



(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 I731310 B

(45)公告日：中華民國 110 (2021) 年 06 月 21 日

(21)申請案號：108106894

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 02 月 27 日

(51)Int. Cl.：

*A61K38/17 (2006.01)**A61K39/395 (2006.01)**A61K47/50 (2017.01)**C07K14/475 (2006.01)**C07K16/22 (2006.01)**G01N33/53 (2006.01)**G01N33/574 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2018/02/28 美國

62/636,825

(71)申請人：圓祥生命科技股份有限公司 (中華民國) AP BIOSCIENCES, INC. (TW)

臺北市南港區園區街 3 號 17 樓

(72)發明人：游忠哲 YOU, JHONG JHE (TW)；徐靜軒 HSU, CHING HSUAN (TW)；黃柏霖

HUANG, PO LIN (TW)；何正宏 HER, JENG-HORNG (US)

(74)代理人：李世章；秦建譜

(56)參考文獻：

CN 107602702A

US 2017/0281765A1

US 2017/0283488A1

審查人員：唐韶璞

申請專利範圍項數：18 項 圖式數：16 共 101 頁

(54)名稱

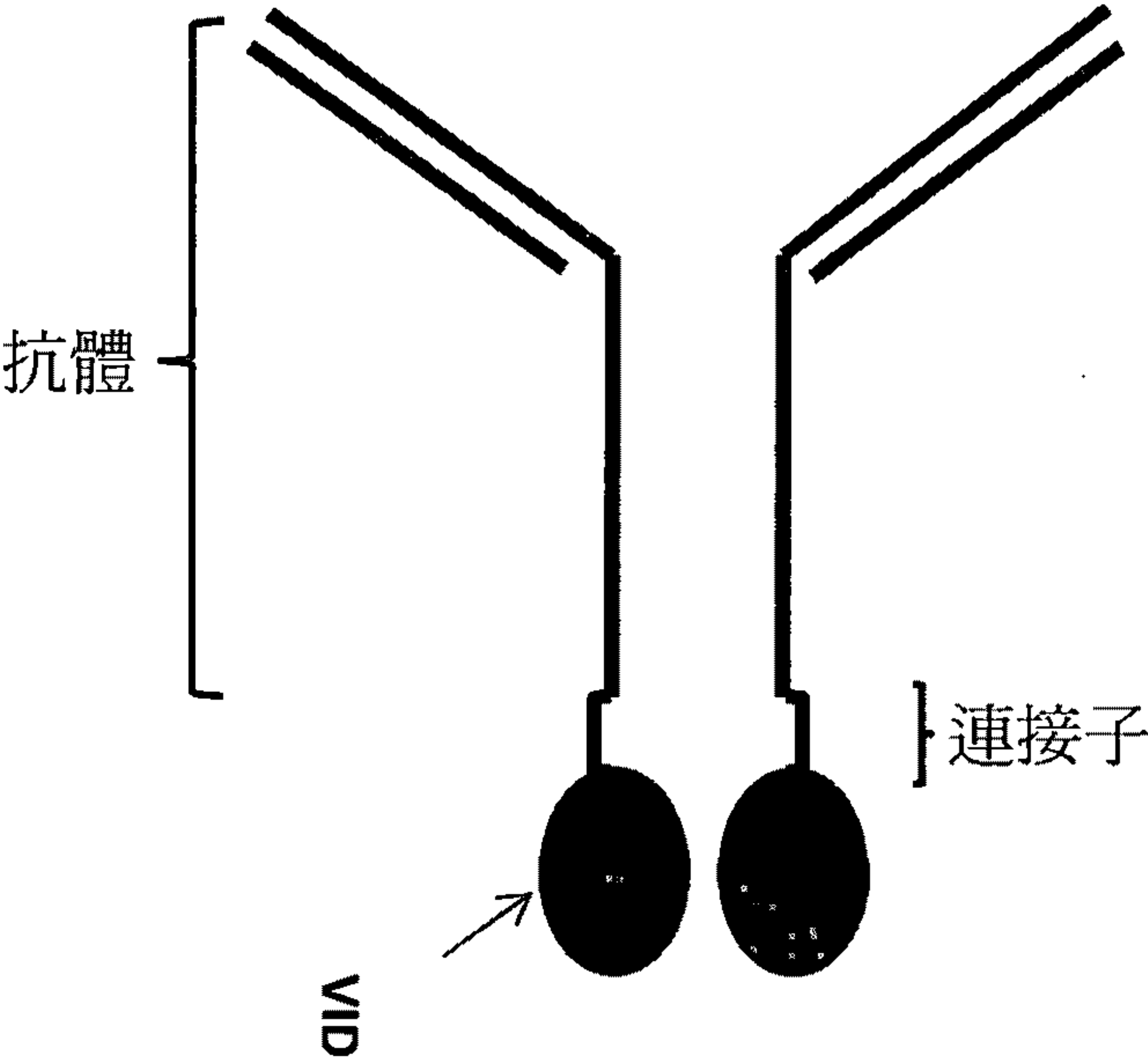
結合檢查點阻礙物作為標的治療的雙功能性蛋白質、其藥物複合體、其醫藥組成物、其核酸、及其用途

(57)摘要

提供一種雙特異性蛋白質，包含結合細胞表面蛋白的結合區、以及血管內皮生長因子抑制區。另提供一種抗體藥物複合體，包含治療試劑以及抗體或抗原結合片段，結合至 PD-L1 及/或血管內皮生長因子抑制區，其中治療試劑藉由連接子與抗體或抗原結合片段共價接合。

Provided are bispecific proteins that comprise a binding domain binding cell surface protein and a vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibiting domain. Provided also is an antibody-drug conjugate that comprises a therapeutic agent and an antibody or an antigen-binding fragment binding PD-L1 and/or a VEGF inhibiting domain, wherein the therapeutic agent is covalently conjugated to the antibody or the antigen-binding fragment by a linker.

指定代表圖：



第 8 圖

I731310

【發明摘要】

【中文發明名稱】 結合檢查點阻礙物作為標的治療的雙功能性蛋白質、其藥物複合體、其醫藥組成物、其核酸、及其用途

【英文發明名稱】 BIFUNCTIONAL PROTEINS
COMBINING CHECKPOINT BLOCKADE FOR
TARGETED THERAPY ANTIBODY-DRUG
CONJUGATE, PHARMACEUTICAL COMPOSITION,
NUCLEIC ACID, AND USE THEREOF

【中文】

提供一種雙特異性蛋白質，包含結合細胞表面蛋白的結合區、以及血管內皮生長因子抑制區。另提供一種抗體藥物複合體，包含治療試劑以及抗體或抗原結合片段，結合至PD-L1及/或血管內皮生長因子抑制區，其中治療試劑藉由連接子與抗體或抗原結合片段共價接合。

【英文】

Provided are bispecific proteins that comprise a binding domain binding cell surface protein and a vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibiting domain. Provided also is an antibody-drug conjugate that comprises a therapeutic agent and an antibody or an antigen-binding fragment binding PD-L1 and/or a VEGF inhibiting domain, wherein the therapeutic

agent is covalently conjugated to the antibody or the antigen-binding fragment by a linker.

【指定代表圖】 第8圖

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 結合檢查點阻礙物作為標的治療的雙功能性蛋白質、其藥物複合體、其醫藥組成物、其核酸、及其用途

【英文發明名稱】 BIFUNCTIONAL PROTEINS
COMBINING CHECKPOINT BLOCKADE FOR
TARGETED THERAPY ANTIBODY-DRUG
CONJUGATE, PHARMACEUTICAL COMPOSITION,
NUCLEIC ACID, AND USE THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明是有關於一種抗體。特別是本發明是有關於一種用於癌症治療的抗體。

【先前技術】

【0002】 人類中兩種主要類型的淋巴細胞是T淋巴細胞(源自胸腺)和B淋巴細胞(源自骨髓)。這些細胞源自於骨髓和胎兒肝臟中的造血幹細胞，並參與淋巴發育途徑。這些幹細胞的後代依照不同的途徑成熟為B或T淋巴細胞。人類B淋巴細胞的發育完全在骨髓內發生。另一方面，T細胞從未成熟的前驅細胞發展而來，這些前驅細胞離開骨髓並通過血流到達胸腺，在那裡它們增殖並分化成成熟的T淋巴細胞。

【0003】 T細胞

【0004】 T細胞是最豐富的(約75%的血液淋巴細胞)且

有效的免疫毒殺細胞。效應T細胞(effector T-cells)在抗腫瘤免疫反應中的腳色，獲得體外研究和觀察結果的強烈支持，CD8⁺ T細胞在幾種類型腫瘤中的高滲透度(infiltration，又稱浸潤)與較佳的臨床預後相關(Fridman等人，2012)。效應初始T細胞的活化需要至少三種互補信號：(i)TCR-CD3/Ag-MHC在共同受體(CD4或CD8)的輔助下的相互作用；(ii)共同刺激分子如CD80或CD86與CD28的結合，CD40與CD40L的結合；及(iii)輔助分子如細胞激素(cytokines)。

【0005】 共同刺激(co-stimulation)或向T細胞提供兩種不同的信號是抗原呈現細胞(antigen presenting cell，APC)對休止狀態T淋巴細胞活化的廣泛接受模式(Lafferty和Cunningham，1975)。此模式進一步提供了對自我與非自我和免疫耐受的區分(Bretscher和Cohn，1970；Bretscher，1999；Jenkins和Schwartz，1987)。在識別主要組織相容性複合物(major histocompatibility complex，MHC)下呈現外來抗原胜肽後，通過T細胞受體(TCR)轉換成初級信號或抗原特異性信號。第二種或共同刺激信號藉由在抗原呈現細胞(antigen-presenting cell，APC)上表達共同刺激分子遞送至T細胞，並誘導T細胞促進複製擴增、細胞激素分泌和效應功能(effector function)(Lenschow等，1996)。在沒有共同刺激的情況下，T細胞變得較不受抗原的刺激、不會產生有效的免疫反應，並且還可能導致對外來抗原無反應或具耐受性。

【0006】 免疫檢查點蛋白：細胞程式死亡-配體 1
(programmed cell death protein 1 ligand, PD-L1)

【0007】 免疫檢查點是關於一群抑制和刺激途徑，主要由配體-受體相互作用引發免疫系統僵化，特別是T細胞介導的免疫，以維持自身耐受並調節外周組織中生理反應的持續時間和幅度，通常便能減少附帶組織損傷(Pardoll, 2012)。腫瘤細胞將某些檢查點途徑作為免疫抗性的主要機制。例如，PD-L1的表現量通常在人類癌症腫瘤細胞的表面上增加。PD-L1與其受體PD-1的相互作用在腫瘤浸潤的淋巴細胞(tumor infiltrated lymphocytes, TILs)上表達，特別是在T細胞上，抑制局部T細胞介導的反應以逃避免疫監視(Liang等人, 2006; Sznol與Chen, 2013)。因此，對癌細胞免疫抑制信號的抑制、或對T細胞直接促效刺激，將導致和/或誘導強烈且持續性的抗腫瘤免疫反應。最近的臨床研究強烈建議藉由抗體免疫檢查點蛋白的阻礙、或由可溶性配體或受體的調節，是最有希望激發治療性抗腫瘤免疫的方式(Topalian等, 2014)。目前抗PD-1和抗細胞毒性T淋巴細胞相關抗原 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4)抗體已被美國食品藥品監督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准用於治療諸如黑素瘤的疾病。

【0008】 血管生成和血管內皮生長因子抑制區
(vascular endothelial growth factor inhibition domain, VID)

【0009】 血管生成，即從已存在的血管形成新血管，是涉及胎兒發育和組織修復中正常且重要的過程。此過程受血管生成因子和抗血管生成因子的高度調節，並且涉及內皮細胞遷移和增殖、血管成熟和重塑、以及細胞外基質的降解。雖然它是正常生長和發育的重要過程，但血管生成在腫瘤生長中也參與關鍵作用。腫瘤需要血管供應來生長，並且可以通過促血管生長因子的表達來實現此一目的，包括血管內皮生長因子配體的家族成員(Hicklin和Ellis，2005)。當血管內皮生長因子和其他內皮生長因子結合至內皮細胞上的受體時，這些細胞內的信號被啟動，促進新血管的生長和存活。用血管內皮生長因子特異性抗體(Avastin)、可溶性血管內皮生長因子受體(aflibercept)、或血管內皮生長因子酪氨酸激酶活性抑製劑(sunitinib)阻斷血管內皮生長因子活性是已經用於治療腫瘤或血管生成型疾病(例如AMD)的策略。

【0010】 雙 特 異 性 (Bi-specific)/ 雙 功 能 性 (bi-functional)抗體

【0011】 在1980年代出現了使用雙特異性抗體能有效地將效應免疫細胞重新以腫瘤細胞做為目標的想法(Karpovsky等人，1984；Perez等人，1985；Staerz等人，1985)。基於不存在或存在Fc片段(fragment crystallizable segment，可結晶區域片段)，雙特異性支架(scaffold)通常區分為具有不同藥物動力學特性的兩個主要群組：類免疫球蛋白G (IgG-like)分子和小型重組雙

特異性形式，其中大多數衍生自單鏈可變片段(single chain variable fragment, scFv)。通過其小巧的尺寸，抗體片段通常比類IgG分子更能有效地穿透腫瘤，但是這種優勢將因過短的血清半衰期(幾小時)而減少，並限制了它們的整體腫瘤吸收程度和停留時間(Goldenberg等，2007)。相比之下，結合新生兒Fc受體Fc片段的存在，為類IgG形式提供了長血清半衰期(>10天)並有利於被腫瘤吸收和保留，但限制了對腫瘤的穿透性。

【0012】最近的研究強調了免疫療法的治療功效，免疫療法是利用患者自身免疫系統來破壞癌細胞的一類癌症治療方法。在腫瘤內，陰性調節分子家族(統稱為「檢查點抑制劑」)的存在可抑制T細胞功能以抑制抗腫瘤的免疫力。檢查點抑制劑，例如CTLA-4和PD-1，減弱T細胞增殖和細胞激素的產生。用拮抗劑(antagonist)單株抗體(monoclonal antibodies, mAbs)將CTLA-4或PD-1作為目標阻斷並釋放T細胞上的「剎車」，以增強抗腫瘤的免疫力。此外，最近的研究已經報導了PD-L1或PD-L2/PD-1途徑與促血管生成基因[包括缺氧誘導因子(hypoxia inducible factors, HIF)和血管內皮生長因子]在幾種惡性腫瘤[如經典霍奇金淋巴瘤，classical Hodgkin lymphoma, cHL (Koh等人，2017)和神經膠質瘤(Xue等人，2017)]中的關聯。Koh等人證實了PD-L1、血管內皮生長因子或微血管密度(microvessel density, MVD)之間的正相關。他們的研究結果提供了證據支持新的治療方法，

包括抗PD-L1/PD-1和抗血管內皮生長因子治療的組合，以及目前的經典霍奇金淋巴瘤標準方案(Koh等，2017)。血管內皮生長因子還證明了其破壞癌症免疫週期中關鍵步驟的能力：T細胞浸潤(或滲入，infiltration)到腫瘤中(Kim和Chen，2016；Terme等，2012)。將血管內皮生長因子作為目標，可以藉由增加T細胞浸潤到腫瘤微環境中來幫助恢復部分癌症免疫循環(Hughes等人，2016；Terme等人，2012；Wallin等人，2016)。血管內皮生長因子途徑的抑制可導致細胞黏附分子在內皮細胞上的表達增加，增加腫瘤內T細胞數以產生免疫發炎的腫瘤微環境。

【發明內容】

【0013】 本揭示內容的目的在於提供一種具有免疫調節和血管生成抑制的雙特異性抗體，用於治療患有癌症的患者進行了檢查，例如前列腺癌(prostate cancer)、肺癌(lung cancer)、非小細胞肺癌(Non-Small Cell Lung Cancer，NSCLC)、黑素瘤(melanoma)、淋巴瘤(lymphoma)、乳癌(breast cancer)、頭頸癌(head and neck cancer)、腎細胞癌(Renal cell carcinoma，RCC)或卵巢癌(ovarian cancer)。

【0014】 本揭示內容提供了一種雙特異性抗體或其抗原結合部分，包含至少一多肽鏈，其中多肽鏈包含：結合細胞表面蛋白的結合區；以及血管內皮生長因子抑制區。

【0015】 在一些實施方式中，細胞表面蛋白包含細胞程

式死亡-配體1 (PD-L1)、細胞程式死亡蛋白1 (PD-1)、表皮生長因子受體(epidermal growth factor receptor, EGFR)、人類表皮生長因子受體2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2)、細胞毒性T淋巴細胞相關抗原4 (CTLA-4)、淋巴細胞活化基因3 (Lymphocyte-activation gene 3, LAG3)、B和T淋巴細胞衰減因子(B and T lymphocyte attenuator, BTLA)、OX40 (分化簇134, Cluster of differentiation 134, CD134)、CD27、CD28、腫瘤壞死因子受體超級家族成員9 (The tumor necrosis factor receptor superfamily 9, TNFRSF9或CD137)、誘導T細胞共同刺激分子(inducible T-cell co-stimulator, ICOS或CD278)、CD40、或其組合。

【0016】 在一些實施方式中，其中結合區結合PD-L1，且結合區包含：重鏈可變區包含胺基酸序列，胺基酸序列與選自於由SEQ ID NO.4與SEQ ID NO.6所組成之群組的胺基酸序列具有至少約80%的序列同源性；以及輕鏈可變區包含胺基酸序列，胺基酸序列與選自於由SEQ ID NO.3的第1-111個位置胺基酸與SEQ ID NO.5的第1-110個位置胺基酸所組成之群組的胺基酸序列具有至少約80%的序列同源性。

【0017】 在一些實施方式中，血管內皮生長因子抑制區係由血管內皮生長因子受器1或血管內皮生長因子受器2所形成。

【0018】 在一些實施方式中，血管內皮生長因子抑制區包含胺基酸序列，胺基酸序列與選自於由SEQ ID NOs.1、2、9、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、及其組合所組成之群組的胺基酸序列具有至少約80%的序列同源性。

【0019】 在一些實施方式中，多肽鏈更包含：抗原結晶區(fragment crystallizable region，Fc區)；以及抗體結合片段(fragment-antigen binding segment，Fab片段)與Fc區的N端連接，且Fab片段包含結合區，其中血管內皮生長因子抑制區與Fc區的C端連接。

【0020】 在一些實施方式中，雙特異性抗體或其抗原結合部分更包含連接子位於Fc區與血管內皮生長因子抑制區之間。

【0021】 在一些實施方式中，雙特異性抗體包含如SEQ ID NO.12或SEQ ID NO.13所示之胺基酸序列。

【0022】 在一些實施方式中，雙特異性抗體或其抗原結合部分包含一對多肽鏈。

【0023】 在一些實施方式中，雙特異性抗體為IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、或IgY抗體。

【0024】 在一些實施方式中，雙特異性抗體為IgG抗體。

【0025】 在一些實施方式中，IgG抗體為IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4抗體。

【0026】 在一些實施方式中，IgG1抗體是抗體依賴性細胞介導之細胞毒性減低的IgG1抗體。

【0027】 在一些實施方式中，雙特異性抗體是人類抗體。

【0028】 本揭示內容另提供了一種醫藥組成物，包含：如前述之雙特異性抗體或其抗原結合部分，以及至少一藥學上可接受的載劑。

【0029】 本揭示內容另提供了一種抗體藥物複合體，包含：治療試劑；以及雙特異性抗體或抗原結合片段，結合至PD-L1及/或血管內皮生長因子抑制區，其中治療試劑藉由連接子與雙特異性抗體或抗原結合片段共價接合。

【0030】 在一些實施方式中，雙特異性抗體或抗原結合片段係選自於如前述之雙特異性抗體或抗原結合片段。

【0031】 本揭示內容另提供了一種治療癌症的方法，此方法包含對有需要之個體施予有效劑量之如前述之雙特異性抗體或其抗原結合部分。

【0032】 在一些實施方式中，癌症係選自於由前列腺癌、肺癌、非小細胞肺癌、黑色素瘤、淋巴瘤、乳癌、頭頸癌、腎細胞癌和卵巢癌所組成之群組。

【0033】 在一些實施方式中，雙特異性抗體或其抗原結合部分治療癌症的有效劑量為0.001 $\mu\text{g/kg}$ 至250 mg/kg 。

【0034】 本揭示內容另提供了一種核酸分子，其編碼如前述之雙特異性抗體或其抗原結合部分。

【0035】 本揭示內容另提供了一種對於個體診斷癌症的方法，包含：(a)從個體取得體液樣本或細胞樣本；(b)以可檢測一組癌症標誌之表現的一種或多種抗體接觸體液樣本或細胞樣本，這組癌症標誌係選自於由PD-L1與血管內皮生

長因子所組成之群組；(c)試驗一種或多種抗體與體液樣品或細胞樣品的結合能力；以及(d)於試驗中評估個體之癌症狀態，其係藉由測定及比較與正常控制組之抗體結合程度，以確定個體具有癌症。

【0036】 本揭示內容另提供了一種評估一個體罹患癌症之風險的方法，包含：(a)從個體取得體液樣本或細胞樣本；(b)以可檢測一組癌症標誌之表現的一種或多種抗體接觸體液樣本或細胞樣本，這組癌症標誌係選自於由PD-L1與血管內皮生長因子所組成之群組；(c)試驗一種或多種抗體與體液樣品或細胞樣品的結合能力；以及(d)於試驗中評估個體之癌症狀態，其係藉由測定及比較與正常控制組之抗體結合程度，以確定個體是否具有罹患癌症之風險。

【圖式簡單說明】

【0037】 為讓本發明之上述和其他目的、特徵、優點與實施例能更明顯易懂，所附圖式之說明如下：

第1圖顯示免疫檢查點調節T細胞介導的免疫。抗體可以依需求使用針對檢查點的促效或拮抗(agonistic or antagonistic)的抗體建構雙功能融合蛋白，例如抗ICOS、抗CD28、抗OX40、抗CD27、抗PD-1、抗CTLA4、抗LAG3、或抗BTLA。

第2A與2B圖顯示藉由直接酵素免疫分析法(direct enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)篩選重組PD-L1的噬菌體殖株(clone，又稱為克隆)。

第3圖顯示通過十二烷基硫酸鈉聚丙稀醯胺凝膠電泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)以非還原或還原試劑對PD-L1專一性之抗體先導物(antibody lead)純化，以揭示其完整性和純度。

第4圖顯示純化的抗免疫檢查點蛋白的直接配體結合活性與抗PD-L1抗體先導物拮抗PD-L1的實施例。首先將以配體預先塗覆(pre-coated)的孔槽與所示各種濃度的抗體先導物一起培養。然後用辣根過氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)接合(conjugated)的山羊抗人類IgG Fab特異性抗體檢測結合的蛋白質，並依OD₄₅₀讀值繪圖。

