I861005

(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 I861005 B**

(45)公告日： 中華民國 113 (2024) 年 11 月 11 日

(21)申請案號：108124754 (22)申請日： 中華民國 108 (2019) 年 07 月 12 日

(51)Int. Cl.： *C07K16/28 (2006.01)* *A61K39/395 (2006.01)*
A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2019/02/26 英國 1902594.9
2018/11/09 英國 1818283.2
2018/07/12 英國 1811405.8

(71)申請人：英商英沃克斯製藥有限公司 (英國) INVOX PHARMA LIMITED (GB)
英國

(72)發明人：拉金斯 馬修 LAKINS, MATTHEW (GB)；蒙歐茲歐拉雅 約瑟 MUNOZ-OLAYA, JOSE (GB)；沃勒湯 法蘭西斯卡 WOLLERTON, FRANCISCA (NL)；巴堤 莎拉 BATEY, SARAH (GB)；吐納 米賀瑞班 TUNA, MIHRIBAN (GB)；寇爾斯 亞歷山大 KOERS, ALEXANDER (DE)

(74)代理人：劉法正；尹重君

(56)參考文獻：

WO 2017/123650A2 WO 2018/056821A1

審查人員：余家嫻

申請專利範圍項數：19 項 圖式數：28 共 530 頁

(54)名稱

結合 PD-L1 及 CD137 的抗體分子

(57)摘要

本申請案係有關於結合 PD-L1 及 CD137 二者且能誘發 CD137 的致效作用之抗體分子。該抗體分子包含一種用於 PD-L1 之以 CDR 為基礎的結合位址，及一種座落於該抗體分子的一恆定域之 CD137 抗原結合位址。本發明之抗體分子於舉例而言，治療疾病例如癌症方面獲得應用。

The present application relates to antibody molecules that bind both PD-L1 and CD137 and are able to induce agonism of CD137. The antibody molecules comprise a CDR-based binding site for PD-L1, and a CD137 antigen-binding site that is located in a constant domain of the antibody molecule. The antibody molecules of the invention find application, for example, in the treatment of diseases, such as cancer.

第108124754號專利申請案摘要修正本
日期：112年11月17日

I861005

【發明摘要】

公告本

【中文發明名稱】

結合PD-L1及CD137的抗體分子

【英文發明名稱】

ANTIBODY MOLECULES THAT BIND PD-L1 AND CD137

【中文】

本申請案係有關於結合PD-L1及CD137二者且能誘發CD137的致效作用之抗體分子。該抗體分子包含一種用於PD-L1之以CDR為基礎的結合位址，及一種座落於該抗體分子的一恆定域之CD137抗原結合位址。本發明之抗體分子於舉例而言，治療疾病例如癌症方面獲得應用。

【英文】

The present application relates to antibody molecules that bind both PD-L1 and CD137 and are able to induce agonism of CD137. The antibody molecules comprise a CDR-based binding site for PD-L1, and a CD137 antigen-binding site that is located in a constant domain of the antibody molecule. The antibody molecules of the invention find application, for example, in the treatment of diseases, such as cancer.

第 108124754 號專利申請案摘要修正本
日期：112 年 11 月 17 日

【指定代表圖】　(無)

【代表圖之符號簡單說明】

(無)

【特徵化學式】

(無)

第108124754號專利申請案說明書修正本
日期：112年11月17日

【發明說明書】

【中文發明名稱】

結合PD-L1及CD137的抗體分子

【英文發明名稱】

ANTIBODY MOLECULES THAT BIND PD-L1 AND CD137

【技術領域】

【0001】發明領域

本發明係有關於結合PD-L1及CD137二者且能誘發CD137的致效作用之抗體分子。該抗體分子包含一種用於PD-L1之以CDR為基礎的結合位址，及一種座落於該抗體分子的一恆定域之CD137抗原結合位址。本發明之抗體分子於舉例而言，治療疾病例如癌症方面獲得應用。

【先前技術】

【0002】發明背景

程式性細胞死亡1(PD-1)及其之配體PD-L1(CD274，B7-H1)與PD-L2(B7-DC)遞送抑制訊息以調節T細胞活化、耐受性及免疫病理學之間的平衡。PD-L1暫時地表現於所有的免疫細胞及一些腫瘤細胞上。PD-L1為B7蛋白家族的成員且與B7.1及B7.2共享大約20%的胺基酸序列同一性。人類PD-L1與鼠類及食蟹獼猴(cynomolgus)的PD-L1異種同源物分別共享70%及93 %的胺基酸同一性。

【0003】PD-L1係以770 nM之親和力(K_D)與其之受體PD-1結合。PD-1係表現於活化的T細胞、B細胞及骨髓

細胞上，以及調控細胞免疫反應的活化或抑制。PD-L1與PD-1之結合遞送了抑制訊息，減少細胞介素生產及T細胞增殖。結果，細胞之PD-L1表現能媒介防範胞毒型T淋巴細胞(CTL)毒殺作用且為病毒感染期間減輕慢性免疫反應的調控機轉。癌症，如同慢性及促進發炎性(pro-inflammatory)疾病，通過上調PD-L1表現而破壞此免疫保護途徑以躲避宿主的免疫反應。於主動免疫反應的情況中，干擾素γ(IFNγ)亦會上調PD-L1的表現。

【0004】PD-L1亦會通過與另一種蛋白，B7.1(也稱為CD80)之交互作用來媒介免疫抑制作用，阻斷其通過CD28遞送T細胞活化第二信號的其中之一的能力。就腫瘤細胞上的PD-L1表現及其與B7.1之銜接而言，此種專一性交互作用於腫瘤免疫抗性之相關性尚不清楚。

【0005】已證實PD-L1表現於種類繁多的實性腫瘤。於一項研究檢查的654個樣本中，包括來自不同位址的19種腫瘤，89個(14%)為PD-L1陽性(頻率≥5%)。最高的PD-L1陽性頻率見於頭頸部(17/54；31%)、子宮頸(10/34；29%)、不明原始來源的癌症(CUP；8/29；28%)、多形性神經膠質母細胞瘤(GBM；5/20；25%)、膀胱癌(8/37；21%)、食道癌(16/80；20%)、三重陰性(TN)乳癌(6/33；18%)及肝癌(6/41；15%) (Grosso等人，2013)。PD-L1之腫瘤關聯性表現已經顯示出會賦予免疫抗性及可能保護腫瘤細胞免受T細胞媒介的細胞凋亡。

【0006】臨床試驗業已顯示靶定患者的PD-L1之臨

床獲益，其迄今導致三種抗PD-L1靶定單株抗體的許可。阿替珠單抗(Atezolizumab) (MPDL3280A, RG7466，癌自禦™(Tecentriq™))，一種結合PD-L1的人化IgG1抗體，於PD-L1陽性腫瘤的患者於非小細胞肺癌(NSCLC)及膀胱癌之臨床試驗後分別顯示出38%及43%的客觀反應率(ORR)之後，已許可用於非小細胞肺癌之一線治療及膀胱癌之一線與二線治療(Iwai等人，2017)。阿維魯單抗(Avelumab) (MSB0010718C, Bavencio™)為一種結合PD-L1之完全的人類IgG1抗體且已許可用於治療默克細胞癌(Merkel-cell carcinoma)及膀胱癌之二線治療，而完全的人類IgG1抗體德瓦魯單抗(durvalumab) (MEDI4736, Imfinzi™)已許可用於膀胱癌之二線治療。此等抗體額外的試驗及其他的抗PD-L1療法持續關注在擴大可治療的實性癌症範圍，包括結腸直腸癌、胃癌、乳癌、頭頸部、胰臟、卵巢及腎細胞癌。

【0007】CD137(4-1BB；TNFRSF9)是一種腫瘤壞死因子受體超家族(TNFRSF)之共刺激分子。眾所周知$CD8^+$ T細胞上的CD137於活化後上調，且亦能表現於活化的$CD4^+$輔助T細胞、B細胞、調節性T細胞、自然殺手(NK)細胞、自然殺手T(NKT)細胞及樹突細胞(DCs)上(Bartkowiak & Curran, 2015)。CD137於提升T細胞之細胞毒性的主要功能角色首次於1997(Shuford等人，1997)乙文描述，且不久以後抗CD137 mAbs被提議作為抗癌療法。

【0008】CD137為一種跨膜蛋白其帶有四個細胞外富含半胱胺酸域，稱為CRD1-4，及負責CD137訊息傳導的細胞質域。CD137的配體是CD137L。雖然CD137/CD137L錯合物(CD137/CD137L complex)無結晶結構存在，但據預測CD137會與CD137L形成三聚體/三聚體錯合物(trimer/trimer complex) (Won等人，2010)。CD137L的銜接導致受體三聚體形成及後續的多個受體三聚體之簇集，並導致CD137訊息傳導級聯(cascade)活化。此訊息傳導級聯提供存活的訊息給T細胞對抗活化誘發的細胞死亡(Hurtado等人，1997)藉此於支撐有效的T細胞免疫反應及產生免疫性記憶方面扮演關鍵性的角色(Bartkowiak & Curran, 2015)。

【0009】活化的T細胞表現CD137且已經使用作為辨識抗原專一性$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞的指標(Wolfl等人，2007；Ye等人，2014)。典型地，$CD8^+$ T細胞上CD137的表現比$CD4^+$ T細胞更高(Wen等人，2002)。就$CD8^+$ T細胞來說，經由生產干擾素γ及介白素2而增殖、存活及細胞毒性效應子功能已被歸因於CD137交聯。CD137交聯亦有助於記憶$CD8^+$ T細胞之分化及維持(Chacon等人，2013)。就一些$CD4^+$ T細胞亞群來說，CD137交聯同樣會造成增殖及活化並導致釋放細胞介素如介白素2(Makkouk等人，2016)。也已經證明CD137表現於腫瘤浸潤型淋巴細胞(TILs)之腫瘤反應性亞群上。已經證明CD137單方療法於數種臨床前免疫性腫瘤模式例如

MC38、CT26及B細胞淋巴瘤上是有效的。

【0010】CD137 mAbs之臨床開發已經因為劑量限制性高度肝發炎與CD137促效劑抗體治療相關而減緩。烏瑞魯單抗(Urelumab)(BMS-663513)，非配體阻斷性人類IgG4同型抗體(Chester等人，2018)為首個進入臨床試驗的抗CD137抗體，但是此等試驗於觀察到顯著的、達目標、劑量依賴性肝毒性之後中止(Chester等人，2018；Segal等人，2017；及Segal等人，2018)。最近，重新開始實性癌症的烏瑞魯單抗治療之臨床試驗，該試驗以烏瑞魯單抗治療組合放射療法(NCT03431948)或其他的治療抗體，例如利妥昔單抗(rituximab) (NCT01775631)、西妥昔單抗(cetuximab)(NCT02110082)、抗PD-1抗體納武單抗(nivolumab)(NCT02253992、NCT02534506、NCT02845323)，以及納武單抗及抗LAG-3抗體BMS986016(NCT02658981)之組合。然而，為了降低與烏瑞魯單抗治療相關的肝毒性，此等試驗中的烏瑞魯單抗用劑必須受到限制且功效結果是令人失望的(Chester等人，2018)。

【0011】輝瑞的抗CD137抗體烏托米單抗(utomilumab) (PF-05082566)，一種人類IgG2同型抗體，於晚期癌症之第I期臨床試驗、於0.03 mg/kg高達10 mg/kg劑量範圍內觀察到沒有劑量限制性毒性(Chester等人之2016；Segal等人，2018)。然而，此抗體於患實性腫瘤患者的總客觀反應率(overall objective response rate)

只有3.8%，可能表示烏托米單抗的效能及臨床功效比烏瑞魯單抗更弱，但具有更有利的安全性剖析(Chester等人，2018；Segal等人，2018)。已經測試烏托米單抗組合以放射療法(NCT03217747)或化學療法，以及組合以其他抗體療法，包括抗PD-L1抗體阿維魯單抗(NCT02554812)及抗PD-1抗體派姆單抗(pembrolizumab) (NCT02179918)，以評估不同治療組合的安全性、可耐受性、劑量限制性毒性(DLTs)、最大耐受劑量(MTD)及功效。此等試驗正在進行中且早期結果顯示烏托米單抗及派姆單抗組合於高達5 mg/kg的劑量都沒有DLTs以及患者反應率為26%。(Tolcher等人，2016) (Pérez-Ruiz等人，2017)。

【0012】測試抗CD137抗體，烏托米單抗，組合抗PD-L1抗體，阿維魯單抗之臨床試驗正在進行中(NCT02554812，NCT3390296)。烏托米單抗連同阿維魯單抗以及其他療法之三重組合亦受測試(NCT02554812，NCT03217747，NCT03440567，NCT03414658)。

【0013】一些靶定CD137的雙專一性分子亦處於早期發展階段，舉例而言靶定CD137以及FAP-α(Link等人，2018；Reichen等人，2018)、HER2(Hinner等人，2015及WO 2016/177802 A1)或EphA2(Liu等人，2017)的該等。亦開發了CD137L融合蛋白其係例如經由FAP-α來靶定腫瘤(Claus等人，2017)。臨床上最先進的CD137雙專一性為PRS-343，一種CD137/HER2雙專一性分子，其最近已進入一系列實性腫瘤治療的第I期臨床試驗以評

估其之安全性、可耐受性及功效(NCT03330561)。

【0014】有其他的方法來組合抗CD137活性及抗PD-L1活性至雙專一療法內。一種方法利用Biclonics技術來生產一種以單價結合CD137及PD-L1二者的全長異質二聚體人類IgG(WO2018056821)導致產生一種分子其能結合CD137及PD-L1二者且於高位準PD-L1存在下誘發CD137致效作用。第二種方法已被描述為使用sdAb-Fc融合以靶定CD137及PD-L1二者(WO2017123650)。二種方法都能在缺乏PD-L1結合的情況下結合CD137且在缺乏PD-L1的情況下誘發低位準的CD137致效作用，此致效作用於高位準的PD-L1存在下會提高。已描述另一種具有單價結合CD137及PD-L1二者的異質二聚體雙專一性抗體(WO2019/025545 A1)，其含有人化抗CD137結合區域及人類抗PD-L1區域其於PD-L1位準的存在下誘發CD137致效作用。

【0015】目前的數據顯示用現存的抗PD-L1單方療法之整體治療導致低於50%的癌症患者有反應。因而，本技藝仍然需要能靶定PD-L1且於癌症療法方面獲得應用之額外的分子。

【0016】PD-1/PD-L1阻斷有很強的臨床確效，然而低於50%的患者於單方療法背景中有反應。預期PD-L1及額外的免疫調控劑的組合會展現出改良的功效。然而，此等組合可能與治療相關的不良事件增加有關聯且因此功效可能受限於有限的治療區間(therapeutic window)。靶定

CD137的促效分子於癌症患者尚未表現出明顯的反應，此可能部分是因為有限的治療指數而相對較低的劑量位準所致。因而，本技藝仍然需要開發組合PD-L1阻斷及引發CD137致效作用於安全且有效的療法之治療。

【發明內容】

【0017】發明概要

如以上的背景章節所述，因為劑量限制性高度肝發炎(烏瑞魯單抗)或臨床功效很低(烏托米單抗)都與治療有相關，所以CD137促效劑分子之臨床發展一直受阻礙。

【0018】本發明人了解到本技藝對於展現出高活性且致效作用能定位在腫瘤微環境的CD137促效劑分子仍然有需要。此等分子能以最佳化該分子的效能及功效的劑量投予給個體，以及舉例而言，能用來治療癌症作為免疫治療藥物。

【0019】本發明之抗體分子包含一種座落於該抗體分子的恆定域內的CD137抗原結合位址。本發明人執行大規模的選擇及親和力成熟計劃來單離一組含CD137抗原結合位址的分子(於此亦稱為“Fcabs”)，其與二聚體CD137結合的親和力比單體CD137更高。

【0020】如本文所述，‘親和力’可指以K_D來測量之抗體分子與其同源抗原之間結合交互作用的強度。在抗體分子能與一抗原形成多重結合交互作用的情況下(例如在抗體分子能與抗原二價地結合且選擇性地，抗原為二聚體的情況下)，以K_D來測量親和力可能也會受總結合性

(avidity)影響，此對熟悉此藝者來說是顯而易見的，因此總結合性係指抗體-抗原錯合物(antibody-antigen complex)之整體強度。

【0021】T細胞於活化時會上調CD137的表現。不希望受理論束縛，但認為由於活化的T細胞上CD137的高表現，CD137於此等細胞表面上會呈二聚體、三聚體及更高階的多聚體形式。相反地，初始的免疫細胞，例如初始的T細胞，表現低或微不足道的CD137位準於其等之細胞表面上並且任何存在的CD137因而可能是呈單體形式。因而預期與二聚體或多聚體CD137結合的總結合性高、包含一CD137抗原結合位址的抗體分子，會優先結合活化的免疫細胞，例如活化的T細胞，而不是舉例而言，初始的免疫細胞。

【0022】CD137抗原結合位址的此等特徵據信使本發明之抗體分子與已知結合CD137的抗體不同，舉例而言如WO2018056821中所述的抗體。WO2018056821描述一種含有以高親和力結合CD137的單價CD137結合域(低nM範圍，參見WO2018056821之表6)。既然此等抗體不區分單體及二聚體或多聚體CD137之間，所以不期望此等先前技藝的抗體會展現同樣的優先結合活化的免疫細胞。

【0023】如以上的背景章節所述，認為CD137配體與CD137起始的連接發起了一連串事件導致受體三聚合作用，接著受體簇集、活化及後續起始有效力抗腫瘤T細胞活性。為了有效率活化CD137的治療劑，因而預期必須以

模擬三聚配體橋接的方式使數種受體單體橋接在一起。

【0024】烏托米單抗為一種IgG2分子且其之促效劑活性係依賴Fcγ受體之交聯作用。烏瑞魯單抗為一種帶有持續活性的IgG4分子且因而活性不需要Fcγ受體之交聯作用，雖然一些Fcγ受體之交聯會提升其之促效劑活性。發現Fcγ受體遍布整個人體。烏托米單抗及烏瑞魯單抗之免疫細胞的活化活性因而不限於身體的特定位址且因而可發生於腫瘤微環境以外的位置，例如肝臟。

【0025】本發明人已證明本發明的抗體分子內存在的CD137抗原結合位址需要交聯作用俾以簇集及活化CD137。然而應該注意到的是，此並不是CD137結合者之內在特徵。相反地，於篩選計劃期間單離的許多CD137結合者與CD137結合但不需要交聯作用用於CD137簇集及活化或者於缺少交聯作用的情況下誘發受限的CD137簇集及活化。

【0026】如上所述，發現Fcγ受體遍布整個人體且因而CD137活化不限於特定的位址，此為Fcγ受體媒介的交聯作用之不利因素。本發明人因而導入突變至Fcabs的CH2域內以降低或廢除Fcγ受體的結合。因而，於通過Fcγ受體以外的製劑之交聯作用不存在的情況下，本發明的抗體分子不會展現出CD137促效劑活性。而且，一般預料此等突變會導致本發明之抗體分子不能誘發抗體細胞的細胞毒性，所以該抗體分子將不會引發其等活化的免疫細胞致死。

【0027】本發明人已證實含有以上所述的CD137抗原結合位址及一種用於PD-L1之以CDR為基礎的結合位址之抗體分子，在CD137及PD-L1共表現的地點例如腫瘤微環境內，活化免疫細胞上為高度有效的。從這個意義上來說共表現包含CD137及PD-L1表現於相同細胞上的情況，例如T細胞，以及CD137及PD-L1表現於不同的細胞上的情況，舉例而言分別為T細胞與腫瘤細胞。

【0028】該抗體分子能同時與CD137及PD-L1結合。因而，在CD137及PD-L1共表現的地點，一般認為抗體分子與PD-L1結合會造成該抗體分子交聯，此又導致T細胞表面上的CD137簇集及活化。

【0029】如本發明人所證實，透過降低或廢除Fcγ受體的結合，該抗體分子之促效劑活性取決於PD-L1與CD137二者均存在。換句話說，促效劑活性是有條件的且抗體分子因而預期能在PD-L1存在的地點，例如於腫瘤微環境內僅活化免疫細胞。此靶定的免疫細胞活化預期在避免，舉例而言烏瑞魯單抗治療所見的肝發炎上是有益的。

【0030】的確，本發明人已證明具有以上所述特徵的抗體分子在小鼠模式投予治療劑量時不會表現嚴重的肝毒性。於已投予此等抗體分子的小鼠只觀察到最小的肝病理學，其不被視為代表先前其他抗CD137促效劑抗體所報告的嚴重肝毒性。於食蟹獼猴的初步研究亦顯示出該抗體分子是安全及可耐受達30mg/kg。不希望受理論束縛，但一般預料期來自此等動物模式的結果將平移到臨床來預測人

類患者肝毒性的風險且因此本發明的抗體分子在以治療劑量治療的人類患者內誘發肝毒性的風險會很低。

【0031】本發明人亦提供*活體外*證據表明該抗體分子所誘發的CD137促效劑活性位準與細胞表面上PD-L1表現的量相關。本發明人已證實該抗體分子甚至在PD-L1表現低位準的的情況下都能致效(agonizing)CD137且隨著系統內PD-L1位準增加，CD137促效劑活性因而增加。此結果進一步支持CD137促效劑活性取決於PD-L1表現的證據並且暗示本發明的抗體分子對於腫瘤細胞表面上表現不同PD-L1位準的腫瘤之活性範圍會很廣。

【0032】以上所述用於PD-L1之以CDR為基礎的結合位址能有效率阻斷PD-L1與其之受體PD-1結合。PD-1係表現於活化的T細胞、B細胞及骨髓細胞上，以及調控細胞免疫反應的活化或抑制。PD-L1與PD-1之結合遞送了抑制訊息，減少細胞介素生產及T細胞增殖，藉此減輕免疫反應。在癌症方面，腫瘤細胞上的PD-L1及T細胞上的PD-1之交互作用會降低T細胞活性以防止免疫系統攻擊腫瘤細胞。因而，一般預料藉由阻斷PD-L1與PD-1結合，本發明的抗體分子能以此方式防止腫瘤細胞躲避免疫系統。不希望受理論束縛，但據信that 此種有效率阻斷PD-L1與PD-1結合與以上所述的CD137促效劑活性一起作用來增加抗體分子之抗腫瘤效能。

【0033】本發明人亦已證明包含以上所述的CD137抗原結合位址及用於PD-L1之以CDR為基礎的結合位址

之抗體分子，能抑止*活體內*的腫瘤生長。此外，與二種單專一性抗體分子組合相比，該組合之抗體分子中的一者包含用於PD-L1之以CDR為基礎的結合位址及另一分子包含用於CD137之以CDR為基礎的結合位址，該雙專一性抗體分子觀察到更有效的腫瘤生長抑止，證明了以本發明的抗體分子所見的CD137的簇集及訊息傳導提升，且因而提升T細胞活化及相應的抗腫瘤效應。

【0034】包含本發明之CD137抗原結合位址的抗體分子可能額外地能與PD-L1二價地結合，而使該抗體分子與CD137及PD-L1二者都二價地結合。這預料是有利的，因二種標靶之二價結合預料會使表現CD137的T細胞及表現PD-L1的細胞之間的橋接更穩定並藉此延長T細胞定位在PD-L1與CD137共表現的位置，例如腫瘤微環境的時間，以及能作用於疾病，諸如腫瘤。這與絕大多數慣用的雙專一性抗體格式不同，慣用的雙專一性抗體格式為異質二聚體且經由一Fab臂與各標靶抗原單價結合。此一單價交互作用預料不只較不穩定而且誘發TNF受體例如CD137簇集的效率很低及/或需要靶定要誘發此簇集，及因而T細胞活化的一者或二者的表現都更高。本發明人進行的實驗支持此點，該實驗顯示包含用於PD-L1之二價Fab結合位址及用於CD137之單價結合位址於該分子的CH3域中的一者內之mAb^2分子，以IFN-γ釋放來測量，誘發T細胞活化的位準比與二種標靶都二價結合者之mAb^2更低。

【0035】本發明人辨識出的抗體分子另外的特徵是

該抗體結構自身內含有用於CD137之抗原結合位址及用於PD-L1之以CDR為基礎的結合位址二者。特別地，該抗體分子不需要經由鏈接子或其他構件來融合其他蛋白與該抗體分子而導致產生二價結合其之二種標靶的分子。這具有許多優點。特別地，該抗體分子能用生產標準抗體使用的方法相似的該等方法來生產，因其等不含任何額外的融合部分。該結構也預料會導致抗體穩定性改良，因鏈接子可能隨著時間降解，造成非均質的抗體分子族群。於此等非均質族群中，族群內只有一種蛋白與其等融合，且因而只單價地結合一種標靶的該等抗體，預期不會如具有二種蛋白與其等融合且因而能與二種標靶都二價結合之該等抗體一般有效率的誘發TNF受體例如CD137之有條件的致效作用。鏈接子之裂解/降解可在治療劑投予給患者之前或投予給患者之後發生(例如通過酵素裂解或患者之*活體內*pH)，藉此導致其於患者體內循環時的效用減少。因本發明的抗體分子內沒有鏈接子，預料抗體分子在投予前或後會保留相同數目的結合位址。此外，抗體分子的結構從分子免疫原性(immunogenicity)的角度來看也是較偏好的，因分子投予給患者時導入融合蛋白或鏈接子或二者可能誘發免疫原性，會導致治療效用降低。

因而，本發明提供：

【0036】[1] 一種結合程式性死亡配體1(programmed death-ligand 1，PD-L1)及CD137的抗體分子，其包含

(a) 一用於PD-L1之以互補性決定區域(CDR)為基礎的抗原結合位址；及

(b) 一座落於該抗體分子的一CH3域之CD137抗原結合位址；

其中該以CDR為基礎的抗原結合位址包含下列列出的CDRs 1-6：

(i)分別為序列辨識編號**1、2、3、4、5及6 [E12v2]**；

(ii)分別為序列辨識編號**1、2、3、18、19及20 [E05v2]**；或

(iii)分別為序列辨識編號**1、2、3、18、19及29 [G12v2]**；及

其中該CD137抗原結合位址包含一第一序列及一第二序列分別座落於該CH3域的AB及EF結構環，其中該第一及第二序列具有序列辨識編號**113**及**114 [FS22-172-003]**，或**79**及**80 [FS22-53-008]**內分別列出的序列。

【0037】 [2] 一種結合程式性死亡配體1(PD-L1)及CD137的抗體分子，其包含

(a)一用於PD-L1之以互補性決定區域(CDR)為基礎的抗原結合位址；及

(b)一座落於該抗體分子的一CH3域之CD137抗原結合位址；

其中該以CDR為基礎的抗原結合位址包含下列列出、根據IMGT]的CDRs 1-6：

(i) 分別為序列辨識編號**7、8、9、10、11及6 [E12v2]**；

(ii) 分別為序列辨識編號**21、8、9、22、11及20 [E05v2]**；或

(iii) 分別為序列辨識編號**21、8、9、22、11及29 [G12v2]**；及

其中該CD137抗原結合位址包含一第一序列及一第二序列分別座落於該CH3域的AB及EF結構環，其中該第一及第二序列具有序列辨識編號**113**及**114 [FS22-172-003]**，或**79**及**80 [FS22-53-008]**內分別列出的序列。

【0038】[3] 如[1]或[2]之抗體分子，其中該抗體分子包含[1]或[2]之(i)或(ii)列出的CDRs 1-6。

【0039】[4] 如[1]或[2]之抗體分子，其中該抗體分子包含[1]或[2]之(i)列出的CDRs 1-6。

【0040】[5] 如[1]至[4]中任一項之抗體分子，其中該抗體分子包含一重鏈可變異(VH)域及/或輕鏈可變異(VL)域，較佳一VH域及一VL域。

【0041】[6] 如[1]至[5]中任一項之抗體分子，其中該抗體分子包含一免疫球蛋白重鏈及/或一免疫球蛋白輕鏈，較佳一免疫球蛋白重鏈及一免疫球蛋白輕鏈。

【0042】[7] 如[5]至[6]中任一項之抗體分子，其中該抗體分子包含VH域及/或VL域，較佳為下列列出的VH域及VL域：

(i) 分別為序列辨識編號**12**及**14 [E12v2]**；

(ii) 分別為序列辨識編號**23**及**25 [E05v2]**；或

(iii) 分別為序列辨識編號**23**及**30 [G12v2]**。

【0043】 [8] 如[7]之抗體分子，其中該抗體分子包含(i)或(ii)內列出的該VH域及VL域。

【0044】[9] 如[8]之抗體分子，其中該抗體分子包含(i)內列出的該VH域及VL域。

【0045】[10] 如[1]至[9]中任一項之抗體分子，其中該第一序列係座落於該抗體分子的該CH3域之位置14至17之間，其中該胺基酸殘基編號係根據IMGT編號方式。

【0046】[11] 如[10]之抗體分子，其中該第一序列係座落於該抗體分子之該CH3域之位置15、16、16.5、16.4、16.3、16.2及16.1處，其中該胺基酸殘基編號係根據IMGT編號方式。

【0047】[12] 如[1]至[11]中任一項之抗體分子，其中該第二序列係座落於該抗體分子之該CH3域之位置92至98處，其中該胺基酸殘基編號係根據IMGT編號方式。

【0048】[13] 如[1]至[12]中任一項之抗體分子，其中該抗體分子進一步包含一第三序列座落於該CH3域的CD結構環。

【0049】[14] 如[13]之抗體分子，其中該第三序列係座落於該抗體分子之該CH3域的位置43至78處，其中該胺基酸殘基編號係根據IMGT編號方式。

【0050】[15] 如[13]至[14]中任一項之抗體分子，其中該第三序列具有序列辨識編號：**73**內列出的序列。

【0051】[16] 如[1]至[15]中任一項之抗體分子，其中該抗體分子包含下列列出的CH3域序列：

(i) 序列辨識編號：**115 [FS22-172-003]**；或

(ii) 序列辨識編號：**81 [FS22-53-008]**。

【0052】 [17]如[1]至[15]中任一項之抗體分子，其中該第一及第二序列具有序列辨識編號**113**及**114 [FS22-172-003]**內分別列出的序列。

【0053】[18] 如[1]至[15]及[17]中任一項之抗體分子，其中該抗體分子包含序列辨識編號：**115 [FS22-172-003]內**列出的CH3域序列。

【0054】[19] 如[1]至[18]中任一項之抗體分子，其中該抗體分子為人類IgG1分子。

【0055】[20] 如[1]至[19]中任一項之抗體分子，其中該抗體分子包含下列抗體之重鏈及輕鏈：

(i) 序列辨識編號**134**及**17**內分別列出的**FS22-172-003-AA/E12v2**之重鏈及輕鏈；

(ii) 序列辨識編號**137**及**28**內分別列出的**FS22-172-003-AA/E05v2**之重鏈及輕鏈；

(iii) 序列辨識編號**140**及**33**內分別列出的**FS22-172-003-AA/G12v2**之重鏈及輕鏈；

(iv) 序列辨識編號**143**及**17**內分別列出的**FS22-053-008-AA/E12v2**之重鏈及輕鏈；

(v) 序列辨識編號**146**及**28**內分別列出的**FS22-053-008-AA/E05v2**之重鏈及輕鏈；或

(vi) 序列辨識編號**149**及**33**內分別列出的**FS22-053-008-AA/G12v2**之重鏈及輕鏈。

【0056】 [21]如[20]之抗體分子，其中該抗體分子包含[20]之(i) – (iv)中任一項列出的輕鏈及重鏈。

【0057】[22] 如[20]之抗體分子，其中該抗體分子包含[20]之(i)列出的輕鏈及重鏈。

【0058】[23] 如[20]至[22]中任一項之抗體分子，其中該抗體之該CH2域的位置**114**處之脯胺酸(P)係用丙胺酸(A)胺基酸予以取代，以及其中該胺基酸殘基編號係根據IMGT編號方式。

【0059】[24] 如[1]至[23]中任一項之抗體分子，其中該抗體分子與人類PD-L1及人類CD137結合。

【0060】[25] 如[24]之抗體分子，其中該PD-L1係由序列辨識編號：**180**內列出之序列所組成或包含序列辨識編號：**180**內列出之序列。

【0061】[26] 如[24]或[25]之抗體分子，其中該人類CD137係由序列辨識編號：**186**內列出之序列所組成或包含序列辨識編號：**186**內列出之序列。

【0062】[27] 如[1]至[26]中任一項之抗體分子，其中該抗體分子於腫瘤細胞表面結合的PD-L1存在下、能活化免疫細胞上的CD137。

【0063】[28] 如[1]至[26]中任一項之抗體分子，其中該抗體分子與免疫細胞上的CD137及與腫瘤細胞表面結合的PD-L1之結合導致該免疫細胞上的CD137簇集。

【0064】[29] 如[27]或[28]之抗體分子，其中該免疫細胞為T細胞、B細胞、自然殺手(NK)細胞、自然殺手T(NKT)細胞或樹突細胞(DC)。

【0065】[30] 如[29]之抗體分子，其中該免疫細胞為T細胞。

【0066】[31] 如[1]至[30]中任一項之抗體分子，其中該抗體分子已經修飾以降低或廢除該抗體分子的該CH2域與一個或多個Fcγ受體的結合。

【0067】[32] 如[1]至[31]中任一項之抗體分子，其中該抗體分子不結合一個或多個Fcγ受體。

【0068】[33] 如[31]或[32]之抗體分子，其中該Fcγ受體係選自於下列所組成的群組：FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb及FcγRIII。

【0069】[34] 一種複合物(conjugate)，其包含如[1]至[33]中任一項之抗體分子及一生物活性分子。

【0070】[35] 一種複合物，其包含如[1]至[33]中任一項之抗體分子及一可偵測的標記。

【0071】[36] 一種核酸分子或多種核酸分子，其編碼如[1]至[33]中任一項之抗體分子。

【0072】[37] 一種核酸分子，其編碼如[1]至[2]、[5]至[7]、[10]至[16]、[19]至[20]及[23]至[33]中任一項之抗體分子，其中該核酸分子包含下列之重鏈核酸序列及/或輕鏈核酸序列：

(i) 序列辨識編號**32及39**，或**135及136**，較佳為序列

辨識編號**32及39**內分別列出的**FS22-172-003-AA/E12v2**之重鏈核酸序列及/或輕鏈核酸序列；

(ii) 序列辨識編號**138及139**內分別列出的**FS22-172-003-AA/E05v2**之重鏈核酸序列及/或輕鏈核酸序列；

(iii) 序列辨識編號**141及142**內分別列出的**FS22-172-003-AA/G12v2**之重鏈核酸序列及/或輕鏈核酸序列；

(iv) 序列辨識編號**144及145**內分別列出的**FS22-053-008-AA/E12v2**之重鏈核酸序列及/或輕鏈核酸序列；

(v) 序列辨識編號**147及148**內分別列出的**FS22-053-008-AA/E05v2**之重鏈核酸序列及/或輕鏈核酸序列；或

(vi) 序列辨識編號**150及151**內分別列出的**FS22-053-008-AA/G12v2**之重鏈核酸序列及/或輕鏈核酸序列。

【0073】 [38]一種載體或多種載體，其包含如[36]至[37]中任一項之核酸分子或多種核酸分子。

【0074】[39] 一種重組宿主細胞，其包含如[36]至[37]中任一項之核酸分子或如[38]之載體。

【0075】[40] 一種生產如[1]至[33]中任一項之抗體分子之方法，其包含於用於生產該抗體分子的條件下培養[39]之重組宿主細胞。

【0076】[41] 如[40]之方法，其進一步包含單離及/或純化該抗體分子。

【0077】[42] 一種藥學組成物，其包含如[1]至[35]中任一項之抗體分子或複合物及一藥學上可接受的賦形劑。

【0078】[43] 如[1]至[35]中任一項之抗體分子或複合物，供用於一種治療一個體癌症的方法。

【0079】[44] 一種治療一個體的癌症的方法，其包含投予一治療有效量的如[1]至[35]中任一項之抗體分子或複合物至該個體。

【0080】[45] 如[1]至[35]中任一項之抗體分子或複合物於製備一用於治療癌症的藥劑之用途。

【0081】[46] 如[43]至[45]中任一項之供用的抗體分子或複合物、方法或用途，其中該癌症係選自於下列名單所組成之群組：黑色素瘤、膀胱癌、腦癌、乳癌、卵巢癌、肺癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、肝癌、頭頸部癌、胰臟癌、腎癌、胃癌及胃腸道基質腫瘤(GISTs)。

【0082】[47] 如[43]之供用的抗體分子或複合物，其中該治療包含投予組合以第二治療劑之該抗體分子或複合物至該個體。

【0083】[48] 如[44]之方法，其中該方法進一步包含投予一治療有效量的第二治療劑至該個體。

【圖式簡單說明】

【0084】**圖1：圖1A、B及C**顯示Fcabs FS22-053、

FS22-053-008、FS22-053-009、FS22-053-010、FS22-053-011、FS22-053-012、FS22-053-013、FS22-053-014、FS22-053-015、FS22-053-016、FS22-053-017、FS22-172、FS22-172-001、FS22-172-002、FS22-172-003、FS22-172-004、FS22-172-005及FS22-172-006以及野生型(WT)Fcab的CH3域序列之排列比對。表明依據IMGT、IMGT外顯子(連續編號)、EU及Kabat編號系統之殘基編號。

【0085】**圖2**顯示CD137/PD-L1 mAb^2 FS22-172-003-AA/E12v2能夠結合至活化的CD4$^+$ T細胞(**圖2A**)與CD8$^+$ T細胞(圖**2B**)。該抗人類CD137/PD-L1 mAb^2 FS22-172-003-AA/E12v2結合至活化的T細胞，就CD4$^+$ T細胞而言具有0.8 nM之EC_{50}值，而就CD8$^+$ T細胞而言具有0.9 nM之EC_{50}值。陽性對照抗人類PD-L1抗體(G1-AA/E12v2)顯示與該mAb^{2}非常類似的親和力，對於兩個細胞類型都具有0.8 nM之EC_{50}值。陽性對照抗人類CD137 抗體(G1-AA/MOR7480.1)顯示低結合至CD4$^+$與CD8$^+$細胞，此表明在該等細胞類型上低位準的CD137表現。

【0086】**圖3**顯示抗人類CD137/PD-L1 mAb^2 FS22-172-003-AA/E12v2 沒有結合至Fcγ受體過度表現的CHO細胞。抗人類CD137/PD-L1 mAb^2 FS22-172-003-AA/E12v2、Fcγ受體結合之陽性對照抗體G1/4420以及無Fcγ受體結合之陰性對照抗體

G1-AA/4420在一細胞結合分析中針對5種不同Fcγ受體過度表現的CHO細胞：(A) FcgRIIA 131H、(B) FcgRIIA 131E、(C) FcgRIIB、(D) FcgRIIIA 158F、(E) FcgRIIIA 158V，以及(F) 用來作為陰性對照的CHO WT 細胞株進行測試。在CH2區域內含有LALA突變之抗人類CD137/PD-L1 mAb^2沒有結合至所測試之Fcγ受體的任一者，且其亦沒有非專一地結合至CHO WT細胞(封閉黑色三角形)。如所預期的，該陽性對照抗體結合Fcγ受體(封閉黑色圓形)而該在CH2區域含有LALA突變之陰性對照抗體G1-AA/4420沒有結合至Fcγ受體(空心灰色正方形)。

【0087】**圖4**顯示在一人類初級$CD8^+$ T細胞活化分析中，於抗人類CD137/PD-L1 mAb^2或陽性對照抗人類CD137抗體G1-AA/20H4.9存在下之人類IL-2 (hIL-2)的釋放。僅有當mAb^2由過度表現人類PD-L1之HEK細胞而交聯時，所有測試的mAb^2驅動CD137簇集與$CD8^+$ T細胞的活化而致使人類IL-2的釋放。抗人類CD137/PD-L1 mAb^2的EC_{50}值是小於陽性對照抗人類CD137抗體G1-AA/20H4.9當與抗人類CH2二級抗體交聯時的EC_{50}值(封閉黑色圓形、點線)，此表明使用mAb^2達成T細胞活化改良。全體顯示在hIL-2釋放上的增加，並且使用該陽性對照抗體比起使用抗人類CD137/PD-L1 mAb^2有一更大的IL-2釋放($E_{最大}$)。

【0088】**圖5**顯示在一人類初級$CD8^+$ T細胞活化分析中，於抗人類CD137/PD-L1 mAb^2或陽性對照抗人類

CD137抗體G1-AA/20H4.9存在下之人類IL-2 (hIL-2)的釋放。僅有當mAb^{2}由內源性表現人類PD-L1之MDA-MD-231細胞而交聯時，所有測試的mAb^{2}驅動CD137簇集與CD8$^+$ T細胞的活化而致使人類IL-2的釋放。抗人類CD137/PD-L1 mAb^{2}的EC_{50}值是小於陽性對照抗人類CD137抗體G1-AA/20H4.9當與抗人類CH2二級抗體交聯時的EC_{50}值(封閉黑色圓形、點線)，此表明使用mAb^{2}達成較佳活性。全體顯示在hIL-2釋放上的增加，並且使用該陽性對照抗體比起使用抗人類CD137/PD-L1 mAb^{2}有一更大的IL-2釋放($E_{最大}$)。

【0089】**圖6**顯示在一人類初級CD8$^+$ T細胞活化分析中，於抗人類CD137/PD-L1 mAb^2 FS22-172-003-AA/E12v2或陽性對照抗人類CD137抗體G1-AA/20H4.9存在下之人類IL-2 (hIL-2)的釋放。僅有當mAb^{2}由包含至少6.5%的總HEK細胞族群之HEK.hPD-L1細胞而交聯時，所有測試的mAb^{2}驅動CD137簇集與CD8$^+$ T細胞的活化而致使人類IL-2的釋放。當調控在該分析中所存在之HEK.hPD-L1細胞的百分率，抗人類CD137/PD-L1 mAb^{2}的EC_{50}值仍是相似的，但是最大活化($E_{最大}$)增加與該分析中HEK.hPD-L1交聯細胞的百分率增加有關。此表明當100%的HEK細胞表現PD-L1時，全部的mAb^{2}達成的最大活性較佳。

【0090】**圖7**顯示抗人類CD137/PD-L1 mAb^{2}能活化T細胞。(**A**)與(**B**)：在一初級人類混合淋巴球反應(MLR)

分析中IFN-γ的釋放是在抗人類CD137/PD-L1 mAb^2、抗人類PD-L1陽性對照抗體G1/S70或抗人類CD137陽性對照抗體G1-AA/20H4.9(以抗人類CH2抗體予以交聯)的存在下進行測試。在此分析中，(**A**)以FS22-053-008 Fcab為基的mAb^2與(**B**)以FS22-172-003 Fcab為基的mAb^2顯示要比任一陽性對照抗體還高的活性，此表明在相同分子中的PD-L1阻斷和CD137致效作用引發較大的T細胞活化，推測是經由以PD-L1為基的簇集及活化CD137。(**C**)在一初級人類MLR分析中IFN-γ的釋放是在抗人類CD137/PD-L1 mAb^2、抗人類PD-L1抗體G1-AA/E12v2、抗人類CD137陽性對照抗體G1-AA/20H4.9(以抗人類CH2抗體予以交聯)，或呈假mAb^2格式之抗人類CD137 Fcab(FS22-172-003-AA/D1.3)的存在下進行測試。在此分析中，FS22-172-003-AA/E12v2 mAb^2顯示要比任一陽性對照抗體或它的呈假mAb^2格式之組分Fcab還高的T細胞活化活性，此表明在相同分子中的PD-L1阻斷和CD137致效作用引發較大的T細胞活化，推測是經由以PD-L1為基的交聯致使簇集與活化CD137。

【0091】**圖8**顯示在一T細胞活化分析中，其中該等T細胞已經經工程處理成過度表現食蟹獼猴CD137，在抗人類CD137/PD-L1 mAb^2與陽性對照抗人類CD137抗體G1-AA/MOR7480.1存在下之IL-2釋放。在一DO11.10 T細胞活化分析中，僅有當由過度表現食蟹獼猴PD-L1之

HEK細胞而交聯時，所有測試的mAb²驅動CD137的簇集及活化，致使小鼠介白素-2 (mIL-2)的釋放(具有實心連接線之空心與封閉的黑色和灰色符號)。先前已由其他人證實對食蟹獼猴CD137有食蟹獼猴交叉反應性之陽性對照抗人類CD137抗體，G1-AA/MOR7480.1，在漸增濃度下顯示在mIL-2釋放上的增加(實心黑色圓形、點線)，然而該最大釋放是顯著低於所有抗人類CD137/PD-L1 mAb²所具者。所有抗人類CD137/PD-L1 mAb²在沒有過度表現PD-L1的HEK細胞進行交聯的情況下，相較於當交聯時顯示較低mIL-2釋放(數據未示出)。

【0092】**圖9**顯示在抗人類CD137/PD-L1 mAb² FS22-053-008-AA/E12v2或172-003-AA/E12v2或抗人類PD-L1陽性對照抗體G1-AA/E12v2或同型對照抗體G1-AA/HelD1.3之滴定物的存在下，從與同種異體的食蟹獼猴單核細胞培養之食蟹獼猴$CD4^+$ T細胞，在第2天的IL-2釋放(**圖9A**)或在第6天的IFN-γ釋放(**圖9B**)。

【0093】**圖10**顯示於DO11.10小鼠CD137 T細胞活化分析中、測試呈假mAb²格式的小鼠及人類交叉反應性CD137 Fcabs FS22-053-014及FS22-053-017、當以蛋白L交聯時的小鼠IL-2釋放。全部都呈HelD1.3假mAb²格式的FS22-053-014及FS22-053-017以及抗小鼠CD137 Fcab FS22m-063，當以蛋白L交聯時會活化CD137，導致mIL-2釋放。陽性對照抗小鼠CD137 mAb，Lob12.3，正如所料顯示出mIL-2釋放增高。全部呈假mAb²格式的抗

CD137 Fcabs在沒有蛋白L交聯的情況下(點線)均顯示出mIL-2釋放大幅下降，與交聯時相比。 FS22-053-017於此分析中的活性較低(EC_{50}與FS22-053-014相比差8倍)但是仍然於分析中顯示出活性。

【0094】**圖11**顯示指示$CD8^+$T細胞活化的小鼠IFNγ釋放。抗小鼠CD137/PD-L1 mAb^2此分析中顯示最大的效能，超出對人類CD137及PD-L1之陽性對照抗體或二者之組合。正如所料，呈假mAb^2格式的FS22m-063-AA Fcab(FS22m-063-AA/HelD1.3)沒有顯示出任何活性。

【0095】**圖12**顯示以G1-AA/4420(IgG對照)、G1/S70(PD-L1陽性對照)、G1-AA/Lob12.3及G1/Lob12.3(有及沒有LALA突變之CD137陽性對照)、G1/S70加上G1-AA/Lob12.3及FS22m-063-AA/S70之組合(呈模擬PD-L1 mAb^2格式的抗小鼠CD137 Fcab FS22m-063)治療的Balb/c小鼠內皮下生長的CT26同基因腫瘤模式之腫瘤體積測量。繪製加或減95%信賴區間之平均腫瘤體積的圖。與IgG對照治療的小鼠及抗PD-L1陽性對照mAb相比，FS22m-063-AA/S70能夠顯著降低CT26同基因腫瘤模式之腫瘤生長。顯示利用混合模型分析法、在全部研究時間的生長率成對統計顯著性。平均腫瘤體積依據數據常態性檢定而酌情顯示為幾何或算術平均。* $P \leq 0.05$；** $P \leq 0.01$；*** $P \leq 0.001$；**** $P \leq 0.0001$。

【0096】**圖13**顯示抗小鼠CD137/PD-L1 mAb^2於CT26同基因小鼠腫瘤模式之劑量反應研究結果。**A**：顯示

以3次劑量的G1-AA/4420(IgG對照，10 mg/kg)、G1/Lob12.3(CD137陽性對照，1 mg/kg)，及4種不同劑量(0.1 mg/kg、0.3 mg/kg、1.0 mg/kg和10.0 mg/kg)的抗小鼠CD137/PD-L1 mAb^2 FS22m-063-AA/S70治療的Balb/c小鼠內皮下生長的CT26同基因腫瘤模式之腫瘤體積測量。各劑量以垂直的黑色箭頭表示於x軸上。繪製加或減95%信賴區間之平均腫瘤體積的圖。與IgG對照治療的小鼠及抗PD-L1陽性對照mAb相比，FS22m-063-AA/S70能夠顯著降低CT26同基因腫瘤模式之腫瘤生長。顯示利用混合模型分析法、在全部研究時間的生長率成對統計顯著性。平均腫瘤體積依據數據常態性檢定而酌情顯示為幾何或算術平均。** $P \leq 0.01$；*** **** $P \leq 0.0001$。**B**：顯示以3次劑量的G1-AA/4420(IgG對照，~10 mg/kg)，及4種不同劑量2μg、6μg、20μg及200μg(等效於大約0.1 mg/kg、0.3 mg/kg、1.0 mg/kg及10.0 mg/kg)的抗小鼠CD137/PD-L1 mAb^2 FS22m-063-AA/S70治療的Balb/c小鼠內皮下生長的CT26同基因腫瘤模式之卡本麥爾(Kaplan Meier)圖。FS22m-063-AA/S70與IgG對照治療的小鼠相比，誘發CT26同基因腫瘤模式之劑量依賴式存活的增加。

【0097】**圖14**顯示於投予q2dx3加上四種不同劑量位準的抗小鼠CD137/PD-L1 mAb^2 FS22m-063-AA/S70的小鼠腫瘤及血液內$CD8^+$:$CD4^+$的百分比(percentage ratio)之劑量依賴式增加係顯示於A和B板以及$CD8^+$ T細

胞上的Ki67表現顯示於C和D組。

【0098】**圖15**顯示以G1-AA/4420(同型對照)、G1-AA/S70(PD-L1陽性對照)、G1-AA/Lob12.3(CD137陽性對照)、G1-AA/S70加上G1-AA/Lob12.3之組合及FS22m-063-AA/S70(呈模擬PD-L1 mAb^2格式的抗小鼠CD137 Fcab FS22m-063)治療的C57BL/6小鼠內皮下生長的MC38同基因腫瘤模式之腫瘤體積測量。繪製加或減95%信賴區間之平均腫瘤體積[以mm^3計]的圖。與IgG對照治療的小鼠、抗PD-L1陽性對照mAb治療的小鼠、抗CD137陽性對照治療的小鼠相比，FS22m-063-AA/S70能夠顯著降低MC38同基因腫瘤模式之腫瘤生長。顯示利用混合模型分析法、在全部研究時間的生長率成對統計顯著性。**** ≤ 0.0001 p-值。

【0099】**圖16**顯示以G1-AA/4420(同型對照)及抗小鼠CD137/PD-L1 mAb^2 FS22m-063-AA/S70治療的C57BL/6小鼠內皮下生長的B16.F10同基因腫瘤模式之腫瘤體積測量。二種組成物都用劑1mg/kg。繪製加或減95%信賴區間之平均腫瘤體積[以mm^3計]的圖。與IgG對照治療的小鼠相比，FS22m-063-AA/S70治療顯著降低B16.F10同基因腫瘤模式之腫瘤生長。顯示利用混合模型分析法、在全部研究時間的生長率成對統計顯著性。平均腫瘤體積依據數據常態性檢定而酌情顯示為幾何或算術平均。* P ≤ 0.05；** P ≤ 0.01；*** P ≤ 0.001；**** P ≤ 0.0001。

【0100】**圖17**顯示以(A)G1-AA/4420(IgG對照)、(C)G1/S70(抗PD-L1陽性對照)、(B)G1-AA/Lob12.3及(D)G1/Lob12.3(有及沒有LALA突變之抗CD137陽性對照)或(E)G1/S70加上G1-AA/Lob12.3之組合及(F)FS22m-063-AA/S70(呈模擬PD-L1 mAb^{2}格式的抗小鼠CD137 Fcab FS22m-063)治療的Balb/c小鼠內皮下生長的CT26同基因腫瘤模式之個別小鼠的義大利麵條圖。與IgG對照治療的小鼠相比，FS22m-063-AA/S70於CT26同基因腫瘤模式誘發腫瘤生長之顯著抑制。

【0101】**圖18**顯示以全部為1mg/kg之G1-AA/4420(IgG對照)、G1/S70加上G1-AA/Lob12.3之組合，及FS22m-063-AA/S70(呈模擬PD-L1 mAb^{2}格式的抗小鼠CD137 Fcab FS22m-063)治療的Balb/c小鼠內皮下生長的CT26同基因腫瘤模式之卡本麥爾圖。與IgG對照治療的小鼠相比，FS22m-063-AA/S70於CT26同基因腫瘤模式誘發顯著的存活。

【0102】**圖19**顯示以G1-AA/HelD1.3(IgG對照)、G1/S70(抗PD-L1陽性對照)、G1-AA/Lob12.3(抗CD137陽性對照)，及FS22m-063-AA/S70(呈模擬PD-L1 mAb^{2}格式的抗小鼠CD137 Fcab FS22m-063)治療的Balb/c小鼠內皮下生長的CT26同基因腫瘤模式之腫瘤體積測量。繪製加或減95%信賴區間之平均腫瘤體積的圖。與IgG對照治療的小鼠、抗PD-L1陽性對照mAb治療的小鼠及抗CD137陽性對照治療的小鼠相比，FS22m-063-AA/S70能

夠顯著降低CT26同基因腫瘤模式之腫瘤生長。顯示利用混合模型分析法、在全部研究時間的生長率成對統計顯著性。平均腫瘤體積依據數據常態性檢定而酌情顯示為幾何或算術平均。* $P \leq 0.05$；** $P \leq 0.01$；*** $P \leq 0.001$；**** $P \leq 0.0001$。

【0103】**圖20**顯示以G1-AA/HelD1.3(IgG對照)、G1/S70(抗PD-L1陽性對照)、G1-AA/Lob12.3(抗CD137陽性對照)及FS22m-063-AA/S70(呈模擬PD-L1 mAb^2格式的抗小鼠CD137 Fcab FS22m-063)治療的Balb/c小鼠內皮下生長的CT26同基因腫瘤模式之卡本麥爾圖。與IgG對照治療的小鼠及CD137陽性對照治療的小鼠相比，FS22m-063-AA/S70於CT26同基因腫瘤模式誘發顯著的存活。

【0104】**圖21**顯示以3次劑量的(A)G1-AA/4420(同型對照)、(B)G1-AA/S70(抗PD-L1陽性對照)、(C)G1-AA/Lob12.3(抗CD137陽性對照)、(D)G1-AA/S70加上G1-AA/Lob12.3之組合，及(E)FS22m-063-AA/S70(呈模擬PD-L1 mAb^2格式的抗小鼠CD137 Fcab FS22m-063)治療的C57BL/6小鼠內皮下生長的MC38同基因腫瘤模式之個別小鼠的義大利麵條圖。與IgG對照治療的小鼠相比，FS22m-063-AA/S70於MC38同基因腫瘤模式誘發完全的腫瘤生長抑制，導致100%無腫瘤小鼠。

【0105】**圖22**顯示以3次劑量的G1-AA/4420(同型對

照）、G1-AA/S70(抗PD-L1陽性對照)、G1-AA/Lob12.3(抗CD137陽性對照)、G1-AA/S70加上G1-AA/Lob12.3之組合，及FS22m-063-AA/S70(呈模擬PD-L1 mAb²格式的抗小鼠CD137 Fcab FS22m-063)治療的C57BL/6小鼠內皮下生長的MC38同基因腫瘤模式之卡本麥爾圖。與IgG對照治療的小鼠相比，FS22m-063-AA/S70於MC38同基因腫瘤模式誘發完全的存活。

【0106】**圖23**顯示以G1-AA/4420(同型對照)(**圖23A**)及抗小鼠CD137/PD-L1 mAb² FS22m-063-AA/S70(**圖23B**)治療的C57BL/6小鼠內皮下生長的B16.F10同基因腫瘤模式之個別小鼠的義大利麵條圖。與IgG對照治療的小鼠相比，FS22m-063-AA/S70於B16.F10同基因腫瘤模式誘發部分的腫瘤生長抑制。

【0107】**圖24**顯示抗-mCD137/PD-L1 mAb²對於T細胞的*離體*結合數據，其係由流動式細胞測量術所測定。平均螢光強度(Mean Fluorescent Intensity(MFI))數值係從與Alexa Fluor 488複合的抗人類Fc二級抗體所量測，抗人類Fc二級抗體偵測結合到細胞的抗-mCD137/PDl-L1 mAb²之人類Fc區。具有相較於未染色對照樣本較高的MFI之陽性細胞係被視為對於抗-mCD137/PD-L1呈陽性，且所呈現的數據以來自血液的(**A**)所有CD8⁺或(**B**)所有CD4⁺ T細胞、或是來自腫瘤的(**C**)所有CD8⁺或(**D**)所有CD4⁺ T細胞之百分率顯示陽性族

群。此等結果證明抗-mCD137/PD-L1 mAb²迅速與存在於腫瘤和血液兩者之$CD8^+$和$CD4^+$ T細胞兩者結合，並且陽性T細胞族群隨時間減少的百分率是取決於劑量位準。

【0108】**圖25**顯示*離體*T細胞之Ki67表現數據，其係由流動式細胞測量術所測定。平均螢光強度(MFI)數值是從與結合到細胞的PE-Cy7複合之抗Ki67抗體所量測。具有相較於未染色對照樣本較高的MFI之陽性細胞係被視為對於Ki67表現呈陽性，且所呈現的數據以來自血液的(**A**)所有$CD8^+$或(**B**)所有$CD4^+$ T細胞、或是來自腫瘤的(**C**)所有$CD8^+$ T細胞或(**D**)所有$CD4^+$ T細胞之百分率顯示陽性族群。此等結果證明以抗-mCD137/PD-L1 mAb²用劑之小鼠中的T細胞在血液中的$CD8^+$和$CD4^+$ T細胞兩者上迅速表現Ki67，且高百分率的Ki67陽性T細胞已經存在於從腫瘤微環境取得的樣本。觀察到Ki67隨時間表現的增加取決於劑量位準。

【0109】**圖26**顯示從對照抗體G1-AA/4420用劑的小鼠所得到的時間匹配樣本相對於其PD-L1受體佔有率，該樣本被*離體*摻雜以100 nM的抗-mCD137/PD-L1 mAb²以使所有PD-L1受體飽和，因此顯示出100%的PD-L1受體佔有率位準(三角形符號與虛線)。自由PD-L1受體是使用一與Bv605複合之競爭抗-mPD-L1抗體的平均螢光強度(MFI)數值來進行偵測。具有相較於未染色對照樣本較高的MFI之陽性細胞係被視為對於自由PD-L1呈陽性。結果以PD-L1受體佔有的百分率顯示陽性族群，該百分率是與

來自血液的(**A**) $CD8^+$或(**B**) $CD4^+$ T細胞、或是來自腫瘤的(**C**) $CD8^+$或(**D**) $CD4^+$ T細胞之100%飽和樣本作比較。此等結果證實在隨時間與劑量位準減少前PD-L1受體佔有率在血液中迅速達到100%。在T細胞上的PD-L1受體佔有率於腫瘤微環境中維持的時間比在血液中更長。

【0110】**圖27**顯示25、10、3與1 mg/kg之抗-CD137/PD-L1 mAb^2以單一靜脈單次劑量投予至C57BL/6初始的(naïve)小鼠之後的藥物動力學剖析。CD137/PD-L1 mAb^2在小鼠中隨時間的濃度被顯示。圖27證實於小鼠中，抗-CD137/PD-L1 mAb^2在每一劑量下的清除率是可相比於一標準人類IgG之清除。

【0111】**圖28**顯示在使用(**A**)食蟹獼猴PBMCs或(**B**)人類PBMCs所進行之PBMC T細胞活化分析中，抗人類CD137/PD-L1 mAb^2 FS22-172-003-AA/E12v2能活化T細胞。在一PBMC分析中IFN-γ的釋放是在抗人類CD137/PD-L1 mAb^2、抗人類CD137陽性對照抗體G1-AA/MOR7480.1(以抗人類CH2抗體予以交聯)的存在下進行測試。該mAb2在兩個分析中都顯示活性並且顯示要比該陽性對照抗體更高的活化位準，此表明由相同分子的PD-L1阻斷與CD137致效作用引發較大的T細胞活化，推測在食蟹獼猴與人類這兩者上都是經由以PD-L1為基的簇集及活化CD137。

【實施方式】

【0112】較佳實施例之詳細說明

現在將參照所附圖式來討論本發明的各態樣與各具體例。其他態樣與具體例將為本技術領域的嫻熟技術人員所顯而易見。內文中所提及的所有文獻皆在此併入本案以為參考資料。

【0113】本發明係有關於結合PD-L1及CD137二者的抗體分子。具體而言，本發明之抗體分子包含一用於PD-L1之以CDR為基礎的抗原結合位址及一座落於該抗體分子的一恆定域內之CD137抗原結合位址。術語“PD-L1”及“CD137”可以指人類PD-L1及人類CD137、鼠類PD-L1及鼠類CD137，及/或食蟹獼猴(cynomologus monkey)PD-L1及食蟹獼猴CD137，除非上下文另有要求。術語“PD-L1”及“CD137”較佳係指人類PD-L1及人類CD137，除非上下文另有要求。

【0114】術語“抗體分子”描述一種免疫球蛋白無論是天然還是部分或完全合成生產的。該抗體分子可以為人類或人化的，較佳為人類的。該抗體分子較佳為單株抗體分子。抗體的實例為免疫球蛋白同型，例如免疫球蛋白G及其等之同型亞類，例如IgG1、IgG2、IgG3及IgG4，以及其片段。就沒有汙染物的意義上，抗體分子可以為單離的，例如能結合其他多肽及/或血清組分的抗體。

【0115】當使用於本文中，術語“抗體分子”因而包括抗體片段，條件是該片段包含一用於PD-L1之以CDR為基礎的抗原結合位址及一座落於一恆定域之CD137抗原結合位址。除非上下文另有要求，否則當使用於本文中，術

語“抗體分子”因而等效於“抗體分子或其片段”。

【0116】取得單株及其他抗體並使用重組DNA科技技術來生產保留原始抗體專一性的其他抗體或嵌合分子是有可能的。此等技術可涉及導入提供CD137抗原結合位址的CDRs或可變異區域及/或恆定域序列至不同的免疫球蛋白之內。導入一免疫球蛋白的CDRs至另一免疫球蛋白之內係描述於舉例而言EP-A-184187、GB 2188638A及EP-A-239400之內。相關的恆定域序列可使用相似的技術。任擇地，生產抗體分子之融合瘤或其他細胞可經歷基因突變或其他改變，其可能或可能不會改變生產的抗體之結合專一性。

【0117】因抗體可以以許多方式予以修飾，所以術語“抗體分子”應該解釋為涵蓋抗體片段、衍生物、功能等效物及抗體同源物，包括含免疫球蛋白結合域之任何多肽，不論是天然或完全或部分合成的。因而含括融合至另一多肽之包含一免疫球蛋白結合域或等效物的嵌合分子。嵌合抗體之選殖及表現係描述於EP-A- 0120694及EP-A-0125023之內。

【0118】一種包含CDR序列及CH3域二者之抗體片段之實例為一種微型抗體(minibody)，其包含連結一CH3域之scFv(Hu等人(1996), Cancer Res., 56(13):3055-61)。

【0119】本發明之抗體分子結合PD-L1及CD137。於此上下文中結合可以指專一的結合。術語“專一的”可以指

抗體分子不會與其專一的結合伙伴，於此為PD-L1及CD137，以外的分子表現出任何明顯結合的情況。術語“專一的”也可適用於抗體分子對一些抗原所攜帶的特定表位，如PD-L1及CD137上的表位為專一的情況中，在這種情況下抗體分子能與攜帶該表位的各種抗原結合。

【0120】本發明人已證明本文所述之抗體分子對人類PD-L1顯示出高位準的專一性且與其他T細胞標靶PD-L1、CD80、PD-1或B7-H3不顯示出任何明顯結合。參見**實施例9.3**。因而，於較佳的具體例中，該抗體分子與下列中的任一者，優選為全體不結合，或不顯示出任何明顯結合：PD-L2、CD80、PD-1及B7-H3。本發明人亦證明CD137抗原結合位址與人類TNFRS受體CD40、OX40及GITR不顯示出任何明顯結合。參見**實施例3.6**。因而，於更佳的具體例中，該抗體分子與下列中的任一者，優選為全體不結合，或不顯示出任何明顯結合：PD-L2、CD80、PD-1、B7-H3、CD40、OX40及GITR。

【0121】抗體及用於建構其等的方法與用途為本技藝熟知的且描述於，舉例而言，Holliger & Hudson(2005)乙文內。取得單株及其他抗體並使用重組DNA科技技術來生產保留原始抗體專一性的其他抗體或嵌合分子是有可能的。此等技術可涉及導入一種抗體分子的CDRs或可變異區域至不同的抗體分子內(EP-A-184187、GB 2188638A及EP-A-239400)。

【0122】以CDR為基礎的抗原結合位址係一種於抗

體可變異區域內之抗原結合位址。以CDR為基礎的抗原結合位址可由三個CDRs形成，例如三個輕鏈可變異域(VL)CDRs或三個重鏈可變異域(VH) CDRs。以CDR為基礎的抗原結合位址較佳由六個CDRs形成；三個VL CDRs及三個VH CDRs。不同CDRs對抗原結合之貢獻在不同的抗原結合位址可能會有所不同。

【0123】抗原結合位址的三個VH域CDRs可座落於免疫球蛋白VH域且三個VL域CDRs可座落於免疫球蛋白VL域。舉例而言，以CDR為基礎的抗原結合位址可座落於一抗體可變異區域。

【0124】抗體分子可具有一種或較佳一種以上，舉例而言二種，用於第一抗原之以CDR為基礎的抗原結合位址。抗體分子因而可包含一種VH及一種VL域但較佳包含二種VH及二種VL域，即二種VH/VL域對，如舉例而言天然存在的IgG分子的情況。

【0125】以CDR為基礎的抗原結合位址可包含抗體**E12v2**、**E05v2**、**G12v2**或**lam-G02v3**，較佳為抗體**E12v2**、**E05v2**或**G12v2**，更佳為**E12v2**或 **E05v2**，最佳為**E12v2**，之三種VH CDRs或三種VL CDRs，較佳為三種VH CDRs及三種VL CDRs。

【0126】此等抗體之VH及VL域序列列出如下：

(i)序列辨識編號**12**及**14**內分別顯示的抗體**E12v2**之VH及VL域序列；

(ii) 序列辨識編號**23**及**25**內分別顯示的抗體**E05v2**之

VH及VL域序列；

(iii) 序列辨識編號**23**及**30**內分別顯示的抗體**G12v2**之VH及VL域序列；及

(iv) 序列辨識編號**23**及**41**內分別顯示的抗體**Iam-G02v3**之VH及VL域序列。

【0127】以上列出的抗體的VH及VL域序列而來的CDRs序列之判定對於熟悉此藝者沒有困難。CDR序列可以，舉例而言，根據Kabat(Kabat, E.A 等人(1991). Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edit., NIH Publication no. 91-3242. U.S. Department of Health and Human Services)或國際ImMunoGeneTic資訊系統(IMGT: Lefranc, M.-P.等人之*Nucleic Acids Res.* 43, D413-22 (2015))來決定。

【0128】根據Kabat編號之抗體分子的VH域CDR1、CDR2及CDR3序列可以分別為座落於該VH域之位置31-35、50-65及95-102處的序列。

【0129】根據IMGT編號之抗體分子的VH域CDR1、CDR2及CDR3序列可以分別為座落於該抗體分子的VH域之位置27-38、56-65及105-117處的序列。

【0130】根據Kabat編號之抗體分子的VL域CDR1、CDR2及CDR3序列可以分別為座落於該VL域之位置24-34、50-56及89-97處的序列。

【0131】根據IMGT編號之抗體分子的VL域CDR1、CDR2及CDR3序列可以分別為座落於該VL域之位置

27-38、56-65及105-117處的序列。

【0132】該抗體分子可包含**SYGIS**(序列辨識編號：**1**)之VH域CDR1、**WISAYSGGTNYAQKLQG**(序列辨識編號：**2**)之VH域CDR2及**DLFPTIFGVSYYYY**(序列辨識編號：**3**)之VH域CDR3的序列，其中該CDR序列係根據Kabat編號方式來定義。

【0133】於較佳的具體例中，該抗體分子於根據Kabat編號方式的位置28處包含一脯胺酸。

【0134】該抗體分子可包含**GYX$_1$FTSYG**(序列辨識編號：**45**)之VH域CDR1、**ISAYSGGT**(序列辨識編號：**8**)之VH域CDR2及**ARDLFPTIFGVSYYYY**(序列辨識編號：**9**)之VH域CDR3的序列；

其中**X$_1$**為**P**或**T**，較佳其中**X$_1$**為**P**；

且其中該CDR序列係根據IMGT編號方式來定義。

【0135】該抗體分子可包含下列之VH域CDR1、CDR2及CDR3的序列：

(i) 分別為序列辨識編號**7**、**8**及**9 [E12v2]**；或

(ii) 分別為序列辨識編號**21**、**8**及**9 [E05v2**、**G12v2**或**lam-G02v3]**，

其中該CDR序列係根據IMGT編號方式來定義。

【0136】VH域的CDRs側面可以是框架(FW)序列(HFW1、HFW2、HFW3及HFW4)。VH域可分別包含序列辨識編號：**51**、**52**、**53**及**54**之HFW1、HFW2、HFW3及HFW4序列，其中FW及CDR序列係根據Kabat編號方式

來定義。任擇地，VH域可分別包含序列辨識編號：**55**、**56**、**57**及**54**之HFW1、HFW2、HFW3及HFW4序列，其中FW及CDR係根據IMGT編號方式來定義。

【0137】該抗體分子可包含**TGTSSDVGGYNYVS**(序列辨識編號：**34**)之VL域CDR1、**EVTNRPS**(序列辨識編號：**35**)之VL域CDR2及**SSFKRGSTLVV**(序列辨識編號：**36**)之VL域CDR3的序列；其中該CDR序列係根據Kabat編號方式來定義。VL域可衍生自一種λ VL域。舉例而言，每種VL域CDRs的側面可以是衍生自一種λ VL域的框架(FW)序列(LFW1、LFW2、LFW3及LFW4)。具體而言，VL域可分別包含序列辨識編號：**65**、**66**、**67**及**68**之LFW1、LFW2、LFW3及LFW4序列，其中FW序列係根據Kabat編號方式來定義。

【0138】該抗體分子可包含**RASQSIX$_2$X$_3$RLA**(序列辨識編號：**46**)之VL域CDR1、**EASX$_4$X$_5$EX$_6$**(序列辨識編號：**47**)之VL域CDR2及**QQSYSX$_7$PX$_8$X$_9$T**(序列辨識編號：**48**)之VL域CDR3的序列；

其中**X$_2$**為**S**或**G**，**X$_3$**為**N**或**G**；**X$_4$**為**T**或**N**；**X$_5$**為**S**或**L**；**X$_6$**為**T**或**S**；**X$_7$**為**T**或**W**；**X$_8$**不存在或**R**；**X$_9$**為**Y**、**R**或**V**；及

其中該CDR序列及位置編號係根據Kabat編號方式來定義。

【0139】較佳地，該抗體分子包含**RASQSIGNRLA**(序列辨識編號：**4**)之VH域CDR1、

EASTSET(序列辨識編號：**5**)之VL CDR2及**QQSYSTPYT**(序列辨識編號：**6**)之VL CDR3的序列，其中該CDR序列係根據Kabat編號方式來定義。VL域可衍生自一種κ VL域。舉例而言，每種VL域CDRs的側面可以是衍生自一種κ VL域的框架(FW)序列(LFW1、LFW2、LFW3及LFW4)。具體而言，VL域可分別包含序列辨識編號：**58**、**59**、**60**及**61**之LFW1、LFW2、LFW3及LFW4序列，其中FW序列係根據Kabat編號方式來定義。

【0140】舉例而言，該抗體分子可包含下列之VL域CDR1、CDR2及CDR3的序列：

(i) 分別為序列辨識編號**4**、**5**及**6 [E12v2]**；

(ii) 分別為序列辨識編號**18**、**19**及**20 [E05v2]**；

(iii) 分別為序列辨識編號**18**、**19**及**29 [G12v2]**；或

(iv) 分別為序列辨識編號**34**、**35**及**36 [lam-G02v3]**，

其中該CDR序列係根據Kabat編號方式來定義。

【0141】該抗體分子可包含**SSDVGGYNY**(序列辨識編號：**37**)之VL域CDR1、**EVT**(序列辨識編號：**38**)之VL域CDR2及**SSFKRGSTLVV**(序列辨識編號：**36**)之VL域CDR3的序列；其中該CDR序列係根據IMGT編號方式來定義。VL域可衍生自一種λ VL域。舉例而言，每種VL域CDRs的側面可以是衍生自一種λ VL域的框架(FW)序列(LFW1、LFW2、LFW3及LFW4)。具體而言，VL域可分別包含序列辨識編號：**69**、**70**、**71**及**68**之LFW1、LFW2、LFW3及LFW4序列，其中FW序列係根據IMGT編號方式

來定義。

【0142】任擇地，該抗體分子可包含**QSIX$_{10}$X$_{11}$R**(序列辨識編號：**49**)之VL域CDR1、**EAS**(序列辨識編號：**11**)之VL域CDR2及**QQSYSX$_{12}$X$_{13}$X$_{14}$X$_{15}$T**(序列辨識編號：**50**)之VL域CDR3的序列；

其中**X$_{10}$**為**G**或**S**；**X$_{11}$**為**N**或**G**；**X$_{12}$**不存在或為**T**；**X$_{13}$**為**T**、**W**或**P**；**X$_{14}$**為**P**或**R**；**X$_{15}$**為**Y**或**R**；及

其中該CDR序列及位置編號係根據IMGT編號方式來定義。

【0143】較佳地，該抗體分子包含**QSIGNR**(序列辨識編號：**10**)之VH域CDR1、**EAS**(序列辨識編號：**11**)之VL CDR2及**QQSYSTPYT**(序列辨識編號：**6**)之VL CDR3的序列，其中該CDR序列係根據IMGT編號方式來定義。VL域可衍生自一種κ VL域。舉例而言，每種VL域CDRs的側面可以是衍生自一種κ VL域的框架(FW)序列(LFW1、LFW2、LFW3及LFW4)。具體而言，VL域可分別包含序列辨識編號：**62**、**63**、**64**及**61**之LFW1、LFW2、LFW3及LFW4序列，其中FW序列係根據IMGT編號方式來定義。

【0144】舉例而言，該抗體分子可包含下列之VL域CDR1、CDR2及CDR3的序列：

(i) 分別為序列辨識編號**10**、**11**及**6 [E12v2]**；

(ii) 分別為序列辨識編號**22**、**11**及**20 [E05v2]**；

(iii) 分別為序列辨識編號**22**、**11**及**29 [G12v2]**；或

(iv) 分別為序列辨識編號**37**、**38**及**36 [lam-G02v3]**，其中該CDR序列係根據IMGT編號方式來定義。

【0145】以CDR為基礎的抗原結合位址可包含抗體**E12v2**、**E05v2**、**G12v2**或**lam-G02v3**，較佳為抗體**E12v2**、**E05v2**或**G12v2**，更佳為**E12v2**或**E05v2**，最佳為**E12v2**，之VH或VL域，較佳為VH及VL域。

【0146】抗體**E12v2**、**E05v2**、**G12v2**及**lam-G02v3**之VH域可具有序列辨識編號**12**、**23**、**23**及**23**內分別列出之序列。抗體**E12v2**、**E05v2**、**G12v2**及**lam-G02v3**之VL域可具有序列辨識編號**14**、**25**、**30**及**41**內分別列出之序列。

【0147】本發明之抗體分子包含一座落於該抗體分子的恆定域之CD137抗原結合位址。恆定域可以為CL、CH1、CH2、CH3或CH4域，較佳恆定域為CH1、CH2或CH3域，更佳為CH2或CH3域，最佳為CH3域。CD137抗原結合位址包含一個或多個修飾的結構環於該抗體分子的恆定域。工程處理抗體恆定域的結構環來創造標靶抗原之抗原結合位址為本技藝已知的且描述於舉例而言，Wozniak-Knopp G等人(2010)；WO2006/072620及WO2009/132876之內。

【0148】該抗體分子之CD137抗原結合位址可包含一第一及第二序列，較佳為一第一及第二序列，其中該第一及第二序列係分別座落於該抗體分子之該恆定域，較佳為該CH3域的AB及EF結構環。

【0149】於較佳的具體例中，該抗體分子之CH3域的

位置95及96處的殘基為野生型，即較佳分別為精胺酸(R)及色胺酸(W)。此等殘基二者均座落於EF結構環。除非另有說明，否則本文之胺基酸殘基位置係根據ImMunoGeneTics (IMGT)編號方式予以編號。Lefranc等人，2005乙文中描述IMGT編號方式。

【0150】該第一序列較佳包含序列PPY(序列辨識編號：**78**)。

【0151】PPY序列可座落於該抗體分子的該CH3域之位置10至19之間，較佳為位置15至17之間。於較佳的具體例中，PPY序列係座落於該CH3域之位置16、16.5及16.4處。任擇地，PPY序列可座落於該CH3域之位置16至17之間。於任擇較佳的具體例中，PPY序列係座落於該CH3域之位置16.3、16.2及16.1處。於IMGT編號方式中，插入的殘基係根據其等座落的環的方向予以編號。設若環向“上”走，則插入的殘基是取緊接在插入前面的殘基號碼且插入的殘基號碼於序列內係以遞升的十進制數數字表示，諸如在殘基16後有三個突變的情況下為16、16.1、16.2、16.3。設若環向“下”走，則插入的殘基是取緊接在插入前面的殘基號碼且插入的殘基號碼於序列內係以下降的十進制數數字表示，諸如在殘基16後有三個突變的情況下為16、16.3、16.2、16.1(LeFranc等人，2005，以及LeFranc等人之2015)。

【0152】於較佳的具體例中，該AB結構環包含一胺基酸插入。該插入的長度可以為1至10、2至9、3至7、4

至6或5個胺基酸。較佳地，該插入的長度為5個胺基酸。

【0153】該插入可座落於該抗體分子的該CH3域之位置10至19之間，較佳為位置14至17之間，更佳為位置16至17之間。於較佳的具體例中，該插入係座落於該抗體分子的該CH3域之位置16.5至16.1處。**圖1**顯示包含CH3域之Fcabs，其中插入係座落於該CH3域之位置16.5至16.1處。

【0154】親和力成熟後辨識出的多數Fcabs都包含一白胺酸(L)殘基於CH3域之位置97處。許多此等Fcabs也包含一天冬胺酸(D)殘基或麩胺酸(E)殘基於CH3域之位置98處。此等胺基酸改變二者均係座落於該EF結構環內。此等結果暗示此等殘基之一者或二者對於CD137的結合可能很重要。因而，第二序列較佳包含序列LD或LE，其中該LD或LE序列較佳座落於抗體分子的CH3域之位置97及98處。

【0155】第一序列及第二序列可以為下列之CH3域的第一及第二序列：**FS22-053-008**、**FS22-053-009**、**FS22-053-011**、**FS22-053-017**、**FS22-053-014**、**FS22-053-010**、**FS22-053-012**、**FS22-053-013**、**FS22-053-015**、**FS22-053-016**、**FS22-053**，較佳為**FS22-053-008**、**FS22-053-009**、**FS22-053-011**、**FS22-053-017**或**FS22-053-014**，更佳為**FS22-053-008**、**FS22-053-009**、**FS22-053-011**或**FS22-053-017**，再更佳為專一性結合物件**FS22-053-008**。

【0156】第一序列及第二序列可以為下列之CH3域的第一及第二序列：**FS22-053-008**、**FS22-053-009**、**FS22-053-011**、**FS22-053-017**、**FS22-053-014**、**FS22-053-010**、**FS22-053-012**、**FS22-053-013**、**FS22-053-015**、**FS22-053-016**、**FS22-053**、**FS22-172-003**、**FS22-172-002**、**FS22-172-004**、**FS22-172-001**、**FS22-172-005**、**FS22-172-006**或**FS22-172**，較佳為**FS22-053-008**、**FS22-053-009**、**FS22-053-011**、**FS22-053-017**、**FS22-053-014**、**FS22-172-003**、**FS22-172-002**、**FS22-172-004**、**FS22-172-001**、**FS22-172-005**或**FS22-172-006**，更佳為**FS22-053-008**、**FS22-053-009**、**FS22-053-011**、**FS22-053-017**、**FS22-172-003**、**FS22-172-002**或**FS22-172-004**，甚至更佳為**FS22-053-008**或**FS22-172-003**，還更佳為**FS22-172-003**。於任擇較佳的具體例中，第一序列及第二序列可以為**FS22-053-017**之CH3域的第一及第二序列。

【0157】**FS22-053-008**、**FS22-053-009**、**FS22-053-011**、**FS22-053-017**、**FS22-053-014**、**FS22-053-010**、**FS22-053-012**、**FS22-053-013**、**FS22-053-015**、**FS22-053-016**、**FS22-053**、**FS22-172-003**、**FS22-172-002**、**FS22-172-004**、**FS22-172-001**、**FS22-172-005**、**FS22-172-006**及**FS22-172**之CH3域序列係分別列於序列辨識編號：**81**、

84、87、90、93、96、99、102、105、108、111、115、118、121、124、127、130及132內。

【0158】**FS22-053-008**、**FS22-053-009**、**FS22-053-011**、**FS22-053-017**、**FS22-053-014**、**FS22-053-010**、**FS22-053-012**、**FS22-053-013**、**FS22-053-015**、**FS22-053-016**、**FS22-053**、**FS22-172-003**、**FS22-172-002**、**FS22-172-004**、**FS22-172-001**、**FS22-172-005**、**FS22-172-006**及**FS22-172**的第一及第二序列可以分別為**FS22-053-008**、**FS22-053-009**、**FS22-053-011**、**FS22-053-017**、**FS22-053-014**、**FS22-053-010**、**FS22-053-012**、**FS22-053-013**、**FS22-053-015**、**FS22-053-016**、**FS22-053**、**FS22-172-003**、**FS22-172-002**、**FS22-172-004**、**FS22-172-001**、**FS22-172-005**、**FS22-172-006及FS22-172**之CH3域的位置14至17，及位置91至99之間的序列。

【0159】任擇地，**FS22-053-008**、**FS22-053-010**、**FS22-053-011**、**FS22-053-012及FS22-053-016**之第一及第二序列可以分別為**FS22-053-008**、**FS22-053-010**、**FS22-053-011**、**FS22-053-012及FS22-053-016**之CH3域的位置14至17，及位置92至99之間的序列。

【0160】**FS22-053-015**之第一及第二序列可以任擇地分別為**FS22-053-015**之CH3域的位置14至17，及位置92至98之間的序列。

【0161】抗體分子之CD環序列較佳為未經修飾的，即野生型。CD環序列因而較佳具有序列辨識編號：**73**內列出的序列。CD環序列較佳座落於該CH3域的位置43至78處。

【0162】第一及第二序列可以分別為**FS22-053-008**、**FS22-053-009**、**FS22-053-011**、**FS22-053-017**、**FS22-053-014**、**FS22-053-010**、**FS22-053-012**、**FS22-053-013**、**FS22-053-015**、**FS22-053-016**、**FS22-053**、**FS22-172-003**、**FS22-172-002**、**FS22-172-004**、**FS22-172-001**、**FS22-172-005**、**FS22-172-006或FS22-172**之完整的AB及EF結構環序列。判定CH3域序列之AB、CD及EF結構環的位置，舉例而言依據IMGT、IMGT外顯子、EU或Kabat編號系統，係在本技術人員的能力範圍內且於Hasenhindl等人(2013)乙文中有描述。於較佳的具體例中，AB、CD及EF結構環依據IMGT編號系統係分別座落於該CH3域之位置10至19、42至79以及91至102之間。於較佳的具體例中，第一、第二及第三序列因而分別為**FS22-053-008**、**FS22-053-009**、**FS22-053-011**、**FS22-053-017**、**FS22-053-014**、**FS22-053-010**、**FS22-053-012**、**FS22-053-013**、**FS22-053-015**、**FS22-053-016**、**FS22-053**、**FS22-172-003**、**FS22-172-002**、**FS22-172-004**、**FS22-172-001**、**FS22-172-005**、**FS22-172-006或FS22-172**的該CH3域之位置10至19、42

至79以及91至102之間的序列。

【0163】因而，於一較佳的具體例中，CD137抗原結合位址的第一及第二序列包含序列辨識編號**171**及**172**內分別列出的AB及EF結構環序列**[FS22-172-003]**，或序列辨識編號**173**及**174**內分別列出的AB及EF結構環序列**[FS22-53-008]**。於更佳的具體例中，CD137抗原結合位址的第一及第二序列包含序列辨識編號**171**及**172**內分別列出的AB及EF結構環序列**[FS22-172-003]**。

【0164】於任擇較佳的具體例中，CD137抗原結合位址的第一及第二序列包含序列辨識編號**173**及**175**內分別列出的AB及EF結構環序列**[FS22-053-017]**。

【0165】於較佳的具體例中，CD137抗原結合位址包含第一及/或第二，較佳為下列列出的第一及第二序列：

(i) 分別為序列辨識編號79及80 **[FS22-053-008]**；

(ii) 分別為序列辨識編號79及83 **[FS22-053-009]**；

(iii) 分別為序列辨識編號79及86 **[FS22-053-011]**；

(iv) 分別為序列辨識編號79及89 **[FS22-053-017]**；

(v) 分別為序列辨識編號79及92 **[FS22-053-014]**；

(vi) 分別為序列辨識編號79及95 **[FS22-053-010]**；

(vii) 分別為序列辨識編號79及98 **[FS22-053-012]**；

(viii)分別為序列辨識編號79及101**[FS22-053-013]**；

(ix) 分別為序列辨識編號79及104 **[FS22-053-015]**；

(x) 分別為序列辨識編號79及107 **[FS22-053-016]**；

(xi) 分別為序列辨識編號79及110 **[FS22-053]**；

(xii) 分別為序列辨識編號113及114 **[FS22-172-003]**；

(xiii) 分別為序列辨識編號117及114 **[FS22-172-002]**；

(xiv) 分別為序列辨識編號120及114 **[FS22-172-004]**；

(xv) 分別為序列辨識編號123及114 **[FS22-172-001]**；

(xvi) 分別為序列辨識編號126及114 **[FS22-172-005]**；

(xvii) 分別為序列辨識編號129及114 **[FS22-172-006]**；或

(xviii)分別為序列辨識編號129及114 **[FS22-172]**；其中該第一及第二序列較佳分別座落於該抗體分子之該CH3域的位置14至17及91至99之間。

