I851605

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I851605 B**

(45)公告日： 中華民國 113 (2024) 年 08 月 11 日

(21)申請案號：108135522 (22)申請日： 中華民國 108 (2019) 年 10 月 01 日

(51)Int. Cl.： *C07K16/28 (2006.01)* *C07K16/40 (2006.01)*
C07K16/46 (2006.01) *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2018/10/01 歐洲專利局 18197866.9

(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：布恩克 彼德 BRUENKER, PETER (DE)；杜爾 哈洛德 DUERR, HARALD (DE)；克雷恩 克里斯俊 KLEIN, CHRISTIAN (DE)；優瑪那 帕伯羅 UMANA, PABLO (CR)；布喬茲克 亞歷山大 BUJOTZEK, ALEXANDER (DE)；賽隆卡 喬治 ZIELONKA, JOERG (DE)；川普海勒 克莉斯汀 TRUMPFHELLER, CHRISTINE (DE)；雷普 莫瑞茲 RAPP, MORITZ (DE)；樂 克雷克 瑪麗恩 LE CLECH, MARINE (FR)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

TW 201806972A TW 201829469A

期刊 Agnes Wyzgol et al., Trimer stabilization, oligomerization, and antibody-mediated cell surface immobilization improve the activity of soluble trimers of CD27L, CD40L, 41BBL, and glucocorticoid-induced TNF receptor ligand. The Journal of Immunology, 183(3): 2009 Aug 1; 1851-1861.

審查人員：吳淑君

申請專利範圍項數：28 項 圖式數：18 共 354 頁

(54)名稱

包含抗 FAP 殖株 212 的雙特異性抗原結合分子

(57)摘要

本發明係關於新穎雙特異性抗原結合分子，其包含(a)至少一個能夠特異性結合於包含 FAP 殖株 212 或其變異體之纖維母細胞活化蛋白(FAP)的抗原結合域，及(b)至少一個能夠特異性結合於 CD40 之抗原結合域，以及係關於製造此等分子之方法及其使用方法。

The invention relates to novel bispecific antigen binding molecules, comprising (a) at least one antigen binding domain capable of specific binding to Fibroblast Activation Protein (FAP) comprising FAP clone 212 or variants thereof, and (b) at least one antigen binding domain capable of specific binding to CD40, and to methods of producing these molecules and to methods of using the same.

指定代表圖：

圖1A

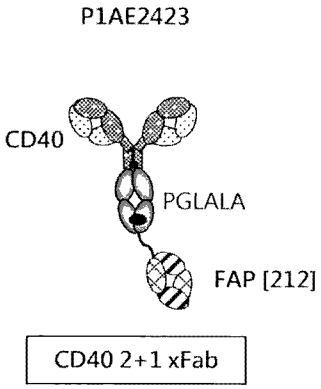

P1AE2423
CD40
PGLALA
FAP [212]
CD40 2+1 xFab

圖1B

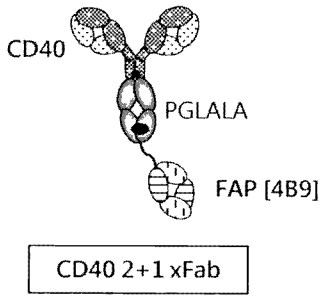

P1AE2487
CD40
PGLALA
FAP [4B9]
CD40 2+1 xFab

圖1C

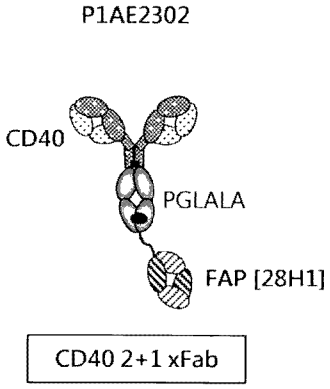

P1AE2302
CD40
PGLALA
FAP [28H1]
CD40 2+1 xFab

圖1D

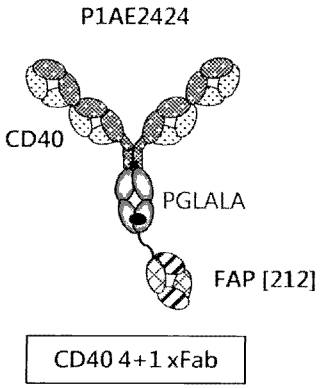
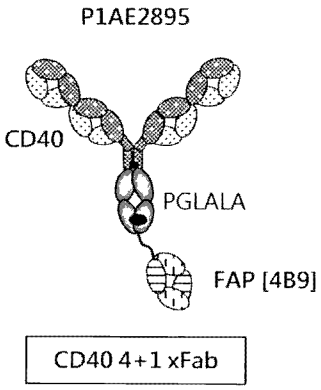
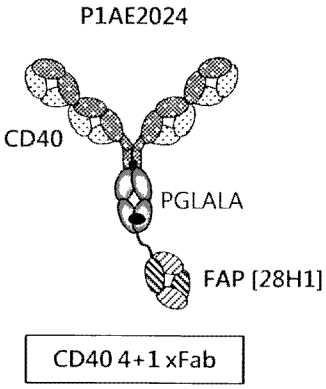


圖1E



【圖1】

圖1F



公告本

I851605

【發明摘要】

【中文發明名稱】

包含抗FAP殖株212的雙特異性抗原結合分子

【英文發明名稱】

BISPECIFIC ANTIGEN BINDING MOLECULES COMPRISING ANTI-FAP CLONE 212

【中文】

本發明係關於新穎雙特異性抗原結合分子，其包含(a)至少一個能夠特異性結合於包含FAP殖株212或其變異體之纖維母細胞活化蛋白(FAP)的抗原結合域，及(b)至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域，以及係關於製造此等分子之方法及其使用方法。

【英文】

The invention relates to novel bispecific antigen binding molecules, comprising (a) at least one antigen binding domain capable of specific binding to Fibroblast Activation Protein (FAP) comprising FAP clone 212 or variants thereof, and (b) at least one antigen binding domain capable of specific binding to CD40, and to methods of producing these molecules and to methods of using the same.

【指定代表圖】

圖1A-1F

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

包含抗FAP殖株212的雙特異性抗原結合分子

【英文發明名稱】

BISPECIFIC ANTIGEN BINDING MOLECULES COMPRISING ANTI-FAP CLONE 212

【技術領域】

【0001】 本發明係關於新的雙特異性抗原結合分子，其包含至少一個能夠特異性結合於纖維母細胞活化蛋白(FAP)之抗原結合域、至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域及由能夠穩定締合之第一及第二次單元構成之Fc域。本發明進一步係關於一種新的抗FAP殖株212。本發明之其他態樣為製造此等分子之方法及其使用方法。

【先前技術】

【0002】 在產生有效適應性免疫反應期間需要多個分子信號。信號1涉及T細胞抗原受體(TCR)與其存在於抗原呈現細胞(APC)之表面上之同源抗原之結合。信號2由協同刺激受體與其在T細胞同APC之間的相應配位體接合組成。最佳研究且最重要的協同刺激效應子之一為腫瘤壞死因子受體(TNFR)家族成員CD40及其配位體CD40L (*Elgueta R.* 等人，*Immunol Rev. 2009;229(1):152-72*)。包括CD40功能之若干TNFR家族成員在初始T細胞活化之後用於支持APC及T細胞反應，且因此在免疫系統之組構及功能中起關鍵作用(Watts T.H. (2005) Annu. Rev. Immunol. 23, 23-68)。不同協同刺激TNFR家族成員之組合允許APC及T細胞活化及存活期之連續及暫時調節，導致免疫反應增加，同時維持APC及T細胞功能

之緊密控制。視疾病病狀而定，經由協同刺激TNF家族成員之刺激可加重或改善疾病。TNFR家族協同刺激因子之活化或阻斷展現若干治療性應用(包括癌症、傳染病、移植及自體免疫)在多個領域中之前景。

【0003】 在若干協同刺激分子中，TNFR家族成員CD40藉由誘導APC之協同刺激分子之成熟、存活、抗原呈現、細胞介素製造及表現而在觸發免疫反應中起關鍵作用，APC接著藉由促炎性細胞介素驅動抗原特異性T細胞反應及NK細胞活化。CD40調節針對感染、腫瘤及自身抗原之免疫反應，且已證明其於APC (諸如B細胞、樹突狀細胞(DC)、單核細胞及巨噬細胞以及血小板)及非造血來源之細胞(諸如肌纖維母細胞、纖維母細胞、上皮及內皮細胞)之表面上的表現(*Elgueta R.*等人，*Immunol Rev. 2009;229(1):152-72*)。CD40配位體CD40L表現於經活化之$CD4^+$輔助T細胞、血小板、單核球性細胞、自然殺手細胞、肥大細胞及嗜鹼性球(*Carbone E.*等人，*J Exp Med. 1997;185(12): 2053-2060*，或*Elgueta R.*等人，*Immunol Rev. 2009;229(1):152-72*)。CD40及CD40L之表現回應於各種免疫刺激信號及APC與$CD4^+$ T細胞之間的CD40-CD40L相互作用而強烈上調，有助於增加APC活化及抗原特異性$CD8^+$ T細胞反應(*Bevan MJ., Nat Rev Immunol. 2014;4(8):595-602*)。藉由使用CD40促效性抗體觀測到類似免疫刺激結果(*Vonderheide RH*及*Glennie MJ., Clin Cancer Res. 2013;19(5):1035-43*)。

【0004】 I型跨膜受體CD40藉由其天然配位體CD40L、II型跨膜蛋白質藉由促效抗體之接合促進CD40簇集且誘導銜接子蛋白質募集至細胞質受體域。稱為TNF受體相關因子(TRAF)之此等銜接子蛋白質之募集引起促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)、磷酸肌醇3-激酶(PI3K)以及典型及非

典型核因子κB (NFκB)信號傳導路徑之協同活化(*Elgueta R.* 等人，*Immunol Rev. 2009;229(1):152-72*) 又，此產生APC成熟及活化，其隨後使抗原特異性T細胞反應達到最大。近期研究已顯示促效CD40抗體在利用抗腫瘤免疫性方面之兩種不同作用模式。除其經由激活適應性免疫系統介導腫瘤細胞殺滅的間接作用模式之外，促效CD40抗體可經由誘導表現CD40之實體腫瘤細胞之細胞凋亡來誘導直接腫瘤細胞殺滅(*Eliopoulos AG.等人，Mol Cell Biol. 2000;20(15):5503-15*) 腫瘤細胞之直接CD40抗體介導之殺滅可以提供可藉由APC處理且呈現之腫瘤抗原來源，該APC係藉由經抗CD40抗體之CD40接合同時活化，接著可以誘導腫瘤抗原特異性T細胞，即被稱為內源性疫苗接種之假定機制。鑒於CD40接合可建立高效抗癌免疫反應，已成功地在多種臨床前腫瘤模型中使用促效性CD40抗體，此等腫瘤模型均作為單一藥劑且與化學療法組合使用(*Vonderheide RH及Glennie MJ., Clin Cancer Res. 2013;19(5):1035-43*)。

【0005】 迄今為止，在臨床試驗中研究六種CD40 mAb：在臨床I階段研究中研究Chi Lob 7/4 (CD40促效IgG1嵌合mAb；Cancer Research UK；*Chowdhury F.* 等人，*Cancer Immunol Res. 2013;2:229-40*)、ADC1013（全人類CD40促效性IgG1抗體；Alligator Bioscience 及 Johnson & Johnson; *Mangsbo SM.* 等人, *Clin Cancer Res. 2015年3月1日;21(5):1115-26*)、APX-005（完全人類化CD40促效IgG1 mAb；Apexigen; *Bjorck P. 等人, J Immunother Cancer. 2015; 3(增刊2): P198*)、SEA-CD40 (CD40促效IgG1嵌合mAb; Seattle Genetics; *Gardai SJ.* 等人 *AACR 第106屆年會；2015年4月18-22日，摘要2472*)，以及RO7009789 (全人類CD40超促效IgG2 mAb)，且在臨床II階段研究中研究

達西珠單抗(dacetuzumab) (CD40部分促效IgG1嵌合mAb；Seattle Genetics; *Khubchandani S.* 等人, *Curr Opin Investig Drugs. 2009;10,579-87*)。此等研究之符合條件的患者具有實體腫瘤、經典霍奇金淋巴瘤(HL)、彌漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)或惰性淋巴瘤(包括濾泡性淋巴瘤)。已展示此等CD40促效抗體之多樣活性，其範圍係經由補體介導之細胞毒性(CMC)或抗體依賴性細胞毒性(ADCC)自$CD40^+$腫瘤細胞之Fc依賴性細胞毒性至用以誘導抗腫瘤T細胞反應之APC活化以及用以使腫瘤及腫瘤基質萎縮之巨噬細胞活化。迄今為止，不存在關於此所觀測到之異質性的結論性解釋。然而，近期研究指出，此作用模式多樣性可至少部分地藉由抗原決定基特異性、同型或Fc: Fc:FcγR相互作用中之抗CD40抗體之差異來解釋。舉例而言，活體內CD40促效抗體似乎需要將由其於目標細胞上之Fab片段結合之CD40與由其於除目標細胞以外的細胞上之Fc片段結合之Fcγ受體交聯，如關於對TNFR超家族之其他細胞凋亡誘導或免疫調節成員具有特異性之促效抗體所描述(*Dahan R., Cancer Cell. 2016 Jun 13;29(6):820-31; Li F.及Ravetch J.V. Science, 2011;333, 1030-1034; Teng M.W.*等人, *J. Immunol. 2009;183, 1911-1920*)。所提出之機制包括Fcγ受體介導之D40跨膜分子於目標細胞上之簇集及隨後加強的CD40信號傳導以實現強效活體內功效。

【0006】 促效CD40抗體之臨床開發已提供有前景的初始結果。在第一臨床試驗中，CP-870,893已展示在患有晚期癌症之患者中之臨床功效。29名患有晚期癌症之患者中有四名在接受CP-870,893之單一靜脈內輸注之後示出部分反應(*Vonderheide RH., J Clin Oncol. 2007年3月1日；25(7):876-83*)。經9次連續劑量之CP-870,893治療之此等四名患者中有一

位在一年半內保持完全緩解超過5年。然而，CP-870,893之最常見副作用為細胞介素釋放症候群及血栓栓塞事件，使得在使用劑量時程及投與途徑之情況下，超過140名患者之1階段臨床研究之組合資料僅指示有限臨床功效且建議局部投與抗體(*Vonderheide RH, Glennie M, Clin Cancer Res. 2013, 19(5), 1035-1043*)。缺乏單一藥劑反應部分地由於由廣泛CD40表現所引起之嚴重中靶/脫靶腫瘤效應而發生，由此引起劑量限制毒性(例如細胞介素釋放症候群)。開發在CD40由腫瘤特異性目標交聯時特異性活化APC之促效CD40抗體可減少副作用且減少劑量限制，從而為新的治療選項提供產生高效持久的抗癌免疫性之潛能。

【0007】 可用臨床前及臨床資料清楚地表明，對能夠誘導及增強對癌症之有效內源免疫反應的CD40之有效促效劑存在較高臨床需求。然而，幾乎從不存在限於單一類型之細胞或經由單一機制起作用之作用，且設計成闡明細胞間及細胞內信號傳導機制之研究已揭露複雜性水準漸增。歸因於諸如細胞介素釋放症候群及凝血細胞/內皮細胞活化之劑量限制性毒性，已知CD40抗體僅可以相對較低劑量投與，導致目標APC之路徑活化不足且治療指數窄。因此，需要較佳地作用於單一類型之細胞的「靶向」促效劑。

【0008】 本發明係關於能夠特異性結合於CD40及纖維母細胞活化蛋白(FAP)且因此組合能夠結合於FAP之部分與能夠促效結合於CD40之部分的新雙特異性抗原結合分子，其中經由CD40活化APC係藉由經由表現於腫瘤基質細胞上之FAP及潛在地經由直接表現於二級淋巴組織中之FAP的交聯提供。相比於能夠特異性結合於CD40及經活化T細胞上之免疫檢查點受體的雙特異性抗原結合分子(諸如CTLA-4或PD-1)，靶向諸如FAP

之腫瘤目標能夠主要在腫瘤基質及腫瘤引流淋巴結中進行CD40介導之APC活化，其中相較於其他組織，纖維母細胞表現增加之FAP含量。因此，本發明之抗原結合分子可能夠不僅有效地觸發CD40受體，而且在所需位點極具選擇性地觸發CD40受體，同時克服對FcγR交聯之需求，由此減少副作用。新雙特異性抗原結合分子之特徵進一步在於包含新的FAP抗原結合域，當其與Fc域之C端融合時，該新FAP抗原結合域不失去其極佳結合特性。

【發明內容】

【0009】 本發明係關於雙特異性抗原結合分子，其組合至少一個能夠特異性結合於協同刺激TNF受體家族成員CD40之抗原結合域與至少一個靶向纖維母細胞活化蛋白(FAP)之抗原結合域，該雙特異性抗原結合分子包含新的鼠類抗人類FAP殖株212及其人類化變異體。此等雙特異性抗原結合分子為有利的，因為其將較佳活化表現FAP之腫瘤相關位點處的協同刺激CD40受體，係因為該等雙特異性抗原結合分子能夠以高親和力結合於FAP。

【0010】 在一個態樣中，本發明提供一種雙特異性抗原結合分子，其包含

(a)至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域，及

(b)至少一個能夠特異性結合於纖維母細胞活化蛋白(FAP)之抗原結合域，該抗原結合域包含重鏈可變區(V_HFAP)，其包含(i)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含選自由SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:11及SEQ ID NO:12組成之群之胺基酸序列的CDR-H2及(iii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含(iv)包

含選自由SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14組成之群之胺基酸序列的CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列之CDR-L2及(vi)包含SEQ ID NO:8之胺基酸序列之CDR-L3。

【0011】 在特定態樣中，雙特異性抗原結合分子包含：(a)至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域；(b)至少一個能夠特異性結合於FAP之抗原結合域，該抗原結合域包含重鏈可變區(V_HFAP)，其包含(i)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含選自由SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:11及SEQ ID NO:12組成之群之胺基酸序列的CDR-H2及(iii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之CDR-H3，及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含(iv)包含選自由SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14組成之群之胺基酸序列的CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列之CDR-L2及(vi)包含SEQ ID NO:8之胺基酸序列之CDR-L3，及(c)由能夠穩定締合之第一及第二次單元構成之Fc域。更特定言之，由能夠穩定締合之第一及第二次單元構成之Fc域包含降低效應功能之突變。

【0012】 在一個態樣中，至少一個能夠特異性結合於FAP之抗原結合域包括：重鏈可變區(V_HFAP)，其包含(i)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含選自由SEQ ID NO:4組成之群之胺基酸序列的CDR-H2及(iii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含(iv)包含選自由SEQ ID NO:6組成之群之胺基酸序列的CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列之CDR-L2及(vi)包含SEQ ID NO:8之胺基酸序列之CDR-L3。在一個態樣中，能夠特異性結合於FAP之抗原結合域包含：重鏈可變區(V_HFAP)，其包含與SEQ ID NO:9之胺基酸序列至少約90%一致之胺基酸序列；及輕鏈可變區(V_LFAP)，其

包含與SEQ ID NO:10之胺基酸序列至少約90%一致之胺基酸序列。在一特定態樣中，能夠特異性結合於FAP之抗原結合域包含：包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)。

【0013】 在另一態樣中，能夠特異性結合於FAP之抗原結合域包含：重鏈可變區(V_HFAP)，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19及SEQ ID NO:20；及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25及SEQ ID NO:26。特定言之，能夠特異性結合於FAP之抗原結合域包含：(a)包含SEQ ID NO:15之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)；(b)包含SEQ ID NO:16之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)；(c)包含SEQ ID NO:16之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)；或(d)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:25之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)特定言之，能夠特異性結合於FAP之抗原結合域包含：(a)包含SEQ ID NO:15之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)。

【0014】 在一個態樣中，能夠特異性結合於CD40之抗原結合域結合於包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列或由其組成的多肽。

【0015】 在另一態樣中，提供一種雙特異性抗原結合分子，其中該

至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域包含：重鏈可變區(V_HCD40)，其包含(i)包含SEQ ID NO:27之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:28之胺基酸序列之CDR-H2及(iii)包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LCD40)，其包含(iv)包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列之CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO:31之胺基酸序列之CDR-L2及(vi)包含SEQ ID NO:32之胺基酸序列之CDR-L3。

【0016】 在一個態樣中，提供如前文所定義之雙特異性抗原結合分子，其中至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域包含

(i)重鏈可變區(V_HCD40)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39及SEQ ID NO:40，及

(ii)輕鏈可變區(V_LCD40)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43及SEQ ID NO:44。

【0017】 在另一態樣中，提供如前文所定義之雙特異性抗原結合分子，其中該至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域包含(i)重鏈可變區(V_HCD40)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49及SEQ ID NO:50，及

(ii)輕鏈可變區(V_LCD40)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53及SEQ ID NO:54。

【0018】 此外，提供如前文所定義之雙特異性抗原結合分子，其中

該至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域包含

(a)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的VL，或

(b)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的VL，或

(c)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:43之胺基酸序列的VL，或

(d)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的VL，或

(e)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的VL，或

(f)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的VL，或

(g)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:43之胺基酸序列的VL，或

(h)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的VL，或

(i)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的VL，或

(j)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的VL，或

(k)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:43之胺基酸序列的VL，或

(l)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的VL，或

(m)包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的VL，或

(n)包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的VL，或

(o)包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:43之胺基酸序列的VL，或

(p)包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的VL。

【0019】 在一特定態樣中，提供一種雙特異性抗原結合分子，其中該至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域包含：VH，其包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列；及VL，其包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列。

【0020】 在另一態樣中，提供如前文所定義之雙特異性抗原結合分子，其中該至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域包含

(a)包含SEQ ID NO:45之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的VL，或

(b)包含SEQ ID NO:46之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的VL，或

(c)包含SEQ ID NO:47之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的VL，或

(d)包含SEQ ID NO:48之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的VL，或

(e)包含SEQ ID NO:45之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的VL，或

(f)包含SEQ ID NO:46之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的VL，或

(g)包含SEQ ID NO:47之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的VL，或

(h)包含SEQ ID NO:48之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的VL，或

(i)包含SEQ ID NO:49之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:53之胺基酸序列的VL，或

(j)包含SEQ ID NO:50之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:53之胺基酸序列的VL，或

(k)包含SEQ ID NO:49之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:54之胺基酸序列的VL，或

(l)包含SEQ ID NO:50之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:54之胺基酸序列的VL。

【0021】 在另一特定態樣中，提供一種雙特異性抗原結合分子，其中該至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域包含：包含SEQ ID NO:45之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的VL，或其中能夠特異性結合於CD40之抗原結合域包含：包含SEQ ID NO:48之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的VL。

【0022】 更特定言之，提供一種雙特異性抗原結合分子，其包含

(i)至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域，其包含：包含

SEQ ID NO:37之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HCD40)及包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LCD40)，及

(ii)至少一個能夠特異性結合於FAP之抗原結合域，其包含：包含SEQ ID NO:15之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)。

【0023】 在一個態樣中，雙特異性抗原結合分子係人類化或嵌合抗體。在另一態樣中，雙特異性抗原結合分子包含IgG Fc區，特定言之，IgG1 Fc區或IgG4 Fc區。特定言之，Fc區包含一或多個降低抗體對Fc受體之結合親和力及/或效應功能的胺基酸取代。在一特定態樣中，提供一種雙特異性抗原結合分子，其中Fc區屬於具有胺基酸突變L234A、L235A及P329G (根據Kabat EU索引編號)之人類IgG1子類別。

【0024】 在另一態樣中，提供如上文所定義之雙特異性抗原結合分子，其中根據杵-臼方法，Fc區之第一次單元包含杵且Fc區之第二次單元包含臼。特定言之，提供一種雙特異性抗原結合分子，其中(i) Fc區之第一次單元包含胺基酸取代S354C及T366W (根據Kabat EU索引編號)且Fc區之第二次單元包含胺基酸取代Y349C、T366S及Y407V (根據Kabat EU索引編號)，或(ii) Fc區之第一次單元包含胺基酸取代K392D及K409D (根據Kabat EU索引編號)且Fc區之第二次單元包含胺基酸取代E356K及D399K (根據Kabat EU索引編號)。更特定言之，提供一種雙特異性抗原結合分子，其中Fc區之第一次單元包含胺基酸取代S354C及T366W (根據Kabat EU索引編號)且Fc區之第二次單元包含胺基酸取代Y349C、T366S及Y407V (根據Kabat EU索引編號)。

【0025】 在另一態樣中，提供一種雙特異性抗原結合分子，其中該

雙特異性抗原結合分子包含

(a)至少兩個能夠特異性結合於CD40之Fab片段，其連接至Fc區，及

(b)一個能夠特異性結合於FAP之抗原結合域，其連接至Fc區之C端。

【0026】 因此，提供一種雙特異性抗原結合分子，其提供對CD40之二價結合及對FAP之單價結合。

【0027】 在另一態樣中，提供一種雙特異性抗原結合分子，其中該雙特異性抗原結合分子包含

(a)至少兩個能夠特異性結合於CD40的Fab片段，其融合至Fc區，及

(b)一個能夠特異性結合於FAP之抗原結合域，其融合至Fc區之C端。

【0028】 在一特定態樣中，能夠特異性結合於FAP的連接至Fc區之C端的抗原結合域為交叉fab片段。因此，提供一種雙特異性抗原結合分子，其中該雙特異性抗原結合分子包含

(a)至少兩個能夠特異性結合於CD40的Fab片段，其融合至Fc區，及

(b)能夠特異性結合於FAP的交叉fab片段，其融合至Fc區之C端。

【0029】 在另一態樣中，雙特異性抗原結合分子包含四個能夠特異性結合於CD40之Fab片段。因此，提供一種雙特異性抗原結合分子，其提供對CD40之四價結合及對FAP之單價結合。

【0030】 在一個態樣中，提供一種雙特異性抗原結合分子，其包含

(a)包含兩個能夠特異性結合於CD40之Fab片段及Fc區的抗體之兩個輕鏈及兩個重鏈，及

(b)能夠特異性結合於FAP之抗原結合域的VH及VL，其中該VH融合

至(a)之兩個重鏈中之一者的C端，且其中該VL融合至(a)之兩個重鏈中之另一者的C端。

【0031】 在另一態樣中，提供一種雙特異性抗原結合分子，其包含

(a)包含兩個能夠特異性結合於CD40之Fab片段及Fc區的抗體之兩個輕鏈及兩個重鏈，及

(b)能夠特異性結合於FAP之交叉fab片段，其中該VH-Cκ鏈融合至(a)之兩個重鏈中之一者的C端。

【0032】 在另一態樣中，提供一種雙特異性抗原結合分子，其包含

(a)包含兩個能夠特異性結合於CD40之Fab片段及Fc區的抗體之兩個輕鏈及兩個重鏈，及

(b)能夠特異性結合於FAP之交叉fab片段，其中該VL-CH1鏈融合至(a)之兩個重鏈中之一者的C端。

【0033】 此外，提供一種雙特異性抗原結合分子，其包含

(a)包含兩個能夠特異性結合於CD40之Fab片段及Fc區的抗體之兩個輕鏈及兩個重鏈，及

(b)兩個能夠特異性結合於FAP之Fab片段，其中該等Fab片段中之一者連接至(a)之兩個重鏈中之一者的C端，且該等Fab片段中之另一者連接至(a)之兩個重鏈中之另一者的C端。

【0034】 在另一態樣中，提供一種雙特異性抗原結合分子，其中該雙特異性抗原結合分子包含

(a)兩個重鏈，各重鏈包含能夠特異性結合於CD40之Fab片段的VH及CH1域及Fc區次單元，

(b)兩個輕鏈，各輕鏈包含能夠特異性結合於CD40之Fab片段的VL及

CL域，及

(c)一個能夠特異性結合於FAP之Fab片段，其中該Fab片段連接至(a)之兩個重鏈中之一者的C端。

【0035】 在另一態樣中，能夠特異性結合於FAP之Fab片段為包含VL-CH1鏈及VH-Cκ鏈之交叉Fab片段，且其中VH-Cκ鏈或VL-CH1鏈連接至(a)之兩個重鏈中之一者的C端。

【0036】 在一個態樣中，提供一種雙特異性抗原結合分子，其中該雙特異性抗原結合分子包含四個能夠特異性結合於CD40之Fab片段。在特定態樣中，提供一種雙特異性抗原結合分子，其中如前文所定義之(a)之兩個重鏈中之每一者包含視情況經肽連接子彼此連接的能夠特異性結合於CD40之Fab片段的兩個VH-CH1鏈。

【0037】 因此，在一個態樣中，本發明提供一種雙特異性抗原結合分子，其包含

(a)兩個重鏈，各重鏈包含視情況經肽連接子彼此連接之能夠特異性結合於CD40之Fab片段的兩個VH-CH1鏈及Fc區次單元，

(b)四個輕鏈，各輕鏈包含能夠特異性結合於CD40之Fab片段的VL及Cκ域，及

(c)能夠特異性結合於FAP的交叉Fab片段，其包含VL-CH1鏈及VH-Cκ鏈，其中VH-Cκ鏈或VL-CH1鏈視情況經肽連接子連接至(a)之兩個重鏈中之一者的C端。

【0038】 在另一態樣中，提供一種雙特異性抗原結合分子，其包含

(a)兩個重鏈，各重鏈包含視情況經肽連接子彼此連接之能夠特異性結合於CD40之Fab片段的兩個VH-CH1鏈及Fc區次單元，

(b)四個輕鏈，各輕鏈包含能夠特異性結合於CD40之Fab片段的VL及CL域，及

(c)能夠特異性結合於FAP之交叉fab片段，其中該交叉fab片段之VH-CL鏈連接至(a)之兩個重鏈中之一者的C端。

【0039】 在另一態樣中，提供一種雙特異性抗原結合分子，其包含

(a)兩個重鏈，各重鏈包含視情況經肽連接子彼此連接之能夠特異性結合於CD40之Fab片段的兩個VH-CH1鏈及Fc區次單元，

(b)四個輕鏈，各輕鏈包含能夠特異性結合於CD40之Fab片段的VL及CL域，及

(c)能夠特異性結合於FAP之交叉fab片段，其中該交叉fab片段之VL-CH1鏈連接至(a)之兩個重鏈中之一者的C端。

【0040】 在另一態樣中，提供一種特異性結合於FAP之抗體，其中該抗體包含重鏈可變區(V_HFAP)，其包含(i)：包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含選自由SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:11及SEQ ID NO:12組成之群之胺基酸序列的CDR-H2及(iii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含：(iv)包含選自由SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14組成之群之胺基酸序列的CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列之CDR-L2及(vi)包含SEQ ID NO:8之胺基酸序列之CDR-L3。在特定態樣中，提供一種特異性結合於FAP之抗體，其中該抗體包含重鏈可變區(V_HFAP)，其包含(i)：包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含選自由SEQ ID NO:4組成之群之胺基酸序列的CDR-H2及(iii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含：(iv)包含選自由SEQ ID

NO:6組成之群之胺基酸序列的CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列之CDR-L2及(vi)包含SEQ ID NO:8之胺基酸序列之CDR-L3。

【0041】 在另一態樣中，提供一種抗體，該抗體包含：(a)重鏈可變區(V_HFAP)，其包含SEQ ID NO:15之胺基酸序列，及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列；(b)重鏈可變區(V_HFAP)，其包含SEQ ID NO:16之胺基酸序列，及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列；(c)重鏈可變區(V_HFAP)，其包含SEQ ID NO:16之胺基酸序列，及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列；或(d)重鏈可變區(V_HFAP)，其包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列，及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含SEQ ID NO:25之胺基酸序列。

【0042】 根據本發明之另一態樣，提供一種編碼如前文所描述之雙特異性抗原結合分子的經分離核酸。亦提供編碼如前文所描述之抗體的經分離核酸。本發明進一步提供一種載體，特定言之，表現載體，其包含本發明之經分離核酸及包含本發明之經分離核酸或表現載體之宿主細胞。在一些態樣中，宿主細胞為真核細胞，特定言之，哺乳動物細胞。

【0043】 在另一態樣中，提供一種製造如前文所描述之雙特異性抗原結合分子或抗體的方法，其包含：在適合於表現雙特異性抗原結合分子或抗體之條件下培養如上文所描述之宿主細胞；及分離雙特異性抗原結合分子或抗體。本發明亦涵蓋特異性結合於CD40及FAP之雙特異性抗原結合分子或藉由本發明方法製造的特異性結合於FAP之抗體。

【0044】 本發明進一步提供一種醫藥組合物，其包含如前文所描述之雙特異性抗原結合分子或如前文所描述之抗體及醫藥學上可接受之載

劑。在一個態樣中，醫藥組合物包含額外治療劑。

【0045】 本發明亦涵蓋如上文所描述之雙特異性抗原結合分子或抗體或包含該雙特異性抗原結合分子之醫藥組合物，其用作藥劑。

【0046】 在一個態樣中，提供一種如前文所描述之雙特異性抗原結合分子或本發明之醫藥組合物，其用於

(i)藉由表現CD40之抗原呈現細胞(APC)誘導免疫刺激，

(ii)刺激腫瘤特異性T細胞反應，

(iii)引起腫瘤細胞之細胞凋亡，

(iv)治療癌症，

(v)延遲癌症進展，

(vi)延長罹患癌症之患者的存活期，

(vii)治療感染。

【0047】 在一特定態樣中，提供如前文所描述之雙特異性抗原結合分子或本發明之醫藥組合物，其用於治療癌症。在另一特定態樣中，本發明提供如前文所描述之用於治療癌症之雙特異性抗原結合分子，其中雙特異性抗原結合分子與化學治療劑、輻射及/或用於癌症免疫療法之其他藥劑組合投與。在一個態樣中，如本文所描述之雙特異性抗原結合分子係用於治療癌症，其中該雙特異性抗原結合分子係用於與阻斷PD-L1/PD-1相互作用之藥劑組合投與。在另一態樣中，提供如前文所描述之雙特異性抗原結合分子或本發明之醫藥組合物，其用於上調或延長細胞毒性T細胞活性。在另一態樣中，提供如上文所述之抗體，其用於治療癌症。

【0048】 在另一態樣中，本發明提供一種抑制個體中腫瘤細胞生長之方法，其包含向該個體投與有效量之如前文所描述之雙特異性抗原結合

分子或本發明之醫藥組合物，以抑制腫瘤細胞生長。在另一態樣中，本發明提供一種治療或延遲個體之癌症的方法，其包含向該個體投與有效量之如前文所描述之雙特異性抗原結合分子或本發明之醫藥組合物。

【0049】 亦提供如前文所描述之雙特異性抗原結合分子的用途，其用於製造供治療有需要之個體的疾病的藥劑，特定言之，用於製造供治療癌症之藥劑，以及提供一種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組合物，該組合物包含醫藥學上可接受之形式的本發明的雙特異性抗原結合分子。在一特定態樣中，疾病係癌症。在上述態樣中之任一者中，個體係哺乳動物，尤其人類。

【圖式簡單說明】

【0050】 **圖1A至圖1F**展示特異性結合於人類CD40及FAP之雙特異性抗原結合分子的示意性表示。**圖1A**展示呈由兩個CD40結合部分與一個FAP (212)結合部分組合作為互換型fab片段組成之2+1型式的雙特異性FAP-CD40抗體之示意性表示，其中VL-CH1鏈在Fc杵鏈之C端融合(對於CD40為二價且對於FAP為單價)。**圖1B**展示呈由兩個CD40結合部分與一個FAP (4B9)結合部分組合作為互換型fab片段組成之2+1型式的雙特異性FAP-CD40抗體之示意性表示，其中VH-Cκ鏈在Fc杵鏈之C端融合(對於CD40為二價且對於FAP為單價)。**圖1C**展示呈由兩個CD40結合部分與一個FAP (28H1)結合部分組合作為互換型fab片段組成之2+1型式的雙特異性FAP-CD40抗體之示意性表示，其中VL-CH1鏈在Fc杵鏈之C端融合(對於CD40為二價且對於FAP為單價)。**圖1D**展示呈由四個CD40結合部分與一個FAP (212)結合部分組合作為互換型fab片段組成之4+1型式的雙特異性FAP-CD40抗體之示意性表示，其中VL-CH1鏈在Fc杵鏈之C端融合(對

於CD40為四價且對於FAP為單價)。**圖1E**展示呈由四個CD40結合部分與一個FAP (4B9)結合部分組合作為互換型fab片段組成之4+1型式的雙特異性FAP-CD40抗體之示意性表示，其中VL-CH1鏈在Fc杵鏈之C端融合(對於CD40為四價且對於FAP為單價)。**圖1F**展示呈由四個CD40結合部分與一個FAP (28H1)結合部分組合作為互換型fab片段組成之4+1型式的雙特異性FAP-CD40抗體之示意性表示，其中VL-CH1鏈在Fc杵鏈之C端融合(對於CD40為四價且對於FAP為單價)。黑點表示杵臼突變。或者，在所有分子中，交叉單抗之VH-Cκ鏈可在Fc杵鏈之C端融合。

【0051】 **圖2A及圖2B**展示免疫接種衍生之FAP殖株與FAP殖株4B9及28H1競爭同經轉染HEK細胞上表現之人類FAP進行細胞結合。**圖2A**展示所有測試的源自融合瘤之鼠類殖株(命名為209、210、211、212、213、214、215、216、217及218)不與抗FAP抗體4B9競爭結合且**圖2B**展示相同殖株不與抗FAP抗體28H1競爭結合。藉由流式細胞測量術量測MFI。x-軸展示FAP抗體之濃度。

【0052】 **圖3A及圖3B**展示抗體構築體之示意性表示，該等抗體構築體經製得以判定抗FAP殖株之結合特性是否在其C端融合至Fc域時不損失。**圖3A**展示包含Fc杵鏈及Fc臼鏈之構築體，其中VH域融合至Fc杵鏈之C端且VL域融合至Fc臼鏈之C端(C項VH/VL融合)。**圖3B**展示包含Fc杵鏈及Fc臼鏈之構築體，其中完整Fab與其VH域融合至Fc杵鏈之C端(C-術語Fab融合)。**圖3C**展示抗原決定基分組之設定，其使用基於表面電漿子共振(SPR)之分析在Biacore T200儀器上進行(參見實例1.9)。

【0053】 **圖4**展示呈FAP (212)、FAP (4B9)或FAP (28H1)靶向單價型式之人類四價或二價抗CD40抗體與人類FAP-陽性NIH/3T3細胞之結

合。轉殖基因修飾之小鼠胚胎纖維母細胞NIH/3T3-hFAP細胞株表現高含量之人類纖維母細胞活化蛋白(huFAP)。所有所描繪的具有FAP結合部分之抗CD40抗原結合分子有效結合於NIH/3T3-hFAP細胞，但在其與NIH/3T3-hFAP細胞之結合強度(EC_{50}值以及信號強度)方面變化。FAP-CD40構築體與C端FAP (212)或FAP (4B9)結合域的結合強於FAP-CD40構築體與C端FAP (28H1)結合域之結合。將結合展示為藻紅素(PE)標記之抗人類IgG Fcγ特異性山羊IgG F(ab')2片段之螢光強度之中值(MFI)，該片段用作二級偵測抗體。藉由流式細胞測量術量測MFI且藉由減去空白對照之MFI來校正基線。x軸展示抗體構築體之濃度。

【0054】 **圖5**展示呈FAP(212)或FAP (4B9)靶向單價型式之人類四價或二價抗CD40抗體與具有高表面表現量之人類CD40的初級人類B細胞的結合。所有所描繪之構築體均結合至CD40，但其與CD40-陽性B細胞之結合強度(EC_{50}值以及信號強度)不同。與四價抗CD40抗體相比，二價抗CD40抗體展示較高EC_{50}含量且達到較高結合平穩程度，與其FAP結合部分無關。使用FACS分析，用結合於藻紅素(PE)之抗人類IgG Fcγ-特異性山羊IgG F(ab`)2片段偵測抗CD40抗體與細胞表面蛋白質之結合。藉由流式細胞測量術量測MFI且藉由減去空白對照之MFI來校正基線。x軸展示抗體構築體之濃度。

【0055】 **圖6A及圖6B**展示在培育2天後在FAP塗佈之Dynabeads® (**圖6A**)或未經塗佈之Dynabeads® (**圖6B**)存在下藉由單價FAP (212)、FAP (4B9)或FAP (28H1)靶向之人類抗CD40構築體進行的人類道迪細胞之活體外活化。在經FAP塗佈之珠粒情況下，所有經描繪之針對FAP為單價之雙特異性抗體誘導B細胞活化標誌物表現CD70增加。與藉由呈具有FAP

(28H1)結合域之2+1型式之雙特異性FAP-CD40抗體、呈具有FAP (212)、FAP (4B9)或FAP (28H1)域之4+1型式之雙特異性FAP-CD40抗體或FAP非依賴性陽性對照抗體誘導的上調相比，藉由呈具有FAP (212)或FAP (4B9)結合域之2+1型式之雙特異性FAP-CD40抗體進行之B細胞活化標誌物上調較高。在不存在FAP (未經塗佈之珠粒)的情況下，在所描繪的針對CD40為二價之FAP靶向雙特異性抗體下，未觀測到CD70增加，而四價CD40結合分子誘導CD70上調，但在程度上比在FAP存在下更小。展示在與所指示滴定抗體一起培育2天之後CD70-陽性活道迪細胞之百分比。x軸展示抗體構築體之濃度。

【0056】 **圖7A及圖7B**展示在培育2天後在FAP塗佈之Dynabeads®(**圖7A**)或未經塗佈之Dynabeads® (**圖7B**)存在下藉由單價FAP (212)、FAP (4B9)或FAP (28H1)靶向之人類抗CD40構築體進行的人類B細胞之活體外活化。在經FAP塗佈之珠粒情況下，所有經描繪之針對FAP為單價之雙特異性抗體誘導B細胞活化標誌物表現CD86增加。與由交聯抗CD40抗體(P1AD4470)誘導之CD86的FAP非依賴性上調相比，由FAP依賴性雙特異性抗原結合分子誘導之CD86上調類似或略微較低。在較低抗體濃度下，與藉由呈具有FAP (28H1)結合域之2+1型式之雙特異性FAP-CD40抗體、呈具有FAP (212)、FAP (4B9)或FAP (28H1)域之4+1型式之雙特異性FAP-CD40抗體或FAP非依賴性陽性對照抗體誘導的上調相比，藉由呈具有FAP (212)或FAP (4B9)結合域之2+1型式之雙特異性FAP-CD40抗體進行之B細胞活化標誌物上調較低。在不存在FAP (未塗佈珠粒)的情況下，在雙特異性抗原結合分子下未觀測到CD86表現增加，而陽性對照抗體誘導CD86之上調。展示在與所指示滴定抗體一起培育2天之後CD86陽性活

B細胞之百分比。x軸展示抗體構築體之濃度。

【0057】 **圖8A及圖8B**展示在FAP存在下(**圖8A**)或在FAP不存在的情況下(**圖8B**)藉由FAP靶向之抗CD40結合分子活化的OVA-脈衝式DC之T細胞激活。自huCD40轉殖基因小鼠分離，用DEC205-OVA結合物處理且用FAP依賴性雙特異性抗CD40抗體以及經FAP塗佈之珠粒刺激之DC誘導抗原特異性T細胞之強增殖。相比之下，在不存在FAP (未塗佈珠粒)的情況下，藉由FAP靶向之抗CD40抗體刺激之DC未誘導T細胞增殖。經具有兩個或四個CD40及一個FAP (212)或FAP (4B9)結合部分之人類雙特異性抗原結合分子刺激之DC誘導的T細胞增殖相當。用大量SIINFEKL而非DEC205-OVA結合物脈衝之DC誘導強T細胞增殖。展示增殖與huCD40 tg DC共培養之(CFSE-低)活CFSE標記之鼠類$CD3^+CD8^+$ OT-1 T細胞之百分比，huCD40 tg DC在OVA存在下(**圖8A及圖8B**)與所指示之經滴定抗體一起預培育。x軸展示抗體構築體之濃度。

【0058】 **圖9**展示雙特異性FAP×CD40抗體在如實例5.3中所描述之兩個細胞株橋連分析中同時結合的作用。展示針對呈不同型式之雙特異性抗體之濃度的光學密度(OD)。

【0059】 在**圖10**中，展示呈不同型式之FAP×CD40抗體活化CD40受體(與FAP無關)之潛力。在報導細胞株分析中，信號轉導引起分泌性胚胎鹼性磷酸酶(SEAP)之NFκB依賴性生成之誘導且量測SEAP活性。相對於分子繪製n=6及3×STDEV之光學密度(OD)之平均值。

【0060】 **圖11**展示在皮下MC38-FAP腫瘤模型中評估相較於非靶向抗CD40抗體，FAP靶向之抗CD40結合分子之安全性、藥物動力學及藥力學概況的活體內小鼠研究的研究設計。

【0061】 **圖12**展示在用指定單一或組合抗體療法治療之小鼠的第1次及第2次(再攻擊) MC38-FAP腫瘤細胞注射後的腫瘤生長。箭頭指示療法注射及再攻擊之天數。y軸表示腫瘤體積(以mm^3為單位)且x軸表示第一次MC38-FAP腫瘤細胞注射後之天數。觀測到MC38-FAP腫瘤在FAP-CD40抗體治療後的完全腫瘤消退，與抗PD-L1抗體之型式及共注射無關。相比之下，在用單獨抗PD-L1抗體、單獨抗CD40抗體或抗CD40抗體與抗PD-L1抗體之組合治療之小鼠中，腫瘤生長與用媒劑對照治療之小鼠相當。此外，在再攻擊後，在先前用FAP-CD40抗體治療之組中無MC38-FAP腫瘤生長，而在未處理小鼠中100%有腫瘤生長。

【0062】 **圖13A**為比較自第28天開始(治療後第6天)之所有治療組之統計表，且**圖13B**為比較自第31天開始(治療後第9天)之所有治療之統計表。

【0063】 **圖14**展示4+1及2+1 FAP靶向之抗CD40結合分子以及非靶向親本抗CD40抗體在注射有FAP表現鼠類結腸腺癌腫瘤細胞株(MC38-FAP)之小鼠中的藥物動力學概況。y軸表示血清中之劑量標準化濃度且x軸表示抗體注射後的時間。對於非靶向抗CD40抗體，觀測到最高清除速率。呈4+1型式之FAP靶向之抗CD40結合分子之清除率低於非目標抗CD40分子，且觀測到呈2+1型式之FAP靶向之抗CD40結合分子的最低清除率。

【0064】 **圖15**、**圖16**及**圖17**展示在注射有FAP表現鼠類結腸腺癌腫瘤細胞株(MC38-FAP)且經非靶向抗CD40 (P1AE2301)、抗CD40-FAP 4+1 (P1AE2024)、抗CD40-FAP 2+1 (P1AE2302)或單獨的媒劑治療之小鼠的引流淋巴結(LN, 圖15A、圖16A及圖17A)、非引流淋巴結(圖15B、

圖16B及圖17B)、脾(圖15C、圖16C及圖17C)及腫瘤(圖15D、圖16D及圖17D)中之DC、T細胞及B細胞活化。相較於經媒劑治療之動物，療法注射之後四天腫瘤中的DC及T細胞活化(**圖15D**及**圖16D**)在經抗CD40-FAP 2+1 (P1AE2302)治療之動物中顯著增加。在所有其他分析組織(引流LN、非引流LN及脾)中，與媒劑組相比，非靶向抗CD40、抗CD40-FAP 4+1及抗CD40-FAP 2+1誘導顯著DC及T細胞活化。相比之下，與媒劑對照組相比，僅非靶向抗CD40在所有經分析組織中介導顯著B細胞活化(**圖17A**至**圖17D**, *p < 0.05，**p < 0.01，***p < 0.001，****p < 0.0001，不成對，雙尾史都登氏測試)。

【0065】 **圖18**展示注射有表現FAP之鼠類結腸腺癌腫瘤細胞株(MC38-FAP)且在共注射抗PD-L1抗體(P1AE0099)或未共注射的情況下經非靶向抗CD40 (P1AE2301)、抗CD40-FAP 4+1 (P1AE2024)、抗CD40-FAP 2+1 (P1AE2302)或媒劑治療的小鼠之體重。y軸展示在治療之前以體重之百分比計之體重，且x軸展示在療法注射之後的天數。僅在經非靶向抗CD40抗體單獨或與抗PD-L1組合治療之小鼠中觀測到明顯體重減輕。

【實施方式】

【0066】

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。

【0067】 如本文所用，術語「**抗原結合分子**」在其最廣泛的意義上

係指特異性結合抗原決定子的分子。抗原結合分子之實例係抗體、抗體片段及骨架抗原結合蛋白。

【0068】 如本文所用，術語「**能夠特異性結合於目標細胞抗原之抗原結合域**」或「能夠特異性結合於目標細胞抗原之部分」係指特異性結合於抗原決定子之多肽分子。在一個態樣中，抗原結合域能夠經由其目標細胞抗原活化信號傳導。在一特定態樣中，抗原結合域能夠將其所連接之實體(例如，CD40促效劑)引導至目標位點，例如攜帶抗原決定子之特定類型的腫瘤細胞或腫瘤基質。能夠特異性結合於目標細胞抗原之抗原結合域包括如本文進一步定義之抗體及其片段。另外，能夠特異性結合於目標細胞抗原之抗原結合域包括如本文進一步定義之骨架抗原結合蛋白，例如基於所設計之重複蛋白質或所設計之重複域(參見例如WO 2002/020565)之結合域。

【0069】 關於抗體或其片段，術語「能夠特異性結合於目標細胞抗原之抗原結合域」係指包含特異性結合於部分或全部抗原及與部分或全部抗原互補之區域的分子的一部分。可例如藉由一或多種抗體可變域(亦稱作抗體可變區)提供能夠特異性結合抗原之抗原結合域。特定言之，能夠特異性結合抗原之抗原結合域包含抗體輕鏈可變區(VL)及抗體重鏈可變區(VH)。在另一態樣中，「能夠特異性結合於目標細胞抗原之抗原結合域」亦可為Fab片段或交叉Fab片段。

【0070】 術語「**抗體**」在本文中以最廣泛意義使用且涵蓋各種抗體結構，包括(但不限於)單株抗體、多株抗體、單特異性及多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及抗體片段，只要其展現所需抗原結合活性即可。

【0071】 如本文所使用之術語「**單株抗體**」係指自實質上均質抗體

之群體獲得的抗體，亦即包含該群體之個別抗體係相同的及/或結合相同抗原決定基，除例如含有天然存在之突變或在單株抗體製劑之製造期間產生的可能之變異抗體之外，此類變異體一般少量地存在。相比於典型地包括針對不同決定子(抗原決定基)之不同抗體的多株抗體製劑，單株抗體製劑中之各單株抗體係針對抗原上之單一決定子。

【0072】 如本文所使用之術語「**單特異性**」抗體表示具有一或多個結合位點之抗體，該一或多個結合位點中之每一者結合於相同抗原之相同抗原決定基。術語「**雙特異性**」意謂抗原結合分子能夠特異性結合於至少兩個不同的抗原決定子。典型地，雙特異性抗原結合分子包含兩個抗原結合位點，其中每一者對不同抗原性決定子具有特異性。在某些實施例中，雙特異性抗原結合分子能夠同時結合兩個抗原決定子，特定言之，兩個不同細胞上所表現的兩個抗原決定子。如本文所描述之雙特異性抗原結合分子亦可形成多特異性抗體之一部分。

