I879267

(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 I879267 B**

(45)公告日： 中華民國 114 (2025) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：112146458 (22)申請日： 中華民國 112 (2023) 年 11 月 30 日

(51)Int. Cl.： *C07K16/18 (2006.01)* *A61K39/395 (2006.01)*
A61P35/00 (2006.01) *C12N15/13 (2006.01)*
C12N15/63 (2006.01) *C12N15/64 (2006.01)*

(30)優先權：2022/11/30 美國 63/428,802

(71)申請人：財團法人生物技術開發中心 (中華民國) DEVELOPMENT CENTER FOR BIOTECHNOLOGY (TW)
新北市汐止區康寧街 169 巷 101 號

(72)發明人：葉舒平 YEH, SHU-PING (TW) ；游成州 YU, CHENG-CHOU (TW) ；駱育壎 LO, YU-HSUN (TW) ；王金玉 WANG, JIN-YU (TW) ；詹美琦 CHAN, MEI-CHI (TW) ；黃朝暘 HUANG, CHAO-YANG (TW) ；賴思良 LAI, SZU-LIANG (TW)

(74)代理人：陳長文；簡秀如；朱淑尹

(56)參考文獻：

TW 202005983A CN 114341180A
US 2016/0311903A1

審查人員：蔡明憲

申請專利範圍項數：22 項 圖式數：13 共 77 頁

(54)名稱

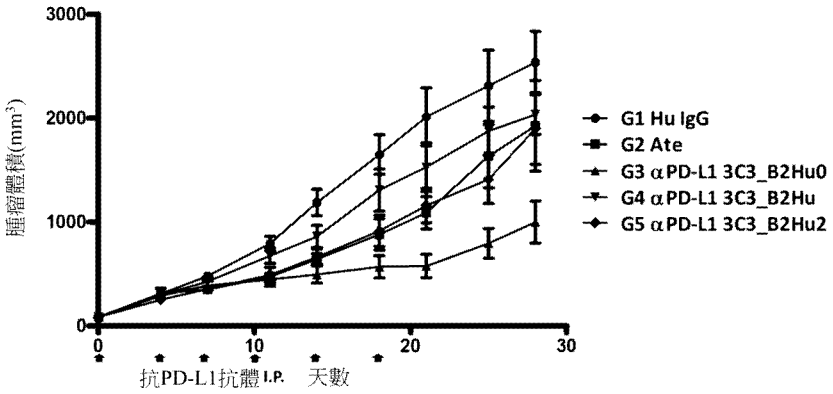
抗人類 PD-L1 抗體及其用途

(57)摘要

本發明係關於一種抗 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，其包含：重鏈可變區序列，其包含具有 SEQ ID NO: 2 至 4、或 6 至 8 之序列之三個 CDR；及輕鏈可變區序列，其包含具有 SEQ ID NO: 10 至 12、或 14 至 16 之序列之三個 CDR。本發明亦係關於一種醫藥組合物及一種偵測樣品中之 PD-L1 之表現的方法。

The present disclosure relates to an anti-PD-L1 antibody or an antigen-binding fragment thereof, comprising: a heavy chain variable region sequence comprising the three CDRs with the sequences of SEQ ID NOs: 2 to 4, or 6 to 8; and a light chain variable region sequence comprising the three CDRs with the sequences of SEQ ID NOs: 10 to 12, or 14 to 16. The present disclosure also relates to a pharmaceutical composition and a method for detecting expression of PD-L1 in a sample.

指定代表圖：


腫瘤體積(mm³)
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
抗PD-L1抗體 I.P.
天數
G1 Hu IgG
G2 Ate
G3 αPD-L1 3C3_B2Hu0
G4 αPD-L1 3C3_B2Hu
G5 αPD-L1 3C3_B2Hu2

【圖13】

I879267

【發明摘要】

【中文發明名稱】

抗人類PD-L1抗體及其用途

【英文發明名稱】

ANTI-HUMAN PD-L1 ANTIBODIES AND THEIR USES

【中文】

本發明係關於一種抗PD-L1抗體或其抗原結合片段，其包含：重鏈可變區序列，其包含具有SEQ ID NO: 2至4、或6至8之序列之三個CDR；及輕鏈可變區序列，其包含具有SEQ ID NO: 10至12、或14至16之序列之三個CDR。本發明亦係關於一種醫藥組合物及一種偵測樣品中之PD-L1之表現的方法。

【英文】

The present disclosure relates to an anti-PD-L1 antibody or an antigen-binding fragment thereof, comprising: a heavy chain variable region sequence comprising the three CDRs with the sequences of SEQ ID NOs: 2 to 4, or 6 to 8; and a light chain variable region sequence comprising the three CDRs with the sequences of SEQ ID NOs: 10 to 12, or 14 to 16. The present disclosure also relates to a pharmaceutical composition and a method for detecting expression of PD-L1 in a sample.

【指定代表圖】

圖13

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

抗人類PD-L1抗體及其用途

【英文發明名稱】

ANTI-HUMAN PD-L1 ANTIBODIES AND THEIR USES

【技術領域】

【0001】 本發明係關於新穎人類抗體，特定言之係關於對具有較高親和力之PD-L1具有特異性之人類單株抗體。此外，本發明係關於此類抗體用於治療及診斷人類疾病之用途。

【先前技術】

【0002】 程序性死亡蛋白質1 (PD-1)為受體之CD28家族的抑制性成員，該家族亦包括CD28、CTLA-4、ICOS及BTLA。PD-1表現於經活化B細胞、T細胞及骨髓細胞(Bennett, Luxenberg等人. 2003, J Immunol 15 January 2003; 170 (2): 711-718)上。其配位體，程式化細胞死亡配位體1 (PD-L1)表現於一些腫瘤細胞上，且藉由經活化B細胞及T細胞、樹突狀細胞、巨噬細胞及成纖維細胞表現(Hansen, Du Pasquier等人. 2009, Mol Immunol. 2009 Jan;46(3):457-72)。PD-L1結合PD-1以藉由誘導T細胞細胞凋亡或耗竭而減弱細胞免疫反應。使用單株抗體阻斷PD-1/PD-L1路徑(抗PD-1或PD-L1)為一種正在對許多類型之人類癌症之研究中探索的有前景之治療方法(Sanmamed and Chen 2014, Cancer J. 2014 Jul-Aug;20(4):256-61)。此等研究之結果表明，藉由促進PD-1/PD-L1路徑活化，PD-L1在幫助腫瘤逃出免疫系統起重要作用。

【0003】 已在各種實體腫瘤中觀測到PD-L1表現，該等實體腫瘤包

括乳癌、肺癌、胃癌、結腸直腸癌、肝細胞癌、腎細胞癌、睪丸癌及乳頭狀甲狀腺癌。此外，若干統合分析已顯示，PD-L1過度表現表示許多癌症類型之不良預後(Wang, Wang等人. 2015, J Intern Med. 2015 Oct;278(4):369-95; Xu, Xu等人. 2015, Int J Clin Exp Med. 2015 Sep 15;8(9):14595-603; Zhang, Kang等人. 2015, Medicine 94:e515, Iacovelli, Nole等人. 2016, Target Oncol. 2016;11:143-148)。因此，需要針對PD-L1之較佳抗體來治療或診斷由PD-L1介導之疾病或病況。

【發明內容】

【0004】 在一個態樣中，本發明係關於對人類PD-L1具有特異性之抗體。

【0005】 因此，本發明提供本發明之抗體或其抗原結合片段，其包含包括HCDR1、HCDR2及HCDR3之重鏈可變區，其中

該HCDR1序列為GYSITSDYWN (SEQ ID NO: 2)、該HCDR2序列為YISYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO: 3)且該HCDR3序列為RGEWLSPFAY (SEQ ID NO: 4)；或

該HCDR1序列為GYSITSDYWD (SEQ ID NO: 6)、該HCDR2序列為YISYTGSTYYNPSLRS (SEQ ID NO: 7)且該HCDR3序列為RGGWLSPFVY (SEQ ID NO: 8)；

其中該等HCDR序列根據Kabat命名法之方法定義。

【0006】 根據本發明之實施例，對人類PD-L1具有特異性之抗體的重鏈可變區序列中之互補決定區(CDR)具有SEQ ID NO: 2、3、4、6、7或8之序列，如圖1A至1B中所示。

【0007】 因此，本發明提供本發明之抗體或其抗原結合片段，其包

含包括LCDR1、LCDR2及LCDR3之輕鏈可變區，其中

該LCDR1序列為KSSQSLLYSSNQKNSLA (SEQ ID NO: 10)、該LCDR2序列為WASTRES (SEQ ID NO: 11)，且該LCDR3序列為QQYYTYPFT (SEQ ID NO: 12)；或

該LCDR1序列為KSRQSLLFSSNQKNSLA (SEQ ID NO: 14)、該LCDR2序列為WASTRES (SEQ ID NO: 15)，且該LCDR3序列為QQYYTYPFT (SEQ ID NO: 16)；

其中該等LCDR序列根據Kabat命名法之方法定義。

【0008】 根據本發明之實施例，對人類PD-L1具有特異性之抗體的輕鏈可變區中之互補決定區具有SEQ ID NO: 10、11、12、14、15或16之序列，如圖2A至2B中所示。

【0009】 在另一態樣中，本發明係關於對人類PD-L1或其抗原結合片段具有特異性之抗體，其包含具有HCDR1、HCDR2及HCDR3之重鏈可變區及具有LCDR1、LCDR2及LCDR3之輕鏈可變區，其中

該重鏈可變區，其包含具有SEQ ID NO: 2之序列的HCDR1、具有SEQ ID NO: 3之序列的HCDR2及具有SEQ ID NO: 4之序列的HCDR3，及該輕鏈可變區，其包含具有SEQ ID NO: 10之序列的LCDR1、具有SEQ ID NO: 11之序列的LCDR2及具有SEQ ID NO: 12之序列的LCDR3；或

該重鏈可變區，其包含具有SEQ ID NO: 6之序列的HCDR1、具有SEQ ID NO: 7之序列的HCDR2及具有SEQ ID NO: 8之序列的HCDR3，及該輕鏈可變區，其包含具有SEQ ID NO: 14之序列的LCDR1、具有SEQ ID NO: 15之序列的LCDR2及具有SEQ ID NO: 16之序列的LCDR3。

【0010】 在本發明之一些實施例中，抗體係嵌合、人源化、複合或

人類抗體。

【0011】 在本發明之一些實施例中，抗體係多特異性的。

【0012】 在本發明之一些實施例中，抗PD-L1抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區包含SEQ ID NO: 1之序列或與SEQ ID NO: 1之序列具有至少約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性的序列；及該輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 9之序列或與SEQ ID NO: 9之序列具有至少約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性的序列。

【0013】 在本發明之一些實施例中，抗PD-L1抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區包含SEQ ID NO: 5之序列或與SEQ ID NO: 5之序列具有至少約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性的序列；及該輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 13之序列或與SEQ ID NO: 13之序列具有至少約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性的序列。

【0014】 在本發明之一些實施例中，抗PD-L1抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區包含SEQ ID NO: 25、27或28之序列或與SEQ ID NO: 25、27或28之序列具有至少約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性之序列，且該輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 26、29或30之序列或與SEQ ID NO: 26、29或30之序列具有至少約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性之序列。

【0015】 在本發明之一些實施例中，抗PD-L1抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區包含SEQ ID NO: 31或35之序列或與SEQ ID NO: 31或35

之序列具有至少約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性之序列，且該輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 32、33或34之序列或與SEQ ID NO: 32、33或34之序列具有至少約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性之序列。

【0016】 在本發明之一些實施例中，抗PD-L1抗體或其抗原結合片段為全抗體、Fab片段、$F(ab')_2$片段或ScFv片段。

【0017】 在本發明之一些實施例中，抗PD-L1抗體或其抗原結合片段為全人類抗體。

【0018】 在本發明之一些實施例中，抗PD-L1抗體或其抗原結合片段包含選自IgG1、IgG2或IgG4同功型之重鏈恆定區及選自κ亞型或λ同功型之輕鏈恆定區。

【0019】 在本發明之一些實施例中，抗PD-L1抗體或其抗原結合片段藉由與第二目標之第二特異性結合域結合而形成雙特異性或多特異性抗體之一部分。第二目標之第二特異性結合域例如可為抗CD3、抗ICOS或抗TIM3等。

【0020】 在本發明之一些實施例中，抗PD-L1抗體或其抗原結合片段與治療劑(有效負載)結合以形成抗體-藥物結合物(ADC)。在一些實施例中，治療劑或有效負載可針對其調節表現PD-L1之細胞或表現PD-1之細胞之功能的能力加以選擇。此類治療劑或有效負載可包括例如DM1、MMAE或MMAF。

【0021】 在本發明之一些實施例中，該抗體或其抗原結合片段表現於細胞之表面上。細胞可為免疫細胞。在本發明之一個實施例中，該免疫細胞係T細胞。

【0022】 本發明亦提供一種編碼抗體或其抗原結合片段之載體。

【0023】 在本發明之一些實施例中，載體包含SEQ ID NO: 1、5、25、27、28、31或35之序列或與SEQ ID NO: 1、5、25、27、28、31或35之序列具有至少約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性的序列；及/或該輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 9、13、26、29、30、32、33或34之序列或與SEQ ID NO: 9、13、26、29、30、32、33或34之序列具有至少約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性的序列。

【0024】 在另一態樣中，本發明提供表現抗體或其抗原結合片段或含有載體之經基因工程化之細胞。經基因工程化之細胞可為免疫細胞。

【0025】 本發明亦提供一種用於製備如本文所揭示之抗體或其抗原結合片段之方法，其包含：(a)將編碼該抗體或抗原結合片段之一或多種聚核苷酸引入至宿主細胞中；(b)在有利於表現該一或多種聚核苷酸之條件下培養該宿主細胞；及(c)視情況自該宿主細胞及/或生長該宿主細胞之培養基中分離該抗體或抗原結合片段。

【0026】 本發明提供一種醫藥組合物，其包含有效量之抗體或其抗原結合片段或經基因工程化之細胞或免疫細胞及醫藥學上可接受之載劑。

【0027】 在本發明之一些實施例中，醫藥組合物用於抑制PD-L1介導之訊號。

【0028】 在本發明之一些實施例中，醫藥組合物用於治療由PD-L1介導之疾病。

【0029】 在本發明之一些實施例中，PD-L1介導之疾病可為癌症。癌症可包括(但不限於)：肺癌、乳癌、前列腺癌、結腸直腸癌、胃癌、肝

細胞癌、腎細胞癌、睪丸癌、黑素瘤、白血病或乳頭狀甲狀腺癌及其他晚期實體腫瘤。

【0030】 本發明提供一種偵測PD-L1表現之方法，其包含使樣品與本文所描述之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段接觸。

