



- (21) 申請案號：110102049 (22) 申請日：中華民國 105 (2016) 年 12 月 02 日
- (51) Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01) C07K16/30 (2006.01)  
 A61K39/395 (2006.01) A61P37/02 (2006.01)  
 A61P35/00 (2006.01)
- (30) 優先權：2015/12/02 美國 62/262,369  
 2016/11/09 美國 62/419,911
- (71) 申請人：美商艾吉納斯公司 (美國) AGENUS INC. (US)  
 美國  
 紀念斯隆凱特琳癌症中心 (美國) MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER (US)  
 美國  
 盧德威格癌症研究協會 (瑞士) LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH LTD. (CH)  
 瑞士
- (72) 發明人：威爾森 尼可拉斯 WILSON, NICHOLAS S. (NZ)；偉特 傑若米 WAIGHT, JEREMY (US)；瑞特 蓋德 RITTER, GERD (DE)；薛爾 大衛 SCHAER, DAVID (US)；賀希賽默曼 丹尼爾 HIRSCHHORN-CYMERMAN, DANIEL (MX)；默格豪伯 塔哈 MERGHOUB, TAHA (US)；布瑞歐尼斯 艾卡特莉娜 BREOUS-NYSTROM, EKATERINA V. (NZ)；賽伯特 沃克 SEIBERT, VOLKER (DE)；辻武正 TSUJI, TAKEMASA (JP)；列格 奧利維爾 LEGER, OLIVIER (FR)；安德伍丹尼斯 UNDERWOOD, DENNIS J. (AU)；德克 馬克 VAN DIJK, MARC (NL)
- (74) 代理人：林志剛
- 申請實體審查：有 申請專利範圍項數：18 項 圖式數：12 共 488 頁

## (54) 名稱

抗體和使用彼之方法

## (57) 摘要

本發明提供特異性結合人類 GITR 及/或人類 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體及包含該等抗體之組合物。在一個特定態樣中，該等多特異性抗體特異性結合人類 GITR 及 OX40 且調節 GITR 及/或 OX40 活性，例如增強、活化或誘導 GITR 及/或 OX40 活性、或降低、去活化或抑制 GITR 及/或 OX40 活性。本發明亦提供用於治療諸如癌症之病症的方法，該等方法係藉由投予多特異性抗體，該多特異性抗體特異性結合人類 GITR 及/或 OX40 且調節 GITR 及/或 OX40 活性，例如增強、活化或誘導 GITR 及/或 OX40 活性。本發明亦提供用於治療自體免疫或發炎性疾病或病症之方法，該等方法係藉由投予多特異性抗體，該多特異性抗體特異性結合人類 GITR 及/或 OX40 且調節 GITR 及/或 OX40 活性，例如降低、去活化或抑制 GITR 及/或 OX40 活性。

The present disclosure provides multispecific (e.g., bispecific) antibodies that specifically bind to human GITR and/or human OX40 as well as compositions comprising such antibodies. In a specific aspect, the

multispecific antibodies specifically bind to human GITR and OX40 and modulate GITR and/or OX40 activity, e.g., enhance, activate, or induce GITR and/or OX40 activity, or reduce, deactivate, or inhibit GITR and/or OX40 activity. The present disclosure also provides methods for treating disorders, such as cancer, by administering a multispecific antibody that specifically binds to human GITR and/or OX40 and modulates GITR and/or OX40 activity, e.g., enhances, activates, or induces GITR and/or OX40 activity. Also provided are methods for treating autoimmune or inflammatory diseases or disorders, by administering a multispecific antibody that specifically binds to human GITR and/or OX40 and modulates GITR and/or OX40 activity, e.g., reduces, deactivates, or inhibits GITR and/or OX40 activity.

指定代表圖：

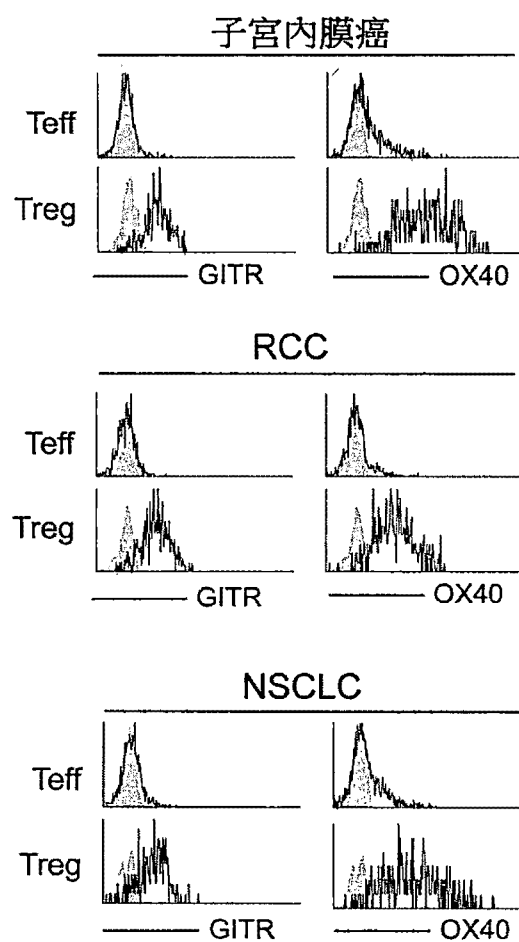


圖1A

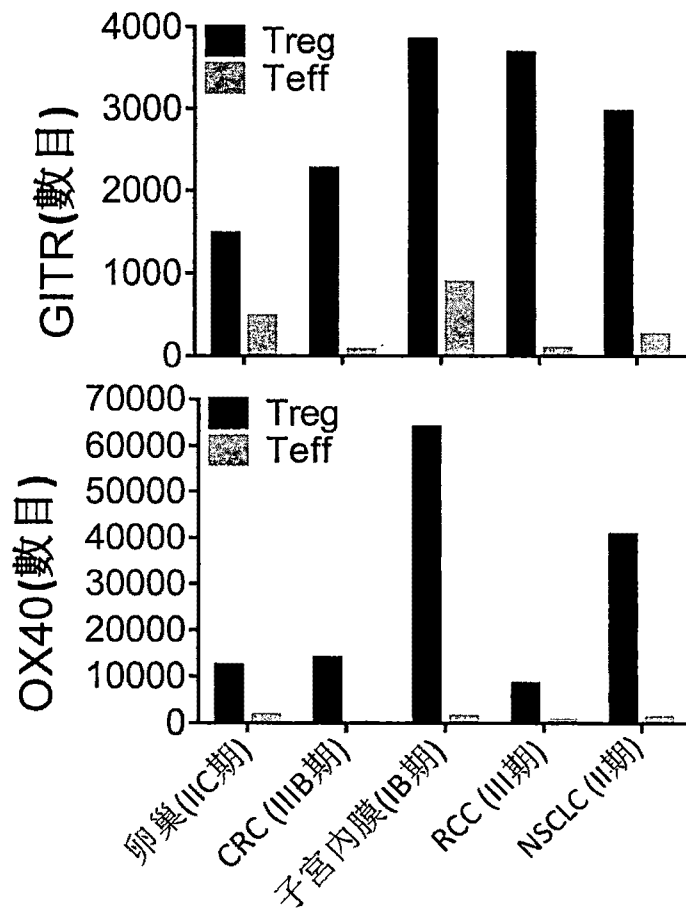


圖1B

## 發明摘要

【發明名稱】(中文/英文)

抗體和使用彼之方法

ANTIBODIES AND METHODS OF USE THEREOF

【中文】

本發明提供特異性結合人類 GITR 及/或人類 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體及包含該等抗體之組合物。在一個特定態樣中，該等多特異性抗體特異性結合人類 GITR 及 OX40 且調節 GITR 及/或 OX40 活性，例如增強、活化或誘導 GITR 及/或 OX40 活性、或降低、去活化或抑制 GITR 及/或 OX40 活性。本發明亦提供用於治療諸如癌症之病症的方法，該等方法係藉由投予多特異性抗體，該多特異性抗體特異性結合人類 GITR 及/或 OX40 且調節 GITR 及/或 OX40 活性，例如增強、活化或誘導 GITR 及/或 OX40 活性。本發明亦提供用於治療自體免疫或發炎性疾病或病症之方法，該等方法係藉由投予多特異性抗體，該多特異性抗體特異性結合人類 GITR 及/或 OX40 且調節 GITR 及/或 OX40 活性，例如降低、去活化或抑制 GITR 及/或 OX40 活性。

## 【 英文 】

The present disclosure provides multispecific (*e.g.*, bispecific) antibodies that specifically bind to human GITR and/or human OX40 as well as compositions comprising such antibodies. In a specific aspect, the multispecific antibodies specifically bind to human GITR and OX40 and modulate GITR and/or OX40 activity, *e.g.*, enhance, activate, or induce GITR and/or OX40 activity, or reduce, deactivate, or inhibit GITR and/or OX40 activity. The present disclosure also provides methods for treating disorders, such as cancer, by administering a multispecific antibody that specifically binds to human GITR and/or OX40 and modulates GITR and/or OX40 activity, *e.g.*, enhances, activates, or induces GITR and/or OX40 activity. Also provided are methods for treating autoimmune or inflammatory diseases or disorders, by administering a multispecific antibody that specifically binds to human GITR and/or OX40 and modulates GITR and/or OX40 activity, *e.g.*, reduces, deactivates, or inhibits GITR and/or OX40 activity.

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】**：第( 1A、1B )圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】**：無

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】**：無

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】(中文/英文)

抗體和使用彼之方法

ANTIBODIES AND METHODS OF USE THEREOF

## [相關申請案]

[0001] 本申請案主張 2015 年 12 月 2 日提出申請之美國臨時申請案第 62/262,369 號及 2016 年 11 月 9 日提出申請之美國臨時申請案第 62/419,911 號之優先權，該等美國臨時申請案之揭示內容以全文引用之方式併入本文。

## [序列表]

[0002] 本申請案含有序列表，該序列表已以 ASCII 格式以電子檔方式提交且在此以全文引用之方式併入本文(該於 2016 年 12 月 1 日建立之 ASCII 複本係命名為 3617\_016PC02\_SeqListing.txt 且大小具有 274,675 位元組)。

## 【技術領域】

[0003] 本發明關於特異性結合人類糖皮質素誘導 TNFR 家族相關受體 (GITR) 及 / 或人類 OX40 受體 (「OX40」) 之多特異性抗體，例如雙特異性抗體；包含該

等抗體之組合物；及，產生和使用該等抗體之方法。

### 【先前技術】

[0004] 先天性免疫反應及適應性免疫反應在控制人體腫瘤生長之作用係經良好表徵(Vesely MD 等人, (2011) *Annu Rev Immunol* 29: 235-271)。因此，基於抗體之策略已出現，該等策略旨在增強用於癌症治療目的之 T 細胞反應，諸如使用促效劑抗體靶向 T 細胞表現之刺激性受體、或使用功能性拮抗劑靶向 T 細胞表現之抑制性受體(Mellman I 等人, (2011) *Nature* 480: 480-489)。抗體介導之促效劑及拮抗劑方法已顯示臨床前活性及近期之臨床活性。

[0005] 免疫反應之兩種重要之刺激因子為糖皮質素誘導 TNFR 相關蛋白(GITR)及 OX40 受體(「OX40」)。GITR 及 OX40 皆為腫瘤壞死因子受體超家族(TNFRSF)之成員。

[0006] GITR(亦稱為活化誘導型 TNFR 家族受體(AITR)、GITR-D、CD357 及腫瘤壞死因子受體超家族成員 18(TNFRSF18))表現於先天性免疫系統及適應性免疫系統之許多組分且刺激後天免疫及先天免疫兩者(Nocentini G 等人, (1994) *PNAS* 94: 6216-6221; Hanabuchi S 等人, (2006) *Blood* 107:3617-3623; Nocentini G 及 Riccardi C (2005) *Eur J Immunol* 35: 1016-1022; Nocentini G 等人,



(2007) *Eur J Immunol* 37:1165-1169)。GITR 表現於若干細胞及組織，彼等包括 T 細胞、B 細胞、樹突細胞(DC)及自然殺手細胞(NK)，且係由其配體 GITRL 活化，該配體 GITRL 主要表現於抗原呈現細胞(APC)、內皮細胞及腫瘤細胞。GITR/GITRL 系統參與自體免疫/發炎反應之發展且加強對感染及腫瘤之反應。舉例而言，使用 GITR-Fc 融合蛋白治療動物改善自體免疫/發炎性疾病，而 GITR 觸發係有效治療病毒感染、細菌感染及寄生物感染且增強對抗腫瘤之免疫反應(Nocentini G 等人, (2012) *Br J Pharmacol* 165: 2089-99)。該等作用歸因於若干個並行機制，該等機制包括：效應 T 細胞之共活化、對調節性 T(Treg)細胞之抑制、NK 細胞共活化、巨噬細胞之活化、樹突細胞功能之調節及外滲過程之調節。在 T 細胞活化之後，GITR 之膜表現增加(Hanabuchi S 等人, (2006) (同上)；Nocentini G 及 Riccardi C (同上))。GITR 觸發會共活化效應 T 淋巴球(McHugh R S 等人, (2002) *Immunity* 16: 311-323；Shimizu J 等人, (2002) *Nat Immunol* 3: 135-142；Ronchetti S 等人, (2004) *Eur J Immunol* 34: 613-622；Tone M 等人, (2003) *PNAS* 100: 15059-15064)。GITR 活化增加對腫瘤及病毒感染之抵抗力，涉及自體免疫/發炎過程且調節白血球外滲(Nocentini G 及 Riccardi C (2005) (同上)；Cuzzocrea S 等人, (2004) *J Leukoc Biol* 76: 933-940；Shevach E M 及 Stephens G L (2006) *Nat Rev Immunol* 6:

613-618 ; Cuzzocrea S 等人, (2006) *J Immunol* 177: 631-641 ; Cuzzocrea S 等人, (2007) *FASEB J* 21: 117-129)。

[0007] 人類 GITR 係以極低之量表現於周邊(未活化)T 細胞。在 T 細胞活化之後, 在 CD4<sup>+</sup>細胞及 CD8<sup>+</sup>細胞兩者中, GITR 經強烈上調達數日(Kwon B 等人, (1999) *J Biol Chem* 274: 6056-6061 ; Gurney AL 等人, (1999) *Curr Biol* 9: 215-218 ; Ronchetti S 等人, (2004) (同上) ; Shimizu J 等人, (2002) (同上) ; Ji H B 等人, (2004) (同上) ; Ronchetti S 等人, (2002) *Blood* 100: 350-352 ; Li Z 等人, (2003) *J Autoimmun* 21: 83-92), CD4<sup>+</sup>細胞比 CD8<sup>+</sup>細胞具有更高之 GITR 表現(Kober J 等人, (2008) *Eur J Immunol* 38(10): 2678-88 ; Bianchini R 等人, (2011) *Eur J Immunol* 41(8): 2269-78)。

[0008] OX40(亦稱為 CD134、腫瘤壞死因子受體超家族成員 4 (TNFRSF4)、TXGP1L、ACT35 及 ACT-4)調節 T 細胞、自然殺手 T(NKT)細胞及 NK 細胞功能(Sugamura K 等人, (2004) *Nat Rev Immunol* 4: 420-431)。OX40 可由抗原特異性 T 細胞在顯示負載同源肽之 MHC I 類或 II 類分子之專職抗原呈現細胞(APC)刺激 T 細胞受體(TCR)之後上調(Sugamura K 等人, (2004) *Nat Rev Immunol* 4: 420-431)。在成熟時, 諸如樹突細胞(DC)之 APC 上調刺激性 B7 家族成員(例如 CD80 及 CD86)及包括 OX40 配體(OX40L)之輔助共刺激分子, 該上調有助於塑造 T 細胞免

疫反應之動力學及量級以及有效之記憶細胞分化。值得注意的是，其他細胞類型亦可表現組成性及/或誘導性 OX40L 之含量，諸如 B 細胞、血管內皮細胞、肥大細胞及在一些情況下經活化之 T 細胞(Soroosh P 等人, (2006) *J Immunol* 176: 5975-5987)。威信 OX40:OX40L 共接合驅動受體三聚體之更高層級之簇集及後續之信號轉導(Compaan DM 等人, (2006) *Structure* 14: 1321-1330)。

[0009] 已在鼠類及人類腫瘤組織中觀測到在腫瘤微環境內 T 細胞表現 OX40(Bulliard Y 等人, (2014) *Immunol Cell Biol* 92: 475-480 ; 及 Piconese S 等人, (2014) *Hepatology* 60: 1494-1507)。相對於習知之 T 細胞群體，調節性 T 細胞(Treg)之腫瘤內群體高度表現 OX40，此為歸因於腫瘤內 Treg 群體之增殖狀態特徵(Waight J D 等人, (2015) *J Immunol* 194: 878-882 ; 及 Bulliard Y 等人, (2014) *Immunol Cell Biol* 92: 475-480)。早期研究證實 OX40 促效劑抗體能夠在小鼠模型中引出腫瘤排斥反應(Weinberg A D 等人, (2000) *J Immunol* 164: 2160-2169 ; 及 Piconese S 等人, (2008) *J Exp Med* 205: 825-839)。促效人類 OX40 信號傳導之小鼠抗體亦已顯示可增強癌症患者之免疫功能(Curti B D 等人, (2013) *Cancer Res* 73: 7189-7198)。

[0010] OX40 與 OX40L 之相互作用亦已與發炎性及自體免疫性疾病及病症之免疫反應相關，該等疾病及病症包

括氣喘/特異反應、腦脊髓炎、類風濕性關節炎、結腸炎/發炎性腸病、移植物抗宿主病(例如移植排斥反應)、非肥胖糖尿病小鼠之糖尿病及動脈粥樣硬化之小鼠模型(Croft M 等人, (2009) *Immunol Rev* 229(1): 173-191 及其中引用之參考文獻)。已報導在 OX40 及 OX40L 缺陷型小鼠、接受負載細胞抑制藥物之抗 OX40 脂質體之小鼠及使用抗 OX40L 阻斷抗體或與人類免疫球蛋白之 Fc 部分融合之重組 OX40 阻斷 OX40 與 OX40L 之相互作用的小鼠中與該等疾病及病症相關之症狀減少(Croft M 等人; Boot EPJ 等人, (2005) *Arthritis Res Ther* 7: R604-615; Weinberg A D 等人, (1999) *J Immunol* 162: 1818-1826)。亦顯示使用阻斷性抗 OX40L 抗體之治療可抑制恆河猴氣喘模型之 Th2 發炎(Croft M 等人; Seshasayee D 等人, (2007) *J Clin Invest* 117: 3868-3878)。此外, OX40L 之多態性已與狼瘡相關(Croft M 等人)。

[0011] 鑒於人類 GITR 及 OX40 在調節免疫反應之角色, 本發明提供特異性結合 GITR 及/或 OX40 之抗體及該等抗體調節 GITR 及/或 OX40 活性之用途。

### 【發明內容】

[0012] 在一個態樣中, 本發明提供結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體。在一種情況下, 分離之多特異性(例如雙特異性)抗體包含特異性結合

OX40(例如人類 OX40)之第一抗原結合域及特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之第二抗原結合域。

[0013] 在一種情況下，抗體包含特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域及 TNF 超家族蛋白質。在一種情況下，抗體包含 TNF 超家族蛋白質及特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域。TNF 超家族蛋白質可置換本發明提供之任何多特異性(例如雙特異性)抗體之第一抗原結合域或第二抗原結合域。

[0014] 在一種情況下，特異性結合人類 OX40 的分離之多特異性(例如雙特異性)抗體包含：(a)特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域，該第一抗原結合域包含：(i)包含胺基酸序列 GSAMH(SEQ ID NO:47)之重鏈可變域(VH)互補決定區(CDR)1；(ii)包含胺基酸序列 RIRSKANSYATAYAASVKG(SEQ ID NO:48)之 VH-CDR2；(iii)包含胺基酸序列 GIYDSSGYDY(SEQ ID NO:49)之 VH-CDR3；(iv)包含胺基酸序列 RSSQSLLHSNGYNYLD(SEQ ID NO:50)之輕鏈可變域(VL)-CDR1；(v)包含胺基酸序列 LGSNRAS(SEQ ID NO:51)之 VL-CDR2；及(vi)包含胺基酸序列 MQGSKWPLT(SEQ ID NO:52)或 MQALQTPLT(SEQ ID NO:53)之 VL-CDR3；以及(b)第二抗原結合域。

[0015] 在一種情況下，特異性結合人類 OX40 的分離之多特異性(例如雙特異性)抗體包含：(a)與抗體特異性結合人類 OX40 之相同表位之第一抗原結合域，該抗體包

含 VH 和 VL，該 VH 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:54 且該 VL 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:55 或 56；以及(b)第二抗原結合域。

[0016] 在一種情況下，特異性結合人類 OX40 的分離之多特異性(例如雙特異性)抗體包含：(a)第一抗原結合域，該第一抗原結合域特異性結合人類 OX40 且相較於與 SEQ ID NO:72 之人類 OX40 序列之結合，表現與 SEQ ID NO:72 相同但存在胺基酸突變之蛋白質的減少或缺少之結合，該胺基酸突變選自由以下組成之群：N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A 及彼等之組合，該胺基酸編號係根據 SEQ ID NO: 72；及(b)第二抗原結合域。

[0017] 在一種情況下，特異性結合人類 OX40 的分離之多特異性(例如雙特異性)抗體包含：(a)包含 VH 及 VL 之特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域，其中該 VH 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:54；及(b)第二抗原結合域。

[0018] 在一種情況下，特異性結合人類 OX40 的分離之多特異性(例如雙特異性)抗體包含：(a)包含 VH 及 VL 之特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域，其中該 VL 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:55 或 SEQ ID NO:56；及(b)第二抗原結合域。

[0019] 在一種情況下，特異性結合人類 GITR 的分離之多特異性(例如雙特異性)抗體包含：(a)第一抗原結合

域；及(b)特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域，該第二抗原結合域包含：(i)包含胺基酸序列  $X_1YX_2MX_3$ (SEQ ID NO:87)之 VH-CDR1，其中  $X_1$  為 D、E 或 G； $X_2$  為 A 或 V；且  $X_3$  為 Y 或 H；(ii)包含胺基酸序列  $X_1IX_2TX_3SGX_4X_5X_6YNQKFX_7X_8$ (SEQ ID NO:88)之 VH-CDR2，其中  $X_1$  為 V 或 L； $X_2$  為 R、K 或 Q； $X_3$  為 Y 或 F； $X_4$  為 D、E 或 G； $X_5$  為 V 或 L； $X_6$  為 T 或 S； $X_7$  為 K、R 或 Q；且  $X_8$  為 D、E 或 G；(iii)包含胺基酸序列 SGTVRGFAY(SEQ ID NO:3)之 VH-CDR3；(iv)包含胺基酸序列  $KSSQSLLNSX_1NQKNYLX_2$ (SEQ ID NO:90)之 VL-CDR1，其中  $X_1$  為 G 或 S；且  $X_2$  為 T 或 S；(v)包含胺基酸序列 WASTRES(SEQ ID NO:5)之 VL-CDR2；及(vi)包含胺基酸序列  $QNX_1YSX_2PYT$ (SEQ ID NO:92)之 VL-CDR3，其中  $X_1$  為 D 或 E；且  $X_2$  為 Y、F 或 S。

[0020] 在一種情況下，特異性結合人類 GITR 的分離之多特異性(例如雙特異性)抗體包含：(a)第一抗原結合域；及(b)與抗體特異性結合人類 GITR 之相同表位之第二抗原結合域，該抗體包含 VH 和 VL，該 VH 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:18 且該 VL 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:19。

[0021] 在一種情況下，特異性結合人類 GITR 的分離之多特異性(例如雙特異性)抗體包含：(a)第一抗原結合域；及(b)第二抗原結合域，該第二抗原結合域特異性結

合人類 GITR 之表位，該表位包含 SEQ ID NO:41 之殘基 60 至 63 中至少一個胺基酸。

[0022] 在一種情況下，特異性結合人類 GITR 的分離之多特異性(例如雙特異性)抗體包含：(a)第一抗原結合域；及(b)第二抗原結合域，該第二抗原結合域特異性結合以下每一者：i)包含 SEQ ID NO:41 之殘基 26 至 241 之人類 GITR 及 ii)石蟹獼猴 GITR 之變異體，該變異體包含 SEQ ID NO:46 之殘基 26 至 234，其中該抗體不特異性結合包含 SEQ ID NO:44 之殘基 26 至 234 之石蟹獼猴 GITR。

[0023] 在一種情況下，特異性結合人類 GITR 的分離之多特異性(例如雙特異性)抗體包含：(a)第一抗原結合域；及(b)第二抗原結合域，該第二抗原結合域特異性結合人類 GITR 且相較於與 SEQ ID NO:41 之殘基 26 至 241 之人類 GITR 序列之結合，表現與 SEQ ID NO:41 之殘基 26 至 241 相同但存在 D60A 或 G63A 胺基酸取代之蛋白質的減少或缺少之結合，該胺基酸編號係根據 SEQ ID NO:41。

[0024] 在一種情況下，特異性結合人類 GITR 的分離之多特異性(例如雙特異性)抗體包含：(a)第一抗原結合域；及(b)第二抗原結合域，該第二抗原結合域特異性結合人類 GITR 且包含 VH 及 VL，其中該 VH 包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:18、20、22、24



及 25。

[0025] 在一種情況下，特異性結合人類 GITR 的分離之多特異性(例如雙特異性)抗體包含：(a)第一抗原結合域；及(b)第二抗原結合域，該第二抗原結合域特異性結合人類 GITR 且包含 VH 及 VL，其中該 VL 包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:19、21、23 及 26。

[0026] 在一種情況下，特異性結合人類 OX40 的分離之多特異性(例如雙特異性)抗體包含第二抗原結合域。在一種情況下，該第二抗原結合域特異性結合 TNFR 超家族蛋白質。在一種情況下，該 TNFR 超家族蛋白質選自由以下組成之群：GITR、OX40(例如其中該第二抗原結合域與該第一抗原結合域結合不同之 OX40 表位)、CD137、DR3、CD40、BAFFR、CD27 及 HVEM。

[0027] 在一種情況下，特異性結合人類 GITR 的分離之多特異性(例如雙特異性)抗體包含第一抗原結合域。在一種情況下，該第一抗原結合域特異性結合 TNFR 超家族蛋白質。在一種情況下，該 TNFR 超家族蛋白質選自由以下組成之群：GITR(例如其中該第一抗原結合域與該第二抗原結合域結合不同之 GITR 表位)、OX40、CD137、DR3、CD40、BAFFR、CD27 及 HVEM。

[0028] 在一種情況下，該第二抗原結合域特異性結合 TNFR 超家族蛋白質人類 GITR。在一種情況下，該結

合人類 GITR 之第二抗原結合域包含：(i)包含胺基酸序列  $X_1YX_2MX_3$ (SEQ ID NO:87)之 VH-CDR1，其中  $X_1$  為 D、E 或 G； $X_2$  為 A 或 V；且  $X_3$  為 Y 或 H；(ii)包含胺基酸序列  $X_1IX_2TX_3SGX_4X_5X_6YNQKFX_7X_8$ (SEQ ID NO:88)之 VH-CDR2，其中  $X_1$  為 V 或 L； $X_2$  為 R、K 或 Q； $X_3$  為 Y 或 F； $X_4$  為 D、E 或 G； $X_5$  為 V 或 L； $X_6$  為 T 或 S； $X_7$  為 K、R 或 Q；且  $X_8$  為 D、E 或 G；(iii)包含胺基酸序列 SGTVRGFAY(SEQ ID NO:3)之 VH-CDR3；(iv)包含胺基酸序列  $KSSQSLLNSX_1NQKNYLX_2$ (SEQ ID NO:90)之 VL-CDR1，其中  $X_1$  為 G 或 S；且  $X_2$  為 T 或 S；(v)包含胺基酸序列 WASTRES(SEQ ID NO:5)之 VL-CDR2；及(vi)包含胺基酸序列  $QNX_1YSX_2PYT$ (SEQ ID NO:92)之 VL-CDR3，其中  $X_1$  為 D 或 E；且  $X_2$  為 Y、F 或 S。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域與抗體結合人類 GITR 之相同表位，該抗體包含 VH 和 VL，該 VH 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:18 且該 VL 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:19。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域結合人類 GITR 之表位，該表位包含 SEQ ID NO:41 之殘基 60 至 63 中至少一個胺基酸。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域結合以下每一者：i)包含 SEQ ID NO:41 之殘基 26 至 241 之人類 GITR 及 ii)石蟹獼猴 GITR 之變異體，該變異體包含 SEQ ID NO:46 之殘基 26 至 234，其中該第二抗原結合域不特

異性結合包含 SEQ ID NO:44 之殘基 26 至 234 之石蟹獼猴 GITR。在一種情況下，相較於與 SEQ ID NO:41 之殘基 26 至 241 之人類 GITR 序列的結合，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域表現與 SEQ ID NO:41 之殘基 26 至 241 相同但存在 D60A 或 G63A 胺基酸取代之蛋白質的減少或缺少之結合，該胺基酸編號係根據 SEQ ID NO:41。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含 VH 及 VL，其中該 VH 包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:18、20、22、24 及 25。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含 VH 及 VL，其中該 VL 包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:19、21、23 及 26。

[0029] 在一種情況下，該第一抗原結合域特異性結合 TNFR 超家族蛋白質人類 OX40。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含：(i)包含胺基酸序列 GSAMH(SEQ ID NO:47)之 VH-CDR1；(ii)包含胺基酸序列 RIRSKANSYATAYAASVKG(SEQ ID NO:48)之 VH-CDR2；(iii)包含胺基酸序列 GIYDSSGYDY(SEQ ID NO:49) 之 VH-CDR3；(iv)包含胺基酸序列 RSSQSLLSNGYNYLD(SEQ ID NO:50)之 VL-CDR1；(v)包含胺基酸序列 LGSNRAS(SEQ ID NO:51)之 VL-CDR2；及(vi)包含胺基酸序列 MQGSKWPLT(SEQ ID NO:52)或 MQALQTPLT(SEQ ID NO:53)之 VL-CDR3。在一種情況

下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域與抗體結合人類 OX40 之相同表位，該抗體包含 VH 和 VL，該 VH 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:54 且該 VL 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:55 或 56。在一種情況下，相較於與 SEQ ID NO:72 之人類 OX40 序列的結合，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域表現與 SEQ ID NO:72 相同但存在胺基酸突變之蛋白質的減少或缺少之結合，該胺基酸突變選自由以下組成之群：N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A 及彼等之組合，該胺基酸編號係根據 SEQ ID NO:72。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含 VH 及 VL，且該 VH 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:54。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含 VH 及 VL，且該 VL 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:55 或 SEQ ID NO:56。

[0030] 在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含：(i)包含胺基酸序列  $X_1YAMX_2$ (SEQ ID NO:1)之 VH-CDR1，其中  $X_1$  為 D、G 或 E；且  $X_2$  為 Y 或 H；(ii)包含胺基酸序列  $X_1IRTYSGX_2VX_3YNQKFX_4X_5$ (SEQ ID NO:2)之 VH-CDR2，其中  $X_1$  為 V 或 L； $X_2$  為 D 或 G； $X_3$  為 T 或 S； $X_4$  為 K、R 或 Q；且  $X_5$  為 D、E 或 G；(iii)包含胺基酸序列 SGTVRGFAY(SEQ ID NO:3)之 VH-CDR3；(iv)包含胺基酸序列  $KSSQSLLNSX_1NQKNYLT$ (SEQ ID NO:4)之 VL-CDR1，其中  $X_1$  為 G 或 S；(v)包含

胺基酸序列 WASTRES(SEQ ID NO:5)之 VL-CDR2；及(vi) 包含胺基酸序列 QNX<sub>1</sub>YSX<sub>2</sub>PYT(SEQ ID NO:6)之 VL-CDR3，其中 X<sub>1</sub> 為 D 或 E；且 X<sub>2</sub> 為 Y 或 F。

[0031] 在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含 VH-CDR1，該 VH-CDR1 包含選自由 SEQ ID NO:7 至 9 組成之群的胺基酸序列。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含 VH-CDR2，該 VH-CDR2 包含選自由 SEQ ID NO:10 至 13 組成之群的胺基酸序列。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含 VL-CDR1，該 VL-CDR1 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:14 或 15。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含 VL-CDR3，該 VL-CDR3 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:16 或 17。

[0032] 在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含 VH-CDR1、VH-CDR2 及 VH-CDR3 序列，該等序列分別以 SEQ ID NO:7、10 及 3、SEQ ID NO:8、11 及 3、SEQ ID NO:9、12 及 3、或 SEQ ID NO:9、13 及 3 示出；及/或 VL-CDR1、VL-CDR2 及 VL-CDR3 序列，該等序列分別以 SEQ ID NO:14、5 及 16 或 SEQ ID NO:15、5 及 17 示出。

[0033] 在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含分別以 SEQ ID NO:7、10、3、14、5 及 16 示出之 VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3、VL-CDR1、

VL-CDR2 及 VL-CDR3 序列。

[0034] 在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含 VH，該 VH 包含以 SEQ ID NO:25 示出之胺基酸序列。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含 VH，該 VH 包含與選自由以下組成之群的胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、95% 或 99% 一致之胺基酸序列：SEQ ID NO:18、20、22 及 24。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含 VH，該 VH 包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:18、20、22 及 24。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含 VH，該 VH 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:18。

[0035] 在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含選自由 SEQ ID NO:29 至 36 組成之群的胺基酸序列。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含選自由 SEQ ID NO:74 至 81 組成之群的胺基酸序列。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:31。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:76。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID

NO:32。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:77。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:34。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:79。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:35。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:80。

[0036] 在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含 VH，該 VH 包含源自於人類 IGHV1-2 生殖系序列之胺基酸序列。

[0037] 在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含 VL，該 VL 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:26。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含 VL，該 VL 包含與選自由以下組成之群的胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、95%或 99%一致之胺基酸序列：SEQ ID NO:19、21 及 23。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含 VL，該 VL 包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:19、21 及 23。在一種情況下，該特異性結合人類

GITR 之第二抗原結合域包含 VL，該 VL 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:19。

[0038] 在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含輕鏈，該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:37。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含輕鏈，該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:38。

[0039] 在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含 VL，該 VL 包含源自於人類 IGKV4-1 生殖系序列之胺基酸序列。

[0040] 在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含 VH 及 VL 序列，該等序列分別以 SEQ ID NO:18 及 19、SEQ ID NO:20 及 21、SEQ ID NO:22 及 23 或 SEQ ID NO:24 及 23 示出。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含 VH 和 VL，該 VH 包含以 SEQ ID NO:18 示出之序列且該 VL 包含以 SEQ ID NO:19 示出之序列。

[0041] 在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含重鏈和輕鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:31 且該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:37。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含重鏈和輕鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:76 且該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:37。在一種



情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含重鏈和輕鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:32 且該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:37。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含重鏈和輕鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:77 且該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:37。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含重鏈和輕鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:34 且該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:37。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含重鏈和輕鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:79 且該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:37。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含重鏈和輕鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:35 且該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:37。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含重鏈和輕鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:80 且該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:37。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含重鏈和輕鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:29 且該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:37。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含重鏈和輕鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:74 且該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:37。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR

之第二抗原結合域包含重鏈和輕鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:30 且該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:37。在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含重鏈和輕鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:75 且該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:37。

[0042] 在一種情況下，該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含重鏈可變區和輕鏈可變區，該重鏈可變區具有源自於人類 IGHV1-2 生殖系序列之胺基酸序列且該輕鏈可變區具有源自於人類 IGKV4-1 生殖系序列之胺基酸序列。

[0043] 在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含 VH，該 VH 包含與胺基酸序列 SEQ ID NO:54 至少 75%、80%、85%、90%、95%或 99%一致之胺基酸序列。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含 VH，該 VH 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:54。

[0044] 在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含選自由 SEQ ID NO:59 至 66 組成之群的胺基酸序列。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含選自由 SEQ ID NO:118 至 125 組成之群的胺基酸序列。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID

NO:61。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:120。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:62。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:121。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:64。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:123。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:65。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:124。

[0045] 在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含 VH，該 VH 包含源自於人類 IGHV3-73 生殖系序列之胺基酸序列。

[0046] 在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含 VL，該 VL 包含與胺基酸序列 SEQ ID NO:55 或 SEQ ID NO:56 至少 75%、80%、85%、90%、95% 或 99% 一致之胺基酸序列。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含 VL-CDR3，該 VL-

CDR3 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:52。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含 VL，該 VL 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:55。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含輕鏈，該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:67。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含輕鏈，該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:68。

[0047] 在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含 VL-CDR3，該 VL-CDR3 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:53。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含 VL，該 VL 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:56。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含輕鏈，該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:69。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含輕鏈，該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:70。

[0048] 在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含 VL，該 VL 包含源自於人類 IGKV2-28 生殖系序列之胺基酸序列。

[0049] 在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含分別以 SEQ ID NO:54 及 55 或 SEQ ID NO:54 及 56 示出之 VH 及 VL 序列。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含重鏈和輕

鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:59 且該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:67 或 69。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含重鏈和輕鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:118 且該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:67 或 69。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含重鏈和輕鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:64 且該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:67 或 69。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含重鏈和輕鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:123 且該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:67 或 69。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含重鏈和輕鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:65 且該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:67 或 69。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含重鏈和輕鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:124 且該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:67 或 69。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含重鏈和輕鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:61 且該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:67 或 69。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含重鏈和輕鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:120 且該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:67 或 69。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含重

鏈和輕鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:62 且該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:67 或 69。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含重鏈和輕鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:121 且該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:67 或 69。

[0050] 在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含 VH 和 VL，該 VH 包含源自於人類 IGHV3-73 生殖系序列之胺基酸序列且該 VL 包含源自於人類 IGKV2-28 生殖系序列之胺基酸序列。

[0051] 在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含以 SEQ ID NO:54 示出之 VH 序列及以 SEQ ID NO:55 或 56 示出之 VL 序列，且該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含以 SEQ ID NO:18 示出之 VH 序列及以 SEQ ID NO:19 示出之 VL 序列。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含以 SEQ ID NO:59 示出之重鏈序列及以 SEQ ID NO:67 或 69 示出之輕鏈序列，且該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含以 SEQ ID NO:29 示出之重鏈序列及以 SEQ ID NO:37 示出之輕鏈序列。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含以 SEQ ID NO:118 示出之重鏈序列及以 SEQ ID NO:67 或 69 示出之輕鏈序列，且其中該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含以 SEQ ID NO:74 示出之重鏈序列及以 SEQ ID NO:37 示出之

輕鏈序列。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含以 SEQ ID NO:61 示出之重鏈序列及以 SEQ ID NO:67 或 69 示出之輕鏈序列，且該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含以 SEQ ID NO:31 示出之重鏈序列及以 SEQ ID NO:37 示出之輕鏈序列。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含以 SEQ ID NO:120 示出之重鏈序列及以 SEQ ID NO:67 或 69 示出之輕鏈序列，且其中該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含以 SEQ ID NO:76 示出之重鏈序列及以 SEQ ID NO:37 示出之輕鏈序列。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含以 SEQ ID NO:62 示出之重鏈序列及以 SEQ ID NO:67 或 69 示出之輕鏈序列，且該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含以 SEQ ID NO:32 示出之重鏈序列及以 SEQ ID NO:37 示出之輕鏈序列。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含以 SEQ ID NO:121 示出之重鏈序列及以 SEQ ID NO:67 或 69 示出之輕鏈序列，且其中該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含以 SEQ ID NO:77 示出之重鏈序列及以 SEQ ID NO:37 示出之輕鏈序列。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含以 SEQ ID NO:64 示出之重鏈序列及以 SEQ ID NO:67 或 69 示出之輕鏈序列，且該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含以 SEQ ID NO:34 示出之重鏈序列

及以 SEQ ID NO:37 示出之輕鏈序列。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含以 SEQ ID NO:123 示出之重鏈序列及以 SEQ ID NO:67 或 69 示出之輕鏈序列，且其中該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含以 SEQ ID NO:79 示出之重鏈序列及以 SEQ ID NO:37 示出之輕鏈序列。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含以 SEQ ID NO:65 示出之重鏈序列及以 SEQ ID NO:67 或 69 示出之輕鏈序列，且該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含以 SEQ ID NO:35 示出之重鏈序列及以 SEQ ID NO:37 示出之輕鏈序列。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含以 SEQ ID NO:124 示出之重鏈序列及以 SEQ ID NO:67 或 69 示出之輕鏈序列，且其中該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含以 SEQ ID NO:80 示出之重鏈序列及以 SEQ ID NO:37 示出之輕鏈序列。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含以 SEQ ID NO:67 示出之輕鏈序列。在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含以 SEQ ID NO:69 示出之輕鏈序列。

[0052] 在一種情況下，該特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合域包含源自於人類 IGHV3-73 生殖系序列之 VH 及源自於人類 IGKV2-28 生殖系序列之 VL，且該特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合域包含源自於人類



IGHV1-2 生殖系序列之 VH 及源自於人類 IGKV4-1 生殖系序列之 VL。

[0053] 在一種情況下，該抗體為  $\kappa$ - $\lambda$  體、雙親和重靶向分子(DART)、杵入白型抗體、股交換工程改造結構域體(SEED 體)或雙特異性抗體 DuoBody<sup>®</sup> 抗體(Genmab A/S)。

[0054] 在一種情況下，該第一抗原結合域包含選自由以下組成之群的重鏈恆定區：人類 IgG<sub>1</sub>、人類 IgG<sub>2</sub>、人類 IgG<sub>3</sub>、人類 IgG<sub>4</sub>、人類 IgA<sub>1</sub> 及人類 IgA<sub>2</sub>，且該第二抗原結合域包含選自由以下組成之群的重鏈恆定區：人類 IgG<sub>1</sub>、人類 IgG<sub>2</sub>、人類 IgG<sub>3</sub>、人類 IgG<sub>4</sub>、人類 IgA<sub>1</sub> 及人類 IgA<sub>2</sub>。在一種情況下，該第一抗原結合域之重鏈恆定區為人類 IgG<sub>1</sub>，且該第二抗原結合域之重鏈恆定區為人類 IgG<sub>1</sub>。

[0055] 在一種情況下，(a)該第一抗原結合域包含第一重鏈恆定區，該第一重鏈恆定區包含 F405L 胺基酸突變；且(b)該第二抗原結合域包含第二重鏈恆定區，該第二重鏈恆定區包含 K409R 胺基酸突變，該等胺基酸編號係根據 EU 編號系統。在一種情況下，(a)該第一抗原結合域包含第一重鏈恆定區，該第一重鏈恆定區包含 K409R 胺基酸突變；且(b)該第二抗原結合域包含第二重鏈恆定區，該第二重鏈恆定區包含 F405L 胺基酸突變，該等胺基酸編號係根據 EU 編號系統。在一種情況下，該第一抗原

結合域之重鏈恆定區為 IgG<sub>1</sub>。在一種情況下，該第二抗原結合域之重鏈恆定區為 IgG<sub>1</sub>。

[0056] 在一種情況下，該第一抗原結合域包含選自由人類 IgG<sub>κ</sub> 及 IgG<sub>λ</sub> 組成之群的輕鏈恆定區，且該第二抗原結合域包含選自由人類 IgG<sub>κ</sub> 及 IgG<sub>λ</sub> 組成之群的輕鏈恆定區。

[0057] 在一種情況下，相較於與 SEQ ID NO:41 之殘基 26 至 241 之人類 GITR 序列的結合，該第二抗原結合域表現與 SEQ ID NO:41 之殘基 26 至 241 相同但存在 D60A 胺基酸取代之蛋白質的減少或缺少之結合，該胺基酸編號係根據 SEQ ID NO:41。在一種情況下，相較於與 SEQ ID NO:41 之殘基 26 至 241 之人類 GITR 序列的結合，該第二抗原結合域表現與 SEQ ID NO:41 之殘基 26 至 241 相同但存在 G63A 胺基酸取代之蛋白質的減少或缺少之結合，該胺基酸編號係根據 SEQ ID NO:41。在一種情況下，該結合人類 GITR 之第二抗原結合域結合選自由 SEQ ID NO:41 之殘基 60、62 及 63 組成之群的至少一個殘基。在一種情況下，該結合人類 GITR 之第二抗原結合域結合選自由 SEQ ID NO:41 之殘基 62 及 63 組成之群的至少一個殘基。在一種情況下，該結合人類 GITR 之第二抗原結合域結合選自由 SEQ ID NO:41 之殘基 60 及 63 組成之群的至少一個殘基。在一種情況下，該結合人類 GITR 之第二抗原結合域結合包含 SEQ ID NO:41 之殘基

60 至 63 之表位。

[0058] 在一種情況下，該抗體 (i) 相較於結合人類 GITR 且與該結合人類 GITR 之第二抗原結合域含有相同之 VH 及 VL 的單特異性二價抗體，顯示與表現人類 GITR 及人類 OX40 之細胞增加的結合；及/或(ii)相較於結合人類 OX40 且與該結合人類 OX40 之第一抗原結合域含有相同之 VH 及 VL 的單特異性二價抗體，顯示與表現人類 GITR 及人類 OX40 之細胞增加的結合。

[0059] 在一種情況下，該抗體 (i) 相較於結合人類 GITR 且與該結合人類 GITR 之第二抗原結合域含有相同之 VH 及 VL 的單特異性二價抗體，顯示與 GITR 陽性、OX40 陰性細胞減少之結合；及/或(ii)相較於結合人類 OX40 且與該結合人類 OX40 之第一抗原結合域含有相同之 VH 及 VL 的單特異性二價抗體，顯示與 GITR 陰性、OX40 陽性細胞減少之結合。

[0060] 在一種情況下，該抗體 (i) 相較於結合人類 GITR 且與該結合人類 GITR 之第二抗原結合域含有相同之 VH 及 VL 的單特異性二價抗體，誘導對調節性 T 細胞更強之自然殺手細胞介導之細胞毒性；及/或(ii)相較於結合人類 OX40 且與該結合人類 OX40 之第一抗原結合域含有相同之 VH 及 VL 的單特異性二價抗體，誘導對調節性 T 細胞更強之自然殺手細胞介導之細胞毒性。

[0061] 在一種情況下，該抗體抑制人類 GITR 配體與

人類 GITR 結合。在一種情況下，該抗體抑制人類 OX40 配體與人類 OX40 結合。

[0062] 在一種情況下，該抗體當結合經活化之調節性 T 細胞時與選自由 CD16、CD32A 及 CD64 組成之群的活化性 Fc $\gamma$  受體之結合程度大於該抗體當結合經活化之效應 T 細胞時與選自由 CD16、CD32A 及 CD64 組成之群的活化性 Fc $\gamma$  受體之結合程度。在一種情況下，該活化性 Fc $\gamma$  受體表現於選自由骨髓衍生之效應細胞及淋巴球衍生之效應細胞組成之群的細胞上。

[0063] 在一種情況下，該抗體對人類 GITR 及/或人類 OX40 具有促效性。在一種情況下，該抗體誘導、活化或增強人類 GITR 之活性。在一種情況下，該抗體誘導、活化或增強人類 OX40 之活性。

[0064] 在一種情況下，該第一抗原結合域包含人類 IgG<sub>1</sub> 重鏈恆定區，該人類 IgG<sub>1</sub> 重鏈恆定區包含 N297A 突變或 N297Q 突變及/或該第二抗原結合域包含人類 IgG<sub>1</sub> 重鏈恆定區，該人類 IgG<sub>1</sub> 重鏈恆定區包含 N297A 突變或 N297Q 突變，該等胺基酸編號係根據 EU 編號系統。

[0065] 在一種情況下，該抗體對人類 GITR 及/或人類 OX40 具有拮抗性。在一種情況下，該抗體去活化、降低或抑制人類 GITR 之活性。在一種情況下，該抗體去活化、降低或抑制人類 OX40 之活性。在一種情況下，該抗體抑制或減少人類 GITR 信號傳導。在一種情況下，該抗

體抑制或減少人類 OX40 信號傳導。在一種情況下，該抗體抑制或減少由人類 GITR 配體誘導之人類 GITR 信號傳導。在一種情況下，該抗體抑制或減少由人類 OX40 配體誘導之人類 OX40 信號傳導。

[0066] 在一種情況下，該抗體減少由來自類風濕性關節炎患者之滑液誘導之 CD4+ T 細胞增殖。在一種情況下，該抗體增加接受人類 PBMC 移植之 NOG 小鼠之存活率。在一種情況下，該抗體增加 GVHD 模型中調節性 T 細胞之增殖。

[0067] 在一種情況下，該抗體進一步包含可偵測之標記。

[0068] 本發明亦提供組合物。在一種情況下，該組合物包含 (i) 編碼本發明提供之抗體之第一抗原結合片段之輕鏈可變區或輕鏈之核酸分子；(ii) 編碼本發明提供之抗體之第一抗原結合片段之重鏈可變區或重鏈之核酸分子；(iii) 編碼本發明提供之抗體之第二抗原結合片段之輕鏈可變區或輕鏈之核酸分子；及 (iv) 編碼本發明提供之抗體之第二抗原結合片段之重鏈可變區或重鏈之核酸分子。

[0069] 本發明亦提供宿主細胞。在一種情況下，宿主細胞包含 (i) 編碼本發明提供之抗體之第一抗原結合片段之輕鏈可變區或輕鏈之核酸分子；(ii) 編碼本發明提供之抗體之第一抗原結合片段之重鏈可變區或重鏈之核酸分子；(iii) 編碼本發明提供之抗體之第二抗原結合片段之輕

鏈可變區或輕鏈之核酸分子；及(iv)編碼本發明提供之抗體之第二抗原結合片段之重鏈可變區或重鏈之核酸分子。在一種情況下，該宿主細胞係選自由以下組成之群：大腸桿菌、假單孢菌 (*Pseudomonas*)、芽孢桿菌 (*Bacillus*)、鏈黴菌 (*Streptomyces*)、酵母菌、CHO、YB/20、NS0、PER-C6、HEK-293T、NIH-3T3、HeLa、BHK、Hep G2、SP2/0、R1.1、B-W、L-M、COS 1、COS 7、BSC1、BSC40、BMT10 細胞、植物細胞、昆蟲細胞及組織培養之人類細胞。本發明亦提供製備結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體之方法。在一種情況下，該方法包括培養本發明提供之宿主細胞以使該等核酸分子表現且產生該抗體。

[0070] 本發明亦提供使用與 GITR 及/或 OX40 結合之多特異性(例如雙特異性)抗體之方法。在一種情況下，在樣品中偵測表現 GITR 及 OX40 之細胞的方法包括使該樣品與本發明提供之抗體接觸。

[0071] 本發明亦提供醫藥組合物。在一種情況下，該醫藥組合物包含本發明提供之抗體及醫藥學上可接受之賦形劑。

[0072] 本發明亦提供套組。在一種情況下，該套組包含本發明提供之抗體或醫藥組合物及 a)偵測試劑、b)GITR 及/或 OX40 抗原、c)反映批准用於人類投藥之使用或銷售的註記或 d)彼等之組合。

[0073] 本發明亦提供使用本發明提供之抗體及醫藥組合物之方法。在一種情況下，調節個體之免疫反應的方法包含對該個體投予有效量之本發明提供之抗體或醫藥組合物。在一種情況下，用於增強或誘導個體之免疫反應的方法包含對該個體投予有效量之本發明提供之抗體或醫藥組合物。

[0074] 在一種情況下，治療個體之癌症的方法包含對該個體投予有效量之本發明提供之抗體或醫藥組合物。在一種情況下，該癌症選自由黑素瘤、腎癌、前列腺癌、結腸癌及肺癌組成之群。在一種情況下，該方法進一步包含對該個體投予吲哚胺-2,3-二氧化酶(IDO)之抑制劑。在一種情況下，該抑制劑為埃帕多塔(epacadostat)。在一種情況下，該抑制劑為 F001287。在一種情況下，該抑制劑為吲哚西莫(indoximod)。在一種情況下，該抑制劑為 NLG919。在一種情況下，該方法進一步包含對該個體投予疫苗。在一種情況下，該疫苗包含熱休克蛋白肽複合物(HSPPC)，該 HSPPC 包含與抗原肽複合之熱休克蛋白。在一種情況下，該熱休克蛋白為 hsp70 或 hsc70 且與腫瘤相關抗原肽複合。在一種情況下，該熱休克蛋白為 gp96 蛋白且與腫瘤相關抗原肽複合，其中該 HSPPC 源自於自個體獲得之腫瘤。在一種情況下，該方法進一步包含對該個體投予查核點靶向劑。在一種情況下，該查核點靶向劑選自由以下組成之群：拮抗劑抗 PD-1 抗體、拮抗劑抗 PD-

L1 抗體、拮抗劑抗 PD-L2 抗體、拮抗劑抗 CTLA-4 抗體、拮抗劑抗 TIM-3 抗體、拮抗劑抗 LAG-3 抗體、拮抗劑抗 CEACAM1 抗體、促效劑抗 GITR 抗體及促效劑抗 OX40 抗體。

[0075] 在一種情況下，治療感染性疾病之方法包含對該個體投予有效量之本發明提供之抗體或醫藥組合物。

[0076] 在一種情況下，減少或抑制個體之免疫反應的方法包含對該個體投予有效量之本發明提供之抗體或醫藥組合物。

[0077] 在一種情況下，治療個體之自體免疫性或發炎性疾病或病症的方法包含對該個體投予有效量之本發明提供之抗體或醫藥組合物。在一種情況下，該自體免疫性或發炎性疾病或病症係選自由以下組成之群：移植排斥反應、移植物抗宿主病、血管炎、氣喘、類風濕性關節炎、皮炎、發炎性腸病、葡萄膜炎、狼瘡、結腸炎、糖尿病、多發性硬化及氣管發炎。

[0078] 在一種情況下，該個體為人類。

#### 【圖式簡單說明】

[0079] 圖 1A 及 1B：圖 1A 為一組直方圖，該等直方圖顯示在來自子宮內膜癌腫瘤組織、腎細胞癌(RCC)腫瘤組織及非小細胞肺癌(NSCLC)腫瘤組織之腫瘤內效應 T 細胞(Teff：CD4+ CD127+ CD25+/- FOXP3-)及調節性 T 細胞



