I833183

(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 I833183 B**

(45)公告日： 中華民國 113 (2024) 年 02 月 21 日

(21)申請案號：111110951 (22)申請日： 中華民國 105 (2016) 年 07 月 28 日

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

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2015/07/30 美國 62/198,867

2015/10/09 美國 62/239,559

2015/11/13 美國 62/255,140

2016/04/15 美國 62/322,974

(71)申請人：美商宏觀基因股份有限公司 (美國) MACROGENICS, INC. (US)

美國

(72)發明人：尚 坎帕納 SHAH, KALPANA (US)；史密斯 道格拉斯 SMITH, DOUGLAS H. (US)；拉莫特莫斯 羅斯 LA MOTTE-MOHS, ROSS (US)；強生 萊斯利 JOHNSON, LESLIE S. (US)；摩爾 保羅 MOORE, PAUL A. (GB)；波維尼 愛利歐 BONVINI, EZIO (US)；寇尼格 史考特 KOENIG, SCOTT (US)

(74)代理人：李文賢；盧建川

(56)參考文獻：

WO 2014179664A2 WO 2014194302A2

審查人員：張維纓

申請專利範圍項數：27 項 圖式數：23 共 505 頁

(54)名稱

PD-1 結合分子和其使用方法

(57)摘要

本發明涉及選擇的能夠結合食蟹猴 PD-1 和人 PD-1 的抗 PD-1 抗體：PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 4、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 8、PD-1 mAb 9、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1 mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14 或 PD-1 mAb 15，和這類抗體的人源化和嵌合形式。本發明另外涉及 PD-1 結合分子，其包括這類抗 PD-1 抗體的 PD-1 結合片段、免疫綴合物，和雙特異性分子，包括雙抗體、BiTE、雙特異性抗體等，其包括(i)這樣的 PD-1 結合片段，和(ii)能夠結合參與調節免疫檢查點的免疫細胞的表面上存在的分子的表位元的結構域。本發明也涉及使用 PD-1 結合分子刺激免疫應答的方法，以及檢測 PD-1 的方法。

The present invention is directed to selected anti-PD-1 antibodies capable of binding to both cynomolgus monkey PD-1 and to human PD-1: PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, or PD-1 mAb 15, and to humanized and chimeric versions of such antibodies. The invention additionally pertains to PD-1-binding molecules that comprise PD-1 binding fragments of such anti-PD-1 antibodies, immunocongugates, and to bispecific molecules, including diabodies, BiTEs, bispecific antibodies, etc., that comprise (i) such PD-1-binding fragments, and (ii) a domain capable of binding an epitope of a molecule involved in regulating an immune check point present on the surface of an

immune cells. The present invention also pertains to methods of using molecules that bind PD-1 for stimulating immune responses, as well as methods of detecting PD-1.

指定代表圖：

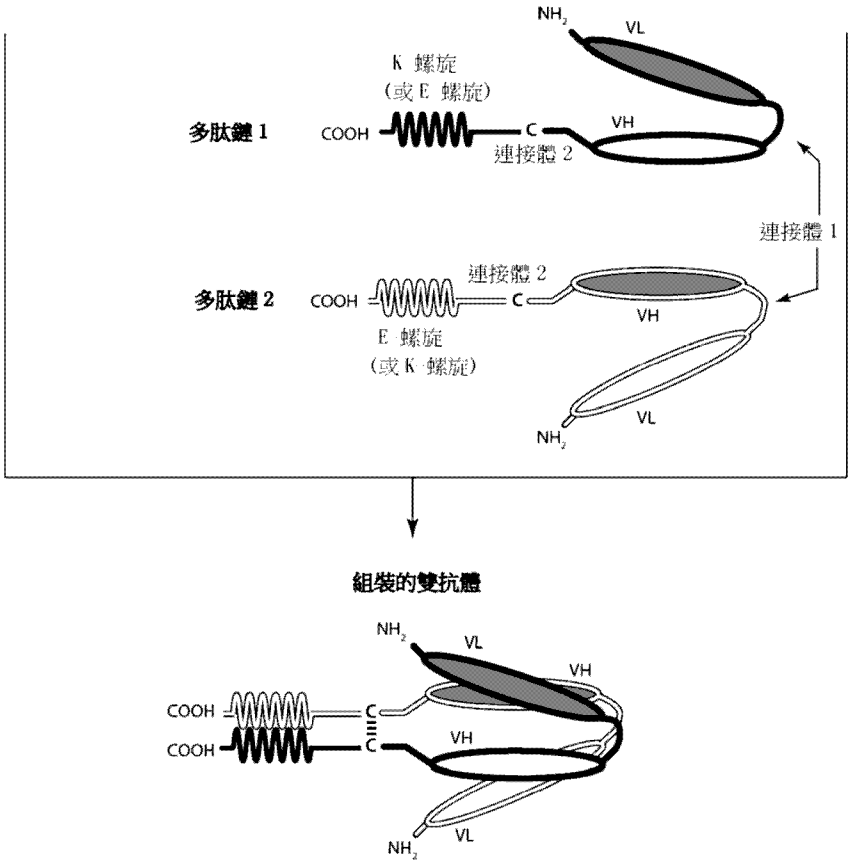

圖 1

專利案號：111110951
原申請案號：109107547
公告本
I833183

【發明摘要】

【中文發明名稱】 PD-1結合分子和其使用方法

【英文發明名稱】 PD-1-Binding Molecules and Methods of Use Thereof

【中文】

本發明涉及選擇的能夠結合食蟹猴PD-1和人PD-1的抗PD-1抗體：PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 4、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 8、PD-1 mAb 9、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1 mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14或PD-1 mAb 15，和這類抗體的人源化和嵌合形式。本發明另外涉及PD-1結合分子，其包括這類抗PD-1抗體的PD-1結合片段、免疫綴合物，和雙特異性分子，包括雙抗體、BiTE、雙特異性抗體等，其包括(i)這樣的PD-1結合片段，和(ii)能夠結合參與調節免疫檢查點的免疫細胞的表面上存在的分子的表位元的結構域。本發明也涉及使用PD-1結合分子刺激免疫應答的方法，以及檢測PD-1的方法。

【英文】

The present invention is directed to selected anti-PD-1 antibodies capable of binding to both cynomolgus monkey PD-1 and to human PD-1: PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, or PD-1 mAb 15, and to humanized and chimeric versions of such antibodies. The invention additionally pertains to PD-1-binding molecules that comprise PD-1 binding fragments of such anti-PD-1 antibodies, immunocongugates,

and to bispecific molecules, including diabodies, BiTEs, bispecific antibodies, etc., that comprise (i) such PD-1-binding fragments, and (ii) a domain capable of binding an epitope of a molecule involved in regulating an immune check point present on the surface of an immune cells. The present invention also pertains to methods of using molecules that bind PD-1 for stimulating immune responses, as well as methods of detecting PD-1.

【指定代表圖】　　圖1

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】　PD-1結合分子和其使用方法

【英文發明名稱】　PD-1-Binding Molecules and Methods of Use Thereof

【技術領域】

【0001】　本發明涉及PD-1結合分子(結合PD-1的分子)，其包括下述選擇的能夠結合食蟹猴(cynomolgus monkey)PD-1和人PD-1的抗PD-1抗體的PD-1結合結構域(結合PD-1的結構域)：PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 4、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 8、PD-1 mAb 9、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1 mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14或PD-1 mAb 15。本發明尤其涉及PD-1結合分子，其是這類抗體的人源化形式或嵌合形式，或其包括這類抗PD-1抗體的PD-1結合片段(結合PD-1的片段)(尤其地，免疫綴合物、雙抗體、BiTE、雙特異性抗體等)。本發明尤其涉及這類PD-1結合分子，其另外能夠結合免疫細胞的表面上存在的參與調節免疫檢查點的分子的表位。本發明也涉及使用這類PD-1結合分子檢測PD-1或刺激免疫應答的方法。本發明也涉及聯合療法(組合療法)的方法，其中包括這類選擇的抗PD-1抗體的一個或多個PD-1結合結構域的PD-1結合分子聯合有效刺激免疫應答的一種或多種另外的分子和/或聯合特異性結合癌症抗原的一種或多種另外的分子施用。

【先前技術】

【0002】　I. 細胞介導的免疫應答

【0003】　人和其他哺乳動物的免疫系統負責提供針對感染和疾病的保護。這種保護通過體液免疫應答和細胞介導的免疫應答二者被提供。體液應答

導致抗體和能夠識別和中和外源靶(抗原)的其他生物分子的產生。相比之下，細胞介導的免疫應答涉及巨噬細胞、天然殺傷細胞(NK)和抗原特異性細胞毒性T-淋巴細胞通過T-細胞的啟動，和回應抗原的識別的各種細胞因數的釋放(Dong, C.等(2003) "*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,* Immunolog. Res. 28(1):39-48)。

【0004】 T-細胞最佳地介導針對抗原的免疫應答的能力需要兩種不同的信號傳導相互作用(Viglietta,V.等(2007) "*Modulating Co-Stimulation*," Neurotherapeutics 4:666-675；Korman, A.J.等(2007) "*Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy*, Adv. Immunol. 90:297-339)。第一，已經排列在抗原呈遞細胞(APC)的表面上的抗原必須被呈遞至抗原特異性幼稚(naive)$CD4^+$ T-細胞。這樣的呈遞經T-細胞受體(TCR)遞送信號，所述信號引導T-細胞啟動對呈遞的抗原為特異性的免疫應答。第二，通過在APC和不同的T-細胞表面分子之間的相互作用介導的一系列共刺激和抑制信號首先引發T-細胞的啟動和增殖，並最終導致它們的抑制。因此，第一信號賦予免疫應答特異性，而第二信號用於確定應答的性質、量級(magnitude)和持續時間。

【0005】 免疫系統通過共刺激和共抑制配體和受體被嚴格地控制。這些分子提供用於T-細胞啟動的第二信號，並且提供正信號和負信號的平衡網路以最大化針對感染的免疫應答，同時限制對自身的免疫性(Wang, L.等(2011年3月7日) "*VISTA, A Novel Mouse Ig Superfamily Ligand That Negatively Regulates T-Cell Responses*," J. Exp. Med. 10.1084/jem.20100619:1-16；Lepenies, B.等(2008) "*The Role Of Negative Costimulators During Parasitic Infections*," Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets 8:279-288)。尤其重要的是抗原呈遞細胞的B7.1(CD80)和B7.2(CD86)配體和$CD4^+$ T-淋巴細胞的CD28和CTLA-4受體之間的結合(Sharpe, A.H.等(2002) "*The B7-CD28 Superfamily*", Nature Rev. Immunol.

2:116-126；Dong, C.等(2003) *"Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules"*, Immunolog. Res. 28(1):39-48；Lindley, P.S.等(2009) *"The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation"*, Immunol. Rev. 229:307-321)。B7.1或B7.2與CD28的結合刺激T-細胞啟動；B7.1或B7.2與CTLA-4的結合抑制這種啟動(Dong, C.等(2003) *"Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules"*, Immunolog. Res. 28(1):39-48；Lindley, P.S.等(2009) *"The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation"*, Immunol. Rev. 229:307-321；Greenwald, R.J.等(2005) *"The B7 Family Revisited"*, Ann. Rev. Immunol. 23:515-548)。CD28在T-細胞的表面上組成型表達(Gross, J., 等(1992) *"Identification And Distribution Of The Costimulatory Receptor CD28 In The Mouse"*, J. Immunol. 149:380–388)，而CTLA-4表達在T細胞啟動之後被快速上調(Linsley, P.等(1996) *"Intracellular Trafficking Of CTLA4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement,"* Immunity 4:535–543)。因為CTLA-4是更高的親和力受體(Sharpe, A.H.等(2002) *"The B7-CD28 Superfamily"*, Nature Rev. Immunol. 2:116-126)，所以結合首先啟動T-細胞增殖(經CD28)，然後抑制它(經CTLA-4的初期表達)，從而在不再需要增殖時阻遏所述效果。

【0006】 對CD28受體的配體的進一步研究導致對一組相關的B7分子("B7超家族")的鑒定和表徵(Coyle, A.J.等(2001) *"The Expanding B7 Superfamily: Increasing Complexity In Costimulatory Signals Regulating T-Cell Function"*, Nature Immunol. 2(3):203-209；Sharpe, A.H.等(2002) *"The B7-CD28 Superfamily"*, Nature Rev. Immunol. 2:116-126；Greenwald, R.J.等(2005) *"The B7 Family Revisited"*, Ann. Rev. Immunol. 23:515-548；Collins, M.等(2005) *"The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands"*, Genome Biol. 6:223.1-223.7；Loke, P.等(2004) *"Emerging Mechanisms Of Immune Regulation: The Extended B7 Family And*

Regulatory T-Cells." Arthritis Res. Ther. 6:208-214；Korman, A.J.等(2007) "*Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy*," Adv. Immunol. 90:297-339；Flies, D.B.等(2007) "*The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity,* " J. Immunother. 30(3):251-260；Agarwal, A.等(2008) "*The Role Of Positive Costimulatory Molecules In Transplantation And Tolerance*, " Curr. Opin. Organ Transplant. 13:366-372；Lenschow, D.J.等(1996) "*CD28/B7 System of T-Cell Costimulation,* " Ann. Rev. Immunol. 14:233-258；Wang, S.等(2004) "*Co- Signaling Molecules Of The B7-CD28 Family In Positive And Negative Regulation Of T Lymphocyte Responses,*" Microbes Infect. 6:759-766)。該家族當前具有若干個已知成員：B7.1(CD80)、B7.2(CD86)、可誘導的共刺激配體(ICOS-L)、程式性死亡-1配體(PD-L1；B7-H1)、程式性死亡-2配體(PD-L2；B7-DC)、B7-H3、B7-H4和B7-H6 (Collins, M.等(2005) "*The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands*, " Genome Biol. 6:223.1-223.7；Flajnik, M.F.等(2012) "*Evolution Of The B7 Family: Co-Evolution Of B7H6 And Nkp30, Identification Of A New B7 Family Member, B7H7, And Of B7's Historical Relationship With The MHC*, " Immunogenetics epub doi.org/10.1007/s00251-012-0616-2)。

【0007】 II. 程式性死亡-1 ("PD-1")

【0008】 程式性死亡-1 ("PD-1"也稱為"CD279")是廣泛地負調節免疫應答的T-細胞調節劑的擴展的CD28/CTLA-4家族的約31 kD I型膜蛋白成員(Ishida, Y.等(1992) "*Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death*," EMBO J. 11:3887-3895；美國專利申請公開號2007/0202100、2008/0311117、2009/00110667、美國專利號6,808,710、7,101,550、7,488,802、7,635,757、7,722,868、PCT公開號WO 01/14557)。

【0009】 PD-1在啟動的T-細胞、B-細胞和單核細胞上表達(Agata, Y.等(1996) "*Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes*," Int. Immunol. 8(5):765-772；Yamazaki, T.等(2002) "*Expression Of Programmed Death 1 Ligands By Murine T-Cells And APC*," J. Immunol. 169:5538-5545)，並且，以低水準在天然殺傷細胞(NK) T-細胞中表達(Nishimura, H.等(2000) "*Facilitation Of Beta Selection And Modification Of Positive Selection In The Thymus Of PD-1-Deficient Mice*," J. Exp. Med. 191:891-898；Martin-Orozco, N.等(2007) "*Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity*," Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298)。

【0010】 PD-1的細胞外區域由與CTLA-4中等同結構域具有23%同一性的單免疫球蛋白(Ig)V結構域組成(Martin-Orozco, N.等(2007) "*Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity*," Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298)。細胞外IgV結構域之後是跨膜區域和細胞內尾區。細胞內尾區包含位於基於免疫受體酪氨酸的抑制基序和基於免疫受體酪氨酸的轉換基序中的兩個磷酸化位點，這表明PD-1負調節TCR信號(Ishida, Y.等(1992) "*Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death*," EMBO J. 11:3887-3895；Blank, C.等(2006) "*Contribution Of The PD-L1/PD-1 Pathway To T-Cell Exhaustion: An Update On Implications For Chronic Infections And Tumor Evasion* Cancer," Immunol. Immunother. 56(5):739-745)。

【0011】 通過結合B7-H1和B7-DC，PD-1介導其對免疫系統的抑制(Flies, D.B.等(2007) "*The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity*," J. Immunother. 30(3):251-260；美國專利號6,803,192、7,794,710、美國專利申請公開號2005/0059051、2009/0055944、2009/0274666、2009/0313687、PCT申請號WO 01/39722、WO 02/086083)。

【0012】 B7-H1和B7-DC在人和鼠科動物組織，比如心臟、胎盤、肌肉、胎肝、脾、淋巴結和胸腺以及鼠科動物肝、肺、腎、胰腺的胰島細胞和小腸的表面上廣泛表達(Martin-Orozco, N.等(2007) "*Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity*," Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298)。在人中，在人內皮細胞(Chen, Y.等(2005) "*Expression of B7-H1 in Inflammatory Renal Tubular Epithelial Cells*," Nephron. Exp. Nephrol. 102:e81-e92；de Haij, S.等(2005) "*Renal Tubular Epithelial Cells Modulate T-Cell Responses Via ICOS-L And B7-H1*" Kidney Int. 68:2091-2102；Mazanet, M.M.等(2002) "*B7-H1 Is Expressed By Human Endothelial Cells And Suppresses T-Cell Cytokine Synthesis*," J. Immunol. 169:3581-3588)、心肌(Brown, J.A.等(2003) "*Blockade Of Programmed Death-1 Ligands On Dendritic Cells Enhances T-Cell Activation And Cytokine Production*," J. Immunol. 170:1257-1266)、合胞滋養層(syncyciotrophoblast)(Petroff, M.G.等(2002) "*B7 Family Molecules: Novel Immunomodulators At The Maternal-Fetal Interface*," Placenta 23:S95-S101)中已經發現了B7-H1蛋白質表達。分子也由一些組織的駐留型巨噬細胞、已經被干擾素(IFN)-γ或腫瘤壞死因數(TNF)-α啟動的巨噬細胞表達(Latchman, Y.等(2001) "*PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-Cell Activation*," Nat. Immunol 2:261-268)，並且在腫瘤中被表達(Dong, H. (2003) "*B7-H1 Pathway And Its Role In The Evasion Of Tumor Immunity*," J. Mol. Med. 81:281-287)。

【0013】 已經發現B7-H1和PD-1之間的相互作用為T和B-細胞提供了重要的負共刺激信號(Martin-Orozco, N.等(2007) "*Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor* Immunity," Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298)，並且用作細胞死亡誘導者(Ishida, Y.等(1992) "*Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death*," EMBO J.

11:3887-3895；Subudhi, S.K.等(2005) "*The Balance Of Immune Responses: Costimulation Verse Coinhibition*," J. Molec. Med. 83:193-202)。更具體而言，已經發現低濃度的PD-1受體和B7-H1配體之間的相互作用導致強烈抑制抗原特異性$CD8^+$ T-細胞增殖的抑制信號的傳輸；在更高的濃度下，與PD-1的相互作用不抑制T細胞增殖但是顯著減少多種細胞因數的產生(Sharpe, A.H.等(2002) "*The B7-CD28 Superfamily*," Nature Rev. Immunol. 2:116-126)。已經發現可溶性B7-H1-Fc融合蛋白抑制靜息和先前啟動的CD4和CD8 T-細胞，以及甚至來自臍帶血的幼稚T-細胞的T細胞增殖和細胞因數產生(Freeman, G.J.等(2000) "*Engagement Of The PD-1 Immunoinhibitory Receptor By A Novel B7 Family Member Leads To Negative Regulation Of Lymphocyte Activation*," J. Exp. Med. 192:1-9；Latchman, Y.等(2001) "*PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-Cell Activation*," Nature Immunol. 2:261-268；Carter, L.等(2002) "*PD-1:PD-L Inhibitory Pathway Affects Both CD4(+) and CD8(+) T-cells And Is Overcome By IL-2*," Eur. J. Immunol. 32(3):634-643；Sharpe, A.H.等(2002) "*The B7-CD28 Superfamily*," Nature Rev. Immunol. 2:116-126)。

【0014】 B7-H1和PD-1在抑制T-細胞啟動和增殖中的作用已經提示這些生物分子可能用作用於治療炎症和癌症的治療性靶。因此，已經建議了抗PD-1抗體治療感染和腫瘤以及上調適應性免疫應答的用途(見，美國專利申請公開號2010/0040614、2010/0028330、2004/0241745、2008/0311117、2009/0217401、美國專利號7,521,051、7,563,869、7,595,048、PCT公開號WO 2004/056875、WO 2008/083174)。下述文獻已經報導了能夠特異性結合PD-1的抗體：Agata, T.等(1996) "*Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes*," Int. Immunol. 8(5):765-772；和Berger, R.等(2008) "*Phase I Safety And Pharmacokinetic Study Of CT-011, A Humanized Antibody Interacting With PD-1,*

In Patients With Advanced Hematologic Malignancies," Clin. Cancer Res. 14(10):3044-3051 (也見美國專利號8,008,449和8,552,154、US專利公開號2007/0166281、2012/0114648、2012/0114649、2013/0017199、2013/0230514和2014/0044738；和PCT專利公開號WO 2003/099196、WO 2004/004771、WO 2004/056875、WO 2004/072286、WO 2006/121168、WO 2007/005874、WO 2008/083174、WO 2009/014708、WO 2009/073533、WO 2012/135408、WO 2012/145549和WO 2013/014668)。

【0015】 然而，儘管所有這些現有技術的進步，仍需要改善的組合物，其能夠更有力地引導身體的免疫系統攻擊癌細胞或病原體感染的細胞，尤其以較低的治療性濃度。儘管適應性免疫系統可以是抵抗癌症和疾病的有力防禦機制，但是其經常在腫瘤微環境中受到免疫抑制機制的阻礙，比如PD-1的表達。此外，在腫瘤環境(milieu)中由腫瘤細胞、免疫細胞和基質細胞表達的共抑制分子可明顯減弱針對癌細胞的T-細胞應答。因此，仍需要有效的PD-1結合分子。尤其地，需要這樣的有效PD-1結合分子：其具有期望的結合動力學特徵並且通過阻斷PD-1/PD-L1相互作用來對抗PD-1/PD-L1軸(axis)，其可為遭受癌症或其他疾病和病況的患者提供改善的治療價值。本發明涉及這些和其他目標。

【發明內容】

【0016】 本發明涉及PD-1結合分子，其包括下述能夠結合食蟹猴PD-1和人PD-1二者的選擇的抗PD-1抗體的PD-1結合結構域：PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 4、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 8、PD-1 mAb 9、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1 mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14或PD-1 mAb 15。本發明尤其涉及PD-1結合分子，其是這類抗體的人源

化形式或嵌合形式，或其包括這類抗PD-1抗體的PD-1結合片段(尤其地，免疫綴合物、雙抗體、BiTE、雙特異性抗體等)。本發明尤其涉及這類PD-1結合分子，其另外能夠結合免疫細胞的表面上存在的參與調節免疫檢查點的分子的表位。本發明也涉及使用這類PD-1結合分子檢測PD-1或刺激免疫應答的方法。本發明也涉及聯合療法的方法，其中包括這類選擇的抗PD-1抗體的一個或多個PD-1結合結構域的PD-1結合分子聯合有效刺激免疫應答的一種或多種另外的分子和/或聯合特異性結合癌症抗原的一種或多種另外的分子施用。

【0017】 詳細地，本發明提供了抗人PD-1結合分子，其包括三個重鏈CDR結構域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3和三個輕鏈CDR結構域CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3，其中：

(A)(1)所述 CDR_H1 結構域、CDR_H2 結構域和 CDR_H3 結構域是 PD-1 mAb 1 的重鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:71**、**SEQ ID NO:72** 和 **SEQ ID NO:73**；和

(2)所述 CDR_L1 結構域、CDR_L2 結構域和 CDR_L3 結構域是 PD-1 mAb 1 的輕鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:76**、**SEQ ID NO:77** 和 **SEQ ID NO:78**；

或

(B)(1)所述 CDR_H1 結構域、CDR_H2 結構域和 CDR_H3 結構域是 PD-1 mAb 2 的重鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:85**、**SEQ ID NO:86** 和 **SEQ ID NO:87**；和

(2)所述 CDR_L1 結構域、CDR_L2 結構域和 CDR_L3 結構域是 PD-1 mAb 2 的輕鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:90**、**SEQ ID NO:91** 和 **SEQ ID NO:92**；

或

(C)(1)所述 CDR_H1 結構域、CDR_H2 結構域和 CDR_H3 結構域是 PD-1 mAb 3 的重鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:99**、**SEQ ID NO:100** 和 **SEQ ID NO:101**；和

(2)所述 CDR_L1 結構域、CDR_L2 結構域和 CDR_L3 結構域是 PD-1 mAb 3 的輕鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:104**、**SEQ ID NO:105** 和 **SEQ ID NO:106**；

或

(D)(1)所述 CDR_H1 結構域、CDR_H2 結構域和 CDR_H3 結構域是 PD-1 mAb 4 的重鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:109**、**SEQ ID NO:110** 和 **SEQ ID NO:111**；和

(2)所述 CDR_L1 結構域、CDR_L2 結構域和 CDR_L3 結構域是 PD-1 mAb 4 的輕鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:114**、**SEQ ID NO:115** 和 **SEQ ID NO:116**；

或

(E)(1)所述 CDR_H1 結構域、CDR_H2 結構域和 CDR_H3 結構域是 PD-1 mAb 5 的重鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:119**、**SEQ ID NO:120** 和 **SEQ ID NO:121**；和

(2)所述 CDR_L1 結構域、CDR_L2 結構域和 CDR_L3 結構域是 PD-1 mAb 5 的輕鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:124**、**SEQ ID NO:125** 和 **SEQ ID NO:126**；

或

(F)(1)所述 CDR_H1 結構域、CDR_H2 結構域和 CDR_H3 結構域是 PD-1 mAb 6 的重鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:129**、**SEQ ID NO:130** 和 **SEQ ID NO:131**；和

(2)所述 CDR_L1 結構域、CDR_L2 結構域和 CDR_L3 結構域是 PD-1 mAb 6 的輕鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:134**、**SEQ ID NO:135** 和 **SEQ ID NO:136**；

或

(G)(1)所述 CDR_H1 結構域、CDR_H2 結構域和 CDR_H3 結構域是 PD-1 mAb 7 的重鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:139**、**SEQ ID NO:140** 和 **SEQ ID NO:141**；和

(2)所述 CDR_L1 結構域、CDR_L2 結構域和 CDR_L3 結構域是 PD-1 mAb 7 的輕鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:144**、**SEQ ID NO:145** 和 **SEQ ID NO:146**；

或

(H)(1)所述 CDR_H1 結構域、CDR_H2 結構域和 CDR_H3 結構域是 PD-1 mAb 8 的重鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:161**、**SEQ ID NO:162** 和 **SEQ ID NO:163**；和

(2)所述 CDR_L1 結構域、CDR_L2 結構域和 CDR_L3 結構域是 PD-1 mAb 8 的輕鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:166**、**SEQ ID NO:167** 和 **SEQ ID NO:168**；

或

(I)(1)所述 CDR_H1 結構域、CDR_H2 結構域和 CDR_H3 結構域是 PD-1 mAb 9 的重鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:171**、**SEQ ID NO:172** 和 **SEQ ID NO:173**；和

(2)所述 CDR_L1 結構域、CDR_L2 結構域和 CDR_L3 結構域是 PD-1 mAb 9 的輕鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:176**、**SEQ ID NO:177** 和 **SEQ ID NO:178**；

或

(J)(1)所述 CDR_H1 結構域、CDR_H2 結構域和 CDR_H3 結構域是 PD-1 mAb 10 的重鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:192**、**SEQ ID NO:193** 和 **SEQ ID NO:194**；和

(2)所述 CDR_L1 結構域、CDR_L2 結構域和 CDR_L3 結構域是 PD-1 mAb 10 的輕鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:197**、**SEQ ID NO:198** 和 **SEQ ID NO:199**；

或

(K)(1)所述 CDR_H1 結構域、CDR_H2 結構域和 CDR_H3 結構域是 PD-1 mAb 11 的重鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:202**、**SEQ ID NO:203** 和 **SEQ ID NO:204**；和

(2)所述 CDR_L1 結構域、CDR_L2 結構域和 CDR_L3 結構域是 PD-1 mAb 11 的輕鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:207**、**SEQ ID NO:208** 和 **SEQ ID NO:209**；

或

(L)(1)所述 CDR_H1 結構域、CDR_H2 結構域和 CDR_H3 結構域是 PD-1 mAb 12 的重鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:212**、**SEQ ID NO:213** 和 **SEQ ID NO:214**；和

(2)所述 CDR_L1 結構域、CDR_L2 結構域和 CDR_L3 結構域是 PD-1 mAb 12 的輕鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:217**、**SEQ ID NO:218** 和 **SEQ ID NO:219**

或

(M)(1)所述 CDR_H1 結構域、CDR_H2 結構域和 CDR_H3 結構域是 PD-1 mAb 13 的重鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:222**、**SEQ ID NO:223** 和 **SEQ ID NO:224**；和

(2)所述 CDR_L1 結構域、CDR_L2 結構域和 CDR_L3 結構域是 PD-1 mAb 13 的輕鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:227**、**SEQ ID NO:228** 和 **SEQ ID NO:229**；

或

(N)(1)所述 CDR_H1 結構域、CDR_H2 結構域和 CDR_H3 結構域是 PD-1 mAb 14 的重鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:232**、**SEQ ID NO:233** 和 **SEQ ID NO:234**；和

(2)所述 CDR_L1 結構域、CDR_L2 結構域和 CDR_L3 結構域是 PD-1 mAb 14 的輕鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:237**、**SEQ ID NO:238** 和 **SEQ ID NO:239**；

或

(O)(1)所述 CDR_H1 結構域、CDR_H2 結構域和 CDR_H3 結構域是 PD-1 mAb 15 的重鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:242**、**SEQ ID NO:243** 和 **SEQ ID NO:244**；和

(2)所述 CDR_L1 結構域、CDR_L2 結構域和 CDR_L3 結構域是 PD-1 mAb 15 的輕鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:247**、**SEQ ID NO:248** 和 **SEQ ID NO:249**；

或

(P)(1)所述 CDR_H1 結構域、CDR_H2 結構域和 CDR_H3 結構域是 hPD-1 mAb 7(1.2)的重鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:139**、**SEQ ID NO:140** 和 **SEQ ID NO:141**；和

(2)所述 CDR_L1 結構域、CDR_L2 結構域和 CDR_L3 結構域是 hPD-1 mAb 7(1.2)的輕鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:157**、**SEQ ID NO:145** 和 **SEQ ID NO:146**；

或

(Q)(1)所述 CDR_H1 結構域、CDR_H2 結構域和 CDR_H3 結構域是 hPD-1 mAb 7(1.3)的重鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:139**、**SEQ ID NO:140** 和 **SEQ ID NO:141**；和

(2)所述 CDR_L1 結構域、CDR_L2 結構域和 CDR_L3 結構域是 hPD-1 mAb 7(1.3)的輕鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:157**、**SEQ ID NO:158** 和 **SEQ ID NO:145**；

或

(R)(1)CDR_H1 結構域、CDR_H2 結構域和 CDR_H3 結構域是 hPD-1 mAb 9(2.2)的重鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:183**、**SEQ ID NO:172** 和 **SEQ ID NO:173**；和

(2)CDR_L1 結構域、CDR_L2 結構域和 CDR_L3 結構域是 hPD-1 mAb 9(2.2)的輕鏈 CDR，並且分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:188**、**SEQ ID NO:189** 和 **SEQ ID NO:178**。

【0018】 本發明進一步涉及所有這類抗人PD-1結合分子的實施方式，其中分子是抗體，尤其地，其中分子是嵌合抗體或人源化抗體。

【0019】 本發明進一步涉及這類抗人PD-1結合分子的實施方式，其中重鏈可變結構域具有**SEQ ID NO:79**、**SEQ ID NO:93**、**SEQ ID NO:147**、**SEQ ID NO:149**、**SEQ ID NO:179**、**SEQ ID NO:181**或SEQ **ID NO:250**的氨基酸序列。

【0020】 本發明進一步涉及這類抗人PD-1結合分子的實施方式，其中輕鏈可變結構域具有**SEQ ID NO:81**、**SEQ ID NO:95**、**SEQ ID NO:151**、**SEQ ID**

NO:153、**SEQ ID NO:155**、**SEQ ID NO:184**、**SEQ ID NO:186**或**SEQ ID NO:251**的氨基酸序列。

【0021】 本發明進一步涉及其中抗人PD-1結合分子是能夠同時結合人PD-1和第二表位的雙特異性結合分子的實施方式，尤其涉及其中第二表位是參與調節免疫檢查點的免疫細胞的表面上存在的分子的表位元的實施方式(尤其地，其中第二表位是下述的表位：B7-H3、B7-H4、BTLA、CD40、CD40L、CD47、CD70、CD80、CD86、CD94、CD137、CD137L、CD226、CTLA-4、半乳凝素-9、GITR、GITRL、HHLA2、ICOS、ICOSL、KIR、LAG-3、LIGHT、I類 或II類MHC、NKG2a、NKG2d、OX40、OX40L、PD1H、PD-1、PD-L1、PD-L2、PVR、SIRPa、TCR、TIGIT、TIM-3或VISTA，最尤其地，其中第二表位是下述的表位：CD137、CTLA-4、LAG-3、OX40、TIGIT或TIM-3)。

【0022】 本發明進一步涉及這樣的實施方式：其中抗人PD-1結合分子是包括LAG-3表位結合位點(結合LAG-3表位的位點)的雙特異性分子，尤其地，其中所述LAG-3表位結合位點包括：

(A)(1)LAG-3 mAb1 的可變重鏈的 CDR_H1 結構域、CDR_H2 結構域和 CDR_H3 結構域，其分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:42**、**SEQ ID NO:43** 和 **SEQ ID NO:44**；和

(2)LAG-3 mAb 1 的可變輕鏈的 CDR_L1 結構域、CDR_L2 結構域和 CDR_L3 結構域，其分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:46**、**SEQ ID NO:47** 和 **SEQ ID NO:48**；

或

(B)(1)hLAG-3 mAb 1 VH1 的可變重鏈的 CDR_H1 結構域、CDR_H2 結構域和 CDR_H3 結構域，其分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:42**、**SEQ ID NO:43** 和 **SEQ ID NO:44**；和

(2)hLAG-3 mAb 1 VL4 的可變輕鏈的 CDR_L1 結構域、CDR_L2 結構域和 CDR_L3 結構域，其分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:55**、**SEQ ID NO:47** 和 **SEQ ID NO:48**；

或

(C)(1)LAG-3 mAb 6 的可變重鏈的 CDR_H1 結構域、CDR_H2 結構域和 CDR_H3 結構域，其分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:57**、**SEQ ID NO:58** 和 **SEQ ID NO:59**；和

(2)LAG-3 mAb 6 的可變輕鏈的 CDR_L1 結構域、CDR_L2 結構域和 CDR_L3 結構域，其分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:61**、**SEQ ID NO:62** 和 **SEQ ID NO:63**；

或

(D)(1) hLAG-3 mAb 6 VH1 的可變重鏈的 CDR_H1 結構域、CDR_H2 結構域和 CDR_H3 結構域，其分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:57**、**SEQ ID NO:58** 和 **SEQ ID NO:59**；和

(2)LAG-3 mAb 6 的可變輕鏈的 CDR_L1 結構域、CDR_L2 結構域和 CDR_L3 結構域，其分別具有下述氨基酸序列：**SEQ ID NO:298**、**SEQ ID NO:62** 和 **SEQ ID NO:63**。

【0023】 本發明進一步涉及這類抗人PD-1結合分子的實施方式，其中分子是雙抗體，和尤其地，其中雙抗體是共價結合的複合物，其包括兩條或三條或四條或五條多肽鏈。本發明進一步涉及這類抗人PD-1結合分子的實施方式，其中分子是三價結合分子，和尤其地，其中三價結合分子是共價結合的複合物，其包括三條、四條、五條或多於五條多肽鏈。本發明另外涉及這類抗人PD-1結合分子的實施方式，其中分子包括Fc區域。本發明另外涉及這類抗人PD-1結合

分子的實施方式，其中分子包括白蛋白結合結構域，尤其地，去免疫化的白蛋白結合結構域。

【0024】 本發明進一步涉及所有這類抗人PD-1結合分子的實施方式，其中分子包括Fc區域，並且其中Fc區域是變異的Fc區域，其包括降低變異的Fc區域對FcγR的親和力和/或延長血清半衰期的一個或多個氨基酸修飾，和更具體地，其中修飾包括選自下述的至少一種氨基酸取代：

(1)L234A；L235A；

(2)L234A 和 L235A；

(3)M252Y；M252Y 和 S254T；

(4)M252Y 和 T256E；

(5)M252Y、S254T 和 T256E；或

(6)K288D 和 H435K；

其中編號是如 Kabat 中 EU 索引的編號。

【0025】 本發明進一步涉及其中任何上述PD-1結合分子被用於刺激T-細胞介導免疫應答的實施方式。本發明另外涉及其中任何上述PD-1結合分子被用於治療與受抑制的免疫系統相關的疾病或病況，尤其癌症或感染，的實施方式。

【0026】 本發明尤其涉及在癌症的治療或診斷或預後中的這類用途，其中癌症特徵在於存在選自由下述的細胞組成的組的癌症細胞：腎上腺腫瘤、AIDS相關的癌症、軟組織腺泡狀肉瘤、星形細胞瘤、膀胱癌、骨癌、腦和脊髓癌、轉移性腦瘤、乳腺癌、頸動脈體瘤、宮頸癌、軟骨肉瘤、脊索瘤、嫌色細胞腎細胞癌、透明細胞癌、結腸癌、結直腸癌、皮膚良性纖維組織細胞瘤、促結締組織增生小圓細胞瘤、室管膜細胞瘤、尤文氏瘤、骨外粘液樣軟骨肉瘤、不完

全性骨纖維生成、骨的纖維發育異常、膽囊癌或膽管癌、胃癌、妊娠滋養層疾病、生殖細胞瘤、頭頸癌、肝細胞癌、胰島細胞腫瘤、卡波西氏肉瘤、腎癌、白血病、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/惡性脂肪瘤、肝癌、淋巴瘤、肺癌、成神經管細胞瘤、黑素瘤、腦膜瘤、多發性內分泌瘤、多發性骨髓瘤、骨髓增生異常綜合征、成神經細胞瘤、神經內分泌腫瘤、卵巢癌、胰腺癌、甲狀腺乳頭狀癌、甲狀旁腺瘤、兒科癌症、周圍神經鞘瘤、嗜鉻細胞瘤、垂體腫瘤、前列腺癌、眼色素層後黑素瘤(posterious uveal melanoma)、罕見血液學疾病、腎轉移性癌症、橫紋肌樣瘤、橫紋肌肉瘤、肉瘤、皮膚癌、軟組織肉瘤、鱗狀細胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲狀腺轉移性癌症和子宮癌。

【0027】 本發明尤其涉及在癌症的治療或診斷或預後中的這類用途，其中癌症是結直腸癌、肝細胞癌、神經膠質瘤、腎癌、乳腺癌、多發性骨髓瘤、膀胱癌、成神經細胞瘤；肉瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、胰腺癌、直腸癌、急性髓細胞樣白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性B成淋巴細胞白血病(B-ALL)、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、毛細胞白血病(HCL)、急性漿細胞樣樹突細胞腫瘤(BPDCN)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)，包括套細胞白血病(MCL)，和小淋巴細胞淋巴瘤(SLL)、霍奇金淋巴瘤、系統性肥大細胞增多症或伯基特淋巴瘤。

【0028】 本發明進一步涉及其中任何上述PD-1結合分子被可檢測地標記和用於檢測PD-1的實施方式。

【圖式簡單說明】

【0029】 **[圖1]**提供了包括兩條多肽鏈的、具有兩個表位結合位點的代表性共價結合的雙抗體的示意圖，每條鏈各具有E-螺旋或K-螺旋異源二聚體促進

結構域(促進異源二聚體的結構域)。半胱氨酸殘基可存在於連接體和/或異源二聚體促進結構域中，如**圖3B**中所顯示。識別相同表位元的VL和VH結構域使用相同的陰影或填充圖案顯示。

【0030】 **[圖2]**提供了包括兩條多肽鏈的、具有兩個表位結合位點的代表性共價結合的雙抗體分子的示意圖，每條鏈各具有CH2和CH3結構域，以便締合的鏈形成所有或部分Fc區域。識別相同表位元的VL和VH結構域使用相同的陰影或填充圖案顯示。

【0031】 **[圖3A-3C]**提供了顯示包括兩對多肽鏈(即，總共四條多肽鏈)的、具有四個表位結合位點的代表性四價雙抗體的示意圖。每對的一條多肽各具有CH2和CH3結構域，以便締合的鏈形成所有或部分Fc區域。識別相同表位元的VL和VH結構域使用相同的陰影或填充圖案顯示。兩對多肽鏈可以相同。在其中VL和VH結構域識別不同的表位元的這樣的實施方式中(如**圖3A-3C**中顯示)，所得分子具有四個表位結合位點，並且就每個結合的表位而言是雙特異性的和二價的。在其中VL和VH結構域識別相同的表位元的這樣的實施方式中(例如，相同的VL結構域CDR和相同的VH結構域CDR用在兩條鏈上)，所得分子具有四個表位結合位點，並且就單個表位而言是單特異性的和四價的。可選地，兩對多肽可以不同。在其中每對多肽識的VL和VH結構域別不同的表位元的這類實施方式中(如**圖3A-3C**中顯示)，所得分子具有四個表位結合位點，並且就每個結合的表位而言是四特異性的和單價的。**圖3A**顯示了Fc雙抗體，其包含包括半胱氨酸殘基的肽異源二聚體促進結構域。**圖3B**顯示了包含Fc區域的雙抗體，其包含包括半胱氨酸殘基和連接體(具有任選的半胱氨酸殘基)的E-螺旋和K-螺旋異源二聚體促進結構域。**圖3C**顯示了包含Fc區域的雙抗體，其包含抗體CH1和CL結構域。

【0032】 [圖4A]和[圖4B]提供了包括三條多肽鏈的、具有兩個表位結合位點的代表性共價結合的雙抗體分子的示意圖。多肽鏈中的兩條各具有CH2和CH3結構域，以便締合的鏈形成所有或部分Fc區域。包括VL和VH結構域的多肽鏈進一步包括異源二聚體促進結構域。識別相同表位元的VL和VH結構域使用相同的陰影或填充圖案顯示。

【0033】 [圖5]提供了包括五條多肽鏈的、具有四個表位結合位點的代表性共價結合的雙抗體分子的示意圖。多肽鏈中的兩條各具有CH2和CH3結構域，以便締合的鏈形成包括所有或部分Fc區域的Fc區域。包括連接的VL和VH結構域的多肽鏈進一步包括異源二聚體促進結構域。識別相同表位元的VL和VH結構域使用相同的陰影或填充圖案顯示。

【0034】 [圖6A-6F]提供了包含Fc區域的代表性三價結合分子的示意圖，所述三價結合分子具有三個表位結合位點。圖6A和6B分別示意性闡釋了三價結合分子的結構域，所述三價結合分子包括具有不同結構域取向的兩個雙抗體型結合結構域和Fab型結合結構域，其中雙抗體型結合結構域在Fc區域的N-末端或C-末端。圖6A和6B中的分子包括四條鏈。圖6C和6D分別示意性闡釋了三價結合分子的結構域，所述三價結合分子包括在Fc區域的N-末端的兩個雙抗體型結合結構域，和其中輕鏈和重鏈經多肽間隔體連接的Fab型結合結構域，或scFv型結合結構域。圖6E和6F中的三價結合分子分別示意性闡釋了三價結合分子的結構域，所述三價結合分子包括在Fc區域的C-末端的兩個雙抗體型結合結構域，和連接的Fab型結合結構域，或scFv型結合結構域，其中雙抗體型結合結構域是。圖6C-6F中的三價結合分子包括三條鏈。識別相同表位元的VL和VH結構域使用相同的陰影或填充圖案顯示。

【0035】 [圖7A-7D]顯示，抗PD-1抗體PD-1 mAb 1-15結合人PD-1。與shPD-1-His結合的結合曲線顯示在圖7A(PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 4

和PD-1 mAb 9)，圖7B(PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6和PD-1 mAb 7)，和圖7C(PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 8、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1 mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14和PD-1 mAb 15)中。與shPD-1-人Fc結合的結合曲線顯示在圖7D(PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 8、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1 mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14，和PD-1 mAb 15)中。

【0036】 [圖8A-8C]顯示，抗PD-1抗體PD-1 mAb 1-15結合食蟹猴PD-1。與scynoPD-1-hFc結合的結合曲線顯示在圖8A(PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 4、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7)，圖8B(PD-1 mAb 9)，和圖8C(PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 8、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1 mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14和PD-1 mAb 15)中。

【0037】 [圖9A-9D]顯示了抗PD-1抗體PD-1 mAb 1-15阻斷人PD-L1與人PD-1結合的能力。抑制曲線顯示在圖9A(PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 15和PD-1 mAb A)，圖9B(PD-1 mAb 4)，圖9C(PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7和PD-1 mAb A)，和圖9D(PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 8、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1 mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14、PD-1 mAb 15和PD-1 mAb A)中。

【0038】 [圖10A-10B]顯示抗人PD-1抗體PD-1 mAb 7的組織特異性。圖10A顯示了正常結腸(圖i和vii)、肝(圖ii和viii)、肺(圖iii和ix)、胰腺(圖iv和x)、腎(圖v和xi)和心臟(圖vi和xii)組織的組織學染色。圖10A，圖i-vi顯示了用標記的PD-1 mAb 7 (0.313 μg/mL)孵育的組織的結果。圖10A，圖vii-xii顯示了用標記的同種型對照mAb (0.314 μg/mL)孵育的組織的結果。圖10B顯示了皮膚(圖i和iv)、扁桃體(圖ii和v)和表達PD-1的NSO細胞(圖iii和vi)的組織學染色。圖10B，圖i-iii顯示了用標記的PD-1 mAb 7 (0.313 μg/mL)孵育的組織的結果。

【0039】 [圖11]顯示了具有用於結合細胞表面PD-1的IgG1 (AA)或IgG4 (P)的人源化抗人PD-1抗體hPD-1 mAb 2、hPD-1 mAb 7(1.1)、hPD-1 mAb 7(1.2)、hPD-1 mAb 9(1.1)和參考抗PD-1抗體PD-1 mAb A和PD-1 mAb B的結合特徵。

【0040】 [圖12A-12B]顯示了具有IgG1 (AA)或IgG4 (P)的人源化抗PD抗體hPD-1 mAb 2、hPD-1 mAb 7(1.1)、hPD-1 mAb 7(1.2)、hPD-1 mAb 9(1.1)和參考抗PD-1抗體PD-1 mAb A和PD-1 mAb B阻斷可溶性人PD-L1 (圖12A)和可溶性人PD-L2 (圖12B)結合細胞表面人PD-1的能力。

【0041】 [圖13]顯示了具有IgG1 (AA)或IgG4 (P)的人源化抗PD抗體hPD-1 mAb 2、hPD-1 mAb 7(1.1)、hPD-1 mAb 7(1.2)、hPD-1 mAb 9(1.1)和參考抗PD-1抗體PD-1 mAb A和PD-1 mAb B在Jurkat-luc-NFAT/CHO-PD-L1螢光素酶報告試驗中，通過阻斷PD-1/PD-L1相互作用和防止下調T-細胞應答而對抗PD-1/PD-L1軸的能力。

【0042】 [圖14]顯示，PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 9和PD-1 mAb 15能夠刺激細胞因數產生，達到與參考抗PD-1抗體(PD-1 mAb A和PD-1 mAb B)相當或比其更高的水準，並且用PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 9和PD-1 mAb 15聯合LAG-3 mAb 1的治療提供了細胞因數釋放的最大增強。IFNγ分泌特徵來自用抗PD-1和抗LAG-3抗體單獨處理和聯合處理的葡萄球菌屬(Staphylococcal)腸毒素B (SEB)-刺激的PBMC。

【0043】 [圖15A-15B]顯示，具有IgG1 (AA)或IgG4 (P)的人源化抗PD抗體hPD-1 mAb 2、hPD-1 mAb 7(1.2)、hPD-1 mAb 9(1.1)和參考抗PD-1抗體PD-1 mAb A和PD-1 mAb B刺激細胞因數產生的能力。IFNγ (圖15A)和TNFα (圖15B)，來自用抗PD-1抗體處理的SEB-刺激的PBMC的分泌特徵。

【0044】 [圖16A-16B]顯示，PD-1 x LAG-3雙特異性雙抗體構建體DART A、DART D、DART E、DART F、DART G和DART H，能夠刺激細胞因數產生，

達到與施用抗PD-1 mAb +抗LAG-3 mAb (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A)的組合時觀察到的水準相當的或比其更高的水準，和PD-1 x LAG-3雙特異性雙抗體構建體DART A、DART D、DART E、DART F和DART G提供了細胞因數釋放的最大增強。將用通過PD-1 x LAG-3雙特異性雙抗體，或通過抗PD-1和抗LAG-3抗體單獨處理和聯合處理的低濃度的SEB (0.2 ng/mL)刺激的PBMC的IFNγ分泌特徵繪圖。使用來自兩個代表性供體的PBMC的結果顯示在圖16A和圖16B中。

【0045】 [圖17A-17B]顯示，PD-1 x LAG-3雙特異性雙抗體構建體DART A、DART B和DART C能夠刺激細胞因數產生，達到比施用抗PD-1 mAb +抗LAG-3 mAb (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A)的組合時觀察到的水準更高的水準。將用通過PD-1 x LAG-3雙特異性雙抗體，或通過抗PD-1和抗LAG-3抗體單獨處理和聯合處理的高濃度的SEB (85 ng/mL)刺激的、來自兩個代表性供體的PBMC的IFNγ分泌特徵繪圖。使用來自兩個代表性供體的PBMC的結果顯示在圖17A和圖17B中。

【0046】 [圖18A-18B]顯示，PD-1 x LAG-3雙特異性雙抗體構建體DART A、DART B和DART C能夠刺激細胞因數產生，達到比施用抗PD-1 mAb +抗LAG-3 mAb (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A)的組合時觀察到的水準更高的水準。將用通過PD-1 x LAG-3雙特異性雙抗體，或通過抗PD-1和抗LAG-3抗體單獨處理和聯合處理的中濃度的SEB (0.5 ng/mL)刺激的、來自兩個代表性供體的PBMC的IFNγ分泌特徵繪圖。使用來自兩個代表性供體的PBMC的結果顯示在圖18A和圖18B中。

【0047】 [圖19]顯示，PD-1 x LAG-3雙特異性雙抗體構建體DART D和DART H能夠刺激細胞因數產生，達到與施用抗PD-1 mAb +抗LAG-3 mAb (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A)的組合時所觀察到的水準相當的或比其更高的水準，並且DART D提供細胞因數釋放的最大增強。將用通過PD-1 x LAG-3雙特異性雙抗

體，或通過抗PD-1和抗LAG-3抗體單獨處理或聯合處理的高濃度的SEB (85 ng/mL)刺激的、來自代表性供體的PBMC的IL-2分泌特徵繪圖。

【0048】 [圖20]顯示，PD-1 x LAG-3雙特異性雙抗體構建體DART B和DART I能夠刺激細胞因數產生，達到比施用抗PD-1 mAb +抗LAG-3 mAb (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A、hPD-1 mAb 7(1.2) + hLAG-3 mAb 1(1.4)、hPD-1 mAb 7(1.2) + hLAG-3 mAb 6(1.1))的組合時觀察到的水準更高的水準。將用通過PD-1 x LAG-3雙特異性雙抗體，或通過抗PD-1和抗LAG-3抗體單獨處理或聯合處理的中等濃度的SEB (0.5 ng/mL)刺激的、來自代表性供體的PBMC的IFNγ分泌特徵繪圖。

【0049】 [圖21A-21D]顯示，PD-1 x LAG-3雙特異性雙抗體DART I能夠刺激細胞因數產生，達到比施用抗PD-1 mAb +抗LAG-3 mAb (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A)的組合時所觀察到的水準更高的水準。將用通過PD-1 x LAG-3雙特異性雙抗體DART-I、抗PD-1和抗LAG-3抗體聯合處理，或通過同種型對照處理的破傷風毒素(5 μg/mL)刺激的、來自兩個代表性供體的CD4記憶細胞的IFNγ (圖21A和21C)和IL-2 (圖21B和21D)分泌特徵繪圖。在第7天，使用來自兩個代表性供體的CD4記憶T細胞的結果顯示在圖21A-B和圖21C-D中。

【0050】 [圖22]顯示食蟹猴中PD-1 x LAG-3雙特異性分子DART I的藥物動力學與抗PD-1抗體PD-1 mAb A IgG4 (P)的藥物動力學相當。線指示DART I (實線)和PD-1 mAb A (虛線)的平均血清濃度。將雄性(實心)和雌性(空心)猴子針對DART I (三角形)和PD-1 mAb A (圓形)的單個值繪圖。

【0051】 [圖23A-23C]顯示，在用不同的抗PD-1抗體處理之後，隨著時間的推移，動物中的血清抗體濃度和CD4+或CD8+ T細胞的表面上結合的PD-1的百分數。將抗PD 1 mAb治療之後CD4+或CD8+ T細胞的表面上結合的PD 1的百分數繪製在右側y軸上；符號表示每個動物個體的T細胞上結合的PD 1的%並且虛

線表示平均值。血清mAb濃度繪製在左側y軸上；符號表示每個動物個體的血清水準並且實線表示資料的非線性擬合。每個圖表示在第1天通過IV輸注而施用10 mg/kg hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) (圖23A)、PD-1 mAb A IgG4 (P) (圖23B)或PD-1 mAb B IgG4 (P) (圖23B)的動物(n = 1/性別/組)的數據。

【實施方式】

【0052】 本發明涉及PD-1結合分子，其包括如下選擇的能夠結合食蟹猴PD-1和人PD-1的抗PD-1抗體的PD-1結合結構域：PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 4、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 8、PD-1 mAb 9、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1 mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14或PD-1 mAb 15。本發明尤其涉及PD-1結合分子，其是這類抗體的人源化形式或嵌合形式，或，其包括這類抗PD-1抗體的PD-1結合片段(尤其地，免疫綴合物、雙抗體(包括但不限於DART-A、DART-B、DART-C、DART-D、DART-E、DART-F、DART-G、DART-H、DART-I和DART-J)、BiTE、雙特異性抗體等)。本發明尤其涉及這類PD-1結合分子，其另外能夠結合免疫細胞的表面上存在的參與調節免疫檢查點的分子的表位。本發明也涉及使用這類PD-1結合分子檢測PD-1或刺激免疫應答的方法。本發明也涉及聯合療法的方法，其中包括這類選擇的抗PD-1抗體的一個或多個PD-1結合結構域的PD-1結合分子聯合有效刺激免疫應答的一種或多種另外的分子和/或聯合特異性結合癌症抗原的一種或多種另外的分子施用。

I. 抗體和它們的結合結構域

【0053】 本發明的抗體是免疫球蛋白分子，其能夠通過位於免疫球蛋白分子的可變結構域中的至少一個抗原識別位點而特異性結合至靶，比如碳水化合

物、多核苷酸、脂質、多肽等。如本文所使用，術語“**抗體**”指單克隆抗體、多特異性抗體、人抗體、人源化抗體、合成抗體、嵌合抗體、多克隆抗體、駱駝源化(camelized)抗體、單鏈Fvs (scFv)、單鏈抗體、Fab片段、F(ab')片段、二硫化物連接的雙特異性Fvs (sdFv)、胞內抗體和任何上述的表位結合片段。尤其地，抗體包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性片段，即，包含抗原結合位點的分子。免疫球蛋白分子可以是任何類型(例如，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)，類別(例如，IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1和IgA_2)或亞類。除了它們在診斷中已知的用途，已經證明抗體可用作治療劑。抗體能夠免疫特異性結合多肽或蛋白質或非蛋白質分子，因為在這樣的分子上存在特定的結構域或部分或構象(“**表位**”)。包含表位的分子可具有免疫原性活性，以便其在動物中引起抗體產生反應；這類分子稱為“**抗原**”)。最近數十年已經看到對抗體的治療潛能的興趣的復興，並且抗體已經成為一種主要類型的生物技術衍生的藥物(Chan, C.E.等(2009) “*The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases*,” Singapore Med. J. 50(7):663-666)。超過200種基於抗體的藥物已經被批准使用或正在開發。

【0054】 術語“**單克隆抗體**”指同質型(homogeneous)抗體群體，其中單克隆抗體包括參與抗原的選擇性結合的氨基酸(天然產生的和非天然產生的)。單克隆抗體是高度特異性的，直接針對單個表位(或抗原位點)。術語“單克隆抗體”不僅僅包括完整的單克隆抗體和全長單克隆抗體，而且也包括其片段(比如Fab、Fab'、$F(ab')_2$ Fv)、單鏈(scFv)、其突變體、包括抗體部分的融合蛋白、人源化的單克隆抗體、嵌合單克隆抗體和包括具有結合抗原的必要的特異性和能力的抗原識別位點的免疫球蛋白分子的任何其他修飾構造(configuration)。就抗體的來源或製備其的方式(例如，通過雜交瘤、噬菌體選擇、重組表達、轉基因動物等)而言，不旨在是限制性的。術語包括完整的免疫球蛋白以及上面根據“抗體”的定

義描述的片段等。製備單克隆抗體的方法是本領域已知的。可採用的一種方法是Kohler, G.等(1975) "*Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity*," Nature 256:495-497的方法或其改良。典型地，單克隆抗體在小鼠、大鼠或兔子中開發。通過用免疫原性量的細胞、細胞提取物或包含期望的表位的蛋白質製品免疫動物而產生抗體。免疫原可以是但不限於原代細胞、培養細胞系、癌細胞、蛋白質、肽、核酸或組織。用於免疫的細胞可被培養一段時間(例如，至少24小時)，然後將它們用作免疫原。細胞它們本身或聯合非變性佐劑，比如Ribi，可用作免疫原(見，例如，Jennings, V.M. (1995) "*Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production*," ILAR J. 37(3):119-125)。一般而言，在用作免疫原時，細胞應保持完整並且優選地有活性。相比於破裂的細胞，完整的細胞可允許抗原被免疫的動物更好地檢測。變性或烈性佐劑，例如，弗氏佐劑的使用，可使細胞破裂，因此，其應用受阻。免疫原可以週期性間隔被多次施用，諸如兩週一次或一週一次，或者可以以維持在動物(例如，在組織重組體中)中的生存力這樣的方式被施用。可選地，對於期望的致病表位是免疫特異性的現有單克隆抗體和任意其他等價抗體可被測序，並通過本領域中已知的任意手段重組產生。在一個實施方式中，對這樣的抗體測序，然後將多核苷酸序列克隆至載體用於表達或增殖。編碼感興趣的抗體的序列可在宿主細胞中保持在載體中，並且，可然後擴展和冷凍宿主細胞，用於將來的使用。這樣的抗體的多核苷酸序列可用于基因操作，以產生本發明的單特異性或多特異性(例如，雙特異性、三特異性和四特異性)分子以及親和力優化的嵌合抗體、人源化抗體和/或犬源化(caninized)抗體，以改善抗體的親和力或其他特徵。人源化抗體的一般原理涉及保留抗體的抗原結合的部分的基本序列，同時用人抗體序列交換抗體的非人剩餘部分。

【0055】 天然抗體(比如IgG抗體)包括與兩條重鏈複合的兩條輕鏈。每條輕鏈包含可變結構域(**VL**)和恒定結構域(**CL**)。每條重鏈包含可變結構域(**VH**)，三個恒定結構域(**CH1**、**CH2**和**CH3**)，和位於CH1和CH2結構域之間的"**鉸鏈**"結構域("**H**")。天然產生的免疫球蛋白(例如，IgG)的基本結構單元因此是具有兩條輕鏈和兩條重鏈的四聚體，通常作為約150,000 Da的糖蛋白被表達。每條鏈的氨基端("N-末端")部分包括主要負責抗原識別的約100至110或更多氨基酸的可變結構域。每條鏈的羧基端("C-末端")部分限定了恒定區，其中輕鏈具有單個恒定結構域而重鏈通常具有三個恒定結構域和鉸鏈結構域。因此，IgG分子的輕鏈的結構是n-VL-CL-c並且IgG重鏈的結構是n-VH-CH1-H-CH2-CH3-c (其中H是鉸鏈結構域，n和c分別表示多肽的N-末端和C-末端)。IgG分子的可變結構域由互補決定區(CDR)和稱為框架區段(FR)的非CDR區段組成，所述互補決定區(CDR)包含與表位接觸的殘基，所述框架區段一般維持結構和決定CDR環的定位，以便允許這類接觸(儘管某些框架殘基也可接觸抗原)。因此，VL和VH結構域具有結構n-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-c。是(或可用作)抗體輕鏈的第一、第二和第三CDR的多肽在本文分別命名為**CDR_L1結構域、CDR_L2結構域和CDR_L3結構域**。類似地，是(或可用作)抗體重鏈的第一、第二和第三CDR的多肽在本文分別命名為**CDR_H1結構域、CDR_H2結構域和CDR_H3結構域**。因此，術語CDR_L1結構域、CDR_L2結構域、CDR_L3結構域、CDR_H1結構域、CDR_H2結構域和CDR_H3結構域指當併入到蛋白質中時使得該蛋白質能夠結合特異性表位的多肽，無論這樣的蛋白質是否是具有輕鏈和重鏈的抗體或雙抗體或單鏈結合分子(例如，scFv、BiTe等)或是另一類型的蛋白質。因此，如本文所使用，術語"**表位結合片段**"意思是能夠免疫特異性結合表位的抗體的片段，並且術語"**表位結合位點**"指包含表位結合片段的分子的、負責表位元結合的部分。表位結合位點可包含這類抗體的1、2、3、4、5或所有6個CDR結構域，並且儘管能夠免疫特異

性結合這類表位，但可展示對與這樣的抗體的表位不同的這樣的表位的特異性、親和力或選擇性。但是，優選地，表位結合片段將包含這類抗體的所有6個CDR結構域。抗體的表位結合片段可以是單個多肽鏈(例如，scFv)，或可包括兩條或更多條多肽鏈，每條鏈均具有氨基末端和羧基末端(例如，雙抗體、Fab片段、$F(ab')_2$片段等)。

【0056】 本發明尤其包括本發明的抗PD-1抗體的單鏈可變結構域片段(“**scFv**”)和包括其的多特異性結合分子。通過使用短的連接肽連接輕鏈和/或重鏈可變結構域而製備單鏈可變結構域片段。Bird等(1988) (“*Single-Chain Antigen-Binding Proteins*,” Science 242:423-426)描述了連接肽的例子，其在一個可變結構域的羧基端和另一可變結構域的氨基端之間橫橋接約3.5 nm。已經設計和使用了其他序列的連接體(Bird等(1988) “*Single-Chain Antigen-Binding Proteins*,” Science 242:423-426)。連接體可進而被修飾，用於另外的功能，比如藥物的附著或附著至固體載體。可經重組或合成產生單鏈變體。為了合成產生scFv，可使用自動合成儀。為了重組產生scFv，可將包含編碼scFv的多核苷酸的適當的質粒引入到適當的宿主細胞中，所述宿主細胞是真核細胞，比如酵母細胞、植物細胞、昆蟲細胞或哺乳動物細胞，或原核細胞，比如大腸埃希氏菌(E. coli)。可通過常規操作比如多核苷酸的連接製備編碼感興趣的scFv的多核苷酸。可使用本領域已知的標準蛋白質純化技術分離所得scFv。

【0057】 本發明還尤其包括本發明的抗PD-1抗體的人源化的變體和包括其的多特異性結合分子。術語“**人源化**”抗體指一般使用重組技術製備的嵌合分子，其具有來自非人物種的免疫球蛋白的抗原結合位點和基於人免疫球蛋白的結構和/或序列的分子的剩餘免疫球蛋白結構。本發明的抗人PD-1抗體包括抗體PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 4、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 8、PD-1 mAb 9、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1

mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14或PD-1 mAb 15的人源化變體、嵌合變體或犬源化變體。這類抗體的可變結構域的多核苷酸序列可用於遺傳操作，以產生這類衍生物和改善這類抗體的親和力或其他特徵。人源化抗體的一般原則涉及保留抗體的抗原結合部分的基本序列，同時用人抗體序列交換抗體的非人剩餘部分。人源化單克隆抗體有四個基本步驟。這些是：(1)確定開始抗體輕鏈和重鏈可變結構域的核苷酸和預測的氨基酸序列(2)設計人源化抗體或犬源化抗體，即，決定在人源化或犬源化過程中使用哪種抗體框架區域(3)實際人源化或犬源化方法/技術和(4)轉染和表達人源化抗體。見，例如，美國專利號4,816,567、5,807,715、5,866,692和6,331,415。

【0058】 抗原結合位點可包括與恒定結構域融合的完整的可變結構域或僅僅包括移植至適當框架區的這類可變結構域的互補決定區(CDR)。抗原結合位點可以是野生型或通過一個或多個氨基酸取代被修飾。這消除了人個體中作為免疫原的恒定區，但是仍保留對外源可變結構域的免疫應答的可能性(LoBuglio, A.F.等(1989) "*Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224)。另一種方法不僅僅關注提供源自人的恒定區，而且也修飾可變結構域，以便重塑它們使其盡可能地與人形式接近。已知重鏈和輕鏈的可變結構域都包含三個互補決定區(CDR)，側翼是四個框架區(FR)，所述互補決定區(CDR)對所討論的抗原回應不同並且決定結合能力，所述框架區(FR)在給定物種中相對保守並且推定其為CDR提供支架。當針對特定抗原製備非人抗體時，通過將源自非人抗體的CDR移植在待修飾的人抗體中存在的FR上可"重塑"或"人源化"可變結構域。已經報導了該方法應用於各種抗體：Sato, K.等(1993) Cancer Res 53:851-856. Riechmann, L.等(1988) "*Reshaping Human Antibodies for Therapy*," Nature 332:323-327；Verhoeyen, M.等(1988) "*Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme*

Activity," Science 239:1534-1536；Kettleborough, C. A.等(1991) "*Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation*," Protein Engineering 4:773-3783；Maeda, H.等(1991) "*Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity*," Human Antibodies Hybridoma 2:124-134；Gorman, S. D.等(1991) "*Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:4181-4185；Tempest, P.R.等(1991) "*Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo*," Bio/Technology 9:266-271；Co, M. S.等(1991) "*Humanized Antibodies For Antiviral Therapy*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:2869-2873；Carter, P.等(1992) "*Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289；和Co, M.S.等(1992) "*Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen*," J. Immunol. 148:1149-1154。在一些實施方式中，人源化抗體保留所有的CDR序列(例如，人源化鼠抗體，其包含來自小鼠抗體的所有六個CDR)。在其他實施方式中，人源化抗體具有一個或多個CDR (一個、兩個、三個、四個、五個或六個)，其序列相對於初始抗體不同。

【0059】 已經描述了包括源自非人免疫球蛋白的抗原結合位點的許多"人源化"抗體分子，包括具有齧齒動物或修飾的齧齒動物可變結構域和它們與人恒定結構域融合的相關的互補決定區(CDR)的嵌合抗體(見，例如，Winter等(1991) "*Man-made Antibodies*," Nature 349:293-299；Lobuglio等(1989) "*Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224 (1989), Shaw等(1987) "*Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody (17-1A) To A Colon Cancer Tumor-Associated Antigen*," J. Immunol. 138:4534-4538, and Brown等(1987)

"*Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/Human Chimeric Monoclonal Antibody*," Cancer Res. 47:3577-3583)。其他參考文獻描述了移植至人支撐框架區(FR)的齧齒動物CDR，其然後與適當的人抗體恒定結構域融合(見，例如，Riechmann, L.等(1988) "*Reshaping Human Antibodies for Therapy*," Nature 332:323-327；Verhoeyen, M.等(1988) "*Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity*," Science 239:1534-1536；和Jones等(1986) "*Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse*," Nature 321:522-525)。另外的參考文獻描述了由重組修飾的齧齒動物框架區支撐的齧齒動物CDR。見，例如，歐洲專利公開號519,596。這些"人源化的"分子被設計，以使對齧齒動物抗人抗體分子的不利免疫應答最小化，所述不利免疫應答限制了這些部分在人接受者中治療應用的持續時間和效力。也可使用的人源化抗體的其他方法，其公開在以下文獻中：Daugherty等(1991) "*Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins*," Nucl. Acids Res. 19:2471-2476和美國專利號6,180,377、6,054,297、5,997,867和5,866,692。

II. Fcγ 受體(FcγR)

【0060】 兩條重鏈的CH2和CH3結構域相互作用，以形成Fc區域，其是被細胞Fc受體，包括但不限於Fc γ受體(FcγR)，識別的結構域。如本文所使用，術語"Fc區域"用於限定IgG重鏈的C-末端區域。示例性人IgG1的CH2-CH3結構域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:1)：

```
231      240       250         260         270         280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
```

```
        290         300         310         320         330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
       340         350         360         370         380
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
       390         400         410         420         430
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
        440    447
ALHNHYTQKS LSLSPGX
```

如在 Kabat 闡釋的 EU 索引編號，其中，**X** 是賴氨酸(K)或不存在。

【0061】 示例性人IgG2的CH2-CH3結構域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:2)：

```
231    240         250         260         270         280
APPVA-GPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD
       290         300         310         320         330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA
       340         350         360         370         380
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE
       390         400         410         420         430
WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
       440    447
ALHNHYTQKS LSLSPGX
```

如在 Kabat 闡釋的 EU 索引編號，其中，**X** 是賴氨酸(K)或不存在。

【0062】 示例性人IgG3的CH2-CH3結構域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:3)：

```
231     240         250         260         270         280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD
        290         300         310         320         330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
        340         350         360         370       380
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
        390         400         410         420         430
WESSGQPENN YNTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NIFSCSVMHE
        440     447
ALHNRFTQKS LSLSPGX
```

如在 Kabat 闡釋的 EU 索引編號，其中，**X** 是賴氨酸(K)或不存在。

【0063】 示例性人IgG4的CH2-CH3結構域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:4)：

```
231     240         250         260         270         280
APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
        290         300         310         320         330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
        340         350         360         370       380
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
        390         400         410         420         430
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE
        440     447
ALHNHYTQKS LSLSLGX
```

如在Kabat闡釋的EU索引編號，其中，**X**是賴氨酸(K)或不存在。

【0064】 遍及本說明書，IgG重鏈的恒定區中殘基的編號是如在Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991) (“Kabat”)中的EU索引的編號，其通過參考明確併入本文。術語“如在Kabat的EU索引”指人IgG1 EU抗體的編號。通過鏈中氨基酸的位置命名來自免疫球蛋白的成熟重鏈和輕鏈的可變結構域的氨基酸。Kabat描述了抗體的許多氨基酸序列，鑒定了每個亞組的氨基酸共有序列，並且為每個氨基酸賦予殘基編號，並且，如Kabat定義的來鑒定CDR(應當理解，如Chothia, C. & Lesk, A. M. ((1987) “Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins,”. J. Mol. Biol. 196:901-917)限定的CDR_H1在之前的五個殘基開始)。通過參考保守的氨基酸比對所討論的抗體與Kabat中的共有序列中的一條，Kabat的編號方案可擴展至未包括在其綱要中的抗體。用於賦予殘基編號的該方法已經成為本領域的標準並且容易鑒定在不同抗體，包括嵌合或人源化的變體中等同位置處的氨基酸。例如，在人抗體輕鏈50位的氨基酸佔據與在小鼠抗體輕鏈的50位氨基酸的等同位置。

【0065】 在抗體恒定區中的許多不同位置(例如，CH1位置，包括但不限於192、193和214位；Fc位置，包括但不限於270、272、312、315、356和358位，如在Kabat闡釋的EU索引編號)處已經觀察到了多態性，因此示出的序列和現有技術的序列之間可能存在輕微的差別。已經充分表徵了人免疫球蛋白的多態性形式。目前，已知18個Gm同種異型：G1m (1、2、3、17)或G1m (a、x、f、z)、G2m (23)或G2m (n)、G3m (5、6、10、11、13、14、15、16、21、24、26、27、28)或G3m (b1、c3、b3、b0、b3、b4、s、t、g1、c5、u、v、g5) (Lefranc, 等, “The Human IgG Subclasses: Molecular Analysis Of Structure, Function And Regulation.”Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990)；Lefranc, G. 等1979，Hum. Genet.: 50, 199-211)。具體考慮本發明的抗體可併入任何免疫球蛋白基因的任何同種異

型(allotype)、異同種異型(isoallotype)或單倍型(haplotype)，並且不限於本文提供的序列的同種異型、異同種異型或單倍型。此外，在一些表達體系中，CH3結構域的C-末端氨基酸殘基(上面粗體顯示的)可在翻譯後去除。因此，CH3結構域的C-末端殘基是本發明的PD-1結合分子中的任選的氨基酸殘基。本發明具體考慮缺少CH3結構域的C-末端殘基的PD-1結合分子。本發明也具體考慮包括CH3結構域的C-末端賴氨酸殘基的這類構建體。

【0066】 通過將Fc區連接至細胞Fcγ受體(FcγR)轉換啟動信號和抑制信號。導致正好相反的功能的這類連接的能力是由於不同FcγR之間的結構差異造成的。受體的胞質信號傳導結構域中的兩個不同的結構域——稱為基於免疫受體酪氨酸的啟動基序(ITAMs)和基於免疫受體酪氨酸的抑制基序(ITIMS)——是造成不同應答的原因。募集不同胞質酶到這些結構中控制了FcγR-介導的細胞應答的結果。含有ITAM的FcγR複合物包括FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIIA，然而，含ITIM的複合物僅包括FcγRIIB。人嗜中性粒細胞表達FcγRIIA基因。通過免疫複合物或特異性抗體交聯的FcγRIIA聚類用於使ITAM與促進ITAM磷酸化的受體相關的激酶聚集。ITAM磷酸化充當Syk激酶的停泊位點，Syk激酶的啟動導致下游底物(例如，PI3K)的啟動。細胞啟動導致促炎性介質的釋放。FcγRIIB基因在B淋巴細胞上表達；其細胞外結構域與FcγRIIA是96%一致的，並且以不能區分的方式結合IgG複合物。ITIM在FcγRIIB的胞質結構域中的存在限定了FcγR的這種抑制性亞類。最近，確定了這種抑制的分子基礎。當與啟動FcγR共連接時，FcγRIIB中的ITIM變成磷酸化的，並且吸引肌醇聚磷酸鹽5'-磷酸酶(SHIP)的SH2結構域，肌醇聚磷酸鹽5'-磷酸酶(SHIP)水解由於含ITAM的FcγR介導的酪氨酸激酶啟動而釋放的磷酸肌醇信使，從而防止細胞內Ca++的流入。因此，FcγRIIB的交聯抑制對FcγR連接的啟動應答並抑制細胞應答。B-細胞啟動、B-細胞增殖和抗體分泌因此被中止。

III. 雙特異性抗體/多特異性雙抗體和DART®雙抗體

【0067】 抗體結合抗原的表位的能力取決於抗體的VL和VH結構域的存在和氨基酸序列。抗體輕鏈和抗體重鏈的相互作用，尤其地，其VL和VH結構域的相互作用，形成天然抗體的兩個表位結合位點之一。天然抗體能夠結合僅僅一個表位種類(即，它們是單特異性的)，但是它們可結合該種類的多個拷貝(即，展示雙價或多價)。

【0068】 本發明的結合結構域以“免疫特異性”方式結合表位元。如本文所使用，如果抗體、雙抗體或其他表位結合分子，相對于可選的表位，與另一分子的區域(即，表位元)更經常、更快速、以更長的持久性和/或以更大的親和力反應或締合，則認為抗體、雙抗體或其他表位結合分子“免疫特異性”結合該表位。例如，免疫特異性結合病毒表位元的抗體是，相比其免疫特異性結合其他病毒表位元或非病毒表位元，以更大的親和力、親合力、更容易和/或以更大的持久性結合該病毒表位元的抗體。通過閱讀該定義，應理解，例如，免疫特異性結合第一靶的抗體(或部分或表位元)可特異性或非特異性或優選或非優選結合第二靶。因此，“免疫特異性結合”不必要求(儘管其可包括)排他性結合。一般而言，但不是必要的，提及結合意思是“特異性”結合。如果兩個分子的結合展示受體結合它們各自配體的特異性，則認為兩個分子能夠彼此以“物理特異性”方式結合。

【0069】 可通過產生可同時結合兩個分開的和獨特的抗原(或相同抗原的不同表位)的基於多特異性抗體的分子，和/或通過產生對於相同的表位和/或抗原具有更高價(即，大於兩個結合位點)的基於抗體的分子，增強抗體的功能。

【0070】 為了提供比天然抗體具有更大能力的分子，已經開發了各種重組雙特異性抗體形式(見，例如，PCT公佈號WO 2008/003116、WO 2009/132876、WO 2008/003103、WO 2007/146968、WO 2009/018386、WO 2012/009544、WO

2013/070565)，其大部分使用連接肽，所述連接肽與其他表位結合片段(例如，scFv、VL、VH等)融合或在抗體核心中(IgA、IgD、IgE、IgG或IgM)或與多個表位結合片段(例如，兩個Fab片段或scFvs)融合。可選的形式使用連接肽，以將表位結合片段(例如，scFv、VL、VH等)與二聚化結構域，比如CH2-CH3結構域，或可選的多肽融合(WO 2005/070966、WO 2006/107786A WO 2006/107617A、WO 2007/046893)。典型地，這些方法涉及折中和權衡。例如，PCT公開號WO 2013/174873、WO 2011/133886和WO 2010/136172公開了使用連接體可造成治療情形中的問題，並且教導了三特異性抗體，其中CL和CH1結構域由其各自的天然位置被轉變，並且VL和VH結構域已經被多樣化(WO 2008/027236、WO 2010/108127)，以允許它們結合大於一種抗原。因此，在這些文檔中公開的分子用結合特異性換取了結合另外抗原種類的能力。PCT公開號WO 2013/163427和WO 2013/119903公開了修飾CH2結構域，以包含包括結合結構域的融合蛋白加合物。文檔指出，CH2結構域在介導效應子功能過程中可能僅僅起到最小的作用。PCT公開號WO 2010/028797、WO2010028796和WO 2010/028795公開了重組抗體，其Fc區已經用另外的VL和VH結構域替換，以便形成三價結合分子。PCT公開號WO 2003/025018和WO2003012069公開了重組雙抗體，其單個鏈包含scFv結構域。PCT公開號WO 2013/006544公開了多價Fab分子，其作為單多肽鏈被合成，然後經歷蛋白酶解，以產生異源二聚化結構。因此，這些文檔中公開的分子用所有或一些介導效應子功能的能力換取結合另外抗原種類的能力。PCT公開號WO 2014/022540、WO 2013/003652、WO 2012/162583、WO 2012/156430、WO 2011/086091、WO 2008/024188、WO 2007/024715、WO 2007/075270、WO 1998/002463、WO 1992/022583和WO 1991/003493公開了添加另外的結合結構域或功能集團至抗體或抗體部分(例如，添加雙抗體至抗體的輕鏈或添加另外的VL和VH結構域至抗體的輕鏈和重鏈或添加異源融合蛋白或彼此連結多個Fab結構

域)。因此，這些文檔中公開的分子用天然抗體結構換取結合另外的抗原種類的能力。

【0071】 現有技術已經另外注意到產生在能夠結合兩個或多個不同表位種類(即，除了雙價或多價之外顯示雙特異性或多特異性)方面不同于這樣的天然抗體的雙抗體的能力(見，例如，Holliger等(1993) "'Diabodies': Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448、US 2004/0058400 (Hollinger等)；US 2004/0220388/WO 02/02781 (Mertens等)；Alt等(1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94；Lu, D.等(2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672；WO 02/02781 (Mertens等)；Olafsen, T.等(2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications," Protein Eng. Des. Sel. 17(1):21-27；Wu, A.等(2001) "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange," Protein Engineering 14(2):1025-1033；Asano等(2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain," Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992；Takemura, S.等(2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," Protein Eng. 13(8):583-588；Baeuerle, P.A.等(2009) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy," Cancer Res. 69(12):4941-4944)。