【圖式簡單說明】

【0031】 圖1A至圖1B展示經設計以對應於小鼠抗人類PD-L1抗體之複合人類重鏈(圖1A，1G8；圖1B，3C3)可變區序列。

【0032】 圖2A至圖2B展示經設計以對應於小鼠抗人類PD-L1抗體之複合人類輕鏈(圖2A，1G8；圖2B，3C3)可變區序列。

【0033】 圖3繪示使用ELISA，抗PD-L1抗體與人類PD-L1結合。

【0034】 圖4展示用流式細胞分析術分析之結合至HCC827細胞的抗PD-L1抗體。

【0035】 圖5繪示各種抗體誘導PD-1/PD-L1阻斷之能力。

【0036】 圖6展示在鼠類同基因型MC38結腸癌模型中，抗PD-L1 mAb處理之活體內功效。

【0037】 圖7展示關於人類PD-L1 mAb 3C3及IMGT之VL及VH序列之人源化進行的序列分析。在根據Kabat方案在殘基編號下展示之第一行中，回復突變位點用下劃線展示。

【0038】 圖8展示關於人類PD-L1 mAb 1G8及IMGT之VL及VH序列之人源化進行的序列分析。在根據Kabat方案在殘基編號下展示之第一行中，回復突變位點用下劃線展示。

【0039】 圖9展示用於產生小鼠-人類嵌合體及PD-L1 (3C3) mAb之人源化版本的表現載體。用於純化抗體之不同PD-L1 (3C3) mAb版本之詳

細程序描述於本發明中。

【0040】 圖10描繪使用小鼠-人類嵌合體3C3 MM及人源化3C3 HuB2Hu0、3C3 HuB2Hu及3C3 HuB2Hu2抗體以確定人源化PD-L1 mAb之結合親和力的結果。嵌合體抗體表現、純化及Kd分析之詳細程序如本發明中所描述進行。

【0041】 圖11描繪使用小鼠-人類嵌合體1G8 MM及人源化1G8 HuHu、1G8 HuB2Hu0、1G8 HuHu2、1G8 HuB2Hu、1G8 HuHu2及1G8 HuB2Hu2抗體以確定人源化PD-L1 mAb之結合親和力的結果。嵌合體抗體表現、純化及Kd分析之詳細程序如本發明中所描述進行。

【0042】 圖12繪示各種人源化PD-L1 3C3抗體誘導PD-1/PD-L1阻斷之能力。

【0043】 圖13展示在鼠類同基因型MC38結腸癌模型中，人源化PD-L1 3C3抗體處理之活體內功效。

【實施方式】

【0044】 應瞭解，本發明不限於本文所描述之特定材料及方法。亦應瞭解，本文所用之術語僅出於描述特定實施例之目的且不意欲限制本發明之範疇，本發明之範疇將僅由所附申請專利範圍限制。

【0045】 必須指出，除非上下文另外明確規定，否則如本說明書及所附申請專利範圍中所使用，單數形式「一(a/an)」及「該/該等(the)」包括複數個參考物。

【0046】 如本文所用，術語「抗體」意謂包含至少一個特異性結合至特定抗原(PD-L1)或與其相互作用之互補決定區(CDR)的任何抗原結合分子或分子複合物。術語「抗體」包括免疫球蛋白分子以及其多聚體(例

如IgM)，該等免疫球蛋白分子包含四個多肽鏈，即通過二硫鍵互連的兩個重(H)鏈和兩個輕(L)鏈。各重鏈包含重鏈可變區(本文中縮寫為HCVR或VH)和重鏈恆定區。重鏈恆定區包含三個域，CH1、CH2及CH3。各輕鏈包含輕鏈可變區(在本文中縮寫為LCVR或VL)及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區包括一個域(CL1)。VH及VL區可進一步再分成高變區，稱為互補決定區(CDR)，穿插稱為構架區(FR)之更保守區。每個VH及VL由自胺基端至羧基端按以下順序排列之三個CDR及四個FR構成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本發明之不同實施例中，抗PD-L1抗體(或其抗原結合部分)之FR可與人類生殖系序列一致，或可經天然或人工修飾。胺基酸共有序列可以基於兩個或更多個CDR之並列分析來確定。

【0047】 如本文所使用，術語「特異性結合」意謂抗體不與其他抗原決定基發生明顯程度的交叉反應。

【0048】 如本文所用，術語「抗原決定基」係指抗體結合至抗原之位點。

【0049】 如本文所使用，術語「互補決定區」(CDR)係指在重鏈及輕鏈多肽之可變區內發現的不連續抗原組合位點。Kabat等人，J.Biol.Chem.252:6609-6616(1977)；Kabat等人，美國衛生及人類服務部(U.S.Dept.of Health and Human Services)，「Sequences of proteins of immunological interest」(1991)；Chothia等人，J.Mol .Biol.196:901-917(1987)；及MacCallum等人，J.Mol.Biol.262:732-745(1996)已經描述CDR，其中定義包括彼此對照比較時胺基酸殘基的重疊或子集。

【0050】 如本文所用之術語「單株抗體」不限於經由融合瘤技術產生之抗體。單株抗體係藉由任何可用或此項技術中已知的手段，自單一純

系得到，該純系包括任何真核、原核或噬菌體純系。

【0051】 如本文所用，術語「嵌合」抗體係指具有衍生自非人類免疫球蛋白及人類免疫球蛋白恆定區之可變序列的抗體，通常選自人類免疫球蛋白模板。

【0052】 非人類抗體之「人源化」形式為含有極少衍生自非人類免疫球蛋白之序列的嵌合免疫球蛋白。一般而言，人源化抗體將包含實質上所有的至少一個且通常兩個可變域，其中所有或實質上所有的CDR區對應於非人類免疫球蛋白之CDR區且所有或實質上所有的FR區為人類免疫球蛋白序列之FR區。

【0053】 如本文所用，術語「複合抗體」係指具有包含生殖系或非生殖系免疫球蛋白序列之可變區的抗體，其來自兩個或更多個不相關可變區。

【0054】 如本文所用，術語抗體之「抗原結合部分」、抗體之「抗原結合片段」及其類似術語包括特異性結合抗原以形成複合物之任何天然存在、以酶方式可獲得、合成或基因工程化之多肽或醣蛋白。

【0055】 如本發明中所用，術語「治療劑」意謂適合於向哺乳動物(例如，人類)投與之具有治療性或藥理學作用的任何化合物、物質、藥物或活性成分。

【0056】 如本文所使用，術語「免疫細胞」係指在免疫反應中起作用之細胞。免疫細胞為造血來源的，且包括淋巴球，諸如B細胞及T細胞；自然殺手細胞；骨髓細胞，諸如單核球、巨噬細胞、嗜伊紅血球、肥大細胞、嗜鹼性球及顆粒球。

【0057】 如本文所使用，術語「T細胞」包括$CD4^+$ T細胞及$CD8^+$ T

細胞。術語T細胞亦包括T輔助1型T細胞、T輔助2型T細胞、T輔助17型T細胞及抑制性T細胞。

【0058】 如本文所用，術語「載體」意指能夠轉運其已連接之另一核酸的核酸分子。載體之一種類型為「質體」，其係指可接合額外DNA片段之環形雙股DNA環。載體之另一類型為病毒載體，其中額外DNA區段可接合至病毒基因體。某些載體能夠在其被引入之宿主細胞中自主複製(例如具有細菌複製起點之細菌載體及附加型哺乳動物載體)。其他載體(例如非附加型哺乳動物載體)在引入至宿主細胞中時可整合至宿主細胞之基因體中，且藉此與宿主基因體一起複製。此外，某些載體能夠引起其以可操作方式連接的基因之表現。此類載體在本文中被稱作「重組表現載體」(或簡言之，「表現載體」)。一般而言，用於重組DNA技術中之表現載體常常呈質體形式。由於質體為載體之最常用形式，因而在本說明書中，「質體」及「載體」可互換使用。然而，本發明意欲包括發揮相等功能之該等其他形式之表現載體，諸如病毒載體(例如複製缺陷反轉錄病毒、腺病毒以及腺相關病毒)。

【0059】 細胞之術語「基因工程化(genetically engineered/genetic engineering)」意指使用基因材料操縱基因以改變細胞中之基因複本及/或基因表現量。基因材料可呈DNA或RNA形式。基因材料可藉由包括病毒轉導及非病毒轉染之各種方式轉移至細胞中。在經基因工程化之後，細胞中某些基因之表現量可永久或暫時改變。

【0060】 如本發明中所使用，術語「醫藥組合物」意謂含有向哺乳動物，例如人類投與以預防、治療或消除哺乳動物所患之特定疾病或病理病況之治療劑的混合物。

【0061】 如本文中所使用，術語「治療有效量」或「靈驗量」係指當投與哺乳動物或其他個體用於治療疾病時，足以實現對該疾病之該治療的抗體之量。

【0062】 如本文所用，術語「治療(treatment/treating)」及其類似者涵蓋哺乳動物(特定言之人類)之疾病的任何治療，且包括：(a)預防可能易患疾病但尚未診斷出患有該疾病的個體出現該疾病；(b)抑制疾病，亦即，遏制其發展；及(c)緩解疾病，亦即，使疾病消退。

【0063】 如本文中可互換地所用，術語「個人」、「個體」、「主體」及「患者」指代哺乳動物，其包括(但不限於)鼠(大鼠、小鼠)、非人類靈長類、人類、犬科動物、貓科動物、有蹄動物(例如，馬科動物、牛科動物、綿羊、豬科動物、山羊)等。

【0064】 如本文中所使用，術語「需要治療」係指由照護者(例如在人類之情況下，為醫師、護士、護理從業者或個人；在動物(包括非人類之哺乳動物)之情況下，為獸醫)作出的判斷，該判斷為個體需要治療或將受益於治療。此判斷係基於多種因素作出，該等因素係在照護者之專業知識領域內，且包括個體由於可用本發明之化合物治療之病況而患病或將患病的知識。

【0065】 「癌症」、「腫瘤」及類似術語包括癌變前、贅生性、轉型及癌細胞，且可指實體腫瘤，或非實體癌(參見例如Edge等人. AJCC Cancer Staging Manual (第7版2009)；Cibas and Ducatman Cytology: Diagnostic principles and clinical correlates (第3版2009))。癌症包括良性贅瘤及惡性贅瘤(異常生長)兩者。「轉型」係指自發的或誘導的表型變化，例如，細胞之不朽化、形態變化、異常細胞生長、減少的接觸抑制及

固著及/或惡性病(參見Freshney, Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique (第3版，1994))。儘管轉型可由經轉型病毒之感染及新基因體DNA之併入或外源DNA之攝入引起，其亦可以自發方式或在暴露於誘癌物之後產生。

【0066】 如本文所用，術語「樣品」涵蓋獲自個人、個體或患者之多種樣品類型，且可用於診斷性或監測分析。該定義涵蓋血液及生物來源之其他液體樣品；固體組織樣品，諸如活組織檢查樣品或組織培養物或源自其之細胞，及其後代。

【0067】 本發明係關於一種新穎抗體，其對PD-L1具有特異性且對其具有較高親和力。抗PD-L1抗體或其抗原結合片段可向個體遞送治療益處。本發明之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段(其可為人類或人源化)可用作用於治療及/或診斷由PD-L1介導之多種病症的治療劑，該等病症更充分地描述於本文中。

【0068】 特定言之，根據本發明之實施例的抗體或其抗原結合片段對人類PD-L1或其片段中之抗原決定基具有特異性。

【0069】 根據本發明實施例之抗體或其抗原結合片段可為全長(例如，IgG1或IgG4抗體)，或可僅包含抗原結合部分(例如，Fab、$F(ab')_2$或scFv片段)，且可視需要經修飾以影響功能性。

【0070】 根據本發明之實施例的抗體或其抗原結合片段對人類PD-L1具有特異性。PD-L1，亦稱為CD274或B7同源物1，係40kDa 1型跨膜蛋白，其經推測在特定事件期間在抑制免疫系統中起主要作用，特定事件諸如懷孕、組織同種異體移植、自體免疫性疾病及其他疾病病況，諸如肝炎。通常，免疫系統與外源性或內源性危險訊號相關之外來抗原反應，其

觸發抗原特異性CD8+ T細胞及/或CD4+輔助細胞之增殖。PD-L1與PD-1或B7.1之結合傳輸抑制性訊號，其降低此等T細胞之增殖且亦可誘導細胞凋亡，該細胞凋亡進一步由基因Bcl-2之較低調節介導。

【0071】 抗原結合片段之非限制性實例包括：(i) Fab片段；(ii) $F(ab')_2$片段；(iii) Fd片段；(iv) Fv片段；(v)單鏈Fv (scFv)分子；(vi) dAb片段；及(vii)由胺基酸殘基組成的模擬抗體高變區之最小識別單元(例如，經分離之互補決定區(CDR)，諸如CDR3肽)，或受限之FR3-CDR3-FR4肽。其他經工程化之分子，諸如域特異性抗體、單域抗體、域缺失抗體、嵌合抗體、CDR移植抗體、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體、微型抗體、奈米抗體(例如單價奈米抗體、二價奈米抗體等)、小模組免疫藥物(SMIP)及鯊魚可變IgNAR域亦涵蓋在如本文所用之表述「抗原結合片段」內。

【0072】 抗體之抗原結合片段典型地包含至少一個可變域。可變域可為任何尺寸或胺基酸組合物且一般將包括與一或多個構架序列相鄰或同框之至少一個CDR。在具有與VL域相關聯的VH域的抗原結合片段中，VH和VL域可以任何適合的配置相對於彼此定位。舉例來說，可變區可以是二聚體並且含有VH-VH、VH-VL或VL-VL二聚體。或者，抗體的抗原結合片段可以含有單體VH或VL域。

【0073】 與完整抗體分子一樣，抗原結合片段可為單特異性或多特異性的(例如雙特異性的)。抗體的多特異性抗原結合片段將通常包含至少兩個不同的可變域，其中各可變域能夠特異性結合於獨立抗原或相同抗原上的不同抗原決定基。任何多特異性抗體型式，包括本文所揭示之例示性雙特異性抗體型式可使用此項技術中可用之常規技術而適用於本發明抗體

之抗原結合片段的情況下。

【0074】 在本發明之一個實施例中，抗體或其抗原結合片段與治療劑結合。本發明抗體可用作抗體-藥物結合物(ADC)，其可特異性靶向PD-L1。ADC上之結合物可調節表現PD-L1之免疫細胞或與表現PD-L1之細胞(例如，表現PD-1之細胞)相互作用的細胞。此等ADC可使用本發明之任何抗體或其抗原結合片段。與抗體(或結合片段)結合之藥物(有效負載)可為ADC中常用之任何藥物。用於結合之方法可為此項技術中已知之彼等方法。

【0075】 如應用於多肽，術語「同源性」意謂兩個肽序列在最佳比對時，諸如使用預設空位權重藉由程式GAP或BESTFIT比對時，具有至少95%序列一致性，甚至更佳至少98%或99%序列一致性。根據本發明之實施例，GCG軟體中之GAP及Best fit程式與預設參數一起使用以測定密切相關之多肽之間的序列同源性或序列一致性。

【0076】 在本發明之實施例中，抗PD-L1抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區及輕鏈可變區，其中該重鏈可變區包含3個CDR區，CDRH1(或HCDR1)、CDRH2 (或HCDR2)及CDRH3 (或HCDR3)區，且該輕鏈可變區包含3個CDR區，CDRL1 (或LCDR1)、CDRL2 (或LCDR2)及CDRL3(或CDRL3)區。

