



(21) 申請案號：105131785

(22) 申請日：中華民國 105 (2016) 年 09 月 30 日

(51) Int. Cl. : C07K16/46 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30) 優先權：2015/10/02 歐洲專利局

15188036.6

2015/10/02 歐洲專利局

15188065.5

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

瑞士

(72) 發明人：柯達瑞－迪克 蘿拉 CODARRI-DEAK, LAURA (CH)；福堤格 基亞格 FERTIG,

GEORG (DE)；費雪 詹斯 FISCHER, JENS (DE)；克連 克利斯添 KLEIN,

CHRISTIAN (DE)；樂菲斯基 維克特 LEVITSKI, VIKTOR (SE)；利夫卡 凡立

瑞亞 LIFKE, VALERIA (DE)；佩洛 馬利歐 PERRO, MARIO (IT)；瑞古拉 喬傑

湯瑪斯 REGULA, JOERG THOMAS (DE)；薛洛紹爾 提爾曼 SCHLOTHAUER,

TILMAN (DE)；席伯 史蒂芬 SEEBER, STEFAN (DE)；尤瑪那 帕洛 UMANA,

PABLO (CR)；溫斯克 伊迪可 WUENSCHKE, ILDIKO (HU)；茲微克 亞德藍

ZWICK, ADRIAN (DE)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：30 項 圖式數：14 共 303 頁

(54) 名稱

特異性針對 PD1 及 TIM3 之雙特異性抗體

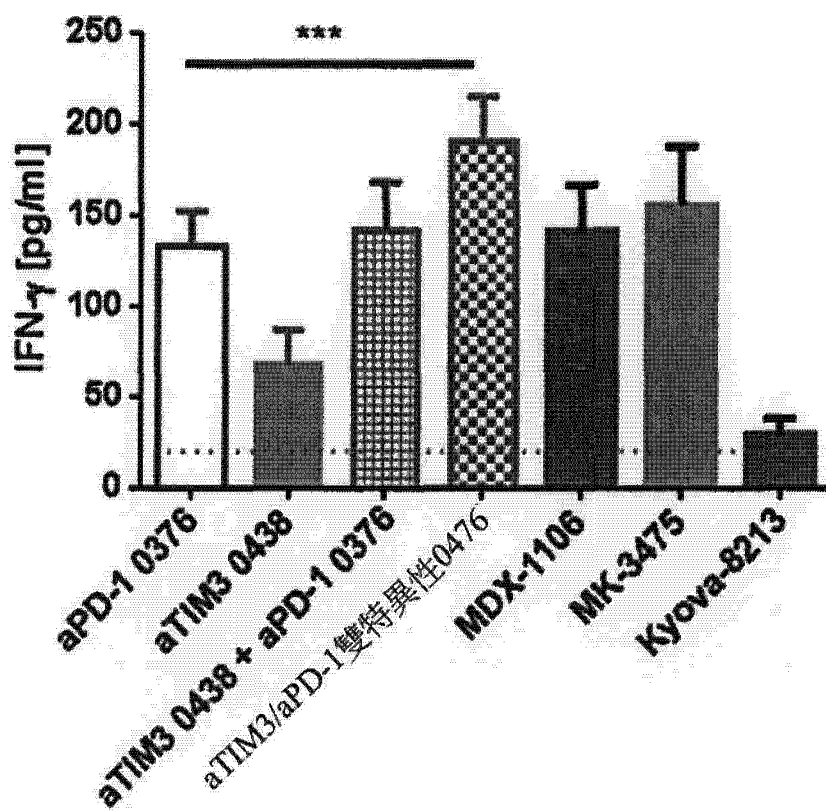
BISPECIFIC ANTIBODIES SPECIFIC FOR PD1 AND TIM3

(57) 摘要

本發明係關於包含特異性結合於 PD1 之第一抗原結合位點及特異性結合於 TIM3 之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，尤其如下雙特異性抗體，其中該雙特異性抗體以低於結合於 PD1 之結合親和力結合於 TIM3。本發明進一步關於產生此等分子之方法及其使用方法。

The invention relates to bispecific antibodies comprising a first antigen-binding site that specifically binds to PD1 and a second antigen-binding site that specifically binds to TIM3, in particular to bispecific antibodies, wherein the bispecific antibody binds to TIM3 with a lower binding affinity when compared to the binding to PD1. The invention further relates to methods of producing these molecules and to methods of using the same.

指定代表圖：



8個供體

(平均值, SEM)

P值	0.0003
----	--------

【圖13】

【發明說明書】

【中文發明名稱】

特異性針對PD1及TIM3之雙特異性抗體

【英文發明名稱】

BISPECIFIC ANTIBODIES SPECIFIC FOR PD1 AND TIM3

【技術領域】

本發明係關於包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，尤其如下雙特異性抗體，其中該雙特異性抗體以低於結合於PD1之結合親和力結合於TIM3。本發明進一步關於產生此等分子之方法及其使用方法。

【先前技術】

免疫系統在預防癌症中之重要性係基於其能夠偵測且摧毀異常細胞。但是，一些腫瘤細胞能夠藉由引起免疫遏制狀態而逃避免疫系統 (Zitvogel等人, *Nature Reviews Immunology* 6 (2006), 715-727)。存在於負載腫瘤之宿主中的免疫遏制機制之一個實例為促進T細胞功能異常或耗盡。由於以下諸點，T細胞已成為主要工作焦點以在治療學上操縱內源性抗腫瘤免疫性：其能夠選擇性識別所有細胞區室中衍生自蛋白質之肽；其能夠直接識別及殺死表現抗原之細胞(藉由CD8+效應T細胞；亦稱為細胞毒性T淋巴細胞(CTL))；以及其能夠協調不同免疫反應(藉由CD4+輔助T細胞)，將適應性及先天性效應機制整合。耗盡之T細胞無法增殖及發揮效應功能，諸如細胞毒性及回應於抗原刺激之細胞因子分泌。進一步研究確定耗盡之T細胞之特徵在於持續表現抑制分子PD-1 (漸進式細胞死亡蛋白1)且在LCMV感染小鼠中阻斷PD-1與PD-L1 (PD-1配位體)相互作用可逆

轉T細胞耗盡且恢復抗原特異性T細胞反應(Barber等人, *Nature* 439 (2006), 682-687)。但是，僅僅靶向PD-1-PD-L1路徑不一直逆轉T細胞耗盡(Gehring等人, *Gastroenterology* 137 (2009), 682-690)，表明其他分子可能與T細胞耗盡有關(Sakuishi, *J. Experimental Med.* 207 (2010), 2187-2194)。

TIM-3為一種最初鑑別為在分泌IFN- γ 之Th1及Tc1細胞上選擇性地表現的分子(Monney等人, *Nature* 415 (2002), 536-541)。TIM-3與其配位體半乳糖凝集素-9之相互作用引發TIM-3+ T細胞中細胞死亡。因此，TIM-3與PD-1均可充當T細胞反應之負調節劑。在實體與血液科惡性病之臨床前模型中已經展示TIM-3標記CD8+ T細胞之最受遏制或功能異常群體(Sakuishi, *J. Experimental Med.* 207 (2010), 2187-2194；Zhou, *Blood* 117 (2011), 4501-4510；Majeti R等人, *PNAS*, 106 (2009), 3396-3401)。在此等模型中，所有CD8+ TIM-3+ T細胞共表現PD1，且此等雙重表現之細胞展現比僅僅表現PD1之細胞更大的細胞週期進程與效應細胞因子產生[介白素(IL)-2、TNF及IFN- γ]的缺陷。因此，TIM-3路徑可與PD-1路徑合作，促進癌症中CD8+T細胞中嚴重功能異常表現型之發展。因此，預期TIM-3及PD1路徑之組合靶向高效控制腫瘤生長。

TIM3為一種屬於免疫球蛋白超家族及TIM蛋白家族之人類蛋白質。人類中，類似於小鼠，TIM-3在T細胞以及吞噬細胞(諸如巨噬細胞及樹突狀細胞)上表現。TIM3結合於蛋白質配位體(例如半乳糖凝集素-9)可經由誘發細胞凋亡之機制抑制Th1反應，且因此諸如誘發外周耐受性。用siRNA減少人類TIM3之表現或藉由阻斷抗體抑制人類TIM3可增加干擾素 α 自CD4陽性T細胞分泌，證實TIM3在人類T細胞中之抑制作用。在吞噬

細胞中，TIM3亦充當識別細胞凋亡細胞之受體。來自自體免疫疾病患者之臨床樣品之分析證實TIM3在CD4陽性細胞中未表現。詳言之，在來源於多發性硬化症患者之腦脊髓液之T細胞純系中，TIM3之表現量較低，且IFN- γ 之分泌程度高於來源於正常健康個人之純系(Koguchi K等人, *J Exp Med.* 203 (2006), 1413-1418)。據報導TIM-3與過敏性哮喘有關係(WO 96/27603及WO2003/063792)。

抗TIM3單株抗體之實例包括抗人類TIM3大鼠單株抗體(純系344823，由R&D Systems製造)及抗人類TIM-3小鼠單株抗體(純系F38-2E2，由R&D Systems製造)。WO2013/06490係關於展示快速內化之抗TIM3抗體及其免疫結合物，用於治療癌症及減少發炎。US2012/189617係關於對與表現人類TIM3之細胞相關之疾病展現更高效應活性，諸如抗體依賴性細胞毒性(ADCC活性)的抗TIM-3抗體。

漸進式細胞死亡蛋白1 (PD-1或CD279)為CD28受體家族之抑制成員，該受體家族亦包括CD28、CTLA-4、ICOS及BTLA。PD-1為一種細胞表面受體且在活化B細胞、T細胞及骨髓細胞上表現(Okazaki等人(2002) *Curr. Opin. Immunol.* 14: 391779-82；Bennett等人(2003) *J Immunol* 170:711-8)。PD-1之結構為單體1型跨膜蛋白，由一個免疫球蛋白可變樣細胞外域及含有基於免疫受體酪胺酸之抑制基元(ITIM)及基於免疫受體酪胺酸之轉換基元(ITSM)的細胞質域組成。活化T細胞短暫表現PD1，但PD1及其配位體PDL1之持續過度表現促進免疫耗盡，引起持續病毒感染、腫瘤逃逸、增加感染及死亡率。PD1表現由抗原識別，經由T細胞受體誘發，且其表現主要經由連續T細胞受體信號傳導維持。長時間抗原暴露後，PD1基因座無法重新甲基化，此促進連續過度表現。阻斷

PD1路徑可使癌症及慢性病毒感染中耗盡T細胞功能性恢復(Sheridan, *Nature Biotechnology* 30 (2012), 729-730)。PD-1之單株抗體已描述於例如 WO 2003/042402、WO 2004/004771、WO 2004/056875、WO 2004/072286、WO 2004/087196、WO 2006/121168、WO 2006/133396、WO 2007/005874、WO 2008/083174、WO 2008/156712、WO 2009/024531、WO 2009/014708、WO 2009/101611、WO 2009/114335、WO 2009/154335、WO 2010/027828、WO 2010/027423、WO 2010/029434、WO 2010/029435、WO 2010/036959、WO 2010/063011、WO 2010/089411、WO 2011/066342、WO 2011/110604、WO 2011/110621、WO 2012/145493、WO 2013/014668、WO 2014/179664及WO 2015/112900中。

亦展示阻斷PD1與TIM3可例如在急性酒精性肝炎(AAH)患者中恢復抗菌免疫反應。來自此等患者之淋巴細胞表現高水準之免疫抑制受體，產生較低水準之干擾素 γ ，且由於慢性內毒素暴露而增加IL10產生。此等作用可藉由阻斷PD1及TIM3而逆轉，增加T細胞及嗜中性白細胞之抗微生物活性(Markwick等人, *Gastroenterology* 148 (2015), 590-602)。

用於慢性免疫病狀中免疫療法的針對TIM3及PD1之雙特異性抗體已描述於WO 2011/159877中。但是，需要提供新雙特異性抗體，其不僅同時結合於PD1及TIM3，因此選擇性地靶向表現PD1與TIM3之T細胞，且亦避免阻斷諸如先天性免疫細胞、例如原始樹突狀細胞(DC)及單核細胞之其他細胞上之TIM3。本發明之雙特異性抗體不僅有效地阻斷過度表現PD1與TIM3之T細胞上的PD1及TIM3，而且其對此等細胞具有高度選擇

性，從而可避免由投與高度活性TIM3抗體所引起之副作用。

【發明內容】

在一個態樣中，本發明提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中

該特異性結合於PD1之第一抗原結合位點包含

包含以下之VH域：

(i)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的HVR-H1，

(ii)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的HVR-H2，及

(iii)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的HVR-H3；以及

包含以下之VL域：

(i)包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列的HVR-L1；

(ii)包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的HVR-L2，及

(iii)包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的HVR-L3；且

該特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點包含

(a)包含以下之VH域：

(i)包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列的HVR-H1，

(ii)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列的HVR-H2，及

(iii)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列的HVR-H3；以及

包含以下之VL域：

(i)包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12之胺基酸序列的HVR-L1，

(ii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列的HVR-L2，及

(iii)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列的HVR-L3；或

(b)包含以下之VH域：

(i)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-H1，

(ii)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-H2，及

(iii)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的HVR-H3；以及

包含以下之VL域：

(i)包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的HVR-L1，

(ii)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的HVR-L2，及

(iii)包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的HVR-L3；或

(c)包含以下之VH域：

(i)包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列的HVR-H1，

(ii)包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列的HVR-H2，及

(iii)包含SEQ ID NO:31之胺基酸序列的HVR-H3；以及

包含以下之VL域：

(i)包含SEQ ID NO:32之胺基酸序列的HVR-L1，

(ii)包含SEQ ID NO:33之胺基酸序列的HVR-L2，及

(iii)包含SEQ ID NO:34之胺基酸序列的HVR-L3。

在一個態樣中，包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體為二價。

在另一態樣中，提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中該雙特異性抗體以低親和力結合於TIM3且以高親和力結合於PD1。在一個特定態樣中，本發明提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中該雙特異性

抗體以比結合於PD1低至少50倍、更尤其比結合於PD1低至少100倍之結合親和力結合於TIM3。在一個較佳實施例中，結合親和力(KD)用表面電漿子共振分析法(如例如實例12中所描述)測定。

在另一態樣中，提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中

該特異性結合於PD1之第一抗原結合位點包含

(a)包含SEQ ID NO: 43之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 44之胺基酸序列的VL域，或

(b)包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 46之胺基酸序列的VL域，或

(c)包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 47之胺基酸序列的VL域，或

(d)包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 48之胺基酸序列的VL域，或

(e)包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 49之胺基酸序列的VL域，

且該特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點包含

(a)包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列的VL域，或

(b)包含SEQ ID NO: 9之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列的VL域，或

(c)包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列的VL域，或

(d)包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 16之胺基酸序列的VL域，或

(e)包含SEQ ID NO: 23之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的VL域，或

(f)包含SEQ ID NO: 25之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 26之胺基酸序列的VL域，或

(g)包含SEQ ID NO: 27之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列的VL域，或

(h)包含SEQ ID NO: 35之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 36之胺基酸序列的VL域。

在一個特定態樣中，提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中

該特異性結合於PD1之第一抗原結合位點包含有包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 46之胺基酸序列的VL域，

且該特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點包含有包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 16之胺基酸序列的VL域或包含SEQ ID NO: 25之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 26之胺基酸序列的VL域。

詳言之，本發明提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中

該特異性結合於PD1之第一抗原結合位點包含
包含以下之VH域：

(i)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的HVR-H1，

(ii)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的HVR-H2，及
(iii)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的HVR-H3；以及
包含以下之VL域：

(i)包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列的HVR-L1；
(ii)包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的HVR-L2，及
(iii)包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的HVR-L3；且
該特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點包含
包含以下之VH域：

(i)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-H1，
(ii)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-H2，及
(iii)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的HVR-H3；以及
包含以下之VL域：

(i)包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的HVR-L1，
(ii)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的HVR-L2，及
(iii)包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的HVR-L3。

更詳言之，提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中該特異性結合於PD1之第一抗原結合位點包含有包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 46之胺基酸序列的VL域，且該特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點包含有包含SEQ ID NO: 25之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 26之胺基酸序列的VL域。

在一個特定態樣中，本發明提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，

其中該雙特異性抗體以比結合於PD1低至少50倍之結合親和力、更尤其比結合於PD1低至少100倍之結合親和力結合於TIM3。

在另一態樣中，包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體為人類、人類化或嵌合抗體。詳言之，其為人類化或嵌合抗體。

在另一態樣中，本發明係關於一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中該雙特異性抗體包含Fc域、包含特異性結合於PD1之抗原結合位點的第一Fab片段及包含特異性結合於TIM3之抗原結合位點的第二Fab片段。

詳言之，Fc域為IgG域，更尤其IgG1 Fc域或IgG4 Fc域。

在一個態樣中，本發明係關於一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中Fc域包含一或多個減少與Fc受體、尤其Fc γ 受體之結合的胺基酸取代。詳言之，Fc域為人類IgG1子類，具有胺基酸突變L234A、L235A及P329G (根據Kabat EU指數編號)。

在另一態樣中，本發明係關於一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中Fc域包含促進Fc域之第一與第二次單元締合的修飾。

在一個態樣中，本發明係關於一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中根據杵臼法(knobs into holes method)，Fc域之第一次單元包含杵且Fc域之第二次單元包含臼。在一個特定態樣中，Fc域之第一次單元包含胺基酸取代S354C及T366W (EU編號)，且Fc域之第二次單元包含胺基酸取代

Y349C、T366S及Y407V (根據Kabat EU指數編號)。

在另一態樣中，本發明係關於一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中在Fab片段之一中，可變域VL及VH彼此置換，從而使得VH域為輕鏈之一部分且VL域為重鏈之一部分。在一個特定態樣中，雙特異性抗體為如下抗體，其中在包含特異性結合於PD1之抗原結合位點的第一Fab片段中，可變域VL及VH彼此置換。

在另一態樣中，本發明係關於一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中在Fab片段之一中，在恆定域CL中，位置124之胺基酸經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)(根據Kabat EU指數編號)獨立地取代，且在恆定域CH1中，位置147及213之胺基酸經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)(根據Kabat EU指數編號)獨立地取代。在一個特定態樣中，雙特異性抗體為如下抗體，其中在包含特異性結合於TIM3之抗原結合位點的第二Fab片段中，恆定域CL之位置124之胺基酸經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)(根據Kabat EU指數編號)獨立地取代，且在恆定域CH1中，位置147及213之胺基酸經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)(根據Kabat EU指數編號)獨立地取代。

在另一態樣中，本發明提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其包含

(a)包含與SEQ ID NO: 50之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一重鏈，包含與SEQ ID NO: 52之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含與SEQ ID NO: 51之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二重鏈，及包含與SEQ ID NO: 53之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(b)包含與SEQ ID NO: 54之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一重鏈，包含與SEQ ID NO: 56之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含與SEQ ID NO: 55之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二重鏈，及包含與SEQ ID NO: 57之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(c)包含與SEQ ID NO: 58之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一重鏈，包含與SEQ ID NO: 60之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含與SEQ ID NO: 59之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二重鏈，及包含與SEQ ID NO: 61之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(d)包含與SEQ ID NO: 62之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一重鏈，包含與SEQ ID NO: 64之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含與SEQ ID NO: 63之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二重鏈，及包含與SEQ ID NO: 65之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(e)包含與SEQ ID NO: 66之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一重鏈，包含與SEQ ID NO: 68之序列至少95%序列一致之胺基酸序列

的第一輕鏈，

包含與SEQ ID NO: 67之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二重鏈，及包含與SEQ ID NO: 69之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二輕鏈。

在一個特定態樣中，本發明提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其包含

(a)包含SEQ ID NO: 50之胺基酸序列的第一重鏈，包含SEQ ID NO: 52之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含SEQ ID NO: 51之胺基酸序列的第二重鏈，及包含SEQ ID NO: 53之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(b)包含SEQ ID NO: 54之胺基酸序列的第一重鏈，包含SEQ ID NO: 56之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含SEQ ID NO: 55之胺基酸序列的第二重鏈，及包含SEQ ID NO: 57之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(c)包含SEQ ID NO: 58之胺基酸序列的第一重鏈，包含SEQ ID NO: 60之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含SEQ ID NO: 59之胺基酸序列的第二重鏈，及包含SEQ ID NO: 61之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(d)包含SEQ ID NO: 62之胺基酸序列的第一重鏈，包含SEQ ID NO: 64之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含SEQ ID NO: 63之胺基酸序列的第二重鏈，及包含SEQ ID NO: 65之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(e)包含SEQ ID NO: 66之胺基酸序列的第一重鏈，包含SEQ ID NO: 68之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含SEQ ID NO: 67之胺基酸序列的第二重鏈，及包含SEQ ID NO: 69之胺基酸序列的第二輕鏈。

根據本發明之另一態樣，提供一種編碼如前文所述之雙特異性抗體的聚核苷酸。本發明進一步提供一種包含本發明之聚核苷酸的載體，尤其表現載體，及包含本發明之聚核苷酸或載體的原核或真核宿主細胞。在一些實施例中，宿主細胞為真核生物細胞，尤其哺乳動物細胞。

在另一態樣中，提供一種用於產生如本文所述的包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體的方法，其包含以下步驟：a)用包含編碼該雙特異性抗體之聚核苷酸之載體使宿主細胞轉形；b)在適合於表現該雙特異性抗體之條件下培養該宿主細胞；以及c)自培養物回收該雙特異性抗體。本發明亦涵蓋一種雙特異性抗體，其藉由本發明之方法產生。

本發明進一步提供一種醫藥組合物，其包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，及至少一種醫藥學上可接受之賦形劑。

本發明亦涵蓋包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，或包含該雙特異性抗體之醫藥組合物，其係用作藥物。

在另一態樣中，本發明提供如本文所述的包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，或包含該雙特異性抗體之醫藥組合物，其用於

- i)調節免疫反應，諸如恢復T細胞活性，
- ii)刺激免疫反應或功能，
- iii)治療感染，
- iv)治療癌症，
- v)延遲癌症進展，
- vi)延長罹患癌症之患者的存活。

在一個態樣中，提供如本文所述的包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，或包含該雙特異性抗體之醫藥組合物，其係用於治療有需要之個體的疾病。在一個特定態樣中，本發明提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，或包含該雙特異性抗體之醫藥組合物，其係用於治療癌症。在另一特定態樣中，提供包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，或包含該雙特異性抗體之醫藥組合物，其係用於調節免疫反應。在另一態樣中，提供包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，或包含該雙特異性抗體之醫藥組合物，其係用於治療慢性病毒感染。

亦提供如本文所述的包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體的用途，其係用於製造供治療有需要之個體之疾病用的藥物，尤其用於製造供治療癌症用的藥物，以及治療個體之疾病的方法，其包含向該個體投與治療有效量的呈醫藥學上可接受之形式的包含如本文所述的包含特異性結合於PD1之第一

抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體的組合物。在一個特定態樣中，疾病為癌症。在另一特定態樣中，疾病為慢性病毒感染。在另一態樣中，提供一種調節個體之免疫反應的方法，其包含向該個體投與治療有效量的呈醫藥學上可接受之形式的包含如本文所述的包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體的組合物。在上述態樣中之任一者中，個體較佳為哺乳動物，尤其為人類。

本發明亦提供如本文所述的包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，或包含該雙特異性抗體之醫藥組合物，其用於預防或治療癌症，其中該雙特異性抗體與化學治療劑、放射線及/或其他用於癌症免疫療法之藥劑組合投與。

此外，提供一種抑制個體中腫瘤細胞生長之方法，其包含向個體投與有效量的如本文所述的包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體以抑制腫瘤細胞生長。個體較佳為哺乳動物，尤其為人類。

【圖式簡單說明】

圖1： 用嵌合PD1-0103阻斷PD1強烈增強同種刺激之初級人類T細胞分泌IFN- γ 。

圖2： 用嵌合PD1-0103阻斷PD1強烈增強同種刺激之初級人類T細胞分泌干擾素- γ (IFN- γ)。

圖3： 用嵌合PD1-0103阻斷PD1強烈增加同種刺激之初級人類T細胞分泌腫瘤壞死因子 α (TNF)。

圖4： 在遞增濃度之不同抗PD-1抗體存在下在MLR之上清液中4A)

產生顆粒酶B之CD4 T細胞之頻率，及4B)藉由吸光度(光密度，O.D.)偵測到之IFN- γ 之量。

圖5： 5A)在不同抗PD-1抗體存在下PD1/PD-L1阻斷對遏制之T細胞受體信號傳導之再活化的影響；5B)在不同抗PD-1抗體存在下PD1/PD-L1阻斷對遏制之T細胞受體信號傳導之再活化的影響。

圖6： 針對抗PD1/Tim3雙特異性抗體與重組細胞同時結合的FRET分析之流程

圖7： 在不同雙特異性PD1TIM3抗體處理/結合時在表現PD1及TIM3之細胞上FRET之誘發：將經PD1 SNAP Tim3 CLIP雙重轉染之HEK293細胞用100 nM SNAP-Lumi4-Tb (Cisbio)及100 nM Clip-Red (Cisbio)在37°C下在Tag-Lite緩衝液(Cisbio)中染色1小時。洗滌後，將標記細胞與所指示之雙特異性抗PD1/Tim3抗體[0-10 nM] (圖7B中所示之人類化雙特異性變異體)一起在4°C下培育1小時，接著在665/620 nm下用BMG Pherastar讀數器量測時差式螢光(描繪為FRET信號之平均值 +/- SD [比率665/620 nm \times 10,000]，n=3)。7A：1+1格式(抗體PD1TIM3_0389及PD1TIM3_0168)，與2+2構築體(PD1TIM3_0358+ PD1TIM3_0359)相比；7B：人類化雙特異性變異體(PD1TIM3_0476及PD1TIM3_477)

圖8： 針對抗PD1/TIM3雙特異性抗體1+1 PD1TIM3-0168之同時結合的FRET分析：將SNAP標記之PD1及CLIP標記之TIM3細胞(如先前所描述)用100 nM SNAP-Lumi4-Tb及100 nM Clip-Red標記。洗滌後，將標記細胞與雙特異性抗PD1/TIM3抗體#0168 [在所指示之濃度下]一起在4°C下培育1小時，接著在665/620 nm下用BMG Pherastar讀數器量測時差式螢光(黑線)。為突出雙特異性抗體誘發之FRET信號的特異性，添加抗

PD1單株抗體(#0165；圖8A)或抗TIM3阻斷抗體(#0018，圖8B)進行競爭，幾乎完全阻止FRET信號(灰色曲線)。用單獨抗PD1抗體處理不誘發FRET(點線，僅僅左圖)。

圖9A：雙特異性1+1 PD1TIM3-0389展示與CD4+ T細胞(PD1+、TIM3+)之結合比率與嵌合TIM3_0028(chi0028)及人類化TIM3-0438(0438)相同，但與單核細胞、NK細胞及CD3+ T細胞之結合較少。

圖9B：雙特異性1+1 PD1TIM3-0389展示比嵌合TIM3_0028(chi0028)及人類化Tim3-0438(0438)顯著增加的與CD4+ T細胞(PD1+、TIM3+)結合之MFI。

圖9C：雙特異性1+1 PD1TIM3-0168在與陽性CD4+ T細胞(PD1+、TIM3+)之結合方面與嵌合TIM3_0018(Tim3-chi0018)及人類化TIM3-0434(0434)無差異。

圖9D：雙特異性1+1 PD1TIM3-0168僅僅展示略微增加的與陽性CD4+ T細胞(PD1+、Tim3+)結合之MFI。

圖9E及圖9F：抗TIM3抗體TIM3-0038展示與單核細胞及CD4+ T細胞兩者結合。

圖9G及圖9H：雙特異性1+1 PD1TIM3-0166(基於嵌合PD1-0103//Tim3-0038)展示強烈減少之與單核細胞之結合(與親本抗TIM3抗體TIM3_0038相比，參見圖4E及4F)，同時保留強烈的與CD4+ T細胞之結合。

圖10A至10D：雙特異性1+1 PD1TIM3-0166(基於嵌合PD1-0103//TIM3-0038)展示與雙特異性2+2 PD1TIM3-0321(亦基於嵌合PD1-0103//TIM3-0038，但具有兩個針對PD之抗原結合位點及兩個針對TIM3

之抗原結合位點)相比且與親本TIM3-0038抗體相比，在活化CD4+ T細胞上及在活化NK細胞上之內化減少。

圖11A： 隨時間推移之分析展示與TIM3抗體之細胞內叢集相比，雙特異性及PD1抗體兩者中膜定位更高。

圖中抗體名稱TIM3 (chi18-A647 = 經AlexaA647標記之嵌合TIM3_0018)、a-TIM3 (chi28-A647 = 經AlexaA647標記之嵌合TIM3_0028)、Bispec (0168-A647 = 經AlexaA647標記之1+1 PD1TIM3_0168 (基於嵌合PD1-0103/TIM3-0018))、Bispec (0389-A647 = 經Alexa 647標記之1+1 PD1TIM3_0389 (基於嵌合PD1-0103/TIM3-0028))及a-PD1 (0165-A488 = 經Alexa488標記之嵌合PD1-0103)。

抗PD1及雙特異性1+1 PD1TIM3_0389 (Bispec 0389)僅僅展示極其減慢之內化，甚至在3小時後，而其他雙特異性1+1 PD1TIM3_0168 (Bispec 0168)之內化較強。aTIM3 Ab 0028展示較強內化，aTIM3-0018展示最大內化。

圖11B： 嵌合PD1-0103 (aPD1-0165)僅僅展示不良內化，而高親和力嵌合TIM3_0018 (aTim3-chi18)在TIM3結合時強烈內化，甚至在15分鐘後。低親和力結合劑嵌合TIM3_0028 (aTIM3-chi28)之內化略微減少。雙特異性1+1 AB 0168 (由高親和力結合劑aPD1-0165及高親和力aTIM3-0018構成)展示更大程度之內化減少。雙特異性1+1 AB 0389 (由高親和力結合劑嵌合PD1-0103 (aPD1-0165)及低親和力嵌合TIM3_0028 (aTIM3-0028)構成)展示極其強烈之內化減少。此可歸因於與PD1及TIM3之二價結合，其中與PD1之高親和力結合將抗體保留在細胞表面上。

圖12A： 與嵌合PD1-0103 (=PD1-0165)及嵌合TIM3_0018 (=TIM3-

chi18)以及其組合相比，PD1-TIM3雙特異性抗體1+1 PD1TIM3_0168 (基於嵌合PD1-0103/TIM3-0018 (=AB 0168))之效能

圖12B： 與嵌合PD1-0103 (=PD1-0165)及嵌合TIM3_0028 (=TIM3-chi28)以及其組合相比，PD1-TIM3雙特異性抗體1+1 PD1TIM3_0389 (基於嵌合PD1-0103/TIM3-0028 (=Bispec AB 0389))之效能。

圖12C： 與嵌合PD1-0103 (=PD1-0165)及抗TIM3-Ky8213 (來自US20120189617 (參見抗體8213)，例如實例33)以及其組合相比，PD1-TIM3雙特異性抗體1+1 PD1-0103/Ky8213 (基於嵌合PD1-0103及來自US20120189617之抗TIM3 Ky8213 (參見抗體8213，例如實例33)，其類似於實例1中所述，作為1+1 CrossMab產生)之效能。

圖12D： 與PD1-TIM3雙特異性抗體2+2 PD1TIM3_0358 (基於嵌合PD1-0103/TIM3-0028 (= Bispec AB 0358 (2+2))及嵌合PD1-0103 (=PD1-0165)及嵌合TIM3_0028 (=TIM3-chi28)以及其組合相比，PD1-TIM3雙特異性抗體1+1 PD1TIM3_0389 (基於嵌合PD1-0103/TIM3-0028 (=Bispec AB 0389 (1+1)))之效能。

圖13： 與用單獨PD1或TIM3抗體處理相比及甚至與用親本抗體PD1_0376與抗體TIM3_0438之組合相比，用PD1-TIM3雙特異性抗體1+1 PD1TIM3_0476處理顯著增加CD4 T細胞釋放IFN- γ 之能力。CD4 T細胞與表現MHCII之腫瘤細胞株共培養。針對PD1抗體aPD1_0376、MDX-1106 (納武單抗 (nivolumab))及MK-3475 (派立珠單抗 (pembrolizumab))、針對TIM3抗體aTIM3_0438及Kyowa-8213 (如WO 2011/155697中揭示)及針對抗PD1抗體aPD1-0376與抗TIM3抗體aTIM3_0438之組合，測試PD1-Tim3雙特異性抗體1+1 PD1TIM3_0476。

圖14A及14B：在經MKN45細胞攻擊且提供有來自健康人類供體之PBMC的免疫遏制雌性小鼠(NOG)中比較PD1-TIM3雙特異性抗體1+1(0476)與單獨PD1或TIM3抗體之功效實驗的結果展示於圖14A及14B中。曲線圖表示在30天時間內腫瘤尺寸之量測平均值(處理組內)，包括腫瘤尺寸平均值之標準誤差。具有實心圓形之曲線對應於未經處理之腫瘤尺寸生長(媒劑)。圖14A中，展示在較低劑量處理(1.5 mg/kg抗體PD1_0376、1.5 mg/kg納武單抗、1.5 mg/kg抗體TIM3_0438或3 mg/kg雙特異性抗體1+1 PD1TIM3_0476)下之腫瘤生長；圖14B中，展示較高劑量(5 mg/kg抗體PD1_0376、5 mg/kg納武單抗、5 mg/kg抗體Tim3_0438或10 mg/kg雙特異性抗體1+1 PD1TIM3_0476)下腫瘤生長。

【實施方式】

定義

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

如本文所用，術語「**抗原結合分子**」在其最廣泛意義上係指特異性結合抗原決定子之分子。抗原結合分子之實例為抗體、抗體片段及骨架抗原結合蛋白。

本文中術語「**抗體**」以最廣泛意義上使用且涵蓋各種抗體結構，包括(但不限於)單株抗體、多株抗體、單特異性及多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及抗體片段，只要該等抗體片段展現所需抗原結合活性即可。

如本文所用，術語「**單株抗體**」係指自實質上均質抗體群體獲得之抗體，亦即構成群體之個別抗體相同及/或結合相同抗原決定基，除了例

如含有天然存在之突變或在產生單株抗體製劑期間產生的可能變異抗體，此類變異體一般以微量存在。相比於通常包括針對不同決定子(抗原決定基)之不同抗體的多株抗體製劑，單株抗體製劑之各單株抗體係針對抗原上之單一決定子。

如本文所使用之術語「單特異性」抗體表示具有一或多個結合位點之抗體，該一或多個結合位點中之每一者結合於相同抗原之相同抗原決定基。術語「雙特異性」意謂抗體能夠特異性結合於至少兩種不同抗原決定子，例如各由一對抗體重鏈可變域(VH)及抗體輕鏈可變域(VL)形成的兩個結合位點結合於不同抗原或相同抗原上不同抗原決定基。此類雙特異性抗體為1+1格式。其他雙特異性抗體格式為2+1格式(包含針對第一抗原或抗原決定基之兩個結合位點及針對第二抗原或抗原決定基之一個結合位點)或2+2格式(包含針對第一抗原或抗原決定基之兩個結合位點及針對第二抗原或抗原決定基之兩個結合位點)。通常，雙特異性抗體包含各對不同抗原決定子具有特異性之兩個抗原結合位點。

如本申請案中所使用之術語「價」表示抗原結合分子中指定數目之結合位點的存在。同樣，術語「二價」、「四價」及「六價」分別表示抗原結合分子中存在兩個結合位點、四個結合位點及六個結合位點。根據本發明之雙特異性抗體為至少「二價」且可為「三價」或「多價」(例如「四價」或「六價」)。在一個特定態樣中，本發明之抗體具有兩個或兩個以上結合位點且為雙特異性的。亦即，抗體甚至在存在超過兩個結合位點(亦即抗體為三價或多價)之情況下亦可為雙特異性的。詳言之，本發明係關於雙特異性二價抗體，其具有一個針對其特異性結合之各抗原的結合位點。

術語「全長抗體」、「完整抗體」及「完全抗體」在本文中可互換使用，其係指具有與天然抗體結構實質上類似之結構的抗體。「天然抗體」係指具有變化結構之天然存在之免疫球蛋白分子。舉例而言，天然IgG類抗體為約150,000道爾頓之雜四聚體醣蛋白，由經二硫鍵鍵結之兩個輕鏈及兩個重鏈構成。自N至C端，各重鏈具有可變區(VH)，亦稱為可變重鏈域或重鏈可變域，接著為三個恆定域(CH1、CH2及CH3)，亦稱為重鏈恆定區。類似地，自N端至C端，各輕鏈具有可變區(VL)，亦稱為可變輕鏈域或輕鏈可變域，接著為輕鏈恆定域(CL)，亦稱為輕鏈恆定區。抗體重鏈可分配為五個類型之一，稱為 α (IgA)、 δ (IgD)、 ϵ (IgE)、 γ (IgG)或 μ (IgM)，其中一些可進一步劃分成亞型，例如 γ_1 (IgG1)、 γ_2 (IgG2)、 γ_3 (IgG3)、 γ_4 (IgG4)、 α_1 (IgA1)及 α_2 (IgA2)。抗體輕鏈可基於其恆定域之胺基酸序列分配為兩個類型之一，稱為 κ (κ)及 λ (λ)。

「抗體片段」係指除完整抗體外的包含結合完整抗體所結合之抗原之完整抗體一部分的分子。抗體片段之實例包括(但不限於) Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體、交叉Fab片段；線性抗體；單鏈抗體分子(例如scFv)；由抗體片段形成之多特异性抗體及單域抗體。關於某些抗體片段之評述，參見Hudson等人, Nat Med 9, 129-134 (2003)。關於scFv片段之評述，參見例如Plückthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第113卷, Rosenberg及Moore編輯, Springer-Verlag, New York, 第269-315頁 (1994)；亦參見WO 93/16185；及美國專利第5,571,894號及第5,587,458號。關於包含救助受體結合抗原決定基殘基且具有增加之活體內半衰期的Fab及F(ab')₂片段之論述，參見美國專利第5,869,046號。雙功能抗體為具有兩個抗原結合位

點之抗體片段，其可為二價或雙特異性，參見例如EP 404,097；WO 1993/01161；Hudson等人，Nat Med 9, 129-134 (2003)；及Hollinger等人，Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993)。三功能抗體及四功能抗體亦描述於Hudson等人，Nat Med 9, 129-134 (2003)中。單域抗體為包含抗體之重鏈可變域全部或一部分或輕鏈可變域全部或一部分的抗體片段。在某些實施例中，單域抗體為人類單域抗體(Domantis, Inc., Waltham, MA；參見美國專利第6,248,516 B1號)。此外，抗體片段包含單鏈多肽，其具有VH域(亦即能夠與VL域一起組裝成功能性抗原結合位點)或VL域(亦即能夠與VH域一起組裝成功能性抗原結合位點)之特徵，且藉此提供全長抗體之抗原結合性質。抗體片段可藉由各種技術製備，包括(但不限於)完整抗體之蛋白水解消化，以及藉由重組宿主細胞(例如大腸桿菌或噬菌體)產生，如本文所述。

完整抗體之番木瓜蛋白酶消化產生兩個相同的抗原結合片段，稱為「Fab」片段，其各含有重鏈及輕鏈可變域以及輕鏈之恆定域及重鏈之第一恆定域(CH1)。因此，如本文所用，術語「**Fab**片段」係指包含含有VL域及輕鏈恆定域(CL)之輕鏈片段以及VH域及重鏈第一恆定域(CH1)的抗體片段。Fab'片段與Fab片段之不同之處在於，在包括一或多個來自抗體鉸鏈區之半胱胺酸之重鏈CH1域的羧基端處添加幾個殘基。Fab'-SH為其中恆定域之半胱胺酸殘基載有游離硫醇基之Fab'片段。胃蛋白酶處理產生具有兩個抗原組合位點(兩個Fab片段)及Fc區一部分之F(ab')₂片段。

術語「交叉**Fab**片段」或「xFab片段」或「交越Fab片段」係指其中重鏈及輕鏈之可變區或恆定區互換之Fab片段。交越Fab分子之兩種不同鏈組成為可能的且包含於本發明之雙特異性抗體中：一方面，Fab重鏈及

輕鏈之可變區互換，亦即交越Fab分子包含由輕鏈可變區(VL)及重鏈恆定區(CH1)構成之肽鏈，及由重鏈可變區(VH)及輕鏈恆定區(CL)構成之肽鏈。此交越Fab分子亦稱為CrossFab_(VLVH)。另一方面，當Fab重鏈及輕鏈之恆定區互換時，交越Fab分子包含由重鏈可變區(VH)及輕鏈恆定區(CL)組成之肽鏈，及由輕鏈可變區(VL)及重鏈恆定區(CH1)組成之肽鏈。此交越Fab分子亦稱為CrossFab_(CLCH1)。

「單鏈Fab片段」或「**scFab**」為由抗體重鏈可變域(VH)、抗體恆定域1 (CH1)、抗體輕鏈可變域(VL)、抗體輕鏈恆定域(CL)及連接子組成之多肽，其中該等抗體結構域及該連接子在N端至C端方向上具有以下次序之一：a) VH-CH1-連接子-VL-CL，b) VL-CL-連接子-VH-CH1，c) VH-CL-連接子-VL-CH1或d) VL-CH1-連接子-VH-CL；且其中該連接子為至少30個胺基酸，較佳32與50個胺基酸之間的多肽。該等單鏈Fab片段經由CL域與CH1域之間的天然雙硫鍵穩定化。另外，此等單鏈Fab分子可進一步藉由插入半胱胺酸殘基(例如根據Kabat編號可變重鏈中位置44及可變輕鏈中位置100)而產生鏈間二硫鍵來穩定化。

「交越單鏈Fab片段」或「**x-scFab**」為由抗體重鏈可變域(VH)、抗體恆定域1 (CH1)、抗體輕鏈可變域(VL)、抗體輕鏈恆定域(CL)及連接子組成之多肽，其中該等抗體結構域及該連接子在N端至C端方向上具有以下次序之一：a) VH-CL-連接子-VL-CH1及b) VL-CH1-連接子-VH-CL；其中VH及VL一起形成抗原結合位點，其特異性結合於抗原且其中該連接子為至少30個胺基酸之多肽。另外，此等x-scFab分子可進一步藉由插入半胱胺酸殘基(例如根據Kabat編號可變重鏈中位置44及可變輕鏈中位置100)而產生鏈間二硫鍵來穩定化。

「單鏈可變片段(scFv)」為經十至約25個胺基酸之短連接子肽連接的抗體重鏈(V_H)及輕鏈(V_L)之可變區之融合蛋白。連接子通常為求可撓性而富含甘胺酸，以及為求溶解性而富含絲胺酸或蘇胺酸，且可將V_H之N端與V_L之C端連接，或反之亦然。儘管移除恆定區及引入連接子，但此蛋白質保留原始抗體之特異性。scFv抗體例如描述於Houston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-96)中。此外，抗體片段包含單鏈多肽，其具有V_H域(亦即能夠與V_L域一起組裝成功能性抗原結合位點)或V_L域(亦即能夠與V_H域一起組裝成功能性抗原結合位點)之特徵，且藉此提供全長抗體之抗原結合性質。

「骨架抗原結合蛋白」為此項技術中已知，例如纖維結合蛋白及經設計之錨蛋白重複蛋白(DARPin)已用作抗原結合域之替代支架，參見例如 Gebauer 及 Skerra, *Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. Curr Opin Chem Biol* 13:245-255 (2009) 及 Stumpp 等人, *Darpins: A new generation of protein therapeutics. Drug Discovery Today* 13: 695-701 (2008)。在本發明之一個態樣中，骨架抗原結合蛋白係選自由以下組成之群：CTLA-4 (艾維伯迪(Evibody))；脂質運載蛋白(抗運載蛋白)；蛋白質A衍生之分子，諸如蛋白A之Z結構域(親和抗體)；A結構域(高親和性多聚體/最大抗體)；血清運鐵蛋白(反式體)；經設計之錨蛋白重複蛋白(DARPin)；抗體輕鏈或重鏈之可變域(單域抗體，sdAb)；抗體重鏈之可變域(奈米抗體，aVH)；V_{NAR}片段；纖維結合蛋白(阿耐克汀(AdNectin))；C型凝集素結構域(四連接素)；新型抗原受體β-內醯胺酶之可變域(V_{NAR}片段)；人類γ-晶狀體球蛋白或泛素(阿菲林(Affilin)分子)；人類蛋白酶抑制劑之庫尼茲型結構域(kunitz type

domain)；微體，諸如來自打結素(knottin)家族之蛋白質、肽適體及纖維結合蛋白(阿耐克汀)。

CTLA-4 (細胞毒性T淋巴細胞相關抗原4)為表現於大部分CD4+ T細胞上之CD28家族受體。其細胞外域具有可變域類Ig摺疊。對應於抗體之CDR之環可經異源序列取代以賦予不同結合特性。經工程改造以具有不同結合特異性之CTLA-4分子亦稱為艾維伯迪(例如US7166697B1)。艾維伯迪大約與抗體之經分離之可變區(例如域抗體)尺寸相同。關於其他細節，參見Journal of Immunological Methods 248 (1-2), 31-45 (2001)。脂質運載蛋白為細胞外蛋白質之家族，其傳遞小型疏水性分子，諸如類固醇、後色膽素、類視黃素及脂質。其具有剛性 β -片狀二級結構，在圓錐結構之開放端具有許多環，其可經工程改造以結合於不同標靶抗原。抗運載蛋白之尺寸在160-180個胺基酸之間，且來源於脂質運載蛋白。關於其他細節參見 Biochim Biophys Acta 1482: 337-350 (2000)、US7250297B1 及 US20070224633。親和抗體為衍生自金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)之蛋白A的骨架，其可經工程改造以結合於抗原。結構域由具有約58個胺基酸之三螺旋束組成。已藉由表面殘基之隨機化產生文庫。關於其他細節參見Protein Eng. Des. Sel. 2004, 17, 455-462及EP 1641818A1。高親和性多聚體為衍生自A結構域骨架家族之多域蛋白質。約35個胺基酸之原生結構域採用既定二硫鍵鍵結之結構。藉由改組A-結構域之家族所呈現之天然變化來產生多樣性。關於其他細節，參見Nature Biotechnology 23(12), 1556 - 1561 (2005)及Expert Opinion on Investigational Drugs 16(6), 909-917 (2007年6月)。運鐵蛋白為單體血清傳遞糖蛋白。運鐵蛋白可藉由在允許之表面環中插入肽序列而進行工程改造以結合不同目標抗

原。經工程改造之傳遞蛋白支架之實例包括反式體。關於其他細節，參見 *J. Biol. Chem* 274, 24066-24073 (1999)。經設計之錨蛋白重複蛋白 (DARPs) 來源於錨蛋白，其為介導整合膜蛋白質與細胞骨架之連接的蛋白質家族。單一錨蛋白重複序列為由兩個 α 螺旋及 β 轉角(beta-turn)組成之33殘基基元。其可藉由隨機化各重複序列之第一個 α 螺旋及 β 轉角中之殘基而進行工程改造以結合不同標靶抗原。可藉由增加模組數目來增加其結合界面(親和力成熟方法)。關於其他細節，參見 *J. Mol. Biol.* 332, 489-503 (2003)；*PNAS* 100(4), 1700-1705 (2003)；及 *J. Mol. Biol.* 369, 1015-1028 (2007)；及US20040132028A1。