【0072】 雙抗體的設計是基於被稱為單鏈可變結構域片段(scFv)的抗體衍生物。這樣的分子通過利用短連接肽連接輕鏈和/或重鏈可變結構域而製備。B Bird等(1988) ("Single-Chain Antigen-Binding Proteins," Science 242:423-426)描述

了連接肽的例子，其在一個可變區的羧基末端和另一可變區的氨基末端之間橋接約3.5 nm。已經設計和使用了其他序列的連接體(Bird等(1988) “Single-Chain Antigen-Binding Proteins,” Science 242:423-426)。連接體進而可被修飾用於另外的功能，比如藥物的附著或附著至固體載體。可重組或合成產生單鏈變體。為了合成產生scFv，可使用自動合成儀。為了重組體產生scFv，可將包含編碼scFv的多核苷酸的合適質粒引入適當的宿主細胞中，所述宿主細胞可以是真核細胞，比如酵母細胞、植物細胞、昆蟲細胞或哺乳動物細胞，或原核細胞，比如大腸埃希氏菌。可通過常規操作比如多核苷酸的連接製備編碼感興趣的scFv的多核苷酸。可使用本領域已知的標準蛋白質純化技術分離所得scFv。

【0073】 非單特異性雙抗體的供應提供了相對於抗體的明顯優勢，包括但不限於共連接和共定位表達不同表位的細胞的能力。因此，雙特異性雙抗體具有寬範圍的應用，包括治療和免疫診斷。在各種應用中，雙特異性在設計和工程化雙抗體方面允許大的靈活性，提供對多聚抗原的增強的親合力、不同抗原的交聯和對特定細胞類型的導向靶向，這取決於兩個靶抗原的存在。由於其增加的價、低離解速率和從迴圈中快速清除(對於小尺寸的雙抗體，為~50 kDa或以下)，本領域中已知的雙抗體分子在腫瘤成像領域還顯示特別的用途(Fitzgerald等(1997) “Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In Pichia pastoris,” Protein Eng. 10:1221)。

【0074】 雙抗體的雙特異性使得它們用於共連接不同的細胞，例如，將細胞毒性T細胞與腫瘤細胞交聯(Staerz等(1985) “Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells,” Nature 314:628-631；和Holliger等(1996) “Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody,” Protein Eng. 9:299-305；Marvin等(2005) “Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies,” Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658)。可選地，或另外，雙特異性雙抗體

可用於共連接不同細胞或單個細胞表面上的受體。不同細胞和/或受體的共連接可用於調節效應子功能和/或免疫細胞信號傳導。包括表位結合位點的多特異性分子(例如，雙特異性雙抗體)可被引導至在T淋巴細胞、天然殺傷細胞(NK)細胞、抗原呈遞細胞或其他單核細胞上表達的任何免疫細胞的表面決定簇，所述免疫細胞比如B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、BTLA (CD272)、CD3、CD8、CD16、CD27、CD32、CD40、CD40L、CD47、CD64、CD70 (CD27L)、CD80 (B7-1)、CD86 (B7-2)、CD94 (KLRD1)、CD137 (4-1BB)、CD137L (4-1BBL)、CD226、CTLA-4 (CD152)、半乳凝素-9、GITR、GITRL、HHLA2、ICOS (CD278)、ICOSL (CD275)、Killer啟動受體(KIR)、LAG-3 (CD223)、LIGHT (TNFSF14、CD258)、I類或II類MHC、NKG2a、NKG2d、OX40 (CD134)、OX40L (CD134L)、PD1H、PD-1 (CD279)、PD-L1 (B7-H1、CD274)、PD-L2 (B7-CD、CD273)、PVR (NECL5、CD155)、SIRPa、TCR、TIGIT、TIM-3 (HAVCR2)和/或VISTA (PD-1H)。尤其地，被引導至參與調節免疫檢查點的細胞表面受體(或其配體)的表位結合位點可用於產生雙特異性或多特異性結合分子，所述雙特異性或多特異性結合分子對抗或阻斷免疫檢查點分子的抑制性信號傳導，從而刺激、上調或增強受試者中的免疫應答。參與調節免疫檢查點的分子包括但不限於B7-H3、B7-H4、BTLA、CD40、CD40L、CD47、CD70、CD80、CD86、CD94、CD137、CD137L、CD226、CTLA-4、半乳凝素-9、GITR、GITRL、HHLA2、ICOS、ICOSL、KIR、LAG-3、LIGHT、I類或II類MHC、NKG2a、NKG2d、OX40、OX40L、PD1H、PD-1、PD-L1、PD-L2、PVR、SIRPa、TCR、TIGIT、TIM-3和/或VISTA。

【0075】 但是，上述優勢需要突出的成本。這類非單特異性雙抗體的形成需要成功組裝兩個或更多個獨特和不同的多肽(即，這樣的形成需要通過不同多肽鏈種類的異源二聚化而形成雙抗體)。該事實與單特異性雙抗體不同，其通過一致的多肽鏈的同源二聚化而形成。由於至少兩個不同的多肽(即，兩個多肽種

類)必須被提供以形成非單特異性雙抗體並且由於這樣的多肽的同源二聚化導致失活分子(Takemura, S.等(2000) “Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,” Protein Eng. 13(8):583-588)，這樣的多肽的產生必須以防止相同種類的多肽之間的共價結合的方式完成(即，以便防止同源二聚化) (Takemura, S.等(2000) “Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,” Protein Eng. 13(8):583-588)。所以，現有技術教導了這類多肽的非共價締合(見，例如，Olafsen等(2004) “Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications,” Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27；Asano等(2004) “A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain,” Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992；Takemura, S.等(2000) “Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,” Protein Eng. 13(8):583-588；Lu, D.等(2005) “A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity,” J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672)。

【0076】 但是，現有技術已經認識到由非共價締合的多肽組成的雙特異性雙抗體不穩定並且容易解離成非功能單體(見，例如，Lu, D.等(2005) “A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity,” J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672)。

【0077】 面對這樣的挑戰，本領域已經成功地開發了穩定的、共價結合的異源二聚非單特異性雙抗體，稱為DART® (雙親和力重靶向試劑)雙抗體；見，

例如，美國專利公開號2013-0295121、2010-0174053和2009-0060910；歐洲專利公開號EP 2714079、EP 2601216、EP 2376109、EP 2158221；和PCT公開號WO 2012/162068、WO 2012/018687、WO 2010/080538； 和Sloan, D.D.等(2015) “Targeting HIV Reservoir in Infected CD4 T Cells by Dual-Affinity Re-targeting Molecules (DARTs) that Bind HIV Envelope and Recruit Cytotoxic T Cells,” PLoS Pathog. 11(11):e1005233. doi: 10.1371/journal.ppat.1005233；Al Hussaini, M.等(2015) “Targeting CD123 In AML Using A T-Cell Directed Dual-Affinity Re-Targeting (DART®) Platform,” Blood pii: blood-2014-05-575704；Chichili, G.R.等(2015) “A CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To Myelogenous Leukemia: Preclinical Activity And Safety In Nonhuman Primates,” Sci. Transl. Med. 7(289):289ra82；Moore, P.A.等(2011) “Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma,” Blood 117(17):4542-4551；Veri, M.C.等(2010) “Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcgamma Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold,” Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943；Johnson, S.等(2010) “Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion,” J. Mol. Biol. 399(3):436-449)。這樣的雙抗體包括兩個或多個共價複合的多肽並涉及將一個或多個半胱氨酸殘基工程化到每個應用的多肽種類中，其允許形成二硫鍵，從而共價結合兩條多肽鏈。例如，將半胱氨酸殘基添加至這樣的構建體的C-末端已經被證明允許多肽鏈之間的二硫結合，穩定了產生的異源二聚體，而不干擾二價分子的結合特性。

【0078】 最簡單的雙特異性DART®雙抗體的兩條多肽的每一條包括三個結構域。第一條多肽包括(在N-末端至C-末端方向)：(i)第一結構域，其包括第一

免疫球蛋白的輕鏈可變結構域(VL1)的結合區；(ii)第二結構域，其包括第二免疫球蛋白的重鏈可變結構域(VH2)的結合區；和(iii)第三結構域，其含有半胱氨酸殘基(或含半胱氨酸的結構域)和異源二聚體促進結構域，其用於促進與雙抗體的第二多肽的異源二聚化和彼此共價結合雙抗體的第一和第二多肽。第二多肽含有(在N-末端至C-末端方向)：(i)第一結構域，其包括第二免疫球蛋白的輕鏈可變結構域(VL2)的結合區；(ii)第二結構域，其包括第一免疫球蛋白的重鏈可變結構域(VH1)的結合區；和(iii)第三結構域，其含有半胱氨酸殘基(或含半胱氨酸的結構域)和互補性異源二聚體促進結構域，其與第一多肽鏈的異源二聚體促進結構域複合，以促進與第一多肽鏈的異源二聚化。第二多肽鏈的第三結構域的半胱氨酸殘基(或含半胱氨酸的結構域)用於促進雙抗體的第二多肽鏈與第一多肽鏈的共價結合。這樣的分子是穩定的、有效的，並且具有同時結合兩個或多個抗原的能力。在一個實施方式中，第一和第二多肽的第三結構域各含半胱氨酸殘基，其用於經二硫鍵將多肽結合在一起。圖1提供了這樣的雙抗體的示意圖，其使用E螺旋/K螺旋異源二聚體-促進結構域和包含半胱氨酸的連接體用於共價結合。如圖2和圖3A-3C中所提供的，多肽中的一條或兩條可另外具有CH2-CH3結構域的序列，以便兩條雙抗體多肽之間的複合形成能夠結合細胞(比如B淋巴細胞、樹突細胞、天然殺傷細胞、巨噬細胞、嗜中性粒細胞、嗜伊紅粒細胞、嗜鹼性粒細胞和肥大細胞)的Fc受體的Fc區。如在下面更詳細提供的，這類多肽鏈的CH2和/或CH3結構域不需要序列一致，並且有利地被修飾以促進兩條多肽鏈之間的複合。

【0079】 已經描述了這類分子的許多變型(見，例如，美國專利公開號2015/0175697、2014/0255407、2014/0099318、2013/0295121、2010/0174053和2009/0060910；歐洲專利公開號EP 2714079、EP 2601216、EP 2376109、EP 2158221；和PCT公開號WO 2012/162068、WO 2012/018687、WO 2010/080538)。

這些包含Fc區域的DART®雙抗體可包括兩對多肽鏈。第一多肽鏈包括(在N-末端至C-末端方向)：(i)第一結構域，其包括第一免疫球蛋白的輕鏈可變結構域(VL1)的結合區，(ii)第二結構域，其包括第二免疫球蛋白的重鏈可變結構域(VH2)的結合區，(iii)第三結構域，其包含半胱氨酸殘基(或包含半胱氨酸的結構域)並且用於促進與雙抗體的第二多肽的異源二聚化並且使雙抗體的第一和第二多肽彼此共價結合，和(iv) CH2-CH3結構域。第二多肽包含(在N-末端至C-末端方向)：(i)第一結構域，其包括第二免疫球蛋白的輕鏈可變結構域(VL2)的結合區，(ii)第二結構域，其包括第一免疫球蛋白的重鏈可變結構域(VH1)的結合區，和(iii))第三結構域，其包含半胱氨酸殘基(或包含半胱氨酸的結構域)和異源二聚體-促進結構域，所述異源二聚體-促進結構域促進與第一多肽鏈的異源二聚化。在本文中，兩條第一多肽彼此複合，以形成Fc區。圖3A-3C提供了利用不同的異源二聚體-促進結構域的這類雙抗體的三個變型的示意圖。

【0080】 其他包含Fc區的DART®雙抗體可包括三條多肽鏈。這類DART®雙抗體的第一多肽包含三個結構域：(i)包含VL1的結構域、(ii)包含VH2的結構域、和(iii)包含CH2-CH3序列的結構域。這類DART®雙抗體的第二多肽包含：(i)包含VL2的結構域、(ii)包含VH1的結構域、和(iii)促進與雙抗體的第一多肽鏈異源二聚化和共價結合的結構域。這類DART®雙抗體的第三多肽包括CH2-CH3序列。因此，這類DART®雙抗體的第一和第二多肽鏈締合在一起，以形成能夠結合表位的VL1/VH1結合位點，以及能夠結合第二表位的VL2/VH2結合位點。這類更複雜的DART®分子也具有包含半胱氨酸的結構域，其用於形成共價結合的複合物。因此，第一和第二多肽通過涉及在它們各自第三結構域中的半胱氨酸殘基的二硫鍵彼此結合。值得注意的是，第一和第三多肽鏈彼此複合，以形成經二硫鍵穩定的Fc區。圖4A-4B提供了包括三條多肽鏈的這類雙抗體的示意圖。

【0081】 其他包含Fc區的DART®雙抗體可包括五條多肽鏈，其可包括來自多達三種不同免疫球蛋白的輕鏈和重鏈可變結構域的結合區(稱為VL1/VH1、VL2/VH2和VL3/VH3)。例如，這類雙抗體的第一多肽鏈可包含：(i)包含VH1的結構域、(ii)包含CH1的結構域、和(iii)包含CH2-CH3序列的結構域。這類雙抗體的第二和第五條多肽鏈可包含：(i)包含VL1的結構域、和(ii)包含CL的結構域。這類雙抗體的第三多肽鏈可包含：(i)包含VH1的結構域、(ii)包含CH1的結構域、(iii)包含CH2-CH3序列的結構域、(iv)包含VL2的結構域、(v)包含VH3的結構域、和(vi)異源二聚體-促進結構域，其中異源二聚體-促進結構域促進第三鏈與第四鏈的二聚化。這類雙抗體的第四多肽可包含：(i)包含VL3的結構域、(ii)包含VH2的結構域、和(iii)促進與雙抗體的第三多肽鏈異源二聚化和共價結合的結構域。在本文中，第一和第三多肽彼此複合，以形成Fc區。這類更複雜的DART®分子也具有包含半胱氨酸的結構域，其用於形成共價結合的複合物，以便每條多肽鏈通過涉及半胱氨酸殘基的二硫鍵結合至少一種另外的多肽鏈。優選地，這類結構域在N-末端至C-末端方向上排列。圖5提供了包括五條多肽鏈的這類雙抗體的示意圖。

【0082】 用於期望四價分子而不需要Fc的應用的可選的構建體在本領域中是已知的，包括但不限於四價串聯抗體，也稱為“TandAbs”(見，例如美國專利公開號2005-0079170、2007-0031436、2010-0099853、2011-020667 2013-0189263；歐洲專利公開號EP 1078004、EP 2371866、EP 2361936和EP 1293514；PCT公開號WO 1999/057150、WO 2003/025018，和WO 2013/013700)，其通過每個具有VH1、VL2、VH2和VL2結構域的兩條相同鏈的同源二聚化而形成。

【0083】 最近，已經描述了合併兩個雙抗體型結合結構域和一個非雙抗體型結構域和Fc區的三價結構(見，例如，2015年5月29日提交的PCT申請號：PCT/US15/33076，名稱是“Tri-Specific Binding Molecules and Methods of Use

Thereof”和2015年5月29日提交的PCT/US15/33081，名稱是“Tri-Specific Binding Molecules That Specifically Bind to Multiple Cancer Antigens and Methods of Use Thereof”)。這類三價分子可用于產生單特異性，雙特異性或三特異性分子。圖6A-6F提供了包括3或4條多肽鏈的這類三價分子的示意圖。

IV. 本發明的抗人PD-1結合分子

【0084】 本發明優選的PD-1結合分子包括抗體、雙抗體、BiTE等，並且能夠結合人PD-1 (CD279)的連續的或不連續的(例如，構象)部分(表位元)。本發明PD-1結合分子優選地也展示結合一個或多個非人物種，尤其地，靈長類物種(尤其是靈長類物種，比如食蟹猴)，的PD-1分子的能力。代表性人PD-1多肽(NCBI序列NP_005009.2；包括20個氨基酸殘基信號序列(以底線顯示)和268個氨基酸殘基成熟蛋白質) 具有氨基酸序列(**SEQ ID NO:68**)：

MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL

【0085】 在某些實施方式中，本發明的抗人PD-1結合分子特徵在於任何(一個或多個)下述標準：

(1)特異性結合在刺激的人T-細胞的表面上內源表達的人PD-1；

(2)特異性結合人PD-1，平衡結合常數(KD)為40 nM或更小；

(3)特異性結合人PD-1，平衡結合常數(KD)為5 nM或更小；

(4)特異性結合人PD-1，結合速率(on rate)(ka)為1.5 x 104 M-1min-1或更大；

(5)特異性結合人PD-1，結合速率(ka)為90.0 x 104 M-1min-1或更大；

(6)特異性結合人PD-1，解離速率(off rate)(kd)為7 x 10-4 min-1或更小；

(7)特異性結合人PD-1，解離速率(kd)為2 x 10-4 min-1或更小；

(8)特異性結合非人靈長類PD-1 (例如，食蟹猴的PD-1)；

(9)抑制(即，阻斷或干擾) PD-1配體(PD-L1/PD-L2)與PD-1的結合/抑制活性；

(10)刺激免疫應答；和/或

(11)與抗人LAG-3抗體協同作用，以刺激抗原特異性T-細胞應答。

【0086】 如本文使用的，術語“抗原特異性T-細胞應答”指通過用對T細胞特異性的抗原刺激T細胞而導致的T細胞的應答。在抗原特異性刺激時，通過T細胞應答的非限制性例子包括增殖和細胞因數產生(例如，TNF-α、IFN-γ產生)。分子刺激抗原特異性T-細胞應答的能力可使用例如本文所述的金黃色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)腸毒素B型抗原(“SEB”)刺激的PBMC試驗來測定。

【0087】 本發明優選的抗人PD-1結合分子具有下述鼠科抗人PD-1單克隆抗體的VH和/或VL結構域：**“PD-1 mAb 1”、“PD-1 mAb 2”、“PD-1 mAb 3”、“PD-1 mAb 4”、“PD-1 mAb 5”、“PD-1 mAb 6”、“PD-1 mAb 7”、“PD-1 mAb 8”、“PD-1 mAb 9”、“PD-1 mAb 10”、“PD-1 mAb 11”、“PD-1 mAb 12”、“PD-1 mAb 13”、“PD-1 mAb 14”**或**“PD-1 mAb 15”**，並且更優選地具有這類抗人PD-1單克隆抗體的VH結構域的1、2或所有3個CDR_H和/或VL結構域的1、2或所有3個CDR_L。這類優選的抗人PD-1結合分子包括雙特異性(或多特異性)抗體、嵌合或人源化抗體、BiTE、雙抗體等，和具有變異的Fc區域的這類結合分子。

【0088】 本發明尤其涉及包括PD-1結合結構域的PD-1結合分子，所述結合結構域具有：

(A)(1) PD-1mAb 1 的 VH 結構域的三個 CDRH；

(2) PD-1 mAb 1 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(3) PD-1 mAb 1 的 VH 結構域的三個 CDRH 和 PD-1 mAb 1 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(4) hPD-1 mAb 1 VH1 的 VH 結構域；

(5) hPD-1 mAb 1 VL1 的 VL 結構域；

(6) hPD-1 mAb 1 的 VH 和 VL 結構域；

(B)(1) PD-1 mAb 2 的 VH 結構域的三個 CDRH；

(2) PD-1 mAb 2 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(3) PD-1 mAb 2 的 VH 結構域的三個 CDRH 和 PD-1 mAb 2 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(4) hPD-1 mAb 2 VH1 的 VH 結構域；

(5) hPD-1 mAb 2 VL1 的 VL 結構域；

(6)hPD-1 mAb 2 的 VH 和 VL 結構域；

(C)(1) PD-1 mAb 3 的 VH 結構域的三個 CDRH；

(2) PD-1 mAb 3 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(3) PD-1 mAb 3 的 VH 結構域的三個 CDRH 和 PD-1 mAb 3 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(D)(1) PD-1 mAb 4 的 VH 結構域的三個 CDRH；

(2) PD-1 mAb 4 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(3) PD-1 mAb 4 的 VH 結構域的三個 CDRH 和 PD-1 mAb 4 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(E)(1) PD-1 mAb 5 的 VH 結構域的三個 CDRH；

(2) PD-1 mAb 5 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(3) PD-1 mAb 5 的 VH 結構域的三個 CDRH 和 PD-1 mAb 5 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(F)(1) PD-1 mAb 6 的 VH 結構域的三個 CDRH；

(2) PD-1 mAb 6 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(3) PD-1 mAb 6 的 VH 結構域的三個 CDRH 和 PD-1 mAb 6 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(G)(1) PD-1 mAb 7 的 VH 結構域的三個 CDRH；

(2) PD-1 mAb 7 或 hPD-1 mAb 7 VL2 或 hPD-1 mAb 7 VL3 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(3)PD-1 mAb 7 的 VH 結構域的三個 CDRH 和 PD-1 mAb 7 或 hPD-1 mAb 7 VL2、hPD-1 mAb 7 VL3 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(4) hPD-1 mAb 7 VH1 或 hPD-1 mAb 7 VH2 的 VH 結構域；

(5) hPD-1 mAb 7 VL1 或 hPD-1 mAb 7 VL2 或 hPD-1 mAb 7 VL 3 的 VL 結構域；

(6) hPD-1 mAb 7(1.1)，或 hPD-1 mAb 7(1.2)，或 hPD-1 mAb 7(1.3)，或 hPD-1 mAb 7(2.1)，或 hPD-1 mAb 7(2.2)，或 hPD-1 mAb 7(2.3)的 VH 和 VL 結構域；

(H)(1) PD-1 mAb 8 的 VH 結構域的三個 CDRH；

(2)PD-1 mAb 8 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(3)PD-1 mAb 8 的 VH 結構域的三個 CDRH 和 PD-1 mAb 8 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(I)(1)PD-1 mAb 9 或 hPD-1 mAb 9 VH2 的 VH 結構域的三個 CDRH；

(2) PD-1 mAb 9 或 hPD-1 mAb 9 VL2 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(3) PD-1 mAb 9 或 hPD-1 mAb 9 VH2 的 VH 結構域的三個 CDRH，和 PD-1 mAb 9 或 hPD-1 mAb 9 VL2 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(4) hPD-1 mAb 9 VH1，或 hPD-1 mAb 9 VH2 的 VH 結構域；

(5) hPD-1 mAb 9 VL1，或 hPD-1 mAb 9 VL2 的 VL 結構域；

(6) hPD-1 mAb 9(1.1)，或 hPD-1 mAb 9(1.2)，或 hPD-1 mAb 9(2.1)，或 hPD-1 mAb 9(2.2)的 VH 和 VL 結構域；

(J)(1) PD-1 mAb 10 的 VH 結構域的三個 CDRH；

(2) PD-1 mAb 10 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(3) PD-1 mAb 10 的 VH 結構域的三個 CDRH 和 PD-1 mAb 10 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(K)(1) PD-1 mAb 11 的 VH 結構域的三個 CDRH；

(2) PD-1 mAb 11 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(3) PD-1 mAb 11 的 VH 結構域的三個 CDRH 和 PD-1 mAb 11 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(L)(1) PD-1 mAb 12 的 VH 結構域的三個 CDRH；

(2) PD-1 mAb 12 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(3) PD-1 mAb 12 的 VH 結構域和 PD-1 mAb 12 的 VL 結構域的三個 CDRH；

(M)(1) PD-1 mAb 13 的 VH 結構域的三個 CDRH；

(2) PD-1 mAb 13 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(3) PD-1 mAb 13 的 VH 結構域的三個 CDRH 和 PD-1 mAb 13 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(N)(1) PD-1 mAb 14 的 VH 結構域的三個 CDRH；

(2) PD-1 mAb 14 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(3) PD-1 mAb 14 的 VH 結構域的三個 CDRH 和 PD-1 mAb 14 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(O)(1) PD-1 mAb 15 的 VH 結構域的三個 CDRH；

(2) PD-1 mAb 15 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(3) PD-1 mAb 15 的 VH 結構域的三個 CDRH 和 PD-1 mAb 15 的 VL 結構域的三個 CDR_L；

(4) hPD-1 mAb 15 VH1 的 VH 結構域；

(5) hPD-1 mAb 15 VL1 的 VL 結構域；

(6)hPD-1 mAb 15 的 VH 和 VL 結構域；

或

其與PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 4、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 8、PD-1 mAb 9、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1 mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14或PD-1 mAb 15結合相同的表位，或與其競爭結合相同的表位。

A. 抗人PD-1抗體PD-1 mAb 1

1. 鼠科抗人PD-1抗體PD-1 mAb 1

【0089】 PD-1 mAb 1的VH結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:69)顯示在下面(CDRH殘基以底線顯示)。

DVQLQESGPG RVKPSQSLSL TCTVTGFSIT **NDYAWN**WIRQ FPGNKLEWMG **HITYSGSTSY NPSLKS**RISI TRDTSKNHFF LQLSSVTPED TATYYCAR**DY GSGYPYTLDY** WGQGTSVTVS S

PD-1 mAb 1的CDRH1**(SEQ ID NO:71):NDYAWN**

PD-1 mAb 1的CDRH2**(SEQ ID NO:72)：HITYSGSTSYNPSLKS**

PD-1 mAb 1的CDRH3**(SEQ ID NO:73):DYGSGYPYTLDY**

【0090】 編碼PD-1 mAb 1的VH結構域的示例性多核苷酸是SEQ ID NO:70(編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

cagatccagt gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctggc cgggtgaaac cttctcagtc tctgtccctc acctgcactg tcactggctt ctcaatcacc **aatgattatg cctggaac**tg gatccgacag tttccaggaa acaaactgga gtggatgggc **cacataacct acagtggcag cactagctac aacccatctc tcaaa**agtcg aatctctatc actcgggaca catccaagaa ccacttcttc ctgcagttga gttctgtgac tcctgaggac acagccacat attactgtgc aaga**gattac ggtagtggct acccctatac tttggactac** tggggtcaag gtacctcagt

caccgtctcc tcc

【0091】 PD-1 mAb 1的VL結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:74)顯示在下面(CDR$_L$殘基以底線顯示)：

QIVLTQSPAL MSASPGEKVT MTC**SATSIVS YVY**WYQQKPG SSPQPWIY**LT SNLAS**GVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMEAE DAATYYC**QQW SDNPYT**FGGG TKLEIK

PD-1 mAb 1 的 CDR$_L$1(**SEQ ID NO:76**):**SATSIVSYVY**

PD-1 mAb 1 的 CDR$_L$2(**SEQ ID NO:77**):**LTSNLAS**

PD-1 mAb 1 的 CDR$_L$3(**SEQ ID NO:78**):**QQWSDNPYT**

【0092】 編碼PD-1 mAb 1的VL結構域的示例性多核苷酸是**SEQ ID NO:75**(編碼CDR$_L$殘基的核苷酸以底線顯示)：

caaattgttc tcacccagtc tccagcactc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc atgacctgc**a gtgccacctc aattgtaagt tacgtttac**t ggtaccagca gaagcctgga tcctcccccc aaccctggat ttat**ctcaca tccaacctgg cttct**ggagt ccctgctcgc ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacaa tcagcagcat ggaggctgaa gatgctgcca cttattactg c**cagcagtgg agtgataacc cgtacacg**tt cggaggggggg accaagctgg aaataaaa

2. 人源化抗人PD-1抗體PD-1 mAb1以形成"hPD-1 mAb 1"

【0093】 當鑒定了抗原表位時，將上述鼠科抗人PD-1抗體PD-1 mAb 1人源化並且進一步去免疫化，以便表明人源化抗人PD-1抗體從而在施用至人接受者時降低其抗原性的能力。人源化產生一個人源化的VH結構域，本文命名為**"hPD-1 mAb 1 VH1"**和一個人源化的VL結構域，本文命名為**"hPD-1 mAb 1 VL1"**。因此，包括與人源化的VH結構域配對的人源化的VL結構域的抗體被稱為**"hPD-1 mAb 1"**。

【0094】 hPD-1 mAb 1 VH1的VH結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:79**)顯示在下面(CDR$_H$殘基以底線顯示)：

DVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCTVSGFSIS **NDYAWN**WIRQ PPGKGLEWIG **HITYSGSTSY**

NPSLKSRLTI TRDTSKNQFV LTMTNMDPVD TATYYCAR**DY GSGYPYTLDY** WGQGTTVTVS S

【0095】 編碼hPD-1 mAb 1 VH1的示例性多核苷酸是SEQ ID NO:80 (編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

gacgtacagc tccaggaaag tggcccaggt ctggtgaagc catcccagac actgagcctg acttgcaccg tgagtggctt ctccatctca **aatgactacg cctggaat**tg gattaggcag cctcccggta aagggctgga gtggatcggc **cacatcacat acagcggctc cacatcatat aatcccagtc tgaag**agccg tcttaccatt actcgcgaca ctagtaagaa ccagtttgtt ctgaccatga ccaacatgga ccctgtggat actgcaacat actattgtgc tcga**gattat ggttctggtt acccttatac actcgactac** tggggacagg gaaccactgt gaccgtgagc tcc

【0096】 hPD-1 mAb 1 VL1的VL結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:81)顯示在下面(CDRH殘基以底線顯示)：

EIVLTQSPAT LSVSPGEKVT ITC**SATSIVS YVY**WYQQKPG QAPQPLIY**LT SNLAS**GIPAR FSGSGSGTDF TLTISSLEAE DAATYYC**QQW SDNPYT**FGGG TKVEIK

【0097】 編碼hPD-1 mAb 1 VL1的示例性多核苷酸是SEQ ID NO:82 (編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

gaaatcgttc tgacccagag cccagcaacc ctgtctgtct cccccggaga aaaggtcacc attacttgc**t ctgctacttc tatcgtgtcc tacgtgtac**t ggtatcagca gaagcccggt caggctcccc agccattgat **atatctgacc agcaacctgg cttct**ggtat cccagctcgt ttttccggta gcgggtccgg gactgatttc actttgacta tcagctctct ggaggcagaa gacgccgcca cctattattg t**caacagtgg tcagacaatc catacact**tt tggcggtggc accaaagtcg aaataaag

B. 抗人PD-1抗體PD-1 mAb 2

1. 鼠科抗人PD-1抗體PD-1 mAb 2

【0098】 PD-1 mAb 2的VH結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:83)顯示在下面(CDRH殘基以底線顯示)。

DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFVFS **SFGMH**WVRQA PEKGLEWVA**Y ISSGSMSISY ADTVKG**RFTV TRDNAKNTLF LQMTSLRSED TAIYYCAS**LS DYFDY**WGQGT TLTVSS

PD-1 mAb 2 的 CDRH1(**SEQ ID NO:85**):**SFGMH**

PD-1 mAb 2 的 CDRH2(**SEQ ID NO:86**)：**YISSGSMSISYADTVKG**

PD-1 mAb 2 的 CDRH3(**SEQ ID NO:87**):**LSDYFDY**

【0099】 編碼PD-1 mAb 2的VH結構域的示例性多核苷酸是**SEQ ID NO:84** (編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

gatgtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccggaaactc tcctgtgcag cctctggatt cgttttcagt **agctttggaa tgcac**tgggt tcgtcaggct ccagagaagg ggctggagtg ggtcgca**tac atcagtagtg gcagtatgag catttcctat gcagacacag tgaagggc**cg attcaccgtc accagagaca atgccaagaa caccctgttc ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atcc**ctgagt gactactttg actac**tgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcc

【0100】 PD-1 mAb 2的VL結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:88**)顯示在下面(CDR$_L$殘基以底線顯示)：

DVVMSQTPLS LPVSLGDQAS ISC**RSSQSLV HSTGNTYLH**W YLQKPGQSPK LLIY**RVSNRF S**GVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV FFC**SQTTHVP WT**FGGGTKLE IK

PD-1 mAb 2 的 CDR$_L$1(**SEQ ID NO:90**):**RSSQSLVHSTGNTYLH**

PD-1 mAb 2 的 CDR$_L$2(**SEQ ID NO:91**):**RVSNRFS**

PD-1 mAb 2 的 CDR$_L$3(**SEQ ID NO:92**):**SQTTHVPWT**

【0101】 編碼PD-1 mAb 2的VL結構域的示例性多核苷酸是**SEQ ID NO:89**(編碼CDR$_L$殘基的核苷酸以底線顯示)：

gatgttgtga tgtcccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc atctcttgc**a gatctagtca gagccttgtt cacagtactg gaaacaccta tttacat**tgg tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctcctgatct ac**agggtttc taaccgattt tct**ggggtcc ccgacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc agtagagtgg aggctgagga tctgggagtt tttttctgc**t ctcaaactac acatgttccg tggacg**ttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa

2. 人源化抗人 PD-1 抗體 PD-1 mAb2 以形成“hPD-1 mAb 2”

【0102】 當鑒定了抗原表位時，將上述鼠科抗人PD-1抗體PD-1 mAb 2人源化並且進一步去免疫化，以便表明人源化抗人PD-1抗體從而在施用至人接受者時降低其抗原性的能力。人源化產生一個人源化的VH結構域，本文命名為“**hPD-1 mAb 2 VH1**”和一個人源化的VL結構域本文命名為“**hPD-1 mAb 1 VL1**”。因此，任何包括與人源化的VH結構域配對的人源化的VL結構域的抗體被稱為“**hPD-1 mAb 2**”。

【0103】 hPD-1 mAb 2 VH1的VH結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:93**)顯示在下面(CDRH殘基以底線顯示)：

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFVFS **SFGMH**WVRQA PGKGLEWVA**Y ISSGSMSISY ADTVKG**RFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRTED TALYYCAS**LS DYFDY**WGQGT TVTVSS

【0104】 編碼hPD-1 mAb 2 VH1的示例性多核苷酸是**SEQ ID NO:94** (編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

gaagtgcaat tggttgagag tggtggtggc ctggtgcagc caggtggaag tctgcggttg tcctgtgcag caagcggatt tgtgttcagc **tcttttggga tgcat**tgggt gcgccaggct cccggcaagg gtctcgagtg ggtagca**tac atctccagcg ggtccatgtc tattagttat gccgacacag tgaaaggc**ag gtttactatc tcccgtgaca atgcaaaaaa cacactgtac ctgcaaatga atagcctgcg caccgaggac accgccttgt actactgcgc ttcc**ctgtct gattacttcg actac**tgggg tcagggcaca actgtgacag tttcttcc

【0105】 hPD-1 mAb 2 VL1的VL結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:95)顯示在下面(CDRH殘基以底線顯示)：

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISC**RSSQSLV HSTGNTYLH**W YLQKPGQSPQ LLIY**RVSNRF S**GVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYC**SQTTHVP WT**FGQGTKLE IK

【0106】 編碼hPD-1 mAb 2 VL1的示例性多核苷酸是SEQ ID NO:96 (編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

gacgttgtga tgacacagtc accactgagt ctgccagtta ccctgggcca gccagccagt atttcttgt**c ggagttcaca gagtctggta cattccacag gaaatacata tctccat**tgg tacctgcaaa aaccagggca gagcccccag ctgctgattt at**agagtgtc taatcgattt**

tctggcgtgc cagatcggtt cagcggcagc gggtctggca ctgatttcac actgaaaatc tctagggtgg aggcagagga cgtaggcgtt tactactgta gtcagaccac ccatgtaccc tggacttttg gccaaggtac taagctggaa atcaag

C. 鼠科抗人 PD-1 抗體 PD-1 mAb 3

【0107】 PD-1 mAb 3的VH結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:97**)顯示在下面(CDRH殘基以底線顯示)。

QVQLQQSGAE LVRPGASVTL SCKASGYTFT DYVMHWVKQT PVHGLEWIGT IDPETGGTAY NQKFKGKAIL TADKSSNTAY MELRSLTSED SAVYYFTREK ITTIVEGTYW YFDVWGTGTT VTVSS

PD-1 mAb 3 的 CDRH1(**SEQ ID NO:99**):**DYVMH**

PD-1 mAb 3 的 CDRH2(**SEQ ID NO:100**)：**TIDPETGGTAYNQKFKG**

PD-1 mAb 3 的 CDRH3(**SEQ ID NO:101**):**EKITTIVEGTYWYFDV**

【0108】 編碼 PD-1 mAb 3 的 VH 結構域的示例性多核苷酸是 **SEQ ID NO:98** (編碼 CDRH 殘基的核苷酸以底線顯示)：

caggttcaac tgcaacagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg tcctgcaagg cttcgggcta cacatttact gactatgtaa tgcactgggt gaagcagaca cctgtgcatg gcctggaatg gattggaact attgatcctg aaactggtgg tactgcctac aatcagaagt tcaagggcaa ggccatactg actgcagaca agtcctccaa cacagcctac atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactttac aagagagaag attactacga tagtagaggg gacatactgg tacttcgatg tctggggcac agggaccacg gtcaccgtct cctca

【0109】 PD-1 mAb 3的VL結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:102**)顯示在下面(CDR$_L$殘基以底線顯示)：

DVLLTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQNIV HSNGDTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHLP YTFGGGTKLE IK

PD-1 mAb 3 的 CDR$_L$1(**SEQ ID NO:104**):**RSSQNIVHSNGDTYLE**

PD-1 mAb 3 的 CDR$_L$2(**SEQ ID NO:105**):**KVSNRFS**

PD-1 mAb 3 的 CDR_L3(**SEQ ID NO:106**):**FQGSHLPYT**

【0110】 編碼PD-1 mAb 3的VL結構域的示例性多核苷酸是SEQ ID NO:103(編碼CDRL殘基的核苷酸以底線顯示)：

gatgttttgc tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc atctcttgca gatctagtca gaacattgta catagtaatg gagacaccta tttggaatgg tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctcctgatct ataaagtttc caaccgattt tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt gggtcaggga cagattttac actcaaaatc agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatcttccg tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa

D. 鼠科抗人 PD-1 抗體 PD-1 mAb 4

【0111】 PD-1 mAb 4的VH結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:107)顯示在下面(CDRH殘基以底線顯示)。

DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFVFS **SFGMH**WVRQA PEKGLEWVA**Y ISSGSMSISY ADTVKG**RFTV TRDNAKNTLF LQMTSLRSED TAIYYCAS**LT DYFDY**WGQGT TLTVSS

PD-1 mAb 4 的 CDRH1(**SEQ ID NO:109**):**SFGMH**

PD-1 mAb 4 的 CDRH2(**SEQ ID NO:110**)：**YISSGSMSISYADTVKG**

PD-1 mAb 4 的 CDRH3(**SEQ ID NO:111**):**LTDYFDY**

【0112】 編碼PD-1 mAb 4的VH結構域的示例性多核苷酸是SEQ ID NO:108 (編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

gatgtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccggaaactc tcctgtgcag cctctggatt cgttttcagt agctttggaa tgcactgggt tcgtcaggct ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatat attagtagtg gcagtatgag tatttcctat gcagacacag tgaagggccg attcaccgtc accagagaca atgccaagaa caccctgttc ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atccctgact gactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctca

【0113】 PD-1 mAb 4的VL結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:112)顯示在下面(CDRL殘基以底線顯示)：

DVVMSQTPLS LPVSLGDQAS ISC**RSSQSLV HSTGNTYFH**W YLQKPGQSPK LLIY**RVSNRF**
SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFC**SQTTHVP WT**FGGGTKLE IK

PD-1 mAb 4 的 CDR_L1(**SEQ ID NO:114**):**RSSQSLVHSTGNTYFH**

PD-1 mAb 4 的 CDR_L2(**SEQ ID NO:115**):**RVSNRFS**

PD-1 mAb 4 的 CDR_L3(**SEQ ID NO:116**):**SQTTHVPWT**

【0114】 編碼PD-1 mAb 4的VL結構域的示例性多核苷酸是SEQ ID NO:113(編碼CDRL殘基的核苷酸以底線顯示)：

gatgttgtga tgtcccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc
atctcctgc**a gatctagtca gagccttgtt cacagtactg gaaacaccta tttccat**tgg
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctcctgatct ac**agggtttc taaccgattt**
tctggggtcc ccgacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgc**t ctcaaactac acatgttccg**
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa

E. 鼠科抗人 PD-1 抗體 PD-1 mAb 5

【0115】 PD-1 mAb 5的VH結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:117)顯示在下面(CDRH殘基以底線顯示)。

QVQLQQPGVE LVRPGASVKL SCKASGYSFT **AYWMN**WMKQR PGQGLEWIG**V IHPSDSETWL**
NQKFKDKATL TVDKSSSTAY MQLISPTSED SAVYYCAR**EH YGSSPFAY**WG QGTLVTVSA

PD-1 mAb 5 的 CDRH1(SEQ ID NO:119):AYWMN

PD-1 mAb 5 的 CDRH2(SEQ ID NO:120)：VIHPSDSETWLNQKFKD

PD-1 mAb 5 的 CDRH3(SEQ ID NO:121):EHYGSSPFAY

【0116】 編碼PD-1 mAb 5的VH結構域的示例性多核苷酸是SEQ ID NO:118 (編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

caggtccaac tgcagcagcc tggggttgaa ctggtgaggc ctggagcttc agtgaagctg
tcctgcaagg cttctggcta ctccttcacc **gcctactgga tgaac**tggat gaaacagagg
cctggacaag gccttgagtg gattggc**gtg attcatcctt ccgatagtga aacttggtta**
aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac

atgcaactca tcagcccgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aaga**gagcac tacggtagta gcccgtttgc ttac**tggggc caagggactc tggtcactgt

ctctgca

【0117】 PD-1 mAb 5的VL結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:122)顯示在下面(CDRL殘基以底線顯示)：

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISC**RANESVD NYGMSFMN**WF QQKPGQPPKL LIY**AASNQGS** GVPARFSGSG SGTDFSLNIH PMEEDDTAMY FC**QQSKEVPY T**FGGGTKLEI K

PD-1 mAb 5 的 CDRL1(SEQ ID NO:124):RANESVDNYGMSFMN

PD-1 mAb 5 的 CDRL2(SEQ ID NO:125):AASNQGS

PD-1 mAb 5 的 CDRL3(SEQ ID NO:126):QQSKEVPYT

【0118】 編碼PD-1 mAb 5的VL結構域的示例性多核苷酸是SEQ ID NO:123(編碼CDRL殘基的核苷酸以底線顯示)：

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc atctcctgc**a gagccaacga aagtgttgat aattatggca tgagttttat gaac**tggttc caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctat**g ctgcatccaa ccaaggatcc** ggggtccctg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag atttcagcct caacatccat cctatggagg aggatgatac tgcaatgtat ttctgt**cagc aaagtaagga ggttccgtac acg**ttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa

F. 鼠科抗人 PD-1 抗體 PD-1 mAb 6

【0119】 PD-1 mAb 6的VH結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:127)顯示在下面(CDRH殘基以底線顯示)。

EVKLVESGGG LVNPGGSLKL SCAASGFTFS **SYGMS**WVRQT PEKRLEWVA**T ISGGGSDTYY PDSVKG**RFTI SRDNAKNNLY LQMSSLRSED TALYYCAR**QK ATTWFAY**WGQ GTLVTVST

PD-1 mAb 6的CDRH1(**SEQ ID NO:129**):**SYGMS**

PD-1 mAb 6 的 CDRH2(**SEQ ID NO:130**)：**TISGGGSDTYYPDSVKG**

PD-1 mAb 6 的 CDRH3(**SEQ ID NO:131**):**QKATTWFAY**

【0120】 編碼PD-1 mAb 6的VH結構域的示例性多核苷酸是SEQ ID NO:128 (編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

gaaatcgtac tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact ctcagctgca **gagcaagtga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaac**tggttt cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcatccac**g ccgcctctaa ccgcggatct** ggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgc**cagc aatctaaaga ggtgccctat act**tttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa

【0121】 PD-1 mAb 6的VL結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:132)顯示在下面(CDR$_L$殘基以底線顯示)：

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISC**RASESVD NYGISFMN**WF QQKPGQPPKL LIY**PASNQGS** GVPARFSGSG SGTDFSLNIH PMEEDDAAMY FC**QQSKEVPW T**FGGGTKLEI K

PD-1 mAb 6 的 CDR$_L$1(**SEQ ID NO:134**):**RASESVDNYGISFMN**

PD-1 mAb 6 的 CDR$_L$2(**SEQ ID NO:135**):**PASNQGS**

PD-1 mAb 6 的 CDR$_L$3(**SEQ ID NO:136**):**QQSKEVPWT**

【0122】 編碼PD-1 mAb 6的VL結構域的示例性多核苷酸是SEQ ID NO:133(編碼CDRL殘基的核苷酸以底線顯示)：

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc atctcctgc**a gagccagcga aagtgttgat aattatggca ttagttttat gaac**tggttc caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctat**c ctgcatccaa ccaaggatcc** ggggtccctg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat cctatggagg aggatgatgc tgcaatgtat ttctgt**cagc aaagtaagga ggttccgtgg acg**ttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa

G. 抗人 PD-1 抗體 PD-1 mAb 7

1. 鼠科抗人 PD-1 抗體 PD-1 mAb 7

【0123】 PD-1 mAb 7的VH結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:137)顯示在下面(CDRH殘基以底線顯示)。

QVQLQQPGAE LVRPGASVKL SCKASGYSFT **SYWMN**WVKQR PGQGLEWIG**V IHPSDSETWL DQKFKD**KATL TVDKSSTTAY MQLISPTSED SAVYYCAR**EH YGTSPFAY**WG QGTLVTVSS

PD-1 mAb 7 的 CDRH1(SEQ ID NO:139):SYWMN

PD-1 mAb 7 的 CDRH2(SEQ ID NO:140)：VIHPSDSETWLDQKFKD

PD-1 mAb 7 的 CDRH3(SEQ ID NO:141):EHYGTSPFAY

【0124】 編碼PD-1 mAb 7的VH結構域的示例性多核苷酸是**SEQ ID NO:138** (編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

gaggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctggtgaggc ctggagcttc agtgaagctg tcctgcaagg cttctggcta ctccttcacc **agctactgga tgaac**tgggt gaagcagagg cctggacaag gccttgagtg gattggc**gtg attcatcctt ccgatagtga aacttggtta gatcagaagt tcaaggac**aa ggccacattg actgtagaca aatcctccac cacagcctac atgcaactca tcagcccgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagg**gagcac tacggtacta gcccgtttgc ttac**tggggc caagggactc tggtcactgt gtcttcc

【0125】 PD-1 mAb 7的VL結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:142)顯示在下面(CDR_L殘基以底線顯示)：

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISC**RANESVD NYGMSFMN**WF QQKPGQPPKL LIH**AASNQGS** GVPARFSGSG FGTDFSLNIH PMEEDDAAMY FC**QQSKEVPY T**FGGGTKLEI K

PD-1 mAb 7 的 CDRL1(**SEQ ID NO:144):RANESVDNYGMSFMN**

PD-1 mAb 7 的 CDRL2(**SEQ ID NO:145):AASNQGS**

PD-1 mAb 7 的 CDRL3(**SEQ ID NO:146):QQSKEVPYT**

【0126】 編碼PD-1 mAb 7的VL結構域的示例性多核苷酸是**SEQ ID NO:143**(編碼CDR_L殘基的核苷酸以底線顯示)：

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc

atctcctgca gagccaacga aagtgttgat aattatggca tgagttttat gaactggttc caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatccatg ctgcatccaa ccaaggatcc ggggtccctg ccaggtttag tggcagtggg tttgggacag acttcagcct caacatccat cctatggagg aggatgatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtac acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa

2. 人源化抗人 PD-1 抗體 PD-1 mAb7 以形成“hPD-1 mAb 7”

【0127】 當鑒定了抗原表位時，將上述鼠科抗人PD-1抗體PD-1 mAb 7人源化並且進一步去免疫化，以便表明人源化抗人PD-1抗體從而在施用至人接受者時降低其抗原性的能力。人源化產生兩個人源化的VH結構域，本文命名為“**hPD-1 mAb 7 VH1**”和“**hPD-1 mAb 7 VH2**”，和三個人源化的VL結構域本文命名為“**hPD-1 mAb 7 VL1**”、“**hPD-1 mAb 7 VL2**”和“**hPD-1 mAb 7 VL3**”。任何人源化的VL結構域可與任一人源化的VH結構域配對。因此，包括與人源化的VH結構域配對的人源化的VL結構域之一的任何抗體一般稱為“**hPD-1 mAb 7**”，並且人源化的VH/VL結構域的具體組合通過參考特定的VH/VL結構域命名，例如包括hPD-1 mAb 7 VH1和hPD-1 mAb 1 VL2的人源化抗體具體稱為“**hPD-1 mAb 7(1.2)**”。

【0128】 hPD-1 mAb 7 VH1的VH結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:147)顯示在下面(CDRH殘基以底線顯示)：

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSS

【0129】 編碼hPD-1 mAb 7 VH1的示例性多核苷酸是**SEQ ID NO:148** (編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

caagttcaat tggtacagag cggggcagag gtgaagaaac ccggcgccag tgttaaggtg tcctgcaaag ccagcggtta cagctttaca agctattgga tgaattgggt gcgtcaagca ccagggcagg gtctggaatg gattggggtg atacatcctt ctgacagcga aacatggttg gaccagaaat ttaaagatcg tgtgacaatt acagtcgata agtccacaag cactgcttac atggaactct ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcgc cagagagcac

tacggcacat caccttttgc atactggggc cagggaactc tcgtaaccgt

atcctcc

【0130】 hPD-1 mAb 7 VH2的VH結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:149)顯示在下面(CDRH殘基以底線顯示)：

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWAGV

IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH

YGTSPFAYWG QGTLVTVSS

【0131】 編碼hPD-1 mAb 7 VH2的示例性多核苷酸是SEQ ID NO:150 (編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

caagttcaat tggtacagag cggggcagag gtgaagaaac ccggcgccag
tgttaaggtg tcctgcaaag ccagcggtta cagctttaca agctattgga
tgaattgggt gcgtcaagca ccagggcagg gtctggaatg ggctggggtg
atacatcctt ctgacagcga aacatggttg gaccagaaat ttaaagatcg
tgtgacaatt acagtcgata agtccacaag cactgcttac atggaactct
ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcgc cagagagcac
tacggcacat caccttttgc atactggggc cagggaactc tcgtaaccgt
atcctcc

【0132】 hPD-1 mAb 7 VL1的VL結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:151)顯示在下面(CDRH殘基以底線顯示)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRANESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL

LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY

TFGGGTKVEI K

【0133】 編碼hPD-1 mAb 7 VL1的示例性多核苷酸是SEQ ID NO:152 (編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

gaaatcgtac tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact
ctcagctgca gagcaaatga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaactggttt
cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcatccacg ccgcctctaa ccagggatct
ggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc

tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgc**cagc aatctaaaga ggtgccctat act**ttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa

【0134】 hPD-1 mAb 7 VL2的VL結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:153**)顯示在下面(CDRH殘基以底線顯示)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSC**RASESVD NYGMSFMN**WF QQKPGQPPKL LIH**AASNQGS** GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FC**QQSKEVPY T**FGGGTKVEI K

【0135】 編碼hPD-1 mAb 7 VL2的示例性多核苷酸是**SEQ ID NO:154** (編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

gaaatcgtac tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact ctcagctgc**a gagcaagtga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaac**tggttt cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcatccac**g ccgcctctaa ccagggatct** ggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgc**cagc aatctaaaga ggtgccctat act**ttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa

【0136】 hPD-1 mAb 7 VL3的VL結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:155**)顯示在下面(CDRH殘基以底線顯示)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSC**RASESVD NYGMSFMN**WF QQKPGQPPKL LIH**AASNRGS** GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FC**QQSKEVPY T**FGGGTKVEI K

【0137】 編碼hPD-1 mAb 7 VL3的示例性多核苷酸是**SEQ ID NO:156** (編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

gaaatcgtac tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact ctcagctgc**a gagcaagtga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaac**tggttt cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcatccac**g ccgcctctaa ccgcggatct** ggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgc**cagc aatctaaaga ggtgccctat act**ttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa

【0138】 hPD-1 mAb 7 VL2和hPD-1 mAb 7 VL3二者的VL結構域的CDRL1包括天冬醯胺至絲氨酸的氨基酸取代，並且具有氨基酸序列：RASESVDNYGMSFMN((SEQ ID NO:157)，取代的絲氨酸以底線顯示)。考慮類似的取代可併入到上述任何PD-1 mAb 7 CDRL1結構域中。

【0139】 另外，hPD-1 mAb 7 VL3的VL結構域的CDRL2包括穀氨醯胺至精氨酸的氨基酸取代，並且具有氨基酸序列：AASNRGS((SEQ ID NO:158)，取代的精氨酸以底線顯示)。考慮類似的取代可併入上述任何PD-1 mAb 7 CDRL2結構域中。

H. 鼠科抗人 PD-1 抗體 PD-1 mAb 8

【0140】 PD-1 mAb 8的VH結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:159)顯示在下面(CDRH殘基以底線顯示)。

EGQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKASGYTFT **DYYMN**WVKQN HGKSLEWIG**D INPKNGDTHY NQKFKG**EATL TVDKSSTTAY MELRSLTSED SAVYYCAS**DF DY**WGQGTTLT VSS

PD-1 mAb 8 的 CDRH1(**SEQ ID NO:161):DYYMN**

PD-1 mAb 8 的 CDRH2(**SEQ ID NO:162)：DINPKNGDTHYNQKFKG**

PD-1 mAb 8 的 CDRH3(**SEQ ID NO:163):DFDY**

【0141】 編碼PD-1 mAb 8的VH結構域的示例性多核苷酸是SEQ ID NO:160 (編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

gagggccagc tgcaacaatc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata tcctgtaagg cttctggata cacgttcact **gactactaca tgaac**tgggt gaagcagaac catggaaaga gccttgagtg gattgga**gat attaatccta aaaatggtga cactcactac aaccagaagt tcaagggc**ga ggccacattg actgtagaca agtcctccac cacagcctac atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc gagc**gatttt gactac**tggg gccaaggcac cactctcaca gtctcctcc

【0142】 PD-1 mAb 8的VL結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:164)顯示在下面(CDRL殘基以底線顯示)：

DVVMTQTPLS LPVGLGDQAS ISC**RSSQTLV YSNGNTYLN**W FLQKPGQSPK LLIY**KVSNRF S**GVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFC**SQSTHVP FT**FGSGTKLE IK

PD-1 mAb 8 的 CDRL1(**SEQ ID NO:166):RSSQTLVYSNGNTYLN**

PD-1 mAb 8 的 CDRL2(**SEQ ID NO:167):KVSNRFS**

PD-1 mAb 8 的 CDRL3(**SEQ ID NO:168):SQSTHVPFT**

【0143】 編碼PD-1 mAb 8的VL結構域的示例性多核苷酸是SEQ ID NO:165(編碼CDRL殘基的核苷酸以底線顯示)：

gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtcg gtcttggaga tcaagcctcc atctcttgc**a gatctagtca gacccttgta tatagtaatg gaaacaccta tttaaat**tgg ttcctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctcctgatct ac**aaagtttc caaccgattt tct**ggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgc**t ctcaaagtac acatgttcca ttcacg**ttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaa

I. 抗人 PD-1 抗體 PD-1 mAb 9

1. 鼠科抗人 PD-1 抗體 PD-1 mAb 9

【0144】 PD-1 mAb 9的VH結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:169)顯示在下面(CDRH殘基以底線顯示)。

EVMLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS **SYLVS**WVRQT PEKRLEWVA**T ISGGGGNTYY SDSVKG**RFTI SRDNAKNTLY LQISSLRSED TALYYCAR**YG FDGAWFAY**WG QGTLVTVSS

PD-1 mAb 9 的 CDRH1(**SEQ ID NO:171):SYLVS**

PD-1 mAb 9 的 CDRH2(**SEQ ID NO:172)：TISGGGGNTYYSDSVKG**

PD-1 mAb 9 的 CDRH3(**SEQ ID NO:173):YGFDGAWFAY**

【0145】 編碼PD-1 mAb 9的VH結構域的示例性多核苷酸是**SEQ ID NO:170** (編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

gaagtgatgc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt **agttatcttg tgtct**tgggt tcgccagact ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc **attagtggtg gtggtggtaa cacctactat tcagacagtg tgaagggt**cg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac ctgcaaatca gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagg**tatggt ttcgacggcg cctggtttgc ttac**tggggc caagggactc tggtcactgt

ctcttcc

【0146】 PD-1 mAb 9的VL結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:174)顯示在下面(CDRL殘基以底線顯示)：

DIQMTQSPAS LSASVGDIVT ITC**RASENIY SYLA**WYQQKQ EKSPQLLVY**N AKTLAA**GVPS RFSGSGSGTQ FSLTINSLQP EDFGNYYC**QH HYAVPWT**FGG

GTRLEIT

PD-1 mAb 9 的 CDRL1(**SEQ ID NO:176):RASENIYSYLA**

PD-1 mAb 9 的 CDRL2(**SEQ ID NO:177):NAKTLAA**

PD-1 mAb 9 的 CDRL3(**SEQ ID NO:178):QHHYAVPWT**

【0147】 編碼PD-1 mAb 9的VL結構域的示例性多核苷酸是SEQ ID NO:175(編碼CDRL殘基的核苷酸以底線顯示)：

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga tattgtcacc atcacatgt**c gagcaagtga gaatatttac agttatttag ca**tggtatca gcagaaacag gaaaaatctc ctcagctcct ggtctat**aat gcaaaaacct tggcagca**gg tgtgccatca aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttctctga ccatcaacag cctgcagcct gaagattttg ggaattatta ctgt**cagcat cattatgctg ttccgtggac g**ttcggtgga ggcaccagac tggaaatcac a

2. 人源化抗人 PD-1 抗體 PD-1 mAb9 以形成“hPD-1 mAb 9”

【0148】 當鑒定了抗原表位時，將上述鼠科抗人PD-1抗體PD-1 mAb 9人源化並且進一步去免疫化，以便表明人源化抗人PD-1抗體從而在施用至人接受者時降低其抗原性的能力。人源化產生兩個人源化的VH結構域，本文命名為“hPD-1 mAb 9 VH1”和“hPD-1 mAb 9 VH2”，和兩個人源化的VL結構域本文命名為“hPD-1 mAb 9 VL1”和“hPD-1 mAb 9 VL2”。任何人源化的VL結構域可與人源化的VH結構域配對。因此，包括與人源化的VH結構域配對的人源化的VL結構域之一的任何抗體一般稱為“hPD-1 mAb 9”，並且人源化的VH/VL結構域的具體組合通過參考特定的VH/VL結構域命名，例如包括hPD-1 mAb 9 VH1和hPD-1 mAb 9 VL2的人源化抗體具體稱為“hPD-1 mAb 9(1.2)”。

【0149】 hPD-1 mAb 9 VH1的VH結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:179**)顯示在下面(CDRH殘基以底線顯示)：

EVQLVESGGG LVRPGGSLKL SCAASGFTFS **SYLVS**WVRQA PGKGLEWVA**T ISGGGGNTYY SDSVKG**RFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TATYYCAR**YG FDGAWFAY**WG QGTLVTVSS

【0150】 編碼hPD-1 mAb 9 VH1的示例性多核苷酸是**SEQ ID NO:180** (編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

gaggtgcagc tggtggaaag tgggggcggc ctggtgcgac ccgggggaag tctgaaactg tcctgtgcag catcaggatt tacttttca **tcttatctcg tgtct**tgggt aagacaagca cccggaaaag gcttggaatg ggtggccact **atctccggtg gaggtggcaa cacctactat agcgacagtg tcaaggga**ag atttaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac ctccagatga actccctgcg cgccgaggac accgccacct attactgtgc acgc**tatgga tttgacggcg catggtttgc ctac**tgggga cagggcacat tggtaaccgt tagctcc

【0151】 hPD-1 mAb 9 VH2的VH結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:181**)顯示在下面(CDRH殘基以底線顯示)：

EVQLVESGGG LARPGGSLKL SCAASGFTFS **SYLVG**WVRQA PGKGLEWTA**T ISGGGGNTYY SDSVKG**RFTI SRDNAKNSLY LQMNSARAED TATYYCAR**YG FDGAWFAY**WG QGTLVTVSS

【0152】 編碼hPD-1 mAb 9 VH2的示例性多核苷酸是SEQ ID NO:182 (編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

gaggtgcagc tggtggaaag tgggggcggc ctggcgcgac ccgggggaag
tctgaaactg tcctgtgcag catcaggatt tacttttca **tcttatctcg**
tgggctgggt aagacaagca cccggaaaag gcttggaatg gacggcc**act**
atctccggtg gaggtggcaa cacctactat agcgacagtg tcaagggaag
atttaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac ctccagatga
actccgcacg cgccgaggac accgccacct attactgtgc acgc**tatgga**
tttgacggcg catggtttgc ctactgggga cagggcacat tggtaaccgt
tagctcc

【0153】 hPD-1 mAb 9 VH2的VH結構域的CDRH1包括絲氨酸至甘氨酸的氨基酸取代，並且具有氨基酸序列：SYLV**G**((**SEQ ID NO:183**)，取代的甘氨酸以底線顯示)。考慮類似的取代可併入上述任何PD-1 mAb 9 CDRH1結構域中。

【0154】 hPD-1 mAb 9 VL1的VL結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:184**)顯示在下面(CDRH殘基以底線顯示)：

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITC**RASENIY SYLA**WYQQKP GKAPKLLIY**N AKTLAA**GVPS
RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYC**QH HYAVPWT**FGQ
GTKLEIK

【0155】 編碼hPD-1 mAb 9 VL1的示例性多核苷酸是**SEQ ID NO:185** (編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtgggga tcgggtcacc
atcacctgc**c gtgcctcaga aaacatctat tcatacctcg cc**tggtatca acagaaacct
ggtaaagccc caaaattgct catttac**aac gccaagaccc tcgcagct**gg cgtgccaagt
aggttctcag gcagcggctc agggacagat ttcaccctca ccatatcctc actgcagccc
gaggattttg ccacttacta ctgc**cagcat cattacgcag tgccctggac c**ttcggacaa
ggcactaagc tcgagatcaa a

【0156】 hPD-1 mAb 9 VL2的VL結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:186**)顯示在下面(CDRH殘基以底線顯示)：

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITC**RASENIY NYLA**WYQQKP GKAPKLLIY**D AKTLAA**GVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYC**QH HYAVPWT**FGQ GTKLEIK

【0157】 編碼hPD-1 mAb 9 VL2的示例性多核苷酸是SEQ ID NO:187 (編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtgggga tcgggtcacc atcacctgc**c gtgcctcaga aaacatctat aactacctcg cc**tggtatca acagaaacct ggtaaagccc caaaattgct catttac**gac gccaagaccc tcgcagct**gg cgtgccaagt aggttctcag gcagcggctc agggacagat ttcaccctca ccatatcctc actgcagccc gaggattttg ccacttacta ctgc**cagcat cattacgcag tgccctggac c**ttcggacaa ggcactaagc tcgagatcaa a

【0158】 hPD-1 mAb 9 VL2的VL結構域的CDR$_L$1包括絲氨酸至天冬醯胺的氨基酸取代，並且具有氨基酸序列：RASENIY**N**YLA (**SEQ ID NO:188**)，取代的天冬醯胺以底線顯示)。考慮類似的取代可併入上述任何PD-1 mAb 9 CDR$_L$1結構域中。

【0159】 hPD-1 mAb 9 VL2的VL結構域的CDRL2包括天冬醯胺至天冬氨酸的氨基酸取代，並且具有氨基酸序列：DAKTLAA ((SEQ ID NO:189)，取代的天冬氨酸以底線顯示)。考慮類似的取代可併入上述任何PD-1 mAb 7 CDRL2結構域中。

J. 鼠科抗人 PD-1 抗體 PD-1 mAb 10

【0160】 PD-1 mAb 10的VH結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:190)顯示在下面(CDRH殘 基以底線顯示)。

EVILVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS **NYLMS**WVRQT PEKRLEWVA**S** **ISGGGSNIYY PDSVKG**RFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRSED TALYYCAR**QE** **LAFDY**WGQGT TLTVSS

PD-1 mAb 10的CDRH1(**SEQ ID NO:192**):**NYLMS**

PD-1 mAb 10 的 CDRH2(**SEQ ID NO:193**)：**SISGGGSNIYYPDSVKG**

PD-1 mAb 10 的 CDRH3(**SEQ ID NO:194**):**QELAFDY**

【0161】 編碼PD-1 mAb 10的VH結構域的示例性多核苷酸是SEQ ID NO:191 (編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

gaagtgatac tggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt **aactatctca tgtct**tgggt tcgccagact ccggagaaga ggctggagtg ggtcgca**agt attagtggtg gtggtagtaa tatctactat ccagacagtg tgaagggt**cg attcaccata tccagggaca atgccaagaa caccctgtac ctgcaaatga acagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aaga**caagaa ctggcttttg actac**tgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcc

【0162】 PD-1 mAb 10的VL結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:195)顯示在下面(CDR$_L$殘基以底線顯示)：

DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISC**RTSQDIS NFLN**WYQQKP DGTIKLLIY**Y TSRLHS**GVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFC**QQ GSTLPWT**FGG GTKLEII

PD-1 mAb 10的CDRL1(**SEQ ID NO:197):RTSQDISNFLN**

PD-1 mAb 10的CDRL2(**SEQ ID NO:198):YTSRLHS**

PD-1 mAb 10的CDRL3(**SEQ ID NO:199):QQGSTLPWT**

【0163】 編碼PD-1 mAb 10的VL結構域的示例性多核苷酸是SEQ ID NO:196(編碼CDRL殘基的核苷酸以底線顯示)：

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc atcagttgc**a ggacaagtca ggacattagc aatttttaa ac**tggtatca gcagaaacca gatggaacta ttaaactcct gatctac**tac acatcaagat tacactca**gg agtcccatca aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa gaagatattg ccacttactt ttgc**caacag ggtagtacgc ttccgtggac g**ttcggtgga ggcaccaagc tggaaatcat a

K. 鼠科抗人 PD-1 抗體 PD-1 mAb 11

【0164】 PD-1 mAb 11的VH結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:200)顯示在下面(CDRH殘基以底線顯示)。

EVQLQQSGTV LARPGASVKM SCKTSGYTFT **GYWMH**WVKQR PGQGLKWMG**A IYPGNSDTHY NQKFKG**KAKL TAVTSASTAY MELSSLTNED SAIYYCTT**GT YSYFDV**WGTG TTVTVSS

PD-1 mAb 11的CDRH1(SEQ ID NO:202):GYWMH

PD-1 mAb 11的CDRH2(SEQ ID NO:203)：AIYPGNSDTHYNQKFKG

PD-1 mAb 11的CDRH3(SEQ ID NO:204):GTYSYFDV

【0165】 編碼PD-1 mAb 11的VH結構域的示例性多核苷酸是**SEQ ID NO:201** (編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

gaggttcagc tccagcagtc tgggactgtg ctggcaaggc ctggggcttc agtgaagatg tcctgcaaga cttctggcta cacatttacc **ggctactgga tgcac**tgggt aaaacagagg cctggacagg gtctgaaatg gatgggg**gct atttatcctg gaaatagtga tactcactac aaccagaagt tcaagggc**aa ggccaaactg actgcagtca catccgccag cactgcctac atggagctca gcagcctgac aaatgaggac tctgcgatct attactgtac tact**gggacc tactcgtact tcgatgtc**tg gggcacaggg accacggtca ccgtctcctc a

【0166】 PD-1 mAb 11的VL結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:205**)顯示在下面(CDR$_L$殘基以底線顯示)：

DILLTQSPAI LSVSPGERVS FSC**RASQSIG TSIH**WYQHRT NGSPRLLIK**Y ASESIS**GIPS RFSGSGSGTD FTLSINSVES EDIADYYC**QQ SNSWLT**FGAG TKLELK

PD-1 mAb 11的CDRL1(SEQ ID NO:207):RASQSIGTSIH

PD-1 mAb 11的CDRL2(SEQ ID NO:208):YASESIS

PD-1 mAb 11的CDRL3(SEQ ID NO:209):QQSNSWLT

【0167】 編碼PD-1 mAb 11的VL結構域的示例性多核苷酸是**SEQ ID NO:206**(編碼CDR$_L$殘基的核苷酸以底線顯示)：

gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga aagagtcagt ttctcctgc**a gggccagtca gagcattggc acaagcatac ac**tggtatca gcacagaaca aatggttctc caaggcttct cataaag**tat gcttctgagt ctatctct**gg gatcccttcc

aggtttagtg gcagtggatc agggactgat tttactctta gcatcaacag tgtggagtct gaagatattg cagattatta ctgtcaacaa agtaatagct ggctcacgtt cggtgctggg accaagctgg agctgaaa

L. 鼠科抗人 PD-1 抗體 PD-1 mAb 12

【0168】 PD-1 mAb 12的VH結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:210**)顯示在下面(CDRH殘基以底線顯示)。

QGHLQQSGAE LVRPGASVTL SCKASGFTFT **DYEMH**WVKQT PVHGLEWIG**T IDPETGGTAY NQKFKG**KAIL TVDKSSTTTY MELRSLTSED SAVFYCSR**ER ITTVVEGAYW YFDV**WGTGTT VTVSS

PD-1 mAb 12的CDRH1(**SEQ ID NO:212**):**DYEMH**

PD-1 mAb 12的CDRH2(**SEQ ID NO:213**)：**TIDPETGGTAYNQKFKG**

PD-1 mAb 12的CDRH3(**SEQ ID NO:214**):**ERITTVVEGAYWYFDV**

【0169】 編碼PD-1 mAb 12的VH結構域的示例性多核苷酸是**SEQ ID NO:211** (編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

cagggtcacc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg tcctgcaagg cttcgggctt cacatttact **gactatgaga tgcac**tgggt gaaacagaca cctgtgcatg gcctggaatg gattggg**act attgatcctg aaactggtgg tactgcctac aatcagaagt tcaagggc**aa ggccatactg acagtagaca aatcttccac tacaacctac atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct tttattgttc aaga**gagagg attactacgg ttgttgaggg ggcatactgg tacttcgatg tc**tggggcac agggaccacg gtcaccgtct cctca

【0170】 PD-1 mAb 4的VL結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:215**)顯示在下面(CDR$_L$殘基以底線顯示)：

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISC**RSSQNIV HSNGNTYLE**W YLQKPGQSPK LLIC**KVSTRF S**GVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYC**FQGSHVP YT**FGGGTKLE IK

PD-1 mAb 12的CDRL1(**SEQ ID NO:217**):**RSSQNIVHSNGNTYLE**

PD-1 mAb 12的CDRL2(**SEQ ID NO:218**):**KVSTRFS**

PD-1 mAb 12的CDRL3(**SEQ ID NO:219**):**FQGSHVPYT**

【0171】 編碼PD-1 mAb 12的VL結構域的示例性多核苷酸是**SEQ ID NO:216**(編碼CDR_L殘基的核苷酸以底線顯示)：

gatgttttga tgacccagac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc atctcttgca gatctagtca gaacattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctcctgatct gcaaagtttc cacccgattt tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattattgct ttcaaggttc acatgttccg tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa

M. 鼠科抗人 PD-1 抗體 PD-1 mAb 13

【0172】 PD-1 mAb 13的VH結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:220**)顯示在下面(CDRH殘基以底線顯示)。

EVMLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS SHTMSWVRQT PEKRLEWVAT ISGGGSNIYY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLRSED TALYYCARQA YYGNYWYFDV WGTGTTVTVS S

PD-1 mAb 13的CDRH1(**SEQ ID NO:222**):**SHTMS**

PD-1 mAb 13的CDRH2(**SEQ ID NO:223**)：**TISGGGSNIYYPDSVKG**

PD-1 mAb 13的CDRH3(**SEQ ID NO:224**):**QAYYGNYWYFDV**

【0173】 編碼PD-1 mAb 13的VH結構域的示例性多核苷酸是**SEQ ID NO:221** (編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

gaagtgatgc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agccatacca tgtcttgggt tcgccagact ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtggtg gtggttctaa tatctactat ccagacagtg tgaagggtcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagacaagct tactacggta attactggta cttcgatgtc tggggcacag ggaccacggt caccgtctcc tcc

【0174】 PD-1 mAb 13的VL結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:225**)顯示在下面(CDR$_L$殘基以底線顯示)：

DIQMTQSPAT QSASLGESVT ITC**LASQTIG TWLA**WYQQKP GKSPQLLIY**A**
ATSLADGVPS RFSGSGSGTK FSFKISSLQA EDFVSYYC**QQ LDSIPWT**FGG GTKLEIK

PD-1 mAb 13的CDRL1(**SEQ ID NO:227**):**LASQTIGTWLA**

PD-1 mAb 13的CDRL2(**SEQ ID NO:228**):**AATSLAD**

PD-1 mAb 13的CDRL3(**SEQ ID NO:229**):**QQLDSIPWT**

【0175】 編碼PD-1 mAb 13的VL結構域的示例性多核苷酸是**SEQ ID NO:226**(編碼CDR$_L$殘基的核苷酸以底線顯示)：

gacattcaga tgacccagtc tcctgccacc cagtctgcat ctctgggaga aagtgtcacc
atcacgtgc**c tggcaagtca gaccattggt acatggttag ca**tggtatca gcagaaacca
gggaaatctc ctcagctcct gatttat**gct gcaaccagct tggcagat**gg ggtcccatca
aggttcagtg gtagtggatc tggcacaaaa ttttctttca agatcagcag cctacaggct
gaagattttg taagttatta ctgt**caacaa cttgacagta ttccgtggac g**ttcggtgga
ggcaccaagc tggaaatcaa a

N. 鼠科抗人 PD-1 抗體 PD-1 mAb 14

【0176】 PD-1 mAb 14的VH結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:230**)顯示在下面(CDRH殘基以底線顯示)。

QVQLQQPGAE LVKPGASVKM SCKASGYNFI **SYWIT**WVKQR PGQGLQWIG**N IYPGTDGTTY**
NEKFKSKATL TVDTSSSTAY MHLSRLTSED SAVYYCAT**GL HWYFDV**WGTG TTVTVSS

PD-1 mAb 14的CDRH1(**SEQ ID NO:232**):**SYWIT**

PD-1 mAb 14的CDRH2(**SEQ ID NO:233**)：**NIYPGTDGTTYNEKFKS**

PD-1 mAb 14的CDRH3(**SEQ ID NO:234**):**GLHWYFDV**

【0177】 編碼PD-1 mAb 14的VH結構域的示例性多核苷酸是**SEQ ID NO:231** (編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggcttc agtgaagatg

tcctgcaagg cttctggcta caacttcatc **agctactgga taacc**tgggt gaaacagagg cctggacaag gccttcagtg gattgga**at atttatcctg gtactgatgg tactacctac aatgagaagt tcaagagc**aa ggccacactg actgtagaca catcctccag cacagcctac atgcacctca gtcgcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aact**gggcta cactggtact tcgatgtc**tg gggcacaggg accacggtca ccgtctcctc c

【0178】 PD-1 mAb 14的VL結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:235**)顯示在下面(CDR$_L$殘基以底線顯示)：

DIVMTQSQKF MSTSVGDRVS VTC**KASQSVG TNVA**WYQQKP GQSPKALIY**S ASSRFS**GVPD RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLAEYFC**QQ YNSYPYT**FGG GTKLEIK

PD-1 mAb 14的CDRL1(**SEQ ID NO:237**)**:KASQSVGTNVA**

PD-1 mAb 14的CDRL2(**SEQ ID NO:238**)**:SASSRFS**

PD-1 mAb 14的CDRL3(**SEQ ID NO:239**)**:QQYNSYPYT**

【0179】 編碼PD-1 mAb 14的VL結構域的示例性多核苷酸是**SEQ ID NO:236**(編碼CDR$_L$殘基的核苷酸以底線顯示)：

gacattgtga tgacccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagt gtcacctgc**a aggccagtca gagtgtgggt actaatgtag cc**tggtatca acagaagccc ggtcaatctc ctaaagcact gatttac**tcg gcatcctccc gattcagt**gg cgtccctgat cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagtaa tgtgcagtct gaagacttgg cagagtattt ctgt**cagcaa tataacagct atccgtacac g**ttcggaggg gggaccaagc tggaaataaa a

O. 抗人 PD-1 抗體 PD-1 mAb 15

1. 鼠科抗人 PD-1 抗體 PD-1 mAb 15

【0180】 PD-1 mAb 15的VH結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:240**)顯示在下面(CDRH殘基以底線顯示)。

EVMLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFIFS **SYLIS**WVRQT PEKRLEWVA**A ISGGGADTYY ADSVKG**RFTI SRDNAKNTLY LQMSSLRSED TALYYCTR**RG TYAMDY**WGQG TSVTVSS

PD-1 mAb 15的CDRH1(**SEQ ID NO:242**):**SYLIS**

PD-1 mAb 15的CDRH2(**SEQ ID NO:243**)：**AISGGGADTYYADSVKG**

PD-1 mAb 15的CDRH3(**SEQ ID NO:244**):**RGTYAMDY**

【0181】 編碼PD-1 mAb 15的VH結構域的示例性多核苷酸是SEQ ID NO:241 (編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

gaagtgatgc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc tcctgtgcag cctctggatt cattttcagt **agctatctca tctct**tgggt tcgccagact ccggagaaga ggctggagtg ggtcgct**gcc attagtggtg gtggtgctga cacctactat gccgacagtg tgaagggt**cg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtat ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccttat attactgtac aaga**cgaggg acctatgcta tggactac**tg gggtcaagga acctcagtca ccgtctcctc c

【0182】 PD-1 mAb 15的VL結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:245)顯示在下面(CDRL殘基以底線顯示)：

DIQMTQSPAS QSASLGESVT ITC**LASQTIG TWLA**WYQQKP GKSPQLLIY**A ATSLAD**GVPS RFSGSGSGTK FSFKISSLQA EDFVNYYC**QQ LYSIPWT**FGG GTKLEIK

PD-1 mAb 15 的 CDR_L1(**SEQ ID NO:247**):**LASQTIGTWLA**

PD-1 mAb 15 的 CDR_L2(**SEQ ID NO:248**):**AATSLAD**

PD-1 mAb 15 的 CDR_L3(**SEQ ID NO:249**):**QQLYSIPWT**

【0183】 編碼PD-1 mAb 15的VL結構域的示例性多核苷酸是SEQ ID NO:246(編碼CDRL殘基的核苷酸以底線顯示)：

gacattcaga tgacccagtc tcccgcctcc cagtctgcat ctctgggaga aagtgtcacc atcacatgc**c tggcaagtca gaccattggt acatggttag ca**tggtatca gcagaaacca gggaaatctc ctcagctcct gatttat**gct gcaaccagct tggcagat**gg ggtcccatca aggttcagtg gtagtggatc tggcacaaaa ttttctttca agatcagcag cctacaggct gaagattttg taaattatta ctgt**caacaa ctttacagta ttccgtggac g**ttcggtgga ggcaccaagc tggaaatcaa a

2. 人源化抗人 PD-1 抗體 PD-1 mAb 15 以形成“hPD-1 mAb 15”

【0184】 當鑒定了抗原表位時，將上述鼠科抗人PD-1抗體PD-1 mAb 15人源化並且進一步去免疫化，以便表明人源化抗人PD-1抗體從而在施用至人接受者時降低其抗原性的能力。人源化產生一個人源化的VH結構域，本文命名為“**hPD-1 mAb 2 VH1**”，和一個人源化的VL結構域本文命名為“**hPD-1 mAb 1 VL1**”。包括與人源化的VH結構域配對的人源化的VL結構域的抗體被稱為“**hPD-1 mAb 15**”。

【0185】 hPD-1 mAb 15 VH1的VH結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:250**)顯示在下面(CDRH殘基以底線顯示)：

EVQLVESGGG LVRPGGSLRL SCAASGFTFS **SYLIS**WVRQA PGKGLEWVA**A ISGGGADTYY ADSVKG**RFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TATYYCAR**RG TYAMDY**WGQG TLVTVSS