(Treg : CD4+ CD127- CD25+ FOXP3+)上 GITR 及 OX40 之表現。圖 1B 為一組條形圖，該等條形圖顯示在來自卵巢癌腫瘤組織、結腸直腸癌(CRC)腫瘤組織、子宮內膜癌腫瘤組織、RCC 腫瘤組織及 NSCLC 腫瘤組織之 Treg 及 Teff 細胞之表面上 GITR 受體及 OX40 受體之預測數目。

[0080] 圖 2A、2B 及 2C 為顯示測試抗體與共表現 GITR 及 OX40 之活化之 Hut102 細胞(圖 2A)、表現 GITR 之 Jurkat 細胞(圖 2B)及表現 OX40 之 Jurkat 細胞(圖 2C)之結合的圖表。繪製平均螢光強度(MFI)對抗體濃度範圍之曲線。所使用之測試抗體為 DuoBody pab1876x pab2049(圖 2A 至 2C)、二價單特異性抗體 pab1876(圖 2A 及 2B)、二價單特異性抗體 pab2049(圖 2A 及 2C)、DuoBody pab1876x同型(圖 2A)、DuoBody pab2049x同型(圖 2A)及同型對照抗體(圖 2A 至 2C)。

[0081] 圖 3A 為一組直方圖，該等直方圖顯示在活化之自然調節性 T(nTreg)細胞上 GITR 及 OX40 之表現。圖 3B 為報導子分析之結果，其中檢驗測試抗體在當該等抗體結合活化之 nTreg 時活化表現  $Fc\gamma RIIIA^{V158}$  之報導細胞株的能力。所使用之測試抗體為 DuoBody pab1876x pab2049、二價單特異性抗體 pab1876、二價單特異性抗體 pab2049 及同型對照抗體。將相對光單位(RLU)相對於經所測試之最高濃度之同型對照抗體處理之樣品之 RLU 值正規化且繪製對抗體濃度之劑量滴定曲線。圖 3C 及 3D

為類似之報導子分析之結果，其中檢驗測試抗體在當該等抗體結合表現 GITR 之 Jurkat 細胞(圖 3C)或表現 OX40 之 Jurkat 細胞(圖 3D)時活化表現 Fc $\gamma$ RIIAV158 之報導細胞的能力。所使用之測試抗體為 DuoBody pab1876 $\times$ pab2049、二價單特異性抗體 pab1876(F405L/F405L)、二價單特異性抗體 pab2049(K409R/K409R)及同型對照抗體。繪製 RLU 對抗體濃度範圍的曲線。圖 3E、3F、及 3G 為量測在同型對照抗體、pab1876、pab2049、DuoBody pab1876 $\times$ pab2049、或 pab1876 與 pab2049 之組合存在下活化之效應 T 細胞或活化之 Treg 之 NK 細胞介導之裂解的分析結果。圖 3E 為一對直方圖，該等直方圖顯示藉由流動式細胞量測術所量測之活化之效應 T 細胞或 Treg 上 GITR(左側)或 OX40(右側)之表現。在圖 3F 及 3G 中，繪製細胞毒性%對抗體濃度之滴定曲線。

[0082] 圖 4A 及 4B 為描繪在葡萄球菌腸毒素 A(SEA)刺激後 DuoBody pab1876 $\times$ pab2049 對來自兩個供者之原生人類 T 細胞之功能活性的圖表。繪製在 DuoBody pab1876 $\times$ pab2049、DuoBody pab2049 $\times$ 同型及同型對照抗體之劑量滴定下 IL-2 之濃度曲線。

[0083] 圖 5A 及 5B：圖 5A 為報導子分析之結果，其中測試 DuoBody pab1876 $\times$ pab2049、三聚體 GITRL 及同型對照抗體活化 Jurkat-huGITR-NF- $\kappa$ B-螢光素酶報導細胞之能力。繪製相對光單位(RLU)對抗體或 GITRL 濃度範圍之

曲線。圖 5B 為報導子分析之結果，其中檢驗 DuoBody pab1876xpab2049 及同型對照抗體阻斷 GITRL 誘導之 NF- $\kappa$ B 信號傳導之能力。在該報導子分析中，將 Jurkat-huGITR-NF- $\kappa$ B-螢光素酶報導細胞與 DuoBody pab1876xpab2049 或同型對照抗體一起預培育，之後由三聚體 GITRL 活化。顯示在抗體濃度之劑量滴定存在下之 GITRL 活性%。

[0084] 圖 6A 及 6B：圖 6A 描繪由多聚體 OX40L、DuoBody pab1876xpab2049 或同型對照抗體觸發之 Jurkat-huOX40-NF- $\kappa$ B-螢光素酶報導細胞之 NF- $\kappa$ B-螢光素酶信號。繪製 RLU 對 OX40L 或抗體濃度之劑量滴定曲線。圖 6B 為報導子分析之結果，其中將 Jurkat-huOX40-NF- $\kappa$ B-螢光素酶報導細胞與 DuoBody pab1876xpab2049 或同型對照抗體一起預培育，之後由多聚體 OX40L 活化。繪製 OX40L 活性%對抗體濃度範圍之曲線。

[0085] 圖 7 為直方圖，該直方圖顯示當將生物素化之 GITR(GITR-bio)與嵌合親本 231-32-15、pab1875 或 pab1876 抗體一起預培育時，表現嵌合親本 231-32-15 抗體之 1624-5 前 B 細胞與 GITR-bio 之結合損失。圖 7 右側曲線描繪表現嵌合親本 231-32-15 抗體之 1624-5 前 B 細胞與 GITR-bio 之結合。然而，在左側曲線中，在將 GITR-bio 與嵌合親本 231-32-15、pab1875 或 pab1876 抗體一起預培育後，表現嵌合親本 231-32-15 抗體之 1624-5

細胞與 GITR-bio 之結合損失。

[0086] 圖 8 顯示藉由表面電漿共振 (BIAcore® T100/200) 所量測之表位競爭分析的結果。將 GITR 抗原固定在 CM5 感應器晶片上且以 300 nM 之濃度施加抗 GITR 抗體。首先施加嵌合親本 231-32-15 抗體，繼而施加鼠類抗體 6C8。

[0087] 圖 9A 及 9B 為使用表現由易錯 PCR 產生之 GITR 變異體之細胞庫的表位定位實驗之結果。圖 9A 及 9B 顯示結合多株抗 GITR 抗體但不結合抗 GITR 嵌合親本 231-32-15 抗體之 GITR 變異體的序列比對。

[0088] 圖 10A 及 10B 為使用丙胺酸掃描之表位定位實驗之結果。分別使人類 GITR 之下列位置(根據 SEQ ID NO:41 編號)突變成丙胺酸：P28A、T29A、G30A、G31A、P32A、T54A、T55A、R56A、C57A、C58A、R59A、D60A、Y61A、P62A、G63A、E64A、E65A、C66A、C67A、S68A、E69A、W70A、D71A、C72A、M73A、C74A、V75A 及 Q76A。圖 10A 所示之實驗所測試之抗體包括：單株抗 GITR 抗體 pab1876、pab1967、pab1975、pab1979 及 m6C8 以及多株抗 GITR 抗體 (AF689, R&D systems 公司)。圖 10A 為彙總 pab1876、pab1967、pab1975、pab1979 及參考抗體 m6C8 與表現人類 GITR 丙胺酸突變體之 1624-5 細胞結合的表。圖 10B 為一組流動式細胞量測術圖，該等圖顯示使用單株抗體

231-32-15、pab1876 或 m6C8 或多株抗體對表現野生型人類 GITR、D60A 突變體或 G63A 突變體之 1624-5 細胞的染色。在各圖中表示 GITR 陽性細胞之百分比。

[0089] 圖 11A 為突顯位置 62 及 63 之人類 GITR、V1M 石蟹獼猴 GITR 及 V1M/Q62P/S63G 石蟹獼猴 GITR 之序列比對，在該等位置處來自石蟹獼猴 GITR 之兩個胺基酸(GlnSer)經人類 GITR 之對應殘基(ProGly)置換。圖 11B 為一組流動式細胞量測術圖，該等圖顯示使用單株抗體 231-32-15、pab1876 或 m6C8 或多株抗 GITR 抗體對表現人類 GITR、V1M 石蟹獼猴 GITR 或 V1M/Q62P/S63G 石蟹獼猴 GITR 之 1624-5 細胞的染色。

[0090] 圖 12 為彙總單株抗 OX40 抗體 pab1949w、pab2049 及 pab1928 與表現人類 OX40 丙胺酸突變體之 1624-5 細胞結合之表。

### 【實施方式】

[0091] 本發明提供特異性結合 GITR(例如人類 GITR)及/或 OX40(例如人類 OX40)之多特異性抗體(例如雙特異性抗體)。

[0092] 舉例而言，本發明提供之多特異性(例如雙特異性)抗體可含有結合 OX40 之第一抗原結合域、及第二抗原結合域。該第二抗原結合域可不同於該第一抗原結合域。該第二抗原結合域可與該第一抗原結合域結合不同之

抗原(亦即不為 OX40 之抗原)。該第二抗原結合域可與該第一抗原結合域結合不同之表位。在一種情況下，本發明提供之抗體含有特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之第一抗原結合域及特異性結合 TNFR 超家族蛋白質之第二抗原結合域。該 TNFR 超家族蛋白質可為例如 GITR、OX40、CD137、DR3、CD40、BAFFR、CD27 或 HVEM。在一種情況下，本發明提供之抗體含有特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之第一抗原結合域及特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之第二抗原結合域。

[0093] 在另一個實施例中，本發明提供之抗體可含有第一抗原結合域及結合 GITR 之第二抗原結合域。該第一抗原結合域可不同於該第二抗原結合域。該第一抗原結合域可與該第一抗原結合域結合不同之抗原(亦即不為 GITR 之抗原)。該第二抗原結合域可與該第一抗原結合域結合不同之表位。在一種情況下，本發明提供之抗體含有特異性結合 TNFR 超家族蛋白質之第一抗原結合域及特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之第二抗原結合域。該 TNFR 超家族蛋白質可為例如 GITR、OX40、CD137、DR3、CD40、BAFFR、CD27 或 HVEM。在另一個實施例中，本發明提供之抗體含有結合 OX40 之第一抗原結合域及結合 GITR 之第二抗原結合域。在一種情況下，本發明提供之抗體含有特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之第一抗原結合域及特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之第二抗

原結合域。

[0094] 本發明亦提供包含特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域及 TNF 超家族蛋白質之抗體。該等抗體可結合表現 OX40(例如人類 OX40)及 TNF 超家族蛋白質受體的細胞。本發明亦提供包含 TNF 超家族蛋白質及特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域的抗體。該等抗體可結合表現 TNF 超家族蛋白質受體及 GITR(例如人類 GITR)的細胞。該 TNF 超家族蛋白質可為例如 GITR 配體、OX40 配體、CD137 配體、DR3 配體、CD40 配體、BAFFR 配體、CD27 配體或 HVEM 配體。TNF 超家族蛋白質可置換本發明提供之任何多特異性(例如雙特異性)抗體之第一抗原結合域或第二抗原結合域。

[0095] 在一個態樣中，本發明提供一種特異性結合 GITR 及 OX40 且增強、誘導或增加一或多種 GITR 及/或 OX40 活性之多特異性(例如雙特異性)抗體。在另一個態樣中，本發明提供一種特異性結合 GITR 及 OX40 且降低、抑制或減少一或多種 GITR 或 OX40 活性之多特異性(例如雙特異性)抗體。在一個特定具體實例中，該抗體經分離。

[0096] 亦提供編碼該等抗體之分離之核酸(聚核苷酸)，諸如互補 DNA(cDNA)。進一步提供載體(例如表現載體)及細胞(例如宿主細胞)，其包含編碼該等抗體之核酸(聚核苷酸)。亦提供製備該等抗體之方法。在其他態樣

中，本發明提供誘導、增加或增強 GITR 及/或 OX40 活性及治療某些病況(諸如癌症)之方法及用途。進一步提供抑制、減少或降低 GITR 及/或 OX40 活性及治療某些病況(諸如發炎性或自體免疫性疾病及病症)之方法及用途。亦提供相關組合物(例如醫藥組合物)、套組及偵測方法。

## 7.1 術語

[0097] 如本文所用之術語「約」及「大致」在用於修飾數值或數值範圍時表明比該值或範圍高 5%至 10%及低 5%至 10%之偏差仍在所述值或範圍之預期含義內。

[0098] 如本文所用，若例如在既定實驗中，或使用來自多次實驗之平均值，B 實質上隨 A 在指定範圍內增加而增加，則 B 為在 A 值之指定範圍內 A 之「實質上遞增函數」。此定義允許對應於 A 之指定值的 B 之值相對於對應於 A 之任何下限值之 B 的值低至多 1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%或 20%。

[0099] 如本文所用，若例如在既定實驗中，或使用來自多次實驗之平均值，B 實質上隨 A 在指定範圍內增加而減少，則 B 為在 A 值之指定範圍內 A 之「實質上遞減函數」。此定義允許對應於 A 之指定值的 B 之值相對於對應於 A 之任何下限值之 B 的值高至多 1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%或 20%。

[0100] 如本文所用之術語「抗體(antibody)」及「抗



體(antibodies)」為此技術之術語且在本文可互換使用且係指具有特異性結合抗原之抗原結合位點之分子。

[0101] 抗體可包括例如單株抗體、重組產生之抗體、人類抗體、人類化抗體、表面重整抗體、嵌合抗體、免疫球蛋白、合成抗體、包含兩個重鏈及兩個輕鏈分子之四聚體抗體、抗體輕鏈單體、抗體重鏈單體、抗體輕鏈二聚體、抗體重鏈二聚體、抗體輕鏈-抗體重鏈對、內抗體、異源結合抗體、單域抗體、單價抗體、單鏈抗體或單鏈 Fv(scFv)、駱駝化抗體、親和體、Fab 片段、F(ab')<sub>2</sub> 片段、二硫鍵連接之 Fv(sdFv)、抗遺傳型(抗 Id)抗體(包括例如抗抗 Id 抗體)、雙特異性抗體及多特異性抗體。在某些具體實例中，本文所述之抗體係指多株抗體群體。抗體可為任何類型(例如 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 或 IgY)、任何類別(例如 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub> 或 IgA<sub>2</sub>)或任何子類(例如 IgG<sub>2a</sub> 或 IgG<sub>2b</sub>)之免疫球蛋白分子。在某些具體實例中，本文所述之抗體為 IgG 抗體或其類別(例如人類 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub> 或 IgG<sub>4</sub>)或子類。在一個特定具體實例中，該抗體為人類化單株抗體。在另一個特定具體實例中，該抗體為人類單株抗體，例如其為免疫球蛋白。在某些具體實例中，本文所述之抗體為 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub> 或 IgG<sub>4</sub> 抗體。

[0102] 「多特異性」抗體為具有至少兩個不同之抗原結合位點之抗體。多特異性抗體包括含有兩個不同抗原

結合位點(不包括 Fc 區)之雙特異性抗體。多特異性抗體可包括例如重組產生之抗體、人類抗體、人類化抗體、表面重整抗體、嵌合抗體、免疫球蛋白、合成抗體、包含兩個重鏈及兩個輕鏈分子之四聚體抗體、抗體輕鏈單體、異源結合抗體、連接之單鏈抗體或連接之單鏈 Fv(scFv)、駱駝化抗體、親和體、連接之 Fab 片段、F(ab')<sub>2</sub> 片段、化學連接之 Fv 及二硫鍵連接之 Fv(sdFv)。多特異性抗體可為任何類型(例如 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 或 IgY)、任何類別(例如 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub> 或 IgA<sub>2</sub>)或任何子類(例如 IgG<sub>2a</sub> 或 IgG<sub>2b</sub>)之免疫球蛋白分子。在某些具體實例中，本文所述之多特異性抗體為 IgG 抗體或其類別(例如人類 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub> 或 IgG<sub>4</sub>)或子類。

[0103] 如本文所用之術語「抗原結合域」、「抗原結合區」、「抗原結合位點」及類似術語係指抗體分子所包含賦予該抗體分子以對抗原之特異性的胺基酸殘基(例如互補決定區(CDR))之部分。抗原結合區可源自於任何動物物種，諸如嚙齒類動物(例如小鼠、大鼠或倉鼠)及人類。

[0104] 如本文所用之術語「抗 GITR/OX40」抗體係指含有結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域及結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域的多特異性抗體(例如雙特異性抗體)。

[0105] 如本文所用之術語「可變區」或「可變域」

可互換使用且為此技術常見的。可變區通常係指抗體之一部分，一般為輕鏈或重鏈之一部分，其通常為成熟重鏈之約胺基末端 110 至 125 個胺基酸及成熟輕鏈之約 90 至 115 個胺基酸，其在序列上在抗體之間廣泛不同且用於特定抗體對其特定抗原之結合及特異性。序列變異性集中在稱作互補決定區(CDR)之彼等區域中，而可變域中較高度保守之區域係稱作構架區(FR)。不希望受任何特定機制或理論所束縛，咸信輕鏈及重鏈之 CDR 主要負責抗體與抗原之相互作用及特異性。在某些具體實例中，可變區為人類可變區。在某些具體實例中，可變區包含嚙齒類動物或鼠類 CDR 及人類構架區(FR)。在特定具體實例中，可變區為靈長類動物(例如非人類靈長類動物)可變區。在某些具體實例中，可變區包含嚙齒類動物或鼠類 CDR 及靈長類動物(例如非人類靈長類動物)構架區(FR)。

[0106] 術語「VL」及「VL 結構域」可互換使用以指抗體之輕鏈可變區。

[0107] 術語「VH」及「VH 結構域」可互換使用以指抗體之重鏈可變區。

[0108] 術語「Kabat 編號」及類似術語為此技術公認且係指對抗體之重鏈及輕鏈可變區或其抗原結合部分之胺基酸殘基進行編號之系統。在某些態樣中，抗體之 CDR 可根據 Kabat 編號系統確定(參見例如 Kabat EA 及 Wu TT (1971) Ann NY Acad Sci 190: 382-391；及 Kabat EA 等人，

(1991)《免疫學相關蛋白質序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》，第五版，美國衛生及人類服務部(U.S. Department of Health and Human Services), NIH 出版號：91-3242)。使用 Kabat 編號系統，抗體重鏈分子之 CDR 通常存在於胺基酸位置 31 至 35 處，其視情況可在 35 後包括一或兩個額外之胺基酸(在 Kabat 編號方案中稱作 35A 及 35B) (CDR1)；胺基酸位置 50 至 65 處 (CDR2)；及胺基酸位置 95 至 102 處 (CDR3)。使用 Kabat 編號系統，抗體輕鏈分子之 CDR 通常存在於胺基酸位置 24 至 34 處 (CDR1)；胺基酸位置 50 至 56 處 (CDR2)；及胺基酸位置 89 至 97 處 (CDR3)。在一個特定具體實例中，本文所述之抗體之 CDR 已根據 Kabat 編號方案。

[0109] 如本文所用之術語「恆定區」或「恆定域」為可互換的且具有此技術常見之含義。恆定區為抗體部分，例如輕鏈及/或重鏈之羧基末端部分，其不直接參與抗體與抗原之結合但可表現出各種效應功能，諸如與 Fc 受體相互作用。相對於免疫球蛋白可變域，免疫球蛋白分子之恆定區一般具有較保守之胺基酸序列。

[0110] 如本文所用之術語「重鏈」在用於提及抗體時可指基於恆定域之胺基酸序列之任何不同類型，例如  $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$  及  $\mu$ ，其分別產生 IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM 類別之抗體，包括 IgG 之子類，例如 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub> 及 IgG<sub>4</sub>。

[0111] 如本文所用之術語「輕鏈」在用於提及抗體時可指基於恆定域之胺基酸序列的任何不同類型，例如  $\kappa$  或  $\lambda$ 。輕鏈胺基酸序列為此技術所習知。在特定具體實例中，輕鏈為人類輕鏈。

[0112] 如本文所用之術語「EU 編號系統」係指用於抗體之恆定區之 EU 編號慣例，如 Edelman, G.M.等人, Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969)；及 Kabat 等人, 《免疫學相關蛋白質序列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest)》，美國衛生及人類服務部，第 5 版，1991 中所述，該等文獻各自以全文引用之方式併入本文中。

[0113] 「結合親和力」一般指分子(例如抗體)之單個結合位點與其結合伴(例如抗原)之間的非共價相互作用之總和的強度。除非另外指示，否則如本文所用之「結合親和力」係指反映結合對之成員(例如抗體及抗原)之間 1:1 相互作用之固有結合親和力。分子 X 對其伴 Y 之親和力可一般由解離常數( $K_D$ )表示。親和力可以此技術習知之許多方式量測及/或表示，該等方式包括(但不限於)平衡解離常數( $K_D$ )及平衡締合常數( $K_A$ )。 $K_D$  係由  $k_{\text{解離}}/k_{\text{締合}}$  之商數計算，而  $K_A$  係由  $k_{\text{締合}}/k_{\text{解離}}$  之商數計算。 $k_{\text{締合}}$  係指例如抗體與抗原之締合速率常數，且  $k_{\text{解離}}$  係指例如抗體與抗原之解離。 $k_{\text{締合}}$  及  $k_{\text{解離}}$  可藉由一般技術者已知之技術(諸如 BIAcore® 或 KinExA)測定。

[0114] 如本文所用之「保守胺基酸取代」為其中胺基酸殘基經具有類似側鏈之胺基酸殘基所置換的胺基酸取代。具有側鏈之胺基酸殘基之家族已在此技術中加以定義。此等家族包括具有鹼性側鏈之胺基酸(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)、具有酸性側鏈之胺基酸(例如天冬胺酸、麩胺酸)、具有不帶電荷之極性側鏈的胺基酸(例如甘胺酸、天冬醯胺、麩醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸、色胺酸)、具有非極性側鏈之胺基酸(例如丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸)、具有 $\beta$ -分支鏈側鏈之胺基酸(例如蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)及具有芳族側鏈之胺基酸(例如酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)。在某些具體實例中，抗體之CDR內或構架區內之一或多個胺基酸殘基可經具有類似側鏈之胺基酸殘基置換。

[0115] 如本文所用之「表位」為此技術之術語且係指抗原之可由抗體特異性結合之局部區域。表位可為例如多肽之連續胺基酸(線性或連續表位)或表位可例如自一個多肽或多個多肽之兩個或多於兩個非連續區域會合在一起(構形、非線性、不連續或非連續表位)。在某些具體實例中，與抗體結合之表位可藉由例如 NMR 光譜學、X 射線繞射結晶學研究、ELISA 分析、氫/氘交換聯同質譜分析(例如液相層析電噴霧質譜分析)、基於陣列之寡肽掃描分析及/或突變誘發定位(例如定點突變誘發定位)確定。對於

X 射線結晶學，結晶可使用此技術已知方法中任一者來實現(例如 Giegé R 等人, (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4): 339-350 ; McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189: 1-23 ; Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1269-1274 ; McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251: 6300-6303)。

抗體: 抗原晶體可使用習知之 X 射線繞射技術來研究且可使用電腦軟體來精修，該電腦軟體諸如 X-PLOR(耶魯大學 (Yale University), 1992, 由 Molecular Simulations 公司經銷；參見例如 *Meth Enzymol* (1985) 第 114 卷及第 115 卷, Wyckoff HW 等人編；U.S. 2004/0014194) 及 BUSTER(Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49(Pt 1): 37-60 ; Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A: 361-423, Carter CW 編；Roversi P 等人 (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56(Pt 10): 1316-1323)。

突變誘發定位研究可使用熟習此技術者已知之任何方法來實現。參見例如 Champe M 等人, (1995) *J Biol Chem* 270: 1388-1394；及 Cunningham BC 及 Wells JA (1989) *Science* 244: 1081-1085 中對包括丙胺酸掃描突變誘發技術之突變誘發技術之描述。在一個特定具體實例中，抗體之表位係使用丙胺酸掃描突變誘發研究來確定。

[0116] 如本文所用之術語「免疫特異性結合」、「免疫特異性識別」、「特異性結合」及「特異性識別」在抗體之背景下為類似術語且係指結合抗原(例如表位或

免疫複合物)之分子，因為該結合係由熟習此技術者所理解。舉例而言，特異性結合抗原之分子可一般以較低之親和力結合其他肽或多肽，如藉由例如免疫分析、BIAcore<sup>®</sup>、KinExA 3000 儀器(愛達荷州波夕之 Sapidyne Instruments 公司)或此技術已知之其他分析所測定。在一個特定具體實例中，免疫特異性結合抗原之分子結合該抗原之  $K_A$  比該等分子非特異性結合另一抗原時之  $K_A$  大至少 2 倍 log、2.5 倍 log、3 倍 log、4 倍 log 或大於 4 倍 log。在多特異性(例如雙特異性)抗體之背景下，術語「免疫特異性結合」、「免疫特異性識別」、「特異性結合」及「特異性識別」係指對多於一個抗原或對單個抗原上之多於一個表位具有不同特異性之抗體。舉例而言，雙特異性抗體可例如以不同之抗原結合域特異性結合例如人類 OX40 及人類 GITR 中每一者。

[0117] 在另一個特定具體實例中，免疫特異性結合抗原之抗原結合域在相似之結合條件下不與其他蛋白質交叉反應。在另一個特定具體實例中，免疫特異性結合 GITR 抗原之抗原結合域不與其他非 GITR 蛋白質交叉反應。在另一個特定具體實例中，免疫特異性結合 OX40 抗原之抗原結合域不與其他非 OX40 蛋白質交叉反應。在一個特定具體實例中，本發明提供一種含有抗原結合域之抗體，相較於對另一無關抗原之親和力，該抗原結合域以較高之親和力結合 GITR 或 OX40。在某些具體實例中，本



發明提供一種含有抗原結合域之抗體，該抗原結合域結合 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或人類 OX40)之親和力比對另一無關抗原之親和力高 20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或高於 95%，如藉由例如放射免疫分析、表面電漿共振或動力學排除分析所量測。在一個特定具體實例中，本文所述之抗 GITR 抗原結合域與無關非 GITR 蛋白質之結合程度小於該抗原結合域與 GITR 蛋白質之結合的 10%、15%或 20%，如藉由例如放射免疫分析所量測。在一個特定具體實例中，本文所述之抗 OX40 抗原結合域與無關非 OX40 蛋白質之結合程度小於該抗原結合域與 OX40 蛋白質之結合的 10%、15%或 20%，如藉由例如放射免疫分析所量測。

[0118] 在一個特定具體實例中，本發明提供一種抗體，該抗體含有結合人類 GITR 之親和力高於對另一種 GITR 之親和力的抗原結合域及/或結合人類 OX40 之親和力高於對另一種 OX40 之親和力的抗原結合域。在某些具體實例中，本發明提供含有抗原結合域之抗體，該抗原結合域結合人類 GITR 之親和力比對另一種 GITR 之親和力高 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%或高於 70%，如藉由例如放射免疫分析、表面電漿共振或動力學排除分析所量測；及/或結合人類 OX40 之親和力比對另一種 OX40 之親

和力高 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%或高於 70%，如藉由例如放射免疫分析、表面電漿共振或動力學排除分析所量測。在一個特定具體實例中，本文所述之結合人類 GITR 及人類 OX40 之抗體與另一種 GITR 及/或 OX40 蛋白質之結合將小於該抗體與人類 GITR 及/或 OX40 蛋白質之結合的 10%、15%或 20%，如藉由例如放射免疫分析、表面電漿共振或動力學排除分析所量測。

[0119] 如本文所用之術語「糖皮質素誘導 TNFR 家族相關受體」或「GITR」或「GITR 多肽」係指 GITR，其包括(但不限於)天然 GITR、GITR 之同功型或 GITR 之種間 GITR 同源物。GITR 亦稱為活化誘導型 TNFR 家族受體(AITR)、GITR-D、CD357 及腫瘤壞死因子受體超家族成員 18(TNFRSF18)。GenBank™ 登錄號 BC152381 及 BC152386 提供人類 GITR 核酸序列。Swiss-Prot 登錄號 Q9Y5U5-1(TNR18\_HUMAN; SEQ ID NO:41)及 GenBank™ 登錄號 NP\_004186 提供同功型 1 之例示性人類 GITR 胺基酸序列。此胺基酸序列具有 241 個胺基酸之長度，前 25 個胺基酸殘基編碼信號序列。同功型 1 為 I 型膜蛋白。人類 GITR 之例示性成熟胺基酸序列係作為 SEQ ID NO:40 提供。相反地，同功型 2 為人類 GITR 之分泌形式且具有約 255 個胺基酸之長度。Swiss-Prot 登錄號 Q9Y5U5-2 及 GenBank™ 登錄號 NP\_683699 提供同功型 2 之例示性人類

GITR 胺基酸序列。人類 GITR 之同功型 3 具有約 234 個胺基酸之長度。Swiss-Prot 登錄號 Q9Y5U5-3 及 GenBank™ 登錄號 NP\_683700(同功型 3 前驅體)提供同功型 3 之例示性人類 GITR 胺基酸序列。在一個特定具體實例中，該 GITR 為人類 GITR。在另一個特定具體實例中，該 GITR 為人類 GITR 同功型 1(SEQ ID NO:41)。在某些具體實例中，該 GITR 為人類同功型 2(SEQ ID NO:42) 或同功型 3(SEQ ID NO:43)。人類 GITR 係由 Entrez Gene 指定為 GeneID : 8784。SEQ ID NO:44 提供石蟹獼猴 GITR 胺基酸序列，且 SEQ ID NO:44 之胺基酸 26-234 表示石蟹獼猴 GITR 之成熟形式。如本文所用之術語「人類 GITR」係指包含多肽序列 SEQ ID NO:40 之 GITR。

[0120] 如本文所用之術語「GITR 配體」及「GITRL」係指糖皮質素誘導 TNFR 相關蛋白配體。GITRL 另外稱為活化誘導 TNF 相關配體(AITRL)及腫瘤壞死因子配體超家族成員 18(TNFSF18)。GenBank™ 登錄號 AF125303 提供例示性人類 GITRL 核酸序列。GenBank™ 登錄號 NP\_005083 及 Swiss-Prot 登錄號 Q9UNG2 提供例示性人類 GITRL 胺基酸序列。

[0121] 如本文所用之術語「OX40 受體」或「OX40」或「OX40 多肽」係指 OX40，其包括(但不限於)天然 OX40、OX40 之同功型或 OX40 之種間 OX40 同源物。OX40 亦稱為腫瘤壞死因子受體超家族成員

4(TNFRSF4)、ACT35、CD134、IMD16 及 TXGP1L。GenBank™ 登錄號 BC105070 及 BC105072 提供人類 OX40 核酸序列。Refseq 號 NP\_003318.1 提供人類 OX40 之胺基酸序列。人類 OX40 之未成熟胺基酸序列係作為 SEQ ID NO:73 提供。人類 OX40 之成熟胺基酸序列係作為 SEQ ID NO:72 提供。人類 OX40 由 Entrez Gene 指定為 GeneID: 7293。RefSeq 號 XM\_005545122.1 及 XP\_005545179.1 分別提供預測之石蟹獼猴 OX40 核酸序列及胺基酸序列。亦已報導人類 OX40 之可溶性同功型(Taylor L 等人, (2001) *J Immunol Methods* 255: 67-72)。如本文所用之術語「人類 OX40」係指包含多肽序列 SEQ ID NO:72 之 OX40。

[0122] 如本文所用之術語「OX40 配體」及「OX40L」係指腫瘤壞死因子配體超家族成員 4(TNFSF4)。OX40L 另外稱為 CD252、GP34、TXGP1 及 CD134L。GenBank™ 登錄號 D90224.1 及 AK297932.1 提供例示性人類 OX40L 核酸序列。RefSeq 號 NP\_003317.1 及 Swiss-Prot 登錄號 P23510-1 提供同功型 1 之例示性人類 OX40L 胺基酸序列。RefSeq 號 NP\_001284491.1 及 Swiss-Prot 登錄號 P23510-2 提供同功型 2 之例示性人類 OX40L 胺基酸序列。人類 OX40L 由 Entrez Gene 指定為 GeneID: 7292。

[0123] 如本文所用之術語「宿主細胞」可為任何類型之細胞，例如原生細胞、培養物中之細胞或來自細胞株

之細胞。在特定具體實例中，術語「宿主細胞」係指經核酸分子轉染之細胞及該細胞之後代或潛在後代。該細胞之後代未必與經核酸分子轉染之母細胞相同，此係例如歸因於可能在後代或核酸分子向宿主細胞基因組中之整合中出現之突變或環境影響。

[0124] 如本文所用之術語「有效量」在對個體投予治療之背景下係指達成所需之預防或治療作用之治療量。

[0125] 如本文所用之術語「個體」及「患者」可互換使用。個體可為動物。在一些具體實例中，個體為哺乳動物，諸如非靈長類動物(例如牛、豬、馬、貓、狗、大鼠等)或靈長類動物(例如猴或人類)，最佳為人類。在一些具體實例中，個體為石蟹獼猴。在某些具體實例中，該等術語係指非人類動物(例如非人類動物，諸如豬、馬、牛、貓或狗)。在一些具體實例中，該等術語係指寵物或農畜。在特定具體實例中，該等術語係指人類。

[0126] 如本文所用，若測試抗體與第一抗原之間的結合相對於測試抗體與第二抗原之間的結合減少至少30%、40%、50%、60%、70%或80%，則相對於測試抗體與第二抗原之間的結合，測試抗體與第一抗原之間的結合「實質上減弱」，如在例如流動式細胞量測術分析中、或在既定實驗中、或使用來自多次實驗之平均值所量測，如藉由例如包括下列步驟之分析所評定：(a)使第一抗原或第二抗原在細胞(例如 1624-5 細胞)之表面上表現；(b)在

流動式細胞量測術分析中使用例如 2  $\mu\text{g/ml}$  之測試抗體或多株抗體對表現第一抗原或第二抗原之細胞進行染色且記錄例如作為來自多於一次量測之平均值的平均螢光強度 (MFI) 值，其中該多株抗體識別第一抗原及第二抗原兩者；(c) 將測試抗體對表現第二抗原之細胞的 MFI 值除以多株抗體對表現第二抗原之細胞的 MFI 值 (MFI 比率<sub>2</sub>)；(d) 將測試抗體對表現第一抗原之細胞的 MFI 值除以多株抗體對表現第一抗原之細胞的 MFI 值 (MFI 比率<sub>1</sub>)；及 (e) 藉由計算  $100\% \times (1 - (\text{MFI 比率}_1 / \text{MFI 比率}_2))$  來確定結合之減少百分比。

[0127] 亦可使用數學演算法來確定兩個序列 (例如胺基酸序列或核酸序列) 之間的「一致性百分比」。用於比較兩個序列之數學演算法之特定非限制性實例為 Karlin S 及 Altschul SF (1990) PNAS 87: 2264-2268 之演算法，其如在 Karlin S 及 Altschul SF (1993) PNAS 90: 5873-5877 中所修改。該演算法併入 Altschul SF 等人, (1990) J Mol Biol 215: 403 之 NBLAST 及 XBLAST 程式中。可進行 BLAST 核苷酸搜尋，其中 NBLAST 核苷酸程式參數係設定為例如得分=100、字長=12 以獲得與本文所述之核酸分子同源之核苷酸序列。可進行 BLAST 蛋白質搜尋，其中 XBLAST 程式參數係設定為例如得分=50、字長=3 以獲得與本文所述之蛋白質分子同源之胺基酸序列。為獲得用於比較目的之空隙比對，可利用空隙 BLAST，如 Altschul

SF 等人, (1997) *Nuc Acids Res* 25: 3389-3402 中所述。或者, 可使用 PSI BLAST 來進行重複搜尋, 該搜尋偵測分子之間的遠源關係(同上)。當利用 BLAST、空隙 BLAST 及 PSI Blast 程式時, 可使用對應程式(例如 XBLAST 及 NBLAST)之預設參數(參見例如全球資訊網上之國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI), [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov))。用於比較序列之數學演算法之另一特定非限制性實例為 Myers 及 Miller, 1988, *CABIOS* 4:11-17 之演算法。該演算法併入作為 GCG 序列比對套裝軟體之一部分的 ALIGN 程式(第 2.0 版)中。當利用 ALIGN 程式比較胺基酸序列時, 可使用 PAM120 權重殘基表、12 之空隙長度罰分及 4 之空隙罰分。

[0128] 兩個序列之間的一致性百分比可使用類似於上文所述之技術, 在允許或不允許空隙之情況下確定。在計算一致性百分比時, 通常僅對精確匹配進行計數。

## 7.2 結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性抗體

[0129] 在一個特定態樣中, 本發明提供特異性結合 GITR 及/或 OX40(例如人類 GITR 及人類 OX40)之多特異性抗體(例如雙特異性抗體)。舉例而言, 本發明提供之多特異性(例如雙特異性)抗體可包含結合 OX40 之第一抗原結合域、及第二抗原結合域。本發明提供之多特異性(例如雙特異性)抗體亦可包含第一抗原結合域及結合 GITR 之

第二抗原結合域。該等多特異性(例如雙特異性)抗體亦可結合其他腫瘤壞死因子受體(TNFR)超家族蛋白質，例如與GITR及/或OX40共調節之彼等蛋白質。與僅結合一種TNFR超家族蛋白質之單特異性二價抗體相比，此等多特異性抗體有利地對含有靶蛋白組合之某些免疫細胞子集顯示出較大之特異性。

[0130] 舉例而言，本發明提供抗體，該等抗體包含結合OX40之第一抗原結合域及結合腫瘤壞死因子受體(TNFR)超家族蛋白質(諸如GITR、OX40、CD137或DR3)之第二抗原結合域。在另一個實施例中，本發明提供抗體，該等抗體包含結合TNFR超家族蛋白質(諸如GITR、OX40、CD137或DR3)之第一抗原結合域及結合GITR之第二抗原結合域。

[0131] 本發明亦提供多特異性(例如雙特異性)抗體，該等抗體包含結合OX40之第一抗原結合域及結合GITR之第二抗原結合域。

[0132] 與例如結合GITR且含有相同之GITR抗原結合域之單特異性二價抗體相比及/或與結合OX40且含有相同之OX40抗原結合域之單特異性二價抗體相比，本發明提供之含有OX40抗原結合域及GITR抗原結合域之抗體可顯示與表現GITR及OX40之細胞(例如T調節性細胞)增加之結合。

[0133] 相較於結合GITR且含有相同之GITR抗原結



合域之單特異性二價抗體，本發明提供之含有 OX40 抗原結合域及 GITR 抗原結合域之抗體亦可顯示與 GITR 陽性、OX40 陰性細胞減少之結合(例如在低濃度下)。

[0134] 相較於結合 OX40 且含有相同之 OX40 抗原結合域之單特異性二價抗體，本發明提供之含有 OX40 抗原結合域及 GITR 抗原結合域之抗體亦可顯示與 GITR 陰性、OX40 陽性細胞減少之結合(例如在低濃度下)。

[0135] 在某些具體實例中，本文所述之特異性結合 GITR 及 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體可結合人類 CD4+ T 細胞及人類 CD8+ T 細胞。在某些具體實例中，本文所述之抗體結合人類 CD4+細胞及石蟹獼猴 CD4+ T 細胞。相較於與效應 T 細胞之結合，本發明提供之特異性結合 GITR 及 OX40 之抗體可顯示與調節性 T 細胞增強之結合。在一些情況下，相較於與腫瘤內效應 T 細胞之結合，本發明提供之特異性結合 GITR 及 OX40 之抗體顯示與腫瘤內調節性 T 細胞增強之結合。

[0136] 本發明提供之特異性結合 GITR 及 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體可抑制人類 GITR 配體與人類 GITR 結合及/或抑制人類 OX40 配體與人類 OX40 結合。

[0137] 在一種情況下，本發明提供之特異性結合 GITR 及 OX40 之抗體含有下表 1 之單列中所示之 CDR 組合。

表 1: 例示性抗 GITR/OX40 抗體之 CDR 序列\*

GITR 結合序列 SEQ ID NO.						OX40 結合序列 SEQ ID NO.					
VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
7	10	3	14	5	16	47	48	49	50	51	52
8	11	3	15	5	17	47	48	49	50	51	52
9	12	3	14	5	16	47	48	49	50	51	52
9	13	3	14	5	16	47	48	49	50	51	52
1	2	3	4	5	6	47	48	49	50	51	52
87	88	3	90	5	92	47	48	49	50	51	52
7	10	3	14	5	16	47	48	49	50	51	53
8	11	3	15	5	17	47	48	49	50	51	53
9	12	3	14	5	16	47	48	49	50	51	53
9	13	3	14	5	16	47	48	49	50	51	53
1	2	3	4	5	6	47	48	49	50	51	53
87	88	3	90	5	92	47	48	49	50	51	53

\*表 1 中之 CDR 係根據 Kabat 確定。

[0138] 在一種情況下，本發明提供之特異性結合 GITR 及 OX40 之抗體含有下表 2 之單列中所示之兩個重鏈可變域及兩個輕鏈可變域之組合。

表 2: 例示性抗 GITR/OX40 抗體之重鏈可變域(VH)及輕鏈可變域(VL)序列

GITR VH (SEQ ID NO:)	GITR VL (SEQ ID NO:)	OX40 VH (SEQ ID NO:)	OX40 VL (SEQ ID NO:)
18	19	54	55
20	21	54	55
22	23	54	55
24	23	54	55
25	26	54	55
18	19	54	56
20	21	54	56
22	23	54	56
24	23	54	56
25	26	54	56

[0139] 在一種情況下，本發明提供之特異性結合 GITR 及 OX40 之抗體含有下表 3 之單列中所示之兩個重鏈及兩個輕鏈之組合。

表 3: 例示性抗 GITR/OX40 DuoBody 抗體之重鏈(HC)及輕鏈(LC)序列

抗體	GITR HC (SEQ ID NO:)	GITR LC (SEQ ID NO:)	OX40 HC (SEQ ID NO:)	OX40 LC (SEQ ID NO:)
pab1876w (F405L) X pab2049w (K409R)	31	37	61	67
pab1876w (F405L/N297A) X pab2049w (K409R/N297A)	32	37	62	67
pab1876w (F405L/L234F/L235E/D265A) X pab2049w (K409R/L234F/L235E/D265A)	33	37	63	67
pab1876w (F405L) X pab1949w (K409R)	31	37	61	69
pab1876w (F405L/N297A) X pab1949w (K409R/N297A)	32	37	62	69
pab1876w (F405L/L234F/L235E/D265A) X pab1949w (K409R/L234F/L235E/D265A)	33	37	63	69
pab1876w (K409R) X pab2049w (F405L)	34	37	64	67
pab1876w (K409R/N297A) X pab2049w (F405L/N297A)	35	37	65	67
pab1876w (K409R/L234F/L235E/D265A) X pab2049w (F405L/L234F/L235E/D265A)	39	37	71	67
pab1876w (K409R) X pab1949w (F405L)	34	37	64	69
pab1876w (K409R/N297A) X pab1949w (F405L/N297A)	35	37	65	69
pab1876w (K409R/L234F/L235E/D265A) X pab1949w (F405L/L234F/L235E/D265A)	39	37	71	69
pab1876w (F405L) X pab2049w (K409R) (不含重鏈末端離胺酸)	76	37	120	67
pab1876w (F405L/N297A) X pab2049w (K409R/N297A) (不含重鏈 末端離胺酸)	77	37	121	67

抗體	GITR HC (SEQ ID NO:)	GITR LC (SEQ ID NO:)	OX40 HC (SEQ ID NO:)	OX40 LC (SEQ ID NO:)
pab1876w (F405L/L234F/L235E/D265A) X pab2049w (K409R/L234F/L235E/D265A) (不含 重鏈末端離胺酸)	78	37	122	67
pab1876w (F405L) X pab1949w (K409R) (不含重鏈末端離胺酸)	76	37	120	69
pab1876w (F405L/N297A) X pab1949w (K409R/N297A) (不含重鏈 末端離胺酸)	77	37	121	69
pab1876w (F405L/L234F/L235E/D265A) X pab1949w (K409R/L234F/L235E/D265A) (不含 重鏈末端離胺酸)	78	37	122	69
pab1876w (K409R) X pab2049w (F405L) (不含重鏈末端離胺酸)	79	37	123	67
pab1876w (K409R/N297A) X pab2049w (F405L/N297A) (不含重鏈 末端離胺酸)	80	37	124	67
pab1876w (K409R/L234F/L235E/D265A) X pab2049w (F405L/L234F/L235E/D265A) (不含 重鏈末端離胺酸)	82	37	83	67
pab1876w (K409R) X pab1949w (F405L) (不含重鏈末端離胺酸)	79	37	123	69
pab1876w (K409R/N297A) X pab1949w (F405L/N297A) (不含重鏈 末端離胺酸)	80	37	124	69
pab1876w (K409R/L234F/L235E/D265A) X pab1949w (F405L/L234F/L235E/D265A) (不含 重鏈末端離胺酸)	82	37	83	69

[0140] 如本發明所提供之結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性抗體，例如雙特異性抗體，可藉由以化學方式連接兩種不同之單株抗體或藉由使兩種融合瘤細胞株融合以產生雜交融合瘤來製備。可使用之其他多價形式包括例如 K $\lambda$  體、dAb、雙功能抗體、TandAb、奈米抗體、SMIP、

DNL、股交換工程改造結構域體 (SEED 體)、親和體、Fynomer、Kunitz 結構域、Albu-dab、DART、DVD-IG、Covx 體、肽體、scFv-Ig、SVD-Ig、dAb-Ig、杵入白型抗體、DuoBody 抗體及三功能抗體 (triomAb)。例示性雙特異性形式論述於 Garber 等人, *Nature Reviews Drug Discovery* 13:799-801 (2014)中, 該文獻以全文引用之方式併入本文中。

[0141] 本發明之例示性雙特異性抗體分子包括 (i) 具有包含不同之抗原結合區之兩個臂之單一抗體, 其中一個臂對第一抗原 (諸如 OX40) 具有特異性且一個臂對第二抗原 (諸如 GITR) 具有特異性; (ii) 具有對第一抗原 (諸如 OX40) 具有特異性之一個抗原結合區或臂及對第二抗原 (諸如 GITR) 具有特異性之第二抗原結合區或臂之單一抗體; (iii) 具有對第一抗原 (諸如 OX40) 之第一特異性及對第二抗原 (諸如 GITR) 之第二特異性的單鏈抗體, 例如經由藉由額外之肽連接子串聯連接之兩個 scFv; (iv) 雙可變域抗體 (DVD-Ig), 其中各輕鏈及重鏈含有經由短肽鏈串聯之兩個可變域 (Wu 等人, 《雙可變域免疫球蛋白 (DVD-Ig.TM.) 分子之產生及表徵 (Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig.TM.) Molecule)》, 《抗體工程改造 (Antibody Engineering)》, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (v) 化學連接之雙特異性 (Fab')<sub>2</sub> 片段; (vi) Tandab, 其為兩個單鏈雙功能抗體之

融合體，從而產生對於靶抗原中之每一者具有兩個結合位點的四價雙特異性抗體；(vii)可撓性體(flexibody)，其為 scFv 與雙功能抗體之組合，從而產生多價分子；(viii)基於蛋白激酶 A 中之「二聚化及停泊結構域(docking domain)」之所謂之「塙與鎖(dock and lock)」分子，其在應用於 Fab 時可產生由連接至不同 Fab 片段之兩個相同之 Fab 片段組成之三價雙特異性結合蛋白；(ix)所謂之 Scorpion 分子，其包含例如與人類 Fab 臂之兩個末端融合之兩個 scFv；及(x)雙功能抗體。

[0142] 不同類別之雙特異性抗體之實例包括(但不限於)IgG 樣分子，其具有互補之 CH3 結構域以迫使異二聚化；重組 IgG 樣雙重靶向分子，其中分子之兩側各自含有至少兩種不同抗體之 Fab 片段或 Fab 片段之一部分；IgG 融合分子，其中全長 IgG 抗體與額外之 Fab 片段或 Fab 片段之部分融合；Fc 融合分子，其中單鏈 Fv 分子或穩定化之雙功能抗體與重鏈恆定域、Fc 區或其部分融合；Fab 融合分子，其中不同 Fab 片段融合於一起；基於 ScFv 之抗體及基於雙功能抗體之抗體以及重鏈抗體(例如結構域抗體、奈米抗體)，其中不同之單鏈 Fv 分子或不同之雙功能抗體或不同之重鏈抗體(例如結構域抗體、奈米抗體)彼此融合或與另一蛋白質或載體分子融合。

[0143] Fab 融合雙特異性抗體之實例包括(但不限於)F(ab)<sub>2</sub>(Medarex 公司/AMGEN 公司)、Dual-Action 或

Bis-Fab(Genentech 公 司 ) 、 Dock-and-Lock(DNL) (ImmunoMedics 公 司 ) 、 Bivalent Bispecific(Biotecnol 公 司)以及 Fab-Fv(UCB-Celltech 公 司) 。 基 於 ScFv 之 抗 體 、 基 於 雙 功 能 抗 體 之 抗 體 以 及 結 構 域 抗 體 之 實 例 包 括 (但 不 限 於)雙 特 異 性 T 細 胞 接 合 劑 (Bispecific T Cell Engager) (BITE) (Micromet 公 司 ) 、 串 聯 雙 功 能 抗 體 (Tandab) (Affimed 公 司 ) 、 雙 親 和 重 靶 向 技 術 (DART) (MacroGenics 公 司 ) 、 單 鏈 雙 功 能 抗 體 (Academic 公 司 ) 、 TCR 樣 抗 體 (AIT, ReceptorLogics 公 司 ) 、 人 血 清 白 蛋 白 ScFv 融 合 體 (Merrimack 公 司)以 及 COMBODY(Epigen Biotech 公 司) 、 雙 重 靶 向 奈 米 抗 體 (Ablynx 公 司)及 雙 重 靶 向 僅 重 鏈 結 構 域 抗 體 。

[0144] 在 特 定 具 體 實 例 中 ， 多 特 異 性 (例 如 雙 特 異 性) 抗 體 可 為 嵌 合 抗 體 或 人 類 化 抗 體 。 在 某 些 具 體 實 例 中 ， 多 特 異 性 (例 如 雙 特 異 性) 抗 體 可 為  $F(ab')_2$  片 段 。

[0145] 在 某 些 具 體 實 例 中 ， 結 合 GITR 及 /或 OX40 之 多 特 異 性 (例 如 雙 特 異 性) 抗 體 為 DuoBody 抗 體 。

[0146] 在 某 些 具 體 實 例 中 ， 如 本 文 所 述 之 結 合 OX40 之 第 一 抗 原 結 合 域 包 含 人 類  $IgG_1$  重 鏈 恆 定 區 ， 該 人 類  $IgG_1$  重 鏈 恆 定 區 包 含 F405L 突 變 ， 且 如 本 文 所 述 之 結 合 GITR 之 第 二 抗 原 結 合 域 包 含 人 類  $IgG_1$  重 鏈 恆 定 區 ， 該 人 類  $IgG_1$  重 鏈 恆 定 區 包 含 K409R 突 變 ， 彼 等 係 根 據 EU 編 號 系 統 編 號 。

[0147] 在某些具體實例中，如本文所述之結合 OX40 之第一抗原結合域包含人類 IgG<sub>1</sub> 重鏈恆定區，該人類 IgG<sub>1</sub> 重鏈恆定區包含 K409R 突變，且如本文所述之結合 GITR 之第二抗原結合域包含人類 IgG<sub>1</sub> 重鏈恆定區，該人類 IgG<sub>1</sub> 重鏈恆定區包含 F405L 突變，彼等係根據 EU 編號系統編號。

[0148] 如本發明所提供者，結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性抗體(例如雙特異性抗體)可促效或拮抗 GITR 及/或 OX40 活性。促效 GITR 及/或 OX40 功能之抗體包括使 GITR 及/或 OX40 簇集之抗體。簇集可例如由於 Fc-Fc 受體(FcR)相互作用而產生。因此，促效 GITR 及/或 OX40 之抗體包括具有增加之 Fc 受體結合之抗體。增加 Fc 受體結合之突變為此技術所習知且包括例如具有無海藻糖基化之 Fc 的抗體以及具有諸如 S267E/L328F(SELF 突變體)及 S239D/A330L/I332E 之突變的抗體，彼等係根據 EU 編號系統編號。在一些具體實例中，結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)促效劑抗體包含 IgG2 恆定區，該 IgG2 恆定區含有 C127S，其係根據 Kabat 編號。拮抗 GITR 及/或 OX40 功能之抗體包括具有減少之 Fc 受體結合的抗體。減少 Fc 受體結合之突變為此技術所習知且包括例如 N297A ; N297Q ; D265A ; L234F/L235E ; L234F/L235E/N297Q ; L234F/L235E/P331S ; D265A/N297Q ; 及 L234F/L235E/D265A/N297Q/P331S，彼



等係根據 EU 編號系統編號。在一些具體實例中，結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)拮抗劑抗體包含 IgG1 恆定區，該 IgG1 恆定區含有 N297A，其係根據 EU 編號系統編號。在一些具體實例中，結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)拮抗劑抗體包含 IgG1 恆定區，該 IgG1 恆定區含有 N297Q，其係根據 EU 編號系統編號。在一些具體實例中，結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)拮抗劑抗體包含 IgG1 恆定區，該 IgG1 恆定區含有 D265A，其係根據 EU 編號系統編號。在一些具體實例中，結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)拮抗劑抗體包含 IgG1 恆定區，該 IgG1 恆定區含有 L234F/L235E/D265A，彼等係根據 EU 編號系統編號。在一些具體實例中，結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)拮抗劑抗體包含 IgG1 恆定區，該 IgG1 恆定區含有選自由 D265A、P329A 及其組合組成之群的突變，彼等係根據 EU 編號系統編號。

