattacggg	480
gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc	540
gcctggctga ccgcccacg acccccgcgc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat	600
agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatftac ggtaaactgc	660
ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtacg cccctattg acgtcaatga	720
cggtaaatgg ccgcctggc attatgcccga gtacatgacc ttatgggact ttcctacttg	780
gcagtacatc tacgtattag tcatcgtat taccatgggtg atgcgggtttt ggcagtacat	840
caatgggcgt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt	900
caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactc	960
cgccccattg acgcaaattg gcggtaggcg tgtacgggtg gaggtctata taagcagagc	1020
tgtccctatc agtgatagag atctccctat cagtgataga gagtttagtg aaccgtcaga	1080
tccgctaggg taccaacatg gctagcatcg tccgaggggtg ggagtgcgaa aagcactcac	1140
agccatggca ggtcctggtc gcctcgcgcg gacgcgccgt gtgtggagggt gtgctgggtcc	1200
acccgcagtg ggtgttgact gcggcccat tgcacagaaa taagtccgtg atcctcttgg	1260
ggagacattc cctgtttcac ccgaagata ctggacaggt gttccaagtg agccactcct	1320
tcccgcattc actgtacgac atgagcctgc tgaagaaccg ctftctgcgg ccaggggacg	1380
actcatcaca cgatttgatg ctgcttcggc tctcggaacc ggccgagctc accgacgcag	1440
tgaaggatcat ggacctccct acgcaagagc ctgctctcgg taccacttgt tacgcatcgg	1500
gatggggctc catcgagccg gaagaattcc tgaccccgaa aaagctgcag tgcgtggatc	1560
tgcacgtgat ttcgaatgac gtgtgcgcgc aagtgcattc aaaaagggtc actaagtcca	1620
tgctgtgcgc cggaagggtg accggcggaa aatcgacctg ttccggcgac agcggaggcc	1680
cactcgtgtg caacggtgtg ctgcagggca tctagctg gggatcagaa ccgtgcgcgc	1740

ttccggagcg gccctcgctc tacacgaagg tgggtgacta ccgcaaattg attaaagata	1800
ccatcgctcg aaaccttgga tccgaaggta ggggttcatt attgacctgt ggagatgtcg	1860
aagaaaaccc aggacccgct agcaaagcag tgctgctggc gtcctgatg gctggactcg	1920
cgctgcagcc tggaaaccgcc ctgctctgtt actcgtgcaa ggcccaagtc tcgaatgagg	1980
actgtttgca agtggaaaac tgcaccagc tcggagaaca atgctggact gcacggatcc	2040
gcgctgtcgg cctgctgacc gtgatctcca aagggtgctc attgaactgc gtggacgata	2100
gccaggacta ctacgtggga aagaagaata tcacttgttg cgacacggat ctttgcaacg	2160
cgtcggagc gcacgccctg cagccagcag ccgccattct ggccctgctt ccggccctgg	2220
ggttgctgct ctgggggtccg ggccagctcg gatcccagac cctgaacttt gatctgctga	2280
aactggcagg cgatgtggaa agcaaccag gcccaatggc tagcgctcg agaccgcgt	2340
ggctgtgtgc aggggcgctc gtcctggcgg gtggcttctt ttgctcggc tttcttttcg	2400
gatggttcac caaatcgta aacgaagcta ccaatatcac ccggaagcac aacatgaagg	2460
cctttctgga tgagctgaag gctgagaaca ttaagaagt cctctacaac ttcaccaga	2520
tcccacattt ggcgggcact gagcagaact ttcagttggc taagcagatc cagagccagt	2580
ggaaggaatt cgccctggac tccgtcgagc tggcgcatga cgatgtgctg ctgagctacc	2640
ctaataagac tcatccgaac tatactctga ttatcaatga ggacggaaac gaaatcttta	2700
acacgtccct ctfcgagccg ccaccgcctg gatacgagaa cgtgtcagat atcgtgcctc	2760
cgttctcggc ctctcgcgcc cagggaatgc ccgaagggga cctgggtgtac gtgaactacg	2820
caaggaccga ggacttcttc aagttaggagc gggatatgaa gatcaattgc agcggaaaga	2880
tcgtcatcgc ccgctacggc aaagtgttcc gcggcaacaa ggtgaagaat gcacagtigg	2940
caggcgccaa gggcgctatc ctctactcgg atcctgccga ctacttcgct cctggcgtga	3000
aatcctaccc tgatggttgg aatctgccag gaggaggggt gcagagggga aatatcctga	3060
acctgaacgg tgccggtgac ccacttactc cgggttaccg ggccaacgaa tacgcgtaca	3120
ggcggggtat cgcggaagcc gtcggactgc cgtccatccc ggtccatccg attggttact	3180
acgacgcca gaagctcctc gaaaagatgg gaggcagcgc cctccggac tcgtcatgga	3240
gaggctcgt gaaggtgcca tacaacgtgg gaccggatt cactggaaat ttcagcactc	3300
aaaaagtga gatgcacatt cactccacta acgaagtcac caggatctac aacgtcatcg	3360
gaaccctccg gggagcggtg gaaccggacc gctacgtgat cctcggtgga caccgggata	3420
gctgggtgtt cggaggaatc gatcctcaat cgggcgcagc cgtcgtccat gaaatcgta	3480

ggtcctttgg tactcttaag aaggagggct ggcgccctag acgcactatt ctgttcgcct	3540
cgtgggatgc cgaagaattt ggtctgctcg gcagcaccga atgggctgag gaaaactccc	3600
gcctgctcca agaacgcgga gtggcgtaga tcaatgccga ctcatccatc gaaggaaact	3660
acacgctgcg ggtggactgc actccactga tgtactcgct cgtgcacaac ctgaccaaag	3720
aactcaaatc cccagacgaa ggattcgagg gaaaatcgct gtacgagtcg tggaccaaga	3780
agagcccatc cccggagttc agcgggatgc cgcggatctc aaagctcgga tcaggaaatg	3840
atttcgaagt gtictttcag aggctgggaa ttgcgtcggg aagggtcgg tacacgaaaa	3900
actgggaaac taacaagtgc tcgggatacc cgctgtacca ctcggtgtat gaaacttacg	3960
aactgggtgga gaaattctac gatcctatgt ttaagtacca cctgactgtg gcccaagtga	4020
gaggcggaat ggtgttcgag ttggccaatt caattgtgct gccattcgat tgccgcgact	4080
acgccgtggg gctgagaaag tacgcagaca aaatctactc aatcagcatg aagcaccac	4140
aagagatgaa aacctactca gtctccttcg actccctctt ctccgcgggtg aagaacttca	4200
ccgagatcgc gagcaaattc tcggagcgcc ttcaagattt tgacaaatcc aatccgatcg	4260
tcctccgcat gatgaatgac cagctcatgt ttctcgaacg ggccttcacg gatccactgg	4320
gacttccgga ccggccggtt taccgccacg tgatctacgc gccctcgtcg cataacaagt	4380
atgctggaga gagcttcccg ggtatctacg acgcattgtt cgacattgag tccaagggtg	4440
atccgtccaa agcctggggg gaagtgaagc gccaaatcta cgtggcggcc ttaccgtcc	4500
aggcggcagc agaaaccttg agcgagggtg ctgactcga gcctaagctt ctagataaga	4560
tatccgatcc accggatcta gataactgat cataatcagc cataccacat ttgtagaggt	4620
tttacttgct ttaaaaaacc tcccacacct cccctgaac ctgaaacata aaatgaatgc	4680
aattgttggt gtttaacttg ttattgcagc ttataatggt taaaaataa gcaatagcat	4740
cacaaatttc acaataaag catTTTTTt actgcattct agttgtggtt tgtccaaact	4800
catcaatgta tcttatatgc tggccaccgt acatgtggct tccatgctc gcaagccctg	4860
gcccaggttc gagcacaatg tcatgaccag gtgcaatatg catctggggt cccgccgagg	4920
catgttcatg ccctaccagt gcaacctgaa ttatgtgaag gtgctgctgg agcccgatgc	4980
catgtccaga gtgagcctga cgggggtgtt tgacatgaat gtggagggtg ggaagattct	5040
gagatatgat gaatccaaga ccaggtgccg agcctgcgag tgcggaggga agcatgccag	5100
gttccagccc gtgtgtgtgg atgtgacgga ggacctgcga ccgatcatt tgggtgtgcc	5160
ctgcaccggg acggagttcg gttccagcgg ggaagaatct gactagagtg agtagtgttc	5220

tggggcgggg gaggacctgc atgaggggcca gaataactga aatctgtgct tttctgtgtg	5280
ttgcagcagc atgagcgga gcggtcctt tgaggagggt gtattcagcc cttatctgac	5340
ggggcgctct cctcctggg cgggagtgcg tcagaatgtg atgggatcca cggtaggacgg	5400
ccggcccgtg cagcccgcga actcttcaac cctgacctat gcaacctga gctcttcgtc	5460
gttggacgca gctgccgccc cagctgtctg atctgccgcc agcgccgtg gcggaatggc	5520
catgggcgcc ggctactacg gcaactctgt ggccaactcg agttccacca ataatcccgc	5580
cagcctgaac gaggagaagc tgttctgtgt gatggcccag ctgaggcct tgaccagcg	5640
cctgggcgag ctgaccagc aggtggctca gctgcaggag cagacgcggg ccgcggttgc	5700
cacggtgaaa tccaaataaa aaatgaatca ataaataaac ggagacggtt gttgatttta	5760
acacagagtc tgaatcttta tttgattttt cgcgcgcggt aggccctgga ccaccggtct	5820
cgatcattga gcaccggtg gatcttttcc aggaccggt agaggtaggc ttggatgttg	5880
aggtacatgg gcatgagccc gtcccggggg tggaggtagc tccattgcag ggctcgtgc	5940
tcgggggtgg tgttgtaaat caccagtc tagcaggggc gcaggcatg gtgttgaca	6000
atatctttga ggaggagact gatggccacg ggcagccctt tggtaggt gttacaaat	6060
ctgttagct gggagggatg catgcggggg gagatgaggt gcatcttggc ctggatcttg	6120
agattggcga tgttaccgcc cagatccgc ctggggttca tgttgtgcag gaccaccagc	6180
acggtgtatc cgggtgcactt ggggaattta tcatgcaact tggaggga ggcgtgaaag	6240
aatttggcga cgcctttgtg cccgcccagg ttttccatgc actcatccat gatgatggcg	6300
atgggcccgt gggcggcggc ctgggcaaag acgtttcggg ggtcggacac atcatagt	6360
tggtcctggg tgaggtcatc ataggccatt ttaatgaatt tggggcggag ggtgccggac	6420
tgggggacaa aggtaccctc gatcccgggg gcgtagtcc cctcacagat ctgcatctcc	6480
caggctttga gctcggaggg ggggatcatg tccacctgcg gggcgataaa gaacacggtt	6540
tccggggcgg gggagatgag ctgggccgaa agcaagtcc ggagcagctg ggacttgcg	6600
cagccggtgg ggccgtagat gacccgatg accggctgca ggtggtagt gagggagaga	6660
cagctgccgt cctcccggag gaggggggcc acctcgttca tcatctcgcg cacgtgcatg	6720
ttctcgcgca ccagttccgc caggaggcgc tctccccca gggataggag ctctggagc	6780
gaggcgaagt ttttcagcgg cttagctccg tcggccatgg gcattttggg gagggtttgt	6840
tgcaagagtt ccaggcggtc ccagagctcg gtgatgtgt ctacggcatc tcatccagc	6900
agacctctc gtttcgcggg ttgggacggc tgcgggagta gggcaccaga cgtgggcgt	6960