【0186】 編碼hPD-1 mAb 15 VH1的示例性多核苷酸是**SEQ ID NO:251** (編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

gaagtgcaac tggttgaaag tggcggcggg ctggtgcggc caggtggttc actcagactg tcttgtgcag cttcaggctt tacattctcc **tcttatctta tctct**tgggt gcgccaagcc ccaggtaagg gccttgaatg ggtc**gccgcc attagtgggg gtggtgccga tacatattat gccgacagcg tcaaggga**cg tttcaccatc agcagggaca acgccaagaa tagcctttac ctgcagatga actcacttag agctgaagac accgctactt attactgtgc ccgg**cgcggg acttacgcta tggactat**tg gggccagggc accttggtca ctgtctcatc c

【0187】 hPD-1 mAb 15 VL1的VH結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:252**)顯示在下面(CDRH殘基以底線顯示)：

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITC**LASQTIG TWLA**WYQQKP GKAPKLLIY**A ATSLAD**GVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDFATYYC**QQ LYSIPWT**FGQ GTKLEIK

【0188】 編碼hPD-1 mAb 15 VL1的示例性多核苷酸是**SEQ ID NO:253** (編碼CDRH殘基的核苷酸以底線顯示)：

gatatccaga tgacccagtc tcccagctct ctcagtgcaa gcgtaggcga ccgtgtgacc atcacctgt**c tggccagtca gaccattgga acctggctcg cc**tggtatca gcagaaacct ggcaaggccc ctaagctgct gatttacgcc **gccacctccc tcgcagat**gg agtgccctcc

cgatttagcg ggtccgggtc cggcaccgac ttcacattca caatcagcag cctccagccc gaggatttcg ctacatacta ctgtcaacag ctctactcca ttccatggac ctttggtcag ggtactaaac tggagatcaa a

IV. 抗人 PD-1 抗體 PD-1 mAb 1-15 以及它們具有工程化的 Fc 區域的衍生物

【0189】 在傳統的免疫功能中，抗體-抗原複合物與免疫系統的細胞的相互作用產生各種各樣的應答，範圍從效應子功能，比如抗體依賴性細胞毒性、肥大細胞脫粒和吞噬，到免疫調節信號，比如調節淋巴細胞增殖和抗體分泌。所有這些相互作用通過抗體或免疫複合物的Fc區與造血細胞上專用細胞表面受體的結合來啟動。由抗體和免疫複合物引發的細胞應答的多樣性由三種Fc受體：FcγRI (CD64)、FcγRII (CD32)和FcγRIII (CD16)的結構異質性造成。FcγRI (CD64)、FcγRIIA (CD32A)和FcγRIII (CD16)是啟動(即，免疫系統增強)性受體；FcγRIIB (CD32B)是抑制(即，免疫系統抑制)性受體。另外，與新生Fc受體(FcRn)的相互作用介導IgG分子從內體至細胞表面的再迴圈並且釋放進入血液中。上面呈現了示例性野生型IgG1 (**SEQ ID NO:1**)、IgG2 (**SEQ ID NO:2**)、IgG3 (**SEQ ID NO:3**)和IgG4 (**SEQ ID NO:4**)的氨基酸序列。

【0190】 Fc區域的修飾通常導致改變的表型，例如改變的血清半衰期、改變的穩定性、改變的對細胞酶的易感性或改變的效應子功能。就效應子功能而言，可期望修飾本發明的抗體或其他結合分子，例如，以便增強這樣的分子在治療癌中的有效性。在某些情況下，期望降低或消除效應子功能，例如在抗體的作用機制涉及阻斷或對抗但不是殺傷攜帶靶抗原的細胞的情況下。當被引導至不期望的細胞諸如其中FcγR以低水準表達的腫瘤和外源細胞時，例如具有低水準FcγRIIB的腫瘤-特異性B細胞(例如，非霍奇金淋巴瘤、CLL和伯基特淋巴瘤)，提高的效應子功能通常是期望的。在所述實施方式中，具有賦予的或改變

的效應子功能活性的本發明的分子可用于治療和/或預防疾病、病症或感染，其中增強的效應子功能活性的功效是期望的。

【0191】 在某些實施方式中，本發明的PD-1結合分子包括Fc區域，其具有對野生型Fc區域(例如，**SEQ ID NO:1**)的氨基酸序列的一個或多個修飾(例如，取代、缺失或插入)，所述修飾降低Fc區域的親和力和親合力，從而降低了本發明的分子對一個或多個FcγR受體的親和力和親合力。在其他實施方式中，本發明的分子包括這樣的Fc區域，其具有對野生型Fc區域的氨基酸的一個或多個修飾，所述修飾提高了Fc區域的親和力和親合力，因此提高了本發明的分子對一個或多個FcγR受體的親和力和親合力。在其他實施方式中，分子包括變異的Fc區域，其中相對於不包括Fc區域或包括野生型Fc區域的分子，所述變體賦予或介導提高的抗體依賴性細胞介導的細胞毒性(ADCC)活性和/或與FcγRIIA增加的結合。在可選的實施方式中，分子包括變異的Fc區域，其中相對於不包括Fc區域或包括野生型Fc區域的分子，所述變體賦予或介導降低的ADCC活性(或其他效應子功能)和/或與FcγRIIB增加的結合。在一些實施方式中，本發明包括這樣的PD-1結合分子，其包括變異的Fc區域，該變異的Fc區域相對於包括野生型Fc區域的相當的分子，不顯示可檢測的與任何FcγR的結合。在其他實施方式中，本發明包括這樣的PD-1結合分子，其包括變異的Fc區域，該變異的Fc區域僅僅結合單FcγR，優選地結合FcγRIIA、FcγRIIB或FcγRIIIA之一。任意這樣的增加的親和力和/或親合力均優選通過體外測量對細胞中的FcγR可檢測的結合程度或FcγR相關活性而評估，所述細胞在親本分子(沒有修飾的Fc區)的結合活性不能在細胞中被檢測到時表達低水準FcγR，或者所述細胞以以下密度表達非FcγR受體靶抗原：密度為30,000至20,000分子/細胞、密度為20,000至10,000分子/細胞、密度為10,000至5,000分子/細胞、密度為5,000至1,000分子/細胞、密度為1,000至200

分子/細胞或密度為200分子/細胞或更小(但是至少為10、50、100或150分子/細胞)。

【0192】 本發明的PD-1結合分子可包括變異的Fc區域，所述變異的Fc區域對於啟動性和/或抑制性Fcγ受體具有改變的親和力。在一個實施方式中，PD-1結合分子包括變異的Fc區域，所述變異的Fc區域相對於具有野生型Fc區域的相當的分子，對於FcγRIIB具有增加的親和力和對於FcγRIIIA和/或FcγRIIA具有降低的親和力。在另一實施方式中，本發明的PD-1結合分子包括變異的Fc區域，所述變異的Fc區域相對於具有野生型Fc區域的相當的分子，對於FcγRIIB具有降低的親和力和對於FcγRIIIA和/或FcγRIIA具有增加親和力。在仍另一實施方式中，本發明的PD-1結合分子包括變異的Fc區域，所述變異的Fc區域相對於具有野生型Fc區域的相當的分子，對於FcγRIIB具有降低的親和力和對於FcγRIIIA和/或FcγRIIA具有降低的親和力。在仍另一實施方式中，本發明的PD-1結合分子包括變異的Fc區域，其相對於具有野生型Fc區域的相當的分子，對於FcγRIIB具有不變的親和力和對於FcγRIIIA和/或FcγRIIA具有降低的(或增加的)親和力。

【0193】 在某些實施方式中，本發明的PD-1結合分子包括變異的Fc區域，其對於FcγRIIIA和/或FcγRIIA具有改變的親和力，使得免疫球蛋白具有增強的效應子功能。效應細胞功能的非限制性例子包括抗體依賴性細胞介導的細胞毒性、抗體依賴性吞噬、吞噬、調理作用、調理吞噬、細胞結合、玫瑰花結(rosetting)、C1q結合和補體依賴性細胞介導的細胞毒性。

【0194】 在優選的實施方式中，相對於包括野生型Fc區域的相當的分子，親和力或效應子功能的改變是至少2倍、優選地至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少50倍或至少100倍。在本發明的其他實施方式中，相對於包括野生型Fc區域的分子，變異的Fc區域以至少65%，優選地至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、

200%、225%或250%更大的親和力免疫特異性結合一個或多個FcR。這類測量可以是體內或體外試驗，在優選的實施方式中是體外試驗，比如ELISA或表面等離子共振試驗。

【0195】 在不同的實施方式中，本發明的PD-1結合分子包括變異的Fc區域，其中所述變體激動(agonize)FcγR受體的至少一種活性或對抗FcγR受體的至少一種活性。在優選的實施方式中，分子包括這樣的變體：其對抗FcγRIIB的一種或多種活性，例如，B細胞受體-介導的信號傳導、B細胞的啟動、B細胞增殖、抗體產生、B細胞的細胞內鈣流入、細胞週期進程、FcγRIIB-介導的對FcεRI信號傳導的抑制、FcγRIIB的磷酸化、SHIP募集、SHIP磷酸化和與Shc的締合或一個或多個下游分子(例如，MAP激酶、JNK、p38或Akt)在FcγRIIB信號轉導途徑中的活性。在另一實施方式中，本發明的PD-1結合分子包括變體，其激動FcεRI的一種或多種活性，例如，肥大細胞啟動、鈣動員、脫粒、細胞因數產生或5-羥色胺釋放。

【0196】 在某些實施方式中，分子包括Fc區，其包括來自兩個或更多個IgG同種型(例如，IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)的區域。如本文所使用，相對於其他IgG同種型，如果Fc區的氨基酸序列與特定的IgG同種型最同源，則認為Fc區具有該IgG同種型。由於它們的鉸鏈和/或Fc區的氨基酸序列的差異，各種IgG同種型展示不同的物理和功能特性，包括血清半衰期、補體結合、FcγR結合親和力和效應子功能活性(例如，ADCC、CDC等)，例如在Flesch and Neppert (1999) J. Clin. Lab. Anal. 14:141-156；Chappel等(1993) J. Biol. Chem. 33:25124-25131；Chappel等(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:9036-9040;或Brüggemann等(1987) J. Exp. Med 166:1351-1361中描述。該類型的變異的Fc區可單獨使用或組合氨基酸修飾使用，以影響Fc-介導的效應子功能和/或結合活性。在組合中，相對於包括野生型Fc區的本發明分子，氨基酸修飾和IgG鉸鏈/Fc區可展示類似的功能(例

如，對FcγRIIA提高的親和力)並可另外或更優選協同作用，以修飾本發明分子中的效應子功能。在其他實施方式中，相對於不包括Fc區或包括相同同種型的野生型Fc區的本發明分子，氨基酸修飾和IgG Fc區可展示相反的功能(例如，分別對FcγRIIA提高的和降低的親和力)並可發揮作用，以選擇減輕和或降低本發明分子的特定功能。

【0197】 在優選的具體實施方式中，本發明的PD-1結合分子包括變異的Fc區域，其中所述變異的Fc區相對於野生型Fc區包括至少一個氨基酸的修飾，以便所述分子對FcR具有改變的親和力，條件是基於諸如由Sondermann等 (2000) Nature 406:267-73公開的Fc-FcR相互作用的晶體學和結構分析，所述變異Fc區在直接接觸FcγR的位置不具有取代。Fc區中直接接觸FcγR的位置的實例是氨基酸殘基234-239、氨基酸殘基265-269 (B/C 環)、氨基酸殘基297-299 (C'/E環)和氨基酸殘基327-332 (F/G環)。在一些實施方式中，本發明的分子包括變異的Fc區，其包括至少一個殘基的修飾，所述殘基基於結構和晶體學分析不直接接觸FcγR，例如不在Fc-FcγR結合位點內。

【0198】 變異的Fc區域是本領域熟知的，並且可在本發明中使用任何已知的變異的Fc區，以賦予或修飾包括Fc區(或其部分)的本發明的分子展示的效應子功能，如在例如NK依賴性或巨噬細胞依賴性試驗中功能測定的。例如，PCT公開 號WO 04/063351、WO 06/088494、WO 07/024249、WO 06/113665、WO 07/021841、WO 07/106707和WO 2008/140603中公開了鑒定為改變效應子功能的Fc區變體，並且，其中公開的任何合適的變體均可用于本發明的分子中。

【0199】 在某些實施方式中，本發明的PD-1結合分子包括變異的Fc區域，其在一個或多個區域中具有一個或多個氨基酸修飾，該修飾(相對於野生型Fc區域)改變了變異的Fc區域對於啟動性FcγR (比如FcγRIIA或FcγRIIIA)相對於抑制性FcγR (比如FcγRIIB)的**親和力的比例**：

$$\text{親和力比} = \frac{\text{在對Fc}\gamma\text{R}_{\text{活化}}\text{的親和力中野生型至變體改變}}{\text{在對Fc}\gamma\text{R}_{\text{抑制}}\text{的親和力中野生型至變體改變}}$$

【0200】 尤其優選的是本發明的PD-1結合分子，其具有變異的Fc區域(相對於野生型Fc區域)，其中變異的Fc區域的親和力的比例大於1。這樣的分子在提供其中期望由FcγR介導的效應細胞功能(例如，ADCC)的增強的功效的疾病、病症或感染，例如癌或感染性疾病，的療法或預防療法或其症狀的改善方面具有特別的用途。相比之下，親和力比例小於1的變異的Fc區介導降低的效應細胞功能的效力。根據其親和力比是否大於或小於1，表1列出了示例性單、雙、三、四和五突變。

表 1
按照親和力的比例列舉的示例性單突變和多突變

單	雙	三	四	五
親和力的比例> 1				
F243L	F243L & R292P	F243L、P247L & N421K	L234F、F243L、R292P & Y300L	L235V、F243L、R292P、Y300L & P396L
D270E	F243L & Y300L	F243L、R292P & Y300L	L235I、F243L、R292P & Y300L	L235P、F243L、R292P、Y300L & P396L
R292G	F243L & P396L	F243L、R292P & V305I	L235Q、F243L、R292P & Y300L	F243L、R292P、V305I、Y300L & P396L
R292P	D270E & P396L	F243L、R292P & P396L	F243L、P247L、D270E & N421K	
	R292P & Y300L	F243L、Y300L & P396L	F243L、R255L、D270E & P396L	
	R292P & V305I	P247L、D270E & N421K	F243L、D270E、G316D & R416G	
	R292P & P396L	R255L、D270E & P396L	F243L、D270E、K392T & P396L	
	Y300L & P396L	D270E、G316D & R416G	F243L、D270E、P396L & Q419H	
	P396L & Q419H	D270E、K392T & P396L	F243L、R292P、Y300L、& P396L	
		D270E、P396L &	F243L、R292P、	

表 1 按照親和力的比例列舉的示例性單突變和多突變				
單	雙	三	四	五
		Q419H	V305I & P396L	
		V284M、R292L & K370N	P247L、D270E、Y300L & N421K	
		R292P、Y300L & P396L	R255L、D270E、R292G & P396L	
			R255L、D270E、Y300L & P396L	
			D270E、G316D、P396L & R416G	
親合力的比例< 1				
Y300L	F243L & P396L	F243L、R292P & V305I		
P396L	P247L & N421K			
	R255L & P396L			
	R292P & V305I			
	K392T & P396L			
	P396L & Q419H			

【0201】 在具體的實施方式中，在變異的Fc區域中，任何氨基酸修飾(例如，取代)在下述任何位置：235、240、241、243、244、247、262、263、269、298、328或330，優選地下述殘基的一個或多個：A240、I240、L241、L243、H244、N298、I328或V330。在不同的具體實施方式中，在變異的Fc區域中，任何氨基酸修飾(例如，取代)在任何下述位置：268、269、270、272、276、278、283、285、286、289、292、293、301、303、305、307、309、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、416、419、430、434、435、437、438或439，優選地下述殘基的一個或多個：H280、Q280、Y280、G290、S290、T290、Y290、N294、K295、P296、D298、N298、P298、V298、I300或L300。

【0202】 在優選的實施方式中，在以改變的親和力結合FcγR的變異的Fc區域中，任何氨基酸修飾(例如，取代)在下述任何位置：255、256、258、267、

268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、300、301、303、305、307、309、312、320、322、326、329、330、332、331、333、334、335、337、338、339、340、359、360、373、376、416、419、430、434、435、437、438或439。優選地，變異的Fc區域具有任何下述殘基：A256、N268、Q272、D286、Q286、S286、A290、S290、A298、M301、A312、E320、M320、Q320、R320、E322、A326、D326、E326、N326、S326、K330、T339、A333、A334、E334、H334、L334、M334、Q334、V334、K335、Q335、A359、A360或A430。

【0203】 在不同的實施方式中，在以降低親和力的結合FcγR (經其Fc區域)的變異的Fc區域中，任何氨基酸修飾(例如，取代)在下述任何位置：252、254、265、268、269、270、278、289、292、293、294、295、296、298、300、301、303、322、324、327、329、333、335、338、340、373、376、382、388、389、414、416、419、434、435、437、438或439。

【0204】 在不同的實施方式中，在以增強的親和力結合FcγR (經其Fc區域)的變異的Fc區域中，任何氨基酸修飾(例如，取代)在下述任何位置：280、283、285、286、290、294、295、298、300、301、305、307、309、312、315、331、333、334、337、340、360、378、398或430。在不同的實施方式中，在以增強的親和力結合FcγRIIA的變異的Fc區域，任何下述殘基：A255、A256、A258、A267、A268、N268、A272、Q272、A276、A280、A283、A285、A286、D286、Q286、S286、A290、S290、M301、E320、M320、Q320、R320、E322、A326、D326、E326、S326、K330、A331、Q335、A337或A430。

【0205】 優選的變體包括在下述任何位置的一個或多個修飾：228、230、231、232、233、234、235、239、240、241、243、244、245、247、262、263、

264、265、266、271、273、275、281、284、291、296、297、298、299、302、304、305、313、323、325、326、328、330或332。

【0206】 尤其優選的變體包括選自 A-AI 組的一個或多個修飾：

A	228E、228K、228Y 或 228G；
B	230A、230E、230Y 或 230G；
C	231E、231K、231Y、231P 或 231G；
D	232E、232K、232Y、232G；
E	233D；
F	234I 或 234F；
G	235D、235Q、235P、235I 或 235V；
H	239D、239E、239N 或 239Q；
I	240A、240I、240M 或 240T；
J	243R、243、243Y、243L、243Q、243W、243H 或 243I；
K	244H；
L	245A；
M	247G、247V 或 247L；
N	262A、262E、262I、262T、262E 或 262F；
O	263A、263I、263M 或 263T；
P	264F、264E、264R、264I、264A、264T 或 264W；
Q	265F、265Y、265H、265I、265L、265T、265V、265N 或 265Q；
R	266A、266I、266M 或 266T；
S	271D、271E、271N、271Q、271K、271R、271S、271T、271H、271A、271V、271L、271I、271F、271M、271Y、271W 或 271G；
T	273I；
U	275L 或 275W；
V	281D、281K、281Y 或 281P；
W	284E、284N、284T、284L、284Y or284M；
X	291D、291E、291Q、291T、291H、291I 或 291G；
Y	299A、299D、299E、299F、299G、299H、299I、299K、299L、299M、299N、299P、299Q、299R、299S、299V、299W 或 299Y；
Z	302I；
AA	304D、304N、304T、304H 或 304L
AB	305I；
AC	313F；
AD	323I；
AE	325A、325D、325E、325G、325H、325I、325L、325K、325R、325S、325F、325M、325T、325V、325Y、325W 或 325P；
AF	328D、328Q、328K、328R、328S、328T、328V、328I、328Y、328W、328P、328G、328A、328E、328F、328H、328M 或 328N；
AG	330L、330Y、330I 或 330V；
AH	332A、332D、332E、332H、332N、332Q、332T、332K、332R、332S、332V、332L、332F、332M、332W、332P、332G 或 332Y；和

AI	336E、336K 或 336Y

【0207】 仍更尤其優選的變體包括選自 1-105 組的一個或多個修飾：

組	變體	組	變體
1	A330L/I332E	54	S239D/D265L/N297D/I332E
2	D265F/N297E/I332E	55	S239D/D265T/N297D/I332E
3	D265Y/N297D/I332E	56	S239D/D265V/N297D/I332E
4	D265Y/N297D/T299L/I332E	57	S239D/D265Y/N297D/I332E
5	F241E/F243Q/V262T/V264F	58	S239D/I332D
6	F241E/F243Q/V262T/V264E/I332E	59	S239D/I332E
7	F241E/F243R/V262E/V264R	60	S239D/I332E/A330I
8	F241E/F243R/V262E/V264R/I332E	61	S239D/I332N
9	F241E/F243Y/V262T/V264R	62	S239D/I332Q
10	F241E/F243Y/V262T/V264R/I332E	63	S239D/N297D/I332E
11	F241L/F243L/V262I/V264I	64	S239D/N297D/I332E/A330Y
12	F241L/V262I	65	S239D/N297D/I332E/A330Y/F241S/F243H/V262T/V264T
13	F241R/F243Q/V262T/V264R	66	S239D/N297D/I332E/K326E
14	F241R/F243Q/V262T/V264R/I332E	67	S239D/N297D/I332E/L235D
15	F241W/F243W/V262A/V264A	68	S239D/S298A/I332E
16	F241Y/F243Y/V262T/V264T	69	S239D/V264I/A330L/I332E
17	F241Y/F243Y/V262T/V264T/N297D/I332E	70	S239D/V264I/I332E
18	F243L/V262I/V264W	71	S239D/V264I/S298A/I332E
19	P243L/V264I	72	S239E/D265N
20	L328D/I332E	73	S239E/D265Q
21	L328E/I332E	74	S239E/I332D
22	L328H/I332E	75	S239E/I332E
23	L328I/I332E	76	S239E/I332N
24	L328M/I332E	77	S239E/I332Q
25	L328N/I332E	78	S239E/N297D/I332E
26	L328Q/I332E	79	S239E/V264I/A330Y/I332 E
27	L328T/I332E	80	S239E/V264I/I332 E
2	L328V/I332E	81	S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E

組	變體	組	變體
8			
29	N297D/A330Y/I332E	82	S239N/A330L/I332E
30	N297D/I332E	83	S239N/A330Y/I332E
31	N297D/I332E/S239D/A330L	84	S239N/I332D
32	N297D/S298A/A330Y/I 332E	85	S239N/I332E
33	N297D/T299L/I332E	86	S239N/I332N
34	N297D/T299F/I332E/N297D/T299H/I332E	87	S239N/I332Q
35	N297D/T299I/I332E	88	S239N1S298A/I332E
36	N297D/T299L/I332E	89	S239Q/I332D
37	N297D/T299V/I332E	90	S239Q/I332E
38	N297E/I332E	91	S239Q/I332N
39	N297S/I332E	92	S239Q/I332Q
40	P230A/E233D/I332E	93	S239Q/V264I/I332E
41	P244H/P245A/P247V	94	S298A/I332E
42	S239D/A330L/I332E	95	V264E/N297D/I332E
43	S239D/A330Y/I332E	96	V264I/A330L/I332E
44	S239D/A330Y/I332E/K326E	97	V264I/A330Y/I332E
45	S239D/A330Y/I332E/K326T	98	V264I/I332E
46	S239D/A330Y/I332E/L234I	99	V264I/S298A/I332E
47	S239D/A330Y/I332E/L235D	100	Y296D/N297D/I332E
48	S239D/A330Y/I332E/V240I	101	Y296E/N297D/I332 E
49	S239D/A330Y/I332E/V264T	102	Y296H/N297D/I332E
50	S239D/A330Y/I332E/V266I	103	Y296N/N297D/I332E
51	S239D/D265F/N297D/I332E	104	Y296Q/N297I/I332E
52	S239D/D265H/N297D/I332E	105	Y296T/N297D/I332E
5	S239D/D265I/N297D/I332E		

組	變體	組	變體
3			

【0208】 在一個實施方式中，本發明的PD-1結合分子包括變異的Fc區域，其在Fc區域中具有至少一個修飾。在某些實施方式中，變異的Fc區域包括選自L235V、F243L、R292P、Y300L、V305I和P396L的至少一個取代。

【0209】 在具體的實施方式中，變異的Fc區域包括：

(A)選自 F243L、R292P、Y300L、V305I 和 P396L 的至少一個取代；

(B)選自下述的至少兩個取代：

(1) F243L 和 P396L；

(2) F243L 和 R292P；和

(3) R292P 和 V305I；

(C)選自下述的至少三個取代：

(1) F243L、R292P 和 Y300L；

(2) F243L、R292P 和 V305I；

(3) F243L、R292P 和 P396L；和

(4) R292P、V305I 和 P396L；

(D)選自下述的至少四個取代：

(1) F243L、R292P、Y300L 和 P396L；和

(2) F243L、R292P、V305I 和 P396L；或

(E)選自下述的至少五個取代：

(1) F243L、R292P、Y300L、V305I 和 P396L；和

(2) L235V、F243L、R292P、Y300L 和 P396L。

【0210】 在另一具體的實施方式中，變異的 Fc 區域包括下述取代：

(A)F243L、R292P 和 Y300L；

(B)L235V、F243L、R292P、Y300L 和 P396L；或

(C)F243L、R292P、Y300L、V305I 和 P396L。

【0211】 在一個實施方式中，本發明的PD-1結合分子包括變異的Fc區域，其(相對於野生型 IgG1 Fc 區域(**SEQ ID NO:1**)展示的結合)展示對 FcγRIA (CD64)、FcγRIIA (CD32A)、FcγRIIB (CD32B)、FcγRIIIA (CD16a)或 FcγRIIIB (CD16b)降低的(或基本上沒有)結合。在一個實施方式中，本發明的 PD-1 結合分子包括變異的 Fc 區域，其展示對 FcγR (例如，FcγRIIIA)降低的(或基本上沒有)結合和降低的(或基本上沒有) ADCC 效應子功能。在某些實施方式中，變異的 Fc 區域包括選自下述的至少一個取代：L234A、L235A、D265A、N297Q 和 N297G。在具體的實施方式中，變異的 Fc 區域包括下述取代：L234A；L235A；L234A 和 L235A；D265A；N297Q 或 N297G。

【0212】 用於本發明的 PD-1 結合分子的 CH2 和 CH3 結構域的優選的 IgG1 序列具有 L234A/L235A 取代(**SEQ ID NO:5**)：

APE**AA**GGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG**X**

其中，**X** 是賴氨酸(K)或不存在。

【0213】 在不同的實施方式中，本發明的 PD-1 結合分子包括 Fc 區域，其(相對於野生型 IgG1 Fc 區域(**SEQ ID NO:1**)展示的結合)固有地展示對 FcγRIIIA (CD16a)降低的(或基本上沒有)結合和/或降低的效應子功能。在具體的實施方式中，本發明的 PD-1 結合分子包括 IgG2 Fc 區域(**SEQ ID NO:2**)或 IgG4 Fc 區域(**SEQ ID:NO:4**)。當使用 IgG4 Fc 區域時，本發明也包括引入穩定化突變，比如

IgG4 鉸鏈區 S228P 取代(見，例如，**SEQ ID NO:13**：ESKYGPPCP**P**CP，(Lu 等, (2008) "*The Effect Of A Point Mutation On The Stability Of Igg4 As Monitored By Analytical* Ultracentrifugation," J. Pharmaceutical Sciences 97:960-969)，以降低鏈交換的發生率。本領域已知的其他穩定化突變可被引入到 IgG4 Fc 區域中(Peters, P 等, (2012) "*Engineering an Improved IgG4 Molecule with Reduced Disulfide Bond Heterogeneity and Increased Fab Domain Thermal Stability*," J. Biol. Chem., 287:24525-24533；PCT 專利公開號：WO 2008/145142)。

【0214】 在其他實施方式中，本發明包括使用本領域已知的任何Fc變體，比如下述文獻中公開的那些：Jefferis, B.J.等(2002) "*Interaction Sites On Human IgG*-Fc *For FcgammaR: Current Models*," Immunol. Lett. 82:57-65；Presta, L.G.等(2002) "*Engineering Therapeutic Antibodies For Improved Function*," Biochem. Soc. Trans. 30:487-90；Idusogie, E.E.等(2001) "*Engineered Antibodies With Increased Activity To Recruit Complement*," J. Immunol. 166:2571-75；Shields, R.L.等(2001) "*High Resolution Mapping Of The Binding Site On Human IgG1 For Fc Gamma RI, Fc Gamma RII, Fc Gamma RIII, And FcRn And Design Of IgG1 Variants With Improved Binding To The Fc gamma R*," J. Biol. Chem. 276:6591-6604；Idusogie, E.E. 等(2000) "*Mapping Of The C1q Binding Site On Rituxan, A Chimeric Antibody With A Human IgG Fc*," J. Immunol. 164:4178-84；Reddy, M.P.等(2000) "*Elimination Of Fc Receptor-Dependent Effector Functions Of A Modified IgG4 Monoclonal Antibody To Human CD4*," J. Immunol. 164:1925-1933；Xu, D.等(2000) "*In Vitro Characterization of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies*," Cell. Immunol. 200:16-26；Armour, K.L.等(1999) "*Recombinant human IgG Molecules Lacking Fcgamma Receptor I Binding And Monocyte Triggering Activities*," Eur. J. Immunol. 29:2613-24；Jefferis, R.等(1996) "*Modulation Of*

Fc(Gamma)R And Human Complement Activation By IgG3-Core Oligosaccharide Interactions," Immunol. Lett. 54:101-04；Lund, J.等(1996) "*Multiple Interactions Of IgG With Its Core Oligosaccharide Can Modulate Recognition By Complement And Human Fc Gamma Receptor I And Influence The Synthesis Of Its Oligosaccharide Chains*," J. Immunol. 157:4963-4969；Hutchins 等(1995) "*Improved Biodistribution, Tumor Targeting, And Reduced Immunogenicity In Mice With A Gamma 4 Variant Of Campath-1H*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 92:11980-84；Jefferis, R.等(1995) "*Recognition Sites On Human IgG For Fc Gamma Receptors: The Role Of Glycosylation*," Immunol. Lett. 44:111-17；Lund, J.等(1995) "*Oligosaccharide-Protein Interactions In IgG Can Modulate Recognition By Fc Gamma Receptors*," FASEB J. 9:115-19；Alegre, M.L.等(1994) "*A Non-Activating "Humanized" Anti-CD3 Monoclonal Antibody Retains Immunosuppressive Properties In Vivo*," Transplantation 57:1537-1543；Lund 等(1992) "*Multiple Binding Sites On The CH2 Domain Of IgG For Mouse Fc Gamma R11*," Mol. Immunol. 29:53-59；Lund 等(1991) "*Human Fc Gamma RI And Fc Gamma RII Interact With Distinct But Overlapping Sites On Human IgG*," J. Immunol. 147:2657-2662；Duncan, A.R.等(1988) "*Localization Of The Binding Site For The Human High-Affinity Fc Receptor On IgG*," Nature 332:563-564；美國專利號 5,624,821、5,885,573、6,194,551、7,276,586 和 7,317,091；以及 PCT 公開 WO 00/42072 和 PCT WO 99/58572。

【0215】 在一些實施方式中，本發明的分子進一步包括一個或多個糖基化位點，從而一個或多個碳水化合物部分被共價連接至分子。優選地，與未修飾的抗體相比，在 Fc 區中具有一個或多個糖基化位點和/或一個或多個修飾的本發明的分子賦予或具有增強的抗體介導的效應子功能，例如，增強的 ADCC 活性。在一些實施方式中，本發明進一步包括這樣的分子：所述分子包括已知直接或

間接與 Fc 區的碳水化合物部分相互作用的氨基酸的一個或多個修飾，所述氨基酸包括但不限於在位置 241、243、244、245、245、249、256、258、260、262、264、265、296、299 和 301 的氨基酸。直接或間接與 Fc 區的碳水化合物部分相互作用的氨基酸是本領域已知的，見，例如，Jefferis 等, 1995 *Immunology Letters,* 44: 111-7，其通過引用以其整體併入本文。

【0216】 在另一實施方式中，本發明包括這樣的分子：所述分子已經通過在分子的一個或多個位點中引入一個或多個糖基化位點被修飾，優選不改變分子的功能，例如，與靶抗原或 FcγR 的結合活性。糖基化位點可被引入到本發明分子的可變結構域和/或恒定結構域中。如本文所使用，“糖基化位點”包括與寡糖(即，碳水化合物，其含有兩個或多個連接在一起的單糖)特異性和共價結合的抗體中的任何特定氨基酸序列。寡糖側鏈通常經 N-或 O-鍵而連接至抗體的骨架。N-連接的糖基化指寡糖部分連接至天冬醯胺殘基的側鏈。O-連接的糖基化指寡糖部分連接至羥基氨基酸，例如，絲氨酸、蘇氨酸。本發明的分子可包括一個或多個糖基化位點，包括 N-連接的和 O-連接的糖基化位點。本領域已知的用於 N-連接的或 O-連接的糖基化的任何糖基化位元點可根據本發明使用。根據本發明的方法可用的示例性 N-連接的糖基化位點是氨基酸序列：Asn-X-Thr/Ser，其中 X 可以是任何氨基酸和 Thr/Ser 指示蘇氨酸或絲氨酸。這類位點可使用本發明所屬領域熟知的方法引入到本發明的分子中(見例如，*In vitro* Mutagenesis, Recombinant DNA: A Short Course, J. D. Watson,等 W.H. Freeman and Company, New York, 1983, 第 8 章, pp. 106-116，其通過引用以其整體併入本文。用於將糖基化位點引入本發明分子中的示例性方法可包括：修飾或突變分子的氨基酸序列，從而獲得期望的 Asn-X-Thr/Ser 序列。

【0217】 在一些實施方式中，本發明包括通過添加或刪除糖基化位點修飾本發明分子的碳水化合物含量的方法。修飾抗體(和包括抗體結構域，例如，Fc

區的分子)的碳水化合物含量的方法是本領域熟知的並且包括在本發明中，見，例如，美國專利號 6,218,149、EP 0 359 096 B1、美國公開號 US 2002/0028486、WO 03/035835、美國公開號 2003/0115614、美國專利號 6,218,149、美國專利號 6,472,511，其所有通過引用以其整體併入本文。在其他實施方式中，本發明包括通過刪除分子的一個或多個內源碳水化合物部分，修飾本發明分子的碳水化合物含量的方法。在具體的實施方式中，本發明包括通過修飾與 297 相鄰的位置而轉變抗體 Fc 區的糖基化位點。在具體的實施方式中，本發明包括修飾 296 位，從而 296 位而不是 297 位被糖基化。

【0218】 也可通過技術，比如通過在 Fc 區中引入一個或多個半胱氨酸殘基，修飾效應子功能，從而允許在該區域內發生鏈間二硫鍵形成，導致產生可具有改善的內化能力和/或提高的補體-介導的細胞殺傷和 ADCC 的同源二聚化抗體(Caron, P.C.等(1992) "*Engineered Humanized Dimeric Forms Of IgG Are More Effective Antibodies*," J. Exp. Med. 176:1191-1195；Shopes, B. (1992) "*A Genetically Engineered Human IgG Mutant With Enhanced Cytolytic Activity*," J. Immunol. 148(9):2918-2922。也可使用異源雙功能交聯劑製備具有增強的抗腫瘤活性的同源二聚化抗體，如 Wolff, E.A.等(1993) "*Monoclonal Antibody Homodimers: Enhanced Antitumor Activity In Nude Mice*," Cancer Research 53:2560-2565 中描述。可選地，抗體可被工程化，其具有雙 Fc 區域並且可從而具有增強的補體裂解和 ADCC 能力(Stevenson, G.T.等(1989) "*A Chimeric Antibody With Dual Fc Regions (bisFabFc) Prepared By Manipulations At The IgG Hinge*," Anti-Cancer Drug Design 3:219-230)。

【0219】 可通過增加 Fc 區域對於 FcRn 的結合親和力而延長包括 Fc 區域的本發明分子的血清半衰期。如本文使用的術語"半衰期"意思是分子的藥物代謝動力學性質，是對在其施用之後分子的平均生存時間的衡量。半衰期可表示為

從受試者的身體(例如，人患者或其他哺乳動物)或其特定區室消除百分之五十(50%)的已知量的分子需要的時間，例如，如在血清中測量的，即，迴圈半衰期，或在其他組織中測量的。一般而言，半衰期的增加導致施用的分子在迴圈中的平均停留時間(MRT)的增加。

【0220】 在一些實施方式中，本發明的PD-1結合分子包括變異的Fc區域，其中所述變異的 Fc 區域相對於野生型 Fc 區域包括至少一個氨基酸修飾，使得所述分子(相對于野生型 Fc 區域)具有增加的半衰期。

【0221】 在一些實施方式中，本發明的PD-1結合分子包括變異的Fc區域，其中所述變異的 Fc 區域在選自下述的一個或多個位置處包括延長半衰期的氨基酸取代：238、250、252、254、256、257、256、265、272、286、288、303、305、307、308、309、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、428、433、434、435 和 436。能夠延長包含 Fc 區域的分子的半衰期的許多具體的突變是本領域已知的，並且包括，例如 M252Y、S254T、T256E 和其組合。例如，見下述文獻描述的突變：美國專利號 6,277,375、7,083,784、7,217,797、8,088,376、美國公開號 2002/0147311、2007/0148164 和國際公開號 WO 98/23289、WO 2009/058492 和 WO 2010/033279，其通過引用以它們的整體併入本文。具有延長半衰期的包含 Fc 區域的分子也包括在下述兩個或更多個 Fc 區域殘基處具有取代的那些分子：250、252、254、256、257、288、307、308、309、311、378、428、433、434、435 和 436。尤其地，兩個或更多個取代選自：T250Q、M252Y、S254T、T256E、K288D、T307Q、V308P、A378V、M428L、N434A、H435K 和 Y436I。

【0222】 在具體的實施方式中，變異的 Fc 區域包括下述取代：

(A)M252Y、S254T 和 T256E；

(B)M252Y 和 S254T；

(C)M252Y 和 T256E；

(D)T250Q 和 M428L；

(E)T307Q 和 N434A；

(F)A378V 和 N434A；

(G)N434A 和 Y436I；

(H)V308P 和 N434A；或

(I)K288D 和 H435K。

【0223】 本發明進一步包括變異的 Fc 區域，其包括：

(A)改變效應子功能和/或 FcγR 的一個或多個突變；和

(B)延長血清半衰期的一個或多個突變。

V. 雙特異性抗人 PD-1 結合分子

【0224】 本發明的一個實施方式涉及雙特異性結合分子，其能夠結合“**第一表位**”和“**第二表位**”，其中第一表位是人 PD-1 的表位和第二表位是 PD-1 的相同的或不同的表位，或是免疫細胞(比如 T 淋巴細胞)的表面上存在的並參與調節免疫檢查點的另一分子的表位。在一個實施方式中，第二表位元是下述的表位：B7-H3、B7-H4、BTLA、CD3、CD8、CD16、CD27、CD32、CD40、CD40L、CD47、CD64、CD70、CD80、CD86、CD94、CD137、CD137L、CD226、CTLA-4、半乳凝素-9、GITR、GITRL、HHLA2、ICOS、ICOSL、KIR、LAG-3、LIGHT、I 類或 II 類 MHC、NKG2a、NKG2d、OX40、OX40L、PD1H、PD-1、PD-L1、PD-L2、PVR、SIRPa、TCR、TIGIT、TIM-3 或 VISTA。在一個實施方式中，第二表位元不是 PD-1 的表位。在具體的實施方式中，第二表位元是 CD137、CTLA-4、LAG-3、OX40、TIGIT 或 TIM-3。在某些實施方式中，雙特異性分子包括多於

兩個表位結合位點。這類雙特異性分子可結合 LAG-3 的兩個或更多個不同表位和不是 LAG-3 的分子的至少一個表位。

【0225】 本發明包括能夠同時結合PD-1和第二表位(例如B7-H3、B7-H4、BTLA、CD40、CD80、CD86、CD137、CTLA-4、ICOS、KIR、LAG-3、I類或II類 MHC、OX40、PD-L1、TCR、TIM-3 等)的雙特異性抗體。在一些實施方式中，使用下述文獻描述的任何方法產生能夠同時結合 PD-1 和第二表位的雙特異性抗體：PCT 公開號 WO 1998/002463、WO 2005/070966、WO 2006/107786 WO 2007/024715、WO 2007/075270、WO 2006/107617、WO 2007/046893、WO 2007/146968、WO 2008/003103、WO 2008/003116、WO 2008/027236、WO 2008/024188、WO 2009/132876、WO 2009/018386、WO 2010/028797、WO2010028796、WO 2010/028795、WO 2010/108127、WO 2010/136172、WO 2011/086091、WO 2011/133886、WO 2012/009544、WO 2013/003652、WO 2013/070565、WO 2012/162583、WO 2012/156430、WO 2013/174873 和 WO 2014/022540，其每一篇通過引用以其整體併入本文。

A. 缺少 Fc 區域的雙特異性雙抗體

【0226】 本發明的一個實施方式涉及雙特異性雙抗體，其包括第一多肽鏈和第二多肽鏈，最優選地由第一多肽鏈和第二多肽鏈組成，所述多肽鏈的序列允許多肽鏈彼此共價結合，以形成共價締合的雙抗體，其能夠同時結合第一表位和第二表位，這類表位彼此不同。這類雙特異性雙抗體因此包括能夠結合第一表位的“**VL1**”/“**VH1**”結構域和能夠結合第二表位的“**VL2**”/“**VH2**”結構域。符號“**VL1**”和“**VH1**”分別表示結合這類雙特異性雙抗體的“第一”表位元的可變輕鏈結構域和可變重鏈結構域。類似地，符號“**VL2**”和“**VH2**”分別表示結合這類雙特異性雙抗體的“第二”表位元的可變輕鏈結構域和可變重鏈結構域。具體的表位是

否被命名為第一或第二表位不重要；這類符號僅僅與本發明的結合分子的多肽鏈的結構域的存在和取向相關。在一個實施方式中，這類表位之一是 PD-1 的表位和這類表位的另一個不是 PD-1 的表位(例如，B7-H3、B7-H4、BTLA、CD40、CD80、CD86、CD137、CTLA-4、ICOS、KIR、LAG-3、I 類或 II 類 MHC、OX40、PD-L1、TCR、TIM-3 等的表位)。

【0227】 第一多肽鏈的 VL 結構域與第二多肽鏈的 VH 結構域相互作用，以形成對於第一抗原特異性的第一功能性抗原-結合位點(即，PD-1 或包含第二表位的抗原)。類似地，第二多肽鏈的 VL 結構域與第一多肽鏈的 VH 結構域相互作用，以便形成對第二抗原(即，包含第二表位的抗原或 PD-1)特異性的第二功能性抗原-結合位點。因此，協調第一和第二多肽鏈的 VL 和 VH 結構域的選擇，以便雙抗體的兩條多肽鏈總體地包括能夠結合 PD-1 的表位和第二表位二者的 VL 和 VH 結構域(即，它們包括 VL_{PD-1}/VH_{PD-1} 和 VL2/VH2，其中 PD-1 是“第一”表位，或 VL1/VH1 和 VL_{PD-1}/VH_{PD-1}，其中 PD-1 是“第二”表位)。

【0228】 這類雙特異性雙抗體的實施方式的第一多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括 N-末端、能夠結合第一或第二表位的單克隆抗體的 VL1 結構域(即，VL_{PD-1} 或 $VL_{表位2}$)、第一間插間隔肽(連接體 1)、能夠結合第二表位(如果這類第一多肽鏈包含 VL_{PD-1})或第一表位(如果這類第一多肽鏈包含 $VL_{表位2}$)的單克隆抗體的 VH2 結構域、任選地包含半胱氨酸殘基的第二間插間隔肽(連接體 2)、異源二聚體促進結構域和 C-末端(**圖 1**)。

【0229】 雙特異性雙抗體的該實施方式的第二多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括N-末端、能夠結合PD-1或第二表位的單克隆抗體的VL2結構域(即，VL_{PD-1} 或 $VL_{表位2}$，並且不是為包括在雙抗體的第一多肽鏈中選擇的 VL 結構域)、間插連接體肽(連接體 1)、能夠結合第二表位(如果這類第二多肽鏈包含 VL_{PD-1})或 PD-1 (如果這類第二多肽鏈包含 $VL_{表位2}$)的單克隆抗體的 VH1 結構域、任選地

包含半胱氨酸殘基的第二間插間隔肽(連接體 2)、異源二聚體促進結構域和 C-末端(**圖 1**)。

【0230】 最優選地，選擇將這類 VL 和 VH 結構域分開的間插連接體肽(例如，連接體 1)的長度，以基本上或完全防止多肽鏈的 VL 和 VH 結構域彼此結合。因此，第一多肽鏈的 VL 和 VH 結構域基本上或完全不能彼此結合。同樣地，第二多肽鏈的 VL 和 VH 結構域基本上或完全不能彼此結合。優選的間插間隔肽(連接體 1)具有序列(**SEQ ID NO:14**)：GGGSGGGG。

【0231】 基於異源二聚體促進結構域的選擇而選擇第二間插連接體肽(連接體 2)的長度和組成。典型地，第二間插連接體肽(連接體 2)包括 3-20 個氨基酸殘基。尤其地，在異源二聚體促進結構域不包括半胱氨酸殘基時，使用包含半胱氨酸的第二間插連接體肽(連接體 2)。包含半胱氨酸的第二間插間隔肽(連接體 2)包含 1、2、3 或更多個半胱氨酸。優選的包含半胱氨酸的間隔肽(連接體 2)具有序列 SEQ ID NO:15：GGCGGG。可選地，連接體 2 不包括半胱氨酸(例如，GGG、GGGS (SEQ ID NO:29)、LGGGSG (SEQ ID NO:261)、GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:262)、ASTKG (SEQ ID NO:30)、LEPKSS (SEQ ID NO:33)、APSSS (SEQ ID NO:34)等)，並且使用如下面所描述的包含半胱氨酸的異源二聚體促進結構域。任選地，使用包含半胱氨酸的連接體 2 和包含半胱氨酸的異源二聚體促進結構域二者。

【0232】 異源二聚體促進結構域可以是一條多肽鏈上的 GVEPKSC (**SEQ ID NO:16**)或 VEPKSC (**SEQ ID NO:17**)或 AEPKSC (**SEQ ID NO:18**)和另一條多肽鏈上的 GFNRGEC (**SEQ ID NO:19**)或 FNRGEC (**SEQ ID NO:20**) (US2007/0004909)。

【0233】 但是，更優選地，這類雙抗體的異源二聚體-促進結構域由具有

相反電荷的一個、兩個、三個或四個串聯重複的螺旋結構域形成，所述螺旋結構域包括至少六個、至少七個或至少八個氨基酸殘基的序列，以便異源二聚體-促進結構域具有淨電荷(Apostolovic, B.等(2008) "*pH-Sensitivity of the E3/K3 Heterodimeric Coiled Coil*," Biomacromolecules 9:3173–3180；Arndt, K.M.等(2001) "*Helix-stabilized Fv (hsFv) Antibody Fragments: Substituting the Constant Domains of a Fab Fragment for a Heterodimeric Coiled-coil Domain*," J. Molec. Biol. 312:221-228；Arndt, K.M.等(2002) "*Comparison of In Vivo Selection and* Rational *Design of Heterodimeric Coiled Coils*," Structure 10:1235-1248；Boucher, C.等(2010) "*Protein Detection By Western Blot Via Coiled–Coil Interactions*," Analytical Biochemistry 399:138-140；Cachia, P.J.等(2004) "*Synthetic Peptide Vaccine Development: Measurement Of Polyclonal Antibody Affinity And Cross-Reactivity Using A New Peptide Capture And Release System For Surface Plasmon Resonance Spectroscopy*," J. Mol. Recognit. 17:540-557；De Crescenzo, G.D.等(2003) "*Real-Time Monitoring of the Interactions of Two-Stranded de novo Designed Coiled-Coils: Effect of Chain Length on the Kinetic and Thermodynamic Constants of Binding*," Biochemistry 42:1754-1763；Fernandez-Rodriquez, J.等(2012) "*Induced Heterodimerization And Purification Of Two Target Proteins By A Synthetic Coiled-Coil Tag*," Protein Science 21:511-519；Ghosh, T.S.等(2009) "*End-To-End And End-To-Middle Interhelical Interactions: New Classes Of Interacting Helix Pairs In Protein Structures*," Acta Crystallographica D65:1032-1041；Grigoryan, G.等(2008) "*Structural Specificity In Coiled-Coil Interactions*," Curr. Opin. Struc. Biol. 18:477-483；Litowski, J.R.等(2002) "*Designing Heterodimeric Two-Stranded α-Helical Coiled-Coils: The Effects Of Hydrophobicity And α-Helical Propensity On Protein Folding, Stability, And Specificity*," J. Biol. Chem. 277:37272-37279；

Steinkruger, J.D.等(2012) "*The d ´--d--d ´ Vertical Triad is Less Discriminating Than the a ´--a--a ´ Vertical Triad in the Antiparallel Coiled-coil Dimer Motif*," J. Amer. Chem. Soc. 134(5):2626–2633；Straussman, R.等(2007) "*Kinking the Coiled Coil – Negatively Charged Residues at the Coiled-coil Interface*," J. Molec. Biol. 366:1232-1242；Tripet, B.等(2002) "*Kinetic Analysis of the Interactions between Troponin C and the C-terminal Troponin I Regulatory Region and Validation of a New Peptide Delivery/Capture System used for Surface Plasmon Resonance*," J. Molec. Biol. 323:345–362；Woolfson, D.N. (2005) "*The Design Of Coiled-Coil Structures And Assemblies*," Adv. Prot. Chem. 70:79-112；Zeng, Y.等(2008) "*A Ligand-Pseudoreceptor System Based On de novo Designed Peptides For The Generation Of Adenoviral Vectors With Altered Tropism*," J. Gene Med. 10:355-367)。

【0234】 這樣的重複的螺旋結構域可以是準確的重複或可具有取代。例如，第一多肽鏈的異源二聚體-促進結構域的螺旋結構域可包括選擇為這類異源二聚體-促進結構域提供負電荷的八個氨基酸殘基的序列，並且第二多肽鏈的異源二聚體-促進結構域的螺旋結構域可包括選擇為這類異源二聚體-促進結構域提供正電荷的八個氨基酸殘基的序列。哪個螺旋被提供給第一或第二多肽鏈是不重要的，前提是另一多肽鏈使用具有相反電荷的螺旋。帶正電的氨基酸可以是賴氨酸、精氨酸、組氨酸等和/或帶負電的氨基酸可以是谷氨酸，天冬氨酸等。帶正電的氨基酸優選地是賴氨酸和/或帶負電的氨基酸優選地是谷氨酸。僅僅使用單個異源二聚體-促進結構域是可能的(因為這類結構域將抑制同源二聚化，從而促進異源二聚化)，但是，優選本發明雙抗體的第一和第二多肽鏈都包含異源二聚體-促進結構域。

【0235】 在優選的實施方式中，異源二聚體-促進結構域之一包括四個串聯的"E螺旋"螺旋結構域(**SEQ ID NO:21**：

EVAAL**E**K-**E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K)，其谷氨酸殘基在 pH 7 形成負電荷，而另一個異源二聚體促進結構域將包括四個串聯“K-螺旋”結構域(**SEQ ID NO:22**：**K**VAAL**K**E-**K**VAAL**K**E-**K**VAAL**K**E-**K**VAAL**K**E)，其賴氨酸殘基將在 pH 7 形成正電荷。這類帶電結構域的存在促進了第一和第二多肽之間的締合，因此有助於異源二聚體形成。尤其優選是這樣的異源二聚體促進結構域：其中 **SEQ ID NO:21** 的四個串聯“E-螺旋”螺旋結構域之一已經被修飾以包含半胱氨酸殘基：**E**VAA**C**E**K**-**E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K (**SEQ ID NO:23**)。同樣地，尤其優選的是這樣的異源二聚體促進結構域：其中 **SEQ ID NO:22** 的四個串聯“K-螺旋”螺旋結構域之一已經被修飾，以包含半胱氨酸殘基：**K**VAA**C**K**E**-**K**VAAL**K**E-**K**VAAL**K**E-**K**VAAL**K**E (**SEQ ID NO:24**)。

【0236】 如在 WO 2012/018687 中公開，為了提高雙抗體的體內藥物代謝動力學特性，雙抗體可被修飾，以在雙抗體的一個或多個末端處包含血清結合蛋白的多肽部分。最優選地，血清結合蛋白的這類多肽部分設置在雙抗體的 C-末端。白蛋白是血漿中最豐富的蛋白質並且在人中半衰期是 19 天。白蛋白具有若干小分子結合位點，這允許其非共價結合其他蛋白，從而延長它們的血清半衰期。鏈球菌屬(Streptococcus)菌株 G148 的蛋白質 G 的白蛋白結合結構域 3 (ABD3)由形成穩定的三螺旋束的 46 個氨基酸殘基組成並且具有廣泛的白蛋白結合特異性(Johansson, M.U.等(2002) “*Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Module*s,” J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120。因此，對於改善雙抗體的體內藥物代謝動力學特性，尤其優選的血清結合蛋白的多肽部分是來自鏈球菌蛋白質 G 的白蛋白結合結構域(ABD)，更優選地，停乳鏈球菌(*Streptococcus dysgalactiae*)菌株 G148 的蛋白質 G 的白蛋白結合結構域 3 (ABD3) (**SEQ ID NO:25**)：LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLIDNAKS AEGVKALIDE ILAALP。

【0237】 如在 WO 2012/162068 (通過引用併入本文)中公開，**SEQ ID NO:25** 的“**去免疫化**”的變體具有削弱或消除 II 類 MHC 結合的能力。基於組合突變結果，對於形成這樣的去免疫化的 ABD，如下取代的組合被認為是優選的取代 ：66D/70S +71A、66S/70S +71A、66S/70S +79A、64A/65A/71A、64A/65A/71A+66S、64A/65A/71A+66D、64A/65A/71A+66E、64A/65A/79A+66S、64A/65A/79A+66D、64A/65A/79A+66E。變異的 ABD 具有修飾 L64A、I65A 和 D79A 或修飾 N66S、T70S 和 D79A。具有下述氨基酸序列：

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLI**D**$_{66}$NAK**S**$_{70}$**A**$_{71}$EGVKALIDE ILAALP (**SEQ ID NO:26**)，

或氨基酸序列：

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKN**A**$_{64}$**A**$_{65}$NNAKT VEGVKALI**A**$_{79}$E ILAALP (**SEQ ID NO:27**)，

或氨基酸序列：

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLI**S**$_{66}$NAK**S**$_{70}$ VEGVKALI**A**$_{79}$E ILAALP (**SEQ ID NO:28**)，

的變異的**去免疫化的** ABD 是尤其優選的，因為這類去免疫化的 ABD 展示基本上野生型結合，同時提供削弱的 II 類 MHC 結合。因此，具有 ABD 的這類雙抗體的第一多肽鏈包含肽連接體，其優選地位於這類多肽鏈的 E 螺旋(或 K 螺旋)結構域的 C-末端，以便插在 E 螺旋(或 K 螺旋)結構域和 ABD (其優選地是去免疫化的 ABD)之間。用於這類肽連接體的優選的序列是 **SEQ ID NO:29**：GGGS。

B. 包含 Fc 區域的雙特異性雙抗體

【0238】 本發明的一個實施方式涉及包括 Fc 區域的雙特異性雙抗體，其

能夠同時結合PD-1和第二表位(例如B7-H3、B7-H4、BTLA、CD40、CD80、CD86、CD137、CTLA-4、ICOS、KIR、LAG-3、I類或II類MHC、OX40、PD-1、PD-L1、TCR、TIM-3等)。將IgG CH2-CH3結構域添加至雙抗體多肽鏈中的一條或兩條中，以便雙抗體鏈的複合導致Fc區域的形成，延長了生物半衰期和/或改變了雙抗體的價。將IgG CH2-CH3結構域併入到兩條雙抗體多肽上允許形成雙鏈雙特異性包含Fc-區域的雙抗體(**圖2**)。

【0239】 可選地，僅僅在一條雙抗體多肽上併入IgG CH2-CH3結構域允許形成更複雜的、包含Fc區的四鏈雙特異性雙抗體(**圖3A-3C**)。**圖3C**顯示具有恒定輕鏈(CL)結構域和恒定重鏈CH1結構域的代表性四鏈雙抗體，然而，可以可選地採用這類結構域的片段以及其他多肽(見，例如，**圖3A**和**3B**，美國專利公開號2013-0295121、2010-0174053和2009-0060910；歐洲專利公開號EP 2714079、EP 2601216、EP 2376109、EP 2158221；和PCT公開號WO 2012/162068、WO 2012/018687、WO 2010/080538)。因此，例如，代替CH1結構域，可採用源自人IgG的鉸鏈結構域的、具有氨基酸序列GVEPKSC (**SEQ ID NO:16**) VEPKSC (**SEQ ID NO:17**)或AEPKSC (**SEQ ID NO:18**)的肽，和代替CL結構域，可採用人κ輕鏈的C-末端6個氨基酸GFNRGEC (**SEQ ID NO:19**)或FNRGEC (**SEQ ID NO:20**)。包含四鏈雙抗體的代表性肽顯示在**圖3A**中。可選地，或另外，可採用包括具有相反電荷的串聯螺旋結構域的肽，比如"E-螺旋"螺旋結構域(**SEQ ID NO:21**：**E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K 或 **SEQ ID NO:23**：**E**VAA**C****E**K-**E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K)；和"K-螺旋"結構域(**SEQ ID NO:22**：**K**VAAL**K**E-**K**VAAL**K**E-**K**VAAL**K**E-**K**VAAL**K**E 或 **SEQ ID NO:24**：**K**VAA**C****K**E-**K**VAAL**K**E-**K**VAAL**K**E-**K**VAAL**K**E)。包含螺旋結構域的代表性四鏈雙抗體顯示在**圖3B**中。

【0240】 本發明的包含Fc區域的雙抗體分子一般包括另外的間插連接體

肽(連接體)。典型地，另外的連接體包括 3-20 個氨基酸殘基。在本發明的包含 Fc 區域的雙抗體分子中可採用的另外或可選的連接體包括：GGGS (**SEQ ID NO:29**)、LGGGSG (**SEQ ID NO:261**)、GGGSGGGSGGG (**SEQ ID NO:262**)、ASTKG (**SEQ ID NO:30**)、DKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:31**)、EPKSCDKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:32**)、LEPKSS (**SEQ ID NO:33**)、APSSS (**SEQ ID NO:34**)和 APSSSPME (**SEQ ID NO:35**)、LEPKSADKTHTCPPC **SEQ ID NO:36**)、GGC 和 GGG。可使用 **SEQ ID NO:33** 代替 GGG 或 GGC，以易於克隆。另外，**SEQ ID NO:31** 可緊隨氨基酸 GGG 或 SEQ **ID NO:33** 之後，以形成可選的連接體：GGGDKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:263**)和 LEPKSSDKTHTCPPCP(**SEQ ID NO:37**)。除了或代替連接體，本發明的包含 Fc 區域的雙抗體分子可併入 IgG 鉸鏈區。示例性鉸鏈區包括：來自 IgG1 的 EPKSCDKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:32**)、來自 IgG2 的 ERKCCVECPPCP (**SEQ ID NO:11**)、來自 IgG4 的 ESKYGPPCPSCP (**SEQ ID NO:12**)和 ESKYGPPCPPCP (**SEQ ID NO:13**)，包括穩定化取代以減少鏈交換的 IgG4 鉸鏈變體。

【0241】 如在**圖 3A-3C** 中提供，本發明的雙抗體可包括四條不同的鏈。這類雙抗體的第一和第三多肽鏈包含三個結構域：(i)包含 VL1 的結構域、(ii)包含 VH2 的結構域、(iii)異源二聚體-促進結構域、和(iv)包含 CH2-CH3 序列的結構域。第二和第四多肽鏈包含：(i)包含 VL2 的結構域、(ii)包含 VH1 的結構域和(iii)異源二聚體-促進結構域，其中異源二聚體-促進結構域促進第一/第三多肽鏈與第二/第四多肽鏈的二聚化。第三和第四多肽鏈的 VL 和/或 VH 結構域，以及第一和第二多肽鏈的 VL 和/或 VH 結構域可以相同或不同，以便允許單特異性、雙特異性或四特異性的四價結合。符號“**VL3**”和“**VH3**”分別表示結合這類雙抗體的“第三”表位元的可變輕鏈結構域和可變重鏈結構域。類似地，符號“**VL4**”和“**VH4**”分別表示結合這類雙抗體的“第四”表位元的可變輕鏈結

構域和可變重鏈結構域。本發明的包含 Fc 區的、代表性四鏈雙抗體的多肽鏈的一般結構提供在**表 2** 中：

表 2		
雙特異性	第二鏈	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
	第一鏈	NH_2-VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	第一鏈	NH_2-VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	第二鏈	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
四特異性	第二鏈	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
	第一鏈	NH_2-VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	第三鏈	NH_2-VL3-VH4-HPD-CH2-CH3-COOH
	第四鏈	NH_2-VL4-VH3-HPD-COOH

HPD =異源二聚體促進結構域

【0242】 在具體的實施方式中，本發明的雙抗體是雙特異性、四價(即，具有四個表位結合位點)、包含 Fc 的雙抗體(**圖 3A-3C**)，其由總共四條多肽鏈組成。本發明雙特異性、四價、包含 Fc 的雙抗體包括對於 PD-1 免疫特異性的兩個表位結合位點(其可以能夠結合 PD-1 的相同表位或 PD-1 的不同表位)，和對於第二表位(例如，B7-H3、B7-H4、BTLA、CD40、CD80、CD86、CD137、CTLA-4、ICOS、KIR、LAG-3 I 類或 II 類 MHC、OX40、PD-L1、TCR、TIM-3 等)特異性的兩個表位結合位點。

【0243】 在進一步的實施方式中，包含 Fc 區的雙特異性雙抗體可包括三條多肽鏈。這類雙抗體的第一多肽包含三個結構域：(i)包含 VL1 的結構域、(ii)包含 VH2 的結構域和(iii)包含 CH2-CH3 序列的結構域。這類雙抗體的第二多肽包含：(i)包含 VL2 的結構域、(ii)包含 VH1 的結構域和(iii)促進與雙抗體的第一多肽鏈異源二聚化和共價結合的結構域。這類雙抗體的第三多肽包括 CH2-CH3 序列。因此，這類雙抗體的第一和第二多肽鏈締合在一起，以形成能夠結合第一表位的 VL1/VH1 結合位點，以及能夠結合第二表位的 VL2/VH2 結合位點。

第一和第二多肽通過涉及在它們各自的第三結構域中的半胱氨酸殘基的二硫鍵彼此結合。值得注意的是，第一和第三多肽鏈彼此複合，以形成經二硫鍵穩定的 Fc 區。這類雙抗體具有增強的效價。**圖 4A 和 4B** 闡釋了這類雙抗體的結構。這類包含 Fc 區的雙特異性的雙抗體可具有兩個取向之一(**表 3**)：

表 3

第一取向	第三鏈	NH_2-CH2-CH3-COOH
	第一鏈	NH_2-VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	第二鏈	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
第二取向	第三鏈	NH_2-CH2-CH3-COOH
	第一鏈	NH_2-CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH
	第二鏈	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH

HPD =異源二聚體促進結構域

【0244】 在具體的實施方式中，本發明的雙抗體是雙特異性、二價(即，具有兩個表位結合位點)、包含 Fc 的雙抗體(**圖 4A-4B**)，其由總共三條多肽鏈組成。本發明雙特異性、二價、包含 Fc 的雙抗體包括對於 PD-1 免疫特異性的一個表位結合位點，和對於第二表位(例如，B7-H3、B7-H4、BTLA、CD40、CD80、CD86、CD137、CTLA-4、ICOS、KIR、LAG-3 I 類或 II 類 MHC、OX40、PD-L1、TCR、TIM-3 等)特異性的一個表位結合位點。

【0245】 在進一步的實施方式中，包含 Fc 區的雙特異性雙抗體可包括總共五條多肽鏈。在具體的實施方式中，所述五條多肽鏈的兩條具有相同的氨基酸序列。這類雙抗體的第一多肽鏈包含：(i)包含 VH1 的結構域、(ii)包含 CH1 的結構域和(iii)包含 CH2-CH3 序列的結構域。第一多肽鏈可以是抗體的重鏈，其包含 VH1 和重鏈恒定結構域。這類雙抗體的第二和第五條多肽鏈包含：(i)包含 VL1 的結構域和(ii)包含 CL 的結構域。這類雙抗體的第二和/或第五多肽鏈可以是抗體的輕鏈，其包含與第一/第三多肽鏈的 VH1 互補的 VL1。第一、第二和

/或第五多肽鏈可分離自天然產生的抗體。可選地，它們可以是重組構建的。這類雙抗體的第三多肽鏈包含：(i)包含 VH1 的結構域、(ii)包含 CH1 的結構域、(iii)包含 CH2-CH3 序列的結構域、(iv)包含 VL2 的結構域、(v)包含 VH3 的結構域和(vi)異源二聚體-促進結構域，其中異源二聚體-促進結構域促進第三鏈與第四鏈的二聚化。這類雙抗體的第四多肽包含：(i)包含 VL3 的結構域、(ii)包含 VH2 的結構域和(iii)促進與雙抗體的第三多肽鏈異源二聚化和共價結合的結構域。

【0246】 因此，這類雙抗體的第一和第二，以及第三和第五多肽鏈締合在一起，以形成能夠結合第一表位的兩個 VL1/VH1 結合位點。這類雙抗體的第三和第四多肽鏈締合在一起，以形成能夠結合第二表位的 VL2/VH2 結合位點，以及能夠結合第三表位的 VL3/VH3 結合位點。第一和第三多肽通過涉及在它們各自恒定區中的半胱氨酸殘基的二硫鍵彼此結合。值得注意的是，第一和第三多肽鏈彼此複合，以形成 Fc 區。這類雙抗體具有增強的效價。**圖 5** 圖解了這類雙抗體的結構。應當理解，VL1/VH1、VL2/VH2 和 VL3/VH3 結構域可以相同或不同，以便允許單特異性、雙特異性或三特異性的結合。但是，如本文所提供，優選地選擇這些結構域，以便結合 PD-1 和第二表位(例如，B7-H3、B7-H4、BTLA、CD40、CD80、CD86、CD137、CTLA-4、ICOS、KIR、LAG-3 I 類或 II 類 MHC、OX40、PD-L1、TCR、TIM-3 等)。

【0247】 選擇多肽鏈的 VL 和 VH 結構域，以便形成對於期望的表位特異性的 VL/VH 結合位點。通過多肽鏈的締合形成的 VL/VH 結合位點可以相同或不同，以便允許單特異性、雙特異性、三特異性或四特異性的四價結合。尤其地，可選擇 VL 和 VH 結構域，以便雙特異性雙抗體可包括針對第一表位的兩個結合位點和針對第二表位的兩個結合位點，或針對第一表位的三個結合位點和針對第二表位的一個結合位點，或針對第一表位的兩個結合位點，針對第二表位的一個結合位點和針對第三表位的一個結合位點(如**圖 5** 中所描繪)。本發明的

代表性包含 Fc 區的五鏈雙抗體的多肽鏈的一般結構提供在**表 4** 中：

表 4		
雙特異性(2x2)	第二鏈	NH_2-VL1-CL-COOH
	第一鏈	NH_2-VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	第三鏈	NH_2-VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH2-HPD-COOH
	第五鏈	NH_2-VL1-CL-COOH
	第四鏈	NH_2-VL2-VH2-HPD-COOH
雙特異性(3x1)	第二鏈	NH_2-VL1-CL-COOH
	第一鏈	NH_2-VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	第三鏈	NH_2-VH1-CH1-CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH
	第五鏈	NH_2-VL1-CL-COOH
	第四鏈	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
三特異性(2x1x1)	第二鏈	NH_2-VL1-CL-COOH
	第一鏈	NH_2-VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	第三鏈	NH_2-VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH3-HPD-COOH
	第五鏈	NH_2-VL1-CL-COOH
	第四鏈	NH_2-VL3-VH2-HPD-COOH

HPD =異源二聚體促進結構域

【0248】 在具體的實施方式中，本發明的雙抗體是雙特異性、四價(即，具有四表位結合位點)、包含 Fc 的雙抗體，其由總共五條多肽鏈組成，具有針對第一表位的兩個結合位點和針對第二表位的兩個結合位點。在一個實施方式中，本發明雙特異性、四價、包含 Fc 的雙抗體包括對於 PD-1 免疫特異性的兩個表位結合位點(其可以能夠結合 PD-1 相同的表位或 PD-1 不同的表位)，和對於第二表位(例如，B7-H3、B7-H4、BTLA、CD40、CD80、CD86、CD137、CTLA-4、ICOS、KIR、LAG-3 I 類或 II 類 MHC、OX40、PD-L1、TCR、TIM-3 等)特異性的兩個表位結合位點。在另一實施方式中，本發明的雙特異性、四價、包含 Fc 的雙抗體包括對於 PD-1 免疫特異性的三個表位結合位點，其可以能夠結合 PD-1 相同的表位或 PD-1 不同的表位)，和對於第二表位(例如，B7-H3、B7-H4、BTLA、CD40、CD80、CD86、CD137、CTLA-4、ICOS、KIR、LAG-3 I 類或 II 類 MHC、

OX40、PD-L1、TCR、TIM-3 等)特異性的一個表位結合位點。在另一實施方式中，本發明的雙特異性、四價、包含 Fc 的雙抗體包括對於 PD-1 免疫特異性的一個表位結合位點，和對於第二表位(例如，B7-H3、B7-H4、BTLA、CD40、CD80、CD86、CD137、CTLA-4、ICOS、KIR、LAG-3 I 類或 II 類 MHC、OX40、PD-L1、TCR、TIM-3 等)特異性的三個表位結合位點。

C. 包含 Fc 區域的雙特異性三價結合分子

【0249】 本發明的進一步實施方式涉及包括 Fc 區並且能夠同時結合第一表位、第二表位和第三表位的雙特異性、三價結合分子，其中這類表位中的至少一個與這類表位中的另一個不同。這類雙特異性雙抗體因此包括能夠結合第一表位的“**VL1**”/“**VH1**”結構域，能夠結合第二表位的“**VL2**”/“**VH2**”結構域和能夠結合第三表位的“**VL3**”/“**VH3**”結構域。在一個實施方式中，這類表位中的一個或兩個是 PD-1 的表位並且這類表位中的另一個(或其他)不是 PD-1 的表位(例如，下述的表位：B7-H3、B7-H4、BTLA、CD40、CD80、CD86、CD137、CTLA-4、ICOS、KIR、LAG-3、I 類或 II 類 MHC、OX40、PD-1、PD-L1、TCR、TIM-3 等)。這類雙特異性三價結合分子包括三個表位結合位點，其中兩個是雙抗體型結合結構域，其提供了結合位點 A 和結合位點 B，和其中一個是非雙抗體型結合結構域，其提供了結合位點 C (見，例如，**圖 6A-6F**，和 PCT 申請號：PCT/US15/33081 和 PCT/US15/33076)。

【0250】 典型地，本發明的三價結合分子包括四條不同的多肽鏈(見**圖 6A-6B**)，但是，例如，通過彼此融合這類多肽鏈(例如，經肽鍵)或通過分開這類多肽鏈，以形成另外的多肽鏈，或通過經二硫鍵締合更少的或另外的多肽鏈，分子可包括更少或更多數量的多肽鏈。**圖 6B-6F** 通過示意性描繪具有三條多肽鏈的這類分子闡釋了本發明的這個方面。如**圖 6A-6F** 中提供的，本發明的三價

結合分子可具有可選的取向，其中雙抗體型結合結構域在Fc區的N-末端(**圖 6A**、**6C** 和 **6D**)或 C-末端(**圖 6B**、**6E** 和 **6F**)。

【0251】 在某些實施方式中，本發明的這類三價結合分子的第一多肽鏈包含：(i)包含 VL1 的結構域、(ii)包含 VH2 的結構域、(iii)異源二聚體-促進結構域和(iv)包含 CH2-CH3 序列的結構域。VL1 和 VL2 結構域位於包含 CH2-CH3 的結構域的 N-末端或 C-末端，如**表 5** (**圖 6A** 和 **6B**)中所顯示。這類實施方式的第二多肽鏈包含：(i)包含 VL2 的結構域、(ii)包含 VH1 的結構域和(iii)異源二聚體-促進結構域。這類實施方式的第三多肽鏈包含：(i)包含 VH3 的結構域、(ii)包含 CH1 的結構域和(iii)包含 CH2-CH3 序列的結構域。第三多肽鏈可以是抗體的重鏈，其包含 VH3 和重鏈恒定區。這類實施方式的第四多肽包含：(i)包含 VL3 的結構域和(ii)包含 CL 的結構域。第四多肽鏈可以是抗體的輕鏈，其包含與第三多肽鏈的 VH3 互補的 VL3。第三或第四多肽鏈可分離自天然產生的抗體。可選地，它們可經重組、合成通過其方式而構建。

【0252】 第一和第二多肽鏈的可變輕鏈結構域通過長度過短的間插間隔連接體與這類多肽鏈的可變重鏈結構域分開，以允許它們的 VL1/VH2 (或它們的 VL2/VH1)結構域締合在一起，以形成能夠結合第一或第二表位的表位結合位點。用於該目的的優選間插間隔肽(連接體 1)具有序列(**SEQ ID NO: 14**)：GGGSGGGG。三價結合分子的其他結構域可通過任選地包括半胱氨酸殘基的一個或多個間插間隔肽分開。本文提供了用於產生三價結合分子的示例性連接體，其也提供在 PCT 申請號：PCT/US15/33081 和 PCT/US15/33076 中。因此，這類三價結合分子的第一和第二多肽鏈締合在一起，以形成能夠結合第一表位的 VL1/VH1 結合位點，以及能夠結合第二表位的 VL2/VH2 結合位點。這類三價結合分子的第三和第四多肽鏈締合在一起，以形成能夠結合第三表位的 VL3/VH3 結合位點。應當理解，VL1/VH1、VL2/VH2 和 VL3/VH3 結構域可以相同或不同，

以便允許單特異性、雙特異性或三特異性的結合。

【0253】 如上述，本發明的三價結合分子可包括三條多肽。可通過將第四多肽 N-末端的結構域連接至第三多肽的包含 VH3 的結構域獲得包括三條多肽鏈的三價結合分子。可選地，使用包含下述三個結構域的本發明的三價結合分子的第三多肽鏈：(i)包含 VL3 的結構域、(ii)包含 VH3 的結構域和(iii)包含 CH2-CH3 序列的結構域，其中 VL3 和 VH3 通過足夠長(至少 9 個或更多個氨基酸殘基)的間插間隔肽彼此分開，以便允許這些結構域締合，以形成表位結合位點。

【0254】 應當理解，VL1/VH1、VL2/VH2 和 VL3/VH3 結構域可以相同或不同，以便允許單特異性、雙特異性或三特異性的結合。但是，如本文提供，優選地選擇這些結構域，以便結合 PD-1 和第二表位(或第二和第三表位) (優選地，這類表位是下述的表位：B7-H3、B7-H4、BTLA、CD40、CD80、CD86、CD137、CTLA-4、ICOS、KIR、LAG-3 I 類或 II 類 MHC、OX40、PD-L1、TCR、TIM-3 等)。

【0255】 尤其地，可選擇 VL 和 VH 結構域，以便三價結合分子包括針對第一表位的兩個結合位點和針對第二表位的一個結合位點，或針對第一表位的一個結合位點和針對第二表位的兩個結合位點，或針對第一表位的一個結合位點、針對第二表位的一個結合位點和針對第三表位的一個結合位點。本發明的代表性三價結合分子的多肽鏈的一般結構提供在**圖 6A-6F** 和**表 5** 中：

表 5

四鏈 第一取向	第二鏈	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
	第一鏈	NH_2-VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	第三鏈	NH_2-VH3-CH1-CH2-CH3-COOH
	第四鏈	NH_2-VL3-CL-COOH
四鏈 第二取向	第二鏈	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
	第一鏈	NH_2 -CH2-CH3--VL1-VH2-HPD COOH
	第三鏈	NH_2-VH3-CH1-CH2-CH3-COOH
	第四鏈	NH_2-VL3-CL-COOH
三鏈 第一取向	第二鏈	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
	第一鏈	NH_2-VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH

	第三鏈	NH_2-VL3-VH3-HPD-CH2-CH3-COOH
三鏈 第二取向	第二鏈	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
	第一鏈	NH_2 -CH2-CH3-VL1-VH2-HPD COOH
	第三鏈	NH_2-VL3-VH3-HPD-CH2-CH3-COOH

HPD =異源二聚體促進結構域

【0256】 本發明的一個實施方式涉及雙特異性三價結合分子，其包括針對 PD-1 的兩個表位結合位點和針對不是 PD-1 的分子(例如 B7-H3、B7-H4、BTLA、CD40、CD80、CD86、CD137、CTLA-4、ICOS、KIR、LAG-3、I 類或 II 類 MHC、OX40，PD-L1、TCR、TIM-3 等)上存在的第二表位的一個表位結合位點。針對 PD-1 的兩個表位結合位點可結合相同的表位或不同的表位。本發明的另一實施方式涉及雙特異性三價結合分子，其包括針對 PD-1 的一個表位結合位點和結合不是 PD-1 的分子(例如 B7-H3、B7-H4、BTLA、CD40、CD80、CD86、CD137、CTLA-4、ICOS、KIR、LAG-3、I 類或 II 類 MHC、OX40，PD-L1、TCR、TIM-3 等)上存在的第二抗原的兩個表位結合位點。針對第二抗原的兩個表位結合位點可結合抗原的相同的表位或不同的表位(例如，LAG-3 的相同的或不同的表位)。如上面提供的，這類雙特異性三價結合分子可包括三條或四條多肽鏈。

VI. 恒定結構域和 Fc 區域

【0257】 本文提供了可用于產生本發明的 PD-1 結合分子(例如，抗體、雙抗體、三價結合分子等)的抗體恒定結構域。

【0258】 優選的 CL 結構域是人 IgG CL κ結構域。示例性人 CL κ結構域的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:8**)：

RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC

【0259】 可選地，示例性 CL 結構域是人 IgG CL λ結構域。示例性人 CL κ

結構域的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:9**)：

QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA GVETTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS

【0260】 如本文提供，本發明的 PD-1 結合分子可包括 Fc 區域。本發明的這類分子的 Fc 區域可以具有任何同種型(例如，IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4)。本發明的 PD-1 結合分子可進一步包括 CH1 結構域和/或鉸鏈區。當存在時，CH1 結構域和/或鉸鏈區可以具有任何同種型(例如，IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4)，並且優選地與期望的 Fc 區域具有相同的同種型。

【0261】 示例性 CH1 結構域是人 IgG1 CH1 結構域。示例性人 IgG1 CH1 結構域的氨基酸序列是(**SEQ** ID **NO:10**)：

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRV

【0262】 示例性 CH1 結構域是人 IgG2 CH1 結構域。示例性人 IgG2 CH1 結構域的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:257**)：

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTV

【0263】 示例性 CH1 結構域是人 IgG4 CH1 結構域。示例性人 IgG4 CH1 結構域的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:254**)：

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRV

【0264】 一個示例性鉸鏈區是人 IgG1 鉸鏈區。示例性人 IgG1 鉸鏈區的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:32**)：EPKSCDKTHTCPPCP。

【0265】 另一示例性鉸鏈區是人 IgG2 鉸鏈區。示例性人 IgG2 鉸鏈區的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:11**)：ERKCCVECPPCP。

【0266】 另一示例性鉸鏈區是人 IgG4 鉸鏈區。示例性人 IgG4 鉸鏈區的氨

基酸序列是(**SEQ ID NO:12**)：ESKYGPPCPSCP。如本文所描述，IgG4 鉸鏈區可包括穩定化突變比如 S228P 取代。示例性穩定化的 IgG4 鉸鏈區的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:13**)：ESKYGPPCP**P**CP。