[0149] 在一些具體實例中，將一個、兩個或多於兩個突變(例如胺基酸取代)引入本文所述之抗體的 Fc 區(例如 CH2 結構域(人類 IgG<sub>1</sub> 之殘基 231 至 340)及/或 CH3 結構域(人類 IgG<sub>1</sub> 之殘基 341 至 447)及/或鉸鏈區)中(其係根據 EU 編號系統編號)以例如增加或減少抗體對效應細胞之表面上的 Fc 受體(例如活化之 Fc 受體)的親和力。抗體之 Fc 區中減少或增加抗體對 Fc 受體之親和力的突變及將此

等突變引入至 Fc 受體或其片段中之技術為熟習此技術者所習知。抗體之 Fc 受體可進行改變抗體對 Fc 受體之親和力的突變之實例描述於例如 Smith P 等人, (2012) PNAS 109: 6181-6186; 美國專利第 6,737,056 號; 及國際公開案第 WO 02/060919 號; 第 WO 98/23289 號; 及第 WO 97/34631 號中, 該等文獻以引用的方式併入本文中。

[0150] 在一個特定具體實例中, 將一個、兩個或多於兩個胺基酸突變(亦即取代、插入或缺失)引入 IgG 恆定域或其 FcRn 結合片段(較佳 Fc 或鉸鏈-Fc 結構域片段)以改變(例如縮短或延長)抗體在活體內之半衰期。參見例如國際公開案第 WO 02/060919 號; 第 WO 98/23289 號; 及第 WO 97/34631 號; 以及美國專利第 5,869,046 號、第 6,121,022 號、第 6,277,375 號及第 6,165,745 號中例如將改變(例如縮短或延長)抗體在活體內之半衰期的突變。在一些具體實例中, 將一個、兩個或多於兩個胺基酸突變(亦即取代、插入或缺失)引入 IgG 恆定域或其 FcRn 結合片段(較佳 Fc 或鉸鏈-Fc 結構域片段)以縮短抗體在活體內之半衰期。在其他具體實例中, 將一個、兩個或多於兩個胺基酸突變(亦即取代、插入或缺失)引入 IgG 恆定域或其 FcRn 結合片段(較佳 Fc 或鉸鏈-Fc 結構域片段)以延長抗體在活體內之半衰期。在一個特定具體實例中, 抗體可在第二恆定(CH2)域(人類 IgG<sub>1</sub> 之殘基 231 至 340)及/或第三恆定(CH3)域(人類 IgG<sub>1</sub> 之殘基 341 至 447)中具有一或多

個胺基酸突變(例如取代)，彼等係根據 EU 編號系統編號。在一個特定具體實例中，本文所述之抗體之 IgG<sub>1</sub> 之恆定區包含位置 252 處甲硫胺酸(M)經酪胺酸(Y)之取代、位置 254 處絲胺酸(S)經蘇胺酸(T)之取代及位置 256 處蘇胺酸(T)經麩胺酸(E)之取代，彼等係根據 EU 編號系統編號。參見美國專利第 7,658,921 號，其以引用的方式併入本文中。已顯示稱為「YTE 突變體」之此類型之突變型 IgG 顯示出半衰期延長至該相同抗體之野生型型式之四倍(參見 Dall'Acqua WF 等人，(2006) J Biol Chem 281: 23514-24)。在某些具體實例中，抗體包含 IgG 恆定域，該 IgG 恆定域包含位置 251 至 257、285 至 290、308 至 314、385 至 389 及 428 至 436 處胺基酸殘基之一個、兩個、三個或多於三個胺基酸取代，彼等係根據 EU 編號系統編號。

[0151] 在另一個具體實例中，將一個、兩個或多於兩個胺基酸取代引入 IgG 恆定域 Fc 區中以改變抗體之效應功能。舉例而言，選自胺基酸殘基 234、235、236、237、297、318、320 及 322 之一或多個胺基酸(彼等係根據 EU 編號系統編號)可經不同胺基酸殘基置換以使得該抗體具有改變之對效應配體之親和力但保留親本抗體之抗原結合能力。親和力改變之效應配體可為例如 Fc 受體或補體之 C1 組分。此方法進一步詳細描述於美國專利第 5,624,821 號及第 5,648,260 號中。在一些具體實例中，恆

定區結構域之缺失或失活(經由點突變或其他方式)可減少循環抗體之 Fc 受體結合，從而增加腫瘤定位。參見例如美國專利第 5,585,097 號及第 8,591,886 號中對使恆定域缺失或失活且從而增加腫瘤定位之突變的描述。在某些具體實例中，可將一或多個胺基酸取代引入本文所述之抗體之 Fc 區中以移除 Fc 區上潛在之糖基化位點，此可減少 Fc 受體結合(參見例如 Shields RL 等人，(2001) J Biol Chem 276: 6591-604)。在各種具體實例中，可進行本文所述之抗體之恆定區中下列突變中之一或多者：N297A 取代；N297Q 取代；L235A 取代及 L237A 取代；L234A 取代及 L235A 取代；E233P 取代；L234V 取代；L235A 取代；C236 缺失；P238A 取代；D265A 取代；A327Q 取代；或 P329A 取代，彼等係根據 EU 編號系統編號。

[0152] 在一個特定具體實例中，本文所述之抗體包含具有 N297Q 或 N297A 胺基酸取代之 IgG<sub>1</sub> 恆定域，彼等係根據 EU 編號系統編號。

[0153] 在某些具體實例中，本文所述之抗體之恆定區中選自胺基酸殘基 329、331 及 322 之一或多個胺基酸(彼等係根據 EU 編號系統編號)可經不同胺基酸殘基置換以使得該抗體具有改變之 C1q 結合及/或降低或消除之補體依賴性細胞毒性(CDC)。此方法進一步詳細描述於美國專利第 6,194,551 號(Idusogie 等人)中。在一些具體實例中，使本文所述之抗體之 CH2 結構域之 N 末端區域中胺

基酸位置 231 至 238 內之一或多個胺基酸殘基改變，從而改變抗體固定補體之能力。此方法進一步描述於國際公開案第 WO 94/29351 號中。在某些具體實例中，藉由使下列位置處之一或多個胺基酸突變(例如引入胺基酸取代)來修飾本文所述之抗體之 Fc 區以增加抗體介導抗體依賴性細胞毒性(ADCC)之能力及/或增加抗體對 Fc $\gamma$  受體之親和力：238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、328、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438 或 439，彼等係根據 EU 編號系統編號。此方法進一步描述於國際公開案第 WO 00/42072 號中。

[0154] 在某些具體實例中，本文所述之抗體包含在位置 267、328 或彼等之組合處具有突變(例如取代)之 IgG<sub>1</sub> 恆定域，彼等係根據 EU 編號系統編號。在某些具體實例中，本文所述之抗體包含具有選自由 S267E、L328F 及彼等之組合組成之群的突變(例如取代)之 IgG<sub>1</sub> 恆定域，彼等係根據 EU 編號系統編號。在某些具體實例中，本文所述之抗體包含具有 S267E/L328F 突變(例如取代)之 IgG<sub>1</sub> 恆定域，其係根據 EU 編號系統編號。在某些具體實例

中，本文所述之包含具有 S267E/L328F 突變(例如取代)之 IgG<sub>1</sub> 恆定域的抗體具有增加之對 FcγRIIA、FcγRIIB 或 FcγRIIA 及 FcγRIIB 之結合親和力，彼等係根據 EU 編號系統編號。

[0155] 在某些具體實例中，本文所述之抗體包含 IgG<sub>4</sub> 抗體之恆定區，且重鏈之胺基酸殘基 228 處之絲胺酸(其係根據 EU 編號系統編號)經脯胺酸取代。

[0156] 在某些具體實例中，本文所述之抗體包含 IgG<sub>2</sub> 抗體之恆定區且重鏈之胺基酸殘基 127 處之半胱胺酸(其係根據 Kabat 編號)經絲胺酸取代。

[0157] 已報導具有降低之海藻糖含量之抗體具有增加之對 Fc 受體(諸如 FcγRIIIa)之親和力。因此，在某些具體實例中，本文所述之抗體具有降低之海藻糖含量或無海藻糖含量。此等抗體可使用熟習此技術者習知之技術產生。舉例而言，可使抗體在海藻糖基化之能力有缺陷或缺乏海藻糖基化之能力的細胞中表現。在一個特定實施例中，可使用具有  $\alpha$ 1,6-海藻糖基轉移酶之兩個對偶基因之基因剔除之細胞株產生具有降低之海藻糖含量的抗體。Potelligent<sup>®</sup>系統(Lonza 公司)為此種可用於產生具有降低之海藻糖含量之抗體之系統之實例。或者，具有降低之海藻糖含量或無海藻糖含量之抗體可藉由例如以下來產生：  
(i)在防止或減少海藻糖基化之條件下培養細胞；(ii)轉譯後移除海藻糖(例如用海藻糖苷酶)；(iii)例如在重組表現

非糖基化醣蛋白之後，轉譯後添加所需之碳水化合物；或 (iv) 純化醣蛋白以選擇其未海藻糖基化之抗體。參見例如 Longmore GD 及 Schachter H (1982) *Carbohydr Res* 100: 365-92；及 Imai-Nishiya H 等人, (2007) *BMC Biotechnol.* 7: 84 中用於產生其無海藻糖含量或具有降低之海藻糖含量的抗體之方法。

[0158] 工程改造之醣型 (glycoform) 可用於多種目的，其包括(但不限於)增強或降低效應功能。用於產生本文所述之抗體之工程改造之醣型的方法包括(但不限於)例如以下文獻中所揭示之彼等方法：Umaña P 等人, (1999) *Nat Biotechnol* 17: 176-180；Davies J 等人, (2001) *Biotechnol Bioeng* 74: 288-294；Shields RL 等人, (2002) *J Biol Chem* 277: 26733-26740；Shinkawa T 等人, (2003) *J Biol Chem* 278: 3466-3473；Niwa R 等人, (2004) *Clin Cancer Res* 1: 6248-6255；Presta LG 等人, (2002) *Biochem Soc Trans* 30: 487-490；Kanda Y 等人, (2007) *Glycobiology* 17: 104-118；美國專利第 6,602,684 號；第 6,946,292 號；及第 7,214,775 號；美國專利公開案第 US 2007/0248600 號；第 2007/0178551 號；第 2008/0060092 號；及第 2006/0253928 號；國際公開案第 WO 00/61739 號；第 WO 01/292246 號；第 WO 02/311140 號；及第 WO 02/30954 號；Potillegent™ 技術(新澤西州普林斯頓之 Biowa 公司)；及 GlycoMAb® 糖基化工程改造技術(瑞士蘇

黎世之 Glycart biotechnology AG 公司)。亦參見例如 Ferrara C 等人, (2006) *Biotechnol Bioeng* 93: 851-861; 國際公開案第 WO 07/039818 號; 第 WO 12/130831 號; 第 WO 99/054342 號; 第 WO 03/011878 號; 及第 WO 04/065540 號。

[0159] 在某些具體實例中, 用於工程改造本文所述之抗體之 Fc 結構域之技術為 Xencor 公司(加利福尼亞州之蒙羅維亞(Monrovia, CA))之 Xmab<sup>®</sup>技術。參見例如美國專利第 8,367,805 號; 第 8,039,592 號; 第 8,124,731 號; 第 8,188,231 號; 美國專利公開案第 2006/0235208 號; 國際公開案第 WO 05/077981 號; 第 WO 11/097527 號; 及 Richards JO 等人, (2008) *Mol Cancer Ther* 7: 2517-2527。

[0160] 在某些具體實例中, 本文所述之抗體之恆定區中對應於人類 IgG1 重鏈中之位置 L234、L235 及 D265 之位置處之胺基酸殘基(彼等係根據 EU 編號系統編號)分別不為 L、L 及 D。此方法詳細描述於國際公開案第 WO 14/108483 號中。在一個特定具體實例中, 對應於人類 IgG1 重鏈中之位置 L234、L235 及 D265 之胺基酸分別為 F、E 及 A; 或 A、A 及 A, 彼等係根據 EU 編號系統編號。

[0161] 在某些具體實例中, 將一個、兩個或多於兩個突變(例如胺基酸取代)引入本文所述之抗體的 Fc 區(例如 CH2 結構域(人類 IgG<sub>1</sub> 之殘基 231 至 340)及/或 CH3 結



構域(人類 IgG<sub>1</sub> 之殘基 341 至 447)及/或鉸鏈區)中(彼等係根據 EU 編號系統編號)以例如改變該抗體之一或多種功能特性，諸如血清半衰期、補體固定、Fc 受體結合及/或抗原依賴性細胞毒性。

[0162] 在某些具體實例中，將一個、兩個或多於兩個突變(例如胺基酸取代)引入 Fc 區(CH1 結構域)之鉸鏈區中以使得鉸鏈區中半胱胺酸殘基之數目改變(例如增加或減少)，如例如美國專利第 5,677,425 號中所述。可以改變 CH1 結構域之鉸鏈區中半胱胺酸殘基之數目以例如促成輕鏈及重鏈之組裝或改變(例如增加或降低)抗體之穩定性。

[0163] 在某些具體實例中，相對於不存在任何抗體之情況下或存在無關抗體(例如非免疫特異性結合 GITR 或 OX40 之抗體)之情況下的 GITR 及/或 OX40(例如人類 GITR 及/或 OX40)活性，免疫特異性結合 GITR 及 OX40(例如人類 GITR 及 OX40)之多特異性(例如雙特異性)抗體使 GITR 及/或 OX40(例如人類 GITR 及/或 OX40)活性增加至少約 1.2 倍、1.3 倍、1.4 倍、1.5 倍、2 倍、2.5 倍、3 倍、3.5 倍、4 倍、4.5 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、15 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、60 倍、70 倍、80 倍、90 倍或 100 倍，如藉由本文所述及/或熟習此技術者所習知之方法評定。舉例而言，相對於不存在任何抗體之情況下或存在無關抗體(例如非免疫特異性結合 GITR 或 OX40 之抗體)之情況下的 GITR 及/或

OX40(例如人類 GITR 及/或 OX40)活性，結合 GITR 及 OX40 之抗體，例如結合 GITR 及 OX40 且包含本文所指定之 CDR 序列之組合、與本文所指定之 VH 及/或 VL 序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99%或 100%序列一致性之 VH 及/或 VL 序列、或本文所指定之重鏈及/或輕鏈之抗體可使 GITR 及/或 OX40(例如人類 GITR 及/或 OX40)活性增加至少 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或 99%，如藉由本文所述及/或熟習此技術者所習知之方法評定。GITR 及/或 OX40(例如人類 GITR 及/或 OX40)活性之非限制性實例可包括 GITR 及/或 OX40(例如人類 GITR 及/或 OX40)信號傳導、細胞增殖、細胞存活及細胞激素產生(例如 IL-2、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10 及/或 IL-13)。

[0164] 如本發明所提供者，結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性抗體(例如雙特異性抗體)可促效 GITR 及/或 OX40 功能，例如藉由在 SEA 分析中刺激 IL-2 釋放，例如如下文實施例所例示者。舉例而言，在例如 37°C、5% CO<sub>2</sub> 及 97%濕度下刺激例如 5 天時，結合 GITR 及 OX40 之抗體，例如結合 GITR 及 OX40 且包含本文所指定之 CDR 序列之組合、與本文所指定之 VH 及/或 VL 序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、

至少 95%、至少 98%、至少 99%或 100%序列一致性之 VH 及/或 VL 序列、或本文所指定之重鏈及/或輕鏈之抗體可與葡萄球菌腸毒素 A(SEA) (例如 100 ng/ml)組合誘導例如 PBMC 中 IL-2 之產生，如藉由例如電致化學發光所量測。在一些具體實例中，IL-2 產生為在以下範圍內抗體濃度之實質上遞增函數：例如 0.08  $\mu\text{g/ml}$  至 20  $\mu\text{g/ml}$ 、0.25  $\mu\text{g/ml}$  至 20  $\mu\text{g/ml}$ 、0.74  $\mu\text{g/ml}$  至 20  $\mu\text{g/ml}$ 、2.2  $\mu\text{g/ml}$  至 20  $\mu\text{g/ml}$  或 6.7  $\mu\text{g/ml}$  至 20  $\mu\text{g/ml}$ 。在某些具體實例中，結合 GITR 及 OX40 之抗體，例如結合 GITR 及 OX40 且包含本文所指定之 CDR 序列之組合、與本文所指定之 VH 及/或 VL 序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99%或 100%序列一致性之 VH 及/或 VL 序列、或本文所指定之重鏈及/或輕鏈之抗體可與葡萄球菌腸毒素 A(SEA)組合誘導例如 PBMC 中 IL-2 之產生，其中 IL-2 產生為在以下範圍內抗體濃度之實質上遞增函數：例如 0.08  $\mu\text{g/ml}$  至 20  $\mu\text{g/ml}$ 、0.25  $\mu\text{g/ml}$  至 20  $\mu\text{g/ml}$ 、0.74  $\mu\text{g/ml}$  至 20  $\mu\text{g/ml}$ 、2.2  $\mu\text{g/ml}$  至 20  $\mu\text{g/ml}$  或 6.7  $\mu\text{g/ml}$  至 20  $\mu\text{g/ml}$ ，如例如在包括下列步驟之分析中所評定：(a)在例如 37°C、5% CO<sub>2</sub> 及 97%濕度下，在不存在或存在不同濃度(例如 20  $\mu\text{g/ml}$ 、46.7  $\mu\text{g/ml}$ 、2.2  $\mu\text{g/ml}$ 、0.74  $\mu\text{g/ml}$ 、0.25  $\mu\text{g/ml}$  及 0.08  $\mu\text{g/ml}$ )之抗體及例如 100 ng/ml 之 SEA 的情況下將 PBMC(例如每孔中 10<sup>5</sup> 個細胞)培養例如 5 天；及(b)收集

澄清之上清液且藉由例如電致化學發光量測 IL-2 之力價。

[0165] 在某些具體實例中，在例如 37°C、5% CO<sub>2</sub> 及 97%濕度下刺激例如 5 天時，結合 GITR 及 OX40 之抗體，例如結合 GITR 及 OX40 且包含本文所指定之 CDR 序列之組合、與本文所指定之 VH 及/或 VL 序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99%或 100%序列一致性之 VH 及/或 VL 序列、或本文所指定之重鏈及/或輕鏈之抗體可與葡萄球菌腸毒素 A(SEA) (例如 100 ng/ml)組合誘導例如 PBMC 中 IL-2 之產生，如藉由例如電致化學發光所量測。在一些具體實例中，當抗體為例如 0.08 µg/ml 至 20 µg/ml、0.25 µg/ml 至 20 µg/ml、0.74 µg/ml 至 20 µg/ml、2.2 µg/ml 至 20 µg/ml 或 6.7 µg/ml 至 20 µg/ml 時，IL-2 產生顯示 S 形劑量反應曲線。在某些具體實例中，結合 GITR 及 OX40 之抗體，例如結合 GITR 及 OX40 且包含本文所指定之 CDR 序列之組合、與本文所指定之 VH 及/或 VL 序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99%或 100%序列一致性之 VH 及/或 VL 序列、或本文所指定之重鏈及/或輕鏈之抗體可與葡萄球菌腸毒素 A(SEA)組合誘導例如 PBMC 中 IL-2 之產生，其中當抗體為例如 0.08 µg/ml 至 20 µg/ml、0.25 µg/ml 至 20 µg/ml、0.74 µg/ml 至 20

$\mu\text{g/ml}$ 、 $2.2 \mu\text{g/ml}$  至  $20 \mu\text{g/ml}$  或  $6.7 \mu\text{g/ml}$  至  $20 \mu\text{g/ml}$  時，IL-2 產生顯示 S 形劑量反應曲線，如例如在包括下列步驟之分析中所評定：(a)在例如  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  及  $97\%$  濕度下，在不存在或存在不同濃度(例如  $20 \mu\text{g/ml}$ 、 $6.7 \mu\text{g/ml}$ 、 $2.2 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.74 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.25 \mu\text{g/ml}$  及  $0.08 \mu\text{g/ml}$ ) 之抗體及例如  $100 \text{ ng/ml}$  之 SEA 的情況下將 PBMC(例如每孔中  $10^5$  個細胞)培養例如 5 天；及(b)收集澄清之上清液且藉由例如電致化學發光量測 IL-2 之力價。在某些具體實例中，在例如  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  及  $97\%$  濕度下刺激例如 5 天時，結合 GITR 及 OX40 之抗體，例如結合 GITR 及 OX40 且包含本文所指定之 CDR 序列之組合、與本文所指定之 VH 及/或 VL 序列具有至少  $70\%$ 、至少  $75\%$ 、至少  $80\%$ 、至少  $85\%$ 、至少  $90\%$ 、至少  $95\%$ 、至少  $98\%$ 、至少  $99\%$  或  $100\%$  序列一致性之 VH 及/或 VL 序列、或本文所指定之重鏈及/或輕鏈之抗體可與葡萄球菌腸毒素 A(SEA) (例如  $100 \text{ ng/ml}$ ) 組合誘導例如 PBMC 中 IL-2 之產生，如藉由例如電致化學發光所量測，其中 IL-2 產生為在以下範圍內抗體濃度之實質上遞增函數：例如  $0.08 \mu\text{g/ml}$  至  $20 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.25 \mu\text{g/ml}$  至  $20 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.74 \mu\text{g/ml}$  至  $20 \mu\text{g/ml}$ 、 $2.2 \mu\text{g/ml}$  至  $20 \mu\text{g/ml}$  或  $6.7 \mu\text{g/ml}$  至  $20 \mu\text{g/ml}$ 。在某些具體實例中，結合 GITR 及 OX40 之抗體，例如結合 GITR 及 OX40 且包含本文所指定之 CDR 序列之組合、與本文所指定之 VH 及/或 VL 序列具有至少  $70\%$ 、至少

75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99%或 100%序列一致性之 VH 及/或 VL 序列、或本文所指定之重鏈及/或輕鏈之抗體可與葡萄球菌腸毒素 A(SEA)組合誘導例如 PBMC 中 IL-2 之產生，其中 IL-2 產生為在以下範圍內抗體濃度之實質上遞增函數：例如 0.08  $\mu\text{g/ml}$  至 20  $\mu\text{g/ml}$ 、0.25  $\mu\text{g/ml}$  至 20  $\mu\text{g/ml}$ 、0.74  $\mu\text{g/ml}$  至 20  $\mu\text{g/ml}$ 、2.2  $\mu\text{g/ml}$  至 20  $\mu\text{g/ml}$  或 6.7  $\mu\text{g/ml}$  至 20  $\mu\text{g/ml}$ ，如例如在包括下列步驟之分析中所評定：(a)在例如 37°C、5% CO<sub>2</sub> 及 97%濕度下，在不存在或存在不同濃度(例如 20  $\mu\text{g/ml}$ 、6.7  $\mu\text{g/ml}$ 、2.2  $\mu\text{g/ml}$ 、0.74  $\mu\text{g/ml}$ 、0.25  $\mu\text{g/ml}$  及 0.08  $\mu\text{g/ml}$ )之抗體及例如 100 ng/ml 之 SEA 的情況下將 PBMC(例如每孔中 10<sup>5</sup> 個細胞)培養例如 5 天；及(b)收集澄清之上清液且藉由例如電致化學發光量測 IL-2 之力價。

[0166] 在一個特定態樣中，本發明提供免疫特異性結合 GITR 及 OX40(例如人類 GITR 及 OX40)之多特異性(例如雙特異性)拮抗性抗體。

[0167] 在一個特定態樣中，如本文所述之免疫特異性結合 GITR 及 OX40(例如人類 GITR 及 OX40)之多特異性(例如雙特異性)抗體包含人類免疫球蛋白 IgG<sub>1</sub> 重鏈恆定區，其中該 IgG<sub>1</sub> 重鏈恆定區之胺基酸序列包含選自由以下組成之群的突變：N297A、D265A、L234F、L235E、N297Q 及 P331S，其係根據 EU 編號系統編號。在某些具

體實例中，突變為 N297A 或 D265A，其係根據 EU 編號系統編號。在某些具體實例中，突變為 L234F 及 L235E，其係根據 EU 編號系統編號。在某些具體實例中，突變為 L234F、L234E 及 D265A，其係根據 EU 編號系統編號。在某些具體實例中，突變為 L234F、L234E 及 N297Q，其係根據 EU 編號系統編號。在某些具體實例中，突變為 L234F、L235E 及 P331S，其係根據 EU 編號系統編號。在某些具體實例中，突變為 D265A 及 N297Q，其係根據 EU 編號系統編號。在某些具體實例中，突變為 L234F、L235E、D265A、N297Q 及 P331S，其係根據 EU 編號系統編號。在一個特定態樣中，如本文所述之免疫特異性結合 GITR 及 OX40(例如人類 GITR 及 OX40)之多特異性(例如雙特異性)抗體包含人類免疫球蛋白 IgG<sub>1</sub> 重鏈恆定區，其中該 IgG<sub>1</sub> 重鏈恆定區之胺基酸序列包含選自由 D265A、P329A 及彼等之組合組成之群的突變，彼等係根據 EU 編號系統編號。在某些具體實例中，該抗體具有拮抗性。

[0168] 在某些具體實例中，相對於不存在任何抗體之情況下或存在無關抗體(例如非免疫特異性結合 GITR 或 OX40 之抗體)之情況下的 GITR 及/或 OX40(例如人類 GITR 及/或 OX40)活性，本文所述之免疫特異性結合 GITR 及 OX40(例如人類 GITR 及 OX40)之拮抗劑多特異性(例如雙特異性)抗體使 GITR 及/或 OX40(例如人類

GITR 及/或 OX40)活性降低至少約 1.2、1.3、1.4、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90 或 100 倍，如藉由本文所述及/或熟習此技術者所習知之方法評定。在某些具體實例中，相對於不存在任何抗體之情況下或存在無關抗體(例如非免疫特異性結合 GITR 或 OX40 之抗體)之情況下的 GITR 及/或 OX40(例如人類 GITR 及/或 OX40)活性，本文所述之免疫特異性結合 GITR 及/或 OX40(例如人類 GITR 及/或 OX40)之拮抗劑多特異性(例如雙特異性)抗體使 GITR 及/或 OX40(例如人類 GITR 及/或 OX40)活性降低至少 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或 99%，如藉由本文所述及/或熟習此技術者所習知之方法評定。GITR 及/或 OX40(例如人類 GITR 及/或 OX40)活性之非限制性實例可包括 GITR 及/或 OX40(例如人類 GITR 及/或 OX40)信號傳導、細胞增殖、細胞存活及細胞激素產生(例如 IL-2、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10 及/或 IL-13)。在特定具體實例中，如下文實施例中所述來評定 GITR 及/或 OX40 活性。

[0169] 如本發明所提供者，結合 GITR 及/或 OX40 之拮抗劑多特異性抗體(例如雙特異性抗體)可拮抗 GITR 及/或 OX40 功能，例如藉由中和 GITRL 誘導之信號傳導，例如如下文實施例中所例示者。舉例而言，結合



GITR 及 OX40 之拮抗劑抗體，例如結合 GITR 及 OX40 且包含本文所指定之 CDR 序列之組合、與本文所指定之 VH 及/或 VL 序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99% 或 100% 序列一致性之 VH 及/或 VL 序列、或本文所指定之重鏈及/或輕鏈之拮抗劑抗體可中和 GITRL 誘導之信號傳導，如藉由例如螢光素酶分析所量測。在某些具體實例中，結合 GITR 及 OX40 之拮抗劑抗體，例如結合 GITR 及 OX40 且包含本文所指定之 CDR 序列之組合、與本文所指定之 VH 及/或 VL 序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99% 或 100% 序列一致性之 VH 及/或 VL 序列、或本文所指定之重鏈及/或輕鏈之拮抗劑抗體可中和 GITRL 誘導之信號傳導，如例如在包括下列步驟之螢光素酶分析中所評定：(a) 在 37°C 及 5% CO<sub>2</sub> 下在補充 10% 熱滅活 FBS 之 RPMI 培養基中，在不存在或存在不同濃度之抗體(例如 12 點劑量滴定，0.05 ng/ml 至 10,000 ng/ml) 及三聚體 GITRL 之情況下，將 Jurkat-huGITR-NF- $\kappa$ B-螢光素酶細胞培養 2 小時；及 (b) 偵測螢光素酶活性。

[0170] 在某些具體實例中，本文所述之結合 GITR 及/或 OX40 之拮抗劑多特異性抗體(例如雙特異性抗體)阻斷 GITR 及/或 OX40 與 GITRL 及/或 OX40L 之相互作用(例如阻斷 GITRL 與 GITR 及/或 OX40L 與 OX40 彼此結合)。在

某些具體實例中，本文所述之結合 GITR 及/或 OX40 之拮抗劑多特異性抗體(例如雙特異性抗體)降低由 GITRL 及/或 OX40L 誘導之 GITR 及/或 OX40 活性(例如 GITR 及/或 OX40 信號傳導)。在某些具體實例中，本文所述之結合 GITR 及/或 OX40 之拮抗劑多特異性抗體(例如雙特異性抗體)抑制 T 細胞增殖。在某些具體實例中，本文所述之結合 GITR 及/或 OX40 之拮抗劑多特異性抗體(例如雙特異性抗體)抑制細胞激素(例如 IL-2、TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$ 、IL-4、IL-10、IL-13 或彼等之組合)之產生。

[0171] 本發明提供之結合 GITR 及/或 OX40 之抗體可融合或結合(例如共價或非共價連接)可偵測標記或物質。該可偵測標記或物質之實例包括酶標記，諸如葡萄糖氧化酶；放射性同位素，諸如碘(<sup>125</sup>I、<sup>121</sup>I)、碳(<sup>14</sup>C)、硫(<sup>35</sup>S)、氫(<sup>3</sup>H)、銦(<sup>121</sup>In)及鎝(<sup>99</sup>Tc)；發光標記，諸如魯米諾(luminol)；及螢光標記，諸如螢光素及若丹明(rhodamine)；及生物素。此等標記之抗體可用於偵測 OX40(例如人類 OX40)蛋白質。參見例如下文之部分 7.5.2。

### 7.2.1 OX40 抗原結合域

[0172] 在一個特定具體實例中，本文所述之特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之 OX40 抗原結合域包含輕鏈可變區(VL)，該輕鏈可變區包含如表 4 中所示：

(a) VL CDR1，其包含以下胺基酸序列、由以下胺基酸序列組成或基本上由以下胺基酸序列組成：胺基酸序列 RSSQSLLSNGYNYLD(SEQ ID NO:50)；

(b) VL CDR2，其包含以下胺基酸序列、由以下胺基酸序列組成或基本上由以下胺基酸序列組成：胺基酸序列 LGSNRAS(SEQ ID NO:51)；及

(c) VL CDR3，其包含以下胺基酸序列、由以下胺基酸序列組成或基本上由以下胺基酸序列組成：胺基酸序列 MQALQTPLT(SEQ ID NO:52) 或 MQALQTPLT(SEQ ID NO:53)。

在一些具體實例中，OX40 抗原結合域包含本文所述之 VL 構架區。

[0173] 在另一個具體實例中，本文所述之特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域包含重鏈可變區 (VH)，該重鏈可變區包含如表 4 中所示：

(a) VH CDR1，其包含以下胺基酸序列、由以下胺基酸序列組成或基本上由以下胺基酸序列組成：胺基酸序列 GSAMH(SEQ ID NO:47)；

(b) VH CDR2，其包含以下胺基酸序列、由以下胺基酸序列組成或基本上由以下胺基酸序列組成：胺基酸序列 RIRSKANSYATAYAASVKG(SEQ ID NO:48)；及

(c) VH CDR3，其包含以下胺基酸序列、由以下胺基酸序列組成或基本上由以下胺基酸序列組成：胺基酸序列

GIYDSSGYDY(SEQ ID NO:49)。

在一些具體實例中，OX40 抗原結合域包含本文所述之 VH 構架。在特定具體實例中，OX40 抗原結合域包含本文所述之抗體之 VH 構架區。

表 4. 抗 OX40 抗體之 VL CDR 胺基酸序列\*

抗體	VL CDR1 (SEQ ID NO:)	VL CDR2 (SEQ ID NO:)	VL CDR3 (SEQ ID NO:)
pab1949w	RSSQSLHLSNGYNYLD (50)	LGSNRAS (51)	MQALQTPLT (53)
pab2049w	RSSQSLHLSNGYNYLD (50)	LGSNRAS (51)	MQGSKWPLT (52)

\*表 4 中之 VL CDR 係根據 Kabat 確定。

表 5. 抗 OX40 抗體之 VH CDR 胺基酸序列\*

抗體	VH CDR1 (SEQ ID NO:)	VH CDR2 (SEQ ID NO:)	VH CDR3 (SEQ ID NO:)
pab1949w	GSAMH(47)	RIRSKANSYATAYAASVKG (48)	GIYDSSGYDY (49)
pab2049w	GSAMH(47)	RIRSKANSYATAYAASVKG (48)	GIYDSSGYDY (49)

\*表 5 中之 VH CDR 係根據 Kabat 確定。

[0174] 在某些具體實例中，本發明提供一種抗原結合域，其特異性結合 OX40(例如人類 OX40)且包含 pab1949w 或 pab2049w 之輕鏈可變區(VL)CDR 及重鏈可變區(VH)CDR，其係例如如表 4 及 5 中所示出(亦即 SEQ ID NO:47 至 52 或 SEQ ID NO:47 至 51 及 53)。

[0175] 在某些具體實例中，OX40 抗原結合域包含源自於人類 IGKV2-28 生殖系序列之輕鏈可變構架區(例如 IGKV2-28\*01，其例如具有胺基酸序列 SEQ ID NO:58)。

[0176] 在某些具體實例中，OX40 抗原結合域包含源自於人類 IGHV3-73 生殖系序列之重鏈可變構架區(例如

IGHV3-73\*01，其例如具有胺基酸序列 SEQ ID NO:57)。

[0177] 在一個特定具體實例中，特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域包含 VL 結構域，該 VL 結構域包含胺基酸序列 SEQ ID NO:55 或 56。在一個特定具體實例中，特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域包含 VL 結構域，該 VL 結構域由胺基酸序列 SEQ ID NO:55 或 56 組成或基本上由胺基酸序列 SEQ ID NO:55 或 56 組成。

[0178] 在某些具體實例中，特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域包含 VH 結構域，該 VH 結構域包含胺基酸序列 SEQ ID NO:54。在一些具體實例中，特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域包含 VH 結構域，該 VH 結構域由胺基酸序列 SEQ ID NO:54 組成或基本上由胺基酸序列 SEQ ID NO:54 組成。

[0179] 在某些具體實例中，特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域包含 VH 結構域及 VL 結構域，其中該 VH 結構域及該 VL 結構域分別包含胺基酸序列 SEQ ID NO:54 及 SEQ ID NO:55 或 56。在某些具體實例中，特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域包含 VH 結構域及 VL 結構域，其中該 VH 結構域及該 VL 結構域分別由胺基酸序列 SEQ ID NO:54 及 SEQ ID NO:55 或 56 組成或基本上由胺基酸序列 SEQ ID NO:54 及 SEQ ID NO:55 或 56 組成，例如如表 6 中所示。

表 6. 例示性抗 OX40 抗體之 VH 及 VL 序列

抗體	VH (SEQ ID NO:)	VL (SEQ ID NO:)
pab2049w	54	55
pab1949w	54	56

在特定態樣中，本發明提供一種抗原結合域，其包含輕鏈及重鏈，例如各別輕鏈及重鏈。對於輕鏈，在一個特定具體實例中，本文所述之抗原結合域之輕鏈為  $\kappa$  輕鏈。在另一個特定具體實例中，本文所述之抗原結合域之輕鏈為  $\lambda$  輕鏈。在另一個特定具體實例中，本文所述之抗原結合域之輕鏈為人類  $\kappa$  輕鏈或人類  $\lambda$  輕鏈。在一個特定具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 OX40 多肽(例如人類 OX40)之抗原結合域包含輕鏈，其中 VL 結構域之胺基酸序列包含以 SEQ ID NO:55 或 56 示出之序列，且其中輕鏈之恆定區包含人類  $\kappa$  輕鏈恆定區之胺基酸序列。在另一個特定具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域包含輕鏈，其中 VL 結構域之胺基酸序列包含以 SEQ ID NO:55 或 56 示出之序列，且其中輕鏈之恆定區包含人類  $\lambda$  輕鏈恆定區之胺基酸序列。在一個特定具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域包含輕鏈，其中 VL 結構域之胺基酸序列包含以 SEQ ID NO:55 或 56 示出之序列，且其中輕鏈之恆定區包含人類  $\kappa$  或  $\lambda$  輕鏈恆定區之胺基酸序列。人類恆定區序列之非限制性實例在此技術中已

被描述，例如參見美國專利第 5,693,780 號及 Kabat EA 等人 (1991) (同上)。

[0180] 在一個特定具體實例中，本文所述之特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域包含輕鏈，該輕鏈包含以 SEQ ID NO:67 或 69 示出之胺基酸序列。

[0181] 對於重鏈，在一個特定具體實例中，本文所述之抗原結合域之重鏈可為  $\alpha$  重鏈、 $\delta$  重鏈、 $\epsilon$  重鏈、 $\gamma$  重鏈或  $\mu$  重鏈。在另一個特定具體實例中，所述之抗原結合域之重鏈可包含人類  $\alpha$  重鏈、 $\delta$  重鏈、 $\epsilon$  重鏈、 $\gamma$  重鏈或  $\mu$  重鏈。在一個特定具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域包含重鏈，其中 VH 結構域之胺基酸序列可包含以 SEQ ID NO:54 示出之序列且其中重鏈之恆定區包含人類  $\gamma$  重鏈恆定區之胺基酸序列。在一個特定具體實例中，本文所述之特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域包含重鏈，其中 VH 結構域之胺基酸序列包含以 SEQ ID NO:54 示出之序列，且其中重鏈之恆定區包含本文所述或此技術已習知之人類重鏈之胺基酸。人類恆定區序列之非限制性實例在此技術中已被描述，例如參見美國專利第 5,693,780 號及 Kabat EA 等人 (1991) (同上)。

[0182] 在一個特定具體實例中，本文所述之特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含以 SEQ ID NO:61 示出之胺基酸序列。在另一個具

體實例中，本文所述之特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含以 SEQ ID NO:62 示出之胺基酸序列。在另一個具體實例中，本文所述之特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含以 SEQ ID NO:63 示出之胺基酸序列。在另一個具體實例中，本文所述之特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含以 SEQ ID NO:64 示出之胺基酸序列。在另一個具體實例中，本文所述之特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含以 SEQ ID NO:65 示出之胺基酸序列。在另一個具體實例中，本文所述之特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含以 SEQ ID NO:71 示出之胺基酸序列。

[0183] 在一個特定具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域包含 VL 結構域及 VH 結構域，該 VL 結構域及 VH 結構域包含本文所述之任何胺基酸序列，其中恆定區包含 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 或 IgY 免疫球蛋白分子、或人類 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 或 IgY 免疫球蛋白分子之恆定區之胺基酸序列。在另一個特定具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域包含 VL 結構域及 VH 結構域，該 VL 結構域及 VH 結構域包含本文所述之任何胺基酸序列，其中恆定區包含 IgG、IgE、



IgM、IgD、IgA 或 IgY 免疫球蛋白分子、任何類別(例如 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub> 及 IgA<sub>2</sub>)或任何子類(例如 IgG<sub>2a</sub> 及 IgG<sub>2b</sub>)之免疫球蛋白分子之恆定區之胺基酸序列。在一個特定具體實例中，恆定區包含人類 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 或 IgY 免疫球蛋白分子、任何類別(例如 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub> 及 IgA<sub>2</sub>)或任何子類(例如 IgG<sub>2a</sub> 及 IgG<sub>2b</sub>)之免疫球蛋白分子之恆定區之胺基酸序列。

[0184] 在另一個特定具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域包含 VL 結構域及 VH 結構域，該 VL 結構域及 VH 結構域包含本文所述之任何胺基酸序列，其中恆定區包含人類 IgG<sub>1</sub>(例如同種異型 G1m3、G1m17,1 或 G1m17,1,2)、人類 IgG<sub>2</sub> 或人類 IgG<sub>4</sub> 之恆定區之胺基酸序列。在一個特定具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域包含 VL 結構域及 VH 結構域，該 VL 結構域及 VH 結構域包含本文所述之任何胺基酸序列，其中恆定區包含人類 IgG<sub>1</sub>(同種異型 G1m3)之恆定區之胺基酸序列。人類恆定區之非限制性實例在此技術中被描述，例如參見 Kabat EA 等人 (1991) (同上)。

[0185] 在另一個具體實例中，本文所述之特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域包含輕鏈和重鏈，該輕鏈包含以 SEQ ID NO:67 示出之胺基酸序列且該重鏈

包含以 SEQ ID NO:61、62、63、64、65 或 71 示出之胺基酸序列。在另一個具體實例中，本文所述之特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域包含輕鏈和重鏈，該輕鏈包含以 SEQ ID NO:69 示出之胺基酸序列且該重鏈包含以 SEQ ID NO:61、62、63、64、65 或 71 示出之胺基酸序列。

[0186] 在某些具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域包含與 pab1949w 或 pab2049w 之 VL 結構域之胺基酸序列(亦即 SEQ ID NO:55 或 56)具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 98%序列一致性之 VL 結構域，例如其中該抗原結合域包含與 pab1949w 或 pab2049w 之 VL CDR 相同之 VL CDR。

[0187] 在某些具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域包含與 pab1949w 或 pab2049w 之 VH 結構域之胺基酸序列(亦即 SEQ ID NO:54)具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 98%序列一致性之 VH 結構域，例如其中該抗原結合域包含與 pab1949w 或 pab2049w 之 VH CDR 相同之 VH CDR。

[0188] 在某些具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域包含：(i)與 pab1949w 或 pab2049w 之 VL 結構域之胺基酸序列(亦即

SEQ ID NO:55 或 56)具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 98%序列一致性之 VL 結構域；及(ii)與 pab1949w 或 pab2049w 之 VH 結構域之胺基酸序列(亦即 SEQ ID NO:54)具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 98%序列一致性之 VH 結構域，例如其中該抗體包含與 pab1949w 或 pab2049w 之 VL CDR 及 VH CDR 相同之 VL CDR 及 VH CDR。

[0189] 在特定態樣中，本發明提供一種抗原結合域，其與包含具有以 SEQ ID NO:55 或 56 示出之胺基酸序列之 VL 結構域及具有以 SEQ ID NO:54 示出之胺基酸序列之 VH 結構域之抗原結合域競爭(例如以劑量依賴性方式)特異性結合 OX40(例如人類 OX40)。

[0190] 在一個特定具體實例中，本文所述之抗原結合域為被與 OX40(例如人類 OX40)之特異性結合由包含具有以 SEQ ID NO:55 或 56 示出之胺基酸序列之 VL 結構域及具有以 SEQ ID NO:54 示出之胺基酸序列之 VH 結構域的抗原結合域競爭性阻斷(例如以劑量依賴性方式)之抗原結合域。

[0191] 可使用熟習此技術者已知或本文所述之分析(例如 X 射線結晶學、氫/氘交換聯同質譜分析(例如液相層析電噴霧質譜分析)、丙胺酸掃描、ELISA 分析等)以確定兩種抗體是否結合相同之表位。

[0192] 在一個特定具體實例中，本文所述之抗原結合域免疫特異性結合與由 pab1949w 或 pab2049w 所結合之表位相同之表位或與該表位重疊之表位。

[0193] 在一個特定態樣中，相對於本文所述之抗原結合域與 SEQ ID NO:72 之人類 OX40 序列之間的結合，該抗原結合域與變異型 OX40 之間的結合實質上減弱，其中除了胺基酸突變(例如取代)之外，該變異型 OX40 包含 SEQ ID NO:72 之序列，該胺基酸突變選自由以下組成之群：N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A 及彼等之組合，或選自由以下組成之群：N60A、R62A、R80A、L88A 及 P93A，彼等係根據 SEQ ID NO: 72 編號。

[0194] 在一些具體實例中，除了任一個突變之外，該變異型 OX40 包含 SEQ ID NO:72 之序列，該突變選自由以下組成之群：N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A 及 P115A，或選自由以下組成之群：N60A、R62A、R80A、L88A 及 P93A，彼等係根據 SEQ ID NO: 72 編號。在一些具體實例中，除了任何兩個、三個、四個、五個、六個或七個突變之外，該變異型 OX40 包含 SEQ ID NO: 72 之序列，該等突變選自由以下組成之群：W58A、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A 及 P115A，或選自由以下組成之群：N60A、R62A、R80A、L88A 及 P93A，彼等係根據 SEQ ID NO: 72 編號。在一些具體實例

中，除了胺基酸突變 W58A、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A 及 P115A 之外或除了胺基酸突變 N60A、R62A、R80A、L88A 及 P93A 之外，變異型 OX40 包含 SEQ ID NO:72 之序列，該等胺基酸編號係根據 SEQ ID NO: 72。

[0195] 在一個特定態樣中，本文所述之抗原結合域結合人類 OX40 序列之表位，該表位包含 SEQ ID NO:72 之殘基、基本上由 SEQ ID NO:72 之殘基組成或由 SEQ ID NO:72 之殘基組成，該殘基選自由以下組成之群：58、60、62、80、88、93、99、115 及彼等之組合，或選自由以下組成之群：60、62、80、88、93 及彼等之組合。在一些具體實例中，該表位包含任一個殘基、或任何兩個、三個、四個、五個、六個或七個殘基；由任一個殘基、或任何兩個、三個、四個、五個、六個或七個殘基組成；或基本上由任一個殘基、或任何兩個、三個、四個、五個、六個或七個殘基組成，該(等)殘基選自由以下組成之群：SEQ ID NO:72 之 58、60、62、80、88、93、99 及 115，或選自由以下組成之群：SEQ ID NO:72 之 60、62、80、88 及 93。在一些具體實例中，該表位包含以下殘基、基本上由以下殘基組成或由以下殘基組成：SEQ ID NO:72 之殘基 58、60、62、80、88、93、99 及 115；或包含 SEQ ID NO:72 之殘基 60、62、80、88 及 93。

[0196] 在一個特定具體實例中，本文所述之抗原結

合域結合 SEQ ID NO:72 之表位，該表位包含以下殘基、基本上由以下殘基組成或由以下殘基組成，該殘基選自由以下組成之群：58、60、62、80、88、93、99、115 及彼等之組合；或 SEQ ID NO:72 之表位，該表位包含以下殘基、基本上由以下殘基組成或由以下殘基組成，該殘基選自由以下組成之群：60、62、80、88、93 及彼等之組合。在一些具體實例中，該表位包含任一個殘基、或任何兩個、三個、四個、五個、六個或七個殘基，該或該等殘基選自由以下組成之群：SEQ ID NO:72 之 58、60、62、80、88、93、99 及 115，或選自由以下組成之群：SEQ ID NO:72 之 60、62、80、88 及 93。在一些具體實例中，該表位包含以下殘基、由以下殘基組成或基本上由以下殘基組成：SEQ ID NO:72 之殘基 58、60、62、80、88、93、99 及 115，或包含 SEQ ID NO:72 之殘基 60、62、80、88 及 93。

[0197] 在一個特定態樣中，本文所述之抗原結合域結合 SEQ ID NO:72 之至少一個殘基，該殘基選自由以下組成之群：58、60、62、80、88、93、99、115 及彼等之組合，或選自由以下組成之群：60、62、80、88、93 及彼等之組合。在一些具體實例中，本文所述之抗原結合域結合任一個殘基、或任何兩個、三個、四個、五個、六個或七個殘基，該(等)殘基選自由以下組成之群：SEQ ID NO:72 之 58、60、62、80、88、93、99 及 115，或選自由

以下組成之群：SEQ ID NO:72 之 60、62、80、88 及 93。在一些具體實例中，本文所述之抗原結合域結合 SEQ ID NO:72 之殘基 58、60、62、80、88、93、99 及 115。在一些具體實例中，本文所述之抗原結合域結合 SEQ ID NO:72 之殘基 60、62、80、88 及 93。

[0198] 在一個特定態樣中，相較於與 SEQ ID NO:72 之人類 OX40 序列之結合，本文所述之抗原結合域表現與 SEQ ID NO:72 相同但存在胺基酸突變(例如取代)之蛋白質的減少或缺少之結合，該胺基酸突變選自由以下組成之群：N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A 及彼等之組合，或選自由以下組成之群：N60A、R62A、R80A、L88A、P93A 及彼等之組合，該胺基酸編號係根據 SEQ ID NO: 72。在一些具體實例中，除存在胺基酸突變之外，該蛋白質與 SEQ ID NO:72 相同，該胺基酸突變包括任一個突變，該突變選自由以下組成之群：N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A 及 P115A，或選自由以下組成之群：N60A、R62A、R80A、L88A 及 P93A，彼等係根據 SEQ ID NO: 72 編號。在一些具體實例中，除存在任何兩個、三個、四個、五個、六個或七個突變之外，該蛋白質與 SEQ ID NO:72 相同，該等突變選自由以下組成之群：W58A、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A 及 P115A，或選自由以下組成之群：N60A、R62A、R80A、L88A 及 P93A，彼等係根據 SEQ ID NO: 72 編

號。在一些具體實例中，除存在胺基酸取代 W58A、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A 及 P115A 之外或除存在胺基酸取代 N60A、R62A、R80A、L88A 及 P93A 之外，該蛋白質與 SEQ ID NO:72 相同，該等胺基酸編號係根據 SEQ ID NO: 72。

[0199] 在某些具體實例中，本文所述之抗原結合域之表位用作免疫原以產生抗體。參見例如下文部分 7.3 中用於產生抗體之方法。

[0200] 在特定態樣中，本文所述之免疫特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域在以單特異性二價形式存在時用作促效劑。

[0201] 在某些具體實例中，相對於不存在任何抗體之情況下或存在無關抗體(例如非免疫特異性結合 OX40 之抗體)之情況下的 OX40(例如人類 OX40)活性，本文所述之免疫特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域在以單特異性二價形式存在時使 OX40(例如人類 OX40)活性增加至少約 1.2 倍、1.3 倍、1.4 倍、1.5 倍、2 倍、2.5 倍、3 倍、3.5 倍、4 倍、4.5 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、15 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、60 倍、70 倍、80 倍、90 倍或 100 倍，如藉由本文所述及/或熟習此技術者所習知之方法評定。在某些具體實例中，相對於不存在任何抗體之情況下或存在無關抗體(例如非免疫特異性結合 OX40 之抗體)之情況下的 OX40(例如



人類 OX40)活性，本文所述之免疫特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域在以單特異性二價形式存在時使 OX40(例如人類 OX40)活性增加至少 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或 99%，如藉由本文所述及/或熟習此技術者所習知之方法評定。OX40(例如人類 OX40)活性之非限制性實例可包括 OX40(例如人類 OX40)信號傳導、細胞增殖、細胞存活及細胞激素產生(例如 IL-2、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10 及/或 IL-13)。在某些具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 OX40(例如人類 OX40)之抗原結合域在以單特異性二價形式存在時誘導、增強或增加 OX40(例如人類 OX40)活性。在特定具體實例中，OX40 活性之增加係如下文實施例所述評定。

[0202] 在某些具體實例中，本發明提供之多特異性(例如雙特異性)抗體包含如美國申請案第 62/161,198 號所述之結合 OX40 之抗原結合域，該美國申請案以全文引用之方式併入本文中。

### 7.2.2 GITR 抗原結合域

[0203] 在一個特定具體實例中，本文所述之特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域包含輕鏈可變區(VL)，該輕鏈可變區包含如表 7 中所示：

(a) 包含胺基酸序列 KSSQSLNSX<sub>1</sub>NQKNYLX<sub>2</sub>(SEQ ID NO:90)之 VL-CDR1，其中 X<sub>1</sub> 為 G 或 S；且 X<sub>2</sub> 為 T 或 S；

(b) 包含胺基酸序列 WASTRES(SEQ ID NO:5)之 VL-CDR2；及

(c) 包含胺基酸序列 QNX<sub>1</sub>YSX<sub>2</sub>PYT(SEQ ID NO:92)之 VL-CDR3，其中 X<sub>1</sub> 為 D 或 E；且 X<sub>2</sub> 為 Y、F 或 S。

[0204] 在另一個具體實例中，本文所述之特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之 GITR 抗原結合域包含重鏈可變區(VH)，該重鏈可變區包含如表 8 中所示：

(a) 包含胺基酸序列 X<sub>1</sub>YX<sub>2</sub>MX<sub>3</sub>(SEQ ID NO:87)之 VH-CDR1，其中 X<sub>1</sub> 為 D、E 或 G；X<sub>2</sub> 為 A 或 V；且 X<sub>3</sub> 為 Y 或 H；

(b) 包含胺基酸序列 X<sub>1</sub>IX<sub>2</sub>TX<sub>3</sub>SGX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>YNQKFX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>(SEQ ID NO:88)之 VH-CDR2，其中 X<sub>1</sub> 為 V 或 L；X<sub>2</sub> 為 R、K 或 Q；X<sub>3</sub> 為 Y 或 F；X<sub>4</sub> 為 D、E 或 G；X<sub>5</sub> 為 V 或 L；X<sub>6</sub> 為 T 或 S；X<sub>7</sub> 為 K、R 或 Q；且 X<sub>8</sub> 為 D、E 或 G；

(c) 包含胺基酸序列 SGTVRGFAY(SEQ ID NO:3)之 VH-CDR3。

[0205] 在另一個特定具體實例中，本文所述之特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域包含輕鏈可變區(VL)，該輕鏈可變區包含如表 7 中所示：

(a) 包含胺基酸序列 KSSQSLNSX<sub>1</sub>NQKNYL(T)(SEQ

ID NO:4)之 VL-CDR1，其中  $X_1$  為 G 或 S；

(b) 包含胺基酸序列 WASTRES(SEQ ID NO:5)之 VL-CDR2；及

(c) 包含胺基酸序列  $QNX_1YSX_2PYT$ (SEQ ID NO:6)之 VL-CDR3，其中  $X_1$  為 D 或 E；且  $X_2$  為 Y 或 F。

[0206] 在另一個具體實例中，本文所述之特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之 GITR 抗原結合域包含重鏈可變區(VH)，該重鏈可變區包含如表 8 中所示：

(a) 包含胺基酸序列  $X_1YAMX_2$ (SEQ ID NO:1)之 VH-CDR1，其中  $X_1$  為 D、G 或 E；且  $X_2$  為 Y 或 H；