第5圖顯示使用表現PD-L1的293細胞的流式分析(flow analysis)。表現PD-L1的人類胚胎腎細胞293(Human embryonic kidney 293 cells, HEK293)首先與純化的抗體先導物一起培養，並用Alexa[®]-488接合的山羊抗人類IgG (重鏈+輕鏈, H+L)檢測結合的抗體，然後進行螢光活化細胞分選儀(fluorescence-activated cell sorter, FACS)分析。

第6圖顯示以純化的抗PD-L1抗體阻礙PD-1/PD-L1的相互作用。將所示的純化抗體與具有生物素的PD-L1-Fc和預先塗覆的PD-1/His用於96孔盤中以評估PD-1/PD-L1相互作用的抑制活性。藉由鏈黴親合素(streptavidin)-Alexa[®]-488檢測重組PD-1與重組PD-L1-Fc的結合，並通過ELISA分析。

第7A與7B圖顯示在抗體治療3天(第7A圖)或5天(第7B圖)後，具有1或10微克/毫升($\mu\text{g/mL}$)的抗PD-L1抗體先導物於混合淋巴細胞反應(mixed lymphocyte reaction, MLR)分析中刺激IL-2和/或IFN- γ 產生。

第8圖顯示抗體重鏈Fc與來自血管內皮生長因子受體的血管內皮生長因子抑制區(VID)融合的結構。

第9圖顯示抗免疫檢查點抗體-VID雙特異性抗體的PAGE凝膠分析的實施例。純化的融合蛋白，兩種抗PD-L1-VID雙特異性抗體顯示分別具有約220千道爾吞(kDa)的分子量(非還原型)，並且兩種抗體中皆具有約85 kDa的重鏈和約25 kDa的輕鏈(還原型)。M表示是標準液(marker)、欄1是非還原型抗PD-L1-VID/eIgG1、欄2是還原型的抗PD-L1-VID/eIgG1、欄3是非還原的抗PD-L1-VID/IgG4、以及欄2是還原型的抗PD-L1-VID/IgG4，每欄注入3 μg 。

第10A和10B圖顯示藉由分子篩選層析-高效能液相層析(Size exclusion chromatography-high performance liquid chromatography, SEC-HPLC)分析從HEK293細胞獲得純化的抗PD-L1-VID/IgG4(第10A圖)和抗PD-L1-VID/eIgG1(第10B圖)的雙特異性抗體的純度。

第11A和11B圖顯示實施例藉由直接ELISA分析純化的抗PD-L1-VID雙特異性抗體與PD-L1(第11A圖)和VEGF₁₆₅(第11B圖)的結合活性。首先將配體預先塗覆的孔槽與所示各種濃度的測試樣品一起培養。然後用辣根過氧化

物酶接合的山羊抗人類IgG Fc或F(ab')₂特異性抗體檢測結合的抗體，並繪製OD₄₅₀讀值。

第12圖顯示藉由純化的抗PD-L1-VID雙特異性抗體抑制VEGF₁₆₅刺激人類臍靜脈內皮細胞(Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)的增殖。將VEGF₁₆₅與測試樣品一起預先培養一天而後施於HUVEC細胞，以監測受VEGF₁₆₅刺激的HUVEC細胞其增殖的情形。培養3天後，通過MTS試劑(Promega)測定細胞增殖。將吸光值對測試樣品的抗體濃度作圖，並測定細胞增殖被抑制50%時的濃度(IC₅₀)。

第13A和13B圖顯示雙特異性抗體協同刺激(synergic stimulates)在3或5天後以混合淋巴細胞反應(MLR)測定T細胞活化所產生的IL-2(第13A圖)和IFN- γ (第13B圖)，實驗使用同型IgG (isotype IgG)、參考抗體(MPDL3280A)或抗PD-L1-VID/eIgG1雙特異性抗體治療。

第14A、14B和14C圖顯示來自不同物種的抗PD-L1-VID/eIgG1雙特異性抗體的體外血清穩定性(圖第14A圖：人類血清；第14B圖：小鼠血清；第圖14C圖：食蟹獼猴血清，Cyno serum)。將純化的抗體在來自不同物種的血清中(15 μ g/mL)培養於37°C、持續1、3、5、7和14天。培養完成後，將收集的樣品用於三明治ELISA(sandwich ELISA)測定以確定PD-L1和VEGF₁₆₅的相對結合能力。基於血清中雙特異性抗體的濃度繪製半衰期。

第15A圖是顯示以抗PD-L1-VID/eIgG1雙特異性抗

體和單殖株抗體，處理Fox Chase SCID[®]Beige小鼠中 (prostate cancer cell lines, PC-3) 腫瘤生長影響的圖式。第15B圖顯示腫瘤大小在雙特異性抗體治療後第35天顯著小於同型(isotype)或參考抗體的治療。

第16A、16B和16C圖顯示抗PD-L1-VID抗體相比於單獨抗PD-L1在以IFN- γ 刺激的A549中(第16A圖)、在人類非小細胞肺癌細胞(NCI-H292)中(第16B圖)、或是在穩定表達PD-L1的293細胞中(第16C圖)，皆能維持其抗原結合特異性；MFI：平均螢光強度(mean fluorescence intensity)。

【實施方式】

【0038】 現在將參照本發明的實施方案詳細地進行說明，本發明實施方案的實例將結合附圖進行說明。

【0039】 本發明描述了分離具功能性VEGF抑制區的雙功能性蛋白質的表達、純化和特徵，所述功能性VEGF抑制區位於抗免疫檢查點蛋白質抗體的Fc區的C端。這些蛋白質與其相應的檢查點相互作用，並傳遞抑制信號以調節T細胞參與免疫，同時中和VEGF誘導的血管生成。本發明中Fc融合蛋白的組成皆源自於人類，因此預期是非免疫原性的(non-immunogenic)並且可以用於人類的治療。

【0040】 雙特異性分子如雙特異性抗體(bispecific antibodies, BsAb)提供了用單一治療劑、同時將相同分子標的或不同標的上的多個抗原決定基(epitopes)做為目標

的手段。作為癌症療法，它們具有潛力賦予新的或更有效的活性、降低商品成本、並促進新治療方案的開發，而不是兩種單株抗體的混合物(Chames和Baty，2009；Hollander，2009；Thakur和Lum，2010)。最近，catumaxomab是一種以人類上皮細胞黏附分子(human epithelial cell adhesion molecule，EpCAM)和CD3作為目標的三功能雙特異性抗體，已顯示出對上皮癌的腹膜癌(peritoneal carcinomatosis of epithelial cancers)患者有明顯的臨床益處(Heiss等人，2010)，對CD19和CD3具有雙重特異性結合能力的雙特異性T細胞結合(bispecific T-cell engaging，BiTE)抗體在CD19表達惡性血液病(hematological malignancies)的患者中，也表現出令人鼓舞的臨床活性(Bargou等人，2008)。儘管人們對開發作為癌症治療劑的雙特異性分子非常感興趣，但是過去在生產具穩定和活性的雙特異性分子技術中面臨挑戰，並阻礙了大多數雙特異性形式的臨床評價。許多工程化抗體(engineered Abs)形式，包括類IgG雙特異性抗體已經克服穩定性或溶解度的問題(Bargou等人，2008；Demarest和Glaser，2008；Lu等人，2005)。此外，已經採取了幾種策略來提高雙特異性分子的產品質量和體內穩定性，包括PEG化(PEGylation)、與人類血清白蛋白接合、以及Fc的工程化(Muller等人，2007；Ridgway等人，1996)。上述一般形式的雙特異性抗體具有以下優點：編碼兩個可變異區(variable region)的核苷酸序列、單個連接子、或一個間

隔子(spacer)可以在單個啟動子的控制下於合適的宿主表達生物中。這增加了設計這些結構的靈活性以及實驗者在其生產過程中的控制程度。此外，IgG的Fc對用於設計新療法中是非常具有吸引力的架構，因為它包含除結合能力之外的所有抗體功能。Fc的工程對於提高雙特異性抗體有效性而言是至關重要的。因此，以IgG為基礎的結構在本發明中用於癌症治療，並以免疫細胞或促血管生成蛋白為兩個獨立的目標。

【0041】 以免疫檢查點蛋白為目標是活化抗腫瘤免疫中備受期待的方法。目前臨床上評估了抗檢查點蛋白，例如PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG3等(第1圖)。初步的實驗數據已顯示免疫檢查點蛋白抑制劑能夠增強抗腫瘤免疫力，並在臨床反應上具有藥效持久性的潛力。然而，儘管這些藥物在許多惡性腫瘤中具有顯著的臨床功效，但很明顯它們對許多患者來說仍不夠有效。許多其他免疫調節途徑，如由骨髓表達或分泌的抑制因子、以及腫瘤微環境中的基質細胞(stromal cell)，是與免疫檢查點阻礙物協同作用的潛在標的。因此，結合抗癌或雙特異性抗體療法對於實現癌症患者的完全緩解和治療是不可或缺的。同時，以VEGF為目標已經知道藉由減少腫瘤血管生成(Hicklin和Ellis，2005)，並且可以藉由增加T細胞浸潤進入腫瘤微環境來幫助恢復部分癌症免疫循環(Hughes等人，2016；Terme等人，2012；Wallin等人，2016)。

【0042】 人類VEGF受體的細胞外配體結合區(SEQ ID

NOs. 1和2)能夠結合VEGF配體，並且包含一種或多種VEGF受體之一種或多種類IgG區D1-D7(表1)。較佳地，VEGF受體的細胞外配體結合區包含第一VEGF受體的類IgG區D2、和第二VEGF受體的類IgG區D3，其中第一和第二VEGF受體是相同或不同的VEGF受體。在本發明中，VEGF抑制區(VID)為VEGF受體的細胞外配體結合區，包含VEGF受體1 (VEGFR1)的類IgG區D2和VEGFR2的類IgG區D3，以阻斷VEGF並減少血管生成。

表1、人類VEGF受體的類IgG區的胺基酸序列

名稱	SEQ ID NO.	序列
人類 VEGFR1 的 D1	14	PELSLKGTQHIMQAGQTLHLQCRGEAA HKWSLPPEMVSKESERLSITKSA
人類 VEGFR1 的 D2	15	GRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIP DGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCE ATVNGH
人類 VEGFR1 的 D3	16	IDVQISTPRPVKLLRGHTLVLNCTATTP LNTRVQMTWSYPDEKNKRASVRRRID QNSHANIFYSVLTIDKMQNKDKGLYT CRVRSGPSFKSVNTSVH
人類 VEGFR1 的 D4	17	TVKHRKQQVLETVAGKRSYRLSMKVK AFPSPEVVWLKDGLPATEKSARYLTRG YSLIKDVTEEDAGNYTILLSIKQSNVFK NLTAT
人類 VEGFR1 的 D5	18	PQIYEKAVSSFPDPALYPLGSRQILTCTA YGIPQPTIKWFWHPCNHNHSEARCDFC SNNEESFILDADSNMGNRIESITQRMAL EGKNKMASTLVVADSRISGIYICIASNK VGTVGRNISFYIT
人類 VEGFR1 的	19	PNGFHVNLEKMPTEGEDLKLSC TVNKF LYRDVTWILLRTVNNRTMHYSISKQKM AITKEHSITLNLTIMNVSLQDSGTYACR

D6		ARNVYTGEEILQ
人類 VEGFR1 的 D7	20	PYLLRNLSDHTVAISSSTTLDCHANGVP EPQITWFKNNHKKIQQEPGIILGPGSSTLFI ERVTEEDEGVYHCKATNQKGSVESSAY LT
人類 VEGFR2 的 D1	21	NTTLQITCRGQRDLWLWPNNQSGSEQ RVEVTECSDGLFCKTLTIPKVIGNDTGA YKCFYRETDL
人類 VEGFR2 的 D2	22	NKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEK RFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAG MVFCEAKINDE
人類 VEGFR2 的 D3	23	YDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTE LNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDL KTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGL YTCAASSGLMTKKNST
人類 VEGFR2 的 D4	24	FVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKYL GYPPPEIKWYKNGIPLSNHTIKAGHVL TIMEVSERDTGNYTVILTNPISKEKQSH VVS
人類 VEGFR2 的 D5	25	PQIGEKSLISPVD SYQYGTTQTLTCTVY AIPPPHHIHWYWQLEEECANEPSQAVS VTNPYPCEEWRSVEDFQGGNKIEVNKN QFALIEGKNKTVSTLVIQAANVSALYK CEAVNKVGRGERVISFHVT
人類 VEGFR2 的 D6	26	PEITLQPDMQPTEQESVSLWCTADRSTF ENLTWYKLG PQPLPIHVGELPTPVCKN LDTLWKLNATMFSNSTNDILIMELKNA SLQDQGDYVCLAQDRKTKKRHCVVRQ LT
人類 VEGFR2 的 D7	27	PTITGNLENQTTSIGESIEVSCTASGNPPP QIMWFKDNETLVEDSGIVLKDGNRNLT IRRVRKEDEGLYTCQACSVLGCAKVEA FFI

【0043】 在一些實施方式中，血管內皮生長因子抑制區包含胺基酸序列，胺基酸序列與選自於由SEQ ID NOs. 1、2、9、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、

25、26、27、及其組合所組成之群組的胺基酸序列具有至少約80%的序列同源性。在一些實施例中，血管內皮生長因子抑制區與前述的胺基酸序列具有至少約85%、90%或95%的序列同源性。

【0044】 本發明描述了來自人類VEGF受體的VEGF抑制區(VID)與抗免疫檢查點蛋白抗體Fc融合的結構、表達和特徵。如果融合對應處被其他免疫檢查點取代例如抗CTLA-4、CD3、OX40抗體、或細胞表面標的分子例如抗EGFR、抗HER2、抗CD40抗體，則位於融合結構N端的抗PD-L1抗體將會增強融合蛋白的免疫力，並超過以免疫增強劑活化免疫力的方式。

【0045】 本發明提供雙特異性抗體或其抗原結合部分，包含結合區結合細胞表面蛋白；和血管內皮生長因子(VEGF)抑制區。在一些實施方式中，結合區結合PD-L1包含重鏈可變區與輕鏈可變區。重鏈可變區包含胺基酸序列與選自於由SEQ ID NO.4與SEQ ID NO.6所組成之群組的胺基酸序列具有至少約80%的序列同源性。在一些實施例中，重鏈可變區包含與前述的胺基酸序列具有至少約85%、90%或95%的序列同源性。輕鏈可變區包含胺基酸序列與選自於由SEQ ID NO.3的第1-111個位置胺基酸與SEQ ID NO.5的第1-110個位置胺基酸所組成之群組的胺基酸序列具有至少約80%的序列同源性。在一些實施例中，輕鏈可變區包含與前述的胺基酸序列具有至少約85%、90%或95%的序列同源性。

【0046】 自OmniMab庫產生的抗體

【0047】 為了產生針對PD-L1具療效的抗體，進行了OmniMab噬菌粒庫(phagemid library)的選擇。噬菌粒庫由AP Biosciences公司(APBio Inc.)從超過100個健康捐贈者B細胞收集產生。在第一輪篩選中使用之噬菌體系以Hyperphage (M13K07ΔpIII，德國海德堡Progen公司)製備。針對PD-L1的固相篩選和細胞篩選是用於選擇PD-L1特異性結合物，並從OmniMab庫中分離。在第一輪選擇中使用重組人類PD-L1-Fc (APBio Inc.)進行固相篩選，然後將表達PD-L1的HEK293細胞用於富集(enrichment)另外兩輪。在三輪選擇後，特異性PD-L1結合物藉由使用相應的重組蛋白以直接ELISA篩選和分離(第2A和2B圖)。預先塗覆的PD-L1-Fc重組蛋白以含有補救噬菌體(rescued phages)的上清液印漬(blots) 1小時，並用含有0.1% Tween-20的磷酸鹽緩衝生理鹽水(phosphate buffered saline, PBS)洗滌三次。噬菌體藉由辣根過氧化物酶接合的抗M13抗體(Roche)檢測，並以TMB受質(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine substrate, TMB substrate)做為信號產生，並記錄OD₄₅₀讀值。分離陽性結合物並送定序以確認重鏈和輕鏈的序列和多樣性。對PD-L1專一的重鏈和輕鏈可變區如SEQ ID NO.3至SEQ ID NO.6所示：SEQ ID NO.3是PD-L1 clone 6的輕鏈、SEQ ID NO.4是PD-L1 clone 6的重鏈可變區、SEQ ID NO.5是PD-L1 clone 32的輕鏈、SEQ ID NO.6是PD-L1 clone 32

的重鏈可變區。如第2A與2B圖所示，與陰性對照組相比，許多植株被分離出並且已知其特異性地識別相應的抗原。

【0048】 次選殖(subcloning)和表達/純化作為IgG形式篩選出的PD-L1特異性結合物

【0049】 為了便於快速篩選具有T細胞活化功能的特異性結合物，由ELISA篩選出PD-L1的陽性結合物的重鏈和輕鏈，接著進行擴增、分解(digest)與次選殖到攜帶IgG4恆定區(constant region)的APBio特異性IgG表達載體中(SEQ ID NO.7)。在序列驗證後，製備質體(plasmid)並使用293 fectin轉染試劑(Invitrogen)轉染到HEK293細胞中以表現抗體。培養4天後，藉由蛋白G層析(Protein G chromatography)將分泌到無血清培養基的抗體從培養基上清液中親和純化出。純化的抗體接著濃縮，並於PBS緩衝液中透析。透析蛋白的最終濃度藉由NanoDrop2000分光光度計測定，且在有或沒有還原劑的條件下以SDS-PAGE測定純度和完整性，如第3圖所示。各種純化的抗體先導物、參考抗體(MPDL3280A)的完整性在HEK293細胞中是正常的。

【0050】 由直接ELISA測定PD-L1特異性IgG先導物的結合活性

【0051】 PD-L1的純化抗體先導物(抗PD-L1抗體先導物)於人類PD-L1-Fc直接塗覆的裝置中進行ELISA結合特徵分析。第4圖顯示抗PD-L1抗體的ELISA結合結果。對於PD-L1特異性抗體，大多數先導物顯示出與參考抗體(Ref

Ab，MPDL3280A，Roche)相似或更好的結合活性。

【0052】 純化的人類PD-L1 IgG1 Fc嵌合體(PD-L1-Fc chimera，APBio)在PBS中透析，調整濃度至1 mg/mL，然後再用PBS稀釋至最終濃度為1 μg/mL。將Nunc-Immuno Maxisorp 96孔盤以每孔0.1 mL重組PD-L1-Fc嵌合體塗覆，留下空孔用於非特異性結合的對照組，並在4°C培養過夜。移除PD-L1-Fc嵌合體溶液，孔盤用0.4 mL沖洗緩衝液(wash buffer，含0.1% Tween-20的PBS溶液)洗滌三次。將孔盤中所有的孔槽加入0.4 mL阻斷緩衝液(blocking buffer，含5%低脂奶粉的PBS)，並在室溫下培養混合1小時。移除阻斷緩衝液後，用0.4 mL沖洗緩衝液洗滌孔盤三次。在PBS中製備PD-L1測試抗體的連續稀釋液，每孔加入0.1 mL稀釋的抗體。將孔盤在室溫下培養1小時。移除抗體溶液，每孔用0.4 mL沖洗緩衝液洗滌孔盤三次。辣根過氧化物酶標記的山羊抗人類IgG F(ab')₂特異性 F(ab')₂ 抗體 (Jackson Immunoresearch #109-036-097)用PBS以1：2000稀釋，每孔加入0.1 mL。將孔盤於室溫下培養1小時，並用每孔0.4 mL的沖洗緩衝液洗滌。加入0.1 mL TMB試劑(Invitrogen)並在室溫下培養1至5分鐘。藉由加入0.05 mL 1N 鹽酸(HCl)終止反應，並在Bio-Tek Spectra上於450 nm處讀取吸光值。計算抗PD-L1抗體先導物對PD-L1的EC₅₀並顯示，由直接ELISA偵測出大多數先導物具有良好的結合活性，MPDL3280A(Ref Ab)也呈現相同的結果(第4圖)。

【0053】 通過FACS確認PD-L1特異性IgG先導物的結合活性

【0054】 純化的抗體先導物(抗PD-L1抗體先導物)也用於流式細胞技術，以確定和比較先導物與PD-L1表達的HEK293細胞的結合活性。第5圖顯示，穩定表達PD-L1的HEK293細胞經FACS可知相應抗體先導物的結合活性。

【0055】 FACS分析以抗PD-L1抗體先導物將穩定表達PD-L1的293細胞進行染色，以檢測PD-L1結合活性。穩定表達的293細胞與1 µg/mL純化的抗PD-L1抗體先導物、參考抗體(Ref Ab MPDL3280A)、或作為陰性對照的同型抗體在冰上培養1小時。用1倍PBS洗滌細胞三次，然後在冰上與Alexa-488接合的山羊抗人類IgG (H+L)(Invitrogen Inc.)再一起培養1小時。染色後，用1倍PBS洗滌細胞三次，並重新懸浮於1倍PBS/2%胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)中，然後通過FACS Calibur (BD Biosciences, Inc.)和FlowJo(TreeStar, LLC)分析。如第5圖所示，大多數抗PD-L1抗體先導物與參考抗體皆具有良好的結合活性。這顯示選自OmniMab庫的噬菌體菌株確實可識別細胞中原始的PD-L1。

【0056】 配體競爭結合(ELISA測定)

【0057】 抗體先導物所顯示的結合選擇性和親和力測定，是用於評價本發明的抗PD-L1抗體先導物阻斷PD-L1與PD-1結合的能力。

【0058】 抗體藉由ELISA測試阻斷人類PD-L1-Fc嵌合

體(PD-L1-Fc)與重組人類PD-1/His(hPD-1/His)結合的能力。將純化的重組hPD-1/His(APBio)在PBS中透析至1 mg/mL，然後在PBS中稀釋至5 µg/mL。將Nunc Maxisorp 96孔盤用在PBS中的250 ng hPD-1/His塗覆過夜。移除hPD-1/His溶液，用0.4 mL沖洗緩衝液(0.1% Tween-20的PBS溶液)洗滌孔盤三次。所有孔槽中加入0.4 mL阻斷緩衝液(含5%低脂奶粉的PBS)，在室溫下培養1小時並混合。在阻斷步驟期間，將抗體原液(antibody stocks)在PBS中以200 nM至0 nM的範圍以2倍連續稀釋。將純化的重組PD-L1-Fc嵌合體在PBS中稀釋至4 µg/mL。用0.2 mL沖洗緩衝液(0.1% Tween-20的PBS溶液)洗滌以PD-1/His塗覆的孔盤三次。將60 µL抗體稀釋液(抗PD-L1抗體先導物或參考抗體Ref Ab MPDL3280A)單獨加入60 µL PD-L1-Fc嵌合體，並在室溫下培養1小時。孔盤被洗滌的方式如前所述。將辣根過氧化物酶接合人類IgG Fc特異性抗體在PBS中以1：2000稀釋，將100 µL所得溶液加入到經洗滌的孔盤的孔槽中，並在室溫下培養1小時。孔盤被洗滌的方式如前所述，每個孔槽中加入100 µL TMB受質溶液並培養10分鐘。用50 µL 1N HCl終止反應，並使用Bio-Tek讀數器讀取450 nm處的吸光值如第6圖所示。部分抗體先導物藉由競爭ELISA (competition ELISA)抑制PD-1-PD-L1之間的相互作用。與參考抗體(Ref Ab MPDL3280A)相比，大多數抗體先導物顯示出類似的阻斷活性。