【0166】於還更佳的具體例中，該抗體分子包含第一及/或第二，較佳為下列列出的第一及第二序列：

(i) 分別為序列辨識編號79及80 **[FS22-053-008]**；

(ii)分別為序列辨識編號79及83**[FS22-053-009]**；

(iii)分別為序列辨識編號79及86**[FS22-053-011]**；

(iv)分別為序列辨識編號79及89**[FS22-053-017]**；

(v)分別為序列辨識編號113及114**[FS22-172-003]**；

(vi) 分別為序列辨識編號117及114**[FS22-172-002]**；**或**

(vii)分別為序列辨識編號120及114**[FS22-172-004]**。

【0167】於甚至更佳的具體例中，該抗體分子之CD137抗原結合位址包含序列辨識編號**113**及**114**內分別列出的第一及第二序列**[FS22-172-003]**，或序列辨識編號**79**及**80**內分別列出的第一及第二序列**[FS22-53-008]**。於還更佳的具體例中，該抗體分子之CD137抗原結合位址包含序列辨識編號**113**及**114**內分別列出的第一及第二序列**[FS22-172-003]**。舉例而言，該CD137抗原結合位址可包含序列辨識編號**171**及**172**內分別列出的AB及EF結構環序列**[FS22-172-003]**。

【0168】於一具體例中，抗體分子，特別是包含序列辨識編號**129**及**114** **[FS22-172-006]**列出的第一及/或第二，較佳為第一及第二序列之抗體分子，可包含一白胺酸(L)於該抗體分子的CH3域之位置19處。

【0169】作為IMGT編號之替代方案，胺基酸殘基位置，包括如本文所述之胺基酸序列、取代、缺失及插入的位置，可依據IMGT外顯子編號(亦稱為連續編號)、EU編號或Kabat編號來編號。**圖1**顯示CH3域殘基位置的IMGT編號、IMGT外顯子編號、EU編號及Kabat編號之間的協和。因而，舉例而言，在根據IMGT編號方式來編號殘基位置的情況下，本申請案指稱第一序列分別座落於該殖株的CH3域之位置14至17之間，在根據IMGT外顯子編號方式來編號殘基位置的情況下，第一序列係座落於該CH3域之位置18至21之間，如**圖1**中所示。任擇地，CH3域之胺

基酸殘基位置，包括如本文所述之CH3域的胺基酸序列、取代、缺失及插入的位置，可參考**序列辨識編號：75**內列出的野生型CH3域序列中其等的位置來定義。**圖1**亦顯示IMGT編號與野生型CH3域序列之間的協和。

【0170】於一具體例中，該抗體分子包含一CH3域，其包含下列、具有下列或由下列所組成：**FS22-053-008**、**FS22-053-009**、**FS22-053-011**、**FS22-053-017**、**FS22-053-014**、**FS22-053-010**、**FS22-053-012**、**FS22-053-013**、**FS22-053-015**、**FS22-053-016**、**FS22-053**、**FS22-172-003**、**FS22-172-002**、**FS22-172-004**、**FS22-172-001**、**FS22-172-005**、**FS22-172-006**或**FS22-172**之CH3域序列，其中**FS22-053-008**、**FS22-053-009**、**FS22-053-011**、**FS22-053-017**、**FS22-053-014**、**FS22-053-010**、**FS22-053-012**、**FS22-053-013**、**FS22-053-015**、**FS22-053-016**、**FS22-053**、**FS22-172-003**、**FS22-172-002**、**FS22-172-004**、**FS22-172-001**、**FS22-172-005**、**FS22-172-006**及**FS22-172**之CH3域序列係分別列於序列辨識編號**81**、**84**、**87**、**90**、**93**、**96**、**99**、**102**、**105**、**108**、**111**、**115**、**118**、**121**、**124**、**127**、**130**及**132**內。

【0171】於較佳的具體例中，該抗體分子包含一CH3域序列，其包含下列、具有下列或由下列所組成：序列辨識編號**115**及**81**內分別列出的**FS22-172-003**或

FS22-053-008之CH3域序列。於更佳的具體例中，該抗體分子包含一CH3域，其包含序列辨識編號**115**內列出的**FS22-172-003**之CH3域序列、具有該序列或由該序列所組成。

【0172】於任擇較佳的具體例中，該抗體分子包含一CH3域，其包含序列辨識編號**90**內列出的**FS22-053-017**之CH3域序列、具有該序列或由該序列所組成。

【0173】該抗體分子之CH3域可選擇性地包含一額外的離胺酸殘基(K)於最接近該CH3域序列之C端處。

【0174】此外，本發明之抗體分子可包含免疫球蛋白G分子之CH2域，例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4分子之CH2域。本發明之抗體分子較佳包含IgG1分子之CH2域。該CH2域可具有序列辨識編號：**76**內列出的序列。

【0175】已知CH2域會結合Fcγ受體及補體。抗體依賴性細胞媒介的細胞毒性(ADCC)需要CH2域與Fcγ受體的結合，而補體依賴性細胞毒性(CDC)需要結合補體。該抗體分子之CH2域較佳包含一個或多個突變其能減少或廢除CH2域與一個或多個Fcγ受體，例如FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIII及/或補體的結合作用。本發明人假設減少或廢除與Fcγ受體的結合作用會降低或消除該抗體分子所媒介的ADCC。相似地，減少或廢除與補體的結合作用預期會降低或消除該抗體分子所媒介的CDC。不希望受理論束縛，但預料此於投予該抗體分子給患者時會減少或避免肝毒性。此外，減少或廢除與Fcγ受體的結合預期可

用於抗體分子包含用於免疫細胞抗原的第二抗原結合位址的情況，其中應該可避免該抗體分子結合的免疫細胞被ADCC及/或CDC媒介的致死作用。減少或廢除CH2域與一個或多個Fcγ受體及/或補體之結合作用的突變為本技藝已知的(Wang等人，2018)。此等突變包括Bruhns等人，2009及Hezareh等人，2001之內描述的"LALA突變"，其涉及以丙胺酸取代CH2域之位置1.3及1.2之白胺酸殘基(L1.3A及L1.2A)。任擇地，經由藉著使CH2域之位置84.4之天冬醯胺酸(N)突變為丙胺酸、甘胺酸或麩醯胺酸(N84.4A、N84.4G或N84.4Q)，而使保守的N-鍵接醣基化位址突變來產生無醣苷基(a-glycosyl)的抗體，亦已知會降低IgG1效應子功能(Wang等人，2018)。作為另一種選擇，已知經由使CH2域之位置114之脯胺酸突變為丙胺酸或甘胺酸(P114A或P114G)會降低補體活化(C1q結合)及ADCC(Idusogie等人，2000；Klein等人，2016)。亦可組合此等突變俾以產生具有進一步降低或沒有ADCC或CDC活性的抗體分子。

【0176】因而，該抗體分子可包含一CH2域，其中該CH2域較佳包含：

(i) 丙胺酸殘基於位置1.3及1.2處；及/或

(ii) 一丙胺酸或甘胺酸於位置114處；及/或

(iii) 一丙胺酸、麩醯胺酸或甘胺酸於位置84.4處；

其中該胺基酸殘基編號係根據IMGT編號方式。

【0177】於較佳的具體例中，該抗體分子包含一CH2

域，其中該CH2域包含：

(i) 一丙胺酸殘基於位置1.3處；及

(ii) 一丙胺酸殘基於位置1.2處；

其中該胺基酸殘基編號係根據IMGT編號方式。

【0178】舉例而言，該CH2域可具有序列辨識編號：**77**內列出的序列。

【0179】於任擇較佳的具體例中，該抗體分子包含一CH2域，其中該CH2域包含：

(i) 一丙胺酸殘基於位置1.3處；

(ii) 一丙胺酸殘基於位置1.2處；及

(iii) 一丙胺酸殘基於位置114處；

其中該胺基酸殘基編號係根據IMGT編號方式。

【0180】舉例而言，該CH2域可具有序列辨識編號：**176**內列出的序列。

【0181】於較佳的具體例中，結合PD-L1及CD137的該抗體分子包含

(a) 一用於PD-L1之以CDR為基礎的抗原結合位址；及

(b) 一座落於該抗體分子的一CH3域之CD137抗原結合位址；

其中該以CDR為基礎的抗原結合位址包含抗體**E12v2**、**E05v2**或**G12v2**，較佳為**E12v2**，之三種VH CDRs及三種VL CDRs(CDRs 1-6)；及

其中該CD137抗原結合位址包含一第一序列及一第二

序列分別座落於該CH3域的AB及EF結構環；其中該第一及第二序列具有序列辨識編號**113**及**114 [FS22-172-003]**，或**79**及**80 [FS22-53-008]**內分別列出的序列，較佳其中該第一及第二序列具有序列辨識編號**113**及**114 [FS22-172-003]**內列出的序列。

【0182】如實施例內所述，一種具有CD137抗原結合位址之抗體分子，該CD137抗原結合位址包含序列辨識編號**79**及**89 [FS22-053-017]**內分別列出的第一序列及第二序列，能結合人類、食蟹獼猴及意外地能結合小鼠CD137。本發明人證明此抗體分子當交聯時於人類、食蟹獼猴及小鼠T細胞活化分析中具有活性。

【0183】於任擇較佳的具體例中，結合PD-L1及CD137的該抗體分子包含

(a) 一用於PD-L1之以CDR為基礎的抗原結合位址；及

(b) 一座落於該抗體分子的一CH3域之CD137抗原結合位址；

其中該以CDR為基礎的抗原結合位址包含抗體**E12v2**、**E05v2**或**G12v2**，較佳為**E12v2**，之三種VH CDRs及三種VL CDRs(CDRs 1-6)；及

其中該CD137抗原結合位址包含一第一序列及一第二序列分別座落於該CH3域的AB及EF結構環，其中該第一及第二序列具有序列辨識編號**79**及**89 [FS22-053-017]**內列出的序列。

【0184】於一些具體例中，該抗體分子包含

(a) 一用於PD-L1之以CDR為基礎的抗原結合位址；及

(b) 一座落於該抗體分子的一CH3域之CD137抗原結合位址；

其中該其中該以CDR為基礎的抗原結合位址包含抗體**E12v2**、**E05v2**或**G12v2**，較佳為**E12v2**，之三種VH CDRs及三種VL CDRs(CDRs 1-6)；及

其中該CD137抗原結合位址包含一第一序列及一第二序列分別座落於該CH3域的AB及EF結構環，其中該第一及第二序列具有序列辨識編號**113**及**114 [FS22-172-003]**，或**79**及**80 [FS22-53-008]**內分別列出的序列，較佳該第一及第二序列具有序列辨識編號**113**及**114 [FS22-172-003]**內列出的序列，但有條件是該抗體分子不包含抗體**G12v2**之CDRs 1-6—其係與具有序列辨識編號**79**及**80 [FS22-053-008]**內列出的第一及第二序列之CD137抗原結合位址配對。

【0185】於進一步較佳的具體例中，結合PD-L1及CD137的抗體分子包含

(a) 一用於PD-L1之以CDR為基礎的抗原結合位址；及

(b) 一CH3域，其包含下列、具有下列或由下列所組成：序列辨識編號**115 [FS22-172-003]**或**81[FS22-53-008]**，較佳為序列辨識編號

115[FS22-172-003]內列出的序列；

其中該以CDR為基礎的抗原結合位址包含抗體**E12v2**、**E05v2**或**G12v2**，較佳為**E12v2**，之三種VH CDRs及三種VL CDRs (CDRs 1-6)。

【0186】於進一步任擇較佳的具體例中，結合PD-L1及CD137的抗體分子包含

(a) 一用於PD-L1之以CDR為基礎的抗原結合位址；及

(b) 一CH3域，其包含下列、具有下列或由下列所組成：序列辨識編號**90**內列出的序列**[FS22-053-017]**；

其中該以CDR為基礎的抗原結合位址包含抗體**E12v2**、**E05v2**或**G12v2**，較佳為**E12v2**，之三種VH CDRs及三種VL CDRs(CDRs 1-6)。

【0187】於更進一步較佳的具體例中，結合PD-L1及CD137的抗體分子包含

(a) 一VH域及一VL域，其包含用於PD-L1之以CDR為基礎的抗原結合位址；及

(b) 一CH3域，其包含下列、具有下列或由下列所組成：序列辨識編號**115 [FS22-172-003]**或**81 [FS22-53-008]**，較佳為序列辨識編號**115 [FS22-172-003]**內列出的序列；

其中該VH及VL域包含下列、具有下列或由下列所組成：抗體**E12v2**、**E05v2**或**G12v2**，較佳為**E12v2**之VH及VL。

【0188】於更進一步任擇較佳的具體例中，結合PD-L1及CD137的抗體分子包含

(a) 一VH域及一VL域，其包含用於PD-L1之以CDR為基礎的抗原結合位址；及

(b) 一CH3域，其包含下列、具有下列或由下列所組成：序列辨識編號**90**內列出的序列**[FS22-053-017]**；

其中該VH及VL域包含下列、具有下列或由下列所組成：抗體**E12v2**、**E05v2**或**G12v2**，較佳為**E12v2**之VH及VL。

【0189】於更進一步較佳的具體例中，結合PD-L1及CD137的抗體分子包含-

(a) 一VH域及一VL域，其包含用於PD-L1之以CDR為基礎的抗原結合位址；

(b) 一CH3域，其包含下列、具有下列或由下列所組成：序列辨識編號**115 [FS22-172-003]**或**81 [FS22-53-008]**，較佳為序列辨識編號**115 [FS22-172-003]**內列出的序列；

(c) 一CH2域，其包含下列、具有下列或由下列所組成：序列辨識編號：**76**內列出的序列，其中該CH2域序列包含：

(i) 一丙胺酸殘基於位置1.3處；

(ii) 一丙胺酸殘基於位置1.2處；

其中該胺基酸殘基編號係根據IMGT編號方式；及

其中該VH及VL域包含下列、具有下列或由下列所組

成：抗體**E12v2**、**E05v2**或**G12v2**，較佳為**E12v2**之VH及VL。

【0190】於另外的具體例中，結合PD-L1及CD137的抗體分子包含：

(a) 一VH域及VL域，其包含一用於PD-L1之以CDR為基礎的抗原結合位址，其中該以CDR為基礎的抗原結合位址包含CDRs 1-6；及

(b) 一座落於該抗體分子的一CH3域之CD137抗原結合位址，該CD137抗原結合位址包含一第一序列及一第二序列座落於該CH3域的AB及EF結構環；

其中該CDRs 1-6、第一序列及第二序列具有下列列出的序列：

(i)分別為序列辨識編號**1**、**2**、**3**、**4**、**5**、**6**、**113**及**114 [FS22-172-003-AA/E12v2]**；

(ii)分別為序列辨識編號**1**、**2**、**3**、**18**、**19**、**20**、**113**及**114 [FS22-172-003-AA/E05v2]**；

(iii)分別為序列辨識編號**1**、**2**、**3**、**18**、**19**、**29**、**113**及**114 [FS22-172-003-AA/G12v2]**；

(iv)分別為序列辨識編號**1**、**2**、**3**、**4**、**5**、**6**、**79**及**80 [FS22-053-008-AA/E12v2]**；或

(v)分別為序列辨識編號**1**、**2**、**3**、**18**、**19**、**20**、**79**及**80 [FS22-053-008-AA/E05v2]**,

或

其中該VH域、VL域、第一序列及第二序列具有下列

列出的序列：

(i) 分別為序列辨識編號**12**、**14**、**113**及**114** **[FS22-172-003-AA/E12v2]**；

(ii) 分別為序列辨識編號**23**、**25**、**113**及**114** **[FS22-172-003-AA/E05v2]**；

(iii) 分別為序列辨識編號**23**、**30**、**113**及**114** **[FS22-172-003-AA/G12v2]**；

(iv) 分別為序列辨識編號**12**、**14**、**79**及**80** **[FS22-053-008-AA/E12v2]**；或

(v) 分別為序列辨識編號**23**、**25**、**79**及**80** **[FS22-053-008-AA/E05v2]**；或

其中該VH域、VL域及CH3域具有下列列出的序列：

(i) 分別為序列辨識編號**12**、**14**及**115** **[FS22-172-003-AA/E12v2]**；

(ii) 分別為序列辨識編號**23**、**25**及**115** **[FS22-172-003-AA/E05v2]**；

(iii) 分別為序列辨識編號**23**、**30**及**115** **[FS22-172-003-AA/G12v2]**；

(iv) 分別為序列辨識編號**12**、**14**及**81** **[FS22-053-008-AA/E12v2]**；或

(v) 分別為序列辨識編號**23**、**25**及**81** **[FS22-053-008-AA/E05v2]**。

【0191】於更進一步較佳的具體例中，結合PD-L1及CD137的抗體分子包含一重鏈，該重鏈包含下列、具有下

列或由下列所組成：下列抗體之重鏈及輕鏈：

(i) 序列辨識編號**134及17**內分別列出的**FS22-172-003-AA/E12v2**之重鏈及輕鏈；

(ii) 序列辨識編號**137及28**內分別列出的**FS22-172-003-AA/E05v2**之重鏈及輕鏈；

(iii) 序列辨識編號**140及33**內分別列出的**FS22-172-003-AA/G12v2**之重鏈及輕鏈；

(iv) 序列辨識編號**143及17**內分別列出的**FS22-053-008-AA/E12v2**之重鏈及輕鏈；

(v) 序列辨識編號**146及28**內分別列出的**FS22-053-008-AA/E05v2**之重鏈及輕鏈；或

(vi) 序列辨識編號**149及33**內分別列出的**FS22-053-008-AA/G12v2**之重鏈及輕鏈。

【0192】於甚至更佳的具體例中，結合PD-L1及CD137的抗體分子包含一重鏈，該重鏈包含下列、具有下列或由下列所組成：下列抗體之重鏈及輕鏈：

(i) 序列辨識編號**134及17**內分別列出的**FS22-172-003-AA/E12v2**之重鏈及輕鏈；

(ii) 序列辨識編號**137及28**內分別列出的**FS22-172-003-AA/E05v2**之重鏈及輕鏈；

(iii) 序列辨識編號**140及33**內分別列出的**FS22-172-003-AA/G12v2**之重鏈及輕鏈；

(iv) 序列辨識編號**143及17**內分別列出的**FS22-053-008-AA/E12v2**之重鏈及輕鏈；或

(v) 序列辨識編號**146及28**內分別列出的**FS22-053-008-AA/E05v2**之重鏈及輕鏈。

【0193】於還更佳的具體例中，結合PD-L1及CD137的抗體分子包含一重鏈，該重鏈包含下列、具有下列或由下列所組成：下列抗體之重鏈及輕鏈：

(i) 序列辨識編號**134及17**內分別列出的**FS22-172-003-AA/E12v2**之重鏈及輕鏈；或

(iv) 序列辨識編號**143及17**內分別列出的**FS22-053-008-AA/E12v2**之重鏈及輕鏈。

【0194】於還更佳的具體例中，結合PD-L1及CD137的抗體分子包含一重鏈，該重鏈包含下列、具有下列或由下列所組成：序列辨識編號**134及17**內分別列出的抗體**FS22-172-003-AA/E12v2**之重鏈及輕鏈。

【0195】於更進一步較佳的具體例中，結合PD-L1及CD137的抗體分子包含一重鏈，該重鏈包含下列、具有下列或由下列所組成：下列抗體之重鏈及輕鏈：

(i) 序列辨識編號**152及17**內分別列出的**FS22-053-017-AA/E12v2**之重鏈及輕鏈；

(ii) 序列辨識編號**153及28**內分別列出的**FS22-053-017-AA/E05v2**之重鏈及輕鏈；或

(iii) 序列辨識編號**154及33**內分別列出的**FS22-053-017-AA/G12v2**之重鏈及輕鏈。

【0196】本發明之抗體分子亦可包含於此所揭示的第一、第二或第三序列、AB、CD或EF結構環序列、CH3

域、CH2域、CH2及CH3域、CDR、FW、VH域、VL域、輕鏈及/或重鏈序列之變異體。可藉由序列改變或突變及篩選的方法來得到合適的變異體。於較佳的具體例中，一種包含一或多變異體序列的抗體分子保留親代抗體分子的一或多功能特徵，例如對於PD-L1及CD137之結合專一性及/或結合親和力。舉例而言，一種包含一或多變異體序列的抗體分子較佳以如該(親代)抗體分子相同的親和力，或比該(親代)抗體分子更高的親和力與PD-L1及/或CD137結合。該親代抗體分子為一種抗體分子其不含已經併入變異體抗體分子內的胺基酸取代、缺失及/或插入。

【0197】舉例而言，本發明之抗體分子可包含一第一、第二或第三序列、AB、CD或EF結構環序列、CH3域、CH2域、CH2及CH3域、CDR、FW、VH域、VL域、輕鏈及/或重鏈序列，其與於此所揭示的結構環、CH3域、CH2域、CH2及CH3域、CDR、FW、VH域、VL域、輕鏈或重鏈序列，有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%或至少99.9%的序列同一性。

【0198】於較佳的具體例中，本發明之抗體分子包含一CH3域序列，其與序列辨識編號：**115 [FS22-172-003]**或**81[FS22-053-008]**，較佳為序列辨識編號：**115 [FS22-172-003]**內列出的CH3域序列，有至少97%、至少

98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%或至少99.9%的序列同一性。

【0199】於進一步較佳的具體例中，本發明之抗體分子具有或包含一CH2域序列，其與序列辨識編號：**76**或**77**內列出的CH2域序列，有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%或至少99.9%的序列同一性。

【0200】序列同一性一般係參考演算法GAP(Wisconsin GCG軟體包，Accelerys Inc, San Diego USA)來定義。GAP使用Needleman及Wunsch演算法來排列兩個完整序列，其使得匹配數目最大且間隙數目最小。一般而言，使用預設參數，且空格創造罰分(gap creation penalty)等於12以及空格擴展罰分等於4。使用GAP可能是較佳的，但是也可使用其他的演算法例如BLAST(其使用Altschul等人，1990的方法)、FASTA(其使用Pearson and Lipman，1988的方法)，或Smith-Waterman演算法(Smith and Waterman，1981)，或之前的Altschul等人，1990乙文之TBLASTN程式，一般使用預設參數。具體而言，可以使用psi-Blast演算法(Altschul等人，1997)。

【0201】本發明之抗體分子亦可包含一第一、第二或第三序列、AB、CD或EF結構環序列、CH3域、CH2域、CH2及CH3域、CDR、FW、VH域、VL域、輕鏈及/或重

鏈，其與於此所揭示的第一、第二或第三序列、AB、CD或EF結構環序列、CH3域、CH2域、CH2及CH3域、CDR、FW、VH域、VL域、輕鏈或重鏈序列相比，具有一或多個胺基酸序列改變(加入、缺失、取代及/或插入一胺基酸殘基)，較佳20個改變或更少、15個改變或更少、10個改變或更少、5個改變或更少、4個改變或更少、3個改變或更少、2個改變或更少或是1個改變。具體而言，可以於CH3域的VH及VL域序列及/或一或多框架區域之外的該抗體分子之一或多框架區域內進行改變。舉例而言，改變可以位於此所揭示的序列，如第一、第二及第三序列或AB、CD或EF結構環序列之外的CH3域內。

【0202】於較佳的具體例中，本發明之抗體分子可包含一CH3域序列，其與序列辨識編號：序列辨識編號：**81**、**84**、**87**、**90**、**93**、**96**、**99**、**102**、**105**、**108**、**111**、**115**、**118**、**121**、**124**、**127**、**130**或**132**內列出的CH3域序列相比，具有一或多個胺基酸序列改變(加入、缺失、取代及/或插入一胺基酸殘基)，較佳20個改變或更少、15個改變或更少、10個改變或更少、5個改變或更少、4個改變或更少、3個改變或更少、2個改變或更少或是1個改變。於更佳的具體例中，本發明之抗體分子可包含一CH3域序列，其與序列辨識編號：**115 [FS22-172-003]** 或 **81 [FS22-053-008]**，較佳為序列辨識編號：**115 [FS22-172-003]**內列出的CH3域序列相比，具有一或多個胺基酸序列改變(加入、缺失、取代及/或插入一胺基酸殘

基)，較佳20個改變或更少、15個改變或更少、10個改變或更少、5個改變或更少、4個改變或更少、3個改變或更少、2個改變或更少或是1個改變。

【0203】於進一步較佳的具體例中，該抗體分子包含一CH2域序列，其與序列辨識編號：**76**或**77**內列出的CH2域序列相比，具有一或多個胺基酸序列改變(加入、缺失、取代及/或插入一胺基酸殘基)，較佳20個改變或更少、15個改變或更少、10個改變或更少、5個改變或更少、4個改變或更少、3個改變或更少、2個改變或更少或是1個改變。

【0204】在一或多個胺基酸係由另一個胺基酸取代的較佳具體例中，該等取代可以為舉例而言如下表之保留式取代。在一些具體例中，中間欄位同一類別的胺基酸係彼此取代，即，舉例而言非極性胺基酸係以另一個非極性胺基酸取代。在一些具體例中，最右邊的欄位同一行的胺基酸係彼此取代。

脂肪族的	非極性	G A P
		I L V
	極性-不帶電的	C S T M
		N Q
	極性-帶電的	D E
		K R
芳香族的		H F W Y

【0205】在一些具體例中，取代可以為功能上保留型。亦即，在一些具體例中包含該取代的抗體分子的一或多種功能性質(如結合親和力)與等效未經取代的抗體分子相比，可能不受該取代影響(或可能不實質影響)。

【0206】在該抗體分子包含於此所揭示的第一序

列、AB結構環序列、CH3域、或重鏈序列之變異體的情況下，該抗體分子較佳保留序列PPY於該抗體分子之該CH3域的位置11及19之間，較佳為位置15及17之間。此外，該抗體分子較佳保留一插入，較佳為5個胺基酸插入於該抗體分子之該CH3域的位置16及17之間。於另外的較佳具體例中，該抗體分子較佳保留於該抗體分子之該CH3域的位置97及98處的該序列。

【0207】此外，或任擇地，在該抗體分子包含於此所揭示的CH3域、CH2及CH3域、輕鏈或重鏈序列之變異體的情況下，該變異體較佳不含任何胺基酸改變於座落於抗體分子的CH3域之AB及EF結構環的第一及第二序列內。舉例而言，該變異體可能不含任何胺基酸改變於抗體分子的CH3域之AB及EF結構環內。此外，該變異體可能不含任何胺基酸改變於抗體分子的CH3域之CD結構環內。亦即，該變異體可能不含任何胺基酸改變於抗體分子的CH3域之AB及EF結構環內。

【0208】在該抗體分子包含於此所揭示的VH域、VL域、輕鏈或重鏈序列之變異體的情況下，該抗體分子較佳不含任何胺基酸改變於CDR序列內。亦即，任何胺基酸改變可能存在於FW序列內，例如HFW1、HFW2、HFW3、HFW4、LFW1、LFW2、LFW3及/或LFW4。舉例而言，該變異體可能不含任何胺基酸改變於CDR1、CDR2、CDR3、CDR4、CDR5及/或CDR6序列內。

【0209】該抗體分子較佳與人類PD-L1及人類

CD137結合。較佳地，該抗體分子能同時結合人類PD-L1及人類CD137，其中人類PD-L1及人類CD137係共表現的。當使用於本文中，共表現意指二種標靶表現於單一細胞表面上或二個分開的細胞表面上。舉例而言，當人類PD-L1及人類CD137共表現於單一細胞如免疫細胞時表面上時，該抗體分子可能可以結合人類PD-L1及人類CD137，以及當人類PD-L1及人類CD137共表現於二個分開的細胞表面上時，例如表現CD137的免疫細胞及於腫瘤微環境內一個分開的表現PD-L1之腫瘤細胞，該抗體分子亦能結合人類PD-L1及人類CD137。

【0210】該抗體分子較佳以8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2 nM、1 nM、0.5 nM、0.4 nM或0.3 nM的親和力(K_D)或更大的親和力與人類PD-L1結合。較佳地，該抗體分子以0.3 nM的親和力(K_D)或更大的親和力與人類PD-L1結合。

【0211】人類PD-L1舉例而言，可具有序列辨識編號：**180**內列出的序列。人類PD-L1舉例而言，可以為可得自於Acro Biosystems(目錄號：PD1-H82E5)、有Avi標誌之重組人類PD-L1(hPD-L1-Avi-His)。重組人類PD-L1可以為生物素化的。

【0212】該抗體分子較佳以60 nM、50 nM、40 nM、30 nM、20 nM、10 nM、5 nM、4 nM、3 nM或2 nM的親和力(K_D)或更大的親和力與二聚體人類CD137結合。較佳地，該抗體分子以2 nM的親和力(K_D)或更大的親和力與

二聚體人類CD137結合。

【0213】於較佳的具體例中，該抗體分子與二聚體CD137結合的親和力比單體CD137更高。於較佳的具體例中，該抗體分子與二聚體CD137結合的親和力比該抗體分子對於單體CD137的親和力更高至少50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、110倍、120倍、130倍、140倍、150倍、160倍、170倍或200倍。

【0214】人類CD137舉例而言，可具有序列辨識編號：**186**內列出的序列。實施例中描述生產二聚體及單體CD137抗原的方法。

【0215】該抗體分子較佳與食蟹獼猴PD-L1及食蟹獼猴CD137結合。較佳地，該抗體分子能同時結合食蟹獼猴PD-L1及食蟹獼猴CD137，其中食蟹獼猴PD-L1及食蟹獼猴CD137係表現於單一細胞表面上或二個分開的細胞表面上。

【0216】於較佳的具體例中，該抗體分子可以8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2 nM、1 nM、0.5 nM、0.4 nM或0.3 nM的親和力(K_D)或更大的親和力與食蟹獼猴PD-L1結合。較佳地，該抗體分子以1 nM的親和力(K_D)或更大的親和力與食蟹獼猴PD-L1結合。

【0217】食蟹獼猴PD-L1舉例而言，可具有序列辨識編號：**184**內列出的序列。

【0218】於較佳的具體例中，該抗體分子可以60 nM、50 nM、40 nM、30 nM、20 nM、10 nM、5 nM、

4 nM、3 nM或2 nM的親和力(K_D)或更大的親和力與二聚體食蟹獼猴CD137結合。較佳地，該抗體分子以2 nM的親和力(K_D)或更大的親和力與二聚體食蟹獼猴CD137結合。

【0219】該抗體分子可以相似的親和力與人類PD-L1及食蟹獼猴PD-L1結合，及/或以相似的親和力與二聚體人類CD137及二聚體食蟹獼猴CD137結合。認為此點對於確保食蟹獼猴進行抗體分子之功效及毒性研究可預測該抗體分子於人類的功效及毒性是有利的。

【0220】因而，於較佳的具體例中，抗體分子與食蟹獼猴PD-L1結合的親和力比抗體分子與人類PD-L1結合的親和力更低或更高不超過10倍，較佳為不超過5倍。於較佳的具體例中，抗體分子與二聚體食蟹獼猴CD137結合的親和力比抗體分子與二聚體人類CD137結合的親和力更低或更高不超過10倍，較佳為不超過5倍。

【0221】抗體分子與同源抗原，諸如人類PD-L1、人類CD137、食蟹獼猴PD-L1或食蟹獼猴CD137的結合親和力能由，舉例而言表面電漿子共振(SPR)，如Biacore來判定。實施例中描述合適的方法之更多細節。

【0222】抗體分子同時結合二種同源抗原，諸如人類PD-L1及人類CD137、或食蟹獼猴PD-L1及食蟹獼猴CD137的能力可由，舉例而言SPR，如Biacore來判定。實施例中描述合適的方法之更多細節。

【0223】抗體分子可能可以阻斷PD-L1及其受體，PD-1，較佳人類PD-L1及人類PD-1之間的交互作用。

【0224】已知PD-1/PD-L1訊息傳導途徑對於媒介免疫抑制作用很重要。因而，能阻斷此途徑的抗體分子預料是有利於因為其等可降低免疫抑制作用並幫助增高抗腫瘤反應。PD-1/PD-L1訊息傳導抑制及CD137活化可一起運作來增加抗腫瘤效能。

【0225】抗體分子阻斷PD-L1與PD-1結合的能力可使用生物發光細胞為基的分析來判定，舉例而言使用，例如來自Promega的PD-1/PD-L1阻斷生物分析法產品。抗體分子阻斷PD-L1與PD-1結合的能力可使用ELISA來判定。實施例中描述合適的方法之更多細節。

【0226】抗體分子阻斷PD-L1與PD-1結合的能力，於此亦稱為PD-1/PD-L1阻斷活性，可參考一種包含下列或由下列所組成之抗體分子來判定：WO2011/066389 A1內分別列出的抗體**2.14H9OPT**之重鏈及輕鏈，或序列辨識編號**177**及**178**內分別列出的抗體**G1/280_02_G02**之重鏈及輕鏈。

【0227】舉例而言，該抗體分子可具有相似或高於一種包含下列或由下列所組成之抗體分子的PD-1/PD-L1阻斷活性：WO2011/066389 A1內列出的抗體**2.14H9OPT**之重鏈及輕鏈，或序列辨識編號**177**及**178**內分別列出的抗體**G1/280_02_G02**之重鏈及輕鏈。

【0228】該抗體分子可具有之PD-1/PD-L1阻斷活性係下列之至少70%、80%或90%：一種包含下列或由下列所組成之抗體分子的PD-1/PD-L1阻斷活性：

WO2011/066389 A1內列出的抗體**2.14H9OPT**之重鏈序列及輕鏈序列，或序列辨識編號**177**及**178**內分別列出的抗體**G1/280_02_G02**之重鏈及輕鏈。

【0229】該抗體分子可具有之PD-1/PD-L1阻斷活性係在下列之70%至130%之間，在下列之80%至120%之間，或在下列之90%至110%之間：一種包含下列或由下列所組成之抗體分子的PD-1/PD-L1阻斷活性：WO2011/066389 A1內列出的抗體**2.14H9OPT**之重鏈序列及輕鏈序列，或序列辨識編號**177**及**178**內分別列出的抗體**G1/280_02_G02**之重鏈及輕鏈。

【0230】如上所述，本發明的抗體分子能同時結合PD-L1及CD137，此導致CD137之活化(致效作用)。於較佳的具體例中，該抗體分子能同時結合人類PD-L1及人類CD137二者，其中此結合造成人類CD137之活化。於額外較佳的具體例中，該抗體分子能同時結合食蟹獼猴PD-L1及食蟹獼猴CD137二者，其中此結合造成食蟹獼猴CD137之活化。測試同時結合及活化的例示性方法包括T細胞活化分析，如以下更詳盡地說明。

【0231】抗體分子活化T細胞的能力能用T細胞活化分析來測量。T細胞於活化時會釋放IL-2。T細胞活化分析因而能測量IL-2釋放來判定由抗體分子誘發的T細胞活化位準。

【0232】舉例而言，抗體分子活化T細胞的能力可藉由測量T細胞活化分析中抗體分子交聯時，要求達到T細胞

之IL-2半最大釋放的抗體分子的濃度。以下稱此為抗體分子的EC_{50}。

【0233】於較佳的具體例中，該抗體分子於T細胞活化分析內所具有的EC_{50}，為**FS22-172-003-AA/E12v2**於相同分析內之EC_{50}的50倍、40倍、30倍、20倍、10倍、5倍、4倍、3倍或2倍之內，其中**FS22-172-003-AA/E12v2**係由序列辨識編號：**134**的重鏈及序列辨識編號：**17**的輕鏈組成。

【0234】舉例而言，該抗體分子於T細胞活化分析內當抗體分子交聯時，可具有30 nM或更小、25 nM或更小、20 nM或更小、14 nM或更小、10 nM或更小、5 nM或更小、4 nM或更小、3 nM或更小、2 nM或更小、1.5 nM或更小、1 nM或更小、0.4 nM或更小、0.4 nM或更小、或0.3 nM或更小，較佳1 nM或更小，更佳1.5 nM或更小的EC_{50}。

【0235】此外，或任擇地，抗體分子活化T細胞的能力可藉由測量T細胞活化分析中、於該抗體分子存在下，T細胞釋放的最大IL-2的濃度($E_{最大}$)來判定。

【0236】該抗體分子於T細胞活化分析中、於該抗體分子存在下，T細胞釋放的最大IL-2的濃度為至少1500 pg/ml、2000 pg/ml、2500 pg/ml、3000 pg/ml或3250 pg/ml或更高，較佳2500 pg/ml或更高的。

【0237】於較佳的具體例中，於T細胞活化分析中、於該抗體分子存在下，T細胞釋放的最大IL-2的濃度為相

同分析內**FS22-172-003-AA/E12v2**存在下，T細胞釋放的最大IL-2的濃度之20%或10%之內，其中**FS22-172-003-AA/E12v2**係由序列辨識編號：**134**的重鏈及序列辨識編號：**17**的輕鏈組成。

【0238】T細胞活化分析較佳包含表現CD137的T細胞及表現PD-L1的細胞，舉例而言，過度表現人類PD-L1之HEK293細胞(HEK.hPD-L1)可如實施例所述予以製備及使用。任擇地，或此外，可使用表現不同位準的PD-L1的細胞，例如人類乳腺癌細胞株MDA-MB-231(ATCC HTB-26)細胞及/或SKBR3細胞。如實施例所述，HEK.hPD-L1表現高位準的人類PD-L1、MDA-MB-231細胞表現中位準的人類PD-L1及SKBR3細胞表現低位準的PD-L1。

【0239】於較佳的具體例中，T細胞活化分析不包含能使表現CD137及PD-L1的細胞以外的抗體分子交聯之任何製劑。能交聯該抗體分子的製劑之實例包括抗人類CH2抗體，如實施例所述。

【0240】T細胞活化分析可以為如本文所述之T細胞分析，例如本實施例中所述之泛T細胞分析。

【0241】舉例而言，T細胞活化分析可以為一種以從人類末梢血液單核細胞(PBMCs)單離的T細胞為基的IL-2釋放分析。舉例而言，T細胞活化分析可包含從白血球耗乏椎(cones)單離人類PBMCs。單離PBMCs的方法為本技藝已知的且描述於本實施例內。繼而可從PBMCs單離T細

胞。從PBMCs單離T細胞(全部的T細胞)的方法為本技藝已知的且描述於本實施例內。

【0242】活化分析可涉及製備所需數量的T細胞於舉例而言合適的實驗培養基，例如T細胞培養基內。所需數量的T細胞可製備為1.0 x 10^6個細胞/ml的濃度。接而可使用提供T細胞活化所需信號之合適的T細胞活化試劑來刺激T細胞。舉例而言，T細胞活化試劑可以為包含CD3及CD28的試劑，例如包含CD3及CD28的小珠。單離的T細胞可與T細胞活化試劑一起孵育過夜以活化T細胞。在這之後，可清洗活化的T細胞以分離T細胞與T細胞活化試劑且以合適的濃度，例如2.0 x 10^6個細胞/ml再懸浮於T細胞培養基內。接而添加活化的T細胞至塗覆抗人類CD3抗體的平盤。

【0243】細胞(如HEK.hPD-L1細胞)可以，例如每孔2 x 10^5個細胞予以平盤培養於抗CD3抗體塗覆的組織培養平盤於T細胞培養基內。例如於孵育4小時之後，可移去全部的T細胞培養基且以含有，例如5.0 x 10^5個細胞/ml的濃度之T細胞的100μl T細胞培養基代替而導致產生5.0 x 10^4個細胞/孔。

【0244】可製備各測試抗體分子合適的稀釋並添加至孔。T細胞接而可與測試抗體於5% CO_2、37℃下孵育歷時24小時。可收集上清液且予以分析來判定上清液內的IL-2濃度。判定溶液內的IL-2濃度之方法為本技藝已知的且描述於本實施例內。可以繪製人類IL-2濃度相對於抗體

分子的log濃度的圖。產生的曲線可以使用log(促效劑)相對反應方程式來擬合。

【0245】該抗體分子可以複合至一種生物活性分子或可偵測的標記。在這種情況下，該抗體分子可以稱為複合物(conjugate)。此等複合物於治療如本文所述的疾病方面獲得應用。

【0246】舉例而言，生物活性分子可以為免疫系統調控劑，例如細胞介素，較佳為人類細胞介素。舉例而言，細胞介素可以為刺激T細胞活化及/或增殖的細胞介素。供用於複合抗體分子之細胞介素之實例包括IL-2、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、GM-CSF及IFN-γ。

【0247】任擇地，生物活性分子可以為配體陷阱，例如細胞介素，如TGF-β或IL-6之配體陷阱。

【0248】任擇地，生物活性分子可以為治療性放射性同位素。

【0249】放射性免疫療法使用於舉例來說，癌症治療。適合放射性免疫療法的治療性放射性同位素係本技藝者已知的且包括釔-90、碘-131、鉍-213、砈-211、鎦177、銪-188、銅-67、錒-225，以及碘-125和鈥-161。

【0250】可與抗體分子複合的合適的可偵測的標記為本技藝已知的且包括放射性同位素，例如碘-125、碘-131、釔-90、銦-111及鎵-99；螢光染料，例如螢光素、玫瑰紅、藻紅素、紅色螢光染劑(Texas Red)以及花青染料衍生物例如，Cy7及Alexa750；顯色染料，例如二胺基

聯苯胺；乳膠珠；酵素標記例如辣根過氧化物酶；磷光體或具光譜隔離吸收或發射特徵之雷射染料；以及化學部分，例如生物素，其能經由結合專一性同源可偵測的部分，例如標記的抗生物素蛋白來偵測。

【0251】該抗體分子可以經由任何合適的共價或非共價鍵聯，例如雙硫鍵或胜肽鍵，與生物活性分子或可偵測的標記複合。於生物活性分子為細胞介素的情況中，細胞介素可以經由胜肽鍵接子與該抗體分子複合。合適的胜肽鍵接子係本技藝已知的且長度可以為5至25、5至20、5至15、10至25、10至20或10至15個胺基酸。

【0252】於一些具體例中，生物活性分子可以經由可切割的鏈接子而與該抗體分子複合。鏈接子能允許生物活性分子於治療位址從該抗體分子釋放。鏈接子可包括醯胺鍵(如胜肽鏈接子)、雙硫鍵或腙。胜肽鏈接子舉例而言可以藉由位址專一性蛋白酶予以切割，雙硫鍵可以藉由胞質液還原環境予以切割以及腙可以藉由酸媒介的水解予以切割。

【0253】本發明亦提供編碼本發明之抗體分子之經單離的核酸分子或多個核酸分子。使用本技藝眾所周知的方法來製備此核酸分子對於熟悉此藝者沒有困難。

【0254】該核酸分子或多個核酸分子可，舉例而言，包含序列辨識編號：**82**、**85**、**88**、**91**、**94**、**97**、**100**、**103**、**106**、**109**、**112**、**116**、**119**、**122**、**125**、**128**、**131**或**133**內列出的序列，其等分別編碼**FS22-053-008**、

FS22-053-009、**FS22-053-011**、**FS22-053-017**、**FS22-053-014**、**FS22-053-010**、**FS22-053-012**、**FS22-053-013**、**FS22-053-015**、**FS22-053-016**、**FS22-053**、**FS22-172-003**、**FS22-172-002**、**FS22-172-004**、**FS22-172-001**、**FS22-172-005**、**FS22-172-006**及**FS22-172**之CH3域。較佳地，該核酸分子或多個核酸分子包含序列辨識編號：**116**或**82**內列出的序列，其等分別編碼**FS22-172-003**或**FS22-053-008**之CH3域。更佳地，該核酸分子或多個核酸分子包含序列辨識編號：**116**內列出的序列，其編碼**FS22-172-003**之CH3域。

【0255】該核酸分子或多個核酸分子可編碼下列之VH域及/或VL域，較佳為下列之VH域及VL域：抗體**E12v2**、**E05v2**、**G12v2**或**Iam-G02v3**，較佳為抗體**E12v2**、**E05v2**或**G12v2**，更佳為抗體**E12v2**或**E05v2**，最佳為抗體**E12v2**。本文中說明此等抗體之VH及VL域序列。

【0256】舉例而言，該核酸分子可包含：

(i)序列辨識編號：**13**內列出的抗體**E12v2**之VH域核酸序列，及/或序列辨識編號：**15**內列出的抗體**E12v2**之VL域核酸序列；或

(ii)序列辨識編號：**24**內列出的抗體**E05v2**之VH域核酸序列，及/或序列辨識編號：**26**內列出的抗體**E05v2**之VL域核酸序列；

(iii) 序列辨識編號：**24**內列出的抗體**G12v2**之VH域核酸序列，及/或序列辨識編號：**31**內列出的抗體**G12v2**之VL域核酸序列；或

(v) 序列辨識編號：**24**內列出的抗體**lam-G02v3**之VH域核酸序列，及/或序列辨識編號：**42**內列出的抗體**lam-G02v3**之VL域核酸序列。

【0257】該核酸分子或多個核酸分子可編碼下列之重鏈及/或輕鏈，較佳為下列之重鏈及輕鏈：抗體**FS22-172-003-AA/E12v2**、**FS22-172-003-AA/E05v2**、**FS22-172-003-AA/G12v2**、**FS22-053-008-AA/E12v2**、**FS22-053-008-AA/E05v2**或**FS22-053-008-AA/G12v2**，較佳為抗體**FS22-172-003-AA/E12v2**、**FS22-172-003-AA/E05v2**、**FS22-172-003-AA/G12v2**、**FS22-053-008-AA/E12v2**或**FS22-053-008-AA/E05v2**，甚至更佳為抗體**FS22-172-003-AA/E12v2**。本文中說明此等抗體之重鏈及輕鏈序列。

【0258】舉例而言，該核酸分子可包含：

(i) 序列辨識編號：**32**或**135**內列出的抗體**FS22-172-003-AA/E12v2**之重鏈核酸序列，及/或序列辨識編號：**39**或**136**內列出的抗體**FS22-172-003-AA/E12v2**之輕鏈核酸序列；或

(ii) 序列辨識編號：**138**內列出的抗體**FS22-172-003-AA/E05v2**之重鏈核酸序列，及/或序列辨

識編號：**139**內列出的抗體**FS22-172-003-AA/E05v2**之輕鏈核酸序列；

(iii) 序列辨識編號：**141**內列出的抗體**FS22-172-003-AA/G12v2**之重鏈核酸序列，及/或序列辨識編號：**142**內列出的抗體**FS22-172-003-AA/G12v2**之輕鏈核酸序列；

(iv) 序列辨識編號：**144**內列出的抗體**FS22-053-008-AA/E12v2**之重鏈核酸序列，及/或序列辨識編號：**145**內列出的抗體**FS22-053-008-AA/E12v2**之輕鏈核酸序列；

(v) 序列辨識編號：**147**內列出的抗體**FS22-053-008-AA/E05v2**之重鏈核酸序列，及/或序列辨識編號：**148**內列出的抗體**FS22-053-008-AA/E05v2**之輕鏈核酸序列；或

(vi) 序列辨識編號：**150**內列出的抗體**FS22-053-008-AA/G12v2**之重鏈核酸序列，及/或序列辨識編號：**151**內列出的抗體**FS22-053-008-AA/G12v2**之輕鏈核酸序列。

【0259】於該核酸編碼本發明之抗體分子的VH及VL域，或重及輕鏈的情況下，兩種域或鏈可由兩種單獨的核酸分子所編碼。

【0260】一種經單離的核酸分子可用來表現本發明之抗體分子。一般而言會提供用於表現重組載體的形式之核酸。本發明另外的態樣因而提供包含如上所述的核酸之

載體。可挑選或建構合適的載體，包含合適的調節性序列，包括啟動子序列、終止子片段、聚腺苷酸化序列、增強子序列、標記基因及其他合適的序列。較佳地，載體含有合適的調節性序列來驅動核酸於宿主細胞內之表現。載體可為合適的質體、病毒如噬菌體或噬粒(phagemid)。

【0261】本文所述之核酸分子或載體可導入宿主細胞內。核酸或載體導入宿主細胞內的技術為本技藝已確立的且可使用任何合適的技術。本技藝已知一系列適合生產重組抗體分子的宿主細胞，且包括細菌、酵母、昆蟲或哺乳動物宿主細胞。較佳的宿主細胞為哺乳動物細胞，諸如CHO、NS0或HEK細胞，舉例而言HEK293細胞。

【0262】本發明另一態樣提供一種生產本發明抗體分子之方法，其包含於宿主細胞內表現編碼該抗體分子之核酸及選擇性地單離及/或純化由此生產的抗體分子。用於培養宿主細胞之方法為本技藝眾所周知的。該方法可進一步包含單離及/或純化該抗體分子。純化重組抗體分子的技術為本技藝眾所周知的且包括，諸如HPLC、FPLC或親和力層析法，舉例而言使用蛋白A或蛋白L。在一些具體例中，可利用抗體分子上的親和力標籤來執行純化。該方法亦可包含調配該抗體分子至一藥學組成物之內，選擇性地加上一藥學上可接受的賦形劑或如以下所述之其他物質。

【0263】已知PD-L1表現於許多癌細胞上且表現於免疫系統的細胞上。CD137表現於免疫系統的細胞上，包括T細胞特別是$CD8^+$ T細胞、B細胞、NK細胞及腫瘤浸潤

淋巴細胞(TILs)。$CD4^+$ T細胞上表現的CD137位準比$CD8^+$ T細胞更低但也已證實涉及誘發一些$CD4^+$ T細胞亞群之增殖及活化。

【0264】CD137活化已經證明於提升$CD8^+$ T細胞之增殖、存活及細胞毒性效應子功能上起了作用，以及$CD8^+$ T細胞分化及記憶$CD8^+$ T細胞之維持。也已經證明CD137之活化會提升NK細胞媒介的ADCC，以及B細胞增殖、存活及細胞介素生產。

【0265】如本文詳盡地說明的，本發明人已證明本發明之抗體分子能同時結合PD-L1及CD137俾以誘發CD137之致效作用。以此方式，該抗體分子基於表現PD-L1及CD137而驅動自主的致效作用，且不需要額外的交聯劑。因為許多癌細胞上都表現PD-L1且CD137表現於免疫細胞上，已知其於提升免疫細胞的增殖及存活有已知的作用，一般預料本發明的抗體分子將能在PD-L1表現的地點，例如於腫瘤微環境內提升免疫反應。此外，本發明人已證實使用具有此等性質之抗體分子於同基因小鼠癌症模式中抑止腫瘤生長是有效的，以及此等抗體分子比投予分別結合PD-L1及CD137的二種結合分子更有效。

【0266】如本文所述之抗體分子因而可用於治療應用，特別是癌症治療。

【0267】如本文所述之抗體分子可用於一種治療人類或動物身體的方法。提供本發明之相關態樣；

(i) 本文所述之抗體分子供用作為一藥劑，

(ii) 本文所述之抗體分子供用於一種治療一疾病或障礙的方法，

(iii) 本文所述之抗體分子於製造一藥劑之用途，該藥劑用於治療一疾病或障礙；以及，

(iv) 一種治療一個體的一疾病或障礙的方法，其中該方法包含投予一治療有效量的如本文所述之抗體分子至該個體。

【0268】個體可以為一患者，較佳為一人類患者。

【0269】治療可以是達成一些所欲治療效應之任何治療或療法，舉例而言，抑制或延遲病況的進展，且包括降低進展速度、使進展速度停止、改良病況、病況的冶癒或緩解(不論是部分或全部)、病況的一或多症狀及/或徵象之預防、改良、延遲、緩和或阻止或是延長個體或患者的存活超出沒有治療所預期者。

【0270】亦包括治療作為預防措施(即預防(prophylaxis))。舉例而言，疑似或有疾病如癌症發生或復發之風險的個體可如本文所述予以治療。此治療能預防或延遲個體之疾病的發生或復發。

【0271】一種如所述之治療方法可包含投予該抗體分子以外之至少一另外的治療至該個體。本文所述之抗體分子因而可以單獨投予或是組合以一或多其他的治療投予至該個體。在該抗體分子組合以另一種治療投予至該個體的情況下，額外的治療可以與該抗體分子之投予同時、相繼或分別投予至該個體。在額外的治療與該抗體分子同時

投予的情況下，該抗體分子與額外的治療可以如一種組合製備物投予至該個體。舉例而言，額外的治療可以為待治療的疾病已知的療法或治療劑。

【0272】當抗體分子可單獨投予時，抗體分子通常會呈藥學組成物形式投予，其可包含該抗體分子以外之至少一組分。本發明的另一種態樣因而提供一種藥學組成物，其包含如本文所述之抗體分子。亦提供一種方法其包含調配一抗體分子至一藥學組成物內。

【0273】藥學組成物，除了抗體分子之外，可包含一藥學上可接受的賦形劑、載劑、緩衝液、安定劑或本技藝熟悉此藝者眾所周知的其他物質。當使用於本文中，術語“藥學上可接受的”係關於化合物、物質、組成物及/或劑量形式，其在健全的醫學判斷範圍內係適合用於接觸個體(如人類)的組織而沒有過量毒性、刺激、過敏反應或其他問題或併發症，相稱於合理的利益/風險比率。各載劑、賦形劑等在與調配物的其他成分相容的意義上也必須是“可接受的”。載體或其他物質的確切性質將依投予途徑而定，投予途徑可為經由灌注、注射或任何其他合適的途徑，如下所述。

【0274】就非經腸，如皮下或靜脈投予而言，諸如透過注射，包含該抗體分子的藥學組成物可呈一種非經腸可接受的水溶液形式，其係無熱原且具有適宜的pH值、等滲透壓性及穩定性。本技藝相關技藝者能使用，舉例而言，等滲透壓性載劑，如氯化鈉注射液、林格氏(Ringer)注射

液、乳酸林格氏注射液來製備適宜的溶液。可視需要使用防腐劑、安定劑、緩衝液、抗氧化劑及/或其他添加劑，包括緩衝液例如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，例如抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(例如氯化十八烷基二甲基苄基銨；氯化六烴季銨；氯化苯二甲烴銨；氯化本索寧(benzethonium chloride)；酚、丁醇或苯甲醇；羥苯甲酸烷基酯，例如羥苯甲酸甲酯或羥苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3'-戊醇；及間甲酚)；低分子量多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啶酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺酸、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣及其他醣類，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖，諸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；成鹽相對離子，諸如鈉；金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合物)；及/或非離子型界面活性劑，諸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

【0275】在一些具體例中，可提供呈凍乾形式之抗體分子供用於在投予前先還原(reconstitution)。舉例而言，凍乾的抗體分子可在投予至個體前先以無菌水還原且與食鹽水混合。

【0276】可按一"治療有效量"予以投予，此為足以顯示對於個體之益處之量。所投予的實際量及投予速率與時程，將取決於要被治療的病況之性質與嚴重性、所治療的特定個體、個體的臨床狀況、該障礙的肇因、組成物的遞

輸部位、抗體分子的類型、投予方法、投予日程安排及執業醫師所知的其他因素而定。治療的處方，例如決定劑量等等，係在普通科醫生及其他醫生的責任範圍內，並且可能依所治療疾病的症狀嚴重性及/或進展而定。抗體分子適當的劑量係本技藝眾所周知的(Ledermann等人(1991) Int. J. Cancer 47: 659-664；及Bagshawe等人(1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922)。可使用本文所示的特定劑量或Physician's Desk Reference (2003)中所指出之適合所投予抗體分子的特定劑量。可藉由比較其*活體外*活性與在動物模式之*活體內*活性而判定一抗體分子的治療有效量或適宜劑量。用於外推小鼠及其他測試動物之有效劑量至人類的方法係已知的。確切劑量將依數項因子而定，包括待治療區域的大小與位置以及該抗體分子的確切性質。

【0277】典型的抗體劑量供用於全身應用係在100 μg至1 g的範圍內，以及供用於局部應用係在1 μg至1 mg的範圍內。可投予起始較高的速效劑量，接著一或多次較低的劑量。此係成年個體單一治療的劑量，小孩及嬰兒可按比例調整劑量，並且與分子量成比例地調整其他的抗體格式。

【0278】治療可以以每天、每星期二次、每星期或每個月的間隔予以重複，由醫師自行決定。個體的治療時間表可取決於抗體組成物的藥物動力學及藥效學性質、投予

途徑及所治療病況的本質。

【0279】治療可以是定期的，且投予之間的期間可為大約二週或更長時間，如大約三週或更長時間，大約四週或更長時間，大約一個月或更長時間一次，大約五週或更長時間，或大約六週或更長時間。舉例而言，治療可以每二至四週或每四至八週。合適的調配物及途徑係如以上所述。

【0280】於較佳的具體例中，本文所述之抗體分子可用於一種治療癌症的方法。

【0281】癌症可特徵在於惡性的癌症細胞之異常增殖。在提及特定類型癌症，諸如乳癌的情況下，此係指相關組織，如乳房組織的惡性細胞之異常增殖。一種繼發性癌症，其位於乳房但為另一組織諸如卵巢組織的惡性細胞之異常增殖的結果，本文不會稱為乳癌而是稱為卵巢癌。

【0282】癌症可為原發性或繼發性癌症。因而，如本文所述之抗體分子可用於一種治療一個體癌症的方法，其中該癌症為原發性腫瘤及/或腫瘤轉移。

【0283】使用如本文所述之抗體分子要治療的癌症腫瘤可包含表現CD137的TILs，舉例而言於其等之細胞表面上。在一具體例中，該腫瘤可能已經判定為包含表現CD137的TILs。用於判定一種抗原於細胞表面上的表現之方法為本技藝已知的且包括，舉例而言，流動式細胞測量術。

【0284】舉例而言，使用如本文所述之抗體分子要治

療的癌症可選自於下列所組成之群組：白血病，例如急性骨髓白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性類淋巴母細胞白血病(acute lymphoblastoid leukaemia)(ALL)及慢性淋巴球性白血病(CLL)；淋巴瘤，例如何杰金氏淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤及多發性骨髓瘤；及實性癌症，例如肉瘤(如軟組織肉瘤)、皮膚癌(如默克細胞癌(Merkel cell carcinoma))、黑色素瘤、膀胱癌(如泌尿上皮癌)、腦癌(如多形性神經膠質母細胞瘤)、乳癌、子宮體/內膜癌、卵巢癌(如卵巢漿液性囊腺腫)、前列腺癌、肺癌(如非小細胞肺癌(NSCLC)及小細胞肺癌(SCLC)、結腸直腸癌(如結腸直腸腺癌)、子宮頸癌(如子宮頸鱗狀細胞癌及子宮頸腺癌)、肝癌(如肝細胞癌)、頭頸部癌(如頭頸部鱗狀細胞癌)、食道癌、胰臟癌、腎癌(如腎臟細胞癌)、腎上腺癌、胃癌(如胃腺癌)、睪丸癌、膽囊及膽道癌(如膽管癌)、甲狀腺癌、胸腺癌(thymus cancer)、骨癌及腦癌。

【0285】於較佳的具體例中，使用如本文所述之抗體分子要治療的癌症係實性癌症。

【0286】更佳地，使用如本文所述之抗體分子要治療的癌症係選自於下列所組成之群組之實性癌症：黑色素瘤、膀胱癌、腦癌、乳癌、卵巢癌、肺癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、肝癌、頭頸部癌、胰臟癌、腎癌、胃癌及胃腸道基質腫瘤(GISTs)。

【0287】於進一步較佳的具體例中，使用如本文所述之抗體分子要治療的癌症可為對一種或多種免疫查核點抑

制劑例如一種結合PD-1、PD-L1或CTLA4之抗體，治療有反應的癌症。一般認為此等腫瘤比對免疫查核點抑制劑療法沒有反應的腫瘤有更高的TIL位準及/或更高的腫瘤突變負荷。此等腫瘤亦稱為溫或熱腫瘤(warm or hot tumours)。

【0288】此等腫瘤之實例包括頭頸部鱗狀細胞癌(HNSCC)、黑色素瘤、肺癌(如鱗狀肺癌、肺腺癌、非小細胞肺癌[NSCLC]或小細胞肺癌[SCLC])、前列腺癌、子宮頸癌(如子宮頸鱗狀細胞癌或內子宮頸(endocervical)腺癌)、膀胱癌、乳癌、甲狀腺癌、腎癌、結腸直腸癌(MSI或MSS；如結腸直腸腺癌)、食道癌、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、胃癌、內膜癌、胰臟癌、卵巢癌、肝細胞癌、間皮瘤、泌尿上皮癌、默克細胞癌(Merkel cell carcinoma)，以及胃腺癌。於較佳的具體例中，該癌症為HNSCC。該癌症可進一步為先前尚未以化學治療或放射治療劑治療的癌症，亦即要治療的個體可為尚未接受用於所談論的癌症之化學治療或放射治療劑治療的癌症患者。

【0289】任擇地，使用如本文所述之抗體分子要治療的癌症可為一種癌症例如胰臟癌或前列腺癌，其對一種或多種免疫查核點抑制劑例如一種結合PD-1、PD-L1或CTLA4之抗體，治療沒有反應。用本發明的抗體治療的個體因而可為對一種或多種免疫查核點抑制劑，例如抗PD-L1或抗PD-1抗體先前的反應不足癌症的患者，例如胰臟癌或前列腺癌患者。

【0290】對一或多種查核點抑制劑之治療沒有反應的腫瘤亦稱為冷腫瘤。不希望受理論束縛，但一般認為一種對一或多種查核點抑制劑單獨、化學療法、放射療法、免疫治療藥物如免疫刺激藥物或抗腫瘤疫苗沒有反應的癌症之治療，將導致癌細胞死亡其又造成腫瘤內TILs增加及免疫抑止受體的表現增加，其又會使得該癌症對查核點抑制劑的治療有反應，亦即使冷腫瘤轉變成溫腫瘤。因而，本發明之抗體分子可用於一種治療一個體癌症的方法，其中該癌症對一或多種查核點抑制劑單獨的治療是沒有反應或難治性的(refractory)，以及其中該方法包含投予該抗體分子組合以一化學治療、放射治療或免疫刺激藥物或抗腫瘤疫苗投予至該個體。亦預期一種治療一個體癌症的方法，其中該癌症對一或多種查核點抑制劑單獨的治療是沒有反應或難治性的，以及其中該方法包含投予該抗體分子組合以一化學治療、放射治療或免疫刺激藥物或抗腫瘤疫苗投予至該個體。

【0291】於癌症的情況中，治療可包括抑制癌症生長，含括完全癌症緩解及/或抑制癌症轉移，以及抑制癌症復發。癌症生長一般係指表示癌症變化的一些指數中的任一者達更發展形式。因而，測量癌症生長抑制的指數包括癌細胞存活減少、腫瘤體積或形態下降(舉例而言，使用電腦斷層(CT)、超音波檢查或其他成像方法來判定)、延遲腫瘤生長、破壞腫瘤血管分佈、改善遲發性過敏反應皮膚測試的表現、增高抗癌免疫細胞的活性或其他抗癌免疫反

應，以及減少腫瘤專一性抗原的位準。活化或提升個體對癌性腫瘤之免疫反應可改善個體抵抗癌症生長的能力，特別是個體內已經存在的癌症之生長及/或減少個體內癌症生長的傾向。

【0292】於癌症治療的情況中，如本文所述之抗體分子可以組合以另一種抗癌療法或治療劑，例如已被證明是合適於，或可能合適於所談論的癌症之治療的抗癌療法或治療劑投予至該個體。舉例而言，抗體分子可以組合以一化學治療藥物、放射療法、放射性核種、免疫治療藥物、抗腫瘤疫苗、溶瘤病毒、授受性細胞轉移(ACT)療法例如授受性NK細胞療法或帶有嵌合抗原受體(CAR)T細胞、自體TILs或γ/δ T細胞之療法或激素療法製劑投予至該個體。

【0293】不希望受理論束縛，但認為本文所述之抗體分子可以作用為抗癌療法的佐劑。具體而言，一般認為投予該抗體分子組合以，舉例而言化學療法或放射療法至該個體，會觸發比化學療法或放射療法單獨達成更大的對抗癌症免疫反應。

【0294】供用於組合如本文所述之抗體分子投予的一種或多種化學治療劑可以選自於下列所組成的群組：紫杉烷(taxanes)、胞毒型(cytotoxic)抗生素、酪胺酸激酶抑制劑、PARP抑制劑、B-Raf酵素抑制劑、MEK抑制劑、c-MET抑制劑、VEGFR抑制劑、PDGFR抑制劑、烷化劑、鉑類似物、核苷類似物、抗葉酸劑(antifolate)、沙利竇邁(thalidomide)衍生物、抗惡性腫瘤化學治療劑及其他。紫

杉烷包括多烯紫杉醇(docetaxel)、紫杉醇(paclitaxel)及nab-紫杉醇；胞毒型抗生素包括放線菌素(actinomycin)、博萊黴素(bleomycin)，及蒽環(anthracyclines)如多柔比星(doxorubicin)、雙羥蒽醌(mitoxantrone)及戊柔比星(valrubicin)；酪胺酸激酶抑制劑包括厄洛替尼(erlotinib)、吉菲替尼(gefitinib)、阿西替尼(axitinib)、PLX3397、伊馬替尼(imatinib)、考比替尼(cobemitinib)及曲美替尼(trametinib)；PARP抑制劑包括尼拉帕尼(piraparib)；B-Raf酵素抑制劑包括維羅非尼(vemurafenib)及達拉菲尼(dabrafenib)；烷化劑包括達卡巴嗪(dacarbazine)、環磷醯胺(cyclophosphamide)及替莫唑胺(temozolomide)；鉑類似物包括卡鉑(carboplatin)、順鉑(cisplatin)及奧沙利鉑(oxaliplatin)；核苷類似物包括阿扎胞苷(azacitidine)、卡培他濱(capecitabine)、氟達拉濱(fludarabine)、氟尿嘧啶(fluorouracil)及吉西他汀(gemcitabine)及；抗葉酸劑包括胺甲喋呤(methotrexate)及培美曲塞(pemetrexed)。合適用於本發明之其他的化學治療劑包括地法替尼(defactinib)、恩替諾特(entinostat)、艾日布林(eribulin)、伊立替康(irinotecan)及長春鹼(vinblastine)。

【0295】供用於和如本文所述之抗體分子一起投予的較佳的治療劑為多柔比星、雙羥蒽醌、環磷醯胺、順鉑、及奧沙利鉑。

【0296】供用於組合如本文所述之抗體分子投予的

放射療法可以為體外放射治療或近接治療。

【0297】供用於和如本文所述之抗體分子一起投予的放射性核種可選自於下列所組成之群組：釔-90、碘-131、鉍-213、砈-211、鎦177、銪-188、銅-67、錒-225、碘-125和鈥-161。

【0298】供用於組合如本文所述之抗體分子投予的免疫治療藥物可以為治療抗體分子、核苷酸、細胞介素或細胞介素為基的療法。舉例而言，治療抗體分子可結合免疫調節分子，諸如抑制性查核點分子或免疫共刺激分子、先天性免疫系統的受體或腫瘤抗原，諸如細胞表面腫瘤抗原或可溶性腫瘤抗原。治療抗體分子可結合的免疫調節分子之實例包括CTLA-4、LAG-3、TIGIT、TIM-3、VISTA、PD-L1、PD-1、CD47、CD73、CSF-1R、KIR、CD40、HVEM、IL-10及CSF-1。治療抗體分子可結合的先天性免疫系統的受體之實例包括TLR4、TLR7、TLR9、似RIG-I受體(例如RIG-I及MDA-5)及STING。治療抗體分子可結合的腫瘤抗原之實例包括HER2、EGFW、CD20及TGF-β。

【0299】供用於組合如本文所述之抗體分子投予的核苷酸可以為siRNA。

【0300】細胞介素或細胞介素為基的療法可以選自於下列所組成的群組：IL-2、複合的IL2之前驅藥、GM-CSF、IL-7、IL-12、IL-9、IL-15、IL-18、IL-21及第一型干擾素。

【0301】癌症治療的抗腫瘤疫苗已在臨床實施且於

科學文獻中詳細討論(例如Rosenberg, S. 2000 Development of Cancer Vaccines)。此主要涉及激起免疫系統以對自體或同種異體癌症細胞表現的各種細胞標記起反應，其係藉由使用該等細胞作為疫苗接種方法，自體或同種異體癌症細胞二者帶有或不帶有顆粒球巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)。GM-CSF於抗原呈現激起強大的反應且當與該策略一起使用時運作得特別好。

【0302】前述詳細說明或下列申請範圍所揭示的特徵，以其等之特定形式表現或就一種執行該揭示的功能之構件或一種用於獲得執行該揭示的結果之方法(method)或方法(process)而言，可酌情分別或以此等特徵之任何組合，用於實行本發明之多種形式。

【0303】雖然本發明已結合例示具體例說明如上，但當考慮到此揭示許多等效修飾及變化將為本技藝熟悉此藝者所顯而易見者。因而，以上提出的本發明之例示具體例應理解僅為了說明而非限制。可以做出所述具體例的多種變化而不偏離本發明的精神與範圍。.

【0304】為避免任何疑問，本文所提供的任何理論解釋是為了增進讀者理解而提供的。本發明人不希望受任何此等理論解釋約束。

【0305】本文中使用之任何節標題僅僅係為了編制的目的以及不被解釋為限制所說明的主題。

【0306】貫穿本說明書，包括隨後的申請專利範圍，除非上下文另外要求，否則應理解用字「包含(comprise)」

及「包括(include)」，以及變體例如「包含(comprises)」及「包含(comprising)」以及「包括(including)」是暗示包括所述的整數或步驟或是整數或步驟組，但是不排除任何其他的整數或步驟或是整數或步驟組。

【0307】必須注意到，當使用於本說明書及隨附的申請專利範圍中，除非上下文另外明確指定，否則單數形式「一(a)」、「一(an)」，以及「該」包括複數的指示對象。範圍於本文中可以表達為由「大約」一特定的數值及/或至「大約」另一特定的數值。當表達此一範圍時，另一具體例會包括由該一特定的數值及/或至其他的特定數值。同樣地，當用先行詞「大約」、以近似值表達數值時，會瞭解到該特定的數值構成另一具體例。與數值有關的術語“約”係可選擇的且意指例如+/- 10%。

實施例

實施例1：抗原選擇作用及特徵化

【0308】用於辨識能結合PD-L1及CD137且致效(agonizing)CD137的mAb[2]之選擇及篩選方法必須使用各種PD-L1及CD137抗原。以下更詳盡地說明此等抗原之生產。

1.1 重組CD137抗原

【0309】腫瘤壞死因子受體超家族(TNFRSF)成員，例如CD137，係以其等與其等的同源配體結合時會簇集在一起而形成多聚體的傾向而著稱(Croft, 2003)。其等的官能性之此種聚集傾向使得生產溶液內不會聚集的可溶性重

組蛋白—供用於*活體外*選擇作用例如噬菌體及酵母菌展示及選出的蛋白之特徵化—具有挑戰性。

【0310】測試數種可購得的重組抗原並且發現由於存在的聚集體位準，多數不適用於此等選擇作用中。於測試的該等之中僅有生物素化、人類分泌的CD137、hFc-融合蛋白(BPS Biosciences，目錄編號71171)，下文稱為‘hCD137-hFc-Avi-BPS’，有足夠低的聚集而適合且用於選擇作用，雖然成功有限(見**實施例2**)。

【0311】既然認為多數可購得的抗原都不適合，所以在機構內部生產下列重組二聚體及單體CD137抗原(參見表**1**)供選擇作用使用：

表1：CD137抗原

類型	名稱	物種	可溶性或細胞	生物素化	抗原格式
重組	mCD137-mFc-Avi	小鼠	可溶性	是	二聚體
重組	mCD137-Avi-His	小鼠	可溶性	是	單體
重組	hCD137-mFc-Avi	人類	可溶性	是	二聚體
重組	hCD137-Avi-His	人類	可溶性	是	單體
重組	cCD137-mFc-Avi	食蟹獼猴	可溶性	是	二聚體

【0312】藉由使用EcoRI-HF及BamHI-HF限制酵素以使編碼人類(序列辨識編號：186)或小鼠CD137(序列辨識編號：188)細胞外域的DNA連同Avi序列及六個C端組胺酸殘基選殖至經修飾的pFUSE載體(Invivogen目錄號pfuse-mg2afc2)來生產單體抗原。使載體轉染至HEK293-6E細胞(National Research Council of Canada)內，且表現的CD137係使用HisTrap™ excel鎳管柱(HisTrap™ excel nickel column) (GE LifeSciences

29048586)及粒徑篩析層析法(SEC)予以純化以確保抗原為單一物種且不含聚集體。

【0313】將編碼融合mIgG2a Fc域之人類、小鼠或食蟹獼猴(cynomolgus)CD137細胞外域、連同Avi序列之DNA建構物選殖至經修飾的pFUSE載體並轉染至HEK293-6E細胞內來生產二聚體抗原。重組CD137係使用MabSelect SuRe™蛋白A管柱(GE Healthcare, 11003494)及粒徑篩析層析法(SEC)予以純化以確保抗原為單一物種且不含聚集體。

【0314】使用BirA生物素-生物素蛋白連接酶反應套組(Avidity LLC, BirA500)來生物素化每種二聚體及單體抗原以生產單一生物素分子標記的單體CD137抗原以及二聚體CD137抗原，其係以二個生物素分子標記在二個單體的每一者上。3 mg抗原係與7.8 µl BirA酵素混合物混合成莫耳比率1:50之酵素與基質。繼而根據製造商的建議添加添加劑(142 µl Biomix A、142 µl Biomix B、142 µ生物素)以及使反應混合物於室溫下孵育二小時。為了維持生物素化蛋白的完整，反應混合物立即使用Amicon 30 µm濾器(Merck Millipore UFC503096)予以緩衝液交換成DPBS(Life Technologies 14190-169)。

【0315】藉由SEC進一步純化蛋白以確保移去BirA酵素以及生產最終高品質的單分散蛋白製備物且沒有高分子量聚集體。更詳細地，同生產批次的材料混合在一起且藉由粒徑篩析高效液相層析法(SE-HPLC)、SDS聚丙烯醯

胺凝膠電泳(SDS-PAGE)及多角度光散射之粒徑篩析層析法(SEC-MALS)來分析穩定性及純度。以鏈黴抗生物素(streptavidin)-位移SDS-PAGE凝膠來確認蛋白完整的生物素化。重組人類及小鼠抗原係以表面電漿子共振(SPR)來確認*活體外*與抗CD137陽性對照抗體(分別為20H4.9(US專利案號7288638))及Lob12.3(南安普敦大學))之結合，以及藉由流動式細胞測量術來確認與表現人類及小鼠CD137配體之DO11.10細胞的結合。細胞以CD137抗原孵育1小時，然後使用螢光標示的抗小鼠Fc片段抗體來偵測細胞結合。重組食蟹獼猴抗原與表現食蟹獼猴CD137配體之DO11.10細胞(National Jewish Health)之結合係如上所述由流動式細胞測量術來確認。為了確認盡可能高純度的材料供用於選擇程序，所以執行透徹的抗原的蛋白特徵化以確認存在的蛋白聚集體不超過2%。

1.2 細胞表現的CD137抗原

【0316】生產分別表現全長小鼠CD137(序列辨識編號：187)或人類CD137(序列辨識編號：185)的DO11.10細胞(National Jewish Health)，稱為‘DO11.10.mCD137’及‘DO11.10.hCD137’，俾以呈現膜結合構形的抗原，大多數與天然形式相似，供用於選出的Fcabs之選擇作用及進一步特徵化，如**表2**中所列。

【0317】使用慢病毒(lentiviral)轉導來產生此等過度表現人類或小鼠CD137受體的DO11.10細胞，其係利用Lenti-X HTX包裝系統(Clontech，目錄編號631249)來進

行。含編碼人類CD137(序列辨識編號：185)或編碼小鼠CD137(序列辨識編號：187)之cDNA的Lenti-X表現載體(pLVX) (Clontech，目錄編號631253)，係與Lenti-X HTX包裝混合物共轉染至Lenti-X 293T細胞株(Clontech，目錄編號632180)之內以產生病毒。DO11.10細胞株繼而以此等慢病毒載體予以轉導。

【0318】此等細胞上的人類CD137或小鼠CD137之表現係用流動式細胞測量術、分別藉由20H4.9及Lob12.3抗CD137陽性對照抗體與細胞的結合予以確認。細胞與人類或小鼠陽性對照抗體孵育1小時然後使用螢光標示的抗人類Fc偵測抗體(Stratech Scientific Ltd，目錄編號109-546-098-JIR)來偵測細胞結合。

【0319】表現食蟹獼猴CD137(序列辨識編號：189)的DO11.10細胞，稱為‘DO11.10.cCD137’，亦使用相同的慢病毒轉導方法論來產生且用來測試抗人類CD137 Fcabs與食蟹獼猴CD137的交叉反應性。食蟹獼猴CD137之表現係藉由透過如前所述的流動式細胞測量術來判定抗CD137陽性對照抗體(MOR7480.1，US 2012/0237498 A1)與細胞的結合予以確認。

表2：細胞表現的CD137

類型	**名稱**	**物種**	**呈現方式**
細胞	DO11.10.hCD137	人類	細胞表現的
細胞	DO11.10.mCD137	小鼠	細胞表現的
細胞	DO11.10.cCD137	食蟹獼猴	細胞表現的

1.3 $CD4^+$及Fc標誌的小鼠及人類PD-L1

【0320】產生帶有融合蛋白之人類及小鼠PD-L1抗原供用於抗體選擇及篩選。抗原表現為帶有C端His標誌及單體大鼠$CD4^+$，第3及4域(rCD4)標誌(Brown and Barclay, 1994)，或二聚體人類IgG1 Fc域，或是僅用於人類PD-L1，Avi標誌任一者(導致hPD-L1-rCD4-His(序列辨識編號：195)、hPD-L1-Fc-His(序列辨識編號：196)、mPD-L1-rCD4-His(序列辨識編號：197)、mPD-L1-Fc-His(序列辨識編號：198)及hPD-L1-His-Avi(序列辨識編號：199)。生產不同格式的抗原能在一連串輪次的抗體噬菌體展示汰洗期間排除標誌結合者。編碼抗原之表現質體轉染至HEK293細胞之內，如Chapple等人，2006乙文所述。轉染5天後收穫上清液且藉由Ni-NTA瓊脂糖凝膠(sepharose)親和力層析法(Schofield等人，2007)純化分泌的抗原。含rCD4及Fc的PD-L1抗原係使用EZ-link Sulfo-NHS-生物素試劑(Thermo Fisher Scientific，產品代碼21326)、遵循製造商的建議予以生物素化。生物素化反應產物經凝膠過濾且收集單體部分。單體部分使用於所有溶液相噬菌體展示選擇作用。每分子的生物素平均數依使用螢光生物素定量套組(Thermo Fisher Scientific，產品代碼46610)判定為每PD-L1單體為1至3個生物素。

實施例2：抗人類CD137 Fcabs之選擇及特徵化

2.1 抗人類CD137 Fcabs之初始的選擇

【0321】為了選擇結合人類CD137的Fcabs，所以使

用酵母菌及噬菌體展示選擇活動，以使辨識的Fcabs之多樣性達到最大。細胞表面展現的人類CD137及重組二聚體人類CD137及二者均使用以提供各種抗原格式，俾以發揮對二聚體或多聚體CD137蛋白之總結合性驅動的選擇壓力。認為獲得熱切地結合CD137錯合物而不是以高親和力結合單體CD137之Fcab是有利的，因為此種Fcab於T細胞刺激後發生CD137上調的情況下只會優先靶定活化及經引發的(primed)T細胞。不希望受理論束縛，但假設是具有低或微不足道的CD137膜表現位準的T細胞會更可能有單體狀態的CD137，不像活化的T細胞有高度上調的CD137，其中多數蛋白會呈二聚體、三聚體或更高的多聚體狀態。由於總結合性驅動的選擇，該Fcab會優先結合活化的T細胞而與只展現單體CD137的初始的T細胞不能很好地結合。透過選擇熱切的CD137 Fcab會減少可能脫靶的T細胞活化，及伴隨降低的毒性。

【0322】使用六種展示人類IgG1的CH3域之初始的噬菌體庫以藉由噬菌體展示來進行選擇作用。所有的六種庫都含隨機化的AB環(包含根據IMGT編號位置14-18處之殘基)及隨機化的EF環(包含根據IMGT編號位置92-101處之殘基)。該等庫中的一者包含在EF環的位置101處(插入的殘基在根據IMGT編號位置101.4-101.1處)帶有二或四個胺基酸(由二或四個NNK密碼子編碼)插入之殖株。

【0323】3230種噬菌體殖株係藉由噬菌體ELISA來篩選與二聚體重組hCD137抗原之結合並使用重組Fc作為

陰性對照。1140種噬菌體殖株係藉由噬菌體FACS來篩選與DO11.10.hCD137細胞之專一性結合。個別的命中者繼而予以定序且形成的76種獨特的序列給予一Fcab殖株識別符號並亞選殖至包含HelD1.3 IgG1重鏈表現匣之pTT5表現載體(National Research Council of Canada)內用於表現呈mAb²格式的Fcab殖株(見**實施例3.2**)。

【0324】使用四種展示人類IgG1的CH1至CH3域之初始的酵母菌庫以藉由酵母菌展示來進行選擇作用。所有的四種庫於CH3域都含有隨機化的AB環(包含根據IMGT編號位置14至18處之殘基)及隨機化的EF環(包含根據IMGT編號位置92至101處之殘基)。該等庫中的二者進一步包含五個胺基酸殘基插入在CH3域的AB環之位置16處(殘基在根據IMGT編號位置16.5至16.1處)。

【0325】從庫選擇作用所辨識的2784種酵母菌單一殖株係使用流動式細胞測量術抗原結合分析來篩選抗原結合，其涉及用生物素化重組二聚體人類抗原或小鼠Fc片段孵育細胞以區別結合重組hCD137抗原的Fc部分之酵母菌殖株。用不同的抗原濃度及條件重複選擇作用，例如增高誘發溫度、減小選擇作用嚴格性或降低輪次的數目俾以增高命中者的數目。命中者定序顯示產品多樣性相當低，且只有辨識出9種Fcab殖株具有獨特的序列：FS22-053、FS22-172、FS22-173、FS22-174、FS22-175、FS22-176、FS22-177、FS22-178及FS22-179。

2.2 呈"假(mock)"mAb²格式的抗人類CD137 Fcabs之製

備

【0326】生產由IgG1分子組成的“假”mAb²抗體，其包含從噬菌體單離的76種抗人類CD137 Fcab殖株及從酵母菌選擇單離的9種殖株，以允許呈mAb²格式的Fcabs之特徵化。該假mAb²之製備係藉由以Fcabs的CH3域的一部分，包含AB、CD及EF環，取代抗母雞卵白溶菌酶抗體HelD1.3的CH3域的對應區域。HelD1.3抗體的產生係描述於Tello等人之1993乙文內。抗體HelD1.3的重鏈及輕鏈序列係分別顯示於SEQ ID **191**及**159**內。藉由暫時表現於HEK293-6E細胞來生產假mAb²分子。為了評估生產的蛋白量，使用PALL之Octet QKe平台及蛋白A定量生物感應器(18-5021)、藉由生物層干涉術來定量IgG蛋白含量。蛋白係藉由蛋白A親和力層析法、使用mAb SelectSure管柱予以純化。53種噬菌體衍生的CD137 mAb²蛋白呈現出低於檢測閾的量度且因而判定不適合進一步分析。32種mAb²係使用mAb Select SuRe蛋白A管柱(GE Healthcare, 11003494)予以純化。

【0327】繼而使用Octet QKe平台、依生物層干涉術(BLI)來測試此等mAb²的選擇物與人類重組抗原(生物素化的hCD137-mFc-Avi)之結合。12種mAb²不結合以及19種結合CD137-塗覆感應器(FS22-007、FS22-033、FS22-042、FS22-049、FS22-050、FS22-052、FS22-053、FS22-054、FS22-169、FS22-172、FS22-173、FS22-174、FS22-179、FS22-180、FS22-181、FS22-183、FS22-187、

FS22-194、FS22-195)。

2.3 選出的抗CD137假mAb²於人類NF-κB報告基因分析之活性

【0328】多聚合(multimerisation)及簇集對於TNFR訊息傳導是必要的(Bitra等人，2017)。當CD137與其之同源配體，CD137L交互作用時，其會簇集及活化NF-kB訊息傳導途徑。促效劑分子模擬配體驅動CD137之簇集及活化，藉此活化NF-kB訊息傳導途徑。已知一些促效抗體一旦結合便能固有地造成CD137簇集，舉例而言烏瑞魯單抗，然而其他抗體需要抗體自身額外的交聯來誘發CD137簇集，例如烏托米單抗(Fisher等人，2012)。已知效應子細胞上的Fc γ受體於*活體內*會誘發此種交聯，雖然此為低效率且可能發生在遠離治療感興趣的位址。既然劑量限制性毒性已經與烏瑞魯單抗有關連但與烏托米單抗(utolimumab)無關，所以決定選擇沒有固有地致效(agonise)的能力之抗CD137結合Fcabs，而只選擇需要額外的交聯俾以誘發CD137簇集之該等。因而，發展一種分析其能偵測到細胞表面上表現的CD137藉由交聯抗體而簇集時之細胞的NF-kB訊息傳導途徑之活化，但是於抗體未交聯時顯現的活性非常小。此分析繼而用於測試呈假mAb²格式的27種抗CD137 Fcab殖株之促效功能活性，以及呈抗CD20 mAb²格式的6種抗CD137 Fcab殖株，不論依據BLI該等Fcabs是否會結合重組抗原。