【0073】 如本申請案中所用的術語「**價**」指示存在對抗原結合分子中一個獨特抗原決定子具有特異性的指定數目之結合位點，其對一個獨特抗原決定子具有特異性。因此，術語「二價」、「四價」及「六價」分別表示抗原結合分子中對某一抗原決定子具有特異性之兩個結合位點、四個結合位點及六個結合位點之存在。在本發明之特定態樣中，根據本發明之雙特異性抗原結合分子對於某一抗原決定子可為單價，意謂其具有僅一個針對該抗原決定子之結合位點，或其對於某一抗原決定子可為二價或四價，意謂其針對該抗原決定子分別具有兩個結合位點或四個結合位點。

【0074】 術語「全長抗體」、「完整抗體」及「完全抗體」在本文中可互換使用，以指代具有與原生抗體結構實質上類似之結構的抗體。「**原**

生抗體」係指具有不同結構的天然存在之免疫球蛋白分子。舉例而言，原生IgG類抗體係約150,000道爾頓(dalton)之雜四聚體醣蛋白，其由二硫鍵鍵結之兩個輕鏈及兩個重鏈構成。自N端至C端，各重鏈具有可變區(VH)，亦稱為可變重鏈域或重鏈可變域，之後為三個恆定域(CH1、CH2及CH3)，亦稱為重鏈恆定區。類似地，自N端至C端，各輕鏈具有可變區(VL)，亦稱為可變輕鏈域或輕鏈可變域，之後為輕鏈恆定域(CL)，亦稱為輕鏈恆定區。抗體之重鏈可歸為五種類型中之一者，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γ1 (IgG1)、γ2 (IgG2)、γ3 (IgG3)、γ4 (IgG4)、α1 (IgA1)及α2 (IgA2)。抗體之輕鏈可基於其恆定域之胺基酸序列歸為兩種類型中之一種，稱為卡帕(kappa) (κ)及拉姆達(lambda) (λ)。

【0075】「**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。對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增加之活體內半衰期之Fab及$F(ab')_2$片段的論述，參見美國專利第5,869,046號。雙功能抗體為具有兩個抗原結合位點之抗體片段，其可為二價或雙特異性，參見例如EP 404,097；WO 1993/01161；Hudson等

人, Nat Med 9, 129-134 (2003)；及Hollinger等人, Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993)。三功能抗體及四功能抗體亦描述於Hudson等人, Nat Med 9, 129-134 (2003)中。單域抗體為包含抗體重鏈可變域之全部或一部分或輕鏈可變域之全部或一部分的抗體片段。在某些實施例中，單域抗體為人類單域抗體(Domantis, Inc., Waltham, MA；參見例如美國專利第6,248,516B1號)。抗體片段可藉由各種技術製得，包括(但不限於)蛋白分解消化完整抗體以及藉由重組宿主細胞(例如大腸桿菌或噬菌體)製造，如本文所描述。

【0076】 完整抗體之番木瓜蛋白酶消化產生兩個相同的抗原結合片段，稱為「Fab」片段，其各自含有重鏈及輕鏈可變域以及輕鏈之恆定域及重鏈之第一恆定域(CH1)。因此，如本文所使用，術語「**Fab片段**」係指包含有包含輕鏈的VL域及恆定域(CL)之輕鏈片段，及重鏈的VH域及第一恆定域(CH1)的抗體片段。Fab'片段與Fab片段之不同之處在於，在包括一或多個來自抗體鉸鏈區之半胱胺酸之重鏈CH1域的羧基端處添加幾個殘基。Fab'-SH為其中恆定域之半胱胺酸殘基具有游離硫醇基之Fab'片段。胃蛋白酶處理產生$F(ab')_2$片段，其具有兩個抗原組合位點(兩個Fab片段)及Fc區之一部分。根據本發明，術語「Fab片段」亦包括如下文所定義之「交叉Fab片段」或「互換型Fab片段」。

【0077】 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交換之Fab片段。交換型Fab分子可能有兩種不同之鏈組成且其包含在本發明之雙特異性抗體中： 一方面，Fab重鏈及輕鏈之可變區交換，亦即，交換型Fab分子包含由輕鏈可變區(VL)及重鏈恆定區(CH1)構成之肽鏈，及由重鏈可變區(VH)及輕鏈

恆定區(CL)構成之肽鏈。此交換型Fab分子亦稱為交叉Fab ($_{VLVH}$)。另一方面，當Fab重鏈及輕鏈之恆定區交換時，互換型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。此互換型Fab分子亦稱為交叉Fab ($_{CLCH1}$)。

【0078】「單鏈Fab片段」或「**scFab**」為由抗體重鏈可變域(VH)、抗體恆定域1 (CH1)、抗體輕鏈可變域(VL)、抗體輕鏈恆定域(CL)及連接子組成之多肽，其中該抗體域及該連接子按N端至C端方向具有以下次序中之一者：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。該等單鏈Fab片段經由CL域與CH1域之間的天然二硫鍵穩定化。此外，此等單鏈Fab分子可能藉由經由插入半胱胺酸殘基(例如，根據Kabat編號之可變重鏈中之位置44及可變輕鏈中之位置100)產生鏈間二硫鍵而進一步穩定化。

【0079】「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，其中該抗體域及該連接子按N端至C端方向具有以下次序中之一者：a) VH-CL-連接子-VL-CH1，及b) VL-CH1-連接子-VH-CL；其中VH及VL一起形成特異性結合於抗原之抗原結合位點，且其中該連接子為至少30個胺基酸之多肽。此外，此等x-scFab分子可能藉由經由插入半胱胺酸殘基(例如，根據Kabat編號之可變重鏈中之位置44及可變輕鏈中之位置100)產生鏈間二硫鍵而進一步穩定化。

【0080】「**單鏈可變片段(scFv)**」係用具有十至約25個胺基酸之短連接肽連接的抗體之重鏈(V_H)及輕鏈(V_L)可變區之融合蛋白。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，且可連接V_H之N端與V_L之C端，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域(亦即能夠與VL域一起組裝成功能性抗原結合位點)或VL域(亦即能夠與VH域一起組裝成功能性抗原結合位點)之特徵，且由此提供全長抗體之抗原結合特性。

【0081】「**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(Anticalin))；蛋白質A衍生之分子，諸如蛋白質A之Z域(親和抗體)；A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質(DARPin)；抗體輕鏈或重鏈之可變域(單域抗體，sdAb)；抗體重鏈之可變域(奈米抗體，aVH)；V_{NAR}片段；纖維結合蛋白(阿耐克汀(AdNectin))；C型凝集素域(四連接素(Tetranectin))；新型抗原受體β-內醯胺酶之可變域(V_{NAR}片段)；人類γ-晶狀體球蛋白或泛素(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(阿耐克汀(adnectin))。CTLA-4 (細胞毒性T淋巴細胞相關抗原4)為表現於大部

分$CD4^+$ T細胞上之CD28家族受體。其細胞外域具有可變域類Ig摺疊。對應於抗體之CDR之環可經異源序列取代以賦予不同結合特性。經工程改造成具有不同結合特異性之CTLA-4分子亦稱為艾維伯迪(例如US7166697B1). 艾維伯迪與抗體(例如域抗體)之經分離之可變區的尺寸大致相同。關於其他細節，參見Journal of Immunological Methods 248 (1-2), 31-45 (2001)。脂質運載蛋白為細胞外蛋白質之家族，其傳遞小型疏水性分子，諸如類固醇、後色膽素、類視黃素及脂質。其具有剛性β-片狀第二結構，其在圓錐結構之開放端具有許多環，其可經工程改造以與不同目標抗原結合。抗運載蛋白之大小在160-180個胺基酸之間，且衍生於脂質運載蛋白。關於其他細節，參見Biochim Biophys Acta 1482: 337-350 (2000)、US7250297B1及US20070224633。親和抗體為來源於金黃色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)之蛋白A之骨架，其可經工程改造以結合至抗原。域由具有約58個胺基酸之三螺旋束組成。已藉由表面殘基之隨機化產生文庫。關於其他細節，參看Protein Eng. Des. Sel. 2004, 17, 455-462及EP 1641818A1。高親合性多聚體為來源於A-域骨架家族之多域蛋白質。約35個胺基酸之原生域採用既定二硫鍵鍵結之結構。藉由改組由A-域之家族呈現之天然變化來產生多樣性。關於其他細節，參見Nature Biotechnology 23(12), 1556 - 1561 (2005) 及 Expert Opinion on Investigational Drugs 16(6), 909-917 (2007年6月)。運鐵蛋白為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，以結合不同目標抗原。經工程改造之運鐵蛋白骨架之實例包括反式體。關於其他細節，參見J. Biol. Chem 274, 24066-24073 (1999)。經設計之錨蛋白重複蛋白質(DARPins)來源於錨蛋白，其為介導整合膜蛋白質

與細胞骨架之連接的蛋白質之家族。單一錨蛋白重複為由兩個α螺旋及β回旋(beta-turn)組成之33殘基基元。其可藉由隨機化各重複之第一個α螺旋及β回旋中之殘基而經工程改造為結合不同目標抗原。可藉由增加模組數目來增加其結合界面(親和力成熟方法)。關於其他細節，參見J. Mol. Biol. 332, 489-503 (2003), PNAS 100(4), 1700-1705 (2003)及J. Mol. Biol. 369, 1015-1028 (2007)以及US20040132028A1。單域抗體為由單一單體可變抗體域組成之抗體片段。第一個單域來源於來自駱駝之抗體重鏈之可變域(奈米抗體或V_HH片段)。此外，術語單域抗體包括自主人類重鏈可變域(aVH)或來源於鯊魚之V_{NAR}片段。纖維結合蛋白為可經工程改造以結合於抗原之骨架。纖連蛋白由III型人類纖維結合蛋白(FN3)之15個重複單元之第10個域的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阿耐克汀能夠特異性識別相關治療目標。關於其他細節，參見Protein Eng. Des. Sel. 18, 435- 444 (2005)、US20080139791、WO2005056764及US6818418B1。肽適體為組合性識別分子，其由恆定骨架蛋白質(通常為硫氧還蛋白(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)。微體來源於天然存在之長度為25-50個胺基酸之微型蛋白質，其含有3至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(knottin)。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。

【0082】 至於參考分子，「**與相同抗原決定基結合之抗原結合分子**」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%或超過50%，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%或超過50%。與參考分子「**不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，其在競爭分析中不阻斷參考分子與其抗原之結合達50%或更大，且相反，參考分子在競爭分析中不阻斷抗原結合分子與其抗原之結合達50%或更大。

【0083】 術語「**抗原結合域**」或「抗原結合位點」係指包含特異性結合於部分或全部抗原且與部分或全部抗原互補之區域的抗原結合分子的部分。當抗原較大時，抗原結合分子可僅結合於抗原之特定一部分，該部分稱為抗原決定基。抗原結合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)。

【0084】 如本文所用，術語「**抗原決定子**」與「抗原」及「抗原決定基」同義且係指多肽大分子上與抗原結合部分結合、形成抗原結合部分-抗原複合物的位點(例如鄰近胺基酸區段或由非鄰近胺基酸之不同區域組成的構形組態)。適用的抗原決定子可發現於例如腫瘤細胞表面上、病毒所感染細胞之表面上、其他病變細胞表面上、免疫細胞表面上、游離於血清中及/或細胞外基質(ECM)中。除非另外指示，否則在本文中適用作抗原之蛋白質可以為來自任何脊椎動物來源，包括哺乳動物，諸如靈長類動物(例如人類)及嚙齒動物(例如小鼠及大鼠)的任何原生形式之蛋白質。在特定實施例中，抗原係人類蛋白質。在本文中提及特定蛋白質的情況下，該術語涵蓋「全長」的未經處理之蛋白質，以及由細胞中之處理所產生的任何形式之蛋白質。該術語亦涵蓋天然存在之蛋白質變異體，例如剪接變異體或對偶基因變異體。

【0085】「**特異性結合**」意謂結合對抗原具選擇性且可與非所需或非特異性相互作用區分。抗原結合分子與特定抗原結合之能力可經由酶聯免疫吸附分析(ELISA)或熟習此項技術者熟悉之其他技術，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如例如藉由SPR量測之抗原結合分子與抗原之結合的約10%。在某些實施例中，結合至抗原之分子之解離常數(Kd)為≤ 1 μM、≤ 100 nM、≤ 10 nM、≤ 1 nM、≤ 0.1 nM、≤ 0.01 nM或≤ 0.001 nM (例如，10^{-8} M或更低，例如10^{-8} M至10^{-13} M，例如10^{-9} M至10^{-13} M)。

【0086】「**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)之間非共價相互作用強度之總和。除非另外指明，否則如本文所使用之「結合親和力」係指反映結合對(例如抗體與抗原)成員之間的1:1相互作用之固有結合親和力。分子X對其搭配物Y的親和力一般可由解離常數(Kd)表示，解離常數係解離速率常數與締合速率常數(分別係koff及kon)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見方法(包括本文所述之方法)量測親和力。一種用於量測親和力之特定方法為表面電漿子共振(SPR)。

【0087】「**親和力成熟**」抗體係指一或多個高變區(HVR)相比於親本抗體存在一或多種變化的抗體，親本抗體不存在該等變化，此類變化引起抗體對抗原之親和力改良。

【0088】 如本文所用，「**目標細胞抗原**」係指目標細胞(特定言之，

腫瘤中之目標細胞，諸如癌細胞或腫瘤基質細胞)之表面上所呈現的抗原決定子。因此，目標細胞抗原為腫瘤相關抗原。特定言之，目標細胞抗原係纖維母細胞活化蛋白(FAP)。

【0089】 除非另外指示，否則術語「**纖維母細胞活化蛋白(FAP)**」，亦稱為脯胺醯基內肽酶FAP或Seprase (EC 3.4.21)，係指來自任何脊椎動物來源(包括哺乳動物，諸如靈長類動物(例如人類)、非人類靈長類動物(例如食蟹獼猴)及嚙齒動物(例如小鼠及大鼠))之任何原生FAP。該術語涵蓋「全長」的未經處理的FAP以及由細胞中之處理產生的FAP的任何形式。該術語亦涵蓋FAP之天然存在之變異體，例如剪接變異體或對偶基因變異體。在一個實施例中，本發明之抗原結合分子能夠特異性結合於人類、小鼠及/或食蟹獼猴FAP。人類FAP之胺基酸序列展示於UniProt (www.uniprot.org)寄存編號Q12884 (版本149，SEQIDNO:2)或NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/)RefSeqNP_004451.2中。人類FAP之細胞外域(ECD)自胺基酸位置26延伸至胺基酸位置760。His標記之人類FAP ECD之胺基酸序列展示於SEQ ID NO 78中。小鼠FAP之胺基酸序列展示於UniProt寄存編號P97321 (版本126，SEQ ID NO:79)或NCBI RefSeq NP_032012.1中。小鼠FAP之細胞外域(ECD)自胺基酸位置26延伸至胺基酸位置761。SEQ ID NO:80展示His標記之小鼠FAP ECD之胺基酸。SEQ ID NO:81展示His標記之食蟹獼猴FAP ECD之胺基酸。本發明之抗FAP結合分子較佳結合於FAP之細胞外域。

【0090】 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域。原生抗體之重鏈及輕鏈(分別為VH及VL)可變域通常具有類似的結構，其中各域包含四個保守性構架區(FR)及

三個高變區(HVR)。參看例如Kindt等人, Kuby Immunology, 第6版, W.H. Freeman及Co., 第91頁 (2007)。單個VH或VL域可足以賦予抗原結合特異性。

【0091】 如本文所用，術語「高變區」或「HVR」係指抗體可變域中的序列高變且決定抗原結合特異性之區(例如「**互補決定區**」(「CDR」))中之每一者。

【0092】 一般而言，抗體包含六個CDR：VH中的三個(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3)及VL中的三個(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3)。本文之例示性CDR包括：

(a) 出現在胺基酸殘基26-32 (L1)、50-52 (L2)、91-96 (L3)、26-32 (H1)、53-55 (H2)及96-101 (H3)處之高變環(Chothia及Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987))；

(b) 出現在胺基酸殘基24-34 (L1)、50-56 (L2)、89-97 (L3)、31-35b (H1)、50-65 (H2)及95-102 (H3)處之CDR (Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版. 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))；及

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

【0093】 除非另外指示，否則CDR根據Kabat等人同前文獻測定，。熟習此項技術者將理解，CDR名稱亦可根據Chothia同前文獻，McCallum同前文獻，或任何其他科學上可接受的命名法系統確定。

【0094】「**構架**」或「FR」係指除互補決定區(CDR)外的可變域殘基。可變域之FR通常由四個FR域組成：FR1、FR2、FR3及FR4。因此，在VH（或VL)中，CDR及FR序列一般依以下序列呈現：FR1-CDR-H1(CDR-L1)-FR2-CDR-H2(CDR-L2)-FR3-CDR-H3(CDR-L3)-FR4。

【0095】術語「**嵌合**」抗體係指重鏈及/或輕鏈之一部分衍生自特定來源或物種，而重鏈及/或輕鏈之其餘部分衍生自不同來源或物種之抗體。

【0096】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別(同型)，例如IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1及IgA_2。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。

【0097】「**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，人類化抗體將包含實質上所有至少一種及通常兩種可變域，其中所有或實質上所有HVR（例如CDR)對應於非人類抗體之彼等者，且所有或實質上所有FR對應於人類抗體之彼等者。人類化抗體視情況可包含來源於人類抗體之抗體恆定區的至少一部分。抗體(例如非人類抗體)之「**人類化形式**」係指已經歷人類化之抗體。本發明涵蓋之「人類化抗體」之其他形式為其中恆定區已經額外修飾或自原始抗體發生變化以產生根據本發明之特性(尤其在C1q結合及/或Fc受體(FcR)結合方面)之抗體。

【0098】術語「Fc域」或「**Fc區**」在本文中用於定義抗體重鏈中含有恆定區之至少一部分的C末端區。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域。人類IgG Fc區之「CH2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域。本文中，CH2域可為原生序列CH2域或變異型CH2域。「CH3域」包含殘基在Fc區中自C端至CH2域之延伸(亦即，自IgG之約位置341處之胺基酸殘基至約位置447處之胺基酸殘基延伸)。在本文中，CH3區可為原生序列CH3域或變異型CH3域(例如，在其一個鏈中具有所引入「隆凸」(「杵」)及在其另一鏈中具有對應引入之「凹穴」(「臼」)之CH3域；參見以引用之方式明確併入本文中之美國專利第5,821,333號)。此類變異型CH3域可用於促進如本文中所描述之兩個非一致抗體重鏈之雜二聚化。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。除非本文另外說明，否則Fc區或恆定區中之胺基酸殘基之編號係根據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中所描述。

【0099】「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，方法涉及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。藉由用較大側鏈(例如酪胺酸或色胺酸)置換第一多肽界面中之小胺基酸側鏈來構築隆凸。大小與隆凸相同或類似之補償性凹穴係在第二多肽之界面中藉由用較小胺基酸側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)置換大胺基酸側鏈來形成。隆凸及凹穴可

藉由改變編碼多肽之核酸製造，例如藉由位點特異性突變誘發或藉由肽合成製造。在一特定實施例中，杵修飾包含Fc域之兩個次單元之一者中的胺基酸取代T366W，且臼修飾包含Fc域之兩個次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域之次單元另外包含胺基酸取代S354C，且包含臼修飾之Fc域之次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區之兩個次單元之間形成二硫橋鍵，由此進一步穩定二聚體(Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001))。

【0100】「與免疫球蛋白之Fc區等效之區」意欲包括免疫球蛋白之Fc區之天然存在之對偶基因變異體以及具有變化之變異體，該等變化產生取代、添加或缺失，但不實質上降低免疫球蛋白介導效應功能(諸如抗體依賴性細胞毒性)之能力。舉例而言，免疫球蛋白之Fc區之N端或C端可缺失一或多個胺基酸而不實質性損失生物功能。此類變異體可根據此項技術中已知的一般法則選擇以對活性具有最小影響(參見例如Bowie, J. U.等人, Science 247:1306-10 (1990))。

【0101】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的細胞毒性(ADCC)、抗體依賴性細胞噬菌作用(ADCP)、細胞介素分泌、免疫複合物介導之抗原呈現細胞攝入抗原、細胞表面受體(例如B細胞受體)之下調及B細胞活化。

【0102】可藉由抗體Fc區與Fc受體(FcR) (其為造血細胞上之特殊化細胞表面受體)之相互作用介導Fc受體結合依賴性效應功能。Fc受體屬於

免疫球蛋白超家族，且已展示介導藉由免疫複合物之噬菌作用移除經抗體塗佈之病原體，及經由抗體依賴性細胞介導之毒性(ADCC)裂解用相應抗體塗佈之紅血球及各種其他細胞標靶(例如，腫瘤細胞) (參見例如，Van de Winkel, J.G.及Anderson, C.L., J. Leukoc. Biol. 49 (1991) 511-524)。FcR由其對免疫球蛋白同型之特異性定義：針對IgG抗體之Fc受體稱為FcγR。在例如Ravetch, J.V.及Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492；Capel, P.J.等人, Immunomethods 4 (1994) 25-34；de Haas, M.等人., J. Lab. Clin. Med. 126 (1995) 330-341；及Gessner, J.E.等人, Ann. Hematol. 76 (1998) 231-248描述Fc受體結合。

【0103】 IgG抗體之Fc區(FcγR)的受體交聯觸發多種效應功能，包括噬菌作用、抗體依賴性細胞毒性及炎性介質釋放，以及免疫複合物清除及抗體產量之調節。在人類中，已表徵三種類別之FcγR，其為：

-FcγRI (CD64)以高親和力結合單體IgG且在巨噬細胞、單核球、嗜中性球及嗜酸性細胞上表現。在Fc區IgG內至少在胺基酸殘基E233-G236、P238、D265、N297、A327及P329 (根據Kabat之EU索引編號)中之一者的修飾減小FcγRI結合。位置233-236處之IgG2殘基(經取代至IgG1及IgG4)減少10^3倍FcγRI結合，且消除人類單核球與抗體敏化紅細胞之反應(Armour, K.L.等人, Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2613-2624)。

-FcγRII (CD32)以中至低親和力結合複合型IgG，並廣泛表現。此受體可分為兩種亞型：FcγRIIA及FcγRIIB。在許多涉及殺滅之細胞(例如巨噬細胞、單核球、嗜中性球)上發現FcγRIIA，且其似乎能夠活化殺滅過程。FcγRIIB似乎在抑制過程中起一定作用，且在B細胞、巨噬細胞上及肥大細胞及嗜酸性球上發現FcγRIIB。在B細胞上，其作用似乎為進一步

抑制免疫球蛋白製造及同型轉換為例如IgE類別。在巨噬細胞上，FcγRIIB用以抑制如經由FcγRIIA介導的吞噬。在嗜酸性球及肥大細胞上，B形式可經由IgE結合至其各別受體而有助於抑制此等細胞之活化。發現對於FcγRIIA結合減小，例如對於包含至少在胺基酸殘基E233-G236、P238、D265、N297、A327、P329、D270、Q295、A327、R292及K414中之一者處具有突變之IgG Fc區的抗體(根據Kabat之EU索引編號)。

-FcγRIII (CD16)以中至低親和力結合IgG，且以兩種類型存在。FcγRIIIA見於NK細胞、巨噬細胞、嗜酸性球及一些單核球及T細胞上，且介導ADCC。FcγRIIIB高度表現於嗜中性球上。發現與FcγRIIIA之結合降低，例如對於包含至少在胺基酸殘基E233-G236、P238、D265、N297、A327、P329、D270、Q295、A327、S239、E269、E293、Y296、V303、A327、K338及D376 (根據Kabat之EU索引編號)中之一者處具有突變之IgG Fc-區的抗體。

【0104】 在人類IgG1上映射Fc受體結合位點、上述突變位點及用於量測FcγRI及FcγRIIA結合之方法描述於Shields, R.L.等人 J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604中。

【0105】 術語「**ADCC**」或「抗體依賴性細胞毒性」為藉由Fc受體結合介導之功能，且係指在效應細胞存在下的情況下藉由如本文所報導之抗體裂解目標細胞。藉由量測其與Fcγ受體表現細胞(諸如以重組方式表現FcγRI及/或FcγRIIA或NK細胞(基本上表現FcγRIIIA)之細胞)之結合，來研究引起介導ADCC之初始步驟的抗體能力。特定言之，量測NK細胞上與FcγR之結合。

【0106】「**活化Fc受體**」為一種Fc受體，其與抗體之Fc區接合之後，引發信號傳導事件，此刺激攜帶受體之細胞執行效應功能。活化Fc受體包括FcγRIIIa (CD16a)、FcγRI (CD64)、FcγRIIa (CD32)及FcαRI (CD89)。特定活化Fc受體為人類FcγRIIIa (參見UniProt寄存編號P08637，版本141)。

【0107】除非另外指示，否則如本文所用之術語「**CD40**」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)及嚙齒動物(例如小鼠及大鼠))之任何原生CD40。該術語涵蓋「全長」的未經處理之CD40以及由細胞中之處理產生的CD40之任何形式。該術語亦涵蓋天然存在之CD40變異體，例如剪接變異體或對偶基因變異體。例示性人類CD40之胺基酸序列展示於SEQ ID NO:1 (Uniprot P25942，版本200)中且例示性小鼠CD40之胺基酸序列展示於SEQ ID NO:146 (Uniprot P27512，版本160)中。CD40抗原係屬於腫瘤壞死因子受體(TNF-R)家族之50 kDa細胞表面糖蛋白(Stamenkovic等人，(1989), EMBO J. 8: 1403-10)。CD40在許多正常細胞類型及腫瘤細胞類型中表現，包括B淋巴球、樹突狀細胞、單核球、巨噬細胞、胸腺上皮、內皮細胞、纖維母細胞及平滑肌細胞。CD40表現於所有B淋巴瘤及70%之所有實體腫瘤中且藉由成熟信號(諸如IFN-γ及GM-CSF)在抗原呈現細胞(APC)中上調。CD40活化亦誘導單核球分化為功能性樹突狀細胞(DC)且經由APC-CD40誘導之細胞介素促進NK細胞之溶胞活性。因此，CD40在藉由誘導APC成熟來起始及促進免疫反應、分泌輔助細胞介素、上調協同刺激分子及增強效應功能方面起至關重要之作用。

【0108】如本文所用，術語「**CD40促效劑**」包括促效CD40/CD40L相

互作用之任何部分。如在此上下文中所使用之CD40較佳係指人類CD40，因此CD40促效劑較佳為人類CD40之促效劑。通常，該部分將為促效CD40抗體或抗體片段。

【0109】 術語「**抗CD40抗體**」、「抗CD40」、「CD40抗體」及「特異性結合於CD40之抗體」係指能夠以足夠親和力結合CD40以使得抗體在靶向CD40時適用作診斷劑及/或治療劑之抗體。在一個態樣中，抗CD40抗體與不相關非CD40蛋白質之結合程度小於抗體與CD40之結合之約10%，如(例如)藉由放射免疫分析(RIA)或流式細胞量測術(FACS)所量測。在某些實施例中，與CD40結合之抗體的解離常數(K_D)為≤ 1 μM、≤ 100 nM、≤ 10 nM、≤ 1 nM、≤ 0.1 nM、≤ 0.01 nM或≤ 0.001 nM (例如10^{-6} M或更小，例如10^{-68} M至10^{-13} M，例如10^{-8} M至10^{-10} M)。

【0110】 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為例如$(G_4S)_n$、$(SG_4)_n$或$G_4(SG_4)_n$肽連接子，其中「n」通常為介於1與10之間、典型地介於2與4之間，特定言之為2之數字，亦即，肽選自由以下組成之群：GGGGS (SEQ ID NO:82)、GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:83)、SGGGGSGGGG (SEQ ID NO:84)及GGGGSGGGGSGGGG (SEQ ID NO:85)，而且包括以下序列：GSPGSSSSGS (SEQ ID NO:86)、$(G4S)_3$ (SEQ ID NO:87)、$(G4S)_4$ (SEQ ID NO:88)、GSGSGSGS (SEQ ID NO:89)、GSGSGNGS (SEQ ID NO:90)、GGSGSGSG (SEQ ID NO:91)、GGSGSG (SEQ ID NO:92)、GGSG (SEQ ID NO:93)、GGSGNGSG (SEQ ID NO:94)、GGNGSGSG (SEQ ID NO:95)及GGNGSG (SEQ ID NO:96)。備受關注之肽連接子係

(G4S) (SEQ ID NO:82)、$(G_4S)_2$或GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:83)、$(G4S)_3$ (SEQ ID NO:87)及$(G4S)_4$ (SEQ ID NO:88)。

【0111】 如本申請案內所用，術語「**胺基酸**」表示天然存在之羧基α-胺基酸之群，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)。

【0112】 「**經融合**」或「**經連接**」意謂組分(例如抗體之重鏈及Fab片段)藉由肽鍵直接地或經由一或多個肽連接子連接。

【0113】 相對於參考多肽(蛋白質)序列之「**胺基酸序列一致性百分比(%)**」定義為在比對序列且視需要引入間隙以達成最大序列一致性百分比之後，且在不將任何保守性取代視為序列一致性之一部分的情況下，候選序列中與參考多肽序列中之胺基酸殘基一致的胺基酸殘基的百分比。出於測定胺基酸序列一致性百分比目地之比對可以使用此項技術範圍內的多種方法，例如使用公開可獲得之電腦軟體(諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN. SAWI或Megalign (DNASTAR)軟體)實現。熟習此項技術者可測定用於比對序列之適當參數，包括在所比較序列之全長內達成最大比對所需的任何演算法。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程式可公開獲自Genentech, Inc., South San Francisco, California，或可自原始碼編寫。ALIGN-2程式經編譯可用於UNIX作業系統，包括數位UNIX V4.0D。所有序列比較參數由ALIGN-2程式設定且不變化。在採用ALIGN-2進行胺基酸序列比較之情形下，給定胺基酸序列A與給定胺基酸序列B之胺基酸序列一致性% (或者，其可表述為與給定胺基酸序列B具有或包含一定胺基酸序列一致性%的給定胺基酸序列A)如下計算：

100 × 分數X/Y

其中X為在A與B之程式比對中藉由序列比對程式ALIGN-2評為一致匹配之胺基酸殘基的數目，且其中Y為B中之胺基酸殘基之總數目。應瞭解，在胺基酸序列A之長度與胺基酸序列B之長度不相等之情況下，A相對於B之胺基酸序列一致性%與B相對於A之胺基酸序列一致性%將不相等。除非另外特定陳述，否則本文所用之所有胺基酸序列一致性%值如緊接前述段落中所描述使用ALIGN-2電腦程式獲得。

【0114】 在某些實施例中，涵蓋本文提供之雙特異性抗原結合分子之**胺基酸序列變異體**。舉例而言，可能需要改良含有TNF配位三聚體之抗原結合分子之結合親和力及/或其他生物特性。含有TNF配位三聚體之抗原結合分子之胺基酸序列變異體可藉由將適合的修飾引入編碼核苷酸序列之分子或藉由肽合成來製備。此類修飾包括例如抗體胺基酸序列內的殘基缺失及/或插入及/或取代。可進行缺失、插入及取代之任何組合以獲得最終構築體，其限制條件為最終構築體具有所需特徵，例如抗原結合。用於取代型誘變之所關注位點包括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類別(1)至(6)進一步描

述。胺基酸取代可經引入至所關注分子且針對所需活性進行篩檢之產物中，以例如保持/改良抗原結合、減少免疫原性或改良ADCC或CDC。

表A

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

【0115】 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。

【0116】 非保守取代將引起此等類別中之一者之成員換成另一個類別。

【0117】 術語「**胺基酸序列變異體**」包括大量變體，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為親和力成熟抗體，其可例如使用基於噬菌體呈現之親和力成熟技術(諸如本文所描述之技術)便利地產生。簡言之，使一或多個HVR殘基突變並在噬菌體上呈現變異抗原結合分子，且針對特定生物活性(例如結合親和力)進行篩選。在某些實施例中，一或多個HVR內可存在取代、插入或缺失，只要此類變化不實質上降低抗原結合分子結合抗原之能力即可。舉例而言，可在HVR中進行不實質上降低結合親和力之保守改變(例如如本文所提供之保守取代)。一種適用於鑑別突變誘發可靶向之抗體之殘基或區的方法稱為「丙胺酸掃描突變誘發」，如Cunningham及Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085所描述。在此方法中，鑑別出一個殘基或一組目標殘基(例如帶電殘基，諸如Arg、Asp、His、Lys及Glu)且將其置換為中性或帶負電荷胺基酸(例如，丙胺酸或聚丙胺酸)以判定抗體與抗原之相互作用是否受到影響。可在對初始取代展現功能敏感性之胺基酸位置處引入其他取代。或者或另外，抗原-抗原結合分子複合物之晶體結構用以鑑別抗體與抗原之間的接觸點。此類接觸殘基及鄰近殘基可作為取代候選物之靶標或排除在取代候選物之外。可篩選變異體以判定其是否含有所需特性。

【0118】 胺基酸序列插入包括長度在一個殘基至含有一百個或多於一百個殘基之多肽範圍內的胺基端及/或羧基端融合，以及單個或多個胺基酸殘基之序列內插入。末端插入的實例包括具有N端甲硫胺醯基殘基的本發明之雙特異性抗原結合分子。分子之其他插入型變異體包括N或C端與多肽之融合，此延長雙特異性抗原結合分子之血清半衰期。

【0119】 在某些實施例中，本文提供之雙特異性抗原結合分子經改變以提高或降低抗體經糖基化之程度。可藉由改變胺基酸序列使得產生或移除之一或多個糖基化位點來便利地獲得分子之糖基化變異體。當含有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原生抗體通常包含分支鏈雙觸角寡醣，其通常藉由N鍵連接至Fc區之CH2域之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-乙醯基葡糖胺(GlcNAc)、半乳糖及唾液酸，以及附接於雙觸角寡醣結構之「主幹」中之GlcNAc上的海藻糖。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經改良特性的變異體。在一個態樣中，提供本發明之雙特異性抗原結合分子或抗體的變異體，其具有碳水化合物結構且不具有(直接或間接)連接至Fc區的海藻糖。該等海藻糖基化變異體可具有經改良之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)。在另一態樣中，本發明之雙特異性抗原結合分子或抗體的變異體具有對分寡醣，例如其中連接至Fc區的二觸角寡醣經GlcNAc對分。該等變異體可具有降低之海藻糖基化及/或經改良之ADCC功能，參見例如WO 2003/011878 (Jean-Mairet等人)；美國專利第

6,602,684號(Umana等人)；及US 2005/0123546 (Umana等人)。亦提供寡醣中之至少一個半乳糖殘基與Fc區連接之抗體變異體。該等抗體變異體可具有經改良之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。

【0120】 在某些態樣中，可能需要產生本發明之雙特異性抗原結合分子的半胱胺酸工程改造之變異體，例如「thioMAb」，其中分子之一或多個殘基經半胱胺酸殘基取代。在特定態樣中，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彼等殘基，反應性硫醇基由此安置於抗體之可達位點處且可用於使抗體與其他部分(諸如藥物部分或連接子-藥物部分)結合以產生免疫結合物。在某些態樣中，以下殘基中之任一者或多者可經半胱胺酸取代：輕鏈之V205 (Kabat編號)；重鏈之A118 (EU編號)；及重鏈Fc區之S400 (EU編號)。半胱胺酸工程改造之抗原結合分子可(例如)如美國專利第7,521,541號中所描述產生。

【0121】 術語「核酸」或「**聚核苷酸**」包括含核苷酸聚合物之任何化合物及/或物質。各核苷酸由鹼基、具體言之嘌呤或嘧啶鹼基(亦即胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)、腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U))、糖(亦即去氧核糖或核糖)及磷酸酯基構成。通常，核酸分子係由鹼基序列描述，由此該等鹼基表示核酸分子之一級結構(線性結構)。鹼基序列通常係自5'至3'表示。在本文中，術語核酸分子涵蓋去氧核糖核酸(DNA)，包括例如互補DNA (cDNA)及基因組DNA；核糖核酸(RNA)，特定言之信使RNA (mRNA)；合成形式之DNA或RNA；及包含兩個或更多個此等分子之混合聚合物。核酸分子可以為線性或環形的。另外，術語核酸分子包括有義股及反義股兩者，以及單股及雙股形式。另外，本文描述之核酸分子可含有

天然存在或非天然存在之核苷酸。非天然存在之核苷酸之實例包括具有衍生化糖或磷酸酯主鏈鍵聯或化學修飾之殘基的經修飾核苷酸鹼基。核酸分子亦涵蓋DNA及RNA分子，其適用作活體外及/或活體內，例如在宿主或患者中直接表現本發明之抗體之載體。此類DNA (例如cDNA)或RNA (例如mRNA)載體可為未修飾或經修飾的。舉例而言，mRNA可經化學修飾以增強RNA載體之穩定性及/或經編碼分子之表現，以使得mRNA可注射至個體中以在活體內產生抗體(參見例如Stadler等人, Nature Medicine 2017, 2017年6月12日在線公佈, doi:10.1038/nm.4356或EP 2 101 823 B1)。

【0122】「**經分離**」核酸係指已與其天然環境之組分分離的核酸分子。經分離核酸包括通常含有核酸分子之細胞中所含的核酸分子，但該核酸分子存在於染色體外或存在於不同於其天然染色體位置之染色體位置處。

【0123】「**編碼雙特異性抗原結合分子或抗體之經分離核酸**」係指編碼雙特異性抗原結合分子或抗體之重鏈及輕鏈(或其片段)之一或多種核酸分子，包括單一載體或單獨載體中之此類核酸分子及存在於宿主細胞中之一或多個位置處之此類核酸分子。

【0124】一種核酸或聚核苷酸的核苷酸序列與本發明之參考核苷酸序列至少例如95%「一致」意指該聚核苷酸之核苷酸序列與參考序列一致，不同之處在於該聚核苷酸序列相對於參考核苷酸序列可每100個核苷酸中包括至多五個點突變。換言之，為了獲得核苷酸序列與參考核苷酸序列至少95%一致的聚核苷酸，參考序列中至多5%的核苷酸可缺失或經另一核苷酸取代，或參考序列中可插入佔參考序列核苷酸總數至多5%的多

個核苷酸。參考序列之此等改變可發生於參考核苷酸序列之5'或3'端位置或彼等末端位置之間的任何位置，此等位置個別地穿插於參考序列殘基中或參考序列內的一或多個鄰近基團中。根據實際情況，習知地可使用已知電腦程式，諸如上文關於多肽所論述之電腦程式(例如ALIGN-2)測定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。

【0125】 術語「**表現卡匣**」係指以重組或合成方式產生之聚核苷酸，其具有容許特定核酸在目標細胞中發生轉錄的一系列特定核酸元件。重組表現卡匣可併入至質體、染色體、粒線體DNA、質體DNA、病毒或核酸片段中。通常，表現載體之重組表現卡匣部分包括待轉錄之核酸序列及啟動子，以及其他序列。在某些實施例中，本發明之表現卡匣包含編碼本發明之雙特異性抗原結合分子或其片段的聚核苷酸序列。

【0126】 術語「**載體**」或「表現載體」與「表現構築體」同義且係指用於引入特定基因且引導該基因表現的DNA分子，該DNA分子與該基因在目標細胞中可操作地連接。該術語包括呈自我複製核酸結構之載體以及併入已引入其之宿主細胞之基因組中的載體。本發明之表現載體包含表現卡匣。表現載體允許大量的穩定mRNA發生轉錄。一旦表現載體進入目標細胞內，則藉由細胞轉錄及/或轉譯機構產生由該基因編碼的核糖核酸分子或蛋白質。在一個實施例中，本發明之表現載體包含表現卡匣，該表現卡匣包含編碼本發明之雙特異性抗原結合分子或其片段的聚核苷酸序列。

【0127】 術語「**宿主細胞**」、「宿主細胞株」及「宿主細胞培養物」可互換使用且係指已引入外源核酸之細胞，包括此類細胞之後代。宿主細

胞包括「轉型體」及「轉型細胞」，其包括初級轉型細胞及自其衍生之子代(不考慮繼代次數)。後代之核酸含量與母細胞可能不完全相同，但可能含有突變。本文中包括針對原始轉型細胞篩選或選擇的具有相同功能或生物活性之突變後代。宿主細胞為可用於產生本發明之雙特異性抗原結合分子之任何類型的細胞系統。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。

【0128】 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。

【0129】 試劑(例如醫藥組合物)之「**治療有效量**」係指在達成所要治療性或預防性結果所需之劑量及時段下有效的量。舉例而言，治療有效量之藥劑可消除、減少、延遲、最小化或預防疾病之副作用。

【0130】 「**個體(individual/subject)**」為哺乳動物。哺乳動物包括(但不限於)馴養動物(例如牛、綿羊、貓、狗及馬)、靈長類動物(例如人類及非人類靈長類動物，諸如猴)、兔及嚙齒動物(例如小鼠及大鼠)。特定言之，個體(individual/subject)為人類。

【0131】 術語「**醫藥組合物**」或「醫藥調配物」係指所呈形式以允許其中所含活性成分之生物活性有效發揮且不含對醫藥組合物將投與之個體具有不可接受毒性之其他組分的製劑。

【0132】 「**醫藥學上可接受之載劑**」係指醫藥組合物或調配物中之除活性成分之外的對個體無毒的成分。醫藥學上可接受之載劑包括(但不

限於)緩衝劑、賦形劑、穩定劑或防腐劑。

【0133】 術語「**藥品說明書**」用以指通常包括於治療性產品之商業包裝中的說明，其含有關於與使用此類治療性產品有關之適應症、用法、劑量、投與、組合療法、禁忌及/或警告的資訊。

【0134】 如本文所用，「**治療(treatment)**」(及其語法變化形式，諸如「治療(treat/treating)」係指臨床介入以試圖改變所治療個體之自然病程，且可以為實現預防或在臨床病理學病程中進行。所需治療作用包括(但不限於)預防疾病發生或復發、緩解症狀、減輕疾病之任何直接或間接病理性結果、預防癌轉移、降低疾病進展速率、改善或緩和疾病病況及緩解或改良預後。在一些實施例中，本發明之分子用於延遲疾病發展或減慢疾病之進展。

【0135】 如本文所用，術語「**癌症**」係指增生性疾病，諸如淋巴瘤、淋巴球性白血病、肺癌、非小細胞肺(NSCL)癌、支氣管肺泡細胞肺癌、骨癌、胰臟癌、皮膚癌、頭癌或頸癌、皮膚或眼內黑素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛區癌、胃癌(stomach cancer)、胃癌(gastric cancer)、結腸癌、乳癌、子宮癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、霍奇金氏病(Hodgkin's Disease)、食道癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、膀胱癌、腎癌或輸尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、間皮瘤、肝細胞癌、膽道癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、脊軸腫瘤、腦幹神經膠質瘤、多形性膠質母細胞瘤、星形細胞瘤、神經鞘瘤、室管膜瘤、神經管胚細胞瘤、腦膜瘤、鱗狀細胞癌、垂體腺瘤及尤文氏肉瘤(Ewings sarcoma)，包括任何上述癌症之難治癒形式，或上述癌症中之一或多者的

組合。

【0136】 如本文所用之術語「**化學治療劑**」係指適用於治療癌症之化合物。在一個態樣中，化學治療劑為抗代謝物。在一個態樣中，抗代謝物選自由以下組成之群：胺基喋呤、甲胺喋呤、培美曲塞(Pemetrexed)、雷替曲塞(Raltitrexed)、克拉屈濱(Cladribine)、氯法拉濱(Clofarabine)、氟達拉賓(Fludarabine)、巰基嘌呤、噴司他丁(Pentostatin)、硫鳥嘌呤、卡培他濱(Capecitabine)、阿糖胞苷、氟尿嘧啶、氟尿苷(Floxuridine)及吉西他濱(Gemcitabine)。在一個特定態樣中，抗代謝物為卡培他濱(capecitabine)或吉西他濱。在另一態樣中，抗代謝物為氟尿嘧啶。在一個態樣中，化學治療劑為影響微管形成之藥劑。在一個態樣中，影響微管形成之藥劑係選自由以下組成之群：太平洋紫杉醇(paclitaxel)、多烯紫杉醇(docetaxel)、長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、長春地辛(vindesine)、長春瑞辛(vinorelbin)、紫杉德(taxotere)、依託泊苷(etoposide)及替尼泊苷(teniposide)。在另一態樣中，化學治療劑為烷基化劑，諸如環磷醯胺。在一個態樣中，化學治療劑為細胞毒性抗生素，諸如拓樸異構酶II抑制劑。在一個態樣中，拓樸異構酶II抑制劑為小紅莓(doxorubicin)。

【0137】

本發明之雙特異性抗體

本發明提供包含新抗FAP抗體(殖株212)之新穎雙特異性抗原結合分子。包含此新抗FAP抗體之雙特異性抗原結合分子具有尤其有利的特性，諸如可生產性、穩定性、結合親和力、生物活性、靶向效率、內化減少、優良藥物動力學(PK)特性、毒性降低、可給予患者之延長的劑量範圍且從

而具有可能增強的功效。

【0138】

例示性雙特異性抗原結合分子

在一個態樣中，本發明提供雙特異性抗原結合分子，其特徵在於靶向促效結合於CD40。特定言之，雙特異性抗原結合分子為針對FAP靶向之CD40促效劑。在另一特定態樣中，本發明之雙特異性抗原結合分子包含由能夠穩定締合之第一及第二次單元構成的Fc區，其包含降低效應功能之突變。使用包含減弱或消除效應功能之突變的Fc區將藉由經由Fc受體交聯而阻止非特異性促效作用且將防止$CD40^+$細胞之ADCC。

【0139】 如本文所描述之雙特異性抗原結合分子具有優於能夠特異性結合於CD40之習知抗體的優勢，在於其選擇性誘導目標細胞(通常為癌細胞或腫瘤基質)處之免疫反應。

【0140】 因此，雙特異性抗原結合分子之特徵為FAP靶向之促效結合至CD40。在FAP表現細胞存在下，雙特異性抗原結合分子能夠活化抗原呈現細胞(APC)，從而活化人類B細胞(實例5.1.2)、人類道迪細胞(實例5.1.1)及人類單核細胞衍生之樹突狀細胞(moDC)。

【0141】 在一個態樣中，提供一種雙特異性抗原結合分子，其包含

(a)至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域，及

(b)至少一個能夠特異性結合於纖維母細胞活化蛋白(FAP)之抗原結合域，該抗原結合域包含重鏈可變區(V_HFAP)，其包含

(i)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含選自由SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:11及SEQ ID NO:12組成之群之胺基酸序列的CDR-H2及(iii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變

區(V_LFAP)，其包含(iv)包含選自由SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14組成之群之胺基酸序列的CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列之CDR-L2及(vi)包含SEQ ID NO:8之胺基酸序列之CDR-L3。

【0142】 在特定態樣中，提供一種雙特異性抗原結合分子，其包含a)至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域及(b)至少一個能夠特異性結合於纖維母細胞活化蛋白(FAP)之抗原結合域，該抗原結合域包含：重鏈可變區(V_HFAP)，其包含(i)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含選自由SEQ ID NO:4組成之群之胺基酸序列的CDR-H2及(iii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含(iv)包含選自由SEQ ID NO:6組成之群之胺基酸序列的CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列的CDR-L2及(vi)包含SEQ ID NO:8之胺基酸序列之CDR-L3。

【0143】 在一個態樣中，提供一種雙特異性抗原結合分子，其中能夠特異性結合於FAP之抗原結合域包含：重鏈可變區(V_HFAP)，其包含與SEQ ID NO:9之胺基酸序列至少約90%一致之胺基酸序列；及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含與SEQ ID NO:10之胺基酸序列至少約90%一致之胺基酸序列。

【0144】 在另一態樣中，提供一種雙特異性抗原結合分子，其中能夠特異性結合於FAP之抗原結合域包含

重鏈可變區(V_HFAP)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19及SEQ ID NO:20，及

輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：

SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25及SEQ ID NO:26。

【0145】在一個態樣中，雙特異性抗原結合分子包含

(a)包含SEQ ID NO:15之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)，

(b)包含SEQ ID NO:16之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)，

(c)包含SEQ ID NO:16之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)，或

(d)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:25之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)。

【0146】在一特定態樣中，雙特異性抗原結合分子包含：包含SEQ ID NO:15之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)。

【0147】在另一態樣中，提供一種雙特異性抗原結合分子，其中能夠特異性結合於CD40之抗原結合域包含：重鏈可變區(V_HCD40)，其包含(i)包含SEQ ID NO:27之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:28之胺基酸序列的CDR-H2及(iii)包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LCD40)，其包含(iv)包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列之CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO:31之胺基酸序列之CDR-L2及(vi)包含SEQ ID NO:32之胺基酸序列之CDR-L3。

【0148】在另一態樣中，提供一種雙特異性抗原結合分子，其中能夠特異性結合於CD40之抗原結合域包含

(i)重鏈可變區(V_HCD40)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39及SEQ ID NO:40，及

(ii)輕鏈可變區(V_LCD40)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43及SEQ ID NO:44。

【0149】在一個態樣中，提供一種雙特異性抗原結合分子，其中能夠特異性結合於CD40之抗原結合域包含

(a)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的VL，或

(b)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的VL，或

(c)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:43之胺基酸序列的VL，或

(d)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的VL，或

(e)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的VL，或

(f)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的VL，或

(g)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:43之胺基酸序列的VL，或

(h)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:44之

胺基酸序列的VL，或

(i)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的VL，或

(j)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的VL，或

(k)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:43之胺基酸序列的VL，或

(l)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的VL，或

(m)包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的VL，或

(n)包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的VL，或

(o)包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:43之胺基酸序列的VL，或

(p)包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的VL。

【0150】 在一特定態樣中，雙特異性抗原結合分子包含能夠特異性結合於CD40之抗原結合域，該抗原結合域包含VH，其包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列；及VL，其包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列。

【0151】 在另一態樣中，提供雙特異性抗原結合分子，其中能夠特異性結合於CD40之抗原結合域包含

(i)重鏈可變區(V_HCD40)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序

列：SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49及SEQ ID NO:50，及

(ii)輕鏈可變區(V_LCD40)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53及SEQ ID NO:54。

【0152】在一個態樣中，提供一種雙特異性抗原結合分子，其中能夠特異性結合於CD40之抗原結合域包含

(a)包含SEQ ID NO:45之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的VL，或

(b)包含SEQ ID NO:46之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的VL，或

(c)包含SEQ ID NO:47之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的VL，或

(d)包含SEQ ID NO:48之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的VL，或

(e)包含SEQ ID NO:45之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的VL，或

(f)包含SEQ ID NO:46之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的VL，或

(g)包含SEQ ID NO:47之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的VL，或

(h)包含SEQ ID NO:48之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的VL，或

(i)包含SEQ ID NO:49之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:53之胺基酸序列的VL，或

(j)包含SEQ ID NO:50之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:53之胺基酸序列的VL，或

(k)包含SEQ ID NO:49之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:54之胺基酸序列的VL，或

(l)包含SEQ ID NO:50之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:54之胺基酸序列的VL。

【0153】 在一特定態樣中，提供一種雙特異性抗原結合分子，其包含：(i)至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域，該抗原結合域包含：包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HCD40)及包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LCD40)；及(ii)至少一個能夠特異性結合於FAP之抗原結合域，該抗原結合域包含：包含SEQ ID NO:15之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)。

【0154】

結合於CD40及FAP之雙特異性抗原結合分子

在另一態樣中，提供雙特異性抗原結合分子，其包含

(i)至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域，該抗原結合域包含重鏈可變區(V_HCD40)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39及SEQ ID NO:40；及輕鏈可變區(V_LCD40)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43及SEQ ID NO:44，及