【0267】 本發明的包含 Fc 區域的分子(例如，抗體、雙抗體和三價分子)的 Fc 區域可以是完整的 Fc 區(例如，完整的 IgG Fc 區)或僅僅 Fc 區的片段。任選地，本發明包含 Fc 區的分子的 Fc 區缺少 C-末端賴氨酸氨基酸殘基。尤其地，本發明包含 Fc 區的分子的 Fc 區可以是工程化的變異的 Fc 區。儘管本發明雙特異性包含 Fc 區的分子的 Fc 區可以具有結合一個或多個 Fc 受體(例如，FcγR)的能力，但是更優選地這類變異的 Fc 區具有對 FcγRIA (CD64)、FcγRIIA (CD32A)、FcγRIIB (CD32B)、FcγRIIIA (CD16a)或 FcγRIIIB (CD16b)改變的結合(相對於野生型 Fc 區展示的結合)，或具有對抑制性受體基本上降低結合能力或沒有結合抑制性受體的能力。因此，本發明包含 Fc 區的分子的 Fc 區可包括完整的 Fc 區的一些或所有 CH2 結構域和/或一些或所有 CH3 結構域，或可包括變異的 CH2 和/或變異的 CH3 序列(其相對於完整的 Fc 區的 CH2 或 CH3 結構域，可包括，例如，一個或多個插入和/或一個或多個缺失)。這類 Fc 區可包括非 Fc 多肽部分，或可包括非天然完整 Fc 區的部分，或可包括非天然產生的取向的 CH2 和/或 CH3 結構域(比如，例如，兩個 CH2 結構域或兩個 CH3 結構域，或者在 N-末端至 C-末端方向上，連接至 CH2 結構域的 CH3 結構域等)。

【0268】 鑒定為改變效應子功能的 Fc 區域修飾是本領域已知的，包括增加與啟動性受體(例如，FcγRIIA (CD16A)的結合的修飾和減少與抑制性受體(例如，FcγRIIB (CD32B)結合的修飾(見，例如，Stavenhagen, J.B.等(2007) "*Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fcgamma Receptors*," Cancer Res. 57(18):8882-8890)。具有與 CD32B 降低的結合和/或與

CD16A 增加的結合的人 IgG1 Fc 區的示例性變體包含 F243L、R292P、Y300L、V305I 或 P296L 取代。這些氨基酸取代可以以任何組合或亞組合存在於人 IgG1 Fc 區中。在一個實施方式中，人 IgG1 Fc 區變體包含 F243L、R292P 和 Y300L 取代。在另一實施方式中，人 IgG1 Fc 區變體包含 F243L、R292P、Y300L、V305I 和 P296L 取代。

【0269】 尤其地，本發明包含 Fc 區的分子的多肽鏈的 Fc 區域優選地展示對 FcγRIA (CD64)、FcγRIIA (CD32A)、FcγRIIB (CD32B)、FcγRIIIA (CD16a)或 FcγRIIIB (CD16b)降低的(或基本上沒有)結合(相對於野生型 IgG1 Fc 區(**SEQ ID NO: 1**)展示的結合)。上面敘述了能夠介導這類改變的結合的變異的 Fc 區和突變體形式。在具體的實施方式中，本發明的包含 Fc 區的分子包括展示降低的 ADCC 效應子功能的 IgG Fc 區。在優選的實施方式中，這類包含 Fc 區的分子的第一和/或第三多肽鏈的 CH2-CH3 結構域包括下述的任何 1、2 或 3 個取代：L234A、L235A、N297Q 和 N297G。在另一實施方式中，人 IgG Fc 區變體包含 N297Q 取代、N297G 取代、L234A 和 L235A 取代或 D265A 取代，因為這些突變消除了 FcR 結合。可選地，使用固有地展示對 FcγRIIIA (CD16a)降低的(或基本上沒有)結合和/或降低的效應子功能(相對於野生型 IgG1 Fc 區(**SEQ ID NO: 1**)展示的結合)的 Fc 區的 CH2-CH3 結構域。在具體的實施方式中，本發明包含 Fc 區的分子包括 IgG2 Fc 區(**SEQ IDNO: 2**)或 IgG4 Fc 區(**SEQ ID：NO: 4**)。當使用 IgG4 Fc 區時，本發明也包括引入穩定化突變，比如上述的鉸鏈區 S228P 取代(見，例如，**SEQ ID NO: 13**)。因為 N297G、N297Q、L234A、L235A 和 D265A 取代消除了效應子功能，在期望效應子功能的情況下，優選地將不採用這些取代。

【0270】 尤其地，本發明的包含 Fc 區域的分子的多肽鏈的 Fc 區域優選地展示延長的血清半衰期(相對於相應的野生型 Fc 展示的半衰期)。上面敘述了展示延長的血清半衰期的變異的 Fc 區域和變體形式。在優選的實施方式中，這類

包含Fc區域的分子的第一和/或第三多肽鏈的CH2-CH3結構域包括下述任何1、2或3個取代：M252Y、S254T和T256E。本發明進一步包括本發明的包含Fc區域的分子，其包括變異的Fc區域，所述變異的Fc區域包括：

(A)改變效應子功能和/或FcγR的一個或多個突變；和

(B)延長血清半衰期的一個或多個突變。

【0271】 對於本發明的包含Fc區域的分子的CH2和CH3結構域優選的IgG1序列將包括取代L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E (**SEQ ID NO:258**)：

APE**AA**GGPSV FLFPPKPKDT L**Y**I**T**R**E**PEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPG**X**

其中，X是賴氨酸(K)或不存在。

【0272】 對於本發明的包含Fc區域的分子的CH2和CH3結構域優選的IgG4序列將包括M252Y/S254T/T256E取代(**SEQ ID NO:259**)：

APEFLGGPSV FLFPPKPKDT L**Y**I**T**R**E**PEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSLG**X**

其中，X是賴氨酸(K)或不存在。

【0273】 對於第一和第三多肽鏈不同的雙抗體和三價結合分子，期望減少或防止兩個第一多肽鏈的CH2-CH3結構域之間或兩個第三多肽鏈的CH2-CH3結構域之間發生同源二聚化。這類多肽鏈的CH2和/或CH3結構域不需要序列相同，並且有利地被修飾以促進兩條多肽鏈之間的複合。例如，氨基酸取代(優

選以包括形成“杵(knob)”的大側基的氨基酸例如色氨酸進行取代)可被引入 CH2 或 CH3 結構域中，以便空間干擾將防止與類似的突變結構域的相互作用並將迫使突變的結構域與其中互補或適應性突變已經被工程化的結構域——即“臼(hole)”(例如，用甘氨酸取代)——配對。這樣的突變組可被工程化到任意對、的包括形成 Fc 區的 CH2-CH3 結構域的多肽中。蛋白質工程化以相對于同源二聚化利於異源二聚化的方法在本領域中是悉知的，尤其就工程化免疫球蛋白樣分子而言，這些都包括在本文中(見例如，Ridgway 等(1996) *“‘Knobs-Into-Holes’ Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization,”* Protein Engr. 9:617-621；Atwell 等(1997) *“Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library,”* J. Mol. Biol. 270: 26-35；和 Xie 等(2005) *“A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis,”* J. Immunol. Methods 296:95-101；其每一篇通過引用以其整體併入本文)。優選地“杵”被工程化至包括三條多肽鏈的雙抗體的第一多肽鏈的 CH2-CH3 結構域中和“臼”被工程化至第三多肽鏈的 CH2-CH3 結構域中。因此，“杵”有助於防止第一多肽鏈經其 CH2 和/或 CH3 結構域而同源二聚化。因為第三多肽鏈優選地包含“臼”取代，其將與第一多肽鏈異源二聚化以及和本身同源二聚化。該策略可用於上面詳述的包括三條、四條或五條鏈的雙抗體和三價結合分子，其中“杵”被工程化至第一多肽鏈的 CH2-CH3 結構域中和“臼”被工程化至第三多肽鏈的 CH2-CH3 結構域中。

【0274】 通過修飾 IgG Fc 區以包含修飾 T366W 而產生優選的杵。通過修飾 IgG Fc 區以包含修飾 T366S、L368A 和 Y407V 而產生優選的臼。為了有助於從最終的雙特異性的、異源二聚化的、包含 Fc 區的分子中純化含臼的第三多肽鏈同源二聚體，優選地通過在 435 位的氨基酸取代(H435R)突變第三多肽鏈的含

臼的 CH2 和 CH3 結構域的蛋白質 A 結合位點。因此，含臼的第三多肽鏈同源二聚體不結合蛋白質 A，而雙特異性的異源二聚體經在第一多肽鏈上的蛋白質 A 結合位點而保持其結合蛋白質 A 的能力。在可選的實施方式中，含臼的第三多肽鏈可併入在 434 和 435 位的氨基酸取代(N434A/N435K)。

【0275】 對於本發明包含 Fc 區域的分子的第一多肽鏈的 CH2 和 CH3 結構域，優選的 IgG1 氨基酸序列具有“**包含杵的**”序列(**SEQ ID NO:6**)：

APE**AA**GGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSL**W**CLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPG**X**

其中，**X** 是賴氨酸(K)或不存在。

【0276】 對於具有兩條多肽鏈的本發明的包含 Fc 區域的分子的第二多肽鏈(或具有三、四或五條多肽鏈的包含 Fc 區域的分子的第三多肽鏈)的 CH2 和 CH3 結構域，優選的 IgG1 氨基酸序列具有“**包含臼的**”序列(**SEQ ID NO:7**)：

APE**AA**GGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSL**S**C**A**VK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFL**V**SKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHN**R**YTQKS LSLSPG**X**

其中，**X** 是賴氨酸(K)或不存在。

【0277】 如將認識到，**SEQ ID NO:6** 和 **SEQ ID NO:7** 的 CH2-CH3 結構域包括在 234 位元用丙氨酸的取代和 235 位用丙氨酸的取代，因此形成展示對 FcγRIA (CD64)、FcγRIIA (CD32A)、FcγRIIB (CD32B)、FcγRIIIA (CD16a)或 FcγRIIIB (CD16b)降低的(或基本上沒有)結合的 Fc 區(相對於野生型 Fc 區(**SEQ**

ID NO: 1)展示的結合)。本發明也包括這類 CH2-CH3 結構域，其包括可選的和/或另外的取代，其修飾 Fc 區域的效應子功能和/或 FγR 結合活性。本發明也包括這類 CH2-CH3 結構域，其進一步包括一個或多個延長半衰期的氨基酸取代。尤其地，本發明包括這類包含臼的和這類包含杵的 CH2-CH3 結構域，其進一步包括 M252Y/S254T/T256E。

【0278】 優選地第一多肽鏈具有“包含杵的”CH2-CH3 序列，比如 **SEQ ID NO:6** 的序列。但是，如將認識到，“包含臼的”CH2-CH3 結構域(例如，**SEQ ID NO:7**)可用在第一多肽鏈中，在該情況下，“包含杵的”CH2-CH3 結構域(例如，**SEQ ID NO:6**)將用在具有兩條多肽鏈的本發明的包含 Fc 區域的分子的第二多肽鏈中(或在具有三、四或五條多肽鏈的包含 Fc 區域的分子的第三多肽鏈中)。

【0279】 如上面詳細描述，本發明包括包含 Fc 區域的分子(例如，包含 Fc 區域的抗體和雙抗體)，其具有野生型 CH2 和 CH3 結構域，或具有包括上述取代的組合的 CH2 和 CH3 結構域。包括這些變異的 IgG1 CH2-CH3 結構域的示例性氨基酸序列是(**SEQ ID NO:260**)：

APEX_1X_2GGPSV FLFPPKPKDT LX_3IX_4RX_5PEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLX_6CX_7VK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLX_8SKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHX_9X_{10}YTQKS LSLSPGX_{11}

其中：

(a)X_1 和 X_2 都是 L (野生型)，或都是 A (降低的 FcγR 結合)；

(b)X_3、X_4 和 X_5 分別是 M、S 和 T (野生型)，或 Y、T 和 E (延長的半衰期)，

(c)X_6、X_7 和 X_8 分別是：T、L 和 Y (野生型)，或 W、L 和 Y (杵)，或 S、A 和 V (臼)；

(d)X_9 和 X_{10} 分別是 N 和 H (野生型)，或 N 和 R (沒有蛋白質 A 結合)，或 A

和 K (沒有蛋白質 A 結合)；和

(e)X_{11}是 K 或不存在。

【0280】 在其他實施方式中，本發明包括 PD-1 結合分子，其包括使用本領域已知的突變已經被工程化成相對于同源二聚化利於異源二聚化的 CH2 和/或 CH3 結構域，比如 PCT 公開號 WO 2007/110205、WO 2011/143545、WO 2012/058768、WO 2013/06867 中公開的那些，其所有通過引用以其整體併入本文。

VIII. PD-1 x LAG-3 雙特異性結合分子

【0281】 本發明尤其涉及 PD-1 x LAG-3 雙特異性結合分子(例如，雙特異性抗體、雙特異性雙抗體等)，其包括抗 PD-1 抗體，優選本文提供的新抗人 PD-1 抗體之一，的表位結合片段，和抗人 LAG-3 抗體，優選本文提供的新的抗人 LAG-3 抗體之一，的表位結合片段。本發明優選的 PD-1 x LAG-3 雙特異性結合分子具有抗體的表位結合片段，所述抗體的表位結合片段能夠確保它們能夠協同結合兩個不同表位：PD-1 的表位和 LAG-3 的表位，以便減弱這類分子的抑制活性。如本文所使用，這類減弱指可檢測的 PD-1 和/或 LAG-3 抑制活性減少至少 20%、減少至少 50%、減少至少 80%或減少至少 90%，或完全消除可檢測的 PD-1 和/或 LAG-3 抑制活性。協調抗人 PD-1 抗體和抗 LAG-3 抗體的表位結合片段(例如，VL 和 VH 結構域)的選擇，以便構成這類 PD-1 x LAG-3 雙特異性結合分子的多肽鏈組裝形成對於第一抗原(即，PD-1 或 LAG-3)特異性的至少一個功能性抗原結合位點和對於第二抗原(即，PD-1 或 LAG-3，取決於第一抗原的身份)特異性的至少一個功能性抗原結合位點。

【0282】 在具體的實施方式中，本發明的 PD-1 x LAG-3 雙特異性結合分子是雙特異性雙抗體，其優選地包括如本文所描述的二、三、四或五條多肽鏈。

在另一具體的實施方式中，本發明的 PD-1 x LAG-3 雙特異性結合分子是雙特異性抗體，其優選地包括如本文所描述的二、三、或四條多肽鏈(也見，例如，WO 2007/024715、WO2007/110205、WO 2009/080251、WO 2009/080254、WO 2009/089004、WO 2011/069104、WO 2011/117329、WO 2011/131746、WO 2011/133886、WO 2011/143545、WO2012/023053、WO 2013/060867，其所有描述通過引用以其整體併入本文)。

A. 抗人 LAG-3 抗體

【0283】 下面提供了對於人 LAG-3 免疫特異性的示例性抗體。可通過分離使用 LAG-3 或其肽片段引起的分泌抗體的雜交瘤，或通過篩選用於結合 LAG-3 或其肽片段的重組抗體文庫，製備另外期望的抗體。人 LAG-3 (包括 28 個氨基酸殘基信號序列(以底線顯示)和 497 個氨基酸殘基成熟的蛋白質)具有氨基酸序列(SEQ ID NO:38)：

MWEAQFLGLL FLQPLWVAPV KPLQPGAEVP VVWAQEGAPA QLPCSPTIPL
QDLSLLRRAG VTWQHQPDSG PPAAAPGHPL APGPHPAAPS SWGPRPRRYT
VLSVGPGGLR SGRLPLQPRV QLDERGRQRG DFSLWLRPAR RADAGEYRAA
VHLRDRALSC RLRLRLGQAS MTASPPGSLR ASDWVILNCS FSRPDRPASV
HWFRNRGQGR VPVRESPHHH LAESFLFLPQ VSPMDSGPWG CILTYRDGFN
VSIMYNLTVL GLEPPTPLTV YAGAGSRVGL PCRLPAGVGT RSFLTAKWTP
PGGGPDLLVT GDNGDFTLRL EDVSQAQAGT YTCHIHLQEQ QLNATVTLAI
ITVTPKSFGS PGSLGKLLCE VTPVSGQERF VWSSLDTPSQ RSFSGPWLEA
QEAQLLSQPW QCQLYQGERL LGAAVYFTEL SSPGAQRSGR APGALPAGHL
LLFLILGVLS LLLLVTGAFG FHLWRRQWRP RRFSALEQGI HPPQAQSKIE
ELEQEPEPEP EPEPEPEPEP EPEQL

1. LAG-3 mAb A

【0284】 已經描述了抗人LAG-3抗體BMS-986016 (25F7；Medarex/BMS)，本文命名為“**LAG-3 mAb A**”和其變體(見，例如，WO 2014/008218)。**LAG-3 mAb**

A 的重鏈可變區的氨基酸序列具有氨基酸序列(**SEQ ID NO:39**) (CDR 加底線顯示)：

QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFS **DYYWN**WIRQP PGKGLEWIG**E**
INHNGNTNSN **PSLKS**RVTLS LDTSKNQFSL KLRSVTAADT AVYYCAF**GYS**
DYEYNWFDPW GQGTLVTVSS

【0285】 **LAG-3 mAb A** 的輕鏈可變區的氨基酸序列具有氨基酸序列(**SEQ ID NO:40**) (CDR 加底線顯示)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSC**RASQSIS** **SYLA**WYQQKP GQAPRLLIY**D**
ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYC**QQ** **RSNWPLT**FGQ
GTNLEIK

【0286】 最近已經鑒定了具有獨特的結合特徵的另外的鼠科抗人 LAG-3 抗體(見，美國專利申請號 62/172,277)。本發明優選的 PD-1 x LAG-3 雙特異性結合分子包括抗人 LAG-3 抗體 **LAG-3 mAb 1** 或 **LAG-3 mAb 6** 抗體的表位結合片段，其結合新的表位並且不與 BMS-986016 競爭 LAG-3 結合。尤其優選的是本發明的 PD-1 x LAG-3 雙特異性結合分子，其具有 LAG-3 mAb 1 或 LAG-3 mAb 6 的人源化的 VH 和/或 VL 結構域。

2. LAG-1 mAb 1

【0287】 LAG-3 mAb 1 的 VH 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:41**)顯示在下面(CDRH 殘基以底線顯示)。

QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFR **NYGMN**WVKQA PGKVLKWMG**W**
INTYTGESTY **ADDFEG**RFAF SLGTSASTAY LQINILKNED TATYFCAR**ES**
LYDYYSMDYW GQGTSVTVSS

LAG-3 mAb 1 的 CDRH1 (**SEQ ID NO:42**):**RNYGMN**

LAG-3 mAb 1 的 CDRH2 (**SEQ ID NO43**)：**WINTYTGESTYADDFEG**

LAG-3 mAb 1 的 CDRH3 (**SEQ ID NO:44**):**ESLYDYYSMDY**

【0288】 LAG-3 mAb 1 的 VL 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:45**)顯示在

下面(CDR$_L$ 殘基以底線顯示)：

DVVVTQTPLT LSVTIGQPAS ISC**KSSQSLL HSDGKTYLN**W LLQRPGQSPE RLIY**LVSELD S**GVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYC**WQGTHFP YT**FGGGTKLE IK

LAG-3 mAb 1 的 CDR$_L$1 (**SEQ ID NO:46**):**KSSQSLLHSDGKTYLN**

LAG-3 mAb 1 的 CDR$_L$2 (**SEQ ID NO:47**):**LVSELDS**

LAG-3 mAb 1 的 CDR$_L$3 (**SEQ ID NO:48**):**WQGTHFPYT**

【0289】 下面提供了本文命名為“**hLAG-3 mAb 1 VH1**”和“**hLAG-3 mAb 1 VH2**”的 LAG-3 mAb 1 的兩個示例性人源化的 VH 結構域，和 LAG-3 mAb 1 的四個示例性人源化的 VL 結構域“**hLAG-3 mAb 1 VL1**”、“**hLAG-3 mAb 1 VL2**”、“**hLAG-3 mAb 1 VL3**”和“**hLAG-3 mAb 1 VL4**”。任何人源化的 VL 結構域可與任何人源化的 VH 結構域配對，以產生 LAG-3 結合結構域。因此，包括與人源化的 VH 結構域配對的人源化的 VL 結構域之一的任何抗體一般稱為“**hLAG-3 mAb 1**”，並且並且人源化的 VH/VL 結構域的具體組合通過參考特定的 VH/VL 結構域命名，例如包括 hLAG-3 mAb 1 VH1 和 hLAG-3 mAb 1 VL2 的人源化抗體具體稱為“**hLAG-3 mAb 1(1.2)**”。

【0290】 **hLAG-3 mAb 1 VH1** 的 VH 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:49**)顯示在下面(CDRH 殘基以底線顯示)：

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT **NYGMN**WVRQA PGQGLEWMG**W INTYTGESTY ADDFEG**RFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYYCAR**ES LYDYYSMDY**W GQGTTVTVSS

【0291】 **hLAG-3 mAb 1 VH2** 的 VH 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:50**)顯示在下面(CDRH 殘基以底線顯示)：

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT **NYGMN**WVRQA PGQGLEWMG**W INTYTGESTY ADDFEG**RFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYFCAR**ES LYDYYSMDY**W GQGTTVTVSS

【0292】 **hLAG-3 mAb 1 VL1** 的 VL 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:51**)顯示在下面(CDR$_L$ 殘基以底線顯示)：

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISC**KSSQSLL HSDGKTYLN**W LLQKPGQSPE RLIY**LVSELD S**GVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYC**WQGTHFP YT**FGGGTKVE IK

【0293】 **hLAG-3 mAb 1 VL2** 的 VL 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:52**)顯示在下面(CDR$_L$ 殘基以底線顯示)：

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISC**KSSQSLL HSDGKTYLN**W LLQRPGQSPE RLIY**LVSELD S**GVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYC**WQGTHFP YT**FGGGTKVE IK

【0294】 **hLAG-3 mAb 1 VL3** 的 VL 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:53**)顯示在下面(CDR$_L$ 殘基以底線顯示)：

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISC**KSSQSLL HSDGKTYLN**W LLQKPGQPPE RLIY**LVSELD S**GVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYC**WQGTHFP YT**FGGGTKVE IK

【0295】 hLAG-3 mAb 1 VL4 的 VL 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:54**)顯示在下面(CDR$_L$ 殘基以底線顯示)：

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISC**KSSQSLL HSDAKTYLN**W LLQKPGQPPE RLIY**LVSELD S**GVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYC**WQGTHFP YT**FGGGTKVE IK

【0296】 hLAG-3 mAb 1 VL4 的 VL 結構域的 CDR$_L$1 包括甘氨酸至丙氨酸的氨基酸取代，並且具有氨基酸序列：**KSSQSLLHSDAKTYLN (SEQ ID NO:55)**，取代的丙氨酸加底線顯示)。考慮類似的取代可併入任何上述 LAG-3 mAb 1 CDR$_L$1 結構域中。

3. LAG-3 mAb 6

【0297】 LAG-3 mAb 6 的 VH 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:56**)顯示

在下面(CDRH 殘基以底線顯示)：

EVLLQQSGPE LVKPGASVKI PCKASGYTFT**DYNMD**WVKQS HGESLEWIG**D**
INPDNGVTIY NQKFEGKATL TVDKSSSTAY MELRSLTSED TAVYYCAR**EA**
DYFYFDYWGQ GTTLTVSS

LAG-3 mAb 6 的 CDRH1 (**SEQ ID NO:57**):**DYNMD**

LAG-3 mAb 6 的 CDRH2 (**SEQ ID NO:58**):**DINPDNGVTIYNQKFEG**

LAG-3 mAb 6 的 CDRH3 (**SEQ ID NO:59**):**EADYFYFDY**

【0298】 LAG-3 mAb 6 的 VL 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:60**)顯示在下面(CDR 殘基以底線顯示)：

DIVMTQSHRF MSTSVGDRVS ITC**KASQDVS SVVA**WYQQKP GQSPKLLIF**S**
ASYRYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA ADLAVYYCQQ **HYSTPWT**FGG
GTKLEIK

LAG-3 mAb 6 的 CDR_L1 (**SEQ ID NO:61**):**KASQDVSSVVA**

LAG-3 mAb 6 的 CDR_L2 (**SEQ ID NO:62**):**SASYRYT**

LAG-3 mAb 6 的 CDR_L3 (**SEQ ID NO:63**):**HYSTPWT**

【0299】 下面提供了本文命名為“**hLAG-3 mAb 6 VH1**”和“**hLAG-3 mAb 6 VH2**”的 LAG-3 mAb 6 的兩個示例性人源化的 VH 結構域，和 LAG-3 mAb 6 的兩個示例性人源化的 VL 結構域“**hLAG-3 mAb 1 VL1**”和“**hLAG-3 mAb 1 VL2**”。任何人源化的 VL 結構域可與任何人源化的 VH 結構域配對，以產生 LAG-3 結合結構域。因此，包括與人源化的 VH 結構域配對的人源化的 VL 結構域之一的任何抗體一般稱為“**hLAG-3 mAb 6**”，並且，人源化的 VH/VL 結構域的具體組合通過參考特定 VH/VL 結構域命名，例如包括 hLAG-3 mAb 6 VH1 和 hLAG-3 mAb 6 VL2 的人源化抗體具體稱為“**hLAG-3 mAb 6(1.2)**.”

【0300】 **hLAG-3mAb 6 VH1** 的 VH 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:294**)顯示在下面(CDRH 殘基以底線顯示)：

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT **DYNMD**WVRQA PGQGLEWMG**D**
INPDNGVTIY NQKFEGRVTM TTDTSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCAR**EA**
DYFYFDYWGQ GTTLTVSS

【0301】 **hLAG-3mAb 6 VH2** 的 VH 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:295**)顯示在下面(CDRH 殘基以底線顯示)：

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **DYNMD**WVRQA PGKGLEWVS**D**
INPDNGVTIY NQKFEGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAR**EA**
DYFYFDYWGQ GTTLTVSS

【0302】 **hLAG-3mAb 6 VL1** 的 VL 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:296**)顯示在下面(CDR_L 殘基以底線顯示)：

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITC**RASQDVS SVVA**WYQQKP GKAPKLLIY**S**
ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ **HYSTPWT**FGG
GTKLEIK

【0303】 **hLAG-3mAb 6 VL2** 的 VL 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:297**)顯示在下面(CDR_L 殘基以底線顯示)：

DIVMTQSPSS LSASVGDRVT ITC**RASQDVS SVVA**WYQQKP GKAPKLLIY**S**
ASYRYTGVPD RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIAVYYCQQ **HYSTPWT**FGG
GTKLEIK

【0304】 hLAG-3 mAb 6 VL1 和 VL2 的 VL 結構域的 CDR_L1 包括賴氨酸至精氨酸的氨基酸取代並且具有氨基酸序列：**RASQDVSSVVA(SEQ ID NO:298)**，取代的精氨酸加底線顯示)。考慮類似的取代可併入上述任何 LAG-3 mAb 6 CDR_L1 結構域中。

C. 具有 E/K-螺旋的、包含 Fc 區域的示例性四鏈雙抗體

【0305】 產生了包含 Fc 區域的四個示例性 PD-1 X LAG-3 雙特異性、四鏈雙抗體，其包括 E/K-螺旋異源二聚體促進結構域(命名為“**DART A**”、“**DART B**”、“**DART C**”和“**DART I**”)。下面詳細描述了這些包含 Fc 區域的雙抗體的結構。

這些示例性 PD-1 x LAG-3 雙抗體旨在是說明性的，但是決不限制本發明的範圍。

1. DART A

【0306】 DART A 是雙特異性、四鏈、包含 Fc 區域的雙抗體，其具有對於 PD-1 特異性的兩個結合位點、對於 LAG-3 特異性的兩個結合位元點、被工程化用於延長半衰期的變異的 IgG4 Fc 區域、和包含半胱氨酸的 E/K-螺旋異源二聚體促進結構域。DART A的第一和第三多肽鏈在N-末端至C-末端方向上包括：N-末端；能夠結合 LAG-3 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL4) (**SEQ ID NO:54**)；間插連接體肽(**連接體 1:**GGGSGGGG (**SEQ ID NO:14**))；能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO:147**)；包含半胱氨酸的間插連接體肽(**連接體 2:**GGCGGG (**SEQ ID NO:15**))；包含半胱氨酸的異源二聚體促進(E-螺旋)結構域(EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:23**))；穩定化的 IgG4 鉸鏈區(**SEQ ID NO:13**)；包括取代 M252Y/S254T/T256E 和缺少 C-末端殘基的變異的 IgG4 CH2-CH3 結構域(**SEQ ID NO:259**)；和 C-末端。

【0307】 DART A 的第一和第三多肽鏈的氨基酸序列是 **SEQ ID NO:267** 的變體：

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDX$_1$KTYLNW LLQKPGQPPE
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
YTFGGGTKVE IKGGGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT
SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY
MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSG GCGGGEVAAC
EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKESKYGPP CPPCPAPEFL GGPSVFLFPP
KPKDTLX$_2$IX$_3$R X$_4$PEVTCVVVD VSQEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE
PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP
PVLDSDGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSL G

其中獨立地選擇 X_1、X_2、X_3 和 X_4，並且其中 X_1 是 A 或 G；X_2 是 Y 或 M；X_3 是 T 或 S；和 X_4 是 E 或 T。

【0308】 DART A 的第一和第三多肽鏈的氨基酸序列是**SEQ ID NO:267**，其中 X_1 是 A；X_2 是 Y；X_3 是 T；和 X_4 是 E。

【0309】 DART A 的第二和第四多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端；能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO:153**)；間插連接體肽(**連接體 1:**GGGSGGGG (**SEQ ID NO:14**))；能夠結合 LAG-3 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (**SEQ ID NO:49**)；包含半胱氨酸的間插連接體肽(**連接體 2:**GGCGGG (**SEQ ID NO:15**))；包含半胱氨酸的異源二聚體促進(K-螺旋)結構域(KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO:24**)；和 C-末端。

【0310】 DART A 的第二和第四多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:268**)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTN
YGMNWVRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTSASTAYL
QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMDYWG QGTTVTVSSG GCGGGKVAAC
KEKVAALKEK VAALKEKVAA LKE

2. DART B

【0311】 DART B 與 DART A 相同，除了 DART B 的第一和第三多肽鏈包括 HLAG-3 mAb 1 VL3 的 VL 結構域(**SEQ ID NO:53**)，其包括 CDR_L1 中的氨基酸取代。因此，DART B 的第一和第三多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端；能夠結合 LAG-3 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL3) (**SEQ ID NO:53**)；間插連接體肽(**連接體 1:**GGGSGGGG (**SEQ ID NO:14**))；能夠

結合 PD-1 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO:147**)；間插連接體肽(**連接體 2:**GGCGGG (**SEQ ID NO:15**))；包含半胱氨酸的異源二聚體促進(E-螺旋)結構域(EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:23**))；穩定化的 IgG4 鉸鏈區(**SEQ ID NO:13**)；包括取代 M252Y/S254T/T256E 並且沒有 C-末端殘基的 IgG4 CH2-CH3 結構域的變體(**SEQ ID NO:259**)；和 C-末端。

【0312】 DART B 的第一和第三多肽鏈的氨基酸序列是 **SEQ ID NO:267**，其中 X_1 是 G；X_2 是 Y；X_3 是 T；和 X_4 是 E。

【0313】 DART B 的第二和第四多肽鏈的氨基酸序列是 **SEQ ID NO:268**。

3. DART C

【0314】 DART C 與 DART B 相同，除了 DART B 的第一和第三多肽鏈包括缺少 C-末端殘基的野生型 IgG4 CH2-CH3 結構域(**SEQ ID NO:4**)。因此，DART C 的第一和第三多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端；能夠結合 LAG-3 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL3) (**SEQ ID NO:53**)；間插連接體肽(**連接體 1:**GGGSGGGG (**SEQ ID NO:14**))；能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO:147**)；間插連接體肽(**連接體 2:**GGCGGG (**SEQ ID NO:15**))；包含半胱氨酸的異源二聚體促進(E-螺旋)結構域(EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:23**))；穩定化的 IgG4 鉸鏈區(**SEQ ID NO:13**)；缺少 C-末端殘基的 IgG4 CH2-CH3 結構域(**SEQ ID NO:4**)；和 C-末端。

【0315】 DART C 的第一和第三多肽鏈的氨基酸序列是 **SEQ ID NO:267**，其中 X_1 是 G；X_2 是 M；X_3 是 S；和 X_4 是 T。

【0316】 DART C 的第二和第四多肽鏈的氨基酸序列是 **SEQ ID**

NO:268。

4. DART I

【0317】 DART I 是雙特異性、四鏈、包含 Fc 區域的雙抗體，其具有對於 PD-1 特異性的兩個結合位點、對於 LAG-3 特異性的兩個結合位元點、被工程化用於延長半衰期的變異的 IgG4 Fc 區域、和包含半胱氨酸的 E/K-螺旋異源二聚體促進結構域。DART I 的第一和第三多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端、能夠結合 LAG-3 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 6 VL1) (**SEQ ID NO:296**)；間插連接體肽(**連接體 1:**GGGSGGGG (**SEQ ID NO:14**))；能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO:147**)；包含半胱氨酸的間插連接體肽(**連接體 2:**GGCGGG (**SEQ ID NO:15**))；包含半胱氨酸的異源二聚體促進(E-螺旋)結構域(EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:23**))；穩定化的 IgG4 鉸鏈區(**SEQ ID NO:13**)；包括取代 M252Y/S254T/T256E 和缺少 C-末端殘基的變異的 IgG4 CH2-CH3 結構域(**SEQ ID NO:259**)；和 C-末端。

【0318】 DART I 的第一和第三多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:290**)：

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS
ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWTFGG
GTKLEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYSFTSYWMN
WVRQAPGQGL EWIGVIHPSD SETWLDQKFK DRVTITVDKS TSTAYMELSS
LRSEDTAVYY CAREHYGTSP FAYWGQGTLV TVSSGGCGGG EVAACEKEVA
ALEKEVAALE KEVAALEKES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT
LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY
RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT
LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS
DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG

【0319】 DART I 的第二和第四多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-

末端;能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO:153**)；間插連接體肽(**連接體 1:**GGGSGGGG (**SEQ ID NO:14**))；能夠結合 LAG-3 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 6 VH1) (**SEQ ID NO:294**)；包含半胱氨酸的間插連接體肽(**連接體 2:**GGCGGG (**SEQ ID NO:15**))；包含半胱氨酸的異源二聚體促進(K-螺旋)結構域(KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO:24**)；和 C-末端。

【0320】 DART I 的第二和第四多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:291**)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTD
YNMDWVRQAP GQGLEWMGDI NPDNGVTIYN QKFEGRVTMT TDTSTSTAYM
ELRSLRSDDT AVYYCAREAD YFYFDYWGQG TTLTVSSGGC GGGKVAACKE
KVAALKEKVA ALKEKVAALK E

C. 具有 CL/CH1 結構域的、包含 Fc 區域的示例性四鏈雙抗體

【0321】 產生了命名為“**DART D**”、“**DART E**”、“**DART J**”和“**DART 1**”的包括 CL/CH1 結構域的四個示例性 PD-1 X LAG-3 雙特異性、四鏈、包含 Fc 區域的雙抗體。下面詳述了這些包含 Fc 區域的雙抗體的結構。這些示例性 PD-1 x LAG-3 雙抗體旨在是說明性的，但是決不限制本發明的範圍。

1. DART D

【0322】 DART D 是雙特異性、四鏈、包含 Fc 區域的雙抗體，其具有對於 PD-1 特異性的兩個結合位點、對於 LAG-3 特異性的兩個結合位點、CL/CH1 結構域和被工程化用於延長半衰期的變異的 IgG4 Fc 區域。DART D 的第一和第三多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端；能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO:153**)；間插連接體肽(**連**

接體 1:GGGSGGGG (**SEQ ID NO:14**))；能夠結合 LAG-3 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (**SEQ ID NO:49**)；間插連接體肽(**連接體 2:** LGGGSG (**SEQ ID NO:261**))；IgG4 CH1 結構域(**SEQ ID NO:254**)；穩定化的 IgG4 鉸鏈區(**SEQ ID NO：13**)；包括取代 M252Y/S254T/T256E 並且缺少 C-末端殘基的 IgG4 CH2-CH3 結構域的變體(**SEQ ID NO:259**)；和 C-末端。

【0323】 DART D 的第一和第三多肽鏈的氨基酸序列是(SEQ ID NO:269)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTN
YGMNWVRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTSASTAYL
QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMDYWG QGTTVTVSSL GGGSGASTKG
PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS LGTKTYTCNV DHKPSNTKVD KRVESKYGPP
CPPCPAPEFL GGPSVFLFPP KPKDTLYITR EPEVTCVVVD VSQEDPEVQF
NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS
DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC
SVMHEALHNH YTQKSLSLSL G

【0324】 DART D的第二和第四多肽鏈在N-末端至C-末端方向上包括：N-末端；能夠結合 LAG-3 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL4) (**SEQ ID NO:54**)；間插連接體肽(**連接體 1**:GGGSGGGG (**SEQ ID NO:14**))；能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO:147**)；間插連接體肽(**連接體 2**:LGGGSG (**SEQ ID NO:261**))；κ CL 結構域 (**SEQ ID NO:8**)；和 C-末端。

【0325】 DART D 的第二和第四多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:270**)：

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
YTFGGGTKVE IKGGGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT
SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY
MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSL GGGSGRTVAA
PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNNFYPR EAKVQWKVDN ALQSGNSQES
VTEQDSKDST YSLSSTLTLS KADYEKHKVY ACEVTHQGLS SPVTKSFNRG EC

2. DART E

【0326】 DART E 是另一雙特異性、四鏈、包含 Fc 區域的雙抗體，其具有對於 PD-1 特異性的兩個結合位點、對於 LAG-3 特異性的兩個結合位點、CL/CH1 結構域和被工程化用於延長的半衰期的變異的 IgG4 Fc 區域。DART E 的 PD-1 和 LAG-3 結合位點的位置與 DART D 相比是顛倒的。

【0327】 DART E 的第一和第三多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端；能夠結合 LAG-3 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL4) (**SEQ ID NO:54**)；間插連接體肽(**連接體 1:**GGGSGGGG (**SEQ ID NO:14**))；能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO:147**)；間插連接體肽(**連接體 2:** LGGGSG (**SEQ ID NO:261**))；IgG4 CH1 結構域(**SEQ ID NO:254**)；穩定化的 IgG4 鉸鏈區(**SEQ ID NO：13**)；包括取代 M252Y/S254T/T256E 並且缺少 C-末端殘基的 IgG4 CH2-CH3 結構域的變體(**SEQ ID NO:259**)；和 C-末端。

【0328】 DART E 的第一和第三多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:271**)：

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
YTFGGGTKVE IKGGGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT
SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY
MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSL GGGSGASTKG

PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS LGTKTYTCNV DHKPSNTKVD KRVESKYGPP
CPPCPAPEFL GGPSVFLFPP KPKDTLYITR EPEVTCVVVD VSQEDPEVQF
NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS
DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC
SVMHEALHNH YTQKSLSLSL G

【0329】 DART E 的第二和第四多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端；能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO:153**)；間插連接體肽(**連接體 1:**GGGSGGGG (**SEQ ID NO:14**))；能夠結合 LAG-3 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (**SEQ ID NO:49**)；間插連接體肽(**連接體 2:** LGGGSG (**SEQ ID NO:261**))；κ CL 結構域(**SEQ ID NO:8**)；和 C-末端。

【0330】 DART E 的第二和第四多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:272**)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTN
YGMNWVRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTSASTAYL
QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMDYWG QGTTVTVSSL GGGSGRTVAA
PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNNFYPR EAKVQWKVDN ALQSGNSQES
VTEQDSKDST YSLSSTLTLS KADYEKHKVY ACEVTHQGLS SPVTKSFNRG EC

3. DART J

【0331】 DART J 是雙特異性、四鏈、包含 Fc 區域的雙抗體，其具有對於 PD-1 特異性的兩個結合位點、對於 LAG-3 特異性的兩個結合位點、CL/CH1 結構域和被工程化用於延長半衰期的變異的 IgG4 Fc 區域。DART J 的第一和第三多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端；能夠結合 LAG-3 的單克隆抗

體的 VL 結構域(VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 6 VL1) (**SEQ ID NO:296**)；間插連接體肽(**連接體 1**：GGGSGGGG (**SEQ ID NO:14**))；能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO:147**)；間插連接體肽(**連接體 2:**LGGGSG (**SEQ ID NO:261**))；IgG4 CH1 結構域(**SEQ ID NO:254**)；穩定化的 IgG4 鉸鏈區(**SEQ ID NO：13**)；包括取代 M252Y/S254T/T256E 並且缺少 C-末端殘基的 IgG4 CH2-CH3 結構域的變體(**SEQ ID NO:259**)；和 C-末端。

【0332】 DART J 的第一和第三多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:292**)：

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS
ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWTFGG
GTKLEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYSFTSYWMN
WVRQAPGQGL EWIGVIHPSD SETWLDQKFK DRVTITVDKS TSTAYMELSS
LRSEDTAVYY CAREHYGTSP FAYWGQGTLV TVSSLGGGSG ASTKGPSVFP
LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP
APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSLG

【0333】 DART J 的第二和第四多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端；能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO:153**)；間插連接體肽(**連接體 1:**GGGSGGGG(**SEQ ID NO:14**))；能夠結合 LAG-3 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 6 VH1) (**SEQ ID NO:294**)；間插連接體肽(**連接體 2**：LGGGSG (**SEQ ID NO:261**))；κ CL 結構域(**SEQ ID NO:8**)；和 C-末端。

【0334】 DART J 的第二和第四多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID**

NO:293)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTD
YNMDWVRQAP GQGLEWMGDI NPDNGVTIYN QKFEGRVTMT TDTSTSTAYM
ELRSLRSDDT AVYYCAREAD YFYFDYWGQG TTLTVSSLGG GSGRTVAAPS
VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNNFYPREA KVQWKVDNAL QSGNSQESVT
EQDSKDSTYS LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

4. DART 1

【0335】 DART 1 是雙特異性、四鏈、包含 Fc 區域的雙抗體，其具有對於 PD-1 特異性的兩個結合位點、對於 LAG-3 特異性的兩個結合位點、CL/CH1 結構域和針對降低的 FcγR 結合被工程化的變異的 IgG1 Fc 區域。DART 1 的第一和第三多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端、能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{PD-1} PD-1 mAb A VL) (**SEQ ID NO:65**)、間插連接體肽(**連接體 1:**GGGSGGGG (**SEQ ID NO:14**))、能夠結合 LAG-3 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{LAG-3} LAG-3 mAb A VH1) (**SEQ ID NO:39**)、間插連接體肽(**連接體 2:**LGGGSG (**SEQ ID NO:261**))、IgG1 CH1 結構域(**SEQ ID NO:10**)、IgG1 鉸鏈區(**SEQ ID NO：32**)、包括取代 L234A/L235A 並且缺少 C-末端殘基的 IgG1 CH2-CH3 結構域的變體(**SEQ ID NO:5**)和 C-末端。

【0336】 DART 1 的第一和第三多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:284**)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGQ
GTNLEIKGGG SGGGGQVQLV ESGGGVVQPG RSLRLDCKAS GITFSNSGMH
WVRQAPGKGL EWVAVIWYDG SKRYYADSVK GRFTISRDNS KNTLFLQMNS
LRAEDTAVYY CATNDDYWGQ GTLVTVSSLG GGSGASTKGP SVFPLAPSSK
STSGGTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS

SVVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVDK RVEPKSCDKT HTCPPCPAPE
AAGGPSVFLF PPKPKDTLYI TREPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE
VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE
KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES
NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH
NHYTQKSLSL SPG

【0337】 DART 1 的第二和第四多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端、能夠結合 LAG-3 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{LAG-3} LAG-3 mAb A VL) (**SEQ ID NO:40**)、間插連接體肽(**連接體 1**：GGGSGGGG (**SEQ ID NO:14**))、能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{PD-1} PD-1 mAb A VH) (**SEQ ID NO:64**)、間插連接體肽(**連接體 2**：LGGGSG (**SEQ ID NO:261**))、κ CL 結構域(**SEQ ID NO:8**)和 C-末端。

【0338】 DART 1 的第二和第四多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:285**)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLQ QWGAGLLKPS ETLSLTCAVY GGSFSDYYWN
WIRQPPGKGL EWIGEINHNG NTNSNPSLKS RVTLSLDTSK NQFSLKLRSV
TAADTAVYYC AFGYSDYEYN WFDPWGQGTL VTVSSLGGGS GRTVAAPSVF
IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ
DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

D.包含 Fc 區域的示例性五鏈雙抗體

【0339】 產生包括 CL/CH1 結構域和 E/K-螺旋異源二聚體促進結構域的兩個示例性 PD-1 X LAG-3 雙特異性、包含 Fc 區域的五鏈雙抗體，命名為“**DART F**”和“**DART G**”。下面詳述了這些包含 Fc 區域的雙抗體的結構。這些示例性 PD-1 x LAG-3 雙抗體旨在是說明性的，但是決不限制本發明的範圍。

1. DART F

【0340】 DART F 是雙特異性、五鏈、包含 Fc 區域的雙抗體，其具有對於 PD-1 特異性的三個結合位點、對於 LAG-3 特異性的一個結合位元點、CL/CH1 結構域、針對降低的 FcγR 結合和延長的半衰期而被工程化的包含變異的杵/臼的 IgG1 Fc 區域和 E/K-螺旋異源二聚體促進結構域。DART F 的第一多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端；能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VH 結構域 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO:147**)；IgG1 CH1 結構域(**SEQ ID NO:10**)；IgG1 鉸鏈區(**SEQ ID NO:32**)；包括取代 L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E/N434A/H435K 並且缺少 C-末端殘基的、包含臼的 IgG1 CH2-CH3 結構域(**SEQ ID NO:260**，其中 X_1 是 A，X_2 是 A；X_3 是 Y，X_4 是 T，X_5 是 E，X_6 是 S，X_7 是 A，X_8 是 V，X_9 是 A，X_{10} 是 K，和 X_{11} 不存在)；和 C-末端。

【0341】 DART F 的第一多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:273**)：

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV
IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY
ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK
DTLYITREPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
YTLPPSREEM TKNQVSLSCA VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL
DSDGSFFLVS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHAKYTQ KSLSLSPG

【0342】 DART F 的第二和第五多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端、能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO:153**)、κ CL 結構域(**SEQ ID NO:8**)和 C-末端。

【0343】 DART F 的第二和第五多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:274**)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV
THQGLSSPVT KSFNRGEC

【0344】 DART F 的第三多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括:N-末端；能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO:147**)；IgG1 CH1 結構域(**SEQ ID NO:10**)；IgG1 鉸鏈區(**SEQ ID NO:32**)；包括取代 L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E 並且缺少 C-末端殘基的、包含杵的 IgG1 CH2-CH3 結構域(**SEQ ID NO:260**，其中 X_1 是 A，X_2 是 A；X_3 是 Y，X_4 是 T，X_5 是 E，X_6 是 W，X_7 是 L，X_8 是 Y，X_9 是 N，X_{10} 是 H，和 X_{11} 不存在)；間插連接體肽(GGGSGGGSGGG (**SEQ ID NO:262**))；能夠結合 LAG-3 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL4) (**SEQ ID NO:54**)；間插連接體肽(**連接體 1:**GGGSGGGG (**SEQ ID NO:14**))；能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO:147**)；包含半胱氨酸的間插連接體肽(**連接體 2:**GGCGGG (**SEQ ID NO:15**))；異源二聚體促進(E-螺旋)結構域(EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:21**))；和 C-末端。

【0345】 DART F 的第三多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:275**)：

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV
IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY
ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK
DTLYITREPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
YTLPPSREEM TKNQVSLWCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL
DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGGG
GSGGGSGGGD IVMTQTPLSL SVTPGQPASI SCKSSQSLLH SDAKTYLNWL

LQKPGQPPER LIYLVSELDS GVPDRFSGSG SGTDFTLKIS RVEAEDVGVY
YCWQGTHFPY TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS
CKASGYSFTS YWMNWVRQAP GQGLEWIGVI HPSDSETWLD QKFKDRVTIT
VDKSTSTAYM ELSSLRSEDT AVYYCAREHY GTSPFAYWGQ GTLVTVSSGG
CGGGEVAALE KEVAALEKEV AALEKEVAAL EK

【0346】 DART F 的第四多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端、能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO:153**)、間插連接體肽(**連接體 1:**GGGSGGGG (**SEQ ID NO:14**))、能夠結合 LAG-3 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (**SEQ ID NO:49**)、包含半胱氨酸的間插連接體肽(**連接體 2:**GGCGGG (**SEQ ID NO:15**))、異源二聚體促進(K-螺旋)結構域(KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO:22**))和 C-末端。

【0347】 DART F 的第四多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:276**)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTN
YGMNWVRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTSASTAYL
QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMDYWG QGTTVTVSSG GCGGGKVAAL
KEKVAALKEK VAALKEKVAA LKE

2. DART G

【0348】 DART G 是雙特異性、五鏈、包含 Fc 區域的雙抗體，其具有對於 PD-1 特異性的兩個結合位點、對於 LAG-3 特異性的兩個結合位元點、CL/CH1 結構域、針對降低的 FcγR 結合和延長的半衰期而被工程化的包含變異的杵/臼的 IgG1 Fc 區域，和 E/K-螺旋異源二聚體促進結構域。DART G 的第一多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端；能夠結合 LAG-3 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (**SEQ ID NO:49**)；IgG1 CH1 結構域(**SEQ ID NO:10**)；IgG1 鉸鏈區(**SEQ ID NO:32**)；包括取代

L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E/N434A/H435K 並且缺少 C-末端殘基的、包含臼的 IgG1 CH2-CH3 結構域(**SEQ ID NO:260**，其中 X_1 是 A，X_2 是 A；X_3 是 Y，X_4 是 T，X_5 是 E，X_6 是 S，X_7 是 A，X_8 是 V，X_9 是 A，X_{10} 是 K，和 X_{11} 不存在)；和 C-末端。

【0349】 DART G 的第一多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:277**)：

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW
INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYYCARES
LYDYYSMDYW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK
DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP
KDTLYITREP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
VYTLPPSREE MTKNQVSLSC AVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV
LDSDGSFFLV SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHAKYT QKSLSLSPG

【0350】 DART G的第二和第五多肽鏈在N-末端至C-末端方向上包括：N-末端、能夠結合 LAG-3 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL4) (**SEQ ID NO:54**)、κ CL 結構域(**SEQ ID NO:8**)和 C-末端。

【0351】 DART G 的第二和第五多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:278**)：

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
YTFGGGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

【0352】 DART G的第三多肽鏈在N-末端至C-末端方向上包括：N-末端；能夠結合 LAG-3 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (**SEQ ID NO:49**)；IgG1 CH1 結構域(**SEQ ID NO:10**)、IgG1 鉸鏈區(**SEQ ID NO:32**)；

包括取代 L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E 並且缺少 C-末端殘基的、包含杵的 IgG1 CH2-CH3 結構域(**SEQ ID NO:260**，其中 X_1 是 A，X_2 是 A；X_3 是 Y，X_4 是 T，X_5 是 E，X_6 是 W，X_7 是 L，X_8 是 Y，X_9 是 N，X_{10} 是 H，和 X_{11} 不存在)；間插連接體肽(GGGSGGGSGGG (**SEQ ID NO:262**))；能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO:153**)；間插連接體肽(**連接體 1:**GGGSGGGG (**SEQ ID NO:14**))；能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO:147**)；包含半胱氨酸的間插連接體肽(**連接體 2:**GGCGGG (**SEQ ID NO:15**))；異源二聚體促進(E-螺旋)結構域(EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:21**))；和 C-末端。

【0353】 DART G 的第三多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:279**)：

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW
INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYYCARES
LYDYYSMDYW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK
DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP
KDTLYITREP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
VYTLPPSREE MTKNQVSLWC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV
LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGG
GGSGGGSGGG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF
QQKPGQPPKL LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY
FCQQSKEVPY TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS
CKASGYSFTS YWMNWVRQAP GQGLEWIGVI HPSDSETWLD QKFKDRVTIT
VDKSTSTAYM ELSSLRSEDT AVYYCAREHY GTSPFAYWGQ GTLVTVSSGG
CGGGEVAALE KEVAALEKEV AALEKEVAAL EK

【0354】 DART G的第四多肽鏈在N-末端至C-末端方向上包括：N-末端、能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO:153**)、間插連接體肽(**連接體 1:**GGGSGGGG (**SEQ ID NO:14**))、能夠結合

PD-1 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO:147**)、包含半胱氨酸的間插連接體肽(**連接體 2:**GGCGGG (**SEQ ID NO:15**))、異源二聚體促進(K-螺旋)結構域(KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO:22**)和 C-末端。

【0355】 DART G 的第四多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:280**)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYSFTS
YWMNWVRQAP GQGLEWIGVI HPSDSETWLD QKFKDRVTIT VDKSTSTAYM
ELSSLRSEDT AVYYCAREHY GTSPFAYWGQ GTLVTVSSGG CGGGKVAALK
EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE

E. 具有 E/K-螺旋的包含 Fc 區域的示例性三鏈雙抗體

【0356】 本發明另外提供了 PD-1 X LAG-3 雙特異性、三鏈、包含 Fc 區域的雙抗體，其包括 E/K-螺旋異源二聚體促進結構域。產生了包括 E/K-螺旋異源二聚體促進結構域的示例性 PD-1 X LAG-3 雙特異性、三鏈、包含 Fc 區域的雙抗體，命名為“**DART H**”。下面詳述了該包含 Fc 區域的雙抗體的結構。該示例性 PD-1 x LAG-3 雙抗體旨在是說明性的，但是決不限制本發明的範圍。

【0357】 DART H 是雙特異性、包含 Fc 區域的三鏈雙抗體，其具有對於 PD-1 特異性的一個結合位點、對於 LAG-3 特異性的一個結合位點、針對降低的 FcγR 結合而被工程化的包含變異的杵/臼的 IgG1 Fc 區域和 E/K-螺旋異源二聚體促進結構域。

【0358】 DART H的第一多肽鏈在N-末端至C-末端方向上包括：N-末端、能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO:153**)、間插連接體肽(**連接體 1:**GGGSGGGG (**SEQ ID NO:14**))、能夠結合 LAG-3 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (**SEQ ID**

NO:49)、包含半胱氨酸的間插連接體肽(**連接體 2:**GGCGGG (**SEQ ID NO:15**))、異源二聚體促進(E-螺旋)結構域(EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:21**))、間插連接體(**間隔體-連接體 3:**GGGDKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:263**))、包括取代 L234A/L235A 和具有 C-末端賴氨酸殘基的包含杵的 IgG1 CH2-CH3 結構域(**SEQ ID NO:6**)和 C-末端。

【0359】 DART H 的第一多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:281**)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTN
YGMNWVRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTSASTAYL
QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMDYWG QGTTVTVSSG GCGGGEVAAL
EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKGGGDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP
PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK

【0360】 DART H的第二多肽鏈在N-末端至C-末端方向上包括:N-末端、能夠結合 LAG-3 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL4) (**SEQ ID NO:54**)、間插連接體肽(**連接體 1:**GGGSGGGG (**SEQ ID NO:14**))、能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO:147**)、包含半胱氨酸的間插連接體肽(**連接體 2:**GGCGGG (**SEQ ID NO:15**))、異源二聚體促進(K-螺旋)結構域(KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO:22**))和 C-末端。

【0361】 DART H 的第二多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:282**)：

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
YTFGGGTKVE IKGGGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT

SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSG GCGGGKVAAL KEKVAALKEK VAALKEKVAA LKE

【0362】 DART H的第三多肽鏈在N-末端至C-末端方向上包括:N-末端、鉸鏈區(DKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:31**)、包括取代 L234A/L235A 並且具有 C-末端賴氨酸殘基的包含臼的 IgG1 CH2-CH3 結構域(**SEQ ID NO:7**)和 C-末端。

【0363】 DART H 的第三多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:283**):

DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSPGK

F. 示例性雙特異性抗體

【0364】 產生示例性 PD-1 X LAG-3 四鏈雙特異性抗體,命名為“**BSAB A**”。下面詳述了該雙特異性抗體的結構。該示例性 PD-1 x LAG-3 雙特異性抗體旨在是說明性的,但是決不限制本發明的範圍。

【0365】 BSAB A 是雙特異性抗體,其具有對於 PD-1 特異性的一個結合位點、對於 LAG-3 特異性的一個結合位元點、被工程化以降低 FcγR 結合和促進兩個不同重鏈多肽之間複合的變異的 IgG1 Fc 區域(見,例如,WO 2011/143545)。

【0366】 BSAB A的第一多肽鏈在N-末端至C-末端方向上包括:N-末端;能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO:147**);IgG1 CH1 結構域(**SEQ ID NO:10**);包括取代 D221E/P228E(根據如在 Kabat 中的 EU 索引編號並且在下面 **SEQ ID NO:286** 中以底線顯示)的變異的 IgG1 鉸鏈區;包括取代 L234A/L235A/L368E(在下面的 **SEQ ID NO:286** 中加底線)並且缺少 C-末端殘基的變異的 IgG1 CH2-CH3 結構域;和 C-末端。

【0367】 BSAB A 的第一多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:286**):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV
IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY
ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SC**E**KTHTCP**E** CPAPE**AA**GGP SVFLFPPKPK
DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
YTLPPSREEM TKNQVSLTC**E** VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL
DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG

【0368】 BSAB 的第二多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端、能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO:153**)、κ CL 結構域(**SEQ ID NO:8**)和 C-末端。

【0369】 BSAB 的第二多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:287**)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV
THQGLSSPVT KSFNRGEC

【0370】 BSAB A 的第三多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端、能夠結合 LAG-3 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (**SEQ ID NO:49**)、IgG1 CH1 結構域(**SEQ ID NO:10**)、包括取代 D221R/P228R (在下面 **SEQ ID NO:288** 中加底線)的變異的 IgG1 鉸鏈區、包括取代 L234A/L235A/L409R (在下面 **SEQ ID NO:288** 中加底線)並且缺少 C-末端殘基的變異的 IgG1 CH2-CH3 結構域和 C-末端。

【0371】 BSAB A 的第三多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:288**)：

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW
INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYYCARES
LYDYYSMDYW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK

DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCRKTHTCP RCPAPEAAGG PSVFLFPPKP
KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV
LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG

【0372】 BSAB A的第四多肽鏈在N-末端至C-末端方向上包括:N-末端、能夠結合 LAG-3 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL4) (**SEQ ID NO:54**)、κ CL 結構域(**SEQ ID NO:8**)和 C-末端。

【0373】 BSAB A 的第四多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:289**):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
YTFGGGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

IX. 參考抗體

A. 參考抗人 PD-1 抗體

【0374】 為了評估和表徵本發明新的抗人 PD-1 結合分子，採用下述參考抗體:尼魯單抗(nivolumab)(也稱為 5C4、BMS-936558、ONO-4538、MDX-1106，並且由 Bristol-Myers Squibb 以 OPDIVO®出售)、本文命名為"**PD-1 mAb A**"的人 IgG4 抗體;和派姆單抗(pembrolizumab)(之前稱為蘭羅利珠單抗(lambrolizumab)，也稱為 MK-3475，SCH-900475，並且由 Merck 以 KEYTRUDA®出售)，一種人源化的 IgG4 抗體，本文命名為"**PD-1 mAb B**"。

1. 尼魯單抗("PD-1 mAb A")

【0375】 **PD-1 mAb A** 的重鏈可變區的氨基酸序列具有氨基酸序列(**SEQ ID NO:64**) (CDR_H殘基以底線顯示):

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS **NSGMH**WVRQA PGKGLEWVA**V**
IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCAT**ND**
DYWGQGTLVT VSS

【0376】 **PD-1 mAb A** 的輕鏈可變區的氨基酸序列具有氨基酸序列(**SEQ ID NO:65**) (CDR_L 殘基以底線顯示)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSC**RASQSVS SYLA**WYQQKP GQAPRLLIY**D**
ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYC**QQ SSNWPRT**FGQ GTKVEIK

2. 派姆單抗 (“PD-1 mAb B”)

【0377】 **PD-1 mAb B** 的重鏈可變區的氨基酸序列具有氨基酸序列(**SEQ ID NO:66**) (CDR_H 殘基以底線顯示)：

QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT **NYYMY**WVRQA PGQGLEWMG**G**
INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCAR**RD**
YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS

【0378】 **PD-1 mAb B 的**輕鏈可變區的氨基酸序列具有氨基酸序列(**SEQ ID NO:67**) (CDR_L 殘基以底線顯示)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSC**RASKGVS TSGYSYLH**WY QQKPGQAPRL
LIY**LASYLES** GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YC**QHSRDLPL**
TFGGGTKVEIK

X.生產方法

【0379】 可由抗 PD-1 抗體 PD-1 mAb 1-15 的多核苷酸和/或序列通過本領域已知的方法，例如，合成或重組產生抗人 PD-1 多肽和其他 PD-1 激動劑、拮抗劑和調節劑。產生這類肽激動劑、拮抗劑和調節劑的一種方法涉及多肽的化學合成，隨後在適於獲得天然構象，即，正確的二硫鍵連接的氧化條件下處理。這可使用本領域技術人員熟知的方法完成(見，例如，Kelley, R. F.等(1990)，在以下中：Genetic Engineering Principles and Methods, Setlow, J.K.編輯, Plenum Press, N.Y., vol. 12，pp 1-19；Stewart, J.M 等(1984) Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, IL；也見美國專利號 4,105,603、3,972,859、3,842,067 和

3,862,925)。

【0380】 可使用固相肽合成常規製備本發明的多肽(Merrifield, B. (1986) "S*olid Phase Synthesis*," Science 232(4748):341-347；Houghten, R.A. (1985) "*General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82(15):5131-5135；Ganesan, A. (2006) "*Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century*," Mini Rev. Med. Chem. 6(1):3-10)。

【0381】 在仍另一可選方案中，可通過使用商業上可得的已經被工程化而表達特異性人免疫球蛋白蛋白質的小鼠，獲得用於結合人 PD-1 的、具有下述的一個或多個 CDR 的完全人抗體或其可溶性形式：PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 4、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 8、PD-1 mAb 9、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1 mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14 或 PD-1 mAb 15，或與 PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 4、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 8、PD-1 mAb 9、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1 mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14 或 PD-1 mAb 15。被設計來產生更期望的(例如，完全人抗體)或更強力免疫應答的轉基因動物也可用於產生人源化抗體或人抗體。這類技術的例子是 Xenomouse™ (Abgenix, Inc., Fremont, CA)和 HuMAb-MOUSE®和 TC MOUSE™ (都來自 Medarex, Inc., Princeton, NJ)。

【0382】 可選地，可重組製備抗體和使用本領域已知的任何方法表達。可如下經重組製備抗體：首先從宿主動物分離製備的抗體，獲得基因序列，和使用基因序列在宿主細胞(例如，CHO 細胞)中重組表達抗體。可採用的另一方法是在植物(例如，煙草)或轉基因奶中表達抗體序列。用於在植物或奶中重組表達

抗體的適當的方法已經被公開了(見，例如，Peeters 等(2001) "*Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants*," Vaccine 19:2756；Lonberg, N.等(1995) "*Human Antibodies From Transgenic Mice*," Int. Rev. Immunol 13:65-93；和 Pollock 等(1999) "*Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies*," J. Immunol Methods 231:147-157)。製備抗體衍生物，例如，人源化抗體、單鏈抗體等的適當的方法是本領域已知的。在另一可選方案中，可通過噬菌體展示技術重組製備抗體(見，例如，美國專利號 5,565,332、5,580,717、5,733,743、6,265,150 和 Winter, G.等(1994) "*Making Antibodies By Phage Display Technology*," Annu. Rev. Immunol. 12.433-455)。

【0383】 可通過 Edman 降解對感興趣的抗體或蛋白質進行測序，其是本領域技術人員熟知的。從質譜或 Edman 降解產生的肽資訊可用於設計用於克隆感興趣的蛋白質的探針或引物。

【0384】 克隆感興趣的蛋白質的可選的方法是通過使用純化 PD-1 或其部分"淘洗"表達感興趣的抗體或蛋白質的細胞，所述感興趣的抗體或蛋白質具有下述的一個或多個 CDR：PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 4、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 8、PD-1 mAb 9、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1 mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14 或 PD-1 mAb 15，或與 PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 4、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 8、PD-1 mAb 9、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1 mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14 或 PD-1 mAb 15，用於結合人 PD-1。可如下進行 "淘洗" 程式：從表達 PD-1 的組織或細胞獲得 cDNA 文庫，在第二細胞類型中過表達 cDNA，和在存在或沒有 PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 4、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 8、PD-1 mAb 9、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1 mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14

或 PD-1 mAb 15 的情況下針對特異性結合 PD-1 篩選轉染的第二細胞類型的細胞。用於通過“淘選”克隆編碼細胞表面蛋白的哺乳動物基因的方法的詳細描述可見于現有技術(見，例如，Aruffo, A.等(1987) “*Molecular Cloning Of A CD28 cDNA By A High-Efficiency COS Cell Expression System*,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 84:8573-8577 和 Stephan, J.等(1999) “*Selective Cloning Of Cell Surface Proteins Involved In Organ Development: Epithelial Glycoprotein Is Involved In Normal Epithelial Differentiation*,” Endocrinol. 140:5841-5854)。

【0385】 包含感興趣的多核苷酸的載體可通過一些適當手段中的任意手段被引入到宿主細胞中，所述適當手段包括電穿孔；採用氯化鈣、鈈氯化物、磷酸鈣、DEAE-葡聚糖或其他物質的轉染；微彈轟擊(microprojectile bombardment)；脂轉染；和感染(例如，在載體是感染劑諸如痘苗病毒的情況下)。引入載體或多核苷酸的選擇常常取決於宿主細胞的特徵。

【0386】 能夠過表達異源 DNA 的任何宿主細胞均可被使用，用於分離編碼感興趣的抗體、多肽或蛋白質的基因的目的。合適的哺乳動物宿主細胞的非的限制性實例包括但不限於 COS、HeLa 和 CHO 細胞。優選地，相比於宿主細胞中相應的感興趣的內源抗體或蛋白質（如果存在），宿主細胞以約 5-倍，更優選 10-倍，甚至更優選 20-倍的水準表達 cDNA。通過免疫試驗或 FACS 實現篩選特異性結合 PD-1 的宿主細胞。可鑒定過表達感興趣的抗體或蛋白質的細胞。

【0387】 本發明包括的多肽包括本發明抗體的氨基酸序列。可通過本領域已知的程式製備本發明的多肽。可通過抗體的蛋白水解或其他降解、如上述的重組方法(即，單個或融合多肽)或化學合成來產生多肽。抗體的多肽，尤其地，上至約 50 個氨基酸的較短的多肽，通過化學合成被常規製備。化學合成方法在本領域中是已知的，並且是商業上可得到的。例如，抗人 PD-1 多肽可通過採用

固相方法的自動多肽合成儀產生。

【0388】 本發明包括下述的變體：PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 4、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 8、PD-1 mAb 9、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1 mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14或 PD-1 mAb 15 抗體，和它們結合 PD-1 的多肽片段，包括功能上等同的抗體和不明顯影響這類分子性質的融合多肽以及具有增強的或降低的活性的變體。多肽的修飾在本領域中是常規操作，因而不需要在本文詳細描述。修飾的多肽的實例包括這樣的多肽：其具有氨基酸殘基的保守取代、未明顯有害改變功能活性的氨基酸的一個或多個缺失或添加，或使用化學類似物。可彼此保守取代的氨基酸殘基包括但不限於：甘氨酸/丙氨酸；絲氨酸/蘇氨酸；纈氨酸/異亮氨酸/亮氨酸；天冬醯胺/穀氨醯胺；天冬氨酸/谷氨酸；賴氨酸/精氨酸；和苯基丙氨酸/酪氨酸。這些多肽還包括糖基化和非糖基化多肽以及具有其它翻譯後修飾的多肽，所述其它翻譯後修飾，諸如例如，用不同糖進行糖基化、乙醯化和磷酸化。優選地，氨基酸取代應該是保守的，即，取代的氨基酸會具有與原始氨基酸類似的化學性質。這樣的保守取代在本領域中是已知的，並且已經在上文提供實例。氨基酸修飾範圍可從改變或修飾一個或多個氨基酸到區域諸如可變結構域的完全重新設計(redesign)。可變結構域中的變化可改變結合親和力和/或特異性。修飾的其它方法包括利用本領域中已知的偶合技術，包括但不限於酶促手段、氧化取代和螯合。修飾可用於例如，連接標籤用於免疫分析，諸如連接放射性部分用於放射免疫分析。修飾的多肽利用本領域中確定的方法製備，並且可利用本領域中已知的標準測定來篩選。

【0389】 本發明包括融合蛋白，其包括本發明的一個或多個多肽或 PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 4、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 8、PD-1 mAb 9、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1 mAb 12、

PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14 或 PD-1 mAb 15 抗體。在一個實施方式中，提供的融合多肽包括輕鏈、重鏈或輕鏈和重鏈二者。在另一實施方式中，融合多肽包含異源免疫球蛋白恒定區。在另一實施方式中，融合多肽包含由公共保藏的雜交瘤產生的抗體的輕鏈可變結構域和重鏈可變結構域。為了本發明的目的，抗體融合蛋白包含特異性結合 PD-1 的一個或多個多肽結構域和其在天然分子中未連接的另外的氨基酸序列，所述另外的氨基酸序列例如，異源序列或來自另一區域的同源序列。

XI. 本發明的 PD-1 結合分子的用途

【0390】 本發明包括組合物，包括藥物組合物，其包括本發明的 PD-1 結合分子(例如，抗 PD-1 抗體、抗 PD-1 雙特異性雙抗體等)、源自這類分子的多肽、包括編碼這類分子或多肽的序列的多核苷酸和如本文所描述的其他試劑。

A. 治療性用途

【0391】 如上所討論，PD-1 在負調節 T-細胞增殖、功能和穩態中起重要的作用。本發明的某些 PD-1 結合分子具有抑制 PD-1 功能的能力，從而逆轉 PD-1-介導的免疫系統抑制。因此，PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 8、PD-1 mAb 9、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1 mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14 和 PD-1 mAb 15、它們人源化的衍生物和包括它們的 PD-1 結合片段的分子(例如，雙特異性抗體、雙特異性雙抗體(包括但不限於 DART-A、DART-B、DART-C、DART-D、DART-E、DART-F、DART-G、DART-H、DART-I 和 DART-J)等)或與這類抗體競爭結合的分子，可用于阻斷 PD-1-介導的免疫系統抑制，從而促進免疫系統的啟動。

【0392】 結合 PD-1 和細胞表面上存在的參與調節免疫檢查點的另一分子(例如，LAG-3)的本發明的這類雙特異性 PD-1 結合分子，通過阻斷 PD-1 和這類免疫檢查點分子介導的免疫系統抑制而加強了免疫系統。因此，本發明的這類

PD-1 結合分子可用于加強受試者的免疫應答(例如，T-細胞介導的免疫應答)。尤其地，本發明的這類 PD-1 結合分子可用于治療與與非期望的被抑制的免疫系統相關的任何疾病或病況，包括與病原體(例如，細菌、真菌、病毒或原生動物感染)的存在相關的癌症和疾病。

【0393】 可由本發明的這類 PD-1 結合分子治療的癌症包括特徵在於存在選自由以下的細胞組成的組的癌症細胞的癌症：腎上腺腫瘤、AIDS 相關的癌症、軟組織腺泡狀肉瘤、星形細胞瘤、膀胱癌、骨癌、腦癌和脊髓癌、轉移性腦瘤、乳腺癌、頸動脈體瘤、宮頸癌、軟骨肉瘤、脊索瘤、嫌色細胞腎細胞癌、透明細胞癌、結腸癌、結直腸癌、皮膚良性纖維組織細胞瘤、促結締組織增生小圓細胞瘤、室管膜細胞瘤、尤文氏瘤、骨外粘液樣軟骨肉瘤、不完全性骨纖維生成、骨的纖維發育異常、膽囊癌或膽管癌、胃癌、妊娠滋養層疾病、生殖細胞瘤、頭頸癌、肝細胞癌、胰島細胞腫瘤、卡波西氏肉瘤、腎癌、白血病、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/惡性脂肪瘤、肝癌、淋巴瘤、肺癌、成神經管細胞瘤、黑素瘤、腦膜瘤、多發性內分泌瘤、多發性骨髓瘤、骨髓增生異常綜合征、成神經細胞瘤、神經內分泌腫瘤、卵巢癌、胰腺癌、甲狀腺乳頭狀癌、甲狀旁腺瘤、兒科癌症、周圍神經鞘瘤、嗜鉻細胞瘤、垂體腫瘤、前列腺癌、眼色素層後黑素瘤、罕見血液學疾病、腎轉移性癌症、橫紋肌樣瘤、橫紋肌肉瘤、肉瘤、皮膚癌、軟組織肉瘤、鱗狀細胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲狀腺轉移性癌症和子宮癌。

【0394】 尤其地，本發明的這類 PD-1 結合分子可用于治療結直腸癌、肝細胞癌、神經膠質瘤、腎癌、乳腺癌、多發性骨髓瘤、膀胱癌、成神經細胞瘤、肉瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、胰腺癌和直腸癌。

【0395】 可由本發明的這類 PD-1 結合分子治療的病原體相關的疾病包括慢性病毒、細菌、真菌和寄生蟲感染。可由本發明的 PD-1 結合分子治療的慢性

感染包括愛潑斯坦-巴爾病毒、甲肝病毒(HAV)；乙肝病毒(HBV)；丙肝病毒(HCV)；皰疹病毒(例如 HSV-1、HSV-2、HHV-6、CMV)、人免疫缺陷病毒(HIV)、水泡性口炎病毒(VSV)、芽孢桿菌綱(*Bacilli*)、檸檬酸桿菌屬(*Citrobacter*)、霍亂(*Cholera*)、白喉(*Diphtheria*)、腸桿菌屬(*Enterobacter*)、淋球菌(*Gonococci*)、幽門螺旋桿菌(*Helicobacter pylori*)、克雷伯氏菌屬(*Klebsiella*)、軍團菌屬(*Legionella*)、腦膜炎球菌(*Meningococci*)、分歧桿菌(mycobacteria)、假單胞菌屬(*Pseudomonas*)、*Pneumonococci*、立克次氏體細菌(rickettsia bacteria)、沙門氏菌屬(*Salmonella*)、沙雷菌屬(*Serratia*)、葡萄球菌屬(*Staphylococci*)、鏈球菌屬(*Streptococci*)、破傷風(*Tetanus*)、曲黴菌屬(*Aspergillus*)(煙麴黴(*fumigatus*)、黑麴黴(*niger*)等)、皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)、念珠菌屬(*Candida*)(白色念珠菌(*albicans*)、克柔假絲酵母(*krusei*)、光滑念珠菌(*glabrata*)、熱帶念珠菌(*tropicalis*)等)、新生隱球菌(*Cryptococcus neoformans*)、毛黴目(*Mucorales*)的屬(毛黴屬(*mucor*)、犁頭黴屬(*absidia*)、根黴屬(*rhizopus*))、申克氏胞絲菌(*Sporothrix schenkii*)、巴西芽生菌(*Paracoccidioides brasiliensis*)、粗球黴菌(*Coccidioides immitis*)、莢膜組織胞漿菌(*Histoplasma capsulatum*)、細螺旋體病(*Leptospirosis*)、包柔氏螺旋體(*Borrelia burgdorferi*)、蠕蟲寄生蟲(鉤蟲、絛蟲、吸蟲、扁形蟲(例如血吸蟲(*Schistosomia*))、藍氏賈第蟲(*Giardia lambia*)、旋毛蟲(*trichinella*)、脆雙核阿米巴(*Dientamoeba Fragilis*)、布氏錐蟲(*Trypanosoma brucei*)、克氏錐蟲(*Trypanosoma cruzi*)和杜氏利什曼蟲(*Leishmania donovani*)。

【0396】 本發明的這類 PD-1 結合分子可聯合其他抗癌劑，尤其地，特異性結合癌症抗原的分子(例如，抗體、雙抗體)。可與本發明的 PD-1 結合分子聯合的抗癌療法包括特異性結合一種或多種癌症抗原的分子，所述癌症抗原包括：結腸癌中發現的 **19.9**、胃癌黏蛋白；**4.2**；**A33** (結直腸癌抗原；Almqvist, Y. 2006, *Nucl Med Biol*. Nov;33(8):991-998)；**ADAM-9** (美國專利公開號 2006/0172350、

PCT 公開號 WO 06/084075)；胃癌中發現的 **AH6**；**ALCAM** (PCT 公開號 WO 03/093443)；**APO-1 (惡性人淋巴細胞抗原)** (Trauth 等(1989) *"Monoclonal Antibody-Mediated Tumor Regression By Induction Of Apoptosis,"*Science 245:301-304)；**B1** (Egloff, A.M.等 2006, *Cancer Res.* 66(1):6-9)；**B7-H3** (Collins, M. 等(2005) "*The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands*," Genome Biol. 6:223.1-223.7)。Chapoval, A.等(2001) "*B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN-γ Production*," Nature Immunol. 2:269–274；Sun, M.等(2002) "*Characterization of Mouse and Human B7-H3 Genes*," J. Immunol. 168:6294-6297)；**BAGE** (Bodey, B. 2002 *Expert Opin Biol Ther.* 2(6):577-84)；**β -聯蛋白**(Prange W. 等 2003 *J Pathol.*201(2):250-9)；如結腸腺癌中發現的**血型 ALe^b/Le^y**；**伯基特淋巴瘤抗原-38.13**，如結腸腺癌中發現的 **C14**；**CA125(卵巢癌抗原)** (Bast, R.C. Jr.等 2005 *Int J Gynecol Cancer* 15 Suppl 3:274-81；Yu 等(1991) *"Coexpression Of Different Antigenic Markers On Moieties That Bear CA 125 Determinants,"*Cancer Res. 51(2):468-475)；**羧肽酶 M** (美國專利公開號 2006/0166291)；**CD5** (Calin, G.A. 等 2006 *Semin Oncol.* 33(2):167-73；**CD19** (Ghetie 等(1994) *"Anti-CD19 Inhibits The Growth Of Human B-Cell Tumor Lines In Vitro And Of Daudi Cells In SCID Mice By Inducing Cell Cycle Arrest,"*Blood 83:1329-1336；Troussard, X.等 1998 *Hematol Cell Ther.* 40(4):139-48)；**CD20** (Reff 等(1994) *"Depletion Of B Cells In Vivo By A Chimeric Mouse Human Monoclonal Antibody To CD20,"*Blood 83:435-445；Thomas, D.A.等 2006 Hematol Oncol Clin North Am. 20(5):1125-36)；**CD22** (Kreitman, R.J. 2006 AAPS J. 18;8(3):E532-51)；**CD23** (Rosati, S.等 2005 *Curr Top Microbiol Immunol.* 5;294:91-107)；**CD25** (Troussard, X.等 1998 *Hematol Cell Ther.* 40(4):139-48)；**CD27** (Bataille, R. 2006 *Haematologica* 91(9):1234-40)；**CD28** (Bataille, R. 2006 *Haematologica* 91(9):1234-40)；**CD33** (Sgouros 等(1993)