【0329】此可藉由該分析中NF-kB訊息傳導途徑之

活化來測量。於分析中使用蛋白L作為交聯劑以經由其等之Fab部分驅動假mAb²的交聯且測量NF-κB活化。

【0330】編碼人類CD137的cDNA(序列辨識編號：185)係使用EcoRI-HF及XhoI限制酵素予以亞選殖至pMSCV-新黴素載體(Takara Clontech, Cat. 634401)之內。使用RetroPack PT67細胞株(Clontech, Cat. 631510)、遵循製造商的程序來生產反轉錄病毒顆粒。此反轉錄病毒隨後用來轉導HEK.FRT.luc細胞，其為以前藉由用含控制螢光素酶表現的NF-κB-敏感型啟動子之Qiagen Cignal Lenti NFkB報告基因(luc) (Qiagen，目錄號336851)慢病毒屬(lentivirus)轉導Flp-In T-REx 293 HEK細胞株(Life Technologies, R780-07)所產生的。使用此等HEK.FRT.luc.hCD137細胞來篩選含選擇作用所辨識的CD137結合者之假mAb²。

【0331】以DPBS(Life Technologies, 14190169)製備各種假mAb²之2 μM稀釋且以報告基因細胞培養基(DMEM(Gibco, Cat. 61965-026)；10% FCS(Gibco, Cat. 10270-106)；1x青黴素鏈黴素(PennStrep) (Gibco, Cat. 15140-122)；殺稻瘟菌素15μg/ml(Melford Laboratories Ltd. Cat. B1105)；嘌呤黴素(puromycin)5μg/ml(Life technologies, Cat. A11113803)；吉歐黴素100μg/ml(InvivoGen, Cat. 11006-33-0)；遺傳黴素(Geneticin)500μg/ml(Life Technologies, Cat. 10131-027)1:3進一步稀釋。使用蛋白L(Life

Technologies, 21189)作為人工交聯劑並且以莫耳比率1:4與mAb²分子混合。孵育24小時後，用100µl Promega Bio-Glo™螢光素酶分析試劑(Promega目錄號G7941)根據製造商的指示來處理細胞且用平盤讀數器及Gen5軟體，BioTek來測量積分時間0.5秒之發光。發光值為對藉由交聯的Fcabs所誘發的CD137簇集之NF-kB訊息傳導途徑活化作出反應所生產之螢光素酶作為衡量標準。繪製發光值相對於Fcab的log濃度的圖以及產生的曲線係以GraphPad Prism、使用log(促效劑)vs反應方程式來擬合。

【0332】當以蛋白L交聯時的螢光素酶信號與未交聯時相比有至少10倍增加，則確認為命中者。判定此等殖株能誘發CD137簇集及隨後活化下游訊息傳導途徑。於所有測試的殖株中，二者於交聯時能誘發螢光素酶10倍增加，FS22-053及FS22-172，雖然無法確定任何一者的EC_{50}。二者均被選出供用於DO11.10 T細胞活化分析予以進一步特徵化。令人驚訝地，剩下的殖株於交聯條件下沒有觀察到活性，儘管依BLI會結合CD137標靶，但也許表示其等結合CD137上不相關的表位，或是此等殖株之親和力不足以足够强烈地結合CD137以起始NF-κB訊息傳導級聯。

【0333】總的來說，雖然測試了30種以上的Fcabs，但只有二種Fcabs(FS22-053及FS22-172)係從初始的選擇辨識出的，其等於NF-κB報告基因分析中、當交聯時展現出所欲的功能且當未交聯時的活性非常小。

2.4 選出的抗CD137假mAb²於DO11.10 T細胞活化分析之

活性

【0334】經由活化的T細胞上的促效劑分子之CD137簇集引發了T細胞活化及下游的訊息傳導，其導致但不限於，IL-2生產。既然確認FS22-053及FS22-172於NF-κB報告基因分析中有活性，以T細胞活化分析來測試其等活化CD137的能力。發展一種DO11.10 T細胞活化分析其使用經工程處理以過度表現人類CD137之DO11.10 T細胞以及藉由測量IL-2釋放來評估T細胞活化。

【0335】DO11.10 T細胞(National Jewish Health)係用如前所述、設計來過度表現小鼠或人類CD137之慢病毒載體予以轉導。此DO11.10 T細胞活化分析測試下列殖株以及FS22-053及FS22-172：FS22-007、FS22-033、FS22-042、FS22-049、FS22-050、FS22-052、FS22-054、(全部呈“假”HelD1.3 mAb^{2}格式)。製備有或沒有重組蛋白L(Life Technologies, 21189)交聯劑之mAb^{2}或20H4.9陽性對照mAb之稀釋，並添加至已經以0.1 μg/ml抗CD3抗體(殖株17A2, BioLegend, 100208)塗覆過夜之96孔圓底平盤內的DO11.10.hCD137細胞。於18小時孵育後，收集上清液且用小鼠IL-2 ELISA套組(eBioscience, 88-7024-86)、遵循製造商的指示予以分析。使用平盤讀數器及Gens軟體，BioTek於450 nm下讀取平盤。450 nm的吸光度值減去570 nm的吸光度值(校正)。根據四參數邏輯曲線擬合(Gens軟體，BioTek)來計算細胞介素濃度的標準曲線。繪製mIL-2濃度vs mAb^{2}或基準mAb的log濃度的

圖以及產生的曲線係以GraphPad Prism、使用log(促效劑)vs反應方程式來擬合。

【0336】於此分析中，殖株FS22-053及FS22-172當以蛋白L交聯時顯現出明顯提升的活性。FS22-053於未交聯時的活性為126 nM且交聯時的活性為21 nM(改進了6倍)，而FS22-172於未交聯時的活性為950 nM且交聯時的活性為44nM(改進了22倍)。結果，二種殖株均被選擇供用於親和力成熟。

【0337】**實施例2.4**顯示測試的mAb²格式之FS22-053及FS22-172當以蛋白L交聯時能驅動DO11.10 T細胞上的CD137簇集及活化。

實施例3：抗人類CD137Fcabs之親和力成熟及後續特徵化

【0338】如前所述，親和力成熟選擇了二種殖株，根據其等於NF-κB報告基因分析，DO11.10 T細胞活化分析之功能特徵FS22-053及FS22-172)。

3.1 FS22-053及FS22-172之親和力成熟

【0339】從FS22-053及FS22-172 Fcab殖株建構四種酵母菌展示庫。七個殘基(根據IMGT在位置15-16.1處)係使用ELLA引子，於各殖株的CH3域之AB環內進行隨機化以製造庫FS22-053 AB及FS22-172 AB。五個殘基(根據IMGT在位置92-94及97-98處)係使用ELLA引子於CH3域之EF環內進行隨機化而產生庫FS22-053 EF及FS22-172 EF。

【0340】關於庫FS22-053 AB及FS22-053 EF，以及

FS22-172 AB及FS22-172 EF，執行三或四輪酵母菌庫的選擇作用以選出親和力成熟的殖株，其係使用二聚體hCD137-mFc-Avi抗原或單體hCD137-Avi-His抗原。單體抗原與二聚體抗原交替使用以確保殖株保留對抗原的親和力及不會只通過總結合性來結合。使用單體或二聚體抗原，以及各輪期間流動式細胞測量術使用的抗原濃度係憑經驗來確定，其係由先前輪次是否觀察到對單體或二聚體抗原的富集作用來確定。只要可能，使用高於親代的分類圈選來單離與親代分子相比親和力成熟的殖株。選擇作用壓力增高到達1nM的二聚體抗原。於各選擇輪次期間，個別的殖株係於瓊脂平盤上塗上斑點以評估選擇作用的進展。各殖株個別地生長及誘發以及接著使用如前所述生物素化的二聚體抗原及抗CH2結構標記、由流動式細胞測量術來判定其之結合及結構參數。遵循此篩選級聯以允許根據來自選擇作用產品之殖株樣本來判定選擇作用的成功以及允許早期篩選隨後能生產為可溶性蛋白的個別殖株。

【0341】以如前所述之抗原結合流動式細胞測量術來篩選總共1152種酵母菌單一殖株與生物素化重組抗原之結合作用。FS22-053 EF庫之選擇作用導致富集138種獨特的環序列。同樣地，從FS22-172 AB庫單離30種獨特的環序列。庫FS22-053 AB及FS22-172 EF不含比起親代殖株顯示出任何結合作用改良的任何殖株。橫跨來自FS22-053 EF及FS22-172 AB庫的最佳結合殖株之序列分析顯示出AB環內保守的PPY序列模式。

【0342】保守的PPY序列存在可能由於脯胺酸殘基受限的可撓性，而藉由導入更剛性或暴露的環結構來促進延伸的結合區域形成。任擇地，PPY序列可能代表涉及此等殖株結合之特定保守的部分，因已經證明富含脯胺酸的序列會結合SH3域蛋白的芳香族序列。而且，既然兩個單獨的Fcabs譜系均已獨立選出該PPY保守的序列，其對於CD137的表位結合可能很重要。此外，FS22-053及FS22-172譜系二者的殖株之CH3域的EF環內保守的LE或LD序列模式，其暗示著EF環內之此胺基酸部分對於結合改良是必要的。

【0343】為了評估選擇作用的進展及是否必須重組親和力成熟殖株之間突變的AB及EF環，所以藉由與10 nM二聚體人類抗原呈現的專一性結合來分級(流動式細胞測量術結合分析中高於30% APC陽性細胞)之來自FS22-053 EF庫的前五種獨特的殖株(FS22-053-008、FS22-053-009、FS22-053-010、FS22-053-011、FS22-053-012)，以及來自FS22-172 AB庫的前六種獨特的殖株(FS22-172-001、FS22-172-002、FS22-172-003、FS22-172-004、FS22-172-005、FS22-172-006，全體於相同的分析中以10 nM二聚體人類抗原篩選時都顯示出10%以上的APC陽性細胞)予以生產為假mAb^2(HelD1.3)及模擬mAb^2(PD-L1)，以評估隨機化環之功能及動力學改良。

3.2 呈“假”及“模擬”mAb^2格式的抗人類CD137 Fcabs之

建構

【0344】親代FS22-053殖株衍生的16種親和力成熟的殖株(FS22-053-001至FS22-053-016)，以及親代FS22-172殖株衍生的6種親和力成熟的殖株(FS22-172-001至FS22-172-006)係製備呈“假”及“模擬”mAb²格式。殖株FS22-053-001至FS22-053-007沒有進一步繼續因其等之mAb²格式沒有表現允許下游純化供進一步測試及特徵化的位準。

【0345】製備包含呈HelD1.3之抗人類CD137 Fcabs的“假”mAb²抗體用於呈mAb²格式之親和力成熟的Fcabs進一步特徵化。此等mAb²係如**實施例2.2**中所述予以製備。

【0346】亦生產包含抗人類CD137 Fcabs還有PD-L1結合Fab區域的“模擬”mAb²(殖株YW243.55.S70來自US 8,217,149 B2)。此等係以**實施例2.2**中所述的方法類似的方式來製備，其係藉由以抗PD-L1結合抗體的CH3域的一部分，包含AB、CD及EF環，取代對應的Fcab區域。此等PD-L1模擬mAb²包含LALA突變於CH2域(AA)。已知導入LALA突變於人類IgG1之CH2域會降低Fcγ受體之結合作用(Bruhns, P.，等人(2009)及Hezareh M.，等人(2001))。

【0347】藉由暫時表現於HEK293-6E細胞來生產CD137/HelD1.3“假”及CD137-AA/PD-L1“模擬”mAb²並且使用mAb Select SuRe蛋白A管柱予以純化。

3.3 呈假mAb²格式的人類Fcabs於人類NF-κB報告基因細

胞分析之活性

【0348】所列出的呈假mAb^2(HelD1.3)格式之親和力成熟的抗人類CD137 Fcabs之功能活性係以**實施例2.3**中所述相同的NF-κB螢光素酶分析予以測試。用平盤讀數器及Gen5軟體，BioTek來測量積分時間0.5秒之發光。正如所料，在無蛋白L交聯(-XL)下、Fcabs中無一者顯現出活性。所有親和力成熟的CD137 Fcabs顯現出超過親代CD137 Fcabs巨大的改良，而其等雖然於此分析中是陽性的，但計算其等之EC_{50}值是不可能的(見**實施例2.3**)。當以蛋白L交聯時(+XL)，FS22-053-008及FS22-172-003顯現出來自每個家族具最低的EC_{50}(分別為26.34 nM及32.64 nM)之最佳的活性。

3.4 呈模擬mAb^{2}格式之親和力成熟的人類Fcabs於人類DO11.10 T細胞活化分析之活性

【0349】呈模擬mAb^2(PD-L1 LALA)格式之親和力成熟的人類Fcabs之功能活性係以DO11.10 T細胞活化分析，相似於**實施例2.4**中所述的分析予以測試。

【0350】藉由使用KpnI及NotI限制位來使編碼小鼠PD-L1的cDNA(序列辨識編號：187)亞選殖至pcDNA5FRT載體(Life Technologies)內且使用脂質體2000(Life Technologies, 11668-019)使載體轉形至Flp-In T-REx 293細胞株(Life Technologies, R780-07)之內以生產HEK.mPD-L1細胞。細胞係生長於含有10% FBS、100 μg/ml潮黴素B(Melford Laboratories Ltd,

Z2475)及15 μg/ml殺稻瘟菌素(Melford Laboratories Ltd, B1105)之DMEM內3-4週直到形成穩定轉形的細胞群落。此等群落係於1 μg/ml多西環素(Sigma Aldrich, D9891)存在下擴大以及使用PE複合的抗小鼠PD-L1(MIH5)抗體(BD Biosciences, 558091)來測試PD-L1的表現。

【0351】使用細胞解離緩衝液使細胞分離、用PBS清洗一次且於96孔平盤的孔內平盤培養$2x10^5$個細胞然後以1:20 PBS稀釋之抗體於4 ℃下孵育1小時。用PBS清洗細胞一次然後以Accuri C6細胞計數器(BD Biosciences)來測量以及使用FlowJoX來分析數據。再次確認小鼠PD-L1之表現。

【0352】**實施例3.2**所生產的呈CD137/PD-L1 mAb^2之15種殖株係於此DO11.10 T細胞活化分析予以測試。製備mAb^2或陽性對照mAb之稀釋，並添加至已經以0.1 μg/ml抗CD3抗體(殖株17A2, BioLegend, 100208)塗覆過夜之96孔平底平盤內的DO11.10.hCD137(每孔$7.5x10^3$個細胞)及HEK.mPD-L1細胞(每孔$2x10^4$個細胞)或DO11.10.hCD137(每孔$7.5x10^3$個細胞)及HEK細胞，其等未經轉導以表現mPD-L1(每孔$2x10^4$個細胞)。於18小時孵育後，收集上清液且用小鼠IL-2 ELISA套組(eBioscience, 88-7024-86)、遵循製造商的指示予以分析。使用平盤讀數器及Gens軟體，BioTek於450 nm下讀取平盤。450 nm的吸光度值減去570 nm的吸光度值(校

正)。根據四參數邏輯曲線擬合(Gens軟體，BioTek)來計算細胞介素濃度的標準曲線。繪製mIL-2濃度vs mAb^2或基準mAb的log濃度的圖以及產生的曲線係以GraphPad Prism、使用log(促效劑)vs反應方程式來擬合。藉由測量mIL-2釋放來偵測T細胞活化。

【0353】在沒有藉由PD-L1表現細胞結合來交聯的情況下，觀察到沒有T細胞活性。一旦交聯，如高mIL-2釋放位準及次納摩爾EC_{50}值所示，所有的mAb^2都有有效力的T細胞活性。FS22-053-009及FS22-172-005之外的所有殖株EC_{50}都小於0.3 nM，如果沒有比陽性對照(抗人類CD137 mAb，G1-AA/20H4.9)更好，就是如陽性對照一樣好。觀察到最小的$E_{最大}$，其為最大的T細胞活化之衡量標準及可能與較大的*活體內*T細胞抗腫瘤活性相關聯，為7758 pg/ml，其比陽性對照(抗人類CD137 mAb，G1-AA/20H4.9)更高。

3.5 初級人類$CD8^+$ T細胞活化分析

【0354】**實施例3.3**中證實Fcabs活化過度表現CD137的T細胞上的CD137之能力。需要初級人類T細胞分析以測試Fcabs對於尚未經工程處理以過度表現CD137的細胞之活性。活化的胞毒型$CD8^+$ T細胞負責直接殺死癌細胞且表現CD137於其等之細胞表面上(Ye等人，2014)。已知CD137之簇集對於誘發下游的訊息傳導及進一步$CD8^+$ T細胞活化是不可缺少的。因而用一種$CD8^+$ T細胞活化分析來評估Fcabs(詳情如下之mAb^2格式)驅動

CD137簇集及隨後的下游訊息傳導的能力。$CD8^+$ T細胞活化係依hIL-2釋放來判定。

【0355】為了單離T細胞，從血小板捐贈的副產品，白血球耗乏椎來採集末梢血液單核細胞(PBMCs)。簡言之，用PBS沖洗白血球椎內容物以及覆蓋於菲科爾(Ficoll)(Sigma-Aldrich, 1440-02)梯度上。藉由離心來採集PBMCs以及回收沒有越過菲科爾梯度的細胞。用PBS進一步沖洗PBMCs以及通過添加10 ml 1X 紅血球溶解緩衝液(eBioscience, 00-4300-54)遵循製造商的指示、溶解剩下的紅血球。使用$CD8^+$ T細胞單離套組II(Miltenyi Biotec Ltd, 130-096-495)根據製造商的指示、從沖提劑內存在的PBMCs單離$CD8^+$ T細胞。

【0356】使用抗CD3抗體孵育作為驅動起始的T細胞活化之第一信號。以配於PBS之8 μg/ml抗CD3抗體(殖株UCHT1, R&D Systems, MAB100-SP)於4 ℃下塗覆96孔平底組織培養平盤過夜。繼而用200 μl PBS清洗平盤3次。

【0357】關於呈PD-L1模擬mAb^2格式之親和力成熟的人類CD137 Fcabs的細胞為基的交聯，基本上如**實施例5.3**中所述來生產過度表現人類PD-L1的HEK293細胞(HEK.hPD-L1)，但是藉由亞選殖編碼人類PD-L1(序列辨識編號：185)序列而非小鼠PD-L1的cDNA。HEK.hPD-L1細胞係以每孔2 x 10^5個細胞予以平盤培養於抗CD3抗體塗覆的(8μg/ml)96孔平底平盤上、配於100μl T細胞培養基(RPMI培養基(Life Technologies, 61870-044)加上

10% FBS (Life Technologies)、1X青黴素鏈黴素(Life Technologies, 15140122)、1mM丙酮酸鈉(Gibco, 11360-070)、10mM Hepes (4-羥乙基哌嗪乙磺酸)(Sigma-Aldrich, H0887)、2mM L-麩醯胺酸(Sigma-Aldrich, G7513)以及50μM 2-巯乙醇(Gibco, M6250))內。一旦於孵育4小時後沒有轉導來表現hPD-L1之HEK.hPD-L1細胞或HEK細胞已經黏著，便移去全部的T細胞培養基且以含5.0 x 10^5個細胞/ml的濃度之T細胞的100μl T細胞培養基代替，其導致5.0 x 10^4個細胞/孔。

【0358】mAb^2係以500nM開始、2X終濃度以T細胞培養基稀釋以及進行1:3滴定。添加100μl的mAb^2滴定至細胞達200μl的總分析體積及1X濃度的抗體。

【0359】陽性對照抗D137抗體(G1-AA/20H4.9)及陰性對照同型IgG抗體(G1-AA/HelD1.3)各自以500nM開始、2X終濃度、以含500nM交聯劑(抗人類CH2，機構內部生產(Jefferis 等人，1985及Jefferis 等人，1992)(mG1/MK1A6))的T細胞培養基予以稀釋以及進行1:3滴定。添加100μl稀釋的陽性對照抗體/交聯劑混合物或陰性對照IgG抗體/交聯劑混合物至細胞達總共200μl的分析體積及1X濃度的抗體。

【0360】該分析係於5% CO_2、37℃下孵育歷時72小時。收集上清液且用人類IL-2 ELISA Ready-SET-Go!套組(eBioscience, Cat. 88-7025-88)、遵循製造商的指示予以分析。使用平盤讀數器及Gen5軟體，BioTek於450 nm

下讀取平盤。450 nm的吸光度值減去630 nm的吸光度值(校正)。根據四參數邏輯曲線擬合(Gen5軟體，BioTek)來計算細胞介素濃度的標準曲線。繪製人類IL-2(hIL-2)濃度vs抗體的log濃度的圖以及產生的曲線係以GraphPad Prism、使用log(促效劑)vs反應方程式來擬合。

【0361】陽性對照抗人類CD137 mAb，20H4.9，當以抗hCH2抗體(mG1/MK1A6)交聯時，顯示出hIL-2釋放增高且EC_{50}為0.5nM。此分析中所有殖株都有活性，多數顯示出良好的效能及次納摩爾(sub-nanomolar)EC_{50}s。含Fcabs FS22-053-007、FS22-053-008、FS22-053-010、FS22-053-011、FS22-053-012、FS22-172-003、FS22-172-004、FS22-172-005之mAb^2在0.19-至0.49 nM的範圍內引發最大的T細胞反應及最小的EC_{50}s。亦測試沒有以PD-L1表現的HEK細胞予以交聯的情況下的mAb^2之亞群(含Fcabs FS22-053-008、FS22-053-011、FS22-053-014、FS22-173-003及FS22-172-004)且於此分析中顯示出沒有活性，正如所料。此確認了NF-kB分析及DO11.10 T細胞活化分析中所見的活性。

3.6 藉由表面電漿子共振(SPR)來判定抗人類CD137 Fcabs之專一性

【0362】測試抗人類CD137 Fcabs關於人類CD137與其他相關的TNFSFR家族成員相比之專一性。測試呈假mAb^2(HelD1.3)格式的Fcabs中的8種且透過Biacore T200(GE Healthcare)之SPR來測量、測試與其他人類

TNFRSF受體：CD40、OX40與GITR之結合。用胺偶合(胺偶合套組，GE Healthcare, BR-1000-50)塗覆人類CD40、GITR與OX40於Biacore CM5晶片(GE Healthcare，目錄號29149603)達大約1000 RU。以HBS-EP+緩衝液(BR100669)製備以1 μM開始、呈假mAb^{2}格式的抗人類CD137 Fcabs(FS22-053-008/HelD1.3、FS22-053-009/HelD1.3、FS22-053-010/HelD1.3、FS22-053-011/HelD1.3、FS22-053-012/HelD1.3、FS22-053-014/HelD1.3、FS22-172-003/HelD1.3、FS22-172-004/HelD1.3)之稀釋且以30 μl/min注射3 min，然後允許於緩衝液內解離4 min。以30 μl/min來注射10 mM甘胺酸pH 2.5歷時12 s以再生晶片。利用對不同的TNFRSF成員專一的抗體作為陽性對照以證實Biacore晶片塗覆。數據減去雙重參考且使用BIAevaluation 3.2軟體予以分析。Fcabs沒有結合任何測試的TNFRSF受體，證明其等對於CD137之專一性。結果，不預期Fcabs，或含來自此等Fcabs之抗原結合位址的mAb^2，會引發與CD137以外的任何東西的脫靶結合。

3.7 呈假mAb^{2}格式的抗人類CD137 Fcabs對於人類、食蟹獼猴及小鼠CD137、依SPR之結合親和力以及FS22-053-017的產生

【0363】呈假mAb^{2}格式的抗人類CD137 Fcabs(FS22-053-008、FS22-053-011、FS22-053-014、

FS22-172-004、FS22-172-004)(見**實施例3.2**)對於人類、食蟹獼猴(cynomolgus)(食蟹獼猴(cyno))及小鼠CD137之親和力係依SPR來測量，以判定Fcabs是否可於動物研究中用於測試。一種抗人類Fab捕捉抗體係遵循製造商的建議(GE Healthcare，人類Fab捕捉套組，#28958325)、固定於一種CM5 S系列晶片(GE Healthcare #BR-1005-30)的全部四個流動室達6000 RU之平均表面密度。於25℃及10 μl/min的流速進行固定達成6000 RUs之平均終回應。藉由以30 μl/min注射HBS-EP+緩衝液(GE Healthcare #BR1006-69)稀釋的3 μg/ml mAb²溶液60秒以捕捉各種mAb²達大約150 RU。繼而配於HBS-EP+緩衝液內不同濃度的人類、食蟹獼猴或小鼠CD137抗原(未生物素化的人類、食蟹獼猴或小鼠CD137-mFc-Avi或人類CD137-Avi-His)係以60 μl/min從晶片上面流過3 min然後允許解離10分鐘。於各種的抗原濃度之後，以30 μl/min的流速注射10mM甘胺酸pH 2.1歷時30秒以使晶片再生。於最高濃度的抗原之前及最低濃度的抗原之後注射緩衝液HBS-EP+用於參考扣除(reference subtraction)，以及隨機重複其中一個濃度二次。用1:1朗繆(Langmuir)模型來擬合結合動力學以產生各樣本的平衡解離常數(K_D)。用BiaEvaluation軟體3.2版來執行數據分析。結果顯示於**表3**內。

【0364】結果分析顯示與各自的親代分子相比之下，所有親和力成熟的殖株和人類及食蟹獼猴CD137二者

之結合均有改良。對單體人類CD137抗原之結合親和力比對二聚體人類及食蟹獼猴Fc融合抗原之結合親和力更弱(達至少100倍)。如**實施例2.1**中所討論，挑選比起單體形式的會優先結合二聚體CD137之Fcabs且此資料確認了選擇策略是成功的。此動力行為使得其等較不可能與未刺激的T細胞上所表現的最小位準單體CD137結合而導致與一些抗CD137單株抗體療法相關的肝或全身毒性的風險降低。

【0365】該資料亦顯示抗人類CD137 Fcabs係以可比得上人類二聚體CD137的親和力與食蟹獼猴二聚體CD137結合。

表3

Fcab	**人類二聚體 CD137 K_D (nM)**	**食蟹獼猴二聚體 CD137 K_D (nM)**	**人類單體 CD137 K_D 相對於人類二聚體 K_D 之 倍數差異**	**小鼠二聚體 CD137 K_D (nM)**
FS22-053	38	34	N/A	N/A
FS22-053-008	4.2	0.9	170 倍	N/A
FS22-053-011	5.5	1.3	>200 倍	N/A
FS22-053-014	3.2	0.9	100 倍	24
FS22-172	52	203	N/A	N/A
FS22-172-003	1.5	1.3	>200 倍	N/A
FS22-172-004	4.3	3.5	>200 倍	N/A

N/A-不適用因信號太低不允許判定K_D

【0366】亦測試呈假mAb^2格式的Fcabs與小鼠二聚體CD137結合的能力。該等殖株中無一者顯現出比小鼠抗原更強的結合作用(如表中所示，其中N/A表示無K_D能計算出來)，除了殖株FS22-053-014之外，意外地發現其對小鼠抗原有24 nM之K_D。此為出乎意料的因為小鼠CD137

和人類CD137共享的序列同源性小於57%。

【0367】FS22-053-014之序列分析顯示一種可能的序列責任其能導致其CH3域的EF環位置98處的轉譯後天門冬胺酸異構化。位置98處的天門冬胺酸(D)係使用QuickChange II定點誘變套組(Agilent，目錄編號200523)、根據製造商的建議，藉由定點誘變而突變成麩胺酸(E)，其產出殖株FS22-053-017。

【0368】繼而進行實驗來確認FS22-053-017殖株之結合親和力或功能活性與FS22-053-014殖株相比沒有受到此突變的負面影響。

【0369】Fcab殖株FS22-053-017之平衡解離常數(K_D)與殖株FS22-053-014之平衡解離常數係依SPR、於Biacore T200系統上作比較，其係分別使用人類CD137-mFc-Avi抗原及小鼠PD-L1-mFc-Avi。結果顯示二種Fcab殖株對於人類抗原的動力學剖析均非常相似，藉此證明位置98處的天門冬胺酸突變為麩胺酸對於人類抗原的結合沒有負面效應。結果亦顯示FS22-053-017顯示出對小鼠CD137抗原之結合強度下降2倍。

【0370】Fcab殖株FS22-053-017係予以亞選殖且表現為HelD1.3“假”mAb^2(參見**實施例2.2**)然後以如**實施例2.4**中所述的人類CD137 DO11.10 T細胞活化分析，與亦呈HelD1.3 mAb^2格式之FS22-053-014殖株作比較。使用G1-AA/20H4.9作為抗CD137陽性對照且G1-AA/HelD1.3作為IgG對照。以沒有蛋白L交聯或1:4比

率之蛋白L予以交聯來測試mAb²。

【0371】結果顯示FS22-053-17 Fcab呈假mAb²格式FS22-053-014 Fcab呈假mAb²格式二者於相同的DO11.10 T細胞活化分析中以蛋白L交聯時均有相當的活性。因而，進行的突變誘發沒有負面影響功能活性。二種殖株呈假mAb²格式在沒有交聯的情況下均沒有活性。

3.8 抗人類CD137 Fcabs之親和力成熟及特徵化之總結

【0372】綜上所述，產生且製備呈mAb²格式之親和力成熟的抗CD137 Fcabs，其繼而予以特徵化。CH3域內含此等CD137抗原結合域的mAb²於人類NF-κB報告基因細胞分析中顯示出高位準的活性且此活性證實為交聯依賴的。含有來自FS22-053-008及FS22-172-003 Fcabs的抗原結合域之mAb²此於分析中顯示出最好的活性。

【0373】此外，已表明當mAb²係從此等Fcabs製備出，而使其等含有CD137抗原結合域及PD-L1結合Fab區域及LALA突變於其等之CH2域內以降低或廢除與Fcγ受體的結合時，那麼該等mAb²於人類DO11.10 T細胞活化分析中會具有有效力的T細胞活性且此活性經證實會依賴藉由結合PD-L1表現細胞之交聯作用。亦證實該mAb²於初級人類$CD8^+$ T細胞活化分析中具有交聯依賴的活性，提供了含有此等親和力成熟的CD137抗原結合域的mAb²能有效誘發CD137致效作用及此促效劑活性的條件是交聯之進一步的證據。

【0374】亦證實含抗人類CD137抗原結合域的mAb²

對CD137為專一的且不會結合其他的TNFRSF成員。證實比起單體人類CD137抗原，該mAb²會優先結合人類二聚體CD137抗原。最後，證實此等mAb²係以可比得上二聚體人類CD137的親和力與二聚體食蟹獼猴CD137結合。

【0375】意外地發現一種殖株，FS22-053-014，亦能結合小鼠CD137。FS22-053-014之序列分析顯示一種可能的序列責任，其能藉由定點誘變(side directed mutagenesis)來校正而生產FS22-053-017殖株。FS22-053-017之特徵化顯示其保留如FS22-053-014一般相似的結合性質且於人類CD137 DO11.10 T細胞活化分析表現出相似的功能活性。

【0376】已證明了含抗人類CD137抗原結合域的mAb²需要交聯作用俾以簇集及活化CD137，下一個目標是要製備除了結合CD137以外還結合人類PD-L1的mAb²。假設是mAb²經由Fab臂與人類PD-L1結合會造成抗體分子的交聯，此又會導致CD137的簇集及活化且此活化會取決於存在的人類PD-L1表現。

【0377】為了製備結合CD137以外還結合人類PD-L1的mAb²，首先必須產生能結合PD-L1的mAbs。以下說明此等mAbs之產生。

實施例4：初始的抗PD-L1 mAb 280_02_G02的單離

4.1 選擇作用

【0378】“IONTAS 1”人類抗體噬菌體展示庫(IONTAS Ltd.)被用來選擇抗PD-L1殖株。用來構建該

IONTAS 1庫的抗體基因係源自於人類淋巴細胞(42個白膜層捐贈)以及一個扁桃腺組織樣本。該等白膜層與扁桃腺組織這兩者皆在地域研究倫理委員会的批准下而獲得。

【0379】三個輪次的固相選擇係利用該IONTAS 1抗體噬菌體展示庫並使用直接被塗覆於聚苯乙烯Nunc管上的抗原來進行，如Schofield等人，2007乙文所述。第一、第二及第三選擇輪係分別使用人類PD-L1-Fc-His、小鼠PD-L1-rCD4-His及人類PD-L1-Fc-His(參見**實施例1.3**所述的抗原細節)。

【0380】經選擇的可變異重(VH)抗PD-L1抗體族群係以如Dyson等人，2011乙文所述之初始的可變異輕(VL)抗體族群予以混洗，而此經混洗、援救的抗體-噬菌體-展示族群被應用於溶液相選擇作用。簡言之，在第1、2及3輪分別以人類PD-L1-rCD4-His(10nM)、人類PD-L1-rCD4-His(200pM)及小鼠PD-L1-rCD4-His(10nM)來進行淘選，而這會導致生成名為“選擇280”的產品抗PD-L1 scFv族群。此scFv族群含有人類和小鼠抗PD-L1結合scFv係藉由如Dyson等人，2011乙文所述所執行的噬菌體多株ELISA來判定，並且展現出與人類PD-1或與rCD4或Fc標籤的最小交叉反應性。

4.2 篩選：ELISA、重組阻斷分析、以細胞為基的阻斷分析

4.2.1單株scFv ELISA

【0381】來自**實施例4.1**的選擇280 scFv族群藉由

ELISA來進行篩選以鑑定出能最佳結合至人類PD-L1的殖株。該scFv族群被亞選殖到可溶性scFv載體pSANG10中並且含有可溶性scFvs的*大腸桿菌*(*E.coli*)培養物係如下文(Martin等人，2006；Studier，2005)所述予以製備。可溶性scFv接著如Schofield等人，2007乙文所述使用於具有固定的人類PD-L1-rCD4-His的單株ELISA中。Nunc Maxisorp平盤(Thermo Fisher Scientific，437111)係塗覆以人類PD-L1-rCD4-His(5μg/ml，PBS)過夜，以2% MPBS來阻斷歷時1小時以及添加大*腸桿菌*培養物上清液(以2X 2% MPBS來稀釋為1：2)，並且容許scFv在室溫下結合歷時1小時。經結合的scFv使用標記有銪的抗-FLAG M2抗體(Sigma，F1804)來檢測。總共有470個殖株被篩選而這導致鑑定出346個帶有比背景高至少10倍之針對PD-L1的結合信號的抗PD-L1殖株，與不含有抗原的“空”阻斷孔相較之下。經由初級ELISA信號所評定的192個最佳抗人類PD-L1殖株被選擇出來供用於進一步分析。

4.2.2 以ELISA為基的PD-L1/PD-1阻斷分析中篩選scFv

【0382】為了鑑定出阻斷PD-L1與PD-1之間交互作用的殖株，進行ELISA以篩選供用於阻斷scFv。簡言之，nunc maxisorp平盤(437111，Thermo Fisher Scientific)係塗覆以抗-rCD4(第3及4域)抗體(MCA1022，OX-68，Bio-Rad)過夜，以3% MPBS阻斷並在室溫下與人類PD-1-rCD4-His(5 μg/ml配於3% MPBS中)孵育歷時1小時。人類PD-L1-Fc-His(50 μl，0.2 nM)與含有scFv的大

*腸桿菌*培養物上清液預混合。Nunc 96孔平盤以PBS，0.1% Tween™-20(PBS-T)清洗3次並用PBS清洗3次，然後加入該人類PD-L1-Fc-His/scFv混合物並在室溫下孵育歷時1小時。清洗平盤並且使用山羊-抗-Fc-生物素(Jackson ImmunoResearch，109-065-098，Laboratories，0.1μg/ml，3% MPBS)與鏈黴抗生物素-銪(Streptavidin-Europium)(Perkin Elmer，1244-360)，繼而為DELFIA增強溶液(Perkin Elmer，4001-0010)來偵測結合的人類PD-L1-Fc-His。在經篩選的192個殖株中，與培養基對照組相較之下，有183個殖株展現出至少90%的阻斷活性。該等經鑑定的183個抗PD-L1 scFv殖株進一步在一初級ELISA，如上面**實施例4.2.1**所述，中針對小鼠PD-L1交叉反應性而被篩選，但使用固定的小鼠PD-L1-rCD4-His代替人類PD-L1。這鑑定出50個小鼠交叉反應性抗PD-L1殖株，它們是供轉化為IgG1型式的候選物。

4.2.3 阻斷抗PD-L1 scFv殖株轉化為IgG1格式

【0383】阻斷PD-L1與PD-1之間交互作用的抗PD-L1 scFv殖株藉由將VL與VH基因亞選殖到IgG1表現質體pINT3-IgG1中並以4ml規模在HEK293中表現而被轉化成為IgG1格式，如Chapple等人，2006乙文所述。該等抗體係依據製造商的操作說明並使用蛋白質A瓊脂糖凝膠珠(PC-A100)與Proteus “1-step batch” midi-spin管柱(Generon，GEN-1SB08)而被分批親和力純化。該等經純

化之抗體的透析係使用GeBAflex maxi管並以一為8kDa的截斷(Generon，D045)來進行。若有必要，該等抗體藉由超過濾(ultrafiltration)而被濃縮至2 μM。

4.2.4 以Jurkat-NFAT報告基因共培養分析來篩選PD-L1-PD-1阻斷活性

【0384】經純化的抗PD-L1 mAb之功能活性接著以一共培養報告基因分析篩選來進行評估。此篩選係依據製造商的操作說明並使用GloResponse NFAT-luc2/PD-1穩定Jurkat細胞株(Promega，CS187102)與Thaw-and-Use PD-L1細胞(Promega，CS178103)來進行。PD-L1細胞予以平盤培養在含有10% FBS的HAM'S-F12培養基中。隔天將培養基去除並同時將PD-1 Jurkat報告基因細胞(Promega，CS187102)再懸浮於分析培養基(90% RPMI1640，1% FBS)中。對含有黏附的PD-L1細胞的平盤加入40 μl的含有呈2X濃度(200 nM)的不同抗體之分析培養基，繼而加入40 μl的PD-1細胞混合物。該平盤在37℃，5% CO_2下孵育歷時6小時。將BioGlo試劑(Promega，G7940，80 μl)加入各孔中並使用BMG pherastar平盤讀取器來讀取螢光素酶輸出。此鑑定出能夠在共培養分析中阻斷PD-L1與PD-1的交互作用的抗體G1/280_02_G02，如藉由與不含有抗體的對照組相較下之螢光素酶活性增加所判定。該活性在一劑量-反應共培養分析(倍增濃度範圍：200至1.56 nM)中會導致一經計算的半最大效應濃度(EC50)為4.2 nM，因而被證實。

4.3 序列最佳化

【0385】對G1/280_02_G02抗體序列的初步分析導致鑑定出VH-CDR2中的可能的脫醯胺作用位置，特別是在Kabat位置54至55處的NG部分。由於在該位置的脫醯胺作用可能會潛在地影響結合，生產NG部分改變為NA、NS、SG或GG的變異體殖株。這些修飾在對重組PD-L1的親和力上或在PD-L1阻斷活性的效力上不會造成任何明顯的降低，並且選擇含有該NS修飾的變異體殖株，命名為G1/280_02_G02_NS，供用於輕鏈混洗。

4.4 總結初始的選擇作用

【0386】噬菌體選擇策略鑑定出超過50個具有有效力的*活體外*PD-1/PD-L1阻斷活性以及小鼠PD-L1交叉反應性的抗人類PD-L1結合殖株。特別地，G1/280_02_G02在一以細胞為基的PD-L1報告基因分析中顯示出有效力的活化且因而被選擇供用於進一步最佳化。

實施例5：產生及特徵化含有*κ輕鏈*(kappa light chain)的抗PD-L1殖株

【0387】該G1/280_02_G02_NS抗體具有λ輕鏈。由於大部分在臨床情況中所使用的單株抗體具有κ輕鏈(Jain等人，2017)，因此藉由使用鏈-混洗策略試圖產生包含該G1/280_02_G02_NS抗體之重鏈但其與κ輕鏈配對的殖株，其保留對人類PD-L1的親和力與小鼠交叉反應性。使用噬菌體展示質體pIONTAS-1(κ-庫)中的IONTAS™ κ-輕鏈庫來製備scFv殖株的輕鏈混洗庫，該

等殖株包含與輕鏈變異體聯結的G1/280_02_G02_NS抗體之重鏈。

5.1 噬菌體選擇作用與篩選策略

【0388】許多噬菌體展示溶液選擇作用係使用生物素化的人類PD-L1-rCD4-His與小鼠PD-L1-rCD4-His抗原並以三個輪次來進行(參見**實施例1.3**所述的抗原細節)。該等選擇作用係藉由降低每個輪次中的抗原濃度(從100 nM變化至0.02 nM)來執行並且在每個選擇作用輪次中使用“無抗原”對照。

【0389】六種選擇作用產品，兩個來自第2輪(編號871與872)以及四個來自第3輪(編號887、890、891及894)，係使用如1.3.1章節中所述的可溶性scFv表現系統來選擇供用於篩選。總共1692種可溶性scFv殖株係利用DELFIA增強溶液並使用在上面**實施例4.2.1**中所述的分析，針對結合至ELISA中的固定抗原(hu-PD-L1-rCD4-His抗原係以3 μg/mL配於Dulbecco PBS中，50μl，塗覆在Maxisorb平盤上)而篩選出來。

【0390】在所篩選出的1692個殖株中，有1029個殖株在DELFIA測定中產生超過2000 RFU的信號，賦予約61%的成功率。最高的前736個殖株接著被選擇並使用三種濃度的hPD-L1-rCD4-His抗原(1.0 nM、0.2 nM及0.04 nM)及利用二級測定(親和力分級)來進行分析。在被篩選的736個殖株中，挑選顯示出最大信號的48個殖株供用於選殖並以IgG1格式來表現。殖株在Expi293F™(Fisher

Scientific目錄編號13479756)細胞中以800 µl規模表現，並且在轉染後第5天收獲培養物上清液以供進一步篩選IgG1格式。

5.2 SPR篩選

【0391】所有48種抗體使用SPR(Biacore T200儀器)而針對親和力來進行分級。為了分級，將經稀釋的上清液(以由1X PBS與0.002% Tween™-20製成的電泳緩衝液稀釋為1:10]固定在蛋白A晶片(GE healthcare，產品代碼：29127556)上並且人類PD-L1-rCD4-His以50 nM的濃度流過製備的表面上。使用該單次注射所產生的締合速率*常數*(k_a)與解離速率*常數*(k_d)用來測定解離常數(K_D)。該等殖株的K_D值與呈Ig1格式(G1/280_02_G02_NS)之殖株G1/280_02_G02_NS的K_D值進行比較。鑑定出顯示出要比殖株G1/280_02_G02_NS還要高的對人類PD-L1的親和力之10種獨特序列的殖株，並因此與殖株G1/280_02_G02_NS一起進行全動力學分析。

【0392】簡言之，使用BIAcore T200儀器來進行SPR實驗。來自經稀釋之培養物上清液的抗體透過FC2以10 µl/分鐘的流速，接觸時間為60秒，而被捕獲在蛋白A晶片(GE Healthcare，29127556)上。典型地，這會導致捕獲500-800 RU的抗體。以30µl/分鐘的流速，從50 nM開始(濃度範圍：50 nM-0.05 nM)注射PD-L1-rCD4-His的加倍稀釋液於FC1與FC2上。在180秒內測量締合，並在300秒內測量解離。所有測量皆在25℃下於PBS，pH 7.4、0.05%

Tween™-20中進行。動力學參數藉由參考室扣除(reference cell subtraction)以及使用BIAevaluation軟體(GE，BR-1005-97)、假設1：1交互作用、擬合感應圖譜實驗數據來判定。所形成的數據使用BIAevaluation軟體而擬合並且計算對應的k_a、k_d以及K_D值。在受測試的10個殖株中，4個抗體，命名為“G1/887_04_E12”、“894_08_A05”、“G1/894_08_E05”及“G1/887_04_G12”，展現出次納摩爾K_D值，其係低於G1/280_02_G02_NS的K_D。在所述篩選條件下所獲得的親和力數據顯示出**實施例5.1**中描述的κ輕鏈混洗允許G1/280_02_G02_NS抗體的重鏈不僅與λ輕鏈配對還能與κ輕鏈配對，俾以生產對於重組人類PD-L1具有良好的、及實際上改良的親和力之抗體。

5.3 呈IgG1格式之κ殖株的特徵化

5.3.1 以細胞為基的PD-1/PD-L1阻斷分析

【0393】含有κ輕鏈、G1/887_04_E12、G1/894_08_E05及G1/887_04_G12的抗PD-L1殖株在阻斷PD-1與PD-L1之間交互作用的能力係在以生物發光細胞為基的測定中使用PD-1/PD-L1阻斷生物分析法產品(Promega，J1250/J1255)、依據製造商的建議而評定。阻斷活性係與G1/280_02_G02_NS殖株進行比較。

【0394】簡言之，所有抗體係如**實施例4.2.3**中所述來純化並以3倍稀釋從100 nM至35 pM(8種濃度)來進行測試，實驗重複2次。所有測試的殖株皆顯示為PD-1/PD-L1

交互作用的有效抑製劑，其中三種含有κ輕鏈的殖株G1/887_04_E12、G1/894_08_E05及G1/884_04_G12表現出比含有λ輕鏈的殖株G1/280_02_G02_NS還要更好的IC_{50}值。

5.3.2 親和力

【0395】抗 PD-L1 mAbs G1/887_04_E12、G1/887_04_G12及G1/894_08_E05與重組人類(生物素化的hPD-L1-Avi-His，Acro Biosystems，PD1-H82E5)、食蟹獼猴(cPD-L1-His，Acro Biosystems，PD1-C52H4)及小鼠PD-L1(mPD-L1-His，Acro Biosystems，PD1-M5220)的結合接著藉由使用Biacore T200處理單元(GE Healthcare)的SPR而被測量。親和力係與呈IgG1格式的280_02_G02_NS殖株進行比較(G1-AA/280_02_G02_NS；此殖株名稱中的“AA”表示此殖株在CH2域中亦含有“LALA”突變)。

【0396】簡言之，以HBS-EP緩衝液(GE Healthcare，BR100188)稀釋為2 μg/ml之抗PD-L1 mAbs分別以30 μl/min注射到蛋白A晶片的流動室2、3及4上(GE Healthcare，29127556)以達到約110 RU的終回應。以HBS-EP緩衝液稀釋的重組人類、食蟹獼猴及小鼠PD-L1-His抗原係以75 μl/min、適度地以3倍稀釋之濃度範圍81 nM至0.037 nM注射於流動室1、2、3及4上歷時4 min然後允許於緩衝液內解離10 min。再生(regeneration)藉由以30 μl/min的速度注射10 mM甘胺酸-HCL pH

1.5(GE Healthcare，人類抗體捕捉套組，BR00356)歷時30 sec而達成。經扣除的數據(流動室2－流動室1，流動室3－流動室1，或流動室4－流動室1)係使用BIAevaluation 3.2軟體(GE Healthcare)來分析，俾以使用模型1：1結合及質量傳遞、加上折射率(RI)常數0來確認結合。為了測定小鼠PD-L1結合曲線的親和力，使用相對應的人類結合剖析的R最大(Rmax)。

【0397】結合數據證明G1-AA/280_02_G02_NS殖株與G1/894_08_E05、G1/887_04_E12以及G1/887_04_G12殖株係以很低的納摩爾(nanomolar)或次納摩爾親和力來結合至人類與食蟹獼猴PD-L1，並且是完全地人類/食蟹獼猴交叉反應性。與G1-AA/280_02_G02_NS殖株相較之下，G1/894_08_E05、G1/887_04_E12及G1/887_04_G12殖株對於人類PD-L1的結合親和力係高約1.8至4.8倍，而對於食蟹獼猴PD-L1的結合親和力係高約2.7至4.7倍。該等殖株對於重組小鼠PD-L1的親和力較低，K_D值範圍為38至225 nM，觀察到G1/887_04_E12殖株有最高親和力。這些數據顯示G1-AA/280_02_G02_NS抗體的重鏈可以與λ和κ輕鏈這兩者配對以產生對於重組人類與食蟹獼猴PD-L1具有良好親和力(並且在κ輕鏈配對的情況下，係次納摩爾)以及對於重組小鼠PD-L1具有一些，雖然較低，親和力的抗體。

5.3.3 抗PD-L1 mAbs與細胞表現的PD-L1之結合

【0398】該等抗人類PD-L1 mAbs G1/894_08_E05、G1/887_04_E12及G1/887_04_G12接著使用流動式細胞測量術來測試與表現人類PD-L1之HEK293細胞(HEK.hPD-L1細胞)的結合。非專一性結合亦藉由測試與缺乏人類PD-L1的HEK293親代細胞(Flp-In T-Rex 293細胞株，Life Technologies，R780-07)的結合來評估。

【0399】編碼人類PD-L1(序列辨識編號：185)的cNDA使用KpnI和NotI限制位而亞選殖到pcDNA™5/FRT載體(ThermoFisher Scientific目錄編號V601020)中，並且該載體接著使用脂質體2000(Life Technologies，11668-019)而轉形至Flp-In T-REx 293細胞株(Life Technologies，R780-07)。細胞在含有10% FBS，100 μg/ml潮黴素B(Melford Laboratories Ltd，Z2475)及15 μg/ml殺稻瘟菌素(Melford Laboratories Ltd，B1105)的DMEM中生長歷時3-4週直至形成穩定轉形的細胞群落。此等群落係於1 μg/ml多西環素(Sigma Aldrich, D9891)存在下擴大以及使用PE複合的抗人類PD-L1(MIH1)抗體(BD Biosciences，557924)來測試PD-L1的表現。使用細胞解離緩衝液使細胞分離、用PBS清洗一次，且於96孔平盤的孔內平盤培養$2x10^5$個細胞然後以1:20 PBS稀釋之抗體於4 ℃下孵育1小時，然後再次以PBS予以清洗並使用Accuri C6細胞計數器(BD Biosciences)來測量。使用FlowJoX軟體來分析數據。人

類PD-L1的表現在該細胞株中被檢測。

【0400】發現G1/894_08_E05、G1/887_04_E12及G1/887_04_G12殖株係以0.26-0.29 nM的範圍內之EC_{50}值與細胞表面表現的人類PD-L1結合。親代HEK293細胞沒有觀察到結合，這顯示出結合專一性。因此，所有受測試的mAb殖株都會專一性地結合至PD-L1，沒有觀察到非專一性結合。

5.3.4 在混合淋巴反應分析中抗PD-L1 mAbs的活性

【0401】以混合淋巴細胞反應(MLR)分析測試抗PD-L1 mAb的活性。MLR分析測量在兩個同種異體淋巴細胞族群(同一物種但基因不同)之間發生的細胞免疫反應。該分析使用來自一供體的$CD4^+$ T細胞以及來自另一供體之單核細胞衍生的樹突細胞(iDCs)。由於免疫細胞含有生理位準的免疫查核點調節劑(immune checkpoint regulators)，MLR分析可用於證實T細胞活化在人類系統中會藉由mAb而增強。

經擴增的$CD4^+$ T細胞之生成

【0402】藉由菲科爾(Ficoll)梯度分離而從白血球錐中單離出PBMCs。$CD4^+$ T細胞係使用人類$CD4^+$ T細胞單離套組(Miltenyi Biotec Ltd，130-096-533)並依據製造商的操作說明而單離。藉由渦流使人類T-活化劑CD3/CD28標記磁珠(Life Technologies，11131D)再懸浮。小珠移至無菌15ml管以及添加10ml RPMI(Life Technologies, 61870044) 加上 10% FBS(Life

Technologies, 10270106)及1x青黴素鏈黴素(Life Technologies, 15140122)來清洗標記磁珠。丟棄上清液。以1.0 x10^6個細胞/ml配於RPMI加上10% FBS及1x青黴素鏈黴素溶液及50 IU/ml重組人類IL2(Peprotech, 200-02-50ug)、以小珠對細胞比3:1之所需量的CD4+ T細胞係移至T75燒瓶(Greiner Bio-one, 690195)以及於37℃ + 5% CO_2下孵育。3天之後溫和地再懸浮細胞且計數。視需要藉由添加新鮮的培養基(RPMI-10% FBS+青黴素鏈黴素溶液1X + 50IU/ml rhuIL2)以使細胞密度維持在0.8-1 x 10^6個細胞/ml之間。於第7或第8天，移去CD3/28小珠以及CD4+ T細胞係以1 x 10^6個細胞/ml新鮮的培養基RPMI-10% FBS+青黴素鏈黴素溶液1X加上減少的10IU/ml rhuIL2休息過夜。細胞冷凍儲存至需要。

iDCs的分化

【0403】未接觸的單核細胞(untouched monocytes)使用人類泛單核細胞(Pan Monocyte)單離套組(Miltenyi Biotec Ltd，130-096-537)並依據製造商的操作說明而從人類PBMCs中單離。單核細胞使用人類Mo-DC分化培養基(Miltenyi Biotec Ltd，130-094-812)並依據製造商的操作說明而分化成iDCs。

【0404】在實驗的前一天解凍擴增的T細胞，以AIM V培養基(Gibco，12055-091)予以清洗並在37℃，5% CO_2的AIM V培養基中孵育過夜。抗人類PD-L1 mAbs G1/894_08_E05、G1/887_04_E12及G1/887_04_G12在

96孔圓底平盤(VWR，734-1797)中以50 μl AIM V培養基係一式三份、稀釋成4X最終濃度。含有LALA突變的抗-FITC抗體，命名為4420(Bedzyk等人，1989及Bedzyk等人，1990)被包括在內作為陰性對照。測試從30 nM起始至0.002 nM的3倍連續稀釋。添加懸浮於50 μl AIM V培養基內的1×10^4個iDC細胞以及懸浮於100 μl AIM V培養基內的1×10^5個擴增的$CD4^+$ T細胞至抗體稀釋，並在37℃+5% CO_2下孵育歷時5天。下列的對照被包括在內：單獨的$CD4^+$ T細胞、單獨的iDC、$CD4^+$ T細胞＋iDCs，以及僅有AIM V培養基。收穫上清液，稀釋樣本(1:25)並使用人類IFN γ ELISA Ready-SET-Go套組(Life Technologies，88-7316-77)來測量干擾素γ(IFN-γ)濃度。使用平盤讀數器及Gen5軟體，BioTek於450 nm下讀取平盤。450 nm的吸光值減去630 nm的吸光值(校正)。根據四參數邏輯曲線擬合(Gen5軟體，BioTek)來計算細胞介素濃度的標準曲線。繪製人類IFN-γ的濃度vs抗體的log濃度的圖以及產生的曲線係以GraphPad Prism、使用log(促效劑)vs反應方程式來擬合。

【0405】抗人類PD-L1 mAbs，G1/894_8_E05，G1/887_4_E12及G1/887_4_G12在MLR測定中顯示出有效活性且EC_{50}值小於0.030 nM以及IFN-γ的最大位準($E_{最大}$)大於10000 pg/ml。EC_{50}表示達到一半反應的mAb濃度，而$E_{最大}$是表示在該分析中達到IFN-γ的最大濃度的絕對值。如所預期的，陰性對照G1-AA/4420 mAb未觀察到活

性。

5.4 抗PD-L1 mAbs在小鼠DO11.10 T細胞活化分析中的活性

【0406】因抗人類PD-L1 mAbs G1/887_04_E12，G1/887_4_G12和G1/894_08_E05顯示出對小鼠PD-L1有較弱的交叉反應(參見**實施例5.3.2**)，所以測定它們在基於DO11.10 OVA T淋巴細胞和LK35.2 B淋巴細胞融合瘤細胞株的介白素-2(IL-2)釋放分析中對於小鼠PD-L1的功能活性。IL-2釋放是T細胞活化的標記。以空載體(pLVX)轉染會表現內源性鼠類PD-1的T細胞。以小鼠PD-L1建構物轉染B細胞。

5.4.1 帶有空載體之T細胞株的生成

【0407】使用慢病毒轉導方法論來產生含有空慢病毒載體pLVX的DO11.10細胞(National Jewish Health)，其係利用Lenti-X HTX包裝系統(Clontech，631249)來進行。Lenti-X表現載體(pLVX)(目錄號631253)係使用Lenti-X HTX包裝混合物而共轉染到Lenti-X 293T細胞株(目錄號632180)中以產生病毒。DO11.10細胞株係使用以Lenti-X HTX包裝系統所產生的慢病毒顆粒予以轉導。

5.4.2 過度表現PD-L1之抗原呈現細胞的生成

【0408】慢病毒轉導方法係使用Lenti-X HTX包裝系統(Clontech，631249)而用來生成會過度表現小鼠PD-L1的LK35.2 B細胞淋巴瘤細胞(ATCC，HB-98)。將含有編碼小鼠PD-L1的cDNA(序列辨識編號：187)的Lenti-X表

現載體(pLVX)(目錄號631253)與Lenti-X HTX包裝混合物共轉染到Lenti-X 293T細胞株(目錄號632180)中以產生病毒。LK35.2細胞株係使用以Lenti-X HTX包裝系統所產生的慢病毒載體予以轉導。

5.4.3 小鼠DO11.10 T細胞活化分析

【0409】製備配於實驗培養基(DMEM(Gibco，61965-026)，10% FBS(Gibco，10270-106)，1 mM丙酮酸鈉(Gibco，11360-070))的抗PD-L1 mAbs G1/887_04_E12、G1/887_4_G12及G1/894_08_E05或抗-FITC陰性對照mAb(G1-AA/4420)的稀釋液。於存在有2.46 μM OVA胜肽(H-ISQAVHAAHAEINEAGR-OH(序列辨識編號：192)(Pepscan))的實驗培養基中，該等mAbs與4×10^5/ml LK35.2 mPD-L1細胞以1：1予以混合(每孔100 μL LK35.2 mPD-L1細胞(以含有mPD-L1的慢病毒載體轉導以過度表現小鼠PD-L1的B細胞融合瘤)/mAb混合物於96-圓底平盤中)，並在37℃，5% CO_2下孵育歷時1小時。將2×10^5個DO11.10 pLVX細胞(以空慢病毒載體轉導的DO11.10 T細胞融合瘤)/ml配於100 μl體積實驗培養基加入100 μl LK35.2 mPD-L1/(mAbs)混合物中。接著混合該等細胞然後在37℃，5% CO_2下孵育歷時24小時。收集上清液並使用小鼠IL-2 ELISA套組(eBioscience，88-7024-88或R＆D systems，SM2000)及依據製造商的操作說明來進行測定。使用平盤讀數器及Gen5軟體，BioTek於450 nm下讀取平盤。450 nm的吸光

值減去570 nm的吸光值(校正)。根據四參數邏輯曲線擬合(Gen5軟體，BioTek)來計算細胞介素濃度的標準曲線。繪製小鼠IL-2的濃度vs抗體的log濃度的圖以及產生的曲線係以GraphPad Prism、使用log(促效劑)vs反應方程式來擬合。

【0410】抗人類PD-L1 mAbs在小鼠T細胞活化分析中顯示出顯著的活性，效力(EC_{50})在1-4.4 nM範圍內。如所預期的，陰性對照mAb未觀察到活性。在所測試的3個殖株中，對於重組小鼠PD-L1展現出最高親和力的G1/887_04_E12亦是在T細胞活化分析中最有效力的殖株。在效力上的差異係小於所測量的親和力，這可能是由於在該分析中小鼠PD-L1在LK35.2細胞上高度的過度表現。

5.5 有關特徵化呈IgG1格式之κ殖株的總結

【0411】含有展現出食蟹獼猴和小鼠PD-L1交叉反應性之選定的κ輕鏈的抗PD-L1 mAbs G1/894_08_E05、G1/887_04_E12及G1/887_04_G12，顯示出與細胞表面表現的PD-L1的專一性結合，並且與含有λ輕鏈的殖株G1/280_02_G02相較之下，對於重組人類與食蟹獼猴PD-L1表現出甚至更高的親和力。該等抗PD-L1 mAbs G1/894_08_E05、G1/887_04_E12及G1/887_04_G12被證明是*活體外*人類T細胞的有效活化劑並且具有功能性小鼠交叉反應性。

實施例6：PD-L1 mAbs的序列最佳化

6.1 可能的蛋白質脫醯胺作用位址的鑑定與移除

【0412】G1/280_02_G02_NS殖株的序列分析導致鑑定出在H-CDR2環中的序列NSNT(在Kabat位置54-57處)作為一可能的脫醯胺作用位址，其若被脫醯胺可能會影響結合。此殖株的重鏈被保留在藉由**實施例5**中所述的鏈混洗策略而獲得的所有含有κ輕鏈的殖株中，因此該可能的脫醯胺作用位址亦存在於殖株G1/887_04_E12、G1/894_08_A05、G1/894_08_E05及G1/887_4_G12中。使用最接近生殖系序列的專一性引子，該NSNT序列在4種含有κ輕鏈的殖株中藉由定點突變而被改變為GGST、SGGT或SGNA以產生經鑑定的變異體殖株。在移除這個可能的脫醯胺作用位址的同時，在G1/887_04_E12殖株的VH區中Kabat位置28處的脯胺酸殘基，其在κ輕鏈混洗過程中被無意地導入該抗體的序列中，的作用亦是藉由將其回復為如在G1/280_02_G02_NS殖株中所含有的蘇胺酸殘基而研究。親代與所形成的變異體殖株(皆呈IgG1格式)以0.8 ml的規模轉染，在轉染之後第5天，收穫的培養物上清液用於以SPR來測定殖株對於人類與食蟹獼猴PD-L1-rCD4-His的親和力。食蟹獼猴PD-L1-rCD4-His係如**實施例1.3**中所述而產生。除了衍生自G1/887_04_E12殖株的變異體殖株之外，所有變異體殖株與它們各自的親代殖株相較之下，皆保留了對人類與食蟹獼猴PD-L1的次納摩爾親和力。

【0413】衍生自G1/894_08_A05、G1/894_08_E05

及G1/887_04_G12親代殖株的經修飾殖株皆顯示出與其各自親代殖株相當的對於人類與食蟹獼猴PD-L1的次納摩爾親和力，這表示GGST、SGGT及SGNA取代作用係為耐受性良好的。G1/929_01_A01、G1/929_01_A02及G1/929_01_A03殖株與其等親代(G1/887_04_E12)相較之下親和力大幅降低，這被認為可能是由於在Kabat位置28處的VH區域中脯胺酸的移除，而不是因為在H-CDR2中存在有GGST、SGGT及SGNA取代。令人驚訝的是，在G1/887_04_E12殖株中這種脯胺酸殘基似乎在其對於PD-L1的親和力上是很重要的。衍生自3種親代殖株G1/887_04_E12、G1/894_08_E05及G1/887_04_G12的變異體，其等在其等H-CDR2(位置54-57)含有SGGT取代，亦即殖株G1/929_01_A02、G1/929_01_A08及G1/929_01_A11，基於該SGGT取代係最接近生殖系序列而選出供進一步特徵化。

【0414】使用定點突變，在G1/280_02_G02_NS殖株的H-CDR2環中可能的脫醯胺作用位置(在Kabat位置54至57處的NSNT)亦被修飾為SGGT。另外，在該殖株的λ輕鏈的CDR1中於Kabat位置31至32處所鑑定出的另一個可能的脫醯胺作用位置(NS部分)係藉由將絲胺酸32(Kabat編號)突變為酪胺酸而被修飾為NY，酪胺酸在許多生殖系序列諸如IGLV2-8-01、IGLV2-8-02、IGLV2-8-03、IGLV2-11-01、IGLV2-11-02、IGLV2-11-03以及IGLV2-14-01、IGLV2-14-02、

IGLV2-14-03、IGLV2-14-04的此位置被發現到。這些修飾的組合產生含有λ輕鏈的殖株G1/lam-G02v3，其亦被選擇供進一步特徵化。

實施例7：mAbs的特徵化

7.1 呈mAb格式之殖株的選殖與生成

【0415】將**實施例6**中所鑑定的G1/929_01_A02 “SGGT”變異體殖株的VH區中於Kabat位置28處的蘇胺酸殘基突變為脯胺酸，其存在於其親代殖株G1/887_04_E12的相同位置，以期改良其對於人類與食蟹獼猴PD-L1的親和力。利用暫時表現於HEK293-6E細胞中且使用mAb Select SuRe蛋白質A管柱之純化來生產**實施例6**中鑑定出的該經修飾的變異體殖株和其他3種“SGGT”變異體殖株(G1/929_01_A08、G1/929_01_A11及G1/lam-G02v3)為呈IgG1格式並且具有LALA突變，俾以能夠在沒有效應子功能的情況下測試它們的功能活性。所形成的mAbs被命名為G1-AA/E12v2、G1-AA/E05v2、G1-AA/G12v2及G1-AA/lamG02v3(稱為G1-AA/lamG02v3或G1-AA/lambdav3)。重鏈與輕鏈序列分別被顯示如下：針對G1-AA/E12v2為序列辨識編號：16與序列辨識編號：17，針對G1-AA/E05v2為序列辨識編號：27與序列辨識編號：28，針對G1-AA/G12v2為序列辨識編號：27與序列辨識編號：33，針對G1-AA/lam-G02v3為序列辨識編號：27與序列辨識編號：44。

7.2 mAb對於人類與食蟹獼猴PD-L1的親和力

【0416】為了測定存在於G1-AA/lam-G02v3中的進一步序列修飾(即，在VH-CDR2中的NSNT至SGGT，在VL-CDR1中的NS至NY，以及LALA突變)與含有κ輕鏈的mAb G1-AA/E12v2、G1-AA/E05v2及G1-AA/G12v2(即，LALA突變，以及僅在G1-AA/E12v2中，在VH域於Kabat位置28處的蘇胺酸至脯胺酸)是否具有有作用的結合動力學，這些抗PD-L1 mAb對於人類與食蟹獼猴PD-L1的親和力係如**實施例5.3.2**所述來進行測定。該等mAbs G1-AA/lam-G02v3、G1-AA/E05v2、G1-AA/E12v2和G1-AA/G12v2對於人類與食蟹獼猴PD-L1所展現出的親和力係相似於在**實施例5.3**中針對該等mAbs G1-AA/280_02_G02_NS、G1/894_08_E05、G1/887_04_E12和G1/887_04_G12所觀察到者，這證明受測試的mAbs與mAb[2]的結合親和力不會受到可能的脫醯胺作用位置之修飾或LALA突變之導入的影響。G1-AA/E12v2 mAb顯示出於所有4種受測試mAbs的最低K_D值(對於人類PD-L1為0.21 nM，及對於食蟹獼猴PD-L1為0.37 nM)。結果如**表4**所示。

【0417】G1-AA/E12v2mAb的VH與G1/929_01_A02區域(**實施例6**)相差一個殘基，E12v2在Kabat位置28處具有脯胺酸，而G1/929_01_A02在該位置處具有蘇胺酸。與G1-AA/E12v2相較之下，G1/929_01_A02對於人類與食蟹獼猴PD-L1的親和力皆

低於10倍以上，該數據證明了在殖株E12v2的VH之位置28處(Kabat命名法)的脯胺酸殘基在它對於人類與食蟹獼猴PD-L1的親和力上具有重要性。

表4

殖株	**人類 PD-L1-His K_D (nM)**	**食蟹獼猴 PD-L1-His K_D (nM)**
G1-AA/lam-G02v3	1.34	2.45
G1-AA/E05v2	0.50	0.89
G1-AA/E12v2	0.21	0.37
G1-AA/G12v2	0.44	0.75

7.3 抗人類PD-L1 mAbs在MLR的活性

【0418】抗 PD-L1 mAbs，G1-AA/E05v2、G1-AA/E12v2和G1-AA/G05v2係如**實施例5.3.4**所述在混合淋巴細胞反應(MLR)測定中受測試。使用G1-AA/4420作為陰性對照。所得到的數據被顯示在**表5**中。該等mAbs G1-AA/E05v2、G1-AA/E12v2和G1-AA/G12v2在MLR分析中顯示出有效活性且EC_{50}值小於0.054 nM以及IFN-γ的最大位準($E_{最大}$)係大於600 pg/ml(**表5**)。該EC_{50}及特別是該$E_{最大}$值係顯著不同於在**實施例5.3.4**中所描述者。這個差異一般認為是由於供體的變異性，因為該反應係取決於來自一個供體的T細胞與來自另一個供體之衍生自樹突細胞的單核細胞之間的同種異體反應。該等抗人類PD-L1 mAbs的效力與**實施例5.3.4**中所描述的數據是一致的，係按照效力順序來分級該等殖株。如所預期的，未觀察到陰性對照G1-AA/4420 mAb的活性。

表5

殖株	在 MLR 分析中的功能活性	
	EC_{50} (nM)	$E_{最大}$ (pg/ml)
G1-AA/E05v2	0.047	632
G1-AA/E12v2	0.054	666
G1-AA/G12v2	0.040	686
G1-AA/4420 陰性對照組	無活性	

7.4 抗PD-L1 mAbs的表現、純化與分析特性

【0419】該等mAbs G1-AA/E05v2、G1-AA/E12v2和G1-AA/G12v2以實驗室規模來生產並且藉由SEC與微差掃描熱量法(DSC)的標準分析方法而特徵化。

7.4.1 抗PD-L1 mAbs的實驗室規模表現與純化

【0420】編碼該等mAbs G1-AA/E05v2、G1-AA/E12v2和G1-AA/G12v2的DNA序列藉由使用PEIpro (Polyplus，France)而轉染到HEK293 6E(National Research Council Canada)細胞中。在5天之後，收獲細胞培養液，並在MabSelect蛋白A預填充管柱中及使用AKTAxpress儀器(兩者皆為GE Healthcare，Uppsala，Sweden)予以純化。管柱的平衡係在50 mM Tris，250 mM NaCl，pH 7.0中進行，繼而裝載收獲的細胞培養液。使用50 mM Tris，250 mM NaCl，pH 7.0來清洗樹脂並接著使用pH小於3.5的緩衝液來溶析該等mAbs。

7.4.2 以SE-UPLC來分析

【0421】純化後SE-UPLC係使用Acquity H-Class Bio UPLC(Waters Corp. UK)而在純化的24小時內(材料

儲存在4℃下)來進行以測量單體的百分率。使用Acquity UPLC BEH200 SEC 1.7 mm管柱(4.6×150 mm)，流動相由250 mM磷酸鈉，100 mM L-精胺酸，pH 6.8所構成。單體、低分子量及高分子量物種的定量係使用Empower軟體(Waters Corp.UK)來進行。

7.4.3 熱穩定性

【0422】G1-AA/E05v2、G1-AA/E12v2和G1-AA/G12v2的熔化溫度(T_m)係使用Microcal VP-毛細管微差掃描熱量法(DSC)來測量。G1-AA/lam-G02v3被包括在內以評估在含有κ和λ輕鏈的mAbs之間的差異。樣本在樣本緩衝液中以0.2 mg/ml的濃度予以測量。掃描速率設定為60℃/hr並在35℃和100℃之間收集數據。使用Origin 7.0軟體來進行數據分析。當Fab與CH3的DSC峰重疊時，會記述一個數值。

表6

mAb	**蛋白質A後的單體純度%**	**Fab/CH3的Tm**
G1-AA/E05v2	99.48 ± 0.01%	80.4-82.8℃
G1-AA/E12v2	98.85 ± 0.07%	81.4-84.1℃
G1-AA/G12v2	99.83 ± 0.11%	78.1-81.3℃
G1-AA/lam-G02v3	99.75 ± 0.25%	68.1℃

【0423】結果總結顯示於**表6**中。3種mAbs：G1-AA/E05v2、G1-AA/E12v2和G1-AA/G12v2顯示出優異的分析特性參數；蛋白質A後的單體純度係大於98%而發現Fab轉變(Tm)的熱穩定性在代表性針對IgG1所記述之轉變的較高端，G1-AA/E12v2似乎是熱穩定性最高的

(Fab/CH3 T_M =81.4-84.1℃)。該λ輕鏈mAb，G1-AA/lamG02v3，具有比含有3個κ輕鏈的mAbs還要低的Tm。

實施例8：抗人類CD137/PD-L1 mAb²的生產與特徵化

8.1 抗人類CD137/PD-L1 mAb²的生產

【0424】生產由IgG1分子所構成的CD137/PD-L1 mAb²抗體，其包含3種抗人類CD137 Fcab殖株FS22-053-008、FS22-053-017和FS22-172-003(參見**實施例3**)以允許特徵化呈mAb²格式的Fcabs。該CD137/PD-L1 mAb²之製備係藉由以Fcabs的CH3域的一部分，包含AB、CD及EF環，取代3種抗PD-L1結合抗體(G1-AA/E05v2、G1-AA/E12v2、G1-AA/G12v2；參見**實施例7.1**)之一者的CH3域的對應區。所有形成的mAb²皆含有LALA突變。該等CD137/PD-L1 mAb²係使用PEIpro(Polyplus，France)予以暫時表現在HEK293 6E(NRCC，Canada)細胞中。在5天之後，收穫細胞培養液，並在MabSelect蛋白A預填充管柱中及使用AKTAxpress儀器(兩者皆為GE Healthcare，Uppsala，Sweden)予以純化。管柱的平衡在50 mM Tris，250 mM NaCl，pH 7.0中進行繼而裝載收穫的細胞培養液。樹脂接著以50 mM Tris，250 mM NaCl，pH 7.0來清洗，繼而使用pH< 3.5的緩衝液來溶析該等mAb²。

【0425】為了評估所生成之蛋白質的量，IgG蛋白質含量係藉由BioLayer干涉測量法並使用具有來自PALL

(18-5021)的蛋白質A定量生物感測器的Octet QKe (ForteBio)來定量。蛋白質係藉由使用mAb SelectSure管柱之蛋白質A親和力層析法來進行純化。9種mAb²係使用mAb Select SuRe蛋白A管柱(GE Healthcare，11003494)來純化。結果如**表7**所示。

表7

CD137/PD-L1 mAb²				
CD137 Fcab	**PD-L1 Fab**	**mAb²**	**在HEK暫時表現的力價(mg/L)**	**產率(蛋白質A)**
FS22-053-008-AA	E05v2	FS22-053-008-AA/E05v2	88	69 %
FS22-053-008-AA	E12v2	FS22-053-008-AA/E12v2	113	74 %
FS22-053-008-AA	G12v2	FS22-053-008-AA/G12v2	108	88 %
FS22-053-017-AA	E05v2	FS22-053-017-AA/E05v2	61	88 %
FS22-053-017-AA	E12v2	FS22-053-017-AA/E12v2	198	65 %
FS22-053-017-AA	G12v2	FS22-053-017-AA/G12v2	89	81 %
FS22-172-003-AA	E05v2	FS22-172-003-AA/E05v2	127	82 %
FS22-172-003-AA	E12v2	FS22-172-003-AA/E12v2	260	76 %
FS22-172-003-AA	G12v2	FS22-172-003-AA/G12v2	229	69 %

【0426】所有9種CD137/PD-L1 mAb²抗體藉由在HEK 293 6E中暫時表現而被生成並且獲得在實驗室規模所預期的典型範圍內之力價和蛋白質A純化產率。FS22-172-003-AA-Iam/G02v3亦被表現與純化以供進一步測試。

8.2 mAb²藉由粒徑篩析層析法(SEC)與SDS-PAGE之生物物理特徵化

8.2.1 以SE-HPLC來分析

【0427】純化後的SE-HPLC係於Agilent 1100系列HPLC(Agilent，UK)中執行，其配備有TSK-GEL SUPERSW3000 4.6 mm ID x 30.0 cm管柱(Tosoh Bioscience)，使用20 mM磷酸鈉、200 mM氯化鈉，pH 6.8作為流動相。單體%的定量係使用Chemstation軟體(Agilent，UK)來進行。

8.2.2 以CE-SDS來分析

【0428】CE-SDS分析係在一種2100生物分析儀毛細管電泳系統(Agilent，UK)中、依據製造商的操作說明來進行。就還原條件而言，加入DTT並且樣本於70℃下變性歷時5分鐘。

表8

mAb²	**還原的 CE-SDS 重鏈%+輕鏈%的總和**	**SEC-HPLC 單體%**
FS22-053-008-AA/E05v2	99.7 %	99.6 %
FS22-053-008-AA/E12v2	99.6 %	98.9 %
FS22-053-008-AA/G12v2	未測試	62.6 %
FS22-053-017-AA/E05v2	99.8 %	99.5 %
FS22-053-017-AA/E12v2	99.7 %	99.6 %
FS22-053-017-AA/G12v2	99.0 %	99.6 %
FS22-172-003-AA/E05v2	99.2 %	99.1 %
FS22-172-003-AA/E12v2	99.7 %	97.9%
FS22-172-003-AA/G12v2	99.6 %	99.3 %

【0429】分析結果的總結顯示在**表8**中。除了FS22-053-008-AA/G12v2之外，所有mAb²在使用蛋白質A純化後顯示出高純度；低位準的可溶性聚集與碎裂化係如蛋白質A之後的單體% >95%及還原的CE-SDS之高純

度(>95%，重鏈%與輕鏈%的總和)所示。FS22-053-008-AA/G12v2在蛋白質A純化後顯示出聚集因此沒有被進一步發展。

實施例9：mAb² 結合之特徵化

9.1 抗人類CD137/PD-L1 mAb²對於人類與食蟹獼猴PD-L1依SPR之結合親和力

【0430】抗人類CD137/PD-L1 mAb²，FS22-172-003-AA/lam-G02v3、FS22-172-003-AA/E05v2、FS22-053-008-AA/E05v2、FS22-172-003-AA/E12v2、FS22-053-008-AA/E12v2及FS22-172-003-AA/G12v2與重組人類與食蟹獼猴PD-L1抗原之結合是使用Biacore T200處理器(GE Healthcare)、藉由SPR來測量。

【0431】簡言之，以2 μg/ml稀釋於HBS-EP緩衝液(GE Healthcare, BR100188)中的抗人類CD137/PD-L1 mAb²分別以30 μl/min注射於一蛋白質A晶片(GE Healthcare, 29127556)的流動室2、3與4上以達到大約110RU的終回應。使用兩種不同的重組人類PD-L1抗原，亦即hPD-L1-His-Avi(針對抗原細節參見**實施例1.3**)及生物素化的hPD-L1-Avi-His(Acrobiosystems, PD-1-H82E5)。稀釋於HBS-EP緩衝液中的人類與食蟹獼猴PD-L1-His(Acrobiosystems, PD-1-C52H4)抗原係以75 μl/min，視情況而定，在81 nM至0.037 nM的濃度範圍，以3倍稀釋注射於流動室1、2、3或4上歷時4 min然後

允許於在緩衝液中解離歷時10min。再生是藉由以30 µl/min的速度注射10 mM甘胺酸-HCL pH1.5(GE Healthcare，人類抗體捕捉套組，BR00356)歷時30 sec來達成。經扣除的數據(流動室2－流動室1、流動室3－流動室1或流動室4－流動室1)是使用BIAevaluation 3.2 軟體(GE Healthcare)來分析以鑑別出結合作用、用模型1:1結合及質量傳遞、加上折射率(RI)常數0。

表9

殖株	**人類 PD-L1-His K_D (nM)**	**食蟹獼猴 PD-L1-His K_D (nM)**
FS22-172-003-AA/lam-G02v3	1.54	1.91
FS22-172-003-AA/E05v2	0.50	0.59
FS22-172-003-AA/E12v2	0.19	0.36
FS22-172-003-AA/G12v2	0.49	0.53
FS22-053-008-AA/E05v2	0.47	0.58
FS22-053-008-AA/E12v2	0.19	0.25

【0432】結合數據證實各個抗人類CD137/PD-L1 mAb^2以低至次納摩爾親合力結合至人類與食蟹獼猴PD-L1並且人類/食蟹獼猴的交叉反應也是如此(**表9**)。所有mAb^2選殖株結合至人類與食蟹獼猴PD-L1同樣地好且對於各個抗原具有等效KD的值。

9.2 抗人類CD137/PD-L1 mAb^2對於人類與食蟹獼猴CD137依SPR之結合親和力

【0433】抗人類CD137/PD-L1 mAb^2與重組二聚體人類與食蟹獼猴CD137抗原之結合作用亦使用一種Biacore T200處理器(GE Healthcare)藉由SPR來測量。

【0434】簡言之，20 µg/ml抗人類Fab抗體(GE

Healthcare，人類Fab捕捉套組28958325)塗覆於Biacore感測器S晶片CM5(GE Healthcare, BR100530)的流動室1、2、3與4上達到大約5000 RU的終回應。以2-5 μg/ml稀釋於HBS-EP緩衝液(GE Healthcare, BR100188)中的mAb²分別以30 μl/min注射於流動室2、3與4上以達到大約70 RU的終回應(針對FS22-172-003-AA/E12v2為200 RU)。稀釋於HBS-EP緩衝液中的重組二聚體抗原，人類CD137-mFc-Avi或食蟹獼猴CD137-mFc-Avi(針對抗原細節參見**實施例1.1**)係以70 μl/min，視情況而定，在81 nM至0.037 nM的濃度範圍，以3倍稀釋注射於流動室1、2、3或4上歷時4分鐘然後允許在緩衝液中解離歷時10分鐘。再生是藉由以30 μl/min的速度注射10 mM甘胺酸pH 2.1(GE Healthcare，人類Fab捕捉套組28958325)歷時60秒來達成。數據分析是如**實施例9.1**中所述予以執行。

表10

mAb² 殖株	**人類 CD137-mFc-Avi K_D (nM)**	**食蟹獼猴 CD137-mFc-Avi K_D (nM)**
FS22-172-003-AA/lam-G02v3	1.3	2.2
FS22-172-003-AA/E05v2	1.5	1.0
FS22-172-003-AA/E12v2	0.7	0.8
FS22-172-003-AA/G12v2	2.2	1.8
FS22-053-008-AA/E05v2	2.8	1.1
FS22-053-008-AA/E12v2	2.6	0.6

【0435】結合數據證實抗人類CD137/PD-L1 mAb²殖株係以低至納摩爾親合力結合二聚體人類與食蟹獼猴CD137並且是完全地人類/食蟹獼猴交叉反應(**表10**)。如所預期的，此等結果是相似於此等Fcab選殖株呈“假”mAb²格式所報導的結合數據(**表3，實施例3.7**)。

FS22-172-003-AA/E12v2觀察到對於二聚體CD137的最高親和力，之後亦使用如以上所述的相同方法來測試其對單體CD137-His-Avi之親和力。FS22-172-003-AA/E12v2高達81 nM沒有偵測到與單體CD137之結合作用，此說明抗人類CD137/PD-L1 mAb^2的Fcab結合區域對單體CD137具有低親和力。這些結果類似於那些針對FS22-053-008 CD137 Fcabs亦觀察到者，顯示Fcab轉化成mAb^2格式在CD137之結合作用造成的變化不大。

9.3 *抗人類CD137/PD-L1 mAb^2依SPR之專一性判定*

9.3.1 對於人類PD-L1的專一性

【0436】為了分析抗人類CD137/PD-L1 mAb^2的專一性，6個mAb^2 (FS22-172-003-AA/lam-G02v3、FS22-172-003-AA/E05v2、FS22-053-008-AA/E05v2、FS22-172-003-AA/E12v2、FS22-053-008-AA/E12v2及FS22-172-003-AA/G12v2)結合至其他T細胞標靶是使用SPR來測試。目的是為了藉由顯示在1 μM濃度下沒有mAb^2結合至抗原PD-L2、CD80、PD-1與B7-H3來證實專一性。

【0437】在CM5晶片上的流動室係以大約1000 RU的人類PD-L2-Fc (R&D Biosystems, 1224-PL)、CD80-Fc (R&D Biosystems, 140-B1)、PD-1-His(R&D Biosystems, 8986-PD)、B7-H3-His (F-star內部生產、序列辨識編號：193)、PD-L1-Fc (R&D Biosystems,

156-B7)以及PD-L1-His(Acrobiosystems, PD-1-H83F3)中任一者予以固定。流動室1留給空白固定。該等mAb^2以1x HBS-EP緩衝液(GE Healthcare、產品代碼BR100188)稀釋成1 μM及1 nM，允許於晶片上面流過3 min然後允許解離4 min。利用30秒注射10mM甘胺酸pH 1.5來再生。注射50-100 nM之陽性對照抗體來證實各抗原塗覆。在締合期的最後判定結合位準並作比較。

【0438】所有的測試mAb^2顯示出高位準的專一性，在1 μM下偵測到低於10 RU的mAb^2結合至4種抗原，相較於在1 nm下與人類PD-L1-Fc或PD-L1-His偵測到有一範圍為105至570 RU的結合回應。此等結果證實該等抗人類CD137/PD-L1 mAb^2對於PD-L1的高位準專一性且未結合所列示之其他T細胞標靶。

9.3.2 對於人類CD137的專一性

【0439】所預期的是CD137/PD-L1 mAb^2保留CD137 Fcab結合部分的專一性，當相較於CD137/HelD1.3 mAb^2（參見實施例**3.6**）。FS22-172-003-AA/E12v2對於TNFR家族成員，OX40、GITR、CD40及DR6(R&D Biosystems))的專一性透過類似於**實施例9.3.1**所述之SPR進行分析。在濃度1 μM下，FS22-172-003-AA/E12v2以低於7 RU結合至人類OX40、GITR、CD40及DR6，相較於以278 RU結合至人類CD137-mFc。此結果證實FS22-172-003-AA/E12v2 mAb^2對於CD137的高位準專一性。

9.4 抗人類CD137/PD-L1 mAb²依SPR與人類PD-L1及人類CD137之同時結合作用

【0440】FS22-172-003-AA/E12v2 mAb²同時結合至人類CD137及人類PD-L1-His Avi(針對抗原細節參見**實施例1.3**)的能力是藉由SPR在Biacore T200上進行測試。G1/S70用來作為對照。在醋酸鈉緩衝液pH 5.0 (GE Healthcare, 18-1069)中稀釋至10 μg/ml的人類PD-L1 His被固定在一CM5感測器S晶片(GE Healthcare, BR100530)上，達到大約1100 RU的表面密度。一個沒有任何蛋白質固定之流動室被活化且去活化供背景扣除。在HBS-EP緩衝液稀釋至5 μg/ml的該等抗體以30 μl/min的流速被捕捉以達到約200-300 RU的密度。人類CD137-mFc-Avi的結合在0與100 nM下以30 μl/min進行測試歷時5分鐘，繼而解離步驟2.5 min。該感測器晶片在每一個循環後以30 μl/min之流速利用20 mM NaOH進行再生60秒。FS22-172-003-AA/E12v2能夠同時結合至人類PD-L1及人類CD137兩者，而對照G1/S70僅結合至人類PD-L1。

9.5 抗人類CD137/PD-L1 mAb2與細胞表面表現的人類或食蟹獼猴PD-L1依流動式細胞測量術之結合親和力

【0441】為了評估抗人類CD137/PD-L1 mAb²結合至細胞表面的人類與食蟹獼猴PD-L1，生產過度表現人類PD-L1的HEK293細胞。過度表現人類PD-L1的HEK293細胞(HEK.hPD-L1)是如**實施例5.3.3**中所描述來生產。過