(ii)至少一個能夠特異性結合於FAP之抗原結合域，該抗原結合域包含重鏈可變區(V_HFAP)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19及SEQ ID NO:20；及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25及SEQ ID NO:26。

【0155】 在另一態樣中，提供雙特異性抗原結合分子，其包含

(i)至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域，該抗原結合域包含重鏈可變區(V_HCD40)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49及SEQ ID NO:50；及輕鏈可變區(V_LCD40)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53及SEQ ID NO:54，及

(ii)至少一個能夠特異性結合於FAP之抗原結合域，該抗原結合域包含重鏈可變區(V_HFAP)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19及SEQ ID NO:20；及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25及SEQ ID NO:26。

【0156】 在一特定態樣中，提供雙特異性抗原結合分子，其包含

(i)至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域，其包含：包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HCD40)及包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LCD40)，及

(ii)至少一個能夠特異性結合於FAP之抗原結合域，該抗原結合域包含重鏈可變區(V_HFAP)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19及SEQ ID NO:20；及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25及SEQ ID NO:26。

【0157】 在另一特定態樣中，提供雙特異性抗原結合分子，其包含

(i)至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域，其包含：包含SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:48之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HCD40)及包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LCD40)，及

(ii)至少一個能夠特異性結合於FAP之抗原結合域，該抗原結合域包含重鏈可變區(V_HFAP)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19及SEQ ID NO:20；及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25及SEQ ID NO:26。

【0158】 在另一態樣中，提供雙特異性抗原結合分子，其中

(i)能夠特異性結合於CD40之抗原結合域包含重鏈可變區(V_HCD40)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39及SEQ ID NO:40；及輕鏈可變區(V_LCD40)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43及SEQ ID NO:44，及

(ii)能夠特異性結合於FAP之抗原結合域包含重鏈可變區VH，其包含

SEQ ID NO:15之胺基酸序列；及輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列。

【0159】 此外，提供雙特異性抗原結合分子，其中

(i)能夠特異性結合於CD40之抗原結合域包含重鏈可變區(V_HCD40)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49及SEQ ID NO:50；及輕鏈可變區(V_LCD40)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53及SEQ ID NO:54，及

(ii)能夠特異性結合於FAP之抗原結合域包含重鏈可變區VH，其包含SEQ ID NO:15之胺基酸序列；及輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列。

【0160】 在一特定態樣中，提供一種雙特異性抗原結合分子，其包含：(i)至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域，該抗原結合域包含：包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HCD40)及包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LCD40)；及(ii)至少一個能夠特異性結合於FAP之抗原結合域，該抗原結合域包含：包含SEQ ID NO:15之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)。

【0161】

雙特異性單價抗原結合分子(1+1型式)

在一個態樣中，本發明係關於雙特異性抗原結合分子，其包含

(a)一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域，

(b)一個能夠特異性結合於纖維母細胞活化蛋白(FAP)之抗原結合域，該抗原結合域包含重鏈可變區(V_HFAP)，其包含

(i)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含選自由SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:11及SEQ ID NO:12組成之群之胺基酸序列的CDR-H2及(iii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含(iv)包含選自由SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14組成之群之胺基酸序列的CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列之CDR-L2及(vi)包含SEQ ID NO:8之胺基酸序列之CDR-L3；及(c)由能夠穩定締合之第一及第二次單元構成之Fc域。

【0162】 在一個特定態樣中，提供雙特異性抗原結合分子，其中該分子包含：(a)能夠特異性結合於CD40之第一Fab片段；(b)能夠特異性結合於FAP之第二Fab片段，該第二Fab片段包含重鏈可變區(V_HFAP)，其包含(i)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含選自由SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:11及SEQ ID NO:12組成之群之胺基酸序列的CDR-H2及(iii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含(iv)包含選自由SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14組成之群之胺基酸序列的CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列之CDR-L2及(vi)包含SEQ ID NO:8之胺基酸序列之CDR-L3；及(c)由能夠穩定締合之第一及第二次單元構成之Fc域。

【0163】 在一個特定態樣中，本發明提供雙特異性抗原結合分子，其包含(a)包含SEQ ID NO:63之胺基酸序列的第一重鏈、包含SEQ ID NO:98之胺基酸序列的第二重鏈、包含SEQ ID NO:61之胺基酸序列的第一輕鏈、包含SEQ ID NO:62之胺基酸序列的第二輕鏈。

【0164】

二價結合於CD40且單價結合於目標細胞抗原之雙特異性抗原結合分子(2+1型式)

在另一態樣中，本發明提供雙特異性抗原結合分子，其包含

(a)兩個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域，

(b)一個能夠特異性結合於FAP之抗原結合域，該抗原結合域包含重鏈可變區(V_HFAP)，其包含(i)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含選自由SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:11及SEQ ID NO:12組成之群之胺基酸序列的CDR-H2及(iii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含(iv)包含選自由SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14組成之群之胺基酸序列的CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列之CDR-L2及(vi)包含SEQ ID NO:8之胺基酸序列之CDR-L3，及

(c)由能夠穩定締合之第一及第二次單元構成的Fc域。

【0165】 因此，提供雙特異性抗原結合分子，其中該雙特異性抗原結合分子二價結合於CD40且單價結合於FAP。

【0166】 在一個態樣中，雙特異性抗原結合分子包含

(a)包含兩個能夠特異性結合於CD40之Fab片段及Fc域的抗體之兩個輕鏈及兩個重鏈，及

(b)能夠特異性結合於目標細胞抗原之VH及VL域，其中該VH域及該VL域各自經由肽連接子連接至該兩個重鏈之一個C端。

【0167】 在另一態樣中，提供雙特異性抗原結合分子，其包含

(a)兩個重鏈，各重鏈包含能夠特異性結合於CD40之Fab片段的VH及

CH1域及Fc區次單元，

(b)兩個輕鏈，各輕鏈包含能夠特異性結合於CD40之Fab片段的VL及CL域，及

(c)能夠特異性結合於FAP的交叉fab片段，其包含VL-CH1鏈及VH-CL鏈，其中該VH-CL鏈連接至(a)之兩個重鏈中之一者的C端。

【0168】 在一個態樣中，VH-CL (VH-Cκ)鏈連接至Fc杵重鏈之C端。

【0169】 在另一態樣中，提供雙特異性抗原結合分子，其包含

(a)兩個重鏈，各重鏈包含能夠特異性結合於CD40之Fab片段的VH及CH1域及Fc區次單元，

(b)兩個輕鏈，各輕鏈包含能夠特異性結合於CD40之Fab片段的VL及CL域，及

(c)能夠特異性結合於FAP的交叉fab片段，其包含VL-CH1鏈及VH-CL鏈，其中該VL-CH1鏈連接至(a)之兩個重鏈中之一者的C端。

【0170】 在一個態樣中，VL-CH1鏈連接至Fc杵重鏈之C端。

【0171】 在一個特定態樣中，本發明提供雙特異性抗原結合分子，其包含

(a)各自包含SEQ ID NO:62之胺基酸序列之兩個輕鏈，包含SEQ ID NO:61之胺基酸序列之一個輕鏈、包含SEQ ID NO:63之胺基酸序列之第一重鏈及包含SEQ ID NO:64之胺基酸序列之第二重鏈，或

(b)各自包含SEQ ID NO:66之胺基酸序列之兩個輕鏈、包含SEQ ID NO:65之胺基酸序列之一個輕鏈、包含SEQ ID NO:67之胺基酸序列之第一重鏈及包含SEQ ID NO:68之胺基酸序列之第二重鏈。

【0172】 在一個特定態樣中，本發明提供雙特異性抗原結合分子，其包含

(a)各自包含SEQ ID NO:62之胺基酸序列之兩個輕鏈、包含SEQ ID NO:61之胺基酸序列之一個輕鏈、包含SEQ ID NO:63之胺基酸序列之第一重鏈及包含SEQ ID NO:64之胺基酸序列之第二重鏈。

【0173】

呈頭對尾型式(2+1)之雙特異性抗原結合分子

在另一態樣中，提供雙特異性抗原結合分子，其包含

(a)包含能夠特異性結合於CD40之Fab片段之VH及CH1域及Fc區次單元的重鏈，

(b)包含能夠特異性結合於CD40之Fab片段之VH及CH1域、能夠特異性結合於FAP之Fab片段之VL及CH1域以及Fc區次單元的重鏈，

(c)兩個輕鏈，各輕鏈包含能夠特異性結合於CD40之Fab片段的VL及CL域，及

(d)包含能夠特異性結合於FAP之Fab片段的VH及CL域的輕鏈。

【0174】

二價結合於CD40且二價結合於目標細胞抗原之雙特異性抗原結合分子(2+2型式)

在另一態樣中，本發明提供雙特異性抗原結合分子，其包含

(a)兩個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域，

(b)兩個能夠特異性結合於FAP之抗原結合域，其包含：(i)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含選自由SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:11及SEQ ID NO:12組成之群之胺基酸序列的CDR-H2及(iii)包含

SEQ ID NO:5之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含(iv)包含選自由SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14組成之群之胺基酸序列的CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列之CDR-L2及(vi)包含SEQ ID NO:8之胺基酸序列之CDR-L3，及

(c)由能夠穩定締合之第一及第二次單元構成的Fc域。

【0175】 因此，提供雙特異性抗原結合分子，其中該雙特異性抗原結合分子二價結合於CD40且二價結合於FAP。

【0176】 在一個態樣中，提供雙特異性抗原結合分子，其中該雙特異性抗原結合分子包含

(a)兩個重鏈，各重鏈包含能夠特異性結合於CD40之Fab片段的VH及CH1域及Fc區次單元，

(b)兩個輕鏈，各輕鏈包含能夠特異性結合於CD40之Fab片段的VL及CL域，及

(c)兩個能夠特異性結合於FAP之Fab片段，其中該等Fab片段中之一者連接至(a)之兩個重鏈中之一者的C端，且該等Fab片段中之另一者連接至(a)之兩個重鏈中之另一者的C端。

【0177】

四價結合於CD40且單價結合於目標細胞抗原之雙特異性抗原結合分子(4+1型式)

在另一態樣中，本發明提供雙特異性抗原結合分子，其包含

(a)四個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域，

(b)一個能夠特異性結合於FAP之抗原結合域，其包含：(i)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含選自由SEQ ID NO:4、SEQ

ID NO:11及SEQ ID NO:12組成之群之胺基酸序列的CDR-H2及(iii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含(iv)包含選自由SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14組成之群之胺基酸序列的CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列之CDR-L2及(vi)包含SEQ ID NO:8之胺基酸序列之CDR-L3，及

(c)由能夠穩定締合之第一及第二次單元構成的Fc域。

【0178】 因此，提供雙特異性抗原結合分子，其中該雙特異性抗原結合分子四價結合於CD40且單價結合於FAP。

【0179】 在一個態樣中，提供雙特異性抗原結合分子，其中能夠特異性結合於CD40之四個抗原結合域為Fab片段且其中各兩個視情況經由肽連接子在重鏈彼此融合。在一特定態樣中，肽連接子包含SEQ ID NO:83之胺基酸序列。更特定言之，抗原結合分子包含兩個重鏈，該等重鏈各自包含VHCH1-肽連接子-VHCH1片段。在一特定態樣中，肽連接子具有SEQ ID NO:83之胺基酸序列。

【0180】 在一特定態樣中，雙特異性抗原結合分子包含

(a)四個輕鏈，各輕鏈包含能夠特異性結合於CD40之Fab片段的VL及CL域，

(b)兩個重鏈，其中各重鏈包含：能夠特異性結合於CD40之Fab片段之VH及CH1域，其融合至能夠特異性結合於CD40之第二Fab片段之VH及CH1域；及Fc區次單元，及

(c)能夠特異性結合於FAP之交叉fab片段，其中VH域經由肽連接子連接至重鏈中之一者的C端。

【0181】 在另一態樣中，雙特異性抗原結合分子包含

(a)四個輕鏈，各輕鏈包含能夠特異性結合於CD40之Fab片段的VL及CL域，

(b)兩個重鏈，其中各重鏈包含：能夠特異性結合於CD40之Fab片段之VH及CH1域，其融合至能夠特異性結合於CD40之第二Fab片段之VH及CH1域；及Fc區次單元，及

(c)能夠特異性結合於FAP之交叉fab片段，其中VL域經由肽連接子連接至重鏈中之一者的C端。

【0182】 在一特定態樣中，肽連接子包含選自SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:87及SEQ ID NO:88之胺基酸序列。更特定言之，肽連接子包含SEQ ID NO:83。

【0183】 在一特定態樣中，本發明提供雙特異性抗原結合分子，其包含

(a)各自包含SEQ ID NO:62之胺基酸序列之四個輕鏈、包含SEQ ID NO:61之胺基酸序列之一個輕鏈、包含SEQ ID NO:69之胺基酸序列之第一重鏈及包含SEQ ID NO:70之胺基酸序列之第二重鏈。

【0184】

四價結合於CD40且二價結合於目標細胞抗原之雙特異性抗原結合分子(4+2型式)

在另一態樣中，本發明提供雙特異性抗原結合分子，其包含

(a)四個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域，

(b)兩個能夠特異性結合於FAP之抗原結合域，其包含

(i)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含選自由SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:11及SEQ ID NO:12組成之群之胺基酸序列的

CDR-H2及(iii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含(iv)包含選自由SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14組成之群之胺基酸序列的CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列之CDR-L2及(vi)包含SEQ ID NO:8之胺基酸序列之CDR-L3，及

(c)由能夠穩定締合之第一及第二次單元構成的Fc域。

【0185】 因此，提供雙特異性抗原結合分子，其中該雙特異性抗原結合分子四價結合於CD40且二價結合於FAP。

【0186】 在一個態樣中，提供雙特異性抗原結合分子，其中四個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域為Fab片段且其中各兩個視情況經由肽連接子彼此融合。在一特定態樣中，肽連接子包含SEQ ID NO:83之胺基酸序列。更特定言之，抗原結合分子包含兩個重鏈，該等重鏈各自包含VHCH1-肽連接子-VHCH1片段。在一特定態樣中，肽連接子具有SEQ ID NO:83之胺基酸序列。

【0187】 在另一態樣中，提供雙特異性抗原結合分子，其中能夠特異性結合於目標細胞抗原之抗原結合域為Fab片段且其中第一Fab片段經由肽連接子連接至Fc域之第一次單元之C端且第二Fab片段經由肽連接子連接至Fc域之第二次單元之C端。在一個態樣中，兩個能夠特異性結合於目標細胞抗原之Fab片段為各自包含VL-CH1鏈及VH-CL鏈之互換型Fab片段，且其中該VL-CH1鏈連接至兩個重鏈中之一者之C端。

【0188】

降低Fc受體結合及/或效應子功能之Fc域修飾

本發明之雙特異性抗原結合分子進一步包含由能夠穩定締合之第一及第二次單元構成之Fc域。

【0189】 在某些態樣中，可將一或多個胺基酸修飾引入至本文所提供之抗體的Fc區中，從而產生Fc區變異體。Fc區變異體可包含人類Fc區序列(例如，人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc區)，其包含在一或多個胺基酸位置處之胺基酸修飾(例如，取代)。

【0190】 Fc域賦予本發明之雙特異性抗體有利的藥物動力學特性，包括長血清半衰期，其促進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受體之細胞而非靶向較佳的攜帶抗原之細胞。因此，在特定實施例中，本發明之雙特異性抗體與原生IgG Fc域(特定言之，IgG1 Fc域或IgG4 Fc域)相比展現降低之對Fc受體的結合親和力及/或降低之效應功能。更特定言之，Fc域係IgG1 Fc域。

【0191】 在一個此類態樣中，Fc域(或包含該Fc域的本發明之雙特異性抗原結合分子)與原生IgG1 Fc域(或包含原生IgG1 Fc域的本發明之雙特異性抗原結合分子)相比展現低於50%，較佳低於20%，更佳低於10%且最佳低於5%的與Fc受體之結合親和力，及/或與原生IgG1 Fc域(或包含原生IgG1 Fc域的本發明之雙特異性抗原結合分子)相比低於50%、較佳低於20%、更佳低於10%且最佳低於5%效應功能。在一個態樣中，Fc域(或包含該Fc域之本發明之雙特異性抗原結合分子)不會實質上結合於Fc受體及/或誘發效應功能。在一特定態樣中，Fc受體為Fcγ受體。在一個態樣中，Fc受體係人類Fc受體。在一個態樣中，Fc受體為活化Fc受體。在特定態樣中，Fc受體為活化人類Fcγ受體，更具體言之，人類FcγRIIIa、FcγRI或FcγRIIa，最具體言之，人類FcγRIIIa。在一個態樣中，Fc受體為抑制Fc受體。在一特定態樣中，Fc受體為抑制人類Fcγ受體，更具體言之人類

FcγRIIB。在一個態樣中，效應功能係CDC、ADCC、ADCP及細胞介素分泌中之一或多者。在特定態樣中，效應功能為ADCC。在一個態樣中，Fc域對新生兒Fc受體(FcRn)展現的結合親和力與原生IgG1 Fc域相比實質上類似。當Fc域(或包含該Fc域之本發明之雙特異性抗原結合分子)展現比原生IgG1 Fc域(或包含原生IgG1 Fc域之本發明之雙特異性抗原結合分子)大於約70%、特定言之大於約80%、更特定言之大於約90%的與FcRn的結合親和力時，實現實質上類似的與FcRn之結合。

【0192】 在特定態樣中，相較於未經工程改造之Fc域，Fc域經工程改造，從而對Fc受體之結合親和力減小及/或效應功能降低。在特定態樣中，本發明之雙特異性抗原結合分子的Fc域包含一或多個降低Fc域與Fc受體之結合親和力及/或效應功能的胺基酸突變。典型地，Fc域之兩個次單元中之每一者中存在相同的一或多個胺基酸突變。在一個態樣中，胺基酸突變使Fc域對Fc受體的結合親和力減小。在另一態樣中，胺基酸突變使Fc域對Fc受體之結合親和力減小至少2倍、至少5倍或至少10倍。在一個態樣中，包含經工程改造之Fc域之本發明之雙特異性抗原結合分子與包含未經工程改造之Fc域的本發明的雙特異性抗體相比展現小於20%，尤其小於10%，更尤其小於5%的對Fc受體的結合親和力。在一特定態樣中，Fc受體為Fcγ受體。在其他態樣中，Fc受體為人類Fc受體。在一個態樣中，Fc受體為抑制Fc受體。在一特定態樣中，Fc受體為抑制人類Fcγ受體，更具體言之人類FcγRIIB。在一些態樣中，Fc受體係活化Fc受體。在特定態樣中，Fc受體為活化人類Fcγ受體，更具體言之，人類FcγRIIIa、FcγRI或FcγRIIa，最具體言之，人類FcγRIIIa。較佳地，與此等受體中之每一者的結合減少。在一些態樣中，對補體組分之結合親和力，具體言

之，對C1q之特異性結合親和力，亦減小。在一個態樣中，對新生兒Fc受體(FcRn)的結合親和力未減小。當Fc域(或包含該Fc域的本發明之雙特異性抗原結合分子)對FcRn展現的結合親和力大於Fc域之未經工程改造形式(或包含該Fc域之未經工程改造形式的本發明之雙特異性抗原結合分子)之結合親和力的約70%時，對FcRn達成實質上類似的結合，亦即保持Fc域對該受體的結合親和力。Fc域或包含該Fc域的本發明之雙特異性抗原結合分子可以展現大於約80%且甚至大於約90%的該親和力。在某些實施例中，本發明之雙特異性抗原結合分子的Fc域經工程改造以具有與非工程改造之Fc域相比降低之效應功能。降低之效應功能可包括(但不限於)以下中之一或多者：降低之補體依賴性細胞毒性(CDC)、降低之抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)、降低之抗體依賴性細胞吞噬(ADCP)、降低之細胞介素分泌、降低之免疫複合物介導之抗原呈現細胞攝入抗原、降低之與NK細胞之結合、降低之與巨噬細胞之結合、降低之與單核球之結合、降低之與多形核細胞之結合、降低之誘導細胞凋亡之直接信號傳導、降低之樹突狀細胞成熟或降低之T細胞激活。

【0193】 效應功能減小之抗體包括具有Fc區殘基238、265、269、270、297、327及329中之一或多者之取代的彼等抗體(美國專利第6,737,056號)。此類Fc突變體包括在胺基酸位置265、269、270、297及327中之兩者或更多者處具有取代的Fc突變體，包括殘基265及297取代為丙胺酸的所謂「DANA」 Fc突變體(美國專利第7,332,581號)。描述具有改良或減弱之FcR結合的某些抗體變異體。(例如美國專利第6,737,056號；WO2004/056312，及Shields, R.L.等人, J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604)。

【0194】在本發明之一個態樣中，Fc域包含在位置E233、L234、L235、N297、P331及P329處之胺基酸取代。在一些態樣中，Fc域包含胺基酸取代L234A及L235A(「LALA」)。在一個此類實施例中，Fc域為IgG1 Fc域，特定言之，人類IgG1 Fc域。在一個態樣中，Fc域包含在位置P329處之胺基酸取代。在更特定態樣中，胺基酸取代係P329A或P329G，特定言之，P329G。在一個實施例中，Fc域包含在位置P329處之胺基酸取代及選自由以下組成之群的另一胺基酸取代：E233P、L234A、L235A、L235E、N297A、N297D或P331S。在更特定實施例中，Fc域包含胺基酸突變L234A、L235A及P329G (「P329G LALA」)。胺基酸取代之「P329G LALA」組合幾乎完全破壞人類IgG1 Fc域之Fcγ受體結合，如PCT專利申請案第WO 2012/130831 A1號中所述。該文獻亦描述製備此類突變Fc域之方法及測定其特性(諸如Fc受體結合或效應功能)的方法。此類抗體為具有突變L234A及L235A或具有突變L234A、L235A及P329G之IgG1 (根據Kabat等人之EU索引編號, 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)。

【0195】在一個態樣中，Fc域係IgG4 Fc域。在一更特定實施例中，Fc域係包含位置S228 (Kabat編號)處之胺基酸取代(特定言之，胺基酸取代S228P)的IgG4 Fc域。在一更特定實施例中，Fc域為IgG4 Fc域，其包含胺基酸取代L235E及S228P及P329G。此胺基酸取代減少活體內IgG4抗體之Fab臂交換(參見Stubenrauch等人, Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010))。

【0196】半衰期延長且與負責將母體IgG轉移至胎兒之新生兒Fc受

體(FcRn)(Guyer, R.L.等人, J. Immunol. 117 (1976) 587-593；及Kim, J.K.等人, J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434)之結合改良之抗體描述於US 2005/0014934中。彼等抗體中包含具有一或多個取代之Fc區，該等取代改良Fc區與FcRn的結合。此類Fc變異體包括以下Fc區殘基中之一或多者發生取代之彼等變異體：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434，例如Fc區殘基434之取代(美國專利第7,371,826號)。Fc區變異體之其他實例亦參看Duncan, A.R.及Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740；US5,648,260；US5,624,821；及WO94/29351。

【0197】 可以例如藉由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)容易測定與Fc受體的結合，且可諸如藉由重組表現來獲得Fc受體。適合的此類結合分析法描述於本文中。或者，Fc域或包含Fc域之細胞活化雙特異性抗原結合分子對Fc受體的結合親和力可使用已知表現特定Fc受體的細胞株(諸如表現FcγIIIa受體的人類NK細胞)評價。可藉由此項技術中已知之方法量測Fc域、或包含Fc域之本發明之雙特異性抗原結合分子的效應功能。適用於量測ADCC之分析描述於本文中。用於評定所關注分子之ADCC活性的活體外分析之其他實例描述於美國專利第5,500,362號；Hellstrom等人 Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986)；及Hellstrom等人, Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985)；美國專利第5,821,337號；Bruggemann等人, J Exp Med 166, 1351-1361 (1987)中。或者，可採用非放射性分析方法(參見例如用於流式細胞測量術之ACTI™非放射性細胞毒性分析(CellTechnology, Inc. Mountain View, CA)；及CytoTox 96®非放射性細

胞毒性分析(Promega, Madison, WI))。適用於此類分析之效應細胞包括周邊血液單核細胞(PBMC)及天然殺手(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所關注分子之ADCC活性。

【0198】 以下部分描述本發明之雙特異性抗原結合分子的較佳態樣，其包含降低Fc受體結合及/或效應功能之Fc域修飾。在一個態樣中，本發明係關於雙特異性抗原結合分子，其包含：(a)至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域，(b)至少一個能夠特異性結合於FAP之抗原結合域，及(c)由能夠穩定締合之第一及第二次單元構成的Fc域，其中該Fc域包含一或多個降低抗體與Fc受體，特定言之對Fcγ受體之結合親和力的一或多個胺基酸取代。在另一態樣中，本發明係關於雙特異性抗原結合分子，其包含(a)至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域，(b)至少一個能夠特異性結合於目標細胞抗原之抗原結合域，及(c)由能夠穩定締合之第一及第二次單元構成的Fc域，其中該Fc域包含一或多個降低效應功能之胺基酸取代。在特定態樣中，Fc域係具有胺基酸突變L234A、L235A及P329G (根據Kabat EU索引編號)的人類IgG1子類別。

【0199】

促進雜二聚化之Fc域修飾

本發明之雙特異性抗原結合分子包含融合至Fc域之兩個次單元中之一個或另一個的不同抗原結合位點，因此Fc域之兩個次單元可包含於兩個不一致多肽鏈中。此等多肽之重組共表現及後續二聚化產生兩種多肽之若干種可能的組合。為改良重組生成中本發明之雙特異性抗原結合分子的產量及純度，因此將適宜在本發明之雙特異性抗原結合分子的Fc域中引入促

進所需多肽結合之修飾。

【0200】 因此，在特定態樣中，本發明係關於雙特異性抗原結合分子，其包含(a)至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域，(b)至少一個能夠特異性結合於FAP之抗原結合域，及(c)由能夠穩定締合之第一及第二次單元構成的Fc域，其中Fc域包含促進Fc域之第一與第二次單元締合的修飾。人類IgG Fc域中之兩個次單元之間的最廣泛蛋白質-蛋白質相互作用的位點位於Fc域之CH3域中。因此，在一個態樣中，該修飾存在於Fc域之CH3域中。

【0201】 在特定態樣中，該修飾為所謂的「杵臼」修飾，其包含Fc域之兩個次單元中之一者中的「杵」修飾及Fc域之兩個次單元之另一者中的「臼」修飾。因此，本發明係關於雙特異性抗原結合分子，其包含(a)至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域，(b)至少一個能夠特異性結合於目標細胞抗原之抗原結合域，及(c)由能夠穩定締合的第一及第二次單元構成的Fc域，其中根據杵臼方法，Fc域之第一次單元包含杵，且Fc域之第二次單元包含臼。在一特定態樣中，Fc域之第一次單元包含胺基酸取代S354C及T366W (EU編號)，且Fc域之第二次單元包含胺基酸取代Y349C、T366S及Y407V (根據Kabat EU索引編號)。

【0202】 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，方法涉及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。藉由用較大側鏈(例如酪胺酸或色胺酸)置換第一多肽界面中之小胺基酸側鏈來構築隆凸。

大小與隆凸相同或類似之補償性凹穴係在第二多肽之界面中藉由用較小胺基酸側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)置換大胺基酸側鏈來形成。

【0203】 因此，在一個態樣中，在本發明之雙特異性抗原結合分子的Fc域的第一次單元的CH3域中，胺基酸殘基經具有較大側鏈體積之胺基酸殘基置換，由此在第一次單元之CH3域內產生隆凸，其可位於第二次單元之CH3域內的凹穴中，且在Fc域之第二次單元的CH3域中，胺基酸殘基經具有較小側鏈體積之胺基酸殘基置換，由此在第二次單元之CH3域內產生凹穴，第一次單元之CH3域內的隆凸可位於該凹穴中。隆凸及凹穴可藉由改變編碼多肽之核酸製造，例如藉由位點特異性突變誘發或藉由肽合成製造。在特定態樣中，在Fc域之第一次單元之CH3域中，位置366處之蘇胺酸殘基經色胺酸殘基(T366W)置換，且在Fc域之第二次單元之CH3域中，位置407處之酪胺酸殘基經纈胺酸殘基(Y407V)置換。在一個態樣中，在Fc域之第二次單元中，位置366處之蘇胺酸殘基另外經絲胺酸殘基(T366S)置換且位置368處之白胺酸殘基經丙胺酸殘基(L368A)置換。

【0204】 在又一態樣中，在Fc域之第一次單元中，位置354處之絲胺酸殘基另外經半胱胺酸殘基(S354C)置換，且在Fc域之第二次單元中，位置349處之酪胺酸殘基另外經半胱胺酸殘基(Y349C)置換。引入此等兩個半胱胺酸殘基使得Fc域之兩個次單元之間形成二硫橋鍵，從而進一步穩定二聚體(Carter (2001), JImmunolMethods248, 7-15)。在一特定態樣中，Fc域之第一次單元包含胺基酸取代S354C及T366W (EU編號)，且Fc域之第二次單元包含胺基酸取代Y349C、T366S及Y407V (根據Kabat EU索引編號)。

【0205】 在替代性態樣中，促進Fc域之第一與第二次單元之締合的

修飾包含介導靜電轉向作用之修飾，例如PCT公開案WO 2009/089004中所描述。一般而言，此方法涉及用帶電胺基酸殘基置換兩個Fc域次單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。

【0206】 如本文所報導之雙特異性抗體之重鏈的C端可為以胺基酸殘基PGK結束之完整C端。重鏈之C端可為縮短C端，其中已移除一或兩個C端胺基酸殘基。在一個較佳態樣中，重鏈之C端為以PG結束之縮短C端。在如本文所報導之所有態樣之一個態樣中，如本文所規定之包含包括C端CH3域之重鏈的雙特異性抗體包含C端甘胺酸-離胺酸二肽(G446及K447，根據Kabat EU索引編號)。在如本文所報導之全部態樣中之一個實施例中，如本文所規定之包含包括C端CH3域之重鏈的雙特異性抗體包含C端甘胺酸殘基(G446，根據Kabat EU索引編號)。

【0207】

Fab域之修飾

在一個態樣中，本發明係關於一種雙特異性抗原結合分子，其包含(a)能夠特異性結合於CD40之第一Fab片段，(b)能夠特異性結合於FAP之第二Fab片段，及(c)由能夠穩定締合之第一及第二次單元構成的Fc域，其中在Fab片段之一中，可變域VH及VL或恆定域CH1及CL經交換。根據交叉單抗(Crossmab)技術製備雙特異性抗體。

【0208】 在一個結合臂中具有域置換/交換的多特異性抗體(CrossMabVH-VL或CrossMabCH-CL)詳細描述於WO2009/080252及Schaefer, W.等人, PNAS, 108 (2011) 11187-1191中。其明顯地減少由針對第一抗原之輕鏈與針對第二抗原之錯誤重鏈失配(與沒有此類域交換之

方法相比較)而造成的副產物。

【0209】 在一個態樣中，本發明係關於一種雙特異性抗原結合分子，其包含(a)能夠特異性結合於CD40之第一Fab片段，(b)能夠特異性結合於FAP之第二Fab片段，及(c)由能夠穩定締合之第一及第二次單元構成的Fc域，其中在Fab片段中之一者中，恆定域CL及CH1經彼此置換，使得CH1域係輕鏈之部分且CL域係重鏈之部分。更特定言之，在能夠特異性結合於目標細胞抗原之第二Fab片段中，恆定域CL及CH1經彼此置換，使得CH1域係輕鏈之部分且CL域係重鏈之部分。

【0210】 在特定態樣中，本發明係關於一種雙特異性抗原結合分子，其包含(a)能夠特異性結合於CD40之第一Fab片段，(b)能夠特異性結合於FAP之第二Fab片段，其中恆定域CL及CH1經彼此置換，使得CH1域係輕鏈之部分且CL域係重鏈之部分。此類分子單價結合於CD40及FAP兩者。

【0211】 在另一態樣中，本發明係關於雙特異性抗原結合分子，該雙特異性抗原結合分子包含：(a)包含兩個能夠特異性結合於CD40之Fab片段及Fc域的抗體之兩個輕鏈及兩個重鏈，及(b)兩個能夠特異性結合於FAP之額外Fab片段，其中該等額外Fab片段各自經由肽連接子連接至(a)之重鏈的C端。在一特定態樣中，額外Fab片段係Fab片段，其中可變域VL及VH經彼此置換，使得VH域係輕鏈之部分且VL域係重鏈之部分。

【0212】 因此，在一特定態樣中，本發明包含雙特異性抗原結合分子，該雙特異性抗原結合分子包含：(a)包含兩個能夠特異性結合於CD40之Fab片段及Fc域的抗體之兩個輕鏈及兩個重鏈，及(b)兩個能夠特異性結合於FAP之額外Fab片段，其中該兩個能夠特異性結合於目標細胞抗原之

額外Fab片段係互換型Fab片段，其中可變域VL及VH經彼此置換且VL-CH鏈各自經由肽連接子連接至(a)之重鏈的C端。

【0213】 在另一態樣中，且為進一步改良正確配對，雙特異性抗原結合分子可含有不同帶電胺基酸取代(所謂的「帶電殘基」)，該雙特異性抗原結合分子包含：(a)能夠特異性結合於CD40之第一Fab片段，(b)能夠特異性結合於FAP之第二Fab片段，及(c)由能夠穩定締合之第一及第二次單元構成的Fc域。將此等修飾引入交叉或非交叉CH1及CL域中。在一特定態樣中，本發明係關於一種雙特異性抗原結合分子，其中在CL域中之一者中，位置123 (EU編號)處之胺基酸已經精胺酸(R)置換，及/或其中位置124 (EU編號)處之胺基酸已經離胺酸(K)取代，且其中在CH1域中之一者中，位置147 (EU編號)及/或位置213 (EU編號)處之胺基酸已經麩胺酸(E)取代。

【0214】

本發明之例示性抗體

在一個態樣中，本發明提供特異性結合於FAP之新抗體及抗體片段。此等抗體結合於與已知FAP抗體4B)或28H1不同之抗原決定基，使其尤其適用於併入至可與其他FAP靶向分子組合使用之雙特異性抗原結合分子中。新抗體之特徵進一步在於其可以高量及高效價製造，其顯示高熱穩定性(如藉由聚集溫度T_{agg}所量測)，其應具有極佳PK特性且其以高親和力結合至人類FAP，如藉由Biacore分析所量測。

【0215】 在一個態樣中，提供特異性結合於FAP (殖株212)之抗體，其中該抗體包含：重鏈可變區(V_HFAP)，其包含(i)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含選自由SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:11

及SEQ ID NO:12組成之群之胺基酸序列的CDR-H2及(iii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含(iv)包含選自由SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14組成之群之胺基酸序列之CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列之CDR-L2及(vi)包含SEQ ID NO:8之胺基酸序列之CDR-L3。

【0216】 在一個態樣中，提供特異性結合於FAP之人類化抗體，其中該抗體包含：重鏈可變區(V_HFAP)，其包含(i)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含選自由SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:11及SEQ ID NO:12組成之群之胺基酸序列的CDR-H2及(iii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含(iv)包含選自由SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14組成之群之胺基酸序列之CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列之CDR-L2及(vi)包含SEQ ID NO:8之胺基酸序列之CDR-L3。

【0217】 在另一態樣中，提供與特異性結合於FAP之抗體競爭結合的抗體，其中該抗體包含：任一重鏈可變區(V_HFAP)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19及SEQ ID NO:20；及任一輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25及SEQ ID NO:26。

【0218】 在一個態樣中，提供與特異性結合於FAP之抗體競爭結合之抗體，其中該抗體包含：包含SEQ ID NO:15之胺基酸序列之重鏈可變區VH及包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列之輕鏈可變區VL。

【0219】 在另一態樣中，提供特異性結合於FAP之抗體，其中該抗體包含

(a)包含SEQ ID NO:15之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)，

(b)包含SEQ ID NO:16之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)，

(c)包含SEQ ID NO:16之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)，或

(d)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:25之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)。

【0220】 在另一態樣中，提供特異性結合於FAP之抗體，其包含：包含SEQ ID NO:15之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)。

【0221】

聚核苷酸

本發明進一步提供編碼如本文所描述之雙特異性抗原結合分子的經分離核酸或其片段或編碼如本文所描述之抗體的經分離核酸。

【0222】 編碼本發明之雙特異性抗原結合分子之經分離聚核苷酸可表現為編碼整個抗原結合分子之單個聚核苷酸或共表現的多個(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，重鏈多肽將與輕鏈多肽結合以形成免疫球蛋白。

【0223】 在一些態樣中，經分離聚核苷酸編碼如本文所描述的根據本發明之雙特異性分子中所包含之多肽。

【0224】 在一個態樣中，本發明係關於編碼雙特異性抗原結合分子之經分離聚核苷酸，其包含：(a)至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域；(b)至少一個能夠特異性結合於FAP之抗原結合域，該抗原結合域包含重鏈可變區(V_HFAP)，其包含(i)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含選自由SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:11及SEQ ID NO:12組成之群之胺基酸序列的CDR-H2及(iii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含(iv)包含選自由SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14組成之群之胺基酸序列的CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列之CDR-L2及(vi)包含SEQ ID NO:8之胺基酸序列之CDR-L3；及(c)由能夠穩定締合之第一及第二次單元構成之Fc域。

【0225】 在某些實施例中，該聚核苷酸或核酸為DNA。在其他實施例中，本發明之聚核苷酸係RNA，例如呈信使RNA (mRNA)形式。本發明之RNA可為單股或雙股RNA。

【0226】

重組方法

本發明之雙特異性抗原結合分子可例如藉由重組生成獲得。對於重組生成，提供一或多個編碼雙特異性抗原結合分子或其多肽片段之聚核苷酸。該一或多個編碼雙特異性抗原結合分子之聚核苷酸經分離且插入至一或多個載體中用於進一步選殖及/或在宿主細胞中表現。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，較佳表現載體。可使用熟習此項技術者熟知的方法構築雙特異性抗原結合分子(片段)之編碼序列與適當轉錄/轉譯控制信號的表現載體。此等方法包括活體外重組DNA技術、合成技術及活體內重組/基因重組。參見例如Maniatis等人，MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989)；及Ausubel等人, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)中所描述之技術。表現載體可為質體、病毒之一部分，或可為核酸片段。表現載體包括表現卡匣，編碼雙特異性抗原結合分子或其多肽片段之聚核苷酸(亦即編碼區)以與啟動子及/或其他轉錄或轉譯控制元件之可操作締合方式選殖於該表現卡匣中。如本文所用，「編碼區」為由轉譯成胺基酸之密碼子組成的核酸之一部分。雖然「終止密碼子」(TAG、TGA或TAA)未轉譯成胺基酸，但其可視為編碼區(若存在)之部分，但任何側接序列(例如啟動子、核糖體結合位點、轉錄終止子、內含子、5'及3'未轉譯區及類似序列)不為編碼區之部分。兩個或更多個編碼區可存在於單一聚核苷酸構築體上，例如單一載體上，或存在於單獨多核苷酸構築體中，例如單獨(不同)載體上。此外，任何載體可含有單個編碼區，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，其經由蛋白水解裂解以後轉譯或共轉譯方式分離成最終蛋白質。另外，本發明之載體、聚核苷酸或核酸可編碼異源編碼區，其融合或未融合至編碼本發明之雙特異性抗原結合分子或其多肽片段的聚核苷酸，或其變異體或衍生物。異源編碼區包括但不限於專用元件或基元，諸如分泌性信號肽或異源功能域。可操作締合為如下狀況：基因產物(例如多肽)之編碼

區與一或多個調節序列締合，以此方式將基因產物之表現置於調節序列之影響或控制下。若誘導啟動子功能導致編碼所要基因產物之mRNA轉錄且若兩個DNA片段之間連接的性質不干擾表現調節序列導引基因產物表現的能力或不干擾DNA模板轉錄的能力，則兩個DNA片段(諸如多肽編碼區及與其締合的啟動子)為「可操作地締合」。因此，若啟動子能夠實現該核酸轉錄，則啟動子區域與編碼多肽之核酸可操作地締合。啟動子可為僅導引預定細胞中之DNA實質性轉錄之細胞特異性啟動子。除啟動子以外的其他轉錄控制元件(例如強化子、操縱子、抑制子及轉錄終止信號)可與導引細胞特異性轉錄之聚核苷酸可操作地締合。

【0227】 適合之啟動子及其他轉錄控制區揭示於本文中。多個轉錄控制區已為熟習此項技術者所知。此等區域包括(但不限於)在脊椎動物細胞中起作用的轉錄控制區，諸如(但不限於)啟動子及強化子區段，其來自巨細胞病毒(例如即刻早期啟動子，連同內含子-A)、猴病毒40 (例如早期啟動子)及逆轉錄病毒(諸如勞斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus))。其他轉錄控制區包括來源於脊椎動物基因(諸如肌動蛋白、熱休克蛋白、牛生長激素及兔â-血球蛋白)之區域，以及能夠控制真核細胞中之基因表現的其他序列。其他適合轉錄控制區包括組織特異性啟動子及強化子以及誘導性啟動子(例如啟動子誘導性四環素(tetracyclin))。類似地，多種轉譯控制元件為一般熟習此項技術者已知的。此等元件包括(但不限於)核糖體結合位點、轉譯起始及終止密碼子，以及來源於病毒系統的元件(特定言之，內部核糖體進入位點或IRES，亦稱為CITE序列)。表現卡匣亦可包括其他特徵，諸如複製起點，及/或染色體整合元件，諸如逆轉錄病毒長末端重複序列(LTR)，或腺相關聯病毒(AAV)反向末端重複序列(ITR)。

【0228】 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結合，從而導引由本發明之聚核苷酸編碼的多肽之分泌。舉例而言，若需要分泌雙特異性抗原結合分子或其多肽片段，則編碼信號序列之DNA可置於編碼本發明之雙特異性抗原結合分子或其多肽片段的核酸上游。根據信號假設，哺乳動物細胞所分泌之蛋白質具有信號肽或分泌性前導序列，一旦生長蛋白質鏈跨越粗糙內質網之輸出已起始，該信號肽或分泌性前導序列自成熟蛋白質裂解。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，或該序列之保持導引可操作地與其結合之多肽之分泌的能力的功能衍生物。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。

【0229】 編碼可用於促進隨後純化(例如組胺酸標記)或幫助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雙特異性抗原結合分子或其多肽片段之聚核苷酸的末端內或末端處。

【0230】 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。在某些態樣中，提供包含一或多種本發明之載體的宿主細胞。聚核苷酸及載體可單獨或組合地併有本文分別與聚核苷酸及載體相關描述之任一特徵。在一個態樣中，宿主細胞包含(例如已轉型或轉染有)載體，該載體包含編碼本發明之雙特異性抗原結合分子(的一部分)的聚核苷酸。如本文所用，術語「宿主細胞」係指任何類型之可經工程改造以產

生本發明之融合蛋白或其片段的細胞系統。適用於複製及支援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，以獲得足量的抗原結合分子以用於臨床應用。適合的宿主細胞包括原核微生物，諸如大腸桿菌(E. coli)，或各種真核細胞，諸如中國倉鼠卵巢細胞(CHO)、昆蟲細胞或其類似物。舉例而言，可在細菌中產生多肽，尤其在不需要糖基化時。在表現之後，可自可溶性部分之細菌細胞糊狀物分離出多肽且可將該多肽進一步純化。除原核生物外，諸如絲狀真菌或酵母之真核微生物為適用於編碼多肽之載體的選殖或表現宿主，包括糖基化路徑已經「人類化」，從而產生具有部分或完全人類糖基化型態之多肽的真菌及酵母菌株。參見Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004)，及Li等人, Nat Biotech 24, 210-215 (2006)。

【0231】 適用於表現(糖基化)多肽的宿主細胞亦來源於多細胞生物體(無脊椎動物及脊椎動物)。無脊椎動物細胞的實例包括植物及昆蟲細胞。已鑑別出眾多可與昆蟲細胞聯合使用，尤其用於轉染草地黏蟲(Spodoptera frugiperda)細胞之桿狀病毒株。植物細胞培養物亦可用作宿主。參見例如美國專利第5,959,177號、第6,040,498號、第6,420,548號、第7,125,978號及第6,417,429號(描述用於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為經SV40轉型的猴腎CV1株(COS-7)；人類胚腎細胞株(293或293T細胞，如例如Graham等人, J Gen Virol 36, 59 (1977)中所描述)；幼倉鼠腎細胞(BHK)；小鼠塞特利氏細胞(mouse sertoli cells)(TM4細胞，

如例如Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980)中所描述)；猴腎細胞(CV1)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76)；人類子宮頸癌細胞(HELA)；犬腎細胞(MDCK)；水牛鼠肝細胞(buffalo rat liver cells)(BRL 3A)；人類肺細胞(W138)；人類肝細胞(Hep G2)；小鼠乳腺腫瘤細胞(MMT 060562)；TRI細胞(如例如Mather等人, Annals N. Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982)中所描述)；MRC 5細胞及FS4細胞。其他適用之哺乳動物宿主細胞株包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，包括dhfr-CHO細胞(Urlaub等人, Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980))；及骨髓瘤細胞株，諸如YO、NS0、P3X63及Sp2/0。關於適用於蛋白質生成之某些哺乳動物宿主細胞株之綜述，參見例如Yazaki及Wu, Methods in Molecular Biology, 第248卷(B.K.C. Lo編, Humana Press, Totowa, NJ), 第255-268頁 (2003)。宿主細胞包括經培養細胞，例如經培養之哺乳動物細胞、酵母細胞、昆蟲細胞、細菌細胞及植物細胞(僅舉數例)，而且包括轉殖基因動物、轉殖基因植物或經培養之植物或動物組織中所包含的細胞。在一個實施例中，宿主細胞係真核細胞，較佳係哺乳動物細胞，諸如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、人類胚腎(HEK)細胞或淋巴細胞(例如Y0、NS0、Sp20細胞)。在此等系統中表現外來基因之標準技術為此項技術中已知的。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，以便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。

【0232】 在一個態樣中，提供製造本發明之雙特異性抗原結合分子或其多肽片段的方法，其中該方法包含在適於表現本發明之雙特異性抗原結合分子或其多肽片段的條件下培養如本文所提供的包含編碼本發明之雙特異性抗原結合分子或其多肽片段的聚核苷酸的宿主細胞，及自宿主細胞

(或宿主細胞培養基)回收本發明之雙特異性抗原結合分子或其多肽片段。

【0233】 如本文所述製備的本發明之雙特異性分子可藉由此項技術中已知的技術(諸如高效液相層析、離子交換層析、凝膠電泳、親和力層析、尺寸排阻層析等)純化。用於純化特定蛋白質的實際條件將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。對於親和力層析純化，可使用雙特異性抗原結合分子所結合之抗體、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力層析純化，可使用具有蛋白質A或蛋白質G之基質。可使用序列蛋白A或G親和層析及尺寸排阻層析來分離基本上如實例中所描述之抗原結合分子。雙特異性抗原結合分子或其片段之純度可藉由多種眾所周知的分析方法中之任一者測定，包括凝膠電泳、高壓液相層析等。舉例而言，如實例中所述表現之雙特異性抗原結合分子顯示為完整的且如還原及非還原SDS-PAGE所證實適當地組裝。

【0234】

分析

本文中提供之抗原結合分子可藉由此項技術中已知之各種分析表徵其結合特性及/或生物活性。特定言之，其藉由該等實例中更詳細地描述之分析表徵。

【0235】

1.結合分析

本文提供之雙特異性抗原結合分子與相應目標表現細胞的結合可例如藉由使用表現人類纖維母細胞活化蛋白(FAP)之鼠類纖維母細胞株及流式細胞測量術(FACS)分析來評估。本文所提供之雙特異性抗原結合分子

與CD40之結合可藉由使用如實例4.2中所描述之初級B細胞測定。

【0236】

2.活性分析

測試本發明之雙特異性抗原結合分子之生物活性。生物活性可包括雙特異性抗原結合分子之功效及特異性。功效及特異性係藉由顯示在結合目標抗原時經由CD40受體之促效信號傳導的分析證明。此外，使用已與雙特異性抗原結合分子一起培育之樹突狀細胞(DC)進行活體外T細胞激活分析。

【0237】

醫藥組合物、調配物及投與途徑

在另一態樣中，本發明提供包含本文所提供之雙特異性抗原結合分子中之任一者的醫藥組合物，其例如用於以下治療方法中之任一者中。在一個實施例中，醫藥組合物包含本文提供之雙特異性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雙特異性抗原結合分子中之任一者及至少一種例如下文所述之額外治療劑。

【0238】 本發明之醫藥組合物包含治療有效量之一或多種雙特異性抗原結合分子，其溶解或分散於醫藥學上可接受之載劑中。片語「醫藥學上或藥理學上可接受」係指分子實體及組合物在所用劑量及濃度下對於接受者而言一般為無毒性的，亦即當適當時投與動物(諸如人類)時，不會產生有害的過敏反應或其他不良反應。含有至少一種根據本發明之雙特異性抗原結合分子及視情況選用之額外活性成分之醫藥組合物之製備將根據本發明為熟習此項技術者已知的，如由Remington's Pharmaceutical

Sciences, 第18版Mack Printing Company, 1990所例示，其以引用之方式併入本文中。特定言之，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、緩衝液、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。

【0239】 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)投與所設計的彼等組合物。注射時，本發明之雙特異性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液(諸如漢克氏溶液(Hanks' solution)、林格氏溶液(Ringer's solution)或生理鹽水緩衝液)中調配。溶液可含有調配劑，諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑。替代地，雙特異性抗原結合分子可呈用於在使用之前用適合之媒劑(例如無菌無熱原質水)復原的粉末形式。無菌可注射溶液藉由將所需量之本發明之抗原結合分子視需要與下文列舉的多種其他成分一起併入適當溶劑中來製備。無菌性可容易藉由例如無菌過濾膜過濾來實現。一般而言，分散液係藉由將各種經滅菌之活性成分併入含有基本分散介質及/或其他成分的無菌媒劑中來製備。在用於製備無菌可注射溶液、懸浮液或乳液之無菌粉末的情況下，較佳製備方法為真空乾燥及冷凍乾燥技術，其由活性成分加任何額外所要成分的預先無菌過濾之液體介質得到該活性成分加任何額外所要成分之粉末。視需要，液體介質宜經緩衝，且在與足量生理食鹽水或葡萄糖一起注射之前，首先使液體稀釋劑呈等張性。該組合物在製造及儲存條件下必須為穩定的，且必須避免諸如細菌及真菌之微生物的污染作用。應瞭解，內毒素污染應最低限度地保持在安全水準，例如低於0.5 ng/mg蛋白質。適合的醫藥學上可接受之賦形

劑包括(但不限於)：緩衝液，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(諸如十八烷基二甲基苯甲基氯化銨；氯化六羥季銨；苯紮氯銨；苄索氯銨；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。另外，活性化合物之懸浮液可視需要製備成油性注射懸浮液。適合親脂性溶劑或媒劑包括脂肪油，諸如芝麻油；或合成脂肪酸酯，諸如油酸乙酯或三酸甘油酯；或脂質體。

【0240】 活性成分可包覆於微膠囊中，例如藉由凝聚技術或藉由界面聚合法所製備之微膠囊，例如分別為羥甲基纖維素或明膠微膠囊及聚(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊；包覆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。可以製備持續釋放型製劑。持續釋放型製劑之適合實例包括含有多肽之固體疏水性聚合物之半滲透基質，該等基質呈成形物品形式，例