單域抗體為由單一單體可變抗體結構域組成之抗體片段。第一單個結構域來源於來自駱駝之抗體重鏈之可變域(奈米抗體或 V_HH 片段)。此外，術語單域抗體包括自主人類重鏈可變域(aVH)或來源於鯊魚之 V_{NAR} 片段。纖維結合蛋白為可經工程改造以結合於抗原之骨架。纖維蛋白由III型人類纖維結合蛋白(FN3)之15個重複單元之第10個結構域的天然胺基酸序列之主鏈組成。在 β -夾心一端之三個環可經工程改造以使纖維蛋白能夠特異性識別相關治療標靶。關於其他細節，參見 *Protein Eng. Des. Sel.* 18, 435-444 (2005)；US20080139791、WO2005056764 及 US6818418B1。肽適體為由恆定骨架蛋白質、通常硫氧還蛋白(TrxA)組成之組合識別分子，其含有插入在活性位點之限制可變肽環。關於其他細節，參見 *Expert Opin. Biol. Ther.* 5, 783-797 (2005)。微體來源於天然存在之長度為25-50個胺基酸之微型蛋白質，其含有3-4個半胱胺酸橋，微型蛋白質之實例包括KalataBI及芋螺毒素(conotoxin)及打結素。微型蛋白具有可經工程改造以包括高達25個胺基酸而不影響微型蛋白之整體摺疊的

環。關於經工程改造之打結素結構域之其他細節，參見WO2008098796。

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

如本文所用，術語「**抗原結合位點**」係指抗原結合分子特異性結合於抗原決定子之部分。更詳言之，術語「**抗原結合位點**」係指包含與抗原部分或全部特異性結合及互補之區域的抗體部分。當抗原較大時，抗原結合分子可僅結合於抗原之特定一部分，該部分稱為抗原決定基。抗原結合位點可由例如一或多個可變域(亦稱可變區)提供。較佳地，抗原結合位點包含抗體輕鏈可變區(VL)及抗體重鏈可變區(VH)。在一個態樣中，抗原結合位點能夠結合於其抗原且阻斷或部分阻斷其功能。特異性結合於PD1或TIM-3之抗原結合位點包括如本文進一步定義之抗體及其片段。另外，抗原結合位點可包括骨架抗原結合蛋白，例如基於經設計之重複蛋白或經設計之重複結構域的結合域(參見例如WO 2002/020565)。

如本文所用，術語「**抗原決定子**」與「**抗原**」及「**抗原決定基**」同義，且係指抗原結合部分所結合之多肽大分子上的位點(例如胺基酸之相鄰延伸或由非鄰接胺基酸之不同區域組成之構形組態)，形成抗原結合部分-抗原複合物。適用的抗原決定子可發現於例如腫瘤細胞表面上、病毒感染細胞之表面上、其他病變細胞表面上、免疫細胞表面上、游離於血清中及/或細胞外基質(ECM)中。除非另外指明，否則適用作本文中抗原之蛋白質可為來自任何脊椎動物來源之任何天然形式，包括哺乳動物，諸如靈長類動物(例如人類)及啮齒動物(例如小鼠及大鼠)。在一個特定實施例

中，抗原為人類蛋白質。在本文中提及特定蛋白質的情況下，該術語涵蓋「全長」的未經處理之蛋白質，以及由細胞中之處理所產生的任何形式之蛋白質。該術語亦涵蓋蛋白質之天然存在之變異體，例如剪接變異體或等位基因變異體。

「特異性結合」意謂結合對抗原具有選擇性且可與非所需或非特異性相互作用區分。抗原結合分子結合於特異性抗原之能力可經由酶聯免疫吸附分析(ELISA)或熟習此項技術者熟悉之其他技術量測，例如表面電漿子共振(SPR)技術(在BIAcore儀器上分析) (Liljeblad等人, Glyco J 17, 323-329 (2000))及傳統結合分析(Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002))。在一個實施例中，如例如藉由SPR所量測，抗原結合分子結合於不相關蛋白質之程度比抗原結合分子與抗原之結合低約10%。在某些實施例中，結合於抗原之分子具有 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ 或 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (例如 10^{-7} M 或更低，例如 10^{-7} M 至 10^{-13} M ，例如 10^{-9} M 至 10^{-13} M)之解離常數(Kd)。

「親和力」或「結合親和力」係指分子(例如抗體)之單個結合位點與其結合搭配物(例如抗原)之間的非共價相互作用之總和的強度。如本文所用，除非另外指示，否則「結合親和力」係指反映結合對(例如抗體及抗原)之成員之間1:1相互作用的內源性結合親和力。分子X對其搭配物Y之親和力通常可由解離常數(Kd)表示，解離常數為解離速率常數與結合速率常數(分別為 k_{off} 及 k_{on})之比率。因此，同等親和力可包含不同速率常數，只要速率常數之比率保持相同即可。可藉由此項技術中已知之常用方法(包括本文所描述之彼等方法)來量測親和力。一種用於量測親和力之具體方法為表面電漿子共振(SPR)。

如本文所用，術語抗體之「高親和力」係指對標靶抗原之Kd為 10^{-9} M或更低且甚至更尤其 10^{-10} M或更低的抗體。術語抗體之「低親和力」係指具有 10^{-8} 或更高之Kd的抗體。

「親和力成熟」抗體係指相較於在一或多個高變區(HVR)中不具有一或多個變化之親本抗體，具有此類變化之抗體，此等變化使抗體對抗原之親和力得到改良。

術語「包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM-3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體」、「特異性結合PD1及TIM-3之雙特異性抗體」、「對PD1及TIM-3具有特異性之雙特異性抗原結合分子」在本文中可互換使用，且係指能夠以足夠親和力結合PD1及TIM-3，使得抗體適用作靶向PD1及TIM-3之診斷及/或治療劑的雙特異性抗體。

術語「PD1」亦稱為漸進式細胞死亡蛋白1，為具有288個胺基酸之I型膜蛋白，其首次係描述於1992年(Ishida等人, EMBO J., 11 (1992), 3887-3895)。PD-1為T細胞調節劑之擴展CD28/CTLA-4家族成員且具有兩種配位體，PD-L1 (B7-H1、CD274)與PD-L2 (B7-DC, CD273)。蛋白質之結構包括細胞外IgV域，接著為跨膜區及細胞內尾區。細胞內尾區含有兩個位於基於免疫受體酪胺酸之抑制基元及基於免疫受體酪胺酸之轉換基元中的磷酸化位點，此表明PD-1負面調節TCR信號。此與在配位體結合時SHP-1及SHP-2結合於PD-1之細胞質尾區相符。雖然PD-1在未處理T細胞上不表現，但其在T細胞受體(TCR)介導之活化後上調，且在活化與耗盡T細胞上觀測到(Agata等人, Int. Immunology 8 (1996), 765-772)。此等耗盡T細胞具有功能異常之表現型且不能夠適當反應。雖然PD-1具有相對較寬之表現模式，但其最重要之作用可能為作為T細胞上之共抑制受體

(Chinai等人, Trends in Pharmacological Sciences 36 (2015), 587-595)。
因此當前治療方法集中於阻斷PD-1與其配位體之相互作用以增強T細胞反應。術語「程序性死亡1」、「漸進式細胞死亡1」、「蛋白質PD-1」、「PD-1」、「PD1」、「PDCD1」、「hPD-1」及「hPD-I」可互換使用，且包括人類PD-1之變異體、同功異型物、物種同源物，以及具有至少一個與PD-1共同之抗原決定基的類似物。人類PD1之胺基酸序列展示於UniProt (www.uniprot.org)寄存編號Q15116 (SEQ ID NO:89)。

術語「抗PD1抗體」及「包含結合於PD1之抗原結合位點的抗體」係指能夠以足夠親和力結合PD1、尤其在細胞表面上表現之PD1多肽，使得抗體適用作靶向PD1之診斷及/或治療劑的抗體。在一個實施例中，如例如藉由放射免疫分析法(RIA)或流動式細胞量測術(FACS)或藉由表面電漿子共振分析，使用生物感測器系統(諸如Biacore®系統)所量測，抗PD1抗體與不相關之非PD1蛋白的結合程度比抗體與PD1之結合低約10%。在某些實施例中，結合於人類PD1之抗原結合蛋白結合於人類PD1之結合親和力的KD值 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ 或 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (例如 10^{-8} M 或更低，例如 10^{-8} M 至 10^{-13} M ，例如 10^{-9} M 至 10^{-13} M)。在一個較佳實施例中，在表面電漿子共振分析中使用人類PD1之細胞外域(ECD)(PD1-ECD)，針對PD1結合親和力測定結合親和力之相應KD值。術語「抗PD1抗體」亦涵蓋能夠結合PD1及第二抗原之雙特異性抗體。

術語「TIM3」(「T細胞免疫球蛋白及含黏蛋白結構域之分子3」之縮寫)亦稱為TIM-3、HAVCR2、KIM-3、TIMD3及FLJ14428，係指調節巨噬細胞活化及發炎性病狀嚴重程度之T輔助細胞1型特異性細胞表面蛋

白。TIM3亦與癌症，尤其癌症幹細胞相關。已知許多物種之TIM3之核苷酸及蛋白質序列。舉例而言，人類胺基酸序列可見於Uniprot寄存編號Q8TDQ0 (SEQ ID NO:93)。人類蛋白質之特徵在於包含Ig樣結構域及黏蛋白結構域(進一步包含O連接及N連接之糖基化位點)之大致包含胺基酸22-202之細胞外域、跨膜結構域(胺基酸203-223)及細胞內(細胞質)域(胺基酸224-301)。對於展示為SEQ ID NO: 93之人類TIM3蛋白質，細胞外域大致包含胺基酸22-202，跨膜結構域大致包含胺基酸203-223，且細胞質域大致包含胺基酸224-301。術語「TIM3」包括人類TIM3之變異體、同功異型物、物種同源物，及具有至少一個與TIM3共同之抗原決定基的類似物。

術語「**抗TIM3抗體**」及「包含結合於TIM3之抗原結合位點的抗體」係指能夠以足夠親和力結合TIM3、尤其在細胞表面上表現之TIM3多肽，使得抗體適用作靶向TIM3之診斷及/或治療劑的抗體。在一個實施例中，如例如藉由放射免疫分析法(RIA)或流動式細胞量測術(FACS)或藉由表面電漿子共振分析，使用生物感測器系統(諸如Biacore®系統)所量測，抗TIM3抗體與不相關之非TIM3蛋白質的結合程度比抗體與TIM3之結合低約10%。在某些實施例中，結合於人類TIM3之抗原結合蛋白結合於人類TIM3之結合親和力的KD值 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ 或 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (例如 10^{-8} M 或更低，例如 10^{-7} M 至 10^{-13} M ，例如 10^{-9} M 至 10^{-13} M)。在一個較佳實施例中，在表面電漿子共振分析中使用人類TIM3之細胞外域(ECD) (TIM3-ECD)，針對TIM3結合親和力確定結合親和力之各別KD值。術語「抗TIM3抗體」亦涵蓋能夠結合TIM3及第二抗原之雙特異性抗體。

「阻斷」抗體或「拮抗」抗體為抑制或降低所結合之抗原之生物活性的抗體。在一些實施例中，阻斷抗體或拮抗抗體實質上或完全抑制抗原之生物活性。舉例而言，本發明之雙特異性抗體阻斷經由PD-1及TIM-3之信號傳導，以便使T細胞之功能性反應(例如增殖、細胞因子產生、標靶細胞殺死)自功能異常狀態恢復至抗原刺激。

術語「可變區」或「可變域」係指抗體重鏈或輕鏈中涉及抗原結合分子與抗原之結合的結構域。天然抗體之重鏈及輕鏈(分別為VH及VL)可變域一般具有類似的結構，其中各結構域均包含四個保守構架區(FR)及三個高變區(HVR)。參見例如Kindt等人, *Kuby Immunology*, 第6版, W.H. Freeman and Co., 第91頁 (2007)。單一VH或VL域可足以賦予抗原結合特異性。

如本文所用，術語「高變區」或「HVR」係指在序列上高變且形成結構上界定之環(「高變環」)的抗體可變域各區域。一般而言，天然四鏈抗體包含六個HVR；三個位於VH中(H1、H2、H3)，且三個位於VL中(L1、L2、L3)。HVR一般包含來自高變環及/或來自「互補決定區」(CDR)的胺基酸殘基，後者具有最高的序列可變性及/或與抗原識別相關。例示性高變環出現在胺基酸殘基26-32 (L1)、50-52 (L2)、91-96 (L3)、26-32 (H1)、53-55 (H2)及96-101 (H3)處。(Chothia及Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。示例性CDR (CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3)存在於L1之胺基酸殘基24-34、L2之胺基酸殘基50-56、L3之胺基酸殘基89-97、H1之胺基酸殘基31-35B、H2之胺基酸殘基50-65及H3之胺基酸殘基95-102 (Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版 Public Health

Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。高變區 (HVR)亦稱為「互補決定區」(CDR)，且此等術語在本文中在提及形成抗原結合區之可變區之一部分時可互換使用。此特定區域已由Kabat等人, U.S. Dept. of Health and Human Services, 「Sequences of Proteins of Immunological Interest」 (1983)及Chothia等人, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)描述，其中定義包括當彼此比較時重疊胺基酸殘基或胺基酸殘基子集。然而，涉及抗體或其變異體之CDR之任何定義的應用意欲處於如本文中所定義及所用之術語的範疇內。涵蓋如上文所引用之參考文獻中每一者所定義之CDR的適當胺基酸殘基闡述於下表A中，作為比較。包含特定CDR之確切殘基數目將視CDR之序列及大小而變。在抗體之可變區胺基酸序列指定的情況下，熟習此項技術者可以常規方式確定哪個殘基包含特定CDR。

表A. CDR定義¹

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

¹ 表A中所有CDR定義之編號係根據Kabat等人闡述之編號約定(參見下文)。

² 如表A中所使用的具有小寫「b」之「AbM」係指如由Oxford Molecular之「AbM」抗體模擬軟件定義之CDR。

Kabat等人亦定義可適用於任何抗體之可變區序列之編號系統。一般技術者可將此「Kabat編號」系統明確地分配給任何可變區序列，而不依

賴於超過序列本身之任何實驗資料。如本文所用，「Kabat編號」係指Kabat等人，U.S. Dept. of Health and Human Services，「Sequence of Proteins of Immunological Interest」(1983)所闡述之編號系統。除非另外說明，否則提及抗體可變區中之特定胺基酸殘基位置的編號係根據Kabat編號系統。

除VH中之CDR1之外，CDR一般包含形成高變環之胺基酸殘基。CDR亦包含「特異性決定殘基」或「SDR」，其為接觸抗原之殘基。SDR含於簡稱為-CDR或a-CDR之CDR區域內。示例性a-CDR (a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2及a-CDR-H3)存在於L1之胺基酸殘基31-34、L2之胺基酸殘基50-55、L3之胺基酸殘基89-96、H1之胺基酸殘基31-35B、H2之胺基酸殘基50-58及H3之胺基酸殘基95-102。(參見Almagro及Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008))。除非另外指示，否則HVR殘基及可變域中之其他殘基(例如FR殘基)在本文中係根據Kabat等人編號。

「**構架**」或「**FR**」係指除高變區(HVR)殘基外之可變域殘基。可變域之FR一般由四個FR域組成：FR1、FR2、FR3及FR4。因此，HVR及FR序列一般以下列順序出現在VH (或VL)中：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

出於本文之目的，「**接受體人類構架**」為包含來源於如以下所定義的人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之輕鏈可變域(VL)構架或重鏈可變域(VH)構架之胺基酸序列的構架。「來源於」人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之接受體人類構架可包含人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之相同胺基酸序列，或其可含有胺基酸序列變化。在一些實施例中，胺基酸

變化之數目為10個或更少、9個或更少、8個或更少、7個或更少、6個或更少、5個或更少、4個或更少、3個或更少或2個或更少。在一些實施例中，VL接受體人類構架之序列與VL人類免疫球蛋白構架序列或人類共同構架序列一致。

術語「嵌合」抗體係指重鏈及/或輕鏈之一部分來源於特定來源或物種，而重鏈及/或輕鏈之其餘部分來源於不同來源或物種之抗體。

抗體之「類別」係指重鏈所具有之恆定域或恆定區的類型。存在五大類抗體：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且其中有幾類可進一步劃分為亞類(同型)，例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及IgA₂。對應於不同類別免疫球蛋白之重鏈恆定域分別稱作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。

「人類化」抗體係指包含來自非人類HVR之胺基酸殘基及來自人類FR之胺基酸殘基的嵌合抗體。在某些實施例中，人類化抗體將包含至少一個且通常兩個可變域實質上全部，其中全部或實質上全部的HVR (例如CDR)對應於非人類抗體之HVR且全部或實質上全部的FR對應於人類抗體之FR區。人類化抗體視情況可包含來源於人類抗體之抗體恆定區的至少一部分。抗體(例如非人類抗體)之「人類化形式」係指已經歷人類化之抗體。本發明涵蓋之「人類化抗體」之其他形式為其中恆定區已另外修飾或自原始抗體發生變化以產生尤其在C1q結合及/或Fc受體(FcR)結合方面的根據本發明之特性的形式。

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

如本文所用，術語「單株抗體」係指自實質上均質抗體群體獲得之抗體，亦即構成群體之個別抗體相同及/或結合相同抗原決定基，除了例如含有天然存在之突變或在產生單株抗體製劑期間產生的可能變異抗體，此類變異體一般以微量存在。相比於通常包括針對不同決定子(抗原決定基)之不同抗體的多株抗體製劑，單株抗體製劑之各單株抗體係針對抗原上之單一決定子。因此，修飾語「單株」指示抗體之特性為獲自實質上均質之抗體群體，且不應理解為需要藉由任何特定方法產生該抗體。舉例而言，根據本發明使用之單株抗體可藉由多種技術製得，包括(但不限於)融合瘤方法、重組DNA方法、噬菌體呈現方法及利用含有所有或部分人類免疫球蛋白基因座之轉殖基因動物的方法，此類方法及其他製備單株抗體之示例性方法在本文中予以描述。

本文中術語「Fc域」或「Fc區」用於定義含有恆定區至少一部分之抗體重鏈之C端區。該術語包括原生序列Fc區及變異Fc區。詳言之，人類IgG重鏈Fc區自Cys226或自Pro230延伸至重鏈羧基端。然而，Fc區之C端離胺酸(Lys447)可存在或可不存在。重鏈之胺基酸序列一直呈現C端離胺酸，然而本發明中包括不具有C端離胺酸之變異體。

IgG Fc區包含IgG CH₂及IgG CH₃域。人類IgG Fc區之「CH₂域」通常自約位置231之胺基酸殘基延伸至約位置340之胺基酸殘基。在一個實施例中，碳水化合物鏈連接至CH₂域。本文中，CH₂域可為原生序列CH₂域或變異CH₂域。「CH₃域」包含Fc區中C端至CH₂域之殘基延伸(亦即IgG之約位置341之胺基酸殘基至約位置447之胺基酸殘基)。本文中之CH₃區可為原生序列CH₃域或變異CH₃域(例如在一條鏈中引入「突起」(「杵」)且在另一鏈中對應引入「空腔」(「臼」)之CH₃域；參見美國專

利第5,821,333號，以引用的方式明確併入本文中)。此類變異CH3域可用於促進如本文中所描述之兩個非一致抗體重鏈之雜二聚化。除非本文另外說明，否則Fc區或恆定區中胺基酸殘基之編號係依據EU編號系統，亦稱為EU索引，如Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991中所述。

「杵白」技術描述於例如US 5,731,168；US 7,695,936；Ridgway等人，*Prot Eng* 9, 617-621 (1996)；及Carter, *J Immunol Meth* 248, 7-15 (2001)。一般而言，該方法涉及在第一多肽之界面處引入突起(「杵」)及在第二多肽之界面處引入相應空腔(「白」)，使得突起可位於空腔中以便促進雜二聚體形成且阻礙均二聚體形成。突起藉由將來自第一多肽界面之小胺基酸側鏈用更大側鏈(例如酪胺酸或色胺酸)替換來構築。大小與突起相同或類似的補償性空腔藉由用較小胺基酸側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)置換大胺基酸側鏈而在第二多肽之界面中產生。可藉由例如藉由位點特異性突變誘發或藉由肽合成，改變編碼多肽之核酸來製造突起及空腔。在一個特定實施例中，杵修飾在Fc域之兩個次單元中之一者中包含胺基酸取代T366W，且白修飾在Fc域之兩個次單元中之另一者中包含胺基酸取代T366S、L368A及Y407V。在另一特定實施例中，包含杵修飾之Fc域之次單元額外包含胺基酸取代S354C，且包含白修飾之Fc域之次單元額外包含胺基酸取代Y349C。引入此兩個半胱胺酸殘基使得Fc區之兩個次單元之間形成二硫橋鍵，由此進一步穩定二聚體(Carter, *J Immunol Methods* 248, 7-15 (2001))。

「與免疫球蛋白之Fc區同等之區域」意欲包括免疫球蛋白之Fc區的

天然存在之等位基因變異體以及具有變化之變異體，該等變化產生取代、添加或缺失，但不實質上降低免疫球蛋白介導效應功能(諸如抗體依賴性細胞毒性)之能力。舉例而言，免疫球蛋白之Fc區之N端或C端可缺失一或多個胺基酸而不實質性損失生物功能。此類變異體可根據此項技術中已知之通則進行選擇以便對活性之作用最低(參見例如Bowie, J. U.等人, *Science* 247:1306-10 (1990))。

術語「**效應功能**」係指可歸因於抗體之Fc區之彼等生物活性，其因抗體同型而異。抗體效應功能之實例包括：C1q結合及補體依賴性細胞毒性(CDC)、Fc受體結合、抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)、抗體依賴性細胞吞噬作用(ADCP)、細胞因子分泌、免疫複合物介導之抗原呈遞細胞之抗原吸收、下調細胞表面受體(例如B細胞受體)及B細胞活化。

「**活化Fc受體**」為一種Fc受體，其與抗體之Fc區接合之後，引發信號傳導事件，刺激攜帶受體之細胞執行效應功能。活化Fc受體包括FcγRIIIa (CD16a)、FcγRI (CD64)、FcγRIIa (CD32)及FcαRI (CD89)。一特定活化Fc受體為人類FcγRIIIa (參見UniProt寄存編號P08637, 第141版)。

術語「**肽連接子**」係指包含一或多個胺基酸、通常約2至20個胺基酸之肽。肽連接子為此項技術中已知或本文中予以描述。適合非免疫原性連接子肽為例如(G₄S)_n、(SG₄)_n或G₄(SG₄)_n肽連接子，其中「n」一般為1與10之間、通常2與4之間的數，尤其為2。

「**融合**」或「**連接**」意謂組件(例如抗原結合位點及Fc域)由肽鍵直接或經由一或多個肽連接子連接。

如本申請案內所用，術語「**胺基酸**」表示天然存在之羧基α-胺基酸

群，其包含丙胺酸(三字母代碼：ala，單字母代碼：A)、精胺酸(arg，R)、天冬醯胺(asn，N)、天冬胺酸(asp，D)、半胱胺酸(cys，C)、麩醯胺酸(gln，Q)、麩胺酸(glu，E)、甘胺酸(gly，G)、組胺酸(his，H)、異白胺酸(ile，I)、白胺酸(leu，L)、離胺酸(lys，K)、甲硫胺酸(met，M)、苯丙胺酸(phe，F)、脯胺酸(pro，P)、絲胺酸(ser，S)、蘇胺酸(thr，T)、色胺酸(trp，W)、酪胺酸(tyr，Y)及纈胺酸(val，V)。

「相對於參考多肽(蛋白質)序列之「胺基酸序列一致性百分比(%)」定義為在比對候選序列與參考多肽序列且必要時引入間隙以達成最大序列一致性百分比之後，且在不將保守性取代視為序列一致性之一部分之情況下，候選序列中與參考多肽序列中之胺基酸殘基一致的胺基酸殘基之百分比。為確定胺基酸序列一致性百分比而進行之比對可以在此項技術技能內之各種方式實現，例如使用公開可使用之電腦軟體，諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN、SAWI或Megalign (DNASTAR)軟體。熟習此項技術者可確定用於比對序列之適當參數，包括在所比較序列之全長內達成最大比對所需的任何算法。但是，出於本文之目的，使用序列比較電腦程式ALIGN-2產生胺基酸序列一致性%值。ALIGN-2序列比較電腦程式藉由Genentech, Inc. 創造，且原始程式碼已與使用者文檔一起提交U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559，其中其登記之美國版權登記號為TXU510087。ALIGN-2程式可公開獲自Genentech, Inc., South San Francisco, California，或可自原始程式碼編寫。ALIGN-2程式經編寫可用於UNIX操作系統，包括數位UNIX V4.0D。所有序列比較參數均由ALIGN-2程式設定且不變化。在採用ALIGN-2進行胺基酸序列比較之情形下，給定胺基酸序列A與給定胺基酸序列B之胺基酸序列一致性% (或

者，其可表述為與、同或相對於給定胺基酸序列B具有或包含一定胺基酸序列一致性%的給定胺基酸序列A)如下計算：

$$100 \times \text{分數} X/Y$$

其中X為在序列比對程式ALIGN-2之A與B比對中藉由該程式評為一致匹配之胺基酸殘基數目，且其中Y為B中胺基酸殘基總數。應瞭解在胺基酸序列A之長度不等於胺基酸序列B之長度下，A與B之胺基酸序列一致性%將不等於B與A之胺基酸序列一致性%。除非另外確切地說明，否則本文所用之所有胺基酸序列一致性%值均如前一段中所述使用ALIGN-2電腦程式獲得。

在某些態樣中，涵蓋本文提供的本發明之雙特異性抗體之胺基酸序列變異體。舉例而言，可期望提高雙特異性抗體之結合親和力及/或其他生物特性。雙特異性抗體之胺基酸序列變異體可藉由將適當修飾引入編碼分子之核苷酸序列中或藉由肽合成來製備。此類修飾包括例如抗體之胺基酸序列內之殘基的缺失及/或插入及/或取代。可進行缺失、插入及取代之任何組合以達成最終構築體，其限制條件為最終構築體具有所需特徵，例如抗原結合。用於取代性突變誘發之相關位點包括HVR及構架(FR)。保守性取代以標題「較佳取代」提供於表B中且在下文中提及胺基酸側鏈分類(1)至(6)時進一步描述。胺基酸取代可引入相關分子中且針對所需活性，例如保留/提高之抗原結合、降低之免疫原性或提高之ADCC或CDC篩選產物。

表B

原始殘基	示例性取代	較佳取代
Ala (A)	Val ; Leu ; Ile	Val
Arg (R)	Lys ; Gln ; Asn	Lys
Asn (N)	Gln ; His ; Asp、Lys ; Arg	Gln

Asp (D)	Glu ; Asn	Glu
Cys (C)	Ser ; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn ; Glu	Asn
Glu (E)	Asp ; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn ; Gln ; Lys ; Arg	Arg
Ile (I)	Leu ; Val ; Met ; Ala ; Phe ; 正白胺酸	Leu
Leu (L)	正白胺酸 ; Ile ; Val ; Met ; Ala ; Phe	Ile
Lys (K)	Arg ; Gln ; Asn	Arg
Met (M)	Leu ; Phe ; Ile	Leu
Phe (F)	Trp ; Leu ; Val ; Ile ; Ala ; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val ; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr ; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp ; Phe ; Thr ; Ser	Phe
Val (V)	Ile ; Leu ; Met ; Phe ; Ala ; 正白胺酸	Leu

胺基酸可根據共有側鏈特性進行分組：

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

非保守取代將需要將此等類別中之一者之成員換成另一個類別。

術語「**胺基酸序列變異體**」包括在親本抗原結合分子(例如人類化或人類抗體)之一或多個高變區殘基中存在胺基酸取代的實質變異體。一般而言，選擇用於進一步研究之所得變異體的某些生物特性相對於親本抗原

結合分子將改善(例如親和力增加、免疫原性降低)，及/或將具有親本抗原結合分子之實質上保留之某些生物特性。一種示例性取代型變異體為親和力成熟抗體，其可例如使用基於噬菌體呈現之親和力成熟技術(諸如本文所描述之技術)便利地產生。簡言之，一或多個HVR殘基突變且變異抗原結合分子呈現在噬菌體上且針對特定生物活性(例如結合親和力)進行篩選。在某些實施例中，一或多個HVR內可存在取代、插入或缺失，只要此類變化不實質上降低抗原結合分子結合抗原之能力即可。舉例而言，可在HVR中進行不實質上降低結合親和力之保守改變(例如如本文所提供之保守取代)。一種適用於鑑別可靶向之抗體之殘基或區域進行突變誘發的方法稱為「丙胺酸掃描突變誘發」，如Cunningham及Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085所描述。在此方法中，鑑別標靶殘基之殘基或基團(例如帶電殘基，諸如Arg、Asp、His、Lys及Glu)且經中性或帶負電胺基酸(例如丙胺酸或聚丙胺酸)置換以確定抗體與抗原之相互作用是否受到影響。可在對初始取代顯示功能敏感性之胺基酸位置處引入其他取代。或者或另外，抗原-抗原結合分子複合物之晶體結構以鑑別抗體與抗原之間的接觸點。此類接觸殘基及鄰近殘基可作為取代候選物之標靶或排除在取代候選物之外。可篩選變異體以確定其是否含有所需特性。

胺基酸序列插入包括在一個殘基至含有一百個或更多個殘基之多肽長度範圍內的胺基及/或羧基端融合物，以及具有單個或多個胺基酸殘基之序列內插入。末端插入之實例包括具有N端甲硫胺醯基殘基之雙特異性抗體。分子之其他插入型變異體包括與多肽之N端或C端稠合，此增加雙特異性抗體之血清半衰期。

在某些態樣中，本文提供之雙特異性抗體經改變以增加或降低抗體

糖基化之程度。分子之糖基化變異體亦藉由改變胺基酸序列，從而產生或移除一或多個糖基化位點來獲得，例如可改變與Fc區附接之碳水化合物。由哺乳動物細胞產生之原生抗體通常包含分支鏈雙觸角寡糖，其一般藉由N鍵附接至Fc區之CH₂域的Asn297。參見例如Wright等人 *TIBTECH* 15:26-32 (1997)。寡糖可包括各種碳水化合物，例如甘露糖、N-乙酰基葡糖胺(GlcNAc)、半乳糖及唾液酸，以及附接至雙觸角寡糖結構之「主幹」中之GlcNAc的海藻糖。在一些實施例中，可對本發明之雙特異性抗體中之寡糖進行修飾以產生具有某些改善之特性的變異體。在一個態樣中，提供具有缺乏附接(直接或間接)於Fc區之海藻糖之碳水化合物結構的雙特異性抗體之變異體。此類海藻糖基化變異體可具有改善之ADCC功能，參見例如美國專利公開案第US 2003/0157108號(Presta, L.)或US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。本發明之雙特異性抗體之其他變異體包括具有平分寡糖之雙特異性抗體之變異體，例如其中藉由GlcNAc平分附接至Fc區之雙觸角寡糖。此類變異體可具有減少之海藻糖基化及/或改善之ADCC功能，參見例如WO 2003/011878 (Jean-Mairet等人)；美國專利第6,602,684號(Umana等人)；及US 2005/0123546 (Umana等人)。亦提供寡糖中之至少一個半乳糖殘基與Fc區附接之變異體。此類抗體變異體可具有改善之CDC功能且描述於例如WO 1997/30087 (Patel等人)；WO 1998/58964 (Raju, S.)；及WO 1999/22764 (Raju, S.)。

在某些態樣中，可能需要產生本發明之雙特異性抗體的經半胱胺酸工程改造之變異體，例如「thioMAb」，其中分子之一或多個殘基經半胱胺酸殘基取代。在特定實施例中，經取代之殘基存在於分子之可及位點處。藉由用半胱胺酸取代彼等殘基，藉此將反應性硫醇基安置於抗體之可

及位點且可用於使抗體與其他部分(諸如藥物部分或連接子-藥物部分)結合以產生免疫結合物。在某些實施例中，以下殘基中之任一或多者可經半胱胺酸取代：輕鏈之V205 (Kabat編號)；重鏈之A118 (Eu編號)；及重鏈Fc區之S400 (Eu編號)。可如例如美國專利第7,521,541號中所描述，產生經半胱胺酸工程改造之抗原結合分子。

在某些態樣中，本文提供之雙特異性抗體可經進一步修飾以含有此項技術中已知且容易獲得之其他非蛋白質部分。適合於抗體衍生化之部分包括(但不限於)水溶性聚合物。水溶性聚合物之非限制性實例包括(但不限於)聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇之共聚物、羧甲基纖維素、聚葡萄糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啉酮、聚-1,3-二氧雜環戊烷、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/順丁烯二酸酐共聚物、聚胺基酸(均聚物或無規共聚物)及聚葡萄糖或聚(n-乙基吡咯啉酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚環氧丙烷/環氧乙烷共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如丙三醇)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛因其於水中之穩定性而可具有製造優勢。聚合物可具有任何分子量，且可為分支鏈或未分支的。附接至抗體之聚合物的數目可變化，且若附接一個以上聚合物，則聚合物可為相同或不同分子。一般而言，用於衍生化之聚合物的數目及/或類型可基於包括(但不限於)以下之考慮因素確定：待改善之抗體之具體特性或功能、雙特異性抗體衍生物是否將用於界定條件下之療法中等。

在另一態樣中，提供抗體與可藉由暴露於放射線來選擇性地加熱之非蛋白質部分之結合物。在一個實施例中，非蛋白質部分為碳奈米管(Kam, N.W.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605)。放射線可具有任何波長，且包括(但不限於)不損害普通細胞，但將非蛋白

質部分加熱至殺死接近抗體-非蛋白質部分之細胞之溫度的波長。

「免疫結合物」為一種結合於一或多個異源分子，包括(但不限於)細胞毒性劑之抗體。

術語「聚核苷酸」係指經分離之核酸分子或構築體，例如信使RNA (mRNA)、病毒來源RNA或質體DNA (pDNA)。聚核苷酸可包含習知磷酸二酯鍵或非習知鍵(例如在肽核酸(PNA)中發現之醯胺鍵)。術語「核酸分子」係指聚核苷酸中存在之任一個或多個核酸區段，例如DNA或RNA片段。

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

一種核酸或聚核苷酸的核苷酸序列與本發明之參考核苷酸序列至少例如95%「一致」意指除該聚核苷酸序列相對於參考核苷酸序列可每100個核苷酸中包括至多五個點突變外，該聚核苷酸之核苷酸序列與參考序列均一致。換言之，為獲得核苷酸序列與參考核苷酸序列至少95%一致之聚核苷酸，參考序列中至多5%的核苷酸可缺失或經另一核苷酸取代，或參

考序列中可插入佔參考序列核苷酸總數至多5%之多個核苷酸。參考序列之此等改變可發生於參考核苷酸序列之5'或3'端位置或彼等末端位置之間的任何位置，此等位置個別地穿插於參考序列殘基中或參考序列內之一或多個鄰近基團中。實際上，任何具體聚核苷酸序列與本發明之核苷酸序列是否至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致可通常使用已知之電腦程式，諸如上文針對多肽所論述之電腦程式(例如ALIGN-2)來確定。

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

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

術語「宿主細胞」、「宿主細胞株」及「宿主細胞培養物」可互換使用且係指已引入外源核酸之細胞，包括此類細胞之後代。宿主細胞包括

「轉形體」及「轉形細胞」，其包括初級轉形細胞及自其衍生之後代(不考慮繼代次數)。後代之核酸含量與親代細胞可能不完全相同，而是可能含有突變。本文包括針對原始轉形細胞篩選或選擇的具有相同功能或生物活性之突變型後代。宿主細胞為可用於產生本發明之雙特異性抗原結合分子的任何類型之細胞系統。詳言之，宿主細胞為原核或真核宿主細胞。宿主細胞包括培養細胞，例如哺乳動物培養細胞，諸如CHO細胞、BHK細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、YO骨髓瘤細胞、P3X63小鼠骨髓瘤細胞、PER細胞、PER.C6細胞或融合瘤細胞、酵母細胞、昆蟲細胞及植物細胞，僅舉數例，且亦包括轉殖基因動物、轉殖基因植物或經培養植物或動物組織內所含的細胞。

藥劑之「有效量」係指在所投與之細胞或組織中產生生理變化所需的量。

例如醫藥組合物之藥劑之「治療有效量」係指在所需劑量及時間下有效實現所需治療或預防結果之量。舉例而言，治療有效量之藥劑消除、減少、延遲、最小化或預防疾病副作用。

「個體(individual)」或「個體(subject)」為哺乳動物。哺乳動物包括(但不限於)家養動物(例如牛、羊、貓、狗及馬)、靈長類動物(例如人類及非人類靈長類動物，諸如猴)、兔及嚙齒動物(例如小鼠及大鼠)。特定言之，個體為人類。

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

「醫藥學上可接受之賦形劑」係指醫藥組合物中除活性成分外對個

體無毒性之成分。醫藥學上可接受之賦形劑包括(但不限於)緩衝劑、穩定劑或防腐劑。

術語「藥品說明書」用於指通常包括於治療性產品之商業包裝中之說明書，其含有關於與使用此類治療性產品有關之適應症、用法、劑量、投藥、組合療法、禁忌症及/或警告的資訊。

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

如本文所用，術語「癌症」係指增生性疾病，諸如淋巴瘤、淋巴細胞性白血病、肺癌、非小細胞肺(NSCL)癌、細支氣管肺泡細胞肺癌、骨癌、胰臟癌、皮膚癌、頭或頸癌、皮膚或眼內黑色素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛門區癌、胃癌(stomach cancer)、胃癌(gastric cancer)、結腸癌、乳癌、子宮癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、霍奇金氏病(Hodgkin's Disease)、食道癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、膀胱癌、腎或輸尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、間皮瘤、肝細胞癌、膽道癌、中樞神經系統贅瘤(CNS)、脊髓軸線腫瘤、腦幹神經膠質瘤、多形性膠質母細胞瘤、星形細胞瘤、神經鞘瘤、室管膜瘤、神經管胚細胞瘤、脊膜瘤、鱗狀細胞癌、垂體腺瘤及尤文氏肉瘤(Ewings

sarcoma)，包括以上癌症中之任一者的難治型式，或一或多種以上癌症之組合。

本發明之雙特異性抗體

本發明提供包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM-3之第二抗原結合位點的新穎雙特異性抗體，其具有尤其有利之特性，諸如可生產性、穩定性、結合親和力、生物活性、特異性靶向某些T細胞、靶向效率及毒性降低。詳言之，此等為如下雙特異性抗體，其中該雙特異性抗體以高親和力結合於PD1且以低親和力結合於TIM3。

A. 結合於PD1及TIM-3之示例性雙特異性抗體

在一個態樣中，本發明提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中

該特異性結合於PD1之第一抗原結合位點包含

包含以下之VH域：

- (i)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的HVR-H1，
- (ii)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的HVR-H2，及
- (iii)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的HVR-H3；以及

包含以下之VL域：

- (i)包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列的HVR-L1；
- (ii)包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的HVR-L2，及
- (iii)包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的HVR-L3；且

該特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點包含

(a)包含以下之VH域：

- (i)包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列的HVR-H1，

(ii)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列的HVR-H2，及
(iii)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列的HVR-H3；以及
包含以下之VL域：

(i)包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12之胺基酸序列的HVR-L1，

(ii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列的HVR-L2，及
(iii)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列的HVR-L3；或
(b)包含以下之VH域：

(i)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-H1，
(ii)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-H2，及
(iii)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的HVR-H3；以及
包含以下之VL域：

(i)包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的HVR-L1，
(ii)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的HVR-L2，及
(iii)包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的HVR-L3；或
(c)包含以下之VH域：

(i)包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列的HVR-H1，
(ii)包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列的HVR-H2，及
(iii)包含SEQ ID NO:31之胺基酸序列的HVR-H3；以及
包含以下之VL域：

(i)包含SEQ ID NO:32之胺基酸序列的HVR-L1，
(ii)包含SEQ ID NO:33之胺基酸序列的HVR-L2，及
(iii)包含SEQ ID NO:34之胺基酸序列的HVR-L3。

在一個特定態樣中，提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中

該特異性結合於PD1之第一抗原結合位點包含

包含以下之VH域：

- (i)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的HVR-H1，
- (ii)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的HVR-H2，及
- (iii)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的HVR-H3；以及

包含以下之VL域：

- (i)包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列的HVR-L1；
- (ii)包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的HVR-L2，及
- (iii)包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的HVR-L3；且

該特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點包含

包含以下之VH域：

- (i)包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列的HVR-H1，
- (ii)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列的HVR-H2，及
- (iii)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列的HVR-H3；以及

包含以下之VL域：

- (i)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列的HVR-L1，
- (ii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列的HVR-L2，及
- (iii)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列的HVR-L3。

在另一特定態樣中，提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中

該特異性結合於PD1之第一抗原結合位點包含

包含以下之VH域：

- (i)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的HVR-H1，
- (ii)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的HVR-H2，及
- (iii)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的HVR-H3；以及

包含以下之VL域：

- (i)包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列的HVR-L1；
- (ii)包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的HVR-L2，及
- (iii)包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的HVR-L3；且

該特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點包含

包含以下之VH域：

- (i)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-H1，
- (ii)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-H2，及
- (iii)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的HVR-H3；以及

包含以下之VL域：

- (i)包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的HVR-L1，
- (ii)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的HVR-L2，及
- (iii)包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的HVR-L3。

在另一態樣中，提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中

該特異性結合於PD1之第一抗原結合位點包含

(a)包含SEQ ID NO: 43之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 44之胺基酸序列的VL域，或

(b)包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 46

之胺基酸序列的VL域，或

(c)包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 47之胺基酸序列的VL域，或

(d)包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 48之胺基酸序列的VL域，或

(e)包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 49之胺基酸序列的VL域，

且該特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點包含

(a)包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列的VL域，或

(b)包含SEQ ID NO: 9之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列的VL域，或

(c)包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列的VL域，或

(d)包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 16之胺基酸序列的VL域，或

(e)包含SEQ ID NO: 23之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的VL域，或

(f)包含SEQ ID NO: 25之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 26之胺基酸序列的VL域，或

(g)包含SEQ ID NO: 27之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列的VL域，或

(h)包含SEQ ID NO: 35之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 36

之胺基酸序列的VL域。

在另一態樣中，包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體為人類、人類化或嵌合抗體。其尤其為人類化抗體。

在一個態樣中，提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的人類化雙特異性抗體，其中

該特異性結合於PD1之第一抗原結合位點包含

(a)包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 46之胺基酸序列的VL域，或

(b)包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 47之胺基酸序列的VL域，或

(c)包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 48之胺基酸序列的VL域，或

(d)包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 49之胺基酸序列的VL域，

且該特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點包含

(a)包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列的VL域，或

(b)包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 16之胺基酸序列的VL域，或

(c)包含SEQ ID NO: 25之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 26之胺基酸序列的VL域，或

(d)包含SEQ ID NO: 27之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 28

之胺基酸序列的VL域。

在一個特定態樣中，提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中

該特異性結合於PD1之第一抗原結合位點包含有包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 46之胺基酸序列的VL域，

且該特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點包含有包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 16之胺基酸序列的VL域或包含SEQ ID NO: 25之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 26之胺基酸序列的VL域。

詳言之，本發明提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中

該特異性結合於PD1之第一抗原結合位點包含

包含以下之VH域：

- (i)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的HVR-H1，
- (ii)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的HVR-H2，及
- (iii)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的HVR-H3；以及

包含以下之VL域：

- (i)包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列的HVR-L1；
- (ii)包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的HVR-L2，及
- (iii)包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的HVR-L3；且

該特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點包含有包含以下之VH域：

- (i)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-H1，

- (ii)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-H2，及
 - (iii)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的HVR-H3；以及
- 包含以下之VL域：
- (i)包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的HVR-L1，
 - (ii)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的HVR-L2，及
 - (iii)包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的HVR-L3。

更詳言之，提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中該特異性結合於PD1之第一抗原結合位點包含有包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含選自由SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48及SEQ ID NO:49組成之群之胺基酸序列的VL域，且該特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點包含有包含SEQ ID NO: 25之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 26之胺基酸序列的VL域。

更詳言之，提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中該特異性結合於PD1之第一抗原結合位點包含有包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 46之胺基酸序列的VL域，且該特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點包含有包含SEQ ID NO: 25之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 26之胺基酸序列的VL域。

在另一態樣中，提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中該特異性結合於PD1之第一抗原結合位點包含有包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含選自由SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO:47、SEQ ID

NO:48及SEQ ID NO:49組成之群之胺基酸序列的VL域，且該特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點包含有包含SEQ ID NO: 27之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列的VL域。

在一個態樣中，包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體為二價。此意謂雙特異性抗體包含一個特異性結合於PD1之抗原結合位點及一個特異性結合於TIM3之抗原結合位點(1+1格式)。

在另一態樣中，提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中該雙特異性抗體以低親和力結合於TIM3且以高親和力結合於PD1。在一個特定態樣中，本發明提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中該雙特異性抗體以比結合於PD1低至少50倍之結合親和力、更尤其比結合於PD1低至少100倍之結合親和力結合於TIM3。在一個較佳實施例中，結合親和力(KD)用表面電漿子共振分析(如例如實例12中所描述)測定。

在一個態樣中，因此提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中

以高親和力特異性結合於PD1之該第一抗原結合位點包含

(a)包含SEQ ID NO: 43之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 44之胺基酸序列的VL域，或

(b)包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 46之胺基酸序列的VL域，或

(c)包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 47

之胺基酸序列的VL域，或

(d)包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 48

之胺基酸序列的VL域，或

(d)包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 49

之胺基酸序列的VL域，

且以低親和力特異性結合於TIM3之該第二抗原結合位點包含

(a)包含SEQ ID NO: 23之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 24

之胺基酸序列的VL域，或

(c)包含SEQ ID NO: 25之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 26

之胺基酸序列的VL域，或

(d)包含SEQ ID NO: 27之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 28

之胺基酸序列的VL域。

在一個特定態樣中，提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中以高親和力特異性結合於PD1之該第一抗原結合位點包含有包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 46之胺基酸序列的VL域，且以低親和力特異性結合於TIM3之該第二抗原結合位點包含有包含SEQ ID NO: 25之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 26之胺基酸序列的VL域。

在另一態樣中，本發明係關於一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中該雙特異性抗體包含Fc域、包含特異性結合於PD1之抗原結合位點的第一Fab片段及包含特異性結合於TIM3之抗原結合位點的第二Fab片段。

詳言之，Fc域為IgG域，更尤其IgG1 Fc域或IgG4 Fc域。

在另一態樣中，本發明提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其包含

(a)包含與SEQ ID NO: 50之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一重鏈，包含與SEQ ID NO: 52之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含與SEQ ID NO: 51之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二重鏈，及包含與SEQ ID NO: 53之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(b)包含與SEQ ID NO: 54之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一重鏈，包含與SEQ ID NO: 56之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含與SEQ ID NO: 55之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二重鏈，及包含與SEQ ID NO: 57之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(c)包含與SEQ ID NO: 58之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一重鏈，包含與SEQ ID NO: 60之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含與SEQ ID NO: 59之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二重鏈，及包含與SEQ ID NO: 61之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(d)包含與SEQ ID NO: 62之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的

第一重鏈，包含與SEQ ID NO: 64之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含與SEQ ID NO: 63之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二重鏈，及包含與SEQ ID NO: 65之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(e)包含與SEQ ID NO: 66之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一重鏈，包含與SEQ ID NO: 68之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含與SEQ ID NO: 67之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二重鏈，及包含與SEQ ID NO: 69之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二輕鏈。