【0077】 參考圖1A至2B，在本發明之一些實施例中，CDRH1區包含SEQ ID NO: 2之胺基酸序列，CDRH2區包含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列，CDRH3區包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列，CDRL1區包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列，CDRL2區包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列，且CDRL3區包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列。

【0078】在本發明之一些實施例中，CDRH1區包含SEQ ID NO: 6之胺基酸序列，CDRH2區包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列，CDRH3區包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列，CDRL1區包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列，CDRL2區包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列，且CDRL3區包含SEQ ID NO: 16之胺基酸序列。

【0079】在本發明之一些實施例中，抗PD-L1抗體或其抗原結合片段包含有包含SEQ ID NO: 1之胺基酸序列的重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 9之胺基酸序列的輕鏈可變區。在本發明之一些實施例中，重鏈可變區由SEQ ID NO: 17之核酸序列編碼，且輕鏈可變區由SEQ ID NO: 19之核酸序列編碼。

【0080】在本發明之一些實施例中，抗PD-L1抗體或其抗原結合片段包含有包含SEQ ID NO: 5之胺基酸序列的重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列的輕鏈可變區。在本發明之一些實施例中，重鏈可變區由SEQ ID NO: 18之核酸序列編碼，且輕鏈可變區由SEQ ID NO: 20之核酸序列編碼。

【0081】與產生抗體之對應生殖系序列相比，本文所揭示之抗PD-L1抗體可在重鏈及輕鏈可變域之構架及/或CDR區中包含一或多個胺基酸取代、插入及/或缺失。此等突變可容易地藉由比較本文所揭示之胺基酸序列與購自例如公共抗體序列資料庫之生殖系序列來確定。本發明包括一種抗體及其抗原結合片段，其衍生自本文所揭示之胺基酸序列中之任一者，其中一或多個構架區及/或CDR區內之一或多個胺基酸突變為產生該抗體之生殖系序列的相應殘基，或另一哺乳動物生殖系序列的相應殘基，或相應生殖系殘基之保守胺基酸取代(此類序列變化在本文中統稱為「生

殖系突變」)。以本文所公開的重鏈和輕鏈可變區序列為起始物質，所屬領域中的普通技術人員可以容易地產生許多包含一或多個個別生殖系突變或其組合的抗體和抗原結合片段。在某些實施例中，VH及/或VL域內的所有構架及/或CDR殘基全部突變回在衍生抗體的初始生殖系序列中發現的殘基。在其他實施例中，僅某些殘基突變回原始生殖系序列，例如僅FR1之前8個胺基酸內或FR4之最後8個胺基酸內發現之突變殘基，或僅CDR1、CDR2或CDR3內發現之突變殘基。在其他實施例中，構架區及/或CDR殘基中之一或多者突變成不同生殖系序列(亦即，不同於最初衍生出抗體之生殖系序列的生殖系序列)之對應殘基。此外，本發明之抗體可含有構架區及/或CDR區內兩個或更多個生殖系突變之任何組合，例如其中某些個別殘基突變為特定生殖系序列之相應殘基，而與原始生殖系序列不同之某些其他殘基維持不變或突變為不同生殖系序列之相應殘基。一旦獲得，即可容易地測試含有一或多個生殖系突變之抗體及抗原結合片段的一或多種所需特性，諸如改良之結合特異性、增加之結合親和力、改良或增強之拮抗或促效生物特性(視具體情況而定)、降低之免疫原性等。本發明內涵蓋以此一般方式獲得的抗體及抗原結合片段。

【0082】 在本發明之一些實施例中，根據本發明之抗體為人源化抗體。為改良根據本發明之人源化抗體之結合親和力，人類構架區中之一些胺基酸殘基經CDR之物種(例如嚙齒動物)中的相應胺基酸殘基置換。

【0083】 在本發明之一些實施例中，人源化抗PD-L1抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 25、27或28之胺基酸序列的重鏈可變區及含有SEQ ID NO: 26、29或30之胺基酸序列的輕鏈可變區。

【0084】 在本發明之一些實施例中，人源化抗PD-L1抗體或其抗原

結合片段包含含有SEQ ID NO: 31或35之胺基酸序列的重鏈可變區及含有SEQ ID NO: 32、33或34之胺基酸序列的輕鏈可變區。

【0085】 本發明之抗體可為單特異性、雙特異性或多特異性。多特異性抗體可對一種靶多肽之不同抗原決定基具有特異性或可含有對多於一種靶多肽具有特異性之抗原結合域。本發明之抗PD-L1抗體可連接至另一功能性分子(例如，另一肽或蛋白質)或與另一功能性分子共表現。舉例而言，抗體或其片段可與一或多個其他分子實體，諸如另一抗體或抗體片段進行功能連接(例如藉由化學偶合、基因融合、非共價締合或其他方式)，以產生具有第二結合特異性之雙特異性或多特異性抗體。舉例而言，本發明包括雙特異性抗體，其中免疫球蛋白之一個臂對PD-L1或其片段具有特異性，且免疫球蛋白之另一個臂對第二目標具有特異性或與治療劑結合。

【0086】 在本發明之一些實施例中，抗體或其抗原結合片段呈嵌合抗原受體形式。

【0087】 術語「嵌合抗原受體」或替代地「CAR」係指包含至少胞外抗原結合域、跨膜域及包含衍生自如下所定義之刺激分子之功能性傳訊域之細胞質傳訊域(在本文中亦稱為「胞內傳訊域」)的重組多肽構築體。在一些實施例中，CAR多肽構築體中的區域處於同一多肽鏈中，例如構成嵌合融合蛋白。在一些實施例中，CAR多肽構築體中各域彼此不相鄰，例如在不同多肽鏈中。

【0088】 編碼所關注之抗體之重鏈及輕鏈的基因可選殖於細胞，例如編碼單株抗體之基因可選殖於融合瘤且用於產生重組單株抗體。編碼單株抗體之重鏈及輕鏈的基因庫亦可由融合瘤或漿細胞製得。重鏈及輕鏈基因產物之隨機組合產生具有不同抗原特異性之大抗體池(參見例如Kuby,

Immunology (第3版1997))。

【0089】 用於製造抗體或抗原結合片段之方法的實例包含：(a)將編碼該抗體或抗原結合片段之一或多種聚核苷酸引入至宿主細胞中；(b)在有利於表現該一或多種聚核苷酸之條件下培養該宿主細胞；及(c)視情況自該宿主細胞及/或生長該宿主細胞之培養基中分離該抗體或抗原結合片段。

【0090】 載體可用於將編碼本發明之抗體或抗原結合片段的聚核苷酸引入宿主細胞。在一個實施例中，一種類型之載體為「質體」，其係指可與額外DNA片段連接之環形雙股DNA環。載體之另一類型為病毒載體，其中額外DNA區段可接合至病毒基因體。某些載體能夠在其被引入之宿主細胞中自主複製(例如具有細菌複製起點之細菌載體及附加型哺乳動物載體)。其他載體(例如非附加型哺乳動物載體)在引入至宿主細胞中時可整合至宿主細胞之基因體中，且藉此與宿主基因體一起複製。此外，某些載體能夠引起其以可操作方式連接的基因之表現。此類載體在本文中被稱作「重組表現載體」(或簡言之，「表現載體」)。一般而言，用於重組DNA技術中之表現載體常常呈質體形式。由於質體為載體之最常用形式，因而在本說明書中，「質體」及「載體」可互換使用。然而，本發明意欲包括發揮相等功能之該等其他形式之表現載體，諸如病毒載體(例如複製缺陷反轉錄病毒、腺病毒以及腺相關病毒)。

【0091】 在另一態樣中，本發明提供表現抗體或其抗原結合片段或含有載體之經基因工程化之細胞。該經基因工程化之細胞可為免疫細胞或幹細胞。

【0092】 本發明提供醫藥組合物，其包含本發明之抗體或其抗原結

合片段、經基因工程化之細胞或免疫細胞。本發明之醫藥組合物係用適合之稀釋劑、載劑、賦形劑及提供改良之轉移、遞送、耐受性及其類似性質之其他藥劑調配。組合物可調配用於特定用途，諸如用於獸醫學用途或人類醫藥用途。所用組合物及賦形劑、稀釋劑及/或載劑之形式將視抗體之預期用途及用於治療性用途之投與模式而定。許多適合的調配物可以發現於所有醫藥化學家已知的處方集：Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa中。此等調配物包括例如散劑、糊劑、軟膏、膠凍、蠟、油、脂質、含有脂質(陽離子或陰離子)之囊泡(諸如LIPOFECTIN.TM., Life Technologies, Carlsbad, Calif.)、DNA結合物、無水吸收糊劑、水包油及油包水乳液、乳液碳蠟(各種分子量之聚乙二醇)、半固體凝膠及含有碳蠟之半固體混合物。亦參見Powell等人「Compendium of excipients for parenteral formulations」PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311。

【0093】 向患者投與之抗體的劑量可視患者之年齡及體型、目標疾病、病狀、投藥途徑及其類似者而變化。較佳劑量典型地根據體重或體表面積計算。當本發明之抗體用於治療成年患者之與PD-L1相關之病況或疾病時，靜脈內投與本發明之抗體可為有利的。視病狀之嚴重程度而定，可調整治療之頻率及持續時間。用於投與抗體之有效劑量及時程可以憑經驗確定；舉例而言，可藉由週期性評估來監測患者進展，且相應地調整劑量。此外，可使用本領域中之熟知方法(例如Mordenti等人, 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351)進行劑量之種間比例調整。

【0094】 各種遞送系統為吾人所知且可用於投與本發明之醫藥組合物，例如囊封於脂質體中、微粒、微膠囊、能夠表現突變病毒之重組細

胞、受體介導之內飲作用(見例如Wu等人, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432)。引入方法包括(但不限於)皮內、肌肉內、腹膜內、靜脈內、皮下、鼻內、硬膜外及經口途徑。組合物可藉由任何便利的途徑投與，例如藉由輸注或推注注射、藉由經由上皮或黏膜皮膚內層(例如口腔黏膜、直腸黏膜及腸黏膜等)吸收，且可與其他生物活性劑一起投與。投藥可為全身性或局部的。

【0095】 可使用標準針及注射器經皮下或靜脈內遞送本發明之醫藥組合物。另外，關於皮下遞送，筆式遞送裝置易於在遞送本發明之醫藥組合物時應用。此類筆式遞送裝置可為可再用的或拋棄式的。可再用的筆式遞送裝置通常利用含有醫藥組合物之可替換套筒。在已投與套筒內之所有醫藥組合物且套筒為空的後，可容易地丟棄空套筒且用含有醫藥組合物之新套筒替換。隨後可再使用筆式遞送裝置。在拋棄式筆式遞送裝置中，不存在可替換套筒。實際上，拋棄式筆式遞送裝置用容納在該裝置內之儲集器中的醫藥組合物預填充。一旦清空儲集器之醫藥組合物，即棄去整個裝置。

【0096】 在某些情況中，該醫藥組合物可在控制釋放系統中遞送。在一個實施例中，可使用泵(參見Langer，見上文；Sefton 1987 CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201)。在另一實施例中，可使用聚合材料；參見《受控釋放之醫藥應用(Medical Applications of Controlled Release)》，Langer及Wise(編)，1974, CRC Pres., Boca Raton, Fla。在又另一實施例中，可將控制釋放系統置於組合物之目標附近，因此僅需要全身性劑量之一部分(參見例如Goodson, 1984, Medical Applications of Controlled Release中,見上文,第2卷,第115-138頁)。其他受控釋放系統論

述於Langer, 1990, Science 249:1527-1533之綜述中。

【0097】 可注射製劑可包括用於靜脈內、皮下、皮內及肌肉內注射、點滴等之劑型。此等可注射製劑可藉由公開已知之方法製備。舉例而言，可注射製劑可例如藉由在習知用於注射之無菌水性介質或油性介質中溶解、懸浮或乳化上文所描述之抗體或其鹽來製備。作為注射用水性介質，存在例如生理鹽水、含有葡萄糖及其他助劑之等滲溶液等，其可與適當增溶劑，諸如醇(例如乙醇)、多元醇(例如丙二醇、聚乙二醇)、非離子界面活性劑[例如聚山梨醇酯80、HCO-50（氫化蓖麻油之聚氧乙烯(50 mol)加合物)]等組合使用。採用例如芝麻油、大豆油等作為油性介質，其可與增溶劑(諸如苯甲酸苯甲酯、苯甲醇等)組合使用。較佳將由此製備之注射液填充於適當安瓿中。

【0098】 上文所描述之用於經口或非經腸使用之醫藥組合物宜製備成呈適於配合活性成分之劑量之單位劑量的劑型。此類呈單位劑量之劑型包括例如錠劑、丸劑、膠囊、注射劑(安瓿)、栓劑等。

【0099】 在本發明之一些實施例中，醫藥組合物用於抑制PD-L1介導之訊號。

【0100】 在本發明之一些實施例中，醫藥組合物用於治療由PD-L1介導之疾病。

【0101】 本發明提供一種偵測PD-L1表現之方法，其包含使樣品與本文所描述之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段接觸。

【0102】 本發明之抗PD-L1抗體亦可用於偵測及/或量測樣品中之表現PD-L1或PD-L1的細胞，例如出於診斷目的。舉例而言，抗PD-L1抗體或其片段可用於診斷以PD-L1之異常表現(例如，過度表現、不足表現、

缺乏表現等)為特徵之病況或疾病。PD-L1之例示性診斷分析可包含例如使獲自患者之樣品與本發明之抗PD-L1抗體接觸，其中抗PD-L1抗體經可偵測標記或報導分子標記。替代地，未標記的抗PD-L1抗體可與自身以可偵測的方式標記的二級抗體組合用於診斷應用中。可偵測標記或報導分子可為放射性同位素，諸如^{3}H、^{14}C、^{32}P、^{35}S或^{125}I；螢光或化學發光部分，諸如異硫氰酸螢光素或若丹明(rhodamine)；或酶，諸如鹼性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、辣根過氧化酶或螢光素酶。可用於偵測或量測樣品中之PD-L1的具體例示性分析包括酶聯結免疫吸附分析(ELISA)、放射免疫分析(RIA)及螢光活化細胞分選(FACS)。

【0103】 提供以下實例以幫助熟習此項技術者實施本發明。

實例

【0104】 本發明之抗體經確認經由ELISA與PD-L1具有特異性結合。簡言之，PD-L1塗佈於96孔ELISA盤(0.1 μg/孔)上。在結合抗PD-L1抗體之後，使用與辣根過氧化酶(HRP)結合之山羊抗小鼠IgG作為第二抗體，且使用3,3',5,5'-四甲基聯苯胺(TMB)作為受質以評估抗體-PD-L1結合。讀取OD405以計算活性。如表1及圖3中所示，若干小鼠融合瘤抗人類PD-L1抗體(mAbs 1G8及3C3)。所有均顯示與PD-L1之特異性及緊密結合。

表1.若干小鼠融合瘤抗人類PD-L1抗體之ELISA KD

純系	濃度 (mg/ml)	體積	內毒素 (EU/mg)	ELISA K_D	Luc報導子 EC_{50} (M)
1G8	4.66	5.0	<5	4.35×10^{-11}	6.2×10^{-10}
3C3	5.42	8.5	<5	3.56×10^{-11}	5.8×10^{-10}