如膜或微膠囊。在特定實施例中，可注射組合物之延長吸收可藉由在組合物中使用延遲吸收劑(諸如單硬脂酸鋁、明膠或其組合)來達成。

【0241】 本文中之例示性醫藥學上可接受之賦形劑進一步包括間質藥物分散劑，諸如可溶性中性活性玻尿酸酶醣蛋白(sHASEGP)，例如人類可溶性PH-20玻尿酸酶醣蛋白，諸如rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.)。某些例示性sHASEGP (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與一或多種其他葡萄糖胺聚糖酶，諸如軟骨素酶組合。

【0242】 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案第6,171,586號及WO 2006/044908中所述之調配物，後一者中之調配物包括組胺酸-乙酸鹽緩衝液。

【0243】 除了先前描述的組合物之外，抗原結合分子亦可調配為儲槽式製劑。此類長效調配物可藉由植入(例如皮下或肌肉內植入)或藉由肌肉內注射來投與。因此，舉例而言，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。

【0244】 包含本發明之雙特異性抗原結合分子的醫藥組合物可藉助於習知混合、溶解、乳化、囊封、包覆或凍乾法製造。醫藥組合物可使用有利於將蛋白質處理成可在醫藥學上使用之製劑的一或多種生理學上可接受之載劑、稀釋劑、賦形劑或助劑以習知方式調配。適當調配物視所選擇之投與途徑而定。

【0245】 雙特異性抗原結合分子可以調配成游離酸或鹼、中性或鹽

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

【0246】 本文中之組合物亦可含有一種以上為所治療之特定適應症所必需之活性成分，較佳為具有不會對彼此產生不利影響之互補活性的活性成分。此類活性成分宜以有效達成預期目的之量的組合存在。

【0247】 用於活體內投與之調配物通常為無菌的。無菌性可容易藉由例如無菌過濾膜過濾來實現。

【0248】

治療方法及組合物

本文提供之雙特異性抗原結合分子中之任一者可用於治療方法中。為了用於治療方法中，本發明之雙特異性抗原結合分子可以符合良好醫學實踐的方式調配、給藥及投與。在此情形下考慮之因素包括所治療之特定病症、所治療之特定哺乳動物、個別患者之臨床病狀、病症起因、藥劑遞送位點、投與方法、投與時程及醫學從業者已知之其他因素。

【0249】 在一個態樣中，提供本發明之雙特異性抗原結合分子，其用作藥劑。

【0250】 在其他態樣中，提供本發明之雙特異性抗原結合分子，其用於(i)藉由CD40+抗原呈現細胞(APC) 誘導免疫刺激，(ii)刺激腫瘤特異

性T細胞反應，(iii)引起腫瘤細胞之細胞凋亡，(iv)治療癌症，(v)延遲癌症進展，(vi)延長罹患癌症之患者的存活期，(vii)治療感染。在一特定態樣中，提供本發明之雙特異性抗原結合分子，其用於治療疾病，尤其用於治療癌症。

【0251】 在某些態樣中，提供本發明之雙特異性抗原結合分子，其用於治療方法中。在一個態樣中，本發明提供如本文所描述之雙特異性抗原結合分子，其用於治療有需要之個體的疾病。在某些態樣中，本發明提供雙特異性抗原結合分子，其用於治療患有疾病之個體的方法中，該方法包含向該個體投與治療有效量之雙特異性抗原結合分子。在某些態樣中，待治療之疾病為癌症。需要治療之個體、患者或「個體(individual)」通常係哺乳動物，更具體言之係人類。

【0252】 在一個態樣中，提供一種方法，其用於i)藉由CD40+抗原呈現細胞(APC)誘導免疫刺激，(ii)刺激腫瘤特異性T細胞反應，(iii)引起腫瘤細胞之細胞凋亡，(iv)治療癌症，(v)延遲癌症進展，(vi)延長罹患癌症之患者的存活期，或(vii)治療感染，其中該方法包含向有需要之個體投與治療有效量之本發明之雙特異性抗原結合分子。

【0253】 在另一態樣中，本發明提供本發明之雙特異性抗原結合分子的用途，其用於製造或製備供治療有需要之個體中的疾病用的藥劑。在一個態樣中，藥劑用於治療疾病之方法中，該方法包含向患有疾病之個體投與治療有效量之藥劑。在某些態樣中，待治療之疾病為增生性病症，尤其癌症。癌症的實例包括(但不限於)膀胱癌、腦癌、頭頸癌、胰臟癌、肺癌、乳癌、卵巢癌、子宮癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、食道癌、結腸癌、結腸直腸癌、直腸癌、胃癌、前列腺癌、血液癌、皮膚癌、鱗狀細胞癌、

骨癌及腎癌。癌症之其他實例包括癌瘤、淋巴瘤(例如霍奇金氏及非霍奇金氏淋巴瘤)、母細胞瘤、肉瘤及白血病。可使用本發明之雙特異性抗原結合分子或抗體治療的其他細胞增殖病症包括(但不限於)定位於以下部位中之贅瘤：腹部、骨骼、乳房、消化系統、肝臟、胰臟、腹膜、內分泌腺體(腎上腺、副甲狀腺、垂體、睾丸、卵巢、胸腺、甲狀腺)、眼部、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、脾臟、胸部以及泌尿生殖系統。亦包括癌前病狀或病變及癌症轉移。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。熟習此項技術者容易認識到，在多數情況下，本發明之雙特異性抗原結合分子或抗體可能不提供治癒但可提供益處。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，提供生理學改變的本發明之雙特異性抗原結合分子或抗體之量視為「有效量」或「治療有效量」。

【0254】 為了預防或治療疾病，本發明之雙特異性抗原結合分子之適當劑量(在單獨地或與一或多種其他額外治療劑組合使用時)將視以下而定：待治療疾病之類型、投與途徑、患者體重、特異性分子、疾病之嚴重程度及病程、是否為了預防性或治療性目的投與本發明之雙特異性抗原結合分子、先前或同時發生的治療性干預、患者之臨床病史及對雙特異性抗原結合分子之反應，及主治醫師之判斷。負責投與的從業者將在任何情況下確定組合物中活性成分之濃度及適用於單獨個體的劑量。本文涵蓋各種給藥時程，包括(但不限於)單次投藥或經各個時間點多次投藥、快速投藥(bolus administration)及脈衝式輸注。

【0255】 本發明之雙特異性抗原結合分子適合一次性或經一連串治

療向患者投與。視疾病之類型及嚴重程度而定，雙特異性抗原結合分子之約1 μg/kg至15 mg/kg (例如0.1 mg/kg至10 mg/kg)可為初始候選劑量以用於向患者投與，例如無論是否藉由一或多次獨立投與抑或藉由連續輸注。視上文所提及之因素而定，一個典型的日劑量可在約1 μg/kg至100 mg/kg或更大之範圍內。對於歷經數日或更長時間之重複投與，視病狀而定，治療通常將持續至疾病症狀之所需抑制發生為止。本發明之雙特異性抗原結合分子的一個例示性劑量將在約0.005 mg/kg至約10 mg/kg之範圍內。在其他實例中，劑量亦可包含每次投與約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體重或更多，及其中可衍生之任何範圍。在來自本文中列舉之數值之可衍生範圍之實例中，基於上文所述之數值，可投與約0.1 mg/kg體重至約20 mg/kg體重、約5 μg/kg體重至約1 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，例如每週或每三週投與(例如以使得患者接受約二至約二十或例如約六個劑量之融合蛋白)。在一特定態樣中，將每三週投與雙特異性抗原結合分子。可投與初始較高起始劑量，接著可投與一或多種較低劑量。然而，其他給藥方案可為適用的。此療法之進程容易藉由習知技術及分析來監測。

【0256】 本發明之雙特異性抗原結合分子一般將以有效實現預期目的之量使用。為了用於治療或預防疾病病狀，本發明之雙特異性抗原結合

分子或其醫藥組合物係以治療有效量投與或施用。治療有效量之判定完全在熟習此項技術者之能力範圍內，尤其係根據本文所提供之詳細揭示內容。關於全身性投與，可首先自活體外分析(諸如細胞培養分析)評估治療有效劑量。可隨後在動物模型中調配劑量以達成循環濃度範圍，包括如在細胞培養物中所測定之IC_{50}。此類資訊可用於更準確地判定適用於人類之劑量。亦可使用此項技術中熟知的技術由活體內資料(例如動物模型)評估初始劑量。一般熟習此項技術者可容易基於動物資料而使向人類投與最佳化。

【0257】 可以獨立地調節劑量及間隔以提供足以維持治療作用的本發明之雙特異性抗原結合分子的血漿含量。常見的患者注射投與劑量在約0.1至50毫克/公斤/天，通常約0.1至1毫克/公斤/天之範圍內。治療有效血漿含量可藉由每日投與多次劑量來達成。血漿含量可藉由例如HPLC量測。在局部投與或選擇性攝入之情況下，本發明之雙特異性抗原結合分子或抗體的有效局部濃度可能與血漿濃度無關。熟習此項技術者將能夠最佳化治療有效局部劑量而無需過度實驗。

【0258】 本文所描述的本發明之雙特異性抗原結合分子的治療有效劑量一般將提供治療益處而不引起實質毒性。可在細胞培養物或實驗動物中藉由標準醫藥學程序測定融合蛋白質之毒性及治療功效。可使用細胞培養分析及動物研究來測定LD_{50} (50%群體致死劑量)及ED_{50} (50%群體治療有效劑量)。毒性作用與治療作用之間的劑量比率為治療指數，其可表示為比率LD_{50}/ED_{50}。較佳為展現大治療指數的雙特異性抗原結合分子。在一個態樣中，本發明之雙特異性抗原結合分子或抗體展現高治療指數。自細胞培養分析法及動物研究獲得之資料可用於調配適用於人類的劑量範

圍。劑量較佳在循環濃度範圍內，其包括毒性極小或無毒性之ED_{50}。劑量可視多種因素而在此範圍內變化，該等因素例如所用劑型、所用投與途徑、個體病狀及其類似因素。可由個別醫師根據患者病狀選擇確切調配物、投與途徑及劑量(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)。

【0259】 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、中斷或調節投與。反之，主治醫師亦已知在臨床反應不充足(排除毒性)時將治療調節至較高水準。管理所關注病症時所投與之劑量的量值將隨待治療之病狀的嚴重程度、投與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加以評估。此外，劑量及可能的給藥頻率亦將根據個別患者之年齡、體重及反應而變。

【0260】

其他藥劑及治療

本發明之雙特異性抗原結合分子可在療法中與一或多種其他藥劑組合投與。舉例而言，本發明之雙特異性抗原結合分子或抗體可與至少一種額外治療劑共投與。術語「治療劑」涵蓋可投與以用於治療需要此類治療之個體之症狀或疾病的任何藥劑。此類額外治療劑可包含適於正治療之特定適應症的任何活性成分，較佳為具有互補活性、彼此間無不利影響的彼等活性成分。在某些實施例中，額外治療劑為另一抗癌劑，例如微管中斷劑、抗代謝物、拓樸異構酶抑制劑、DNA嵌入劑、烷基化劑、激素療法、激酶抑制劑、受體拮抗劑、腫瘤細胞凋亡活化劑或抗血管生成劑。在

某些態樣中，額外治療劑為免疫調節劑、細胞抑制劑、細胞黏附抑制劑、細胞毒性或細胞生長抑制劑、細胞凋亡活化劑或提高細胞對細胞凋亡誘導劑之靈敏度的藥劑。

【0261】 因此，提供本發明之雙特異性抗原結合分子或包含該等雙特異性抗原結合分子之醫藥組合物，其用於治療癌症，其中雙特異性抗原結合分子與化學治療劑、輻射及/或用於癌症免疫療法之其他藥劑組合投與。

【0262】 此類其他藥劑宜以可有效用於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上文所論述之其他因素而定。本發明之雙特異性抗原結合分子或抗體一般以相同劑量及如本文所述之投與途徑，或約1至99%本文所述的劑量，或經驗上/臨床上判定為適當的任何劑量及任何途徑使用。

【0263】 上文提及之此類組合療法涵蓋組合投與(其中相同或單獨組合物中包括兩種或更多種治療劑)以及分別投與，在此情況下，本發明之雙特異性抗原結合分子或抗體的投與可在額外治療劑及/或助劑投與之前、同時及/或之後進行。

【0264】 在另一態樣中，提供如前文所描述之雙特異性抗原結合分子，其用於治療癌症，其中雙特異性抗原結合分子係與另一種免疫調節劑組合投與。

【0265】 術語「免疫調節劑」係指包括影響免疫系統之單株抗體的任何物質。本發明之分子可被視為免疫調節劑。免疫調節劑可用作用於治療癌症之抗腫瘤劑。在一個態樣中，免疫調節劑包括(但不限於)抗CTLA4抗體(例如伊匹單抗(ipilimumab))、抗PD1抗體(例如納武單抗(nivolumab)

或帕博利珠單抗(pembrolizumab))、PD-L1抗體(例如阿特珠單抗(atezolizumab)、阿維魯單抗(avelumab)或德瓦魯單抗(durvalumab))、OX-40抗體、4-1BB抗體及GITR抗體。在另一態樣中，提供如前文所描述之雙特異性抗原結合分子，其用於治療癌症，其中雙特異性抗原結合分子係與阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑組合投與。在一個態樣中，阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑為抗PD-L1抗體或抗PD1抗體。更特定言之，阻斷PD-L1/PD-1相互作用之藥劑為抗PD-L1抗體，尤其選自由以下組成之群之抗PD-L1抗體：阿特珠單抗、德瓦魯單抗、帕博利珠單抗及納武單抗。在一個特定態樣中，阻斷PD-L1/PD-1相互作用之藥劑為阿特珠單抗(MPDL3280A，RG7446)。在另一態樣中，阻斷PD-L1/PD-1相互作用之藥劑為包含SEQ ID NO:107之重鏈可變域VH(PDL-1)及SEQ ID NO:108之輕鏈可變域VL(PDL-1)的抗PD-L1抗體。在另一態樣中，阻斷PD-L1/PD-1相互作用之藥劑為包含SEQ ID NO:109之重鏈可變域VH(PDL-1)及SEQ ID NO:110之輕鏈可變域VL(PDL-1)的抗PD-L1抗體。在另一態樣中，阻斷PD-L1/PD-1相互作用之藥劑為抗PD1抗體，尤其選自帕博利珠單抗或納武單抗之抗PD1抗體。此類其他藥劑宜以有效用於預期目的之量組合存在。此類其他藥劑之有效量視所用雙特異性抗原結合分子之量、病症或治療之類型及上文所論述其他因素而定。如前文所描述之雙特異性抗原結合分子一般以如本文所描述之相同劑量及投與途徑使用，或以本文所描述之劑量之約1%至99%，或以憑經驗/臨床上判定為適當之任何劑量及任何途徑使用。

【0266】 上文提及之此類組合療法涵蓋組合投與(其中相同或單獨組合物中包括兩種或更多種治療劑)以及分別投與，在此情況下，雙特異性

抗原結合分子的投與可在額外治療劑及/或佐劑投與之前、與其同時及/或在其之後進行。

【0267】

製品

在本發明之另一態樣中，提供含有適用於治療、預防及/或診斷上文所描述之病症之製品。製品包含容器及容器上或容器隨附之標籤或藥品說明書。適合的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器、IV溶液袋等。容器可由多種材料(諸如玻璃或塑膠)形成。容器容納單獨組合物或與有效治療、預防及/或診斷病狀之另一組合物組合之組合物，且可具有無菌接取口(例如容器可為具有可由皮下注射針刺穿之塞子的靜脈內溶液袋或小瓶)。組合物中的至少一種活性劑為本發明之雙特異性抗原結合分子。

【0268】 標籤或藥品說明書指示組合物用於治療所選病狀。此外，製品可包含(a)其中含有組合物的第一容器，其中該組合物包含本發明之雙特異性抗原結合分子；及(b)其中含有組合物的第二容器，其中該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的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。

【0269】 或者或另外，該製品可進一步包含第二(或第三)容器，其包含醫藥學上可接受之緩衝液，諸如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸鹽緩衝鹽水、林格氏溶液及右旋糖溶液。其可進一步包括就商業及使用者觀點而言所需之其他物質，包括其他緩衝液、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

表B (序列)：

SEQ ID NO:	名稱	序列
1	hu CD40	UniProt no. P25942, 版本200 MVRLPLQCVL WGCLLTAVHP EPPTACREKQ YLINSQCCSL CQPGQKLVSD CTEFTETECL PCGESEFLDT WNRETHCHQH KYCDPNLGLR VQQKGTSETD TICTCEEGWH CTSEACESCV LHRSCSPGFG VKQIATGVSD TICEPCPVGF FSNVSSAFEK CHPWTSCETK DLVVQQAGTN KTDVVCGPQD RLRALVVIPI IFGILFAILL VLVFIKKVAK KPTNKAPHPK QEPQEINFPD DLPGSNTAAP VQETLHGCQP VTQEDGKESR ISVQERQ
2	hu FAP	UniProt no. Q12884, 版本168 MKTWVKIVFG VATSAVLALL VMCIVLRPSR VHNSEENTMR ALTLKDILNG TFSYKTFFPN WISGQEYLHQ SADNNIVLYN IETGQSYTIL SNRTMKSVNA SNYGLSPDRQ FVYLESDYSK LWRYSYTATY YIYDLSNGEF VRGNELPRPI QYLCWSPVGS KLAYVYQNNI YLKQRPGDPP FQITFNGREN KIFNGIPDWV YEEEMLATKY ALWWSPNGKF LAYAEFNDTD IPVIAYSYYG DEQYPRTINI PYPKAGAKNP VVRIFIIDTT YPAYVGPQEV PVPAMIASSD YYFSWLTWVT DERVCLQWLK RVQNVSVLSI CDFREDWQTW DCPKTQEHIE ESRTGWAGGF FVSTPVFSYD AISYYKIFSD KDGYKHIHYI KDTVENAIQI TSGKWEAINI FRVTQDSLFY SSNEFEEYPG RRNIYRISIG SYPPSKKCVT CHLRKERCQY YTASFSDYAK YYALVCYGPG IPISTLHDGR TDQEIKILEE NKELENALKN IQLPKEEIKK LEVDEITLWY KMILPPQFDR SKKYPLLIQV YGGPCSQSVR SVFAVNWISY LASKEGMVIA LVDGRGTAFQ GDKLLYAVYR KLGVYEVEDQ ITAVRKFIEM GFIDEKRIAI WGWSYGGYVS SLALASGTGL FKCGIAVAPV SSWEYYASVY TERFMGLPTK DDNLEHYKNS TVMARAEYFR NVDYLLIHGT ADDNVHFQNS AQIAKALVNA QVDFQAMWYS DQNHGLSGLS TNHLYTHMTH FLKQCFSLSD
3	FAP (212) CDR-H1	DYNMD
4	FAP (212) CDR-H2	DIYPNTGGTIYNQKFKG
5	FAP (212) CDR-H3	FRGIHYAMDY

SEQ ID NO:	名稱	序列
6	FAP (212) CDR-L1	RASESVDNYGLSFIN
7	FAP (212) CDR-L2	GTSNRGS
8	FAP (212) CDR-L3	QQSNEVPYT
9	FAP (212) VH	EVLLQQSGPELVKPGASVKIACKASGYTLTDY NMDWVRQSHGKSLEWIGDIYPNTGGTIYNQKF KGKATLTIDKSSSTAYMDLRSLTSEDTAVYYC TRFRGIHYAMDYWGQGTSVTVSS
10	FAP (212) VL	DIVLTQSPVSLAVSLGQRATISCRASESVDNY GLSFINWFQQKPGQPPKLLIYGTSNRGSGVPA RFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSN EVPYTFGGGTNLEIK
11	FAP (VH1G3a) CDR-H2	DIYPNTGGTIYAQKFQG
12	FAP (VH2G3a) CDR-H2	DIYPNTGGTIYADSVKG
13	FAP (VL1G3a) CDR-L1	RASESVDNYGLSFLA
14	FAP (VL2G3a) CDR-L1	RASESIDNYGLSFLN
15	FAP (VH1G1a)	參見表10
16	FAP (VH1G2a)	參見表10
17	FAP (VH1G3a)	參見表10
18	FAP (VH2G1a)	參見表10
19	FAP (VH2G2a)	參見表10
20	FAP (VH2G3a)	參見表10
21	FAP (VL1G1a)	參見表10
22	FAP (VL1G2a)	參見表10
23	FAP (VL1G3a)	參見表10
24	FAP (VL2G1a)	參見表10
25	FAP (VL2G2a)	參見表10
26	FAP (VL2G3a)	參見表10
27	hu CD40 CDR-H1	GYYIH
28	hu CD40 CDR-H2	RVIPNAGGTSYNQKFKG
29	hu CD40 CDR-H3	EGIYW
30	hu CD40 CDR-L1	RSSQSLVHSNGNTFLH
31	hu CD40 CDR-L2	TVSNRFS
32	hu CD40 CDR-L3	SQTTHVPWT
33	hu CD40 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGY YIHWVRQAPGKGLEWVARVIPNAGGTSYNQKF KGRFTLSVDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC AREGIYWWGQGTLVTVSS
34	hu CD40 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHS NGNTFLHWYQQKPGKAPKLLIYTVSNRFSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCSQT THVPWTFGQGTKVEIK
35	CD40 (S2C6) VH	EVQLQQSGPD LVKPGASVKI SCKASGYSFT

SEQ ID NO:	名稱	序列
		GYYIHWVKQS HGKSLEWIGR VIPNNGGTSY NQKFKGKAIL TVDKSSSTAY MELRSLTSED SAVYYCAREG IYWWGHGTTL TVSS
36	CD40 (S2C6) VL	DVVVTQTPLS LPVSLGAQAS ISCRSSQSLV HSNGNTFLHW YLQKPGQSPK LLIYTVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQTTHVP WTFGGGTKLE IQ
37	VH1a (CD40)	參見表17
38	VH1b (CD40)	參見表17
39	VH1c (CD40)	參見表17
40	VH1d (CD40)	參見表17
41	VL1a (CD40)	參見表17
42	VL1b (CD40)	參見表17
43	VL1c (CD40)	參見表17
44	VL1d (CD40)	參見表17
45	VH2a (CD40)	參見表18
46	VH2b (CD40)	參見表18
47	VH2c (CD40)	參見表18
48	VH2d (CD40)	參見表18
49	VH2ab (CD40)	參見表18
50	VH2ac (CD40)	參見表18
51	VL2a (CD40)	參見表18
52	VL2b (CD40)	參見表18
53	VL2ab (CD40)	參見表18
54	VL2ac (CD40)	參見表18
55	P1AE0400重鏈	參見表20
56	P1AE0400輕鏈	參見表20
57	P1AE0403重鏈	參見表20
58	P1AE0403輕鏈	參見表20
59	P1AE0817重鏈	參見表20
60	P1AE0817輕鏈	參見表20
61	(P1AE1689)輕鏈交叉 VH-Cκ	參見表24
62	VL1a (CD40)輕鏈(帶電)	參見表24
63	VH1a (CD40) (VHCH1帶電) Fc杵 _PGLALA_(P1AE1689) (VL-CH1)	參見表24
64	VH1a (CD40) (VHCH1帶電) Fc臼_PGLALA	參見表24
65	(P1AE1689)輕鏈交叉 VL-CH1	參見表24

SEQ ID NO:	名稱	序列
66	VL1a (CD40)輕鏈	參見表24
67	VH1a (CD40) (VHCH1) Fc杵 _PGLALA_(P1AE1689) (VH-Cκ)	參見表24
68	VH1a (CD40) (VHCH1) Fc臼_PGLALA	參見表24
69	VH1a (CD40) (VHCH1帶電 _VH1a (CD40) (VHCH1帶電)-Fc杵 _PGLALA_(P1AE1689) (VL-CH1)	參見表24
70	VH1a (CD40) (VHCH1帶電)_VH1a (CD40) (VHCH1帶電)-Fc臼 _PGLALA	參見表24
71	4B9輕鏈交叉VL-CH1	參見表24
72	VH1a (CD40) (VHCH1) Fc杵_PGLALA_4B9 (VH-Cκ)	參見表24
73	VH1a (CD40) (VHCH1) _VH1a (CD40) (VHCH1)-Fc杵 _PGLALA_ (4B9) (VH-Cκ)	參見表24
74	VH1a (CD40) (VHCH1)_VH1a (CD40) (VHCH1)-Fc臼 _PGLALA	參見表24
75	28H1輕鏈交叉VH-Cκ	參見表24
76	VH1a (CD40) (VHCH1帶電) Fc杵 _PGLALA_28H1 (VL-CH1)	參見表24
77	VH1a (CD40) (VHCH1帶電) _VH1a (CD40) (VHCH1帶電) Fc杵 _PGLALA_28H1 (VL-CH1)	參見表24
78	hu FAP胞外域+聚離胺酸標記+his_6標記	RPSRVHNSEENTMRALTLKDILNGTFSYKTFF PNWISGQEYLHQSADNNIVLYNIETGQSYTIL SNRTMKSVNASNYGLSPDRQFVYLESDYSKLW RYSYTATYYIYDLSNGEFVRGNELPRPIQYLC

SEQ ID NO:	名稱	序列
		WSPVGSKLAYVYQNNIYLKQRPGDPPFQITFN GRENKIFNGIPDWVYEEEMLATKYALWWSPNG KFLAYAEFNDTDIPVIAYSYYGDEQYPRTINI PYPKAGAKNPVVRIFIIDTTYPAYVGPQEVPV PAMIASSDYYFSWLTWVTDERVCLQWLKRVQN VSVLSICDFREDWQTWDCPKTQEHIEESRTGW AGGFFVSTPVFSYDAISYYKIFSDKDGYKHIH YIKDTVENAIQITSGKWEAINIFRVTQDSLFY SSNEFEEYPGRRNIYRISIGSYPPSKKCVTCH LRKERCQYYTASFSDYAKYYALVCYGPGIPIS TLHDGRTDQEIKILEENKELENALKNIQLPKE EIKKLEVDEITLWYKMILPPQFDRSKKYPLLI QVYGGPCSQSVRSVFAVNWISYLASKEGMVIA LVDGRGTAFQGDKLLYAVYRKLGVYEVEDQIT AVRKFIEMGFIDEKRIAIWGWSYGGYVSSLAL ASGTGLFKCGIAVAPVSSWEYYASVYTERFMG LPTKDDNLEHYKNSTVMARAEYFRNVDYLLIH GTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQVDFQAMWYS DQNHGLSGLSTNHLYTHMTHFLKQCFSLSDGK KKKKKGHHHHHH
79	小鼠FAP	UniProt no. P97321
80	鼠類FAP胞外域+聚離胺酸標記+his_6標記	RPSRVYKPEGNTKRALTLKDILNGTFSYKTYF PNWISEQEYLHQSEDDNIVFYNIETRESYIIL SNSTMKSVNATDYGLSPDRQFVYLESDYSKLW RYSYTATYYIYDLQNGEFVRGYELPRPIQYLC WSPVGSKLAYVYQNNIYLKQRPGDPPFQITYT GRENRIFNGIPDWVYEEEMLATKYALWWSPDG KFLAYVEFNDSDIPIIAYSYYGDGQYPRTINI PYPKAGAKNPVVRVFIVDTTYPHHVGPMEVPV PEMIASSDYYFSWLTWVSSERVCLQWLKRVQN VSVLSICDFREDWHAWECPKNQEHVEESRTGW AGGFFVSTPAFSQDATSYYKIFSDKDGYKHIH YIKDTVENAIQITSGKWEAIYIFRVTQDSLFY SSNEFEGYPGRRNIYRISIGNSPPSKKCVTCH LRKERCQYYTASFSYKAKYYALVCYGPGLPIS TLHDGRTDQEIQVLEENKELENSLRNIQLPKV EIKKLKDGGLTFWYKMILPPQFDRSKKYPLLI QVYGGPCSQSVKSVFAVNWITYLASKEGIVIA LVDGRGTAFQGDKFLHAVYRKLGVYEVEDQLT AVRKFIEMGFIDEERIAIWGWSYGGYVSSLAL ASGTGLFKCGIAVAPVSSWEYYASIYSERFMG LPTKDDNLEHYKNSTVMARAEYFRNVDYLLIH GTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQVDFQAMWYS

SEQ ID NO:	名稱	序列
		DQNHGILSGRSQNHLYTHMTHFLKQCFSLSDG KKKKKKGHHHHHH
81	食蟹獼猴FAP胞外域+聚離胺酸標記+his_6標記	RPPRVHNSEENTMRALTLKDILNGTFSYKTFF PNWISGQEYLHQSADNNIVLYNIETGQSYTIL SNRTMKSVNASNYGLSPDRQFVYLESDYSKLW RYSYTATYYIYDLSNGEFVRGNELPRPIQYLC WSPVGSKLAYVYQNNIYLKQRPGDPPFQITFN GRENKIFNGIPDWVYEEEMLATKYALWWSPNG KFLAYAEFNDTDIPVIAYSYYGDEQYPRTINI PYPKAGAKNPFVRIFIIDTTYPAYVGPQEVPV PAMIASSDYYFSWLTWVTDERVCLQWLKRVQN VSVLSICDFREDWQTWDCPKTQEHIEESRTGW AGGFFVSTPVFSYDAISYYKIFSDKDGYKHIH YIKDTVENAIQITSGKWEAINIFRVTQDSLFY SSNEFEDYPGRRNIYRISIGSYPPSKKCVTCH LRKERCQYYTASFSDYAKYYALVCYGPGIPIS TLHDGRTDQEIKILEENKELENALKNIQLPKE EIKKLEVDEITLWYKMILPPQFDRSKKYPLLI QVYGGPCSQSVRSVFAVNWISYLASKEGMVIA LVDGRGTAFQGDKLLYAVYRKLGVYEVEDQIT AVRKFIEMGFIDEKRIAIWGWSYGGYVSSLAL ASGTGLFKCGIAVAPVSSWEYYASVYTERFMG LPTKDDNLEHYKNSTVMARAEYFRNVDYLLIH GTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQVDFQAMWYS DQNHGLSGLSTNHLYTHMTHFLKQCFSLSDGK KKKKKGHHHHHH
82	肽連接子(G4S)	GGGGS
83	肽連接子$(G4S)_2$	GGGGSGGGGS
84	肽連接子$(SG4)_2$	SGGGGSGGGG
85	肽連接子G4$(SG4)_2$	GGGGSGGGGSGGGG
86	肽連接子	GSPGSSSSGS
87	$(G4S)_3$肽連接子	GGGGSGGGGSGGGGS$_3$
88	$(G4S)_4$肽連接子	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
89	肽連接子	GSGSGSGS
90	肽連接子	GSGSGNGS
91	肽連接子	GGSGSGSG
92	肽連接子	GGSGSG
93	肽連接子	GGSG
94	肽連接子	GGSGNGSG
95	肽連接子	GGNGSGSG
96	肽連接子	GGNGSG
97	Fc杵鏈	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV

SEQ ID NO:	名稱	序列
		HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
98	Fc臼鏈	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
99	接受體構架 IGHJ6*01/02 (106頁)	YYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
100	接受體構架 IGKJ4*01/02 (106頁)	LTFGGGTKVEIK
101	接受體構架1 IGHJ6*01/02 (110頁)	YYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
102	接受體構架1 IGKJ4*01/02 (110頁)	LTFGGGTKVEIK
103	接受體構架2 IGHJ6*01/02 (111頁)	YYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
104	接受體構架2 IGKJ4*01/02 (111頁)	LTFGGGTKVEIK
105	huCD40輕鏈(帶電)	參見表24
106	huCD40 (VHCH1帶電) Fc PGLALA FAP (VL-CH1)	參見表24
107	VH (PD-L1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDS WIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSV KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC ARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSS
108	VL (PD-L1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPA TFGQGTKVEIK
109	VH (PD-L1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRY WMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC AREGGWFGELAFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:	名稱	序列
110	VL (PD-L1)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSS YLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFS GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLP WTFGQGTKVEIK

【0270】 以下編號段落(段)描述本發明之態樣。

1.一種雙特異性抗原結合分子，其包含

(a)至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域，及

(b)至少一個能夠特異性結合於纖維母細胞活化蛋白(FAP)之抗原結合域，該抗原結合域包含重鏈可變區(V_HFAP)，其包含

(i)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含選自由SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:11及SEQ ID NO:12組成之群之胺基酸序列的CDR-H2及(iii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含(iv)包含選自由SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14組成之群之胺基酸序列的CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列之CDR-L2及(vi)包含SEQ ID NO:8之胺基酸序列之CDR-L3。

2.如第1段之雙特異性抗原結合分子，其另外包含

(c)由能夠穩定締合之第一及第二次單元構成的Fc區。

3.如第1段或第2段之雙特異性抗原結合分子，其中該能夠特異性結合於FAP之抗原結合域包含：重鏈可變區(V_HFAP)，其包含與SEQ ID NO:9之胺基酸序列至少約90%一致之胺基酸序列；及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含與SEQ ID NO:10之胺基酸序列至少約90%一致之胺基酸序列。

4.如第1段至第3段中任一段之雙特異性抗原結合分子，其中能夠特異性結合於FAP之抗原結合域包含

重鏈可變區(V_HFAP)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19及SEQ ID NO:20，及

輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25及SEQ ID NO:26。

5.如第1段至第4段中任一段之雙特異性抗原結合分子，其中能夠特異性結合於FAP之抗原結合域包含

(a)包含SEQ ID NO:15之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)，

(b)包含SEQ ID NO:16之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)，

(c)包含SEQ ID NO:16之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)，或

(d)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:25之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)。

6.如第1段至第5段中任一段之雙特異性抗原結合分子，其中能夠特異性結合於CD40之抗原結合域包含：重鏈可變區(V_HCD40)，其包含：(i)包含SEQ ID NO:27之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:28之胺基酸序列之CDR-H2及(iii)包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LCD40)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列之CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO:31之胺基酸序列之CDR-L2及(vi)包含SEQ ID NO:32之胺基酸序列之CDR-L3。

7.如第1段至第6段中任一段之雙特異性抗原結合分子，其中能夠特異性結合於CD40之抗原結合域包含

(i)重鏈可變區(V_HCD40)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39及SEQ ID NO:40，及

(ii)輕鏈可變區(V_LCD40)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43及SEQ ID NO:44。

8.如第1段至第6段中任一段之雙特異性抗原結合分子，其中能夠特異性結合於CD40之抗原結合域包含

(i)重鏈可變區(V_HCD40)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49及SEQ ID NO:50，及

(ii)輕鏈可變區(V_LCD40)，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53及SEQ ID NO:54。

9.如第1段至第5段或第7段中任一段之雙特異性抗原結合分子，其中能夠特異性結合於CD40之抗原結合域包含

(a)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的VL，或

(b)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的VL，或

(c)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:43之胺

基酸序列的VL，或

(d)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的VL，或

(e)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的VL，或

(f)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的VL，或

(g)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:43之胺基酸序列的VL，或

(h)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的VL，或

(i)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的VL，或

(j)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的VL，或

(k)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:43之胺基酸序列的VL，或

(l)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的VL，或

(m)包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的VL，或

(n)包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的VL，或

(o)包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:43之胺基酸序列的VL，或

(p)包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的VL。

10.如第1段至第5段或第7段或第9段中任一段之雙特異性抗原結合分子，其中能夠特異性結合於CD40之抗原結合域包含：包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列之VH及包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列之VL。

11.如第1段至第5段或第8段中任一段之雙特異性抗原結合分子，其中能夠特異性結合於CD40之抗原結合域包含

(a)包含SEQ ID NO:45之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的VL，或

(b)包含SEQ ID NO:46之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的VL，或

(c)包含SEQ ID NO:47之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的VL，或

(d)包含SEQ ID NO:48之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的VL，或

(e)包含SEQ ID NO:45之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的VL，或

(f)包含SEQ ID NO:46之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的VL，或

(g)包含SEQ ID NO:47之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的VL，或

(h)包含SEQ ID NO:48之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的VL，或

(i)包含SEQ ID NO:49之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:53之胺基酸序列的VL，或

(j)包含SEQ ID NO:50之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:53之胺基酸序列的VL，或

(k)包含SEQ ID NO:49之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:54之胺基酸序列的VL，或

(l)包含SEQ ID NO:50之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:54之胺基酸序列的VL。

12.如第1段至第5段或第8段或第11段中任一段之雙特異性抗原結合分子，其中能夠特異性結合於CD40之抗原結合域包含：包含SEQ ID NO:45之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的VL，或其中能夠特異性結合於CD40之抗原結合域包含：包含SEQ ID NO:48之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的VL。

13.如第1段至第7段中任一段之雙特異性抗原結合分子，其包含

(i)至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域，其包含：包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HCD40)及包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LCD40)，及

(ii)至少一個能夠特異性結合於FAP之抗原結合域，其包含：包含SEQ ID NO:15之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)。

14.如第2段至第13段中任一段之雙特異性抗原結合分子，其中該Fc

區為IgG，特定言之，IgG1 Fc區或IgG4 Fc區，且其中該Fc區包含一或多個降低抗體對Fc受體之結合親和力及/或效應功能的胺基酸取代。

15.如第2段至第14段中任一段之雙特異性抗原結合分子，其中該Fc區屬於具有胺基酸突變L234A、L235A及P329G (根據Kaba EU索引之編號)之人類IgG1子類別。

16.如第1段至第15段中任一段之雙特異性抗原結合分子，其中該雙特異性抗原結合分子包含

(a)至少兩個能夠特異性結合於CD40之Fab片段，其連接至Fc區，及

(b)一個能夠特異性結合於FAP之抗原結合域，其連接至Fc區之C端。

17.如第1段至第16段中任一段之雙特異性抗原結合分子，其中該雙特異性抗原結合分子包含

(a)至少兩個能夠特異性結合於CD40的Fab片段，其融合至Fc區，及

(b)能夠特異性結合於FAP的交叉fab片段，其融合至Fc區之C端。

18.如第17段之雙特異性抗原結合分子，其中能夠特異性結合於FAP之交叉fab片段之VH-Cκ鏈融合至Fc區之C端。

19.如第1段至第18段中任一段之雙特異性抗原結合分子，其中該雙特異性抗原結合分子包含四個能夠特異性結合於CD40之Fab片段。

20.一種特異性結合於FAP之抗體，其中該抗體包含：重鏈可變區(V_HFAP)，其包含(i)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含選自由SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:11及SEQ ID NO:12組成之群之胺基酸序列的CDR-H2及(iii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含(iv)包含選自由SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:13

及SEQ ID NO:14組成之群之胺基酸序列的CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列之CDR-L2及(vi)包含SEQ ID NO:8之胺基酸序列之CDR-L3。

21.如第20段之抗體，其中該抗體包含

(a)包含SEQ ID NO:15之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)，

(b)包含SEQ ID NO:16之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)，

(c)包含SEQ ID NO:16之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)，或

(d)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:25之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)。

22.一種經分離核酸，其編碼如第1段至第19段中任一段之雙特異性抗原結合分子或如第20段或第21段之抗體。

23.一種表現載體，其包含如第22段之經分離核酸。

24.一種宿主細胞，其包含如第22段之經分離核酸或如第23段之表現載體。

25.一種產生雙特異性抗原結合分子之方法，其包含在適於表現該雙特異性抗原結合分子之條件下培養如第24段之宿主細胞，及分離該雙特異性抗原結合分子。

26.一種醫藥組合物，其包含如第1段至第19段中任一段之雙特異性抗原結合分子或第20段或第21段之抗體及醫藥學上可接受之載劑。

27.如第26段之醫藥組合物，其進一步包含額外治療劑。

28.如第1段至第19段中任一項之雙特異性抗原結合分子或如第26段之醫藥組合物，其用作藥劑。

29.如第1段至第19段中任一項之雙特異性抗原結合分子或如第26段之醫藥組合物，其係用於

(i)藉由表現CD40之抗原呈現細胞(APC)誘導免疫刺激，

(ii)刺激腫瘤特異性T細胞反應，

(iii)引起腫瘤細胞之細胞凋亡，

(iv)治療癌症，

(v)延遲癌症進展，

(vi)延長罹患癌症之患者的存活期，

(vii)治療感染。

30.如第1段至第19段中任一項之雙特異性抗原結合分子或如第26段之醫藥組合物，其用於治療癌症。

31.一種如第1段至第19段中任一項之雙特異性抗原結合分子或如第26段之醫藥組合物之用途，其係用於製造供治療癌症用之藥劑。

32.一種治療患有癌症之個體的方法，其包含向該個體投與有效量之如第1段至第19段中任一項之雙特異性抗原結合分子或如第26段之醫藥組合物。

33.如第1段至第19段中任一段之雙特異性抗原結合分子或如第26段之醫藥組合物，其係用於治療癌症，其中該雙特異性抗原結合分子係與化學治療劑、輻射及/或用於癌症免疫療法之其他藥劑組合投與。

【0271】

實例

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

【0272】

重組DNA技術

使用標準方法操縱DNA，如Sambrook等人, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989中所描述。根據製造商說明書，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的總體資訊係給出於：Kabat, E.A.等人，(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版, NIH公開案第91-3242號中。

【0273】

DNA定序

藉由雙股定序法測定DNA序列。

【0274】

基因合成

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

【0275】

蛋白質純化

參考標準方案，自經過濾之細胞培養上清液純化蛋白質。簡言之，將抗體施用於蛋白A瓊脂糖凝膠管柱(GE Healthcare)且用PBS洗滌。在pH 2.8下實現抗體之溶離，接著立即中和樣本。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。合併單體抗體部分，必要時使用例如MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO)離心濃縮器濃縮，冷凍且儲存在-20℃或-80℃下。提供部分樣本用於例如藉由SDS-PAGE、尺寸排阻層析(SEC)或質譜分析進行後續蛋白質分析及分析表徵。

【0276】

SDS-PAGE

根據製造商說明書使用NuPAGE®預製凝膠系統(Invitrogen)。特定言之，使用10%或4%至12% NuPAGE® Novex® Bis-TRIS預製凝膠(pH 6.4)及NuPAGE® MES (還原性凝膠，具有NuPAGE® Antioxidant操作緩衝液添加劑)或MOPS (非還原性凝膠)操作緩衝液。

【0277】

CE-SDS

使用微流Labchip技術(Caliper Life Science, USA)，藉由CE-SDS分析雙特異性抗體及對照抗體之純度、抗體完整性及分子量。使用HT蛋白表現套組根據製造商說明書製備5 μl蛋白質溶液，且使用HT蛋白表現晶

片在LabChip GXII系統上分析。使用LabChip GX軟體版本3.0.618.0分析資料。

【0278】

分析性尺寸排阻層析

藉由HPLC層析進行用於測定抗體之聚集及寡聚狀態之尺寸排阻層析(SEC)。簡言之，將蛋白質A純化抗體施用於Agilent HPLC 1100系統上300 mM NaCl、50 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4，pH 7.5中之Tosoh TSKgel G3000SW管柱或Dionex HPLC系統上2×PBS中之Superdex 200管柱(GE Healthcare)。藉由UV吸光度及峰面積之積分來定量溶離之蛋白質。將BioRad凝膠過濾標準151-1901用作標準。

【0279】

質譜分析

此部分描述具有VH/VL或CH/CL交換(交叉單抗)之多特異性抗體之表徵，其中強調其正確組裝。藉由去糖基化完整交叉單抗及去糖基化/FabALACTICA消解或以其他方式去糖基化/GingisKHAN消解交叉單抗之電噴霧電離質譜法(ESI-MS)來分析預期主要結構。

【0280】 在蛋白質濃度為1 mg/ml下，交叉單抗在磷酸鹽或Tris緩衝液中，在37℃下用N-糖苷酶去糖基化至多17 h。在由供應商供應之緩衝液中用100 µg去糖基化交叉單抗執行FabALACTICA或GingisKHAN (Genovis AB; Sweden)消解。在質譜分析之前，在Sephadex G25管柱(GE Healthcare)上經由HPLC將樣本去鹽。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。

【0281】

實例1

產生抗纖維母細胞活化蛋白(FAP)之新抗體

【0282】

1.1 小鼠免疫接種

使用Balb/c及NMRI小鼠進行免疫接種。動物係根據附件A「動物收容及護理指南」圈養在AAALACi所認可之動物設施中。所有動物免疫接種方案及實驗均經Upper Bavaria政府審批通過(許可證號55.2-1-54-2531-19-10)且係根據德國動物福利法及歐洲議會及理事會之指令2010/63進行。6至8週齡的Balb/c及NMRI小鼠(n=5)接受四輪免疫接種，其中人類纖維母細胞活化蛋白質α (胺基酸27-759；寄存編號NP_004451)之重組製造的細胞外域共價連接至His標記(SEQ ID NO:78)。每次免疫接種之前，用氧氣與異氟醚之氣體混合物麻醉小鼠。對於第一次免疫接種，將溶解於PBS (pH 7.4)中之30 μg蛋白質與等體積之CFA (BD Difco, #263810)混合且經腹膜內(i.p.)投與。在第6週經皮下(s.c.)投與在阿金科(Abisco)佐劑中乳化之另一10 μg蛋白質。在第10週經腹膜內投與第三劑量之不含佐劑的5 μg蛋白質。最後，在使用融合瘤技術製備用於抗體研發之脾細胞之前三天，對小鼠進行靜脈內(i.v.)增強免疫接種50 μg蛋白質。藉由ELISA測試血清之抗原特異性總IgG抗體產生。在最終免疫接種之後三天，將小鼠安樂死，且無菌分離脾臟且準備用於融合瘤產生。分離小鼠淋巴球且使用基於PEG之標準方案與小鼠骨髓瘤細胞株融合以產生融合瘤。將所得融合瘤細胞在平底96孔微量滴定盤中以大致10^4塗鋪，隨後在選擇性培養基中培養約兩週，且接著篩選以用於產生抗原特異性抗體。一旦發生大量融合瘤

生長，即對分泌抗體之融合瘤再塗鋪。藉由ELISA篩選融合瘤上清液與重組人類纖維母細胞活化蛋白α (huFAP)特異性結合，隨後使用Biacore量測評估與重組huFAP之動力學結合參數。

【0283】 融合瘤之培養：在37℃及5% CO_2下在補充有以下之RPMI 1640 (PAN-目錄號(Cat. No.) PO4-17500)中培養產生的muMAb融合瘤：2 mM L-麩醯胺酸(GIBCO-目錄號35050-038)、1 mM丙酮酸鈉(GIBCO-目錄號11360-039)、1× NEAA (GIBCO-目錄號11140-035)、10% FCS (PAA-目錄號A15-649)、1× 鏈黴素(Pen Strep) (Roche-目錄號1074440)、1× Nutridoma CS (Roche-目錄號1363743)、50 μM巰基乙醇(GIBCO-目錄號31350-010)及50 U/ml IL 6小鼠(Roche-目錄號1 444 581)。

【0284】

1.2 抗huFAP抗體與FAP殖株4B9及28H1之競爭性細胞結合

相較於FAP殖株4B9，測試所得殖株之結合特性。FAP殖株4B9及28H1之產生及製備描述於WO 2012/020006 A2中，其以引用之方式併入本文中。為了判定鼠類FAP殖株是否將不同抗原決定基識別為殖株4B9及28H1，進行與經轉染HEK細胞上表現之人類FAP的競爭性結合。

【0285】 簡言之，用細胞解離緩衝液採集目標細胞，用FACS緩衝液(PBS +2% FCS + 5 mM EDTA + 0.25%疊氮化鈉)洗滌且接種於96-U形底盤(1×10^5個細胞/孔)中。將未標記之初級抗人類FAP抗體(mu IgG1)添加至細胞中(最終濃度為60 μg/ml至0.2 μg/ml；1:3稀釋)且在4℃下培育20 min，之後添加AlexaFluor647-標記之抗FAP抗體4B9或28H1 (最終濃度20 μg/ml)。在4℃下培育30 min之後，洗滌細胞，固定且使用Miltenyi

MACSQuant量測AF647標記之殖株4B9及28H1之螢光信號強度。

【0286】 如**圖2A及圖2B**中可見，鑑別不與抗FAP抗體4B9或28H1競爭結合的10種源自融合瘤之鼠類抗體(命名為殖株209、210、211、212、213、214、215、216、217及218)。

【0287】

1.3 抗huFAP鼠類抗體之目標結合特異性

纖維母細胞活化蛋白(FAP、FAP-α、牽引酶)為II型跨膜絲胺酸蛋白酶，屬於脯胺醯基寡肽酶家族。此家族包含優先在脯胺酸殘基之後裂解肽之絲胺酸蛋白酶。在人類蛋白質組中表現之此家族之其他重要成員為脯胺醯基寡肽酶(PREP)及二肽基肽酶(DPP)。DPP-IV為FAP之最接近同源物。相比於FAP，DPP-IV經普遍表現且在諸如T細胞協同刺激、趨化介素生物學、葡萄糖代謝及腫瘤形成之各種生物過程中起作用，且因此所需抗人類FAP抗體不應結合於人類DPP-IV。

【0288】 藉由流式細胞測量術使用經人類FAP或人類DPPIV-轉染HEK細胞測定與人類FAP及人類DPP-IV之結合。簡言之，用細胞解離緩衝液採集目標細胞，用FACS緩衝液(PBS + 2% FCS + 5 mM EDTA + 0.25%疊氮化鈉)洗滌且接種於96-U形底盤(1×10^5個細胞/孔)中。將未標記之初級抗體添加至細胞(最終濃度10 μg/ml)中且在4℃下培育30 min。洗滌之後，在4℃下在暗處將細胞與山羊抗小鼠IgG-PE F(ab')2 (Serotec)一起培育30min。隨後，洗滌細胞，固定且使用BD FACS Canto™ II量測。對於10種源自融合瘤之抗人類FAP抗體中之任一者未偵測到與人類DPP-IV之非特異性結合。

【0289】

1.4 產生呈huIgG1_LALA_PG型式之抗huFAP抗體

使用標準定序方法測定新的抗huFAP抗體之DNA序列。基於VH及VL域，新的抗FAP抗體以具有效應沉默Fc (P329G；L234、L235A)之huIgG1抗體形式表現，以根據WO 2012/130831 A1中所描述之方法取消與Fcγ受體之結合。詳言之，藉由用編碼不同肽鏈之表現載體短暫轉染懸浮生長之HEK293-F細胞來表現抗體。在無血清FreeStyle 293表現培養基(Invitrogen)中，根據細胞供應商說明書，使用Maxiprep (Qiagen, Germany)抗體載體製劑、F17基礎培養基(Invitrogen, USA)、PEIpro (Polyscience Europe GmbH)及1至2百萬活細胞/ml的初始細胞密度來進行轉染成HEK293-F細胞(Invitrogen, USA)。在藉由於14000 g下離心30分鐘而在搖瓶或攪拌醱酵槽中培養7天之後採集細胞培養上清液，且經由0.22 μm過濾器過濾。

【0290】藉由親和層析，使用MabSelectSure-Sepharose™ (GE Healthcare, Sweden)層析自細胞培養上清液純化抗體。簡言之，在經PBS緩衝液(10 mM Na_2HPO_4、1 mM KH_2PO_4、137 mM NaCl及2.7 mM KCl，pH 7.4)平衡的MabSelect SuRe樹脂上捕捉無菌過濾的細胞培養上清液，用平衡緩衝液洗滌且用25 mM檸檬酸鹽(pH 3.0)溶離。在用1 M Tris pH 9.0中和之後，在20 mM組胺酸、140 mM NaCl (pH 6.0)中藉由尺寸排阻層析(Superdex 200, GE Healthcare)將聚集之蛋白質自單體抗體物質分離。合併單體蛋白質溶離份，必要時使用例如MILLIPORE Amicon Ultra (30KD MWCO)離心濃縮器濃縮且儲存在-80℃下。使用樣本等分試樣以供例如藉由CE-SDS、尺寸排阻層析法、質譜分析及內毒素測定進行後續分析表徵。