(b) 包含胺基酸序列  $X_1IRTYSGX_2VX_3YNQKFX_4X_5$ (SEQ ID NO:2)之 VH-CDR2，其中  $X_1$  為 V 或 L； $X_2$  為 D 或 G； $X_3$  為 T 或 S； $X_4$  為 K、R 或 Q；且  $X_5$  為 D、E 或 G；及

包含胺基酸序列 SGTVRGFAY(SEQ ID NO:3)之 VH-CDR3。

表 7. GITR VL CDR 胺基酸序列\*

抗體	VL CDR1 (SEQ ID NO:)	VL CDR2 (SEQ ID NO:)	VL CDR3 (SEQ ID NO:)
共同 1	KSSQSLNSX <sub>1</sub> NQKNYLX <sub>2</sub> , 其中 X <sub>1</sub> 為 G 或 S ; 且 X <sub>2</sub> 為 T 或 S(90)	WASTRES (5)	QNX <sub>1</sub> YSX <sub>2</sub> PYT, 其中 X <sub>1</sub> 為 D 或 E ; 且 X <sub>2</sub> 為 Y、F 或 S(92)
共同 2	KSSQSLNSX <sub>1</sub> NQKNYLT X <sub>1</sub> 為 G 或 S (4)	WASTRES (5)	QNX <sub>1</sub> YSX <sub>2</sub> PYT X <sub>1</sub> 為 D 或 E ; 且 X <sub>2</sub> 為 Y 或 F (6)
pab1876w	KSSQSLNSGNQKNYLT (14)	WASTRES (5)	QNDYSYPYT (16)
pab1967w	KSSQSLNSSNQKNYLT (15)	WASTRES (5)	QNEYSFPYT (17)
pab1975w	KSSQSLNSGNQKNYLT (14)	WASTRES (5)	QNDYSYPYT (16)
pab1979w	KSSQSLNSGNQKNYLT (14)	WASTRES (5)	QNDYSYPYT (16)

\*表 7 中之 VL CDR 係根據 Kabat 確定。

表 8. GITR VH CDR 胺基酸序列\*

抗體	VH CDR1 (SEQ ID NO:)	VH CDR2 (SEQ ID NO:)	VH CDR3 (SEQ ID NO:)
共同 1	X <sub>1</sub> YX <sub>2</sub> MX <sub>3</sub> 其中 X <sub>1</sub> 為 D、E 或 G ; X <sub>2</sub> 為 A 或 V ; 且 X <sub>3</sub> 為 Y 或 H(87)	X <sub>1</sub> IX <sub>2</sub> TX <sub>3</sub> SGX <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> YNQKFX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> , 其中 X <sub>1</sub> 為 V 或 L ; X <sub>2</sub> 為 R、K 或 Q ; X <sub>3</sub> 為 Y 或 F ; X <sub>4</sub> 為 D、E 或 G ; X <sub>5</sub> 為 V 或 L ; X <sub>6</sub> 為 T 或 S ; X <sub>7</sub> 為 K、R 或 Q ; 且 X <sub>8</sub> 為 D、E 或 G(88)	SGTVRGFAY (3)
共同 2	X <sub>1</sub> YAMX <sub>2</sub> X <sub>1</sub> 為 D、G 或 E ; 且 X <sub>2</sub> 為 Y 或 H(1)	X <sub>1</sub> IRTYSGX <sub>2</sub> VX <sub>3</sub> YNQKFX <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>1</sub> 為 V 或 L ; X <sub>2</sub> 為 D 或 G ; X <sub>3</sub> 為 T 或 S ; X <sub>4</sub> 為 K、R 或 Q ; 且 X <sub>5</sub> 為 D、E 或 G(2)	SGTVRGFAY (3)
pab1876w	DYAMY (7)	VIRTYSGDVTYNQKFKD (10)	SGTVRGFAY (3)
pab1967w	GYAMH (8)	LIRTYSGGVSYNQKFRE (11)	SGTVRGFAY (3)
pab1975w	EYAMH (9)	LIRTYSGGVSYNQKFQG (12)	SGTVRGFAY (3)
pab1979w	EYAMH (9)	VIRTYSGGVSYNQKFQE (13)	SGTVRGFAY (3)

\*表 8 中之 VH CDR 係根據 Kabat 確定。

[0207] 在某些具體實例中，本發明提供一種抗原結合域，其特異性結合 GITR(例如人類 GITR)且包含 pab1876、pab1967、pab1975 或 pab1979 之輕鏈可變區 (VL)CDR 及重鏈可變區 (VH)CDR，例如如表 1 及 2 中所

示(亦即 SEQ ID NO:14、5、16、7、10 及 3；SEQ ID NO:15、5、17、8、11 及 3；SEQ ID NO:14、5、16、9、12 及 3；或 SEQ ID NO:14、5、16、9、13 及 3)。

[0208] 在某些具體實例中，GITR 抗原結合域包含源自於人類 IGKV4-1 生殖系序列之輕鏈可變構架區(例如 IGKV4-1\*01，其例如具有胺基酸序列 SEQ ID NO:28)。

[0209] 在某些具體實例中，GITR 抗原結合域包含源自於人類 IGHV1-2 生殖系序列之重鏈可變構架區(例如 IGHV1-2\*02，其例如具有胺基酸序列 SEQ ID NO:27)。

[0210] 在一個特定具體實例中，特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域包含 VL 結構域，該 VL 結構域包含胺基酸序列 SEQ ID NO:19、21、23 或 26。在一個特定具體實例中，特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域包含 VL 結構域，該 VL 結構域由胺基酸序列 SEQ ID NO:19、21、23 或 26 組成或基本上由胺基酸序列 SEQ ID NO:19、21、23 或 26 組成。

[0211] 在某些具體實例中，特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域包含 VH 結構域，該 VH 結構域包含胺基酸序列 SEQ ID NO:18、20、22、24 或 25。在一些具體實例中，特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域包含 VH 結構域，該 VH 結構域由胺基酸序列 SEQ ID NO:18、20、22、24 或 25 組成或基本上由胺基酸序列 SEQ ID NO:18、20、22、24 或 25 組成。

[0212] 在某些具體實例中，特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域包含 VH 結構域及 VL 結構域，其中該 VH 結構域及該 VL 結構域分別包含胺基酸序列 SEQ ID NO:18 及 19；SEQ ID NO:20 及 21；SEQ ID NO:22 及 23；SEQ ID NO:24 及 23；或 SEQ ID NO:25 及 26。在某些具體實例中，特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域包含 VH 結構域及 VL 結構域，其中該 VH 結構域及該 VL 結構域分別由以下胺基酸序列組成或基本上由以下胺基酸序列組成：胺基酸序列 SEQ ID NO:18 及 19；SEQ ID NO:20 及 21；SEQ ID NO:22 及 23；SEQ ID NO:24 及 23；或 SEQ ID NO:25 及 26，例如如表 9 中所示。

表 9. 例示性抗 GITR 抗體之 VH 及 VL 序列

抗體	VH (SEQ ID NO:)	VL (SEQ ID NO:)
pab1876w	18	19
pab1967w	20	21
pab1975w	22	23
pab1979w	24	23

[0213] 在特定態樣中，本發明提供一種抗原結合域，其包含輕鏈及重鏈，例如各別輕鏈及重鏈。對於輕鏈，在一個特定具體實例中，本文所述之抗原結合域之輕鏈為  $\kappa$  輕鏈。在另一個特定具體實例中，本文所述之抗原結合域之輕鏈為  $\lambda$  輕鏈。在另一個特定具體實例中，本文所述之抗原結合域之輕鏈為人類  $\kappa$  輕鏈或人類  $\lambda$  輕鏈。在一個特定具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 GITR

多肽(例如人類 GITR)之抗原結合域包含輕鏈，其中 VL 結構域之胺基酸序列包含以 SEQ ID NO:19、21、23 或 26 示出之序列且其中輕鏈之恆定區包含人類  $\kappa$  輕鏈恆定區之胺基酸序列。在另一個特定具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域包含輕鏈，其中 VL 結構域之胺基酸序列包含以 SEQ ID NO:19、21、23 或 26 示出之序列且其中輕鏈之恆定區包含人類  $\lambda$  輕鏈恆定區之胺基酸序列。在一個特定具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域包含輕鏈，其中 VL 結構域之胺基酸序列包含以 SEQ ID NO:19、21、23 或 26 示出之序列且其中輕鏈之恆定區包含人類  $\kappa$  或  $\lambda$  輕鏈恆定區之胺基酸序列。人類恆定區序列之非限制性實例在此技術中已被描述，例如參見美國專利第 5,693,780 號及 Kabat EA 等人 (1991) (同上)。

[0214] 在一個特定具體實例中，本文所述之特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域包含輕鏈，該輕鏈包含以 SEQ ID NO:37 或 38 示出之胺基酸序列。

[0215] 對於重鏈，在一個特定具體實例中，本文所述之抗原結合域之重鏈可為  $\alpha$  重鏈、 $\delta$  重鏈、 $\epsilon$  重鏈、 $\gamma$  重鏈或  $\mu$  重鏈。在另一個特定具體實例中，所述之抗原結合域之重鏈可包含人類  $\alpha$  重鏈、 $\delta$  重鏈、 $\epsilon$  重鏈、 $\gamma$  重鏈或  $\mu$  重鏈。在一個特定具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域包含重鏈，其中

VH 結構域之胺基酸序列可包含以 SEQ ID NO:18、20、22、24 或 25 示出之序列且其中重鏈之恆定區包含人類  $\gamma$  重鏈恆定區之胺基酸序列。在一個特定具體實例中，本文所述之特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域包含重鏈，其中 VH 結構域之胺基酸序列包含以 SEQ ID NO: 18、20、22、24 或 25 示出之序列，且其中重鏈之恆定區包含本文所述或此技術中已知之人類重鏈之胺基酸。人類恆定區序列之非限制性實例在此技術中已被描述，例如參見美國專利第 5,693,780 號及 Kabat EA 等人 (1991) (同上)。

[0216] 在一個特定具體實例中，本文所述之特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含以 SEQ ID NO:31 示出之胺基酸序列。在另一個具體實例中，本文所述之特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含以 SEQ ID NO:32 示出之胺基酸序列。在另一個具體實例中，本文所述之特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含以 SEQ ID NO:33 示出之胺基酸序列。在另一個具體實例中，本文所述之特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含以 SEQ ID NO:34 示出之胺基酸序列。在另一個具體實例中，本文所述之特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含以 SEQ ID NO:35 示出之胺基酸序列。



在另一個具體實例中，本文所述之特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域包含重鏈，該重鏈包含以 SEQ ID NO:39 示出之胺基酸序列。

[0217] 在一個特定具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域包含 VL 結構域及 VH 結構域，該 VL 結構域及 VH 結構域包含本文所述之任何胺基酸序列，其中恆定區包含 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 或 IgY 免疫球蛋白分子、或人類 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 或 IgY 免疫球蛋白分子之恆定區之胺基酸序列。在另一個特定具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域包含 VL 結構域及 VH 結構域，該 VL 結構域及 VH 結構域包含本文所述之任何胺基酸序列，其中恆定區包含 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 或 IgY 免疫球蛋白分子、任何類別(例如 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub> 及 IgA<sub>2</sub>)或任何子類(例如 IgG<sub>2a</sub> 及 IgG<sub>2b</sub>)之免疫球蛋白分子之恆定區之胺基酸序列。在一個特定具體實例中，恆定區包含人類 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 或 IgY 免疫球蛋白分子、任何類別(例如 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub> 及 IgA<sub>2</sub>)或任何子類(例如 IgG<sub>2a</sub> 及 IgG<sub>2b</sub>)之免疫球蛋白分子之恆定區之胺基酸序列。

[0218] 在另一個特定具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域包含 VL

結構域及 VH 結構域，該 VL 結構域及 VH 結構域包含本文所述之任何胺基酸序列，其中恆定區包含人類 IgG<sub>1</sub>(例如同種異型 G1m3、G1m17,1 或 G1m17,1,2)、人類 IgG<sub>2</sub> 或人類 IgG<sub>4</sub> 之恆定區之胺基酸序列。在一個特定具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域包含 VL 結構域及 VH 結構域，該 VL 結構域及 VH 結構域包含本文所述之任何胺基酸序列，其中恆定區包含人類 IgG<sub>1</sub>(同種異型 G1m3)之恆定區之胺基酸序列。人類恆定區之非限制性實例在此技術中被描述，例如參見 Kabat EA 等人 (1991)。(同上)。

[0219] 在另一個具體實例中，本文所述之特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域包含輕鏈和重鏈，該輕鏈包含以 SEQ ID NO:37 示出之胺基酸序列且該重鏈包含以 SEQ ID NO:31、32、33、34、35 或 39 示出之胺基酸序列。

[0220] 在某些具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域包含與 pab1876w、pab1967w、pab1975w 或 pab1979w 之 VL 結構域之胺基酸序列(亦即 SEQ ID NO:19、21 或 23)具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 98%序列一致性之 VL 結構域，例如其中該抗原結合域包含與 pab1876w、pab1967w、pab1975w 或 pab1979w 之 VL CDR 相同之 VL CDR。

[0221] 在某些具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域包含與 pab1876w、pab1967w、pab1975w 或 pab1979w 之 VH 結構域之胺基酸序列(亦即 SEQ ID NO:18、20、22 或 24)具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 98%序列一致性之 VH 結構域，例如其中該抗原結合域包含與 pab1876w、pab1967w、pab1975w 或 pab1979w 之 VH CDR 相同之 VH CDR。

[0222] 在某些具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域包含：(i)與 pab1876w、pab1967w、pab1975w 或 pab1979w 之 VL 結構域之胺基酸序列(亦即 SEQ ID NO:19、21 或 23)具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 98%序列一致性之 VL 結構域；及(ii)與 pab1876w、pab1967w、pab1975w 或 pab1979w 之 VH 結構域之胺基酸序列(亦即 SEQ ID NO:18、20、22 或 24)具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 98%序列一致性之 VH 結構域，例如其中該抗體包含與 pab1876w、pab1967w、pab1975w 或 pab1979w 之 VL CDR 及 VH CDR 相同之 VL CDR 及 VH CDR。

[0223] 在特定態樣中，本發明提供一種抗原結合域，其與包含 VH 結構域及 VL 結構域之抗原結合域競爭

(例如以劑量依賴性方式)特異性結合 GITR(例如人類 GITR)，該 VH 結構域及該 VL 結構域分別具有以 SEQ ID NO:18 及 19；SEQ ID NO:20 及 21；SEQ ID NO:22 及 23；或 SEQ ID NO:24 及 23 示出之胺基酸序列。

[0224] 在一個特定具體實例中，本文所述之抗原結合域為被與 GITR(例如人類 GITR)之特異性結合由包含 VH 結構域及 VL 結構域之抗原結合域競爭性阻斷(例如以劑量依賴性方式)之抗原結合域，該 VH 結構域及該 VL 結構域分別具有以 SEQ ID NO:18 及 19；SEQ ID NO:20 及 21；SEQ ID NO:22 及 23；或 SEQ ID NO:24 及 23 示出之胺基酸序列。

[0225] 可使用熟習此技術者已知或本文所述之分析(例如 X 射線結晶學、氫/氘交換聯同質譜分析(例如液相層析電噴霧質譜分析)、丙胺酸掃描、ELISA 分析等)以確定兩種抗體是否結合相同之表位。

[0226] 在一個特定具體實例中，本文所述之抗原結合域免疫特異性結合與由 pab1876w、pab1967w、pab1975w 或 pab1979w 所結合之表位相同之表位或與該表位重疊之表位。

[0227] 在一個特定態樣中，相對於本文所述之抗原結合域與 SEQ ID NO: 41 之殘基 26 至 241 之人類 GITR 序列之間的結合，該抗原結合域與變異型 GITR 之間的結合實質上減弱，其中除了存在 D60A 或 G63A 突變之外，該

變異型 GITR 包含 SEQ ID NO: 41 之殘基 26 至 241 之序列，該胺基酸編號係根據 SEQ ID NO: 41。在一些具體實例中，除了存在 D60A 及 G63A 突變之外，該變異型 GITR 包含 SEQ ID NO: 41 之殘基 26 至 241 之序列，該胺基酸編號係根據 SEQ ID NO: 41。

[0228] 在一個特定態樣中，本文所述之抗原結合域結合人類 GITR 序列之表位，該表位包含 SEQ ID NO:41 之胺基酸 60 至 63 中之至少一個殘基、基本上由 SEQ ID NO:41 之胺基酸 60 至 63 中之至少一個殘基組成或由 SEQ ID NO:41 之胺基酸 60 至 63 中之至少一個殘基組成。在一些具體實例中，該表位包含 SEQ ID NO:41 之胺基酸 60 至 63、基本上由 SEQ ID NO:41 之胺基酸 60 至 63 組成或由 SEQ ID NO:41 之胺基酸 60 至 63 組成。

[0229] 在一個特定具體實例中，本文所述之抗原結合域結合人類 GITR 之表位，該表位包含以下殘基、基本上由以下殘基組成或由以下殘基組成，該殘基選自由以下組成之群：SEQ ID NO:41 之殘基 60、62 及 63、及彼等之組合。在一些具體實例中，該表位包含任一個殘基或任何兩個或三個殘基、基本上由任一個殘基或任何兩個或三個殘基組成或由任一個殘基或任何兩個或三個殘基組成，該或該等殘基選自由以下組成之群：SEQ ID NO:41 之殘基 60、62 及 63。

[0230] 在一個特定態樣中，相較於與 SEQ ID NO: 41

之殘基 26 至 241 之人類 GITR 序列之結合，本文所述之抗原結合域表現與 SEQ ID NO:41 之殘基 26 至 241 相同但存在 D60A 或 G63A 胺基酸突變(例如取代)之蛋白質的減少或缺少之結合，該胺基酸突變選自由以下組成之群：D60A 及 G63A，該胺基酸編號係根據 SEQ ID NO: 41。在一些具體實例中，該取代為 D60A，其係根據 SEQ ID NO: 41 編號。在一些具體實例中，該取代為 G63A，其係根據 SEQ ID NO: 41 編號。

[0231] 在某些具體實例中，本文所述之抗原結合域之表位用作免疫原以產生抗體。參見例如下文部分 7.3 中用於產生抗體之方法。

[0232] 在特定態樣中，本文所述之免疫特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域在以單特異性二價形式存在時用作促效劑。

[0233] 在某些具體實例中，相對於不存在任何抗體之情況下或存在無關抗體(例如非免疫特異性結合 GITR 之抗體)之情況下的 GITR(例如人類 GITR)活性，本文所述之免疫特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域在以單特異性二價形式存在時使 GITR(例如人類 GITR)活性增加至少約 1.2 倍、1.3 倍、1.4 倍、1.5 倍、2 倍、2.5 倍、3 倍、3.5 倍、4 倍、4.5 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、15 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、60 倍、70 倍、80 倍、90 倍或 100 倍，如藉由本文所述及/或熟習

此技術者已知之方法評定。在某些具體實例中，相對於不存在任何抗體之情況下或存在無關抗體(例如非免疫特異性結合 GITR 之抗體)之情況下的 GITR(例如人類 GITR)活性，本文所述之免疫特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域在以單特異性二價形式存在時使 GITR(例如人類 GITR)活性增加至少 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或 99%，如藉由本文所述及/或熟習此技術者已知之方法評定。GITR(例如人類 GITR)活性之非限制性實例可包括 GITR(例如人類 GITR)信號傳導、細胞增殖、細胞存活及細胞激素產生(例如 IL-2、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10 及/或 IL-13)。在某些具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 GITR(例如人類 GITR)之抗原結合域在以單特異性二價形式存在時誘導、增強或增加 GITR(例如人類 GITR)活性。在特定具體實例中，GITR 活性之增加係如下文實施例中所述評定。

[0234] 在某些具體實例中，本發明提供之多特異性(例如雙特異性)抗體包含如國際申請案第 PCT/US2015/032895 號中所述之結合 GITR 之抗原結合域，該國際申請案以全文引用之方式併入本文中。

### 7.2.3 抗原結合域

[0235] 在某些態樣中，本文所述之抗原結合域可單

獨由其 VL 結構域、或單獨由其 VH 結構域、或單獨由其 3 個 VL CDR、或單獨由其 3 個 VH CDR 來描述。參見例如 Rader C 等人 (1998) PNAS 95: 8910-8915，該文獻以全文引用之方式併入本文中，其描述藉由分別自人類輕鏈或重鏈庫識別互補輕鏈或重鏈以對小鼠抗  $\alpha v\beta 3$  抗體進行人類化，從而產生具有與原始抗體之親和力同樣高或比該親和力高之親和力的人類化抗體變異體。亦參見 Clackson T 等人 (1991) Nature 352: 624-628，該文獻以全文引用之方式併入本文中，其描述產生結合特定抗原之抗體的方法，該等方法係藉由使用特定 VL 結構域(或 VH 結構域)且在庫中篩選互補可變域。該篩選產生特定 VH 結構域之 14 個新伴及特定 VL 結構域之 13 個新伴，其為強結合劑，如由 ELISA 所測定。亦參見 Kim S J 及 Hong H J, (2007) J Microbiol 45: 572-577，該文獻以全文引用之方式併入本文中，其描述產生結合特定抗原之抗體之方法，該等方法係藉由使用特定 VH 結構域且在庫(例如人類 VL 庫)中篩選互補 VL 結構域；進而可使用所選擇之 VL 結構域以指導額外之互補(例如人類)VH 結構域之選擇。

[0236] 在某些態樣中，抗原結合域之 CDR 可根據 Chothia 編號方案確定，其係指免疫球蛋白結構環之位置(參見例如 Chothia C 及 Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196: 901-917; Al-Lazikani B 等人 (1997) J Mol Biol 273: 927-948; Chothia C 等人, (1992) J Mol Biol 227: 799-817;



Tramontano A 等人, (1990) J Mol Biol 215(1): 175-82 ; 及美國專利第 7,709,226 號)。通常, 當使用 Kabat 編號慣例時, Chothia CDR-H1 環存在於重鏈胺基酸 26 至 32、33 或 34 處, Chothia CDR-H2 環存在於重鏈胺基酸 52 至 56 處, 且 Chothia CDR-H3 環存在於重鏈胺基酸 95 至 102 處, 而 Chothia CDR-L1 環存在於輕鏈胺基酸 24 至 34 處, Chothia CDR-L2 環存在於輕鏈胺基酸 50 至 56 處, 且 Chothia CDR-L3 環存在於輕鏈胺基酸 89 至 97 處。當使用 Kabat 編號慣例編號時, Chothia CDR-H1 環之末端在 H32 與 H34 之間變動, 視環之長度而定(此係因為 Kabat 編號方案在 H35A 及 H35B 處置放插入物; 若既不存在 35A, 亦不存在 35B, 則該環終止於 32; 若僅存在 35A, 則該環終止於 33; 若存在 35A 及 35B 兩者, 則該環終止於 34)。

[0237] 在某些態樣中, 本發明提供抗原結合域, 其特異性結合 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)且包含 pab1876w、pab1967w、pab1975w、pab1979w、pab2049w 或 pab1949w 之 VL 之 Chothia VL CDR。在某些態樣中, 本發明提供抗原結合域, 其特異性結合 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)且包含 pab1876、pab1967、pab1975、pab1979、pab2049 或 pab1949 之 VH 之 Chothia VH CDR。在某些態樣中, 本發明提供抗原結合域, 其特異性結合 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)且包含 pab1876、pab1967、pab1975w、pab1979w、

pab2049w 或 pab1949w 之 VL 之 Chothia VL CDR，且包含 pab1876w、pab1967w、pab1975w、pab1979w、pab2049w 或 pab1949w 之 VH 之 Chothia VH CDR。在某些具體實例中，特異性結合 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)之抗原結合域包含一或多個 CDR，其中 Chothia CDR 與 Kabat CDR 具有相同之胺基酸序列。在某些具體實例中，本發明提供抗原結合域，其特異性結合 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)且包含 Kabat CDR 與 Chothia CDR 之組合。

[0238] 在某些態樣中，抗原結合域之 CDR 可根據 IMGT 編號系統確定，如以下文獻中所述：Lefranc M-P, (1999) *The Immunologist* 7: 132-136；及 Lefranc M-P 等人, (1999) *Nucleic Acids Res* 27: 209-212。根據 IMGT 編號方案，VH-CDR1 處於位置 26 至 35 處，VH-CDR2 處於位置 51 至 57 處，VH-CDR3 處於位置 93 至 102 處，VL-CDR1 處於位置 27 至 32 處，VL-CDR2 處於位置 50 至 52 處，且 VL-CDR3 處於位置 89 至 97 處。在一個特定具體實例中，本文提供抗原結合域，其特異性結合 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)且包含 pab1876w、pab1967w、pab1975w、pab1979w、pab2049w 或 pab1949w 之如藉由 IMGT 編號系統確定之 CDR，例如如 Lefranc M-P (1999) (同上)及 Lefranc M-P 等人 (1999) (同上)中所述。

[0239] 在某些態樣中，抗原結合域之 CDR 可根據 MacCallum RM 等人，(1996) J Mol Biol 262: 732-745 確定。亦參見例如 Martin A. 「抗體可變域之蛋白質序列及結構分析 (Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains)」，《抗體工程改造 (Antibody Engineering)》，Kontermann 及 Dübel 編，第 31 章，第 422-439 頁，Springer-Verlag, Berlin (2001)。在一個特定具體實例中，本發明提供抗原結合域，其特異性結合 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)且包含 pab1876w、pab1967w、pab1975w、pab1979w、pab2049w 或 pab1949w 之如由 MacCallum RM 等人之方法所確定之 CDR。

[0240] 在某些態樣中，抗體之 CDR 可根據 AbM 編號方案確定，其涉及 AbM 高變區，該等 AbM 高變區代表 Kabat CDR 與 Chothia 結構環之間的折衷，且由 Oxford Molecular 之 AbM 抗體模型化軟體 (Oxford Molecular Group 公司)所使用。在一個特定具體實例中，本發明提供抗原結合域，其特異性結合 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)且包含 pab1876w、pab1967w、pab1975w、pab1979w、pab2049w 或 pab1949w 之如由 AbM 編號方案確定之 CDR。

[0241] 在一個特定具體實例中，沿本文所述之抗原結合域之 VH 區(例如 CDR1、CDR2 或 CDR3)及/或 VL 區

(例如 CDR1、CDR2 或 CDR3)之一或多個 CDR 之位置可變化一個、兩個、三個、四個、五個或六個胺基酸位置，只要維持(例如實質上維持例如至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%)與 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)之免疫特異性結合即可。舉例而言，在一個具體實例中，界定本文所述之抗原結合域之 CDR 的位置可藉由使 CDR 之 N 末端及/或 C 末端邊界相對於本文所述之抗原結合域之 CDR 位置移動一個、兩個、三個、四個、五個或六個胺基酸而變化，只要維持(例如實質上維持例如至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%)與 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)之免疫特異性結合即可。在另一個具體實例中，沿本文所述之抗原結合域之 VH 區(例如 CDR1、CDR2 或 CDR3)及/或 VL 區(例如 CDR1、CDR2 或 CDR3)之一或多個 CDR 之長度可變化(例如更短或更長)一個、兩個、三個、四個、五個或多於五個胺基酸，只要維持(例如實質上維持例如至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%)與 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)之免疫特異性結合即可。

[0242] 在一個具體實例中，本文所述之 VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2 及/或 VH CDR3 可比本文所述之一或多個 CDR(例如 SEQ ID NO:1 至 6；SEQ ID NO:87、88、3、90、5 及 92；SEQ ID

NO:7、10、3、14、5 及 16；SEQ ID NO:8、11、3、15、5 及 17；SEQ ID NO:9、12、3、14、5 及 16；SEQ ID NO:9、13、3、14、5 及 16；SEQ ID NO:47 至 52；或 SEQ ID NO:47 至 51 及 53)短一個、兩個、三個、四個、五個或多於五個胺基酸，只要維持(例如實質上維持例如至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%)與 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)之免疫特異性結合即可。在另一個具體實例中，本文所述之 VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2 及/或 VH CDR3 可比本文所述之一或多個 CDR(例如 SEQ ID NO:1 至 6；SEQ ID NO:87、88、3、90、5 及 92；SEQ ID NO:7、10、3、14、5 及 16；SEQ ID NO:8、11、3、15、5 及 17；SEQ ID NO:9、12、3、14、5 及 16；SEQ ID NO:9、13、3、14、5 及 16；SEQ ID NO:47 至 52；或 SEQ ID NO:47 至 51 及 53)長一個、兩個、三個、四個、五個或多於五個胺基酸，只要維持(例如實質上維持例如至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%)與 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)之免疫特異性結合即可。在另一個具體實例中，相較於本文所述之一或多個 CDR(例如 SEQ ID NO:1 至 6；SEQ ID NO:87、88、3、90、5 及 92；SEQ ID NO:7、10、3、14、5 及 16；SEQ ID NO:8、11、3、15、5 及 17；SEQ ID NO:9、12、3、14、5 及 16；SEQ ID NO:9、13、3、

14、5 及 16；SEQ ID NO:47 至 52；或 SEQ ID NO:47 至 51 及 53)，本文所述之 VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2 及/或 VH CDR3 之胺基末端可延長一個、兩個、三個、四個、五個或多於五個胺基酸，只要維持(例如實質上維持例如至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%)與 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)之免疫特異性結合即可。在另一個具體實例中，相較於本文所述之一或多個 CDR(例如 SEQ ID NO:1 至 6)，本文所述之 VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2 及/或 VH CDR3 之羧基末端可延長一個、兩個、三個、四個、五個或多於五個胺基酸，只要維持(例如實質上維持例如至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%)與 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)之免疫特異性結合即可。在另一個具體實例中，相較於本文所述之一或多個 CDR(例如 SEQ ID NO:1 至 6)，本文所述之 VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2 及/或 VH CDR3 之胺基末端可縮短一個、兩個、三個、四個、五個或多於五個胺基酸，只要維持(例如實質上維持例如至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%)與 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)之免疫特異性結合即可。在一個具體實例中，相較於本文所述之一或多個 CDR(例如 SEQ ID NO:1 至 6；SEQ ID

NO:87、88、3、90、5 及 92；SEQ ID NO:7、10、3、14、5 及 16；SEQ ID NO:8、11、3、15、5 及 17；SEQ ID NO:9、12、3、14、5 及 16；SEQ ID NO:9、13、3、14、5 及 16；SEQ ID NO:47 至 52；或 SEQ ID NO:47 至 51 及 53)，本文所述之 VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2 及/或 VH CDR3 之羧基末端可縮短一個、兩個、三個、四個、五個或多於五個胺基酸，只要維持(例如實質上維持例如至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%)與 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)之免疫特異性結合即可。可使用此技術中已知之任何方法以確定是否維持與 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)之免疫特異性結合，例如本文提供之「實施例」部分(部分 8)中所述之結合分析及條件。

[0243] 在另一個特定具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)之抗原結合域包含重鏈及輕鏈，其中(i)該重鏈及輕鏈分別包含 VH 結構域及 VL 結構域，其中該 VH 結構域及 VL 結構域之 VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2 及 VL CDR3 分別包含以 SEQ ID NO:1 至 6；SEQ ID NO:87、88、3、90、5 及 92；SEQ ID NO:7、10、3、14、5 及 16；SEQ ID NO:8、11、3、15、5 及 17；SEQ ID NO:9、12、3、14、5 及 16；SEQ ID NO:9、13、3、

14、5 及 16；SEQ ID NO:47 至 52；或 SEQ ID NO:47 至 51 及 53 示出之胺基酸序列；(ii)該輕鏈進一步包含輕鏈恆定域，其包含人類  $\kappa$  輕鏈之恆定域之胺基酸序列；及(iii)該重鏈進一步包含重鏈恆定域，其包含人類 IgG<sub>1</sub>(視情況為 IgG<sub>1</sub>(同種異型 G1m3))重鏈之恆定域之胺基酸序列。

[0244] 在另一個特定具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)之抗原結合域包含重鏈及輕鏈，其中(i)該重鏈及輕鏈分別包含 VH 結構域及 VL 結構域，該 VH 結構域及 VL 結構域分別包含以 SEQ ID NO:18 及 19；SEQ ID NO:20 及 21；SEQ ID NO:22 及 23；SEQ ID NO:24 及 23；SEQ ID NO:25 及 26；SEQ ID NO:54 及 55；或 SEQ ID NO:54 及 56 示出之胺基酸序列；(ii)該輕鏈進一步包含恆定域，其包含人類  $\kappa$  輕鏈之恆定域之胺基酸序列；及(iii)該重鏈進一步包含恆定域，其包含人類 IgG<sub>1</sub>(視情況為 IgG<sub>1</sub>(同種異型 G1m3))重鏈之恆定域之胺基酸序列。

[0245] 在另一個特定具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)之抗原結合域包含重鏈及輕鏈，其中(i)該重鏈及輕鏈分別包含 VH 結構域及 VL 結構域，其中該 VH 結構域及 VL 結構域之 VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2 及 VL CDR3 分別包含以 SEQ ID NO:1 至 6；SEQ ID NO:87、88、3、90、5 及 92；SEQ ID NO:7、10、3、



14、5 及 16；SEQ ID NO:8、11、3、15、5 及 17；SEQ ID NO:9、12、3、14、5 及 16；SEQ ID NO:9、13、3、14、5 及 16；SEQ ID NO:47 至 52；或 SEQ ID NO:47 至 51 及 53 示出之胺基酸序列；(ii)該輕鏈進一步包含輕鏈恆定域，其包含人類  $\kappa$  輕鏈之恆定域之胺基酸序列；及(iii)該重鏈進一步包含重鏈恆定域，其包含人類 IgG<sub>4</sub> 重鏈之恆定域之胺基酸序列。

[0246] 在另一個特定具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)之抗原結合域包含重鏈及輕鏈，其中(i)該重鏈及輕鏈分別包含 VH 結構域及 VL 結構域，該 VH 結構域及 VL 結構域分別包含以 SEQ ID NO:18 及 19；SEQ ID NO:20 及 21；SEQ ID NO:22 及 23；SEQ ID NO:24 及 23；SEQ ID NO:25 及 26；SEQ ID NO:54 及 55；或 SEQ ID NO:54 及 56 示出之胺基酸序列；(ii)該輕鏈進一步包含恆定域，其包含人類  $\kappa$  輕鏈之恆定域之胺基酸序列；及(iii)該重鏈進一步包含恆定域，其包含人類 IgG<sub>4</sub> 重鏈之恆定域之胺基酸序列。

[0247] 在另一個特定具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)之抗原結合域包含重鏈及輕鏈，其中(i)該重鏈及輕鏈分別包含 VH 結構域及 VL 結構域，其中該 VH 結構域及 VL 結構域之 VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2 及 VL CDR3 分別包含以 SEQ ID NO:1 至 6；SEQ

ID NO:87、88、3、90、5 及 92；SEQ ID NO:7、10、3、14、5 及 16；SEQ ID NO:8、11、3、15、5 及 17；SEQ ID NO:9、12、3、14、5 及 16；SEQ ID NO:9、13、3、14、5 及 16；SEQ ID NO:47 至 52；或 SEQ ID NO:47 至 51 及 53 示出之胺基酸序列；(ii)該輕鏈進一步包含輕鏈恆定域，其包含人類  $\kappa$  輕鏈之恆定域之胺基酸序列；及(iii)該重鏈進一步包含重鏈恆定域，其包含人類 IgG<sub>2</sub> 重鏈之恆定域之胺基酸序列。

[0248] 在另一個特定具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)之抗原結合域包含重鏈及輕鏈，其中(i)該重鏈及輕鏈分別包含 VH 結構域及 VL 結構域，該 VH 結構域及 VL 結構域分別包含以 SEQ ID NO:18 及 19；SEQ ID NO:20 及 21；SEQ ID NO:22 及 23；SEQ ID NO:24 及 23；SEQ ID NO:25 及 26；SEQ ID NO:54 及 55；或 SEQ ID NO:54 及 56 示出之胺基酸序列；(ii)該輕鏈進一步包含恆定域，其包含人類  $\kappa$  輕鏈之恆定域之胺基酸序列；及(iii)該重鏈進一步包含恆定域，其包含人類 IgG<sub>2</sub> 重鏈之恆定域之胺基酸序列。

[0249] 在另一個特定具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)之抗原結合域包含重鏈及輕鏈，其中(a)包含在胺基酸位置 297 處具有 N 經 A 或 Q 之胺基酸取代之胺基酸序列 SEQ ID NO: 59 的重鏈；及(b)包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 67 或

69 之輕鏈。

[0250] 在另一個特定具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)之抗原結合域包含(a)包含具有選自由以下組成之群的胺基酸取代之胺基酸序列 SEQ ID NO: 59 或 29 之重鏈：胺基酸位置 267 處 S 經 E 之取代、胺基酸位置 328 處 L 經 F 之取代、及胺基酸位置 267 處 S 經 E 之取代及胺基酸位置 328 處 L 經 F 之取代兩者；及(b)包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 67 或 69 或 SEQ ID NO:37 之輕鏈。

[0251] 在特定具體實例中，本文所述之免疫特異性結合 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)之抗原結合域包含構架區(例如 VL 結構域及/或 VH 結構域之構架區)，該等構架區為人類構架區或源自於人類構架區。人類構架區之非限制性實例在此技術中被描述，例如參見 Kabat EA 等人 (1991) (同上)。在某個具體實例中，本文所述之抗原結合域包含構架區(例如 VL 結構域及/或 VH 結構域之構架區)，該等構架區為靈長類動物(例如非人類靈長類動物)構架區或源自於靈長類動物(例如非人類靈長類動物)構架區。

[0252] 舉例而言，將來自抗原特異性非人類抗體(通常為嚙齒類動物來源(例如小鼠或大鼠))之 CDR 移植至同源人類或非人類靈長類動物接受體構架上。在一個具體實例中，非人類靈長類動物接受體構架來自舊世界猿。在一

個特定具體實例中，舊世界猿接受體構架來自黑猩猩(*Pan troglodytes*)、侏儒黑猩猩(*Pan paniscus*)或大猩猩(*Gorilla gorilla*)。在一個特定具體實例中，非人類靈長類動物接受體構架來自黑猩猩。在一個特定具體實例中，非人類靈長類動物接受體構架為舊世界猴接受體構架。在一個特定具體實例中，舊世界猴接受體構架來自獼猴屬(*Macaca*)。在某個具體實例中，非人類靈長類動物接受體構架源自於石蟹獼猴(*Macaca cynomolgus*)。非人類靈長類動物構架序列描述於美國專利申請公開案第 US 2005/0208625 號中。

[0253] 在另一個態樣中，本發明提供含有抗原結合域之抗體，該等抗原結合域與本文所述之抗體(例如 pab1949w、pab2049w 或 pab1876w)結合 GITR 或 OX40 之相同或重疊表位(例如人類 GITR 或 OX40 之表位)。在某些具體實例中，抗體之表位可藉由例如 NMR 光譜學、X 射線繞射結晶學研究、ELISA 分析、氫/氘交換聯同質譜分析(例如液相層析電噴霧質譜分析)、基於陣列之寡肽掃描分析及/或突變誘發定位(例如定點突變誘發定位)確定。對於 X 射線結晶學，結晶可使用此技術中已知方法中之任一者實現(例如 Giegé R 等人, (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189: 1-23; Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1269-1274; McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251: 6300-6303)。抗體:抗原晶體可使用習知之 X 射線繞射技術來研

究且可使用電腦軟體來精修，該電腦軟體諸如 X-PLOR(耶魯大學，1992，由 Molecular Simulations 公司經銷；參見例如 Meth Enzymol (1985) 第 114 卷及第 115 卷，Wyckoff HW 等人編；美國專利申請案第 2004/0014194 號)及 BUSTER(Bricogne G (1993) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 49(Pt 1): 37-60；Bricogne G (1997) Meth Enzymol 276A: 361-423, Carter CW 編；Roversi P 等人，(2000) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 56(Pt 10): 1316-1323)。突變誘發定位研究可使用熟習此技術者已知之任何方法來實現。參見例如 Champe M 等人 (1995) (同上)；及 Cunningham BC 及 Wells JA (1989) (同上)中對包括丙胺酸掃描突變誘發技術之突變誘發技術之描述。在一個特定具體實例中，抗原結合片段之表位係使用丙胺酸掃描突變誘發研究確定。此外，識別且結合 GITR 及/或 OX40(例如人類 GITR 及/或 OX40)之相同或重疊表位之抗原結合片段可使用諸如免疫分析之常規技術，例如藉由顯示一種抗體阻斷另一種抗體與靶抗原結合之能力(亦即競爭結合分析)來識別。競爭結合分析亦可用於確定兩種抗體是否對表位具有相似之結合特異性。競爭結合可在其中所測試之免疫球蛋白抑制參考抗體與共同抗原(諸如 GITR 或 OX40)之特異性結合之分析確定。許多類型之競爭結合分析為已知，例如：固相直接或間接放射免疫分析(RIA)、固相直接或間接酶免疫分析(EIA)、夾心競爭分析

(參見 Stahli C 等人, (1983) *Methods Enzymol* 9: 242-253); 固相直接生物素-抗生物素蛋白 EIA(參見 Kirkland TN 等人, (1986) *J Immunol* 137: 3614-9); 固相直接標記分析、固相直接標記夾心分析(參見 Harlow E 及 Lane D, (1988) 《抗體：實驗室手冊 (Antibodies: A Laboratory Manual)》, Cold Spring Harbor Press); 使用 I-125 標記之固相直接標記 RIA(參見 Morel GA 等人, (1988) *Mol Immunol* 25(1): 7-15); 固相直接生物素-抗生物素蛋白 EIA(Cheung RC 等人, (1990) *Virology* 176: 546-52); 及直接標記 RIA(Moldenhauer G 等人, (1990) *Scand J Immunol* 32: 77-82)。通常，此種分析涉及使用結合至固體表面之純化抗原(例如 GITR 或 OX40，諸如人類 GITR 或 OX40)或帶有此等抗原中之任一者之細胞、未標記之測試免疫球蛋白及標記之參考免疫球蛋白。競爭性抑制可藉由測定在測試免疫球蛋白存在下結合至固體表面或細胞之標記的量來量測。通常，測試免疫球蛋白以過量存在。通常，當競爭性抗體以過量存在時，其將參考抗體與共同抗原之特異性結合抑制至少 50%至 55%、55%至 60%、60%至 65%、65%至 70%、70%至 75%或大於 75%。競爭結合分析可使用標記抗原或標記抗體組態成許多不同形式。在此分析之常見型式中，將抗原固定在 96 孔盤上。接著使用放射性標記或酶標記量測未標記之抗體阻斷標記之抗體與抗原結合之能力。對於另外之細節，參見例如 Wagener C 等人，

(1983) *J Immunol* 130: 2308-2315 ; Wagener C 等人 ,  
(1984) *J Immunol Methods* 68: 269-274 ; Kuroki M 等人 ,  
(1990) *Cancer Res* 50: 4872-4879 ; Kuroki M 等人 , (1992)  
*Immunol Invest* 21: 523-538 ; Kuroki M 等人 , (1992)  
*Hybridoma* 11: 391-407 ; 及 《 抗體 : 實驗室手冊  
(Antibodies: A Laboratory Manual) 》 , Harlow E 及 Lane D  
編(同上), 第 386-389 頁。

[0254] 在一個具體實例中，競爭分析係使用表面電漿共振 (BIAcore<sup>®</sup>)，例如藉由『串聯方法』，諸如 Abdiche YN 等人，(2009) *Analytical Biochem* 386: 172-180 所述之方法來進行，藉此將 GITR 或 OX40 抗原固定於晶片表面(例如 CM5 感應器晶片)上，且接著使抗 GITR 或 OX40 抗體在該晶片上通過。為確定抗體是否與本文所述之抗 GITR 或 OX40 抗原結合域競爭，首先使含有該抗 GITR 或 OX40 抗原結合域之抗體在晶片表面上通過以達成飽和，且接著添加潛在之競爭性抗體。接著可測定競爭性抗體之結合且相對於非競爭性對照定量。

[0255] 在某些態樣中，當兩種抗體在諸如競爭 ELISA 分析之競爭結合分析中識別相同或空間上重疊之表位時，可使用競爭結合分析來確定其中一種抗體是否由其中作為參考抗體之另一種抗體(例如結合基本上相同之表位或重疊表位之抗體)例如以劑量依賴性方式競爭性阻斷，該等競爭結合分析可使用標記之抗原或標記之抗體組

態成許多不同形式。在一個特定具體實例中，可在競爭結合分析中用本文所述之抗體(例如抗體 pab1949w、pab2049w 或 pab1876w)、或其嵌合或 Fab 抗體、或包含本文所述之抗體(例如 pab1949w、pab2049w 或 pab1876w)之 VH CDR 及 VL CDR 之抗體來測試抗體。

[0256] 在另一個態樣中，本發明提供抗原結合域，其與本文所述之抗原結合域競爭(例如以劑量依賴性方式)結合 GITR 或 OX40(例如人類 OX40)，如使用熟習此技術者已知或本文所述之分析(例如 ELISA 競爭分析或表面電漿共振)確定。在另一個態樣中，本發明提供抗原結合域，其競爭性抑制(例如以劑量依賴性方式)本文所述之抗原結合域(例如 pab1949w、pab2049w 或 pab1876w)結合 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)，如使用熟習此技術者已知或本文所述之分析(例如 ELISA 競爭分析、或懸浮陣列或表面電漿共振分析)確定。在特定態樣中，本文提供抗原結合片段，其與包含本文所述之胺基酸序列(例如 pab1949w、pab2049w 或 pab1876w 之 VL 及/或 VH 胺基酸序列)之抗體競爭(例如以劑量依賴性方式)特異性結合 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)，如使用熟習此技術者已知或本文所述之分析(例如 ELISA 競爭分析、或懸浮陣列或表面電漿共振分析)確定。

[0257] 在某些具體實例中，本發明提供抗原結合片段，其與本文所述之抗原結合片段競爭結合 GITR 或



OX40(例如人類 GITR 或 OX40)，該競爭程度與本文所述之抗原結合片段自我競爭結合 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)之程度相同。在一些具體實例中，本發明提供第一抗原結合抗體片段，其與本文所述之抗原結合抗體片段競爭結合 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)，其中該第一抗原結合抗體片段在包括下列步驟之分析中競爭結合：(a)將 GITR 及/或 OX40 轉染之細胞與呈未標記形式之第一抗原結合抗體片段在容器中培育；及(b)在該容器中添加呈標記形式之本文所述之抗原結合抗體片段且在該容器中培育細胞；及(c)偵測呈標記形式之本文所述之抗原結合抗體片段與細胞之結合。在某些具體實例中，本發明提供第一抗原結合抗體片段，其與本文所述之抗原結合抗體片段競爭結合 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)，其中該競爭表現為該第一抗原結合抗體片段與 GITR 或 OX40 之結合減少超過 80%(例如 85%、90%、95%、或 98%、或 80%至 85%、80%至 90%、85%至 90%或 85%至 95%)。

### 7.3 抗體產生

[0258] 免疫特異性結合 GITR 及/或 OX40(例如人類 GITR 及人類 OX40)之多特異性(例如雙特異性)抗體可藉由此技術中已知用於合成抗體之任何方法，例如藉由化學合成或藉由重組表現技術產生。除非另外指示，否則本文

所述之方法使用分子生物學、微生物學、遺傳分析、重組 DNA、有機化學、生物化學、PCR、寡核苷酸合成及修飾、核酸雜交及此技術內相關領域之習知技術。此等技術描述於例如本文引用之參考文獻中且在文獻中加以充分解釋。參見例如 Maniatis T 等人, (1982) 《分子選殖：實驗室手冊 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)》, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J 等人, (1989), 《分子選殖：實驗室手冊 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)》, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J 等人, (2001) 《分子選殖：實驗室手冊 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)》, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM 等人, 《最新分子生物學方案 (Current Protocols in Molecular Biology)》, John Wiley & Sons (1987 年及每年更新); 《最新免疫學方案 (Current Protocols in Immunology)》, John Wiley & Sons (1987 年及每年更新); Gait (編) (1984) 《寡核苷酸合成：實用方法 (Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach)》, IRL Press; Eckstein (編) (1991) 《寡核苷酸及類似物：實用方法 (Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach)》, IRL Press; Birren B 等人 (編) (1999) 《基因組分析：實驗室手冊 (Genome Analysis: A Laboratory Manual)》, Cold Spring Harbor Laboratory

Press。

[0259] 在一個特定具體實例中，本文所述之多特異性(例如雙特異性)抗體為藉由任何方式製備、表現、形成或分離之多特異性(例如雙特異性)抗體(例如重組抗體)，該方式涉及例如經由 DNA 序列之合成、遺傳工程改造形成。在某些具體實例中，此種多特異性(例如雙特異性)抗體包含在動物或哺乳動物(例如人類)之活體內抗體生殖系譜系內非天然存在之序列(例如 DNA 序列或胺基酸序列)。

[0260] 雙特異性二價抗體及製備彼之方法描述於例如美國專利第 5,731,168 號、第 5,807,706 號、第 5,821,333 號及美國申請公開案第 2003/020734 號及第 2002/0155537 號中，該等文獻各自以全文引用之方式併入本文中。雙特異性四價抗體及製備彼之方法描述於例如國際申請公開案第 WO02/096948 號及第 WO00/44788 號中，此兩者之揭示內容以全文引用之方式併入本文中。一般參見國際申請公開案第 WO93/17715 號、第 WO92/08802 號、第 WO91/00360 號及第 WO92/05793 號；Tutt 等人，J. Immunol. 147:60-69 (1991)；美國專利第 4,474,893 號；第 4,714,681 號；第 4,925,648 號；第 5,573,920 號；及第 5,601,819 號；及 Kostelny 等人，J. Immunol. 148:1547-1553 (1992)，該等文獻各自以全文引用之方式併入本文中。

[0261] 如本文所述之雙特異性抗體可根據 DuoBody 技術平台(Genmab A/S 公司)來產生，如例如國際公開案第 WO 2011/131746 號、第 WO 2011/147986 號、第 WO 2008/119353 號及第 WO 2013/060867 號；以及 Labrijn AF 等人，(2013) PNAS 110(13): 5145-5150 中所述。DuoBody 技術可用於將含有兩個重鏈及兩個輕鏈之第一單特異性抗體之一半與含有兩個重鏈及兩個輕鏈之第二單特異性抗體之一半組合。所得之異二聚體含有與來自第二抗體之一個重鏈及一個輕鏈配對之來自第一抗體之一個重鏈及一個輕鏈。當該兩種單特異性抗體識別不同抗原上之不同表位時，所得之異二聚體為雙特異性抗體。

[0262] DuoBody 技術要求該等單特異性抗體各自包括在 CH3 結構域中具有單點突變之重鏈恆定區。該等點突變允許所得之雙特異性抗體中之 CH3 結構域之間的相互作用強於該等單特異性抗體中之任一者中之 CH3 結構域之間的相互作用。各單特異性抗體中之單點突變處於重鏈恆定區之 CH3 結構域中之殘基 366、368、370、399、405、407 或 409 處，該胺基酸編號係根據 EU 編號系統，如例如國際公開案第 WO 2011/131746 號中所述。此外，在一種單特異性抗體中，相較於另一種單特異性抗體，該單點突變位於不同之殘基處。舉例而言，一種單特異性抗體可包含突變 F405L(亦即在殘基 405 處苯丙胺酸突變成白胺酸)，而另一種單特異性抗體可包含突變 K409R(亦即

在殘基 409 處離胺酸突變成精胺酸)，該胺基酸編號係根據 EU 編號系統。單特異性抗體之重鏈恆定區可為 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub> 或 IgG<sub>4</sub> 同型(例如人類 IgG<sub>1</sub> 同型)，且藉由 DuoBody 技術產生之雙特異性抗體可保留 Fc 介導之效應功能。

[0263] 另一種產生雙特異性抗體之方法已稱作「杵入白」策略(參見例如國際公開案 WO2006/028936)。在此技術中藉由使 IgG 中形成 CH3 結構域之界面之所選胺基酸突變來減少 Ig 重鏈之錯配。在 CH3 結構域內兩個重鏈直接相互作用之位置處，將具有小側鏈之胺基酸(白)引入一個重鏈之序列中，且將具有大側鏈之胺基酸(杵)引入另一個重鏈上之對應相互作用殘基位置中。在一些具體實例中，本發明之組合物具有免疫球蛋白鏈，其中已藉由使在兩個多肽之間的界面處相互作用之所選胺基酸突變以優先形成雙特異性抗體來修飾 CH3 結構域。雙特異性抗體可由同一子類(例如 IgG1 或 IgG3)或不同子類(例如 IgG1 及 IgG3、或 IgG3 及 IgG4)之免疫球蛋白鏈構成。

[0264] 在一個具體實例中，結合 GITR 及/或 OX40 之雙特異性抗體包含「杵鏈」中之 T366W 突變及「白鏈」中之 T366S、L368A、Y407V 突變以及視情況存在之在 CH3 結構域之間額外之鏈間二硫橋，該二硫橋係藉由例如將 Y349C 突變引入至「杵鏈」中且將 E356C 突變或 S354C 突變引入至「白鏈」中而形成；「杵鏈」中之

R409D、K370E 突變及「白鏈」中之 D399K、E357K 突變；「杵鏈」中之 R409D、K370E 突變及「白鏈」中之 D399K、E357K 突變；「杵鏈」中之 T366W 突變及「白鏈」中之 T366S、L368A、Y407V 突變；「杵鏈」中之 R409D、K370E 突變及「白鏈」中之 D399K、E357K 突變；一個鏈中之 Y349C、T366W 突變及對應鏈中之 E356C、T366S、L368A、Y407V 突變；一個鏈中之 Y349C、T366W 突變及對應鏈中之 S354C、T366S、L368A、Y407V 突變；一個鏈中之 Y349C、T366W 突變及對應鏈中之 S354C、T366S、L368A、Y407V 突變；以及一個鏈中之 Y349C、T366W 突變及對應鏈中之 S354C、T366S、L368A、Y407V 突變(該等胺基酸編號係根據 EU 編號系統)。