ccagcgcagc caggggtccgg tccttccagg gtcgcagcgt ccgcgtcagg gtgggtctccg	7020
tcacggtgaa ggggtgcgcg ccgggctggg cgcttgcgag ggtgcgcctc aggctcatcc	7080
ggctgggtcga aaaccgctcc cgatcggcgc cctgcgcgtc ggccaggtag caattgacca	7140
tgagttcgta gttgagcgcc tcggccgcgt ggcctttggc gcggagctta cctttggaag	7200
tctgcccgcga ggccgggacag aggagggact tgagggcgta gagcttgggg gcgaggaaga	7260
cggactcggg ggcgtaggcg tccgcgccgc agtgggcgca gacggtctcg cactccacga	7320
gccaggtgag gtcgggctgg tcgggggtcaa aaaccagttt cccgccgttc tttttgatgc	7380
gtttcttacc tttgggtctcc atgagctcgt gtccccgctg ggtgacaaag aggctgtccg	7440
tgtccccgta gaccgacttt atgggccggt cctcgagcgg tgtgccgcgg tcctcctcgt	7500
agaggaaccc cgcccaactcc gagacgaaag cccgggtcca ggccagcacg aaggaggcca	7560
cgtgggacgg gtagcggctg ttgtccacca gcgggtccac cttttccagg gtatgcaaac	7620
acatgtcccc ctctgtccaca tccaggaagg tgattggctt gtaagtgtag gccacgtgac	7680
cgggggtccc ggccgggggg gtataaaagg gtgcgggtcc ctgctcgtcc tcaactgtctt	7740
ccggatcgt gtccaggagc gccagctgtt ggggtaggta ttccctctcg aaggcgggca	7800
tgacctcggc actcaggttg tcagtttcta gaaacgagga ggatttgata ttgacgggtgc	7860
cggcggagat gcctttcaag agcccctcgt ccatctggtc agaaaagacg atctttttgt	7920
tgtcgagctt ggtggcgaag gagccgtaga gggcgttgga gaggagcttg gcgatggagc	7980
gcatgggtctg gtttttttcc ttgtcggcgc gtccttggc ggcatgttg agctgcacgt	8040
actcgcgcgc cacgcacttc cattcgggga agacggtggt cagctcgtcg ggcacgattc	8100
tgacctgcca gccccgatta tgcaggtga tgagggtccac actgggtggcc acctcgccgc	8160
gcaggggctc attagtccag cagaggcgtc cgcccttgcg cgagcagaag gggggcaggg	8220
ggtccagcat gacctcgtcg ggggggtcgg catcgatggt gaagatgccg ggcaggaggt	8280
cgggggtcaa gtagctgatg gaagtggcca gatcgtccag ggcagcttgc cattcgcgca	8340
cggccagcgc gcgctcgtag ggactgaggg gcgtgcccc gggcatggga tgggtaagcg	8400
cggaggcgta catgccgcag atgtcgtaga cgtagagggg ctccctcagg atgccgatgt	8460
aggtggggta gcagcgcccc ccgcggatgc tggcgcgcac gtagtcatac agctcgtgcg	8520
agggggcgag gagccccggg ccaggttgg tgcgactggg cttttcggcg cggtagacga	8580
tctggcggaa aatggcatgc gatttggagg agatgggtggg cctttggaag atgttgaagt	8640
gggcgtgggg cagtccgacc gattcgcgga tgaagtgggc gtaggagtct tgcagcttgg	8700

cgacgagctc ggcggtgact aggacgtcca gagcgagta gtcgagggtc tcctggatga	8760
tgtcatactt gagctgtccc ttttgtttcc acagctcgcg gttgagaagg aactcttcgc	8820
ggtccttcca gtactcttcg agggggaacc cgtcctgacg tgcacggtaa gagcctagca	8880
tgtagaactg gttgacggcc ttgtaggcgc agcagccctt ctccacgggg agggcgtagg	8940
cctgggcggc cttgcgcagg gaggtgtgcg tgaggggcga agtgtccctg accatgacct	9000
tgaggaaactg gtgcttgaag tcgatatcgt cgcagcccc ctgctcccag agctggaagt	9060
ccgtgcgctt cttgtaggcg gggttgggca aagcgaaaagt aacatcggtg aagaggatct	9120
tgcccgcgcg gggcataaag ttgcgagta tgcggaaaagg ttggggcacc tcggcccgtt	9180
tgttgatgac ctgggcggcg agcacgatct cgtcgaagcc gttgatgttg tggcccacga	9240
tgtagagttc cacgaatcgc ggacggccct tgacgtgggg cagtctcttg agtcctcgt	9300
aggtgagctc gtcgggggtcg ctgagcccg gctgctcgag cggccagtcg gcgagatggg	9360
ggttggcgcg gaggaaggaa gtccagagat ccacggccag ggcggtttgc agacgggtccc	9420
ggtactgacg gaactgctgc ccgacggcca ttttttcggg ggtgacgcag tagaagggtc	9480
gggggtcccc gtgccagcga tcccatttga gctggagggg gagatcgagg gcgagctcga	9540
cgagccggtc gtccccggag agtttcatga ccagcatgaa ggggacgagc tgcttgccga	9600
aggaccccat ccagggtgtg gtttccacat cgtagggtgag gaagagccct tcggtgcgag	9660
gatgcgagcc gatggggaag aactggatct cctgccacca attggaggaa tggctgttga	9720
tgtgatggaa gtagaaatgc cgacggcgcg ccgaacactc gtgcttgtgt ttatacaagc	9780
ggccacagtg ctgcgaacgc tgcacgggat gcacgtgctg cacgagctgt acctgagttc	9840
ctttgacgag gaatttcagt gggaagtgga gtcgtggcgc ctgcatctcg tgctgtacta	9900
cgtcgtggtg gtcggccttg cctcttcttg cctcgatggt ggtcatgctg acgagcccg	9960
gcgggaggca ggtccagacc tcggcgcgag cgggtcggag agcgaggacg agggcgcgca	10020
ggccggagct gtccagggtc ctgagacgct gcggagtcag gtcagtgggc agcgcgcgcg	10080
cgcggttgac ttgcaggagt ttttccaggg cgcgcgggag gtccagatgg tacttgatct	10140
ccaccgcgcc attggtggcg acgtcgatgg cttgcagggt cccgtgcccc tggggtgtga	10200
ccaccgtccc ccgtttcttc ttgggcggct ggggcgacgg gggcggtgcc tcttccatgg	10260
ttagaagcgg cggcgaggac gcgcgccggg cggcaggggc ggctcggggc ccggaggcag	10320
gggcggcagg ggcacgtcgg cgcgcgcgcg gggtaggttc tggtagtgcg cccggagaag	10380
actggcgta gcgacgacgc gacggttgac gtcctggatc tgacgcctct gggatgaaggc	10440

cacgggaccc gtgagtttga acctgaaaga gagttcgaca gaatcaatct cggtatcggt	10500
gacggcgggcc tgccgcagga tctcttgac gtcgcccagag ttgtcctggt aggcgatctc	10560
ggtcatgaac tgctcgatct cctcctcttg aaggtctccg cggccggcgc gctccacggt	10620
ggccgcgagg tcgttggaga tgcggcccat gagctgcgag aaggcgttca tgccgcctc	10680
gttccagacg cggctgtaga ccacgacgcc ctggggatcg cgggcgcgca tgaccacctg	10740
ggcgaggttg agctccacgt ggcgcgtaga gaccgcgtag ttgcagaggc gctggtagag	10800
gtagttagac gtggtggcga tgtgctcggg gacgaagaaa tacatgatcc agcggcggag	10860
cggcatctcg ctgacgtcgc ccagcgccctc caaacgttcc atggcctcgt aaaagtccac	10920
ggcgaagtig aaaaactggg agttgcgcgc cgagacggtc aactcctcct ccagaagacg	10980
gatgagctcg gcgatggttg cgcgcacctc gcgctcgaag gccccggga gttcctccac	11040
ttcctcttct tctcctcca ctaacatctc ttctacttcc tctcaggcg gcagtgggtg	11100
cgggggaggg ggcttgcgtc gccggcggcg cacgggcaga cggtcgatga agcgctcgat	11160
ggtctcgccg cgccggcgtc gcatggtctc ggtgacggcg ccccgtcct cgcggggccg	11220
cagcgtgaag acgccgccgc gcatctccag gtggccgggg gggtccccgt tgggcaggga	11280
gagggcgctg acgatgcac ttatcaattg ccccgtaggg actccgcgca aggacctgag	11340
cgtctcgaga tccacgggat ctgaaaaccg ctgaacgaag gcttcgagcc agtcgcagtc	11400
gcaaggtagg ctgagcacgg tttcttcttg cgggtcatgt tggttgggag cggggcgggc	11460
gatgctgctg gtgatgaagt tgaatatggc ggttctgaga cggcggatgg tggcgaggag	11520
caccaggtct ttgggcccgg ctgtctggat gcgcagacgg tcggccatgc ccaggcggtg	11580
gtcctgacac ctggccaggt ccttgtagta gtcctgcatg agccgctcca cgggcacctc	11640
ctcctcgccc gcggggccgt gcatgcgcgt gagcccgaag ccgcgctggg gctggacgag	11700
cgccaggtcg gcgacgacgc gctcggcgag gatggcttgc tggatctggg tgagggtggt	11760
ctggaagtca tcaaagtcga cgaagcgggt gtaggctccg gtgttgatgg tgtaggagca	11820
gttggccatg acggaccagt tgacggtctg gtggcccgga cgcacgagct cgtggtactt	11880
gaggcgcgag taggcgcgcg tgtcgaagat gtagtcgttg caggtgcgca ccaggctactg	11940
gtagccgatg aggaagtgcg gcggcggtg gcggtagagc ggccatcgct cgggtggcggg	12000
ggcgccgggc gcgaggtcct cgagcatggt gcggtggtag ccgtagatgt acctggacat	12060
ccaggatgat ccggcgggcg tggtaggagc gcgcgggaac tcgcggacgc ggttccagat	12120
gttgcgcagc ggcaggaagt agttcatggt gggcacggtc tggcccgtga ggcgcgcgca	12180

gtcgtggatg ctctatacgg gcaaaaacga aagcggtcag cggctcgact ccgtggcctg	12240
gaggctaagc gaacgggttg ggctgcgcgt gtaccccgtt tcgaatctcg aatcaggctg	12300
gagccgcagc taacgtggta ttggcactcc cgtctcgacc caagcctgca ccaaccctcc	12360
aggatacggg ggcgggtcgt ttgcaactt ttttttggag gccggatgag actagtaagc	12420
gcggaaagcg gccgaccgag atggctcgct gccgtagtct ggagaagaat cgccagggtt	12480
gcgttgcggt gtgccccggt tcgaggccgg ccggattccg cggctaacga gggcgtggct	12540
gccccgtcgt ttccaagacc ccatagccag ccgacttctc cagttacgga gcgagccccct	12600
cttttgtttt gtttgttttt gccagatgca tcccgtactg cggcagatgc gccccacca	12660
ccctccaccg caacaacagc cccctccaca gccggcgctt ctgccccgc cccagcagca	12720
acttccagcc acgaccgccc cggccgccgt gagcggggct ggacagagtt atgacacca	12780
gctggccttg gaagagggcg aggggctggc gcgcctgggg gcgtcgtcgc cggagcggca	12840
cccgcgcgtg cagatgaaaa gggacgctcg cgaggcctac gtgccaagc agaacctgtt	12900
cagagacagg agcggcgagg agcccgagga gatgcgcgcg gcccggttcc acgcggggcg	12960
ggagctgcgg cgcggccttg accgaaagag ggtgctgagg gacgaggatt tcgaggcgga	13020
cgagctgacg gggatcagcc ccgcgcgcgc gcacgtggcc gcggccaacc tggtcacggc	13080
gtacgagcag accgtgaagg aggagagcaa ctccaaaaa tccttcaaca accacgtgcg	13140
caccctgacg gcgcgcgagg aggtgacctt gggcctgatg cacctgtggg acctgctgga	13200
ggccatcgtg cagaaccca ccagcaagcc gctgacggcg cagctgttcc tgggtgtgca	13260
gcatagtcgg gacaacgaag cgttcaggga ggcgctgctg aatatcaccg agcccgaggg	13320
ccgctggctc ctggacctgg tgaacattct gcagagcatc gtggtgcagg agcgcgggct	13380
gccgctgtcc gagaagctgg cggccatcaa ctctcgggtg ctgagtttgg gcaagtacta	13440
cgctaggaag atctacaaga ccccgtagct gcccatagac aaggaggatga agatcgacgg	13500
gttttacatg cgcattgacc tgaagtgct gacctgagc gacgatctgg ggggtgtaccg	13560
caacgacagg atgcaccgtg cggtagcgc cagcaggcgg cgcgagctga gcgaccagga	13620
gctgatgcat agtctgcagc gggccctgac cggggccggg accgaggggg agagctactt	13680
tgacatgggc gcggacctgc actggcagcc cagccgccgg gccttggagg cggcggcagg	13740
accctacgta gaagaggttg acgatgaggt ggacgaggag ggcgagtacc tggaagactg	13800
atggcgcgac cgtatTTTTT ctagatgcaa caacaacagc caccctctga tcccgcgatg	13860
cgggcggcgc tgcagagcca gccgtccggc attaacctct cggacgattg gaccagggcc	13920