【0105】 為了進一步驗證本發明之抗體在癌症治療中之效用，評估此等抗體結合癌細胞上所表現之PD-L1的能力。舉例而言，抗PD-L1抗體

與表現PD-L1之細胞的結合藉由流式細胞分析術使用HCC827細胞(肺腺癌)分析，該等細胞表現高含量PD-L1。簡言之，將HCC827細胞(PD-L1較高)與抗PD-L1抗體一起培育1小時，隨後使用流式細胞分析術進行分析。如圖4中所示，本發明之mAb 1G8及3C3皆可結合HCC827細胞，指示此等抗體可識別癌細胞表面上之PD-L1。本發明之其他抗體亦展現出類似活性。因此，本發明之抗體可用於藉由結合至癌細胞上表現之PD-L1治療癌症，且從而抑制PD-L1介導之免疫抑制或耗竭。

【0106】 儘管以上實驗測試本發明之抗體與活體外PD-L1分子之結合，但亦用分別表現於相互作用細胞上之PD-1及PD-L1測試此類結合。舉例而言，PD-1/PD-L1阻斷分析可使用任何商業套組，諸如來自Promega (Maddison, WI, USA)之套組。Promega PD-1/PD-L1阻斷生物分析為基於生物發光細胞之分析。該分析套組由兩個基因工程化之細胞株組成：PD-1效應細胞，其為由NFAT反應元件(NFAT-RE)驅動表現人類PD-1及螢光素酶報導子之Jurkat T細胞，及PD-L1 aAPC/CHO-K1細胞，其為經設計以抗原非依賴性方式活化TCR之表現人類PD-L1及經工程化之細胞表面蛋白質的CHO-K1細胞。

【0107】 當兩種細胞類型共同培養時，PD-1/PD-L1之相互作用會抑制TCR傳訊及NFAT-RE介導之發光。添加阻斷PD-1/PD-L1相互作用之本發明之抗PD-L1抗體可釋放抑制訊號，引起TCR活化及NFAT-RE介導之發光。生物發光訊號可使用Bio-Glo™螢光素酶分析系統及標準光度計，諸如來自PROMEGA® (Maddison, WI, USA)之GloMax®發現系統進行偵測及定量。

【0108】 如表2及圖5中所示，本發明之mAb 1G8及3C3皆展示阻斷

PD-1/PD-L1相互作用之特定及有效的活性。本發明之其他抗體亦展現出類似活性。此等結果確認，本發明之抗體將有效緩解由相互作用細胞上之PD-1及PD-L1相互作用介導之免疫抑制。因此，本發明之抗體應適用作因PD-1及/或PD-L1傳訊所致之免疫抑制或耗竭引起之疾病的治療劑。該等疾病包括各種癌症。

表2. PD1/PD-L1阻斷報導分析

	3C3	1G8
EC_{50}	5.821E-10	6.198E-10

【0109】 本發明之一些實施例係關於用於治療或緩解由PD-1及/或PD-L1傳訊介導之疾病之病況/症狀的方法；此類疾病可包括癌症。為展示本發明之抗體在治療癌症方面之效用，使用鼠類同基因型模型。簡言之，B-hPD-1/hPD-L1小鼠在右側前腹中皮下注射懸浮於0.1 mL PBS中之MC38-hPD-L1腫瘤細胞(5×10^5)以用於腫瘤發展。當平均腫瘤尺寸達到75 ± 25 mm^3時，攜帶腫瘤之動物隨機入選七個研究組。G1組由6隻小鼠組成。G2至G7組由8隻小鼠組成。三個組為Mu IgG (5 mg/kg)、3C3 (5 mg/kg)、1G8 (5 mg/kg)。所有測試物品以每週兩次之頻率腹膜內投與攜帶腫瘤之小鼠持續總共六次。量測腫瘤體積及體重且每週記錄兩次。研究在最後一次給藥後七天終止。在此實驗結束時，自安樂死之動物移除腫瘤，稱重且拍照。

【0110】 如表3及圖6中所示，在研究期間未發現計劃外的動物死亡或明顯的臨床徵象。所有組之體重在此研究期間逐漸增加，表明動物對測試物品之良好耐受性。在開始處理後第28天，Mu IgG (5 mg/kg)組之平均腫瘤體積為2486 ± 447 mm^3。3C3 (5 mg/kg)處理組，平均腫瘤體積為415±155 mm^3，其中TGITV為85.3%。1G8 (5 mg/kg)處理組，平均腫瘤體

積為647±216 mm^3，其中TGITV為75.8%。

表3. αPD-L1 Ab在人源化B-hPD-1/hPD-L1小鼠之皮下MC38-hPD-L1結腸癌模型處理中的有效性評估

	Mu IgG	3C3	1G8
$TGI_{28天}$(%)		85.3	75.8

【0111】 在此實驗中，3C3及1G8在所測試之劑量下展現出顯著抗腫瘤活性，且呈現不會對動物體重產生負面影響或誘發任何明顯的臨床徵象。此等結果清楚地證明，本發明之抗體將適用於治療癌症之臨床用途，諸如肺癌、乳癌、前列腺癌、結腸直腸癌等。

【0112】 小鼠單株抗體可在患者中誘導強免疫原性及抗藥物抗體。因此，小鼠單株抗體之人源化為進一步藥物開發之必需及關鍵步驟。藉由使用3C3及1G8小鼠單株抗體作為親本抗體，基於Kabat定義之mAb CDR序列描述於圖1及圖2中(SEQ ID NO: 1至SEQ ID NO: 20)。

【0113】 對於人源化mAb製備，自IMGT資料庫(國際免疫遺傳學資訊系統®)鑑別與3C3及1G8 mAb構架區具有更高同源性程度之人類生殖系VL及VH序列。同源性搜尋可用序列BLAST或類似方法進行。將小鼠mAb可變區序列用作查詢序列。此等研究分別將人類VH生殖系基因IGHV4-59*01 (SEQ ID NO: 21)及VL生殖系基因IGKV4-1*01 (SEQ ID NO: 22)、IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 23)及IGKV2-29*01 (SEQ ID NO: 24)鑑別為與小鼠mAb中之對應重鏈及輕鏈構架序列更同源的VH及VL序列。

【0114】 基於所選擇人類重鏈及輕鏈可變區同源物，抗PD-L1抗體可藉由將已知CDR序列自已知抗PD-L1抗體(例如，mAb 3C3及1G8)接枝至同源人類重鏈及輕鏈可變序列中構築。如圖7及圖8中所示，此等輕鏈及

重鏈序列對用作構築針對人類PD-L1之人源化抗體的實例。

【0115】 CDR移植至構架上產生來自不同來源之可變域(VH及VL)。此類嵌合域可能不具有最佳序列。因此，抗體之親和力可並非最佳。為提高結合親和力，可將一些胺基酸回復突變成其他物種。此等關鍵胺基酸殘基有時影響位於抗體上部核心區及界面區域之抗體結合(E. Stefan, H. Annemarie and P. Andreas Methods 34 (2004) 184-199)。在以下額外考慮因素中：(i)避免Fv b-筒狀物之大多數結構上保守的股；(ii)藉由相對較高表面可接近性(例如，大於30%)對表面再塑位點(小鼠胺基酸)進行分級；及(iii)對通常報導之構架風險位點進行分類。根據上文所描述之原理，分別在構架區上設計人源化3C3 Hu-B1 (VH)及3C3 Hu-B2 (VH)六個及八個回復突變位點(圖7及表4)。人源化1G8 Hu-B2 (VH)經設計為構架區上之七個回復突變位點(圖8及表5)。mAb 3C3之所得重鏈為HU 3C3 VH作為SEQ ID NO: 25；HU 3C3 VHB2作為SEQ ID NO: 27及HU 3C3 VHB1作為SEQ ID NO: 28。mAb 3C3之所得輕鏈為HU0 3C3 VL作為SEQ ID NO: 26；HU 3C3 VL作為SEQ ID NO: 29及HU2 3C3 VL作為SEQ ID NO: 30。mAb 1G8之所得重鏈為HU 1G8 VHB2作為SEQ ID NO: 31且HU 1G8 VH作為SEQ ID NO: 35。mAb 1G8之所得輕鏈為HU0 1G8 VL為SEQ ID NO: 32；HU 1G8 VL為SEQ ID NO: 33及HU2 1G8 VL為SEQ ID NO: 34。

表4：人源化3C3構架及回復突變位點之清單。

3C3重鏈			
名稱	構架	回復突變	回復
M	小鼠	所有小鼠	
Hu	lGH4-59*01F	16(E16Q)	1
Hu-B1		1,16,48,67,71,78	6
Hu-B2		1,16,39,47,48,67,71,78	8
3C3輕鏈			

Hu0	IGKV4-1*01	無回復突變	0
Hu	IGKV1-39*01	無回復突變	0
Hu2	IGKV2-29*01	無回復突變	0

【0116】 表4展示各種抗PD-L1 (3C3)抗體之VH區段之構架區的一級序列比對：小鼠抗PD-L1抗體(M)、人源化抗PD-L1抗體(Hu)、回復突變人源化抗PD-L1抗體(Hu-B1)、進一步改進之抗PD-L1抗體(Hu-B2)。各種抗PD-L1抗體之VL片段之構架區的一級序列比對：小鼠抗PD-L1抗體(M)、人源化抗PD-L1抗體(H)、無回復突變人源化抗PD-L1抗體(Hu0)、進一步改進之抗PD-L1抗體(Hu)及抗PD-L1抗體(Hu2)。

表5：人源化1G8構架及回復突變位點之清單。

1G8重鏈			
名稱	構架	回復突變	回復
M	小鼠	所有小鼠	
Hu	IGH4-59*01F	16(E16Q)	1
Hu-B2		1,16,39,47,67,71,78	7
1G8輕鏈			
Hu0	lGKV4-1*01	無回復突變	0
Hu	IGKV1-39*01	無回復突變	0
Hu2	IGKV2-29*01	無回復突變	0

【0117】 表5展示各種抗PD-L1 (1G8)抗體之VH區段之構架區的一級序列比對：小鼠抗PD-L1抗體(M)、人源化抗PD-L1抗體(Hu)、回復突變人源化抗PD-L1抗體、進一步改進之抗PD-L1抗體(Hu-B2)。各種抗PD-L1抗體之VL片段之構架區的一級序列比對：小鼠抗PD-L1抗體(M)、人源化抗PD-L1抗體(H)、無回復突變人源化抗PD-L1抗體(Hu0)、進一步改進之抗PD-L1抗體(Hu)及抗PD-L1抗體(Hu2)。

【0118】 為確認小鼠抗體人源化之後的親和力變化，分別藉由核苷酸合成方法直接產生人源化輕鏈及人源化重鏈之可變區。將小鼠或人源化可變區構築至人類嵌合體抗體表現載體pTCAED重鏈及pTCAED輕鏈質體中(圖9)，且引入宿主細胞中以製備表現重組抗體之細胞。使用

FreeStyle™293或Expi 293細胞(由INVITROGEN™製造)作為宿主細胞以進行表現。根據說明書手冊(由INVITROGEN™製造)，藉由聚乙烯亞胺(PEI)將載體引入至宿主細胞中，其中將約1.25微克比率之抗體表現載體引入至1 x 10^6個細胞中。

【0119】 藉由以下描述之方法製備含有人類IgG抗體之培養物上清液。使產生抗體之細胞適應Free Style™ 293表現培養基(GIBCO™)。在組織培養燒瓶中培養細胞，並且當活細胞比率達到90%時，收集培養物上清液。將收集之上清液經由10 μm及0.2 μm過濾器(由Millipore製造)過濾以移除污染物。含有抗體之培養物上清液使用蛋白質A (由MILLIPORE™製造)、PBS作為吸收緩衝液及200 mM甘胺酸緩衝液(pH 2.5)作為溶離緩衝液進行親和力純化。藉由添加50mM Tris緩衝液(pH 9.0)將溶離份調節至約pH 6.0-7.0。使用透析膜(10,000 MW截止值，由SPECTRUM™ Laboratories製造)用PBS替換所製備之抗體溶液，且經由孔徑為0.22微米之膜過濾器(由MILLIPORE™製造)過濾滅菌，以產生經純化抗體。藉由量測在280 nm下之吸光度並基於1.45最佳密度等於1 mg/ml轉化量測值，確定純化抗體之濃度。

【0120】 人源化抗體之結合活性可藉由使用小規模抗體表現之重鏈及輕鏈的所有組合有效比較。培養物上清液中之抗體的濃度藉由抗人類IgG ELISA確定。對於PD-L1 ELISA，盤用PD-L1-hFc 1 μg/ml塗佈且用5%milk-PBS阻斷。將分析抗體調節至300 ng/ml，100 μl/孔。抗PD-L1訊號藉由二級山羊抗人類κ HRP IgG 1:4000量測，且顏色經TMB受質(KPL)產生。藉由拜耳雷德ELISA讀取器在OD450-655nm下量測光吸收值。

【0121】 3C3人源化抗體HuHu0、HuHu及HuHu2對於PDL1之結合

訊號低得多(為了比較，mAb 3C3、HuB2Hu0、HuB2Hu及HuB2Hu2在結合ELISA中）（表6）。然而，3C3-HuB2Hu0、3C3-HuB2Hu及3C3-HuB2Hu2展現出與親本小鼠純系之更類似的結合訊號。與3C3 Hu (VH)之序列相比，3C3 HuB2 (VH)中之彼等在重鏈構架區中含有八種有益突變(圖7)。發現此等胺基酸已自3C3 Hu (VH)中之殘基突變回至小鼠mAb中之對應殘基(亦即，回復突變)。此等胺基酸全部在重鏈可變序列中，如圖7中所示。回復突變產生較佳結合子之事實表明，構架區中之此等殘基間接有助於結合於PDL1。其可能有助於維持CDR區中之適當構形。

表6：人源化3C3表現量及PD-L1結合測試形式D6培養之自由式293細胞培養物.