度表現食蟹獼猴PD-L1的HEK293細胞 (HEK.cPD-L1)亦如**實施例5.3.3**中所描述來生產，除了亞選殖編碼食蟹獼猴PD-L1的cDNA(序列辨識編號：189)至pcDNA™5/FRT載體內，而非人類PD-L1序列。

【0442】接著，使用流動式細胞測量術來測試該抗人類CD137/PD-L1 mAb^2，FS22-172-003-AA/E12v2結合至表現人類或食蟹獼猴PD-L1的HEK293細胞。非專一性結合亦藉由測試結合至缺少人類PD-L1之HEK293親代細胞(Flp-In T-Rex 293細胞株；Life Technologies, R780-07)來進行評估。結合親和力是與陽性對照抗體G1-AA/E12v2 (重鏈與輕鏈分別為序列辨識編號：16與17)比較，該陽性對照抗體的可變異域予以選殖並表現呈人類IgG1格式，該人類IgG1格式包含在CH2區域的LALA突變(G1-AA格式)。

【0443】HEK293、HEK.hPD-L1以及HEK.cPD-L1懸浮液是配製於FACS緩衝液(DPBS (Gibco, 14190-094)含有0.5% BSA(Sigma, A7906))內並且以100 µl、1 x 10^5個細胞/孔播種在圓底96孔平盤(VWR, 734-1797)。細胞以FACS緩衝液予以清洗一次。mAb^2 FS22-172-003-AA/E12v2、假mAb^2 FS22-172-003-AA/HelD1.3、mAb G1-AA/E12v2以及陰性對照mAb G1-AA/4420以100 µl FACS緩衝液予以稀釋(400 nM – 0.005 nM、5倍稀釋)。經清洗的細胞在稀釋的抗體混合物中進行再懸浮、在4℃孵育30分鐘，並且接著FACS緩衝液

予以清洗一次。接著添加100 µl/孔、以FACS緩衝液1:1000予以稀釋之二級抗體(山羊抗人類IgG Alexa Fluor 647標記抗體；Invitrogen, A21445)、在4℃孵育20 mins，並且在使用Canto II細胞計數器(BD Bioscience)進行分析之前，細胞再次以FACS緩衝液予以清洗及再懸浮於100 µl之含有7AAD(1:1000, Biotium, 40043)的PBS中。排除死亡細胞而測量APC通道(638nm 660/20)的螢光。幾何平均螢光強度(GMFI)數值是相對於抗體的log濃度來作圖，並且所產生的曲線是使用GraphPad Prism中的log(致效劑)相對於反應方程式來擬合。

【0444】發現FS22-172-003-AA/E12v2 mAb^2與G1-AA/E12v2抗體以落在3.1 – 3.7 nM之範圍的EC_{50}值結合至細胞表面的人類PD-L1，並且以落在0.6 – 0.7 nM之範圍的EC_{50}值結合至細胞表面的食蟹獼猴PD-L1(參見表**11**)。沒有觀察到與缺少PD-L1過度表現的HEK293細胞之結合，顯示結合的專一性。因此，測試的FS22-172-003-AA/E12v2 mAb^2專一地結合至PD-L1，而無觀察到非專一性結合。此等結果顯示，就PD-L1 mAb所觀察而言，保留了與人類與食蟹獼猴PD-L1之專一性結合(參見實施例**5.3.3**)。

表11

		FS22-172-003-AA/E12v2 EC_{50} (nM)	**G1-AA/E12v2 EC_{50} (nM)**
人類 PD-L1	EC_{50} (nM)	3.7 ± 0.4	3.1
食蟹獼猴 PD-L1	EC_{50} (nM)	0.7 ± 0.3	0.6 ± 0.3

9.6 抗人類CD137/PD-L1 mAb2與細胞表面表現的人類或食蟹獼猴CD137依流動式細胞測量術之結合親和力

【0445】生產表現全長人類CD137(序列辨識編號：185)或食蟹獼猴CD137(序列辨識編號：189)之DO11.10細胞(National Jewish Health)，分別命名為'DO11.10.hCD137'與'DO11.10.cCD137']，以令該抗原以最相似於其天然形式之膜結合構形呈現，供後續所選擇之抗人類CD137/PD-L1 mAb^{2}之進一步特徵化。DO11.10.hCD137與DO11.10.cCD137細胞的生產與表現確認之細節是描述於**實施例1.2**中。

【0446】使用流動式細胞測量術來測試該抗人類CD137/PD-L1 mAb^2 FS22-172-003-AA/E12v2結合至表現人類或食蟹獼猴CD137之細胞(DO11.10.hCD137或DO11.10.cCD137)。非專一性結合亦藉由測試結合至缺少CD137表現之DO11.10細胞來進行評估。MOR7480.1的可變異域(美國專利號2012/0237498)被選殖並表現呈人類IgG1格式，該人類IgG1格式包含在CH2區域的LALA突變(G1-AA格式)而此被用來作為一陽性對照。

【0447】簡言之，DO11.10、DO11.10.hCD137或DO11.10.cCD137懸浮液是製備於FACS緩衝液(含有0.5% BSA(Sigma, A7906)之DPBS (Gibco, 14190-094))內，並且以100 µl、1 x 10^5個細胞/孔播種在圓底96孔平盤(VWR, 734-1797)。細胞以FACS緩衝液予以清洗一次而mAb^2 FS22-172-003-AA/E12v2、假mAb^2

FS22-172-003-AA/HelD1.3、抗體G1-AA/MOR7480.1及陰性對照mAb G1-AA/4420以100 µl FACS緩衝液予以稀釋(400 nM – 0.005 nM、5倍稀釋)。經清洗的細胞在稀釋的抗體混合物中進行再懸浮、在4℃孵育30分鐘，並且接著以FACS緩衝液予以清洗一次。接著添加100 µl/孔、以FACS緩衝液1:1000予以稀釋之二級抗體(山羊抗人類IgG Alexa Fluor 647標記抗體；Invitrogen, A21445)，在4℃孵育細胞/抗體混合物20 mins，並且在使用Canto II細胞計數器(BD Bioscience)進行分析之前，細胞再次以FACS緩衝液予以清洗以及再懸浮於100 µl之含有7AAD(1:1000, Biotium, 40043)的PBS中。排除死亡細胞且測量APC通道(638nm 660/20)的螢光。幾何平均螢光強度(GMFI)數值是相對於抗體的log濃度來作圖，並且所產生的曲線是使用GraphPad Prism中的log(致效劑)相對於反應方程式來擬合。

【0448】結果顯示於**圖12**中。發現FS22-172-003-AA/E12v2 mAb^2與FS22-172-003-AA/HelD1.3假mAb^2以落在4.8 – 9.1 nM之範圍的EC_{50}值結合至細胞表面表現的人類與食蟹獼猴CD137受體，並且發現陽性對照mAb分別以1.45 nM與4.4nM的EC_{50}值結合至人類與食蟹獼猴CD137受體。沒有觀察到結合至未過度表現CD137之DO11.10或HEK293細胞，證實透過mAb^2的專一性結合。

表12

抗原	FS22-172-003-AA/ E12v2 (EC_{50} (nM))	FS22-172-003-AA/ HelD1.3 (EC_{50} (nM))	G1-AA/MOR7480.1 (EC_{50} (nM))
人類 CD137	6.2 ± 1.95	6.25 ± 2.03	1.48 ± 0.4
食蟹獼猴 CD137	7.39 ± 6.07	9.09 ± 6.93	2.6 ± 1.85

9.7 抗人類CD137/PD-L1 mAb^2對於在活化的初級人類T細胞上之內源性表現的CD137與PD-L1的結合親和力

【0449】抗人類CD137/PD-L1 mAb^2對於在活化的初級人類T細胞上之內源性表現的CD137與PD-L1的親和力是使用流動式細胞測量術來測量。為了單離T細胞，從血小板捐贈的副產品，白血球耗乏椎來單離末梢血液單核細胞(PBMCs)。簡言之，用PBS沖洗白血球椎內容物以及覆蓋於菲科爾(Ficoll) (Sigma-Aldrich, 1440-02)梯度上。藉由離心來單離PBMCs以及回收沒有越過菲科爾梯度的細胞。用PBS進一步沖洗PBMCs以及通過添加10 ml 1X紅血球溶解緩衝液(eBioscience, 00-4300-54)遵循製造商的指示、溶解剩下的紅血球。使用泛T細胞單離套組II(Miltenyi Biotec Ltd, 130-095-130)、依據製造商的操作說明而從沖提劑內存在的PBMCs單離泛T細胞(Pan T cells)。CD137在活化的CD8+ T細胞上快速地表現達高位準且亦在活化的CD4+ T細胞上具有低位準(Xue-Zhong Yu等人，2013)，因此泛T細胞依據製造商的指示使用Dynabeads™人類T-活化劑CD3/CD28小珠(Thermo, 11132D)予以刺激歷時24小時。在使用一細胞結合試驗來測試關於FS22-172-003-AA/E12v2 mAb^2、FS22-172-003-AA/HelD1.3假mAb^2、G1-AA/E12v2陽性

對照抗人類PD-L1抗體、G1-AA/MOR7480.1陽性對照抗人類CD137抗體、G1-AA/4420陰性對照抗體的結合之前，使用DynaMagTM-15磁石(Thermo, 12301D)遵照製造商的指南、自該等T細胞沖洗掉人類T-活化劑小珠。

【0450】受刺激的泛人類T細胞懸浮液是配製於FACS緩衝液(含有0.5%BSA(Sigma, A7906)之DPBS (Gibco, 14190-094))內並且以100 µl、1 x 10^5個細胞/孔播種在圓底96孔平盤(VWR, 734-1797)。細胞以FACS緩衝液予以清洗一次，而mAb^2 FS22-172-003-AA/E12v2、假mAb^2 FS22-172-003-AA/HelD1.3、陽性對照抗體G1-AA/E12v2、陽性對照抗體G1-AA/20H4.9及陰性對照抗體G1-AA/4420以100 µl FACS緩衝液予以稀釋(80 nM – 0.005 nM、5倍稀釋)。經清洗的細胞在稀釋的抗體混合物—含有抗人類$CD4^+$ FITC標記的抗體(BD Biosciences, 550628)與抗人類$CD8^+$ eFluor450標記的抗體(Invitrogen, 48-0087-42)以區分$CD4^+$與$CD8^+$ T細胞—中進行再懸浮、在4℃孵育30分鐘，並且接著在FACS緩衝液予以清洗一次。接著添加100 µl/孔、以FACS緩衝液1:1000予以稀釋之二級抗體(山羊抗人類IgG Alexa Fluor 647標記抗體；Invitrogen, A21445)，細胞/抗體混合物在4℃孵育20分鐘，並且在使用Canto II細胞計數器(BD Bioscience)進行分析之前，細胞再次以FACS緩衝液予以清洗以及再懸浮於100 µl之含有7AAD(1:1000, Biotium, 40043)的PBS中。排除死亡細胞且測量APC通道

(638nm 660/20)的螢光以顯示測試抗體結合。幾何平均螢光強度(GMFI)數值是相對於抗體的log濃度來作圖，並且所產生的曲線是使用GraphPad Prism中的log(致效劑)相對於反應方程式來擬合。

【0451】發現FS22-172-003-AA/E12v2 mAb^2結合至受刺激的人類初級$CD4^+$ T細胞與$CD8^+$ T細胞，如**圖2**中之MFI值所示。該PD-L1陽性對照抗體G1-AA/E12v2以類似mAb^2的MFI值結合至$CD4^+$ and $CD8^+$ T細胞兩者，證實PD-L1在該等細胞上表現。

【0452】發現G1-AA/MOR7480.1，CD137陽性對照經由遠遠低於FS22-172-003-AA/E12v2或G1-AA/E12v2所觀察到之MFI結合至如上所述之相同細胞。此很可能是因為在該等細胞上，相較於PD-L1表現，有一較低位準的CD137。再者，對於G1-AA/MOR7480.1結合至$CD8^+$ T細胞，MFI值是高於$CD4^+$ T細胞。如先前所描述，預期觀察到CD137表現在受刺激的$CD4^+$ T細胞上會較$CD8^+$ T細胞上還低(Xue-Zhong Yu等人，2013)，此致使在$CD4^+$ T細胞上CD137陽性對照抗體MOR7480.1結合位準比$CD8^+$ T細胞的更低。此在初級T細胞，特別是$CD4^+$ T細胞，上所見之低CD137表現亦很可能致使呈假mAb^2格式之Fcab(FS22-172-003-AA/HelD1.3)的未結合或少量結合。

9.8 抗人類CD137/PD-L1 mAb^2依SPR與FcRn之結合作用

【0453】新生Fc受體(FcRn)結合對於抗體回收是至關重要的(Martins等人，2016)。

FS22-172-003-AA/lam-G02v3、FS22-172-003-AA/E12v2以及FS22-053-008-AA/E12v2 mAb²結合至人類和小鼠FcRn是藉由SPR使用BIAcore T200 GE Healthcare)來進行測量。G1-AA/HelD1.3納入作為同型對照IgG對照，其在CH3域上缺少突變。

【0454】簡言之，mAb²各自塗覆在S系列感測器晶片CM5(GE Healthcare, BR100530)的流動室2、3及4上以達大約1000 RU的回應。流動室1被活化/去活化但被留空作為參考。人類FcRn(Acro Biosystems, FCM-H5286)或小鼠FcRn(R&D systems, 9114-Fc)在MHBS-EP⁺B pH 6.0或pH 7.4緩衝液(10 mM MES, FortéBio,18-5026；1x HBS-EP, GE Healthcare, BR100669；0.1 mg/ml BSA, Sigma, A7906)進行透析與稀釋，並且在2000-3000 nM以2倍稀釋、以80 µl/min注射於流動室1、2、3與4歷時1min，且之後允許在緩衝液中解離歷時3min。不需要再生。經扣除的數據(流動室2－流動室1、流動室3－流動室1或流動室4－流動室1)是使用Biacore T200評估軟體2.0來分析以使用模型穩定狀態親和力來確認結合作用。結合數據顯示於**表13**中並且證實FS22-172-003-AA/lam-G02v3、FS22-172-003-AA/E12v2與FS22-053-008-AA/E12v2 mAb²在pH 6.0下、以類似於對照抗體G1-AA/HelD1.3的親和力結合至人類或小鼠FcRn。在pH7.4沒有觀察到與人類或小鼠FcRn之結合。此數據顯示mAb²保留了FcRn結

合。

表13

	人類 FcRn K_D (M)		小鼠 FcRn K_D (M)	
	pH 6.0	**pH 7.4**	**pH 6.0**	**pH 7.4**
FS22-172-003-AA/lam-G02v3	1.22×10^{-6}	無結合	1.67×10^{-7}	無結合
FS22-172-003-AA/E12v2	1.12×10^{-6}	無結合	1.58×10^{-7}	無結合
FS22-053-008-AA/E12v2	9.98×10^{-7}	無結合	1.77×10^{-7}	無結合
G1-AA/HelD1.3	1.23×10^{-6}	無結合	1.60×10^{-7}	無結合

9.9 *抗人類CD137/PD-L1 mAb²與表現Fcγ受體之細胞依流動式細胞測量術之結合作用*

【0455】靶定TNFRSF膜之致效抗體需要經由Fcγ受體進行交聯以驅動標靶簇集與活化來達到*活體內*活性(Li等人，2013)。然而，為了避免因為可能的脫靶效應(off-target effects)，諸如因為Fcγ受體結合之交聯的全身性CD137活化，以及為了降低誘發表現這兩個抗原之免疫細胞如T細胞之ADCC的可能性，所以決定要藉由在CH2域導入一LALA突變(有關LALA格式之細節參見**實施例3.2**)來降低抗人類CD137/PD-L1 mAb²的Fcγ受體結合能力。透過流動式細胞測量術，細胞結合至僅過度表現FcγRIIA(ECACC目錄號：15042905)、FcγRIIA(ECACC目錄號：15042903)、FcγRIIIA(ECACC目錄號：15042902)、FcγRIIIA(ECACC目錄號：15042901)或FcγRIIB(ECACC目錄號：15042907)的CHO細胞被用來確認的是，抗人類CD137/PD-L1 mAb²的CH2域中存在LALA突變已降低其對於前述Fcγ受體的結合親和力。

【0456】簡言之，CHO.FcγRIIA.131H、CHO.FcγRIIA.131E、CHO.FcγRIIIA.158F、

CHO.FcγRIIIA.158V、CHO.FcγRIIB或CHO.WT懸浮液是配製於FACS緩衝液(含有0.5% BSA(Sigma, A7906)之DPBS(Gibco, 14190-094))內，並且以100 µl、1 x 10^5個細胞/孔播種在圓底96孔平盤(VWR, 734-1797)。細胞以FACS緩衝液予以清洗一次，而mAb^2 FS22-172-003-AA/E12v2、關於Fcγ受體結合之陽性對照抗體G1/4420以及關於Fcγ受體結合之陰性對照抗體G1-AA/4420在100 µl FACS緩衝液進行稀釋(500 nM – 0.03 nM、4倍稀釋)。經清洗的細胞在稀釋的抗體混合物中進行再懸浮、在4℃孵育30分鐘，並且接著在FACS緩衝液予以清洗一次。接著添加100 µl/孔、以FACS緩衝液1:1000予以稀釋之二級抗體(山羊抗人類IgG Alexa Fluor 488標記抗體，Stratech Scientific Ltd, 109-545-098-JIR)，細胞/抗體混合物在4℃孵育20分鐘，並且在使用CytoFLEX流動式細胞計數器(Beckman Coulter)進行分析之前，細胞再次以FACS緩衝液予以清洗以及再懸浮於100 µl之含有7AAD(1:1000, Biotium, 40043)的PBS中。排除死亡細胞且測量FITC通道(488nm 525/40)的螢光。幾何平均螢光強度(GMFI)數值是相對於抗體的log濃度來作圖，並且所產生的曲線是使用GraphPad Prism中的log(致效劑)相對於反應方程式來擬合。

【0457】該FS22-172-003-AA/E12v2 mAb^2顯示出對於所有測試之Fcγ受體表現細胞沒有結合(或低於陰性

對照抗體G1-AA/4420之位準的結合)(**圖3**(A) FcgRIIA 131H、(B) FcgRIIA 131E、(C) FcgRIIB、(D) FcgRIIIA 158F、(E) FcgRIIIA 158V)。此表明LALA突變使與FcγRIIA、FcγRIIIA或FγgRIIB之結合降低，而這亦將會降低mAb^{2}經由受體*活體內*的交聯。

實施例10：mAb^{2}功能之特徵化

10.1 抗人類CD137/PD-L1 mAb^{2}在一人類初級CD8$^+$ T細胞分析中的活性

【0458】如**實施例3.5**中所描述的人類初級T細胞分析用來測試mAb^{2}的活性。

【0459】關於以細胞為基的抗人類CD137/PD-L1 mAb^{2}的交聯，過度表現hPD-L1的HEK293細胞(HEK.hPD-L1)實質上如**實施例3.5**中所描述來生產。HEK.hPD-L1已經經工程處理成表現高位準的人類PD-L1，並且與下列細胞一起被使用：表現中等位準的人類PD-L1之MDA-MB-231細胞以及表現低位準的人類PD-L1之SKBR3細胞(**表14**)，此係按照製造商操作指南藉由抗體結合能力小珠(Quantum Simply Cellular, Bans Laboratories, Inc.；目錄號816A)進行定量。

表14

細胞株	抗體結合能力
HEK WT	7463 (± 971)
HEK.hPD-L1	702000 (± 58000)
MDA-MB-231	137369 (± 2429)
SKBR3	14734 (± 239)

【0460】CD8$^+$ T細胞是如**實施例3.5**所述予以單離並

使用抗-CD3抗體來活化。HEK.hPD-L1細胞以每孔2 x 10^5細胞平盤培養於塗覆有抗-CD3抗體(8μg/ml)的96孔平底平盤上，內含100μl T細胞培養基(RPMI培養基(Life Technologies, 61870-044)，具有10% FBS (Life Technologies)、1X青黴素鏈黴素(Life Technologies, 15140122)、1 mM丙酮酸鈉(Gibco, 11360-070)以及50μM 2-巰基乙醇(Gibco, M6250))。一旦於孵育4小時後，HEK.hPD-L1細胞或沒有轉導來表現hPD-L1、用來作為對照之HEK細胞已經黏著，便移去全部的T細胞培養基且以含5.0 x 10^5個細胞/ml的濃度之T細胞的100μl T細胞培養基代替，其導致5.0 x 10^4個細胞/孔。

【0461】對於具有較低生理位準的PD-L1表現之以細胞為基的交聯，使用人類乳腺癌細胞株MDA-MB-231 (ATCC HTB-26)且利用針對以HEK.hPD-L1細胞為基的交聯所述的相同方法學。

【0462】mAb^2是從50 nM開始、在2X最終濃度以T細胞培養基稀釋並且進行1:5滴定。將100μl的mAb^2滴定加入至該等細胞以達為200μl總分析體積與1X濃度的抗體。

【0463】陽性對照抗CD137抗體(G1-AA/20H4.9)是從50 nM開始、含有50nM交聯劑(抗人類CH2 抗體(mG1/MK1A6)、在2X最終濃度以T細胞培養基稀釋並且進行1:5滴定。將100μl經稀釋的陽性對照抗體/交聯劑混合物加入至細胞以達為200μl總分析體積與1X濃度的抗體。

【0464】該分析係於5% CO_2、37℃下孵育歷時72小時。收集上清液且用人類IL-2 ELISA Ready-SET-Go!套組(eBioscience, Cat. 88-7025-88)、遵循製造商的指示予以分析。使用平盤讀數器及Gen5軟體，BioTek於450 nm下讀取平盤。450 nm的吸光度值減去630 nm的吸光度值(校正)。根據四參數邏輯曲線擬合(Gen5軟體，BioTek)來計算細胞介素濃度的標準曲線。繪製人類IL-2(hIL-2)濃度vs抗體的log濃度的圖以及產生的曲線係以GraphPad Prism、使用log(促效劑)vs反應方程式來擬合。

【0465】**表15**顯示在使用以細胞為基的交聯進行測試之抗人類CD137/PD-L1 mAb^2的存在下，於T細胞活化分析中所觀察到的EC_{50}值與IL-2釋放的最大反應。陽性對照抗人類CD137 mAb 20H4.9顯示，在每一分析中當與抗hCH2抗體交聯時在hIL-2釋放上的增加，具有0.21至0.31 nM的EC_{50}。在該等分析中所有殖株具有活性，每一者展現具有次納摩爾EC_{50}s的效力。含有Fcab FS22-172-003之mAb^2引發最大的T細胞反應，在HEK.hPD-L1為基的分析中具有0.19至0.31 nM之範圍的EC_{50}s而在MDA-MB-231為基的分析中為0.01 – 0.02 nM。該mAb^2之子集(含有Fcabs FS22-053-008、FS22-053-011、FS22-053-014、FS22-173-003以及FS22-172-004)亦在未藉由表現於HEK上之PD-L1交聯下進行測試，且如預期的在該分析中顯示沒有活性。**圖4**與**圖5**顯示表**15**所示之mAb^2關於T細胞活化分析之IL-2釋放的代表圖。

【0466】該FS22-053與FS22-172 Fcab譜系亦在此分析中使用最低PD-L1表現之人類乳腺癌細胞株，SK-BR-3 (ATCC HTB-30)進行測試。如所預期，與先前兩分析相符，越低的PD-L1表現致使越低的$CD8^+$ T細胞活化(數據未示出)。

表15

	EC_{50} (nM)供體 171115A		EC_{50} (nM) 供體 171115B	
mAb^2	**HEK.hPD-L1 XL**	**MDA-MB-231 XL**	**HEK.hPD-L1 XL**	**MDA-MB-231 XL**
FS22-053-008-AA/E05 v2	0.16	0.01	0.11	0.02
FS22-053-008-AA/E12 v2	0.10	0.01	0.11	0.02
FS22-053-008-AA/G12 v2	0.13	0.02	0.12	0.02
FS22-053-017-AA/E05 v2	0.15	0.01	0.12	0.01
FS22-053-017-AA/E12 v2	0.11	0.01	0.12	0.01
FS22-053-017-AA/G12 v2	0.10	0.01	0.20	0.01
FS22-172-003-AA/E05 v2	0.27	0.02	0.19	0.02
FS22-172-003-AA/E12 v2	0.24	0.02	0.31	0.02
FS22-172-003-AA/G12 v2	0.21	0.02	0.22	0.01
G1-AA/20H4.9	0.21	0.31	0.29	0.28

【0467】此等結果顯示該等mAb^2可以結合至表現不同位準之PD-L1的細胞。結合至細胞表現的PD-L1導致該等mAb^2的交聯，使得它們能夠與T細胞上的CD137結合、簇集且活化，如由IL-2生成所測量。所觀察到的活化位準是與由結合PD-L1之交聯的位準有關，其中mAb^2結合至表現更高位準的hPD-L1之細胞(HEK.hPD-L1)，有越大活化，而較低位準的PD-L1表現引發較少活化。

10.2 與不同族群之HEK.hPD-L1交聯之抗人類

CD137/PD-L1 mAb²在人類初級CD8⁺ T細胞活化分析中的活性

【0468】因為不同細胞株的PD-L1表現位準被觀察到會影響CD137的活化，決定進一步探究PD-L1表現在所測試之mAb²的功能活性上的影響。執行相似於**實施例10.1**所描述之分析，其中為了在以族群為主的方法調整人類PD-L1表現的位準，將HEK.hPD-L1相對HEK.WT細胞的比率作變化。

【0469】HEK.hPD-L1細胞與未經轉導來表現hPD-L1之HEK細胞(HEK.WT)以不同比率平盤培養，以提供於**圖6**中所示之總存在的HEK細胞中不同百分率的HEK.hPD-L1細胞(100%、50%、25%、12.5%、6.5%或0%)。HEK細胞以每孔2 x 10^5個總HEK細胞平盤培養於經抗-CD3抗體塗覆(8μg/ml)的96孔平底平盤上，內含100 μl T細胞培養基(RPMI培養基(Life Technologies, 61870-044)，具有10% FBS (Life Technologies)、1X青黴素鏈黴素(Life Technologies, 15140122)、1 mM丙酮酸鈉(Gibco, 11360-070)以及50 μM 2-巰基乙醇(Gibco, M6250))。一旦全部HEK細胞在4小時孵育之後已經黏著，便移除全部T細胞培養基並且以含5.0 x 10^5個細胞/ml的濃度之T細胞的100μl T細胞培養基代替，其導致5.0 x 10^4個細胞/孔。

【0470】分析是以抗人類CD137/PD-L1 mAb2 FS22-172-003-AA/E12v2來進行，除此之外是依據**實施**

例10.1所描述之步驟準則。具有經抗CH2抗體的額外交聯之抗-CD137陽性對照抗體G1-AA/20H4.9被納入。抗體G1-AA/4420用來作為陰性對照。

【0471】**圖6**中的結果顯示，當HEK.hPD-L1細胞族群增加，mAb^{2}活性亦增加，如同由所觀察到之最大hIL-2濃度上之增加所闡明者。當存在的HEK細胞族群100%為HEK.hPD-L1，達成最大交聯且觀察到最高的最大hIL-2濃度。該陽性對照抗體G1-AA/20H4.9當透過抗CH2抗體之最大地人工交聯時亦達到相似的最大hIL-2濃度。

【0472】此數據支持下列觀察：在該系統(由在它們的細胞表面上表現不同位準PD-L1之測試細胞株或者由調整呈現PD-L1之一族群的細胞數量來表示)中存在之PD-L1含量控制mAb^{2}的交聯，並且藉此支配由該mAb^{2}所誘發之CD137致效作用的程度。然而，甚至連僅低位準的PD-L1存在之情況下，該mAb^{2}仍能夠致效CD137。因此，該mAb^{2}被預期具有活性，其中PD-L1於一系統表現，且表現CD137之活化的T細胞存在。當該系統中之PD-L1位準增加，所發揮之致效作用亦預期會增加。與在低位準CD137存在下仍能夠誘發CD137致效作用的mAb^{2}相反，單價地結合CD137之CD137/PD-L1分子被預期在低PD-L1位準存在下具有低效能，因為結合至PD-L1之分子很有可能會離太遠以致於無法驅動CD137的簇集，而當分子可以二價地結合CD137，如同在本發明之mAb^{2}的狀況，這不被預期會成為一問題。

10.3 抗人類CD137/PD-L1 mAb²在人類初級混合淋巴球反應分析中之活性

【0473】抗人類CD137/PD-L1 mAb²的活性是在一混合淋巴球反應(MLR)分析(參見**實施例5.3.4**)中進行測試。該MLR分析是使用來自一供體的$CD4^+$ T細胞與另一供體的單核細胞衍生的樹突細胞(iDCs)。由於免疫細胞含有生理位準的免疫查核點調節劑，MLR分析可用來確認T細胞活化在人類系統中會藉由mAb²而增強。

【0474】擴增的$CD4^+$ T細胞與iDC是如**實施例5.3.4**中所描述的予以生成。

【0475】在實驗的前一天解凍擴增的T細胞，以AIM V培養基(Gibco, 12055-091)予以清洗並在37℃、5% CO2下於AIM V培養基中孵育過夜。在96孔圓底平盤(VWR, 734-1797)中，將**表16**中所示之抗-CD137與抗PD-L1抗體以及抗人類CD137/PD-L1 mAb²以50 µl AIM V培養基一式三份、稀釋成4x最終濃度。一種含有該LALA突變之抗巨細胞病毒(CMV)gH醣蛋白抗體，命名為MSL109(於WO1994/016730 A1中所述)，被納入作為陰性對照。測試從30 nM起始至0.002 nM的3倍連續稀釋。添加懸浮於50 µl AIM V培養基之$1x10^4$個iDC細胞以及懸浮於100 µl AIM V培養基之$1x10^5$個擴增的$CD4^+$ T細胞這二者至抗體稀釋中，並且在37℃ + 5% CO2下孵育歷時5天。下列的陰性對照被納入：單獨$CD4^+$ T細胞、單獨iDC、$CD4^+$ T細胞+ iDCs，以及僅有AIM V培養基。收穫上清液、稀釋樣

本(1:25)以及使用人類IFNγELISA Ready-SET-Go!套組(Life Technologies, 88-7316-77)來量測干擾素-γ(IFN-γ)濃度。使用平盤讀數器及Gen5軟體，BioTek於450 nm下讀取平盤。450 nm的吸光度值減去630 nm的吸光度值(校正)。根據四參數邏輯曲線擬合(Gen5軟體，BioTek)來計算細胞介素濃度的標準曲線。繪製人類IFN-γ濃度vs抗體的log濃度的圖以及產生的曲線係以GraphPad Prism、使用log(促效劑)vs反應方程式來擬合。

【0476】該抗人類PD-L1抗體G1/S70在MLR分析中顯示有效活性且具有0.06 nM之EC_{50}值以及1135 pg/ml之IFN-γ最大位準($E_{最大}$)(**表16**、代表圖**7A**與**7B**)。EC_{50}表示達到一半致效反應的mAb濃度，而$E_{最大}$是表示在該分析中達到IFN-γ的最大濃度的絕對值。如所預期的，陰性對照G1-AA/MSL109抗體無觀察到活性。陽性對照抗人類CD137抗體G1-AA/20H4.9當與抗-hCH2抗體交聯時沒有引發任何活性，此表明CD137表現可能是低的並且在此分析中PD-L1阻斷覆沒CD137訊息傳導，因為PD-L1阻斷非常強烈。令人驚訝地，在此分析中所有測試的抗人類CD137/PD-L1 mAb^2顯示低於0.04 nM之非常有力的EC_{50}值以及範圍在2626至3327 pg/ml之高$E_{最大}$值。此表明該等mAb^2在此分析中具有增加的效力，優於任一個PD-L1與CD137單株抗體。

表16

分子(等)	種類	EC50 (nM)	$E_{最大}$ (pg/ml)
FS22-172-003-AA/E05v2	mAb^2	0.03	2654
FS22-172-003-AA/E12v2	mAb^2	0.02	2626
FS22-053-008-AA/E05v2	mAb^2	0.02	2797
FS22-053-008-AA/E12v2	mAb^2	0.04	3128
FS22-053-017-AA/E12v2	mAb^2	0.04	3327
G1-AA/20H4.9+抗人類 CH2	CD137 mAb	N/A	N/A
G1/S70	PD-L1 mAb	0.06	1135
G1-AA/MSL109	同型	N/A	N/A
單獨 $CD4^+$ T 細胞	細胞對照	N/A	N/A
單獨 iDC	細胞對照	N/A	N/A
單獨 $CD4^+$ T 細胞 + iDC	細胞對照	N/A	N/A

N/A –不適用因信號太低不允許判定 EC_{50}

【0477】按照如上所述之相同步驟準則，該抗人類CD137/PD-L1 mAb^2 FS22-172-003-AA/E12v2的活性再次於MLR中進行測試，但這次是對比每一個組成部分(呈假mAb^2格式之抗人類FS22-172-003 Fcab以及抗PD-L1抗體G1-AA/E12v2)，以及此二者的組合。

【0478】抗人類PD-L1組分抗體G1-AA/E12v2在MLR分析中顯示有效力的活性，具有為0.08 nM之EC_{50}值以及為12421 pg/ml之IFN-γ最大位準($E_{最大}$)(**表17**；代表**圖7C**)。如所預期的，陰性對照G1-AA/4420抗體沒有觀察到活性，且呈假mAb^2格式之抗人類Fcab FS22-173-003沒有觀察到活性。陽性對照抗人類CD137抗體G1-AA/20H4.9當與抗hCH2抗體交聯時沒有引發任何活性，此表明CD137表現可能是低的，並且如上所見，在此分析中PD-L1阻斷覆沒CD137訊息傳導，因為PD-L1阻斷非常強烈。如所預期的，抗人類CD137/PD-L1

FS22-172-003-AA/E12v2 mAb^2顯示為0.07 nM之非常有力的EC_{50}值以及為17874 pg/ml之高$E_{最大}$值。此表示mAb^2在此分析中具有增加的效力，優於抗PD-L1與抗CD137單株抗體任一者單獨或二者的組合。該數據亦此表明在此分析中，mAb^2要比兩個分別包含mAb^2之Fcab與Fab結合位址的抗體之組合具有更高的效力。

表17

分子(等)	種類	EC_{50} (nM)	$E_{最大}$ (pg/ml)
FS22-172-003-AA/E12v2	mAb^2	0.07	17874
FS22-172-003-AA/HelD1.3	mAb^2	N/A	3574
G1-AA/E12v2	PD-L1 mAb	0.08	12421
FS22-172-003-AA/HelD1.3 + G1-AA/E12v2	組份組合	0.06	12301
G1-AA/20H4.9+抗人類 CH2	CD137 mAb	1.9	4307
G1-AA/E12v2 + G1-AA/20H4.9 + 抗人類 CH2	mAb 組合	0.14	17525
G1-AA/4420	同型	N/A	N/A
單獨 $CD4^+$ T 細胞	細胞對照	N/A	N/A
單獨 iDC	細胞對照	N/A	N/A
單獨 $CD4^+$ T 細胞 + iDC	細胞對照	N/A	N/A

N/A –不適用因信號太低不允許判定 EC_{50}

10.4 抗人類CD137/PD-L1 mAb^2在抗原回憶T細胞活化分析中之活性

【0479】抗人類CD137/PD-L1 mAb^2之活性是在抗原回憶T細胞活化分析中，藉由量測對於兩個不同的含有生理上相關之抗原的胜肽池的免疫反應來進行測試。一個包含來自巨細胞病毒、艾司坦-巴爾病毒(Epstein-Barr virus)及流感病毒之MHC I類-限制性胜肽(CEF)之池用於測試$CD8^+$ T細胞活化；以及包含來自巨細胞病毒、艾司坦

-巴爾病毒、流感病毒及破傷風毒素之MHC II類-限制性胜肽(CEFT)之第二個池用於測試$CD4^+$ T細胞活化。因使用來自單一供體之人類PBMCs，以及因該等免疫細胞含有生理位準的免疫查核點調節劑並且受抗原呈現而非由抗CD3抗體之T細胞受體交聯所刺激，該分析的結果確認抗原驅動的T細胞活化在人類系統中會藉由mAb^2而增強。

【0480】將冷凍保存的末梢血液單核細胞(PBMCs)進行解凍與計數，並且以每孔$1.9x10^5$個細胞播種至96孔平底培養平盤中的200 µl羅斯威爾公園癌症研究所(Roswell Park Memorial Institute，RPMI)培養基內，該RPMI培養基含有10%胎牛血清(FBS) + 1 ng/ml IL-2 + 5 ng/ml IL-7及1 µg/ml CEF胜肽池(Thinkpeptides；目錄號PX-CEF-G)或1 µg/ml CEFT胜肽池(Thinkpeptides；目錄號PX-CEFT-G)。細胞在37℃下以5% CO_2孵育歷時3天。在3天之後，透過添加含有10% FBS之22.5 µl新鮮RPMI來補充培養基且維持1 ng/ml IL-2與1 ng/ml IL-7。細胞在37℃下以5% CO_2孵育再4天。

【0481】將細胞收集並且一起匯聚，之後以每孔$1x10^5$個細胞分配遍及96孔圓底平盤內的150 µl RPMI中，其含有10% FBS + 1 ng/ml IL-2 + 5 ng/ml IL-7及1 µg/ml CEF胜肽池或1 µg/ml CEFT胜肽池。mAb^2在和細胞播種其內相同的培養基中進行稀釋，並且添加至細胞。

【0482】陽性對照抗-CD137抗體(G1-AA/20H4.9)與陽性對照抗PD-L1抗體(G1-AA/E12v2)各自從400 nM

開始、含有400 nM交聯劑(該抗人類CH2抗體(MK1A6)、在2X最終濃度以和細胞播種其內相同的培養基中進行稀釋，並且進行1:5滴定。將50 μl經稀釋的每一陽性對照抗體/交聯劑混合物添加至細胞中以達為200μl的總分析體積及1X抗體濃度。

【0483】該分析在37℃、5% CO_2下孵育歷時72小時。收集上清液並且以MSD U-PLEX套組(Meso Scale Discovery；目錄號K15067L-2)依據製造商的指示進行分析。平盤是在MESO QuickPlex SQ 120電化學發光平盤讀數器上、使用1:5的樣本稀釋來進行讀數。使用MSD Discovery Workbench 4.0軟體來計算細胞介素濃度的標準曲線，且在上清液中的細胞介素濃度是使用GraphPad Prism中之log(致效劑)vs反應方程式來擬合。

【0484】如**表18**與**表19**所示，抗人類PD-L1抗體G1-AA/E12v2顯示對於$CD4^+$與$CD8^+$ T細胞活化兩者之活性，分別具有0.06 nM與0.04 nM之EC_{50}值($E_{最大}$分別為65840 pg/ml與86613 pg/ml)。EC_{50}表示達到一半致效反應的mAb濃度，而$E_{最大}$是表示在該分析中達到IFN-γ的最大濃度的絕對值。陽性對照抗人類CD137抗體G1-AA/20H4.9當與抗hCH2抗體交聯時，顯示對於CD8+ T細胞活化之活性且具有0.33 nM之EC_{50}值以及116204 pg/ml之$E_{最大}$值，但對於$CD4^+$ T細胞活化未引發任何活性，此表明相對於$CD4^+$ T細胞，在$CD8^+$T 細胞上CD137表現可能較高。如所預期的，陰性對照G1-AA/4420抗體

未觀察到活性。令人驚訝地，mAb^2在$CD4^+$ T細胞活化與$CD8^+$ T細胞活化這兩者分析上都顯示活化且分別有0.08 nM與0.03 nM之EC_{50}值。mAb^2可結合PBMC表現的PD-L1且在兩種細胞類型上都展現等效的PD-L1活性。再者，結合至PBMC表現的PD-L1致使mAb^2的交聯，使得其等能夠與兩種T細胞亞型上的CD137結合、簇集並活化，如藉由IFN-γ釋放所測量。以mAb^2處理之T細胞所釋放的IFN-γ最大濃度是高於任一陽性對照抗體，對於$CD4^+$ T活化與$CD8^+$ T細胞活化分別具有86680 pg/ml與188242 pg/ml之$E_{最大}$值。此表明mAb^2在此分析中具有增加的活性，優於PD-L1與CD137單株抗體任一者的活性。

表18–CEFT胜肽池抗原回憶分析值($CD4^+$ T細胞活化)

分子(等)	種類	EC_{50} (nM)	$E_{最大}$ (pg/ml)
FS22-172-003-AA/E12v2	mAb^2	0.08	86680
G1-AA/20H4.9+抗人類 CH2	CD137 mAb	N/A	12965
G1-AA/E12v2	PD-L1 mAb	0.06	65840
G1-AA/4420	同型	N/A	N/A

N/A–不適用因信號太低不允許判定EC_{50}

表19–CEF胜肽池抗原回憶分析值($CD8^+$ T細胞活化)

分子(等)	種類	EC_{50} (nM)	$E_{最大}$ (pg/ml)
FS22-172-003-AA/E12v2	mAb^2	0.03	188242
G1-AA/20H4.9+抗人類 CH2	CD137 mAb	0.33	116204
G1-AA/E12v2	PD-L1 mAb	0.04	86613
G1-AA/4420	同型	N/A	N/A

N/A–不適用因信號太低不允許判定EC_{50}

10.5 抗人類CD137/PD-L1 mAb^2在PD-L1阻斷小鼠DO11.10 T細胞活化分析中之活性

【0485】FS22-172-003-AA/E12v2的活性是在小鼠DO11.10 T細胞活化分析中進行測試以研究PD-L1查核點阻斷活性。對於人類PD-L1之功能活性是如**實施例5.4**所述、在IL-2釋放分析中使用DO11.10 OVA T細胞與LK35.2 B細胞融合瘤細胞來進行試驗。

【0486】結果顯示於**表20**。抗人類CD137/PD-L1 mAb^2在小鼠DO11.10 T細胞活化分析中顯示有效力的活性，具有1.27 nM之EC_{50}值，此確認FS22-172-003-AA/E12v2可以結合PD-L1並且阻斷PD-L1與PD-1的交互作用。它的活性相似於該等陽性對照抗人類PD-L1抗體G1-AA/E12v2與G1-AA/S70所具者，此表明當G1-AA/E12v2併入FS22-172-003-AA/E12v2 mAb^2分子內時，沒有抗人類PD-L1活性的損失發生。

表20–DO11.10 T細胞活化分析值(小鼠IL-2釋放)

分子(等)	**類型**	**EC_{50} (nM)**	**E 最大 (pg/ml)**
FS22-172-003-AA/E12v2	mAb^2	1.27	424
G1-AA/E12v2	PD-L1 mAb	1.19	480
G1-AA/S70	PD-L1 mAb	1.4	498
G1-AA/HelD1.3	人類IgG1同型對照mAb	N/A	N/A

N/A–不適用因信號太低不允許判定EC_{50}

實施例11：抗人類CD137/PD-L1 mAb^2在食蟹獼猴功能分析中的功能交叉反應性

11.1 抗人類CD137/PD-L1 mAb^2在食蟹獼猴DO11.10 T細胞活化分析中的活性

【0487】活化的T細胞上經由致效分子之CD137簇集引發T細胞活化與下游訊息傳導，此致使但不限於，IL-2

生成。抗人類CD137/PD-L1 mAb²活化表現食蟹獼猴CD137的DO11.10細胞之能力是在T細胞活化分析中進行測試。開發一種使用經工程處理要過度表現食蟹獼猴CD137之DO11.10 T細胞的DO11.10 T細胞活化分析，而T細胞活化是藉由測量IL-2釋放來評估。

【0488】如**實施例1.2**所述，生產表現全長食蟹獼猴CD137(序列辨識編號：189)之DO11.10細胞(National Jewish Health)，命名為'DO11.10.cCD137'，且確認食蟹獼猴CD137的表現。

【0489】下列抗人類CD137/PD-L1 mAb²於此DO11.10 T細胞活分析中進行測試：FS22-172-003-AA/lamG02v3、FS22-053-008-AA/E05v2、FS22-053-008-AA/E12v2、FS22-053-008-AA/G12v2、FS22-053-017-AA/E05v2、FS22-053-017-AA/E12v2、FS22-053-017-AA/G12v2、FS22-172-003-AA/E05v2、FS22-172-003-AA/E12v2、FS22-172-003-AA/G12v2。準備有或沒有抗hCH2抗體(mG1/MK1A6)交聯劑之mAb²或G1-AA/MOR7480.1陽性對照mAb的稀釋液，並且加入96孔圓底平盤中的DO11.10.cCD137細胞內，該平盤已經以0.1 μg/ml抗CD3抗體(殖株17A2, BioLegend, 100208)塗覆過夜且已經播種有過度表現食蟹獼猴PD-L1之2x10⁵個HEK.cyPD-L1細胞—欲作為以細胞為基的交聯細胞。過度表現食蟹獼猴PD-L1的細胞是使用**實施例9.5**所描述的食蟹獼猴

PD-L1，如**實施例5.3.3**中所述予以製造。在18小時孵育之後，收集上清液並且使用小鼠IL-2 ELISA套組(eBioscience, 88-7024-86)依據製造商的指示來進行分析。使用平盤讀數器及Gens軟體，BioTek於450 nm下讀取平盤。450 nm的吸光度值減去570 nm的吸光度值(校正)。根據四參數邏輯曲線擬合(Gens軟體，BioTek)來計算細胞介素濃度的標準曲線。繪製mIL-2濃度vs mAb^2或基準mAb的log濃度的圖以及產生的曲線係以GraphPad Prism、使用log(促效劑)vs反應方程式來擬合。

【0490】此分析中所測試的全部抗人類CD137/PD-L1 mAb^2，在過度表現食蟹獼猴PD-L1的HEK細胞的存在下去交聯mAb^2顯示出活性，此表明全部mAb^2能夠結合食蟹獼猴PD-L1以及結合並簇集食蟹獼猴CD137這兩者而引發DO11.10 T細胞活化，如由IL-2生成所讀出(參見**表21**與**圖8**)。僅當經由細胞表現的食蟹獼猴PD-L1來交聯時，全部抗人類CD137/PD-L1 mAb^2顯示相似活性，具有範圍在0.06至0.11 nM的EC50值以及範圍在8060至12300 pg/ml IL-2的$E_{最大}$值。當分析是使用不表現食蟹獼猴PD-L1的HEK細胞進行時，在缺少食蟹獼猴PD-L1之下，因為沒有交聯而沒有活性。已證明為食蟹獼猴交叉反應性之陽性對照CD137抗體G1-AA/MOR7480.1(Fisher等人，2012)，在此分析中當與抗CH2交聯時顯示出活性，然而全部的抗人類CD137/PD-L1 mAb^2就較低EC_{50}值與較高$E_{最大}$值這兩者

而言是較佳的，此表明在食蟹獼猴CD137表現系統中之交叉反應性與較佳的活性。

表21

分子	類型	EC_{50}(nM)(經交聯)	$E_{最大}$(pg/ml)(經交聯)
FS22-172-003-AA-Iam/GO2v3	mAb^2	0.08	12304
FS22-053-008-AA/E05V2	mAb^2	0.06	8057
FS22-053-008-AA/E12V2	mAb^2	0.08	9010
FS22-053-008-AA/G12V2	mAb^2	0.07	9656
FS22-053-017-AA/E05V2	mAb^2	0.10	9021
FS22-053-017-AA/E12V2	mAb^2	0.11	9362
FS22-053-017-AA/G12V2	mAb^2	0.08	8933
FS22-172-003-AA/E05V2	mAb^2	0.08	10520
FS22-172-003-AA/E12V2	mAb^2	0.06	11291
FS22-172-003-AA/G12V2	mAb^2	0.06	11216
G1-AA/MOR7480.1	CD137 mAb	0.71	5705

11.2 抗人類CD137/PD-L1 mAb^2在食蟹獼猴初級混合的白血球反應分析中的活性

【0491】抗人類CD137/PD-L1 mAb^2的活性是在食蟹獼猴混合淋巴球反應(MLR)分析中進行測試。類似於**實施例10.3**中所描述的人類MLR分析，此分析測量發生在兩個同種異體淋巴球族群(相同物種但基因相異)之間的細胞免疫分析反應。此分析使用來自一食蟹獼猴個體的$CD4^+$ T細胞以及來自另一食蟹獼猴個體的$CD14^+$單核細胞。由於該等免疫細胞含有生理位準的免疫查核點調節劑，該MLR分析可以用來確認T細胞活化在食蟹獼猴系統中會藉由mAb^2而增強。

$CD4^+$ T 細胞的單離

【0492】PBMCs是藉由Ficoll梯度分離法而從食蟹

獼猴血液樣本單離出來。$CD4^+$ T細胞是使用非人類的靈長類$CD4^+$單離套組(Miltenyi Biotec Ltd, 130-091-102)依據製造商的指示來進行單離。該等細胞在MLR分析中新鮮使用。

$CD14^+$單核細胞的單離

【0493】未接觸的單核細胞是使用非人類的靈長類CD14單離套組(Miltenyi Biotec Ltd, 130-091-097)依據製造商的指示而從食蟹獼猴PBMCs單離出來。單核細胞在在MLR分析中新鮮使用。

MLR分析

【0494】在96孔圓底平盤(VWR, 734-1797)中，將抗人類CD137/PD-L1 mAb^2 FS22-172-003-AA/E12v2與抗人類PD-L1抗體G1-AA/E12v2和同型對照抗體G1-AA/4420以50µl AIMV培養基一式三份、稀釋成4X最終濃度。含有LALA突變之抗母雞卵白溶菌酶(HEL)抗體，稱為HelD1.3(如**實施例2.2**中所述)，被包括在內作為陰性對照。測試從300 nM開始至0.02 nM之4倍稀釋系列。添加懸浮於50 µl AIM V培養基之$7.5x10^4$個單核細胞以及懸浮於100 µl AIM V培養基之$7.5x10^5$個$CD4^+$ T細胞這二者至抗體稀釋液中並且在37℃ + 5% CO2下孵育歷時6天。下列的陰性對照被包括在內：單獨$CD4^+$ T細胞、單獨$CD14^+$單核細胞、$CD4^+$ T細胞+ iDCs，以及僅有AIM V培養基。在第2天收穫上清液並且使用MILLIPLEX MAP非人類靈長類細胞介素磁珠板(Cytokine Magnetic Bead

Panel)(Merck Millipore；目錄號PRCYTOMAG-40K-01)來量測介白素-2(IL-2)濃度，在第6天亦收穫上清液且使用相同的套組來測量干擾素-γ(IFN-γ)濃度。以來自Bio-Rad的Bio Plex 200機器分析樣本。

【0495】抗人類CD137/PD-L1 mAb²二者在此分析中都顯示活性，此表明mAb²能夠結合食蟹獼猴PD-L1且隨後與新鮮單離的食蟹獼猴免疫細胞內源性表現位準的食蟹獼猴CD137結合並簇集，而致使由於T細胞活化的細胞介素釋放(參見**圖9**)。

11.3 抗人類CD137/PD-L1 mAb²在食蟹獼猴初級PBMC分析中的活性

【0496】抗人類CD137/PD-L1 mAb²的活性是在一食蟹獼猴初級PBMC分析中進行測試。此分析測量一細胞免疫分析反應，其發生在已經以抗-CD3 mAb刺激之PBMCs之一混合族群中。該分析使用來自一食蟹獼猴個體之整個PBMCs，並且由於該等免疫細胞含有生理位準的免疫查核點調節劑，該PBMC分析可以用來確認T細胞活化在食蟹獼猴系統中會藉由mAb²而增強。

【0497】該實驗大致上是如**實施例3.5**中所描述的來執行，但具有下列差異：陽性對照抗-CD137抗體(G1-AA/MOR7480.1)從40 nM開始、含有40 nM交聯劑(抗人類CH2抗體(MK1A6)、在2X最終濃度以和細胞播種其內相同的培養基中進行稀釋，並且進行1:4滴定。該mAb²(FS22-172-003-AA/E12v2)與陰性對照抗體

(G1-AA/HelD1.3)以相同的方式稀釋，但沒有交聯劑。將100 μl經稀釋的抗體/交聯劑混合物添加至細胞中以達為200μl的總分析體積，以及1X抗體濃度。該分析是在37℃下以5% CO_2孵育歷時3天。

【0498】收集上清液並且使用一種MSD V-Plex前炎性板1(Proinflammatory Panel 1)(NHP)套組(Meso Scale Discovery，目錄號K15056D-2)依據製造商的指示來進行分析。平盤是在MESO QuickPlex SQ 120電化學發光平盤讀數器上來進行讀數。使用MSD Discovery Workbench 4.0軟體來計算細胞介素濃度的標準曲線，且上清液中的細胞介素濃度是使用GraphPad Prism之log(致效劑)vs反應方程式來擬合。

【0499】**圖28A**顯示於該食蟹獼猴PBMC分析中IFN-γ從T細胞活化釋放的代表圖，以及**圖28B**顯示該人類PBMC分析中IFN-γ從T細胞活化釋放的代表圖。

【0500】該抗人類CD137抗體G1-AA/MOR7480.1當與抗hCH2抗體交聯時在兩個PBMC分析中都顯示活性。如所預期的，陰性對照G1-AA/HelD1.3抗體沒有觀察到活性。令人驚訝地，mAb^2在兩個PBMC分析中都顯示相似的活化，分別具有0.08 nM與0.03 nM之EC_{50}值。EC_{50}表示達到一半致效反應的mAb濃度。因此，mAb^2可以結合至PBMC表現的PD-L1致使mAb^2的交聯，使得它們能夠與兩物種的T細胞上的CD137結合、簇集並活化，如由IFN-γ 釋放所量測的。以mAb^2處理之T細胞所釋放的

IFN-γ最大濃度是高於任一陽性對照抗體，此表明mAb²在此分析中具有增加的活性，優於CD137單株抗體的活性。

實施例12：抗小鼠CD137 Fcabs之生產

【0501】為了測試含有CD137抗原結合區域之mAb²於*活體內*小鼠模式的活性，但因為由於小鼠及人類CD137序列之間的序列同源性很低而無法獲得小鼠人類交叉反應性Fcabs的風險，所以產生專一性結合小鼠CD137的Fcabs且予以特徵化。於產生小鼠CD137-結合Fcabs之後，隨後驚訝地發現FS22-053-14能與小鼠及人類交叉反應。

12.1 抗小鼠CD137 Fcabs之初始的選擇作用

【0502】為了選擇結合人類CD137的Fcabs，所以使用酵母菌及噬菌體展示選擇活動，類似於先前所述關於結合人類CD137者(參見**實施例2.1**)。使用重組小鼠二聚體CD137或表現全長小鼠CD137的細胞作為抗原作為抗原(參見**實施例1**)。

【0503】於使用六種噬菌體庫之選擇作用中使用機構內部的mCD137-mFc-Avi抗原及表現mCD137的DO11.10細胞(DO11.10.mCD137)。所有第3輪重組抗原產品(576種殖株)及所有第3輪選擇作用產品(576種殖株)係藉由噬菌體ELISA來篩選以及對於DO11.10.mCD137細胞之細胞結合。34個Fcab殖株命中者係如**實施例2.2**中所述予以亞選殖及生產為HelD1.3 mAb²。

【0504】先前用於選擇結合人類CD137之Fcabs的四種展示人類IgG1的CH1至CH3域之初始的酵母菌庫，係用

來選擇結合小鼠CD137之Fcabs。執行總共53次單獨輪次的選擇作用來辨識抗小鼠CD137結合者。使用機構內部生產的、重組、二聚體、生物素化小鼠CD137(mCD137-mFc-Avi)抗原以從酵母菌初始庫選擇出結合者。

12.2 來自初始的選擇之抗小鼠CD137 Fcabs之特徵化

【0505】測試呈HelD1.3“假”mAb^2格式的抗小鼠CD137 Fcabs對於小鼠CD137之專一性且藉由測試Fcabs與其他小鼠TNFRSF受體(CD40、OX40、GITR)之結合、以Octet QKe系統、依BLI進行測量。鏈黴抗生物素生物感測器(PALL ForteBio 18-5021)塗覆10 ng/μl小鼠CD40、GITR、OX40受體(全部都得自於R&D Systems且使用來自Thermoscientific #21328之EZ-Link Sulfo-NHS-SS-生物素套組予以生物素化)。呈假mAb^2格式的抗小鼠CD137 Fcabs係以動力學緩衝液(PALL 18-1092)1:1稀釋達至少1μM的終濃度。抗原塗覆的感應器在mAb^2溶液中浸180秒接著於1 ×動力學緩衝液180秒。使用每種TNFRSF受體的抗體作為陽性對照。Fcab殖株FS22m-055、FS22m-063、FS22m-066、FS22m-075、FS22m-135、FS22m-055、FS22m-063、FS22m-066不與任何測試的TNFRSF受體結合，因而證明其等對於小鼠CD137之專一性。

【0506】遵照如先前於**實施例2.3**中所述相同的方法論來生產表現小鼠CD137序列(序列辨識編號：187)的

HEK.FRT.luc細胞。含有以前選出的抗小鼠CD137 Fcabs之mAb²係使用此細胞株，HEK.FRT.luc.mCD137，根據於**實施例2.3**中所述的方法來篩選。測試56種mAb²，其中29種為NF-kB活性陽性的。使用含有有LALA突變的人類IgG1 Fc的Lob12.3(G1-AA/Lob12.3)作為陽性對照抗小鼠CD137 mAb且顯示出發光增加而確認了該分析的效度。HelD1.3，亦含有有LALA突變的人類IgG1 Fc，於此分析中使用作為陰性對照人類IgG同型以從人類IgG假Fab排除干擾。在可能的情況下計算EC_{50}且忽視活性沒有到達平台區之mAb²以利於顯示出典型的S形活性動力學之mAb²。按照一旦以蛋白L交聯時之EC_{50}及活性的倍數變化(fold-change)來分級mAb²。選出FS22m-063，根據其一旦交聯時具有最佳的EC_{50}(1.44nM)以及一旦交聯時活性有最高的倍數變化(27倍)。

12.3 呈假mAb²格式之FS22m-063、FS22-053-014及FS22-053-017 Fcabs於小鼠CD137 DO11.10 T細胞活化分析的活性

【0507】亦以如**實施例2.4**中所述之小鼠CD137 DO11.10 T細胞活化分析來比較FS22-053-017殖株(呈HelD1.3假mAb²格式)對抗鼠類CD137結合Fcab殖株FS22m-063(亦呈HelD1.3假mAb²格式)，以及親代FS22-053-014殖株(呈HelD1.3假mAb²格式)。mAb²分子與蛋白L係以莫耳比率4:1(mAb²:蛋白L)予以交聯。結果顯示於**表22**內。

【0508】正如所料，以IL-2釋放來測量，全部測試分子當以蛋白L交聯時證明都有活性，但是沒有交聯時則沒有活性。經選出與小鼠CD137結合之FS22m-063於分析中、在交聯時具有最好的活性，且EC_{50}為0.39nM。FS22-053-14及FS22-053-017二者於分析中均有活性，表示功能沒有因為突變誘發而損失，雖然FS22-053-017的活性有輕微的損失且EC_{50}比FS22-053-14更差8倍，在以蛋白L交聯時。**圖10**顯示呈HelD1.3假mAb^2格式之親和力成熟的人類及鼠類交叉反應性CD137 Fcabs FS22-053-014及FS22-053-017，及抗小鼠CD137 Fcab FS22m-063，於DO11.10 T細胞活化分析中當以蛋白L交聯時會活化CD137而導致mIL-2釋放。

表22

Fcab 殖株(呈 HelD1.3 mAb^2 格式)或 mAb	**有或沒有蛋白 L 交聯之 IL-2 釋放**		
	沒有 XL	**+XL $E_{最大}$ (IL-2 pg/ml)**	**+XL EC_{50} (nM)**
FS22-053-014	N/A	28071	2.04
FS22-053-017	N/A	41042	16.74
FS22m-063	N/A	24175	0.39
G1-AA/Lob12.3+蛋白 L	N/A	21332	2.26

N/A–不適用因信號太低不允許判定EC_{50}

實施例13：活體外之特徵化抗小鼠CD137/PD-L1 mAb^2

【0509】挑選實施例**12.3**中所述的T細胞活化分析中活性最佳的FS22m-063來測試含有CD137抗原結合區域之mAb^2 於*活體內*小鼠模式內的活性。

*13.1 抗小鼠CD137/PD-L1 mAb^2*之建構、表現及純化

【0510】生產包含抗小鼠CD137 Fcab FS22m-063還

有PD-L1結合Fab區域(殖株YW243.55.S70來自US 8,217,149 B2)的抗小鼠CD137/PD-L1 mAb²。其等係以類似**實施例3.2**中所述的方法予以製備，其係藉由以抗PD-L1結合抗體的CH3域的一部分，包含AB、CD及EF環，取代對應的Fcab區域。此等PD-L1模擬mAb²包含LALA突變於CH2域(AA)。已知導入LALA突變於人類IgG1之CH2域會降低Fcγ受體之結合作用(Bruhns, P.，等人(2009)及Hezareh M.，等人(2001))。

【0511】藉由暫時表現於HEK293-6E細胞來生產S22m-063-AA/PD-L1 mAb²及使用mAb Select SuRe蛋白A管柱予以純化。

13.2 抗小鼠CD137/PD-L1 mAb²於小鼠初級OT-1 T細胞活化分析之活性

【0512】需要初級人類T細胞分析以測試抗小鼠CD137/PD-L1 mAb²對於尚未經工程處理以過度表現CD137的細胞之活性。活化的胞毒型$CD8^+$ T細胞負責直接殺死癌細胞且表現CD137於其等之細胞表面上(Ye等人，2014)。已知CD137之簇集對於誘發下游的訊息傳導及進一步$CD8^+$ T細胞活化是不可缺少的。因而用一種CD8+ T細胞活化分析來評估mAb²驅動CD137簇集及隨後的下游訊息傳導的能力。雖然嘗試一模一樣地反映人類$CD8^+$T細胞活化分析，但自初始的C57BL/6或Balb/c脾臟單離的鼠類$CD8^+$ T細胞來並未顯示出此分析要求的活化潛力。因而，發展替代的抗原專一性$CD8^+$ T細胞活化分

析。$CD8^+$ T細胞活化之實行係藉由以單離自C57BL/6 OT-1小鼠、具有對卵白蛋白肽257-264專一的T細胞受體的基因改造OT-1 T細胞(Jackson Laboratory，目錄號003831)予以抗原刺激，以及依IL-2釋放來判定。

【0513】自新鮮的OT-1小鼠脾臟單離脾細胞來單離$CD8^+$ T 細胞。簡言之，自C57BL/6 OT-1小鼠採集每個脾臟且儲存於PBS內然後移至6孔組織培養平盤的孔內並用2根針予以機械破壞。破壞的脾臟通經70μm細胞過濾器且用PBS沖洗過濾器。細胞懸浮液藉由離心使成丸粒，移去上清液，以及遵循製造商的指示、通過添加10 ml 1X紅血球溶解緩衝液(eBioscience, 00-4300-54)溶解紅血球。脾細胞係以每孔$10x10^6$個細胞於含有10nM SIINFEKL胜肽(序列辨識編號：194) InvivoGen，目錄號vac-sin)之T細胞活化培養基(IMDM, 5%FCS, 50μM 2-巯乙醇, 1X Penstrep)平盤培養於6孔平盤內。平盤以5% CO2、於37℃孵育48小時。於48小時之後，藉由使用$CD8^+$ T細胞單離套組(Miltenyi Biotec, 130-104-075)、遵循製造商的指示來單離$CD8^+$ T細胞。所單離及活化的$CD8^+$ T細胞係於增補30U/ml IL-2(Peprotech, AF-200-02)之培養基(IMDM, 5% FCS, 50μM 2-巯乙醇, 1X Penstrep)平盤培養以及以每天分裂方式保持每ml低於$1x10^6$再過3天。於擴增3天之後，細胞接而用於下列分析中。

【0514】孵育B16.F10細胞，其係於IFN-γ存在下培養以誘發PD-L1的表現，且接而用SIINFEKL胜肽予以脈

衝用作為驅動OT-1 T細胞起始活化之第一信號且隨後用於評定抗小鼠CD137/PD-L1 mAb^2 FS22m-063-AA/S70之功效。

【0515】簡言之，B16.F10細胞首先於20 ng/ml鼠類IFN-γ(Peprotech，目錄號AF-315-05-100UG)存在下培養以誘發PD-L1表現。此等細胞接而用500nM SIINFEKL胜肽於37℃孵育一小時然後以每孔1.5 x 10^4個細胞配於100 µl培養基播種於平底96孔平盤。每孔添加配於50µl培養基之2 x 10^4個OT-1細胞至B16.F10細胞。測試抗體(FS22m-063-AA/S70, G1-AA/S70, G1-AA/Lob12.3, FS22m-063-AA/HelD1.3)係以160nM開始(4X終濃度)1:4滴定來製備並添加50µl抗體混合物至各孔於是導致200µl的終分析體積。該分析係於5% CO_2、37℃下孵育歷時3天。於3天之後，收穫上清液並根據製造商的指示來執行mIFN-γ之ELISA(eBioscience，目錄號88-7314-88)。

【0516】如**圖11**及**表23**中所見，抗小鼠CD137/PD-L1 mAb^{2}有最高的效能及0.003 nM之EC_{50}值。此分析表示mAb^{2}由於簇集CD137而導致增高的致效作用及$CD8^+$ T細胞活化而具有強的效能。

表23

分子	類型	EC_{50} (nM)	$E_{最大}$ (pg/ml)
FS22m-063-AA/S70	mAb^2	0.003	23886
G1-AA/S70 + G1-AA/Lob12.3 + 抗 hCH2	陽性對照 mAb 組合	0.02	24703
G1-AA/S70	PD-L1 mAb	0.02	19477
G1-AA/Lob12.3 + 抗 hCH2	CD137 mAb	0.36	17833
FS22m-063-AA/HelD1.3	Mock mAb^2	n/a	3854

N/A意指–不適用因信號太低不允許判定EC_{50}

【0517】已顯示*活體外*活性及活性比陽性抗體對照更優異，希望接著於合適*活體內*同基因小鼠腫瘤模式內測試抗小鼠CD137/PD-L1 mAb^2。

實施例14：抗小鼠CD137/PD-L1 mAb^2之活體內特徵化

14.1 抗小鼠CD137/PD-L1 mAb^2於CT26同基因小鼠腫瘤模式之活性

【0518】已證明FS22m-063 Fcab能於*活體外*驅動CD137的簇集及活化，所以希望測試其於*活體內*活化CD137的能力。

製備呈mAb^2格式之FS22m-063 Fcab用於小鼠活體內測試

【0519】使用**實施例3.2**生產模擬mAb^2相似的方法論來製備含抗小鼠CD137 Fcab，FS22m-063及PD-L1專一的Fab區域之mAb^2且以CT26同基因小鼠腫瘤模式來測試*活體內*抗腫瘤活性。

【0520】對照：G1/Lob12.3，G1-AA/Lob12.3，G1/S70，G1-AA/4420。

【0521】生產*活體內*實驗之對照抗體係藉由連結抗PD-L1抗體S70的可變異重區域(殖株YW243.55.S70來自US 8,217,149 B2)與含LALA突變的人類IgG1(G1m17)恆定區域，以及來自S70抗體的可變異輕區域係經由人類κ J-區域與人類恆定區域(Lm1)連結。使用恆定區域有或沒有LALA突變、呈人類IgG1格式之抗小鼠CD137抗體Lob12.3(Taraban等人，2002)作為抗小鼠CD137陽性對

照抗體。mAb^2係藉由以FS22m-063取代以上所述經改革的建構物之CH3域來產生且稱為‘FS22m-063-AA/S70’。

【0522】同基因小鼠模式被接受為合適用於測試抑制治療標靶之抗腫瘤效應的鼠類系統以及已經廣泛地用於證實人類療法的發展。此實驗使用CT26同基因腫瘤模式，因已知CT26腫瘤為高度免疫性(Lechner等人，2013)以及對於抗CD137抗體單方療法作出部分反應(Kim等人，2009)且表現PD-L1(Kleinovink, 2017)。

【0523】年齡8-10週大且各自稱重為20-25 g之Balb/c雌性小鼠(Charles River)於研究開始休息一週。所有的動物都被切出微缺口且給予獨一無二的識別符號。每群有12隻小鼠。CT26結腸癌細胞株(S.Rosenberg, NIH)初步被擴增、儲存，然後由IDEXX Bioresearch使用IMPACT I程序來預篩選病原體並且顯示為無病原體。各動物於左側接受皮下注射配於100µl DMEM之0.1 x 10^6個細胞。腫瘤細胞接種7天後，從研究中去除在此刻沒有腫瘤的小鼠。

【0524】FS22m-063-AA/S70 mAb^2及對照抗體(G1/Lob12.3、G1-AA/Lob12.3(抗CD137陽性對照)、G1/S70(陽性對照抗PD-L1)、G1-AA/4420(同型對照))係以配於DPBS+1mM精胺酸+0.05吐溫80之每小鼠20 µg(終濃度~1 mg/kg)予以腹膜內注射至小鼠。各小鼠於腫瘤接種後第7、9及11天藉由200 µl腹膜內(IP)注射來接受mAb^2分子或對照抗體或二種對照抗體之組合。進行準確的

腫瘤測量，於討論的合適日子執行任何藥物用劑，以及剩餘的研究期間密切觀察小鼠。用測徑器進行腫瘤體積測量以判定腫瘤的最長軸及最短軸。使用下式來計算腫瘤體積：

$L \times (S^2) / 2$

其中L=最長軸；S=最短軸

【0525】如**圖12**中所示，FS22m-063-AA/S70 mAb^2與一些對照抗體治療的小鼠相比顯示出顯著的腫瘤生長抑制。利用混合模型分析法比較所有組別，在全部研究時間的生長率都顯現出成對統計顯著性。小鼠中無一者顯示出明顯毒性的符號(signed)且所有的治療都是耐受良好的，表示雙專一性靶定CD137及PD-L1不會誘發顯著的毒性。

【0526】所有含有測得等於或低於62.5mm^3腫瘤的動物都算作完全反應的動物(參見**表24**)。在研究的最後28%的G1/Lob12.3(無LALA突變的抗CD137陽性對照)治療的動物視為無腫瘤，而7%的G1-AA/Lob12.3治療的動物(有LALA突變的抗CD137陽性對照)及0%的FS22m-063-AA/S70(抗小鼠CD137 Fcab FS22m-063呈模擬PD-L1 mAb^2格式)治療的小鼠視為無腫瘤。與IgG對照治療的小鼠相比，FS22m-063-AA/S70於CT26同基因腫瘤模式內誘發顯著的腫瘤生長抑制。G1-AA/4420(IgG對照)或G1/S70(PD-L1陽性對照)治療的動物沒有一隻在研究的最後是無腫瘤的。**圖17**中的圖顯示每隻動物隨著時間以mm^3計之腫瘤體積測量。

【0527】**表24**：CT26同基因腫瘤研究於研究最後的

無腫瘤小鼠數目及百分率。

化合物	於研究最後的無腫瘤小鼠
G1-AA/4420	0/13 (0%
G1-AA/Lob12.3	1/14 (7%)
G1/S70	0/14 (0%)
G1/Lob12.3	4/14 (28%)
G1-AA/Lob12.3 + G1/S70	1/14 (7%)
FS22m-063-AA/S70	0/14 (0%)

【0528】研究顯示於具有完全運作的免疫系統的小鼠內，於CT26同基因小鼠腫瘤模式，CD137致效作用，據推測是經由PD-L1交聯的後果，想來是由於腫瘤內CD8+ T細胞的胞毒型活性增高而導致腫瘤生長減少。

【0529】存活分析(**圖18**及**表25**)顯示與同型對照(G1-AA/4420)相比，FS22m-063-AA/S70誘發明顯的存活利益。**表25**顯示以G1-AA/4420(IgG對照)、G1/S70加上G1-AA/Lob12.3之組合及FS22m-063-AA/S70(呈模擬PD-L1 mAb^{2}格式的抗小鼠CD137 Fcab FS22m-063)治療的Balb/c小鼠皮下生長的CT26同基因腫瘤模式內，以天數計的每組中位數存活及成對統計分析(對數秩)之總結。與IgG對照治療的小鼠相比，FS22m-063-AA/S70導致明顯增高的存活。FS22m-063-AA/S70比起G1/S70 + G1-AA/Lob12.3的之組合沒有表現出明顯的存活利益。

【0530】**表25：**以各化合物治療的動物之中位數存活時間。

化合物	中位數存活(天)	P-值對數秩	
FS22m-063-AA/S70	30.5		
G1/S70+G1-AA/Lob12.3	27	0.2235	Ns
G1-AA/4420	26	0.0058	**

【0531】已證明於具有完全運作的免疫系統的小鼠內，於CT26同基因小鼠腫瘤模式，CD137致效作用，據推測是經由PD-L1交聯的後果，想來是由於腫瘤內CD8+ T細胞的胞毒型活性增高而導致腫瘤生長減少，重複該研究加上下列偏差。

【0532】FS22m-063-AA/S70 mAb^2 及對照抗體G1-AA/Lob12.3(陽性對照抗CD137)、G1/S70(陽性對照抗PD-L1)、G1-AA/HelD1.3(同型對照))係以配於DPBS+1mM精胺酸+0.05吐溫80之每小鼠200 μg(終濃度~10 mg/kg)予以腹膜內注射至小鼠。各小鼠於腫瘤接種後第7、9及11天藉由200 μl腹膜內(IP)注射來接受mAb^2分子或對照抗體或二種對照抗體之組合。

【0533】與對照抗體相比，FS22m-063-AA/S70之治療導致顯著的腫瘤生長抑制(如**圖19**之腫瘤體積平均所示)。

【0534】存活分析(**圖20**及**表26**)顯示與同型對照(G1-AA/HelD1.3)及G1/S70相比，FS22m-063-AA/S70誘發明顯的存活利益。比起G1-AA/Lob12.3沒有明顯的存活利益。

【0535】**表26**顯示以G1-AA/HelD1.3(IgG對照)、G1/S70(抗PD-L1陽性對照)、G1-AA/Lob12.3(抗CD137

陽性對照)及FS22m-063-AA/S70(呈模擬PD-L1 mAb²格式之抗小鼠CD137 Fcab FS22m-063)治療的Balb/c小鼠皮下生長的CT26同基因腫瘤模式內，以天數計的每組中位數存活及成對統計分析(對數秩)之總結。與IgG對照治療的小鼠及CD137陽性對照治療的小鼠相比，FS22m-063-AA/S70於CT26同基因腫瘤模式誘發顯著的存活。

【0536】**表26**：CT26同基因腫瘤模式中以天數計的每組中位數存活及成對統計分析(對數秩)之總結。

化合物	**中位數存活(天)**	**P-值對數秩**	
FS22m-063-AA/S70	48.5		
G1/S70	23.5	0.0057	**
G1-AA/Lob12.3	28	0.131	Ns
G1-AA/HelD1.3	27	0.0149	*

14.2 抗小鼠CD137/PD-L1 mAb²於CT26同基因小鼠腫瘤模式之劑量反應活性

劑量反應抗腫瘤活性

【0537】抗小鼠CD137/PD-L1 mAb² FS22m-063-AA/S70以每2天每小鼠20μg的劑量(~1mg//kg)之用劑3次(q2dx3)於CT26同基因腫瘤模式內顯示出抗腫瘤活性。為了研究FS22m-063-AA/S70 mAb²於*活體內*最佳的劑量，所以於CT26模式測試一系列的劑量(2、6、20及200μg/小鼠，等效於大約0.1、0.3、1及10 mg/kg)，其係於腫瘤細胞接種之後7天開始以如以上所述的q2dx3用劑時間表來進行。含括每小鼠200μg(~10

mg/kg)劑量及相同排程的陰性對照抗體G1-AA/4420。含括每小鼠20μg(~1 mg/kg)之次優劑量及相同排程的陽性對照抗體 G1/Lob12.3。

【0538】遵循如**實施例14.1**中所述相同的程序，年齡8-10週大且各自稱重為20-25 g之Balb/c雌性小鼠(Charles River)於研究開始休息一週。所有的動物都被切出微缺口且給予獨一無二的識別符號。每群有12隻小鼠。CT26結腸癌細胞株(ATCC CRL-2638)初步被擴增、儲存，然後由IDEXX Bioresearch使用IMPACT I程序來預篩選病原體並且顯示為無病原體。各動物於左側接受皮下注射配於100μl DMEM之0.1 x 10^5個細胞。腫瘤細胞接種7天後，從研究中去除在此刻沒有腫瘤的小鼠。

【0539】於研究第7天，腹膜內注射依據上述劑量範圍之終濃度的FS22m-063-AA/S70 mAb^2至小鼠。對照抗體(G1/Lob12.3(CD137陽性對照抗體)、G1-AA/4420(同型對照))係以配於DPBS+1mM精胺酸+0.05吐溫80之每小鼠20 μg(~1 mg/kg)及每小鼠200 μg(~10 mg/kg)的終濃度分別腹膜內注射至小鼠。各小鼠於腫瘤接種後第7、9及11天藉由200 μl腹膜內(IP)注射來接受mAb^2分子或對照抗體(q2dx3)。進行準確的腫瘤測量，於討論的合適日子執行任何藥物用劑，以及剩餘的研究期間密切觀察小鼠。如**實施例14.1**中所述用測徑器進行腫瘤體積測量以判定腫瘤的最長軸及最短軸。

【0540】如**圖13A**中所示，與同型對照(G1-AA/4420)

治療的小鼠相比，FS22m-063-AA/S70 mAb^{2}當用劑~0.3 mg/kg高至~10 mg/kg時顯示出顯著的腫瘤生長抑制。顯示利用混合模型分析法比較所有組別之統計顯著性。存活分析，**圖13B**及**表27**，顯示與同型對照相比，FS22m-63-AA/S70 mAb^{2}當用劑位準在0.3 mg/kg以上時會於CT26同基因模式內誘發統計上顯著的存活利益。使用對數秩(Mantel Cox)檢定執行統計顯著性。* P ≤ 0.05；** P ≤ 0.01；*** P ≤ 0.001；**** P ≤ 0.0001。小鼠中無一者顯示出明顯毒性的符號(signed)且所有的治療都是耐受良好的。

表27

治療	中位數存活(天)	統計顯著性(對數秩檢定)			
		FS22m-063-AA/S70			
		10mg/kg	1mg/kg	0.3mg/kg	0.1mg/kg
FS22m-063-AA/S70 10mg/kg	39				
FS22m-063-AA/S70 1mg/kg	29	ns			
FS22m-063-AA/S70 0.3mg/kg	24	***	*		
FS22m-063-AA/S70 0.1mg/kg	21	****	***	**	
G1-AA/4420 10mg/kg	21	****	**	*	ns

NS意指不顯著

【0541】研究顯示於具有完全運作的免疫系統的小鼠內，於CT26同基因小鼠腫瘤模式，CD137致效作用，據推測是經由PD-L1交聯的後果，會導致劑量依賴性腫瘤生長減少及劑量依賴性的存活增高，想來是由於腫瘤內CD8+ T細胞的胞毒型活性增高。

14.3 劑量依賴性的作用機轉

【0542】以如**實施例14.2**中所述、相同的CT26患腫瘤小鼠模式來評估抗小鼠CD137/PD-L1 mAb²的作用機轉。來自四種不同劑量(2、6、20及200μg/小鼠，等效於大約0.1、0.3、1、10 mg/kg)的FS22m-063-AA/S70以及陰性對照抗體G1-AA/4420治療的患CT26腫瘤小鼠的血液、脾臟及腫瘤組織，予以測試的T細胞活化及已知為CD137致效作用之下游效應的增殖指標(Fisher等人，2012)。

【0543】遵循如本實施例中所述之相同的研究程序於第9天(於第一劑48小時之後)、第11天(於第二劑48小時之後)及第15天(於第三且最終劑96小時之後)藉由心臟穿刺採血至含EDTA的管子內，以及透過解剖採集脾臟及腫瘤組織。透過標準的機械及酵素法使脾臟及腫瘤組織崩解成單一細胞懸浮液。紅血球係根據製造商的指示以紅血球溶解緩衝液(eBioscience，目錄號00-4300-54)溶解一次。

【0544】未凝固的血之紅血球係根據製造商的指示以紅血球溶解緩衝液(eBioscience目錄號00-4300-54)溶解二次。

【0545】接著相同地處理全部樣本。接著用PBS清洗細胞一次且以PBS 1:3000稀釋的可固定成活力染色劑(Invitrogen，目錄號65-0865-14)遵循製造商的指示染色樣本。於Fc阻斷物(block)(eBioscience目錄號14-0161-86，以1:50)存在下、用抗體染色組(全部但沒有Ki67及FoxP3抗體)(以下**表28**)於4 ℃下染色細胞30分鐘

用於細胞表面標記的流動式細胞測量術。接著用eBioscience Foxp3染色套組(eBioscience目錄號00-5523-00)根據製造商的指示來使細胞固定及通透(permeabilized)。使細胞再懸浮於存在有Fc阻斷物、具有Ki67和Foxp3的抗體(全部都以1:100稀釋)之100 μl通透(permeabilization)緩衝液內且於室溫下在黑暗中孵育30分鐘。接著用通透緩衝液清洗細胞一次且再懸浮於200 μl PBS+0.5% BSA內。接著以BD Fortessa流式細胞儀分析細胞。以FlowJoX、Excel及GraphPad Prism來分析數據。繪製的數據代表T細胞豐度以及隨時間觀察到的$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞亞族群之增殖。數據係以根據Y軸的族群說明表示為親代族群百分率。

【0546】如**圖14B**中所示，於腫瘤及末梢二者的$CD8^+$:$CD4^+$百分率比率偏向$CD8^+$ T細胞增高，符合抗小鼠CD137/PD-L1 mAb^2增高的劑量，表示治療造成二種T細胞亞族群平衡偏移很可能是因為$CD8^+$ T細胞數目增高。第15天$CD8^+$T細胞上之增殖指標的增高符合治療劑量位準且最高的增殖見於最高的劑量位準。此將表示增殖的$CD8^+$ T細胞是活化的徵象以及導致$CD8^+$ T細胞數目增高而造成$CD8^+$:$CD4^+$ T細胞比率增高。

【0547】總的來說，此研究已顯示增高抗小鼠CD137/PD-L1的劑量位準導致腫瘤內更多的$CD8^+$ T細胞。$CD8^+$ T細胞(通常亦稱為胞毒型淋巴細胞)的主要角色是經由3種主要的機轉殺死感染或惡性的細胞：1)釋放細

胞介素如TNFα和IFN-γ，2)生產及釋放細胞毒性顆粒以及3)表現FasL。抗小鼠CD137/PD-L1治療後於腫瘤內存在更多$CD8^+$ T細胞據推測是導致經由此等的機轉對抗腫瘤之細胞毒性活性，導致腫瘤控制。

表28

標靶	抗體殖株	螢光團	公司	目錄號
CD45	30-F11	AF700	eBioscience	56-0451-82
CD3	145-2C11	PECy7	eBioscience	25-0031-82
$CD4^+$	RM4-5	BUV395	BD Biosciences	740208
$CD8^+$	53-6.7	BUV737	BD Biosciences	564297
FoxP3	Fjk-16S	PerCP-Cy5.5	Invitrogen	45-5773-82
CD44	IM7	BV650	BioLegend	103049
CD62L	MEL-14	Bv421	BioLegend	104435
CD69	H1.2F3	Bv510	BioLegend	104532
Ki67	16A8	647	BioLegend	652407
PD-L1	10F.9G2	Bv785	BioLegend	124331
IgG	MK1A6	FITC	Bio-Rad	MCA647F
成活力	n/a	780	Invitrogen	65-0865-14

n/a意指不適用

14.4 抗小鼠CD137/PD-L1 mAb^2於MC38同基因小鼠腫瘤模式之活性

【0548】同基因小鼠模式被接受為合適用於測試抑制治療標靶之抗腫瘤效應的鼠類系統以及已經廣泛地用於證實人類療法的發展。此實驗使用MC38同基因腫瘤模式，因已知MC38腫瘤為高度免疫性以及對於抗CD137抗體單方療法作出反應(Kocak等人，2006)且表現PD-L1(Juneja等人，2017)。

【0549】年齡9-10週大且各自稱重為18至24 g之C57BL/6雌性小鼠(The Jackson Laboratory)於研究開始

休息一週。所有的動物都被切出微缺口且給予獨一無二的識別符號。每群有12隻小鼠。MC38結腸癌細胞株(National Cancer Institute, USA)初步被擴增、儲存，然後預篩選病原體並且顯示為無病原體。各動物於右側接受皮下注射配於100μl無血清培養基(改良杜氏依格氏培養基(Dulbecco's Modified Eagle Medium))之1 x 10^6個細胞。腫瘤細胞接種7天後，從研究中去除在此刻沒有腫瘤的小鼠。

【0550】FS22m-063-AA/S70 mAb^2及對照抗體(G1-AA/Lob12.3(CD137陽性對照)、G1-AA/S70(陽性對照PD-L1)、G1-AA/4420(同型對照))係以配於DPBS+1mM精胺酸+0.05吐溫80之每劑量20 μg的固定濃度腹膜內注射至小鼠。各小鼠於腫瘤接種後第7、9及11天藉由200 μl腹膜內(IP)注射來接受mAb^2分子或對照抗體。進行準確的腫瘤測量，於討論的合適日子執行任何藥物用劑，以及剩餘的研究期間密切觀察小鼠。用測徑器進行腫瘤體積測量以判定腫瘤的最長軸及最短軸。使用下式來計算腫瘤體積：

$L \times (S^2) / 2$

其中L=最長軸；S=最短軸

【0551】如**圖15**中所示，FS22m-063-AA/S70 mAb^2與任一對照抗體治療的小鼠相比顯示出顯著的腫瘤生長抑制。利用混合模型分析法比較所有組別，在全部研究時間的生長率都顯現出成對統計顯著性。如**表29**中所示，出乎

意料地所有FS22m-063-AA/S70 mAb^{2}治療的小鼠在研究的最後都是無腫瘤的，與抗PD-L1及抗CD137抗體之組合(G1-AA/S70 + G1-AA/Lob12.3)治療的12隻小鼠中只有4隻或是PD-L1或CD137抗體單獨相比。**圖21**中的圖顯示每隻動物隨著時間以mm^{3}計之腫瘤體積測量。

