



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201805306 A

(43) 公開日：中華民國 107 (2018) 年 02 月 16 日

(21) 申請案號：106115699 (22) 申請日：中華民國 106 (2017) 年 05 月 12 日

(51) Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01) C07K14/705 (2006.01)

C12N15/13 (2006.01) C12N15/62 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01) A61P35/00 (2006.01)

(30) 優先權：2016/05/13 歐洲專利局 16169487.2

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

(72) 發明人：伏拉拉 寇勒 克勞蒂亞 FERRARA KOLLER, CLAUDIA (CH)；克勞斯 克莉絲汀娜 CLAUS, CHRISTINA (DE)；克萊 克莉絲汀 KLEIN, CHRISTIAN (DE)；席伯 史蒂芬 SEEBER, STEFAN (DE)；阿曼 瑪麗亞 AMANN, MARIA (DE)；葛洛-瑞秋 珊卓 GRAU-RICHARDS, SANDRA (DE)；布恩克 彼德 BRUENKER, PETER (DE)；優瑪那 帕伯羅 UMANA, PABLO (CR)；樂菲斯基 維克特 LEVITSKI, VIKTOR (SE)；摩斯納 艾克哈得 MOESSNER, EKKEHARD (DE)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：36 項 圖式數：18 共 473 頁

(54) 名稱

包含 TNF 家族配位三聚體及 PD1 結合部份之抗原結合分子

ANTIGEN BINDING MOLECULES COMPRISING A TNF FAMILY LIGAND TRIMER AND PD1 BINDING MOIETY

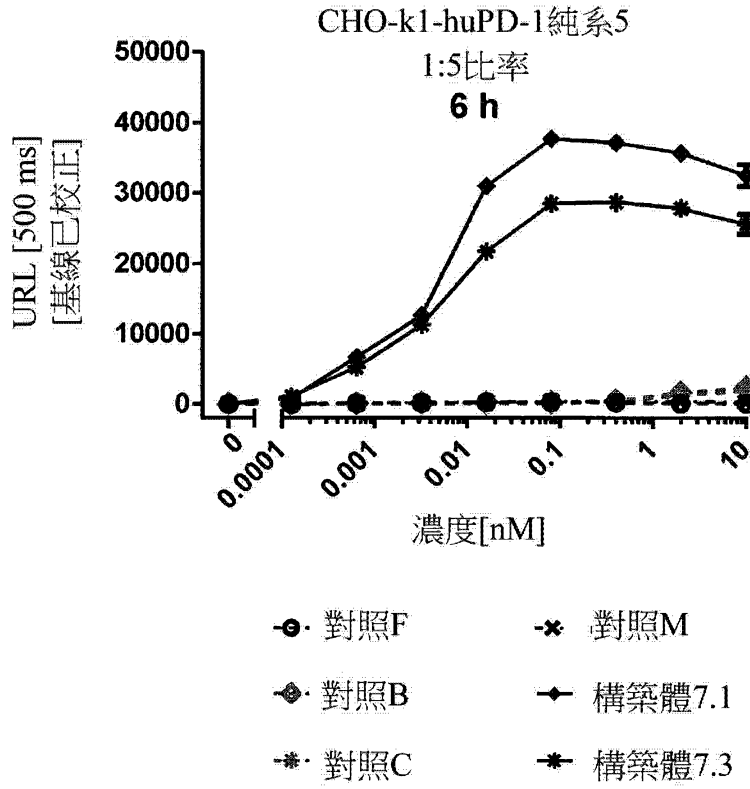
(57) 摘要

本發明係關於新穎的含有 TNF 家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含(a)至少一個能夠特異性結合於 PD1 之部分，及(b)藉由雙硫鍵彼此連接之第一及第二多肽，其特徵在於該第一多肽包含 TNF 配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接，且其特徵在於該第二多肽包含該 TNF 配位體家族成員之僅一個胞外域或其片段。

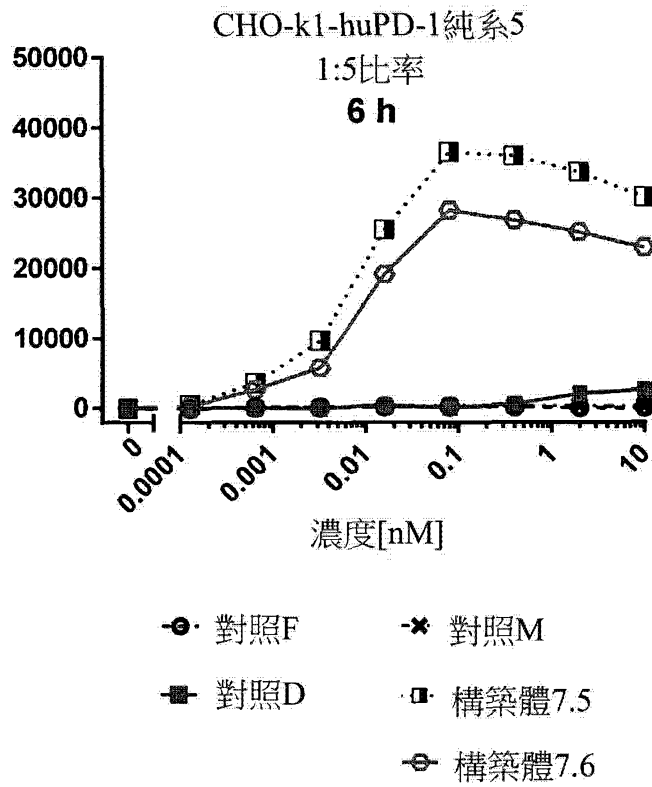
The invention relates to novel TNF family ligand trimer-containing antigen binding molecules comprising (a) at least one moiety capable of specific binding to PD1 and (b) a first and a second polypeptide that are linked to each other by a disulfide bond, characterized in that the first polypeptide comprises two ectodomains of a TNF ligand family member or fragments thereof that are connected to each other by a peptide linker and in that the second polypeptide comprises only one ectodomain of said TNF ligand family member or a fragment thereof.

指定代表圖：

(圖18C)



(圖18D)



【圖18】(續)

【發明說明書】

【中文發明名稱】

包含TNF家族配位三聚體及PD1結合部份之抗原結合分子

【英文發明名稱】

ANTIGEN BINDING MOLECULES COMPRISING A TNF FAMILY
LIGAND TRIMER AND PD1 BINDING MOIETY

【技術領域】

本發明係關於新穎的含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含(a)至少一個能夠特異性結合於PD1之部分，及(b)藉由雙硫鍵彼此連接之第一及第二多肽，其中該等抗原結合分子之特徵在於該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其兩個片段，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子彼此連接，且其特徵在於該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之僅一個胞外域或其片段。本發明進一步係關於此等分子之製造方法及其使用方法。

【先前技術】

與TNF (腫瘤壞死因子)受體超家族之分子相互作用之配位體在免疫系統之組織及功能中具有重要作用。在調節正常功能，諸如免疫反應、血細胞生成及形態發生之同時，TNF家族配位體(亦稱為細胞介素)亦在腫瘤發生、移植排斥、敗血性休克、病毒複製、骨骼再吸收、類風濕性關節炎及糖尿病中起作用(Aggarwal, 2003)。TNF配位體家族包含編碼19種II型(亦即細胞內N端及細胞外C端)跨膜蛋白之18種基因，其特徵在於存在創造『TNF同源性域』(THD)之保存C端域。此結構域負責受體結合且因此對於TNF配位體家族成員之生物活性十分關鍵。家族成員之間的序列一致

性為約20-30% (Bodmer, 2002)。TNF配位體家族之成員以自組裝、非共價三聚體形式發揮其生物功能(Banner等人, Cell 1993, 73, 431-445)。因此, TNF家族配位體形成三聚體, 其能夠結合於且活化TNFR超家族之相應受體。

4-1BB (CD137), TNF受體超家族之成員, 已首先被鑑別為其表現係由T細胞活化誘導之分子(Kwon及Weissman, 1989)。後續研究表明4-1BB於T淋巴細胞及B淋巴細胞(Snell等人, 2011; Zhang等人, 2010)、NK細胞(Lin等人, 2008)、NKT細胞(Kim等人, 2008)、單核細胞(Kienzle及von Kempis, 2000; Schwarz等人, 1995)、嗜中性白血球(Heinisch等人, 2000)、肥大細胞(Nishimoto等人, 2005)及樹突狀細胞以及非造血來源細胞(諸如內皮及平滑肌細胞)(Broll等人, 2001; Olofsson等人, 2008)中之表現。4-1BB於不同細胞類型中之表現大部分可由多種刺激信號, 諸如T細胞受體(TCR)或B細胞受體觸發以及經由促炎性細胞介素之共刺激分子或受體誘導之信號傳導誘導及驅動(Diehl等人, 2002; von Kempis等人, 1997; Zhang等人, 2010)。

4-1BB配位體(4-1BBL或CD137L)之表現受到較多限制且在專業抗原呈現細胞(APC)(諸如B細胞、樹突狀細胞(DC)及巨噬細胞)上觀測到。4-1BBL之誘導性表現為T細胞(包括 $\alpha\beta$ 及 $\gamma\delta$ T細胞子集)及內皮細胞之特徵(綜述於Shao及Schwarz, 2011中)。

已知CD137信號傳導可刺激NK細胞之IFN γ 分泌及增生(Buechele等人, 2012; Lin等人, 2008; Melero等人, 1998)以及促進DC活化, 如由其增加之存活率以及分泌細胞介素及上調共刺激分子之能力所指示(Choi等人, 2009; Futagawa等人, 2002; Wilcox等人, 2002)。然而, CD137最佳

表徵為共刺激分子，其調節T細胞之CD4+與CD8+子集中TCR誘導之活化。與TCR觸發組合，促效性4-1BB特異性抗體增強T細胞之增生、刺激淋巴激素分泌以及降低T-淋巴球對活化誘導之細胞死亡的敏感性(綜述於Snell等人, 2011中)。

根據活體外4-1BB抗體對T細胞之此等共刺激作用，其對帶有腫瘤之小鼠之投藥在許多實驗腫瘤模型中引起強效抗腫瘤作用(Melero等人, 1997; Narazaki等人, 2010)。然而，4-1BB通常僅在與其他免疫調節化合物(Curran等人, 2011; Guo等人, 2013; Morales-Kastresana等人, 2013; Teng等人, 2009; Wei等人, 2013)、化學治療劑(Ju等人, 2008; Kim等人, 2009)、腫瘤特異性疫苗接種(Cuadros等人, 2005; Lee等人, 2011)或放射線療法(Shi及Siemann, 2006)組合投與時呈現其作為抗腫瘤劑之效能。活體內耗乏實驗表明CD8+ T細胞在4-1BB特異性抗體之抗腫瘤作用中起最重要作用。然而，視腫瘤模型或包括抗4-1BB之組合療法而定，已報導其他類型細胞(諸如DC、NK細胞或CD4+ T細胞)之貢獻(Melero等人, 1997; Murillo等人, 2009; Narazaki等人, 2010; Stagg等人, 2011)。

除對不同淋巴細胞子集之直接作用以外，4-1BB促效劑亦可經由4-1BB介導之腫瘤血管內皮上細胞間黏附分子1(ICAM1)及血管細胞黏附分子1(VCAM1)之上調來誘導腫瘤中經活化T細胞之浸潤及滯留(Palazon等人, 2011)。

4-1BB觸發亦可逆轉由暴露於可溶性抗原誘導之T細胞能力缺失之狀態，該可溶性抗原可促進腫瘤微環境中或慢性感染期間免疫耐受性之破壞(Wilcox等人, 2004)。

似乎活體內4-1BB促效抗體之免疫調節特性需要抗體分子上存在野生

型Fc部分，藉此暗示Fc受體結合為此類試劑之藥理學活性所需之重要事件，如關於對TNFR超家族之其他誘導細胞凋亡或免疫調節成員具有特異性之促效抗體所描述(Li及Ravetch, 2011；Teng等人, 2009)。然而，具有功能活性Fc結構域之4-1BB特異性促效抗體之全身性投藥亦誘導與肝毒性相關之CD8+ T細胞之擴增(Dubrot等人, 2010)，其在小鼠中在不存在功能性Fc受體之情況下減弱或顯著改善。在人類臨床試驗(ClinicalTrials.gov, NCT00309023)中，每三週一次投與Fc勝任型4-1BB促效抗體(BMS-663513)持續12週可引起黑素瘤、卵巢或腎細胞癌之患者之疾病穩定。然而，另一試驗(NCT00612664)中提供之相同抗體引起4級肝炎，導致試驗終止(Simeone及Ascierto, 2012)。

總體而言，可獲得之臨床前及臨床數據明確表明存在對有效4-1BB促效劑之高度臨床需求。然而，新一代候選藥物應不僅有效接合造血及內皮細胞之表面上的4-1BB，且亦能夠經由除結合於Fc受體以外的機制實現，以避免不可控制的副作用。後者可經由優先結合於腫瘤特異性或腫瘤相關部分且在其上進行寡聚作用來實現。

已製得由4-1BB配位體之一個細胞外域及單鏈抗體片段組成之融合蛋白(Mueller等人, 2008；Hornig等人, 2012)或與重鏈之C端融合之單一4-1BB配位體(Zhang等人, 2007)。WO 2010/010051揭示由三個彼此連接且與抗體部分融合之TNF配位體胞外域組成的融合蛋白之產生。

漸進式細胞死亡蛋白1 (PD1或CD279)為受體CD28家族之抑制成員，該家族亦包括CD28、CTLA-4、ICOS及BTLA。PD1係細胞表面受體且表現於活化B細胞、T細胞及骨髓細胞上(Okazaki等人(2002) *Curr. Opin. Immunol.* 14: 391779-82；Bennett等人 (2003) *J Immunol*

170:711-8)。PD1之結構係單體1型跨膜蛋白，其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切換基元(ITSM)之細胞質域組成。活化T細胞短暫表現PD1，但PD1及其配位體PDL1之持續過表現促進免疫耗竭，從而導致持續病毒感染、腫瘤免疫逃逸(tumor evasion)、感染增加及死亡。PD1表現藉由抗原識別經由T細胞受體誘導，且其表現主要經由連續T細胞受體信號傳導維持。在抗原暴露延長之後，PD1基因座不再發生甲基化，由此促進連續過表現。阻斷PD1途徑可使癌症及持續病毒感染中之耗竭之T細胞功能恢復(Sheridan, Nature Biotechnology 30 (2012), 729-730)。PD1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。已出售兩種PD1單株抗體，奧普迪沃(Opdivo) (納武單抗(nivolumab))及克珠達(Keytruda) (派立珠單抗(pembrolizumab))用於治療某些癌症。然而，儘管存在引人注目的抗腫瘤活性，但已逐漸觀察到治療性PD1阻斷之後腫瘤生長復發(Koyama等人，Nature Communications 2016, DOI: 10.1038/ncomms10501)。

已展示腫瘤微環境中CD137/PD1之雙重靶向消除局部抑制且對效應T細胞進行功能救援且使其擴增，該等效應T細胞隨後殺死癌細胞(Wei等人, 2014)。在皮下腫瘤之小鼠模型中已展示，與用抗體中之一者單獨處理之小鼠相比，用抗4-1BB抗體及抗PD1抗體之組合處理之小鼠具有最佳抗腫瘤反應，(Shindo等人, 2015)。在腫瘤小鼠模型中投與抗PD1抗體及4-1BB促效抗體之組合產生有效且持久的全身抗腫瘤反應，然而單獨給予之4-1BB促效劑之已知毒性略增加(Chen等人, 2014)。因此，需要組合抗PD1抗體以及4-1BB抗體之正效應與改良之安全概況的新穎分子。

本發明之新穎抗原結合分子組合PD1部分與能夠形成共刺激TNF配位三聚體且穩定性足以醫藥學上適用之部分。出人意料地，本發明之抗原結合分子提供一種三聚體且因此提供生物學活性TNF配位體，但三聚TNF配位胞外域中之一者與分子之其他兩個TNF配位胞外域相比位於另一多肽上。藉由抗PD1部分靶向，本發明之抗原結合分子在腫瘤微環境中具有增加之活性且與單獨習知4-1BB促效抗體相比，因此應產生較少安全性問題。

【發明內容】

在一個態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

- (a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，及
- (b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中該抗原結合分子之特徵在於該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接，且該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之僅一個胞外域或其片段。

在一特定態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中該抗原結合分子之特徵在於該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接，且該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之僅一個胞外域或其片段，及

(c) Fc結構域，其由能夠穩定締合之第一及第二子單元構成。

在另一態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中該抗原結合分子之特徵在於

(i)分別地，該第一多肽含有CH1或CL結構域且該第二多肽含有CL或CH1結構域，其中該第二多肽藉由該CH1與CL結構域之間的雙硫鍵連接至該第一多肽，且其中該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其兩個片段，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子彼此連接且連接至該CH1或CL結構域，且其中該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之CL或CH1結構域，或

(ii)分別地，該第一多肽含有CH3結構域且該第二多肽含有CH3結構域，且其中該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其兩個片

段，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子彼此連接且連接至該CH3結構域之C端，且其中該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之僅一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之CH3結構域之C端，或

(iii)分別地，該第一多肽含有VH-CL或VL-CH1結構域且該第二多肽含有VL-CH1結構域或VH-CL結構域，其中該第二多肽藉由該CH1與CL結構域之間的雙硫鍵連接至該第一多肽，且其中該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接且連接至VH或VL，且其中該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之VL或VH。

在一特定態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中該抗原結合分子之特徵在於

(i)分別地，該第一多肽含有CH1或CL結構域且該第二多肽含有CL或CH1結構域，其中該第二多肽藉由該CH1與CL結構域之間的雙硫鍵連接至該第一多肽，且其中該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其兩個片段，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子彼此連接且連接至該CH1或CL結構域，且其中該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之CL或CH1結構域，或

(ii)分別地，該第一多肽含有CH3結構域且該第二多肽含有CH3結構域，且其中該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其兩個片段，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子彼此連接且連接至該CH3結構域之C端，且其中該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之僅一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之CH3結構域之C端。

在一個態樣中，TNF配位體家族成員係共刺激人類T細胞活化之成員。因此，含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子包含(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於靶細胞抗原，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中抗原結合分子之特徵在於第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其兩個片段，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子彼此連接，且其特徵在於第二多肽包含該TNF配位體家族成員之僅一個胞外域或其片段，其中該TNF配位體家族成員共刺激人類T細胞活化。更特定言之，TNF配位體家族成員係選自4-1BBL及OX40L。

在一特定態樣中，TNF配位體家族成員係4-1BBL。

在另一態樣中，TNF配位體家族成員之胞外域包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7及SEQ ID NO:8，尤其SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5之胺基酸序列。更特定言之，TNF配位體家族成員之胞外域包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列。

在另一態樣中，本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

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

在一個態樣中，本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

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

在另一態樣中，本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，

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

且其中抗原結合分子之特徵在於第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其兩個片段，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子彼此連接且連接至CH1或CL結構域，且第二多肽包含該TNF配位體家族成員之僅一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段藉由肽連接子連接至該多肽之CL或CH1結構域。

在一個態樣中，提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，

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

且其中抗原結合分子之特徵在於第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其兩個片段，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子彼此連接且連接至CH1結構域，且其特徵在於第二多肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之CL結構域。

在另一態樣中，提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，

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

且其中抗原結合分子之特徵在於第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其兩個片段，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子彼此連接且連接至CL結構域，且其特徵在於第二多肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之CH1結構域。

在另一態樣中，本發明提供一種如上文所定義之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中能夠特異性結合PD1之部分係選自由以下組成之群：抗體、抗體片段及骨架抗原結合蛋白。詳言之，能夠特異性結合

於PD1之部分係選自由以下組成之群：抗體片段、Fab分子、交換型Fab分子、單鏈Fab分子、Fv分子、scFv分子、單域抗體以及aVH及骨架抗原結合蛋白。

在一個態樣中，本發明提供一種如上文所定義之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中能夠特異性結合於PD1之部分係抗體片段。詳言之，能夠特異性結合於PD1之部分係選自由以下組成之群：Fab分子、交換型Fab分子、單鏈Fab分子、Fv分子、scFv分子、單域抗體及aVH。

在一個態樣中，本發明提供一種如上文所定義之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中能夠特異性結合於PD1之部分為骨架抗原結合蛋白。

在一特定態樣中，本發明係關於一種如上文所定義之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中能夠特異性結合於PD1之部分為能夠特異性結合於靶細胞抗原之Fab分子或scFV分子。更特定言之，能夠特異性結合於PD1之部分係Fab分子。

本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含至少一個能夠特異性結合於PD1之部分。在一特定態樣中，含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子包含一個能夠特異性結合於PD1之部分，意謂含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子係單價的。在另一態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含兩個能夠特異性結合於PD1之部分，意謂含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子係二價的。

在一個態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結

合分子，其中能夠特異性結合於PD1之部分包含

(a) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:13之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:15之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:16之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-L3，

(b) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:26之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:27之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:28之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:31之胺基酸序列的HVR-L3，

(c) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:34之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:35之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:36之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的HVR-L3，

(d) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:43之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:45之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:46之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:47之胺基酸序列的HVR-L3，

(e) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:50之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ

ID NO:52之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:53之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:54之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:55之胺基酸序列的HVR-L3，

(f) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:58之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:59之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:60之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:61之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:62之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:63之胺基酸序列的HVR-L3，或

(g) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:66之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:67之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:68之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:69之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:70之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:71之胺基酸序列的HVR-L3。

在另一態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中能夠特異性結合於PD1之部分包含

(a)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的VL結構域，

(b)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的VL結構域，

(c)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:23之胺基酸序列的VL結構域，

(d)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:24之胺基酸序列的VL結構域，

(e) 包含 SEQ ID NO:21 之胺基酸序列的 VH 結構域及包含 SEQ ID NO:25 之胺基酸序列的 VL 結構域，

(f) 包含 SEQ ID NO:32 之胺基酸序列的 VH 結構域及包含 SEQ ID NO:33 之胺基酸序列的 VL 結構域，

(g) 包含 SEQ ID NO:40 之胺基酸序列的 VH 結構域及包含 SEQ ID NO:41 之胺基酸序列的 VL 結構域，

(h) 包含 SEQ ID NO:48 之胺基酸序列的 VH 結構域及包含 SEQ ID NO:49 之胺基酸序列的 VL 結構域，

(i) 包含 SEQ ID NO:56 之胺基酸序列的 VH 結構域及包含 SEQ ID NO:57 之胺基酸序列的 VL 結構域，

(k) 包含 SEQ ID NO:64 之胺基酸序列的 VH 結構域及包含 SEQ ID NO:65 之胺基酸序列的 VL 結構域，或

(l) 包含 SEQ ID NO:72 之胺基酸序列的 VH 結構域及包含 SEQ ID NO:73 之胺基酸序列的 VL 結構域。

在一個態樣中，本發明提供一種含有 TNF 家族配位三聚體之抗原結合分子，其中能夠特異性結合於 PD1 之部分包含

(a) VH 結構域，其包含 (i) 包含 SEQ ID NO:13 之胺基酸序列的 HVR-H1，(ii) 包含 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列的 HVR-H2，及 (iii) 包含 SEQ ID NO:15 之胺基酸序列的 HVR-H3；及 VL 結構域，其包含 (iv) 包含 SEQ ID NO:16 之胺基酸序列的 HVR-L1，(v) 包含 SEQ ID NO:17 之胺基酸序列的 HVR-L2，及 (vi) 包含 SEQ ID NO:18 之胺基酸序列的 HVR-L3。

在一特定態樣中，本發明提供一種含有 TNF 家族配位三聚體之抗原結合分子，其中能夠特異性結合於 PD1 之部分包含

(a) 包含 SEQ ID NO:19 之胺基酸序列的 VH 結構域及包含 SEQ ID NO:20 之胺基酸序列的 VL 結構域，

(b) 包含 SEQ ID NO:21 之胺基酸序列的 VH 結構域及包含 SEQ ID NO:22 之胺基酸序列的 VL 結構域，

(c) 包含 SEQ ID NO:21 之胺基酸序列的 VH 結構域及包含 SEQ ID NO:23 之胺基酸序列的 VL 結構域，

(d) 包含 SEQ ID NO:21 之胺基酸序列的 VH 結構域及包含 SEQ ID NO:24 之胺基酸序列的 VL 結構域，或

(e) 包含 SEQ ID NO:21 之胺基酸序列的 VH 結構域及包含 SEQ ID NO:25 之胺基酸序列的 VL 結構域。

在一個態樣中，提供一種如上文所定義之含有 TNF 家族配位三聚體之抗原結合分子，其中能夠特異性結合於 PD1 之部分包含有包含 SEQ ID NO:21 之胺基酸序列的可變重鏈及包含 SEQ ID NO:22 之胺基酸序列的可變輕鏈，或其中能夠特異性結合於 PD1 之部分包含有包含 SEQ ID NO:21 之胺基酸序列的可變重鏈及包含 SEQ ID NO:24 之胺基酸序列的可變輕鏈。

在一特定態樣中，本發明係關於一種如上文所定義之含有 TNF 家族配位三聚體之抗原結合分子，其中肽連接子係 (G4S)₂，亦即 SEQ ID NO:117 之肽連接子。在一個態樣中，所有實例中之肽連接子均係 (G4S)₂。

本發明亦係關於一種如上文所定義之含有 TNF 家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含由能夠穩定締合之第一及第二子單元構成之 Fc 結構域。

在一個態樣中，包含(c)由能夠穩定締合之第一及第二子單元構成之Fc結構域的本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子進一步包含(a)能夠特異性結合於靶細胞抗原之Fab分子，其中Fab重鏈在C端與Fc結構域中CH2結構域之N端融合。

在另一態樣中，Fc結構域係IgG，尤其IgG1 Fc結構域或IgG4 Fc結構域。

更特定言之，Fc結構域係IgG1 Fc結構域。在一特定態樣中，Fc結構域包含促進Fc結構域之第一及第二子單元之締合的修飾。在一特定態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中Fc結構域之第一子單元包含胺基酸取代S354C及T366W (根據Kabat EU索引編號)且Fc結構域之第二子單元包含胺基酸取代Y349C、T366S、L368A及Y407V(根據Kabat EU索引編號)。

在另一態樣中，本發明係關於一種如上文所定義之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(c) Fc結構域，其由能夠穩定締合之第一及第二子單元構成，其中Fc結構域包含一或多個胺基酸取代，其使與Fc受體，尤其與Fc γ 受體之結合減少。

詳言之，Fc結構域包含IgG重鏈之位置234及235 (EU編號)及/或329 (EU編號)處的胺基酸取代。特定言之，提供根據本發明之含三聚體TNF家族配位體之抗原結合分子，其包含有包含位置234及235 (EU編號)及/或329 (EU編號)處之胺基酸取代，尤其胺基酸取代L234A、L235A及P329G (EU編號)之IgG1 Fc結構域。

在另一態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結

合分子，其中分別地，抗原結合分子包含

第一重鏈及第一輕鏈，其皆包含能夠特異性結合於PD1之Fab分子，

第一肽，其包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由第一肽連接子彼此連接，該第一肽在其C端藉由第二肽連接子與第二重鏈或輕鏈融合，

及第二肽，其包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域，該第二肽在其C端藉由第三肽連接子與第二輕鏈或重鏈融合。

在另一態樣中，提供含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中第一肽在其C端藉由第二肽連接子與作為重鏈之一部分的CH1結構域融合，該第一肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由第一肽連接子彼此連接，

且該第二肽在其C端藉由第三肽連接子與作為輕鏈之一部分的CL結構域融合，該第二肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段。

在又一態樣中，提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中第一肽在其C端藉由第二肽連接子與作為重鏈之一部分的CL結構域融合，該第一肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由第一肽連接子彼此連接，

且該第二肽在其C端藉由第三肽連接子與作為輕鏈之一部分的CH1結構域融合，該第二肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段。

在另一態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中第一肽在其C端藉由第二肽連接子與作為重鏈之一部分的VH結構域融合，該第一肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由第一肽連接子彼此連接，

且該第二肽在其C端藉由第三肽連接子與作為輕鏈之一部分的VL結構域融合，該第二肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段。

在一特定態樣中，本發明係關於一種如上文所定義之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中肽連接子係(G4S)₂，亦即SEQ ID NO:117之肽連接子。在一個態樣中，第一、第二及第三肽連接子係(G4S)₂。

進一步提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中在與TNF配位體家族成員相鄰之CL結構域中，位置123 (EU編號)處之胺基酸已經精胺酸(R)置換且位置124 (EU編號)處之胺基酸已經離胺酸(K)取代，且其中在與TNF配位體家族成員相鄰之CH1結構域中，位置147 (EU編號)及位置213 (EU編號)處之胺基酸已經麩胺酸(E)取代。

在另一態樣中，提供一種如上文中所述之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中抗原結合分子包含

(a)第一重鏈及第一輕鏈，其皆包含能夠特異性結合於PD1之Fab分子，

(b)第二重鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12及SEQ ID NO:10，及

第二輕鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4及SEQ ID NO:5。

在一個態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中抗原結合分子包含

(a) Fab分子，其能夠特異性結合於PD1，及

(b)第二重鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID

NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12及SEQ ID NO:10，及

第二輕鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4及SEQ ID NO:5。

在一特定態樣中，提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中抗原結合分子包含

(i)第一重鏈，其包含有包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的VH結構域，及第一輕鏈，其包含有包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的VL結構域，或

第一重鏈，其包含有包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域，及第一輕鏈，其包含有包含選自由以下組成之群的胺基酸序列之VL結構域：SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24及SEQ ID NO:25，

(ii)第二重鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:78及SEQ ID NO:80，及

(iii)第二輕鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:79及SEQ ID NO:81。

在另一態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中抗原結合分子包含

(a)包含SEQ ID NO:82之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:171之胺基酸序列的第一輕鏈、包含SEQ ID NO:74之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:75之胺基酸序列的第二輕鏈，

(b)包含SEQ ID NO:82之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID

NO:83或SEQ ID NO:171之胺基酸序列的第一輕鏈、包含SEQ ID NO:76之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:77之胺基酸序列的第二輕鏈，

(c) 包含SEQ ID NO:82之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:171之胺基酸序列的第一輕鏈、包含SEQ ID NO:78之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:79之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(d) 包含SEQ ID NO:82之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:171之胺基酸序列的第一輕鏈、包含SEQ ID NO:80之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:81之胺基酸序列的第二輕鏈。

在又一態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a) 至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，及

(b) 第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中抗原結合分子之特徵在於分別地第一多肽含有CH3結構域且第二多肽含有CH3結構域，且其中該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接且連接至CH3結構域之C端，且其中該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之CH3結構域之C端。

詳言之，此類含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子包含兩個能夠特異性結合於PD1之Fab結構域。

詳言之，提供一種如上文中所述之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a) 包含SEQ ID NO:84之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:85之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:171之胺基酸序列的兩個輕鏈，或

(b) 包含SEQ ID NO:86之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:87之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:171之胺基酸序列的兩個輕鏈。

在另一特定態樣中，本發明提供一種如上文所述之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子包含一個能夠特異性結合於PD1之Fab結構域。

在此類態樣中，提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中抗原結合分子包含

(i) 融合多肽，其包含Fc結構域之第一子單元及TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接且連接至CH3結構域之C端，(ii) 重鏈，其包含能夠特異性結合於PD1之Fab結構域之VH結構域、Fc結構域之第二子單元及該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至CH3結構域之C端，及(iii) 輕鏈，其包含能夠特異性結合於PD1之Fab結構域的VL結構域，或

(i) 融合多肽，其包含Fc結構域之第一子單元及TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段藉由肽連接子連接至CH3結構域之C端，(ii) 重鏈，其包含能夠特異性結合於PD1之Fab結構域的VH結構

域、Fc結構域之第二子單元及該TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段經由肽連接子彼此連接且連接至CH3結構域之C端，及(iii)輕鏈，其包含能夠特異性結合於PD1之Fab結構域的VL結構域。

在一特定態樣中，提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中抗原結合分子包含

(a) 包含SEQ ID NO:88之胺基酸序列的融合多肽、包含SEQ ID NO:87之胺基酸序列的重鏈及包含SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:171之胺基酸序列的輕鏈，

(b) 包含SEQ ID NO:89之胺基酸序列的融合多肽、包含SEQ ID NO:90之胺基酸序列的重鏈及包含SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:171之胺基酸序列的輕鏈，

(c) 包含SEQ ID NO:91之胺基酸序列的融合多肽、包含SEQ ID NO:86之胺基酸序列的重鏈及包含SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:171之胺基酸序列的輕鏈，

(b) 包含SEQ ID NO:93之胺基酸序列的融合多肽、包含SEQ ID NO:92之胺基酸序列的重鏈及包含SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:171之胺基酸序列的輕鏈。

根據本發明之另一態樣，提供編碼如上文所定義之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子的經分離之聚核苷酸。本發明進一步提供載體，尤其表現載體，其包含本發明之經分離之聚核苷酸，及宿主細胞，其包含本發明之經分離之聚核苷酸或載體。在一些實施例中，宿主細胞為真核細胞，尤其哺乳動物細胞。

在另一態樣中，提供製造本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子之方法，其包含在適用於表現含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子之條件下培養本發明之宿主細胞，及分離含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子。本發明亦涵蓋藉由本發明之方法製造之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子。

本發明亦提供醫藥組合物，其包含本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子及至少一種醫藥學上可接受之賦形劑。

本發明亦涵蓋本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子或本發明之醫藥組合物，其適用作藥劑。在一個態樣中，提供本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子或本發明之醫藥組合物，其用於治療有需要個體之疾病。在一個特定實施例中，提供本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子或本發明之醫藥組合物，其用於治療癌症。在另一態樣中，提供本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子或本發明之醫藥組合物，其用於上調或延長T細胞細胞毒性活性。

亦提供本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子之用途，其係用於製造用以治療有需要個體之疾病的藥劑，詳言之，用於製造用以治療癌症之藥劑，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之呈醫藥學上可接受之形式的包含本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子的組合物。在一特定實施例中，疾病為癌症。亦提供上調或延長患有癌症之個體的T細胞細胞毒性活性之方法，其包含向個體投與有效量之本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子或本發明之醫藥組合物。在任一上述實施例中，個體較佳為哺乳動物，尤其人類。

【圖式簡單說明】

圖1展示具有嵌合抗體純系PD1-0103之PD1的阻斷藉由同種異體受激原代人類T細胞來強有力地增強IFN- γ 分泌。IFN- γ 分泌高於參考抗體MDX5C4或MK-3475。

在**圖2**中，其展示與嵌合純系PD1-0103相比，PD1人類化純系PD1-0103-0312及PD1-103-314之阻斷藉由同種異體受激原代人類T細胞甚至更強有力地增加干擾素- γ (IFN-g)分泌。

圖3表明具有嵌合抗體純系PD1-0103之PD1及人類化純系PD1-0103-0312及PD1-103-314之阻斷藉由同種異體受激原代人類T細胞來強有力地增加腫瘤壞死因子 α (TNF)分泌。TNF- α 分泌高於參考抗體MDX5C4或MK-3475。

圖4A展示在遞增濃度之不同抗PD1抗體(嵌合抗體純系PD1-0103及人類化純系PD1-0103-0312、PD1-0103-0313、PD1-0103-0314、PD1-0103-0315)存在下製造顆粒酶B之CD4⁺ T細胞之頻率，且**圖4B**展示在MLR之上清液中在遞增濃度之不同抗PD1抗體存在下藉由吸光度(光學密度，O.D.)偵測之IFN- γ 之量。

圖5A展示與PDL1單獨相比，在嵌合抗PD1抗體純系PD1-0103存在下PD1/PD-L1阻斷對經抑制T細胞受體信號傳導再活化之影響，且在**圖5B**中呈現在不同抗PD1抗體(嵌合抗體純系PD1-0103及人類化純系PD1-0103-0312、PD1-0103-0313、PD1-0103-0314、PD1-0103-0315)存在下PD1/PD-L1阻斷對經抑制T細胞受體信號傳導再活化之影響。

圖6展示用於組裝裂解型三聚人類4-1BB配位體之組分。**圖6A**展示二聚4-1BB(71-254)配位體，其在C端與具有突變E123R及Q124K(帶電變異體)之人類CL結構域融合，且**圖6B**展示單體4-1BB(71-254)配位體，其在

其C端與具有突變K147E及K213E(帶電變異體)之人類CH1結構域融合。**圖6C**展示二聚4-1BB(71-254)配位體，其在C端與無突變之人類CL結構域融合，且**圖6D**展示單體4-1BB(71-254)配位體，其在C端與無突變之人類CH1結構域融合。**圖6E**展示二聚4-1BB(71-254)配位體，其在N端與人類IgG1 Fc白域融合，且**圖6F**展示單體4-1BB(71-254)配位體，其在N端與人類IgG1 Fc杵域融合。

圖7示意性地說明本發明之含4-1BBL-三聚體之抗原結合分子構築體7.1至7.6之結構。此等構築體之製備及製造描述於實例2中。VH及VL結構域係抗PD1抗體之該等VH及VL結構域(詳言之0103-0314)，粗黑點表示杵-臼修飾。*表示CH1及CL結構域中之胺基酸修飾(所謂的帶電變異體)。**圖7A**展示具有帶電變異體及hu 4-1BBL(71-254)之構築體7.1，相應無帶電變異體之構築體示於**圖7B**中。如**圖7D**中所示之構築體7.4包含三個hu 4-1BBL(71-248)及帶電變異體，相應無帶電變異體之構築體示於**圖7E**中。**圖7C**展示在Fc鏈之C端具有hu 4-1BBL (71-254)之二價構築體，且相應無hu 4-1BBL(71-248)之構築體示於**圖7F**中。

圖8展示用於組裝裂解型三聚人類4-1BB配位體之組分。**圖8A**展示二聚4-1BB(71-248)配位體，其在C端與具有突變E123R及Q124K(帶電變異體)之人類CL結構域融合，且**圖8B**展示單體4-1BB(71-248)配位體，在其C端與具有突變K147E及K213E(帶電變異體)之人類CH1結構域融合。**圖8C**展示二聚4-1BB(71-248)配位體，其在C端與無突變之人類CL結構域融合，且**圖8D**展示單體4-1BB(71-248)配位體，在其C端與無突變之人類CH1結構域融合。**圖8E**展示二聚4-1BB(71-248)配位體，其在N端與人類IgG1 Fc白域融合，且**圖8F**展示單體4-1BB(71-248)配位體，其在N端與

人類IgG1 Fc杵域融合。

圖9展示用於組裝裂解型三聚人類4-1BB配位體之組分，其中二聚4-1BB配位體及單體4-1BB配位體各在其N端與另一多肽鏈，詳言之與Fc結構域之子單元中之一者融合。**圖9A**展示在N端融合之二聚配位體，且**圖9B**展示在N端融合之單體配位體。含4-1BBL-三聚體之抗原結合分子構築體7.11及7.12之示意性圖式分別示於**圖9C**及**圖9D**中。**圖9C**展示抗原結合分子，其中能夠特異性結合於PD1之Fab結構域連接至Fc杵鏈，二聚4-1BBL與Fc杵鏈之C端融合且單體4-1BBL與Fc杵鏈之C端融合。**圖9D**展示抗原結合分子，其中能夠特異性結合於PD1之Fab結構域連接至Fc杵鏈，二聚4-1BBL亦與Fc杵鏈之C端融合且單體4-1BBL與Fc杵鏈之C端融合。

構築體7.13及7.14之示意性圖式分別示於**圖10A**及**圖10B**中。**圖10A**展示抗原結合分子，其中能夠特異性結合於PD1之Fab結構域連接至Fc杵鏈，二聚4-1BBL與Fc杵鏈之C端融合且單體4-1BBL與Fc杵鏈之C端融合。**圖10B**展示抗原結合分子，其中能夠特異性結合於靶細胞抗原之Fab結構域連接至Fc杵鏈，二聚4-1BBL亦與Fc杵鏈之C端融合且單體4-1BBL與Fc杵鏈之C端融合。

在**圖11A**至**圖11D**中展示對照分子之示意性圖式。**圖11A**及**圖11B**分別展示構築體7.1及7.3之「未經靶向」變異體，其中抗PD1 Fab結構域經DP47 (生殖系)Fab結構域置換。該等分子分別稱為對照B及對照C。**圖11C**展示稱為對照D之構築體7.4之未經靶向變異體。對照分子之製備描述於實例2.9中。**圖11D**係具有PGLALA突變之單特異性IgG1分子之圖，其中Fab結構域係DP47 Fab結構域(對照F)或PD1 0103-0314 Fab結構域(對照M)。此等分子描述於實例2.10中。

圖12A展示用於靶向PD1之本發明之含裂解型三聚體C端4-1BB配位體之抗原結合分子之同時結合的SPR實驗之設定。與靶向PD1(0314)之裂解型4-1BBL (71-254) Fc kih抗原結合分子構築體7.1人類4-1BB及人類PD1之同時結合示於**圖12B**中。二價的靶向PD1(0314)之裂解型4-1BBL(71-254)Fc kih抗原結合分子(構築體7.3)與人類4-1BB及人類PD1之同時結合示於**圖12C**中。靶向PD1(0314)之裂解型4-1BBL(71-248)Fc kih抗原結合分子(構築體7.5)與人類4-1BB及人類PD1之同時結合示於**圖12D**中且二價的靶向PD1(0314)之裂解型4-1BBL(71-248)Fc kih抗原結合分子(構築體7.6)與人類4-1BB及人類PD1之同時結合示於**圖12E**中。

圖13A至**圖13H**展示如實例5.1中所述之靶向PD1之4-1BB裂解型三聚體配位體Fc融合物抗原結合分子與新近分離之PBMC之結合。展示PE結合之第二偵測抗體之螢光強度(y軸)相對於所測試之構築體之濃度(x軸)的幾何平均值。為較佳綜述，將圖表一分為二，分別係圖(13A)、圖(13B)、圖(13C)及圖(13D)以及圖(13E)、圖(13F)、圖(13G)及圖(13H)，由此將對照F及對照M之曲線作為參考示於所有圖表中。對新鮮人類CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺ T細胞(圖(13A)及圖(13E))、新鮮人類CD45⁺ CD3⁺ CD8⁺ T細胞(圖(13B)及圖(13F))、新鮮人類CD45⁺ CD3⁺ CD4^{陰性} CD8^{陰性} $\gamma\delta$ T細胞(圖(13C)及圖(13G))及CD45⁺ CD3^{陰性} CD19⁺ B細胞(圖(13D)及圖(13H))監測結合。

圖14A至**圖14H**說明如實例5.1中所述之靶向PD1之裂解型三聚體4-1BB配位體Fc融合物抗原結合分子與所測試之活化人類PBMC之結合。展示PE結合之第二偵測抗體之螢光強度(y軸)相對於所測試之構築體之濃度(x軸)的幾何平均值。使用對照F作為陰性對照。為較佳綜述，將圖表一分

為二，亦即圖(14A)、圖(14B)、圖(14C)及圖(14D)以及圖(14E)、圖(14F)、圖(14G)及圖(14H)，由此將對照F及對照M之曲線作為參考示於所有圖表中。在用促效抗人類CD28及抗人類CD3抗體活化之後，對於大多數CD45⁺ CD3⁺ CD8⁺ T細胞(參見如圖(14A)或圖(14E))或CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺ T細胞(參見如圖(14B)及圖(14F))，且在更小的程度上對於大多數人類CD45⁺ CD3⁺ CD4^{陰性} CD8^{陰性} $\gamma\delta$ T細胞(圖(14C)或圖(14G))或CD45⁺ CD3^{陰性} CD19⁺ B細胞(圖(14D)或圖(14H))4-1BB表現上調

圖15A及**圖15B**展示靶向或未靶向PD1之裂解型三聚人類4-1BB配位體Fc (kih)融合物抗原結合分子與表現人類PD1之CHO-k1-huPD1純系5細胞之結合。方法描述於實例5.2中。用R-藻紅素-螢光染料結合之抗人類IgG Fc γ 特異性山羊IgG F(ab')₂片段偵測結合，且藉由流式細胞測量術量測之幾何平均值示於y軸上。在x軸上，展示所使用之靶向PD1之4-1BB裂解型三聚配位體Fc融合物抗原結合分子及其對照的濃度。為較佳綜述，將圖表一分為二(圖(15A)及圖(15B))，由此將對照F及對照M之曲線作為參考示於兩圖表中。

圖16A及**圖16B**展示如實例5.2中所述靶向或未靶向PD1之裂解型三聚人類4-1BB配位體Fc (kih)融合物抗原結合分子與所測試之表現人類4-1BB之HeLa-hu4-1BBL-NFkB-luc純系26細胞之結合。用R-藻紅素-螢光染料結合之抗人類IgG Fc γ 特異性山羊IgG F(ab')₂片段偵測結合，且藉由流式細胞測量術量測之幾何平均值示於y軸上。在x軸上，展示所使用之靶向PD1之4-1BB裂解型三聚配位體Fc融合物抗原結合分子及其對照的濃度。為較佳綜述，將圖表一分為二，稱為圖(16A)及圖(16B)，由此將對照F及對照M之曲線作為參考示於兩圖表中。

圖17展示一個流程，其說明使用報導子細胞株之實例6中所描述之NF κ B活性分析之一般原理。展示用表現人類4-1BB之HeLa報導子細胞株進行之活化分析。表現於報導細胞上之4-1BB之交聯誘導NF κ B活化及NF κ B介導之螢光素酶表現。在細胞溶解之後，螢光素酶可催化螢光素氧化成氧化螢光素。此化學反應與NF κ B介導之螢光素酶表現之強度正相關且可藉由發光強度(所釋放之光之單元)量測。

圖18A至圖18D展示NF κ B活化誘導之螢光素酶表現及如藉由實例6中所描述之分析量測之活性。以0.5秒/孔量測所釋放之光之單元(URL)且針對所使用之靶向或未靶向PD1之裂解型三聚人類4-1BB配位體Fc (kih)構築體之濃度來繪製。在不存在(圖(18A)及圖(18B))或存在交聯之表現人類PD1之CHO-k1-huPD1純系5細胞(圖(18C)及圖(18D))下培育表現人類4-1BB之HeLa報導子細胞6小時。表現人類4-1BB之HeLa報導子細胞與CHO-k1-huPD1純系5細胞之細胞比率示於各圖中。

【實施方式】

定義

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

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

如本文所用，術語「**能夠特異性結合於PD1之部分**」或「**能夠特異**

性結合於PD1之抗原結合結構域」係指特異性結合於PD1之多肽分子。在一個態樣中，抗原結合部分能夠經由PD1活化信號傳導。在一特定態樣中，抗原結合部分能夠將其所連接之實體(例如TNF家族配位三聚體)導引至目標部位，例如達至特定類型之帶有PD1之腫瘤細胞中或帶有PD1之T細胞上。能夠特異性結合於PD1之部分包括如本文所進一步定義之抗體及其片段。另外，能夠特異性結合於靶細胞抗原之部分包括如本文中所進一步定義之骨架抗原結合蛋白，例如結合域，其係基於經設計之重複蛋白質或經設計之重複域(參見例如WO 2002/020565)。

關於抗體或其片段，術語「能夠特異性結合於靶細胞抗原之部分」係指分子之一部分，其包含特異性結合於一部分或所有抗原且與其互補之區域。可例如藉由一或多個抗體可變域(亦稱為抗體可變區)提供能夠進行特異性抗原結合之部分。特定言之，能夠進行特異性抗原結合之部分包含抗體輕鏈可變區(VL)及抗體重鏈可變區(VH)。

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

如本文所用，術語「**單株抗體**」係指自實質上均質抗體之群體獲得之抗體，亦即除可能變異抗體(例如含有天然產生之突變或在製造單株抗體製劑期間出現之變異抗體，此類變異體通常以較小量存在)以外，構成該群體之個別抗體相同及/或結合相同抗原決定基。相比於通常包括針對不同決定子(抗原決定基)之不同抗體的多株抗體製劑，單株抗體製劑中之各單株抗體係針對抗原上之單一決定子。

如本文所用，術語「**單特異性**」抗體表示具有一或多個結合位點之

抗體，該一或多個結合位點各結合於相同抗原之相同抗原決定基。術語「**雙特異性**」意謂抗原結合分子能夠特異性結合至至少兩個不同的抗原決定子。通常，雙特異性抗原結合分子包含兩個抗原結合位點，其各對不同抗原性決定子具有特異性。在某些實施例中，雙特異性抗原結合分子能夠同時結合兩個抗原性決定子，詳言之，兩個不同細胞上所表現之兩個抗原性決定子。

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

術語「**全長抗體**」、「**完整抗體**」及「**完全抗體**」在本文中可互換使用，其係指具有與原生抗體結構實質上類似之結構的抗體。「**原生抗體**」係指具有不同結構之天然產生之免疫球蛋白分子。舉例而言，原生IgG類抗體為約150,000道爾頓(dalton)之雜四聚體糖蛋白，其由雙硫鍵鍵結之兩個輕鏈及兩個重鏈構成。自N端至C端，各重鏈具有可變區(VH)，亦稱為可變重鏈域或重鏈可變域，之後係三個恆定域(CH1、CH2及CH3)，亦稱為重鏈恆定區。類似地，自N端至C端，各輕鏈具有可變區(VL)，亦稱為可變輕鏈域或輕鏈可變域，之後係輕鏈恆定域(CL)，亦稱為輕鏈恆定區。抗體之重鏈歸屬於五種類型中之一者，該五種類型稱為 α (IgA)、 δ (IgD)、 ϵ (IgE)、 γ (IgG)或 μ (IgM)，其中一些可進一步分成亞型，例如 $\gamma 1$ (IgG1)、 $\gamma 2$ (IgG2)、 $\gamma 3$ (IgG3)、 $\gamma 4$ (IgG4)、 $\alpha 1$ (IgA1)及 $\alpha 2$ (IgA2)。抗體之輕鏈可基於其恆定域之胺基酸序列歸屬於兩種類型中之一者，稱為(κ)及(λ)。

「**抗體片段**」係指不同於完整抗體，包含完整抗體之一部分，結合

完整抗體所結合之抗原的分子。抗體片段之實例包括(但不限於) Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體、交叉Fab片段；線性抗體；單鏈抗體分子(例如scFv)；及單域抗體。關於某些抗體片段之綜述，參見Hudson等人, Nat Med 9, 129-134 (2003)。關於scFv片段之綜述，參見例如 Plückthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第113卷，Rosenburg及Moore編，Springer-Verlag, New York, 第269-315頁(1994)；亦參見WO93/16185；及美國專利第5,571,894號及第5,587,458號。關於包含救助受體結合抗原決定基殘基及具有延長之活體內半衰期之Fab及F(ab')₂片段的論述，參見美國專利第5,869,046號。雙功能抗體為具有兩個抗原結合位點之抗體片段，其可為二價或雙特異性的，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；參見例如美國專利第6,248,516B1號)。抗體片段可藉由各種技術製得，包括(但不限於)蛋白水解消化完整抗體以及藉由重組宿主細胞(例如大腸桿菌(E. coli)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)。如本文所用，因此，術語「**Fab**片段」係指包含有包含輕鏈之VL結構域及恆定域(CL)之輕鏈片段，及重鏈之VH結構域及第一恆

定域(CH1)的抗體片段。Fab'片段與Fab片段之不同之處在於，在包括一或多個來自抗體鉸鏈區之半胱胺酸之重鏈CH1結構域的羧基端處添加幾個殘基。Fab'-SH為其中恆定域之半胱胺酸殘基帶有游離硫醇基之Fab'片段。胃蛋白酶處理產生F(ab')₂片段，其具有兩個抗原結合位點(兩個Fab片段)及Fc區之一部分。

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

「單鏈Fab片段」或「scFab」係由抗體重鏈可變域(VH)、抗體恆定域1 (CH1)、抗體輕鏈可變域(VL)、抗體輕鏈恆定域(CL)及連接子組成之多肽，其中該抗體域及該連接子按N端至C端方向之次序具有以下中之一者：a) VH-CH1-連接子-VL-CL，b) VL-CL-連接子-VH-CH1，c) VH-CL-連接子-VL-CH1或d) VL-CH1-連接子-VH-CL；且其中該連接子為至少30個胺基酸，較佳32與50個胺基酸之間的多肽。該單鏈Fab片段經由CL結構域與CH1結構域之間的天然雙硫鍵穩定化。另外，此等單鏈Fab分子可經由插入半胱胺酸殘基(例如可變重鏈中之位置44及可變輕鏈中之位置100，根據Kabat編號)而產生鏈間雙硫鍵來進一步穩定化。