在一個特定態樣中，本發明提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其包含

(a)包含SEQ ID NO: 50之胺基酸序列的第一重鏈，包含SEQ ID NO: 52之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含SEQ ID NO: 51之胺基酸序列的第二重鏈，及包含SEQ ID NO: 53之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(b)包含SEQ ID NO: 54之胺基酸序列的第一重鏈，包含SEQ ID NO: 56之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含SEQ ID NO: 55之胺基酸序列的第二重鏈，及包含SEQ ID NO: 57之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(c)包含SEQ ID NO: 58之胺基酸序列的第一重鏈，包含SEQ ID NO:

60之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含SEQ ID NO: 59之胺基酸序列的第二重鏈，及包含SEQ ID NO:

61之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(d)包含SEQ ID NO: 62之胺基酸序列的第一重鏈，包含SEQ ID NO:

64之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含SEQ ID NO: 63之胺基酸序列的第二重鏈，及包含SEQ ID NO:

65之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(e)包含SEQ ID NO: 66之胺基酸序列的第一重鏈，包含SEQ ID NO:

68之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含SEQ ID NO: 67之胺基酸序列的第二重鏈，及包含SEQ ID NO:

69之胺基酸序列的第二輕鏈。

更詳言之，本發明提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其包含有包含SEQ ID NO: 62之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO: 64之胺基酸序列的第一輕鏈、包含SEQ ID NO: 63之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO: 65之胺基酸序列的第二輕鏈。

在另一特定態樣中，提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其包含有包含SEQ ID NO: 66之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO: 68之胺基酸序列的第一輕鏈、包含SEQ ID NO: 67之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO: 69之胺基酸序列的第二輕鏈。

在另一態樣中，包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體為四價。在一個態樣

中，雙特異性抗體包含兩個特異性結合於PD1之抗原結合位點及兩個特異性結合於TIM3之抗原結合位點(2+2格式)。

在一個態樣中，本發明之雙特異性抗體包含

(a)包含有包含特異性結合於TIM3之抗原結合位點之兩個Fab片段的抗體之兩個輕鏈及兩個重鏈，及

(b)包含特異性結合於PD1之抗原結合位點的兩個其他Fab片段，其中該等其他Fab片段各經由肽連接子連接至(a)之重鏈之C端。

在一個特定態樣中，肽連接子為(G4S)₄。在另一態樣中，包含特異性結合於PD1之抗原結合位點的兩個其他Fab片段為交越Fab片段，其中可變域VL及VH彼此置換，且VL-CH鏈各經由肽連接子連接至(a)之重鏈之C端。

在一個特定態樣中，本發明提供一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其包含

(a) 各包含SEQ ID NO: 70之胺基酸序列之兩條重鏈、包含SEQ ID NO: 71之胺基酸序列的第一輕鏈及包含SEQ ID NO: 72之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(b)各包含SEQ ID NO: 73之胺基酸序列之兩條重鏈、包含SEQ ID NO: 74之胺基酸序列的第一輕鏈及包含SEQ ID NO: 75之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(c)各包含SEQ ID NO: 76之胺基酸序列之兩條重鏈、包含SEQ ID NO: 77之胺基酸序列的第一輕鏈及包含SEQ ID NO: 78之胺基酸序列的第二輕鏈78。

降低Fc受體結合及/或效應功能之Fc域修飾

在某些態樣中，可將一或多個胺基酸修飾引入至本文所提供之抗體的Fc區中，從而產生Fc區變異體。Fc區變異體可包含在一或多個胺基酸位置包含胺基酸修飾(例如取代)之人類Fc區序列(例如人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc區)。

以下部分描述包含降低Fc受體結合及/或效應功能之Fc域修飾的本發明之雙特異性抗原結合分子的較佳態樣。在一個態樣中，本發明係關於一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中Fc域包含一或多個減少與Fc受體、尤其Fc γ 受體之結合的胺基酸取代。詳言之，Fc域為人類IgG1子類，具有胺基酸突變L234A、L235A及P329G(根據Kabat EU指數編號)。

Fc域賦予本發明之雙特異性抗體有利的藥物動力學特性，包括長血清半衰期，其促進標靶組織中之良好累積及有利的組織-血液分佈率。然而，其同時可引起本發明之雙特異性抗體不合需要地靶向表現Fc受體之細胞而非較佳的攜有抗原之細胞。因此，在特定實施例中，本發明之雙特異性抗體與原生IgG Fc域(尤其IgG1 Fc域或IgG4 Fc域)相比展現降低之對Fc域的結合親和力及/或降低之效應功能。更特定言之，Fc域為IgG1 Fc域。

在一個此類態樣中，Fc域(或包含該Fc域的本發明之雙特異性抗原結合分子)與原生IgG1 Fc域(或包含原生IgG1 Fc域的本發明之雙特異性抗原結合分子)相比展現低於50%，較佳低於20%，更佳低於10%且最佳低於5%的與Fc受體之結合親和力，及/或與原生IgG1 Fc域(或包含原生IgG1 Fc域的本發明之雙特異性抗原結合分子)相比低於50%、較佳低於20%、更佳低於10%且最佳低於5%的效應功能。在一個態樣中，Fc域(或包含該

Fc域的本發明之雙特異性抗原結合分子)不會實質上結合於Fc受體及/或誘發效應功能。在一個特定態樣中，Fc受體為Fc γ 受體。在一個態樣中，Fc受體為人類Fc受體。在一個態樣中，Fc受體為活化Fc受體。在一個特定態樣中，Fc受體為活化人類Fc γ 受體，更尤其人類Fc γ RIIIa、Fc γ RI或Fc γ RIIa，最尤其人類Fc γ RIIIa。在一個態樣中，Fc受體為抑制Fc受體。在一個特定態樣中，Fc受體為抑制人類Fc γ 受體，更尤其人類Fc γ RIIB。在一個態樣中，效應功能為CDC、ADCC、ADCP及細胞因子分泌中之一或多者。在一個特定態樣中，效應功能為ADCC。在一個態樣中，Fc域對新生兒Fc受體(FcRn)展現的結合親和力與原生IgG1 Fc域相比實質上類似。當Fc域(或包含該Fc域的本發明之雙特異性抗原結合分子)展現比原生IgG1 Fc域(或包含原生IgG1 Fc域的本發明之雙特異性抗原結合分子)高約70%、尤其高約80%、更尤其高約90%的與FcRn之結合親和力時，實現實質上類似的與FcRn之結合。

在一個特定態樣中，Fc域經工程改造，相較於未經工程改造之Fc域，對Fc受體之結合親和力減小及/或效應功能降低。在一個特定態樣中，本發明之雙特異性抗原結合分子的Fc域包含一或多個降低Fc域對Fc受體之結合親和力及/或效應功能的胺基酸突變。通常，Fc域之兩個次單元中之每一者中存在相同的一或多個胺基酸突變。在一個態樣中，胺基酸突變使Fc域對Fc受體之結合親和力減小。在另一態樣中，胺基酸突變使Fc域對Fc受體之結合親和力減小至少2倍、至少5倍或至少10倍。在一個態樣中，包含經工程改造之Fc域的本發明之雙特異性抗原結合分子與包含未經工程改造之Fc域的本發明之雙特異性抗體相比展現小20%，尤其小10%，更尤其小5%的對Fc受體之結合親和力。在一個特定態樣中，Fc受

體為Fc γ 受體。在其他態樣中，Fc受體為人類Fc受體。在一個態樣中，Fc受體為抑制Fc受體。在一個特定態樣中，Fc受體為抑制人類Fc γ 受體，更尤其人類Fc γ RIIB。在一些態樣中，Fc受體為活化Fc受體。在一個特定態樣中，Fc受體為活化人類Fc γ 受體，更尤其人類Fc γ RIIIa、Fc γ RI或Fc γ RIIa，最尤其人類Fc γ RIIIa。較佳地，與此等受體中之每一者的結合減少。在一些態樣中，對補體組分之結合親和力，即對C1q之特異性結合親和力，亦減小。在一個態樣中，對新生兒Fc受體(FcRn)之結合親和力未減小。當Fc域(或包含該Fc域的本發明之雙特異性抗原結合分子)對FcRn之結合親和力比Fc域之未經工程改造形式(或包含該Fc域之未經工程改造形式的本發明之雙特異性抗原結合分子)高約70%時，實現對FcRn的實質上類似之結合，亦即保持Fc域對該受體之結合親和力。Fc域或包含該Fc域的本發明之雙特異性抗原結合分子可展現超過約80%以及甚至超過約90%此類親和力。在某些實施例中，本發明之雙特異性抗原結合分子的Fc域經工程改造以具有與非工程改造之Fc域相比降低之效應功能。降低之效應子功能可包括(但不限於)以下中之一或多者：降低之補體依賴性細胞毒性(CDC)、降低之抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)、降低之抗體依賴性細胞吞噬(ADCP)、降低之細胞因子分泌、降低的免疫複合物介導之抗原呈遞細胞之抗原吸收、降低之與NK細胞之結合、降低之與巨噬細胞之結合、降低之與單核細胞之結合、降低之與多形核細胞之結合、降低之誘導細胞凋亡之直接信號傳導、降低之樹突狀細胞成熟或降低之T細胞激活。

效應功能降低之抗體包括具有Fc區殘基238、265、269、270、297、327及329中之一或多者之取代的抗體(美國專利第6,737,056號)。此

類Fc突變體包括在胺基酸位置265、269、270、297及327中之兩者或兩者以上具有取代的Fc突變體，包括殘基265及297取代為丙胺酸的所謂「DANA」Fc突變體(美國專利第7,332,581號)。描述具有提高或降低之與FcR之結合的某些抗體變異體。(例如美國專利第6,737,056號；WO 2004/056312及Shields, R.L.等人, J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604)。

在本發明之一個態樣中，Fc域包含在位置E233、L234、L235、N297、P331及P329之胺基酸取代。在一些態樣中，Fc域包含胺基酸取代L234A及L235A(「LALA」)。在一個此類實施例中，Fc域為IgG1 Fc域，尤其人類IgG1 Fc域。在一個態樣中，Fc域包含在位置P329之胺基酸取代。在一更特定態樣中，胺基酸取代為P329A或P329G，尤其P329G。在一個實施例中，Fc域包含在位置P329之胺基酸取代及選自由以下組成之群的另一胺基酸取代：E233P、L234A、L235A、L235E、N297A、N297D或P331S。在一更特定實施例中，Fc域包含胺基酸突變L234A、L235A及P329G(「P329G LALA」)。胺基酸取代之「P329G LALA」組合幾乎完全消除人類IgG1 Fc域之Fc γ 受體結合，如PCT專利申請案第WO 2012/130831 A1號中所述。該文獻亦描述製備此類突變Fc域之方法及用於測定其特性(諸如Fc受體結合或效應功能)的方法。此類抗體為具有突變L234A及L235A或具有突變L234A、L235A及P329G之IgG1(編號係根據Kabat等人之EU索引，Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991)。

在一個態樣中，本發明之雙特異性抗體包含(所有位置均根據Kabat

之EU指數) (i)視情況具有突變P329G、L234A及L235A之人類IgG1子類的均二聚Fc區；或(ii)視情況具有突變P329G、S228P及L235E之人類IgG4子類的均二聚Fc區；或(iii)視情況具有突變P329G、L234A、L235A、I253A、H310A及H435A或視情況具有突變P329G、L234A、L235A、H310A、H433A及Y436A之人類IgG1子類的均二聚Fc區；或(iv)如下雜二聚體Fc區，其中一個Fc區多肽包含突變T366W，且另一Fc區多肽包含突變T366S、L368A及Y407V，或其中一個Fc區多肽包含突變T366W及Y349C，且另一Fc區多肽包含突變T366S、L368A、Y407V及S354C，或其中一個Fc區多肽包含突變T366W及S354C，且另一Fc區多肽包含突變T366S、L368A、Y407V及Y349C；或(v)如下人類IgG1子類之雜二聚體Fc區，其中兩個Fc區多肽均包含突變P329G、L234A及L235A，且一個Fc區多肽包含突變T366W，且另一Fc區多肽包含突變T366S、L368A及Y407V，或其中一個Fc區多肽包含突變T366W及Y349C，且另一Fc區多肽包含突變T366S、L368A、Y407V及S354C，或其中一個Fc區多肽包含突變T366W及S354C，且另一Fc區多肽包含突變T366S、L368A、Y407V及Y349C。

在一個態樣中，Fc域為IgG4 Fc域。在一更特定實施例中，Fc域為包含位置S228 (Kabat編號)之胺基酸取代、尤其胺基酸取代S228P的IgG4 Fc域。在一個更特定實施例中，Fc域為包含胺基酸取代L235E及S228P及P329G之IgG4 Fc域。此胺基酸取代減少活體內IgG4抗體之Fab臂交換(參見 Stubenrauch 等人，Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010))。因此，在一個態樣中，提供一種雙特異性抗體，其包含(所有位置均係根據Kabat之EU指數)如下人類IgG4子類之雜二聚體Fc區，其中兩

個Fc區多肽均包含突變P329G、S228P及L235E，且一個Fc區多肽包含突變T366W，且另一Fc區多肽包含突變T366S、L368A及Y407V，或其中一個Fc區多肽包含突變T366W及Y349C，且另一Fc區多肽包含突變T366S、L368A、Y407V及S354C，或其中一個Fc區多肽包含突變T366W及S354C，且另一Fc區多肽包含突變T366S、L368A、Y407V及Y349C。

半衰期延長且與負責將母體IgG轉移至胎兒之新生兒Fc受體(FcRn) (Guyer, R.L.等人, *J. Immunol.* 117 (1976) 587-593；及Kim, J.K.等人, *J. Immunol.* 24 (1994) 2429-2434)之結合改善的抗體描述於US 2005/0014934中。彼等抗體包含其中具有一或多個取代之Fc區，該等取代改善Fc區與FcRn之結合。此類Fc變異體包括在以下Fc區殘基中之一或多者處具有取代之彼等變異體：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434，例如Fc區殘基434之取代(美國專利第7,371,826號)。關於Fc區變異體之其他實例，亦參見Duncan, A.R.及Winter, G., *Nature* 322 (1988) 738-740；US 5,648,260；US 5,624,821；及WO 94/29351。

與Fc受體之結合可容易例如藉由ELISA，或藉由表面電漿子共振(SPR)，使用標準儀器，諸如BIAcore儀器(GE Healthcare)測定，且諸如可藉由重組表現來獲得Fc受體。適合的此類結合分析描述於本文中。或者，Fc域或包含Fc域之細胞活化雙特異性抗原結合分子對Fc受體的結合親和力可使用已知表現特定Fc受體的細胞株(諸如表現Fc γ IIIa受體之人類NK細胞)評估。Fc域或包含Fc域之本發明之雙特異性抗體之效應功能可藉由此項技術中已知之方法量測。適用於量測ADCC之分析描述於本文中。

評估相關分子之ADCC活性的活體外分析之其他實例描述於美國專利第5,500,362號；Hellstrom等人 Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) 及 Hellstrom 等人, Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985)；美國專利第5,821,337號；Bruggemann等人, J Exp Med 166, 1351-1361 (1987)。或者，可採用非放射性分析法(參見例如用於流動式細胞量測術之ACTI™非放射性細胞毒性分析(CellTechnology, Inc. Mountain View, CA)；及CytoTox 96®非放射性細胞毒性分析(Promega, Madison, WI))。適用於此類分析之效應細胞包括末梢血液單核細胞(PBMC)及天然殺手(NK)細胞。或者或另外，相關分子之ADCC活性可在活體內，例如在諸如Clynes等人, Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998)中揭示之動物模型中評估。

促進雜二聚化之Fc域修飾

本發明之雙特異性抗原結合分子包含與Fc域之兩個次單元中之一個或另一個融合的不同抗原結合位點，因此Fc域之兩個次單元可包含於兩個不相同多肽鏈中。此等多肽之重組共表現及隨後二聚化引起兩種多肽出現若干種可能的組合。為提高重組產生中本發明之雙特異性抗體的產量及純度，因此將適宜在本發明之雙特異性抗原結合分子的Fc域中引入促進所要多肽締合之修飾。

因此，在特定態樣中，本發明係關於一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中Fc域包含促進Fc域之第一及第二次單元之締合的修飾。人類IgG Fc域中之兩個次單元之間最廣泛蛋白質-蛋白質相互作用的位點存在於Fc域之CH3域中。因此，在一個態樣中，該修飾存在於Fc域之CH3域中。

在一個特定態樣中，該修飾為所謂的「杵臼」修飾，其包含Fc域之兩個次單元中之一者中的「杵」修飾及Fc域之兩個次單元之另一者中的「臼」修飾。因此，本發明係關於一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中根據杵臼法，該Fc域之第一次單元包含杵且Fc域之第二次單元包含臼。在一個特定態樣中，Fc域之第一次單元包含胺基酸取代S354C及T366W (EU編號)，且Fc域之第二次單元包含胺基酸取代Y349C、T366S及Y407V (根據Kabat EU索引編號)。

杵-臼技術描述於例如US 5,731,168；US 7,695,936；Ridgway等人, Prot Eng 9, 617-621 (1996)及Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)中。一般而言，該方法涉及在第一多肽之界面處引入突起(「杵」)及在第二多肽之界面處引入相應空腔(「臼」)，使得突起可位於空腔中以便促進雜二聚體形成且阻礙均二聚體形成。突起藉由將來自第一多肽界面之小胺基酸側鏈用更大側鏈(例如酪胺酸或色胺酸)替換來構築。大小與突起相同或類似的補償性空腔藉由用較小胺基酸側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)置換大胺基酸側鏈而在第二多肽之界面中產生。

因此，在一個態樣中，在本發明之雙特異性抗原結合分子的Fc域之第一次單元的CH3域中，胺基酸殘基置換為具有較大側鏈體積之胺基酸殘基，由此在第一次單元之CH3域內產生突起，該突起可位於第二次單元之CH3域內的空腔中，且在Fc域之第二次單元的CH3域中，胺基酸殘基置換為具有較小側鏈體積之胺基酸殘基，由此在第二次單元之CH3域內產生空腔，第一次單元之CH3域內的突起可位於該空腔中。可藉由例如藉由位點特異性突變誘發或藉由肽合成，改變編碼多肽之核酸來製造突起及空腔。

在一個特定態樣中，在Fc域之第一次單元之CH3域中，位置366之蘇胺酸殘基經色胺酸殘基(T366W)置換，且在Fc域之第二次單元之CH3域中，位置407之酪胺酸殘基經纈胺酸殘基(Y407V)置換。在一個態樣中，在Fc域之第二次單元中，另外，位置366之蘇胺酸殘基經絲胺酸殘基(T366S)置換且位置368之白胺酸殘基經丙胺酸殘基(L368A)置換。

在另一態樣中，在Fc域之第一次單元中，位置354之絲胺酸殘基另外經半胱胺酸殘基(S354C)置換，且在Fc域之第二次單元中，位置349之酪胺酸殘基另外經半胱胺酸殘基(Y349C)置換。引入此兩個半胱胺酸殘基使得Fc域之兩個次單元之間形成二硫橋鍵，進一步穩定二聚體(Carter (2001), J Immunol Methods 248, 7-15)。在一個特定態樣中，Fc域之第一次單元包含胺基酸取代S354C及T366W (EU編號)，且Fc域之第二次單元包含胺基酸取代Y349C、T366S及Y407V (根據Kabat EU索引編號)。

或者或另外，且亦可使用如EP 1 870 459描述之其他杵臼技術。在一個實施例中，多特異性抗體在「杵鏈」之CH3域中包含突變R409D及K370E且在「臼鏈」之CH3域中包含突變D399K及E357K (根據Kabat EU索引編號)。

在一個態樣中，多特異性抗體在「杵鏈」之CH3域中包含T366W突變且在「臼鏈」之CH3域中包含突變T366S、L368A及Y407V，且另外在「杵鏈」之CH3域中包含突變R409D及K370E且在「臼鏈」之CH3域中包含突變D399K及E357K (根據Kabat EU索引編號)。

在一個態樣中，雙特異性抗體在兩個CH3域中之一者中包含突變Y349C及T366W，且在兩個CH3域之另一者中包含突變S354C、T366S、L368A及Y407V，或多特異性抗體在兩個CH3域中之一者中包含突變

Y349C及T366W，且在兩個CH3域之另一者中包含突變S354C、T366S、L368A及Y407V，且另外在「杵鏈」之CH3域中包含突變R409D及K370E，且在「臼鏈」之CH3域中包含突變D399K及E357K（根據Kabat EU指數編號）。

在一個替代性態樣中，促進Fc域之第一及第二次單元之締合的修飾包含調節靜電導引作用之修飾，例如如PCT公開案WO 2009/089004中所描述。一般而言，此方法涉及用帶電胺基酸殘基置換兩個Fc域次單元之界面處之一或多個胺基酸殘基，使得均二聚體形成變成在靜電上不利的，而雜二聚在靜電上為有利的。

除「杵臼技術」以外，用於修飾多特異性抗體之重鏈之CH3域以便加強雜二聚化的其他技術為此項技術中已知。本文涵蓋此等技術，尤其WO 96/27011、WO 98/050431、EP 1870459、WO 2007/110205、WO 2007/147901、WO 2009/089004、WO 2010/129304、WO 2011/90754、WO 2011/143545、WO 2012/058768、WO 2013/157954及WO 2013/096291中所描述之技術作為「杵臼技術」之替代方案，與多特異性抗體組合。

在一個態樣中，在雙特異性抗體中，在EP 1870459中描述之方法用於支持多特異性抗體之第一重鏈與第二重鏈之雜二聚化。此方法係基於在第一與第二重鏈之間的CH3/CH3域界面中之特定胺基酸位置引入具有相反電荷之帶電胺基酸。

因此，在此態樣中，在多特異性抗體之三級結構中，第一重鏈之CH3域與第二重鏈之CH3域形成位於各別抗體CH3域之間的界面，其中第一重鏈之CH3域及第二重鏈之CH3域之各別胺基酸序列各自包含位於抗體

之三級結構中的該界面內之一組胺基酸，其中來自位於一個重鏈之CH3域中的界面中之該組胺基酸的第一胺基酸經帶正電胺基酸取代，且來自位於另一重鏈之CH3域中的界面中之該組胺基酸的第二胺基酸經帶負電胺基酸取代。根據此態樣之多特異性抗體在本文中亦稱為「CH3(+/-)工程改造之雙特異性抗體」(其中縮寫「+/-」表示引入各別CH3域中之帶相反電荷胺基酸)。

在一個態樣中，在CH3(+/-)工程改造之雙特異性抗體中，帶正電胺基酸選自K、R及H，且帶負電胺基酸選自E或D。

在一個態樣中，在CH3(+/-)工程改造之雙特異性抗體中，帶正電胺基酸選自K及R，且帶負電胺基酸選自E或D。

在一個態樣中，在CH3(+/-)工程改造之雙特異性抗體中，帶正電胺基酸為K，且帶負電胺基酸為E。

在一個態樣中，在CH3(+/-)工程改造之雙特異性抗體中，在一個重鏈之CH3域中位置409之胺基酸R經D取代且位置392之胺基酸K經E取代，且在另一重鏈之CH3域中位置399之胺基酸D經K取代且位置357之胺基酸E經K取代(根據Kabat EU索引編號)。

在一個態樣中，WO 2013/157953中描述之方法用於支持多特異性抗體之第一重鏈與第二重鏈之雜二聚化。在一個實施例中，在一個重鏈之CH3域中，位置366之胺基酸T經K取代，且在另一重鏈之CH3域中，位置351之胺基酸L經D取代(根據Kabat EU索引編號)。在另一個實施例中，在一個重鏈之CH3域中，位置366之胺基酸T經K取代，且位置351之胺基酸L經K取代，且在另一個重鏈之CH3域中，位置351之胺基酸L經D取代(根據Kabat EU索引編號)。

在另一態樣中，在一個重鏈之CH3域中，位置366處之胺基酸T經K取代，且位置351之胺基酸L經K取代，且在另一個重鏈之CH3域中，位置351之胺基酸L經D取代(根據Kabat EU索引編號)。另外，在另一重鏈之CH3域中包含以下取代中之至少一者：位置349之胺基酸Y經E取代、位置349之胺基酸Y經D取代且位置368之胺基酸L經E取代(根據Kabat EU索引編號)。在一個實施例中，位置368之胺基酸L經E取代(根據Kabat EU索引編號)。

在一個態樣中，WO 2012/058768中描述之方法用於支持多特異性抗體之第一重鏈與第二重鏈之雜二聚化。在一個態樣中，在一個重鏈之CH3域中位置351之胺基酸L經Y取代且位置407之胺基酸Y經A取代，且在另一重鏈之CH3域中位置366之胺基酸T經A取代且位置409之胺基酸K經F取代(根據Kabat EU索引編號)。在另一個實施例中，除前述取代之外，在另一個重鏈之CH3域中，位置411 (最初T)、399 (最初D)、400 (最初S)、405 (最初F)、390 (最初N)及392 (最初K)之胺基酸中之至少一者經取代(根據Kabat EU索引編號)。較佳取代為：

- 位置411之胺基酸T經選自N、R、Q、K、D、E及W之胺基酸取代(根據Kabat EU索引編號)，

- 位置399之胺基酸D經選自R、W、Y及K之胺基酸取代(根據Kabat EU索引編號)，

- 位置400之胺基酸S經選自E、D、R及K之胺基酸取代(根據Kabat EU索引編號)，

- 位置405之胺基酸F經選自I、M、T、S、V及W之胺基酸取代(根據Kabat EU索引編號)；

- 位置390之胺基酸N經選自R、K及D之胺基酸取代(根據Kabat EU索引編號)；及
- 位置392之胺基酸K經選自V、M、R、L、F及E之胺基酸取代(根據Kabat EU索引編號)。

在另一態樣中，雙特異性抗體根據WO 2012/058768進行工程改造，亦即在一個重鏈之CH3域中位置351之胺基酸L經Y取代且位置407之胺基酸Y經A取代，且在另一重鏈之CH3域中位置366之胺基酸T經V取代且位置409之胺基酸K經F取代(根據Kabat EU索引編號)。在多特異性抗體之另一個實施例中，在一個重鏈之CH3域中位置407之胺基酸Y經A取代，且在另一重鏈之CH3域中位置366之胺基酸T經A取代且位置409之胺基酸K經F取代(根據Kabat EU索引編號)。在該上一前述實施例中，在該另一重鏈之CH3域中位置392之胺基酸K經E取代，位置411之胺基酸T經E取代，位置399之胺基酸D經R取代且位置400之胺基酸S經R取代(根據Kabat EU索引編號)。

在一個態樣中，WO 2011/143545中描述之方法用於支持多特異性抗體之第一重鏈與第二重鏈之雜二聚化。在一個態樣中，兩個重鏈之CH3域中的胺基酸修飾引入位置368及/或409 (根據Kabat EU索引編號)。

在一個態樣中，WO 2011/090762中描述之方法用於支持雙特異性抗體之第一重鏈與第二重鏈之雜二聚化。WO 2011/090762係關於根據「杵臼」(KiH)技術之胺基酸修飾。在一個實施例中，在一個重鏈之CH3域中，位置366之胺基酸T經W取代，且在另一重鏈之CH3域中，位置407之胺基酸Y經A取代(根據Kabat EU索引編號)。在另一個實施例中，在一個重鏈之CH3域中，位置366之胺基酸T經Y取代，且在另一重鏈之CH3域

中，位置407之胺基酸Y經T取代(根據Kabat EU索引編號)。

在一個態樣中，WO 2009/089004中描述之方法用於支持多特異性抗體之第一重鏈與第二重鏈之雜二聚化。在一個實施例中，在一個重鏈之CH3域中，位置392之胺基酸K或N經帶負電胺基酸(在一個實施例中經E或D，在一個較佳實施例中經D)取代，且在另一重鏈之CH3域中，位置399之胺基酸、位置356之胺基酸E或D或位置357之胺基酸E經帶正電胺基酸(在一個實施例中K或R，在一個較佳實施例中K，在一個較佳實施例中位置399或356之胺基酸經K取代)取代(根據Kabat EU索引編號)。在另一實施例中，除前述取代之外，在一個重鏈之CH3域中位置409之胺基酸K或R經帶負電胺基酸(在一個實施例中，經E或D，在一個較佳實施例中，經D)取代(根據Kabat EU索引編號)。在甚至另一態樣中，除以上提及之取代之外或者替代以上提及之取代，在一個重鏈之CH3域中，位置439之胺基酸K及/或位置370之胺基酸K彼此獨立地經帶負電胺基酸(在一個實施例中經E或D，在一個較佳實施例中經D)取代(根據Kabat EU索引編號)。

在一個態樣中，WO 2007/147901中描述之方法用於支持多特異性抗體之第一重鏈與第二重鏈之雜二聚化。在一個實施例中，在一個重鏈之CH3域中，位置253之胺基酸K經E取代，位置282之胺基酸D經K取代，且位置322之胺基酸K經D取代，且在另一重鏈之CH3域中，位置239之胺基酸D經K取代，位置240之胺基酸E經K取代且位置292之胺基酸K經D取代(根據Kabat EU索引編號)。

如本文所報導之雙特異性抗體之重鏈的C端可為以胺基酸殘基PGK結束之完整C端。重鏈之C端可為縮短C端，其中已移除一個或兩個C端胺基酸殘基。在一個較佳態樣中，重鏈之C端為以PG結束之縮短C端。

在如本文所報導之所有態樣之一個態樣中，如本文所說明之包含包括C端CH3域之重鏈的雙特異性抗體包含C端甘胺酸-離胺酸二肽(G446及K447，根據Kabat EU索引編號)。在如本文所報導之所有態樣中之一個實施例中，如本文所說明之包含包括C端CH3域之重鏈的雙特異性抗體包含C端甘胺酸殘基(G446，根據Kabat EU索引編號)。

Fab結構域中之修飾

在一個態樣中，本發明係關於一種包含特異性結合於PD1之第一Fab片段及特異性結合於TIM3之第二Fab片段的雙特異性抗體，其中在Fab片段之一中，可變域VH及VL或恆定域CH1及CL交換。根據Crossmab技術製備該等雙特異性抗體。

在一個結合臂中具有結構域置換/交換的多特異性抗體(CrossMabVH-VL或CrossMabCH-CL)詳細描述於WO2009/080252及Schaefer, W.等人, PNAS, 108 (2011) 11187-1191中。其明顯地減少由針對第一抗原之輕鏈與針對第二抗原之錯誤重鏈錯配(與沒有此類結構域交換之方法相比較)而產生的副產物。

在一個特定態樣中，本發明係關於一種包含特異性結合於PD1之第一Fab片段及特異性結合於TIM3之第二Fab片段的雙特異性抗體，其中在Fab片段之一中，可變域VL與VH彼此置換，從而使得VH域為輕鏈之一部分且VL域為重鏈之一部分。在一個特定態樣中，雙特異性抗體為如下抗體，其中在包含特異性結合於PD1之抗原結合位點的第一Fab片段中，可變域VL及VH彼此置換。

在另一態樣中，且為進一步提高正確配對，包含特異性結合於PD1之第一Fab片段及特異性結合於TIM3之第二Fab片段的雙特異性抗體可含有

不同帶電胺基酸取代(所謂的「帶電殘基」)。將此等修飾引入交叉或非交叉CH1及CL域中。

在一個特定態樣中，本發明係關於一種包含特異性結合於PD1之第一Fab片段及特異性結合於TIM3之第二Fab片段的雙特異性抗體，其中在Fab片段之一中，在恆定域CL中，位置124之胺基酸經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)(根據Kabat EU索引編號)獨立地取代，且在恆定域CH1中，位置147及213之胺基酸經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)獨立地取代(根據Kabat EU索引編號)。在一個特定態樣中，雙特異性抗體為如下抗體，其中在包含特異性結合於TIM3之抗原結合位點的第二Fab片段中，恆定域CL之位置124之胺基酸經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)(根據Kabat EU指數編號)獨立地取代，且在恆定域CH1中，位置147及213之胺基酸經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)(根據Kabat EU指數編號)獨立地取代。

在一個特定態樣中，本發明係關於一種包含特異性結合於PD1之第一Fab片段及特異性結合於TIM3之第二Fab片段的雙特異性抗體，其中在一個CL域中，位置123 (EU編號)之胺基酸已經精胺酸(R)置換且位置124 (EU編號)之胺基酸已經離胺酸(K)取代，且其中在一個CH1域中，位置147 (EU編號)及位置213 (EU編號)之胺基酸已經麩胺酸(E)取代。在一個特定態樣中，雙特異性抗體為如下雙特異性抗體，其中在包含特異性結合於TIM3之抗原結合位點的第二Fab片段中，位置123之胺基酸(EU編號)已經精胺酸(R)置換且位置124之胺基酸(EU編號)已經離胺酸(K)取代，且其中在一個CH1域中，位置147 (EU編號)及位置213 (EU編號)之胺基酸已經麩胺酸(E)取代。

在另一態樣中，雙特異性抗體為包含以下之二價抗體：

a)特異性結合於第一抗原之抗體之第一輕鏈及第一重鏈，及

b)特異性結合於第二抗原之抗體之第二輕鏈及第二重鏈，其中該第二輕鏈及該第二重鏈之可變域VL及VH彼此置換。

a)之抗體不含如b)所報導之修飾，且a)之重鏈及輕鏈為分離鏈。

在b)之抗體中，在輕鏈內，可變輕鏈域VL經該抗體之可變重鏈域VH置換，且在重鏈內，可變重鏈域VH經該抗體之可變輕鏈域VL置換。

在一個態樣中，(i)在a)之第一輕鏈之恆定域CL中，位置124 (根據Kabat編號)之胺基酸經帶正電胺基酸取代，且其中在a)之第一重鏈之恆定域CH1中，位置147之胺基酸或位置213之胺基酸(根據Kabat EU索引編號)經帶負電胺基酸取代，或(ii)在b)之第二輕鏈之恆定域CL中，位置124之胺基酸(根據Kabat編號)經帶正電胺基酸取代，且其中在b)之第二重鏈之恆定域CH1中，位置147之胺基酸或位置213之胺基酸(根據Kabat EU索引編號)經帶負電胺基酸取代。

在另一態樣中，(i)在a)之第一輕鏈之恆定域CL中，位置124之胺基酸經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)(根據Kabat編號)獨立地取代(在一個較佳實施例中，獨立地經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代)，且其中在a)之第一重鏈之恆定域CH1中，位置147之胺基酸或位置213之胺基酸經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)(根據Kabat EU索引編號)獨立地取代，或(ii)在b)之第二輕鏈之恆定域CL中，位置124之胺基酸經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)(根據Kabat編號)獨立地取代(在一個較佳實施例中，獨立地經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代)，且其中在b)之第二重鏈之恆定域CH1中，位置147之胺基酸或位置213之胺基酸經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)(根據Kabat EU索引編號)獨立地取代。

在一個態樣中，在第二重鏈之恆定域CL中，位置124及123之胺基酸經K取代(根據Kabat EU索引編號)。

在一個態樣中，在第二重鏈之恆定域CL中，位置123之胺基酸經R取代且位置124之胺基酸經K取代(根據Kabat EU索引編號)。

在一個態樣中，在第二輕鏈之恆定域CH1中，位置147及213之胺基酸經E (根據Kabat EU索引編號)取代。

在一個態樣中，在第一輕鏈之恆定域CL中，位置124及123之胺基酸經K取代，且在第一重鏈之恆定域CH1中，位置147及213之胺基酸經E取代(根據Kabat EU索引編號)。

在一個態樣中，在第一輕鏈之恆定域CL中，位置123之胺基酸經R取代，且位置124之胺基酸經K取代，且在第一重鏈之恆定域CH1中，位置147及213之胺基酸均經E取代(根據Kabat EU索引編號)。

在一個態樣中，在第二重鏈之恆定域CL中，位置124及123之胺基酸經K取代，且其中在第二輕鏈之恆定域CH1中，位置147及213之胺基酸經E取代，且在第一輕鏈之可變域VL中，位置38之胺基酸經K取代，在第一重鏈之可變域VH中，位置39之胺基酸經E取代，在第二重鏈之可變域VL中，位置38之胺基酸經K取代，且在第二輕鏈之可變域VH中，位置39之胺基酸經E取代(根據Kabat EU索引編號)。

在一個態樣中，雙特異性抗體為包含以下之二價抗體：

a)特異性結合於第一抗原之抗體之第一輕鏈及第一重鏈，及

b)特異性結合於第二抗原之抗體之第二輕鏈及第二重鏈，其中該第二輕鏈及該第二重鏈之可變域VL及VH彼此置換，且其中該第二輕鏈及該第二重鏈之恆定域CL及CH1彼此置換。

a)之抗體不含如b)所報導之修飾，且a)之重鏈及輕鏈為分離鏈。在b)之抗體中，在輕鏈內，可變輕鏈域VL經該抗體之可變重鏈域VH置換，且恆定輕鏈域CL經該抗體之恆定重鏈域CH1置換；且在重鏈內，可變重鏈域VH經該抗體之可變輕鏈域VL置換，且恆定重鏈域CH1經該抗體之恆定輕鏈域CL置換。

在一個態樣中，雙特異性抗體為包含以下之二價抗體：

a)特異性結合於第一抗原之抗體之第一輕鏈及第一重鏈，及

b)特異性結合於第二抗原之抗體之第二輕鏈及第二重鏈，其中該第二輕鏈及該第二重鏈之恆定域CL及CH1彼此置換。

a)之抗體不含如b)所報導之修飾，且a)之重鏈及輕鏈為分離鏈。在b)之抗體中，在輕鏈內，恆定輕鏈域CL經該抗體之恆定重鏈域CH1置換；且在重鏈內，恆定重鏈域CH1經該抗體之恆定輕鏈域CL置換。

在一個態樣中，多特異性抗體為包含以下之多特異性抗體：

a)全長抗體，其特異性結合於第一抗原且由兩個抗體重鏈及兩個抗體輕鏈組成，及

b)一個、兩個、三個或四個單鏈Fab片段，其特異性結合於一個至四個其他抗原(亦即第二及/或第三及/或第四及/或第五抗原，較佳特異性結合於另一個抗原，亦即第二抗原)，

其中b)之該等單鏈Fab片段與a)之該全長抗體在該全長抗體之該重鏈或輕鏈之C端或N端經由肽連接子融合。

在一個態樣中，結合於第二抗原之一個或兩個相同單鏈Fab片段與該全長抗體在該全長抗體之重鏈或輕鏈之C端經由肽連接子融合。

在一個態樣中，結合於第二抗原之一或兩個相同單鏈Fab片段與該全

長抗體在該全長抗體之重鏈之C端經由肽連接子融合。

在一個態樣中，結合於第二抗原之一或兩個相同單鏈Fab片段與該全長抗體在該全長抗體之輕鏈之C端經由肽連接子融合。

在一個態樣中，結合於第二抗原之兩個相同單鏈Fab片段與該全長抗體在該全長抗體之各重鏈或輕鏈之C端經由肽連接子融合。

在一個態樣中，結合於第二抗原之兩個相同單鏈Fab片段與該全長抗體在該全長抗體之各重鏈之C端經由肽連接子融合。

在一個態樣中，結合於第二抗原之兩個相同單鏈Fab片段與該全長抗體在該全長抗體之各輕鏈之C端經由肽連接子融合。

在一個態樣中，雙特異性抗體為包含以下之三價抗體：

a)全長抗體，其特異性結合於第一抗原且由兩個抗體重鏈及兩個抗體輕鏈組成，

b)第一多肽，其由以下組成：

ba)抗體重鏈可變域(VH)，或

bb)抗體重鏈可變域(VH)及抗體恆定域1 (CH1)，

其中該第一多肽以其VH域之N端經由肽連接子與該全長抗體之兩個重鏈中之一者的C端融合，

c)第二多肽，其由以下組成：

ca)抗體輕鏈可變域(VL)，或

cb)抗體輕鏈可變域(VL)及抗體輕鏈恆定域(CL)，

其中該第二多肽以VL域之N端經由肽連接子與該全長抗體之兩個重鏈中之另一者的C端融合，

其中該第一多肽之抗體重鏈可變域(VH)與該第二多肽之抗體輕鏈可

變域(VL)一起形成特異性結合於第二抗原之抗原結合位點。

在一個態樣中，b)之多肽之抗體重鏈可變域(VH)及c)之多肽之抗體輕鏈可變域(VL)藉由在以下位置之間引入二硫鍵，經由鏈間二硫橋鍵連接且穩定化：

(i)重鏈可變域位置44至輕鏈可變域位置100，或

(ii)重鏈可變域位置105至輕鏈可變域位置43，或

(iii)重鏈可變域位置101至輕鏈可變域位置100 (始終根據Kabat EU索引編號)。

引入非天然二硫橋鍵用於穩定化之技術描述於例如WO 94/029350；Rajagopal, V.等人, Prot. Eng. (1997) 1453-1459；Kobayashi, H.等人, Nucl. Med. Biol. 25 (1998) 387-393；及Schmidt, M.等人, Oncogene 18 (1999) 1711-1721中。在一個實施例中，b)及c)之多肽的可變域之間的視情況選用之二硫鍵係在重鏈可變域位置44與輕鏈可變域位置100之間。在一個實施例中，b)及c)之多肽的可變域之間的視情況選用之二硫鍵係在重鏈可變域位置105與輕鏈可變域位置43之間(始終根據Kabat編號)。在一個實施例中，在單鏈Fab片段之可變域VH與VL之間無該視情況選用之二硫鍵穩定化的三價雙特異性抗體為較佳。

在一個態樣中，雙特異性抗體為包含以下之三特異性或四特異性抗體：

a)特異性結合於第一抗原之全長抗體之第一輕鏈及第一重鏈，及

b)特異性結合於第二抗原之全長抗體之第二(修飾)輕鏈及第二(修飾)重鏈，其中可變域VL及VH彼此置換，及/或其中恆定域CL及CH1彼此置換，及

c)其中特異性結合於一個或兩個其他抗原(亦即，第三及/或第四抗原)之一個至四個抗原結合肽經由肽連接子與a)及/或b)之輕鏈或重鏈之C端或N端融合。

a)之抗體不含如b)所報導之修飾，且a)之重鏈及輕鏈為分離鏈。

在一個態樣中，三特異性或四特異性抗體包含c)之特異性結合於一個或兩個其他抗原之一個或兩個抗原結合肽。

在一個態樣中，抗原結合肽係選自scFv片段及scFab片段之群。

在一個態樣中，抗原結合肽為scFv片段。

在一個態樣中，抗原結合肽為scFab片段。

在一個態樣中，抗原結合肽與a)及/或b)之重鏈之C端融合。

在一個態樣中，三特異性或四特異性抗體包含c)之特異性結合於一個其他抗原之一個或兩個抗原結合肽。

在一個態樣中，三特異性或四特異性抗體包含c)之特異性結合於第三抗原之兩個相同抗原結合肽。在一個較佳實施例中，此類兩個相同抗原結合肽經由相同肽連接子與a)及b)之重鏈之C端融合。在一個較佳實施例中，兩個相同抗原結合肽為scFv片段或scFab片段。

在一個態樣中，三特異性或四特異性抗體包含c)之特異性結合於第三及第四抗原之兩個抗原結合肽。在一個實施例中，該兩個抗原結合肽均經由相同肽連接子與a)及b)之重鏈的C端融合。在一個較佳實施例中，該兩個抗原結合肽為scFv片段或scFab片段。

在一個態樣中，雙特異性抗體為包含以下之雙特異性四價抗體：

a)特異性結合於第一抗原(且包含兩個Fab片段)之抗體之兩個輕鏈及兩個重鏈，

b)特異性結合於第二抗原之抗體之兩個額外Fab片段，其中該等額外Fab片段均經由肽連接子與a)之重鏈之C端或N端融合，

其中在該等Fab片段中進行以下修飾：

(i)在a)之兩個Fab片段中或在b)之兩個Fab片段中，可變域VL及VH彼此置換，及/或恆定域CL及CH1彼此置換，或

(ii)在a)之兩個Fab片段中，可變域VL及彼此置換，且恆定域CL及CH1彼此置換，且在b)之兩個Fab片段中，可變域VL及VH彼此置換，或恆定域CL及CH1彼此置換，或

(iii)在a)之兩個Fab片段中，可變域VL及VH彼此置換，或恆定域CL及CH1彼此置換，且在b)之兩個Fab片段中，可變域VL及VH彼此置換，且恆定域CL及CH1彼此置換，或

(iv)在a)之兩個Fab片段中，可變域VL及VH彼此置換，且在b)之兩個Fab片段中，恆定域CL及CH1彼此置換，或

v)在a)之兩個Fab片段中，恆定域CL及CH1彼此置換，且在b)之兩個Fab片段中，可變域VL及VH彼此置換。

在一個態樣中，該等額外Fab片段均經由肽連接子與a)之重鏈之C端或與a)之重鏈之N端融合。

在一個態樣中，該等額外Fab片段均經由肽連接子與a)之重鏈之C端融合。

在一個態樣中，該等額外Fab片段均經由肽連接子與a)之重鏈之N端融合。

在一個態樣中，在Fab片段中，進行以下修飾：在a)之兩個Fab片段中，或在b)之兩個Fab片段中，可變域VL及VH彼此置換，及/或恆定域CL

及CH1彼此置換。

在一個態樣中，雙特異性抗體為包含以下之四價抗體：

a)特異性結合於第一抗原且包含第一VH-CH1域對之第一抗體之(修飾)重鏈，其中該第一抗體之第二VH-CH1域對之N端經由肽連接子與該重鏈之C端融合，

b) a)之該第一抗體之兩個輕鏈，

c)特異性結合於第二抗原且包含第一VH-CL域對之第二抗體之(修飾)重鏈，其中該第二抗體之第二VH-CL域對之N端經由肽連接子與該重鏈之C端融合，及

d) c)之該第二抗體的兩個(修飾)輕鏈，其各包含CL-CH1域對。

在一個態樣中，雙特異性抗體包含

a)特異性結合於第一抗原之第一全長抗體之重鏈及輕鏈，及

b)特異性結合於第二抗原之第二全長抗體之重鏈及輕鏈，其中該重鏈之N端經由肽連接子與該輕鏈之C端連接。

a)之抗體不含如b)所報導之修飾，且重鏈及輕鏈為分離鏈。

在一個態樣中，雙特異性抗體包含

a)全長抗體，其特異性結合於第一抗原且由兩個抗體重鏈及兩個抗體輕鏈組成，及

b) Fv片段，其特異性結合於包含VH2域及VL2域之第二抗原，其中兩個域經由二硫橋鍵彼此連接，

其中僅該VH2域或該VL2域經由肽連接子與特異性結合於第一抗原之該全長抗體之重鏈或輕鏈融合，

在雙特異性抗體中，a)之重鏈及輕鏈為分離鏈。

在一個態樣中，VH2域或VL2域之另一者不經由肽連接子與特異性結合於第一抗原之全長抗體之重鏈或輕鏈融合。

在如本文所報導之所有態樣中，第一輕鏈包含VL域及CL域，且第一重鏈包含VH域、CH1域、鉸鏈區、CH2域及CH3域。

在一個態樣中，雙特異性抗體為包含以下之三價抗體：

a)特異性結合於第一抗原之兩個Fab片段，

b)特異性結合於第二抗原之一個CrossFab片段，其中CH1及CL域彼此互換，

c)包含第一Fc區重鏈及第二Fc區重鏈之一個Fc區，

其中兩個Fab片段之CH1域之C端連接於重鏈Fc區多肽之N端，且其中CrossFab片段之CL域之C端連接於一個Fab片段之VH域之N端。

在一個態樣中，雙特異性抗體為包含以下之三價抗體：

a)特異性結合於第一抗原之兩個Fab片段，

b)特異性結合於第二抗原之一個CrossFab片段，其中CH1及CL域彼此互換，

c)包含第一Fc區重鏈及第二Fc區重鏈之一個Fc區，

其中第一Fab片段之CH1域之C端連接於一個重鏈Fc區多肽之N端，且CrossFab片段之CL域之C端連接於另一重鏈Fc區多肽之N端，且其中第二Fab片段之CH1域之C端連接於第一Fab片段之VH域之N端或CrossFab片段之VH域之N端。