【0059】 藉由抗PD-L1抗體抑制PD-1：PD-L1配體相

互作用以增強刺激T細胞活化

【0060】 PD-1 信息傳導途徑抑制中度TCR/CD28 共同刺激信號，首先減少細胞激素產生而T細胞增殖則沒有減少。隨著TCR/CD28 共同刺激信號減弱，PD-1 途徑占主導地位，細胞激素的產生大幅減少，同時也伴隨著增殖的減少。因此，為了藉由抑制PD-1 與PD-L1 的相互作用來確認PD-1 的抑制情形，本發明的人類抗體增強T細胞活化，並進行混合淋巴細胞反應(MLR)。

【0061】 通過RosetteSep™人類單核細胞富集組(產品型號15068)富集來自人類全血的單核細胞，並在分化培養基含10% FBS RPMI 1640、100 ng/mL (1000U/mL) GM-CSF、100 ng/mL (500 U/mL) 中培養6天。由DC-SIGN-PE、與異硫氰酸螢光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 抗體接合的抗CD14、與PE抗體接合的抗CD83、或與FITC抗體接合的抗CD80檢查從單核細胞分化的樹突細胞(dendritic cells, DC)，以在混合淋巴細胞反應中驗證分化情形與驗證曾經為抗原呈現細胞 (antigen-presenting cell, APC)。

【0062】 藉由RosetteSep™人類CD4⁺ T細胞富集組(商品型號15062)分離來自人類全血的異體(Allogenic) CD4⁺ T細胞。用抗CD4接合的APC抗體檢查CD4⁺ T細胞的純度以確保純度高於95%，然後用1 μM CFSE (CellTrace™ CFSE 細胞增殖試劑盒，Life technologies，商品型號C34554)標記T細胞增殖試驗。標

記的CD4⁺ T細胞用於與未成熟的樹突細胞及不同的抗體先導物共同培養3天和5天，以觀察抗體先導物是否可以通過阻斷PD-1和PD-L1之間的相互作用來恢復T細胞活化。培養3天和5天後，收集上清液中的細胞激素，例如藉由ELISA定量的IL-2和IFN- γ 。與同型IgG (iso#1, #2)處理的培養物相比(如第7A和7B圖所示)，向未成熟樹突細胞和異體T細胞培養物中添加抗PD-L1抗體先導物(殖株6、32、28、51、64、27和37)預期會導致T細胞增殖和細胞激素產生增加。在第3天(第7A圖)或第5天(第7B圖)抗體處理後與同型抗體處理相比，MLR中IL-2和IFN- γ 產生顯著增加，特別是對於抗PD-L1抗體殖株6。抗體治療5天後，細胞激素的增加仍然顯著，其結果與參考抗體(ref) MPDL3280A相似。這顯示抗PD-L1抗體殖株6應該是雙特異性抗體複合物的潛在先導物之一。

【0063】 抗PD-L1-VID抗體的結構、表達和純化

【0064】 由於雙特異性被設計為與VEGF抑制區融合的IgG，因此抗PD-L1抗體殖株6被指定為IgG形式。另一方面，VEGF受體中的VEGF結合區D1和D2與抗PD-L1殖株6抗體中Fc區的C端融合在一起。由於Fc同型或工程化Fc對於改善哺乳動物細胞中雙特異性抗體的有效性或產生是重要的，因此，兩種不同的Fc同型體：IgG4 (SEQ ID NO.7)和工程化IgG1 (eIgG1，經抗體依賴性細胞介導之細胞毒性減低，SEQ ID NO.8)用於雙特異性架構。VID (SEQ ID NO.9)與雙特異性抗PD-L1抗體Fc融合的結構繪示於第8

圖中。將短小靈活的多肽連接子(GGGGS)₃ (SEQ ID NO.10)置於例如Fc區的抗PD-L1抗體重鏈C端(SEQ ID NO.4)和VID的N端之間，以確保正確折疊並儘量減少空間阻礙。IgG4和eIgG1的抗PD-L1-VID重鏈的編碼序列顯示在SEQ ID NO.12和NO.13中。建構的抗體Fc融合蛋白由信號胜肽(SEQ ID NO.11)引導並由哺乳動物細胞表達，並通過一步蛋白G色譜法(1-step Protein G chromatography)從轉染的細胞培養上清液中純化。如第9圖所示，在單步純化過程中可以獲得大於95%的純度，並且顯示純化的融合蛋白具有正確的分子量(Mw=220kDa)。由於低純度或低回收率是在化學、製造和控制(chemistry, manufacturing, and controls, CMC)生產雙特異性抗體或融合蛋白時的主要問題，因此，兩種純化的雙特異性抗體也使用高效能液相層析的粒徑篩析層析法(size exclusion column, SEC)，以評估雙特異性抗體的純度(第10A和10B圖)。兩種雙特異性抗體，無論是抗PD-L1-VID/IgG4(第10A圖)還是抗PD-L1-VID/eIgG1(第10B圖)，在SEC-HPLC分析中均顯示純度高於99%。這顯示此模式可以在CMC開發中易於執行，並在進一步發展中提供成功的機會。

【0065】 如第8圖所示，Fc末端與VID融合的抗免疫檢查點抗體的結構。在一些實施方式中，抗體可以是抑制性抗免疫檢查點抗體(例如抗PD-L1、抗PD-1、抗CTLA4、抗LAG3等)、刺激性抗體(例如抗CD28、抗CD137、抗

CD27、抗ICOS等)、或細胞表面受體/抗原(例如HER2、EGFR等)。將連接子置於抗體Fc和VID之間以產生雙特異性抗體。

【0066】 融合蛋白與PD-L1和VEGF₁₆₅的結合親和力

【0067】 使用直接ELISA來測量雙特異性抗體與PD-L1或VEGF₁₆₅ (VEGF-A的剪接變異, splice variant)的結合親和力。重組VEGF捕獲蛋白(trapping protein, VEGFR-Fc)和抗PD-L1抗體植株6分別作為VEGF和PD-L1的陽性對照。VEGFR-Fc (aflibercept)是一種可溶性VEGF受體, 其經基因工程作為治療用途, 並且目前被美國食品和藥物管理局批准用於治療年齡相關性黃斑變性(age-related macular degeneration, AMD)。VEGFR-Fc含有VEGFR1的第二類Ig區(D2)與VEGFR2的第三類Ig區(D3)融合, 再與人類IgG1的Fc區融合(Holash等人, 2002)。

【0068】 將100 μ L塗覆溶液(1 μ g/mL VEGF₁₆₅在PBS中, pH 7.2)加入到ELISA 96孔盤的每個孔槽中, 並將孔盤在4°C培養過夜。將孔槽用400 μ L PBS緩衝液沖洗兩次, 並用紙巾小心地移除過量的液體。每個孔槽中加入400 μ L阻斷溶液(含5%脫脂乳的PBS), 並將孔盤在室溫下培養1小時。用PBS緩衝液洗滌孔槽兩次。將雙特異性抗體和對照組樣品在阻斷溶液中連續稀釋三倍, 最高蛋白質濃度為100 nM。將100 μ L連續稀釋的樣品加入每個孔槽中。蓋上孔盤並在孔盤振盪器(plate shaker, 約100 rpm)上於室溫

培養1小時。用沖洗緩衝液(0.05% Tween-20的PBS溶液)洗滌孔槽三次。將100 μ L在阻斷溶液中以1:2500稀釋的辣根過氧化物酶接合山羊抗人類IgG Fc特異性抗體加入每個孔槽中。將孔盤密封並在孔盤振盪器上於室溫培養1小時。用洗滌緩衝液將板洗滌三次。每個孔槽中加入100 μ L TMB受質，將孔盤培養3至5分鐘以使反應發生。為了停止反應，每個孔槽中加入100 μ L終止溶液(1N HCl)。使用ELISA孔盤讀數器(Bio-Tek)在450 nm吸光波長下測定每個孔槽的光密度(optical density, OD)。將吸光值相對於融合蛋白或對照組的蛋白質濃度作圖，並偵測出信號為最大有效濃度之一半(EC₅₀)時的濃度。同時，PD-L1對兩種雙特異性抗體的結合活性也如上所述進行，除了雙特異性抗體的結合是藉由辣根過氧化物酶接合山羊抗人類IgG F(ab')₂特異性F(ab')₂抗體所檢測。

【0069】 如第11A圖中所示的數據，抗PD-L1-VID/IgG4和抗PD-L1-VID/eIgG1抗體對於重組PD-L1蛋白的結合親和力為0.075（表示為EC₅₀值）。兩種雙特異性抗體與陽性對照組抗PD-L1植株6抗體(0.1 nM)都進行比較結合活性。同時，還記錄了VEGF結合活性測試的結果。如第11B圖中所示的數據，與陽性對照組VEGFR-Fc (aflibercept)相比，兩種雙特異性抗體顯示出相似的VEGF結合活性。無論是PD-L1或VEGF結合活性，兩種雙特異性抗體均不影響PD-L1或VEGF各自的結合活性。

【0070】 由抗PD-L1-VID雙特異性抗體抑制HUVEC

增殖

【0071】 進行人類臍靜脈內皮細胞(HUVEC)增殖測定以測試本發明中雙特異性抗體的功能。如上所述，VEGFR-Fc作為陽性對照組。將100 μ L塗覆溶液(在二次蒸餾水中含有1%明膠，gelatin)加入到ELISA 96孔盤的每個孔槽中，並將孔盤在37°C下培養2小時或過夜。用PBS緩衝液洗滌孔槽兩次。將在內皮細胞生長培養基內的3500個HUVEC細胞加入至每個孔槽中，並將孔盤在37°C培養過夜。將所示樣品稀釋於測定緩衝液(assay buffer：Medium-199含1倍Earle's Salts、10% FBS、10 mM HEPES、1倍抗生素/抗真菌劑)中，最高蛋白質濃度為30 nM。將樣品與VEGF₁₆₅ (8 ng/mL)混合，並將混合物在室溫下培養過夜。然後用200 μ L PBS洗滌孔槽。每個孔槽中加入100 μ L VEGF₁₆₅/樣品混合物，並將孔盤在37°C下用5% CO₂培養72小時。培養後，將10 μ L MTS檢測試劑[(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)與吩嗪硫酸甲酯(phenazine methosulfate)於蒸餾水PBS中]加入每個孔槽中，並將孔盤在37°C下培養2.5小時。使用ELISA孔盤讀數器(Bio-Tek)在490 nm的吸光波長下測定每個孔槽的OD值。將吸光值對測試樣品的蛋白質濃度作圖，並測定細胞增殖被抑制50%時的濃度(IC₅₀)。對於本發明的測試融合蛋白，確定細胞增殖的抑制情形(IC₅₀)在0.1070和0.1233 nM之間。雙特異性抗體之一的抗

PD-L1-VID/eIgG1顯示出比另一種雙特異性抗體的抗PD-L1-VID/IgG4更好的抑制效果(第12圖，0.1070 nM對比0.1233 nM)。抗PD-L1-VID/eIgG1的IC₅₀與陽性對照VEGFR-Fc(0.1072 nM)的IC₅₀一樣好。

【0072】 在MLR中增強抗PD-L1-VID/eIgG1雙特異性抗體先導物對T細胞活化的刺激

【0073】 通過抑制PD-1和PD-L1之間的相互作用，來確定雙特異性抗體在增強T細胞活化中的拮抗功能。如上所述，將雙特異性抗體先導物抗PD-L1-VID/eIgG1抗體應用於MLR，然後在抗體處理3或5天後記錄IL-2和IFN- γ 的產生。以等莫爾量(mole)單或雙特異性抗體比較T細胞活化增強中的拮抗功能，並將同型IgG作為陰性對照組。如第13A和13B圖所示的數據，抗PD-L1-VID/eIgG1抗體在處理3天後顯示IL-2被顯著誘導出，並在處理5天後下降。細胞激素產生的概況與參考抗體MPDL3280A的施予情形高度相似。同時，在處理3或5天後，雙特異性抗體中的IFN- γ 產量也有增加與積累。這顯示抗PD-L1-VID/eIgG1雙特異性抗體在T細胞活化中也具有拮抗功能，參考抗體也有相同的結果而不損失本發明中的任何活性。

【0074】 抗PD-L1-VID/eIgG1雙特異性抗體的體外血清穩定性

【0075】 將純化的抗PD-L1-VID/eIgG1與來自不同物種的血清(15 μ g/mL)一起培養在37°C水浴中。含有純化的雙特異性抗體的血清樣品在不同時間點採集直至14天。如

下使用三明治ELISA測定法測定血清樣品中雙特異性抗體的濃度。將以VEGF₁₆₅ (1 µg/mL)預先塗覆的孔槽與純化抗PD-L1-VID/eIgG1雙特異性抗體的滴定濃度(titrated concentration)一起培養，作為標準曲線以計算血清中的抗體濃度(現場配製，第0天)。將來自不同時間點的收集樣品也已預先塗覆的VEGF₁₆₅孔槽用於檢測。以含有0.1% Tween-20的PBS洗滌後，完整和結合的抗體在顯色前用生物素化的PD-L1-Fc和辣根過氧化物酶接合的鏈黴抗生物素蛋白進行檢測。血清中抗體的濃度以內插法計算，然後如第14A、14B和14C圖所示繪示抗體的半衰期。在食蟹獼猴(8.6天)、小鼠(9.2天)或人類血清(11.9天)中，抗PD-L1-VID/eIgG1的半衰期長於8天。半衰期長可以提供雙特異性抗體的使用靈活性，在未來的動物研究或臨床試驗中具有較少的給藥頻率。

【0076】 雙特異性抗體的抗腫瘤活性(體內模式)

【0077】 由於PD-L1在雙特異性抗體中缺乏嚙齒動物交叉反應性，阻礙了標準鼠同源或人類異種移植腫瘤模型用於評估抗體抗人類腫瘤的功效。因此，使用SCID-Bg小鼠(CB.17/Icr.Cg Pkrdc^{scid}Lyst^{bg}/CrI)產生新的huPBL-SCID-Bg異種腫瘤小鼠模型，其含有米色(beige, Bg)突變、缺乏T和B淋巴細胞、與缺乏有功能性自然殺手細胞(natural killer cell, NK cell)。

【0078】 PC-3人類前列腺取自美國典型培養物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)，並在

含有 L- 麩 胺 酸 (L-glutamine)、 丙 酮 酸 鈉 (sodium pyruvate)、 青 黴 素 / 鏈 黴 素 (penicillin/streptomycin) 和 10% 熱 滅 活 的 胎 牛 血 清 (heat-inactivated FBS, Gibco 商品型號 10437 號) 的 RPMI-1640 (Invitrogen) 中 培 養。細 胞 在 T-150 Falcon 燒 瓶 中 生 長 至 飽 和。隨 後，用 胰 蛋 白 酶 處 理 細 胞 (胰 蛋 白 酶 0.25%-EDTA; Invitrogen) 並 將 生 長 放 大 至 足 夠 的 細 胞 數 用 於 接 種。根 據 製 造 商 的 操 作 準 則 (STEMCELL Technologies Inc.)，使 用 Lymphoprep™ 將 從 以 肝 素 處 理 之 血 液 (heparinized blood) 中 分 離 出 外 周 血 淋 巴 細 胞 (peripheral blood lymphocytes, PBMC)。將 計 數 的 細 胞 懸 浮 液 進 行 組 合，使 得 每 隻 小 鼠 在 PBS 中 單 次 推 注 (single bolus injection) 0.1 mL 時，接 受 0.75×10^6 個 PBMC 和 3×10^6 個 腫 瘤 細 胞。為 了 促 進 在 小 鼠 內 生 長 的 腫 瘤 細 胞，接 著 將 另 外 0.1 mL 基 質 膠 (matrigel) 與 組 合 細 胞 懸 浮 液 混 合，然 後 立 即 注 射 到 製 備 小 鼠。

【0079】 對於每隻小鼠，將 0.2 mL 體積的組合細胞懸浮液皮下注射到動物的右側腹中。接種 14 天後，形成實體瘤並達到約 250 至 300 mm³，並且每週兩次持續三至四周以雙特異性抗體 (10 mg/kg) 或對照組抗體以腹腔內注射 (intraperitoneal injection, i.p.) 的方式進行挑戰 (challenged)。在實驗期間每週兩次通過 Pressier 卡尺進行腫瘤與測試樣品的測量，並且也記錄體重。腫瘤體積使用以下算式計算：長度 × 寬度² × 0.44 = 體積 (mm³) 並繪製在第 15A 圖中。在實驗終止之前，腫瘤體積達到 2000 mm³ 或動

物體重減輕20%的情況時將小鼠從研究中移除。當在接種後第7天測量腫瘤時觀察到類似的結果，並且根據腫瘤體積隨機分配動物。對於動物研究，每組包含6隻小鼠。如第15A圖中顯示的數據，雙特異性抗體在PC-3異種移植小鼠模型中顯示出顯著的抗腫瘤成效。腫瘤大小在接種後18天有變小，相同的結果在施予PD-L1參考抗體中也有觀察到，並繼續降低至200 mm³以下。第15B圖顯示，在接種後第35天時，腫瘤大小在雙特異性抗體治療下顯著小於同型或參考抗體的治療。這顯示抗PD-L1-VID/eIgG1抗體對動物的抗腫瘤活性具有協同作用(synergic effect)。PC-3異種移植小鼠模型初步證明了雙特異性抗體的抗腫瘤作用，並揭示了其未來治療藥物的潛力。

【0080】 總體來說，這些結果表示雙特異性抗體在PD-1/PD-L1信號傳導中，維持其免疫檢查點阻斷並中和促血管生成蛋白VEGF。正在進行的研究將使用適當的動物模型進一步研究這些蛋白質的生物活性，例如人源化NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1wj1}/SzJ (NSG)模型中的PC-3腫瘤。

【0081】 本發明中的Fc區可以來自任何免疫球蛋白同型(immunoglobulin isotypes)、亞類(subclasses)、同種異型(allotypes)、或工程化突變體(engineered mutants)，例如鈕與扣的Fc片段(knob and hole Fc fragment)。

【0082】 實施例

【0083】 以下實施例描述了產生適合於將人類PD-L1和VEGF作為目標與治療目的的單株抗體。從抗PD-L1抗體殖株6與從人類VEGF受體選出的VEGF捕獲區分別產生組合的人類抗人類PD-L1和VEGF中和區(VEGF neutralized domains)。人類變異區(V區)序列的區段源自於無關的人類抗體(生殖細胞和非生殖細胞, germline and non-germline)序列數據庫。

【0084】 實施例1 產生與PD-L1和VEGF結合的IgG抗體

【0085】 本發明提供的特定抗體最初由Fabs與人類PD-L1結合產生。從噬菌體展示庫(phage display library): OmniMab噬菌粒庫中選擇Fab, 接著在交替篩選相應的Fc融合蛋白(PD-L1-Fc)和表達人類相應蛋白(PD-L1)的細胞。在直接ELISA篩選後, 對陽性殖株的重鏈和輕鏈進行定序。這些Fab包括指定為PD-L1的「OM-PD-L1-6」和「OM-PD-L1-32」等。本案揭示的PD-L1抗體: PD-L1-殖株6和PD-L1-殖株32, 從HEK293細胞或CHO-S細胞中的「OM-PD-L1-6」和「OM-PD-L1-32」產生。同時將PD-L1和VEGF作為目標的雙特異性抗體被設計為抗PD-L1-VID(VEGF抑制區)抗體。所提供的Fab之輕鏈可變區和重鏈可變區的胺基酸序列, 分別與輕鏈可變區和重鏈可變區的胺基酸序列相同。

【0086】 實施例2 抗PD-L1-VID雙特異性抗體與其相應標的的體外結合

【0087】 如第8圖所示，建構抗PD-L1-VID雙特異性抗體並在HEK293細胞或CHO-S細胞中表達。藉由蛋白G層析從培養上清液中親和純化含有雙特異性抗體的培養基。接著濃縮經純化的抗體，然後在PBS緩衝液中透析並藉由SDS-PAGE分析如第9圖所示。為了在ELISA上測試純化的融合蛋白與PD-L1或VEGF₁₆₅的直接結合能力，以每孔100 ng濃度的重組PD-L1塗覆在ELISA 96孔盤中。然後將各種濃度的純化抗PD-L1-VID抗體加入每個孔槽中並培養1小時。洗滌後，每個孔槽中加入1：5000稀釋的抗Fab或抗Fc辣根過氧化物酶接合物(Jackson Immunochemicals)並再培養1小時。最後洗滌後，加入TMB受質(Invitrogen Inc.)並測量450 nm處的OD吸光值。使用GraphPad Prism 5通過S形曲線擬合(sigmoidal curve fitting)分析數據和計算EC₅₀。

【0088】 實施例3 由FACS分析抗PD-L1-VID的抗原結合特異性

【0089】 為了測試抗PD-L1-VID抗體結合特異性，穩定的PD-L1表達293細胞、IFN- γ 刺激的A549、或WiDr(結腸直腸腺癌細胞株)以1 μ g/mL抗PD-L1-VID抗體在冰上染色1小時，然後用1倍PBS洗滌三次。以Alexa-488接合的山羊抗人類IgG (H+L)檢測結合的抗體融合蛋白，然後進行FACS分析。同型抗體為測試的陰性對照組。結果顯示，與單獨的抗PD-L1相比，抗PD-L1-VID抗體維持其抗原結合特異性。

【0090】 為了測試抗PD-L1-VID抗體結合的特異性，PD-L1穩定表達的293細胞(人類胚腎細胞)、IFN- γ 刺激的A549(肺癌細胞)、或NCI-H292(黏液表皮樣肺癌)以1 $\mu\text{g/mL}$ 抗PD-L1-VID抗體在冰上染色1小時，然後用1倍PBS洗滌3次。以Alexa-488接合的山羊抗人類IgG(H+L)檢測結合的抗體融合蛋白，然後進行FACS分析。同型抗體為測試的陰性對照組。結果顯示，與單獨的抗PD-L1相比，抗PD-L1-VID抗體維持其抗原結合特異性。(第16A、16B和16C圖)。

【0091】 實施例4 抗PD-L1-VID雙特異性抗體的體外免疫調節作用

【0092】 為了測量抗PD-L1-VID抗體調節T細胞反應能力，將純化的T細胞與異體的樹突細胞一起培養，藉由在GM-CSF和IL-4中培養單核細胞幾天來製備。設置平行孔盤以允許在第3天和第5天收集上清液，使用市售ELISA試劑盒分別測量IL-2和IFN- γ 。Genentech/Roche的人源化抗PD-L1(MPDL3280A)將出現在預定孔盤中並作為陽性對照組。如第13A和13B圖所示，抗體處理3或5天後，在雙特異性抗體處理以及參考抗體中IL-2和IFN- γ 的含量顯著提升。它揭示了雙特異性抗體仍然具有抑制T細胞和樹突細胞之間PD-1/PD-L1的相互作用，以活化T細胞活性的能力。