【0291】

1.5 抗huFAP抗體之細胞結合

使用經人類FAP轉染之HEK細胞，藉由流式細胞測量術測定具有人類IgG1 P329G LALA Fc之抗FAP抗體與人類FAP之結合。簡言之，用細胞解離緩衝液採集目標細胞，用FACS緩衝液(PBS + 2% FCS + 5 mM EDTA + 0.25%疊氮化鈉)洗滌且接種於96-U形底盤(1×10^5個細胞/孔)中。將未標記之初級抗體添加至細胞中(最終濃度為10 μg/ml至0.64 ng/ml；1:5稀釋)且在4℃下培育30 min。洗滌之後，將細胞與Fcγ特異性的PE結合之AffiPure $F(ab)_2$片段羊抗人IgG (Jackson Immunoresearch)一起在4℃下在暗處培育30 min。隨後，洗滌細胞，固定且使用BD FACS LSR Fortessa™量測。

【0292】 如先前所見，所有抗FAP抗體示出與人類FAP之類似結合。所選黏合劑之EC_{50}值展示於下表1中。

表1：抗FAP抗體與huFAP表現細胞之細胞結合

樣本ID	殖株	EC_{50} [μg/ml] 與經FAP轉染之HEK細胞之細胞結合
	4B9	0.089
P1AD9427	209	0.145
P1AD9436	210	0.125
P1AD9437	211	0.198
P1AD9438	212	0.118
P1AD9440	214	0.086

【0293】

1.6 抗huFAP抗體之細胞內化

FAP黏合劑之內化係使用經人類FAP轉染之HEK細胞作為目標來測定。簡言之，用細胞解離緩衝液採集目標細胞，用低溫FACS緩衝液(PBS

+ 2% FCS + 5 mM EDTA + 0.25%疊氮化鈉)洗滌且以1.5×10^6個細胞/ml再懸浮於低溫FACS緩衝液中。將細胞分佈於15 ml試管中(各試管含有3×10^6個細胞於2 ml中)。將2 ml抗人類FAP抗體溶液添加至細胞(最終濃度20 μg/ml)中且在4℃下培育45 min。隨後，洗滌細胞，將其再懸浮於低溫FACS緩衝液中，且緊接著將時間點「0」之細胞接種至96-U形底盤(1.5×10^6個細胞/孔)中且保持在4℃下，而將所有其他細胞離心，再懸浮於含有10 % FCS及1 % Glutamax (1.5×10^6個細胞/ml)之溫熱RPMI1640培養基中，並在含濕氣培育箱(5 % CO_2)中變為37℃。在各指示時間點之後，將100 μl/試管之細胞懸浮液轉移至培養盤，緊接著用低溫FACS緩衝液冷卻且儲存於冰箱中，直至已收集到所有時間點為止。在收集所有時間點之後，用低溫FACS緩衝液洗滌細胞且與經PE標記之二級抗體一起在4℃下培育30 min。隨後，洗滌細胞，固定且使用BD FACS Canto™ II量測。

【0294】 由經標記二級抗體引起之信號隨時間推移保持幾乎不變，此意謂隨時間推移未觀測到抗體損失，所測試之抗huFAP抗體中無一者被內化。

【0295】

1.7 抗huFAP抗體之結合動力學

為了評估人類FAP結合動力學，根據製造商說明書將經生物素標記之人類FAP固定在S系列Biacore CAPture晶片(GE Healthcare 28-9202-34)上，產生約20個共振單位(RU)之表面密度。作為操作及稀釋緩衝液，使用HBS-P+ (10 mM HEPES，150 mM NaCl pH 7.4，0.05%界面活性劑P20)。依次注射抗huFAP Fab之稀釋系列(3.7至300 nM，1:3稀釋)，各自

持續120 s，在30 μl/min之流動速率(單循環動力學)下監測解離，持續1800s。藉由注射6 M 胍-HCl、0.25 M NaOH達120秒而使表面再生。藉由減去空白注射且藉由減去不含捕捉的人類FAP之對照流槽獲得之反應來校正整體折射率差異。在Biacore評估軟體內使用1:1朗格繆爾(Langmuir)結合模型進行曲線擬合。親和力資料展示於下表2中。

表2：如藉由Biacore所量測的抗FAP Fab對人類FAP之親和力

樣本ID	殖株	ka (1/Ms)	kd (1/s)	**KD**
	4B9_Fab	1.82E+06	7.80E-04	430 pM
P1AD9427_Fab	209	3.50E+06	1.77E-03	510 pM
P1AD9436_Fab	210	1.87E+06	< E-06	< 10 pM
P1AD9437_Fab	211	8.13E+05	4.61E-05	60 pM
P1AD9438_Fab	212	1.06E+06	< E-06	< 10 pM
P1AD9440_Fab	214	1.99E+06	< E-06	< 10 pM

【0296】

1.8 抗huFAP殖株之型式依賴性結合

為了在抗FAP殖株於C端融合至Fc域時判定其結合特性是否丟失，測試包含Fc杵鏈及Fc臼鏈之構築體，其中VH域融合至Fc杵鏈之C端且VL域融合至Fc臼鏈之C端(圖3A，C項VH/VL融合)及包含Fc杵鏈及Fc臼鏈之構築體，其中完整Fab與其VH域一起融合至Fc杵鏈之C端(圖3B，C項Fab融合)。Fc杵鏈具有SEQ ID NO:97之胺基酸序列且Fc臼鏈具有SEQ ID NO:98之胺基酸序列。

【0297】 相較於抗體，構築體對經生物素標記之重組人類FAP及經生物素標記之重組食蟹獼猴FAP之親和力展示於下表3中。

表3：如藉由Biacore所量測之對人類FAP及食蟹獼猴FAP之親和力

	對人類FAP之親和力 KD [nM]			對食蟹獼猴FAP之親和力 KD [nM]		
殖株	游離 Fab	C項Fab 融合	C項VH/VL 融合	IgG	C項Fab 融合	C項VH/VL 融合
209	0.31	1.52	42.40	0.33	1.60	50.00
210	0.07	0.17	3.95	0.12	0.20	3.44
211	0.28	1.20	10.90	0.32	1.30	11.40
212	0.12	0.62	5.72	0.14	0.64	6.19
214	0.06	0.19	2.49	0.09	0.21	2.77

【0298】 如前所述，亦已測定構築體與經FAP轉染之HEK細胞之細胞結合。EC_{50}值展示於表4中。所有抗FAP抗體之C端融合構築體能夠結合於人類及食蟹獼猴FAP，然而其中完整Fab與其VH域一起融合至Fc杵鏈之C端的構築體優於其中VH域融合至Fc杵鏈之C端且VL域融合至Fc臼鏈之C端的構築體。

表4：與huFAP表現細胞之細胞結合

	與人類FAP之細胞結合 EC_{50} [μg/ml]			與食蟹獼猴FAP之細胞結合 EC_{50} [μg/ml]		
殖株	IgG	C項Fab 融合	C項 VH/VL融合	IgG	C項Fab 融合	C項 VH/VL融合
209	0.15	1.2	5.7	0.4	1.1	7.9
210	0.13	1.8	9.0	0.4	1.3	7.1
211	0.20	3.7	9.3	0.3	2.9	6.7
212	0.12	2.8	8.8	0.3	2.3	11.1
214	0.09	1.7	9.4	0.3	1.3	3.6

【0299】

1.9 如藉由Biacore所測定之抗人類FAP殖株之競爭性結合

在Biacore T200儀器上使用基於表面電漿子共振(SPR)之分析進行抗

原決定基分組。藉由固定的抗His抗體捕捉FAP抗原。在第一步驟中，注入FAP結合子直至飽和。隨後注射第二FAP結合子。分析設計示意性地展示於圖3C中。添加第二抗體之後的結合信號增加指示其與不同於第一抗體之抗原決定基的結合。無額外結合指示第一及第二抗體識別相同抗原決定基區。

【0300】 藉由胺偶合(GE Healthcare套組BR-1000-50)將濃度為20 μg/ml之抗His抗體(GE Healthcare套組28-9950-56)固定至CM5感測器晶片(GE Healthcare BR-1005-30)之表面。注射時間在10 μl/min之流動速率下為600秒以在兩個流槽上得到12000個反應單位(RU)，該兩個流槽一個用作參考且一個用作作用中流槽。操作緩衝液為HBL-N (GE Healthcare BR-1006-70)。為了量測，將PBS-P+ (GE Healthcare 28-9950-84)用作操作及稀釋緩衝液。將流槽溫度設定為25℃，樣本隔室設定為12℃。整個操作之流動速率設定為10 μl/min。

【0301】 在作用中流槽中捕捉濃度為20 μg/ml之His標記之FAP抗原，持續180秒。經兩個流槽依次注射第一及第二抗體(FAP結合劑)，各持續120秒，濃度為10 μg/ml。在各循環之後，用10 mM甘胺酸(pH 1.5)使表面再生60秒(GE Healthcare BR-1003-54)。

【0302】 結果展示於下表5中：

表5：抗FAP抗體與4B9之競爭性結合

	4B9	209	210	211	212	214
4B9	競爭性結合	同時結合	同時結合	同時結合	同時結合	同時結合
209	同時結合	競爭性結合	同時結合	同時結合	同時結合	同時結合
210	同時結合	同時結合	競爭性結合	競爭性結合	競爭性結合	競爭性結合
211	同時結合	同時結合	競爭性結合	競爭性結合	競爭性結合	競爭性結合
212	同時結合	同時結合	競爭性結合	競爭性結合	競爭性結合	競爭性結合
214	同時結合	同時結合	競爭性結合	競爭性結合	競爭性結合	競爭性結合

【0303】 因此，鑑別三個抗原決定基組。如所請求，抗FAP抗體中無一者與抗體4B9 (抗原決定基組1)競爭結合。抗體210、211、212及214彼此競爭結合且因此形成一個基團(抗原決定基組3)，而抗體209不與抗體中之任何其他者競爭結合(抗原決定基組2)。

【0304】

1.9 抗FAP抗體之熱穩定性評估

在20 mM組胺酸/組胺酸氯、140 mM NaCl (pH 6.0)中製備濃度為1 mg/mL之樣本，經由0.4 μm過濾盤藉由離心轉移至光學384孔培養盤中且用石蠟油覆蓋。藉由動態光散射在DynaPro盤式讀取器(Wyatt)上重複量測流體動力學半徑，同時以0.05℃/min之速率將樣本自25℃加熱至80℃。或者，將樣本轉移至10 μL微光析槽陣列中，且用Optim1000儀器(Avacta Inc.)記錄靜態光散射資料以及在266 nm雷射下激發後之螢光資料，同時以0.1℃/min之速率將樣本自25℃加熱至90℃。聚集起始溫度(T_{agg})經定義為流體動力學半徑(DLS)或散射光強度(Optim 1000)開始增加之溫度。解鏈溫度經定義為展示螢光強度對波長之圖中的拐點。所選抗FAP抗體之聚集起始溫度展示於表6中。

表6：抗FAP抗體之聚集起始溫度

	4B9	209	210	212	214
T_{agg} (℃)	60	66	61	67	61

【0305】 選擇抗FAP殖株212進行人類化，因為其係以與抗體4B9相當的親和力結合於人類FAP且展示出開發之有利特性。其序列之電腦模擬分析僅指示一個預測降級熱點(位置401處之Trp)。鼠類殖株212之序列展示於表7中。

表7：鼠類抗FAP殖株212之可變域之胺基酸序列

描述	序列	Seq ID No
FAP(212) VH	EVLLQQSGPELVKPGASVKIACKASGYTLTDYNMDWVRQS HGKSLEWIGDIYPNTGGTIYNQKFKGKATLTIDKSSSTAY MDLRSLTSEDTAVYYCTRFRGIHYAMDYWGQGTSVTVSS	9
FAP(212) VL	DIVLTQSPVSLAVSLGQRATISCRASESVDNYGLSFINWF QQKPGQPPKLLIYGTSNRGSGVPARFSGSGSGTDFSLNIH PMEEDDTAMYFCQQSNEVPYTFGGGTNLEIK	10

【0306】

1.10 抗FAP殖株212之人類化

1.10.1方法

藉由查詢鼠類輸入序列之人類V區及J區序列之BLASTp資料庫來鑑別適合之人類接受體構架(削減至可變部分)。用於選擇人類接受體構架之選擇性準則為序列同源性、相同或類似CDR長度及人類生殖系之估計頻率，以及在VH-VL域界面處保守某些胺基酸。在生殖系鑑別步驟之後，將鼠類輸入序列之CDR移植至人類接受體構架區上。評定此等初始CDR移植物與親本抗體之間的各胺基酸差異對各別可變區之結構完整性有可能的影響的等級，且只要認為適合，即引入針對親本序列之「回復突變」。結構評定係基於親本抗體及人類化變異體兩者之Fv區同源性模型，其利用使用17R2版Biovia Discovery Studio Environment實施之內部抗體結構同源性建模工具形成。在一些人類化變異體中，包括「正向突變」，亦即，出現在親本結合子之既定CDR位置處之原始胺基酸變成在人類接受體生殖系之等效位置處發現之胺基酸的胺基酸交換。目的為增加人類化變異體之總體人類特徵(除構架區以外)以進一步降低免疫原性風險。

【0307】 使用內部開發之電腦模擬工具預測成對VH及VL人類化變異體之VH-VL域取向(參見WO 2016/062734)。將結果與親本結合子之經

預測VH-VL域取向比較，以選擇幾何形狀上與原始抗體接近之構架組合。基本原理為偵測VH-VL界面區中可能的胺基酸交換，其可能導致兩個域之配對的分裂性變化，該等變化又可能對結合特性具有不利影響。

【0308】

1.10.2 接受體構架及其適應性之選擇

選擇以下接受體構架：

表8：接受體構架

	鼠類V區生殖系	移植物變異體	人類接受體V區生殖系之選擇	移植之後與人類V區生殖系之一致性(BLASTp)：
FAP (212) VH	IGHV1-18*01	VH1	IGHV1-46*01	87.8 %
		VH2	IGHV3-23*03	82.7 %
FAP (212) VL	IGKV3-2*01	VL1	IGKV3-11*01	85.1 %
		VL2	IGKV1-39*01	82.8 %

【0309】後CDR3構架區係自人類IGHJ生殖系IGHJ6*01/02 (YYYYYGMDV**WGQGTTVTVSS**)及人類IGKJ生殖系IGKJ4*01/02 (LT**FGGGTKVEIK**)調適。與接受體構架相關之部分係以粗體字表示。

【0310】基於結構考量，在以下位置處引入自人類接受體構架至親本結合子中之胺基酸的回復突變：H43 (Q>K)、H44 (G>S)、H48 (M>I)、H71 (R>I)、H73 (T>K)、H93 (A>T) [VH1]、H49 (S>G)、H71 (R>I)、H73 (N>K)、H78 (L>A)、H93 (A>T)、H94 (K>R) [VH2]、L36 (Y>F)、L43 (A>P)、L87 (Y>F) [VL1]及L36 (Y>F)、L42 (K>Q)、L43 (A>P)、L85 (T>M)、L87 (Y>F) [VL2]。

【0311】此外，將位置H60 (N>A)、H64 (K>Q) [VH1]、H60 (N>A)、H61 (Q>D)、H62 (K>S)、H63 (F>V) [VH2]、L33 (I>L)、L34 (N>A) [VL1]及L27b (V>I)、L33 (I>L) [VL2]鑑別為用於前向突變之有前景的候選。所有位置均在Kabat EU編號方案中給出。

表9：變異體之清單

變異體名稱	回復/前向突變	與人類V區生殖系之一致性(BLASTp)
VH1G1a	bM48I, bR71I, bA93T	84.7 %
VH1G2a	bQ43K, bG44S, bM48I, bR71I, bT73K, bA93T	81.6 %
VH1G3a	bM48I, fN60A, fK64Q, bR71I, bA93T	86.7 %
VH2G1a	bS49G, bA93T, bK94R	79.6 %
VH2G2a	bS49G, bR71I, bN73K, bL78A, bA93T, bK94R	76.5 %
VH2G3a	bS49G, fN60A, fQ61D, fK62S, fF63V, bA93T, bK94R	83.7 %
VL1G1a	bY36F, bY87F	83 %
VL1G2a	bY36F, bA43P, bY87F	81.9 %
VL1G3a	fI33L, fN34A, bY36F, bY87F	85.1 %
VL2G1a	bY36F, bY87F	80.8 %
VL2G2a	bY36F, bK42Q, bA43P, bT85M, bY87F	77.8 %
VL2G3a	fV27bI, fI33L, bY36F, bY87F	82.8 %

注意：回復突變以b為前綴，前向突變以f為前綴，例如bM48I係指在位置48 (Kabat)自甲硫胺酸至異白胺酸之回復突變(人類生殖系胺基酸至親本抗體胺基酸)。

【0312】 基於接受體構架之人類化FAP抗體之所得VH及VL域可見於下表10中。

表10：人類化FAP抗體之VH及VL域之胺基酸序列

描述	序列	Seq ID No
VH1G1a	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTDYNMDWVRQAPGQGLEWIGDIYPNTGGTIYNQKFKGRVTMTIDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRFRGIHYAMDYWGQGTTVTVSS	15
VH1G2a	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTDYNMDWVRQAPGKSLEWIGDIYPNTGGTIYNQKFKGRVTMTIDKSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRFRGIHYAMDYWGQGTTVTVSS	16
VH1G3a	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTDYNMDWVRQAPGQGLEWIGDIYPNTGGTIYAQKFQGRVTMTIDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRFRGIHYAMDYWGQGTTVTVSS	17
VH2G1a	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTLTDYNMDWVRQAPGKGLEWVGDIYPNTGGTIYNQKFKGRFTISRDNSKNT	18

	LYLQMNSLRAEDTAVYYCTRFRGIHYAMDYWGQGTTVTV SS	
VH2G2a	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTLTDYNMDWVRQ APGKGLEWVGDIYPNTGGTIYNQKFKGRFTISIDKSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCTRFRGIHYAMDYWGQGTTVTV SS	19
VH2G3a	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTLTDYNMDWVRQ APGKGLEWVGDIYPNTGGTIYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCTRFRGIHYAMDYWGQGTTVTV SS	20
VL1G1a	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGLSFINW FQQKPGQAPRLLIYGTSNRGSGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYFCQQSNEVPYTFGGGTKVEIK	21
VL1G2a	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGLSFINW FQQKPGQPPRLLIYGTSNRGSGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYFCQQSNEVPYTFGGGTKVEIK	22
VL1G3a	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGLSFLAW FQQKPGQAPRLLIYGTSNRGSGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYFCQQSNEVPYTFGGGTKVEIK	23
VL2G1a	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDNYGLSFINW FQQKPGKAPKLLIYGTSNRGSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYFCQQSNEVPYTFGGGTKVEIK	24
VL2G2a	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDNYGLSFINW FQQKPGQPPKLLIYGTSNRGSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFAMYFCQQSNEVPYTFGGGTKVEIK	25
VL2G3a	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESIDNYGLSFLNW FQQKPGKAPKLLIYGTSNRGSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYFCQQSNEVPYTFGGGTKVEIK	26

【0313】

1.10.3 新人類化抗FAP Fab

基於VH及VL之新的人類化變異體，表現新的抗FAP Fab。

表11：表現為Fab之VH/VL組合之命名法

	VL1G1a	VL1G2a	VL1G3a	VL2G1a	VL2G2a	VL2G3a
VH1G1a	P1AE1689					
VH1G2a	P1AE1690	P1AE1693				
VH1G3a						
VH2G1a						
VH2G2a					P1AE1702	
VH2G3a						

【0314】 相較於抗FAP抗體4B9，分析基於殖株212之新人類化抗FAP變異體之親和力。此外，計算人類化變異體之人類化，且量測其聚集起始溫度。

表12：如藉由Biacore所量測之殖株212之人類化變異體的親和力

樣本ID	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (pM)	T 1/2 (min)	與hu V生殖系之一致性	T_{agg} [℃]
P1AE1689 _Fab	4.43E+05	4.21E-05	95	274	83/84.7	72.7
P1AE1690 _Fab	5.51E+05	6.30E-05	114	183	83/81.7	75.4
P1AE1693 _Fab	5.30E+05	7.18E-05	135	161	81.9/81.7	75.4
P1AE1702 _Fab	5.02E+05	1.07E-04	213	108	77.8/76.5	71.6
4B9_Fab	7.47E+05	2.08E-04	279	55		60

【0315】

1.11 FcRn/肝素結合及電腦模擬電荷分佈

在電腦模擬模型中計算抗體4B9及P1AE1689於PBS (pH 7.4)中之電荷分佈。根據該模型，4B9具有有時與增加之肝素結合相關之大陽性斑塊(patch)。另一方面，P1AE1689展示可指示弱肝素相互作用之大負電荷斑塊。

【0316】 此等預測係藉由使用FcRn親和力管柱及pH梯度以及肝素親和力管柱及pH梯度對兩種抗體進行層析來確認。WO 2015/140126揭示一種基於在FcRn親和層析管柱上所測定之滯留時間預測抗體之活體內半衰期的方法，而肝素結合與細胞表面結構之非特異性相互作用相關。

【0317】

實例2

抗CD40抗體S2C6之人類化變異體之產生及製造

2.1 抗CD40抗體S2C6之人類化變異體之產生

【0318】

2.2.1 方法

為了鑑別抗CD40結合子S2C6在人類化期間之適合人類接受體構架，使用兩種方法之組合。一方面，藉由搜尋具有高序列同源性之接受體構架、CDR在此構架上之移植及評估可設想哪些回復突變來進行經典方法。更明確而言，判斷所鑑別之構架與親本抗體之各胺基酸差異對結合子之結構完整性之影響，且在適當時引入對親本序列之回復突變。結構評定係基於親本抗體及其人類化版本兩者之Fv區同源性模型，其利用使用4.5版Biovia Discovery Studio Environment實施之內部抗體結構同源性建模工具形成。

【0319】 另一方面，內部研發之電腦模擬工具用於預測人類化版本之VH及VL域對彼此之取向(參見WO 2016062734，其以引用之方式併入本文中)。將結果與親本結合子之經預測VH-VL域取向比較，以選擇幾何形狀上與起始抗體接近之構架組合。基本原理為偵測VH-VL界面區中可能的胺基酸交換，其可能導致兩個域之配對的分裂性變化。

2.2.2 接受體構架及其適應性之選擇

【0320】 如下**表16**及**表18**中所描述選擇兩個不同接受體構架。

表13：接受體構架1：「IGHV1-IGKV2D」

	鼠類V區生殖系	人類接受體V區生殖系之選擇	移植之後與人類V區生殖系之一致性(BLASTp)：
S2C6 VH	IGHV1-26*01	IGHV1-2*05	91.8 %
S2C6 VL	IGKV1-110*01	IGKV2D-29*02	88.0 %

【0321】 後CDR3構架區係自人類IGHJ生殖系IGHJ6*01/02(YYYYYGMDV**WGQGTTVTVSS**)及人類IGKJ生殖系IGKJ4*01/02(LT**FGGGTKVEIK**)調適。與接受體構架相關之部分係以粗體字表示。

【0322】 基於結構考量，在以下各處引入自人類接受體構架至親本

結合子中之胺基酸的回復突變：VH區之位置H43 (Q>K)、H44 (G>S)、H69 (M>L)、H71 (R>V)、H73 (T>K)、H88 (V>A)及H105 (Q>H) 及VL區之位置L2 (I>V)、L4 (M>V)、L87 (Y>F)及L104 (V>L)。在一個變異體中，包括突變T70S (VH)以研究略微更具親水性之殘基在此位置之作用。

【0323】 所有變異體包括N54A突變(VH)以解決推定之可發展性熱點(天冬醯胺去醯胺化)。所有位置均在Kabat EU編號方案中給出。

【0324】 在下**表14**中展示人類化變異型VH-VL配對基質：

		VL1a	VL1b	VL1c	VL1d
		bY87F	bM4V, bY87F	bI2V, bM4V, bY83F	bI2V, bM4V, bY783F, bV104L
VH1a	bG44S, bM69L, bR71V, bT73K, bV88A	x	x	x	x
VH1b	bQ43K, bG44S, bM69L, bR71V, bT73K, bV88A	x	x	x	x
VH1c	bG44S, bM69L, bR71V, bT73K, bV88A, bQ105H	x	x	x	x
VH1d	bG44S, bM69L, bR71V, bT73K, bV88A, xT70S	x	x	x	x

【0325】 突變N54A適用於所有VH變異體且未明確提及。回復突變以**b**為前綴，前向突變以**f**為前綴，且其他突變以**x**為前綴

表15：接受體構架2：「IGHV3-IGKV1」

	鼠類V區生殖系	人類接受體V區生殖系之選擇	移植之後與人類V區生殖系之一致性(BLASTp)：
S2C6 VH	IGHV1-26*01	IGHV3-23*02	79.6%
S2C6 VL	IGKV1-110*01	IGKV1-39*01	79.0%

【0326】 後CDR3構架區係自人類IGHJ生殖系IGHJ6*01/02 (YYYYYGMDV**WGQGTTVTVSS**)及人類IGKJ生殖系IGKJ4*01/02 (LT**FGGGTKVEIK**)調適。與接受體構架相關之部分係以粗體字表示。

【0327】 基於結構性考量，在以下各處引入自人類接受體構架至親本結合子中之胺基酸的回復突變：VH區之位置H44 (G>S)、H49 (S>G)、H71 (R>V)、H78 (L>A)、H94 (K>R)及H105 (Q>H)及VL區之位置L42 (K>Q)、L43 (A>S)及L87 (Y>F)。此外，CDRH2中之四個位置經鑑別為用於前向突變之有前景的候選，亦即，自親本結合子與人類接受體生殖系之胺基酸交換以便增加總體人類特徵，即H60 (N>G)、H61 (Q>D)、H62 (K>S)及H63 (F>V)。

【0328】 所有變異體包括N54A突變(VH)以解決推定之可發展性熱點(天冬醯胺去醯胺化)。所有位置均在Kabat EU編號方案中給出。

【0329】 在下**表16**中展示人類化變異型VH-VL配對基質：

		VL2a	VL2b
		bY87F	**bK42Q, bA43S, bY87F**
VH2a	bS49G, bR71V, bL78A, bK94R	x	x
VH2b	bG44S, bS49G, bR71V, bL78A, bK94R	x	x
VH2c	bS49G, bR71V, bL78A, bK94R, bQ105H	x	x
VH2d	bS49G, fN60G, fQ61D, fK62S, fF63V, bR71V, bL78A, bK94R	x	x

回復突變以**b**為前綴，前向突變以**f**為前綴。

【0330】

2.2.3 所得人類化CD40抗體之VH及VL域

基於接受體構架1之人類化CD40抗體之所得VH及VL域可見於下表17中，且基於接受體構架2之人類化CD40抗體之所得VH及VL域列於下表18中。

表17：基於接受體構架1之人類化CD40抗體之VH及VL域的胺基酸序列

描述	序列	Seq ID No
VH1a	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHWVRQA PGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAY MELSRLRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS	37
VH1b	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHWVRQA PGKSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAY MELSRLRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS	38
VH1c	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHWVRQA PGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAY MELSRLRSDDTAVYYCAREGIYWWGHGTTVTVSS	39
VH1d	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHWVRQA PGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLSVDKSISTAY MELSRLRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS	40
VL1a	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHSNGNTFLHW YLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYFCSQTTHVPWTFGGGTKVEIK	41
VL1b	DIVVTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHSNGNTFLHW YLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYFCSQTTHVPWTFGGGTKVEIK	42
VL1c	DVVVTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHSNGNTFLHW YLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYFCSQTTHVPWTFGGGTKVEIK	43
VL1d	DVVVTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHSNGNTFLHW YLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYFCSQTTHVPWTFGGGTKLEIK	44

表18：基於接受體構架2之人類化CD40抗體之VH及VL域的胺基酸序列

描述	序列	Seq ID No
VH2a	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYYIHWVRQA PGKGLEWVGRVIPNAGGTSYNQKFKGRFTISVDNSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS	45
VH2b	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYYIHWVRQA PGKSLEWVGRVIPNAGGTSYNQKFKGRFTISVDNSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS	46
VH2c	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYYIHWVRQA PGKGLEWVGRVIPNAGGTSYNQKFKGRFTISVDNSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCAREGIYWWGHGTTVTVSS	47
VH2d	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYYIHWVRQA PGKGLEWVGRVIPNAGGTSYGDSVKGRFTISVDNSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS	48
VH2ab	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYYMHWVRQA	49

	PGKGLEWVGRVIPNAGGTSYNQKFKGRFTISVDNSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS	
VH2ac	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYYIHWVRQA PGKGLEWVGRVIPNAGGTSYNQKVKGRFTISVDNSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS	50
VL2a	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGNTFLHW YQQKPGKAPKLLIYTVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYFCSQTTHVPWTFGGGTKVEIK	51
VL2b	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGNTFLHW YQQKPGQSPKLLIYTVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYFCSQTTHVPWTFGGGTKVEIK	52
VL2ab	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSLVHSNGNTFLHW YQQKPGKAPKLLIYTVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYFCSQTTHVPWTFGGGTKVEIK	53
VL2ac	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIVHSNGNTFLHW YQQKPGKAPKLLIYTVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYFCSQTTHVPWTFGGGTKVEIK	54

【0331】

2.2.4 呈huIgG1_LALA_PG型式之新人類化CD40抗體

基於VH及VL之新人類化變異體，新CD40抗體以具有效應沉默Fc (P329G ； L234 、 L235A) 之 huIgG1 抗體形式表現，以根據WO 2012/130831 A1中所描述之方法取消與Fcγ受體之結合。

表19：表現為huIgG1_LALA_PG抗體之VH/VL組合之命名法

	VL1a	VL1b	VL1c	VL1d	VL2a	VL2b	VL2ab	VL2ac
VH1a	P1AE0817	P1AE1001	P1AE0993	P1AE0996				
VH1b	P1AE1002	P1AE1003	P1AE1004	P1AE1005				
VH1c	P1AE0997	P1AE1006	P1AE0818	P1AE0998				
VH1d	P1AE0999	P1AE1007	P1AE1000	P1AE0819				
VH2a					P1AE0400	P1AE0404		
VH2b					P1AE0401	P1AE0405		
VH2c					P1AE0402	P1AE0406		

VH2d					P1AE0403	P1AE0407		
VH2ab							P1AE1125	P1AE1126
VH2ac							P1AE1134	P1AE1135

【0332】 人類化CD40抗體作為人類IgG1_LALAPG抗體之例示性全長序列可見於表20中。

表20：人類化CD40 IgG1_LALAPG抗體之胺基酸序列

抗體	序列	Seq ID No
P1AE0400重鏈	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYYIHWVRQAP GKGLEWVGRVIPNAGGTSYNQKFKGRFTISVDNSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	55
P1AE0400輕鏈	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGNTFLHWY QQKPGKAPKLLIYTVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYFCSQTTHVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	56
P1AE0403重鏈	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYYIHWVRQAP GKGLEWVGRVIPNAGGTSYGDSVKGRFTISVDNSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	60
P1AE0403輕鏈	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGNTFLHWY QQKPGKAPKLLIYTVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYFCSQTTHVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF	61

抗體	序列	Seq ID No
	PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	
P1AE0817 重鏈	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHWVRQAP GQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAYME LSRLRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	62
P1AE0817 輕鏈	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHSNGNTFLHWY LQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYFCSQTTHVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	63

【0333】

2.2.5 呈huIgG1_LALA_PG型式之新人類化CD40抗體之製造

藉由用編碼不同肽鏈之表現載體短暫轉染懸浮生長之HEK293-F細胞來表現抗體。在無血清FreeStyle 293表現培養基(Invitrogen)中，根據細胞供應商說明書，使用Maxiprep (Qiagen, Germany)抗體載體製劑、F17基礎培養基(Invitrogen, USA)、PEIpro (Polyscience Europe GmbH)及1至2百萬活細胞/ml的初始細胞密度來進行轉染成HEK293-F細胞(Invitrogen, USA)。在藉由於14000 g下離心30分鐘而在搖瓶或攪拌醱酵槽中培養7天之後採集細胞培養上清液，且經由0.22 μm過濾器過濾。

【0334】藉由親和層析，使用MabSelectSure-Sepharose™ (GE Healthcare, Sweden)層析自細胞培養上清液純化抗體。簡言之，在經PBS緩衝液(10 mM Na_2HPO_4、1 mM KH_2PO_4、137 mM NaCl及2.7 mM

KCl，pH 7.4)平衡的MabSelect SuRe樹脂上捕捉無菌過濾的細胞培養上清液，用平衡緩衝液洗滌且用25 mM檸檬酸鹽(pH 3.0)溶離，隨後用1 M Tris (pH 9.0)中和。取決於在蛋白質A純化後得到的產品品質，包括使用丁基瓊脂糖凝膠4FF (GE Healthcare, Sweden)樹脂之疏水相互作用層析(HIC)純化步驟。在HIC純化之前，相對於HIC平衡緩衝液透析蛋白質。使用40 mM乙酸鹽、1.5 M硫酸銨(pH 5.5)作為平衡/洗滌緩衝液及40 mM乙酸鹽(pH 5.5)作為溶離緩衝液進行HIC純化且應用線性梯度進行純化。隨後，在20 mM組胺酸、140 mM NaCl (pH 6.0)中藉由尺寸排阻層析(Superdex 200, GE Healthcare)自單體抗體物質分離聚集之蛋白質。合併單體蛋白質溶離份，必要時使用例如MILLIPORE Amicon Ultra (30KD MWCO)離心濃縮器濃縮且儲存在-80℃下。使用樣本等分試樣以供例如藉由CE-SDS、尺寸排阻層析法、質譜分析及內毒素測定進行後續分析表徵。

【0335】 不同人類化CD40抗體之製造產量在表21中展示為效價值，該等效價值係使用MabSelectSure-Sepharose™層析自製備型親和層析之後的產量計算。

【0336】 藉由CE-SDS分析，在還原劑存在及不存在下分析分子在最終純化步驟之後的純度及分子量。根據製造商說明書使用測徑規LabChip GXII系統(Caliper lifescience)。

【0337】 在25℃下，在25 mM磷酸鉀、125 mM氯化鈉、200 mM L-精胺酸單鹽酸鹽、0.02% (w/v) NaN_3、pH 6.7操作緩衝液中使用TSKgel G3000 SW XL分析型尺寸排阻管柱(Tosoh)分析分子聚集物含量。

【0338】 為了直接比較全部抗體，藉由靜態光散射(SLS)且藉由量測回應於施加之溫度應力的內源蛋白質螢光來監測熱穩定性。將蛋白質濃度為1 mg/ml之30 μg經過濾蛋白質樣本一式兩份地施加至Optim 2儀器(Avacta Analytical Ltd)。溫度以0.1℃/min自25℃勻速升至85℃，收集半徑及總散射強度。在測定內源蛋白質螢光時，樣本在266 nm下激發且收集275 nm與460 nm之間的發射。對於所有抗體，聚集溫度(Tagg)在64℃與69℃之間且提供於下表21或表22中。

【0339】 具有不同構架之人類化CD40抗體之製造產量展示於下表21或表22中。

表21：基於接受體構架2之人類化CD40抗體之製造效價、人性化及聚集溫度

抗體	VH /VL	效價[μg/ml]	人性化(以%為單位之VH/VL)	T_{agg}
P1AD4470	對照	140	77.6 / 78	68
P1AE0400	VL2a/VH2a	219	77.6 / 78	69
P1AE0401	VL2a/VH2b	162	76.5 / 78	69
P1AE0402	VL2a/VH2c	196	77.6 / 78	69
P1AE0403	VL2a/VH2d	137	80.6 / 78	67
P1AE0404	VL2b/VH2a	165	77.6 / 76	69
P1AE0405	VL2b/VH2b	128	76.5 / 76	69
P1AE0406	VL2b/VH2c	154	77.6 / 76	69
P1AE0407	VL2b/VH2d	102	80.6 / 76	67

表22：基於接受體構架1之人類化CD40抗體之製造效價、人性化及聚集溫度

抗體	VH /VL	效價[μg/ml]	人性化(以%為單位之VH/VL)	T_{agg}
P1AE0816	對照	8.5	84.7 / 84	64
P1AE0817	VH1a/VL1a	62	86.7 / 87	67
P1AE0818	VH1c/VL1c	47	86.7 / 85	66
P1AE0819	VH1d/VL1d	90	85.7 / 85	67
P1AE0993	VH1a/VL1c	34	86.7 / 85	67
P1AE0996	VH1a/VL1d	16	86.7 / 85	67
P1AE0997	VH1c/VL1a	44	86.7 / 87	66
P1AE0998	VH1c/VL1d	24	86.7 / 85	66
P1AE0999	VH1d/VL1a	34	85.7 / 87	67
P1AE1000	VH1d/VL1c	16	85.7 / 85	66
P1AE1001	VH1a/VL1b	34	86.7 / 86	65
P1AE1002	VH1b/VL1a	46	85.7 / 87	67
P1AE1003	VH1b/VL1b	49	85.7 / 86	66
P1AE1004	VH1b/VL1c	60	85.7 / 85	67
P1AE1005	VH1b/VL1d	7	85.7 / 85	65
P1AE1006	VH1c/VL1b	24	86.7 / 86	65
P1AE1007	VH1d/VL1b	34	85.7 / 86	67

2.2.6 重組型人類及食蟹獼猴CD40細胞外域蛋白質之產生

【0340】以下構築體經選殖且藉由HEK293細胞中之短暫表現來表現：

1)具有C端His-AviTag™標記(SEQ ID NO:266)之人類CD40細胞外域(SEQ ID NO:1之胺基酸21-193，NCBI寄存編號NP_001241)

2)具有C端His-AviTag™標記(SEQ ID NO:267)之食蟹獼猴(長尾獼猴(macaca fascicularis)) CD40細胞外域(胺基酸21-193，即食蟹獼猴CD40細胞外域序列，係獲自Roche食蟹獼猴cDNA資料庫，未公開資料)

【0341】藉由基因合成(Eurofins Genomics GmbH service,

Germany)產生用於結合分析之CD40細胞外域抗原，使用標準選殖程序經由獨特限制位點選殖至羅氏內部表現載體中。藉由定序檢驗所有構築體之選殖。所有抗原均在CMV啟動子之控制下表現。為了短暫表現CD40細胞外域構築體，懸浮調適之HEK293-F細胞(Life Technologies, USA)經各別質體轉染。一般而言，根據製造商說明書，將約2×10^6個細胞/ml之1L HEK293-F細胞經藉由PEIpro轉染試劑(Polysciences Europe GmbH, Germany)複合之總計500 μg質體DNA轉染。在轉染之後，培育HEK293-F細胞6天。隨後藉由離心收集細胞且使用0.22 μm真空過濾系統(Millipore)過濾含蛋白質上清液。藉由IMAC親和層析，使用完整-His標記樹脂(Roche Diagnostics)純化His-AviTag™標記之蛋白質。在用50 mM Na_2PO_4、300 mM NaCl (pH 8.0)洗滌之後，使用補充有500 mM咪唑(pH 7.0)之洗滌緩衝液溶離His- AviTag™融合蛋白。在20 mM Tris、150 mM NaCl pH 7.4中藉由尺寸排阻層析(Superdex 75, GE Healthcare)自單體融合蛋白分離聚集之蛋白質。合併單體蛋白質溶離份，必要時使用例如MILLIPORE Amicon Ultra (10KD MWCO)離心濃縮器濃縮且儲存在-80℃下。使用樣本等分試樣以供例如藉由CE-SDS、尺寸排阻層析法及質譜分析進行後續分析表徵。

【0342】

CD40細胞外域之生物素標記：

根據製造商說明書，藉由使用BirA生物素蛋白連接酶套組(Avidity LLC, USA)進行含有C端AviTag™之人類或食蟹獼猴CD40細胞外域構築體的酶促位點特異性生物素標記。簡言之，將1/10體積之BiomixA (10×濃度：0.5M二甘胺酸緩衝液，pH 8.3)及BiomixB (10×濃度：100mM

ATP、100mM MgOAc、500μM d-生物素)添加至含有AviTag™之蛋白質中，隨後每10 nmol蛋白質添加2.5 μg BirA接合酶。反應混合物在30℃下培育1h且藉由尺寸排阻層析法在Superdex75製備級預填充HiLoad管柱(GE Healthcare, Sweden)上純化。

【0343】

2.2.7 人類/食蟹獼猴CD40結合表面電漿子共振光譜分析

藉由使用GE Healthcare所供應之胺偶合套組在pH 5.0下於CM5晶片(GE Healthcare BR-1005-30)上偶合捕捉系統(10 μg/ml山抗人$F(ab)'_2$；命令碼：28958325；GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden)之約12000個共振單位(RU)。該樣本及系統緩衝液為PBS-T (10 mM磷酸鹽緩衝鹽水，包括0.05% Tween20) pH 7.4。將流槽設定為25℃，且將樣本區塊設定為12℃，且用操作緩衝液預塗佈兩次。藉由以5 μl/min之流量注射50 nM溶液30秒來捕捉抗體。藉由呈1:3稀釋之300 nM為起始物質，以30 μl/min之流量在溶液中注射各種濃度之人類CD40細胞外域或食蟹獼猴CD40細胞外域持續300秒來量測締合。解離階段經監測長達1200秒且藉由自樣本溶液轉換為操作緩衝劑來觸發。以30 μl/min之流動速率，用甘胺酸pH 2.1溶液洗滌60秒使表面再生。藉由減去自羊抗人$F(ab')_2$表面獲得之反應來校正整體折射率差異。亦減去空白注射(=二次參考)。為計算表觀K_D及其他動力學參數，使用朗格繆爾1:1模型。使用BiacoreTM B4000評估軟體(版本1.1)計算表觀Kd。

【0344】

2.2.8 用於表徵CD40特異性人類化抗體之細胞結合分析

使用胰蛋白酶自培養瓶分離CD40陽性細胞(Raji細胞)且使用Casy細

胞計數器計數。在4℃下粒化之後，使細胞再懸浮於FACS緩衝液(含2.5% FCS之PBS)中，調節至2.0E+06個細胞/mL，且分配至96孔PP V形底盤(25 µL/孔 = 5.0E+04Zellen/孔)。

【0345】 在FACS緩衝液中將CD40特異性抗體調節至20 µg/mL，產生10 µg/mL之最終濃度。將20µl添加至25µl細胞懸浮液中且在4℃下培育1h。隨後在FACS緩衝液中洗滌細胞兩次。在洗滌之後，使細胞再懸浮於50 µL含有二級抗體(<huIgG>-Alexa488, c=10 µg/mL)之FACS緩衝液中且在4℃下培育1h。接著將細胞在FACS緩衝液中洗滌兩次且再懸浮於70 µl/孔FACS緩衝液中以使用FACS Canto (BD, Pharmingen)進行量測。

【0346】 在表23中，展示人類化CD40抗體之親和力(藉由Biacore量測)及與CD40表現細胞(Raji細胞)之細胞結合。

表23：人類化CD40抗體對CD40表現細胞的親和力及細胞結合

ID	VH /VL	親和力 [nM]	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	EC_{50} [µg/ml]細胞結合(Raji)
P1AD4470	對照	4.6	1.69E+06	7.81E-03	0.09
P1AE0400	VL2a/VH2a	4.2	1.68E+06	6.99E-03	0.12
P1AE0401	VL2a/VH2b	4.6	1.69E+06	7.87E-03	0.13
P1AE0402	VL2a/VH2c	4.2	1.67E+06	7.09E-03	0.13
P1AE0403	VL2a/VH2d	29	1.40E+06	4.07E-02	0.12
P1AE0404	VL2b/VH2a	4.2	1.63E+06	6.93E-03	0.11
P1AE0405	VL2b/VH2b	5.1	1.61E+06	8.14E-03	0.09
P1AE0406	VL2b/VH2c	4.2	1.67E+06	7.09E-03	0.09
P1AE0407	VL2b/VH2d	30	1.19E+06	3.55E-02	0.12
P1AE0816	對照	8.7	2.53E+06	2.19E-02	0.09
P1AE0817	VH1a/VL1a	2.5	2.40E+06	5.93E-03	0.09
P1AE0818	VH1c/VL1c	3.2	2.63E+06	8.47E-03	0.14
P1AE0819	VH1d/VL1d	3.4	2.59E+06	8.77E-03	0.11
P1AE0993	VH1a/VL1c	3.4	2.68E+06	8.98E-03	0.13
P1AE0996	VH1a/VL1d	3.5	2.59E+06	9.08E-03	0.12
P1AE0997	VH1c/VL1a	2.3	2.59E+06	6.03E-03	0.12
P1AE0998	VH1c/VL1d	3.3	2.70E+06	8.96E-03	0.12
P1AE0999	VH1d/VL1a	2.4	2.45E+06	5.92E-03	0.15

ID	VH /VL	親和力 [nM]	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	EC_{50} [μg/ml]細胞結合(Raji)
P1AE1000	VH1d/VL1c	3.2	2.68E+06	8.62E-03	0.14
P1AE1001	VH1a/VL1b	2.7	2.56E+06	6.81E-03	0.08
P1AE1002	VH1b/VL1a	2.2	2.54E+06	5.57E-03	0.13
P1AE1003	VH1b/VL1b	2.5	2.46E+06	6.06E-03	0.13
P1AE1004	VH1b/VL1c	3	2.63E+06	7.95E-03	0.14
P1AE1005	VH1b/VL1d	3.2	2.58E+06	8.16E-03	0.11
P1AE1006	VH1c/VL1b	2.6	2.53E+06	6.51E-03	0.14
P1AE1007	VH1d/VL1b	2.7	2.50E+06	6.62E-03	0.12

【0347】

2.2.9 藉由UHR-ESI-QTOF質譜分析表徵抗體

藉由HPLC在葡聚糖凝膠G25 5×250 mm管柱(Amersham Biosciences, Freiburg, Germany)上使用40%乙腈以及2%甲酸(v/v)將樣本去鹽。藉由在配備有TriVersa NanoMate來源(Advion, Ithaca, NY)之maXis 4G UHR-QTOF MS系統(Bruker Daltonik, Bremen, Germany)上之UHR-ESI-QTOF MS測定總質量。以900至4000 m/z (ISCID：0.0 eV)進行資料獲取。使用內部開發之軟體工具評估原始質譜且將其轉化成個別相對莫耳質量。

【0348】

2.2.10 抗體之熱穩定性評估

在20 mM組胺酸/組胺酸氯、140 mM NaCl (pH 6.0)中製備濃度為1 mg/mL之樣本，經由0.4 μm過濾盤藉由離心轉移至光學384孔培養盤中且用石蠟油覆蓋。藉由動態光散射在DynaPro盤式讀取器(Wyatt)上重複量測流體動力學半徑，同時以0.05℃/min之速率將樣本自25℃加熱至80℃。或者，將樣本轉移至10 μL微光析槽陣列中，且用Optim1000儀器(Avacta Inc.)記錄靜態光散射資料以及在266 nm雷射下激發後之螢光資料，同時以0.1℃/min之速率將樣本自25℃加熱至90℃。聚集起始溫度經定義為流

體動力學半徑(DLS)或散射光強度(Optim1000)開始增加之溫度。解鏈溫度經定義為展示螢光強度對波長之圖中的拐點。

【0349】

實例3

產生及製造具有新抗FAP殖株212及其人類化變異體之雙特異性構築體

【0350】

3.1 靶向纖維母細胞活化蛋白(FAP)及CD40之雙特異性抗原結合分子之產生

雙特異性CD40-FAP抗體係以由兩個CD40結合部分與一個FAP結合部分在Fc之C端處組合組成之2+1型式(**圖1A至圖1c**)或以由四個CD40結合部分與一個FAP結合部分在Fc之C端處組合組成之4+1型式(**圖1D至圖1F**)製備。雙特異性CD40-FAP抗體包括新的抗FAP殖株212 (圖1A及圖1D)，然而為了比較而製備具有FAP殖株4B9 (圖1B及圖1E)及28H1 (圖1C及圖1F)的對應分子。FAP結合子28H1及4B9之產生及製備已描述於WO 2012/020006 A2中，其以引用之方式併入本文中。為產生4+1及2+1分子，使用杵-臼技術達成雜二聚化。S354C/T366W突變經引入第一重鏈HC1 (Fc杵重鏈)中且Y349C/T366S/L368A/Y407V突變經引入第二重鏈HC2 (Fc臼重鏈)中。獨立於雙特異性形式，在所有情況下，根據WO 2012/130831 A1中所描述之方法，使用效應沉默Fc (P329G；L234、234A)取消與Fcγ受體之結合。雙特異性分子之序列展示於**表24**中。

【0351】 所有基因在嵌合MPSV啟動子控制下短暫表現，該啟動子由MPSV核心啟動子與CMV啟動子強化子片段之組合組成。表現卡匣亦在cDNA之3'端處含有合成polyA信號。表現載體亦含有針對含有EBNA

(埃-巴二氏病毒核抗原)之宿主細胞中游離型複製之oriP區。

表24：雙特異性抗原結合分子之胺基酸序列

構築體	序列	Seq ID No
P1AE2423 CD40 (P1AE0817) × FAP (P1AE1689) (2+1) C端交叉單抗融合		
(P1AE1689)輕鏈交叉VH-Cκ	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTDYNMDWVR QAPGQGLEWIGDIYPNTGGTIYNQKFKGRVTMTIDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCTRFRGIHYAMDYWGQGTT VTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	61
VL1a (CD40)輕鏈(帶電)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHSNGNTFL HWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYFCSQTTHVPWTFGGGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	62
VH1a (CD40) (VHCH1帶電) Fc杵_PGLALA_(P1AE1689) (VL-CH1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHWVR QAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSI STAYMELSRLRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDN YGLSFINWFQQKPGQAPRLLIYGTSNRGSGIPARFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYFCQQSNEVPYTFGGGTK VEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	63
VH1a (CD40) (VHCH1帶電) Fc臼_PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHWVR QAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSI STAYMELSRLRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE	64

構築體	序列	Seq ID No
	DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
P1AE2734 CD40 (P1AE0817) × FAP (P1AE1689) (2+1) +不同C端交叉互抗融合		
(P1AE1689)輕鏈交叉VL-CH1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGLSFIN WFQQKPGQAPRLLIYGTSNRGSGIPARFSGSGSGTDFT LTISSLEPEDFAVYFCQQSNEVPYTFGGGTKVEIKSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	65
VL1a (CD40)輕鏈	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHSNGNTFL HWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYFCSQTTHVPWTFGGGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	66
VH1a (CD40) (VHCH1) Fc杵_PGLALA_(P1AE1689) (VH-Cκ)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHWVR QAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSI STAYMELSRLRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTD YNMDWVRQAPGQGLEWIGDIYPNTGGTIYNQKFKGRVT MTIDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRFRGIHYAMD YWGQGTTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC	67
VH1a (CD40) (VHCH1) Fc臼_PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHWVR QAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSI STAYMELSRLRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL	68