[0265] 結合 GITR 及/或 OX40 之雙特異性抗體在一些情況下可含有 IgG4 與 IgG1、IgG4 與 IgG2、IgG4 與 IgG2、IgG4 與 IgG3、或 IgG1 與 IgG3 鏈異二聚體。此等異二聚體重鏈抗體可常規地藉由例如修飾人類 IgG4 及 IgG1 或 IgG3 中形成 CH3 結構域之界面的所選胺基酸以有利於異二聚體重鏈形成經工程改造。

[0266] 在特定具體實例中，多特異性(例如雙特異性)抗體可為嵌合抗體或人類化抗體。在某些具體實例中，多特異性(例如雙特異性)抗體可為 F(ab')<sub>2</sub> 片段。F(ab')<sub>2</sub> 片段含有四聚體抗體分子之由鉸鏈區中之二硫鍵連接的兩個抗

原結合臂。

[0267] 本文所述之多特異性(例如雙特異性)抗體可藉由熟習此技術者已知之任何技術產生。舉例而言，本文所述之  $F(ab')_2$  片段可藉由使用諸如胃蛋白酶之酶對免疫球蛋白分子進行蛋白水解裂解產生。

[0268] 在某個態樣中，本文提供一種製備免疫特異性結合 GITR 及/或 OX40(例如人類 GITR 及/或 OX40)之抗體或抗原結合片段的方法，其包括培養本文所述之一種細胞或多種細胞。在某個態樣中，本文提供一種製備免疫特異性結合 GITR 及/或 OX40(例如人類 GITR 及/或 OX40)之抗體或抗原結合片段之方法，其包括使用本文所述之細胞或宿主細胞(例如包含編碼本文所述之抗體之聚核苷酸之細胞或宿主細胞)使該抗體或抗原結合片段表現(例如重組表現)。在一個特定具體實例中，該細胞為分離之細胞。在一個特定具體實例中，已將外源性聚核苷酸引入該細胞中。在一個特定具體實例中，該方法進一步包括純化獲自該細胞或宿主細胞之抗體或抗原結合片段之步驟。

[0269] 抗體之抗原結合片段可例如自單株抗體並使用此技術中已知之多種技術製備，該等技術包括使用融合瘤、重組體及噬菌體呈現技術或彼等之組合。舉例而言，單株抗體可使用融合瘤技術產生，該等技術包括此技術中已知及教示之彼等技術，例如 Harlow E 及 Lane D, 《抗體：實驗室手冊 (Antibodies: A Laboratory Manual)》，

(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第 2 版, 1988); Hammerling GJ 等人, 《單株抗體及 T 細胞融合瘤 (Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas)》, 563 681 (Elsevier, N.Y., 1981)。如本文所用之術語「單株抗體」不限於經由融合瘤技術產生之抗體。舉例而言, 單株抗體可由外源表現本文所述之抗體的宿主細胞重組產生。本文所述之單株抗體可例如藉由如 Kohler G 及 Milstein C (1975) *Nature* 256: 495 中所述之融合瘤方法來製備, 或可例如使用例如如本文所述之技術自噬菌體庫分離。用於製備純系細胞株及由其所表現之單株抗體的其他方法為此技術中所習知(參見例如《精編分子生物學實驗指南 (Short Protocols in Molecular Biology)》, (2002) 第 5 版, Ausubel FM 等人(同上)中之第 11 章)。

[0270] 此外, 本文所述之抗體或其抗原結合片段亦可使用此技術中已知之各種噬菌體呈現方法產生。在噬菌體呈現方法中, 使蛋白質呈現於攜帶編碼彼之聚核苷酸序列之噬菌體顆粒之表面上。特定而言, 自動物 cDNA 庫(例如受影響之組織之人類或鼠類 cDNA 庫)擴增編碼 VH 結構域及 VL 結構域之 DNA 序列。用 scFv 連接子藉由 PCR 將編碼 VH 結構域及 VL 結構域之 DNA 重組在一起且選殖至噬菌粒載體中。將該載體在大腸桿菌中電穿孔且用輔助噬菌體感染大腸桿菌。此等方法中所用之噬菌體通常為包括 fd 及 M13 之絲狀噬菌體, 且 VH 結構域及 VL 結



構域通常重組融合至噬菌體基因 III 或基因 VIII。可用抗原，例如使用標記之抗原或結合或捕捉至固體表面或珠粒之抗原，以選擇或識別表現結合特定抗原之抗體或片段之噬菌體。可用於製備本文所述之抗體之噬菌體呈現方法之實例包括以下文獻中所揭示之彼等方法：Brinkman U 等人，(1995) *J Immunol Methods* 182: 41-50；Ames RS 等人，(1995) *J Immunol Methods* 184: 177-186；Kettleborough CA 等人，(1994) *Eur J Immunol* 24: 952-958；Persic L 等人，(1997) *Gene* 187: 9-18；Burton DR 及 Barbas CF (1994) *Advan Immunol* 57: 191-280；PCT 申請案第 PCT/GB91/001134 號；國際公開案第 WO 90/02809 號、第 WO 91/10737 號、第 WO 92/01047 號、第 WO 92/18619 號、第 WO 93/1 1236 號、第 WO 95/15982 號、第 WO 95/20401 號、及第 WO 97/13844 號；及美國專利第 5,698,426 號、第 5,223,409 號、第 5,403,484 號、第 5,580,717 號、第 5,427,908 號、第 5,750,753 號、第 5,821,047 號、第 5,571,698 號、第 5,427,908 號、第 5,516,637 號、第 5,780,225 號、第 5,658,727 號、第 5,733,743 號、及第 5,969,108 號。

[0271] 如上述參考文獻中所述，在噬菌體選擇之後，可分離來自噬菌體之抗體編碼區且用於產生抗體(包括人類抗體)且使其表現於任何所需之宿主中，該宿主包括哺乳動物細胞、昆蟲細胞、植物細胞、酵母及細菌，例

如如下文所述。亦可使用此技術中已知之方法以利用重組產生抗體(諸如 Fab、Fab'及 F(ab')<sub>2</sub> 片段)之技術，該等方法諸如以下文獻中所揭示之彼等方法：PCT 公開案第 WO 92/22324 號；Mullinax RL 等人，(1992) BioTechniques 12(6): 864-9；Sawai H 等人，(1995) Am J Reprod Immunol 34: 26-34；及 Better M 等人，(1988) Science 240: 1041-1043。

[0272] 在一個態樣中，為產生抗體，可使用包括 VH 或 VL 核苷酸序列、限制性位點及保護該限制性位點之側接序列的 PCR 引子來自模板(例如 scFv 純系)擴增 VH 或 VL 序列。利用熟習此技術者已知之選殖技術，可將 PCR 擴增之 VH 結構域選殖至表現 VH 恆定區之載體中，且可將 PCR 擴增之 VL 結構域選殖至表現 VL 恆定區(例如人類  $\kappa$  或  $\lambda$  恆定區)之載體中。亦可將 VH 結構域及 VL 結構域選殖至表現必需之恆定區的一個載體中。接著使用熟習此技術者已知之技術將重鏈轉化載體及輕鏈轉化載體共轉染至細胞株中以產生表現抗體(例如 IgG)之穩定或瞬時細胞株。

[0273] 嵌合抗體為如下分子，其中抗體之不同部分源自於不同免疫球蛋白分子。舉例而言，嵌合抗體可含有小鼠或大鼠單株抗體之可變區，其融合至人類抗體之恆定區。用於產生嵌合抗體之方法為此技術中已知的。參見例如 Morrison SL (1985) Science 229: 1202-7；Oi VT 及

Morrison SL (1986) *BioTechniques* 4: 214-221 ; Gillies SD 等人, (1989) *J Immunol Methods* 125: 191-202 ; 及美國專利第 5,807,715 號、第 4,816,567 號、第 4,816,397 號及第 6,331,415 號。

[0274] 人類化抗體能夠結合預定抗原且包含實質上具有人類免疫球蛋白之胺基酸序列之構架區及實質上具有非人類免疫球蛋白(例如鼠類免疫球蛋白)之胺基酸序列之 CDR。在特定具體實例中，人類化抗體亦包含免疫球蛋白(通常為人類免疫球蛋白)恆定區(Fc)之至少一部分。抗體亦可包括重鏈之 CH1 區、鉸鏈區、CH2 區、CH3 區及 CH4 區。人類化抗體可選自任何類別之免疫球蛋白，其包括 IgM、IgG、IgD、IgA 及 IgE；及任何同型，其包括 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub> 及 IgG<sub>4</sub>。人類化抗體可使用此技術中已知之多種技術產生，該等技術包括(但不限於)CDR 移植(歐洲專利第 EP 239400 號；國際公開案第 WO 91/09967 號；及美國專利第 5,225,539 號、第 5,530,101 號及第 5,585,089 號)；鑲飾或表面重整(歐洲專利第 EP 592106 號及第 EP 519596 號；Padlan EA (1991) *Mol Immunol* 28(4/5): 489-498；Studnicka GM 等人，(1994) *Prot Engineering* 7(6): 805-814；及 Roguska MA 等人，(1994) *PNAS* 91: 969-973)；鏈改組(美國專利第 5,565,332 號)；及例如以下文獻中所揭示之技術：美國專利第 6,407,213 號、美國專利第 5,766,886 號、國際公開案第 WO

93/17105 號；Tan P 等人, (2002) *J Immunol* 169: 1119-25；Caldas C 等人, (2000) *Protein Eng.* 13(5): 353-60；Morea V 等人, (2000) *Methods* 20(3): 267-79；Baca M 等人, (1997) *J Biol Chem* 272(16): 10678-84；Roguska MA 等人, (1996) *Protein Eng* 9(10): 895-904；Couto JR 等人, (1995) *Cancer Res.* 55 (23 增刊): 5973s-5977s；Couto JR 等人, (1995) *Cancer Res* 55(8): 1717-22；Sandhu JS (1994) *Gene* 150(2): 409-10；及 Pedersen JT 等人, (1994) *J Mol Biol* 235(3): 959-73。亦參見美國申請公開案第 US 2005/0042664 A1 號(2005 年 2 月 24 日)，其以全文引用之方式併入本文中。

[0275] 在特定具體實例中，人類抗體包含本文所述之抗原結合域，該抗原結合域與本文所述之其抗 GITR 或 OX40 抗原結合片段結合 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)之相同表位。在特定具體實例中，人類抗體包含抗原結合片段，該抗原結合片段競爭性阻斷(例如以劑量依賴性方式)本文所述之抗原結合片段中之任一者(例如 pab1949w、pab2049w、pab1876w、pab1967w、pab1975w 或 pab1979w)結合 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)。人類抗體可使用此技術中已知之任何方法產生。舉例而言，可使用不能表現功能性內源性免疫球蛋白但可表現人類免疫球蛋白基因之轉殖基因小鼠。特定而言，可隨機或藉由同源重組將人類重鏈及輕鏈免疫球蛋白基因複

合物引入至小鼠胚胎幹細胞中。或者，除人類重鏈及輕鏈基因之外，亦可將人類可變區、恆定區及多樣性區域引入至小鼠胚胎幹細胞中。可與藉由同源重組引入人類免疫球蛋白基因座分開或同時使小鼠重鏈及輕鏈免疫球蛋白基因變成非功能性的。特定而言， $J_H$  區之同型接合缺失防止內源性抗體產生。使經修飾之胚胎幹細胞擴增且顯微注射至胚泡中以產生嵌合小鼠。接著使嵌合小鼠繁殖以產生表現人類抗體之同型接合後代。以正常方式用所選抗原，例如抗原(例如 OX40)之全部或一部分對轉殖基因小鼠進行免疫接種。可使用習知之融合瘤技術自接受免疫接種之轉殖基因小鼠獲得針對該抗原之單株抗體。由轉殖基因小鼠所帶有之人類免疫球蛋白轉殖基因在 B 細胞分化期間重排，且隨後進行類別轉換及體細胞突變。因此，使用該技術，有可能產生治療上可用之 IgG、IgA、IgM 及 IgE 抗體。對於此種用於產生人類抗體之技術之概述，參見 Lonberg N 及 Huszar D (1995) *Int Rev Immunol* 13:65-93。對於此種用於產生人類抗體及人類單株抗體之技術及用於產生此等抗體之方案的詳細論述，參見例如國際公開案第 WO 98/24893 號、第 WO 96/34096 號及第 WO 96/33735 號；及美國專利第 5,413,923 號、第 5,625,126 號、第 5,633,425 號、第 5,569,825 號、第 5,661,016 號、第 5,545,806 號、第 5,814,318 號及第 5,939,598 號。能夠產生人類抗體之小鼠之實例包括 Xenomouse<sup>TM</sup>(Abgenix 公

司；美國專利第 6,075,181 號及第 6,150,184 號)、HuAb-Mouse<sup>TM</sup>(Medarex 公司/Gen Pharm 公司；美國專利第 5,545,806 號及第 5,569,825 號)、Trans Chromo Mouse<sup>TM</sup>(Kirin 公司)及 KM Mouse<sup>TM</sup>(Medarex 公司/Kirin 公司)。

[0276] 特異性結合 GITR 或 OX40(例如人類 GIT 或 OX40)之人類抗體或抗原結合片段可藉由此技術中已知之多種方法製備，該等方法包括上文所述之使用源自於人類免疫球蛋白序列之抗體庫之噬菌體呈現方法。亦參見美國專利第 4,444,887 號、第 4,716,111 號、及第 5,885,793 號；及國際公開案第 WO 98/46645 號、第 WO 98/50433 號、第 WO 98/24893 號、第 WO 98/16654 號、第 WO 96/34096 號、第 WO 96/33735 號及第 WO 91/10741 號。

[0277] 在一些具體實例中，人類抗體可使用小鼠-人類融合瘤產生。舉例而言，可使經埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus, EBV)轉型之人類周邊血淋巴球與小鼠骨髓瘤細胞融合以產生分泌人類單株抗體之小鼠-人類融合瘤，且可篩選此等小鼠-人類融合瘤以確定分泌免疫特異性結合靶抗原(例如 OX40(例如人類 OX40))之人類單株抗體之融合瘤。此等方法在此技術中為已知且被描述，參見例如 Shinmoto H 等人, (2004) Cytotechnology 46: 19-23；Naganawa Y 等人, (2005) Human Antibodies 14: 27-31。

### 7.3.1 聚核苷酸

[0278] 在某些態樣中，本發明提供聚核苷酸，其包含編碼本文所述之免疫特異性結合 GITR 及/或 OX40(例如人類 GITR 及/或 OX40)抗原之抗體或其片段(例如輕鏈可變區及/或重鏈可變區)之核苷酸序列；及載體，例如包含此等聚核苷酸之用於在宿主細胞(例如大腸桿菌及哺乳動物細胞)中重組表現之載體。本文提供包含編碼本文提供之任何抗體之核苷酸序列的聚核苷酸及包含此等聚核苷酸序列之載體，例如用於使其在宿主細胞(例如哺乳動物細胞)中有效表現之表現載體。

[0279] 如本文所用之「分離」之聚核苷酸或核酸分子為與存在於核酸分子之天然來源中(例如小鼠或人類中)之其他核酸分子分離之聚核苷酸或核酸分子。此外，「分離」之核酸分子(諸如 cDNA 分子)在藉由重組技術產生時可實質上不含其他細胞物質或培養基或在化學合成時實質上不含化學前驅體或其他化學品。舉例而言，措辭「實質上不含」包括具有少於約 15%、10%、5%、2%、1%、0.5%或 0.1%(特定而言少於約 10%)之其他物質之聚核苷酸或核酸分子之製備物，該其他物質例如細胞物質、培養基、其他核酸分子、化學前驅體及/或其他化學品。在一個特定具體實例中，編碼本文所述之抗體之核酸分子經分離或純化。

[0280] 在特定態樣中，本文提供包含編碼以下抗體之核苷酸序列之聚核苷酸：免疫特異性結合 GITR 及/或 OX40 多肽(例如人類 GITR 及/或 OX40)且包含如本文所述之胺基酸序列的抗體；及與此等抗體競爭結合 GITR 及/或 OX40 多肽(例如以劑量依賴性方式)或與此等抗體結合相同之表位之抗體。

[0281] 在某些態樣中，本文提供聚核苷酸，其包含編碼本文所述之抗體之輕鏈或重鏈的核苷酸序列。該等聚核苷酸可包含編碼包含本文所述之抗體之 VL CDR(參見例如表 1、4 及 7)之輕鏈或輕鏈可變域之核苷酸序列。該等聚核苷酸可包含編碼包含本文所述之抗體之 VH CDR(參見例如表 1、5 及 8)之重鏈或重鏈可變域之核苷酸序列。在特定具體實例中，本文所述之聚核苷酸編碼包含以 SEQ ID NO:19、21、23、26、55 或 56 示出之胺基酸序列之 VL 結構域。在特定具體實例中，本文所述之聚核苷酸編碼包含以 SEQ ID NO:18、20、22、24、25 及 54 示出之胺基酸序列之 VH 結構域。

[0282] 在特定具體實例中，本文提供包含編碼抗 GITR 或 OX40 抗原結合域之核苷酸序列之聚核苷酸，該抗 GITR 或 OX40 抗原結合域包含三個 VL 鏈 CDR，例如含有本文所述之抗體中任一者之 VL CDR1、VL CDR2 及 VL CDR3(例如參見表 1、4 及 7)。在特定具體實例中，本文提供聚核苷酸，該等聚核苷酸包含三個 VH 鏈 CDR，例



如含有本文所述之抗體中任一者之 VH CDR1、VH CDR2 及 VH CDR3(例如參見表 1、5 及 8)。在特定具體實例中，本文提供包含編碼抗 GITR 或 OX40 抗原結合域之核苷酸序列之聚核苷酸，該抗 GITR 或 OX40 抗原結合域包含三個 VH 鏈 CDR，例如含有本文所述之抗體中任一者之 VL CDR1、VL CDR2 及 VL CDR3(例如參見表 1、4 及 7)；及三個 VH 鏈 CDR，例如含有本文所述之抗體中任一者之 VH CDR1、VH CDR2 及 VH CDR3(例如參見表 1、5、及 8)。

[0283] 在某些具體實例中，本文所述之聚核苷酸包含編碼本文提供之抗體或抗原結合域之核苷酸序列，該抗體或抗原結合域包含含有本文所述之胺基酸序列(例如 SEQ ID NO:19、21、23、26、55 或 56)之輕鏈可變區，其中該抗體或抗原結合域免疫特異性結合 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)。

[0284] 在某些具體實例中，本文所述之聚核苷酸包含編碼本文提供之抗體或抗原結合域之核苷酸序列，該抗體或抗原結合域包含重鏈可變區，該重鏈可變區含本文所述之胺基酸序列(例如 SEQ ID NO:18、20、22、24、25 或 54)，其中該抗體或抗原結合域免疫特異性結合 GITR 或 OX40(例如人類 GITR 或 OX40)。

[0285] 在特定態樣中，本文提供一種聚核苷酸，該聚核苷酸包含編碼包含輕鏈及重鏈(例如各別輕鏈及重鏈)

之抗體的核苷酸序列。對於輕鏈，在一個特定具體實例中，本文所述之聚核苷酸包含編碼  $\kappa$  輕鏈之核苷酸序列。在另一個特定具體實例中，本文所提供之聚核苷酸包含編碼  $\lambda$  輕鏈之核苷酸序列。在另一個特定具體實例中，本文提供之聚核苷酸包含編碼本文所述之包含人類  $\kappa$  輕鏈或人類  $\lambda$  輕鏈之抗體的核苷酸序列。在一個特定具體實例中，本文提供之聚核苷酸包含編碼免疫特異性結合 GITR 及/或 OX40(例如人類 GITR 及/或 OX40)之抗體的核苷酸序列，其中該抗體包含輕鏈，其中 VL 結構域之胺基酸序列可包含以 SEQ ID NO:19、21、23、26、55 或 56 示出之胺基酸序列且其中該輕鏈之恆定區包含人類  $\kappa$  輕鏈恆定區之胺基酸序列。在另一個特定具體實例中，本文提供之聚核苷酸包含編碼免疫特異性結合 GITR 及/或 OX40(例如人類 GITR 及/或 OX40)且包含輕鏈之抗體的核苷酸序列，其中 VL 結構域之胺基酸序列可包含以 SEQ ID NO:19、21、23、26、55 或 56 示出之胺基酸序列且其中該輕鏈之恆定區包含人類  $\lambda$  輕鏈恆定區之胺基酸序列。舉例而言，人類恆定區序列可為美國專利第 5,693,780 號中所述之序列。

[0286] 在一個特定具體實例中，本文提供之聚核苷酸包含編碼本文所述之免疫特異性結合 GITR 及/或 OX40(例如人類 GITR 及/或 OX40)之抗體的核苷酸序列，其中該抗體包含重鏈，其中 VH 結構域之胺基酸序列可包含以 SEQ ID NO:18、20、22、24、25 或 54 示出之胺基酸

序列且其中該重鏈之恆定區包含人類  $\gamma$  重鏈恆定區之胺基酸序列。

[0287] 在某個具體實例中，本文提供之聚核苷酸包含核苷酸序列，其編碼本文所述之免疫特異性結合 GITR 及/或 OX40(例如人類 OX40)之抗體的 VH 結構域及/或 VL 結構域(諸如 VH 結構域之 SEQ ID NO:18、20、22、24、25 或 54 及/或 VL 結構域之 SEQ ID NO:19、21、23、26、55 或 56)。

[0288] 在另一個特定具體實例中，本文提供之聚核苷酸包含編碼本文所述之免疫特異性結合 GITR 及/或 OX40(例如人類 OX40)之抗體的核苷酸序列，其中該抗體包含含有本文所述之任何胺基酸序列之 VL 結構域及 VH 結構域，其中恆定區包含人類 IgG<sub>1</sub>(例如同種異型 1、17 或 3)、人類 IgG<sub>2</sub> 或人類 IgG<sub>4</sub> 之恆定區之胺基酸序列。

[0289] 在一個特定具體實例中，本文提供包含核苷酸序列之聚核苷酸，該核苷酸序列編碼本文所指定之抗 OX40 抗體或其結構域，參見例如表 1 至 9。

[0290] 本文亦提供編碼抗 GITR 及/或 OX40 抗體或其片段之聚核苷酸，其例如藉由密碼子/RNA 最佳化、用異源信號序列置換及消除 mRNA 不穩定性元件來最佳化。可藉由相應地調適例如以下文獻中所述之最佳化方法來進行藉由引入密碼子變化及/或消除 mRNA 中之抑制區以產生用於重組表現之經最佳化之編碼抗 GIR 及/或 OX40 抗

體或其片段(例如輕鏈、重鏈、VH結構域或VL結構域)之核酸的方法：美國專利第 5,965,726 號；第 6,174,666 號；第 6,291,664 號；第 6,414,132 號；及第 6,794,498 號。舉例而言，可使 RNA 內之潛在剪接位點及不穩定性元件(例如富含 A/T 或 A/U 之元件)突變而不改變由核酸序列編碼之胺基酸以增加用於重組表現之 RNA 的穩定性。該等改變利用遺傳密碼之簡併，例如使用用於相同胺基酸之替代性密碼子。在一些具體實例中，可能需要改變一或多個密碼子以編碼保守突變，例如與原始胺基酸具有相似之化學結構及特性及/或功能之相似胺基酸。

[0291] 在某些具體實例中，最佳化之編碼本文所述之抗 GITR 及/或 OX40 抗體或其片段(例如 VL 結構域或 VH 結構域)之聚核苷酸序列可與未最佳化之編碼本文所述之抗 GITR 及/或 OX40 抗體或其片段(例如 VL 結構域或 VH 結構域)之聚核苷酸序列之反義(例如互補)聚核苷酸雜交。在特定具體實例中，最佳化之編碼本文所述之抗 GITR 及/或 OX40 抗體或片段之核苷酸序列在高嚴格度條件下與未最佳化之編碼本文所述之抗 GITR 及/或 OX40 抗體或其片段之聚核苷酸序列之反義聚核苷酸雜交。在一個特定具體實例中，最佳化之編碼本文所述之抗 GITR 及/或 OX40 抗體或其片段之核苷酸序列在高嚴格度、中等嚴格度或較低嚴格度雜交條件下與未最佳化之編碼本文所述之抗 GITR 及/或 OX40 抗體或其片段之核苷酸序列之反義聚

核苷酸雜交。關於雜交條件之資訊已被描述，參見例如美國專利申請公開案第 US 2005/0048549 號(例如第 72-73 段)，該美國專利申請公開案以引用的方式併入本文中。

[0292] DNA 亦可例如藉由用人類重鏈及輕鏈恆定域之編碼序列取代鼠類序列、或藉由使免疫球蛋白編碼序列與非免疫球蛋白多肽之編碼序列的全部或一部分共價連接來修飾。

[0293] 亦提供在高嚴格度、中等或較低嚴格度雜交條件下與編碼本文所述之抗體的聚核苷酸雜交之聚核苷酸。在特定具體實例中，本文所述之聚核苷酸在高嚴格度、中等或較低嚴格度雜交條件下與編碼本文提供之 VH 結構域(例如 SEQ ID NO:18、20、22、24、25 或 54)及/或 VL 結構域(例如 SEQ ID NO:19、21、23、25、55 或 56)之聚核苷酸雜交。

[0294] 雜交條件已在此技術中被描述且為熟習此技術者已知。舉例而言，在嚴格條件下雜交可包括在約 45 °C 下在 6×氯化鈉/檸檬酸鈉(SSC)中與過濾器結合之 DNA 雜交，繼而在約 50°C 至 65°C 下在 0.2×SSC/0.1% SDS 中進行一或多次洗滌；在高度嚴格條件下雜交可包括在約 45 °C 下在 6×SSC 中與過濾器結合之核酸雜交，繼而在約 68 °C 下在 0.1×SSC/0.2% SDS 中進行一或多次洗滌。在其他嚴格雜交條件下之雜交為熟習此技術者已知且已被描述，參見例如 Ausubel FM 等人編，(1989) 《最新分子生物學

方案(Current Protocols in Molecular Biology)》，第 I 卷，紐約之 Green Publishing Associates 公司及 John Wiley & Sons 公司中之第 6.3.1-6.3.6 頁及第 2.10.3 頁。

### 7.3.2 細胞及載體

[0295] 在某些態樣中，本文提供細胞(例如宿主細胞)，該等細胞表現(例如重組)本文所述之特異性結合 GITR 及/或 OX40(例如人類 GITR 及/或 OX40)之抗體以及相關聚核苷酸及表現載體。本文提供用於在宿主細胞中，較佳在哺乳動物細胞中重組表現之載體(例如表現載體)，該等載體包含含有編碼抗 GITR 及/或 OX40 抗體或片段之核苷酸序列的聚核苷酸。本文亦提供用於重組表現本文所述之抗 GITR 及/或 OX40 抗體(例如人類或人類化抗體)之宿主細胞，該等宿主細胞包含此等載體。在一個特定態樣中，本文提供用於產生本文所述之抗體的方法，其包括在宿主細胞中表現此種抗體。

[0296] 本文所述之特異性結合 GITR 及/或 OX40(例如人類 OX40)之抗體或其片段(例如本文所述之抗體之重鏈或輕鏈)之重組表現涉及構築含有編碼該抗體或片段之聚核苷酸的表現載體。一旦已獲得編碼本文所述之抗體或其片段(例如重鏈可變域或輕鏈可變域)之聚核苷酸，即可藉由重組 DNA 技術，使用此技術中習知之技術以產生用於產生該抗體分子之載體。因此，藉由表現含有編碼抗體

或抗體片段(例如輕鏈或重鏈)之核苷酸序列之聚核苷酸來製備蛋白質的方法描述於本文中。可使用熟習此技術者習知之方法來構築表現載體，該等表現載體含有抗體或抗體片段(例如輕鏈或重鏈)編碼序列及適當之轉錄及轉譯控制信號。此等方法包括例如試管內重組 DNA 技術、合成技術及活體內遺傳重組。亦提供可複製之載體，該等載體包含編碼本文所述之抗體分子、抗體之重鏈或輕鏈、抗體之重鏈可變域或輕鏈可變域或其片段或重鏈或輕鏈 CDR 之可操作連接至啟動子之核苷酸序列。此等載體可例如包括編碼抗體分子之恆定區之核苷酸序列(參見例如國際公開案第 WO 86/05807 號及第 WO 89/01036 號；及美國專利第 5,122,464 號)，且可將抗體之可變域選殖至此種載體中以表現整個重鏈、整個輕鏈、或整個重鏈及輕鏈兩者。

[0297] 可藉由習知技術將表現載體轉移至細胞(例如宿主細胞)中，且接著可藉由習知技術培養所得之細胞以產生本文所述之抗體(例如包含 pab1949w、pab2049w、pab1876w、pab1967w、pab1975w 或 pab1979w 之 CDR 的抗體)或其片段。因此，本文提供宿主細胞，其含有編碼本文所述之抗體(例如包含 pab1949w、pab2049w、pab1876w、pab1967w、pab1975w 或 pab1979w 之 CDR 之抗體)或其片段(例如其重鏈或輕鏈或其片段)之聚核苷酸，該聚核苷酸可操作地連接至啟動子以在宿主細胞中表現此等序列。在某些具體實例中，為表現雙鏈抗體，可使個別

地編碼重鏈及輕鏈兩者之載體共表現於宿主細胞中以表現整個免疫球蛋白分子，如下文所詳述。在某些具體實例中，宿主細胞含有載體，該載體包含編碼本文所述之抗體(例如包含 pab1949w、pab2049w、pab1876w、pab1967w、pab1975w 或 pab1979w 之 CDR 之抗體)之重鏈及輕鏈兩者或其片段之聚核苷酸。在特定具體實例中，宿主細胞含有兩種不同之載體，即第一載體，其包含編碼本文所述之抗體(例如包含 pab1949w、pab2049w、pab1876w、pab1967w、pab1975w 或 pab1979w 之 CDR 之抗體)之重鏈或重鏈可變區或其片段之聚核苷酸；及第二載體，其包含編碼本文所述之抗體(例如包含 pab1949w、pab2049w、pab1876w、pab1967w、pab1975w 或 pab1979w 之 CDR 之抗體)之輕鏈或輕鏈可變區或其片段之聚核苷酸。在其他具體實例中，第一宿主細胞包含第一載體，其包含編碼本文所述之抗體(例如包含 pab1949w、pab2049w、pab1876w、pab1967w、pab1975w 或 pab1979w 之 CDR 之抗體)之重鏈或重鏈可變區或其片段之聚核苷酸，且第二宿主細胞包含第二載體，其包含編碼本文所述之抗體(例如包含 pab1949w、pab2049w、pab1876w、pab1967w、pab1975w 或 pab1979w 之 CDR 之抗體)之輕鏈或輕鏈可變區之聚核苷酸。在特定具體實例中，由第一細胞表現之重鏈/重鏈可變區與第二細胞之輕鏈/輕鏈可變區締合以形成本文所述之抗 G1TR 及 / 或 OX40 抗體(例如包含



pab1949w、pab2049w、pab1876w、pab1967w、pab1975w 或 pab1979w 之 CDR 之抗體)。在某些具體實例中，本文提供包含此種第一宿主細胞及此種第二宿主細胞之宿主細胞群體。

[0298] 在一個特定具體實例中，本文提供載體之群體，該群體包含第一載體，其包含編碼本文所述之抗 GITR 及/或 OX40 抗體(例如包含 pab1949w、pab2049w、pab1876w、pab1967w、pab1975w 或 pab1979w 之 CDR 之抗體)之輕鏈/輕鏈可變區之聚核苷酸；及第二載體，其包含編碼本文所述之抗 OX40 抗體(例如包含 pab1949w、pab2049w、pab1876w、pab1967w、pab1975w 或 pab1979w 之 CDR 之抗體)之重鏈/重鏈可變區之聚核苷酸。

[0299] 可利用多種宿主表現載體系統來表現本文所述之抗體分子(參見例如美國專利第 5,807,715 號)。此等宿主表現系統代表可用來產生且隨後純化相關編碼序列之運載體，且亦代表在用適當之核苷酸編碼序列轉型或轉染時可原位表現本文所述之抗體分子的細胞。此等系統包括(但不限於)微生物，諸如細菌(例如大腸桿菌及枯草芽孢桿菌(*B. subtilis*))，其經含有抗體編碼序列之重組噬菌體 DNA、質體 DNA 或黏質體 DNA 表現載體轉型；經含有抗體編碼序列之重組酵母表現載體轉型之酵母(例如畢赤酵母(*Saccharomyces Pichia*))；經含有抗體編碼序列之重組病毒表現載體(例如桿狀病毒)感染之昆蟲細胞系統；植物

細胞系統(例如綠藻, 諸如萊茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)), 其經重組病毒表現載體(例如花椰菜花葉病毒(CaMV); 煙草花葉病毒(TMV))感染或經含有抗體編碼序列之重組質體表現載體(例如 Ti 質體)轉型; 或哺乳動物細胞系統(例如 COS(例如 COS1 或 COS)、CHO、BHK、MDCK、HEK 293、NS0、PER.C6、VERO、CRL7030、HsS78Bst、HeLa、及 NIH 3T3、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20 及 BMT10 細胞), 其帶有含有源自於哺乳動物細胞之基因組(例如金屬硫蛋白啟動子)或源自於哺乳動物病毒(例如腺病毒晚期啟動子; 牛痘病毒 7.5K 啟動子)之啟動子的重組表現構築體。在一個特定具體實例中, 用於表現本文所述之抗體(例如包含抗體 pab1949w、pab2049w、pab1876w、pab1967w、pab1975w 或 pab1979w 中任一者之 CDR 之抗體)之細胞為 CHO 細胞, 例如來自 CHO GS System™(Lonza 公司)之 CHO 細胞。在一個特定具體實例中, 用於表現本文所述之抗體之細胞為人類細胞, 例如人類細胞株。在一個特定具體實例中, 哺乳動物表現載體為 pOptiVEC™ 或 pcDNA3.3。在一個特定具體實例中, 使用尤其用於表現整個重組抗體分子之諸如大腸桿菌之細菌細胞或真核細胞(例如哺乳動物細胞)來表現重組抗體分子。舉例而言, 諸如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞之哺乳動物細胞結合諸如來自人類巨細胞病毒之主要中間早期基因啟動子

元件的載體為抗體之有效表現系統 (Foecking MK 及 Hofstetter H (1986) *Gene* 45: 101-105; 及 Cockett MI 等人, (1990) *Biotechnology* 8: 662-667)。在某些具體實例中，本文所述之抗體由 CHO 細胞或 NS0 細胞產生。在一個特定具體實例中，編碼本文所述之免疫特異性結合 GITR 及/或 OX40(例如人類 GITR 及/或 OX40)之抗體之核苷酸序列之表現由組成型啟動子、誘導型啟動子或組織特異性啟動子調節。

[0300] 此外，可選擇宿主細胞株，其以所需之特定方式調節插入之序列之表現、或修飾及加工基因產物。此等對蛋白質產物之修飾(例如糖基化)及加工(例如裂解)對於蛋白質之功能而言可尤為重要。不同之宿主細胞具有轉譯後加工及修飾蛋白質及基因產物之特徵性及特定機制。可選擇適當之細胞株或宿主系統以確保正確修飾及加工所表現之外來蛋白。為此，可使用具有基因產物之適當初級轉錄物加工、糖基化及磷酸化之細胞機制的真核宿主細胞。此等哺乳動物宿主細胞包括(但不限於)CHO、VERO、BHK、Hela、MDCK、HEK 293、NIH 3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20 及 T47D、NS0(不內源性產生任何免疫球蛋白鏈之鼠類骨髓瘤細胞株)、CRL7030、COS(例如 COS1 或 COS)、PER.C6、VERO、HsS78Bst、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20、BMT10 及 HsS78Bst 細胞。

在某些具體實例中，本文所述之抗 G1TR 及/或 OX40 抗體係在哺乳動物細胞(諸如 CHO 細胞)中產生。

[0301] 在一個特定具體實例中，本文所述之抗體具有降低之海藻糖含量或無海藻糖含量。此等抗體可使用熟習此技術者已知之技術產生。舉例而言，可使抗體在海藻糖基化之能力有缺陷或缺乏海藻糖基化之能力的細胞中表現。在一個特定實施例中，可使用具有  $\alpha$ 1,6-海藻糖基轉移酶之兩個對偶基因之基因剔除之細胞株產生具有降低之海藻糖含量的抗體。Potelligent<sup>®</sup>系統(Lonza 公司)為此種可用於產生具有降低之海藻糖含量之抗體之系統之實例。

[0302] 為長期高產率產生重組蛋白，可產生穩定表現細胞。舉例而言，可工程改造穩定表現本文所述之抗 G1TR 及/或 OX40 抗體之細胞株。

[0303] 一旦已藉由重組表現產生本文所述之抗體分子，即可將其藉由此技術中已知用於純化免疫球蛋白分子之任何方法來純化，例如藉由層析(例如離子交換層析；親和層析，尤其藉由在蛋白 A 之後對特定抗原之親和力；及篩分管柱層析)、離心、差異溶解度、或藉由用於純化蛋白質之任何其他標準技術。此外，本文所述之抗體可融合至本文所述或此技術中另外已知之異源性多肽序列以促成純化。

[0304] 在特定具體實例中，本文所述之抗體經分離或純化。一般而言，分離之抗體為實質上不含與該分離之

抗體具有不同之抗原特異性之其他抗體的抗體。舉例而言，在一個特定具體實例中，本文所述之抗體的製劑實質上不含細胞物質及/或化學前驅體。措辭「實質上不含細胞物質」包括抗體之製劑，其中該抗體與用於分離出或重組產生其之細胞之細胞組分相分離。因此，實質上不含細胞物質之抗體包括具有少於約 30%、20%、10%、5%、2%、1%、0.5%或 0.1%(以乾重計)之異源蛋白質(在本文亦稱為「污染蛋白」)及/或抗體之變異體(例如抗體之不同轉譯後修飾形式)的抗體製劑。當重組產生抗體或片段時，其亦一般實質上不含培養基，亦即培養基佔蛋白質製劑之體積的少於約 20%、10%、2%、1%、0.5%或 0.1%。當藉由化學合成來產生抗體或片段時，其一般實質上不含化學前驅體或其他化學品，亦即其與參與合成蛋白質之化學前驅體或其他化學品分離。因此，抗體或片段之此等製劑具有少於約 30%、20%、10%或 5%(以乾重計)之除相關抗體或片段以外的化學前驅體或化合物。在一個特定具體實例中，本文所述之抗體經分離或純化。

#### 7.4 醫藥組合物

[0305] 本文提供組合物，其在生理學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑(《雷明頓醫藥科學(Remington's Pharmaceutical Sciences)》，(1990)，賓夕法尼亞州伊斯頓之 Mack Publishing 公司)中包含具有所需純度之本文所述

之抗體。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所用之劑量及濃度下對接受者無毒。

[0306] 本文所述之包含本文所述之促效性抗體之醫藥組合物可用於增強、誘導或活化 GITR 及/或 OX40 活性且治療諸如癌症或感染性疾病之病況。可根據本文所述之方法治療之癌症的實例包括(但不限於)B 細胞淋巴瘤(例如 B 細胞慢性淋巴球性白血病、B 細胞非霍奇金氏淋巴瘤(B cell non-Hodgkin's lymphoma)、皮膚 B 細胞淋巴瘤、彌漫性大 B 細胞淋巴瘤)、基底細胞癌、膀胱癌、母細胞瘤、腦轉移、乳癌、伯基特淋巴瘤(Burkitt lymphoma)、癌瘤(例如腺癌(例如胃食管連接部腺癌))、子宮頸癌、結腸癌、結腸直腸癌(結腸癌及直腸癌)、子宮內膜癌、食管癌、尤文氏肉瘤(Ewing sarcoma)、濾泡性淋巴瘤、胃癌、胃食管連接部癌、胃腸癌、膠質母細胞瘤(例如多形性膠質母細胞瘤, 例如新診斷或復發)、膠質瘤、頭頸部癌(例如頭頸部鱗狀細胞癌)、肝轉移、霍奇金氏及非霍奇金氏淋巴瘤、腎癌(例如腎細胞癌及韋爾姆斯氏腫瘤(Wilms' tumor))、喉癌、白血病(例如慢性髓細胞性白血病、毛細胞白血病)、肝臟癌症(例如肝癌及肝細胞瘤)、肺癌(例如非小細胞肺癌及小細胞肺癌)、淋巴母細胞性淋巴瘤、淋巴瘤、套細胞淋巴瘤、轉移性腦腫瘤、轉移癌、骨髓瘤(例如多發性骨髓瘤)、神經母細胞瘤、眼部黑素瘤、口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌(例如胰臟導管腺癌)、前列

腺癌(例如激素難治性(例如去勢抗性)、轉移性、轉移性激素難治性(例如去勢抗性、非雄激素依賴性))、腎細胞癌(例如轉移性)、唾液腺癌、肉瘤(例如橫紋肌肉瘤)、皮膚癌(例如黑素瘤(例如轉移性黑素瘤))、軟組織肉瘤、實體腫瘤、鱗狀細胞癌、滑膜肉瘤、睪丸癌、甲狀腺癌、移行細胞癌(尿路上皮細胞癌)、葡萄膜黑素瘤(例如轉移性)、疣狀癌、陰道癌及瓦爾登斯特倫巨球蛋白血症(Waldenstrom macroglobulinemia)。

[0307] 本文所述之包含本文所述之拮抗性抗體之醫藥組合物可用於降低、抑制或去活化 GITR 及/或 OX40 活性且治療諸如發炎性或自體免疫疾病或病症或感染性疾病之病況。

[0308] 本文所述之包含本文所述之拮抗性抗體之醫藥組合物可用於降低、去活化或抑制 GITR 及/或 OX40 活性且治療選自由以下組成之群的病況：感染(病毒、細菌、真菌及寄生物)、與感染相關之內毒素性休克、關節炎、類風濕性關節炎、氣喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、盆腔發炎性疾病、阿茲海默氏病(Alzheimer's Disease)、發炎性腸病、克羅恩氏病(Crohn's disease)、潰瘍性結腸炎、佩羅尼氏病(Peyronie's Disease)、乳糜瀉、膽囊疾病、藏毛疾病、腹膜炎、銀屑病、血管炎、手術黏連、中風、第 I 型糖尿病、萊姆病(lyme disease)、關節炎、腦膜腦炎、葡萄膜炎、自體免疫葡萄膜炎、中樞及周邊神經系

統之免疫介導之發炎性病徵(諸如多發性硬化)、狼瘡(諸如全身性紅斑狼瘡)及吉蘭-巴利症候群(Guillain-Barré syndrome)、皮炎、異位性皮炎、自體免疫肝炎、纖維性肺泡炎、格雷氏病(Grave's disease)、IgA 腎病、特發性血小板減少性紫癜、美尼爾氏病(Meniere's disease)、天皰瘡、原發性膽汁性肝硬化、類肉瘤病、硬皮病、韋格納肉牙腫病(Wegener's granulomatosis)、胰臟炎、創傷(手術)、移植物抗宿主病、移植排斥反應、心臟病(亦即心血管疾病), 包括缺血性疾病, 諸如心肌梗塞以及動脈粥樣硬化、血管內凝血; 骨骼再吸收、骨質疏鬆症、骨關節炎、牙周炎、胃酸過少症及視神經脊髓炎。

[0309] 欲用於活體內投藥之組合物可無菌。此係容易地藉由經由例如無菌濾膜過濾來實現。

## 7.5 用途及方法

### 7.5.1 治療用途及方法

[0310] 在一個態樣中, 本文提供用於調節個體之一或多種免疫功能或反應之方法, 其包括對有需要之個體投予本文所述之結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體或包含此種抗體之組合物。在一個特定態樣中, 本文提供用於活化、增強或誘導個體之一或多種免疫功能或反應之方法, 其包括對有需要之個體投予結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體或包含



此種抗體之組合物。在一個特定具體實例中，本文提供用於預防及/或治療需要活化或增強一或多種免疫功能或反應之疾病的方法，其包括對有需要之個體投予本文所述之結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體或其組合物。在某個具體實例中，本文提供治療感染性疾病之方法，其包括對有需要之個體投予結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體或其組合物。在某個具體實例中，本文提供治療癌症之方法，其包括對有需要之個體投予結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體或其組合物。該癌症可選自由黑素瘤、腎癌及前列腺癌組成之群。該癌症可選自由黑素瘤、腎癌、前列腺癌、結腸癌及肺癌組成之群。在某個具體實例中，本文提供治療黑素瘤之方法，其包括對有需要之個體投予結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體或其組合物。在某個具體實例中，本文提供治療腎癌之方法，其包括對有需要之個體投予結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體或其組合物。在某個具體實例中，本文提供治療前列腺癌之方法，其包括對有需要之個體投予結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體或其組合物。在某些具體實例中，本文提供治療結腸癌之方法，其包括對有需要之個體投予結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體或其組合物。在某些具體實例中，本文提供治療肺癌之方法，其包括對有需

要之個體投予結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體或其組合物。在某些具體實例中，本文提供治療非小細胞肺癌(NSCLC)之方法，其包括對有需要之個體投予結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體或其組合物。

[0311] 在某個具體實例中，本文提供治療選自由以下組成之群的癌症之方法：B 細胞淋巴瘤(例如 B 細胞慢性淋巴球性白血病、B 細胞非霍奇金氏淋巴瘤、皮膚 B 細胞淋巴瘤、彌漫性大 B 細胞淋巴瘤)、基底細胞癌、膀胱癌、母細胞瘤、腦轉移、乳癌、伯基特淋巴瘤、癌瘤(例如腺癌(例如胃食管連接部腺癌))、子宮頸癌、結腸癌、結腸直腸癌(結腸癌及直腸癌)、子宮內膜癌、食管癌、尤文氏肉瘤、濾泡性淋巴瘤、胃癌、胃食管連接部癌、胃腸癌、膠質母細胞瘤(例如多形性膠質母細胞瘤，例如新診斷或復發)、膠質瘤、頭頸部癌(例如頭頸部鱗狀細胞癌)、肝轉移、霍奇金氏及非霍奇金氏淋巴瘤、腎癌(例如腎細胞癌及韋爾姆斯氏腫瘤)、喉癌、白血病(例如慢性髓細胞性白血病、毛細胞白血病)、肝臟癌症(例如肝癌及肝細胞瘤)、肺癌(例如非小細胞肺癌及小細胞肺癌)、淋巴母細胞性淋巴瘤、淋巴瘤、套細胞淋巴瘤、轉移性腦腫瘤、轉移癌、骨髓瘤(例如多發性骨髓瘤)、神經母細胞瘤、眼部黑色素瘤、口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌(例如胰臟導管腺癌)、前列腺癌(例如激素難治性(例如去勢抗性)、轉移

性、轉移性激素難治性(例如去勢抗性、非雄激素依賴性))、腎細胞癌(例如轉移性)、唾液腺癌、肉瘤(例如橫紋肌肉瘤)、皮膚癌(例如黑素瘤(例如轉移性黑素瘤))、軟組織肉瘤、實體腫瘤、鱗狀細胞癌、滑膜肉瘤、睪丸癌、甲狀腺癌、移行細胞癌(尿路上皮細胞癌)、葡萄膜黑素瘤(例如轉移性)、疣狀癌、陰道癌及瓦爾登斯特倫巨球蛋白血症。

[0312] 在另一個具體實例中，向經診斷患有癌症之患者投予結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體以增加該患者之一或多個免疫細胞群體(例如 T 細胞效應細胞，諸如 CD4<sup>+</sup>及 CD8<sup>+</sup> T 細胞)之增殖及/或效應功能。

[0313] 在一個特定具體實例中，使用此技術中習知之分析(例如 ELISPOT、ELISA 及細胞增殖分析)，相對於未接受本文所述之結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體投藥之個體的免疫功能，本文所述之結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體將個體之一或多種免疫功能或反應活化或增強或誘導至少 99%、至少 98%、至少 95%、至少 90%、至少 85%、至少 80%、至少 75%、至少 70%、至少 60%、至少 50%、至少 45%、至少 40%、至少 35%、至少 30%、至少 25%、至少 20%、或至少 10%、或 10%至 25%、25%至 50%、50%至 75%或 75%至 95%之範圍。在一個特定具體

實例中，免疫功能為細胞激素產生(例如 IL-2、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10 及/或 IL-13 產生)。在另一個具體實例中，免疫功能為 T 細胞增殖/擴增，其可例如藉由流動式細胞量測術來分析以偵測表現 T 細胞標誌物(例如 CD3、CD4 或 CD8)之細胞數目。在另一個具體實例中，免疫功能為抗體產生，其可例如藉由 ELISA 來分析。在一些具體實例中，免疫功能為效應功能，其可例如藉由細胞毒性分析或此技術中習知之其他分析來分析。在另一個具體實例中，免疫功能為 Th1 反應。在另一個具體實例中，免疫功能為 Th2 反應。在另一個具體實例中，免疫功能為記憶反應。

[0314] 在特定具體實例中，可由結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體增強或誘導之免疫功能之非限制性實例為效應淋巴球之增殖/擴增(例如效應 T 淋巴球數目增加)及對效應淋巴球(例如效應 T 淋巴球)之細胞凋亡之抑制。在特定具體實例中，由本文所述之結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體增強或誘導之免疫功能為以下細胞之數目的增殖/擴增或活化：CD4<sup>+</sup> T 細胞(例如 Th1 及 Th2 輔助 T 細胞)、CD8<sup>+</sup> T 細胞(例如細胞毒性 T 淋巴球、 $\alpha/\beta$  T 細胞、及  $\gamma/\delta$  T 細胞)、B 細胞(例如漿細胞)、記憶 T 細胞、記憶 B 細胞、腫瘤駐留 T 細胞、CD122<sup>+</sup> T 細胞、自然殺手(NK)細胞、巨噬細胞、單核球、樹突細胞、肥大細胞、嗜酸性球、嗜鹼性球

或多形核白血球。在一個具體實例中，本文所述之結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體活化或增強淋巴球祖細胞之增殖/擴增或數目。在一些具體實例中，相對於陰性對照(例如未用本文所述之結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體處理、培養或接觸之對應細胞之數目)，本文所述之結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體使以下細胞之數目增加約至少 99%、至少 98%、至少 95%、至少 90%、至少 85%、至少 80%、至少 75%、至少 70%、至少 60%、至少 50%、至少 45%、至少 40%、至少 45%、至少 35%、至少 30%、至少 25%、至少 20%、或至少 10%、或 10%至 25%、25%至 50%、50%至 75%或 75%至 95%之範圍：CD4<sup>+</sup> T 細胞(例如 Th1 及 Th2 輔助 T 細胞)、CD8<sup>+</sup> T 細胞(例如細胞毒性 T 淋巴球、 $\alpha/\beta$  T 細胞、及  $\gamma/\delta$  T 細胞)、B 細胞(例如漿細胞)、記憶 T 細胞、記憶 B 細胞、腫瘤駐留 T 細胞、CD122<sup>+</sup> T 細胞、自然殺手細胞(NK 細胞)、巨噬細胞、單核球、樹突細胞、肥大細胞、嗜酸性球、嗜鹼性球或多形核白血球。

[0315] 在一些具體實例中，對個體投予本文所述之結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體與靶向免疫調節酶之化合物的組合，該(等)免疫調節酶諸如 IDO(吲哚胺-(2,3)-二氧化酶)及 TDO(色胺酸 2,3-二氧化酶)。在特定具體實例中，此種化合物選自由以下組成之

群：埃帕多塔(Incyte 公司)、F001287(Flexus Biosciences 公司)、吡哌西莫(NewLink Genetics 公司)及 NLG919(NewLink Genetics 公司)。在一個具體實例中，該化合物為埃帕多塔。在另一個具體實例中，該化合物為 F001287。在另一個具體實例中，該化合物為吡哌西莫。在另一個具體實例中，該化合物為 NLG919。

[0316] 在一些具體實例中，對個體投予本文所述之結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體與疫苗之組合。

[0317] 在一些具體實例中，對個體投予本文所述之結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體與基於熱休克蛋白之腫瘤疫苗或基於熱休克蛋白之病原體疫苗之組合。在一個特定具體實例中，對個體投予結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體與基於熱休克蛋白之腫瘤疫苗的組合。熱休克蛋白(HSP)為所有物種中普遍存在之高度保守蛋白質之家族。其表現可由於熱休克或其他形式之應激而強有力地誘導至較高之程度，該應激包括暴露於毒素、氧化應激或葡萄糖剝奪。已根據分子量分為五個家族：HSP-110、HSP-90、HSP-70、HSP-60 及 HSP-28。HSP 經由交叉呈現途徑在抗原呈現細胞(APC) (諸如巨噬細胞及樹突細胞(DC))中傳遞免疫原性肽，從而引起 T 細胞活化。HSP 用作形成能夠誘導腫瘤特異性免疫之複合物的腫瘤相關抗原肽之伴侶載體。在由垂

死之腫瘤細胞釋放時，HSP-抗原複合物由抗原呈現細胞 (APC) 攝取，其中抗原係加工成結合 MHC I 類及 II 類分子之肽，從而引起抗腫瘤 CD8+ 及 CD4+ T 細胞活化。由源自於腫瘤製劑之 HSP 複合物引出之免疫特異性針對由各個體之癌症所表現之獨特抗原肽譜系。

[0318] 熱休克蛋白肽複合物 (HSPPC) 為由與抗原肽非共價複合之熱休克蛋白組成之蛋白質肽複合物。HSPPC 引出先天免疫反應及適應性免疫反應兩者。在一個特定具體實例中，該(等)抗原肽呈現所治療之癌症的抗原性。HSPPC 由 APC 經由膜受體(主要為 CD91)或藉由結合至 Toll 樣受體而有效捕獲。HSPPC 內化引起 APC 之功能成熟，趨化因子及細胞激素產生引起自然殺手細胞(NK)、單核球及 Th1 及 Th-2 介導之免疫反應的活化。在一些具體實例中，用於本文所揭示之方法中的 HSPPC 包含與抗原肽複合之來自應激蛋白之 hsp60、hsp70、或 hsp90 家族之一或多種熱休克蛋白。在一些具體實例中，HSPPC 包含 hsc70、hsp70、hsp90、hsp110、grp170、gp96、鈣網蛋白或彼等之兩者或多於兩者之組合。