表現μg/ml

		輕鏈			
重鏈		M	Hu0	Hu	Hu2
	M	2.80	4.99	1.65	3.66
	Hu	2.46	8.61	1.02	2.31
	Hu-B1	6.16	15.31	9.21	16.68
	Hu-B2	4.90	12.36	4.52	6.73
300 ng/ml PDL1結合					
OD450-650 nM		輕鏈			
重鏈		M	Hu0	Hu	Hu2
	M	1.524	1.577	1.851	1.548
	Hu	0.25	0.15	0.148	0.081
	Hu-B1	0.61	0.539	0.455	0.349
	Hu-B2	1.204	1.128	1.352	1.053

【0122】 表6描繪使用嵌合體PD-L1及人類PD-L1 mAb 3C3抗體以確定PD-L1 mAb之結合親和力的結果。嵌合體抗體表現、純化及Kd分析之詳細程序如本發明中所描述進行。

【0123】 用PDL1-hFc 1ug/ml塗佈ELISA盤且用5%milk-PBS阻斷，隨後添加分析抗體形式45 nM至2.7 x 10^{-3} nM稀釋液(4×倍稀釋)。將藉由添加山羊抗人類KAPPA HRP IgG 1:4000及結合曲線量測分析，且KD藉

由GraphPad Prism軟體使用針對非線性擬合方法之一個位點特異性結合確定。

【0124】 3C3人源化抗體HuB2Hu0、HuB2Hu及HuB2Hu2之結合親和力分別為1.08 x 10^{-10} M、9.36 x 10^{-11} M及1.01 x 10^{-10} M。此等三種人源化抗體皆展示比親本小鼠純系3C3之親和力損失少2倍(圖10)。1G8人源化抗體HuHu0、HuHu及HuHu2之結合親和力比小鼠純系1G8低得多，分別為3.99 x 10^{-9} M、3.24 x 10^{-9} M及9.68 x 10^{-9} M。然而，1G8人源化抗體HuB2Hu0、HuB2Hu及HuB2Hu2之結合親和力分別為2.38 x 10^{-10} M、2.48 x 10^{-10} M及1.08 x 10^{-10} M。此等人源化1G8變異體展示與親本小鼠純系1G8類似之親和力(圖11)。與1G8 Hu (VH)之序列相比，1G8 HuB2 (VH)中之彼等在重鏈構架區中含有七種有益突變(圖8)。回復突變產生較佳結合子之事實表明，構架區中之此等殘基間接有助於結合於PDL1。

【0125】 如表7及圖12中所示，3C3人源化抗體HuB2Hu0、HuB2Hu及HuB2Hu2之mAb皆展示阻斷PD-1/PD-L1相互作用之特定及有效的活性。本發明之其他抗體亦展現出類似活性。此等結果確認，本發明之抗體將有效緩解由相互作用細胞上之PD-1及PD-L1相互作用介導之免疫抑制。因此，本發明之抗體應適用作因PD-1及/或PD-L1傳訊所致之免疫抑制或耗竭引起之疾病的治療劑。該等疾病包括各種癌症。

表7. 3C3人源化抗體阻斷報導分析

	αPD-L1 3C3_B2Hu0	αPD-L1 3C3_B2Hu	αPD-L1 3C3_B2Hu2
EC_{50}	4.77E-10	4.41E-10	4.09E-10

【0126】 如表8及圖13中所示，在研究期間未發現計劃外的動物死亡或明顯的臨床徵象。所有組之體重在此研究期間逐漸增加，表明動物對測試物品之良好耐受性。在此實驗結束時，IgG組之平均腫瘤體積為2537

± 300 mm^3。分別在阿特珠單抗(Atz)、αPD-L1 3C3 B2Hu0、αPD-L1 3C3 B2Hu組，Atz組，平均腫瘤體積為1926±436 mm3，其中TGITV為24.9%，在αPD-L1 3C3 B2Hu2組，平均腫瘤體積為999 ± 202 mm^3，其中TGITV為62.7%，2035 ± 191 mm^3，其中TGITV為20.5%，1900±344 mm3，其中TGITV為26.0%。在此實驗中，αPD-L1 3C3 B2Hu0在5 mg/kg之含量下展現出顯著抗腫瘤活性，且未對動物體重產生負面影響或誘發任何明顯臨床症狀。

	Hu IgG	Atz	αPD-L1 3C3_B2Hu0	αPD-L1 3C3_B2Hu	αPD-L1 3C3_B2Hu2
$TGI_{28天}$(%)		24.9	62.7	20.5	26.0

表8.在皮下處理中αPD-L1 Ab之有效性評估

【0127】 雖然本發明之實施例已用有限數目之實例加以說明，但熟習此項技術者應瞭解，其他修改及變化係可能的。因此，本發明之保護範疇應僅受所附申請專利範圍限制。

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing  dtdVersion="V1_3" fileName="C261009SEQA.xml"
softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.3.0" productionDate="2024-05-
23">
 <ApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>112146458</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2023-11-30</FilingDate>
 </ApplicationIdentification>
 <ApplicantFileReference>D07585/261009</ApplicantFileReference>
 <EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>US</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>63/428,802</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2022-11-30</FilingDate>
 </EarliestPriorityApplicationIdentification>
 <ApplicantName languageCode="zh">財團法人生物技術開發中心</ApplicantName>
 <ApplicantNameLatin>DEVELOPMENT CENTER FOR BIOTECHNOLOGY</ApplicantNameLatin>
 <InventorName languageCode="zh">葉舒平</InventorName>
 <InventorNameLatin>YEH, SHU-PING</InventorNameLatin>
 <InventionTitle languageCode="zh">抗人類PD-L1抗體及其用途</InventionTitle>
 <SequenceTotalQuantity>35</SequenceTotalQuantity>
 <SequenceData sequenceIDNumber="1">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>118</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..118</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q9">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQESGPGLAKPSQTLSLTCSVTGYSITSDYWNWIRKFPGNKLEFMGYISYTGSTYYNPS
LKSRISITRDTSKNQYYLQLNSVTTEDTATYYCARRGEWLSPFAYWGQGTLVTVSA</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="2">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q10">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>GYSITSDYWN</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="3">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
```

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q11">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>YISYTGSTYYNPSLKS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q12">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
```

```
    <INSDSeq_sequence>RGEWLSPFAY</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="5">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>118</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..118</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q13">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLQESGPGLTKPSQTLSLTCSVTGYSITSDYWDWIRKFPGNKLEYMGYISYTGSTYYNPS
LRSRISITRDTSKNQYYLQLSSVTSEDSATYYCARRGGWLSPFVYWGQGTLVTVSA</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="6">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q14">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GYSITSDYWD</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q15">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>YISYTGSTYYNPSLRS</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="8">
 <INSDSeq>
```

```
  <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q17">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>RGGWLSPFVY</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="9">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>113</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..113</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q19">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVMSQSPSSLGVSVGEKITMSCKSSQSLLYSSNQKNSLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKSEDLAVYYCQQYYTYPFTFGAGTNLELK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="10">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q21">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>KSSQSLLYSSNQKNSLA</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="11">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
```

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q23">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>WASTRES</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="12">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q25">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>QQYYTYPFT</INSDSeq_sequence>
```

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="13">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>113</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..113</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q27">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DTVMSQSPSSLGVSVGERVTLTCKSRQSLLFSSNQKNSLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKSEDLAVYYCQQYYTYPFTFGAGTSLELK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="14">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q29">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>KSRQSLLFSSNQKNSLA</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="15">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q31">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>WASTRES</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="16">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
```

```
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q33">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QQYYTYPFT</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="17">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>354</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..354</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q36">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>caggtgcagcttcaggagtcaggacctggcctggcaaaaccttctcagactctgtccctcac
ctgttctgtcactggctactccatcaccagtgattactggaactggatccggaaattcccagggaataaacttgaattca
tgggatatataagctacactggtagcacttactacaatccatctctcaaaagtcgaatctccatcactcgagacacatcc
aagaaccagtattacctgcagttgaattctgtgactactgaggacacagccacatattactgtgccagaagaggggaatg
gttatccccgtttgcttactggggccaagggactctggtcactgtctctgca</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="18">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>354</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..354</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q38">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gaggtgcagcttcaggagtcaggacctggcctgacaaaaccttctcagactctgtccctcac
ctgttctgtcactggctactccatcaccagtgattactgggactggatccggaaattcccagggaataaacttgaataca
tgggatatataagctacactggtagcacttactacaatccatctctcagaagtcgaatctccatcactcgagacacatcc
aagaaccagtattacctgcagttgagttctgtgacttctgaggactcagccacatattactgtgccagaagaggggatg
gttatccccgtttgtttactggggccaagggactctggtcactgtctctgca</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="19">
```

```
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>339</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..339</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q40">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gacattgtgatgtcacagtctccatcctccctaggtgtgtcagttggagagaagattactat
gagctgcaagtccagtcagagccttttatatagtagcaatcaaaagaactccttggcctggtaccagcagaaaccagggc
agtctcctaaactgctgatttactgggcgtccactagggaatctggggtccctgatcgcttcacaggcagtggatctggg
acagatttcactctcaccatcagcagtgtgaagtctgaagacctggcagtttattactgtcagcaatattatacctatcc
tttcacgttcggtgctgggaccaatctggagctgaaa</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="20">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>339</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..339</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q42">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gacactgtgatgtcacagtctccatcctccctaggtgtgtcagttggagagagggttacttt
gacctgcaagtcccgtcagagccttttatttagtagcaatcaaaaaaactccttggcctggtaccagcagaaaccagggc
agtctcctaaactgctgatttactgggcgtccactagggaatctggggtccctgatcgcttcacaggcagtggatctggg
acagatttcactctcaccatcagcagtgtgaagtctgaagacctggcagtttattactgtcagcaatattatacctatcc
tttcacgttcggtgctgggaccagtctggagctgaaa</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="21">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>108</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..108</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q44">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPS
LKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
```

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="22">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>111</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..111</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q46">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES
GVPDRFSGSGSCTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPFGQGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="23">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>105</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..105</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q48">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYDNLPFGQGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="24">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>112</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..112</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q50">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLYWYLQKPGQSPQLLIYEVSSRFSG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQYSGYPLTFGQGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="25">
```

```
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>118</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..118</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q52">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITSDYWDWIRQPPGKGLEWIGYISYTGSTYYNPS
LRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARRGGWLSPFVYWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="26">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>113</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..113</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q54">
```

```
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSRQSLLFSSNQKNSLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYTYPFTFGQGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="27">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>118</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..118</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q56">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITSDYWDWIRKPPGKGLEYMGYISYTGSTYYNPS
LRSRITISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYCARRGGWLSPFVYWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="28">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>118</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..118</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q58">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITSDYWDWIRQPPGKGLEWMGYISYTGSTYYNPS
LRSRITISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYCARRGGWLSPFVYWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="29">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>113</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..113</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q60">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSRQSLLFSSNQKNSLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRES
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPFTFGQGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="30">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>113</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..113</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q62">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSRQSLLFSSNQKNSLAWYLQKPGQSPQLLIYWASTRES
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQYYTYPFTFGQGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="31">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>118</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
```

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..118</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q64">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITSDYWNWIRKPPGKGLEYMGYISYTGSTYYNPS
LKSRITISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYCARRGEWLSPFAYWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="32">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>113</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..113</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q66">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
```