構築體	序列	Seq ID No
	GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
P1AE2424 CD40 (P1AE0817) × FAP (P1AE1689) (4+1) + C端交叉單抗融合		
(P1AE1689)輕鏈交叉VH-Cκ	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTDYNMDWVR QAPGQGLEWIGDIYPNTGGTIYNQKFKGRVTMTIDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCTRFRGIHYAMDYWGQGTT VTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	61
VL1a (CD40)輕鏈(帶電)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHSNGNTFL HWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYFCSQTTHVPWTFGGGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	62
VH1a (CD40) (VHCH1帶電_VH1a (CD40) (VHCH1帶電)-Fc杵_PGLALA_(P1AE1689) (VL-CH1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHWVR QAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSI STAYMELSRLRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGS QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHWVR QAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSI STAYMELSRLRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDN YGLSFINWFQQKPGQAPRLLIYGTSNRGSGIPARFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYFCQQSNEVPYTFGGGTK VEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY	69

構築體	序列	Seq ID No
	FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	
VH1a (CD40) (VHCH1帶電)_VH1a (CD40) (VHCH1帶電)-Fc臼_PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHWVR QAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSI STAYMELSRLRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGS QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHWVR QAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSI STAYMELSRLRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	70
P1AE2487 CD40 (P1AE0817) × FAP (4B9) (2+1) C端交叉單抗融合		
4B9輕鏈交叉 VL-CH1	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQ QKPGQAPRLLINVGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIKSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	71
VL1a (CD40)輕鏈	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHSNGNTFL HWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYFCSQTTHVPWTFGGGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	66
VH1a (CD40) (VHCH1) Fc杵_PGLALA_4B9 (VH-Cκ)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHWVR QAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSI STAYMELSRLRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE	72

構築體	序列	Seq ID No
	PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYW GQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	
VH1a (CD40) (VHCH1) Fc臼_PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHWVR QAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSI STAYMELSRLRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	68
P1AE2895 CD40 (P1AE0817) × FAP (4B9) (4+1) C端交叉單抗融合		
4B9輕鏈交叉 VL-CH1	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQ QKPGQAPRLLINVGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIKSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	71
VL1a (CD40)輕鏈	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHSNGNTFL HWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYFCSQTTHVPWTFGGGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	66
VH1a (CD40) (VHCH1) _VH1a (CD40) (VHCH1)-Fc杵_PGLALA_(4B9) (VH-Cκ)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHWVR QAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSI STAYMELSRLRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGS QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHWVR	73

構築體	序列	Seq ID No
	QAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSI STAYMELSRLRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYW GQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	
VH1a (CD40) (VHCH1)_VH1a (CD40) (VHCH1)-Fc臼 _PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHWVR QAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSI STAYMELSRLRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGS QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHWVR QAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSI STAYMELSRLRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	74
P1AE2302 CD40 (P1AE0817) × FAP (28H1) (2+1) C端交叉單抗融合		
28H1輕鏈交叉 VH-Cκ	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVR QAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFDYWGQGTLVTV SSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL	75

構築體	序列	Seq ID No
	SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
VL1a (CD40)輕鏈(帶電)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHSNGNTFL HWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYFCSQTTHVPWTFGGGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	62
VH1a (CD40) (VHCH1帶電) Fc杵 _PGLALA_28H1 (VL-CH1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHWVR QAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSI STAYMELSRLRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSR SYLAWYQQKPGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPTFGQGTKVEI KSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	76
VH1a (CD40) (VHCH1帶電) Fc臼_PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHWVR QAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSI STAYMELSRLRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	64
P1AE2024 CD40 (P1AE0817) × FAP (28H1) (4+1) C端交叉單抗融合		
28H1輕鏈交叉 VH-Cκ	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVR QAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFDYWGQGTLVTV SSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE	75

構築體	序列	Seq ID No
	AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
VL1a (CD40)輕鏈(帶電)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHSNGNTFL HWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYFCSQTTHVPWTFGGGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	62
VH1a (CD40)(VHCH1帶電)_VH1a (CD40)(VHCH1帶電)Fc杵_PGLALA_28H1 (VL-CH1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHWVR QAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSI STAYMELSRLRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGS QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHWVR QAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSI STAYMELSRLRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSR SYLAWYQQKPGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPTFGQGTKVEI KSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	77
VH1a (CD40)(VHCH1帶電)_VH1a (CD40)(VHCH1帶電)-Fc臼_PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHWVR QAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSI STAYMELSRLRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGS QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHWVR QAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSI STAYMELSRLRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL	70

構築體	序列	Seq ID No
	GTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
P1AF0873 CD40 (P1AE0817) × FAP (P1AE1689) (1+1) C端交叉單抗融合		
(P1AE1689)輕鏈交叉VH-Cκ	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTDYNMDWVR QAPGQGLEWIGDIYPNTGGTIYNQKFKGRVTMTIDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCTRFRGIHYAMDYWGQGTT VTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	61
VL1a (CD40)輕鏈(帶電)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHSNGNTFL HWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYFCSQTTHVPWTFGGGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	62
VH1a (CD40) (VHCH1帶電) Fc杵_PGLALA (P1AE1689) (VL-CH1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHWVR QAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSI STAYMELSRLRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDN YGLSFINWFQQKPGQAPRLLIYGTSNRGSGIPARFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYFCQQSNEVPYTFGGGTK VEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	63
Fc臼	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF	98

構築體	序列	Seq ID No
	YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
P1AA9663 CD40 (huCD40) × FAP (28H1) (2+2) C端交叉單抗融合		
28H1輕鏈交叉VH-Cκ	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVR QAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFDYWGQGTLVTV SSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	75
CD40輕鏈(帶電)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGNTFL HWYQQKPGKAPKLLIYTVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYFCSQTTHVPWTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	105
CD40 (VHCH1帶電) Fc PGLALA FAP (VL-CH1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYYIHWVR QAPGKGLEWVARVIPNAGGTSYNQKFKGRFTLSVDNSK NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGIYWWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSR SYLAWYQQKPGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPTFGQGTKVEI KSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	106

3.2 靶向FAP及CD40之雙特異性抗原結合分子之製造

【0352】 靶向纖維母細胞活化蛋白(FAP)及CD40之雙特異性抗原結合分子係藉由用編碼4種不同肽鏈之表現載體短暫轉染懸浮生長之HEK細胞來表現。在無血清FreeStyle 293表現培養基(Invitrogen)中，根據細胞供應商說明書，使用Maxiprep (Qiagen, Germany)抗體載體製劑、F17培

養基(Invitrogen, USA)、Peipro (Polyscience Europe GmbH)及1至2百萬活細胞/ml的初始細胞密度來進行轉染成HEK293-F細胞(Invitroge)。在藉由於14000 g下離心30分鐘而在搖瓶或攪拌醱酵槽中培養7天之後採集細胞培養上清液，且經由0.22 μm過濾器過濾。

【0353】 利用MabSelectSure-Sepharose™ (GE Healthcare, Sweden)層析，藉由蛋白A親和層析法而自細胞培養上清液中純化雙特異性抗體。簡言之，在經PBS緩衝液(10 mM Na_2HPO_4、1 mM KH_2PO_4、137 mM NaCl及2.7 mM KCl，pH 7.4)平衡的MabSelect SuRe樹脂上捕捉無菌過濾的細胞培養上清液，用平衡緩衝液洗滌且用25 mM檸檬酸鹽(pH 3.0)溶離。在用1 M Tris pH 9.0中和之後，在20 mM組胺酸、140 mM NaCl (pH 6.0)中藉由尺寸排阻層析(Superdex 200, GE Healthcare)將聚集之蛋白質自單體抗體物質分離。合併單體蛋白質溶離份，必要時使用例如MILLIPORE Amicon Ultra (30KD MWCO)離心濃縮器濃縮且儲存在-80℃下。使用樣本等分試樣以供例如藉由CE-SDS、尺寸排阻層析法、質譜分析及內毒素測定進行後續分析表徵。

表25：雙特異性CD40-FAP抗原結合分子之製造產量

樣本	來自0.9 L短暫HEK表現之ProtA之後的產量(以mg為單位)	ProtA之後根據SEC之單體%	ProtA之後藉由CE-SDS所得之產物峰值%	製備型HIC及製備型SEC後之產量[mg/L]	製備型HIC及製備型SEC後藉由SEC得到之單體%	製備型HIC及製備型SEC後藉由CE-SDS得到之產物峰值%
P1AE2423	16.5	92	>95	11.25	>95	>95
P1AE2424	10.4	93	>95	6.4	>95	>95
P1AE2734	25	89	18			
P1AE2487	14	93	82	4.8	>95	>95
P1AE2895	14.4	94	91	4.1	>95	>95
P1AE2302				12		
P1AE2024				6.6		

【0354】 P1A2734為一種雙特異性抗體，其中交叉單抗之VH-Cκ鏈融合至Fc域重鏈中之一者之C端。相較於雙特異性抗體P1AE2423，此雙特異性抗體更難以產生及純化，其中交叉單抗之VL-CH1鏈融合至Fc域重鏈之一者的C端。必須應用另外的純化步驟，亦即離子交換層析以及產生1 mg物質的額外CE-SDS。

【0355】

3.3 雙特異性抗huFAP抗體之結合動力學

為評估雙特異性FAP靶向抗體之人類FAP結合動力學，如實例1.7中所描述但使用HIS標記之人類FAP胞外域作為配位體來量測結合動力學。具有交叉單抗之不同融合之雙特異性2+1 CD40×FAP抗體的親和力數據展示於下表25A中。

表25A：如藉由SPR所量測的2+1 CD40×FAP雙特異性抗體對人類FAP之親和力

樣本ID	ka (1/Ms)	kd (1/s)	**KD [nM]**
P1AE2423 VL-CH1融合至Fc	3.4E+05	3.2E-05	9.4E-11
P1AE2734 VH-Cκ融合至Fc	2.5E+05	5.2E-05	2.1E-10

【0356】 雙特異性抗體作為C端Fab融合之FAP結合親和力在兩種交叉變異體之間的類似範圍內(藉由SPR量測)。

【0357】

實例4

靶向CD40及FAP之雙特異性構築體的表徵

【0358】

4.1 結合於表現人類FAP之鼠類纖維母細胞

使用表現人類纖維母細胞活化蛋白(huFAP)之NIH/3T3-hFAP殖株19測試與細胞表面FAP之結合。藉由用表現載體pETR4921轉染小鼠胚胎纖維母細胞NIH/3T3細胞株(ATCC CRL-1658)以在1.5 μg/mL嘌呤黴素選擇huFAP下表現來產生NIH/3T3-huFAP殖株19。

【0359】 使用補充有10%胎牛血清(FBS) (life technologies, 目錄號16140，批號1797306A)之1×達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM) (gibco, 目錄號42430-025)培養NIH/3T3-huFAP細胞。將1.5 μg/mL嘌呤黴素(gibco, 目錄號A11138-03)添加至用於選擇FAP表現細胞的培養基中。藉由使用無酶細胞解離緩衝液(gibco, 目錄號13151014)自培養燒瓶移除NIH/3T3-huFAP細胞。將0.3×10^5個NIH/3T3-hFAP殖株19細胞添加於具有10% FBS之200 μl 1×DMEM中，到達圓底96孔培養盤之各孔中(greiner bio-one, cellstar, 目錄號650185)。在1700 rpm下將培養盤離心5分鐘且拂去上清液。用200 μL 4℃低溫FACS緩衝液(eBioscience, 目錄號00-4222-26)洗滌細胞一次。將所有樣本以指定濃度範圍(一式兩份)再懸浮於50 μL/孔的含有雙特異性抗原結合分子(初級抗體)或同型對照抗體DP47之4℃低溫FACS緩衝液中且在4℃下培育120分鐘。然後用200 μL 4℃低溫FACS緩衝液洗滌細胞三次。將細胞用25 μL/孔的含有R-藻紅素(PE)結合之AffiniPure $F(ab')_2$片段羊抗人IgG、Fcγ片段特異性(Jackson ImmunoResearch, 目錄號109-116-098)二級抗體的4℃低溫二級抗體溶液(二級抗體之1:50稀釋)進一步染色且在4℃下在暗處培育60分鐘。將細胞用200 μl FACS緩衝液洗滌且再懸浮於85 μL/孔的含有0.2 μg/mL DAPI (Roche,目錄號10236276001)之FACS緩衝液中，且使用5-雷射LSR-Fortessa (具有DIVA軟體之BD

Bioscience)在同一天採集。使用FlowJo版本10軟體(FlowJo LLC)進行資料分析。

【0360】 如**圖4**中所示，對FAP為單價之雙特異性抗體結合於表現人類FAP之目標細胞。因此，經FAP靶向之抗CD40抗原結合分子展示直接腫瘤靶向特性。FAP構築體與C端FAP (212 (P1AE1689))或FAP (4B9)結合域的結合強於FAP構築體與C端FAP (28H1)結合域的結合，其藉由FAP (212)及FAP (4B9)結合子對人類FAP的結合親和力相較於FAP (28H1)結合子較高來解釋。觀測到2+1構築體與FAP (4B9)結合部分(P1AE2487)的最強FAP結合。未偵測到同型對照抗體DP47 (人類生殖系對照)與NIH/3T3-hFAP細胞之結合。如針對不同雙特異性抗體所量測之EC_{50}值展示於下表26中。

表26：呈不同雙特異性抗體型式之212(P1AE1689)、4B9及28H1的人類FAP結合表徵

分子		EC_{50} [nM]
P1AE2423	CD40 x FAP (212) 2+1交叉單抗	5.19
P1AE2487	CD40 x FAP (4B9) 2+1交叉單抗	3.70
P1AE2302	CD40 x FAP (28H1) 2+1交叉單抗	20.01
P1AE2424	CD40 x FAP (212) 4+1交叉單抗	7.52
P1AE2895	CD40 x FAP (4B9) 4+1交叉單抗	5.27
P1AE2024	CD40 x FAP (28H1) 4+1交叉單抗	38.67

【0361】

4.2 與表現人類CD40之初級B細胞之結合

使用自末梢血液單核細胞(PBMC)分離之人類初級B細胞來測試與細胞表面CD40之結合。為了分離PBMC，自Stiftung Zürcher Blutspendedienst SRK獲得白血球層。在相同體積之PBS (gibco, 目錄號10010023)中稀釋

50 mL白血球層。向50 mL聚丙烯離心管(TPP，目錄號91050)供應15 mL Lymphoprep™ (STEMCELL Technologies，目錄號07851)及25 mL白血球層/PBS溶液，每個試管小心層疊於Lymphorep™上方。在低加速度及無斷裂情況下，使試管於室溫在2000 rpm下離心24分鐘。然後，自界面收集PBMC，用PBS洗滌三次，再懸浮於10 mL PBS中且用Beckman Coulter細胞計數器Ac·T™ 5diff OV (Beckman Coulter，目錄號6605580)分析細胞之細胞類型及數目。在自PBMC分離B細胞之前，藉由利用CD14微珠(Miltenyi，目錄號130-050-201)磁性標記CD14陽性細胞及利用autoMACS® Pro分離器(Miltenyi，目錄號130-092-545)進行後續分離來移除CD14陽性溶離份。CD14陰性溶離份係用於利用Miltenyi B細胞分離套組II (目錄號130-091-151)及autoMACS®分離進行之後續B細胞分離。在由洛斯維帕克紀念研究所培養基(Roswell Park Memorial Institute medium; RPMI) 1640 (gibco, 目錄號31870-025)組成之200 µl R10培養基中將0.3×10^5個B細胞添加至圓底96孔培養盤(greiner bio-one, cellstar, 目錄號650185)之各孔中，該RPMI 1640經供應有10 % (v/v) FBS、1 % (v/v)青黴素鏈黴素(gibco, 目錄號15070-063)、1 % (v/v) L-麩醯胺酸(gibco, 目錄號25030-024)、1 % (v/v)丙酮酸鈉(gibco, 目錄號11360-039)、1 % (v/v) MEM非必需氨基酸(gibco, 目錄號11140-035)及50 µM β-巰基乙醇(gibco, 目錄號31350-010)。在1700 rpm下將培養盤離心5分鐘且拂去上清液。用200 µL 4℃低溫FACS緩衝液(eBioscience, 目錄號00-4222-26)洗滌細胞一次。將所有樣本以指定濃度範圍(一式兩份)再懸浮於50 µL/孔的含有雙特異性抗原結合分子(初級抗體)或同型對照抗體DP47之4℃低溫FACS緩衝液中且在4℃下培育120分鐘。然後用200 µL 4℃低溫

FACS緩衝液洗滌細胞三次。將細胞用25 μL/孔的含有R-藻紅素(PE)結合之AffiniPure F(ab')$_2$片段羊抗人IgG、Fcγ片段特異性(Jackson ImmunoResearch, 目錄號109-116-098)二級抗體的4℃低溫二級抗體溶液(二級抗體之1:50稀釋)進一步染色且在4℃下在暗處培育60分鐘。將細胞用200 μl FACS緩衝液洗滌且再懸浮於85 μL/孔的含有0.2 μg/mL DAPI (Roche, 目錄號10236276001)之FACS緩衝液中，且使用5-雷射LSR-Fortessa (具有DIVA軟體之BD Bioscience)在同一天採集。使用FlowJo版本10軟體(FlowJo LLC)進行資料分析。

【0362】 如**圖5**中所示，所有所描繪之殖株均結合至CD40，但其與CD40陽性B細胞之結合強度(EC_{50}值以及信號強度)不同。與其FAP結合部分無關，相較於藉由每抗體佔據較多CD40結合位點及相對於二價CD40型式之四價親合力增益解釋的四價抗CD40抗體，二價抗CD40抗體展示較高EC_{50}水平且達到較高結合平穩程度。未偵測到陰性對照抗體與B細胞之結合。如針對不同雙特異性抗體所量測之EC_{50}值展示於下表27中。

表27：呈不同雙特異性抗體型式之CD40抗體之人類CD40結合表徵

分子		EC_{50} [nM]
P1AD4470	CD40 IgG1	0.333
P1AE2423	CD40 x FAP (212) 2+1交叉單抗	0.095
P1AE2487	CD40 x FAP (4B9) 2+1交叉單抗	0.086
P1AE2424	CD40 x FAP (212) 4+1交叉單抗	0.036
P1AE2895	CD40 x FAP (4B9) 4+1交叉單抗	0.049

【0363】

實例5

FAP靶向之抗人類CD40結合分子之功能特性

【0364】

5.1 FAP靶向之抗人類CD40結合分子對人類B細胞進行的CD40介導之活化

CD40之接合誘導B細胞及樹突狀細胞(DC)成熟以及活化且促進此等細胞類型之存活。在CD40信號傳導後，B細胞及DC之表面上之細胞介素產生及協同刺激分子表現增加(S. Quezada等人，Annu RevImmunol. 2004, 22, 307-328；S. Danese等人，Gut. 2004, 53, 1035-1043；G. Bishop等人，Adv Exp Med Biol. 2007, 597, 131-151)。

【0365】 為了測試不同FAP依賴性抗CD40抗體之促效特性及FAP特異性，在經FAP塗佈之珠粒存在下將獲自人類白血球層之道迪細胞或初級B細胞與FAP依賴性促效抗人類CD40抗體一起培育且藉由FACS量測B細胞活化。

【0366】

5.1.1. 藉由FAP靶向之抗人類CD40結合分子使用經FAP塗佈之Dynabeads®作為抗原來源來活化人類道迪細胞

將1×10^5個道迪細胞(一種具有高表現量之人類CD40 (ATCC CCL-213)的人類B淋巴母細胞細胞株)添加於100 µl的1×達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM) ((gibco, 目錄號42430-025)，其補充有96孔平底培養盤每孔10%胎牛血清(FBS) (life technologies, 目錄號16140，批號1797306A)。將抗生蛋白鏈菌素Dynabeads® (ThermoFisher Scientific, 目錄號：11205D)根據製造商說明書用經生物素標記之人類FAP (內部產生) (6.5×10^4個珠粒之結合能力: 0.01 µg蛋白質)塗佈且在具有10% FBS之50 µl 1×DMEM中以2: 1之珠粒與細胞比率添加至道迪細胞中。作為對照，將未經塗佈之珠粒添加至道迪細胞。在具有10% FBS培養基之50 µl

1×DMEM中將FAP靶向之抗人類CD40抗體添加至濃度在6.7 nM至0.003 nM範圍內之道迪細胞(3×稀釋系列)。作為陽性對照，使用FAP非依賴性促效抗人類CD40抗體SGN40 (IgG1，INN：達西珠單抗)。對於CD40，抗體為二價的。因為文獻中描述SGN-40抗體需要Fc受體交聯以得到生物活性(C. Law等人，Cancer Res 2005, 65, 8331-8338)，故將抗體與交聯羊抗人IgG Fcγ片段特異性F(ab')$_2$片段(Jackson ImmunoResearch, 目錄號109-006-008)一起培育30分鐘，隨後將該抗體添加至道迪細胞中。在48小時之後，將細胞轉移至96孔圓底培養板中，用PBS洗滌一次且與50 µl之3 µg/mL Fc受體阻斷小鼠IgG同型對照(ThermoFisher Scientific，目錄號10400C)/PBS一起培育。在4℃下培育15分鐘之後，用PBS洗滌細胞且將50 µl經螢光標記之抗體於PBS中之混合物添加至細胞。使用以下經螢光標記之抗體：抗人類CD83 BV421 (Biolegend, 殖株HB15e，目錄號305324)、抗人類CD80 BV605 (BD Biosciences, 殖株L307.4，目錄號563315)、抗HLA-ABC FITC (BD Biosciences, 殖株G46-2.6，目錄號555552)、抗人類CD14 PerCP-Cy5.5 (Biolegend, 殖株HCD14，目錄號325622)、抗人類CD3 PerCP-Cy5.5 (Biolegend, 殖株UCHT1，目錄號300430)、抗人類CD70 PE (Biolegend, 殖株113-16，目錄號355104)、抗人類CD86 PE-CF594 (BD Biosciences, 殖株FUN-1，目錄號562390)、抗HLA-DR APC (BD Biosciences, 殖株G46-6，目錄號559866)及抗人類CD19 APC-H7 (BD Biosciences, 殖株SJ25C1，目錄號560177)。為了區分活細胞與死亡細胞，將存活染料Zombie Aqua™ (Biolegend，目錄號423102)添加至抗體混合物。在4℃下培育30分鐘後，用PBS洗滌兩次細胞且再懸浮於200 µl PBS中。同一天使用5-雷射LSR-Fortessa (具有DIVA軟

體之BD Bioscience)分析細胞。使用FlowJo版本10軟體(FlowJo LLC)進行資料分析。分析對CD14及CD3陰性及對CD19陽性之活(溶液陰性)細胞之CD70、CD80、CD83及CD86表現。

【0367】 在與促效抗CD40抗體一起培育2天之後分析之道迪細胞展示所有所描繪之抗體之CD70表現增加(參見**圖6A及圖6B**)。在不同FAP靶向抗體之情況下，此活化標記物之上調視FAP而定。在較低抗體濃度下，此等FAP依賴性抗體誘導之表現增加與交聯CD40抗體(P1AD4470)所誘導之表現增加相比較高。另外，與藉由呈具有FAP (28H1)結合域之2+1型式之雙特異性FAP-CD40抗體、呈具有FAP (212)、FAP (4B9)或FAP (28H1)結合域之4+1型式之雙特異性FAP-CD40抗體或FAP非依賴性陽性對照抗體誘導的上調相比，藉由呈具有FAP (212)或FAP (4B9)結合域之2+1型式之雙特異性FAP-CD40抗體進行之CD70上調較高。在不存在FAP (未塗佈珠粒)的情況下，在所描繪之雙特異性抗體對CD40為二價的情況下，未觀測到CD70增加，而四價CD40結合分子誘導CD70上調，但相比在FAP存在下誘導程度較低，表明在道迪細胞中存在四價CD40結合子之低但可偵測到之FAP非依賴性CD40活化。

【0368】

5.1.2 使用FAP塗佈之Dynabeads®作為抗原來源，藉由FAP靶向之抗人類CD40結合分子對人類B細胞的活化

自如實例4.2中所描述之白血球層分離B細胞且96孔平底培養盤每孔添加100 µl R10培養基中之1×10^5個B細胞。將抗生蛋白鏈菌素Dynabeads® (ThermoFisher Scientific, 目錄號：11205D)根據製造商說明書用經生物素標記之人類FAP (內部產生) (6.5×10^4個珠粒之結合能力:

0.01 μg蛋白質)塗佈且在50 μl R10培養基中以2:1之珠粒與細胞比率添加至B細胞中。作為對照，將未經塗佈之珠粒添加至B細胞。在50 μl R10培養基中添加FAP靶向之抗人類CD40抗體或陽性對照抗體(實例5.1.1中所描述)至B細胞。在2天之後，在實例5.1.1中指定之染色及分析程序之後，藉由FACS分析B細胞。

【0369】 在與促效抗CD40抗體一起培育2天之後分析的B細胞展示所有所描繪之抗體的CD86表現增加(參見**圖7A及圖7B**)。在不同FAP靶向抗體的情況下，CD86之上調依賴於FAP，且此等FAP依賴性抗體所誘導之表現增加與交聯之抗CD40抗體P1AD4470所誘導之增加相當或比其略微降低。具有一個FAP (212)結合域之對於FAP為單價之雙特異性抗體誘導與具有一個FAP (4B9)結合部分之分子類似的活化標記物表現之增加。與具有FAP (212)或FAP (4B9)結合部分之2+1型式相比，在較低抗體濃度下，及4+1型式(無關於其FAP結合部分)誘導較高的B細胞活化。

【0370】

5.2. FAP靶向之抗CD40結合分子對DC之CD40介導之活化及隨後對T細胞的激活

為了展現藉由FAP依賴性抗人類CD40抗體活化之DC有效激活T細胞之能力，建立活體外T細胞激活分析。對於此等分析，分離來自表現人類CD40受體之轉殖基因小鼠(huCD40tg小鼠；具有類似人類及鼠類CD40受體表現模式之小鼠；C57BL/6背景；由Taconic產生)之脾臟的DC，用SIINFEKL肽或用卵白蛋白(OVA；DEC-205受體介導之抗原攝入)脈衝且與不同的促效抗人類CD40抗體一起培育。經由FAP塗佈之Dynabeads®提供FAP，以展示雙特異性抗原結合分子之FAP依賴性。24小時後，自OT1

小鼠之脾臟分離CD8陽性T細胞（此等小鼠之CD8陽性T細胞在H2-Kb之情形中均具有識別SIINFEKL之轉殖基因TCR；C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/Crl, Charles River)、經羧基螢光素丁二醯亞胺基酯(CFSE)標記且添加至脈衝DC中。在實驗第4天，藉由FACS分析T細胞增殖。

【0371】

5.2.1. 經由藉由FAP靶向之抗CD40結合分子活化之OVA脈衝DC進行T細胞激活

自huCD40tg小鼠之脾臟分離DC。為了分離脾DC，將huCD40tg小鼠的脾放入6孔培養盤之一個孔中，該培養盤含有具有鈣$^{2+}$ (gibco, 目錄號14025-05)之2.25 mL漢克氏平衡鹽溶液(HBSS)、250 µl 10 mg/mL膠原蛋白酶D溶液(最終濃度1 mg/mL) (Sigma-Aldrich, 目錄號11088866001)及12.5 µl 10 mg/mL脫氧核糖核酸酶溶液(最終濃度0.05 mg/mL) (Sigma-Aldrich, D5025-150KU, 批號SLBR0535V)。使用具有21G針頭(Braun,目錄號4657527)之3 mL注射器(BD，目錄號309658)使脾臟膨脹，且隨後藉助於剪刀將其撕裂成小塊。在37℃下培育25分鐘之後，添加50 µL 0.5 M乙二胺四乙酸(EDTA) (Applichem, 目錄號A4892.1000)，隨後在37℃下進行第二培育步驟五分鐘。將含有脾細胞及小塊脾組織之溶液經由40 µm過濾器(Corning, 目錄號352340)過濾至50 mL聚丙烯離心管中。經由過濾器使用3 mL注射器塞子末端粉碎剩餘脾組織塊。在下一步驟中，在室溫下以1500 rpm將50 mL試管離心5分鐘，丟棄上清液且將1 mL 1×細胞溶解緩衝液(用蒸餾水1:10稀釋) (BD，目錄號555899)添加至脾細胞以便溶解紅血球。在室溫下培育四分鐘之後，添加20 mL R10，接著進行在室溫下

以1500 rpm離心5分鐘的步驟。移除上清液，將脾細胞再懸浮於30 mL R10中且藉由自動化EVE細胞計數器(VWR, 目錄號734-2675)測定細胞數目以及成活力。根據製造商說明書使用小鼠CD11c超純微珠粒(Miltenyi, 目錄號130-108-338)以藉由autoMACS®分離DC。隨後，將0.25×10^5個DC以96孔平底培養盤每孔接種於50 µl R10中。

【0372】 DC隨後用1 ng/ml SIINFEKL (卵白蛋白殘基257-264，Eurogentec, 目錄號AS-60193-5, 批號1360618)脈衝，作為陽性對照其不需要DC攝入及處理，抑或裝載有作為抗原之OVA蛋白。為了促進以鐸樣受體(TLR)刺激非依賴性方式之OVA攝入(額外TLR刺激可能導致DC之高總體活化，使得由於用促效性抗CD40抗體刺激而偵測到不同活化狀態不可能)，根據製造商的方案使用OVA抗原遞送試劑(Miltenyi, 目錄號130-094-663)與經生物素標記之抗小鼠DEC205抗體(Miltenyi, 殖株NLDC-145, 目錄號130-101-854)之組合。簡言之，將DC與結合於DEC205受體之經生物素標記之抗體一起培育，該受體在CD8陽性交叉呈現DC上高度表現(M. Lahoud等人，Int Immunol. 2000, 12(5), 731-735)。然後，將OVA遞送試劑(偶合至FITC及OVA之抗生物素抗體)添加至細胞中，引起OVA之DEC205受體介導之攝入。為了提供陰性對照，DC僅在不添加OVA的情況下用抗DEC205抗體標記。另外，在50 µL R10中以2:1之珠粒與細胞比率將人類FAP塗佈或未經塗佈之Dynabeads®添加至DC中，如實例5.1.1中所描述。在下一步驟中，在50 µL R10中添加濃度在6.7 nM至0.01 nM範圍內的不同促效性抗CD40抗體(10×稀釋系列)。在此實驗配置中，比較含有一個FAP (212)或FAP (4B9) FAP結合位點之雙特異性2+1及4+1抗人類CD40抗體與交聯SGN40抗體。

【0373】次日，分離來自OT1小鼠之脾CD8-陽性細胞。為如此做，經由40 μm過濾器，使用3 mL注射器塞子之末端將OT1小鼠之脾粉碎至50 mL試管中。用R10洗滌過濾器且在室溫下以1500 rpm離心脾細胞5分鐘。將1 mL 1×細胞溶解緩衝液(用蒸餾水1:10稀釋)添加至細胞中且在室溫下培育四分鐘之後，添加20 mL R10。在室溫下以1500 rpm離心試管5分鐘且棄去上清液。將脾細胞再懸浮於30 mL R10中且藉由自動化EVE細胞計數器測定細胞計數以及成活力。根據製造商說明書，使用小鼠$CD8a^+$ T細胞分離套組(Miltenyi, 目錄號130-104-075)及autoMACS®分離在陰性選擇過程中分離CD8-陽性細胞。隨後用預溫熱之PBS洗滌在分離之後在陰性部分中發現之CD8陽性細胞，用EVE細胞計數器計數，且在預溫熱之PBS中將細胞數目調節至2×10^7個細胞/mL。將10 mM CFSE溶液(CellTrace™ CFSE細胞增殖套組, ThermoFisher, 目錄號C34554)在預溫熱之PBS中稀釋5000倍且以1:1比率(CFSE最終濃度1 μM)添加至再懸浮於PBS中之細胞。在短渦旋之後，在室溫下培育細胞五分鐘。藉由向細胞中添加40 mL預溫熱之R10培養基來停止標記反應。在用PBS進行兩個洗滌步驟之後，使CD8陽性細胞再懸浮於R10中且將0.5×10^5個細胞添加於100 μl R10至經脈衝DC。在實驗之第四天，藉由流式細胞測量術分析T細胞增殖。因此，將細胞自96孔平底培養盤轉移至96孔圓底培養盤中，用PBS洗滌一次且與50 μl含3 μg/mL的阻斷小鼠IgG同型對照之Fc受體之PBS一起培育。在4℃下培育15分鐘之後，用PBS洗滌細胞且將50 μl經螢光標記之抗體於PBS中之混合物添加至細胞。使用以下抗體：抗小鼠CD4 BV421 (Biolegend, 殖株GK1.5, 目錄號100438)、抗小鼠CD86 BV785 (Biolegend, 殖株GL-1, 目錄號105043)、

抗I-A/I-E PerCp-Cy5.5 (Biolegend, 殖株M5/114.15.2, 目錄號107626)、抗小鼠CD70 PE (eBioscience, 殖株FR70, 目錄號12-0701-82)、抗小鼠CD3 PE-CF594 (BD Biosciences, 殖株145-2C11, 目錄號562286)、抗小鼠CD25 PE-Cy7 (eBioscience, 殖株PC61.5, 目錄號25-0251-82)、抗小鼠CD11c APC (BD Biosciences, 殖株HL3, 目錄號561119)、抗小鼠CD44 Alexa Fluor 700 (BD Biosciences, 殖株IM7, 目錄號560567)及抗小鼠CD8 APC-Cy7 (Biolegend, 殖株53-6.7, 目錄號100714)。為了區分活細胞與死亡細胞，將存活染料Zombie Aqua™添加至抗體混合物。在4℃下將細胞與50 µl染色抗體混合物一起培育30分鐘。隨後，用PBS洗滌細胞兩次，再懸浮於200 µl PBS中且使用5-雷射LSRFortessa分析。使用FlowJo版本10軟體進行資料分析。針對CFSE信號以及CD25及CD44表現分析活的CD3及CD8陽性細胞。

【0374】 **圖8A及圖8B**展示DC與OVA傳遞試劑一起培育且用靶向人類CD40及FAP之雙特異性抗原結合分子刺激高度增強CD8陽性OT1 T細胞增殖。此等效應為FAP依賴性的。所描繪之FAP依賴性抗體誘導之T細胞增殖增加與交聯CD40抗體(P1AD4470)誘導之增加相比略微較低。經具有一個FAP (212)或FAP (4B9)結合部分之2+1或4+1雙特異性抗CD40抗體刺激之DC誘導的增殖水平相當。

【0375】

5.3 FAP結合及CD40信號轉導之兩個細胞株橋接分析

雙特異性抗體之作用模式反映於兩個細胞株橋接分析中：抗體結合於FAP表現細胞株上之FAP且結合於報導基因細胞株上之CD40受體。在簇集CD40受體之情況下，信號轉導引起誘導分泌性胚胎鹼性磷酸酶之

NFκB依賴性製造。

【0376】 簡言之：藉由阿庫酶(Accutase) (Life Technologies)分離報導細胞株HEK-Blue™ CD40L (Invivogen，經編碼人類CD40受體之質體及NFkB誘導性分泌性胚胎鹼性磷酸酶(SEAP)轉染)，且直至使用時才將6.8×10^6個細胞轉移至無菌50 mL離心管(Greiner)中且置放於輥混合器(Heidolph)上。

【0377】 在表面上表現FAP之原生目標細胞(WM-266-4，ATCC)用作備用冷凍細胞。各小瓶含有2×10^7個細胞/2 mL DMEM、10% FBS及5% DMSO。細胞之維持培養應在具有高葡萄糖及HEPES之DMEM中進行(Life Technologies)。在37℃預溫熱水浴中將目標細胞解凍2分鐘。將2 mL細胞懸浮液立即轉移至具有30 mL DMEM、10 %FBS (Life Technologies)之50 mL離心管中。直至使用時才將13.6×10^6個細胞之等分試樣轉移至50 mL離心管中且置放於輥混合器上。在製備抗體稀釋系列之後進行細胞解凍。

【0378】 使用HEK-Blue™偵測培養基(Invivogen)製備細胞懸浮液及抗體稀釋液。將三個小袋溶解於150 mL去離子水(Life Technologies)中且經由0.22 μm膜(Millipore)過濾至無菌玻璃瓶(Schott)中。添加150 μl慶大黴素(Gentamicin) (50 mg/mL，Life Technologies)。

【0379】 在HEK-Blue™偵測培養基中以2倍濃縮製造抗體稀釋液。連續稀釋系列(1:4)中之八個濃度產生518 pM至0.0316 pM之最終分析濃度。將100 μL各抗體濃度轉移至透明96孔微量滴定組織培養盤(Greiner)中。評估每分子3個培養盤上之複本。

【0380】 將兩個細胞株(報導細胞株及目標細胞株)在室溫下在

180×g下離心4分鐘。移除上清液且將各細胞株再懸浮於17 mL HEK-Blue™偵測培養基中。藉由組合兩種細胞株，混合物最終含有2×10^5個HEK-Blue™ CD40L細胞/毫升及4×10^5個WM-266 4細胞/毫升。將100 µL細胞混合物添加至分析培養盤之各孔中。最後，20.000個HEK-Blue™ CD40L細胞及40.000個WM-266-4細胞存在於各孔中。將培養盤在室溫下預培育15分鐘以使得細胞分佈及沈降，且隨後在37℃及5% CO_2 (細胞培育箱)下培育20小時。在650 nm下使用HEK-Blue™偵測培養基(Victor X4, Perkin Elmer)量測SEAP活性。相對於抗體之濃度繪製光學密度(OD)(參見**圖9**)。EC_{50}值展示於下表28中。

表28：如在兩個細胞株橋接分析中所量測之EC_{50}值

分子		EC_{50} [pM]
P1AE2423	CD40 x FAP (212) 2+1交叉單抗	3.2
P1AF0873	CD40 x FAP (212) 1+1交叉單抗	26.5
P1AA9663	CD40 x FAP (28H1) 2+2交叉單抗	13.2
P1AE2302	CD40 x FAP (28H1) 2+1交叉單抗	2.5

【0381】 對於包含兩個CD40結合Fab片段及FAP結合交叉單抗片段之2+1分子P1AE2423及P1AE2302，EC_{50}值非常類似。1+1交叉單抗構築體P1AF0873及2+2構築體P1AA9663的EC_{50}顯著較高。另外，1+1構築體P1AF0873展示顯著較不明顯之較高漸近線，意謂有效性較小。

5.4 FAP非依賴性CD40特異性分析

【0382】 評估在未經由FAP進行簇集之情況下的CD40路徑之潛在活化。在CD40受體活化之情況下，信號轉導引起誘導分泌性胚胎鹼性磷酸酶之NFκB依賴性製造。

【0383】 簡言之，藉由阿庫酶(Life Technologies)分離報導細胞株HEK-Blue™ CD40L (Invivogen，經編碼人類CD40受體之質體及NFkB誘

導性分泌性胚胎鹼性磷酸酶(SEAP)轉染)且直至使用時才將3.4×10^6個細胞轉移至無菌50 mL離心管(Greiner)中且置放於輥混合器(Heidolph)上。根據「用於FAP結合及CD40信號轉導之兩種細胞株橋接分析」使用HEK-Blue™偵測培養基(Invivogen)。在HEK-Blue™偵測培養基中以2倍濃縮製造抗體稀釋液。最終分析濃度為518 pM。在「用於FAP結合及CD40信號轉導之兩種細胞株橋接分析」之三個獨立稀釋系列中，將100 µL最高抗體濃度一式兩份地轉移至透明96孔微量滴定組織培養盤Greiner)中。此導致在1個培養盤上評估每分子6個值。

【0384】 將報導細胞株在室溫下在180×g下離心4分鐘。移除上清液且將細胞再懸浮於17 mL HEK-Blue™偵測培養基中。包含20.000個HEK-Blue™ CD40L細胞之100 µL存在於孔中。將培養盤在室溫下預培育15分鐘以使得細胞分佈及沈降，且隨後在37℃及5% CO_2 (細胞培育箱)下培育20小時。在650 nm下使用HEK-Blue™偵測培養基(Victor X4, Perkin Elmer)量測SEAP活性。相對於分子繪製n=6及3×STDEV之光學密度(OD)之平均值(參見**圖10**)。

【0385】 FAP依賴性分析中所用之最高濃度用於將CD40特異性報導細胞與分子一起培育。在未經由FAP結合進行簇集之情況下，CD40受體活化及後續信號轉導極低。P1AF0873 (1+1交叉單抗)及P1AA9663 (2+2交叉單抗)之CD40受體活化及後續信號轉導甚至低於2+1分子P1AE2423及P1AE2302 (重疊誤差杠)。

【0386】

實例6

評定FAP靶向之抗人類CD40結合分子與PD-L1組合之抗腫瘤功效

【0387】 設計活體內研究(**圖11**)，以便在具有免疫能力之小鼠中測定促效性抗FAP×CD40抗體對FAP表現腫瘤細胞的作用。特定言之，評估在呈具有28H1 FAP結合域結合於鼠類FAP之4+1型式之雙特異性FAP-CD40抗體、呈具有28H1 FAP結合域之2+1型式之雙特異性FAP-CD40抗體與經或未經aPD-L1處理之FAP非依賴性CD40對照抗體之間的差異。

【0388】 根據提交之指南(GV-Solas; Felasa; TierschG)，在實驗開始時將年齡為6至9週處(購自Charles Rivers, France)及最初獲自Taconic之總計97+9個huCD40 tg HO雌性小鼠(再攻擊實驗所需)維持在無特異性病原體條件下，每日循環為12 h亮/12 h暗。實驗研究方案由當地政府審查且審批通過(ZH225-17)。動物在到達之後維持一週以使其適應新環境且進行觀察。之後小鼠在背之右側皮下植入應答器以進行鑑別且維持一週以上以得到回收率。在常規基礎上進行連續健康監測。每日控制動物之臨床症狀且偵測不良作用。

【0389】 MC38-muFAP invipa細胞(CRC)係獲自在Roche Glycart AG下進行之活體外通路，且在增殖之後寄放於Glycart內部細胞庫中。在含有10% FCS (PAA Laboratories, Austria)、1 mM丙酮酸鹽、1×NEAA及6 μg/ml嘌呤黴素之DMEM中培養MC38-muFAP invipa細胞。在37℃下在5% CO_2下於水飽和氛圍中培養細胞。在活體外通路10及94.5%活力下注射細胞。

【0390】 對於腫瘤細胞接種，將小鼠麻醉且在左側腹上用29G針頭(BD)皮下注射100 μl於50% RPMI + 50%基質膠培養基中含有2×10^6個MC38-muFAP單一細胞懸浮液之溶液。對於用相同腫瘤細胞株再攻擊，在第1療法後第93天，45隻小鼠係根據相同程序在右側腹上進行注射。

【0391】 在第22天，當腫瘤平均值達到200 mm^3時，將小鼠隨機分成9隻小鼠的8個不同組，各組具有類似的腫瘤大小平均值(表29)。在隨機分組之後，根據研究組(表31)，用29G針頭向小鼠腹膜內注射具有不同化合物(表30)。在第1療法後第7天及第14天，向B組、F組、G組及H組腹膜內注射第二及第三劑量之抗PD-L1。

【0392】 在隨機分組及療法注射之後，藉由測徑規量測一週追蹤腫瘤尺寸3次。進行每日監測以確保符合動物福利。在許可標準(ZH225-17)中，殺死具有如下情況之小鼠：潰瘍腫瘤；腫瘤達到超過3000 mm^3的腫瘤體積或小鼠體重損失高於其初始體重的20% (第0天)。當需要終止時，用異氟醚麻醉小鼠且進行機械頸椎脫位術。

表29：在第22天根據腫瘤體積之動物隨機分組

	腫瘤體積(mm^3)							
	均值_	中值_	StDev_	SEM_	IQR (25%)	IQR (75%)	N (動物)	N (量測值)
TG1	205.87	183.09	117.82	39.27	83.77	118.89	9	9
TG2	212.06	166.15	129.07	43.02	61.73	134.20	9	9
TG3	203.06	195.36	109.90	36.63	86.46	71.22	9	9
TG4	207.98	197.16	120.68	40.23	80.87	98.34	9	9
TG5	222.03	193.11	160.66	53.55	84.25	69.29	9	9
TG6	206.73	181.89	119.04	39.68	69.52	117.74	9	9
TG7	207.83	195.20	132.17	44.06	84.94	62.45	9	9
TG8	201.83	190.58	114.43	38.14	73.22	76.46	9	9
排除							25	

表30: 所使用之抗原結合分子

物種	分子名稱	物質識別符
小鼠	PD-L1 6E11 mIgG2a. PG LALA	P1AE0099
人類	FAP-CD40 4+1: 4+1_huIgG1_PGLALA_C項_xFab_P1AE0817_28H1	P1AE2024
人類	FAP-CD40 2+1: 2+1_huIgG1_PGLALA_C項_xFab_P1AE0817_28H1	P1AE2302
人類	CD40: muIgG1_wt_SGN40	P1AE2301

表31：治療之研究組

組	**第1療法** 第22天	**第2療法** 第29天	**第3療法** 第36天
A	媒劑	媒劑	媒劑
B	PD-L1	PD-L1	PD-L1
C	FAP-CD40 2+1		
D	FAP-CD40 4+1		
E	huCD40 muIgG1		
F	PD-L1 + FAP-CD40 2+1	PD-L1	PD-L1
G	PD-L1 + FAP-CD40 4+1	PD-L1	PD-L1
H	PD-L1 + huCD40 muIgG1	PD-L1	PD-L1

【0393】 自排除之動物，選擇12隻動物且用來自A組、C組、D組及E組(每次療法3隻動物)之療法治療以便作為偵查單位處死，以在第1次療法注射後第4天分析免疫核查藥物動力學效果。

【0394】

6.1 FAP靶向之抗CD40結合分子誘導完全腫瘤緩解及高效的抗腫瘤免疫記憶反應。

【0395】 藉由測徑規測量一週監測腫瘤尺寸3次。JMP12軟體用於腫瘤生長資料之統計分析。為了測試組平均值之顯著差異以進行多重比較，應用使用圖基-克拉默(Tukey-Kramer)方法之標準變異數分析(ANOVA)。圖基-克拉默對於該等手段中之成對差異進行測試；若樣本大小相同，則其為準確的α級測試。

【0396】 第1療法後第93天，向顯示完全腫瘤消退之小鼠的相對側腹皮下注射MC38-FAP腫瘤細胞，以便判定形成針對此腫瘤細胞株之免疫細胞記憶。作為對照，根獸醫許可，向9隻未處理C57bl/6-huCD40 tg小鼠注射相同MC38-FAP腫瘤細胞，且藉由一週2至3次地測徑規量測追蹤腫瘤

生長。

【0397】 如**圖12**中所示，在存在及不存在PDL1治療下，兩種FAP-CD40雙特異性分子(2+1及4+1)均誘導完全緩解。在用非靶向CD40、PD-L1或該兩者組合治療之小鼠中，腫瘤生長與媒劑組相比未延遲。另外，在再攻擊後，在先前用FAP-CD40抗體治療之組中無MC38-FAP腫瘤生長，而在未處理小鼠中100%有腫瘤生長。此等結果表明相比非靶向CD40療法，靶向CD40療法之強MC38-FAP抗腫瘤功效及腫瘤生長消退。由於用抗FAP-CD40抗體治療之所有小鼠展示100%腫瘤緩解，在此等小鼠中不存在明顯的抗PD-L1附加作用。另外，在腫瘤生長抑制方面，2+1與4-1種型式之間未展現差異。再攻擊資料指示在用FAP-CD40抗體治療之所有小鼠中形成針對MC38-FAP腫瘤細胞之高效免疫記憶反應。

【0398】 統計分析指示，2+1 FAP-CD40抗體治療組之數據自第28天(療法後第6天)開始與媒劑相比顯著不同(**圖13A**，在第28天比較所有組的統計分析)且4+1 FAP-CD40抗體治療組的數據自第31天(療法後第9天)開始與媒劑相比顯著不同(**圖13B**，在第31天比較所有組的統計分析)。

【0399】

6.2 相較於2+1 FAP靶向之抗CD40結合分子，4+1 FAP靶向之抗CD40結合分子具有較高血清清除率

【0400】 收集每組3至4隻小鼠之血液以便在腹膜內注射時遵循藥物之藥物動力學概況。在第一次抗體療法之後6h、24h、48h、72h、96h、8天及15天收集血清樣本以分析血液抗CD40含量。每時間點收集最多100 µl血液。藉由39℃升溫之盒子使小鼠體溫略微升高以確保血管之良好擴張。用22G針頭進行尾靜脈上之穿刺。將血液收集於1.1 ml Z-凝膠微型管

(SARSTEDT)中且在離心之後藉由收集上清液抽出血清。將樣本儲存在-20℃下，且隨後使用各別抗體分析抗CD40含量以用於校準。

【0401】 根據方案(Roche-Glycart, Switzerland)使用CD40/Fc嵌合體(R&D, 1493-CD-050) ELISA針對抗CD40 huIgG之定量測試血清中之抗CD40濃度。使用試劑捕捉蛋白：人類IgG-Fc生物素(Abcam, ab98561)及CD40/Fc嵌合體(R&D, 1493-CD-050)，偵測抗體：抗小鼠IgG(HRP)(Abcam, ab97040)或抗huCH1-DIG (Roche-Penzberg, Germany)及抗DIG-POD (Roche, 11633716001)。視注射劑量(mg/kg)及在抗CD40注射之後的收集時間(6h、24h、48h、96h)而定，在連續稀釋液中分析血清樣本。使用405 nm之量測波長及490 nm之參考波長(SpectraMax i3微型盤式讀取儀，Molecular Devices)量測吸收率。

【0402】 對於PK分析，使用Phoenix 64, WinNonlin 6.4軟體計算曲線下面積以及Cmax。因為僅監測藥物動力學至多96小時，故未描繪PK參數，諸如清除率及半衰期。

【0403】 如**圖14**及**表32**中所示，與2+1型式相比，對於4+1型式觀測到較高清除率。可藉由對四價CD40結合子(4+1型式)比對二價CD40結合子(2+1型式)更顯著之CD40特異性目標介導之藥物處置(TMDD)解釋此較高清除率。

【0404】 此外，與兩種FAP-CD40分子相比，非靶向CD40展示較高清除率。此清除率不可藉由TMDD假設解釋，但可能由在CD40療法時形成抗藥物抗體(ADA)引起。

表32：PK參數

	劑量 (mg/kg)	Cmax (ng/mL)	AUClast (天*ng/mL)
FAP-CD40 2+1	13	78914	229808
FAP-CD40 4+1	20	168667	334143
huCD40 muIgG1	10	109762	193079

【0405】

6.3 在處理96小時後經FAP靶向之抗CD40結合分子對DC、B細胞及T細胞進行的CD40介導之活化

【0406】 第1療法後96h，處死每組3隻小鼠且在PBS中收集以下器官以用流式細胞測量術分析：腫瘤、脾、腹股溝引流淋巴結及腹股溝、軸及肱非引流淋巴結。

【0407】 對於流式細胞儀分析，如實例5.2.1中所述製備所有所收集器官之單細胞懸浮液且用螢光標記之抗體染色。為此目的，將所製備之單細胞懸浮液轉移至96孔平底培養盤中，用PBS洗滌，且與50 µl之3 µg/ml Fc受體阻斷小鼠IgG同型對照(ThermoFisher Scientific, 目錄號10400C)/PBS一起培育。在4℃下培育15分鐘之後，細胞用PBS洗滌且將50 µl PBS中之經螢光標記之抗體的混合物添加至細胞。使用以下抗體：抗小鼠CD3 Pacific Blue™ (BD Bioscience, 殖株500A2, 目錄號558214)、抗小鼠CD86 BV605 (Biolegend, 殖株GL-1, 目錄號105037)、CD45 Alexa Fluor 700 (eBioscience, 殖株30-F11, 目錄號56-0451-82)、抗小鼠CD19 BUV395 (BD Biosciences, 殖株1D3, 目錄號563557)、抗小鼠CD11c BV785 (Biolegend, 殖株N418, 目錄號117336)、抗小鼠B220 APC-Cy7 (Biolegend, 殖株RA3-6B2, 目錄號103224)、抗小鼠CD69 BUV737 (BD Biosciences, 殖株H1.2F3, 目錄號612793)、抗I-A/I-E