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

「**單鏈可變片段(scFv)**」為抗體之重鏈(V_H)及輕鏈(V_L)之可變區之融合蛋白，其與十至約25個胺基酸之短連接子肽連接。連接子通常富含甘胺酸以具有可撓性，以及絲胺酸或蘇胺酸以具有可溶性，且可使V_H之N端與V_L之C端連接，或反之亦然。儘管移除恆定區且引入連接子，但此蛋白質保留初始抗體之特異性。scFv抗體例如描述於Houston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-96)中。另外，抗體片段包含單鏈多肽，其具有VH結構域(亦即能夠與VL結構域一起組裝成功能性抗原結合位點)或VL結構域(亦即能夠與VH結構域一起組裝成功能性抗原結合位點)之特徵，且由此提供全長抗體之抗原結合特性。

「**骨架抗原結合蛋白**」在此項技術中已知，例如纖維結合蛋白及經設計錨蛋白重複蛋白質(DARPins)已用作抗原結合域之替代骨架，參見例如Gebauer及Skerra, *Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. Curr Opin Chem Biol* 13:245-255 (2009)及Stumpp等人, *Darpins: A new generation of protein therapeutics. Drug Discovery Today* 13: 695-701 (2008)。在本發明之一個態樣中，骨架抗

原結合蛋白係選自由以下組成之群：CTLA-4 (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，諸如蛋白質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(纖連蛋白(AdNectin))；C型凝集素域(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kunitz型域，微體，諸如來自knottin家族之蛋白質、肽適體及纖維結合蛋白(纖連蛋白)。

CTLA-4 (細胞毒性T淋巴細胞相關抗原4)為表現於大部分CD4+ T細胞上之CD28家族受體。其細胞外域具有可變域類Ig摺疊。對應於抗體之CDR之環可經異源序列取代以賦予不同結合特性。經工程改造以具有不同結合特異性之CTLA-4分子亦稱為艾維伯迪(Evibodies)(例如US7166697B1)。艾維伯迪與抗體(例如域抗體)之經分離之可變區之尺寸大致相同。關於其他細節，參見Journal of Immunological Methods 248 (1-2), 31-45 (2001)。

脂質運載蛋白為細胞外蛋白質之家族，其傳遞小型疏水性分子，諸如類固醇、後色膽素、類視黃素及脂質。其具有剛性β-片狀第二結構，其在圓錐結構之開放端具有許多環，其可經工程改造以結合於不同靶抗原。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。

親和抗體為來源於金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)之蛋白質

A之骨架，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.* 17, 455-462 (2004)及EP 1641818A1。

高親和性多聚體為來源於A結構域骨架家族之多域蛋白質。約35個胺基酸之原生域採用既定雙硫鍵鍵結之結構。藉由改組由A結構域之家族呈現之天然變化來產生多樣性。關於其他細節，參見 *Nature Biotechnology* 23(12), 1556 - 1561 (2005)及 *Expert Opinion on Investigational Drugs* 16(6), 909-917 (2007年6月)。

運鐵蛋白係單體血清傳遞糖蛋白。運鐵蛋白可藉由在允許的表面環中插入肽序列而經工程改造以結合不同靶抗原。經工程改造之運鐵蛋白骨架之實例包括反式體。關於其他細節，參見 *J. Biol. Chem* 274, 24066-24073 (1999)。

經設計之錨蛋白重複蛋白質(DARPin)來源於錨蛋白，其為介導整合膜蛋白與細胞骨架之連接的蛋白質之家族。單一錨蛋白重複蛋白為由兩個 α 螺旋及 β 回旋(beta-turn)組成之33殘基主結構。其可藉由隨機化各重複蛋白之第一個 α 螺旋及 β 回旋中之殘基而經工程改造以結合不同靶抗原。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。

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

纖維結合蛋白為可經工程改造以結合於抗原之骨架。纖維蛋白由III

型人類纖維結合蛋白(FN3)之15個重複單元之第10個結構域之天然胺基酸序列之主鏈組成。 β -夾層結構之一端處的三個環可經工程改造以使纖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。

肽適體為組合性識別分子，其由恆定骨架蛋白(通常係硫氧還蛋白(TrxA))組成，該恆定骨架蛋白質含有在活性位點處插入之限制性可變肽環。關於其他細節，參見Expert Opin. Biol. Ther. 5, 783-797 (2005)。

微體來源於天然產生之長度為25-50個胺基酸之微型蛋白質，其含有3-4個半胱胺酸橋，微型蛋白質之實例包括KalataBI及芋螺毒素(conotoxin)及打結素。微型蛋白質具有環，其可經工程改造以包括至多25個胺基酸而不影響微型蛋白質之整體摺疊。關於經工程改造之打結素域之其他細節，參見WO2008098796。

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%或更高，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%或更高。

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

如本文所用，術語「**抗原決定子**」與「**抗原**」及「**抗原決定基**」同

義且係指多肽大分子上與抗原結合部分結合，形成抗原結合部分-抗原複合物的位點(例如鄰近胺基酸區段或由非鄰近胺基酸之不同區域組成的構形組態)。適用的抗原決定子可見於例如腫瘤細胞表面上、病毒所感染細胞之表面上、其他病變細胞表面上、免疫細胞表面上、游離於血清中及/或細胞外基質(ECM)中。除非另外指明，否則本文中適用作抗原之蛋白質可為來自任何脊椎動物來源(包括哺乳動物，諸如靈長類動物(例如人類)及嚙齒動物(例如小鼠及大鼠))之蛋白質的任何原生形式。在一特定實施例中，抗原係人類蛋白質。在本文中提及特定蛋白質之情況下，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之任何形式的蛋白質。該術語亦涵蓋天然產生之蛋白質變異體，例如剪接變異體或對偶基因變異體。

術語「**能夠特異性結合於PD1**」係指能夠以足以使抗原結合分子適用作靶向PD1中之診斷劑及/或治療劑之親和力結合PD1之抗原結合分子。抗原結合分子包括(但不限於)抗體、Fab分子、交換型Fab分子、單鏈Fab分子、Fv分子、scFv分子、單域抗體以及VH及骨架抗原結合蛋白。在一個態樣中，抗PD1抗原結合分子與不相關非PD1蛋白質之結合程度低於抗原結合分子與PD1之結合的約10%，如例如藉由放射免疫分析(RIA)所量測。詳言之，能夠特異性結合於PD1之抗原結合分子之解離常數(K_d) $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ 或 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (例如 10^{-8} M 或更小，例如 10^{-8} M 至 10^{-13} M ，例如 10^{-9} M 至 10^{-13} M)。在某些實施例中，抗PD1抗原結合分子結合於來自不同物種之PD1。詳言之，抗PD1抗原結合分子結合於人類及食蟹獼猴PD1。

「**特異性結合**」意謂結合對於抗原而言具選擇性且可與非所需或非

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

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

如本文所用, 「**靶細胞抗原**」係指靶細胞(例如T細胞或B細胞, 一種腫瘤細胞, 諸如癌細胞或腫瘤基質細胞)表面上所呈遞的抗原決定子。在某些實施例中, 靶細胞抗原係T細胞之表面上的抗原。在一個實施例中, 靶細胞抗原係PD1。

術語「**PD1**」, 亦稱為漸進式細胞死亡蛋白1, 係具有288個胺基酸之

I型膜蛋白，其首先描述於1992 (Ishida等人, EMBO J., 11 (1992), 3887-3895)中。PD1係T細胞調節因子之擴展CD28/CTLA-4家族之成員且具有兩個配位體PD-L1 (B7-H1, CD274)及PD-L2 (B7-DC, CD273)。蛋白結構包括細胞外IgV結構域，之後為跨膜區及細胞內尾。細胞內尾含有位於基於免疫受體酪胺酸之抑制性基元及基於免疫受體酪胺酸之切換基元中之兩個磷酸化部位，由此表明PD1負調節TCR信號。此情況與SHP-1及SHP-2磷酸酶與配位體結合時PD1之細胞質尾之結合一致。儘管PD1不表現於未處理T細胞上，但其在T細胞受體(TCR)介導之活化之後得以上調且在活化與耗竭之T細胞上皆觀察到(Agata等人, Int. Immunology 8 (1996), 765-772)。此等耗竭之T細胞具有功能異常表型且不能適當地進行反應。儘管PD1具有相對較寬的表現模式，但其最重要的作用可能係作為T細胞上之共抑制受體(Chinai等人, Trends in Pharmacological Sciences 36 (2015), 587-595)。因此，目前治療方法集中於阻斷PD1與其配位體之相互作用以增強T細胞反應。術語「漸進式死亡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PD1之變異體、同功異型物、物種同源物及具有至少一個與PD1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 (SEQIDNO:94)中。

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(分別係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性構架區(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結構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**」係指抗體可變域中在序列上具有高變性及/或形成結構上定義之環(「**高變環**」)的各區域。一般而言，原生四鏈抗體包含六個**HVR**；三個位於**VH**中(**H1**、**H2**、**H3**)，且三個位於**VL**中(**L1**、**L2**、**L3**)。**HVR**一般包含來自高變環及/或來自「**互補決定區**」(**CDR**)之胺基酸殘基，後者具有最高的序列可變性及/或與抗原識別相關。例示性高變環出現在胺基酸殘基26-32 (**L1**)、50-52 (**L2**)、91-96 (**L3**)、26-32 (**H1**)、53-55 (**H2**)及96-101 (**H3**)處。(Chothia及Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。例示性**CDR** (**CDR-L1**、**CDR-L2**、**CDR-L3**、**CDR-H1**、**CDR-H2**及**CDR-H3**)出現在**L1**之胺基酸殘基24-34、**L2**之胺基酸殘基50-56、**L3**之胺基酸殘基89-97、**H1**之胺基酸殘基31-35B、**H2**之胺基酸殘基50-65及**H3**之胺基酸殘基95-102處。(Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版 美國公共衛生署 (Public Health Service), 美國國家衛生研究院 (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, 美國衛生與人群服務部(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，其中定義包括對照彼此比較時胺基酸殘基之交疊部分或子集。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之每一者所定義之**CDR**的適當胺基酸殘基闡述於下表A中作為比較。涵蓋特定

CDR之確切殘基數目將視CDR序列及大小而變。在抗體之可變區胺基酸序列指定的情況下，熟習此項技術者可以常規方式確定哪個殘基包含特定CDR。

表A. CDR定義¹

CDR	Kabat	Chothia	AbM²
V _H CDR1	31-35	26-32	26-35
V _H CDR2	50-65	52-58	50-58
V _H CDR3	95-102	95-102	95-102
V _L CDR1	24-34	26-32	24-34
V _L CDR2	50-56	50-52	50-56
V _L CDR3	89-97	91-96	89-97

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

²如表A中所用之含有小寫字母「b」的「AbM」係指如藉由Oxford Molecular之「AbM」抗體模型化軟體所定義的CDR。

Kabat等人亦定義適用於任何抗體的可變區序列編號系統。一般熟習此項技術者可將此「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的任何實驗數據。如本文所用，「Kabat編號」係指由Kabat等人，美國衛生與人群服務部，「Sequence of Proteins of Immunological Interest」(1983)所闡述之編號系統。除非另外說明，否則提及抗體可變區中之特異性胺基酸殘基位置的編號係根據Kabat編號系統。

除V_H中之CDR1以外，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。例示性CDR (CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3)出現在L1之胺基酸殘基

31-34、L2之胺基酸殘基50-55、L3之胺基酸殘基89-96、H1之胺基酸殘基31-35B、H2之胺基酸殘基50-58及H3之胺基酸殘基95-102處。(參見Almagro及Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)。) 除非另外指明，否則在本文中，根據Kabat等人，同上對可變域中之HVR殘基及其他殘基(例如FR殘基)進行編號。

如本文所使用，在抗原結合分子(例如抗體)之情形下，術語「**親和力成熟**」係指來源於參考抗原結合分子(例如藉由突變)之抗原結合分子，其結合於與參考抗體相同的抗原，較佳結合於相同的抗原決定基；且與參考抗原結合分子相比對抗原具有較高親和力。親和力成熟一般涉及抗原結合分子之一或多個CDR中一或多個胺基酸殘基之修飾。通常，親和力成熟抗原結合分子結合於與初始參考抗原結合分子相同的抗原決定基。

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

出於本文之目的，「**接受體人類構架**」係包含來源於如以下所定義之人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之輕鏈可變域(VL)構架或重鏈可變域(VH)構架之胺基酸序列的構架。「來源於」人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之接受體人類構架可包含人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之相同胺基酸序列，或其可含有胺基酸序列變化。在一些實施例中，胺基酸變化之數目為10個或更少、9個或更少、8個或更少、7個或更少、6個或更少、5個或更少、4個或更少、3個或更少或2個或更少。在一些實施例中，VL接受體人類構架之序列與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/或輕鏈之一部分源自特定來源或物種，而重鏈及/或輕鏈之其餘部分源自不同來源或物種之抗體。

抗體之「**類別**」係指其重鏈所具有之恆定域或恆定區的類型。存在五種主要類別之抗體：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且此等類別中之若干者可進一步分成子類(同型)，例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及IgA₂。對應於不同類別之免疫球蛋白之重鏈恆定域分別稱為 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之胺基酸殘基之嵌合抗體。在某些實施例中，人類化抗體將包含至少一個且典型地兩個可變域之實質上所有者，其中所有或實質上所有HVR(例如CDR)皆對應於非人類抗體之HVR，且所有或實質上所有FR皆對應於人類抗體之FR。人類化抗體視情況可包含源自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」之其他形成為其中恆定區已經額外修飾或自原始抗體發生變化以產生根據本發明之特性，尤其在C1q結合及/或Fc受體(FcR)結合方面。

「**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之抗體之胺基酸序列的抗體。人類抗體之此定義特定排除包含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。

術語「**Fc結構域**」或「**Fc區**」在本文中用於定義抗體重鏈中含有恆定區之至少一部分的C端區域。該術語包括原生序列Fc區及變異型Fc區。

IgG Fc區包含IgG CH₂及IgG CH₃結構域。人類IgG Fc區之「CH₂結構域」通常自約位置231處之胺基酸殘基延伸至約位置340處之胺基酸殘基。在一個實施例中，碳水化合物鏈連接至CH₂結構域。本文中，CH₂結構域可為原生序列CH₂結構域或變異型CH₂結構域。「CH₃結構域」包含Fc區中C端殘基延伸至CH₂結構域(亦即自IgG之約位置341之胺基酸殘基至約位置447處之胺基酸殘基)。本文中，CH₃區可為原生序列CH₃結構域或變異型CH₃結構域(例如在其一個鏈中具有引入之「隆凸」(「杵」)且在其另一個鏈中具有相應的引入之「凹穴」(「臼」)的CH₃結構域；參見美國專利第5,821,333號，其以引用之方式明確併入本文中)。此類變異型CH₃結構域可用於促進如本文中所述之兩個非一致抗體重鏈之雜二聚化。在一個實施例中，人類IgG重鏈Fc區自Cys226或自Pro230延伸至重鏈之羧基端。然而，Fc區之C端離胺酸(Lys447)可存在或可不存在。除非另外說明，否則Fc區或恆定區胺基酸殘基之編號係依據EU編號系統，亦稱為EU索引，如Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版. 美國公共衛生署, 美國國家衛生研究院, Bethesda, Md., 1991中所述。

「杵-臼」技術描述於例如US 5,731,168；US 7,695,936；Ridgway等人, *Prot Eng* 9, 617-621 (1996)及Carter, *J Immunol Meth* 248, 7-15 (2001)中。一般而言，方法包括在第一多肽之界面處引入隆凸(「杵」)及在第二多肽之界面處引入相應凹穴(「臼」)，使得隆凸可定位於凹穴中以便促進雜二聚體形成且阻礙均二聚體形成。隆凸藉由用較大側鏈(例如酪胺酸或色胺酸)置換第一多肽界面中之小胺基酸側鏈來構築。大小與隆凸相同或相似的補償性凹穴藉由用較小胺基酸側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)置

換交大胺基酸側鏈而形成於第二多肽之界面中。隆凸及凹穴可藉由改變編碼多肽之核酸，例如藉由定點突變誘發或藉由肽合成產生。在一特定實施例中，杵修飾包含Fc結構域之兩個子單元中之一者中之胺基酸取代T366W，且臼修飾包含Fc結構域之兩個子單元中之另一者中的胺基酸取代T366S、L368A及Y407V。在另一特定實施例中，包含杵修飾之Fc結構域之子單元另外包含胺基酸取代S354C，且包含臼修飾之Fc結構域之子單元另外包含胺基酸取代Y349C。引入此等兩個半胱胺酸殘基使得Fc區之兩個子單元之間形成雙硫橋鍵，由此進一步穩定二聚體(Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001))。編號係根據Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版. 美國公共衛生署, 美國國家衛生研究院, Bethesda, MD, 1991之EU索引。

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

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(ADCP)、細胞激素分泌、免疫複合物介導之抗原呈遞細胞攝入抗原、細胞表面受體(例如B細胞受體)下調及B細胞活化。

「活化Fc受體」係一種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Fc γ RIIIa (CD16a)、Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIa (CD32)及Fc α RI (CD89)。特定活化Fc受體為人類Fc γ RIIIa (參見UniProt寄存編號P08637，版本141)。

術語「TNF配位體家族成員」或「TNF家族配位體」係指促炎性細胞激素。細胞激素通常(且特定言之TNF配位體家族之成員)在免疫系統之刺激及配位中起重要作用。當前，基於序列、功能性及結構類似性，已發現十九種細胞激素為TNF (腫瘤壞死因子)配位體超家族之成員。所有此等配位體皆為具有C端細胞外域(胞外域)、N端細胞胞內域及單一跨膜域之II型跨膜蛋白。C端細胞外域(稱為TNF同源性域(THD))在超家族成員之間具有20-30%胺基酸一致性且負責結合於受體。TNF胞外域亦負責TNF配位體以形成三聚複合物，其由其特異性受體而被識別。

TNF配位體家族之成員係選自由以下組成之群：淋巴毒素 α (亦稱為LTA或TNFSF1)、TNF (亦稱為TNFSF2)、LT β (亦稱為TNFSF3)、OX40L (亦稱為TNFSF4)、CD40L (亦稱為CD154或TNFSF5)、FasL (亦稱為CD95L、CD178或TNFSF6)、CD27L (亦稱為CD70或TNFSF7)、CD30L (亦稱為CD153或TNFSF8)、4-1BBL (亦稱為TNFSF9)、TRAIL (亦稱為APO2L、CD253或TNFSF10)、RANKL (亦稱為CD254或TNFSF11)、TWEAK (亦稱為TNFSF12)、APRIL (亦稱為CD256或TNFSF13)、BAFF (亦稱為CD257或TNFSF13B)、LIGHT (亦稱為CD258或TNFSF14)、TL1A (亦稱為VEGI或TNFSF15)、GITRL (亦稱為TNFSF18)、EDA-A1 (亦稱為外異蛋白A1)及EDA-A2 (亦稱為外異蛋白

A2)。除非另外指明，否則該術語係指來自任何脊椎動物來源(包括哺乳動物，諸如靈長類動物(例如人類)、非人類靈長類動物(例如食蟹獼猴)及啮齒動物(例如小鼠及大鼠))之任何原生TNF家族配位體。在本發明之特定實施例中，TNF配位體家族成員係選自由以下組成之群：OX40L、FasL、CD27L、TRAIL、4-1BBL、CD40L及GITRL。在一特定實施例中，TNF配位體家族成員係選自4-1BBL及OX40L。

TNF配位體家族成員之其他資訊(特定言之，序列)可自公開可用資料庫(諸如Uniprot (www.uniprot.org))獲得。舉例而言，人類TNF配位體具有以下胺基酸序列：人類淋巴毒素 α (UniProt寄存編號P01374，SEQ ID NO:95)、人類TNF (UniProt寄存編號P01375，SEQ ID NO:96)、人類淋巴毒素 β (UniProt寄存編號Q06643，SEQ ID NO:97)、人類OX40L (UniProt寄存編號P23510，SEQ ID NO:98)、人類CD40L (UniProt寄存編號P29965，SEQ ID NO:99)、人類FasL (UniProt寄存編號P48023，SEQ ID NO:100)、人類CD27L (UniProt寄存編號P32970，SEQ ID NO:101)、人類CD30L (UniProt寄存編號P32971，SEQ ID NO:102)、4-1BBL (UniProt寄存編號P41273，SEQ ID NO:103)、TRAIL (UniProt寄存編號P50591，SEQ ID NO:104)、RANKL (UniProt寄存編號O14788，SEQ ID NO:105)、TWEAK (UniProt寄存編號O43508，SEQ ID NO:106)、APRIL (UniProt寄存編號O75888，SEQ ID NO:107)、BAFF (UniProt寄存編號Q9Y275，SEQ ID NO:108)、LIGHT (UniProt寄存編號O43557，SEQ ID NO:109)、TL1A (UniProt寄存編號O95150，SEQ ID NO:110)、GITRL (UniProt寄存編號Q9UNG2，SEQ ID NO:111)及外異蛋白A (UniProt寄存編號Q92838，SEQ ID NO:112)。

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

術語「共刺激性TNF配位體家族成員」或「共刺激性TNF家族配位體」係指TNF配位體家族成員之子群，其能夠共刺激T細胞之增殖及細胞激素產生。此等TNF家族配位體可在與其相應TNF受體相互相用時共刺激TCR信號且與其受體之相互相用可引起TNFR相關因子(TRAF)之募集，其起始可引起T細胞活化之信號級聯。共刺激性TNF家族配位體係選自由以下組成之群：4-1BBL、OX40L、GITRL、CD70、CD30L及LIGHT，更特定言之，共刺激性TNF配位體家族成員係選自4-1BBL及OX40L。

如上文中所述，4-1BBL為II型跨膜蛋白及TNF配位體家族中之一個成員。已描述具有SEQ ID NO:103之胺基酸序列的完全或全長4-1BBL可形成細胞表面上之三聚體。藉由4-1BBL之胞外域之特異性移動實現三聚體之形成。該等動機在本文中稱為「三聚區域」。人類4-1BBL序列(SEQ ID NO:113)之胺基酸50-254形成4-1BBL之細胞外域，但即使其片段亦能夠形成三聚體。在本發明之特定實施例中，術語「4-1BBL之胞外域或其片段」係指具有選自以下之胺基酸序列的多肽：SEQ ID NO:4 (人類4-1BBL之胺基酸52-254)、SEQ ID NO:1 (人類4-1BBL之胺基酸71-254)、SEQ ID NO:3 (人類4-1BBL之胺基酸80-254)及SEQ ID NO:2 (人類4-

1BBL之胺基酸85-254)；或具有選自以下之胺基酸序列的多肽：SEQ ID NO:5 (人類4-1BBL之胺基酸71-248)、SEQ ID NO:8 (人類4-1BBL之胺基酸52-248)、SEQ ID NO:7 (人類4-1BBL之胺基酸80-248)及SEQ ID NO:6 (人類4-1BBL之85-248 of)，而且本文中亦包括能夠進行三聚作用之胞外域之其他片段。

如上文中所描述，OX40L係另一種II型跨膜蛋白及TNF配位體家族中之另一成員。完全或全長人類OX40L具有SEQ ID NO:98之胺基酸序列。人類OX40L序列(SEQ ID NO:114)之胺基酸51-183形成OX40L之細胞外域，但即使其片段亦能夠形成三聚體。在本發明之特定實施例中，術語「OX40L之胞外域或其片段」係指具有選自SEQ ID NO:114 (人類OX40L之胺基酸51-183)或SEQ ID NO:115 (人類OX40L之胺基酸52-183)之胺基酸序列的多肽，但本文中亦包括其他能夠進行三聚之胞外域之片段。

術語「**肽連接子**」係指包含一或多個胺基酸(通常約2至20個胺基酸)的肽。肽連接子在此項技術中已知或描述於本文中。適合的非免疫原性連接肽係例如 $(G_4S)_n$ 、 $(SG_4)_n$ 或 $G_4(SG_4)_n$ 肽連接子，其中「n」一般係1與10之間，通常1與4之間的數值，詳言之係2，亦即選自由以下組成之群的肽：GGGGS (SEQ ID NO:116)、GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:117)、SGGGGSGGGG (SEQ ID NO:118)、 $(G_4S)_3$ 或GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:119)、GGGGSGGGGSGGGG 或 $G_4(SG_4)_2$ (SEQ ID NO:120)及 $(G_4S)_4$ 或GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:121)，而且包括序列GSPGSSSSGS (SEQ ID NO:122)、GSGSGSGS (SEQ ID NO:123)、GSGSGNGS (SEQ ID NO:124)、GGSGSGSG (SEQ ID

NO:125)、GGSGSG (SEQ ID NO:126)、GGSG (SEQ ID NO:127)、GGSGNGSG (SEQ ID NO:128)、GGNGSGSG (SEQ ID NO:129)及GGNGSG (SEQ ID NO:130)。尤其關注之肽連接子係(G₄S)₁或GGGGS (SEQ ID NO:86)、(G₄S)₂或GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:117)及GSPGSSSSGS (SEQ ID NO:122)，更特定言之(G₄S)₂或GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:117)。

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

如本文所用，「**融合多肽**」或「**單一融合多肽**」係指由該TNF配位體家族成員之與抗原結合部分之一部分或Fc部分融合的一或兩個胞外域構成之單鏈多肽。融合可藉由將抗原結合部分之N端或C端胺基酸經由肽連接子直接連接至該TNF配位體家族成員之胞外域之C端或N端胺基酸來進行。

「融合」或「連接」意謂組分(例如多肽及該TNF配位體家族成員之胞外域)由肽鏈(直接或經由一或多個肽連接子)連接。

相對於參考多肽序列之「**胺基酸序列一致性百分比(%)**」定義為在比對參考多肽序列與候選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。出於測定胺基酸序列一致性百分比之目的之比對可以此項技術內之各種方式實現，例如使用公開可用之電腦軟體，如BLAST、BLAST-2、ALIGN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。然而，出於本文之目的，使用序列比較電腦程式ALIGN-2產生胺基酸序列一致性%值。ALIGN-2序列比較電腦程式由Genentech, Inc.設計，且原始程式碼已在美國著作權局(U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559申請用戶文檔，其在此註冊在美國版權註冊第TXU510087號下。ALIGN-2程式可公開購自Genentech, Inc., South San Francisco, California或可自原始程式碼編譯。ALIGN-2程序經編寫可用於UNIX操作系統，包括數位UNIX V4.0D。所有序列比較參數由ALIGN-2程序設定且不變化。在採用ALIGN-2進行胺基酸序列比較之情形下，既定胺基酸序列A與既定胺基酸序列B之胺基酸序列一致性% (或者，其可表述為與既定胺基酸序列B具有或包含一定胺基酸序列一致性%的既定胺基酸序列A)如下計算：

100乘以分率X/Y

其中X係在A與B之比對程式中藉由序列比對程式ALIGN-2評為一致匹配之胺基酸殘基之數目，且其中Y係B中之胺基酸殘基之總數目。應瞭解，在胺基酸序列A之長度與胺基酸序列B之長度不相等之情況下，A相對於B之胺基酸序列一致性%與B相對於A之胺基酸序列一致性%將不相等。除非另外特定規定，否則本文所用之所有胺基酸序列一致性%值係如前述段落中剛剛所述使用ALIGN-2電腦程式獲得。

在某些實施例中，涵蓋本文中提供之含有TNF配位三聚體之抗原結

合分子的**胺基酸序列變異體**。舉例而言，可能需要改良含TNF配位三聚體之抗原結合分子之結合親和力及/或其他生物特性。含TNF配位三聚體之抗原結合分子之胺基酸序列變異體可藉由將適合的修飾引入編碼核苷酸序列之分子或藉由肽合成來製備。此類修飾包括例如在抗體之胺基酸序列內的殘基之缺失及/或插入及/或取代。可進行缺失、插入及取代之任何組合以獲得最終構築體，其限制條件係最終構築體具有所需特徵，例如抗原結合。用於取代性突變誘發之相關位點包括HVR及構架(FR)。保守性取代以標題「較佳取代」提供於表B中且在下文中參考胺基酸側鏈分類(1)至(6)進一步描述。可將胺基酸取代引入相關分子且針對所需活性篩檢產物，例如保持/改良之抗原結合、降低之免疫原性或改良之ADCC或CDC。

表B

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

初始殘基	例示性取代	較佳取代
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。

非保守取代將必然伴有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**」包括實質性變異體，其中在親本抗原結合分子(例如人類化或人類抗體)之一或多個高變區殘基中存在胺基酸取代。一般而言，所選擇之用於進一步研究之所得變異體與親本抗原結合分子相比將具有某些生物特性之修飾(例如改良)(例如提高之親和力、降低之免疫原性)及/或將實質上保持親本抗原結合分子之某些生物特性。例示性取代型變異體係親和力成熟抗體，其可例如宜使用基於噬菌體呈現之親和力成熟技術(諸如本文所述之技術)產生。簡言之，一或多個HVR殘基發生突變且變異型抗原結合分子呈現於噬菌體上且針對特定生物活性(例如結合親和力)進行篩檢。在某些實施例中，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)。一種適用於鑑別突變誘發可靶向之抗體殘基或區域的方法稱為「丙胺酸掃描突變誘發」，如Cunningham及Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085所述。在此方法中，鑑別殘基或一組靶殘基(例如帶電殘基，諸如Arg、Asp、His、Lys及Glu)且經中性或帶負電胺基酸(例如丙胺酸或聚丙胺酸)置換以判定抗體與抗原之相互作用是否受到影響。可在對初始取代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-抗原結合分子之晶體結構複合以鑑別抗體與抗原之間的接觸點。此類接觸殘基及鄰近殘基可作為取代候選物之標靶或排除在取代候選物之外。可篩檢變異體以判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含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子。分子之其他插入型變異體包括與多肽之N或C端融合，其增加含TNF配位三聚體之抗原結合分子之血清半衰期。

在某些實施例中，本文中提供之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子經改變以增加或降低抗體之糖基化程度。可藉由改變胺基酸序列使得創造或移除之一或多個糖基化位點宜獲得分子之糖基化變異體。當含TNF配位三聚體之抗原結合分子包含Fc區時，可改變與其連接之碳水化合物。由哺乳動物細胞產生之天然抗體通常包含分支鏈雙觸角寡醣，其一般藉由N鍵連接至Fc區之CH2結構域的Asn297。參見例如Wright等人 *TIBTECH* 15:26-32 (1997)。寡醣可包括各種碳水化合物，例如甘露糖、N-乙醯基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖及唾液酸，以及連接至雙觸寡醣結構之「主幹」中之GlcNAc的海藻糖。在一些實施例中，可進行含有TNF家

族配位三聚體之抗原結合分子中寡糖之修飾以產生具有某些改良之特性的變異體。在一個態樣中，提供含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子的變異體，其具有不含與Fc區連接(直接或間接)之海藻糖的碳水化合物結構。此類海藻糖基化變異體可具有改良之ADCC功能，參見例如美國專利公開案第US 2003/0157108號(Presta, L.)或US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子之其他變異體包括具有平分寡糖之變異體，例如其中連接至Fc區之雙觸角寡糖由GlcNAc平分。此類變異體可具有降低之海藻糖基化及/或改良之ADCC功能，參見例如WO 2003/011878 (Jean-Mairet等人)；美國專利第6,602,684號(Umana等人)；及US 2005/0123546 (Umana等人)。亦提供寡糖中之至少一個半乳糖殘基與Fc區連接之變異體。此類抗體變異體可具有改良之CDC功能且描述於例如WO 1997/30087 (Patel等人)；WO 1998/58964 (Raju, S.)；及WO 1999/22764 (Raju, S.)中。

在某些實施例中，可能需要產生本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子的經半胱胺酸工程改造之變異體，例如「thioMAbs」，其中分子之一或多個殘基經半胱胺酸殘基取代。在特定實施例中，經取代之殘基存在於分子之可達位點處。藉由用半胱胺酸取代此等殘基，藉此將反應性硫醇基安置於抗體之可達位點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)。經半胱胺酸工程改造之抗原結合分子可如例如美國專利第7,521,541號中所述產生。

在某些態樣中，本文中提供之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合

分子可經進一步修飾以含有此項技術中已知且可容易地獲得之其他非蛋白質部分。適用於抗體衍生作用之部分包括(但不限於)水可溶聚合物。水溶性聚合物之非限制性實例包括(但不限於)聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇之共聚物、羧甲基纖維素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啉酮、聚-1,3-二氧雜環戊烷、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/順丁烯二酸酐共聚物、聚胺基酸(均聚物或無規共聚物)及葡聚糖或聚(n-乙基吡咯啉酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙烯多元醇(例如丙三醇)、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在製造中具有優勢。聚合物可具有任何分子量，且可為分支鏈或未分支的。連接至抗體之聚合物的數目可變化，且若連接多於一個聚合物，則聚合物可為相同或不同分子。一般而言，用於衍生作用之聚合物之數目及/或類型可基於包括(但不限於)待改良抗體之特定特性或功能、雙特異性抗體衍生物是否將用於限定條件下之療法等考慮因素來確定。在另一態樣中，提供抗體與可藉由暴露於輻射來選擇性地加熱之非蛋白質部分之結合物。在一個實施例中，非蛋白質部分係碳奈米管(Kam, N.W.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605)。輻射可具有任何波長，且包括(但不限於)不損害普通細胞但將非蛋白質部分加熱至殺死抗體-非蛋白質部分近側之細胞之溫度的波長。

在另一態樣中，可獲得本文中提供之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子的免疫結合物。「**免疫結合物**」係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**」係指分離之核酸分子或構築體，例如信使RNA (mRNA)、病毒源性RNA或質體DNA (pDNA)。聚核苷酸可包含習知磷酸

二酯鍵或非習知鍵(例如醯胺鍵，諸如肽核酸(PNA)中所見)。術語「核酸分子」係指聚核苷酸中存在之任一或多個核酸區段，例如DNA或RNA片段。

「分離之」核酸分子或聚核苷酸意欲係已自原生環境中移除之核酸分子、DNA或RNA。舉例而言，出於本發明之目的，編碼載體中所含之多肽的重組性聚核苷酸視為分離。分離之聚核苷酸之其他實例包括異源宿主細胞中所維持之重組聚核苷酸或溶液中純化(部分或實質上)之聚核苷酸。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。分離之RNA分子包括本發明之活體內或活體外RNA轉錄物，以及正股及負股形式，及雙股形式。本發明之分離之聚核苷酸或核酸進一步包括以合成方式製造之此類分子。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之核苷酸序列與本發明之參考核核苷酸序列至少例如95%「一致」意指該聚核苷酸之核苷酸序列與參考序列一致，但該聚核苷酸序列相對於參考核核苷酸序列可每100個核苷酸中包括至多五個點突變。換言之，為獲得核苷酸序列與參考核核苷酸序列至少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%的多個核苷酸。參考序列之此等改變可發生於參考核核苷酸序列之5'或3'端位置或彼等末端位置之間的任何位置，此等位置個別地穿插於參考序列殘基中或參考序列內的一或多個鄰近基團中。實際來看，任何特定聚核苷酸序列是否與本發明之核苷酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致可習知地

使用已知電腦程式確定，諸如上文關於多肽所論述的電腦程式(例如 ALIGN-2)。

術語「**表現卡匣**」係指以重組或合成方式產生之聚核苷酸，其具有允許靶細胞中之特定核酸發生轉錄的一系列特定核酸要素。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之聚核苷酸序列。

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分子與該基因在靶細胞中可操作地締合。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。表現載體允許大量穩定mRNA發生轉錄。一旦表現載體進入靶細胞內，則藉由細胞轉錄及/或轉譯機構製造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，包括此類細胞之子代。宿主細胞包括「**轉型體**」及「**轉型細胞**」，其包括初級轉型細胞及自其衍生之子代(不考慮繼代次數)。子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型細胞篩檢或選擇之具有相同功能或生物活性之突變型子代。宿主細胞係可用於產生本發明之雙特異性抗原結合分子的任何類型之細胞系統。宿主細胞包括培養細胞，例如哺乳動物培養細

胞，諸如CHO細胞、BHK細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、YO骨髓瘤細胞、P3X63小鼠骨髓瘤細胞、PER細胞、PER.C6細胞或融合瘤細胞、酵母細胞、昆蟲細胞及植物細胞(僅舉數例)，而且包括轉殖基因動物、轉殖基因植物或培養植物或動物組織內所含的細胞。

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的「**治療有效量**」係指在所需劑量及時段下有效獲得所需治療或預防結果之量。舉例而言，治療有效量之藥劑消除、減少、延遲、最小化或預防疾病副作用。

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

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的製劑，且其不含對調配物將投與之個體具有不可接受毒性之其他組分。

「**醫藥學上可接受之賦形劑**」係指醫藥組合物中除活性成分以外之對個體無毒的成分。醫藥學上可接受之賦形劑包含(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，且可以為實現預防或在臨床病理學病程中進行。所需治療作用包括(但不限於)預防疾病發生或復發、緩解症狀、減輕疾病之任何直接或間接病理性後果、預防癌轉移、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之進程。

如本文所使用，術語「**癌症**」係指增生性疾病，諸如淋巴瘤、癌瘤、淋巴瘤、母細胞瘤、肉瘤、白血病、淋巴球性白血病、肺癌、非小細胞肺(NSCL)癌、細支氣管肺泡細胞肺癌、骨癌、胰臟癌、皮膚癌、頭頸癌、皮膚或眼內黑素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛門區癌、胃癌(stomach cancer)、胃癌(gastric cancer)、結腸直腸癌(CRC)、胰臟癌、乳癌、三陰性乳癌、子宮癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、霍奇金氏病(Hodgkin's Disease)、食道癌、小腸癌、內分泌系統癌症、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、膀胱癌、腎臟或尿管之癌症、腎細胞癌、腎盂癌、間皮瘤、肝細胞癌、膽癌、中樞神經系統(CNS)之贅瘤、脊柱軸腫瘤、腦幹神經膠質瘤、多形性膠質母細胞瘤、星形細胞瘤、神經鞘瘤、室管膜瘤、神經管胚細胞瘤、脊膜瘤、鱗狀細胞癌、垂體腺瘤及尤文氏肉瘤(Ewings sarcoma)、黑素瘤、多發性骨髓瘤、B細胞癌(淋巴瘤)、慢性淋巴球性白血病(CLL)、急性淋巴母細胞白血病(ALL)、毛細胞白血病、慢性骨髓母細胞白血病，包括以上癌症中之任一者之頑抗性版本，或以上癌症中之一或多者之組合。

本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子

本發明提供新穎的含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其具有尤其有利特性，諸如可生產性、穩定性、結合親和力、生物活性、靶向功效及降低之毒性。

在第一態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中該抗原結合分子之特徵在於該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接，且該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之僅一個胞外域或其片段。

在一特定態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中該抗原結合分子之特徵在於該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接，且該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之僅一個胞外域或其片段，及

(c) Fc結構域，其由能夠穩定締合之第一及第二子單元構成。

在一特定態樣中，含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子包含(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中抗原結合分子之特徵在於第一多肽包含TNF配位體家族成員之

兩個胞外域或其兩個片段，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子彼此連接，且其特徵在於第二多肽包含該TNF配位體家族成員之僅一個胞外域或其片段，其中該TNF配位體家族成員共刺激人類T細胞活化。

在另一特定態樣中，含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子包含
(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中抗原結合分子之特徵在於第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其兩個片段，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子彼此連接，且其特徵在於第二多肽包含該TNF配位體家族成員之僅一個胞外域或其片段，其中在所有情況下該TNF配位體家族成員之胞外域相同。

在另一態樣中，提供一種如上文所定義之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中該抗原結合分子之特徵在於

(i)分別地，該第一多肽含有CH1或CL結構域且該第二多肽含有CL或CH1結構域，其中該第二多肽藉由該CH1與CL結構域之間的雙硫鍵連接至該第一多肽，且其中該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其兩個片段，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子彼此連接且連接至該CH1或CL結構域，且其中該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之CL或CH1結構域，或

(ii)分別地，該第一多肽含有CH3結構域且該第二多肽含有CH3結構

域，且其中該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其兩個片段，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子彼此連接且連接至該CH3結構域之C端，且其中該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之僅一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之CH3結構域之C端，或

(iii)分別地，該第一多肽含有VH-CL或VL-CH1結構域且該第二多肽含有VL-CH1結構域或VH-CL結構域，其中該第二多肽藉由該CH1與CL結構域之間的雙硫鍵連接至該第一多肽，且其中該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接且連接至VH或VL，且其中該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之VL或VH。

在另一態樣中，提供一種如上文所定義之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中該抗原結合分子之特徵在於

(i)分別地，該第一多肽含有CH1或CL結構域且該第二多肽含有CL或CH1結構域，其中該第二多肽藉由該CH1與CL結構域之間的雙硫鍵連接至該第一多肽，且其中該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其兩個片段，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子彼此連接且連接至該CH1或CL結構域，且其中該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之

CL或CH1結構域，或

(ii)分別地，該第一多肽含有CH3結構域且該第二多肽含有CH3結構域，且其中該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其兩個片段，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子彼此連接且連接至該CH3結構域之C端，且其中該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之僅一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之CH3結構域之C端。

在一個態樣中，含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子包含選自4-1BBL及OX40L之共刺激人類T細胞活化之TNF配位體家族成員。更特定言之，TNF配位體家族成員為4-1BBL。

在另一態樣中，TNF配位體家族成員之胞外域包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7及SEQ ID NO:8，尤其SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5之胺基酸序列。更特定言之，TNF配位體家族成員之胞外域包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列。

在另一態樣中，本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

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

在一個態樣中，本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

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

在另一態樣中，本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中該抗原結合分子之特徵在於第一多肽包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列且其特徵在於第二多肽包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列。

在另一態樣中，TNF配位體家族成員係OX40L。在一特定態樣中，提供含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中TNF配位體家族成員之胞外域包含SEQ ID NO:114或SEQ ID NO:115之胺基酸序列，尤其SEQ ID NO:114之胺基酸序列。

在另一態樣中，本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，

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

且其中抗原結合分子之特徵在於第一多肽包含TNF配位體家族成員

之兩個胞外域或其兩個片段，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子彼此連接且連接至CH1或CL結構域，且第二多肽包含該TNF配位體家族成員之僅一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段藉由肽連接子連接至該多肽之CL或CH1結構域。

在一個態樣中，提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，

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

且其中抗原結合分子之特徵在於第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其兩個片段，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子彼此連接且連接至CH1結構域，且其特徵在於第二多肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之CL結構域。

在另一態樣中，提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，

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

且其中抗原結合分子之特徵在於第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其兩個片段，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子彼此連接且連接至CL結構域，且其特徵在於第二多肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該

多肽之CH1結構域。

在另一態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

- (a)一個部分，其能夠特異性結合於PD1，及
- (b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中該抗原結合分子之特徵在於該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其兩個片段，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子彼此連接，且其特徵在於該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之僅一個胞外域或其片段。

在又一態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

- (a)多於一個部分，其能夠特異性結合於PD1，及
- (b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中抗原結合分子之特徵在於第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其兩個片段，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子彼此連接，且其特徵在於第二多肽包含該TNF配位體家族成員之僅一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽。

在一個態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

- (a)兩個部分，其能夠特異性結合於PD1，及
- (b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中該抗原結合分子之特徵在於該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其兩個片段，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子

彼此連接，且其特徵在於該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之僅一個胞外域或其片段。

在一特定態樣中，提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中抗原結合分子之特徵在於分別地第一多肽含有CH3結構域且第二多肽含有CH3結構域，且其中該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接且連接至CH3結構域之C端，且其中該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之CH3結構域之C端。特定言之，此類含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子包含兩個能夠特異性結合於靶細胞抗原之部分。

在一個態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)兩個部分，其能夠特異性結合於PD1，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中該抗原結合分子之特徵在於該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其兩個片段，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子彼此連接，且其特徵在於該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，

其中該兩個能夠特異性結合於靶細胞抗原之部分結合於兩個不同的靶細胞抗原。

在另一態樣中，本發明提供一種如上文所定義之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中能夠特異性結合於靶細胞抗原之部分係選自由以下組成之群：抗體、抗體片段及骨架抗原結合蛋白。

在一個態樣中，提供一種如上文所述之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中能夠特異性結合於PD1之部分係選自由以下組成之群：抗體片段、Fab分子、交換型Fab分子、單鏈Fab分子、Fv分子、scFv分子、單域抗體、aVH及骨架抗原結合蛋白。在一個態樣中，能夠特異性結合於PD1之部分係aVH或骨架抗原結合蛋白。在一個態樣中，能夠特異性結合於靶細胞抗原之部分係能夠特異性結合於靶細胞抗原之骨架抗原結合蛋白。

詳言之，含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子包含一或兩個能夠特異性結合於PD1之部分。

在一特定態樣中，提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中能夠特異性結合於PD1之部分係能夠特異性結合於PD1之Fab分子或交換型Fab分子。詳言之，能夠特異性結合於靶細胞抗原之部分係能夠特異性結合於PD1之Fab。

在另一態樣中，提供一種根據本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中包含TNF配位體家族成員之藉由第一肽連接子彼此連接之兩個胞外域或其片段的肽在其C端藉由第二肽連接子與重鏈之CH1結構域融合，且其中該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段在其C端藉由第三肽連接子與輕鏈上之CL結構域融合。

在另一態樣中，提供一種根據本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中包含TNF配位體家族成員之藉由第一肽連接子彼此連

接之兩個胞外域或其片段的肽在其C端藉由第二肽連接子與重鏈之CL結構域融合，且其中該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段在其C端藉由第三肽連接子與輕鏈上之CH1結構域融合。

在另一態樣中，本發明涉及一種根據本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中包含TNF配位體家族成員之藉由第一肽連接子彼此連接之兩個胞外域或其片段的肽在其C端藉由第二肽連接子與輕鏈之CL結構域融合，且其中該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段在其C端藉由第三肽連接子與重鏈之CH1結構域融合。

在一特定態樣中，本發明係關於一種如上文所定義之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中肽連接子係(G4S)₂。在一個態樣中，第一肽連接子係(G4S)₂ (SEQ ID NO:117)，第二肽連接子係GSPGSSSSGS (SEQ ID NO:122)且第三肽連接子係(G4S)₂ (SEQ ID NO:117)。詳言之，本發明係關於一種如上文所定義之含TNF配位三聚體之抗原結合分子，其中第一肽連接子係(G4S)₂ (SEQ ID NO:117)，第二肽連接子係(G4S)₂ (SEQ ID NO:117)且第三肽連接子為(G4S)₂ (SEQ ID NO:117)。

在另一態樣中，如上文所定義之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子包含由能夠穩定締合之第一及第二子單元組成之Fc結構域。

詳言之，本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子包含(a)能夠特異性結合於PD1之Fab分子，其中Fab重鏈在C端與Fc結構域中CH2結構域之N端融合，及(c)由能夠穩定締合之第一及第二子單元構成之Fc結構域。

在另一態樣中，Fc結構域係IgG，尤其IgG1 Fc結構域或IgG4 Fc結構域。更特定言之，Fc結構域係IgG1 Fc結構域。在一特定態樣中，Fc結構

域包含促進Fc結構域之第一及第二子單元之締合的修飾。

降低Fc受體結合及/或效應功能之Fc結構域修飾

本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子之Fc結構域由包含免疫球蛋白分子之重鏈域的一對多肽鏈組成。舉例而言，免疫球蛋白G (IgG)分子之Fc結構域係二聚體，其中各子單元包含CH2及CH3 IgG重鏈恆定域。Fc結構域之兩個子單元能夠彼此穩定締合。

Fc結構域賦予本發明之抗原結合分子有利的藥物動力學特性，包括長血清半衰期，其促進目標組織中之良好聚集及有利的組織-血液分佈率。然而，其同時可引起本發明之雙特異性抗體不合需要地靶向表現Fc受體之細胞並非較佳的攜有抗原之細胞。因此，在特定態樣中，與原生IgG1 Fc結構域相比，本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子的Fc結構域呈現降低之針對Fc受體之結合親和力及/或降低之效應功能。在一個態樣中，Fc不實質上結合於Fc受體及/或不誘導效應功能。在一特定態樣中，Fc受體係Fc γ 受體。在一個態樣中，Fc受體係人類Fc受體。在一特定態樣中，Fc受體係活化人類Fc γ 受體，更特定言之，係人類Fc γ RIIIa、Fc γ RI或Fc γ RIIa，最特定言之，係人類Fc γ RIIIa。在一個態樣中，Fc結構域不誘導效應功能。降低之效應功能可包括(但不限於)以下中之一或多者：降低之補體依賴性細胞毒性(CDC)、降低之抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)、降低之抗體依賴性細胞吞噬(ADCP)、降低之細胞激素分泌、降低之免疫複合物介導之抗原呈現細胞之抗原捕捉、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。

在某些態樣中，可將一或多個胺基酸修飾引入至本文中提供之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子之Fc區中，由此產生Fc區變異體。Fc區變異體可包含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)。

在一特定態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中該抗原結合分子之特徵在於該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其兩個片段，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子彼此連接，且其特徵在於該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，及

(c) Fc結構域，其由能夠穩定締合之第一及第二子單元構成，其中Fc結構域包含一或多個胺基酸取代，其使與Fc受體，尤其與Fc γ 受體之結合減少。

在一個態樣中，本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子的Fc結構域包含一或多個胺基酸突變，其降低Fc結構域對Fc受體及/或效應子功能之結合親和力。典型地，Fc結構域之兩個子單元中之每一者中存在相同的一或多個胺基酸突變。詳言之，Fc結構域在位置E233、L234、L235、N297、P331及P329 (EU編號)處包含胺基酸取代。詳言之，Fc結構域包含IgG重鏈之位置234及235 (EU編號)及/或329 (EU編號)處的胺基酸取代。更特定言之，提供根據本發明之含三聚TNF家族配位體之抗原結合分子，其包含具有IgG重鏈中之胺基酸取代L234A、L235A及P329G

(「P329G LALA」，EU編號)之Fc結構域。胺基酸取代L234A及L235A係指所謂的LALA突變。胺基酸取代之「P329G LALA」組合幾乎完全消除人類IgG1 Fc結構域之Fc γ 受體結合且描述於國際專利申請公開案第WO 2012/130831 A1號中，其亦描述製備此類突變型Fc結構域之方法及測定其特性(諸如Fc受體結合或效應功能)之方法。「EU編號」係指根據Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版 美國公共衛生署, 美國國家衛生研究院, Bethesda, MD, 1991之EU索引之編號。

具有降低之Fc受體結合及/或效應功能之Fc結構域亦包括具有Fc結構域殘基238、265、269、270、297、327及329中之一或多者之取代的結構域(美國專利第6,737,056號)。此類Fc突變體包括具有胺基酸位置265、269、270、297及327中之兩者或更多者之取代的Fc突變體，包括殘基265及297取代為丙胺酸的所謂「DANA」Fc突變體(美國專利第7,332,581號)。

在另一態樣中，Fc結構域係IgG4 Fc結構域。相較於IgG1抗體，IgG4抗體展現減小之與Fc受體之結合親和力及減少之效應功能。在一更特定態樣中，Fc結構域係包含位置S228 (Kabat編號)之胺基酸取代(特定言之，胺基酸取代S228P)的IgG4 Fc結構域。在一更特定態樣中，Fc結構域係IgG4 Fc結構域，其包含胺基酸取代L235E及S228P及P329G (EU編號)。此類IgG4 Fc結構域突變體及其Fc γ 受體結合特性亦描述於WO 2012/130831中。

突變型Fc結構域可使用此項技術中熟知之遺傳學或化學方法、藉由胺基酸缺失、取代、插入或修飾來製備。遺傳學方法可包括DNA編碼序列之位點特異性突變誘發、PCR、基因合成及類似方法。恰當的核苷酸變

化可藉由例如定序來檢驗。

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，且可藉由重組表現來獲得諸如Fc受體。適合的此類結合分析描述於本文中。或者，Fc結構域或包含Fc結構域之細胞活化雙特異性抗原結合分子對Fc受體之結合親和力可使用已知表現特定Fc受體的細胞株(諸如表現FcγIIIa受體的人類NK細胞)評價。

Fc結構域或包含Fc結構域之本發明之雙特異性抗體之效應功能可藉由此項技術中已知之方法量測。適用於量測ADCC之分析描述於本文中。用於評定相關分子之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)中。或者，可採用非放射性分析方法(參見例如流動式細胞測量術用的ACTI™非放射性細胞毒性分析(CellTechnology, Inc. Mountain View, CA)；及CytoTox 96®非放射性細胞毒性分析(Promega, Madison, WI))。適用於此類分析之效應細胞包括周邊血液單核細胞(PBMC)及自然殺手(NK)細胞。或者或另外，可例如在動物模型中，諸如 Clynes等人, Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998)中所揭示之動物模型中活體內評定相關分子之ADCC活性。

在一些實施例中，Fc結構域相對於補體組分(特定言之，C1q)的結合減少。因此，在其中Fc結構域經工程改造而具有減少之效應功能的一些實施例中，該減少之效應功能包括降低之CDC。可進行C1q結合分析以測定