[0319] 在一個特定具體實例中，對個體投予結合 GITR 及/或 OX40 之多特異性(例如雙特異性)抗體與熱休克蛋白肽複合物 (HSPPC) (例如熱休克蛋白肽複合物-96(HSPPC-96))之組合以治療癌症。HSPPC-96 包含與抗原肽複合之 96 kDa 熱休克蛋白(Hsp)gp96。HSPPC-96 為由

個體之腫瘤製成之癌症免疫治療且含有癌症之抗原「指紋」。在一些具體實例中，此指紋含有僅存在於該特定個體之特定癌細胞中之獨特抗原且注射疫苗意欲刺激個體之免疫系統來識別且攻擊帶有該特定癌症指紋之任何細胞。

[0320] 在一些具體實例中，例如 HSPPC-96 之 HSPPC 由個體之腫瘤組織產生。在一個特定具體實例中，HSPPC(例如 HSPPC-96)由所治療之癌症或其轉移之類型的腫瘤產生。在另一個特定具體實例中，HSPPC(例如 HSPPC-96)為所治療之受試者自體的。在一些具體實例中，腫瘤組織為非壞死腫瘤組織。在一些具體實例中，使用至少 1 公克(例如至少 1 公克、至少 2 公克、至少 3 公克、至少 4 公克、至少 5 公克、至少 6 公克、至少 7 公克、至少 8 公克、至少 9 公克或至少 10 公克)之非壞死腫瘤組織產生疫苗方案。在一些具體實例中，在手術切除之後，在用於疫苗製備之前，將非壞死腫瘤組織冷凍。在一些具體實例中，例如 HSPPC-96 之 HSPPC 係藉由純化技術自腫瘤組織分離，過濾且製備用於可注射之疫苗。在一些具體實例中，對個體投予 6 至 12 次劑量之 HSPPC，例如 HSPCC-96。在此等具體實例中，HSPPC(例如 HSPPC-96)劑量可每週一次投予前 4 次劑量，且接著每兩週一次投予 2 至 8 次額外之劑量。

[0321] 可根據本文所述之方法使用之 HSPPC 之其他實例揭示於以下專利及專利申請案中，該等專利及專利申



請案出於所有目的以全文引用的方式併入本文中：美國專利第 6,391,306 號、第 6,383,492 號、第 6,403,095 號、第 6,410,026 號、第 6,436,404 號、第 6,447,780 號、第 6,447,781 號及第 6,610,659 號。

[0322] 在一個態樣中，如本文所提供之用於調節個體之一或多種免疫功能或反應之方法為去活化、降低或抑制個體之一或多種免疫功能或反應之方法，其包括對有需要之個體投予結合 GITR 及/或 OX40 之拮抗性多特異性(例如雙特異性)抗體或其組合物。在一個特定具體實例中，本文提供用於預防及/或治療需要去活化、降低或抑制一或多種免疫功能或反應之疾病的方法，其包括對有需要之個體投予結合 GITR 及/或 OX40 之拮抗性多特異性(例如雙特異性)抗體或其組合物。

[0323] 在某個具體實例中，本文提供治療自體免疫性疫或發炎性疾病或病症之方法，其包括對有需要之個體投予有效量之結合 GITR 及/或 OX40 之拮抗性多特異性(例如雙特異性)抗體或其組合物。在某些具體實例中，該疾病或病症選自由以下組成之群：感染(病毒、細菌、真菌及寄生物)、與感染相關之內毒素性休克、關節炎、類風濕性關節炎、氣喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、盆腔發炎性疾病、阿茲海默氏病、發炎性腸病、克羅恩氏病、潰瘍性結腸炎、佩羅尼氏病、乳糜瀉、膽囊疾病、藏毛疾病、腹膜炎、銀屑病、血管炎、手術黏連、中風、第 I 型糖尿

病、萊姆病、關節炎、腦膜腦炎、葡萄膜炎、自體免疫葡萄膜炎、中樞及周邊神經系統之免疫介導之發炎性病徵(諸如多發性硬化)、狼瘡(諸如全身性紅斑狼瘡)及吉蘭-巴利症候群、皮炎、異位性皮炎、自體免疫肝炎、纖維性肺泡炎、格雷氏病、IgA 腎病、特發性血小板減少性紫癜、美尼爾氏病、天皰瘡、原發性膽汁性肝硬化、類肉瘤病、硬皮病、韋格納肉牙腫病、胰臟炎、創傷(手術)、移植物抗宿主病、移植排斥反應、心臟病(亦即心血管疾病)，包括缺血性疾病，諸如心肌梗塞以及動脈粥樣硬化、血管內凝血；骨骼再吸收、骨質疏鬆症、骨關節炎、牙周炎、胃酸過少症、及視神經脊髓炎。在某些具體實例中，該自體免疫或發炎性疾病或病徵為移植排斥反應、移植物抗宿主病、血管炎、氣喘、類風濕性關節炎、皮炎、發炎性腸病、葡萄膜炎、狼瘡、結腸炎、糖尿病、多發性硬化或氣管發炎。在某些具體實例中，該個體為人類。

[0324] 在另一個具體實例中，向經診斷患有自體免疫性或發炎性疾病或病徵之患者投予結合 GITR 及/或 OX40 之拮抗性多特異性(例如雙特異性)抗體以減少該患者之一或多個免疫細胞群體(例如 T 細胞效應細胞，諸如 CD4<sup>+</sup>及 CD8<sup>+</sup> T 細胞)之增殖及/或效應功能。在某些具體實例中，該自體免疫性或發炎性疾病或病徵為移植排斥反應、移植物抗宿主病、血管炎、氣喘、類風濕性關節炎、皮炎、發炎性腸病、葡萄膜炎、狼瘡、結腸炎、糖尿病、

多發性硬化或氣管發炎。

[0325] 在一個特定具體實例中，使用此技術中習知之分析(例如 ELISPOT、ELISA 及細胞增殖分析)，相對於未接受本文所述之結合 GITR 及/或 OX40 之拮抗性多特異性(例如雙特異性)抗體投藥之個體的免疫功能，本文所述之結合 GITR 及/或 OX40 之拮抗性多特異性(例如雙特異性)抗體將個體之一或多種免疫功能或反應去活化或降低或抑制至少 99%、至少 98%、至少 95%、至少 90%、至少 85%、至少 80%、至少 75%、至少 70%、至少 60%、至少 50%、至少 45%、至少 40%、至少 45%、至少 35%、至少 30%、至少 25%、至少 20%、或至少 10%、或 10%至 25%、25%至 50%、50%至 75%或 75%至 95%之範圍。在一個特定具體實例中，免疫功能為細胞激素產生(例如 IL-2、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10 及/或 IL-13 產生)。在另一個具體實例中，免疫功能為 T 細胞增殖/擴增，其可例如藉由流動式細胞量測術來分析以偵測表現 T 細胞標誌物(例如 CD3、CD4、或 CD8)之細胞數目。在另一個具體實例中，免疫功能為抗體產生，其可例如藉由 ELISA 來分析。在一些具體實例中，免疫功能為效應功能，其可例如藉由細胞毒性分析或此技術中習知之其他分析來分析。在另一個具體實例中，免疫功能為 Th1 反應。在另一個具體實例中，免疫功能為 Th2 反應。在另一個具體實例中，免疫功能為記憶反應。

[0326] 在特定具體實例中，可由結合 GITR 及/或 OX40 之拮抗性多特異性(例如雙特異性)抗體降低或抑制之免疫功能之非限制性實例為效應淋巴球之增殖/擴增(例如效應 T 淋巴球數目減少)及對效應淋巴球(例如效應 T 淋巴球)之細胞凋亡之刺激。在特定具體實例中，由本文所述之結合 GITR 及/或 OX40 之拮抗性多特異性(例如雙特異性)抗體降低或抑制之免疫功能為以下細胞之數目之增殖/擴增或活化：CD4<sup>+</sup> T 細胞(例如 Th1 及 Th2 輔助 T 細胞)、CD8<sup>+</sup> T 細胞(例如細胞毒性 T 淋巴球、 $\alpha/\beta$  T 細胞、及  $\gamma/\delta$  T 細胞)、B 細胞(例如漿細胞)、記憶 T 細胞、記憶 B 細胞、腫瘤駐留 T 細胞、CD122<sup>+</sup> T 細胞、自然殺手(NK)細胞、巨噬細胞、單核球、樹突細胞、肥大細胞、嗜酸性球、嗜鹼性球或多形核白血球。在一個具體實例中，本文所述之結合 GITR 及/或 OX40 之拮抗性多特異性(例如雙特異性)抗體去活化或減少淋巴球祖細胞之增殖/擴增或數目。在一些具體實例中，相對於陰性對照(例如未用本文所述之結合 GITR 及/或 OX40 抗體之拮抗性多特異性(例如雙特異性)抗體處理、培養或接觸之對應細胞之數目)，本文所述之結合 GITR 及/或 OX40 之拮抗性多特異性(例如雙特異性)抗體使以下細胞之數目減少約至少 99%、至少 98%、至少 95%、至少 90%、至少 85%、至少 80%、至少 75%、至少 70%、至少 60%、至少 50%、至少 45%、至少 40%、至少 45%、至少 35%、至少 30%、至少

25%、至少 20%、或至少 10%、或 10%至 25%、25%至 50%、50%至 75%或 75%至 95%之範圍：CD4<sup>+</sup> T 細胞(例如 Th1 及 Th2 輔助 T 細胞)、CD8<sup>+</sup> T 細胞(例如細胞毒性 T 淋巴球、 $\alpha/\beta$  T 細胞、及  $\gamma/\delta$  T 細胞)、B 細胞(例如漿細胞)、記憶 T 細胞、記憶 B 細胞、腫瘤駐留 T 細胞、CD122<sup>+</sup> T 細胞、自然殺手細胞(NK 細胞)、巨噬細胞、單核球、樹突細胞、肥大細胞、嗜酸性球、嗜鹼性球或多形核白血球。

#### 7.5.1.1 投藥途徑及劑量

[0327] 本文所述之抗體或組合物可藉由多種途徑向個體投遞。

[0328] 將有效治療及/或預防病況之抗體或組合物之量將視疾病之性質而定，且可藉由標準臨床技術確定。

[0329] 欲用於組合物中之精確劑量亦將視投藥途徑及疾病之嚴重程度而定，且應當根據專業人員之判斷及各受試者之情況來決定。舉例而言，有效劑量亦可視投藥方式、靶向部位、患者之生理狀態(包括年齡、體重及健康情況)、患者為人類還是動物、投予之其他藥物或治療為預防性還是治療性而不同。通常，患者為人類，但亦可治療非人類哺乳動物，包括轉殖基因哺乳動物。最佳對治療劑量進行滴定以最佳化安全性及功效。

[0330] 在某些具體實例中，使用試管內分析來幫助

識別最佳劑量範圍。有效劑量可自由試管內或動物模型測試系統獲得之劑量反應曲線外推。

[0331] 一般而言，與來自其他物種之抗體相比，由於對外來多肽之免疫反應，因此人類抗體在人體內具有較長之半衰期。因此，人類抗體之較低劑量及不太頻繁之投藥常常為可能的。

### 7.5.2 偵測及診斷用途

[0332] 本文所述之抗 OX40 抗體(參見例如部分 7.2)可用於使用熟習此技術者已知之典型免疫組織學方法分析生物樣品中之 OX40 蛋白含量，該等方法包括免疫分析，諸如酶聯免疫吸附分析(ELISA)、免疫沈澱或西方印漬術。適合之抗體分析標記為此技術中已知的且包括酶標記，諸如葡萄糖氧化酶；放射性同位素，諸如碘( $^{125}\text{I}$ 、 $^{121}\text{I}$ )、碳( $^{14}\text{C}$ )、硫( $^{35}\text{S}$ )、氘( $^3\text{H}$ )、銦( $^{121}\text{In}$ )及鎝( $^{99}\text{Tc}$ )；發光標記，諸如魯米諾；及螢光標記，諸如螢光素及若丹明；及生物素。此等標記可用於標記本文所述之抗體。或者，識別本文所述之抗 OX40 抗體之二級抗體可經標記且與抗 OX40 抗體組合用於偵測 OX40 蛋白含量。

[0333] 分析 OX40 蛋白質之表現含量意欲包括直接(例如藉由測定或估計絕對蛋白含量)或相對(例如藉由與第二生物樣品中之疾病相關蛋白含量相比)定性或定量量測或估計第一生物樣品中 OX40 蛋白質之含量。可量測或估

計第一生物樣品中之 OX40 多肽表現含量且將其與標準 OX40 蛋白含量相比，該標準係取自獲自未患該病症之個體的第二生物樣品或藉由計算來自未患該病症之個體之群體的含量之平均值來確定。如此項技術中所將瞭解，一旦已知「標準」OX40 多肽含量，即可將其反復用作標準以進行比較。

[0334] 如本文所用之術語「生物樣品」係指獲自潛在表現 OX40 之個體、細胞株、組織或其他細胞來源之任何生物樣品。自動物(例如人類)獲得組織活檢及體液之方法為此技術所習知。生物樣品包括周邊單核血球。

[0335] 本文所述之抗 OX40 抗體可用於預後、診斷、監測及篩選應用，其包括熟習此技術者習知及標準且基於本發明描述之試管內及活體內應用。用於試管內評定及評估免疫系統狀態及/或免疫反應之預後、診斷、監測及篩選分析及套組可用於預測、診斷及監測以評估患者樣品，該等樣品包括已知有或疑似有免疫系統功能障礙或與預期或所需之免疫系統反應、抗原反應或疫苗反應相關之樣品。評定及評估免疫系統狀態及/或免疫反應亦可用於確定患者對於藥物臨床試驗或相比於不同藥劑或抗體，對於特定化學治療劑或抗體(包括其組合)之投藥之適合性。此種類型之預後及診斷監測及評定已在實踐中利用針對乳癌中之 HER2 蛋白質之抗體(HerceptTest™，Dako 公司)，其中該分析亦用於評估患者以使用 Herceptin®進行抗體治

療。活體內應用包括定向細胞治療及免疫系統調節以及免疫反應之放射性成像。

[0336] 在一個具體實例中，抗 OX40 抗體可以用於活檢樣品之免疫組織化學。

[0337] 在另一個具體實例中，抗 OX40 抗體可用於偵測 OX40 之含量或在膜表面上含有 OX40 之細胞之含量，接著可使該等含量與某些疾病症狀相關聯。本文所述之抗 OX40 抗體可攜帶可偵測標記或功能標記。當使用螢光標記時，可利用此項技術中已知之目前可用之顯微術及螢光活化細胞分選儀分析(FACS)或該兩種方法程序之組合來識別及定量特異性結合成員。本文所述之抗 OX40 抗體可攜帶螢光標記。例示性螢光標記包括例如反應性及結合之探針，例如胺基香豆素、螢光素、德克薩斯紅(Texas red)、Alexa Fluor 染料、Cy 染料及 DyLight 染料。抗 OX40 抗體可攜帶放射性標記，諸如同位素  $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{36}\text{Cl}$ 、 $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{57}\text{Co}$ 、 $^{58}\text{Co}$ 、 $^{59}\text{Fe}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{117}\text{Lu}$ 、 $^{121}\text{I}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{198}\text{Au}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{225}\text{Ac}$  及  $^{186}\text{Re}$ 。當使用放射性標記時，可利用此技術中已知之目前可用之計數程序來識別及定量抗 OX40 抗體與 OX40(例如人類 OX40)之特異性結合。在標記為酶之情況下，偵測可藉由此技術中已知之任何目前利用之比色、分光光度、螢光分光光度、電流滴定或氣體定量技術來實現。此可藉由使樣品或對照樣品與抗 OX40 抗體在允



許形成抗體與 OX40 之間的複合物之條件下接觸。在樣品及對照中偵測抗體與 OX40 之間形成之任何複合物且比較。鑒於本文所述之抗體對 OX40 之特異性結合，其抗體可用於特異性偵測細胞表面上之 OX40 表現。本文所述之抗體亦可用於經由免疫親和純化來純化 OX40。

[0338] 本文亦包括分析系統，其可製備成測試套組之形式，該測試套組用於定量分析例如 OX40 或 OX40/OX40L 複合物之存在程度。該系統或測試套組可包括標記之組分，例如標記之抗體；及一或多種額外之免疫化學試劑。有關套組之更多資訊，參見例如下文部分 7.6。

## 7.6 套組

[0339] 本文提供套組，其包括本文所述之一或多種抗體或其結合物。在一個特定具體實例中，本文提供一種醫藥包裝或套組，其包括填充有本文所述之醫藥組合物之一或多種成分(諸如本文提供之一或多種抗體)之一或多個容器。在一些具體實例中，該等套組含有本文所述之醫藥組合物及任何預防劑或治療劑，諸如本文所述之彼等藥劑。在某些具體實例中，該等套組可含有 T 細胞有絲分裂原，諸如植物血球凝集素(PHA)及/或佛波醇肉豆蔻酸酯乙酸酯(PMA)、或 TCR 複合物刺激抗體，諸如抗 CD3 抗體及抗 CD28 抗體。註記可視情況與該(等)容器締合，該註

記呈由監管醫藥製品或生物製品之製造、使用或銷售之政府機構規定之形式，該註記反映用於人類投藥之製造、使用或銷售由該機構批准。

[0340] 本文亦提供可用於上述方法中之套組。在一個具體實例中，套組在一或多個容器中包括本文所述之抗體，較佳為純化之抗體。在一個特定具體實例中，本文所述之套組含有實質上分離之 OX40 抗原(例如人類 OX40)，其可用作對照。在另一個特定具體實例中，本文所述之套組進一步包括對照抗體，其不與 OX40 抗原反應。在另一個特定具體實例中，本文所述之套組含有用於偵測抗體與 OX40 抗原之結合之一或多種元件(例如抗體可結合至可偵測之受質，諸如螢光化合物、酶受質、放射性化合物或發光化合物、或識別一級抗體之二級抗體可結合至可偵測之受質)。在特定具體實例中，本文提供之套組可包括重組產生或化學合成之 OX40 抗原。套組中所提供之 OX40 抗原亦可連接至固體載體。在一個更特定具體實例中，上述套組之偵測裝置包括與 OX40 抗原連接之固體載體。此種套組亦可包括非連接之報導子標記之抗人類抗體或抗小鼠/大鼠抗體。在此具體實例中，抗體與 OX40 抗原之結合可藉由該報導子標記之抗體之結合來偵測。

[0341] 以說明方式而非以限制方式提供以下實施例。

## 8. 實施例

[0342] 該部分(亦即部分 8)中之實施例係以說明方式，而非以限制方式提供。

### 8.1 實施例 1：腫瘤內調節性 T 細胞上 GITR 及 OX40 表現之表徵

[0343] 使用流動式細胞量測術來表徵腫瘤內調節性 T 細胞(Treg)及效應 T 細胞(Teff)上 GITR 及 OX40 之表現。簡言之，來自多種腫瘤類型(卵巢，IIC 期；結腸直腸，IIIB 期；子宮內膜，IB 期；腎，III 期；及非小細胞肺癌，II 期)之冷凍保存之腫瘤細胞係獲自 Conversant Bio 有限責任公司。該等腫瘤細胞係在治療介入之前經分離。在解凍之後，在室溫下用人類 Fc 受體阻斷劑(FcR 阻斷劑，Biolegend®)將細胞處理 15 分鐘以減少非特異性結合。將樣品洗滌兩次。將抗體混合物在 FACS 緩衝液(PBS、2 mM EDTA、0.5% BSA，pH 7.2)中稀釋且添加至各樣品中，該抗體混合物含有識別 CD4(BV605，OKT4，批號：B185762)、CD127(APC，A019D5，批號：B193084)及 CD25(PECy7，M-A251，批號：B190207)之抗體、Zombie Green™ 可固定活力染料(FITC，批號：B201900)以及抗 OX40 抗體(PE，BER-ACT35，批號：B203538)、抗 GITR 抗體(PE，110416，批號：LAV0614061)、或同源同型對照抗體(PE，MOPC-21，批

號：B197832)，全部均為 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在 4°C 下將樣品培育 30 分鐘。在染色之前，留出額外之樣品以用於單染色補償對照 (CD45-FITC、CD45-PE、CD45-PECy7、CD45-APC、及 CD45-BV605；全部為純系 H130)。接著將樣品在 FACS 緩衝液中洗滌三次且在室溫下在暗處在 1×固定-透化緩衝液 (Foxp3 染色套組，eBioscience 公司) 中培育 45 分鐘。在固定後，將細胞在 1×透化緩衝液 (Foxp3 染色套組，eBioscience 公司) 中洗滌三次且在 4°C 下與在 1×透化緩衝液中稀釋之 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  之抗 FOXP3 或大鼠 IgG2a 抗體一起培育 45 分鐘。將樣品在 1×透化緩衝液中洗滌兩次，再懸浮於 FACS 緩衝液中，且使用 LSRFortessa 流式細胞儀 (BD Biosciences 公司) 分析。使用 FACS DIVA 及 WEHI Weasel 軟體之組合分析 FACS 圖。

[0344] 效應 T 細胞係限定為 CD4<sup>+</sup> CD127<sup>+</sup> CD25<sup>+/-</sup> FOXP3<sup>-</sup>。調節性 T 細胞係限定為 CD4<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup>。如圖 1A 中所示，來自子宮內膜癌腫瘤組織、腎細胞癌 (RCC) 腫瘤組織、及非小細胞肺癌 (NSCLC) 腫瘤組織之腫瘤內調節性 T 細胞顯示 GITR 及 OX40 之表現升高，而來自相同腫瘤組織之腫瘤內效應 T 細胞並非如此。

[0345] 對於受體定量，使用確定之儀器設置來分析具有預定數目之 PE 分子之珠粒 (Quantum<sup>TM</sup> R-PE MESF；Bangs Laboratories 公司)。使用珠粒及先前分析之 GITR/OX40 抗體兩者之平均螢光強度 (MFI)，計算腫瘤內

調節性 T 細胞及效應 T 細胞之 GITR 及 OX40 受體之預測數目。

[0346] 來自卵巢腫瘤組織、結腸直腸癌(CRC)腫瘤組織、子宮內膜癌腫瘤組織、RCC 腫瘤組織及 NSCLC 腫瘤組織之調節性 T 細胞均比來自相同腫瘤組織之效應 T 細胞顯示更高之 GITR 及 OX40 表現(圖 1B)。

## 8.2 實施例 2：抗 GITR/OX40 雙特異性抗體之表徵

[0347] 在此實施例中，研究使用 Genmab DuoBody 技術構築之抗 GITR/OX40 雙特異性抗體之結合及功能特徵。 DuoBody pab1876×pab2049 及 DuoBody pab1876×pab1949 兩者均包含 GITR 結合臂(pab1876)及 OX40 結合臂(pab2049 或 pab1949)。使用三種其他 DuoBody 抗體作為對照：DuoBody pab1876×同型、DuoBody pab2049×同型及 DuoBody pab1949×同型。對應於此等 DuoBody 抗體之重鏈及輕鏈序列之 SEQ ID NO 列於表 10 中。此外，在一些實驗中亦使用二價單特異性抗體 pab1876、pab2049 及 pab1949w。pab1876w 為包含 SEQ ID NO:29 之重鏈及 SEQ ID NO:37 之輕鏈的 IgG<sub>1</sub> 抗體。pab1876 與 pab1876w 包含相同之重鏈及輕鏈序列，不同之處在於 pab1876 在輕鏈恆定域中含有 T109S 取代(亦即相對於野生型輕鏈恆定域，在位置 109 處蘇胺酸經絲胺酸取代)(根據 Kabat 來編號)，該取代促成可變區在

框內選殖至恆定區。該突變為不影響抗體結合或功能之保守修飾。pab2049w 為包含 SEQ ID NO:59 之重鏈及 SEQ ID NO:67 之輕鏈的 IgG<sub>1</sub> 抗體。除輕鏈恆定區中之 T109S 突變(根據 Kabat 編號)之外，pab2049 與 pab2049w 包含相同之重鏈及輕鏈序列。pab1949w 為包含 SEQ ID NO:59 之重鏈及 SEQ ID NO:69 之輕鏈的 IgG<sub>1</sub> 抗體。除輕鏈恆定區中之 T109S 突變(根據 Kabat 編號)之外，pab1949 與 pab1949w 包含相同之重鏈及輕鏈序列。

表 10. DuoBody 重鏈(HC)及輕鏈(LC)序列

DuoBody	第一臂		第二臂	
	HC (SEQ ID NO:)	LC (SEQ ID NO:)	HC (SEQ ID NO:)	LC (SEQ ID NO:)
pab1876 × pab2049	31	38	61	68
pab1876 × pab1949	31	38	61	70
pab1876 × 同型	31	38	N/A	N/A
pab2049 × 同型	61	68	N/A	N/A
pab1949 × 同型	61	70	N/A	N/A
pab1876 × pab2049 (不含重鏈末端離胺酸)	76	38	120	68
pab1876 × pab1949 (不含重鏈末端離胺酸)	76	38	120	70
pab1876 × 同型 (不含重鏈末端離胺酸)	76	38	N/A	N/A
pab2049 × 同型 (不含重鏈末端離胺酸)	120	68	N/A	N/A
pab1949 × 同型 (不含重鏈末端離胺酸)	120	70	N/A	N/A

### 8.2.1 抗 GITR/OX40 雙特異性抗體之選擇性

[0348] 使用懸浮陣列技術評定 DuoBody pab1876×pab2049 對 GITR 及 OX40 相對於對 TNFR 超家族之其他成員的選擇性。使用山羊抗人類 IgG F(ab')<sub>2</sub>(Jackson

Immuno Research 公司，COOH 偶聯，100  $\mu\text{g/ml}$ ，pH 5.0) 使 TNFR 超家族之許多重組蛋白偶聯至 Luminex<sup>®</sup> 珠粒，該等重組蛋白包括重組人類 GITR-His(Sino Biological 公司，50  $\mu\text{g/ml}$ )、重組人類 OX40-His(Sino Biological 公司，50  $\mu\text{g/ml}$ )、重組人類淋巴毒素  $\beta$  受體 (LTBR)-Fc(AcroBiosystems 公司，65  $\mu\text{g/ml}$ )、重組人類死亡受體 6(DR6)-bio(Sino Biological 公司，50  $\mu\text{g/ml}$ )、重組人類腫瘤壞死因子樣弱細胞凋亡誘導因子受體 (TWEAKR)-Fc(Sino Biological 公司，50  $\mu\text{g/ml}$ )、重組人類 CD137-Fc(SrtA-bio 公司，50  $\mu\text{g/ml}$ )、及重組人類 B 細胞活化因子受體 (BAFFR)-Fc(R&D Systems 公司，50  $\mu\text{g/ml}$ )。接著在 20°C 下將多個濃度(最終 8333 ng/ml、833.3 ng/ml、83.3 ng/ml 及 8.33 ng/ml)之 DuoBody pab1876 $\times$ pab2049 與抗原偶聯之珠粒一起培育 1 小時(650 RPM，在暗處)。在洗滌以移除非特異性結合(在 PBS 中兩次)後，在 20°C 下將珠粒與偵測抗體(藻紅蛋白包被之山羊抗 huIgG F(ab')<sub>2</sub>，最終 2.5  $\mu\text{g/ml}$ )一起培育 1 小時(650 RPM，在暗處)。接著將珠粒洗滌兩次且在 Luminex 200<sup>®</sup> 上讀取。藉由截止偵測值(基於 LX200 對照)來確定高於(+)或低於(-)臨限值之結合。

[0349] DuoBody pab1876 $\times$ pab2049 顯示與人類 GITR 及 OX40 之特異性結合，且在測試濃度下未觀測到與其他 TNFR 家族成員之顯著結合(表 11)。

表 11. DuoBody pab1876×pab2049 對 TNFR 超家族成員之選擇性

標靶	GITR	OX40	LTBR	DR6	TWEAKR	CD137	BAFFR
結合	+	+	-	-	-	-	-

### 8.2.2 抗 GITR/OX40 雙特異性抗體與表現 GITR 及 OX40 之細胞的結合

[0350] 藉由流動式細胞量測術研究 DuoBody pab1876×pab2049 與共表現 GITR 及 OX40 之細胞、僅表現 GITR 之細胞及僅表現 OX40 之細胞的結合。

[0351] 在 37°C 及 5% CO<sub>2</sub> 下將 Hut102 細胞(人類 T 細胞淋巴瘤, ATCC)在補充有 1 µg/ml 植物血球凝集素 (PHA)及 10%熱滅活 FBS 之 RPMI 培養基中培育 72 小時以誘導 GITR 及 OX40 表現。藉由將慢病毒載體(EF1a 啟動子)轉導至 Jurkat 細胞中來產生異位表現 GITR 或 OX40 之細胞。經由單細胞分選(FACS ARIA Fusion)產生穩定純系。藉由流動式細胞量測術驗證表現。對於結合分析, 在 4°C 下將穩定之 Jurkat 細胞或活化之 Hut102 細胞與在 FACS 緩衝液(PBS、2 mM EDTA、0.5% BSA, pH 7.2)中稀釋之測試抗體(12 點劑量滴定, 0.01 至 10,000 ng/ml)一起培育 30 分鐘。將樣品在 FACS 緩衝液中洗滌兩次且接著在 4°C 下與 APC 結合之小鼠抗人類 κ 偵測抗體(Life Technologies 公司, HP6062)一起培育 30 分鐘。接著將樣品洗滌兩次且使用 LSRFortessa 流式細胞儀 (BD



Biosciences 公司)分析。使用 FACS DIVA 及 WEHI Weasel 軟體之組合分析 FACS 圖。用 Graphpad Prism 軟體對數據進行作圖。

[0352] 如圖 2A 中所示，相較於二價單特異性抗體 pab1876 及 pab2049，DuoBody pab1876×pab2049 顯示增強之與共表現 GITR 及 OX40 之細胞的結合。增強之與共表現 GITR 及 OX40 之細胞的結合由兩個臂所促成，此係因為用兩種對照 DuoBody 抗體 pab1876×同型及 pab2049×同型中之同型臂置換任一臂引起與活化之 Hut102 細胞之結合減少。如所預期，對於僅表現 GITR 或 OX40 而非表現兩者之細胞，在所測試之除最高濃度以外之所有濃度下，DuoBody pab1876×pab2049 之結合弱於二價單特異性抗體 pab1876 及 pab2049 之結合(圖 2B 及 2C)。

### 8.2.3 抗 GITR/OX40 雙特異性抗體對 FcγRIIIA 報導細胞株之作用

[0353] 隨後，使用表現 FcγRIIIA 之報導細胞株 (Promega 公司)以及共表現 GITR 及 OX40 之靶細胞來評估 DuoBody pab1876×pab2049 接合 GITR 及 OX40 且經由 FcγRIIIA 進行信號傳導之能力。使用穩定表現 FcγRIIIA V158 變異體及驅動螢火蟲螢光素酶表現之 NFAT 反應元件之工程改造之 Jurkat 細胞作為效應細胞。抗體/抗原複合物(其中該抗原位於靶細胞之表面上)與 FcγRIIIA 之結合

向效應細胞之啟動子/報導子構築體進行信號傳導且引起螢光素酶基因轉錄。

[0354] 活化自然調節性 T 細胞(nTreg)以產生共表現 GITR 及 OX40 之靶細胞。經由 Ficoll 梯度(Research Blood Components 有限責任公司)自健康供者白細胞層分離 PBMC 且對其進行基於磁性之 nTreg 增濃(Mitenyi Biotec 公司, 130-093-631, 批號: 5150629039)。接著在 37°C 及 5% CO<sub>2</sub> 下使用 Miltenyi Biotec 公司之 Treg 擴增套組(130-095-345, 批號: 5150420196)在補充有 10%熱滅活 FBS 之 RPMI 培養基中將細胞活化 8 天。每 3 天-4 天將含有 Treg 擴增套組之新鮮培養基添加至分離之 nTreg 中。在第 8 天, 藉由流動式細胞量測術確認 GITR 及 OX40 之細胞表現。簡言之, 在室溫下用人類 Fc 受體阻斷劑處理 20,000 個細胞 15 分鐘以減少非特異性結合(FcR 阻斷劑, Biologend 公司)。將樣品洗滌兩次且將抗體混合物在 FACS 緩衝液(PBS、2 mM EDTA、0.5% BSA, pH 7.2)中稀釋, 添加至各樣品中且在 4°C 下培育 30 分鐘, 該抗體混合物含有識別 CD4(BV605, OKT4, 批號: B185762)、CD127(APC, A019D5, 批號: B193084)、及 CD25(PECy7, M-A251, 批號: B195168)之抗體及 Zombie Green™ 可固定活力染料(FITC, 批號: B201900)以及抗 OX40 抗體(PE, BER-ACT35, 批號: B203538)、抗 GITR 抗體(PE, 110416, 批號: LAV0614061)或同源同型對照

抗體 (PE, MOPC-21, 批號: B197832), 全部均為 2.5  $\mu\text{g/ml}$ 。在染色之前, 留出額外之樣品以用於單染色補償對照 (CD45-FITC、CD45-PE、CD45-PECy7、CD45-APC 及 CD45-BV605; 全部為純系 H130)。接著將樣品在 FACS 緩衝液中洗滌三次且在室溫下在暗處在 1 $\times$ 固定-透化緩衝液 (Foxp3 染色套組, eBioscience 公司, 批號: E00029-1691) 中培育 45 分鐘。在固定後, 將細胞在 1 $\times$ 透化緩衝液 (Foxp3 染色套組, eBioscience 公司) 中洗滌三次且在 4 $^{\circ}\text{C}$  下與在 1 $\times$ 透化緩衝液中稀釋之 2.5  $\mu\text{g/ml}$  之抗 FOXP3 (eFluor450, PCH101, 批號: E11056-1635) 或大鼠 IgG2a (eFluor450, eBR2a, 批號: E08519-1633) 抗體一起培育 45 分鐘。將樣品在 1 $\times$ 透化緩衝液中洗滌兩次, 再懸浮於 FACS 緩衝液中, 且使用 LSRFortessa 流式細胞儀 (BD Biosciences 公司) 分析。

[0355] 如圖 3A 中所示, 活化之 nTreg 在細胞表面上表現 GITR 及 OX40 兩者。

[0356] 為了評定對 Fc $\gamma$ RIIIA 報導細胞之影響, 將活化 8 天之 125,000 個 nTreg 與遞增濃度 (6 點劑量滴定, 0.04  $\mu\text{g/ml}$  至 10  $\mu\text{g/ml}$ ) 之 DuoBody pab1876 $\times$ pab2049、二價單特異性抗體 pab1876、二價單特異性抗體 pab2049、或同型對照抗體一起培育。在 37 $^{\circ}\text{C}$  及 5%  $\text{CO}_2$  下將表現 Fc $\gamma$ RIIIA<sup>V158</sup> 之 NFAT 報導細胞於補充有 4% 熱滅活低 IgG FBS 之 RPMI 培養基中以 1:1 比率 (125,000 個細胞) 添加至

抗體-nTreg 混合物中。在 20 小時培育之後，將 Bio-Glo™ 螢光素酶分析受質 (Promega 公司，G720A) 添加至各樣品中 (1:1 v/v)。使用 EnVision® 多標記盤讀取器 (Perkin-Elmer 公司) 量測發光。使用 FACS DIVA 及 WEHI Weasel 軟體之組合分析 FACS 圖。用 Graphpad Prism 軟體對數據進行作圖。

[0357] 與相較於二價單特異性抗體 pab1876 及 pab2049，DuoBody pab1876×pab2049 顯示增強之與共表現 GITR 及 OX40 之細胞的結合之觀測結果 (圖 2A) 相一致，在結合共表現 GITR 及 OX40 之 nTreg 時，與 pab1876 及 pab2049 相比，DuoBody pab1876×pab2049 表現出較強之 FcγRIIIA 活化 (圖 3B)。

[0358] 此外，使用上文所述之表現 FcγRIIIA 之報導細胞株以及表現 GITR 或 OX40 而非表現兩者之靶細胞來評估 DuoBody pab1876×pab2049 接合 GITR 或 OX40 且經由 FcγRIIIA 進行信號傳導之能力。簡言之，對表現 GITR 或 OX40 之 Jurkat 靶細胞進行計數且將其以  $6 \times 10^6$  個細胞/毫升之濃度再懸浮於含 4% 低 IgG FBS 之 RPMI-1640 中。向多個 96 孔白色分析盤之內部 60 個孔中，向各孔中添加 25  $\mu$ l 之細胞懸浮液。以 10  $\mu$ g/ml 之起始最終濃度用 3 倍稀釋液連續稀釋測試抗體。在兩個重複孔中，將 25  $\mu$ l 之各抗體稀釋液添加至靶細胞中。最終，將表現 FcγRIIIA<sup>V158</sup> 之 NFAT 報導細胞以  $6 \times 10^6$  個細胞/毫升之濃

度再懸浮於含 4% 低 IgG FBS 之 RPMI-1640 中。將 25  $\mu$ l 之此等報導細胞添加至各孔中，從而產生 1:1 之效應細胞與靶細胞之比率。在 37°C 及 5% CO<sub>2</sub> 下將盤培育 20 小時。在此培育後，將 Bio-Glo 螢光素酶分析試劑 (Promega 公司) 在室溫下解凍且將 75  $\mu$ l 添加至 96 孔白色分析盤之各孔中。在 5 分鐘-10 分鐘內，使用 EnVision 多標記盤讀取器 (PerkinElmer 公司) 量測發光。將背景發光 (空白外部孔) 自各樣品讀數中扣除且記錄調整之相對光單位 (RLU)。用 Graphpad Prism 軟體對數據進行作圖。所測試之抗體為： DuoBody pab1876 $\times$ pab2049、二價抗 GITR 抗體 pab1876(F405L/F405L)、二價抗 OX40 抗體 pab2049(K409R/K409R)、 DuoBody pab1876 $\times$  同型、 DuoBody pab2049 $\times$  同型及同型對照抗體。抗體 pab1876(F405L/F405L) 在兩個重鏈恆定區中包含 F405L 取代且抗體 pab2049(K409R/K409R) 在兩個重鏈恆定區中包含 K409R 取代，其係根據 EU 編號系統來編號。

[0359] 對於僅表現 GITR 或 OX40 而非表現兩者之細胞，與 DuoBody pab1876 $\times$ pab2049 之結合弱於 pab1876 及 pab2049 之結合的觀測結果 (圖 2B 及 2C) 相一致，當結合表現 GITR 或 OX40 而非表現兩者之 Jurkat 細胞時，與 pab1876(F405L/F405L) 及 pab2049(K409R/K409R) 相比，在所測試之除最高濃度以外之所有濃度下， DuoBody pab1876 $\times$ pab2049 表現出較弱之 Fc $\gamma$ RIIIA 活化 (圖 3C 及

3D)。

#### 8.2.4 抗 GITR/OX40 雙特異性抗體對 NK 細胞介導之 ADCC 活性之作用

[0360] 在此實施例中，研究 DuoBody pab1876×pab2049 誘導對共表現 GITR 及 OX40 之細胞的自然殺手(NK)細胞介導之抗體依賴性細胞毒性(ADCC)之能力。

[0361] 使用磁性珠粒分離(MACS，Miltenyi 公司，130-094-775)將經由 ficoll 梯度(Research Blood Components 有限責任公司)自健康供者白細胞層分離之人類 PBMC 針對效應 T 細胞或自然 Treg 進一步增濃。在 37 °C 及 5% CO<sub>2</sub> 下在補充有 10% 熱滅活 FBS 之 RPMI 培養基中用 CD3-CD28 微珠(1:1 珠粒:細胞，Invitrogen 公司，11132D)及重組人類 IL-2(20 U/ml 用於效應 T 細胞；100 U/ml 用於 Treg) (Peprotech 公司，200-02)將增濃之效應 T 細胞或 Treg 活化 7 天。在刺激後，經由流動式細胞量測術評估細胞之 GITR 及 OX40 表現。為了減少非特異性結合，在環境溫度下將細胞與 FcγR 阻斷抗體(Biolegend 公司，422302)一起培育 15 分鐘。接著將樣品洗滌兩次且在 4°C 下與 CD3、CD4、CD8、及 CD25 之譜系抗體組以及可固定之活/死標記一起培育 30 分鐘。對於 Treg 劃分，接著將樣品洗滌兩次，固定，透化，且在 4°C 下與抗 FOXP3

抗體(eBiosciences 公司，純系# PCH101)一起培育 30 分鐘。接著將樣品洗滌兩次且使用 LSRFortessa 流式細胞儀(BD Biosciences 公司)分析。使用 FACS DIVA 及 WEHI Weasel 軟體之組合分析流動式細胞量測術圖。為了評估 ADCC 活性，經由磁性珠粒分離(MACS，Miltenyi 公司，130-092-657)自健康供者 PBMC 中分離原生 NK 細胞。將 NK 細胞與 20 U/ml 之重組人類 IL-2(Peprótech 公司，200-02)一起靜置隔夜。將 NK 細胞與靶細胞(效應 T 細胞或 Treg)一起共培養且在補充有熱滅活 0.5% FBS 之 RPMI 1640 無酚紅培養基中以 10:1 之 E:T 比率與抗體(滴定範圍：0.0004 至 1.9  $\mu\text{g/ml}$ )一起培育 4 小時。存在五個處理組：同型對照、單獨 pab1876、單獨 pab2049、DuoBody pab1876×pab2049 及 pab1876 與 pab2049 之組合。在最後一組中，將 pab1876 與 pab2049 以等莫耳濃度添加以達成與其他組相同之最終濃度。在各孔中以 100 $\mu\text{l}$  之總體積添加總共  $2\times 10^5$  個靶細胞(效應 T 細胞或 Treg)及  $2\times 10^6$  個 NK 細胞。在培育後，使用 CytoTox 96 非放射性細胞毒性分析(Promega 公司，G1780)，根據製造商之說明書來量測如由乳酸脫氫酶(LDH)釋放所證實之細胞裂解。細胞毒性(細胞裂解%)係使用下式來確定：細胞毒性%=(實驗-效應細胞自發 - 靶細胞自發)/(靶細胞最大 - 靶細胞自發) $\times 100$ 。

[0362] 如圖 3E 中所示，與活化之效應 T 細胞相比，

活化之 Treg 表現較高含量之 GITR 及 OX40。與該差異表現模式相一致，針對 GITR 及/或 OX40 之抗體未誘導高於背景水準之顯著的活化效應 T 細胞裂解(圖 3F)，而相同抗體以劑量依賴性方式誘導對活化之 Treg 強烈之 NK 細胞介導之 ADCC 活性(圖 3G)。值得注意的是，與單獨 pab1876、單獨 pab2049 或 pab1876 及 pab2049 之組合相比，DuoBody pab1876×pab2049 誘導較高程度之活化 Treg 裂解。

#### 8.2.5 在葡萄球菌腸毒素 A(SEA)刺激後抗 GITR/OX40 雙特異性抗體對人類 T 細胞之作用

[0363] 在葡萄球菌腸毒素 A(SEA)刺激後評估 DuoBody pab1876×pab2049 對原生人類 T 細胞之功能活性。簡言之，在 37°C 及 5% CO<sub>2</sub> 下將經由 Ficoll 梯度 (Research Blood Components 有限責任公司)自健康供者白細胞層分離之 PBMC 在補充有 100 ng/ml SEA 超抗原 (Sigma-Aldrich 公司)及 10%熱滅活 FBS 以及遞增濃度之測試抗體(7 點劑量滴定，0.02 至 20 µg/ml)之 RPMI 培養基中培育 5 天。在培育後，使用 AlphaLISA 免疫分析 (Perkin-Elmer 公司)分析無細胞上清液中之 IL-2 產生。使用 EnVision<sup>®</sup>多標記盤讀取器(Perkin-Elmer 公司)收集數據且使用 IL-2 標準曲線確定 IL-2 之濃度。將值使用 Graphpad Prism 軟體內插及作圖。



[0364] DuoBody pab1876×pab2049 在該使用來自兩個供者之細胞的原生人類 PBMC 分析中誘導 IL-2 產生(圖 4A 及 4B)。重要的是，DuoBody pab1876×pab2049 能夠以藥理學相關抗體濃度誘導高度之 IL-2 產生。由 DuoBody pab1876×pab2049 誘導之 IL-2 產生為在較寬之抗體濃度範圍(例如圖 4A 中之 0.08 µg/ml 至 20 µg/ml 及圖 4B 中之 0.009 µg/ml 至 20 µg/ml)內抗體濃度之實質上遞增函數。

### 8.3 實施例 3：作為拮抗劑抗體之抗 GITR/OX40 雙特異性抗體

[0365] GITR 及 OX40 信號傳導之活化依賴於受體簇集以形成較高級之受體複合物，其有效募集頂端銜接蛋白以驅動細胞內信號轉導。不受理論所束縛，部分 8.2.4 中所示之 DuoBody pab1876×pab2049 之促效活性之一個可能之機制係藉由經由輔助骨髓或淋巴樣細胞(例如樹突細胞、單核球、巨噬細胞、自然殺手(NK)細胞及/或 B 細胞)上 Fc-Fc 受體(FcR)之共接合以使 GITR 受體及/或 OX40 受體簇集。表現 FcR 之一些腫瘤細胞亦可介導抗體簇集，例如血液學癌症(急性骨髓性白血病(AML)、漿細胞癌及非霍奇金氏淋巴瘤(NHL))以及某些實體(上皮)腫瘤細胞(例如黑色素瘤)。因此，研發抗 GITR/OX40 雙特異性拮抗劑抗體之一種方法為選擇與 GITR 配體(GITRL)及 OX40 配體(OX40L)競爭結合其對應受體之雙特異性抗體且減少或消

除雙特異性抗體之 Fc 區與 Fc 受體之結合。在此實施例中，研發兩種報導子分析以首先確認在不存在 FcR 相互作用之情況下 DuoBody pab1876×pab2049 之促效活性的損失，且其次研究 DuoBody pab1876×pab2049 拮抗 GITRL 及 OX40L 經由 GITR 及 OX40 受體誘導之信號傳導的能力。

### 8.3.1 抗 GITR/OX40 雙特異性抗體對 GITR NF- $\kappa$ B-螢光素酶報導細胞之作用

[0366] 首先，使用 GITR 報導子分析評估 DuoBody pab1876×pab2049 對 GITR 之促效活性。該報導子分析係使用表現最少量(若存在)之 FcR 之 Jurkat 細胞來構建，從而減小 FcR 介導之 GITR 分子簇集之可能性。

[0367] 藉由將慢病毒載體 (EF1a 啟動子)轉導至 Jurkat 細胞中來產生異位表現 GITR 及 NF- $\kappa$ B-螢光素酶 (奈米螢光素酶，NanoLuc<sup>®</sup>)報導子之細胞。經由單細胞分選(FACS ARIA Fusion)產生穩定純系。藉由流動式細胞量測術驗證 GITR 之表現。為評估促效活性，在 37°C 及 5% CO<sub>2</sub> 下在補充有 10%熱滅活 FBS 之 RPMI 培養基中將 Jurkat-huGITR-NF- $\kappa$ B-螢光素酶細胞與遞增濃度之 DuoBody pab1876×pab2049 或三聚體 GITRL(12 點劑量滴定，0.05 至 10,000 ng/ml)一起培育 2 小時。對於偵測螢光素酶活性，在室溫下在被動裂解緩衝液中將樣品與所製備

之 Nano-Glo<sup>®</sup>螢光素酶分析受質(Promega 公司, 1:1 v/v)一起培育 5 分鐘。使用 EnVision<sup>®</sup>多標記盤讀取器(Perkin-Elmer 公司)收集數據。將值使用 Graphpad Prism 軟體作圖。

[0368] 與誘導高度之如由 RLU(相對螢光素酶單位)所表示之 NF- $\kappa$ B-螢光素酶活性的三聚體 GITRL 相反, DuoBody pab1876 $\times$ pab2049 甚至在所測試之最高濃度下亦顯示最低之 GITR 報導細胞促效活性(圖 5A)。

[0369] 隨後, 研究 DuoBody pab1876 $\times$ pab2049 中和 GITRL 誘導之 NF- $\kappa$ B 信號傳導之能力, 該能力為 DuoBody 之配體阻斷活性之替代結果。

[0370] 簡言之, 將 Jurkat-huGITR-NF- $\kappa$ B-螢光素酶細胞與遞增濃度之 DuoBody pab1876 $\times$ pab2049 或同型對照抗體(10 點劑量滴定, 0.5 至 10,000 ng/ml)一起培育 30 分鐘。接著將樣品用 RPMI 洗滌兩次, 再懸浮於 1  $\mu$ g/ml 之三聚體 GITRL 中且在 37 $^{\circ}$ C 下再培育 2 小時。如上文所述偵測且分析螢光素酶活性。為確定 GITRL 活性%, 將在不添加抗體之情況下 GITRL(1  $\mu$ g/ml)之 RLU 值確定為 100% 活性。相應計算 DuoBody pab1876 $\times$ pab2049 及同型對照之相對值。

[0371] 如圖 5B 中所示, Jurkat-huGITR-NF- $\kappa$ B-螢光素酶報導細胞與遞增濃度之 DuoBody pab1876 $\times$ pab2049 預培育以劑量依賴性方式顯著降低 GITRL 誘導之 NF- $\kappa$ B-螢

光素酶活性。

### 8.3.2 抗 GITR/OX40 雙特異性抗體對 OX40 NF- $\kappa$ B-螢光素酶報導細胞之作用

[0372] 類似地，研發 OX40 報導子分析以測試 DuoBody pab1876×pab2049 對表現 OX40 之細胞的促效活性。此 OX40 報導子分析亦使用 FcR 表現最低之 Jurkat 細胞來構築。

[0373] 藉由將慢病毒載體 (EF1a 啟動子) 轉導至 Jurkat 細胞中來產生異位表現 OX40 及 NF- $\kappa$ B-螢光素酶 (奈米螢光素酶，NanoLuc<sup>®</sup>) 報導子之細胞。經由單細胞分選 (FACS ARIA Fusion) 產生穩定純系。藉由流動式細胞量測術驗證 OX40 之表現。為評估促效活性，在 37°C 及 5% CO<sub>2</sub> 下在補充有 10% 熱滅活 FBS 之 RPMI 培養基中將 Jurkat-huOX40-NF- $\kappa$ B-螢光素酶細胞與遞增濃度之多聚體 OX40L、DuoBody pab1876×pab2049 或同型對照抗體 (10 點劑量滴定，0.5 至 10,000 ng/ml) 一起培育 2 小時。對於偵測螢光素酶活性，在室溫下在被動裂解緩衝液中將樣品與所製備之 Nano-Glo<sup>®</sup> 螢光素酶分析受質 (Promega 公司，1:1 v/v) 一起培育 5 分鐘。使用 EnVision<sup>®</sup> 多標記盤讀取器 (Perkin-Elmer 公司) 收集數據。將值使用 Graphpad Prism 軟體作圖。

[0374] 雖然多聚體 OX40L 在較寬之濃度範圍內誘導

NF- $\kappa$ B-螢光素酶活性，但在與 DuoBody pab1876×pab2049 一起培育之後觀測到最小之螢光素酶信號(圖 6A)。

[0375] 隨後，評定 DuoBody pab1876×pab2049 阻斷 OX40L 誘導之 NF- $\kappa$ B 信號傳導之能力。將 Jurkat-huOX40-NF- $\kappa$ B-螢光素酶細胞與遞增濃度之 DuoBody pab1876×pab2049 或同型對照抗體(10 點劑量滴定，0.5 至 10,000 ng/ml)一起培育 30 分鐘。接著將樣品用 RPMI 洗滌兩次，再懸浮於 1  $\mu$ g/ml 之多聚體 OX40L 中且在 37°C 下再培育 2 小時。如上文所述偵測且分析螢光素酶活性。為確定 OX40L 活性%，將在不添加抗體之情況下 OX40L(1  $\mu$ g/ml)之 RLU 值確定為 100%活性。相應計算 DuoBody pab1876×pab2049 及同型對照之相對值。

[0376] 如圖 6B 中所示，Jurkat-huOX40-NF- $\kappa$ B-螢光素酶報導細胞與遞增濃度之 DuoBody pab1876×pab2049 預培育以劑量依賴性方式顯著降低 OX40L 誘導之 NF- $\kappa$ B-螢光素酶活性。

#### 8.4 實施例 4：抗 GITR 抗體之表位定位

[0377] 此實施列表徵下列抗 GITR 抗體之結合表位：嵌合親本 231-32-15 抗體及其人類化型式(pab1876、pab1875、pab1967、pab1975 及 pab1979)。此外，在一些研究中亦使用命名為 m6C8 之參考抗 GITR 抗體來進行比較。抗體 m6C8 係基於 PCT 申請公開案第 WO

2006/105021 號(以引用方式併入本文)中所提供之抗體 6C8 之可變區來產生。對應於此等抗 GITR 抗體之重鏈可變區及輕鏈可變區之 SEQ ID NO 列於表 12 中。

表 12. 抗 GITR 抗體之 VH 及 VL 序列

抗體	VH (SEQ ID NO:)	VL (SEQ ID NO:)
231-32-15	101	102
pab1876	18	19
pab1875	18	103
pab1967	20	21
pab1975	22	23
pab1979	24	23
m6C8	104	105

#### 8.4.1 表位競爭——細胞結合分析

[0378] 為確認人類化變異抗體保留嵌合 231-32-15 親本抗體之表位特異性，進行細胞結合分析。收集表現嵌合親本 231-32-15 抗體之 1624-5 前 B 細胞且將  $1 \times 10^6$  個細胞再懸浮於 200  $\mu$ l FACS 緩衝液加上以下物質中：i)與 2  $\mu$ g 嵌合親本 231-32-15 抗體預培育 15 分鐘之生物素化之 GITR(GITR-bio) (1:1000)；ii)與 2  $\mu$ g pab1875 預培育 15 分鐘之 GITR-bio(1:1000)；iii)與 2  $\mu$ g pab1876 預培育 15 分鐘之 GITR-bio(1:1000)；或 iv)GITR-bio(1:1000)。將細胞在 4°C 下培育 20 分鐘且接著用 4 ml FACS 緩衝液洗滌且在 4°C 下以 300 g 離心 5 分鐘。將細胞沈澱物再懸浮於 200  $\mu$ l FACS 緩衝液加上鏈黴親和素-PE(1:1000)中且接著