PerCp-Cy5.5 (Biolegend, 殖株M5/114.15.2, 目錄號107626)。為了區分活細胞與死亡細胞，將存活染料Zombie Aqua™ 或Fixable blue(均為Life technologies)添加至抗體混合物。將細胞在4℃下與細胞外染色抗體溶液一起培育30分鐘。隨後，細胞用PBS洗滌兩次，滲透且根據製造商方案利用Foxp3/轉錄因子染色緩衝液組(eBioscience,目錄號00-5523-00)使用抗小鼠Ki-67 PECy7 (eBioscience,殖株SolA15, 目錄號25-5698-82)針對Ki-67細胞內染色。將細胞再懸浮於200 µl PBS中且在同一天使用5-雷射LSR-Fortessa分析。使用FlowJo版本10軟體進行資料分析。分析存活CD45+、CD3+及CD8+ T細胞之Ki-67表現。分析可存活樹突狀細胞(CD45+、MHCII+、CD11c+)的DC活化標記物CD86之表現，且分析可存活B細胞(CD45+、CD19+、B220+)的B細胞活化標記物CD69之表現。

【0408】 如**圖15**中所示，兩種FAP靶向之抗CD40抗體型式(2+1及4+1)在治療之後第四天誘導腫瘤引流淋巴結、非引流淋巴結及脾臟中DC活化(CD86表現)顯著增加，但程度低於非靶向抗CD40抗體。相比之下，與媒劑組相比，僅呈2+1型式之FAP靶向之抗CD40抗體誘導腫瘤中之顯著DC活化。如**圖16**中所示，觀測到用於活化T細胞之相同模式(Ki-67表現)。僅在經非靶向抗CD40抗體治療之小鼠中觀測到相比媒劑組的所有經分析組織樣本中之顯著B細胞活化(CD69表現) (**圖17**)。

【0409】

6.4 與非靶向CD40抗體相比，FAP靶向之抗CD40結合分子在小鼠中誘導較少副作用

6.4.1 經FAP靶向之抗CD40抗體治療之小鼠與非靶向抗CD40抗體治療之小鼠相比未顯示體重減輕

在療法注射之後，每日量測各小鼠之重量，持續15天。將體重損失高於其初始體重之20% (第0天)之小鼠處死(此處，不需要處死小鼠)。

【0410】 如**圖18**說明用非靶向抗CD40抗體治療之小鼠在抗體注射時顯示明顯體重減輕，且在同時用抗PD-L1抗體注射抗CD40之情況下，此體重減輕持續較長。在注射有4+1或2+1 FAP-CD40單一藥劑、PD-L1單一藥劑之組中及在FAP-CD40 (4+1或2+1)+ PD-L1組合組中未觀測到體重減輕。此結果表明相較於非靶向抗CD40抗體，FAP靶向之抗CD40結合分子之安全概況。

【0411】

6.4.1 相較於用非靶向抗CD40抗體治療之小鼠，經FAP靶向之抗CD40抗體治療之小鼠展示較少抗PD-L1介導之不良事件

在第3次注射抗PD-L1抗體後觀測到一些不良事件。不需要處死小鼠，但該等症狀描述為在療法注射之後5分鐘內小鼠之活性降低、身體後屈及邋遢皮毛。表33指示在第3次療法後展示彼等症狀之小鼠的百分比。

表33：在第3次抗PD-L1療法後顯示不良事件之動物的百分比。

組	在第3次注射PD-L1後顯示不良事件之小鼠的%	恢復時間(分鐘)
PD-L1	33%	30-40
FAP-CD40 2+1 + PD-L1	44%	10-20
FAP-CD40 4+1 + PD-L1	55%	10-20
CD40 + PD-L1	100%	30-40

【0412】 結果顯示組合組PD-L1+CD40中不良事件明顯增加，而相較於抗PD-L1單一藥劑治療組，抗PD-L1+FAP-CD40組(4+1及2+1)中觀測到的不良事件百分比僅略微增加。

【0413】 所觀測到的不良事件可為歸因於抗PD-L1之ADA形成的強

免疫反應(細胞介素風暴)的結果，其在非靶向抗CD40抗體之呈現中進一步增加。此觀測結果表明，當兩種分子與抗PD-L1抗體療法組合時，相較於非靶向抗CD40抗體，靶向FAP-CD40分子之安全概況更佳。

【0414】 總之，與未靶向之抗CD40親本抗體相比，呈4+1及2+1型式之具有CD40之FAP依賴性活化的經FAP靶向之抗CD40分子在帶有腫瘤之小鼠中誘導全身性毒性降低的強效抗腫瘤免疫反應。

【序列表】

<110> 瑞士商赫孚孟拉羅股份公司(F. Hoffmann-La Roche AG)

<120> 包含抗FAP殖株212的雙特異性抗原結合分子

<130> P35043-WO

<150> EP18197866.9
<151> 2018-10-01

<160> 110

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 277
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1

```
Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
1               5                  10                  15


Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu
            20                  25                  30


Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val
        35                  40                  45


Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu
    50                  55                  60


Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His
65                  70                  75                  80


Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr
                85                  90                  95


Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr
            100                 105                 110
```

Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
115 120 125

Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
130 135 140

Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
145 150 155 160

Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln
165 170 175

Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu
180 185 190

Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile
195 200 205

Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn
210 215 220

Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp
225 230 235 240

Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His
245 250 255

Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser
260 265 270

Val Gln Glu Arg Gln
275

<210> 2
<211> 760
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

```
Met Lys Thr Trp Val Lys Ile Val Phe Gly Val Ala Thr Ser Ala Val
1               5                  10                  15

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

Asn Ser Glu Glu Asn Thr Met Arg Ala Leu Thr Leu Lys Asp Ile Leu
        35                  40                  45

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

Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Ala Asp Asn Asn Ile Val Leu Tyr Asn
65                  70                  75                  80

Ile Glu Thr Gly Gln Ser Tyr Thr Ile Leu Ser Asn Arg Thr Met Lys
                85                  90                  95

Ser Val Asn Ala Ser Asn Tyr Gly Leu Ser Pro Asp Arg Gln Phe Val
            100                 105                 110

Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala
        115                 120                 125

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

Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys Trp Ser Pro Val Gly Ser
145                 150                 155                 160

Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu Lys Gln Arg Pro
                165                 170                 175

Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Phe Asn Gly Arg Glu Asn Lys Ile
            180                 185                 190
```

```
Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu Glu Glu Met Leu Ala Thr
        195                 200                 205

Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly Lys Phe Leu Ala Tyr Ala
    210                 215                 220

Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly
225                 230                 235                 240

Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile Pro Tyr Pro Lys Ala Gly
                245                 250                 255

Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Ile Phe Ile Ile Asp Thr Thr Tyr Pro
            260                 265                 270

Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val Pro Ala Met Ile Ala Ser
        275                 280                 285

Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp Val Thr Asp Glu Arg Val
    290                 295                 300

Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn Val Ser Val Leu Ser Ile
305                 310                 315                 320

Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp Asp Cys Pro Lys Thr Gln
                325                 330                 335

Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp Ala Gly Gly Phe Phe Val
            340                 345                 350

Ser Thr Pro Val Phe Ser Tyr Asp Ala Ile Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe
        355                 360                 365

Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His Tyr Ile Lys Asp Thr Val
    370                 375                 380

Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys Trp Glu Ala Ile Asn Ile
385                 390                 395                 400
```

```
Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr Ser Ser Asn Glu Phe Glu
                405                 410                 415

Glu Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg Ile Ser Ile Gly Ser Tyr
            420                 425                 430

Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His Leu Arg Lys Glu Arg Cys
        435                 440                 445

Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu
    450                 455                 460

Val Cys Tyr Gly Pro Gly Ile Pro Ile Ser Thr Leu His Asp Gly Arg
465                 470                 475                 480

Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu Asn Lys Glu Leu Glu Asn
                485                 490                 495

Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu Glu Ile Lys Lys Leu Glu
            500                 505                 510

Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met Ile Leu Pro Pro Gln Phe
        515                 520                 525

Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gln Val Tyr Gly Gly Pro
    530                 535                 540

Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala Val Asn Trp Ile Ser Tyr
545                 550                 555                 560

Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala Leu Val Asp Gly Arg Gly
                565                 570                 575

Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu Tyr Ala Val Tyr Arg Lys Leu
            580                 585                 590
```

Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Ile Thr Ala Val Arg Lys Phe Ile
595 600 605

Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Lys Arg Ile Ala Ile Trp Gly Trp Ser
610 615 620

Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ser Gly Thr Gly Leu
625 630 635 640

Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr
645 650 655

Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly Leu Pro Thr Lys Asp Asp
660 665 670

Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val Met Ala Arg Ala Glu Tyr
675 680 685

Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn
690 695 700

Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala Lys Ala Leu Val Asn Ala
705 710 715 720

Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser Asp Gln Asn His Gly Leu
725 730 735

Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr His Met Thr His Phe Leu
740 745 750

Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp
755 760

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> FAP (212) CDR-H1

<400> 3

Asp Tyr Asn Met Asp
1 5

<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP (212) CDR-H2

<400> 4

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

Gly

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP (212) CDR-H3

<400> 5

Phe Arg Gly Ile His Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP (212) CDR-L1

<400> 6

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Leu Ser Phe Ile Asn
1 5 10 15

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP (212) CDR-L2

<400> 7

Gly Thr Ser Asn Arg Gly Ser
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP (212) CDR-L3

<400> 8

Gln Gln Ser Asn Glu Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 9
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP (212) VH

<400> 9

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

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

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

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

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 10
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP (212) VL

<400> 10

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

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

Gly Leu Ser Phe Ile Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

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

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP (VH1G3a) CDR-H2

<400> 11

Asp Ile Tyr Pro Asn Thr Gly Gly Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP (VH2G3a) CDR-H2

<400> 12

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

Gly

<210> 13
<211> 15

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP (VL1G3a) CDR-L1

<400> 13

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Leu Ser Phe Leu Ala
1 5 10 15

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP (VL2G3a) CDR-L1

<400> 14

Arg Ala Ser Glu Ser Ile Asp Asn Tyr Gly Leu Ser Phe Leu Asn
1 5 10 15

<210> 15
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP (VH1G1a)

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 16
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP (VH1G2a)

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 17
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP (VH1G3a)

<400> 17

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ile Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP (VH2G1a)

<400> 18

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 Tyr Thr Leu Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Asp Ile Tyr Pro Asn Thr Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
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

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

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

<220>

<223> FAP (VH2G2a)

<400> 19

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 Tyr Thr Leu Thr Asp Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 20
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP (VH2G3a)

<400> 20

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 Tyr Thr Leu Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Asp Ile Tyr Pro Asn Thr Gly Gly Thr Ile 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

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 21
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP (VL1G1a)

<400> 21

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Leu Ser Phe Ile Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Arg Gly 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 Phe Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

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

<210> 22
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP (VL1G2a)

<400> 22

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Leu Ser Phe Ile Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Arg Gly 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 Phe Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

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

<210> 23
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP (VL1G3a)

<400> 23

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Leu Ser Phe Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Arg Gly 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 Phe Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

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

<210> 24
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP (VL2G1a)

<400> 24

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

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

Gly Leu Ser Phe Ile Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

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

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

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

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

<210> 25
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP (VL2G2a)

<400> 25

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

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

Gly Leu Ser Phe Ile Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

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

<210> 26
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP (VL2G3a)

<400> 26

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

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

Gly Leu Ser Phe Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

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

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

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

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

<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hu CD40 CDR-H1

<400> 27

Gly Tyr Tyr Ile His
1 5

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

<220>
<223> hu CD40 CDR-H2

<400> 28

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

Gly

<210> 29
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hu CD40 CDR-H3

<400> 29

Glu Gly Ile Tyr Trp
1 5

<210> 30
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hu CD40 CDR-L1

<400> 30

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

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hu CD40 CDR-L2

<400> 31

Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hu CD40 CDR-L3

<400> 32

Ser Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 33
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> hu CD40 VH

<400> 33

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

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

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

Ala Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Ser Ser

<210> 34
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hu CD40 VL

<400> 34

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 35
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD40 (S2C6) VH

<400> 35

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly His Gly Thr Thr Leu Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 36
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD40 (S2C6) VL

<400> 36

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

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

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

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

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

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

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

<210> 37
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH1a (CD40)

<400> 37

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

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

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

Gly Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 38
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH1b (CD40)

<400> 38

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

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

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

Gly Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 39
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH1c (CD40)

<400> 39

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

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

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

Gly Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly His Gly Thr Thr Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 40
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH1d (CD40)

<400> 40

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

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

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

Gly Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 41
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL1a (CD40)

<400> 41

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

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

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

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

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

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

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

<210> 42
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL1b (CD40)

<400> 42

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

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

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

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

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

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

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

<210> 43
<211> 112

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL1c (CD40)

<400> 43

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

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

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

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

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

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

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

<210> 44
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL1d (CD40)

<400> 44

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

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

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

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

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

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

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

<210> 45
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH2a (CD40)

<400> 45

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

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

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

Gly Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 46
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH2b (CD40)

<400> 46

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 Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 47
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH2c (CD40)

<400> 47

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 Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly His Gly Thr Thr Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 48
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH2d (CD40)

<400> 48

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 Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 49
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH2ab (CD40)

<400> 49

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 Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 50
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH2ac (CD40)

<400> 50

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 Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 51
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL2a (CD40)

<400> 51

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 52
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL2b (CD40)

<400> 52

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 53
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL2ab (CD40)

<400> 53

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

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

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

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

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

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

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

<210> 54
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL2ac (CD40)

<400> 54

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 55
<211> 443
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> P1AE0400重鏈

<400> 55

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 Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

```
Gly Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
            100                 105                 110

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

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
    130                 135                 140

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

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

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

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
        195                 200                 205

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
    210                 215                 220

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

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 56
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> P1AE0400輕鏈

<400> 56

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
            20                  25                  30

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

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

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
        115                 120                 125

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

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

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

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

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

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

<210> 57
<211> 443
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> P1AE0403重鏈

<400> 57

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 Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

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

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

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

```
Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
            100                 105                 110

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

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
    130                 135                 140

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

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

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

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
        195                 200                 205

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
    210                 215                 220

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

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
            260                 265                 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 58
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> P1AE0403輕鏈

<400> 58

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

```
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
            20                  25                  30

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

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

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
        115                 120                 125

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

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

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

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

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

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

<210> 59
<211> 443
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> P1AE0817重鏈

<400> 59

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

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

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

Gly Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
100 105 110

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

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

```
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
145                 150                 155                 160

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

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

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
        195                 200                 205

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
    210                 215                 220

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

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
            260                 265                 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 60
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> P1AE0817輕鏈

<400> 60

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

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

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

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

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
        115                 120                 125

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

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

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

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

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

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

<210> 61
<211> 226
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> (P1AE1689)輕鏈交叉VH-Cκ

<400> 61

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

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

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

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

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

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

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
    130                 135                 140

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

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

Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
            180                 185                 190
```

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
195 200 205

Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
210 215 220

Glu Cys
225

<210> 62
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL1a (CD40)輕鏈(帶電)

<400> 62

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

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

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

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

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg
115 120 125

Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

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

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

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

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

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

<210> 63
<211> 679
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH1a (CD40) (VHCH1帶電) Fc杵_PGLALA_(P1AE1689) (VL-CH1)

<400> 63

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

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

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

```
Gly Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
        195                 200                 205

Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
    210                 215                 220

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

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser
435 440 445

```
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
    450                 455                 460

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu
465                 470                 475                 480

Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly
                485                 490                 495

Leu Ser Phe Ile Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
            500                 505                 510

Leu Leu Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Arg Gly Ser Gly Ile Pro Ala Arg
        515                 520                 525

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
    530                 535                 540

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Glu
545                 550                 555                 560

Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser
                565                 570                 575

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
            580                 585                 590

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
        595                 600                 605

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
    610                 615                 620

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
625                 630                 635                 640

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
                645                 650                 655
```

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
660 665 670

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
675

<210> 64
<211> 443
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH1a (CD40) (VHCH1帶電) Fc臼_PGLALA

<400> 64

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

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

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

Gly Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
100 105 110

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

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

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

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

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

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
195 200 205

Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
210 215 220

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

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 65
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> (P1AE1689)輕鏈交叉VL-CH1

<400> 65

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Leu Ser Phe Ile Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Arg Gly 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 Phe Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

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

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

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

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

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

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

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

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215

<210> 66
<211> 219

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL1a (CD40)輕鏈

<400> 66

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

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

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

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

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
        115                 120                 125

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

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

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

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

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

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

<210> 67
<211> 689
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH1a (CD40) (VHCH1) Fc杵_PGLALA_(P1AE1689) (VH-Cκ)

<400> 67

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

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

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

Gly Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
100 105 110

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

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

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

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

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

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
195 200 205

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
210 215 220

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

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser
        435                 440                 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
    450                 455                 460

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser
465                 470                 475                 480

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Asp Tyr Asn
                485                 490                 495

Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
            500                 505                 510
```

Asp Ile Tyr Pro Asn Thr Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
515 520 525

Gly Arg Val Thr Met Thr Ile Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met
530 535 540

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
545 550 555 560

Arg Phe Arg Gly Ile His Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
565 570 575

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
580 585 590

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
595 600 605

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
610 615 620

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
625 630 635 640

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
645 650 655

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
660 665 670

His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
675 680 685

Cys

<210> 68
<211> 443
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH1a (CD40) (VHCH1) Fc臼_PGLALA

<400> 68

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

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

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

Gly Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
100 105 110

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

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

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

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

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

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
        195                 200                 205

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
    210                 215                 220

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

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
            260                 265                 270

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

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

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

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

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

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly
        355                 360                 365
```

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

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

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

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

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

<210> 69
<211> 907
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH1a (CD40) (VHCH1帶電_VH1a (CD40) (VHCH1帶電)-Fc杵_PGLALA_(P1AE1689) (VL-CH1) knob_PGLALA_(P1AE1689) (VL-CH1)

<400> 69

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

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

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

Gly Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
100 105 110

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

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

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

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

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

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
195 200 205

Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly
210 215 220

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
225 230 235 240

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
245 250 255

Phe Thr Gly Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser
260 265 270

Leu Glu Trp Met Gly Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr
275 280 285

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ile
290 295 300

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala
305 310 315 320

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr
325 330 335

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
340 345 350

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
355 360 365

Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
370 375 380

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
385 390 395 400

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
405 410 415

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
420 425 430

Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
435 440 445

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
450 455 460

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

465 470 475 480

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
485 490 495

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
500 505 510

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
515 520 525

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
530 535 540

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr
545 550 555 560

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
565 570 575

Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
580 585 590

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
595 600 605

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

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
645 650 655

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
660 665 670

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
675 680 685

Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu
690 695 700

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val
705 710 715 720

Asp Asn Tyr Gly Leu Ser Phe Ile Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly
725 730 735

Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Arg Gly Ser Gly
740 745 750

Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
755 760 765

Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln
770 775 780

Gln Ser Asn Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
785 790 795 800

Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
805 810 815

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
820 825 830

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
835 840 845

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
850 855 860

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu

865 870 875 880

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
885 890 895

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
900 905

<210> 70
<211> 671
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH1a (CD40) (VHCH1帶電)_VH1a (CD40) (VHCH1帶電)-Fc臼_PGLALA

<400> 70

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

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

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

Gly Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser

115 120 125

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

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

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

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

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
195 200 205

Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly
210 215 220

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
225 230 235 240

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
245 250 255

Phe Thr Gly Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser
260 265 270

Leu Glu Trp Met Gly Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr
275 280 285

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ile
290 295 300

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala
305 310 315 320

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr
325 330 335

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
340 345 350

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
355 360 365

Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
370 375 380

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
385 390 395 400

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
405 410 415

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
420 425 430

Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
435 440 445

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
450 455 460

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
465 470 475 480

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
485 490 495

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
500 505 510

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

515 520 525

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
530 535 540

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr
545 550 555 560

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
565 570 575

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
580 585 590

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
595 600 605

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

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
625 630 635 640

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
645 650 655

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
660 665 670

<210> 71
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B9輕鏈交叉VL-CH1

<400> 71

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 Thr 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 Asn Val Gly Ser Arg 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 Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser
100 105 110

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

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
130 135 140

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
145 150 155 160

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

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

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

Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 72
<211> 687
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH1a (CD40) (VHCH1) Fc杵_PGLALA_4B9 (VH-Cκ)

<400> 72

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

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

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

Gly Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
100 105 110

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

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

```
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
145                 150                 155                 160

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

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

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
        195                 200                 205

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
    210                 215                 220

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

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
            260                 265                 270

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

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

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

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

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg
```

340 345 350

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

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

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

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser
435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
450 455 460

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
465 470 475 480

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
485 490 495

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
500 505 510

Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
515 520 525

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
530 535 540

```
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
545                 550                 555                 560

Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
                565                 570                 575

Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
            580                 585                 590

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
        595                 600                 605

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
    610                 615                 620

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
625                 630                 635                 640

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
                645                 650                 655

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
            660                 665                 670

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
        675                 680                 685
```

<210> 73
<211> 915
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH1a (CD40) (VHCH1) _VH1a (CD40) (VHCH1)-Fc杵_PGLALA_(4B9) (VH-Cκ)

<400> 73

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

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

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

Gly Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
            100                 105                 110

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

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
    130                 135                 140

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

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

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

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
        195                 200                 205

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly
```

210 215 220

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
225 230 235 240

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
245 250 255

Phe Thr Gly Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser
260 265 270

Leu Glu Trp Met Gly Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr
275 280 285

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ile
290 295 300

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala
305 310 315 320

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr
325 330 335

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
340 345 350

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
355 360 365

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
370 375 380

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
385 390 395 400

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
405 410 415

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
420 425 430

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
435 440 445

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
450 455 460

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
465 470 475 480

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
485 490 495

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
500 505 510

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
515 520 525

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
530 535 540

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr
545 550 555 560

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
565 570 575

Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
580 585 590

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
595 600 605

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

610 615 620

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
645 650 655

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
660 665 670

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
675 680 685

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
690 695 700

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
705 710 715 720

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
725 730 735

Glu Trp Val Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala
740 745 750

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
755 760 765

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
770 775 780

Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln
785 790 795 800

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val
805 810 815

```
Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
            820                 825                 830

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
        835                 840                 845

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
    850                 855                 860

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
865                 870                 875                 880

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
                885                 890                 895

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
            900                 905                 910

Gly Glu Cys
        915
```

<210> 74
<211> 671
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH1a (CD40) (VHCH1)_VH1a (CD40) (VHCH1)-Fc臼_PGLALA

<400> 74

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45
```

```
Gly Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
            100                 105                 110

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

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
    130                 135                 140

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

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

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

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
        195                 200                 205

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    210                 215                 220

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
225                 230                 235                 240

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
```

245 250 255

Phe Thr Gly Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser
260 265 270

Leu Glu Trp Met Gly Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr
275 280 285

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ile
290 295 300

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala
305 310 315 320

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr
325 330 335

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
340 345 350

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
355 360 365

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
370 375 380

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
385 390 395 400

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
405 410 415

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
420 425 430

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
435 440 445

```
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
    450                 455                 460

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
465                 470                 475                 480

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                485                 490                 495

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            500                 505                 510

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
        515                 520                 525

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    530                 535                 540

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr
545                 550                 555                 560

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
                565                 570                 575

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
            580                 585                 590

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        595                 600                 605

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

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
625                 630                 635                 640

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
```

645 650 655

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
660 665 670

<210> 75
<211> 223
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 28H1輕鏈交叉VH-Cκ
<400> 75

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 His
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 Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
115 120 125

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

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

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

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

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

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

<210> 76
<211> 676
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH1a (CD40) (VHCH1帶電) Fc杵_PGLALA_28H1 (VL-CH1)

<400> 76

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

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

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

Gly Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
        195                 200                 205

Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
    210                 215                 220

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

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
            260                 265                 270
```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser
        435                 440                 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
    450                 455                 460

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu
465                 470                 475                 480
```

```
Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser Tyr
                485                 490                 495

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
            500                 505                 510

Ile Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
        515                 520                 525

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
    530                 535                 540

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro Pro
545                 550                 555                 560

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
                565                 570                 575

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
            580                 585                 590

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
        595                 600                 605

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
    610                 615                 620

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
625                 630                 635                 640

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
                645                 650                 655

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
            660                 665                 670
```

Pro Lys Ser Cys
675

<210> 77
<211> 904
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH1a (CD40) (VHCH1帶電) _VH1a (CD40) (VHCH1帶電) Fc杵_PGLALA_28H1 (VL-CH1)
<400> 77

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

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

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

Gly Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
100 105 110

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

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

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu

145 150 155 160

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

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

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
195 200 205

Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly
210 215 220

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
225 230 235 240

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
245 250 255

Phe Thr Gly Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser
260 265 270

Leu Glu Trp Met Gly Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr
275 280 285

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ile
290 295 300

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala
305 310 315 320

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr
325 330 335

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
340 345 350

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
355 360 365

Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
370 375 380

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
385 390 395 400

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
405 410 415

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
420 425 430

Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
435 440 445

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
450 455 460

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
465 470 475 480

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
485 490 495

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
500 505 510

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
515 520 525

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
530 535 540

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr

545 550 555 560

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
565 570 575

Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
580 585 590

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
595 600 605

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

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
645 650 655

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
660 665 670

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
675 680 685

Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu
690 695 700

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
705 710 715 720

Ser Arg Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
725 730 735

Arg Leu Leu Ile Ile Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp
740 745 750

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
755 760 765

Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln
770 775 780

Val Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser
785 790 795 800

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
805 810 815

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
820 825 830

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
835 840 845

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
850 855 860

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
865 870 875 880

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
885 890 895

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
900

<210> 78
<211> 748
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hu FAP胞外域+聚離胺酸標記+his6標記
<400> 78

```
Arg Pro Ser Arg Val His Asn Ser Glu Glu Asn Thr Met Arg Ala Leu
1               5                  10                  15

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

Pro Asn Trp Ile Ser Gly Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Ala Asp Asn
        35                  40                  45

Asn Ile Val Leu Tyr Asn Ile Glu Thr Gly Gln Ser Tyr Thr Ile Leu
    50                  55                  60

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

Pro Asp Arg Gln Phe Val Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp
                85                  90                  95

Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Ser Asn Gly
            100                 105                 110

Glu Phe Val Arg Gly Asn Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys
        115                 120                 125

Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile
    130                 135                 140

Tyr Leu Lys Gln Arg Pro Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Phe Asn
145                 150                 155                 160

Gly Arg Glu Asn Lys Ile Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu
                165                 170                 175

Glu Glu Met Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly
            180                 185                 190

Lys Phe Leu Ala Tyr Ala Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile
        195                 200                 205
```

Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile
210 215 220

Pro Tyr Pro Lys Ala Gly Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Ile Phe Ile
225 230 235 240

Ile Asp Thr Thr Tyr Pro Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val
245 250 255

Pro Ala Met Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp
260 265 270

Val Thr Asp Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn
275 280 285

Val Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp
290 295 300

Asp Cys Pro Lys Thr Gln Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp
305 310 315 320

Ala Gly Gly Phe Phe Val Ser Thr Pro Val Phe Ser Tyr Asp Ala Ile
325 330 335

Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His
340 345 350

Tyr Ile Lys Asp Thr Val Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys
355 360 365

Trp Glu Ala Ile Asn Ile Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr
370 375 380

Ser Ser Asn Glu Phe Glu Glu Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg
385 390 395 400

Ile Ser Ile Gly Ser Tyr Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His
405 410 415

Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Asp Tyr
420 425 430

Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu Val Cys Tyr Gly Pro Gly Ile Pro Ile Ser
435 440 445

Thr Leu His Asp Gly Arg Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu
450 455 460

Asn Lys Glu Leu Glu Asn Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu
465 470 475 480

Glu Ile Lys Lys Leu Glu Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met
485 490 495

Ile Leu Pro Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile
500 505 510

Gln Val Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala
515 520 525

Val Asn Trp Ile Ser Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala
530 535 540

Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu Tyr
545 550 555 560

Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Ile Thr
565 570 575

Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Lys Arg Ile
580 585 590

Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu
595 600 605

Ala Ser Gly Thr Gly Leu Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val
610 615 620

Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly
625 630 635 640

Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val
645 650 655

Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His
660 665 670

Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala
675 680 685

Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser
690 695 700

Asp Gln Asn His Gly Leu Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr
705 710 715 720

His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp Gly Lys
725 730 735

Lys Lys Lys Lys Lys Gly His His His His His His
740 745

<210> 79
<211> 761
<212> PRT
<213> 鼠類

<400> 79

Met Lys Thr Trp Leu Lys Thr Val Phe Gly Val Thr Thr Leu Ala Ala
1 5 10 15

Leu Ala Leu Val Val Ile Cys Ile Val Leu Arg Pro Ser Arg Val Tyr

20 25 30

Lys Pro Glu Gly Asn Thr Lys Arg Ala Leu Thr Leu Lys Asp Ile Leu
35 40 45

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

Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Glu Asp Asp Asn Ile Val Phe Tyr Asn
65 70 75 80

Ile Glu Thr Arg Glu Ser Tyr Ile Ile Leu Ser Asn Ser Thr Met Lys
85 90 95

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

Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala
115 120 125

Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Gln Asn Gly Glu Phe Val Arg Gly Tyr
130 135 140

Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys Trp Ser Pro Val Gly Ser
145 150 155 160

Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu Lys Gln Arg Pro
165 170 175

Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Tyr Thr Gly Arg Glu Asn Arg Ile
180 185 190

Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu Glu Glu Met Leu Ala Thr
195 200 205

Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asp Gly Lys Phe Leu Ala Tyr Val
210 215 220

```
Glu Phe Asn Asp Ser Asp Ile Pro Ile Ile Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly
225                 230                 235                 240

Asp Gly Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile Pro Tyr Pro Lys Ala Gly
                245                 250                 255

Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Val Phe Ile Val Asp Thr Thr Tyr Pro
            260                 265                 270

His His Val Gly Pro Met Glu Val Pro Val Pro Glu Met Ile Ala Ser
        275                 280                 285

Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp Val Ser Ser Glu Arg Val
    290                 295                 300

Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn Val Ser Val Leu Ser Ile
305                 310                 315                 320

Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp His Ala Trp Glu Cys Pro Lys Asn Gln
                325                 330                 335

Glu His Val Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp Ala Gly Gly Phe Phe Val
            340                 345                 350

Ser Thr Pro Ala Phe Ser Gln Asp Ala Thr Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe
        355                 360                 365

Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His Tyr Ile Lys Asp Thr Val
    370                 375                 380

Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys Trp Glu Ala Ile Tyr Ile
385                 390                 395                 400

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

Gly Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg Ile Ser Ile Gly Asn Ser
```

420 425 430

Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His Leu Arg Lys Glu Arg Cys
435 440 445

Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Tyr Lys Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu
450 455 460

Val Cys Tyr Gly Pro Gly Leu Pro Ile Ser Thr Leu His Asp Gly Arg
465 470 475 480

Thr Asp Gln Glu Ile Gln Val Leu Glu Glu Asn Lys Glu Leu Glu Asn
485 490 495

Ser Leu Arg Asn Ile Gln Leu Pro Lys Val Glu Ile Lys Lys Leu Lys
500 505 510

Asp Gly Gly Leu Thr Phe Trp Tyr Lys Met Ile Leu Pro Pro Gln Phe
515 520 525

Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gln Val Tyr Gly Gly Pro
530 535 540

Cys Ser Gln Ser Val Lys Ser Val Phe Ala Val Asn Trp Ile Thr Tyr
545 550 555 560

Leu Ala Ser Lys Glu Gly Ile Val Ile Ala Leu Val Asp Gly Arg Gly
565 570 575

Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Phe Leu His Ala Val Tyr Arg Lys Leu
580 585 590

Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Leu Thr Ala Val Arg Lys Phe Ile
595 600 605

Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Glu Arg Ile Ala Ile Trp Gly Trp Ser
610 615 620

Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ser Gly Thr Gly Leu
625 630 635 640

Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr
645 650 655

Ala Ser Ile Tyr Ser Glu Arg Phe Met Gly Leu Pro Thr Lys Asp Asp
660 665 670

Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val Met Ala Arg Ala Glu Tyr
675 680 685

Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn
690 695 700

Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala Lys Ala Leu Val Asn Ala
705 710 715 720

Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser Asp Gln Asn His Gly Ile
725 730 735

Ser Ser Gly Arg Ser Gln Asn His Leu Tyr Thr His Met Thr His Phe
740 745 750

Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp
755 760

<210> 80
<211> 749
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鼠類FAP胞外域+聚離胺酸-標記+his6標記

<400> 80

Arg Pro Ser Arg Val Tyr Lys Pro Glu Gly Asn Thr Lys Arg Ala Leu
1 5 10 15

```
Thr Leu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Tyr Phe
            20                  25                  30

Pro Asn Trp Ile Ser Glu Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Glu Asp Asp
        35                  40                  45

Asn Ile Val Phe Tyr Asn Ile Glu Thr Arg Glu Ser Tyr Ile Ile Leu
    50                  55                  60

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

Pro Asp Arg Gln Phe Val Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp
                85                  90                  95

Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Gln Asn Gly
            100                 105                 110

Glu Phe Val Arg Gly Tyr Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys
        115                 120                 125

Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile
    130                 135                 140

Tyr Leu Lys Gln Arg Pro Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Tyr Thr
145                 150                 155                 160

Gly Arg Glu Asn Arg Ile Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu
                165                 170                 175

Glu Glu Met Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asp Gly
            180                 185                 190

Lys Phe Leu Ala Tyr Val Glu Phe Asn Asp Ser Asp Ile Pro Ile Ile
        195                 200                 205

Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly Asp Gly Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile
```

210 215 220

Pro Tyr Pro Lys Ala Gly Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Val Phe Ile
225 230 235 240

Val Asp Thr Thr Tyr Pro His His Val Gly Pro Met Glu Val Pro Val
245 250 255

Pro Glu Met Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp
260 265 270

Val Ser Ser Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn
275 280 285

Val Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp His Ala Trp
290 295 300

Glu Cys Pro Lys Asn Gln Glu His Val Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp
305 310 315 320

Ala Gly Gly Phe Phe Val Ser Thr Pro Ala Phe Ser Gln Asp Ala Thr
325 330 335

Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His
340 345 350

Tyr Ile Lys Asp Thr Val Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys
355 360 365

Trp Glu Ala Ile Tyr Ile Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr
370 375 380

Ser Ser Asn Glu Phe Glu Gly Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg
385 390 395 400

Ile Ser Ile Gly Asn Ser Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His
405 410 415

Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Tyr Lys
420 425 430

Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu Val Cys Tyr Gly Pro Gly Leu Pro Ile Ser
435 440 445

Thr Leu His Asp Gly Arg Thr Asp Gln Glu Ile Gln Val Leu Glu Glu
450 455 460

Asn Lys Glu Leu Glu Asn Ser Leu Arg Asn Ile Gln Leu Pro Lys Val
465 470 475 480

Glu Ile Lys Lys Leu Lys Asp Gly Gly Leu Thr Phe Trp Tyr Lys Met
485 490 495

Ile Leu Pro Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile
500 505 510

Gln Val Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Lys Ser Val Phe Ala
515 520 525

Val Asn Trp Ile Thr Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Ile Val Ile Ala
530 535 540

Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Phe Leu His
545 550 555 560

Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Leu Thr
565 570 575

Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Glu Arg Ile
580 585 590

Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu
595 600 605

Ala Ser Gly Thr Gly Leu Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val

610 615 620

Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Ile Tyr Ser Glu Arg Phe Met Gly
625 630 635 640

Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val
645 650 655

Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His
660 665 670

Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala
675 680 685

Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser
690 695 700

Asp Gln Asn His Gly Ile Leu Ser Gly Arg Ser Gln Asn His Leu Tyr
705 710 715 720

Thr His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp Gly
725 730 735

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly His His His His His His
740 745

<210> 81
<211> 748
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 食蟹獼猴FAP胞外域+聚離胺酸標記+his6標記

<400> 81

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

Thr Leu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Phe Phe

20 25 30

Pro Asn Trp Ile Ser Gly Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Ala Asp Asn
35 40 45

Asn Ile Val Leu Tyr Asn Ile Glu Thr Gly Gln Ser Tyr Thr Ile Leu
50 55 60

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

Pro Asp Arg Gln Phe Val Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp
85 90 95

Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Ser Asn Gly
100 105 110

Glu Phe Val Arg Gly Asn Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys
115 120 125

Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile
130 135 140

Tyr Leu Lys Gln Arg Pro Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Phe Asn
145 150 155 160

Gly Arg Glu Asn Lys Ile Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu
165 170 175

Glu Glu Met Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly
180 185 190

Lys Phe Leu Ala Tyr Ala Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile
195 200 205

Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile
210 215 220

Pro Tyr Pro Lys Ala Gly Ala Lys Asn Pro Phe Val Arg Ile Phe Ile
225 230 235 240

Ile Asp Thr Thr Tyr Pro Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val
245 250 255

Pro Ala Met Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp
260 265 270

Val Thr Asp Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn
275 280 285

Val Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp
290 295 300

Asp Cys Pro Lys Thr Gln Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp
305 310 315 320

Ala Gly Gly Phe Phe Val Ser Thr Pro Val Phe Ser Tyr Asp Ala Ile
325 330 335

Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His
340 345 350

Tyr Ile Lys Asp Thr Val Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys
355 360 365

Trp Glu Ala Ile Asn Ile Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr
370 375 380

Ser Ser Asn Glu Phe Glu Asp Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg
385 390 395 400

Ile Ser Ile Gly Ser Tyr Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His
405 410 415

Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Asp Tyr

420 425 430

Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu Val Cys Tyr Gly Pro Gly Ile Pro Ile Ser
435 440 445

Thr Leu His Asp Gly Arg Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu
450 455 460

Asn Lys Glu Leu Glu Asn Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu
465 470 475 480

Glu Ile Lys Lys Leu Glu Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met
485 490 495

Ile Leu Pro Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile
500 505 510

Gln Val Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala
515 520 525

Val Asn Trp Ile Ser Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala
530 535 540

Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu Tyr
545 550 555 560

Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Ile Thr
565 570 575

Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Lys Arg Ile
580 585 590

Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu
595 600 605

Ala Ser Gly Thr Gly Leu Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val
610 615 620

Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly
625 630 635 640

Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val
645 650 655

Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His
660 665 670

Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala
675 680 685

Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser
690 695 700

Asp Gln Asn His Gly Leu Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr
705 710 715 720

His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp Gly Lys
725 730 735

Lys Lys Lys Lys Lys Gly His His His His His His
740 745

<210> 82
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子G4S

<400> 82

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 83
<211> 10
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子(G4S)2

<400> 83

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

<210> 84
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子(SG4)2

<400> 84

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

<210> 85
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子G4(SG4)2

<400> 85

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

<210> 86
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 86

Gly Ser Pro Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser

1 5 10

<210> 87
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子 (G4S)3

<400> 87

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

<210> 88
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子 (G4S)4

<400> 88

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> 89
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 89

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5

<210> 90

<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 90

Gly Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser
1 5

<210> 91
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 91

Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 92
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 92

Gly Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 93
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 93

Gly Gly Ser Gly
1

<210> 94
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 94

Gly Gly Ser Gly Asn Gly Ser Gly
1 5

<210> 95
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 95

Gly Gly Asn Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 96
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 96