在一個態樣中，雙特異性抗體包含

a)全長抗體，其特異性結合於第一抗原且由兩個抗體重鏈及兩個抗體輕鏈組成，及

b)特異性結合於第二抗原之包含有包含重鏈片段及輕鏈片段之VH2域及VL2域的Fab片段，其中在輕鏈片段內，可變輕鏈域VL2經該抗體之可變重鏈域VH2置換，且在重鏈片段內可變重鏈域VH2經該抗體之可變輕鏈域VL2置換。

其中重鏈Fab片段插入全長抗體之一個重鏈之CH1域與全長抗體之相應Fc區之間，且輕鏈Fab片段之N端結合於與重鏈Fab片段插入之全長抗體之重鏈配對的全長抗體之輕鏈之C端。

在一個態樣中，雙特異性抗體包含

a)全長抗體，其特異性結合於第一抗原且由兩個抗體重鏈及兩個抗體輕鏈組成，及

b)特異性結合於第二抗原的包含有包含重鏈片段及輕鏈片段之VH2域及VL2域的Fab片段，其中在輕鏈片段內，可變輕鏈域VL2經該抗體之可變重鏈域VH2置換，且在重鏈片段內，可變重鏈域VH2經該抗體之可變輕鏈域VL2置換，且其中Fab片段之重鏈片段之C端結合於全長抗體之一個重鏈之N端，且Fab片段之輕鏈片段之C端結合於與Fab片段之重鏈片段結合之全長抗體之重鏈配對的全長抗體之輕鏈之N端。

聚核苷酸

本發明進一步提供編碼如本文所述之雙特異性抗體或其片段的經分離之聚核苷酸。

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

B. 重組方法

本文提供之雙特異性抗體可使用例如如美國專利第4,816,567號中所述之重組方法及組合物產生。在一個態樣中，提供編碼本文所述之雙特異性抗體的經分離之核酸。此類核酸可編碼包含分別特異性結合於PD1及TIM-3之抗原結合位點(例如在抗體之輕鏈及/或重鏈中)之VL的胺基酸序列及/或包含VH之胺基酸序列。在另一態樣中，提供包含此類核酸之一或多個載體(例如表現載體)。在另一態樣中，提供包含此類核酸之宿主細胞。在一個此類態樣中，宿主細胞包含(例如經以下轉形)：(1)包含編碼包含抗體VL之胺基酸序列及包含抗體VH之胺基酸序列的核酸的載體；或(2)包含編碼包含抗體VL之胺基酸序列之核酸的第一載體，及包含編碼包含抗體VH之胺基酸序列之核酸的第二載體。在一個態樣中，宿主細胞為真核細胞，例如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或淋巴細胞(例如Y0、NS0、Sp20細胞)。在一個態樣中，提供一種製造雙特異性抗體之方法，其中該方法包含在適合於表現抗體之條件下培養如上文所提供之包含編碼抗體之核酸的宿主細胞且視情況自宿主細胞(或宿主細胞培養基)回收抗體。

為重組產生如本文所述的包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM-3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，例如如上述之編碼雙特異性抗體之核酸經分離且插入一或多個載體中以及在宿主細胞中進一步選殖及/或表現。此類核酸可容易使用習知程序(例如藉由使用能夠特異性結合於編碼抗體重鏈及輕鏈之基因的寡核苷酸探針)分離及測序。

適用於選殖或表現編碼抗體之載體之宿主細胞包括本文所述之原核或真核細胞。舉例而言，抗體可於細菌中產生，在不需要糖基化及Fc效應功能時尤其如此。為在細菌中表現抗體片段及多肽，參見例如US

5,648,237、US 5,789,199及US 5,840,523。(亦參見 Charlton, K.A., *Methods in Molecular Biology*, 第248卷, Lo, B.K.C. (編輯), Humana Press, Totowa, NJ (2003), 第245-254頁, 描述大腸桿菌中抗體片段之表現)。在表現之後, 可自細菌細胞糊狀物以可溶性溶離份分離抗體且可進一步純化。

除原核生物外, 諸如絲狀真菌或酵母之真核微生物為適用於編碼抗體之載體的選殖或表現宿主, 包括糖基化路徑已經「人類化」, 從而使得所產生之抗體具有部分或完全人類糖基化型態的真菌及酵母菌株。參見 Gerngross, T.U., *Nat. Biotech.* 22 (2004) 1409-1414; 及Li, H.等人, *Nat. Biotech.* 24 (2006) 210-215。

適用於表現糖基化抗體之宿主細胞亦來源於多細胞生物體(無脊椎動物及脊椎動物)。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已鑑別出眾多可與昆蟲細胞聯合使用, 尤其用於轉染草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*)細胞之桿狀病毒株。

植物細胞培養物亦可用作宿主。參見例如美國專利第5,959,177號、第6,040,498號、第6,420,548號、第7,125,978號及第6,417,429號(描述在轉殖基因植物中產生抗體之PLANTIBODIESTM技術)。

脊椎動物細胞亦可用作宿主。舉例而言, 適於在懸浮液中生長之哺乳動物細胞株可為適用的。適用哺乳動物宿主細胞株之其他實例為藉由SV40轉形之猴腎CV1株系(COS-7); 人胚腎株系(293或293細胞, 如例如Graham, F.L.等人, *J. Gen Virol.* 36 (1977) 59-74中所描述); 幼倉鼠腎細胞(BHK); 小鼠塞特利氏細胞(mouse sertoli cells)(TM4細胞, 如例如Mather, J.P., *Biol. Reprod.* 23 (1980) 243-252中所描述); 猴腎細胞

(CV1)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76)；人類子宮頸癌細胞(HELA)；犬科動物腎細胞(MDCK)；布法羅大鼠肝臟細胞(BRL 3A)；人類肺細胞(W138)；人類肝臟細胞(Hep G2)；小鼠乳房腫瘤(MMT 060562)；TRI細胞，如例如Mather, J.P.等人, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383 (1982) 44-68中所描述；MRC 5細胞；以及FS4細胞。其他適用哺乳動物宿主細胞株包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，包括DHFR- CHO細胞(Urlaub, G.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 4216-4220)；以及骨髓瘤細胞株，諸如Y0、NS0及Sp2/0。關於適於抗體產生之某些哺乳動物宿主細胞株的評述，參見例如Yazaki, P.及Wu, A.M., *Methods in Molecular Biology*, 第248卷, Lo, B.K.C. (編輯), Humana Press, Totowa, NJ (2004), 第255-268頁。

C. 分析

可藉由此項技術中已知之各種分析，鑑別、篩選或表徵本文提供的包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM-3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體的物理/化學特性及/或生物活性。

1. 親和力分析

本文提供的雙特異性抗原結合分子、抗體及抗體片段對相應抗原之親和力可根據實例中闡述之方法，藉由表面電漿子共振(SPR)，使用標準儀器，諸如Biacore®儀器(GE Healthcare)測定，且諸如可藉由重組表現獲得受體或標靶蛋白。用於量測結合親和力之一特定說明性及示例性實施例描述於實例1b、5或12中。根據一個態樣，藉由表面電漿子共振，使用BIACORE® T100機(GE Healthcare)在25°C下量測 K_D 。

2. 結合分析及其他分析

在一個態樣中，例如藉由已知方法，諸如ELISA、西方墨點法等，測試本發明抗體之抗原結合活性。本文提供之雙特異性抗體與對應重組抗原或表現抗原之細胞的結合可藉由如實例12中所述之ELISA評估。

在另一態樣中，本發明提供一種基於細胞之TR-FRET分析，以確定雙特異性抗體格式與一個細胞上存在之兩種不同受體的同時結合。所選Tag-lite技術為經典TR-FRET (時差式螢光共振能量轉移)與SNAP-標籤技術(例如New England Biolabs, CISBIO)之組合，其允許細胞表面上存在之抗原經螢光供體或接受體染料標記。分析描述於實例13中。

在另一態樣中，在結合分析中使用新鮮末梢血液單核細胞(PBMC)以展示與諸如單核細胞、NK細胞及T細胞之不同末梢血液單核細胞(PBMC)的結合。

在另一態樣中，可使用競爭分析以鑑別相應地與特異性抗體或抗原結合位點競爭結合於標靶之抗體。在某些實施例中，此類競爭抗體結合於與根據本發明包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體所結合相同的抗原決定基(例如線性或構形抗原決定基)。用於定位抗體結合之抗原決定基的詳細示例性方法提供於Morris (1996) 「Epitope Mapping Protocols」, *Methods in Molecular Biology* 第66卷 (Humana Press, Totowa, NJ)。

在一示例性競爭分析中，將固定之PD1或TIM3在包含結合於PD1或TIM3之第一標記抗體及測試與第一抗體競爭結合於PD1或TIM3之能力之第二未標記抗體的溶液中培育。第二抗體可存在於融合瘤上清液中。作為對照，在包含第一標記抗體但無第二未標記抗體之溶液中培育固定之PD1或TIM3。在允許第一抗體結合於PD1或TIM3之條件下培育之後，移除過

量未結合抗體，且量測與固定之PD1或TIM3締合之標記之量。若相對於對照樣品，測試樣品中與固定之PD1或TIM3締合之標記之量實質上減少，則此表明第二抗體與第一抗體競爭結合於PD1或TIM3。參見Harlow及Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* 第14章 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。

3. 活性分析

在一個態樣中，提供用於鑑別具有生物活性的包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體的分析。生物活性可包括例如能夠增強不同免疫細胞、尤其T細胞之活化及/或增殖、分泌調節免疫之細胞因子(諸如IFN γ 或TNF- α)、阻斷PD1路徑、阻斷TIM3路徑、殺死腫瘤細胞。亦提供在活體內及/或活體外具有此類生物活性之抗體。

在某些態樣中，測試本發明抗體之此類生物活性。在一個態樣中，提供一種免疫細胞分析，其量測來自一名個體(供體X)之淋巴細胞面對來自另一個體(供體Y)之淋巴細胞時的活化。混合淋巴細胞反應(MLR)可證實阻斷PD1至淋巴細胞效應細胞之路徑的作用。針對活化及IFN- γ 分泌，在本發明之雙特異性抗體存在或不存在下測試分析中之T細胞。分析更詳細地描述於實例16中。

D. 免疫結合物

本發明亦提供免疫結合物，其包含本發明之雙特異性抗體結合於一或多種細胞毒性劑，諸如化學治療劑或藥物、生長抑制劑、毒素(例如蛋白質毒素、細菌、真菌、植物或動物來源之酶促活性毒素或其片段)或放射性同位素。

在一個態樣中，免疫結合物為抗體-藥物結合物(ADC)，其中抗體結合於一或多種藥物，包括(但不限於)類美登素(maytansinoid)(參見美國專利第5,208,020號、第5,416,064號及歐洲專利EP 0 425 235 B1)；阿瑞他汀(auristatin)，諸如單甲基阿瑞他汀藥物部分DE及DF (MMAE及MMAF)(參見美國專利第5,635,483號及第5,780,588號及第7,498,298號)；海兔毒素(dolastatin)；卡奇黴素(calicheamicin)或其衍生物(參見美國專利第5,712,374號、第5,714,586號、第5,739,116號、第5,767,285號、第5,770,701號、第5,770,710號、第5,773,001號及第5,877,296號；Hinman等人，*Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993)；及Lode等人，*Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998))；蒽環黴素(anthracycline)，諸如道諾黴素(daunomycin)或小紅莓(doxorubicin)(參見Kratz等人，*Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006)；Jeffrey等人，*Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006)；Torgov等人，*Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005)；Nagy等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000)；Dubowchik等人，*Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002)；King等人，*J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002)；及美國專利第6,630,579號)；甲胺喋呤(methotrexate)；長春地辛(vindesine)；紫杉烷，諸如多烯紫杉醇(docetaxel)、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、拉洛他賽(larotaxel)、替司他賽(tesetaxel)及奧他賽(ortataxel)；單端孢黴烯族毒素；及CC1065。

在另一實施例中，免疫結合物包含與酶促活性毒素結合之如本文所述之抗體或其片段，該酶促活性毒素包括(但不限於)白喉A鏈(diphtheria A chain)、白喉毒素(diphtheria toxin)之非結合活性片段、外毒素A鏈(來自綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素A鏈(ricin A chain)、

相思子毒素A鏈(abrin A chain)、莫迪素A鏈(modeccin A chain)、 α -帚麴菌素(alpha-sarcin)、油桐(Aleurites fordii)蛋白、康乃馨(dianthin)蛋白、洋商陸(Phytolaca americana)蛋白(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜(momordica charantia)抑制劑、麻瘋樹毒蛋白(curcin)、巴豆毒素(crotonin)、肥皂草(sapaonaria officinalis)抑制劑、白樹素(gelonin)、有絲分裂素(mitogellin)、侷限麴菌素(restrictocin)、酚黴素(phenomycin)、伊諾黴素(enomycin)及單端孢黴烯族毒素。

在另一個實施例中，免疫結合物包含與放射性原子結合以形成放射性結合物的如本文所述之抗體。多種放射性同位素可用於產生放射性結合物。實例包括At211、I131、I125、Y90、Re186、Re188、Sm153、Bi212、P32、Pb212及Lu之放射性同位素。當放射性結合物用於偵測時，其可包含用於閃爍攝影研究之放射性原子，例如tc99m或I123；或用於核磁共振(NMR)成像(亦稱為磁共振成像，mri)之自旋標記，又諸如碘-123、碘-131、銻-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、釷、錳或鐵。

可使用多種雙官能蛋白質偶合劑製備抗體與細胞毒性劑之結合物，該等雙官能蛋白質偶合劑為諸如N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、丁二醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(SMCC)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、醯亞胺酯之雙官能衍生物(諸如二亞胺代己二酸二甲酯HCl)、活性酯(諸如辛二酸二丁二醯亞胺基酯)、醛(諸如戊二醛)、雙疊氨基化合物(諸如雙(對疊氨基苯甲醯基)己二胺)、雙重氮衍生物(諸如雙(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，蓖麻毒素免疫毒素可如Vitetta等人，Science 238:1098 (1987)中所述來製備。碳

14標記之1-異硫氰基苯甲基-3-甲基二伸乙三胺五乙酸(MX-DTPA)為一種用於將放射性核苷酸結合於抗體之例示性螯合劑。參見WO94/11026。連接子可為有助於細胞毒性藥物在細胞中釋放之「可裂解連接子」。舉例而言，可使用酸不穩定連接子、肽酶敏感性連接子、光不穩定連接子、二甲基連接子或含有二硫鍵之連接子(Chari等人, *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); 美國專利第5,208,020號)。

本文之免疫結合物或ADC明確涵蓋(但不限於)用交聯試劑製備之此類結合物，交聯試劑包括(但不限於) BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC及磺基-SMPB，及SVSB(丁二醯亞胺基-(4-乙烯基)苯甲酸酯)，該等交聯試劑可購得(例如購自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A)。

E. 用於診斷及偵測之方法及組合物

在某些態樣中，本文提供的包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM-3之第二抗原結合位點的任一雙特異性抗體可用於偵測生物樣品中PD1與TIM3之存在。如本文所用之術語「偵測」涵蓋定量或定性偵測。在某些實施例中，生物樣品包含細胞或組織，諸如AML癌症幹細胞。

在一個態樣中，提供一種用於診斷或偵測方法之雙特異性抗體。在另一態樣中，提供偵測生物樣品中PD1與TIM3之存在之方法。在某些實施例中，該方法包含使生物樣品與如本文所述之雙特異性抗體在允許雙特異性抗體與PD1及TIM3兩者結合之條件下接觸，且偵測在雙特異性抗體

與兩種抗原之間是否形成複合物。此類方法可為活體外或活體內方法。在一個實施例中，雙特異性抗體用於選擇適合用包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM-3抗體之第二抗原結合位點的雙特異性抗體治療的個體，例如其中PD1及TIM3為選擇患者之生物標記物。

在某些態樣中，提供標記之雙特異性抗體。標記包括(但不限於)直接偵測之標記或部分(諸如螢光、發色、電子緻密、化學發光及放射性標記)，以及例如經由酶反應或分子相互作用間接偵測之部分(諸如酶或配位體)。示例性標記包括(但不限於)放射性同位素 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 及 ^{131}I ；螢光團，諸如稀土螯合物或螢光素及其衍生物；若丹明及其衍生物；丹醯基；傘酮；螢光素酶，例如螢火蟲螢光素酶及細菌螢光素酶(美國專利第4,737,456號)；螢光素；2,3-二氫酞嗪二酮；辣根過氧化酶(HRP)；鹼性磷酸酶； β -半乳糖苷酶；葡糖澱粉酶；溶菌酶；醣氧化酶，例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶及葡萄糖-6-磷酸去氫酶；雜環氧化酶，諸如尿酸酶及黃嘌呤氧化酶，其與採用過氧化氫氧化染料前驅體之酶(諸如HRP、乳過氧化酶或微過氧化酶)偶合；生物素/抗生物素蛋白；自旋標記；噬菌體標記；或穩定自由基。

F. 醫藥組合物、調配物及投藥途徑

在另一態樣中，本發明提供包含本文提供的包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM-3之第二抗原結合位點的任一雙特異性抗體的醫藥組合物，其例如用於任一以下治療方法中。在一個實施例中，醫藥組合物包含本文提供之任一雙特異性抗體及至少一種醫藥學上可接受之賦形劑。在另一實施例中，醫藥組合物包含本文提供之任一雙特異性抗體及至少一種例如如下所述之其他治療劑。

本發明之醫藥組合物包含溶解或分散於醫藥學上可接受之賦形劑中的治療有效量之一或多種雙特異性抗體。短語「醫藥學上或藥理學上可接受」係指分子實體及組合物在所用劑量及濃度下對於接受者而言一般為無毒的，亦即當適當時投與動物(諸如人類)時，不會產生有害的過敏反應或其他不良反應。含有至少一種雙特異性抗體及視情況選用之其他活性成分的醫藥組合物之製備將為熟習此項技術者依據本發明已知，如以引用的方式併入本文中之Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版 Mack Printing Company, 1990所例示。詳言之，組合物為凍乾調配物或水溶液。如本文所用，「醫藥學上可接受之賦形劑」包括如一般技術者已知之任何及所有溶劑、緩衝劑、分散介質、包衣、界面活性劑、抗氧化劑、防腐劑(例如抗菌劑、抗真菌劑)、等張劑、鹽、穩定劑及其組合。

非經腸組合物包括經設計以藉由注射(例如皮下、皮內、病灶內、靜脈內、動脈內、肌肉內、鞘內或腹膜內注射)來投與的組合物。為進行注射，本發明之雙特異性抗體可於水溶液，較佳於生理學上相容之緩衝液(諸如漢克氏溶液(Hanks' solution)、林格氏溶液(Ringer's solution)或生理食鹽水緩衝液)中調配。溶液可含有調配劑，諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑。或者，雙特異性抗體可呈粉末形式以用於在使用之前用適合媒劑(例如無菌無熱原質水)復原。藉由將所需量之本發明之融合蛋白併入視需要具有多種下文列舉之其他成分之適當溶劑中來製備無菌可注射溶液。無菌性可容易藉由例如經由無菌過濾膜過濾來實現。一般而言，分散液係藉由將各種經滅菌之活性成分併入含有基本分散介質及/或其他成分之無菌媒劑中來製備。在用於製備無菌可注射溶液、懸浮液或乳液之無菌粉末情況下，較佳製備方法為真空乾燥及冷凍乾燥技術，其自預先無菌過濾之液

體介質產生活性成分與任何其他所需成分之粉末。必要時，液體介質宜經緩衝，且在注射之前，首先用足量鹽水或葡萄糖使液體稀釋劑呈等張性。組合物在製造及儲存條件下必須為穩定的，且避免諸如細菌及真菌之微生物的污染作用。應瞭解，內毒素污染應最低限度地保持在安全水準，例如低於0.5 ng/mg蛋白質。適合醫藥學上可接受之賦形劑包括(但不限於)：緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(諸如十八烷基二甲基苯甲基氯化銨；氯化六羥季銨；氯化苯甲銨；苜索氯銨；苯酚、丁醇或苯甲醇；對羥基苯甲酸烷基酯，諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(小於約10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啉酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖，諸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；成鹽相對離子，諸如鈉；金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合物)；及/或非離子型界面活性劑，諸如聚乙二醇(PEG)。水性注射懸浮液可含有增加懸浮液黏度之化合物，諸如羧甲基纖維素鈉、山梨糖醇、聚葡萄糖或其類似物。視情況，懸浮液亦可含有適合穩定劑或增加化合物溶解性之試劑以允許製備高度濃縮之溶液。此外，活性化合物之懸浮液可製備成適當的油性注射懸浮液。適合親脂性溶劑或媒劑包括脂肪油，諸如芝麻油；或合成脂肪酸酯，諸如油酸乙酯或甘油三酯；或脂質體。

活性成分可截留於微膠囊中，例如藉由凝聚技術或藉由界面聚合法所製備之微膠囊，例如分別為羥甲基纖維素或明膠微膠囊及聚(甲基丙烯

酸甲酯)微膠囊；截留於膠態藥物遞送系統(例如脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米顆粒及奈米膠囊)中或巨乳液中。此類技術揭示於 Remington's Pharmaceutical Sciences (第18版 Mack Printing Company, 1990)中。可製備持續釋放製劑。持續釋放製劑之適合實例包括含有多肽之固體疏水性聚合物之半滲透基質，該等基質呈成形物品形式，例如薄膜或微膠囊。在特定實施例中，可注射組合物之延長吸收可藉由在組合物中使用延遲吸收劑(諸如單硬脂酸鋁、明膠或其組合)來達成。

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

示例性凍乾抗體調配物描述於美國專利第6,267,958號中。水性抗體調配物包括美國專利第6,171,586號及WO2006/044908中所述之彼等調配物，後者調配物包括組胺酸-乙酸鹽緩衝液。

除前述組合物以外，雙特異性抗體亦可調配為儲槽式製劑。此類長效調配物可藉由植入(例如皮下或肌肉內植入)或藉由肌肉內注射來投與。因此，舉例而言，雙特異性抗體可用適合聚合物或疏水性材料(例如於可接受之油中的乳液)或離子交換樹脂調配，或調配為微溶性衍生物，例如微溶性鹽。

包含本發明之雙特異性抗體之醫藥組合物可藉助於習知混合、溶解、乳化、囊封、包覆或凍乾製程製造。醫藥組合物可使用一或多種有利

於將蛋白質處理成可在醫藥學上使用之製劑的生理學上可接受之載劑、稀釋劑、賦形劑或助劑以習知方式調配。適當調配物視所選投藥途徑而定。

雙特異性抗體可調配成游離酸或鹼、中性或鹽形式之組合物。醫藥學上可接受之鹽為實質上保留游離酸或鹼之生物活性的鹽。此等鹽包括酸加成鹽，例如與蛋白質組合物之游離胺基形成的鹽，或與無機酸(諸如鹽酸或磷酸)或有機酸(諸如乙酸、乙二酸、酒石酸或杏仁酸)形成的鹽。與游離羧基形成的鹽亦可衍生自無機鹼，諸如氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫氧化銨、氫氧化鈣或氫氧化鐵；或有機鹼，諸如異丙胺、三甲胺、組胺酸或普魯卡因(procaine)。相較於對應游離鹼形式，醫藥鹽傾向於更溶於水性及其他質子溶劑中。

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

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

G. 治療方法及組合物

本文提供的包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM-3之第二抗原結合位點的任一雙特異性抗體可用於治療方法中。

為用於治療方法，如前文所定義的包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM-3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體可依符合優良醫療實踐之方式調配、給藥及投與。在此情形中考慮之因素包括所治療之特定病症、所治療之特定哺乳動物、個別患者之臨床病狀、病症起因、藥劑遞送部位、投藥方法、投藥時程及醫學從業者已知之其他因

素。

在一個態樣中，提供如本文所定義的包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM-3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其適用作藥物。在其他態樣中，提供如本文所定義的包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM-3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其用於治療疾病，尤其用於治療癌症。在某些實施例中，提供包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM-3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其用於治療方法中。在一個實施例中，本發明提供如本文所述的包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM-3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其用於治療有需要之個體之疾病。在某些實施例中，本發明提供包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM-3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其用於治療患有疾病之個體之方法中，該方法包含向該個體投與治療有效量之雙特異性抗體。在某些實施例中，待治療之疾病為癌症。在另一態樣中，待治療之疾病為慢性病毒感染，如HIV、HBV、HCV、HSV1、CMV、LCMV或EBV。需要治療之個體(subject)、患者或「個體(individual)」通常為哺乳動物，更特定言之，人類。

在另一態樣中，本發明提供如前文所定義的包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM-3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體的用途，其用於製造或製備供治療有需要之個體之疾病用的藥物。在一個實施例中，藥物係用於治療疾病之方法，該方法包含向患有疾病之個體投與治療有效量之藥物。

在某些態樣中，待治療之疾病為增生性病征，尤其癌症。癌症之實

例包括膀胱癌、腦癌、頭頸癌、胰臟癌、肺癌、乳癌、卵巢癌、子宮癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、食道癌、結腸癌、結腸直腸癌、直腸癌、胃癌、前列腺癌、血液癌、皮膚癌、鱗狀細胞癌、骨癌及腎臟癌。可使用根據本發明的包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM-3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體治療的其他細胞增殖病症包括(但不限於)位於腹部、骨骼、乳房、消化系統、肝臟、胰臟、腹膜、內分泌腺(腎上腺、副甲狀腺、垂體、睪丸、卵巢、胸腺、甲狀腺)、眼睛、頭頸部、神經系統(中樞及周圍)、淋巴系統、骨盆、皮膚、軟組織、脾臟、胸部及泌尿生殖器系統中的贅瘤。亦包括癌前病狀或病變及癌症轉移。在某些態樣中，癌症係選自由以下各者組成之群：腎細胞癌、皮膚癌、肺癌、結腸直腸癌、乳癌、腦癌、頭頸癌。在其他態樣中，癌症係選自癌瘤、淋巴瘤(例如霍奇金氏及非霍奇金氏淋巴瘤)、母細胞瘤、肉瘤及白血病。在另一態樣中，待治療之癌症係選自鱗狀細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺鱗狀癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌、胰臟癌、神經膠質瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝瘤、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜或子宮癌、唾液腺癌、腎癌、肝癌、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、肝癌、白血病及其他淋巴增生病症及各種類型頭頸癌。

在另一態樣中，待治療之疾病為慢性病毒感染。術語「慢性病毒感染」係指罹患或感染慢性病毒之個體。慢性病毒感染之實例為人類免疫缺乏病毒(HIV)、B型肝炎病毒感染(HBV)、C型肝炎病毒感染(HCV)、1型單純疱疹病毒(HSV1)、巨細胞病毒(CMV)、淋巴細胞性脈絡叢腦膜炎病毒(LCMV)或艾伯斯坦-巴爾病毒(Epstein-Barr virus, EBV)。

熟練技術人員容易認識到在多數情況下雙特異性分子可能不會提供

治癒，而僅僅可能提供部分益處。在一些實施例中，具有一些益處之生理學變化亦視為治療上有益的。因此，在一些實施例中，雙特異性抗體提供生理改變之量視為「有效量」或「治療有效量」。

在另一態樣中，本發明提供一種用於治療個體之疾病的方法，其包含向該個體投與治療有效量的本發明之包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM-3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體。在一個實施例中，呈醫藥學上可接受之形式的包含本發明之雙特異性抗體的組合物投與該個體。在某些實施例中，待治療之疾病為增生性病變。在一個特定實施例中，該疾病為癌症。在某些實施例中，該方法進一步包含向個體投與治療有效量之至少一種其他治療劑，例如抗癌劑(若待治療之疾病為癌症)。在另一態樣中，疾病為慢性病毒感染。根據任一上述實施例之「個體」可為哺乳動物，較佳為人類。

為預防或治療疾病，本發明的包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM-3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體之適當劑量(當單獨或與一或多種其他額外治療劑組合使用時)將視待治療之疾病的類型、投藥途徑、患者體重、融合蛋白類型、疾病之嚴重程度及過程、雙特異性抗體出於預防還是治療目的投與、先前或同時進行之治療介入、患者之臨床病史及對融合蛋白之反應以及主治醫師之判斷而定。無論如何，負責投藥之行醫者均將確定組合物中活性成分之濃度及適用於單獨個體的劑量。本文中涵蓋各種給藥時程，包括(但不限於)單次投與或經各個時間點多次投與、快速投與以及脈衝式輸注。

如本文所定義的包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM-3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體一次性或經一系列治療

適當投與患者。視疾病之類型及嚴重程度而定，約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至15 mg/kg (例如0.1 mg/kg -10 mg/kg)雙特異性抗體可為投與患者之初始候選劑量，無論一或多次分開投與，還是連續輸液。一種典型日劑量可在約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至100 mg/kg 或更大之範圍內，視上文所提及之因素而定。對於歷經數日或更長時間之重複投與，治療一般將視病狀而定持續至發生疾病症狀之所需抑制為止。雙特異性抗體之一個示例性劑量將在約0.005 mg/kg 至約10 mg/kg 範圍內。在其他實例中，劑量亦可包含每次投藥約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 體重、約5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 體重、約10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 體重、約50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 體重、約100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 體重、約200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 體重、約350 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 體重、約500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 體重、約1 mg/kg 體重、約5 mg/kg 體重、約10 mg/kg 體重、約50 mg/kg 體重、約100 mg/kg 體重、約200 mg/kg 體重、約350 mg/kg 體重、約500 mg/kg 體重至約1000 mg/kg 體重或更多，及其中可衍生之任何範圍。在來自本文中列舉之數值之可衍生範圍之實例中，基於上述數值，可投與約5 mg/kg 體重至約100 mg/kg 體重、約5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 體重至約500 mg/kg 體重等之範圍。因此，可向患者投與約0.5 mg/kg 、2.0 mg/kg 、5.0 mg/kg 或10 mg/kg (或其任何組合)之一或多種劑量。此類劑量可間歇地投與，例如每週或每三週(例如以使得患者接收約二至約二十或例如約六劑之融合蛋白)。可投與初始較高起始劑量，隨後可投與一或多個較低劑量。然而，其他給藥方案可為適用的。此療法之進展易於藉由習知技術及分析監測。

如本文所定義的包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM-3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體一般將以有效實現預期目的之量使用。為用於治療或預防疾病病狀，本發明之雙特異性抗體或其醫藥組合物以治療有效量投與或施加。治療有效量之確定完全在熟習此項

技術者之能力範圍內，尤其根據本文所提供之詳細揭示內容。

關於全身性投藥，可首先自活體外分析(諸如細胞培養分析)估算治療有效劑量。接著可在動物模型中調配劑量以實現循環濃度範圍，包括如在細胞培養物中測定的 IC_{50} 。此類資訊可用於更準確地確定適用於人類之劑量。

初始劑量亦可自活體內資料(例如動物模型)、使用此項技術中熟知之技術估算。一般技術者容易基於動物資料最佳化人類投藥。

劑量及時間間隔可個別地調整以提供雙特異性抗體足夠維持治療作用之血漿含量。常見患者注射投藥之劑量範圍為約0.1至50毫克/公斤/天，通常為約0.5至1毫克/公斤/天。治療有效之血漿含量可藉由每日投與多劑來達成。血漿含量可藉由例如HPLC量測。

在局部投與或選擇性吸收之情況下，雙特異性抗體之有效局部濃度可不與血漿濃度相關。熟習此項技術者無需過度實驗即可最佳化治療有效局部劑量。

本文所述之雙特異性抗體的治療有效劑量一般將提供治療益處而不引起實質毒性。可在細胞培養物或實驗動物中藉由標準醫學程序測定融合蛋白質之毒性及治療功效。可使用細胞培養分析及動物研究來確定 LD_{50} (50%群體致死劑量)及 ED_{50} (50%群體治療有效劑量)。毒性作用與治療作用之間的劑量比為治療指數，其可表示為比率 LD_{50}/ED_{50} 。展現大治療指數之雙特異性抗體為較佳。在一個實施例中，根據本發明之雙特異性抗體展現高治療指數。自細胞培養分析及動物研究獲得之資料可用於調配適用於人類之劑量範圍。該劑量較佳在循環濃度範圍內，包括毒性極小或無毒性的 ED_{50} 。該劑量可視各種因素而在此範圍內變化，該等因素為例如所

採用之劑型、所採用之投藥途徑、個體之病狀及其類似因素。確切調配物、投藥途徑及劑量可由個別醫師考慮患者之病狀選擇(參見例如Fingl等人, 1975, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 第1章, 第1頁, 以全文引用之方式併入本文中)。

用本發明之雙特異性抗體治療之患者的主治醫師將知曉如何及何時因毒性、器官功能異常及其類似物而終止、中斷或調整投藥。相反, 主治醫師亦知曉若臨床反應不充足(排除毒性), 則將治療調節至較高水準。管理所關注病症時所投與劑量之量值將因待治療之病狀之嚴重程度及投與途徑及其類似因素而不同。病狀之嚴重程度可例如部分地藉由標準預後評估方法來評估。另外, 劑量及可能的給藥頻率亦將根據個別患者之年齡、體重及反應而變。

其他藥劑及治療

如上文所述的包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM-3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體可與一或多種其他藥劑在療法中組合投與。舉例而言, 本發明之融合蛋白可與至少一種其他治療劑共同投與。術語「治療劑」涵蓋可投與用於治療需要此類治療之個體之症狀或疾病的任何藥劑。此類其他治療劑可包含適於治療特定適應症的任何活性成分, 較佳為具有互補活性、彼此間無不利影響的彼等活性成分。在某些實施例中, 其他治療劑為另一種抗癌劑。

此類其他藥劑宜以可有效達成預定目的之量組合存在。此類其他藥劑之有效量視所使用之融合蛋白之量、病症或治療之類型及如上文所論述之其他因素而定。含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子通常以相同劑量及藉由如本文所述之投藥途徑使用, 或本文所述之劑量之約1%至

99%，或以任何劑量及藉由憑經驗/臨床上確定適合之任何途徑。

上述此類組合療法涵蓋組合投藥(其中兩種或兩種以上治療劑包括在同一或分開調配物中)及分開投藥，在此情況下，雙特異性抗體之投與可在投與其他治療劑及/或佐劑之前、同時及/或之後進行。

H. 製品

在本發明之另一態樣中，提供含有可用於治療、預防及/或診斷上述病症之製品。製品包含容器及容器上或與容器相聯之標籤或藥品說明書。適合容器包括例如瓶子、小瓶、注射器、IV溶液袋等。容器可由各種材料形成，諸如玻璃或塑膠。容器容納單獨或與有效治療、預防及/或診斷病狀之另一組合物組合之組合物，且可具有無菌接管口(例如容器可為具有可由皮下注射針刺穿之塞子的靜脈內溶液袋或小瓶)。組合物中之至少一種活性劑為如本文所定義的包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM-3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體。

標籤或藥品說明書指示組合物用於治療所選病狀。此外，製品可包含(a)其中含有組合物之第一容器，其中該組合物包含本發明之雙特異性抗體；及(b)其中含有組合物之第二容器，其中該組合物包含另一細胞毒性劑或另外的治療劑。本發明之此實施例中之製品可進一步包含指示組合物可用於治療特定病狀之藥品說明書。

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

表C (序列)：

SEQ ID NO:	名稱	序列
1	重鏈HVR-H1, Tim3_0016	GFSLSTSGM
2	重鏈HVR-H2, Tim3_0016	LND
3	重鏈HVR-H3, Tim3_0016	NGYLYALD
4	輕鏈HVR-L1, Tim3_0016	SSSVNY
5	輕鏈HVR-L2, Tim3_0016	DAF
6	輕鏈HVR-L3, Tim3_0016	WSSYPWT
7	重鏈可變域VH, Tim3_0016	QVTLKESGPG ILQPSQTLRL TCSFSGFSL TSGMSVGVWIR QPSGKGLEWL AHIWLNDDVF FNPALKSRLT ISKDTSNNQV FLQIASVVTA DTATYYCVRA NGYLYALDYW GQGTSVTVSS
8	輕鏈可變域VL, Tim3_0016	QIVLTQSPAI MSASPGQKVT ITCASSSVN YTQWYQQKLG SSPKLWIYDA FKLAPGVPAR FSGSGTGTSY SLTISSMEAE DAASYFCHQW SSYPWTFGGG TKLEIK
9	重鏈可變域VH, Tim3_0016變異體 (0018)	QVTLKESGPG ILQPSQTL RL SL TCSFSGFSL TSGMSVGVWIR QPSGKGLEWL AHIWLNDDVF FNPALKRRRT ISKDTSNNQV FLQIASVVTA DTATYYCVRA NGYLYALDYW GQGISVTVSS
10	輕鏈可變域VL, Tim3_0016變異體 (0018)	QIVLTQSPAI MSASPGQKVT ITCASSSVN YTQWYQQKLG SSPKLWIYDA FKLAPGVPAR FSGSGTGTSY SLTISSMEAE DAASYFCHQW SSYPWTFGGG TKLEIK
11	輕鏈HVR-L1, Tim3_0016_HVR-L1 變異體1_NQ (藉由N至Q突變移除糖基化位點)	SSSVQY
12	輕鏈HVR-L1, Tim3_0016_HVR-L1 變異體2_NS	SSSVSY

	(藉由N至S突變移除糖基化位點)	
13	Tim3_0016變異體(0018)之VH人類化型式 (= Tim3-0433)	QITLKESGPT LVKPTQTLTL TCTFSGFSL TSGMSVGWIR QPPGKGLEWL AHIWLNDDVF FNPALKSRLT ITKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCVRA NGYLYALDYW GQGTLVTVSS
14	Tim3_0016變異體(0018)之VL人類化型式(= Tim3-0433)	ETTLTQSPAF MSATPGDKVN IACSASSVS YTQWYQQKPG EAPKLWIYDA FKLAPGIPPR FSGSGYGTDF TLTINNIESE DAAYYFCHQW SSYPWTFGQG TKLEIK
15	Tim3_0016變異體(0018)之VH人類化型式 (= Tim3-0434)	QITLKESGPT LVKPTQTLTL TCTFSGFSL TSGMSVGWIR QPPGKGLEWL AHIWLNDDVF FNPALKSRLT ITKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCVRA NGYLYALDYW GQGTLVTVSS
16	Tim3_0016變異體(0018)之VL人類化型式 (= Tim3-0434)	DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCSASSVS YTQWYQQKPG KAPKLWIYDA FKLAPGVPSR 60 FSGSGSGTEF TLTISSLQPE DFATYFCHQW SSYPWTFGQG TKLEIK
17	重鏈HVR-H1, Tim3_0028	GFNIKTT
18	重鏈HVR-H2, Tim3_0028	ADD
19	重鏈HVR-H3, Tim3_0028	FGYVAWFA
20	輕鏈HVR-L1, Tim3_0028	SQSVDNY
21	輕鏈HVR-L2, Tim3_0028	YAS
22	輕鏈HVR-L3, Tim3_0028	HYSSPY
23	重鏈可變域VH, Tim3_0028	EVQLQQSVAE LVRPGASVKL SCTASGFNIK TTYMHVVKQR PEQGLEWIGR IDPADDNTKY APKFQ GKATI TADTSSNTAY LQLSSLTSED AAIYYCVRDF GYVAWFAYWG QGTLVTFSA

24	輕鏈可變域VL, Tim3_0028	NIVMTPTPKF MTCRASQSVD GQSPKLLIYY RFTGSGSGTD EDLAVYFCQQ HYSSPYTFGS LPVSSGDRVT NYVAWYQQKP ASNRYIGVPD FTFTISSVQV GTKLEIK
25	Tim3-0028之VH人類化型式(= Tim3-0438)	EVQLVESGGG SCAASGFNIK PGKGLEWVGR APKFQ GKATI LQMNSLRAED GYVAWFAYWG QGTLVTVSS LVQPGGSLRL TTYMHWVRQA IDPADDNTKY SADTSKNTAY TAVYYCVRDF
26	Tim3-0028之VL人類化型式(= Tim3-0438)	DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRASQSVD NYVAWYLQKP ASNRYIGVPD FTLKISRVEA HYSSPYTFGQ GTKVEIK GQSPQLLIYY RFSGSGSGTD EDVGVYYCQQ
27	Tim3-0028之VH人類化型式(= Tim3-0443)	EVQLVESGGG SCAASGFNIK PGKGLEWVGR APKFQ GKATI LQMNSLRAED GYVAWFAYWG QGTLVTFSS LVQPGGSLRL TTYMHWVRQA IDPADDNTKY SADTSKNTAY TAVYYCVRDF
28	Tim3-0028之VL人類化型式(= Tim3-0443)	DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRASQSVD NYVAWYLQKP ASNRYIGVPD FTLKISRVEA HYSSPYTFGQ GTKVEIK GQSPQLLIYY RFSGSGSGTD EDVGVYYCQQ
29	重鏈HVR-H1, Tim3_0038	GFNIKDY
30	重鏈HVR-H2, Tim3_0038	EDG
31	重鏈HVR-H3, Tim3_0038	HGYVGWFA
32	輕鏈HVR-L1, Tim3_0038	ASENVDTY
33	輕鏈HVR-L2, Tim3_0038	GAS
34	輕鏈HVR-L3, Tim3_0038	SYSYPW
35	重鏈可變域VH, Tim3_0038	EVQLQQSGAE TCTTSGFNK PLKPGASVKL DYYIHWVKQR

		SDQGLEWIGR APKFQDKATI LQLNSLTSED GYVGWFAYWG QGTLVTVSA	IDPEDGELIY TVDTSSNIAY TAVYYCSRDH
36	輕鏈可變域VL，Tim3_0038	NVVMTQSPKS LNCKASENVD EQSPKLLIYG RFTGSRSATD EDLAVYYCGQ SYSYPWTFGG GTKLEFR	MIMSVGQRVT TYVSWYQQKP ASNRYTGVPD FTLISSVQA
37	重鏈HVR-H1，PD1-0103	GFSFSSY	
38	重鏈HVR-H2，PD1-0103	GGR	
39	重鏈HVR-H3，PD1-0103	TGRVYFALD	
40	輕鏈HVR-L1，PD1-0103	SESVDTSDNSF	
41	輕鏈HVR-L2，PD1-0103	RSS	
42	輕鏈HVR-L3，PD1-0103	NYDVPW	
43	重鏈可變域VH，PD1-0103	EVILVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFSFS SYTMSWVRQTPEKRLDWVATISGGGRDI YYPDSVKGRFTISRDNANTLYLEMSSLM SEDTALYYCVLLTGRVYFALDSWGQTSV TVSS	
44	輕鏈可變域VL，PD1-0103	KIVLTQSPASLPVSLGQRATISCRASESVDT SDNSFIHWYQQRPGQSPKLLIYRSSTLESG VPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDVATYY CQQNYDVPWTFGGGTKLEIK	
45	PD1-0103_01之人類化變異體-重鏈可變域VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRD IYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVTVSS	
46	PD1-0103_01之人類化變異體-輕鏈可變域VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVD TSDNSFIHWYQQKPGQSPKLLIYRSSTLES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVY YCQQNYDVPWTFGQGTKVEIK	
47	PD1-0103_02之人類化變異體-輕鏈可變域VL	DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRASESVD TSDNSFIHWYQQRPGQSPRLIYRSSTLES	

		GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIK
48	PD1-0103_03之人類化變異體-輕鏈可變域VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDT SDNSFIHWYQQKPGQSPRLLIYRSSTLESG IPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC QQNYDVPWTFGQGTKVEIK
49	PD1-0103_04之人類化變異體-輕鏈可變域VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDT SDNSFIHWYQQKPGQSPRLLIYRSSTLESG IPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC QQNYDVPWTFGQGTKVEIK
50	1+1 PD1TIM3_0389 (基於嵌合PD1-0103/Tim3-0028)之重鏈1	KIVLTQSPAS LPVSLGQRAT ISCRASESVD TSDNSFIHWY QQRPGQSPKL LIYRSSTLES GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVEADDVATY YCQQNYDVPW TFGGGTKLEI KSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALGAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC RDELTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLSG PGK
51	1+1 PD1TIM3_0389之重鏈2	EVQLQQSVAE LVRPGASVKL SCTASGFNIK TTYMHWVKQR PEQGLEWIGR IDPADDNTKY APKFQGKATI TADTSSNTAY LQLSSLTSED

		AAIYYCVRDF QGTLVTFSA APSSKSTSGG YFPEPVTVSW TFPAVLQSSG ICNVNHNKPSN SCDKTHTCPP SVFLFPPKPK VTCVVVDVSH VDGVEVHNAK TYRVVSVLTV YKCKVSNKAL AKGQPREPQV TKNQVSLSCA VEWESNGQPE DSDGSFFLVS QGNVFSCSVM KSLSLSPGK	GYVAWFAYWG STKGPSVFPL TAALGCLVED NSGALTSGVH LYSLSSVVTV TKVDEKVEPK CPAPEAAGGP DTLMISRTPE EDPEVKFNWY TKPREEQYNS LHQDWLNGKE GAPIEKTISK CTLPPSRDEL VKGFYPSDIA NNYKTTTPVL KLTVDKSRWQ HEALHNRFTQ
52	1+1 PD1TIM3_0389之輕鏈1	EVILVESGGG SCAASGFSFS PEKRLDWVAT PDSVKGRFTI LEMSSLMS GRVYFALDSW ASVAAPSVFI GTASVVCLLN WKVDNALQSG SKDSTYSLSS KHKVYACEVT	LVKPGGSLKL SYTMSWVRQT ISGGGRDIYY SRDNAKNTLY TALYYCVLLT GQGTSVTVSS FPPSDEQLKS NFYPREAKVQ NSQESVTEQD TLTLSKADYE HQGLSSPVTK SFNRGEC
53	1+1 PD1TIM3_0389之輕鏈2	NIVMTPTPKF MTCRASQSVD GQSPKLLIYY RFTGSGSGTD EDLAVYFCQQ GTKLEIKRTV	LPVSSGDRVT NYVAWYQQKP ASNRYIGVPD FTFTISSVQV HYSSPYTFGS AAPSVFIFPP SDRKLKSGTA

		SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
54	1+1 PD1TIM3_0168 (基於嵌合PD1-0103/Tim3-0018)之重鏈1	KIVLTQSPAS LPVSLGQRAT ISCRASESVD TSDNSFIHWY QQRPGQSPKL LIYRSSTLES GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVEADDVATY YCQQNYDVPW TFGGGTKLEI KSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALGAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC RDELTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK
55	1+1 PD1TIM3_0168之重鏈2	QVTLKESGPG ILQPSQTL ^S L TCSFSGF ^S LS TSGMSVGWIR QPSGKGLEWL AHIWLND ^D VF FNPALKRRLT ISKDTSNNQV FLQIASV ^V TA DTATYYCVRA NGYLYALDYW GQGISVT ^V SS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVE DYFPEPV ^T VS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSV ^V T VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDEKVEP

		KSCDKTHTCP PSVFLFPPKP EVTCVVVDVS YVDGVEVHNA STYRVVSVLT EYKCKVSNKA KAKGQPREPQ LTKNQVSLSC AVEWESNGQP LDSGDGFFLV QQGNVFSCSV QKSLSLSPGK	PCPAPEAAGG KDTLMIS RTP HEDPEVKFNW KTKPREEQYN VLHQDWLNGK LGAPIEKTIS VCTLPPSRDE AVKGFYPSDI ENNYKTTTPV SKLTVDKSRW MHEALHNRFT
56	1+1 PD1TIM3_0168之輕鏈1	EVILVESGGG SCAASGFSFS PEKRLDWVAT PDSVKGRFTI LEMSSLMSSED GRVYFALDSW ASVAAPSVFI GTASVVCLLN NFYPREAKVQ NSQESVTEQD TLTLKADYE HQGLSSPVTK SFNRGEC	LVKPGGSLKL SYTMSWVRQT ISGGGRDIYY SRDNAKNTLY TALYYCVLLT GQGTSVTVSS FPPSDEQLKS WKVDNALQSG SKDSTYSLSS KHKVYACEVT
57	1+1 PD1TIM3_0168之輕鏈2	QIVLTQSPAI MSASPGQKVT YTQWYQQLG FKLAPGVPAR SLTISSMEAE SSYPWTFGGG TKLEIKRTVA DRKLKSGTAS REAKVQWKVD SVTEQDSKDS SKADYKHKV SSPVTKSFNR GEC	ITCSASSSVN SSPKLWIYDA FSGSGTGTSY DAASYFCHQW APSVFIFPPS VVCLLNNFYP NALQSGNSQE TYSLSSTLTL YACEVTHQGL
58	1+1 PD1TIM3_0166之重鏈1：(基於	KIVLTQSPAS LPVSLGQRAT ISCRASESVD	

	嵌合PD1-0103/Tim3-0038	TSDNSFIHWY QQRPGQSPKL LIYRSSTLES GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVEADDVATY YCQQNYDVPW TFGGGTKLEI KSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCAPEA AGGPSVFLP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALGAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC RDELTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK
59	1+1 PD1TIM3_0166之重鏈2	EVQLQQSGAE PLKPGASVKL TCTTSGFNIK DYYIHWVKQR SDQGLEWIGR IDPEDGELIY APKFQDKATI TVDTSNLIAY LQLNSLTSED TAVYYCSRDH GYVGFAYWG QGTLVTVSAA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVED YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFAVLQSSG LYSLSSVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDEKVEPK SCDKTHTCPP CPAEAAGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS

		TYRVVSVLTV YKCKVSNKAL AKGQPREPQV TKNQVSLSCA VEWESNGQPE DSDGSFFLVS QGNVFSCSVM KSLSLSPGK	LHQDWLNGKE GAPIEKTISK CTLPPSRDEL VKGFYPSDIA NNYKTPPVV KLTVDKSRWQ HEALHNRFTQ
60	1+1 PD1TIM3_0166之輕鏈1	EVILVESGGG SCAASGFSFS PEKRLDWVAT PDSVKGRFTI LEMSSLMSSED GRVYFALDSW ASVAAPSVFI GTASVVCLLN WKVDNALQSG SKDSTYSLSS KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC	LVKPGGSLKL SYTMSWVRQT ISGGGRDIYY SRDNAKNTLY TALYYCVLLT GQGTSVTVSS FPPSDEQLKS NFYPREAKVQ NSQESVTEQD TLTLKADYE
61	1+1 PD1TIM3_0166之輕鏈2	NVVMTQSPKS LNCKASENVD EQSPKLLIYG RFTGSRSATD EDLAVYYCGQ GTKLEFRRTV AAPSVFIFPP SDRKCLKSGTA SVVCLLNNFY DNALQSGNSQ STYSLSSTLT VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEN	MIMSVGQRVT TYVSWYQQKP ASNRYTGVPD FTLTISSVQA SYSYPWTFGG PREAKVQWKV ESVTEQDSKD LSKADYEKHK
62	1+1 PD1TIM3_0476之重鏈1：(基於人類化 PD1-0103_0312/Tim3-0438)	DIVMTQSPDS INCKASESVD QQKPGQSPKL GVPDRFSGSG SLQAEDVAVY TFGQGTKVEI	LAVSLGERAT TSDNSFIHWY LIYRSSTLES SGTDFTLTIS YCQQNYDVPW KSSASTKGPS

		VFPLAPSSKS	TSGGTAALGC
		LVKDYFPEPV	TVSWNSGALT
		SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG	
		TQTYICNVNH	KPSNTKVDKK
		VEPKSCDKTH	TCPPCPAPEA
		AGGPSVFLFP	PKPKDTLMIS
		RTPEVTCVVV	DVSHEDPEVK
		FNWYVDGVEV	HNAKTKPREE
		QYNSTYRVVS	VLTVLHQDWL
		NGKEYKCKVS	NKALGAPIEK
		TISKAKGQPR	EPQVYTLPPC
		RDELTKNQVS	LWCLVKGFYP
		SDIAVEWESN	GQPENNYKTT
		PPVLDSGGSF	FLYSKLTVDK
		SRWQQGNVFS	CSVMHEALHN
		HYTQKSLSLS PGK	
63	1+1 PD1TIM3_0476之重鏈2	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL
		SCAASGFNIK	TTYMHWVRQA
		PGKGLEWVGR	IDPADDNTKY
		APKFQ GKATI	SADTSKNTAY
		LQMNSLRAED	TAVYYCVRDF
		GYVAWFAYWG	QGTLLTVSSA
		STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
		TAALGCLVED	YFPEPVTVSW
		NSGALTSGVH	TFPAVLQSSG
		LYSLSSVVTV	PSSSLGTQTY
		ICNVNHKPSN	TKVDEKVEPK
		SCDKTHTCPP	CPAPEAAGGP
		SVFLFPPKPK	DTLMISRTPE
		VTCVVVDVSH	EDPEVKFNWY
		VDGVEVHNAK	TKPREEQYNS
		TYRVVSVLTV	LHQDWLNGKE
		YKCKVSNKAL	GAPIEK TISK
		AKGQPREPQV	CTLPPSRDEL
		TKNQVSLSCA	VKGFYPSDIA

		VEWESNGQPE DSDGSFFLVS QGNVFSCSVM KSLSLSPGK	NNYKTTTPVL KLTVDKSRWQ HEALHNHYTQ
64	1+1 PD1TIM3_0476之輕鏈1	EVQLLESGGG SCAASGFSFS PGKGLEWVAT PDSVKGRFTI LQMNSLRAED GRVYFALDSW ASVAAPSVFI GTASVVCLLN WKVDNALQSG SKDSTYSLSS KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC	LVQPGGSLRL SYTMSWVRQA ISGGGRDIYY SRDNSKNTLY TAVYYCVLLT GQGTLVTVSS FPPSDEQLKS NFYPREAKVQ NSQESVTEQD TLTLKADYE
65	1+1 PD1TIM3_0476之輕鏈2	DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRASQSVD NYVAWYLQKP ASNRYIGVPD FTLKISRVEA HYSSPYTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDRKLKSGTA PREAKVQWKV ESVTEQDSKD LSKADYEKHK LSSPVTKSFN RGEC	GQSPQLLIYY RFSGSGSGTD EDVGVYYCQQ AAPSVEIFPP SVVCLLNNFY DNALQSGNSQ STYLSSTLT VYACEVTHQG
66	1+1 PD1TIM3_0477之重鏈1：(基於人類化 PD1-0103_0312/Tim3-0434)	DIVMTQSPDS INCKASESVD QQKPGQSPKL GVPDRFSGSG SLQAEDVAVY TFGQGTKVEI VFPLAPSSKS LVKDYPPEPV SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH	LAVSLGERAT TSDNSFIHWY LIYRSSTLES SGTDFTLTIS YCQQNYDVPW KSSASTKGPS TSGGTAALGC TVSWNSGALT KPSNTKVDKK

		VEPKSCDKTH	TCPPEAPEA
		AGGPSVFLFP	PKPKDTLMIS
		RTPEVTCVVV	DVSHEDPEVK
		FNWYVDGVEV	HNAKTKPREE
		QYNSTYRVVS	
		VLTVLHQDWL	NGKEYKCKVS
		NKALGAPIEK	TISKAKGQPR
		EPQVYTLPPC	RDELTKNQVS
		LWCLVKGFYP	SDIAVEWESN
		GQPENNYKTT	PPVLDSGGSF
		FLYSKLTVDK	SRWQQGNVFS
		CSVMHEALHN	HYTQKSLSLS PGK
67	1+1 PD1TIM3_0477之重鏈2	QITLKESGPT	LVKPTQTLTL TCTFSGFSLS
		TSGMSVGWIR	QPPGKGLEWL
		AHIWLNDDEV	FNPALKSRLT
		ITKDTSKNQV	VLTMTNMDPV
		DTATYYCVRA	NGYLYALDYW
		GQGTLVTVSS	ASTKGPSVFP
		LAPSSKSTSG	GTAALGCLVE
		DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV
		HTFPAVLQSS	GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
		YICNVNHKPS	NTKVDEKVEP
		KSCDKTHTCP	PCPAPEAAGG
		PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP
		EVTCVVVDVS	HEDPEVKFNW
		YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN
		STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK
		EYKCKVSNKA	LGAPIEKTIS
		KAKGQPREPQ	VCTLPPSRDE
		LTKNQVSLSC	AVKGFYPSDI
		AVEWESNGQP	ENNYKTTTPPV
		LDSGGSFFLV	SKLTVDKSRW
		QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT
		QKSLSLSPGK	
68	1+1 PD1TIM3_0477之輕鏈1	EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL

		SCAASGFSFS	SYTMSWVRQA
		PGKGLEWVAT	ISGGGRDIYY
		PDSVKGRFTI	SRDNSKNTLY
		LQMNSLRAED	TAVYYCVLLT
		GRVYFALDSW	GQGTLVTVSS
		ASVAAPSVFI	FPPSDEQLKS
		GTASVVCLLN	NFYPPREKAVQ
		WKVDNALQSG	NSQESVTEQD
		SKDSTYSLSS	TLTLKADYE
		KHKVYACEVT	HQGLSSPVTK SFNRGEC
69	1+1 PD1TIM3_0477之輕鏈2	DIQLTQSPSF	LSASVGDRVT
		ITCSASSSVS	YTQWYQQKPG
		KAPKLWYDA	FKLAPGVPSR
		FSGSGSGTEF	TLTISSLQPE
		DFATYFCHQW	SSYPWTFGGQ
		TKLEIKRTVA	APSVFIFPPS
		DRKLKSGTAS	VVCLLNNFYF
		REAKVQWKVD	NALQSGNSQE
		SVTEQDSKDS	TYSLSSTLTL
		SKADYKHKV	YACEVTHQGL
		SSPVTKSFNR	GEC
70	2+2 PD1TIM3_0358 之重鏈：嵌合 PD1-0103/Tim3-0028	EVQLQSSVAE	LVRPGASVKL
		SCTASGFNIK	TTYMHVVKQR
		PEQGLEWIGR	IDPADDNTKY
		APKFQGKATI	TADTSSNTAY
		LQLSSLTSED	AAIYYCVRDF
		GYVAWFAYWG	QGTLVTFSA
		STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
		TAALGCLVED	YFPEPVTVSW
		NSGALTSGVH	TFPAVLQSSG
		LYSLSSVTV	PSSSLGTQTY
		ICNVNHKPSN	TKVDEKVEPK
		SCDKTHTCPP	CPAPEAAGGP
		SVFLFPPKPK	DTLMISRTPE
		VTCVVVDVSH	EDPEVKFNWY
		VDGVEVHNAK	TKPREEQYNS
		TYRVVSVLTV	LHQDWLNGKE
		YKCKVSNKAL	GAPIEKTISK

		AKGQPREPQV TKNQVSLTCL VEWESNGQPE DSDGSFFLYS QGNVFSCSVM KSLSLSPGGG GGSGGGGSKI VLTQSPASLP VSLGQRATIS CRASESVDTS RPGQSPKLLI YRSSTLESGV PARFSGSGSR TDFTLTIDPV QQNYDVPWTF SASTKGPSVF GGTAALGCLV SWNSGALTSG SGLYSLSSVV TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCD	YTLPPSRDEL VKGFYPSDIA NNYKTPPVV KLTVDKSRWQ HEALHNHYTQ GGSGGGGSGG DNSFIHWYQQ PARFSGSGSR EADDVATYYC GGGKLEIKS PLAPSSKSTS KDYFPEPVTV VHTFPAVLQS TVPSSSLGTQ
71	2+2 PD1TIM3_0358之輕鏈1	NIVMTPTPKF MTCRASQSVD GQSPKLLIYY RFTGSGSGTD EDLAVYFCQQ GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDRKLKSGTA SVVCLLNNFY DNALQSGNSQ STYLSSTLT VYACEVTHQG	LPVSSGDRVT NYVAWYQQKP ASNRYIGVPD FTFTISSVQV HYSSPYTFGS SDRKLKSGTA PREAKVQWKV ESVTEQDSKD LSKADYEKHK
72	2+2 PD1TIM3_0358之輕鏈2	EVILVESGGG SCAASGFSFS PEKRLDWVAT PDSVKGRFTI LEMSSLMSSED GRVYFALDSW ASVAAPSVFI GTASVVCLLN WKVDNALQSG	LVKPGGSLKL SYTMSWVRQT ISGGGRDIYY SRDNAKNTLY TALYYCVLLT GQGTSVTVSS FPPSDEQLKS NFYPREAKVQ NSQESVTEQD

		SKDSTYSLSS	TLTLSKADYE
		KHKVYACEVT	HQGLSSPVTK SFNRGEC
73	2+2 PD1TIM3_0359 之重鏈：嵌合 PD1-0103/Tim3-0018	QVTLKESGPG ILQPSQTLSL	TCSFSGFSL
		TSGMSVGWIR	QPSGKGLEWL
		AHIWLNDVDF	FNPALKRRLT
		ISKDTSNNQV	FLQIASVVTA
		DTATYYCVRA	NGYLYALDYW
		GQGISVTVSS	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG
		GTAALGCLVE	DYFPEPVTVS
		WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS
		GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT
		YICNVNHKPS	NTKVDEKVEP
		KSCDKTHTCP	PCPAEAAGG
		PSVFLFPPKP	KDTLMIS RTP
		EVTCVVVDVS	HEDPEVKFNW
		YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN
		STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK
		EYKCKVSNKA	LGAPIEKTIS
		KAKGQPREPQ	VYTLPPSRDE
		LTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI
		AVEWESNGQP	ENNYKTTTPV
		LDSGDGSFFLY	SKLTVDKSRW
		QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT
		QKSLSLSPGG	GGGSGGGGSG
		GGGSGGGGSK	IVLTQSPASL
		PVSLGQRATI	SCRASESVDT
		SDNSFIHWYQ	QRPGQSPKLL
		IYRSSTLESG	VPARFSGSGS RTDFTLTIDP
		VEADDVATYY	CQQNYDVPWT
		FGGGTKLEIK	SSASTKGPSV FPLAPSSKST
		SGGTAALGCL	VKDYFPEPVT
		VSWNSGALTS	GVHTFPAVLQ
		SSGLYSLSSV	VTVPSSSLGT
		QTYICNVNHK	PSNTKVDKKV EPKSCD
74	2+2 PD1TIM3_0359 之輕鏈1	QIVLTQSPAI	MSASPGQKVT ITCASSSVN

		YTQWYQQKLG FKLAPGVPAR SLTISSMEAE SSYPWTFGGG TKLEIKRTVA DRKCLKSGTAS REAKVQWKVD SVTEQDSKDS SKADYEKHKV SSPVTKSFNR GEC	SSPKLWIYDA FSGSGTGTSY DAASYFCHQW APSVFIFPPS VVCLLNNFYF NALQSGNSQE TYSLSSTLTL YACEVTHQGL
75	2+2 PD1TIM3_0359之輕鏈2	EVILVESGGG SCAASGFSFS PEKRLDWVAT PDSVKGRFTI LEMSSLMSSED GRVYFALDSW ASVAAPSVFI GTASVVCLLN WKVDNALQSG SKDSTYSLSS KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC	LVKPGGSLKL SYTMSWVRQT ISGGGRDIYY SRDNAKNTLY TALYYCVLLT GQGTSVTVSS FPPSDEQLKS NFYPREAKVQ NSQESVTEQD TLTLSKADYE
76	2+2 PD1TIM3_0321 之重鏈：嵌合 PD1-0103/Tim3-0038	EVQLQQSGAE TCTTSGFNIK SDQGLEWIGR APKFQDKATI LQLNSLTSED GYVGWFAYWG STKGPSVFPL TAALGCLVED NSGALTSGVH LYSLSSVVTV ICNVNHNKPSN SCDKTHTCPP SVFLFPPKPK VTCVVVDVSH VDGVEVHNAK TKPREEQYNS	PLKPGASVKL DYIHWVKQR IDPEDGELIY TVDTSSNIAY TAVYYCSRDH QGTLVTVSAA APSSKSTSGG YFPEPVTVSW TFPAVLQSSG PSSSLGTQTY TKVDEKVEPK CPAPEAAGGP DTLMISRTPE EDPEVKFNWY

		TYRVVSVLTV YKCKVSNKAL AKGQPREPQV TKNQVSLTCL VEWESNGQPE DSDGSFFLYS QGNVFSCSVM KSLSLSPGGG GSGSGGGSKI VLTQSPASLP VSLGQRATIS CRASESVDTS RPGQSPKLLI YRSSTLESGV PARFSGSGSR TDFTLTIDPV QQNYDVPWTF SASTKGPSVF GGTAALGCLV SWNSGALTSG SGLYSLSSVV TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCD	LHQDWLNGKE GAPIEKTISK YTLPPSRDEL VKGFYPSDIA NNYKTTPPVV KLTVDKSRWQ HEALHNHYTQ GSGGGGGSGG DNSFIHWYQQ PARFSGSGSR EADDVATYYC GGGTKLEIKS PLAPSSKSTS KDYFPEPVTV VHTFPAVLQS TVPSSSLGTQ
77	2+2 PD1TIM3_0321之輕鏈1	NVVMTQSPKS LNCKASENVD EQSPKLLIYG RFTGSRSATD EDLAVYYCGQ GTKLEFRRTV AAPSVFIFPP SDRKLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ STYSLSSTLT VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK	MIMSVGQRVT TYVSWYQQKP ASNRYTGVPD FTLTISSVQA SYSYPWTFGG SDRKLKSGTA ESVTEQDSKD LSKADYEKHK
78	2+2 PD1TIM3_0321之輕鏈2	EVILVESGGG SCAASGFSEF PEKRLDWVAT PDSVKGRFTI LEMSSLMSSE GRVYFALDSW ASVAAPSVFI	LVKPGGSLKL SYTMSWVRQT ISGGGRDIYY SRDNAKNTLY TALYYCVLLT GQGTSVTVSS FPPSDEQLKS

		GTASVVCLLN WKVDNALQSG SKDSTYSLSS KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC	NFYPPREAKVQ NSQESVTEQD TLTLSKADYE
79	人類κ輕鏈恆定區	RTVAAPSVFI GTASVVCLLN WKVDNALQSG SKDSTYSLSS KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC	FPPSDEQLKS NFYPPREAKVQ NSQESVTEQD TLTLSKADYE
80	人類λ輕鏈恆定區	QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA GVETTTPSKQ SNNKYAASSY HRSYSCQVTH EGSTVEKTVA PTECS	WKADSSPVKA LSLTPEQWKS
81	來源於IgG1之人類重鏈恆定區	ASTKGPSVFP GTAALGCLVK WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT YICNVNHKPS KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP EVTCVVVDVS YVDGVEVHNA STYRVVSVLT EYKCKVSNKA KAKGQPREPQ LTKNQVSLTC AVEWESNGQP LDSGDGSFFLY QQGNVFSCSV QKSLSLSPGK	LAPSSKSTSG DYFPEPVTVS VPSSSLGTQT NTKVDKKVEP KDTLMISRTP HEDPEVKFNW KTKPREEQYN VLHQDWLNGK LPAPIEKTIS VYTLPPSRDE LVKGFYPSDI ENNYKTTPPV SKLTVDKSRW MHEALHNHYT
82	具有突變L234A及L235A之來源於IgG1之人類重鏈恆定區	ASTKGPSVFP GTAALGCLVK WNSGALTSGV GLYSLSSVVT	LAPSSKSTSG DYFPEPVTVS HTFPAVLQSS VPSSSLGTQT

		YICNVNHNKPS KSCDKTHTCP PSVFLFPPKP EVTCVVVDVS YVDGVEVHNA STYRVVSVLT EYKCKVSNKA KAKGQPREPQ LTKNQVSLTC AVEWESNGQP LDSGDGSFFLY QQGNVFSCSV QKSLSLSPGK	NTKVDDKKVEP PCPAPEAAGG KDTLMISRTP HEDPEVKFNW KTKPREEQYN VLHQDWLNGK LPAPIEKTIS VYTLPPSRDE LVKGFYPSDI ENNYKTTPPV SKLTVDKSRW MHEALHNHYT
83	具有突變L234A、L235A及P329G之 來源於IgG1之人類重鏈恆定區	ASTKGPSVFP GTAALGCLVK WNSGALTSGV GLYSLSSVVT YICNVNHNKPS KSCDKTHTCP PSVFLFPPKP EVTCVVVDVS YVDGVEVHNA STYRVVSVLT EYKCKVSNKA KAKGQPREPQ LTKNQVSLTC AVEWESNGQP LDSGDGSFFLY QQGNVFSCSV QKSLSLSPGK	LAPSSKSTSG DYFPEPVTVS HTFPAVLQSS VPSSSLGTQT NTKVDDKKVEP PCPAPEAAGG KDTLMISRTP HEDPEVKFNW KTKPREEQYN VLHQDWLNGK LGAPIEKTIS VYTLPPSRDE LVKGFYPSDI ENNYKTTPPV SKLTVDKSRW MHEALHNHYT
84	來源於IgG4之人類重鏈恆定區	ASTKGPSVFP STAALGCLVK WNSGALTSGV GLYSLSSVVT YTCNVDHKPS	LAPCSRSTSE DYFPEPVTVS HTFPAVLQSS VPSSSLGTKT NTKVDDKRVES

		KYGPPCPSCP FLFPPKPKDT CVVVDVSQED GVEVHNAKTK RVVSVLTVLH CKVSNKGLPS GQPREPQVYT NQVSLTCLVK WESNGQPENN DGSFFLYSRL NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK	APEFLGGPSV LMISRTPEVT PEVQFNWYVD PREEQFNSTY QDWLNGKEYK SIEKTISKAK LPPSQEEMTK GFYPSDIAVE YKTPPVLDL TVDKSRWQEG
85	示例性人類TIM3序列	SEVEYRAEVG PAAPGNLVPV ECGNVVLRTD YWLNGDFRKG LADSGIYCCR IQIPGIMNDE KFNLKLVIKP AKVTPAPTRQ LTTRGHGPAE TQTLGSLPDI NLTQISTLAN ELRDSRLAND GIYIGAGICA LIFKWYSHSK EKIQNLSLIS LANLPPSGLA NAVAEGIRSE YEVEEPNEY Y QPLGCRFAMP	QNAYLPCFYT CWGKGACPVF ERDVNYWTSR DVSLTIENVT KFNLKLVIKP RDFTAAFPRM NLTQISTLAN LRDSGATIRI GLALALIFGA LANLPPSGLA ENIYTIENV CYVSSRQQPS
86	人類TIM3細胞外域(ECD)	SEVEYRAEVG PAAPGNLVPV ECGNVVLRTD YWLNGDFRKG LADSGIYCCR IQIPGIMNDE KFNLKLVIKP AKVTPAPTRQ LTTRGHGPAE TQTLGSLPDI NLTQISTLAN ELRDSRLAND LRDSGATIRI G	QNAYLPCFYT CWGKGACPVF ERDVNYWTSR DVSLTIENVT KFNLKLVIKP RDFTAAFPRM NLTQISTLAN LRDSGATIRI
87	示例性人類PD1序列	PGWFLDSPDR LLVVTEGDNA ESFVLNWYRM	PWNPPTFSPA TFTCSFSNTS SPSNQTDKLA

		AFPEDRSQPG PNGRDFHMSV YLCGAISLAP ELRVTERRAE RPAGQFQTLV LVLLVWVLAV GARRTGQPLK VDYGELDFQW CVPEQTEYAT SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL	QDCRFRTVL VRARRNDSGT KAQIKESLRA VPTAHPSPSP VGVVGGLLGS ICSRAARGTI EDPSAVPVFS REKTPEPPVP IVFPSGMGTS
88	人類PD1細胞外域(ECD)	PGWFLDSPDR LLVVTEGDNA ESFVLNWYRM AFPEDRSQPG PNGRDFHMSV YLCGAISLAP ELRVTERRAE RPAGQFQTLV	PWNPPTFSPA TFTCSFSNTS SPSNQTDKLA QDCRFRTVL VRARRNDSGT KAQIKESLRA VPTAHPSPSP
89	包括信號肽之人類PD1細胞外域(ECD)	MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSP DRPWNPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSN TSEFVLNWYRMSPSNQTDKLA AFPEDRS QPGQDCRFRTVL PNGRDFHMSV VRARR NDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVT ERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVGVV GGLLGSLLVWVLAVICSRAARGTIGAR RTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWRE KTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSP ARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL	
90	GGGGS間隔子	GGGGS	
91	SNAP-標籤	DKDCEMKRTTLDSP LGKLELSGCEQGLH EIKLLGKGTSAADAVEVPAPAAVLGGPEPL MQATAWLNAYFHQPEAIEFFVPALHHPV FQQESFTRQVLWLLKVVKFGEVISYQQL AALAGNPAATAAVKTALSGNPVPIIPCHR VVSSSGAVGGYEGGLAVKEWLLAHEGHR	

		LGKPGLGPAGGSPGLEVN
92	Flag-標籤	DYKDDDDK
93	包括信號肽之人類TIM3細胞外域(ECD)	MFSHLPFDCVLLLLLLLLLRSSEVEYRAEV GQNAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWGKGAC PVFECGNVLRTERDVNYWTSRYWLN GDFRKGDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQP GIMNDEKFNKLVKPAKVTPAPTRQRDFT AAFPRMLTTRGHGPAETQTLGSLPDINLTQ ISTLANELRDSRLANDLRDSGATIRIGIYIG AGICAGLALALIFGALIFKWYSHSKEKIQN LSLISLANLPPSGLANAVAEGIRSEENIYTIE ENVYVEVEEPNEYCYVSSRQQPSQPLGCR FAM
94	Clip-標籤	DKDCMKRTTLDSPGKLELSGCEQGLH RIIFLGKGTSAADAVEVPAPAAVLGGPEPLI QATAWLNAYFHQPEAJEEFPVPALHHPVF QQESFTRQVLWKLLKVVKFGEVISESHLA ALVGNPAATAAVNTALDGNPVPILIPCHRV VQGSDVGPYLGGLAVKEWLLAHEGHR LGKPGLG

在下文中，列出本發明之特定實施例：

1. 一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中

該特異性結合於PD1之第一抗原結合位點包含

包含以下之VH域：

(i)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的HVR-H1，

(ii)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的HVR-H2，及

(iii)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的HVR-H3；以及

包含以下之VL域：

(i)包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列的HVR-L1；

(ii)包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的HVR-L2，及
(iii)包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的HVR-L3；且
該特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點包含

(a)包含以下之VH域：

(i)包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列的HVR-H1，

(ii)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列的HVR-H2，及

(iii)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列的HVR-H3；以及

包含以下之VL域：

(i)包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12之胺基酸序列的HVR-L1，

(ii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列的HVR-L2，及

(iii)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列的HVR-L3；或

(b)包含以下之VH域：

(i)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-H1，

(ii)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-H2，及

(iii)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的HVR-H3；以及

包含以下之VL域：

(i)包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的HVR-L1，

(ii)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的HVR-L2，及

(iii)包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的HVR-L3；或

(c)包含以下之VH域：

(i)包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列的HVR-H1，

(ii)包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列的HVR-H2，及

(iii)包含SEQ ID NO:31之胺基酸序列的HVR-H3；以及
包含以下之VL域：

(i)包含SEQ ID NO:32之胺基酸序列的HVR-L1，

(ii)包含SEQ ID NO:33之胺基酸序列的HVR-L2，及

(iii)包含SEQ ID NO:34之胺基酸序列的HVR-L3。

2. 一種包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，其中該雙特異性抗體以比結合於PD1低至少50倍之結合親和力、更尤其比結合於PD1低至少100倍之結合親和力結合於TIM3。

3. 如前文所定義之雙特異性抗體，其中

該特異性結合於PD1之第一抗原結合位點包含

(a)包含SEQ ID NO: 43之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 44之胺基酸序列的VL域，或

(b)包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 46之胺基酸序列的VL域，或

(c)包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 47之胺基酸序列的VL域，或

(d)包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 48之胺基酸序列的VL域，或

(e)包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 49之胺基酸序列的VL域，

且該特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點包含

(a)包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 8之

胺基酸序列的VL域，或

(b)包含SEQ ID NO: 9之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列的VL域，或

(c)包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列的VL域，或

(d)包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 16之胺基酸序列的VL域，或

(e)包含SEQ ID NO: 23之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的VL域，或

(f)包含SEQ ID NO: 25之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 26之胺基酸序列的VL域，或

(g)包含SEQ ID NO: 27之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列的VL域，或

(h)包含SEQ ID NO: 35之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 36之胺基酸序列的VL域。

4. 如前文所定義之雙特異性抗體，其中

該特異性結合於PD1之第一抗原結合位點包含有包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 46之胺基酸序列的VL域，

且該特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點包含有包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 16之胺基酸序列的VL域或包含SEQ ID NO: 25之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 26之胺基酸序列的VL域。

5. 如前文所定義之雙特異性抗體，其中

該特異性結合於PD1之第一抗原結合位點包含有包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 46之胺基酸序列的VL域，

且該特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點包含有包含SEQ ID NO: 25之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 26之胺基酸序列的VL域。

6. 如前文所定義之雙特異性抗體，其中該雙特異性抗體為人類、人類化或嵌合抗體。

7. 如前文所定義之雙特異性抗體，其中該雙特異性抗體包含Fc域、包含特異性結合於PD1之抗原結合位點的第一Fab片段及包含特異性結合於TIM3之抗原結合位點的第二Fab片段。

8. 如前文所定義之雙特異性抗體，其中該Fc域為IgG，尤其IgG1 Fc域或IgG4 Fc域。

9. 如前文所定義之雙特異性抗體，其中該Fc域包含一或多個減少與Fc受體、尤其Fc γ 受體之結合的胺基酸取代。

10. 如前文所定義之雙特異性抗體，其中該Fc域為人類IgG1子類，具有胺基酸突變L234A、L235A及P329G (根據Kabat EU指數編號)。

11. 如前文所定義之雙特異性抗體，其中該Fc域包含促進該Fc域之第一次單元與第二次單元締合的修飾。

12. 如前文所定義之雙特異性抗體，其中根據杵臼方法，該Fc域之該第一次單元包含杵且該Fc域之該第二次單元包含臼。

13. 如前文所定義之雙特異性抗體，其中該Fc域之該第一次單元包含胺基酸取代S354C及T366W (EU編號)，且該Fc域之該第二次單元包含胺基酸取代Y349C、T366S及Y407V (根據Kabat EU指數編號)。

14. 如前文所定義之雙特異性抗體，其中在Fab片段之一中，可變域VL及VH彼此置換，使得VH域為輕鏈之一部分且VL域為重鏈之一部分。

15. 如前文所定義之雙特異性抗體，其中在包含特異性結合於PD1之抗原結合位點的第一Fab片段中，可變域VL及VH彼此置換。

16. 如前文所定義之雙特異性抗體，其中在該等Fab片段之一中，在恆定域CL中，位置124之胺基酸經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)(根據Kabat EU指數編號)獨立地取代，且在恆定域CH1中，位置147及213之胺基酸經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)(根據Kabat EU指數編號)獨立地取代。

17. 如前文所定義之雙特異性抗體，其中在包含特異性結合於TIM3之抗原結合位點的第二Fab片段中，恆定域CL位置124之胺基酸經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)(根據Kabat EU指數編號)獨立地取代，且在恆定域CH1中，位置147及213之胺基酸經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)(根據Kabat EU指數編號)獨立地取代。

18. 如前文所定義之雙特異性抗體，其包含

(a)包含與SEQ ID NO: 50之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一重鏈，包含與SEQ ID NO: 52之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含與SEQ ID NO: 51之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二重鏈，及包含與SEQ ID NO: 53之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(b)包含與SEQ ID NO: 54之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一重鏈，包含與SEQ ID NO: 56之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含與SEQ ID NO: 55之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二重鏈，及包含與SEQ ID NO: 57之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(c)包含與SEQ ID NO: 58之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一重鏈，包含與SEQ ID NO: 60之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含與SEQ ID NO: 59之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二重鏈，及包含與SEQ ID NO: 61之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(d)包含與SEQ ID NO: 62之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一重鏈，包含與SEQ ID NO: 64之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含與SEQ ID NO: 63之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二重鏈，及包含與SEQ ID NO: 65之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(e)包含與SEQ ID NO: 66之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一重鏈，包含與SEQ ID NO: 68之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含與SEQ ID NO: 67之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二重鏈，及包含與SEQ ID NO: 69之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二輕鏈。

19. 如前文所定義之雙特異性抗體，其包含

(a)包含SEQ ID NO: 50之胺基酸序列的第一重鏈，包含SEQ ID NO:

52之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含SEQ ID NO: 51之胺基酸序列的第二重鏈，及包含SEQ ID NO:

53之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(b)包含SEQ ID NO: 54之胺基酸序列的第一重鏈，包含SEQ ID NO:

56之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含SEQ ID NO: 55之胺基酸序列的第二重鏈，及包含SEQ ID NO:

57之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(c)包含SEQ ID NO: 58之胺基酸序列的第一重鏈，包含SEQ ID NO:

60之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含SEQ ID NO: 59之胺基酸序列的第二重鏈，及包含SEQ ID NO:

61之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(d)包含SEQ ID NO: 62之胺基酸序列的第一重鏈，包含SEQ ID NO:

64之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含SEQ ID NO: 63之胺基酸序列的第二重鏈，及包含SEQ ID NO:

65之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(e)包含SEQ ID NO: 66之胺基酸序列的第一重鏈，包含SEQ ID NO:

68之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含SEQ ID NO: 67之胺基酸序列的第二重鏈，及包含SEQ ID NO:

69之胺基酸序列的第二輕鏈。

20. 一種聚核苷酸，其編碼如前文所定義之雙特異性抗體。

21. 一種載體、尤其表現載體，其包含如前文所定義之聚核苷酸。

22. 一種原核或真核宿主細胞，其包含如前文所定義之聚核苷酸或如前文所定義之載體。

23. 一種產生如前文所定義之雙特異性抗體的方法，其包含以下步驟：a)用包含編碼該雙特異性抗體之聚核苷酸之載體使宿主細胞轉形；b)在適合於表現該雙特異性抗體之條件下培養該宿主細胞；以及c)自培養物回收該雙特異性抗體。

24. 一種醫藥組合物，其包含如前文所定義之雙特異性抗體及至少一種醫藥學上可接受之賦形劑。

25. 如前文所定義之雙特異性抗體或如前文所定義之醫藥組合物，其係用作藥物。

26. 如前文所定義之雙特異性抗體或如前文所定義之醫藥組合物，其係用於

i)調節免疫反應，諸如恢復T細胞活性，

ii)刺激免疫反應或功能，

iii)治療感染，

iv)治療癌症，

v)延遲癌症進展，

vi)延長罹患癌症之患者的存活。

27. 如前文所定義之雙特異性抗體或如前文所定義之醫藥組合物，其係用於預防或治療癌症。

28. 如前文所定義之雙特異性抗體或如前文所定義之醫藥組合物，其係用於治療慢性病毒感染。

29. 如前文所定義之雙特異性抗體或如前文所定義之醫藥組合物，其係用於預防或治療癌症，其中該雙特異性抗體與化學治療劑、放射線及/或其他用於癌症免疫療法之藥劑組合投與。

30. 一種抑制個體中腫瘤細胞生長之方法，其包含向該個體投與有效量之如前文所定義之雙特異性抗體以抑制腫瘤細胞生長。

實例

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

材料及通用方法

關於人類免疫球蛋白輕鏈及重鏈之核苷酸序列之總體資訊在以下中給出：Kabat, E.A. 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)。抗體鏈之胺基酸係根據如上所定義之根據Kabat之編號系統編號及提及(Kabat, E.A. 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。

重組DNA技術

使用標準方法以如 Sambrook, J. 等人, Molecular Cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989中所述操控DNA。根據製造商之說明書使用分子生物試劑。

基因合成

由藉由化學合成製備之寡核苷酸製備所需基因片段。藉由單一限制核酸內切酶裂解位點側接之600-1800 bp長基因區段係藉由退火及接合寡核苷酸，包括PCR擴增來裝配，且隨後經由所指示之限制位點，例如KpnI/SacI或AscI/PacI選殖至基於pPCRScrip (Stratagene)之pGA4選殖載

體中。藉由DNA測序確認次選殖基因片段之DNA序列。根據Geneart (Regensburg, Germany)給定之說明書排序基因合成片段。

DNA序列測定

藉由在MediGenomix GmbH (Martinsried, Germany)或Sequiserve GmbH (Vaterstetten, Germany)進行之雙股測序來測定DNA序列。

DNA及蛋白質序列分析及序列數據管理

GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin)套裝軟體版本10.2及Infomax之Vector NT1 Advance套件版本8.0用於序列創建、定位、分析、註釋及圖示。

表現載體

為表現所述抗體，基於有或無CMV-內含子A啟動子之cDNA組織化或基於有CMV啟動子之基因組組織化，應用表現質體之變異體進行細胞短暫表現(例如HEK293中)。

除了抗體表現卡匣之外，載體亦含有：

- 允許在大腸桿菌中複製此質體之複製起點，及
- 在大腸桿菌中賦予安比西林抗性之 β -內醯胺酶基因。

抗體基因之轉錄單元由以下原件構成：

- 5'端之獨特限制位點
- 來自人類巨細胞病毒之即刻早期強化子及啟動子，
- 接著為在cDNA組織化之情況下之內含子A序列，
- 人類抗體基因之5'非轉譯區，
- 免疫球蛋白重鏈信號序列，
- 在免疫球蛋白外顯子-內含子組織化下作為cDNA或作為基因組組織

化之人類抗體鏈(野生型或具有結構域互換)

- 含聚腺苷酸化信號序列之3'非轉譯區，以及
- 3'端之獨特限制位點。

如下所述包含抗體鏈之融合基因藉由PCR及/或基因合成產生，且藉由已知重組方法及技術，藉由例如使用各別載體中之獨特限制位點連接相應核酸區段來裝配。藉由DNA測序檢驗次選殖核酸序列。對於短暫轉染，較大量質體藉由質體製備，自轉形之大腸桿菌培養物(Nucleobond AX, Macherey-Nagel)來製備。

細胞培養技術

使用如下所述之標準細胞培養技術：Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J.及Yamada, K.M. (編輯), John Wiley & Sons, Inc。

在黏附生長之HEK293-EBNA中或在如下所述懸浮生長之HEK29-F細胞中，藉由各別表現質體之短暫共同轉染表現多特異性抗體。

HEK293系統中短暫轉染

藉由使用Freestyle系統(ThermoFisher)短暫轉染293F細胞，來產生所有抗體及雙特異性抗體。此處，293F細胞在F17培養基中培養，經293Free (Novagene)轉染且在4小時後饋入VPA 4mM及Feed 7且在16小時後饋入0.6%葡萄糖。此外，使用Expi293F™表現系統套組(ThermoFisher)。此處，Expi293F™細胞在Expi293™表現培養基中培養且使用ExpiFectamine™293轉染套組，根據製造商之說明書轉染。由於穩定性及純度提高且在CH1/CL界面中另外引入帶電胺基酸對之**CrossMAb^{Vh-VL}**雙特異性抗體之凝聚傾向降低(進一步詳述參見各別序列中

之位置)，所以不調整質體比率。因此，針對LC、HC、雜交LC及雜交HC質體之共同轉染，1+1 CrossMab使用1:1:1:1之相對質體比率，或2+2 CrossMab使用1:1:1之相對質體比率。在7天後收穫細胞上清液且藉由標準方法來純化。

蛋白質測定

根據Pace等人, *Protein Science* 4 (1995) 2411-1423，使用基於胺基酸序列所計算之莫耳消光係數，藉由在280 nm下測定光密度(OD)來測定純化抗體及衍生物之蛋白質濃度。

上清液中抗體濃度測定

藉由用蛋白A瓊脂糖-珠粒(Roche)進行免疫沈澱，估計細胞培養物上清液中抗體及衍生物之濃度。將60 μ L蛋白A瓊脂糖珠粒在TBS-NP40 (50 mM Tris pH 7.5、150 mM NaCl、1% Nonidet-P40)中洗滌三次。隨後，將1 mL至15 mL細胞培養物上清液施加至在TBS-NP40中預平衡之蛋白A瓊脂糖珠粒。在室溫下培育1小時後，珠粒在Ultrafree-MC-過濾器管柱(Amicon)上用0.5 mL TBS-NP40洗滌一次，用0.5 mL 2x磷酸鹽緩衝生理食鹽水(2x PBS, Roche)洗滌兩次，且簡短用0.5 mL 100 mM檸檬酸鈉pH 5.0洗滌四次。藉由添加35 μ l NuPAGE® LDS樣品緩衝液(Invitrogen)來溶離結合抗體。分別地，一半樣品與NuPAGE®樣品還原劑組合或保持未還原，且在70°C下加熱10分鐘。因此，5 μ l至30 μ l施加至4%至12% NuPAGE® Bis-Tris SDS-PAGE (Invitrogen) (具有針對非還原性SDS-PAGE之MOPS緩衝液，以及具有針對還原SDS-PAGE之NuPAGE®抗氧化操作緩衝液添加劑(Invitrogen)之MES緩衝液)，且用考馬斯藍(Coomassie Blue)染色。

藉由親和力HPLC層析來定量量測細胞培養物上清液中抗體及衍生物之濃度。簡言之，將含有結合於蛋白A之抗體及衍生物的細胞培養物上清液於200 mM KH₂PO₄、100 mM檸檬酸鈉pH 7.4中施加至Applied Biosystems Poros A/20管柱，且在Agilent HPLC 1100系統上自具有200 mM NaCl、100 mM檸檬酸pH 2.5之基質溶離。藉由UV吸光度及峰值面積之積分來定量溶離之蛋白質。經純化之標準IgG1抗體充當標準品。

或者，藉由夾心-IgG-ELISA來量測細胞培養物上清液中抗體及衍生物之濃度。簡言之，StreptaWell高度結合抗生蛋白鏈菌素A-96孔微量滴定盤(Roche)用100微升/孔生物素標記之抗人類IgG捕捉分子F(ab')₂<hF γ > BI (Dianova)以0.1 μ g/mL在室溫下塗佈1小時，或者在4°C下隔夜，且隨後用200微升/孔PBS、0.05% Tween (PBST, Sigma)洗滌三次。將100微升/孔含有個別抗體之細胞培養物上清液於PBS (Sigma)中之一系列稀釋液添加至孔，且在室溫下於微量滴定盤式震盪器上培育1至2小時。用200微升/孔PBST洗滌孔三次，且以0.1 μ g/mL之100 μ l F(ab')₂<hF γ >POD (Dianova)為偵測抗體，在室溫下於微量滴定盤式震盪器上1至2小時，來偵測結合抗體。未結合之偵測抗體用200微升/孔PBST洗滌三次，且藉由添加100 μ L ABTS/孔偵測所結合之偵測抗體。在量測波長405 nm (參考波長492 nm)下在Tecan Fluor光譜儀上進行吸光度測定。

蛋白質純化

參考標準方案，自經過濾之細胞培養物上清液純化蛋白質。簡言之，將抗體施加至蛋白A瓊脂糖凝膠管柱(GE Healthcare)且用PBS洗滌。在pH 2.8下實現抗體之溶離，接著立即中和樣品。在PBS或20 mM組胺

酸、150 mM NaCl pH 6.0中藉由尺寸排阻層析(Superdex 200, GE Healthcare)自單體抗體分離聚集之蛋白質。將單體抗體溶離份彙集，用例如MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO)離心濃縮器濃縮(必要時)，冷凍且儲存在-20°C或-80°C下。提供部分樣品用於例如藉由SDS-PAGE、尺寸排阻層析(SEC)或質譜分析進行後續蛋白質分析及分析型表徵。

SDS-PAGE

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

分析型尺寸排阻層析

藉由HPLC層析進行用於測定抗體之聚集及寡聚狀態之尺寸排阻層析(SEC)。簡言之，將經蛋白A純化的抗體施加至Agilent HPLC 1100系統上300 mM NaCl、50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄，pH 7.5中之Tosoh TSKgel G3000SW管柱或Dionex HPLC系統上2x PBS中之Superdex 200管柱(GE Healthcare)。藉由UV吸光度及峰值面積之積分來定量溶離之蛋白質。BioRad Gel過濾標準151-1901用作標準品。

質譜分析

此部分描述具有VH/VL互換之多特異性抗體(VH/VL CrossMab)之表徵，其中強調其組裝正確。藉由去糖基化完整CrossMab及去糖基化/纖維蛋白溶酶消化或以替代方式去糖基化/限制LysC消化之CrossMab的電噴霧電離質譜分析(ESI-MS)來分析預期主要結構。

在1 mg/ml之蛋白質濃度下，VH/VL CrossMab在磷酸鹽或Tris緩衝

液中，在37°C下用N-糖苷酶F去糖基化17小時。纖維蛋白溶酶或限制LysC (Roche)消化用100 µg去糖基化VH/VL CrossMab在Tris緩衝液pH 8中，分別在室溫下進行120小時及在37°C下進行40分鐘。在質譜分析之前，在Sephadex G25管柱(GE Healthcare)上經由HPLC將樣品去鹽。在配備有TriVersa NanoMate源(Advion)之maXis 4G UHR-QTOF MS系統(Bruker Daltonik)上經由ESI-MS測定總質量。

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

使用 BIACORE 儀器 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Sweden)藉由表面電漿子共振來研究所產生之抗體與各別抗原之結合。簡言之，對於親和力量測，山羊抗人類IgG，JIR 109-005-098抗體經由胺偶合固定在CM5晶片上以呈現針對各別抗原之抗體。在HBS緩衝液(HBS-P)(10 mM HEPES、150 mM NaCl、0.005% Tween 20，pH 7.4)中，在25°C下(或在37°C下)量測結合。在溶液中以多種濃度添加抗原(R&D Systems或內部純化)。藉由80秒至3分鐘之抗原注射來量測結合；藉由用HBS緩衝液洗滌晶片表面3-10分鐘來量測解離且使用1:1朗格繆爾結合模型(Langmuir binding model)來評估KD值。自樣品曲線減去陰性對照資料(例如緩衝液曲線)以用於校正系統內源性基線偏移及降低雜訊信號。使用各別Biacore Evaluation軟體進行感測器圖譜之分析及親和力資料之計算。

TIM3抗體

實例1a：產生抗TIM3抗體

小鼠免疫接種

NMRI小鼠使用編碼全長人類Tim-3之質體表現載體，藉由皮內施用100 μg 載體DNA (質體15304_hTIM3-fl)，隨後電穿孔(2個1000 V/cm之方形脈衝，持續時間0.1 ms，時間間隔0.125 s；隨後4個287.5 V/cm之方形脈衝，持續時間10 ms，時間間隔0.125 s)進行基因免疫接種。小鼠在第0、14、28、42、56、70及84天接受6次連續免疫。在第36、78及92天獲取血液且製備血清，其用於藉由ELISA進行效價測定(參見下文)。選擇具有最高效價之動物在第96天藉由靜脈內注射50 μg 重組人類Tim-3人類Fc嵌合體增強免疫，且藉由融合瘤技術藉由在增強免疫之後3天使脾細胞融合至骨髓瘤細胞株來分離單株抗體。

測定血清效價(ELISA)