【0093】 實施例5 體內雙特異性抗體誘導的人類白血球擴增

【0094】 由於缺乏可檢測PD-L1抗體與鼠PD-L1的交

叉反應性(cross-reactivity)、和對人免疫細胞存在的要求，因此需要開發用於雙特異性抗體之體內功能評估的模型。具有嚴重聯合免疫缺陷(severe combined immunodeficient, SCID)突變和缺乏IL-2受體共同 γ 鏈(通常稱為NSG)的NOD遺傳背景的小鼠，能夠支持大量人類外周白血球(human peripheral blood leukocytes, huPBL)的植入並維持至少30天(King等人，2008)。此小鼠模型，也稱為huPBL-NSG模型，用於評估體內全身施用抗體對人免疫細胞的效果。

【0095】 具體地，通過靜脈內注射將600萬新鮮分離的人類PBMC轉移到huPBL-NSG小鼠中。PBMC注射9天後，通過腹腔內注射給動物並施用單一1 mg/kg單株抗體、雙特異性抗體或同型對照抗體。在PBMC植入後第24至28天，通過流式細胞儀以人和鼠CD45抗體染色評估PBMC。前方和側向散射輪廓用於確定框選淋巴細胞範圍。雙特異性抗體能夠增強人類白血球的擴增，這可藉由移植小鼠外周血中人類CD45⁺細胞比例的增加來證明。每組具有 $n \geq 6$ 隻小鼠。

【0096】 實施例6 由抗PD-L1-VID/eIgG1抗體對huPBL-NSG中PC-3或A498腫瘤細胞生長的抑制

【0097】 屬於PD-L1陽性的人類前列腺癌細胞株PC-3(ATCC[®]#CRL-1435)或腎癌細胞株A498(ATCC[®]HTB-44TM)，可用於huPBL-NSG小鼠中建立異種移植模型。對於腫瘤形成，如上所述，將每隻小鼠 3×10^6 個PC-3

細胞(或A498細胞)以皮下注射到huPBL-NSG小鼠中。為了評估對腫瘤生長的抑制作用，小鼠腫瘤細胞植入14天後，將每週兩次持續4週以靜脈注射不同濃度的抗PD-L1-VID/eIgG1抗體、參考抗體、或0.1至3 mg/kg的同型抗體。如Fox Chase SCID[®]Beige小鼠模型中所述，腫瘤生長將每週測量兩次持續5週。

【0098】 實施例7 小鼠和猴子中抗PD-L1-VID/eIgG1的藥物動力學評估

【0099】 將10 mg/kg至40 mg/kg雙功能蛋白(抗PD-L1-VID/eIgG1)通過皮下注射或靜脈注射施予小鼠或猴子。在注射後不同時間點採集血清樣品至15天。使用三明治ELISA測定法測定血清樣品中Fc融合蛋白的濃度。

【0100】 雖然本發明已以實施方式揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作各種之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

【符號說明】

【0101】 無

【序列表】

<110> 圓祥生命科技股份有限公司

<120> 結合檢查點阻礙物作為標的治療的雙功能性蛋白質、其藥物
複合體、其醫藥組成物、其核酸、及其用途

<130> NP-24214-TW

<140> TW 108106894

<141> 2019-02-27

<150> US 62/636,825

<151> 2018-02-28

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 732

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

Ser Lys Leu Lys Asp Pro Glu Leu Ser Leu Lys Gly Thr Gln His Ile
1 5 10 15

Met Gln Ala Gly Gln Thr Leu His Leu Gln Cys Arg Gly Glu Ala Ala
20 25 30

His Lys Trp Ser Leu Pro Glu Met Val Ser Lys Glu Ser Glu Arg Leu
35 40 45

Ser Ile Thr Lys Ser Ala Cys Gly Arg Asn Gly Lys Gln Phe Cys Ser
50 55 60

Thr Leu Thr Leu Asn Thr Ala Gln Ala Asn His Thr Gly Phe Tyr Ser

65					70					75					80
Cys	Lys	Tyr	Leu	Ala	Val	Pro	Thr	Ser	Lys	Lys	Lys	Glu	Thr	Glu	Ser
				85					90					95	
Ala	Ile	Tyr	Ile	Phe	Ile	Ser	Asp	Thr	Gly	Arg	Pro	Phe	Val	Glu	Met
				100					105					110	
Tyr	Ser	Glu	Ile	Pro	Glu	Ile	Ile	His	Met	Thr	Glu	Gly	Arg	Glu	Leu
		115						120					125		
Val	Ile	Pro	Cys	Arg	Val	Thr	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr	Val	Thr	Leu	Lys
		130					135					140			
Lys	Phe	Pro	Leu	Asp	Thr	Leu	Ile	Pro	Asp	Gly	Lys	Arg	Ile	Ile	Trp
145					150					155					160
Asp	Ser	Arg	Lys	Gly	Phe	Ile	Ile	Ser	Asn	Ala	Thr	Tyr	Lys	Glu	Ile
				165					170					175	
Gly	Leu	Leu	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	Val	Asn	Gly	His	Leu	Tyr	Lys	Thr
			180						185					190	
Asn	Tyr	Leu	Thr	His	Arg	Gln	Thr	Asn	Thr	Ile	Ile	Asp	Val	Gln	Ile
		195						200					205		
Ser	Thr	Pro	Arg	Pro	Val	Lys	Leu	Leu	Arg	Gly	His	Thr	Leu	Val	Leu
		210				215					220				
Asn	Cys	Thr	Ala	Thr	Thr	Pro	Leu	Asn	Thr	Arg	Val	Gln	Met	Thr	Trp
225					230					235					240

108 年 5 月 20 日無劃線替換頁

Ser Tyr Pro Asp Glu Lys Asn Lys Arg Ala Ser Val Arg Arg Arg Ile
245 250 255

Asp Gln Ser Asn Ser His Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile
260 265 270

Asp Lys Met Gln Asn Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg
275 280 285

Ser Gly Pro Ser Phe Lys Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp
290 295 300

Lys Ala Phe Ile Thr Val Lys His Arg Lys Gln Gln Val Leu Glu Thr
305 310 315 320

Val Ala Gly Lys Arg Ser Tyr Arg Leu Ser Met Lys Val Lys Ala Phe
325 330 335

Pro Ser Pro Glu Val Val Trp Leu Lys Asp Gly Leu Pro Ala Thr Glu
340 345 350

Lys Ser Ala Arg Tyr Leu Thr Arg Gly Tyr Ser Leu Ile Ile Lys Asp
355 360 365

Val Thr Glu Glu Asp Ala Gly Asn Tyr Thr Ile Leu Leu Ser Ile Lys
370 375 380

Gln Ser Asn Val Phe Lys Asn Leu Thr Ala Thr Leu Ile Val Asn Val
385 390 395 400

Lys Pro Gln Ile Tyr Glu Lys Ala Val Ser Ser Phe Pro Asp Pro Ala
405 410 415

Leu	Tyr	Pro	Leu	Gly	Ser	Arg	Gln	Ile	Leu	Thr	Cys	Thr	Ala	Tyr	Gly	
			420					425					430			
Ile	Pro	Gln	Pro	Thr	Ile	Lys	Trp	Phe	Trp	His	Pro	Cys	Asn	His	Asn	
		435					440					445				
His	Ser	Glu	Ala	Arg	Cys	Asp	Phe	Cys	Ser	Asn	Asn	Glu	Glu	Ser	Phe	
	450					455					460					
Ile	Leu	Asp	Ala	Asp	Ser	Asn	Met	Gly	Asn	Arg	Ile	Glu	Ser	Ile	Thr	
465						470				475					480	
Gln	Arg	Met	Ala	Ile	Ile	Glu	Gly	Lys	Asn	Lys	Met	Ala	Ser	Thr	Leu	
				485					490						495	
Val	Val	Ala	Asp	Ser	Arg	Ile	Ser	Gly	Ile	Tyr	Ile	Cys	Ile	Ala	Ser	
			500					505					510			
Asn	Lys	Val	Gly	Thr	Val	Gly	Arg	Asn	Ile	Ser	Phe	Tyr	Ile	Thr	Asp	
		515					520					525				
Val	Pro	Asn	Gly	Phe	His	Val	Asn	Leu	Glu	Lys	Met	Pro	Thr	Glu	Gly	
	530						535				540					
Glu	Asp	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Thr	Val	Asn	Lys	Phe	Leu	Tyr	Arg	Asp	
545					550					555					560	
Val	Thr	Trp	Ile	Leu	Leu	Arg	Thr	Val	Asn	Asn	Arg	Thr	Met	His	Tyr	
			565						570					575		
Ser	Ile	Ser	Lys	Gln	Lys	Met	Ala	Ile	Thr	Lys	Glu	His	Ser	Ile	Thr	
			580					585					590			

Leu Asn Leu Thr Ile Met Asn Val Ser Leu Gln Asp Ser Gly Thr Tyr
595 600 605

Ala Cys Arg Ala Arg Asn Val Tyr Thr Gly Glu Glu Ile Leu Gln Lys
610 615 620

Lys Glu Ile Thr Ile Arg Asp Gln Glu Ala Pro Tyr Leu Leu Arg Asn
625 630 635 640

Leu Ser Asp His Thr Val Ala Ile Ser Ser Ser Thr Thr Leu Asp Cys
645 650 655

His Ala Asn Gly Val Pro Glu Pro Gln Ile Thr Trp Phe Lys Asn Asn
660 665 670

His Lys Ile Gln Gln Glu Pro Gly Ile Ile Leu Gly Pro Gly Ser Ser
675 680 685

Thr Leu Phe Ile Glu Arg Val Thr Glu Glu Asp Glu Gly Val Tyr His
690 695 700

Cys Lys Ala Thr Asn Gln Lys Gly Ser Val Glu Ser Ser Ala Tyr Leu
705 710 715 720

Thr Val Gln Gly Thr Ser Asp Lys Ser Asn Leu Glu
725 730

<210> 2
<211> 745
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

Ala Ser Val Gly Leu Pro Ser Val Ser Leu Asp Leu Pro Arg Leu Ser
1 5 10 15

Ile Gln Lys Asp Ile Leu Thr Ile Lys Ala Asn Thr Thr Leu Gln Ile
20 25 30

Thr Cys Arg Gly Gln Arg Asp Leu Asp Trp Leu Trp Pro Asn Asn Gln
35 40 45

Ser Gly Ser Glu Gln Arg Val Glu Val Thr Glu Cys Ser Asp Gly Leu
50 55 60

Phe Cys Lys Thr Leu Thr Ile Pro Lys Val Ile Gly Asn Asp Thr Gly
65 70 75 80

Ala Tyr Lys Cys Phe Tyr Arg Glu Thr Asp Leu Ala Ser Val Ile Tyr
85 90 95

Val Tyr Val Gln Asp Tyr Arg Ser Pro Phe Ile Ala Ser Val Ser Asp
100 105 110

Gln His Gly Val Val Tyr Ile Thr Glu Asn Lys Asn Lys Thr Val Val
115 120 125

Ile Pro Cys Leu Gly Ser Ile Ser Asn Leu Asn Val Ser Leu Cys Ala
130 135 140

Arg Tyr Pro Glu Lys Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg Ile Ser Trp
145 150 155 160

Asp Ser Lys Lys Gly Phe Thr Ile Pro Ser Tyr Met Ile Ser Tyr Ala

165					170					175						
Gly	Met	Val	Phe	Cys	Glu	Ala	Lys	Ile	Asn	Asp	Glu	Ser	Tyr	Gln	Ser	
180					185					190						
Ile	Met	Tyr	Ile	Val	Val	Val	Val	Gly	Tyr	Arg	Ile	Tyr	Asp	Val	Val	
195					200					205						
Leu	Ser	Pro	Ser	His	Gly	Ile	Glu	Leu	Ser	Val	Gly	Glu	Lys	Leu	Val	
210					215					220						
Leu	Asn	Cys	Thr	Ala	Arg	Thr	Glu	Leu	Asn	Val	Gly	Ile	Asp	Phe	Asn	
225					230					235					240	
Trp	Glu	Tyr	Pro	Ser	Ser	Lys	His	Gln	His	Lys	Lys	Leu	Val	Asn	Arg	
245					250					255						
Asp	Leu	Lys	Thr	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Met	Lys	Lys	Phe	Leu	Ser	Thr	
260					265					270						
Leu	Thr	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Arg	Ser	Asp	Gln	Gly	Leu	Tyr	Thr	Cys	
275					280					285						
Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Met	Thr	Lys	Lys	Asn	Ser	Thr	Phe	Val	Arg	
290					295					300						
Val	His	Glu	Lys	Pro	Phe	Val	Ala	Phe	Gly	Ser	Gly	Met	Glu	Ser	Leu	
305					310					315					320	
Val	Glu	Ala	Thr	Val	Gly	Glu	Arg	Val	Arg	Ile	Pro	Ala	Lys	Tyr	Leu	
325					330					335						

108 年 5 月 20 日無劃線替換頁

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

Ala Val Asn Lys Val Gly Arg Gly Glu Arg Val Ile Ser Phe His Val
515 520 525

Thr Arg Gly Pro Glu Ile Thr Leu Gln Pro Asp Met Gln Pro Thr Glu
530 535 540

Gln Glu Ser Val Ser Leu Trp Cys Thr Ala Asp Arg Ser Thr Phe Glu
545 550 555 560

Asn Leu Thr Trp Tyr Lys Leu Gly Pro Gln Pro Leu Pro Ile His Val
565 570 575

Gly Glu Leu Pro Thr Pro Val Cys Lys Asn Leu Asp Thr Leu Trp Lys
580 585 590

Leu Asn Ala Thr Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile Leu Ile Met
595 600 605

Glu Leu Lys Asn Ala Ser Leu Gln Asp Gln Gly Asp Tyr Val Cys Leu
610 615 620

Ala Gln Asp Arg Lys Thr Lys Lys Arg His Cys Val Val Arg Gln Leu
625 630 635 640

Thr Val Leu Glu Arg Val Ala Pro Thr Ile Thr Gly Asn Leu Glu Asn
645 650 655

Gln Thr Thr Ser Ile Gly Glu Ser Ile Glu Val Ser Cys Thr Ala Ser
660 665 670

Gly Asn Pro Pro Pro Gln Ile Met Trp Phe Lys Asp Asn Glu Thr Leu
675 680 685

Val Glu Asp Ser Gly Ile Val Leu Lys Asp Gly Asn Arg Asn Leu Thr
690 695 700

Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu Asp Glu Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala
705 710 715 720

Cys Ser Val Leu Gly Cys Ala Lys Val Glu Ala Phe Phe Ile Ile Glu
725 730 735

Gly Ala Gln Glu Lys Thr Asn Leu Glu
740 745

<210> 3
<211> 217
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 3

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Asn Ala Trp Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

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

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

- <210> 4
- <211> 118
- <212> PRT
- <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 4

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

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Val Phe Gly Ala Ala Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Phe Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Met Val Thr Val Ser Ser
115

- <210> 5
- <211> 216
- <212> PRT
- <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 5

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asn Asp Val Gly Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ile Tyr Glu Val Ala Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

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

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His

180					185					190						
Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	Lys	
195					200					205						
Thr	Val	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser									
210					215											
<210> 6																
<211> 121																
<212> PRT																
<213> 智人 (Homo sapiens)																
<400> 6																
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Lys	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	
1	5				10					15						
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
20					25					30						
Ala	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
35					40					45						
Gly	Arg	Ile	Ile	Pro	Ile	Leu	Gly	Ile	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	
50					55					60						
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	
65					70					75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
85					90					95						
Ala	Arg	Val	Val	Pro	Gly	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Pro	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	

115					120					125						
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	
130					135					140						
Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
145					150					155					160	
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	
					165					170					175	
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	
					180					185					190	
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	
					195					200					205	
Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	
210					215					220						
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	
225					230					235					240	
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	
					245					250					255	
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	
					260					265					270	
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	
275					280					285						

108年5月20日無劃線替換頁

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Gly Gly
325

- <210> 8
- <211> 329
- <212> PRT
- <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- <220>
- <223> 工程化 IgG1 (eIgG1)之重鏈不變區
- <400> 8

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

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

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

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

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

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85								90								95							
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys								
100								105								110							
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro								
115								120								125							
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys								
130								135								140							
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp								
145								150								155							
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu								
165								170								175							
Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu								
180								185								190							
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Ala	Val	Ser	Asn								
195								200								205							
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly								
210								215								220							
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu								
225								230								235							
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr								
245								250								255							

108 年 5 月 20 日無劃線替換頁

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 9
<211> 205
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 9

Gly Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
1 5 10 15

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val
20 25 30

Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr
35 40 45

Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe
50 55 60

108 年 5 月 20 日無劃線替換頁

Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu
65 70 75 80

Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
85 90 95

Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile
100 105 110

Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr
115 120 125

Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys
130 135 140

His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly
145 150 155 160

Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr
165 170 175

Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met
180 185 190

Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys
195 200 205

- <210> 10
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

- <220>
- <223> 多肽連接子 (peptide linker)

<400> 10

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 11
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<223> 信號胜肽 (signal peptide)

<400> 11

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly
20

<210> 12
<211> 666
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<223> 抗 PD-L1 殖株 6 重鏈-VID/IgG4 雙特異性抗體

<400> 12

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

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Val Phe Gly Ala Ala Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Phe Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	
210						215					220					
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	
225					230				235						240	
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	
			245					250						255		
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	
		260					265					270				
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	
	275					280						285				
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	
290					295					300						
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	
305				310					315						320	
Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	
			325					330						335		
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	
		340						345					350			
Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	
	355					360					365					
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	
370					375					380						

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

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

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

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp Thr
450 455 460

Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His
465 470 475 480

Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro
485 490 495

Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro
500 505 510

Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser
515 520 525

Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val
530 535 540

Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn

545					550					555					560
Thr	Ile	Ile	Asp	Val	Val	Leu	Ser	Pro	Ser	His	Gly	Ile	Glu	Leu	Ser
				565					570					575	
Val	Gly	Glu	Lys	Leu	Val	Leu	Asn	Cys	Thr	Ala	Arg	Thr	Glu	Leu	Asn
			580					585					590		
Val	Gly	Ile	Asp	Phe	Asn	Trp	Glu	Tyr	Pro	Ser	Ser	Lys	His	Gln	His
		595					600					605			
Lys	Lys	Leu	Val	Asn	Arg	Asp	Leu	Lys	Thr	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Met
	610					615					620				
Lys	Lys	Phe	Leu	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Arg	Ser	Asp
625					630					635					640
Gln	Gly	Leu	Tyr	Thr	Cys	Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Met	Thr	Lys	Lys
				645					650					655	
Asn	Ser	Thr	Phe	Val	Arg	Val	His	Glu	Lys						
			660					665							
<210> 13															
<211> 669															
<212> PRT															
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)															
<220>															
<223> 抗 PD-L1 殖株 6 重鏈-VID/eIgG1 雙特異性抗體															
<400> 13															
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Val Phe Gly Ala Ala Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Phe Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

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

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

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
450 455 460

Gly Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
465 470 475 480

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val
485 490 495

Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr
500 505 510

Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe
515 520 525

Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu
530 535 540

Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
545 550 555 560

Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile
565 570 575

Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr
580 585 590

Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys
595 600 605

His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly
610 615 620

Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr
625 630 635 640

Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met
645 650 655

Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys
660 665

- <210> 14
- <211> 49
- <212> PRT
- <213> 智人 (Homo sapiens)

- <400> 14

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 16

Ile	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Thr	Pro	Arg	Pro	Val	Lys	Leu	Leu	Arg	Gly
1				5					10					15	

His	Thr	Leu	Val	Leu	Asn	Cys	Thr	Ala	Thr	Thr	Pro	Leu	Asn	Thr	Arg
			20					25					30		

Val	Gln	Met	Thr	Trp	Ser	Tyr	Pro	Asp	Glu	Lys	Asn	Lys	Arg	Ala	Ser
		35					40					45			

Val	Arg	Arg	Arg	Ile	Asp	Gln	Ser	Asn	Ser	His	Ala	Asn	Ile	Phe	Tyr
	50					55					60				

Ser	Val	Leu	Thr	Ile	Asp	Lys	Met	Gln	Asn	Lys	Asp	Lys	Gly	Leu	Tyr
65					70					75				80	

Thr	Cys	Arg	Val	Arg	Ser	Gly	Pro	Ser	Phe	Lys	Ser	Val	Asn	Thr	Ser
				85					90					95	

Val His

<210> 17

<211> 87

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 17

Thr	Val	Lys	His	Arg	Lys	Gln	Gln	Val	Leu	Glu	Thr	Val	Ala	Gly	Lys
1				5					10					15	