本發明之雙特異性抗體是否能夠結合C1q且因此具有CDC活性。參見例如WO 2006/029879及WO 2005/100402中之C1q及C3c結合ELISA。為評定補體活化，可執行CDC分析(參見例如Gazzano-Santoro等人, *J Immunol Methods* 202, 163 (1996)；Cragg等人, *Blood* 101, 1045-1052 (2003)；及Cragg及Glennie, *Blood* 103, 2738-2743 (2004))。

在一特定態樣中，Fc結構域包含促進Fc結構域之第一及第二子單元之締合的修飾。

促進雜二聚化之Fc結構域修飾

在一個態樣中，含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子包含(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中抗原結合分子之特徵在於第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其兩個片段，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子彼此連接，且其特徵在於第二多肽包含該TNF配位體家族成員之僅一個胞外域或其片段，及(c) Fc結構域，其由能夠穩定締合之第一及第二子單元構成，其中Fc結構域包含一或多個胺基酸取代，其使與Fc受體，尤其與Fc γ 受體之結合減少。因此，其包含不同部分，與兩個不相同的多肽鏈(「重鏈」)中通常所包含之Fc結構域之兩個子單元中之一者或另一者融合。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。為改良重組製造中含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子之產率及純度，因此宜在本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子之Fc結構域中引入促進所需多肽之締合的修飾。

因此，本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子之Fc結構

域包含促進Fc結構域之第一及第二子單元之締合的修飾。人類IgG Fc結構域中之兩個子單元之間最廣泛蛋白質-蛋白質相互作用的位點存在於Fc結構域之CH3結構域中。因此，該修飾尤其存在於Fc結構域之CH3結構域中。

在一特定態樣中，該修飾係所謂的「杵臼」修飾，其包含Fc結構域之兩個子單元中之一者中的「杵」修飾及Fc結構域之兩個子單元之另一者中的「臼」修飾。因此，在一特定態樣中，本發明係關於如上文中所述之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含IgG分子，其中第一重鏈之Fc部分包含第一二聚模組且第二重鏈之Fc部分包含第二二聚模組，從而實現IgG分子之兩個重鏈之雜二聚化，且根據杵臼技術，第一二聚模組包含杵且第二二聚模組包含臼。

杵臼技術描述於例如US 5,731,168；US 7,695,936；Ridgway等人，Prot Eng 9, 617-621 (1996)及Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)中。一般而言，方法包括在第一多肽之界面處引入隆凸(「杵」)及在第二多肽之界面處引入相應凹穴(「臼」)，使得隆凸可定位於凹穴中以便促進雜二聚體形成且阻礙均二聚體形成。隆凸藉由用較大側鏈(例如酪胺酸或色胺酸)置換第一多肽界面中之小胺基酸側鏈來構築。大小與隆凸相同或相似的補償性凹穴藉由用較小胺基酸側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)置換交大胺基酸側鏈而形成於第二多肽之界面中。

因此，在一特定態樣中，在本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子之Fc結構域之第一子單元之CH3結構域中，胺基酸殘基經具有較大側鏈體積的胺基酸殘基置換，由此在第一子單元之CH3結構域內產生可定位於第二子單元之CH3結構域內之凹穴中的隆凸，且在Fc結構域之第

二子單元之CH3結構域中，胺基酸殘基經具有較小側鏈體積的胺基酸殘基置換，由此在第二子單元之CH3結構域內產生供第一子單元之CH3結構域內之隆凸可定位於其中的凹穴。

隆凸及凹穴可藉由改變編碼多肽之核酸，例如藉由定點突變誘發或藉由肽合成產生。

在一特定態樣中，在Fc結構域之第一子單元之CH3結構域中，位置366處之蘇胺酸殘基經色胺酸殘基(T366W)置換，且在Fc結構域之第二子單元之CH3結構域中，位置407處之酪胺酸殘基經纈胺酸殘基(Y407V)置換。更特定言之，另外在Fc結構域之第二子單元中，位置366處之蘇胺酸殘基經絲胺酸殘基(T366S)置換且位置368處之白胺酸殘基經丙胺酸殘基(L368A)置換。更特定言之，另外在Fc結構域之第一子單元中，位置354處之絲胺酸殘基經半胱胺酸殘基(S354C)置換，且另外在Fc結構域之第二子單元中，位置349處之酪胺酸殘基經半胱胺酸殘基(Y349C)置換。引入此等兩個半胱胺酸殘基可引起在Fc結構域之兩個子單元之間形成雙硫橋鍵。雙硫橋鍵進一步使二聚體穩定(Carter, *J Immunol Methods* 248, 7-15 (2001))。

在一替代態樣中，促進Fc結構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結構域子單元之界面處之一或多個胺基酸殘基，使得均二聚體形成變成在靜電上不利的，但雜二聚在靜電上為有利的。

CH1/CL結構域中之修飾

為了進一步改良正確配對，含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分

子可含有不同的帶電胺基酸取代(所謂的「帶電殘基」)。將此等修飾引入交叉或非交叉CH1及CL結構域中。在一特定態樣中，本發明係關於一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中在一個CL結構域中，位置123 (EU編號)處之胺基酸經精胺酸(R)置換且位置124 (EU編號)處之胺基酸經離胺酸(K)取代，且其中在一個CH1結構域中，位置147 (EU編號)及位置213 (EU編號)處之胺基酸經麩胺酸(E)取代。

更特定言之，本發明係關於一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中在與TNF配位體家族成員相鄰之CL結構域中，位置123 (EU編號)處之胺基酸由精胺酸(R)置換且位置124 (EU編號)處之胺基酸經離胺酸(K)取代，且其中在與TNF配位體家族成員相鄰之CH1結構域中，位置147 (EU編號)及位置213 (EU編號)處之胺基酸經麩胺酸(E)取代。

因此，在一特定態樣中，提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，

(b)包含胺基酸突變E123R及Q124K之含有CL結構域之第一多肽及包含胺基酸突變K147E及K213E之含有CH1結構域第二多肽，其中第二多肽藉由CH1與CL結構域之間的雙硫鍵連接至第一多肽，

且其中抗原結合分子之特徵在於第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其兩個片段，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子彼此連接且連接至CL結構域，且其特徵在於第二多肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之CH1結構域。

特定的含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子

在另一態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中分別地，抗原結合分子包含

第一重鏈及第一輕鏈，其皆包含能夠特異性結合於PD1之Fab分子，

第一肽，其包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由第一肽連接子彼此連接，該第一肽在其C端藉由第二肽連接子與第二重鏈或輕鏈融合，

及第二肽，其包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域，該第二肽在其C端藉由第三肽連接子與第二輕鏈或重鏈融合。

在另一態樣中，提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中第一肽在其C端藉由第二肽連接子與作為重鏈之一部分的CH1結構域融合，該第一肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由第一肽連接子彼此連接，且第二肽在其C端藉由第三肽連接子與作為輕鏈之一部分的CL結構域融合，該第二肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段。

在又一態樣中，提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中第一肽在其C端藉由第二肽連接子與作為重鏈之一部分的CL結構域融合，該第一肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由第一肽連接子彼此連接，

及該第二肽在其C端藉由第三肽連接子與作為輕鏈之一部分的CH1結構域融合，該第二肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段。

在一個態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中在與TNF配位體家族成員相鄰之CL結構域中，位置123 (EU編號)處之胺基酸已經精胺酸(R)置換且位置124 (EU編號)處之胺基酸已經

離胺酸(K)取代，且其中在與TNF配位體家族成員相鄰之CH1結構域中，位置147 (EU編號)及位置213 (EU編號)處之胺基酸已經麩胺酸(E)取代。此等修飾產生具有有利特性之所謂的帶電殘基，其避免不合需要的作用，例如錯配。

詳言之，CL結構域包含胺基酸突變E123R及Q124K且CH1結構域包含胺基酸突變K147E及K213E。

在一個態樣中，本發明提供一種如上文所定義之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中能夠特異性結合於PD1之部分為骨架抗原結合蛋白。

在一特定態樣中，本發明係關於一種如上文所定義之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中能夠特異性結合於PD1之部分為能夠特異性結合於靶細胞抗原之Fab分子。

本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含至少一個能夠特異性結合於PD1之部分。在一特定態樣中，含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子包含一個能夠特異性結合於PD1之部分，意謂含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子係單價的。在另一態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含兩個能夠特異性結合於PD1之部分，意謂含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子係二價的。

在一個態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該能夠特異性結合於PD1之部分包含

(a) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:13之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ

ID NO:15之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:16之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-L3，

(b) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:26之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:27之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:28之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:31之胺基酸序列的HVR-L3，

(c) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:34之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:35之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:36之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的HVR-L3，

(d) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:43之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:45之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:46之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:47之胺基酸序列的HVR-L3，

(e) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:50之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:53之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:54之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:55之胺基酸序列的HVR-L3，

(f) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:58之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:59之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:60之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:61之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:62之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:63之胺基酸序列的HVR-L3，或

(g) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:66之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:67之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:68之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:69之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:70之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:71之胺基酸序列的HVR-L3。

在另一態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該能夠特異性結合於PD1之部分包含

(a)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的VL結構域，

(b)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的VL結構域，

(c)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:23之胺基酸序列的VL結構域，

(d)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:24之胺基酸序列的VL結構域，

(e)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:25之胺基酸序列的VL結構域，

(f)包含SEQ ID NO:32之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID

NO:33之胺基酸序列的VL結構域，

(g)包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的VL結構域，

(h)包含SEQ ID NO:48之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:49之胺基酸序列的VL結構域，

(i)包含SEQ ID NO:56之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:57之胺基酸序列的VL結構域，

(k)包含SEQ ID NO:64之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:65之胺基酸序列的VL結構域，或

(l)包含SEQ ID NO:72之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:73之胺基酸序列的VL結構域。

在一個態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該能夠特異性結合於PD1之部分包含

(a) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:13之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:15之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:16之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-L3。

在一特定態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該能夠特異性結合於PD1之部分包含

(a)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的VL結構域，

(b)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID

NO:22之胺基酸序列的VL結構域，

(c) 包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:23之胺基酸序列的VL結構域，

(d) 包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:24之胺基酸序列的VL結構域，或

(e) 包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:25之胺基酸序列的VL結構域。

在另一態樣中能夠特異性結合於PD1之部分包含重鏈可變區，其包含與SEQ ID NO:21之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%、99%、100%一致之胺基酸序列，及輕鏈可變區，其包含與SEQ ID NO:22之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列。

在另一態樣中，能夠特異性結合於PD1之部分包含重鏈可變區，其包含與SEQ ID NO:21之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列，及輕鏈可變區，其包含與SEQ ID NO:24之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列。

在一個態樣中，提供一種如上文所定義之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中能夠特異性結合於PD1之部分包含有包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的可變重鏈及包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的可變輕鏈，或其中能夠特異性結合於FAP之部分包含有包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的可變重鏈及包含SEQ ID NO:24之胺基酸序列的可變輕鏈。

在一特定態樣中，能夠特異性結合於PD1之部分包含有包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的重鏈可變區及包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的

輕鏈可變區。在另一特定態樣中，能夠特異性結合於PD1之部分包含有包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的重鏈可變區及包含SEQ ID NO:24之胺基酸序列的輕鏈可變區。在一特定態樣中，能夠特異性結合於PD1之部分包含由SEQ ID NO:21之胺基酸序列組成之VH結構域及由SEQ ID NO: 22之胺基酸序列組成之VL結構域或由SEQ ID NO:21之胺基酸序列組成之VH結構域及由SEQ ID NO:24之胺基酸序列組成之VL結構域。

在另一態樣中，本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子包含

(a)至少一個能夠特異性結合於PD1之部分，其包含有包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的重鏈可變區及包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的輕鏈可變區或包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的重鏈可變區及包含SEQ ID NO:24之胺基酸序列的輕鏈可變區，及

(b)第二重鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12及SEQ ID NO:10，及

第二輕鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4及SEQ ID NO:5。

在一特定態樣中，本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子包含

(a)至少一個能夠特異性結合於PD1之部分，其包含有包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的重鏈可變區及包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的輕鏈可變區或包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的重鏈可變區及包含SEQ ID NO:24之胺基酸序列的輕鏈可變區，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

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

在另一態樣中，提供一種如上文中所述之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中抗原結合分子包含

(a)第一重鏈及第一輕鏈，其皆包含能夠特異性結合於PD1之Fab分子，

(b)第二重鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12及SEQ ID NO:10，及

第二輕鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4及SEQ ID NO:5。

在一個態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中抗原結合分子包含

(a)能夠特異性結合於PD1之Fab分子，其包含有包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的重鏈可變區及包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的輕鏈可變區或包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的重鏈可變區及包含SEQ ID NO:24之胺基酸序列的輕鏈可變區，及

(b)第二重鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12及SEQ ID NO:10，及

第二輕鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4及SEQ ID NO:5。

在一個態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中抗原結合分子包含

(a)(i)第一重鏈，其包含有包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的VH結

構域，及第一輕鏈，其包含有包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的VL結構域，或

第一重鏈，其包含有包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域，及第一輕鏈，其包含有包含選自由以下組成之群的胺基酸序列之VL結構域：SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24及SEQ ID NO:25，及

(b)第二重鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12及SEQ ID NO:10，及

第二輕鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4及SEQ ID NO:5。

在一特定態樣中，提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中抗原結合分子包含

(i)第一重鏈，其包含有包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的VH結構域，及第一輕鏈，其包含有包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的VL結構域，或

第一重鏈，其包含有包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域，及第一輕鏈，其包含有包含選自由以下組成之群的胺基酸序列之VL結構域：SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24及SEQ ID NO:25，

(ii)第二重鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:78及SEQ ID NO:80，及

(iii)第二輕鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:79及SEQ ID NO:81。

在另一態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中抗原結合分子包含

(a) 包含SEQ ID NO:82之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:83之胺基酸序列的第一輕鏈、包含SEQ ID NO:74之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:75之胺基酸序列的第二輕鏈，

(b) 包含SEQ ID NO:82之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:83之胺基酸序列的第一輕鏈、包含SEQ ID NO:76之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:77之胺基酸序列的第二輕鏈，

(c) 包含SEQ ID NO:82之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:83之胺基酸序列的第一輕鏈、包含SEQ ID NO:78之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:79之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(d) 包含SEQ ID NO:82之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:83之胺基酸序列的第一輕鏈、包含SEQ ID NO:80之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:81之胺基酸序列的第二輕鏈。

在另一態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中抗原結合分子包含

(a) 包含SEQ ID NO:82之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:171之胺基酸序列的第一輕鏈、包含SEQ ID NO:74之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:75之胺基酸序列的第二輕鏈，

(b) 包含SEQ ID NO:82之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:171之胺基酸序列的第一輕鏈、包含SEQ ID NO:76之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:77之胺基酸序列的第二輕鏈，

(c) 包含SEQ ID NO:82之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID

NO:171之胺基酸序列的第一輕鏈、包含SEQ ID NO:78之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:79之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(d)包含SEQ ID NO:82之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:171之胺基酸序列的第一輕鏈、包含SEQ ID NO:80之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:81之胺基酸序列的第二輕鏈。

詳言之，提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中抗原結合分子包含有包含SEQ ID NO:82之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:83之胺基酸序列的第一輕鏈、包含SEQ ID NO:78之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:79之胺基酸序列的第二輕鏈。

在另一特定態樣中，提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中抗原結合分子包含有包含SEQ ID NO:82之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:171之胺基酸序列的第一輕鏈、包含SEQ ID NO:78之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:79之胺基酸序列的第二輕鏈。

在又一態樣中，本發明提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中抗原結合分子之特徵在於分別地第一多肽含有CH3結構域且第二多肽含有CH3結構域，且其中該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接且連接至CH3結構域之C端，且其中該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之CH3

結構域之C端。

詳言之，此類含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子包含兩個能夠特異性結合於PD1之Fab結構域。

詳言之，提供一種如上文中所述之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a) 包含SEQ ID NO:84之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:85之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:83之胺基酸序列的兩個輕鏈，或

(b) 包含SEQ ID NO:86之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:87之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:83之胺基酸序列的兩個輕鏈。

在另一態樣中，提供一種如上文所述之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a) 包含SEQ ID NO:84之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:85之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:171之胺基酸序列的兩個輕鏈，或

(b) 包含SEQ ID NO:86之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:87之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:171之胺基酸序列的兩個輕鏈。

在另一特定態樣中，本發明提供一種如上文所述之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子包含一個能夠特異性結合於PD1之Fab結構域。

在此類態樣中，提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分

子，其中抗原結合分子包含

(i)融合多肽，其包含Fc結構域之第一子單元及TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接且連接至CH3結構域之C端，(ii)重鏈，其包含能夠特異性結合於PD1之Fab結構域之VH結構域、Fc結構域之第二子單元及該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至CH3結構域之C端，及(iii)輕鏈，其包含能夠特異性結合於PD1之Fab結構域的VL結構域，或

(i)融合多肽，其包含Fc結構域之第一子單元及TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段藉由肽連接子連接至CH3結構域之C端，(ii)重鏈，其包含能夠特異性結合於PD1之Fab結構域的VH結構域、Fc結構域之第二子單元及該TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段經由肽連接子彼此連接且連接至CH3結構域之C端，及(iii)輕鏈，其包含能夠特異性結合於PD1之Fab結構域的VL結構域。

在一特定態樣中，提供一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中抗原結合分子包含

(a)包含SEQ ID NO:88之胺基酸序列的融合多肽、包含SEQ ID NO:87之胺基酸序列的重鏈及包含SEQ ID NO:83之胺基酸序列的輕鏈，

(b)包含SEQ ID NO:89之胺基酸序列的融合多肽、包含SEQ ID NO:90之胺基酸序列的重鏈及包含SEQ ID NO:83之胺基酸序列的輕鏈，

(c)包含SEQ ID NO:91之胺基酸序列的融合多肽、包含SEQ ID NO:86之胺基酸序列的重鏈及包含SEQ ID NO:83之胺基酸序列的輕鏈，

或

(d) 包含 SEQ ID NO:93 之胺基酸序列的融合多肽、包含 SEQ ID NO:92 之胺基酸序列的重鏈及包含 SEQ ID NO:83 之胺基酸序列的輕鏈。

在另一特定態樣中，提供一種含有 TNF 家族配位三聚體之抗原結合分子，其中抗原結合分子包含

(a) 包含 SEQ ID NO:88 之胺基酸序列的融合多肽、包含 SEQ ID NO:87 之胺基酸序列的重鏈及包含 SEQ ID NO:171 之胺基酸序列的輕鏈，

(b) 包含 SEQ ID NO:89 之胺基酸序列的融合多肽、包含 SEQ ID NO:90 之胺基酸序列的重鏈及包含 SEQ ID NO:171 之胺基酸序列的輕鏈，

(c) 包含 SEQ ID NO:91 之胺基酸序列的融合多肽、包含 SEQ ID NO:86 之胺基酸序列的重鏈及包含 SEQ ID NO:171 之胺基酸序列的輕鏈，

或

(d) 包含 SEQ ID NO:93 之胺基酸序列的融合多肽、包含 SEQ ID NO:92 之胺基酸序列的重鏈及包含 SEQ ID NO:171 之胺基酸序列的輕鏈。

聚核苷酸

本發明進一步提供編碼如本文中所述之含有 TNF 家族配位三聚體之抗原結合分子的分離之聚核苷酸或其片段。

編碼本發明之含有 TNF 配位三聚體之抗原結合分子的分離之聚核苷酸可表現為編碼整個抗原結合分子之單一聚核苷酸或表現為共表現之多個 (例如兩個或更多個) 聚核苷酸。由共表現之聚核苷酸編碼之多肽可經由例如雙硫鍵或其他手段締合，以形成功能性抗原結合分子。舉例而言，免疫球蛋白之輕鏈部分可由來自免疫球蛋白之重鏈部分的單獨聚核苷酸編碼。當共表現時，重鏈多肽與輕鏈多肽締合以形成免疫球蛋白。

在一些態樣中，分離之聚核苷酸編碼如本文中所述之根據本發明之整個含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子。詳言之，分離之聚核苷酸編碼如本文中所述之根據本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子中所包含之多肽。

在一個態樣中，本發明係針對編碼含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子之分離之聚核苷酸，其中聚核苷酸包含(a)編碼能夠特異性結合於PD1之部分的序列，(b)編碼包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其兩個片段之多肽的序列，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子彼此連接，及(c)編碼包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段之多肽的序列。

在另一態樣中，提供一種編碼含有4-1BB配位三聚體之抗原結合分子的分離之聚核苷酸，其中聚核苷酸包含(a)編碼能夠特異性結合於PD1之部分的序列，(b)編碼包含4-1BBL之兩個胞外域或其兩個片段之多肽的序列，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子彼此連接，及(c)編碼包含4-1BBL之一個胞外域或其片段之多肽的序列。

在另一態樣中，本發明係針對一種分離之聚核苷酸，其包含編碼包含兩個4-1BBL片段之多肽的序列，該兩個4-1BBL片段包含與以SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8所示之胺基酸序列至少約90%、95%、98%或100%一致之胺基酸序列，且係針對一種聚核苷酸，其包含編碼包含一個4-1BBL片段之多肽的序列，該一個4-1BBL片段包含與以SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8所示之胺基酸序

列至少約90%、95%、98%或100%一致之胺基酸序列。

此外，提供一種編碼含有OX40配位三聚體之抗原結合分子的分離之聚核苷酸，其中聚核苷酸包含(a)編碼能夠特異性結合於PD1之部分的序列，(b)編碼包含OX40L之兩個胞外域或其兩個片段之多肽的序列，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子彼此連接，及(c)編碼包含OX40L之一個胞外域或其片段之多肽的序列。

在其他態樣中，本發明係關於包含與本文中所揭示之特異性cDNA序列至少約90%、95%、98%或100%一致的序列之聚核苷酸。在一特定態樣中，本發明係關於包含與本文中所揭示之特異性cDNA序列中之一者一致的序列之聚核苷酸。

在其他態樣中，核酸分子包含或由編碼如以下中之任一者所闡述之胺基酸序列的核苷酸序列組成：SEQ ID NO:19、20、21、22、23、24、25、32、33、40、41、48、49、56、57、64、65、72或73。在另一態樣中核酸分子包含或由編碼如以下中之任一者所闡述之胺基酸序列的核苷酸序列組成：SEQ ID NO:9、10、11或12。

在其他態樣中，核酸分子包含或由選自由以下組成之群的核苷酸序列組成：SEQ ID NO: 131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149或150。

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

重組方法

本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子可例如藉由固態

肽合成(例如梅里菲爾德固相合成(Merrifield solid phase synthesis))或重組製造來獲得。關於重組製造，分離一或多個編碼含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子之聚核苷酸或其多肽片段(例如上文所述)且插入一或多個載體中以用於宿主細胞中之進一步選殖及/或表現。此類聚核苷酸可使用習知程序容易地分離及定序。在本發明之一個態樣中，提供包含本發明之聚核苷酸中之一或多者的載體，較佳係表現載體。可使用熟習此項技術者熟知的方法構築表現載體，該等表現載體具有含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子之編碼序列(片段)以及適合的轉錄/轉譯控制信號。此等方法包括活體外重組DNA技術、合成技術及活體內重組/基因重組。參見例如 Maniatis 等人，MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989)；及 Ausubel 等人，CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)中所述之技術。表現載體可為質體、病毒之一部分，或可為核酸片段。表現載體包括其中編碼含有腫瘤壞死因子家族配位三聚體之抗原結合分子之聚核苷酸或其多肽片段(亦即編碼區)以與啟動子及/或其他轉錄或轉譯對照要素可操作地締合之方式選殖的表現卡匣。如本文所用，「編碼區」為由轉譯成胺基酸之密碼子組成的核酸之一部分。「終止密碼子」(TAG、TGA或TAA)雖然未轉譯成胺基酸，但其可視為編碼區(若存在)之一部分，但任何側接序列(例如啟動子、核糖體結合位點、轉錄終止子、內含子、5'及3'未轉譯區及類似序列)並非編碼區之一部分。兩個或更多個編碼區可存在於單一聚核苷酸構築體中，例如單一載體上，或存在於各別聚核苷酸構築體中，例如各別(不同)載體上。此外，任何載體可含有單一編碼區，或可包含兩個

或更多個編碼區，例如本發明之載體可編碼一或多個多肽，其經由蛋白水解分裂而轉譯後或共轉譯分離成最終蛋白質。此外，本發明之載體、聚核苷酸或核酸可編碼異源編碼區(與或未與編碼本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子的聚核苷酸或其多肽片段融合)，或其變異體或衍生物。異源編碼區包括(不限於)專門化要素或基元，諸如分泌性信號肽或異源功能域。可操作地締合為基因產物(例如多肽)之編碼區與一或多個調節序列以使基因產物之表現受到調節序列之影響或控制的方式締合。若誘導啟動子功能導致編碼所需基因產物之mRNA轉錄且若兩個DNA片段之間連接的性質不干擾表現調節序列導引基因產物表現的能力或不干擾DNA模板轉錄的能力，則兩個DNA片段(諸如多肽編碼區及與其締合的啟動子)為「可操作地締合」。因此，若啟動子能夠實現編碼多肽之核酸的轉錄，則啟動子區域將與該核酸可操作地締合。啟動子可為僅導引預定細胞中之DNA實質性轉錄之細胞特異性啟動子。除啟動子外之其他轉錄控制要素(例如增強子、操縱子、抑制子及轉錄終止信號)與引導細胞特異性轉錄之聚核苷酸可操作地締合。

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

如啟動子誘導性四環素(tetracyclin))。類似地，多種轉譯控制要素已為一般技術者所知。此等要素包括(但不限於)核糖體結合位點、轉譯起始及終止密碼子，以及來源於病毒系統的要素(特定言之，內部核糖體入口位點或IRES，亦稱為CITE序列)。表現卡匣亦可包括其他特徵，諸如複製起點，及/或染色體整合元件，諸如反轉錄病毒長末端重複序列(LTR)，或腺相關病毒(AAV)反向末端重複序列(ITR)。

本發明之聚核苷酸及核酸編碼區可與編碼分泌肽或信號肽的其他編碼區締合，從而引導由本發明之聚核苷酸編碼的多肽的分泌。舉例而言，若需要分泌含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子或其多肽片段，則可將編碼信號序列之DNA置放於編碼本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子或其多肽片段之核酸的上游。根據信號假設，哺乳動物細胞所分泌的蛋白質具有自成熟蛋白質裂解(一旦生長蛋白質鏈跨越粗糙內質網輸出已起始)的信號肽或分泌性前導序列。一般熟習此項技術者認識到，脊椎動物細胞分泌的多肽通常具有與多肽之N端融合的信號肽，該信號肽自所轉譯之多肽裂解而產生呈分泌或「成熟」形式的多肽。在某些實施例中，使用原生信號肽(例如免疫球蛋白重鏈或輕鏈信號肽)，或該序列之功能衍生物，該功能衍生物保留引導與其可操作地締合之多肽之分泌的能力。或者，可使用異源哺乳動物信號肽或其功能衍生物。舉例而言，野生型前導序列可經人類組織纖維蛋白溶酶原活化因子(TPA)或小鼠 β -葡糖醛酸酶之前導序列取代。

編碼可用於促進較晚純化(例如組胺酸標籤)或有助於標記融合蛋白之短蛋白質序列之DNA可包括於編碼本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子或其多肽片段之聚核苷酸內或位於其末端。

在本發明之另一態樣中，提供包含一或多種本發明之聚核苷酸的宿主細胞。在某些實施例中，提供包含一或多種本發明載體之宿主細胞。聚核苷酸及載體可合併本文分別關於聚核苷酸及載體所述之任一特徵(單個或組合)。在一個態樣中，宿主細胞包含載體(例如已經其轉型或轉染)，該載體包含編碼本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子(之一部分)的聚核苷酸。如本文中所示，術語「宿主細胞」係指任何類型之可經工程改造以產生本發明之融合蛋白或其片段的細胞系統。適用於複製及支持抗原結合分子之表現的宿主細胞為此項技術中熟知。此類細胞可視需要經特定表現載體轉染或轉導，且可生長含有大量載體之細胞以用於接種大型醱酵槽，以獲得足量抗原結合分子以用於臨床應用。適合的宿主細胞包括原核微生物，諸如大腸桿菌，或各種真核生物細胞，諸如中國倉鼠卵巢細胞(CHO)、昆蟲細胞或其類似物。舉例而言，可利用細菌產生多肽，特別是在不需要糖基化時。在表現之後，可自可溶性部分之細菌細胞糊狀物分離出多肽且可將該多肽進一步純化。除原核生物外，諸如絲狀真菌或酵母之真核微生物為適用於編碼多肽之載體的選殖或表現宿主，包括糖基化路徑已經「人類化」，從而產生具有部分或完全人類糖基化型態之多肽的真菌及酵母菌株。參見Gerngross, *Nat Biotech* 22, 1409-1414 (2004)，及Li等人, *Nat Biotech* 24, 210-215 (2006)。

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

多肽的細胞可經工程改造以亦表現免疫球蛋白鏈中之另一者，使得所表現產物為具有重鏈及輕鏈的免疫球蛋白。

在一個態樣中，提供製造本發明之含有腫瘤壞死因子家族配位三聚體之抗原結合分子或其多肽片段之方法，其中該方法包含在適用於表現本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子或其多肽片段之條件下培養包含聚核苷酸之宿主細胞，該等聚核苷酸編碼如本文中提供之本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子或其多肽片段，及自宿主細胞(或宿主細胞培養基)回收本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子或其多肽片段。

在本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子中，該等組分(至少一個能夠特異性結合於靶細胞抗原之部分、一個包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段的多肽及一個包含該TNF家族配位體家族成員之一個胞外域或其片段的多肽)不以遺傳學方式彼此融合。多肽經設計使得其組分(TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段及其他組分，諸如CH或CL)直接或經由連接子序列彼此融合。連接子之組成及長度可根據此項技術中熟知之方法確定且可測試其功效。本發明之抗原結合分子之不同組分之間的連接子序列之實例見於本文中提供之序列中。亦可包括合併裂解位點的其他序列以在必要時將融合蛋白中之個別組分分離，例如內肽酶識別序列。

在某些實施例中，形成抗原結合分子之一部分的能夠特異性結合於靶細胞抗原(例如Fab片段)之部分包含至少一個能夠結合於抗原之免疫球蛋白可變區。可變區可形成天然或非天然產生之抗體及其片段之一部分且來源於天然或非天然產生之抗體及其片段。製造多株抗體及單株抗體之方

法為此項技術中熟知(參見例如Harlow及Lane, 「Antibodies, a laboratory manual」, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。非天然產生之抗體可使用固相肽合成法構築, 可以重組方式製造(例如如美國專利第4,186,567號中所述)或可藉由例如篩檢包含可變重鏈及可變輕鏈之組合文庫來獲得(參見例如McCafferty之美國專利第5,969,108號)。

本發明中可使用任何動物物種之免疫球蛋白。適用於本發明之非限制性免疫球蛋白可為鼠、靈長類動物或人類來源。若融合蛋白意欲用於人類用途, 則可使用其中免疫球蛋白之恆定區來自人類之免疫球蛋白之嵌合形式。亦可根據此項技術中熟知之方法製備免疫球蛋白之人類化或完全人類形式(參見例如Winter之美國專利第5,565,332號)。人類化可藉由各種方法達成, 包括(但不限於) (a)將非人類(例如供者抗體)CDR移植至人類(例如接受者抗體)構架區及恆定區上, 保留或不保留關鍵構架殘基(例如對於保留良好抗原結合親和力或抗體功能而言具有重要作用的該等殘基); (b)僅將非人類特異性決定區(SDR或a-CDR; 對於抗體-抗原相互作用而言具有關鍵作用的殘基)移植至人類構架區及恆定區上; 或(c)移植整個非人類可變域, 但藉由表面殘基置換而用人類類似區段對其進行「遮掩」。人類化抗體及其製造方法綜述於例如Almagro及Fransson, *Front Biosci* 13, 1619-1633 (2008)中, 且進一步描述於例如Riechmann等人, *Nature* 332, 323-329 (1988); Queen等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 10029-10033 (1989); 美國專利第5,821,337號、第7,527,791號、第6,982,321號及第7,087,409號; Jones等人, *Nature* 321, 522-525 (1986); Morrison等人, *Proc Natl Acad Sci* 81, 6851-6855 (1984); Morrison及Oi, *Adv Immunol* 44, 65-92 (1988); Verhoeyen等人, *Science* 239, 1534-1536 (1988);

Padlan, *Molec Immun* 31(3), 169-217 (1994) ; Kashmiri等人, *Methods* 36, 25-34 (2005) (描述SDR (a-CDR)移植) ; Padlan, *Mol Immunol* 28, 489-498 (1991) (描述「表面重修」) ; Dall'Acqua等人, *Methods* 36, 43-60 (2005) (描述「FR改組」) ; 及 Osbourn 等人, *Methods* 36, 61-68 (2005)及 Klimka 等人, *Br J Cancer* 83, 252-260 (2000) (描述FR改組的「導向選擇」方法)中。根據本發明之特定免疫球蛋白係人類免疫球蛋白。人類抗體及人類可變區可使用此項技術中已知之各種技術製造。人類抗體大體上描述於 van Dijk 及 van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5, 368-74 (2001)及 Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20, 450-459 (2008)中。人類可變區可形成藉由融合瘤方法製得之人類單株抗體的一部分且可來源於藉由融合瘤方法製得之人類單株抗體(參見例如 *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 第51-63頁 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。人類抗體及人類可變區亦可藉由如下製備：向已經修飾之轉殖基因動物投與免疫原，從而響應於抗原攻擊而產生完整人類抗體或具有人類可變區之完整抗體(參見例如 Lonberg, *Nat Biotech* 23, 1117-1125 (2005)。人類抗體及人類可變區亦可藉由分隔選自人類衍生之噬菌體呈現文庫的Fv純系可變區序列來產生(參見例如 Hoogenboom 等人, *Methods in Molecular Biology* 178, 1-37 (O'Brien 等人編, Human Press, Totowa, NJ, 2001) ; 及 McCafferty 等人, *Nature* 348, 552-554 ; Clackson 等人, *Nature* 352, 624-628 (1991))。噬菌體通常以單鏈Fv (scFv)片段或 Fab 片段形式呈現抗體片段。

在某些態樣中，本發明之抗原結合分子中所包含之能夠特異性結合於靶細胞抗原之部分(例如 Fab 片段)根據例如 PCT 公開案 WO 2012/020006

(參見與親和力成熟相關之實例)或美國專利申請公開案第2004/0132066號中所揭示之方法經工程改造以具有增強之結合親和力。本發明之抗原結合分子結合於特異性抗原決定子之能力可經由酶聯結免疫吸附分析(ELISA)或熟習此項技術者熟悉之其他技術(例如表面電漿子共振(SPR)技術(Liljeblad等人, *Glyco J* 17, 323-329 (2000))及傳統結合分析(Heeley, *Endocr Res* 28, 217-229 (2002))量測。可使用競爭分析鑑別與參考抗體競爭結合於特定抗原之抗原結合分子。在某些實施例中,此類競爭抗原結合分子結合於與由參考抗原結合分子所結合相同的抗原決定基(例如直鏈或構形抗原決定基)。抗原結合分子所結合之抗原決定基之定位的詳細例示性方法提供於Morris (1996)「*Epitope Mapping Protocols*」, *Methods in Molecular Biology*第66卷(Humana Press, Totowa, NJ)中。在例示性競爭分析中,在包含結合於抗原之第一標記抗原結合分子及測試與第一抗原結合分子競爭結合於抗原之能力的第二未標記抗原結合分子之溶液中培育固定抗原。第二抗原結合分子可存在於融合瘤上清液中。作為對照,在包含第一標記抗原結合分子但不包含第二未標記抗原結合分子之溶液中培育固定抗原。在允許第一抗體結合至抗原之條件下培育之後,移除過量的未結合抗體,且量測與所固定抗原締合之標記的量。若與對照樣品相比,測試樣品中與固定抗原締合之標記之量實質上降低,則表明第二抗原結合分子與第一抗原結合分子競爭結合於抗原。參見Harlow及Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* 第14章 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。

如本文中所描述製備之本發明之含有TNF配位三聚體之抗原結合分子可藉由此項技術中已知的技術純化,諸如高效液相層析、離子交換層

析、凝膠電泳、親和層析、尺寸排阻層析及其類似方法。用於純化特定蛋白質之實際條件部分地視諸如淨電荷、疏水性、親水性等因素而定，且對於熟習此項技術者而言為顯而易見的。關於親和層析純化，可使用與含有TNF配位三聚體之抗原結合分子結合之抗體、配位體、受體或抗原。舉例而言，關於本發明之融合蛋白之親和層析純化，可使用具有蛋白質A或蛋白質G之基質。可使用序列蛋白質A或G親和層析及尺寸排阻層析來分離實質上如實例中所描述之抗原結合分子。可藉由多種熟知分析方法(包括凝膠電泳、高壓液相層析及其類似方法)中之任一種測定含有TNF配位三聚體之抗原結合分子或其片段的純度。舉例而言，證實如實例中所描述來表現之含有TNF配位三聚體之抗原結合分子為完整的且經適當組裝，如由還原及非還原性SDS-PAGE證明。

分析

可藉由此項技術中已知之各種分析對本文中提供之抗原結合分子針對其物理/化學特性及/或生物活性進行鑑別、篩檢或表徵。生物活性可包括(例如)增強活化及/或增生不同免疫細胞，尤其T細胞之能力。舉例而言，其增強免疫調節細胞介素(例如干擾素- γ (IFN- γ)及/或腫瘤壞死因子 α (TNF α))之分泌。增強或可增強之其他免疫調節細胞介素係例如 IL12、粒酶B等。生物活性亦可包括食蟹獼猴結合交叉反應性以及結合於不同細胞類型。亦提供在活體內及/或活體外具有此類生物活性之抗原結合分子。

1. 親和力分析

可使用標準測試設備(諸如BIAcore儀器(GE Healthcare))及諸如可藉由重組表現獲得之受體或靶蛋白質，根據實例中所闡述之方法藉由表面電

漿子共振(SPR)測定本文中提供之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子對相應TNF受體之親和力。亦可使用標準測試設備(諸如BIAcore儀器(GE Healthcare))及諸如可藉由重組表現獲得之受體或靶蛋白質，藉由表面電漿子共振(SPR)測定含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子對PD1之親和力。用於量測結合親和力之特定說明性及例示性實施例描述於實例4中。根據一個態樣，藉由表面電漿子共振，使用BIACORE® T100機器(GE Healthcare)在25°C下量測 K_D 。

2. 結合分析及其他分析

本文中提供之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子與表現相應受體之細胞的結合可使用表現特定受體或靶抗原之細胞株藉由例如流動式細胞測量術(FACS)來評估。在一個態樣中，結合分析中使用表現TNF受體之新鮮的周邊血液單核細胞(PBMC)。此等細胞在分離後(未處理PMBC)或在刺激後(經活化之PMBC)直接使用。在另一態樣中，使用經活化之小鼠脾細胞(表現TNF受體分子)表明本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子與表現相應TNF受體之細胞的結合。

在另一態樣中，使用表現PD1之細胞株表明抗原結合分子與此靶細胞抗原之結合。

在另一態樣中，可使用競爭分析來鑑別分別與特定抗體或抗原結合分子競爭結合於目標或TNF受體之抗原結合分子。在某些實施例中，此類競爭性抗原結合分子結合於與由特異性抗靶抗體或特異性抗TNF受體抗體所結合相同的抗原決定基(例如直鏈或構形抗原決定基)。抗體所結合之抗原決定基之定位的詳細例示性方法提供於Morris (1996) 「Epitope Mapping Protocols」, Methods in Molecular Biology第66卷(Humana

Press, Totowa, NJ)中。

3. 活性分析

在一個態樣中，提供用於鑑別結合於具有生物活性之特異性靶細胞抗原及特異性TNF受體之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子的分析。生物活性可包括例如經細胞上表現靶細胞抗原之TNF受體進行之促效性信號傳導。亦提供由分析鑑別為具有此類活體外生物活性之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子。

在某些態樣中，針對此類生物活性測試本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子。用於偵測本發明之分子之生物活性的分析係實例5及6中所描述之該等分析。此外，用於偵測細胞溶解(例如藉由量測LDH釋放)、誘導之細胞凋亡動力學(例如藉由量測卡斯蛋白酶3/7活性)或細胞凋亡(例如使用TUNEL分析)之分析為此項技術中熟知的。此外，此類複合物之生物活性可藉由評估其對多種淋巴細胞子集，諸如NK細胞、NKT細胞或 $\gamma\delta$ T細胞之存活、增生及淋巴激素分泌之作用或評估其調節抗原呈現細胞，諸如樹突狀細胞、單核細胞/巨噬細胞或B細胞之表現型及功能的能力來評估。

醫藥組合物、調配物及投藥途徑

在另一態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含本文中提供之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子中之任一者，例如以用於以下治療方法中之任一者。在一個實施例中，醫藥組合物包含本文中提供之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子中之任一者及至少一種醫藥學上可接受之賦形劑。在另一實施例中，醫藥組合物包含本文提供之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子中之任一者及至少一種其他治療劑，例如如下所

述。

本發明之醫藥組合物包含治療有效量之一或多種溶解或分散於醫藥學上可接受之賦形劑中之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子。片語「醫藥學上或藥理學上可接受」係指分子實體及組合物在所用劑量及濃度下對於接受者而言一般為無毒性的，亦即當適當時投與至動物(諸如人類)時，不會產生有害的過敏反應或其他不良反應。含有至少一個含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子及視情況存在之其他活性成分之醫藥組合物之製備根據本發明將為熟習此項技術者所已知，如藉由Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 第18版 Mack Printing Company, 1990所例示，其以引用的方式併入本文中。詳言之，組合物係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」包括任何及所有溶劑、緩衝劑、分散介質、塗料、界面活性劑、抗氧化劑、防腐劑(例如抗菌劑、抗真菌劑)、等張劑、鹽、穩定劑及其組合，如一般熟習此項技術者所已知。

非經腸組合物包括為藉由注射(例如皮下、皮內、病灶內、靜脈內、動脈內、肌肉內、鞘內或腹膜內注射)投藥所設計的該等組合物。關於注射，本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子可於水溶液中調配，較佳於生理上相容的緩衝劑，諸如漢克氏溶液(Hanks' solution)、林格氏溶液(Ringer's solution)或生理鹽水緩衝劑中調配。溶液可含有調配劑，諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑。或者，融合蛋白可呈粉末形式以用於在使用之前用適合的媒劑(例如無菌無熱原質水)復原。藉由將所需量之本發明之融合蛋白併入視需要具有多種下文列舉之其他成分之適當溶劑中來製備無菌可注射溶液。無菌性可容易藉由例如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之無菌粉末的情況下，較佳製備方法係真空乾燥及冷凍乾燥技術，其利用預先無菌過濾之液體介質產生活性成分與任何其他所需成分之粉末。必要時，液體介質宜經緩衝，且在用足量生理食鹽水或葡萄糖注射之前，首先使液體稀釋劑呈等張性。該組合物在製造及儲存條件下必須為穩定的，且必須避免諸如細菌及真菌之微生物的污染作用。應瞭解，內毒素污染應最低限度地保持在安全水準，例如低於0.5 ng/mg蛋白質。適合的醫藥學上可接受之賦形劑包括(但不限於)：緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(諸如十八烷基二甲基苯甲基氯化銨；氯化六羥季銨；苯紮氯銨；苜索氯銨；酚、丁醇或苯甲醇；對羥基苯甲酸烷基酯，諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(小於約10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啶酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖，諸如蔗糖、甘露糖醇、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/或非離子性界面活性劑，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作用所製備之微膠囊，例如分別為羥基甲基纖維素或明膠微膠囊及聚(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊；截留於膠態藥物遞送系統(例如脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米顆粒及奈米膠囊)中或巨乳液中。此類技術揭示於 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (第18版, Mack Printing Company, 1990)中。可製備持續釋放製劑。持續釋放型製劑之適合實例包括含有多肽之固體疏水性聚合物之半滲透基質，該等基質呈成形物品形式，例如薄膜或微膠囊。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。

本文中之例示性醫藥學上可接受之載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。

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

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

包含本發明之融合蛋白之醫藥組合物可借助於習知混合、溶解、乳
化、包裹、包覆或凍乾方法製造。醫藥組合物可使用一或多種有利於將蛋
白質處理成可在醫藥學上使用之製劑的生理學上可接受之載劑、稀釋劑、
賦形劑或助劑以習知方式調配。適當調配物視所選投藥途徑而定。

含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子可調配成游離酸或游離
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)。相較於相應游
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多於一種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。
此類活性成分適合地以對預期目的有效之量組合存在。

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

治療方法及組合物

任一種本文中提供之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子均可
用於治療方法中。

對於用於治療方法中，本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結
合分子可以符合良好醫學實踐之方式調配、給藥及投與。在此情形中考慮
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的其他因素。

在一個態樣中，提供用作藥劑之本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子。在其他態樣中，提供本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其係用於治療疾病，尤其用於治療癌症。在某些態樣中，提供本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其係用於治療方法。在一個態樣中，本發明提供如本文中所描述之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其係用於治療有需要之個體中之疾病。在某些態樣中，本發明提供含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其係用於治療患有疾病之個體之方法，該方法包含向個體投與治療有效量之融合蛋白。在某些態樣中，待治療之疾病係癌症。癌症之實例包括實體腫瘤、膀胱癌、腎細胞癌、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、血液癌症、皮膚癌、鱗狀細胞癌、骨癌及腎癌、黑素瘤、B細胞淋巴瘤、B細胞白血病、非霍奇金氏淋巴瘤及急性淋巴母細胞白血病。因此，提供如本文中所述之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其係用於治療癌症。需要治療之個體、患者或「個體」通常係哺乳動物，更特定言之係人類。

在另一態樣中，提供如本文中所述之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其係用於治療感染性疾病，尤其用於治療病毒感染。在另一態樣中，提供如本文中所述之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其係用於治療自體免疫疾病，諸如狼瘡疾病。

在另一態樣中，本發明係關於含有TNF家族配位三聚體之抗原結合

分子之用途，其係用於製造或製備用以治療有需要之個體中之疾病的藥劑。在一個態樣中，藥劑用於治療疾病之方法中，其包含向患有疾病之個體投與治療有效量之藥劑。在某些實施例中，待治療之疾病係增生性病變，特定言之係癌症。因此，在一個態樣中，本發明係關於本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子之用途，其係用於製造或製備用以治療癌症之藥劑。癌症之實例包括實體腫瘤、膀胱癌、腎細胞癌、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、血液癌症、皮膚癌、鱗狀細胞癌、骨癌及腎癌、黑素瘤、B細胞淋巴瘤、B細胞白血病、非霍奇金氏淋巴瘤及急性淋巴母細胞白血病。其他可使用本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子治療的細胞增生病症包括(但不限於)位於以下部位之贅瘤：腹部、骨骼、乳房、消化系統、肝、胰腺、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、頭部及頸部、神經系統(中樞及周邊)、淋巴系統、骨盆、皮膚、軟組織、脾、胸區及泌尿生殖系統。亦包括癌前病狀或病變及癌轉移。在某些實施例中，癌症係選自由以下組成之群：腎細胞癌、皮膚癌、肺癌、結腸直腸癌、乳癌、腦癌、頭頸癌。熟習此項技術者可認識到，在一些情況下，含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子可能不提供治癒，而僅可提供部分益處。在一些實施例中，具有一些益處之生理學變化亦視為治療上有利的。因此，在一些態樣中，提供生理學變化之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子之量視為「有效量」或「治療有效量」。

在另一態樣中，本發明係關於如本文中所述之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子之用途，其係用於製造或製備用以治療感染性疾病，

尤其用於治療病毒感染或用於治療自體免疫疾病(例如狼瘡疾病)之藥劑。

在另一態樣中，本發明提供用於治療個體中之疾病的方法，其包含向該個體投與治療有效量之本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子。在一個態樣中，向該個體投與組合物，其包含醫藥學上可接受之形式的本發明之融合蛋白。在某些態樣中，待治療之疾病係增生性病變。在一特定態樣中，疾病係癌症。在另一態樣中，疾病係感染性疾病或自體免疫疾病。在某些態樣中，若待治療之疾病係癌症，則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。根據任一上述實施例之「個體」可為哺乳動物，較佳人類。

對於預防或治療疾病，本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子之適合劑量(當單獨或與一或多種其他額外治療劑組合使用時)將取決於待治療之疾病類型、投藥途徑、患者之體重、融合蛋白之類型、疾病之嚴重度及病程、融合蛋白是否投與用於預防性或治療性目的、先前或並行治療干預、患者臨床病史及對融合蛋白之反應以及主治醫師之判斷。負責投藥之從業者將在任何情況下確定組合物中活性成分之濃度及適用於單獨個體的劑量。本文中涵蓋各種給藥時程，包括(但不限於)單次投與或經各個時間點多次投與、快速投與及脈衝式輸注。

含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子宜一次性或經一系列治療來投與患者。視疾病之類型及嚴重度而定，約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至15 mg/kg (例如0.1 mg/kg -10 mg/kg)之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子可為投與患者之初始候選劑量，無論例如藉由一或多次單獨投藥或藉由連續輸注。視上文所提及之因素而定，一種典型日劑量可在約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至100 mg/kg 或更高之範圍內。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。融合蛋白之一種例示性劑量將在約0.005 mg/kg至約10 mg/kg範圍內。在其他實例中，劑量亦可包含每次投藥約1 µg/kg體重、約5 µg/kg體重、約10 µg/kg體重、約50 µg/kg體重、約100 µg/kg體重、約200 µg/kg體重、約350 µg/kg體重、約500 µg/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體重或更高，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 µg/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，或例如約六個劑量之融合蛋白)。可投與較高初始起始劑量，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。

本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子通常以可有效實現所欲目的之量使用。對於用於治療或預防疾病病狀，本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子或其醫藥組合物以治療有效量投與或施用。治療有效量之確定完全屬於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IC₅₀。此類資訊可用於更準確地確適用於人類之劑

量。

初始劑量亦可自活體內數據(例如動物模型)、使用此項技術中熟知的技術估算。一般熟習此項技術者容易基於動物數據使人類投藥達最佳。

可個別地調節劑量及區間以提供足以維持治療作用之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子的血漿含量。常見的患者注射投藥劑量範圍係約0.1至50毫克/公斤/天，通常係約0.5至1毫克/公斤/天。治療有效的血漿含量可藉由每日投與多次劑量來達成。血漿含量可藉由例如HPLC量測。

在局部投藥或選擇性捕捉之情況下，含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子之有效局部濃度可能與血漿濃度無關。熟習此項技術者能夠不經不當實驗使治療有效局部劑量達最佳。

本文中所述之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子之治療有效劑量通常將提供治療效益而不引起實質性毒性。可在細胞培養物或實驗動物中藉由標準醫藥學程序測定融合蛋白之毒性及治療功效。可使用細胞培養分析及動物研究來確定LD₅₀ (50%群體致死劑量)及ED₅₀ (50%群體治療有效劑量)。毒性作用與治療作用之間的劑量比係治療指數，其可表示為比率LD₅₀/ED₅₀。呈現較大治療指數之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子係較佳的。在一個實施例中，根據本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子呈現高治療指數。自細胞培養分析及動物研究獲得之數據可用於調配適用於人類的劑量範圍。該劑量較佳在循環濃度範圍內，包括毒性極小或無毒性的ED₅₀。該劑量可視各種因素而定在此範圍內變化，該等因素係例如所採用之劑型、所採用之投藥途徑、個體之病狀及其類似因素。準確調配物、投藥途徑及劑量可由個別醫師鑒於患者之病狀加以選擇(參見例如 Fingl 等人, 1975, *The Pharmacological Basis of*

Therapeutics, 第1章第1頁, 其以全文引用之方式併入本文中)。

用本發明之融合蛋白質治療之患者之主治醫師將知曉如何及何時由於毒性、器官功能不全及其類似原因而終止、中斷或調節投藥。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的嚴重度及投藥途徑及其類似因素而變化。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、體重及反應而變化。

其他藥劑及治療

本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子可與療法中之一或多種其他藥劑組合投與。舉例而言, 本發明之融合蛋白可與至少一種其他治療劑共同投與。術語「治療劑」涵蓋可投與用於治療需要此類治療之個體中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, 較佳係具有互補活性、彼此間無不利影響的該等活性成分。在某些實施例中, 其他治療劑係另一種抗癌劑。

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一般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/臨床上確定合適之任何途徑。

上文指出的此類組合療法涵蓋組合投與(其中在相同或各別組合物中包括兩種或更多種治療劑)及各別投與, 在此情況下, 本發明之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子之投與可在其他治療劑及/或佐劑之投與

之前、同時及/或之後進行。

製品

在本發明之另一態樣中，提供含有適用於治療、預防及/或診斷上文所述之病症的製品。製品包含容器及容器上或容器隨附之標記或藥品說明書。適合的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器、IV溶液袋等。容器可由各種材料形成，諸如玻璃或塑膠。容器容納單獨或與有效治療、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本發明之含有TNF配位三聚體之抗原結合分子。