將人類重組Tim-3人類Fc嵌合體以0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 於PBS中100微升/孔固定於96孔NUNC Maxisorp盤上，隨後：用200微升/孔含2% Crotein C之PBS阻斷該盤；施用抗血清於含0.5% Crotein C之PBS中之連續稀釋液，一式兩份，100微升/孔；用結合HRP之山羊抗小鼠抗體(Jackson ImmunoResearch/Dianova 115-036-071；1/16000)偵測。對於所有步驟，將盤在37°C下培育1小時。在所有步驟之間，用含0.05% Tween 20之PBS洗滌培養盤3次。藉由以100微升/孔添加BM Blue POD可溶性受質(Roche)來顯現信號；且藉由添加100微升/孔1 M HCl來停止。在450 nm下，對照690 nm作為參考，讀出吸光度。效價定義為產生半最大信號的抗血清之稀釋度。

實例1b：表徵抗TIM3抗體

TIM3之ELISA

Nunc-Maxi Sorp 抗 生 蛋 白 鏈 菌 素 盤 (MicroCoat #

11974998/MC1099)藉由用25微升/孔Tim3-ECD-His-生物素(用BirA接合酶生物素標記)塗佈且在室溫下培育1小時，同時在400 rpm旋轉下震盪。在洗滌(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)之後，添加25 µl aTim3樣品或經稀釋(1:2步驟)參考抗體aTim3 F38-2E2 (Biolegend)且在室溫下培育1小時。在洗滌(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)之後，以25微升/孔添加1:9000稀釋之綿羊抗小鼠-POD (GE NA9310V)且在室溫下培育1小時，同時在400 rpm旋轉下震盪。在洗滌(用PBST緩衝液，4×90微升/孔)之後，添加25微升/孔TMB受質(Calbiochem，#CL07)且培育直至OD 1.5-2.5。接著藉由添加25微升/孔1N HCl溶液停止反應。量測在370/492 nm下進行。

ELISA結果以EC₅₀值[ng/ml]列於以下彙總表1中。

TIM3之細胞ELISA

用編碼全長人類Tim3之質體15312_hTIM3-fl_pUC_Neo穩定轉染且用G418 (質體上之新黴素抗性標記物)選擇之黏附CHO-K1細胞株以1.2×10E6個細胞/毫升之濃度接種至384孔平底盤中且生長隔夜。

次日，添加25微升/孔Tim3樣品或無疊氮化物之aTim3參考抗體F38-2E2 (Biolegend，354004)且在4℃下培育2小時(以避免內化)。在洗滌(3×90微升/孔PBST (BIOTEK洗滌器：Prog. 29，1×90))之後，細胞藉由倒掉剩餘緩衝液且添加50微升/孔0.05%戊二醛(用1x PBS緩衝液以1:500稀釋25%戊二醛(Sigma目錄號G5882))來固定且在室溫下培育1小時。在洗滌(3×90微升/孔PBST (BIOTEK洗滌器：Prog. 21，3×90 GreinLysin))之後，添加25微升/孔二次抗體以進行偵測(羊抗小鼠-POD；辣根POD連接之F(ab')₂片段；GE NA9310)，隨後在室溫下培育2小時，同時在400 rpm下震盪。在洗滌(3×90微升/孔PBST (BIOTEK洗滌器：Prog. 21，

3×90 GreinLysin)) 之後，添加 25 微升 / 孔 TMB 受質溶液 (Roche 11835033001) 且培育直至 OD 1.5-2.5。接著藉由添加 25 微升 / 孔 1N HCl 溶液停止反應。量測在 370/492 nm 下進行。

細胞 ELISA 結果以「EC₅₀ CHO-Tim3」值 [ng/ml] 列於以下彙總表 1 中。

表 1：示例性抗體之結合親和力(ELISA 及 BIACORE)

分析	Tim3_0018	Tim3_0021	Tim3_0028	Tim3_0026	Tim3_0033	Tim3_0038
親和力 KD [nM]						
單體/二聚體 Tim3	3.4 / 1.1	204 / 4.1	173 / 2.8	6.2 / 1.5	n.f. / 3.1	7.6 / 0.6
EC ₅₀ ELISA [nM]	0.56		0.22			0.501
EC ₅₀ ELISA [ng/ml]	94	47	37	47	1321	83
EC ₅₀ CHO-Tim3 [nM]	0.52		0.32			0.17
EC ₅₀ CHO-Tim3 [ng/ml]	87	73	53	69	3710	29

TIM3 抗體之 BIAcore 表徵

已使用基於表面電漿子共振 (SPR) 之分析確定若干鼠類 Tim3 結合劑以及市售人類 Tim3 結合參考之間的結合之動力學參數。因此，抗小鼠 IgG 藉由與 (BIAcore) CM5 感測器晶片表面之胺偶合而固定。接著捕捉樣品且使單體 hu/cy Tim3-ECD 以及 Fc 標記之人類 Tim3-ECD 二聚體與其結合。在各分析週期之後使感測器晶片表面再生。平衡常數 K_D 最終藉由將資料與 1:1 朗格繆爾相互作用模型擬合而獲得。

在 BIAcore B4000 中在 pH 5.0 下藉由使用 GE Healthcare 提供之胺偶合套組，將約 12000 個反應單元 (RU) 之 30 μg/ml 抗小鼠 IgG (GE Healthcare #BR-1008-38) 偶合至 CM5 感測器晶片之流槽 1-4 之點 1、2、4 及 5 上 (點 1、5 為活性點且點 2、4 為參考點)。

樣品及操作緩衝液為HBS-EP+ (0.01 M HEPES、0.15 M NaCl、3 mM EDTA、0.05% v/v界面活性劑P20，pH 7.4)。流槽溫度設定為25°C且樣品隔室溫度設定為12°C。系統用操作緩衝液激活。

以200 µg/ml之濃度注射樣品30秒且結合至各流槽之點1及5，從而允許平行量測八個樣品。接著在各樣品上注射一整組不同(單體獼猴、單體人類及huFc融合之二聚人類Tim3-ECD)濃度240 s，接著30/1800 s之解離時間。接著用30秒長注射甘胺酸鹽酸鹽pH 1.7使各分析週期(樣品捕捉、點1及5-Tim3 ECD注射)再生。整個操作之流速設為30微升/分鐘。

最終，用BIAcore B4000評估軟體將雙重參考資料與1:1朗格繆爾相互作用模型擬合。所得對單體人類、獼猴Tim3及huFc融合之二聚人類Tim3之親和力展示於表2a中。對hu Tim3二聚體之親和力最可能受親合力影響，且因此明顯強於對單體huTim3之親和力。

表2a：藉由經動力學SPR量測獲得之BIAcore-KD值確定之結合親和力。- n.f.意謂不可擬合，最可能歸因於無結合或結合弱。

樣品	huTim3 (25°C) [M]	huTim3Fc (25°C) [M]	cyTim3 (25°C) [M]
TIM3-0016	3.29E-09	1.09E-09	2.16E-08
TIM3-0016變異體(0018)	3.40E-09	1.11E-09	4.19E-08
TIM3-0021	2.04E-07	4.07E-09	n.f.
TIM3-0022	1.26E-07	1.52E-09	2.84E-08
TIM3-0026	6.23E-09	1.52E-09	n.f.
TIM3-0028	1.73E-07	2.77E-09	n.f.
TIM3-0030	3.11E-09	1.28E-09	n.f.
TIM3-0033	n.f.	3.05E-09	n.f.
TIM3-0038	7.56E-09	5.69E-10	n.f.
參考抗體 Biolegend F38-2E2	1.36E-08	7.50E-09	1.68E-07
參考抗體	1.34E-08	7.73E-09	1.41E-07

樣品	huTim3 K_D (25°C) [M]	huTim3Fc K_D (25°C) [M]	cyTim3 K_D (25°C) [M]
USB 11E365			

經由SPR確定對Tim3之親和力(嵌合TIM3-0016變異體(0018)及人類化型式)

蛋白A藉由與(Biacore) CM5感測器晶片之表面之胺偶合而固定。接著捕捉樣品且hu Tim3-ECD與其結合。在各分析週期之後使感測器晶片表面再生。最終藉由將資料與1:1朗格繆爾相互作用模型擬合來獲得平衡常數及動力學速率常數。

在Biacore B4000儀器中使用GE Healthcare提供之胺偶合套組使約2000個反應單元(RU)之20 $\mu\text{g/ml}$ 蛋白A偶合至CM5感測器晶片之所有流槽之點1、2、4及5上。

樣品及操作緩衝液為HBS-EP+ (0.01 M HEPES、0.15 M NaCl、3 mM EDTA、0.05% v/v界面活性劑P20, pH 7.4)。流槽溫度設定為25°C且樣品隔室溫度設定為12°C。系統用操作緩衝液激活。

注射濃度為10 nM之不同樣品30秒，且連續結合至所有流槽中之點1及5。接著，在各樣品上注射一整組單體人類Tim3-ECD稀釋液(600 nM、200 nM、66.7 nM、2×22.2 nM、7.4 nM、2.5 nM及2×0 nM) 300秒。各抗原注射之後為12s/1000s之解離時間及兩個用甘胺酸鹽酸鹽(pH 1.5)溶液進行之30s再生步驟，其中最後一個在20秒注射後含有穩定化期。

最終，用Biacore B4000評估軟體將雙重參考資料與1:1朗格繆爾相互作用模型擬合。所得 K_D 值展示於表2b中。

經由SPR確定對Tim3之親和力((嵌合TIM3-0028及人類化型式))

抗人類Fc IgG藉由與(BIAcore) CM5感測器晶片表面之胺偶合而固

定。接著捕捉樣品且hu Tim3-ECD與其結合。在各分析週期之後使感測器晶片表面再生。最終藉由將資料與1:1朗格繆爾相互作用模型擬合來獲得平衡常數及動力學速率常數。

在Biacore B4000儀器中使用GE Healthcare提供之胺偶合套組使約2500個反應單元(RU)之10 µg/ml抗人類Fc IgG (GE Healthcare #BR-1008-39)偶合至CM5感測器晶片之所有流槽之點1、2、4及5上。

樣品及操作緩衝液為HBS-EP+ (0.01 M HEPES、0.15 M NaCl、3 mM EDTA、0.05% v/v界面活性劑P20，pH 7.4)。流槽溫度設定為25°C且樣品隔室溫度設定為12°C。系統用操作緩衝液激活。

注射濃度為10 nM之不同樣品30秒，且連續結合至所有流槽中之點1及5。接著，在各樣品上注射一整組單體人類Tim3-ECD稀釋液(600 nM、200 nM、66.7 nM、2×22.2 nM、7.4 nM、2.5 nM及2×0 nM) 300秒。各抗原注射之後為12s/700s之解離時間及兩個用3 M MgCl₂溶液進行之30s再生步驟，其中最後一個含有用操作緩衝液進行「注射後額外洗滌」。

最終，用Biacore B4000評估軟體將雙重參考資料與1:1朗格繆爾相互作用模型擬合。所得K_D值展示於表2b中。

表2b：藉由經動力學SPR量測獲得之BIAcore-KD值確定之結合親和力

樣品	huTim3 K _D (25°C) [M]
嵌合TIM3-0016變異體(0018)	2.78E-09
TIM3-0433	5.74E-09
TIM3-0434	5.76E-09
嵌合TIM3-0028	2.35E-07
TIM3-0438	3.05E-07
TIM3-0443	2.87E-07

實例2：抗TIM3抗體衍生物之產生

嵌合抗體衍生物

嵌合 Tim3 抗體如下產生：經由 PCR 擴增抗 TIM3 小鼠抗體 Tim3-0016、Tim3-0016 變異體(0018)、Tim3-0021、Tim3-0022、Tim3-0026、Tim3-0028、Tim3-0030 及 Tim3-0033、Tim3-0038 之可變重鏈及輕鏈區且將其作為與具有 LALA 及 PG 突變(白胺酸 234 至丙胺酸、白胺酸 235 至丙胺酸、脯胺酸 329 至甘胺酸)從而消除效應功能之人類 IgG1 主鏈/人類 CH1-鉸鏈-CH2-CH3 之融合蛋白選殖至重鏈表現載體中，且作為與人類 C- κ 之融合蛋白選殖至輕鏈表現載體中。接著 LC 及 HC 質體共轉染至 HEK293 中且在 7 天之後藉由抗體純化之標準方法自上清液純化。

移除糖基化位點 NYT：藉由 Q 或 S 取代 N 修飾 Tim3-0016、Tim3_0016 變異體(稱為 0018 或 Tim3_0018)中之 1 HVR-L1 位置

Tim3_0016 及 Tim3_0016 變異體(0018)之可變輕鏈區內之突變係使用 Agilent 「快速變化閃電定點突變誘發套組」，根據製造商之說明書，藉由活體外突變誘發來產生。藉由此方法，輕鏈 HVR-L1 (SEQ ID NO:4) 中之糖基化位點基元 NYT 之天冬醯胺(N)經麩醯胺酸(Q)置換(產生 SEQ ID NO:11 = Tim3_0016_HVR-L1 變異體 1_NQ)，或者，天冬醯胺(N)經絲胺酸(S)置換(產生 SEQ ID NO:12 = Tim3_0016_HVR-L1 變異體 2_NS)。在兩者中，成功修飾糖基化位點基元 NYT。接著編碼變異體之 LC 及 HC 質體共轉染至 HEK293 中且在 7 天之後藉由抗體純化之標準方法自上清液純化。

藉由人類 Tim3 上之 ELISA、獼猴 Tim3 上之 ELISA 及表現全長人類 Tim3 之黏附 CHO-K1 細胞上之細胞 ELISA 測試所產生之突變體。

表 3：

測試之抗體及突變 抗體	生化人類		生化獼猴		細胞結合 CHO-TIM3	
	關於樣品	拐點	關於樣品	拐點	關於樣品	拐點

	最大值之 EC ₅₀ [ng/ml]值	[ng/ml]	最大值之 EC ₅₀ [ng/ml]值	[ng/ml]	最大值之 EC ₅₀ [ng/ml]值	[ng/ml]
抗Tim3 F38-2E2	73.2	88.3	423.0	209871.3	150.2	224.3
Tim3_0018 (TIM3-0016變異體)	15.1	15.3	14.6	14.6	26.4	29.4
Tim3_0018MutNQ	12.0	10.8	13.2	10.8	13.4	12.8
Tim3_0018MutNS	10.3	6.5	11.9	6.5	11.2	11.1
Tim3_0016MutNQ	7.6	5.7	8.3	5.7	6.3	5.4
Tim3_0016MutNS	8.5	5.5	9.7	5.5	9.1	8.5

發現所有產生之突變體均展示，分別與親本抗體Tim3_0016或Tim3_0016抗體變異體Tim3_0018相比，以甚至更具功能性之方式結合於人類TIM3 (人類)、獼猴TIM3(獼猴)或CHO細胞上之人類TIMR。

人類化抗體衍生物

鼠類抗Tim3-0016變異體(0018)及抗Tim3_0028之VH及VL域之人類化

基於a)抗Tim3抗體Tim3_0016變異體(0018)(具有6個HVR之胺基酸序列，其中在輕鏈中使用HVR-L1變異體2_NS (藉由N至S突變移除糖基化位點))之VH及VL域之胺基酸序列，產生人類化抗Tim3抗體變異體Tim3-0433及Tim3-0434，且基於b)抗Tim3抗體Tim3_0028之VH及VL域之胺基酸序列，產生人類化抗Tim3抗體變異體Tim3-0438及Tim3-0443。

重鏈及輕鏈可變區之人類化胺基酸序列回譯成DNA且合成所得cNDA (GenArt)且接著將其作為與具有LALA及PG突變(白胺酸234至丙胺酸、白胺酸235至丙胺酸、脯胺酸329至甘胺酸)從而消除效應功能之人類IgG1主鏈/人類CH1-鉸鏈-CH2-CH3之融合蛋白選殖至重鏈表現載體中，且作為與人類C-κ之融合蛋白選殖至輕鏈表現載體中。接著LC及HC質體共轉染至HEK293中且在7天之後藉由抗體純化之標準方法自上清液純化。所得人類化Tim3-抗體如下命名：

表4：人類化抗體之VH及VL序列

Tim3_0016 變異體 (0018) 之人類化抗體	VH/SEQ ID NO:	VL/SEQ ID NO:
Tim3-0433	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14
Tim3-0434	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16
Tim3_0028 之人類化抗體	VH/SEQ ID NO:	VL/SEQ ID NO:
Tim3-0438	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26
Tim3-0443	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 28

表5：人類化抗體之HVR序列

Tim3_0016 變異體 (0018) 之人類化抗體	HVR-H1 、 HVR-H2 及 HVR-H3/SEQ ID NO:	HVR-L1 、 HVR-L2 及 HVR-L3/SEQ ID NO:
Tim3-0433	SEQ ID NO: 1、2及3	SEQ ID NO: 12、5及6
Tim3-0434	SEQ ID NO: 1、2及3	SEQ ID NO: 12、5及6
Tim3_0028 之人類化抗體	HVR-H1 、 HVR-H2 及 HVR-H3/SEQ ID NO:	HVR-L1 、 HVR-L2 及 HVR-L3/SEQ ID NO:
Tim3-0438	SEQ ID NO: 17、18及19	SEQ ID NO: 20、21及22
Tim3-0443	SEQ ID NO: 17、18及19	SEQ ID NO: 20、21及22

實例3：混合淋巴細胞反應(MLR)中人類抗TIM-3抗體對細胞因子產生之作用

混合淋巴細胞反應用以證明阻斷TIM-3至淋巴細胞效應細胞之路徑的作用。分析中測試在存在或不存在抗TIM-3 mAb之情況下T細胞之活化及IFN- γ 分泌。

藉由密度梯度離心，使用Leukosep (Greiner Bio One, 227 288)自健康供體之末梢血液分離人類淋巴細胞。簡言之，用三倍體積之PBS稀釋肝素化血液且稀釋之血液的25 ml等分試樣分層堆積於50 ml Leukosep管中。在室溫下在800×g下離心15分鐘(無破裂)之後，收集含有淋巴細胞之部分，在PBS中洗滌且直接用於功能性分析中或以1.0E+07個細胞/毫升再懸浮於冷凍培養基(10% DMSO、90% FCS)中，且儲存於液氮中。在

MLR分析中使用1:1標靶/反應細胞比率(亦即各MLR培養物含有來自各供體之 $-2.0E+05$ PBMC, 總體積為 $200 \mu\text{l}$)。將不同抗體濃度之抗TIM3單株抗體 Tim3_0016、Tim3_0016 變異體 (Tim3_0018)、Tim3_0021、Tim3_0022、Tim3_0026 Tim3_0028、Tim3_0030、Tim3_0033、Tim3_0038及F38-2E2 (BioLegend)添加至各培養物中。使用無抗體或使用同型對照抗體作為陰性對照且使用rec hu IL-2 (20 EU/ml)作為陽性對照。在 37°C 下培養該等細胞6天。在第6天之後, 自各培養物取出 $100 \mu\text{l}$ 培養基用於量測細胞因子。使用OptEIA ELISA套組(BD Biosciences)量測IFN- γ 之含量。

結果展示於表6中(IFN- γ 分泌/釋放)。抗TIM-3單株抗體以濃度依賴性方式促進T細胞活化及IFN- γ 分泌。與F38-2E2抗體相比, 抗TIM3抗體 Tim3_0021、Tim3_0022、Tim3_0028及Tim3_0038更多地減少發炎性細胞因子 IFN- γ 之釋放。當與 F38-2E2 抗體比較時, Tim3_0016、Tim3_0016 變異體 (Tim3_0018)、Tim3_0033及Tim3_0038顯示類似釋放。相比之下, 含有同型對照抗體之培養物未展示IFN- γ 分泌增加。

表6a：與rec hu IL-2 (20 EU/ml) (=100%)作為陽性對照及無抗體作為陰性對照相比抗Tim3抗體誘導之IFN γ 釋放之百分比

化合物 濃度	MLR +IL-2 20U/ml	同型 IgG2a	F38- 2E2	Tim3 0016	Tim3 0018	Tim3 0021	Tim3 0022	Tim3 0026	Tim3 0028	Tim3 0030	Tim3 0033	Tim3 0038	同型 hIgG1
40 $\mu\text{g/ml}$		2	36	33	36	112	58	25	40	14	35	51	0
10 $\mu\text{g/ml}$	100	0	26	22	30	108	38	16	38	4	30	38	5
1 $\mu\text{g/ml}$		0	7	7	12	101	18	18	12	3	0	1	0

在其他實驗中，量測與0.1 µg/ml 抗PD1 mAb組合之以下嵌合及人類化抗體(如上文所述產生)之EC50值：嵌合chi_Tim3_018抗體及其人類化型式Tim3-433及Tim3-434、嵌合chi_Tim3_028抗體及其人類化型式Tim3-438及Tim3-443，用不同淋巴細胞供體混合物(分別為D2及D3或D1及D5)量測，結果展示於表6b中。

表6b：抗Tim3抗體誘導之(IFN-γ分泌/釋放)之EC₅₀

抗體	供體D2+D3下EC ₅₀ [nM]	供體D1+D5下EC ₅₀ [nM]
chi_Tim3_018	3.1	4.2
Tim3-433	3.0	2.4
Tim3-434	1.7	2.6
chi_Tim3_028	2.9	6.4
Tim3-438	1.9	2.7
Tim3-443	3.0	4.7

PD1抗體

實例4：抗PD-1抗體之產生

小鼠免疫接種

NMRI小鼠使用編碼全長人類PD-1之質體表現載體，藉由皮內施用100 µg載體DNA (質體15300_hPD1-fl)，隨後電穿孔(2個1000 V/cm之方形脈衝，持續時間0.1 ms，時間間隔0.125 s；隨後4個287.5 V/cm之方形脈衝，持續時間10 ms，時間間隔0.125 s)進行基因免疫接種。小鼠在第0、14、28、42、56、70及84天接受6次連續免疫。在第36、78及92天獲取血液且製備血清，其用於藉由ELISA進行效價測定(參見下文)。選擇具有最高效價之動物在第96天藉由靜脈內注射50 µg重組人類PD1人類Fc嵌合體來增強免疫，且藉由融合瘤技術，藉由在增強免疫之後3天使脾細胞融合至骨髓瘤細胞株來分離單株抗體。

測定血清效價(ELISA)

將人類重組PD1人類Fc嵌合體以0.3 µg/ml於PBS中100微升/孔固定於96孔NUNC Maxisorp盤上，隨後：用200微升/孔含2% Crotein C之PBS阻斷該盤；施用抗血清於含0.5% Crotein C之PBS中之連續稀釋液，一式兩份，100微升/孔；用結合HRP之山羊抗小鼠抗體(Jackson ImmunoResearch/Dianova 115-036-071；1/16000)偵測。對於所有步驟，將培養盤在37°C下培育1小時。在所有步驟之間，用含0.05% Tween 20之PBS洗滌培養盤3次。藉由以100微升/孔添加BM Blue POD可溶性受質(Roche)來顯現信號；且藉由添加100微升/孔1 M HCl來停止。在450 nm下，對照690 nm作為參考，讀出吸光度。效價定義為產生半最大信號的抗血清之稀釋度。

實例5：表徵抗PD1抗體/抗PD1抗體與人類PD1之結合

hu PD1之ELISA

用25微升/孔經生物素標記之PD1-ECD-AviHis來塗佈經Nunc maxisorp抗生蛋白鏈菌素塗佈之培養盤(MicroCoat #11974998001)且在4°C下培育隔夜。在洗滌(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)之後，添加25 µl抗PD1樣品或參考抗體(人類抗PD1；Roche/小鼠抗PD1；Biolegend；目錄號：329912)且在室溫下培育1小時。在洗滌(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)之後，以1:2000/1:1000之稀釋度添加25微升/孔山羊抗人類H+L-POD(JIR，JIR109-036-088)/綿羊抗小鼠-POD(GE Healthcare；NA9310)且在室溫下在震盪器上培育1小時。在洗滌(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)之後，添加25微升/孔TMB受質(Roche目錄號11835033001)且培育直至OD 2-3。量測在370/492 nm下進行。

ELISA結果以EC₅₀值[ng/ml]列於以下彙總表7及8中。

PD1之細胞ELISA

以0.01×10E6個細胞/孔之濃度將用編碼全長人類PD1之質體15311_hPD1-fl_pUC_Neo來穩定轉染且用G418(質體上之新黴素抗性標記物)選擇之黏附CHO-K1細胞株接種至384孔平底培養盤中且生長隔夜。

次日，添加25微升/孔PD1樣品或人類抗PD1 (Roche)/小鼠抗PD1 (Biolegend；目錄號：329912)參考抗體且在4℃下培育2小時(以避免內化)。在小心地洗滌(1×90微升/孔PBST)之後，藉由添加於1x PBS緩衝液中稀釋之30微升/孔0.05%戊二醛(sigma，目錄號G5882，25%)來固定細胞且在室溫下培育10分鐘。在洗滌(3×90微升/孔PBST)之後，添加25微升/孔二次抗體用於偵測：山羊抗人類H+L-POD (JIR，JIR109-036-088)/綿羊抗小鼠-POD (GE NA9310)，接著在室溫下在震盪器上培育1小時。在洗滌(3×90微升/孔PBST)之後，添加25微升/孔TMB受質溶液(Roche 11835033001)且培育直至OD 1.0-2.0。在370 nm/492 nm下量測培養盤。

細胞ELISA結果以「EC50 CHO-PD1」值[ng/ml]列於以下彙總表8中。

獼猴PD1之ELISA

用25微升/孔經生物素標記之獼猴PD1-ECD-生物素來塗佈經Nunc maxisorp抗生蛋白鏈菌素塗佈之培養盤(MicroCoat #11974998001)且在4℃下培育隔夜。在洗滌(3×90微升/孔，用PBST-緩衝液)之後，添加25微升抗PD1樣品或參考抗體(人類抗PD1；Roche)且在室溫下在震盪器上培育1小時。在洗滌(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)之後，添加1:1000稀釋之25微升/孔山羊抗人類H+L-POD (JIR，JIR109-036-088)且在室溫下在震盪

器上培育1小時。在洗滌(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)之後，添加25微升/孔 TMB 受質(Roche，11835033001)且培育直至OD 2-3。量測在370/492 nm下進行。

ELISA結果以EC₅₀值[ng/ml]列於以下彙總表7及8中。

PD配位體1替換分析

用25微升/孔經生物素標記之PD1-ECD-AviHis來塗佈經Nunc maxisorp 96孔板(96孔)經生物素化之培養盤(MicroCoat #11974998001)且在4°C下培育隔夜。在洗滌(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)之後，添加25 μl抗PD1樣品或參考抗體(人類抗PD1；Biolegend；目錄號：329912)且在室溫下在震盪器上培育1小時。在洗滌(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)之後，添加25微升/孔PD-L1 (重組人類B7-H1/PD-L1 Fc嵌合體；156-B7，R&D)且在室溫下在震盪器上培育1小時。在洗滌(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)之後，添加1:1000稀釋之25微升/孔山羊抗人類H+L-POD (JIR，109-036-088)且在室溫下在震盪器上培育1小時。在洗滌(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)之後，添加25微升/孔TMB受質(Roche，11835033001)且培育直至OD 2-3。量測在370/492 nm下進行。

ELISA結果以IC₅₀值[ng/ml]列於以下彙總表7中。

PD配位體2替換分析

用25微升/孔經生物素標記之PD1-ECD-AviHis來塗佈經Nunc maxisorp 96孔板(96孔)經生物素化之培養盤(MicroCoat #11974998001)且在4°C下培育隔夜。在洗滌(3×90微升/孔，用PBST-緩衝液)之後，添加25微升抗PD1樣品或參考抗體(人類抗huPD1；Roche)且在室溫下在震盪器上培育1小時。在洗滌(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)之後，添加25微升/孔

PD-L2 (重組人類B7-DC/PD-L2 Fc嵌合體；1224-PL-100，R&D)且在室溫下在震盪器上培育1小時。在洗滌(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)之後，添加1:2000稀釋之25微升/孔山羊抗人類H+L-POD (JIR，JIR109-036-088)且在室溫下在震盪器上培育1小時。在洗滌(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)之後，添加25微升/孔TMB受質(Roche，11835033001)且培育直至OD 2-3。量測在370/492 nm下進行。

ELISA結果以IC₅₀值[ng/ml]列於以下彙總表7中。

抗原決定基定位ELISA/結合競爭分析

用25微升/孔捕捉抗體(山羊抗小鼠IgG；JIR；115-006-071)塗佈Nunc maxisorp培養盤(Nunc #464718)且在室溫下在震盪器上培育1小時。在洗滌(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)之後，用含有2% BSA之PBS緩衝液在室溫下在震盪器上阻斷培養盤1小時。在洗滌(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)之後，添加25微升小鼠抗PD1樣品且在室溫下在震盪器上培育1小時。在洗滌(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)之後，藉由30微升/孔小鼠IgG (JIR；015-000-003)在室溫下在震盪器上阻斷捕捉抗體1小時。同時，經生物素標記之PD1-ECD-AviHis與第二樣品抗體在室溫下在震盪器上一起預培育1小時。在洗滌分析培養盤(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)之後，將PD1抗體混合物轉移至分析培養盤且在室溫下在震盪器上培育1小時。在洗滌(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)之後，添加1:4000稀釋之25微升/孔抗生蛋白鏈菌素POD (Roche，#11089153001)且在室溫下在震盪器上培育1小時。在洗滌(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)之後，添加25微升/孔TMB受質(Roche，#11089153001)且培育直至OD 1.5-2.5。量測在370/492 nm下進行。抗原決定基群由針對參考抗體之層級聚類定義。

表7：示例性抗體之結合、PD-L1抑制及抗原決定基區域群(ELISA)

抗體	ELISA huPD1 EC ₅₀ [ng/ml]	ELISA cyPD1 EC ₅₀ [ng/ml]	ELISA PD-L1 抑制 IC ₅₀ [ng/ml]	ELISA PD-L2抑制 IC ₅₀ [ng/ml]	藉由競爭分析之抗原決定基區域群
PD1- 0050	17.9	9.8	128	34	1
PD1- 0069	45.7	22.7	225	89	6
PD1- 0073	15.1	8.3	124	65	5
PD1- 0078	26.3	22.4	x	86	2
PD1- 0098	50.8	54.6	174	45	5
PD1- 0102	34.2	52.7	>35.5 µg/ml	140	4
PD1-0103	33.7	36.9	182	51	5

表8：來源於親本小鼠抗體PD1-0103之人類化PD1抗體之生物化學-及細胞結合(ELISA)

人類化抗體	ELISA huPD1 EC ₅₀ [ng/ml]	ELISA cyPD1 EC ₅₀ [ng/ml]	ELISA CHO-PD1 EC ₅₀ [ng/ml]
PD1-103-0312	11	8.3	10.1
PD1-103-0313	15	11	10.8
PD1-103-0314	11	8.3	7.7
PD1-103-0315	10	7.9	7.3

人類化抗PD-1抗體之Biacore表徵

已使用基於表面電漿子共振(SPR)之分析確定若干鼠類PD1結合劑以及市售人類PD1結合參考之間的結合之動力學參數。因此，抗人類IgG藉由與(Biacore) CM5感測器晶片表面之胺偶合而固定。接著捕捉樣品且使 hu PD1-ECD與其結合。在各分析週期之後使感測器晶片表面再生。最終

藉由將資料與1:1朗格繆爾相互作用模型擬合來獲得平衡常數及動力學速率常數。

藉由使用GE Healthcare供應之胺偶合套組，在pH 5.0下，將約2000個反應單位(RU)之20 µg/ml抗人類IgG (GE Healthcare #BR-1008-39)偶合至Biacore T200中之CM5感測器晶片之流槽1及2 (或者：3及4)上。

樣品及操作緩衝液為HBS-EP+ (0.01 M HEPES、0.15 M NaCl、3 mM EDTA、0.05% v/v界面活性劑P20，pH 7.4)。流槽溫度設定為25°C且樣品隔室溫度設定為12°C。系統用操作緩衝液激活。

注射濃度為10 nM之樣品20秒且與第二流槽結合。接著，在各樣品上注射一整組人類PD1-ECD濃度(144 nM、48 nM、16 nM、5.33 nM、1.78 nM、0.59 nM、0.20 nM及0 nM) 120秒，接著為30s/300s之解離時間及兩個用3 M MgCl₂溶液進行之20s再生步驟，其中最後一個含有用操作緩衝液進行「注射後額外洗滌」。

最終，用Biacore T200評估軟體將雙重參考資料與1:1朗格繆爾相互作用模型擬合。所得 K_D 、 k_a 及 k_d 值展示於表9中。

表9：藉由Biacore測定之嵌合PD1-0103及人類化PD1-Ab之動力學速率常數及平衡常數

配位體	k_a [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_d [s ⁻¹]	K_D [nM]
嵌合PD1-0103	3.86E+05	3.07E-04	0.8
PD1-0103-0312	1.95E+05	3.45E-04	1.8
PD1-0103-0313	1.60E+05	3.67E-04	2.3
PD1-0103-0314	1.87E+05	2.79E-04	1.5
PD1-0103-0315	1.89E+05	2.91E-04	1.5

如表9中所示，嵌合PD1-0103 (產生參見實例6)之全部人類化型式呈現與親本抗體(嵌合PD1-0103)相似之動力學特性。

動力學

根據製造商之說明書，將CM5感測器系列S安裝至Biacore 4000系統中且以水動力方式定址偵測點。

以 10000 RU 將多株兔 IgG 抗體 <IgGFC γ M>R (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.)固定在流槽1、2、3及4中之偵測點1及5上。根據製造商之說明書，經由EDC/NHS化學進行偶合。流槽中之剩餘點充當參考。樣品緩衝液為補充有1 mg/ml羧甲基葡聚糖之系統緩衝液。

在一個實施例中，在25°C下驅動該分析。在另一實施例中，在37°C下驅動該分析。藉由以10 μ l/min注射1分鐘在感測器表面上捕捉50 nM之各鼠類單株抗體。隨後以100 nM、2 \times 33 nM、11 nM、4 nM、1 nM及系統緩衝液0 nM一系列濃度，以30 μ l/min注射對應抗原，歷時4分鐘締合期時間。再監測解離4分鐘。以30 μ l/min注射10 mM甘胺酸(pH 1.5) 3分鐘使捕捉系統再生。根據製造商說明書，使用Biacore評估軟體計算相關動力學資料。

抗原決定基定位

Biacore 4000儀器安裝有Biacore CAP感測器且如製造商所建議來準備。儀器緩衝液為HBS-ET (10 mM HEPES pH 7.4、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.005% w/v Tween 20)。在25°C下操作儀器。

將所有樣品於系統緩衝液中稀釋。藉由在流槽1、2、3及4中之點1及5中以30 μ l/min注射1分鐘，來在200 RU下在CAP感測器表面上捕捉35kDa經生物素標記之抗原PD1-ECD-AviHis。點2、3及4充當參考。在另一實施例中，以同樣的方式在200 RU下在CAP感測器上捕捉35 kDa經

生物素標記之抗原PD1-ECD-AviHis。

隨後以30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 注射100 nM一級抗體3分鐘，接著以30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 注射100 nM二級抗體3分鐘。注射一級抗體直至表面呈現之抗原完全飽和。在一級及二級抗體注射期結束時，設定報告點「結合後期」(BL)以監測相應抗體之結合反應。計算二級抗體結合反應「BL2」與一級抗體反應「BL1」之間的商(莫耳比)。當一級抗體已與抗原複合時，莫耳比用作二級抗體之抗原可及性之指標。

如製造商所建議，藉由以30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 注射2 M鹽酸胍、250 nM NaOH再生緩衝液2分鐘，自感測器表面完全移除複合物，接著以30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 注射系統緩衝液1分鐘。

實例6：混合淋巴細胞反應(MLR)中不同抗PD-1抗體對細胞因子產生之作用

3A)混合淋巴細胞反應(MLR)為一種量測來自一名個體(供體X)之淋巴細胞面對來自另一個體(供體Y)之淋巴細胞時的活化的免疫細胞分析。混合淋巴細胞反應用以證實阻斷PD1至淋巴細胞效應細胞之路徑的作用。在分析中測試在存在或不存在抗PD1 mAb之情況下T細胞之活化及其IFN- γ 分泌。

為進行同種MLR，藉由密度梯度離心，使用Leukosep (Greiner Bio One, 227 288)來分離來自未知HLA類型之至少四名健康供體的末梢血液單核細胞(PBMC)。簡言之，用三倍體積之PBS稀釋肝素化血液樣品且稀釋之血液的25 ml等分試樣分層堆積於50 ml Leukosep管中。在室溫下在800 \times g下離心15分鐘(無破裂)之後，收集含有淋巴細胞之部分，在PBS中洗滌且直接用於功能性分析中或以1.0E+07個細胞/毫升再懸浮於冷凍培養

基(10% DMSO、90% FCS)中，且儲存於液氮中。藉由以1:1刺激/反應細胞比率混合來自兩種不同供體之PBMC來建立個別雙向MLR反應，且在存在或無不同濃度範圍之經純化抗PD1單株抗體PD1-0050、PD1-0069、PD1-0073、PD1-0078、PD1-0098、PD1-0102、PD1-0103之情況下，在37°C、5% CO₂下至少一式兩份地在平底96孔盤中共培養6天。作為參考抗PD1抗體，用人類IgG1之主鏈(具有突變L234A、L235A及P329G(Kabat之EU索引))來合成及選殖包含納武單抗(nivolumab)(亦稱為MDX-5C4或MDX-1106)或派立珠單抗(pembrolizumab)(亦稱為MK-3475或Org 1.09A)之VH及VL域之抗體。使用無抗體或使用同型對照抗體作為陰性對照且使用rec hu IL-2 (20 EU/ml)作為陽性對照。在第6天之後，自各培養物取出100 µl培養基用於量測細胞因子。使用OptEIA ELISA套組(BD Biosciences)量測IFN- γ 之含量。

結果展示於表10中(IFN- γ 分泌/釋放)。抗PD1單株抗體以濃度依賴性方式促進T細胞活化及IFN- γ 分泌。相對於不添加任何阻斷mAb(基本同種刺激誘導之IFN γ 值，為E-c)之MLR及添加20 EU/ml rec hu IL-2(陽性對照=100% IFN γ 值，為E+c)之MLR的IFN- γ 產生來計算IFN γ 分泌之增加%且根據下式計算：相對刺激 [%] = ((樣品 - E-c)/(E+c - E-c) × 100。

表10：相較於作為陽性對照之重組人類IL-2處理(20 EU/mL)(=100%增加)之作用，在同種刺激及用抗PD-1抗體處理之後的IFN γ 分泌百分比

	濃度(μ g/ml)	1:12	1:120	1:1200	MLR中之作用
PD1-0050	44	136	96	33	+++
PD1-0069	60	76	71	55	+++
PD1-0073	43	103	63	38	++
PD1-0078	64	99	72	21	++

若干PD1阻斷抗體PD1-0050、PD1-0069、PD1-0073、PD1-0078、

PD1-0098、PD1-0102、PD1-0103藉由增強干擾素 γ (IFN- γ)之分泌來顯示強烈的免疫調節活性(資料未展示全部抗體)。

3B)在另一實驗中，評估嵌合PD1-0103 (具有突變L234A、L235A及P329G (Kabat之EU索引)之人類IgG1同型)。用嵌合PD1-0103阻斷PD1強烈增強同種刺激之初級人類T細胞分泌IFN- γ 。嵌合PD1-0103比參考抗PD1抗體更有效(參見圖1)。

為進行比較，使用用人類IgG1之主鏈(具有突變L234A、L235A及P329G (Kabat之EU索引))合成及選殖之包含納武單抗(亦稱為MDX5C4或MDX-1106)及派立珠單抗(亦稱為MK-3475或Org 1.09A)之VH及VL域的參考抗PD1抗體。

3C)在其他實驗中，如上所述在MLR中評估抗PD-1抗體PD1-0103之人類化變異體(人類化抗體PD1-0103-0312、PD1-0103-0314，圖2及3，亦參見以下實例9)的免疫調節活性：a) IFN釋放(分泌)；b) TNF- α 釋放(分泌)。將嵌合PD1-0103抗體及其人類化型式之作用與利用人類IgG1之主鏈(具有突變L234A、L235A及P329G (Kabat之EU索引))的包含納武單抗(亦稱為MDX5C4或MDX-1106)及派立珠單抗(亦稱為MK-3475或Org 1.09A)之VH及VL域的參考抗PD1抗體作比較。在6天MLR培養之後，採集50 μ l上清液且使用Bio-Plex Pro™ 人類細胞因子Th1/Th2分析(Bio-Rad Laboratories Inc.)在單一培養中量測多種細胞因子。(資料未展示全部細胞因子)。

在增強T細胞活化及IFN- γ 分泌方面嵌合PD1-0103抗體及其人類化型式(PD1-0103_0312及PD1-0103_0314)比參考抗PD1抗體更有效(參見圖2)。

此外，嵌合PD1-0103抗體及其人類化變異體藉由抗原呈現細胞增加腫瘤壞死因子 α (TNF α) (參見圖3)及IL-12 (資料未展示)分泌且增強單核細胞/巨噬細胞或抗原呈現細胞刺激T細胞之能力。

實例7：抗PD-1阻斷對藉由與同種成熟樹突狀細胞共培養之人類CD4 T細胞的細胞毒性顆粒酶B釋放及IFN- γ 分泌之作用

為進一步在同種背景下研究抗PD-1處理之作用，研發一種分析，其中在單核細胞衍生之同種成熟樹突狀細胞(mDC)的存在下共培養剛經純化之CD4 T細胞5天。提前一週經由塑性黏附自新鮮PBMC分離單核細胞，接著移除非黏附細胞。隨後藉由在含有GM-CSF (50 ng/ml)及IL-4 (100 ng/ml)之培養基中培養5天，自單核細胞產生不成熟DC。為誘導iDC成熟，添加TNF- α 、IL-1 β 及IL-6 (各50 ng/ml)至培養基，再持續2天。隨後藉由經由流動式細胞量測術(LSRFortessa，BD Biosciences)量測主要組織相容性複合物II類(MHCII)、CD80、CD83及CD86之表面表現來評估DC成熟。

在混合淋巴細胞反應(mMLR)最小之日，經由微珠套組(Miltenyi Biotec)自獲自不相關供體之 10^8 個PBMC富集CD4 T細胞。培養之前，用5 μ M羧基-螢光素-丁二醯亞胺酯(CFSE)標記CD4 T細胞。隨後在存在或不存在阻斷抗PD1抗體(PD1-0103、嵌合PD1-0103或人類化抗體PD1-0103-0312、PD1-0103-0313、PD1-0103-0314、PD1-0103-0315，在圖4A及4B中簡稱為0312、0313、0314、0315)之情況下，以10 μ g/ml之濃度(若圖式中未不同地指示)將 10^5 個CD4 T細胞連同成熟同種-DC (5:1)一起塗鋪於96孔盤中。

五天後收集細胞培養物上清液，稍後用以藉由ELISA (R&D

systems)來量測IFN- γ 含量，且在存在Golgi Plug (布雷菲爾德菌素A (Brefeldin A))及Golgi Stop (莫能菌素(Monensin))之情況下在37°C下再靜置細胞5小時。隨後洗滌細胞，在表面上用抗人類CD4抗體及存活/死亡可固定染料 Aqua (Invitrogen) 染色，之後用固定/滲透緩衝液(BD Bioscience)固定/滲透。針對顆粒酶B (BD Bioscience)、IFN- γ 及IL-2 (均來自eBioscience)進行胞內染色。

亦測試不同濃度之人類化變異體PD1-0103 (人類化抗體PD1-0103-0312、PD1-0103-0313、PD1-0103-0314、PD1-0103-0315，在圖式中簡稱為0312、0313、0314、0315，亦參見以下實例9)且發現其在增強顆粒酶B及干擾素 γ 方面應同樣良好。DP47為在Fc部分中具有LALA突變之非結合人類IgG以避免經Fc γ R識別且用作陰性對照。結果展示於圖4A及4B中。

實例8：嵌合抗體衍生物

嵌合PD1抗體如下產生：經由PCR擴增抗PD1小鼠抗體PD1-0098、PD1-0103之重鏈及輕鏈可變區，且將其作為與具有突變L234A、L235A及P329G (Kabat之EU索引) (白胺酸234至丙胺酸、白胺酸235至丙胺酸、脯胺酸329至甘胺酸)從而消除效應功能之人類IgG1主鏈/人類CH1-鉸鏈-CH2-CH3之融合蛋白選殖至重鏈表現載體中，且作為與人類C- κ 之融合蛋白選殖至輕鏈表現載體中。隨後將LC及HC質體共轉染至HEK293中且在7天之後藉由抗體純化之標準方法自上清液純化。將嵌合PD1抗體重新命名為嵌合chiPD1-0098 (chiPD1-0098)及嵌合PD1-0103 (chiPD1-0103)。為進行比較，使用用人類IgG1之主鏈(具有突變L234A、L235A及P329G (Kabat之EU索引))合成及選殖之包含納武單抗(亦稱為MDX5C4或MDX-

1106)及派立珠單抗(亦稱為MK-3475或Org 1.09A)之VH及VL域的參考抗PD1抗體。

實例9：抗PD1抗體PD-0103 (huMab PD-0103)之人類化變異體之產生、表現及純化以及表徵

鼠類抗PD1抗體0103之VH及VL域之人類化

基於鼠類抗PD1抗體PD1-0103之鼠類VH及VL域之胺基酸序列(SEQ ID NO:43及SEQ ID NO:44)產生人類化抗PD1抗體變異體。

人類化VH-變異體係基於人類生殖系IMGT_hVH_3_23與具有若干突變之人類J-元件生殖系IGHJ5-01組合。(產生SEQ ID NO:45)。

VL之人類化變異體係基於人類生殖系IMGT_hVK_4_1、IMGT_hVK_2_30、IMGT_hVK_3_11及IMGT_hVK_1_39與人類J-元件生殖系IGKJ1-01組合。不同突變得到SEQ ID NO:46至SEQ ID NO:49之人類化變異體。

PD1-0103之重鏈及輕鏈可變區之人類化胺基酸序列回譯成DNA且合成所得cNDA (GenArt)且接著將其作為與具有LALA及PG突變(白胺酸234至丙胺酸、白胺酸235至丙胺酸、脯胺酸329至甘胺酸)從而消除效應功能之人類IgG1主鏈/人類CH1-鉸鏈-CH2-CH3之融合蛋白選殖至重鏈表現載體中，且作為與人類C- κ 之融合蛋白選殖至輕鏈表現載體中。隨後將LC及HC質體共轉染至HEK293中且在7天之後藉由抗體純化之標準方法自上清液純化。所得人類化PD1抗體命名如下：

表11：PD1-0103之人類化變異抗體之VH及VL序列

PD1-0103之人類化抗體	VH之人類化型式/SEQ ID NO:	VL之人類化型式/SEQ ID NO:
PD1-0103-0312	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 46
PD1-0103-0313	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 47

PD1-0103之人類化抗體	VH 之人類化型式 /SEQ ID NO:	VL 之人類化型式 /SEQ ID NO:
PD1-0103-0314	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 48
PD1-0103-0315	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 49

表12：PD1-0103之人類化變異抗體之HVR序列

PD1-0103之人類化抗體	人類化型式之HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3/SEQ ID NO:	人類化型式之HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3/SEQ ID NO:
PD-0103-0312	SEQ ID NO: 37、38及39	SEQ ID NO: 40、41及42
PD-0103-0313	SEQ ID NO: 37、38及39	SEQ ID NO: 40、41及42
PD-0103-0314	SEQ ID NO: 37、38及39	SEQ ID NO: 40、41及42
PD-0103-0315	SEQ ID NO: 37、38及39	SEQ ID NO: 40、41及42