表29

組別	無腫瘤小鼠%	無腫瘤小鼠的數目
G1-AA/Lob12.3	16%	2/12
G1-AA/4420	0%	0/12
G1-AA/S70	16%	2/12
G1-AA/S70+G1-AA/Lob12.3	33%	4/12
FS22m-063-AA/S70	100%	12/12

【0552】研究顯示於具有完全運作的免疫系統，第二種同基因腫瘤模式，MC38小鼠內，其對1 mg/kg的PD-L1 mAb顯示出次優反應，令人驚訝地，1 mg/kg的CD137/PD-L1 mAb^{2}誘發100 %治療的小鼠完全的腫瘤退化。

【0553】存活分析(**圖22**及**表30**)顯示以3次劑量的G1-AA/4420(同型對照)、G1-AA/S70(抗PD-L1陽性對照)、G1-AA/Lob12.3(抗CD137陽性對照)、G1-AA/S70加上G1-AA/Lob12.3之組合，以及FS22m-063-AA/S70(呈模擬PD-L1 mAb^{2}格式的抗小鼠CD137 Fcab FS22m-063)治療的各組別以天數計的中位數存活之總結。**表30**亦顯示成對統計分析(對數秩)。FS22m-063-AA/S70於MC38同基因腫瘤模式誘發完全的存活，且動物在研究的最後100%存活(標示‘未定義的’)，與IgG對照治療的小鼠相比。

表30：MC38腫瘤模式之中位數存活

化合物	中位數存活	P-值對數秩	
FS22m-063-AA/S70	未定義的		
G1-AA/S70+G1-AA/Lob12.3	33.5	0.0006	***
G1-AA/Lob12.3	25	0.0001	***
G1-AA/S70	28	<0.0001	****
G1-AA/4420	20	<0.0001	****

14.5 抗小鼠CD137/PD-L1 mAb²於B16.F10同基因小鼠腫瘤模式之活性

【0554】使用B16.F10同基因腫瘤模式來測試抗小鼠CD137/PD-L1 mAb²(FS22m-063-AA/S70)之*活體內*抗腫瘤活性。此模式被視為對治療抗體治療更具挑戰性的(Baird, J. R.，等人，2013)。研究中使用抗體G1-AA/4420作為同型對照。以前沒有證實過B16.F10同基因腫瘤模式對CD137促效劑抗體敏感。然而，從B16.F10腫瘤單離的腫瘤浸潤型淋巴細胞(TILs)表現CD137(Curran. M.,等人，2013)。

【0555】年齡8-10週大且各自稱重為20-25 g之C57BL/6雌性小鼠(Charles River)於研究開始適應新環境一週。所有的動物都被切出微缺口且給予獨一無二的識別符號。每群有10隻小鼠。B16.F10黑色素瘤細胞株(ATCC目錄號CRL-6475)初步被擴增、儲存，然後由IDEXX Bioresearch使用IMPACT I程序來預篩選病原體並且顯示為無病原體。自-150 ℃儲存解凍B16.F10細胞且添加至含10% FCS(Gibco, 10270-106)之20 ml DMEM(Gibco, 61965-026)的T175組織培養燒瓶內。各

動物於左側接受皮下注射1x10^{6}個細胞。

【0556】配於200 μl PBS之每種抗體20 μg注射至小鼠(~1 mg/kg)內。各小鼠於腫瘤細胞接種後第7天開始，每2天藉由腹膜內(IP)注射來接受3次劑量的抗體。用測徑器來測量以判定腫瘤體積(如**實施例14.1**中所述)且於討論的合適日子執行任何藥物用劑，以及剩餘的試驗期間密切觀察小鼠。如**實施例14.1**中所述來計算腫瘤體積。

【0557】根據腫瘤體積及狀況、於到達人道終點時停止試驗。利用混合模型分析法來成對進行研究全部時間的生長率之統計分析。

【0558】與同型對照抗體G1-AA/4420相比，抗小鼠CD137/PD-L1 mAb^{2}有使腫瘤生長率明顯變慢(**圖16**)。與IgG對照治療的小鼠相比，FS22m-063-AA/S70於B16.F10同基因腫瘤模式誘發部分的腫瘤生長抑制。**圖23**中的圖顯示每隻動物隨著時間以mm^{3}計之腫瘤體積測量。

【0559】存活分析(**表31**)顯示以G1-AA/4420(同型對照)及抗小鼠CD137/PD-L1 mAb^2 FS22m-063-AA/S70治療的C57BL/6小鼠皮下生長的B16.F10同基因腫瘤模式內，以天數計的每組中位數存活及成對統計分析(對數秩)之總結。與IgG對照治療的小鼠相比，FS22m-063-AA/S70於B16.F10同基因腫瘤模式誘發增高的存活。

表31：B16.F10同基因腫瘤模式之中位數存活

化合物	中位數存活(天)	P-值 對數秩
FS22m-063-AA/S70	23.5	n/a
G1-AA/4420	19	n/a

【0560】此研究顯示於具有完全運作的免疫系統的小鼠內，眾所周知難以治療的B16.F10同基因小鼠腫瘤模式內，CD137致效作用，據推測是經由PD-L1交聯的後果，想來是由於腫瘤內CD8+ T細胞的胞毒型活性增高而導致腫瘤生長減少。

14.6 CT26同基因小鼠腫瘤模式中抗小鼠CD137/PD-L1 mAb²的肝臟藥理學

【0561】在研究性臨床實驗中對實性腫瘤患者的抗CD137 mAb與烏瑞魯單抗之治療已經造成了嚴重的治療相關免疫反應事件，該等事件已被證明與投予的烏瑞魯單之劑量有關。該等免疫反應事件的效果在肝臟中是以嚴重的肝毒性顯示出來(Segal, N. H.等人，2017)。

【0562】在以CD137促效劑工具抗體用劑的動物之小鼠中所進行的臨床前機轉研究已經證明類似的肝毒性。此等研究顯示在形成的肝毒性中T細胞和CD137之必須性(Niu, L.等人之2007和Dubrot J.等人之2010)。雖然未能充分理解，但骨髓和T細胞隔室間的相互作用已被證明對起始發炎級聯而導致肝臟損傷和肝毒性是重要的(Bartkowiak, T等人之2018)。因而，此等動物模式在用於臨床上預測其他CD137促效劑且特別是CD137/PD-L1 mAb²投予後的人類患者肝毒性(hepatotoxicity)的風險，有平移相關性(translational relevance)。

【0563】描述於**實施例14.1**中的CT26同源腫瘤研究之小鼠在以FS22m-063-AA/S70 mAb^{2}重複用劑後沒有顯示出明顯的毒性徵兆，FS22m-063-AA/S70 mAb^{2}在PD-L1交聯時有CD137促效能力。為了測定在此等動物中以約1 mg/kg的FS22m-063-AA/S70 mAb^2(其與抗腫瘤免疫活性有關聯)進行治療後所觀察的免疫活化是否與肝毒性相關，於屍體解剖時取得肝臟樣本以進行組織切片評估。FS22m-063-AA/S70 mAb^{2}與對照小鼠於最後投予後的第4、7、和14天進行屍體解剖(每個時間點每組三隻小鼠)，然後對肝臟樣本進行福馬林固定及石蠟包埋。肝臟切片繼而經切割並以蘇木精(hematoxilin)和伊紅(eosin)染色並由一個合格的病理學家對肝臟發炎和損傷的參數評分以進行組織病理學評估。組織製備和經由蘇木精和伊紅進行組織病理學染色的方法已是高度標準化並於所屬技藝中是已知的。

【0564】一評分系統是用於評估蘇木精和伊紅染色切片的肝臟病理學。肝臟是以對應於下列的病理學來評分：肝細胞壞死、門脈區發炎(portal tract inflammation)、變性肝細胞和增加有絲分裂。每組小鼠顯示最小、輕微、中度和顯著效果的次數列於**表32**中。

【0565】經FS22m-063-AA/S70 mAb^{2}治療的動物有最小的肝臟病理學。明確來說：

•最小至輕微的肝細胞壞死並伴隨混合的淋巴細胞浸潤至肝實質(parenchyma)中

•最小至輕微的混合發炎細胞於門脈周圍區(periportal tract)

•最小的變性肝細胞

•最小至顯著增加的有絲分裂

表32：肝臟測定結果

肝臟	G1/4420(同型對照)			FS22m-063-AA/S70		
	第 4 天	第 7 天	第 14 天	第 4 天	第 7 天	第 14 天
肝細胞壞死、變性伴隨混合發炎細胞(肝實質)						
最小	3	3	3	2	2	3
輕微	0	0	0	1	1	0
門脈區中的混合發炎細胞 (+/- SCN)						
最小	1	0	0	1	3	3
輕微	0	0	0	1	0	0
變性肝細胞						
最小	0	0	0	0	0	0
增加有絲分裂						
最小	1	1	1	2	2	3
輕微	1	0	1	1	0	0
中度	0	0	0	0	0	0
顯著	0	0	0	0	0	0

【0566】此等發現不被視為代表嚴重的肝毒性，如其他抗CD137促效劑抗體實施例觀察到的。

【0567】考量到對經CD137促效劑治療的人類患者進行嚴重的肝毒性風險評估所需的小鼠臨床前研究其相關性，此等結果指出藉由PD-L1結合所媒介的交聯而致效CD137的mAb^{2}對於以治療劑量治療的人類患者中誘發肝毒性的風險是低的。

14.7 在CT26同基因小鼠腫瘤模式中抗小鼠CD137/PD-L1 mAb^{2}的腫瘤和末梢受體佔有及藥效動力學

效果

【0568】在**實施例14.3**中，抗小鼠CD137-PD-L1 mAb^2 FS22m-063-AA/S70在多次劑量後展現出在腫瘤中增加CD8$^+$ T細胞的能力。為了研究在T細胞上標靶結合的程度、PD-L1阻斷和FS22m-063-AA/S70在T細胞增殖上的效果，單次劑量藥效動力學研究於與**實施例14.1**中所述相同的CT26同基因腫瘤模式中進行。

【0569】使用抗體G1-AA/4420作為對照。*活體內*實驗所用的抗小鼠CD137/PD-L1 mAb^{2}和對照抗體係如**實施例14.1**中所述來製備。

【0570】按照如**實施例14.1**中所述相同的操作程序，8至10週大且各自稱重為20-25g的雌性Balb/c小鼠(Charles River)在研究開始前休息一週。所有的動物都被切出微缺口且給予獨一無二的識別符號。此研究包含三個用劑組，其在8個時間點(2h、6h、24h、48h、72h、96h、120h、192)接受兩種劑量之一的對照抗體或是mAb^2。每用劑群有64隻小鼠(每個時間點8隻小鼠)。CT26結腸癌細胞株(S.Rosenberg, NIH)初步被擴增、儲存，然後由IDEXX Bioresearch使用IMPACT I程序來預篩選病原體並且顯示為無病原體。各動物於左側接受皮下注射配於100 µl DMEM的1x10^{5}個細胞。腫瘤細胞接種7天後，從研究中去除在此刻沒有腫瘤的小鼠。

【0571】在腫瘤接種後的第11天，每隻小鼠藉由100 µl的靜脈(IV)注射液接收測試樣本。對於接受mAb^{2}的組

別，FS22m-063-AA/S70 mAb²以每隻小鼠20 μg或200 μg的劑量(最終濃度分別為約1 mg/kg和約10 mg/kg)靜脈注射至小鼠，以及對於接受對照抗體的組別，G1-AA/4420(同型對照)係以配於DPBS+1mM精胺酸+0.05吐溫80之每小鼠200 μg的量(最終濃度為約10 mg/kg)靜脈注射至小鼠。

【0572】抗小鼠CD137/PD-L1 mAb²用劑後的腫瘤和末梢血液受體銜接作用及藥效動力學反應受到評估。對FS22m-063-AA/S70(抗mCD137/PD-L1 mAb²)各劑量治療以及陰性對照抗體G1-AA/4420治療的患CT26腫瘤小鼠之腫瘤組織和血液進行測試以測定抗小鼠CD137/PD-L1 mAb²結合的陽性T細胞、T細胞增殖以及未與抗小鼠CD137/PD-L1 mAb²結合的自由PD-L1。也評估CD137總表現量。

【0573】藉由尾巴靜脈放血來收集血液(100μl)至EDTA塗覆的毛細管，並且根據製造商的指示以紅血球溶解緩衝液(eBioscience目錄號00-4300-54)溶解二次。

【0574】透過解剖採集腫瘤組織並以標準的機械及酵素法使腫瘤組織崩解成單一細胞懸浮液。任何在崩解的腫瘤組織中殘存的紅血球細胞係根據製造商的指示以紅血球溶解緩衝液(eBioscience，目錄號00-4300-54)溶解一次。

【0575】用PBS清洗細胞一次且以PBS 1:3000稀釋的可固定成活力染色劑(Invitrogen，目錄號65-0865-14)

遵循製造商的指示染色樣本。於Fc阻斷物(eBioscience目錄號14-0161-86，以1:50)存在下、用抗體染色組(全部但沒有Ki67及FoxP3抗體) (以下**表33**)於4 ℃下染色細胞30分鐘用於細胞表面標記的流動式細胞測量術。接著用eBioscience Foxp3染色套組(eBioscience目錄號00-5523-00)根據製造商的指示來使細胞固定及通透。使細胞再懸浮於存在有Fc阻斷物、具有Ki67和Foxp3的抗體之100 µl通透緩衝液內以及於室溫下在黑暗中孵育30分鐘。接著用通透緩衝液清洗細胞一次且再懸浮於200 µl PBS + 0.5% BSA內。接著以BD Fortessa流式細胞儀分析細胞。以FlowJoX、Excel及GraphPad Prism來分析數據。

【0576】**圖24**顯示從血液或腫瘤單離出來的$CD4^+$ 和$CD8^+$ T細胞之百分率，該等T細胞對於樣本中與mCD137/PD-L1 mAb^2結合的抗IgG抗體呈陽性。如**圖24**所示，該等T細胞最快在靜脈投予後的2小時對於結合的抗mCD137/PD-L1 mAb^2呈現陽性。對於結合耐久性來說係有劑量依賴的相關性，因為以1 mg/kg的劑量投予後從血液和腫瘤單離出來的T細胞上在第96小時不再偵測到抗mCD137/PD-L1 mAb^2，然而以10 mg/kg的劑量投予後在第120小時和第192小時之間仍能偵測到抗mCD137/PD-L1 mAb^2。如所預期，針對對照抗體觀察到最小的背景染色。對抗mCD137/PD-L1 mAb^2呈現陽性、的從腫瘤單離出來之T細胞族群在一開始於比從血液單離出來的T細胞更大。上述可以指示標靶表現量，不管是

CD137或PD-L1，在從腫瘤單離出來之T細胞上是較高的，因此抗mCD137/PD-L1相較於血液中的T細胞來說其對於腫瘤的標靶是較有效率的。

【0577】**圖25**顯示Ki67被測得為在從血液和腫瘤單離出來的$CD4^+$和 $CD8^+$ T細胞上的T細胞增殖標記。如**圖25**所指出，當與對照抗體比較，抗mCD137/PD-L1 mAb^2造成象徵藥效動力學反應的Ki67陽性的末梢血液T細胞頻率增加，亦即，在兩個測試的劑量位準上，兩個標靶如增殖反應所示在一些時間點會或已經銜接而造成T細胞活化。由於腫瘤浸潤T細胞是暴露在發炎環境，從腫瘤單離出來的T細胞族群展現出較高頻率的Ki67陽性的增殖T細胞。對比下，血液中Ki67陽性的T細胞之基線頻率是相當低的。$CD4^+$和$CD8^+$ T細胞兩者似乎都對抗mCD137/PD-L1治療起反應，顯示出兩種細胞種類上的CD137皆被mAb^2銜接並藉由與PD-L1結合而簇集在一起，以導致CD137訊息傳導和T細胞活化而造成增殖的增加。該效果對於$CD8^+$ T細胞似乎更強，其與下述一致：$CD8^+$ T細胞相對於$CD4^+$ T細胞表現出更高的CD137位準。此等數據暗示1 mg/kg會達到最大效果，雖然反應的持久性在10 mg/kg劑量時是較佳的，其可能與下述相關：在較高劑量位準時有較延長的受體佔有因此在標靶銜接上較長。受體佔有較延長時，PD反應會較佳。在腫瘤中，T細胞已經是高度增殖的，且觀察到在$CD4^+$和$CD8^+$ T細胞兩者上隨時間之增殖強度有劑量相關之增加。

【0578】從對照抗體G1-AA/4420治療的小鼠所得之樣本摻雜100 nM的抗mCD137/PD-L1 mAb^{2}且作為100% PD-L1受體銜接的對照。此係由競爭的抗mPD-L1抗體(殖株10F.9G2，參見表**33**)其結合的缺少所證明。於研究的全程時，從抗mCD137/PD-L1治療的小鼠之腫瘤和血液所得之樣本顯示出在10mg/kg劑量時幾乎完全的PD-L1阻斷，如**圖26**中所示以100% PD-L1受體佔有來代表。從1mg/kg的抗mCD137/PD-L1治療的小鼠所得到之樣本中，存在於血液和腫瘤中的T細胞上之PD-L1受體銜接於大約72小時後會減少，血液中存在的T細胞上之PD-L1受體銜接減少速度遠快於在腫瘤存在的T細胞上者。此數據指出腫瘤專一性PD-L1阻斷具有抑制PD-1/PD-L1軸線以及保留抗-mCD137/PD-L1 mAb^{2}在腫瘤中比在血液中的時間更長這兩種優點，其被預期可讓藥物的完整效果在腫瘤中可持續，同時限制末梢的標靶效果。

【0579】整體而言，此研究證實增加抗小鼠CD137/PD-L1的劑量導致腫瘤中CD8$^+$與CD4$^+$ T細胞的活化與增殖，如量測mAb^{2}所結合之細胞的數目、透過mAb^{2}銜接PD-L1受體以及增加作為增殖標記之Ki67的表現。亦在末梢血液中觀察到經活化及增殖的CD8$^+$與CD4$^+$細胞，此充當抗小鼠CD137/PD-L1誘發之活性的進一步標記。此劑量依賴的T細胞活化支持先前在**實施例14**中所觀察到，當投予抗小鼠CD137/PD-L1時的腫瘤生長抑制作用。

【0580】CD8$^+$ T細胞(通常亦稱為胞毒型淋巴細胞)

的主要角色是經由3種主要的機轉殺死感染或惡性的細胞：1)釋放細胞介素(如TNFα和IFN-γ)，2)生產及釋放細胞毒性顆粒以及3)表現FasL配體。抗小鼠CD137/PD-L1治療後於腫瘤內存在更多$CD8^+$ T細胞預期經由此等機轉致使細胞毒性活性來對抗腫瘤，導致腫瘤控制。儘管$CD8^+$ T細胞是負責腫瘤細胞毒殺的主要T細胞，$CD4^+$ T細胞在後天性免疫上扮演重要角色，藉由辨識由MHC II類分子所呈現的胜肽而成為活化的並且生成IFN-γ與TNFα，這兩者都媒介保護使受腫瘤所害(Zanetti, 2015, JI, 2015)。

表33

標靶	抗體殖株	螢光團	公司	目錄號
CD45	30-F11	AF700	eBioscience	56-0451-82
CD3	145-2C11	BUV737	BD Biosciences	564618
CD4	RM4-5	Bv786	BD Biosciences	563727
CD8	53-6.7	BUV395	BD Biosciences	563786
FoxP3	Fjk-16S	PerCP-Cy5.5	Invitrogen	45-5773-82
CD4+4	IM7	BV650	BioLegend	103049
CD62L	MEL-14	Bv421	BioLegend	104435
CD137	17B5	PE	BioLegend	106105
Ki67	16A8	PE-Cy7	BioLegend	652426
PD-L1	10F.9G2	Bv605	BioLegend	124321
IgG	MK1A6	FITC	Bio-Rad	MCA647F
成活力	n/a	e780	Invitrogen	65-0865-14

n/a意指不適用

實施例15：抗人類CD137/PD-L1 mAb^2在小鼠中的藥物動力學

【0581】為了決定抗CD137/PD-L1 mAb^2在小鼠中的藥物動力學，C57BL/6雌性小鼠(參見實施例**14.4**)但不具有MC38腫瘤，亦即無腫瘤小鼠，以4種劑量(25mg/kg、10mg/kg、3mg/kg及1mg/kg)、100 μl抗CD137/PD-L1

mAb²予以投予且監測歷時384小時。

【0582】大約20 µl全血的微抽樣是在2、6、24、48、96及384小時執行，並且予以處理以單離出大約5µl的血清。使用Gyros Protein Technologies之Gyrolab xPlore系統來測量每一時間點存在的抗-CD137/PD-L1 mAb²的量。執行一種三明治分析，其係使用Gyrolab Bioaffy 1000 CD(產品編號P0004253)加上生物素化的山羊抗人類IgG-(重與輕鏈)猴吸附抗体(Cambridge Bioscience產品編號A80-319B)作為捕捉抗體以及山羊抗人類IgG-AlexaFluor® 647(Cambridge Bioscience產品編號2040-31)作為偵測抗體。使用範圍為8000-0.07 ng/ml所產生之標準曲線來決定樣本濃度，樣本視需要以Rexxip AN緩衝液(Gyros產品編號P0004994)進行稀釋。其他緩衝液是根據製造商的建議來使用。將來自個別小鼠在每一時間點(每時間點三隻小鼠)的平均樣本濃度進行作圖(**圖27**)。

【0583】**圖27**顯示抗CD137/PD-L1 mAb²的藥物動力學，此證實該mAb²在小鼠中具有可相比於標準的人類IgG之末端清除(Bergman等人，1998)。

實施例16：抗人類CD137/PD-L1 mAb²在食蟹獼猴中的藥物動力學/藥效學反應以及耐受性

【0584】進行一初步劑量範圍調查研究以評估抗人類CD137/PD-L2 mAb²在食蟹獼猴中的藥物動力學/藥效學(PK/PD)反應以及耐受性。簡言之，將該

FS22-172-003-AA/E12v2 mAb²以單一劑量或以重複劑量經由靜脈內(IV)滴注灌注投予至食蟹獼猴。評價標準毒理學參數諸如體重、食物消耗、臨床觀測、血液學以及血液化學，供用於評估在該研究期間的耐受性。

【0585】該FS22-172-003-AA/E12v2 mAb²具有大約6天的末端半衰期(terminal half-life)且大體來說良好地被耐受高達每週用劑30 mg/kg，如由臨床化學與組織病理學結果所決定)。在第一天於所有動物中觀察到增加的血清sPD-L1位準(直接標靶銜接與細胞活化的指徵)，且在灌注結束之後168小時達到高峰，在此之後位準下降，與該FS22-172-003-AA/E12v2 mAb²的全身性位準下降一致。

【0586】與評估抗小鼠CD137/PD-L1 mAb²在同基因小鼠腫瘤模式中的PD反應之研究的發現(**實施例15**)一致，於$CD4^+$與$CD8^+$中央記憶與效應子記憶T細胞觀察到與藥物有關之細胞增殖與活化上的增加，其是透過Ki67表現之增加所量測。類似的動力學亦在NK細胞觀察到，且在$CD4^+$調節性T細胞($CD4^+$ $FoxP3^+$)的相對百分率與絕對計數上有中等但短暫的增加。

【0587】綜合此等結果強烈地指明，該抗人類FS22-172-003-AA/E12v2 mAb²在食蟹獼猴具有有效力的*活體內*藥理活性，且亦良好地耐受高達30 mg/kg。此外，所產生的PK/PD數據是與替代分子(FS22m-063-AA/S70)數據相符，強化在臨床環境中使用FS22-172-003-AA/E12v2 mAb²的理念。

【0588】序列表

E12v2 mAb之CDR胺基酸序列 (Kabat)

VH CDR1 – SYGIS (序列辨識編號：**1**)

VH CDR2–WISAYSGGTNYAQKLQG(序列辨識編號：**2**)

VH CDR3 – DLFPTIFGVSYYYY (序列辨識編號：**3**)

VL CDR1 – RASQSIGNRLA (序列辨識編號：**4**)

VL CDR2 – EASTSET (序列辨識編號：**5**)

VL CDR3 – QQSYSTPYT (序列辨識編號：**6**)

E12v2之CDR胺基酸序列 (IMGT)

VH CDR1 – GYPFTSYG (序列辨識編號：**7**)

VH CDR2 – ISAYSGGT (序列辨識編號：**8**)

VH CDR3 – ARDLFPTIFGVSYYYY (序列辨識編號：**9**)

VL CDR1 – QSIGNR (序列辨識編號：**10**)

VL CDR2 – EAS (序列辨識編號：**11**)

VL CDR3 – QQSYSTPYT (序列辨識編號：**6**)

E12v2 mAb的VH域核酸序列 (序列辨識編號：**12**)

IMGT CDRs(粗斜體)；Kabat CDRs(斜體及劃底線)。

*EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKAS**GYPFTSYGIS**WVR*

*QAPGQGLEWMG**WISAYSGGT**NYAQKLQGRVTMTTDT*

*STSTAYMELRSLRSDDTAVYYC**ARDLFPTIFGVSYYYY***

WGQGTLVTVSS

E12v2 mAb的VH域核酸序列 (序列辨識編號：**13**)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCA

AGAGGCCTGGAGCGTCCGTGAAGGTGTCCTGCAA

AGCCTCAGGATACCCCTTCACTTCGTACGGGATTT

CCTGGGTCCGCCAAGCACCGGGTCAAGGCTTGGA

GTGGATGGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGA

ACCAACTACGCTCAAAAGCTGCAGGGTCGCGTGA

CCATGACCACCGATACCTCCACCTCAACGGCCTAC

ATGGAACTGAGATCTCTGCGGAGCGACGACACTG

CCGTGTACTACTGTGCCCGGGACCTGTTCCCCACT

ATCTTCGGAGTGTCGTACTACTACTACTGGGGCCA

GGGGACTCTCGTGACCGTGTCGAGC

E12v2 mAb的VL域胺基酸序列 (序列辨識編號：**14**)

IMGT CDRs(粗斜體)；Kabat CDRs(斜體及劃底線)。

DIQMTQSPSTLSASVRDRVIITC<u>*RAS**QSIGNR**LA*</u>*WYQH*

KPGKAPKLLIY<u>***EAS**TSET*</u>*GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS*

LQPEDFATYYC<u>***QQSYSTPYT***</u>*FGQGTKLEIK*

E12v2 mAb的VL域核酸序列 (序列辨識編號：**15**)

GACATCCAGATGACGCAGAGCCCGTCTACCCTGT

CCGCCTCCGTGAGAGATCGCGTGATCATCACCTGT

CGGGCCAGCCAGTCCATCGGAAACCGCTTGGCGT

GGTACCAGCACAAGCCTGGGAAGGCTCCGAAGCT

GCTCATCTACGAAGCCTCGACTTCGGAGACTGGT

GTCCCTAGCCGGTTCAGCGGATCGGGATCAGGGA

CCGATTTCACTCTGACCATTTCCTCCCTGCAACCC

GAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAACAGTCAT

ATTCCACCCCGTACACCTTCGGACAAGGCACCAA

GCTCGAAATCAAG

G1-AA/E12v2 mAb之重鏈胺基酸序列(有LALA) (序列辨識編號：**16**)

VH域(斜體)；IMGT CDRs(粗體及斜體)；Kabat CDRs(斜體及劃底線)；LALA突變(粗體及劃底線)

*EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKAS**GYPFTSYG**ISWVR*

*QAPGQGLEWMG**WISAYSGGT**NYAQKLQG**RVTMTTDT*

*STSTAYMELRSLRSDDTAVYYC**ARDLFPTIFGVSYYYY***

*WGQGTLVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG

CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL

YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

EPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTL

MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN

AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK

CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE

LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK

TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV

MHEALHNHYTQKSLSLSPG

G1-AA/E12v2 mAb之輕鏈胺基酸序列 (序列辨識編號：**17**)

VH域(斜體)；IMGT CDRs(粗體及斜體)；Kabat CDRs(斜體及劃底線)；

*DIQMTQSPSTLSASVRDRVIITC**RASQSIGNR**LAWYQH*

*KPGKAPKLLIY**EAS**TSETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS*

*LQPEDFATYYC**QQSYSTPYT**FGQGTKLEIK*RTVAAPS

VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV

DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY

EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

E05v2 mAb之CDR胺基酸序列 (Kabat)

VH CDR1 – SYGIS (序列辨識編號：**1**)

VH CDR2–WISAYSGGTNYAQKLQG(序列辨識編號：**2**)

VH CDR3 – DLFPTIFGVSYYYY (序列辨識編號：**3**)

VL CDR1 – RASQSISGRLA (序列辨識編號：**18**)

VL CDR2 – EASNLES (序列辨識編號：**19**)

VL CDR3 – QQSYSTPRVT (序列辨識編號：**20**)

E05v2之CDR胺基酸序列 (IMGT)

VH CDR1 – GYTFTSYG (序列辨識編號：**21**)

VH CDR2 – ISAYSGGT (序列辨識編號：**8**)

VH CDR3 – ARDLFPTIFGVSYYYY (序列辨識編號：**9**)

VL CDR1 – QSISGR (序列辨識編號：**22**)

VL CDR2 – EAS (序列辨識編號：**11**)

VL CDR3 – QQSYSTPRVT (序列辨識編號：**20**)

E05v2 mAb的VH域胺基酸序列 (序列辨識編號：**23**)

IMGT CDRs(粗體及斜體)；Kabat CDRs(斜體及劃底線)；

*EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKAS**GYTFT**__**SYG**__IS*WVR

*QAPGQGLEWMG**WISAYSGGT**__NYAQKLQG__RVTMTTDT*

*STSTAYMELRSLRSDDTAVYYC**AR**__**DLFPTIFGVSYYYY**__*

WGQGTLVTVSS

E05v2 mAb的VH域核酸序列 (序列辨識編號：**24**)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCA

AGAGGCCTGGAGCGTCCGTGAAGGTGTCCTGCAA

AGCCTCAGGATACACCTTCACTTCGTACGGGATTT

CCTGGGTCCGCCAAGCACCGGGTCAAGGCTTGGA

GTGGATGGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGA

ACCAACTACGCTCAAAAGCTGCAGGGTCGCGTGA

CCATGACCACCGATACCTCCACCTCAACGGCCTAC

ATGGAACTGAGATCTCTGCGGAGCGACGACACTG

CCGTGTACTACTGTGCCCGGGACCTGTTCCCCACT

ATCTTCGGAGTGTCGTACTACTACTACTGGGGCCA

GGGGACTCTCGTGACCGTGTCGAGC

E05v2 mAb的VL域胺基酸序列 (序列辨識編號：**25**)

IMGT CDRs(粗體及斜體)；Kabat CDRs(斜體及劃底線)；

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISGRLAWY

QQKPGKAPNLLIYEASNLESGVPSRFSGSGSGTEFTL

TISSLQPEDFATYYCQQSYSTPRVTFGQGTKVEIK

E05v2 mAb的VL域核酸序列 (序列辨識編號：**26**)

GACATTCAGATGACCCAATCCCCGTCCACGCTGA

GCGCCTCCGTCGGTGATCGCGTGACAATCACTTGT

CGGGCGTCGCAGTCCATCTCTGGAAGGCTCGCCT

GGTACCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCTCCCAACCT

CCTTATCTACGAAGCCAGCAACCTGGAGTCCGGA
GTGCCTAGCCGGTTCAGCGGATCAGGGTCCGGTA
CCGAGTTCACCCTGACCATTTCCTCGCTCCAACCT
GAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAACAGTCCTA
TTCAACTCCGCGCGTGACCTTCGGCCAGGGCACTA
AGGTCGAAATCAAA

G1-AA/E05v2 mAb (有LALA)之重鏈胺基酸序列(序列辨識編號：**27**)

VH域(斜體)；IMGT CDRs(粗體及斜體)；Kabat CDRs(斜體及劃底線)；LALA突變(粗體及劃底線)

*EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKAS**GYTFTSYG**ISWVR*
*QAPGQGLEWMG**WISAYSGGT**NYAQKLQGRVTMTTDT*
*STSTAYMELRSLRSDDTAVYYC**ARDLFPTIFGVSYYYY***
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
*DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP*
EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
G

G1-AA/E05v2 mAb 及 FS22-172-003-AA/E05v2 及

FS22-053-008-AA/E05v2 mAb²之輕鏈胺基酸序列(序列辨識編號：**28**)

VH域(斜體)；IMGT CDRs(粗體及斜體)；Kabat CDRs(斜體及劃底線)；

*DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC**RAS**__**QSISGR**__**LA**WYQQ*

*KPGKAPNLLIY**EAS**__**NLES**__GVPSRFSGSGSGTEFTLTISS*

*LQPEDFATYYC**QQSYSTPRVT**FGQGTKVEIK*RTVAAP

SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK

VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD

YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

G12v2 mAb之CDR胺基酸序列 (Kabat)

VH CDR1 – SYGIS (序列辨識編號：**1**)

VH CDR2–WISAYSGGTNYAQKLQG(序列辨識編號：**2**)

VH CDR3 – DLFPTIFGVSYYYY (序列辨識編號：**3**)

VL CDR1 – RASQSISGRLA (序列辨識編號：**18**)

VL CDR2 – EASNLES (序列辨識編號：**19**)

VL CDR3 – QQSYSWPRT (序列辨識編號：**29**)

G12v2之CDR胺基酸序列 (IMGT)

VH CDR1 – GYTFTSYG (序列辨識編號：**21**)

VH CDR2 – ISAYSGGT (序列辨識編號：**8**)

VH CDR3 – ARDLFPTIFGVSYYYY (序列辨識編號：**9**)

VL CDR1 – QSISGR (序列辨識編號：**22**)

VL CDR2 – EAS (序列辨識編號：**11**)

VL CDR3 – QQSYSWPRT (序列辨識編號：**29**)

G12v2 mAb的VH域胺基酸序列 (序列辨識編號：**23**)

IMGT CDRs(粗體及斜體)；Kabat CDRs(斜體及劃底線)；

*EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKAS**GYTFTSYG**ISWVR*

*QAPGQGLEWMG**WISAYSGGT**NYAQKLQG**RVTMTTDT*

*STSTAYMELRSLRSDDTAVYYC**ARDLFPTIFGVSYYYY***

WGQGTLVTVSS

G12v2 mAb的VH域核酸序列 (序列辨識編號：**24**)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCA

AGAGGCCTGGAGCGTCCGTGAAGGTGTCCTGCAA

AGCCTCAGGATACACCTTCACTTCGTACGGGATTT

CCTGGGTCCGCCAAGCACCGGGTCAAGGCTTGGA

GTGGATGGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGA

ACCAACTACGCTCAAAAGCTGCAGGGTCGCGTGA

CCATGACCACCGATACCTCCACCTCAACGGCCTAC

ATGGAACTGAGATCTCTGCGGAGCGACGACACTG

CCGTGTACTACTGTGCCCGGGACCTGTTCCCCACT

ATCTTCGGAGTGTCGTACTACTACTACTGGGGCCA

GGGGACTCTCGTGACCGTGTCGAGC

G12v2 mAb的VL域胺基酸序列 (序列辨識編號：**30**)

IMGT CDRs(粗體及斜體)；Kabat CDRs(斜體及劃底線)；

*DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC**RAS**QSISGR**LAWYQQ*

*KPGKAPNLLIY**EAS**NLES**GVPSRFSGSGSGTEFTLTISS*

*LQPEDFATYYC**QQSYSWPRT**FGQGTKVEIK*

G12v2 mAb的VL域核酸序列 (序列辨識編號：**31**)

GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGAGCACGCTGT
CCGCAAGCGTGGGGGACAGAGTGACCATCACTTG
CCGCGCCTCACAATCCATCAGCGGACGCTTGGCCT
GGTACCAGCAGAAGCCCGGAAAGGCCCCAAACCT
TCTGATCTACGAAGCCTCGAACCTGGAGTCAGGC
GTCCCTTCGCGGTTCTCTGGCTCCGGTTCCGGAAC
TGAGTTCACCCTCACCATCTCGTCCCTGCAACCGG
AAGATTTCGCCACCTACTACTGCCAACAGTCGTAC
TCCTGGCCCCGGACATTCGGACAGGGAACCAAAG
TCGAGATTAAG

G1-AA/G12v2 mAb (有LALA)之重鏈胺基酸序列 (序列辨識編號：**27**)

VH域(斜體)；IMGT CDRs(粗體及斜體)；Kabat CDRs(斜體及劃底線)；LALA突變(粗體及劃底線)

*EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKAS**GYTFTSYGISWVR***
*QAPGQGLEWMG**WISAYSGGTNYAQKLQGRVTMTTDT***
*STSTAYMELRSLRSDDTAVYYC**ARDLFPTIFGVSYYYY***
*WGQGTLVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
EPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK

CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPG

G1-AA/G12v2 mAb 及 FS22-172-003-AA/G12v2 及 FS22-053-008-AA/G12v2 mAb[2]之輕鏈胺基酸序列(序列辨識編號：33)

VH域(斜體)；IMGT CDRs(粗體及斜體)；Kabat CDRs(斜體及劃底線)；

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC<u>*RAS**QSISGR**LA*</u>*WYQQ*
KPGKAPNLLIY<u>***EAS**NLES*</u>*GVPSRFSGSGSGTEFTLTISS*
LQPEDFATYYC<u>***QQSYSWPRT***</u>*FGQGTKVEIK*RTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

lambdav3/lam-G02v3 mAb之CDR胺基酸序列 (Kabat)

VH CDR1 – SYGIS (序列辨識編號：**1**)

VH CDR2–WISAYSGGTNYAQKLQG(序列辨識編號：**2**)

VH CDR3 – DLFPTIFGVSYYYY (序列辨識編號：**3**)

VL CDR1 – TGTSSDVGGYNYVS (序列辨識編號：**34**)

VL CDR2 – EVTNRPS (序列辨識編號：**35**)

VL CDR3 – SSFKRGSTLVV (序列辨識編號：**36**)

lambdav3/lam-G02v3 之CDR胺基酸序列(IMGT)

VH CDR1 – GYTFTSYG (序列辨識編號：**21**)

VH CDR2 – ISAYSGGT (序列辨識編號：**8**)

VH CDR3 – ARDLFPTIFGVSYYYY (序列辨識編號：**9**)

VL CDR1 – SSDVGGYNY (序列辨識編號：**37**)

VL CDR2 – EVT (序列辨識編號：**38**)

VL CDR3 – SSFKRGSTLVV (序列辨識編號：**36**)

lambdav3/lam-G02v3 mAb的VH域胺基酸序列 (序列辨識編號：**23**)

IMGT CDRs(粗體及斜體)；Kabat CDRs(斜體及劃底線)；

*EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKAS**GYTFTSYG**ISWVR*

*QAPGQGLEWMG**WISAYSGGT**NYAQKLQG**RVTMTTDT*

*STSTAYMELRSLRSDDTAVYYC**ARDLFPTIFGVSYYYY***

WGQGTLVTVSS

lambdav3/lam-G02v3 mAb的VH域核酸序列 (序列辨識編號：**24**)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCA

AGAGGCCTGGAGCGTCCGTGAAGGTGTCCTGCAA

AGCCTCAGGATACACCTTCACTTCGTACGGGATTT

CCTGGGTCCGCCAAGCACCGGGTCAAGGCTTGGA

GTGGATGGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGA

ACCAACTACGCTCAAAAGCTGCAGGGTCGCGTGA

CCATGACCACCGATACCTCCACCTCAACGGCCTAC

ATGGAACTGAGATCTCTGCGGAGCGACGACACTG

CCGTGTACTACTGTGCCCGGGACCTGTTCCCCACT

ATCTTCGGAGTGTCGTACTACTACTACTGGGGCCA

GGGGACTCTCGTGACCGTGTCGAGC

lambdav3/lam-G02v3 mAb的VL域胺基酸序列 (序列辨識編號：**41**)

IMGT CDRs(粗體及斜體)；Kabat CDRs(斜體及劃底線)；

*QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGT**SSDVGGYNY**VSWY*

*QQFPGKAPKLMIF**EVT**NRPSGVSDRFSGSKSDNTASLT*

*ISGLQAEDEAEYYC**SSFKRGSTLVV**FGGGTKLTVL*

lambdav3/lam-G02v3 mAb的VL域核酸序列 (序列辨識編號：**42**)

CAGTCGGCCCTTACTCAACCCGCGTCAGTCTCCGG

TAGCCCCGGACAGTCCATCACGATTTCGTGCACCG

GAACCAGCAGCGATGTCGGGGGATACAACTACGT

GTCCTGGTACCAGCAGTTCCCGGGAAAGGCCCCT

AAGCTGATGATCTTCGAAGTCACTAACAGACCTTC

CGGAGTGTCGGACCGGTTCTCCGGCTCCAAGTCC

GACAACACTGCGAGCCTGACCATCTCGGGCCTGC

AAGCCGAGGACGAAGCCGAGTACTACTGTAGCTC

ATTCAAGCGCGGTTCCACCCTCGTGGTGTTCGGCG

GTGGCACTAAGCTCACCGTGCTGGGA

G1-AA/lambdav3/lam-G02v3 mAb (有LALA)之重鏈胺基酸序列 (序列辨識編號：**27**)

VH域(斜體)；IMGT CDRs(粗體及斜體)；Kabat CDRs(斜體及劃底線)；LALA突變(粗體及劃底線)

*EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKAS**GYTFTSYG**ISWVR*

*QAPGQGLEWMG**WISAYSGGT**NYAQKLQG**RVTMTTDT*

*STSTAYMELRSLRSDDTAVYYC**ARDLFPTIFGVSYYYY***

*WGQGTLVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG

CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL

YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

EPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTL

MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN

AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK

CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE

LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK

TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV

MHEALHNHYTQKSLSLSPG

G1-AA/lambdav3/lam-G02v3 mAb 之輕鏈胺基酸序列(序列辨識編號：**44**)

VL域(斜體)；IMGT CDRs(粗體及斜體)；Kabat CDRs(斜體及劃底線)；

*QSALTQPASVSGSPGQSITISC**TGTSSDVGGYNY**VSWY*

*QQFPGKAPKLMIF**EVT**NRPS**GVSDRFSGSKSDNTASLT*

*ISGLQAEDEAEYYC**SSFKRGSTLVV**FGGGTKLTVL*GQ

PAAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT

VAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSL

TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

HCDR1 任擇的定義(IMGT) (序列辨識編號：**45**)

GYX$_1$FTSYG

其中X$_1$為P或T

LCDR1任擇的定義 (Kabat) (序列辨識編號：**46**)

RASQSIX$_2$X$_3$RLA

其中X$_2$為S或G，X$_3$為N或G

LCDR2任擇的定義 (Kabat) (序列辨識編號：**47**)

EASX$_4$X$_5$EX$_6$

其中X$_4$為T或N；X$_5$為S或L；X$_6$為T或S

LCDR3任擇的定義 (Kabat) (序列辨識編號：**48**)

QQSYSX$_7$PX$_8$X$_9$T

其中X$_7$為T或W；X$_8$不存在或R；X$_9$為Y、R或V

LCDR1任擇的定義 (IMGT) (序列辨識編號：**49**)

QSIX$_{10}$X$_{11}$R

其中X$_{10}$為G或S；X$_{11}$為N或G

LCDR3任擇的定義 (IMGT) (序列辨識編號：**50**)

QQSYSX$_{12}$X$_{13}$X$_{14}$X$_{15}$T

其中X$_{12}$不存在或T；X$_{13}$為T、W或P；X$_{14}$為P或R；X$_{15}$為Y或R

HFW胺基酸序列IgG1 (Kabat)

HFW1 –

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYX$_{16}$FT(序列辨識編號：**51**)

其中X$_{16}$為P或T

HFW2 – WVRQAPGQGLEWMG (序列辨識編號：**52**)

HFW3 – RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR(序列辨識編號：**53**)

HFW4 – WGQGTLVTVSS (序列辨識編號：**54**)

IgG1之HFW胺基酸序列 (IMGT)

HFW1 – EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKAS (序列辨識編號：**55**)

HFW2 – ISWVRQAPGQGLEWMGW(序列辨識編號：**56**)

HFW3 – NYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC (序列辨識編號：**57**)

HFW4 – WGQGTLVTVSS (序列辨識編號：**54**)

κ輕鏈之LFW胺基酸序列(Kabat)

LFW1–DIQMTQSPSTLSASVRDRVIITC(序列辨識編號：**58**)

LFW2 – WYQHKPGKAPKLLIY (序列辨識編號：**59**)

LFW3 – GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (序列辨識編號：**60**)

LFW4 – FGQGTKLEIK (序列辨識編號：**61**)

κ輕鏈之LFW胺基酸序列 (IMGT)

LFW1 – DIQMTQSPSTLSASVRDRVIITCRAS (序列辨識編號：**62**)

LFW2 – LAWYQHKPGKAPKLLIY (序列辨識編號：**63**)

LFW3 –

TSETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC

(序列辨識編號：**64**)

LFW4 – FGQGTKLEIK (序列辨識編號：**61**)

λ輕鏈之LFW胺基酸序列(Kabat)

LFW1 – QSALTQPASVSGSPGQSITISC(序列辨識編號：**65**)

LFW2 – WYQQFPGKAPKLMIF (序列辨識編號：**66**)

LFW3 – GVSDRFSGSKSDNTASLTISGLQAEDEAEYYC (序列辨識編號：**67**)

LFW4 – FGGGTKLTVL (序列辨識編號：**68**)

λ輕鏈之LFW胺基酸序列(IMGT)

LFW1 – QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGT (序列辨識編號：**69**)

LFW2 – VSWYQQFPGKAPKLMIF (序列辨識編號：**70**)

LFW3 – NRPSGVSDRFSGSKSDNTASLTISGLQAEDEAEYYC

(序列辨識編號：**71**)

LFW4 – FGGGTKLTVL (序列辨識編號：**68**)

WT CH3域結構環之胺基酸序列

WT AB環 – RDELTKNQ (序列辨識編號：72)

WT CD環– SNGQPENNY (序列辨識編號：73)

WT EF環 – DKSRWQQGNV (序列辨識編號：74)

WT CH3域之胺基酸序列 (序列辨識編號：75)

AB、CD及EF環劃底線

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD

IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV

DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

CH2域之胺基酸序列(序列辨識編號：76)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS

HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR

VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS

KAK

有LALA突變的CH2域之胺基酸序列 (序列辨識編號：77)

LALA突變劃底線

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV

SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR

VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS

KAK

有LALA突變及P114A突變的CH2域之胺基酸序列(序列辨識編號：176)

LALA突變劃底線；P114A突變粗體及劃底線

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV

SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR

VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**A**APIEKTI

SKAK

PPY部分之胺基酸序列(序列辨識編號：78)

PPY

FS22-053-008 CH3域結構環序列的胺基酸序列

FS22-053-008第一序列– NPPYLFS (序列辨識編號：79)

FS22-053-008第二序列–DYWRWLE(序列辨識編號：80)

FS22-053-008 CH3域的胺基酸序列(序列辨識編號：81)

第一及第二序列劃底線

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKG

FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY

SKLTVDYWRWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL

SLSPG

FS22-053-008 CH3域的核酸序列(序列辨識編號：82)

GGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC

CCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCT

GTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA

AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG

GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA

GACCACGCCTCCCGTACTGGACTCCGACGGCTCCT

TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATTACTGG

AGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG

TGATGCATGAGGCGCTGCACAACCACTACACTCA

GAAGAGCTTGTCCCTGTCGCCCGGT

FS22-053-009 CH3域結構環序列的胺基酸序列

FS22-053-009第一序列– NPPYLFS (序列辨識編號：79)

FS22-053-009第二序列– EHTRWLD(序列辨識編號：83)

FS22-053-009 CH3域的胺基酸序列(序列辨識編號：84)

第一及第二序列劃底線

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKG

FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY

SKLTVEHTRWLDGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS

LSPG

FS22-053-009 CH3域的核酸序列(序列辨識編號：85)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC

CCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCT

GTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA

AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG

GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA

GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT

TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAACATACT

AGGTGGCTGGATGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT

GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAG

AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Fcab FS22-053-011 CH3域結構環序列的胺基酸序列

FS22-053-011第一序列–NPPYLFS (序列辨識編號：79)

FS22-053-011第二序列–DYWRWTD(序列辨識編號：86)

Fcab FS22-053-011 CH3域的胺基酸序列(序列辨識編號：87)

第一及第二序列劃底線

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKG

FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY

SKLTVDYWRWTDGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPG

Fcab FS22-053-011 CH3域的核酸序列(序列辨識編號：88)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC
CCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCT
GTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA
GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATTACTGG
AGGTGGACTGATGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT
GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAG
AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Fcab FS22-053-017 CH3域結構環序列的胺基酸序列

FS22-053-017第一序列– NPPYLFS(序列辨識編號：79)

FS22-053-017第二序列–YHWRWLE(序列辨識編號：89)

Fcab FS22-053-017 CH3域的胺基酸序列(序列辨識編號：90)

第一及第二序列劃底線

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVYHWRWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPG

Fcab FS22-053-017 CH3域的核酸序列(序列辨識編號：91)

GGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACTCTGC
CCCCTTCACGCGACGAACTCAATCCGCCCTACCTG
TTCTCCAACCAAGTCTCCCTGACCTGTCTTGTGAA
GGGTTTCTACCCATCCGATATCGCCGTGGAGTGGG
AGAGCAACGGACAGCCGGAGAACAACTATAAGAC
TACCCCGCCTGTGCTGGACTCGGACGGCAGCTTCT
TCTTGTACTCCAAACTGACCGTGTACCACTGGCGG
TGGCTGGAAGGGAACGTGTTTAGCTGCTCCGTCAT
GCATGAAGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG
TCCCTCTCGCTCTCTCCGGGT

Fcab FS22-053-014 CH3域結構環序列的胺基酸序列

FS22-053-014第一序列– NPPYLFS (序列辨識編號：79)

FS22-053-014第二序列–YHWRWLD(序列辨識編號：92)

Fcab FS22-053-014 CH3域的胺基酸序列(序列辨識編號：93)

第一及第二序列劃底線

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVYHWRWLDGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPG

Fcab FS22-053-014 CH3域的核酸序列(序列辨識編號：94)

GGACAGCCTCGAGAGCCTCAAGTGTACACCCTGC

CCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCT

GTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA

AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG

GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA

GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT

TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGTACCATTGG

AGGTGGCTGGATGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT

GATGCATGAGGCGCTGCACAACCACTACACTCAG

AAGAGCTTGTCCCTGTCGCCCGGA

Fcab FS22-053-010 CH3域結構環序列的胺基酸序列

FS22-053-010第一序列– NPPYLFS (序列辨識編號：79)

FS22-053-010第二序列–DYMRWLD(序列辨識編號：95)

Fcab FS22-053-010 CH3域的胺基酸序列(序列辨識編號：96)

第一及第二序列劃底線

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKG

FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY

SKLTVDYMRWLDGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL

SLSPG

Fcab FS22-053-010 CH3域的核酸序列(序列辨識編號：97)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC

CCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCT

GTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA
GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATTACATG
AGGTGGCTGGATGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT
GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAG
AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Fcab FS22-053-012 CH3域結構環序列的胺基酸序列

FS22-053-012第一序列– NPPYLFS (序列辨識編號：79)

FS22-053-012 第二序列– DHMRWLE(序列辨識編號：98)

Fcab FS22-053-012 CH3域的胺基酸序列(序列辨識編號：99)

第一及第二序列劃底線

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDHMRWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPG

Fcab FS22-053-012 CH3域的核酸序列(序列辨識編號：100)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC
CCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCT
GTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA

AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA
GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATCATATG
AGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG
TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Fcab FS22-053-013 CH3域結構環序列的胺基酸序列

FS22-053-013第一序列– NPPYLFS (序列辨識編號：79)

FS22-053-013第二序列–GYERWLE(序列辨識編號：101)

Fcab FS22-053-013 CH3域的胺基酸序列(序列辨識編號：102)

第一及第二序列劃底線

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVGYERWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPG

Fcab FS22-053-013 CH3域的核酸序列(序列辨識編號：103)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC
CCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCT
GTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG

GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA
GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGTTACGAA
AGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG
TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Fcab FS22-053-015 CH3域結構環序列的胺基酸序列

FS22-053-015第一序列– NPPYLFS (序列辨識編號：79)

FS22-053-015第二序列–DHWRWLQ(序列辨識編號：104)

Fcab FS22-053-015 CH3域的胺基酸序列(序列辨識編號：105)

第一及第二序列劃底線

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDHWRWLQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPG

Fcab FS22-053-015 CH3域的核酸序列(序列辨識編號：106)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC
CCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCT
GTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA

GACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATCATTGG
AGGTGGCTGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT
GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAG
AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Fcab FS22-053-016 CH3域結構環序列的胺基酸序列

FS22-053-016第一序列– NPPYLFS (序列辨識編號：79)

FS22-053-016第二序列–DYIRWLN(序列辨識編號：107)

Fcab FS22-053-016 CH3域的胺基酸序列(序列辨識編號：108)

第一及第二序列劃底線

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDYIRWLNGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPG

Fcab FS22-053-016 CH3域的核酸序列(序列辨識編號：109)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC
CCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCT
GTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA
GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATTACATC

AGGTGGCTGAACGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT
GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAG
AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

FS22-053 CH3域結構環序列的胺基酸序列

FS22-053-008第一序列– NPPYLFS (序列辨識編號：79)

FS22-053-008第二序列–YYNRWQD(序列辨識編號：110)

FS22-053 CH3域的胺基酸序列(序列辨識編號：111)

第一及第二序列劃底線

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVYYNRWQDGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPG

Fcab FS22-053 CH3域的核酸序列(序列辨識編號：112)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC
CCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCT
GTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA
GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGTATTATAAC
AGGTGGCAGGATGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG
TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Fcab FS22-172-003 CH3域結構環序列的胺基酸序列

FS22-172-003第一序列– PYIIPPY (序列辨識編號：113)

FS22-172-003第二序列–GADRWLE(序列辨識編號：114)

Fcab FS22-172-003 CH3域的胺基酸序列(序列辨識編號：115)

第一及第二序列劃底線

GQPREPQVYTLPPSRDELPYIIPPYNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVGADRWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPG

Fcab FS22-172-003 CH3域的核酸序列(序列辨識編號：116)

GGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC
CCCCATCCCGGGATGAGCTGCCATACATCATCCCA
CCATACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA
GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGCAGAT
AGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG
TGATGCATGAGGCGCTGCACAACCACTACACTCA
GAAGAGCTTGTCCCTGTCGCCCGGT

Fcab FS22-172-002 CH3域結構環序列的胺基酸序列

FS22-172-002第一序列–PFQMPPY(序列辨識編號：117)

FS22-172-002第二序列–GADRWLE(序列辨識編號：114)

Fcab FS22-172-002 CH3域的胺基酸序列(序列辨識編號：118)

第一及第二序列劃底線

GQPREPQVYTLPPSRDELPFQMPPYNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVGADRWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPG

Fcab FS22-172-002 CH3域的核酸序列(序列辨識編號：119)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC
CCCCATCCCGGGATGAGCTGCCATTCCAGATGCC
ACCATACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTC
AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT
GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACA
AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTC
CTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGCAG
ATAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACA
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Fcab FS22-172-004 CH3域結構環序列的胺基酸序列

FS22-172-004第一序列–NYIYPPY(序列辨識編號：120)

FS22-172-004第二序列–GADRWLE(序列辨識編號：114)

Fcab FS22-172-004 CH3域的胺基酸序列(序列辨識編號：121)

第一及第二序列劃底線

GQPREPQVYTLPPSRDELNYIYPPYNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVGADRWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPG

Fcab FS22-172-004 CH3域的核酸序列(序列辨識編號：122)

GGACAGCCTCGAGAGCCTCAAGTGTACACCCTGC
CCCCATCCCGGGATGAGCTGAACTACATCTACCC
ACCATACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTC
AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT
GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACA
AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTC
CTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGCAG
ATAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCGCTGCACAACCACTACACT
CAGAAGAGCTTGTCCCTGTCGCCCGGA

Fcab FS22-172-001 CH3域結構環序列的胺基酸序列

FS22-172-001第一序列–PFVMPPY(序列辨識編號：123)

FS22-172-001第二序列–GADRWLE(序列辨識編號：

114)

Fcab FS22-172-001 CH3域的胺基酸序列(序列辨識編號：124)

第一及第二序列劃底線

GQPREPQVYTLPPSRDELPFVMPPYNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVGADRWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPG

Fcab FS22-172-001 CH3域的核酸序列(序列辨識編號：125)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC
CCCCATCCCGGGATGAGCTGCCATTCGTTATGCCA
CCATACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA
GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGCAGAT
AGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG
TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Fcab FS22-172-005 CH3域結構環序列的胺基酸序列

FS22-172-005第一序列–QQVYPPY(序列辨識編號：126)

FS22-172-005第二序列–GADRWLE(序列辨識編號：114)

Fcab FS22-172-005 CH3域的胺基酸序列(序列辨識編號：127)

第一及第二序列劃底線

GQPREPQVYTLPPSRDELQQVYPPYNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVGADRWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPG

Fcab FS22-172-005 CH3域的核酸序列(序列辨識編號：128)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC
CCCCATCCCGGGATGAGCTGCAGCAGGTTTACCC
ACCATACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTC
AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT
GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACA
AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTC
CTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGCAG
ATAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACA
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Fcab FS22-172-006 CH3域結構環序列的胺基酸序列

FS22-172-006第一序列–RKYYPPY(序列辨識編號：129)

FS22-172-006第二序列–GADRWLE(序列辨識編號：114)

Fcab FS22-172-006 CH3域的胺基酸序列(序列辨識編

號：130)

第一及第二序列劃底線

GQPREPQVYTLPPSRDELRKYYPPYNQLSLTCLVKG

FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY

SKLTVGADRWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS

LSPG

Fcab FS22-172-006 CH3域的核酸序列(序列辨識編號：131)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC

CCCCATCCCGGGATGAGCTGCGTAAATACTACCC

GCCGTACAACCAGCTCAGCCTGACCTGCCTGGTC

AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT

GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACA

AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTC

CTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGCAG

ATAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTC

CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACA

CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Fcab FS22-172 CH3域結構環序列的胺基酸序列

FS22-172第一序列– RKYYPPY (序列辨識編號：129)

FS22-172第二序列– GADRWLE (序列辨識編號：114)

Fcab FS22-172 CH3域的胺基酸序列(序列辨識編號：132)

第一及第二序列劃底線

GQPREPQVYTLPPSRDELRKYYPPYNQVSLTCLVKG

FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY

SKLTVGADRWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS

LSPG

Fcab FS22-172 CH3域的核酸序列(序列辨識編號：133)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC

CCCCATCCCGGGATGAGCTGCGTAAATACTACCC

GCCGTACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTC

AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT

GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACA

AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTC

CTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGCAG

ATAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTC

CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACA

CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

有LALA突變的FS22-172-003-AA/E12v2 mAb^{2}之重鏈的胺基酸序列(序列辨識編號：134)

VH域(斜體)；LALA突變(粗體劃底線)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYPFTSYGISWVR

QAPGQGLEWMGWISAYSGGTNYAQKLQGRVTMTTDT

STSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPTIFGVSYYYYW

*GQGTLVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC

LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY

SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE

PKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMI

SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC

KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL

PYIIPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN

YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCS

VMHEALHNHYTQKSLSLSPG

有LALA突變的FS22-172-003-AA/E12v2 mAb^{2}之重鏈的核酸序列 (序列辨識編號：135)

GAAGTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGA

AAAGACCTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCCTGCAA

GGCTTCTGGCTACCCCTTTACCTCCTACGGCATCT

CCTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAAGGCTTGGA

ATGGATGGGCTGGATCTCCGCTTATTCCGGCGGCA

CCAATTACGCCCAGAAACTGCAGGGCAGAGTGAC

CATGACCACCGACACCTCTACCTCCACCGCCTACA

TGGAACTGCGGTCCCTGAGATCTGACGACACCGC

CGTGTACTACTGCGCCAGAGATCTGTTCCCCACCA

TCTTCGGCGTGTCCTACTACTACTATTGGGGCCAG

GGCACCCTGGTCACCGTGTCCTCTGCTTCTACCAA

GGGACCCAGCGTGTTCCCTCTGGCTCCTTCCAGCA

AGTCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGC

CTGGTCAAGGACTACTTTCCTGAGCCTGTGACCGT

GTCTTGGAACTCTGGCGCTCTGACATCTGGCGTGC

ACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG

TACTCTCTGTCCTCTGTCGTGACCGTGCCTTCCAG

CTCTCTGGGAACCCAGACCTACATCTGCAATGTGA

ACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGAA

GGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACC

TGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAAGCTGCTGGCGG

CCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGG

ACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACC

TGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGGACCCAG

AAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGA

AGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAA

CAGTACAACTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCT

GACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAA

GAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGC

CTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAA

GGGCCAGCCTAGGGAACCCCAGGTTTACACCTTG

CCTCCATCTCGGGACGAGCTGCCCTACATCATCCC

TCCATACAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGA

AGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGG

GAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGA

CAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC

TTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGGCGCCGACA

GATGGCTGGAAGGGAACGTGTTCTCCTGCAGCGT

GATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACACAG

AAGTCCCTGTCTCTGTCCCCTGGC

FS22-172-003-AA/E12v2 及 FS22-053-008-AA/E12v2 mAb^{2}之輕鏈的胺基酸序列 (序列辨識編號：17)

DIQMTQSPSTLSASVRDRVIITCRASQSIGNRLAWYQ
HKPGKAPKLLIYEASTSETGVPSRFSGSGSGTDFTLT
ISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKLEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FS22-172-003-AA/E12v2 mAb^{2}之輕鏈的核酸序列 (序列辨識編號：136)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCACACTGTC
CGCCTCTGTGCGGGACAGAGTGATCATCACCTGT
AGAGCCAGCCAGTCCATCGGCAACAGACTGGCCT
GGTATCAGCACAAGCCTGGCAAGGCTCCCAAGCT
GCTGATCTACGAGGCCTCCACATCTGAGACAGGC
GTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCAC
CGACTTTACCCTGACAATCTCCAGCCTGCAGCCTG
AGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTCCTAC
AGCACCCCTTACACCTTTGGCCAGGGCACCAAGC
TGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGT
GTTCATCTTCCCCCCAAGCGACGAGCAGCTGAAG
AGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACA
ACTTCTACCCCAGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA
GGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAG

GAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCA

CCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAA

GGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGT

GAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGA

CCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC

有LALA突變的FS22-172-003-AA/E05v2 mAb^{2}之重鏈的胺基酸序列(序列辨識編號：137)

VH域(斜體)；LALA突變(粗體劃底線)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVR

QAPGQGLEWMGWISAYSGGTNYAQKLQGRVTMTTDT

STSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPTIFGVSYYYYW

*GQGTLVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC

LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY

SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE

PKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMI

SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC

KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL

PYIIPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN

YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCS

VMHEALHNHYTQKSLSLSPG

有LALA突變的FS22-172-003-AA/E05v2 mAb^{2}之重鏈的核酸序列 (序列辨識編號：138)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCA

AGAGGCCTGGAGCGTCCGTGAAGGTGTCCTGCAA

AGCCTCAGGATACACCTTCACTTCGTACGGGATTT

CCTGGGTCCGCCAAGCACCGGGTCAAGGCTTGGA

GTGGATGGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGA

ACCAACTACGCTCAAAAGCTGCAGGGTCGCGTGA

CCATGACCACCGATACCTCCACCTCAACGGCCTAC

ATGGAACTGAGATCTCTGCGGAGCGACGACACTG

CCGTGTACTACTGTGCCCGGGACCTGTTCCCCACT

ATCTTCGGAGTGTCGTACTACTACTACTGGGGCCA

GGGGACTCTCGTGACCGTGTCGAGCGCTAGCACT

AAGGGCCCGTCGGTGTTCCCGCTGGCCCCATCGTC

CAAGAGCACATCAGGGGGTACCGCCGCCCTGGGC

TGCCTTGTGAAGGATTACTTTCCCGAGCCCGTCAC

AGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGA

GTGCATACTTTCCCGGCTGTGCTTCAGTCCTCTGG

CCTGTACTCATTGTCCTCCGTGGTCACCGTCCCTT

CGTCCTCCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGTAAT

GTCAACCATAAGCCCTCGAACACCAAGGTCGACA

AGAAGGTCGAGCCGAAGTCGTGCGACAAGACTCA

CACTTGCCCGCCTTGCCCAGCCCCGGAAGCTGCCG

GTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCCAAGCCG

AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAG

TGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGA

CCCGGAAGTGAAATTCAATTGGTACGTGGATGGA

GTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGG

AAGAACAGTACAACTCTACCTACCGCGTGGTGTC

CGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAAC

GGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGG

CGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAA

AGCCAAGGGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTAC

ACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGCCATACAT

CATCCCACCATACAACCAGGTCAGCCTGACCTGC

CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT

GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA

CTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC

GGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGG

CGCAGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCA

TGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACAACCACT

ACACTCAGAAGAGCTTGTCCCTGTCGCCCGGT

FS22-172-003-AA/E05v2 mAb^{2}之輕鏈的核酸序列(序列辨識編號：139)

GACATTCAGATGACCCAATCCCCGTCCACGCTGA

GCGCCTCCGTCGGTGATCGCGTGACAATCACTTGT

CGGGCGTCGCAGTCCATCTCTGGAAGGCTCGCCT

GGTACCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCTCCCAACCT

CCTTATCTACGAAGCCAGCAACCTGGAGTCCGGA

GTGCCTAGCCGGTTCAGCGGATCAGGGTCCGGTA

CCGAGTTCACCCTGACCATTTCCTCGCTCCAACCT

GAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAACAGTCCTA

TTCAACTCCGCGCGTGACCTTCGGCCAGGGCACTA

AGGTCGAAATCAAAAGAACCGTGGCAGCCCCATC

GGTGTTTATCTTCCCGCCCTCGGACGAACAGCTGA

AGTCAGGCACTGCTAGCGTGGTCTGTCTCCTGAAC

AATTTCTACCCGCGCGAAGCTAAGGTCCAGTGGA

AGGTCGACAACGCGCTGCAGTCCGGAAACAGCCA

GGAGTCAGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGATTCC

ACTTATTCCCTGTCCTCCACCCTGACTTTGAGCAA

GGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGC

GAAGTGACCCATCAAGGGCTTTCGTCGCCCGTGA

CCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGC

有LALA突變的FS22-172-003-AA/G12v2 mAb^{2}之重鏈的胺基酸序列(序列辨識編號：140)

VH域(斜體)；LALA突變(粗體劃底線)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGIS

WVRQAPGQGLEWMGWISAYSGGTNYAQKLQGRVT

MTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPTIF

GVSYYYYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST

SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF

PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS

NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF

PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY

VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD

WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV

YTLPPSRDELPYIIPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE

WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVGAD

RWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

有LALA突變的FS22-172-003-AA/G12v2 mAb^{2}之重鏈的核酸序列(序列辨識編號：141)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCA

AGAGGCCTGGAGCGTCCGTGAAGGTGTCCTGCAA

AGCCTCAGGATACACCTTCACTTCGTACGGGATTT

CCTGGGTCCGCCAAGCACCGGGTCAAGGCTTGGA

GTGGATGGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGA

ACCAACTACGCTCAAAAGCTGCAGGGTCGCGTGA

CCATGACCACCGATACCTCCACCTCAACGGCCTAC

ATGGAACTGAGATCTCTGCGGAGCGACGACACTG

CCGTGTACTACTGTGCCCGGGACCTGTTCCCCACT

ATCTTCGGAGTGTCGTACTACTACTACTGGGGCCA

GGGGACTCTCGTGACCGTGTCGAGCGCTAGCACT

AAGGGCCCGTCGGTGTTCCCGCTGGCCCCATCGTC

CAAGAGCACATCAGGGGGTACCGCCGCCCTGGGC

TGCCTTGTGAAGGATTACTTTCCCGAGCCCGTCAC

AGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGA

GTGCATACTTTCCCGGCTGTGCTTCAGTCCTCTGG

CCTGTACTCATTGTCCTCCGTGGTCACCGTCCCTT

CGTCCTCCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGTAAT

GTCAACCATAAGCCCTCGAACACCAAGGTCGACA

AGAAGGTCGAGCCGAAGTCGTGCGACAAGACTCA

CACTTGCCCGCCTTGCCCAGCCCCGGAAGCTGCCG

GTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCCAAGCCG

AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAG

TGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGA

CCCGGAAGTGAAATTCAATTGGTACGTGGATGGA

GTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGG

AAGAACAGTACAACTCTACCTACCGCGTGGTGTC

CGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAAC

GGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGG

CGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAA

AGCCAAGGGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTAC

ACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGCCATACAT

CATCCCACCATACAACCAGGTCAGCCTGACCTGC

CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT

GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA

CTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC

GGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGG

CGCAGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCA

TGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACAACCACT

ACACTCAGAAGAGCTTGTCCCTGTCGCCCGGT

FS22-172-003-AA/G12v2 mAb^{2}之輕鏈的核酸序列(序列辨識編號：142)

GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGAGCACGCTGT

CCGCAAGCGTGGGGGACAGAGTGACCATCACTTG

CCGCGCCTCACAATCCATCAGCGGACGCTTGGCCT

GGTACCAGCAGAAGCCCGGAAAGGCCCCAAACCT

TCTGATCTACGAAGCCTCGAACCTGGAGTCAGGC

GTCCCTTCGCGGTTCTCTGGCTCCGGTTCCGGAAC

TGAGTTCACCCTCACCATCTCGTCCCTGCAACCGG

AAGATTTCGCCACCTACTACTGCCAACAGTCGTAC

TCCTGGCCCCGGACATTCGGACAGGGAACCAAAG

TCGAGATTAAGCGGACTGTGGCGGCTCCTAGCGT

GTTCATCTTTCCCCCGTCCGACGAACAGCTGAAGT

CCGGTACCGCTAGCGTGGTCTGTCTCCTGAACAAT

TTCTACCCGCGCGAAGCTAAGGTCCAGTGGAAGG

TCGACAACGCGCTGCAGTCCGGAAACAGCCAGGA

GTCAGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGATTCCACT

TATTCCCTGTCCTCCACCCTGACTTTGAGCAAGGC

CGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAA

GTGACCCATCAAGGGCTTTCGTCGCCCGTGACCA

AGAGCTTCAACCGGGGCGAATGC

<u>有LALA突變的FS22-053-008-AA/E12v2 mAb^{2}之重鏈的AA序列(序列辨識編號：143)</u>

VH域(斜體)；LALA突變(粗體劃底線)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYPFTSYGISWVR

QAPGQGLEWMGWISAYSGGTNYAQKLQGRVTMTTDT

STSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPTIFGVSYYYYW

*GQGTLVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC

LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY

SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE

PKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMI

SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC

KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL

NPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN

NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDYWRWLEGNVFS

CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

有LALA突變的FS22-053-008-AA/E12v2 mAb^{2}之重鏈的核酸序列(序列辨識編號：144)

CAGGATACCCCTTCACTTCGTACGGGATTTCCTGG

GTCCGCCAAGCACCGGGTCAAGGCTTGGAGTGGA

TGGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGAACCAA

CTACGCTCAAAAGCTGCAGGGTCGCGTGACCATG

ACCACCGATACCTCCACCTCAACGGCCTACATGG

AACTGAGATCTCTGCGGAGCGACGACACTGCCGT

GTACTACTGTGCCCGGGACCTGTTCCCCACTATCT

TCGGAGTGTCGTACTACTACTACTGGGGCCAGGG

GACTCTCGTGACCGTGTCGAGCGCTAGCACTAAG

GGCCCGTCGGTGTTCCCGCTGGCCCCATCGTCCAA

GAGCACATCAGGGGGTACCGCCGCCCTGGGCTGC

CTTGTGAAGGATTACTTTCCCGAGCCCGTCACAGT

GTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGAGTG

CATACTTTCCCGGCTGTGCTTCAGTCCTCTGGCCT

GTACTCATTGTCCTCCGTGGTCACCGTCCCTTCGT

CCTCCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGTAATGTC

AACCATAAGCCCTCGAACACCAAGGTCGACAAGA

AGGTCGAGCCGAAGTCGTGCGACAAGACTCACAC

TTGCCCGCCTTGCCCAGCCCCGGAAGCTGCCGGTG

GTCCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCCAAGCCGAAG

GATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGA

CCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCC

GGAAGTGAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTG

GAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAG

AACAGTACAACTCTACCTACCGCGTGGTGTCCGTG

CTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGA

AGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCGCT

GCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCC

AAGGGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCC

TGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTA

CCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGG

TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGA

GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTAC

AAGACCACGCCTCCCGTACTGGACTCCGACGGCT

CCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATTAC

TGGAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCT

CCGTGATGCATGAGGCGCTGCACAACCACTACAC

TCAGAAGAGCTTGTCCCTGTCGCCCGGT

FS22-053-008-AA/E12v2 mAb^{2}之輕鏈的核酸序列 (序列辨識編號：145)

GACATCCAGATGACGCAGAGCCCGTCTACCCTGT

CCGCCTCCGTGAGAGATCGCGTGATCATCACCTGT

CGGGCCAGCCAGTCCATCGGAAACCGCTTGGCGT

GGTACCAGCACAAGCCTGGGAAGGCTCCGAAGCT

GCTCATCTACGAAGCCTCGACTTCGGAGACTGGT

GTCCCTAGCCGGTTCAGCGGATCGGGATCAGGGA

CCGATTTCACTCTGACCATTTCCTCCCTGCAACCC

GAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAACAGTCAT

ATTCCACCCCGTACACCTTCGGACAAGGCACCAA

GCTCGAAATCAAGCGGACTGTCGCCGCACCTTCC

GTGTTCATTTTCCCACCCTCCGACGAACAGCTGAA

ATCGGGTACAGCTAGCGTGGTCTGTCTCCTGAACA

ATTTCTACCCGCGCGAAGCTAAGGTCCAGTGGAA

GGTCGACAACGCGCTGCAGTCCGGAAACAGCCAG

GAGTCAGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGATTCCA

CTTATTCCCTGTCCTCCACCCTGACTTTGAGCAAG

GCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCG

AAGTGACCCATCAAGGGCTTTCGTCGCCCGTGAC

CAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGC

有LALA突變的FS22-053-008-AA/E05v2之重鏈的AA序列(序列辨識編號：146)

VH域(斜體)；LALA突變(粗體劃底線)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVR

QAPGQGLEWMGWISAYSGGTNYAQKLQGRVTMTTDT

STSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPTIFGVSYYYYW

*GQGTLVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC

LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY

SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE

PKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMI

SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC

KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL

NPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN

NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDYWRWLEGNVFS

CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

有LALA突變的FS22-053-008-AA/E05v2 mAb^{2}之重鏈的核酸序列(序列辨識編號：147)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCA

AGAGGCCTGGAGCGTCCGTGAAGGTGTCCTGCAA

AGCCTCAGGATACACCTTCACTTCGTACGGGATTT

CCTGGGTCCGCCAAGCACCGGGTCAAGGCTTGGA

GTGGATGGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGA

ACCAACTACGCTCAAAAGCTGCAGGGTCGCGTGA

CCATGACCACCGATACCTCCACCTCAACGGCCTAC

ATGGAACTGAGATCTCTGCGGAGCGACGACACTG

CCGTGTACTACTGTGCCCGGGACCTGTTCCCCACT

ATCTTCGGAGTGTCGTACTACTACTACTGGGGCCA

GGGGACTCTCGTGACCGTGTCGAGCGCTAGCACT

AAGGGCCCGTCGGTGTTCCCGCTGGCCCCATCGTC

CAAGAGCACATCAGGGGGTACCGCCGCCCTGGGC

TGCCTTGTGAAGGATTACTTTCCCGAGCCCGTCAC

AGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGA

GTGCATACTTTCCCGGCTGTGCTTCAGTCCTCTGG

CCTGTACTCATTGTCCTCCGTGGTCACCGTCCCTT

CGTCCTCCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGTAAT

GTCAACCATAAGCCCTCGAACACCAAGGTCGACA

AGAAGGTCGAGCCGAAGTCGTGCGACAAGACTCA

CACTTGCCCGCCTTGCCCAGCCCCGGAAGCTGCCG

GTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCCAAGCCG

AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAG

TGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGA

CCCGGAAGTGAAATTCAATTGGTACGTGGATGGA

GTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGG

AAGAACAGTACAACTCTACCTACCGCGTGGTGTC

CGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAAC

GGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGG

CGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAA

AGCCAAGGGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTAC

ACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGC

CGTACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGC

CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT

GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA

CTACAAGACCACGCCTCCCGTACTGGACTCCGAC

GGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGA

TTACTGGAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCA

TGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACAACCACT

ACACTCAGAAGAGCTTGTCCCTGTCGCCCGGT

FS22-053-008-AA/E05v2 mAb[2]之輕鏈的核酸序列(序列辨識編號：148)

GACATTCAGATGACCCAATCCCCGTCCACGCTGA

GCGCCTCCGTCGGTGATCGCGTGACAATCACTTGT

CGGGCGTCGCAGTCCATCTCTGGAAGGCTCGCCT

GGTACCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCTCCCAACCT

CCTTATCTACGAAGCCAGCAACCTGGAGTCCGGA

GTGCCTAGCCGGTTCAGCGGATCAGGGTCCGGTA

CCGAGTTCACCCTGACCATTTCCTCGCTCCAACCT

GAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAACAGTCCTA

TTCAACTCCGCGCGTGACCTTCGGCCAGGGCACTA

AGGTCGAAATCAAAAGAACCGTGGCAGCCCCATC

GGTGTTTATCTTCCCGCCCTCGGACGAACAGCTGA

AGTCAGGCACTGCTAGCGTGGTCTGTCTCCTGAAC

AATTTCTACCCGCGCGAAGCTAAGGTCCAGTGGA

AGGTCGACAACGCGCTGCAGTCCGGAAACAGCCA

GGAGTCAGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGATTCC

ACTTATTCCCTGTCCTCCACCCTGACTTTGAGCAA

GGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGC

GAAGTGACCCATCAAGGGCTTTCGTCGCCCGTGA

CCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGC

有LALA突變的FS22-053-008-AA/G12v2之重鏈的AA序列(序列辨識編號：149)

VH域(斜體)；LALA突變(粗體劃底線)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVR

QAPGQGLEWMGWISAYSGGTNYAQKLQGRVTMTTDT

STSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPTIFGVSYYYYW

*GQGTLVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC

LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY

SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE

PKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMI

SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC

KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL

NPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN

NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDYWRWLEGNVFS

CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

有LALA突變的FS22-053-008-AA/G12v2 mAb^{2}之重鏈

的核酸序列(序列辨識編號：150)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCA

AGAGGCCTGGAGCGTCCGTGAAGGTGTCCTGCAA

AGCCTCAGGATACACCTTCACTTCGTACGGGATTT

CCTGGGTCCGCCAAGCACCGGGTCAAGGCTTGGA

GTGGATGGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGA

ACCAACTACGCTCAAAAGCTGCAGGGTCGCGTGA

CCATGACCACCGATACCTCCACCTCAACGGCCTAC

ATGGAACTGAGATCTCTGCGGAGCGACGACACTG

CCGTGTACTACTGTGCCCGGGACCTGTTCCCCACT

ATCTTCGGAGTGTCGTACTACTACTACTGGGGCCA

GGGGACTCTCGTGACCGTGTCGAGCGCTAGCACT

AAGGGCCCGTCGGTGTTCCCGCTGGCCCCATCGTC

CAAGAGCACATCAGGGGGTACCGCCGCCCTGGGC

TGCCTTGTGAAGGATTACTTTCCCGAGCCCGTCAC

AGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGA

GTGCATACTTTCCCGGCTGTGCTTCAGTCCTCTGG

CCTGTACTCATTGTCCTCCGTGGTCACCGTCCCTT

CGTCCTCCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGTAAT

GTCAACCATAAGCCCTCGAACACCAAGGTCGACA

AGAAGGTCGAGCCGAAGTCGTGCGACAAGACTCA

CACTTGCCCGCCTTGCCCAGCCCCGGAAGCTGCCG

GTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTTCCCCGCCCAAGCCG

AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAG

TGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGA

CCCGGAAGTGAAATTCAATTGGTACGTGGATGGA

GTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGG

AAGAACAGTACAACTCTACCTACCGCGTGGTGTC

CGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAAC

GGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGG

CGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAA

AGCCAAGGGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTAC

ACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGC

CGTACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGC

CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT

GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA

CTACAAGACCACGCCTCCCGTACTGGACTCCGAC

GGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGA

TTACTGGAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCA

TGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACAACCACT

ACACTCAGAAGAGCTTGTCCCTGTCGCCCGGT

FS22-053-008-AA/G12v2 mAb^{2}之輕鏈的核酸序列(序列辨識編號：151)

GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGAGCACGCTGT

CCGCAAGCGTGGGGGACAGAGTGACCATCACTTG

CCGCGCCTCACAATCCATCAGCGGACGCTTGGCCT

GGTACCAGCAGAAGCCCGGAAAGGCCCCAAACCT

TCTGATCTACGAAGCCTCGAACCTGGAGTCAGGC

GTCCCTTCGCGGTTCTCTGGCTCCGGTTCCGGAAC

TGAGTTCACCCTCACCATCTCGTCCCTGCAACCGG

AAGATTTCGCCACCTACTACTGCCAACAGTCGTAC

TCCTGGCCCCCGGACATTCGGACAGGGAACCAAAG

TCGAGATTAAGCGGACTGTGGCGGCTCCTAGCGT

GTTCATCTTTCCCCCGTCCGACGAACAGCTGAAGT

CCGGTACCGCTAGCGTGGTCTGTCTCCTGAACAAT

TTCTACCCGCGCGAAGCTAAGGTCCAGTGGAAGG

TCGACAACGCGCTGCAGTCCGGAAACAGCCAGGA

GTCAGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGATTCCACT

TATTCCCTGTCCTCCACCCTGACTTTGAGCAAGGC

CGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAA

GTGACCCATCAAGGGCTTTCGTCGCCCGTGACCA

AGAGCTTCAACCGGGGCGAATGC

有LALA突變的FS22-053-017AA/E12v2之重鏈的AA序列(序列辨識編號：152)

VH域(斜體)；LALA突變(粗體劃底線)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYPFTSYGISWVR

QAPGQGLEWMGWISAYSGGTNYAQKLQGRVTMTTDT

STSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPTIFGVSYYYYW

*GQGTLVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC

LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY

SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE

PKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMI

SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC

KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL

NPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN

NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVYHWRWLEGNVFS

CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

有LALA突變的FS22-053-017AA/E05v2之重鏈的AA序列 (序列辨識編號：153)

VH域(斜體)；LALA突變(粗體劃底線)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVR

QAPGQGLEWMGWISAYSGGTNYAQKLQGRVTMTTDT

STSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPTIFGVSYYYYW

*GQGTLVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC

LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY

SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE

PKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMI

SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC

KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL

NPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN

NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVYHWRWLEGNVFS

CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

有LALA突變的FS22-053-017AA/G12v2之重鏈的AA序列(序列辨識編號：154)

VH域(斜體)；LALA突變(粗體劃底線)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVR

QAPGQGLEWMGWISAYSGGTNYAQKLQGRVTMTTDT

STSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPTIFGVSYYYYW

*GQGTLVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC

LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY

SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE

PKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMI

SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC

KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL

NPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN

NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVYHWRWLEGNVFS

CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

有LALA突變的FS22-172-003AA/1am-G02v3之重鏈的AA序列(序列辨識編號：155)

VH域(斜體)；LALA突變(粗體劃底線)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVR

QAPGQGLEWMGWISAYSGGTNYAQKLQGRVTMTTDT

STSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPTIFGVSYYYYW

*GQGTLVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC

LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY

SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE

PKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMI

SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC

KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL

PYIIPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN

YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCS

VMHEALHNHYTQKSLSLSPG

有LALA突變的FS22-172-003AA/S70之重鏈的AA序列

(序列辨識編號：156)

VH域(斜體)；LALA突變(粗體劃底線)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWV

RQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTS

KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQG

*TLVTVSA*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK

DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS

SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS

CDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRT

PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK

PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN

KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELPYIIP

PYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT

TPPVLDSDGSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVM

HEALHNHYTQKSLSLSPG

S70之輕鏈的AA序列 (序列辨識編號：157)

VL域(斜體)；

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQ

KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL

*QPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIK*RTVAAPSV

FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD

NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE

KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

有LALA突變的FS22-172-003AA/HelD1.3之重鏈的AA序列(序列辨識編號：158)

VH域(斜體)；LALA突變(粗體劃底線)

QVQLQESGPGLVRPSQTLSLTCTVSGSTFSGYGVNWVR

QPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNSALKSRVTMLVDTSK

NQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGSLVT

*VSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP

EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT

VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT

HTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT

CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE

QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL

PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELPYIIPPYN

QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV

LDSDGSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMHEAL

HNHYTQKSLSLSPG

HelD1.3之輕鏈的AA序列 (序列辨識編號：159)

VL域(斜體)

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQ

KQGKSPQLLVYNAKTLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKIN

*SLQPEDFGSYYCQHFWSTPRTFGGGTKLEIK*RTVAAP

SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK

VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD

YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

有LALA突變的FS22m-063AA/S70之重鏈的AA序列（序列辨識編號：160)

VH域(斜體)；LALA突變(粗體劃底線)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWV

RQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTS

KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQG

*TLVTVSA*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK

DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS

SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS

CDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRT

PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK

PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN

KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEPYWS

YVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV

LDSDGSFFLYSKLTVMNYRWELGNVFSCSVMHEAL

HNHYTQKSLSLSPG

有LALA突變的FS22m-063AA/HelD1.3之重鏈的AA序列(序列辨識編號：161)

VH域(斜體)；LALA突變(粗體劃底線)

QVQLQESGPGLVRPSQTLSLTCTVSGSTFSGYGVNWVR

QPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNSALKSRVTMLVDTSK

NQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGSLVT

*VSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP

EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT

VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT

HTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT

CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE

QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL

PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEPYWSYVSL

TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD

GSFFLYSKLTVMNYRWELGNVFSCSVMHEALHNHY

TQKSLSLSPG

有LALA突變的G1-AA/E12v2之重鏈的AA序列(序列辨識編號：162)