atgcaacgca tcatggcgct gacgacccgc aacccgaag cctttagaca gcagccccag	13980
gccaaccggc tctcgccat cctggaggcc gtggtgccct cgcgctcaa cccacgcac	14040
gagaagggtcc tggccatcgt gaacgcgctg gtggagaaca aggccatccg cggcgacgag	14100
gccggcctgg tgtacaacgc gctgctggag cgcgtggccc gctacaacag caccaacgtg	14160
cagaccaacc tggaccgcat ggtgaccgac gtgcgcgagg ccgtggcca gcgcgagcgg	14220
ttccaccgag agtccaacct gggatccatg gtggcgctga acgccttcct cagcaccag	14280
cccgccaacg tgccccgggg ccaggaggac tacaccaact tcatcagcgc cctgcgcctg	14340
atggtgaccg aggtgcccc gagcgaggtg taccagtccg ggccggacta cttcttcag	14400
accagtcgcc agggcttgca gaccgtgaac ctgagccagg ctttcaagaa ctgcagggc	14460
ctgtggggcg tgcaggcccc ggtcggggac cgcgcgacgg tgcgagcct gctgacgccg	14520
aactcgcgcc tgctgctgct gctggtggcc cccttcacgg acagcggcag catcaaccgc	14580
aactcgtacc tgggctacct gattaacctg taccgcgagg ccatcgcca ggcgacgtg	14640
gacgagcaga cctaccagga gatcaccac gtgagccgc ccctgggcca ggacgacccg	14700
ggcaacctgg aagccaccct gaactttttg ctgaccaacc ggtcgcagaa gatcccgccc	14760
cagtacgcgc tcagcaccga ggaggagcgc atcctgcgtt acgtgcagca gagcgtgggc	14820
ctgttctga tgcaggaggg ggccacccc agcgccgcgc tcgacatgac cgcgcgaac	14880
atggagccca gcatgtacgc cagcaaccgc ccgttcacat ataaactgat ggactacttg	14940
catcgggcgg ccgcatgaa ctctgactat ttaccaacg ccatcctgaa tccccactgg	15000
ctcccgccgc cggggttcta cacgggcgag tacgacatgc ccgacccaa tgacgggttc	15060
ctgtgggacg atgtggacag cagcgtgttc tcccccgac cgggtgctaa cgagcgcccc	15120
ttgtggaaga aggaaggcag cgaccgacgc ccgtcctcgg cgctgtccgg ccgcgagggt	15180
gctgccgcgg cgggtgcccga ggccgccagt ctttccga gcttgccctt ctcgtgaac	15240
agtatccgca gcagcgagct gggcaggatc acgcgcccgc gcttgctggg cgaagaggag	15300
tacttgaatg actcgtgtt gagacccgag cgggagaaga acttcccaa taacgggata	15360
gaaagcctgg tggacaagat gagccgctgg aagacgtat gcgaggagca cagggacgat	15420
ccccgggcgt cgcagggggc cacgagccgg ggcagcgccg cccgtaaacg ccggtggcac	15480
gacaggcagc ggggacagat gtgggacgat gaggactccg ccgacgacag cagcgtgttg	15540
gacttgggtg ggagtggtaa cccgttcgct cacctgcgc cccgtatcgg gcgcatgatg	15600
taagagaaac cgaaaataaa tgatactcac caaggccatg gcgaccagcg tgcgttcgtt	15660

tcttctctgt tgttgttgta tctagtatga tgaggcgtgc gtacccggag ggtcctcctc	15720
cctcgtagca gagcgtgatg cagcaggcga tggcggcggc ggcgatgcag cccccgtgg	15780
aggctcctta cgtgcccccg cggtagctgg cgcctacgga ggggcggaac agcattcggt	15840
actcggagct ggcacccttg tacgatacca cccggttgta cctgggtggac aacaagtcgg	15900
cggacatcgc ctcgctgaac taccagaacg accacagcaa ctctctgacc accgtggtgc	15960
agaacaatga ctacaccccc acggaggcca gcaccagac catcaacttt gacgagcgt	16020
cgcggtgggg cggccagctg aaaaccatca tgcacaccaa catgcccaac gtgaacgagt	16080
tcatgtacag caacaagtgc aaggcgcggg tgatggtctc ccgcaagacc cccaatgggg	16140
tgacagtgc agaggattat gatggtagtc aggatgagct gaagtatgaa tgggtggaat	16200
ttgagctgcc cgaaggcaac ttctcggtag ccatgaccat cgacctgatg aacaacgcca	16260
tcatcgacaa ttacttggcg gtggggcggc agaacggggt gctggagagc gacatcggcg	16320
tgaagttcga cactaggaac ttcaggctgg gctgggacct cgtgaccgag ctggtcatgc	16380
ccggggtgta caccaacgag gctttccatc ccgatatgt ctgctgccc ggctgcgggg	16440
tggacttcac cgagagccgc ctacagcaacc tgctgggcat tcgcaagagg cagcccttcc	16500
aggaaggctt ccagatcatg tacgaggatc tggagggggg caacatcccc gcgctcctgg	16560
atgtcgacgc ctatgagaaa agcaaggagg atgcagcagc tgaagcaact gcagccgtag	16620
ctaccgcctc taccgaggtc aggggcgata attttgcaag cgccgcagca gtggcagcgg	16680
ccgaggcggc tgaaacgaa agtaagatag tcattcagcc ggtggagaag gatagcaaga	16740
acaggagcta caacgtacta ccggacaaga taaacaccgc ctaccgcagc tggtagctag	16800
cctacaacta tggcgacccc gagaaggggc tgcgctcctg gacgctgctc accacctcgg	16860
acgtcacctg cggcgtggag caagtctact ggtcgtgcc cgacatgatg caagaccgg	16920
tcaccttccg ctccacgcgt caagttagca actaccgggt ggtgggcgcc gagctcctgc	16980
ccgtctactc caagagcttc ttcaacgagc aggcggtcta ctgcagcag ctgcgcgct	17040
tcacctcgct tacgcacgtc ttcaaccgct tccccagaaa ccagatcctc gtccgcccgc	17100
ccgcgcccac cattaccacc gtcagtgaac acgttctcgc tctcacagat cacgggacct	17160
tgcgctgcg cagcagtatc cggggagtc agcgcgtgac cgttactgac gccagacgcc	17220
gcacctgccc ctacgtctac aaggccctgg gcatagtcgc gccgcgcgtc ctctcgagcc	17280
gcaccttcta aatgtccatt ctcatctcgc ccagtaataa caccggttgg ggcctgcgcg	17340
cgcccagcaa gatgtacgga ggcgctcgcc aacgctccac gcaacacccc gtgcgcgtgc	17400

gcggggcactt ccgcgctccc tggggcgccc tcaagggccg cgtgcggtcg cgcaccaccg	17460
tcgacgacgt gatcgaccag gtggtggccg acgcgcgcaa ctacaccccc gccgccgcgc	17520
ccgtctccac cgtggacgcc gtcacgcaca gcgtggtggc cgacgcgcgc cggtagcccc	17580
gcgccaagag ccggcgggcg cgcatcgccc ggcgggcaccg gagcaccccc gccatgcgcg	17640
cggcgcgagc cttgctgcgc agggccaggc gcacgggacg caggggccatg ctcagggcgg	17700
ccagacgcgc ggcttcaggc gccagcgccg gcaggaccgc gagacgcgcg gccacggcg	17760
cggcagcggc catcgccagc atgtcccgcc cgcggcgagg gaacgtgtac tgggtgcgcg	17820
acgccgccac cgggtgtgcgc gtgcccgtgc gcacccgcc cctcgcact tgaagatgtt	17880
cacttcgcga tgttgatgtg tcccagcggc gaggaggatg tccaagcgca aattcaagga	17940
agagatgctc caggatcatc cgctgagat ctacggccct gcggtggtga aggaggaaag	18000
aaagccccgc aaaatcaagc gggtaaaaa ggacaaaaag gaagaagaaa gtgatgtgga	18060
cggattggtg gagtttgtgc gcgagttcgc ccccgggcg cgctgcagt ggcgcgggcg	18120
gaaggtgcaa ccggtgctga gacccggcac caccgtggtc ttcacggcg gcgagcgctc	18180
cggcaccgct tccaagcgct cctacgacga ggtgtacggg gatgatgata ttctggagca	18240
ggcgggccgag cgctggggcg agtttgctta cggcaagcg agccgttccg caccgaagga	18300
agaggcggtg tccatccgc tggaccacgg caacccacg ccgagcctca agcccgtagc	18360
cttgacgagc gtgctgccga ccgcggcgcc gcgccggggg ttcaagcgcg agggcgagga	18420
tctgtacccc accatgcagc tgatggtgcc caagcgccag aagctggaag acgtgctgga	18480
gacatgaag gtggaccgg acgtgcagcc cgaggatcaag gtgcggccca tcaagcaggt	18540
ggccccgggc ctgggcgtgc agaccgtgga catcaagatt cccacggagc ccatggaaac	18600
gcagaccgag cccatgatca agcccagcac cagcaccatg gaggtgcaga cggatccctg	18660
gatgccatcg gctcctagtc gaagaccccc gcgcaagtac ggcgcgcca gcctgctgat	18720
gccaactac gcgctgcac cttccatcat cccacgccg ggctaccgcg gcacgcgctt	18780
ctaccgggt cataccagca gccgccgcc caagaccacc actcgccgc gccgtcgccg	18840
caccgccgt gcaaccaccc ctgccgccct ggtgcggaga gtgtaccgcc gcggccgcgc	18900
acctctgacc ctgccgcgc gcgctacca ccgagcatc gccatttaa ctttcgcctg	18960
ctttgcagat caatggccct cacatgccgc cttcgcttc ccattacggg ctaccgagga	19020
agaaaaccgc gccgtagaag gctggcgggg aacgggatgc gtcgccacca ccaccggcg	19080
cggcgcgcca tcagcaagcg gttgggggga ggcttcctgc ccgcgctgat ccccatcatc	19140

gccgcggcga tcggggcgat ccccggcatt gcctccgtgg cggatgcaggc ctctcagcgc	19200
cactgagaca cacttggaac catcttgtaa taaaccaatg gactctgacg ctcttggtcc	19260
tgtgatgtgt tttcgtagac agatggaaga catcaatttt tcgtccctgg ctccgcgaca	19320
cggcacgcgg ccgttcatgg gcacctggag cgacatcggc accagccaac tgaacggggg	19380
cgccctcaat tggagcagtc tctggagcgg gcttaagaat ttcgggtcca cgcttaaaac	19440
ctatggcagc aaggcgtgga acagcaccac agggcaggcg ctgagggata agctgaaaga	19500
gcagaacttc cagcagaagg tggatgatgg gctgcctcg ggcatcaacg ggggtggtgga	19560
cctggccaac caggccgtgc agcggcagat caacagccgc ctggaccggg tgccgcccgc	19620
cggctccgtg gagatgccgc aggtggagga ggagctgcct cccctggaca agcggggcga	19680
gaagcgaccc cgcccgatg cggaggagac gctgctgacg cacacggacg agccgcccc	19740
gtacgaggag gcggtgaaac tgggtctgcc caccacgcgg cccatcgcgc ccctggccac	19800
cggggtgctg aaaccgaaa agcccgcgac cctggacttg cctcctcccc agccttccc	19860
ccctcttaca gtggctaagc ccctgccgcc ggtggccgtg gcccgcgcgc gaccggggg	19920
caccgcccgc cctcatgcga actggcagag cactctgaac agcatcgtgg gtctgggagt	19980
gcagagtgtg aagcgccgcc gctgctatta aacctaccgt agcgcttaac ttgcttgtct	20040
gtgtgtgtat gtattatgtc gccgccgccg ctgtccacca gaaggaggag tgaagaggcg	20100
cgtcgccgag ttgcaagatg gccaccccat cgatgctgcc ccagtgggcg tacatgcaca	20160
tcgccggaca ggacgcttcg gactacctga gtccgggtct ggtgcagttt gcccgcgcca	20220
cagacacctt ctctcagctg gggaacaagt ttaggaacct cacggtggcg cccacgcacg	20280
atgtgaccac cgaccgcagc cagcggctga cgctgcgctt cgtgcccgtg gaccgcgagg	20340
acaacacctt ctctgtacaaa gtgcgctaca cgctggccgt gggcgacaac cgcgtgctgg	20400
acatggccag cactactttt gacatccgcg gcgtgctgga tcggggccct agcttcaaac	20460
cctactccgg caccgcctac aacagtctgg cccccaaggg agcacccaac acttgtcagt	20520
ggacatataa agccgatggt gaaactgcca cagaaaaaac ctatacatat ggaaatgcac	20580
ccgtgcaggg cattaacatc aaaaagatg gtattcaact tggaaactgac accgatgatc	20640
agccaatcta cgcagataaa acctatcagc ctgaacctca agtgggtgat gctgaatggc	20700
atgacatcac tgggtactgat gaaaagtatg gaggcagagc tcttaagcct gataccaaaa	20760
tgaagccttg ttatggttct tttgccaagc ctactaataa agaaggaggt caggcaaatg	20820
tgaaaacagg aacaggcact actaaagaat atgacataga catggctttc ttgacaaca	20880

gaagtgcggc tgctgctggc ctagctccag aaattgtttt gtatactgaa aatgtggatt	20940
tggaaactcc agatacccat attgtataca aagcaggcac agatgacagc agctcttcta	21000
ttaatttggg tcagcaagcc atgcccacaa gacctaacta cattggtttc agagacaact	21060
ttatcgggct catgtactac aacagcactg gcaatatggg ggtgctggcc ggtcaggctt	21120
ctcagctgaa tgctgtggtt gacttgcaag acagaaacac cgagctgtcc taccagctct	21180
tgcttgactc tctgggtgac agaaccgggt atttcagtat gtggaatcag gcggtggaca	21240
gctatgatcc tgatgtgcgc attattgaaa atcatggtgt ggaggatgaa ctcccaact	21300
attgtttccc tctggatgct gttggcagaa cagatactta tcagggaatt aaggctaattg	21360
gaactgatca aaccacatgg accaaagatg acagtgtcaa tgatgctaata gagataggca	21420
agggtaatcc attcgccatg gaaatcaaca tccaagccaa cctgtggagg aacttcctct	21480
acgccaacgt ggccctgtac ctgcccgaact ctacaagta cacgccggcc aatgttaccc	21540
tgccaccaa caccaacacc tacgattaca tgaacggccg ggtggtggcg ccctcgctgg	21600
tggactccta catcaacatc ggggcgcgct ggtcgctgga tcccatggac aacgtgaacc	21660
ccttcaacca ccaccgcaat gcggggctgc gctaccgctc catgctcctg ggcaacgggc	21720
gctacgtgcc ctccacatc cagggtgccc agaaattttt cgccatcaag agcctcctgc	21780
tcctgcccgg gtcctacacc tacgagtgga acttccgcaa ggacgtcaac atgacccctgc	21840
agagctccct cggcaacgac ctgcgcacgg acggggcctc catctccttc accagcatca	21900
acctctacgc caccttcttc ccatggcgc acaacacggc ctccacgctc gaggccatgc	21960
tgcgcaacga caccaacgac cagtccctca acgactacct ctggcgggcc aacatgctct	22020
accccatccc ggccaacgcc accaacgtgc ccatctccat cccctcgcg c aactgggccc	22080
ccttccgagg ctggtccttc acgcgtctca agaccaagga gacgccctcg ctgggctccg	22140
ggttcgacct ctacttcgtc tactcgggct ccatcccta cctcgacggc acctctacc	22200
tcaaccacac cttcaagaag gtctccatca ccttcgactc ctccgtcagc tggcccggca	22260
acgaccggct cctgacgcc aacgagttcg aaatcaagcg caccgtcgac ggcgagggt	22320
acaacgtggc ccagtgcac atgaccaagg actggttcc tggccagatg ctggccact	22380
acaacatcgg ctaccagggc ttctacgtgc ccgagggtca caaggaccgc atgtactcct	22440
tcttccgcaa ctccagccc atgagccgcc aggtggtgga cgaggtcaac tacaaggact	22500
accaggccgt caccctggcc taccagcaca acaactcggg ctccgtcggc tacctcgcgc	22560
ccacatgcg ccagggccag ccctacccc ccaactacct ctaccgctc atcggaaga	22620