標記或藥品說明書指示組合物用於治療所選病狀。此外，製品可包含(a)其中含有組合物的第一容器，其中組合物包含本發明之含有TNF配位三聚體之抗原結合分子；及(b)其中含有組合物的第二容器，其中組合物包含另一種細胞毒性劑或其他治療劑。本發明之此實施例中之製品可進一步包含指示組合物可用於治療特定病狀之藥品說明書。

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劑，諸如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸鹽緩衝鹽水、林格氏溶液(Ringer's solution)及右旋糖溶液。其可進一步包括就商業及使用者觀點而言所需之其他物質，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

表C(序列)：

SEQ ID NO:	描述	序列
1	人類(hu) 4-1BBL (71-254)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQ NVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSY KEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVA

SEQ ID NO:	描述	序列
		GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT VDLPPASSEARNNSAFGFQGRLLHLSAGQR LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFR VTPEIPAGLPSRSE
2	hu 4-1BBL (85-254)	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGV YYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQP LRSAGAAALALTVDLPPASSEARNNSAFG FQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA WQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
3	hu 4-1BBL (80-254)	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPS PRSE
4	hu 4-1BBL (52-254)	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDD PAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPS PRSE
5	人類(hu) 4-1BBL (71-248)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQ NVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSY KEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT VDLPPASSEARNNSAFGFQGRLLHLSAGQR LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFR VTPEIPAGL
6	hu 4-1BBL (85-248)	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD

SEQ ID NO:	描述	序列
		PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGV YYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQP LRSAAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFG FQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA WQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
7	hu 4-1BBL (80-248)	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
8	hu 4-1BBL (52-248)	PWAVSGARASPGSAASPRREGPELSPDD PAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
9	藉由(G4S) ₂ 連接子連接之二聚 hu 4-1BBL (71-254)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQ NVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSY KEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT VDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQR LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFR VTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGGSREGP ELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTK ELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSG SVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPA SSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHL HTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIP AGLPSRSE
10	藉由(G4S) ₂ 連接子連接之二聚	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQ

SEQ ID NO:	描述	序列
	hu 4-1BBL (71-248)	NVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSY KEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT VDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQR LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFR VTPEIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDD PAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
11	藉由(G4S) ₂ 連接子連接之二聚 hu 4-1BBL (80-254)	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPS PRSEGGGGSGGGGSDPAGLLDLRQGMFA QLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTG GLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAA LALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLS AGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSRSE
12	藉由(G4S) ₂ 連接子連接之二聚 hu 4-1BBL (52-254)	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDD PAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPS PRSEGGGGSGGGGSPWAVSGARASPGSA

SEQ ID NO:	描述	序列
		ASPRREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQ LVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGG LSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRR VVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAL ALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSA GQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVL GLFRVTPEIPAGLPSRSE
13	重鏈HVR-H1，PD1-0103	GFSFSSY
14	重鏈HVR-H2，PD1-0103	GGR
15	重鏈HVR-H3，PD1-0103	TGRVYFALD
16	輕鏈HVR-L1，PD1-0103	SESVDTSDNSF
17	輕鏈HVR-L2，PD1-0103	RSS
18	輕鏈HVR-L3，PD1-0103	NYDVPW
19	重鏈可變域VH，PD1-0103	EVILVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFSFS <u>SYTMSWVRQTPEKRLDWVATISGGGRDI</u> YYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLEMSSL MSEDTALYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT SVTVSS
20	輕鏈可變域VL，PD1-0103	KIVLTQSPASLPVSLGQRATISCRASESVD <u>TSDNSFIHWYQQRPGQSPKLLIYRSSTLES</u> GVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDVATY YCQQNYDVPWTFGGGKLEIK
21	人類化變異體 -PD1-0103-0312、PD1-0103-0313、PD1-0103-0314及PD1-0103-0315之重鏈可變域VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFSF <u>SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRD</u> IYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVTVSS
22	人類化變異體 -PD1-0103-0312之輕鏈可變域VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESV <u>DTSDNSFIHWYQKPGQSPKLLIYRSSTL</u> ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVA

SEQ ID NO:	描述	序列
		VYYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIK
23	人類化變異體 -PD1-0103-0313 之輕鏈可變域VL	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRASESV DTSDNSFIHWYQQRPGQSPRLLIYRSSTL ESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADV GVYYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIK
24	人類化變異體 -PD1-0103-0314 之輕鏈可變域VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDI SDNSFIHWYQQKPGQSPRLLIYRSSTLES GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYY CQQNYDVPWTFGQGTKVEIK
25	人類化變異體 -PD1-0103-0315 之輕鏈可變域VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDI SDNSFIHWYQQKPGQSPRLLIYRSSTLES GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYY CQQNYDVPWTFGQGTKVEIK
26	重鏈HVR-H1，PD1-0098	GYSITSDY
27	重鏈HVR-H2，PD1-0098	YSG
28	重鏈HVR-H3，PD1-0098	HGSAPWYFD
29	輕鏈HVR-L1，PD1-0098	SQNIVHSDGNTY
30	輕鏈HVR-L2，PD1-0098	KVS
31	輕鏈HVR-L3，PD1-0098	GSHFPL
32	重鏈可變域VH，PD1-0098	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSIT SDYAWNWRQFPGDKLEWLGWYITYSGFT NYNPSLKSRISSRDTSKNQFFLQLNSVAT EDTATYYCARWHGSAPWYFDYWGRGTT LTVSS
33	輕鏈可變域VL，PD1-0098	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNI VHSDGNTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKVS RRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DLGVYYCFQGSHFPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO:	描述	序列
34	重鏈HVR-H1，PD1-0050	GYSITSDY
35	重鏈HVR-H2，PD1-0050	YTG
36	重鏈HVR-H3，PD1-0050	MDYYGSTLD
37	輕鏈HVR-L1，PD1-0050	SESVDRYGNSF
38	輕鏈HVR-L2，PD1-0050	RAS
39	輕鏈HVR-L3，PD1-0050	NNEDPY
40	重鏈可變域VH，PD1-0050	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVT <u>GYSI</u> <u>TSDY</u> AWNWIRQFPGNKLEWMGYIT <u>YTG</u> RTSYNPSLKSRI SITRDTSKNQFFLQLNSV TTEDTATYYCARE <u>MDYYGSTLD</u> YWGQG TTLTVSS
41	輕鏈可變域VL，PD1-0050	KIVLTQSPASLAVSLRQRATISCRASE <u>SVD</u> <u>RYGNSFI</u> HWYQQKPGQPPKVL <u>IYRAS</u> NL ESGFPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDA TYYCQQ <u>NNEDPY</u> TFGSGTKLEIK
42	重鏈HVR-H1，PD1-0069	GYTFTDY
43	重鏈HVR-H2，PD1-0069	YSG
44	重鏈HVR-H3，PD1-0069	GITTGFA
45	輕鏈HVR-L1，PD1-0069	SKGVSTSSYSF
46	輕鏈HVR-L2，PD1-0069	YAS
47	輕鏈HVR-L3，PD1-0069	SREFPW
48	重鏈可變域VH，PD1-0069	QVQLQQSGPELVRPGVSVKISCKG <u>SGYT</u> <u>FTDY</u> AMHWVKQSHARTLEWIGVIST <u>YSG</u> DTNYNQKFKDKATMTVDKSSSTAYLELA RMTSEDSAIYYCARL <u>GITTGFA</u> YWGQGT LVTVSA
49	輕鏈可變域VL，PD1-0069	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRAS <u>KGVS</u> <u>TSSYSE</u> MHWYQQKPRQPPK <u>LLIKYAS</u> YL ESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDA ATYYCHHS <u>SREFPW</u> TFGGG <u>TKLEIK</u>
50	重鏈HVR-H1，PD1-0073	GFTFSNY

SEQ ID NO:	描述	序列
51	重鏈HVR-H2，PD1-0073	GGR
52	重鏈HVR-H3，PD1-0073	YYGID
53	輕鏈HVR-L1，PD1-0073	SQDVTTA
54	輕鏈HVR-L2，PD1-0073	WAS
55	輕鏈HVR-L3，PD1-0073	HYSIPW
56	重鏈可變域VH，PD1-0073	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAAS <u>GFT</u> <u>FSNY</u> GMSWIRQTPEKGLEWVATIS <u>GGR</u> DTYYPDSVKGRFTISRDNVKNLNLYLQMS SLRSEDTAFYYCAS <u>YYGID</u> YWGQGTSV TVSS
57	輕鏈可變域VL，PD1-0073	DIVMTQPHKFMSTSVGDRVRITCKA <u>SOD</u> <u>VTTA</u> VAWYQQKPGQSPKLLI <u>WAST</u> RHT GVPDRFTGSGSGTEFTLTISVQAEDLALY YCQQ <u>HYSIPW</u> TFGGGTKLEIK
58	重鏈HVR-H1，PD1-0078	GYTFTST
59	重鏈HVR-H2，PD1-0078	SDS
60	重鏈HVR-H3，PD1-0078	PFD
61	輕鏈HVR-L1，PD1-0078	SQDVSTA
62	輕鏈HVR-L2，PD1-0078	SAS
63	輕鏈HVR-L3，PD1-0078	HYSHPF
64	重鏈可變域VH，PD1-0078	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKAS <u>GY</u> <u>TFTST</u> WMHWVKQRPGGLEWIGAI <u>DPS</u> <u>DSY</u> TTYNQKFKGKATLTVDTSS <u>TAY</u> MQ LSSLTSEDSAVYYCTRS <u>PFD</u> YWGQGTTLT VSS
65	輕鏈可變域VL，PD1-0078	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKA <u>SOD</u> <u>VSTA</u> VAWYQQKPGQSPKLLI <u>SAS</u> YRYT GVPDRFTGSGSGTDF <u>TAISS</u> VQAEDLAV YYCQQ <u>HYSHPF</u> TFGSGTKLEIK

SEQ ID NO:	描述	序列
66	重鏈HVR-H1, PD1-0102	GYSITSGY
67	重鏈HVR-H2, PD1-0102	SSG
68	重鏈HVR-H3, PD1-0102	RNWFYD
69	輕鏈HVR-L1, PD1-0102	SQSLNSGTQKNY
70	輕鏈HVR-L2, PD1-0102	WAS
71	輕鏈HVR-L3, PD1-0102	DYTFPL
72	重鏈可變域VH, PD1-0102	DVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVT GYSI TSGYS WHWIRQFPGNKLEWMGFIH SSGD TNYNPSLKSRI SFTRDTSKNQFFLQLSSLT DEDATYYCATY RNWFYD VWGAGTTVT VSS
73	輕鏈可變域VL, PD1-0102	DIVMTQSPSSSLTVTAGEKVTMRCK SSQSL LNSGTQKNY LTWYQQKPGQPPKLLIYW AST RESGVPNRFTGSGSGTDFTLTISSVQA EDLSVYYCQ SDYTFPL TFGGGTKLELK
74	二聚 4-1BB 配位體 (71-254) - CL* Fc 杵鏈	參見表8
75	單體 4-1BB 配位體 (71-254)- CH1*	參見表8
76	二聚4-1BB配位體(71-254) - CL Fc 杵鏈	參見表9
77	單體 4-1BB 配位體 (71-254) - CH1	參見表9
78	二聚 4-1BB 配位體 (71-248) - CL* Fc 杵鏈	參見表11
79	單體 4-1BB 配位體 (71-248)- CH1*	參見表11
80	二聚4-1BB配位體(71-248) - CL Fc 杵鏈	參見表12
81	單體 4-1BB 配位體 (71-248)- CH1	參見表12

SEQ ID NO:	描述	序列
82	抗PD1(314) Fc臼鏈	參見表8
83	抗PD1(314)輕鏈	參見表8
84	抗PD1(314) Fc臼二聚4-1BB配位體(71-254)	參見表10
85	抗PD1(314) Fc杵單體4-1BB配位體(71-254)	參見表10
86	抗PD1(314) Fc臼二聚4-1BB配位體(71-248)	參見表13
87	抗PD1(314) Fc杵單體4-1BB配位體(71-248)	參見表13
88	Fc臼二聚4-1BB配位體(71-248)	參見表14
89	Fc臼單體4-1BB配位體(71-248)	參見表15
90	抗PD1(314) Fc杵二聚4-1BB配位體(71-248)	參見表15
91	與單體4-1BB配位體(71-248)鏈融合之Fc杵鏈	參見表16
92	抗PD1(314) Fc臼單體4-1BB配位體(71-248)鏈	參見表17
93	Fc杵二聚4-1BB配位體(71-248)	參見表17
94	人類PD1	UniProt號Q15116
95	人類淋巴毒素 α	UniProt號P01374
96	人類TNF	UniProt號P01375
97	人類淋巴毒素 β	UniProt號Q06643
98	人類OX40L	UniProt號P23510
99	人類CD40L	UniProt號P29965
100	人類FasL	UniProt號P48023
101	人類CD27L	UniProt號P32970
102	人類CD30L	UniProt號P32971
103	人類4-1BBL	UniProt號P41273
104	人類TRAIL	UniProt號P50591
105	人類RANKL	UniProt號O14788
106	人類TWEAK	UniProt號O43508
107	人類APRIL	UniProt號O75888

SEQ ID NO:	描述	序列
108	人類BAFF	UniProt號Q9Y275
109	人類LIGHT	UniProt號O43557
110	人類TL1A	UniProt號O95150
111	人類GITRL	UniProt號Q9UNG2
112	人類外異蛋白A	UniProt號Q92838
113	人類4-1BBL(50-254)	ACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSP DDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAKAGVYYVFFQLELRVAVAGEGSGSVS LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSE ARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTE ARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL PSPRSE
114	人類OX40L (51-183)	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQ KEDEIMKVQNNVIINCDGFYLISLKG YF SQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSL MVASLTYKDKVYLNVTDDNTSLDDFHVN GGELILIHQNPGEFCVL
115	人類OX40L (52-183)	VSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQK EDEIMKVQNNVIINCDGFYLISLKG YFS QEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSL MVASLTYKDKVYLNVTDDNTSLDDFHVN GGELILIHQNPGEFCVL
116	肽連接子G4S	GGGGS
117	肽連接子(G4S) ₂	GGGGS GGGGS
118	肽連接子(SG4) ₂	SGGGGS GGGG
119	肽連接子(G4S) ₃	GGGGS GGGGS GGGGS
120	肽連接子G4(SG4) ₂	GGGGS GGGGS GGGG
121	肽連接子(G4S) ₄	GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS
122	肽連接子	GSPGSSSSGS
123	肽連接子	GSGSGSGS
124	肽連接子	GSGSGNGS
125	肽連接子	GGSGSGSG

SEQ ID NO:	描述	序列
126	肽連接子	GGSGSG
127	肽連接子	GGSG
128	肽連接子	GGSGNGSG
129	肽連接子	GGNGSGSG
130	肽連接子	GGNGSG
131	二聚hu 4-1BBL (71-254) - CL* Fc杵鏈之核苷酸序列	參見表8
132	單體 hu 4-1BBL (71-254) - CH1*之核苷酸序列	參見表8
133	抗PD1(0314) Fc白鏈之核苷酸 序列	參見表8
134	抗PD1(0314)輕鏈之核苷酸序 列	參見表8
135	二聚hu 4-1BBL (71-254) - CL Fc杵鏈之核苷酸序列	參見表9
136	單體hu 4-1BBL (71-254) - CH1 之核苷酸序列	參見表9
137	與二聚hu 4-1BBL (71-254)融合 之抗PD1(0314) Fc白鏈之核苷 酸序列	參見表10
138	與單體hu 4-1BBL (71-254)融合 之抗PD1(0314) Fc杵鏈之核苷 酸序列	參見表10
139	二聚hu 4-1BBL (71-248) - CL* Fc杵鏈之核苷酸序列	參見表11
140	單體 hu 4-1BBL (71-248) - CH1*之核苷酸序列	參見表11
141	二聚hu 4-1BBL (71-248) - CL Fc杵鏈之核苷酸序列	參見表12
142	單體hu 4-1BBL (71-248) - CH1 之核苷酸序列	參見表12
143	與二聚hu 4-1BBL (71-248)融合 之抗PD1(0314) Fc白鏈之核苷	參見表13

SEQ ID NO:	描述	序列
	酸序列	
144	與單體hu 4-1BBL (71-248)融合之抗PD1(0314) Fc杵鏈之核苷酸序列	參見表13
145	Fc白二聚配位體(71-248)鏈之核苷酸序列	參見表14
146	Fc白單體配位體(71-248)鏈之核苷酸序列	參見表15
147	與二聚hu 4-1BBL (71-248)融合之抗PD1(0314) Fc杵鏈之核苷酸序列	參見表15
148	與單體hu 4-1BBL (71-248)融合之Fc杵鏈之核苷酸序列	參見表16
149	抗PD1(0314) Fc白單體配位體(71-248)鏈之核苷酸序列	參見表17
150	與二聚hu 4-1BBL (71-248)融合之之核苷酸序列 Fc杵鏈	參見表17
151	DP47 Fc白鏈之核苷酸序列	參見表18
152	DP47輕鏈之核苷酸序列	參見表18
153	DP47 Fc白鏈	參見表18
154	DP47輕鏈	參見表18
155	與二聚hu 4-1BBL (71-254)融合之DP47 Fc白鏈之核苷酸序列	參見表19
156	與單體hu 4-1BBL (71-254)融合之DP47 Fc杵鏈之核苷酸序列	參見表19
157	與二聚hu 4-1BBL (71-254)融合之DP47 Fc白鏈	參見表19
158	與單體hu 4-1BBL (71-254)融合之DP47 Fc杵鏈	參見表19
159	DP47重鏈(hu IgG1 PGLALA)之核苷酸序列	參見表21
160	DP47重鏈(hu IgG1 PGLALA)	參見表21
161	PD1(0314) 重 鏈 (huIgG1	參見表22

SEQ ID NO:	描述	序列
	PGLALA)之核苷酸序列	
162	PD1(0314) 重 鏈 (huIgG1 PGLALA)	參見表22
163	人類4-1BB ECD，Q07011之aa 24-186	
164	Fc白鏈之核苷酸序列	參見表24
165	人類4-1BB抗原Fc杵鏈之核苷酸序列	參見表24
166	Fc白鏈	參見表24
167	人類4-1BB抗原Fc杵鏈	參見表24
168	Avi標籤	GLNDIFEAQKIEWHE
169	人類4-1BB His之核苷酸序列	參見表25
170	人類4-1BB His	參見表25
171	抗PD1 (0312)輕鏈	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESV DTSDNSFIHWYQQKPGQSPKLLIYRSSTL ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC

關於人類免疫球蛋白輕鏈及重鏈之核苷酸序列之一般資訊提供於 Kabat, E.A.等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, 美國公共衛生署, 美國國家衛生研究院, Bethesda, MD (1991)中。根據如上文所定義之根據Kabat (Kabat, E.A.等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, 美國公共衛生署, 美國國家衛生研究院, Bethesda, MD (1991))之EU編號系統編號及參考抗體鏈之胺基酸。

以下經編碼之段落係本發明之態樣：

1. 一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中該抗原結合分子之特徵在於該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接，且該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之僅一個胞外域或其片段。

2. 如段落1之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其進一步包含

(c) Fc結構域，其由能夠穩定締合之第一及第二子單元構成。

3. 如段落1或2之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中該抗原結合分子之特徵在於

a. 分別地，該第一多肽含有CH1或CL結構域且該第二多肽含有CL或CH1結構域，其中該第二多肽藉由該CH1與CL結構域之間的雙硫鍵連接至該第一多肽，且其中該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接且連接至該CH1或CL結構域，且其中該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之該CL或CH1結構域。

b. 分別地，該第一多肽含有CH3結構域且該第二多肽含有CH3結構域，且其中該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接且連接至該CH3結構域

之C端，且其中該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之僅一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之該CH3結構域之C端，或

c. 分別地，該第一多肽含有VH-CL或VL-CH1結構域且該第二多肽含有VL-CH1結構域或VH-CL結構域，其中該第二多肽藉由該CH1與CL結構域之間的雙硫鍵連接至該第一多肽，且其中該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接且連接至VH或VL，且其中該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之VL或VH。

4. 如段落1至3中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該TNF配位體家族成員共刺激人類T細胞活化。

5. 如段落1至4中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該TNF配位體家族成員係選自4-1BBL及OX40L。

6. 如段落1至5中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該TNF配位體家族成員係4-1BBL。

7. 如段落1至6中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中TNF配位體家族成員之該胞外域包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7及、SEQ ID NO:8，尤其SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5之胺基酸序列。

8. 如段落1至7中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中TNF配位體家族成員之該胞外域包含SEQ ID NO:5之胺基酸序

列。

9. 如段落1至8中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中該抗原結合分子之特徵在於該第一多肽包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12及SEQ ID NO:10，且其特徵在於該第二多肽包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4及SEQ ID NO:5。

10. 如段落1至9中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，及

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

且其中該抗原結合分子之特徵在於該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其兩個片段，該兩個胞外域或其兩個片段藉由肽連接子彼此連接且連接至該CH1或CL結構域，且其特徵在於該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之僅一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之該CL或CH1結構域。

11. 如段落1至10中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該能夠特異性結合於PD1之部分係選自由以下組成之群：抗體片段、Fab分子、交換型Fab分子、單鏈Fab分子、Fv分子、scFv分子、單域

抗體、aVH及骨架抗原結合蛋白。

12. 如段落1至11中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該分子包含一個能夠特異性結合於PD1之部分。

13. 如段落1至12中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該能夠特異性結合於PD1之部分係能夠特異性結合於PD1之Fab分子。

14. 如段落1至13中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該能夠特異性結合於PD1之部分包含

(a) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:13之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:15之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:16之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-L3，

(b) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:26之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:27之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:28之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:31之胺基酸序列的HVR-L3，

(c) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:34之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:35之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:36之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的HVR-L3，

(d) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:43之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:45之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:46之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:47之胺基酸序列的HVR-L3，

(e) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:50之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:53之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:54之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:55之胺基酸序列的HVR-L3，

(f) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:58之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:59之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:60之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:61之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:62之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:63之胺基酸序列的HVR-L3，或

(g) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:66之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:67之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:68之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:69之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:70之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:71之胺基酸序列的HVR-L3。

15. 如段落1至14中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該能夠特異性結合於PD1之部分包含

(a) 包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID

NO:20之胺基酸序列的VL結構域，

(b)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的VL結構域，

(c)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:23之胺基酸序列的VL結構域，

(d)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:24之胺基酸序列的VL結構域，

(e)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:25之胺基酸序列的VL結構域，

(f)包含SEQ ID NO:32之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:33之胺基酸序列的VL結構域，

(g)包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的VL結構域，

(h)包含SEQ ID NO:48之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:49之胺基酸序列的VL結構域，

(i)包含SEQ ID NO:56之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:57之胺基酸序列的VL結構域，

(k)包含SEQ ID NO:64之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:65之胺基酸序列的VL結構域，或

(l)包含SEQ ID NO:72之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:73之胺基酸序列的VL結構域。

16. 如段落1至14中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該能夠特異性結合於PD1之部分包含

(a) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:13之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:15之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:16之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-L3。

17. 如段落1至16中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該能夠特異性結合於PD1之部分包含

(a)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的VL結構域，

(b)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的VL結構域，

(c)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:23之胺基酸序列的VL結構域，

(d)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:24之胺基酸序列的VL結構域，或

(e)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:25之胺基酸序列的VL結構域。

18. 如段落2至17中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該Fc結構域係IgG，尤其係IgG1 Fc結構域或IgG4 Fc結構域

19. 如段落2至18中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該Fc結構域係IgG1 Fc結構域，其包含位置234及235 (EU編號)及/或329 (EU編號)處的胺基酸取代。

20. 如段落1至19中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分

子，其中該Fc結構域之第一子單元包含胺基酸取代S354C及T366W（根據Kabat EU索引編號）且該Fc結構域之第二子單元包含胺基酸取代Y349C、T366S、L368A及Y407V（根據Kabat EU索引編號）。

21. 如段落1至20中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中分別地，該抗原結合分子包含

第一重鏈及第一輕鏈，其皆包含能夠特異性結合於PD1之Fab分子，

第一肽，其包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由第一肽連接子彼此連接，該第一肽在其C端藉由第二肽連接子與第二重鏈或輕鏈融合，

及第二肽，其包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域，該第二肽在其C端藉由第三肽連接子與第二輕鏈或重鏈融合。

22. 如段落1至20中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該第一肽在其C端藉由第二肽連接子與作為重鏈之一部分的CH1結構域融合，該第一肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由第一肽連接子彼此連接，

且該第二肽在其C端藉由第三肽連接子與作為輕鏈之一部分的CL結構域融合，該第二肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段。

23. 如段落1至20中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該第一肽在其C端藉由第二肽連接子與作為重鏈之一部分的CL結構域融合，該第一肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由第一肽連接子彼此連接，

且該第二肽在其C端藉由第三肽連接子與作為輕鏈之一部分的CH1結構域融合，該第二肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段。

24. 如段落1至20中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該第一肽在其C端藉由第二肽連接子與作為重鏈之一部分的VH結構域融合，該第一肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由第一肽連接子彼此連接，

且該第二肽在其C端藉由第三肽連接子與作為輕鏈之一部分的VL結構域融合，該第二肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段。

25. 如段落21至23中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中在與該TNF配位體家族成員相鄰之該CL結構域中，位置123 (EU編號)處之胺基酸已經精胺酸(R)置換且位置124 (EU編號)處之胺基酸已經離胺酸(K)取代，且其中在與該TNF配位體家族成員相鄰之該CH1結構域中，位置147 (EU編號)及位置213 (EU編號)處之胺基酸已經麩胺酸(E)取代。

26. 如段落1至20中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該抗原結合分子包含

(a)第一重鏈及第一輕鏈，其皆包含能夠特異性結合於PD1之Fab分子，

(b)第二重鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12及SEQ ID NO:10，及

第二輕鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4及SEQ ID NO:5。

27. 如段落1至20或26中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該抗原結合分子包含

(i)第一重鏈，其包含有包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的該VH結

構域，及第一輕鏈，其包含有包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的該VL結構域，或

第一重鏈，其包含有包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的該VH結構域，及第一輕鏈，其包含有包含選自由以下組成之群的胺基酸序列之該VL結構域：SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24及SEQ ID NO:25，

(ii)第二重鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:78及SEQ ID NO:80，及

(iii)第二輕鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:79及SEQ ID NO:81。

28. 如段落1至21中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該抗原結合分子包含

(a)包含SEQ ID NO:82之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:83之胺基酸序列的第一輕鏈、包含SEQ ID NO:74之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:75之胺基酸序列的第二輕鏈，

(b)包含SEQ ID NO:82之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:83之胺基酸序列的第一輕鏈、包含SEQ ID NO:76之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:77之胺基酸序列的第二輕鏈，

(c)包含SEQ ID NO:82之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:83之胺基酸序列的第一輕鏈、包含SEQ ID NO:78之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:79之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(d)包含SEQ ID NO:82之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:83之胺基酸序列的第一輕鏈、包含SEQ ID NO:80之胺基酸序列的第

二重鏈及包含SEQ ID NO:81之胺基酸序列的第二輕鏈。

29. 如段落1至20中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)至少一個Fab結構域，其能夠特異性結合於PD1，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中該抗原結合分子之特徵在於分別地該第一多肽含有CH3結構域且該第二多肽含有CH3結構域，且其中該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接且連接至該CH3結構域之C端，且其中該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之該CH3結構域之C端。

30. 如段落29之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含兩個能夠特異性結合於PD1之Fab結構域。

31. 如段落29之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該抗原結合分子包含

(a)包含SEQ ID NO:84之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:85之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:83之胺基酸序列的兩個輕鏈，或

(b)包含SEQ ID NO:86之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:87之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:83之胺基酸序列的兩個輕鏈。

32. 如段落29之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含一個能夠特異性結合於PD1之Fab結構域。

33. 如段落29或32之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該抗原結合分子包含

(i)融合多肽，其包含Fc結構域之第一子單元及TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接且連接至該CH3結構域之C端，(ii)重鏈，其包含該能夠特異性結合於PD1之Fab結構域之VH結構域、該Fc結構域之第二子單元及該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該CH3結構域之C端，及(iii)輕鏈，其包含該能夠特異性結合於PD1之Fab結構域的VL結構域，或

(i)融合多肽，其包含Fc結構域之第一子單元及TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段藉由肽連接子連接至該CH3結構域之C端，(ii)重鏈，其包含該能夠特異性結合於PD1之Fab結構域的VH結構域、該Fc結構域之第二子單元及該TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段經由肽連接子彼此連接且連接至該CH3結構域之C端，及(iii)輕鏈，其包含該能夠特異性結合於PD1之Fab結構域的VL結構域。

34. 如段落31之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該抗原結合分子包含

(a)包含SEQ ID NO:88之胺基酸序列的融合多肽、包含SEQ ID NO:87之胺基酸序列的重鏈及包含SEQ ID NO:83之胺基酸序列的輕鏈，

(b)包含SEQ ID NO:89之胺基酸序列的融合多肽、包含SEQ ID NO:90之胺基酸序列的重鏈及包含SEQ ID NO:83之胺基酸序列的輕鏈，

(c)包含SEQ ID NO:91之胺基酸序列的融合多肽、包含SEQ ID

NO:86之胺基酸序列的重鏈及包含SEQ ID NO:83之胺基酸序列的輕鏈，

(b)包含SEQ ID NO:93之胺基酸序列的融合多肽、包含SEQ ID NO:92之胺基酸序列的重鏈及包含SEQ ID NO:83之胺基酸序列的輕鏈。

35. 一種分離之聚核苷酸，其編碼如段落1至34中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子。

36. 一種載體，特定言之是一種表現載體，其包含如段落35之分離之聚核苷酸。

37. 一種宿主細胞，其包含如段落35之分離之聚核苷酸或如段落36之載體。

38. 一種製造如段落1至34中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子之方法，其包含以下步驟

(i)在適於表現該抗原結合分子之條件下培養如段落37之宿主細胞，及

(ii)回收該抗原結合分子。

39. 一種醫藥組合物，其包含如段落1至34中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子及至少一種醫藥學上可接受之賦形劑。

40. 如段落1至34中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子或如段落39之醫藥組合物，其係用作藥劑。

41. 如段落1至34中任一項之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子或如段落39之醫藥組合物，其係用於治療癌症。

42. 如段落1至34中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其係用於製造用以治療癌症之藥劑。

43. 一種治療個體之疾病之方法，其包含向該個體投與治療有效量

之呈醫藥學上可接受之形式的包含如段落1至34中任一者之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子之組合物。

44. 如段落43之方法，其中該疾病係癌症。

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通用說明，可實施各種其他實施例。

重組型DNA技術

使用標準方法操縱DNA，如Sambrook等人，*Molecular cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989中所述。根據製造商說明書，使用分子生物學試劑。關於人類免疫球蛋白輕鏈及重鏈之核苷酸序列之通用資訊提供於Kabat, E.A. 等人，(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版, NIH公開案第91-3242號中。

DNA定序

藉由雙股定序法測定DNA序列。

基因合成

所需基因區段係使用適當模板藉由PCR製造，或藉由自動化基因合成法，藉由Geneart AG (Regensburg, Germany)自合成寡核苷酸及PCR產物合成。在確切基因序列無法獲得的情況下，根據來自最近同源物的序列來設計寡核苷酸引子且藉由RT-PCR自來源於適當組織之RNA分離基因。將側接有單數個限制性核酸內切酶裂解位點的基因區段選殖至標準選殖/定序載體中。自經轉型之細菌純化質體DNA且藉由UV光譜學來測定濃度。經次選殖之基因片段之DNA序列藉由DNA定序來證實。基因區段經

設計具有允許次選殖入各別表現載體中的適合限制位點。所有構築體經設計具有5'端DNA序列，該序列編碼靶向真核細胞中分泌之蛋白質的前導肽。

細胞培養技術

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

蛋白質純化

參考標準方案，自經過濾之細胞培養物上清液純化蛋白質。簡言之，將抗體施用於蛋白質A瓊脂糖凝膠管柱(GE Healthcare)且用PBS洗滌。在pH 2.8下實現抗體之溶離，接著立即中和樣品。在PBS或20 mm組胺酸、150 mM NaCl pH 6.0中藉由尺寸排阻層析(Superdex 200, GE Healthcare)自單體抗體分離聚集之蛋白質。單體抗體溶離份經合併、使用例如MILLIPORE Amicon Ultra (30MWCO)離心濃縮器濃縮(必要時)、凍結且儲存於-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%至12% NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Cast凝膠(pH 6.4)及NuPAGE® MES (還原性凝膠，具有NuPAGE® Antioxidant操作緩衝劑添加劑)或MOPS (非還原性凝膠)操作緩衝劑。

分析型尺寸排阻層析

藉由HPLC層析進行用於測定抗體之聚集及寡聚狀態之尺寸排阻層析

(SEC)。簡言之，將蛋白質A純化抗體施用於Agilent HPLC 1100系統上之Tosoh TSKgel G3000SW管柱用300 mM NaCl、50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH 7.5)進行或Dionex HPLC系統上之Superdex 200管柱(GE Healthcare)用2×PBS進行。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。

質譜分析

此章節描述具有VH/VL交換(VH/VL CrossMabs)之多特異性抗體之表徵，其中強調其正確組裝。藉由去糖基化完整CrossMabs及去糖基化/纖維蛋白溶酶消化或以其他方式去糖基化/受限LysC消化CrossMabs之電噴霧電離質譜(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緩衝劑中，在37°C下用N-糖苷酶F去糖基化17小時。纖維蛋白溶酶或受限LysC (Roche)消化用100 µg去糖基化VH/VL CrossMab分別在Tris緩衝劑(pH 8)中，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來源(Advion)之maXis 4G UHR-QTOF MS系統(Bruker Daltonik)上經由ESI-MS測定總質量。

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

使用BIAcore儀器(GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Sweden)藉由表面電漿子共振研究所產生之抗體與各別抗原之結合。簡言之，對於親和力量測，Goat-Anti-Human IgG、JIR 109-005-098抗體經由胺偶合固定在CM5晶片上以用於針對各別抗原之抗體之呈現。在HBS

緩衝劑(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締合；藉由用HBS緩衝劑洗滌晶片表面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數據(例如緩衝劑曲線)以用於系統內源性基線偏移之校正及雜訊信號降低。使用各別Biacore Evaluation軟體進行感測器圖譜之分析及親和力數據之計算。

實例1

1.1抗PD1抗體之產生

小鼠免疫接種

NMRI小鼠使用編碼全長人類PD1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進行滴定測定(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天使脾細胞與骨髓瘤細胞株融合來分離單株抗體。

測定血清效價(ELISA)

將人類重組PD1人類Fc嵌合體於PBS中以0.3 µg/ml、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；施用抗血清之連續稀釋液，一式兩份，在含0.5% Crotein C之PBS中，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洗滌盤3次。藉由以100微升/孔添加BM Blue POD可溶性底物(Roche)顯現信號；且藉由添加1 M HCl，100微升/孔停止。在450 nm下，對照690 nm作為參考，讀出吸光度。將效價定義為產生半最大信號的抗血清之稀釋度。

1.2表徵抗PD1抗體/抗PD1抗體與人類PD1之結合

用於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編號11974998001)且在4°C下培育隔夜。在洗滌(用PBST緩衝劑，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。在沖洗(用3×90微升/孔的PBST緩衝劑)之後，以1:2000/1:1000之稀釋度添加25微升/孔的山羊抗人類H+L-POD (JIR，JIR109-036-088)/綿羊抗小鼠-POD (GE Healthcare; NA9310)並在室溫下在振盪器上培育1小時。在洗滌(用PBST緩衝劑，3×90微升/孔)之後，添加25微升/孔之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]列於以下概述性表1及表2中。

用於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)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°C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緩衝劑中稀釋之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。在沖洗(3×90微升/孔PBST)之後，添加25微升/孔的二次抗體用於檢測：山羊抗人類H+L-POD (JIR，109-036-088)/綿羊抗小鼠-POD (GE NA9310)，之後在室溫下在振盪器上培育1小時。在洗滌(3×90微升/孔PBST)之後，添加25微升/孔之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]列於以下概述性表表2中。

用於食蟹獼猴PD1之ELISA

用25微升/孔經生物素標記之食蟹獼猴PD1-ECD-Biotin來塗佈經Nunc maxisorp 抗生蛋白鏈菌素塗佈之培養盤 (MicroCoat 編號11974998001)且在4°C下培育隔夜。在沖洗(3×90微升/孔之PBST-緩衝劑)之後，添加25微升抗PD1樣品或參考抗體(人類抗PD1；羅氏)且在室溫下在振盪器上培育1小時。在沖洗(3×90微升/孔的PBST緩衝劑)之後，以1:1000之稀釋度添加25微升/孔的山羊抗人類H+L-POD (JIR，109-036-088)且在室溫下在振盪器上培育1小時。在洗滌(3×90微升/孔之PBST緩衝劑)之後，添加25微升/孔之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]列於以下概述性表1及表2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(含生物素塗佈之培養盤(MicroCoat編號11974998001))且在4°C下培育隔夜。在洗滌(3×90微升/孔之PBST緩衝劑)之後，添加25 μl抗PD1樣品或參考抗體(小鼠抗PD1；Biolegend；目錄號：329912)且在室溫下在振盪器上培育1小時。在洗滌(3×90微升/孔之PBST緩衝劑)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)且在室溫下在振盪器上培育1小時。在沖洗(3×90微升/孔之PBST緩衝劑)之後，以1:1000之稀釋度添加25微升/孔的山羊抗人類H+L-POD (JIR，109-036-088)且在室溫下在振盪器上培育1小時。在洗滌(3×90微升/孔之PBST緩衝劑)之後，添加25微升/孔之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]列於以下概述性表1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(含生物素塗佈之培養盤(MicroCoat編號11974998001))且在4°C下培育隔夜。在洗滌(3×90微升/孔之PBST-緩衝劑)之後，添加25微升抗PD1樣品或參考抗體(小鼠抗huPD1；羅氏)且在室溫下在振盪器上培育1小時。在洗滌(3×90微升/孔之PBST緩衝劑)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)且在室溫下在振盪器上培育1小時。在洗滌(3×90微升/孔之PBST緩衝劑)之後，以1:2000之稀釋度添加25微升/孔的山羊抗人類H+L-POD (JIR，109-036-

088)且在室溫下在振盪器上培育1小時。在洗滌(3×90微升/孔之PBST緩衝劑)之後，添加25微升/孔之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]列於以下概述性表1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編號464718)且在室溫下在震盪器上培育1小時。在洗滌(3×90微升/孔之PBST-緩衝劑)之後，用含有2% BSA之PBS緩衝劑在室溫下在震盪器上阻斷培養盤1小時。在洗滌(3×90微升/孔之PBST緩衝劑)之後，添加25微升小鼠抗PD1樣品且在室溫下在振盪器上培育1小時。在洗滌(3×90微升/孔之PBST-緩衝劑)之後，藉由30微升/孔小鼠IgG(JIR；015-000-003)在室溫下在振盪器上阻斷捕捉抗體1小時。同時，用第二樣品抗體在室溫下在震盪器上預培育經生物素標記之PD1-ECD-AviHis 1小時。在洗滌分析培養盤(3×90微升/孔之PBST-緩衝劑)之後，將PD1抗體混合物轉移至分析培養盤且在室溫下在振盪器上培育1小時。在洗滌(3×90微升/孔之PBST-緩衝劑)之後，以1:4000之稀釋度添加25微升/孔抗生蛋白鏈菌素POD (Roche，編號11089153001)且在室溫下在震盪器上培育1小時。在洗滌(3×90微升/孔之PBST緩衝劑)之後，添加25微升/孔TMB受質(Roche 編號 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1：例示性PD1抗體之結合、PD-L1抑制及抗原決定基區群組(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]	抗原決定基區 群組 (藉由競爭分析)
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2：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)之分析以確定若干鼠類PD1黏合劑與市售人類PD1結合參考物之間的結合動力學參數。因此，抗人類IgG藉由偶合至(Biacore) CM5感測器晶片表面之胺來固定。接著捕捉樣品且使hu PD1-ECD與其結合。在各分析週期之後更新感測器晶片表面。最終藉由將數據擬合至1:1朗格繆爾相互作用模型獲得平衡常數及動力學速率常數。

藉由使用GE Healthcare供應之胺類偶合套組在pH 5.0下將約2000個反應單位(RU)之20 µg/ml的抗人類IgG (GE Healthcare編號BR-1008-39) 偶合至Biacore T200中之CM5感測器晶片之流通槽1及2 (或者：3及4) 上。

該樣品及操作緩衝劑係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)。流通槽溫度設定為25 °C且樣品腔室溫度設定為12°C。系統用操作緩衝劑預致敏。

注射濃度係10 nM之樣品20秒且與第二流通槽結合。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，之後係30/300秒之解離時間及兩個用3 M MgCl₂溶液進行之20秒再生步驟，其中最後一個含有用操作緩衝劑進行「注射後額外洗滌」。

最終，用Biacore T200評估軟體將雙重參考數據擬合至1:1朗格繆爾相互作用模型。所得K_D、k_a及k_d值示於表3中。

表3：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3中所示，嵌合PD1-0103 (產生參見實例1.3)之全部人類化形式呈現與親本抗體(嵌合PD1-0103)相似之動力學特性。

動力學

根據製造商說明書，將CM5感測器系列S安裝於Biacore 4000系統中且以水動力方式解決偵測點。

在流通槽1、2、3及4中以10000個RU將多株兔IgG抗體<IgGFC γ M>R (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.)固定在檢測點1及5上。根據製造商之說明書經由EDC/NHS化學法完成偶合。流通槽中之剩餘點充當參考。樣品緩衝劑係補充有1 mg/ml羧甲基葡聚糖之系統緩衝劑。

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 min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及系統緩衝劑0 nM之一系列濃度，以30 μ l/min注射各別抗原，歷時4分鐘締合相時間。再監測解離4 min。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數據。

抗原決定基定位

將Biacore 4000儀器安裝Biacore CAP感測器且其如製造商所建議來製備。儀器緩衝劑係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。

將全部樣本稀釋於系統緩衝劑中。藉由在流通槽1、2、3及4中在點1及5中以30 μ l/min注射1分鐘來在200個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 μ l/min注射100 nM初級抗體3分鐘，接著以30 μ l/min注射

100 nM二級抗體3分鐘。注射初級抗體直至呈現抗原之表面充分飽和。在初級及二級抗體注射相結束時，設定報告點「結合後期」(BL)以監測各別抗體之結合反應。計算二級抗體結合反應「BL2」與初級抗體反應「BL1」之間的商(莫耳比)。當已藉由初級抗體來複合抗原時，將莫耳比用作二級抗體之抗原可接近性之指標。

如製造商所建議，藉由以30 μ l/min注射2 M鹽酸胍250 mM NaOH再生緩衝劑2分鐘，接著以30 μ l/min注射系統緩衝劑1分鐘，自感測器表面完全移除複合物。

1.3混合淋巴細胞反應(MLR)中不同抗PD-1抗體對細胞激素產生之作用

3A)混合淋巴細胞反應(MLR)係量測一個個體(供者X)之淋巴細胞面對另一個體(供者Y)之淋巴細胞進行之活化的免疫細胞分析。混合淋巴細胞反應用以表明阻斷PD1至淋巴細胞效應細胞之路徑的效應。在存在或不存在抗PD1 mAb之情況下測試分析中之T細胞之活化及其IFN- γ 分泌。

為進行同種異體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者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等分試樣以層狀放置於50 ml Leukosep管中。在室溫下在800 x g下離心15分鐘(有或無破裂)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者之PBMC來建立個別雙向MLR反應，且在有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結構域之抗體。不將抗體或同型對照抗體用作陰性對照且將rec hu IL-2 (20 EU/ml)用作陽性對照。在第6天之後，自用於細胞激素量測之各培養物取出100 μl培養基。使用OptEIA ELISA套組(BD Biosciences)量測IFN-γ之含量。

結果示於表4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。參考添加/不添加任何阻斷mAb (誘導如E-c之IFNg值的基本同種異體刺激)之MLR及添加20 EU/ml rec hu IL-2 (陽性對照=100%之如E+c的IFNg值)之MLR的IFN-γ產生來計算IFNg分泌之增加%之值且根據下式計算：Rel. 刺激 [%] = ((實例- E-c)/(E+c - E-c)*100)。

表4：相較於作為陽性對照之重組人類IL-2治療(20 EU/ml) (=100%增加)之作用，在同種異體刺激及用抗PD1抗體治療之後的IFN_γ分泌之百分比

	濃度(μg/ml)	1:12	1:120	1:1200	在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)之分泌來表明強烈的免疫調節活性(數據未展示全部抗體)。

3B)在另一實驗中，評價嵌合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抗體更強效(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(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結構域的參考抗PD1抗體。

3C)在其他實驗中，如上文所述在MLR中評價抗PD1抗體PD1-0103(人類化抗體PD1-0103-0312、PD1-0103-0314，在圖2及3中)之人類化變異體之免疫調節活性，亦即a)IFN γ 釋放(分泌)、b)TNF- α 釋放(分泌)。將嵌合PD1-0103抗體及其人類化形式之作用與具有人類IgG1之主鏈(具有突變體L234A、L235A及P329G (Kabat之EU索引))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結構域的參考抗PD1抗體作比較。在6天MLR培養之後，獲取50 μ l上清液且使用Bio-Plex Pro™人類細胞介素Th1/Th2分析(Bio-Rad Laboratories Inc.)在單一培養中量測多種細胞介素。(數據未展示全部細胞介素)。

在增強T細胞活化及IFN- γ 分泌方面嵌合PD1-0103抗體及其人類化形式(PD1-0103_0312及PD1-0103_0314)比參考抗PD1抗體更強效(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 (數據未展示)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。

1.4藉由與同種異體成熟樹突狀細胞共培養之人類CD4 T細胞得到抗PD-1阻斷對細胞毒性粒酶B釋放及IFN- γ 分泌之作用

為進一步在同種異體環境下研究抗PD-1治療之效果，吾等研發一種分析，其中在衍生出單核細胞之同種異體成熟樹突狀細胞(mDC)的存在下共培養新近純化之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，之後移除非黏附細胞。吾等接著藉由在含有GM-CSF (50 ng/ml)及IL-4 (100 ng/ml)之培養基中培養其5天來自單核細胞產生未成熟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。吾等接著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之表面表現來評定DC成熟。

在最小混合淋巴細胞反應(mMLR)當天，經由微珠套組(Miltenyi Biotec)自獲自不相關供者之 10^8 個PBMC富集CD4 T細胞。培養之前，用5 μ M之羧基螢光素丁二醯亞胺酯(CFSE)標記CD4 T細胞。接著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中縮寫為0312、0313、0314、0315)之情況下，以10 μ g/ml之濃度(若圖式中未另外指定)將 10^5 個CD4 T細胞連同成熟同種異體DC (5:1)一起塗覆於96孔盤中。

五天後，收集細胞培養上清液，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 $^{\circ}$ C下再

靜置細胞5小時。隨後在具有抗人類CD4抗體及存活/死亡可固定染料Aqua (Invitrogen)之表面上洗滌、染色細胞，之後用固定/滲透緩衝劑(BD Bioscience)將其固定/滲透。進行顆粒酶B (BD Bioscience)、IFN- γ 及IL-2 (兩者來自eBioscience)之胞內染色。

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，在圖式中縮寫為0312、0313、0314、0315，亦參見下文之實例1.6)且發現其在增強顆粒酶B及干擾素 γ 方面應同樣良好。DP47係在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。結果示於圖4A及4B中。

1.5嵌合抗體衍生物

藉由經由PCR擴增抗PD1小鼠抗體PD1-0098、PD1-0103之重鏈及輕鏈可變區來生成嵌合PD1抗體並將其選殖至作為具有有消除效應功能之突變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)之人類IgG1主鏈/人類CH1-鉸鏈-CH2-CH3之融合蛋白的重鏈表現載體及作為人類C- κ 之融合蛋白的輕鏈表現載體中。接著將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MDX-5C4或MDX-1106)或派立珠單抗(亦稱為MK-3475或Org 1.09A)之VH及VL結構域的參考抗PD1抗體。

1.6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結構域之人類化

基於鼠類抗PD1抗體PD1-0103之鼠類VH及VL結構域之胺基酸序列 (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-要素生殖系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-要素生殖系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。

將PD1-0103之重鏈及輕鏈可變區之人類化胺基酸序列回譯至DNA中且合成所得cNDA (GenArt)且接著選殖至作為具有有消除效應功能之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)之人類IgG1主鏈/人類CH1-鉸鏈-CH2-CH3之融合蛋白的重鏈表現載體及作為人類C- κ 之融合蛋白的輕鏈表現載體中。接著將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5：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之人類化變異體 /SEQ ID NO:	VL之人類化變異體 /SEQ ID NO:
PD1-0103-0312	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22
PD1-0103-0313	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 23
PD1-0103-0314	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 24
PD1-0103-0315	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 25

表6：PD1-0103之人類化變異抗體之HVR序列

PD1-0103 之人類化抗體	人類化變異體之 HVR-H1、HVR-H2 及 HVR-H3/SEQ ID NO:	人類化變異體之 HVR-L1、HVR-L2 及 HVR-L3/SEQ ID NO:
PD-0103-0312	SEQ ID NO: 13、14及15	SEQ ID NO: 16、17及18
PD-0103-0313	SEQ ID NO: 13、14及15	SEQ ID NO: 16、17及18
PD-0103-0314	SEQ ID NO: 13、14及15	SEQ ID NO: 16、17及18
PD-0103-0315	SEQ ID NO: 13、14及15	SEQ ID NO: 16、17及18

如上所述表徵人類化PD1-0103抗體變異體及親本嵌合PD1-0103。結果示於表7中。

表7：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 [nM]，在37°C 下	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

1.7中和PD-1抗體之效能

為測試內部產生之PD1抗體模擬重建活體外遏制T細胞反應之中和效能，使用市售PD1/PD-L1報導子分析(Promega)。此系統由PD1+ NFAT Jurkat細胞及PD-L1+ CHO對應體構成，其亦給予活化信號。大體上，該報導子系統係基於三個步驟：(1)TCR介導之NFAT活化、(2)在活化時即藉由PD-1/PD-L1軸抑制NFAT信號及(3)藉由PD1阻斷抗體回收NFAT信號。

材料及方法：

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

- 分析培養基：RPMI 1640 (編號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(批號第139147號)：2至3×10⁴個細胞/96孔

PD1+NFAT Jurkat細胞(批號第133024號)：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定細胞濃度接種且在37°C及5% CO₂下培養隔夜。第二天，移除培養基且PD-L1+細胞以指定濃度與製備之抗體一起培育(在分析培養基中)。同時，解凍PD1+NFAT Jurkat細胞且將上文所提及之細胞成員轉移至PD-L1+細胞並與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基底升溫至室溫(添加之前1至2小時)。根據套組製造商之建議，在每孔添加80 μl Bio-Glo溶液之前，自培育箱移除細胞培養盤且調整至室溫(10分鐘)，在以Tecan無限讀取器量測螢光之前培育5至10分鐘。結果可見於圖5A及圖5B中，其中展示在TCR刺激時不同PD-1抗體復原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))合成且選殖包含納武單抗(亦稱為MDX-5C4或MDX-1106)之VH及VL結構域的抗PD1抗體。**圖5B**：PD1_0103之四個人類化變異體表明與先導抗體相似之活體外效能且亦略微優於參考抗體。

實例2

靶向PD1之含有4-1BB配位三聚體之Fc融合物抗原結合分子之製備

根據Uniprot資料庫之P41273序列(SEQ ID NO:103)合成編碼人類4-1BB配位體之胞外域之一部分(胺基酸71-254及71-248)的DNA序列之不同片段。

2.1具有交叉CH1-CL結構域及帶電殘基之單價的靶向PD1 (0314)之含有4-1BB配位(71-254)三聚體之Fc(kih)融合物抗原結合分子(構築體7.1)之製備

如圖6A中所描繪選殖含有4-1BB配位體(71-254)之兩個胞外域(由(G4S)₂連接子分離且與人類IgG1-CL結構域融合)之多肽：人類4-1BB配位體、(G4S)₂連接子、人類4-1BB配位體、(G4S)₂連接子、人類CL。

如圖6B中所描述選殖含有4-1BB配位體(71-254)之一個胞外域且與人類IgG1-CH1結構域融合之多肽：人類4-1BB配位體、(G4S)₂連接子、人類CH。

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

在具有白之恆定重鏈或人類IgG1之恆定輕鏈的框架中次選殖編碼對PD1，純系0314 (或0103-0314)具有特異性之結合子之重鏈及輕鏈DNA序列的可變區。PD1結合子之產生及製備描述於實例1中。