*"Modeling And Dosimetry Of Monoclonal Antibody M195 (Anti-CD33) In Acute Myelogenous Leukemia,"*J. Nucl. Med. 34:422-430)；**CD36** (Ge, Y. 2005 *Lab Hematol*. 11(1):31-7)；CD40/CD154 (Messmer, D.等 2005 *Ann N Y Acad Sci*. 1062:51-60)；**CD45** (Jurcic, J.G. 2005 *Curr Oncol Rep*. 7(5):339-46)；CD56 (Bataille, R. 2006 *Haematologica* 91(9):1234-40)；**CD46** (美國專利號 7,148,038；PCT 公開號 WO 03/032814)；**CD52** (Eketorp, S.S.等(2014) "*Alemtuzumab (Anti-CD52 Monoclonal Antibody) As Single-Agent Therapy In Patients With Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukaemia (CLL)-A Single Region Experience On Consecutive Patients*," Ann Hematol. 93(10):1725-1733；Suresh, T.等(2014) "*New Antibody Approaches To Lymphoma Therapy*," J. Hematol. Oncol. 7:58；Hoelzer, D. (2013) "*Targeted Therapy With Monoclonal Antibodies In Acute Lymphoblastic Leukemia*," Curr. Opin. Oncol. 25(6):701-706)；**CD56** (Bataille, R. 2006 *Haematologica* 91(9):1234-40)；**CD79a/CD79b** (Troussard, X.等 1998 *Hematol Cell Ther*. 40(4):139-48；Chu, P.G.等 2001 Appl Immunohistochem Mol Morphol. 9(2):97-106)；**CD103** (Troussard, X.等 1998 *Hematol Cell Ther*. 40(4):139-48)；**CD317**(Kawai, S.等 (2008) "*Interferon-A Enhances CD317 Expression And The Antitumor Activity Of Anti-CD317 Monoclonal Antibody In Renal Cell Carcinoma Xenograft Models*," Cancer Science 99(12):2461-2466；Wang, W.等(2009) *HM1.24 (CD317) Is A Novel Target Against Lung Cancer For Immunotherapy Using Anti-HM1.24 Antibody*," Cancer Immunology, Immunotherapy 58(6):967-976；Wang, W.等(2009) "*Chimeric And Humanized Anti-HM1.24 Antibodies Mediate Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Against Lung Cancer Cells. Lung Cancer*," 63(1):23-31；Sayeed, A.等 (2013) "*Aberrant Regulation Of The BST2 (Tetherin) Promoter Enhances Cell Proliferation And Apoptosis Evasion In High Grade Breast Cancer Cells*," PLoS ONE

8(6)e67191, pp. 1-10)；**CDK4** (Lee, Y.M.等 2006 *Cell Cycle* 5(18):2110-4)；**CEA** (癌胚抗原；Foon 等(1995) *"Immune Response To The Carcinoembryonic Antigen In Patients Treated With An Anti-Idiotype Antibody Vaccine,"*J. Clin. Invest. 96(1):334-42)；Mathelin, C. 2006 *Gynecol Obstet Fertil*. 34(7-8):638-46；Tellez-Avila, F.I.等 2005 *Rev Invest Clin*. 57(6):814-9)；**CEACAM9/CEACAM6** (Zheng, C.等 (2011) "*A Novel Anti-CEACAM5 Monoclonal Antibody, CC4, Suppresses Colorectal Tumor Growth and Enhances NK Cells-Mediated Tumor Immunity*," PLoS One 6(6):e21146, pp. 1-11)；**CO17-1A** (Ragnhammar 等(1993) *"Effect Of Monoclonal Antibody 17-1A And GM-CSF In Patients With Advanced Colorectal Carcinoma - Long-Lasting, Complete Remissions Can Be Induced,"*Int. J. Cancer 53:751-758)；**CO-43** (血型 Le^b)；如在腺癌中發現的 **CO-514** (血型 Le^a)；**CTA-1**；**CTLA-4** (Peggs, K.S.等 2006 *Curr Opin Immunol*.18(2):206-13)；**細胞角蛋白 8** (PCT 公開號 WO 03/024191)；**D1.1**；**$D_1$56-22**；**DR5** (Abdulghani, J.等(2010) "*TRAIL Receptor Signaling And Therapeutics*," Expert Opin. Ther. Targets 14(10):1091-1108；Andera, L. (2009) "*Signaling Activated By The Death Receptors Of The TNFR Family*," Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub. 153(3):173-180；Carlo-Stella, C.等(2007) "*Targeting TRAIL Agonistic Receptors for Cancer Therapy*," Clin, Cancer 13(8):2313-2317；Chaudhari, B.R.等(2006) "*Following the TRAIL to Apoptosis*," Immunologic Res. 35(3):249-262)；如胰腺癌中發現的 **E_1** 系列(血型 B)；**EGFR** (表皮生長因數受體；Adenis, A.等 2003 *Bull Cancer*. 90 Spec No:S228-32)；**肝配蛋白受體**(尤其是 **EphA2** (美國專利號 7,569,672、PCT 公開號 WO 06/084226)；**Erb** (ErbB1；ErbB3；ErbB4；Zhou, H.等 2002 *Oncogene* 21(57):8732-8740；Rimon, E.等 2004 Int J Oncol. 24(5):1325-1338)；**GAGE** (GAGE-1；GAGE-2；Akcakanat, A.等 2006 *Int J Cancer*. 118(1):123-128)；**GD2/GD3/GM2** (Livingston, P.O.等 2005

Cancer Immunol Immunother. 54(10):1018-1025)；**神經節苷脂 GD2** (G_{D2}；Saleh 等(1993) *"Generation Of A Human Anti-Idiotypic Antibody That Mimics The GD2 Antigen,"* J.Immunol., 151, 3390-3398)；**神經節苷脂 GD3** ((G_{D3}；Shitara 等(1993) *"A Mouse/Human Chimeric Anti-(Ganglioside GD3) Antibody With Enhanced Antitumor Activities,"*Cancer Immunol. Immunother. 36:373-380)；**神經節苷脂 GM2**(G_{M2}；Livingston 等(1994) *"Improved Survival In Stage III Melanoma Patients With GM2 Antibodies: A Randomized Trial Of Adjuvant Vaccination With GM2 Ganglioside,"*J. Clin. Oncol. 12:1036-1044)；**神經節苷脂 GM3** (G_{M3}；Hoon 等(1993) *"Molecular Cloning Of A Human Monoclonal Antibody Reactive To Ganglioside GM3 Antigen On Human Cancers,"*Cancer Res. 53:5244-5250)；**GICA 19-9** (Herlyn 等(1982) *"Monoclonal Antibody Detection Of A Circulating Tumor-Associated Antigen. I. Presence Of Antigen In Sera Of Patients With Colorectal, Gastric, And Pancreatic Carcinoma,"*J. Clin. Immunol. 2:135-140)；**gp100** (Lotem, M.等 2006 *J Immunother.* 29(6):616-27)；**Gp37** (人白血病 T 細胞抗原；Bhattacharya-Chatterjee 等(1988) *"Idiotype Vaccines Against Human T Cell Leukemia. II. Generation And Characterization Of A Monoclonal Idiotype Cascade (Ab1, Ab2, and Ab3),"*J. Immunol.141:1398-1403)；**gp75** (黑素瘤抗原；Vijayasardahl 等(1990) *"The Melanoma Antigen Gp75 Is The Human Homologue Of The Mouse B (Brown) Locus Gene Product,"*J. Exp. Med. 171(4):1375-1380)；**gpA33** (Heath, J.K.等(1997) "*The Human A33 Antigen Is A Transmembrane Glycoprotein And A Novel Member Of The Immunoglobulin* Superfamily," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 94(2):469-474；Ritter, G.等(1997) "*Characterization Of Posttranslational Modifications Of Human A33 Antigen, A Novel Palmitoylated Surface Glycoprotein Of Human Gastrointestinal Epithelium*," Biochem. Biophys. Res. Commun. 236(3):682-686；Wong, N.A.等

(2006) "*EpCAM and gpA33 Are Markers Of Barrett's Metaplasia*," J. Clin. Pathol. 59(3):260-263)；**HER2 抗原**(HER2/neu, $p185^{HER2}$；Kumar, Pal S 等 2006 Semin Oncol. 33(4):386-91)；**HMFG** (人乳脂肪球抗原；WO1995015171)；**人乳頭瘤病毒-E6/人乳頭瘤病毒-E7** (DiMaio, D.等 2006 *Adv Virus Res*. 66:125-59；**HMW-MAA** (高分子量黑素瘤抗原；Natali 等(1987) *"Immunohistochemical Detection Of Antigen In Human Primary And Metastatic Melanomas By The Monoclonal Antibody 140.240 And Its Possible Prognostic Significance,"*Cancer 59:55-63；Mittelman 等(1990) *"Active Specific Immunotherapy In Patients With Melanoma. A Clinical Trial With Mouse Antiidiotypic Monoclonal Antibodies Elicited With Syngeneic Anti-High-Molecular-Weight-Melanoma-Associated Antigen Monoclonal Antibodies,"*J. Clin. Invest. 86:2136-2144)；**I 抗原**(分化抗原；Feizi (1985) *"Demonstration By Monoclonal Antibodies That Carbohydrate Structures Of Glycoproteins And Glycolipids Are Onco-Developmental Antigens,"*Nature 314:53-57)；**IL13Rα2** (PCT 公開號 WO 2008/146911；Brown, C.E.等(2013) "*Glioma IL13Rα2 Is Associated With Mesenchymal Signature Gene Expression And Poor Patient Prognosis*," PLoS One. 18;8(10):e77769；Barderas, R.等(2012) "*High Expression Of IL-13 Receptor A2 In Colorectal Cancer Is Associated With Invasion, Liver Metastasis, And Poor Prognosis*," Cancer Res. 72(11):2780-2790；Kasaian, M.T. 等(2011) "*IL-13 Antibodies Influence IL-13 Clearance In Humans By Modulating Scavenger Activity Of IL-13Rα2*," J. Immunol. 187(1):561-569；Bozinov, O.等(2010) "*Decreasing Expression Of The Interleukin-13 Receptor IL-13Ralpha2 In Treated Recurrent Malignant Gliomas*," Neurol. Med. Chir. (Tokyo) 50(8):617-621；Fujisawa, T.等(2009) "*A novel role of interleukin-13 receptor alpha2 in pancreatic cancer invasion and metastasis*," Cancer Res. 69(22):8678-8685)；**整聯蛋白 β6** (PCT 公開

號 WO 03/087340)；**JAM-3** (PCT 公開號 WO 06/084078)；**KID3** (PCT 公開號 WO 05/028498)；**KID31** (PCT 公開號 WO 06/076584)；**KS 1/4 泛(pan)-癌抗原**(Perez 等(1989) *"Isolation And Characterization Of A cDNA Encoding The Ks1/4 Epithelial Carcinoma Marker,"*J. Immunol.142:3662-3667；Möller 等(1991) *"Bi-specific-Monoclonal-Antibody-Directed Lysis Of Ovarian Carcinoma Cells By Activated Human T Lymphocytes,"*Cancer Immunol. Immunother. 33(4):210-216；Ragupathi, G. 2005 *Cancer Treat Res*. 123:157-80)；**L6** 和 **L20** (人肺癌抗原；Hellström 等(1986) *"Monoclonal Mouse Antibodies Raised Against Human Lung Carcinoma,"*Cancer Res. 46:3917-3923)；**LEA**；**LUCA-2** (美國專利公開號 2006/0172349；PCT 公開號 WO 06/083852)；**M1:22:25:8**；**M18**；**M39**；**MAGE** (MAGE-1；MAGE-3；Bodey, B. 2002 *Expert Opin Biol Ther*. 2(6):577-84)；**MART** (Kounalakis, N.等 2005 *Curr Oncol Rep*. 7(5):377-82；**間皮蛋白**(Chang K, 和 Pastan I. 1996 *"Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers*," Proc Natl Acad Sci USA 93:136–40)、**MUC-1** (Mathelin, C. 2006 *Gynecol Obstet Fertil*. 34(7-8):638-46)；**MUM-1** (Castelli, C.等 2000 *J Cell Physiol*. 182(3):323-31)；**Myl**；**N-乙醯葡糖氨基轉移酶** (Dennis, J.W. 1999 *Biochim Biophys Acta*. 6;1473(1):21-34)；**擬糖蛋白**；如腺癌中發現的 **NS-10**；**OFA-1**；**OFA-2**；**致癌蛋白 M** (致癌蛋白受體 β；美國專利號 7,572,896；PCT 公開號 WO 06/084092)；**p15** (Gil, J.等 2006 *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7(9):667-77)；**p97** (黑素瘤相關的抗原；Estin 等(1989) *"Transfected Mouse Melanoma Lines That Express Various Levels Of Human Melanoma-Associated Antigen p97,"*J. Natl. Cancer Instit. 81(6):445-454)；**PEM** (多態上皮粘蛋白；Hilkens 等(1992) *"Cell Membrane-Associated Mucins And Their Adhesion-Modulating Property,"*Trends in Biochem. Sci. 17:359-363)；**PEMA (多態上皮粘蛋白抗原)**；

PIPA (美國專利號 7,405,061；PCT 公開號 WO 04/043239)；**PSA** (前列腺特異性抗原；Henttu 等(1989) *"cDNA Coding For The Entire Human Prostate Specific Antigen Shows High Homologies To The Human Tissue Kallikrein Genes,"*Biochem. Biophys. Res. Comm. 10(2):903-910；Israeli 等(1993) *"Molecular Cloning Of A Complementary DNA Encoding A Prostate-Specific Membrane Antigen,"* Cancer Res. 53:227-230；Cracco, C.M.等 2005 *Minerva Urol Nefrol*. 57(4):301-11)；**PSMA** (前列腺特異性膜抗原；Ragupathi, G. 2005 *Cancer Treat Res*. 123:157-180)；**前列腺酸性磷酸酯**(Tailor 等(1990) *"Nucleotide Sequence Of Human Prostatic Acid Phosphatase Determined From A Full-Length cDNA Clone,"*Nucl. Acids Res. 18(16):4928)；如黑素瘤中發現的 **R_{24}**；**ROR1** (美國專利號 5,843,749)；**鞘脂**；**SSEA-1**；**SSEA-3**；**SSEA-4**；**sTn** (Holmberg, L.A. 2001 *Expert Opin Biol Ther*. 1(5):881-91)；來自皮膚 T 細胞淋巴瘤的 **T 細胞受體衍生的肽**(見 Edelson (1998) *"Cutaneous T-Cell Lymphoma: A Model For Selective Immunotherapy,"*Cancer J Sci Am. 4:62-71)；髓樣細胞中發現的 **T_5A_7**；**TAG-72**(Yokota 等(1992) *"Rapid Tumor Penetration Of A Single-Chain Fv And Comparison With Other Immunoglobulin Forms,"*Cancer Res. 52:3402-3408)；**TL5** (血型 A)；**TNF-受體**(TNF-α 受體，TNF-ß 受體；**TNF-γ 受體**(van Horssen, R.等 2006 *Oncologist*. 11(4):397-408；Gardnerova, M.等 2000 *Curr Drug Targets*. 1(4):327-64)；**TRA-1-85** (血型 H)；**運鐵蛋白受體**(美國專利號 7,572,895；PCT 公開號 WO 05/121179)；**5T4** (TPBG，滋養層糖蛋白；Boghaert, E.R.等(2008) *"The Oncofetal Protein,* 5T4, *Is A Suitable Target For Antibody-Guided Anti-Cancer Chemotherapy With Calicheamicin*," Int. J. Oncol. 32(1):221-234；Eisen, T.等(2014) *"Naptumomab Estafenatox: Targeted Immunotherapy with a Novel Immunotoxin*," Curr. Oncol. Rep. 16:370, pp. 1-6)；**TSTA (腫瘤特異性移植抗原)**比如病毒誘導的腫瘤抗原，包括 T-抗原 DNA 腫瘤病毒和

RNA 腫瘤病毒的包膜抗原，癌胚抗原甲胎蛋白，比如結腸的 CEA、膀胱腫瘤癌胚抗原(Hellström 等(1985) *"Monoclonal Antibodies To Cell Surface Antigens Shared By Chemically Induced Mouse Bladder Carcinomas,"*Cancer. Res. 45:2210-2188)；**VEGF** (Pietrantonio, F.等(2015) *"Bevacizumab-Based Neoadjuvant Chemotherapy For Colorectal Cancer Liver Metastases: Pitfalls And Helpful Tricks In A Review For Clinicians*," Crit. Rev. Oncol. Hematol. 95(3):272-281；Grabowski, J.P. (2015) "*Current Management Of Ovarian Cancer*," Minerva Med. 106(3):151-156；Field, K.M. (2015) "*Bevacizumab And Glioblastoma: Scientific Review, Newly Reported Updates, And Ongoing Controversies*," Cancer 121(7):997-1007；Suh, D.H.等(2015) "*Major Clinical Research Advances In Gynecologic Cancer In 2014*," J. Gynecol. Oncol. 26(2):156-167；Liu, K.J.等(2015) "*Bevacizumab In Combination With Anticancer Drugs For Previously Treated Advanced Non-Small Cell Lung Cancer*," Tumour Biol. 36(3):1323-1327；Di Bartolomeo, M.等(2015) "Bevacizumab treatment in the elderly patient with metastatic colorectal cancer," Clin. Interv. Aging 10:127-133)；**VEGF 受體**(O'Dwyer. P.J. 2006 *Oncologist*. 11(9):992-998)；**VEP8**；**VEP9**；**VIM-D5**；和 **Y 半抗原**，胚胎性癌細胞中發現的 **Le^y**。

【0397】 在某些實施方式中，本發明的這類抗 PD-1 結合分子與特異性結合 5T4、B7H3、CD19、CD20、CD51、CD123、DR5、EGFR、EpCam、GD2、gpA33、HER2、ROR-1、TAG-72、VEGF-A 抗體和/或 VEGFR2 的一個或多個分子聯合使用。

【0398】 本發明的這類 PD-1 結合分子可與免疫原性試劑比如腫瘤疫苗聯合。這類疫苗可包括純化的腫瘤抗原(包括重組蛋白、肽和碳水化合物分子)，自體或異源的腫瘤細胞。已經描述了許多腫瘤疫苗策略(見例如，Palena, C.,等, (2006) "*Cancer vaccines: preclinical studies and novel strategies*," Adv. Cancer Res.

95, 115-145；Mellman, I.,等(2011) "*Cancer immunotherapy comes of age*," Nature 480, 480–489；Zhang, X. M.等(2008) "*The anti-tumor immune response induced by a combination of MAGE-3/MAGE-n-derived peptides*," Oncol. Rep. 20, 245–252；Disis, M. L.等(2002) *"Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines,"* J. Clin. Oncol. 20, 2624–2632；*Vermeij, R.等(2012) "Potentiation of a p53-SLP vaccine by cyclophosphamide in ovarian cancer: a single-arm phase II study."* Int. J. Cancer 131, E670–E680)。本發明的這類 PD-1 結合分子可聯合化療方案。在這些情況下，可能降低施用的化療劑的劑量(Mokyr 等(1998) Cancer Research 58: 5301-5304)。

【0399】 本發明的這類 PD-1 結合分子可聯合其他免疫刺激分子，比如啟動宿主免疫反應性的抗體，以提供增加水準的 T-細胞啟動。尤其地，已經表明抗 PD-1 抗體、抗 PD-L1 抗體和/或抗 CTLA-4 抗體啟動免疫系統(見，例如，del Rio, M-L.等(2005) "*Antibody-Mediated Signaling Through PD-1 Costimulates T Cells And Enhances CD28-Dependent Proliferation*," Eur. J. Immunol 35:3545-3560；Barber, D. L.等(2006) "*Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection*," Nature 439, 682–687；Iwai, Y.等(2002) "*Involvement Of PD-L1 On Tumor Cells In The Escape From Host Immune System And Tumor Immunotherapy By PD-L1 Blockade*," Proc. Natl Acad. Sci. USA 99, 12293–12297；Leach, D. R.,等, (1996) "*Enhancement Of Antitumor Immunity By CTLA-4 Blockade*," Science 271, 1734-1736)。可與本發明的 PD-1 結合分子聯合的另外的免疫刺激分子包括啟動樹突細胞(DC)功能和抗原呈遞的針對樹突細胞表面上的分子的抗體、能夠代替 T 細胞助細胞活性的抗 CD40 抗體、和針對 T 細胞共刺激分子，比如 PD-L1、CTLA-4、OX-40 4-1BB 和 ICOS 的啟動抗體(見，例如，Ito 等(2000) "*Effective Priming Of Cytotoxic T Lymphocyte Precursors By Subcutaneous Administration Of Peptide*

Antigens In Liposomes Accompanied By Anti-CD40 And Anti-CTLA-4 Antibodies,"Immunobiology 201:527-40；美國專利號 5,811,097；Weinberg 等(2000) "*Engagement of the OX-40 Receptor In Vivo Enhances Antitumor Immunity*," Immunol 164:2160-2169；Melero 等(1997) "*Monoclonal Antibodies Against The 4-1BB T-Cell Activation Molecule Eradicate Established Tumors*," Nature Medicine 3: 682-685；Hutloff 等(1999) "*ICOS Is An Inducible T-Cell Co-Stimulator Structurally And Functionally Related To CD28*," Nature 397: 263-266；和 Moran, A.E.等(2013) "*The TNFRs OX40, 4-1BB, and CD40 As Targets For Cancer Immunotherapy*," Curr Opin Immunol. 2013 Apr；25(2): 10.1016/j.coi.2013.01.004)，和/或刺激性嵌合抗原受體(**CAR**)，其包括針對與來自各種共刺激蛋白質受體(例如，CD28、4-1BB、ICOS、OX40 等)的一個或多個細胞內信號傳導結構域融合的疾病抗原的抗原結合結構域，其用於在抗原結合時刺激 T 細胞(見，例如，Tettamanti, S.等(2013) "*Targeting Of Acute Myeloid Leukaemia By Cytokine-Induced Killer Cells Redirected With A Novel CD123-Specific Chimeric* Antigen *Receptor*," Br. J. Haematol. 161:389-401；Gill, S.等(2014) "*Efficacy Against Human Acute Myeloid Leukemia And Myeloablation Of Normal Hematopoiesis In A Mouse Model Using Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells*," Blood 123(15): 2343-2354；Mardiros, A.等(2013) "*T Cells Expressing CD123-Specific Chimeric Antigen Receptors Exhibit Specific Cytolytic Effector Functions And Antitumor Effects Against Human Acute Myeloid Leukemia*," Blood 122:3138-3148；Pizzitola, I.等(2014) "*Chimeric Antigen Receptors Against CD33/CD123 Antigens Efficiently Target Primary Acute Myeloid Leukemia Cells in vivo*," Leukemia doi:10.1038/leu.2014.62)。

【0400】 本發明的這類 PD-1 結合分子可聯合抑制性嵌合抗原受體(**iCAR**)，以轉移(divert off)靶向免疫療法應答。iCAR，一種針對與來自各種抑制性蛋白質

受體(例如，CTLA-4、PD-1 等)的一個或多個細胞內信號傳導結構域融合的疾病抗原的抗原結合結構域，其用於在抗原結合時約束 T-細胞應答(見，例如，Fedorov V.D. (2013) "*PD-1– and CTLA-4–Based Inhibitory Chimeric Antigen Receptors (iCARs) Divert Off-Target Immunotherapy Responses*," Sci. Tranl. Med. 5:215ra172 doi:10.1126/scitranslmed.3006597。

【0401】 尤其地，本發明的這類抗 PD-1 結合分子與抗 CD137 抗體、抗 CTLA-4 抗體、抗 OX40 抗體、抗 LAG-3 抗體、抗 PD-L1 抗體、抗 TIGIT 抗體、抗 TIM-3 抗體和/或癌症疫苗組合使用。

B. **診斷和治療診斷用途**

【0402】 本發明的某些 PD-1 結合分子幾乎不展示或不展示阻斷 PD-1 和 PD-1L 配體之間結合的能力。因此，抗體 PD-1 mAb 2 和 PD-1 mAb 4、它們的人源化衍生物和包括它們的 PD-1 結合片段的分子(例如，雙特異性雙抗體等)或與這類抗體競爭結合的分子可被可檢測地標記(例如，標記以放射性、酶、螢光、化學發光、順磁性、抗磁性或其他標記部分)，並且用於檢測樣品中的 PD-1 或用於細胞上 PD-1 的成像。因為這類分子不影響 PD-1 的生物活性，所以它們尤其可用於確定受試者(例如，針對與表達或靶向 PD-1 相關的癌症被治療的受試者)中 PD-1 表達的程度、位置和改變的方法中。

XII. 藥物組合物

【0403】 本發明的組合物包括原料藥組合物(bulk drug composition)，其可用於製備藥學組合物(例如，不純或非無菌組合物)和可用於製備單位劑型的藥學組合物(即，適於施用給受試者或患者的組合物)。這樣的組合物包括預防有效量的或治療有效量的本發明的 PD-1 結合分子或這類劑和藥學上可接受的載體的組合。優選地，本發明的組合物包括預防或治療有效量的本發明的 PD-1 結合分子和藥學上可接受的載體。本發明尤其包括這類藥物組合物，其中 PD-1 結合分子

是：PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 4、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 8、PD-1 mAb 9、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1 mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14 或 PD-1 mAb 15；人源化 PD-1 mAb 1；PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 4、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 8、PD-1 mAb 9、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1 mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14 或 PD-1 mAb 15；任何這類抗體的 PD-1 結合片段；或其中 PD-1 結合分子是雙特異性 PD-1 雙抗體(例如，PD-1 x LAG-3 雙特異性雙抗體)。尤其包括的是這類分子：其包括下述的 3 個 CDR_L 和 3 個 CDRH：PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 4、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 8、PD-1 mAb 9、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1 mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14 或 PD-1 mAb 15 抗體；人源化的 PD-1 mAb 1；PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 4、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 8、PD-1 mAb 9、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1 mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14 或 PD-1 mAb 15。

【0404】 本發明還包括這樣的藥學組合物，其另外包括對特定癌抗原是特異性的第二治療抗體(例如，腫瘤特異性單克隆抗體)和藥學上可接受的載體。

【0405】 在具體的實施方式中，術語“藥學上可接受的”表示獲得聯邦政府或州政府管理機構的許可或列於美國藥典(U.S. Pharmacopeia)或其他通常獲得認可的藥典中，供用於動物，特別是用於人類。術語“載體”指與治療劑一起施用的稀釋劑、佐劑(例如弗氏佐劑(完全和不完全)、賦形劑或媒介。這類藥學載體可以是無菌液體，如水和油，包括石油、動物油、植物油或合成來源的油，如花生油、大豆油、礦物油、芝麻油等。當靜脈內施用藥學組合物時，水是優選的載體。鹽水溶液和含水右旋糖以及甘油溶液也可以用作液體載體，特別是對於可注射溶液而言。合適的藥用賦形劑包括澱粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明

膠、麥芽、米、麵粉、白堊、矽膠、硬脂酸鈉、單硬脂酸甘油酯、滑石、氯化鈉、脫脂乳粉(dried skim milk)、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。若需要，組合物也可以含有小量濕潤劑或乳化劑或 pH 緩衝劑。這些組合物可以採用溶液、懸液、乳液、片劑、丸劑、膠囊、粉劑、緩釋製劑等形式。

【0406】 一般而言，本發明組合物的成分被單獨提供或以單位劑型混合在一起，例如作為標明活性劑的量的密封容器中的凍乾粉或無水濃縮物，所述密封容器如安瓿或小袋(sachette)。當通過輸注施用組合物時，其可以用含有無菌的藥學級水或鹽水的輸注瓶分配。如果通過注射施用所述組合物，則可以提供一安瓿注射用無菌水或鹽水，以便可以在施用前混合所述成分。

【0407】 可以將本發明的組合物配製為中性或鹽形式。藥學上可接受的鹽包括但不限於用陰離子形成的鹽以及用陽離子形成的鹽，所述陰離子例如來源於鹽酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的陰離子，並且所述陽離子例如來自氫氧化納、氫氧化鉀、氫氧化銨、氫氧化鈣、氫氧化鐵、異丙胺、三乙胺、2-乙基氨基乙醇、組氨酸、普魯卡因等的陽離子。

【0408】 本發明也提供藥學包裝或試劑盒，其包括一個或多個容器，所述容器填充本發明的 PD-1 結合分子(更優選地，PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 4、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 8、PD-1 mAb 9、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1 mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14 或 PD-1 mAb 15；人源化的 PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 4、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 8、PD-1 mAb 9、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1 mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14 或 PD-1 mAb 15 抗體；任何這類抗體的 PD-1 結合片段；或其中 PD-1 結合分子是雙特異性 PD-1 雙抗體(例如，PD-1 x LAG-3 雙特異性雙抗體))。尤其包括這類分子，其包括 PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 4、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1

mAb 7、PD-1 mAb 8、PD-1 mAb 9、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1 mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14 或 PD-1 mAb 15 的 3 個 CDR_L 和 3 個 CDRH，單獨地或與這類藥學上可接受的載體一起。另外，用於治療疾病的一種或多種其他預防劑或治療劑也可包括在藥物包裝或試劑盒中。本發明也提供了這樣的藥物包裝或試劑盒，其包括一個或多個容器，所述容器填充本發明藥物組合物的一種或多種成分。任選地與這類容器(一個或多個)關聯的可以是管理藥物或生物產品的製造、使用或銷售的政府機構規定的形式的佈告(notice)，所述佈告反映了管理機構許可用於人類施用的製造、使用或銷售。

【0409】 本發明提供了可用於上述方法的試劑盒。試劑盒可包括本發明的任何 PD-1 結合分子。試劑盒可在一個或多個容器中進一步包括可用於治療癌症的一種或多種其他預防劑和/或治療劑；和/或試劑盒可進一步包括結合與癌症相關的一種或多種癌症抗原的一種或多種細胞毒性抗體。在某些實施方式中，其他預防劑或治療劑是化療劑。在其他實施方式中，預防劑或治療劑是生物或激素治療劑。

XIII. 施用方法

【0410】 通過向受試者施用有效量的本發明的融合蛋白或綴合分子或包括本發明的融合蛋白或綴合分子的藥學組合物，可以提供本發明的組合物用來治療、預防和改善與疾病、病症或感染相關的一種或多種症狀。在優選的方面，這類組合物基本上是純的(即，基本上不含限制其效果或產生不期望的副作用的物質)。在具體實施方式中，受試者是動物，優選哺乳動物，如非靈長類(例如牛、馬、貓科動物、犬科動物、齧齒動物等)或靈長類(例如，猴子，如食蟹猴、人等)。在優選的實施方式中，受試者是人。

【0411】 各種送遞系統是已知的，並且可以用於施用本發明的組合物，例如封裝於脂質體中、微粒、微膠囊、能表達抗體或融合蛋白的重組細胞、受體

介導的內吞作用(見，例如，Wu 等(1987) "*Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System,*" J. Biol. Chem. 262:4429-4432)、構建核酸作為逆轉錄病毒或其他載體的一部分等。

【0412】 施用本發明的分子的方法包括但不限於腸胃外施用(例如皮內、肌肉、腹腔內、靜脈內以及皮下)、硬膜外以及粘膜(例如鼻內和口腔途徑)。在具體實施方式中，本發明的 PD-1 結合分子經肌肉、靜脈內或皮下施用。組合物可以通過任何方便途徑施用，例如通過輸注或彈丸注射、通過上皮或黏膜皮膚被覆(lining) (例如口腔粘膜、直腸和腸粘膜等)吸收，並且可以與其他生物活性劑一起施用。給藥可以是全身的或局部的。另外，也可以應用肺給藥，例如通過使用吸入器或噴霧器，並且與霧化劑一起配製。見，例如，美國專利號 6,019,968、5,985,320、5,985,309、5,934,272、5,874,064、5,855,913、5,290,540 和 4,880,078；和 PCT 申請號 WO 92/19244、WO 97/32572、WO 97/44013、WO 98/31346 和 WO 99/66903，其每一篇通過引用以其整體併入本文。

【0413】 本發明也使得本發明的 PD-1 結合分子包裝在密封容器中，比如指示分子的數量的安瓿或小袋中。在一個實施方式中，這樣的分子作為凍幹無菌粉或無水濃縮物提供於密封容器中，並且可以用例如水或鹽水重構至適當濃度，用於施用於受試者。優選地，本發明的 PD-1 結合分子作為凍幹無菌粉提供於密封容器中。

【0414】 本發明的凍幹的 PD-1 結合分子應在它們的初始容器中儲存在 2°C 和 8°C 之間，並且分子應該在重構之後 12 小時內，優選地 6 小時內、5 小時內、3 小時內或 1 小時內施用。在可選的實施方式中，這樣的分子以液體形式提供在指示分子、融合蛋白或綴合分子的量和濃度的密封容器中。優選地，這類 PD-1 結合分子在以液體形式提供時，被供應在密封容器中。

【0415】 可通過標準臨床技術確定本發明的組合物有效治療、預防或改善

與病症相關的一個或多個症狀的量。製劑中採用的精確劑量還將取決於施用的路徑和病況的嚴重性，並且應根據從業者的判斷和每個患者的情況決定。有效的劑量可從源自體外或動物模型測試系統的劑量回應曲線推斷。

【0416】 如本文所使用，在一個實施方式中，“**有效量**”的藥物組合物是足夠實現有益或期望的結果的量，所述結果包括但不限於臨床結果，比如減少源自疾病的症狀、減少感染的症狀(例如，病毒量、發燒、疼痛、敗血症等)或癌症的症狀(例如，癌細胞的增殖、腫瘤存在、腫瘤轉移等)，從而提高遭受疾的患者的生命品質，降低治療疾病需要的其他藥物治療的劑量、比如經靶向和/或內化增強另一藥物的作用、延遲疾病的進展，和/或延長個體的生存。

【0417】 可在一次或多次施用中施加有效量。為了本發明的目的，有效量的藥物、化合物或藥物組合物是足夠減少病毒存在的增殖(或影響)和直接或間接減少和/或延遲病毒疾病的發展的量。在一些實施方式中，藥物、化合物或藥物組合物的有效量可聯合或不聯合另一藥物、化合物或藥物組合物實現。因此，“有效量”可在施用一種或多種化療劑的背景下考慮，並且如聯合一種或多種其他劑，可實現或實現期望的結果，則單劑可視為以有效量施用。儘管個體的需要不同，但是測定每種組分的有效量的最佳範圍是本領域技術人員已知的。

【0418】 對於本發明包括的 PD-1 結合分子，向患者施用的劑量優選地基於接受受試者的體重(kg)確定。對於本發明包括的 PD-1 結合分子，向患者施用的劑量通常是至少約 0.01 μg/kg、至少約 0.05 μg/kg、至少約 0.1 μg/kg、至少約 0.2 μg/kg、至少約 0.5 μg/kg、至少約 1 μg/kg、至少約 2 μg/kg、至少約 5 μg/kg、至少約 10 μg/kg、至少約 20 μg/kg、至少約 50 μg/kg、至少約 0.1 mg/kg、至少約 1 mg/kg、至少約 3 mg/kg、至少約 5 mg/kg、至少約 10 mg/kg、至少約 30 mg/kg、至少約 50 mg/kg、至少約 75 mg/kg、至少約 100 mg/kg、至少約 125 mg/kg、至少約 150 mg/kg 受試者的體重或更多。

【0419】 可通過修飾比如，例如脂質化而增強分子的吸收和組織滲透，來減少或改變施用的本發明的 PD-1 結合分子的劑量和頻率。

【0420】 對於用作單劑療法，可計算向患者施用的本發明的 PD-1 結合分子的劑量。可選地，分子可與其他治療組合物聯合使用，並且向患者施用的劑量小於當所述分子用作單劑療法時的劑量。

【0421】 本發明的藥物組合物可被局部施用至需要治療的區域；這可通過例如，但不限於下述方式實現：局部注入、通過注射、或通過植入物的手段，所述植入物是多孔的、非多孔的或膠狀材料，包括膜，比如矽橡膠膜或纖維。優選地，當施用本發明的分子時，必須注意使用不吸收該分子的材料。

【0422】 本發明的組合物可在泡狀體(vesicle)，尤其是脂質體中遞送(見 Langer (1990) *"New Methods Of Drug Delivery,"* Science 249:1527-1533)；Treat 等，在 Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein 和 Fidler (編輯), Liss, New York, pp. 353- 365 (1989)中；Lopez-Berestein, 同上, pp. 317-327)。

【0423】 本發明的組合物可以在控釋或緩釋系統中遞送。本領域技術人員已知的任何技術均可用於產生包括本發明的一個或多個 PD-1 結合分子的緩釋製劑。見，例如，美國專利號 4,526,938；PCT 公開 WO 91/05548；PCT 公開 WO 96/20698；Ning 等(1996) *"Intratumoral Radioimmunotheraphy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel,"* Radiotherapy & Oncology 39:179-189；Song 等(1995) *"Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions,"* PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397；Cleek 等(1997) *"Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application,"* Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854；和 Lam 等(1997) *"Microencapsulation Of Recombinant Humanized*

*Monoclonal Antibody For Local Delivery,"*Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760，其每一篇通過引用以其整體併入本文。在一個實施方式中，泵可用於控釋系統(見 Langer, 上文; Sefton, (1987) *"Implantable Pumps,"*CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240；Buchwald 等(1980) *"Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis,"* Surgery 88:507-516；和 Saudek 等(1989) *"A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery,"*N. Engl. J. Med. 321:574-579)。在另一實施方式中，聚合材料可用于實現分子的控釋(見例如，Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974)；Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984)；Levy 等(1985) *"Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate,"*Science 228:190-192；During 等(1989) *"Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization,"* Ann. Neurol. 25:351-356；Howard 等(1989) *"Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits,"*J. Neurosurg. 7(1):105-112)；美國專利號 5,679,377、美國專利號 5,916,597、美國專利號 5,912,015、美國專利號 5,989,463、美國專利號 5,128,326、PCT 公開號 WO 99/15154 和 PCT 公開號 WO 99/20253)。緩釋製劑中所用的聚合物的實例包括但不限於聚(甲基丙烯酸 2-羥乙酯)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸)、乙烯-乙烯基乙酸酯共聚物(poly(ethylene-co-vinyl acetate))、聚(甲基丙烯酸)、聚乙醇酸交酯(PLG)、聚酐、聚(N-乙烯基吡咯烷酮)、聚(乙烯醇)、聚丙烯醯胺、聚(乙二醇)、聚交酯(PLA)、丙交酯-乙交酯共聚物(PLGA)以及聚原酸酯(polyorthoester)。控釋系統可接近治療靶(例如，肺)佈置，因此僅僅需要全身劑量的一部分(見，例如，Goodson, 在

以下中：Medical Applications of Controlled Release, 上文, vol. 2，pp. 115-138 (1984))。根據 Dunn 等 (見 U.S. 5,945,155)，使用可用作控釋移植物的聚合物組合物。該特定方法基於聚合物系統中生物活性材料原位控釋的治療效果。移植可通常發生于患者身體內需要治療的任何地方。可使用非聚合物持續遞送系統，由此受試者身體內的非聚合物移植物被用作藥物遞送系統。一旦移植到身體中，移植物的有機溶劑會從組合物中消散、分散或滲漏到周圍組織流中，並且非聚合物材料會逐漸凝結或沉澱，形成固體微孔基質(見美國 5,888,533)。

【0424】 Langer 的綜述中討論了控釋系統(1990, *"New Methods Of Drug Delivery,"* Science 249:1527-1533)。可以使用本領域技術人員已知的任何技術來生產包含本發明的一種或多種治療劑的緩釋製劑。見，例如美國專利號 4,526,938；國際公開號 WO 91/05548 和 WO 96/20698；Ning 等(1996) *"Intratumoral Radioimmunotheraphy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel,"* Radiotherapy & Oncology 39:179-189；Song 等(1995) *"Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions,"* PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397；Cleek 等(1997) *"Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application,"* Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854；和 Lam 等(1997) *"Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery,"* Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760，其每一篇通過引用以其整體併入本文。

【0425】 在本發明的組合物是編碼本發明的 PD-1 結合分子的核酸的情況下，核酸可被體內施用，以通過如下方式促進其編碼的 PD-1 結合分子的表達：將其構建為適當的核酸表達載體的一部分並且施用其從而其成為細胞內的，例如，通過使用逆轉錄病毒載體(見美國專利號 4,980,286)，或通過直接注射，或通

過使用微粒轟擊(例如，基因槍；生物彈道技術(Biolistic), Dupont)，或用脂質或細胞表面受體或轉染試劑包被，或通過與已知進入核的同源框樣肽聯合施用(見例如，Joliot 等(1991) *"Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis,"*Proc. Natl. Acad.Sci. (U.S.A.) 88:1864-1868)等。可選地，可以將核酸引入細胞內並通過同源重組整合到宿主細胞 DNA 中，以進行表達。

【0426】 用治療或預防有效量的本發明的 PD-1 結合分子治療受試者可包括單治療，或優選地，可包括一系列治療。在優選的實施例中，用這類雙抗體治療受試者每週一次，持續約 1 至 10 周，優選地 2 至 8 周，更優選地約 3 至 7 周，和甚至更優選地持續約 4、5 或 6 周。本發明的藥物組合物可每天施用一次、每天施用兩次或每天施用三次。可選地，藥物組合物可每週施用一次、每週兩次、每兩週一次、每月一次、每六週一次、每兩個月一次、每年兩次或每年一次。也將認識到，用於治療的分子的有效劑量可隨著具體治療的療程而增加或降低。

實施例

【0427】 下述實施例闡釋了組合物在本發明的診斷或治療方法中的的各種方法。實施例旨在是說明性的，但是決不限制本發明的範圍。

實施例 1

抗人 PD-1 單克隆抗體的表徵

【0428】 分離能夠特異性結合人和食蟹猴 PD-1 二者的十五種鼠科單克隆抗體，並且給與命名"**PD-1 mAb 1**"、"**PD-1 mAb 2**"、"**PD-1 mAb 3**"、"**PD-1 mAb 4**"、"**PD-1 mAb 5**"、"**PD-1 mAb 6**"、"**PD-1 mAb 7**"、"**PD-1 mAb 8**"、"**PD-1 mAb 9**"、"**PD-1 mAb 10**"、"**PD-1 mAb 11**"、"**PD-1 mAb 12**"、"**PD-1 mAb 13**"、"**PD-1 mAb 14"**和"**PD-1 mAb 15**"。發現這些抗體的 CDR 不同，並且在上面提供。如下評估與人和食蟹猴 PD-1 的細胞外結構域的結合：用可溶性人或食蟹猴 PD-1(與

組氨酸標籤(shPD-1 His)或人 Fc 區域(shPD-1 hFc)融合的人 PD-1 的細胞外結構域，或與人 Fc 區域融合的食蟹猴 PD-1 的細胞外結構域(scyno-PD1 Fc))塗覆平底 maxisorb 96 孔板，每個孔 0.5 或 1 μg/mL，洗滌平板，並且用分離的抗 PD-1 抗體 PD-1 mAb 1-15 之一進行孵育。對於這些研究，以 3、1.0、0.3333、0.1111、0.0370、0.0123 或 0.0041 μg/mL(三倍連續稀釋)使用抗 PD-1 抗體。使用山羊抗小鼠 IgG-HRP 二抗，評估結合至固定的 PD-1 (人或食蟹猴)的抗體的量。在平板閱讀器(Victor 2 Wallac, Perkin Elmers)上分析所有的樣品。可溶性人和可溶性食蟹猴 PD-1 的代表性結合曲線分別顯示在**圖 7A-7D** 和**圖 8A-8C** 中。

【0429】 這些結合試驗的結果(**圖 7A-7D** 和**圖 8A-8C**)顯示，所有的抗 PD-1 抗體 PD-1 mAb 1-15 均結合可溶性人和可溶性食蟹猴 PD-1 二者。

【0430】 為了進一步表徵鼠科抗 PD-1 抗體，在兩個不同的試驗中評估它們阻斷可溶性人 PD-L1 與可溶性人 PD-1 的結合的能力。在一個試驗中，檢測抗體阻斷人 PD-1 與固定在表面上的 PD-L1 的結合的能力。對於該試驗，將抗 PD-1 抗體 PD-1 mAb 1-15 中的每種，或參考抗 PD-1 抗體(PD-1 mAb A)與 shPD-1 His 融合蛋白(以 2.5 μg/mL)混合，並且分別與以 1 μg/mL 固定在鏈黴抗生物素包被的板上的生物素標記的可溶性人 PD-L1 (與人 Fc 融合的 PD-L1 的細胞外結構域(sPD-L1))一起孵育。對於這些研究，以 10、5.0、2.5、1.25、0.625、0.3125 或 0.1563 μg/mL (兩倍連續稀釋)使用抗 PD-1 抗體。使用抗 His-Tag-HRP 二抗，經 His-Tag，評估與固定的 sPD-L1 結合的 shPD-1 His 的量。在平板閱讀器(Victor 2 Wallac, Perkin Elmers)上分析所有的樣品。該實驗的結果顯示在**圖 9A-9D** 中。

【0431】 這些抑制試驗的結果(**圖 9A-9D**)顯示，抗 PD-抗體 PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 8、PD-1 mAb 9、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1 mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14 和 PD-1 mAb 15 能夠不能程度地阻斷可溶性人 PD-L1 與可溶性人 PD-1 的結合，而

PD-1 mAb 2 和 PD-1 mAb 4 在該試驗形式中展示很小的阻斷活性至沒有阻斷活性。

【0432】 在第二個試驗中，檢測鼠科抗 PD-1 抗體 PD-1 mAb 1-15 阻斷 PD-1 配體(即，人 PD-L1 或人 PD-L2)與在 NSO 細胞的表面上表達的 PD-1 結合的能力。對於該試驗，將抗 PD-1 抗體 PD-1 mAb 1-15 中的每種，或參考抗 PD-1 抗體(PD-1 mAb A 或 PD-1 mAb B)分別與生物素化的-可溶性人 PD-L1 (shPD-L1 融合蛋白)或生物素化的-可溶性人 PD-L2-muIgFc 融合蛋白(shPD-L2；Ancell Cat# 573-030)混合，各為 0.1 μg/測試，並且在阻斷緩衝液(FACS + 10%人血清白蛋白)中與表達人 PD-1 的 NSO 細胞一起孵育(~250,000 細胞/孔)。對於這些研究，以 4.0、1.0、2.5 x10^{-1}、6.25 x 10^{-2}、1.56 x 10^{-2}、3.90 x 10^{-3}、9.76 x 10^{-4}、2.4 x 10^{-4}、0.6 x 10^{-4}μg/測試(四倍連續稀釋)使用抗 PD-1 抗體。使用 PE 綴合的鏈黴抗生物素二抗通過 FACS 分析測定結合至 NSO 細胞的表面的 shPD-L1 (或 shPD-L2)的量。測定抑制 PD-1/PD-L1 結合的 IC50 值，並且在**表 6** 中提供至少兩個實驗的樣品平均值(　) (除非在指出的情況下)。

表 6

抗 PD-1 抗體	IC50 (μg/測試)		抗 PD-1 抗體	IC50 (μg/測試)
PD-1 mAb A	0.0044		PD-1 mAb 8	0.6611 ‡
PD-1 mAb B	0.0064		PD-1 mAb 9	0.0154
PD-1 mAb 1	0.0048		PD-1 mAb 10	0.0057
PD-1 mAb 2	0.0110		PD-1 mAb 11	0.0259 ‡
PD-1 mAb 3	0.0361 ‡		PD-1 mAb 12	0.0238 ‡
PD-1 mAb 4	0.0156 ‡		PD-1 mAb 13	0.0117
PD-1 mAb 5	0.0039		PD-1 mAb 14	0.0149 ‡
PD-1 mAb 6	0.0051		PD-1 mAb 15	0.0060
PD-1 mAb 7	0.0024			

‡來自單個實驗的結果

【0433】 shPD-L1 抑制試驗的結果(**表 6**)顯示，抗 PD-1 抗體 PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 4、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 9、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1 mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1

mAb 14 和 PD-1 mAb 15 能夠阻斷人 PD-L1 與在 NSO 細胞的表面上表達的人 PD-1 的結合。尤其地，相比參考 PD-1 抗體(PD-1 mAb A、PD-1 mAb B)，PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 10 和 PD-1 mAb 15 一樣好地阻斷或更好地阻斷 shPD-L1 結合，而 PD-1 mAb 8 在該試驗形式中基本上是非阻斷的。PD-1 mAb 2 和 PD-1 mAb 4 都能夠在該試驗形式中阻斷 PD-1/PD-L1 結合。

【0434】 類似地，抗 PD-1 抗體 PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2 和 PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 4、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 9、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14 能夠阻斷人 PD-L2 與在 NSO 細胞的表面上表達的人 PD-1 的結合，而 PD-1 mAb 8 在該試驗形式中基本上是非阻斷的。尤其地，與參考 PD-1 抗體(PD-1 mAb A、PD-1 mAb B)相比，PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7 和 PD-1 mAb 10 一樣好地阻斷或更好地阻斷 shPD-L2 結合。在該試驗中，沒有檢測 PD-1 抗體 PD-1 mAb 11 和 PD-1 mAb 15。下面提供了若干人源化抗 PD-1 抗體，包括 hPD-1 mAb 15 的結果。

實施例 2

人源化和進一步表徵

【0435】 將抗 PD-1 抗體 PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 9 和 PD-1 mAb 15 的可變結構域人源化，在鑒定了抗原表位元的情況下，使抗體進一步去免疫化，以產生最終的人源化可變結構域。PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2 和 PD-1 mAb 15 的人源化為每種抗體產生一個人源化的 VH 結構域和一個人源化的 VL 結構域，本文命名為**“hPD-1 mAb 1 VH1”**和**“hPD-1 mAb 1 VL1”**、“**hPD-1 mAb 2 VH1”**和**“hPD-1 mAb 2 VL1**”和**“hPD-1 mAb 15 VH1”**和**“hPD-1 mAb 15 VL1”**。PD-1 mAb 7 的人源化產生兩個人源化的 VH 結構域，本文命名為**“hPD-1 mAb 7 VH1”**和**“hPD-1 mAb 7 VH2**”，和三個人源化的 VL 結構域，本

文命名為**“hPD-1 mAb 1 VL1”**、**“hPD-1 mAb 7 VL2”**和**“hPD-1 mAb 7 VL3”**。PD-1 mAb 9 的人源化產生兩個人源化的 VH 結構域，本文命名為**“hPD-1 mAb 9 VH1”**和**“hPD-1 mAb 9 VH2”**，和兩個人源化的 VL 結構域，本文命名為**“hPD-1 mAb 9 VL1”**和**“hPD-1 mAb 1 VL2”**。在產生多個人源化的可變結構域的情況下，具體抗 PD-1 抗體(例如，PD-1 mAb 7)的人源化的重鏈和輕鏈可變結構域可以以任何組合使用，並且參考特定的 VH/VL 結構域命名人源化的鏈的具體組合，例如包括 hPD-1 mAb 7 VH1 和 hPD-1 mAb 7 VL2 的人源化抗體具體稱為**“hPD-1 mAb 7(1.2)”**。產生全長人源化抗體，其具有包括 L234A/L235A 取代(IgG1 (AA))的人 IgG1 恒定區或包括 S228P 取代(IgG4 (P))的人 IgG4 恒定區。

【0436】 如下構建全長 IgG1 人源化抗體重鏈：將人源化的 VH 結構域的 C-末端與具有變異的 CH2-CH3 結構域(包括 L234A/L235A (AA)取代)並且缺少 C-末端賴氨酸殘基的人 IgG1 恒定區的 N-末端融合(**SEQ ID NO:255**)：

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP
KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG

【0437】 在 **SEQ ID NO:255** 中，氨基酸殘基 1-98 對應 IgG1 CH1 結構域(**SEQ ID NO：10**)，氨基酸殘基 99-113 對應 IgG1 鉸鏈區(**SEQ ID NO：32**)和氨基酸殘基 114-329 對應包括 L234A/L235A 取代(加底線的)但是缺少 C-末端賴氨酸殘基的 IgG1 CH2-CH3 結構域(**SEQ ID NO:5**)。

【0438】 具有包括 L234A/L235A 突變並且缺少 C-末端賴氨酸殘基的 IgG1 重鏈恒定區的示例性人源化抗體((hPD-1 mAb 7(1.2))的重鏈的氨基酸序列

是(**SEQ ID NO:265**)：

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV
IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA stkgpsvfpl apsskstsgg taalgclvkd
yfpepvtvsw nsgaltsgvh tfpavlqssg lyslssvvtv pssslgtqty
icnvnhkpsn tkvdkrvepk scdkthtcpp cpape**aa**ggp svflfppkpk
dtlmisrtpe vtcvvvdvsh edpevkfnwy vdgvevhnak tkpreeqyns
tyrvvsvltv lhqdwlngke ykckvsnkal papiektisk akgqprepqv
ytlppsreem tknqvsltcl vkgfypsdia vewesngqpe nnykttppvl
dsdgsfflys kltvdksrwq qgnvfscsvm healhnhytq kslslspg

【0439】 在**SEQ ID NO：265**中，氨基酸殘基1-119對應hPD-1 mAb 7 VH1的VH結構域(**SEQ ID NO：147**)，氨基酸殘基120-217對應IgG1 CH1結構域(**SEQ ID NO：10**)，殘基218-232對應IgG1鉸鏈區(**SEQ ID NO：32**)和殘基233-448對應包括 L234A/L235A 取代(加底線的)但是缺少 C-末端賴氨酸殘基的 IgG1 CH2-CH3結構域(**SEQ ID NO:5**)。

【0440】 如下構建全長IgG4人源化抗體重鏈：將人源化的VH結構域的C-末端與具有穩定化的鉸鏈區(包括 S228P 取代)並且缺少 C-末端賴氨酸殘基的人IgG4恒定區的N-末端融合(**SEQ ID NO:256**)：

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES
KYGPPCP**P**CP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED
PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG

【0441】 在**SEQ ID NO:256**中，氨基酸殘基1-98對應IgG4 CH1結構域(**SEQ ID NO:254**)，氨基酸殘基99-110對應包括S228P取代(加底線的)的穩定化的IgG4鉸鏈區(**SEQ ID NO：13**)和氨基酸殘基111-326對應IgG4 CH2-CH3結構

域(**SEQ ID NO:4**)，但是缺少 C-末端賴氨酸殘基。

【0442】 具有 IgG4 重鏈恒定區的示例性人源化抗體((hPD-1 mAb 7(1.2))的重鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:266**)，所述 IgG4 重鏈恒定區包括具有 S228P 突變的穩定化的鉸鏈區並且缺少 C-末端賴氨酸殘基：

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV
IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APCSRSTSES TAALGCLVKD
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTKTY
TCNVDHKPSN TKVDKRVESK YGPPCPPCPA PEFLGGPSVF LFPPKPKDTL
MISRTPEVTC VVVDVSQEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTYR
VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKGLPSS IEKTISKAKG QPREPQVYTL
PPSQEEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD
GSFFLYSRLT VDKSRWQEGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSLG

【0443】 在 **SEQ ID NO:266** 中，氨基酸殘基 1-119 對應 hPD-1 mAb 7 VH1 的 VH 結構域(**SEQ ID NO:147**)，氨基酸殘基 120-217 對應 IgG4 CH1 結構域(**SEQ ID NO:254**)，氨基酸殘基 218-229 對應包括 S228P 取代(加底線的)的穩定化的 IgG4 鉸鏈區(**SEQ ID NO:13**)和氨基酸殘基 230-445 對應 IgG4 CH2-CH3 結構域(**SEQ ID NO:4**)，但是缺少 C-末端賴氨酸殘基。

【0444】 如下構建全長人源化抗體輕鏈：將人源化的 VL 結構域的 C-末端與人輕鏈 κ 區域(**SEQ ID NO:8**)的 N-末端融合。相同輕鏈與 IgG1 (AA)和 IgG4 (P)重鏈配對。

【0445】 具有 κ 恒定區的示例性人源化的 PD-1 抗體(hPD-1 mAb 7(1.2))的輕鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:264**)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV

THQGLSSPVT KSFNRGEC

【0446】 在 **SEQ ID NO:264** 中，氨基酸殘基 1-111 對應 hPD-1 mAb 7 VL2 的 VL 結構域(**SEQ ID NO:153**)，和氨基酸殘基 112-218 對應輕鏈 κ 恒定區(**SEQ ID NO：8**)。

【0447】 通過併入不同的恒定區和/或通過引入一個或多個氨基酸取代、添加或缺失，容易產生具有可選的恒定區，例如工程化的 Fc 區域，的抗 PD-1 抗體。例如，在期望雙特異性抗體的情況下，包含杵的和包含臼的 CH2-CH3 結構域用於利於異源二聚化。如上述產生包括鼠科可變區和人恒定區的嵌合抗 PD-1 抗體。

【0448】 如上所述測試人源化抗體(IgG1 (AA)和/或 IgG4 (P))的結合和阻斷活性。比較人源化抗體和相應的鼠科抗體與人 PD-1 (shPD-1 His，和 shPD-1 hFc)和食蟹猴 PD-1 (shPD-L1 hFc)的結合。另外，在 ELISA 試驗中，人源化抗體保持阻斷人 PD-L1 與人 PD-1 結合的能力。

【0449】 使用 Biacore 分析研究鼠科抗體 PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 9、PD-1 mAb 15、人源化抗體 hPD-1 mAb 2、hPD-1 mAb 7(1.2)、hPD-1 mAb 9(1.1)、hPD-1 mAb 15、和參考抗 PD-1 抗體 PD-1 mAb A 和 PD-1 mAb B 的結合動力學。將抗 PD-1 抗體捕獲在固定的蛋白質 A 上，並且用 His 標記的可溶性人 PD-1 (shPD-1-His)或被切割以去除 Fc 部分的可溶性人食蟹猴 PD-1 Fc 融合物(scyno PD-1 hFc)孵育，並且經 Biacore 分析測定結合的動力學。在另外的研究中，將抗 PD-1 抗體 hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)、hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)、hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA)、hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P)、PD-1 mAb A IgG1 (AA)、PD-1 mAb A IgG4 (P)、PD-1 mAb B IgG1 (AA)和 PD-1 mAb B IgG4 (P)捕獲在固定的 $F(ab)_2$ 山羊抗人 Fc 上，並且如上述通過 Biacore 分析測定結合動力學。來自這些研究的計算的 ka、kd 和 KD 提供在**表 7** 中。

表 7							
蛋白質 A 捕獲							
抗 PD-1 抗體	人 [a]				食蟹猴 [b]		
	$k_a(x10^4)$	$k_d(x10^{-4})$	KD (nM)		$k_a(x10^4)$	$k_d(x10^{-4})$	KD (nM)
PD-1 mAb A	60	18	3		14	9.6	6.9
PD-1 mAb B	140	35	2.5		37	12	3.2
PD-1 mAb 7	21	2.8	1.3		17	6	3.5
hPD-1 mAb 7(1.2)	110	4.3	0.39		37	6.4	1.7
PD-1 mAb 9	4.3	4.2	9.8		2.2	16	72.7
hPD-1 mAb 9(1.1)	1.8	6.5	36.1		1.5	11	73.3
PD-1 mAb 15	4.5	1.3	2.9		2.7	11	40.7
hPD-1 mAb 15	2.4	3.2	13.3		2.3	18	78.3
PD-1 mAb 2	5.5	5.6	10.2		4.2	6.0	14.3
hPD-1 mAb 2	3.2	1.6	5.0		2.3	3.9	17
$F(ab)_2$ 山羊抗人 Fc 捕獲							
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	13	8.4	6.5		8.1	4.5	5.6
PD-1 mAb A IgG4 (P)	13	7.9	6.1		8.4	5.0	6.0
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	25	28	11.2		20	6.4	3.2
PD-1 mAb B IgG4 (P)	26	25	9.6		20	7.9	4.0
hPD-1 mAb 7(1.2)IgG1 (AA)	25	3.8	1.5		16	7.8	4.9
hPD-1 mAb 7(1.2)IgG4 (P)	27	4.1	1.5		17	7.8	4.6
hPD-1 mAb 9(1.1)IgG1 (AA)	5.6	6.1	10.9		5.6	5.2	9.3
hPD-1 mAb 9(1.1)IgG4 (P)	6.1	5.8	9.5		4.9	7.4	15.1

[a] 組氨酸標記的可溶性人 PD-1 (shPD-1 His)

[b] 可溶性食蟹猴 PD-1 (scyno PD-1 hFc)，切割的

【0450】 結果表明，PD-1 mAb 7 和人源化的 hPD-1 mAb 7(1.2)相對於參考抗 PD-1 抗體 PD-1 mAb A 和 PD-1 mAb B 展示更好的結合動力學。PD-1 mAb 2 和 hPD-1 mAb 2 展示的結合動力學在參考抗 PD-1 抗體的約兩倍之內，而 PD-1 mAb 9、hPD-1 mAb 9(1.1)、PD-1 mAb 15 和 hPD-1 mAb 15 展示的結合動力學在參考抗 PD-1 抗體的約 2-6 倍之內。

【0451】 研究抗人 PD-1 抗體 PD-1 mAb 7 的組織特異性。使正常的組織與 PD-1 mAb 7 或與同種型對照(0.313 μg/mL)接觸，並且使染色的程度視覺化。Bloxall 用於內源酶阻斷，以減少結腸組織中的非特異性粘蛋白染色。如**圖 10A，圖 i-xii** 中顯示，PD-1 mAb 7 和同種型對照二者都不能標記正常結腸、肝、肺、胰腺、腎和心臟組織的細胞。另外，PD-1 mAb 7 和同種型對照不能使正常皮膚染色(**圖 10B，圖 i-ii**)。相反，發現 PD-1 mAb 7 強烈標記正常扁桃體組織中存在的淋巴細胞和表達 PD-1 的 PDCD1 轉染的 NSO 細胞(**圖 10B，圖 iii** 和 **v**)，而同種型對照不能標記任何一個(**圖 10B，圖 iv** 和 **vi)**。結果呈現在**圖 10A-10B** 中，因此指示 PD-1 mAb 7 能夠特異性結合淋巴細胞和表達 PD-1 的細胞。

【0452】 檢查 hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)、hPD-1 mAb 7(1.1)IgG1 (AA)、hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)、hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)、hPD-1 mAb 9(1.1)IgG1 (AA)、hPD-1 mAb 9(1.1)IgG4 (P)、hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)和參考抗 PD-1 抗體 PD-1 mAb A 和 PD-1 mAb B 的結合飽和度特徵(saturation profile)。簡言之，將抗 PD-1 抗體，PD-1 mAb 1-15，或參考抗 PD-1 抗體(PD-1 mAb A 和 PD-1 mAb B)中的每一種與表達人 PD-1 的 NSO 細胞(~250,000 細胞/孔)在封閉緩衝液(FACS + 10%人血清白蛋白)中混合。對於這些研究，以 50、12.5、3.13、2.0 $x10^{-1}$、4.9 x 10^{-2}、1.2 x 10^{-2}、3.0 x 10^{-3}、1.9 x 10^{-4}、7.6 x 10^{-4}、4.75 x 10^{-5} 或 1.19 x 10^{-5}μg/測試(四倍連續稀釋)使用抗 PD-1 抗體。通過 FACS 分析使用山羊抗人-APC 二抗測定結合至 NSO 細胞的表面的抗體的量。代表性飽和度曲線顯示在**圖 11** 中。測定 EC50 和 EC90 值，並且在**表 8** 中提供來自四個獨立實驗的樣品平均值(SM)和標準差(SD **σ**)。

表 8

	飽和度結合			
	EC50 (μg/測試)		**EC90 (μg/測試)**	
抗 PD-1 抗體	**SM**	**SD σ**	**SM**	**SD σ**
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	0.1991	0.1309	1.4528	0.8040

PD-1 mAb A IgG4 (P)	0.1581	0.1161	1.5464	1.7690
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	0.1347	0.0681	1.3917	0.9573
PD-1 mAb B IgG4 (P)	0.1398	0.0951	1.1619	1.2681
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)	0.4431	0.1997	2.4374	1.2637
hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA)	0.1069	0.0500	0.9102	0.5476
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)	0.1872	0.1553	0.6810	0.3226
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	0.1376	0.0926	0.6609	0.3437
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA)	0.3123	0.2291	1.6486	0.9117
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P)	0.5128	0.2228	3.0563	0.9437
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)	0.2927	0.1333	2.0640	0.6096

【0453】 結合飽和度研究表明，PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 9 和 PD-1 mAb 15 的人源化形式對於與細胞表面 PD-1 結合具有有利的特徵。尤其地，在所有檢測的抗體中，人源化的 PD-1 mAb 7 (具有 IgG1 (AA)或 IgG4 (P) Fc 區域的 hPD-1 mAb 7(1.1)和 hPD-1 mAb 7(1.2))具有最低 EC90 值。

【0454】 為了進一步表徵人源化的抗 PD-1 抗體 hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)、hPD-1 mAb 7(1.1)IgG1 (AA)、hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)、hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)、hPD-1 mAb 9(1.1)IgG1 (AA)、hPD-1 mAb 9(1.1)IgG4 (P)和 hPD-1 mAb 15IgG1 (AA)，檢查它們阻斷人 PD-L1 (shPD-L1)和人 PD-L2 (shPD-L2)與在 NSO 細胞的表面上表達的 PD-1 結合的能力。基本上如上述進行這些試驗。抑制 sPD-L1 和 sPD-L2 與在 NSO 細胞上表達的 PD-1 結合的代表性曲線分別顯示在**圖 12A** 和 **12B**。測定 IC50 和 IC90 值，並且在**表 9** 中提供來自三個單獨實驗的樣品平均值(SM)和標準差(SD **σ**)。

表 9

	sPD-L1				**sPD-L2**			
	IC50 (μg/測試)		**IC90 (μg/測試)**		**IC50 (μg/測試)**		**IC90 (μg/測試)**	
抗 PD-1 抗體	**SM**	**SD σ**	**SM**	**SD σ**	**SM**	**SD σ**	**SM**	**SD σ**
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	0.0203	0.0089	0.2985	0.3279	0.0414	0.0124	0.1601	0.066
PD-1 mAb A IgG4 (P)	0.0156	0.0096	0.0776	0.0208	0.0280	0.0070	0.1594	0.1153
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	0.0148	0.0008	0.1034	0.0100	0.0280	0.0059	0.1190	0.060
PD-1 mAb B IgG4 (P)	0.0143	0.0013	0.0798	0.0239	0.0280	0.0055	0.0924	0.0065
hPD-1 mAb 2	0.0578	0.0124	0.2480	0.050	0.1294	0.0143	0.3813	0.0656

IgG1 (AA)								
hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA)	0.0166	0.0032	0.0674	0.0041	0.0283	0.0147	0.0886	0.0166
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)	0.0118	0.0027	0.0678	0.0031	0.0212	0.0031	0.0672	0.0043
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	0.0103	0.0023	0.0520	0.0033	0.0213	0.0019	0.0616	0.0063
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA)	0.0593	0.0036	0.3238	0.0508	0.4002	0.5000	0.4573	0.1805
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P)	0.0460	0.0118	0.2461	0.0513	0.1105	0.0146	0.2914	0.0526
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)	0.0440	0.0092	0.2068	0.035	0.0945	0.0022	0.3093	0.0588

【0455】 配體結合抑制研究表明，PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 9 和 PD-1 mAb 15 的人源化的形式能夠抑制 sPD-L1 和 sPD-L2 與細胞表面上的 PD-1 結合。尤其地，在所有檢測的抗體中，人源化的 PD-1 mAb 7 (hPD-1 mAb 7(1.1)和 hPD-1 mAb 7(1.2))具有最低 IC90 值。

實施例 3

通過人源化抗人 PD-1 抗體阻斷 PD-1/PD-L1 檢查點

【0456】 在 Jurkat-luc-NFAT/CHO-PD-L1 螢光素酶報告試驗中，檢測 hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)、hPD-1 mAb 7(1.1)IgG1 (AA)、hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1，(AA)、hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)、hPD-1 mAb 9(1.1)IgG1 (AA)、hPD-1 mAb 9(1.1)IgG4 (P)、hPD-1 mAb 15IgG1 (AA)和參考抗 PD-1 抗體 PD-1 mAb A 和 PD-1 mAb B 對抗 PD-1/PD-L1 軸(axis)的能力(即，阻斷 PD-1/PD-L1 相互作用和防止 T-細胞應答的下調)。簡言之，將表達 PD-L1 的 CHO 細胞(CHO/PD-L1)以 40,000/孔塗鋪在 100 μL 培養基(RPMI + 10% FBS + 100 μg/mL 潮黴素 B + 100 μg/mL G418)中並且孵育過夜。第二天，去除培養基，並且，以 50,000 細胞/孔將在 40 μL 試驗緩衝液(RPMI + 2% FBS)中的 MNFAT-luc2/PD-1 Jurkat 細胞(Promega)以及抗 PD-1 抗體 PD-1 mAb 1-15 或參考抗 PD-1 抗體(PD-1 mAb A 和 PD-1 mAb B) (0-25 μg/mL；在試驗緩衝液中八次 2.5 倍連續稀釋)添加至每個孔中，並且在 37℃孵

育 6 小時，隨後在環境溫度孵育 5-10 分鐘。接著，將 80 μL 的 BioGlo 底物(Promega)添加至每個孔中，並且將平板在環境溫度孵育另外的 5-10 分鐘，在 Victor 平板閱讀器中測量發光。代表性飽和度曲線顯示在**圖 13** 中。測定 EC50 和 EC90 值，並且，在**表 10** 中提供來自四個單獨實驗的樣品平均值(SM)和標準差(SD σ)。

表 10

抗 PD-1 抗體	報告信號傳導			
	EC50 (μg/測試)		EC90 (μg/測試)	
	SM	SD σ	SM	SD σ
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	0.2549	0.0480	2.4474	1.2228
PD-1 mAb A IgG4 (P)	0.2049	0.0719	2.5535	1.2139
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	0.2119	0.1781	2.2036	2.0118
PD-1 mAb B IgG4 (P)	0.1142	0.0323	0.9418	0.2863
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)	0.3539	0.0983	3.8975	2.0054
hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA)	0.1080	0.0386	1.1992	0.5103
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)	0.0944	0.0153	0.6452	0.2615
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	0.0965	0.0169	0.6885	.01858
hPD-1 mAb 9 IgG1 (AA)	0.2835	0.0530	2.9968	0.8866
hPD-1 mAb 9 IgG4 (P)	0.3154	0.0872	5.0940	4.0496
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)	0.2585	0.0592	3.3138	1.0532

【0457】 報告信號傳導研究表明，PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 9 和 PD-1 mAb 15 的人源化形式可阻斷 PD-1/PD-L1 軸並且防止 T-細胞應答的下調。尤其地，人源化的 PD-1 mAb 7 (具有 IgG1 (AA)或 IgG4 (P) Fc 區域的 hPD-1 mAb 7(1.1)和 hPD-1 mAb 7(1.2))具有最低的 EC50/EC90 值。

實施例 4

抗人 PD-1 抗體的功能活性

【0458】 金黃色葡萄球菌腸毒素 B 型(SEB)是能夠啟動 SEB-應答供體中大部分 T-細胞(5-30%)的微生物超級抗原。SEB 結合肽結合槽(peptide binding grove)外面的 MHC II，因此是 MHC II 依賴性的，但是是不受限制的和 TCR 介導的。T 細胞的 SEB-刺激使得寡克隆 T 細胞增殖和細胞因數產生(儘管可觀察到供體變化性，並且一些供體無應答)。在 SEB-刺激 48 小時內，PMBC 上調 PD-1 和 LAG-3，在 96-孔板中伴隨 SEB-刺激的二次培養後第 5 天，看到進一步增強。

SEB-刺激 PBMC 之後，免疫檢查點蛋白質 PD-1 和 LAG-3 的上調限制了再次刺激時的細胞因數釋放。檢測抗 PD-1 抗體單獨和聯合抗 LAG-3 抗體通過檢查點抑制增強細胞因數釋放的能力。

【0459】 簡言之，使用 Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare)密度梯度離心方法，根據製造商的指導，從在健康供體知情同意的情況下獲得自健康供體的全血(Biological Specialty Corporation)純化 PBMC，然後使用 Dynabeads® Untouched Human T Cells Kit (Dynabeads® Untouched 人 T 細胞試劑盒)(Life Technologies)，根據製造商的指導，純化 T 細胞。在 T-25 大燒瓶中的 RPMI-培養基+ 10%熱失活的 FBS + 1%青黴素/鏈黴素中單獨培養純化的 PBMC，2-3 天，或與 SEB (Sigma-Aldrich)，0.1ng/mL (初次刺激)，一起培養 2-3 天。在第一輪的 SEB-刺激結束時，用 PBS 洗滌 PBMC 兩次，並且在 96 孔組織培養板中立即以 1-5 x 10^5 細胞/孔的濃度鋪平板，其在單獨的培養中、在具有對照或抗 PD-1 抗體的培養基中、在具有 0.1ng/mL 的 SEB (二次刺激)和無抗體的培養基中，或在具有 SEB 和對照 IgG 或抗 PD-1 抗體+/-抗 LAG-3 mAb 的培養基中，並且培養另外的 2-3 天。在二次刺激結束時，收穫上清液，以使用針對 IFNγ、TNFα、IL-10 和 IL-4 的人 DuoSet ELIS Kits (R&D Systems)，根據製造商的指導，測量細胞因數分泌。

【0460】 檢測 PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 9 和 PD-1 mAb 15 單獨或聯合獨特的抗 LAG-3 抗體 LAG-3 mAb1 通過檢查點抑制而增強細胞因數釋放的能力。這些研究也包括一個或多個下述參考抗 PD-1 抗體：PD-1 mAb A、PD-1 mAb B 和 LAG-3 mAb A，單獨的或組合的。**圖 14** 顯示了來自通過：無抗體；同種型對照抗體；PD-1 mAb 7 和/或 LAG-3 mAb 7；PD-1 mAb 9 和/或 LAG-3 mAb 1；PD-1 mAb 15 和/或 LAG-3 mAb 1；PD-1 mAb 2 和/或 LAG-3 mAb 1；或參考抗 PD-1 抗體 PD-1 mAb B 和/或 LAG-3 mAb A (以 10 μg/mL 使用抗體)處理的代表性應答供體(D:38941)的 SEB-刺激的(0.1 ng/mL) PBMC 的 IFNγ 分泌特徵。

【0461】 在另外的研究中，檢測了人源化形式的 PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 9 和 PD-1 mAb 15(包括人 IgG1 (AA)或人 IgG4 (P) Fc 區域)以及參考抗 PD-1 抗體 PD-1 mAb A 和 PD-1 mAb B 通過檢查點抑制而增強細胞因數釋放的能力。對於這些研究，以 0.625、2.5 和 10 μg/mL 使用抗體。**圖 15A-15B** 顯示了來自不用抗體處理或通過以下抗體之一處理的代表性應答供體(D:57709)的 SEB-刺激的(0.2 ng/mL) PBMC 的 IFNγ (**圖 15A**)和 TNFα (**圖 15B**)分泌特徵：同種型對照；hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)；hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)；hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)；hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA)；hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P)；hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)；或參考抗 PD-1 抗體 PD-1 mAb A IgG1 (AA)、PD-1 mAb A IgG4 (P)、PD-1 mAb B IgG1 (AA)、PD-1 mAb B IgG4 (P)。對於通過抗 PD-1 抗體以 0.625、2.5 和 10 μg/mL 處理的樣品，測定用 SEB+Ab 處理的樣品中總的 pg/mg 的 IFNγ，並且將來自 3 個不同應答供體(除非在指出的情況下)的樣品平均值(SM)和標準差(SD **σ**)提供在**表 11** 中。用人源化形式的 PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 9 和 PD-1 mAb 15 (包括人 IgG1 (AA)或人 IgG4 (P) Fc 區域)與參考抗 PD-1 抗體 PD-1 mAb A 和 PD-1 mAb B (即，人源化抗 PD-1/PD-1 mAb A，和人源化抗 PD-1/PD-1 mAb B)處理的樣品中 IFNγ 分泌的比例分別提供在**表 12** 和**表 13** 中。

表 11

	IFNγ 分泌(pg/mL)					
μg/mL 抗 PD1 抗體	0.625 μg/mL		2.5 μg/mL		10 μg/mL	
抗 PD-1 抗體	**SM**	**SD σ**	**SM**	**SD σ**	**SM**	**SD σ**
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	221.18	110.89	341.13	247.93	347.46	144.72
PD-1 mAb A IgG4 (P)	281.36	132.65	495.15	190.57	399.41	117.56
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	366.69	196.64	387.682	215.51	387.32	282.81
PD-1 mAb B IgG4 (P)	348.40	185.96	433.382	163.23	551.68	125.08
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)	302.05	185.71	610.70	209.77	414.63	272.65
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	384.57‡	323.79‡	411.40	398.59	370.06	108.12
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA)	340.81	207.76	442.598	303.70	655.29	567.91
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P)	309.82	130.30	468.62	350.15	424.35	288.95
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)	360.00	274.28	373.32	160.25	541.83	444.22

hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)	275.88	135.23	372.73	53.53	496.70	235.37
對照 IgG	137.14	76.61	100.65	48.67	138.10	120.81
無抗體	120.05	73.90	120.05	73.90	109.46	85.18

‡來自兩個應答供體的結果

表 12						
	IFNγ 分泌比例(新抗 PD-1/PD-1 mAb A)					
μg/mL 抗 PD1 抗體	0.625 μg/mL		2.5 μg/mL		10 μg/mL	
抗 PD-1 抗體	**SM**	**SD σ**	**SM**	**SD σ**	**SM**	**SD σ**
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00
PD-1 mAb A IgG4 (P)	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	1.77	0.92	1.28	0.36	1.07	0.42
PD-1 mAb B IgG4 (P)	1.23	0.16	0.92	0.27	1.40	0.12
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)	1.36	0.37	2.46	1.85	1.17	0.41
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	1.20‡	0.35‡	0.79	0.54	0.95	0.22
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA)	1.48	0.19	1.46	0.71	1.70	0.84
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P)	1.13	0.13	0.91	0.42	1.02	0.46
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)	1.50	0.39	1.51	1.23	1.48	0.71
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)	1.32	0.53	1.48	0.86	1.42	0.12
對照 IgG	0.63	0.2	0.33	0.08	0.39	0.24
無抗體	0.54	0.12	0.39	0.14	0.31	0.17

‡來自兩個應答供體的結果

表 13						
	IFNγ 分泌比例(新抗 PD-1/PD-1 mAb B)					
μg/mL 抗 PD1 抗體	0.625 μg/mL		2.5 μg/mL		10 μg/mL	
抗 PD-1 抗體	**SM**	**SD σ**	**SM**	**SD σ**	**SM**	**SD σ**
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	0.37	0.37	0.82	0.20	1.06	0.48
PD-1 mAb A IgG4 (P)	0.82	0.12	1.16	0.38	0.72	0.07
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	1.0	0.00	1.0	0.00	1.0	0.00
PD-1 mAb B IgG4 (P)	1.0	0.00	1.0	0.00	1.0	0.00
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)	0.84	0.22	1.77	0.81	1.11	0.07
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	0.91‡	0.26‡	0.83	0.50	0.68	0.17
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA)	1.04	0.59	1.12	0.29	1.60	0.42
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P)	0.92	0.09	0.99	0.36	0.75	0.39
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)	1.01	0.48	1.07	0.57	1.34	0.15
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)	0.78	0.12	1.10	0.38	1.46	0.53
對照 IgG	0.39	0.08	0.27	0.08	0.34	0.13
無抗體	0.34	0.11	0.31	0.03	0.28	0.08

‡來自兩個應答供體的結果

【0462】 這些研究的結果表明，當再次刺激時，PD-1 抗體 PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 9 和 PD-1 mAb 15 顯著增強來自 SEB-刺激的 PBMC 的 IFNγ (**圖 14** 和 **15A**，和**表 11-13**)和 TNFα (**圖 15B**)產生。另外，當再次刺激時，抗 PD-1 抗體與抗 LAG-3 抗體的聯合導致來自 SEB-刺激的 PBMC 的細胞因數釋放的進一步增強(**圖 14**)。尤其地，PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 9 或 PD-1 mAb 15 與獨特的抗 LAG-3 抗體 LAG-3 mAb 1 的組合提供了最大的增強。

實施例 5

PD-1 x LAG-3 雙特異性分子結合研究

【0463】 產生許多 PD-1 x LAG-3 雙特異性分子，包括具有三、四和五條鏈的、包含 Fc 區域的雙抗體以及雙特異性抗體。產生具有四條鏈並且包括 E/K-螺旋異源二聚體促進結構域的四種雙抗體，並且命名為“**DART A**”、“**DART B**”、“**DART C**”和“**DART I**”。產生具有四條鏈並且包括 CH1/CL 結構域的四種雙抗體，並且命名為“**DART D**”、“**DART E**”、“**DART J**”和“**DART 1**”。產生具有五條鏈並且包括 E/K-螺旋異源二聚體促進結構域和 CH1/CL 結構域的兩種雙抗體，並且命名為“**DART F**”和“**DART G**”。產生具有三條鏈並且包括 E/K-螺旋異源二聚體促進結構域的一種雙抗體，並且命名為“**DART H**”。產生具有四條鏈的一種雙特異性抗體，並且命名為“**BSAB A**”。上面提供了這些 PD-1 x LAG-3 雙特異性分子的結構和氨基酸序列並且總結在下面**表 14** 中。