108 年 5 月 20 日無劃線替換頁

Arg Ser Tyr Arg Leu Ser Met Lys Val Lys Ala Phe Pro Ser Pro Glu
20 25 30

Val Val Trp Leu Lys Asp Gly Leu Pro Ala Thr Glu Lys Ser Ala Arg
35 40 45

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

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

Phe Lys Asn Leu Thr Ala Thr
85

<210> 18
<211> 126
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 18

Pro Gln Ile Tyr Glu Lys Ala Val Ser Ser Phe Pro Asp Pro Ala Leu
1 5 10 15

Tyr Pro Leu Gly Ser Arg Gln Ile Leu Thr Cys Thr Ala Tyr Gly Ile
20 25 30

Pro Gln Pro Thr Ile Lys Trp Phe Trp His Pro Cys Asn His Asn His
35 40 45

Ser Glu Ala Arg Cys Asp Phe Cys Ser Asn Asn Glu Glu Ser Phe Ile
50 55 60

108 年 5 月 20 日無劃線替換頁

Leu Asp Ala Asp Ser Asn Met Gly Asn Arg Ile Glu Ser Ile Thr Gln
65 70 75 80

Arg Met Ala Ile Ile Glu Gly Lys Asn Lys Met Ala Ser Thr Leu Val
85 90 95

Val Ala Asp Ser Arg Ile Ser Gly Ile Tyr Ile Cys Ile Ala Ser Asn
100 105 110

Lys Val Gly Thr Val Gly Arg Asn Ile Ser Phe Tyr Ile Thr
115 120 125

<210> 19
<211> 94
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 19

Pro Asn Gly Phe His Val Asn Leu Glu Lys Met Pro Thr Glu Gly Glu
1 5 10 15

Asp Leu Lys Leu Ser Cys Thr Val Asn Lys Phe Leu Tyr Arg Asp Val
20 25 30

Thr Trp Ile Leu Leu Arg Thr Val Asn Asn Arg Thr Met His Tyr Ser
35 40 45

Ile Ser Lys Gln Lys Met Ala Ile Thr Lys Glu His Ser Ile Thr Leu
50 55 60

Asn Leu Thr Ile Met Asn Val Ser Leu Gln Asp Ser Gly Thr Tyr Ala
65 70 75 80

108年5月20日無劃線替換頁

Cys Arg Ala Arg Asn Val Tyr Thr Gly Glu Glu Ile Leu Gln
85 90

<210> 20
<211> 87
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 20

Pro Tyr Leu Leu Arg Asn Leu Ser Asp His Thr Val Ala Ile Ser Ser
1 5 10 15

Ser Thr Thr Leu Asp Cys His Ala Asn Gly Val Pro Glu Pro Gln Ile
20 25 30

Thr Trp Phe Lys Asn Asn His Lys Ile Gln Gln Glu Pro Gly Ile Ile
35 40 45

Leu Gly Pro Gly Ser Ser Thr Leu Phe Ile Glu Arg Val Thr Glu Glu
50 55 60

Asp Glu Gly Val Tyr His Cys Lys Ala Thr Asn Gln Lys Gly Ser Val
65 70 75 80

Glu Ser Ser Ala Tyr Leu Thr
85

<210> 21
<211> 65
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 21

Asn Thr Thr Leu Gln Ile Thr Cys Arg Gly Gln Arg Asp Leu Asp Trp

1				5					10					15			
Leu	Trp	Pro	Asn	Asn	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Gln	Arg	Val	Glu	Val	Thr		
			20					25					30				
Glu	Cys	Ser	Asp	Gly	Leu	Phe	Cys	Lys	Thr	Leu	Thr	Ile	Pro	Lys	Val		
		35					40					45					
Ile	Gly	Asn	Asp	Thr	Gly	Ala	Tyr	Lys	Cys	Phe	Tyr	Arg	Glu	Thr	Asp		
	50					55					60						
Leu																	
65																	
<210>	22																
<211>	67																
<212>	PRT																
<213>	智人 (Homo sapiens)																
<400>	22																
Asn	Lys	Asn	Lys	Thr	Val	Val	Ile	Pro	Cys	Leu	Gly	Ser	Ile	Ser	Asn		
1				5				10					15				
Leu	Asn	Val	Ser	Leu	Cys	Ala	Arg	Tyr	Pro	Glu	Lys	Arg	Phe	Val	Pro		
			20					25					30				
Asp	Gly	Asn	Arg	Ile	Ser	Trp	Asp	Ser	Lys	Lys	Gly	Phe	Thr	Ile	Pro		
		35					40					45					
Ser	Tyr	Met	Ile	Ser	Tyr	Ala	Gly	Met	Val	Phe	Cys	Glu	Ala	Lys	Ile		
	50					55					60						
Asn	Asp	Glu															

65

<210> 23
<211> 97
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 23

Tyr Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly
 20 25 30

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

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

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

Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser
 85 90 95

Thr

<210> 24
<211> 86
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 24

Phe Val Ala Phe Gly Ser Gly Met Glu Ser Leu Val Glu Ala Thr Val
1 5 10 15

Gly Glu Arg Val Arg Ile Pro Ala Lys Tyr Leu Gly Tyr Pro Pro Pro
20 25 30

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

Ile Lys Ala Gly His Val Leu Thr Ile Met Glu Val Ser Glu Arg Asp
50 55 60

Thr Gly Asn Tyr Thr Val Ile Leu Thr Asn Pro Ile Ser Lys Glu Lys
65 70 75 80

Gln Ser His Val Val Ser
85

- <210> 25
- <211> 128
- <212> PRT
- <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 25

Pro Gln Ile Gly Glu Lys Ser Leu Ile Ser Pro Val Asp Ser Tyr Gln
1 5 10 15

Tyr Gly Thr Thr Gln Thr Leu Thr Cys Thr Val Tyr Ala Ile Pro Pro
20 25 30

Pro His His Ile His Trp Tyr Trp Gln Leu Glu Glu Glu Cys Ala Asn
35 40 45

Glu Pro Ser Gln Ala Val Ser Val Thr Asn Pro Tyr Pro Cys Glu Glu
50 55 60

Trp Arg Ser Val Glu Asp Phe Gln Gly Gly Asn Lys Ile Glu Val Asn
65 70 75 80

Lys Asn Gln Phe Ala Leu Ile Glu Gly Lys Asn Lys Thr Val Ser Thr
85 90 95

Leu Val Ile Gln Ala Ala Asn Val Ser Ala Leu Tyr Lys Cys Glu Ala
100 105 110

Val Asn Lys Val Gly Arg Gly Glu Arg Val Ile Ser Phe His Val Thr
115 120 125

<210> 26
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 26

Pro Glu Ile Thr Leu Gln Pro Asp Met Gln Pro Thr Glu Gln Glu Ser
1 5 10 15

Val Ser Leu Trp Cys Thr Ala Asp Arg Ser Thr Phe Glu Asn Leu Thr
20 25 30

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

Pro Thr Pro Val Cys Lys Asn Leu Asp Thr Leu Trp Lys Leu Asn Ala
50 55 60

Thr Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile Leu Ile Met Glu Leu Lys
65 70 75 80

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

Arg Lys Thr Lys Lys Arg His Cys Val Val Arg Gln Leu Thr
100 105 110

<210> 27
<211> 87
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 27

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

Ser Ile Glu Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Asn Pro Pro Pro Gln Ile
20 25 30

Met Trp Phe Lys Asp Asn Glu Thr Leu Val Glu Asp Ser Gly Ile Val
35 40 45

Leu Lys Asp Gly Asn Arg Asn Leu Thr Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu
50 55 60

Asp Glu Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Cys Ser Val Leu Gly Cys Ala
65 70 75 80

Lys Val Glu Ala Phe Phe Ile
85

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種雙特異性抗體或其抗原結合部分，包含至少一多肽鏈，其中該多肽鏈包含：

一結合區，結合細胞表面蛋白，其中該結合區結合 PD-L1，且該結合區包含：

一重鏈可變區，包含一胺基酸序列，該胺基酸序列與選自於由 SEQ ID NO.4 與 SEQ ID NO.6 所組成之群組的胺基酸序列具有至少約 80% 的序列同源性；以及

一輕鏈可變區，包含一胺基酸序列，該胺基酸序列與選自於由 SEQ ID NO.3 的第 1-111 個位置胺基酸與 SEQ ID NO.5 的第 1-110 個位置胺基酸所組成之群組的胺基酸序列具有至少約 80% 的序列同源性；以及

一血管內皮生長因子抑制區，包含一胺基酸序列，該胺基酸序列與選自於由 SEQ ID NOs. 1、2、9、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、及其組合所組成之群組的胺基酸序列具有至少約 80% 的序列同源性。

【第2項】 如請求項 1 所述之雙特異性抗體或其抗原結合部分，其中該多肽鏈更包含：

一 Fc 區；以及

一 Fab 片段，與該 Fc 區的 N 端連接，且該 Fab 片段包含該結合區，

其中該血管內皮生長因子抑制區與該 Fc 區的 C 端連接。

【第3項】 如請求項 2 所述之雙特異性抗體或其抗原結合部分，更包含一連接子位於該 Fc 區與該血管內皮生長因子抑制區之間。

【第4項】 如請求項 3 所述之雙特異性抗體或其抗原結合部分，其中該雙特異性抗體包含如 SEQ ID NO.12 或 SEQ ID NO.13 所示之胺基酸序列。

【第5項】 如請求項 1 所述之雙特異性抗體或其抗原結合部分，其中該雙特異性抗體或其抗原結合部分包含一對多肽鏈。

【第6項】 如請求項 5 所述之雙特異性抗體或其抗原結合部分，其中該雙特異性抗體為 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、或 IgY 抗體。

【第7項】 如請求項 6 所述之雙特異性抗體或其抗原結合部分，其中該雙特異性抗體為 IgG 抗體。

【第8項】 如請求項 7 所述之雙特異性抗體或其抗原結合部分，其中該 IgG 抗體為 IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4 抗體。

【第9項】 如請求項 8 所述之雙特異性抗體或其抗原結合部分，其中該 IgG1 抗體是抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity，

ADCC)減低的 IgG1 抗體。

【第10項】 如請求項 1 所述之雙特異性抗體或其抗原結合部分，其中該雙特異性抗體是人類抗體。

【第11項】 一種醫藥組成物，包含：
一如請求項 1 所述之雙特異性抗體或其抗原結合部分，
以及至少一藥學上可接受的載劑。

【第12項】 一種抗體藥物複合體，包含：
一治療試劑；以及
一如請求項 1 所述之雙特異性抗體或一抗原結合片段，
其中治療試劑藉由一連接子與該雙特異性抗體或該抗原結合片段共價接合。

【第13項】 一種如請求項 1 所述之雙特異性抗體或其抗原結合部分的用途，其係用於製備治療癌症的藥物。

【第14項】 如請求項 13 所述之用途，其中該癌症係選自於由前列腺癌、肺癌、黑色素瘤、淋巴瘤、乳癌、頭頸癌、腎細胞癌和卵巢癌所組成之群組。

【第15項】 如請求項 14 所述之用途，其中該肺癌包含非小細胞肺癌。

【第16項】 如請求項 13 所述之用途，其中該治療癌症的有效劑量為 0.001 $\mu\text{g/kg}$ 至 250 mg/kg 。

【第17項】 一種核酸分子，其編碼如請求項 1 所述之該雙特異性抗體或其抗原結合部分。

【第18項】 一種評估一個體罹患癌症之風險的方法，包含：

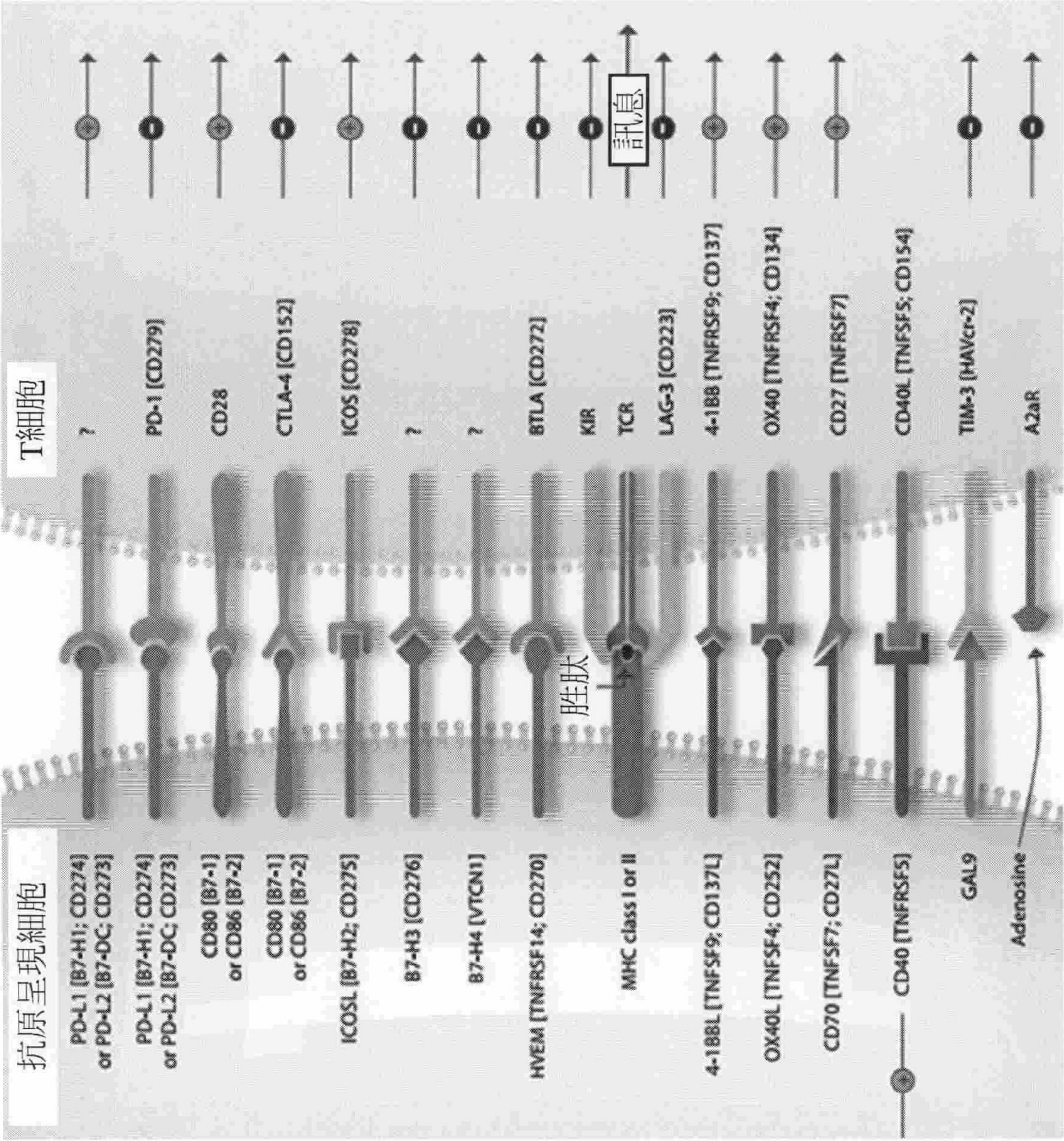
(a)提供一體液樣本或一細胞樣本；

(b)以可檢測一組癌症標誌之表現的一種如請求項 1 所述之雙特異性抗體或其抗原結合部分接觸該體液樣本或該細胞樣本，該組癌症標誌係選自於由 PD-L1 與血管內皮生長因子所組成之群組；

(c)試驗該雙特異性抗體或其抗原結合部分與該體液樣品或該細胞樣品的結合能力；以及

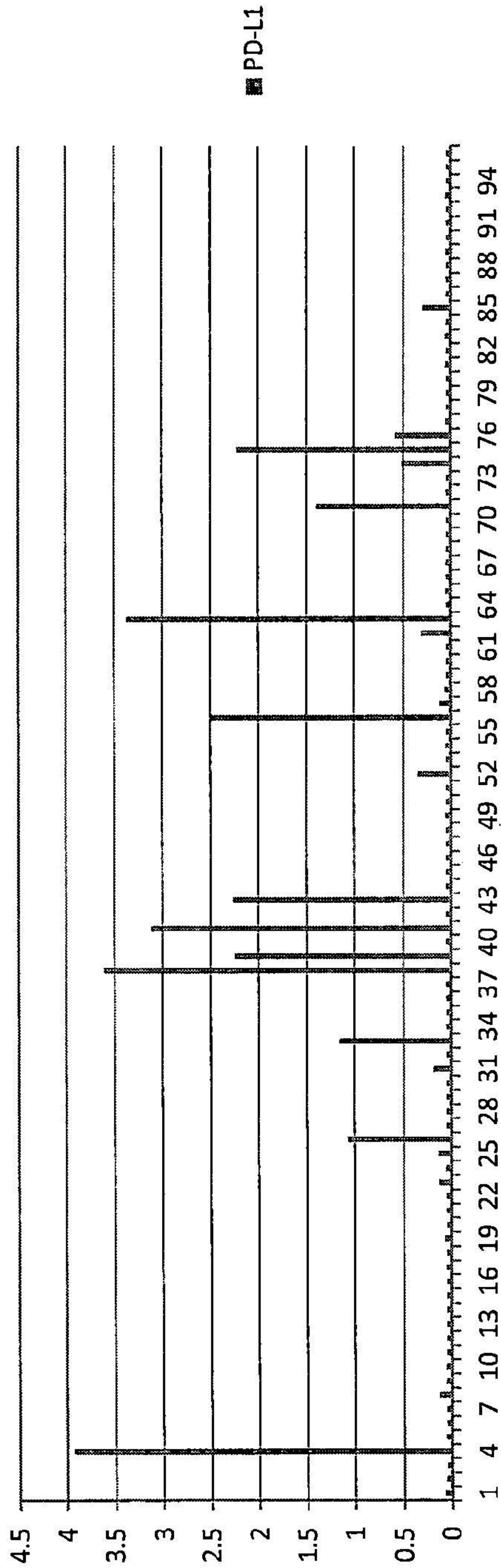
(d)於一試驗中評估該個體之癌症狀態，其係藉由測定及比較與正常控制組之抗體結合程度，以確定該個體是否具有罹患癌症之風險。