<INSDSeq_sequence>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNSLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYTYPFTFGQGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="33">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>113</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..113</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q68">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYSSNQKNSLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRES
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPFTFGQGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="34">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>113</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..113</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q70">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSSNQKNSLAWYLQKPGQSPQLLIYWASTRES
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQYYTYPFTFGQGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="35">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>118</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..118</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q76">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITSDYWNWIRQPPGKGLEWIGYISYTGSTYYNPS
LKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARRGEWLSPFAYWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
```

</SequenceData>
</ST26SequenceListing>

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種抗PD-L1抗體或其抗原結合片段，其包含重鏈可變區之互補決定區(CDR)及輕鏈可變區之互補決定區，其中

該重鏈可變區，其包含具有SEQ ID NO: 6之序列的HCDR1、具有SEQ ID NO: 7之序列的HCDR2及具有SEQ ID NO: 8之序列的HCDR3，及該輕鏈可變區，其包含具有SEQ ID NO: 14之序列的LCDR1、具有SEQ ID NO: 15之序列的LCDR2及具有SEQ ID NO: 16之序列的LCDR3。

【請求項2】

如請求項1之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段，其中該抗體為嵌合、人源化、複合或人類抗體。

【請求項3】

如請求項1之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段，其中

該重鏈可變區包含SEQ ID NO: 5、25、27或28之序列或與SEQ ID NO: 5、25、27或28之序列具有至少約95%同源性的序列；及/或

該輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 13、26、29或30之序列或與SEQ ID NO: 13、26、29或30之序列具有至少約95%同源性的序列。

【請求項4】

如請求項1之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段，其中

該重鏈可變區包含SEQ ID NO: 5之序列或與該序列具有至少約95%同源性之序列，且該輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 13之序列或與該序列具有至少約95%同源性之序列；或

該重鏈可變區包含SEQ ID NO: 25、27或28之序列或與該等序列具有

至少約95%同源性之序列，且該輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 26、29或30之序列或與該等序列具有至少約95%同源性之序列。

【請求項5】

如請求項1之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段，其與治療劑結合。

【請求項6】

如請求項1之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段，其共價連接至治療劑。

【請求項7】

如請求項1之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段，其連接至第二目標之第二特異性結合域。

【請求項8】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其係在細胞之表面上表現。

【請求項9】

如請求項8之抗體或其抗原結合片段，其中該細胞係免疫細胞。

【請求項10】

如請求項8之抗體或其抗原結合片段，其中該細胞為T細胞。

【請求項11】

一種載體，其編碼如請求項1之抗體或其抗原結合片段。

【請求項12】

如請求項11之載體，其包含SEQ ID NO: 5、25、27或28之序列或與SEQ ID NO: 5、25、27或28之序列具有至少約95%同源性的序列；及/或該輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 13、26、29或30之序列或與SEQ ID NO: 13、26、29或30之序列具有至少約95%同源性的序列。

【請求項13】

一種經基因工程化之細胞，其表現如請求項1之抗體或其抗原結合片段。

【請求項14】

一種經基因工程化之細胞，其含有如請求項11之載體。

【請求項15】

如請求項14之經基因工程化之細胞，其為免疫細胞。

【請求項16】

如請求項14之經基因工程化之細胞，其為T細胞。

【請求項17】

一種用於製備如請求項1至10中任一項之抗體或其抗原結合片段之方法，其包含：(a)將編碼該抗體或抗原結合片段之一或多種聚核苷酸引入至宿主細胞中；(b)在有利於表現該一或多種聚核苷酸之條件下培養該宿主細胞；及(c)視情況自該宿主細胞及/或生長該宿主細胞之培養基中分離該抗體或抗原結合片段。

【請求項18】

一種醫藥組合物之用途，其係用以製備用於抑制有需要之個體之PD-L1介導之訊號的藥物，其中該醫藥組合物包含如請求項1至10中任一項之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段，或如請求項14之經基因工程化之細胞及醫藥學上可接受之載劑。

【請求項19】

一種醫藥組合物之用途，其係用以製備用於治療有需要之個體之PD-L1介導之疾病的藥物，其中該醫藥組合物包含如請求項1至10中任一項之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段，或如請求項14之經基因工程化之細胞及

醫藥學上可接受之載劑。

【請求項20】

如請求項19之用途，其中該疾病為癌症。

【請求項21】

如請求項19之用途，其中該疾病為肺癌、乳癌、前列腺癌、結腸直腸癌、胃癌、肝細胞癌、腎細胞癌、睪丸癌、黑素瘤、白血病或乳頭狀甲狀腺癌。

【請求項22】

一種用於偵測PD-L1之表現的方法，其包含使樣品與如請求項1至10中任一項之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段接觸。

抗PD-L1 1G8 (蛋白質：SEQ ID NO: 1；核苷酸：SEQ ID NO: 17)
重鏈序列

cag gtg cag ctt cag gag tca gga cct ggc ctg gca aaa cct tct cag act ctg tcc ctc
Q V Q L Q E S G P G L A K P S Q T L S L
acc tgt tct gtc act ggc tac tcc atc acc agt gat tac tgg aac tgg atc cgg aaa ttc
T C S V T G Y S I T S D Y W N W I R K F

(SEQ ID NO: 2) HCDR1

cca ggg aat aaa ctt gaa ttc atg gga tat ata agc tac act ggt agc act tac tac aat
P G N K L E F M G Y I S Y T G S T Y Y N

(SEQ ID NO: 3) HCDR2

cca tct ctc aaa agt cga atc tcc atc act cga gac aca tcc aag aac cag tat tac ctg
P S L K S R I S I T R D T S K N Q Y Y L
cag ttg aat tct gtg act act gag gac aca gcc aca tat tac tgt gcc aga aga ggg gaa
Q L N S V T T E D T A T Y Y C A R R G E
tgg tta tcc ccg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca
W L S P F A Y W G Q G T L V T V S A

(SEQ ID NO: 4) HCDR3

【圖1A】

抗PD-L1 3C3 (蛋白質：SEQ ID NO: 5；核苷酸：SEQ ID NO: 18)
重鏈序列

gag gtg cag ctt cag gag tca gga cct ggc ctg aca aaa cct tct cag act ctg tcc ctc
E V Q L Q E S G P G L T K P S Q T L S L
acc tgt tct gtc act ggc tac tcc atc acc agt gat tac tgg gac tgg atc cgg aaa ttc
T C S V T G Y S I T S D Y W D W I R K F

(SEQ ID NO: 6) HCDR1

cca ggg aat aaa ctt gaa tac atg gga tat ata agc tac act ggt agc act tac tac aat
P G N K L E Y M G Y I S Y T G S T Y Y N

(SEQ ID NO: 7) HCDR2

cca tct ctc aga agt cga atc tcc atc act cga gac aca tcc aag aac cag tat tac ctg
P S L R S R I S I T R D T S K N Q Y Y L
cag ttg agt tct gtg act tct gag gac tca gcc aca tat tac tgt gcc aga aga ggg gga
Q L S S V T S E D S A T Y Y C A R R G G
tgg tta tcc ccg ttt gtt tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca
W L S P F V Y W G Q G T L V T V S A

(SEQ ID NO: 8) HCDR3

【圖1B】

抗PD-L1 1G8 (蛋白質：SEQ ID NO: 9；核苷酸：SEQ ID NO: 19)