表 14

名稱	親本 mAbs	Fc‡	鏈	SEQ ID NO:	其他組分
DART A	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 1(1.4)	IgG4 (YTE)	4	267 (X_1=A； X_2=Y；X_3=T； X_4=E)和 268	E/K-螺旋；見圖 3B
DART B	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 1(1.3)	IgG4 (YTE)	4	267 (X_1=G； X_2=Y；X_3=T； X_4=E)和 268	E/K-螺旋；見圖 3B
DART C	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 1(1.3)	IgG4	4	267 (X_1=G； X_2=M；X_3=S； X_4=T)和 268	E/K-螺旋；見圖 3B

表 14					
名稱	**親本 mAbs**	**Fc‡**	**鏈**	**SEQ ID NO:**	**其他組分**
DART D	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 1(1.4)	IgG4 (YTE)	4	269 和 270	CL/CH1；見圖 3C
DART E	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 1(1.4)	IgG4 (YTE)	4	271 和 272	CL/CH1；見圖 3C
DART F	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 1(1.4)	IgG1 (AA/YTE)	5	273、274、275 和 276	CL/CH1 和 E/K-螺旋；見圖 5
DART G	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 1(1.4)	IgG1 (AA/YTE)	5	277、278、279 和 280	CL/CH1 和 E/K-螺旋；見圖 5
DART H	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 1(1.4)	IgG1 (AA)	3	281、282 和 283	E/K Coils；見圖 4A
DART I	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 6(1.1)	IgG4 (YTE)	4	290 和 291	E/K-螺旋；見圖 3B
DART J	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 6(1.1)	IgG4 (YTE)	4	292 和 293	CL/CH1；見圖 3C
DART 1	PD-1 mAb A LAG-3 mAb A	IgG1 (AA)	4	284 和 285	CL/CH1；見圖 3C
BSAB A	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 1(1.4)	IgG1 (AA)	4	286、287、288 和 289	具有工程化的 Fc 區域的 mAb

‡併入 IgG4 Fc 區域的分子，也併入穩定化的 IgG4 鉸鏈區。

【0464】 通過併入不同 VH 和 VL 結構域，可容易產生包括可選的 PD-1 和/或 LAG-3 表位結合位點的另外的 PD-1 x LAG-3 雙特異性分子。類似地，可通過併入具有期望的特異性的 VH 和 VL 產生結合不是 LAG-3 的抗原的分子。

【0465】 基本上如上所述檢測 PD-1 x LAG-3 雙特異性雙抗體構建體：DART A、DART B、DART D、DART E、DART F、DART G、DART H、DART I 和 DART 1；抗 PD-1 抗體：hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)、hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)、PD-1 mAb A IgG1 (AA)和 PD-1 mAb A IgG4 (P)；和抗 LAG-3 抗體：hLAG-3 mAb 1(1.4)IgG4 (P)、LAG-3 mAb AIgG4 (P)、hLAG-3 mAb 1(1.4)IgG1 (AA)和 LAG-3 mAb AIgG1 (AA)的結合飽和度特徵。測試 PD-1 x LAG-3 雙特異性雙抗體構建體的 PD-1 和 LAG-3 結合，同時，僅僅測試抗 PD-1 和抗 LAG-3 抗體與它們各自抗原的結合。對於這些研究，使用表達 PD-1 或 LAG-3 的 NSO 細胞。使用雙抗體和抗體(170.0-0.013 μM 或 85.0-0.0021 μM(四倍連續稀釋)。測定 EC50 和

EC90 值並且提供在**表 15-16** 中。提供了進行 2 個或更多個單獨實驗的樣品平均值(SM)和標準差(SD **σ**)。

表 15

分子	飽和度結合 PD-1			
	EC50 (μM)		EC90 (μM)	
	SM	SD σ	SM	SD σ
DART A	1.9297	0.4324	9.6027	0.4801
DART B	1.7640§		12.2700§	
DART D	2.2267	0.4140	10.9313	2.6351
DART E	3.2180	0.5742	23.840	3.2385
DART F	1.4320§		14.5800§	
DART G	1.1488	0.6227	3.4220	2.4600
DART H	4.5310§		22.6600§	
DART I	1.3232	0.4890	7.8135	4.0821
DART 1	2.1329	1.4850	13.8113	9.0256
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	1.2083	0.8112	3.9340	1.8746
PD-1 mAb A IgG4 (P)	2.3470	1.2362	22.7770	15.0690
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)	1.0879	0.3958	7.4153	3.0794
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	1.6733	0.5464	9.9543	6.6569

§來自單個實驗的結果

表 16

分子	飽和度結合 LAG-3			
	EC50 (μM)		EC90 (μM)	
	SM	SD σ	SM	SD σ
DART A	0.8402	0.2231	4.4448	2.4770
DART B	1.0750§		9.8580§	
DART D	0.8985	0.5326	5.7967	4.7329
DART E	0.9250	0.8075	5.6450	5.6809
DART F	5.0090	0.5770	19.3350	4.7447
DART G	0.9396	0.3045	8.5507	4.7448
DART H	2.3840§		9.7810	4.2412
DART I	0.5321	0.0547	4.198	3.2188
DART 1	20.0233	2.1454	115.97	15.2425
hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG4 (P)	1.0057	0.1969	5.1360	4.7904
LAG-3 mAb A IgG4 (P)	0.5968	0.1376	2.0833	0.3244
hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG1 (AA)	0.6069	0.3430	3.6373	2.4762
LAG-3 mAb A IgG1 (AA)	0.4523	0.1660	2.0187	0.7035

§來自單個實驗的結果

【0466】 結合飽和度研究表明，PD-1 x LAG-3 雙特異性雙抗體構建體保

持與 PD-1 的結合，並且，其結合特徵與親本抗 PD-1 抗體的結合特徵類似。類似地，PD-1 x LAG-3 雙特異性雙抗體構建體保持與 LAG-3 的結合，並且，除了 DART 1 以外，其結合特徵與親本抗 LAG-3 抗體的結合特徵類似。

實施例 6

PD-1 x LAG-3 雙特異性分子抑制研究

【0467】 基本上如上所述檢測 PD-1 x LAG-3 雙特異性分子：DART A、DART B、DART D、DART E、DART F、DART G、DART H、DART I、DART 1 和 BSAB A；和抗 PD-1 抗體：hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)、hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)、PD-1 mAb A IgG1 (AA)和 PD-1 mAb A IgG4 (P)阻斷人 PD-L1 (shPD-L1) 和人 PD-L2 (shPD-L2)結合在 NSO 細胞的表面上表達的 PD-1 的能力。以 33.75-0.002 μM 或 107.5-0.0001μM(四倍連續稀釋)使用雙抗體和抗體。

【0468】 測定 IC50 和 IC90 值並且呈現在**表 17** 中。提供了進行 2 個或更多個單獨實驗的樣品平均值(SM)和標準差(SD **σ**)。

表 17

分子	阻斷 PD-L1/PD-1 結合				阻斷 PD-L2/PD-1 結合			
	IC50 (μM)		IC90 (μM)		IC50 (μM)		IC90 (μM)	
	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ
DART A	0.9645	0.1485	5.6312	1.5247	1.6273	0.4285	6.9335	3.9849
DART B	1.1515	0.0007	4.8615	0.2199	2.1150	0.3154	7.9550	0.0933
DART D	1.5548	0.1692	7.8950	2.5135	3.1255	0.5869	9.2973	5.5426
DART E	1.6533	0.3307	7.8470	1.1642	2.9460	0.7736	6.6135	0.0177
DART F	0.5697	0.1729	2.0360	0.1174	0.8389	0.0846	1.7995	0.2171
DART G	1.6013	0.3581	8.1953	1.5708	2.5540	0.7891	7.4810	0.2333
DART H	3.3950	0.1018	18.640	9.5742	6.2065	3.6847	29.395	3.8679
DART I	0.8363	0.1302	5.3115	0.3125	1.286	0.3125	6.2485	1.3951
DART 1	1.7467	0.3097	5.4533	1.0214	2.8355	1.8250	7.2735	3.9831
BSAB A	2.1590	0.3097	11.075	0.8132	4.8775	0.5438	15.580	1.3294
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	0.5186	0.1668	3.8050	1.2227	1.0425	0.2563	3.4880	0.5459
PD-1 mAb A IgG4 (P)	0.9209	0.3256	4.3023	0.7069	1.3859	0.3882	5.1675	0.2943

hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1(AA)	0.7320	0.2337	3.2048	1.1479	0.9769	0.2893	2.8437	1.4801
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	1.0765	0.2393	5.2775	0.9933	1.9510	0.8814	5.0880	1.3831

【0469】 配體結合抑制研究表明，PD-1 x LAG-3 雙特異性雙抗體構建體保留抑制 sPD-L1 和 sPD-L2 結合細胞表面上 PD-1 的能力。

【0470】 另外，檢測 PD-1 x LAG-3 雙特異性分子：DART A、DART B、DART D、DART E、DART F、DART G、DART H、DART I、DART 1 和 BSAB A；和抗 LAG-3 抗體：hLAG-3 mAb 1(1.4)IgG4 (P)，LAG-3 mAb AIgG4 (P)，hLAG-3 mAb 1(1.4)IgG1 (AA)和 LAG-3 mAb AIgG1 (AA)阻斷人 LAG-3 結合 Daudi 細胞的表面上的天然 II 型 MHC 的能力。簡言之，混合每種 PD-1 x LAG-3 雙特異性分子和對照抗 LAG-3 抗體與生物素化的-可溶性人 LAG-3-Fc 融合蛋白(shLAG-3)(以 0.5 μg/ml)，並且分別與 MHC II 陽性 Daudi 細胞($2.5x10^6$細胞)孵育。使用綴合 PE 的鏈黴抗生物素二抗通過 FACS 分析測定與 Daudi 細胞的表面結合 LAG-3 的量。以 27.5-0.026μM (兩倍連續稀釋)或 107.5-0.0001μM (四倍連續稀釋)，或 35-0.002 μM (四倍連續稀釋)使用雙抗體和抗體。

【0471】 測定 IC50 和 IC90 值並且提供在**表 18** 中。提供進行了 2 個或更多個單獨實驗的樣品平均值(SM)和標準差(SD **σ**)。

表 18

分子	阻斷 shLAG-3/II 型 MHC 結合			
	EC50 (μM)		EC90 (μM)	
	SM	SD σ	SM	SD σ
DART A	1.3835	1.6465	8.396102	8.3962
DART B	0.4081	0.1104	3.0645	0.3924
DART D	1.1843	1.1398	8.0041	7.3317
DART E	3.2706	2.9177	28.9683	24.1694
DART F	1.5347	1.2674	10.3920	11.2555
DART G	2.0618	3.3552	11.4422	12.4964
DART H	2.8967	4.9817	17.2533	21.1420

DART I	0.4864	0.1549	2.339	1.1780
DART 1	15.9610	14.0883	87.1486	109.533
BSAB A	0.7101	0.0571	7.2470	1.0706
hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG4 (P)	0.4815	0.2176	3.4837	1.7564
LAG-3 mAb A IgG4 (P)	0.7011	0.1900	2.4232	0.3481
hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG1 (AA)	0.3637	0.1409	9.4422	7.9319
LAG-3 mAb A IgG1 (AA)	0.5923	0.3407	2.1451	1.1139

【0472】 配體結合抑制研究表明，PD-1 x LAG-3 雙特異性雙抗體構建體保留抑制 shLAG-3-Fc 融合蛋白結合細胞表面上 II 型 MHC 的能力。除了 DART 1 之外，PD-1 x LAG-3 雙特異性分子具有與親本抗 LAG-3 抗體類似的抑制特徵。

實施例 7

通過 PD-1 x LAG-3 雙特異性分子阻斷 PD-1/PD-L1 檢查點

【0473】 基本上如上所述，在 Jurkat-luc2-NFAT/CHO-PD-L1 螢光素酶報告試驗(使用 CHO/PD-L1 細胞和 MNFAT-luc2/PD-1 Jurkat 細胞)中檢測 PD-1 x LAG-3 雙特異性分子：DART A、DART B、DART D、DART E、DART F、DART G、DART H、DART I、DART 1 和 BSAB A；和抗 PD-1 抗體：hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)，hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)，PD-1 mAb A IgG1 (AA)和 PD-1 mAb A IgG4 (P)對抗 PD-1/PD-L1 軸(即，阻斷 PD-1/PD-L1 相互作用和防止 T-細胞應答的下調)的能力。以 100-0.0065 μM (四倍連續稀釋)或 100-0.0013 μM (五倍連續稀釋)使用雙抗體和抗體。

【0474】 測定 IC50 和 IC90 值並且提供在**表 19 中**。提供進行了 2 個或更多個單獨實驗的樣品平均值(SM)和標準差(SD **σ**)。

表 19

分子	報告信號傳導			
	IC50 (μM)		IC90 (μM)	
	SM	SD σ	SM	SD σ
DART A	0.8804	0.1949	7.9115	1.3232
DART B	1.079	0.1535	7.5413	3.1483
DART D	1.4044	0.2584	12.0786	3.6616
DART E	1.4060	0.1222	13.7867	1.4981
DART F	0.3404	0.0103	1.8710	0.481

DART G	0.6914	0.0206	4.2090	0.7331
DART H	36.6167	20.8078	968.300	811.8471
DART I	1.3335	0.3641	12.146	6.8787
DART 1	11.8807	3.4905	1048.2000	1508.9992
BSAB A	9.7825	1.0288	113.3350	22.2951
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	0.6460	0.3035	6.0736	2.5513
PD-1 mAb A IgG4 (P)	1.328	0.7439	16.5138	9.7149
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1(AA)	0.5214	0.1541	4.7592	2.1044
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	1.4514	1.0049	35.7382	40.9858

【0475】 報告信號傳導研究表明，大部分 PD-1 x LAG-3 雙特異性雙抗體構建體保留抑制 sPD-L1 結合細胞表面上 PD-1 的能力。在該試驗中，四價 PD-1 x LAG-3 雙特異性雙抗體構建體，DART A、DART B、DART D、DART-E、DART F、DART G 和 DART I 是最強的抑制劑。在 PD-L2 報告試驗中檢測的這些雙特異性構建體中的若干構建體獲得了類似的結果。

實施例 8

PD-1 x LAG-3 雙特異性分子的功能活性

【0476】 除非在說明的情況下，否則基本上如上所述，在再刺激時，在 SEB-刺激的 PBMC 中檢測 PD-1 x LAG-3 雙特異性分子通過檢查點抑制而增強細胞因數釋放的能。

【0477】 在初始研究中，檢測 PD-1 x LAG-3 雙特異性分子：DART A、DART D、DART E、DART F、DART G、DART H；和抗 PD-1 和抗 LAG 抗體：PD-1 mAb A IgG4 (P)和 LAG-3 mAb A IgG4 (P)，單獨地或組合地，通過檢查點抑制而增強細胞因數釋放的能力。在這些試驗中，以 3.125、12.5 或 50 nM 的總濃度使用 PD-1 x LAG-3 雙特異性分子和抗體，並且用 0.2 ng/mL 的 SEB 刺激 PBMC (之前的研究使用 0.1 ng/mL)。對於這些研究，在使用抗體的組合的情況下，每種抗體以總濃度的一半(即，1.563、6.25 或 25 nM)被提供。**圖 16A** 和 **16B** 分別顯示來自兩個代表性應答供體 D：35644 和 D：59697 的 SEB-刺激的 PBMC 的 IFNγ 分泌特徵。

【0478】 如所述的，並不是所有的供體對 0.1 或 0.2 ng/mL 的 SEB 應答。為了增強來自更多數量供體的 PBMC 的 SEB 刺激，在另外的研究中，以 85 ng/mL 的高濃度，或 0.5 ng/mL 的中等濃度使用 SEB。在這些濃度，SEB 刺激在更多的供體中更強，儘管仍可看到供體-供體之間的差異。

【0479】 在一個這樣的研究中，檢測 PD-1 x LAG-3 雙特異性分子：DART A、DART B；抗 PD-1 抗體：hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P)；抗 LAG-3 抗體：LAG-3 mAb 1(1.4) IgG4(P)；以及 PD-1 mAb A IgG4 (P)和 LAG-3 mAb A IgG4 (P)的組合通過檢查點抑制而增強細胞因數釋放的能力。在這些試驗中，以 0.019、0.078、0.3125、1.25、5 或 20 nM 的濃度使用 PD-1 x LAG-3 雙特異性分子和抗體，並且用 85 ng/mL 的 SEB 刺激 PBMC。對於使用抗體組合的該試驗，以指示的濃度提供每種抗體，因此總的抗體濃度是每種抗體使用的濃度的兩倍(即，0.038、0.156、0.625、2.5、10 或 40 nM)。**圖 17A** 和 **17B** 分別顯示了來自兩個代表性供體 D:55515 和 D:54024 的 SEB-刺激的 PBMC 的 IFNγ 分泌特徵。

【0480】 在另一研究中，檢測 PD-1 x LAG-3 雙特異性分子：DART A、DART B、DART C；抗 PD-1 抗體：hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P)；抗 LAG-3 抗體：LAG-3 mAb 1(1.4) IgG4(P)；和 PD-1 mAb A IgG4 (P)和 LAG-3 mAb A IgG4 (P)的組合通過檢查點抑制而增強細胞因數釋放的能力。在這些試驗中，使用的 PD-1 x LAG-3 雙特異性分子和抗體的總濃度是 0.048、0.195、0.78、3.125、12.5 或 50 nM，並且用 0.5 ng/mL 的 SEB 刺激 PBMC。對於其中使用抗體組合的這些研究，以總濃度的一半提供每種抗體(即，0.024、0.098、0.39、1.563、6.25 或 25 nM)。**圖 18A** 和 **18B** 分別顯示了來自兩個代表性供體 D:20990 和 D:54947 的 SEB-刺激 PBMC 的 IFNγ 分泌特徵)。

【0481】 在進一步的研究中，檢測細胞因數 IL-2 的釋放。具體而言，檢測 PD-1 x LAG-3 雙特異性分子：DART D、DART H；抗 PD-1 抗體：PD-1 mAb

A IgG4 (P)，hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P)；抗 LAG-3 抗體：LAG-3 mAb A IgG4 (P)和LAG-3 mAb 1(1.4) IgG4(P)；和PD-1 mAb A IgG4 (P)和LAG-3 mAb A IgG4 (P)，以及 hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P)和 LAG-3 mAb 1(1.4) IgG4(P)的組合，通過檢查點抑制而增強 IL-2 釋放。在這些試驗中，使用的 PD-1 x LAG-3 雙特異性分子和抗體的總濃度是 3.125、12.5 或 50 nM，並且用 85 ng/mL 的高濃度的 SEB 刺激 PBMC。對於其中使用抗體組合的這些研究，以總濃度的一半提供每種抗體(即，1.563、6.25 或 25 nM)。**圖 19** 顯示了來自代表性供體(D:54024)的 SEB-刺激的 PBMC 的 IL-2 分泌特徵。

【0482】 在另外的研究中，檢測 PD-1 x LAG-3 雙特異性分子：DART B 和 DART I；抗 PD-1 抗體：PD-1 mAb A IgG4 (P)和 hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P)；抗 LAG-3 抗體：LAG-3 mAb A IgG4 (P)、hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG4(P)和 hLAG-3 mAb 6(1.1) IgG4 (P)；以及 PD-1 mAb A IgG4 (P)和 LAG-3 mAb A IgG4 (P)、hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P)和 hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG4(P)、和 hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P)和 hLAG-3 mAb 6(1.1) IgG4 (P)的組合，通過檢查點抑制而增強細胞因數釋放。在這些試驗中，使用的 PD-1 x LAG-3 雙特異性分子和抗體的濃度是 0.0061、0.024、0.09、0.39、1.56、6.25 或 25 nM，並且用 0.5 ng/mL 的 SEB 刺激 PBMC。對於其中使用抗體組合的這些研究，以指示的濃度提供每種抗體，因此總抗體濃度是每種抗體使用的濃度的兩倍(即，0.0122、0.048、0.18、0.78、3.12、12.5 或 50 nM)。**圖 20** 顯示了來自代表性供體 D:56041)的 SEB-刺激的 PBMC 的 IFNγ 分泌特徵。

【0483】 使用破傷風毒素回憶試驗(Tetanus--toxoid recall assay)檢測 PD-1 x LAG-3 雙特異性分子 DART I；抗 PD-1 抗體 PD-1 mAb A IgG4 和抗 LAG-3 抗體 LAG-3 mAb A IgG4 (P)的組合；和陰性對照抗體增強抗原特異性 T 細胞應答的能力。尤其地，在共培養試驗系統中，使用破傷風毒素作為回憶抗原測量細

胞因數的抗原特異性增強分泌的應答。簡言之，使用陰性選擇分離試劑盒(Miltenyi Biotec, San Diego, CA 和 Invitrogen, Carlsbad, CA)從人外周血液分離 CD4 記憶 T 細胞(0.5-1.0 X10^5細胞/孔)，並且用來自相同供體的照射的單核細胞(0.01-0.05X10^5細胞/孔，3500 拉德(rads))在存在或沒有 5 μg/mL 回憶抗原破傷風毒素(TTd)和 DART I、PD-1 mAb AIgG4 + LAG-3 mAb AIgG4(P)或同種型對照的稀釋(始於 25nM)的情況下培養 5-7 天。在平行板中，在第 5-7 天，通過併入氚標記的胸苷測量增殖，並且使用 ELISA (R&D systms, Minneapolis, MN)測量 IL-2 和 IFNγ。**圖 21A-D** 顯示了來自兩個代表性供體(D50702 和 D54267)在第 7 天的 IFNγ (**圖 21A，21C**)和 IL-2 (**圖 21B，21D**)分泌特徵。

【0484】 這些研究的結果表明，當再刺激時，PD-1 x LAG-3 雙特異性分子顯著增強來自 SEB-刺激的 PBMC 的 IFNγ (**圖 16A-16B、17A-17B、18A-18B、20**)和 IL-2 (**圖 19**)產生。另外，PD-1 x LAG-3 雙特異性分子顯著增強了來自用破傷風毒素刺激的 CD4 記憶 T 細胞的 IFNγ 產生(**圖 21A** 和 **21C**)。尤其地，四價 PD-1 x LAG-3 雙特異性分子提供了比抗 PD-1 抗體與抗 LAG-3 抗體組合更大的增強 。

實施例 9

PD-1 x LAG-3 雙特異性分子的藥物動力學

【0485】 在食蟹猴中檢測代表性 PD-1 x LAG-3 雙特異性分子 DART I 和代表性抗 PD-1 抗體 PD-1 mAb A 的藥物動力學。簡言之，兩個食蟹猴(一個雄性和一個雌性)被輸注單劑量的 DART I (5 mg/kg)或 PD-1 mAb A (10 mg/kg)，並且使用夾心 ELISA 試驗監測分子隨著時間推移的血清濃度。簡言之，使 maxisorb 96 孔試驗板包被可溶性人 PD-1 (shPD-1)，用牛血清白蛋白阻斷、洗滌並且用校準標準品、品質控制標準品和稀釋的血清樣品孵育。通過順序添加山羊抗人 IgG Fc-生物素二抗和鏈黴抗生物素-辣根過氧化物酶(SA-HRP)，評估捕獲的 DART I 和 PD-1 mAb A 的量。使用 TMB 底物檢測 HRP 活性。通過酶標儀(SpectraMax M2e,

Molecular Device, Sunnyvale, CA)分析所有的樣品，並且使用 SoftMax Pro 軟體(5.4 版本, Molecular Device)將通過標準校準器產生的 OD 信號用於四-參數邏輯模型中。通過描述標準曲線的方程式，從樣品的 OD 信號資料的內推(interpolation)確定 PD-1 mAb A 或 DART I 的濃度。以 9.775 ng/mL 評估對於該試驗的定量(LLOQ)的下限以。

【0486】 **圖 22** 顯示隨著時間推移的血清濃度，線表示被輸注 DART I (實線，三角形)或 PD-1 mAb A (虛線，圓圈)的雄性(填充符號)和雌性(開放符號)猴子的平均數。這些資料表明，PD-1 x LAG-3 雙特異性分子在食蟹猴中的藥物動力學與抗 PD-1 抗體的藥物動力學相當。

實施例 10

PD-1 抗體和 PD-1 x LAG-3 雙特異性分子的毒理學研究

【0487】 在食蟹猴中，在非 GLP (實驗室管理規範(good laboratory practice))給藥研究中，評估代表性抗 PD1 抗體 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)和代表性 PD1 x LAG3 雙特異性分子 DART I 的安全性特徵。

【0488】 在該研究中，評估當通過多次靜脈內輸注而施用時，抗 PD-1 抗體(hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P))的潛在毒性和毒性動力學。另外，也評估當通過單次靜脈內輸注時，PD-1 x LAG-3 DART 分子(DART I)的潛在的毒性和藥物動力學。研究方案提供在**表 20** 中。

表 20

組號	測試材料	劑量水準 (mg/kg)	給藥天	劑量體積	劑量 (mg/mL)	動物的編號	
						雄性	雌性
1	對照	0	1、8、15	5	0	1[a]	1[a]
2A	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	1	1、8、15	5	0.2	1[a]	1[a]
2B	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	1	1、8、15	5	0.2	1[b]	1[b]
3A	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	100	1、8、15	5	20	1[a]	1[a]
3B	hPD-1 mAb 7	100	1、8、15	5	20	1[b]	1[b]

	(1.2) IgG4 (P)						
4	DART I	5	1	5	1	1[c]	1[c]

[a]組 1、2A 和 3A 在第 1 天開始給藥並且在它們在第 18 天最後(第三次)給藥後 72 小時被屍體剖檢。
[b]組 2B 和 3B 在第 1 天開始給藥並且在它們在第 22 天最後(第三次)給藥後 7 天被屍體剖檢。
[c]組 4 在第 1 天開始給藥，並且單劑量施用之後持續 28 天(至天 29)；然後，式動物返回群體(colony)。

【0489】 在該研究中評估下述參數和端點：臨床表現、體重、食物消耗、體溫、臨床病理學參數(血液學、凝聚和臨床化學)、生物分析和毒代動力學參數、抗藥物抗體分析、流式細胞術、細胞因數、肉眼屍檢發現、器官重量和組織病理學檢查。

【0490】 所有的動物均存活，直到在第 18 或 22 天安排的安樂死，或在第 29 天從研究釋放。對於 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)，在臨床表現、食物消耗、體重、體溫、血液學、凝聚或臨床化學參數或肉眼屍檢發現方面沒有測試物相關(test-article related)的變化。在第 18 和 22 天，脾重量的增加和紅髓從輕度至中度的劑量依賴性淋巴組織細胞滲透物(lymphohistiocytic infiltrate)在接收 1 或 100 mg/kg 的 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)的動物中是明顯的。與周圍淋巴細胞相比，淋巴組織細胞具有灰白色細胞質和不規則細胞核。稀有的有絲分裂圖是明顯的。對於增加的脾重量，滲透物是顯微相關物。

【0491】 被給予 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)的動物的血清濃度-時間特徵顯示在該物種中針對抗體的預期的特徵(profile)，有很少的例外。對於 1 mg/kg 劑量組的兩個動物和 100 mg/kg 劑量組的兩個動物，第三劑量之後曲線的斜率比第一劑量之後更急劇地下降，表明在稍後的迴圈中可能出現抗藥物抗體(ADA)。分析顯示，在 1 mg/kg 組中 2/4 的動物發展了 ADA 和在 100 mg/kg 組中 1/4 的動物發展了 ADA。

【0492】 總之，以 1 和 100 mg/kg 的水準，通過靜脈內輸注，每週一次，

持續 3 周(第 1、8 和 15 天)，hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)的施用在食蟹猴中是良好耐受的。在 1 和 100 mg/kg hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)中存在脾紅髓的輕度至中度劑量依賴性淋巴組織細胞滲透物。

【0493】 對於 DART I，在臨床表現、食物消耗、體重、體溫、血液學或凝聚參數方面沒有測試物相關的變化。在臨床化學參數方面的 DART I 相關的變化包括在第 2 天，天冬氨酸轉氨酶(AST)和乳酸脫氫酶(LDH)的非損害、暫態升高。平均 AST 變化是媒介處理的對照動物的 3.2x 和預研究(prestudy)水準的 7.8x，其中水準高於對照參考範圍 2。平均 LDH 變化是媒介處理的對照動物的 2.5x 和預研究水準的 6.9x。在第 8 天，兩個參數都回到基線水準附近。總之，在 5 mg/kg 的水準，通過靜脈內輸注，DART-I 的單施用在食蟹猴中良好耐受。

實施例 11

用抗 PD-1 抗體的單劑量 PK 研究

【0494】 用選擇的毒理學端點在食蟹猴中進行單劑量 PK 研究。在該研究中，比較 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)與兩個其他抗 PD1 IgG4 (P), κ mAbs：PD-1 mAb A IgG4 (P)和 PD-1 mAb B IgG4 (P)。將每種抗體以 10 mg/kg 通過 1-小時靜脈內輸注施用至 2 只猴子(1M，1F)中，並且監測動物 65 天。

【0495】 沒有與施用 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)或 PD-1 mAb A IgG4 (P)相關的體重、食物消耗、細胞因數或免疫表型方面的測試物相關的臨床表現變化。資料與 PD-1 mAb B IgG4 (P)的類似，除了在 PD-1 mAb B IgG4 (P)施用之後觀察到 IL-5 的升高之外。

【0496】 對於從用 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)、PD-1 mAb A IgG4 (P)或 PD-1 mAb B IgG4 (P)處理的食蟹猴收集的全時間段(full time course)的血液樣品在沒有(PBS 對照)或存在過量競爭劑(未標記的 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P))的情況下，通過流式細胞術使用競爭方法測定抗 PD-1 抗體與 T 細胞表面上的 PD-1

的結合，其中結合 T 細胞的螢光標記的 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)的平均螢光強度(MFI)。如**圖 23A-23C** 中顯示，與 PD-1 mAb A IgG4 (P) (PD-1 結合保持在≥ 80%，達 21 天或更少) (**圖 23B**)相比，hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)和 PD-1 mAb B IgG4 (P)表現出與 CD4+和 CD8+ T 細胞表面上的 PD-1 的延長的結合(PD-1 結合保持在≥ 80%，達 28 天或更多) (分別為**圖 23A** 和 **23C**)。對於每種抗 PD-1 抗體，將 T-細胞 PD-1 結合資料與它們的血清濃度相關聯。

實施例 12

重複劑量毒理學研究

【0497】 為了評估本發明治療分子的安全性、毒代動力學和藥效特徵，將示例性分子(hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P))施用至食蟹猴並且進行 GLP (實驗室管理規範)給藥研究。在該研究中，通過以 3 劑量水準輸注，用 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)或對照物處理四組動物(每組 10 只，5 只雄性，和 5 只雌性)，每週一次。在 4-周藥物給藥期間，隨後在另外的 10-周無藥物期間進行監測，評估動物的任何潛在毒性。該研究的實驗方案提供在**表 21** 中。在研究的第 1、8、15 和 22 天，使用校準輸注泵經一小時靜脈內輸注向動物給藥，每週一次。在第 25 天，處死來自每個組的一隻雄性和一隻雌性，在研究的第 95 天處死剩餘的動物。評估 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)施用對迴圈中白細胞亞群的作用，包括 T-淋巴細胞上 PD-1 受體的佔據。另外，測定抗藥物抗體(ADA)特徵。

表 21

組號	測試材料 [a]	劑量水準 (mg/kg)	劑量體積 (mL/kg)	劑量 (mg/mL)	動物的編號 [b]			
					主要研究		恢復研究	
					M	F	M	F
1	對照	0	5.88	0	3	3	2	2
2	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	10	5.88	1.7	3	3	2	2
3	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	40	5.88	6.8	3	3	2	2
4	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	150	5.88	25.5	3	3	2	2

表 21								
組號	測試材料 [a]	劑量水準 (mg/kg)	劑量體積 (mL/kg)	劑量 (mg/mL)	動物的編號 [b]			
					主要研究		恢復研究	
					M	F	M	F

[a]經靜脈內輸注每週施用一次對照和 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)

[b]每組六隻猴子(3M/3F)在第 25 天被屍體剖檢，而剩餘的恢復組猴子(2M/2F)在第 95 天被屍體剖檢

【0498】 以 0、10、40 和 150 mg/kg 每週一次向食蟹猴靜脈內(IV)輸注 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)是良好耐受的，並且所有的動物均存活，直到它們被安排在第 25 或 95 天的安樂死。在臨床表現、食物消耗、體重、身體檢查、眼科和神經科學檢查，心電學、體溫、呼吸速度、血壓和心率、凝聚、臨床化學和尿分析參數、器官重量或肉眼屍檢發現方面，沒有 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)相關的變化。

【0499】 血液學參數的 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)相關的變化包括淋巴細胞滴度(lymphocyte titer)的暫態下降。在≥ 10 mg/kg 的雄性和雌性中，在第 2 天(輸注後 23 小時)，與預研究(給藥前(predose)1 天)相比，淋巴細胞滴度適度降低，對於 10 和 40 mg/kg 的雄性和 40 和 150 mg/kg 的雌性與對照相比是統計學上顯著的。在給藥前第 8 天，淋巴細胞滴度返回到接近預研究水準，但是在第 9 天(輸注後 23 小時)，對於在所有劑量水準(0.47x 至 0.68x 預研究)的一些個體雄性和雌性，其輕微降低。在第 15 和 22 天給藥之前，淋巴細胞滴度增加，但是在第 16 和 23 天(輸注後 23 小時)，對於一些個體雄性和雌性(0.36x 至 0.54x 預研究)，其降低。

【0500】 與對照組相比，在 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)處理的動物中，在輸注結束後 23 小時，觀察到迴圈免疫細胞群體，包括總的白細胞、T 細胞、B 細胞和 NK 細胞，的非劑量依賴性、暫態下降。在第 1 天第一劑量施用之後觀察到改變的最大量級；在第 8、15 或 22 天的隨後劑量之後瞬間觀察到較小量級的

改變。在 EOI 後 72 小時和整個恢復階段，免疫細胞群體一般恢復至基線值或接近基線值。與對照組相比，在 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)處理的動物中，沒有觀察到迴圈單核細胞的變化。

【0501】 在所有測試劑量(10、40 或 150 mg/kg)的研究的 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)處理期間，觀察到與 PD-1+/CD4+和 PD-1+/CD8+細胞的最大 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)結合。在恢復過程中，未發展抗藥物抗體(ADA)應答的動物中，血清 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)濃度保持高於 29 μg/mL，並且在整個 10-周恢復期間，保持與 PD-1+/CD4+和 PD-1+/CD8+ T 細胞的最大 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)結合。在這些動物中，沒有 PD-1 對 T 細胞進行調節的證據。在發展了 ADA 應答的恢復動物中，MGD012 結合的 PD-1+ T 細胞的頻率下降至基線水準。當表觀(apparent)血清 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)濃度下降低於約 25 μg/mL 時，通常出現 ADA 陽性動物的 PD-1+/CD4+和 PD-1+/CD8+細胞上的最大 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)結合的下降。但是，不清楚該表觀閾值關係是否適用於 ADA 陰性動物，因為在 ADA 陽性動物中 ADA 的存在可有助於阻斷 PD-1 抗體與 PD-1 的結合。

【0502】 在 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)的藥物代謝動力學應答中存在最小的性別相關的差異，其在評估的劑量範圍內是線性的(10 至 150 mg/kg)。對於 10、40 和 150 mg/kg 的 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)，性別組合的平均 C_{max} 分別是 240 μg/mL (0.240 mg/mL)、1078 μg/mL (1.08 mg/mL)和 3938 μg/mL (3.94 mg/mL)，並且 AUC 是 47310 h•μg/mL (47.3 h•mg/mL)、205723 h•μg/mL (206 h•mg/mL)和 745681 h•μg/mL (746 h•mg/mL)。在出現 ADA 之前，通過第一迴圈的 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)的非房室模型分析(NCA)的平均清除(mean clearance)是 0.21 mL/h/kg，大大低於如針對大分子量蛋白質可預期的食蟹猴的腎小球濾過率。通過第一迴圈的 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)的 NCA 的分佈的平均穩態體積是 68

mL/kg，接近血清體積的 1.5 倍，但是小於細胞外水空間。這提示，hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)從血管腔隙溢出進入組織細胞外空間，但是，並不是所有的細胞外空間對於該分子都是可到達的。通過第一迴圈的 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)的 NCA 的平均停留時間(MRT)的平均值是 335 小時或約 14 天。在第 2 至 4 迴圈中，ADA 的出現降低了 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)的濃度。在 10、40 和 150 mg/kg 劑量組中，在重複劑量的 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)之後，分別在 7/10、4/10 和 3/10 動物中觀察到降低的 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)血清濃度的證據。在 10、40 和 150 mg/kg 劑量組中，分別在這些動物的 4 個、2 個和 1 個中確認了抗 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)的 ADA 的存在；其中 ADA 未被確認的的所有動物處於最終的屍體剖檢組中，在此期間，hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)血清濃度可能干擾檢測 ADA 的能力。因此，在隨後的 TK 分析中，當波谷濃度小於之前的波谷濃度時，核實自該時間以來的資料。根據 3 個劑量組的所有迴圈的資料的二室模型，排除受 ADA 影響的點，二室模型的主要 TK 參數的平均值對於清除是 0.22 mL/h/kg，對於分佈的初始體積(V_1)是 38.5 mL/kg，和對於 V_2 是 33.8 mL/kg，其產生的分佈的平均穩態體積(V_{ss})是 72.3 mL/kg，和 MRT 是 329 小時。這些值與從第一劑量的 NCA 獲得的參數一致。在沒有 ADA 的情況下，類比預測，在每週給藥的情況下，第 5 次給藥之後將在食蟹猴中實現穩態，並且積累指數將是 2.4。

【0503】 在第 25 天，在≥ 40 mg/kg 的雄性和≥ 10 mg/kg 的雌性中，在 IV 注射位點的淺層真皮中出現 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)相關的最小多灶血管周圍單核細胞滲透物，其是對重複注射外源蛋白(單克隆抗體)的預期的反應。在第 95 天，沒有注意到 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)相關的顯微鏡變化，指示在第 25 天出現的測試物相關的變化的恢復。

【0504】 總之，該研究的結果指示，在食蟹猴中以 10、40 或 150 mg/kg 的水準每週一次(第 1、8、15 和 22 天)經靜脈內輸注施用 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)

在臨床上是良好耐受的。觀察到的作用限於迴圈淋巴細胞的暫態下降和與注射外源蛋白相關的最小的注射位點變化。基於這些結果，認為沒有觀察到的不利作用水準(NOAEL)是 150 mg/kg (性別組合的平均 C_{max} 是 3.94 mg/mL 和 AUC 是 746 h•mg/mL)。

【0505】 本說明書提到的所有出版物和專利通過參考併入本文，達到如同具體和單獨指出每個單個出版物或專利申請通過參考以其整體併入的相同程度。儘管已經結合其具體實施方式描述了本發明，但是應當理解，其能夠被進一步修改，並且本申請旨在覆蓋大體上根據本發明原理並且包括與本公開的偏離的本發明的任何變型、用途或改變，只要在本發明所屬領域的已知或習慣實踐內並且如可應用至本文之前所闡釋的本質特徵。

【符號說明】

【0506】 無

【序列表】

<110> 宏觀基因股份有限公司 MacroGenics, Inc.

<120> PD-1 結合分子和其使用方法

<150> US 62/198,867
<151> 2015-07-30

<150> US 62/239,559
<151> 2015-10-09

<150> US 62/255,140
<151> 2015-11-13

<150> US 62/322,974
<151> 2016-04-15

<160> 298

<170> PatentIn 3.5 版本

<210> 1
<211> 217
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(217)
<223> 人 IgG1 CH2-CH3 結構域

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (217)..(217)
<223> Xaa 是賴氨酸(K)或不存在

<400> 1

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 Gly Gln
            100                 105                 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
        115                 120                 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
    130                 135                 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145                 150                 155                 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                165                 170                 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
            180                 185                 190
```

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 2
<211> 216
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(216)
<223> 人 IgG2 CH2-CH3 結構域

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (216)..(216)
<223> Xaa 是賴氨酸(K)或不存在

<400> 2

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

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
20 25 30

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

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
50 55 60

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
65 70 75 80

```
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
                85                  90                  95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
            100                 105                 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
        115                 120                 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
    130                 135                 140

Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
145                 150                 155                 160

Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
                165                 170                 175

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
            180                 185                 190

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
        195                 200                 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
    210                 215
```

〈210〉 3
〈211〉 217
〈212〉 PRT
〈213〉 智人

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(217)
<223> 人 IgG3 CH2-CH3 結構域

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (217)..(217)
<223> Xaa 是賴氨酸(K)或不存在

<400> 3

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 Gln Phe Lys 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 Phe 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 Thr Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 4
<211> 217
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(217)
<223> 人 IgG4 CH2-CH3 結構域

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (217)..(217)
<223> Xaa 是賴氨酸(K)或不存在

<400> 4

Ala Pro Glu Phe 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 Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln 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 Phe 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

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
            100                 105                 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
        115                 120                 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
    130                 135                 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145                 150                 155                 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                165                 170                 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
            180                 185                 190
```

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Xaa
210 215

<210> 5
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人 IgG1 CH2-CH3 結構域，其具有 L234A/L235A 取代

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (217)..(217)
<223> Xaa 是賴氨酸(K)或不存在

<400> 5

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 Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 6
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> "含有杵的"人 IgG1 CH2-CH3 結構域

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (217)..(217)
<223> Xaa 是賴氨酸(K)或不存在

<400> 6

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 Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

```
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145                 150                 155                 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                165                 170                 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
            180                 185                 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
        195                 200                 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
    210                 215
```

<210> 7
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> "含有臼的" 人 IgG1 CH2-CH3 結構域

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (217)..(217)
<223> Xaa 是賴氨酸(K)或不存在

<400> 7

```
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 Gly Gln
            100                 105                 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
        115                 120                 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
    130                 135                 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145                 150                 155                 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                165                 170                 175

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
            180                 185                 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln
        195                 200                 205
```

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(107)
<223> 人 IgG CL κ 結構域

<400> 8

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

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

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 9
<211> 104
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(104)
<223> 人 IgG CL λ 結構域

<400> 9

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

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45

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

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
65 70 75 80

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
85 90 95

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100

<210> 10
<211> 98
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(98)
<223> 人 IgG1 CH1 結構域

<400> 10

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

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

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

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

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

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val

<210> 11
<211> 12
<212> PRT

<213> 智人

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(12)
<223> 人 IgG2 鉸鏈區

<400> 11

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(12)
<223> 人 IgG4 鉸鏈區

<400> 12

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
1 5 10

<210> 13
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 穩定化的 IgG4 鉸鏈區

<400> 13

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接體 1

<400> 14

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 包含半胱氨酸的連接體 2

<400> 15

Gly Gly Cys Gly Gly Gly
1 5

<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 異源二聚體促進結構域

<400> 16

Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

<210> 17

<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 異源二聚體促進結構域

<400> 17

Val Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

<210> 18
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 異源二聚體促進結構域

<400> 18

Ala Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 異源二聚體促進結構域

<400> 19

Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5

<210> 20
<211> 6
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 異源二聚體促進結構域

<400> 20

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5

<210> 21
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 異源二聚體促進(E-螺旋)結構域

<400> 21

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
20 25

<210> 22
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 異源二聚體促進"K-螺旋"結構域

<400> 22

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu

20 25

<210> 23
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 包含半胱氨酸的異源二聚體促進"E-螺旋"結構域

<400> 23

Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
20 25

<210> 24
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 包含半胱氨酸的異源二聚體促進"K-螺旋"結構域

<400> 24

Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
20 25

<210> 25
<211> 46
<212> PRT
<213> 停乳鏈球菌

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(46)
<223> 鏈球菌菌株的蛋白質 G 的白蛋白結合結構域 3
G148

<400> 25

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 26
<211> 46
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 變異的去免疫化的白蛋白結合結構域

<400> 26

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 27

<211> 46
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 變異的去免疫化的白蛋白結合結構域

<400> 27

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ala Ala Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Ala Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 28
<211> 46
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 變異的去免疫化的白蛋白結合結構域

<400> 28

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Ser Asn Ala Lys Ser Val Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Ala Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 29

<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 可選的連接體 2

<400> 29

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 30
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 可選的連接體 2

<400> 30

Ala Ser Thr Lys Gly
1 5

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接體

<400> 31

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 32
<211> 15
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 連接體

<400> 32

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 33
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 可選的連接體 2

<400> 33

Leu Glu Pro Lys Ser Ser
1 5

<210> 34
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 可選的連接體 2

<400> 34

Ala Pro Ser Ser Ser
1 5

<210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接體

<400> 35

Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu
1 5

<210> 36
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接體

<400> 36

Leu Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
1 5 10 15

<210> 37
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接體

<400> 37

Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 38
<211> 525
<212> PRT
<213> 智人

<220>

<221> MISC_特徵
<222> (1)..(525)
<223> 人 LAG-3（信號序列和成熟的蛋白質）

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(28)
<223> 信號序列

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (29)..(525)
<223> 成熟的蛋白質

<400> 38

```
Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
1               5                  10                  15

Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
            20                  25                  30

Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
        35                  40                  45

Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln
    50                  55                  60

His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu
65                  70                  75                  80

Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro
                85                  90                  95

Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly
            100                 105                 110
```

```
Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln
        115                 120                 125

Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala
    130                 135                 140

Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys
145                 150                 155                 160

Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro
                165                 170                 175

Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser
            180                 185                 190

Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln
        195                 200                 205

Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser
    210                 215                 220

Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly
225                 230                 235                 240

Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn
                245                 250                 255

Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala
            260                 265                 270

Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu Pro Ala Gly Val
        275                 280                 285
```

Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly
290 295 300

Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu
305 310 315 320

Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His
325 330 335

Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr
340 345 350

Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu
355 360 365

Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser
370 375 380

Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala
385 390 395 400

Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln
405 410 415

Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser
420 425 430

Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala Leu Pro Ala Gly
435 440 445

His Leu Leu Leu Phe Leu Ile Leu Gly Val Leu Ser Leu Leu Leu Leu
450 455 460

Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro
465 470 475 480

Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro Pro Gln Ala Gln
485 490 495

Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro
500 505 510

Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln Leu
515 520 525

<210> 39
<211> 120
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(120)
<223> LAG-3 mAb A 的重鏈可變結構域

<400> 39

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

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

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

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

Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 40
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(107)
<223> LAG-3 mAb A 的輕鏈可變結構域

<400> 40

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 41
<211> 120
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(107)
<223> LAG-3 mAb 1的重鏈可變結構域

<400> 41

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Gly Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Ile Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 42
<211> 6
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(6)
<223> LAG-3 mAb 1 的 CDRH1

<400> 42

Arg Asn Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 43
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(17)
<223> LAG-3 mAb 1 的 CDRH2

<400> 43

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu
1 5 10 15

Gly

<210> 44
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(11)
<223> LAG-3 mAb 1的CDRH3

<400> 44

Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 45
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(112)
<223> LAG-3 mAb 1的VL結構域

<400> 45

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 46
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(16)
<223> LAG-3 mAb 1的CDRL1

<400> 46

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(7)
<223> LAG-3 mAb 1的CDRL2

<400> 47

Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser
1 5

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(9)
<223> LAG-3 mAb 1的CDRL3

<400> 48

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 49
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hLAG-3 mAb 1 VH1的VH結構域

<400> 49

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 50
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hLAG-3 mAb 1 VH2 的 VH 結構域

<400> 50

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

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

```
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 51
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hLAG-3 mAb 1 VL1 的 VH 結構域

<400> 51

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1               5                   10                  15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
            20                  25                  30
```

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 52
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hLAG-3 mAb 1 VL2 的 VL 結構域

<400> 52

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 53
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hLAG-3 mAb 1 VL3的VL結構域

<400> 53

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 54
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hLAG-3 mAb 1 VL4 的 VL 結構域

<400> 54

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 55
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hLAG-3 mAb 1 VL4 的 VL 結構域的 CDRL1

<400> 55

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Ala Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 56
<211> 118
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(118)
<223> LAG-3 mAb 6 的 VH 結構域

<400> 56

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

Ser Val Lys Ile Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Glu Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Val Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 57
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(5)
<223> LAG-3 mAb 6的CDRH1

<400> 57

Asp Tyr Asn Met Asp
1 5

<210> 58
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(17)
<223> LAG-3 mAb 6的CDRH2

<400> 58

Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Val Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Glu
1 5 10 15

Gly

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(9)
<223> LAG-3 mAb 6的CDRH3

<400> 59

Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 60
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(107)
<223> LAG-3 mAb 6的VL結構域

<400> 60

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Val
20 25 30

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

Phe Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

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

Ala Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 61
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(11)
<223> LAG-3 mAb 6的CDRL1

<400> 61

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Val Val Ala
1 5 10

<210> 62
<211> 7

<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(7)
<223> LAG-3 mAb 6的CDRL2

<400> 62

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 63
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(7)
<223> LAG-3 mAb 6的CDRL3

<400> 63

His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
1 5

<210> 64
<211> 113
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(113)
<223> PD-1 mAb A的重鏈可變結構域

<400> 64

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
            20                  25                  30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu 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 Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
            100                 105                 110

Ser
```

<210> 65
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(107)
<223> PD-1 mAb A 的輕鏈可變結構域

<400> 65

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 66
<211> 120
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(120)
<223> PD-1 mAb B的重鏈可變結構域

<400> 66

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

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

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 67
<211> 111
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(111)
<223> PD-1 mAb B的輕鏈可變結構域

<400> 67

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

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

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

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 68
<211> 288
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(288)
<223> 人 PD-1 多肽(NCI 序列 NP 005009.2)

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(20)
<223> 人 PD-1 信號序列

<400> 68

```
Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1               5                  10                  15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
            20                  25                  30

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

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
    50                  55                  60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
65                  70                  75                  80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
                85                  90                  95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
            100                 105                 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
        115                 120                 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
    130                 135                 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
145                 150                 155                 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
                165                 170                 175
```

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285

<210> 69
<211> 121
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(121)
<223> PD-1 mAb 1的VH結構域

<400> 69

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Arg Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Phe Ser Ile Thr Asn Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly His Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn His Phe Phe
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Tyr Gly Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 70
<211> 373
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(373)
<223> 編碼 PD-1 mAb 1 的 VH 結構域的多核苷酸

<400> 70
cagatccagt gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctggc cgggtgaaac cttctcagtc 60

tctgtccctc acctgcactg tcactggctt ctcaatcacc aatgattatg cctggaactg 120

gatccgacag tttccaggaa acaaactgga gtggatgggc cacataacct acagtggcag 180

cactagctac aacccatctc tcaaaagtcg aatctctatc actcgggaca catccaagaa 240

ccacttcttc ctgcagttga gttctgtgac tcctgaggac acagccacat attactgtgc 300

aagagattac ggtagtggct acccctatac tttggactac tggggtcaag gtacctcagt 360

caccgtctcc tcc 373

<210> 71
<211> 6
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(6)

<400> 71

Asn Asp Tyr Ala Trp Asn
1 5

<210> 72
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(16)
<223> PD-1 mAb 1的CDRH2

<400> 72

His Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 73
<211> 12
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(12)
<223> PD-1 mAb 1的CDRH3

<400> 73

Asp Tyr Gly Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 74
<211> 106
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(106)
<223> PD-1 mAb 1的VL結構域
<400> 74

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ile Val Ser Tyr Val
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Gln Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asp Asn Pro Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 75
<211> 318
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(318)
<223> 編碼 PD-1 mAb 1 的 VL 結構域的多核苷酸

<400> 75
caaattgttc tcacccagtc tccagcactc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60

atgacctgca gtgccacctc aattgtaagt tacgtttact ggtaccagca gaagcctgga 120

tcctcccccc aaccctggat ttatctcaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc 180

ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacaa tcagcagcat ggaggctgaa 240

gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtgataacc cgtacacgtt cggaggggg 300

accaagctgg aaataaaa 318

<210> 76
<211> 10
<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(10)
<223> PD-1 mAb 1的CDRL1

<400> 76

Ser Ala Thr Ser Ile Val Ser Tyr Val Tyr
1 5 10

<210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(7)
<223> PD-1 mAb 1的CDRL2

<400> 77

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(9)
<223> PD-1 mAb 1的CDRL3

<400> 78

Gln Gln Trp Ser Asp Asn Pro Tyr Thr
1 5

<210> 79
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hPD-1 mAb 1 VH1 的 VH 結構域

<400> 79

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Ile Ser Asn Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly His Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 80
<211> 363
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 編碼 hPD-1 mAb 1 VH1 的多核苷酸

<400> 80
gacgtacagc tccaggaaag tggcccaggt ctggtgaagc catcccagac actgagcctg 60

acttgcaccg tgagtggctt ctccatctca aatgactacg cctggaattg gattaggcag 120

cctcccggta aagggctgga gtggatcggc cacatcacat acagcggctc cacatcatat 180

aatcccagtc tgaagagccg tcttaccatt actcgcgaca ctagtaagaa ccagtttgtt 240

ctgaccatga ccaacatgga ccctgtggat actgcaacat actattgtgc tcgagattat 300

ggttctggtt acccttatac actcgactac tggggacagg gaaccactgt gaccgtgagc 360

tcc 363

<210> 81
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hPD-1 mAb 1 VL1 的 VL 結構域

<400> 81

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ile Val Ser Tyr Val
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Gln Pro Leu Ile Tyr
35 40 45

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asp Asn Pro Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 82
<211> 318
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 編碼 hPD-1 mAb 1 VL1 的多核苷酸

<400> 82
gaaatcgttc tgacccagag cccagcaacc ctgtctgtct cccccggaga aaaggtcacc 60

attacttgct ctgctacttc tatcgtgtcc tacgtgtact ggtatcagca gaagcccggt 120

caggctcccc agccattgat atatctgacc agcaacctgg cttctggtat cccagctcgt 180

ttttccggta gcgggtccgg gactgatttc actttgacta tcagctctct ggaggcagaa 240

gacgccgcca cctattattg tcaacagtgg tcagacaatc catacacttt tggcggtggc 300

accaaagtcg aaataaag 318

<210> 83
<211> 116

<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(116)
<223> PD-1 mAb 2的VH結構域

<400> 83

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

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Met Ser Ile Ser Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Thr Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 84

<211> 348
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(348)
<223> 編碼 PD-1 mAb 2 的 VH 結構域的多核苷酸

<400> 84
gatgtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccggaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cgttttcagt agctttggaa tgcactgggt tcgtcaggct 120

ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatac atcagtagtg gcagtatgag catttcctat 180

gcagacacag tgaagggccg attcaccgtc accagagaca atgccaagaa cacccctgttc 240

ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atccctgagt 300

gactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcc 348

<210> 85
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(5)
<223> PD-1 mAb 2 的 CDRH1

<400> 85

Ser Phe Gly Met His
1 5

<210> 86
<211> 17
<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(17)
<223> PD-1 mAb 2的CDRH2

<400> 86

Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Met Ser Ile Ser Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 87
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(7)
<223> PD-1 mAb 2的CDRH3

<400> 87

Leu Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 88
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(112)

<223> PD-1 mAb 2的VL結構域

<400> 88

Asp Val Val Met Ser 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

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg 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 Phe Phe Cys Ser Gln Thr
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 89
<211> 336
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(336)
<223> 編碼PD-1 mAb 2的VL結構域的多核苷酸

<400> 89

gatgttgtga tgtcccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagccttgtt cacagtactg gaaacaccta tttacattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acagggtttc taaccgattt 180

tctggggtcc ccgacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agtagagtgg aggctgagga tctgggagtt tttttctgct ctcaaactac acatgttccg 300

tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 90
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(16)
<223> PD-1 mAb 2的CDRL1

<400> 90

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 91
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(7)
<223> PD-1 mAb 2的CDRL2

<400> 91

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 92
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(9)
<223> PD-1 mAb 2的CDRL3

<400> 92

Ser Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 93
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hPD-1 mAb 2 VH1的VH結構域

<400> 93

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 Val Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Met Ser Ile Ser Tyr Ala Asp Thr Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 94
<211> 348
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 編碼 hPD-1 mAb 2 VH1 的多核苷酸

<400> 94
gaagtgcaat tggttgagag tggtggtggc ctggtgcagc caggtggaag tctgcggttg 60

tcctgtgcag caagcggatt tgtgttcagc tcttttggga tgcattgggt gcgccaggct 120

cccggcaagg gtctcgagtg ggtagcatac atctccagcg ggtccatgtc tattagttat 180

gccgacacag tgaaaggcag gtttactatc tcccgtgaca atgcaaaaaa cacactgtac 240

ctgcaaatga atagcctgcg caccgaggac accgccttgt actactgcgc ttccctgtct 300

gattacttcg actactgggg tcagggcaca actgtgacag tttcttcc 348

<210> 95
<211> 112
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> hPD-1 mAb 2 VL1的VL結構域

<400> 95

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Thr
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 96
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 編碼hPD-1 mAb 2 VL1的多核苷酸

<400> 96

gacgttgtga tgacacagtc accactgagt ctgccagtta ccctgggcca gccagccagt 60

atttcttgtc ggagttcaca gagtctggta cattccacag gaaatacata tctccattgg 120

tacctgcaaa aaccagggca gagcccccag ctgctgattt atagagtgtc taatcgattt 180

tctggcgtgc cagatcggtt cagcggcagc gggtctggca ctgatttcac actgaaaatc 240

tctagggtgg aggcagagga cgtaggcgtt tactactgta gtcagaccac ccatgtaccc 300

tggacttttg gccaaggtac taagctggaa atcaag 336

<210> 97
<211> 125
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(125)
<223> PD-1 mAb 3的VH結構域

<400> 97

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

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

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

Gly Thr Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Thr Arg Glu Lys Ile Thr Thr Ile Val Glu Gly Thr Tyr Trp Tyr Phe
100 105 110

Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 98
<211> 375
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(375)
<223> 編碼 PD-1 mAb 3 的 VH 結構域的多核苷酸

<400> 98
caggttcaac tgcaacagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg 60

tcctgcaagg cttcgggcta cacatttact gactatgtaa tgcactgggt gaagcagaca 120

cctgtgcatg gcctggaatg gattggaact attgatcctg aaactggtgg tactgcctac 180

aatcagaagt tcaagggcaa ggccatactg actgcagaca agtcctccaa cacagcctac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactttac aagagagaag 300

attactacga tagtagaggg gacatactgg tacttcgatg tctggggcac agggaccacg 360

gtcaccgtct cctca 375

<210> 99
<211> 5
<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(5)
<223> PD-1 mAb 3的CDRH1

<400> 99

Asp Tyr Val Met His
1 5

<210> 100
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(17)
<223> PD-1 mAb 3的CDRH2

<400> 100

Thr Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 101
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(16)

<223> PD-1 mAb 3的CDRH3

<400> 101

Glu Lys Ile Thr Thr Ile Val Glu Gly Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10 15

<210> 102
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(112)
<223> PD-1 mAb 3的VL結構域

<400> 102

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu 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 Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 103
<211> 336
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(336)
<223> 編碼 PD-1 mAb 3 的 VL 結構域的多核苷酸

<400> 103
gatgttttgc tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gaacattgta catagtaatg gagacaccta tttggaatgg 120

tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctcctgatct ataaagtttc caaccgattt 180

tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt gggtcaggga cagattttac actcaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatcttccg 300

tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 104
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(16)
<223> PD-1 mAb 3 的 CDRL1

<400> 104

Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 105
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(7)
<223> PD-1 mAb 3的CDRL2

<400> 105

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 106
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(9)
<223> PD-1 mAb 3的CDRL3

<400> 106

Phe Gln Gly Ser His Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 107
<211> 116
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_特徵
<222> (1)..(116)
<223> PD-1 mAb 4的VH結構域

<400> 107

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

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Met Ser Ile Ser Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Thr Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 108
<211> 348
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(348)
<223> 編碼 PD-1 mAb 4 的 VH 結構域的多核苷酸

<400> 108
gatgtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccggaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cgttttcagt agctttggaa tgcactgggt tcgtcaggct 120

ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatat attagtagtg gcagtatgag tatttcctat 180

gcagacacag tgaagggccg attcaccgtc accagagaca atgccaagaa caccctgttc 240

ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atccctgact 300

gactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctca 348

<210> 109
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(5)
<223> PD-1 mAb 4 的 CDRH1

<400> 109

Ser Phe Gly Met His
1 5

<210> 110
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵

<222> (1)..(17)
<223> PD-1 mAb 4的CDRH2

<400> 110

Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Met Ser Ile Ser Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 111
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(7)
<223> PD-1 mAb 4的CDRH3

<400> 111

Leu Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 112
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(112)
<223> PD-1 mAb 4的VL結構域

<400> 112

Asp Val Val Met Ser 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

Thr Gly Asn Thr Tyr Phe His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Thr
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 113
<211> 336
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(336)
<223> 編碼 PD-1 mAb 的 VL 結構域的多核苷酸

<400> 113
gatgttgtga tgtcccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcctgca gatctagtca gagccttgtt cacagtactg gaaacaccta tttccattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acagggtttc taaccgattt 180

tctggggtcc ccgacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaactac acatgttccg 300

tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 114
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(16)
<223> PD-1 mAb 4的CDRL1

<400> 114

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Phe His
1 5 10 15

<210> 115
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(7)
<223> PD-1 mAb 4的CDRL2

<400> 115

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 116
<211> 9

<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(9)
<223> PD-1 mAb 4的CDRL3

<400> 116

Ser Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 117
<211> 119
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(119)
<223> PD-1 mAb 5的VH結構域

<400> 117

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Val Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Trp Met Asn Trp Met Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu His Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 118
<211> 357
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(357)
<223> 編碼 PD-1 mAb 5 的 VH 結構域的多核苷酸

<400> 118
caggtccaac tgcagcagcc tggggttgaa ctggtgaggc ctggagcttc agtgaagctg 60

tcctgcaagg cttctggcta ctccttcacc gcctactgga tgaactggat gaaacagagg 120

cctggacaag gccttgagtg gattggcgtg attcatcctt ccgatagtga aacttggtta 180

aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240

atgcaactca tcagcccgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagagagcac 300

tacggtagta gcccgtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctctgca 357

<210> 119
<211> 5
<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(5)
<223> PD-1 mAb 5的CDRH1

<400> 119

Ala Tyr Trp Met Asn
1 5

<210> 120
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(17)
<223> PD-1 mAb 5的CDRH2

<400> 120

Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 121
<211> 10
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(10)

<223> PD-1 mAb 5的CDRH3

<400> 121

Glu His Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 122
<211> 111
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(111)
<223> PD-1 mAb 5的VL結構域

<400> 122

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Asn Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 123
<211> 333
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(333)
<223> 編碼 PD-1 mAb 5 的 VL 結構域的多核苷酸

<400> 123
gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atctcctgca gagccaacga aagtgttgat aattatggca tgagttttat gaactggttc 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa ccaaggatcc 180

ggggtccctg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag atttcagcct caacatccat 240

cctatggagg aggatgatac tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtac 300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa 333

<210> 124
<211> 15
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(15)
<223> PD-1 mAb 5 的 CDRL1

<400> 124

Arg Ala Asn Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Met Ser Phe Met Asn

1 5 10 15

<210> 125
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(7)
<223> PD-1 mAb 5的CDRL2

<400> 125

Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
1 5

<210> 126
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(9)
<223> PD-1 mAb 5的CDRL3

<400> 126

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 127
<211> 118
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_特徵
<222> (1)..(118)
<223> PD-1 mAb 6的VH結構域

<400> 127

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Asn Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Asn Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gln Lys Ala Thr Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Thr
115

<210> 128
<211> 333
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(333)
<223> 編碼 PD-1 mAb 6的VH結構域的多核苷酸

<400> 128
gaaatcgtac tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact 60

ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaactggttt 120

cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcatccacg ccgcctctaa ccgcggatct 180

ggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc 240

tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat 300

acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa 333

<210> 129
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(5)
<223> PD-1 mAb 6的CDRH1

<400> 129

Ser Tyr Gly Met Ser
1 5

<210> 130
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵

<222> (1)..(17)
<223> PD-1 mAb 6的CDRH2

<400> 130

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 131
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(9)
<223> PD-1 mAb 6的CDRH3

<400> 131

Gln Lys Ala Thr Thr Trp Phe Ala Tyr
1 5

<210> 132
<211> 111
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(111)
<223> PD-1 mAb 6的VL結構域

<400> 132

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Pro Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Met Glu Glu Asp Asp Ala Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 133
<211> 333
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(333)
<223> 編碼 PD-1 mAb 6 的 VL 結構域的多核苷酸

<400> 133
gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atctcctgca gagccagcga aagtgttgat aattatggca ttagttttat gaactggttc 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc ctgcatccaa ccaaggatcc 180

ggggtccctg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat 240

cctatggagg aggatgatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtgg 300

acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa 333

<210> 134
<211> 15
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(15)
<223> PD-1 mAb 6的CDRL1

<400> 134

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn
1 5 10 15

<210> 135
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(7)
<223> PD-1 mAb 6的CDRL2

<400> 135

Pro Ala Ser Asn Gln Gly Ser
1 5

<210> 136
<211> 9

<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(9)
<223> PD-1 mAb 6的CDRL3

<400> 136

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 137
<211> 119
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(119)
<223> PD-1 mAb 7的VH結構域

<400> 137

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 138
<211> 357
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(357)
<223> 編碼 PD-1 mAb 7 的 VH 結構域的多核苷酸

<400> 138
gaggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctggtgaggc ctggagcttc agtgaagctg 60

tcctgcaagg cttctggcta ctccttcacc agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120

cctggacaag gccttgagtg gattggcgtg attcatcctt ccgatagtga aacttggtta 180

gatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccac cacagcctac 240

atgcaactca tcagcccgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagggagcac 300

tacggtacta gcccgtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt gtcttcc 357

<210> 139
<211> 5
<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(5)
<223> PD-1 mAb 7的CDRH1

<400> 139

Ser Tyr Trp Met Asn
1 5

<210> 140
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(17)
<223> PD-1 mAb 7的CDRH2

<400> 140

Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 141
<211> 10
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(10)

<223> PD-1 mAb 7的CDRH3

<400> 141

Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 142
<211> 111
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(111)
<223> PD-1 mAb 7的VL結構域

<400> 142

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Asn Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Met Glu Glu Asp Asp Ala Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 143
<211> 333
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(333)
<223> 編碼 PD-1 mAb 7 的 VL 結構域的多核苷酸

<400> 143
gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atctcctgca gagccaacga aagtgttgat aattatggca tgagttttat gaactggttc 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatccatg ctgcatccaa ccaaggatcc 180

ggggtccctg ccaggtttag tggcagtggg tttgggacag acttcagcct caacatccat 240

cctatggagg aggatgatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtac 300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa 333

<210> 144
<211> 15
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(15)
<223> PD-1 mAb 7 的 CDRL1

<400> 144

Arg Ala Asn Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Met Ser Phe Met Asn

1 5 10 15

<210> 145
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(7)
<223> PD-1 mAb 7的CDRL2

<400> 145

Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
1 5

<210> 146
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(9)
<223> PD-1 mAb 7的CDRL3

<400> 146

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 147
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hPD-1 mAb 7 VH1的VH結構域

<400> 147

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

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

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

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 148
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 編碼 hPD-1 mAb 7 VH1 的多核苷酸

<400> 148

caagttcaat tggtacagag cggggcagag gtgaagaaac ccggcgccag tgttaaggtg 60

tcctgcaaag ccagcggtta cagctttaca agctattgga tgaattgggt gcgtcaagca 120

ccagggcagg gtctggaatg gattggggtg atacatcctt ctgacagcga aacatggttg 180

gaccagaaat ttaaagatcg tgtgacaatt acagtcgata agtccacaag cactgcttac 240

atggaactct ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcgc cagagagcac 300

tacggcacat cacctttgc atactggggc cagggaactc tcgtaaccgt atcctcc 357

<210> 149
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VhPD-1 mAb 7 VH2的H結構域

<400> 149

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

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

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

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 150
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 編碼 hPD-1 mAb 7 VH2 的多核苷酸

<400> 150
caagttcaat tggtacagag cggggcagag gtgaagaaac ccggcgccag tgttaaggtg 60

tcctgcaaag ccagcggtta cagctttaca agctattgga tgaattgggt gcgtcaagca 120

ccagggcagg gtctggaatg ggctggggtg atacatcctt ctgacagcga aacatggttg 180

gaccagaaat ttaaagatcg tgtgacaatt acagtcgata agtccacaag cactgcttac 240

atggaactct ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcgc cagagagcac 300

tacggcacat cacctttgc atactggggc cagggaactc tcgtaaccgt atcctcc 357

<210> 151
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hPD-1 mAb 7 VL1 的 VL 結構域

<400> 151

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

```
1               5                   10                  15

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

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
    50                  55                  60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
                85                  90                  95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 152
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 編碼 hPD-1 mAb 7 VL1 的多核苷酸

<400> 152
gaaatcgtac tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact 60

ctcagctgca gagcaaatga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaactggttt 120

cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcatccacg ccgcctctaa ccagggatct 180

ggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc 240

tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat 300

acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa 333

<210> 153
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hPD-1 mAb 7 VL2 的 VL 結構域

<400> 153

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

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

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 154

<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 編碼 hPD-1 mAb 7 VL2 的多核苷酸

<400> 154
gaaatcgtac tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact 60

ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaactggttt 120

cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcatccacg ccgcctctaa ccagggatct 180

ggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc 240

tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat 300

acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa 333

<210> 155
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hPD-1 mAb 7 VL3 的 VL 結構域

<400> 155

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

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

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Arg Gly Ser Gly Val Pro Ser

50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 156
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 編碼 hPD-1 mAb 7 VL3 的多核苷酸

<400> 156
gaaatcgtac tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact 60

ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaactggttt 120

cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcatccacg ccgcctctaa ccgcggatct 180

ggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc 240

tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat 300

acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa 333

<210> 157
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hPD-1 mAb 7 VL2 和 hPD-1 mAb 7 VL3 的 VL 結構域的 CDRL1

<400> 157

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Met Ser Phe Met Asn
1 5 10 15

<210> 158
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hPD-1 mAb 7 VL3 的 VL 結構域的 CDRL2

<400> 158

Ala Ala Ser Asn Arg Gly Ser
1 5

<210> 159
<211> 113
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(113)
<223> PD-1 mAb 8 的 VH 結構域

<400> 159

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

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

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Asn His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Lys Asn Gly Asp Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Ser

<210> 160
<211> 339
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(339)
<223> 編碼 PD-1 mAb 8 的 VH 結構域的多核苷酸

<400> 160
gagggccagc tgcaacaatc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60

tcctgtaagg cttctggata cacgttcact gactactaca tgaactgggt gaagcagaac 120

catggaaaga gccttgagtg gattggagat attaatccta aaaatggtga cactcactac 180

aaccagaagt tcaagggcga ggccacattg actgtagaca agtcctccac cacagcctac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc gagcgatttt 300

gactactggg gccaaggcac cactctcaca gtctcctcc 339

<210> 161
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(5)
<223> PD-1 mAb 8的CDRH1

<400> 161

Asp Tyr Tyr Met Asn
1 5

<210> 162
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(17)
<223> PD-1 mAb 8的CDRH2

<400> 162

Asp Ile Asn Pro Lys Asn Gly Asp Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 163
<211> 4
<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(4)
<223> PD-1 mAb 8的CDRH3

<400> 163

Asp Phe Asp Tyr
1

<210> 164
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(112)
<223> PD-1 mAb 8的VL結構域

<400> 164

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Gly Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Leu Val Tyr Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu 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 Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 165
<211> 336
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(336)
<223> 編碼 PD-1 mAb 8 的 VL 結構域的多核苷酸

<400> 165
gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtcg gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gacccttgta tatagtaatg gaaacaccta tttaaattgg 120

ttcctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcca 300

ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaa 336

<210> 166
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵

<222> (1)..(16)
<223> PD-1 mAb 8的CDRL1

<400> 166

Arg Ser Ser Gln Thr Leu Val Tyr Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 167
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(7)
<223> PD-1 mAb 8的CDRL2

<400> 167

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 168
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(9)
<223> PD-1 mAb 8的CDRL3

<400> 168

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Phe Thr
1 5

<210> 169

<211> 119
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(119)
<223> PD-1 mAb 9的VH結構域

<400> 169

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Val Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Phe Asp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 170
<211> 357
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(357)
<223> 編碼 PD-1 mAb 9的VH結構域的多核苷酸

<400> 170
gaagtgatgc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agttatcttg tgtcttgggt tcgccagact 120

ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtggtg gtggtggtaa cacctactat 180

tcagacagtg tgaagggtcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240

ctgcaaatca gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aaggtatggt 300

ttcgacggcg cctggtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctcttcc 357

<210> 171
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(5)
<223> PD-1 mAb 9的CDRH1

<400> 171

Ser Tyr Leu Val Ser
1 5

<210> 172
<211> 17

<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(17)
<223> PD-1 mAb 9的CDRH2

<400> 172

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 173
<211> 10
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(10)
<223> PD-1 mAb 9的CDRH3

<400> 173

Tyr Gly Phe Asp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 174
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵

<222> (1)..(107)
<223> PD-1 mAb 9的VL結構域

<400> 174

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

Asp Ile Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Glu Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Ala Val Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Thr
100 105

<210> 175
<211> 321
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(321)
<223> 編碼PD-1 mAb 9的VL結構域的多核苷酸

<400> 175
gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga tattgtcacc 60

atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agttatttag catggtatca gcagaaacag 120

gaaaaatctc ctcagctcct ggtctataat gcaaaaacct tggcagcagg tgtgccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttctctga ccatcaacag cctgcagcct 240

gaagattttg ggaattatta ctgtcagcat cattatgctg ttccgtggac gttcggtgga 300

ggcaccagac tggaaatcac a 321

<210> 176
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(11)
<223> PD-1 mAb 9的CDRL1

<400> 176

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 177
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(7)
<223> PD-1 mAb 9的CDRL2

<400> 177

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Ala
1 5

<210> 178
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(9)
<223> PD-1 mAb 9的CDRL3

<400> 178

Gln His His Tyr Ala Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 179
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hPD-1 mAb 9 VH1的VH結構域

<400> 179

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Phe Asp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 180
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 編碼 hPD-1 mAb 9 VH1 的多核苷酸

<400> 180
gaggtgcagc tggtggaaag tgggggcggc ctggtgcgac ccgggggaag tctgaaactg 60

tcctgtgcag catcaggatt tacttttca tcttatctcg tgtcttgggt aagacaagca 120

cccggaaaag gcttggaatg ggtggccact atctccggtg gaggtggcaa cacctactat 180

agcgacagtg tcaagggaag atttaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac 240

ctccagatga actccctgcg cgccgaggac accgccacct attactgtgc acgctatgga 300

tttgacggcg catggtttgc ctactgggga cagggcacat tggtaaccgt tagctcc 357

<210> 181
<211> 119
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> hPD-1 mAb 9 VH2的VH結構域

<400> 181

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Ala Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Phe Asp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 182
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 編碼 hPD-1 mAb 9 VH2 的多核苷酸

<400> 182
gaggtgcagc tggtggaaag tgggggcggc ctggcgcgac ccgggggaag tctgaaactg 60

tcctgtgcag catcaggatt tacttttttca tcttatctcg tgggctgggt aagacaagca 120

cccggaaaag gcttggaatg gacggccact atctccggtg gaggtggcaa cacctactat 180

agcgacagtg tcaagggaag atttaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac 240

ctccagatga actccgcacg cgccgaggac accgccacct attactgtgc acgctatgga 300

tttgacggcg catggtttgc ctactgggga cagggcacat tggtaaccgt tagctcc 357

<210> 183
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有絲氨酸至甘氨酸氨基酸取代的 hPD-1 mAb 9 VH2 的 VH 結構域的 CDRH1

<400> 183

Ser Tyr Leu Val Gly
1 5

<210> 184
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hPD-1 mAb 9 VL1 的 VL 結構域

<400> 184

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Ala 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 His His Tyr Ala Val Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 185
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 編碼 hPD-1 mAb 9 VL1 的多核苷酸

<400> 185
gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtggggga tcgggtcacc 60

atcacctgcc gtgcctcaga aaacatctat tcatacctcg cctggtatca acagaaacct 120

ggtaaagccc caaaattgct catttacaac gccaagaccc tcgcagctgg cgtgccaagt 180

aggttctcag gcagcggctc agggacagat ttcaccctca ccatatcctc actgcagccc 240

gaggattttg ccacttacta ctgccagcat cattacgcag tgccctggac cttcggacaa 300

ggcactaagc tcgagatcaa a 321

<210> 186
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hPD-1 mAb 9 VL2 的 VL 結構域

<400> 186

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Lys Thr Leu Ala Ala 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 His His Tyr Ala Val Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 187
<211> 321
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 編碼 hPD-1 mAb 9 VL2 的多核苷酸

<400> 187
gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtggggga tcgggtcacc 60

atcacctgcc gtgcctcaga aaacatctat aactacctcg cctggtatca acagaaacct 120

ggtaaagccc caaaattgct catttacgac gccaagaccc tcgcagctgg cgtgccaagt 180

aggttctcag gcagcggctc agggacagat ttcaccctca ccatatcctc actgcagccc 240

gaggattttg ccacttacta ctgccagcat cattacgcag tgccctggac cttcggacaa 300

ggcactaagc tcgagatcaa a 321

<210> 188
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hPD-1 mAb 9 VL2 的 VL 結構域的 CDRL1

<400> 188

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 189
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hPD-1 mAb 9 VL2 的 VL 結構域的 CDRL2

<400> 189

Asp Ala Lys Thr Leu Ala Ala

1 5

<210> 190
<211> 116
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(116)
<223> PD-1 mAb 10的VH結構域

<400> 190

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 191
<211> 348
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(348)
<223> 編碼 PD-1 mAb 10 的 VH 結構域的多核苷酸

<400> 191
gaagtgatac tggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactatctca tgtcttgggt tcgccagact 120

ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaagt attagtggtg gtggtagtaa tatctactat 180

ccagacagtg tgaagggtcg attcaccata tccagggaca atgccaagaa caccctgtac 240

ctgcaaatga acagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagacaagaa 300

ctggcttttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcc 348

<210> 192
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(5)
<223> PD-1 mAb 10 的 CDRH1

<400> 192

Asn Tyr Leu Met Ser
1 5

<210> 193
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(17)
<223> PD-1 mAb 10的CDRH2

<400> 193

Ser Ile Ser Gly Gly Gly Ser Asn Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 194
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(7)
<223> PD-1 mAb 10的CDRH3

<400> 194

Gln Glu Leu Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 195
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(107)
<223> PD-1 mAb 10 的 VL 結構域

<400> 195

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Ile
100 105

<210> 196
<211> 321
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>

<221> misc_特徵
<222> (1)..(321)
<223> 編碼 PD-1 mAb 10 的 VL 結構域的多核苷酸

<400> 196
gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60

atcagttgca ggacaagtca ggacattagc aatttttaa actggtatca gcagaaacca 120

gatggaacta ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180

aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240

gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtagtacgc ttccgtggac gttcggtgga 300

ggcaccaagc tggaaatcat a 321

<210> 197
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(11)
<223> PD-1 mAb 10 的 CDRL1

<400> 197

Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe Leu Asn
1 5 10

<210> 198
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(7)

<223> PD-1 mAb 10的CDRL2

<400> 198

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

<210> 199
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (19)..()
<223> PD-1 mAb 10的CDRL3

<400> 199

Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 200
<211> 117
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(117)
<223> PD-1 mAb 11的VH結構域

<400> 200

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Thr Thr Gly Thr Tyr Ser Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 201
<211> 351
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(351)
<223> 編碼 PD-1 mAb 11 的 VH 結構域的多核苷酸

<400> 201
gaggttcagc tccagcagtc tgggactgtg ctggcaaggc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcctgcaaga cttctggcta cacatttacc ggctactgga tgcactgggt aaaacagagg 120

cctggacagg gtctgaaatg gatgggggct atttatcctg gaaatagtga tactcactac 180

aaccagaagt tcaagggcaa ggccaaactg actgcagtca catccgccag cactgcctac 240

atggagctca gcagcctgac aaatgaggac tctgcgatct attactgtac tactgggacc 300

tactcgtact tcgatgtctg gggcacaggg accacggtca ccgtctcctc a 351

<210> 202
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(5)
<223> PD-1 mAb 11 的 CDRH1