gcgccgtcac cagcgtcacc cagaaaaagt tcctctgcga cagggtcatg tggcgcatcc	22680
ccctctccag caacttcatg tccatgggcg cgctcaccga cctcggccag aacatgctct	22740
atgccaaactc cgcccacgcg ctagacatga atttgaagt cgaccccatg gatgagtcca	22800
cccttctcta tgttgtcttc gaagtcttcg acgtcgtccg agtgcaccag cccaccgcg	22860
gcgtcatcga ggccgtctac ctgcgacccc ccttctcggc cggtaacgcc accacctaag	22920
ctcttgcttc ttgcaagcca tggccgcggg ctccggcgag caggagctca gggccatcat	22980
ccgcgacctg ggctgcgggc cctacttcct gggcaccttc gataagcgct tcccgggatt	23040
catggccccg cacaagctgg cctgcgccat cgtaaacacg gccggccgcg agaccggggg	23100
cgagcactgg ctggccttcg cctggaaccc gcgctcgaac acctgctacc tcttcgaccc	23160
cttcgggttc tcggacgagc gcctcaagca gatctaccag ttcgagtacg agggcctgct	23220
gcgccgcagc gccctggcca ccgaggaccg ctgcgtcacc ctggaaaagt ccaccagac	23280
cgtgcagggc ccgcgctcgg ccgcctgcgg gctcttctgc tgcattgtcc tgcacgcctt	23340
cgtgcactgg ccgaccgcc ccatggacaa gaacccacc atgaacttgc tgacgggggt	23400
gccaacggc atgtctcagt cgcaccagg ggaacccacc ctgcgccgca accaggaggc	23460
gctctaccgc ttcctcaact cccactccgc ctactttcgc tcccaccgcg cgcgcatcga	23520
gaaggccacc gccttcgacc gcatgaatca agacatgtaa accgtgtgtg tatgttaaat	23580
gtctttaata aacagcactt tcatgttaca catgcatctg agatgattta tttagaaatc	23640
gaaagggctc tgccgggtct cggcatggcc cgcgggcagg gacacgttgc ggaactggta	23700
cttggccagc cacttgaact cggggatcag cagtctgggc agcgggggtg cggggaagga	23760
gtcggccac agcttcgcg tcagttgcag ggcgccagc aggtcgggcg cggagatctt	23820
gaaatcgag ttgggaccgc cgttctgcgc gcgggagtig cggtaacagg ggttgcagca	23880
ctggaacacc atcagggcgc ggtgcttcac gctcgccagc accgtcgcgt cggatgatgt	23940
ctccacgtcg aggtcctcgg cgttggccat cccgaagggg gtcactctgc aggtctgcct	24000
tcccatggtg ggcacgcacc cgggcttgtg gttgcaatcg cagtgcaggg ggatcagcat	24060
catctgggcc tggtcggcgt tcatcccgcg gtacatggcc ttcattgaaag cctccaattg	24120
cctgaacgcc tgctgggcct tggctccctc ggtgaagaag accccgcagg acttgctaga	24180
gaactggttg gtggcgaccc cggcgtcgtg cacgcagcag cgcgcgtcgt tgttggccag	24240
ctgcaccacg ctgcgcccc agcggttctg ggtgatcttg gcccggtcgg ggttctcctt	24300
cagcgcgcgc tgcccgttct cgctcgccac atccatctcg atcatgtgct ccttctggat	24360

catggtggtc ccggtgcaggc accgcagctt gccctcggcc tcggtgcacc cgtgcagcca	24420
cagcgcgcac ccggtgcaact ccagttctt gtgggcgac tcgggaatgcg cgtgcacgaa	24480
gccctgcagg aagcggccca tcatggtggt cagggtcttg ttgctagtga aggtcagcgg	24540
aatgccgcgg tgctcctcgt tgatgtacag gtggcagatg cggcgggtaca cctcgccctg	24600
ctcgggcac agctggaagt tggctttcag gtcggtctcc acgcggtagc ggtccatcag	24660
catagtcatg atttccatac ccttctccca ggccgagacg atgggcaggc tcatagggtt	24720
cttcaccatc atcttagcgc tagcagccgc ggccaggggg tcgctctcgt ccagggtctc	24780
aaagctccgc ttgccgtcct tctcggtgat ccgcaccggg gggtagctga agcccacggc	24840
cgccagctcc tccctggcct gtctttcgtc ctcgctgtcc tggctgacgt cctgcaggac	24900
cacatgcttg gtcttgccgg gtttcttctt gggcggcagc ggcggcggag atgttggaga	24960
tggcgagggg gagcgcgagt tctcgctcac cactactatc tcttctctt ctgtgtccga	25020
ggccacgcgg cggtaggtat gtctcttcgg gggcagaggc ggaggcgacg ggctctcgcc	25080
gccgcgactt ggcggatggc tggcagagcc ccttccgcgt tcgggggtgc gctcccggcg	25140
gcgctctgac tgacttctc cgcgcccggc cattgtgttc tcttagggag gaacaacaag	25200
catggagact cagccatcgc caacctcgcc atctgcccc accgccgacg agaagcagca	25260
gcagcagaat gaaagcttaa ccgccccgcc gccagcccc gccacctcg acgcggccgt	25320
cccagacatg caagagatgg aggaatccat cgagattgac ctgggctatg tgacgcccgc	25380
ggagcacgag gaggagctgg cagtgcgctt ttcacaagaa gagatacacc aagaacagcc	25440
agagcaggaa gcagagaatg agcagagtca ggctgggctc gagcatgacg gcgactacct	25500
ccacctgagc gggggggagg acgcgctcat caagcatctg gcccggcagg ccacctcgt	25560
caaggatgcg ctgctcgacc gcaccgaggt gccctcagc gtggaggagc tcagccgcgc	25620
ctacgagttg aacctcttct cgccgcgctt gcccccaag cgccagccca atggcacctg	25680
cgagcccaac ccgcgcctca acttctaccc ggtcttcgcg gtgcccagg ccttgccac	25740
ctaccacatc tttttcaaga accaaaagat ccccgctctc tgccgcgcca accgcaccg	25800
cgccgacgcc cttttcaacc tgggtcccgg cgccgccta cctgatateg cctccttgga	25860
agaggttccc aagatcttcg aggtcttggg cagcgacgag actcgggccg cgaacgctct	25920
gcaaggagaa ggaggagagc atgagcacca cagcgccctg gtcgagttgg aaggcgacaa	25980
cgcgcggtg gcggtgctca aacgcacggt cgagctgacc catttcgctt acccggtct	26040
gaacctgccc ccaaagtca tgagcgcggt catggaccag gtgctcatca agcgcgcgtc	26100

gccccatctcc gaggacgagg gcatgcaaga ctccgaggag ggcaagcccc tggtcagcga	26160
cgagcagctg gcccgggtggc tgggtcctaa tgctagtccc cagagtittg aagagcggcg	26220
caaaactcatg atggccgtgg tcctgggtgac cgtggagctg gagtgcctgc gccgcttctt	26280
cgccgacgcg gagaccctgc gcaaggtcga ggagaacctg cactacctct tcaggcacgg	26340
gttcgtgcmc caggcctgca agatctccaa cgtggagctg accaacctgg tctcctacat	26400
gggcatcttg cacgagaacc gcctggggca gaacgtgctg cacaccaccc tgcgcgggga	26460
ggccccggcg gactacatcc gcgactgcgt ctacctctac ctctgccaca cctggcagac	26520
gggcatgggc gtgtggcagc agtgtctgga ggagcagaac ctgaaagagc tctgcaagct	26580
cctgcagaag aacctcaagg gtctgtggac cgggttcgac gagcgcacca ccgctcggga	26640
cctggccgac ctcatitttc ccgagcgctt caggctgacg ctgcgcaacg gcctgcccga	26700
ctttatgagc caaagcatgt tgcaaaactt tcgtcttttc atcctcgaac gctccggaat	26760
cctgccccgc acctgtctcc cgctgccctc ggacttcgtg ccgctgacct tccgcgagt	26820
ccccccgccc ctgtggagcc actgtctacct gctgcgcctg gccaaactacc tggcctacca	26880
ctcggacgtg atcgaggacg tcagcggcga gggcctgctc gagtgccact gccgctgcaa	26940
cctctgcacg ccgcaccgct ccctggcctg caacccccag ctgctgagcg agaccagat	27000
catcggcacc ttcgagttgc aaggggcccag cgaaggcgag ggttcagccg ccaagggggg	27060
tctgaaactc accccggggc tgttgacctc ggcctacttg cgcaagtctg tgcccagga	27120
ctaccatccc ttcgagatca ggttctacga ggaccaatcc catccgcca aggccgagct	27180
gtcggcctgc gtcatcacc agggggcgat cctggcccaa ttgcaagcca tccagaaatc	27240
ccgccaagaa ttcttgctga aaaaggggccg cggggtctac ctcgaccccc agaccggtga	27300
ggagctcaac cccggcttcc ccaggatgc cccgaggaaa caagaagctg aaagtggagc	27360
tgccgcccgt ggaggatttg gaggaagact gggagaacag cagtcaggca gaggaggagg	27420
agatggagga agactgggac agcactcagg cagaggagga cagcctgcaa gacagtctgg	27480
aggaagacga ggaggaggca gaggaggagg tggaagaagc agccgccgcc agaccgtcgt	27540
cctcggcggg ggagaaagca agcagcacgg ataccatctc cgctccgggt cggggtccc	27600
ctcgaccaca cagtagatgg gacgagaccg gacgattccc gaaccccacc acccagaccg	27660
gtaagaagga gcggcaggga tacaagtctt ggcgggggca caaaaacgcc atcgtctcct	27720
gcttgcaggc ctgcgggggc aacatctcct tcacccggcg ctacctgctc ttccaccgcg	27780
gggtgaactt tccccgcaac atcttgcatl actaccgtca cctccacagc ccctactact	27840

tccaagaaga ggcagcagca gcagaaaaag accagcagaa aaccagcagc tagaaaatcc	27900
acagcggcgg cagcaggtgg actgaggatc gcggcgaacg agccggcgca aaccggggag	27960
ctgaggaacc ggatctttcc caccctctat gccatcttcc agcagagtcg ggggcaggag	28020
caggaactga aagtcaagaa ccgttctctg cgctcgctca cccgcagttg tctgtatcac	28080
aagagcgaag accaacttca gcgcactctc gaggacgccg aggctctctt caacaagtac	28140
tgcgcgctca ctcttaaaga gtagcccgcg cccgcccagt cgcagaaaaa ggcggggaatt	28200
acgtcacctg tgcccttcgc cctagccgcc tccaccatc atcatgagca aagagattcc	28260
cacgccttac atgtggagct accagcccca gatgggcctg gccgccggtg ccgccagga	28320
ctactccacc cgcatgaatt ggctcagcgc cgggcccgcg atgatctcac gggatgaatga	28380
catccgcgcc caccgaaacc agatactcct agaacagtca gcgctcaccg ccacgccccg	28440
caatcacctc aatccgcgta attggcccg cgccttggtg taccaggaaa ttccccagcc	28500
cacgaccgta ctacttccgc gagacgcccc ggccgaagtc cagctgacta actcaggtgt	28560
ccagctggcg ggccggcgcca cctgtgtcg tcaccgcccc gtcagggtg taaagcggct	28620
ggtgatccgg ggcagaggca cacagctcaa cgacgaggtg gtgagctctt cgctgggtct	28680
gcgacctgac ggagtcttcc aactcgccgg atcggggaga tcttcttca cgctcgtca	28740
ggccgtcctg actttggaga gttcgtcctc gcagccccgc tcgggtggca tcggcactct	28800
ccagttcgtg gaggagtcca ctccctcggt ctacttcaac ccttctccg gctccccgg	28860
ccactaccg gacgagtcca tcccgaactt cgacgccatc agcgagtcgg tggacggcta	28920
cgattgaatg tcccatggtg gcgcagctga cctagctcgg ctccgacacc tggaccactg	28980
ccgccgttc cgctgcttcg ctcgggatct cgccgagttt gcctactttg agctgcccga	29040
ggagcacctt cagggccccg cccacggagt gcgcatcgtc gtcgaagggg gcctcgactc	29100
ccacctgctt cggatcttca gccagcgtcc gatcctggtc gagcgcgagc aaggacagac	29160
ccttctgact ctgtactgca tctgcaacca ccccgccctg catgaaagtc tttgttgtct	29220
gctgtgtact gagtataata aaagctgaga tcagcgacta ctccggactt ccgtgtgttc	29280
ctgaatccat caaccagtct ttgttcttca ccgggaacga gaccgagctc cagctccagt	29340
gtaagcccca caagaagtac ctcacctggc tgttccaggg ctccccgac gccgttgtca	29400
accactgcga caacgacgga gtcctgtga gcggccctgc caaccttact ttttccaccc	29460
gcagaagcaa gctccagctc ttccaacctt tcctccccgg gacctatcag tgcgtctcgg	29520
gacctgcca tcacaccttc cactgatcc cgaataccac agcgtcgctc cccgtacta	29580