根據國際專利申請公開案第WO 2012/130831號中描述之方法，將Pro329Gly、Leu234Ala及Leu235Ala突變引入杵及白重鏈之恆定區以消

除與Fc γ 受體之結合。

對於所有構築體，在杵鏈中之S354C/T366W突變及相應的臼鏈中之Y349C/T366S/L368A/Y407V突變情況下使用杵臼雜二聚化技術。

含有S354C/T366W突變之二聚配位體-Fc杵鏈、單體CH1融合物、靶向之含有Y349C/T366S/L368A/Y407V突變之抗PD1-Fc臼鏈及抗PD1輕鏈之組合允許產生雜二聚體，其包括組裝之三聚4-1BB配位體及PD1結合Fab(圖7，構築體7.1)。

表8展示含有CH1-CL交換型物及帶電殘基之單價的PD1(0314)-人類4-1BB配位體(71-254) Fc (kih)融合物抗原結合分子(構築體7.1)之cDNA及胺基酸序列。

表8：單價的靶向PD1(0314)之含有人類4-1BB配位體(71-254)之Fc (kih)融合物分子構築體7.1之序列

SEQ ID NO:	描述	序列
131	二聚 hu 4-1BBL (71-254) - CL* Fc 杵鏈之核苷酸序列	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGC TGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCA GCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCC CCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGT GTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACA CCAAAGAAGTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTAC TACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGCAGGAGAGTGGTG GCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTG CATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCA GCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGC TCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTGGGTTTCAAGGC AGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGG AGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGC CTGTTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTG

		<p>CCTTCTCCAAGAAGCGAAGGCGGAGGCGGATCTGG CGGCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCGAAGTGTCC CTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAG GGAATGTTCCGCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTG CTGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCA GGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTC CTACAAAGAAGATACAAAAGAAGTGGTGGTGGCTA AAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTCAGCTGGAAC TGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCT GTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCT GCTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGA CCTGCCACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAACAGCG CCTTCGGGTTCGAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCG CCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAG CCAGAGCCCAGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGG GCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGA GATCCCTGCCGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAAGG GGGCGGAGGTTCCGGAGGGGGAGGATCTCGTACGG TGGCTGCACCATCTGTCTTTATCTTCCCACCCAGCGA CCGGAAGCTGAAGTCTGGCACAGCCAGCGTCGTGT GCCTGCTGAATAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGG TGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGC AACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGCAGGACAGCA AGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACC CTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTA CGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCC CCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCGAC AAGACCCACACCTGTCCTCCATGCCCTGCCCCTGAA GCTGCTGGCGGCCCTAGCGTGTTCTGTTCCCCCA AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCC TGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACG AGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGAC GGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCGCG GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG</p>
--	--	---

		<p>GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC CTCGGCGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCT GCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCT CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG GGTAAA</p>
132	<p>單體 hu 4-1BBL (71-254) - CH1*之 核苷酸序列</p>	<p>AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGC TGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCA GCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCC CCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGT GTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACA CCAAAGA AACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTAC TACGTGTTCTTTCAGCTGGA AACTGCGGAGAGTGGTG GCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTG CATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCA GCTCTGGCTCTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGC TCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGC CGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGACTGGG AGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGAGCCAGGCACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGC CTGTTTCAAGAGTGACCCCCGAGATTCTGCCGGCCTG CCTAGCCCTAGATCTGAAGGCCGGCGGAGGTTCCGG AGGCGGAGGATCTGCTAGCACAAAGGGCCCCAGCG TGTTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCAAGAGCACATCTG GCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGGAAAGAT TACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAATTCT GGCGCCCTGACAAGCGGCGTGCACACCTTCCAGC CGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTA TCTCTGAGCA GCGTCGTGACAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACC</p>

		CAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAG CAACACCAAGGTGGACGAGAAGGTGGAACCCAAG TCCTGC
133	抗PD1(0314) Fc白 鏈之核苷酸序列	GAAGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGGGGACTGGT CCAGCCC GGCGGTTCCCTGAGGCTGTCTTGCGCCGC TTCAGGGTTCAGCTTTTCCCTCTTACACCATGAGTTGG GTCAGACAGGCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGT CGCCACAATCAGCGGTGGCGGGCGCGACATTTATTA CCCAGATTCCGTGAAAGGACGGTTCACCATCTCTAG GGACA ACTCAAAGAATACTCTGTATTTGCAGATGAA CAGCCTGAGAGCTGAGGATACAGCAGTTTACTACTG TGTGCTCCTGACCGGCCGCGTCTATTTTGCCCTTGAC TCCTGGGGACAAGGCACTCTGGTGACCGTATCTAGT GCTAGCACC AAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCC CCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGC TCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCC CGTGACCGTGTCTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCT CCGGCGTGACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTT CTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGC CTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAA ACTC ACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCTGCA GGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAA AACC AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCG CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCC ATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCC TCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACA

		TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC CGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
134	抗PD1 (0314)輕鏈 之核苷酸序列	GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGCCACACTCTCC CTGTCTCCTGGCGAAAGGGCTACCCTTTCATGCAGA GCAAGCGAGTCCGTGGACACTTCTGATAACAGTTTC ATTC ACTGGTATCAGCAGAAGCCAGGGCAGAGCCC CCGCCTGCTCATCTATCGGTCCTCTACACTGGAGTCA GGGATTCCTGCCAGGTTTAGCGGCTCCGGTTCTGGG ACCGACTTCACTTTGACCATCAGTAGCCTGGAACCA GAGGATTTTGTGTGTACTATTGTCAACAGAATTACG ACGTCCCCTGGACATTCGGCCAGGGAACCAAAGTG GAGATAAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTC ATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATC CCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAAC GCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT CACA GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAG CAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGA AACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAG GGGAGAGTGT
74	二聚 hu 4-1BBL (71-254) - CL* Fc 杵鏈	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVF FQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALAL TVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHT EARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGG GGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSA AGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQ RLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAG

		<p>LSPRSEGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSLTTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
75	單體 hu 4-1BBL (71-254) - CH1*	<p>REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVF FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALAL TVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHT EARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGG GGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVE DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC</p>
82	抗PD1 (0314) Fc白 鏈	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMSWV RQAPGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP IEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK</p>
83	抗PD1 (0314)輕鏈	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDTSDFSIHW YQQKPGQSPRLLIYRSSTLESIGIPARFSGSGGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK</p>

		VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
--	--	---

2.2具有交叉CH1-CL結構域但無帶電殘基之單價的靶向PD1(0314)之含有4-1BB配位體(71-254)之Fc(kih)融合物抗原結合分子(構築體7.2)之製備

如圖6C中所描繪選殖含有4-1BB配位體(71-254)之兩個胞外域(由(G4S)₂連接子分離且與人類IgG1-CL結構域融合)之多肽：人類4-1BB配位體、(G4S)₂連接子、人類4-1BB配位體、(G4S)₂連接子、人類CL。

如圖6D中所描述選殖含有4-1BB配位體(71-254)之一個胞外域且與人類IgG1-CH1結構域融合之多肽：人類4-1BB配位體、(G4S)₂連接子、人類CH1。

在具有白之恆定重鏈或人類IgG1之恆定輕鏈的框架中次選殖編碼對PD1，純系0103-0314具有特異性之結合子之重鏈及輕鏈DNA序列的可變區。

將Pro329Gly、Leu234Ala及Leu235Ala突變引入杵及白重鏈之恆定區以消除與Fc γ 受體之結合(WO 2012/130831)。

含有S354C/T366W突變之二聚配位體-Fc結鏈、單體CH1融合物、靶向之含有Y349C/T366S/L368A/Y407V突變之抗FAP-Fc白鏈及抗FAP輕鏈之組合允許產生雜二聚體，其包括組裝之三聚4-1BB配位體及FAP結合Fab(圖7，構築體7.2)。

表9展示含有CH1-CL交叉型物但無帶電殘基之單價的抗PD1(0314)人類4-1BB配位體(71-254)Fc(kih)融合物抗原結合分子(構築體7.2)之cDNA及胺基酸序列。

表9：單價的靶向PD1(0314)之含有人類4-1BB配位體(71-254)之Fc(kih)融合物分子構築體7.2之序列

SEQ ID NO:	描述	序列
135	二聚 hu 4-1BBL (71-254) - CL Fc 杵 鏈之核苷酸序列	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGC TGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCA GCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCC CCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGT GTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACA CCAAAGAAGTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTAC TACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGCAGGAGAGTGGTG GCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTG CATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCA GCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGC TCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTGGGTTTCAAGGC AGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGG AGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGC CTGTTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTG CCTTCTCCAAGAAGCGAAGGCCGGAGGCGGATCTGG CGGCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCGAAGTGTCCC CTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAG GGAATGTTCCGCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTG CTGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCA GGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTC CTACAAAGAAGATACAAAAGAAGTGGTGGTGGCTA AAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAAC TGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCT GTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCT GCTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGA CCTGCCACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAACAGCG CCTTCGGGTTCGAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCG CCGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAG CCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGG GCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGA GATCCCTGCCGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAAGG GGGCGGAGGTTCCGGAGGGGGAGGATCTCGTACGG

		<p>TGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTTCCCCCATCCGA TGAACAGCTGAAAAGCGGCACCGCCTCCGTGCTGT GTCTGCTGAACAATTTTTACCCTAGGGAAGCTAAAG TGCAGTGGAAAGTGGATAACGCACTGCAGTCCGGC AACTCCCAGGAATCTGTGACAGAACAGGACTCCAA GGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACACT GTCTAAGGCTGATTATGAGAAACACAAAGTCTACGC CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGT CACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGACAAG ACCCACACCTGTCCCCCTTGTCTGCCCCTGAAGCT GCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCTGTTCCCCCAAAG CCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCGA AGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGG ACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGC GTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCG TCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC GGCGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTC AGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCC GGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGG TAAA</p>
136	單體 hu 4-1BBL (71-254) - CHI 之 核苷酸序列	<p>AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGC TGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCA GCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCC CCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGT GTC ACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACA CCAAAGA ACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTAC</p>

		<p>TACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGC GGAGAGTGGTG GCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTG CATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCA GCTCTGGCTCTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGC TCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTGGGTTTCAAGGC CGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGACTGGG AGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGAGCCAGGCACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGC CTGTTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCTGCCGGCCTG CCTAGCCCTAGATCTGAAGGCGGCGGAGGTTCCGG AGGCGGAGGATCTGCTAGCACCAAAGGCCCTTCCG TGTTTCCTCTGGCTCCTAGCTCCAAGTCCACCTCTG GAGGCACCGCTGCTCTCGGATGCCTCGTGAAGGATT ATTTTCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAATAGCG GAGCACTGACCTCTGGAGTGCATACTTTCCCGCTG TGCTGCAGTCCTCTGGACTGTACAGCCTGAGCAGCG TGGTGACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAG ACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAA CACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCTT GT</p>
133	抗PD1(0314) Fc白 鏈之核苷酸序列	參見表8
134	抗PD1(0314) 輕鏈 之核苷酸序列	參見表8
76	二聚 hu 4-1BBL (71-254) - CL Fc杵 鏈	<p>REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVF FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALAL TVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHT EARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGG GGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSA AGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQ RLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAG LPSRSEGGGGSGGGGSRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGT</p>

		ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
77	單體 hu 4-1BBL (71-254) - CH1	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVF FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALAL TVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHT EARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGG GGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSQGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKKVEPKSC
82	抗PD1(0314) Fc 白 鏈	參見表8
83	抗PD1(0314)輕鏈	參見表8

2.3 具有在各重鏈之C端融合之二聚及單體4-1BB配位體之二價的靶向PD1(0314)之含有4-1BB配位(71-254)三聚體之Fc (kih)融合物抗原結合分子(構築體7.3)之製備

含有由(G4S)₂連接子分離之4-1BB配位體(71-254)之兩個胞外域之多肽與人類IgG1 Fc 白鏈之C端融合，如圖6E中所描繪：人類IgG1 Fc 白、(G4S)₂連接子、人類4-1BB配位體、(G4S)₂連接子、人類4-1BB配位體。含有4-1BB配位體(71-254)之一個胞外域之多肽與人類IgG1 Fc 杵鏈之C端融合，如圖6F中所描述：人類IgG1 Fc 杵、(G4S)₂連接子、人類4-1BB配位體。

在具有白、杵之恆定重鏈或人類IgG1之恆定輕鏈的框架中次選殖編

碼對PD1，純系0103-0314具有特異性之結合子之重鏈及輕鏈DNA序列的可變區。

根據WO 2012/130831中所述之方法，將Pro329Gly、Leu234Ala及Leu235Ala突變引入杵及臼重鏈之恆定區以消除與Fc γ 受體之結合。

含有Y349C/T366S/L368A/Y407V突變之抗FAP huIgG1臼二聚配位體鏈、含有S354C/T366W突變之抗FAP huIgG1杵單體配位體鏈及抗FAP輕鏈之組合允許產生雜二聚體，其包括組裝之三聚4-1BB配位體及兩個PD1結合Fab (圖7，構築體7.3)。

表10展示含有二價的靶向PD1(0314)之4-1BB配位三聚體之Fc (kih)融合物分子構築體7.3 (具有2個抗PD1 Fab、分別在各重鏈之C端融合之二聚及單體4-1BB配位體之PD1裂解型三聚體)之cDNA及胺基酸序列。

表 10：二價的靶向PD1(0314)之含有人類4-1BB配位體(71-254)之Fc (kih)融合物分子構築體7.3之序列

SEQ ID NO:	描述	序列
137	與二聚 hu 4-1BBL (71-254) 融合之抗 PD1(0314) Fc 臼鏈之核苷酸序列	GAAGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGGGGACTGGT CCAGCCCGGCGGTTCCCTGAGGCTGTCTTGCGCCGC TTCAGGGTTCAGCTTTTCCTCTTACACCATGAGTTGG GTCAGACAGGCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGT CGCCACAATCAGCGGTGGCGGGCGCGACATTTATTA CCCAGATTCCGTGAAAGGACGGTTCACCATCTCTAG GGACA ACTCAAAGAATACTCTGTATTTGCAGATGAA CAGCCTGAGAGCTGAGGATACAGCAGTTTACTACTG TGTGCTCCTGACCGGCCGCGTCTATTTTGCCCTTGAC TCCTGGGGACAAGGCACTCTGGTGACCGTATCTAGT GCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCC CCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGC TCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCC CGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCT

		<p>CCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTT CTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGC CTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAATC ACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCTGCA GGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCC AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCG CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCC ATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCC TCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC CGACGGCTCCTTCTTCTCGTGAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGA GGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGG GCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGC TGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGG CCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCT GGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGA CAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAA CTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTC TTTCAGCTGGAACCTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGA AGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCA GCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGG CACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGG</p>
--	--	--

		<p> CCCGGAATAGCGCATTGTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGC TGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCAT CTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCA GCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCA GAGTGACCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTC CAAGAAGCGAAGGCGGAGGCGGATCTGGCGGGCGG AGGATCTAGAGAGGGACCCGAACTGTCCCCTGACG ATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGT TCGCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTG ACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTG GCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAA AGAAGATACAAAAGAAGCTGGTGGTGGCTAAAGCTG GGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAAGTGGGC GGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCC CTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCT GGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGACCTGCC ACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCG GGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGA CAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGA GCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAAC TGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCC TGCCGGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAA </p>
138	<p> 與單體 hu 4-1BBL (71-254) 融合之抗 PD1(0314) Fc 杵鏈 之核苷酸序列 </p>	<p> GAAGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGGGGACTGGT CCAGCCCGGCGGTTCCCTGAGGCTGTCTTGCGCCGC TTCAGGGTTCAGCTTTTCCCTCTTACACCATGAGTTGG GTCAGACAGGCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGT CGCCACAATCAGCGGTGGCGGGCGCGACATTTATTA CCCAGATTCCGTGAAAGGACGGTTCACCATCTCTAG GGACA ACTCAAAGAATACTCTGTATTTGCAGATGAA CAGCCTGAGAGCTGAGGATACAGCAGTTTACTACTG TGTGCTCCTGACCGGCCGCGTCTATTTTGCCCTTGAC TCCTGGGGACAAGGCACTCTGGTGACCGTATCTAGT GCTAGCACC AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA CCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC </p>

		<p>GGTGACGGTGTCTCGTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC CCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA ACTCA CACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCTGCAG GGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCCA AGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA CCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCC TGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCT GTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCAGCGATAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGA ACA ACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGC GACGGCAGCTTCTTCTGTACTCCAAACTGACCGTG GACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAG CTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACT ACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGA GGCGGCGGAAGCGGAGGAGGATCCAGAGAGG GCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGC TGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGG CCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCT GGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGA CAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAA CTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTC TTTCAGCTGGA ACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGA AGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCA GCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGG</p>
--	--	--

		CACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGG CCCGGAATAGCGCATTGTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGC TGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCAT CTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCA GCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCA GAGTGACCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTC CAAGAAGCGAA
134	抗 PD1(0314) 輕鏈 之核苷酸序列	參見表8
84	與二聚 hu 4-1BBL (71-254) 融合之抗 PD1(0314) Fc 白鏈	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMSWV RQAPGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP IEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQ LVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTK ELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQ PLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVT PEIPAGLPSRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLL DLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTG GLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGS GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQG ATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
85	與單體 hu 4-1BBL (71-254) 融合之抗 PD1(0314) Fc 杵鏈	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMSWV RQAPGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWG

		QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQ LVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTK ELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQ PLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVT PEIPAGLPSRSE
83	抗PD1(0314)輕鏈	參見表21

2.4具有交叉CH1-CL結構域及帶電殘基之單價的靶向PD1(0314)之含有4-1BB配位(71-248)三聚體之Fc(kih)融合物抗原結合分子(構築體7.4)之製備

如圖8A中所描繪選殖含有4-1BB配位體(71-248)之兩個胞外域(由(G4S)₂連接子分離且與人類IgG1-CL結構域融合)之多肽：人類4-1BB配位體、(G4S)₂連接子、人類4-1BB配位體、(G4S)₂連接子、人類CL。如圖8B中所描述選殖含有4-1BB配位體(71-248)之一個胞外域且與人類IgG1-CH結構域融合之多肽：人類4-1BB配位體、(G4S)₂連接子、人類CH1。

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

在具有白之恆定重鏈或人類IgG1之恆定輕鏈的框架中次選殖編碼對PD1，純系0103-0314具有特異性之結合子之重鏈及輕鏈DNA序列的可變區。

根據WO 2012/130831中所述之方法，將Pro329Gly、Leu234Ala及Leu235Ala突變引入杵及白重鏈之恆定區以消除與Fc γ 受體之結合。

含有S354C/T366W突變之二聚配位體-Fc杵鏈、單體CH1融合物、靶向之含有Y349C/T366S/L368A/Y407V突變之抗PD1(0314)-Fc白鏈及抗PD1(0314)輕鏈之組合允許產生雜二聚體，其包括組裝之三聚4-1BB配位體及FAP結合Fab (圖7，構築體7.4)。

表11個展示含有CH1-CL交換型物及帶電殘基之單價的PD1(0314)-人類4-1BB配位體(71-248) Fc (kih)融合物抗原結合分子(構築體7.4)之cDNA及胺基酸序列。

表11：單價的靶向PD1(0314)之含有人類4-1BB配位體(71-248)之Fc (kih)融合物分子構築體7.4之序列

SEQ ID NO:	描述	序列
139	二聚hu 4-1BBL (71-248) - CL* Fc杵鏈之核苷酸序列	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGC TGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCA GCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCC CCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGT GTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACA CCAAAGAAGTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTAC TACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGC GGAGAGTGGTG GCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTG CATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCT GCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGC AGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTGGGTTTCAAGGC AGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGG

		<p>AGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGC CTGTTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGACTG GGAGGCGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGA AGGACCCGAGCTGTCCCCTGACGATCCAGCCGGGC TGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTTCGCCCAGCTGG TGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGA GCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCC CTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAA AGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGT GTTTTTTCAGCTGGAAGTGAAGCGGGTGGTGGCTG GGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATC TGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGGGCTGCAGCA CTGGCCCTGACTGTGGACCTGCCCCAGTTCTTCC GAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTCCAAGGACG CCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAG TGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTT GGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTG TTTCGCGTGACACCTGAGATCCCCGCTGGACTGGGC GGAGGCGGTTCCGGAGGGGGAGGATCTCGTACGGT GGCTGCACCATCTGTCTTTATCTTCCCACCCAGCGAC CGGAAGCTGAAGTCTGGCACAGCCAGCGTCGTGTG CCTGCTGAATAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGT GCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCA ACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAA GGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCT GAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACG CCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCC GTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCGACAA GACCCACACCTGTCCTCCATGCCCTGCCCTGAAGC TGCTGGCGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAA GCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCTG AAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAG GACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGG CGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCGCGGG</p>
--	--	--

		AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT CGGCGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG CCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC CGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTC ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA
140	單體hu 4-1BBL (71-248) - CH1*之核苷酸序列	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGC TGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCA GCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCC CCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGT GTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACA CCAAAGAAGTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTAC TACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGCAGGAGAGTGGTG GCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTG CATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCT GCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGC AGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTGTTGGTTTCAAGGC AGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGG AGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGC CTGTTTACAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGACTG GGAGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGAGGATCTGCTAG CACAAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTAG CAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGG GCTGCCTGGTGGAAAGATTACTTCCCCGAGCCCGTGA CCGTGTCCTGGAATTCTGGCGCCCTGACAAGCGGCG TGCACACCTTTCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGC

		CTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCCAGC AGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACGAGA AGGTGGAACCCAAGTCCTGC
133	抗PD1(0314) Fc白鏈 之核苷酸序列	參見表8
134	抗PD1(0314)輕鏈之 核苷酸序列	參見表8
78	二聚hu 4-1BBL (71- 248) - CL* Fc杵鏈	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVF FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALAL TVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHT EARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGG GGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGV YYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGG GSGGGGSRVAAPS VFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
79	單體hu 4-1BBL (71- 248) - CH1*	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVF FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALAL TVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHT EARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGG GGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS

		SSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDEKVEPKSC
82	抗PD1(0314) Fc白鏈	參見表8
83	抗PD1(0314)輕鏈	參見表8

2.5具有交叉CH1-CL結構域但無帶電殘基之單價的靶向PD1(0314)之含有4-1BB配位(71-248)三聚體之Fc(kih)融合物抗原結合分子(構築體7.5)之製備

如圖8C中所描繪選殖含有4-1BB配位體(71-248)之兩個胞外域(由(G4S)₂連接子分離且與人類IgG1-CL結構域融合)之多肽：人類4-1BB配位體、(G4S)₂連接子、人類4-1BB配位體、(G4S)₂連接子、人類CL。如圖8D中所描述選殖含有4-1BB配位體(71-248)之一個胞外域且與人類IgG1-CH結構域融合之多肽：人類4-1BB配位體、(G4S)₂連接子、人類CH。

在具有白之恆定重鏈或人類IgG1之恆定輕鏈的框架中次選殖編碼對PD1，純系0103-0314具有特異性之結合子之重鏈及輕鏈DNA序列的可變區。

根據WO 2012/130831中所述之方法，將Pro329Gly、Leu234Ala及Leu235Ala突變引入杵及白重鏈之恆定區以消除與Fc γ 受體之結合。

含有S354C/T366W突變之二聚配位體-Fc杵鏈、單體CH1融合物、靶向之含有Y349C/T366S/L368A/Y407V突變之抗PD1白鏈及抗PD1輕鏈之組合允許產生雜二聚體，其包括組裝之三聚4-1BB配位體及FAP結合Fab(圖7，構築體7.5)。

表12展示含有CH1-CL交換型物但無帶電殘基之單價的抗PD1(0314)人類4-1BB配位體(71-248)Fc(kih)融合物抗原結合分子(構築體7.5)之cDNA及胺基酸序列。

表 12：單價的靶向 PD1(0314) 之含有人類 4-1BB 配位體 (71-248) 之 Fc (kih) 融合物分子構築體 7.5 之序列

SEQ ID NO:	描述	序列
141	二聚 hu 4-1BBL (71-248) - CL Fc 杵鏈之核苷酸序列	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGC TGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCA GCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCC CCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGT GTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACA CCAAAGAAGTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTAC TACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGCAGGAGAGTGGTG GCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTG CATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCT GCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGC AGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTGTTGGTTC AAGGC AGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGG AGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGC CTGTT CAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGACTG GGAGGCGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGA AGGACCCGAGCTGTCCCCTGACGATCCAGCCGGGC TGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTCCGCCAGCTGG TGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGA GCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCC CTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAA AGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGT GTTTTTTCAGCTGGAAGT GAGGCGGGTGGTGGCTG GGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATC TGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGGGCTGCAGCA CTGGCCCTGACTGTGGACCTGCCCCAGCTTCTTCC GAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACG CCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAG TGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTT GGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTG

		<p>TTTCGCGTGACACCTGAGATCCCCGCTGGACTGGGC GGAGGCGGTTCCGGAGGGGGAGGATCTCGTACGGT GGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTTCCCCCATCCGAT GAACAGCTGAAAAGCGGCACCGCCTCCGTCGTGTG TCTGCTGAACAATTTTACCCTAGGGAAGCTAAAGT GCAGTGGAAAGTGGATAACGCACTGCAGTCCGGCA ACTCCCAGGAATCTGTGACAGAACAGGACTCCAAG GACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACTG TCTAAGGCTGATTATGAGAAACACAAAGTCTACGCC TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGACAAGA CCCACACCTGTCCCCCTTGTCTGCCCCTGAAGCTG CTGGCGGCCCTTCTGTGTTCTGTTCCCCCAAAGC CCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCGAA GTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGA CCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGT GGAAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCG GCGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC CCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCA GCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG GAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCAC CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AA</p>
142	單體hu 4-1BBL (71-248) - CHI之核苷酸序列	<p>AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGC TGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCA GCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCC CCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGT</p>

		<p>GTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACA CCAAAGAAGTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTAC TACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGC GGAGAGTGGTG GCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTG CATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCT GCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGC AGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTGTTGGTTC AAGGC AGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGG AGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGC CTGTT CAGAGTGACCCCGAGATTCCAGCCGGACTG GGAGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGAGGATCTGCTAG CACCAAAGGCCCTTCCGTGTTTCCTCTGGCTCCTAG CTCCAAGTCCACCTCTGGAGGCACCGCTGCTCTCGG ATGCCTCGTGAAGGATTATTTTCCTGAGCCTGTGAC AGTGTCTGGAATAGCGGAGCACTGACCTCTGGAGT GCATACTTTCCCGCTGTGCTGCAGTCTCTGGACT GTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCAGCA GCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA AGGTGGAACCCAAGTCTTGT</p>
133	抗PD1(0314) Fc白鏈 之核苷酸序列	參見表8
134	抗PD1(0314)輕鏈之 核苷酸序列	參見表8
80	二聚hu 4-1BBL (71- 248) - CL Fc杵鏈	<p>REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYV FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALAL TVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHT EARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGG GGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGV YYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGG</p>

		GSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
81	單體hu 4-1BBL (71-248) - CH1	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVF FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALAL TVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHT EARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGG GGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
82	抗PD1(0314) Fc白鏈	參見表8
83	抗PD1(0314)輕鏈	參見表8

2.6 具有在各重鏈之C端融合之二聚及單體4-1BB配位體之二價的靶向PD1(0314)之含有4-1BB配位(71-248)三聚體之Fc (kih)融合物抗原結合分子(構築體7.6)之製備

含有由(G4S)₂連接子分離之4-1BB配位體(71-248)之兩個胞外域之多肽與人類IgG1 Fc白鏈之C端融合，如圖8E中所描繪：人類IgG1 Fc白、(G4S)₂連接子、人類4-1BB配位體、(G4S)₂連接子、人類4-1BB配位體。含有4-1BB配位體(71-248)之一個胞外域之多肽與人類IgG1 Fc杵鏈之C端融合，如圖8F中所描述：人類IgG1 Fc杵、(G4S)₂連接子、人類4-1BB配位體。

在具有白、杵之恆定重鏈或人類IgG1之恆定輕鏈的框架中次選殖編

碼對PD1，純系0103-0314具有特異性之結合子之重鏈及輕鏈DNA序列的可變區。

根據WO 2012/130831中所述之方法，將Pro329Gly、Leu234Ala及Leu235Ala突變引入杵及臼重鏈之恆定區以消除與Fc γ 受體之結合。

含有Y349C/T366S/L368A/Y407V突變之抗PD1 huIgG1臼二聚配位體鏈、含有S354C/T366W突變之抗PD1 huIgG1杵單體配位體鏈及抗PD1輕鏈之組合允許產生雜二聚體，其包括組裝之三聚4-1BB配位體及兩個PD1結合Fab (圖7，構築體7.6)

表13展示含有靶向二價PD1(0314)之4-1BB配位三聚體之Fc (kih)融合物分子構築體7.6 (具有2個抗PD1 Fab、分別在各重鏈之C端融合之二聚及單體4-1BB配位體之PD1裂解型三聚體)之cDNA及胺基酸序列。

表 13：二價的靶向PD1(0314)之含有人類4-1BB配位體(71-248)之Fc (kih)融合物分子(構築體7.6)之序列

SEQ ID NO:	描述	序列
143	與二聚 hu 4-1BBL (71-248) 融合之抗 PD1(0314) Fc臼鏈之核苷酸序列	GAAGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGGGGACTGGT CCAGCCCGGCGGTTCCCTGAGGCTGTCTTGCGCCGC TTCAGGGTTCAGCTTTTCCTCTTACACCATGAGTTGG GTCAGACAGGCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGT CGCCACAATCAGCGGTGGCGGGCGCGACATTTATTA CCCAGATTCCGTGAAAGGACGGTTCACCATCTCTAG GGACA ACTCAAAGAATACTCTGTATTTGCAGATGAA CAGCCTGAGAGCTGAGGATACAGCAGTTTACTACTG TGTGCTCCTGACCGGCCGCGTCTATTTTGCCCTTGAC TCCTGGGGACAAGGCACTCTGGTGACCGTATCTAGT GCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCC CCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGC TCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCC CGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCT

		<p>CCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTT CTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGC CTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAATC ACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCA GGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCC AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCG CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCC ATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCC TCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC CGACGGCTCCTTCTTCTCGTGAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGA GGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGG GCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGACTGC TGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCAGCTGGTG GCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCC TGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTG ACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGA ACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTT CTTTCAGCTGGAACCTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCG AAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGC AGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGG CACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAG</p>
--	--	--

		<p>GCCCCGAATAGCGCATTGTTGGGTTTCAAGGCAGGCTG CTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCA TCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGC AGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTC AGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCAGGCCTGGGAGG CGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAAGGAC CCGAGCTGTCCCCGACGATCCCGCTGGGCTGCTGG ATCTGAGACAGGGCATGTTTCGCTCAGCTGGTGGCTC AGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGGT ACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACT GGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAACT GGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTT TCAGCTGGAAGTGAAGCGGGTGGTGGCTGGGGAGG GCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGC CACTGCGCTCTGCAGCAGGGGCTGCAGCACTGGCC CTGACTGTGGACCTGCCCCAGCTTCTTCCGAGGCC AGAAACAGCGCCTTCGGGTTCOAAGGACGCCTGCT GCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATC TGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGC TGAICTAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGC GTGACACCTGAGATCCCAGCCGGGCTC</p>
144	與單體 hu 4-1BBL (71-248) 融合之抗 PD1(0314) Fc 杵鏈之核苷酸序列	<p>GAAGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGGGGACTGGT CCAGCCCGGCGGTTCCCTGAGGCTGTCTTGCGCCGC TTCAGGGTTCAGCTTTTCTCTTACACCATGAGTTGG GTCAGACAGGCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGT CGCCACAATCAGCGGTGGCGGGCGCGACATTTATTA CCCAGATTCCGTGAAAGGACGGTTCACCATCTCTAG GGACA ACTCAAAGAATACTCTGTATTTGCAGATGAA CAGCCTGAGAGCTGAGGATACAGCAGTTTACTACTG TGTGCTCCTGACCGGCCGCGTCTATTTTGCCCTTGAC TCCTGGGGACAAGGCACTCTGGTGACCGTATCTAGT GCTAGCACC AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA CCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC GGTGACGGTGTCTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCA</p>

	<p>GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC CCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCA CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAG GGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCA AGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA CCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCC TGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCT GTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCAGCGATAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGA ACA ACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGC GACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAACTGACCGTG GACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTGAG CTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACT ACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGA GGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGG GCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGACTGC TGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCAGCTGGTG GCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCC TGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTG ACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGA ACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTT CTTTCAGCTGGA ACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCG AAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGC AGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGG CACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAG</p>
--	---

		GCCCCGAATAGCGCATTGTTGGGTTTCAAGGCAGGCTG CTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCA TCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGC AGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTC AGAGTGACCCCCGAGATTCCTGCCGGGCTC
134	抗PD1(0314)輕鏈之 核苷酸序列	參見表8
86	與二聚 hu 4-1BBL (71-248) 融合之抗 PD1(0314) Fc白鏈	EVQLLES GGGLVQP GGSRLS CAASGFS FSSYTMSWV RQAPGK GLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWG QGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP IEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQ LVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTK ELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQ PLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVT PEIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQG MFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYK EDTKELVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQG RLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGL FRVTPEIPAGL
87	與單體 hu 4-1BBL (71-248) 融合之抗 PD1(0314) Fc杵鏈	EVQLLES GGGLVQP GGSRLS CAASGFS FSSYTMSWV RQAPGK GLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWG QGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS

		VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQ LVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTK ELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQ PLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVT PEIPAGL
83	抗PD1(0314)輕鏈	參見表8

2.7 具有在各重鏈之C端融合之二聚及單體4-1BB配位體之單價的靶向PD1(0314)之含有4-1BB配位(71-248)三聚體之Fc(kih)融合物抗原結合分子(杵鏈上之抗PD1，構築體7.11及7.12)之製備

將含有由(G4S)₂連接子分離之4-1BB配位體之兩個胞外域之多肽在框架中次選殖至人類IgG1 Fc白或杵鏈之C端，如圖9A中所描繪：人類IgG1 Fc、(G4S)₂連接子、人類4-1BB配位體、(G4S)₂連接子、人類4-1BB配位體。將含有4-1BB配位體之一個胞外域之多肽在框架中次選殖至人類IgG1 Fc杵或白鏈之C端，如圖9B中所描述：人類IgG1 Fc、(G4S)₂連接子、人類4-1BB配位體。

在具有杵之恆定重鏈或人類IgG1之恆定輕鏈的框架中次選殖編碼對PD1，純系0314具有特異性之結合子之重鏈及輕鏈DNA序列的可變區。

根據WO 2012/130831中所述之方法，將Pro329Gly、Leu234Ala及Leu235Ala突變引入杵及白重鏈之恆定區以消除與Fcγ受體之結合。

含有 Y349C/T366S/L368A/Y407V 突變之 huIgG1 白鏈、含有

S354C/T366W突變之抗PD1 huIgG1 杵鏈及抗PD1輕鏈之組合允許產生雜二聚體，其包括組裝之三聚4-1BB配位體及一個PD1結合Fab (圖9C及D，構築體7.11及7.12)。

表14展示單價的靶向PD1(0314)之含有4-1BB配位三聚體之Fc(kih)融合物分子構築體7.11 (具有一個抗PD1 Fab、在Fc白鏈之C端融合之二聚4-1BB配位體及在Fc杵鏈之C端融合之單體4-1BB配位體之PD1裂解型三聚體)之cDNA及胺基酸序列。

表 14：單價的靶向PD1(0314)之含有人類4-1BB配位體(71-248)之Fc(kih)融合物分子(構築體7.11)之序列

SEQ ID NO:	描述	序列
145	Fc白二聚配位體(71-248)鏈之核苷酸序列	GACAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACC TGAAGCTGCAGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCC CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GCCCTCGGCGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCAC CCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACC AGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG CAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGT GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCGTGAGCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT CCGGGTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGAT

		<p>CCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCT GCCGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGC CCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGG CCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGG CGTGTCCTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGG ACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTG TACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGCAGGAGAGTG GTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCC CTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCC GCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCC AGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAA GGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGAC ACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTG GGCCTGTTTACAGAGTGACCCCGAGATTCCAGCAGG CCTGGGAGGCGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTA GAGAAGGACCCGAGCTGTCCCCGACGATCCCGCT GGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGCATGTTTCGCTCAG CTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCT CTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGT GTCCCTGACTGGGGGACTGTCTACAAAGAAGATAC AAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACT ATGTGTTTTTTCAGCTGGAAGTGCAGGCGGGTGGTGG CTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGC ATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGGGCTGCA GCACTGGCCCTGACTGTGGACCTGCCCCAGCTTCT TCCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGG ACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGG GAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATG CTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGA CTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCAGCCGGGCTC</p>
144	與單體 hu 4-1BBL (71-248) 融合之抗 PD1(0314) Fc 杵鏈之核苷酸序列	參見表13

134	抗PD1(0314)輕鏈之核苷酸序列	參見表8
88	Fc白二聚配位體(71-248)鏈	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPISRDELTKNQVSL CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQG MFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYK EDTKELVAKAGVYYVFFQLELRVAVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQG RLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGL FRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDL RQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGL SYKEDTKELVAKAGVYYVFFQLELRVAVAGEGSGSV SLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVL GLFRVTPEIPAGL
87	與單體 hu 4-1BBL (71-248) 融合之抗 PD1(0314) Fc 杵鏈	參見表13
83	抗PD1(0314)輕鏈	參見表8

表15展示單價的靶向PD1(0314)之含有4-1BB配位三聚體之Fc(kih)融合物分子構築體7.12 (具有一個抗PD1 Fab、在Fc白鏈之C端融合之二聚4-1BB配位體及在Fc杵鏈之C端融合之單體4-1BB配位體之PD1裂解型三聚體)之cDNA及胺基酸序列。

表 15：單價的靶向 PD1(0314) 之含有人類 4-1BB 配位體 (71-248) 之 Fc (kih) 融合物分子(構築體 7.12) 之序列

SEQ ID NO:	描述	序列
146	Fc白單體配位體(71-	GACAAACTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACC

248) 鏈之核苷酸序列		<p>TGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCC CCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GCCCTCGGCGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCAC CCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACC AGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG CAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGT GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCGTGAGCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT CCGGGTAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGA TCCTGCCGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTT TGCCCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGA TGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGC TGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAG AGGACACCAAAGAAGTGGTGGTGGCCAAGGCCGGC GTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGCAGGAGA GTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTG GCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGC GCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCT GCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTT CAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAG GCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTA GACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTG CTGGGCCTGTTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCTGCC GGGCTC</p>
147	與二聚 hu 4-1BBL	GAAGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGGGGACTGGT

(71-248) 融合之抗-PD1(0314) Fc 杵鏈之核苷酸序列	CCAGCCCGGCGGTTCCCTGAGGCTGTCTTGCGCCGC TTCAGGGTTCAGCTTTTCCTCTTACACCATGAGTTGG GTCAGACAGGCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGT CGCCACAATCAGCGGTGGCGGGCGGACATTTATTA CCCAGATTCCGTGAAAGGACGGTTCACCATCTCTAG GGACA ACTCAAAGAATACTCTGTATTTGCAGATGAA CAGCCTGAGAGCTGAGGATACAGCAGTTTACTACTG TGTGCTCCTGACCGGCCGCGTCTATTTTGCCCTTGAC TCCTGGGGACAAGGCACTCTGGTGACCGTATCTAGT GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA CCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC GGTGACGGTGTCTGTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC CCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA ACTCA CACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCTGCAG GGGGACCGTCAGTCTTCCCTTCCCCCAAACCCA AGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA CCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCC TGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCT GTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCAGCGATAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGA ACA ACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGC GACGGCAGCTTCTTCCCTGTACTCCA AACTGACCGTG GACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTT CAG
-------------------------------------	--

		<p>CTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACT ACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAGA GAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAGCT GGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCT GTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTC ACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCA AAGAAGTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTAC GTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGC GGAGAGTGGTGGC CGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCA TCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGC TCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAG CGAGGCCCGGAATAGCGCATTGTTGGTTC AAGGCAG GCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAG TGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCC TGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCT GTTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCAGGCCTGG GAGGCGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAA GGACCCGAGCTGTCCCCCGACGATCCCGCTGGGCT GCTGGATCTGAGACAGGGCATGTTTCGCTCAGCTGGT GGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAG CTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCT GACTGGGGGACTGTCCCTACAAAGAAGATACAAAAG AACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGT TTTTTCAGCTGGAAGTGCAGGCGGGTGGTGGCTGGG GAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTG CAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGGGCTGCAGCACT GGCCCTGACTGTGGACCTGCCCCAGCTTCTTCCGA GGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTC AAGGACGCC TGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTG CATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGG CAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTT TCGCGTGACACCTGAGATCCAGCCGGGCTC</p>
134	抗PD1(0314)輕鏈之 核苷酸序列	參見表8

89	Fc 單體配位體(71-248)鏈	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSL CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNV LLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA AGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAA GAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQR LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
90	與二聚 hu 4-1BBL (71-248) 融合之抗 PD1(0314) Fc 杵鏈	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSSSYTMSWV RQAPGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWG QGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA AGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAA GAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQR LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGG GSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNV LLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA AGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAA GAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQR LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
83	抗PD1(0314)輕鏈	參見表8

2.8 具有在各重鏈之 C 端融合之二聚及單體 4-1BB 配位體之單價的靶向

PD1(0314)之含有4-1BB配位(71-248)三聚體之Fc(kih)融合物抗原結合分子(杵鏈上之抗PD1，構築體7.13及7.14)之製備

將含有由(G4S)₂連接子分離之4-1BB配位體之兩個胞外域之多肽在框架中次選殖至人類IgG1 Fc白或杵鏈之C端，如圖9A中所描繪：人類IgG1 Fc、(G4S)₂連接子、人類4-1BB配位體、(G4S)₂連接子、人類4-1BB配位體。將含有4-1BB配位體之一個胞外域之多肽在框架中次選殖至人類IgG1 Fc杵或白鏈之C端，如圖9B中所描述：人類IgG1 Fc、(G4S)₂連接子、人類4-1BB配位體。

在具有白之恆定重鏈或人類IgG1之恆定輕鏈的框架中次選殖編碼對PD1，純系0314具有特異性之結合子之重鏈及輕鏈DNA序列的可變區。

根據WO 2012/130831中所述之方法，將Pro329Gly、Leu234Ala及Leu235Ala突變引入杵及白重鏈之恆定區以消除與Fc γ 受體之結合。

含有Y349C/T366S/L368A/Y407V突變之抗PD1 huIgG1白鏈、含有S354C/T366W突變之huIgG1杵鏈及抗PD1輕鏈之組合允許產生雜二聚體，其包括組裝之三聚4-1BB配位體及一個PD1結合Fab (圖10A及B，構築體7.13及7.14)。

表16展示單價的靶向PD1(0314)之含有4-1BB配位三聚體之Fc(kih)融合物分子構築體7.13 (具有一個抗PD1 Fab、在Fc白鏈之C端融合之二聚4-1BB配位體及在Fc杵鏈之C端融合之單體4-1BB配位體之PD1裂解型三聚體)之cDNA及胺基酸序列。

表 16：單價的靶向PD1(0314)之含有人類4-1BB配位體(71-248)之Fc(kih)融合物分子(構築體7.13)之序列

SEQ ID NO:	描述	序列
143	抗PD1(0314) Fc白二聚配位體 (71-248)鏈之核苷酸序列	參見表13
148	與單體hu 4-1BBL (71-248)融合之Fc杵鏈之核苷酸序列	GACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACC TGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCC CCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GCCCTCGGCGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC CCTGCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACC AGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACC CCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGC CAGCCTGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGT GCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAA ACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCA ACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTG CACAACCACTACACCAGAAGTCCCTGAGCCTGAG CCCCGGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGA TCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCT GCCGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGC CCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGG CCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGG CGTGTCCTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGG ACACCAAAGAAGTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTG TACTACGTGTTCTTTTCAGCTGGAAGTGCAGGAGAGTG GTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCC

		CTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCC GCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCC AGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTGTTGGGTTTCAA GGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGAC ACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTG GGCCTGTTACAGAGTGACCCCGAGATTCCTGCCGGG CTC
134	抗PD1(0314)輕鏈 之核苷酸序列	參見表8
86	抗PD1(0314) Fc白 二聚配位體 (71- 248)鏈	參見表13
91	與單體hu 4-1BBL (71-248)融合之Fc 杵鏈	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQG MFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYK EDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRRVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQG RLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGL FRVTPEIPAGL
83	抗PD1(0314)輕鏈	參見表8

表17展示單價的靶向PD1(0314)之含有4-1BB配位三聚體之Fc(kih)融合物分子構築體7.14 (具有一個抗PD1 Fab、在Fc白鏈之C端融合之二聚4-1BB配位體及在Fc杵鏈之C端融合之單體4-1BB配位體之PD1裂解型三聚體)之cDNA及胺基酸序列。

表17：單價的靶向PD1(0314)之含有人類4-1BB配位體(71-248)之Fc(kih)融合物分子(構築體7.14)之序列

SEQ ID NO:	描述	序列
149	抗PD1(0314) Fc白 單體配位體 (71- 248)鏈之核苷酸序 列	GAAGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGGGGACTGGT CCAGCCCGGCGGTTCCCTGAGGCTGTCTTGCGCCGC TTCAGGGTTCAGCTTTTCTCTTACACCATGAGTTGG GTCAGACAGGCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGT CGCCACAATCAGCGGTGGCGGGCGCGACATTTATTA CCCAGATTCCGTGAAAGGACGGTTCACCATCTCTAG GGACA ACTCAAAGAATACTCTGTATTTGCAGATGAA CAGCCTGAGAGCTGAGGATACAGCAGTTTACTACTG TGTGCTCCTGACCGGCCGCGTCTATTTTGCCCTTGAC TCCTGGGGACAAGGCACTCTGGTGACCGTATCTAGT GCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCC CCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGC TCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCC CGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCT CCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTT CTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGC CTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAATC ACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCTGCA GGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCC AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCG CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCC ATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCC TCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG

		<p>AACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC CGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGA GGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGG GCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGACTGC TGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAGCTGGTG GCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCC TGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTG ACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGA ACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTT CTTTCAGCTGGA ACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCG AAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGC AGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGG CACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAG GCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTG CTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCA TCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGC AGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTC AGAGTGACCCCCGAGATTCTGCCGGGCTC</p>
150	與二聚 hu 4-1BBL (71-248) 融合之 Fc 杵鏈之核苷酸序列	<p>GACAAA ACTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACC TGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCC CCCAA AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GCCCTCGGCGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC CCTGCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACC AGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACC CCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGC</p>

		<p>CAGCCTGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGT GCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAA ACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCA ACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTG CACAACCACTACACCAGAAGTCCCTGAGCCTGAG CCCCGGCGGAGGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGA TCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCT GCCGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGC CCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGG CCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGG CGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGG ACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTG TACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGCAGGAGAGTG GTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCC CTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCC GCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCC AGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAA GGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGAC ACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTG GGCCTGTTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCAGG CCTGGGAGGCGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTA GAGAAGGACCCGAGCTGTCCCCGACGATCCCGCT GGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGCATGTTTCGCTCAG CTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCT CTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGT GTCCCTGACTGGGGGACTGTCCACAAAGAAGATAC AAAAGAAGTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACT ATGTGTTTTTTCAGCTGGAAGTGCAGGCGGGTGGTGG CTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGC ATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGGGCTGCA GCACTGGCCCTGACTGTGGACCTGCCCCAGCTTCT TCCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGG ACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGG GAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCCGGCATG</p>
--	--	---

		CTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGA CTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCAGCCGGGCTC
134	抗 PD1(0314) 輕鏈 之核苷酸序列	參見表8
92	抗PD1(0314) Fc 白 單體配位體 (71- 248)鏈	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMSWV RQAPGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWG QGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP IEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQ LVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTK ELVVAKAGVYYVFFQLELRRRVAGEGSGSVSLALHLQ PLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVT PEIPAGL
93	與二聚 hu 4-1BBL (71-248) 融合之 Fc 杵鏈	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQG MFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYK EDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRRVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQG RLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGL FRVTPEIPAGLGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDL RQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGL

		SYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRRVVAGEGSGSV SLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVL GLFRVTPEIPAGL
83	抗PD1(0314)輕鏈	參見表8

2.9 未經靶向之含有人類4-1BB配位三聚體之Fc融合物抗原結合分子(對照分子)之製備

如上文關於靶向PD1之抗原結合分子所描述製備對照分子，唯一不同之處在於經不結合於抗原之稱為DP47之生殖系對照置換抗PD1結合子(VH及VL)。

對照B係含有CH-CL交換型物及帶電殘基之未經靶向單價的裂解型三聚人類4-1BB配位體(71-254) Fc(kih)抗原結合分子(圖11A)。然而，與構築體7.1相對應，PD1結合子之重鏈及輕鏈DNA序列之可變區經生殖系對照(DP47)之該等重鏈及輕鏈DNA序列之可變區置換且在框架中用白之恆定重鏈或人類IgG1之恆定輕鏈次選殖。

二價變異體對照C (圖11B)與二價構築體7.3及7.6類似來製備且單價變異體對照D (圖11C)與構築體7.3 (含有4-1BB配位(71-248)三聚體)類似來製備，唯一不同之處在於經生不結合於抗原之稱為DP47之殖系對照置換抗PD1結合子(VH及VL)。

表18展示在含有4-1BB配位體之臂中具有CH1-CL交換型物及帶電殘基之未靶向DP47之含有4-1BB配位(71-254)三聚體之Fc (kih)融合物抗原結合分子(對照B)之cDNA及胺基酸序列。

表18：未靶向DP47之含有4-1BB配位(71-254)三聚體之Fc (kih)融合物抗原結合分子(DP47裂解型4-1BBL三聚體)對照B之序列

SEQ ID NO:	描述	序列

131	二聚 hu 4-1BBL (71-254) - CL* Fc 杵鏈之核苷酸序列	參見表8
132	單體 hu 4-1BBL (71-254) - CH1*之 核苷酸序列	參見表8
151	DP47 Fc白鏈之核 苷酸序列	<p>GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT ACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTG GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGG TCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTA CGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCA GAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGA ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACT GTGCGAAAGGCAGCGGATTTGACTACTGGGGCCAA GGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAA GGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTG AGCCCAAATCTTGTGACAAAACACTCACACATGCCAC CGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCA GTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA GGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGA AAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA</p>

		<p>CCACAGGTGTGCACCCTGCCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGT CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGA CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA</p>
152	DP47 輕鏈之核苷酸序列	<p>GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCT TTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAG GGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTG GTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCC TCATCTATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCC CAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGAC TTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGAT TTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCAC CGCTGACGTTCCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAATC AAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTACC TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG AGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTC CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCA GGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCA CCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG AGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT</p>
74	二聚 hu 4-1BBL (71-254) - CL* Fc 杵鏈	參見表8
75	單體 hu 4-1BBL (71-254) - CH1*	參見表8
153	DP47 Fc白鏈	<p>EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN</p>

		SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGSDFDYWGQGL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
154	DP47輕鏈	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGGSSPLTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

表19展示二價的未靶向DP47之裂解型三聚4-1BB配位體(71-254) Fc (kih)融合物分子對照C之cDNA及胺基酸序列。

表19：二價的未靶向DP47之含有人類4-1BB配位體(71-254)之Fc (kih)融合物分子對照C之序列

SEQ ID NO:	描述	序列
155	與二聚 hu 4-1BBL (71-254) 融合之 DP47 Fc白鏈之核苷酸序列	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT ACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTG GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGG TCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTA CGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCA GAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGA ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACT GTGCGAAAGGCAGCGGATTTGACTACTGGGGCCAA GGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAA

		<p>GGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAA GAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCC TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGT CCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCAC ACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTAT AGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGC CTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGG AGCCCAAGAGCTGCGACAAAACCTCACACATGCCCA CCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTC AGTCTTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCT CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA ACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCATCCCGGGATGA GCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAG TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGACAACACTACAAG ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGC GGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGA GCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGC AGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTG CTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCTTGGTACAGCGAT CCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCT GAGCTACAAAGAGGACACCAAGAAGTGGTGGTGG CCAAGGCCGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGG</p>
--	--	--