圖式



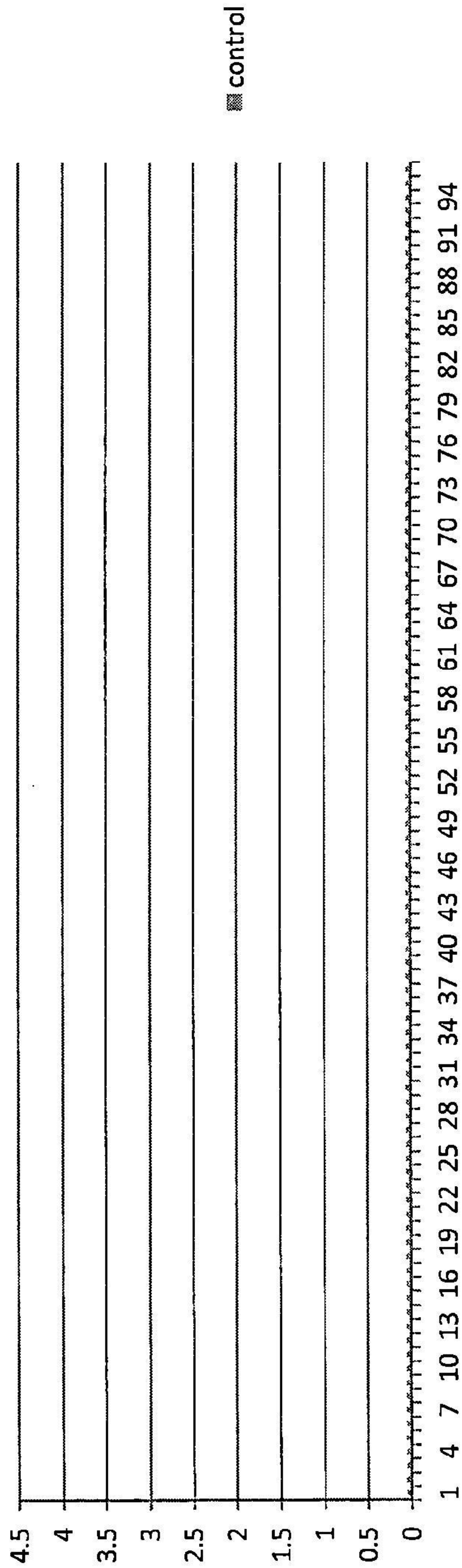
第 1 圖

PD-L1

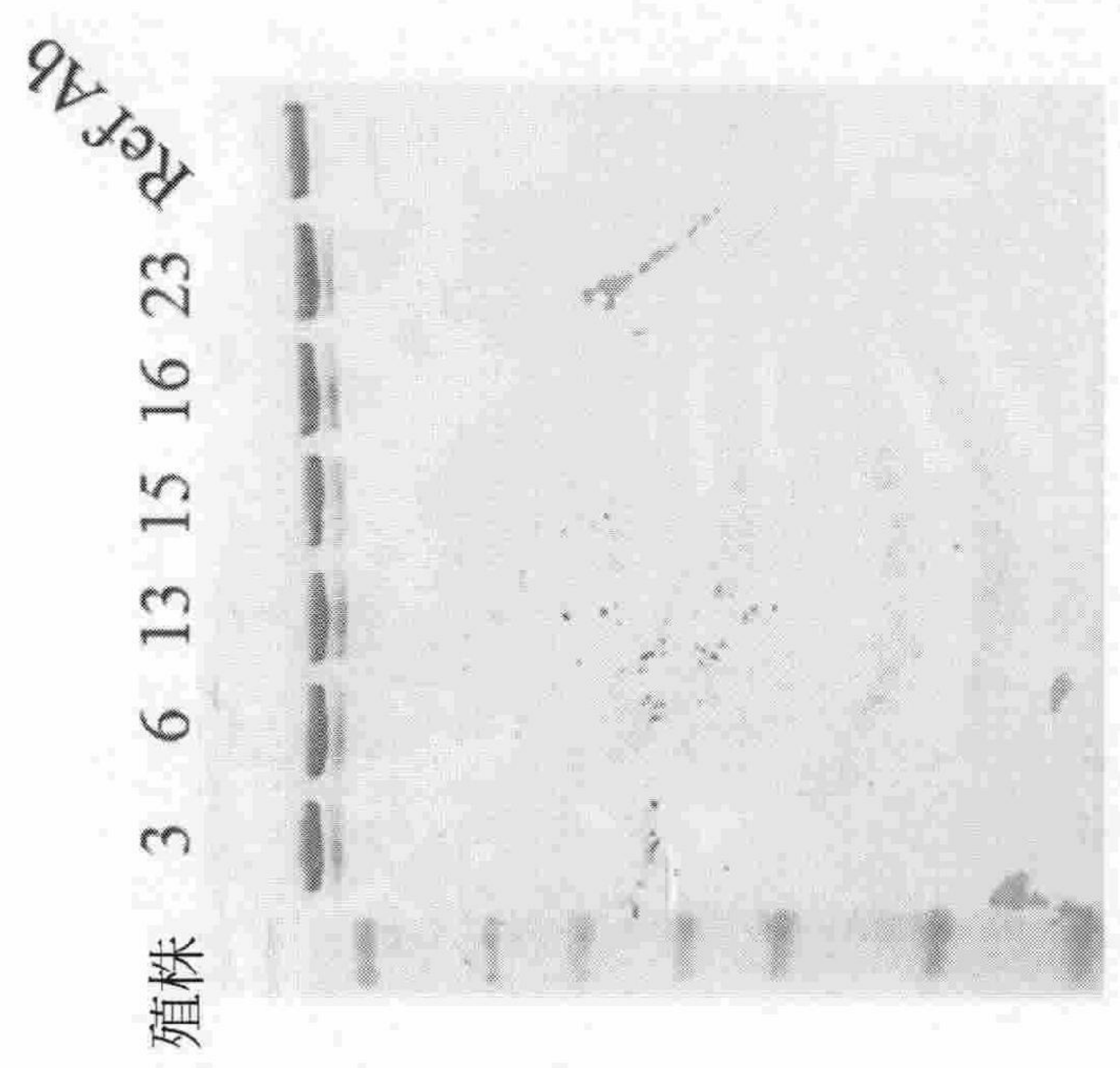


第2A圖

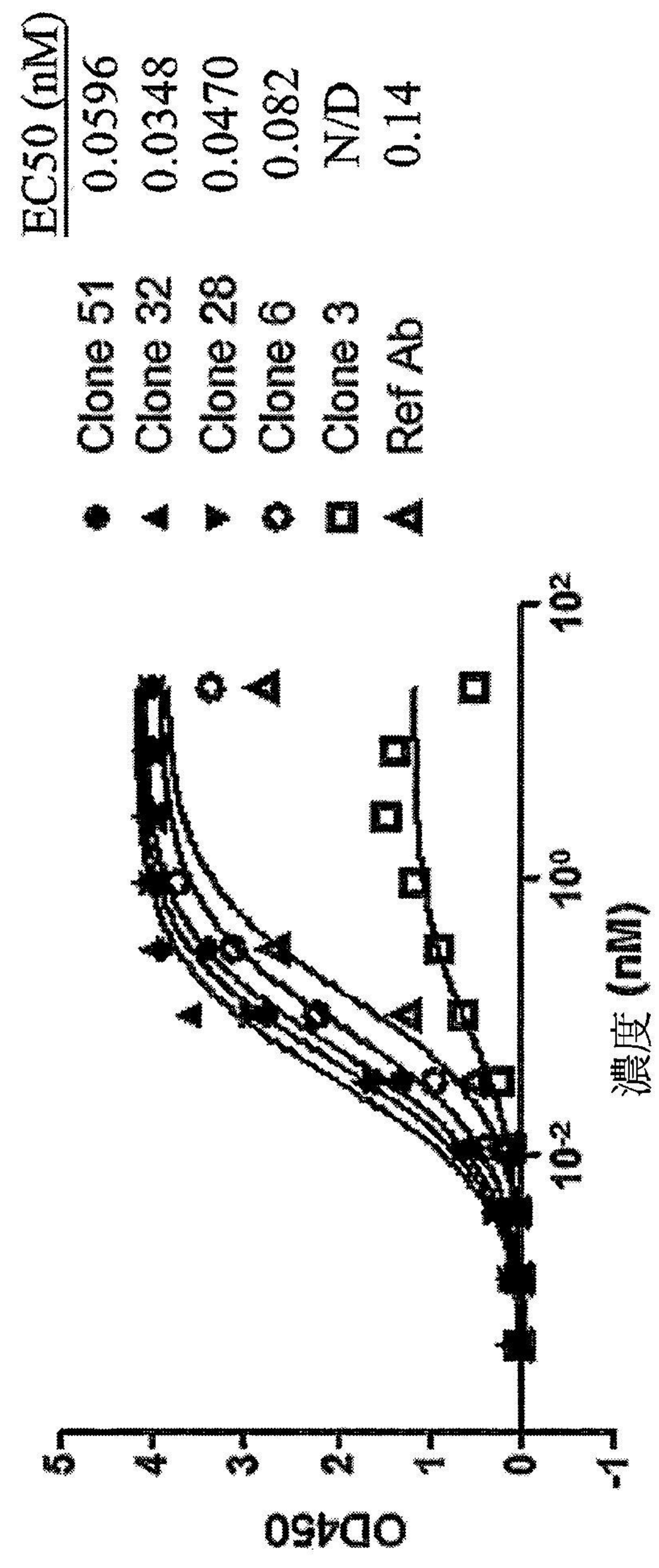
陰性對照組



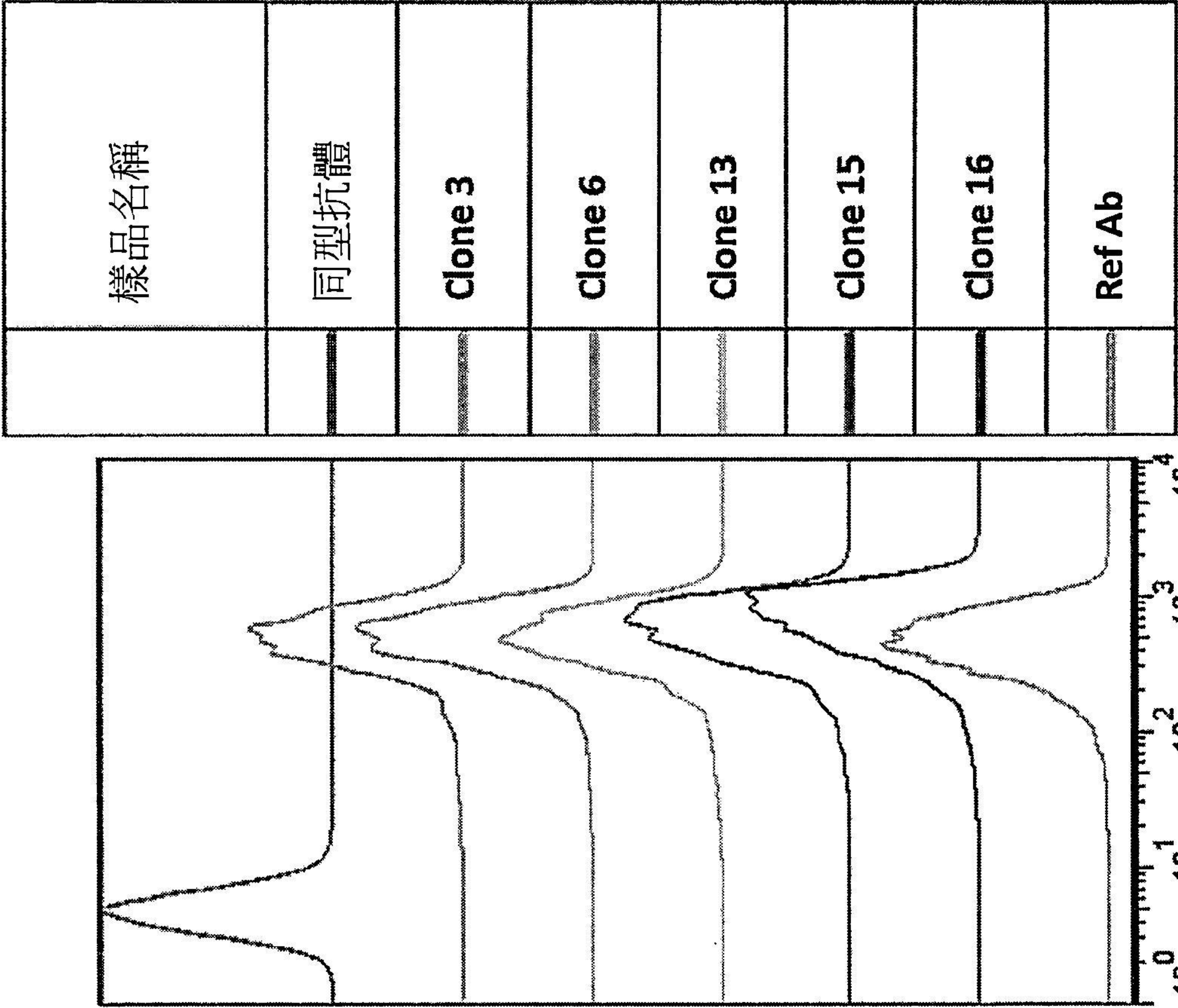
第2B圖



第3圖

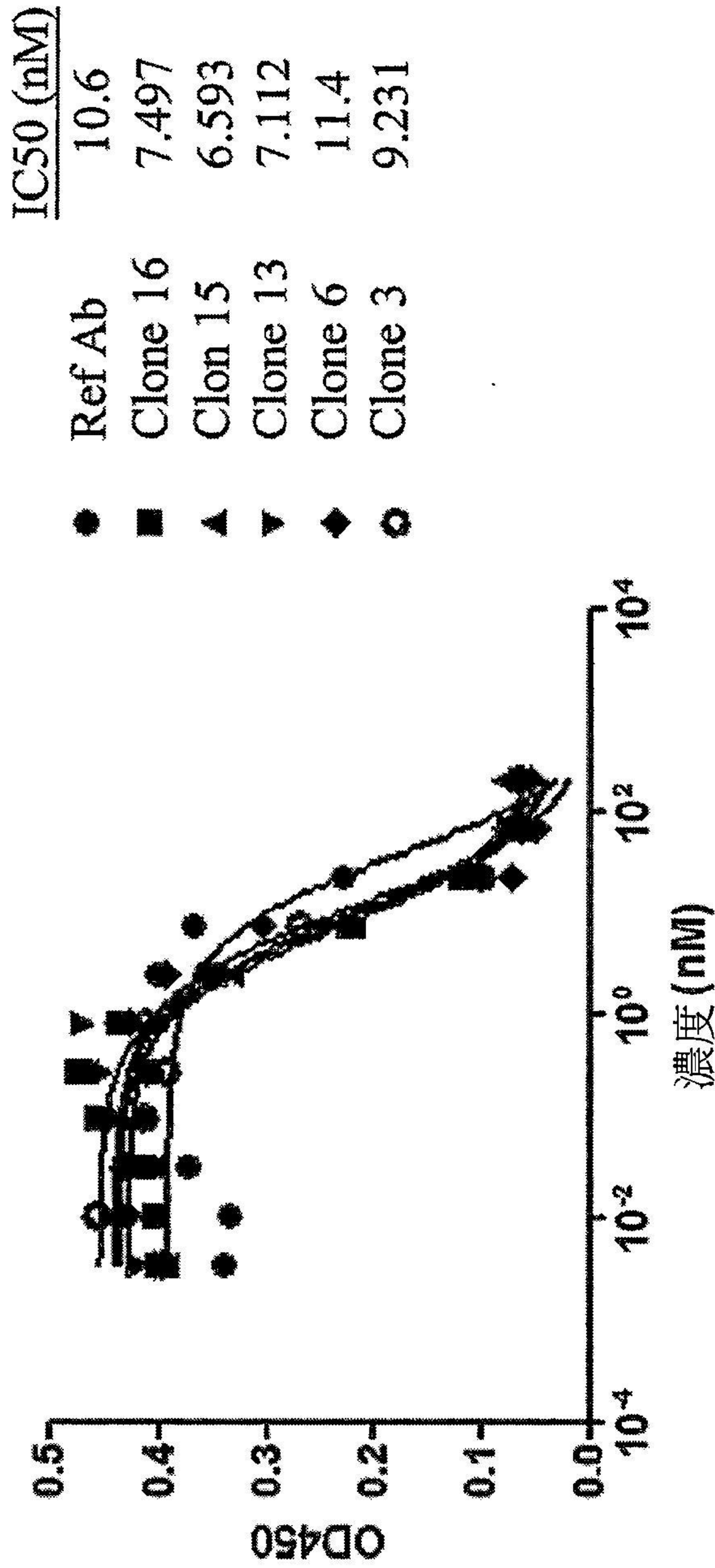


第 4 圖



FL1-H

第 5 圖

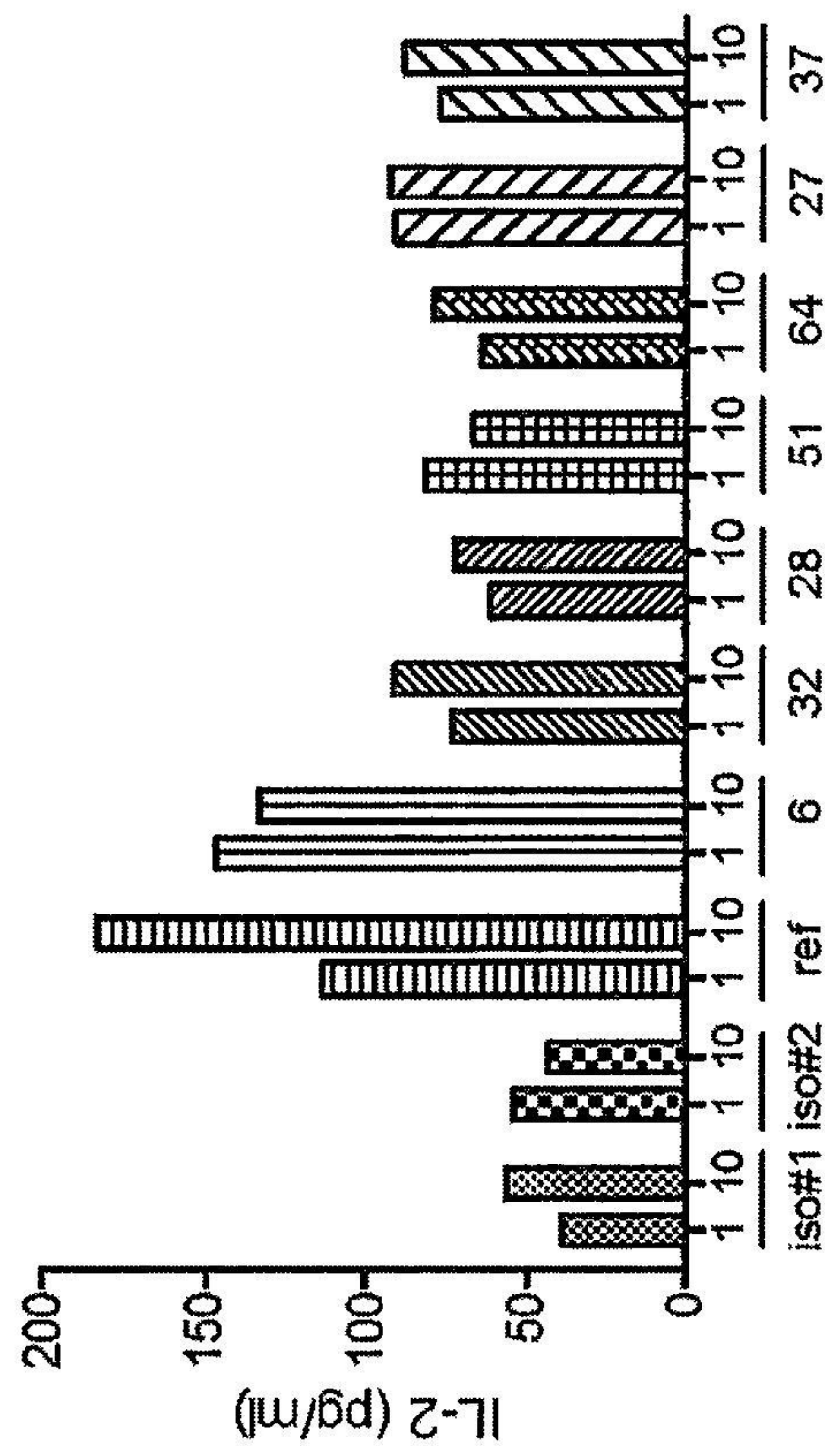


第6圖

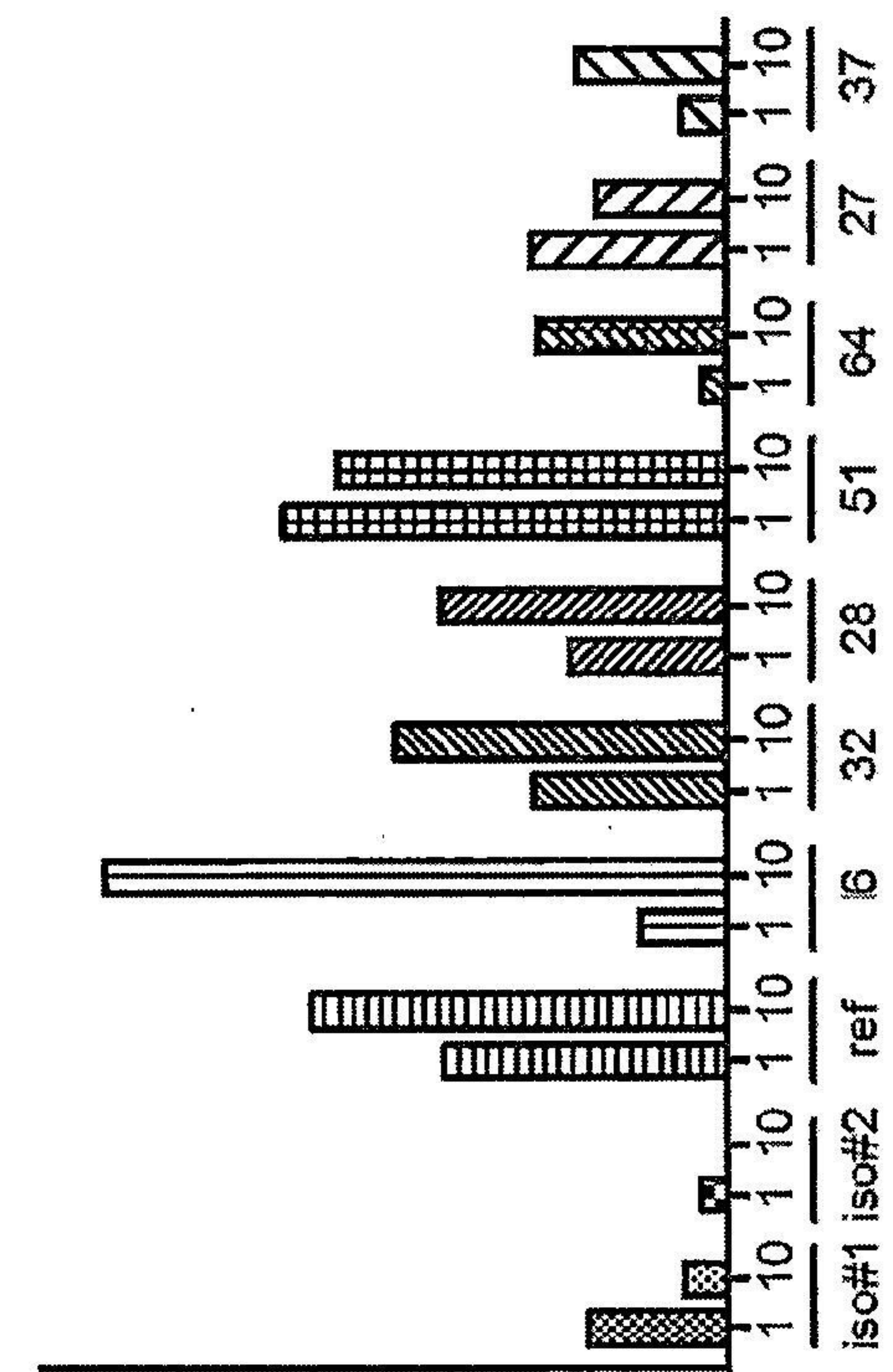
第3天



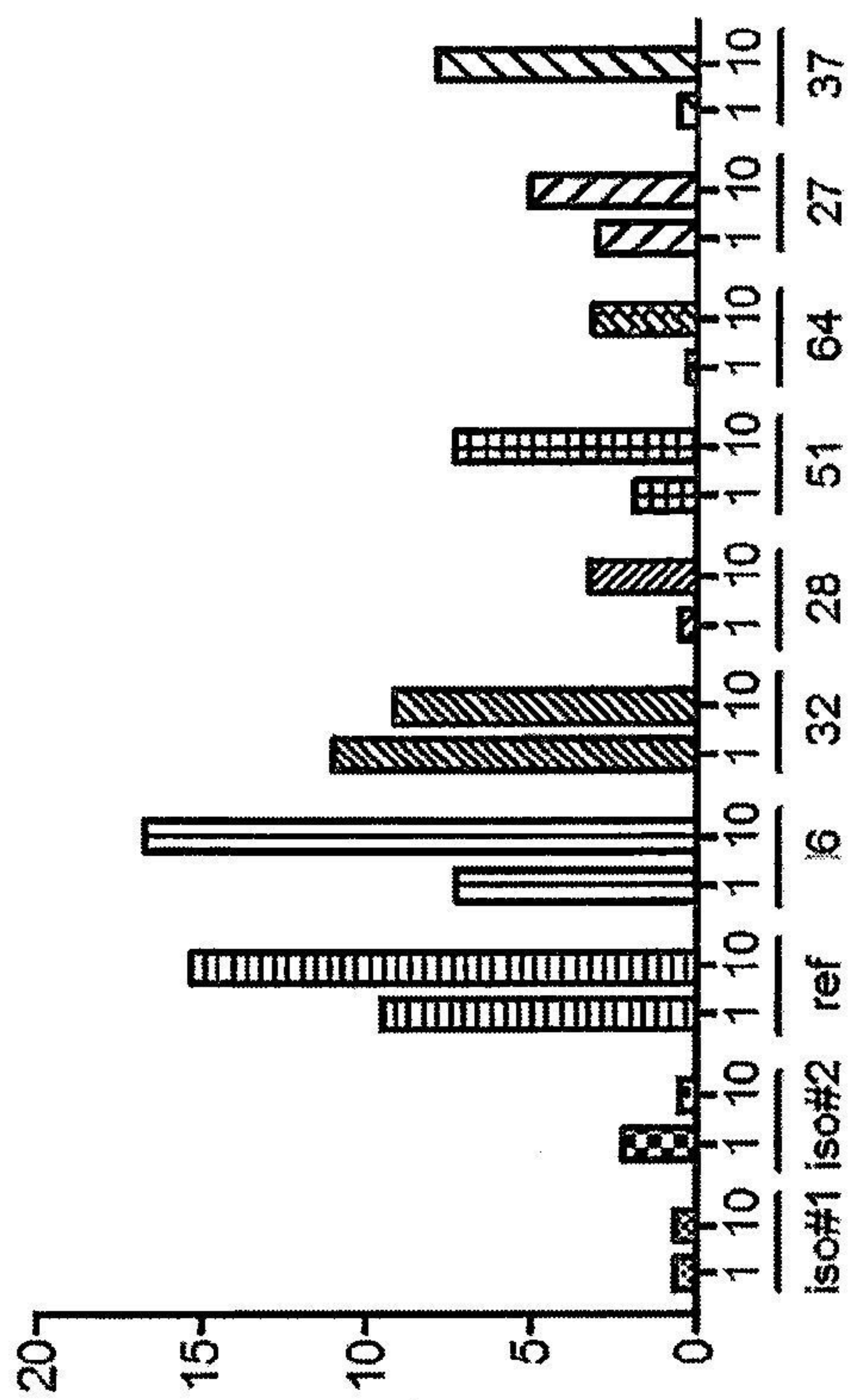
第5天



IFN- γ (ng/ml)