acaaccaaac taacctccac caacgccacc gtcgctaggc cacaatacat gcccatatta	29640
gactatgagg ccgagccaca gcgacccatg ctccccgcta ttagttactt caatctaacc	29700
ggcggagatg actgaccac tggccaacaa caacgtcaac gaccttctcc tggacatgga	29760
cggccgcgcc tcggagcagc gactcgccca acttcgcatt cgccagcagc aggagagagc	29820
cgtcaaggag ctgcaggatg cgggtggccat ccaccagtgc aagagaggca tcttctgcct	29880
ggtgaaacag gccaagatct cctacgaggt cactccaaac gaccatcgcc tctcctacga	29940
gctcctgcag cagcgccaga agttcacctg cctggtcgga gtcaaccca tcgtcatcac	30000
ccagcagtct ggcgatacca aggggtgcat ccactgctcc tgcgactccc ccgactgcgt	30060
ccacactctg atcaagaccc tctgcggcct ccgcgacctc ctccccatga actaatcacc	30120
cccttatcca gtgaaataaa gatcatattg atgatgattt tacagaaata aaaaataatc	30180
atttgatttg aaataaagat acaatcatat tgatgatttg agttaacaa aaaaataaag	30240
aatcacttac ttgaaatctg ataccaggtc tctgtccatg ttttctgcca acaccacttc	30300
actccccctt tcccagctct ggtactgcag gccccggcgg gctgcaaact tcctccacac	30360
gctgaagggg atgtcaaat cctcctgtcc ctcaatcttc attttatctt ctatcagatg	30420
tccaaaaagc gcgtccgggt ggatgatgac ttcgaccccg tctacccta cgatgcagac	30480
aacgcaccga ccgtgccctt catcaacccc ccttcgtct cttcagatgg attccaagag	30540
aagcccctgg gggtgttgtc cctgcgactg gccgaccccg tcaccaccaa gaacggggaa	30600
atcacctca agctgggaga gggggtggac ctcgattcct cgggaaaact catctccaac	30660
acggccacca aggccgccgc ccctctcagt tttccaaca acaccatttc ccttaacatg	30720
gatcacccct tttaactaa agatggaaaa ttatccttac aagtttctcc accattaaat	30780
atactgagaa caagcattct aaacacacta gctttagggt ttggatcagg tttaggactc	30840
cgtggctctg ccttggcagt acagttagtc tctccactta catttgatac tgatggaaac	30900
ataaagctta ccttagacag aggtttgcat gtiacaacag gagatgcaat tgaaagcaac	30960
ataagctggg ctaaaggttt aaaatttgaa gatggagcca tagcaaccaa cattggaaat	31020
gggttagagt ttggaagcag tagtacagaa acagggtgtg atgatgctta cccaatccaa	31080
gttaaacttg gatctggcct tagctttgac agtacaggag ccataatggc tggtaacaaa	31140
gaagacgata aactcacttt gtggacaaca cctgatccat caccaaactg tcaaatactc	31200
gcagaaaatg atgcaaaact aacactttgc ttgactaaat gtggtagtca aatactggcc	31260
actgtgtcag tcttagttgt aggaagtgga aacctaaacc ccattactgg caccgtaagc	31320

agtgtctcagg tgtttctacg ttttgatgca aacgggtgttc ttttaacaga acattctaca	31380
ctaaaaaaaaat actgggggta taggcaggga gatagcatag atggcactcc atataccaat	31440
gctgtaggat tcatgccc aa tttaaaagct tatccaaagt cacaaagttc tactactaaa	31500
aataatatag tagggcaagt atacatgaat ggagatgttt caaaacctat gcttctcact	31560
ataaccctca atgggtactga tgacagcaac agtacatatt caatgtcatt ttcatacacc	31620
tggactaatg gaagctatgt tggagcaaca tttggggcta actcttatac cttctcatac	31680
atcgcccaag aatgaacact gtatcccacc ctgcatgcc aaccttcca cccactctg	31740
tggaacaaac tctgaaacac aaaataaaat aaagtcaag tgttttattg attcaacagt	31800
tttacaggat tcgagcagtt atttttcctc caccctcca ggacatggaa tacaccacc	31860
tctccccccg cacagccttg aacatctgaa tgccattggg gatggacatg cttttggctc	31920
ccacgttcca cacagtcca gagcgagcca gctcgggtc ggtcaggag atgaaacct	31980
ccgggcactc ccgcatctgc acctcacagc tcaacagctg aggattgtcc tcggtggctg	32040
ggatcacggt tatctggaag aagcagaaga gcggcgggtg gaatcatagt ccgcgaacgg	32100
gatcgcccg tggtgtcgca tcaggccccg cagcagtcgc tgccgccgcc gctccgtcaa	32160
gctgtctgtc aggggggtccg ggtccaggga ctccctcagc atgatgcca cgccctcag	32220
catcagtcgt ctggtgcggc gggcgagca gcgcatgcgg atctcgctca ggtcgctgca	32280
gtacgtgcaa cacagaacca ccaggttgtt caacagtcca tagttcaaca cgctccagcc	32340
gaaactcatc gcgggaagga tgctaccac gtggccgtcg taccagatcc tcaggtaa	32400
caagtgggtc cccctccaga acacgtgtcc cacgtacatg atctccttgg gcatgtggcg	32460
gttcaccacc tcccgtacc acatcacct ctggttgaac atgcagcccc ggatgatcct	32520
gcggaaccac agggccagca ccgccccgcc cgccatgcag cgaagagacc ccgggtcccg	32580
gcaatggcaa tggaggacct accgctcgta cccgtggatc atctgggagc tgaacaagtc	32640
tatgttggca cagcacaggc atatgtcat gcatctcttc agcactctca actcctcggg	32700
ggtcaaaacc atatcccagg gcacggggaa ctcttgagg acagcgaacc ccgcagaaca	32760
gggcaatcct cgcacagaac ttacattgtg catggacagg gtatcgcaat caggcagcac	32820
cggtgatcc tccaccagag aagcgcggt ctcggtctcc tcacagcgtg gtaagggggc	32880
cgccgatac ggggtgatggc gggacgcggc tgatcgtgtt cgcgaccgtg tcatgatgca	32940
gttgctttcg gacattttcg tacttgctgt agcagaacct ggtccgggcg ctgcacaccg	33000
atcgccggcg gcggtctcgg cgcttggaa gctcgggtgtt gaaattgtaa aacagccact	33060

ctctcagacc gtgcagcaga tctagggcct caggagtgat gaagatccca tcatgcctga	33120
tggctctgat cacatcgacc accgtggaat gggccagacc cagccagatg atgcaatttt	33180
gttgggtttc ggtgacggcg ggggagggaa gaacaggaag aacctgatt aacttttaat	33240
ccaaacggtc tgggagtact tcaaaatgaa gatcgcgag atggcacctc tgcccccgc	33300
tgtgttggtg gaaaataaca gccagggtcaa aggtgatacg gttctcgaga tgttccacgg	33360
tggcttccag caaagcctcc acgcgcacat ccagaaacaa gacaatagcg aaagcgggag	33420
ggttctctaa ttcttcaatc atcatgttac actcctgcac catccccaga taattttcat	33480
ttttccagcc ttgaatgatt cgaactagtt cctgaggtaa atccaagcca gccatgataa	33540
agagctcgcg cagagcgccc tccaccggca ttcttaagca caccctcata attccaagat	33600
attctgtctc tgggtcacct gcagcagatt gacaagcgga atatcaaaat ctctgccgcg	33660
atccctgagc tcttccctca gcaataactg taagtactct ttcatactct ctccgaaatt	33720
tttagccata ggaccaccag gaataagatt agggcaagcc acagtacaga taaaccgaag	33780
tcttccccag tgagcattgc caaatgcaag actgctataa gcatgctggc tagaccgggt	33840
gatatcttcc agataactgg acagaaaatc gcccaggcaa tttttaagaa aatcaacaaa	33900
agaaaaatcc tccagggtga cgtttagagc ctcggaaca acgatgaagt aaatgcaagc	33960
ggtgcgttcc agcatggtta gttagctgat ctgtagaaaa aacaaaaatg aacattaaac	34020
catgctagcc tggcgaacag gtgggtaaat cgttctctcc agcaccaggc aggccacggg	34080
gtctccggcg cgacctcgt aaaaattgtc gctatgatig aaaaccatca cagagagacg	34140
ttccgggtgg cggcggtgaa tgattcgaca agatgaatac acccccggaa cattggcgtc	34200
cgcgagtga aaaaagcgcc cgaggaagca ataaggcact acaatgctca gtcicaagtc	34260
cagcaaagcg atgcatgcg gatgaagcac aaaattctca ggtgcgtaca aaatgtaatt	34320
actcccctcc tgcacaggca gcaaagcccc cgatcccctc aggtacacat acaaagcctc	34380
agcgtccata gcttaccgag cagcagcaca caacaggcgc aagagtcaga gaaaggctga	34440
gtctaacct gtccaccgc tctctgtca atatatagcc cagatctaca ctgacgtaaa	34500
ggccaaagtc taaaaatacc cgccaaataa tcacacacgc ccagcacacg cccagaaacc	34560
ggtgacacac tcaaaaaaat acgcgcactt cctcaaagc ccaaaactgc cgtcatttcc	34620
gggttcccac gctacgtcat caaaacacga ctttcaaatt ccgtcgaccg ttaaaaacgt	34680
caccgcccc gccctaacg gtcgcccgtc tctcagccaa tcagcgcccc gcatcccaa	34740
attcaaacac ctcatittga tattaacgcg cacaaaaagt ttgaggtata ttattgatga	34800

tgg

34803

<210> 46
<211> 7182
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 46
ggcgtaatgc tctgccagtg ttacaaccaa ttaaccaatt ctgattagaa aaactcatcg 60
agcatcaaat gaaactgcaa ttattcata tcaggattat caataccata tttttgaaaa 120
agccgtttct gtaatgaagg agaaaactca ccgaggcagt tccataggat ggcaagatcc 180
tggtatcggc ctgcgattcc gactcgtcca acatcaatac aacctattaa tttcccctcg 240
tcaaaaataa gggtatcaag tgagaaatca ccatgagtga cgactgaatc cggtgagaat 300
ggcaaaagct tatgcatttc tttccagact tgttcaacag gccagccatt acgctcgtca 360
tcaaaatcac tcgcatcaac caaaccgta ttcatctgtg attgcgcctg agcgagacga 420
aatacgcgat cgctgtttaa aggacaatta caaacaggaa tcaaatgcaa ccggcgcagg 480
aacactgcca gcgcatcaac aatatittca cctgaatcag gatattcttc taataacctg 540
aatgctgttt tcccggggat cgcagtgggt agtaaccatg catcatcagg agtacggata 600
aaatgcttga tggctggaag aggcataaat tccgtcagcc agtttagtct gaccatctca 660
tctgtaacat cattggcaac gctacctttg ccatgtttca gaaacaactc tggcgcacgc 720
ggcttcccat acaatcgata gattgtcgca cctgattgcc cgacattatc gcgagcccat 780
ttatacccat ataaatcagc atccatgttg gaatttaatc gcggcctcga gcaagacgtt 840
tcccgttgaa tatggctcat aacacccctt gtattactgt ttatgtaagc agacaggctc 900
acaatattgg ctattggcca ttgcatacgt tgtatctata tcataatatg tacatttata 960
ttggctcatg tccaatatga ccgccatgtt gacattgatt attgactagt tattaatagt 1020
aatcaattac ggggtcatta gtccatagcc catatatgga gttccgcgtt acataactta 1080
cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgcccc acgacccccg cccattgacg tcaataatga 1140
cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt 1200
tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca tatgccaagt ccgcccccta 1260
ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgcc tggcattatgc ccagtacatg accttacggg 1320
actttcctac ttggcagtac atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggc 1380