		<p>AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGC TCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGA AGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGT GGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAG CGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTC TGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAG AGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAG GGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTTCAGAGTGACCCCC GAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGA AGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAG AGGGACCCGAAGTGTCCCCTGACGATCCAGCCGGG CTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTCCGCCAGCTG GTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTG AGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTC CCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAA AAGAAGTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATG TGTTTTTTCAGCTGGAAGTGGAGGCGGGTGGTGGCTG GGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATC TGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCAC TGGCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGCCTCTAGCG AGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCGAAGGACGC CTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGT GCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTG GCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGT TTCGCGTGACACCTGAGATCCCTGCCGGACTGCCAA GCCCTAGATCAGAA</p>
156	與單體 hu 4-1BBL (71-254) 融合之 DP47 Fc 杵鏈之核苷酸序列	<p>GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT ACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTG GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGG TCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTA CGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCA GAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGA ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACT GTGCGAAAGGCAGCGGATTTGACTACTGGGGCCAA</p>

		<p>GGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAA GGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTG AGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCAC CGTGCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCA GTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA GGTCTCCAACAAGCCCTCGGCGCCCCATCGAGA AAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCTGCAGAGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTC AAGGGCTTCTACCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACACTACAAGAC CACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTT CCTGTACTCCAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGT GGCAGCAGGGCAACGTGTTTACGCTGCAGCGTGATG CACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTC CCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGGCGGCGGAAGCG GAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGC CCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAG GGCATGTTTGTCTCAGCTGGTGGCCAGAACGTGCTG CTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCT GGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAG CTACAAAGAGGACACCAAAGAAGTGGTGGTGCCA</p>
--	--	---

		AGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTTCAGCTGGAAC TGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGC GCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGAT CTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCA TTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCC GGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGC CAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCG CTACAGTGCTGGGCCTGTTTCAGAGTGACCCCCGAGA TTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA
152	DP47 輕鏈之核苷酸序列	參見表18
157	與二聚 hu 4-1BBL (71-254) 融合之 DP47 Fc 白鏈	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGSDFDYWGQGT LTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGLVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG GGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVA QNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLR SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSA GQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIP AGLPSRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLR QGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLS YKEDTKELV VAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVS LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVL GLFRVTPEIPAGLPSRSE

158	與單體 hu 4-1BBL (71-254) 融合之 DP47 Fc 杵鏈	EVQLLES GGGGLVQP GGSRLR LSCAASGFT FSSYAMSWV RQAPGK GLEWVSAISGSG GSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAK GSGFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLV AQNVL LIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKEL VVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPL RSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLS AGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEI PAGLPSRSE
154	DP47 輕鏈	參見表 18

表 20 分別展示含有 CH-CL 交叉物及帶電殘基之單價未靶向 DP47 之裂解型三聚 4-1BB 配位體 (71-248) Fc (kih) 融合物、對照 D 之 cDNA 及胺基酸序列。

表 20：具有 CH-CL 交叉物及帶電殘基之單價的未靶向 DP47 之裂解型三聚人類 4-1BB 配位體 (71-248) Fc (kih) 融合物 (對照 D) 之 cDNA 及胺基酸序列。*帶電殘基

SEQ ID NO:	描述	序列
139	二聚 hu 4-1BBL (71-248) - CL* Fc 杵鏈之核苷酸序列	參見表 11
140	單體 hu 4-1BBL (71-248) - CH1* 之核苷酸序列	參見表 11
151	核苷酸序列 DP47 Fc 白鏈	參見表 18
152	核苷酸序列 DP47 輕鏈	參見表 18
78	二聚 hu 4-1BBL (71-254) - CL* Fc 杵鏈	參見表 11
79	單體 hu 4-1BBL (71-254) - CH1*	參見表 11

153	DP47 Fc 白鏈	參見表18
154	DP47 輕鏈	參見表18

2.10 製備作為對照之人類IgG1抗原結合分子

用於分析之另一對照分子(對照F)係未經靶向之DP47、生殖系對照、人類IgG1，其含有Pro329Gly、Leu234Ala及Leu235Ala突變以消除與Fc γ 受體之結合，根據國際專利申請公開案第WO 2012/130831號中描述之方法。

表21展示未經靶向之DP47 huIgG1 PGLALA (對照F)之cDNA及胺基酸序列。

表21：未經靶向之DP47 huIgG1 (對照F)之序列

SEQ ID NO:	描述	序列
159	DP47 重鏈 (hu IgG1 PGLALA) 之核苷酸序列	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT ACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTG GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGG TCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTA CGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCA GAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGA ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACT GTGCGAAAGGCAGCGGATTTGACTACTGGGGCCAA GGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTG AGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCAC

		<p>CGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCA GTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA GGTCTCCAACAAAGCCCTCGGGCGCCCCATCGAGA AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGT CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGA CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA</p>
152	DP47輕鏈之核苷酸 序列	參見表18
160	DP47重鏈(hu IgG1 PGLALA)	<p>EVQLLESGLLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGSDFDYWGQGLT VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K</p>
154	DP47輕鏈	參見表18

表22展示抗PD1 huIgG1 PGLALA (純系0314)，亦即對照M之cDNA及胺基酸序列。

表22：抗PD1 (0314)huIgG1 PGLALA (對照M)之cDNA及胺基酸序列

SEQ ID NO:	描述	序列
161	PD1(0314) 重 鏈 (huIgG1 PGLALA)之核苷酸序列	GAAGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGGGG ACTGGTCCAGCCCGGCGGTTCCCTGAGGC TGTCTTGCGCCGCTTCAGGGTTCAGCTTTT CCTCTTACACCATGAGTTGGGTCAGACAGG CACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTCGCC ACAATCAGCGGTGGCGGGCGCGACATTTAT TACCAGATTCCGTGAAAGGACGGTTCACC ATCTCTAGGGACA ACTCAAAGAATACTCTG TATTTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCTGAG GATACAGCAGTTTACTACTGTGTGCTCCTG ACCGGCCGCGTCTATTTTGCCCTTGACTCC TGGGGACAAGGCACTCTGGTGACCGTATCT AGTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTC CCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCT GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG TGTCGTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGC GGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAG TCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAA GCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA ACTCAC ACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGC TGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCC CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC CCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA

		GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGA CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCC ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC TGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAG AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACT CCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGC TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
134	抗PD1(0314)輕鏈之核苷酸 序列	參見表8
162	PD1(0314) 重 鏈 (huIgG1 PGLALA)	EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSS YTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRDIYYP DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCVLLTGRVYFALDSWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
83	抗PD1(0314)輕鏈	參見表8

實例3

單價及二價的靶向抗PD1之裂解型三聚4-1BB配位體Fc融合物抗原結合分子及對照分子之製造及純化

將經靶向及未經靶向之裂解型三聚4-1BB配位體Fc (kih)融合物分子編碼序列選殖至質體載體中，該質體載體驅動插入物自MPSV啟動子之表現且含有位於在CDS之3'端處的合成polyA序列。另外，載體含有用於質體之游離型維護之EBV OriP序列。

藉由使用聚乙烯亞胺共轉染HEK293-EBNA細胞及哺乳動物表現載體來製造裂解型三聚4-1BB配位體Fc(kih)融合物分子。用相應表現載體轉染細胞。對於構築體7.1、7.2、7.4、7.6及相對照分子對照B及D，係在1:1:1:1之比率下(「載體Fc白鏈」:「載體PD1輕鏈」:「載體Fc杵鏈」:「載體4-1BBL輕鏈」)。對於構築體7.3、7.6、7.11、7.12、7.13、7.14及對照C，係在1:1:1之比率下(「載體Fc白鏈」:「載體Fc杵鏈」:「載體抗PD1輕鏈」)。對於雙特異性構築體製造在分析中用作對照之人類IgG (僅對於轉染，使用1:1比率之用於輕鏈之載體及用於重鏈之載體)。

關於在500 mL搖瓶中製造，在轉染之前24小時接種3億個HEK293 EBNA細胞。對於轉染，細胞在210 x g下離心10分鐘，且用20 mL預溫熱CD CHO培養基置換上清液。在20 mL CD CHO培養基中混合表現載體(200 µg完全DNA)。在添加540 µL PEI之後，使溶液渦動15秒且在室溫下培育10分鐘。隨後，將細胞與DNA/PEI溶液混合，轉移至500mL搖瓶中且在具有5% CO₂氛圍的培育箱中在37°C下培育3小時。在培育之後，添加補充有6 mM L-麩醯胺酸、5 g/L PEPSOY及1.2 mM丙戊酸之160 mL Excell培養基且培養細胞24小時。在轉染之後一天，添加12% Feed 7及葡

葡萄糖(最終濃度3 g/L)。在培養7天之後，藉由在至少400 x g下離心30-40分鐘來收集上清液。將溶液無菌過濾(0.22 μm 過濾器)，補充疊氮化鈉至最終濃度係0.01% (w/v)，且保持在4°C下。

藉由親和層析，使用蛋白A，隨後尺寸排阻層析，自細胞培養物上清液純化所分泌之蛋白質。對於親和層析，將上清液裝載於MabSelect Sure管柱(CV = 5 - 15 mL，來自GE Healthcare之樹脂)上，用磷酸鈉(20 mM)、檸檬酸鈉(20 mM)緩衝劑(pH 7.5)平衡。藉由用至少6倍管柱體積之相同緩衝劑洗滌來移除未結合之蛋白質。用20 mM檸檬酸鈉、100 mM氯化鈉、100 mM甘胺酸緩衝劑(pH 2.5)，使用線性梯度(20 CV)或分步溶離(8 CV)來溶離結合之蛋白質。對於線性梯度，應用額外的4倍管柱體積分步溶離。

藉由添加1/10 (v/v) 0.5 M磷酸鈉，pH 8.0來調節所收集之溶離份之pH值。在裝載於用20 mM組胺酸、140 mM氯化鈉、0.01% (v/v)Tween20溶液(pH 6.0)平衡之HiLoad Superdex 200管柱(GE Healthcare)之前濃縮蛋白質。

藉由量測280 nm下之光學密度(OD)，使用基於胺基酸序列計算之莫耳消光係數來測定蛋白質濃度。藉由在存在及不存在還原劑(5 mM 1,4-二硫蘇糖醇)之情況下進行SDS-PAGE且用Coomassie SimpleBlue™ SafeStain (Invitrogen USA)染色或使用Caliper LabChip GXII (Perkin Elmer)進行CE-SDS來分析經靶向之三聚4-1BB配位體Fc (kih)融合物之純度及分子量。在25°C下，使用在25 mM K_2HPO_4 、125 mM NaCl、200 mM L-精胺酸單鹽酸鹽、0.02% (w/v) NaN_3 ，pH 6.7操作緩衝劑中平衡之TSKgel G3000 SW XL分析型尺寸排阻管柱(Tosoh)分析樣品之聚集物含

量。

表23概述靶向及未靶向FAP(4B9)之含有4-1BB配位三聚體之Fc (kih)融合物抗原結合分子及對照分子之產量及最終單體含量。

表23 靶向及未靶向PD1之含有4-1BB配位三聚體Fc (kih)融合物抗原結合分子及對照分子之生物化學分析

構築體	單體[%] (SEC)	產量 [mg/l]
構築體7.1	97.2	110.2
構築體7.3	96.6	8.9
構築體7.5	85	5.1
構築體7.6	100	16.5
對照B	99	15.4
對照C	98	12.6
對照D	99.5	25.9
對照M	99	34.4
對照F	100	50

實例4

藉由表面電漿子共振進行靶向PD1之4-1BB裂解型三聚配位體Fc融合物抗原結合分子之同時結合

4.1用於表面電漿子共振之抗原的製備、純化及表徵

製備4-1BB Fc(kih)融合物分子

在具有杆上之人類IgG1重鏈CH2及CH3結構域的框架中次選殖編碼人類4-1BB之胞外域的DNA序列(根據Q07011之人類4-1BB之胺基酸24至186，SEQ ID NO:163)。在抗原胞外域與人類IgG1之Fc之間引入AcTEV蛋白酶裂解位點。在抗原-Fc杆之C端引入用於引導生物素標記之Avi標籤。含有S354C/T366W突變之抗原-Fc杆鏈與含有Y349C/T366S/L368A/Y407V突變之Fc白鏈之組合允許產生雜二聚體，其

包括含有4-1BB胞外域之鏈之單一複本，因此產生Fc連接之抗原之單體形式。表24展示抗原Fc-融合物構築體之cDNA及胺基酸序列。

表24：單體抗原Fc (kih)融合分子之cDNA及胺基酸序列

SEQ ID NO:	抗原	序列
164	Fc白鏈之核苷酸序列	GACAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTG AACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCA AAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCA TCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCG AGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCATCCCGGGAT GAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAG TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCT CGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCGGGTA
165	人類4-1BB 抗原Fc杵鏈之核苷酸序列	CTGCAGGACCCCTGCAGCAACTGCCCTGCCGGCACCT TCTGCGACAACAACCGGAACCAGATCTGCAGCCCCTG CCCCCAACAGCTTCAGCTCTGCCGGCGGACAGCGG ACCTGCGACATCTGCAGACAGTGCAAGGGCGTGTTCA GAACCCGGAAAGAGTGCAGCAGCACCAGCAACGCCG AGTGCGACTGCACCCCGGCTTCCATTGTCTGGGAGCC GGCTGCAGCATGTGCGAGCAGGACTGCAAGCAGGGCC AGGAACTGACCAAGAAGGGCTGCAAGGACTGCTGCTT CGGCACCTTCAACGACCAGAAGCGGGGCATCTGCCGG CCCTGGACCAACTGTAGCCTGGACGGCAAGAGCGTGC

		<p>TGGTCAACGGCACCAAAGAACGGGACGTCTGTGTGCGG CCCCAGCCCTGCTGATCTGTCTCCTGGGGCCAGCAGCG TGACCCCTCCTGCCCCTGCCAGAGAGCCTGGCCACTCT CCTCAGGTCGACGAACAGTTATATTTTCAGGGCGGCTC ACCCAAATCTGCAGACAAAACCTCACACATGCCACCG TGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACG TGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC CCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCC TGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCCGGAGGCCTGA ACGACATCTTCGAGGCCCAGAAGATTGAATGGCACGA G</p>
166	Fc白鏈	<p>DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
167	人類4-1BB抗原 Fc杵鏈	<p>LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCD ICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMC EQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCS LDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAR</p>

		EPGHSPQVDEQLYFQGGSPKSADKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE
--	--	---

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

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

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

藉由親和層析，使用蛋白A，隨後尺寸排阻層析，自細胞培養物上清

液純化所分泌之蛋白質。對於親和層析，將上清液裝載於經40 mL 20 mM 磷酸鈉、20 mM檸檬酸鈉(pH 7.5)平衡之HiTrap ProteinA HP管柱(CV = 5 mL, GE Healthcare)上。藉由用至少10倍管柱體積之含有20 mM磷酸鈉、20 mM檸檬酸鈉、0.5 M氯化鈉之緩衝劑(pH 7.5)洗滌來移除未結合之蛋白質。使用經20倍管柱體積之20 mM檸檬酸鈉、0.01% (v/v)Tween-20 (pH 3.0)產生之氯化鈉之線性pH梯度(0至500 mM)來溶離結合之蛋白質。接著用10倍管柱體積之20 mM檸檬酸鈉、500 mM氯化鈉、0.01% (v/v) Tween-20 (pH 3.0)洗滌管柱。

藉由添加1/40 (v/v) 2 M Tris (pH 8.0)來調節所收集之溶離份之pH值。在裝載於用2 mM MOPS、150 mM氯化鈉、0.02% (w/v)疊氮化鈉溶液(pH 7.4)平衡之HiLoad Superdex 200管柱(GE Healthcare)之前濃縮蛋白質。

關於人類受體之親和力測定，亦在具有 avi (GLNDIFEAQKIEWHE, SEQ ID NO:168)及六組胺酸標籤之框架中次選殖人類4-1BB之胞外域。

如上文針對Fc融合蛋白所述進行蛋白質製造。藉由螯合層析，隨後尺寸排阻層析自細胞培養物清液層純化所分泌之蛋白質。在用20 mM磷酸鈉、500 nM氯化鈉(pH 7.4)平衡之NiNTA Superflow濾筒(5 ml, Qiagen)上進行第一層析步驟。藉由經12倍管柱體積施用5%至45%溶離緩衝劑(20 mM磷酸鈉、500 nM氯化鈉、500 mM咪唑，pH 7.4)之梯度來進行溶離。在裝載於用2 mM MOPS、150 mM氯化鈉、0.02% (w/v)疊氮化鈉溶液(pH 7.4)平衡之HiLoad Superdex 75管柱(GE Healthcare)之前濃縮蛋白質且過濾(表25)。

表25：單體人類4-1BB His分子之序列

SEQ ID NO:	抗原	序列
169	人類 4-1BB His之核苷酸序列	CTGCAGGACCCCTGCAGCAACTGCCCTGCCGGCACCTTCT GCGACAACAACCGGAACCAGATCTGCAGCCCCTGCCCCCC CAACAGCTTCAGCTCTGCCGGCGGACAGCGGACCTGCGAC ATCTGCAGACAGTGCAAGGGCGTGTTCAGAACCCGGAAAG AGTGCAGCAGCACCAGCAACGCCGAGTGCGACTGCACCCC CGGCTTCCATTGTCTGGGAGCCGGCTGCAGCATGTGCGAGC AGGACTGCAAGCAGGGCCAGGAACTGACCAAGAAGGGCT GCAAGGACTGCTGCTTCGGCACCTTCAACGACCAGAAGCG GGGCATCTGCCGGCCCTGGACCAACTGTAGCCTGGACGGC AAGAGCGTGCTGGTCAACGGCACCAAAGAACGGGACGTC GTGTGCGGCCCCAGCCCTGCTGATCTGTCTCCTGGGGCCAG CAGCGTGACCCCTCCTGCCCTGCCAGAGAGCCTGGCCAC TCTCCTCAGGTCGACGAACAGTTATATTTTCAGGGCGGCTC AGGCCTGAACGACATCTTCGAGGCCCAGAAGATCGAGTGG CACGAGGCTCGAGCTCACCACCATCACCATCAC
170	人類 4-1BB His	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICR QCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCK QGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLV NGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQVDEQL YFQGGSLNDIFEAQKIEWHEARAHHHHHH

人類PD1 Fc融合抗原購自R&D systems (目錄號1086-PD-050)。

4.2藉由表面電漿子共振測定經靶向C端4-1BB裂解型三聚配位體Fc融合物 抗原結合分子之同時結合

藉由表面電漿子共振(SPR)評定同時結合人類4-1BBFc (kih)及人類PD1之能力。所有SPR實驗均在Biacore T200上在25°C下以HBS-EP作為操作緩衝劑(0.01 M HEPES pH 7.4、0.15 M NaCl、3 mM EDTA、0.005%界面活性劑P20, Biacore, Freiburg/Germany)來進行。

經生物素標記之人類4-1BB Fc (kih)與抗生蛋白鏈菌素(SA)感測器晶

片之流通槽直接偶合。使用至多200個共振單位(RU)之固定程度。使200 nM之濃度範圍之經靶向三聚C端4-1BB配位體Fc(kih)融合物分子以30 μ L/分鐘之流量流經流通槽90秒，且將解離設定為零秒。濃度500 nM之人類PD1-Fc (R&D systems)作為第二分析物以30 μ L/分鐘之流量注射穿過流通槽90秒(圖12A)。監測解離120秒。藉由減去在參考流通槽(其中未固定蛋白質)中獲得之反應來校正整體折射率差異。全部雙特異性構築體均可同時結合於人類4-1BB及人類PD1 (圖12B、12C、12D及12E)。

實例5

靶向PD1之含有4-1BB配位三聚體之Fc融合物抗原結合分子之功能性表徵

5.1. 靶向PD1之含有4-1BB配位三聚體之Fc (kih)融合物抗原結合分子之新鮮且經活化之人類PMBC上之結合

自Zürich血液供給中心獲得白血球層。為分離新鮮的周邊血液單核細胞(PBMC)，用相同體積之DPBS (Gibco, Life Technologies, 目錄號14190 326)稀釋白血球層。提供50 mL聚丙烯離心管(TPP, 目錄號91050)及15 mL Histopaque 1077 (SIGMA Life Science, 目錄號10771, 聚蔗糖及泛影酸鈉, 調節至1.077 g/mL之密度)且經稀釋之白血球層內含物在Histopaque 1077上分層。使管在450 x g下離心30分鐘。接著, 自界面收集PBMC, 用DPBS洗滌三次且再懸浮於由以下組成之T細胞培養基中: 具有10% (v/v)胎牛血清(FBS, US-origin, PAN biotech, P30-2009, 批號P150307GI, γ 照射、無黴漿菌, 在56°C下熱不活化35分鐘)、1% (v/v) GlutaMAXI (GIBCO, Life Technologies, 目錄號35050038)、1 mM丙酮酸鈉(SIGMA, 目錄號S8636)、1% (v/v)MEM非必需胺基酸(SIGMA, 目

錄號M7145)及50 μ M β -巰基乙醇(SIGMA, M3148)之RPMI1640培養基(Gibco, Life Technology, 目錄號42401-042)。

在分離之後直接使用PBMC(結合於新鮮人類PBMC上)或刺激其以誘導T細胞之細胞表面上之4-1BB表現(結合於經活化之人類PBMC上)。為誘導人類T細胞上之4-1BB上調, 在具有10%胎牛血清(FBS, US-origin, PAN biotech, P30-2009, 批號P150307GI, γ 照射、無黴漿菌, 在56°C下熱不活化35分鐘)、1% GlutaMAX-I (GIBCO, life technologies, 目錄號35050-038)、200 U/mL Proleukin (Novartis Pharma Schweiz AG, CHCLB-P-476-700-10340, 批號AA4493BAL)及2 μ g/mL PHA-L (SIGMA, 目錄號L2769)之RPMI 1640 (GIBCO, life technologies, 目錄號42401-042)中以 1×10^6 個細胞/毫升之濃度培養PBMC 3天。在三天之後, 收集預活化之人類PBMC, 再懸浮於具有10% FBS、1 mM丙酮酸鈉 (SIGMA, 目錄號S8636)、1% Gluta-MAX-I、1% MEM-非必需胺基酸溶液(SIGMA, 目錄號M7145)及50 μ M β -巰基乙醇(Sigma M3148)之RPMI 1640中至最終濃度係 1×10^6 個細胞/毫升。之後, 將細胞接種於6孔組織培養盤(TTP, 目錄號92006)中, 該培養盤已在4°C下用10 μ g/mL抗人類CD3 (純系OKT3, 小鼠IgG2a, BioLegend, 目錄號317315)及2 μ g/mL抗人類CD28(純系CD28.2, 小鼠IgG1, BioLegend, 目錄號302923)塗佈隔夜。將細胞在37°C及5% CO₂下再培育2天。

對於結合分析, 將 0.1×10^6 個新鮮或經活化之PBMC添加至圓底懸浮細胞96孔盤(greiner bio-one, cellstar, 目錄號650185)之各孔中。培養盤用350 x g且在4°C下離心5分鐘, 且丟棄上清液。之後, 在4°C下在黑暗中用100微升/孔含有1:5000稀釋之可固定存活力染料eF660 (eBioscience,

目錄號65-0864-18)之DPBS染色細胞30分鐘。細胞用200 μ L冰冷DPBS緩衝劑洗滌一次。接下來，添加50微升/孔之含有滴定濃度之構築體7.1、構築體7.3、構築體7.5及構築體7.6及作為對照之對照B、對照C、對照D、對照M及對照F的4 $^{\circ}$ C冷FACS緩衝劑(具有2% FBS、5 mM EDTA pH8 (Amresco, 目錄號E177)及7.5 mM 疊氮化鈉(Sigma-Aldrich, 目錄號S2002)之DPBS), 且在4 $^{\circ}$ C下培育細胞60分鐘, 用200微升/孔4 $^{\circ}$ C FACS緩衝劑洗滌三次。將細胞進一步再懸浮於50微升/孔之含有0.67 μ g/ml抗人類CD45-AF488 (純系HI30, 小鼠IgG1k, BioLegend, 目錄號304019)、0.33 μ g/mL抗人類CD8a-BV510 (純系SK1, 小鼠IgG1k, BioLegend, 目錄號344732)、0.23 μ g/mL抗人類CD4-BV421 (純系OKT4, 小鼠IgG2b κ , BioLegend, 目錄號317434)、0.67 μ g/mL抗人類CD3-PerCP-Cy5.5 (純系UCHT1, 小鼠IgG1k, BioLegend, 目錄號300430)、0.67 μ g/mL抗人類CD19-PE/Cy7 (純系HIB19, 小鼠IgG1k, BioLegend, 目錄號302216)、5 μ g/mL PE結合之親和純化抗人類IgG F(ab')₂-片段特異性山羊F(ab')₂片段(Jackson ImmunoResearch, 目錄號109 116 098)之4 $^{\circ}$ C冷FACS緩衝劑中, 且在4 $^{\circ}$ C下培育30分鐘。細胞用200微升/孔4 $^{\circ}$ C FACS緩衝劑洗滌兩次, 且接著用具有1%甲醛(Sigma, HT501320-9.5L)之DPBS固定。使細胞再懸浮於100微升/孔之FACS緩衝劑中且使用MACS Quant分析儀10 (Miltenyi Biotech)獲取。使用FlowJo V10 (FlowJo, LLC)及GraphPad Prism 6.04 (GraphPad Software, Inc)分析數據。

將閘極設置於活的CD45⁺ CD3⁺ CD19^{陰性} CD8^{陰性} CD4⁺ T細胞、CD45⁺ CD3⁺ CD19^{陰性} CD4^{陰性} CD8⁺ T細胞、CD45⁺ CD3⁺ CD4^{陰性} CD8^{陰性} $\gamma\delta$ T細胞及CD45⁺ CD3^{陰性} CD19⁺ B細胞上且針對滴定濃縮之靶向PD1或

未靶向DP47之4-1BB裂解型三聚配位體Fc融合物抗原結合分子印跡結合PE之親和純化抗人類IgG IgGFc γ 片段特異性山羊F(ab')₂片段之螢光強度之幾何平均值。如圖13A-H中所示，關於來自健康供者之靜止之新鮮的分離之人類PBMC，僅靶向PD1之4-1BB裂解型三聚配位體Fc融合物抗原結合分子(構築體7.1、構築體7.3、構築體7.5及構築體7.6)及靶向PD1之人類IgG對照M結合於CD3⁺ CD4⁺、CD3⁺ CD8⁺及CD3⁺ CD4^{陰性} CD8^{陰性} $\gamma\delta$ T細胞。然而未靶向DP47之4-1BB裂解型三聚配位體Fc融合物抗原結合分子(對照B、C及D)不結合於任何新近分離之PBMC。因此，關於新近分離之人類PBMC，大多數細胞並不表現4-1BB，然而T細胞群體表現可偵測量之PD1。在表26中，概述新近分離之人類PBMC之結合曲線之EC₅₀值。

表26：新近分離之靜止人類PBMC之結合曲線之EC₅₀值

	對照M	構築體7.1	構築體7.3	構築體7.5	構築體7.6
活化之CD4 T細胞上之EC ₅₀ [nM]	0.03	0.13	0.11	0.28	0.11
活化之CD8 T細胞上之EC ₅₀ [nM]	0.07	0.21	0.17	0.38	0.19
活化之 $\gamma\delta$ T細胞上之EC ₅₀ [nM]	0.03	0.34	0.13	0.42	0.27

如圖14A-H中所示，在活化之後，活的CD45⁺ CD3⁺ CD19^{陰性} CD8^{陰性} CD4⁺ T細胞、CD45⁺ CD3⁺ CD19^{陰性} CD4^{陰性} CD8⁺ T細胞、CD45⁺ CD3⁺ CD4^{陰性} CD8^{陰性} $\gamma\delta$ T細胞及CD45⁺ CD3^{陰性} CD19⁺ B細胞表現人類4-1BB及人類PD1。由此僅PD1結合分子(對照M)或僅人類4-1BB結合分子(對照B、對照C及對照D)證明在活化之CD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞及B細胞上PD1高度上調，然而在CD8⁺ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞及B細胞上4-1BB主要上調且在CD4⁺ T細胞上較小程度上調。靶向PD1之4-1BB裂解型三聚配位體Fc融合物抗原結合分子(構築體7.1、構築體7.3、構築體7.5及構築體7.6)結合於PD1及人類4-1BB，且此由高於配合對照之螢光強度之幾何平均值

反映。在表27中，概述活化之人類PBMC之結合曲線之EC₅₀值。

表27：活化之人類PBMC之結合曲線的EC₅₀值

	對照B	對照C	對照D	對照M	構築體 7.1	構築體 7.3	構築體 7.5	構築體 7.6
活化之CD8 T細胞 上之EC ₅₀ [nM]	0.19	0.15	0.08	0.30	0.15	0.09	0.62	0.25
活化之CD4 T細胞 上之EC ₅₀ [nM]	0.43	0.25	0.15	0.33	0.32	0.15	1.32	0.33
活化之 $\gamma\delta$ T細胞上 之EC ₅₀ [nM]	0.20	0.16	0.09	0.71	0.12	0.12	0.52	0.32
活化之CD19細胞上 之EC ₅₀ [nM]	0.15	0.15	0.08	0.33	0.15	0.08	1.13	0.40

5.2 人類PD1及人類4-1BB轉染之腫瘤細胞之結合

對於表現PD1及4-1BB之腫瘤細胞之結合分析，使用兩個經遺傳修飾之腫瘤細胞。人類表現HeLa-hu4-1BB-NF κ B-luc純系26細胞之產生將描述於實例5.3.1中。對於表現人類PD1之腫瘤細胞株，如下用人類PD1轉染CHO-k1細胞：用編碼全長人類PD1之質體15311_hPD1-fl_pUC_Neo穩定轉染親本黏附CHO-K1細胞株(ATCC CCL-61)且用G418(質體上之新黴素耐受性標記)選擇。

將再懸浮於DPBS (Gibco, Life Technologies, 目錄號14190 326)中之 0.1×10^6 個腫瘤細胞添加至圓底懸浮細胞96孔盤(greiner bio-one, cellstar, 目錄號650185)之各孔中。細胞用200 μ L DPBS洗滌一次。細胞再懸浮於100微升/孔之含有1:5000稀釋之可固定存活力染料eFluor 660 (eBioscience, 目錄號65-0864-18)的4 $^{\circ}$ C冷DPBS緩衝劑中且在4 $^{\circ}$ C下培育培養盤30分鐘。細胞用200微升/孔 4 $^{\circ}$ C冷DPBS緩衝劑洗滌一次且再懸浮於50微升/孔之一系列濃度之含有靶向PD1之4-1BB裂解型三聚配位體Fc

融合物抗原結合分子之4°C冷FACS緩衝劑(具有2% FBS、5 mM EDTA pH8 (Amresco, 目錄號E177)及7.5 mM疊氮化鈉(Sigma-Aldrich S2002)之DPBS)中,之後在4°C下培育1小時。在充分洗滌之後,在4°C下進一步用50微升/孔之含有5 µg/mL結合PE之親和純化抗人類IgG F(ab')₂-片段特異性山羊F(ab')₂片段(Jackson ImmunoResearch, 目錄號109 116 098)之4°C冷FACS緩衝劑染色細胞30分鐘。細胞用200微升/孔4°C FACS緩衝劑洗滌兩次且將細胞固定於50微升/孔之含有1%甲醛(Sigma, HT501320-9.5L)之DPBS中。使細胞再懸浮於100微升/孔之FACS緩衝劑中且使用MACS Quant分析儀 10 (Miltenyi Biotech)獲取。使用FlowJo V10 (FlowJo, LLC)及GraphPad Prism 6.04 (GraphPad Software, Inc)分析數據。

將閘極設置於活的腫瘤細胞上且針對滴定濃縮之靶向PD1之4-1BB裂解型三聚配位體Fc融合物抗原結合分子或其對照印跡結合PE之親和純化抗人類IgG IgGFcγ片段特異性山羊F(ab')₂片段之螢光強度之幾何平均值。如圖15A及15B中所示,僅靶向PD1將裂解型三聚4-1BB配位體融合物分子構築體7.1、構築體7.3、構築體7.5及構築體7.6及對照M結合於表現PD1之CHO-k1-huPD1純系5,然而未靶向PD1之對照分子,對照B、對照C、對照D及對照F不結合於腫瘤細胞。在圖16A及16B中,僅含有裂解型三聚4-1BB配位體之融合物分子構築體7.1、構築體7.3、構築體7.5及構築體7.6及對照B、對照C、及對照D結合於表現人類4-1BB之HeLa-hu4-1BB-NFκB-luc純系26,然而不含融合之裂解型三聚4-1BB配位體之對照(對照F及對照M)不結合於表現人類4-1BB之腫瘤細胞。在表28中列舉曲線之EC₅₀值。

表28：表現人類PD1或人類4-1BB之腫瘤細胞之結合曲線的EC₅₀值

	對照 C	對照B	對照D	對照M	構築體 7.1	構築體 7.3	構築體 7.5	構築體 7.6
HeLa-huCD137-NFκB-luc純系26細胞上之EC ₅₀ [nM]	0.16	0.19	0.25	n.d.	0.14	0.28	0.36	0.32
CHO-K1-huPD1純系5細胞上之EC ₅₀ [nM]	n.d.	n.d.	n.d.	1.59	1.73	1.43	3.33	1.82

實例6

靶向PD1之含有4-1BB配位三聚體之Fc融合物抗原結合分子之生物活性

表現人類4-1BB之HeLa報導子細胞株之NF-κB活化

6.1表現人類4-1BB及NF-κB螢光素酶之HeLa細胞之產生

人類乳頭瘤病毒18誘導性子宮頸癌細胞株HeLa (ATCC CCL-2)在CMV-啟動子及嘌呤黴素耐受性基因控制下用基於表現載體pETR10829之質體轉導，該質體含有人類4-1BB之序列(Uniprot寄存號Q07011)。細胞在具有10%胎牛血清(FBS，GIBCO，Life Technologies，目錄號16000-044，批號941273，γ照射，無黴漿菌，在56°C下熱不活化35分鐘)、1% GlutaMAX-I (GIBCO，Life Technologies，目錄號35050-038)及3 μg/mL 嘌呤黴素(InvivoGen，目錄號ant-pr-1)之DMEM培養基(Gibco，Life Technologies，目錄號42430-025)中培養。

藉由流式細胞測量術測試4-1BB轉導之HeLa細胞之4-1BB表現：使 0.2×10^6 個活細胞再懸浮於100 μL含有0.1 μg PerCP/Cy5.5結合之抗人類4-1BB小鼠IgG1κ純系4B4-1 (BioLegend目錄號309814)或其同型對照(PerCP/Cy5.5結合之小鼠IgG1κ同型對照抗體純系MOPC 21，BioLegend，目錄號400150)之FACS緩衝劑(具有2% FBS、5 mM EDTA

pH 8 (Amresco, 目錄號E177)及7.5 mM疊氮化鈉(Sigma-Aldrich, 目錄號S2002)之DPBS)中且在4°C下培育30分鐘。細胞用FACS緩衝劑洗滌兩次,再懸浮於含有0.06 µg DAPI (Santa Cruz Biotec, 目錄號Sc-3598)之300 µL FACS緩衝液中且使用5-雷射LSR-Fortessa (BD Bioscience, DIVA software)獲取。如下執行有限稀釋以產生單一純系:使人類-4-1BB轉導之HeLa細胞再懸浮於培養基中至10、5及2.5個細胞/毫升之濃度,且將200 µL細胞懸浮液轉移至圓底之經組織培養物處理之96孔盤(6個盤/細胞濃度, TPP目錄號92697)中。收集單一純系,擴增且如上文所述測試4-1BB表現。選擇具有最高4-1BB表現之純系(純系5)用於隨後用NFκB螢光素酶表現載體5495p Tranlucent HygB進行之轉染。載體賦予經轉染細胞對潮黴素B之耐藥性及在NF-kB反應元素(Panomics, 目錄號LR0051)之控制下表現螢光素酶之能力。培養人類4-1BB HeLa純系5細胞至70%匯合。50 µg (40 µL)線性化(限制酶AseI及SalI) 5495p Tranlucent HygB表現載體添加至無菌0.4 cm Gene Pulser/MicroPulser光析管(Biorad, 目錄號165-2081)中。添加含 2.5×10^6 個人類4-1BB HeLa純系5細胞之400 µl不含DMEM培養基之補充劑且與質體溶液小心混合。使用Gene Pulser Xcell完全系統(Biorad, 目錄號1652660)在以下設定下進行細胞之轉染:指數脈衝,電容500 µF,電壓160 V,電阻 ∞ 。緊接在脈衝之後,將轉染之細胞轉移至有具有10% FBS及1% GlutaMAX I (GIBCO, Life Technologies, 目錄號35050 038)之15 mL 37°C溫熱DMEM培養基(Gibco, Life Technologies, 目錄號42430-025)的組織培養燒瓶75 cm² (TPP, 目錄號90075)中。第二天,添加含有3 µg/mL嘌呤黴素培養基(InvivoGen, 目錄號ant-pr-1)及200 µg/mL潮黴素B (Roche, 目錄號10843555001)。擴增活

細胞且如上文所述進行有限稀釋以產生單一純系。如上文所述測試純系之4-1BB表現且如下測試NF- κ B螢光素酶活性：在選擇培養基中收集純系且使用Cell Counter Vi-細胞 xr 2.03 (Beckman Coulter, 目錄號731050)計數。細胞設定為 0.33×10^6 個細胞/毫升之細胞密度且將150 μ L此細胞懸浮液轉移至具有蓋子之無菌白色96孔平底組織培養盤(greiner bio one, 目錄號655083)之各孔中，且作為對照物轉移至正常96孔平底組織培養盤(TPP 目錄號92096)中以在第二天測試存活率及細胞密度。細胞在37°C及5% CO₂下培育隔夜。第二天，將50 μ L含有不同濃度之重組人類腫瘤壞死因子 α (rhTNF α , PeproTech, 目錄號30001A)之培養基添加至96孔盤之各孔中達到100、50、25、12.5、6.25及0奈克/孔之rhTNF α 之最終濃度。細胞在37°C及5% CO₂下培育6小時且接著用200微升/孔DPBS洗滌三次。將報導子溶解緩衝液(Promega, 目錄號：E3971)添加至各孔(30 μ l)中且將培養盤儲存在-20°C下隔夜。第二天，將冷凍細胞培養盤及偵測緩衝劑(Luciferase 1000分析系統, Promega, 目錄號E4550)解凍至室溫。將100 μ L偵測緩衝液添加至各孔中且使用SpectraMax M5/M5e微定量盤式讀取器及SoftMax Pro軟體(Molecular Devices)儘可能快地量測培養盤。將高於對照(不添加rhTNF α)之量測之URL視為螢光素酶活性。選擇NF κ B-luc-4-1BB-HeLa純系26用於進一步使用，呈現最高螢光素酶活性及可觀4-1BB表現量。

6.2與表現PD1之CHO-k1-huPD1純系5細胞共培養之表現人類4-1BB之HeLa細胞之NF κ B活化

NF κ B-luc-4-1BB-海拉純系26細胞用DPBS (Gibco, Life Technologies, 目錄號14190 326)洗滌且在37°C下用0.05%胰蛋白酶

EDTA(Gibco, Life Technologies, 目錄號25300 054)處理5分鐘。收集細胞且再懸浮於具有10%胎牛血清(FBS, US-origin, PAN biotech, P30-2009, 批號P150307GI, γ 照射, 無黴漿菌, 在56°C下熱不活化35分鐘)及1%GlutaMAX-I (GIBCO Life Technologies, 目錄號35050 038)之DMEM培養基(Gibco, Life Technologies, 目錄號42430 025)中。使用細胞計數器Vi-cell xr 2.03 (Beckman Coulter, 目錄號731050)計數細胞且設定為細胞密度係 0.2×10^6 個細胞/毫升。將100 μ L(2×10^4 個細胞)之此細胞懸浮液轉移至具有蓋子之無菌白色96孔平底組織培養盤(greiner bio one, 目錄號655083)之各孔中且在37°C及5% CO₂下培育培養盤隔夜。第二天, 加入50 μ L含有不同滴定濃度之含有融合物分子構築體7.1、構築體7.3、構築體7.5及構築體7.6或配合對照(對照B、對照C、對照D、對照F及對照M)之裂解型三聚4-1BB配位體的培養基。對於PD1結合介導之交聯, 使用表現PD1之CHO-k1-huPD1純系5細胞。

黏附 CHO-k1-huPD1 純系 5 細胞用 DPBS(Gibco, Life Technologies, 目錄號14190 326)洗滌且在37°C下用無酶之基於PBS之細胞解離緩衝液(Gibco, Life Technologies, 目錄號13151-014)處理10分鐘。之後收集細胞且使用細胞計數器Vi-cell xr 2.03計數。使細胞再懸浮於具有10% FBS及1% L-GlutaMAX -I之DEM中至 2×10^6 個細胞/毫升且每孔添加50 μ L。在添加交聯表現PD1之CHO-k1-huPD1純系5細胞之後, 在37°C及5% CO₂下培育培養盤6小時。白色平底96孔盤用200微升/孔DPBS洗滌三次。將40 μ l新近製備之報導子溶解緩衝劑(Promega, 目錄號: E3971)添加至各孔中且將培養盤儲存於-20°C下隔夜。第二天, 將冷凍培養盤及偵測緩衝劑(Luciferase 1000分析系統, Promega, 目錄號E4550)

解凍至室溫。將100 μ L偵測緩衝劑添加至各孔中且儘快使用SpectraMax M5/M5e微量盤式讀取器及具有以下設定之SoftMax Pro軟體(Molecular Devices)量測培養盤：對於螢光素酶(RLU)，500 ms整合時間，無過濾器，收集所有波長及上部讀數。

含有靶向PD1之4-1BB配位三聚體之Fc融合物抗原結合分子(PD1裂解型4-1BBL三聚體)在報導子細胞株中在存在表現PD1之腫瘤細胞下觸發NF κ B信號傳導路徑之活化。相比之下，相同分子之未經靶向之變異體在任一測試濃度下皆未觸發此作用(圖18C及18D)。當甚至在存在靶向PD1之含有4-1BB配位三聚體之Fc融合物抗原結合分子下用PD1陰性腫瘤細胞培養NF-kB報導子細胞株時仍不能偵測到NF-kB活化時，經靶向4-1BBL之此活性嚴格取決於腫瘤細胞之細胞表面處PD1之表現(圖18A及18B)。展示如針對構築體7.1、7.3、7.5及7.6所量測之活性。以下表29中給出如在表現PD1之腫瘤細胞存在下所量測之EC₅₀值。

表29：NF κ B活化誘導之螢光素酶活性曲線之EC₅₀值

	構築體7.1	構築體7.3	構築體7.5	構築體7.6
有CHO-k1-huPD1純系5下之EC ₅₀ [nM]	0.004	0.004	0.006	0.007

引用文獻：

Ascierto, P. A., E. Simeone, M. Sznol, Y. X. Fu, and I. Melero (2010), Clinical experiences with anti-CD137 and anti-PD1 therapeutic antibodies. *Semin Oncol* 37:508-516.

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

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

receptor activation. *Cell* 73, 431-445.

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

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

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

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

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

Cuadros, C., Dominguez, A.L., Lollini, P.L., Croft, M., Mittler, R.S., Borgstrom, P., and Lustgarten, J. (2005). Vaccination with dendritic cells pulsed with apoptotic tumors in combination with anti-

OX40 and anti-4-1BB monoclonal antibodies induces T cell-mediated protective immunity in Her-2/neu transgenic mice. *Int J Cancer* 116, 934-943.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Kim, D.H., Chang, W.S., Lee, Y.S., Lee, K.A., Kim, Y.K., Kwon, B.S., and Kang, C.Y. (2008). 4-1BB engagement costimulates NKT cell activation and exacerbates NKT cell ligand-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *J Immunol* 180, 2062-2068.

Kim, Y.H., Choi, B.K., Oh, H.S., Kang, W.J., Mittler, R.S., and Kwon, B.S. (2009). Mechanisms involved in synergistic anticancer

effects of anti-4-1BB and cyclophosphamide therapy. *Mol Cancer Ther* 8, 469-478.

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

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

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

Li, F., and Ravetch, J.V. (2011). Inhibitory Fcγ receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies. *Science* 333, 1030-1034.

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

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

antibodies. *Cell Immunol* 190, 167-172.

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

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

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

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

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

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

1941-1948.

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

Olofsson, P.S., Soderstrom, L.A., Wagsater, D., Sheikine, Y., Ocaya, P., Lang, F., Rabu, C., Chen, L., Rudling, M., Aukrust, P., et al. (2008). CD137 is expressed in human atherosclerosis and promotes development of plaque inflammation in hypercholesterolemic mice. *Circulation* 117, 1292-1301.

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

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

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

Shi, W., and Siemann, D.W. (2006). Augmented antitumor effects of

radiation therapy by 4-1BB antibody (BMS-469492) treatment. *Anticancer Res* 26, 3445-3453.

Shindo Y., Yoshimura K., Kuramasu A., Watanabe Y., Ito H.; Kondo T., et al. (2015). Combination Immunotherapy with 4-1BB activation and PD-1 blockade enhances antitumor efficacy in a mouse model of subcutaneous tumor. *Anticancer Res.* 35(1), 129-136.

Simeone, E., and Ascierto, P.A. (2012). Immunomodulating antibodies in the treatment of metastatic melanoma: the experience with anti-CTLA-4, anti-CD137, and anti-PD1. *J Immunotoxicol* 9, 241-247.

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

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

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

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

Wei, H., Zhao, L., Li, W., Fan, K., Qian, W., Hou, S., Wang, H., Dai, M., Hellstrom, I., Hellstrom, K.E., and Guo, Y. (2013). Combinatorial PD-1 blockade and CD137 activation has therapeutic efficacy in murine cancer models and synergizes with cisplatin. *PLoS One* 8, e84927.

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

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

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

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

Zhang, X., Voskens, C.J., Sallin, M., Maniar, A., Montes, C.L., Zhang, Y., Lin, W., Li, G., Burch, E., Tan, M., et al. (2010). CD137

promotes proliferation and survival of human B cells. J Immunol 184,
787-795.