VH域(斜體)；LALA突變(粗體劃底線)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYPFTSYGISWVR

QAPGQGLEWMGWISAYSGGTNYAQKLQGRVTMTTDT

STSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPTIFGVSYYYYW

*GQGTLVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC

LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY

SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE

PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI

SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC

KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL

TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT

TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM

HEALHNHYTQKSLSLSPG

G1/S70之重鏈的AA序列 (序列辨識編號：163)

VH域(斜體)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWV

RQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTS

KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQG

*TLVTVSA*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK

DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS

SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS

CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT

PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK

PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN

KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ

VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL

DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH

NHYTQKSLSLSPGK

有LALA突變的G1-AA/S70之重鏈的AA序列(序列辨識編號：164)

VH域(斜體)；LALA突變(粗體劃底線)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWV

RQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTS

KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQG

*TLVTVSA*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK

DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS

SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS

CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT

PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK

PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN

KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ

VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL

DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH

NHYTQKSLSLSPGK

G1/4420之重鏈的AA序列 (序列辨識編號：165)

VH域(斜體)

EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNW

VRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISR

DDSKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQ

*GTSVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV

KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL

SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK

SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR

TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS

NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN

QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV

LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL

HNHYTQKSLSLSPGK

4420之輕鏈的AA序列 (序列辨識編號：166)

VL域(斜體)

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYL

RWYLQKPGQSPKVLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDF

*TLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIK*RT

VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK

VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT

LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

有LALA突變的G1-AA/4420之重鏈的AA序列(序列辨識編號：167)

VH域(斜體)；LALA突變(粗體劃底線)

EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNW

VRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISR

DDSKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQ

*GTSVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV

KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL

SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK

SCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISR

TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS

NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

有LALA突變的G1-AA/HelD1.3之重鏈的AA序列(序列辨識編號：168)

VH域(斜體)；LALA突變(粗體劃底線)

QVQLQESGPGLVRPSQTLSLTCTVSGSTFSGYGVNWVR
QPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNSALKSRVTMLVDTSK
NQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGSLVT
*VSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

有LALA突變的G1-AA/MLS109之重鏈的AA序列(序列辨識編號：169)

VH域(斜體)；LALA突變(粗體劃底線)

EEQVLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSPYSVFWVR

QAPGKGLEWVSSINSDSTYKYYADSVKGRFTISRDNAE

NSIFLQMNSLRAEDTAVYYCARDRSYYAFSSGSLSDYYY

*GLDVWGQGTTVIVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT

AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL

QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK

VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPK

PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG

VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN

GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL

PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP

ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV

FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

MLS109之輕鏈的胺基酸序列(序列辨識編號：170)

VL域(斜體)

DIVMTQSPLSLSVTPGEPASISCRSSQSLLHTNGYNYLD

WYVQKPGQSPQLLIYLASNRASGVPDRFSGSGSGTDFT

*LKISRVETEDVGVYYCMQALQIPRTFGQGTKVEIK*RTV

AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV

QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS

KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FS22-172-003 CH3域AB及EF環的胺基酸序列

AB環– RDELPYIIPPYNQ (序列辨識編號：171)

EF環 – GADRWLEGNV (序列辨識編號：172)

FS22-53-008 CH3域AB及EF環的胺基酸序列

AB環– RDELNPPYLFSNQ (序列辨識編號：173)

EF環 – DYWRWLEGNV (序列辨識編號：174)

FS22-053-017 CH3域AB及EF環的胺基酸序列

AB環– RDELNPPYLFSNQ (序列辨識編號：173)

EF環– YHWRWLEGNV (序列辨識編號：175)

G1/280 02 G02之重鏈的胺基酸序列(序列辨識編號：177)

VH域(斜體)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVR

QAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDT

STSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPTIFGVSYYYYW

*GQGTLVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC

LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY

SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE

PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI

SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC

KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL

TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT

TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM

HEALHNHYTQKSLSLSPG

G1/280 02 G02之輕鏈的胺基酸序列(序列辨識編號：178)

VL域(斜體)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQ

QFPGKAPKLMIFEVTNRPSGVSDRFSGSKSDNTASLTI

*SGLQAEDEAEYYCSSFKRGSTLVVFGGGTKLTVL*GQP

AAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT

VAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSL

TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

人類PD-L1的胺基酸序列 (序列辨識編號：179)

細胞外域(斜體)；跨膜及細胞內域(粗體)

FTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVY

WEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS

LGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVN

APYNKINQRILVVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSS

DHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYC

*TFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPPNER***THLVILGAI**

LLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSK

KQSDTHLEET

人類PD-L1細胞外域之胺基酸序列 (序列辨識編號：180)

FTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALI

VYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLK

DQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYK

RITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTSEHELTCQAEGY

PKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTST

LRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHP

PNER

小鼠PD-L1的胺基酸序列 (序列辨識編號：181)

細胞外域(斜體)；跨膜及細胞內域(粗體)

FTITAPKDLYVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVVY

WEKEDEQVIQFVAGEEDLKPQHSNFRGRASLPKDQLL

KGNAALQITDVKLQDAGVYCCIISYGGADYKRITLKVN

APYRKINQRISVDPATSEHELICQAEGYPEAEVIWTNSD

HQPVSGKRSVTTSRTEGMLLNVTSSLRVNATANDVFYC

*TFWRSQPGQNHTAELIIPELPATHPPQNRTH***WVLLGS**

ILLFLIVVSTVLLFLRKQVRMLDVEKCGVEDTSSK

NRNDTQFEET

小鼠PD-L1細胞外域之胺基酸序列(序列辨識編號：182)

FTITAPKDLYVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALV

VYWEKEDEQVIQFVAGEEDLKPQHSNFRGRASLPK

DQLLKGNAALQITDVKLQDAGVYCCIISYGGADYK

RITLKVNAPYRKINQRISVDPATSEHELICQAEGYPE

AEVIWTNSDHQPVSGKRSVTTSRTEGMLLNVTSSLR

VNATANDVFYCTFWRSQPGQNHTAELIIPELPATHP

PQNRTH

食蟹獼猴PD-L1的胺基酸序列 (序列辨識編號：183)

細胞外域(斜體)；跨膜及細胞內域(粗體)

FTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLTSLIVY

WEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSNYRQRAQLLKDQLS

LGNAALRITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVN

APYNKINQRILVVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSS

DHQVLSGKTTTTNSKREEKLLNVTSTLRINTTANEIFYC

*IFRRLDPEENHTAELVIPELPLALPPNERTH***LVILGAI**

FLLLGVALTFIFYLRKGRMMDMKKCGIRVTNSK

KQRDTQLEETKGPSARFDIPDEIPVIESKPNTLSIV

LGTTLTVAMIIVATIFGYRRQKGRLRTLKL

食蟹獼猴PD-L1細胞外域之胺基酸序列(序列辨識編號：184)

FTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLTSLI

VYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSNYRQRAQLLK

DQLSLGNAALRITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYK

RITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTSEHELTCQAEGY

PKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLLNVTST

LRINTTANEIFYCIFRRLDPEENHTAELVIPELPLALP

PNERTH

人類CD137的胺基酸序列 (序列辨識編號：185)

細胞外域(斜體)；跨膜及細胞內域(粗體)

LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQR

TCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGA

GCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGI

CRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGA

*SSVTPPAPAREPGHSPQ***IISFFLALTSTALLFLLFFLT**

LRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC

SCRFPEEEEGGCEL

人類CD137細胞外域之胺基酸序列(序列辨識編號：186)

LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQ

RTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCL

GAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQK

RGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPAD

LSPGASSVTPPAPAREPGHSPQ

小鼠CD137的胺基酸序列 (序列辨識編號：187)

細胞外域(斜體)；跨膜及細胞內域(粗體)

VQNSCDNCQPGTFCRKYNPVCKSCPPSTFSSIGGQPN

CNICRVCAGYFRFKKFCSSTHNAECECIEGFHCLGPQ

CTRCEKDCRPGQELTKQGCKTCSLGTFNDQNGTGVC

RPWTNCSLDGRSVLKTGTTEKDVVCGPPVVSFSPSTTI

*SVTPEGGPGGHSLQVL***TLFLALTSALLLALIFITLLF**

SVLKWIRKKFPHIFKQPFKKTTGAAQEEDACSCR

CPQEEEGGGGGYEL

小鼠CD137細胞外域之胺基酸序列(序列辨識編號：188)

VQNSCDNCQPGTFCRKYNPVCKSCPPSTFSSIGGQP

NCNICRVCAGYFRFKKFCSSTHNAECECIEGFHCLG

PQCTRCEKDCRPGQELTKQGCKTCSLGTFNDQNGT

GVCRPWTNCSLDGRSVLKTGTTEKDVVCGPPVVSF

SPSTTISVTPEGGPGGHSLQVL

食蟹獼猴CD137的胺基酸序列 (序列辨識編號：189)

細胞外域(斜體)；跨膜及細胞內域(粗體)

LQDLCSNCPAGTFCDNNRSQICSPCPPNSFSSAGGQRT

CDICRQCKGVFKTRKECSSTSNAECDCISGYHCLGAEC

SMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRP

WTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSA

*TPPAPAREPGHSPQ***IIFFLALTSTVVLFLLFFLVLRF**

SVVKRSRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR

FPEEEEGGCEL

食蟹獼猴CD137細胞外域之胺基酸序列(序列辨識編號：190)

LQDLCSNCPAGTFCDNNRSQICSPCPPNSFSSAGGQ

RTCDICRQCKGVFKTRKECSSTSNAECDCISGYHCL

GAECSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQK

RGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPAD

LSPGASSATPPAPAREPGHSPQ

G1/HelD1.3之重鏈的胺基酸序列 (序列辨識編號：191)

VH域(斜體)

QVQLQESGPGLVRPSQTLSLTCTVSGSTFSGYGVNWVR

QPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNSALKSRVTMLVDTSK

NQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGSLVT

*VSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP

EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT

VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT

HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT

CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE

QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL

PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL

TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPG

OVA胜肽(序列辨識編號：192)

ISQAVHAAHAEINEAGR

人類B7-H3細胞外域之胺基酸序列(序列辨識編號：193)

ILEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPEPGFSLAQL
NLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYANRTALFPD
LLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAV
SLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYQG
YPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDV
HSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQ
RSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPGF
SLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRT
ALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDF
GSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITC
SSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQ
GLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGS
VTITGQPMT

SIINFEKL胜肽(序列辨識編號：194)

SIINFEKL

人類PD-L1-rCD4-His的胺基酸序列 (序列辨識編號：195)

信號胜肽(劃底線)；PD-L1之細胞外域(正常字體)；C端大鼠$CD4^+$(第3及4域) (斜體)；編碼NotI限制位之抗原及C端

融合之間的接合處(粗體及劃底線)；C端六組胺酸標籤(粗體)

MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSN
MTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGE
EDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKL
QDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRI
LVVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSG
KTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRL
DPEENHTAELVIPELPLAHPPNERT**AAA***TSITAYKSEG*
ESAEFSFPLNLGEESLQGELRWKAEKAPSSQSWITFSL
KNQKVSVQKSTSNPKFQLSETLPLTLQIPQVSLQFAGS
GNLTLTLDRGILYQEVNLVVMKVTQPDSNTLTCEVMG
PTSPKMRLILKQENQEARVSRQEKVIQVQAPEAGVWQ
*CLLSEGEEVKMDSKIQVLSKGLN***GSHHHHHH**

人類PD-L1-Fc-His的胺基酸序列 (序列辨識編號：196)

信號胜肽(劃底線) PD-L1之細胞外域(正常字體) 人類IgG1 Fc(斜體) 編碼NotI限制位之抗原及C端融合之間的接合處(粗體及劃底線) C端六組胺酸標籤(粗體)

MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSN
MTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGE
EDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKL
QDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRI
LVVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSG
KTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRL

DPEENHTAELVIPELPLAHPPNERT**AAA***DKTHTCPP*

CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV

SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV

SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG

QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV

EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR

*WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK***GSHHH**

HHH

小鼠PD-L1-rCD4-His的胺基酸序列(序列辨識編號：197)

信號胜肽(劃底線)；PD-L1之細胞外域(正常字體)；C端大鼠CD4^{+}(第3及4域) (斜體)；編碼NotI限制位之抗原及C端融合之間的接合處(粗體及劃底線)；C端六組胺酸標籤(粗體)

MRIFAGIIFTACCHLLRAFTITAPKDLYVVEYGSNVT

MECRFPVERELDLLALVVYWEKEDEQVIQFVAGEE

DLKPQHSNFRGRASLPKDQLLKGNAALQITDVKLQ

DAGVYCCIISYGGADYKRITLKVNAPYRKINQRISV

DPATSEHELICQAEGYPEAEVIWTNSDHQPVSGKRS

VTTSRTEGMLLNVTSSLRVNATANDVFYCTFWRSQ

PGQNHTAELIIPELPATHPPQNRT**AAA***TSITAYKSEGE*

SAEFSFPLNLGEESLQGELRWKAEKAPSSQSWITFSLK

NQKVSVQKSTSNPKFQLSETLPLTLQIPQVSLQFAGSG

NLTLTLDRGILYQEVNLVVMKVTQPDSNTLTCEVMGP

TSPKMRLILKQENQEARVSRQEKVIQVQAPEAGVWQC

*LLSEGEEVKMDSKIQVLSKGLN***GSHHHHHH**

小鼠PD-L1-Fc-His的胺基酸序列(序列辨識編號：198)

信號胜肽(劃底線) PD-L1之細胞外域(正常字體) 人類IgG1 Fc(斜體) 編碼NotI限制位之抗原及C端融合之間的接合處(粗體及劃底線) C端六組胺酸標籤(粗體)

MRIFAGIIFTACCHLLRAFTITAPKDLYVVEYGSNVT
MECRFPVERELDLLALVVYWEKEDEQVIQFVAGEE
DLKPQHSNFRGRASLPKDQLLKGNAALQITDVKLQ
DAGVYCCIISYGGADYKRITLKVNAPYRKINQRISV
DPATSEHELICQAEGYPEAEVIWTNSDHQPVSGKRS
VTTSRTEGMLLNVTSSLRVNATANDVFYCTFWRSQ
PGQNHTAELIIPELPATHPPQNRT**AAA***DKTHTCPPCP*
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
*QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK***GSHHHH**
HH

人類PD-L1-His-Avi的胺基酸序列(序列辨識編號：199)

PD-L1之細胞外域(正常字體) C端六組胺酸標籤(斜體) Avi標籤(粗體)

FTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALI
VYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLK

DQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYK

RITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTSEHELTCQAEGY

PKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTST

LRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHP

PNER*GSHHHHHH*GG**GLNDIFEAQKIEWHE**

編碼FS22-172-003-AA/E12v2重鏈之密碼子最佳化的核酸序列 (序列辨識編號：32)

AAGCTTGCCGCCACCATGGAATGGTCCTGGGTGTT

CCTGTTCTTCCTGTCCGTGACCACCGGCGTGCACT

CTGAAGTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGT

GAAAAGACCTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCCTGC

AAGGCTTCTGGCTACCCCTTTACCTCCTACGGCAT

CTCCTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAAGGCTTG

GAATGGATGGGCTGGATCTCCGCTTATTCCGGCG

GCACCAATTACGCCCAGAAACTGCAGGGCAGAGT

GACCATGACCACCGACACCTCTACCTCCACCGCCT

ACATGGAACTGCGGTCCCTGAGATCTGACGACAC

CGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGATCTGTTCCCCA

CCATCTTCGGCGTGTCCTACTACTACTATTGGGGC

CAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCTCTGCTTCTAC

CAAGGGACCCAGCGTGTTCCCTCTGGCTCCTTCCA

GCAAGTCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGG

CTGCCTGGTCAAGGACTACTTTCCTGAGCCTGTGA

CCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCTCTGACATCTGGC

GTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGG

CCTGTACTCTCTGTCCTCTGTCGTGACCGTGCCTT

CCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTACATCTGCAAT

GTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACA

AGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCA

CACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAAGCTGCTG

GCGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCT

AAGGACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAG

TGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGGA

CCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGC

GTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAG

AGGAACAGTACAACTCCACCTACAGAGTGGTGTC

CGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAAC

GGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGG

CCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAG

GCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCAGGTTTACA

CCTTGCCTCCATCTCGGGACGAGCTGCCCTACATC

ATCCCTCCATACAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCT

CGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGG

AATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACTA

CAAGACAACCCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGC

TCATTCTTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGGCGC

CGACAGATGGCTGGAAGGGAACGTGTTCTCCTGC

AGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACA

CACAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCCTGGCAAG

TGATGAATTC

編碼FS22-172-003-AA/E12v2輕鏈之密碼子最佳化的核酸序列(序列辨識編號：39)

AAGCTTGCCGCCACCATGTCTGTGCCTACACAGGT

TCTGGGACTGCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCA

GATGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCAC

ACTGTCCGCCTCTGTGCGGGACAGAGTGATCATC

ACCTGTAGAGCCAGCCAGTCCATCGGCAACAGAC

TGGCCTGGTATCAGCACAAGCCTGGCAAGGCTCC

CAAGCTGCTGATCTACGAGGCCTCCACATCTGAG

ACAGGCGTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTC

TGGCACCGACTTTACCCTGACAATCTCCAGCCTGC

AGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCA

GTCCTACAGCACCCCTTACACCTTTGGCCAGGGCA

CCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCC

CAGCGTGTTCATCTTCCCCCCAAGCGACGAGCAG

CTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGC

TGAACAACTTCTACCCCAGGGAGGCCAAGGTGCA

GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC

AGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAG

GACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCC

TGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTA

CGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGC

CCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGCT
GATGAATTC

參考資料

【0589】本說明書所提及之所有文件係以其等之整體併入以作為參考資料。

【0590】Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215(3), 403-10 (1990).

【0591】Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25(17), 3389-402 (1997).

【0592】Bagshawe KD, Sharma SK, Springer CJ, Antoniw P, Rogers GT, Burke PJ, Melton R. Antibody-enzyme conjugates can generate cytotoxic drugs from inactive precursors at tumor sites. Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4, 915-922 (1991).

【0593】Baird JR *et al.* Immune-mediated regression of established B16F10 melanoma by intratumoral injection of attenuated Toxoplasma gondii protects against rechallenge. J Immunol. 190(1): 469-478 (2013).

【0594】Bartkowiak T, Curran MA. 4-1BB Agonists: Multi-Potent Potentiators of Tumor Immunity. Front Oncol. Jun 8；5, 117 (2015).

【0595】Bartkowiak T *et al.* Activation of 4-1BB on Liver Myeloid Cells Triggers Hepatitis via an Interleukin-27-Dependent Pathway. Clin Cancer Res. 24(5), 1138-51 (2018).

【0596】Bergman I, Burckart GJ, Pohl CR, Venkataramanan R, Barmada MA, Griffin JA And Cheung NV. Pharmacokinetics of IgG and IgM Anti-Ganglioside Antibodies in Rats and Monkeys After Intrathecal Administration. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 284(1), 111–115 (1998)

【0597】Bitra A, Doukov T, Wang J, Picarda G, Benedict CA, Croft M, Zajonc DM. Crystal structure of murine 4-1BB and its interaction with 4-1BBL support a role for galectin-9 in 4-1BB signaling. J Biol Chem. 293(4):1317-1329 (2017).

【0598】Brown MH, Barclay AN. Expression of immunoglobulin and scavenger receptor superfamily domains as chimeric proteins with domains 3 and 4 of CD4+ for ligand analysis. Protein Eng. 7(4), 515-21 (1994).

【0599】Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, Daëron M. Specificity and affinity of human Fcgamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. Blood. 113(16):3716-25 (2009).

【0600】Chacon JA1, Wu RC, Sukhumalchandra P, Molldrem JJ, Sarnaik A, Pilon-Thomas S, Weber J, Hwu P, Radvanyi L. Co-stimulation through 4-1BB/CD137 improves the expansion and function of CD8(+) melanoma tumor-infiltrating lymphocytes for adoptive T-cell therapy. PLoS One. 8(4):e60031 (2013).

【0601】Chapple SD, Crofts AM, Shadbolt SP, McCafferty J, Dyson MR. Multiplexed expression and screening for recombinant protein production in mammalian cells. BMC Biotechnol. 6:49 (2006).

【0602】Chester C, Ambulkar S, Kohrt HE. 4-1BB agonism: adding the accelerator to cancer immunotherapy. Cancer Immunol Immunother. 65(10):1243-8 (2016).

【0603】Chester C, Sanmamed MF, Wang J, Melero I. Immunotherapy targeting 4-1BB: mechanistic rationale, clinical results, and future strategies. Blood. 131(1):49-57 (2018).

【0604】Claus C *et al.* A novel tumor-targeted

4-1BB agonist and its combination with T-cell bispecific antibodies: an off-the-shelf cancer immunotherapy alternative to CAR T-cells [abstract]. In: Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2017. Cancer Res. 77 (2017).

【0605】Croft M. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? Nat Rev Immunol. 3(8):609-20 (2003).

【0606】Curran MA, Geiger TL, Montalvo W, Kim M, Reiner SL, Al-Shamkhani A, Sun JC, Allison J. P. Systemic 4-1BB activation induces a novel T cell phenotype driven by high expression of Eomesodermin. J. Exp.Med. 210(4): 743-755 (2013).

【0607】Dubrot J *et al*. Treatment with anti-CD137 mAbs causes intense accumulations of liver T cells without selective antitumor immunotherapeutic effects in this organ. Cancer Immunol Immunother. 59(8):1223-1233 (2010).

【0608】Dyson MR, Zheng Y, Zhang C, Colwill K, Pershad K, Kay BK, Pawson T, McCafferty J: Mapping protein interactions by combining antibody affinity maturation and mass spectrometry. Anal. Biochem. 417(1), 25-35 (2011).

【0609】Fisher TS *et al*. Targeting of 4-1BB by

monoclonal antibody PF-05082566 enhances T-cell function and promotes anti-tumor activity. Cancer Immunol Immunother. 61(10):1721-33 (2012).

【0610】Grosso J, Inzunza D, Wu Q, Simon J, Singh P, Zhang X, Phillips T, Simmons P, Cogswell J. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in various tumor types. Journal for Immunotherapy of Cancer. 1(Suppl 1):P53. (2013).

【0611】Hasenhindl C, Traxlmayr MW, Wozniak-Knopp G, Jones PC, Stadlmayr G, Rüker F, Obinger C. Stability assessment on a library scale: a rapid method for the evaluation of the commutability and insertion of residues in C-terminal loops of the CH3 domains of IgG1-Fc. Protein Eng. Des. Sel., 26(10), 675-82 (2013).

【0612】Hezareh M, Hessell AJ, Jensen RC, van de Winkel JG, Parren PW. Effector function activities of a panel of mutants of a broadly neutralizing antibody against human immunodeficiency virus type 1. J Virol. 75(24):12161-8. (2001).

【0613】Hinner MJ, Aiba, RSB., Wiedenmann A, Schlosser C, Allersdorfer A, Matschiner G, Rothe C, Moebius U, Kohrt HE, Olwill SA. Costimulatory T cell engagement via a novel bispecific anti-CD137

/anti-HER2 protein. J. Immunotherapy Cancer 3 (Suppl 2): P187. (2015).

【0614】Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nat Biotechnol. 23(9):1126-36 (2005).

【0615】Hu S, Shively L, Raubitschek A, Sherman M, Williams LE, Wong JY, Shively JE, Wu AM. Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts. Cancer Res. 56(13):3055-61 (1996).

【0616】Hurtado JC, Kim YJ, Kwon BS. Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death. J Immunol. 15;158(6):2600-9 (1997).

【0617】Idusogie EE, Presta LG, Gazzano-Santoro H, Totpal K, Wong PY, Ultsch M, Meng YG, Mulkerrin MG. Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. J Immunol. 164(8), 4178-84 (2000).

【0618】Jain T *et al*. Biophysical properties of the clinical-stage antibody landscape. PNAS 114 (5), 944-949 (2017).

【0619】Jefferis R, Reimer CB, Skvaril F, de

Lange G, Ling NR, Lowe J, Walker MR, Phillips DJ, Aloisio CH, Wells TW. Evaluation of monoclonal antibodies having specificity for human IgG sub-classes: results of an IUIS/WHO collaborative study. Immunol. Lett.1, 223-52 (1985).

【0620】Jefferis R, Reimer CB, Skvaril F, de Lange GG, Goodall DM, Bentley TL, Phillips DJ, Vlug A, Harada S, Radl J. Evaluation of monoclonal antibodies having specificity for human IgG subclasses: results of the 2nd IUIS/WHO collaborative study. Immunol. Lett. 31(2),143-68 (1992).

【0621】Juneja VR, McGuire KA, Manguso RT, LaFleur MW, Collins N, Haining WN, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-L1 on tumor cells is sufficient for immune evasion in immunogenic tumors and inhibits CD8+ T cell cytotoxicity. J Exp Med. 214(4), 895-904 (2017).

【0622】Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. NIH Publication No. 91-3242. Washington, D.C.: U.S. Department of Health and Human Services (1991).

【0623】Kim YH, Choi BK, Kim KH, Kang SW, Kwon BS. Combination Therapy with Cisplatin and

Anti-4-1BB. Cancer Res. 68(18), 7264-7269 (2009).

【0624】Klein C, Schaefer W, Regula JT. The use of CrossMAb technology for the generation of bi- and multispecific antibodies. MAbs 8(6), 1010-20 (2016).

【0625】Kleinovink JW, Marijt KA, Schoonderwoerd MJA, Hall T, Ossendorp F, Fransen MF. PD-L1 expression on malignant cells is no prerequisite for checkpoint therapy. Oncoimmunology. 6(4), e1294299 (2017).

【0626】Kocak E *et al.* Combination therapy with anti-CTL antigen-4 and anti-4-1BB antibodies enhances cancer immunity and reduces autoimmunity. Cancer Res. 15；66(14), 7276-84 (2006).

【0627】Lechner MG *et al.* Immunogenicity of murine solid tumor models as a defining feature of in vivo behavior and response to immunotherapy. J Immunother. 36(9), 477-89 (2013).

【0628】Ledermann JA, Begent RH, Massof C, Kelly AM, Adam T, Bagshawe KD. A phase-I study of repeated therapy with radiolabelled antibody to carcinoembryonic antigen using intermittent or continuous administration of cyclosporin A to supress the immune response. Int. J. Cancer 47(5), 659-64 (1991).

【0629】Lefranc MP *et al*. IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® 25 years on. Nucleic Acids Res. 43(Database issue):D413-22 (2015).

【0630】Lefranc MP *et al*. IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains. Dev. Comp. Immunol. 29(3), 185-203 (2005).

【0631】Li F. and Ravetech JV. Antitumor activities of agonistic anti-TNFR antibodies require differential FcγRIIB coengagement in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A, 110(48), 19501-6 (2013).

【0632】Link A *et al*. Preclinical pharmacology of MP0310: a 4-1BB/FAP bispecific DARPin drug candidate promoting tumor-restricted T cell co-stimulation [abstract]. In: Proceedings of the Annual Meeting of the American Association for Cancer Research； 2018 Apr 14–18； Chicago (IL) Abstract nr 3752 (2018).

【0633】Makkouk A, Chester C, Kohrt HE. Rationale for anti-CD137 cancer immunotherapy. Eur J Cancer. 54, 112-119 (2016).

【0634】Martins JP, Kennedy PJ, Santos HA, Barrias C, Sarmento B. A comprehensive review of the

neonatal Fc receptor and its application in drug delivery. Pharmcol. Ther. 161, 22-39 (2016).

【0635】Niu L *et al.* Cytokine- mediated disruption of lymphocyte trafficking, hemopoiesis, and induction of lymphopenia, anemia, and thrombocytopenia in anti-CD137-treated mice. J Immunol. 178(7), 4194-4213 (2007).

【0636】Pérez-Ruiz E, Etxeberria I, Rodriguez-Ruiz, Melero I. Anti-CD137 and PD-1/PD-L1 Antibodies En Route toward Clinical Synergy. Clin. Cancer Res. 23, (18) (2017)

【0637】Reichen C *et al.* FAP-mediated tumor accumulation of a T-cell agonistic FAP/4-1BB DARPin drug candidate analyzed by SPECT/CT and quantitative biodistribution [abstract]. In: Proceedings of the Annual Meeting of the American Association for Cancer Research ; 2018 Apr 14–18 ; Chicago (IL) Abstract nr 3029 (2018).

【0638】Schofield DJ *et al.* Application of phage display to high throughput antibody generation and characterization. Genome Biol. 8(11), R254 (2007).

【0639】Segal NH *et al.* Phase I Study of Single-Agent Utomilumab (PF-05082566), a 4-1BB/CD137 Agonist, in Patients with Advanced

Cancer. Clin Cancer Res. 24(8):1816-1823 (2018).

【0640】Segal NH *et al*. Results from an Integrated Safety Analysis of Urelumab, an Agonist Anti-CD137 Monoclonal Antibody. Clin Cancer Res. 23(8):1929-1936 (2017).

【0641】Shuford WW *et al.l* 4-1BB costimulatory signals preferentially induce $CD8^+$ T cell proliferation and lead to the amplification *in vivo* of cytotoxic T cell responses. J Exp Med. 186(1), 47-55 (1997).

【0642】Smith TF, Waterman MS. Identification of common molecular subsequences. J. Mol. Biol. 147(1), 195-7 (1981).

【0643】Taraban VY *et al*. Expression and costimulatory effects of the TNF receptor superfamily members CD134 (OX40) and CD137 (4-1BB), and their role in the generation of anti-tumor immune responses. Eur. J. Immunol. 32, 3617-3627 (2002).

【0644】Tello, D, Goldbaum, FA, Mariuzza, RA, Ysern, X, Schwarz, FP, Poljak, RJ. Three-dimensional structure and thermodynamics of antigen binding by anti-lysozyme antibodies, Biochem Soc. Trans., 21(4), 943-6 (1993).

【0645】Tolcher AW *et al*. Phase Ib Study of Utomilumab (PF-05082566), a 4-1BB/CD137 Agonist,

in Combination with Pembrolizumab (MK-3475) in Patients with Advanced Solid Tumors. Clin. Cancer Res. 23, 5349-57 (2017)

【0646】Wang X, Mathieu M, Brezski RJ. IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions. Protein Cell 9(1), 63-73 (2018).

【0647】Wen T, Bukczynski J, Watts TH. 4-1BB ligand-mediated costimulation of human T cells induces $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell expansion, cytokine production, and the development of cytolytic effector function. J Immunol. 168(10), 4897-906 (2002).

【0648】Wolfl M, Kuball J, Ho WY, Nguyen H, Manley TJ, Bleakley M, Greenberg PD. Activation-induced expression of CD137 permits detection, isolation, and expansion of the full repertoire of CD8+ T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities. Blood. 110(1):201-10 (2007).

【0649】Won EY, Cha K, Byun JS, Kim DU, Shin S, Ahn B, Kim YH, Rice AJ, Walz T, Kwon BS, Cho HS. The structure of the trimer of human 4-1BB ligand is unique among members of the tumor necrosis factor superfamily. J Biol Chem.285(12), 9202-10 (2010).

【0650】Wozniak-Knopp G *et al.* Introducing

antigen-binding sites in structural loops of immunoglobulin constant domains: Fc fragments with engineered HER2/neu-binding sites and antibody properties. Protein Eng Des Sel. 23(4), 289-97 (2010).

【0651】Ye Q, Song DG, Poussin M, Yamamoto T, Best A, Li C, Coukos G, Powell DJ Jr. CD137 accurately identifies and enriches for naturally occurring tumor-reactive T cells in tumor. Clin Cancer Res. 20(1):44-55 (2014).

【0652】Yu X, Anasetti C. CH 10 - T-cell costimulation in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect. Immune Biology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 195-222 (2013).

【0653】Zanetti M. Tapping CD4 T Cells for Cancer Immunotherapy: The Choice of Personalized Genomics. J Immunol. 194:2049-2056 (2015).

序列表

<110> 英商F星貝塔有限公司 (F-STAR BETA LIMITED)

<120> 結合PD-L1及CD137的抗體分子

<140> TW 108124754
<141> 2019-07-12

<150> GB 1811405.8
<151> 2018-07-12

<150> GB 1818283.2
<151> 2018-11-09

<150> GB 1902594.9
<151> 2019-02-26

<160> 199

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> E12v2 mAb (Kabat) VH CDR1

<400> 1

Ser Tyr Gly Ile Ser
1 5

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> E12v2 mAb (Kabat) VH CDR2

<400> 2

Trp Ile Ser Ala Tyr Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 3
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> E12v2 mAb (Kabat) VH CDR3

<400> 3

Asp Leu Phe Pro Thr Ile Phe Gly Val Ser Tyr Tyr Tyr Tyr
1 5 10

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> E12v2 mAb (Kabat) VL CDR1

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Arg Leu Ala
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> E12v2 mAb (Kabat) VL CDR2

<400> 5

Glu Ala Ser Thr Ser Glu Thr
1 5

<210> 6
<211> 9

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> E12v2 mAb (Kabat) VL CDR3

<400> 6

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> E12v2 (IMGT) VH CDR1

<400> 7

Gly Tyr Pro Phe Thr Ser Tyr Gly
1 5

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> E12v2 (IMGT) VH CDR2

<400> 8

Ile Ser Ala Tyr Ser Gly Gly Thr
1 5

<210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> E12v2 (IMGT) VH CDR3

<400> 9

Ala Arg Asp Leu Phe Pro Thr Ile Phe Gly Val Ser Tyr Tyr Tyr Tyr
1 5 10 15

<210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> E12v2 (IMGT) VL CDR1

<400> 10

Gln Ser Ile Gly Asn Arg
1 5

<210> 11
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> E12v2 (IMGT) VL CDR2

<400> 11

Glu Ala Ser
1

<210> 12
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> E12v2 mAb

<400> 12

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Leu Phe Pro Thr Ile Phe Gly Val Ser Tyr Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 13
<211> 369
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> E12v2 mAb

<400> 13
gaagtgcagc tggtgcagtc cggagccgaa gtcaagaggc ctggagcgtc cgtgaaggtg 60

tcctgcaaag cctcaggata ccccttcact tcgtacggga tttcctgggt ccgccaagca 120

ccgggtcaag gcttggagtg gatgggatgg atcagcgcgt attccggggg aaccaactac 180

gctcaaaagc tgcagggtcg cgtgaccatg accaccgata cctccacctc aacggcctac 240

atggaactga gatctctgcg gagcgacgac actgccgtgt actactgtgc ccgggacctg 300

ttccccacta tcttcggagt gtcgtactac tactactggg gccaggggac tctcgtgacc 360

gtgtcgagc 369

<210> 14
<211> 107

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> E12v2 mAb VL域

<400> 14

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Arg
1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Arg
20 25 30

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

Tyr Glu Ala Ser Thr Ser Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 15
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> E12v2 mAb VL域

<400> 15
gacatccaga tgacgcagag cccgtctacc ctgtccgcct ccgtgagaga tcgcgtgatc 60

atcacctgtc gggccagcca gtccatcgga aaccgcttgg cgtggtacca gcacaagcct 120

gggaaggctc cgaagctgct catctacgaa gcctcgactt cggagactgg tgtccctagc 180

cggttcagcg gatcgggatc agggaccgat ttcactctga ccatttcctc cctgcaaccc 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccaacag tcatattcca ccccgtacac cttcggacaa 300

ggcaccaagc tcgaaatcaa g 321

<210> 16
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> G1-AA/E12v2 mAb (有LALA)重鏈

<400> 16

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Leu Phe Pro Thr Ile Phe Gly Val Ser Tyr Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

```
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
    130                 135                 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145                 150                 155                 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
                165                 170                 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
            180                 185                 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
        195                 200                 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
    210                 215                 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
225                 230                 235                 240

Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
                245                 250                 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
            260                 265                 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
        275                 280                 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
    290                 295                 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305                 310                 315                 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
                325                 330                 335
```

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

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

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly
450

<210> 17
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> G1-AA/E12v2 mAb輕鏈

<400> 17

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Arg
1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Arg
20 25 30

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

Tyr Glu Ala Ser Thr Ser Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> E05v2 mAb (Kabat) VL CDR1

<400> 18

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Arg Leu Ala
1 5 10

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> E05v2 mAb (Kabat) VL CDR2

<400> 19

Glu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> E05v2 mAb (Kabat) VL CDR3

<400> 20

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Arg Val Thr
1 5 10

<210> 21
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> E05v2 VH CDR1

<400> 21

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly
1 5

<210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> E05v2 VL CDR1

<400> 22

Gln Ser Ile Ser Gly Arg
1 5

<210> 23
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> E05v2 mAb VH域

<400> 23

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Leu Phe Pro Thr Ile Phe Gly Val Ser Tyr Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 24
<211> 369
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> E05v2 mAb VH域

<400> 24
gaagtgcagc tggtgcagtc cggagccgaa gtcaagaggc ctggagcgtc cgtgaaggtg 60

tcctgcaaag cctcaggata caccttcact tcgtacggga tttcctgggt ccgccaagca 120

ccgggtcaag gcttggagtg gatgggatgg atcagcgcgt attccggggg aaccaactac 180

gctcaaaagc tgcagggtcg cgtgaccatg accaccgata cctccacctc aacggcctac 240

atggaactga gatctctgcg gagcgacgac actgccgtgt actactgtgc ccgggacctg 300

ttccccacta tcttcggagt gtcgtactac tactactggg gccaggggac tctcgtgacc 360

gtgtcgagc 369

<210> 25
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> E05v2 mAb VL域

<400> 25

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Arg
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95

Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 26
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> E05v2 mAb VL域

<400> 26
gacattcaga tgacccaatc cccgtccacg ctgagcgcct ccgtcggtga tcgcgtgaca 60

atcacttgtc gggcgtcgca gtccatctct ggaaggctcg cctggtacca gcagaagcct 120

ggaaaggctc ccaacctcct tatctacgaa gccagcaacc tggagtccgg agtgcctagc 180

cggttcagcg gatcagggtc cggtaccgag ttcaccctga ccatttcctc gctccaacct 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccaacag tcctattcaa ctccgcgcgt gaccttcggc 300

cagggcacta aggtcgaaat caaa 324

<210> 27
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> G1-AA/E05v2 mAb之重鏈胺基酸序列

<400> 27

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Asp Leu Phe Pro Thr Ile Phe Gly Val Ser Tyr Tyr Tyr Tyr
            100                 105                 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
        115                 120                 125

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

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145                 150                 155                 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
                165                 170                 175
```

```
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
            180                 185                 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
        195                 200                 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
    210                 215                 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
225                 230                 235                 240

Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
                245                 250                 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
            260                 265                 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
        275                 280                 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
    290                 295                 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305                 310                 315                 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
                325                 330                 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
            340                 345                 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
        355                 360                 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
    370                 375                 380
```

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

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

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly
450

<210> 28
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> G1-AA/E05v2 mAb及
FS22-172-003-AA/E05v2及FS22-053-008-AA/E05v2 mAb2之輕鏈胺基酸序列

<400> 28

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Arg
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95

Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

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

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> G12v2 mAb (Kabat) VL CDR3

<400> 29

Gln Gln Ser Tyr Ser Trp Pro Arg Thr

1 5

<210> 30
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> G12v2 mAb VL域

<400> 30

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Arg
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 31
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> G12v2 mAb VL域

<400> 31

gacattcaga tgacccagtc cccgagcacg ctgtccgcaa gcgtggggga cagagtgacc 60

atcacttgcc gcgcctcaca atccatcagc ggacgcttgg cctggtacca gcagaagccc 120

ggaaaggccc caaaccttct gatctacgaa gcctcgaacc tggagtcagg cgtcccttcg 180

cggttctctg gctccggttc cggaactgag ttcaccctca ccatctcgtc cctgcaaccg 240

gaagatttcg ccacctacta ctgccaacag tcgtactcct ggccccggac attcggacag 300

ggaaccaaag tcgagattaa g 321

<210> 32
<211> 1456
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 編碼FS22-172-003-AA/E12v2重鏈之密碼子最佳化的核酸序列

<400> 32
aagcttgccg ccaccatgga atggtcctgg gtgttcctgt tcttcctgtc cgtgaccacc 60

ggcgtgcact ctgaagttca gctggttcag tctggcgccg aagtgaaaag acctggcgcc 120

tctgtgaagg tgtcctgcaa ggcttctggc taccccttta cctcctacgg catctcctgg 180

gtccgacagg ctcctggaca aggcttggaa tggatgggct ggatctccgc ttattccggc 240

ggcaccaatt acgcccagaa actgcagggc agagtgacca tgaccaccga cacctctacc 300

tccaccgcct acatggaact gcggtccctg agatctgacg acaccgccgt gtactactgc 360

gccagagatc tgttccccac catcttcggc gtgtcctact actactattg gggccagggc 420

accctggtca ccgtgtcctc tgcttctacc aagggaccca gcgtgttccc tctggctcct 480

tccagcaagt ctacctctgg cggaacagct gctctgggct gcctggtcaa ggactacttt 540

cctgagcctg tgaccgtgtc ttggaactct ggcgctctga catctggcgt gcacaccttt 600

ccagctgtgc tgcagtcctc cggcctgtac tctctgtcct ctgtcgtgac cgtgccttcc 660

agctctctgg gaacccagac ctacatctgc aatgtgaacc acaagccttc caacaccaag 720

gtggacaaga aggtggaacc caagtcctgc gacaagaccc acacctgtcc tccatgtcct 780

gctccagaag ctgctggcgg ccccttccgtg tttctgttcc ctccaaagcc taaggacacc 840

ctgatgatct ctcggacccc tgaagtgacc tgcgtggtgg tggatgtgtc tcacgaggac 900

ccagaagtga agttcaattg gtacgtggac ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag 960

cctagagagg aacagtacaa ctccacctac agagtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac 1020

caggattggc tgaacggcaa agagtacaag tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgcctgct 1080

cctatcgaaa agaccatctc caaggccaag ggccagccta gggaacccca ggtttacacc 1140

ttgcctccat ctcgggacga gctgccctac atcatccctc catacaacca ggtgtccctg 1200

acctgcctcg tgaagggctt ctacccttcc gatatcgccg tggaatggga gagcaatggc 1260

cagcctgaga acaactacaa gacaacccct cctgtgctgg actccgacgg ctcattcttt 1320

ctgtactcca agctgacagt gggcgccgac agatggctgg aagggaacgt gttctcctgc 1380

agcgtgatgc acgaggccct gcacaatcac tacacacaga agtccctgtc tctgtccccc 1440

ggcaagtgat gaattc 1456

<210> 33
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> G1-AA/G12v2 mAb及
FS22-172-003-AA/G12v2 and FS22-053-008-AA/G12v2 mAb2之輕鏈胺基酸序列

<400> 33

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Arg
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 34
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> lambdav3/lam-G02v3 mAb (Kabat) VL CDR1

<400> 34

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> lambdav3/lam-G02v3 mAb (Kabat) VL CDR2

<400> 35

Glu Val Thr Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> lambdav3/lam-G02v3 mAb (Kabat) VL CDR3

<400> 36

Ser Ser Phe Lys Arg Gly Ser Thr Leu Val Val
1 5 10

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> lambdav3/lam-G02v3 (IMGT) VL CDR1

<400> 37

Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr
1 5

<210> 38
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> lambdav3/lam-G02v3 (IMGT) VL CDR2

<400> 38

Glu Val Thr
1

<210> 39
<211> 727
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 編碼FS22-172-003-AA/E12v2輕鏈之密碼子最佳化的核酸序列

<400> 39
aagcttgccg ccaccatgtc tgtgcctaca caggttctgg gactgctgct gctgtggctg 60

accgacgcca gatgcgacat ccagatgacc cagtctccat ccacactgtc cgcctctgtg 120

cgggacagag tgatcatcac ctgtagagcc agccagtcca tcggcaacag actggcctgg 180

tatcagcaca agcctggcaa ggctcccaag ctgctgatct acgaggcctc cacatctgag 240

acaggcgtgc cctctagatt ctccggctct ggctctggca ccgactttac cctgacaatc 300

tccagcctgc agcctgagga cttcgccacc tactactgcc agcagtccta cagcaccccc 360

tacacctttg gccagggcac caagctggaa atcaagcgta cggtggccgc tcccagcgtg 420

ttcatcttcc ccccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 480

ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 540

agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 600

agcagcaccc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag 660

gtgacccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgctga 720

tgaattc 727

<210> 40

<400> 40
000

<210> 41
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> lambdav3/lam-G02v3 mAb VL域

<400> 41

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 Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

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

Met Ile Phe Glu Val Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe
50 55 60

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ser Ser Phe Lys Arg Gly
85 90 95

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

<210> 42
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> lambdav3/lam-G02v3 mAb VL域

<400> 42
cagtcggccc ttactcaacc cgcgtcagtc tccggtagcc ccggacagtc catcacgatt 60

tcgtgcaccg gaaccagcag cgatgtcggg ggatacaact acgtgtcctg gtaccagcag 120

ttcccgggaa aggcccctaa gctgatgatc ttcgaagtca ctaacagacc ttccggagtg 180

tcggaccggt tctccggctc caagtccgac aacactgcga gcctgaccat ctcgggcctg 240

caagccgagg acgaagccga gtactactgt agctcattca agcgcggttc caccctcgtg 300

gtgttcggcg gtggcactaa gctcaccgtg ctggga 336

<210> 43

<400> 43
000

<210> 44
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> G1-AA/lambdav3/lam-G02v3 mAb之輕鏈胺基酸序列

<400> 44

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 Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

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

Met Ile Phe Glu Val Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe
50 55 60

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ser Ser Phe Lys Arg Gly
85 90 95

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

Gln Pro Ala 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> 45
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HCDR1任擇的定義 (IMGT)

<220>
<221> 其他特徵
<222> (3)..(3)
<223> X = P或T

<400> 45

Gly Tyr Xaa Phe Thr Ser Tyr Gly
1 5

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> LCDR1任擇的定義 (Kabat)

<220>
<221> 其他特徵
<222> (7)..(7)
<223> X = S或G

<220>
<221> 其他特徵
<222> (8)..(8)
<223> X = N或G

<400> 46

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Xaa Xaa Arg Leu Ala
1 5 10

<210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> LCDR2任擇的定義 (Kabat)

<220>
<221> 其他特徵
<222> (4)..(4)
<223> X = T或N

<220>
<221> 其他特徵
<222> (5)..(5)
<223> X = S或L

<220>
<221> 其他特徵
<222> (7)..(7)
<223> X = T或S

<400> 47

Glu Ala Ser Xaa Xaa Glu Xaa
1 5

<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> LCDR3任擇的定義 (Kabat)

<220>
<221> 其他特徵
<222> (6)..(6)
<223> X = T或W

<220>
<221> 其他特徵
<222> (8)..(8)
<223> X = 不存在或R

<220>
<221> 其他特徵
<222> (9)..(9)
<223> X = Y, R或V

<400> 48

Gln Gln Ser Tyr Ser Xaa Pro Xaa Xaa Thr
1 5 10

<210> 49
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> LCDR1任擇的定義 (IMGT)

<220>
<221> 其他特徵
<222> (4)..(4)
<223> X = G或S

<220>
<221> 其他特徵
<222> (5)..(5)
<223> X = N或G

<400> 49

Gln Ser Ile Xaa Xaa Arg
1 5

<210> 50
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> LCDR3任擇的定義 (IMGT)

<220>
<221> 其他特徵
<222> (6)..(6)
<223> X = 不存在或T

<220>
<221> 其他特徵
<222> (7)..(7)
<223> X = T, W或P

<220>
<221> 其他特徵
<222> (8)..(8)
<223> X = P或R

<220>
<221> 其他特徵
<222> (9)..(9)
<223> X = Y或R

<400> 50

Gln Gln Ser Tyr Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Thr
1 5 10

<210> 51
<211> 30
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> IgG1 (Kabat) HFW1

<220>
<221> 其他特徵
<222> (28)..(28)
<223> X = P或T

<400> 51

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

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

<210> 52
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG1 (Kabat) HFW2

<400> 52

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 53
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG1 (Kabat) HFW3

<400> 53

Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG1 (Kabat) HFW4

<400> 54

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 55
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG1 (IMGT) HFW1

<400> 55

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 56
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG1 (IMGT) HFW2

<400> 56

Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10 15

Trp

<210> 57
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG1 (IMGT) HFW3

<400> 57

Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr
1 5 10 15

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 58
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> κ輕鏈(Kabat) LFW1

<400> 58

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Arg
1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys
20

<210> 59
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> κ輕鏈(Kabat) LFW2

<400> 59

Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 60
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> κ輕鏈(Kabat) LFW3

<400> 60

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 61
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> κ輕鏈(Kabat) LFW4

<400> 61

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 62
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> κ輕鏈(IMGT) LFW1

<400> 62

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Arg

1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Arg Ala Ser
20 25

<210> 63
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> κ輕鏈(IMGT) LFW2

<400> 63

Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 64
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> κ輕鏈(IMGT) LFW3

<400> 64

Thr Ser Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
20 25 30

Thr Tyr Tyr Cys
35

<210> 65
<211> 22
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> λ輕鏈(Kabat) LFW1

<400> 65

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
20

<210> 66
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> λ輕鏈(Kabat) LFW2

<400> 66

Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Phe
1 5 10 15

<210> 67
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> λ輕鏈(Kabat) LFW3

<400> 67

Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Asp Asn Thr Ala Ser
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 68
<211> 10
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> λ輕鏈(Kabat) LFW4

<400> 68

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
1 5 10

<210> 69
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> λ輕鏈(IMGT) LFW1

<400> 69

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
20 25

<210> 70
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> λ輕鏈(IMGT) LFW2

<400> 70

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile
1 5 10 15

Phe

<210> 71
<211> 36
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> λ輕鏈(IMGT) LFW3

<400> 71

Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Asp
1 5 10 15

Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala
20 25 30

Glu Tyr Tyr Cys
35

<210> 72
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> WT CH3域結構AB環

<400> 72

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
1 5

<210> 73
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> WT CH3域結構CD環

<400> 73

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
1 5

<210> 74
<211> 10
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> WT CH3域結構EF環

<400> 74

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
1 5 10

<210> 75
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> WT CH3域

<400> 75

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
100 105

<210> 76

<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CH2域

<400> 76

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

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

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105 110

<210> 77
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CH2域有LALA突變

<400> 77

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

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

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105 110

<210> 78
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CH2域有LALA突變及P114A突變

<400> 78

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

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

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Ala Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105 110

<210> 79
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PPY部分

<400> 79

Pro Pro Tyr
1

<210> 80
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FS22-053-008 CH3域結構環序列

<400> 80

Asp Tyr Trp Arg Trp Leu Glu
1 5

<210> 81
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FS22-053-008 CH3域

<400> 81

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Asn Pro Pro Tyr Leu Phe Ser Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
20 25 30

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
35 40 45

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
50 55 60

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Tyr Trp
65 70 75 80

Arg Trp Leu Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
85 90 95

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
100 105 110

<210> 82
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FS22-053-008 CH3域

<400> 82
ggacagcctc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaacccg 60

ccgtacctgt tctctaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 120

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 180

cccgtactgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggattactgg 240

aggtggctgg aagggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggcgct gcacaaccac 300

tacactcaga agagcttgtc cctgtcgccc ggt 333

<210> 83
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FS22-053-009 CH3域結構環序列

<400> 83

Glu His Thr Arg Trp Leu Asp
1 5

<210> 84
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FS22-053-009 CH3域

<400> 84

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Asn Pro Pro Tyr Leu Phe Ser Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
20 25 30

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
35 40 45

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
50 55 60

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Glu His Thr
65 70 75 80

Arg Trp Leu Asp Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
85 90 95

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

100 105 110

<210> 85
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FS22-053-009 CH3域

<400> 85
ggccagcctc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaacccg 60

ccgtacctgt tctctaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 120

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 180

cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggaacatact 240

aggtggctgg atgggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 300

tacacacaga agagcctctc cctgtctccg ggt 333

<210> 86
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-053-011 CH3域結構環序列

<400> 86

Asp Tyr Trp Arg Trp Thr Asp
1 5

<210> 87
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-053-011 CH3域

<400> 87

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp

1 5 10 15

Glu Leu Asn Pro Pro Tyr Leu Phe Ser Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
20 25 30

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
35 40 45

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
50 55 60

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Tyr Trp
65 70 75 80

Arg Trp Thr Asp Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
85 90 95

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
100 105 110

<210> 88
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-053-011 CH3域

<400> 88
ggccagcctc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaacccg 60

ccgtacctgt tctctaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 120

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 180

cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggattactgg 240

aggtggactg atgggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 300

tacacacaga agagcctctc cctgtctccg ggt 333

<210> 89

<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-053-017 CH3域結構環序列

<400> 89

Tyr His Trp Arg Trp Leu Glu
1 5

<210> 90
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-053-017 CH3域

<400> 90

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Asn Pro Pro Tyr Leu Phe Ser Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
20 25 30

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
35 40 45

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
50 55 60

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Tyr His Trp
65 70 75 80

Arg Trp Leu Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
85 90 95

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
100 105 110

<210> 91
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-053-017 CH3域

<400> 91
ggacagcctc gagaaccaca ggtgtacact ctgccccctt cacgcgacga actcaatccg 60

ccctacctgt tctccaacca agtctccctg acctgtcttg tgaagggttt ctacccatcc 120

gatatcgccg tggagtggga gagcaacgga cagccggaga acaactataa gactaccccg 180

cctgtgctgg actcggacgg cagcttcttc ttgtactcca aactgaccgt gtaccactgg 240

cggtggctgg aagggaacgt gtttagctgc tccgtcatgc atgaagccct gcacaaccac 300

tacacccaga agtccctctc gctctctccg ggt 333

<210> 92
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-053-014 CH3域結構環序列

<400> 92

Tyr His Trp Arg Trp Leu Asp
1 5

<210> 93
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-053-014 CH3域

<400> 93

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Asn Pro Pro Tyr Leu Phe Ser Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
20 25 30

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
35 40 45

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
50 55 60

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Tyr His Trp
65 70 75 80

Arg Trp Leu Asp Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
85 90 95

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
100 105 110

<210> 94
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-053-014 CH3域

<400> 94
ggacagcctc gagagcctca agtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaacccg 60

ccgtacctgt tctctaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 120

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 180

cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt gtaccattgg 240

aggtggctgg atgggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggcgct gcacaaccac 300

tacactcaga agagcttgtc cctgtcgccc gga 333

<210> 95
<211> 7
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-053-010 CH3域結構環序列

<400> 95

Asp Tyr Met Arg Trp Leu Asp
1 5

<210> 96
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-053-010 CH3域

<400> 96

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Asn Pro Pro Tyr Leu Phe Ser Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
20 25 30

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
35 40 45

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
50 55 60

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Tyr Met
65 70 75 80

Arg Trp Leu Asp Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
85 90 95

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
100 105 110

<210> 97

<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-053-010 CH3域

<400> 97
ggccagcctc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaacccg 60

ccgtacctgt tctctaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 120

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 180

cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggattacatg 240

aggtggctgg atgggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 300

tacacacaga agagcctctc cctgtctccg ggt 333

<210> 98
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-053-012 CH3域結構環序列

<400> 98

Asp His Met Arg Trp Leu Glu
1 5

<210> 99
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-053-012 CH3域

<400> 99

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Asn Pro Pro Tyr Leu Phe Ser Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

20 25 30

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
35 40 45

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
50 55 60

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp His Met
65 70 75 80

Arg Trp Leu Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
85 90 95

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
100 105 110

<210> 100
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-053-012 CH3域

<400> 100
ggccagcctc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaacccg 60

ccgtacctgt tctctaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 120

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 180

cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggatcatatg 240

aggtggctgg aagggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 300

tacacacaga agagcctctc cctgtctccg ggt 333

<210> 101
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-053-013 CH3域結構環序列

<400> 101

Gly Tyr Glu Arg Trp Leu Glu
1 5

<210> 102
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-053-013 CH3域

<400> 102

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Asn Pro Pro Tyr Leu Phe Ser Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
20 25 30

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
35 40 45

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
50 55 60

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Gly Tyr Glu
65 70 75 80

Arg Trp Leu Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
85 90 95

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
100 105 110

<210> 103
<211> 333
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-053-013 CH3域

<400> 103
ggccagcctc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaacccg 60

ccgtacctgt tctctaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 120

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 180

cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt gggttacgaa 240

aggtggctgg aagggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 300

tacacacaga agagcctctc cctgtctccg ggt 333

<210> 104
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-053-015 CH3域結構環序列

<400> 104

Asp His Trp Arg Trp Leu Gln
1 5

<210> 105
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-053-015 CH3域

<400> 105

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Asn Pro Pro Tyr Leu Phe Ser Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
20 25 30

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
35 40 45

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
50 55 60

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp His Trp
65 70 75 80

Arg Trp Leu Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
85 90 95

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
100 105 110

<210> 106
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-053-015 CH3域

<400> 106
ggccagcctc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaacccg 60

ccgtacctgt tctctaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 120

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 180

cccgtgttgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggatcattgg 240

aggtggctgc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 300

tacacacaga agagcctctc cctgtctccg ggt 333

<210> 107
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-053-016 CH3域結構環序列

<400> 107

Asp Tyr Ile Arg Trp Leu Asn
1 5

<210> 108
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-053-016 CH3域

<400> 108

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Asn Pro Pro Tyr Leu Phe Ser Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
20 25 30

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
35 40 45

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
50 55 60

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Tyr Ile
65 70 75 80

Arg Trp Leu Asn Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
85 90 95

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
100 105 110

<210> 109
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-053-016 CH3域

<400> 109
ggccagcctc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaacccg 60

ccgtacctgt tctctaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 120

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 180

cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggattacatc 240

aggtggctga acgggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 300

tacacacaga agagcctctc cctgtctccg ggt 333

<210> 110
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FS22-053 CH3域結構環序列

<400> 110

Tyr Tyr Asn Arg Trp Gln Asp
1 5

<210> 111
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FS22-053 CH3域

<400> 111

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Asn Pro Pro Tyr Leu Phe Ser Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
20 25 30

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

35 40 45

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
50 55 60

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Tyr Tyr Asn
65 70 75 80

Arg Trp Gln Asp Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
85 90 95

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
100 105 110

<210> 112
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FS22-053 CH3域

<400> 112
ggccagcctc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaacccg 60

ccgtacctgt tctctaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 120

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 180

cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt gtattataac 240

aggtggcagg atgggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 300

tacacacaga agagcctctc cctgtctccg ggt 333

<210> 113
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-172-003 CH3域結構環序列

<400> 113

Pro Tyr Ile Ile Pro Pro Tyr
1 5

<210> 114
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-172-003 CH3域結構環序列

<400> 114

Gly Ala Asp Arg Trp Leu Glu
1 5

<210> 115
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-172-003 CH3域

<400> 115

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Pro Tyr Ile Ile Pro Pro Tyr Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
20 25 30

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
35 40 45

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
50 55 60

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Gly Ala Asp
65 70 75 80

Arg Trp Leu Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

85 90 95

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
100 105 110

<210> 116
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-172-003 CH3域

<400> 116
ggacagcctc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgccatac 60

atcatcccac catacaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 120

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 180

cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt gggcgcagat 240

aggtggctgg aagggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggcgct gcacaaccac 300

tacactcaga agagcttgtc cctgtcgccc ggt 333

<210> 117
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-172-002 CH3域結構環序列

<400> 117

Pro Phe Gln Met Pro Pro Tyr
1 5

<210> 118
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-172-002 CH3域

<400> 118

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Pro Phe Gln Met Pro Pro Tyr Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
20 25 30

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
35 40 45

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
50 55 60

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Gly Ala Asp
65 70 75 80

Arg Trp Leu Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
85 90 95

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
100 105 110

<210> 119
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-172-002 CH3域

<400> 119
ggccagcctc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgccattc 60

cagatgccac catacaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 120

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 180

cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt gggcgcagat 240

aggtggctgg aagggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 300

tacacacaga agagcctctc cctgtctccg ggt 333

<210> 120
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-172-004 CH3域結構環序列

<400> 120

Asn Tyr Ile Tyr Pro Pro Tyr
1 5

<210> 121
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-172-004 CH3域

<400> 121

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Asn Tyr Ile Tyr Pro Pro Tyr Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
20 25 30

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
35 40 45

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
50 55 60

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Gly Ala Asp
65 70 75 80

Arg Trp Leu Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
85 90 95

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
100 105 110

<210> 122
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-172-004 CH3域

<400> 122
ggacagcctc gagagcctca agtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaactac 60

atctacccac catacaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 120

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 180

cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt gggcgcagat 240

aggtggctgg aagggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggcgct gcacaaccac 300

tacactcaga agagcttgtc cctgtcgccc gga 333

<210> 123
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-172-001 CH3域結構環序列

<400> 123

Pro Phe Val Met Pro Pro Tyr
1 5

<210> 124
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-172-001 CH3域

<400> 124

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Pro Phe Val Met Pro Pro Tyr Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
20 25 30

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
35 40 45

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
50 55 60

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Gly Ala Asp
65 70 75 80

Arg Trp Leu Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
85 90 95

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
100 105 110

<210> 125
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-172-001 CH3域

<400> 125
ggccagcctc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgccattc 60

gttatgccac catacaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 120

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 180

cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt gggcgcagat 240

aggtggctgg aagggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 300

tacacacaga agagcctctc cctgtctccg ggt 333

<210> 126
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-172-005 CH3域結構環序列

<400> 126

Gln Gln Val Tyr Pro Pro Tyr
1 5

<210> 127
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-172-005 CH3域

<400> 127

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Gln Gln Val Tyr Pro Pro Tyr Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
20 25 30

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
35 40 45

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
50 55 60

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Gly Ala Asp
65 70 75 80

Arg Trp Leu Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
85 90 95

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

100 105 110

<210> 128
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-172-005 CH3域

<400> 128
ggccagcctc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgcagcag 60

gtttacccac catacaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 120

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 180

cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt gggcgcagat 240

aggtggctgg aagggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 300

tacacacaga agagcctctc cctgtctccg ggt 333

<210> 129
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-172-006 CH3域結構環序列

<400> 129

Arg Lys Tyr Tyr Pro Pro Tyr
1 5

<210> 130
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-172-006 CH3域

<400> 130

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp

1 5 10 15

Glu Leu Arg Lys Tyr Tyr Pro Pro Tyr Asn Gln Leu Ser Leu Thr Cys
20 25 30

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
35 40 45

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
50 55 60

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Gly Ala Asp
65 70 75 80

Arg Trp Leu Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
85 90 95

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
100 105 110

<210> 131
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-172-006 CH3域

<400> 131
ggccagcctc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgcgtaaa 60

tactacccgc cgtacaacca gctcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 120

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 180

cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt gggcgcagat 240

aggtggctgg aagggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 300

tacacacaga agagcctctc cctgtctccg ggt 333

<210> 132

<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-172 CH3域

<400> 132

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Arg Lys Tyr Tyr Pro Pro Tyr Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
20 25 30

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
35 40 45

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
50 55 60

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Gly Ala Asp
65 70 75 80

Arg Trp Leu Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
85 90 95

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
100 105 110

<210> 133
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Fcab FS22-172 CH3域

<400> 133
ggccagcctc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgcgtaaa 60

tactacccgc cgtacaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 120

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 180

cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt gggcgcagat 240

aggtggctgg aagggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 300

tacacacaga agagcctctc cctgtctccg ggt 333

<210> 134
<211> 457
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 有LALA突變的FS22-172-003-AA/E12v2 mAb2之重鏈

<400> 134

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Leu Phe Pro Thr Ile Phe Gly Val Ser Tyr Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

```
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
    130                 135                 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145                 150                 155                 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
                165                 170                 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
            180                 185                 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
        195                 200                 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
    210                 215                 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
225                 230                 235                 240

Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
                245                 250                 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
            260                 265                 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
        275                 280                 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
    290                 295                 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305                 310                 315                 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
```

325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Pro Tyr Ile Ile
355 360 365

Pro Pro Tyr Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Gly Ala Asp Arg Trp Leu Glu Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 135
<211> 1371
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 有LALA突變的FS22-172-003-AA/E12v2 mAb2之重鏈

<400> 135
gaagttcagc tggttcagtc tggcgccgaa gtgaaaagac ctggcgcctc tgtgaaggtg 60

tcctgcaagg cttctggcta ccccttacc tcctacggca tctcctgggt ccgacaggct 120

cctggacaag gcttggaatg gatgggctgg atctccgctt attccggcgg caccaattac 180

gcccagaaac tgcagggcag agtgaccatg accaccgaca cctctacctc caccgcctac 240

atggaactgc ggtccctgag atctgacgac accgccgtgt actactgcgc cagagatctg 300

ttccccacca tcttcggcgt gtcctactac tactattggg gccagggcac cctggtcacc 360

gtgtcctctg cttctaccaa gggacccagc gtgttccctc tggctccttc cagcaagtct 420

acctctggcg gaacagctgc tctgggctgc ctggtcaagg actactttcc tgagcctgtg 480

accgtgtctt ggaactctgg cgctctgaca tctggcgtgc acaccttтcc agctgtgctg 540

cagtcctccg gcctgtactc tctgtcctct gtcgtgaccg tgccttccag ctctctggga 600

acccagacct acatctgcaa tgtgaaccac aagccttcca acaccaaggt ggacaagaag 660

gtggaaccca agtcctgcga caagacccac acctgtcctc catgtcctgc tccagaagct 720

gctggcggcc cttccgtgtt tctgttccct ccaaagccta aggacaccct gatgatctct 780

cggacccctg aagtgacctg cgtggtggtg gatgtgtctc acgaggaccc agaagtgaag 840

ttcaattggt acgtggacgg cgtggaagtg cacaacgcca agaccaagcc tagagaggaa 900

cagtacaact ccacctacag agtggtgtcc gtgctgaccg tgctgcacca ggattggctg 960

aacggcaaag agtacaagtg caaggtgtcc aacaaggccc tgcctgctcc tatcgaaaag 1020

accatctcca aggccaaggg ccagcctagg gaaccccagg tttacacctt gcctccatct 1080

cgggacgagc tgccctacat catccctcca tacaaccagg tgtccctgac ctgcctcgtg 1140

aagggcttct acccttccga tatcgccgtg gaatgggaga gcaatggcca gcctgagaac 1200

aactacaaga caacccctcc tgtgctggac tccgacggct cattctttct gtactccaag 1260

ctgacagtgg gcgccgacag atggctggaa gggaacgtgt tctcctgcag cgtgatgcac 1320

gaggccctgc acaatcacta cacacagaag tccctgtctc tgtcccctgg c 1371

<210> 136
<211> 642
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FS22-172-003-AA/E12v2 mAb2之輕鏈

<400> 136

gacatccaga tgacccagtc tccatccaca ctgtccgcct ctgtgcggga cagagtgatc 60

atcacctgta gagccagcca gtccatcggc aacagactgg cctggtatca gcacaagcct 120

ggcaaggctc ccaagctgct gatctacgag gcctccacat ctgagacagg cgtgccctct 180

agattctccg gctctggctc tggcaccgac tttaccctga caatctccag cctgcagcct 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tcctacagca ccccttacac ctttggccag 300

ggcaccaagc tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttcccccca 360

agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gtctgctgaa caacttctac 420

cccagggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 480

gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gtgaggtgac ccaccagggc 600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc 642

<210> 137
<211> 457
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 有LALA突變的FS22-172-003-AA/E05v2 mAb2之重鏈

<400> 137

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Leu Phe Pro Thr Ile Phe Gly Val Ser Tyr Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
225 230 235 240

Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Pro Tyr Ile Ile
355 360 365

Pro Pro Tyr Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Gly Ala Asp Arg Trp Leu Glu Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 138

<211> 1371
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 有LALA突變的FS22-172-003-AA/E05v2 mAb2之重鏈

<400> 138
gaagtgcagc tggtgcagtc cggagccgaa gtcaagaggc ctggagcgtc cgtgaaggtg 60

tcctgcaaag cctcaggata caccttcact tcgtacggga tttcctgggt ccgccaagca 120

ccgggtcaag gcttggagtg gatgggatgg atcagcgcgt attccggggg aaccaactac 180

gctcaaaagc tgcagggtcg cgtgaccatg accaccgata cctccacctc aacggcctac 240

atggaactga gatctctgcg gagcgacgac actgccgtgt actactgtgc ccgggacctg 300

ttccccacta tcttcggagt gtcgtactac tactactggg gccaggggac tctcgtgacc 360

gtgtcgagcg ctagcactaa gggcccgtcg gtgttcccgc tggccccatc gtccaagagc 420

acatcagggg gtaccgccgc cctgggctgc cttgtgaagg attactttcc cgagcccgtc 480

acagtgtcct ggaacagcgg agccctgacc tccggagtgc atactttccc ggctgtgctt 540

cagtcctctg gcctgtactc attgtcctcc gtggtcaccg tcccttcgtc ctccctgggc 600

acccagacct atatctgtaa tgtcaaccat aagccctcga acaccaaggt cgacaagaag 660

gtcgagccga agtcgtgcga caagactcac acttgcccgc cttgcccagc cccggaagct 720

gccggtggtc cttcggtgtt cctcttcccg cccaagccga aggataccct gatgatctca 780

cggacccccg aagtgacctg tgtggtggtg gacgtgtccc acgaggaccc ggaagtgaaa 840

ttcaattggt acgtggatgg agtggaagtg cacaacgcca agaccaagcc acgggaagaa 900

cagtacaact ctacctaccg cgtggtgtcc gtgctcactg tgctgcacca agactggctg 960

aacgggaagg agtacaagtg caaagtgtcc aacaaggcgc tgcctgcccc aattgagaaa 1020

actatctcga aagccaaggg acagcctcga gaaccacagg tgtacaccct gccccccatcc 1080

cgggatgagc tgccatacat catcccacca tacaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 1140

aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 1200

aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag 1260

ctcaccgtgg gcgcagatag gtggctggaa gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1320

gaggcgctgc acaaccacta cactcagaag agcttgtccc tgtcgcccgg t 1371

<210> 139
<211> 645
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FS22-172-003-AA/E05v2 mAb2之輕鏈

<400> 139
gacattcaga tgacccaatc cccgtccacg ctgagcgcct ccgtcggtga tcgcgtgaca 60

atcacttgtc gggcgtcgca gtccatctct ggaaggctcg cctggtacca gcagaagcct 120

ggaaaggctc ccaacctcct tatctacgaa gccagcaacc tggagtccgg agtgcctagc 180

cggttcagcg gatcagggtc cggtaccgag ttcaccctga ccatttcctc gctccaacct 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccaacag tcctattcaa ctccgcgcgt gaccttcggc 300

cagggcacta aggtcgaaat caaaagaacc gtggcagccc catcggtgtt tatcttcccg 360

ccctcggacg aacagctgaa gtcaggcact gctagcgtgg tctgtctcct gaacaatttc 420

tacccgcgcg aagctaaggt ccagtggaag gtcgacaacg cgctgcagtc cggaaacagc 480

caggagtcag tgaccgagca ggactccaag gattccactt attccctgtc ctccaccctg 540

actttgagca aggccgacta cgagaagcac aaagtgtacg cctgcgaagt gacccatcaa 600

gggctttcgt cgcccgtgac caagagcttc aaccggggcg aatgc 645

<210> 140
<211> 457
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 有LALA突變的FS22-172-003-AA/G12v2 mAb2之重鏈

<400> 140

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Asp Leu Phe Pro Thr Ile Phe Gly Val Ser Tyr Tyr Tyr Tyr
            100                 105                 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
        115                 120                 125

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

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145                 150                 155                 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
                165                 170                 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
            180                 185                 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
        195                 200                 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
```

210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
225 230 235 240

Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Pro Tyr Ile Ile
355 360 365

Pro Pro Tyr Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Gly Ala Asp Arg Trp Leu Glu Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 141
<211> 1371
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 有LALA突變的FS22-172-003-AA/G12v2 mAb2之重鏈

<400> 141
gaagtgcagc tggtgcagtc cggagccgaa gtcaagaggc ctggagcgtc cgtgaaggtg 60

tcctgcaaag cctcaggata caccttcact tcgtacggga tttcctgggt ccgccaagca 120

ccgggtcaag gcttggagtg gatgggatgg atcagcgcgt attccggggg aaccaactac 180

gctcaaaagc tgcagggtcg cgtgaccatg accaccgata cctccacctc aacggcctac 240

atggaactga gatctctgcg gagcgacgac actgccgtgt actactgtgc ccgggacctg 300

ttccccacta tcttcggagt gtcgtactac tactactggg gccaggggac tctcgtgacc 360

gtgtcgagcg ctagcactaa gggcccgtcg gtgttcccgc tggccccatc gtccaagagc 420

acatcagggg gtaccgccgc cctgggctgc cttgtgaagg attactttcc cgagcccgtc 480

acagtgtcct ggaacagcgg agccctgacc tccggagtgc atactttccc ggctgtgctt 540

cagtcctctg gcctgtactc attgtcctcc gtggtcaccg tcccttcgtc ctccctgggc 600

acccagacct atatctgtaa tgtcaaccat aagccctcga acaccaaggt cgacaagaag 660

gtcgagccga agtcgtgcga caagactcac acttgcccgc cttgcccagc cccggaagct 720

gccggtggtc cttcggtgtt cctcttcccg cccaagccga aggataccct gatgatctca 780

cggacccccg aagtgacctg tgtggtggtg gacgtgtccc acgaggaccc ggaagtgaaa 840

ttcaattggt acgtggatgg agtggaagtg cacaacgcca agaccaagcc acgggaagaa 900

cagtacaact ctacctaccg cgtggtgtcc gtgctcactg tgctgcacca agactggctg 960

aacgggaagg agtacaagtg caaagtgtcc aacaaggcgc tgcctgcccc aattgagaaa 1020

actatctcga aagccaaggg acagcctcga gaaccacagg tgtacaccct gccccccatcc 1080

cgggatgagc tgccatacat catcccacca tacaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 1140

aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 1200

aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag 1260

ctcaccgtgg gcgcagatag gtggctggaa gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1320

gaggcgctgc acaaccacta cactcagaag agcttgtccc tgtcgcccgg t 1371

<210> 142
<211> 642
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FS22-172-003-AA/G12v2 mAb2之輕鏈

<400> 142
gacattcaga tgacccagtc cccgagcacg ctgtccgcaa gcgtgggggga cagagtgacc 60

atcacttgcc gcgcctcaca atccatcagc ggacgcttgg cctggtacca gcagaagccc 120

ggaaaggccc caaaccttct gatctacgaa gcctcgaacc tggagtcagg cgtcccttcg 180

cggttctctg gctccggttc cggaactgag ttcaccctca ccatctcgtc cctgcaaccg 240

gaagatttcg ccacctacta ctgccaacag tcgtactcct ggccccggac attcggacag 300

ggaaccaaag tcgagattaa gcggactgtg gcggctccta gcgtgttcat ctttcccccg 360

tccgacgaac agctgaagtc cggtaccgct agcgtggtct gtctcctgaa caatttctac 420

ccgcgcgaag ctaaggtcca gtggaaggtc gacaacgcgc tgcagtccgg aaacagccag 480

gagtcagtga ccgagcagga ctccaaggat tccacttatt ccctgtcctc caccctgact 540

ttgagcaagg ccgactacga gaagcacaaa gtgtacgcct gcgaagtgac ccatcaaggg 600

ctttcgtcgc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgaat gc 642

<210> 143
<211> 457
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 有LALA突變的FS22-053-008-AA/E12v2 mAb2之重鏈

<400> 143

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Asp Leu Phe Pro Thr Ile Phe Gly Val Ser Tyr Tyr Tyr Tyr
            100                 105                 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
        115                 120                 125

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

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145                 150                 155                 160
```

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
225 230 235 240

Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Asn Pro Pro Tyr

355 360 365

Leu Phe Ser Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Tyr Trp Arg Trp Leu Glu Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 144
<211> 1371
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 有LALA突變的FS22-053-008-AA/E12v2 mAb2之重鏈

<400> 144
gaagtgcagc tggtgcagtc cggagccgaa gtcaagaggc ctggagcgtc cgtgaaggtg 60

tcctgcaaag cctcaggata ccccttcact tcgtacggga tttcctgggt ccgccaagca 120

ccgggtcaag gcttggagtg gatgggatgg atcagcgcgt attccggggg aaccaactac 180

gctcaaaagc tgcagggtcg cgtgaccatg accaccgata cctccacctc aacggcctac 240

atggaactga gatctctgcg gagcgacgac actgccgtgt actactgtgc ccgggacctg 300

ttccccacta tcttcggagt gtcgtactac tactactggg gccaggggac tctcgtgacc 360

gtgtcgagcg ctagcactaa gggcccgtcg gtgttcccgc tggccccatc gtccaagagc 420

acatcagggg gtaccgccgc cctgggctgc cttgtgaagg attactttcc cgagcccgtc 480

acagtgtcct ggaacagcgg agccctgacc tccggagtgc atactttccc ggctgtgctt 540

cagtcctctg gcctgtactc attgtcctcc gtggtcaccg tcccttcgtc ctccctgggc 600

acccagacct atatctgtaa tgtcaaccat aagccctcga acaccaaggt cgacaagaag 660

gtcgagccga agtcgtgcga caagactcac acttgcccgc cttgcccagc cccggaagct 720

gccggtggtc cttcggtgtt cctcttcccg cccaagccga aggataccct gatgatctca 780

cggacccccg aagtgacctg tgtggtggtg gacgtgtccc acgaggaccc ggaagtgaaa 840

ttcaattggt acgtggatgg agtggaagtg cacaacgcca agaccaagcc acgggaagaa 900

cagtacaact ctacctaccg cgtggtgtcc gtgctcactg tgctgcacca agactggctg 960

aacgggaagg agtacaagtg caaagtgtcc aacaaggcgc tgcctgcccc aattgagaaa 1020

actatctcga aagccaaggg acagcctcga gaaccacagg tgtacaccct gccccccatcc 1080

cgggatgagc tgaacccgcc gtacctgttc tctaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 1140

aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 1200

aactacaaga ccacgcctcc cgtactggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag 1260

ctcaccgtgg attactggag gtggctggaa gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1320

gaggcgctgc acaaccacta cactcagaag agcttgtccc tgtcgcccgg t 1371

<210> 145
<211> 642
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 有LALA突變的FS22-053-008-AA/E12v2 mAb2之輕鏈

<400> 145
gacatccaga tgacgcagag cccgtctacc ctgtccgcct ccgtgagaga tcgcgtgatc 60

atcacctgtc gggccagcca gtccatcgga aaccgcttgg cgtggtacca gcacaagcct 120

gggaaggctc cgaagctgct catctacgaa gcctcgactt cggagactgg tgtccctagc 180

cggttcagcg gatcgggatc agggaccgat ttcactctga ccatttcctc cctgcaaccc 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccaacag tcatattcca ccccgtacac cttcggacaa 300

ggcaccaagc tcgaaatcaa gcggactgtc gccgcacctt ccgtgttcat tttcccaccc 360

tccgacgaac agctgaaatc gggtacagct agcgtggtct gtctcctgaa caatttctac 420

ccgcgcgaag ctaaggtcca gtggaaggtc gacaacgcgc tgcagtccgg aaacagccag 480

gagtcagtga ccgagcagga ctccaaggat tccacttatt ccctgtcctc caccctgact 540

ttgagcaagg ccgactacga gaagcacaaa gtgtacgcct gcgaagtgac ccatcaaggg 600

ctttcgtcgc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgaat gc 642

<210> 146
<211> 457
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 有LALA突變的FS22-053-008-AA/E05v2之重鏈

<400> 146

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Leu Phe Pro Thr Ile Phe Gly Val Ser Tyr Tyr Tyr Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
225 230 235 240

Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Asn Pro Pro Tyr
355 360 365

Leu Phe Ser Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Tyr Trp Arg Trp Leu Glu Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 147
<211> 1371
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 有LALA突變的FS22-053-008-AA/E05v2之重鏈
<400> 147
gaagtgcagc tggtgcagtc cggagccgaa gtcaagaggc ctggagcgtc cgtgaaggtg 60

tcctgcaaag cctcaggata caccttcact tcgtacggga tttcctgggt ccgccaagca 120

ccgggtcaag gcttggagtg gatgggatgg atcagcgcgt attccggggg aaccaactac 180

gctcaaaagc tgcagggtcg cgtgaccatg accaccgata cctccacctc aacggcctac 240

atggaactga gatctctgcg gagcgacgac actgccgtgt actactgtgc ccgggacctg 300

ttccccacta tcttcggagt gtcgtactac tactactggg gccaggggac tctcgtgacc 360

gtgtcgagcg ctagcactaa gggcccgtcg gtgttcccgc tggccccatc gtccaagagc 420

acatcagggg gtaccgccgc cctgggctgc cttgtgaagg attactttcc cgagcccgtc 480

acagtgtcct ggaacagcgg agccctgacc tccggagtgc atactttccc ggctgtgctt 540

cagtcctctg gcctgtactc attgtcctcc gtggtcaccg tcccttcgtc ctccctgggc 600

acccagacct atatctgtaa tgtcaaccat aagccctcga acaccaaggt cgacaagaag 660

gtcgagccga agtcgtgcga caagactcac acttgcccgc cttgcccagc cccggaagct 720

gccggtggtc cttcggtgtt cctcttcccg cccaagccga aggataccct gatgatctca 780

cggacccccg aagtgacctg tgtggtggtg gacgtgtccc acgaggaccc ggaagtgaaa 840

ttcaattggt acgtggatgg agtggaagtg cacaacgcca agaccaagcc acgggaagaa 900

cagtacaact ctacctaccg cgtggtgtcc gtgctcactg tgctgcacca agactggctg 960

aacgggaagg agtacaagtg caaagtgtcc aacaaggcgc tgcctgcccc aattgagaaa 1020

actatctcga aagccaaggg acagcctcga gaaccacagg tgtacaccct gccccccatcc 1080

cgggatgagc tgaacccgcc gtacctgttc tctaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 1140

aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 1200

aactacaaga ccacgcctcc cgtactggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag 1260

ctcaccgtgg attactggag gtggctggaa gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1320

gaggcgctgc acaaccacta cactcagaag agcttgtccc tgtcgcccgg t 1371

<210> 148
<211> 645
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 有LALA突變的FS22-053-008-AA/E05v2之輕鏈

<400> 148
gacattcaga tgacccaatc cccgtccacg ctgagcgcct ccgtcggtga tcgcgtgaca 60

atcacttgtc gggcgtcgca gtccatctct ggaaggctcg cctggtacca gcagaagcct 120

ggaaaggctc ccaacctcct tatctacgaa gccagcaacc tggagtccgg agtgcctagc 180

cggttcagcg gatcagggtc cggtaccgag ttcaccctga ccatttcctc gctccaacct 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccaacag tcctattcaa ctccgcgcgt gaccttcggc 300

cagggcacta aggtcgaaat caaaagaacc gtggcagccc catcggtgtt tatcttcccg 360

ccctcggacg aacagctgaa gtcaggcact gctagcgtgg tctgtctcct gaacaatttc 420

tacccgcgcg aagctaaggt ccagtggaag gtcgacaacg cgctgcagtc cggaaacagc 480

caggagtcag tgaccgagca ggactccaag gattccactt attccctgtc ctccaccctg 540

actttgagca aggccgacta cgagaagcac aaagtgtacg cctgcgaagt gacccatcaa 600

gggctttcgt cgcccgtgac caagagcttc aaccggggcg aatgc 645

<210> 149
<211> 457
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 有LALA突變的FS22-053-008-AA/G12v2之重鏈

<400> 149

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

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

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

```
Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Asp Leu Phe Pro Thr Ile Phe Gly Val Ser Tyr Tyr Tyr Tyr
            100                 105                 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
        115                 120                 125

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

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145                 150                 155                 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
                165                 170                 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
            180                 185                 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
        195                 200                 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
    210                 215                 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
225                 230                 235                 240

Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
                245                 250                 255
```

```
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
            260                 265                 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
        275                 280                 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
    290                 295                 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305                 310                 315                 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
                325                 330                 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
            340                 345                 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Asn Pro Pro Tyr
        355                 360                 365

Leu Phe Ser Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
    370                 375                 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385                 390                 395                 400

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Tyr Trp Arg Trp Leu Glu Gly Asn
            420                 425                 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
        435                 440                 445
```

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 150
<211> 1371
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 有LALA突變的FS22-053-008-AA/G12v2之重鏈

<400> 150
gaagtgcagc tggtgcagtc cggagccgaa gtcaagaggc ctggagcgtc cgtgaaggtg 60

tcctgcaaag cctcaggata caccttcact tcgtacggga tttcctgggt ccgccaagca 120

ccgggtcaag gcttggagtg gatgggatgg atcagcgcgt attccggggg aaccaactac 180

gctcaaaagc tgcagggtcg cgtgaccatg accaccgata cctccacctc aacggcctac 240

atggaactga gatctctgcg gagcgacgac actgccgtgt actactgtgc ccgggacctg 300

ttccccacta tcttcggagt gtcgtactac tactactggg gccaggggac tctcgtgacc 360

gtgtcgagcg ctagcactaa gggcccgtcg gtgttcccgc tggccccatc gtccaagagc 420

acatcagggg gtaccgccgc cctgggctgc cttgtgaagg attactttcc cgagcccgtc 480

acagtgtcct ggaacagcgg agccctgacc tccggagtgc atactttccc ggctgtgctt 540

cagtcctctg gcctgtactc attgtcctcc gtggtcaccg tcccttcgtc ctccctgggc 600

acccagacct atatctgtaa tgtcaaccat aagccctcga acaccaaggt cgacaagaag 660

gtcgagccga agtcgtgcga caagactcac acttgcccgc cttgcccagc cccggaagct 720

gccggtggtc cttcggtgtt cctcttcccg cccaagccga aggataccct gatgatctca 780

cggacccccg aagtgacctg tgtggtggtg gacgtgtccc acgaggaccc ggaagtgaaa 840

ttcaattggt acgtggatgg agtggaagtg cacaacgcca agaccaagcc acgggaagaa 900

cagtacaact ctacctaccg cgtggtgtcc gtgctcactg tgctgcacca agactggctg 960

aacgggaagg agtacaagtg caaagtgtcc aacaaggcgc tgcctgcccc aattgagaaa 1020

actatctcga aagccaaggg acagcctcga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc 1080

cgggatgagc tgaacccgcc gtacctgttc tctaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 1140

aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 1200

aactacaaga ccacgcctcc cgtactggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag 1260

ctcaccgtgg attactggag gtggctggaa gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1320

gaggcgctgc acaaccacta cactcagaag agcttgtccc tgtcgcccgg t 1371

<210> 151
<211> 642
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 有LALA突變的FS22-053-008-AA/G12v2之輕鏈

<400> 151
gacattcaga tgacccagtc cccgagcacg ctgtccgcaa gcgtggggga cagagtgacc 60

atcacttgcc gcgcctcaca atccatcagc ggacgcttgg cctggtacca gcagaagccc 120

ggaaaggccc caaaccttct gatctacgaa gcctcgaacc tggagtcagg cgtcccttcg 180

cggttctctg gctccggttc cggaactgag ttcaccctca ccatctcgtc cctgcaaccg 240

gaagatttcg ccacctacta ctgccaacag tcgtactcct ggccccggac attcggacag 300

ggaaccaaag tcgagattaa gcggactgtg gcggctccta gcgtgttcat ctttcccccg 360

tccgacgaac agctgaagtc cggtaccgct agcgtggtct gtctcctgaa caatttctac 420

ccgcgcgaag ctaaggtcca gtggaaggtc gacaacgcgc tgcagtccgg aaacagccag 480

gagtcagtga ccgagcagga ctccaaggat tccacttatt ccctgtcctc caccctgact 540

ttgagcaagg ccgactacga gaagcacaaa gtgtacgcct gcgaagtgac ccatcaaggg 600

ctttcgtcgc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgaat gc 642

<210> 152
<211> 457
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 有LALA突變的FS22-053-017AA/E12v2之重鏈

<400> 152

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Leu Phe Pro Thr Ile Phe Gly Val Ser Tyr Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