如上所述表徵人類化PD1-0103抗體變異體及親本嵌合PD1-0103。結果展示於表13中。

表13：人類化PD1-0103抗體變異體及親本嵌合PD1-0103之結果的概述

分析	嵌合PD1-0103	PD-0103-0312	PD-0103-0313	PD-0103-0314	PD-0103-0315
親和力 K_D 37°C [nM] *)	2.0 / 0.8	1.5 / 1.8	1.9 / 2.3	1.6 / 1.5	1.7 / 1.5
ELISA EC ₅₀ [nM]	0.2	0.1	0.07	0.07	0.06
CHO-PD1 EC ₅₀	+	+	+	+	+
IC ₅₀ PD-L1、2 [nM]	1.35	tbd	tbd	tbd	tbd
混合淋巴細胞反應分析	+++	+++	+++	++++	++
獼猴交叉反應性 (EC ₅₀ [nm])	+	0.08	0.06	0.05	0.04

實例10：PD-1抗體之中和效能

為測試內部產生之PD-1抗體模擬恢復活體外遏制T細胞反應時之中和效能，使用市售PD1/PD-L1報導基因分析(Promega)。此系統由PD1+ NFAT Jurkat細胞及PD-L1+ CHO對應體組成，其亦給予活化信號。原則上，該報導系統係基於三個步驟：(1) TCR介導之NFAT活化、(2)在活化

後藉由PD-1/PD-L1軸抑制NFAT信號及(3)藉由PD-1阻斷抗體恢復NFAT信號。

材料與方法：

- PD-L1培養基：PAN Biotech (#P04-03609)；FBS (10%)及L-Gln (4 mM)

- 分析培養基：RPMI 1640 (#31870；Invitrogen)，25 mM HEPES，2 mM L-Gln，FBS (2%)

- 用於此分析之細胞(細胞類型均購自Promega)：

PD-L1+ CHO細胞(批號#139147)：2-3×10⁴個細胞/96孔

PD-1+ NFAT Jurkat細胞(批號#133024)：3.5×10⁴個細胞/孔

第1天，將PD-L1+細胞解凍，在以上所提及之培養基中以指示細胞濃度接種且在37°C及5% CO₂下培養隔夜。次日，移除培養基且PD-L1+細胞以指示濃度與所製備之抗體一起培育(在分析培養基中)。同時，將PD-1+ NFAT Jurkat細胞解凍且將上文所提及之細胞數目轉移至PD-L1+細胞且與PD-L1+細胞一起共培養。在37°C及5% CO₂下培育6小時之後，將Bio-Glo基板升溫至室溫(添加之前1至2小時)。自培育箱移除細胞培養盤且調整至室溫(10分鐘)，接著每孔添加80 μl Bio-Glo溶液，培育5至10分鐘，然後根據套組製造商之建議，以Tecan Infinite讀數器量測發光。結果可見於圖5A及圖5B中，其中展示在TCR刺激後不同PD-1抗體恢復PD-1/PD-L1介導之NFAT信號遏制：圖5A：當與參考抗體比較時，嵌合PD1_0103展示可再現之優良作用。作為參考，用人類IgG1之主鏈(具有突變L234A、L235A及P329G (Kabat之EU索引))合成及選殖包含納武單抗(亦稱為MDX-5C4或MDX-1106)之VH及VL域的抗PD1抗體。圖5B：

PD1_0103之四個人類化變異體顯示出與先導抗體相似之活體外效能且亦略微優於參考抗體。

雙特異性PD1/TIM3抗體

實例11A

在一個結合臂中具有VH/VL域互換/替換(*CrossMab^{Vh-VL}*)且在CH1/CL界面中具有單個帶電胺基酸取代的結合於PD1及TIM3之多特異性抗體的產生及表現

在一實例中，如通用方法部分中所述，藉由經典分子生物技術產生結合於人類PD1及人類TIM3之多特異性抗體，且如上所述在Expi293F細胞之293F中短暫表現。多特異性1+1 *CrossMab^{Vh-Vl}*抗體亦描述於WO 2009/080252中。使用含有編碼表14a中描繪之胺基酸序列之核酸的表現質體表現多特異性抗體。

表 14a： 具有 VH/VL 域互換 / 替換之輕鏈 (LC) 及重鏈 (HC)(1+1 *CrossMab^{Vh-V}*)的胺基酸序列

1+1抗體	HC1	HC2	LC1	LC2
PD1TIM3_0389	SEQ ID NO:50	SEQ ID NO:51	SEQ ID NO:52	SEQ ID NO:53
PD1TIM3-0168	SEQ ID NO:54	SEQ ID NO:55	SEQ ID NO:56	SEQ ID NO:57
PD1TIM3-0476	SEQ ID NO:62	SEQ ID NO:63	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:65
PD1TIM3-0477	SEQ ID NO:66	SEQ ID NO:67	SEQ ID NO:68	SEQ ID NO:69
PD1TIM3_0166	SEQ ID NO:58	SEQ ID NO:59	SEQ ID NO:60	SEQ ID NO:61

對於所有構築體，杵臼雜二聚化技術與第一CH3域中之典型杵取代(T366W)及第二CH3域中之相應臼取代(T366S、L368A及Y410V) (以及兩個額外引入之半胱胺酸殘基S354C/Y349'C) (含於以上所描繪之各別相應重鏈(HC)序列中)一起使用。

實例11B

在兩個結合臂中具有VH/VL域互換/替換(2+2 *CrossMab*^{Vh-VL})且在CH1/CL界面中具有單個帶電胺基酸取代的結合於PD1及TIM3之多特異性抗體的產生及表現

在一實例中，如通用方法部分中描述，藉由經典分子生物技術產生結合於人類PD1及人類TIM3之多特異性抗體，且如上所述在Expi293F細胞之293F中短暫表現。多特異性2+2 *CrossMab*^{VH-VL}抗體亦描述於WO 2010/145792中。使用含有編碼表14b中描繪之胺基酸序列之核酸的表現質體表現多特異性抗體。

表 14b： 具有VH/VL域互換/替換之輕鏈(LC)及重鏈(HC)(2+2 *CrossMab*^{Vh-VL})的胺基酸序列

2+2抗體	HC	LC1	LC2
PD1TIM3_0358	SEQ ID NO:70	SEQ ID NO:71	SEQ ID NO:72
PD1TIM3_0359	SEQ ID NO:73	SEQ ID NO:74	SEQ ID NO:75
PD1TIM3_0321	SEQ ID NO:76	SEQ ID NO:77	SEQ ID NO:80

實例11C

結合於PD1及TIM3之多特異性抗體之純化及表徵

藉由蛋白A親和層析與尺寸排阻層析之組合自上清液純化以上表現之多特異性抗體。所有多特異性抗體均可以良好產率產生且穩定。藉由質譜分析表徵所獲得之產物的身分，且藉由SDS-PAGE表徵諸如純度、單體含量及穩定性之分析特性。

質譜分析

藉由去糖基化完整*CrossMab*及去糖基化/纖維蛋白溶酶消化或以替代方式去糖基化/限制LysC消化之*CrossMab*的電噴霧電離質譜分析(ESI-MS)來分析預期主要結構。

在1 mg/ml之蛋白質濃度下，VH/VL CrossMab在磷酸鹽或Tris緩衝液中，在37°C下用N-糖苷酶F去糖基化長達17小時。纖維蛋白溶酶或限制LysC (Roche)消化用100 µg去糖基化VH/VL CrossMab在Tris緩衝液pH 8中，分別在室溫下進行120小時及在37°C下進行40分鐘。在質譜分析之前，在Sephadex G25管柱(GE Healthcare)上經由HPLC將樣品去鹽。在配備有TriVersa NanoMate源(Advion)之maXis 4G UHR-QTOF MS系統(Bruker Daltonik)上經由ESI-MS測定總質量。

多特異性抗體之穩定性

為評估抗體構築體之穩定性，根據以下程序評估熱穩定性以及聚集起始溫度。在20 mM組胺酸/組胺酸氯化物、140 mM NaCl pH 6.0中製備濃度為1 mg/mL之所指示抗體之樣品，轉移至10 µL微比色皿陣列中，且用Optim1000儀器(Avacta Inc.)記錄在用266 nm雷射激發時靜態光散射資料以及螢光資料，而在0.1°C/min之速率下樣品自25°C加熱至90°C。

聚集起始溫度(T_{agg})定義為散射光強度開始增加之溫度。熔融溫度(T_m)定義為螢光強度對比波長之圖中的拐點。結果展示於表15中。

表15

抗體	蛋白A			蛋白A + 製備型SEC				
	產率 [mg/L]	CE-SDS 主峰	SEC 單體	產率 [mg/L]	CE-SDS 主峰	SEC單 體	T-agg	MS
PD1TIM3-0389	21	88.9	97.6	19	92.1%	100%		證實
PD1TIM3-0168	48	87.3	88.9	42	98.4%	95.2%		證實
PD1TIM3-0476	271	100	97.8	230	98.9%	100%		證實
PD1TIM3-0477	211	94.3	85.3	159	97.4%	94.7%		證實

實例12

抗PD1-TIM3多特異性抗體之表徵

結合Elisa

hu PD1之ELISA

用濃度為500 ng/ml之25微升/孔經生物素標記之PD1-ECD-AviHis來塗佈經 Nunc maxisorp 抗生素蛋白鏈菌素塗佈之培養盤 (MicroCoat #11974998001)且在4°C下培育隔夜。在洗滌(3×90微升/孔，用PBST-緩衝液)之後，添加25微升遞增濃度之抗PD1樣品且在室溫下培育1小時。在洗滌(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)之後，添加1:5000稀釋之25微升/孔山羊抗人類H+L-POD (JIR，JIR109-036-098)且在室溫下在震盪器上培育1小時。在洗滌(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)之後，添加25微升/孔TMB受質(Roche，11835033001)且培育直至OD 2-3。量測在370/492 nm下進行。

hu TIM3之ELISA

用濃度為60 ng/ml之25微升/孔經生物素標記之TIM3-ECD-AviHis來塗佈經 Nunc maxisorp 抗生素蛋白鏈菌素塗佈之培養盤 (MicroCoat #11974998001)且在4°C下培育隔夜。在洗滌(3×90微升/孔，用PBST-緩衝液)之後，添加25微升遞增濃度之抗PD1樣品且在室溫下培育1小時。在洗滌(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)之後，添加1:5000稀釋之25微升/孔山羊抗人類H+L-POD (JIR，JIR109-036-098)且在室溫下在震盪器上培育1小時。在洗滌(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)之後，添加25微升/孔TMB受質(Roche，11835033001)且培育直至OD 2-3。量測在370/492 nm下進行。

ELISA結果以EC₅₀值[nM]列於表16中。

表16：抗PD1-TIM3雙特異性抗體(ELISA)之生物化學及細胞結合

抗體	樣品	huPD1 EC ₅₀ [nM]	huTIM3 EC ₅₀ [nM]
PD1 IgG (二價)	嵌合PD1-0103	0.12	無結合
TIM3 IgG (二價)	嵌合TIM3-0018	無結合	0.15
1+1 (二價)	1+1 PD1TIM3-0168	0.11	0.41
2+2 (四價)	2+2 PD1TIM3-0359	0.09	0.11
TIM3 IgG (二價)	嵌合TIM3-0028	無結合	0.29 上部平台在66%
1+1 (二價)	1+1 PD1TIM3_0389	0.13	無結合
2+2 (四價)	2+2 PD1TIM3-0358	0.08	0.19 上部平台在65%

可偵測針對Tim3為二價之抗體(嵌合TIM3-0018、2+2 PD1TIM3-0359、嵌合TIM3-0028、2+2 PD1TIM3-0358)的親合結合(亦即兩個臂之結合)。1+1 CrossMab之更高EC50值由與塗佈抗原之單價(針對Tim3)非親合性結合引起。針對PD1結合未偵測到親合力作用。二價及四價格式之EC50值相當。

結合Biacore

結合於PD1及TIM3之多特異性抗體之抗原結合特性

藉由Biacore®評估多特異性抗體與其相應標靶抗原，亦即PD1及TIM3之結合。

根據以下程序評估PD1結合：

抗人類Fc IgG藉由與(BIAcore) CM5感測器晶片表面之胺偶合而固定。接著捕捉樣品且使hu PD1-ECD與其結合。在各分析週期之後使感測器晶片表面再生。最終藉由將資料與1:1朗格繆爾相互作用模型擬合來獲得平衡常數及動力學速率常數。

使用GE Healthcare供應之胺偶合套組，將約10,000個反應單位(RU)

之20 µg/ml抗人類IgG (GE Healthcare #BR-1008-39)偶合至Biacore T200中之CM5感測器晶片之所有流槽上。樣品及操作緩衝液為HBS-EP+ (0.01 M HEPES、0.15 M NaCl、3 mM EDTA、0.05% v/v界面活性劑P20，pH 7.4)。流槽溫度設定為25°C且樣品隔室溫度設定為12°C。系統用操作緩衝液激活。

注射濃度為10 nM之不同樣品15秒，且連續結合至流槽2、3及4。接著，在各樣品上注射一整組人類PD1-ECD濃度(300 nM、100 nM、2×33.3 nM、11.1 nM、3.7 nM、1.2 nM及2×0 nM) 300s，接著為10/600s之解離時間及兩個用3 M MgCl₂進行之30s再生步驟，其中最後一個含有用操作緩衝液進行「注射後額外洗滌」。最終，用Biacore T200評估軟體將雙重參考資料與1:1朗格繆爾相互作用模型擬合。所得 K_D 、 k_a 及 k_d 值展示於表17中。

根據以下程序評估TIM3結合：

抗人類Fab IgG藉由與(Biacore) CM5感測器晶片表面之胺偶合而固定。接著捕捉樣品且hu Tim3-ECD與其結合。在各分析週期之後使感測器晶片表面再生。最終藉由將資料與1:1朗格繆爾相互作用模型擬合來獲得平衡常數及動力學速率常數。

使用GE Healthcare供應之胺偶合套組，將約10,000個反應單位(RU)之20 µg/ml抗人類Fab IgG (GE Healthcare #28-9583-25)偶合至Biacore T200中之CM5感測器晶片之所有流槽上。樣品及操作緩衝液為HBS-EP+ (0.01 M HEPES、0.15 M NaCl、3 mM EDTA、0.05% v/v界面活性劑P20，pH 7.4)。流槽溫度設定為25°C且樣品隔室溫度設定為12°C。系統用操作緩衝液激活。

注射濃度為10 nM之不同樣品30秒，且連續結合至流槽2、3及4。接著，在各樣品上注射一整組人類Tim3-ECD濃度(600 nM、200 nM、 2×66.7 nM、22.2 nM、7.4 nM及 2×0 nM) 200s，接著為10/600s之解離時間及兩個用甘胺酸鹽酸鹽pH 2.1進行之30s再生步驟，其中最後一個含有用操作緩衝液進行「注射後額外洗滌」。最終，用Biacore T200評估軟體將雙重參考資料與1:1朗格繆爾相互作用模型擬合。所得 K_D 、 k_a 及 k_d 值展示於表17中。

結果指示於表17中。

表17：PD1-Tim3雙特異性抗體之親和力

樣品	PD1臂KD [nM]	Tim3臂KD [nM]
PD1TIM3-0389 (0357)	1.3	245
PD1TIM3-0358 (2+2)	0.3	240
PD1TIM3-0168	1.2	10.3
PD1TIM3-0359 (2+2)	1.8	2.3
PD1TIM3-0476	0.1	332
PD1TIM3-0477	<0.1	12

所有測試抗體均特異性結合於兩個標靶PD1與TIM3，且展現奈莫耳範圍內之抗原親和力。

實例13：抗PD1/TIM3雙特異性抗體同時結合於重組細胞之FRET分析

此實例描述研發一種基於細胞之TR-FRET分析，以測定雙特異性抗體格式與一個細胞上存在之兩種不同受體的同時結合。所選Tag-lite技術為經典TR-FRET (時差式螢光共振能量轉移)與SNAP-標籤技術(例如New England Biolabs, CISBIO)之組合，其允許細胞表面上存在之抗原經螢光供體或接受體染料標記。

此技術評估之目標

此分析意欲證實抗PD1/Tim3雙特異性抗體同時結合於表現PD1與

Tim3受體之細胞，該等受體呈由既定受體之細胞外域(ECD)及螢光染料可結合之標籤組成之重組融合蛋白形式。在可結合兩個標記受體之PD1-Tim3雙特異性抗體存在下，蛋白質將靠近以允許兩個FRET染料之間能量轉移(參見圖6)。

重組PD1⁺TIM3⁺ HEK細胞之產生

使用標準方法以如 Sambrook, J. 等人, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989中所描述產生DNA。對於PD1及TIM3變異體之選殖，SNAP或CLIP插入受體之TM-區域近端且除了7 aa，移除細胞質域，且經Flag-標籤置換。

短暫轉染

將HEK293細胞與轉染試劑293free (Novagen)及Opti-MEM® I還原性血清培養基(Life Technologies)在30 ml培養物體積中每次使用兩種質體共轉染，DNA總量為15 µg。簡言之，如他處所描述，將HEK293細胞用編碼由PD1或Tim3 ECD及SNAP或CLIP標籤組成之融合蛋白的以下質體短暫轉染：

質體ID及參考，例如PD1-SNAP、Tim3-CLIP (亦構築及表現組合PD1-CLIP及Tim3-SNAP，但僅僅產生低FRET信號)。

質體：

a) PD1-SNAP (在5'至3'方向上)：

- 編碼人類PD1細胞外域，包括信號肽之核酸(SEQ ID NO:89之殘基1-170 (30))，
- 編碼GGGGS間隔子之核酸(SEQ ID NO: 90)，

- 編碼來自pSNAP-tag(T7)2之SNAP的核酸(不具有N端甲硫胺酸殘基)，該SNAP為O6-烷基鳥嘌呤-DNA-烷基轉移酶(hAGT)之人類基因的突變形式。(與野生型hAGT相比，SNAP-標籤蛋白質含有突變C26A、K125A、A127T、R128A、G131K、G132T、M134L、R135S、C150S、N157G、S159E，且在G182後截短)(SEQ ID NO: 91)，

- 編碼GGGGS間隔子之核酸(SEQ ID NO: 90)，

- 編碼人類PD1-跨膜及細胞質域之核酸(SEQ ID NO: 89之殘基171-191)，

- 編碼GGGGS間隔子之核酸(SEQ ID NO: 90)，

- 編碼Flag-標籤之核酸(DYKDDDDK；SEQ ID NO: 92)。

b) Tim3-CLIP (在5'至3'方向上)：

- 編碼人類Tim3細胞外域，包括信號肽之核酸(SEQ ID NO:93之殘基1-202)

- 編碼GGGGS間隔子之核酸(SEQ ID NO: 90)，

- 編碼來自pCLIPf之CLIP的核酸(不具有N端甲硫胺酸殘基)，該CLIP為O6-烷基鳥嘌呤-DNA-烷基轉移酶(hAGT)之人類基因的突變形式(SEQ ID NO:94)。

- 編碼GGGGS間隔子之核酸(SEQ ID NO: 90)，

- 編碼人類Tim3跨膜及細胞質域之核酸(SEQ ID NO: 93之殘基203-230)，

- 編碼GGGGS間隔子之核酸(SEQ ID NO: 90)，

- 編碼Flag-標籤之核酸(DYKDDDDK；SEQ ID NO: 92)。

在轉染時，細胞在震盪燒瓶中培育，直至最終用於FACS (轉染後24-

48小時)或FRET實驗(48小時後)。

證實短暫轉染之HEK293細胞上PD1及Tim3表現(FACS)

短暫轉染Hek293細胞後24-48小時，分析細胞之PD1及Tim3表現：通常，在冰上在10 $\mu\text{g/ml}$ 下將 $1-3 \times 10^5$ 個單或雙轉染細胞染色30分鐘，用PBS/2% FCS洗滌兩次，且在FacsCanto II上使用以下分析

- PD1-FITC (Biolegend 329904，純系EH12.2H7)或PD1-PE (R&D #FAB1086P)及/或
- Tim3-PE (R&D FAB2365P純系344823)及/或

使用抗PD1/TIM3雙特異性抗體之描述細胞標記及FRET分析

使用抗PD1/TIM3雙特異性抗體之描述細胞標記及FRET分析：

經轉染細胞沈降且以 1×10^6 個細胞/毫升之密度再懸浮於Tag-lite緩衝液(Cisbio)中。接著，在Tag-Lite緩衝液(Cisbio)中在 37°C 下將細胞用100 nM SNAP-Lumi4-Tb (Cisbio)及100 nM Clip-Red (Cisbio)染色1小時。洗滌及再懸浮於PBS/2% FCS後，將約50,000個細胞(50 μl 體積中)接種至96孔平底白色盤(Costar)中，接著以0.001-10 nM之最終濃度添加對照(例如單特異性同型參考)或雙特異性抗體至細胞中。在一些實驗中，經由山羊抗人類Fc (20 nM最終濃度，資料未展示)使親本單株抗體交聯。在 4°C 或室溫下培育1小時後，時差式螢光用BMG Pherastar讀數器或Tecan Infinite M1000 Pro，使用供應商提供之標準設置量測為665/620 nm比率。視情況，將SNAP-Lumi4-Tb及100nM Clip-Red標記細胞儲存在 -80°C 下或在液氮中，且新鮮解凍用於FRET實驗。

結果：

如FRET誘發所證實，表徵不同雙特異性抗體及抗體格式同時結合受體及

交聯

如上所述處理表現PD1及TIM3之HEK細胞，以在經由與滴定量之不同雙特異性抗體(0.12-10nM)一起培育進行同時受體結合時量測FRET信號。

所有雙特異性抗體均以劑量依賴性方式誘發表現PD-1-TIM3之細胞中FRET信號。如圖7A中可見，1+1格式(抗體#389及168)與2+2構築體(358+359)相比之間無嚴重差異

另外，亦評估基於人類化PD1 TIM3抗體(#476及477)之兩種雙特異性格式在處理時誘發細胞中FRET之能力。如圖7B中證實，兩種構築體均誘發PD1+TIM3+ HEK細胞中顯著FRET信號，表明以功能性方式同時結合。

為展示雙特異性抗體之同時結合所誘發的FRET信號之特異性，添加僅僅一種特異性之單株IgG進行競爭。

SNAP標記之PD1及CLIP標記之TIM3細胞(如前所述)用100 nM SNAP-Lumi4-Tb及100nM Clip-Red標記。洗滌後，標記細胞與雙特異性抗PD1/TIM3抗體#0168 [以所指示之濃度]一起在4°C下培育1小時，接著在665/620 nm下用BMG Pherastar讀數器量測時差式螢光(黑線)。為突出雙特異性抗體處理後FRET信號之特異性，添加抗PD1單株抗體(#0165，圖8A，灰色曲線)或抗TIM-3單株抗體(#0018，圖8B，灰色曲線)進行競爭，使得FRET信號幾乎完整阻止。單獨親本(單特異性)抗PD-1抗體不誘發FRET (點線)。

在與雙特異性抗體並行添加之TIM3親本抗體(0018；灰色曲線)存在下亦阻止FRET信號之誘發(圖8B)。

實例14：抗體與不同末梢血液單核細胞(PBMC)之結合

結合分析

新鮮分離之PBMC或3天多株活化(盤結合之抗CD3及可溶性抗CD28抗體，各1 ug/ml，均來自BD Pharmingen) CD4 T細胞用Alexa 647直接結合之抗TIM-3或抗TIM-3/抗PD-1雙特異性抗體在4°C下染色1小時。接著洗滌細胞以消除未結合之抗體且在4°C下針對表面標記物染色30分鐘以辨別單核細胞(CD14⁺ (BD Pharmingen))、NK細胞(CD16⁺ (eBioscience)、CD56⁺ (BioLegend)及CD3⁻)及T細胞(CD3⁺ (eBioscience))，之後用BD Cell Fix來固定。在LSRFortessa (BD Biosciences)獲得細胞。與抗Tim3抗體相比雙特異性抗體之結果在圖9A至9H中展示。

實例15：內化

圖15A)將先前與1 mg/ml盤結合之抗CD3及1 mg/ml可溶性抗CD28抗體一起培養的三天多株活化CD4 T細胞在抗TIM-3或抗TIM-3/抗PD-1雙特異性抗體存在下在4°C下培育30分鐘(一式兩份)。接著洗滌細胞，分成兩組，其中一組在37°C下再培育3小時，且另一組立即用標記之二級抗體(eBioscience)染色，隨後用BD Cell Fix來固定。培育3小時後，第二組細胞亦用標記之二級抗體染色，隨後固定。

在LSRFortessa (BD Biosciences)獲得細胞且比較兩組中可偵測抗體在細胞表面上之表現量。結果展示在圖10A至10D中。雙特異性1+1 PD1TIM3-0166 (基於嵌合PD1-0103/TIM3-0038)展示與雙特異性2+2 PD1TIM3-0321 (亦基於嵌合PD1-0103/TIM3-0038，但具有兩個針對PD之抗原結合位點及兩個針對TIM3之抗原結合位點)相比且與親本TIM3-

0038抗體相比在CD4+ T細胞及活化NK細胞上內化減少。

實例15B) 藉由螢光共聚焦顯微法目測抗體定位及內化

除了用抗PD1抗體染色時，活化CD4-陽性細胞用CMFDA (Molecular Probes, Life technologies)染色，且塗鋪在經聚-L-離胺酸 (Sigma)處理之圓形蓋玻片上。使細胞在37°C下黏附30分鐘，接著直接添加螢光標記之抗體(1 µg/mL)：a-TIM3 (chi18-A647 = 經AlexaA647標記之嵌合Tim3_0018)、a-TIM3 (chi28-A647 = 經AlexaA647標記之嵌合Tim3_0028)、Bispec (0168-A647 = 經AlexaA647標記之1+1 PD1TIM3_0168 (基於嵌合PD1-0103/Tim3-0018))及Bispec (0389-A647= 經Alexa 647標記之1+1 PD1TIM3_0389 (基於嵌合PD1-0103/Tim3-0028))及a-PD1 (0165-A488 = 經Alexa488標記之嵌合PD1-0103)至生長培養基中，歷時不同持續時間(15分鐘、1小時、2小時、3小時)。使用冷PBS (Lonza)淬滅反應且洗去未結合之抗體。接著固定(BD Cytotfix)細胞20分鐘且用洗滌緩衝液(BD染色緩衝液)洗滌兩次。蓋玻片轉移至乾燥表面後，其接著用封固劑(FluoromountG, eBioscience)安裝在載玻片上且保持在黑暗中在4°C下，接著成像。來自高度靶向細胞之膜ROI的螢光信號強度除以來自相同細胞之細胞質ROI之螢光信號強度，得到方框圖中顯示之比率。為比較樣品，使用單向ANOVA分析(* = $p < 0.05$; **= $p < 0.001$)。用來自Zeiss之具有60x上油物鏡之倒置式LSM 700進行螢光共聚焦顯微法。使用耦接至顯微鏡之Zen軟體(Zeiss)收集影像。用Imaris軟體(Bitplane ; Oxford Instrument)進行影像分析且藉由GraphPad Prism (Graphpad軟體)進行統計分析。隨時間推移之分析展示與TIM3抗體之細胞內叢集相比雙特異性與PD1抗體中膜定位更高，此展示在11A及11B圖

中。抗PD1及Bispec 0389僅僅展示極其減慢之內化，甚至在3小時之後，而另一Bispec 0168之內化則較強。aTim3 Ab 0028展示較強內化，aTim3-0018展示最大內化。

實例16：經由混合淋巴細胞反應(MLR)分析之T細胞活化

混合淋巴細胞反應(MLR)為量測來自一名個體(供體X)之淋巴細胞面對來自另一個體(供體Y)之淋巴細胞時的活化的免疫細胞分析。混合淋巴細胞反應用以證實阻斷PD1至淋巴細胞效應細胞之路徑的作用。在分析中測試在抗PD1/TIM3雙特異性mAb存在或不存在下T細胞活化及IFN- γ 分泌。

為進行同種MLR，藉由密度梯度離心，使用Leukosep (Greiner Bio One, 227 288)來分離來自未知HLA類型之至少四個健康供體的末梢血液單核細胞(PBMC)。簡言之，用三倍體積之PBS稀釋肝素化血液樣品且稀釋之血液的25 ml等分試樣分層堆積於50 ml Leukosep管中。在室溫下在800 \times g下離心15分鐘(無破裂)之後，收集含有淋巴細胞之部分，在PBS中洗滌且直接用於功能性分析中或以1.0E+07個細胞/毫升再懸浮於冷凍培養基(10% DMSO、90% FCS)中，且儲存於液氮中。藉由以1:1刺激/反應細胞比率混合來自兩種不同供體之PBMC來建立個別雙向MLR反應，且在存在或無不同濃度範圍之經純化雙特異性PD1-TIM3抗體或其親本單特異性抗體(單獨或組合)之情況下，在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂下至少一式兩份地在平底96孔盤中共培養6天。使用無抗體或使用同型對照抗體作為陰性對照且使用recom hu IL-2 (20 EU/ml)作為陽性對照。在第6天之後，自各培養物取出100 μ l培養基用於量測細胞因子。使用OptEIA ELISA套組(BD Biosciences)量測IFN- γ 之含量。

結果展示於表18A至18D (IFN- γ 分泌/釋放)。雙特異性PD1TIM3抗體以濃度依賴性方式促進T細胞活化及IFN- γ 分泌。相對於不添加任何阻斷mAb (基本同種刺激誘導之IFN γ 值，為E-c)之MLR及添加20 EU/ml recom hu IL-2 (陽性對照=100% IFN γ 值，為E+c)之MLR的IFN- γ 產生來計算IFN γ 分泌之增加%值且根據下式計算：相對刺激 [%] = ((樣品 - E-c)/(E+c - E-c)×100。

進行四個獨立實驗：

在實驗1中，評估與嵌合PD1-0103 (=PD1-0165)及嵌合TIM3_0018 (=Tim3-chi18) 以及其組合相比，PD1-TIM3 雙特異性抗體 1+1 PD1TIM3_0168 (基於嵌合PD1-0103 / TIM3-0018 (=AB 0168))之效能。結果展示於圖12A及表18A。

表18A

抗體	EC ₅₀ [nM] D2 + D6
aPD1-0165 (= 嵌合PD1-0103)	7.7
aTIM3-chi18 (=嵌合TIM3_0018)	>274
Combo aPD1-0165 + aTIM3-chi18	1.7
Bispec AB 0168 (= 1+1 PD1TIM3_0168 (基於嵌合PD1-0103 / Tim3-0018)	4.3

在實驗2中，評估與嵌合PD1-0103 (=PD1-0165)及嵌合TIM3_0028 (=TIM3-chi28) 以及其組合相比，PD1-TIM3 雙特異性抗體 1+1 PD1TIM3_0389 (基於嵌合PD1-0103/TIM3-0028 (=Bispec AB 0389))之效能。結果展示於圖12B及表18B中。

表18B

抗體	EC ₅₀ [nM] D2 + D6
aPD1-0165 (=嵌合PD1-0103)	6.5
aTIM3-chi28 (=嵌合TIM3_0028)	>274
Combo aPD1-0165 + aTIM3-chi18	1.5
Bispec AB 0389 (=1+1 PD1TIM3_0389 (基於嵌合PD1-0103 / TIM3-0028))	2.8

在實驗3中，評估與嵌合PD1-0103 (=PD1-0165)及抗TIM3-Ky8213 (來自US 2012/0189617 (參見抗體8213)，例如實例33)以及其組合相比，PD1-TIM3雙特異性抗體1+1 PD1-0103/Ky8213 (基於嵌合PD1-0103及來自US 2012/0189617之抗TIM3 Ky8213 (參見抗體8213，例如實例33)，其如實例1中所述類似地產生為1+1 CrossMab)之效能。結果展示於圖12C及表18C中。

表18C

抗體	EC ₅₀ [nM] D2 + D6
aPD1-0165 (=嵌合PD1-0103)	6.0
aTIM3-Ky8213	111
Combo aPD1-0165 + aTIM3-Ky8213	0.9
Bispec AB 1+1 PD1-0103 / TIM3-Ky8213	4.6

在實驗4中，評估與PD1-TIM3雙特異性抗體2+2 PD1TIM3_0358 (基於嵌合PD1-0103/TIM3-0028) (= Bispec AB 0358 (2+2))及嵌合PD1-0103 (=PD1-0165)及嵌合TIM3_0028 (=TIM3-chi28)以及其組合相比，PD1-TIM3雙特異性抗體1+1 PD1TIM3_0389 (基於嵌合PD1-0103/TIM3-

0028 (=Bispec AB 0389 (1+1)))之效能。結果展示於圖12D及表18D中。

表18D：

抗體	EC ₅₀ [nM] D2 + D4	EC ₅₀ [nM] D1+D3
aPD1-0165 (=嵌合PD1-0103)	5.7	5.7
aTIM3-chi28(=嵌合Tim3_0028)	>264	>264
Combo aPD1-0165 + aTim3-chi28	0.6	0.8
Bispec AB 0389 (1+1) (= 1+1 PD1TIM3_0389 (基於嵌合PD1-0103 / Tim3-0028))	1.9	2.0
Bispec AB 0358 (2+2) (=2+2 PD1TIM3_0358 (基於嵌合PD1-0103 / Tim3-0028))	5.7	6.8

表19：觀測特性/結果之概述：

分析 (- = 無作用, +/- = 極弱作用, + = 弱作用, ++ = 中等作用, +++ = 強作用, ++++ = 極強作用)						
抗體	結合				內化	MLR
	單核細胞	NK細胞	T細胞	CD4 T細胞	CD4 T細胞	IFN- γ ELISA
單特異性 TIM3-0018	++	+/-	-	++	++	+/-
雙特異性 1+1 PD1TIM3_0168	++	+	+/-	+++	-	+++
雙特異性 2+2 PD1TIM3_0359	++++	+/-	-/+	+++	-	
單特異性 TIM3-0038	++	+/-	-/+	++	+	+
雙特異性 1+1 PD1TIM3_0166	+	+/-	+/-	++	-	++
雙特異性 2+2 PD1TIM3_0321	+++	+/-	-/+	+++	++	+++

單特異性 TIM3-0028	+	+/-	-/+	+	++	+/-
雙特異性 1+1 PD1TIM3 0389	-	-	+/-	+++	-	+++
雙特異性 2+2 PD1TIM3 0358						++

實例17：抗原特異性CD4 T細胞與B細胞-類淋巴母細胞細胞株ARH77之共培養

為研究在表現MHCII之腫瘤細胞株存在下抗PD-1阻斷對CD4 T細胞之作用，研發一種分析，其中在EBV永生B細胞淋巴母細胞細胞株 (ARH77)存在下新純化之CD4 T細胞共培養5天。在最小混合淋巴細胞反應(mMLR)當天，經由微珠套組(Miltenyi Biotec)自獲自健康供體之 10^8 個PBMC富集CD4 T細胞。培養之前，用5 mM羧基-螢光素-丁二醯亞胺酯 (CFSE)標記CD4 T細胞。隨後在存在或不存在阻斷抗PD1抗體(人類化PD-1 0376、納武單抗或派立珠單抗)、抗TIM3抗體(人類化抗TIM3 0438或Kyowa-8213)或抗PD-1/TIM3雙特異性抗體(人類化0476)之情況下，以 $10 \mu\text{g/ml}$ 之濃度將 10^5 個CD4 T細胞連同B細胞株(5:1)一起塗鋪於96孔盤中。五天後，收集細胞培養物上清液，用於藉由ELISA (R&D systems)量測IFN- γ 含量。

如圖13中所示，有趣地觀測到與未經處理之CD4 T細胞(虛線)相比，抗PD-1處理顯著增加CD4 T細胞產生IFN- γ 之能力。在此分析中，抗PD-1抗體0376已同等作為基準標記抗體，能夠誘發CD4 T細胞分泌IFN- γ ，而單獨抗TIM3抗體0438僅僅具有微小作用，即使比基準抗體Kyowa-8213強。

意外地，雙特異性抗體0476比親本抗體、單獨抗PD1抗體0376及基

準抗體之組合更佳地驅動CD4 T細胞分泌IFN- γ ($P < 0.01$ ，單向ANOVA)。

實例18：活體內PD1-TIM3雙特異性抗體之功效增強

在實驗起始時6-8週齡之免疫遏制雌性小鼠(NOG)在第0天在1:1比率之基質膠存在下皮下經 10^6 個MKN45細胞(人類胃癌細胞株，表現高含量之CEA)攻擊。第7天，自健康人類供體分離PBMC：人類肝素化血液在磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)(Gibco)中約2:1稀釋，且轉移至各含有15 ml Histopaque-1077 (Sigma Aldrich)之製備之50 ml Leucosep管中。離心(30分鐘， $450\times g$ ，室溫，無剎車)後，用5 ml移液管收集PBMC亮帶。將細胞轉移至50 ml管中且用PBS洗滌(在 $350\times g$ 下離心10分鐘)。重複洗滌步驟(在 $300\times g$ 下離心10分鐘)。離心(10分鐘， $350\times g$)後，細胞再懸浮於RPMI培養基中。 10^7 個PBMC靜脈內注射於NOG小鼠中，產生小鼠-人類嵌合模型。第10天，開始每週一次排定療法(媒劑或用選自抗PD1 (0376)、納武單抗、抗TIM3 (0438)或抗PD1-TIM3 (0476)之化合物處理)且藉由腹膜內注射來給予。用PD1-Tim3雙特異性抗體(3或10 mg/kg；空心三角形)處理與等莫耳(1.5或5 mg/Kg)濃度之單一藥劑PD1抗體(0376)、納武單抗及Tim3抗體(0438)相比較。在30天時間段內，每2-3天，藉由卡尺量測腫瘤尺寸，以mm為單位。在圖14A及14B中，腫瘤體積之量測展示為該組小鼠內之平均體積。

所有處理展示當與媒劑處理組比較時能夠控制腫瘤生長。僅僅PD1(藉由PD1抗體(0376)或基準納武單抗)及僅僅TIM3抗體(0438)之抑制產生控制腫瘤生長之類似功效。此表明藉由阻斷PD1或TIM3，可增強抗腫瘤反應。然而，當PD1與TIM3由PD1-TIM3雙特異性抗體結合時可觀測腫瘤

生長抑制增加。雖然在低濃度下無法觀測到雙特異性抗體與其他處理之間的腫瘤生長差異，但在較高劑量下藉由用PD1-TIM3雙特異性抗體處理抑制PD1與TIM3使得腫瘤生長受到強烈抑制。

【序列表】

<110> 瑞士商赫孚孟拉羅股份公司

<120> 特異性針對PD1及TIM3之雙特異性抗體

<130> P33115-WO

<150> EP15188036.6

<151> 2015-10-02

<160> 94

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 1

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met
1 5

<210> 2

<211> 3

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 2

Leu Asn Asp
1

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 3

Asn Gly Tyr Leu Tyr Ala Leu Asp
1 5

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 4

Ser Ser Ser Val Asn Tyr
1 5

<210> 5

<211> 3

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 5

Asp Ala Phe

1

<210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 6

Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 7

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

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

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Leu Asn Asp Asp Val Phe Phe Asn Pro Ala
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val
 65 70 75 80

Phe Leu Gln Ile Ala Ser Val Val Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 8

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

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

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

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

Gly Thr Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

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

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

<210> 9
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 9

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Leu Asn Asp Asp Val Phe Phe Asn Pro Ala
 50 55 60

Leu Lys Arg Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val
 65 70 75 80

Phe Leu Gln Ile Ala Ser Val Val Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

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

Gly Ile Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 10
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 10

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

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

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

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

Gly Thr Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

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

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

<210> 11
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 11

Ser Ser Ser Val Gln Tyr
 1 5

<210> 12
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 12

Ser Ser Ser Val Ser Tyr
 1 5

<210> 13
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> Tim3_0016變異體(0018)的VH人類化型式(= Tim3-0433)

<400> 13

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Leu Asn Asp Asp Val Phe Phe Asn Pro Ala
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 14
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> Tim3_0016變異體(0018)的VL人類化型式 (= Tim3-0433)

<400> 14

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly
 1 5 10 15

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

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

Asp Ala Phe Lys Leu Ala Pro Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

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

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

<210> 15
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>

<223> Tim3_0016變異體(0018)的VH人類化型式 (= Tim3-0434)

<400> 15

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Leu Asn Asp Asp Val Phe Phe Asn Pro Ala
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 16

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> Tim3_0016變異體(0018)的VL人類化型式 (= Tim3-0434)

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

<210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 17

Gly Phe Asn Ile Lys Thr Thr
 1 5

<210> 18
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 18

Ala Asp Asp
 1

<210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 19

Phe Gly Tyr Val Ala Trp Phe Ala
 1 5

<210> 20
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 20

Ser Gln Ser Val Asp Asn Tyr
 1 5

<210> 21
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 21

Tyr Ala Ser
 1

<210> 22
 <211> 6
 <212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 22

His Tyr Ser Ser Pro Tyr
1 5

<210> 23

<211> 119

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 23

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

<210> 24

<211> 107

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 24

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

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Val
65 70 75 80

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

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

<210> 25
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> Tim3-0028的VH人類化型式 (= Tim3-0438)

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 26
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> Tim3-0028的VL人類化型式 (= Tim3-0438)

<400> 26

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 27
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> Tim3-0028的VH人類化型式 (= Tim3-0443)

<400> 27

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Phe Ser Ser

115

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

<220>
 <223> Tim3-0028的VL人類化型式 (= Tim3-0443)

<400> 28

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 29
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 29

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 1 5

<210> 30
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 30

Glu Asp Gly
 1

<210> 31
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 31

His Gly Tyr Val Gly Trp Phe Ala
1 5

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 32

Ala Ser Glu Asn Val Asp Thr Tyr
1 5

<210> 33

<211> 3

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 33

Gly Ala Ser
1

<210> 34

<211> 6

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 34

Ser Tyr Ser Tyr Pro Trp
1 5

<210> 35

<211> 119

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 35

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 36
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 36

Asn Val Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ile Met Ser Val Gly
1 5 10 15

Gln Arg Val Thr Leu Asn Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Asp Thr Tyr
20 25 30

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Arg Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Trp
85 90 95

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

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 37

Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr
1 5

<210> 38
<211> 3
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 38

Gly Gly Arg
1

<210> 39
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 39

Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp
 1 5

<210> 40
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 40

Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser Asp Asn Ser Phe
 1 5 10

<210> 41
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 41

Arg Ser Ser
 1

<210> 42
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 42

Asn Tyr Asp Val Pro Trp
 1 5

<210> 43
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 43

Glu Val Ile Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 44
<211> 111
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 44

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

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

Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro
35 40 45

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

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr
85 90 95

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

<210> 45
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工

<220>

<223> PD1-0103_01的人類化變異體-重鏈可變域VH

<400> 45

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 46
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> PD1-0103_01的人類化變異體-輕鏈可變域VL

<400> 46

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 Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser
 20 25 30

Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 35 40 45

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

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

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

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

<210> 47

<211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> PD1-0103_02的人類化變異體-輕鏈可變域VL

<400> 47

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

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

Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro
 35 40 45

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

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

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

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

<210> 48
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> PD1-0103_03的人類化變異體-輕鏈可變域VL

<400> 48

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

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

Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

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

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

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

<210> 49
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> PD1-0103_04的人類化變異體-輕鏈可變域VL

<400> 49

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

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

Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

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

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

<210> 50
<211> 443
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 1+1 PD1TIM3_0389的重鏈1 (基於嵌合PD1-0103 / Tim3-0028)

<400> 50

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

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

Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro
35 40 45

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

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr
 85 90 95

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

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

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

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 145 150 155 160

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

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

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

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 210 215 220

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

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 260 265 270

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

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

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

305 310 315 320
 Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 325 330 335
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 340 345 350
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 355 360 365
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395 400
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 405 410 415
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

 <210> 51
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工

 <220>
 <223> 1+1 PDITIM3_0389的重鏈2

 <400> 51
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Val Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Thr Thr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asp Asp Asn Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55
 Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ala Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Val Arg Asp Phe Gly Tyr Val Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Phe Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 130 135 140

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 145 150 155 160

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

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 180 185 190

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 195 200 205

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 210 215 220

Gly Glu Cys
 225

<210> 53
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 1+1 PD1TIM3_0389的輕鏈2

<400> 53

Asn Ile Val Met Thr Pro Thr Pro Lys Phe Leu Pro Val Ser Ser Gly
 1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Val
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 54
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 1+1 PD1TIM3_0168的重鏈1 (基於嵌合PD1-0103 / Tim3-0018)

<400> 54

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

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

Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro
 35 40 45

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

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr
 85 90 95

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

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

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

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 145 150 155 160

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

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

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

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 210 215 220

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

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 260 265 270

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

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

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

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

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 55
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 1+1 PD1TIM3_0168的重鏈2

<400> 55

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Leu Asn Asp Asp Val Phe Phe Asn Pro Ala
50 55 60

Leu Lys Arg Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Gln Ile Ala Ser Val Val Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

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

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

Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

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

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

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

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 225 230 235 240

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

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

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

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 56
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 1+1 PD1TIM3_0168的輕鏈1

<400> 56

Glu Val Ile Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 130 135 140

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 145 150 155 160

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

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 180 185 190

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 195 200 205

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 210 215 220

Gly Glu Cys
 225

<210> 57
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 1+1 PD1TIM3_0168的輕鏈2

<400> 57

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

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

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

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

Gly Thr Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

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

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

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

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 58
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 1+1 PD1TIM3_0166的重鏈1：(基於嵌合PD1-0103 / Tim3-0038

<400> 58

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

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

Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro
 35 40 45

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

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr
 85 90 95

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

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

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

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 145 150 155 160

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

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 180 185 190
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 195 200 205
 Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 210 215 220
 Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 225 230 235 240
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 260 265 270
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 275 280 285
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 305 310 315 320
 Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 325 330 335
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 340 345 350
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 355 360 365
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395 400
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 405 410 415
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 59
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 1+1 PD1TIM3_0166的重鏈2

<400> 59

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

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Glu Leu Ile Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
 355 360 365
 Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 60
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 1+1 PD1TIM3_0166的輕鏈1

<400> 60

Glu Val Ile Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 130 135 140

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 145 150 155 160

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

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 180 185 190

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 195 200 205

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 210 215 220

Gly Glu Cys
 225

<210> 61
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>

<223> 1+1 PD1TIM3_0166的輕鏈2

<400> 61

Asn Val Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ile Met Ser Val Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Val Thr Leu Asn Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Asp Thr Tyr
 20 25 30

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Arg Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Phe Arg Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 62

<211> 443

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> I+1 PD1TIM3_0476的重鏈1：(基於人類化PD1-0103_0312 / Tim3-0438)

<400> 62

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 Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser
 20 25 30

Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 35 40 45

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

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

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

Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser
 100 105 110

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

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

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 145 150 155 160

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

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

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

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 210 215 220

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

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

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

290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
 355 360 365
 Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 64
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 1+1 PD1TIM3_0476的輕鏈1

<400> 64

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

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

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

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

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

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
130 135 140

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
145 150 155 160

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

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
180 185 190

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
195 200 205

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
210 215 220

Gly Glu Cys
225

<210> 65
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 1+1 PD1TIM3_0476的輕鏈2

<400> 65

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

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

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

<210> 66

<211> 443

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1+1 PD1TIM3_0477的重鏈1：(基於人類化PD1-0103_0312 / Tim3-0434)

<400> 66

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 Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser
 20 25 30
 Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 35 40 45

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

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

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

Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser
 100 105 110

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

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

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 145 150 155 160

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

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

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

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 210 215 220

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

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 260 265 270

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

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

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

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

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 67
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 1+1 PDITIM3_0477的重鏈2

<400> 67

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Leu Asn Asp Asp Val Phe Phe Asn Pro Ala
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Val Arg Ala Asn Gly Tyr Leu Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

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

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

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 68
<211> 227
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 1+1 PD1TIM3_0477的輕鏈I