輕鏈序列

gac att gtg atg tca cag tct cca tcc tcc cta ggt gtg tca gtt gga gag aag att act
D I V M S Q S P S S L G V S V G E K I T
atg agc tgc aag tcc agt cag agc ctt tta tat agt agc aat caa aag aac tcc ttg gcc
M S C K S S Q S L L Y S S N Q K N S L A
(SEQ ID NO:10) LCDR1
tgg tac cag cag aaa cca ggg cag tct cct aaa ctg ctg att tac tgg gcg tcc act agg
W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R
(SEQ ID NO:11) LCDR2
gaa tct ggg gtc cct gat cgc ttc aca ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc
E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T
atc agc agt gtg aag tct gaa gac ctg gca gtt tat tac tgt cag caa tat tat acc tat
I S S V K S E D L A V Y Y C Q Q Y Y T Y
(SEQ ID NO:12) LCDR3
cct ttc acg ttc ggt gct ggg acc aat ctg gag ctg aaa
P F T F G A G T N L E L K

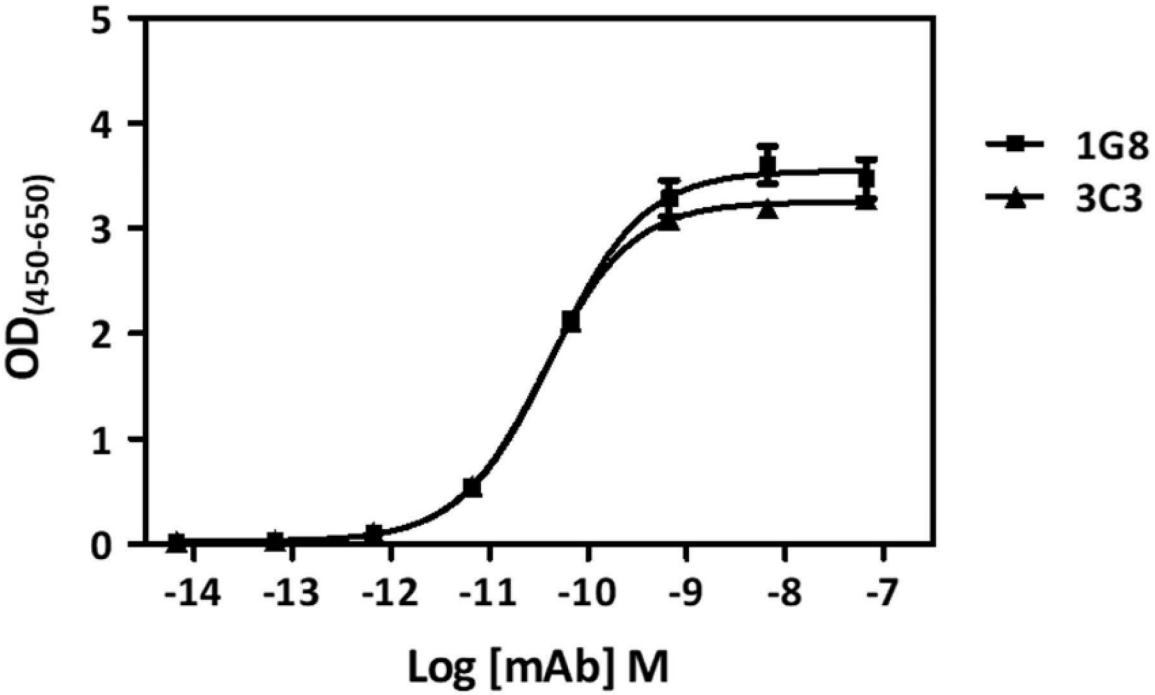
【圖2A】

抗PD-L1 3C3 (蛋白質：SEQ ID NO: 13；核苷酸：SEQ ID NO: 20)
輕鏈序列

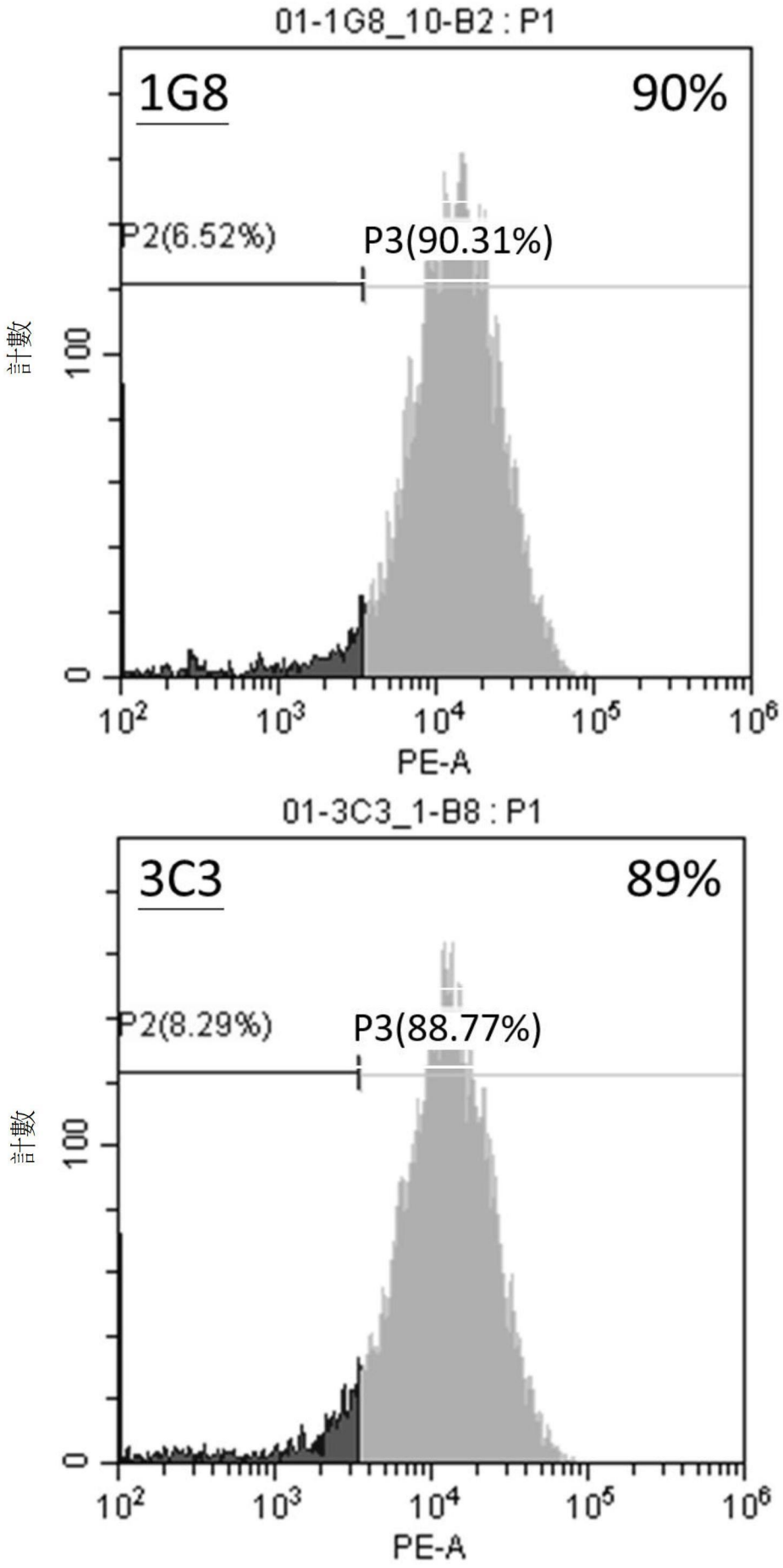
```
gac act gtg atg tca cag tct cca tcc tcc cta ggt gtg tca gtt gga gag agg gtt act
 D   T   V   M   S   Q   S   P   S   S   L   G   V   S   V   G   E   R   V   T
ttg acc tgc aag tcc cgt cag agc ctt tta ttt agt agc aat caa aaa aac tcc ttg gcc
 L   T   C   K   S   R   Q   S   L   L   F   S   S   N   Q   K   N   S   L   A
                 (SEQ ID NO: 14) LCDR1
tgg tac cag cag aaa cca ggg cag tct cct aaa ctg ctg att tac tgg gcg tcc act agg
 W   Y   Q   Q   K   P   G   Q   S   P   K   L   L   I   Y   W   A   S   T   R
                                                             (SEQ ID NO: 15) LCDR2
gaa tct ggg gtc cct gat cgc ttc aca ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc
 E   S   G   V   P   D   R   F   T   G   S   G   S   G   T   D   F   T   L   T
atc agc agt gtg aag tct gaa gac ctg gca gtt tat tac tgt cag caa tat tat acc tat
 I   S   S   V   K   S   E   D   L   A   V   Y   Y   C   Q   Q   Y   Y   T   Y
                                                 (SEQ ID NO: 16) LCDR3
cct ttc acg ttc ggt gct ggg acc agt ctg gag ctg aaa
 P   F   T   F   G   A   G   T   S   L   E   L   K
```

【圖2B】

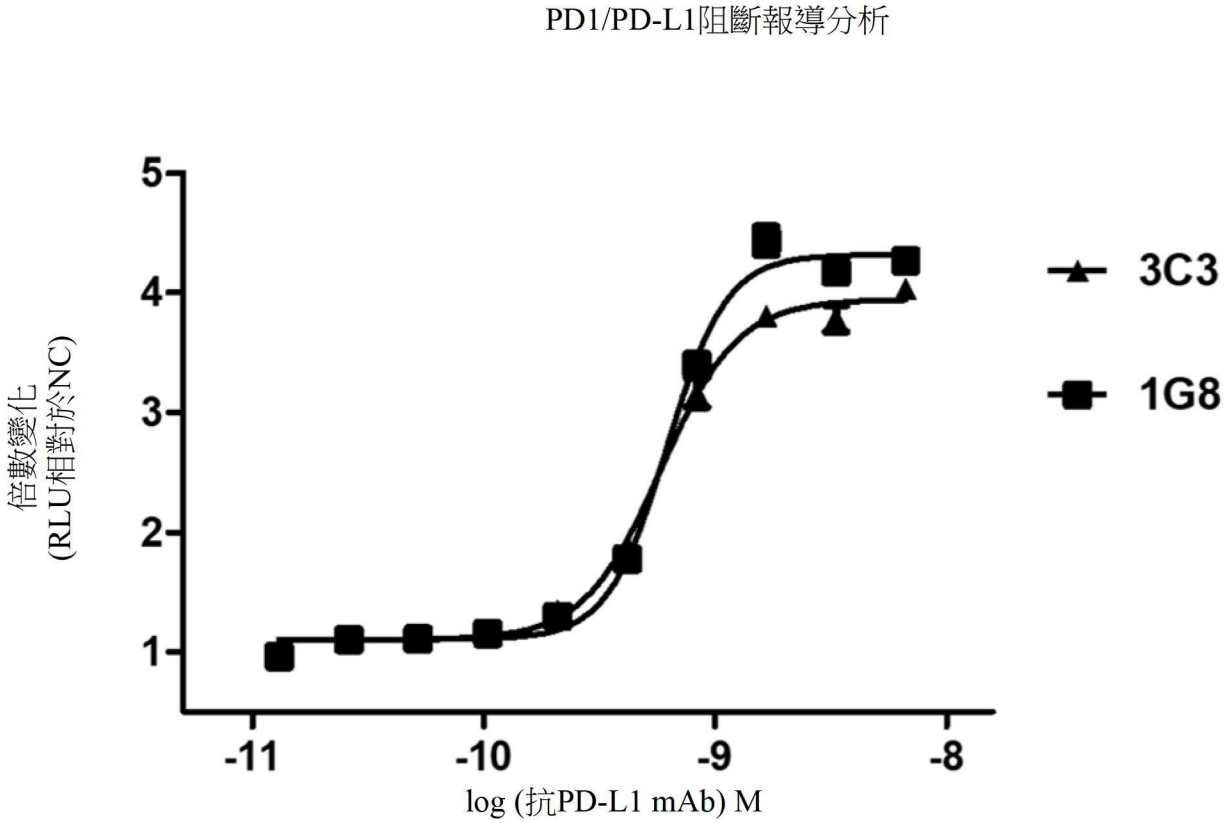
融合瘤α -人類PD-L1
與PD-L1 Fc之結合親和力



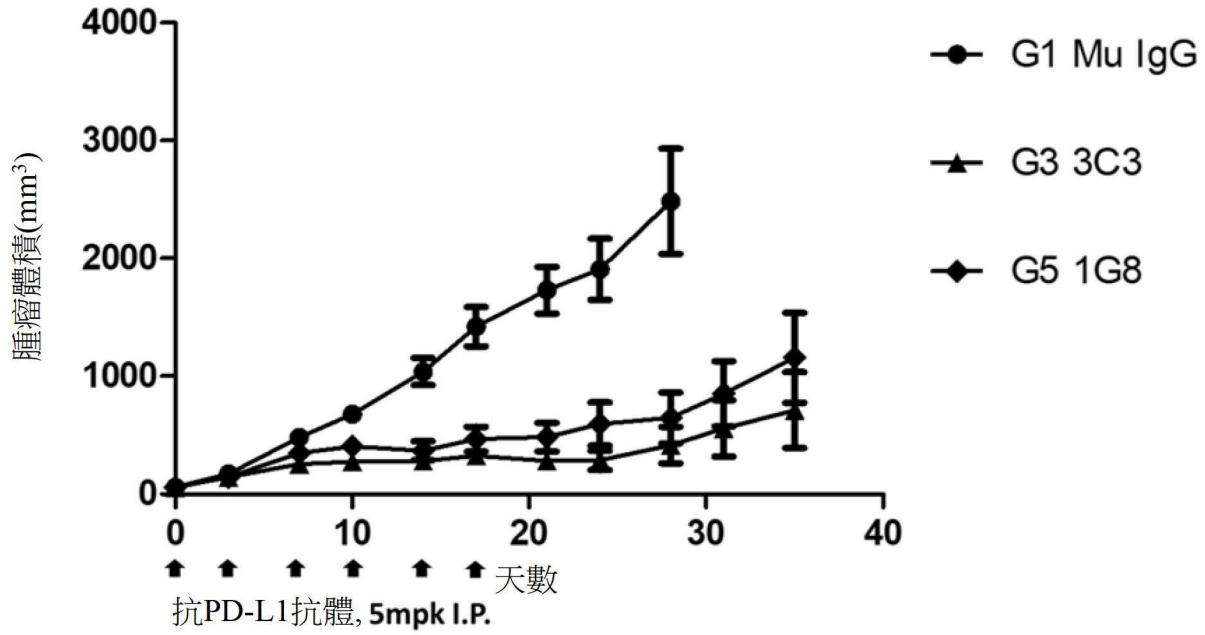
【圖3】


01-1G8_10-B2 : P1
1G8
90%
P2(6.52%)
P3(90.31%)
計數
100
0
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
PE-A
01-3C3_1-B8 : P1
3C3
89%
P2(8.29%)
P3(88.77%)
計數
100
0
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
PE-A

【圖4】


PD1/PD-L1阻斷報導分析
倍數變化
(RLU相對於NC)
5
4
3
2
1
-11
-10
-9
-8
log (抗PD-L1 mAb) M
3C3
1G8

【圖5】


腫瘤體積(mm³)
4000
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
40
天數
抗PD-L1抗體, 5mpk I.P.
G1 Mu IgG
G3 3C3
G5 1G8

【圖6】

1121146458 C261009DA.pdf 表單編號 A0202 第8頁，共16頁(發明圖式) 1133134680-0

抗PDL1 (3C3)人源化設計

| | | |

	FR1	CDR1	FR2	CDR2
Kabat 編號	1 23	35	49	57
小鼠 **3C3 VL (SEQ ID NO: 13)**	DTVMSQSPSSLGVSVGERVTLTC	KSRQSLLFSSNQKNSLA	WYQQKPGQSPKLLIY	WASTRES
IGKV4-1*01 (SEQ ID NO: 22)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	KSSQSVLYSSNNKNYLA	WYQQKPGQPPKLLIY	WASTRES
HU0 3C3 VL (SEQ ID NO: 26)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	KSRQSLLFSSNQKNSLA	WYQQKPGQPPKLLIY	WASTRES

	FR3	CDR3	FR4
Kabat 編號	88	98	
小鼠 **3C3 VL (SEQ ID NO: 13)**	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKSEDLAVYYC	QQYYTYPFT	FGAGTSLELK
IGKV4-1*01 (SEQ ID NO: 22)	GVPDRFSGSGSCTDFTLTISSLQAEDVAVYYC	QQYYSTP	FGQGTKLEIK
HU0 3C3 VL (SEQ ID NO: 26)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC	QQYYTYPFT	FGQGTKLEIK

【圖7】(續)

抗PDL1 (1G8)人源化設計

	FR1	CDR1	FR2	CDR2
Kabat 編號	1 22		36 49	
小鼠 **1G8 VH** **(SEQ ID NO: 1)**	QVQLQESGPGLAKPSQTLSLTCSVT	GYSITSDYWN	WIRKFPGNKLEFMG	YISYTGSTYYNPSLKS
IGHV4-59*01 (SEQ ID NO: 21)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS	GGSISSYYWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYYSGSTNYNPSLKS
HU 1G8 VH (SEQ ID NO: 35)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS	GYSITSDYWN	WIRQPPGKGLEWIG	YISYTGSTYYNPSLKS
HU 1G8 VHB2 (SEQ ID NO: 31)	EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS	GYSITSDYWN	WIRKPPGKGLEYMG	YISYTGSTYYNPSLKS

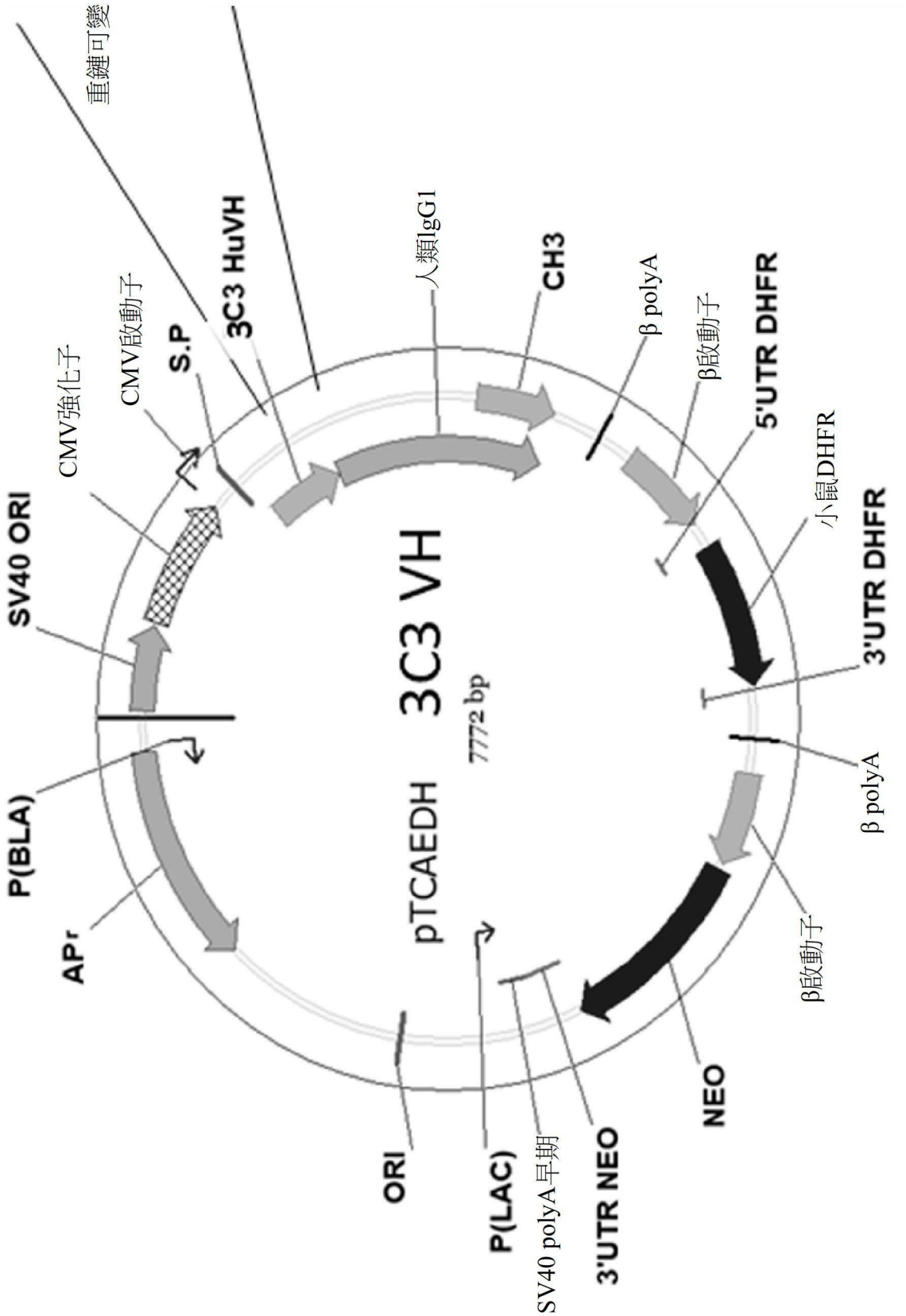
	FR3	CDR3	FR4
Kabat 編號	66 92	103	
小鼠 **1G8 VH** **(SEQ ID NO: 1)**	RISITRDTSKNQYYLQLNSVTTEDTATYYCAR	RGEWLSPFAY	WGQGTLVTVSA
IGHV4-59*01 (SEQ ID NO: 21)	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR		WGQGTLVTVSS
HU 1G8 VH (SEQ ID NO: 35)	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	RGEWLSPFAY	WGQGTLVTVSS
HU 1G8 VHB2 (SEQ ID NO: 31)	RITISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYCAR	RGEWLSPFAY	WGQGTLVTVSS

【圖8】

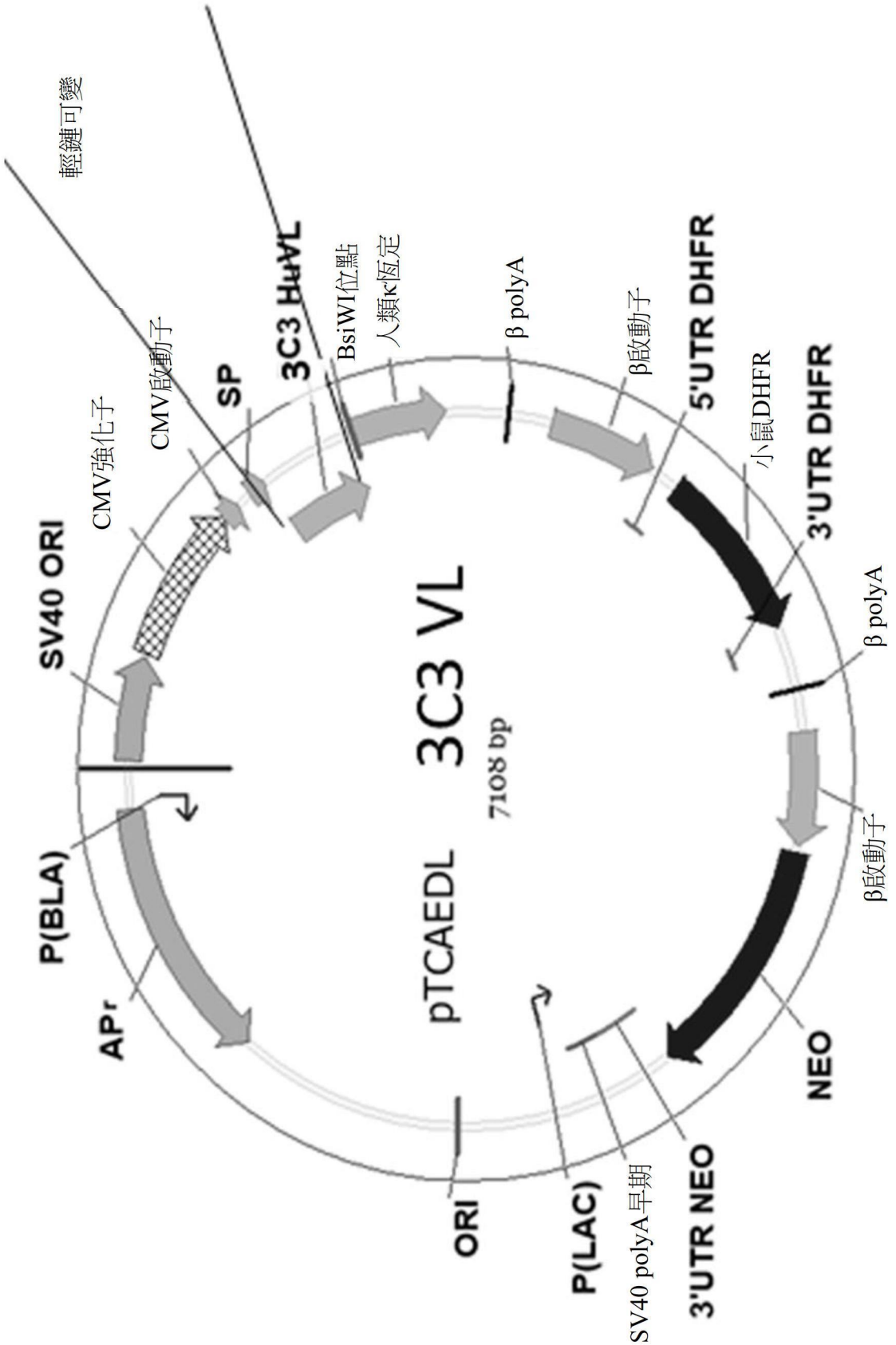
```
                          FR1                      CDR1                FR2          CDR2
Kabat 編號          1                      23            35                49        57
 小鼠  1G8 VL       DIVMSQSPSSLGVSVGEKITMSC KSSQSLLYSSNQKNSLA WYQQKPGQSPKLLIY WASTRES
(SEQ ID NO: 9)
IGKV4-1*01         DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSVLYSSNNKNYLA WYQQKPGQPPKLLIY WASTRES
(SEQ ID NO: 22)
IGKV1-39*01        DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC QASQDISNYLN       WYQQKPGKAPKLLIY DASNLET
(SEQ ID NO: 23)
IGKV2-29*02        DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC KSSQSLLHSDGKTYLY  WYLQKPGQSPQLLIY EVSSRFS
(SEQ ID NO: 24)
HU0 1G8 VL         DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSLLYSSNQKNSLA WYQQKPGQPPKLLIY WASTRES
(SEQ ID NO: 32)
HU 1G8 VL          DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC KSSQSLLYSSNQKNSLA WYQQKPGKAPKLLIY WASTRES
(SEQ ID NO: 33)
HU2 1G8 VL         DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC KSSQSLLYSSNQKNSLA WYLQKPGQSPQLLIY
(SEQ ID NO: 34)WASTRES