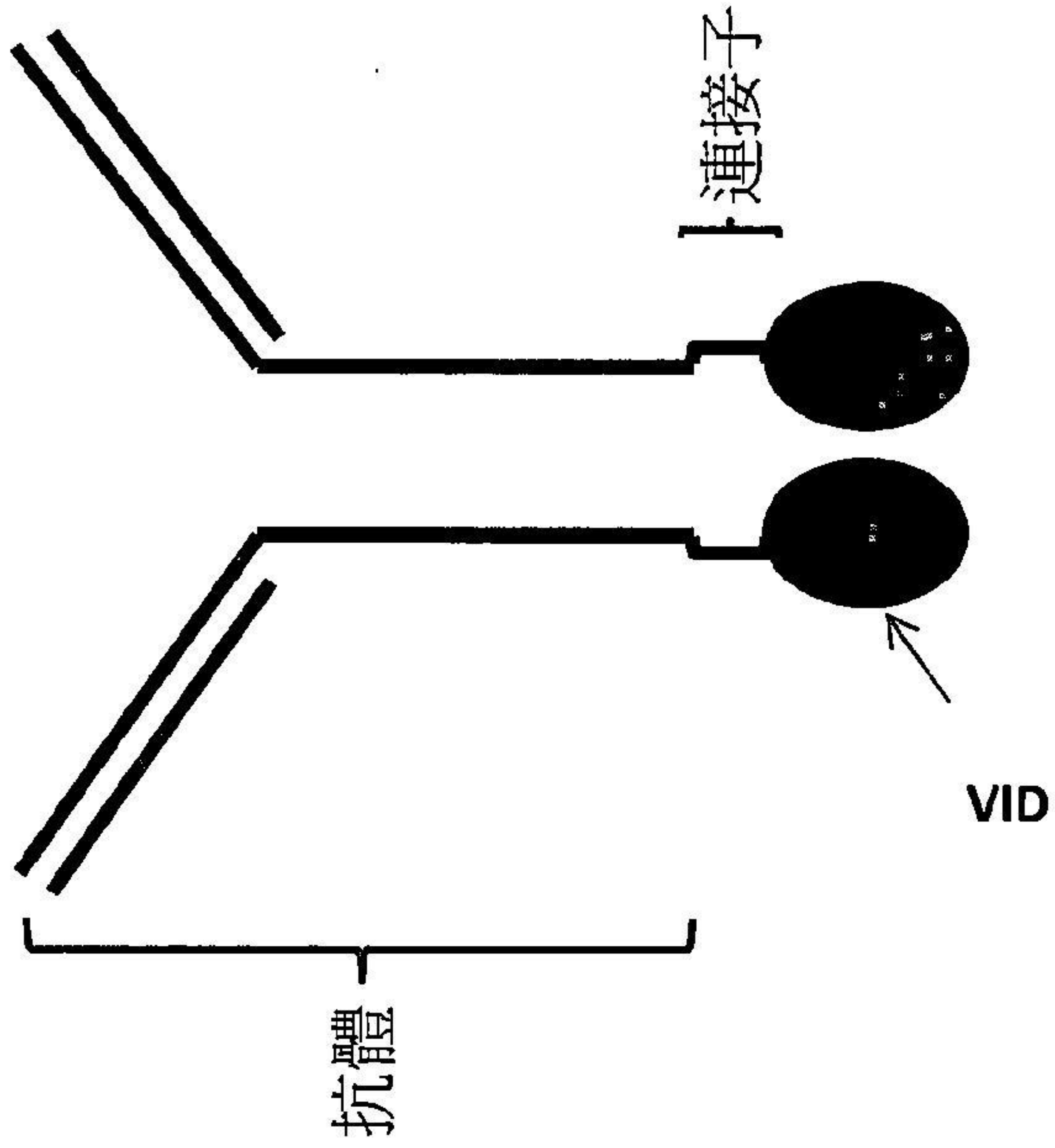


IFN- γ (ng/ml)

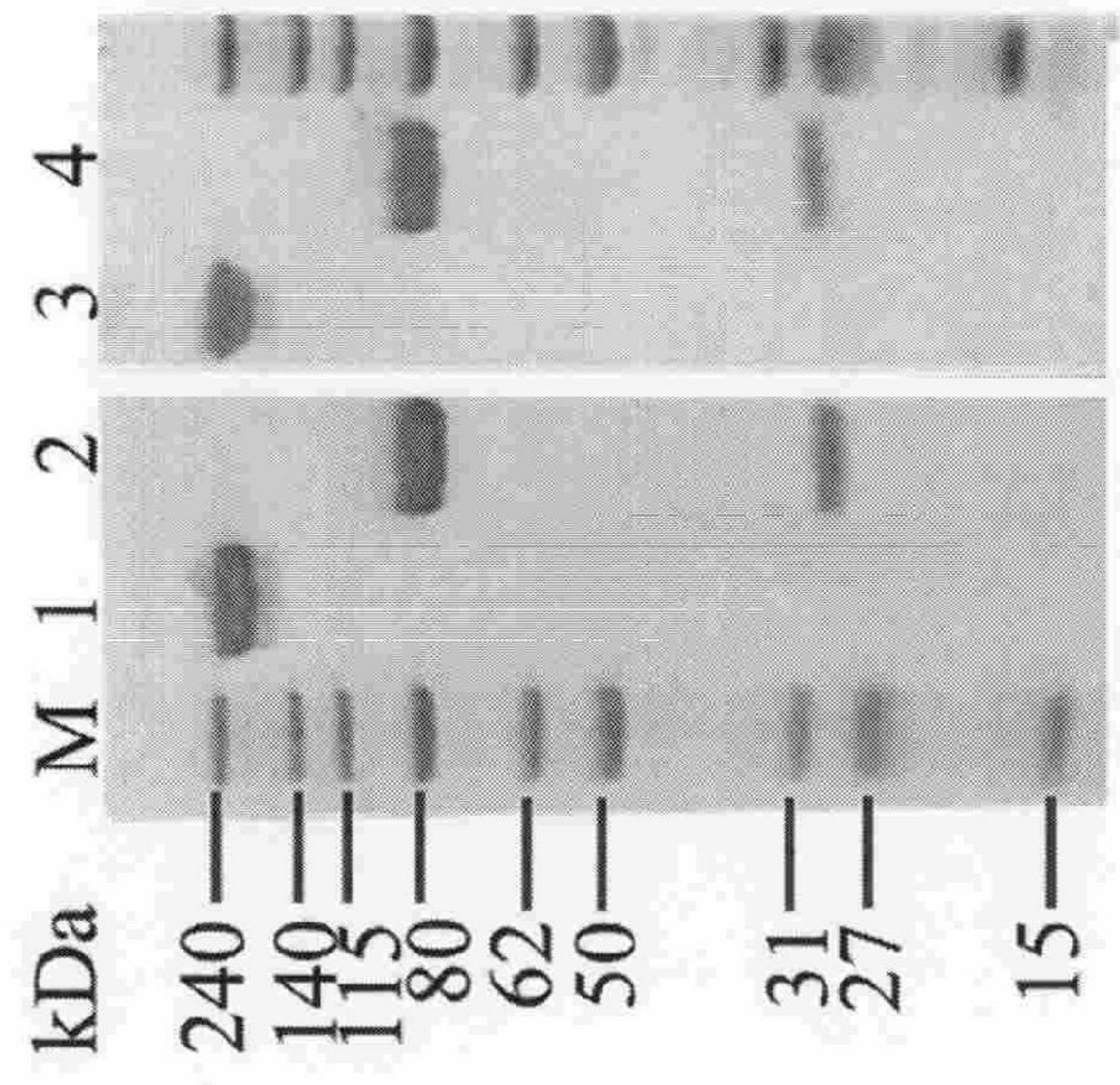


第7A圖

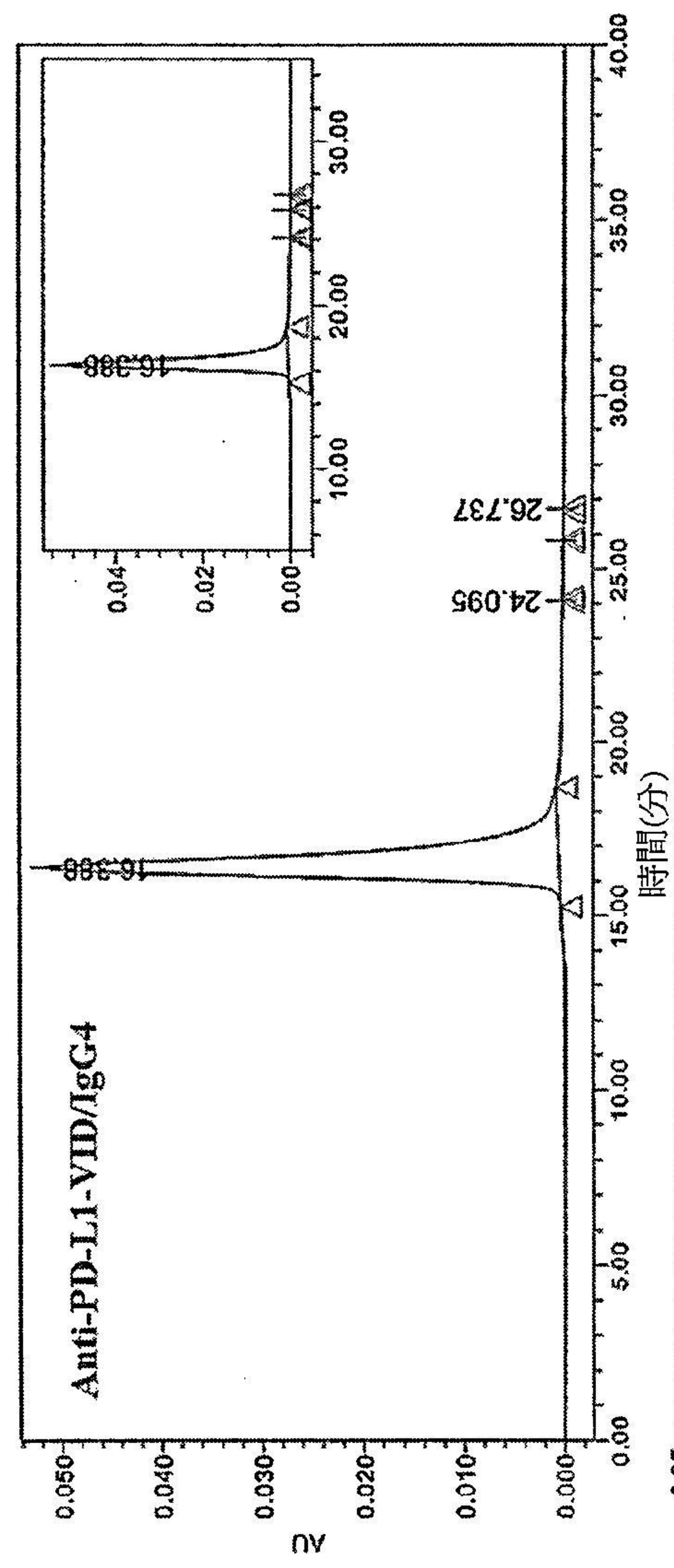
第7B圖



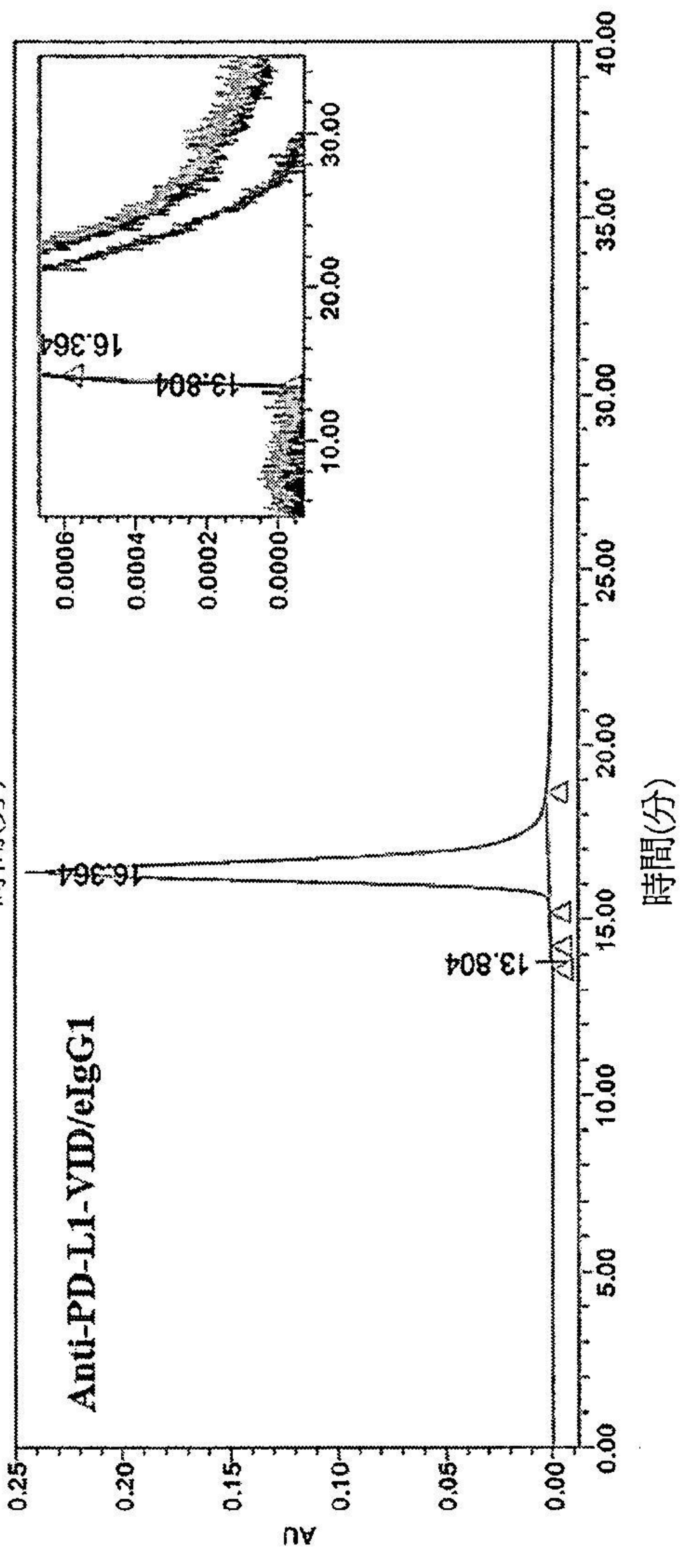
第8圖



第9圖



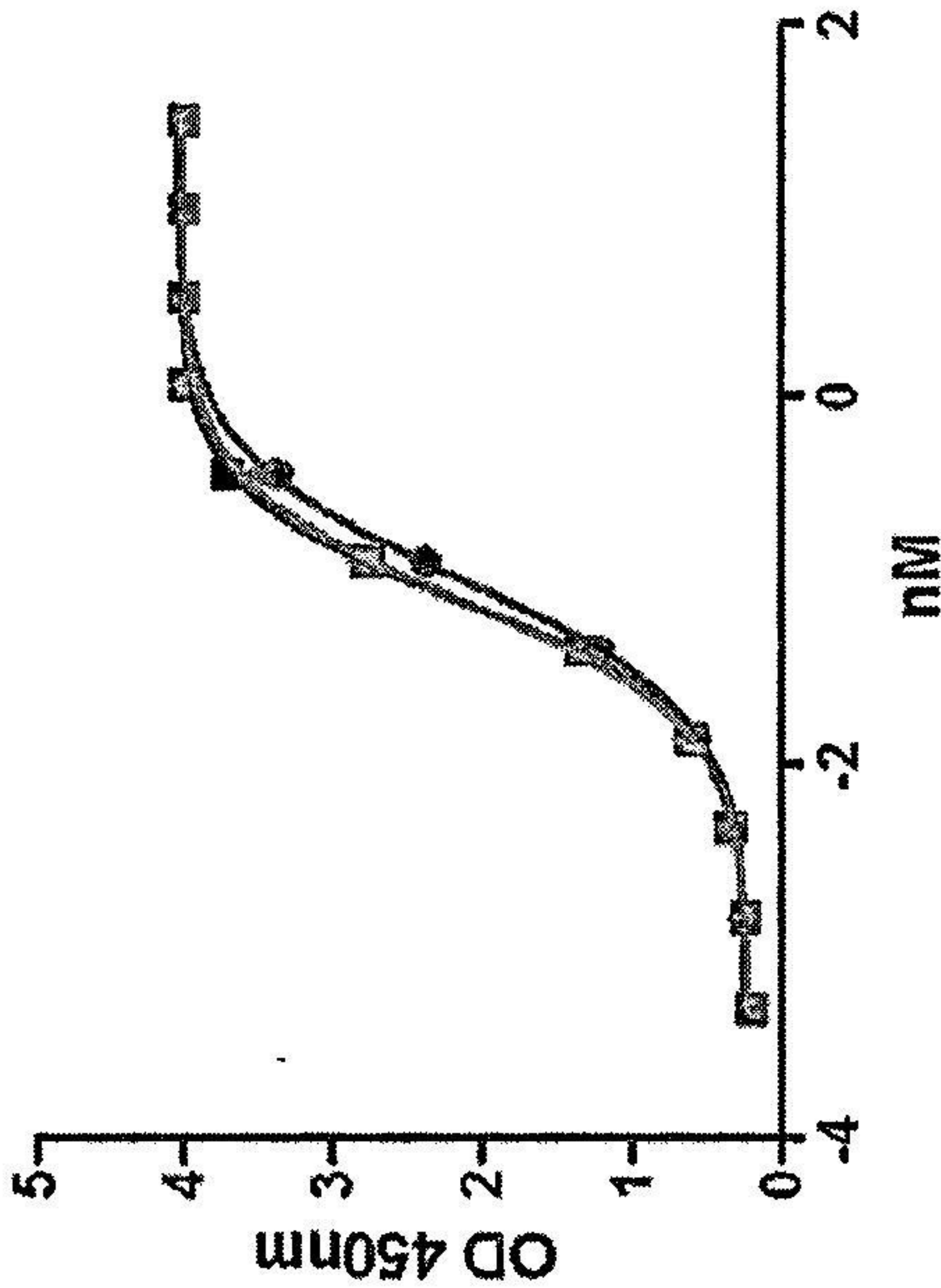
第 10A 圖



第 10B 圖

EC50 (nM)

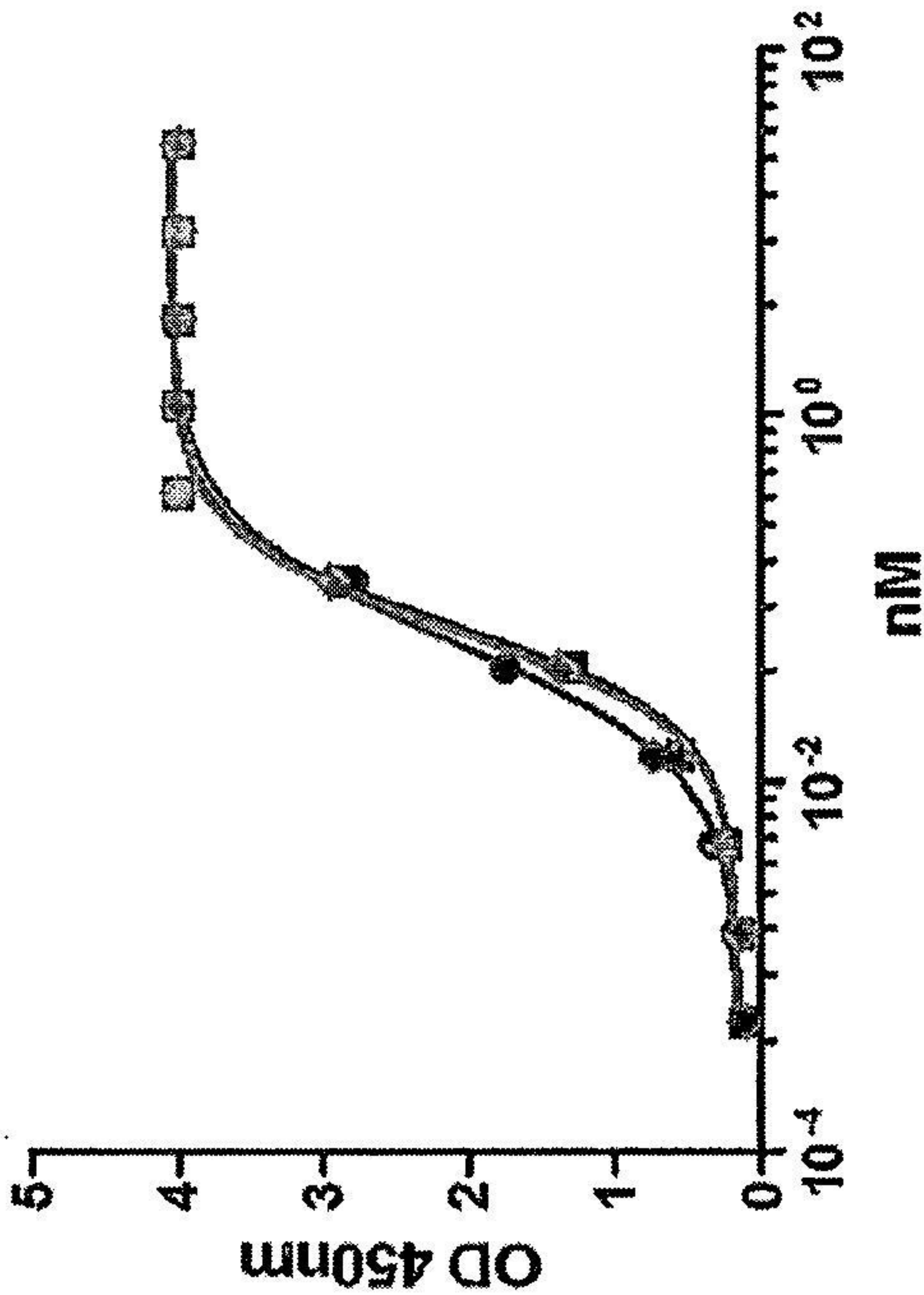
●	Anti-PD-L1 Clone 6 Abs	0.1
■	Anti-PD-L1-VID/elgG1	0.075
▲	Anti-PD-L1-VID/igG4	0.075



第 11A 圖

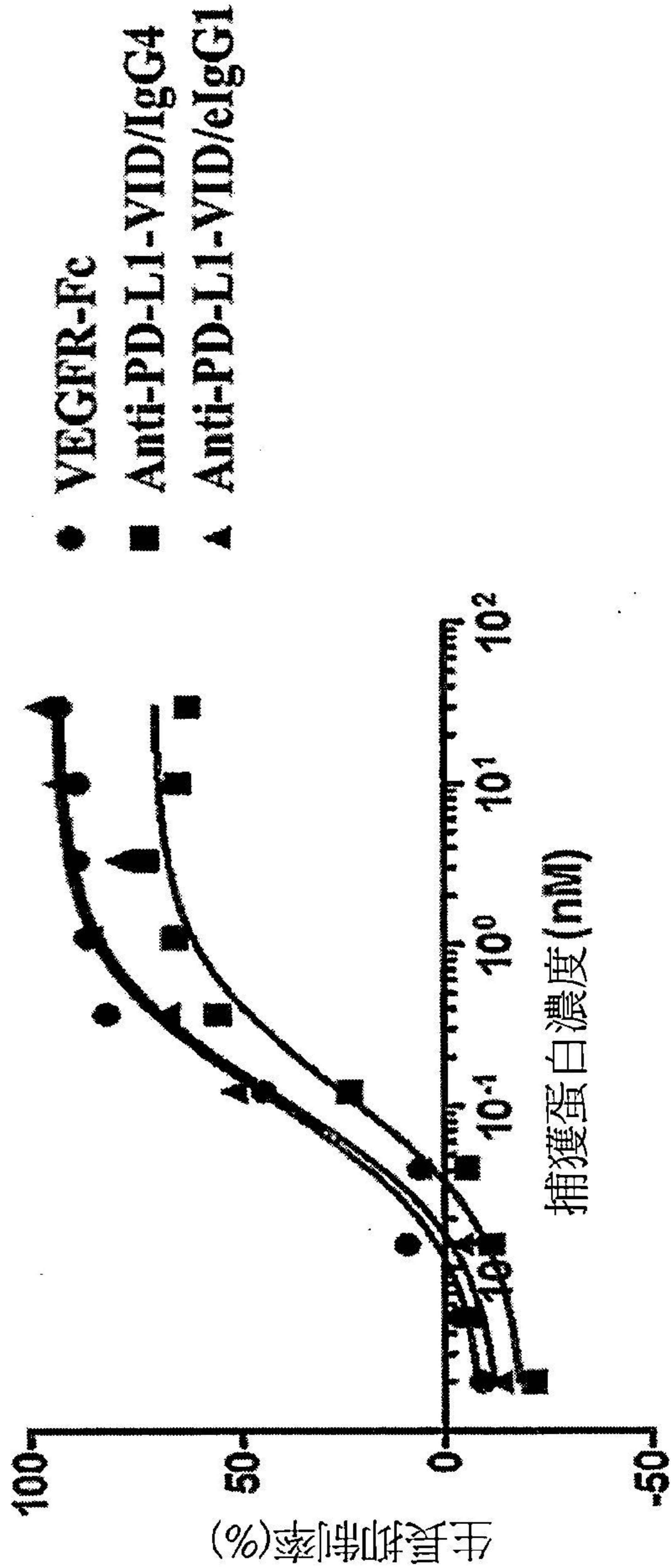
EC50 (nM)