tttggcagta caccaatggg cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc	1440
accccatiga cgtcaatggg agtttgtttt ggcacaaaaa tcaacgggac tttccaaaat	1500
gtcgtataaa ccccgccccg ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct	1560
atataagcag agctcgttta gtgaaccgtc agatcgcttg gagacgccat ccacgtgttt	1620
ttgacctcca tagaagacac cgggaccgat ccagcctccg cggccgggaa cgggtgcattg	1680
gaacgcggat tccccgtgcc aagagtgact caccgtccgg atctcagcaa gcaggtatgt	1740
actctccagg gtgggcctgg ctccccagt caagactcca gggatttgag ggacgtgtg	1800
ggctcttctc ttacatgtac cttttgcttg cctcaacct gactatcttc caggtcagga	1860
tcccagagtc aggggtctgt attttcctgc tgggtggctc agttcaggaa cagtaaacc	1920
tgtctcgaat attgcctctc acatctctgc aatctccgcg aggactgggg accctgtgac	1980
gaacatggct agcattgtgg gaggtctgga gtgcgagaag cattcccaac cctggcaggt	2040
gcttgtggcc tctcgtggca gggcagctctg cggcggtgtt ctggtgcacc ccagtggtt	2100
cctcacagct gccactgca tcaggaacaa aagcgtgac ttgctgggtc ggcacagctt	2160
gtttcatcct gaagacacag gccaggtatt tcaggtcagc cacagcttcc cacaccgct	2220
ctacgatatg agcctcctga agaatcgatt cctcaggcca ggtgatgact ccagccacga	2280
cctcatgctg ctccgcctgt cagagcctgc cgagctcacg gatgctgtga aggtcatgga	2340
cctgcccacc caggagccag cactggggac cacctgctac gcctcaggct ggggcagcat	2400
tgaaccagag gagttcttga ccccaaagaa acttcagtgt gtggacctcc atgttatctc	2460
caatgacgtg tgtgcgcaag ttcacctca gaaggtgacc aagttcatgc tgtgtgctgg	2520
acgttggaac gggggcaaaa gcacctgctc ggggtgattct gggggccac ttgtctgtaa	2580
tgggtgtgctt caaggtatca cgtcatgggg cagtgaacca tgtgccctgc ccgaaaggcc	2640
ttccctgtac accaaggtgg tgcattaccg gaagtggatc aaggacacca tcgtggccaa	2700
ccccggatcc gaaggtaggg gttcattatt gacctgtgga gatgtcgaag aaaaccagg	2760
acccgctagc aaggctgtgc tgcctgccct gtgatggca ggcttggccc tgcagccagg	2820
cactgccctg ctgtgctact cctgcaaagc ccaggtagc aacgaggact gcctgcaggt	2880
ggagaactgc acccagctgg gggagcagtg ctggaccgcg cgcatccgcg cagttggcct	2940
cctgaccgtc atcagcaaag gctgcagctt gaactgcgtg gatgactcac aggactacta	3000
cgtgggcaag aagaacatca cgtgctgtga caccgacttg tgcaacgcca gcggggccca	3060
tgccctgcag ccggctgccg ccatccttgc gctgctccct gcactcggcc tgctgctctg	3120

gggacccggc cagctaggat cccagaccct gaactttgat ctgctgaaac tggcaggcga	3180
tgtggaaagc aaccaggcc caatggcaag cgcgcgccgc ccgcgctggc tgtgcgctgg	3240
ggcgctgggtg ctggcgggtg gcttctttct cctcggcttc ctcttcgggt ggtttataaa	3300
atcctccaat gaagctacta acattactcc aaagcataat atgaaagcat ttttggatga	3360
attgaaagct gagaacatca agaagttctt atataatfff acacagatac cacatttagc	3420
aggaacagaa caaaactttc agcttgcaaa gcaaattcaa tcccagtgga aagaatttgg	3480
cctggattct gttagagctgg cacattatga tgtcctgttg tctacccaa ataagactca	3540
tcccaactac atctcaataa ttaatgaaga tggaaatgag attttcaaca catcattatt	3600
tgaaccacct cctccaggat atgaaaatgt ttcggatatt gtaccacctt tcagtgcfff	3660
ctctcctcaa ggaatgccag agggcgatct agtgtatgtt aactatgcac gaactgaaga	3720
cttcttttaa ttggaacggg acatgaaaat caattgctct gggaaaattg taattgccag	3780
atatgggaaa gttttcagag gaaataaggt taaaaatgcc cagctggcag gggccaaagg	3840
agtcattctc tactccgacc ctgctgacta cttgtctct ggggtgaagt cctatccaga	3900
tggttggaat ctctctggag gtggtgtcca gcgtggaaat atcctaaatc tgaatggtgc	3960
aggagacctt ctacaccag gttaccagc aaatgaatat gcttataggc gtggaattgc	4020
agaggctgtt ggtcttccaa gtattcctgt tcatccaatt ggatactatg atgcacagaa	4080
gctcctagaa aaaatgggtg gctcagcacc accagatagc agctggagag gaagctcaa	4140
agtgccctac aatgttggac ctggctttac tggaaacttt tctacacaaa aagtcaagat	4200
gcacatccac tctaccaatg aagtgacaag aatttacaat gtgataggta ctctcagagg	4260
agcagtggaa ccagacagat atgtcattct gggaggtcac cgggactcat ggggtgtttg	4320
tggfattgac ctctcagagt gagcagctgt tgttcatgaa attgtgagga gctttggaac	4380
actgaaaaag gaagggtgga gacctagaag aacaattttg ttgcaagct gggatgcaga	4440
agaatttgggt ctctctgggt ctactgagt ggagaggag aattcaagac tccttcaaga	4500
gcgtggcgtg gcttataatta atgtgactc atctatagaa ggaaactaca ctctgagagt	4560
tgattgtaca ccgctgatgt acagcttgggt acacaacct acaaaagagc tgaaaagccc	4620
tgatgaaggc ttggaaggca aatctcttta tgaaagtgg actaaaaaaa gtccttcccc	4680
agagttcagt ggcatgccc ggataagcaa attgggatct ggaaatgatt ttgaggtgtt	4740
cttccaacga ctggaattg cttcaggcag agcacggtat actaaaaatt gggaaacaaa	4800
caaattcagc ggctatccac tgtatcacag tgtctatgaa acatatgagt tgggtgaaaa	4860

gttttatgat ccaatgttta aatatcacct cactgtggcc caggttcgag gagggatggt	4920
gtttgagctg gccaatcca tagtgctccc ttttgattgt cgagattatg ctgtagtttt	4980
aagaaagtat gctgacaaaa tctacagtat ttctatgaaa catccacagg aaatgaagac	5040
atacagtgtat tcatttgatt cacttttttc tgcagtaaag aattttacag aaattgcttc	5100
caagttcagt gagagactcc aggactttga caaaagcaac ccaatagtat taagaatgat	5160
gaatgatcaa ctcatgtttc tggaaagagc atttatgat ccattagggt taccagacag	5220
gcctttttat aggcatgtca tctatgctcc aagcagccac aacaagtatg caggggagtc	5280
attcccagga atttatgatg ctctgtttga tattgaaagc aaagtggacc ctccaaggc	5340
ctggggagaa gtgaagagac agatttatgt tgcagccttc acagtgcagg cagctgcaga	5400
gactttgagt gaagtagcct aaagatctgg gccctaaca aacaaaaaga tggggttatt	5460
ccctaaactt catgggttac gtaattggaa gtgggggac attgccacaa gatcatattg	5520
tacaaaagat caaacactgt tttagaaaac ttctgtaaa caggcctatt gattggaaag	5580
tatgtcaaag gattgtgggt cttttgggt ttgctgctcc atttacacaa tgtggatata	5640
ctgccttaat gcctttgtat gcatgtatac aagctaaaca ggctttcact ttctcgccaa	5700
cttacaaggc ctttctaagt aaacagtaca tgaaccttta ccccgttgct cggcaacggc	5760
ctggctctgtg ccaagtgttt gctgacgcaa ccccaactgg ctggggcttg gccataggcc	5820
atcagcgcat gcgtggaacc ttgtgtggctc ctctgccgat ccatactgcg gaactcctag	5880
ccgcttgttt tgctcgagc cggctctggag caaagctcat aggaactgac aattctgtcg	5940
tcctctcgcg gaaatataca tcgtttcgat ctacgtatga tctttttccc tctgcaaaaa	6000
attatgggga catcatgaag ccccttgagc atctgacttc tggctaataa aggaaattta	6060
ttttcattgc aatagtgtgt tggaaatttt tgtgtctctc actcggaagg aattctgcat	6120
taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc	6180
tcgctcactg actcgctgcg ctcggtcgtt cggctgcggc gagcggtatc agctcactca	6240
aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca	6300
aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggt tttccatagg	6360
ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagagggt gcgaaacccg	6420
acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct cctctgtgcg ctctcctgtt	6480
ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt	6540
tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc	6600

tgtgtgcacg aaccccccg t cagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt	6660
gagtgcaacc cggt aagaca cgacttatcg ccaactggcag cagccactgg taacaggatt	6720
agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gatttcttga agtgggtggcc taactacggc	6780
tacactagaa gaacagtatt tggatatctgc gctctgctga agccagttac cttcggaaaa	6840
agagttggta gctcttgatc cggcaaaca accaccgctg gtagcgggtgg tttttttgtt	6900
tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaa ggtatcctcaag aagatccttt gatcttttct	6960
acgggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggatttttgt catgagatta	7020
tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat gaagttttta atcaatctaa	7080
agtatatatg agtaaacctg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc	7140
tcagcgaatc gtctatttcg ttcacccata gttgcctgac tc	7182

<210> 47
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 47

Met	Trp	Val	Pro	Val	Val	Phe	Leu	Thr	Leu	Ser	Val	Thr	Trp	Ile	Gly
1				5					10					15	

Ala	Ala	Pro	Leu	Ile	Leu	Ser	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Trp	Glu	Cys	Glu
			20					25					30		

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

Val	Cys	Gly	Gly	Val	Leu	Val	His	Pro	Gln	Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala
	50					55					60				

His	Cys	Ile	Arg	Asn	Lys	Ser	Val	Ile	Leu	Leu	Gly	Arg	His	Ser	Leu
65					70					75					80

Phe	His	Pro	Glu	Asp	Thr	Gly	Gln	Val	Phe	Gln	Val	Ser	His	Ser	Phe
			85						90					95	

Pro	His	Pro	Leu	Tyr	Asp	Met	Ser	Leu	Leu	Lys	Asn	Arg	Phe	Leu	Arg
			100					105					110		

Pro	Gly	Asp	Asp	Ser	Ser	His	Asp	Leu	Met	Leu	Leu	Arg	Leu	Ser	Glu
		115					120					125			

Pro Ala Glu Leu Thr Asp Ala Val Lys Val Met Asp Leu Pro Thr Gln
130 135 140

Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr Cys Tyr Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile
145 150 155 160

Glu Pro Glu Glu Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu
165 170 175

His Val Ile Ser Asn Asp Val Cys Ala Gln Val His Pro Gln Lys Val
180 185 190

Thr Lys Phe Met Leu Cys Ala Gly Arg Trp Thr Gly Gly Lys Ser Thr
195 200 205

Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asn Gly Val Leu Gln
210 215 220

Gly Ile Thr Ser Trp Gly Ser Glu Pro Cys Ala Leu Pro Glu Arg Pro
225 230 235 240

Ser Leu Tyr Thr Lys Val Val His Tyr Arg Lys Trp Ile Lys Asp Thr
245 250 255

Ile Val Ala Asn Pro
260

<210> 48
<211> 123
<212> PRT
<213> 智人

<400> 48

Met Lys Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Met Ala Gly Leu Ala Leu Gln
1 5 10 15

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

Glu Asp Cys Leu Gln Val Glu Asn Cys Thr Gln Leu Gly Glu Gln Cys
35 40 45

Trp Thr Ala Arg Ile Arg Ala Val Gly Leu Leu Thr Val Ile Ser Lys

50 55 60

Gly Cys Ser Leu Asn Cys Val Asp Asp Ser Gln Asp Tyr Tyr Val Gly
65 70 75 80

Lys Lys Asn Ile Thr Cys Cys Asp Thr Asp Leu Cys Asn Ala Ser Gly
85 90 95

Ala His Ala Leu Gln Pro Ala Ala Ala Ile Leu Ala Leu Leu Pro Ala
100 105 110

Leu Gly Leu Leu Leu Trp Gly Pro Gly Gln Leu
115 120

<210> 49
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 49
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt 24

<210> 50
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 50
tcgtcgtttt tcggtgcttt t 21

<210> 51
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 51
tcgtcgtttt tcggtcgttt t 21

申請專利範圍

1. 一種經分離之拮抗劑抗體，其專一性結合 PD-1 且包含：

重鏈可變區(VH)，其包含該 VH 的 VH 互補決定區 1(CDR1)、VH CDR2 及 VH CDR3，該 VH 具有選自 SEQ ID NO：3、SEQ ID NO：4、SEQ ID NO：5 及 SEQ ID NO：6 所組成群組之胺基酸序列；及

輕鏈可變區(VL)，其包含該 VL 的 VL CDR1、VL CDR2 及 VL CDR3，該 VL 具有選自 SEQ ID NO：2、SEQ ID NO：7、SEQ ID NO：8 及 SEQ ID NO：9 所組成群組之胺基酸序列。