<400> 202

Gly Tyr Trp Met His
1 5

<210> 203
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(17)
<223> PD-1 mAb 11 的 CDRH2

<400> 203

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 204
<211> 8
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(8)
<223> PD-1 mAb 11 的 CDRH3

<400> 204

Gly Thr Tyr Ser Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 205
<211> 106
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(106)
<223> PD-1 mAb 11 的 VL 結構域

<400> 205

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln His Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
65 70 75 80

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

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 206
<211> 318
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(318)
<223> 編碼 PD-1 mAb 11 的 VL 結構域的多核苷酸

<400> 206
gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga aagagtcagt 60

ttctcctgca gggccagtca gagcattggc acaagcatac actggtatca gcacagaaca 120

aatggttctc caaggcttct cataaagtat gcttctgagt ctatctctgg gatcccttcc 180

aggtttagtg gcagtggatc agggactgat tttactctta gcatcaacag tgtggagtct 240

gaagatattg cagattatta ctgtcaacaa agtaatagct ggctcacgtt cggtgctggg 300

accaagctgg agctgaaa 318

<210> 207
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(11)
<223> PD-1 mAb 11 的 CDRL1

<400> 207

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser Ile His
1 5 10

<210> 208
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(7)
<223> PD-1 mAb 11 的 CDRL2

<400> 208

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 209
<211> 8
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(8)
<223> PD-1 mAb 11 的 CDRL3

<400> 209

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Leu Thr

1 5

<210> 210
<211> 125
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(125)
<223> PD-1 mAb 12 的 VH 結構域

<400> 210

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

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

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

Gly Thr Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ser Arg Glu Arg Ile Thr Thr Val Val Glu Gly Ala Tyr Trp Tyr Phe
100 105 110

Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 211
<211> 375
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(375)
<223> 編碼 PD-1 mAb 12 的 VH 結構域的多核苷酸

<400> 211
cagggtcacc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg 60

tcctgcaagg cttcgggctt cacatttact gactatgaga tgcactgggt gaaacagaca 120

cctgtgcatg gcctggaatg gattgggact attgatcctg aaactggtgg tactgcctac 180

aatcagaagt tcaagggcaa ggccatactg acagtagaca aatcttccac tacaacctac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct tttattgttc aagagagagg 300

attactacgg ttgttgaggg ggcatactgg tacttcgatg tctggggcac agggaccacg 360

gtcaccgtct cctca 375

<210> 212
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(5)
<223> PD-1 mAb 12 的 CDRH1

<400> 212

Asp Tyr Glu Met His
1 5

<210> 213
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(17)
<223> PD-1 mAb 12 的 CDRH2

<400> 213

Thr Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 214
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(16)
<223> PD-1 mAb 12 的 CDRH3

<400> 214

Glu Arg Ile Thr Thr Val Val Glu Gly Ala Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10 15

<210> 215
<211> 112

<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(112)
<223> PD-1 mAb 4的VL結構域

<400> 215

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 216
<211> 336
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(336)
<223> 編碼 PD-1 mAb 12 的 VL 結構域的多核苷酸

<400> 216
gatgttttga tgacccagac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gaacattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120

tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctcctgatct gcaaagtttc cacccgattt 180

tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattattgct ttcaaggttc acatgttccg 300

tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 217
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(16)
<223> PD-1 mAb 12 的 CDRL1

<400> 217

Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 218
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_特徵
<222> (1)..(7)
<223> PD-1 mAb 12 的 CDRL2

<400> 218

Lys Val Ser Thr Arg Phe Ser
1 5

<210> 219
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(9)
<223> PD-1 mAb 12 的 CDRL3

<400> 219

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 220
<211> 121
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(121)
<223> PD-1 mAb 13 的 VH 結構域

<400> 220

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
20 25 30

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

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Asn Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gln Ala Tyr Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 221
<211> 363
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(363)
<223> 編碼 PD-1 mAb 13 的 VH 結構域的多核苷酸

<400> 221
gaagtgatgc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agccatacca tgtcttgggt tcgccagact 120

ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtggtg gtggttctaa tatctactat 180

ccagacagtg tgaagggtcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240

ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagacaagct 300

tactacggta attactggta cttcgatgtc tggggcacag ggaccacggt caccgtctcc 360

tcc 363

<210> 222
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(5)
<223> PD-1 mAb 13 的 CDRH1

<400> 222

Ser His Thr Met Ser
1 5

<210> 223
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(17)
<223> PD-1 mAb 13 的 CDRH2

<400> 223

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Asn Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 224
<211> 12
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(12)
<223> PD-1 mAb 13 的 CDRH3

<400> 224

Gln Ala Tyr Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 225
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(107)
<223> PD-1 mAb 13 的 VL 結構域

<400> 225

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

Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Val Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Asp Ser Ile Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 226
<211> 321
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(321)
<223> 編碼 PD-1 mAb 13 的 VL 結構域的多核苷酸

<400> 226
gacattcaga tgacccagtc tcctgccacc cagtctgcat ctctgggaga aagtgtcacc 60

atcacgtgcc tggcaagtca gaccattggt acatggttag catggtatca gcagaaacca 120

gggaaatctc ctcagctcct gatttatgct gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gtagtggatc tggcacaaaa ttttctttca agatcagcag cctacaggct 240

gaagattttg taagttatta ctgtcaacaa cttgacagta ttccgtggac gttcggtgga 300

ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 227
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(11)
<223> PD-1 mAb 13 的 CDRL1

<400> 227

Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 228
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(7)
<223> PD-1 mAb 13 的 CDRL2

<400> 228

Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp
1 5

<210> 229
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(9)
<223> PD-1 mAb 13 的 CDRL3

<400> 229

Gln Gln Leu Asp Ser Ile Pro Trp Thr
1 5

<210> 230
<211> 117
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(117)
<223> PD-1 mAb 14 的 VH 結構域

<400> 230

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Ile Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Thr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile
35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Asp Gly Thr Thr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Thr Gly Leu His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 231
<211> 351
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(351)
<223> 編碼 PD-1 mAb 14 的 VH 結構域的多核苷酸

<400> 231
caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggcta caacttcatc agctactgga taacctgggt gaaacagagg 120

cctggacaag gccttcagtg gattggaaat atttatcctg gtactgatgg tactacctac 180

aatgagaagt tcaagagcaa ggccacactg actgtagaca catcctccag cacagcctac 240

atgcacctca gtcgcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aactgggcta 300

cactggtact tcgatgtctg gggcacaggg accacggtca ccgtctcctc c 351

<210> 232
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(5)
<223> PD-1 mAb 14 的 CDRH1

<400> 232

Ser Tyr Trp Ile Thr
1 5

<210> 233
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(17)
<223> PD-1 mAb 14的CDRH2

<400> 233

Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Asp Gly Thr Thr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 234
<211> 8
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(8)
<223> PD-1 mAb 14的CDRH3

<400> 234

Gly Leu His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 235
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(107)
<223> PD-1 mAb 14 的 VL 結構域

<400> 235

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Gly Thr Asn
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

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

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 236
<211> 321
<212> DNA

<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(321)
<223> 編碼 PD-1 mAb 14 的 VL 結構域的多核苷酸

<400> 236
gacattgtga tgacccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagt 60

gtcacctgca aggccagtca gagtgtgggt actaatgtag cctggtatca acagaagccc 120

ggtcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcatcctccc gattcagtgg cgtccctgat 180

cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagtaa tgtgcagtct 240

gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacagct atccgtacac gttcggaggg 300

gggaccaagc tggaaataaa a 321

<210> 237
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(11)
<223> PD-1 mAb 14 的 CDRL1

<400> 237

Lys Ala Ser Gln Ser Val Gly Thr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 238
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(7)
<223> PD-1 mAb 14 的 CDRL2

<400> 238

Ser Ala Ser Ser Arg Phe Ser
1 5

<210> 239
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(9)
<223> PD-1 mAb 14 的 CDRL3

<400> 239

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 240
<211> 117
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(117)
<223> PD-1 mAb 15 的 VH 結構域

<400> 240

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ile Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Arg Gly Thr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 241
<211> 351
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(351)
<223> 編碼 PD-1 mAb 15 的 VH 結構域的多核苷酸

<400> 241
gaagtgatgc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cattttcagt agctatctca tctcttgggt tcgccagact 120

ccggagaaga ggctggagtg ggtcgctgcc attagtggtg gtggtgctga cacctactat 180

gccgacagtg tgaagggtcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtat 240

ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccttat attactgtac aagacgaggg 300

acctatgcta tggactactg gggtcaagga acctcagtca ccgtctcctc c 351

<210> 242
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(5)
<223> PD-1 mAb 15的CDRH1

<400> 242

Ser Tyr Leu Ile Ser
1 5

<210> 243
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(17)
<223> PD-1 mAb 15的CDRH2

<400> 243

Ala Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 244
<211> 8
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(8)
<223> PD-1 mAb 15 的 CDRH3

<400> 244

Arg Gly Thr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 245
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(107)
<223> PD-1 mAb 15 的 VL 結構域

<400> 245

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

Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Val Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Ile Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 246
<211> 321
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(321)
<223> 編碼 PD-1 mAb 15 的 VL 結構域的多核苷酸

<400> 246
gacattcaga tgacccagtc tcccgcctcc cagtctgcat ctctgggaga aagtgtcacc 60

atcacatgcc tggcaagtca gaccattggt acatggttag catggtatca gcagaaacca 120

gggaaatctc ctcagctcct gatttatgct gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gtagtggatc tggcacaaaa ttttctttca agatcagcag cctacaggct 240

gaagattttg taaattatta ctgtcaacaa ctttacagta ttccgtggac gttcggtgga 300

ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 247
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(11)
<223> PD-1 mAb 15的CDRL1

<400> 247

Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 248
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(7)
<223> PD-1 mAb 15的CDRL2

<400> 248

Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp
1 5

<210> 249
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(9)
<223> PD-1 mAb 15的CDRL3

<400> 249

Gln Gln Leu Tyr Ser Ile Pro Trp Thr
1 5

<210> 250
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hPD-1 mAb 15 VH1 的 VH 結構域

<400> 250

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Ala Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Gly Thr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 251
<211> 351
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 編碼 hPD-1 mAb 15 VH1 的多核苷酸

<400> 251
gaagtgcaac tggttgaaag tggcggcggg ctggtgcggc caggtggttc actcagactg 60

tcttgtgcag cttcaggctt tacattctcc tcttatctta tctcttgggt gcgccaagcc 120

ccaggtaagg gccttgaatg ggtcgccgcc attagtgggg gtggtgccga tacatattat 180

gccgacagcg tcaagggacg tttcaccatc agcagggaca acgccaagaa tagcctttac 240

ctgcagatga actcacttag agctgaagac accgctactt attactgtgc ccggcgcggg 300

acttacgcta tggactattg gggccagggc accttggtca ctgtctcatc c 351

<210> 252
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hPD-1 mAb 15 VL1 的 VH 結構域

<400> 252

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 Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Ile Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 253
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 編碼 hPD-1 mAb 15 VL1 的多核苷酸

<400> 253
gatatccaga tgacccagtc tcccagctct ctcagtgcaa gcgtaggcga ccgtgtgacc 60

atcacctgtc tggccagtca gaccattgga acctggctcg cctggtatca gcagaaacct 120

ggcaaggccc ctaagctgct gatttacgcc gccacctccc tcgcagatgg agtgccctcc 180

cgatttagcg ggtccgggtc cggcaccgac ttcacattca caatcagcag cctccagccc 240

gaggatttcg ctacatacta ctgtcaacag ctctactcca ttccatggac ctttggtcag 300

ggtactaaac tggagatcaa a 321

<210> 254

<211> 98
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(98)
<223> 人 IgG4 CH1 結構域

<400> 254

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

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

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

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

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

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val

<210> 255
<211> 329
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG1 人源化抗體重鏈

<400> 255

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

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

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

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

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

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 256
<211> 326
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有穩定化的鉸鏈區的 IgG4 人源化抗體重鏈

<400> 256

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

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

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

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

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

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
            100                 105                 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
        115                 120                 125
```

```
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
    130                 135                 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145                 150                 155                 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
                165                 170                 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
            180                 185                 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
        195                 200                 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
    210                 215                 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225                 230                 235                 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
                245                 250                 255

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly
325

<210> 257
<211> 98
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (1)..(98)
<223> 人 IgG2 CH1 結構域

<400> 257

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

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

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

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

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

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val

<210> 258
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CH2 和 CH3 結構域的 IgG1 序列

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (217)..(217)
<223> Xaa 是賴氨酸(K)或不存在

<400> 258

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 Tyr Ile Thr Arg Glu 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 Gly Gln
            100                 105                 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
        115                 120                 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
    130                 135                 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145                 150                 155                 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                165                 170                 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
            180                 185                 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
        195                 200                 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
    210                 215
```

<210> 259
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於 CH2 和 CH3 結構域的 IgG4 序列

<220>
<221> MISC_特徵

<222> (217)..(217)
<223> Xaa 是賴氨酸(K)或不存在

<400> 259

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

Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val
            20                  25                  30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln 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 Phe 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

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
            100                 105                 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
        115                 120                 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
    130                 135                 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145                 150                 155                 160
```

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Xaa
210 215

<210> 260
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 野生型和變異的人 IgG1 CH2 和 CH3 結構域

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (4)..(5)
<223> Xaa4 和 Xaa5 都是 L（野生型），或都是 A（降低的 Fc γ R 結合）

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (22)..(26)
<223> Xaa22, Xaa24 和 Xaa26 各自是 M, S 和 T（野生型），或是 Y、T 和 E（延長的半衰期）

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (136)..(177)
<223> Xaa136, Xaa138, 和 Xaa177 各自是: T, L 和 Y（野生型），或是 W、L 和 Y（杵）或 S、A 和 V（臼）

<220>
<221> MISC_特徵

<222> (204)..(205)
<223> Xaa204 和 Xaa205 各自是 N 和 H (野生型),或是 N 和 R (沒有蛋白質 A 結合), 或 A 和 K (沒有蛋白質 A 結合)

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (217)..(217)
<223> Xaa217 是 K 或不存在

<400> 260

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

Pro Lys Asp Thr Leu Xaa Ile Xaa Arg Xaa 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 Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Xaa Cys Xaa Val Lys Gly Phe Tyr Pro

130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Xaa Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Xaa Xaa Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 261
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 可選的連接體 2

<400> 261

Leu Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 262
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接體 3

<400> 262

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 263
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接體 3

<400> 263

Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 264
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化 PD-1 抗體(hPD-1 mAb 7(1.2))的輕鏈

<400> 264

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

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

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser

50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

〈210〉 265

<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體((hPD-1 mAb 7(1.2))的重鏈

<400> 265

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

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

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

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320
```

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 266
<211> 445
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體((hPD-1 mAb 7(1.2))的重鏈

<400> 266

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

```
1               5                   10                  15

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

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

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

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

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

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

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

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
```

180 185 190

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

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe 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 Gln Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe 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 Gly Leu Pro Ser Ser 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 Gln Glu Glu Met 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 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Glu 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 Leu Gly
435 440 445

<210> 267
<211> 501
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DART A 的第一和第三多肽鏈

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (34)..(34)
<223> Xaa34 是 A 或 G

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (307)..(307)
<223> Xaa307 是 Y 或 M

<220>
<221> MISC_特徵

<222> (309)..(309)
<223> Xaa309是T或S

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (311)..(311)
<223> Xaa311是E或T

<400> 267

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Xaa Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
115 120 125

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
130 135 140

```
Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
145                 150                 155                 160

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser
                165                 170                 175

Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val
            180                 185                 190

Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
        195                 200                 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser
    210                 215                 220

Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
225                 230                 235                 240

Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala
                245                 250                 255

Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu
            260                 265                 270

Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
        275                 280                 285

Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
    290                 295                 300

Thr Leu Xaa Ile Xaa Arg Xaa Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
305                 310                 315                 320
```

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
325 330 335

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
340 345 350

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
355 360 365

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
370 375 380

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
385 390 395 400

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
405 410 415

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
420 425 430

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
435 440 445

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
450 455 460

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
465 470 475 480

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
485 490 495

Ser Leu Ser Leu Gly
500

<210> 268
<211> 273
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DART A 的第二和第四多肽鏈

<400> 268

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

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

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
100 105 110

```
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
        115                 120                 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
    130                 135                 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu
                165                 170                 175

Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp
            180                 185                 190

Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu
        195                 200                 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr
    210                 215                 220

Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
225                 230                 235                 240

Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala
                245                 250                 255

Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys
            260                 265                 270

Glu
```

<210> 269
<211> 571
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DART D的第一和第三多肽鏈

<400> 269

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

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

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu
165 170 175

Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp
180 185 190

Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr
210 215 220

Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Leu
225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
245 250 255

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
260 265 270

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

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
290 295 300

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
305 310 315 320

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
325 330 335

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
340 345 350

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
355 360 365

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val
370 375 380

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
385 390 395 400

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
405 410 415

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
420 425 430

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
435 440 445

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
450 455 460

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
465 470 475 480

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
485 490 495

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
500 505 510

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
515 520 525

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
530 535 540

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
545 550 555 560

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
565 570

<210> 270
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DART D 的第二和第四多肽鏈

<400> 270

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

```
Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
                85                  90                  95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
        115                 120                 125

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
    130                 135                 140

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
145                 150                 155                 160

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser
                165                 170                 175

Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val
            180                 185                 190

Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
        195                 200                 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser
    210                 215                 220
```

```
Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu
225                 230                 235                 240

Gly Gly Gly Ser Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
                245                 250                 255

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
            260                 265                 270

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
        275                 280                 285

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
    290                 295                 300

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
305                 310                 315                 320

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
                325                 330                 335

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
            340                 345                 350
```

<210> 271
<211> 571
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DART E的第一和第三多肽鏈

<400> 271

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1               5                   10                  15
```

```
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
            20                  25                  30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
                85                  90                  95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
        115                 120                 125

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
    130                 135                 140

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
145                 150                 155                 160

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser
                165                 170                 175

Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val
            180                 185                 190
```

```
Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
        195                 200                 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser
    210                 215                 220

Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu
225                 230                 235                 240

Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
                245                 250                 255

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
            260                 265                 270

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

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
    290                 295                 300

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
305                 310                 315                 320

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
                325                 330                 335

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
            340                 345                 350

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
        355                 360                 365
```

```
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val
    370                 375                 380

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
385                 390                 395                 400

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
                405                 410                 415

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
            420                 425                 430

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
        435                 440                 445

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
    450                 455                 460

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
465                 470                 475                 480

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
                485                 490                 495

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
            500                 505                 510

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
        515                 520                 525

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
    530                 535                 540
```

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
545 550 555 560

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
565 570

<210> 272
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DART E的第二和第四多肽鏈

<400> 272

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

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

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

```
Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
        115                 120                 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
    130                 135                 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu
                165                 170                 175

Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp
            180                 185                 190

Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu
        195                 200                 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr
    210                 215                 220

Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Leu
225                 230                 235                 240

Gly Gly Gly Ser Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
                245                 250                 255

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
            260                 265                 270
```

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
275 280 285

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
290 295 300

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
305 310 315 320

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
325 330 335

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
340 345 350

<210> 273
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DART F 的第一多肽鏈

<400> 273

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

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

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

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
225 230 235 240

```
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr
                245                 250                 255

Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

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

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

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

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

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

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

<210> 274
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DART F 的第二和第五多肽鏈

<400> 274

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

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

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 275
<211> 732
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DART F的第三多肽鏈

<400> 275

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

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

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

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

```
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr
                245                 250                 255

Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Asp Ile Val Met Thr
    450                 455                 460

Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile
465                 470                 475                 480

Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Ala Lys Thr Tyr
                485                 490                 495

Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Glu Arg Leu Ile
            500                 505                 510

Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
        515                 520                 525

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala
    530                 535                 540
```

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr
545 550 555 560

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
565 570 575

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
580 585 590

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
595 600 605

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
610 615 620

Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp
625 630 635 640

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
645 650 655

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
660 665 670

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp
675 680 685

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly
690 695 700

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
705 710 715 720

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
725 730

<210> 276
<211> 273
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DART F 的第四多肽鏈

<400> 276

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

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

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
100 105 110

```
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
        115                 120                 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
    130                 135                 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu
                165                 170                 175

Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp
            180                 185                 190

Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu
        195                 200                 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr
    210                 215                 220

Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
225                 230                 235                 240

Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala
                245                 250                 255

Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys
            260                 265                 270

Glu
```

<210> 277
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DART G 的第一多肽鏈

<400> 277

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile
245 250 255

Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

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

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

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

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

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

Glu Ala Leu His Ala Lys Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 278
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> DART G的第二和第五多肽鏈

<400> 278

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1               5                  10                  15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
            20                  25                  30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
                85                  90                  95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
        115                 120                 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
    130                 135                 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145                 150                 155                 160
```

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 279
<211> 732
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DART G的第三多肽鏈

<400> 279

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

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

```
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
        195                 200                 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
    210                 215                 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225                 230                 235                 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile
                245                 250                 255
```

```
Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        275                 280                 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
            340                 345                 350

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

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

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430
```

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu
450 455 460

Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
465 470 475 480

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Met Ser Phe
485 490 495

Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
500 505 510

His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
515 520 525

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
530 535 540

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Tyr
545 550 555 560

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
565 570 575

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
580 585 590

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
595 600 605

```
Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
    610                 615                 620

Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp
625                 630                 635                 640

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
                645                 650                 655

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
            660                 665                 670

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp
        675                 680                 685

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly
    690                 695                 700

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
705                 710                 715                 720

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
                725                 730
```

<210> 280
<211> 272
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DART G 的第四多肽鏈

<400> 280

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

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

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
    50                  55                  60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
                85                  90                  95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
        115                 120                 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
    130                 135                 140

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu
                165                 170                 175
```

Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp
180 185 190

Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro
210 215 220

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
225 230 235 240

Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
245 250 255

Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265 270

<210> 281
<211> 503
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DART H的第一多肽鏈

<400> 281

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

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

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu
165 170 175

Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp
180 185 190

Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr
210 215 220

Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
225 230 235 240

Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala
245 250 255

Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu
260 265 270

Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
275 280 285

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
290 295 300

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
305 310 315 320

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
325 330 335

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
340 345 350

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
355 360 365

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
370 375 380

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
385 390 395 400

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
405 410 415

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
420 425 430

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
435 440 445

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
450 455 460

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
465 470 475 480

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
485 490 495

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500

<210> 282
<211> 273
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DART H的第二多肽鏈

<400> 282

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

```
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
            20                  25                  30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
                85                  90                  95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
        115                 120                 125

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
    130                 135                 140

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
145                 150                 155                 160

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser
                165                 170                 175

Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val
            180                 185                 190
```

Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
195 200 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser
210 215 220

Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
225 230 235 240

Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala
245 250 255

Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys
260 265 270

Glu

<210> 283
<211> 227
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DART H的第三多肽鏈

<400> 283

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

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

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

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

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 284
<211> 563
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DART 1的第一和第三多肽鏈

<400> 284

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

```
Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
        115                 120                 125

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe
    130                 135                 140

Ser Asn Ser Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
145                 150                 155                 160

Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala
                165                 170                 175

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
            180                 185                 190

Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
        195                 200                 205

Tyr Tyr Cys Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
    210                 215                 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
                245                 250                 255

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
            260                 265                 270

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
        275                 280                 285
```

```
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
    290                 295                 300

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
305                 310                 315                 320

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
                325                 330                 335

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
            340                 345                 350

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
        355                 360                 365

Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
    370                 375                 380

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
385                 390                 395                 400

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
                405                 410                 415

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
            420                 425                 430

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
        435                 440                 445

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
    450                 455                 460
```

```
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
465                 470                 475                 480

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
                485                 490                 495

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
            500                 505                 510

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
        515                 520                 525

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
    530                 535                 540

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
545                 550                 555                 560

Ser Pro Gly
```

〈210〉 285
〈211〉 348
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 DART 1的第二和第四多肽鏈

〈400〉 285

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
            20                  25                  30
```

```
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
        115                 120                 125

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe
    130                 135                 140

Ser Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
145                 150                 155                 160

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro
                165                 170                 175

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln
            180                 185                 190

Phe Ser Leu Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
        195                 200                 205
```

```
Tyr Cys Ala Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro
    210                 215                 220

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Gly Ser
225                 230                 235                 240

Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
                245                 250                 255

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
            260                 265                 270

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
        275                 280                 285

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
    290                 295                 300

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
305                 310                 315                 320

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
                325                 330                 335

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
            340                 345
```

<210> 286
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> BSAB A的第一多肽鏈

<400> 286

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

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

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

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Glu Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Glu Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335
```

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 287
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> BSAB A的第二多肽鏈

<400> 287

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

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

```
Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
    50                  55                  60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
                85                  90                  95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
        115                 120                 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
    130                 135                 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145                 150                 155                 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
                165                 170                 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
            180                 185                 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
        195                 200                 205
```

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 288
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> BSAB A的第三多肽鏈

<400> 288

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

```
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125

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

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
        195                 200                 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Arg
    210                 215                 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225                 230                 235                 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                245                 250                 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        275                 280                 285
```

```
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
            340                 345                 350

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

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

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

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

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

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

Gly
```

<210> 289
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> BSAB A的第四多肽鏈

<400> 289

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 290
<211> 496
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DART I的第一和第三多肽鏈

<400> 290

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 Ser Val
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 Tyr Arg Tyr 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 His Tyr Ser Thr Pro Trp
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
        115                 120                 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
    130                 135                 140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145                 150                 155                 160

Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp
                165                 170                 175

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
            180                 185                 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
        195                 200                 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp
    210                 215                 220
```

```
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly
225                 230                 235                 240

Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
                245                 250                 255

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Ser Lys Tyr
            260                 265                 270

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
        275                 280                 285

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr
    290                 295                 300

Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
305                 310                 315                 320

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
                325                 330                 335

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
            340                 345                 350

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
        355                 360                 365

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
    370                 375                 380

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
385                 390                 395                 400
```

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
405 410 415

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
420 425 430

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
450 455 460

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
465 470 475 480

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
485 490 495

<210> 291
<211> 271
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DART I的第二和第四多肽鏈

<400> 291

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

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

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Val
165 170 175

Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp
180 185 190

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe
210 215 220

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys
225 230 235 240

Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys
245 250 255

Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265 270

<210> 292
<211> 566
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DART J的第一和第三多肽鏈

<400> 292

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 Ser Val
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 Tyr Arg Tyr 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 His Tyr Ser Thr Pro Trp
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
        115                 120                 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
    130                 135                 140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145                 150                 155                 160

Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp
                165                 170                 175

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
            180                 185                 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
        195                 200                 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp
    210                 215                 220

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Gly Ser Gly
225                 230                 235                 240

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
                245                 250                 255
```

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
260 265 270

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
275 280 285

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
290 295 300

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
305 310 315 320

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
325 330 335

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
340 345 350

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
355 360 365

Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
370 375 380

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
385 390 395 400

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
405 410 415

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
420 425 430

```
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
        435                 440                 445

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
    450                 455                 460

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
465                 470                 475                 480

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
                485                 490                 495

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
            500                 505                 510

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
        515                 520                 525

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
    530                 535                 540

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
545                 550                 555                 560

Leu Ser Leu Ser Leu Gly
                565
```

<210> 293
<211> 350
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DART J 的第二和第四多肽鏈

<400> 293

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

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

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Val
165 170 175

```
Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp
            180                 185                 190

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp
        195                 200                 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe
    210                 215                 220

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly
225                 230                 235                 240

Gly Ser Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
                245                 250                 255

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
            260                 265                 270

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
        275                 280                 285

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
    290                 295                 300

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
305                 310                 315                 320

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
                325                 330                 335