○	VEGFR-Fc	0.057
■	Anti-PD-L1-VID/elgG1	0.071
◇	Anti-PD-L1-VID/igG4	0.066



第 11B 圖

HUVEC增生分析



第12圖

人類血清

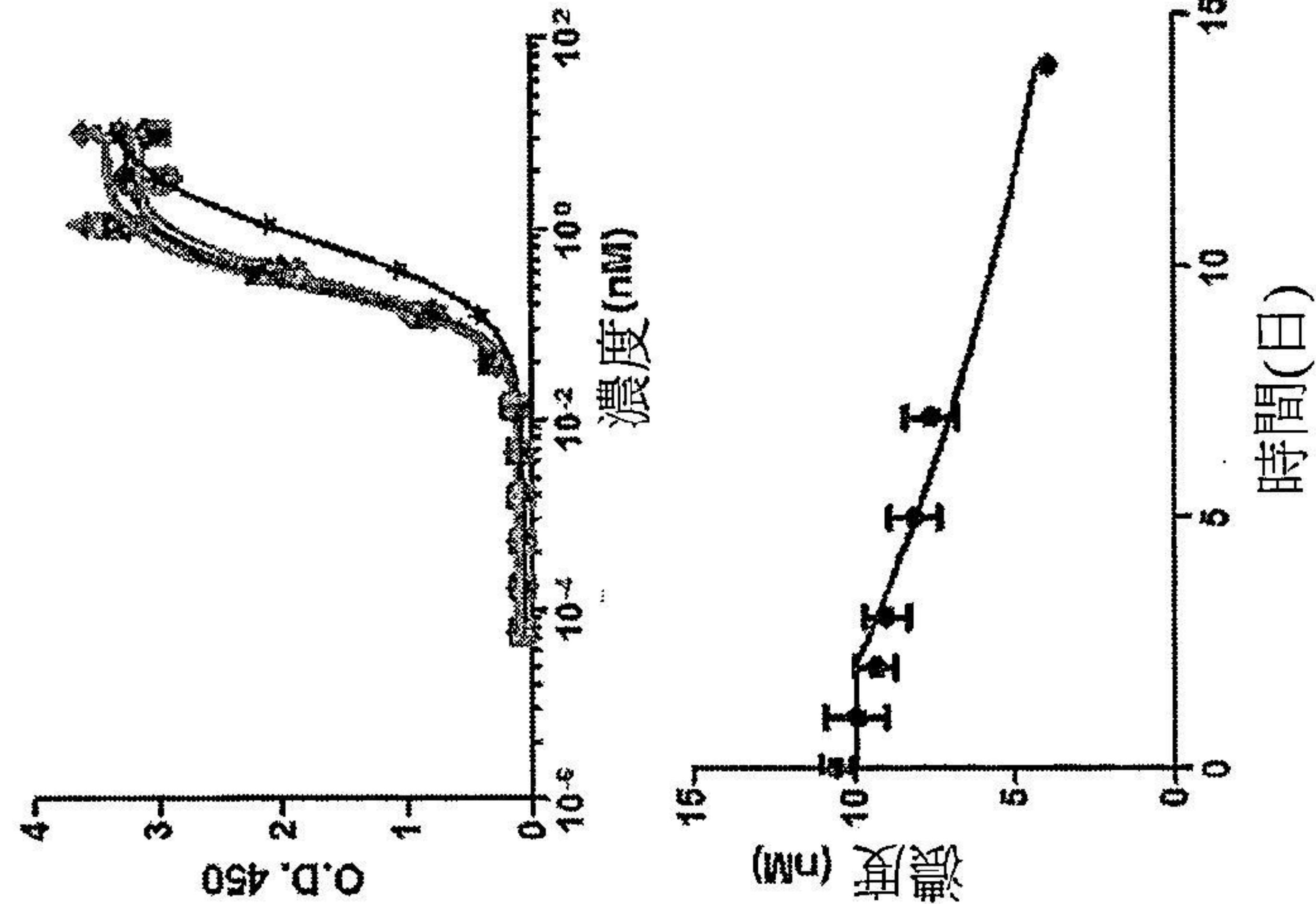
小鼠血清

食蟹獼猴血清

對VEGF的結合能力

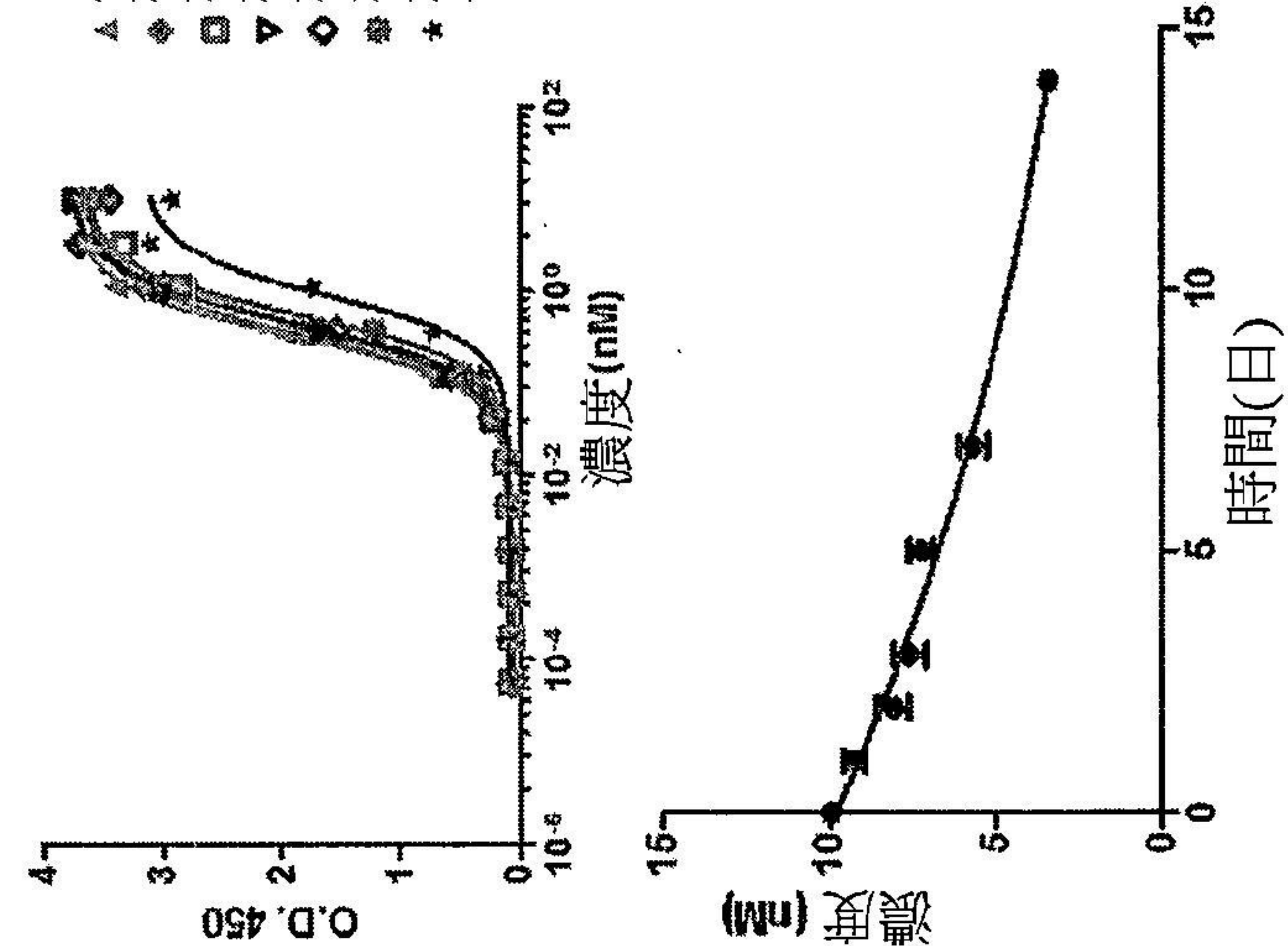
對VEGF的結合能力

對VEGF的結合能力



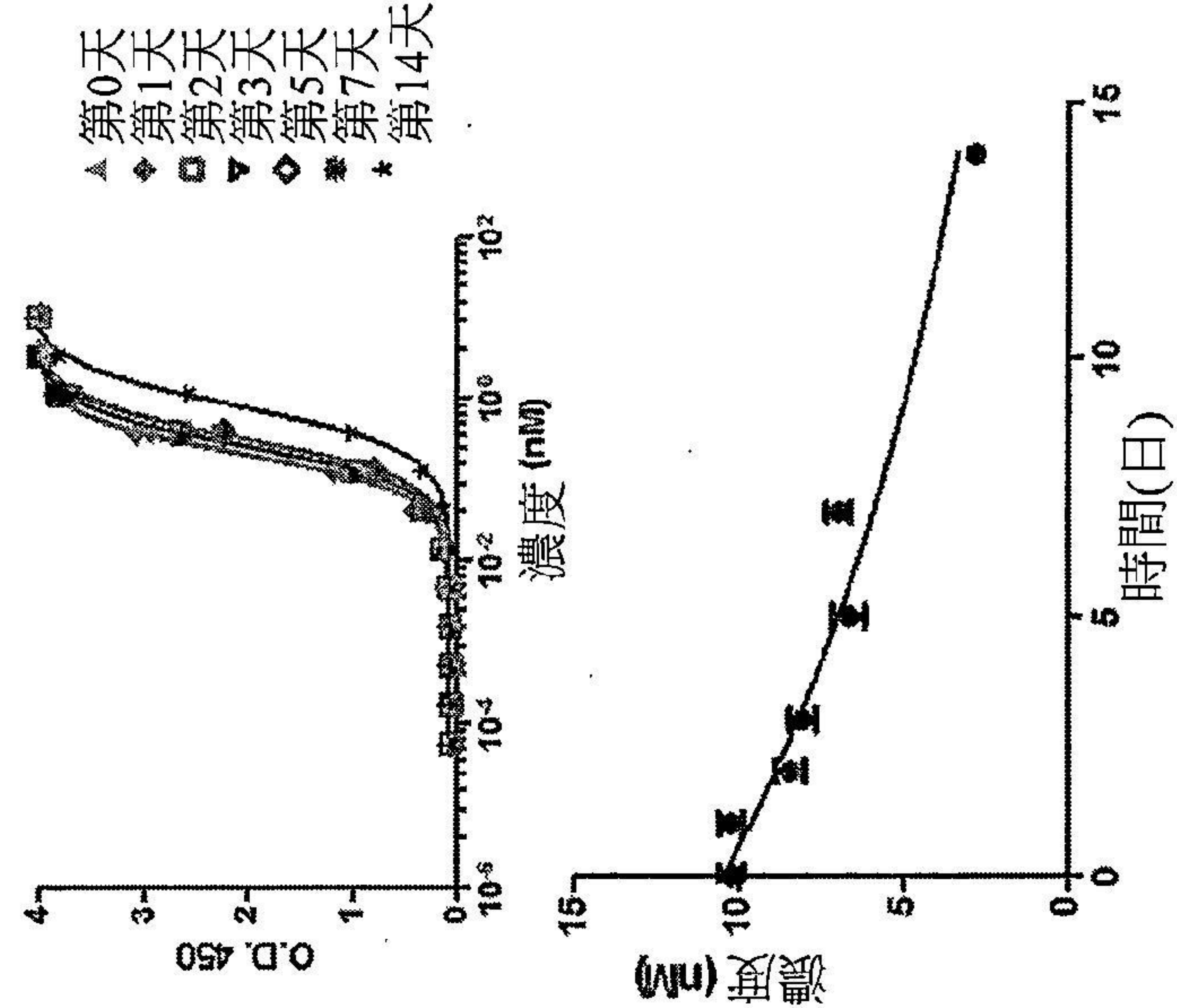
半衰期：11.9 days

第14A圖



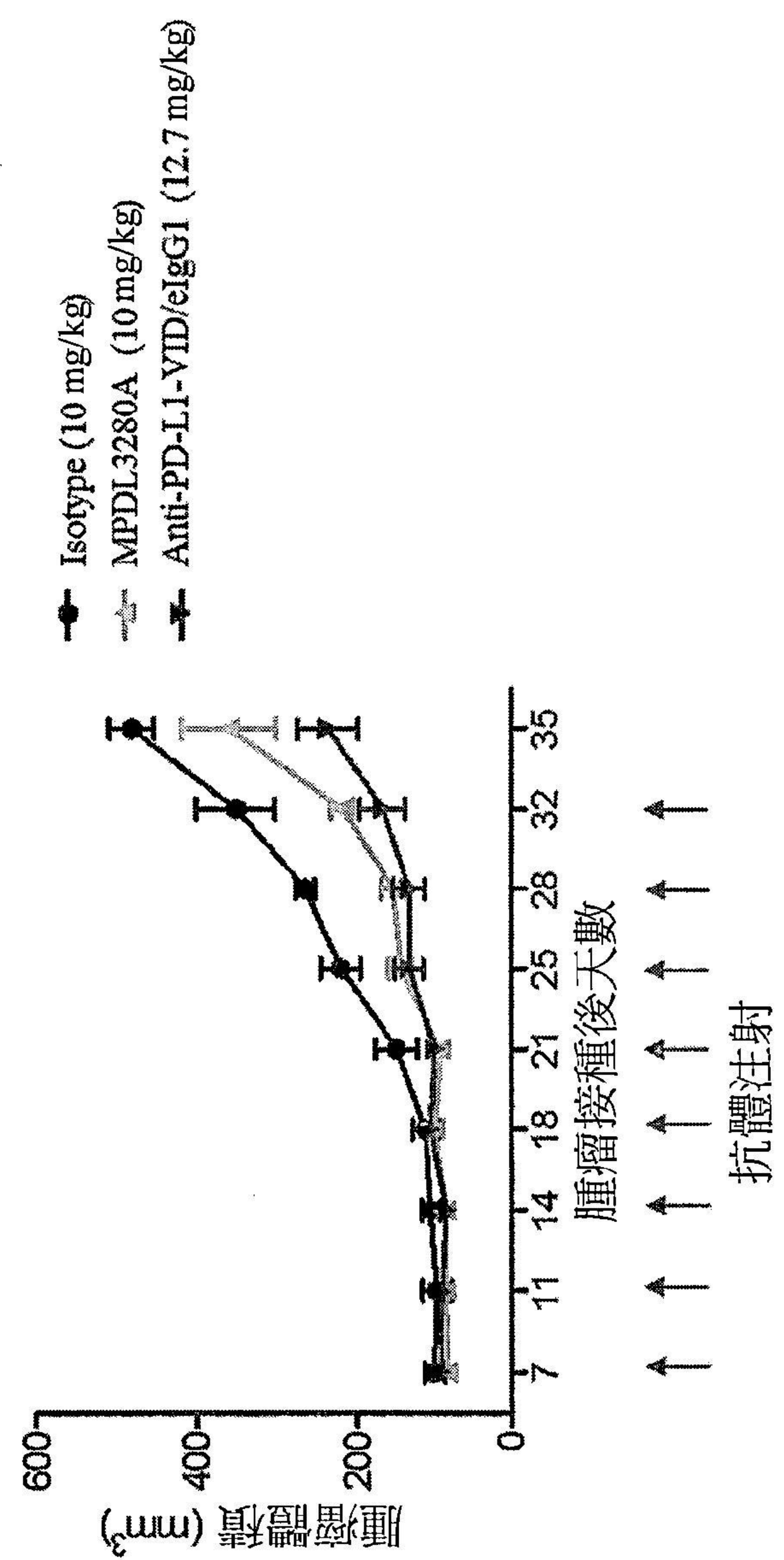
半衰期：9.2 days

第14B圖

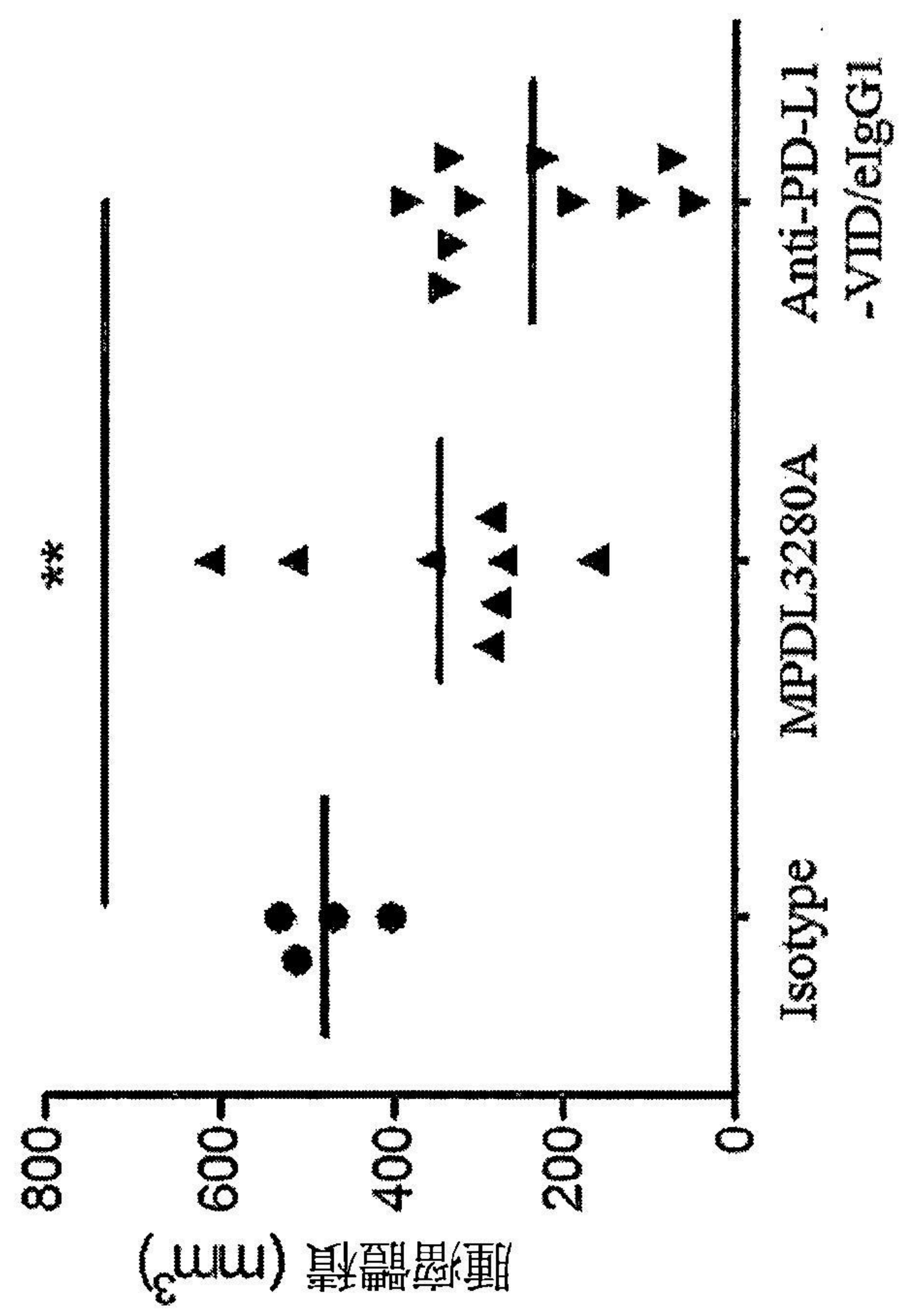


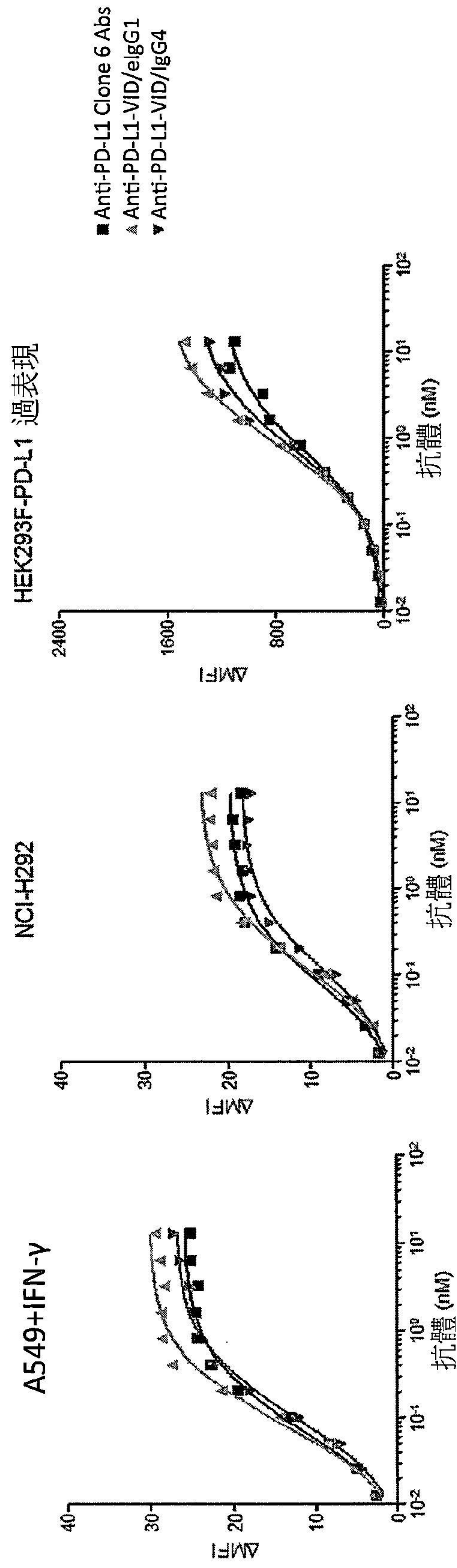
半衰期：8.6 days

第14C圖



第 15A 圖





第 16A 圖

第 16B 圖

第 16C 圖