2. 如申請專利範圍第 1 項之經分離之拮抗劑抗體，其中該抗體包含：包含示於 SEQ ID NO：13、14 或 15 之胺基酸序列之 VH CDR1、包含示於 SEQ ID NO：16、17、24、25、27、28 或 35 之胺基酸序列之 VH CDR2、包含示於 SEQ ID NO：18、23 或 26 之胺基酸序列之 VH CDR3、包含示於 SEQ ID NO：10、22 或 30 之胺基酸序列之 VL CDR1、包含示於 SEQ ID NO：11 或 20 之胺基酸序列之 VL CDR2 及包含示於 SEQ ID NO：12、21 或 31 之胺基酸序列之 VL CDR3。

3. 如申請專利範圍第 1 項之經分離之拮抗劑抗體，其中該抗體包含：包含示於 SEQ ID NO：3、4、5 或 6 之胺基酸序列之 VH、或彼在非 CDR 內之殘基具有一或數個保守性胺基酸取代之變體。

4. 如申請專利範圍第 3 項之經分離之拮抗劑抗體，其中該抗體包含：包含示於 SEQ ID NO：2、7、8 或 9 之胺基酸序列之 VL、或彼在非 CDR 內之胺基酸具有一或數個胺基酸取代之變體。

5. 如申請專利範圍第 1 項之經分離之拮抗劑抗體，其中該抗體包含：包含示於 SEQ ID NO：4 之胺基酸序列之 VH 及包含示於 SEQ ID NO：8 之胺基酸序列之 VL。

6. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之經分離之拮抗劑抗體，其中該抗體包含：包含示於 SEQ ID NO：29 或 38 之胺基酸序列之重鏈及包含示於 SEQ ID NO：39 之胺基酸序列之輕鏈。

7. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之經分離之拮抗劑抗體，其中該抗體包含恆定區。

8. 如申請專利範圍第 7 項之經分離之拮抗劑抗體，其中該抗體具有選自 IgG₂、IgG_{2Δa}、IgG₄、IgG_{4Δb}、IgG_{4Δc}、IgG₄ S228P、IgG_{4Δb} S228P 及 IgG_{4Δc} S228P 所組成群組之同型。

9. 如申請專利範圍第 7 項之經分離之拮抗劑抗體，其中該恆定區係 IgG₄ S228P。

10. 如申請專利範圍第 1 項之經分離之拮抗劑抗體，其中該抗體之各 CDR 係根據卡巴(Kabat)定義、柯西亞(Chothia)定義、卡巴定義及柯西亞定義之組合、AbM 定義或 CDR 之接觸定義而定義。

11. 一種經分離之抗 PD-1 抗體，其中該抗體包含：

包含示於 SEQ ID NO：13 之胺基酸序列之 VH CDR1、包含示於 SEQ ID NO：17 之胺基酸序列之 VH CDR2、包含示於 SEQ ID NO：23 之胺基酸序列之 VH CDR3、包含示於 SEQ ID NO：10 之胺基酸序列之 VL CDR1、包含示於 SEQ ID NO：20 之胺基酸序列之 VL CDR2 及包含示於 SEQ ID NO：21 之胺基酸序列之 VL CDR3。

12. 如申請專利範圍第 1 至 5 及 11 項中任一項之經分離之抗體，其中該抗體促進 T 細胞分泌 IFN γ 及/或 TNF。

13. 如申請專利範圍第 1 至 5 及 11 項中任一項之經分離之抗體，其中該抗體促進 T 細胞增生。

14. 如申請專利範圍第 1 至 5 及 11 項中任一項之經分離之抗體，其中該抗體抑制腫瘤生長。

15. 如申請專利範圍第 1 至 5 及 11 項中任一項之經分離之抗體，其中該抗體結合人類 PD-1 與鼠類 PD-1。

16. 如申請專利範圍第 15 項之經分離之抗體，其中該抗體以藉由表面電漿共振於 25°C 下測量之約 0.73 nM 之親和性結合人類 PD-1。

17. 一種經分離之細胞系，其產製如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項之抗體。

18. 一種經分離之核酸，其編碼如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項之抗體。

19. 一種重組表現載體，其包含如申請專利範圍第 18 項之核酸。

20. 一種宿主細胞，其包含如申請專利範圍第 19 項之表現載體。

21. 一種融合瘤，其能產製如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項之抗體。

22. 一種產製抗 PD-1 拮抗劑抗體之方法，該方法包含：將重組產製如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項之抗體之細胞系培養於其中該抗體被產製之條件下；及回收該抗體。

23. 一種產製抗 PD-1 拮抗劑抗體之方法，該方法包含：將包含編碼抗體之核酸之細胞系培養於其中該抗體被產製之條件下，其中該抗體包含：包含示於 SEQ ID NO：29 或 38 之胺基酸序列之重鏈及包含示於 SEQ ID NO：39 之胺基酸序列之輕鏈；及回收該抗體。

24. 如申請專利範圍第 23 項之方法，其中該抗體之重鏈與輕鏈係編碼在個別載體上。

25. 如申請專利範圍第 23 項之方法，其中該抗體之重鏈與輕鏈係編碼在相同載體上。

26. 一種醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項之抗體及醫藥上可接受之載體。

27. 一種用於癌症治療之套組，其包含如申請專利範圍第 26 項之醫藥組成物。

28. 一種如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項之經分離之抗體或如申請專利範圍第 26 項之醫藥組成物於製備用於治療個體之癌症的藥劑或套組之用途，使得個體中

一或多種與該癌症相關之症狀被改善。

29. 如申請專利範圍第 28 項之用途，其中該癌症係選自胃癌(gastric cancer)、肉瘤、淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、白血病、頭部和頸部癌症、鱗狀細胞頭頸癌、胸腺癌、上皮癌、唾液腺癌、肝癌、胃癌(stomach cancer)、甲狀腺癌、肺癌、卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、食道癌、胰腺癌、膠質瘤、白血病、多發性骨髓瘤、腎細胞癌、膀胱癌、子宮頸癌、絨毛膜癌、結腸癌、口腔癌、皮膚癌及黑色素瘤所組成群組。

30. 如申請專利範圍第 28 項之用途，其中該個體係具有局部晚期或轉移黑色素瘤、鱗狀細胞頭頸癌(SCHNC)、卵巢惡性腫瘤(ovarian carcinoma)、肉瘤或復發或難治的經典霍奇金氏淋巴瘤(cHL)之先前經治療的成人病患。

31. 如申請專利範圍第 28 至 30 項中任一項之用途，其中該抗體以劑量約 0.5 mg/kg、約 1.0 mg/kg、約 3.0 mg/kg 或約 10 mg/kg 投予。

32. 如申請專利範圍第 28 至 30 項中任一項之用途，其中該抗體以每 7、14、21 或 28 天投予一次。

33. 如申請專利範圍第 28 至 30 項中任一項之用途，其中該抗體係經靜脈內或皮下投予。

34. 如申請專利範圍第 28 至 30 項中任一項之用途，其中該藥劑或套組進一步包含第二治療劑。

35. 如申請專利範圍第 34 項之用途，其中該第二治

療劑係選自抗 CTLA4 抗體、抗 4-1BB 抗體、第二 PD-1 拮抗劑、抗 PD-L1 抗體、抗 TIM3 抗體、抗 LAG3 抗體、抗 TIGIT 抗體、抗 OX40 抗體、抗 GITR 抗體、酪胺酸激酶抑制劑及 ALK 抑制劑所組成群組。

36. 如申請專利範圍第 35 項之用途，其中該酪胺酸激酶抑制劑係阿西替尼(axitinib)或帕博西尼(palbociclib)。

37. 如申請專利範圍第 35 項之用途，其中該 ALK 抑制劑係舒尼替尼(sunitinib)或克里唑替尼(crizotinib)。

38. 一種(1)如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項之經分離之抗體或如申請專利範圍第 26 項之醫藥組成物與(2)能引發抗癌細胞的免疫反應的疫苗之組合於製備用於治療個體的癌症之單一劑量單位藥劑或多劑量單位套組之用途，其中於該多劑量單位中，一劑量單位含有該經分離之抗體或該醫藥組成物，且另一劑量單位含有該疫苗。

39. 一種如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項之經分離之抗體或如申請專利範圍第 26 項之醫藥組成物於製備藥劑或套組之用途，該藥劑或套組係用於在接受用於癌症治療之疫苗之個體內增進該疫苗之免疫原性或治療效應。

40. 如申請專利範圍第 38 或 39 項之用途，其中該癌症係選自乳腺癌、胃癌、肝癌、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌及結腸直腸癌所組成群組。

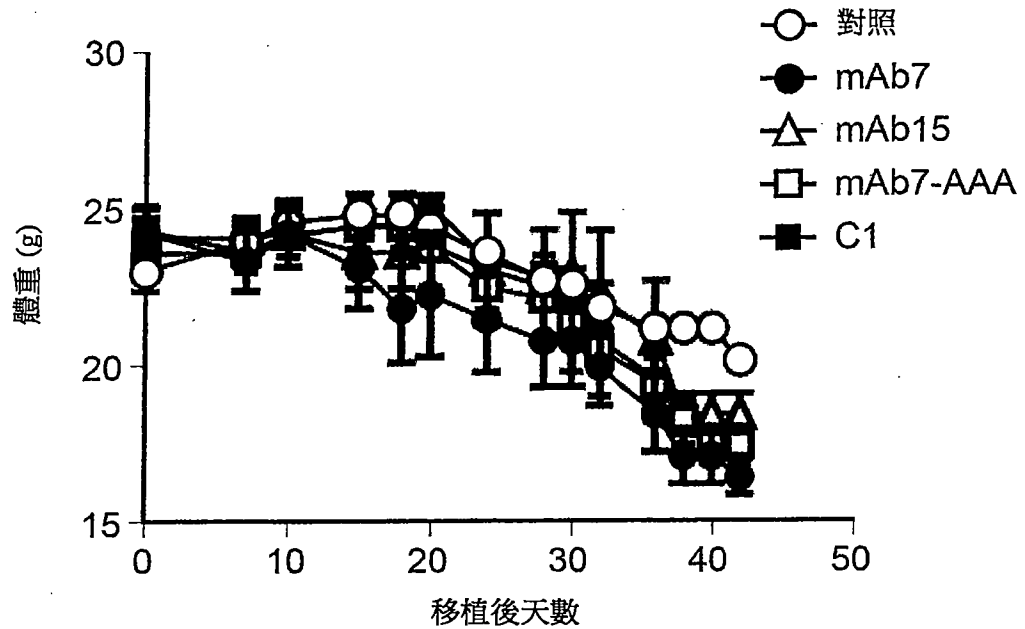
41. 如申請專利範圍第 38 或 39 項之用途，其中該藥

劑或套組進一步包含一或多種其他免疫調節劑。

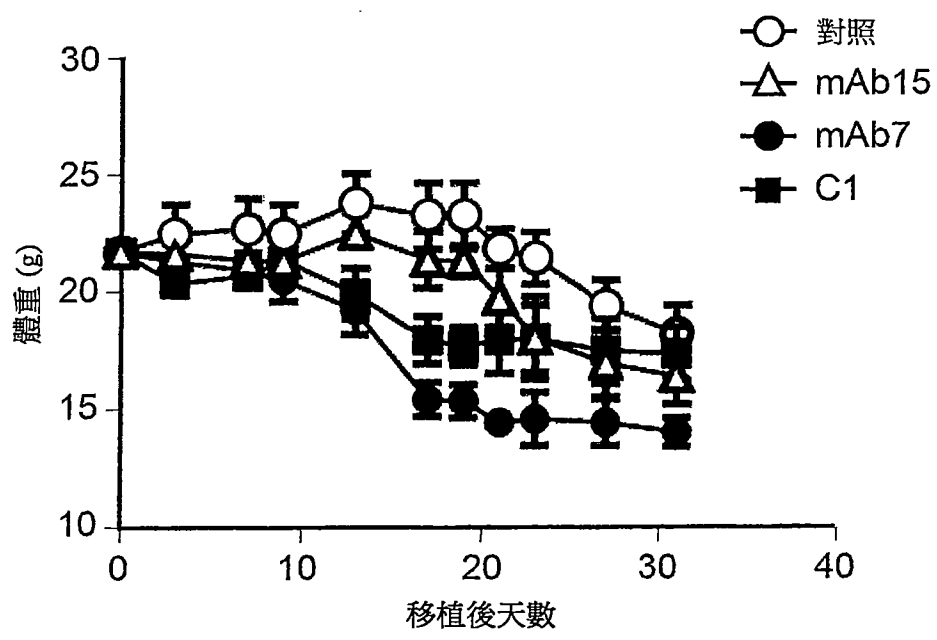
42. 如申請專利範圍第 41 項之用途，其中該其他免疫調節劑係選自蛋白激酶受體抑制劑、CTLA-4 拮抗劑、CD40 促效劑及 TLR9 促效劑所組成群組。