Gly Gly Asn Gly Ser Gly
1 5

<210> 97
<211> 227
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> Fc杵鏈

<400> 97

```
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

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 Lys
225

<210> 98
<211> 227
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fc臼鏈

<400> 98

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> 99
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

<400> 99

Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
1 5 10 15

Thr Val Ser Ser
20

<210> 100
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 100

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 101
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

<400> 101

Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
1 5 10 15

Thr Val Ser Ser
20

<210> 102
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 102

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 103
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

<400> 103

Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
1 5 10 15

Thr Val Ser Ser
20

<210> 104
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 104

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 105
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> huCD40輕鏈(帶電)

<400> 105

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

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

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

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

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg
115 120 125

Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

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

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

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

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

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

<210> 106
<211> 676
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> huCD40 (VHCH1帶電) Fc PGLALA FAP (VL-CH1)

<400> 106

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

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

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

35 40 45

Ala Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
195 200 205

Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
210 215 220

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

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser

435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
450 455 460

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu
465 470 475 480

Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser Tyr
485 490 495

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
500 505 510

Ile Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
515 520 525

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
530 535 540

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro Pro
545 550 555 560

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
565 570 575

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
580 585 590

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
595 600 605

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
610 615 620

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
625 630 635 640

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
645 650 655

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
660 665 670

Pro Lys Ser Cys
675

<210> 107
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH (PD-L1)

<400> 107

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 108
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL (PD-L1)

<400> 108

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

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

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

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

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

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

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

<210> 109
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH (PD-L1)

<400> 109

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 110
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL (PD-L1)

<400> 110

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 Arg 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 Asp 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 Leu Pro
85 90 95

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

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種雙特異性抗原結合分子，其包含

(a)至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域，及

(b)至少一個能夠特異性結合於纖維母細胞活化蛋白(FAP)之抗原結合域，其包含

包含SEQ ID NO:15之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)，或

包含SEQ ID NO:16之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)，或

包含SEQ ID NO:16之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)，或

包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:25之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)。

【第2項】

如請求項1之雙特異性抗原結合分子，其另外包含

(c)由能夠藉由介導靜電轉向作用穩定締合之第一及第二次單元構成的Fc區。

【第3項】

如請求項1或2之雙特異性抗原結合分子，其中能夠特異性結合於CD40之該抗原結合域包含重鏈可變區(V_HCD40)，其包含：(i)包含SEQ ID NO:27之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:28之胺基酸序列之CDR-H2及(iii)包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可

變區(V_LCD40)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列之CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO:31之胺基酸序列之CDR-L2及(vi)包含SEQ ID NO:32之胺基酸序列之CDR-L3。

【第4項】

如請求項1或2之雙特異性抗原結合分子，其中能夠特異性結合於CD40之該抗原結合域包含

(a)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的VL，或

(b)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的VL，或

(c)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:43之胺基酸序列的VL，或

(d)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的VL，或

(e)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的VL，或

(f)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的VL，或

(g)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:43之胺基酸序列的VL，或

(h)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的VL，或

(i)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:41之胺

基酸序列的VL，或

(j)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的VL，或

(k)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:43之胺基酸序列的VL，或

(l)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的VL，或

(m)包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的VL，或

(n)包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的VL，或

(o)包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:43之胺基酸序列的VL，或

(p)包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的VL。

【第5項】

如請求項1或2之雙特異性抗原結合分子，其中能夠特異性結合於CD40之該抗原結合域包含：包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的VL。

【第6項】

如請求項1或2之雙特異性抗原結合分子，其中能夠特異性結合於CD40之該抗原結合域包含

(a)包含SEQ ID NO:45之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:51之胺

基酸序列的VL，或

(b)包含SEQ ID NO:46之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的VL，或

(c)包含SEQ ID NO:47之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的VL，或

(d)包含SEQ ID NO:48之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的VL，或

(e)包含SEQ ID NO:45之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的VL，或

(f)包含SEQ ID NO:46之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的VL，或

(g)包含SEQ ID NO:47之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的VL，或

(h)包含SEQ ID NO:48之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的VL，或

(i)包含SEQ ID NO:49之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:53之胺基酸序列的VL，或

(j)包含SEQ ID NO:50之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:53之胺基酸序列的VL，或

(k)包含SEQ ID NO:49之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:54之胺基酸序列的VL，或

(l)包含SEQ ID NO:50之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:54之胺基酸序列的VL。

【第7項】

如請求項1或2之雙特異性抗原結合分子，其中能夠特異性結合於CD40之該抗原結合域包含：包含SEQ ID NO:45之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的VL，或其中能夠特異性結合於CD40之該抗原結合域包含：包含SEQ ID NO:48之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的VL。

【第8項】

如請求項1或2之雙特異性抗原結合分子，其包含

(i)至少一個能夠特異性結合於CD40之抗原結合域，其包含：包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HCD40)及包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LCD40)，及

(ii)至少一個能夠特異性結合於FAP之抗原結合域，其包含：包含SEQ ID NO:15之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)。

【第9項】

如請求項2之雙特異性抗原結合分子，其中該Fc區為IgG1 Fc區或IgG4 Fc區，且其中該Fc區包含一或多個降低該抗體對Fc受體之結合親和力及/或效應功能的胺基酸取代。

【第10項】

如請求項2之雙特異性抗原結合分子，其中該Fc區屬於具有胺基酸突變L234A、L235A及P329G (根據Kabat EU索引編號)之人類IgG1子類別。

【第11項】

如請求項1或2之雙特異性抗原結合分子，其中該雙特異性抗原結合分子包含

(a)至少兩個能夠特異性結合於CD40之Fab片段，其連接至該Fc區，及

(b)一個能夠特異性結合於FAP之抗原結合域，其連接至該Fc區之C端。

【第12項】

如請求項1或2之雙特異性抗原結合分子，其中該雙特異性抗原結合分子包含

(a)至少兩個能夠特異性結合於CD40的Fab片段，其融合至該Fc區，及

(b)能夠特異性結合於FAP的交叉fab片段，其融合至該Fc區之C端。

【第13項】

如請求項12之雙特異性抗原結合分子，其中能夠特異性結合於FAP之該交叉fab片段的VH-Cκ鏈融合至該Fc區之該C端。

【第14項】

如請求項1或2之雙特異性抗原結合分子，其中該雙特異性抗原結合分子包含

(a)包含兩個能夠特異性結合於CD40之Fab片段及Fc區的抗體之兩個輕鏈及兩個重鏈，及

(b)能夠特異性結合於FAP之交叉fab片段，其中該VL-CH1鏈融合至(a)之兩個重鏈中之一者的C端。

【第15項】

如請求項1或2之雙特異性抗原結合分子，其包含

(a)各自包含SEQ ID NO:62之胺基酸序列之兩個輕鏈、包含SEQ ID NO:61之胺基酸序列之一個輕鏈、包含SEQ ID NO:63之胺基酸序列之第一重鏈及包含SEQ ID NO:64之胺基酸序列之第二重鏈，或

(b)各自包含SEQ ID NO:66之胺基酸序列之兩個輕鏈、包含SEQ ID NO:65之胺基酸序列之一個輕鏈、包含SEQ ID NO:67之胺基酸序列之第一重鏈及包含SEQ ID NO:68之胺基酸序列之第二重鏈。

【第16項】

如請求項1或2之雙特異性抗原結合分子，其包含各自包含SEQ ID NO:62之胺基酸序列之兩個輕鏈、包含SEQ ID NO:61之胺基酸序列之一個輕鏈、包含SEQ ID NO:63之胺基酸序列之第一重鏈及包含SEQ ID NO:64之胺基酸序列之第二重鏈。

【第17項】

如請求項1或2之雙特異性抗原結合分子，其中該雙特異性抗原結合分子包含四個能夠特異性結合於CD40之Fab片段。

【第18項】

一種特異性結合於FAP之抗體，其中該抗體包含：

(a)包含SEQ ID NO:15之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)，

(b)包含SEQ ID NO:16之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)，

(c)包含SEQ ID NO:16之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)，或

(d)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO:25之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)。

【第19項】

一種經分離核酸，其編碼如請求項1至17中任一項之雙特異性抗原結合分子或如請求項18之抗體。

【第20項】

一種表現載體，其包含如請求項19之經分離核酸。

【第21項】

一種宿主細胞，其包含如請求項19之經分離核酸或如請求項20之表現載體。

【第22項】

一種製造雙特異性抗原結合分子之方法，其包含在適於表現該雙特異性抗原結合分子之條件下培養如請求項21之宿主細胞，及分離該雙特異性抗原結合分子。

【第23項】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至17中任一項之雙特異性抗原結合分子或如請求項18之抗體及醫藥學上可接受之載劑。

【第24項】

如請求項23之醫藥組合物，其進一步包含額外治療劑。

【第25項】

一種如請求項1至17中任一項之雙特異性抗原結合分子或如請求項23之醫藥組合物的用途，其用於製造供治療癌症用之藥劑。

【第26項】

一種如請求項1至17中任一項之雙特異性抗原結合分子或如請求項23之醫藥組合物之用途，其用於製造藥劑，該藥劑係用於：

(i)藉由表現CD40之抗原呈現細胞(APC)誘導免疫刺激，

(ii)刺激腫瘤特異性T細胞反應，

(iii)引起腫瘤細胞之細胞凋亡，

(iv)延遲癌症進展，

(v)延長罹患癌症之患者的存活期，或

(vi)治療感染。

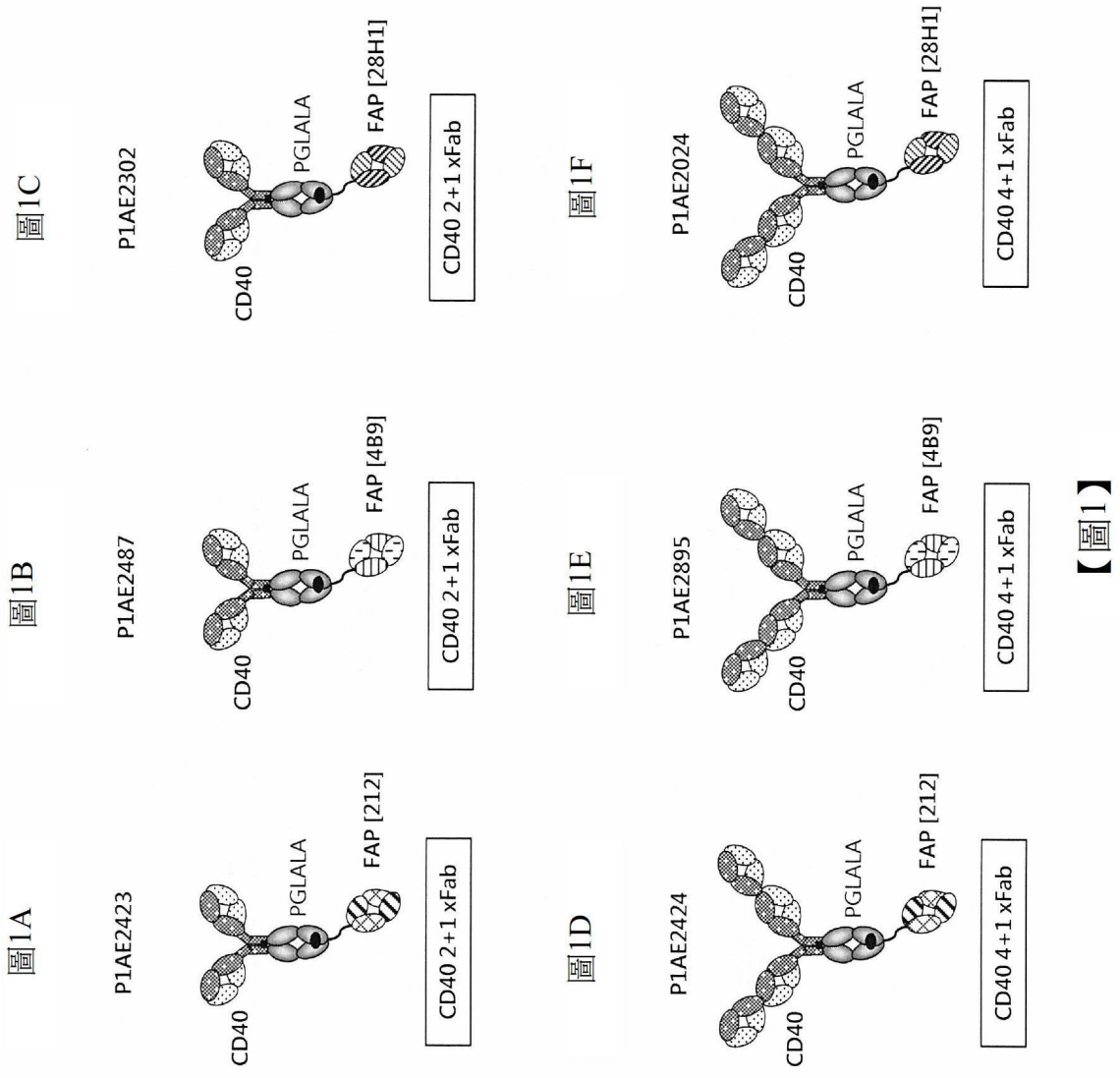
【第27項】

如請求項25或26之用途，其中該藥劑係用於與化學治療劑、輻射及/或用於癌症免疫療法之其他藥劑組合投與。

【第28項】

如請求項25或26之用途，其中該藥劑係用於與阻斷PD-L1/PD-1相互作用之藥劑組合投與。

【發明圖式】


圖1A
P1AE2423
CD40
PGLALA
FAP [212]
CD40 2+1 xFab
圖1B
P1AE2487
CD40
PGLALA
FAP [4B9]
CD40 2+1 xFab
圖1C
P1AE2302
CD40
PGLALA
FAP [28H1]
CD40 2+1 xFab
圖1D
P1AE2424
CD40
PGLALA
FAP [212]
CD40 4+1 xFab
圖1E
P1AE2895
CD40
PGLALA
FAP [4B9]
CD40 4+1 xFab
圖1F
P1AE2024
CD40
PGLALA
FAP [28H1]
CD40 4+1 xFab

【圖1】

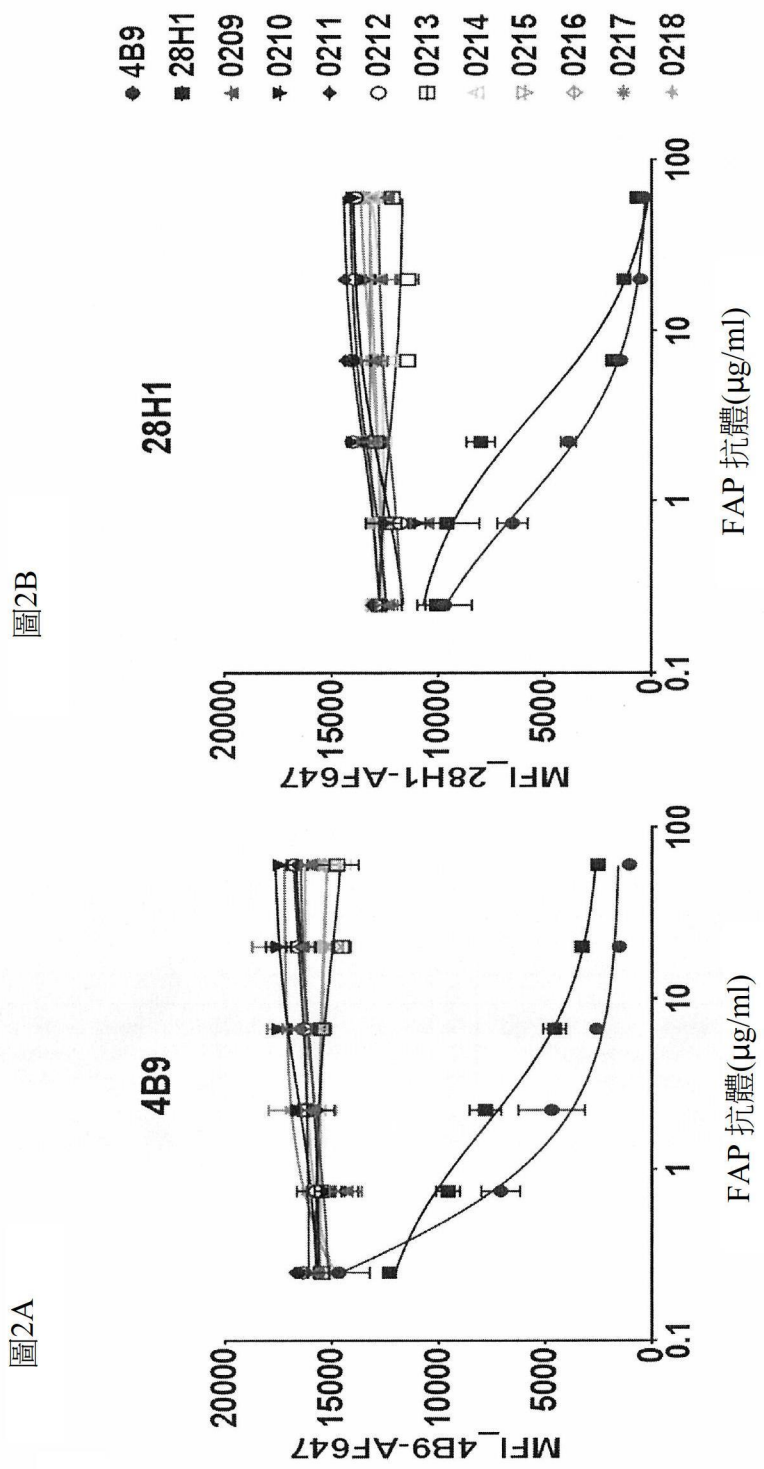
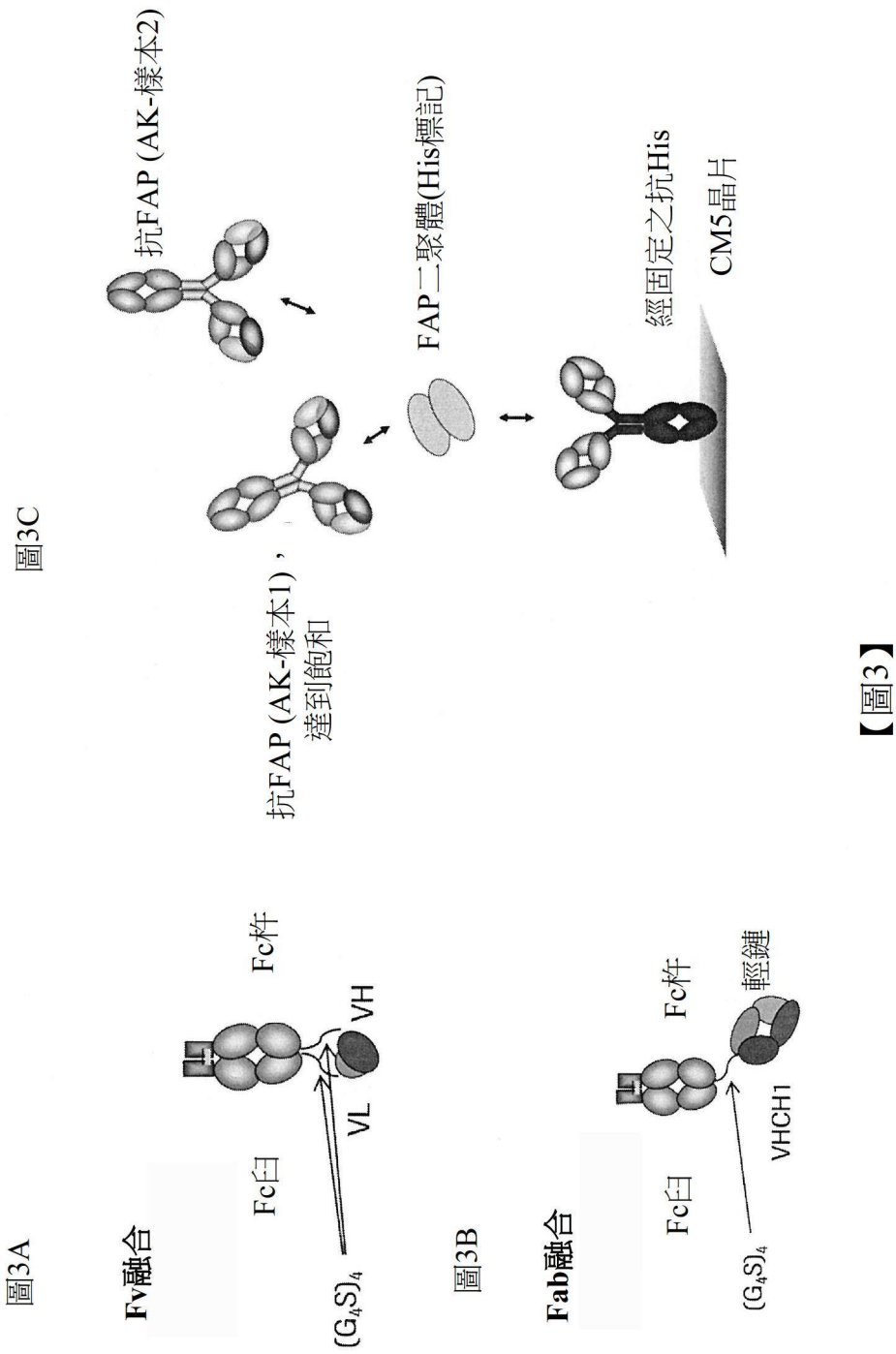

4B9
28H1
0209
0210
0211
0212
0213
0214
0215
0216
0217
0218
28H1
4B9
MFI_28H1-AF647
MFI_4B9-AF647
20000
15000
10000
5000
0
0.1
1
10
100
FAP 抗體(μg/ml)
FAP 抗體(μg/ml)

圖2B

圖2A

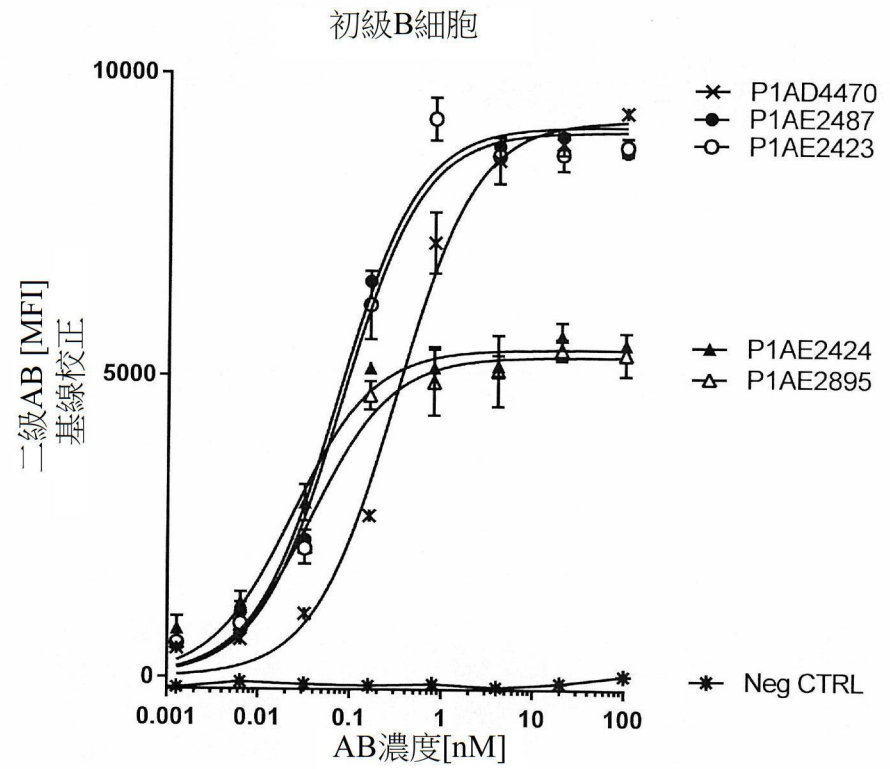
【圖2】


圖3A
Fv融合
Fc臼
Fc杵
VH
VL
$(G_4S)_4$
圖3B
Fab融合
Fc臼
Fc杵
輕鏈
VHCH1
$(G_4S)_4$
圖3C
抗FAP (AK-樣本2)
抗FAP (AK-樣本1)，
達到飽和
FAP二聚體(His標記)
經固定之抗His
CM5晶片

【圖3】

P1AE2423: CD40 x FAP (212) 2+1交叉單抗　**P1AE2424:** CD40 x FAP (212) 4+1交叉單抗
P1AE2487: CD40 x FAP (4B9) 2+1交叉單抗　**P1AE2895:** CD40 x FAP (4B9) 4+1交叉單抗
P1AE2302: CD40 x FAP (28H1) 2+1交叉單抗　**P1AE2024:** CD40 x FAP (28H1) 4+1交叉單抗

【圖4】



P1AD4470: CD40 IgG1
P1AE2423: CD40 x FAP (212) 2+1交叉單抗
P1AE2487: CD40 x FAP (4B9) 2+1交叉單抗
P1AE2424: CD40 x FAP (212) 4+1交叉單抗
P1AE2895: CD40 x FAP (4B9) 4+1交叉單抗

【圖5】

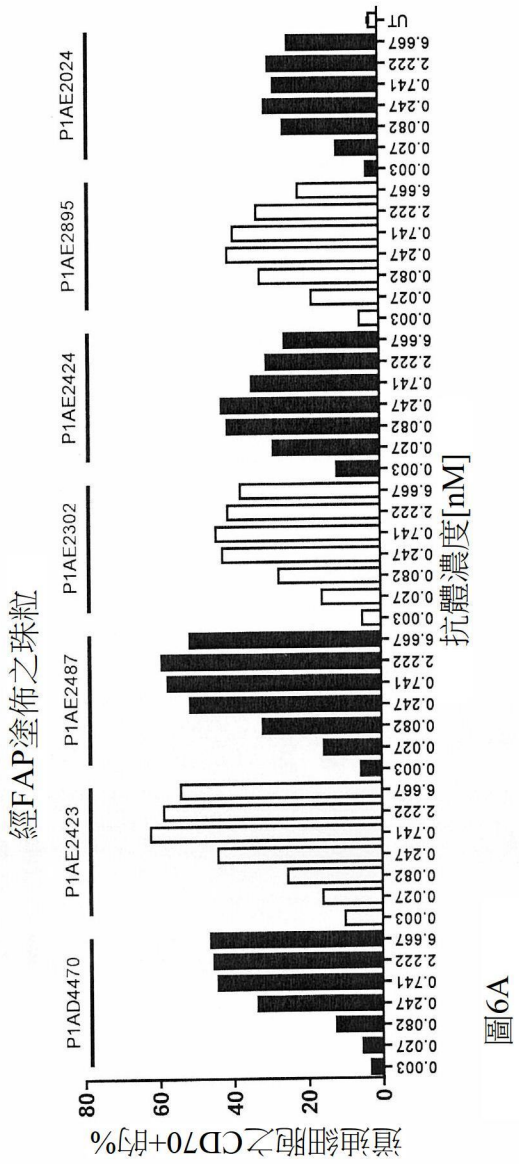


圖6A

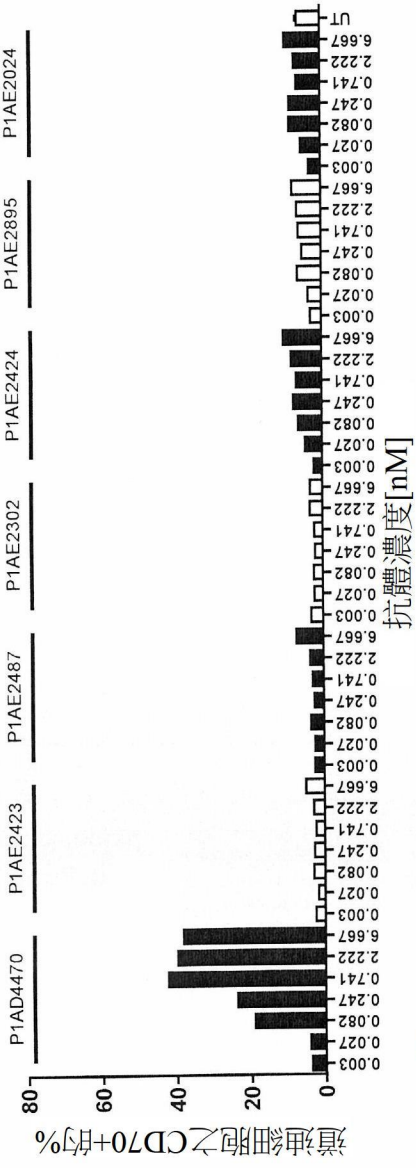


圖6B

P1AD4470: CD40 lgG1
P1AE2423: CD40 x FAP (212) 2+1交叉單抗
P1AE2487: CD40 x FAP (4B9) 2+1交叉單抗
P1AE2302: CD40 x FAP (28H1) 2+1交叉單抗
P1AE2424: CD40 x FAP (212) 4+1交叉單抗
P1AE2895: CD40 x FAP (4B9) 4+1交叉單抗
P1AE2024: CD40 x FAP (28H1) 4+1交叉單抗

【圖6】

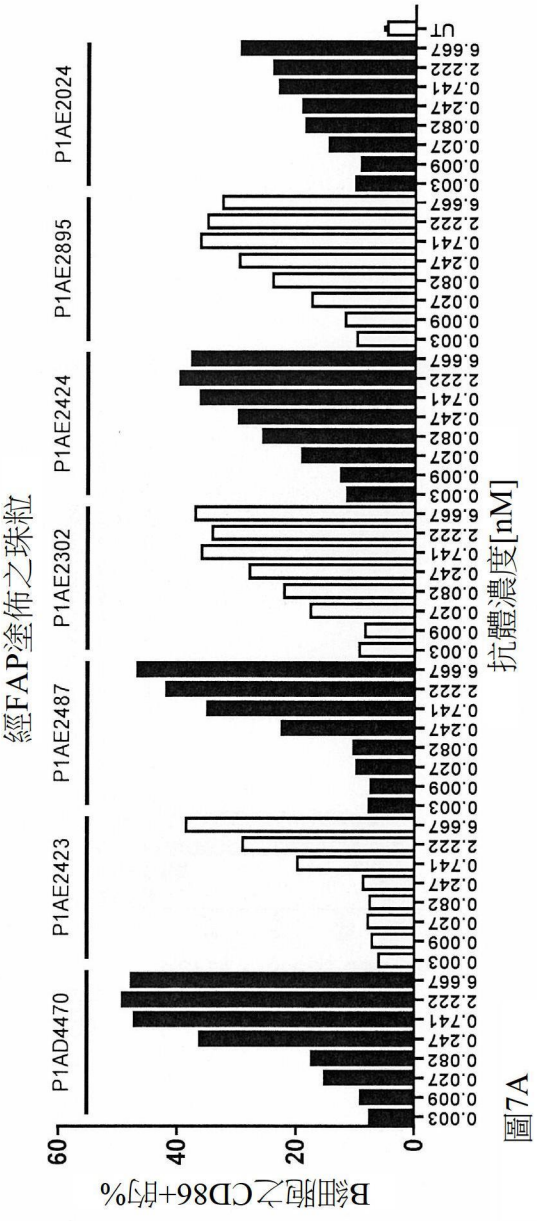


圖7A

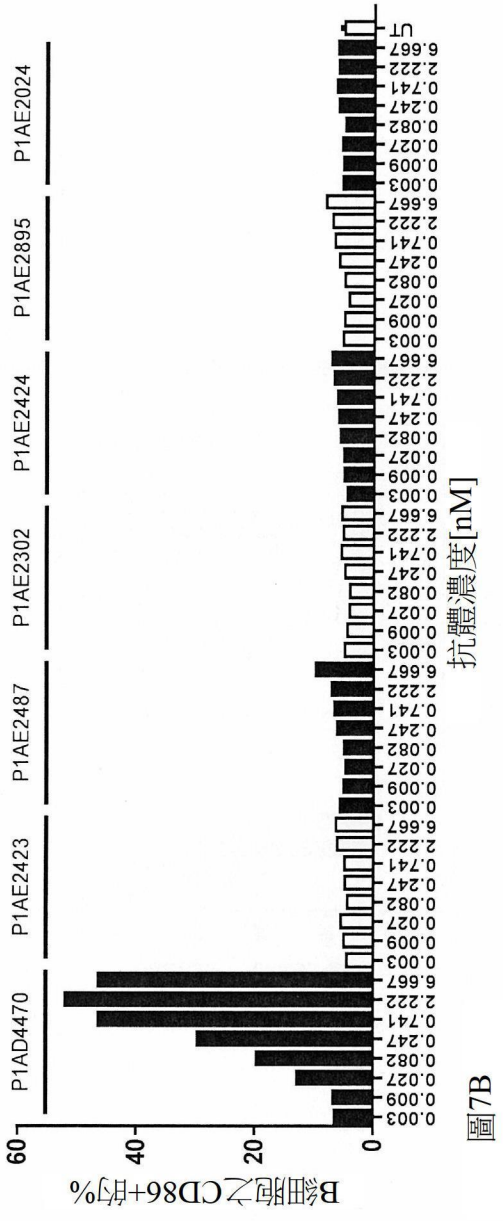


圖7B

【圖7】

P1AD4470: CD40 IgG1
P1AE2423: CD40 x FAP (212) 2+1交叉單抗
P1AE2487: CD40 x FAP (4B9) 2+1交叉單抗
P1AE2302: CD40 x FAP (28H1) 2+1 交叉單抗
P1AE2424: CD40 x FAP (212) 4+1交叉單抗
P1AE2895: CD40 x FAP (4B9) 4+1交叉單抗
P1AE2024: CD40 x FAP (28H1) 4+1 交叉單抗

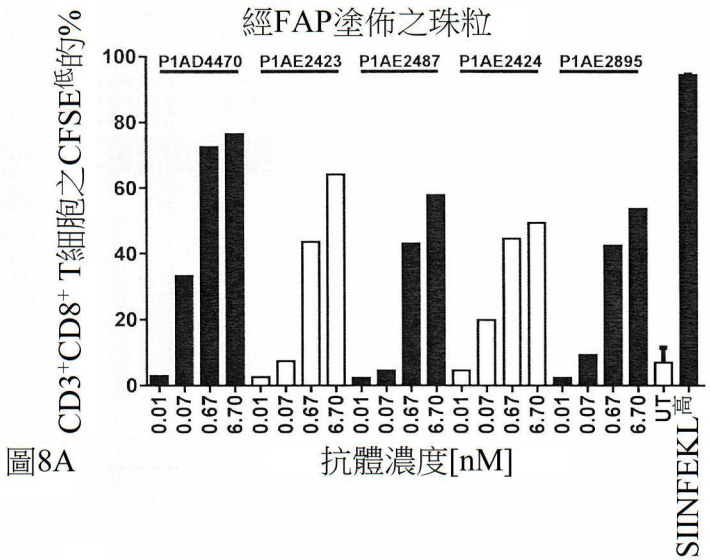


圖8A

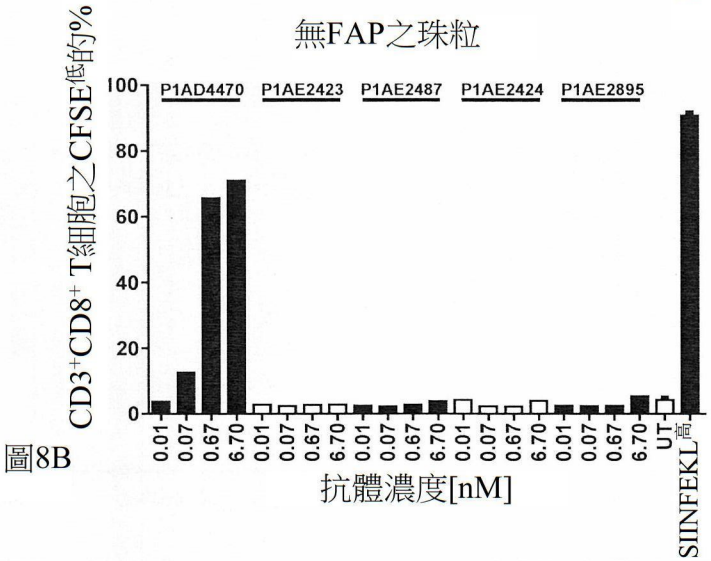
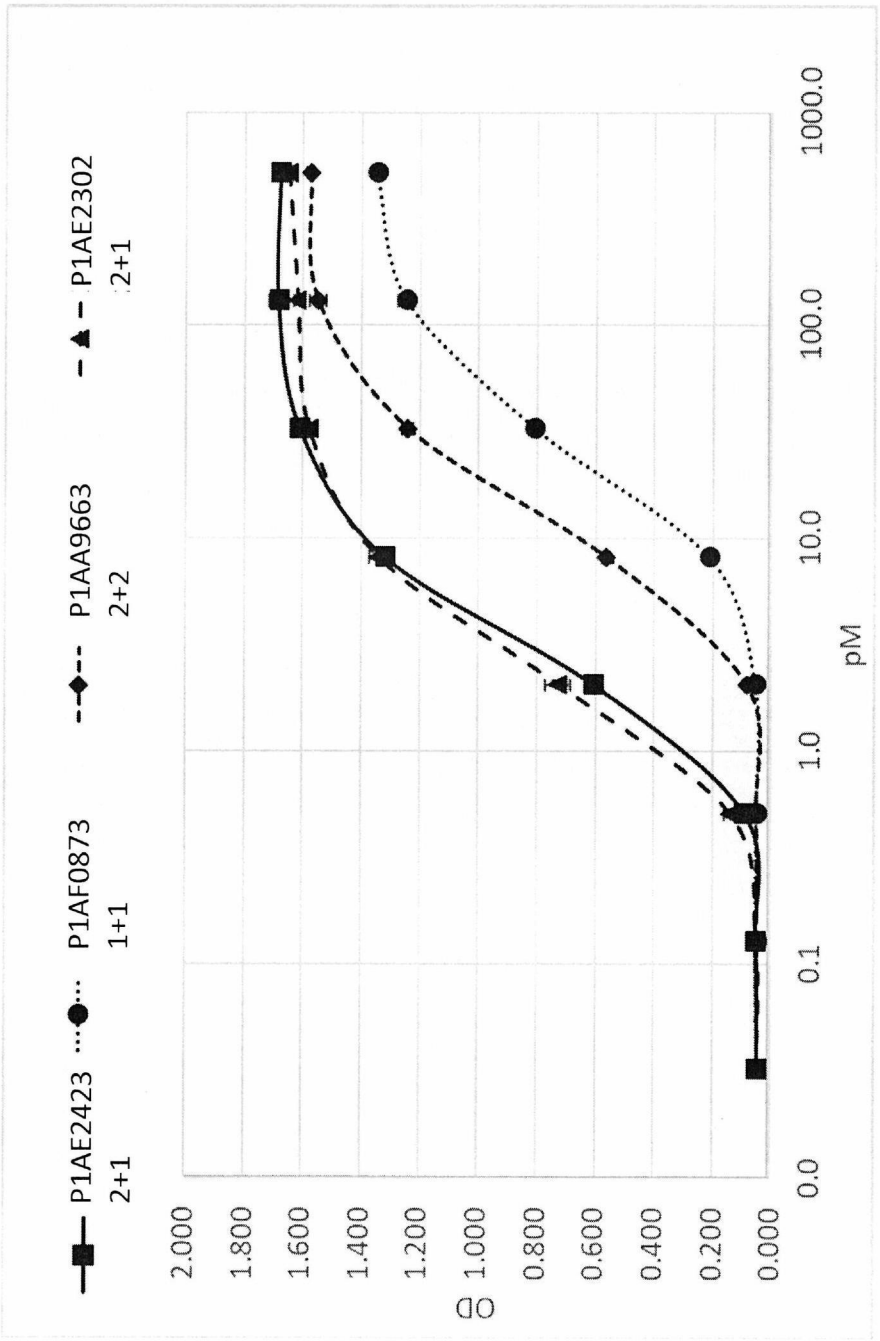


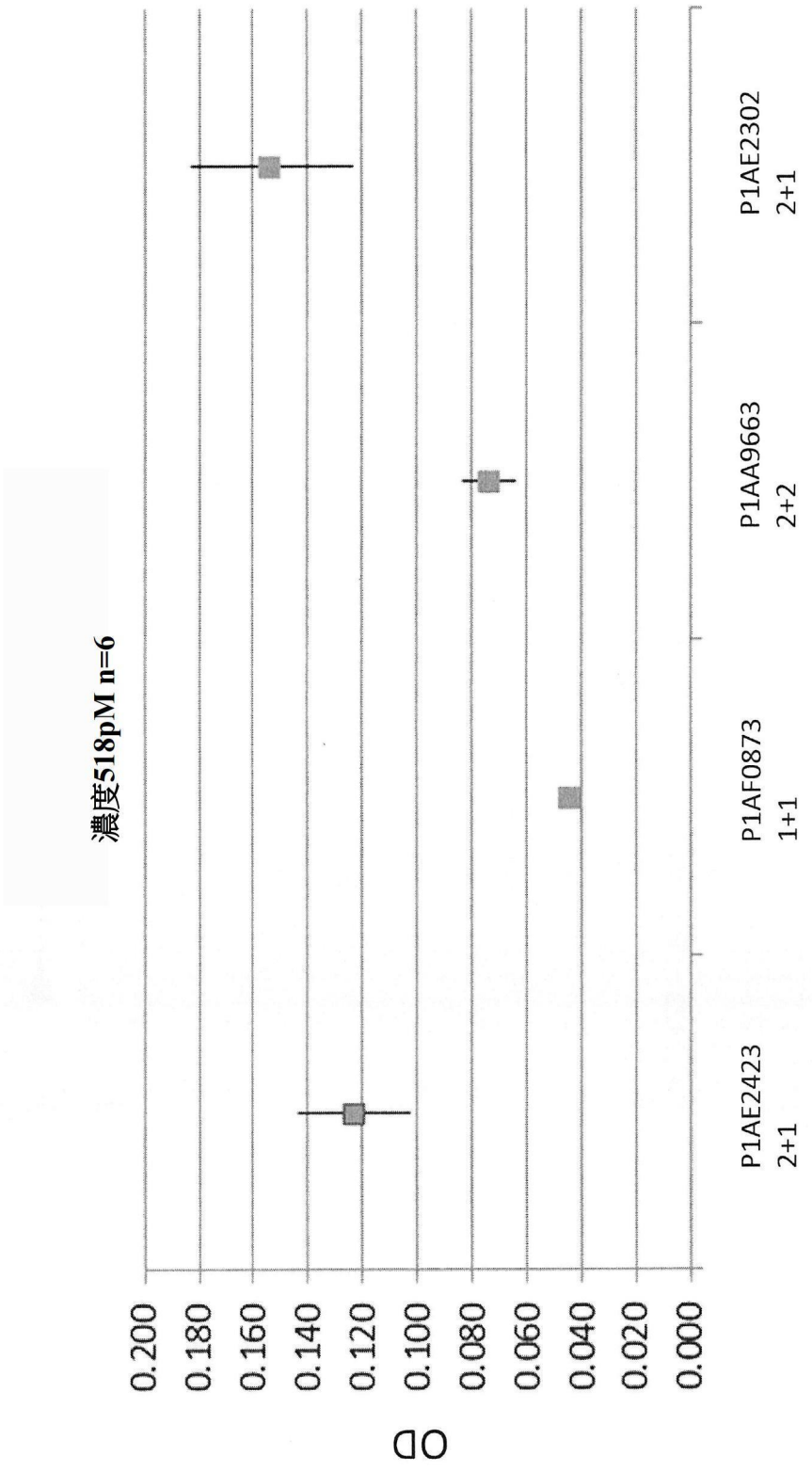
圖8B

P1AD4470: CD40 IgG1
P1AE2423: CD40 x FAP (212) 2+1交叉單抗
P1AE2487: CD40 x FAP (4B9) 2+1交叉單抗
P1AE2424: CD40 x FAP (212) 4+1交叉單抗
P1AE2895: CD40 x FAP (4B9) 4+1交叉單抗

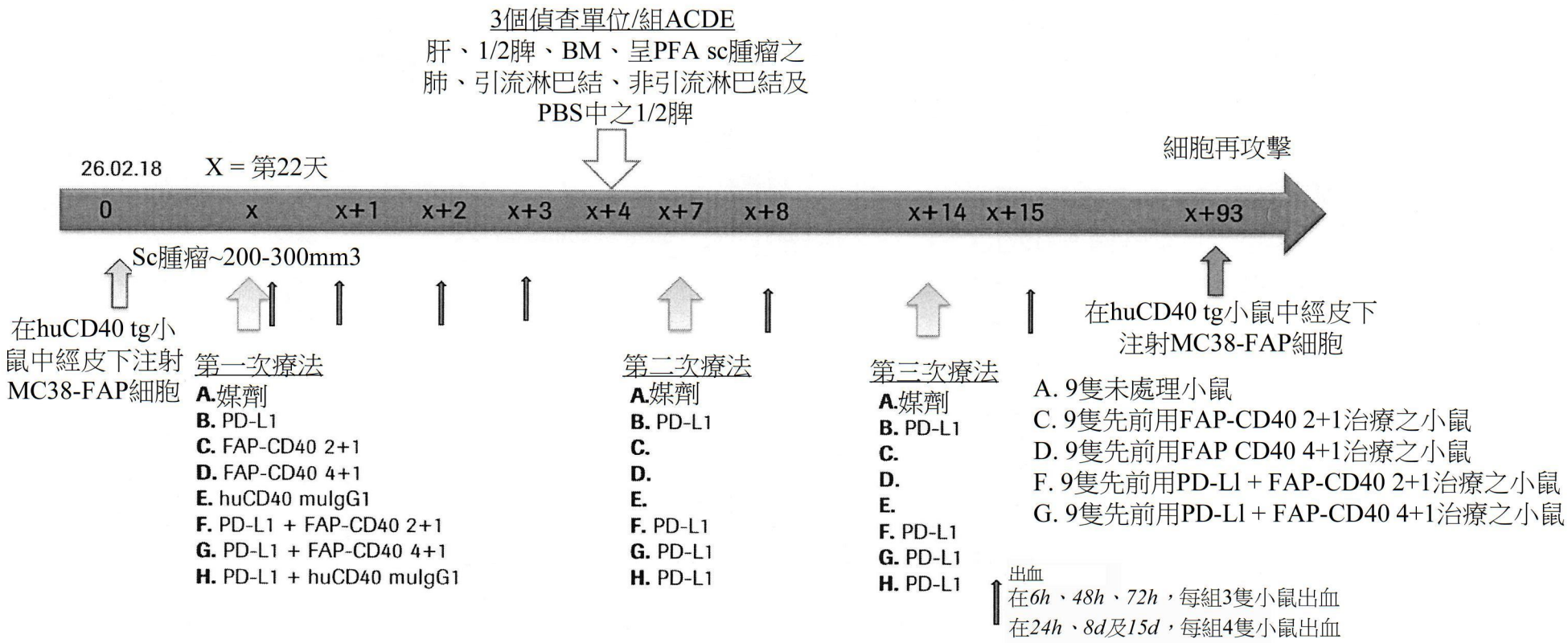
【圖8】


P1AE2423 2+1
P1AF0873 1+1
P1AA9663 2+2
P1AE2302 2+1
OD
2.000
1.800
1.600
1.400
1.200
1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000
0.0
0.1
1.0
10.0
100.0
1000.0
pM

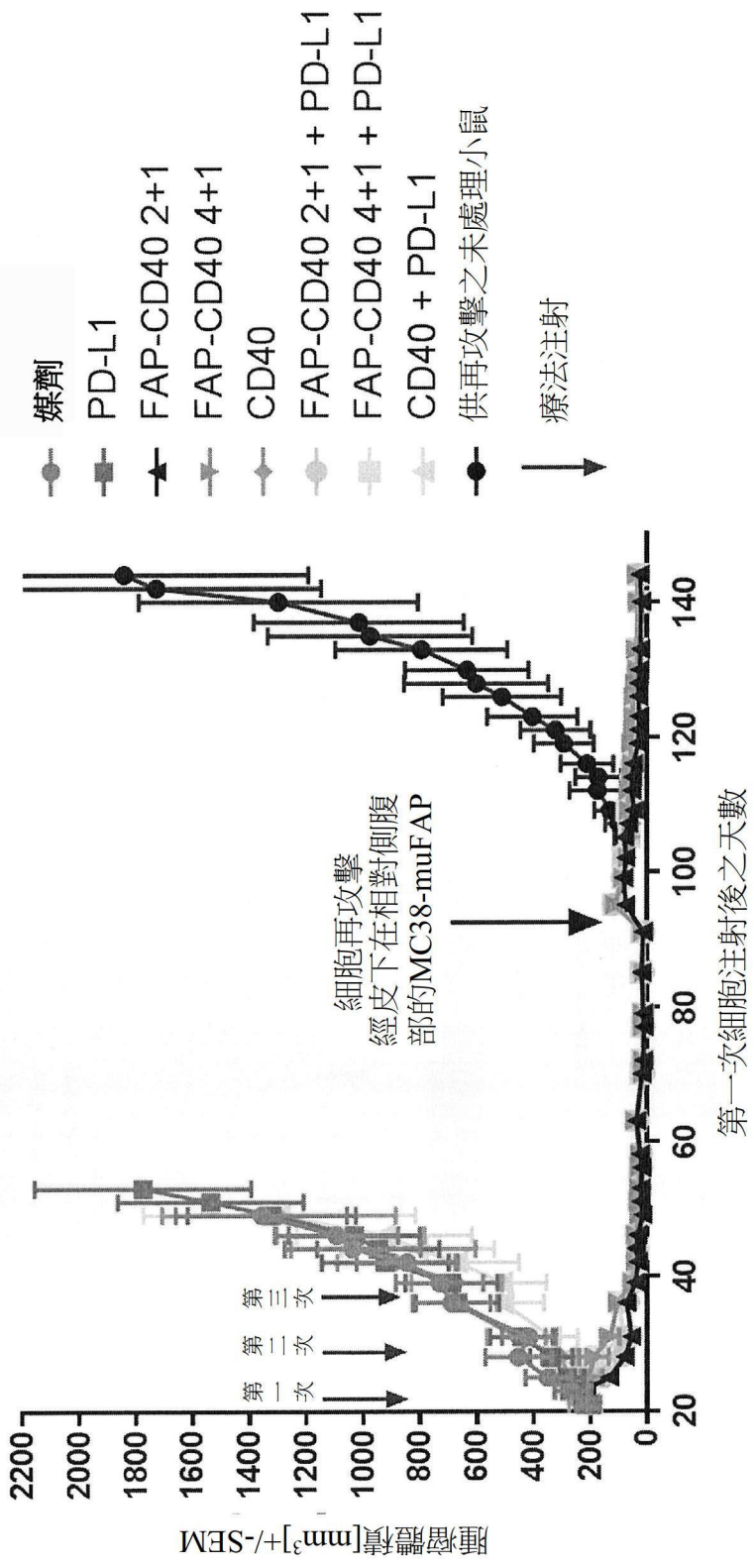
【圖9】


濃度518pM n=6
OD
0.200
0.180
0.160
0.140
0.120
0.100
0.080
0.060
0.040
0.020
0.000
P1AE2423
2+1
P1AF0873
1+1
P1AA9663
2+2
P1AE2302
2+1

【圖10】


3個偵查單位/組ACDE
肝、1/2脾、BM、呈PFA sc腫瘤之
肺、引流淋巴結、非引流淋巴結及
PBS中之1/2脾
細胞再攻擊
26.02.18
X = 第22天
0
x
x+1
x+2
x+3
x+4
x+7
x+8
x+14
x+15
x+93
Sc腫瘤~200-300mm3
在huCD40 tg小鼠中經皮下注射MC38-FAP細胞
第一次療法
A.媒劑
B. PD-L1
C. FAP-CD40 2+1
D. FAP-CD40 4+1
E. huCD40 mulgG1
F. PD-L1 + FAP-CD40 2+1
G. PD-L1 + FAP-CD40 4+1
H. PD-L1 + huCD40 mulgG1
第二次療法
A.媒劑
B. PD-L1
C.
D.
E.
F. PD-L1
G. PD-L1
H. PD-L1
第三次療法
A.媒劑
B. PD-L1
C.
D.
E.
F. PD-L1
G. PD-L1
H. PD-L1
在huCD40 tg小鼠中經皮下注射MC38-FAP細胞
A. 9隻未處理小鼠
C. 9隻先前用FAP-CD40 2+1治療之小鼠
D. 9隻先前用FAP CD40 4+1治療之小鼠
F. 9隻先前用PD-L1 + FAP-CD40 2+1治療之小鼠
G. 9隻先前用PD-L1 + FAP-CD40 4+1治療之小鼠
出血
在6h、48h、72h，每組3隻小鼠出血
在24h、8d及15d，每組4隻小鼠出血

【圖11】


媒劑
PD-L1
FAP-CD40 2+1
FAP-CD40 4+1
CD40
FAP-CD40 2+1 + PD-L1
FAP-CD40 4+1 + PD-L1
CD40 + PD-L1
供再攻擊之未處理小鼠
療法注射
腫瘤體積[mm³]+/-SEM
第一次細胞注射後之天數
第一次
第二次
第三次
細胞再攻擊
經皮下在相對側腹
部的MC38-muFAP
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
20
40
60
80
100
120
140

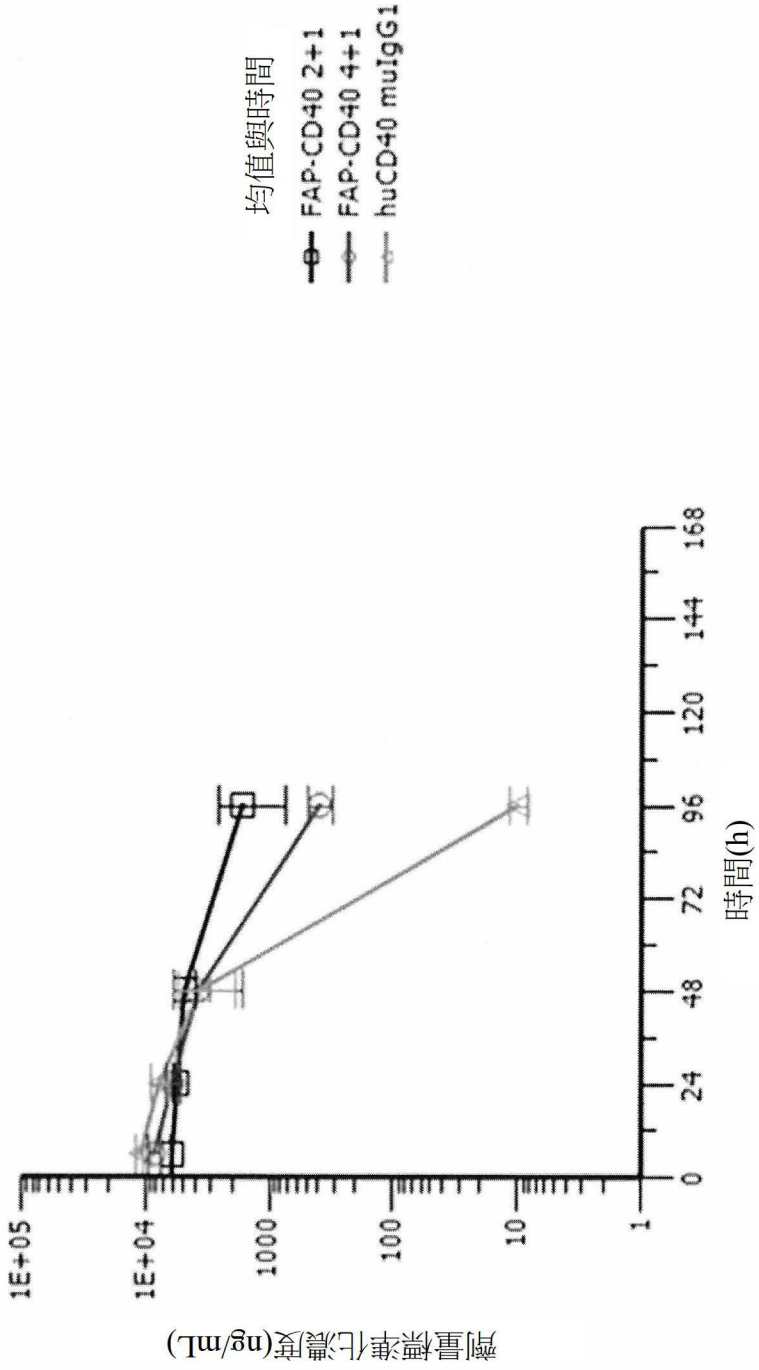
【圖12】

含量	- 含量	差	標準誤差	下CL	上CL	p值
媒劑	FAP-CD40 2+1	375.2659	86.97106	102.307	648.2245	0.0015*
媒劑	FAP-CD40 2+1 + PD-L1	363.6771	86.97106	90.718	636.6358	0.0023*
媒劑	FAP-CD40 4+1 + PD-L1	278.2715	86.97106	5.313	551.2302	0.0426*
媒劑	FAP-CD40 4+1	265.6936	86.97106	-7.265	538.6523	0.0619
PD-L1	FAP-CD40 2+1	259.9493	86.97106	-13.009	532.9079	0.0729
PD-L1	FAP-CD40 2+1 + PD-L1	248.3605	86.97106	-24.598	521.3192	0.1003
CD40	FAP-CD40 2+1	228.9741	92.97597	-62.831	520.7792	0.2312
CD40	FAP-CD40 2+1 + PD-L1	217.3854	92.97597	-74.420	509.1905	0.2906
CD40 + PD-L1	FAP-CD40 2+1	203.7975	89.64772	-77.562	485.1568	0.3249
CD40 + PD-L1	FAP-CD40 2+1 + PD-L1	192.2087	89.64772	-89.151	473.5681	0.3995
媒劑	CD40 + PD-L1	171.4684	89.64772	-109.891	452.8277	0.5478
PD-L1	FAP-CD40 4+1 + PD-L1	162.9549	86.97106	-110.004	435.9136	0.5737
PD-L1	FAP-CD40 4+1			-122.582	423.3357	0.6687
媒劑	CD40	146.2917	92.97597	-145.513	438.0968	0.7639
CD40	FAP-CD40 4+1 + PD-L1	131.9798	92.97597	-159.825	423.7849	0.8447
CD40	FAP-CD40 4+1	119.4019	92.97597	-172.403	411.2070	0.9012
媒劑	PD-L1	115.3166	86.97106	-157.642	388.2753	0.8854
FAP-CD40 4+1	FAP-CD40 2+1	109.5722	86.97106	-163.386	382.5309	0.9098
CD40 + PD-L1	FAP-CD40 4+1 + PD-L1	106.8031	89.64772	-174.556	388.1625	0.9314
FAP-CD40 4+1	FAP-CD40 2+1 + PD-L1	97.9835	86.97106	-174.975	370.9421	0.9484
FAP-CD40 4+1 + PD-L1	FAP-CD40 2+1	96.9943	86.97106	-175.964	369.9530	0.9510
CD40 + PD-L1	FAP-CD40 4+1	94.2252	89.64772	-187.134	375.5846	0.9642
FAP-CD40 4+1 + PD-L1	FAP-CD40 2+1 + PD-L1	85.4056	86.97106	-187.553	358.3642	0.9753
PD-L1	CD40 + PD-L1	56.1518	89.64772	-225.208	337.5111	0.9984
PD-L1	CD40	30.9751	92.97597	-260.830	322.7802	1.0000
CD40	CD40 + PD-L1	25.1767	95.48445	-274.501	324.8546	1.0000
FAP-CD40 4+1	FAP-CD40 4+1 + PD-L1	12.5779	86.97106	-260.381	285.5365	1.0000
FAP-CD40 2+1 + PD-L1	FAP-CD40 2+1	11.5888	86.97106	-261.370	284.5474	1.0000

【圖13A】

含量	- 含量	差	標準誤差	下CL	上CL	p值
CD40	FAP-CD40 2+1	406.4652	100.9955	89.306	723.6240	0.0038*
CD40	FAP-CD40 2+1 + PD-L1	406.4280	100.9955	89.269	723.5868	0.0038*
PD-L1	FAP-CD40 2+1	387.1015	94.4727	90.427	683.7764	0.0030*
PD-L1	FAP-CD40 2+1 + PD-L1	387.0642	94.4727	90.389	683.7391	0.0030*
CD40	FAP-CD40 4+1 + PD-L1	377.9195	100.9955	60.761	695.0783	0.0092*
媒劑	FAP-CD40 2+1	361.5613	97.3802	55.756	667.3668	0.0100*
媒劑	FAP-CD40 2+1 + PD-L1	361.5240	97.3802	55.719	667.3295	0.0100*
PD-L1	FAP-CD40 4+1 + PD-L1	358.5557	94.4727	61.881	655.2306	0.0078*
媒劑	FAP-CD40 4+1 + PD-L1	333.0155	97.3802	27.210	638.8210	0.0235*
CD40	FAP-CD40 4+1	330.0047	100.9955	12.846	647.1636	0.0358*
PD-L1	FAP-CD40 4+1	310.6410	94.4727	13.966	607.3159	0.0338*
媒劑	FAP-CD40 4+1	285.1008	97.3802	-20.705	590.9063	0.0849
CD40 + PD-L1	FAP-CD40 2+1	284.2873	97.3802	-21.518	590.0929	0.0866
CD40 + PD-L1	FAP-CD40 2+1 + PD-L1	284.2501	97.3802	-21.555	590.0556	0.0867
CD40 + PD-L1	FAP-CD40 4+1 + PD-L1	255.7416	97.3802	-50.064	561.5471	0.1670
CD40 + PD-L1	FAP-CD40 4+1	207.8269	97.3802	-97.979	513.6324	0.4057
CD40	CD40 + PD-L1	122.1778	103.7204	-203.538	447.8936	0.9351
PD-L1	CD40 + PD-L1	102.8141	97.3802	-202.991	408.6196	0.9633
媒劑	CD40 + PD-L1	77.2739	100.2034	-237.397	391.9452	0.9940
FAP-CD40 4+1	FAP-CD40 2+1	76.4604	94.4727	-220.214	373.1354	0.9920
FAP-CD40 4+1	FAP-CD40 2+1 + PD-L1	76.4232	94.4727	-220.252	373.0981	0.9920
FAP-CD40 4+1	FAP-CD40 4+1 + PD-L1	47.9147	94.4727	-248.760	344.5896	0.9996
CD40	媒劑	44.9039	103.7204	-280.812	370.6196	0.9999
FAP-CD40 4+1 + PD-L1	FAP-CD40 2+1	28.5457	94.4727	-268.129	325.2207	1.0000
FAP-CD40 4+1 + PD-L1	FAP-CD40 2+1 + PD-L1	28.5085	94.4727	-268.166	325.1834	1.0000
PD-L1	媒劑	25.5402	97.3802	-280.265	331.3457	1.0000
CD40	PD-L1	19.3637	100.9955	-297.795	336.5226	1.0000
FAP-CD40 2+1 + PD-L1	FAP-CD40 2+1	0.0372	94.4727	-296.638	296.7122	1.0000

【圖13B】


均值與時間
FAP-CD40 2+1
FAP-CD40 4+1
huCD40 muIgG1
1E+05
1E+04
1000
100
10
1
0
24
48
72
96
120
144
168
時間(h)
劑量標準化濃度(ng/mL)

【圖14】

圖15A 圖15B 圖15C 圖15D

【圖15】

圖16A 圖16B 圖16C 圖16D

【圖16】

圖17A 圖17B 圖17C 圖17D

【圖17】

媒劑
PD-L1
FAP-CD40 2+1
FAP-CD40 4+1
CD40
FAP-CD40 2+ 1 + PD-L1
FAP-CD40 4+1 + PD-L1
CD40 + PD-L1
體重(與治療前的體重的%)
110
100
90
80
0
2
4
6
8
10
12
14
療法後之天數

【圖18】