如前所述培育及洗滌。接著將細胞再懸浮於 200  $\mu$ l FACS 緩衝液中以使用 FACS-AriaII(BD Biosciences 公司)分析。

[0379] 圖 7 顯示人類化變異抗體保留嵌合親本 231-32-15 抗體之表位特異性。右側曲線顯示 GITR-bio 與表現嵌合親本 231-32-25 抗體之 1624-5 前 B 細胞之結合。然而，當將 GITR-bio 與嵌合親本 231-32-15、pab1875 或 pab1876 抗體預培育時，存在 GITR-bio 與 1624-5 細胞之結合損失(左側曲線)。重疊之 FACS 曲線表明人類化變異體亦彼此且與嵌合親本 231-32-15 抗體顯示極相似之 GITR 結合特性。

#### 8.4.2 表位競爭——懸浮陣列技術

[0380] 將抗 GITR 抗體(25  $\mu$ l)在分析緩衝液(Roche 公司，11112589001)中稀釋至 2  $\mu$ g/ml 且在暗處在振盪條件下在 0.5 ml LoBind 管(Eppendorf 公司，0030108.116)中與偶聯抗人類 IgG(F(ab)<sub>2</sub> 特異性，JIR 公司，105-006-097)之 1500 個 Luminex<sup>®</sup> 珠粒(5  $\mu$ l，Luminex 公司，編號：5 LC10005-01)一起培育隔夜。接著將此混合物轉移至預潤濕之 96 孔過濾盤(Millipore 公司，MABVN1250)中。將盤用 200 微升/孔 PBS 洗滌兩次以移除未結合之抗體。同時，在暗處以 650 rpm 將 20  $\mu$ g/ml 之相同抗 GITR 抗體、不同抗 GITR 抗體、或分析緩衝液與 20  $\mu$ l(1  $\mu$ g/ml)R-PE 標記之 GITR 抗原(R&D systems 公司，二硫鍵連接之同二

聚體；689-GR；內部用 AbDSerotec 公司之 LYNX 套組 (LNK022RPE)標記)一起培育 1 小時。將珠粒混合物與抗原/抗體混合物 1:1 混合(各 20  $\mu$ l)且在振盪條件(20°C、650 rpm)下再培育一小時。在量測之前直接將 40  $\mu$ l 之分析緩衝液添加至各孔中且使用 Luminex<sup>®</sup> 200 系統(Millipore 公司)及 48  $\mu$ l 樣品體積中 100 個珠粒之讀數進行分析。使用非競爭對照(100%結合，僅分析緩衝液作為競爭化合物)之 MFI 值來確定結合。

[0381] 當使用嵌合親本 231-32-15 抗體作為捕捉抗體時，觀測到與人類化抗體 pab1875 及 pab1876 兩者之完全結合競爭。當使用抗 GITR 抗體 m6C8 作為捕捉抗體時，未觀測到與嵌合親本 231-32-15 抗體或兩種人類化變異體 pab1875 及 pab1876 之結合競爭(數據未示)。此等結果表明 m6C8 與本文所述之抗 GITR 抗體識別人類 GITR 上之不同表位。

#### 8.4.3 表位競爭——表面電漿共振

[0382] 對於使用表面電漿共振之表位框併(epitope binning)，使用「串聯方法」(Abdiche YN 等人，(2009) *Analytical Biochemistry*, 386: 172-180)。為了該目的，使用不同密度之 GITR 抗原(R&D systems 公司，二硫鍵連接之同二聚體；689-GR)之固定在 CM5 感應器晶片(GE Healthcare 公司，S CM5 系列，BR-1005-30)上產生不同晶



片表面。流槽 2 容納低密度(667 RU)之 GITR 抗原，在流槽 3 中評定中等密度(1595 RU)且在流槽 4 中，達成高密度(4371 RU)。在流槽 1 中，固定卵白蛋白(1289 RU，Pierce ThermoFisher 公司，77120)用於參考。根據來自製造商(GE Healthcare 公司)之用於胺偶聯之標準方案(用 0.4 M EDC 及 0.1 M NHS 活化表面，GE Healthcare 胺偶聯套組，BR-1000-50)來進行固定。用 1 M 乙醇-胺-HCl(pH 8.5)使未反應基團失活。之後，使 300 nM(45 µg/ml)濃度之抗 GITR 抗體以 5 微升/分鐘通過不同表面，持續 240 秒。使用此等條件，應已達到 GITR 表面之飽和。在添加競爭性抗體(300 nM，5 微升/分鐘)之前包括 60 秒之解離時間。使用 10 mM 甘胺酸(pH 2.0) (GE Healthcare 公司，BR-1003-55)以 10 微升/分鐘進行晶片表面之再生，持續 60 秒。使用非競爭對照(100%結合，飽和條件)之反應單位(RU)數進行框併。

[0383] 如圖 8 中所示，當嵌合親本 231-32-15 抗體首先結合至 GITR 時，不存在此抗體之進一步結合。然而，當嵌合親本 231-32-15 抗體首先結合至 GITR 且施加抗體 m6C8 時，此抗體仍能結合至 GITR。

#### 8.4.4 表位定位——PCR 突變誘發及丙胺酸掃描

[0384] 為了定位 GITR 上與本文所述之抗 GITR 抗體結合之表位，使用易錯 PCR 產生人類 GITR 抗原之變異

體。使變異型 GITR 蛋白表現在細胞庫中細胞之表面上且針對抗 GITR 抗體之結合篩選此等細胞。作為陽性對照，使用多株抗 GITR 抗體確認 GITR 蛋白質之正確摺疊。對於存在減少之抗體結合或不存在抗體結合之人類 GITR 抗原變異體，進行丙胺酸掃描突變誘發以確定為由本文所述之抗 GITR 抗體結合所需之精確表位殘基。

#### 8.4.4.1 人類 GITR 變異體之產生

[0385] 使用易錯 PCR 突變誘發以產生在細胞外結構域中具有隨機突變之人類 GITR 變異體。對於易錯 PCR，根據製造商之說明書使用 GeneMorphII 隨機突變誘發套組 (Stratagene 公司)。簡言之，使用作為模板之內部構築體 (13 ng，構築體編號：4377 pMA-T-huGITR)、0.05 U/ $\mu$ l Mutazyme II DNA 聚合酶、1 $\times$ Mutazyme II 反應緩衝液、0.2  $\mu$ M 之各引子及 0.2 mM 各去氧核苷三磷酸 (dATP、dCTP、dGTP 及 dTTP) 以 50  $\mu$ l 之體積進行 20 個 PCR 循環。使用下列程序藉由 PCR (德國 Eppendorf 公司) 擴增樣品：95 $^{\circ}$ C 持續 2 分鐘；95 $^{\circ}$ C 持續 30 秒、56 $^{\circ}$ C 持續 30 秒、72 $^{\circ}$ C 持續 1 分鐘之 20 個循環；及 72 $^{\circ}$ C 持續 10 分鐘之最終延伸步驟。使用 1% 瓊脂糖凝膠對 PCR 產物進行凝膠純化，將對應於 720 bp 之預期尺寸之 DNA 條帶剪出且使用 NucleoSpin 凝膠及 PCR 淨化套組 (Macherey&Nagel 公司) 根據產品手冊進行凝膠提取。使用 T4 DNA 連接酶及 1:3

之比率(載體:插入物)經由 XhoI/EcoRI 位點將純化之 DNA 連接至內部表現載體中。在 2 小時之後用在 65°C 下進行 10 分鐘之熱變性步驟停止連接(25°C)。使用酵母 t-RNA 使來自連接反應之 DNA 進行 EtOH 沈澱。使用標準消化及連接技術。將連接反應物電穿孔至 DH10B 細胞(大腸桿菌 ElectroMax DH10B 電感受態細胞, Invitrogen 公司; 1900 V/5 ms)中。將電穿孔之細菌接種至 LB 瓊脂+100 µg/ml 安比西林(ampicillin)平板上且獲得約  $1.9 \times 10^8$  個菌落。

[0386] 接著自平板刮下所有電穿孔之細菌且用於根據製造商之說明書進行大規模 DNA 質體製備 (Macherey&Nagel 公司, NucleoBond Xtra Maxi Plus 套組) 以產生 DNA 庫。使用 XhoI/EcoRI 及 BsrGI/EcoRI 進行限制酶消化以對庫進行品質控制。挑取單個純系且送去定序以確定最終之庫多樣性。

#### 8.4.4.2 具有人類 GITR 變異體之細胞庫之產生

[0387] 使用先轉染, 繼而轉導之標準技術以在 1624-5 細胞表面上表現人類 GITR 突變體。對於反轉錄病毒顆粒之產生, 使用 X-tremeGENE 9 DNA 轉染試劑(德國 Roche Diagnostics 有限公司)將 DNA 庫及表現反轉錄病毒蛋白質 Gag、Pol 及 Env 之載體轉染至反轉錄病毒包裝細胞株(HEK 細胞)中。所得之反轉錄病毒顆粒在反轉錄病毒包裝細胞之細胞培養上清液中積聚。在轉染後兩天時, 收

集無細胞之含有病毒載體顆粒之上清液且對 1624-5 細胞進行旋轉感染 (spin-infection)。獲得約 4% 之轉導效率 (表現人類 GITR 之細胞%)。在再連續培養至少一天時，使用嘌呤黴素 (1.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 選擇細胞。未轉導之細胞用作陰性對照 (NC)。在抗生素選擇之後，大部分細胞在細胞表面上穩定表現人類 GITR 抗原庫。經由 Ficoll 分離步驟移除非存活細胞。

[0388] 使用 FACS 以使用多株抗 GITR 抗體選擇表現正確摺疊之人類 GITR 突變體之細胞且隨後選擇表現不結合抗 GITR 嵌合親本 231-32-15 抗體之人類 GITR 變異體之個別細胞。簡言之，藉由 FACS 分析抗體結合細胞且藉由製備型高速 FACS (FACSAriaII, BD Biosciences 公司) 將表現出特異性抗體結合之細胞與非結合細胞群體分離。在組織培養中再次擴增抗體反應性或非反應性細胞池且由於反轉錄病毒轉導之細胞的穩定表現表型，重複抗體導向細胞分選及組織培養擴增之循環，直至獲得明確可偵測之抗 GITR 抗體 (嵌合親本 231-32-15) 非反應性細胞群體之時為止。對此抗 GITR 抗體 (嵌合親本 231-32-15) 非反應性細胞群體進行最終之單細胞分選步驟。在細胞擴增數日之後，在 FACSCalibur (BD Biosciences 公司) 上使用 96 孔盤分析再次測試單細胞分選之細胞與抗 GITR 嵌合親本 231-32-15 抗體之非結合及與多株抗 GITR 抗體之結合。

#### 8.4.4.3 表位分析

[0389] 為了使表型(多株抗 GITR+、嵌合親本 231-32-15-)與基因型相關聯，對單細胞分選之 huGITR 變異體進行定序。圖 9A 及 9B 顯示來自此等變異體之序列之比對。圖 9A 及 9B 中之胺基酸殘基係根據人類 GITR 之未成熟胺基酸序列(SEQ ID NO:41)來編號。定序識別出具有增加之突變或「熱點」(例如 P62 及 G63)之區域，從而提供有關人類 GITR 上由抗 GITR 嵌合親本 231-32-15 抗體識別之表位的指示。

[0390] 為了確認人類 GITR 之參與結合抗 GITR 抗體之精確胺基酸，對熱點胺基酸進行丙胺酸置換。分別將下列位置(根據 SEQ ID NO:41 編號)突變成丙胺酸：P28A、T29A、G30A、G31A、P32A、T54A、T55A、R56A、C57A、C58A、R59A、D60A、Y61A、P62A、G63A、E64A、E65A、C66A、C67A、S68A、E69A、W70A、D71A、C72A、M73A、C74A、V75A 及 Q76A。使用先轉染，繼而轉導之標準技術以在 1624-5 細胞表面上表現此等人類 GITR 丙胺酸突變體。

[0391] 最終，在流動式細胞量測術(FACSCalibur；BD Biosciences 公司)中測試 1624-5 細胞上表現之丙胺酸突變體與抗 GITR 人類化抗體 pab1876、pab1967、pab1975 及 pab1979 以及參考抗體 m6C8 之結合。簡言之，在 4°C 下將表現個別人類 GITR 丙胺酸突變體之 1624-

5 細胞與在 100  $\mu$ l FACS 緩衝液(PBS+2% FCS)中稀釋之 2  $\mu$ g/ml 之單株抗 GITR 抗體 pab1876、pab1967、pab1975、pab1979 或 m6C8；或與 APC 結合之多株抗 GITR 抗體 (AF689, R&D systems 公司)、及 Fc 受體阻斷劑(1:200；BD 公司，目錄號：553142)一起培育 20 分鐘。在洗滌後，若需要偵測，則在 4°C 下將細胞與在 100  $\mu$ l FACS 緩衝液(PBS+2% FCS)中稀釋之二級抗 IgG 抗體(與 APC 結合；BD 公司，目錄號：109-136-097)一起培育 20 分鐘。接著洗滌細胞且使用流式細胞儀(BD Biosciences 公司)獲得該等細胞。將測試之單株抗體之平均螢光強度(MFI)值除以多株抗體之 MFI 值，從而產生個別 GITR 丙胺酸突變體之 MFI 比率(單株抗體/多株抗體)。基於所有突變體之個別 MFI 比率計算平均 MFI 比率(「AMFI 比率」)。圖 10A 為彙總 pab1876、pab1967、pab1975、pab1979 及參考抗體 m6C8 與表現人類 GITR 丙胺酸突變體之 1624-5 細胞之結合的表。認為高於 AMFI 比率之 60%之個別 MFI 比率指示在正規化之後與多株抗體相似之結合且在圖 10A 中由「+」表示。介於 AMFI 比率之 30%與 60%之間的個別 MFI 比率在圖 10A 中由「+/-」表示。低於 AMFI 比率之 30%之個別 MFI 比率在圖 10A 中由「-」表示。

[0392] 如圖 10A 中所示，D60A 突變體及 G63A 突變體(根據 SEQ ID NO:41 來編號)特異性破壞或減弱 pab1876、pab1967、pab1975 及 pab1979 之結合，而不破

壞或減弱參考抗體 m6C8 之結合。C58A 突變體破壞所有五種抗體之結合且可能為結構突變，而非表位特異性突變。C74A 突變體具有較弱之表現且不能用於結合比較。

[0393] 此外，比較抗 GITR 抗體 231-32-15、pab1876 及 m6C8 與野生型或突變型人類 GITR 之結合。簡言之，如上文所述使野生型人類 GITR 及兩種 GITR 丙胺酸突變體(D60A 突變體及 G63A 突變體，其係根據 SEQ ID NO:41 編號)在 1624-5 細胞表面上表現且如上文所述在流動式細胞量測術分析中測試，其中將細胞首先使用 2  $\mu\text{g/ml}$  之單株抗體 231-32-15、pab1876 及 m6C8、或與 APC 結合之多株抗體染色，且接著若需要偵測，則使用二級抗 IgG 抗體(與 APC 結合；1:1000；BD 公司，目錄號：109-136-097)染色。將所有平均螢光強度(MFI)值計算為兩次量測之平均值。將所測試之單株抗體對特定細胞類型之 MFI 值除以多株抗體對相同細胞類型之 MFI 值，從而產生總共九個 MFI 比率(單株抗體/多株抗體)：MFI 比率<sub>231-32-15,WT</sub>、MFI 比率<sub>pab1876,WT</sub>、MFI 比率<sub>m6C8,WT</sub>、MFI 比率<sub>231-32-15,D60A</sub>、MFI 比率<sub>pab1876,D60A</sub>、MFI 比率<sub>m6C8,D60A</sub>、MFI 比率<sub>231-32-15,G63A</sub>、MFI 比率<sub>pab1876,G63A</sub> 及 MFI 比率<sub>m6C8,G63A</sub>。藉由將 GITR 丙胺酸突變體之特定 MFI 比率除以野生型之相應 MFI 比率(例如用 MFI 比率<sub>pab1876,D60A</sub> 除以 MFI 比率<sub>pab1876,WT</sub>)來計算相對於與野生型 GITR 之結合，抗體與 GITR 丙胺酸突變體之結合百分比。結合減少

百分比係藉由計算例如  $100\% \times (1 - (\text{MFI 比率}_{\text{pab1876,D60A}} / \text{MFI 比率}_{\text{pab1876,WT}}))$  來確定。

[0394] 如圖 10B 中所示，D60A 突變體及 G63A 突變體特異性破壞或減弱 231-32-15 及 pab1876 之結合，而不破壞或減弱 m6C8 之結合。圖 10B 中所示之百分比為各圖中 GITR 陽性細胞之百分比。當使用表現 GITR D60A 之細胞測試時，231-32-15 及 pab1876 之抗體結合分別減少 82% 及 88%，相比之下，m6C8 之抗體結合減少 10%。類似地，當使用表現 GITR G63A 之細胞測試時，231-32-15 及 pab1876 之結合分別減少 37% 及 59%，而 m6C8 之結合增加 62%。

[0395] 作為抗 GITR 抗體之結合特徵之進一步證據，比較該等抗體與石蟹獼猴 GITR 之結合。石蟹獼猴 GITR 之未成熟蛋白質包含胺基酸序列 SEQ ID NO:44。為了增加蛋白質表現，將石蟹獼猴 GITR 之信號肽之第一個殘基置換為甲硫胺酸，從而產生 V1M 石蟹獼猴 GITR。接著產生突變型石蟹獼猴 GITR V1M/Q62P/S63G，其中位置 62 及 63 處之胺基酸殘基(GlnSer) (根據 SEQ ID NO:44 編號) 經人類 GITR 中之相應殘基(ProGly)置換。圖 11A 為人類 GITR、V1M 石蟹獼猴 GITR、及 V1M/Q62P/S63G 石蟹獼猴 GITR 之間的序列比對。如上文所述使圖 11A 中所示之三種蛋白質在 1624-5 細胞表面上表現且如上文所述在流動式細胞量測術分析中測試，其中將細胞首先使用 2



μg/ml 之單株抗體 231-32-15、pab1876 及 m6C8、或與 APC 結合之多株抗體染色，且接著使用二級抗 IgG 抗體 (與 APC 結合；1:1000；BD 公司，目錄號：109-136-097) 染色。

[0396] 如圖 11B 中所示，抗 GITR 抗體 231-32-15 及 pab1876 顯示僅與表現 V1M/Q62P/S63G 石蟹獼猴 GITR 之細胞結合，而不與表現 V1M 石蟹獼猴 GITR 之細胞結合。

## 8.5 實施例 5：抗 OX40 抗體之表位定位

[0397] 此實施列表徵抗 OX40 抗體 pab1949w、pab2049 及參考抗 OX40 抗體 pab1928 之表位。抗體 pab1928 係基於美國專利公開案第 US 2013/0280275 號(以引用之方式併入本文中)中所提供之抗體 Hu106-122 之可變區而產生。pab1928 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:106 之重鏈及胺基酸序列 SEQ ID NO:107 之輕鏈。

### 8.5.1 表位定位——丙胺酸掃描

[0398] 藉由丙胺酸掃描評定 pab1949w、pab2049 及參考抗體 pab1928 之結合特徵。簡言之，使用 QuikChange HT 蛋白質工程改造系統(Agilent Technologies 公司，G5901A)產生在細胞外結構域中具有丙胺酸取代之人類 OX40 突變體。如上文所述使用先轉染，繼而轉導之

標準技術使人類 OX40 突變體在 1624-5 細胞表面上表現。

[0399] 在如由在流動式細胞量測術中與多株抗 OX40 抗體之結合所證實的表現正確摺疊之人類 OX40 突變體之細胞中進一步選擇表現不結合單株抗 OX40 抗體 pab1949w、pab2049 或 pab1928 之人類 OX40 突變體的子群。藉由製備型高速 FACS(FACS AriaII, BD Biosciences 公司)將表現出特異性抗體結合之細胞與非結合細胞群體分離。在組織培養中再次擴增抗體反應性或非反應性細胞池且由於反轉錄病毒轉導之細胞的穩定表現表型，重複抗體導向細胞分選及組織培養擴增之循環直至獲得明確可偵測之抗 OX40 抗體(pab1949w、pab2049 或 pab1928)非反應性細胞群體之時為止。對此抗 OX40 抗體非反應性細胞群體進行最終之單細胞分選步驟。在細胞擴增數日之後，再次使用流動式細胞量測術來測試單細胞分選之細胞與多株抗 OX40 抗體之結合及與單株抗體 pab1949w、pab2049 或 pab1928 之非結合。簡言之，將表現個別人類 OX40 丙胺酸突變體之 1624-5 細胞與單株抗 OX40 抗體 pab1949w、pab2049 或 pab1928 一起培育。對於各抗體，測試兩個抗體濃度(pab1949w：2  $\mu\text{g/ml}$  及 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ；pab2049：1.8  $\mu\text{g/ml}$  及 0.3  $\mu\text{g/ml}$ ；pab1928：1.1  $\mu\text{g/ml}$  及 0.4  $\mu\text{g/ml}$ )。以 1:2000 稀釋與 APC 結合之多株抗 OX40 抗體(AF3388, R&D systems 公司)。添加 Fc 受體阻斷劑(1:200；BD 公

司，目錄號：553142)，且在 4°C 下將樣品培育 20 分鐘。在洗滌後，若需要偵測，則在 4°C 下將細胞與二級抗 IgG 抗體(與 PE 結合；BD 公司，目錄號：109-116-097)一起培育 20 分鐘。接著洗滌細胞且使用流式細胞儀(BD Biosciences 公司)獲得該等細胞。

[0400] 為使表型(多株抗 OX40 抗體+、單株抗 OX40 抗體-)與基因型相關聯，對單細胞分選之人類 OX40 突變體進行定序。圖 12 為顯示仍結合多株抗 OX40 抗體，但不結合單株抗 OX40 抗體 pab1949w、pab2049 或 pab1928 之人類 OX40 丙胺酸突變體的表。所有殘基係根據人類 OX40 之成熟胺基酸序列(SEQ ID NO:72)編號。基於流動式細胞量測術分析，「+」指示結合且「-」指示結合損失。

\*\*\*

[0401] 本發明之範疇不受本文所述之特定具體實例限制。實際上，除所述之修改之外，對本發明之各種修改對於熟習此項技術者而言亦因上述描述及隨附圖式而將變得顯而易見。此等修改意欲落入隨附申請專利範圍之範疇內。

[0402] 本文引用之所有參考文獻(例如公開案或專利或專利申請案)出於所有目的以全文引用的方式併入本文中，其引用程度就如同特定且個別指示各個別參考文獻(例如公開案或專利或專利申請案)出於所有目的以全文引

用之方式併入本文中一般。

[0403] 其他具體實例落入下列申請專利範圍內。

## 序列表

- <110> 美商艾吉納斯公司(Agenus)  
紀念斯隆凱特琳癌症中心(Memorial Sloan-Kettering Cancer Center)  
盧德威格癌症研究協會(Ludwig Institute for Cancer Research Ltd.)
- <120> 抗體和使用彼之方法
- <140> TW 110102049  
<141> 2016-12-02
- <150> US 62/419,911  
<151> 2016-11-09
- <150> US 62/262,369  
<151> 2015-12-02
- <160> 136
- <170> PatentIn 3.5 版
- <210> 1  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> GITR HCDR1 共同序列
- <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Xaa 為 Asp、Gly 或 Glu
- <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5)..(5)  
<223> Xaa 為 Tyr 或 His

<400> 1

Xaa Tyr Ala Met Xaa

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GITR HCDR2 共同序列

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1).. (1)

<223> Xaa 為 Val 或 Leu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8).. (8)

<223> Xaa 為 Asp 或 Gly

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10).. (10)

<223> Xaa 為 Thr 或 Ser

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (16).. (16)

<223> Xaa 為 Lys、Arg 或 Gln

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (17).. (17)

<223> Xaa 為 Asp、Glu 或 Gly

<400> 2

Xaa Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Xaa Val Xaa Tyr Asn Gln Lys Phe Xaa  
 1                    5                    10                    15

Xaa

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GITR HCDR3 共同序列(pab1876/pab1967/pab1975/pab1979 HCDR3)

<400> 3

Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr  
 1                    5

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GITR LCDR1 共同序列

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa 為 Gly 或 Ser

<400> 4

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Xaa Asn Gln Lys Asn Tyr Leu  
 1                    5                    10                    15

Thr

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GITR Lcdr2 共同序列 (pab1876/pab1967/pab1975/pab1979 Lcdr2)

<400> 5

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1                    5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GITR Lcdr3 共同序列

<220>

<221> MISC\_FEATURE



<222> (3).. (3)  
<223> Xaa 為 Asp 或 Glu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6).. (6)  
<223> Xaa 為 Tyr 或 Phe

<400> 6

Gln Asn Xaa Tyr Ser Xaa Pro Tyr Thr  
1                      5

<210> 7  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> pab1876 HCDR1

<400> 7

Asp Tyr Ala Met Tyr  
1                      5

<210> 8  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> pab1967 HCDR1

<400> 8

Gly Tyr Ala Met His

1                    5

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1975/pab1979 HCDR1

<400> 9

Glu Tyr Ala Met His

1                    5

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1876 HCDR2

<400> 10

Val Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Asp Val Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1                    5                    10                    15

Asp

<210> 11

<211> 17

<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> pab1967 HCDR2

<400> 11

Leu Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Gly Val Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Arg  
1                    5                    10                    15

Glu

<210> 12  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> pab1975 HCDR2

<400> 12

Leu Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Gly Val Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Gln  
1                    5                    10                    15

Gly

<210> 13  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> pab1979 HCDR2

<400> 13

Val Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Gly Val Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Gln  
1                   5                           10                           15

Glu

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1876/pab1975/pab1979 LCDR1

<400> 14

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu  
1                   5                           10                           15

Thr

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1967 LCDR1

<400> 15

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu  
 1                    5                    10                    15

Thr

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1876/pab1975/pab1979 LCDR3

<400> 16

Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr  
 1                    5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1967 LCDR3

<400> 17

Gln Asn Glu Tyr Ser Phe Pro Tyr Thr  
 1                    5

<210> 18  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> pab1876 VH

<400> 18

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 Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
                   20                    25                    30

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

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

Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65                    70                    75                    80

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

Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
                   100                    105                    110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 19

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1876 VL

<400> 19

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20

25

30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35

40

45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50

55

60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65

70

75

80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr His Cys Gln Asn

85

90

95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
 100 105 110

Lys

<210> 20  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> pab1967 VH

<400> 20

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 Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30

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

Gly Leu Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Gly Val Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Arg Glu Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80



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

Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Ile Thr Val Ser Ser  
115

<210> 21  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> pab1967 VL

<400> 21

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser  
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65                                70                                75                                80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr His Cys Gln Asn  
                                  85                                90                                95

Glu Tyr Ser Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
                                  100                                105                                110

Lys

<210> 22  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> pab1975 VH

<400> 22

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 Glu Tyr  
                                  20                                25                                30

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

Gly Leu Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Gly Val Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

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

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

Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 23

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1975/pab1979 VL

<400> 23

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser  
 20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80

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

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
 100 105 110

Lys

<210> 24  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> pab1979 VH

<400> 24

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 Glu Tyr  
 20 25 30

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

Gly Val Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Gly Val Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

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

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

Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 25

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GITR VH 共同序列

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (24).. (24)

<223> Xaa 為 Gly 或 Ala

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (31).. (31)

<223> Xaa 為 Asp、Gly 或 Glu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (35).. (35)

<223> Xaa 為 Tyr 或 His

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (48).. (48)

<223> Xaa 為 Ile 或 Met

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (50).. (50)

<223> Xaa 為 Val 或 Leu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (57).. (57)

<223> Xaa 為 Asp 或 Gly

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (59).. (59)

<223> Xaa 為 Thr 或 Ser

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (65).. (65)  
 <223> Xaa 為 Lys、Arg 或 Gln

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (66).. (66)  
 <223> Xaa 為 Asp、Glu 或 Gly

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (68).. (68)  
 <223> Xaa 為 Ala 或 Val

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (74).. (74)  
 <223> Xaa 為 Lys 或 Thr

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (114).. (114)  
 <223> Xaa 為 Val 或 Ile

<400> 25

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 Xaa Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Xaa Tyr  
                   20                                    25                                    30

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

Gly Xaa Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Xaa Val Xaa Tyr Asn Gln Lys Phe





&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (84)..(84)

&lt;223&gt; Xaa 為 Leu 或 Val

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (93)..(93)

&lt;223&gt; Xaa 為 His 或 Tyr

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (97)..(97)

&lt;223&gt; Xaa 為 Asp 或 Glu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (100)..(100)

&lt;223&gt; Xaa 為 Tyr 或 Phe

&lt;400&gt; 26

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser  
                   20                    25                    30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
                   50                    55                    60



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

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

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

Ala Arg

<210> 28

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GITR VL 生殖系 IGKV4-1\*01

<400> 28

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser  
 20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro  
 100

<210> 29

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1876 HC IgG1

<400> 29

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 Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

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

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

Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 30

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1876 HC IgG1 N297A

<400> 30

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 Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

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

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

Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

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

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

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

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



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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 31  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>

<223> pab1876 HC IgG1 F405L

<400> 31

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 Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
                  20                   25                   30

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

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

Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65                   70                   75                   80

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

Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
                  100                   105                   110

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
     210                                    215                                    220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
     225                                    230                                    235                                    240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
     245                                    250                                    255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
     260                                    265                                    270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
     275                                    280                                    285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 32  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> pab1876 HC IgG1 F405L N297A

<400> 32

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 Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
                   20                    25                    30

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

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

Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65                    70                    75                    80

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

Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
                   100                    105                    110

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350

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

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

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

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



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

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

<210> 33

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1876 HC IgG1 F405L L234F L235E D265A

<400> 33

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 Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

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

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

Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 34  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> pab1876 HC IgG1 K409R

<400> 34

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 Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

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

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

Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 35

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1876 HC IgG1 K409R N297A

<400> 35

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 Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

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

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

Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

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

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

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



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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 36  
 <211> 445  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; pab1876 HC IgG4 S228P

&lt;400&gt; 36

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 Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
                   20                    25                    30

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

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

Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65                    70                    75                    80

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

Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
                   100                    105                    110

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys  
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu  
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln  
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 340 345 350

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

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 370 375 380

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

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

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

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

<210> 37  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> pab1876w LC

<400> 37

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser  
 20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr His Cys Gln Asn  
 85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
 100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
 115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
 130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu  
 145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
 165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
 180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
 195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215 220

<210> 38  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>

<223> pab1876 LC T109S

<400> 38

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser  
                  20                   25                   30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
          50                   55                   60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65                   70                   75                   80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr His Cys Gln Asn  
                  85                   90                   95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
                  100                   105                   110

Lys Arg Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
          115                   120                   125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
          130                   135                   140



Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu  
 145                                    150                                    155                                    160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
     165                                    170                                    175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
     180                                    185                                    190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
     195                                    200                                    205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
     210                                    215                                    220

<210> 39

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1876 HC IgG1 K409R L234F L235E D265A

<400> 39

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
     20                                    25                                    30

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

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

Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 40

<211> 216

<212> PRT

<213> 智人

<400> 40

Gln Arg Pro Thr Gly Gly Pro Gly Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu



Gly Leu His Ile Trp Gln Leu Arg Ser Gln Cys Met Trp Pro Arg Glu  
 165 170 175

Thr Gln Leu Leu Leu Glu Val Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala Arg Ser  
 180 185 190

Cys Gln Phe Pro Glu Glu Glu Arg Gly Glu Arg Ser Ala Glu Glu Lys  
 195 200 205

Gly Arg Leu Gly Asp Leu Trp Val  
 210 215

<210> 41  
 <211> 241  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 41

Met Ala Gln His Gly Ala Met Gly Ala Phe Arg Ala Leu Cys Gly Leu  
 1 5 10 15

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

Gly Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu Gly Thr Gly Thr Asp Ala Arg  
 35 40 45

Cys Cys Arg Val His Thr Thr Arg Cys Cys Arg Asp Tyr Pro Gly Glu  
 50 55 60

Glu Cys Cys Ser Glu Trp Asp Cys Met Cys Val Gln Pro Glu Phe His  
65 70 75 80

Cys Gly Asp Pro Cys Cys Thr Thr Cys Arg His His Pro Cys Pro Pro  
85 90 95

Gly Gln Gly Val Gln Ser Gln Gly Lys Phe Ser Phe Gly Phe Gln Cys  
100 105 110

Ile Asp Cys Ala Ser Gly Thr Phe Ser Gly Gly His Glu Gly His Cys  
115 120 125

Lys Pro Trp Thr Asp Cys Thr Gln Phe Gly Phe Leu Thr Val Phe Pro  
130 135 140

Gly Asn Lys Thr His Asn Ala Val Cys Val Pro Gly Ser Pro Pro Ala  
145 150 155 160

Glu Pro Leu Gly Trp Leu Thr Val Val Leu Leu Ala Val Ala Ala Cys  
165 170 175

Val Leu Leu Leu Thr Ser Ala Gln Leu Gly Leu His Ile Trp Gln Leu  
180 185 190

Arg Ser Gln Cys Met Trp Pro Arg Glu Thr Gln Leu Leu Leu Glu Val  
195 200 205

Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala Arg Ser Cys Gln Phe Pro Glu Glu Glu  
 210 215 220

Arg Gly Glu Arg Ser Ala Glu Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp Leu Trp  
 225 230 235 240

Val

<210> 42  
 <211> 255  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 42

Met Ala Gln His Gly Ala Met Gly Ala Phe Arg Ala Leu Cys Gly Leu  
 1 5 10 15

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

Gly Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu Gly Thr Gly Thr Asp Ala Arg  
 35 40 45

Cys Cys Arg Val His Thr Thr Arg Cys Cys Arg Asp Tyr Pro Gly Glu  
 50 55 60

Glu Cys Cys Ser Glu Trp Asp Cys Met Cys Val Gln Pro Glu Phe His  
 65 70 75 80



Cys Gly Asp Pro Cys Cys Thr Thr Cys Arg His His Pro Cys Pro Pro  
 85 90 95

Gly Gln Gly Val Gln Ser Gln Gly Lys Phe Ser Phe Gly Phe Gln Cys  
 100 105 110

Ile Asp Cys Ala Ser Gly Thr Phe Ser Gly Gly His Glu Gly His Cys  
 115 120 125

Lys Pro Trp Thr Asp Cys Cys Trp Arg Cys Arg Arg Arg Pro Lys Thr  
 130 135 140

Pro Glu Ala Ala Ser Ser Pro Arg Lys Ser Gly Ala Ser Asp Arg Gln  
 145 150 155 160

Arg Arg Arg Gly Gly Trp Glu Thr Cys Gly Cys Glu Pro Gly Arg Pro  
 165 170 175

Pro Gly Pro Pro Thr Ala Ala Ser Pro Ser Pro Gly Ala Pro Gln Ala  
 180 185 190

Ala Gly Ala Leu Arg Ser Ala Leu Gly Arg Ala Leu Leu Pro Trp Gln  
 195 200 205

Gln Lys Trp Val Gln Glu Gly Gly Ser Asp Gln Arg Pro Gly Pro Cys  
 210 215 220

Ser Ser Ala Ala Ala Ala Gly Pro Cys Arg Arg Glu Arg Glu Thr Gln



Gly Gln Gly Val Gln Ser Gln Gly Lys Phe Ser Phe Gly Phe Gln Cys  
 100 105 110

Ile Asp Cys Ala Ser Gly Thr Phe Ser Gly Gly His Glu Gly His Cys  
 115 120 125

Lys Pro Trp Thr Asp Cys Thr Gln Phe Gly Phe Leu Thr Val Phe Pro  
 130 135 140

Gly Asn Lys Thr His Asn Ala Val Cys Val Pro Gly Ser Pro Pro Ala  
 145 150 155 160

Glu Pro Leu Gly Trp Leu Thr Val Val Leu Leu Ala Val Ala Ala Cys  
 165 170 175

Val Leu Leu Leu Thr Ser Ala Gln Leu Gly Leu His Ile Trp Gln Leu  
 180 185 190

Arg Lys Thr Gln Leu Leu Leu Glu Val Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala  
 195 200 205

Arg Ser Cys Gln Phe Pro Glu Glu Glu Arg Gly Glu Arg Ser Ala Glu  
 210 215 220

Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp Leu Trp Val  
 225 230

<210> 44

<211> 234

<212> PRT

<213> 石蟹獼猴

<400> 44

Val Ala Arg His Gly Ala Met Cys Ala Cys Gly Thr Leu Cys Cys Leu  
1                   5                   10                   15

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

Gly Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu Gly Thr Gly Lys Asp Ala Arg  
          35                   40                   45

Cys Cys Arg Val His Pro Thr Arg Cys Cys Arg Asp Tyr Gln Ser Glu  
          50                   55                   60

Glu Cys Cys Ser Glu Trp Asp Cys Val Cys Val Gln Pro Glu Phe His  
65                   70                   75                   80

Cys Gly Asn Pro Cys Cys Thr Thr Cys Gln His His Pro Cys Pro Ser  
                  85                   90                   95

Gly Gln Gly Val Gln Pro Gln Gly Lys Phe Ser Phe Gly Phe Arg Cys  
                  100                   105                   110

Val Asp Cys Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Gly His Asp Gly His Cys  
          115                   120                   125

Lys Pro Trp Thr Asp Cys Thr Gln Phe Gly Phe Leu Thr Val Phe Pro

130

135

140

Gly Asn Lys Thr His Asn Ala Val Cys Val Pro Gly Ser Pro Pro Ala  
 145 150 155 160

Glu Pro Pro Gly Trp Leu Thr Ile Val Leu Leu Ala Val Ala Ala Cys  
 165 170 175

Val Leu Leu Leu Thr Ser Ala Gln Leu Gly Leu His Ile Trp Gln Leu  
 180 185 190

Gly Lys Thr Gln Leu Leu Leu Glu Val Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala  
 195 200 205

Ser Ser Cys Gln Phe Pro Glu Glu Glu Arg Gly Glu Arg Leu Ala Glu  
 210 215 220

Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp Leu Trp Val  
 225 230

<210> 45  
 <211> 234  
 <212> PRT  
 <213> 石蟹獼猴

<400> 45

Met Ala Arg His Gly Ala Met Cys Ala Cys Gly Thr Leu Cys Cys Leu  
 1 5 10 15

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

Gly Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu Gly Thr Gly Lys Asp Ala Arg  
 35 40 45

Cys Cys Arg Val His Pro Thr Arg Cys Cys Arg Asp Tyr Gln Ser Glu  
 50 55 60

Glu Cys Cys Ser Glu Trp Asp Cys Val Cys Val Gln Pro Glu Phe His  
 65 70 75 80

Cys Gly Asn Pro Cys Cys Thr Thr Cys Gln His His Pro Cys Pro Ser  
 85 90 95

Gly Gln Gly Val Gln Pro Gln Gly Lys Phe Ser Phe Gly Phe Arg Cys  
 100 105 110

Val Asp Cys Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Gly His Asp Gly His Cys  
 115 120 125

Lys Pro Trp Thr Asp Cys Thr Gln Phe Gly Phe Leu Thr Val Phe Pro  
 130 135 140

Gly Asn Lys Thr His Asn Ala Val Cys Val Pro Gly Ser Pro Pro Ala  
 145 150 155 160

Glu Pro Pro Gly Trp Leu Thr Ile Val Leu Leu Ala Val Ala Ala Cys  
 165 170 175

Val Leu Leu Leu Thr Ser Ala Gln Leu Gly Leu His Ile Trp Gln Leu  
 180 185 190

Gly Lys Thr Gln Leu Leu Leu Glu Val Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala  
 195 200 205

Ser Ser Cys Gln Phe Pro Glu Glu Glu Arg Gly Glu Arg Leu Ala Glu  
 210 215 220

Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp Leu Trp Val  
 225 230

<210> 46  
 <211> 234  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> V1M/Q62P/S63G 石蟹獼猴 G1TR 未成熟蛋白

<400> 46

Met Ala Arg His Gly Ala Met Cys Ala Cys Gly Thr Leu Cys Cys Leu  
 1 5 10 15

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

Gly Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu Gly Thr Gly Lys Asp Ala Arg  
 35 40 45

Cys Cys Arg Val His Pro Thr Arg Cys Cys Arg Asp Tyr Pro Gly Glu  
 50 55 60

Glu Cys Cys Ser Glu Trp Asp Cys Val Cys Val Gln Pro Glu Phe His  
 65 70 75 80

Cys Gly Asn Pro Cys Cys Thr Thr Cys Gln His His Pro Cys Pro Ser  
 85 90 95

Gly Gln Gly Val Gln Pro Gln Gly Lys Phe Ser Phe Gly Phe Arg Cys  
 100 105 110

Val Asp Cys Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Gly His Asp Gly His Cys  
 115 120 125

Lys Pro Trp Thr Asp Cys Thr Gln Phe Gly Phe Leu Thr Val Phe Pro  
 130 135 140

Gly Asn Lys Thr His Asn Ala Val Cys Val Pro Gly Ser Pro Pro Ala  
 145 150 155 160

Glu Pro Pro Gly Trp Leu Thr Ile Val Leu Leu Ala Val Ala Ala Cys  
 165 170 175

Val Leu Leu Leu Thr Ser Ala Gln Leu Gly Leu His Ile Trp Gln Leu  
 180 185 190



Gly Lys Thr Gln Leu Leu Leu Glu Val Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala  
 195 200 205

Ser Ser Cys Gln Phe Pro Glu Glu Glu Arg Gly Glu Arg Leu Ala Glu  
 210 215 220

Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp Leu Trp Val  
 225 230

<210> 47  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> pab2049/pab1949 HCDR1

<400> 47

Gly Ser Ala Met His  
 1 5

<210> 48  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> pab2049/pab1949 HCDR2

<400> 48

Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala Ser  
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 49  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> pab2049/pab1949 HCDR3

<400> 49

Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr  
 1                    5                    10

<210> 50  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> pab2049/pab1949 LCDR1

<400> 50

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp  
 1                    5                    10                    15

<210> 51  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>

<223> pab2049/pab1949 Lcdr2

<400> 51

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser

1                    5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab2049 Lcdr3

<400> 52

Met Gln Gly Ser Lys Trp Pro Leu Thr

1                    5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1949 Lcdr3

<400> 53

Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Leu Thr

1                    5

<210> 54  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> pab2049/pab1949 VH

<400> 54

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
                   20                   25                   30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                   40                   45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala  
                   50                   55                   60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65                   70                   75                   80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
                   85                   90                   95

Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly  
                   100                   105                   110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 55  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> pab2049 VL

<400> 55

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Gly  
 85 90 95

Ser Lys Trp Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 56  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> pab1949 VL

<400> 56

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
 85 90 95

Leu Gln Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 57  
 <211> 100  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> OX40 HC 生殖系 IGHV3-73\*01

<400> 57

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala  
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95

Tyr Cys Thr Arg  
100

<210> 58  
<211> 100  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> OX40 LC 生殖系 IGKV2-28\*01

<400> 58

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
                  20                    25                    30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
                  35                    40                    45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
                  50                    55                    60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
                  85                    90                    95



Leu Gln Thr Pro  
100

<210> 59

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab2049/pab1949 HC IgG1

<400> 59

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
                  20                   25                   30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                  35                   40                   45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala  
                  50                   55                   60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
65                   70                   75                   80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
                  85                   90                   95

Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150 155 160

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

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

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350

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

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445

Pro Gly Lys  
 450

<210> 60

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab2049/pab1949 HC IgG1 N297A

<400> 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala  
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95

Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150 155 160

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

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

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr  
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350

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

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445

Pro Gly Lys  
 450

<210> 61

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab2049/pab1949 HC IgG1 K409R

<400> 61

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
                   20                    25                    30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                    40                    45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala  
                   50                    55                    60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65                    70                    75                    80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
                   85                    90                    95

Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly  
                   100                    105                    110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
                   115                    120                    125

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145                    150                    155                    160



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

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

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350

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

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445

Pro Gly Lys  
 450

<210> 62  
 <211> 451  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> pab2049/pab1949 HC IgG1 K409R N297A

<400> 62

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
                   20                    25                    30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                    40                    45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala  
                   50                    55                    60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65                    70                    75                    80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
                   85                    90                    95

Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly  
                   100                    105                    110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150 155 160

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

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

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr  
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350

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

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445

Pro Gly Lys  
 450

<210> 63  
 <211> 451  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> pab2049/pab1949 HC K409R L234F L235E D265A

<400> 63

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala  
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
115 120 125

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
145 150 155 160

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

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

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly  
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val Ser His  
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350

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



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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445

Pro Gly Lys  
 450

<210> 64

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab2049/pab1949 HC F405L

<400> 64

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala  
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95

Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150 155 160

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

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

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350

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

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445

Pro Gly Lys  
 450

<210> 65  
 <211> 451  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> pab2049/pab1949 HC F405L N297A

<400> 65

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
                   20                   25                   30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                   40                   45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala  
                   50                   55                   60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65                   70                   75                   80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
                   85                   90                   95

Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly  
                   100                   105                   110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150 155 160

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

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

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr  
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350

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

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445

Pro Gly Lys  
 450

<210> 66  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> pab2049/pab1949 HC IgG4 S228P

<400> 66

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala  
 50 55 60



Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95

Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala  
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150 155 160

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

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

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly  
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro  
 260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 67

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab2049w LC

<400> 67

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Gly  
 85 90 95

Ser Lys Trp Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

<210> 68

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab2049 LC T109S

<400> 68

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Gly  
 85 90 95

Ser Lys Trp Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

Arg Ser 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> 69  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Pab1949w LC

<400> 69

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
                   20                   25                   30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
           35                   40                   45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
       50                   55                   60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
                   85                   90                   95

Leu Gln Thr Pro Leu 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> 70  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Pab1949 LC T109S

<400> 70



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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
                   20                    25                    30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
                   35                    40                    45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
                   50                    55                    60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
                   85                    90                    95

Leu Gln Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                   100                    105                    110

Arg Ser 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> 71

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab2049/pab1949 HC F405L L234F L235E D265A

<400> 71

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala  
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95

Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150 155 160

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

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

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly  
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val Ser His  
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350

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

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445

Pro Gly Lys  
 450

<210> 72

<211> 249

<212> PRT

<213> 智人

<400> 72

Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His

1	5	10	15
Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln	20	25	30
Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val	35	40	45
Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly	50	55	60
Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg	65	70	75
Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp	85	90	95
Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala	100	105	110
Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln	115	120	125
Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro	130	135	140
Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr	145	150	155
			160

Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr  
 165 170 175

Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly  
 180 185 190

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

Leu Tyr Leu Leu Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys  
 210 215 220

Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala  
 225 230 235 240

Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile  
 245

<210> 73  
 <211> 277  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 73

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu  
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val  
 20 25 30

Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro  
 35 40 45

Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys  
 50 55 60

Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro  
 65 70 75 80

Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys  
 85 90 95

Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly  
 100 105 110

Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys  
 115 120 125

Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp  
 130 135 140

Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn  
 145 150 155 160

Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro  
 165 170 175



Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr  
 180 185 190

Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu  
 195 200 205

Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val  
 210 215 220

Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu  
 225 230 235 240

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly  
 245 250 255

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser  
 260 265 270

Thr Leu Ala Lys Ile  
 275

<210> 74

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1876 HC IgG1

<400> 74

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

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

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

Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 75

<211> 447

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; pab1876 HC IgG1 N297A

&lt;400&gt; 75

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 Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
                   20                    25                    30

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

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

Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65                    70                    75                    80

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

Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
                   100                    105                    110

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 76

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1876 HC IgG1 F405L

<400> 76

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

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

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

Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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



Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 77

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1876 HC IgG1 F405L N297A

<400> 77

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

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

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

Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65                                   70                                   75                                   80

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

Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
                          100                                   105                                   110

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 78

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1876 HC IgG1 F405L L234F L235E D265A

<400> 78

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 Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

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

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

Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335



Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
                   340                                  345                                  350

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

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

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

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

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

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

<210> 79  
 <211> 447  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> pab1876 HC IgG1 K409R

&lt;400&gt; 79

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 Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
                   20                    25                    30

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

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

Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65                    70                    75                    80

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

Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
                   100                    105                    110

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 80  
 <211> 447  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> pab1876 HC IgG1 K409R N297A

<400> 80

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 Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
           20                    25                    30

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

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

Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65                    70                    75                    80

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

Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
                           100                    105                    110

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 81  
 <211> 444  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> pab1876 HC IgG4 S228P

<400> 81

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 Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

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

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

Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80



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

Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
                           100  105  110

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys  
                           210  215  220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu  
                           225  230  235  240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln  
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 340 345 350

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

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 370 375 380

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

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

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

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

<210> 82

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1876 HC IgG1 K409R L234F L235E D265A

<400> 82

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 Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

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

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

Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 83  
 <211> 450  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> pab2049/pab1949 HC F405L L234F L235E D265A

<400> 83

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala  
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95

Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150 155 160

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

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

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly  
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val Ser His  
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320



Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350

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

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445

Pro Gly  
 450

<210> 84

<400> 84  
000

<210> 85

<400> 85  
000

<210> 86

<400> 86  
000

<210> 87

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> H-CDR1 抗 GITR 共同序列

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1).. (1)

<223> Xaa 為 Asp、Glu 或 Gly

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3).. (3)

<223> Xaa 為 Ala 或 Val

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5).. (5)

<223> Xaa 為 Tyr 或 His

<400> 87

Xaa Tyr Xaa Met Xaa

1                      5

<210> 88

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> H-CDR2 抗 GITR 共同序列

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1).. (1)

<223> Xaa 為 Val 或 Leu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3).. (3)

<223> Xaa 為 Arg、Lys 或 Gln

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5).. (5)

<223> Xaa 為 Tyr 或 Phe

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8).. (8)

<223> Xaa 為 Asp、Glu 或 Gly

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (9).. (9)

<223> Xaa 為 Val 或 Leu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10).. (10)

<223> Xaa 為 Thr 或 Ser

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (16).. (16)

<223> Xaa 為 Lys、Arg 或 Gln

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (17).. (17)

<223> Xaa 為 Asp、Glu 或 Gly

<400> 88

Xaa Ile Xaa Thr Xaa Ser Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Asn Gln Lys Phe Xaa

1

5

10

15

Xaa

<210> 89

<400> 89

000

<210> 90

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> L-CDR1 抗 GITR 共同序列

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10).. (10)

<223> Xaa 為 Gly 或 Ser

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (17).. (17)

<223> Xaa 為 Thr 或 Ser

<400> 90

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Xaa Asn Gln Lys Asn Tyr Leu  
 1                    5                    10                    15

Xaa

<210> 91

<400> 91

000

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> L-CDR3 抗 GITR 共同序列

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3).. (3)  
<223> Xaa 為 Asp 或 Glu

<220>

<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6).. (6)  
<223> Xaa 為 Tyr、Phe 或 Ser

<400> 92

Gln Asn Xaa Tyr Ser Xaa Pro Tyr Thr  
1                            5

<210> 93  
<211> 330  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> 人類 IgG1 恒定區共同序列

<220>

<221> MISC\_FEATURE  
<222> (97).. (97)  
<223> Xaa 為 Lys 或 Arg

<220>

<221> MISC\_FEATURE  
<222> (239).. (239)  
<223> Xaa 為 Asp 或 Glu

<220>

<221> MISC\_FEATURE  
<222> (241).. (241)  
<223> Xaa 為 Leu 或 Met

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (314).. (314)

&lt;223&gt; Xaa 為 Gly 或 Ala

&lt;400&gt; 93

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

Xaa Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
                   100                    105                    110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
                   115                    120                    125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

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 Xaa Glu  
 225 230 235 240

Xaa 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 Xaa Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 94

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類 IgG1 G1m3 同種異型

<400> 94

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 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
	115	120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
	130	135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145	150	155 160
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 Lys  
 325 330

<210> 95  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人類 IgG1 G1m17, 1 同種異型

&lt;400&gt; 95

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

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

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

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

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

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
                   85                    90                    95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
                   100                    105                    110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
                   115                    120                    125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys



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 Lys  
 325 330

<210> 96  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人類 IgG1 G1m17, 1, 2 同種異型

<400> 96

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

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

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

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

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

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
145 150 155 160

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





&lt;400&gt; 97

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

Ser 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 Lys  
                                   325

&lt;210&gt; 98

&lt;211&gt; 327

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; IgG4 恒定區 S228P 修飾

&lt;400&gt; 98

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





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 Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
           100                   105                   110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
           115                   120                   125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
       130                   135                   140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

145		150		155		160
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn						
		165		170		175
Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp						
	180		185		190	
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro						
	195		200		205	
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu						
	210		215		220	
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn						
	225		230		235	240
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile						
		245		250		255
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr						
	260		265		270	
Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys						
	275		280		285	
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys						
	290		295		300	

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325

<210> 100

<211> 326

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IgG2 恒定區 C127S 修飾

<400> 100

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser 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 Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn  
 165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp  
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro  
 195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn

225                                    230                                    235                                    240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
     245                                    250                                    255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
     260                                    265                                    270

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
     325

<210> 101

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 231-32-15 VH

<400> 101

Gln Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Thr Glu Leu Val Arg Pro Gly Val

1                    5                    10                    15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
                   20                    25                    30  
 Ala Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
                   35                    40                    45  
 Gly Val Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Asp Val Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
                   50                    55                    60  
 Lys Asp Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Ile Ala Tyr  
                   65                    70                    75                    80  
 Met Glu Leu Ala Arg Leu Ser Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys  
                   85                    90                    95  
 Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
                   100                    105                    110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
                   115

<210> 102  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 231-32-15 VL

&lt;400&gt; 102

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

Glu Lys Val Ile Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser  
                   20                                    25                                    30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
                   50                                    55                                    60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65                                    70                                    75                                    80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr His Cys Gln Asn  
                   85                                    90                                    95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
                   100                                    105                                    110

Lys

&lt;210&gt; 103

&lt;211&gt; 113

&lt;212&gt; PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1875 VL

<400> 103

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

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser  
                  20                   25                   30