                                FR3                        CDR3        FR4
Kabat 編號                                    88          98
 小鼠  1G8 VL       GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKSEDLAVYYC QQYYTYPFT FGAGTNLELK
(SEQ ID NO: 13)
IGKV4-1*01         GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QQYYSTP   FGQGTKLEIK
(SEQ ID NO: 22)
IGKV1-39*01        GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQYDNLP   FGQGTKLEIK
(SEQ ID NO: 23)
IGKV2-29*02        GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC QQYSGYPLT FGQGTKLEIK
(SEQ ID NO: 24)
HU0 1G8 VL         GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QQYYTYPFT FGQGTKLEIK
(SEQ ID NO: 32)
HU 1G8 VL          GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQYYTYPFT FGQGTKLEIK
(SEQ ID NO: 33)
HU2 1G8 VL         GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC QQYYTYPFT FGQGTKLEIK
(SEQ ID NO: 34)
```

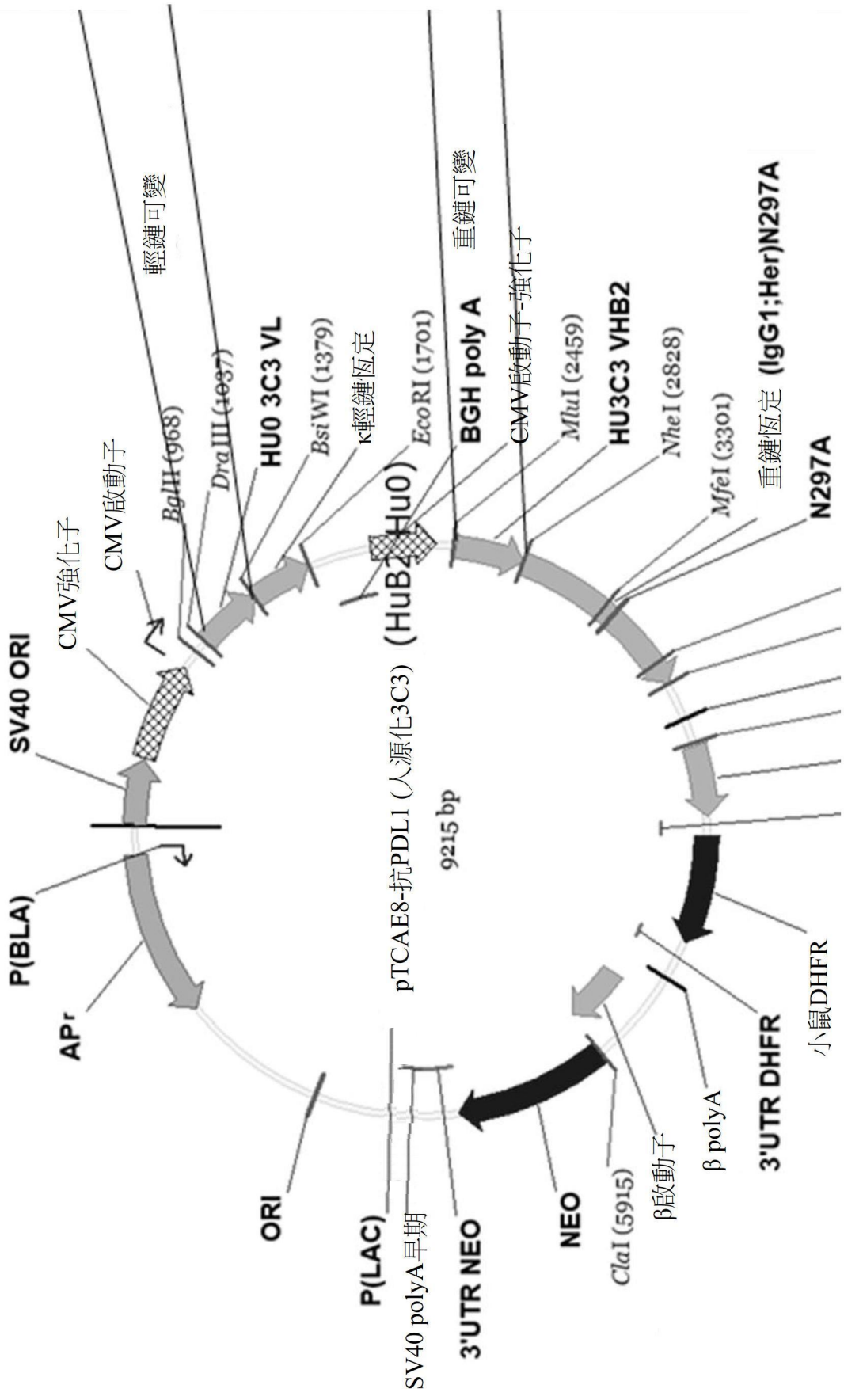
【圖8】(續)


重鏈可變
3C3 HuVH
S.P
CMV啟動子
CMV強化子
SV40 ORI
P(BLA)
APr
ORI
P(LAC)
SV40 polyA早期
3'UTR NEO
NEO
β啟動子
β polyA
3'UTR DHFR
小鼠DHFR
5'UTR DHFR
β啟動子
β polyA
CH3
人類IgG1
pTCAEDH
3C3 VH
7772 bp

【圖9】

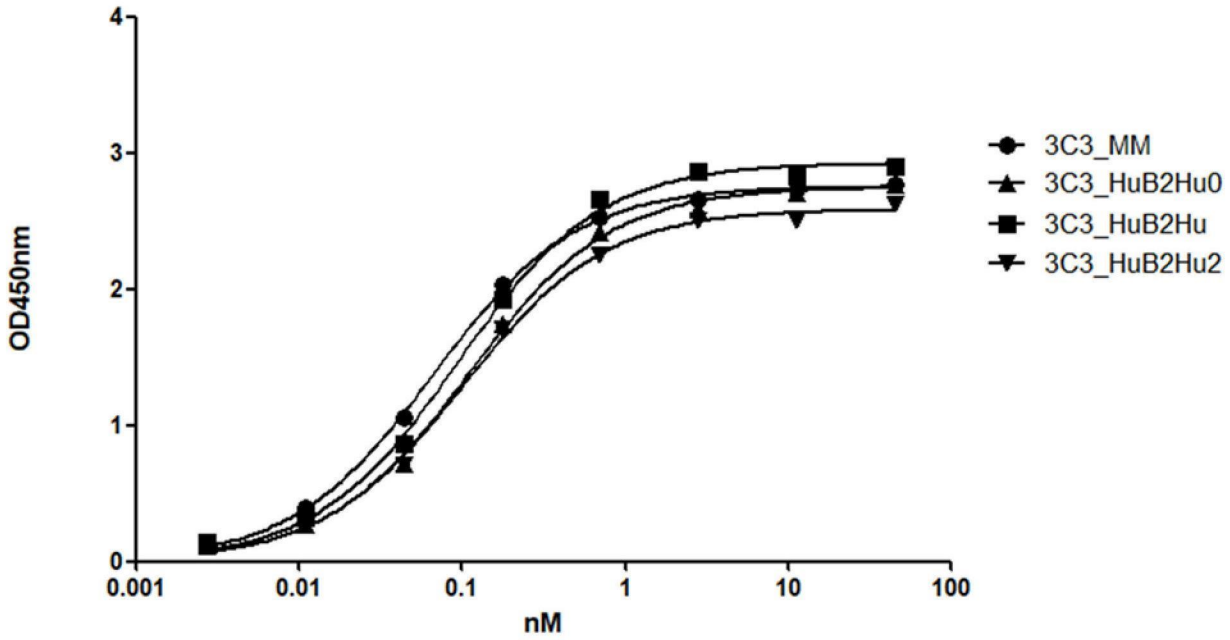

pTCAEDL
3C3 VL
7108 bp
SV40 ORI
CMV強化子
CMV啟動子
SP
3C3 HuVL
BsiWI位點
人類κ恆定
β polyA
βpolyA
5'UTR DHFR
小鼠DHFR
3'UTR DHFR
β polyA
βpolyA
NEO
3'UTR NEO
SV40 polyA早期
P(LAC)
ORI
APr
P(BLA)
輕鏈可變

【圖9】(續)


SV40 ORI
CMV強化子
CMV啟動子
輕鏈可變
BglII (968)
DraIII (1037)
HU0 3C3 VL
BsiWI (1379)
κ輕鏈恆定
EcoRI (1701)
(HuB2-Hu0)
BGH poly A
重鏈可變
CMV啟動子-強化子
MluI (2459)
HU3C3 VHB2
NheI (2828)
MfeI (3301)
重鏈恆定 (IgG1;Her)N297A
N297A
P(BLA)
APr
pTCAE8-抗PDL1 (人源化3C3)
9215 bp
ORI
P(LAC)
SV40 polyA早期
3'UTR NEO
NEO
ClaI (5915)
β啟動子
β polyA
3'UTR DHFR
小鼠DHFR

【圖9】(續)

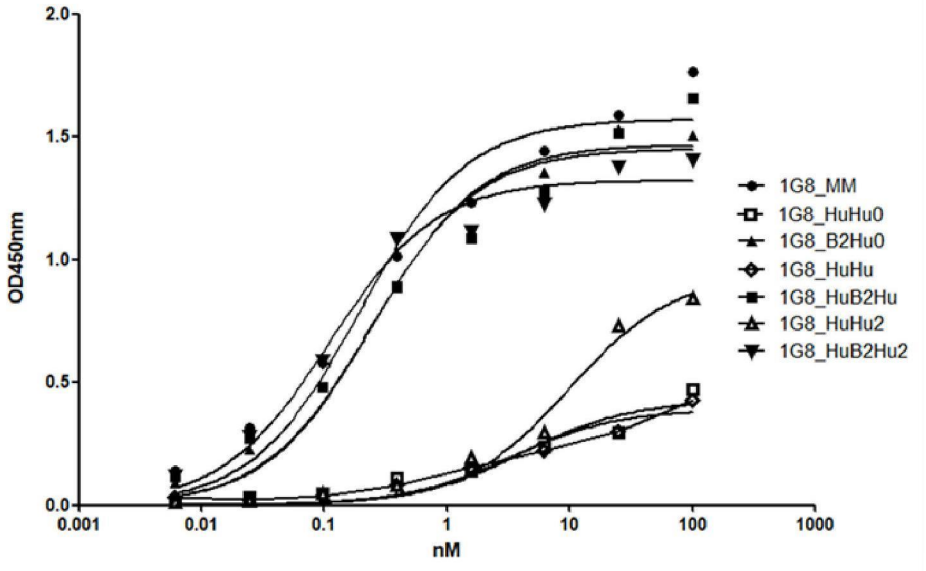
人源化3C3 PDL1結合ELISA



單位點特異性結合	MM	HuB2Hu0	HuB2Hu	HuB2Hu2
Kd	0.0666	0.1084	0.0936	0.1011

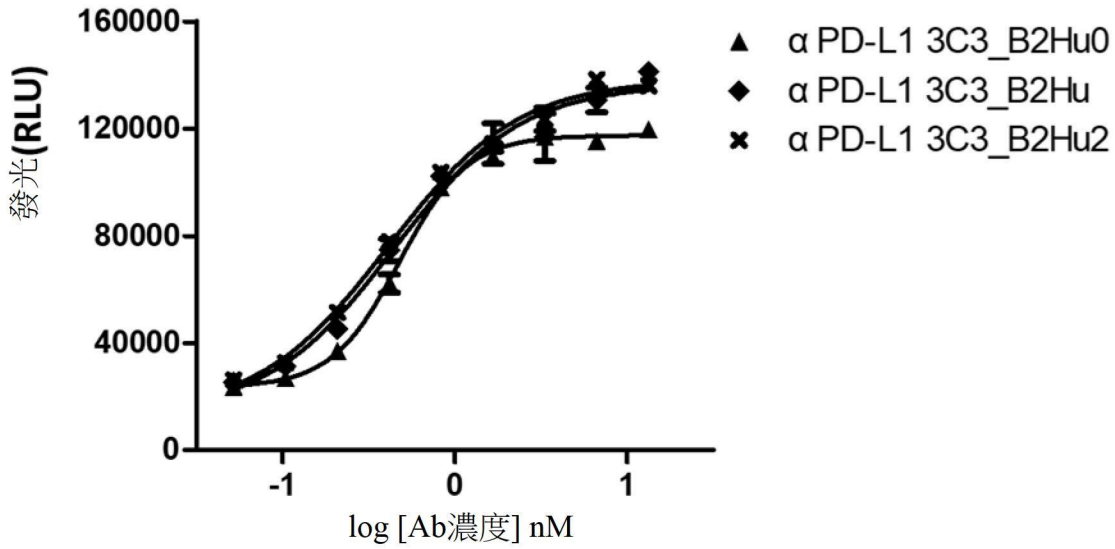
【圖10】

人源化1G8 PDL1結合ELISA

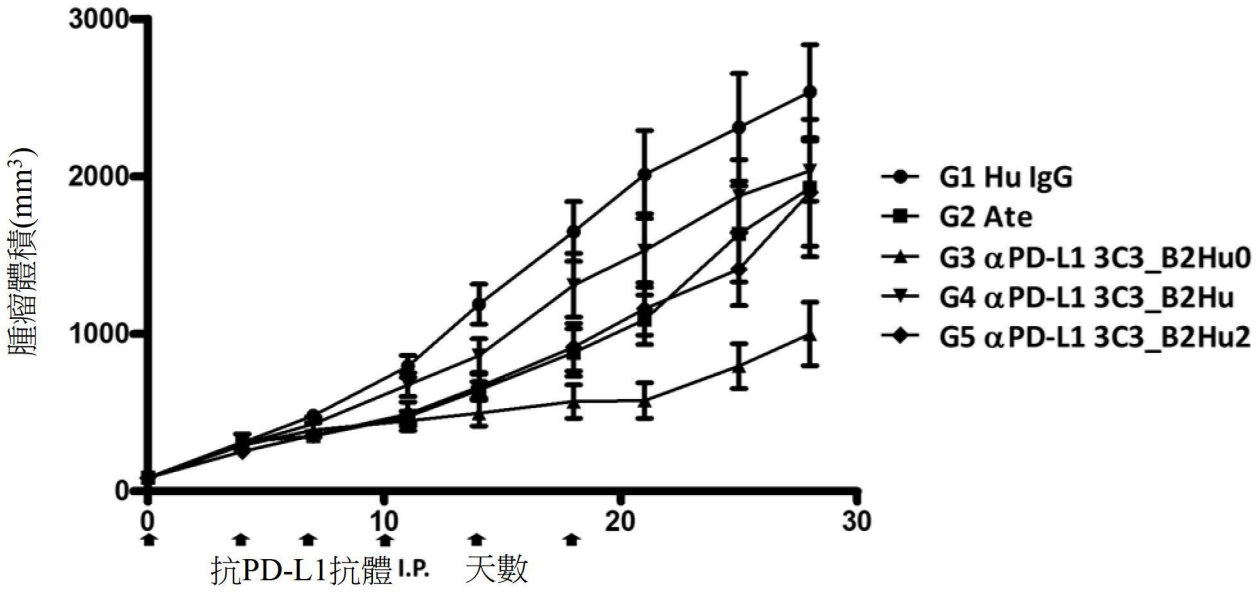


單位點特異性結合	MM	HuHu0	HuB2Hu0	HuHu	HuB2Hu	HuHu2	HuB2Hu2
Kd(nM)	0.1917	3.993	0.2380	3.240	0.2480	9.687	0.1088

【圖11】


160000
120000
80000
40000
0
發光(RLU)
-1
0
1
log [Ab濃度] nM
α PD-L1 3C3_B2Hu0
α PD-L1 3C3_B2Hu
α PD-L1 3C3_B2Hu2

【圖12】


3000
2000
1000
0
腫瘤體積(mm3)
0
10
20
30
抗PD-L1抗體 I.P.
天數
G1 Hu IgG
G2 Ate
G3 αPD-L1 3C3_B2Hu0
G4 αPD-L1 3C3_B2Hu
G5 αPD-L1 3C3_B2Hu2

【圖13】