【序列表】

<110> 瑞士商赫孚孟拉羅股份公司

<120> 包含TNF家族配位三聚體及PD1結合部份之抗原結合分子

<130> P33618-EP

<150> EP16169487.2

<151> 2016-05-13

<160> 171

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 184

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
 180

<210> 2
 <211> 170
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 4
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Leu

<210> 6
<211> 164
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ala Gly Leu

<210> 7
 <211> 169
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
165

<210> 8
<211> 197
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Pro Ala Gly Leu
 195

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

<220>
 <223> 藉由(G4S)2連接子連接之二聚hu 4-1BBL (71-254)

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln

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

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

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

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

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>

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

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
 180 185 190

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu

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

225 230 235 240
 Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln
 245 250 255
 Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr
 260 265 270
 Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr
 275 280 285
 Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr
 290 295 300
 Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser
 305 310 315 320
 Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala
 325 330 335
 Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser
 340 345 350
 Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu
 355 360 365
 Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala
 370 375 380
 Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe
 385 390 395 400
 Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
 405 410 415

 <210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

 <400> 13
 Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr

1 5

<210> 14
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 14

Gly Gly Arg
 1

<210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 15

Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp
 1 5

<210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 16

Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser Asp Asn Ser Phe
 1 5 10

<210> 17
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 17

Arg Ser Ser
 1

<210> 18
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 18

Asn Tyr Asp Val Pro Trp

1

5

<210> 19
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 19

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> 20
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 20

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> 21
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化變異體 - PD1-0103-0312、PD1-0103-0313、
 PD1-0103-0314及PD1-0103-0315之重鏈可變域VH

<400> 21

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> 22
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化變異體 - PD1-0103-0312之輕鏈可變域VL

<400> 22

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> 23
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人類化變異體 - PD1-0103-0313之輕鏈可變域VL

<400> 23

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> 24

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化變異體 - PD1-0103-0314之輕鏈可變域VL

<400> 24

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> 25
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化變異體 - PD1-0103-0315之輕鏈可變域VL

<400> 25

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> 26
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重鏈HVR-H1, PD1-0098

<400> 26

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr
 1 5

<210> 27
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重鏈HVR-H2, PD1-0098

<400> 27

Tyr Ser Gly
 1

<210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重鏈HVR-H3, PD1-0098

<400> 28

His Gly Ser Ala Pro Trp Tyr Phe Asp
 1 5

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

<220>
 <223> 輕鏈HVR-L1, PD1-0098

<400> 29

Ser Gln Asn Ile Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10

<210> 30
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 輕鏈HVR-L2，PD1-0098

<400> 30

Lys Val Ser
 1

<210> 31
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 輕鏈HVR-L3，PD1-0098

<400> 31

Gly Ser His Phe Pro Leu
 1 5

<210> 32
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重鏈可變域VH，PD1-0098

<400> 32

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asp Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

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

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

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

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

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 33
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變域VL · PD1-0098

<400> 33

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

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

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

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

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

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

Ser His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 34
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈HVR-H1, PD1-0050

<400> 34

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr
1 5

<210> 35
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈HVR-H2, PD1-0050

<400> 35

Tyr Thr Gly
1

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈HVR-H3, PD1-0050

<400> 36

Met Asp Tyr Tyr Gly Ser Thr Leu Asp
1 5

<210> 37
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈HVR-L1, PD1-0050

<400> 37

Ser Glu Ser Val Asp Arg Tyr Gly Asn Ser Phe
1 5 10

<210> 38
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 輕鏈HVR-L2 , PD1-0050

<400> 38

Arg Ala Ser
 1

<210> 39
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 輕鏈HVR-L3 , PD1-0050

<400> 39

Asn Asn Glu Asp Pro Tyr
 1 5

<210> 40
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重鏈可變域VH , PD1-0050

<400> 40

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Thr Gly Arg Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

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

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

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

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 41
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變域VL, PD1-0050

<400> 41

Lys Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Arg
1 5 10 15

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

Gly Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Val Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Phe 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 Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

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

<210> 42

<211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重鏈HVR-H1, PD1-0069

<400> 42

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 1 5

<210> 43
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重鏈HVR-H2, PD1-0069

<400> 43

Tyr Ser Gly
 1

<210> 44
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重鏈HVR-H3, PD1-0069

<400> 44

Gly Ile Thr Thr Gly Phe Ala
 1 5

<210> 45
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 輕鏈HVR-L1, PD1-0069

<400> 45

Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Phe
 1 5 10

<210> 46
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 輕鏈HVR-L2, PD1-0069

<400> 46

Tyr Ala Ser
 1

<210> 47
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 輕鏈HVR-L3, PD1-0069

<400> 47

Ser Arg Glu Phe Pro Trp
 1 5

<210> 48
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重鏈可變域VH, PD1-0069

<400> 48

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

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

Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Val Ile Ser Thr Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

<212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重鏈HVR-H1，PD1-0073

<400> 50

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 1 5

<210> 51
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重鏈HVR-H2，PD1-0073

<400> 51

Gly Gly Arg
 1

<210> 52
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重鏈HVR-H3，PD1-0073

<400> 52

Tyr Tyr Gly Ile Asp
 1 5

<210> 53
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 輕鏈HVR-L1，PD1-0073

<400> 53

Ser Gln Asp Val Thr Thr Ala
 1 5

<210> 54

<211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 輕鏈HVR-L2, PD1-0073

<400> 54

Trp Ala Ser
 1

<210> 55
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 輕鏈HVR-L3, PD1-0073

<400> 55

His Tyr Ser Ile Pro Trp
 1 5

<210> 56
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重鏈可變域VH, PD1-0073

<400> 56

Glu Val Lys 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 Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 57
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 輕鏈可變域VL, PD1-0073

<400> 57

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

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

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

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

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

Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Ile Pro Trp
 85 90 95

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

<210> 58
 <211> 7
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈HVR-H1，PD1-0078

<400> 58

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Thr
1 5

<210> 59

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈HVR-H2，PD1-0078

<400> 59

Ser Asp Ser
1

<210> 60

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈HVR-H3，PD1-0078

<400> 60

Pro Phe Asp
1

<210> 61

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈HVR-L1，PD1-0078

<400> 61

Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
1 5

<210> 62

<211> 3

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈HVR-L2, PD1-0078

<400> 62

Ser Ala Ser
1

<210> 63
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈HVR-L3, PD1-0078

<400> 63

His Tyr Ser His Pro Phe
1 5

<210> 64
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變域VH, PD1-0078

<400> 64

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser

<210> 65
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 輕鏈可變域VL, PD1-0078

<400> 65

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Ala Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80

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

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

<210> 66
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈HVR-H1，PD1-0102

<400> 66

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr
1 5

<210> 67

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈HVR-H2，PD1-0102

<400> 67

Ser Ser Gly
1

<210> 68

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈HVR-H3，PD1-0102

<400> 68

Arg Asn Trp Tyr Phe Asp
1 5

<210> 69

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈HVR-L1，PD1-0102

<400> 69

Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Thr Gln Lys Asn Tyr
1 5 10

<210> 70

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈HVR-L2, PD1-0102

<400> 70

Trp Ala Ser

1

<210> 71

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈HVR-L3, PD1-0102

<400> 71

Asp Tyr Thr Phe Pro Leu

1

5

<210> 72

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈可變域VH, PD1-0102

<400> 72

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Phe Ile His Ser Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 73
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變域VL，PD1-0102

<400> 73

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

Glu Lys Val Thr Met Arg Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

Lys

<210> 74

<211> 722
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 二聚hu 4-1BBL (71-254) - CL* Fc杵鏈

<400> 74

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 370 375 380

Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 385 390 395 400

Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
625 630 635 640

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
645 650 655

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
660 665 670

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
675 680 685

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
690 695 700

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
705 710 715 720

Gly Lys

<210> 75
<211> 297
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 單體hu 4-1BBL (71-254) - CH1*

<400> 75

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

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

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

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

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg

Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
290 295

<210> 76
<211> 722
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 二聚hu 4-1BBL (71-254) - CL Fc杵鏈

<400> 76

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 385 390 395 400

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 405 410 415

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 420 425 430

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 435 440 445

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 450 455 460

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 465 470 475 480

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp
 485 490 495

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 500 505 510

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 515 520 525

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 530 535 540

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 545 550 555 560

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 565 570 575

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 580 585 590

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
 595 600 605

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
610 615 620

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
625 630 635 640

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
645 650 655

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
660 665 670

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
675 680 685

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
690 695 700

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
705 710 715 720

Gly Lys

<210> 77
<211> 297
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 單體hu 4-1BBL (71-254) - CH1

<400> 77

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 210 215 220

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

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 245 250 255

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 260 265 270

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 275 280 285

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 290 295

<210> 78
 <211> 710
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 二聚hu 4-1BBL (71-248) - CL* Fc杵鏈

<400> 78

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
 370 375 380

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 385 390 395 400

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 405 410 415

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
 420 425 430

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 435 440 445

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 450 455 460

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 465 470 475 480

Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 485 490 495

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 500 505 510

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 515 520 525

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 530 535 540

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 545 550 555 560

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 565 570 575

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly
 580 585 590

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
705 710

<210> 79
<211> 291
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 單體hu 4-1BBL (71-248) - CH1*

<400> 79

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Cys
 290

<210> 80
 <211> 710
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 二聚hu 4-1BBL (71-248) - CL Fc杵鏈

<400> 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
 370 375 380

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 385 390 395 400

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 405 410 415

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
 420 425 430

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 435 440 445

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 450 455 460

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 465 470 475 480

Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 485 490 495

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 500 505 510

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 515 520 525

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 530 535 540

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 545 550 555 560

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 565 570 575

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly

580

585

590

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
705 710

<210> 81
<211> 291
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 單體hu 4-1BBL (71-248) - CHI

<400> 81

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn

260

265

270

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

Lys Ser Cys
 290

<210> 82
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗PD1 (0314) Fc白鏈
 <400> 82

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 Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 225 230 235 240

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355

360

365

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

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

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 83
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗PD1 (0314)輕鏈

<400> 83

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 Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

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

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

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

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

- <210> 84
- <211> 837
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 與二聚hu 4-1BBL (71-254)融合之抗PD1(0314) Fc白鏈

<400> 84

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

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

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

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu
 450 455 460

Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met

Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr
690 695 700

Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys
705 710 715 720

Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val
725 730 735

Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro
740 745 750

Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu
755 760 765

Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly
770 775 780

Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His
785 790 795 800

Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr
805 810 815

Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro
820 825 830

Ser Pro Arg Ser Glu
835

- <210> 85
- <211> 643
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 與單體hu 4-1BBL (71-254)融合之抗PD1(0314)Fc杵鏈

<400> 85

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

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Trp 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 Arg Glu Gly Pro Glu
 450 455 460

Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met
465 470 475 480

Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu
485 490 495

Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly
500 505 510

Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly
515 520 525

Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly
530 535 540

Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg
545 550 555 560

Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro
565 570 575

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

Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu
595 600 605

Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu
610 615 620

Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro
625 630 635 640

Arg Ser Glu

<210> 86
<211> 825
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 與二聚hu 4-1BBL (71-248)融合之抗PD1(0314) Fc白鍵

<400> 86

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 Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp
645 650 655

Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu
660 665 670

Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser
675 680 685

Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys
690 695 700

Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val
705 710 715 720

Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly
725 730 735

Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly
740 745 750

Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu
755 760 765

Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser
770 775 780

Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg
785 790 795 800

His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg
805 810 815

Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
820 825

<210> 87
<211> 637
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 與單體hu 4-1BBL (71-248)融合之抗PD1(0314) Fc杵鏈

<400> 87

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 Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 225 230 235 240

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

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

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Trp 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 Arg Glu Gly Pro Glu
 450 455 460

Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met
 465 470 475 480

Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu
 485 490 495

Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly
 500 505 510

Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly
 515 520 525

Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly
 530 535 540

Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg
 545 550 555 560

Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro
 565 570 575

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

Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu
 595 600 605

Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu
 610 615 620

Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
 625 630 635

<210> 88

<211> 602
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Fc白二聚配位體(71-248)鏈

<400> 88

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 100 105 110

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

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
 225 230 235 240

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
 245 250 255

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
 260 265 270

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
 275 280 285

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
 290 295 300

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
 305 310 315 320

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
 325 330 335

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
 340 345 350

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
 355 360 365

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
 370 375 380

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
 385 390 395 400

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

<220>

<223> Fc白單體配位體(71-248)鏈

<400> 89

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
100 105 110

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

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

<210> 90
 <211> 815
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 與二聚hu 4-1BBL (71-248)融合之抗PD1(0314) Fc杵鏈

<400> 90

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 Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

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

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

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

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

	180		185		190										
Ser	Ser	Ser 195	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr 200	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val 205	Asn	His	Lys
Pro	Ser 210	Asn	Thr	Lys	Val	Asp 215	Lys	Lys	Val	Glu	Pro 220	Lys	Ser	Cys	Asp
Lys 225	Thr	His	Thr	Cys	Pro 230	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro 235	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly 240
Pro	Ser	Val	Phe 245	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro 250	Lys	Asp	Thr	Leu	Met 255	Ile
Ser	Arg	Thr	Pro 260	Glu	Val	Thr	Cys	Val 265	Val	Val	Asp	Val	Ser 270	His	Glu
Asp	Pro	Glu 275	Val	Lys	Phe	Asn	Trp 280	Tyr	Val	Asp	Gly	Val 285	Glu	Val	His
Asn 290	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg 295	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn 300	Ser	Thr	Tyr	Arg
Val 305	Val	Ser	Val	Leu	Thr 310	Val	Leu	His	Gln	Asp 315	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys 320
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys 325	Val	Ser	Asn	Lys	Ala 330	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile 335	Glu
Lys	Thr	Ile 340	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln 345	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln 350	Val	Tyr
Thr	Leu	Pro 355	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu 360	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln 365	Val	Ser	Leu
Trp	Cys 370	Leu	Val	Lys	Gly	Phe 375	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile 380	Ala	Val	Glu	Trp
Glu 385	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro 390	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys 395	Thr	Thr	Pro	Pro	Val 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 Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu
 450 455 460

Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu
 465 470 475 480

Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly
 485 490 495

Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu
 500 505 510

Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu
 515 520 525

Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu
 530 535 540

His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu
 545 550 555 560

Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe
 565 570 575

Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly
 580 585 590

Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr
 595 600 605

Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro
 610 615 620

Ala Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly
625 630 635 640

Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln
645 650 655

Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly
660 665 670

Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr
675 680 685

Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys
690 695 700

Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val
705 710 715 720

Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro
725 730 735

Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu
740 745 750

Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly
755 760 765

Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His
770 775 780

Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr
785 790 795 800

Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
805 810 815

<210> 91
<211> 414
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 與單體hu 4-1BBL (71-248)融合之Fc杵鏈

<400> 91

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
100 105 110

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

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

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

<210> 92
 <211> 637

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗PD1(0314)Fc白單體配位體(71-248)鏈

<400> 92

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 Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 225 230 235 240

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

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

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

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu
450 455 460

Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met
465 470 475 480

Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu
485 490 495

Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly
500 505 510

Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly
515 520 525

Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly
530 535 540

Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg
545 550 555 560

Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro
565 570 575

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

Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu
595 600 605

Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu
610 615 620

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

625

630

635

<210> 93
 <211> 602
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 與二聚hu 4-1BBL (71-248)融合之Fc杵鏈

<400> 93

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 100 105 110

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

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
 225 230 235 240

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
 245 250 255

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
 260 265 270

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
 275 280 285

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
 290 295 300

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
 305 310 315 320

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
 325 330 335

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
 340 345 350

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
 355 360 365

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
 370 375 380

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val

<210> 94
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 94

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> 95
<211> 205
<212> PRT
<213> 智人

<400> 95

Met Thr Pro Pro Glu Arg Leu Phe Leu Pro Arg Val Cys Gly Thr Thr
1 5 10 15

Leu His Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Leu Pro Gly Ala
20 25 30

Gln Gly Leu Pro Gly Val Gly Leu Thr Pro Ser Ala Ala Gln Thr Ala
35 40 45

Arg Gln His Pro Lys Met His Leu Ala His Ser Thr Leu Lys Pro Ala
50 55 60

Ala His Leu Ile Gly Asp Pro Ser Lys Gln Asn Ser Leu Leu Trp Arg
65 70 75 80

Ala Asn Thr Asp Arg Ala Phe Leu Gln Asp Gly Phe Ser Leu Ser Asn
85 90 95

Asn Ser Leu Leu Val Pro Thr Ser Gly Ile Tyr Phe Val Tyr Ser Gln
 100 105 110

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

Leu Tyr Leu Ala His Glu Val Gln Leu Phe Ser Ser Gln Tyr Pro Phe
 130 135 140

His Val Pro Leu Leu Ser Ser Gln Lys Met Val Tyr Pro Gly Leu Gln
 145 150 155 160

Glu Pro Trp Leu His Ser Met Tyr His Gly Ala Ala Phe Gln Leu Thr
 165 170 175

Gln Gly Asp Gln Leu Ser Thr His Thr Asp Gly Ile Pro His Leu Val
 180 185 190

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

<210> 96
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 96

Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala
 1 5 10 15

Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe
 20 25 30

Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe
 35 40 45

Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro
 50 55 60

Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser
 65 70 75 80

Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro
85 90 95

Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu
100 105 110

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

Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly
130 135 140

Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala
145 150 155 160

Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro
165 170 175

Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu
180 185 190

Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu
195 200 205

Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly
210 215 220

Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
225 230

<210> 97
<211> 244
<212> PRT
<213> 智人

<400> 97

Met Gly Ala Leu Gly Leu Glu Gly Arg Gly Gly Arg Leu Gln Gly Arg
1 5 10 15

Gly Ser Leu Leu Leu Ala Val Ala Gly Ala Thr Ser Leu Val Thr Leu
20 25 30

Leu Leu Ala Val Pro Ile Thr Val Leu Ala Val Leu Ala Leu Val Pro
 35 40 45

Gln Asp Gln Gly Gly Leu Val Thr Glu Thr Ala Asp Pro Gly Ala Gln
 50 55 60

Ala Gln Gln Gly Leu Gly Phe Gln Lys Leu Pro Glu Glu Glu Pro Glu
 65 70 75 80

Thr Asp Leu Ser Pro Gly Leu Pro Ala Ala His Leu Ile Gly Ala Pro
 85 90 95

Leu Lys Gly Gln Gly Leu Gly Trp Glu Thr Thr Lys Glu Gln Ala Phe
 100 105 110

Leu Thr Ser Gly Thr Gln Phe Ser Asp Ala Glu Gly Leu Ala Leu Pro
 115 120 125

Gln Asp Gly Leu Tyr Tyr Leu Tyr Cys Leu Val Gly Tyr Arg Gly Arg
 130 135 140

Ala Pro Pro Gly Gly Gly Asp Pro Gln Gly Arg Ser Val Thr Leu Arg
 145 150 155 160

Ser Ser Leu Tyr Arg Ala Gly Gly Ala Tyr Gly Pro Gly Thr Pro Glu
 165 170 175

Leu Leu Leu Glu Gly Ala Glu Thr Val Thr Pro Val Leu Asp Pro Ala
 180 185 190

Arg Arg Gln Gly Tyr Gly Pro Leu Trp Tyr Thr Ser Val Gly Phe Gly
 195 200 205

Gly Leu Val Gln Leu Arg Arg Gly Glu Arg Val Tyr Val Asn Ile Ser
 210 215 220

His Pro Asp Met Val Asp Phe Ala Arg Gly Lys Thr Phe Phe Gly Ala
 225 230 235 240

Val Met Val Gly

<210> 98
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 98

Met Glu Arg Val Gln Pro Leu Glu Glu Asn Val Gly Asn Ala Ala Arg
 1 5 10 15

Pro Arg Phe Glu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gln
 20 25 30

Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser
 35 40 45

Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val
 50 55 60

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

Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn
 85 90 95

Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu
 100 105 110

Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln
 115 120 125

Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr
 130 135 140

Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu
 145 150 155 160

Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn
 165 170 175

Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
 180

<210> 99
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 99

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
 20 25 30

Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
 35 40 45

Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
 50 55 60

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
 65 70 75 80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
 85 90 95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu
 100 105 110

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
 115 120 125

Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
 130 135 140

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
 145 150 155 160

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
 165 170 175

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
 180 185 190

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
 195 200 205

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
 210 215 220

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

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
 245 250 255

Gly Leu Leu Lys Leu
 260

<210> 100
 <211> 281
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 100

Met Gln Gln Pro Phe Asn Tyr Pro Tyr Pro Gln Ile Tyr Trp Val Asp
 1 5 10 15

Ser Ser Ala Ser Ser Pro Trp Ala Pro Pro Gly Thr Val Leu Pro Cys
 20 25 30

Pro Thr Ser Val Pro Arg Arg Pro Gly Gln Arg Arg Pro Pro Pro Pro
 35 40 45

Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro
 50 55 60

Pro Leu Pro Leu Pro Pro Leu Lys Lys Arg Gly Asn His Ser Thr Gly
 65 70 75 80

Leu Cys Leu Leu Val Met Phe Phe Met Val Leu Val Ala Leu Val Gly
 85 90 95

Leu Gly Leu Gly Met Phe Gln Leu Phe His Leu Gln Lys Glu Leu Ala
 100 105 110

Glu Leu Arg Glu Ser Thr Ser Gln Met His Thr Ala Ser Ser Leu Glu
 115 120 125

Lys Gln Ile Gly His Pro Ser Pro Pro Pro Glu Lys Lys Glu Leu Arg
 130 135 140

Lys Val Ala His Leu Thr Gly Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met Pro Leu
 145 150 155 160

Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Ile Val Leu Leu Ser Gly Val Lys Tyr
 165 170 175

Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr
 180 185 190

Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn Asn Leu Pro Leu Ser
 195 200 205

His Lys Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr Pro Gln Asp Leu Val Met
 210 215 220

Met Glu Gly Lys Met Met Ser Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala
 225 230 235 240

Arg Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His
 245 250 255

Leu Tyr Val Asn Val Ser Glu Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser
 260 265 270

Gln Thr Phe Phe Gly Leu Tyr Lys Leu
 275 280

<210> 101

<211> 193

<212> PRT

<213> 智人

<400> 101

Met Pro Glu Glu Gly Ser Gly Cys Ser Val Arg Arg Arg Pro Tyr Gly
 1 5 10 15

Cys Val Leu Arg Ala Ala Leu Val Pro Leu Val Ala Gly Leu Val Ile
 20 25 30

Cys Leu Val Val Cys Ile Gln Arg Phe Ala Gln Ala Gln Gln Gln Leu
 35 40 45

Pro Leu Glu Ser Leu Gly Trp Asp Val Ala Glu Leu Gln Leu Asn His
 50 55 60

Thr Gly Pro Gln Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro Ala
 65 70 75 80

Leu Gly Arg Ser Phe Leu His Gly Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln Leu
 85 90 95

Arg Ile His Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr Leu
 100 105 110

Ala Ile Cys Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu
 115 120 125

Ala Val Gly Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg
 130 135 140

Leu Ser Phe His Gln Gly Cys Thr Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro
 145 150 155 160

Leu Ala Arg Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu
 165 170 175

Pro Ser Arg Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg
 180 185 190

Pro

<210> 102

<211> 234

<212> PRT

<213> 智人

<400> 102

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

Leu Ser Ile Phe Leu Tyr Ser Asn Ser Asp
225 230

<210> 103
<211> 254
<212> PRT
<213> 智人

<400> 103

Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro
1 5 10 15

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

Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val Phe
35 40 45

Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser
50 55 60

Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp
65 70 75 80

Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val
85 90 95

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

Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu
115 120 125

Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe
130 135 140

Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser
145 150 155 160

Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala
165 170 175

Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala
180 185 190

Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala
195 200 205

Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His
210 215 220

Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val
225 230 235 240

Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
245 250

<210> 104

<211> 281

<212> PRT

<213> 智人

<400> 104

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

Val Leu Ile Val Ile Phe Thr Val Leu Leu Gln Ser Leu Cys Val Ala
20 25 30

Val Thr Tyr Val Tyr Phe Thr Asn Glu Leu Lys Gln Met Gln Asp Lys
35 40 45

Tyr Ser Lys Ser Gly Ile Ala Cys Phe Leu Lys Glu Asp Asp Ser Tyr
50 55 60

Trp Asp Pro Asn Asp Glu Glu Ser Met Asn Ser Pro Cys Trp Gln Val
65 70 75 80

Lys Trp Gln Leu Arg Gln Leu Val Arg Lys Met Ile Leu Arg Thr Ser
85 90 95

Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro
100 105 110

Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly
 115 120 125

Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu
 130 135 140

Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly
 145 150 155 160

His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile
 165 170 175

His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe
 180 185 190

Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln
 195 200 205

Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys
 210 215 220

Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr
 225 230 235 240

Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile
 245 250 255

Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala
 260 265 270

Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
 275 280

<210> 105

<211> 317

<212> PRT

<213> 智人

<400> 105

Met Arg Arg Ala Ser Arg Asp Tyr Thr Lys Tyr Leu Arg Gly Ser Glu
 1 5 10 15

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

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

<210> 107
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 107

Met Pro Ala Ser Ser Pro Phe Leu Leu Ala Pro Lys Gly Pro Pro Gly
 1 5 10 15
 Asn Met Gly Gly Pro Val Arg Glu Pro Ala Leu Ser Val Ala Leu Trp
 20 25 30
 Leu Ser Trp Gly Ala Ala Leu Gly Ala Val Ala Cys Ala Met Ala Leu

35

40

45

Leu Thr Gln Gln Thr Glu Leu Gln Ser Leu Arg Arg Glu Val Ser Arg
 50 55 60

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

Gln Ser Leu Pro Glu Gln Ser Ser Asp Ala Leu Glu Ala Trp Glu Asn
 85 90 95

Gly Glu Arg Ser Arg Lys Arg Arg Ala Val Leu Thr Gln Lys Gln Lys
 100 105 110

Lys Gln His Ser Val Leu His Leu Val Pro Ile Asn Ala Thr Ser Lys
 115 120 125

Asp Asp Ser Asp Val Thr Glu Val Met Trp Gln Pro Ala Leu Arg Arg
 130 135 140

Gly Arg Gly Leu Gln Ala Gln Gly Tyr Gly Val Arg Ile Gln Asp Ala
 145 150 155 160

Gly Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Gln Val Leu Phe Gln Asp Val Thr Phe
 165 170 175

Thr Met Gly Gln Val Val Ser Arg Glu Gly Gln Gly Arg Gln Glu Thr
 180 185 190

Leu Phe Arg Cys Ile Arg Ser Met Pro Ser His Pro Asp Arg Ala Tyr
 195 200 205

Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Val Phe His Leu His Gln Gly Asp Ile
 210 215 220

Leu Ser Val Ile Ile Pro Arg Ala Arg Ala Lys Leu Asn Leu Ser Pro
 225 230 235 240

His Gly Thr Phe Leu Gly Phe Val Lys Leu
 245 250

<210> 108
 <211> 285
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 108

Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu
 1 5 10 15

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

Arg Lys Glu Ser Pro Ser Val Arg Ser Ser Lys Asp Gly Lys Leu Leu
 35 40 45

Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Cys Leu Thr Val Val
 50 55 60

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

Ala Glu Leu Gln Gly His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly
 85 90 95

Ala Pro Lys Ala Gly Leu Glu Glu Ala Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu
 100 105 110

Lys Ile Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn
 115 120 125

Ser Arg Asn Lys Arg Ala Val Gln Gly Pro Glu Glu Thr Val Thr Gln
 130 135 140

Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys
 145 150 155 160

Gly Ser Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser
 165 170 175

Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr
 180 185 190

Phe Phe Ile Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met
195 200 205

Gly His Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu
210 215 220

Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu
225 230 235 240

Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly
245 250 255

Asp Glu Leu Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu
260 265 270

Asp Gly Asp Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu
275 280 285

<210> 109

<211> 240

<212> PRT

<213> 智人

<400> 109

Met Glu Glu Ser Val Val Arg Pro Ser Val Phe Val Val Asp Gly Gln
1 5 10 15

Thr Asp Ile Pro Phe Thr Arg Leu Gly Arg Ser His Arg Arg Gln Ser
20 25 30

Cys Ser Val Ala Arg Val Gly Leu Gly Leu Leu Leu Leu Leu Met Gly
35 40 45

Ala Gly Leu Ala Val Gln Gly Trp Phe Leu Leu Gln Leu His Trp Arg
50 55 60

Leu Gly Glu Met Val Thr Arg Leu Pro Asp Gly Pro Ala Gly Ser Trp
65 70 75 80

Glu Gln Leu Ile Gln Glu Arg Arg Ser His Glu Val Asn Pro Ala Ala
85 90 95

His Leu Thr Gly Ala Asn Ser Ser Leu Thr Gly Ser Gly Gly Pro Leu
100 105 110

Leu Trp Glu Thr Gln Leu Gly Leu Ala Phe Leu Arg Gly Leu Ser Tyr
115 120 125

His Asp Gly Ala Leu Val Val Thr Lys Ala Gly Tyr Tyr Tyr Ile Tyr
130 135 140

Ser Lys Val Gln Leu Gly Gly Val Gly Cys Pro Leu Gly Leu Ala Ser
145 150 155 160

Thr Ile Thr His Gly Leu Tyr Lys Arg Thr Pro Arg Tyr Pro Glu Glu
165 170 175

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

Ser Ser Arg Val Trp Trp Asp Ser Ser Phe Leu Gly Gly Val Val His
195 200 205

Leu Glu Ala Gly Glu Lys Val Val Val Arg Val Leu Asp Glu Arg Leu
210 215 220

Val Arg Leu Arg Asp Gly Thr Arg Ser Tyr Phe Gly Ala Phe Met Val
225 230 235 240

<210> 110

<211> 251

<212> PRT

<213> 智人

<400> 110

Met Ala Glu Asp Leu Gly Leu Ser Phe Gly Glu Thr Ala Ser Val Glu
1 5 10 15

Met Leu Pro Glu His Gly Ser Cys Arg Pro Lys Ala Arg Ser Ser Ser
20 25 30

Ala Arg Trp Ala Leu Thr Cys Cys Leu Val Leu Leu Pro Phe Leu Ala
35 40 45

Gly Leu Thr Thr Tyr Leu Leu Val Ser Gln Leu Arg Ala Gln Gly Glu
50 55 60

Ala Cys Val Gln Phe Gln Ala Leu Lys Gly Gln Glu Phe Ala Pro Ser
65 70 75 80

His Gln Gln Val Tyr Ala Pro Leu Arg Ala Asp Gly Asp Lys Pro Arg
85 90 95

Ala His Leu Thr Val Val Arg Gln Thr Pro Thr Gln His Phe Lys Asn
100 105 110

Gln Phe Pro Ala Leu His Trp Glu His Glu Leu Gly Leu Ala Phe Thr
115 120 125

Lys Asn Arg Met Asn Tyr Thr Asn Lys Phe Leu Leu Ile Pro Glu Ser
130 135 140

Gly Asp Tyr Phe Ile Tyr Ser Gln Val Thr Phe Arg Gly Met Thr Ser
145 150 155 160

Glu Cys Ser Glu Ile Arg Gln Ala Gly Arg Pro Asn Lys Pro Asp Ser
165 170 175

Ile Thr Val Val Ile Thr Lys Val Thr Asp Ser Tyr Pro Glu Pro Thr
180 185 190

Gln Leu Leu Met Gly Thr Lys Ser Val Cys Glu Val Gly Ser Asn Trp
195 200 205

Phe Gln Pro Ile Tyr Leu Gly Ala Met Phe Ser Leu Gln Glu Gly Asp
210 215 220

Lys Leu Met Val Asn Val Ser Asp Ile Ser Leu Val Asp Tyr Thr Lys
225 230 235 240

Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly Ala Phe Leu Leu
245 250

<210> 111

<211> 199

<212> PRT

<213> 智人

<400> 111

Met Thr Leu His Pro Ser Pro Ile Thr Cys Glu Phe Leu Phe Ser Thr
 1 5 10 15

Ala Leu Ile Ser Pro Lys Met Cys Leu Ser His Leu Glu Asn Met Pro
 20 25 30

Leu Ser His Ser Arg Thr Gln Gly Ala Gln Arg Ser Ser Trp Lys Leu
 35 40 45

Trp Leu Phe Cys Ser Ile Val Met Leu Leu Phe Leu Cys Ser Phe Ser
 50 55 60

Trp Leu Ile Phe Ile Phe Leu Gln Leu Glu Thr Ala Lys Glu Pro Cys
 65 70 75 80

Met Ala Lys Phe Gly Pro Leu Pro Ser Lys Trp Gln Met Ala Ser Ser
 85 90 95

Glu Pro Pro Cys Val Asn Lys Val Ser Asp Trp Lys Leu Glu Ile Leu
 100 105 110

Gln Asn Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Gly Gln Val Ala Pro Asn Ala Asn
 115 120 125

Tyr Asn Asp Val Ala Pro Phe Glu Val Arg Leu Tyr Lys Asn Lys Asp
 130 135 140

Met Ile Gln Thr Leu Thr Asn Lys Ser Lys Ile Gln Asn Val Gly Gly
 145 150 155 160

Thr Tyr Glu Leu His Val Gly Asp Thr Ile Asp Leu Ile Phe Asn Ser
 165 170 175

Glu His Gln Val Leu Lys Asn Asn Thr Tyr Trp Gly Ile Ile Leu Leu
 180 185 190

Ala Asn Pro Gln Phe Ile Ser
 195

<210> 112
 <211> 391
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 112

Met Gly Tyr Pro Glu Val Glu Arg Arg Glu Leu Leu Pro Ala Ala Ala
 1 5 10 15

Pro Arg Glu Arg Gly Ser Gln Gly Cys Gly Cys Gly Gly Ala Pro Ala
 20 25 30

Arg Ala Gly Glu Gly Asn Ser Cys Leu Leu Phe Leu Gly Phe Phe Gly
 35 40 45

Leu Ser Leu Ala Leu His Leu Leu Thr Leu Cys Cys Tyr Leu Glu Leu
 50 55 60

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

Ser Gly Thr Pro Gly Thr Ser Gly Thr Leu Ser Ser Leu Gly Gly Leu
 85 90 95

Asp Pro Asp Ser Pro Ile Thr Ser His Leu Gly Gln Pro Ser Pro Lys
 100 105 110

Gln Gln Pro Leu Glu Pro Gly Glu Ala Ala Leu His Ser Asp Ser Gln
 115 120 125

Asp Gly His Gln Met Ala Leu Leu Asn Phe Phe Phe Pro Asp Glu Lys
 130 135 140

Pro Tyr Ser Glu Glu Glu Ser Arg Arg Val Arg Arg Asn Lys Arg Ser
 145 150 155 160

Lys Ser Asn Glu Gly Ala Asp Gly Pro Val Lys Asn Lys Lys Lys Gly
 165 170 175

Lys Lys Ala Gly Pro Pro Gly Pro Asn Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly
 180 185 190

Pro Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Ile Pro Gly Ile Pro Gly Ile
 195 200 205

Pro Gly Thr Thr Val Met Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly
 210 215 220

Pro Gln Gly Pro Pro Gly Leu Gln Gly Pro Ser Gly Ala Ala Asp Lys
 225 230 235 240

Ala Gly Thr Arg Glu Asn Gln Pro Ala Val Val His Leu Gln Gly Gln
 245 250 255

Gly Ser Ala Ile Gln Val Lys Asn Asp Leu Ser Gly Gly Val Leu Asn
 260 265 270

Asp Trp Ser Arg Ile Thr Met Asn Pro Lys Val Phe Lys Leu His Pro
 275 280 285

Arg Ser Gly Glu Leu Glu Val Leu Val Asp Gly Thr Tyr Phe Ile Tyr
 290 295 300

Ser Gln Val Glu Val Tyr Tyr Ile Asn Phe Thr Asp Phe Ala Ser Tyr
 305 310 315 320

Glu Val Val Val Asp Glu Lys Pro Phe Leu Gln Cys Thr Arg Ser Ile
 325 330 335

Glu Thr Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Thr Cys Tyr Thr Ala Gly Val Cys
 340 345 350

Leu Leu Lys Ala Arg Gln Lys Ile Ala Val Lys Met Val His Ala Asp
 355 360 365

Ile Ser Ile Asn Met Ser Lys His Thr Thr Phe Phe Gly Ala Ile Arg
 370 375 380

Leu Gly Glu Ala Pro Ala Ser
 385 390

<210> 113
 <211> 205

<212> PRT

<213> 智人

<400> 113

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr
 180 185 190

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

<210> 114
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 114

Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe
 1 5 10 15

Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu
 20 25 30

Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp
 35 40 45

Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn
 50 55 60

Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys
 65 70 75 80

Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys
 85 90 95

Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp
 100 105 110

Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly
 115 120 125

Glu Phe Cys Val Leu
 130

<210> 115
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 115

Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr
 1 5 10 15

Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp
 20 25 30

Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly
 35 40 45

Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile
 50 55 60

Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys
 65 70 75 80

Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp
 85 90 95

Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe
 100 105 110

His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu
 115 120 125

Phe Cys Val Leu
 130

<210> 116
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽連接子G4S

<400> 116

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 117
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽連接子(G4S)2

<400> 117

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

<210> 118

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽連接子(SG4)2

<400> 118

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

<210> 119

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽連接子(G4S)3

<400> 119

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

<210> 120

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽連接子G4(SG4)2

<400> 120

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

<210> 121

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽連接子(G4S)4

<400> 121

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

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 122

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽連接子GSPGSSSSGS

<400> 122

Gly Ser Pro Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser
1 5 10

<210> 123

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽連接子GSGSGSGS

<400> 123

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5

<210> 124

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽連接子GSGSGNGS

<400> 124

Gly Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser
1 5

<210> 125

<211> 8

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子GGSGSGSG

<400> 125

Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 126
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子GGSGSG

<400> 126

Gly Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 127
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子GGSG

<400> 127

Gly Gly Ser Gly
1

<210> 128
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GGSGNGSG

<400> 128

Gly Gly Ser Gly Asn Gly Ser Gly
1 5

<210> 129

<211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽連接子GGNGSGSG

<400> 129

Gly Gly Asn Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5

<210> 130
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽連接子GGNGSG

<400> 130

Gly Gly Asn Gly Ser Gly
 1 5

<210> 131
 <211> 2166
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 二聚hu 4-1BBL (71-254) - CL* Fc杵鏈之核苷酸序列

<400> 131
 agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgcctggacct ggggcagggc 60
 atgtttgctc agctgggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggccccct gtctctggtac 120
 agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180
 aaagaactgg tgggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt lctttcagct ggaactgegg 240
 agagtgggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300
 agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgctcc tgccagctcc 360
 gaggccccga atagegcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgc tgccggccag 420
 aggctgggag tgcactctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480
 ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 540

```

ccaagaagcg aaggcggagg cggatctggc ggcggaggat ctagagagg acccgaactg      600
tcccctgacg atccagccgg gctgctggat ctgagacagg gaatgttcgc ccagctggtg      660
gctcagaatg tgctgctgat tgacggacct ctgagctggt actccgacce agggctggca      720
ggggtgtccc tgactggggg actgtcctac aaagaagata caaaagaact ggtggtggct      780
aaagctgggg tgactatgt gttttttcag ctggaactga ggcgggtggt ggctggggag      840
ggctcaggat ctgtgtccct ggctctgcat ctgcagccac tgcgctctgc tgctggcgca      900
gctgcactgg ctctgactgt ggacctgcca ccagcctcta gcgaggccag aaacagcgcc      960
ttcgggttcc aaggacgctt gctgcatctg agcgcgggac agcgcctggg agtgcatctg    1020
catactgaag ccagagcccc gcatgcttgg cagctgactc agggggcaac tgtgctggga    1080
ctgtttcgcg tgacacctga gatccctgcc ggactgcaa gccctagatc agaagggggc    1140
ggagggttccg gagggggagg atctcgtacg gtggctgcac catctgtctt tatcttccca    1200
cccagcgacc ggaagctgaa gtctggcaca gccagcgtcg tgtgcctgct gaataacttc    1260
tacccccgcg aggccaaggt gcagtggaag gtggacaatg cctgcagag cggcaacagc    1320
caggaaagcg tgaccgagca ggacagcaag gactccacct acagcctgag cagcaccctg    1380
acctgagca aggccgacta cgagaagcac aaggtgtacg cctgcgaagt gaccaccag    1440
ggcctgtcta gccccgtgac caagagcttc aaccggggcg agtgcgaca gaccacacc    1500
tgtcttccat gccctgcccc tgaagctgct ggcggcccta gcgtgttctt gttccccca    1560
aagcccaagg acacctgat gatcagccgg accttgaag tgacctgctt ggtggtggat    1620
gtgtcccacg aggacctga agtgaagttc aattggtacg tggacggcgt ggaagtgcac    1680
aatgccaaga ccaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtacctgtt ggtcagcgtc    1740
ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac    1800
aaagccctcg gcgccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa    1860
ccacagggtg acacctgccc cccatgccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg    1920
tggtgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatgcggc tggagtggga gagcaatggg    1980
cagccggaga acaactacaa gaccacgctt cccgigtctg actccgacgg ctctttcttc    2040
ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc    2100
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg    2160
ggtaaa                                           2166

```

<210> 132
 <211> 891
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 單體hu 4-1BBL (71-254) - CH1*之核苷酸序列

<400> 132
 agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60
 atgtttgctc agctgggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggccccct gtcctggtac 120
 agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180
 aaagaactgg tggtaggcaa ggccggcgtg tactacgtgt tcttcagct ggaactgcgg 240
 agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300
 agaagcgtcg ctggcgtgac agctctggct ctgacagtgg atctgcctcc tgccagetcc 360
 gaggccccga atagcgcatt tgggtttcaa ggccggctgc tgcacctgic tgccggccag 420
 agactgggag tgcattctgca cacagaggcc agagccaggc acgcctggca gctgacacag 480
 ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttcttgccgg cctgcctagc 540
 cctagatctg aaggcggcgg aggttccgga ggccggaggat ctgctagcac aaagggcccc 600
 agcgtgttcc ctctggcccc tagcagcaag agcacatctg gcggaacagc cggcctgggc 660
 tgccitggigg aagattactt ccccagacc gtgaccgtgt cctggaattc tggcgccttg 720
 acaagcggcg tgcacacctt tccagccgtg ctgcagagca gggcctgta ctctctgagc 780
 agcgtcglga cagtgccag cagctctctg ggcaccaga cctacatctg caacgtgaac 840
 cacaagccca gcaacaccaa ggtggacgag aaggtggaac ccaagtctg c 891

<210> 133
 <211> 1350
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗PD1(0314) Fc白鏈之核苷酸序列

<400> 133
 gaagtgacg tgctcgaaag cggcggggga ctggtccagc ccggcggttc cctgaggctg 60
 tcttgcccg ctccagggtt cagcttttcc tcttacacca tgagttgggt cagacaggca 120

cctggcaagg gactggagtg ggtcgccaca atcagcgggtg gcgggcgcga catttattac 180
 ccagattccg tgaaggacg gttcaccatc tctagggaca actcaaagaa tactctglat 240
 ttgcagatga acagcctgag agctgaggat acagcagttt actactgtgt gctcctgacc 300
 ggccgcgtct attttgcct tgactcctgg ggacaaggca ctctggtgac cgtatctagt 360
 gctagcacca agggccctc cgtgttcccc ctggcccca gcagcaagag caccagcggc 420
 ggcacagccg ctctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
 tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgcccgtgt gcagagtict 540
 ggccctgtata gcctgagcag cgtggtcacc gtgcccttcta gcagcctggg caccagacc 600
 tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagccc 660
 aagagctgcg acaaaactca cacatgccc cccgtgccag cacctgaagc tgcaggggga 720
 ccgtcagtct tctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct 780
 gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840
 tacgtggacg gegtggaggt gcalaatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
 agcacgtacc gltggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag 960
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020
 aaagccaaag ggcagcccc agaaccacag gtgtgcacc tgccccatc ccgggatgag 1080
 ctgaccaaga accaggtcag cctctcgtgc gcagtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
 ctggactccg acggtcctt ctctctcgtg agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
 cagcagggga acgtctctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa cacttacacg 1320
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 134
 <211> 654
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗PD1 (0314)輕鏈之核苷酸序列

<400> 134
 gagatcgtgc tgaccagag ccccgccaca ctctccctgt ctctggcga aagggctacc 60
 ctttcatgca gagcaagcga gtccgtggac acttctgata acagtttcat tcaactggtat 120

cagcagaagc cagggcagag cccccgcctg ctcatctatc ggtccctctac actggagtca 180
 gggattccctg ccaggttttag cggctccggt tctgggaccg acttcacitit gaccatcagt 240
 agcctggaac cagaggattt tgctgtgtac tattgtcaac agaattacga cgtcccctgg 300
 acattcggcc agggaaaccaa agtggagata aagcgtacgg tggtgcacc atctgtcttc 360
 atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgtttgt gtgcctgctg 420
 aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 480
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540
 agcaccttga cgctgagcaa agcagactac gaaaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600
 acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt 654

<210> 135
 <211> 2166
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 二聚hu 4-1BBL (71-254) - CL Fc杵鏈之核苷酸序列

<400> 135
 agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60
 atgtttgctc agctgggtggc ccagaacgtg ctgtgatcg atggccccct gtcttggtac 120
 agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180
 aaagaactgg tggtagccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgogg 240
 agagtgggtg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccttgcattt gcagcctctg 300
 agaagcgtg ctggcgtgac agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 360
 gaggccccga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420
 aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480
 ggcgctacag tgctgggctt gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 540
 ccaagaagcg aaggcggagg cggatctggc ggcggaggat cttagagaggg acccgaactg 600
 tcccctgacg atccagccgg gctgctggat ctgagacagg gaatgttctg ccagctggtg 660
 gctcagaatg tgctgctgat tgacggacct ctgagctggt actccgacct agggctggca 720
 ggggtgtccc tgactggggg actgtcctac aaagaagata caaaagaact ggtggtggt 780

aaagctgggg tgtactatgt gttttttcag ctggaactga ggcgggtggt ggctggggag 840
 ggctcaggat ctgtgtccct ggctctgcat ctgcagccac tgcgctctgc tgctggcgca 900
 gctgcactgg ctctgactgt ggacctgcca ccagcctcta gcgaggccag aaacagcgcc 960
 ttcgggttcc aaggacgcct gctgcatctg agcgccggac agcgccctggg agtgcactctg 1020
 catactgaag ccagagcccc gcatgcttgg cagctgactc agggggcaac tgtgctggga 1080
 ctgtttcgcg tgacacctga gatccctgcc ggactgcea gccctagatc agaagggggc 1140
 ggaggttccg gagggggagg atctcgtacg gtggccgctc cctccgtgtt tatctttccc 1200
 ccatccgatg aacagctgaa aagcggcacc gcctccgtcg tgtgtctgct gaacaatttt 1260
 tacctaggg aagctaaagt gcagtggaaa gtggataacg cactgcagtc cggcaactcc 1320
 caggaatctg tgacagaaca ggactccaag gacagcacct aciccctgtc ctccaccctg 1380
 aactgtcta aggctgatta tgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 1440
 ggctgagct cggccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgtgaca gaccacacc 1500
 tgteccctt gtcctgccc tgaagctgct ggcggccctt ctgtgttctt gttccccca 1560
 aagcccaagg acacctgat gatcagccgg acccccgaag tgacctgctt ggtggtggat 1620
 gtgtcccacg aggacctga agtgaagttc aattggtacg tggacggcgt ggaagtgcac 1680
 aatgccaaga ccaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggteagcgtc 1740
 cteaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1800
 aaagccctcg gcgccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 1860
 ccacaggtgt acacctgcc cccatgccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 1920
 tggtgcttgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1980
 cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctctttcttc 2040
 ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 2100
 tccgtgatgc atgaggetct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 2160
 ggtaaa 2166

- <210> 136
- <211> 891
- <212> DNA
- <213> 人工序列

<220>

<223> 單體hu 4-1BBL (71-254) - CH1之核苷酸序列

<400> 136

```

agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc      60
atgtttgctc agctgggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggccccct gtcctgggtac      120
agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggeggec tgagctacaa agaggacacc      180
aaagaactgg tgggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg      240
agagtgggtg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg      300
agaagcgtg ctggcgtgc agctctggct ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc      360
gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggccggctgc tgcacctgtc tgccggccag      420
agactgggag tgcatactgca cacagaggcc agagccagge acgcctggca gctgacacag      480
ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttcttgccgg cctgcctagc      540
cctagatctg aaggcggcgg aggttccgga ggcggaggat ctgctagcac caaaggccct      600
tccgtgttte ctctggctcc tagctccaag tccacctctg gaggcaccgc tgctctcgga      660
tgccctgtga aggattatft tctgagcct gtgacagtgt cctggaatag cggagcactg      720
acctctggag tgcatacttt ccccgctgtg ctgcagtcct ctggactgta cagcctgagc      780
agcgtgggtg cagtgccacg cagcagcctg ggcaccacga cctacatctg caacgtgaac      840
cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag aaggtggaac ccaagtcttg t      891

```

<210> 137

<211> 2511

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 與二聚hu 4-1BBL (71-254)融合之抗PD1(0314) Fc白鏈之核苷酸序列

<400> 137

```

gaagtgcagc tgctcgaag cggcggggga ctggtccagc ccggcggttc cctgaggctg      60
tcttgcgceg cttcagggtt cagcttttcc tcttacacca tgagttgggt cagacaggca      120
cctggcaagg gactggagtg ggtcgccaca atcagcggtg gcgggcgcga catttattac      180
ccagattccg tgaaaggacg gttcaccatc tetagggaca actcaaagaa tactctgtat      240
ttgcagatga acagcctgag agctgaggat acagcagttt actactgtgt gctcctgacc      300

```

ggccgcgtct attttgcctt tgactcctgg ggacaaggca ctctgggtgac cgtatctagt 360
 gctagcacca agggcccctc cgtgttcccc ctggcccca gcagcaagag caccagcggc 420
 ggcacagccg ctctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
 tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagttct 540
 ggctgtata gcctgagcag cgtggteacc gtgccitcta gcagcctggg caccagacc 600
 tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagccc 660
 aagagctgcg acaaaaactca cacatgccc ccgtgccag cactgaagc tgcaggggga 720
 ccgtcagtct tctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct 780
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
 agcacgtacc gigtggtcag cgtctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag 960
 gagtacaagt gcaaggctct caacaaagcc ctggcgccc ccctcgagaa aacctctcc 1020
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtgcacc tgcctccatc ccgggatgag 1080
 ctgaccaaga accaggtcag cctctcgtgc gcagtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
 ctggactccg acggctcctt ctctctcgtg agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtgga ggcggcggaa gcggaggagg aggatccaga 1380
 gagggcccctg agctgagccc cgatgatcct gctggactgc tggacctgcg gcagggcatg 1440
 tttgctcagc tgggtggccca gaacgtgctg ctgatcgatg gccccctgtc ctggtacagc 1500
 gatcctggac tggctggcgt gtcactgaca ggcgccctga gctacaaaga ggacaccaa 1560
 gaactggigg tggccaagge cggcgtgtac tacgtgttct ttcagctgga actgcggaga 1620
 gtggtggccg gcgaaggatc tggctctgtg tctctggccc tgcattctga gcctctgaga 1680
 agcgtctctg gcgctgcage tctggcactg acagtggatc tgctctctgc cagctccgag 1740
 gcccgaata gcgcatttgg gtttcaaggc aggctgctgc acctgtctgc cggccagagg 1800
 ctgggagtgc atctgcacac agaggccagg gctagacaag cctggcagct gacacagggc 1860
 gctacagtgc tgggcctgtt cagagtgacc cccgagattc cagccggcct gccttctca 1920
 agaagcgaag gcggaggcgg atctggcggc ggaggatcta gagagggacc cgaactgtcc 1980

cctgacgatac cagccgggct gctggatctg agacagggaa tgftegccca gctggtggct 2040
 cagaatgtgc tgctgattga cggacctctg agctggfact ccgaccagg gctggcaggg 2100
 gtgtccctga ctgggggact gtcctacaaa gaagatacaa aagaactggt ggtggctaaa 2160
 gctgggggtgt actatgtgtt ttttcagctg gaactgaggc gggtaggtggc tggggagggc 2220
 tcaggatctg tgccctggc tetgeatctg cageactgc gctctgctgc tggcgcagct 2280
 gcaactggctc tgactgtgga cctgccacca gccctagcg aggccagaaa cagcgccttc 2340
 gggttccaag gacgcctgct gcatctgagc gccggacagc gccaggaggt gcatctgcat 2400
 actgaagcca gagccccgca tgcttggcag ctgactcagg gggcaactgt gctgggactg 2460
 tttcgcgtga cacctgagat cctgcccga ctgccaagcc ctagatcaga a 2511

<210> 138
 <211> 1929
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 與單體hu 4-1BBL (71-254)融合之抗PD1(0314) Fc杵鏈之核苷酸序列

<400> 138
 gaagtgcagc tgctcgaaag cggcggggga ctggtccagc ccggcggttc cctgaggctg 60
 tcttgcccg cttcagggtt cagctttcc tcttacacca tgagttgggt cagacagga 120
 cctggcaagg gactggagtg ggtgccaca atcagcggtg gcgggcgcga catttattac 180
 ccagattccg tgaaggagc gttcaccatc tctagggaca actcaaagaa tactctgtat 240
 ttgcagatga acagcctgag agctgaggat acagcagitt actactgtgt gctcctgacc 300
 ggccgcgtct attttgccct tgactcctgg ggacaaggca ctctggtgac cgtatctagt 360
 gctagcacca agggcccac ggtcttccc ctggcacct cctccaagag cacctctggg 420
 ggcacagcgg ccttgggctg cctggtaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg 480
 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttc eggctgtcct acagtcctca 540
 ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 600
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660
 aaafcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaagc tgcaggggga 720
 ccgtcagtct tctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccgaccct 780

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgagggtcaa gttcaactgg 840
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag 960
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcgggcggc ccatcgagaa aaccatctcc 1020
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcacctg cagagatgag 1080
 ctgaccaaga accaggtgtc cctgtggtgt ctggtcaagg gcttctaccc cagegatatc 1140
 gccgtggagt gggagagcaa cggccagcct gagaacaact acaagaccac cccccctgtg 1200
 ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac tccaaactga ccgtggacaa gagccgggtg 1260
 cagcagggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgagg cctgcacaa ccaactaccc 1320
 cagaagtccc tgagcctgag ccccgccgga ggcggcggaa gcggaggagg aggatccaga 1380
 gagggccctg agctgagccc cgatgatcct gctggactgc tggacctgcg gcagggcatg 1440
 tttgctcage tgggtggcca gaacgtgctg ctgatgatg gccccctgtc ctggtacagc 1500
 gatcctggac tggctggcgt gtcactgaca ggcgccctga gctacaaaga ggacacccaaa 1560
 gaactggtgg tggccaaggc cggcgtgtac tacgtgttct ttcagctgga actgcggaga 1620
 gtggtggccg gcgaaggatc tggctctgtg tctctggccc tgcattctgca gcctctgaga 1680
 agecctgctg gcgctgcagc tctggcactg acagtggatc tgcctcctgc cagctccgag 1740
 gcccgaata gcgcatttgg gtttcaaggc aggctgctgc acctgtctgc cggccagagg 1800
 ctgggagtgc atctgcacac agaggccagg gctagacacg cctggcagct gacacagggc 1860
 gctacagtgc tgggcctgtt cagagtgacc cccgagattc cagccggcct gccttctcca 1920
 agaagcгаа 1929

<210> 139
 <211> 2130
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 二聚hu 4-1BBL (71-248) - CL* Fc杵鏈之核苷酸序列

<400> 139
 agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60
 atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggccccct gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180
 aaagaactgg tggtaggcaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240
 agagtggagg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccttgcattt gcagcctctg 300
 agatctgctg ctggcgccgc tgctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagcagc 360
 gagggcccga atagegcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420
 aggctgggag tgcattctgca cacagaggcc agggctagac acgctggca gctgacacag 480
 ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga tccagccgg actgggaggc 540
 ggcgatctg gcggcggagg atctagagaa ggaccgagc tgtcccctga cgatccagcc 600
 gggctgctgg atctgagaca gggaatgttc gccagctgg ttgctcagaa tgtgctgctg 660
 attgacggac ctctgagctg gtactccgac ccagggtgg caggggtgtc cctgactggg 720
 ggactgtcct acaagaaga taaaaaga ctgggtgggg ctaaagctgg ggtgtactat 780
 gtgttttttc agctggaact gaggcgggtg gtggctgggg agggctcagg atctgtgtcc 840
 ctggctctgc atctgcagcc actgcctctt gcagcagggg ctgcagcact ggccctgact 900
 gtggacctgc cccagcttc tccgaggcc agaaacagcg ccttcgggtt ccaaggacgc 960
 ctgctgcatt tgagcggcg acagcgcctg ggagtgcatt tgcatactga agccagagcc 1020
 cggcatgctt ggcagctgac tcagggggca actgtgctgg gactgtttcg cgtgacacct 1080
 gagatccccg ctggactggg cggaggcggg tccggagggg gaggatctcg tacggtggct 1140
 gcaccatctg tttttatctt cccaccagc gaccggaagc tgaagtctgg cacagccagc 1200
 gtctgtgtcc tgctgaataa cttctacccc cgcgaggcca aggtgcagtg gaagggtggc 1260
 aatgccctgc agagcggcaa cagccaggaa agcgtgaccg agcaggacag caaggactcc 1320
 acctacagcc tgagcagcac cctgacctg agcaaggccg actacgagaa gcacaaggtg 1380
 tacgctgagc aagtgacca ccaggcctg tctagccccg tgaccaagag ctccaaccgg 1440
 ggcgagtgcg acaagacce cacctgtcct ccatgccctg cccctgaagc tgctggcggc 1500
 cctagcgtgt tctgtttccc cccaaagccc aaggacacce tgatgatcag cggaccct 1560
 gaagtgacct gcgtgggtgg ggatgtgtcc cagcaggacc ctgaagtgaa gttcaattgg 1620
 tacgtggacg gcgtggaagt gcacaatgcc aagaccaagc cgcgggagga gcagtacaac 1680
 agcacgtacc gtgtggctcag cgtcctcacc gtctgcacc aggaactggct gaatggcaag 1740

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1800
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatg ccgggatgag 1860
 ctgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1920
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1980
 ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 2040
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa cactacacg 2100
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 2130

<210> 140
 <211> 873
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 單體hu 4-IBBL (71-248) - CH1*之核苷酸序列

<400> 140
 agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60
 atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggccccct gtctctggtac 120
 agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180
 aaagaactgg tgggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240
 agagtgggtg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300
 agatctgctg ctggcgccgc tgctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagcagc 360
 gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420
 aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480
 ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg actgggaggc 540
 ggaggttccg gaggcggagg atctgctagc acaaagggcc ccagcgtgtt cctcttgcc 600
 cctagcagca agagcacatc tggcggaaaca gccgccctgg gctgcctggt ggaagattac 660
 ttccccgagc ccgtgaccgt gtcttggaaat tctggcgccc tgacaagcgg cgtgcacacc 720
 tttccagccg tgctgcagag cagcggcctg tactctctga gcagcgtcgt gacagtgcc 780
 agcagctctc tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc 840
 aaggtggacg agaaggtgga acccaagtcc tgc 873

<210> 141
 <211> 2130
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 二聚hu 4-1BBL (71-248) - CL Fc杵鏈之核苷酸序列