<400> 68

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 130 135 140

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 145 150 155 160

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

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 180 185 190

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 195 200 205

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 210 215 220

Gly Glu Cys
 225

<210> 69
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 1+1 PDITIM3_0477的輕鏈2

<400> 69

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

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

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

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

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 70
 <211> 685
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 2+2 PD1TIM3_0358的重鏈：嵌合PD1-0103 / Tim3-0028
 <400> 70
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Val Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Thr Thr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asp Asp Asn Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ala Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Asp Phe Gly Tyr Val Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Phe Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 450 455 460
 Gly Gly Gly Ser Lys Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Pro
 465 470 475 480
 Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
 485 490 495
 Val Asp Thr Ser Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro
 500 505 510
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser
 515 520 525
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
 530 535 540
 Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
 545 550 555 560
 Gln Gln Asn Tyr Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 565 570 575
 Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 580 585 590
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 595 600 605
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 610 615 620
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 625 630 635 640
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 645 650 655

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
660 665 670

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
675 680 685

<210> 71
<211> 200
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 2+2 PD1TIM3_0358的輕鏈1

<400> 71

Asn Ile Val Met Thr Pro Thr Pro Lys Phe Leu Pro Val Ser Ser Gly
1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Val
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
195 200

<210> 72
<211> 227
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 2+2 PD1TIM3_0358的輕鏈2

<400> 72

Glu Val Ile Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
130 135 140

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
145 150 155 160

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

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
180 185 190

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
195 200 205

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg

210

215

220

Gly Glu Cys
225<210> 73
<211> 686
<212> PRT
<213> 人工<220>
<223> 2+2 PD1TIM3_0359的重鏈：嵌合PD1-0103 / Tim3-0018

<400> 73

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

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 225 230 235 240

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

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

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 450 455 460

Gly Gly Gly Gly Ser Lys Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu

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

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

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

Gly Thr Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

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

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

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

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 75
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 2+2 PD1TIM3_0359的輕鏈2

<400> 75

Glu Val Ile Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

Gly Glu Cys
225

<210> 76
 <211> 685
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 2+2 PD1TIM3_0321的重鏈：嵌合PD1-0103 / Tim3-0038

<400> 76

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

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

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

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

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

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 450 455 460

Gly Gly Gly Ser Lys Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Pro
 465 470 475 480

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
 485 490 495

Val Asp Thr Ser Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro
 500 505 510

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser
 515 520 525

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
 530 535 540

Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
545 550 555 560

Gln Gln Asn Tyr Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
565 570 575

Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
580 585 590

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
595 600 605

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
610 615 620

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
625 630 635 640

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
645 650 655

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
660 665 670

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
675 680 685

<210> 77

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 2+2 PDITIM3_0321的輕鏈1

<400> 77

Asn Val Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ile Met Ser Val Gly
1 5 10 15

Gln Arg Val Thr Leu Asn Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Asp Thr Tyr
20 25 30

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Arg Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Phe Arg Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 78
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 2+2 PD1TIM3_0321的輕鏈2
 <400> 78

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

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

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

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

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
130 135 140

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
145 150 155 160

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

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
180 185 190

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
195 200 205

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
210 215 220

Gly Glu Cys
225

<210> 79
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 79

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

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

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

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

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

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

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

<210> 80
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 80

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

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 20 25 30

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

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 65 70 75 80

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

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

<210> 81
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 81

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

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

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

<210> 82
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 82

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

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

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

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

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

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

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 83
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 83

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

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

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

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

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

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

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 84
<211> 327
<212> PRT
<213> 智人

<400> 84

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

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

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

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

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

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

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

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 85
<211> 280
<212> PRT
<213> 智人

<400> 85

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

Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu Val Pro Val Cys Trp
20 25 30

Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly Asn Val Val Leu Arg
35 40 45

Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser Arg Tyr Trp Leu Asn
50 55 60

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

Leu Ala Asp Ser Gly Ile Tyr Cys Cys Arg Ile Gln Ile Pro Gly Ile
85 90 95

Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys Leu Val Ile Lys Pro Ala Lys
100 105 110

Val Thr Pro Ala Pro Thr Arg Gln Arg Asp Phe Thr Ala Ala Phe Pro
115 120 125

Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His Gly Pro Ala Glu Thr Gln Thr Leu
130 135 140

Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu Thr Gln Ile Ser Thr Leu Ala Asn
145 150 155 160

Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu Arg Asp Ser Gly Ala
165 170 175

Thr Ile Arg Ile Gly Ile Tyr Ile Gly Ala Gly Ile Cys Ala Gly Leu
180 185 190

Ala Leu Ala Leu Ile Phe Gly Ala Leu Ile Phe Lys Trp Tyr Ser His
195 200 205

Ser Lys Glu Lys Ile Gln Asn Leu Ser Leu Ile Ser Leu Ala Asn Leu
210 215 220

Pro Pro Ser Gly Leu Ala Asn Ala Val Ala Glu Gly Ile Arg Ser Glu
225 230 235 240

Glu Asn Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Asn Val Tyr Glu Val Glu Glu Pro
245 250 255

Asn Glu Tyr Tyr Cys Tyr Val Ser Ser Arg Gln Gln Pro Ser Gln Pro
260 265 270

Leu Gly Cys Arg Phe Ala Met Pro
275 280

<210> 86
<211> 181
<212> PRT
<213> 智人

<400> 86

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

Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu Val Pro Val Cys Trp
20 25 30

Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly Asn Val Val Leu Arg
35 40 45

Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser Arg Tyr Trp Leu Asn
50 55 60

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

Leu Ala Asp Ser Gly Ile Tyr Cys Cys Arg Ile Gln Ile Pro Gly Ile
85 90 95

Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys Leu Val Ile Lys Pro Ala Lys
100 105 110

Val Thr Pro Ala Pro Thr Arg Gln Arg Asp Phe Thr Ala Ala Phe Pro
115 120 125

Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His Gly Pro Ala Glu Thr Gln Thr Leu
130 135 140

Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu Thr Gln Ile Ser Thr Leu Ala Asn
145 150 155 160

Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu Arg Asp Ser Gly Ala
165 170 175

Thr Ile Arg Ile Gly
180

<210> 87
<211> 268
<212> PRT
<213> 智人

<400> 87

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
1 5 10 15

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
35 40 45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
50 55 60

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

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
85 90 95

Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala
100 105 110

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
115 120 125

Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
130 135 140

Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly Leu Leu Gly Ser
145 150 155 160

Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys Ser Arg Ala Ala
165 170 175

Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Lys Glu Asp
180 185 190

Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly Glu Leu Asp Phe
195 200 205

Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro Cys Val Pro Glu
210 215 220

Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly Met Gly Thr Ser
 225 230 235 240

Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg Ser Ala Gln Pro
 245 250 255

Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
 260 265

<210> 88
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 88

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
 1 5 10 15

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
 20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
 35 40 45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
 50 55 60

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

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
 85 90 95

Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala
 100 105 110

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
 115 120 125

Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
 130 135 140

Gln Phe Gln Thr Leu Val
 145 150

<210> 89
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 89

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> 90
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GGGGS間隔子

<400> 90

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 91
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> SNAP-標籤

<400> 91

Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro Leu Gly
 1 5 10 15

Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile Lys Leu
 20 25 30

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

Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Ala Thr Ala Trp
 50 55 60

Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro Val
 65 70 75 80

Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr Arg Gln
 85 90 95

Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val Ile Ser
 100 105 110

Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr Ala Ala
 115 120 125

Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile Pro Cys
 130 135 140

His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu Gly Gly
 145 150 155 160

Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg Leu Gly
 165 170 175

Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Gly Ser Pro Gly Leu Glu Val Asn
 180 185 190

<210> 92
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Flag-標籤

<400> 92

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 93
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 93

Met Phe Ser His Leu Pro Phe Asp Cys Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Thr Arg Ser Ser Glu Val Glu Tyr Arg Ala Glu Val Gly Gln
 20 25 30

Asn Ala Tyr Leu Pro Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu
 35 40 45

Val Pro Val Cys Trp Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly
 50 55 60

Asn Val Val Leu Arg Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser
 65 70 75 80

Arg Tyr Trp Leu Asn Gly Asp Phe Arg Lys Gly Asp Val Ser Leu Thr
 85 90 95

Ile Glu Asn Val Thr Leu Ala Asp Ser Gly Ile Tyr Cys Cys Arg Ile
 100 105 110

Gln Ile Pro Gly Ile Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys Leu Val
 115 120 125

Ile Lys Pro Ala Lys Val Thr Pro Ala Pro Thr Arg Gln Arg Asp Phe
 130 135 140

Thr Ala Ala Phe Pro Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His Gly Pro Ala
145 150 155 160

Glu Thr Gln Thr Leu Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu Thr Gln Ile
165 170 175

Ser Thr Leu Ala Asn Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu
180 185 190

Arg Asp Ser Gly Ala Thr Ile Arg Ile Gly Ile Tyr Ile Gly Ala Gly
195 200 205

Ile Cys Ala Gly Leu Ala Leu Ala Leu Ile Phe Gly Ala Leu Ile Phe
210 215 220

Lys Trp Tyr Ser His Ser Lys Glu Lys Ile Gln Asn Leu Ser Leu Ile
225 230 235 240

Ser Leu Ala Asn Leu Pro Pro Ser Gly Leu Ala Asn Ala Val Ala Glu
245 250 255

Gly Ile Arg Ser Glu Glu Asn Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Asn Val Tyr
260 265 270

Glu Val Glu Glu Pro Asn Glu Tyr Tyr Cys Tyr Val Ser Ser Arg Gln
275 280 285

Gln Pro Ser Gln Pro Leu Gly Cys Arg Phe Ala Met
290 295 300

<210> 94
<211> 181
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Clip-標籤

<400> 94

Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro Leu Gly
1 5 10 15

Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Arg Ile Ile Phe
20 25 30

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

Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Ile Gln Ala Thr Ala Trp
50 55 60

Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro Val

201718660

【發明摘要】

G07K 16/46 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

【中文發明名稱】

特異性針對PD1及TIM3之雙特異性抗體

【英文發明名稱】

BISPECIFIC ANTIBODIES SPECIFIC FOR PD1 AND TIM3

【中文】

本發明係關於包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點的雙特異性抗體，尤其如下雙特異性抗體，其中該雙特異性抗體以低於結合於PD1之結合親和力結合於TIM3。本發明進一步關於產生此等分子之方法及其使用方法。

【英文】

The invention relates to bispecific antibodies comprising a first antigen-binding site that specifically binds to PD1 and a second antigen-binding site that specifically binds to TIM3, in particular to bispecific antibodies, wherein the bispecific antibody binds to TIM3 with a lower binding affinity when compared to the binding to PD1. The invention further relates to methods of producing these molecules and to methods of using the same.

【指定代表圖】

圖13

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種雙特異性抗體，其包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點，其中

該特異性結合於PD1之第一抗原結合位點包含

包含以下之VH域：

(i)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的HVR-H1，

(ii)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的HVR-H2，及

(iii)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的HVR-H3；以及

包含以下之VL域：

(i)包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列的HVR-L1；

(ii)包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的HVR-L2，及

(iii)包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的HVR-L3；且

該特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點包含

(a)包含以下之VH域：

(i)包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列的HVR-H1，

(ii)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列的HVR-H2，及

(iii)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列的HVR-H3；以及

包含以下之VL域：

(i)包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12之胺基酸序列的HVR-L1，

(ii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列的HVR-L2，及

(iii)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列的HVR-L3；或

(b)包含以下之VH域：

- (i)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-H1，
 - (ii)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-H2，及
 - (iii)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的HVR-H3；以及
- 包含以下之VL域：

- (i)包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的HVR-L1，
- (ii)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的HVR-L2，及
- (iii)包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的HVR-L3；或

(c)包含以下之VH域：

- (i)包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列的HVR-H1，
 - (ii)包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列的HVR-H2，及
 - (iii)包含SEQ ID NO:31之胺基酸序列的HVR-H3；以及
- 包含以下之VL域：

- (i)包含SEQ ID NO:32之胺基酸序列的HVR-L1，
- (ii)包含SEQ ID NO:33之胺基酸序列的HVR-L2，及
- (iii)包含SEQ ID NO:34之胺基酸序列的HVR-L3。

【第2項】

如請求項1之雙特異性抗體，其包含特異性結合於PD1之第一抗原結合位點及特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點，其中該雙特異性抗體以比結合於PD1低至少50倍之結合親和力、更尤其比結合於PD1低至少100倍之結合親和力結合於TIM3。

【第3項】

如請求項1或2之雙特異性抗體，其中

該特異性結合於PD1之第一抗原結合位點包含

(a)包含SEQ ID NO: 43之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 44之胺基酸序列的VL域，或

(b)包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 46之胺基酸序列的VL域，或

(c)包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 47之胺基酸序列的VL域，或

(d)包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 48之胺基酸序列的VL域，或

(e)包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 49之胺基酸序列的VL域，

且該特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點包含

(a)包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列的VL域，或

(b)包含SEQ ID NO: 9之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列的VL域，或

(c)包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列的VL域，或

(d)包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 16之胺基酸序列的VL域，或

(e)包含SEQ ID NO: 23之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的VL域，或

(f)包含SEQ ID NO: 25之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO:

26之胺基酸序列的VL域，或

(g)包含SEQ ID NO: 27之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列的VL域，或

(h)包含SEQ ID NO: 35之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 36之胺基酸序列的VL域。

【第4項】

如請求項1或2之雙特異性抗體，其中

該特異性結合於PD1之第一抗原結合位點包含有包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 46之胺基酸序列的VL域，

且該特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點包含有包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 16之胺基酸序列的VL域或包含SEQ ID NO: 25之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 26之胺基酸序列的VL域。

【第5項】

如請求項1或2之雙特異性抗體，其中

該特異性結合於PD1之第一抗原結合位點包含有包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 46之胺基酸序列的VL域，

且該特異性結合於TIM3之第二抗原結合位點包含有包含SEQ ID NO: 25之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO: 26之胺基酸序列的VL域。

【第6項】

如請求項1或2之雙特異性抗體，其中該雙特異性抗體為人類、人類化或嵌合抗體。

【第7項】

如請求項1或2之雙特異性抗體，其中該雙特異性抗體包含Fc域、包含該特異性結合於PD1之抗原結合位點的第一Fab片段及包含該特異性結合於TIM3之抗原結合位點的第二Fab片段。

【第8項】

如請求項1或2之雙特異性抗體，其中該Fc域為IgG，尤其IgG1 Fc域或IgG4 Fc域。

【第9項】

如請求項1或2之雙特異性抗體，其中該Fc域包含一或多個減少與Fc受體、尤其Fc γ 受體之結合的胺基酸取代。

【第10項】

如請求項1或2之雙特異性抗體，其中該Fc域為人類IgG1子類，具有胺基酸突變L234A、L235A及P329G (根據Kabat EU指數編號)。

【第11項】

如請求項1或2之雙特異性抗體，其中該Fc域包含促進該Fc域之第一次單元與第二次單元締合的修飾。

【第12項】

如請求項1或2之雙特異性抗體，其中根據杵臼方法，該Fc域之該第一次單元包含杵且該Fc域之該第二次單元包含臼。

【第13項】

如請求項1或2之雙特異性抗體，其中該Fc域之該第一次單元包含胺基酸取代S354C及T366W (EU編號)，且該Fc域之該第二次單元包含胺基酸取代Y349C、T366S及Y407V (根據Kabat EU指數編號)。

【第14項】

如請求項1或2之雙特異性抗體，其中在該等Fab片段之一中，該等可變域VL及VH彼此置換，從而使得該VH域為該輕鏈之一部分且該VL域為該重鏈之一部分。

【第15項】

如請求項14之雙特異性抗體，其中在包含該特異性結合於PD1之抗原結合位點的該第一Fab片段中，該等可變域VL及VH彼此置換。

【第16項】

如請求項1或2之雙特異性抗體，其中在該等Fab片段之一中，在恆定域CL中，位置124之胺基酸經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)(根據Kabat EU指數編號)獨立地取代，且在恆定域CH1中，位置147及213之胺基酸經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)(根據Kabat EU指數編號)獨立地取代。

【第17項】

如請求項16之雙特異性抗體，其中在包含該特異性結合於TIM3之抗原結合位點的該第二Fab片段中，該恆定域CL之位置124之胺基酸經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)(根據Kabat EU指數編號)獨立地取代，且在該恆定域CH1中，位置147及213之胺基酸經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)(根據Kabat EU指數編號)獨立地取代。

【第18項】

如請求項1或2之雙特異性抗體，其包含

(a)包含與SEQ ID NO: 50之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一重鏈，包含與SEQ ID NO: 52之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含與SEQ ID NO: 51之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二重鏈，及包含與SEQ ID NO: 53之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(b)包含與SEQ ID NO: 54之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一重鏈，包含與SEQ ID NO: 56之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含與SEQ ID NO: 55之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二重鏈，及包含與SEQ ID NO: 57之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(c)包含與SEQ ID NO: 58之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一重鏈，包含與SEQ ID NO: 60之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含與SEQ ID NO: 59之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二重鏈，及包含與SEQ ID NO: 61之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(d)包含與SEQ ID NO: 62之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一重鏈，包含與SEQ ID NO: 64之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含與SEQ ID NO: 63之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二重鏈，及包含與SEQ ID NO: 65之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(e)包含與SEQ ID NO: 66之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第一重鏈，包含與SEQ ID NO: 68之序列至少95%序列一致之胺基酸序列

的第一輕鏈，

包含與SEQ ID NO: 67之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二重鏈，及包含與SEQ ID NO: 69之序列至少95%序列一致之胺基酸序列的第二輕鏈。

【第19項】

如請求項1或2之雙特異性抗體，其包含

(a)包含SEQ ID NO: 50之胺基酸序列的第一重鏈，包含SEQ ID NO: 52之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含SEQ ID NO: 51之胺基酸序列的第二重鏈，及包含SEQ ID NO: 53之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(b)包含SEQ ID NO: 54之胺基酸序列的第一重鏈，包含SEQ ID NO: 56之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含SEQ ID NO: 55之胺基酸序列的第二重鏈，及包含SEQ ID NO: 57之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(c)包含SEQ ID NO: 58之胺基酸序列的第一重鏈，包含SEQ ID NO: 60之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含SEQ ID NO: 59之胺基酸序列的第二重鏈，及包含SEQ ID NO: 61之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(d)包含SEQ ID NO: 62之胺基酸序列的第一重鏈，包含SEQ ID NO: 64之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含SEQ ID NO: 63之胺基酸序列的第二重鏈，及包含SEQ ID NO: 65之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(e)包含SEQ ID NO: 66之胺基酸序列的第一重鏈，包含SEQ ID NO:

68之胺基酸序列的第一輕鏈，

包含SEQ ID NO: 67之胺基酸序列的第二重鏈，及包含SEQ ID NO: 69之胺基酸序列的第二輕鏈。

【第20項】

一種聚核苷酸，其編碼如請求項1至19中任一項之雙特異性抗體。

【第21項】

一種載體，其包含如請求項20之聚核苷酸。

【第22項】

一種原核或真核宿主細胞，其包含如請求項20之聚核苷酸或如請求項21之載體。

【第23項】

一種產生如請求項1至19之雙特異性抗體的方法，其包含以下步驟：
a)用包含編碼該雙特異性抗體之聚核苷酸之載體使宿主細胞轉形；b)在適合於表現該雙特異性抗體之條件下培養該宿主細胞；以及c)自該培養物回收該雙特異性抗體。

【第24項】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至19中任一項之雙特異性抗體及至少一種醫藥學上可接受之賦形劑。

【第25項】

如請求項24之醫藥組合物，其係用作藥物。

【第26項】

如請求項24之醫藥組合物，其係用於

i)調節免疫反應，諸如恢復T細胞活性，

- ii) 刺激免疫反應或功能，
- iii) 治療感染，
- iv) 治療癌症，
- v) 延遲癌症進展，
- vi) 延長罹患癌症之患者的存活。

【第27項】

如請求項24之醫藥組合物，其係用於預防或治療癌症。

【第28項】

如請求項24之醫藥組合物，其係用於治療慢性病毒感染。

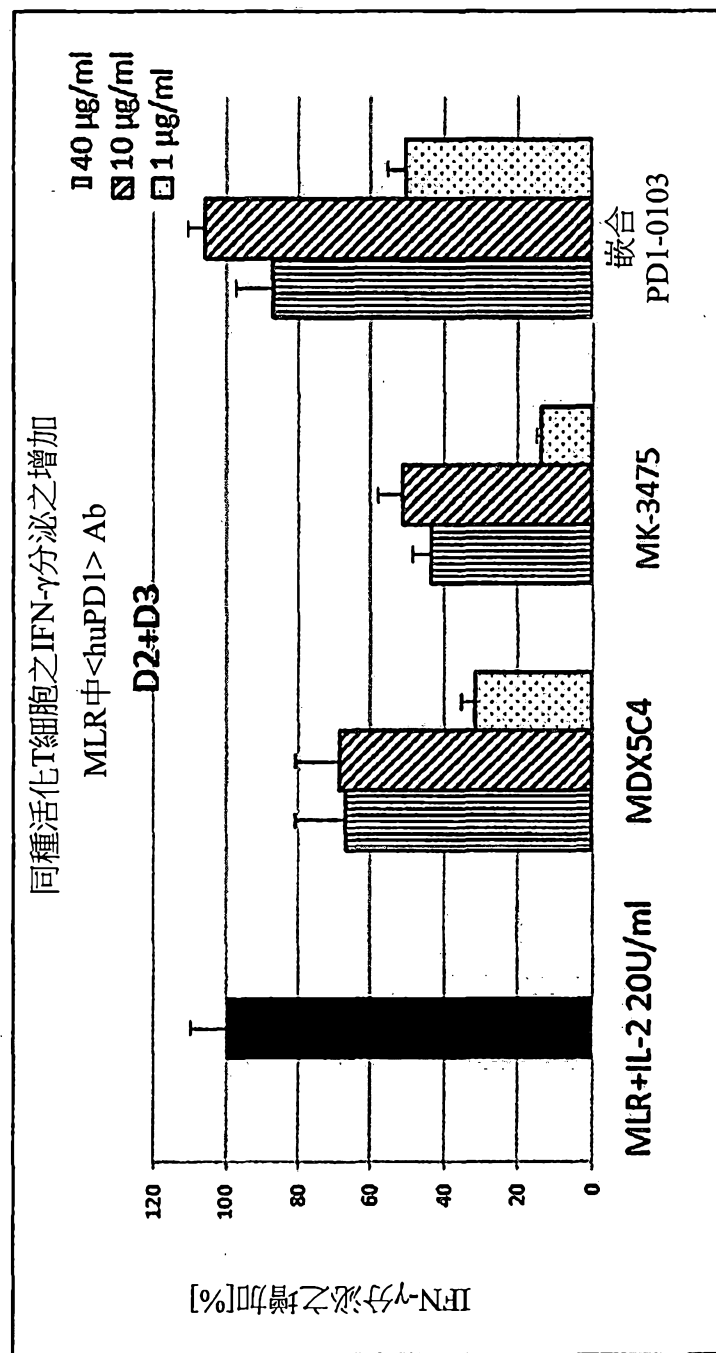
【第29項】

如請求項24之醫藥組合物，其係用於預防或治療癌症，其中該雙特異性抗體與化學治療劑、放射線及/或其他用於癌症免疫療法之藥劑組合投與。

【第30項】

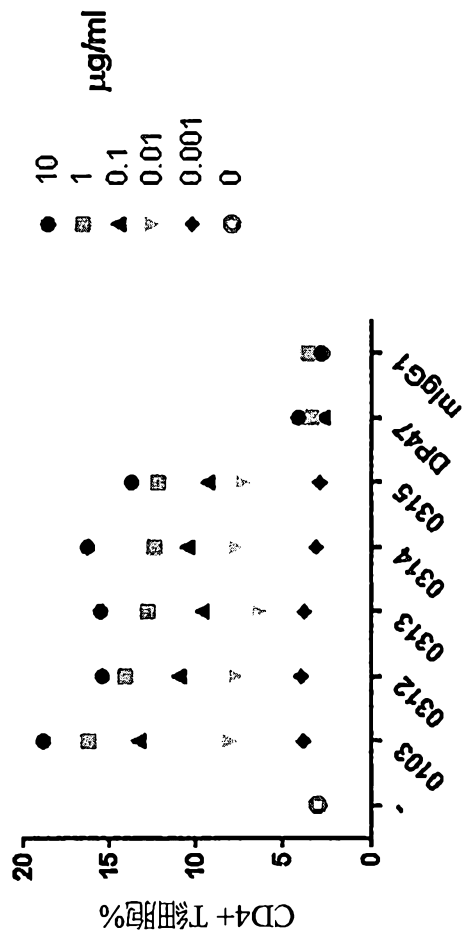
一種如請求項1至19中任一項之雙特異性抗體的用途，其係用於製造供抑制腫瘤細胞生長用之藥物。

【發明圖式】

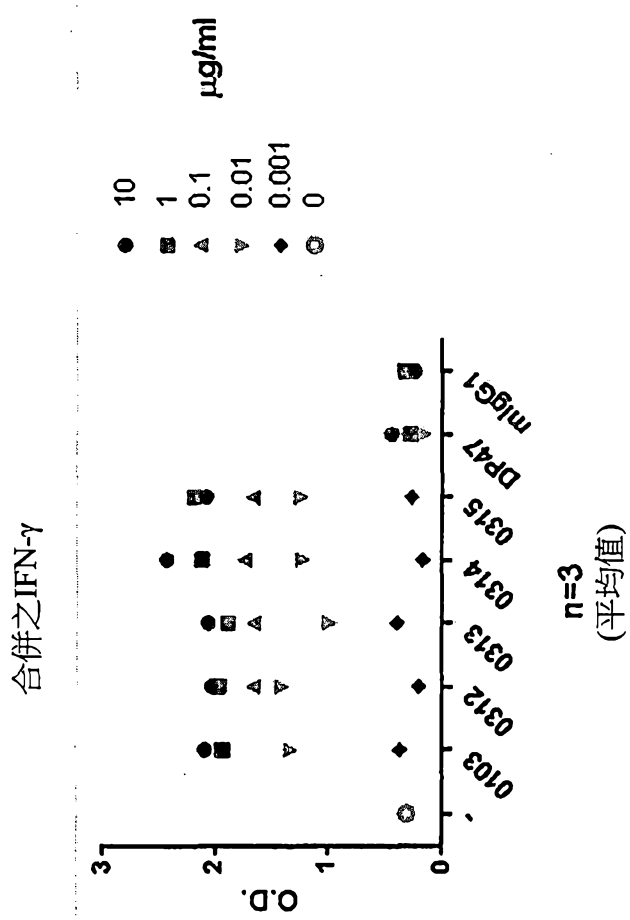


【圖1】

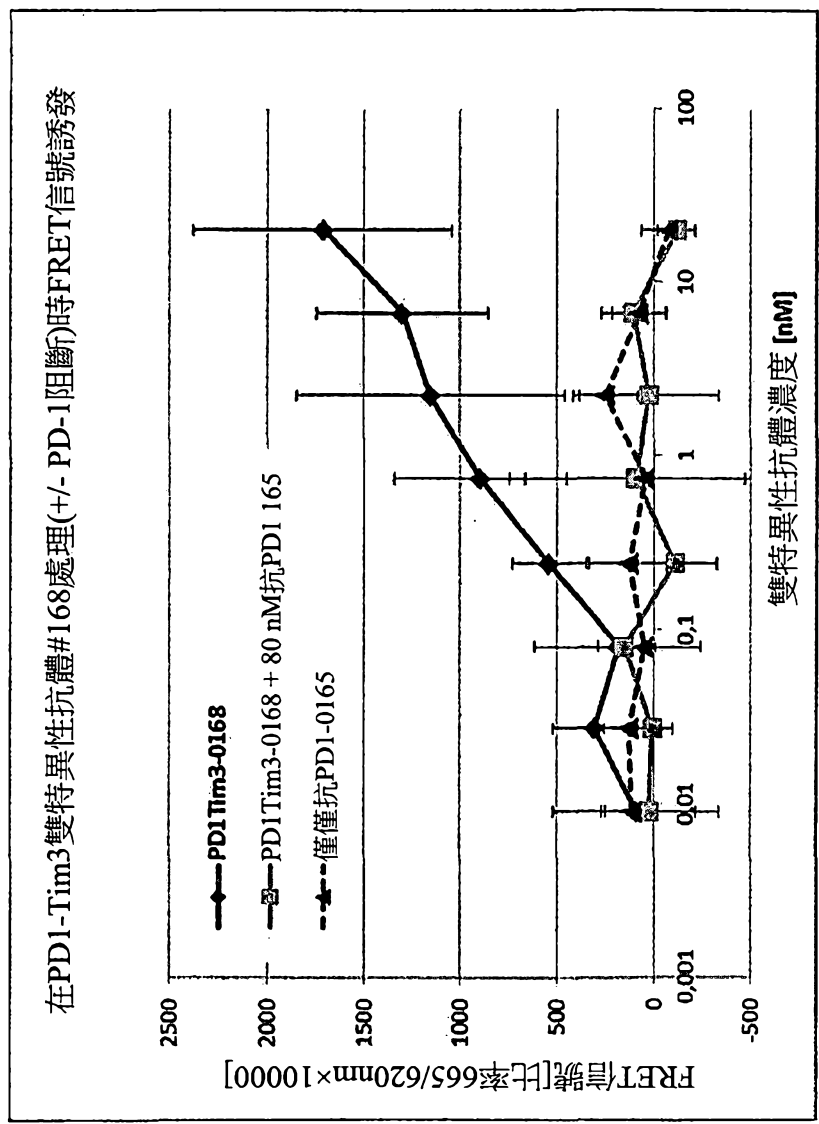
合併之顆粒酶B



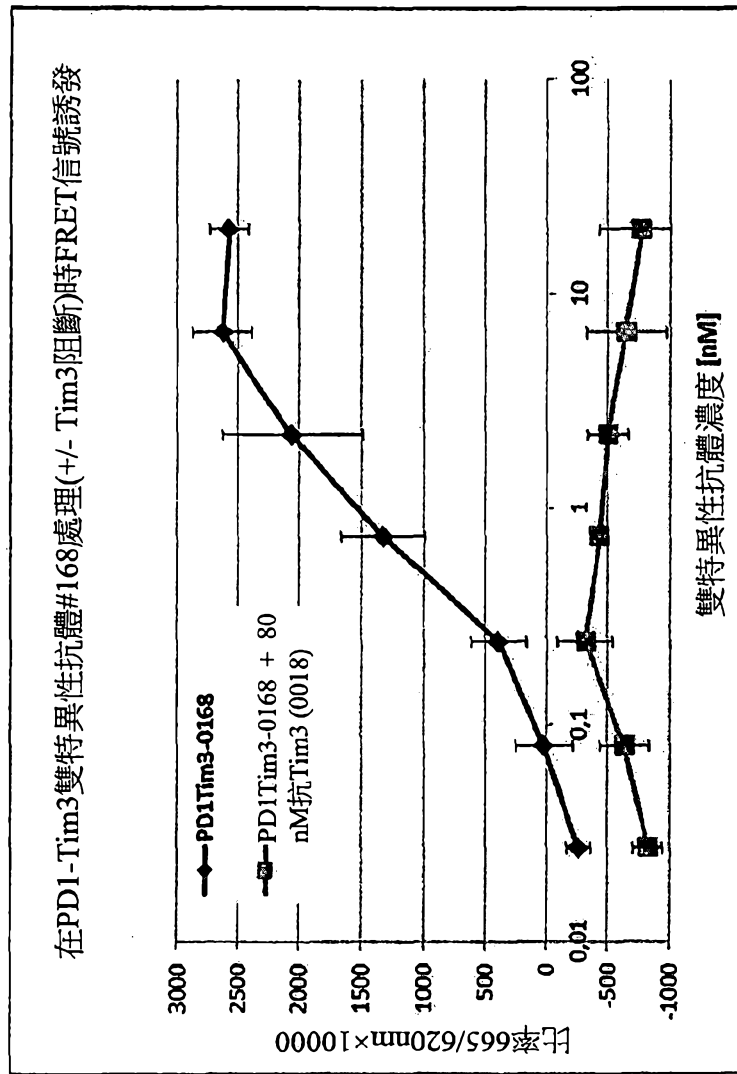
n=4
(平均值)
【圖4A】



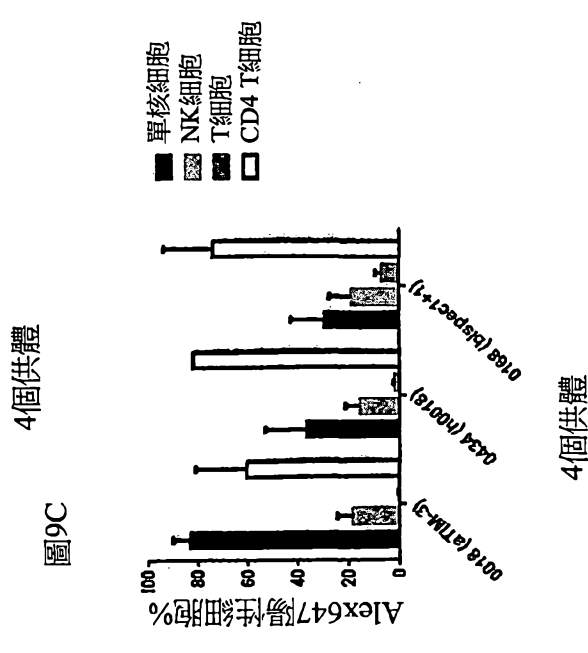
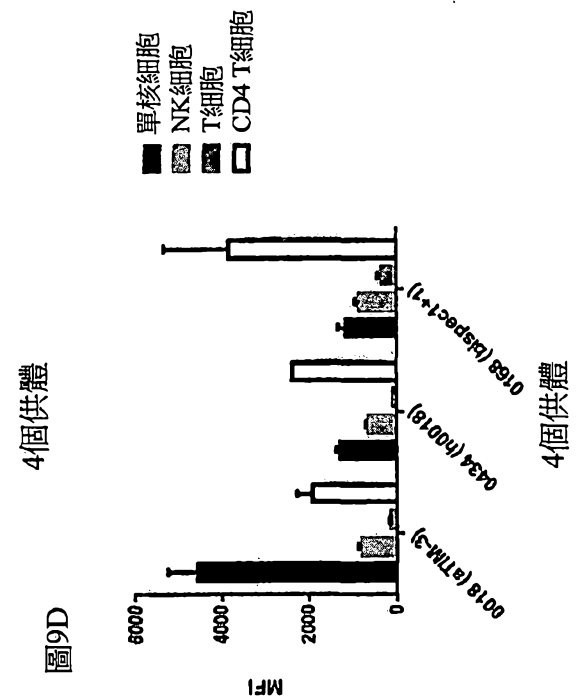
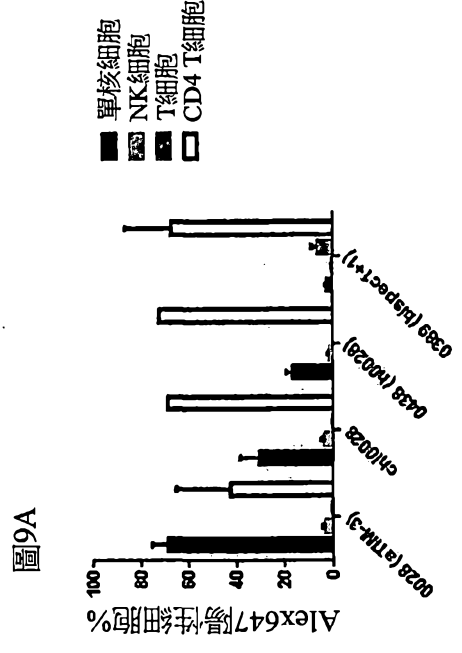
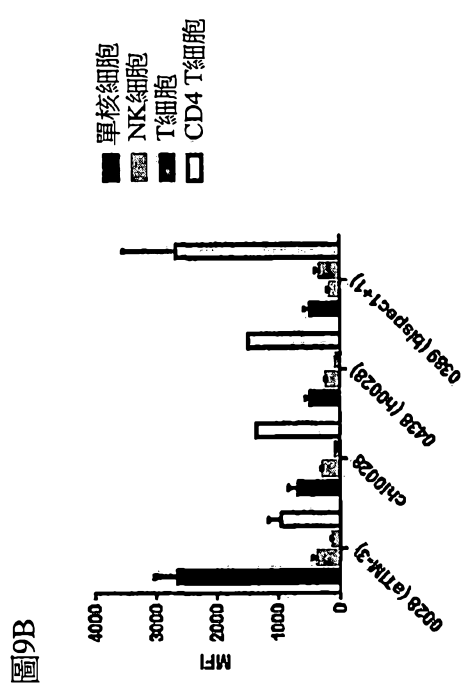
【圖4B】



【圖8A】

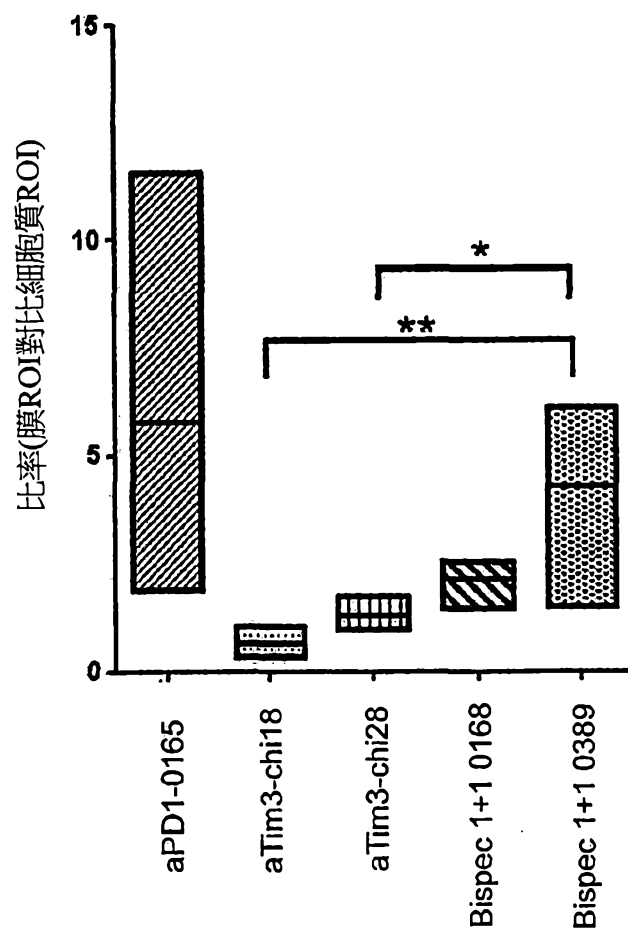


【圖8B】

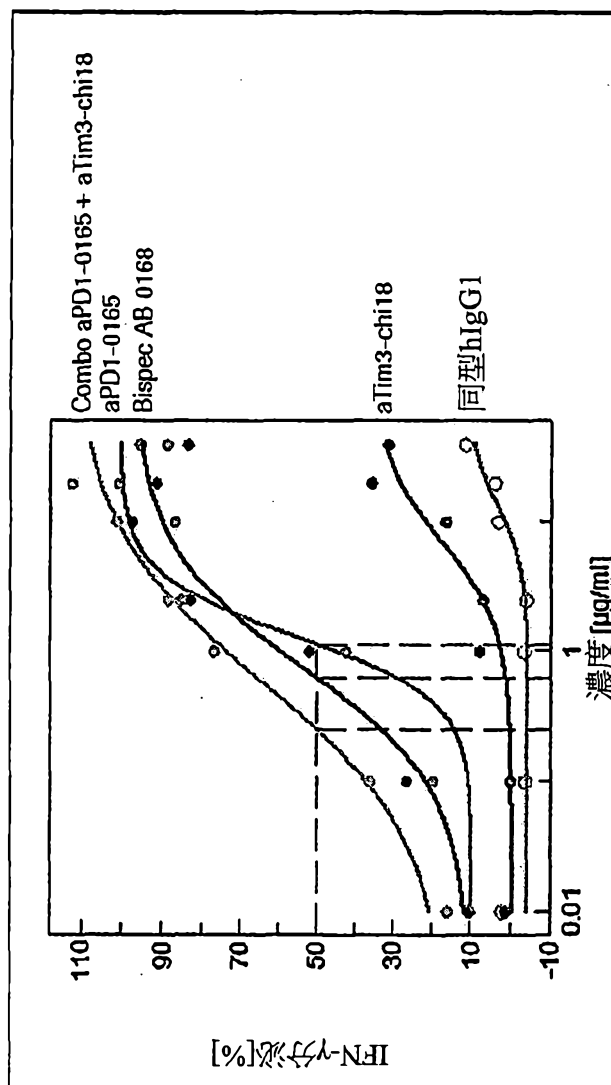


【圖9】

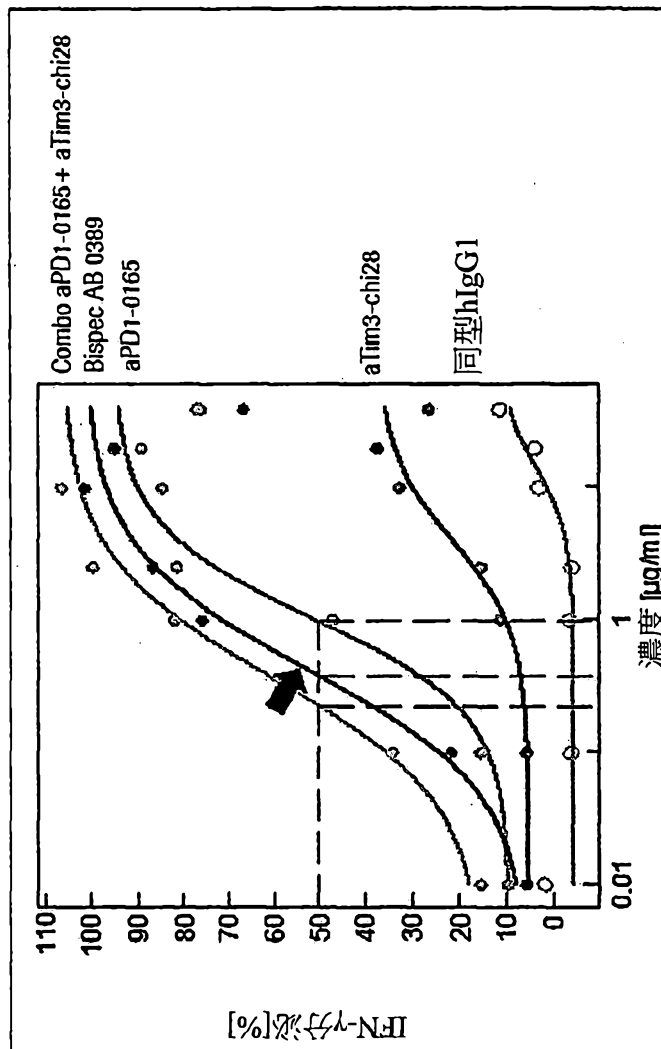
15分鐘時強度總和(膜對比細胞質之比率)



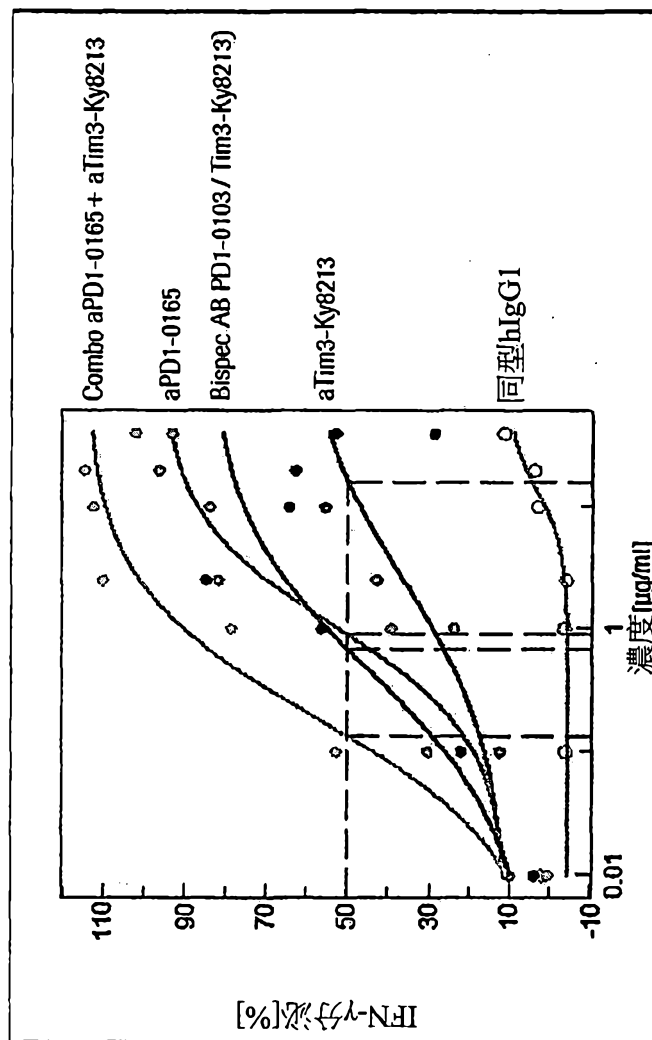
【圖11B】



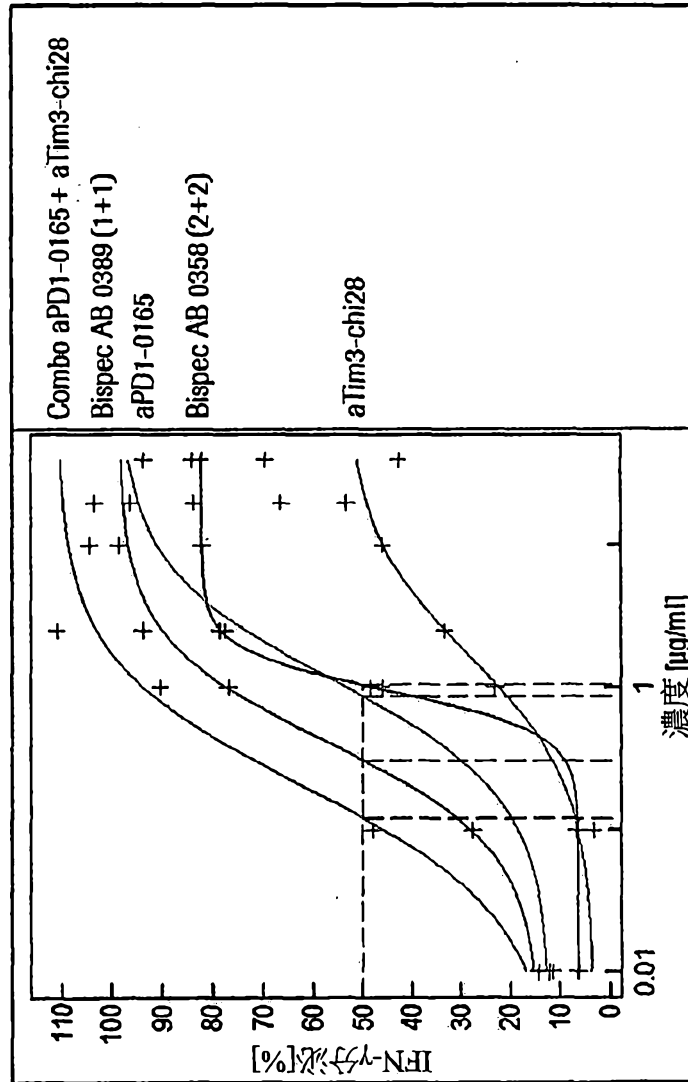
【圖12A】



【圖12B】



【圖12C】



【圖12D】