```
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
        195                 200                 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
    210                 215                 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
225                 230                 235                 240

Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
                245                 250                 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
            260                 265                 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
        275                 280                 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
    290                 295                 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305                 310                 315                 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
                325                 330                 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
            340                 345                 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Asn Pro Pro Tyr
        355                 360                 365

Leu Phe Ser Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
    370                 375                 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385                 390                 395                 400
```

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Tyr His Trp Arg Trp Leu Glu Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 153
<211> 457
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 有LALA突變的FS22-053-017AA/E05v2之重鏈

<400> 153

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Leu Phe Pro Thr Ile Phe Gly Val Ser Tyr Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
225 230 235 240

Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Asn Pro Pro Tyr
355 360 365

Leu Phe Ser Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Tyr His Trp Arg Trp Leu Glu Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 154
<211> 457
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 有LALA突變的FS22-053-017AA/G12v2之重鏈

<400> 154

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Asp Leu Phe Pro Thr Ile Phe Gly Val Ser Tyr Tyr Tyr Tyr
            100                 105                 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
        115                 120                 125

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

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145                 150                 155                 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
                165                 170                 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
            180                 185                 190
```

```
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
        195                 200                 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
    210                 215                 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
225                 230                 235                 240

Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
                245                 250                 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
            260                 265                 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
        275                 280                 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
    290                 295                 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305                 310                 315                 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
                325                 330                 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
            340                 345                 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Asn Pro Pro Tyr
        355                 360                 365

Leu Phe Ser Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
    370                 375                 380
```

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Tyr His Trp Arg Trp Leu Glu Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 155
<211> 457
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 有LALA突變的FS22-172-003AA/1am-G02v3之重鏈

<400> 155

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Leu Phe Pro Thr Ile Phe Gly Val Ser Tyr Tyr Tyr Tyr
            100                 105                 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
        115                 120                 125

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

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145                 150                 155                 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
                165                 170                 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
            180                 185                 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
        195                 200                 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
    210                 215                 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
225                 230                 235                 240

Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
                245                 250                 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
            260                 265                 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
        275                 280                 285
```

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Pro Tyr Ile Ile
355 360 365

Pro Pro Tyr Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Gly Ala Asp Arg Trp Leu Glu Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 156
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 有LALA突變的FS22-172-003AA/S70之重鏈

<400> 156

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
            20                  25                  30

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

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Leu Val Thr Val Ser Ala 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
            180                 185                 190

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
    210                 215                 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225                 230                 235                 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                245                 250                 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
            260                 265                 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
        275                 280                 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
    290                 295                 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305                 310                 315                 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
                325                 330                 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
            340                 345                 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Pro Tyr Ile Ile Pro Pro Tyr Asn Gln
        355                 360                 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
    370                 375                 380
```

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

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

Thr Val Gly Ala Asp Arg Trp Leu Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly
450

<210> 157
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> S70之輕鏈

<400> 157

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 158
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 有LALA突變的FS22-172-003AA/HelD1.3之重鏈

<400> 158

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
1 5 10 15

```
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Thr Phe Ser Gly Tyr
            20                  25                  30

Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
    50                  55                  60

Ser Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65                  70                  75                  80

Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Glu Arg Asp Tyr Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
        195                 200                 205
```

```
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
    210                 215                 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
225                 230                 235                 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                245                 250                 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
            260                 265                 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
        275                 280                 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
    290                 295                 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305                 310                 315                 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
                325                 330                 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
            340                 345                 350

Ser Arg Asp Glu Leu Pro Tyr Ile Ile Pro Pro Tyr Asn Gln Val Ser
        355                 360                 365

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385                 390                 395                 400

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

Gly Ala Asp Arg Trp Leu Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly
450

<210> 159
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HelD1.3之輕鏈

<400> 159

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 160
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 有LALA突變的FS22m-063AA/S70之重鏈

<400> 160

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30

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

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala 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
180 185 190

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

```
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                245                 250                 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
            260                 265                 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
        275                 280                 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
    290                 295                 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305                 310                 315                 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
                325                 330                 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
            340                 345                 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Pro Tyr Trp Ser Tyr 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 Met Asn Tyr
                405                 410                 415

Arg Trp Glu Leu 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
        435                 440                 445
```

<210> 161
<211> 445
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 有LALA突變的FS22m-063AA/HelD1.3之重鏈

<400> 161

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Thr Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Glu Arg Asp Tyr Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val
100 105 110

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

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

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

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

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

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Asp Glu Pro Tyr Trp Ser Tyr Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

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

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

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Met Asn Tyr Arg Trp
405 410 415

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

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

<210> 162
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 有LALA突變的G1-AA/E12v2之重鏈

<400> 162

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

```
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Asp Leu Phe Pro Thr Ile Phe Gly Val Ser Tyr Tyr Tyr Tyr
            100                 105                 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
        115                 120                 125

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

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145                 150                 155                 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
                165                 170                 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
            180                 185                 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
        195                 200                 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
    210                 215                 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
225                 230                 235                 240

Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
                245                 250                 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
            260                 265                 270
```

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

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

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly
450

<210> 163
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> G1/S70之重鏈

<400> 163

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
            20                  25                  30

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

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Leu Val Thr Val Ser Ala 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
180 185 190

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu 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 Lys
435 440 445

<210> 164
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 有LALA突變的G1-AA/S70之重鏈

<400> 164

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30

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

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala 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
180 185 190

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu 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 Lys
435 440 445

<210> 165
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> G1/4420之重鏈

<400> 165

```
Glu Val Lys Leu Asp Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1               5                  10                  15

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

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp
    50                  55                  60

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

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Met Gly Ile Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Thr Gly Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Ser 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
            180                 185                 190
```

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu 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 Lys
435 440 445

<210> 166
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4420之輕鏈

<400> 166

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 167
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 有LALA突變的G1-AA/4420之重鏈

<400> 167

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

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

```
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp
    50                  55                  60

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

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Met Gly Ile Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Thr Gly Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Ser 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
            180                 185                 190

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
    210                 215                 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225                 230                 235                 240
```

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu 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 Lys
435 440 445

<210> 168
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 有LALA突變的G1-AA/He1D1.3之重鏈

<400> 168

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Thr Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Glu Arg Asp Tyr Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val
100 105 110

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

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

```
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145                 150                 155                 160

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

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

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
        195                 200                 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
    210                 215                 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
225                 230                 235                 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                245                 250                 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
            260                 265                 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
        275                 280                 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
    290                 295                 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305                 310                 315                 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
                325                 330                 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
            340                 345                 350
```

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

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

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

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

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

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

<210> 169
<211> 460
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 有LALA突變的G1-AA/MLS109之重鏈

<400> 169

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

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

Ser Val Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Asn Ser Asp Ser Thr Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn Ser Ile Phe
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Arg Ser Tyr Tyr Ala Phe Ser Ser Gly Ser Leu Ser Asp
100 105 110

Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Ile Val
115 120 125

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

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
145 150 155 160

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
165 170 175

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
195 200 205

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
210 215 220

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
225 230 235 240

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
245 250 255

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
260 265 270

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
275 280 285

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
290 295 300

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
305 310 315 320

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
325 330 335

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
340 345 350

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
355 360 365

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
370 375 380

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
385 390 395 400

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
405 410 415

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
420 425 430

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
435 440 445

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 170
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> MLS109之輕鏈

<400> 170

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Thr
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Thr Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 171
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FS22-172-003 CH3域AB環

<400> 171

Arg Asp Glu Leu Pro Tyr Ile Ile Pro Pro Tyr Asn Gln
1 5 10

<210> 172
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FS22-172-003 CH3域EF環

<400> 172

Gly Ala Asp Arg Trp Leu Glu Gly Asn Val
1 5 10

<210> 173
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FS22-53-008 CH3域AB環

<400> 173

Arg Asp Glu Leu Asn Pro Pro Tyr Leu Phe Ser Asn Gln
1 5 10

<210> 174
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FS22-53-008 CH3域EF環

<400> 174

Asp Tyr Trp Arg Trp Leu Glu Gly Asn Val
1 5 10

<210> 175
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FS22-053-017 CH3域EF環

<400> 175

Tyr His Trp Arg Trp Leu Glu Gly Asn Val
1 5 10

<210> 176
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 有LALA突變及P114A突變的CH2域

<400> 176

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

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

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Ala Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105 110

<210> 177
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> G1/280_02_G02之重鏈

<400> 177

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

```
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Asp Leu Phe Pro Thr Ile Phe Gly Val Ser Tyr Tyr Tyr Tyr
            100                 105                 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
        115                 120                 125

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

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145                 150                 155                 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
                165                 170                 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
            180                 185                 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
        195                 200                 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
    210                 215                 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225                 230                 235                 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
                245                 250                 255
```

```
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
            260                 265                 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
        275                 280                 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
    290                 295                 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305                 310                 315                 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
                325                 330                 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
            340                 345                 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
        355                 360                 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
    370                 375                 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385                 390                 395                 400

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

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
            420                 425                 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
        435                 440                 445

Leu Ser Pro Gly
    450
```

<210> 178
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> G1/280_02_G02之輕鏈

<400> 178

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 Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

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

Met Ile Phe Glu Val Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe
50 55 60

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ser Ser Phe Lys Arg Gly
85 90 95

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

Gln Pro Ala 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> 179
<211> 272
<212> PRT
<213> 智人PD-L1

<400> 179

Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
1 5 10 15

Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu
20 25 30

Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln
35 40 45

Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg
50 55 60

Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala
65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys
85 90 95

Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val

100 105 110

Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
115 120 125

Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
130 135 140

Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
145 150 155 160

Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr
165 170 175

Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr
180 185 190

Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile
195 200 205

Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His Leu Val
210 215 220

Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile
225 230 235 240

Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile
245 250 255

Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu Glu Thr
260 265 270

<210> 180
<211> 220
<212> PRT
<213> 智人PD-L1細胞外域

<400> 180

```
Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
1               5                  10                  15

Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu
            20                  25                  30

Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln
        35                  40                  45

Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg
    50                  55                  60

Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala
65                  70                  75                  80

Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys
                85                  90                  95

Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val
            100                 105                 110

Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
        115                 120                 125

Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
    130                 135                 140

Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
145                 150                 155                 160

Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr
            180                 185                 190

Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile
        195                 200                 205
```

Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg
210 215 220

<210> 181
<211> 272
<212> PRT
<213> 鼠類PD-L1

<400> 181

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

Asn Val Thr Met Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Arg Glu Leu Asp Leu
20 25 30

Leu Ala Leu Val Val Tyr Trp Glu Lys Glu Asp Glu Gln Val Ile Gln
35 40 45

Phe Val Ala Gly Glu Glu Asp Leu Lys Pro Gln His Ser Asn Phe Arg
50 55 60

Gly Arg Ala Ser Leu Pro Lys Asp Gln Leu Leu Lys Gly Asn Ala Ala
65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Cys Cys
85 90 95

Ile Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Leu Lys Val
100 105 110

Asn Ala Pro Tyr Arg Lys Ile Asn Gln Arg Ile Ser Val Asp Pro Ala
115 120 125

Thr Ser Glu His Glu Leu Ile Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Glu Ala
130 135 140

Glu Val Ile Trp Thr Asn Ser Asp His Gln Pro Val Ser Gly Lys Arg

145 150 155 160

Ser Val Thr Thr Ser Arg Thr Glu Gly Met Leu Leu Asn Val Thr Ser
165 170 175

Ser Leu Arg Val Asn Ala Thr Ala Asn Asp Val Phe Tyr Cys Thr Phe
180 185 190

Trp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asn His Thr Ala Glu Leu Ile Ile Pro
195 200 205

Glu Leu Pro Ala Thr His Pro Pro Gln Asn Arg Thr His Trp Val Leu
210 215 220

Leu Gly Ser Ile Leu Leu Phe Leu Ile Val Val Ser Thr Val Leu Leu
225 230 235 240

Phe Leu Arg Lys Gln Val Arg Met Leu Asp Val Glu Lys Cys Gly Val
245 250 255

Glu Asp Thr Ser Ser Lys Asn Arg Asn Asp Thr Gln Phe Glu Glu Thr
260 265 270

<210> 182
<211> 221
<212> PRT
<213> 鼠類PD-L1細胞外域

<400> 182

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

Asn Val Thr Met Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Arg Glu Leu Asp Leu
20 25 30

Leu Ala Leu Val Val Tyr Trp Glu Lys Glu Asp Glu Gln Val Ile Gln
35 40 45

Phe Val Ala Gly Glu Glu Asp Leu Lys Pro Gln His Ser Asn Phe Arg
50 55 60

Gly Arg Ala Ser Leu Pro Lys Asp Gln Leu Leu Lys Gly Asn Ala Ala
65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Cys Cys
85 90 95

Ile Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Leu Lys Val
100 105 110

Asn Ala Pro Tyr Arg Lys Ile Asn Gln Arg Ile Ser Val Asp Pro Ala
115 120 125

Thr Ser Glu His Glu Leu Ile Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Glu Ala
130 135 140

Glu Val Ile Trp Thr Asn Ser Asp His Gln Pro Val Ser Gly Lys Arg
145 150 155 160

Ser Val Thr Thr Ser Arg Thr Glu Gly Met Leu Leu Asn Val Thr Ser
165 170 175

Ser Leu Arg Val Asn Ala Thr Ala Asn Asp Val Phe Tyr Cys Thr Phe
180 185 190

Trp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asn His Thr Ala Glu Leu Ile Ile Pro
195 200 205

Glu Leu Pro Ala Thr His Pro Pro Gln Asn Arg Thr His
210 215 220

<210> 183
<211> 328
<212> PRT
<213> 食蟹獼猴PD-L1

<400> 183

```
Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
1               5                  10                  15

Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu
            20                  25                  30

Thr Ser Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln
        35                  40                  45

Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Asn Tyr Arg
    50                  55                  60

Gln Arg Ala Gln Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala
65                  70                  75                  80

Leu Arg Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys
                85                  90                  95

Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val
            100                 105                 110

Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
        115                 120                 125

Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
    130                 135                 140

Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
145                 150                 155                 160

Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Leu Asn Val Thr
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Ala Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Ile
            180                 185                 190

Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile
```

195 200 205

Pro Glu Leu Pro Leu Ala Leu Pro Pro Asn Glu Arg Thr His Leu Val
210 215 220

Ile Leu Gly Ala Ile Phe Leu Leu Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile
225 230 235 240

Phe Tyr Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Met Lys Lys Cys Gly Ile
245 250 255

Arg Val Thr Asn Ser Lys Lys Gln Arg Asp Thr Gln Leu Glu Glu Thr
260 265 270

Lys Gly Pro Ser Ala Arg Phe Asp Ile Pro Asp Glu Ile Pro Val Ile
275 280 285

Glu Ser Lys Pro Asn Thr Leu Ser Ile Val Leu Gly Thr Thr Leu Thr
290 295 300

Val Ala Met Ile Ile Val Ala Thr Ile Phe Gly Tyr Arg Arg Gln Lys
305 310 315 320

Gly Arg Leu Arg Thr Leu Lys Leu
325

<210> 184
<211> 222
<212> PRT
<213> 食蟹獼猴PD-L1細胞外域

<400> 184

Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
1 5 10 15

Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu
20 25 30

Thr Ser Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln
35 40 45

Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Asn Tyr Arg
50 55 60

Gln Arg Ala Gln Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala
65 70 75 80

Leu Arg Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys
85 90 95

Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val
100 105 110

Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
115 120 125

Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
130 135 140

Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
145 150 155 160

Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Leu Asn Val Thr
165 170 175

Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Ala Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Ile
180 185 190

Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile
195 200 205

Pro Glu Leu Pro Leu Ala Leu Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
210 215 220

<210> 185
<211> 232

<212> PRT
<213> 智人CD137

<400> 185

```
Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1               5                  10                  15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
            20                  25                  30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
        35                  40                  45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
    50                  55                  60

Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
65                  70                  75                  80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
                85                  90                  95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
            100                 105                 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
        115                 120                 125

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
    130                 135                 140

Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
145                 150                 155                 160

Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu
                165                 170                 175

Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu Arg Phe Ser Val Val Lys Arg
```

180 185 190

Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro
195 200 205

Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu
210 215 220

Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
225 230

<210> 186
<211> 163
<212> PRT
<213> 智人CD137細胞外域

<400> 186

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
85 90 95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
115 120 125

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
130 135 140

Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
145 150 155 160

Ser Pro Gln

<210> 187
<211> 233
<212> PRT
<213> 鼠類CD137

<400> 187

Val Gln Asn Ser Cys Asp Asn Cys Gln Pro Gly Thr Phe Cys Arg Lys
1 5 10 15

Tyr Asn Pro Val Cys Lys Ser Cys Pro Pro Ser Thr Phe Ser Ser Ile
20 25 30

Gly Gly Gln Pro Asn Cys Asn Ile Cys Arg Val Cys Ala Gly Tyr Phe
35 40 45

Arg Phe Lys Lys Phe Cys Ser Ser Thr His Asn Ala Glu Cys Glu Cys
50 55 60

Ile Glu Gly Phe His Cys Leu Gly Pro Gln Cys Thr Arg Cys Glu Lys
65 70 75 80

Asp Cys Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr Lys Gln Gly Cys Lys Thr Cys
85 90 95

Ser Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn Gly Thr Gly Val Cys Arg Pro
100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg Ser Val Leu Lys Thr Gly Thr
115 120 125

Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro Pro Val Val Ser Phe Ser Pro
130 135 140

Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu Gly Gly Pro Gly Gly His Ser
145 150 155 160

Leu Gln Val Leu Thr Leu Phe Leu Ala Leu Thr Ser Ala Leu Leu Leu
165 170 175

Ala Leu Ile Phe Ile Thr Leu Leu Phe Ser Val Leu Lys Trp Ile Arg
180 185 190

Lys Lys Phe Pro His Ile Phe Lys Gln Pro Phe Lys Lys Thr Thr Gly
195 200 205

Ala Ala Gln Glu Glu Asp Ala Cys Ser Cys Arg Cys Pro Gln Glu Glu
210 215 220

Glu Gly Gly Gly Gly Gly Tyr Glu Leu
225 230

<210> 188
<211> 164
<212> PRT
<213> 鼠類CD137細胞外域

<400> 188

Val Gln Asn Ser Cys Asp Asn Cys Gln Pro Gly Thr Phe Cys Arg Lys
1 5 10 15

Tyr Asn Pro Val Cys Lys Ser Cys Pro Pro Ser Thr Phe Ser Ser Ile
20 25 30

Gly Gly Gln Pro Asn Cys Asn Ile Cys Arg Val Cys Ala Gly Tyr Phe
35 40 45

Arg Phe Lys Lys Phe Cys Ser Ser Thr His Asn Ala Glu Cys Glu Cys
50 55 60

Ile Glu Gly Phe His Cys Leu Gly Pro Gln Cys Thr Arg Cys Glu Lys
65 70 75 80

Asp Cys Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr Lys Gln Gly Cys Lys Thr Cys
85 90 95

Ser Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn Gly Thr Gly Val Cys Arg Pro
100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg Ser Val Leu Lys Thr Gly Thr
115 120 125

Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro Pro Val Val Ser Phe Ser Pro
130 135 140

Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu Gly Gly Pro Gly Gly His Ser
145 150 155 160

Leu Gln Val Leu

<210> 189
<211> 231
<212> PRT
<213> 食蟹獼猴CD137

<400> 189

Leu Gln Asp Leu Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Ser Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val

35 40 45

Phe Lys Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Cys Ile Ser Gly Tyr His Cys Leu Gly Ala Glu Cys Ser Met Cys Glu
65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
85 90 95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
115 120 125

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
130 135 140

Gly Ala Ser Ser Ala Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
145 150 155 160

Ser Pro Gln Ile Ile Phe Phe Leu Ala Leu Thr Ser Thr Val Val Leu
165 170 175

Phe Leu Leu Phe Phe Leu Val Leu Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Ser
180 185 190

Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val
195 200 205

Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu
210 215 220

Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
225 230

<210> 190
<211> 163
<212> PRT
<213> 食蟹獼猴CD137細胞外域

<400> 190

Leu Gln Asp Leu Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Ser Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45

Phe Lys Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Cys Ile Ser Gly Tyr His Cys Leu Gly Ala Glu Cys Ser Met Cys Glu
65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
85 90 95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
115 120 125

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
130 135 140

Gly Ala Ser Ser Ala Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
145 150 155 160

Ser Pro Gln

<210> 191
<211> 445
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> G1/He1D1.3之重鏈

<400> 191

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
1               5                  10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Thr Phe Ser Gly Tyr
            20                  25                  30

Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
    50                  55                  60

Ser Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65                  70                  75                  80

Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Glu Arg Asp Tyr Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val
            100                 105                 110

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

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

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145                 150                 155                 160
```

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

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

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 192
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OVA胜肽

<400> 192

Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly
1 5 10 15

Arg

<210> 193
<211> 434
<212> PRT
<213> 智人B7-H3細胞外域

<400> 193

Ile Leu Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly

1 5 10 15

Thr Asp Ala Thr Leu Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser
20 25 30

Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu
35 40 45

Val His Ser Phe Ala Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn
50 55 60

Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu
65 70 75 80

Arg Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe
85 90 95

Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala
100 105 110

Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu
115 120 125

Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr
130 135 140

Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr
145 150 155 160

Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp
165 170 175

Val His Ser Ile Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser
180 185 190

Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Ser Ser Val
195 200 205

Thr Ile Thr Pro Gln Arg Ser Pro Thr Gly Ala Val Glu Val Gln Val
210 215 220

Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu Arg
225 230 235 240

Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu
245 250 255

Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr Glu
260 265 270

Gly Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro
275 280 285

Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg
290 295 300

Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe
305 310 315 320

Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro
325 330 335

Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val
340 345 350

Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe
355 360 365

Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser
370 375 380

Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg
385 390 395 400

Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro

405 410 415

Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro
420 425 430

Met Thr

<210> 194
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> SIINFEKL胜肽

<400> 194

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
1 5

<210> 195
<211> 433
<212> PRT
<213> 智人PD-L1-rCD4-His

<400> 195

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10 15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
35 40 45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
50 55 60

Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
65 70 75 80

```
Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
                85                  90                  95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
            100                 105                 110

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
        115                 120                 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
    130                 135                 140

Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
145                 150                 155                 160

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

Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
            180                 185                 190

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
        195                 200                 205

Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
    210                 215                 220

Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr Ala
225                 230                 235                 240

Ala Ala Thr Ser Ile Thr Ala Tyr Lys Ser Glu Gly Glu Ser Ala Glu
                245                 250                 255

Phe Ser Phe Pro Leu Asn Leu Gly Glu Glu Ser Leu Gln Gly Glu Leu
            260                 265                 270
```

Arg Trp Lys Ala Glu Lys Ala Pro Ser Ser Gln Ser Trp Ile Thr Phe
275 280 285

Ser Leu Lys Asn Gln Lys Val Ser Val Gln Lys Ser Thr Ser Asn Pro
290 295 300

Lys Phe Gln Leu Ser Glu Thr Leu Pro Leu Thr Leu Gln Ile Pro Gln
305 310 315 320

Val Ser Leu Gln Phe Ala Gly Ser Gly Asn Leu Thr Leu Thr Leu Asp
325 330 335

Arg Gly Ile Leu Tyr Gln Glu Val Asn Leu Val Val Met Lys Val Thr
340 345 350

Gln Pro Asp Ser Asn Thr Leu Thr Cys Glu Val Met Gly Pro Thr Ser
355 360 365

Pro Lys Met Arg Leu Ile Leu Lys Gln Glu Asn Gln Glu Ala Arg Val
370 375 380

Ser Arg Gln Glu Lys Val Ile Gln Val Gln Ala Pro Glu Ala Gly Val
385 390 395 400

Trp Gln Cys Leu Leu Ser Glu Gly Glu Glu Val Lys Met Asp Ser Lys
405 410 415

Ile Gln Val Leu Ser Lys Gly Leu Asn Gly Ser His His His His His
420 425 430

His

<210> 196
<211> 477
<212> PRT
<213> 智人PD-L1-Fc-His

<400> 196

```
Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1               5                  10                  15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
            20                  25                  30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
        35                  40                  45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
    50                  55                  60

Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
65                  70                  75                  80

Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
                85                  90                  95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
            100                 105                 110

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
        115                 120                 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
    130                 135                 140

Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
145                 150                 155                 160

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

Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
            180                 185                 190

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
```

195 200 205

Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
210 215 220

Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr Ala
225 230 235 240

Ala Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
245 250 255

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys Gly Ser His His His His His His
465 470 475

<210> 197
<211> 432
<212> PRT
<213> 鼠類PD-L1-rCD4-His

<400> 197

Met Arg Ile Phe Ala Gly Ile Ile Phe Thr Ala Cys Cys His Leu Leu
1 5 10 15

Arg Ala Phe Thr Ile Thr Ala Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20 25 30

Gly Ser Asn Val Thr Met Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Arg Glu Leu
35 40 45

Asp Leu Leu Ala Leu Val Val Tyr Trp Glu Lys Glu Asp Glu Gln Val
50 55 60

Ile Gln Phe Val Ala Gly Glu Glu Asp Leu Lys Pro Gln His Ser Asn
65 70 75 80

Phe Arg Gly Arg Ala Ser Leu Pro Lys Asp Gln Leu Leu Lys Gly Asn
85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
100 105 110

Cys Cys Ile Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Leu
115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Arg Lys Ile Asn Gln Arg Ile Ser Val Asp
130 135 140

Pro Ala Thr Ser Glu His Glu Leu Ile Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro
145 150 155 160

Glu Ala Glu Val Ile Trp Thr Asn Ser Asp His Gln Pro Val Ser Gly
165 170 175

Lys Arg Ser Val Thr Thr Ser Arg Thr Glu Gly Met Leu Leu Asn Val
180 185 190

Thr Ser Ser Leu Arg Val Asn Ala Thr Ala Asn Asp Val Phe Tyr Cys
195 200 205

Thr Phe Trp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asn His Thr Ala Glu Leu Ile
210 215 220

Ile Pro Glu Leu Pro Ala Thr His Pro Pro Gln Asn Arg Thr Ala Ala
225 230 235 240

Ala Thr Ser Ile Thr Ala Tyr Lys Ser Glu Gly Glu Ser Ala Glu Phe
245 250 255

Ser Phe Pro Leu Asn Leu Gly Glu Glu Ser Leu Gln Gly Glu Leu Arg
260 265 270

Trp Lys Ala Glu Lys Ala Pro Ser Ser Gln Ser Trp Ile Thr Phe Ser
275 280 285

Leu Lys Asn Gln Lys Val Ser Val Gln Lys Ser Thr Ser Asn Pro Lys
290 295 300

Phe Gln Leu Ser Glu Thr Leu Pro Leu Thr Leu Gln Ile Pro Gln Val
305 310 315 320

Ser Leu Gln Phe Ala Gly Ser Gly Asn Leu Thr Leu Thr Leu Asp Arg
325 330 335

Gly Ile Leu Tyr Gln Glu Val Asn Leu Val Val Met Lys Val Thr Gln
340 345 350

Pro Asp Ser Asn Thr Leu Thr Cys Glu Val Met Gly Pro Thr Ser Pro
355 360 365

Lys Met Arg Leu Ile Leu Lys Gln Glu Asn Gln Glu Ala Arg Val Ser
370 375 380

Arg Gln Glu Lys Val Ile Gln Val Gln Ala Pro Glu Ala Gly Val Trp
385 390 395 400

Gln Cys Leu Leu Ser Glu Gly Glu Glu Val Lys Met Asp Ser Lys Ile
405 410 415

Gln Val Leu Ser Lys Gly Leu Asn Gly Ser His His His His His His
420 425 430

<210> 198
<211> 476
<212> PRT
<213> 鼠類PD-L1-Fc-His

<400> 198

Met Arg Ile Phe Ala Gly Ile Ile Phe Thr Ala Cys Cys His Leu Leu
1 5 10 15

Arg Ala Phe Thr Ile Thr Ala Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20 25 30

```
Gly Ser Asn Val Thr Met Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Arg Glu Leu
        35                  40                  45

Asp Leu Leu Ala Leu Val Val Tyr Trp Glu Lys Glu Asp Glu Gln Val
    50                  55                  60

Ile Gln Phe Val Ala Gly Glu Glu Asp Leu Lys Pro Gln His Ser Asn
65                  70                  75                  80

Phe Arg Gly Arg Ala Ser Leu Pro Lys Asp Gln Leu Leu Lys Gly Asn
                85                  90                  95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
            100                 105                 110

Cys Cys Ile Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Leu
        115                 120                 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Arg Lys Ile Asn Gln Arg Ile Ser Val Asp
    130                 135                 140

Pro Ala Thr Ser Glu His Glu Leu Ile Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro
145                 150                 155                 160

Glu Ala Glu Val Ile Trp Thr Asn Ser Asp His Gln Pro Val Ser Gly
                165                 170                 175

Lys Arg Ser Val Thr Thr Ser Arg Thr Glu Gly Met Leu Leu Asn Val
            180                 185                 190

Thr Ser Ser Leu Arg Val Asn Ala Thr Ala Asn Asp Val Phe Tyr Cys
        195                 200                 205

Thr Phe Trp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asn His Thr Ala Glu Leu Ile
    210                 215                 220

Ile Pro Glu Leu Pro Ala Thr His Pro Pro Gln Asn Arg Thr Ala Ala
```

225 230 235 240

Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Ser Pro Gly Lys Gly Ser His His His His His His
465 470 475

<210> 199
<211> 245
<212> PRT
<213> 智人PD-L1-His-Avi

<400> 199

Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
1 5 10 15

Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu
20 25 30

Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln
35 40 45

Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg
50 55 60

Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala
65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys
85 90 95

Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val
100 105 110

Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
115 120 125

Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
130 135 140

Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
145 150 155 160

Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr
165 170 175

Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr
180 185 190

Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile
195 200 205

Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Gly Ser His His
210 215 220

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

Ile Glu Trp His Glu
245

第108124754號專利申請案申請專利範圍替換本
日期：113年5月17日

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種結合程式性死亡配體1(programmed death-ligand 1，PD-L1)及CD137的抗體分子，其包含

(a) 一用於PD-L1之以互補性決定區域(CDR)為基礎的抗原結合位址；及

(b) 一座落於該抗體分子的一CH3域之CD137抗原結合位址；

其中該以CDR為基礎的抗原結合位址包含下列列出的CDRs 1-6，其等是根據Kabat編號方式來定義：

(i) 分別為序列辨識編號**1、2、3、4、5及6 [E12v2]**；

(ii) 分別為序列辨識編號**1、2、3、18、19及20 [E05v2]**；或

(iii) 分別為序列辨識編號**1、2、3、18、19及29 [G12v2]**；或

其中該以CDR為基礎的抗原結合位址包含下列列出的CDRs 1-6，其等是根據ImMunoGeneTics (IMGT)編號方式來定義：

(i) 分別為序列辨識編號**7、8、9、10、11及6 [E12v2]**；

(ii) 分別為序列辨識編號**21、8、9、22、11及20 [E05v2]**；或

(iii) 分別為序列辨識編號**21、8、9、22、11及29 [G12v2]**；及

其中該CD137抗原結合位址包含一第一序列及一第二序列分別座落於該CH3域的AB及EF結構環，其中該第一及第二序列具有序列辨識編號**113**及**114 [FS22-172-003]**、序列辨識編號**79**及**80 [FS22-053-008]**，或序列辨識編號**79**及**89 [FS22-053-017]**內分別列出的序列。

【請求項2】　如請求項1之抗體分子，其中該抗體分子包含下列列出的VH域及VL域：

(i)　分別為序列辨識編號**12**及**14 [E12v2]**；

(ii)　分別為序列辨識編號**23**及**25 [E05v2]**；或

(iii) 分別為序列辨識編號**23**及**30 [G12v2]**。

【請求項3】　如請求項1或2之抗體分子，其中該抗體分子包含：

(i)　序列辨識編號**1、2、3、4、5及6**內分別列出的CDRs 1-6 **[E12v2]**，其等是根據Kabat編號方式來定義；

(ii)　序列辨識編號**7、8、9、10、11及6**內分別列出的CDRs 1-6 **[E12v2]**，其等是根據IMGT編號方式來定義；及/或

(iii) 序列辨識編號**12及14**內分別列出的該VH域及VL域**[E12v2]**。

【請求項4】　如請求項1或2之抗體分子，其中

(i) 該第一序列係座落於該抗體分子的該CH3域之位置14至17之間；及/或

(ii) 該第二序列係座落於該抗體分子之該CH3域的位

置91至99之間；及

其中，胺基酸殘基編號係根據IMGT編號方式。

【請求項5】　如請求項1或2之抗體分子，其中該抗體分子包含序列辨識編號：**115**內列出的CH3域**[FS22-172-003]**、序列辨識編號：**81**內列出的CH3域**[FS22-053-008]**或序列辨識編號：**90**內列出的CH3域**[FS22-053-017]**。

【請求項6】　如請求項5之抗體分子，其中該CH3域序列進一步包含離胺酸殘基(K)於最接近該CH3域序列之C端處。

【請求項7】　如請求項1或2之抗體分子，其中該抗體分子包含下列抗體之重鏈及輕鏈：

(i) 序列辨識編號**134**及**17**內分別列出的**FS22-172-003-AA/E12v2**之重鏈及輕鏈；

(ii) 序列辨識編號**137**及**28**內分別列出的**FS22-172-003-AA/E05v2**之重鏈及輕鏈；

(iii) 序列辨識編號**140**及**33**內分別列出的**FS22-172-003-AA/G12v2**之重鏈及輕鏈；

(iv) 序列辨識編號**143**及**17**內分別列出的**FS22-053-008-AA/E12v2**之重鏈及輕鏈；

(v) 序列辨識編號**146**及**28**內分別列出的**FS22-053-008-AA/E05v2**之重鏈及輕鏈；或

(vi) 序列辨識編號**149**及**33**內分別列出的**FS22-053-008-AA/G12v2**之重鏈及輕鏈；

(vii) 序列辨識編號**152**及**17**內分別列出的**FS22-053-017-AA/E12v2**之重鏈及輕鏈；

(viii) 序列辨識編號**153**及**38**內分別列出的**FS22-053-017-AA/E05v2**之重鏈及輕鏈；或

(ix) 序列辨識編號**154**及**33**內分別列出的**FS22-053-017-AA/G12v2**之重鏈及輕鏈。

【請求項8】 如請求項7之抗體分子，其中該重鏈序列中的該CH3域包含離胺酸殘基(K)於最接近該CH3域序列之C端處。

【請求項9】 如請求項1或2之抗體分子，其中該抗體分子包含序列辨識編號134及17內分別列出的重鏈及輕鏈[**FS22-172-003-AA/E12v2**]。

【請求項10】 如請求項9之抗體分子，其中該重鏈序列中的該CH3域包含離胺酸殘基(K)於最接近該CH3域序列之C端處。

【請求項11】 如請求項1或2之抗體分子，其中：

(i) 該抗體分子已經修飾以降低或廢除該抗體分子的CH2域與一個或多個Fcγ受體的結合；

(ii) 該抗體分子不結合一個或多個Fcγ受體；及/或

(iii) 該抗體分子與一免疫細胞上的CD137及與腫瘤細胞表面結合的PD-L1之結合導致該免疫細胞上的CD137簇集。

【請求項12】 一種核酸分子，其編碼如請求項1至11中任一項之抗體分子。

【請求項13】 一種複數核酸分子，其編碼如請求項1至11中任一項之抗體分子。

【請求項14】 一種載體，其包含如請求項12之核酸分子或如請求項13之複數核酸分子。

【請求項15】 一種複數載體，其包含如請求項12之核酸分子或如請求項13之複數核酸分子。

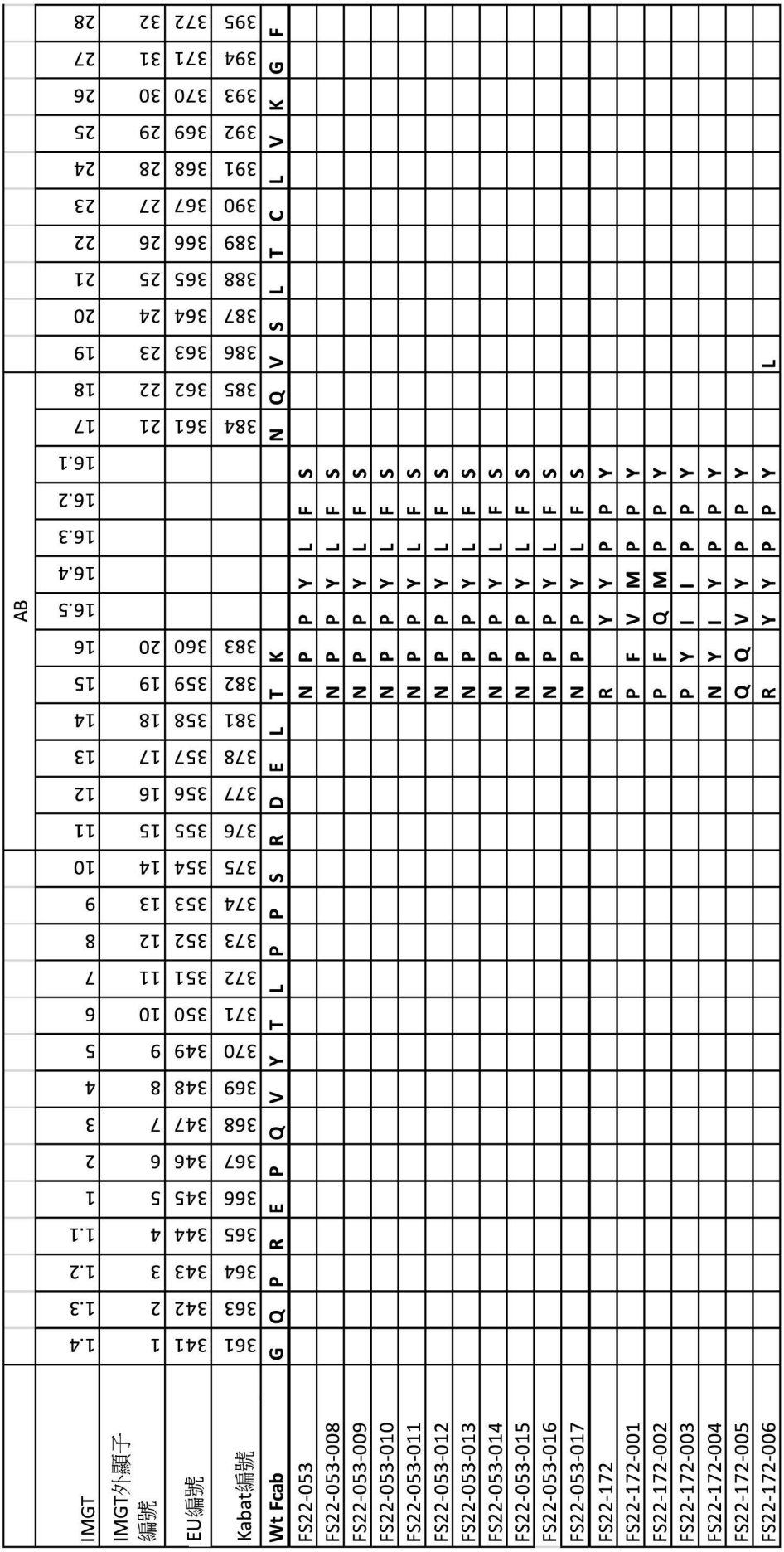
【請求項16】 一種重組宿主細胞，其包含如請求項12之核酸分子或如請求項13之複數核酸分子或如請求項14之載體或如請求項15之複數載體。

【請求項17】 一種生產如請求項1至11中任一項之抗體分子之方法，其包含於用於生產該抗體分子的條件下培養如請求項16之重組宿主細胞，任選地其進一步包含單離及/或純化該抗體分子。

【請求項18】 一種藥學組成物，其包含如請求項1至11中任一項之抗體分子及一藥學上可接受的賦形劑。

【請求項19】 一種如請求項1至11中任一項之抗體分子於製備藥物的用途，該藥物是用於治療一個體中的癌症。

【發明圖式】

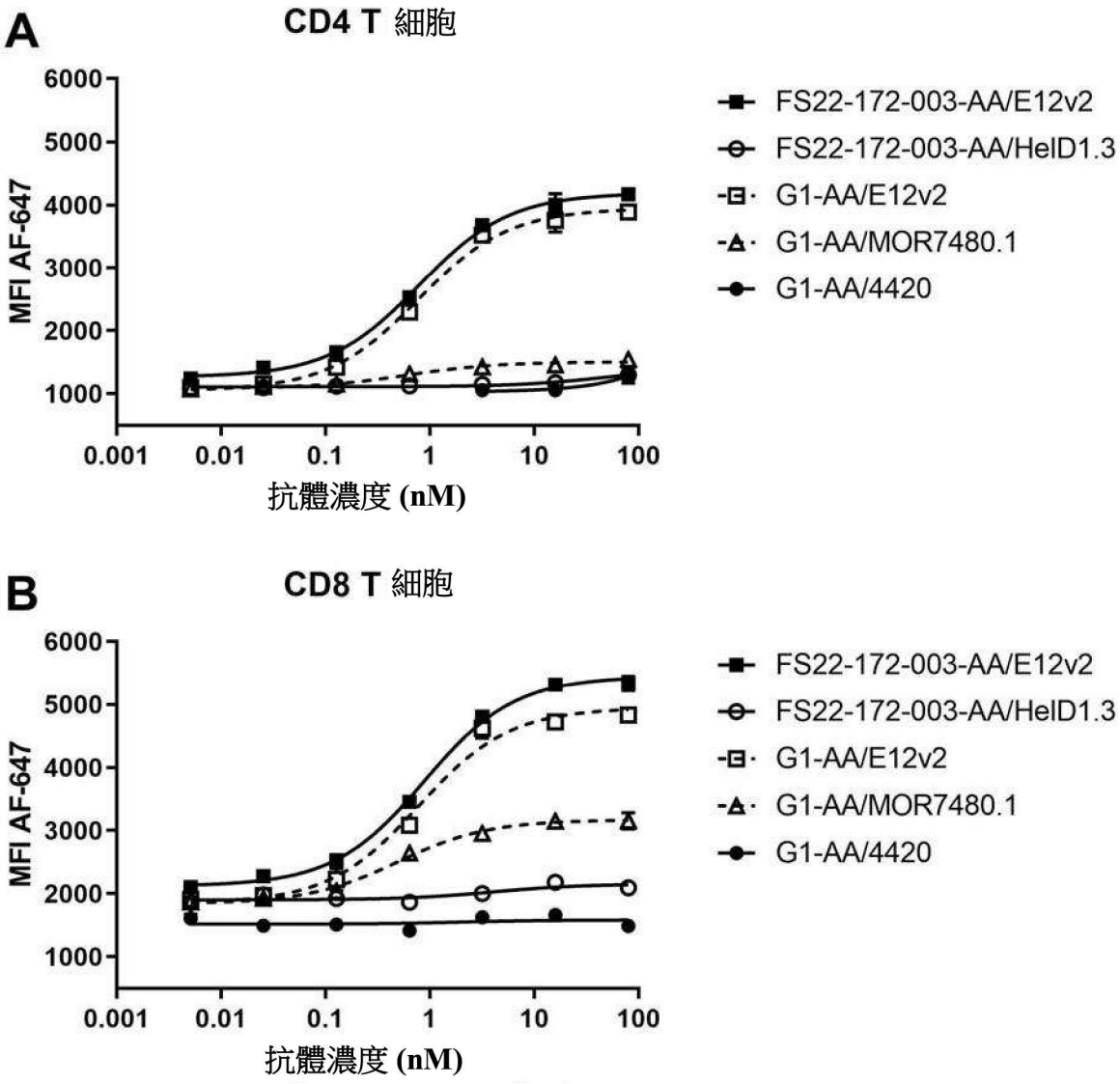


| | IMGT | IMGT外顯子編號 | EU編號 | Kabat編號 | Wt Fcab | G | Q | P | R | E | P | Q | V | Y | T | L | P | S | R | D | E | L | T | K | AB | | |

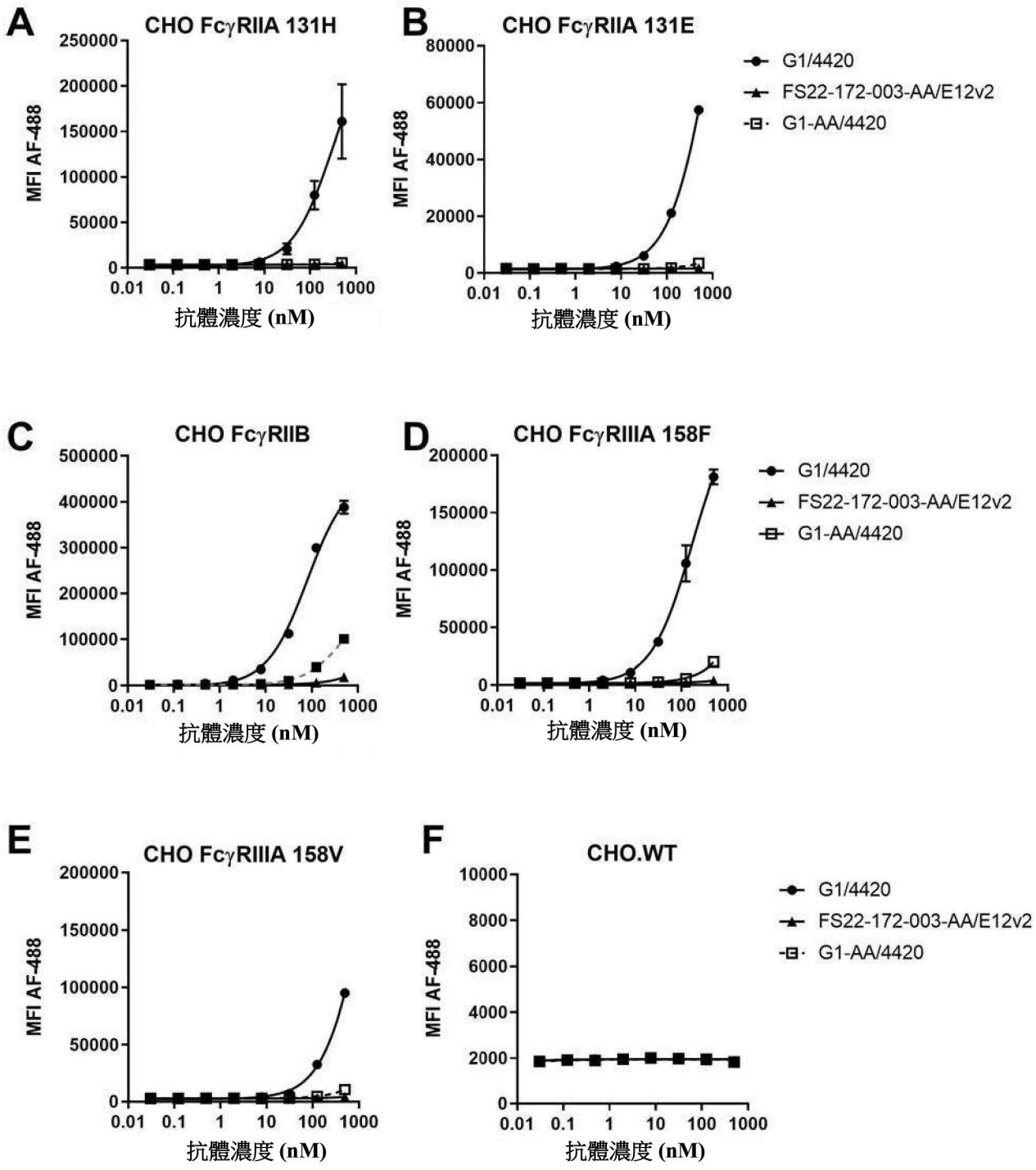
	IMGT	IMGT外顯子編號	EU編號	Kabat編號	Wt Fcab	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	CD	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K
	29	33	373	396																																								
	30	34	374	397																																								
	35	35	375	398																																								
	36	36	376	399																																								
	37	37	377	400																																								
	38	38	378	401																																								
	39	39	379	402																																								
	40	40	380	405																																								
	41	41	381	406																																								
	42	42	382	407																																								
CD	43	43	383	408																																								
	44	44	384	410																																								
	45	45	385	411																																								
	45.1	46	386	414																																								
	45.2	47	387	415																																								
	45.3	48	388	416																																								
	45.4	49	389	417																																								
	77	50	390	418																																								
	78	51	391	419																																								
	79	52	392	420																																								
	80	53	393	421																																								
	81	54	394	422																																								
	82	55	395	423																																								
	83	56	396	424																																								
	84	57	397	425																																								
	84.1	58	398	426																																								
	84.2	59	399	427																																								
	84.3	60	400	428																																								
	84.4	61	401	430																																								
	85.4	62	402	433																																								
	85.3	63	403	434																																								
	85.2	64	404	435																																								
	85.1	65	405	436																																								
	85	66	406	437																																								
	86	67	407	438																																								
	87	68	408	439																																								
	88	69	409	440																																								

【圖1B】

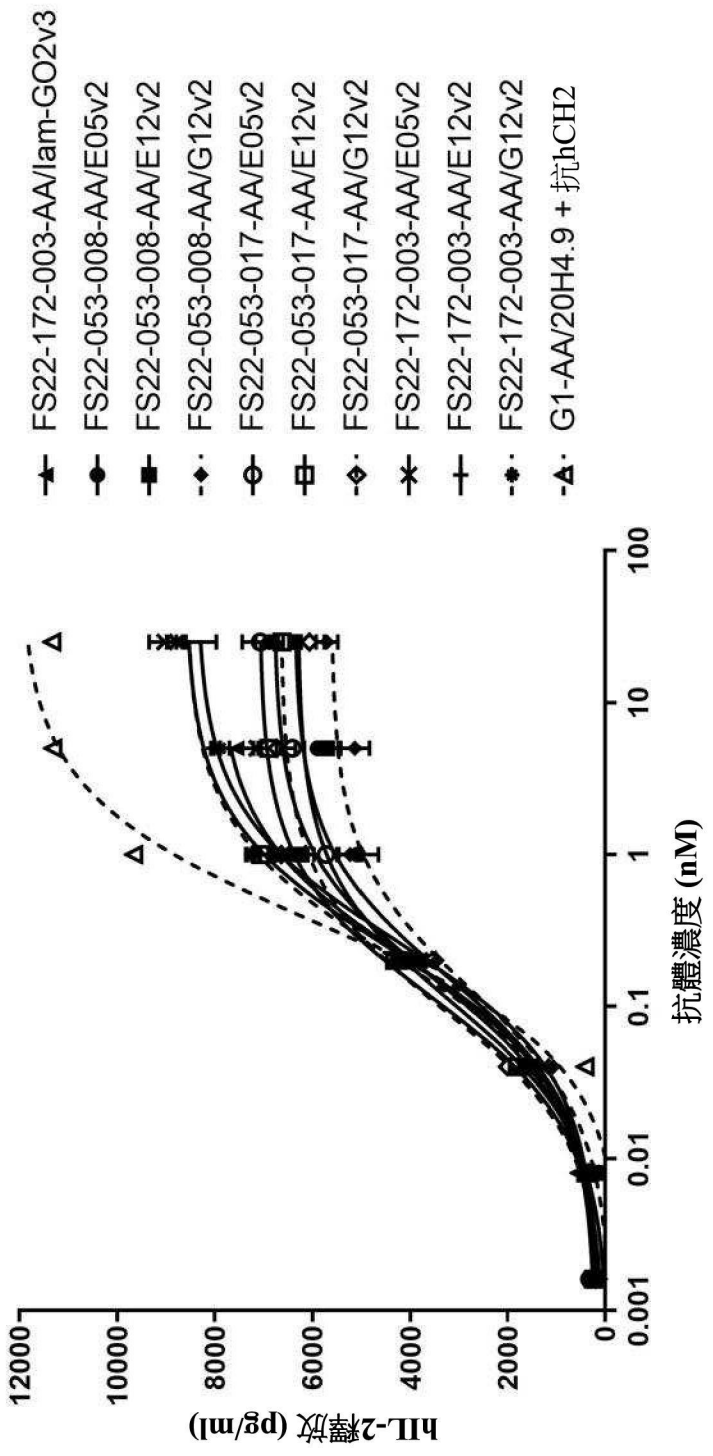
| | IMGT | | |


A
CD4 T 細胞
MFI AF-647
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗體濃度 (nM)
FS22-172-003-AA/E12v2
FS22-172-003-AA/HelD1.3
G1-AA/E12v2
G1-AA/MOR7480.1
G1-AA/4420
B
CD8 T 細胞
MFI AF-647
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗體濃度 (nM)
FS22-172-003-AA/E12v2
FS22-172-003-AA/HelD1.3
G1-AA/E12v2
G1-AA/MOR7480.1
G1-AA/4420

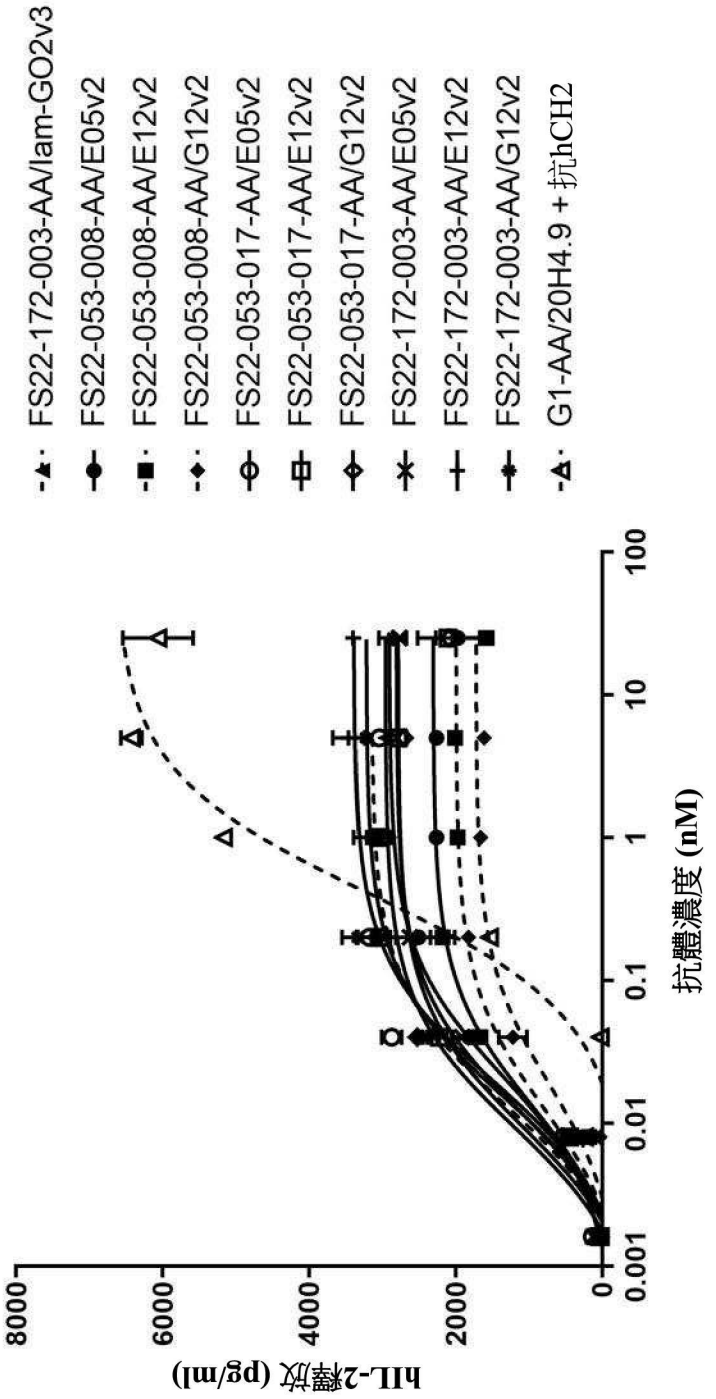
【圖2】


A
CHO FcγRIIA 131H
MFI AF-488
250000
200000
150000
100000
50000
0
0.01 0.1 1 10 100 1000
抗體濃度 (nM)
B
CHO FcγRIIA 131E
MFI AF-488
80000
60000
40000
20000
0
0.01 0.1 1 10 100 1000
抗體濃度 (nM)
G1/4420
FS22-172-003-AA/E12v2
G1-AA/4420
C
CHO FcγRIIB
MFI AF-488
500000
400000
300000
200000
100000
0
0.01 0.1 1 10 100 1000
抗體濃度 (nM)
D
CHO FcγRIIIA 158F
MFI AF-488
200000
150000
100000
50000
0
0.01 0.1 1 10 100 1000
抗體濃度 (nM)
G1/4420
FS22-172-003-AA/E12v2
G1-AA/4420
E
CHO FcγRIIIA 158V
MFI AF-488
200000
150000
100000
50000
0
0.01 0.1 1 10 100 1000
抗體濃度 (nM)
F
CHO.WT
MFI AF-488
10000
8000
6000
4000
2000
0
0.01 0.1 1 10 100 1000
抗體濃度 (nM)
G1/4420
FS22-172-003-AA/E12v2
G1-AA/4420

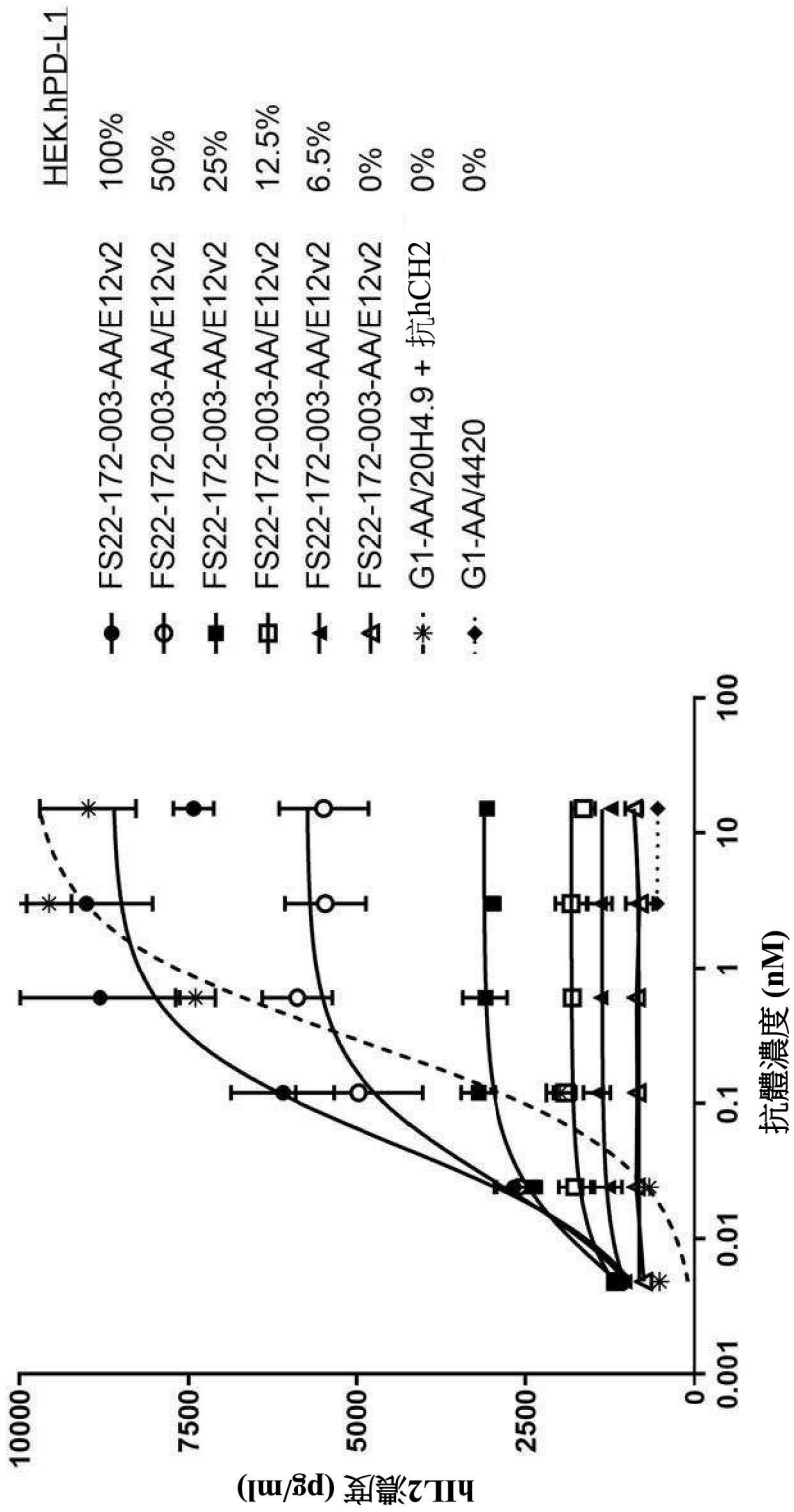
【圖3】


FS22-172-003-AA/Iam-GO2v3
FS22-053-008-AA/E05v2
FS22-053-008-AA/E12v2
FS22-053-008-AA/G12v2
FS22-053-017-AA/E05v2
FS22-053-017-AA/E12v2
FS22-053-017-AA/G12v2
FS22-172-003-AA/E05v2
FS22-172-003-AA/E12v2
FS22-172-003-AA/G12v2
G1-AA/20H4.9 + 抗hCH2
hIL-2釋放 (pg/ml)
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗體濃度 (nM)

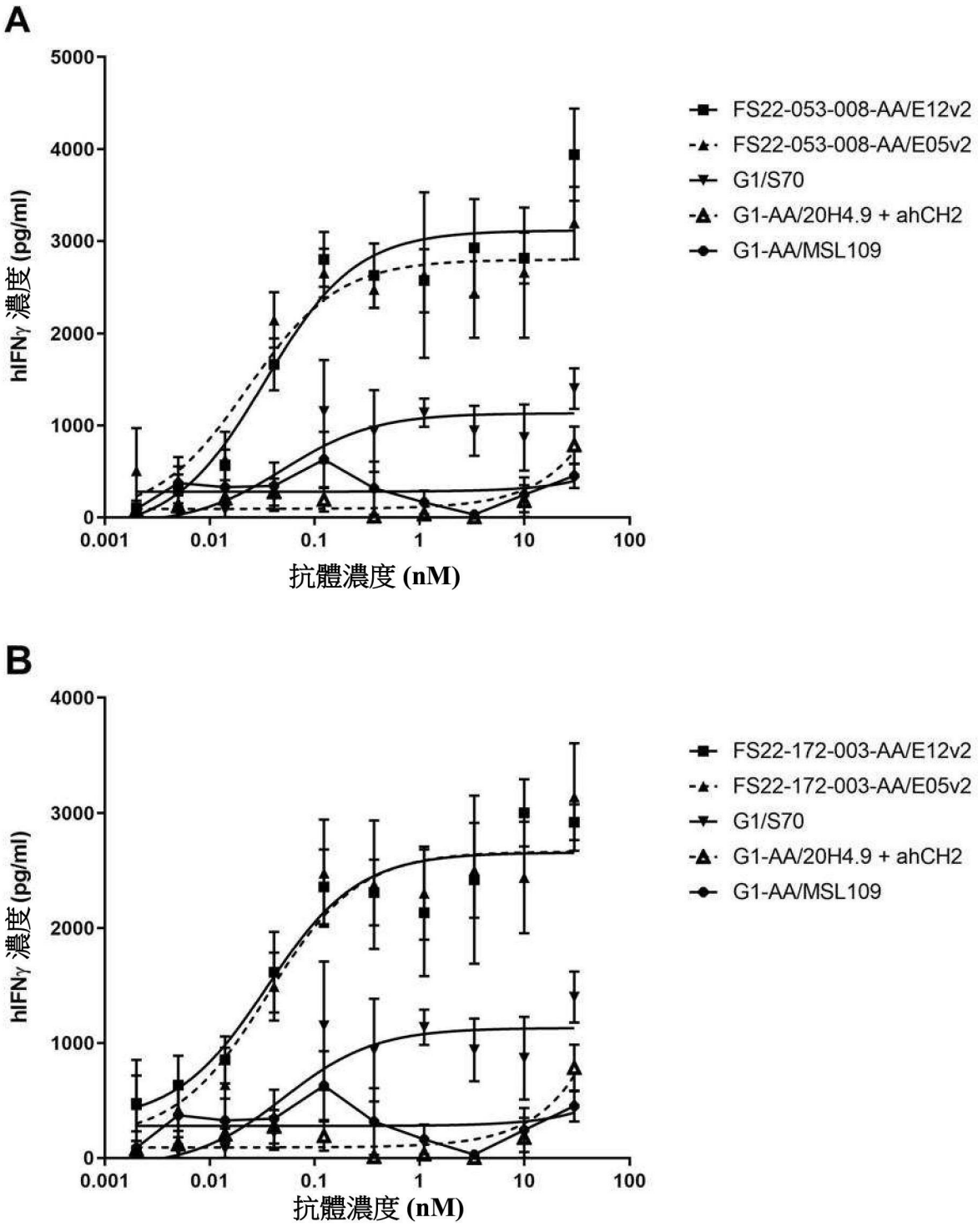
【圖4】


FS22-172-003-AA/lam-GO2v3
FS22-053-008-AA/E05v2
FS22-053-008-AA/E12v2
FS22-053-008-AA/G12v2
FS22-053-017-AA/E05v2
FS22-053-017-AA/E12v2
FS22-053-017-AA/G12v2
FS22-172-003-AA/E05v2
FS22-172-003-AA/E12v2
FS22-172-003-AA/G12v2
G1-AA/20H4.9 + 抗hCH2
hIL-2釋放 (pg/ml)
8000
6000
4000
2000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗體濃度 (nM)

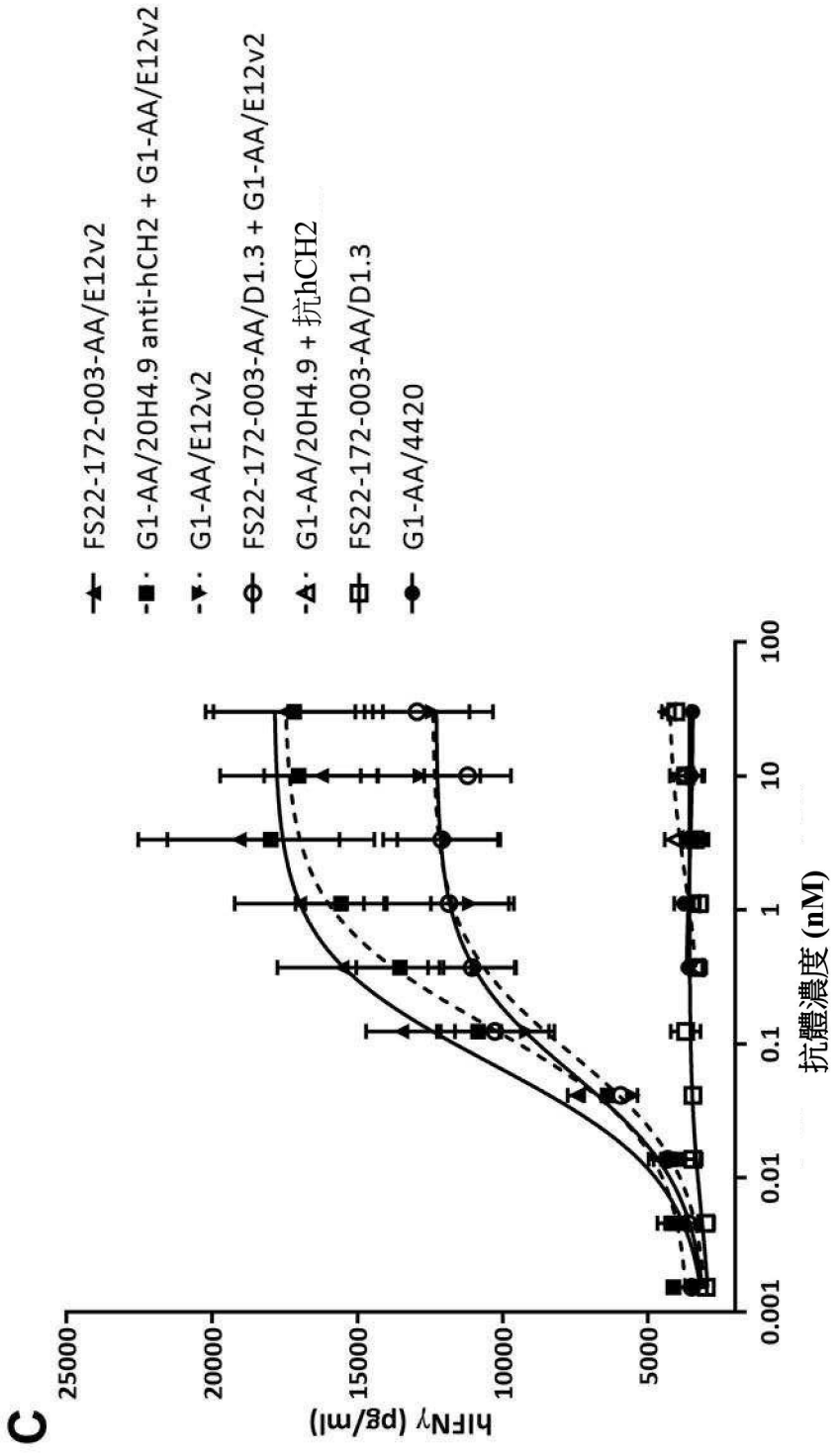
【圖5】


HEK.hPD-L1
FS22-172-003-AA/E12v2 100%
FS22-172-003-AA/E12v2 50%
FS22-172-003-AA/E12v2 25%
FS22-172-003-AA/E12v2 12.5%
FS22-172-003-AA/E12v2 6.5%
FS22-172-003-AA/E12v2 0%
G1-AA/20H4.9 + 抗hCH2 0%
G1-AA/4420 0%
hIL2濃度 (pg/ml)
10000
7500
5000
2500
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗體濃度 (nM)

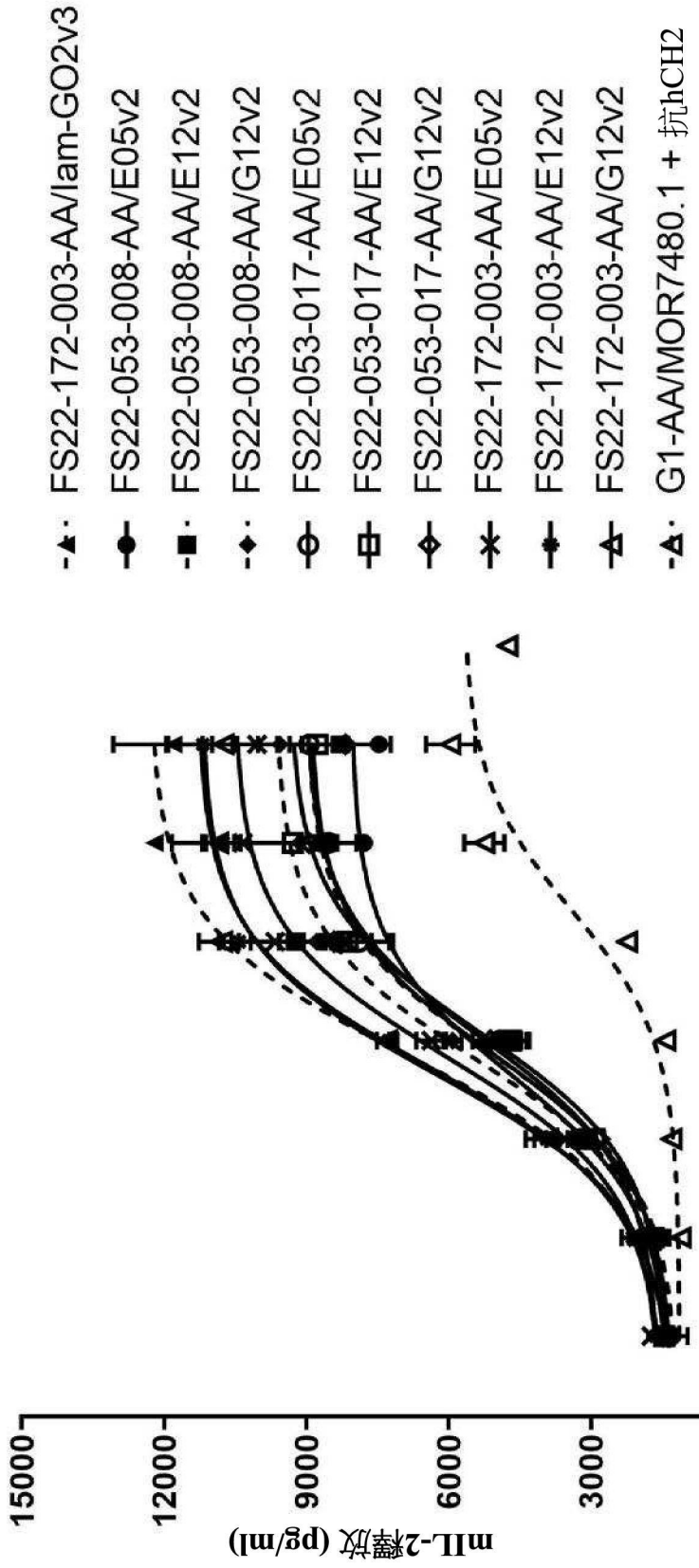
【圖6】


A
5000
4000
3000
2000
1000
0
hIFNγ 濃度 (pg/ml)
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗體濃度 (nM)
FS22-053-008-AA/E12v2
FS22-053-008-AA/E05v2
G1/S70
G1-AA/20H4.9 + ahCH2
G1-AA/MSL109
B
4000
3000
2000
1000
0
hIFNγ 濃度 (pg/ml)
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗體濃度 (nM)
FS22-172-003-AA/E12v2
FS22-172-003-AA/E05v2
G1/S70
G1-AA/20H4.9 + ahCH2
G1-AA/MSL109

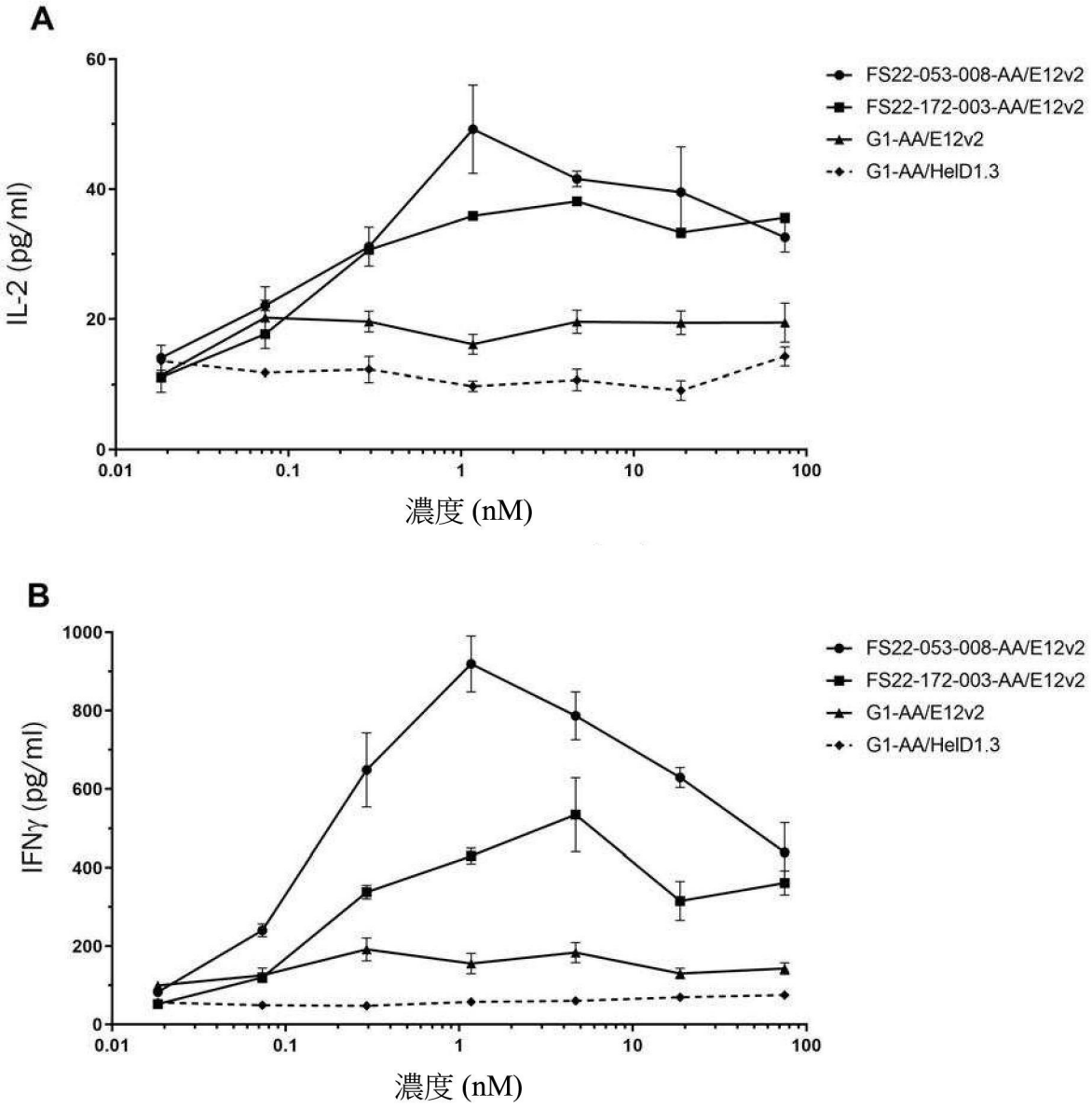
【圖7】


C
hIFNγ (pg/ml)
25000
20000
15000
10000
5000
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗體濃度 (nM)
FS22-172-003-AA/E12v2
G1-AA/20H4.9 anti-hCH2 + G1-AA/E12v2
G1-AA/E12v2
FS22-172-003-AA/D1.3 + G1-AA/E12v2
G1-AA/20H4.9 + 抗hCH2
FS22-172-003-AA/D1.3
G1-AA/4420

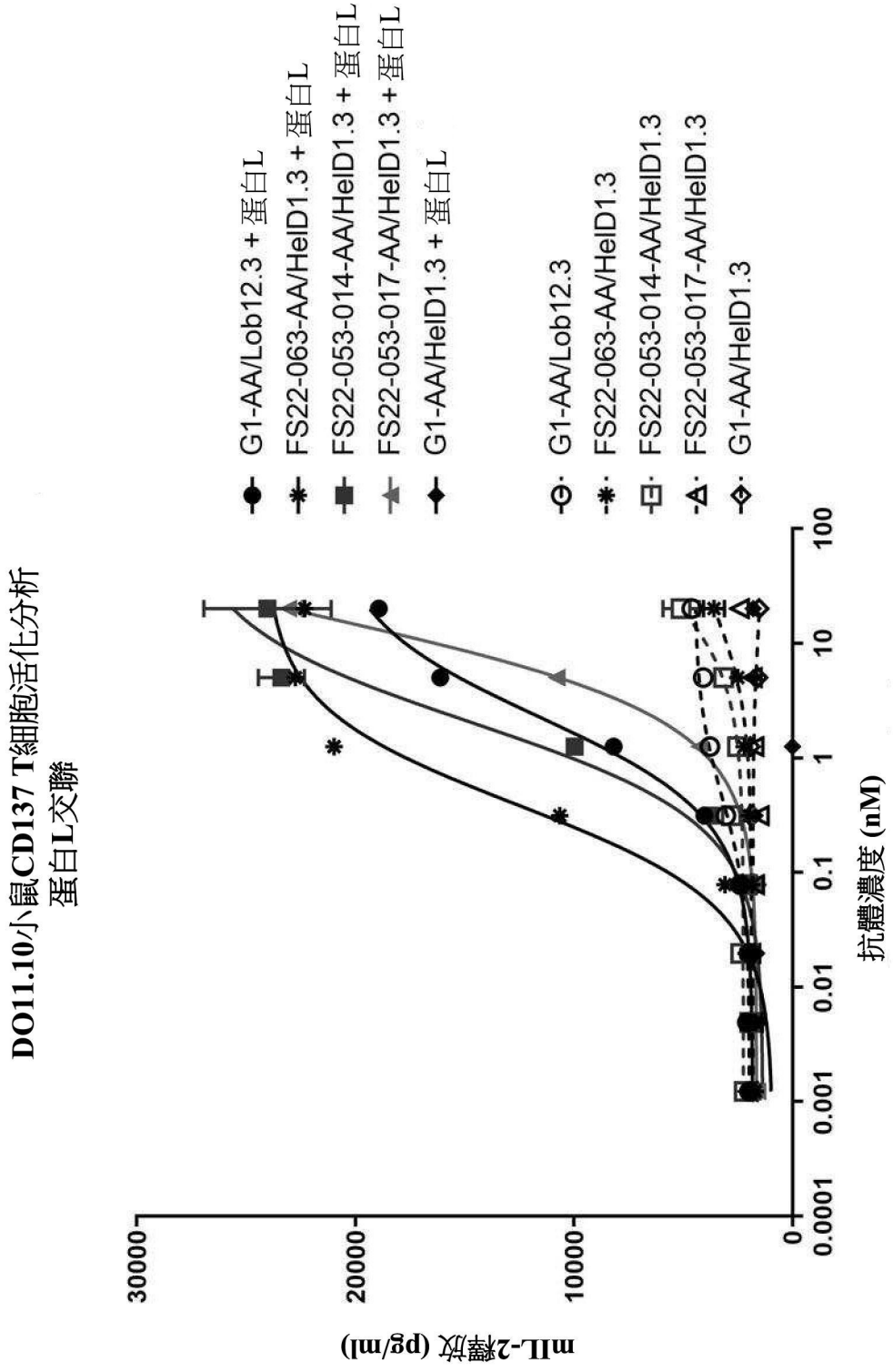
【圖7】(續)


FS22-172-003-AA/lam-GO2v3
FS22-053-008-AA/E05v2
FS22-053-008-AA/E12v2
FS22-053-008-AA/G12v2
FS22-053-017-AA/E05v2
FS22-053-017-AA/E12v2
FS22-053-017-AA/G12v2
FS22-172-003-AA/E05v2
FS22-172-003-AA/E12v2
FS22-172-003-AA/G12v2
G1-AA/MOR7480.1 + 抗hCH2
mIL-2釋放 (pg/ml)
15000
12000
9000
6000
3000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗體濃度 (nM)

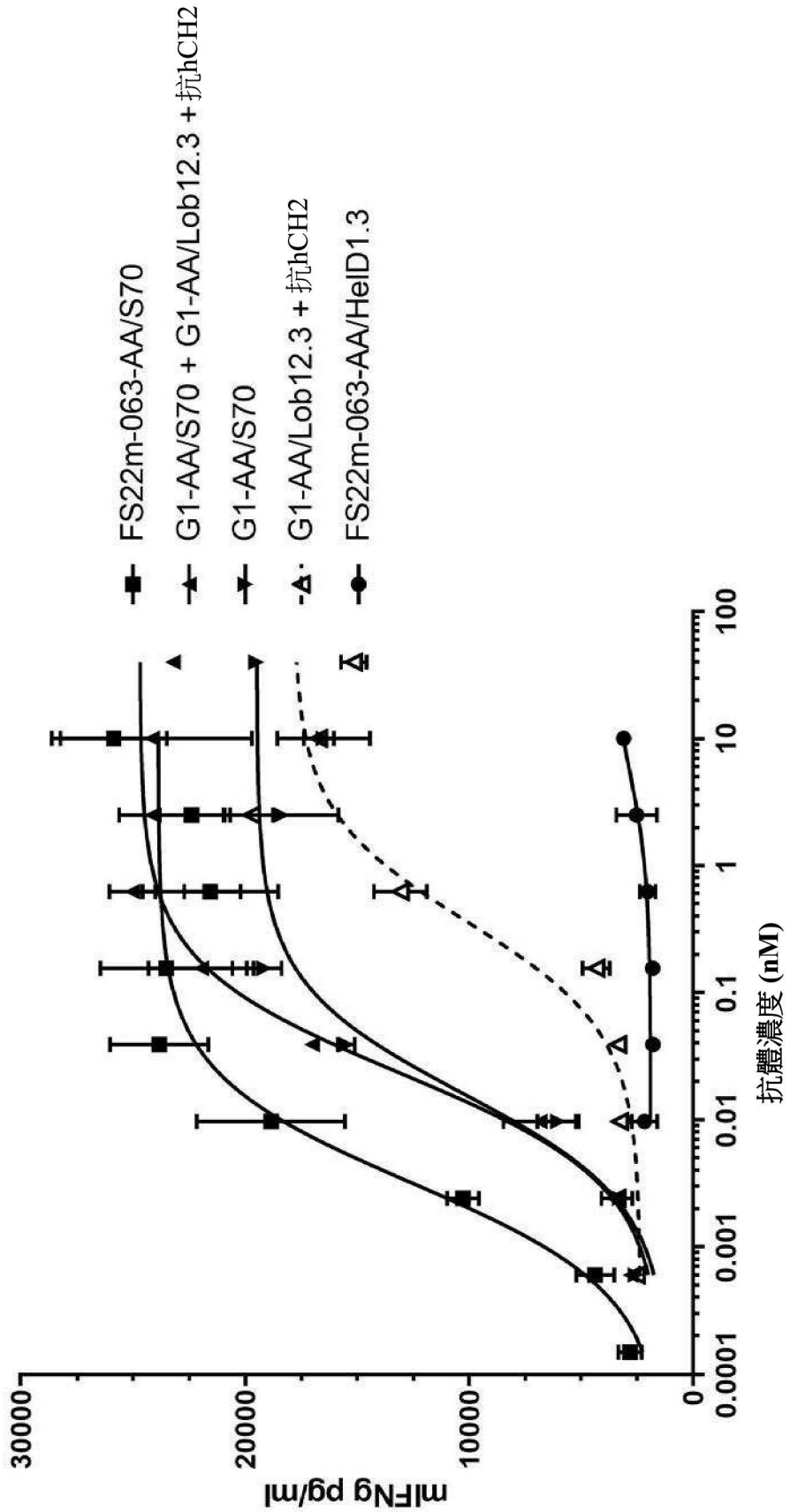
【圖8】


A
IL-2 (pg/ml)
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
濃度 (nM)
FS22-053-008-AA/E12v2
FS22-172-003-AA/E12v2
G1-AA/E12v2
G1-AA/HelD1.3
B
IFNγ (pg/ml)
1000
800
600
400
200
0
0.01
0.1
1
10
100
濃度 (nM)
FS22-053-008-AA/E12v2
FS22-172-003-AA/E12v2
G1-AA/E12v2
G1-AA/HelD1.3