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
            340                 345                 350
```

<210> 294
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hLAG-3 mAb 6 VH1 的 VH 結構域

<400> 294

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

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

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Val Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Glu 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 Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 295
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hLAG-3 mAb 6 VH2 的 VH 結構域

<400> 295

Glu Val Gln Leu Val 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 Asp Tyr
20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 296
<211> 107

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hLAG-3 mAb 6 VL1 的 VL 結構域

<400> 296

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 Ser Val
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 Tyr Arg Tyr 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 His Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 297
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hLAG-3 mAb 6 VL2 的 VL 結構域

<400> 297

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

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

Glu Asp Ile Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 298
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hLAG-3 mAb 6 VL1 和 VL2 的 VL 結構域的 CDRL1

<400> 298

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Val Val Ala
1 5 10

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種包括抗人PD-1結合單特異性單克隆抗體和有效刺激免疫應答的一種或多種另外的分子的組合，其中該抗人PD-1結合單特異性單克隆抗體包括可變重鏈結構域和可變輕鏈結構域，其中：

該可變重鏈結構域包括氨基酸序列SEQ ID NO:147，和該可變輕鏈結構域包括氨基酸序列SEQ ID NO:153，其中該組合用於刺激需要其的受試者的T-細胞介導的免疫應答。

【請求項2】一種包括抗人PD-1結合單特異性單克隆抗體和特異性結合癌症抗原的一種或多種另外的分子和/或化療劑的組合，其中該抗人PD-1結合單特異性單克隆抗體包括可變重鏈結構域和可變輕鏈結構域，其中：

該可變重鏈結構域包括氨基酸序列SEQ ID NO:147，和該可變輕鏈結構域包括氨基酸序列SEQ ID NO:153，其中該組合用於治療癌症。

【請求項3】如請求項1或2所述的組合，其中該抗人PD-1結合單特異性單克隆抗體是嵌合抗體或人源化抗體。

【請求項4】如請求項1或2所述的組合，其中該抗人PD-1結合單特異性單克隆抗體包括Fc區域。

【請求項5】如請求項4所述的組合，其中該Fc區域具有IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同種型。

【請求項6】如請求項5所述的組合，其中該抗人PD-1結合單特異性單克隆抗體進一步包括鉸鏈結構域。

【請求項7】如請求項6所述的組合，其中該Fc區域和該鉸鏈結構域具有IgG4同種型，並且其中該鉸鏈結構域包括穩定化突變。

【請求項8】如請求項4所述的組合，其中該抗人PD-1結合單特異性單克隆抗體包括SEQ ID NO: 264和 265。

【請求項9】如請求項4所述的組合，其中該抗人PD-1結合單特異性單克隆抗體包括SEQ ID NO: 264和266。

【請求項10】如請求項4所述的組合，其中該Fc區域是變異的Fc區域，其包括：

(a)降低該變異的Fc區域對FcγR的親和力的一個或多個氨基酸修飾；和/或

(b)延長該變異的Fc區域的血清半衰期的一個或多個氨基酸修飾。

【請求項11】如請求項10所述的組合，其中降低該變異的Fc區域對FcγR的親和力的一個或多個氨基酸修飾包括下述取代：L234A；L235A；或L234A和L235A，其中編號是如Kabat中EU索引的編號。

【請求項12】如請求項10所述的組合，其中延長該變異的Fc區域的血清半衰期的一個或多個氨基酸修飾包括下述取代：M252Y；M252Y和S254T；M252Y和T256E；M252Y、S254T和T256E；或K288D和H435K，其中編號是如Kabat中EU索引的編號。

【請求項13】如請求項1所述的組合，其中該有效刺激免疫應答的一種或多種另外的分子是抗CD137抗體、抗CTLA-4抗體、抗OX40抗體、抗LAG-3抗體、抗PD-L1抗體、抗TIGIT抗體、抗TIM-3抗體和/或癌症疫苗。

【請求項14】如請求項2所述的組合，其中該癌症抗原是5T4、B7H3、CD19、CD20、CD51、CD123、DR5、EGFR、EpCam、GD2、gpA33、HER2、ROR-1、TAG-72、VEGF-A和/或VEGFR2。

【請求項15】如請求項2或14述的組合，其中該癌症特徵在於存在選自由下述的細胞組成的組的癌症細胞：腎上腺腫瘤、AIDS相關的癌症、軟組織腺泡狀肉瘤、星形細胞瘤、膀胱癌、骨癌、腦和脊髓癌、轉移性腦瘤、乳腺癌、頸動脈體瘤、宮頸癌、軟骨肉瘤、脊索瘤、嫌色細胞腎細胞癌、透明細胞癌、結腸癌、結直腸癌、皮膚良性纖維組織細胞瘤、促結締組織增生小圓細胞瘤、室管膜細胞瘤、尤文氏瘤、骨外黏液樣軟骨肉瘤、不完全性骨纖維生成、骨的纖維發育異常、膽囊癌或膽管癌、胃癌、妊娠滋養層疾病、生殖細胞瘤、頭頸癌、肝細胞癌、胰島細胞腫瘤、卡波西氏肉瘤、腎癌、白血病、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/惡性脂肪瘤、肝癌、淋巴瘤、肺癌、成神經管細胞瘤、黑素瘤、腦膜瘤、多發性內分泌瘤、多發性骨髓瘤、骨髓增生異常綜合症、成神經細胞瘤、神經內分泌腫瘤、卵巢癌、胰腺癌、甲狀腺乳頭狀癌、甲狀旁腺瘤、兒科癌症、周圍神經鞘瘤、嗜鉻細胞瘤、垂體腫瘤、前列腺癌、眼色素層後黑素瘤、罕見血液學疾病、腎轉移性癌症、橫紋肌樣瘤、橫紋肌肉瘤、肉瘤、皮膚癌、軟組織肉瘤、鱗狀細胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲狀腺轉移性癌症和子宮癌。

【請求項16】如請求項2或14所述的組合，其中該癌症是結直腸癌；肝細胞癌；神經膠質瘤；腎癌；乳腺癌；多發性骨髓瘤；膀胱癌；成神經細胞瘤；肉瘤；非霍奇金淋巴瘤；非小細胞肺癌；卵巢癌；胰腺癌；直腸癌；急性髓細胞樣白血病(AML)；慢性骨髓性白血病(CML)；急性B成淋巴細胞白血病(B-ALL)；慢性淋巴細胞性白血病(CLL)；毛細胞白血病(HCL)；急性漿細胞樣樹突細胞腫瘤(BPDCN)；非霍奇金淋巴瘤(NHL)，包括套細胞白血病(MCL)和小淋巴細胞淋巴瘤(SLL)；霍奇金淋巴瘤；系統性肥大細胞增多症或伯基特淋巴瘤。

【請求項17】如請求項2或14所述的組合，其中該癌症是子宮癌。

【請求項18】如請求項2或14所述的組合，其中該癌症是鱗狀細胞癌。

【請求項19】如請求項2或14所述的組合，其中該癌症是神經膠質瘤。

【請求項20】如請求項2或14所述的組合，其中該癌症是宮頸癌。

【請求項21】如請求項2或14所述的組合，其中該癌症是腎癌。

【請求項22】如請求項2或14所述的組合，其中該癌症是肺癌。

【請求項23】如請求項2或14所述的組合，其中該癌症是非小細胞肺癌。

【請求項24】如請求項2或14所述的組合，其中該癌症是頭頸癌。

【請求項25】如請求項2或14所述的組合，其中該癌症是腎轉移性癌症。

【請求項26】如請求項2或14所述的組合，其中該癌症是嫌色細胞腎細胞癌。

【請求項27】如請求項2或14所述的組合，其中該癌症是皮膚癌。

【發明圖式】

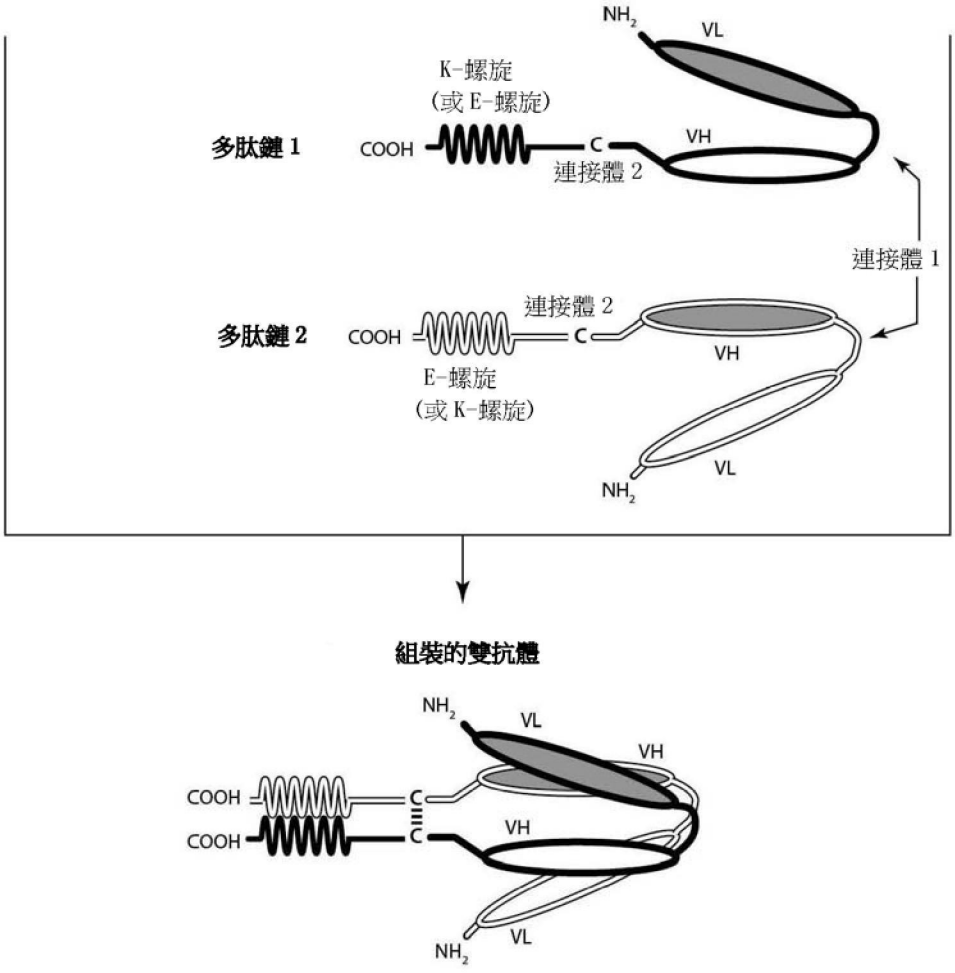
NH2
VL
K-螺旋
(或 E-螺旋)
多肽鏈 1
COOH
C
VH
連接體 2
連接體 1
多肽鏈 2
COOH
C
連接體 2
VH
E-螺旋
(或 K-螺旋)
VL
NH2
組裝的雙抗體
NH2
VL
VH
COOH
C
COOH
C
VH
VL
NH2

圖 1

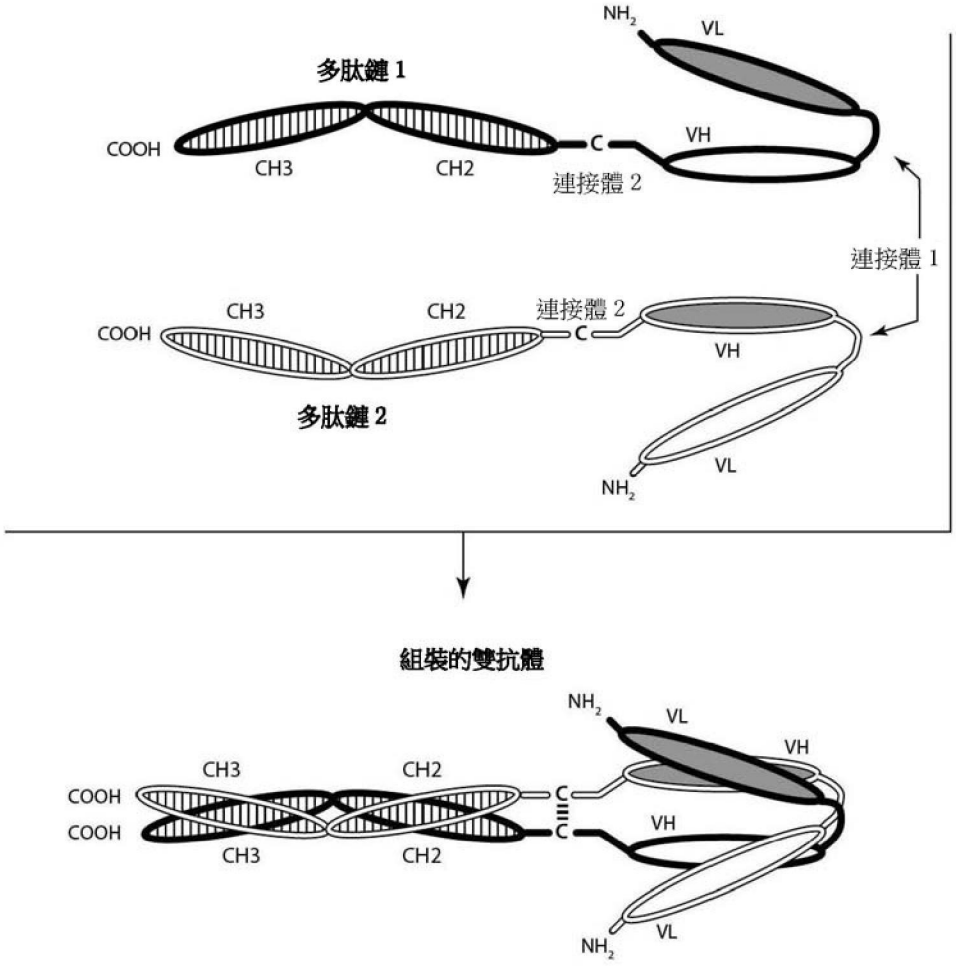
NH2
VL
多肽鏈 1
COOH
CH3
CH2
C
VH
連接體 2
連接體 1
CH3
CH2
連接體 2
COOH
C
VH
多肽鏈 2
VL
NH2
組裝的雙抗體
NH2
VL
VH
CH3
CH2
COOH
C
COOH
C
VH
CH3
CH2
VL
NH2

圖 2

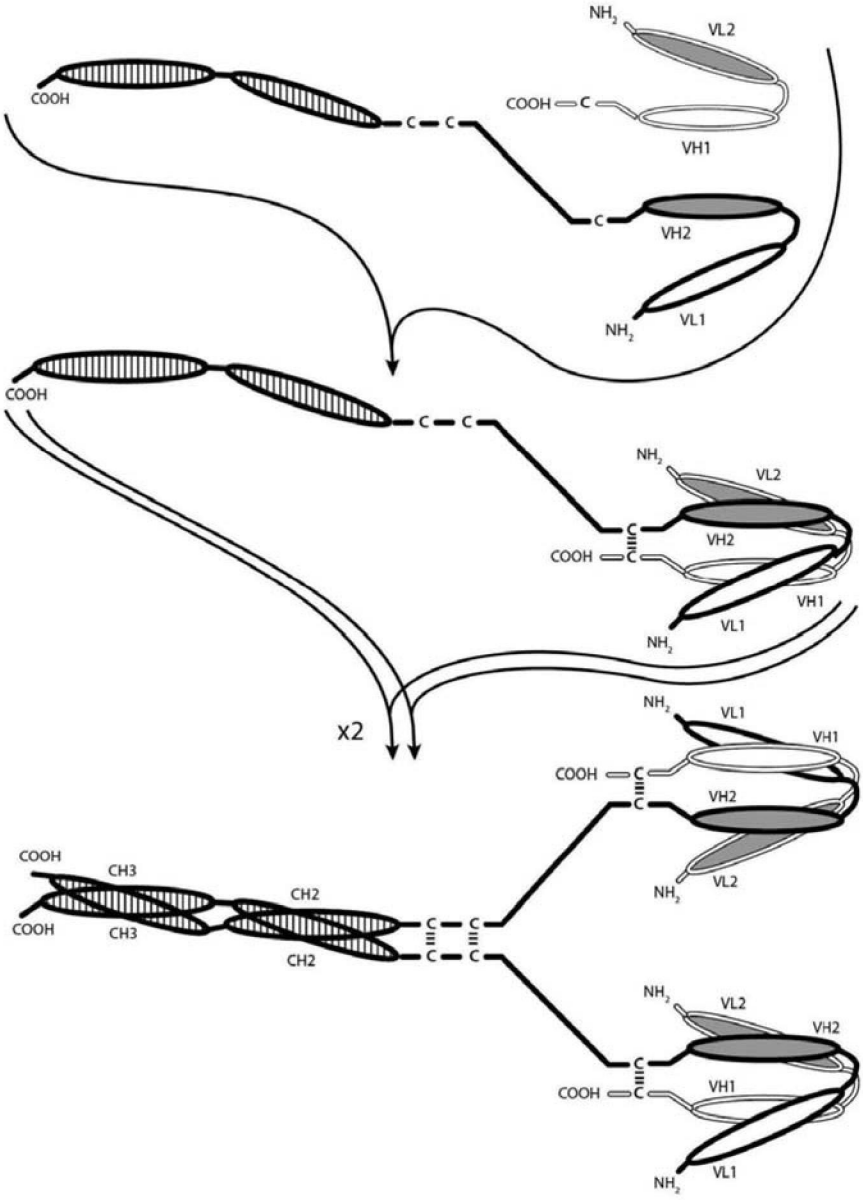
NH2
VL2
COOH
C
C
COOH
C
VH1
C
VH2
NH2
VL1
COOH
C
C
NH2
VL2
C
C
VH2
COOH
C
C
VH1
VL1
NH2
x2
NH2
VL1
VH1
COOH
C
C
VH2
C
C
NH2
VL2
COOH
CH3
CH2
C
C
COOH
CH3
C
C
CH2
NH2
VL2
VH2
C
C
COOH
VH1
C
C
NH2
VL1

圖 3A

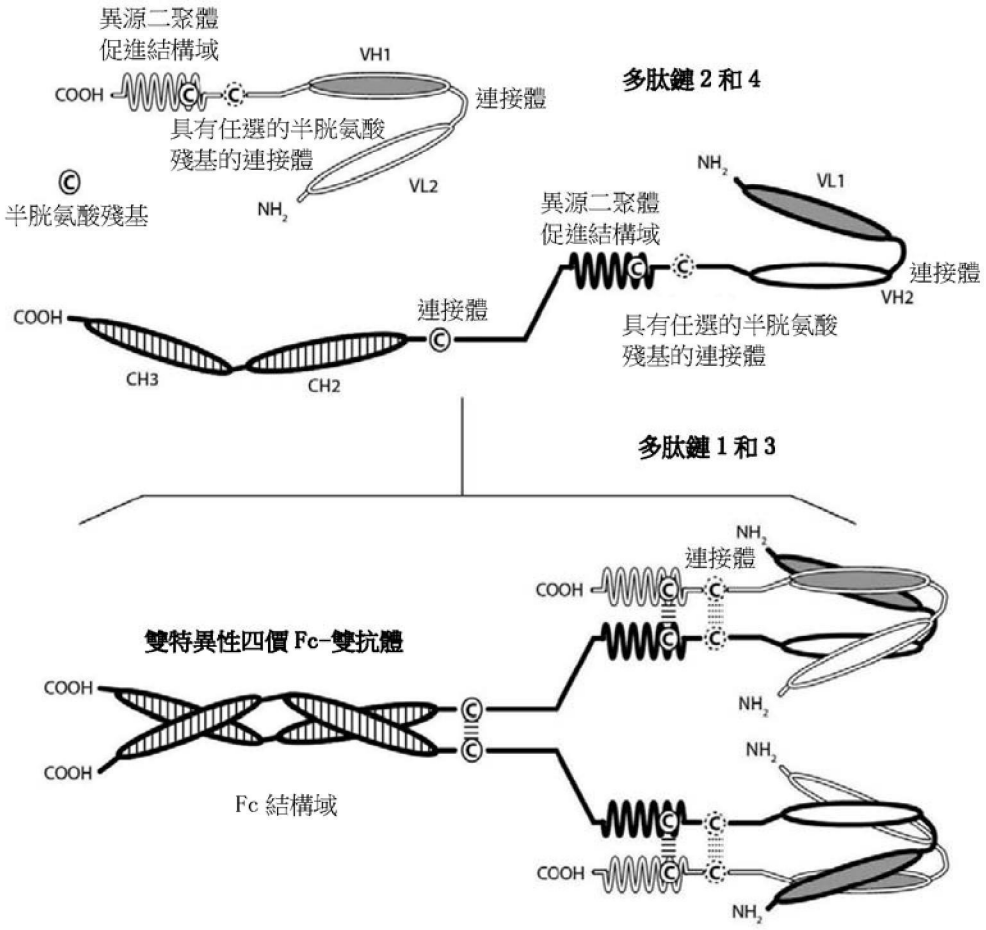
異源二聚體
促進結構域
VH1
COOH
連接體
具有任選的半胱氨酸
殘基的連接體
VL2
NH2
半胱氨酸殘基
多肽鏈 2 和 4
NH2
VL1
異源二聚體
促進結構域
連接體
VH2
具有任選的半胱氨酸
殘基的連接體
COOH
連接體
CH3
CH2
多肽鏈 1 和 3
NH2
連接體
COOH
雙特異性四價 Fc–雙抗體
COOH
COOH
Fc 結構域
NH2
COOH
NH2

圖 3B

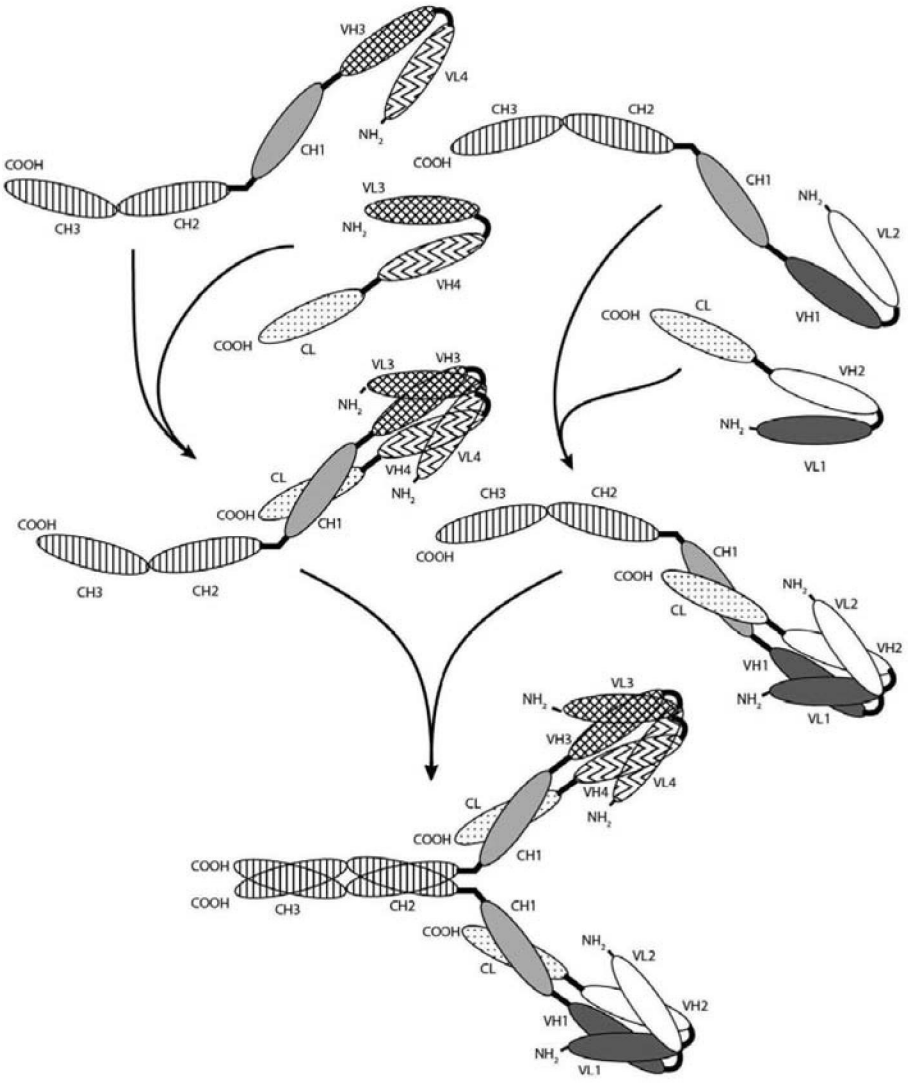
VH3
VL4
NH2
CH1
COOH
CH3
CH2
VL3
NH2
VH4
COOH
CL
CH3
CH2
COOH
CH1
NH2
VL2
VH1
COOH
CL
VH2
NH2
VL1
VL3
VH3
NH2
VH4
VL4
CL
COOH
CH1
NH2
COOH
CH3
CH2
CH3
CH2
COOH
CH1
COOH
NH2
VL2
CL
VH2
VH1
NH2
VL1
VL3
NH2
VH3
VH4
VL4
CL
COOH
CH1
COOH
COOH
CH3
CH2
CH1
COOH
NH2
VL2
CL
VH2
VH1
NH2
VL1

圖 3C

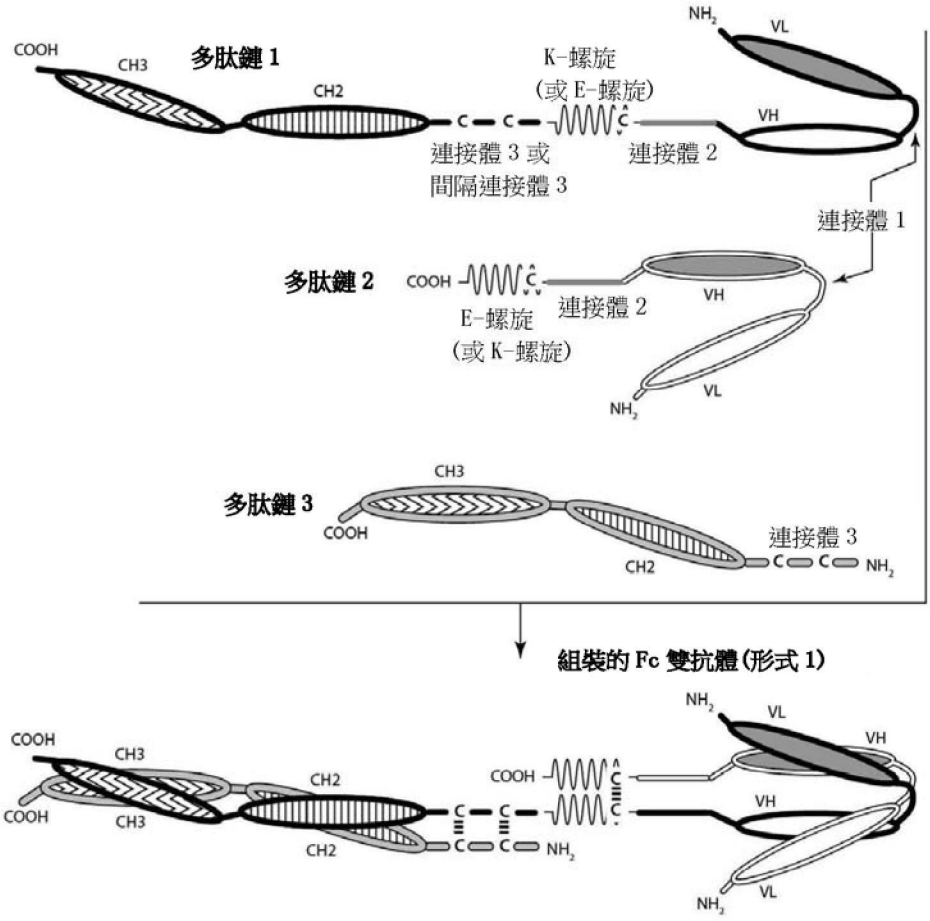
多肽鏈 1
COOH
CH3
CH2
K-螺旋
(或 E-螺旋)
連接體 3 或
間隔連接體 3
連接體 2
NH2
VL
VH
連接體 1
多肽鏈 2
COOH
E-螺旋
(或 K-螺旋)
連接體 2
VH
VL
NH2
多肽鏈 3
CH3
COOH
CH2
連接體 3
NH2
組裝的 Fc 雙抗體(形式 1)
COOH
CH3
CH2
CH3
CH2
NH2
COOH
NH2
VL
VH
VH
VL

圖 4A

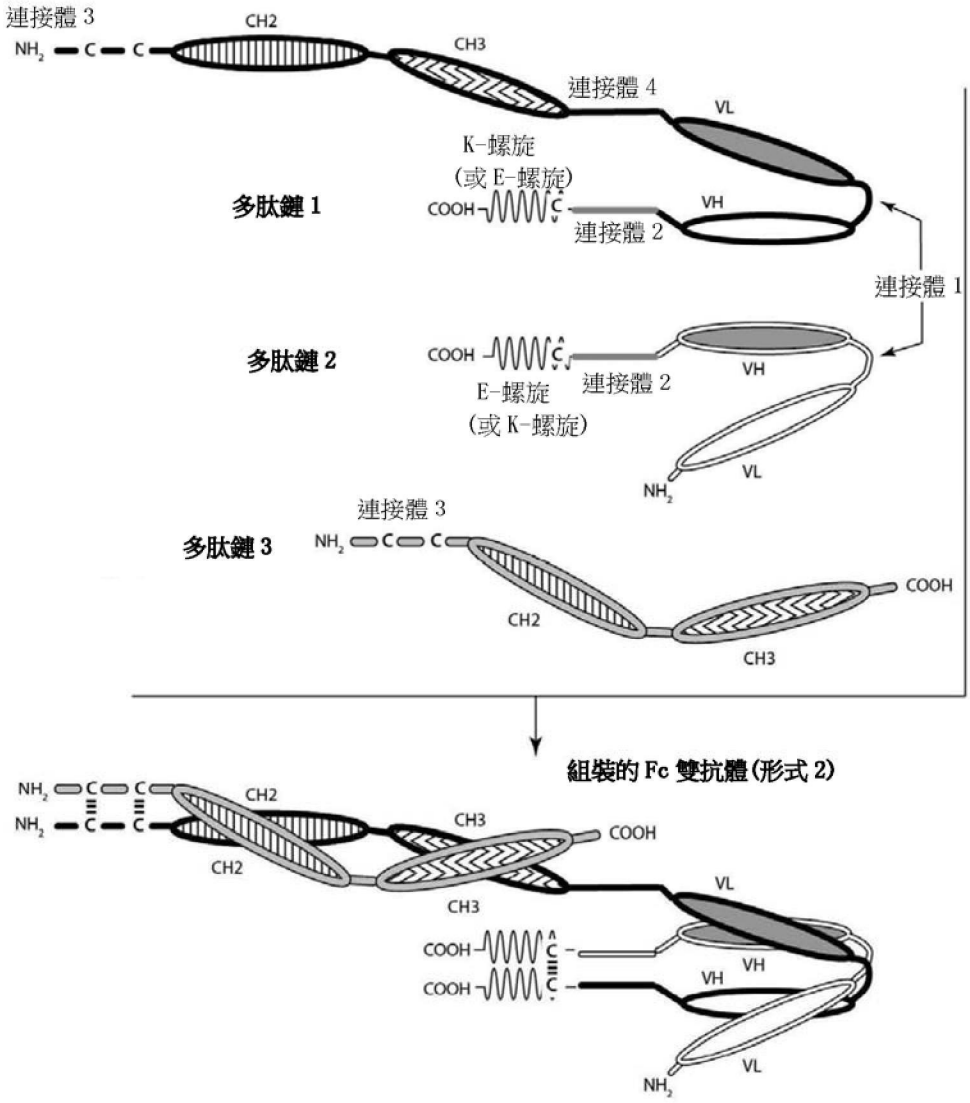
連接體 3
CH2
CH3
連接體 4
VL
K-螺旋
(或 E-螺旋)
多肽鏈 1
COOH
VH
連接體 2
連接體 1
多肽鏈 2
COOH
VH
連接體 2
E-螺旋
(或 K-螺旋)
VL
連接體 3
多肽鏈 3
CH2
COOH
CH3
組裝的 Fc 雙抗體(形式 2)
CH2
CH3
COOH
CH2
CH3
VL
COOH
VH
COOH
VH
VL

圖 4B

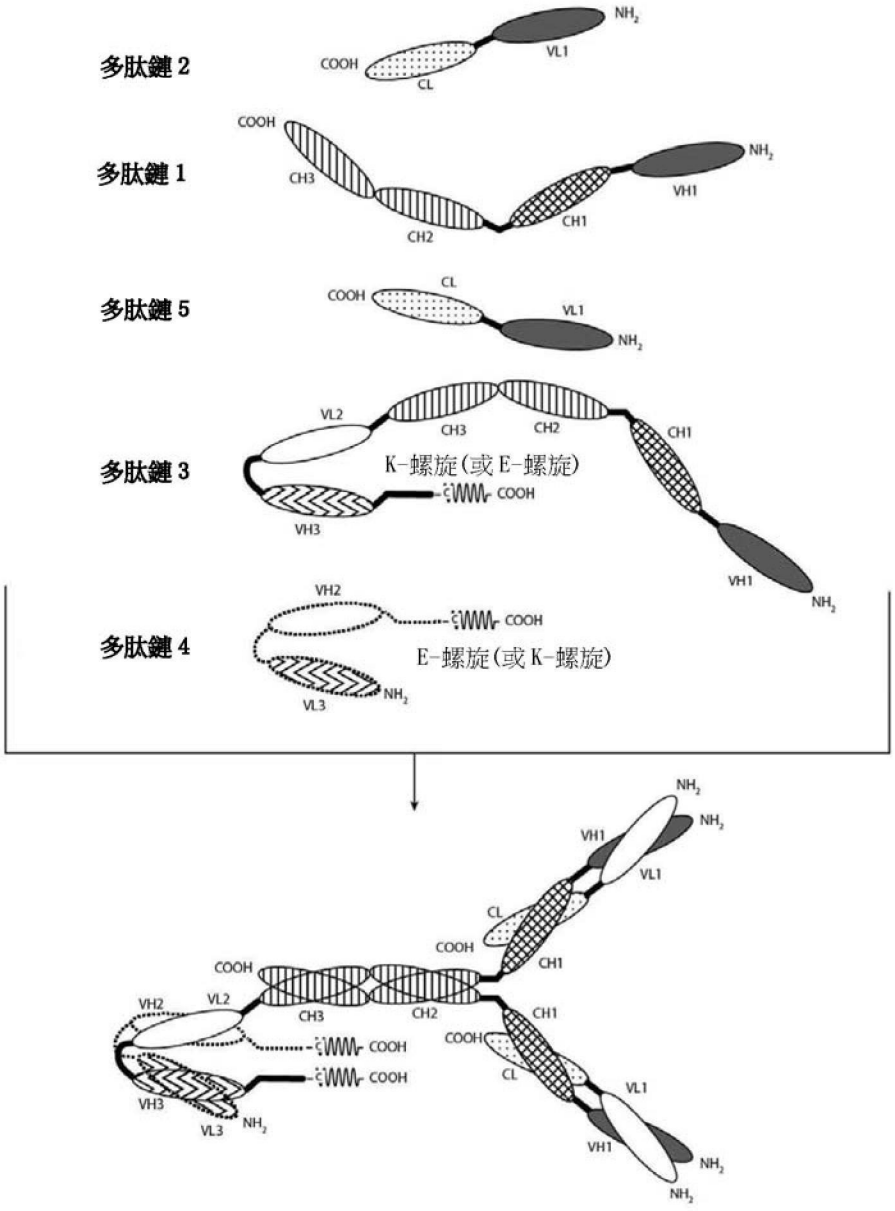
多肽鏈 2
NH2
VL1
COOH
CL
多肽鏈 1
COOH
CH3
NH2
VH1
CH2
CH1
多肽鏈 5
CL
COOH
VL1
NH2
多肽鏈 3
VL2
CH3
CH2
CH1
K-螺旋(或 E-螺旋)
COOH
VH3
VH1
NH2
多肽鏈 4
VH2
COOH
E-螺旋(或 K-螺旋)
VL3
NH2
NH2
VH1
NH2
VL1
CL
COOH
CH1
COOH
VH2
VL2
CH3
CH2
CH1
COOH
COOH
CL
VH3
VL3
NH2
VL1
VH1
NH2
NH2

圖 5

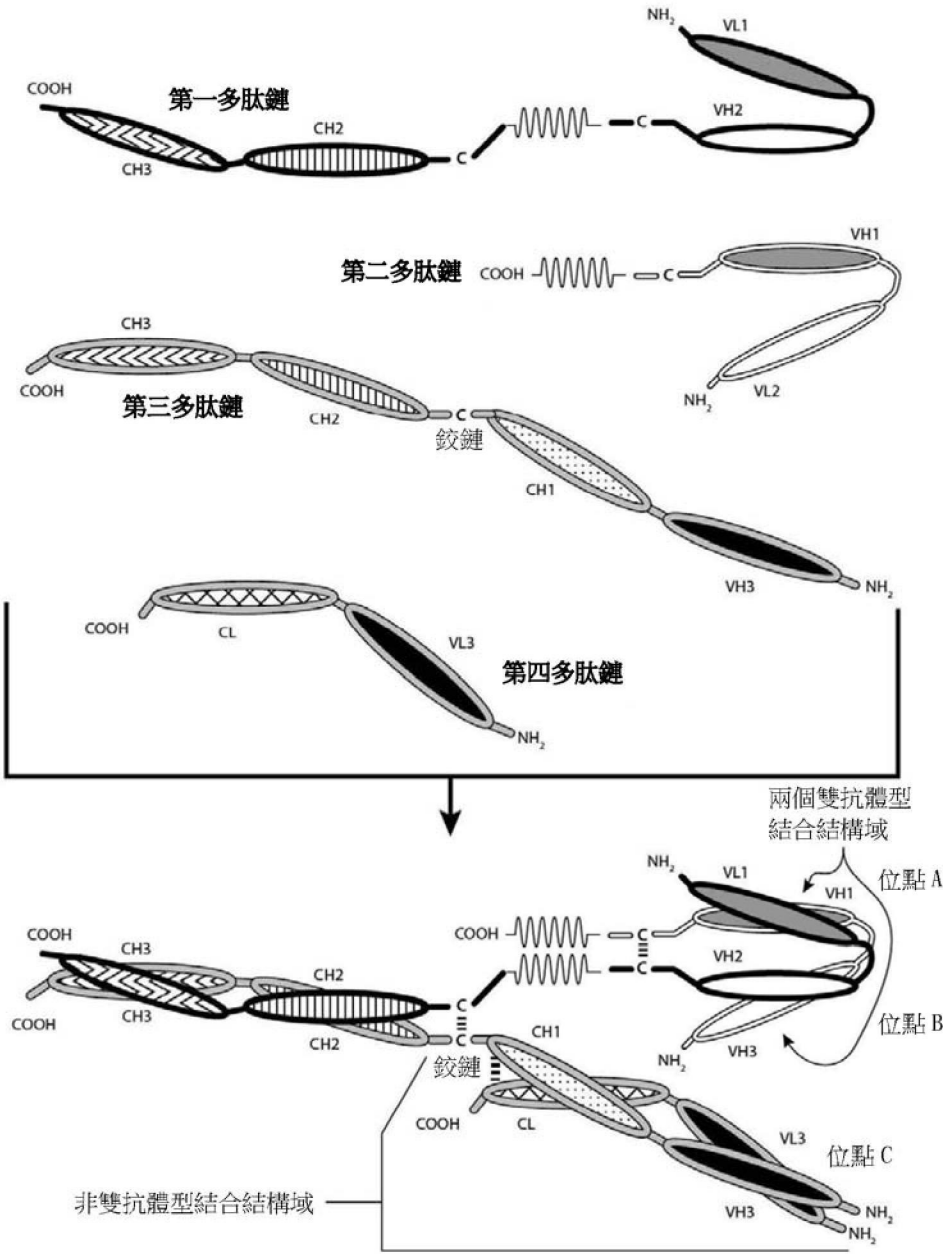
第一多肽鏈
第二多肽鏈
第三多肽鏈
第四多肽鏈
鉸鏈
兩個雙抗體型
結合結構域
位點 A
位點 B
位點 C
非雙抗體型結合結構域
COOH
NH2
VL1
VH1
VH2
VL2
CH1
CH2
CH3
CL
VL3
VH3

圖 6A

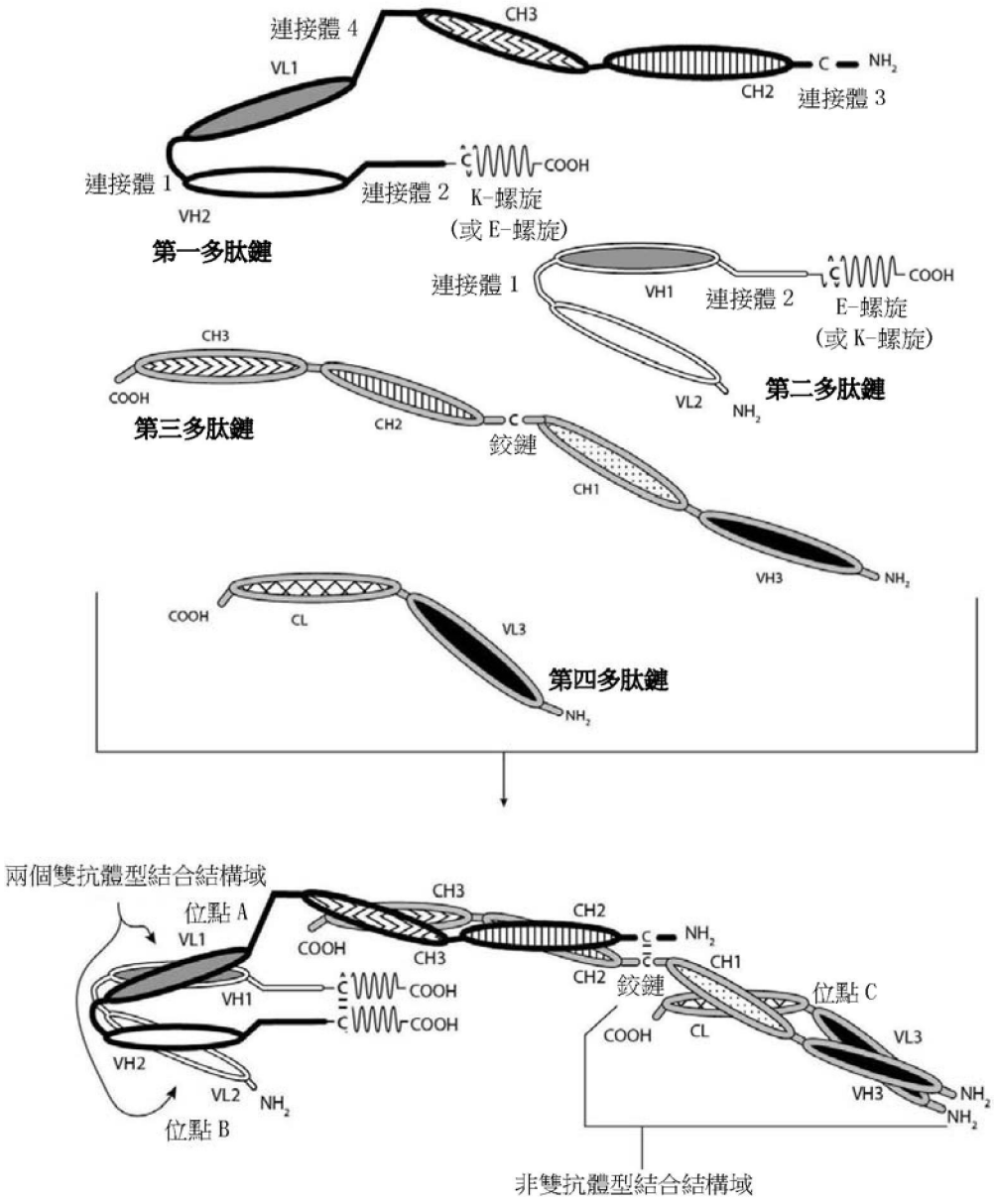
連接體 4
CH3
VL1
CH2
連接體 3
連接體 1
連接體 2
K-螺旋
(或 E-螺旋)
VH2
第一多肽鏈
連接體 1
VH1
連接體 2
E-螺旋
(或 K-螺旋)
第二多肽鏈
VL2
CH3
COOH
第三多肽鏈
CH2
鉸鏈
CH1
VH3
COOH
CL
VL3
第四多肽鏈
兩個雙抗體型結合結構域
位點 A
VL1
CH3
CH2
CH3
CH2
鉸鏈
CH1
位點 C
VH1
VH2
VL2
位點 B
CL
VL3
VH3
非雙抗體型結合結構域

圖 6B

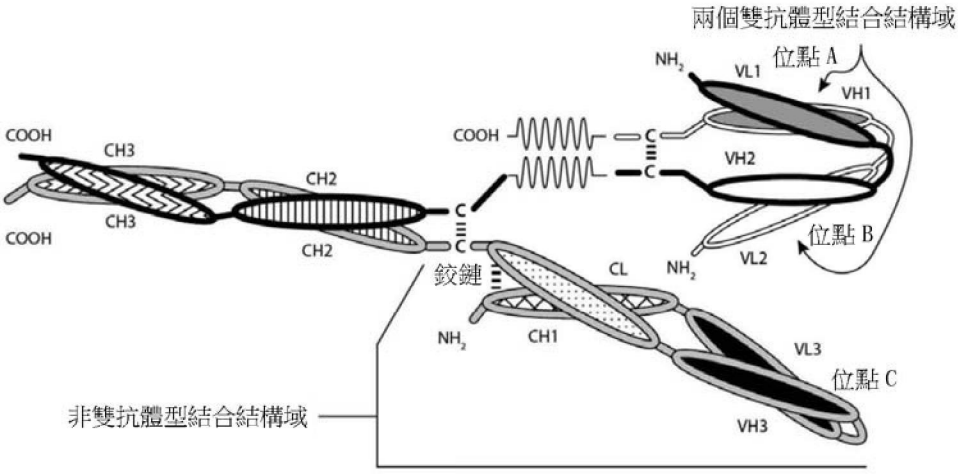
兩個雙抗體型結合結構域
位點 A
位點 B
位點 C
VL1
VH1
VH2
VL2
VL3
VH3
CL
CH1
CH2
CH3
COOH
NH2
鉸鏈
非雙抗體型結合結構域

圖 6C

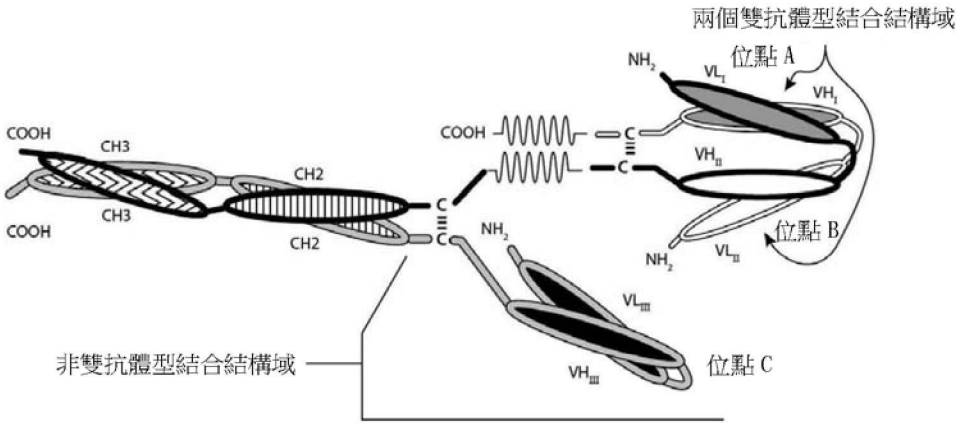
兩個雙抗體型結合結構域
位點 A
位點 B
位點 C
VL1
VH1
VH2
VL2
VL3
VH3
CH2
CH3
COOH
NH2
非雙抗體型結合結構域

圖 6D

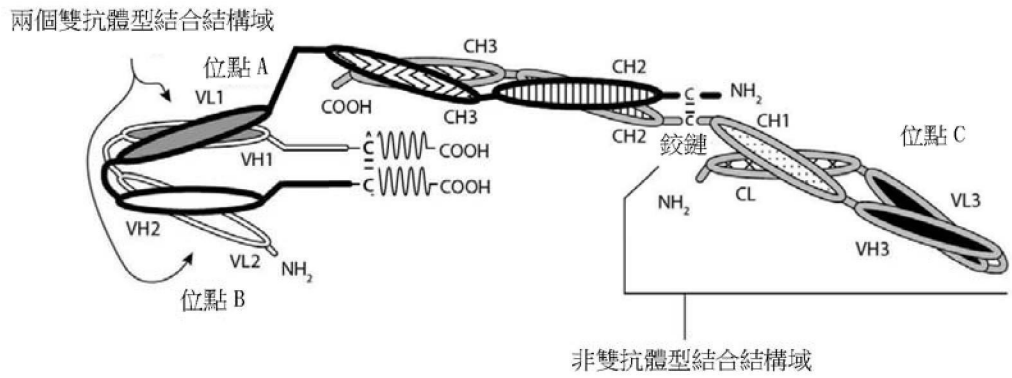
兩個雙抗體型結合結構域
位點 A
VL1
CH3
COOH
CH3
CH2
NH2
CH2
CH1
鉸鏈
位點 C
VH1
COOH
COOH
CL
NH2
VL3
VH2
VH3
VL2
NH2
位點 B
非雙抗體型結合結構域

圖 6E

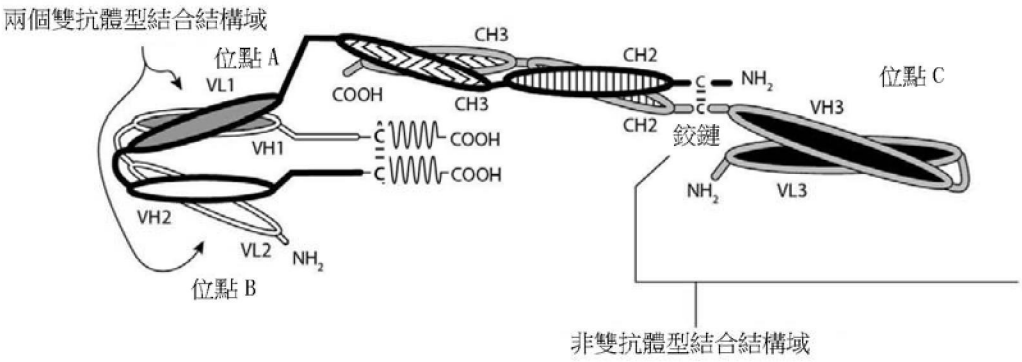
兩個雙抗體型結合結構域
位點 A
VL1
CH3
COOH
CH3
CH2
NH2
位點 C
CH2
鉸鏈
VH3
VH1
COOH
COOH
NH2
VL3
VH2
VL2
NH2
位點 B
非雙抗體型結合結構域

圖 6F

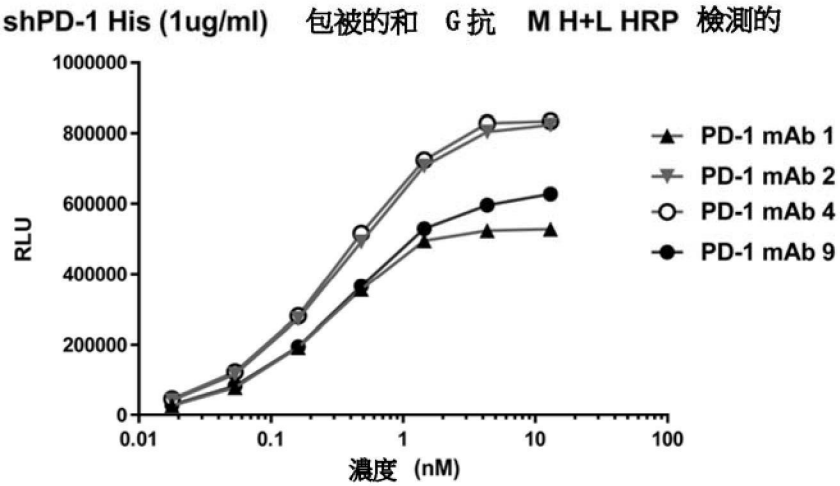
shPD-1 His (1ug/ml) 包被的和 G抗 M H+L HRP 檢測的
1000000
800000
600000
400000
200000
0
RLU
0.01
0.1
1
10
100
濃度 (nM)
PD-1 mAb 1
PD-1 mAb 2
PD-1 mAb 4
PD-1 mAb 9

圖 7A

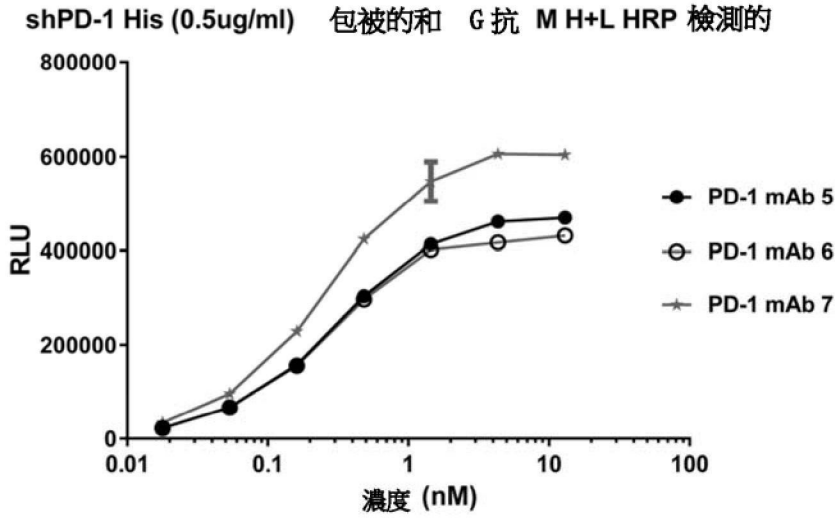
shPD-1 His (0.5ug/ml) 包被的和 G抗 M H+L HRP 檢測的
800000
600000
400000
200000
0
RLU
0.01
0.1
1
10
100
濃度 (nM)
PD-1 mAb 5
PD-1 mAb 6
PD-1 mAb 7

圖 7B

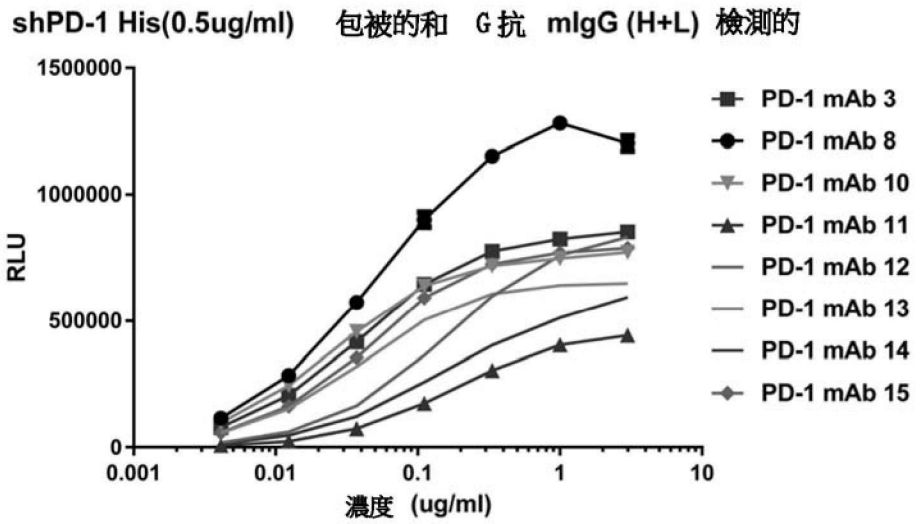
shPD-1 His(0.5ug/ml) 包被的和 G抗 mIgG (H+L) 檢測的
RLU
1500000
1000000
500000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
濃度 (ug/ml)
PD-1 mAb 3
PD-1 mAb 8
PD-1 mAb 10
PD-1 mAb 11
PD-1 mAb 12
PD-1 mAb 13
PD-1 mAb 14
PD-1 mAb 15

圖 7C

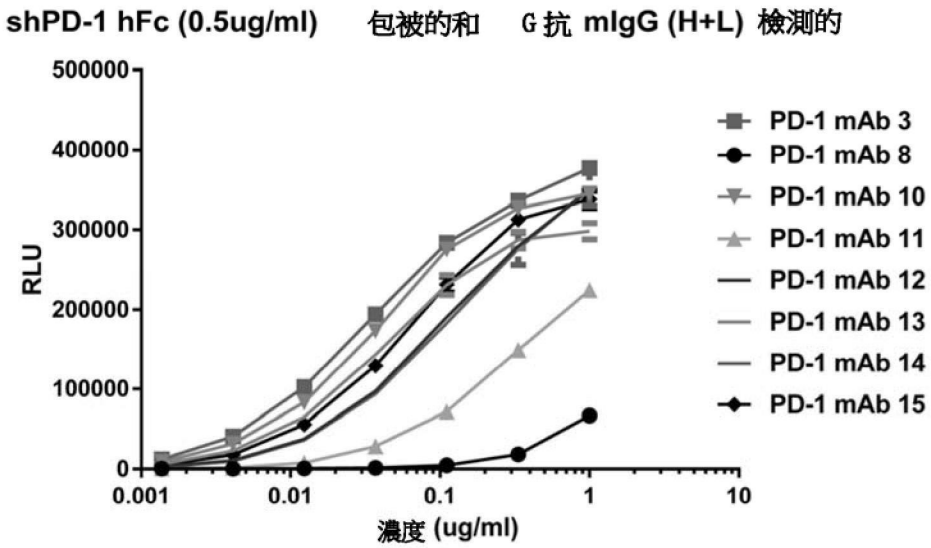
shPD-1 hFc (0.5ug/ml) 包被的和 G抗 mIgG (H+L) 檢測的
RLU
500000
400000
300000
200000
100000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
濃度 (ug/ml)
PD-1 mAb 3
PD-1 mAb 8
PD-1 mAb 10
PD-1 mAb 11
PD-1 mAb 12
PD-1 mAb 13
PD-1 mAb 14
PD-1 mAb 15

圖 7D

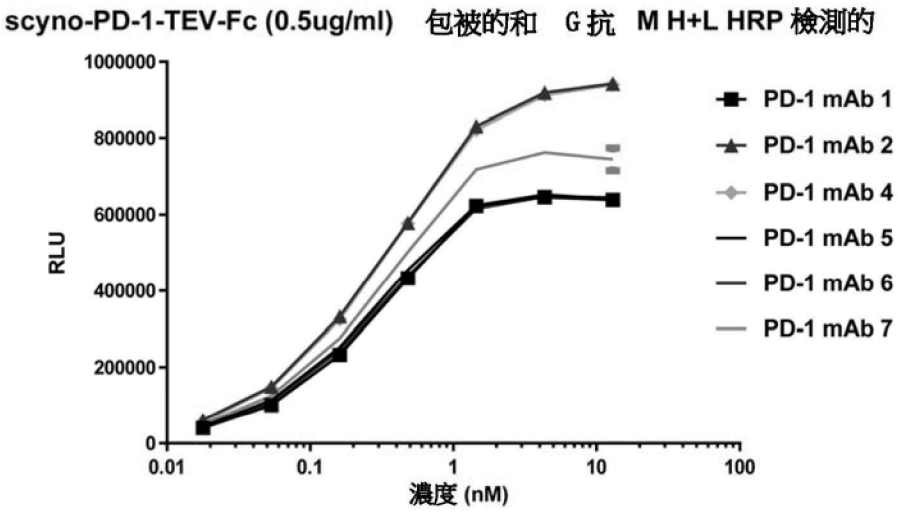
scyno-PD-1-TEV-Fc (0.5ug/ml) 包被的和 G抗 M H+L HRP 檢測的
RLU
1000000
800000
600000
400000
200000
0
0.01
0.1
1
10
100
濃度 (nM)
PD-1 mAb 1
PD-1 mAb 2
PD-1 mAb 4
PD-1 mAb 5
PD-1 mAb 6
PD-1 mAb 7

圖 8A

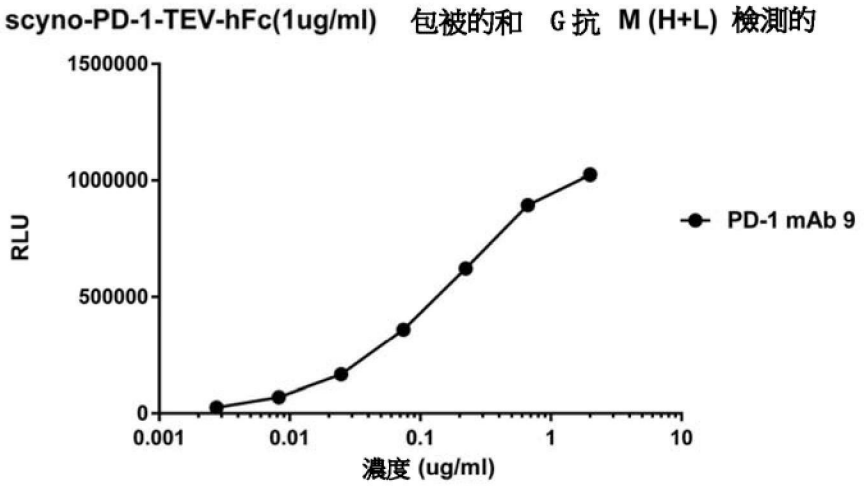
scyno-PD-1-TEV-hFc(1ug/ml) 包被的和 G抗 M (H+L) 檢測的
RLU
1500000
1000000
500000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
濃度 (ug/ml)
PD-1 mAb 9

圖 8B

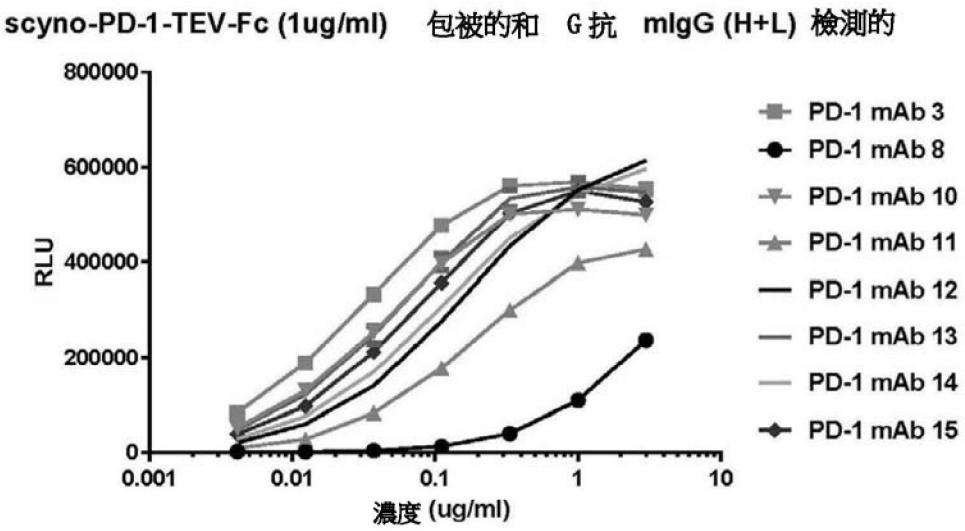
scyno-PD-1-TEV-Fc (1ug/ml) 包被的和 G 抗 mIgG (H+L) 檢測的
800000
600000
400000
200000
0
RLU
0.001
0.01
0.1
1
10
濃度 (ug/ml)
PD-1 mAb 3
PD-1 mAb 8
PD-1 mAb 10
PD-1 mAb 11
PD-1 mAb 12
PD-1 mAb 13
PD-1 mAb 14
PD-1 mAb 15

圖 8C

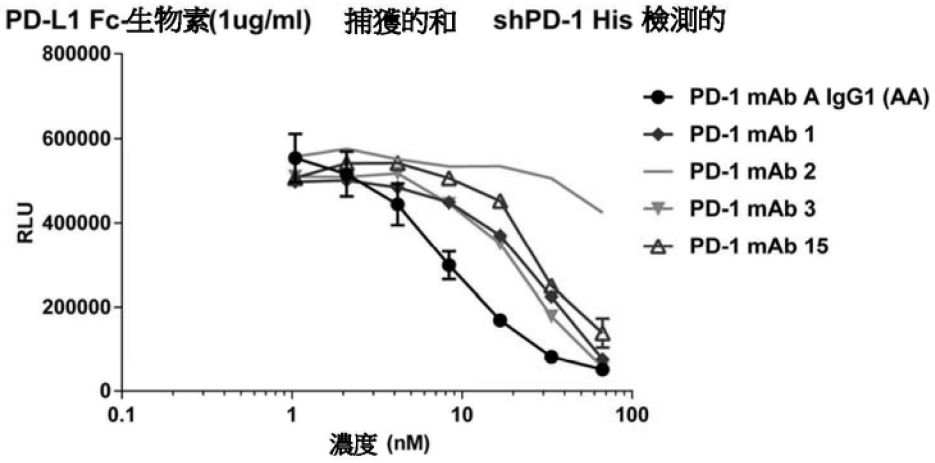
PD-L1 Fc-生物素(1ug/ml) 捕獲的和 shPD-1 His 檢測的
800000
600000
400000
200000
0
RLU
0.1
1
10
100
濃度 (nM)
PD-1 mAb A IgG1 (AA)
PD-1 mAb 1
PD-1 mAb 2
PD-1 mAb 3
PD-1 mAb 15

圖 9A

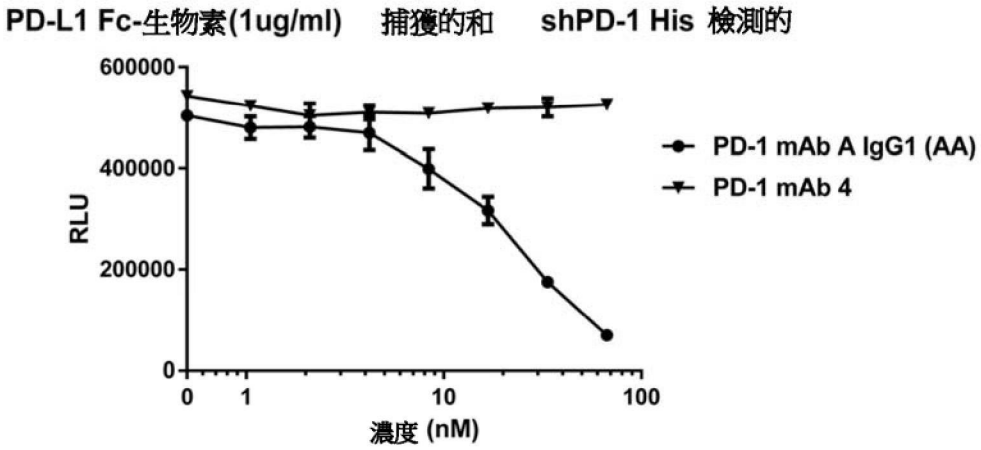
PD-L1 Fc-生物素(1ug/ml) 捕獲的和 shPD-1 His 檢測的
600000
400000
200000
0
RLU
0
1
10
100
濃度 (nM)
PD-1 mAb A IgG1 (AA)
PD-1 mAb 4

圖 9B

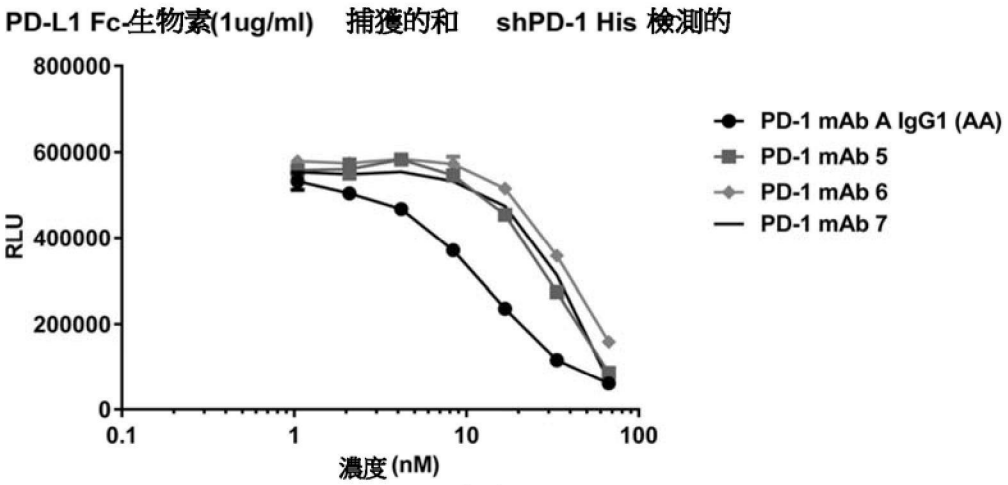
PD-L1 Fc-生物素(1ug/ml) 捕獲的和 shPD-1 His 檢測的
800000
600000
400000
200000
0
RLU
0.1
1
10
100
濃度 (nM)
PD-1 mAb A IgG1 (AA)
PD-1 mAb 5
PD-1 mAb 6
PD-1 mAb 7

圖 9C

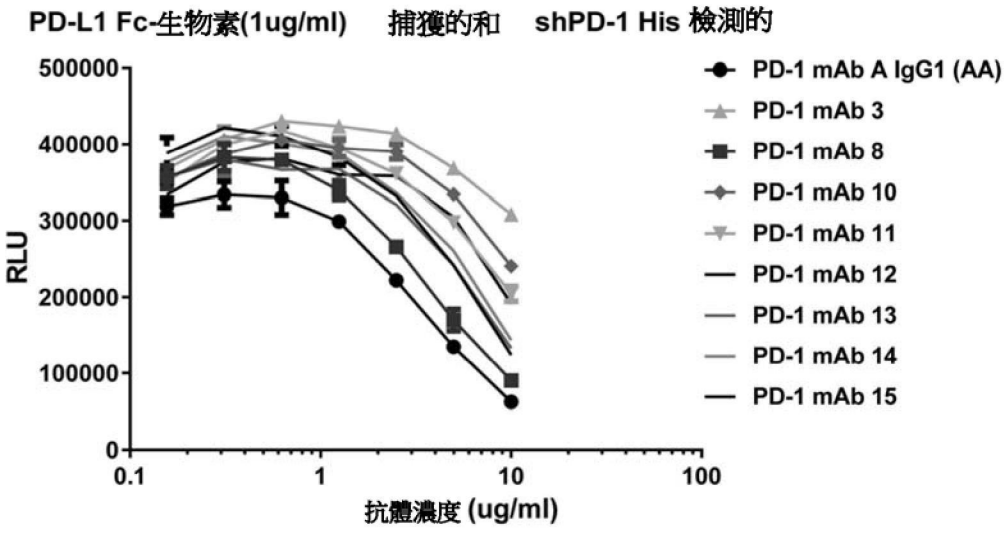
PD-L1 Fc-生物素(1ug/ml) 捕獲的和 shPD-1 His 檢測的
500000
400000
300000
200000
100000
0
RLU
0.1
1
10
100
抗體濃度 (ug/ml)
PD-1 mAb A IgG1 (AA)
PD-1 mAb 3
PD-1 mAb 8
PD-1 mAb 10
PD-1 mAb 11
PD-1 mAb 12
PD-1 mAb 13
PD-1 mAb 14
PD-1 mAb 15

圖 9D

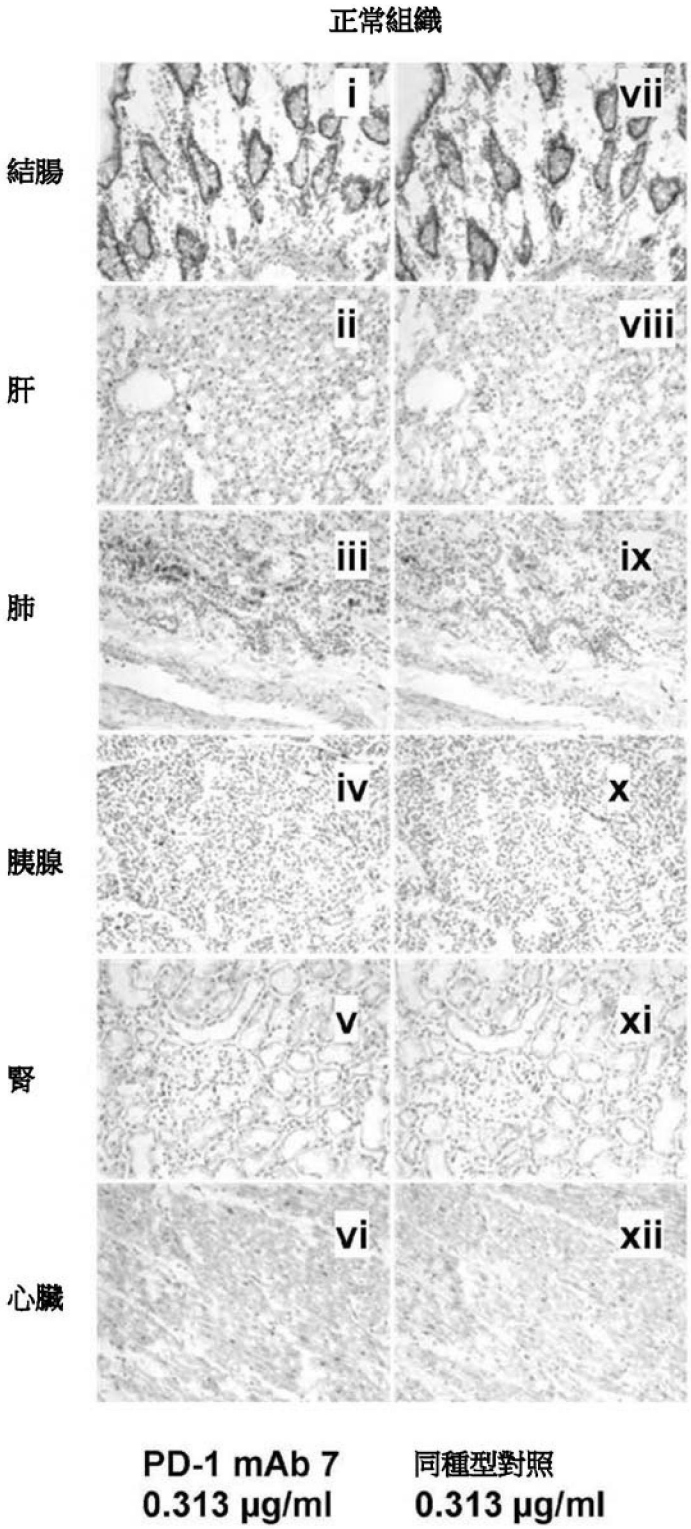
正常組織
結腸
肝
肺
胰腺
腎
心臟
i
vii
ii
viii
iii
ix
iv
x
v
xi
vi
xii
PD-1 mAb 7
0.313 μg/ml
同種型對照
0.313 μg/ml

圖 10A

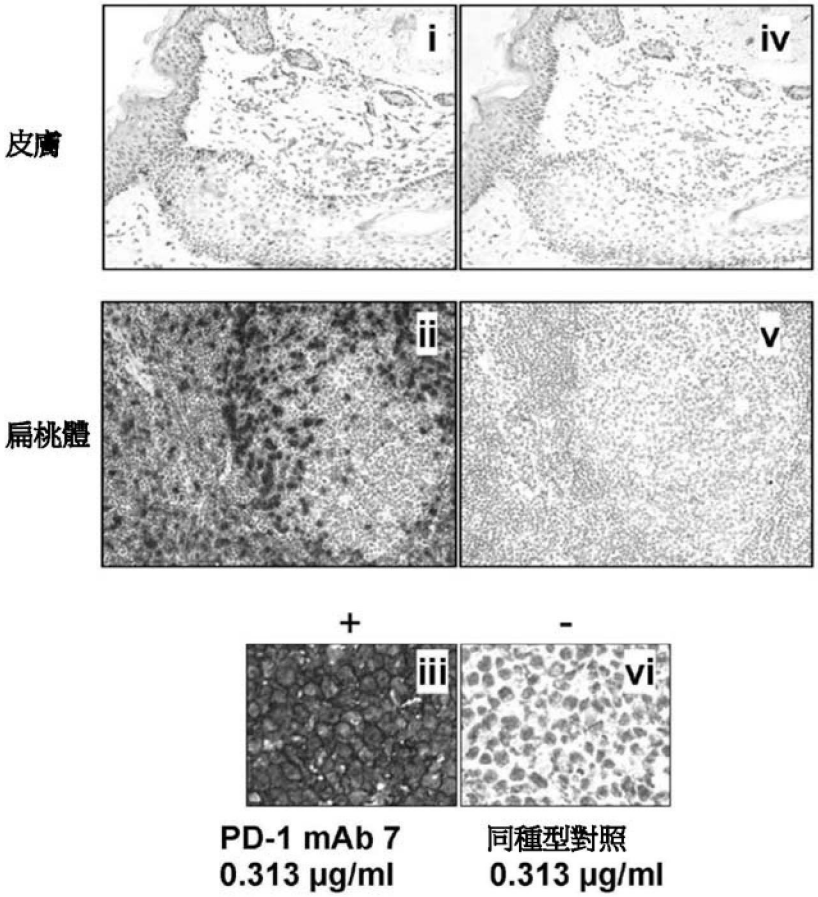

圖 10B

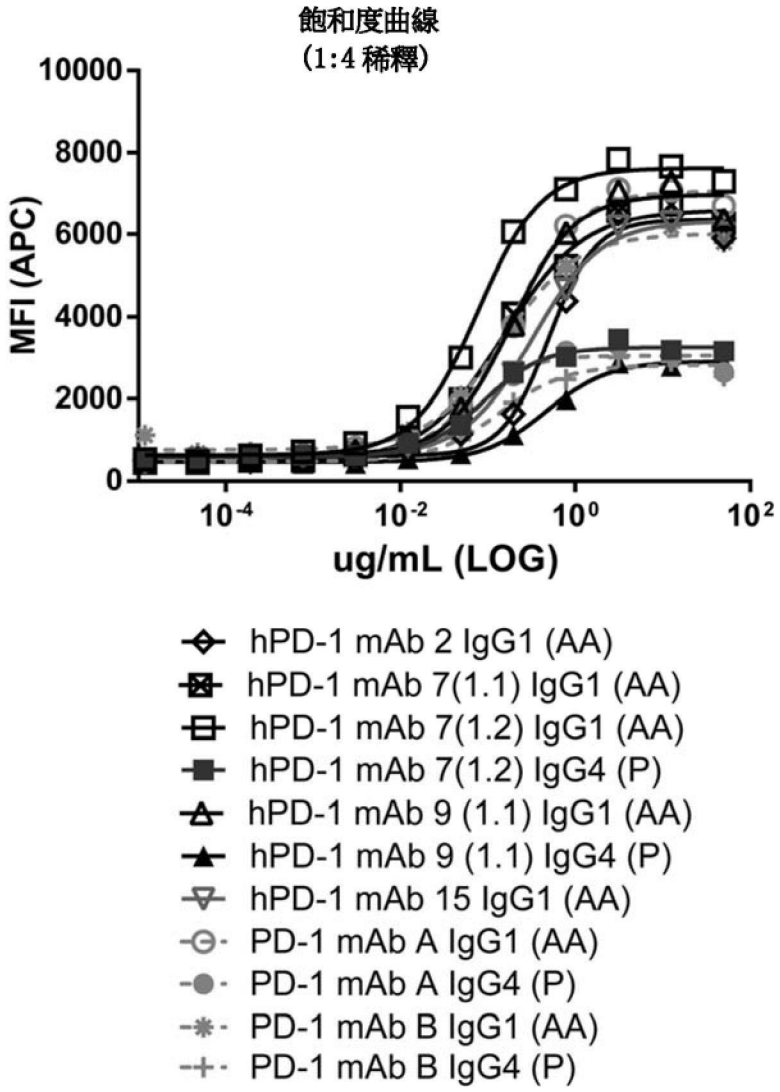
飽和度曲線
(1:4 稀釋)
10000
8000
6000
4000
2000
0
MFI (APC)
10-4
10-2
100
102
ug/mL (LOG)
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG4 (P)
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)
PD-1 mAb A IgG1 (AA)
PD-1 mAb A IgG4 (P)
PD-1 mAb B IgG1 (AA)
PD-1 mAb B IgG4 (P)

圖 11

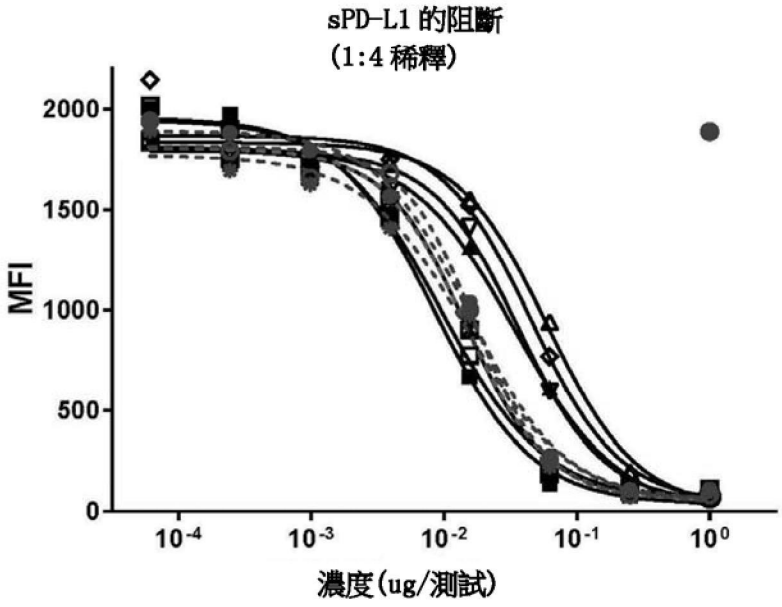
sPD-L1 的阻斷
(1:4 稀釋)
MFI
2000
1500
1000
500
0
10^{-4}
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
濃度(ug/測試)
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG4 (P)
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)
PD-1 mAb A IgG1(AA)
PD-1 mAb A IgG4 (P)
PD-1 mAb B IgG1 (AA)
PD-1 mAb B IgG4 (P)
僅僅 PDL1
未染色的

圖 12A

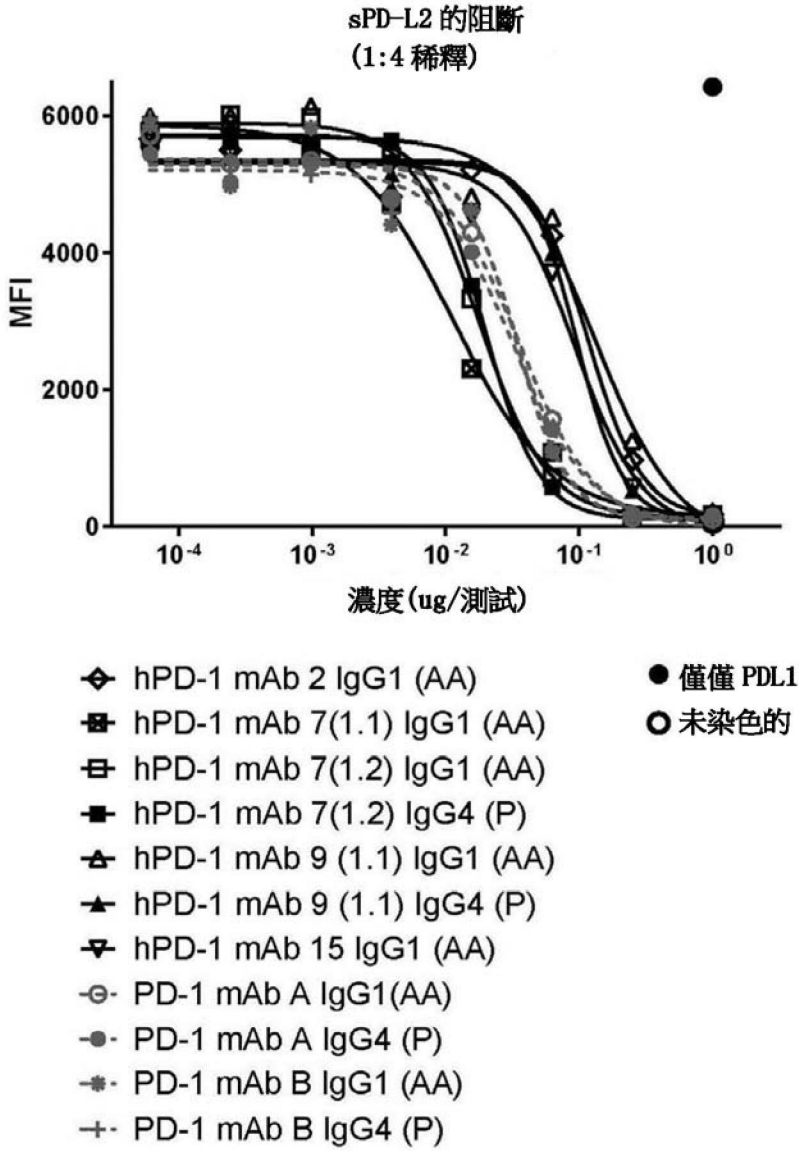
sPD-L2 的阻斷
(1:4 稀釋)
6000
4000
2000
0
MFI
10-4
10-3
10-2
10-1
100
濃度(ug/測試)
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG4 (P)
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)
PD-1 mAb A IgG1(AA)
PD-1 mAb A IgG4 (P)
PD-1 mAb B IgG1 (AA)
PD-1 mAb B IgG4 (P)
僅僅 PDL1
未染色的

圖 12B

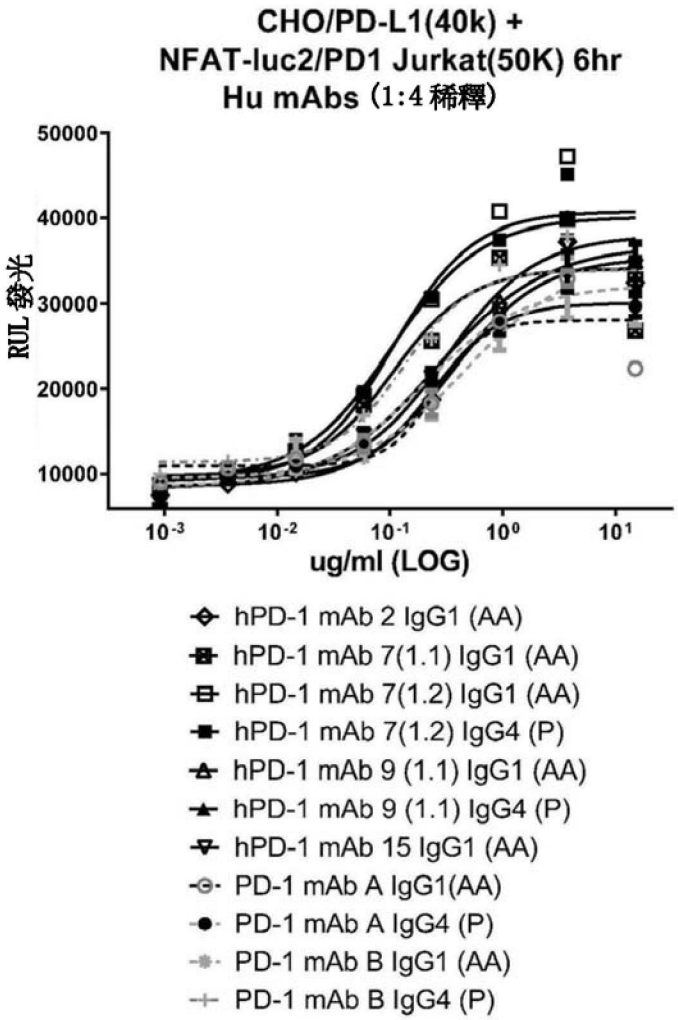
CHO/PD-L1(40k) +
NFAT-luc2/PD1 Jurkat(50K) 6hr
Hu mAbs (1:4 稀釋)
RUL 發光
50000
40000
30000
20000
10000
10-3
10-2
10-1
100
101
ug/ml (LOG)
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG4 (P)
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)
PD-1 mAb A IgG1(AA)
PD-1 mAb A IgG4 (P)
PD-1 mAb B IgG1 (AA)
PD-1 mAb B IgG4 (P)

圖 13

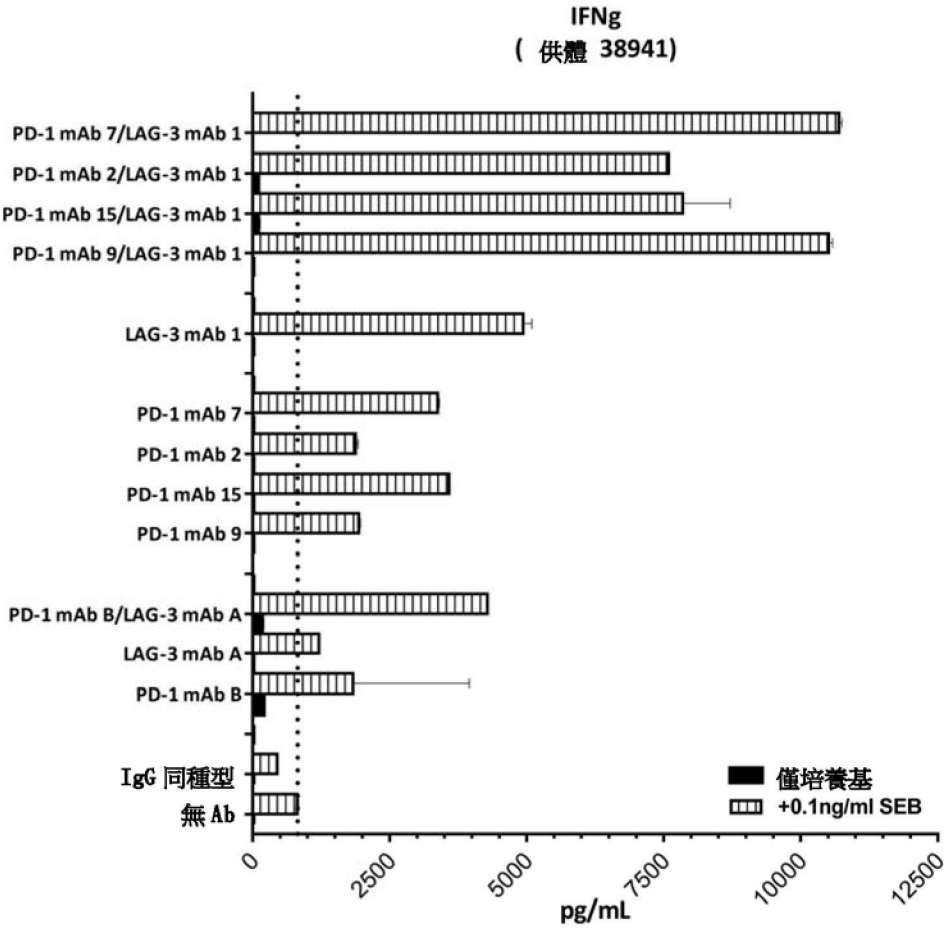
IFNg
(供體 38941)
PD-1 mAb 7/LAG-3 mAb 1
PD-1 mAb 2/LAG-3 mAb 1
PD-1 mAb 15/LAG-3 mAb 1
PD-1 mAb 9/LAG-3 mAb 1
LAG-3 mAb 1
PD-1 mAb 7
PD-1 mAb 2
PD-1 mAb 15
PD-1 mAb 9
PD-1 mAb B/LAG-3 mAb A
LAG-3 mAb A
PD-1 mAb B
IgG 同種型
無 Ab
僅培養基
+0.1ng/ml SEB
0
2500
5000
7500
10000
12500
pg/mL

圖 14

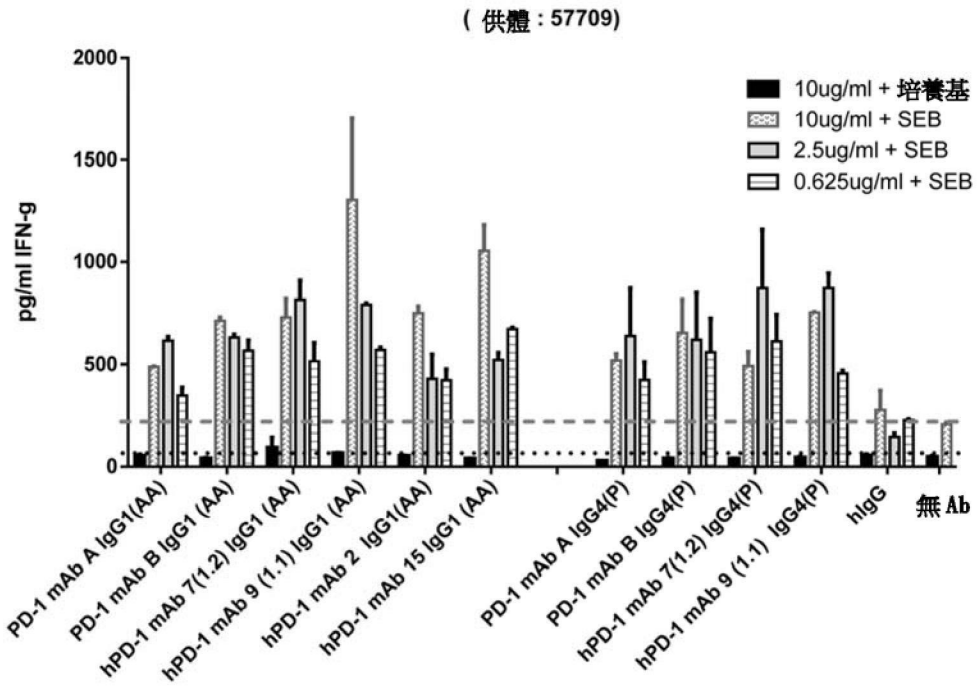
(供體 : 57709)
pg/ml IFN-g
2000
1500
1000
500
0
10ug/ml + 培養基
10ug/ml + SEB
2.5ug/ml + SEB
0.625ug/ml + SEB
PD-1 mAb A IgG1(AA)
PD-1 mAb B IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 2 IgG1(AA)
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)
PD-1 mAb A IgG4(P)
PD-1 mAb B IgG4(P)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P)
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG4(P)
hIgG
無 Ab

圖 15A

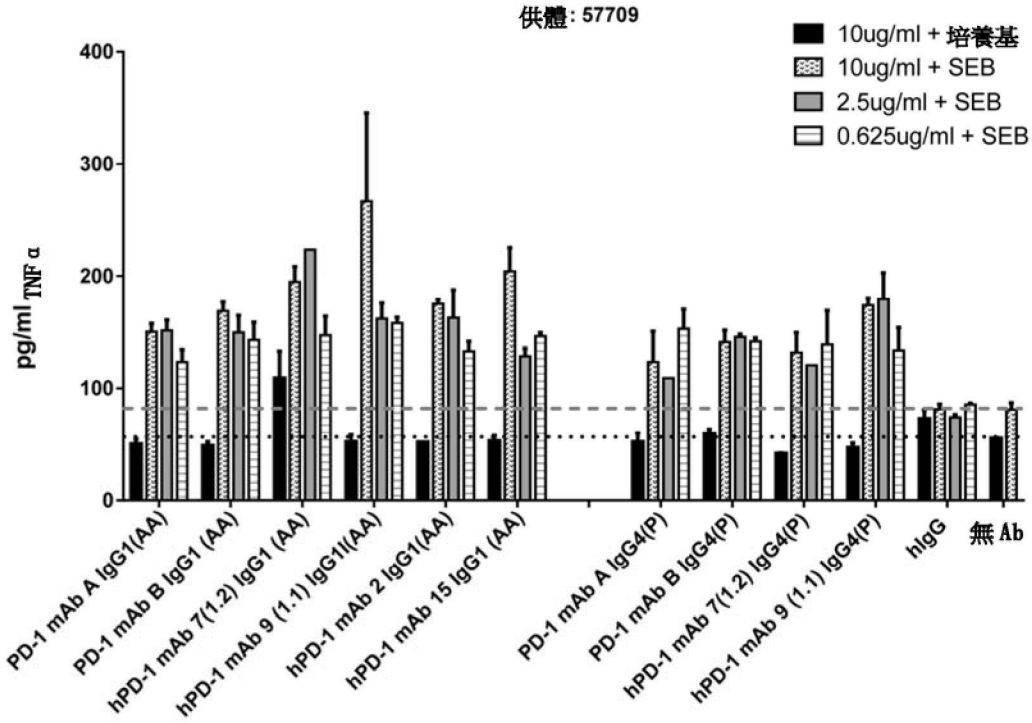
供體: 57709
10ug/ml + 培養基
10ug/ml + SEB
2.5ug/ml + SEB
0.625ug/ml + SEB
pg/ml TNFα
400
300
200
100
0
PD-1 mAb A IgG1(AA)
PD-1 mAb B IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG1l(AA)
hPD-1 mAb 2 IgG1(AA)
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)
PD-1 mAb A IgG4(P)
PD-1 mAb B IgG4(P)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P)
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG4(P)
hIgG
無 Ab

圖 15B

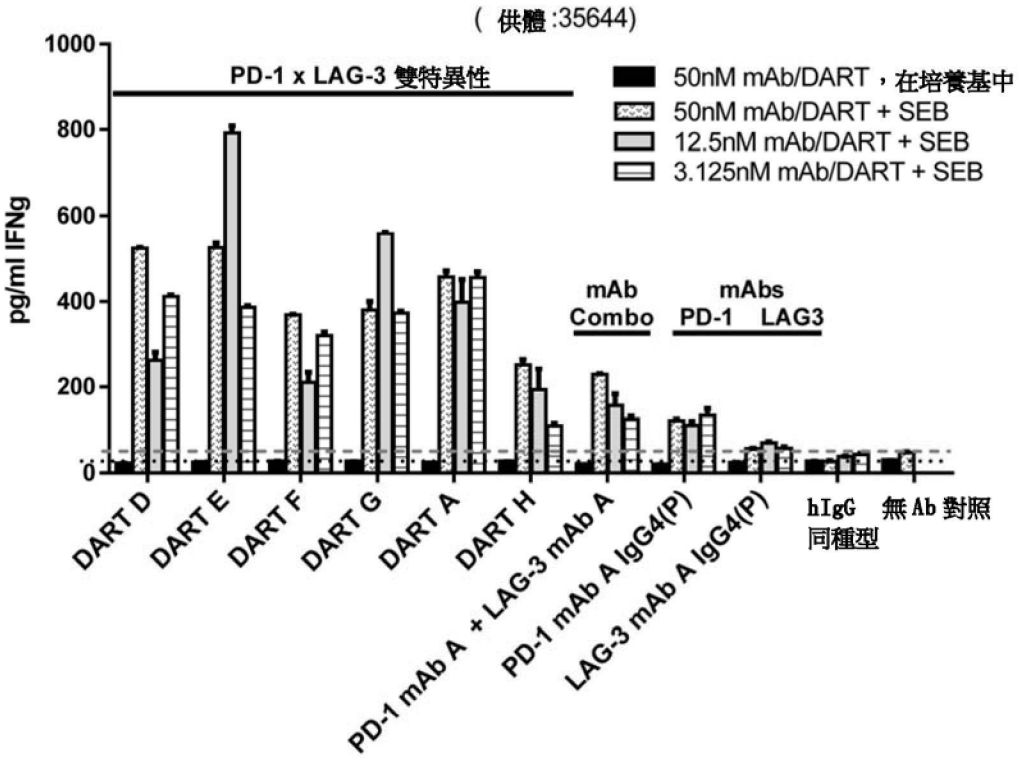
(供體 :35644)
PD-1 x LAG-3 雙特異性
50nM mAb/DART，在培養基中
50nM mAb/DART + SEB
12.5nM mAb/DART + SEB
3.125nM mAb/DART + SEB
pg/ml IFNg
1000
800
600
400
200
0
mAb Combo
mAbs PD-1 LAG3
DART D
DART E
DART F
DART G
DART A
DART H
PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A
PD-1 mAb A IgG4(P)
LAG-3 mAb A IgG4(P)
hIgG 無 Ab 對照 同種型

圖 16A

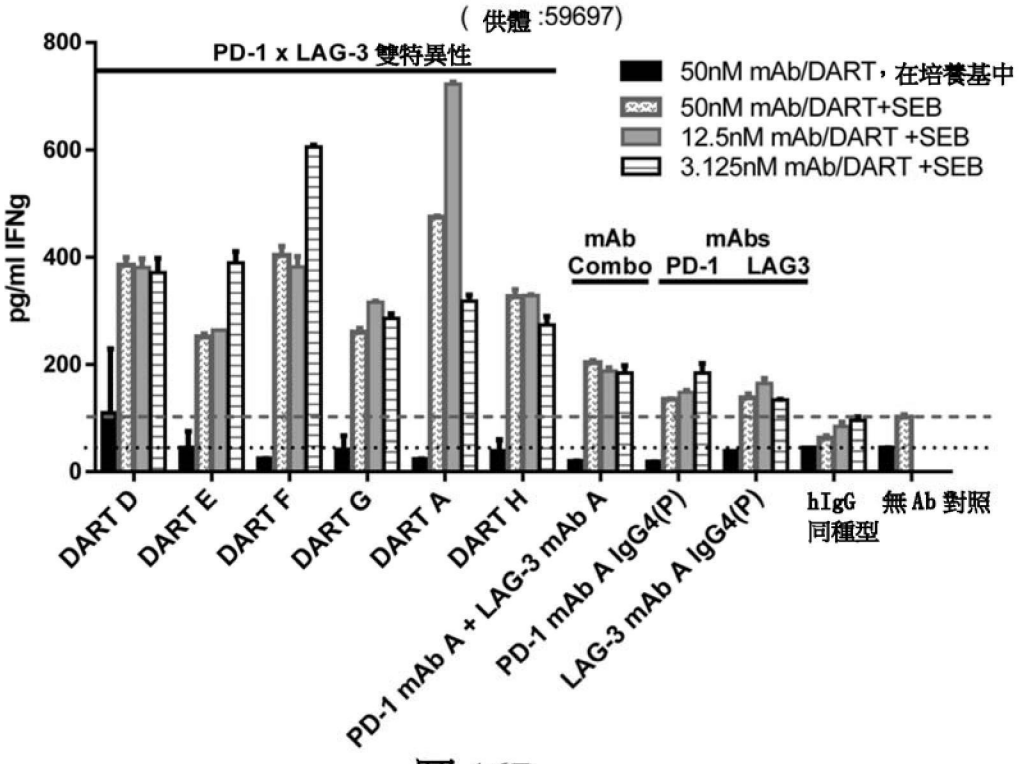
(供體 :59697)
PD-1 x LAG-3 雙特異性
50nM mAb/DART，在培養基中
50nM mAb/DART+SEB
12.5nM mAb/DART +SEB
3.125nM mAb/DART +SEB
pg/ml IFNg
800
600
400
200
0
mAb Combo
mAbs PD-1 LAG3
DART D
DART E
DART F
DART G
DART A
DART H
PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A
PD-1 mAb A IgG4(P)
LAG-3 mAb A IgG4(P)
hIgG 無 Ab 對照 同種型

圖 16B

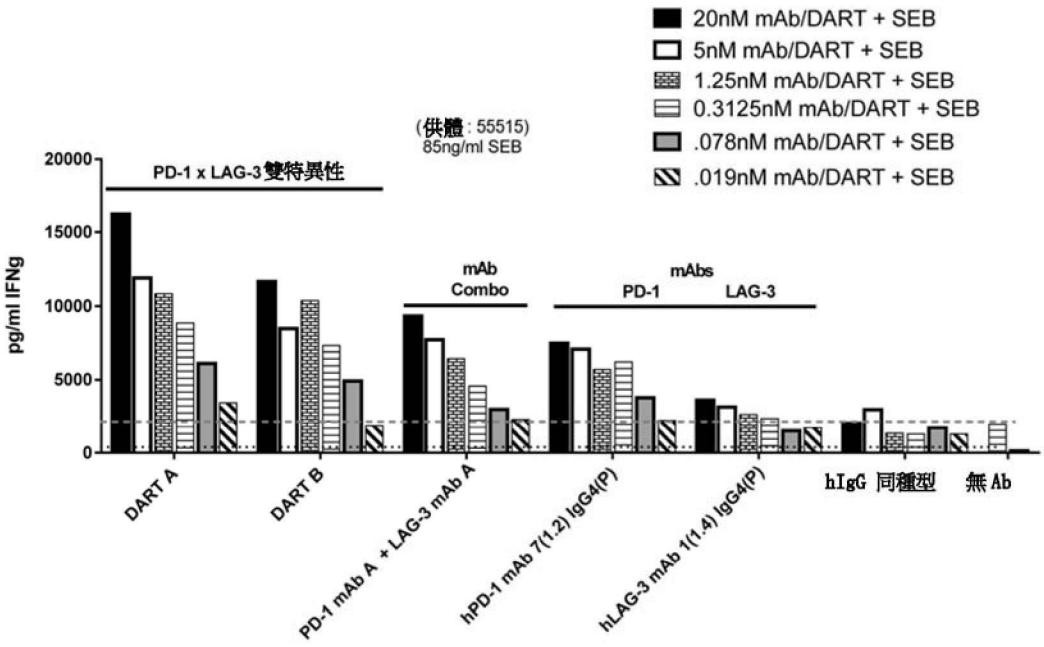
20nM mAb/DART + SEB
5nM mAb/DART + SEB
1.25nM mAb/DART + SEB
0.3125nM mAb/DART + SEB
.078nM mAb/DART + SEB
.019nM mAb/DART + SEB
(供體 : 55515)
85ng/ml SEB
PD-1 x LAG-3 雙特異性
mAb Combo
mAbs
PD-1
LAG-3
pg/ml IFNg
20000
15000
10000
5000
0
DART A
DART B
PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P)
hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG4(P)
hIgG 同種型
無 Ab

圖 17A

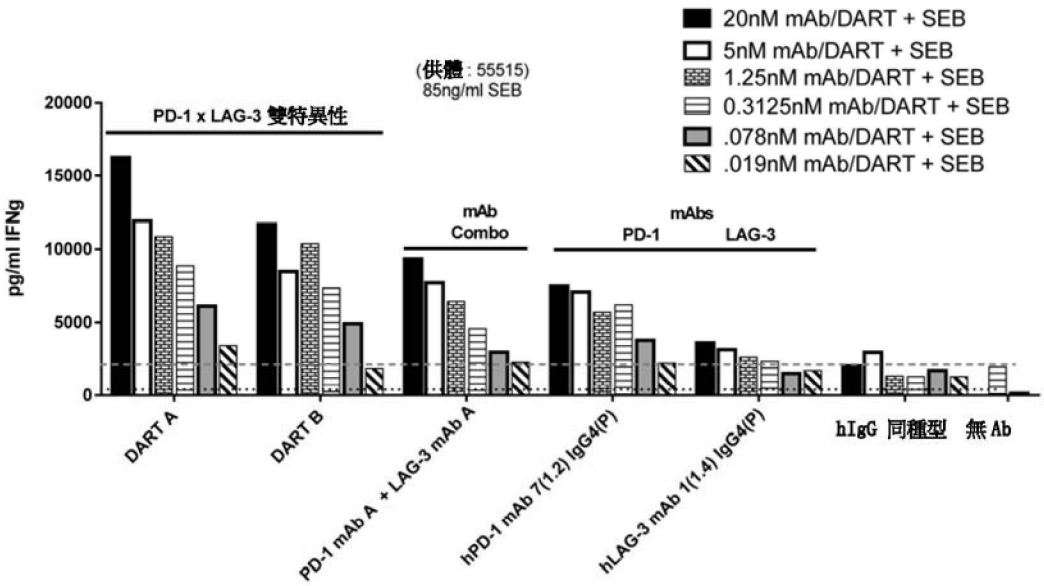
20nM mAb/DART + SEB
5nM mAb/DART + SEB
1.25nM mAb/DART + SEB
0.3125nM mAb/DART + SEB
.078nM mAb/DART + SEB
.019nM mAb/DART + SEB
(供體 : 55515)
85ng/ml SEB
PD-1 x LAG-3 雙特異性
mAb Combo
mAbs
PD-1
LAG-3
pg/ml IFNg
20000
15000
10000
5000
0
DART A
DART B
PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P)
hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG4(P)
hIgG 同種型
無 Ab

圖 17B

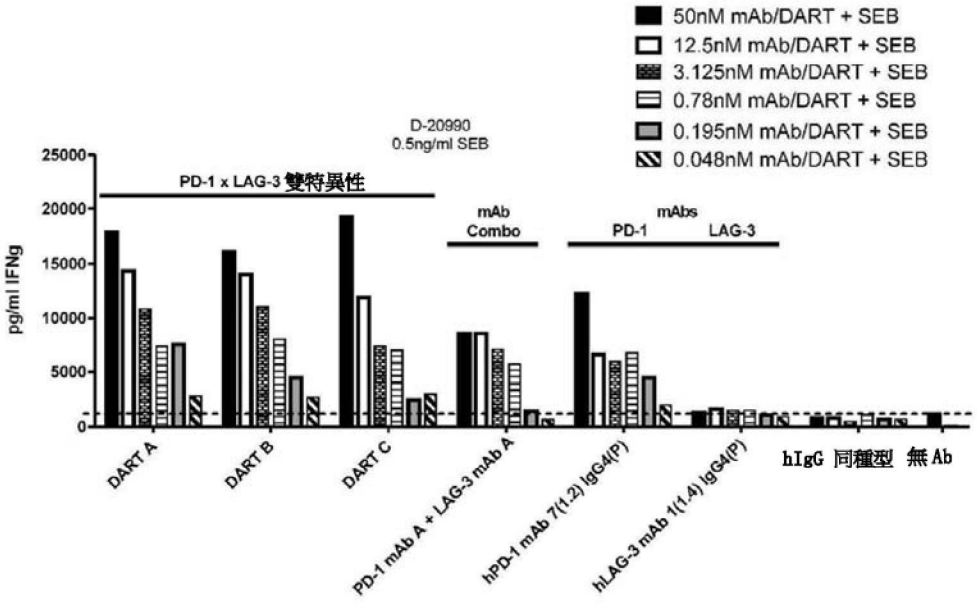
50nM mAb/DART + SEB
12.5nM mAb/DART + SEB
3.125nM mAb/DART + SEB
0.78nM mAb/DART + SEB
0.195nM mAb/DART + SEB
0.048nM mAb/DART + SEB
D-20990
0.5ng/ml SEB
PD-1 x LAG-3 雙特異性
mAb Combo
mAbs
PD-1
LAG-3
pg/ml IFNg
25000
20000
15000
10000
5000
0
DART A
DART B
DART C
PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P)
hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG4(P)
hIgG 同種型 無 Ab

圖 18A

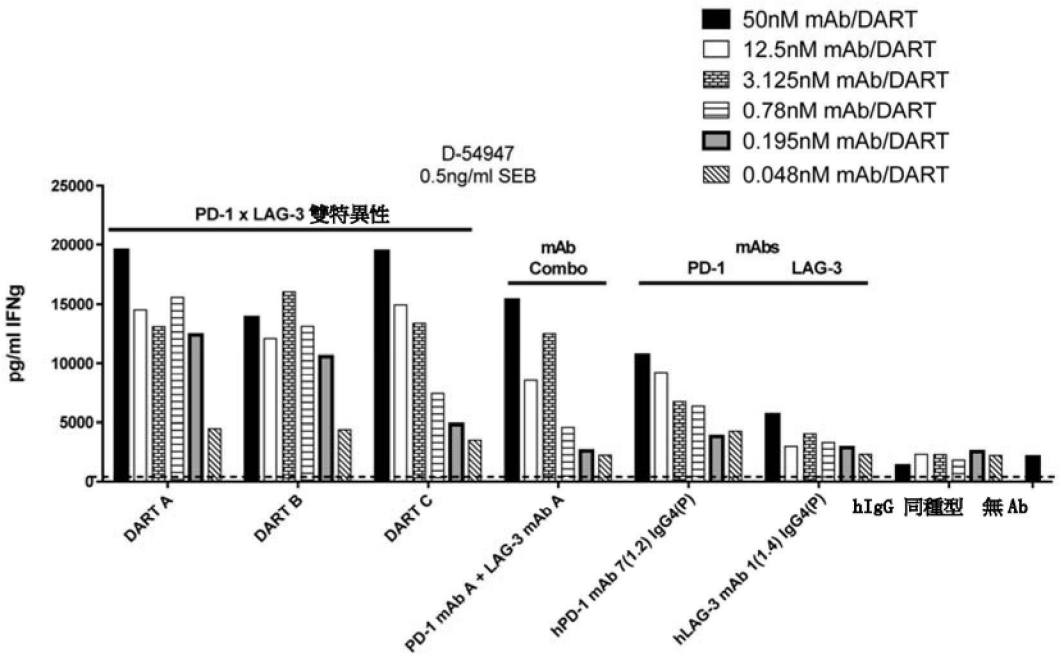
50nM mAb/DART
12.5nM mAb/DART
3.125nM mAb/DART
0.78nM mAb/DART
0.195nM mAb/DART
0.048nM mAb/DART
D-54947
0.5ng/ml SEB
pg/ml IFNg
25000
20000
15000
10000
5000
0
PD-1 x LAG-3 雙特異性
mAb Combo
mAbs
PD-1
LAG-3
DART A
DART B
DART C
PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P)
hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG4(P)
hIgG 同種型
無 Ab

圖 18B

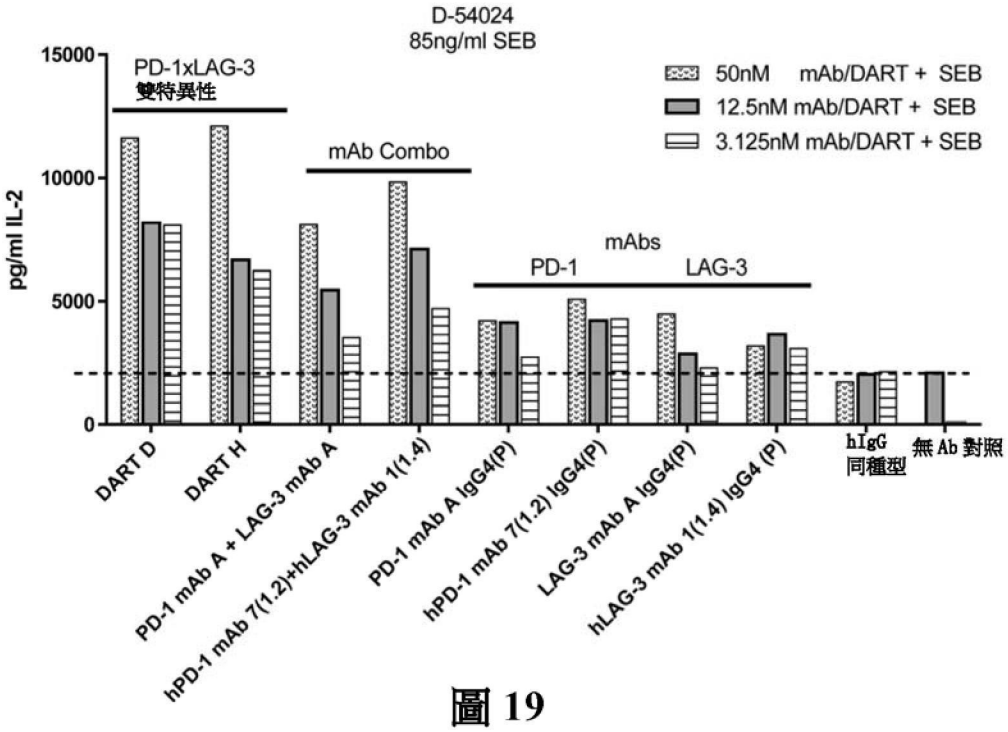
D-54024
85ng/ml SEB
15000
10000
5000
0
pg/ml IL-2
PD-1xLAG-3
雙特異性
mAb Combo
mAbs
PD-1
LAG-3
50nM mAb/DART + SEB
12.5nM mAb/DART + SEB
3.125nM mAb/DART + SEB
DART D
DART H
PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A
hPD-1 mAb 7(1.2)+hLAG-3 mAb 1(1.4)
PD-1 mAb A IgG4(P)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P)
LAG-3 mAb A IgG4(P)
hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG4 (P)
hIgG
同種型
無 Ab 對照

圖 19

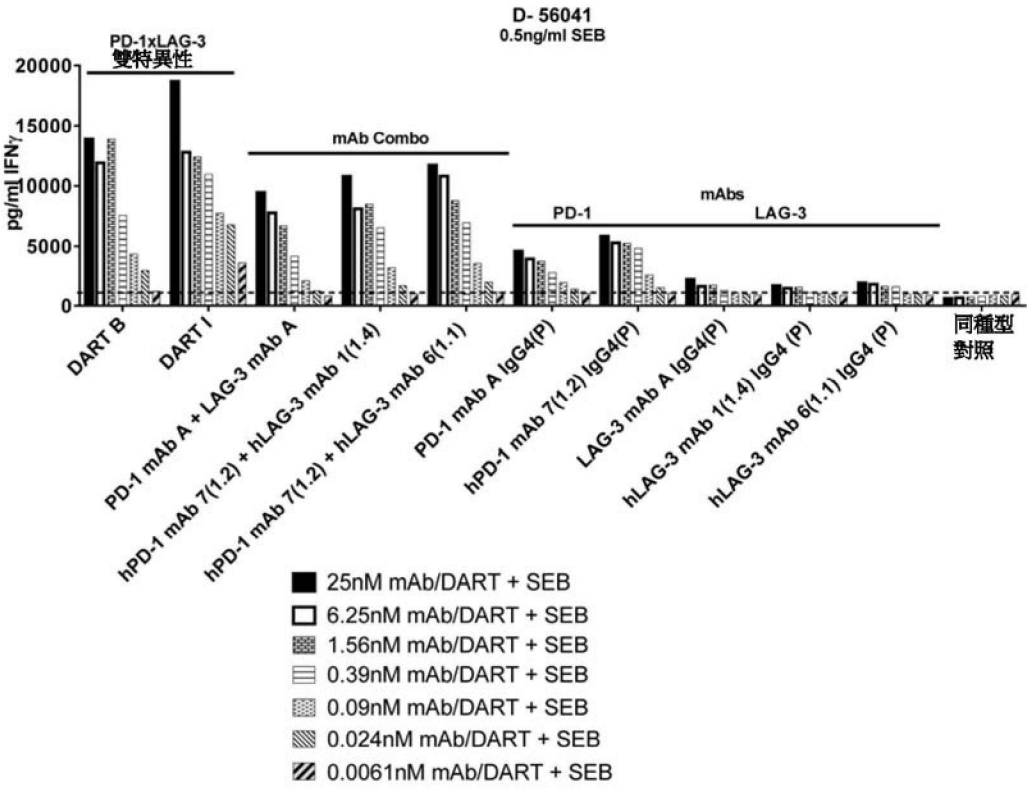
D- 56041
0.5ng/ml SEB
PD-1xLAG-3
雙特異性
mAb Combo
mAbs
PD-1
LAG-3
pg/ml IFNγ
20000
15000
10000
5000
0
DART B
DART I
PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A
hPD-1 mAb 7(1.2) + hLAG-3 mAb 1(1.4)
hPD-1 mAb 7(1.2) + hLAG-3 mAb 6(1.1)
PD-1 mAb A IgG4(P)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P)
LAG-3 mAb A IgG4(P)
hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG4 (P)
hLAG-3 mAb 6(1.1) IgG4 (P)
同種型
對照
25nM mAb/DART + SEB
6.25nM mAb/DART + SEB
1.56nM mAb/DART + SEB
0.39nM mAb/DART + SEB
0.09nM mAb/DART + SEB
0.024nM mAb/DART + SEB
0.0061nM mAb/DART + SEB

圖 20

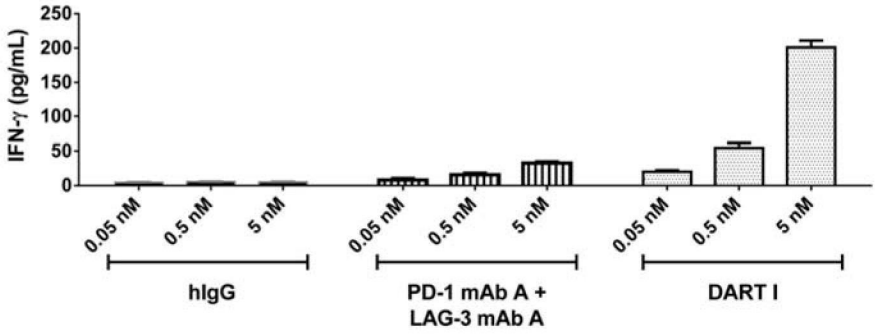
IFN-γ (pg/mL)
250
200
150
100
50
0
0.05 nM
0.5 nM
5 nM
0.05 nM
0.5 nM
5 nM
0.05 nM
0.5 nM
5 nM
hIgG
PD-1 mAb A +
LAG-3 mAb A
DART I

圖 21A

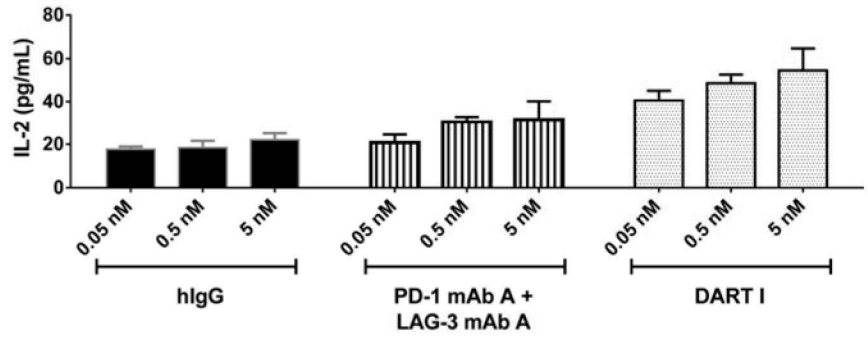
IL-2 (pg/mL)
80
60
40
20
0
0.05 nM
0.5 nM
5 nM
0.05 nM
0.5 nM
5 nM
0.05 nM
0.5 nM
5 nM
hIgG
PD-1 mAb A +
LAG-3 mAb A
DART I

圖 21B

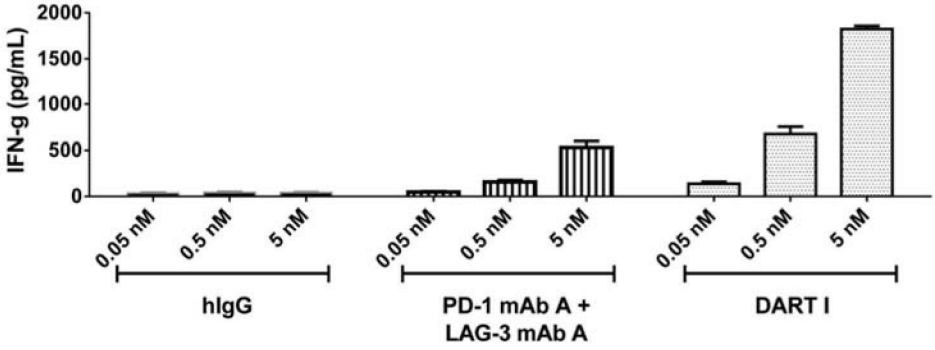
IFN-g (pg/mL)
2000
1500
1000
500
0
0.05 nM
0.5 nM
5 nM
hIgG
PD-1 mAb A +
LAG-3 mAb A
DART I

圖 21C

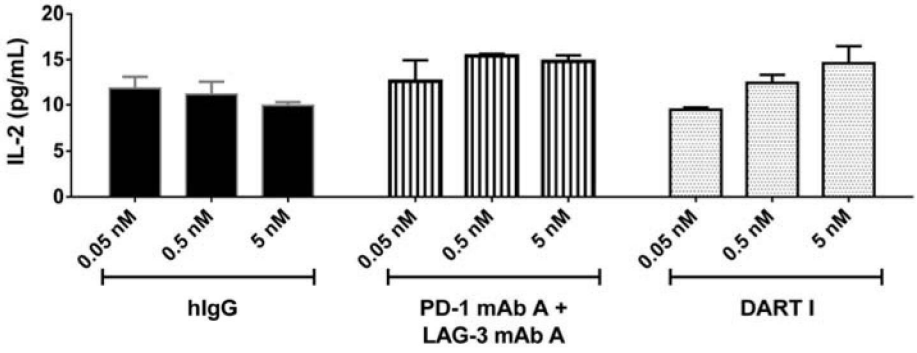
IL-2 (pg/mL)
20
15
10
5
0
0.05 nM
0.5 nM
5 nM
hIgG
PD-1 mAb A +
LAG-3 mAb A
DART I

圖 21D

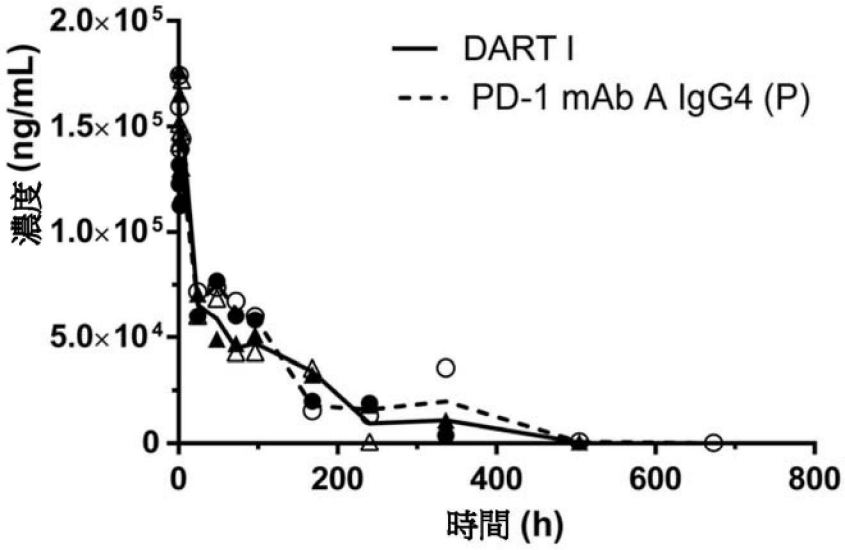
2.0×10^5
1.5×10^5
1.0×10^5
5.0×10^4
0
濃度 (ng/mL)
0
200
400
600
800
時間 (h)
DART I
PD-1 mAb A IgG4 (P)

圖 22

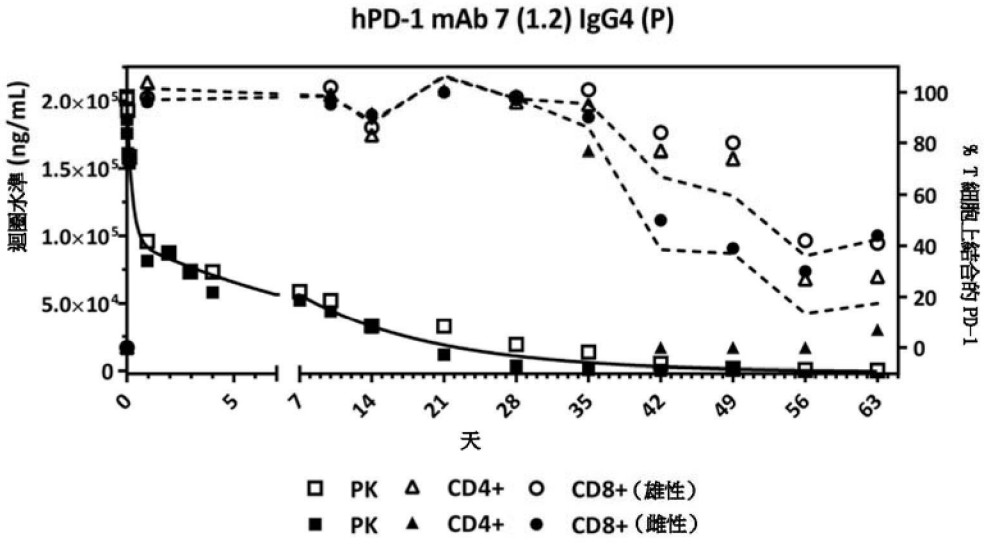
hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)
迴圈水準 (ng/mL)
2.0×10^5
1.5×10^5
1.0×10^5
5.0×10^4
0
% T 細胞上結合的 PD-1
100
80
60
40
20
0
0
5
7
14
21
28
35
42
49
56
63
天
PK
CD4+
CD8+（雄性）
PK
CD4+
CD8+（雌性）

圖 23A

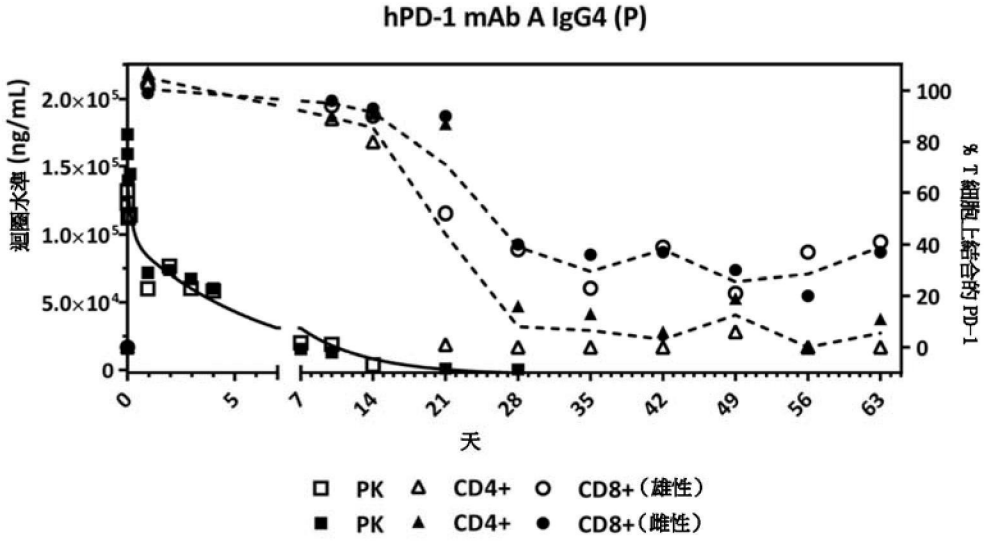
hPD-1 mAb A IgG4 (P)
迴圈水準 (ng/mL)
2.0×10^5
1.5×10^5
1.0×10^5
5.0×10^4
0
% T 細胞上結合的 PD-1
100
80
60
40
20
0
0
5
7
14
21
28
35
42
49
56
63
天
PK
CD4+
CD8+（雄性）
PK
CD4+
CD8+（雌性）

圖 23B

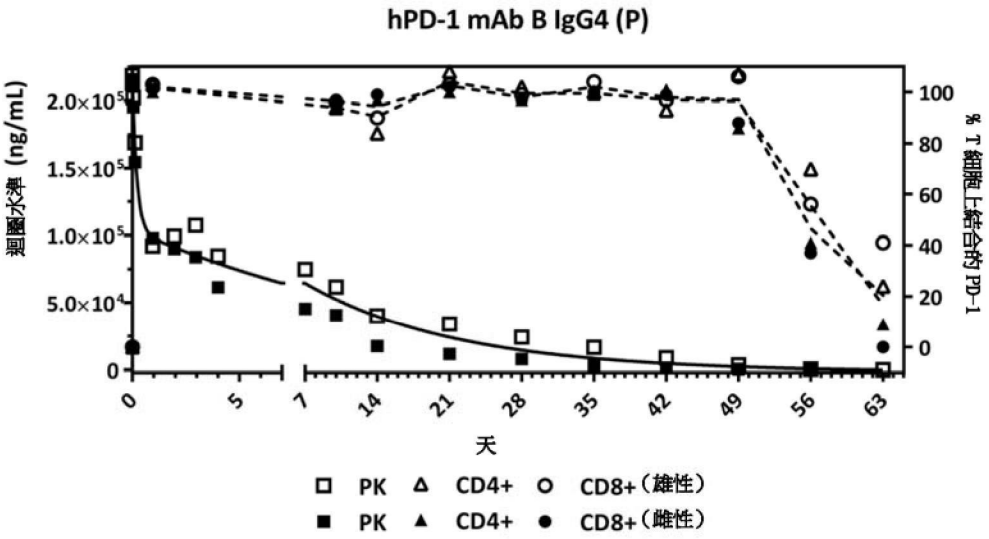
hPD-1 mAb B IgG4 (P)
血漿水準 (ng/mL)
2.0×10^5
1.5×10^5
1.0×10^5
5.0×10^4
0
% T細胞上結合的 PD-1
100
80
60
40
20
0
0
5
7
14
21
28
35
42
49
56
63
天
PK
CD4+
CD8+（雄性）
PK
CD4+
CD8+（雌性）

圖 23C