圖式

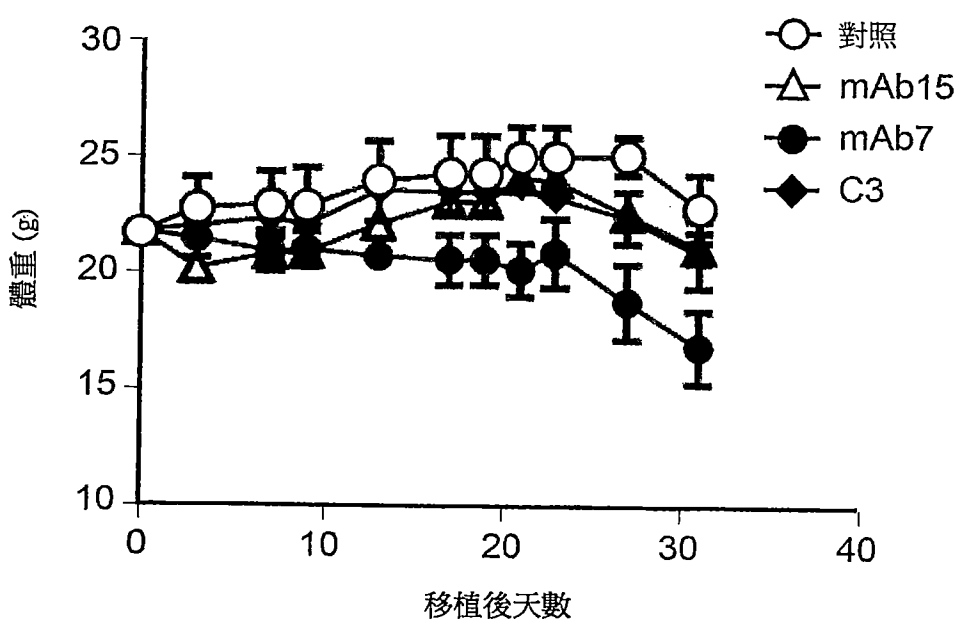
第 1A 圖



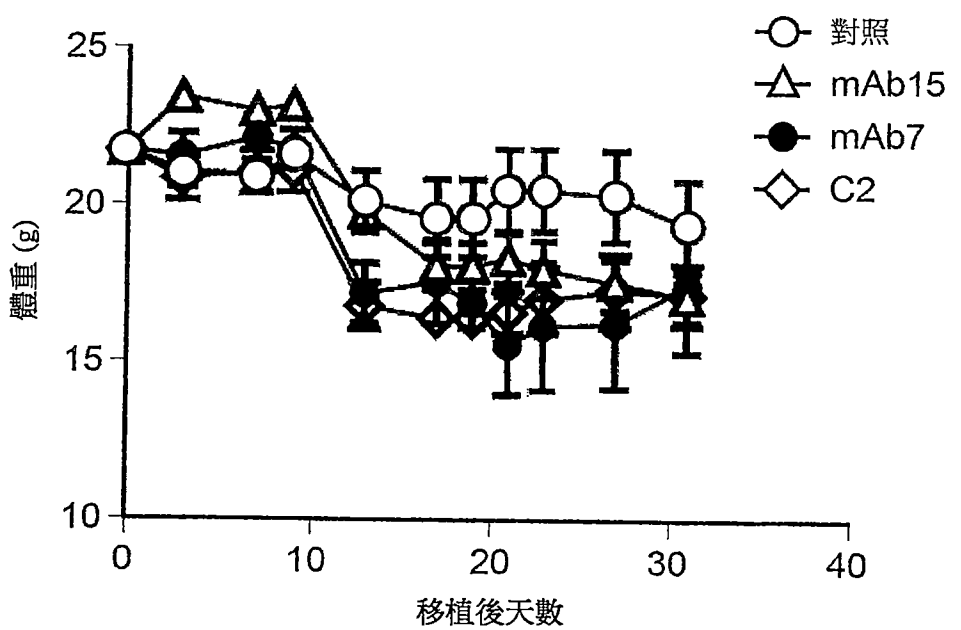
第 1B 圖



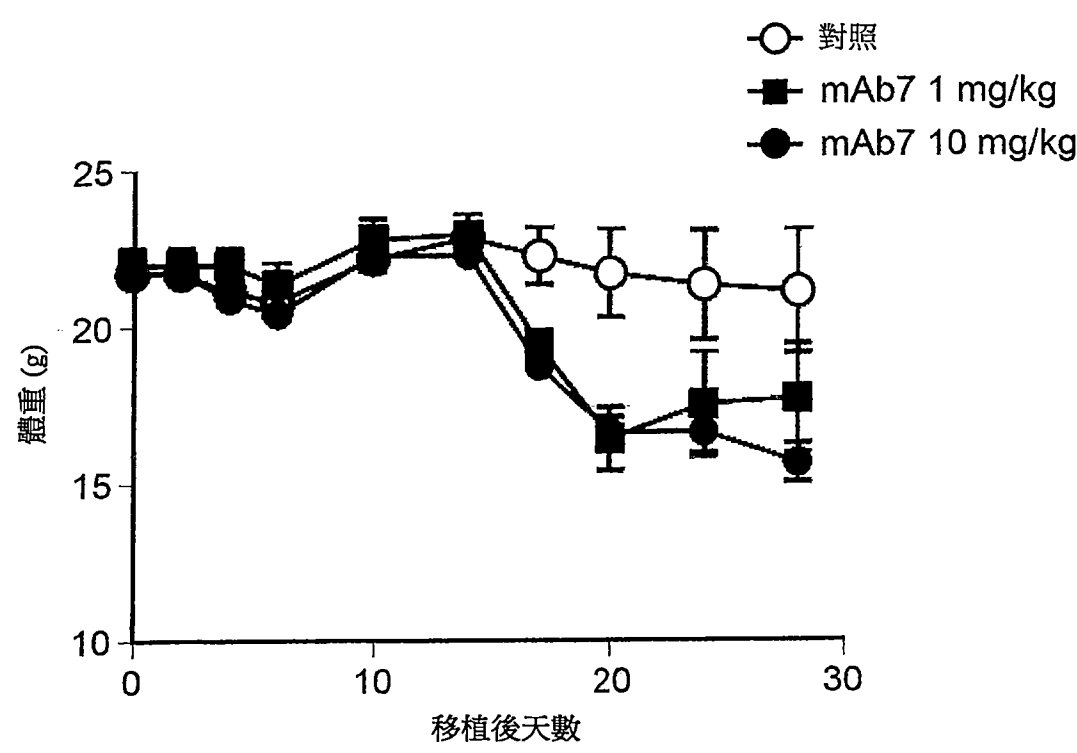
第 1C 圖



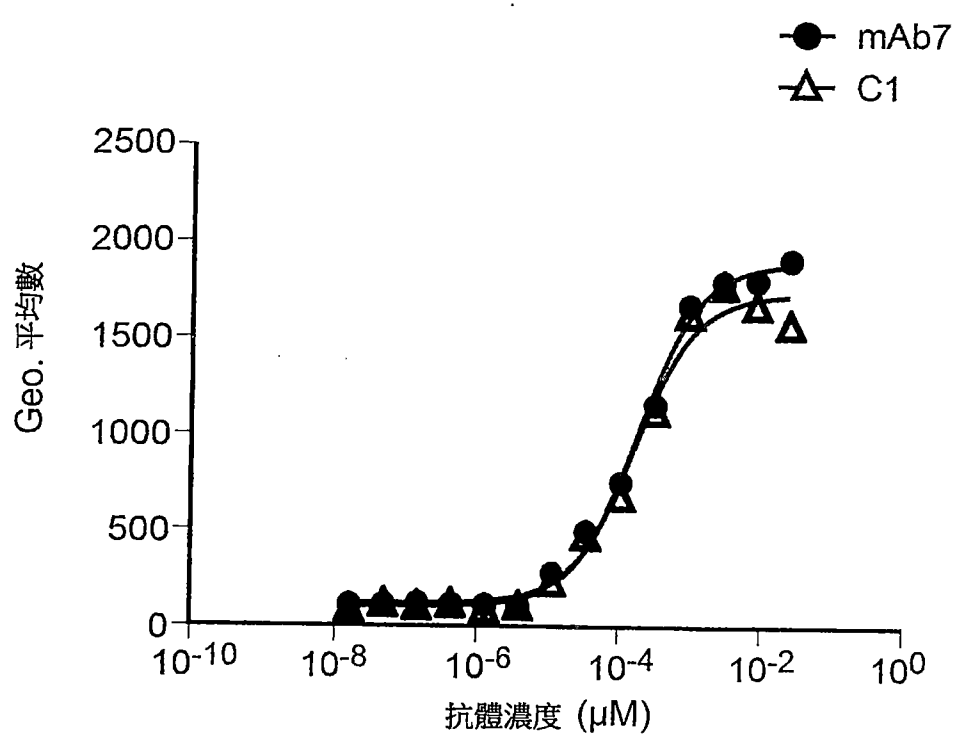
第 1D 圖



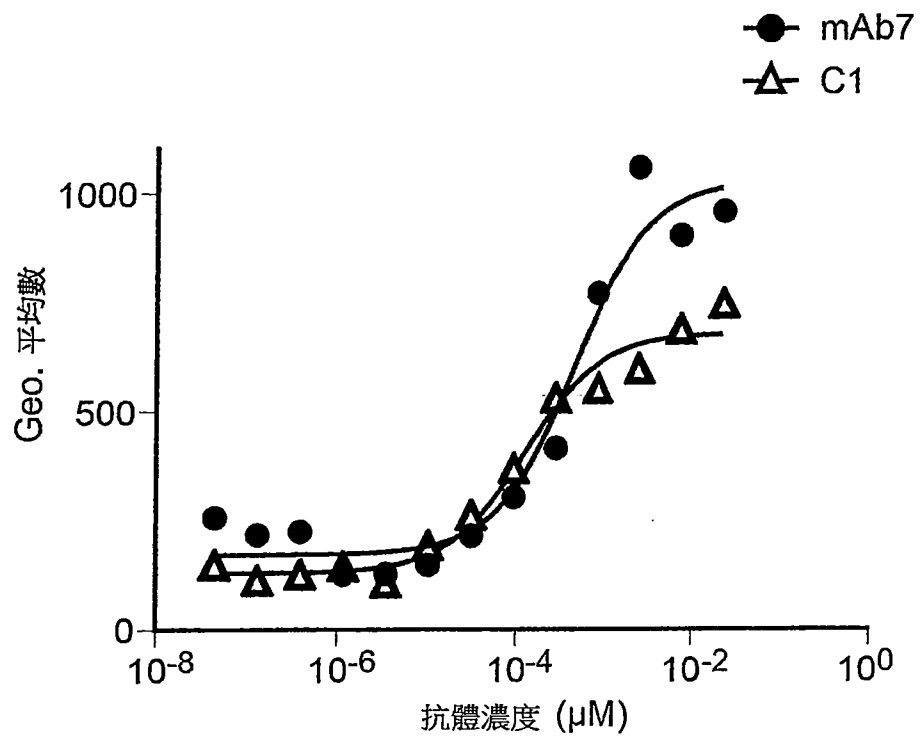
第 1E 圖



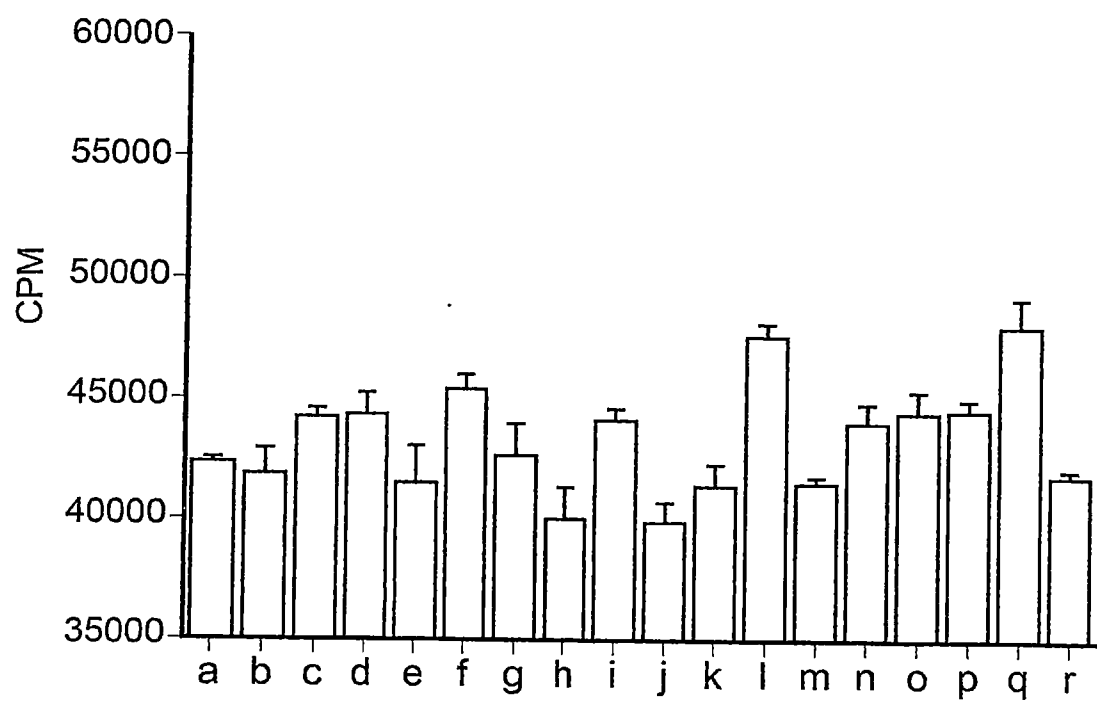
第 2A 圖



第 2B 圖



第 3 圖



第 4 圖