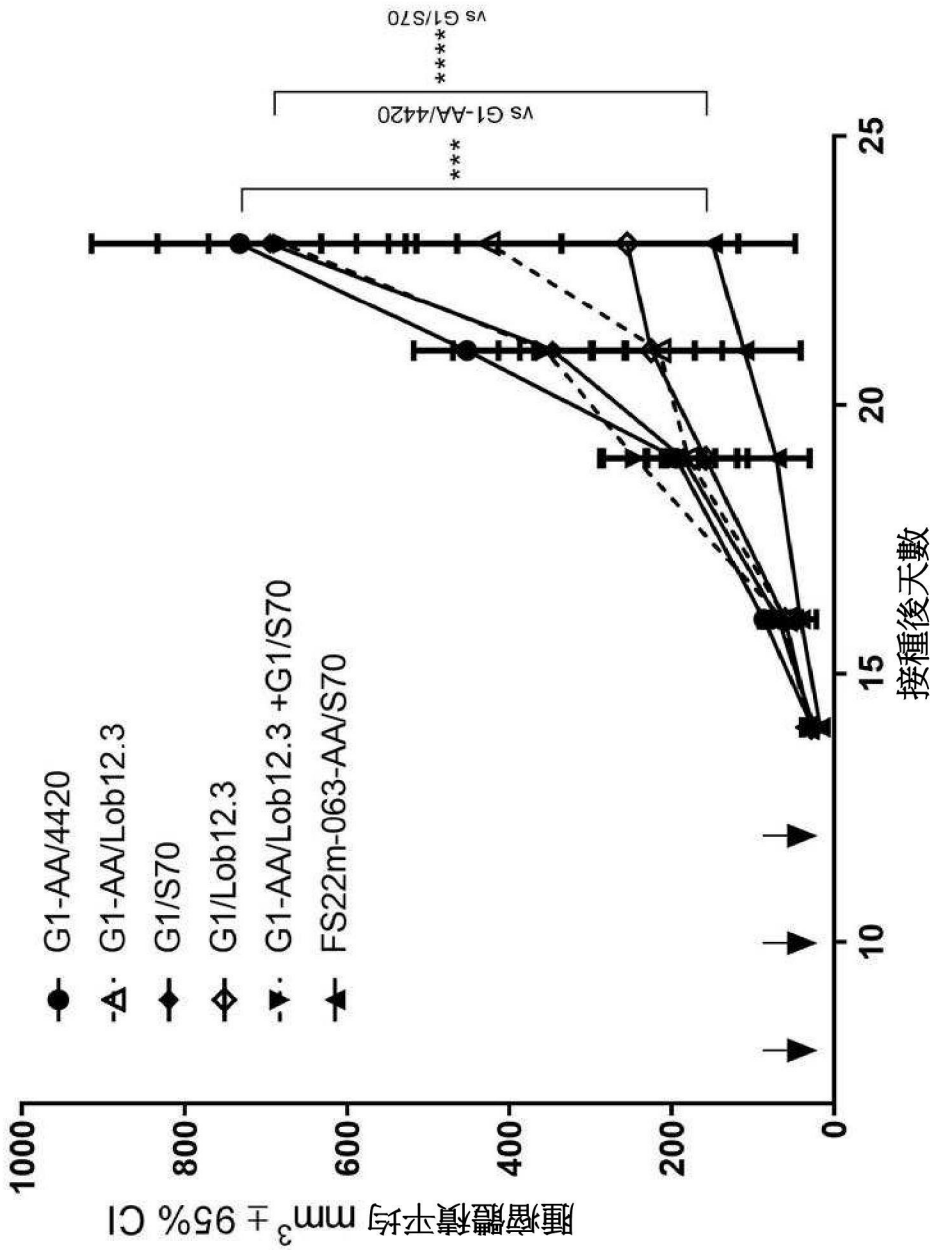
【圖9】


DO11.10小鼠CD137 T細胞活化分析
蛋白L交聯
G1-AA/Lob12.3 + 蛋白L
FS22-063-AA/HelD1.3 + 蛋白L
FS22-053-014-AA/HelD1.3 + 蛋白L
FS22-053-017-AA/HelD1.3 + 蛋白L
G1-AA/HelD1.3 + 蛋白L
G1-AA/Lob12.3
FS22-063-AA/HelD1.3
FS22-053-014-AA/HelD1.3
FS22-053-017-AA/HelD1.3
G1-AA/HelD1.3
mIL-2釋放 (pg/ml)
30000
20000
10000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗體濃度 (nM)

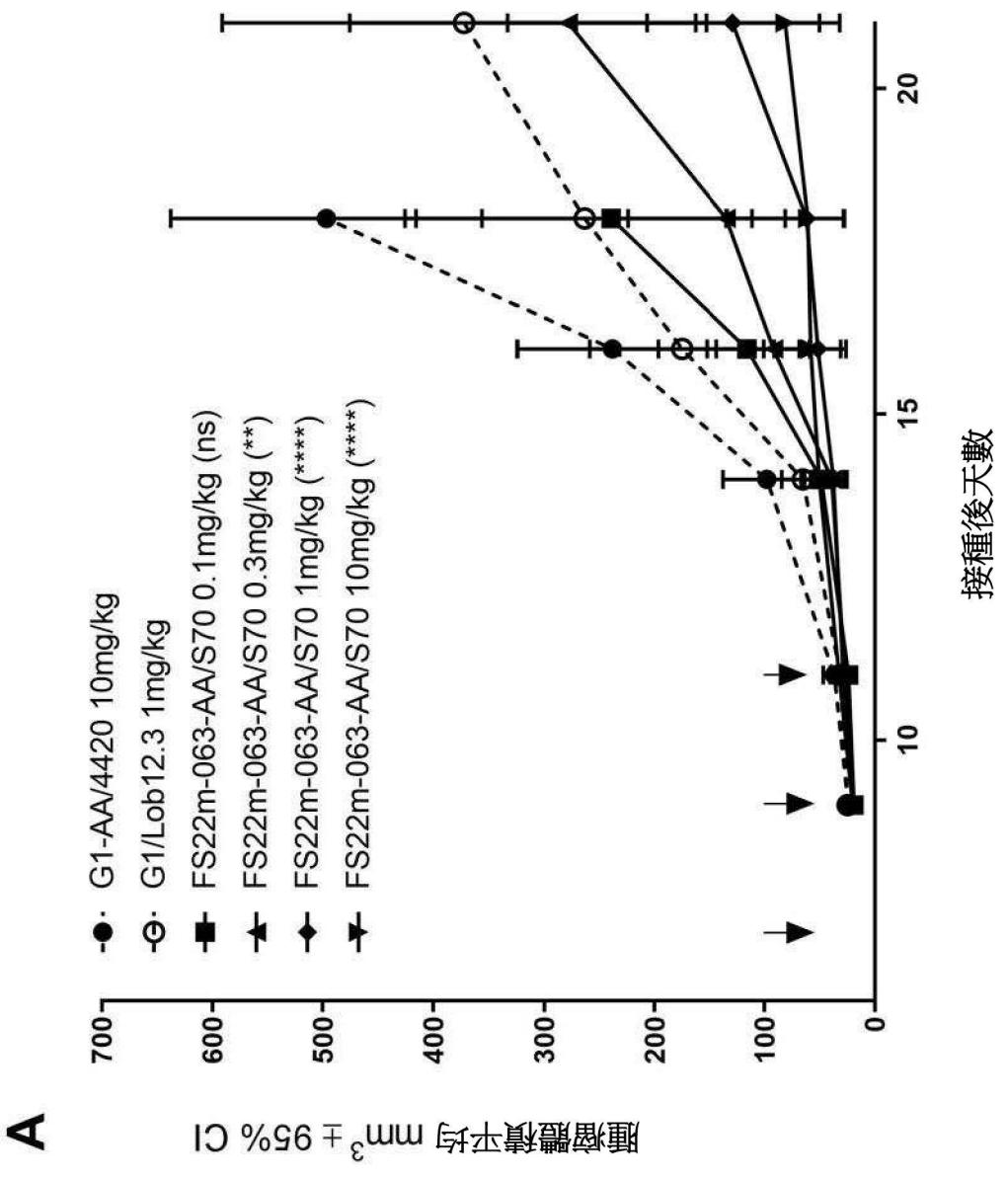
【圖10】


FS22m-063-AA/S70
G1-AA/S70 + G1-AA/Lob12.3 + 抗hCH2
G1-AA/S70
G1-AA/Lob12.3 + 抗hCH2
FS22m-063-AA/HelD1.3
mIFNg pg/ml
30000
20000
10000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗體濃度 (nM)

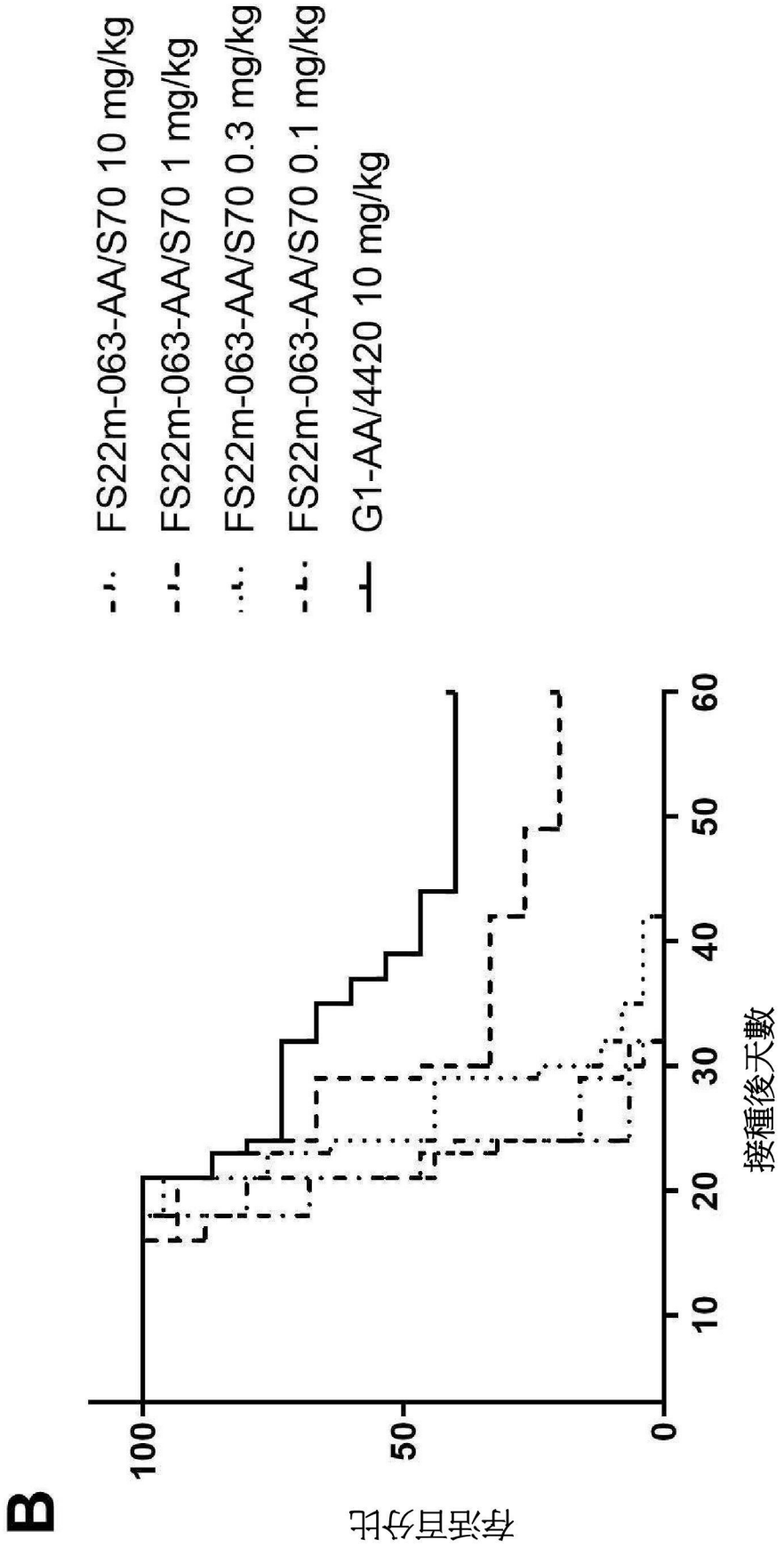
【圖11】


腫瘤體積平均 mm³ ± 95% CI
1000
800
600
400
200
0
10
15
20
25
接種後天數
G1-AA/4420
G1-AA/Lob12.3
G1/S70
G1/Lob12.3
G1-AA/Lob12.3 +G1/S70
FS22m-063-AA/S70
vs G1-AA/4420
***
vs G1/S70
****

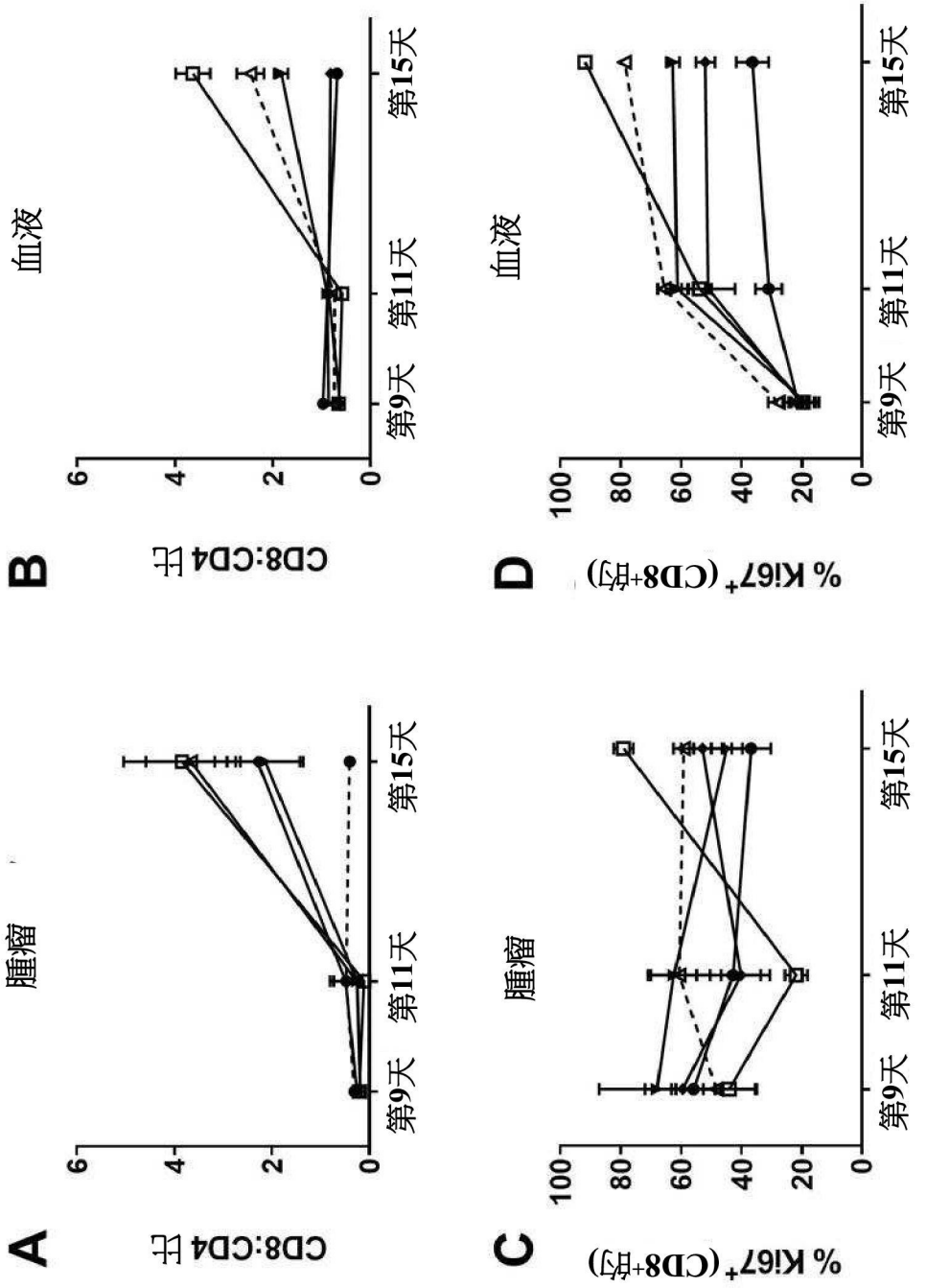
【圖12】


A
腫瘤體積平均 mm³ ± 95% CI
700
600
500
400
300
200
100
0
10
15
20
接種後天數
G1-AA/4420 10mg/kg
G1/Lob12.3 1mg/kg
FS22m-063-AA/S70 0.1mg/kg (ns)
FS22m-063-AA/S70 0.3mg/kg (**)
FS22m-063-AA/S70 1mg/kg (****)
FS22m-063-AA/S70 10mg/kg (****)

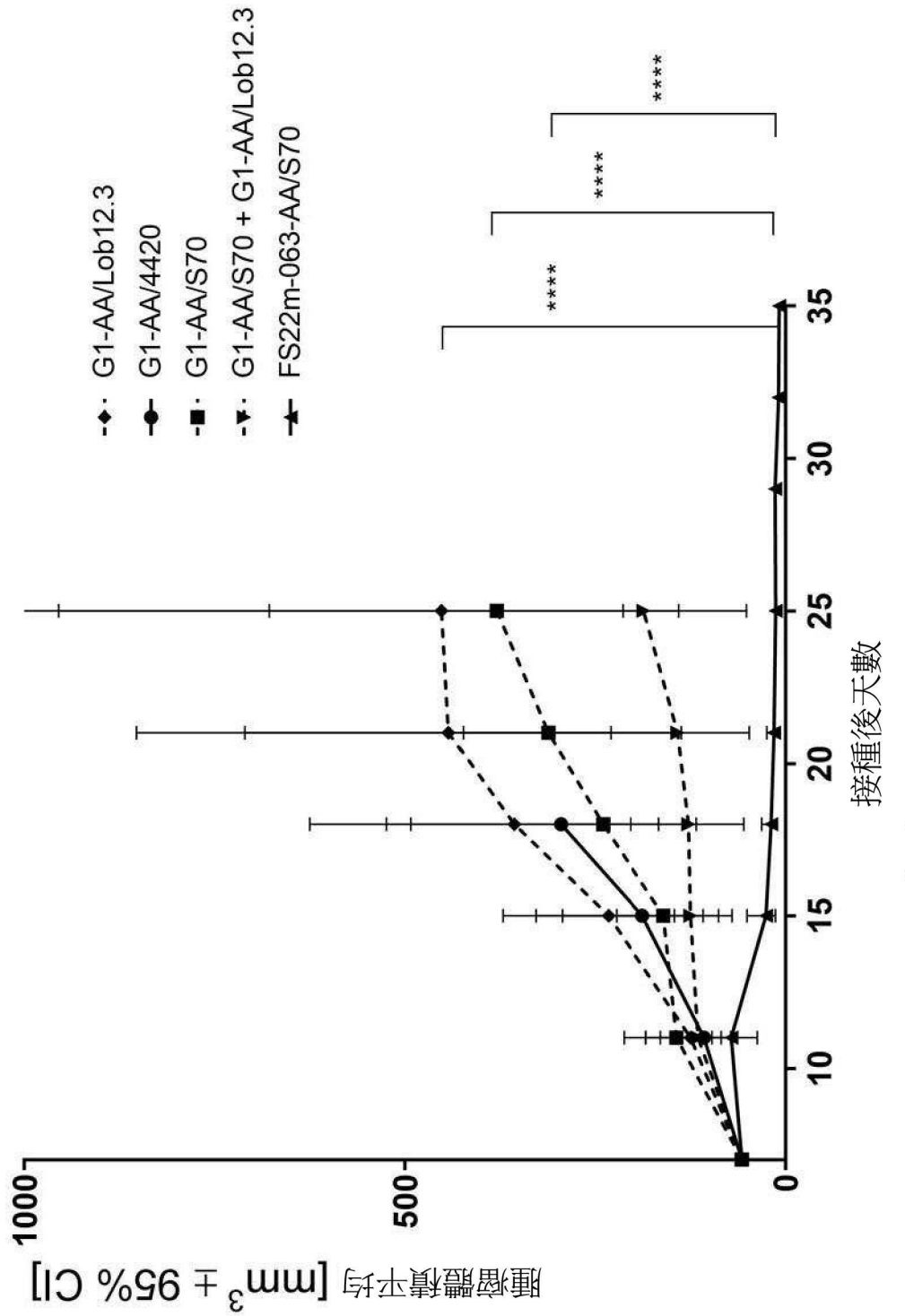
【圖13】


B
存活百分比
100
50
0
10
20
30
40
50
60
接種後天數
FS22m-063-AA/S70 10 mg/kg
FS22m-063-AA/S70 1 mg/kg
FS22m-063-AA/S70 0.3 mg/kg
FS22m-063-AA/S70 0.1 mg/kg
G1-AA/4420 10 mg/kg

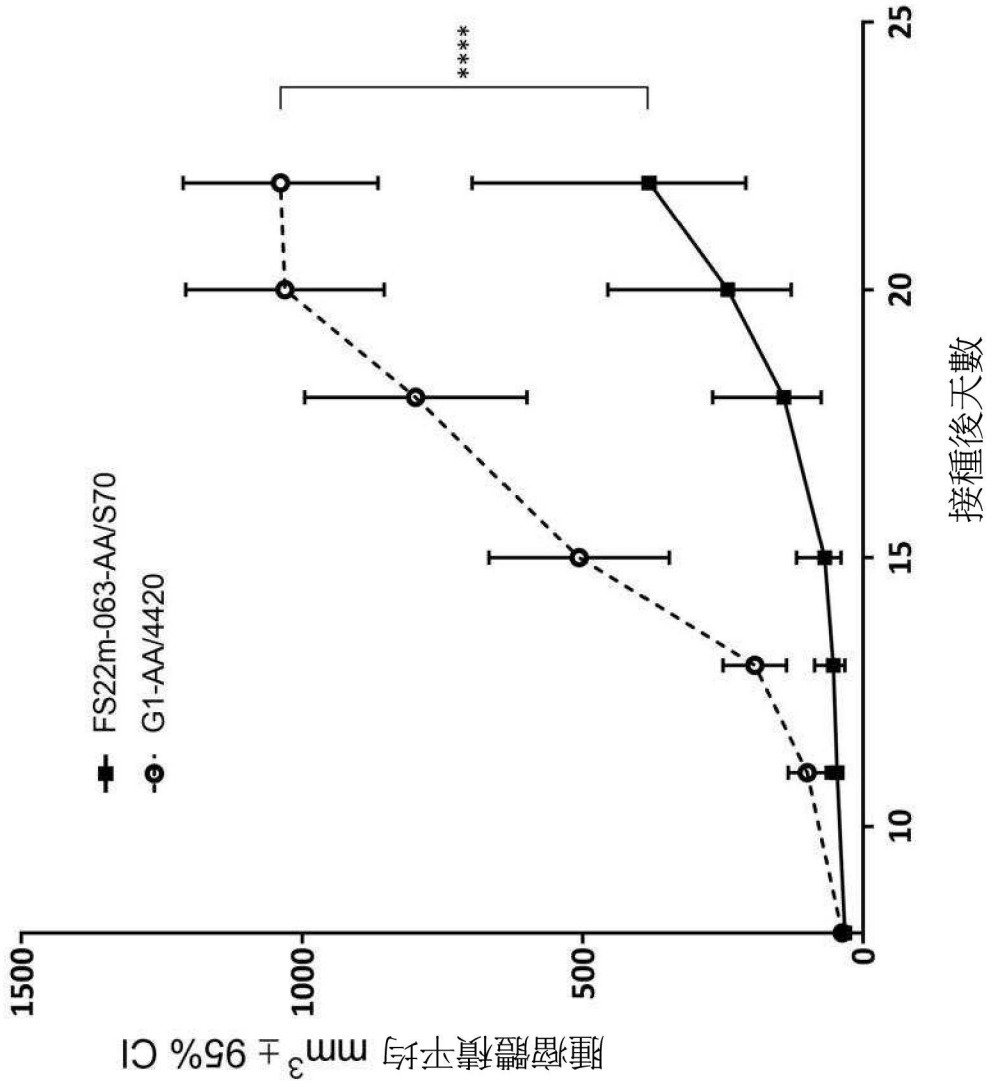
【圖13】(續)


A
腫瘤
CD8:CD4 比
第9天
第11天
第15天
B
血液
CD8:CD4 比
第9天
第11天
第15天
C
腫瘤
% Ki67+ (CD8+的)
第9天
第11天
第15天
D
血液
% Ki67+ (CD8+的)
第9天
第11天
第15天

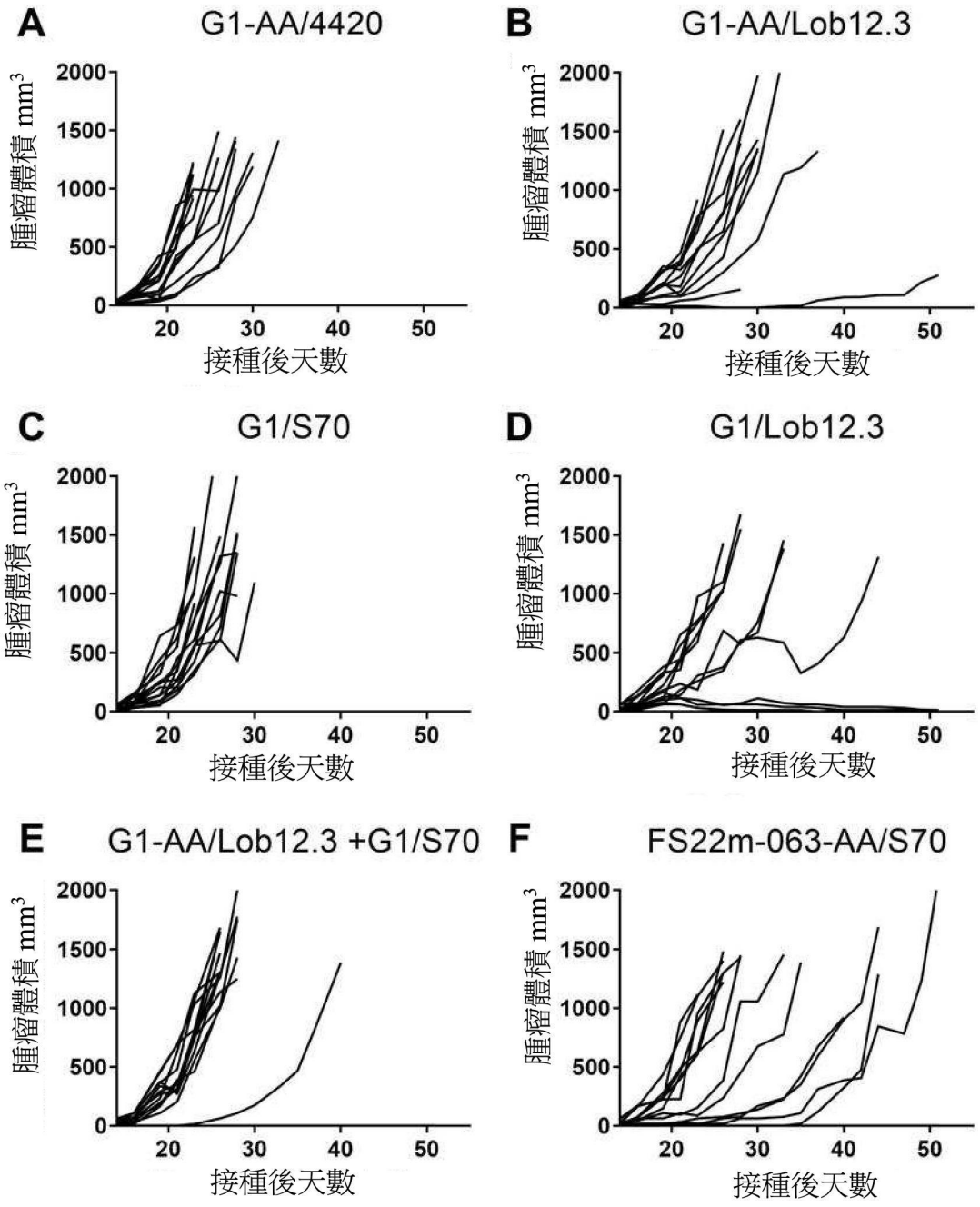
【圖14】


腫瘤體積平均 [mm³ ± 95% CI]
1000
500
0
10
15
20
25
30
35
接種後天數
G1-AA/Lob12.3
G1-AA/4420
G1-AA/S70
G1-AA/S70 + G1-AA/Lob12.3
FS22m-063-AA/S70
****
****
****

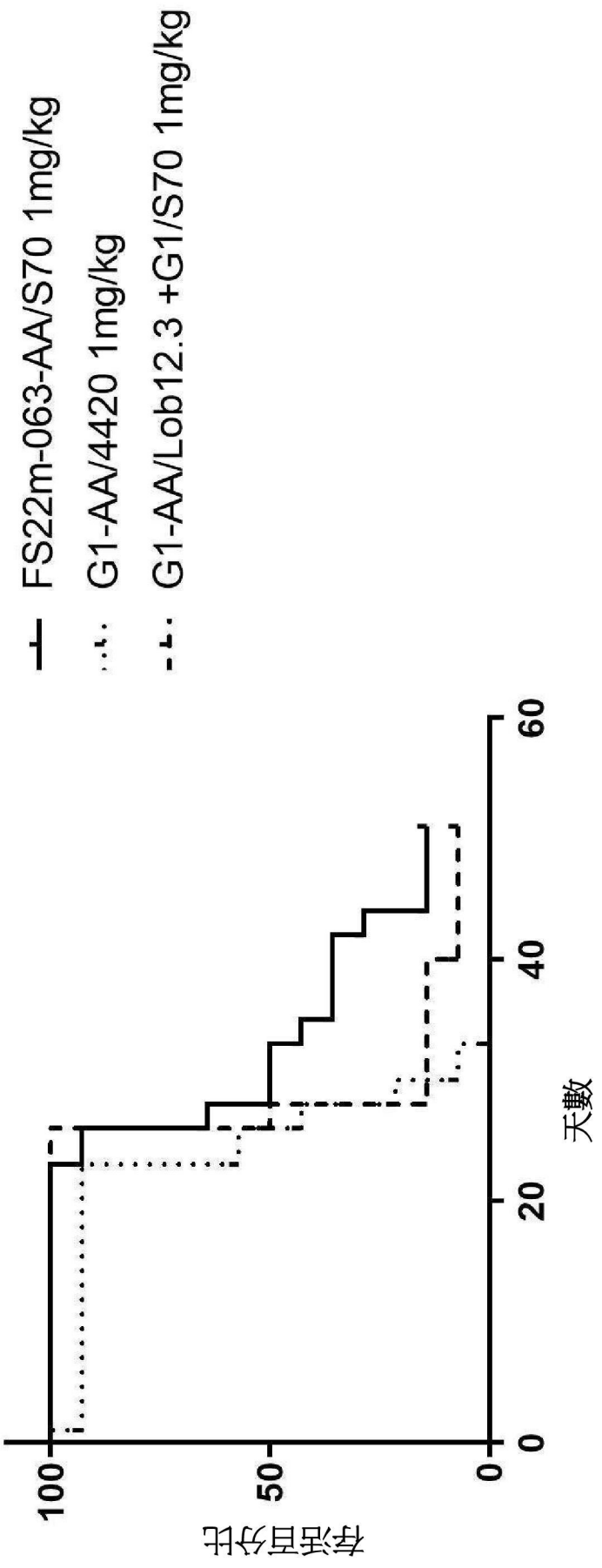
【圖15】


腫瘤體積平均 mm3 ± 95% CI
1500
1000
500
0
10
15
20
25
接種後天數
****
FS22m-063-AA/S70
G1-AA/4420

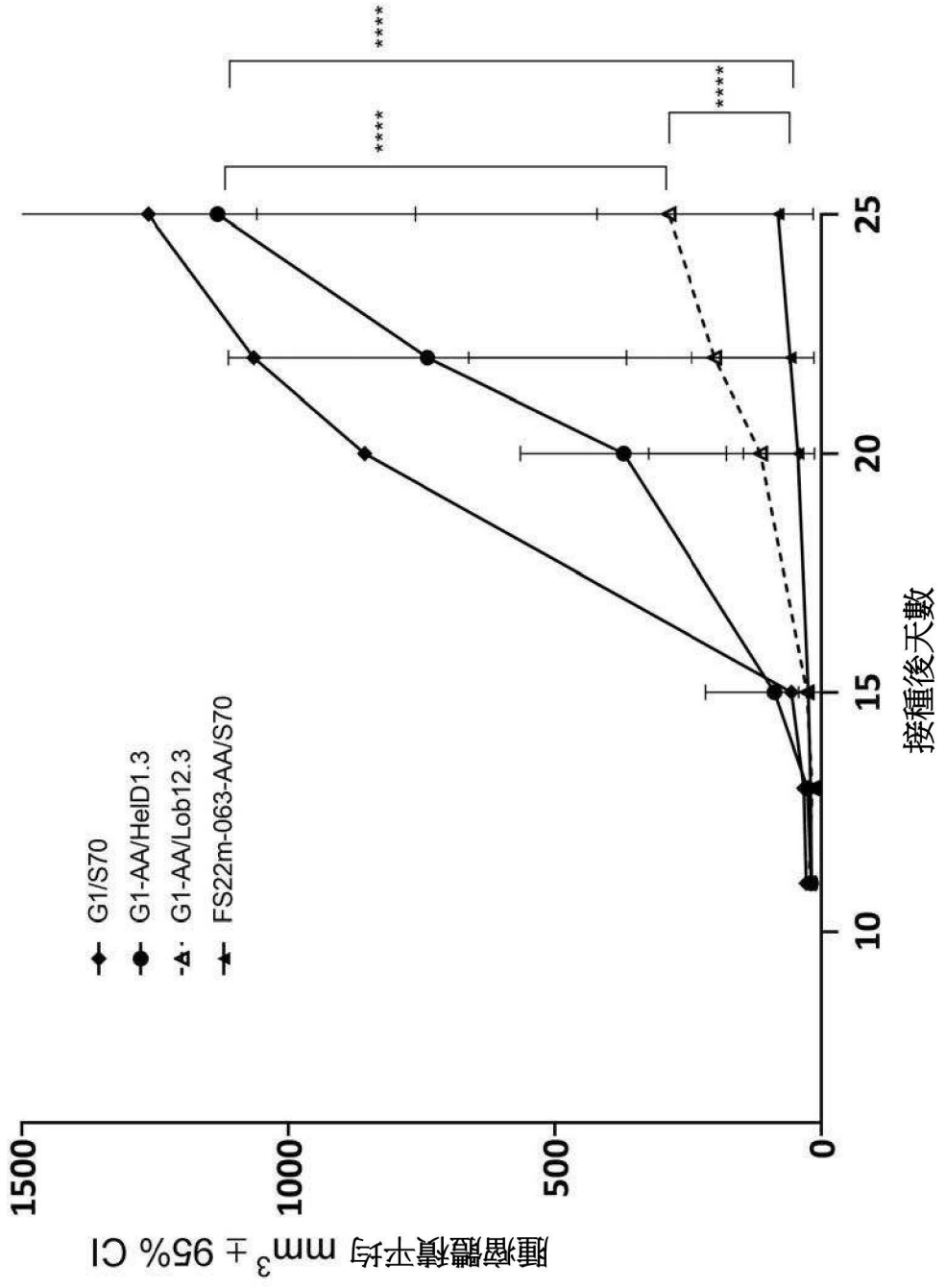
【圖16】


A
G1-AA/4420
B
G1-AA/Lob12.3
C
G1/S70
D
G1/Lob12.3
E
G1-AA/Lob12.3 +G1/S70
F
FS22m-063-AA/S70
腫瘤體積 mm3
2000
1500
1000
500
0
20
30
40
50
接種後天數

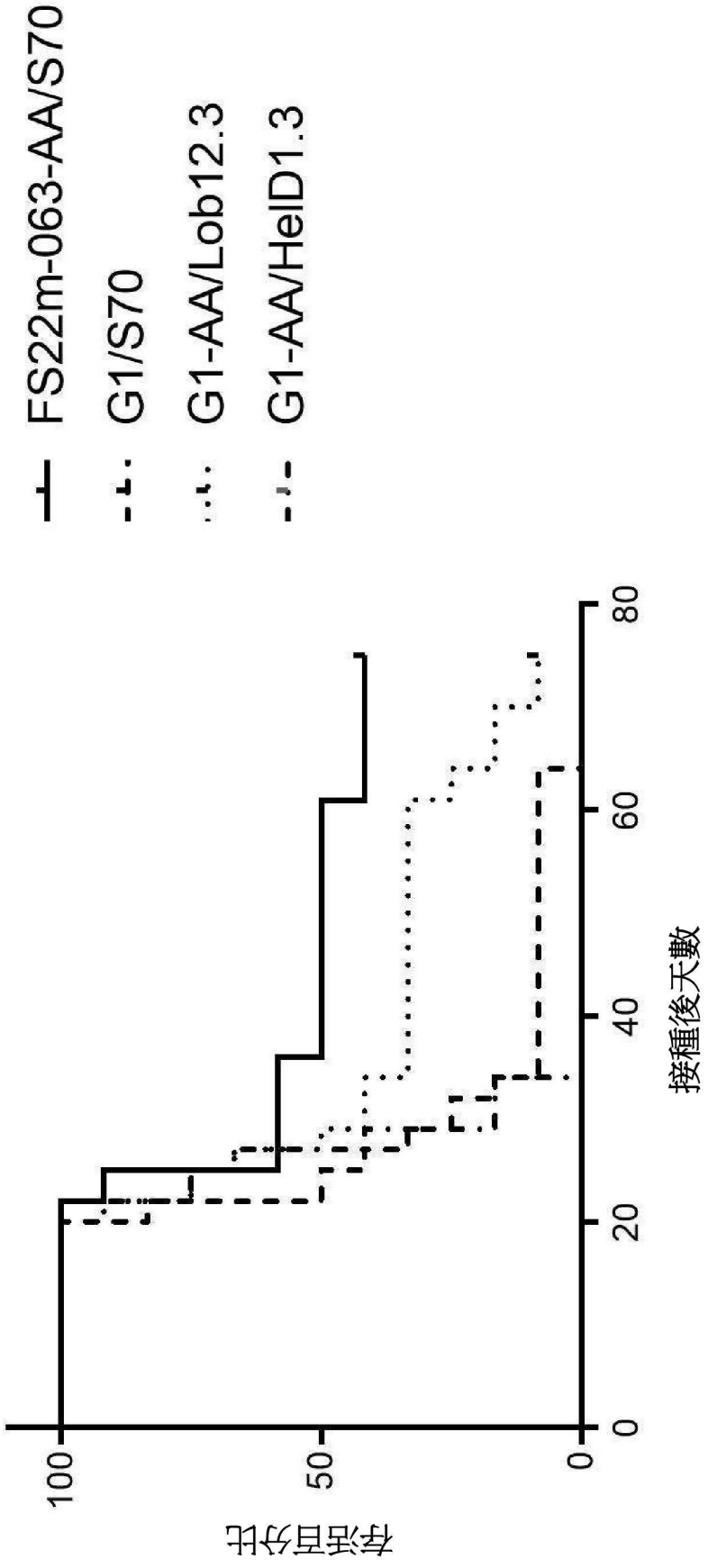
【圖17】


FS22m-063-AA/S70 1mg/kg
G1-AA/4420 1mg/kg
G1-AA/Lob12.3 +G1/S70 1mg/kg
存活百分比
100
50
0
0
20
40
60
天數

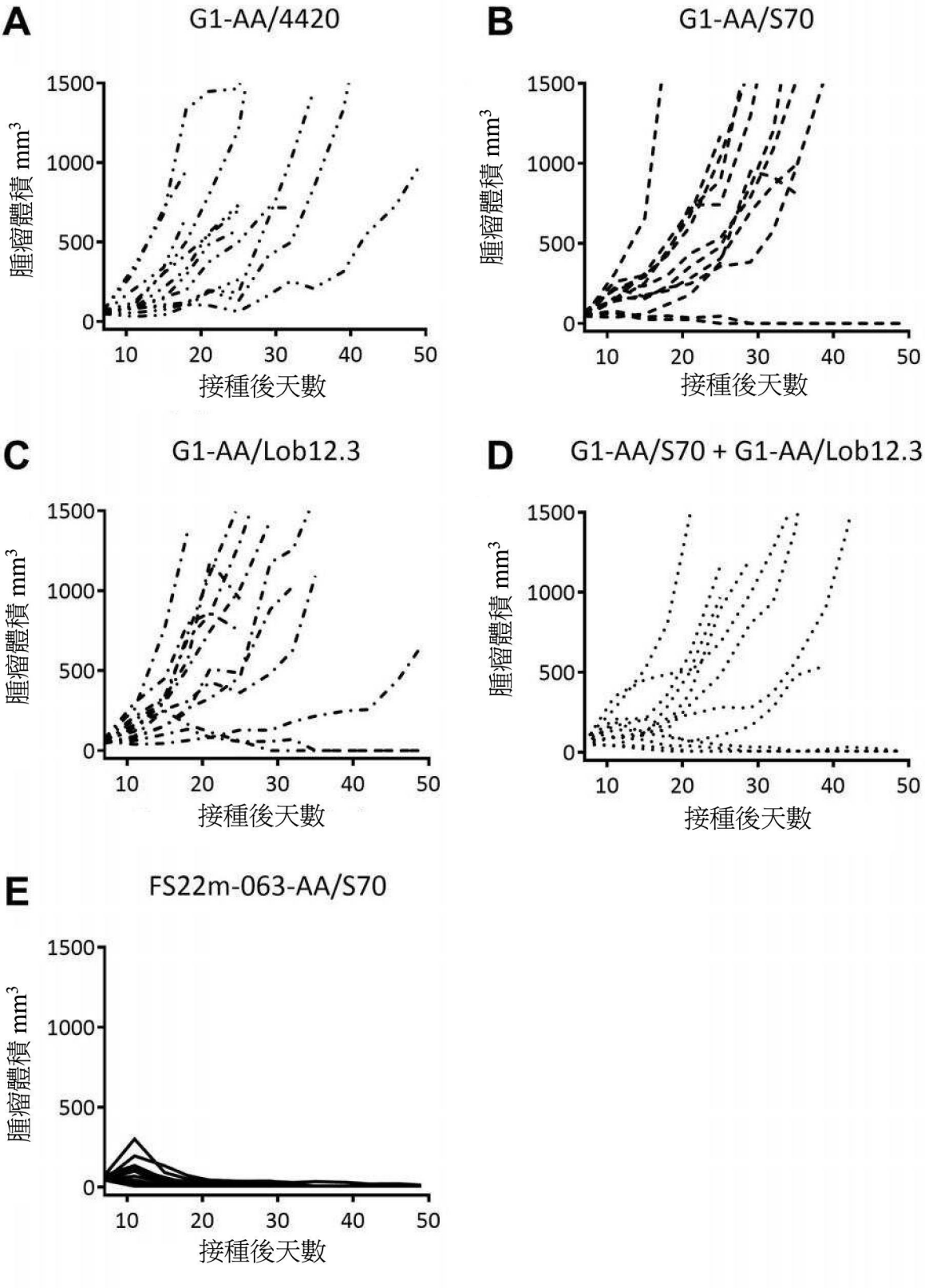
【圖18】


腫瘤體積平均 mm³ ± 95% CI
1500
1000
500
0
10
15
20
25
接種後天數
G1/S70
G1-AA/HelD1.3
G1-AA/Lob12.3
FS22m-063-AA/S70
****
****
****

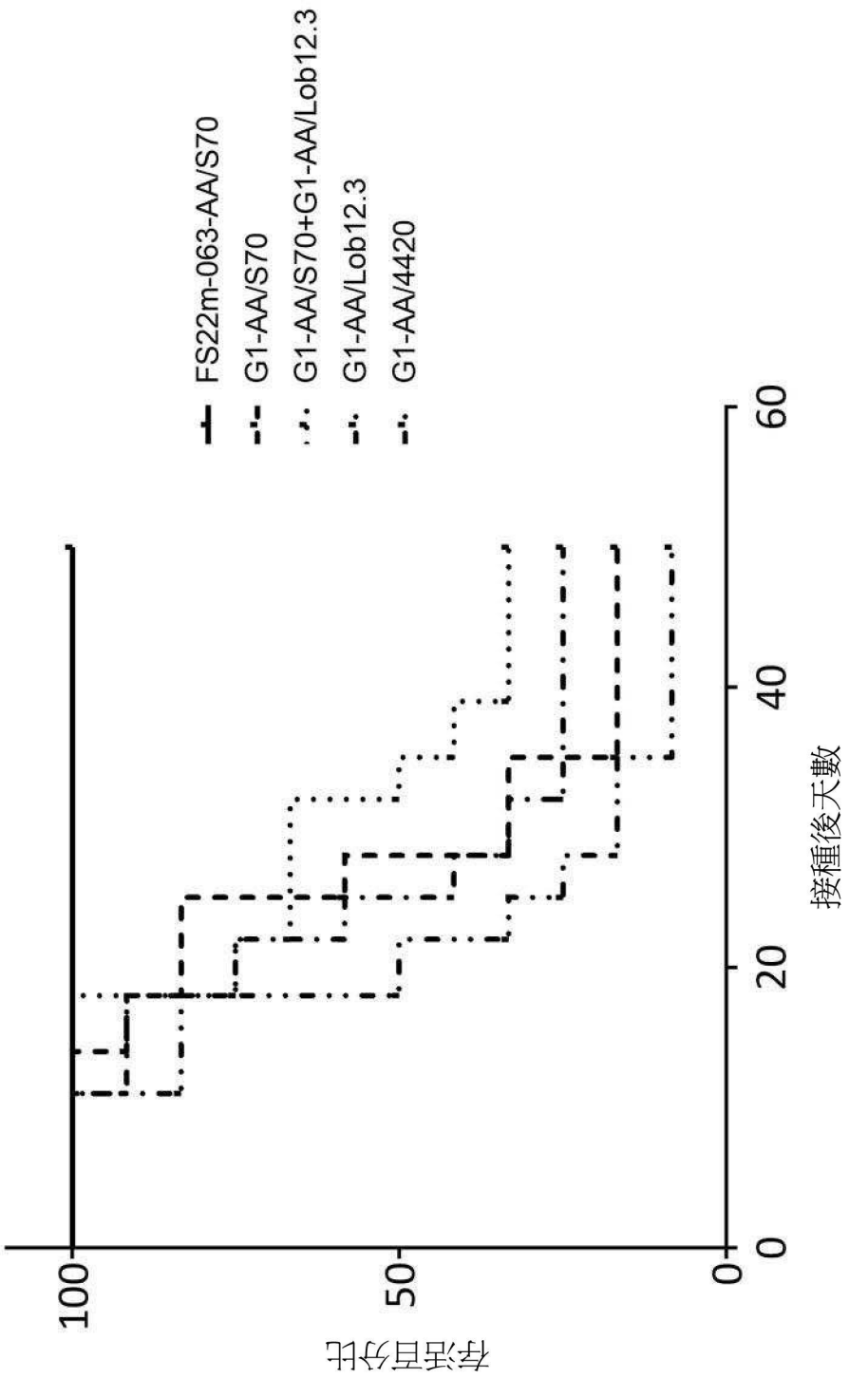
【圖19】


FS22m-063-AA/S70
G1/S70
G1-AA/Lob12.3
G1-AA/HelD1.3
存活百分比
100
50
0
0
20
40
60
80
接種後天數

【圖20】


A
G1-AA/4420
B
G1-AA/S70
C
G1-AA/Lob12.3
D
G1-AA/S70 + G1-AA/Lob12.3
E
FS22m-063-AA/S70
腫瘤體積 mm3
接種後天數
0
500
1000
1500
10
20
30
40
50

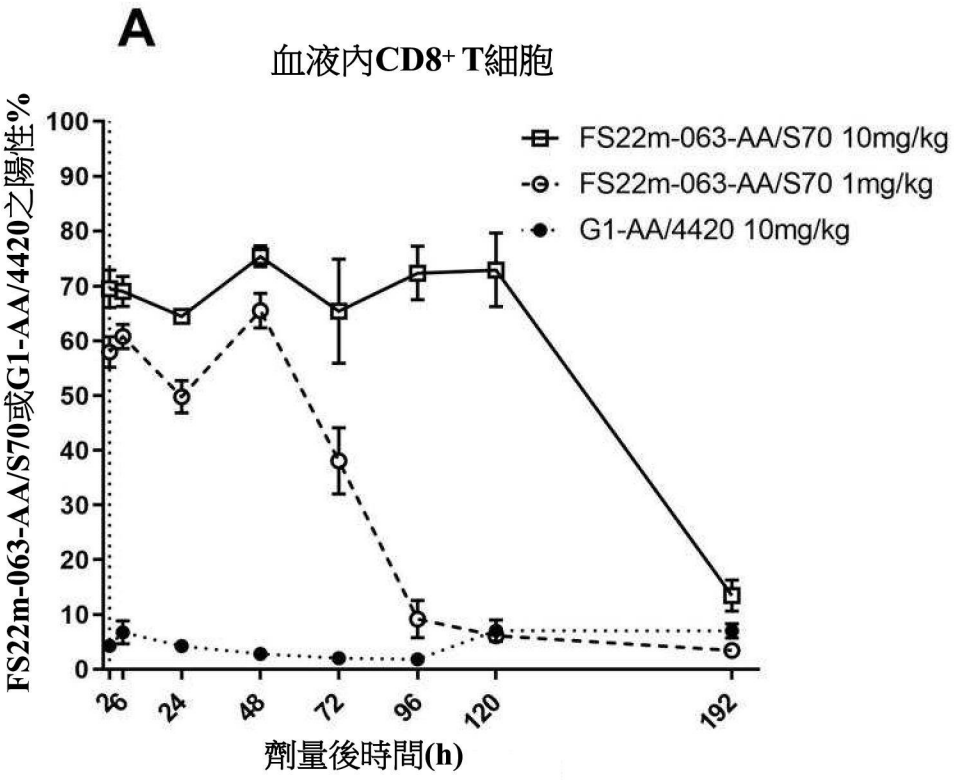
【圖21】

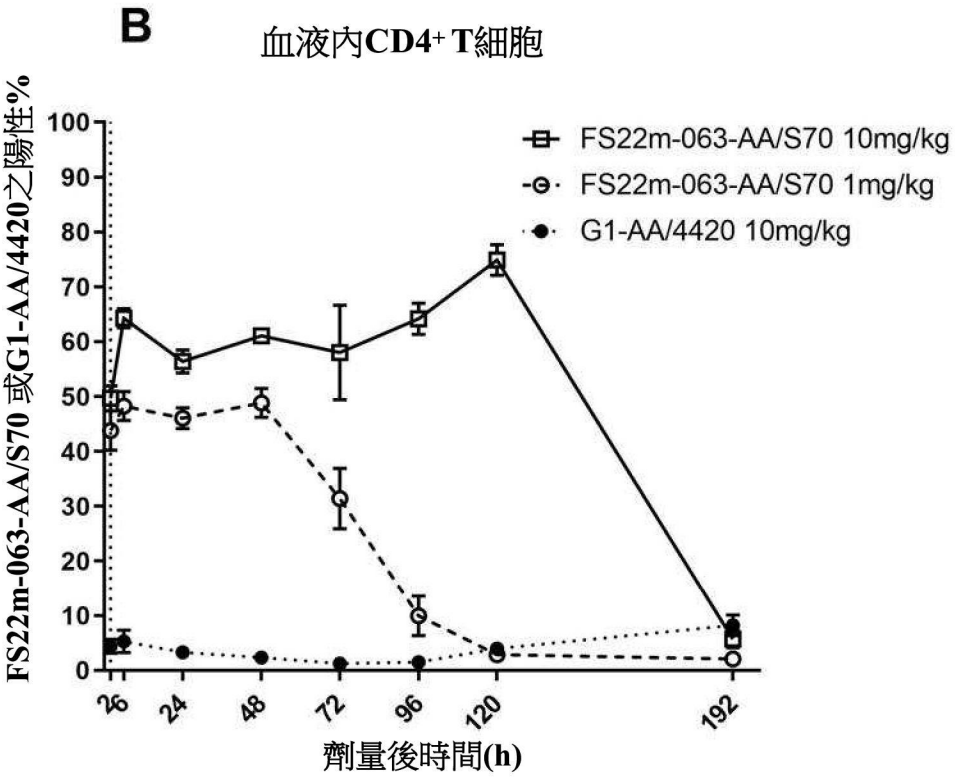

FS22m-063-AA/S70
G1-AA/S70
G1-AA/S70+G1-AA/Lob12.3
G1-AA/Lob12.3
G1-AA/4420
存活百分比
100
50
0
0
20
40
60
接種後天數

【圖22】

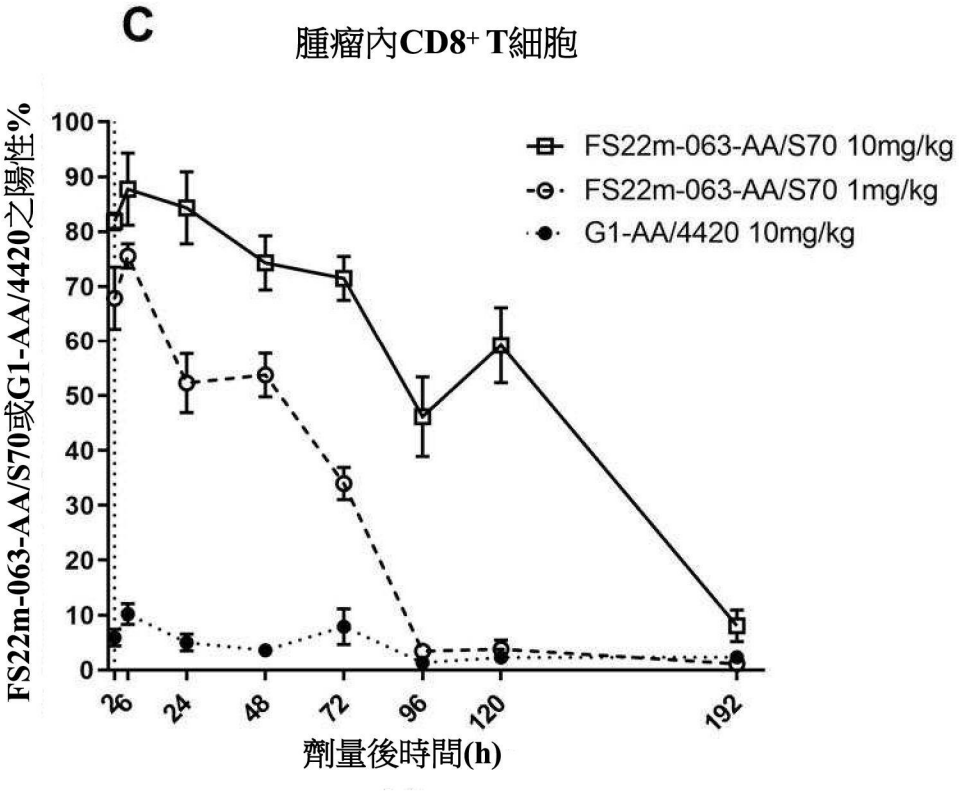
A
G1-AA/4420
腫瘤體積 mm3
1000
800
600
400
200
0
10
15
20
25
30
接種後天數
B
FS22m-063-AA/S70
腫瘤體積 mm3
1000
800
600
400
200
0
10
15
20
25
30
接種後天數

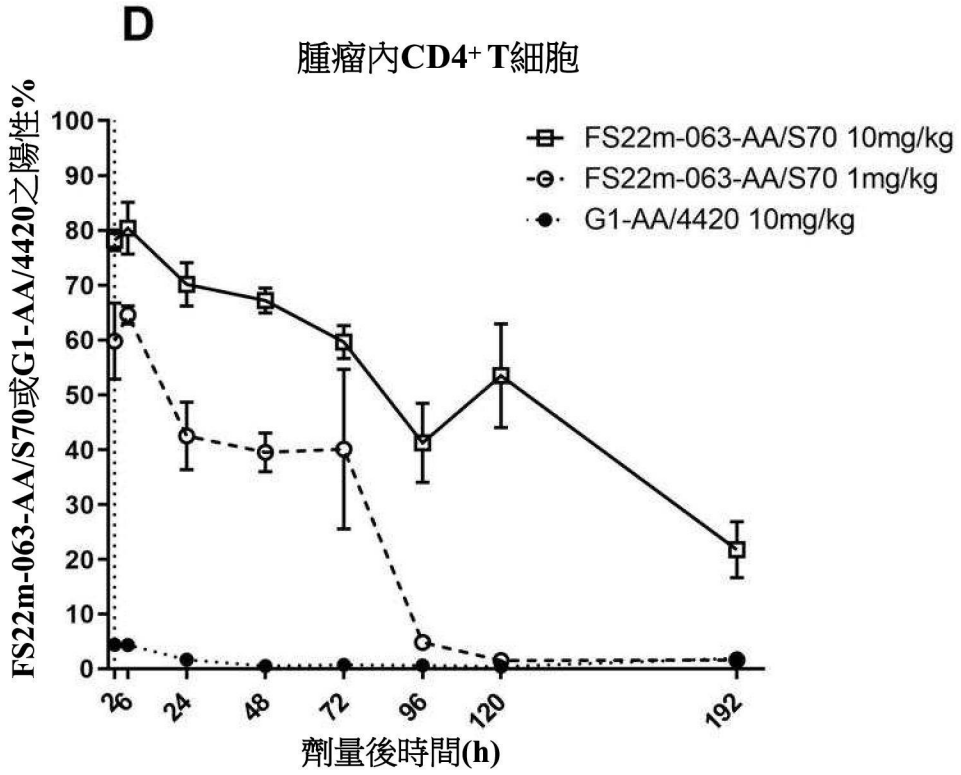
【圖23】


A
血液內CD8+ T細胞
FS22m-063-AA/S70 10mg/kg
FS22m-063-AA/S70 1mg/kg
G1-AA/4420 10mg/kg
FS22m-063-AA/S70或G1-AA/4420之陽性%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
26
24
48
72
96
120
192
劑量後時間(h)

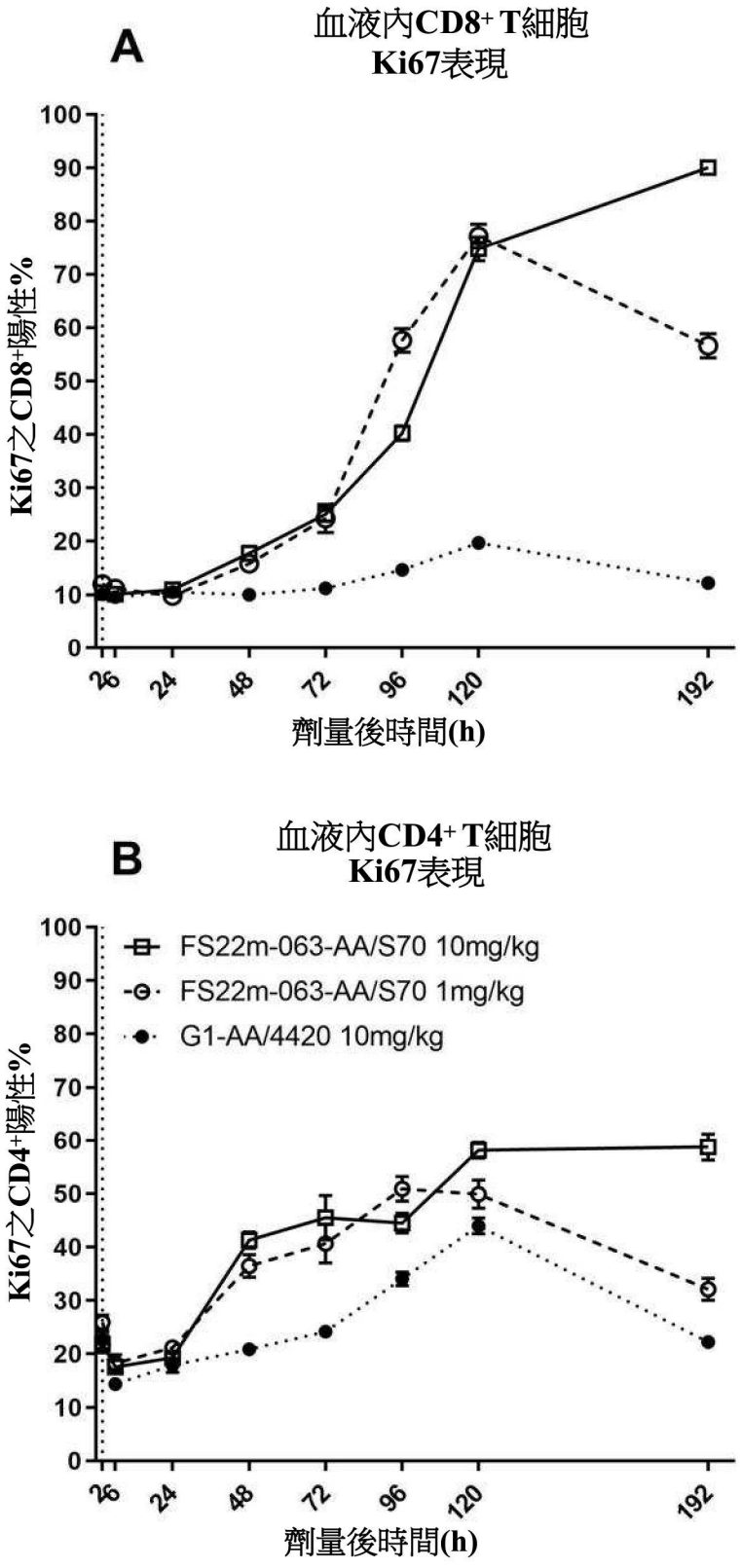

B
血液內CD4+ T細胞
FS22m-063-AA/S70 10mg/kg
FS22m-063-AA/S70 1mg/kg
G1-AA/4420 10mg/kg
FS22m-063-AA/S70 或G1-AA/4420之陽性%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
26
24
48
72
96
120
192
劑量後時間(h)

【圖24】

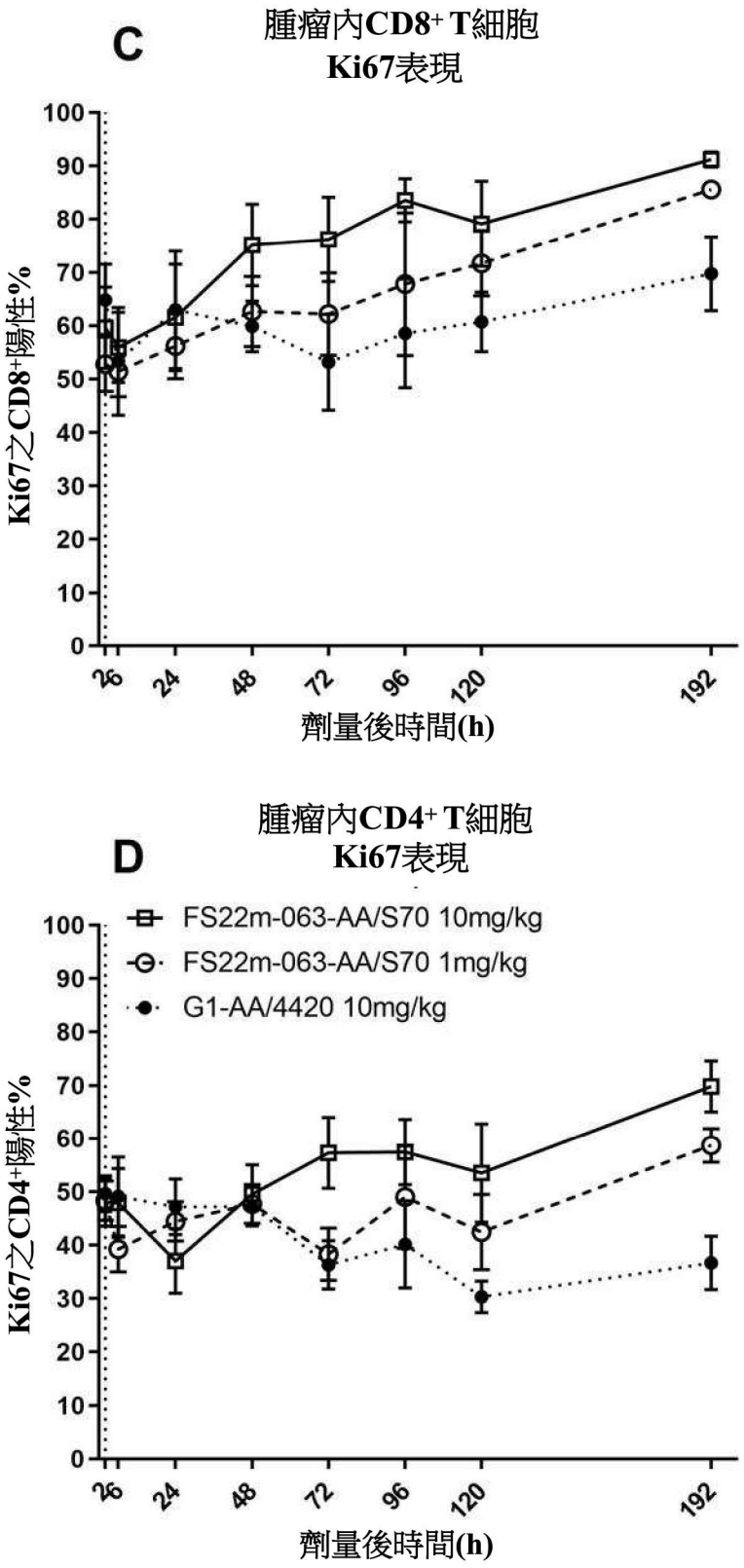

C
腫瘤內CD8+ T細胞
FS22m-063-AA/S70或G1-AA/4420之陽性%
FS22m-063-AA/S70 10mg/kg
FS22m-063-AA/S70 1mg/kg
G1-AA/4420 10mg/kg
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0
24
48
72
96
120
192
劑量後時間(h)


D
腫瘤內CD4+ T細胞
FS22m-063-AA/S70或G1-AA/4420之陽性%
FS22m-063-AA/S70 10mg/kg
FS22m-063-AA/S70 1mg/kg
G1-AA/4420 10mg/kg
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0
24
48
72
96
120
192
劑量後時間(h)

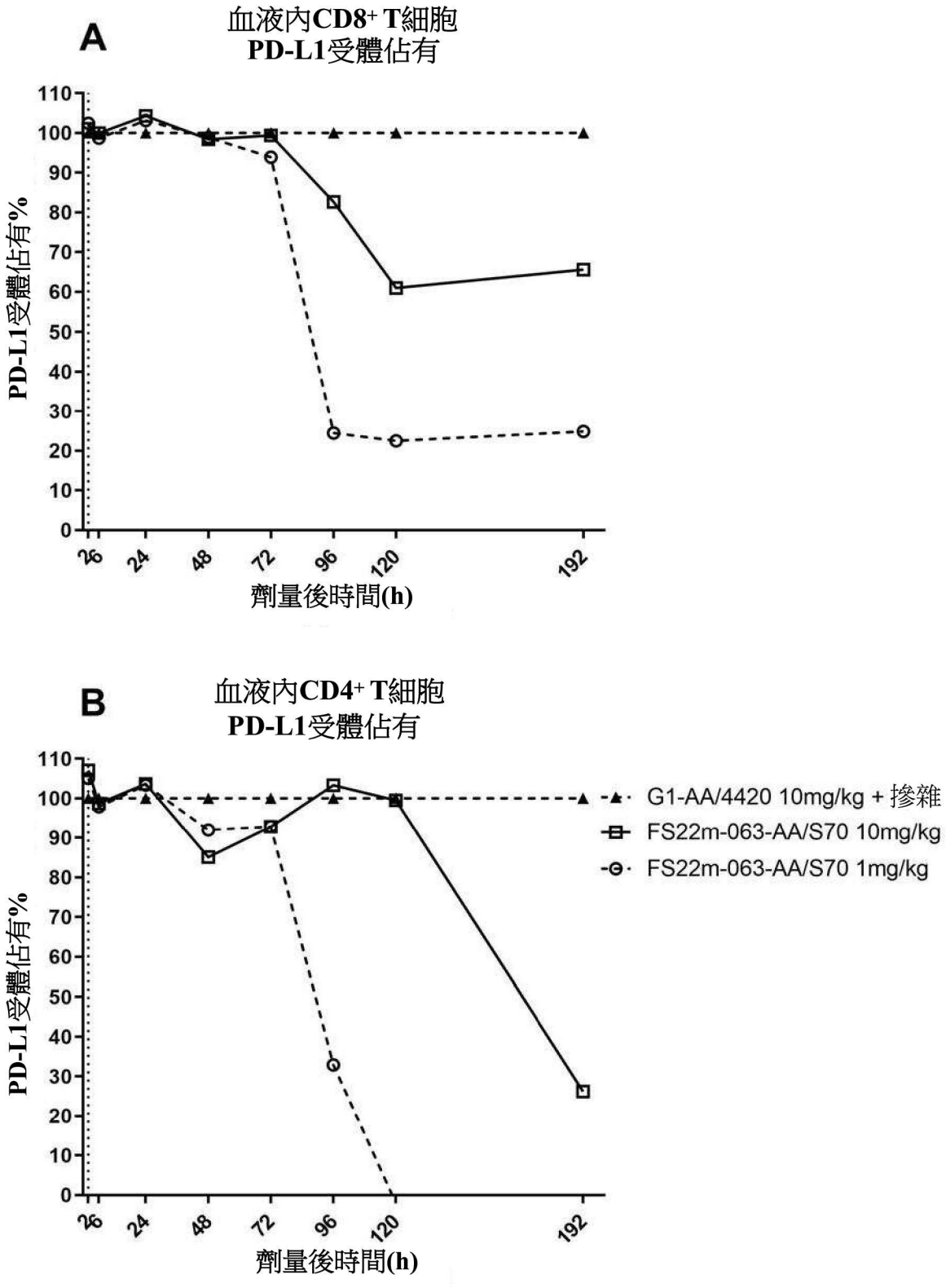
【圖24】(續)


A
血液內CD8+ T細胞
Ki67表現
Ki67之CD8+陽性%
劑量後時間(h)
B
血液內CD4+ T細胞
Ki67表現
FS22m-063-AA/S70 10mg/kg
FS22m-063-AA/S70 1mg/kg
G1-AA/4420 10mg/kg
Ki67之CD4+陽性%
劑量後時間(h)

【圖25】

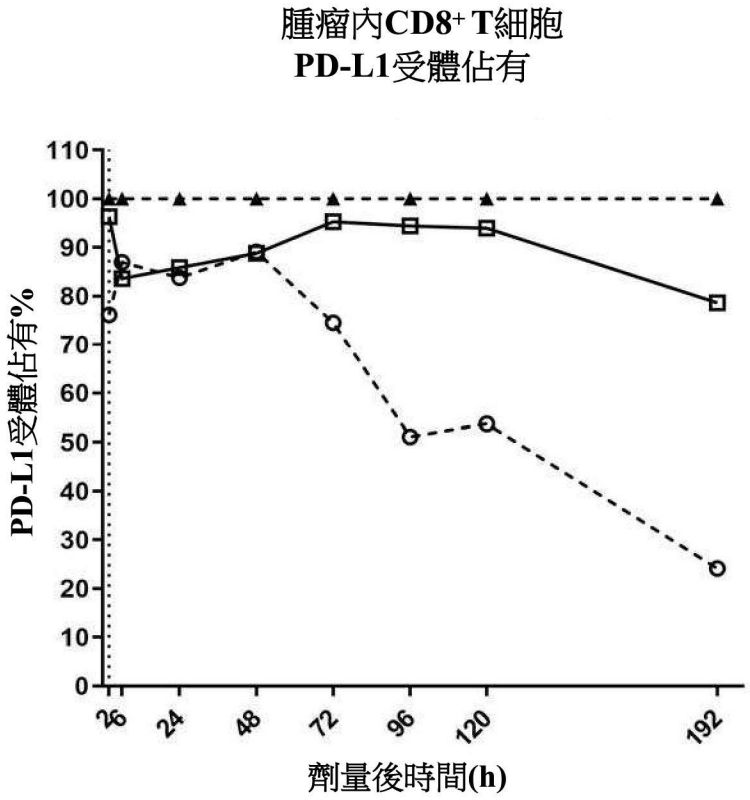

C
腫瘤內CD8+ T細胞
Ki67表現
Ki67之CD8+陽性%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
26
24
48
72
96
120
192
劑量後時間(h)
D
腫瘤內CD4+ T細胞
Ki67表現
FS22m-063-AA/S70 10mg/kg
FS22m-063-AA/S70 1mg/kg
G1-AA/4420 10mg/kg
Ki67之CD4+陽性%
劑量後時間(h)

【圖25】(續)

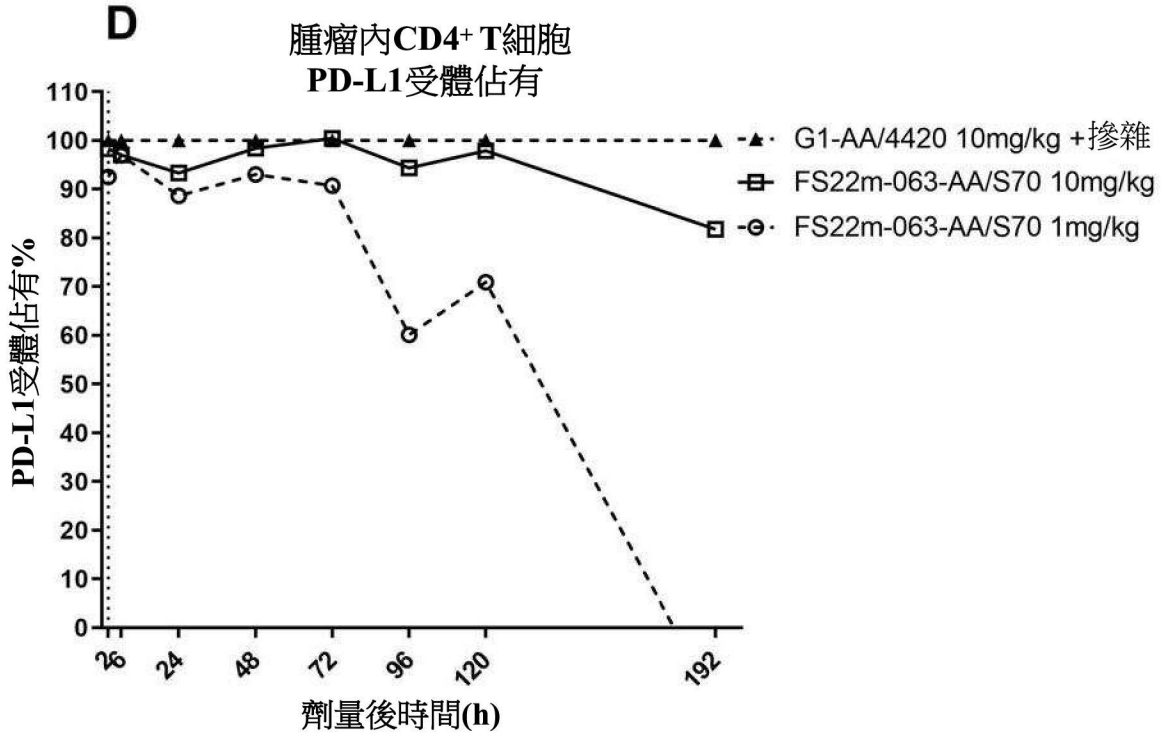

A
血液內CD8+ T細胞
PD-L1受體佔有
PD-L1受體佔有%
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
26
24
48
72
96
120
192
劑量後時間(h)
B
血液內CD4+ T細胞
PD-L1受體佔有
PD-L1受體佔有%
劑量後時間(h)
G1-AA/4420 10mg/kg + 摻雜
FS22m-063-AA/S70 10mg/kg
FS22m-063-AA/S70 1mg/kg

【圖26】

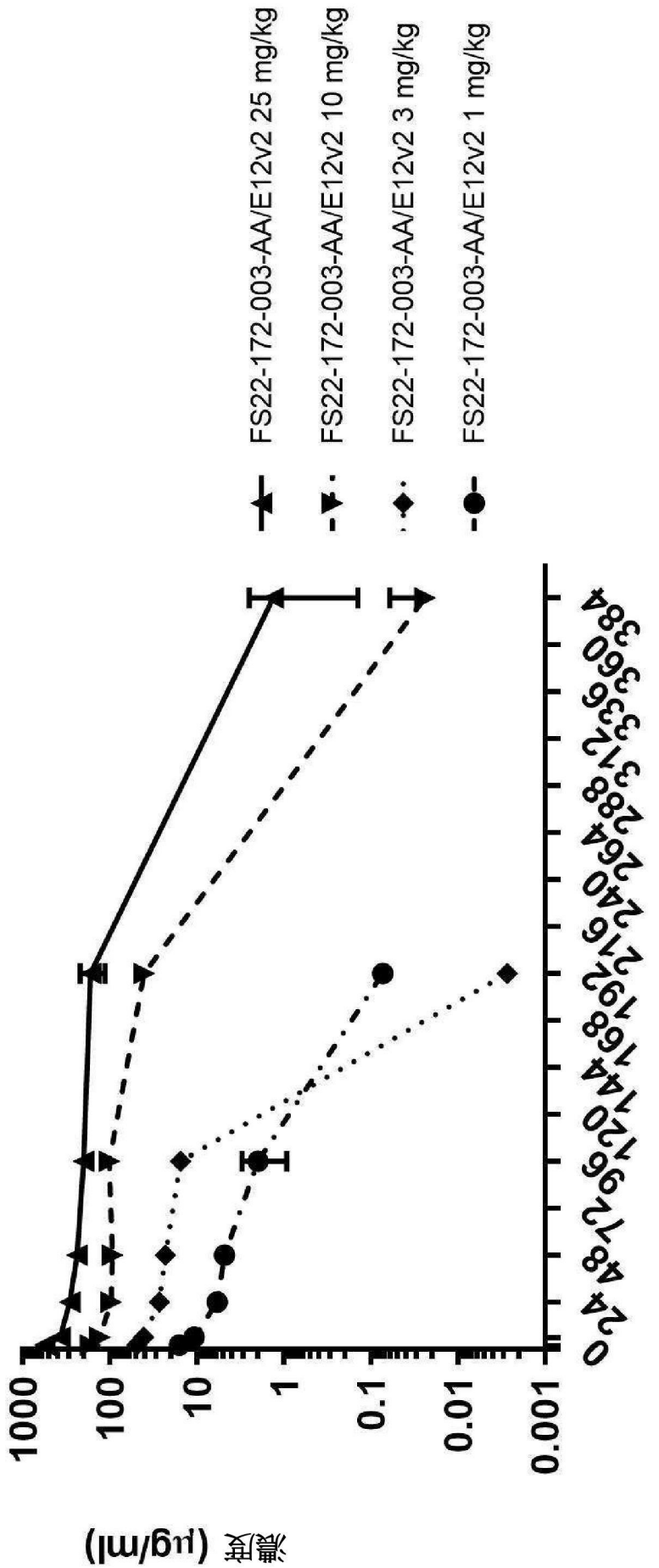
C


腫瘤內CD8+ T細胞
PD-L1受體佔有
PD-L1受體佔有%
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
26
24
48
72
96
120
192
劑量後時間(h)

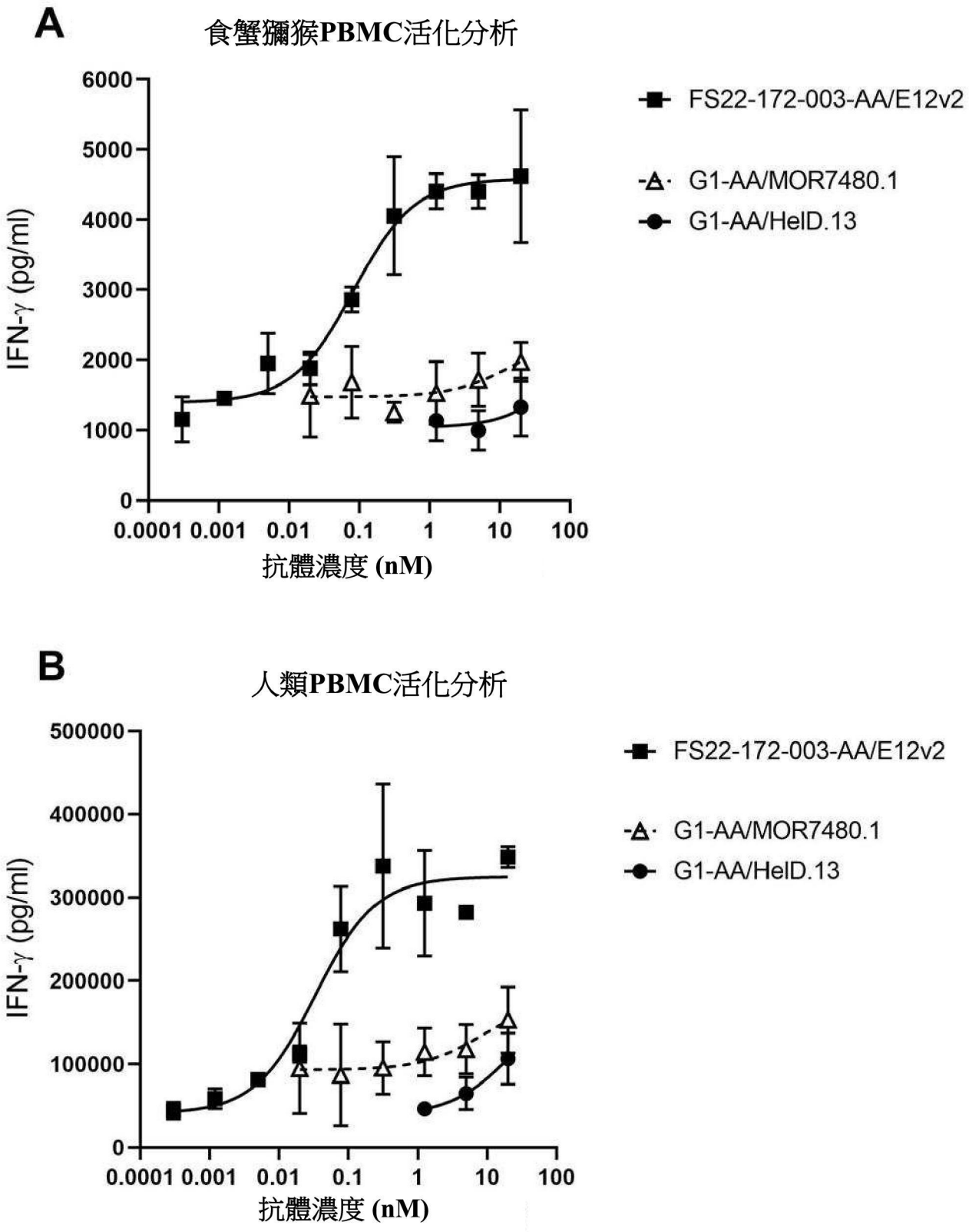
D


腫瘤內CD4+ T細胞
PD-L1受體佔有
PD-L1受體佔有%
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
26
24
48
72
96
120
192
劑量後時間(h)
G1-AA/4420 10mg/kg +摻雜
FS22m-063-AA/S70 10mg/kg
FS22m-063-AA/S70 1mg/kg

【圖26】(續)


FS22-172-003-AA/E12v2 25 mg/kg
FS22-172-003-AA/E12v2 10 mg/kg
FS22-172-003-AA/E12v2 3 mg/kg
FS22-172-003-AA/E12v2 1 mg/kg
濃度 (μg/ml)
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0 24 48 72 96 120 144 168 192 216 240 264 288 312 336 360 384
時間 (h)

【圖27】


A
食蟹獼猴PBMC活化分析
IFN-γ (pg/ml)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
抗體濃度 (nM)
FS22-172-003-AA/E12v2
G1-AA/MOR7480.1
G1-AA/HelD.13
B
人類PBMC活化分析
IFN-γ (pg/ml)
500000
400000
300000
200000
100000
0
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
抗體濃度 (nM)
FS22-172-003-AA/E12v2
G1-AA/MOR7480.1
G1-AA/HelD.13

【圖28】