<400> 141
 agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgetggac tgctggacct gcggcagggc 60
 atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggccccct gtcttggtac 120
 agcgatcctg gactggetgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180
 aaagaactgg tgggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240
 agagtgggtg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccttgcctct gcagcctctg 300
 agatctgctg ctggcgccgc tgctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagcagc 360
 gagggcccga atagcgcat tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420
 aggctgggag tgcattctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480
 ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg actgggaggg 540
 ggcggatctg gcggcggagg atctagagaa ggaccgcgagc tgtcccctga cgatccagcc 600
 gggctgctgg atctgagaca gggaatgttc gccagctgg tggtcagaa tigtctgctg 660
 attgacggac ctctgagctg gtactccgac ccagggctgg caggggtgtc cctgactggg 720
 ggactgtcct acaaagaaga tacaaaagaa ctggtggtgg ctaaagctgg ggtgtactat 780
 gtgttttttc agctggaact gaggcgggtg gtggctgggg agggctcagg atctgtgtcc 840
 ctggctctgc atctgcagcc actgcgctct gcagcagggg ctgcagcact ggcctgact 900
 gtggacctgc cccagcttc ttccgaggcc agaaacagcg ccttcgggtt ccaaggacgc 960
 ctgctgcatc tgagcggcgg acagcgctg ggagtgcate tgcatactga agccagagcc 1020
 cggcatgctt ggcagctgac tcagggggca actgtgctgg gactgtttcg cgtgacacct 1080
 gagatccccg ctggactggg cggaggcgggt tccggagggg gaggatctcg tacggtggcc 1140
 gctccctecg tgtttatctt tccccatcc gatgaacagc tgaaaagcgg caccgcctcc 1200
 gtcgtgtgtc tgctgaacaa tttttaccct aggggaagcta aagtgcagtg gaaagtggat 1260
 aacgcactgc agtccggcaa ctcccaggaa tctgtgacag aacaggactc caaggacagc 1320
 acctactccc tgctctccac cctgacactg tetaaggctg attatgagaa acacaaagtc 1380

tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg 1440
 ggagagtgtg acaagaccca cacctgtccc ccttgtcctg cccctgaagc tgctggcggc 1500
 ccttctgtgt tcctgttccc cccaaagccc aaggacaccc tgatgatcag ccggaccccc 1560
 gaagtgacct gcgtgggtgt ggatgtgtcc cacgaggacc ctgaagtgaa gttcaattgg 1620
 tacgtggacg gcgtggaagt gcacaatgcc aagaccaagc cgcgggagga gcagtacaac 1680
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcttgcacc aggactggct gaatggcaag 1740
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1800
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatg ccgggatgag 1860
 ctgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1920
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1980
 ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 2040
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccaactacag 2100
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 2130

- <210> 142
- <211> 873
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 單體hu 4-1BBL (71-248) - CH1之核苷酸序列

<400> 142
 agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60
 atgtttgctc agctgggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggccccct gtctctggtac 120
 agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180
 aaagaactgg tgggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240
 agagtgggtg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300
 agatctgctg ctggcgccgc tgctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagcagc 360
 gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420
 aggctgggag tgcattctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480
 ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg actgggaggc 540

ggaggttccg gaggcggagg atctgctagc accaaaggcc ctcccggtt tccctctggt 600
 cctagetcca agtccaccic tggaggcacc gctgctctcg gatgcctcgt gaaggattat 660
 tttcctgagc ctgtgacagt gtccctggaat agcggagcac tgacctctgg agtgcatact 720
 ttccccgctg tgctgcagtc ctctggactg tacagcctga gcagcgtggt gacagtgcc 780
 agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc 840
 aaggtggaca agaaggtgga acccaagtct tgt 873

<210> 143
 <211> 2475
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 與二聚hu 4-1BBL (71-248)融合之抗PD1(0314) Fc白鏈之核苷酸序列

<400> 143
 gaagtgcagc tgctcgaaag cggcggggga ctggtccagc ccggcggttc cctgaggctg 60
 tcttgcccg ctccagggtt cagcttttcc tcttacacca tgagttgggt cagacaggca 120
 cctggcaagg gactggagtg ggtcgccaca atcagcggtg gcgggcgcga catttattac 180
 ccagattccg tgaaggagc gttcaccatc tctagggaca actcaaagaa tactctgtat 240
 ttgcagatga acagcctgag agctgaggat acagcagttt actactgtgt gctcctgacc 300
 ggcccgctct attttgccct tgactcctgg ggacaaggca ctctggtgac cgtatctagt 360
 gctagcacca agggcccctc cgtgttcccc ctggccccca gcagcaagag caccagcggc 420
 ggcacagccg ctctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
 tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagttct 540
 ggccctgtata gcctgagcag cgtgggtcacc gtgccttcta gcagcctggg caccagacc 600
 tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagccc 660
 aagagctgcg acaaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720
 ccgtcagctt tcccttttccc cccaaaacc aaggacacc tcatgalctc ccggaccct 780
 gaggtcacat gcgtgggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgagggtcaa gttcaactgg 840
 tacgtggacg gcgtggagggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
 agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctgggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtgcaccc tgccccatc ccgggatgag 1080
 ctgaccaaga accaggtcag cctctcgtgc gcagtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
 ctggactccg acggctcctt cttcctcgtg agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccaactacag 1320
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtgga ggcggcgga gcgaggagg aggatccaga 1380
 gagggccctg agctgagccc tgatgatcct gccggactgc tggacctgcg gcagggaatg 1440
 tttgccagc tggtagccca gaacgtgctg ctgatcgatg gccccctgtc ctggtacagc 1500
 gatcctggac tggctggcgt gtcactgaca ggcggcctga gctacaaaga ggacacccaa 1560
 gaactgggtg tggccaaggc cggcgtgtac tacgtgttct ttcagctgga actgcbgaga 1620
 gtggtggccg gcgaaggatc tggctctgtg tctctggccc tgcatctgca gcctctgaga 1680
 tctgtctgct gcgcccgtgc tctggcactg acagtggatc tgccctctgc cagcagcgag 1740
 gcccggata gcgcatttgg gtttcaaggc aggtctgtgc acctgtctgc cggccagagg 1800
 ctgggagtgc atctgcacac agaggccagg gctagacacg cctggcagct gacacagggc 1860
 gctacagtgc tgggcctgtt cagagtgacc cccgagattc cagcaggcct gggaggcggc 1920
 ggatctggcg gcggaggatc tagagaagga cccgagctgt cccccgacga tcccgtggg 1980
 ctgctggatc tgagacaggg catgttcgct cagctgggtg ctcagaatgt gctgctgatt 2040
 gacggacctc tgagctggta ctccgacca ggcctggcag ggggtgtcct gactggggga 2100
 ctgtcctaca aagaagatac aaaagaactg gtggtggcta aagctggggg gtactatgtg 2160
 tttttcagc tggaaactgag gcgggtggtg gctggggagg gctcaggatc tgtgtccctg 2220
 gctctgcatc tgcagccact gcgctctgca gcaggggctg cagcactggc cctgactgtg 2280
 gacctgcccc cagcttcttc cgaggccaga aacagcgctt tcgggtlcca aggacgctg 2340
 ctgcatctga gcgccggaca gcgcctggga gtgcatctgc atactgaagc cagagcccgg 2400
 catgcttggc agctgactca gggggcaact gtgctgggac tgtttcgcgt gacacctgag 2460
 atcccagccg ggctc 2475

<210> 144
 <211> 1911

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 與單體hu 4-1BBL (71-248)融合之抗PD1(0314) Fc杵鏈之核苷酸序列

<400> 144

```

gaagtcagc tgctcgaaag cggcggggga ctggtccagc ccggcgggtc cctgaggctg      60
tcttgcgccg ctteagggtt cagcttttcc tcttacacca tgagttgggt cagacaggca      120
cctggcaagg gactggagtg ggtcgccaca atcagcggig gcgggcgcga catttattac      180
ccagattccg tgaaggacg gttcaccatc tctagggaca actcaaagaa tactctgtat      240
ttgcagatga acagcctgag agctgaggat acagcagttt actactgtgt gtcctgacc      300
ggccgcgtct attttgcctt tgactcctgg ggacaaggca ctctggtgac cgtatctagt      360
gctagcacca agggcccacg ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg      420
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg      480
tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca      540
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc      600
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc      660
aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcccc ccgtgccagc cacctgaagc tgcaggggga      720
ccgtcagtet tctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct      780
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      840
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac      900
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag      960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggegcc ccatcgagaa aacctctcc      1020
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgcacctg cagagatgag      1080
ctgaccaaga accaggtgtc cctgtggtgt ctggtcaagg gcttctacc cagcgatctc      1140
gccgtggagt gggagagcaa cggccagcct gagaacaact acaagaccac cccccctgtg      1200
ctggacagcg acggcagctt ctctctgtac tccaaactga ccgtggacaa gagccggtgg      1260
cagcagggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc      1320
cagaagtccc tgagcctgag ccccggcgga ggcggcgga gcgaggagg aggateccaga      1380
gagggccctg agctgagccc tgatgatcct gccggactgc tggacctgcg gcagggaatg      1440

```

ttgcccagc tggaggccca gaacgtgctg ctgatcgatg gccccctgtc ctggtacagc 1500
 gatcctggac tggctggcgt gtcactgaca ggcgccctga gctacaaaga ggacacccaaa 1560
 gaactggagg tggccaaggc cggcgtgtac tacgtgttct ttcagctgga actgctggaga 1620
 gtggtggccg gcgaaggatc tggctctgtg tctctggccc tgcattctgca gcctctgaga 1680
 tctgtctctg gcgccctgct tctggcactg acagtggatc tgcctcctgc cagcagcgag 1740
 gcccggaata gcgcatttgg gtttcaaggc aggcctctgc acctgtctgc cggccagagg 1800
 ctgggagtgc atctgcacac agaggccagg gctagacacg cctggcagct gacacagggc 1860
 gctacagtgc tgggcctggt cagagtgacc cccgagattc ctgccgggct c 1911

<210> 145
 <211> 1806
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Fc白二聚配位體(71-248)鏈之核苷酸序列

<400> 145
 gacaaaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 60
 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
 tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtea agttcaactg gtacgtggac 180
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtataa cagcacgtac 240
 cgtgtggica gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggegcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa 360
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtgcacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag 420
 aaccaggtea gcctctcgtg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctggag 480
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540
 gacggctcct tcttctctgt gagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg 600
 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660
 ctctccctgt ctccgggtgg aggcggcgga agcggaggag gaggatccag agagggccct 720
 gagctgagcc ctgatgatcc tgcggactg ctggacctgc ggcagggaat gtttggccag 780
 ctggtggccc agaacgtgct gctgatgat ggccccctgt cctggtacag cgatcctgga 840

ctggctggcg tgcactgac aggcggcctg agctacaaag aggacaccaa agaactggtg 900
 gtggccaagg ccggcgtgta ctacgtgttc tttcagctgg aactgaggag agtgggtggcc 960
 ggcgaaggat ctggctctgt gtctctggcc ctgcatctgc agcctctgag atctgctgct 1020
 ggcgccgctg ctctggcact gacagtggat ctgcctcctg ccagcagcga ggccccgaat 1080
 agcgcatttg ggtttcaagg caggctgctg cacctgtctg ccggccagag gctgggagtg 1140
 catctgcaca cagaggccag ggctagacac gcctggcagc tgacacaggg cgctacagtg 1200
 ctgggcctgt tcagagtgac ccccagatt ccagcaggcc tgggaggcgg cggatctggc 1260
 ggcggaggat ctagagaagg acccgagctg tccccgacg atccccctgg gctgctggat 1320
 ctgagacagg gcatgttcgc tcagctggtg gctcagaatg tgctgctgat tgacggacct 1380
 ctgagctggg actccgacct agggctggca ggggtgtccc tgactggggg actgtectac 1440
 aaagaagata caaaagaact ggtgggtggct aaagctgggg tgtactatgt gttttttcag 1500
 ctggaactga ggcgggtggg ggctggggag ggctcaggat ctgtgtccct ggctctgcat 1560
 ctgcagccac tgcgctctgc agcaggggct gcagcactgg ccttgactgt ggacctgcc 1620
 ccagcttctt ccgaggccag aaacagcgcc ttcgggttcc aaggacgct gctgcatctg 1680
 agcggccggac agcgcttggg agtgcatctg catactgaag ccagagcccg gcatgcttgg 1740
 cagctgactc agggggcaac tgtgctggga ctgtttcgcg tgacacctga gateccagcc 1800
 gggctc 1806

<210> 146
 <211> 1212
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Fc白單體配位體(71-248)鏈之核苷酸序列

<400> 146
 gacaaaactc acacatgccc accgtgceca gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 60
 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgactc cccggacccc tgaggtcaca 120
 tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtea agttcaactg gtacgtggac 180
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
 cgtgtggtea gcgtectcac cgtectgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
 tgcaaggctc ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtgcacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 420
aaccaggtea gccctctcgtg cgcagtc meta ggcttctatc ccagcgacat cgcctgtggag 480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctccogt gctggactcc 540
gacggctcct tcttctcgtg gagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg 600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660
ctctccctgt ctccgggtag agagggccct gagctgagcc ctgatgatcc tgccggactg 720
ctggacctgc ggcaggggat gtttgcccag ctggtggccc agaactgtgt gctgatcgat 780
ggccccctgt cctggtacag cgatcctgga ctggctggcg tgtcactgac aggcggcctg 840
agctacaaag aggacaccaa agaactggtg gtggccaagg ccggcgtgta ctacgtgttc 900
tttcagctgg aactgcggag agtgggtggcc ggcgaaggat ctggctctgt gtctctggcc 960
ctgcatctgc agcctctgag atctgctgct ggcgccgtg ctctggcact gacagtggat 1020
ctgctctctg ccagcagcga ggccccggaat agcgcatttg ggtttcaagg caggctgctg 1080
cacctgtctg ccggccagag gctgggagtg catctgcaca cagaggccag ggctagacac 1140
gcctggcagc tgacacaggg cgctacagtg ctgggcctgt tcagagtgac ccccagatt 1200
cctgccgggc tc 1212

- <210> 147
- <211> 2445
- <212> DNA
- <213> 人工序列

<220>
<223> 與二聚hu 4-1BBL (71-248)融合之抗PD1(0314) Fc杵鏈之核苷酸序列

<400> 147
gaagtgcagc tgctcgaaag cggcggggga ctggtccagc ccggcggttc cctgaggctg 60
tcttgcgccg ctccaggggt cagcttttcc tcttacacca tgagttgggt cagacaggca 120
cctggcaagg gactggagtg ggtcgccaca atcagcggtg gcgggcgcga catttattac 180
ccagattccg tgaaaggacg gttcaccatc tctagggaca actcaaagaa tactctgtat 240
ttgcagatga acagcctgag agctgaggat acagcagttt actactgtgt gctcctgacc 300
ggccgcgtct attttgcct tgactcctgg ggacaaggca ctctggtgac cgtatctagt 360
gctagcacca agggcccac ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420

ggcacagcgg ccctgggetg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg	480
tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgttcc acagtccctca	540
ggactctact cctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	600
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	660
aaatcttgtg acaaaaactca cacatgccc cegtgccag cacctgaage tgcaggggga	720
ccgtcagtct tectettccc cccaaaacce aaggacacce tcatgatctc ccggaccct	780
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	840
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	900
agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag	960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc	1020
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgcacctg cagagatgag	1080
ctgaccaaga accaggtgtc cctgtgggtgt ctggltcaagg gcttctacc cagcgatctc	1140
gccgtggagt gggagagcaa cggccagcct gagaacaact acaagaccac cccccctgtg	1200
ctggacagcg acggcagctt ctctctgtac tccaaactga ccgtggacaa gagccgggtg	1260
cagcagggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgagg cctgcacaa cactacacc	1320
cagaagtccc tgagcctgag ccccggcaga gagggcctg agctgagccc tgatgatctc	1380
gccggactgc tggacctgcg gcagggaatg ttgcccagc tgggtggccca gaacgtgctg	1440
ctgatgatg gccccctgtc ctggtacagc galcctggac tggctggcgt gtcactgaca	1500
ggcggcctga gctacaaaga ggacaccaa gaactgggtg tggccaaggc cggcgtgtac	1560
tacgtgttct ttcagctgga actgcggaga gtgggtggccg gcgaaggatc tggtctctgtg	1620
tctctggccc tgcactctgca gcctctgaga tctgtctgtg gcgccctgc tctggcactg	1680
acagtggatc tgcctctgc cagcagcag gcccgaata gcgcatttgg gtttcaaggc	1740
aggctgctgc acctgtctgc cggccagagg ctgggagtgc atctgcacac agaggccagg	1800
gctagacacg cctggcagct gacacagggc gctacagtgc tgggcctgtt cagagtgacc	1860
cccagattc cagcagccct gggaggcggc ggatctggcg gcggaggatc tagagaagga	1920
cccagctgt cccccacga tcccgtggg ctgctggatc tgagacaggg catgttcgct	1980
cagctgggtg ctcagaatgt gctgctgatt gacggacctc tgagctggta ctccgacca	2040

gggctggcag ggggtgtccct gactggggga ctgtcctaca aagaagatac aaaagaactg 2100
 gtgggtggcta aagctgggggt gtactatgtg ttttttcagc tggaactgag gcgggtgggtg 2160
 gctggggagg gctcaggatc tgtgtccctg gctctgcate tgcagccact gcgctctgca 2220
 gcaggggctg cagcactggc cctgactgtg gacctgccc cagcttcttc cgaggccaga 2280
 aacagcgcct tcgggttcca aggacgcctg ctgcatctga gcgccggaca gcgcctggga 2340
 gtgcatctgc atactgaagc cagagcccgg catgcttggc agctgactca gggggcaact 2400
 gtgctgggac tgtttcgcgt gacacctgag atcccagccg ggctc 2445

<210> 148
 <211> 1242
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 與單體hu 4-1BBL (71-248)融合之Fc杵鏈之核苷酸序列

<400> 148
 gacaaaactc acacatgccc accgtgccc gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 60
 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
 tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac 180
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
 cgtgtgggtca gcgtctctac cgtctctgac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccct gcagagatga gctgaccaag 420
 aaccagggtg cctgtgtgtg tctggtaag ggcttctacc ccagcgatat cgcctggag 480
 tgggagagca acggccagcc tgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggacagc 540
 gacggcagct tcttctgta ctccaaactg accgtggaca agagccggtg gcagcagggc 600
 aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtc 660
 ctgagcctga gccccggcgg aggcggcgga agcggaggag gaggatccag agagggcct 720
 gagctgagcc ctgatgatcc tgccggactg ctggacctgc ggcagggaat gtttggccag 780
 ctgggtggccc agaacgtgct gctgatcgat ggccccctgt cctgggtacag cgatcctgga 840
 ctggctggcg tgtcactgac aggcggcctg agctacaaag aggacaccaa agaactgggtg 900

glggccaagg ccggcgtgla ctacgtgttc tticagctgg aactlccggag agtgggtggcc 960
 ggccaaggat ctggctctgt gtctctggcc ctgcatctgc agcctctgag atctgctgct 1020
 ggccgctgt ctctggcact gacagtggat ctgcctctg ccagcagcga ggccccgaat 1080
 agcgcatttg ggtttcaagg caggctgctg cacctgtctg ccggccagag gctgggagtg 1140
 catctgcaca cagaggccag ggctagacac gcctggcagc tgacacaggg cgctacagtg 1200
 ctgggcctgt tcagagtgac ccccagagatt cctgcccggc tc 1242

<210> 149
 <211> 1911
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗PD1(0314)Fc白單體配位體(71-248)鏈之核苷酸序列

<400> 149
 gaagtgcagc tgctcgaaag ccggcgggga ctggtccagc ccggcggttc cctgaggctg 60
 tcttgcgccg ctteagggtt cagcttttcc tcttacacca tgagtgggt cagacaggca 120
 ccitggcaagg gactggagtg ggtcgccaca atcagcggtg gcgggcgcga catttattac 180
 ccagattccg tgaaaggacg gttcaccatc tctagggaca actcaaagaa tactctgtat 240
 ttgcagatga acagcctgag agctgaggat acagcagttt actactgtgt gctcctgacc 300
 ggccgcgtct attttgccct tgactcctgg ggacaaggca ctctggtgac cgtatctagt 360
 gctagcacca agggccccctc cgtgttcccc ctggccccca gcagcaagag caccagcggc 420
 ggcacagccg ctctgggctg cctggtaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
 tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagttct 540
 ggccctgtata gcctgagcag cgtggtaacc gtgccttcta gcagcctggg caccagacc 600
 tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagccc 660
 aagagctgcg acaaaaactca cacatgccc cctgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720
 ccgtcagtct tectcttccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct 780
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtaaa gttaactgg 840
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
 agcacgtacc gtgtggtaag cgtcttacc gtcttgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcggcgccc ccacgagaa aaccatctcc 1020
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtgcaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080
 ctgaccaaga accaggctcag cctctcgtgc gcagtcaaag gctttetatcc cagcgacatc 1140
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
 ctggactccg acggctcctt ctteectcgtg agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtgga ggcggcgga ggggaggagg aggatccaga 1380
 gagggccctg agctgagccc tgatgatcct gccggactgc tggacctgcg gcagggaaatg 1440
 tttgccccagc tgggtggcca gaacgtgctg ctgatcgatg gccccctgic ctggtacagc 1500
 gatcctggac tggctggcgt gtcactgaca ggcggcctga gctacaaaga ggacacacaaa 1560
 gaactggtgg tggccaaggc cggcgtgtac tacgtgttct ttcagctgga actgcggaga 1620
 gtggtggccg gcgaaggatc tggctctgtg tctctggccc tgcacttgcg gcctctgaga 1680
 tctgctgctg gcgcccgtgc tctggcactg acagtggatc tgcctcctgc cagcagcgag 1740
 gcccggaata gcgcatttgg gtttcaaggc aggctgctgc acctgtctgc cggccagagg 1800
 ctgggagtgc atctgcacac agaggccagg gctagacacg cctggcagct gacacagggc 1860
 gctacagtgc tgggcctgtt cagagtgacc cccgagattc ctgccgggt c 1911

<210> 150
 <211> 1806
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 與二聚hu 4-1BBL (71-248)融合之Fc杵鏈之核苷酸序列

<400> 150
 gacaaaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 60
 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaaag ccgcccggagg agcaglacaa cagcacgtac 240
 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
 tgcaaggtct ccaacaaage cctcggcgccc cccacgaga aaaccatctc caaagccaaa 360

gggcagcccc gagaaccaca ggtglacacc ctgccccct gcagagatga gctgaccaag 420
 aaccagggtg ccctgtggtg tctggtcaag ggcttctacc ccagcgatat cgccgtggag 480
 tgggagagca acggccagcc tgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggacagc 540
 gacggcagct tcttctgta ctccaaactg accgtggaca agagccgggtg gcagcagggc 600
 aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 660
 ctgagcctga gccccggcgg aggcggcggga agcggaggag gaggatccag agagggcct 720
 gagctgagcc ctgatgatec tgccggactg ctggacctgc ggcagggaat gtttgcccag 780
 ctggtggccc agaacgtgct gctgatcgat ggccccctgt cctggtaacag cgatcctgga 840
 ctggctggcg tgtcactgac aggcggcctg agctacaaag aggacaccaa agaactggtg 900
 gtggccaagg ccggcgtgta ctacgtgttc ttfcagctgg aactgcggag agtggtggcc 960
 ggccaaggat ctggctctgt gtctctggcc ctgcatctgc agcctctgag atctgctgct 1020
 ggcgccctg ctctggcact gacagtggat ctgcctcctg ccagcagcga ggccccggaat 1080
 agcgcatitg ggtttcaagg caggctgctg cacctgtctg ccggccagag gctgggagtg 1140
 catctgcaca cagaggccag ggctagacac gcctggcagc tgacacaggg cgtacagtg 1200
 ctgggcctgt tcagagtgc ccccagatt ccagcaggcc tgggaggcgg cggatctggc 1260
 ggccgaggat ctagagaagg acccgagctg tccccgacg atccccctgg gctgctggat 1320
 ctgagacagg gcatgttcgc tcagctggtg gctcagaatg tgctgctgat tgacggacct 1380
 ctgagctggt actccgacce agggctggca ggggtgtccc tgactggggg actgtcctac 1440
 aaagaagata caaaagaact ggtggtggct aaagctgggg tgtactatgt gttttttcag 1500
 ctggaactga ggcgggtggt ggctggggag ggctcaggat ctgtgtccct ggctctgcat 1560
 ctgcagccac tgcgctctgc agcaggggct gcagcactgg ccctgactgt ggacctgcc 1620
 ccagcttctt ccgaggccag aacagcgc ttcgggttcc aaggacgcct gctgcatctg 1680
 agcgccggac agcgccctggg agtgcatctg catactgaag ccagagcccg gcatgcttgg 1740
 cagctgactc agggggcaac tgtgctggga ctgtttcgcg tgacacctga gatcccagcc 1800
 gggctc 1806

<210> 151
 <211> 1335
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> DP47 Fc白鏈之核苷酸序列

<400> 151

```

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccagggaaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgat attactgtgc gaaaggcagc      300
ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc      360
ccatcggtct tccccctggc accctctctc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg      420
ggctgcctgg tcaaggacta ctccccgaa ccggtgacgg tgctctggaa ctcaggcgcc      480
ctgaccagcg gcgtgcacac ctccccggt gtcttacagt cctcaggact ctactcctc      540
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg      600
aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagtig agcccaaate ttgtgacaaa      660
actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttctc      720
tccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg      780
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg      840
gaggtgcata atgccaaagc aaagccgagg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg      900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag      960
gtctccaaca aagccctcgg cgcceccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag      1020
ccccgagaac cacaggtgtg caccctgcc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag      1080
gtcagcctct cgtgcgcagt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag      1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc      1200
tcctttctcc tcgtgagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc      1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagectctcc      1320
ctgtctccgg gtaaa

```

<210> 152

<211> 645

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> DP47輕鏈之核苷酸序列

<400> 152

```

gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcttgca gggccagtea gagtgttagc agcagctact tagcciggta ccagcagaaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatecca      180
gacaggltca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgct gacgttcggc      300
caggggacca aagtggaaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg      360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcttgc t gaataacttc      420
tatcccagag aggccaaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaate gggtaaactcc      480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccttg      540
acgttgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag      600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacagggggag agtgt                          645

```

<210> 153

<211> 445

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DP47 Fc白鏈

<400> 153

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

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

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

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

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

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220

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

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

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

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

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

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

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

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

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys
355 360 365

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

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

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

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

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

<210> 154
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DP47輕鏈

<400> 154

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 155
 <211> 2496
 <212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 與二聚hu 4-1BBL (71-254)融合之DP47 Fc白鏈之核苷酸序列

<400> 155

```

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctccgatt caccttttagc agttatgcc a tgagctgggt ccgccagget      120
ccagggaaagg ggctggagtg ggtctcagct attagiggta gtggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgat attactgtgc gaaaggcagc      300
ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgict cgagtgctag caccaagggc      360
ccctccgtgt tccccctggc ccccagcagc aagagcacca gcggcggcac agccgctctg      420
ggctgcctgg tcaaggacta ctccccgag cccgtgaccg tgtcctggaa cagcggagcc      480
ctgacctccg gcgtgcacac ctccccgcc gtgctgcaga gttctggcct gtatagcctg      540
agcagcgtgg tcaccgtgcc ttctagcagc ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg      600
aaccacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaggtag agcccaagag ctgcgacaaa      660
actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttctc      720
tccccccaa aacccaagga caccctcatg atctccgga cccctgaggt cacatgcgtg      780
gtggtggacg tgagccacga agacctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg      840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg      900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag      960
gtctccaaca aagccctcgg cgcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag      1020
ccccgagaac cacaggtgtg caccctgcc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag      1080
gtcagcctct cgtgcgcagt caaaggctc talcccagcg acatcgccgt ggagtgggag      1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc      1200
tcctttctcc tcgtgagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc      1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggetctg cacaaccact acaocgagaa gagectctcc      1320
ctgtctccgg gtggaggcgg cggaagcggg ggaggaggat ccagagaggg cctgagctg      1380
agccccgatg atcctgctgg actgctggac ctgcggcagg gcatgtttgc tcagctggtg      1440

```

gccagaacg tgctgctgat cgatggcccc ctgtcctggt acagcgatcc tggactggct 1500
 ggcgtgtcac tgacaggcgg cctgagctac aaagaggaca ccaaagaact ggtggtggcc 1560
 aaggccggcg tgtactacgt gttctttcag ctggaactgc ggagagtggg ggccggcgaa 1620
 ggatctggct ctgtgtctct ggccctgcat ctgcagcctc tgagaagcgc tgctggcgct 1680
 gcagctctgg cactgacagt ggatctgcct cctgccagct ccgaggcccc gaatagcgc 1740
 tttgggtttc aaggcaggct gctgcacctg tctgccggcc agaggctggg agtgcattctg 1800
 cacacagagg ccagggctag acacgcctgg cagctgacac agggcgctac agtgctgggc 1860
 ctgttcagag tgacccccga gattccagcc ggcctgcctt ctccaagaag cgaaggcgga 1920
 ggcggatctg gcggcggagg atctagagag ggacccgaac tgtccctga cgatccagcc 1980
 gggctgctgg atctgagaca gggaatgttc gccagctgg tggctcagaa tgtgctgctg 2040
 attgacggac ctctgagctg gtactccgac ccagggtctg caggggtgtc cctgactggg 2100
 ggactgtcct acaaagaaga tacaaaagaa ctgggtgggtg ctaaagctgg ggtgtactat 2160
 gtgttttttc agctggaact gaggcgggtg gtggctgggg agggctcagg atctgtgtcc 2220
 ctggctctgc atctgcagcc actgcgctct gctgctggcg cagctgcaact ggctctgact 2280
 gtggacctgc caccagcctc tagcgaggcc agaaacagcg ccttcgggtt ccaaggacgc 2340
 ctgctgcatc tgagcgccgg acagcgctg ggagtgcac tgatactga agccagagcc 2400
 cggeatgctt ggcagctgac tcagggggca actgtgctgg gactgtttcg cgtgacacct 2460
 gagatccctg ccggactgcc aagccctaga tcagaa 2496

<210> 156
 <211> 1914
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 與單體hu 4-1BBL (71-254)融合之DP47 Fc杵鏈之核苷酸序列

<400> 156
 gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tctgtgcag cctccgatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggt 120
 ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccate tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcage	300
ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc	360
ccatcggctt tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg	420
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc	480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccgct gtectacagt cctcaggact ctactcctc	540
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg	600
aatcacaagc ccagcaaac caaggtggac aagaaagtig agcccaaate ttgtgacaaa	660
actcacacat gcccaaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttctc	720
ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg	780
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg	840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg	900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag	960
gtctccaaca aagccctcgg cgccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag	1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc cctgcagag atgagctgac caagaaccag	1080
gtgtccctgt ggtgtctggt caagggcttc taccctcagc atatcgccgt ggagtgggag	1140
agcaacggcc agcctgagaa caactacaag accaccccc ctgtgctgga cagcgacggc	1200
agcttcttcc tgtactcaa actgaccgtg gacaagagcc ggtggcagca gggcaacgtg	1260
ttcagctgca gcgtgatgca cgaggccctg cacaaccact acaccagaa gtccctgagc	1320
ctgagccccg gcggaggcgg cggaaagcga ggaggaggat ccagagaggg cctgagctg	1380
agccccgatg atcctgctgg actgctggac ctgcggcagg gcatgtttgc tcagctggtg	1440
gcccagaacg tctctctgat cgatggcccc ctgtcctggt acagcgatcc tggactggct	1500
ggcgtgtcac tgacaggcgg cctgagctac aaagaggaca ccaaagaact ggtggtggcc	1560
aaggccggcg tgtactacgt gtctttcag ctggaactgc ggagagtggg ggccggcgaa	1620
ggatctggct ctgtgtctct ggccctgcat ctgcagcctc tgagaagcgc tgctggcgt	1680
gcagctctgg cactgacagt ggatctgct cctgccagct ccgaggcccc gaatagcgca	1740
tttgggtttc aaggcaggct gctgcacctg tctgccggcc agaggctggg agtgcactg	1800
cacacagagg ccagggctag acacgcctgg cagctgacac agggcgctac agtctgggc	1860
ctgttcagag tgacccccga gatccagcc ggccctgcctt ctccaagaag cgaa	1914

<210> 157
 <211> 832
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 與二聚hu 4-1BBL (71-254)融合之DP47 Fc白鏈

<400> 157

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

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

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

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

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

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

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

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

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

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

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

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

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

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

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys
 355 360 365

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

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

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

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

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp
450 455 460

Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val
465 470 475 480

Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp
485 490 495

Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu
500 505 510

Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe
515 520 525

Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser
530 535 540

Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala
545 550 555 560

Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala
565 570 575

Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala
580 585 590

Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His
595 600 605

Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val

610		615		620											
Thr 625	Pro	Glu	Ile	Pro	Ala 630	Gly	Leu	Pro	Ser	Pro 635	Arg	Ser	Glu	Gly	Gly 640
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly 645	Gly	Gly	Ser	Arg	Glu 650	Gly	Pro	Glu	Leu	Ser 655	Pro
Asp	Asp	Pro	Ala 660	Gly	Leu	Leu	Asp	Leu 665	Arg	Gln	Gly	Met	Phe 670	Ala	Gln
Leu	Val	Ala 675	Gln	Asn	Val	Leu	Leu 680	Ile	Asp	Gly	Pro	Leu 685	Ser	Trp	Tyr
Ser	Asp 690	Pro	Gly	Leu	Ala	Gly 695	Val	Ser	Leu	Thr	Gly 700	Gly	Leu	Ser	Tyr
Lys 705	Glu	Asp	Thr	Lys	Glu 710	Leu	Val	Val	Ala	Lys 715	Ala	Gly	Val	Tyr	Tyr 720
Val	Phe	Phe	Gln	Leu 725	Glu	Leu	Arg	Arg	Val 730	Val	Ala	Gly	Glu	Gly 735	Ser
Gly	Ser	Val	Ser 740	Leu	Ala	Leu	His	Leu 745	Gln	Pro	Leu	Arg	Ser 750	Ala	Ala
Gly	Ala	Ala 755	Ala	Leu	Ala	Leu	Thr 760	Val	Asp	Leu	Pro	Pro 765	Ala	Ser	Ser
Glu 770	Ala	Arg	Asn	Ser	Ala	Phe 775	Gly	Phe	Gln	Gly	Arg 780	Leu	Leu	His	Leu
Ser 785	Ala	Gly	Gln	Arg	Leu 790	Gly	Val	His	Leu	His 795	Thr	Glu	Ala	Arg	Ala 800
Arg	His	Ala	Trp	Gln 805	Leu	Thr	Gln	Gly	Ala 810	Thr	Val	Leu	Gly	Leu	Phe 815
Arg	Val	Thr	Pro 820	Glu	Ile	Pro	Ala	Gly 825	Leu	Pro	Ser	Pro	Arg 830	Ser	Glu

<210> 158
 <211> 638
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 與單體hu 4-1BBL (71-254)融合之DP47 Fc杵鏈

<400> 158

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

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

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

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly

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

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

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

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp
 450 455 460

Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val
 465 470 475 480

Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp
 485 490 495

Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu
 500 505 510

Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe
 515 520 525

Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser
 530 535 540

Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala
 545 550 555 560

Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala
 565 570 575

Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala
 580 585 590

Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His
 595 600 605

Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val
 610 615 620

Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
625 630 635

<210> 159
<211> 1335
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> DP47重鏈(hu IgG1 PGLALA)之核苷酸序列

<400> 159
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcttgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg ggctggagt ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaaggccg gttcaccatc tccagagaca attccaaga cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300
ggatttgact actggggcca aggaacctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc 360
ccatcggtct tccccctggc acctccctcc aagagcacct ctgggggcac agcggccctg 420
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tctctggaa ctcaggcgcc 480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccggt gtctacagt cctcaggact ctactccctc 540
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600
aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagtgt agcccaaatc ttgtgacaaa 660
actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttctc 720
tccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780
gtggtggacg tgagccacga agacctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac glaccgtgtg 900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 960
gtctccaaca aagccctcgg cgeccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260

ttctcatgct ccgigtatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
 ctgtctccgg gtaaa 1335

<210> 160
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> DP47重鏈(hu IgG1 PGLALA)

<400> 160

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

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

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

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

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

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

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

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

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

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

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

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

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

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

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

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

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

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

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

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

- <210> 161
- <211> 1350
- <212> DNA
- <213> 人工序列

<220>
 <223> PD1(0314)重鏈(hulG1 PGLALA)之核苷酸序列

<400> 161
 gaagtgcagc tgctcgaaag cggcggggga ctggtccagc ccggcgggtc cctgaggctg 60
 tcttgcgccc cttcagggtt cagcttttcc tcttacacca tgagttgggt cagacaggca 120
 cctggcaagg gactggagtg ggtcgccaca atcagcgggtg gcgggcgcga catttattac 180
 ccagattccg tgaaggagc gttcaccatc tctagggaca actcaaagaa tactctgtat 240
 ttgcagatga acagcctgag agctgaggat acagcagttt actactgtgt gctcctgacc 300
 ggccgcgtct attttgcctt tgactcctgg ggacaaggca ctctggtgac cgtatctagt 360
 gctagcacca agggcccate ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420
 ggcacagcgg ccttgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccgtt gacgggtgtcg 480
 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtctct acagtctctca 540
 ggactctact cctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 600
 tacalctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660
 aaatcttgtg acaaaaactca cacatgceca cegtgccag cacctgaagc tgcaggggga 720
 ccgtcagttt tctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct 780
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgagggtcaa gttcaactgg 840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtectcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccategagaa aaccatctcc 1020
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcceccatc ccgggatgag 1080
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
 ctggactccg acggctcctt cttectctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 162
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PD1(0314)重鏈(huIgG1 PGLALA)

<400> 162

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

325

330

335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

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

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 163
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 163

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
 35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540
gacggctcct tcttcctcgt gagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660
ctctccctgt ctccgggtaa a 681

<210> 165
<211> 1266
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類4-1BB抗原Fc杵鏈之核苷酸序列

<400> 165
ctgcaggacc cctgcagcaa ctgccctgcc ggcaccttct gcgacaacaa ccggaaccag 60
atctgcagcc cctgcccccc caacagcttc agctctgccg gcggacagcg gacctgcgac 120
atctgcagac agtgaaggg cgtgttcaaga acccgaaag agtgcagcag caccagcaac 180
gccgagtgcg actgcacccc cggttccat tctctgggag ccggctgcag catgtgcgag 240
caggactgca agcagggcca ggaactgacc aagaagggtc gcaaggactg ctgcttcggc 300
acctcaacg accagaagcg gggcatctgc cggccctgga ccaactglag cctggacggc 360
aagagcgtgc tggtaacgg caccaaagaa cgggacgtcg tctgcggccc cagccctgct 420
gatctgtctc ctggggccag cagcgtgacc cctcctgccc ctgccagaga gcctggccac 480
tctcctcagg tcgacgaaca gttatatttt cagggcggct cacccaaatc tgcagacaaa 540
actcaacat gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc 600
ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga ccctgaggt cacatgcgtg 660
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttea actggtacgt ggacggcgtg 720
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 780
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 840
gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tcaccaaaagc caaagggcag 900
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatgccggg atgagctgac caagaaccag 960
gtcagcctgt ggtgcctggt caaaggttc tatcccagcg acatgccgt ggagtgggag 1020
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accagcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1080

tcctttctcc tetacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1140
 ttctcatgct cegtgatgca ttaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1200
 ctgtctccgg gtaaatccgg aggcctgaac gacatcttcg aggcccagaa gattgaatgg 1260
 cacgag 1266

<210> 166
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Fc白鏈

<400> 166

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

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

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 167
<211> 422
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類4-1BB抗原Fc杵鏈

<400> 167

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
305 310 315 320

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
325 330 335

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
340 345 350

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
355 360 365

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
370 375 380

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
385 390 395 400

Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln
405 410 415

Lys Ile Glu Trp His Glu
420

<210> 168
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> avi標籤

<400> 168

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
1 5 10 15

<210> 169
<211> 594
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類4-IBB His之核苷酸序列

<400> 169

ctgcaggacc cctgcagcaa ctgccctgcc ggcacettct gcgacaacaa ccggaaccag 60
 atctgcagcc cctgcccccc caacagcttc agctctgccg gggacagcg gacctgcgac 120
 atctgcagac agtgcagggg cgtgttcaga acccggaag agtgcagcag caccagcaac 180
 gccgagtgcg actgcacccc cggttccat tgtctgggag ccggctgcag catgtgcgag 240
 caggactgca agcagggcca ggaactgacc aagaagggt gcaaggactg ctgcttcggc 300
 accttcaacg accagaagcg gggcatctgc cggccctgga ccaactgtag cctggacggc 360
 aagagcgtgc tggtaacgg caccaaagaa cgggacgtcg tgtgcggccc cagccctgct 420
 gatctgtctc ctggggccag cagcgtgacc cctcctgcc ctgccagaga gcctggccac 480
 tctctcagg tcgacgaaca gttatatttt cagggcggt caggcctgaa cgacatcttc 540
 gaggcccaga agatcgagtg gcacgaggct cgagctcacc accatcacca tcac 594

<210> 170
 <211> 198
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類4-1BB His

<400> 170

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
 35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60

Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140

Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160

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

Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Ala Arg Ala
 180 185 190

His His His His His His
 195

<210> 171
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗PD1 (0312)輕鏈

<400> 171

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



201805306

申請日: 106/05/12

IPC分類:

【發明摘要】

【中文發明名稱】

包含TNF家族配位三聚體及PD1結合部份之抗原結合分子

【英文發明名稱】

ANTIGEN BINDING MOLECULES COMPRISING A TNF FAMILY
LIGAND TRIMER AND PD1 BINDING MOIETY

【中文】

本發明係關於新穎的含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含(a)至少一個能夠特異性結合於PD1之部分，及(b)藉由雙硫鍵彼此連接之第一及第二多肽，其特徵在於該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接，且其特徵在於該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之僅一個胞外域或其片段。

【英文】

The invention relates to novel TNF family ligand trimer-containing antigen binding molecules comprising (a) at least one moiety capable of specific binding to PD1 and (b) a first and a second polypeptide that are linked to each other by a disulfide bond, characterized in that the first polypeptide comprises two ectodomains of a TNF ligand family member or fragments thereof that are connected to each other by a peptide linker and in that the second polypeptide comprises only one ectodomain of said TNF ligand family member or a fragment thereof.

【指定代表圖】

圖18C及18D

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中該抗原結合分子之特徵在於該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接，且該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段。

【第2項】

如請求項1之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其進一步包含

(c) Fc結構域，其由能夠穩定締合之第一及第二子單元構成。

【第3項】

如請求項1或2之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中該抗原結合分子之特徵在於

(i)分別地，該第一多肽含有CH1或CL結構域且該第二多肽含有CL或CH1結構域，其中該第二多肽藉由該CH1與CL結構域之間的雙硫鍵連接至該第一多肽，且其中該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接且連接至該CH1或CL結構域，且其中該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連

接子連接至該多肽之該CL或CH1結構域，或

(ii)分別地，該第一多肽含有CH3結構域且該第二多肽含有CH3結構域，且其中該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接且連接至該CH3結構域之C端，且其中該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之該CH3結構域之C端，或

(iii)分別地，該第一多肽含有VH-CL或VL-CH1結構域且該第二多肽含有VL-CH1結構域或VH-CL結構域，其中該第二多肽藉由該CH1與CL結構域之間的雙硫鍵連接至該第一多肽，且其中該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接且連接至VH或VL，且其中該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之VL或VH。

【第4項】

如請求項1或2之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該TNF配位體家族成員係選自4-1BBL及OX40L。

【第5項】

如請求項1或2之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該TNF配位體家族成員係4-1BBL。

【第6項】

如請求項1或2之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中TNF配位體家族成員之該胞外域包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7及SEQ ID NO:8，尤其SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5之胺基酸序列。

【第7項】

如請求項1或2之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中該抗原結合分子之特徵在於該第一多肽包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12及SEQ ID NO:10，且其特徵在於該第二多肽包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4及SEQ ID NO:5。

【第8項】

如請求項1或2之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)至少一個部分，其能夠特異性結合於PD1，及

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

且其中該抗原結合分子之特徵在於該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接且連接至該CH1或CL結構域，且其特徵在於該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之該CL或CH1結構域。

【第9項】

如請求項1或2之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該能夠特異性結合於PD1之部分係能夠特異性結合於PD1之Fab分子。

【第10項】

如請求項1或2之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該能夠特異性結合於PD1之部分包含

(a) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:13之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:15之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:16之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-L3，

(b) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:26之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:27之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:28之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:31之胺基酸序列的HVR-L3，

(c) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:34之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:35之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:36之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的HVR-L3，

(d) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:43之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ

ID NO:45之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:46之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:47之胺基酸序列的HVR-L3，

(e) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:50之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:53之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:54之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:55之胺基酸序列的HVR-L3，

(f) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:58之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:59之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:60之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:61之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:62之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:63之胺基酸序列的HVR-L3，或

(g) VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:66之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:67之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:68之胺基酸序列的HVR-H3；及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:69之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:70之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:71之胺基酸序列的HVR-L3。

【第11項】

如請求項1或2之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該能夠特異性結合於PD1之部分包含

(a) 包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的VL結構域，

(b) 包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID

NO:22之胺基酸序列的VL結構域，

(c)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID

NO:23之胺基酸序列的VL結構域，

(d)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID

NO:24之胺基酸序列的VL結構域，

(e)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID

NO:25之胺基酸序列的VL結構域，

(f)包含SEQ ID NO:32之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID

NO:33之胺基酸序列的VL結構域，

(g)包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID

NO:41之胺基酸序列的VL結構域，

(h)包含SEQ ID NO:48之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID

NO:49之胺基酸序列的VL結構域，

(i)包含SEQ ID NO:56之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID

NO:57之胺基酸序列的VL結構域，

(k)包含SEQ ID NO:64之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID

NO:65之胺基酸序列的VL結構域，或

(l)包含SEQ ID NO:72之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID

NO:73之胺基酸序列的VL結構域。

【第12項】

如請求項1或2之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該能夠特異性結合於PD1之部分包含VH結構域，其包含(i)包含SEQ ID NO:13之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列的

HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:15之胺基酸序列的HVR-H3，及VL結構域，其包含(iv)包含SEQ ID NO:16之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-L3。

【第13項】

如請求項1或2之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該能夠特異性結合於PD1之部分包含

(a)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的VL結構域，

(b)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的VL結構域，

(c)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:23之胺基酸序列的VL結構域，

(d)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:24之胺基酸序列的VL結構域，或

(e)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH結構域及包含SEQ ID NO:25之胺基酸序列的VL結構域。

【第14項】

如請求項1或2之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中分別地，該抗原結合分子包含

第一重鏈及第一輕鏈，其皆包含能夠特異性結合於PD1之Fab分子，

第一肽，其包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由第一肽連接子彼此連接，該第一肽在其C端藉由第

二肽連接子與第二重鏈或輕鏈融合，

及第二肽，其包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域，該第二肽在其C端藉由第三肽連接子與第二輕鏈或重鏈融合。

【第15項】

如請求項1或2之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該第一肽在其C端藉由第二肽連接子與作為重鏈之一部分的CL結構域融合，該第一肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由第一肽連接子彼此連接，

且該第二肽在其C端藉由第三肽連接子與作為輕鏈之一部分的CH1結構域融合，該第二肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段。

【第16項】

如請求項1或2之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)至少一個Fab結構域，其能夠特異性結合於PD1，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中該抗原結合分子之特徵在於分別地，該第一多肽含有CH3結構域且該第二多肽含有CH3結構域，且其中該第一多肽包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接且連接至該CH3結構域之C端，且其中該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之該CH3結構域之C端。

【第17項】

如請求項1或2之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該抗原結合分子包含

(i)融合多肽，其包含Fc結構域之第一子單元及TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接且連接至該CH3結構域之C端，(ii)重鏈，其包含該能夠特異性結合於PD1之Fab結構域之VH結構域、該Fc結構域之第二子單元及該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該CH3結構域之C端，及(iii)輕鏈，其包含該能夠特異性結合於PD1之Fab結構域的VL結構域，或

(i)融合多肽，其包含Fc結構域之第一子單元及TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段藉由肽連接子連接至該CH3結構域之C端，(ii)重鏈，其包含該能夠特異性結合於PD1之Fab結構域的VH結構域、該Fc結構域之第二子單元及該TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段經由肽連接子彼此連接且連接至該CH3結構域之C端，及(iii)輕鏈，其包含該能夠特異性結合於PD1之Fab結構域的VL結構域。

【第18項】

如請求項2之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該Fc結構域包含一或多個胺基酸取代，其使與Fc受體，尤其與Fc γ 受體之結合減少。

【第19項】

如請求項2之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該Fc結構域係IgG1 Fc結構域，其包含胺基酸取代L234A、L235A及P329G (根據Kabat EU索引編號)。

【第20項】

如請求項2之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該Fc結構域包含促進該Fc結構域之第一及第二子單元之締合的杵-臼修飾。

【第21項】

如請求項1、2及18至20中任一項之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該抗原結合分子包含

(i)第一重鏈，其包含有包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的該VH結構域，及第一輕鏈，其包含有包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的該VL結構域，或

第一重鏈，其包含有包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的該VH結構域，及第一輕鏈，其包含有包含選自由以下組成之群的胺基酸序列之該VL結構域：SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24及SEQ ID NO:25，

(ii)第二重鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:78及SEQ ID NO:80，及

(iii)第二輕鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:79及SEQ ID NO:81。

【第22項】

如請求項1、2及18至20中任一項之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該抗原結合分子包含

(a)包含SEQ ID NO:82之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:171之胺基酸序列的第一輕鏈、包含SEQ ID NO:74之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:75之胺基酸序列的第二輕鏈，

(b) 包含SEQ ID NO:82之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:171之胺基酸序列的第一輕鏈、包含SEQ ID NO:76之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:77之胺基酸序列的第二輕鏈，

(c) 包含SEQ ID NO:82之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:171之胺基酸序列的第一輕鏈、包含SEQ ID NO:78之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:79之胺基酸序列的第二輕鏈，或

(d) 包含SEQ ID NO:82之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:171之胺基酸序列的第一輕鏈、包含SEQ ID NO:80之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:81之胺基酸序列的第二輕鏈。

【第23項】

如請求項1、2及18至20中任一項之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其包含兩個能夠特異性結合於PD1之Fab結構域。

【第24項】

如請求項1、2及18至20中任一項之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該抗原結合分子包含

(a) 包含SEQ ID NO:84之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:85之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:171之胺基酸序列的兩個輕鏈，或

(b) 包含SEQ ID NO:86之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:87之胺基酸序列的第二重鏈及包含SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:171

之胺基酸序列的兩個輕鏈。

【第25項】

如請求項1、2及18至20中任一項之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其中該抗原結合分子包含

(a) 包含SEQ ID NO:88之胺基酸序列的融合多肽、包含SEQ ID NO:87之胺基酸序列的重鏈及包含SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:171之胺基酸序列的輕鏈，

(b) 包含SEQ ID NO:89之胺基酸序列的融合多肽、包含SEQ ID NO:90之胺基酸序列的重鏈及包含SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:171之胺基酸序列的輕鏈，

(c) 包含SEQ ID NO:91之胺基酸序列的融合多肽、包含SEQ ID NO:86之胺基酸序列的重鏈及包含SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:171之胺基酸序列的輕鏈，

(b) 包含SEQ ID NO:93之胺基酸序列的融合多肽、包含SEQ ID NO:92之胺基酸序列的重鏈及包含SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:171之胺基酸序列的輕鏈。

【第26項】

一種分離之聚核苷酸，其編碼如請求項1至25中任一項之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子。

【第27項】

一種載體，特定言之是一種表現載體，其包含如請求項26之分離之聚核苷酸。

【第28項】

一種宿主細胞，其包含如請求項26之分離之聚核苷酸或如請求項27之載體。

【第29項】

一種製造如請求項1至25中任一項之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子之方法，其包含在適於表現該含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子之條件下培養如請求項28之宿主細胞，及分離該含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子。

【第30項】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至25中任一項之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子及至少一種醫藥學上可接受之賦形劑。

【第31項】

如請求項1、2及18至20中任一項之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，或如請求項30之醫藥組合物，其係用作藥劑。

【第32項】

如請求項1、2及18至20中任一項之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，或如請求項30之醫藥組合物，其係用於上調或延長T細胞細胞毒性活性。

【第33項】

如請求項1、2及18至20中任一項之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子，其係用於治療癌症。

【第34項】

一種如請求項1至25中任一項之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子之用途，其係用於製造用以治療癌症之藥劑。

【第35項】

一種如請求項1至25中任一項之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子或如請求項30之醫藥組合物之用途，其係用於製造用以治療患有癌症之個體的藥劑。

【第36項】

一種如請求項1至25中任一項之含有TNF家族配位三聚體之抗原結合分子或如請求項30之醫藥組合物之用途，其係用於製造用以上調或延長患有癌症之個體之T細胞細胞毒性活性之藥劑。