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

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Ile  
                  50                   55                   60

Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65                   70                   75                   80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr His Cys Gln Asn  
                  85                   90                   95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
                  100                   105                   110

Lys

<210> 104  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> m6C8 VH

<400> 104

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
                   20                   25                   30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser  
                   50                   55                   60

Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val  
 65                   70                   75                   80

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

Cys Ala Arg Thr Arg Arg Tyr Phe Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
                   100                   105                   110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 105

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m6C8 VL

<400> 105

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Val His Ser  
65                   70                   75                   80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Thr Asp Pro Leu  
                  85                   90                   95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 106

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Pab1928 (Hu106-122) HC

<400> 106

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu 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

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met  
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val 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 Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
 115 120 125

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

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 145 150 155 160

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

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser  
 210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
 225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

		245								250										255
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser				
			260						265					270						
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu					
		275					280					285								
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr					
		290				295					300									
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn					
305					310					315					320					
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro					
				325					330					335						
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln					
			340						345					350						
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val					
			355				360						365							
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val					
			370				375					380								
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro					
385					390					395					400					

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

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 435 440 445

Ser Pro Gly Lys  
 450

<210> 107

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Pab1928 (Hu106-122) LC T109S

<400> 107

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 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala  
 20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr 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 Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Val Ala Ala  
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195

200

205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

&lt;210&gt; 108

&lt;211&gt; 330

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成肽

&lt;400&gt; 108

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 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

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 Leu  
 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 Lys  
 325 330

<210> 109  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成肽

<400> 109

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 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

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 Arg 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 Lys  
325 330

<210> 110

<400> 110  
000

<210> 111

<400> 111  
000

<210> 112

<400> 112  
000

<210> 113

<400> 113  
000

<210> 114

<400> 114  
000

<210> 115

<400> 115  
000

<210> 116

<400> 116

000

&lt;210&gt; 117

&lt;400&gt; 117

000

&lt;210&gt; 118

&lt;211&gt; 450

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; pab2049/pab1949 HC IgG1

&lt;400&gt; 118

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
                   20                    25                    30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                    40                    45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala  
                   50                    55                    60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65                    70                    75                    80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

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

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350

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

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

385

390

395

400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445

Pro Gly  
 450

<210> 119

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab2049/pab1949 HC IgG1 N297A

<400> 119

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

	35		40		45														
Gly	Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Ala	Asn	Ser	Tyr	Ala	Thr	Ala	Tyr	Ala	Ala				
50						55						60							
Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Thr				
65					70					75					80				
Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr				
				85					90						95				
Tyr	Cys	Thr	Ser	Gly	Ile	Tyr	Asp	Ser	Ser	Gly	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly				
			100					105							110				
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser				
		115					120						125						
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala				
130						135						140							
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val				
145					150					155					160				
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala				
				165					170						175				
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val				
			180					185						190					

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr  
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val



340

345

350

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

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445

Pro Gly  
 450

<210> 120  
 <211> 450  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>

<223> pab2049/pab1949 HC IgG1 K409R

&lt;400&gt; 120

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
                   20                    25                    30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                    40                    45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala  
                   50                    55                    60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65                    70                    75                    80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
                   85                    90                    95

Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly  
                   100                    105                    110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
                   115                    120                    125

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150 155 160

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

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

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

290

295

300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350

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

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445

Pro Gly  
450

<210> 121  
<211> 450  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> pab2049/pab1949 HC IgG1 K409R N297A

<400> 121

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
                  20                   25                   30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                  35                   40                   45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala  
50                   55                   60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
65                   70                   75                   80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
                  85                   90                   95

Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150 155 160

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

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

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

	245		250		255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His					
	260		265		270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val					
	275		280		285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr					
	290		295		300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly					
	305		310		315
					320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile					
			325		330
					335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val					
	340		345		350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser					
	355		360		365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu					
	370		375		380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro					
	385		390		395
					400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445

Pro Gly  
 450

<210> 122  
 <211> 450  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> pab2049/pab1949 HC K409R L234F L235E D265A

<400> 122

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45



Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala  
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95

Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150 155 160

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

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

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

195	200	205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys		
210	215	220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly		
225	230	235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
	245	250 255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val Ser His		
	260	265 270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
	275	280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
	290	295 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
305	310	315 320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
	325	330 335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
	340	345 350

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

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445

Pro Gly  
 450

<210> 123

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab2049/pab1949 HC F405L

<400> 123

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
                   20                                    25                                    30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                                    40                                    45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala  
                   50                                    55                                    60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65                                    70                                    75                                    80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
                   85                                    90                                    95

Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly  
                   100                                    105                                    110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
                   115                                    120                                    125

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145		150		155		160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala						
		165		170		175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val						
		180		185		190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His						
		195		200		205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys						
		210		215		220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly						
225		230		235		240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met						
		245		250		255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His						
		260		265		270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val						
		275		280		285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr						
		290		295		300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350

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

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445

Pro Gly

450

&lt;210&gt; 124

&lt;211&gt; 450

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; pab2049/pab1949 HC F405L N297A

&lt;400&gt; 124

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
                   20                    25                    30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                    40                    45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala  
                   50                    55                    60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65                    70                    75                    80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
                   85                    90                    95

Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly

	100		105		110															
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser					
	115						120					125								
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala					
	130						135					140								
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val					
145					150					155					160					
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala					
				165					170					175						
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val					
			180						185					190						
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His					
	195						200						205							
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys					
	210						215				220									
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly					
225					230					235					240					
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met					
				245					250					255						



Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr  
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350

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

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

405

410

415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445

Pro Gly  
 450

<210> 125

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab2049/pab1949 HC IgG4 S228P

<400> 125

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala

50	55	60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr		
65	70	75 80
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
	85	90 95
Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly		
	100	105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
	115	120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala		
	130	135 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
145	150	155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
	165	170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
	180	185 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His		
	195	200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly  
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro  
 260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys



<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (239).. (239)  
 <223> Xaa 可為 Asp 或 Glu

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (241).. (241)  
 <223> Xaa 可為 Leu 或 Met

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (314).. (314)  
 <223> Xaa 可為 Gly 或 Ala

<400> 126

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

Xaa Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

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 Xaa Glu  
 225 230 235 240

Xaa 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 Xaa Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 325

<210> 127

<211> 329

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類 IgG1 G1m3 同種異型

<400> 127

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 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

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> 128

<211> 329

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類 IgG1 G1m17, 1 同種異型

<400> 128

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

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

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

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

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

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85                   90                   95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

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 Asp Glu  
 225 230 235 240

Leu 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> 129

<211> 329

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類 IgG1 G1m17, 1, 2 同種異型

<400> 129

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

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

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

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

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

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

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 Asp Glu  
 225 230 235 240

Leu 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 Gly Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 325

<210> 130  
 <211> 326  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人類 IgG4 野生型恒定區

<400> 130

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

Ser 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> 131

<211> 326

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IgG4 恒定區 S228P 修飾

<400> 131

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> 132  
 <211> 325  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人類 IgG2 野生型恒定區

<400> 132

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 Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
                   100                    105                    110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn  
 165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp  
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro  
 195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 260 265 270

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly  
 325

<210> 133  
 <211> 325  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> IgG2 恒定區 C127S 修飾

<400> 133

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser 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 Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn  
 165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp  
 180 185 190



Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro  
 195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 260 265 270

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly  
 325

<210> 134

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Pab1928 (Hu106-122) HC

<400> 134

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu 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

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met  
                  35                    40                    45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe  
                  50                    55                    60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val 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 Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp  
                  100                    105                    110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
                  115                    120                    125

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

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 145 150 155 160

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

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser  
 210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
 225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
 245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
 275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
 290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
 325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 340 345 350

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

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 385 390 395 400

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

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 435 440 445

Ser Pro Gly  
 450

<210> 135

<211> 329

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 包含 F405L 突變之 IgG1 恒定區

<400> 135

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 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
145 150 155 160

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



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 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160



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 Arg 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

## 申請專利範圍

【請求項 1】一種分離之多特異性抗體，其包含：

(a)特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合區，該第一抗原結合區包含第一重鏈可變區(VH)和第一輕鏈可變區(VL)，該第一 VH 包含 VH 互補決定區(CDR)1、VH CDR2 及 VH CDR3，且該第一 VL 包含 VL CDR1、VL CDR2 及 VL CDR3，其中該第一 VH 包含 SEQ ID NO: 54 之 VH 胺基酸序列的 VH CDR1、VH CDR2 及 VH CDR3 之胺基酸序列，且該第一 VL 包含 SEQ ID NO: 55 之 VL 胺基酸序列的 VL CDR1、VL CDR2 及 VL CDR3 之胺基酸序列；及

(b)特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合區，該第二抗原結合區包含第二 VH 和第二 VL，該第二 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 及 VH CDR3，且該第二 VL 包含 VL CDR1、VL CDR2 及 VL CDR3，其中該第二 VH 包含 SEQ ID NO: 25 之 VH 胺基酸序列的 VH CDR1、VH CDR2 及 VH CDR3 之胺基酸序列，且該第二 VL 包含 SEQ ID NO: 26 之 VL 胺基酸序列的 VL CDR1、VL CDR2 及 VL CDR3 之胺基酸序列，

其中該第二抗原結合區之 VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3、VL-CDR1、VL-CDR2 及 VL-CDR3 分別不包含 SEQ ID NO: 7、10、3、14、5 及 16 之胺基酸序列。

【請求項 2】如請求項 1 之多特異性抗體，其中該抗體包含：

(a)特異性結合人類 OX40 之第一抗原結合區，該第一

抗原結合區包含：

(i)包含 SEQ ID NO: 47 之胺基酸序列之 VH-CDR1；

(ii)包含 SEQ ID NO: 48 之胺基酸序列之 VH-CDR2；

(iii)包含 SEQ ID NO: 49 之胺基酸序列之 VH-CDR3；

(iv)包含 SEQ ID NO: 50 之胺基酸序列之 VL-CDR1；

(v)包含 SEQ ID NO: 51 之胺基酸序列之 VL-CDR2；及

(vi)包含 SEQ ID NO: 52 或 53 之胺基酸序列之 VL-CDR3；及

(b)特異性結合人類 GITR 之第二抗原結合區，該第二抗原結合區包含：

(i)包含胺基酸序列  $X_1YX_2MX_3$  (SEQ ID NO: 87) 之 VH-CDR1，其中  $X_1$  為 D、E 或 G； $X_2$  為 A 或 V；且  $X_3$  為 Y 或 H；

(ii)包含胺基酸序列  $X_1IX_2TX_3SGX_4X_5X_6YNQKFX_7X_8$  (SEQ ID NO: 88) 之 VH-CDR2，其中  $X_1$  為 V 或 L； $X_2$  為 R、K 或 Q； $X_3$  為 Y 或 F； $X_4$  為 D、E 或 G； $X_5$  為 V 或 L； $X_6$  為 T 或 S； $X_7$  為 K、R 或 Q；且  $X_8$  為 D、E 或 G；

(iii)包含 SEQ ID NO: 3 之胺基酸序列之 VH-CDR3；

(iv)包含胺基酸序列  $KSSQSLLNSX_1NQKNYLX_2$  (SEQ ID NO: 90) 之 VL-CDR1，其中  $X_1$  為 G 或 S；且  $X_2$  為 T 或 S；

(v) 包含 SEQ ID NO: 5 之胺基酸序列之 VL-CDR2；及

(vi) 包含胺基酸序列 QNX<sub>1</sub>YSX<sub>2</sub>PYT (SEQ ID NO: 92) 之 VL-CDR3，其中 X<sub>1</sub> 為 D 或 E；且 X<sub>2</sub> 為 Y、F 或 S。

【請求項 3】如請求項 1 或 2 之多特異性抗體，其中該第二抗原結合區包含 VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3、VL-CDR1、VL-CDR2 及 VL-CDR3，該 VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3、VL-CDR1、VL-CDR2 及 VL-CDR3 分別包含 SEQ ID NO: 8、11、3、15、5 及 17、SEQ ID NO: 9、12、3、14、5 及 16 或 SEQ ID NO: 9、13、3、14、5 及 16 之胺基酸序列。

【請求項 4】如前述請求項中任一項之多特異性抗體，其中：

(a) 該第一抗原結合區包含 VH 及/或 VL，該 VH 包含 SEQ ID NO: 54 之胺基酸序列，且該 VL 包含 SEQ ID NO: 55 或 56 之胺基酸序列；及/或

(b) 該第二抗原結合區包含 VH 及/或 VL，該 VH 包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:18、20、22、24 及 25，且該 VL 包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:19、21、23 及 26。

【請求項 5】如前述請求項中任一項之多特異性抗體，其中該第二抗原結合區包含 VH 和 VL，該 VH 和 VL 分別包含 SEQ ID NO: 20 和 21、SEQ ID NO: 22 和 23、

SEQ ID NO: 24 和 23 或 SEQ ID NO: 25 和 26 之胺基酸序列。

【請求項 6】如前述請求項中任一項之多特異性抗體，其中該第一抗原結合區及/或該第二抗原結合區包含選自由人類 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub> 及 IgA<sub>2</sub> 組成之群之重鏈恆定區。

【請求項 7】如請求項 6 之多特異性抗體，其中該重鏈恆定區係 IgG<sub>1</sub> 重鏈恆定區。

【請求項 8】如請求項 7 之多特異性抗體，其中該重鏈恆定區包含 SEQ ID NO: 126 之胺基酸序列。

【請求項 9】如請求項 7 之多特異性抗體，其中：

(a) 該第一抗原結合區包含第一重鏈恆定區，該第一重鏈恆定區於胺基酸位置 366、368 及 407 分別包含絲胺酸、丙胺酸及纈胺酸，且該第二抗原結合區包含第二重鏈恆定區，該第二重鏈恆定區於胺基酸位置 366 包含色胺酸；或

(b) 該第一抗原結合區包含第一重鏈恆定區，該第一重鏈恆定區於胺基酸位置 366 包含色胺酸，且該第二抗原結合區包含第二重鏈恆定區，該第二重鏈恆定區於胺基酸位置 366、368 及 407 分別包含絲胺酸、丙胺酸及纈胺酸，

該等胺基酸位置係根據 EU 編號系統編號。

【請求項 10】如請求項 9 之多特異性抗體，其中該第一重鏈恆定區及/或該第二重鏈恆定區於胺基酸位置

239、330 及 332 分別包含天門冬胺酸、白胺酸及麩胺酸，該等胺基酸位置係根據 EU 編號系統編號。

【請求項 11】如前述請求項中任一項之多特異性抗體，其中該第一抗原結合區包含第一重鏈，該第一重鏈包含 SEQ ID NO: 54 之胺基酸序列，及/或該第二抗原結合區包含第二重鏈，該第二重鏈包含 SEQ ID NO: 25 之胺基酸序列。

【請求項 12】如前述請求項中任一項之多特異性抗體，其中該第一抗原結合區及/或該第二抗原結合區包含輕鏈恆定區，該輕鏈恆定區係選自由人類  $\kappa$  輕鏈恆定區和人類  $\lambda$  輕鏈恆定區組成之群。

【請求項 13】如前述請求項中任一項之多特異性抗體，其中該第一抗原結合區包含第一輕鏈，該第一輕鏈包含 SEQ ID NO: 55、56、67 或 69 之胺基酸序列，及/或該第二抗原結合區包含第二輕鏈，該第二輕鏈包含 SEQ ID NO: 26 之胺基酸序列。

【請求項 14】一種組合物，該組合物包含 (i) 編碼如前述請求項中任一項之多特異性抗體之第一抗原結合區之輕鏈可變區 (VL) 或輕鏈之核酸分子； (ii) 編碼如前述請求項中任一項之多特異性抗體之第一抗原結合區之重鏈可變區 (VH) 或重鏈之核酸分子； (iii) 編碼如前述請求項中任一項之多特異性抗體之第二抗原結合區之 VL 或輕鏈之核酸分子；及 (iv) 編碼如前述請求項中任一項之多特異性抗體之第二抗原結合區之 VH 或重鏈之核酸分子。

【請求項 15】一種醫藥組合物，該醫藥組合物包含如請求項 1 至 13 中任一項之多特異性抗體或如請求項 14 之組合物及醫藥學上可接受之賦形劑。

【請求項 16】一種如請求項 1 至 13 中任一項之多特異性抗體、如請求項 14 之組合物或如請求項 15 之醫藥組合物於製備藥物之用途，該藥物係用於治療個體之癌症。

【請求項 17】如請求項 16 之用途，其中該癌症係選自由黑素瘤、腎癌、前列腺癌、結腸癌及肺癌組成之群。

【請求項 18】一種如請求項 1 至 13 中任一項之多特異性抗體、如請求項 14 之組合物或如請求項 15 之醫藥組合物於製備藥物之用途，該藥物係用於治療個體之感染性疾病。



圖式

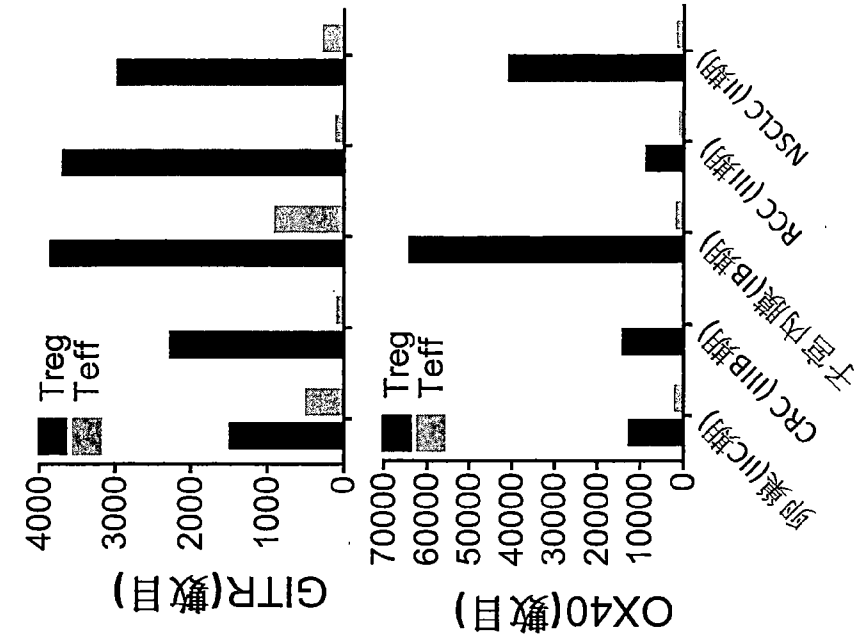


圖1B

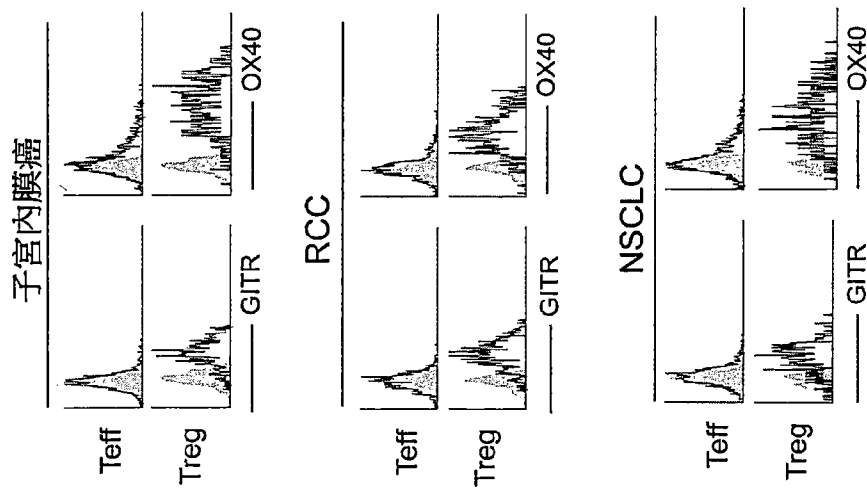


圖1A

與活化之Hut102細胞之結合  
(GITR+/OX40+)

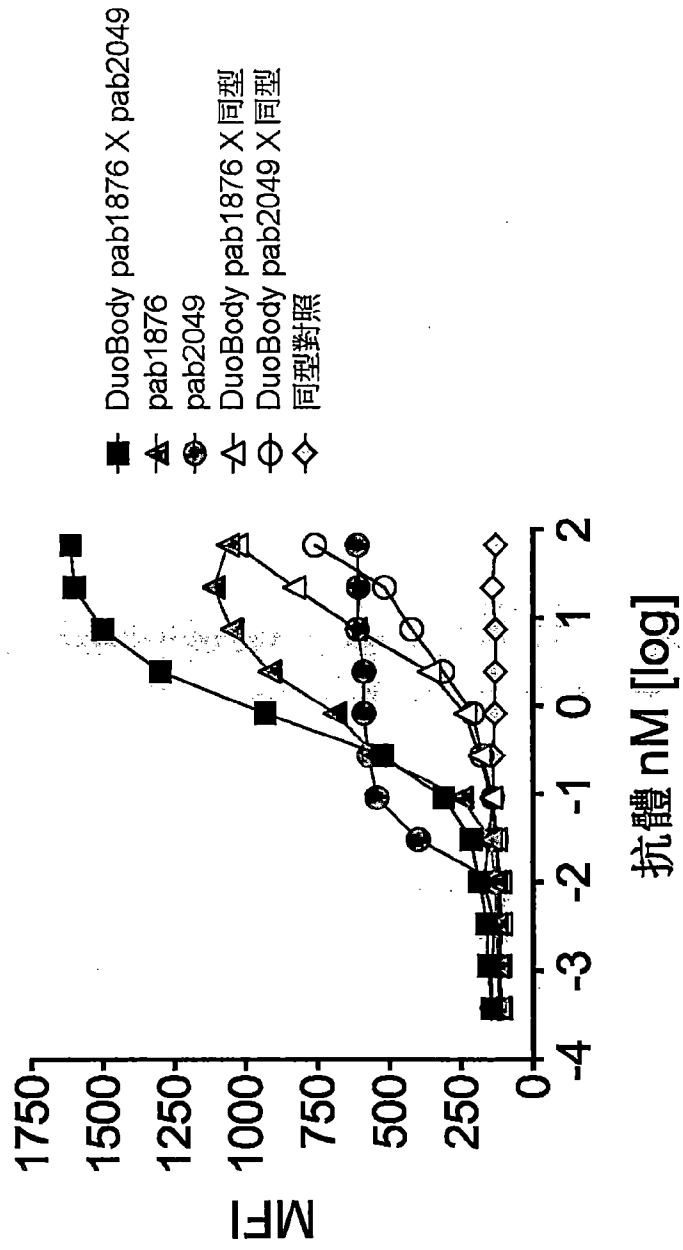


圖2A

與Jurkat-huGITR細胞之結合  
(GITR+/OX40-)

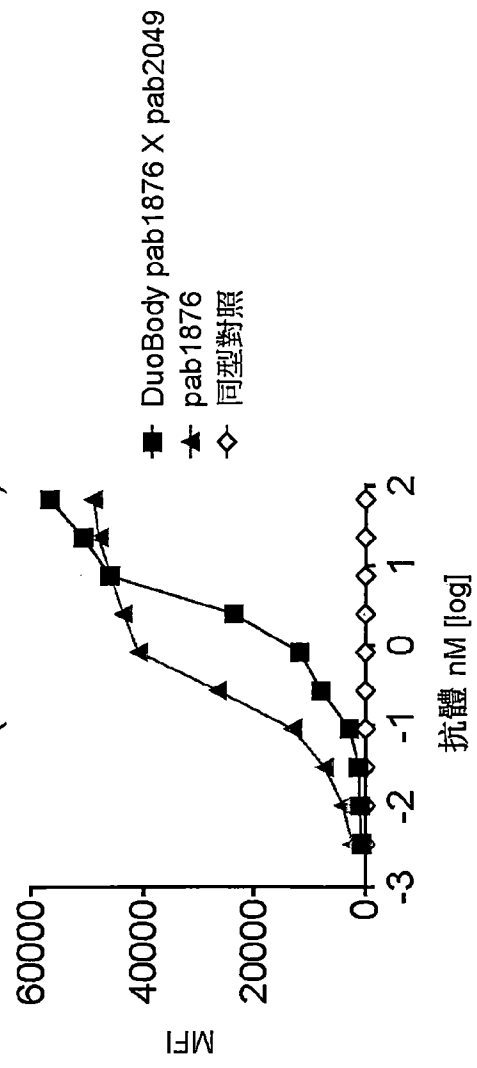


圖2B

與Jurkat-huOX40細胞之結合  
(GITR-/OX40+)

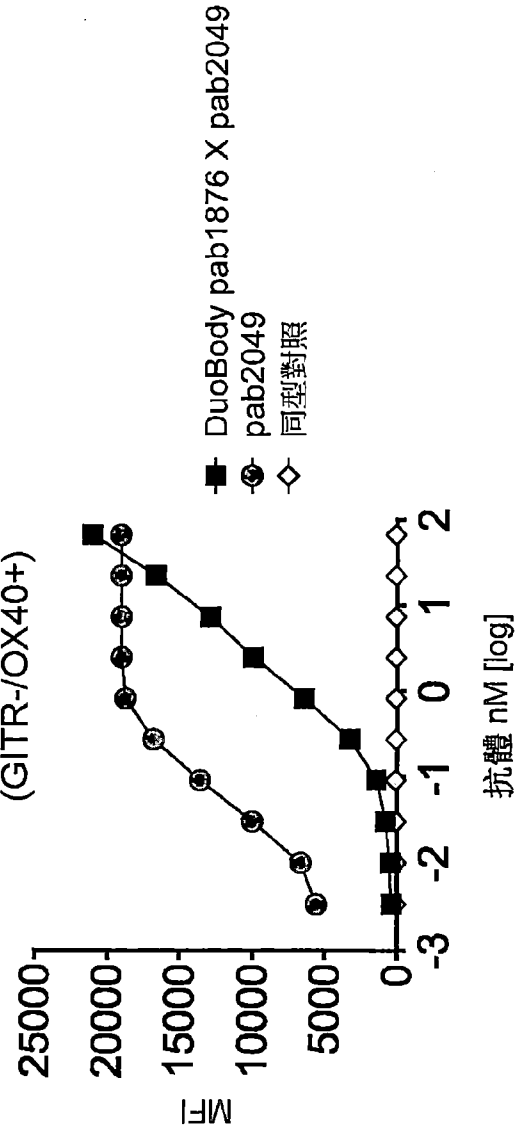


圖2C

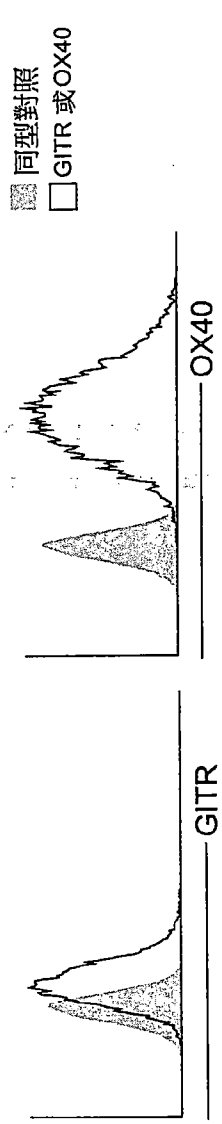


圖3A  
活化之nreg  
FcγRIIIA V158 變異體

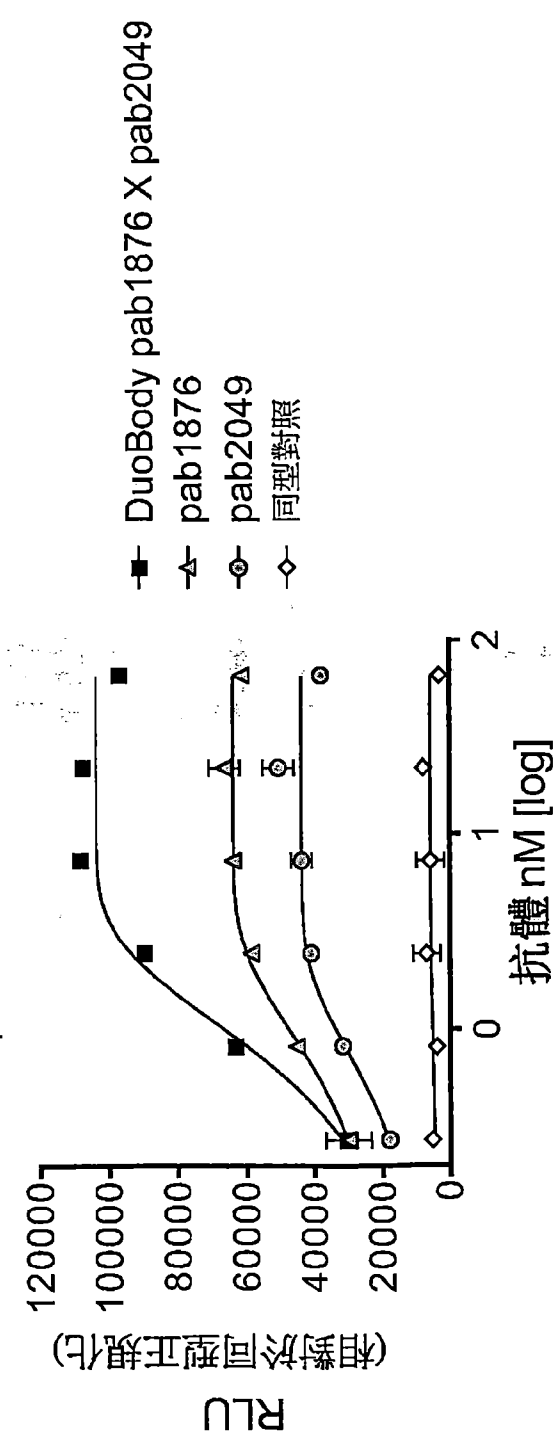


圖3B

Jurkat-huGITR 細胞 (GITR+/OX40-)  
FcγRIIIA V158 變異體

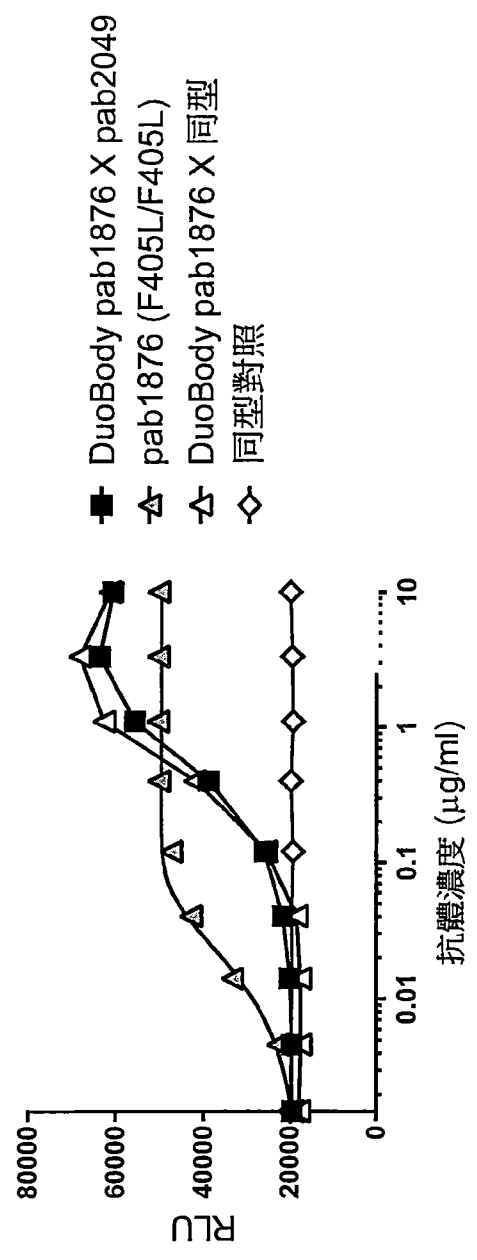


圖3C

Jurkat-huOX40 細胞 (GITR-/OX40+)  
FcγRIIIA V158 變異體

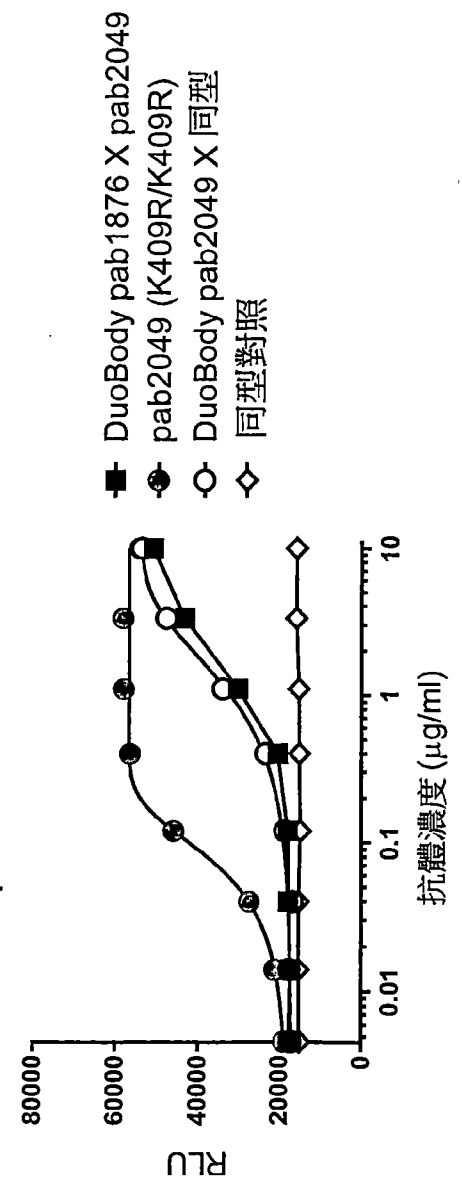


圖3D

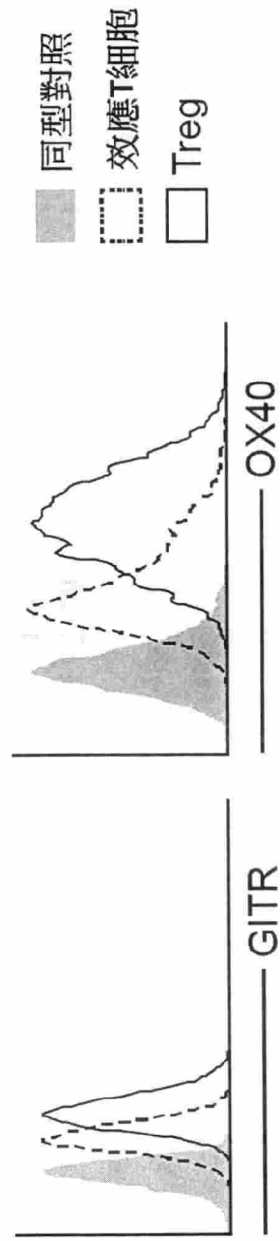


圖3E

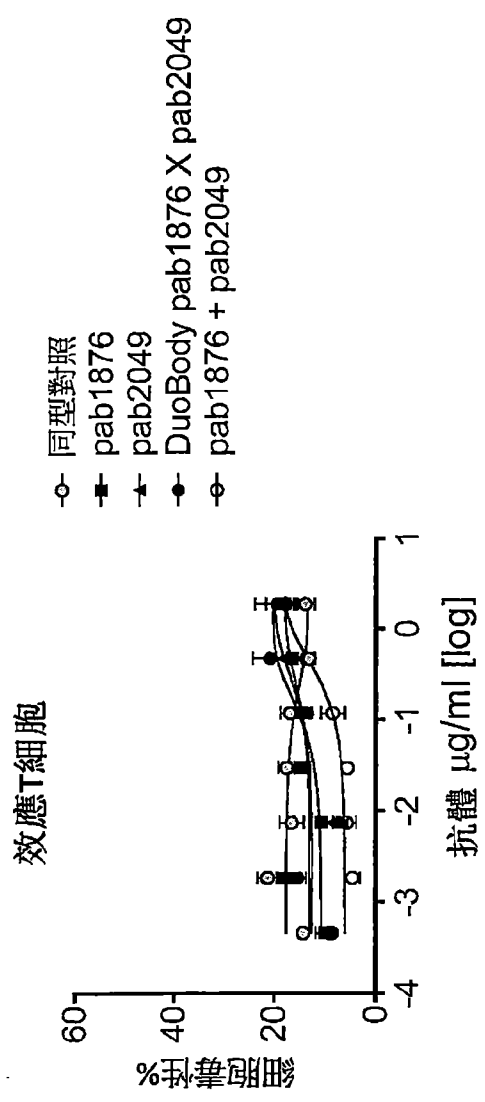


圖3F

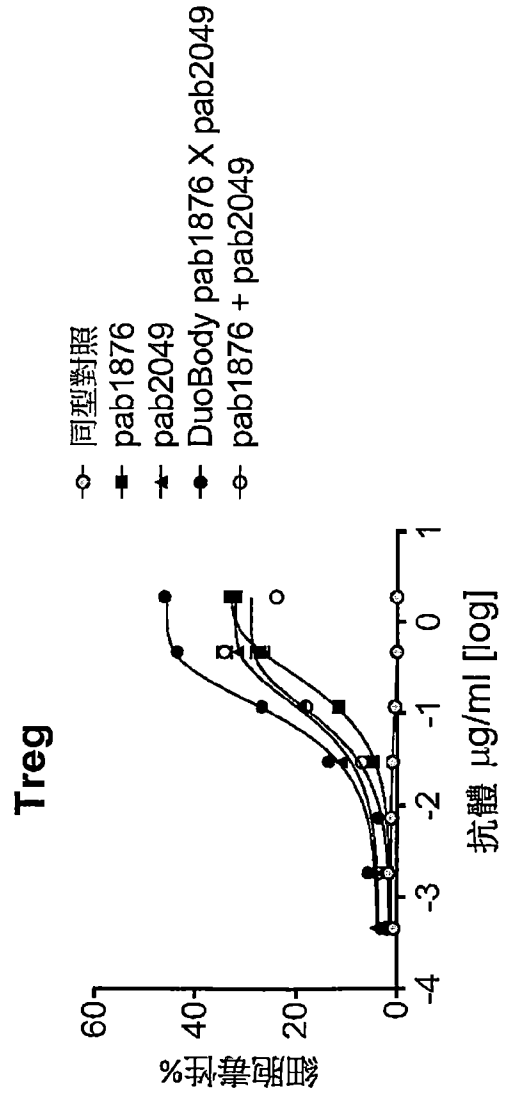


圖3G

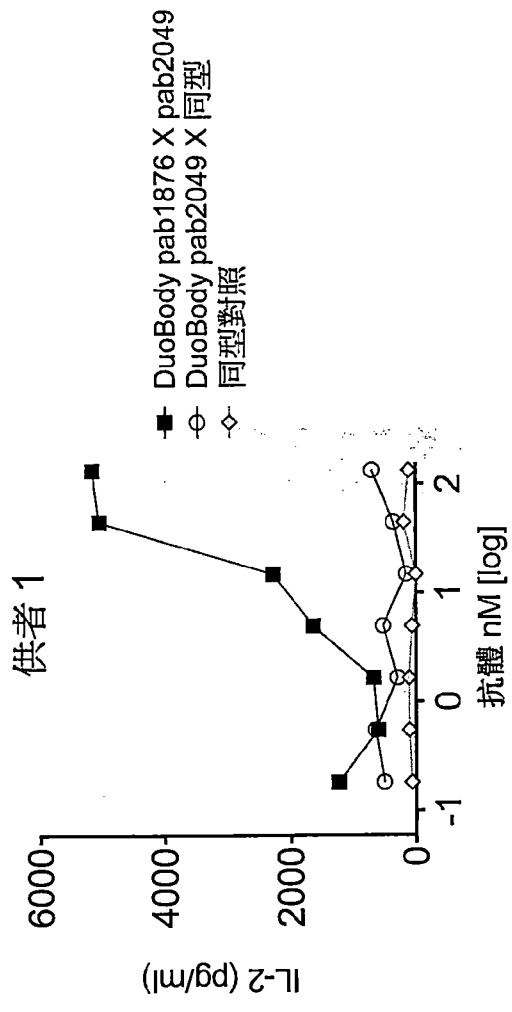


圖4A

供者 2

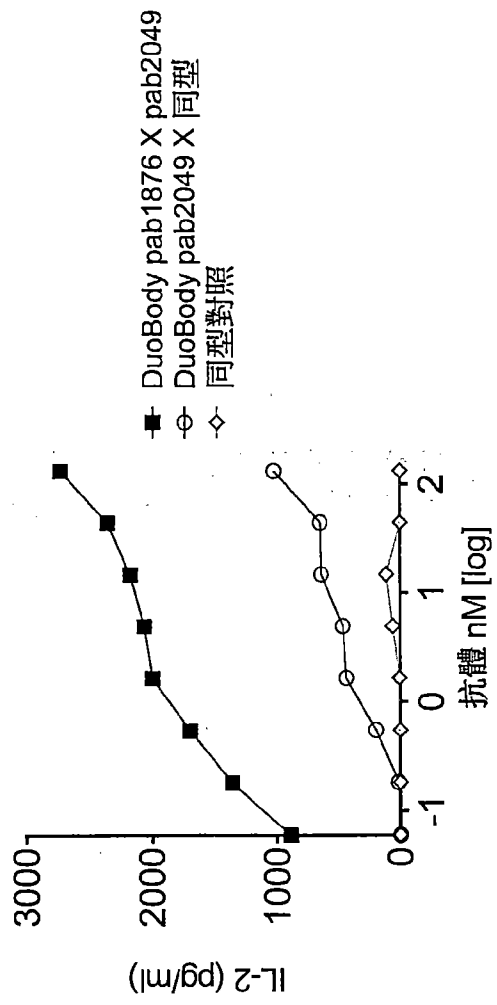


圖4B



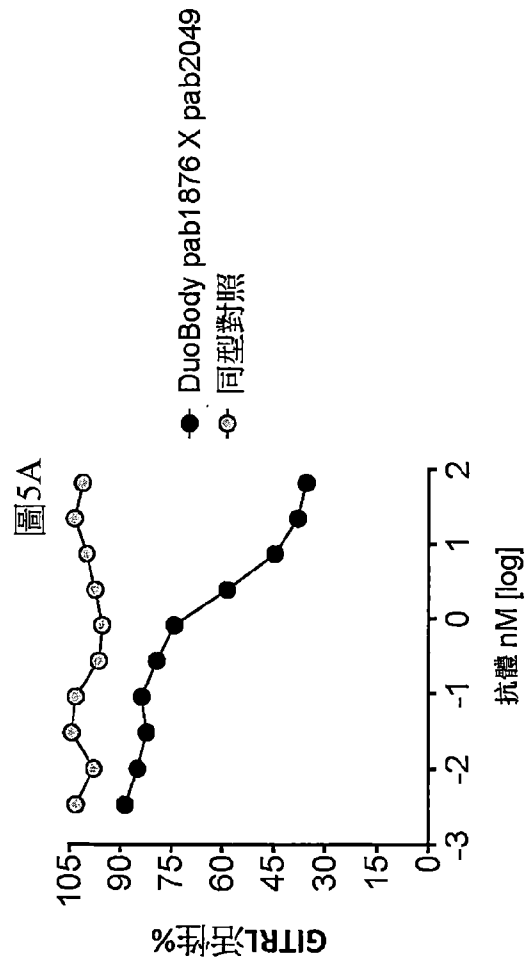
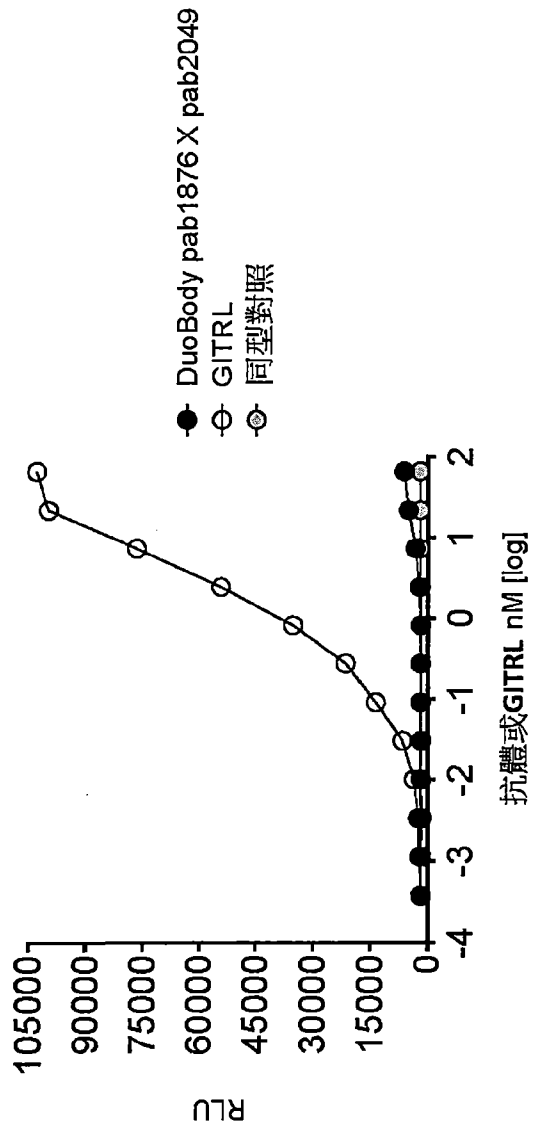


圖5A

圖5B

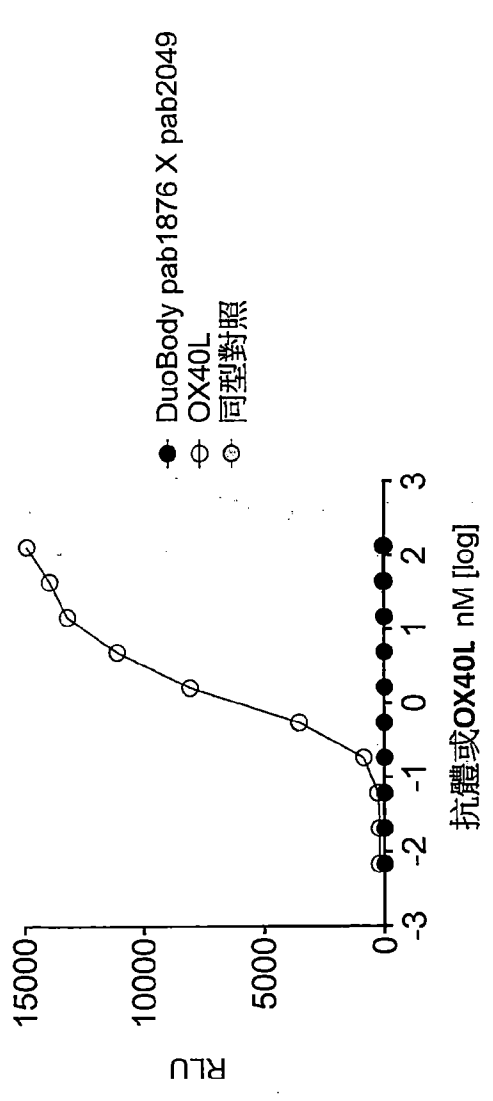


圖6A

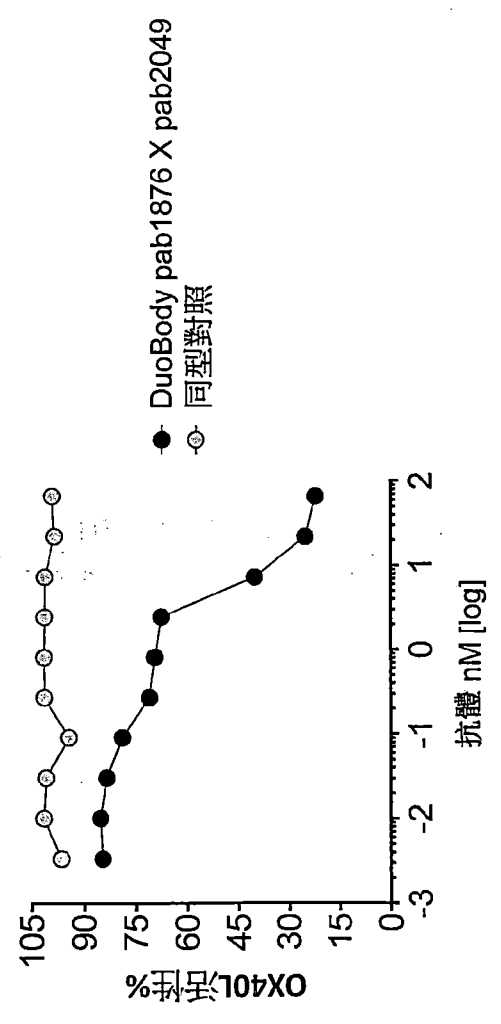


圖6B

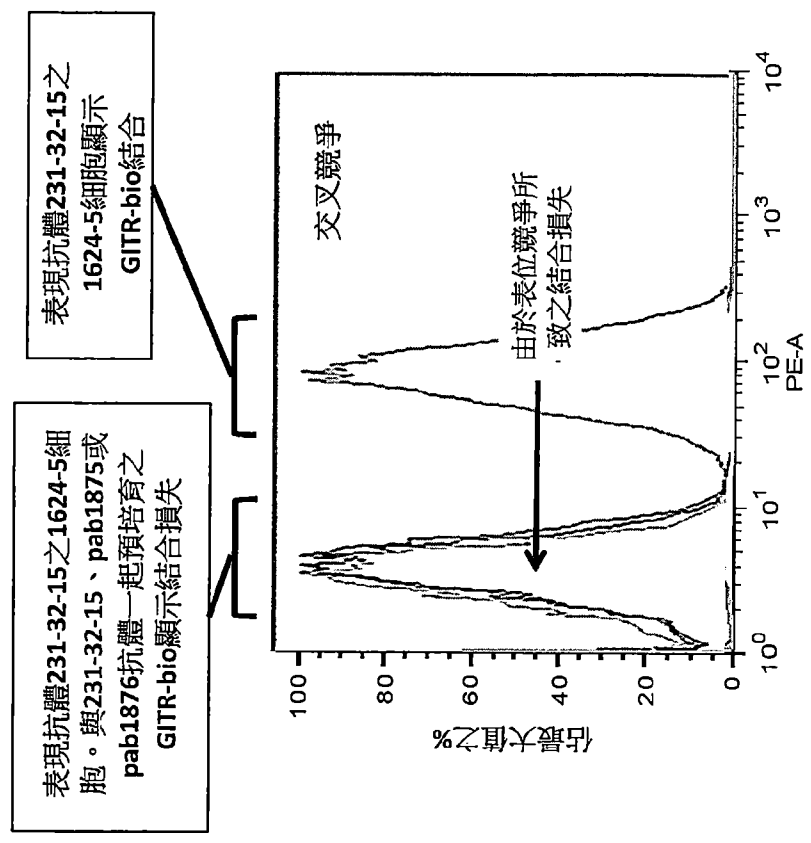


圖7

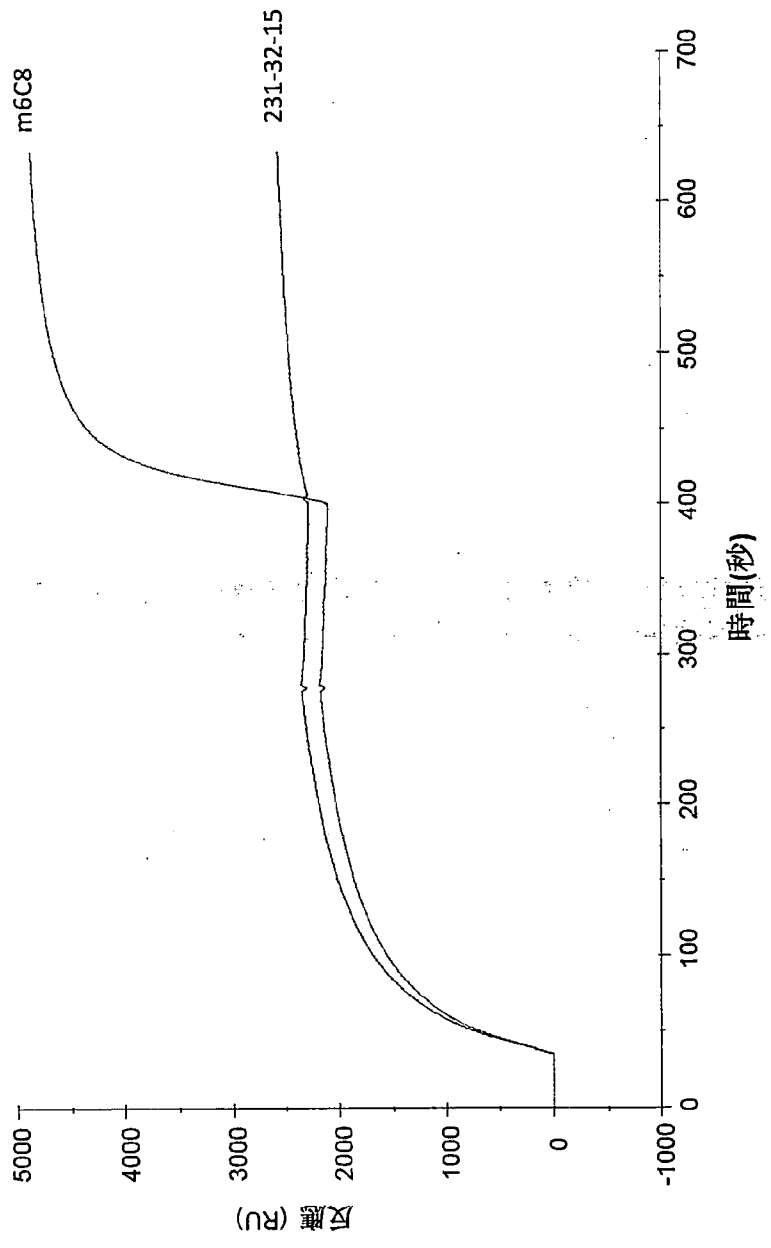


圖8

MAQHGMGAFRALCGLLALCALSLGQRPTGGPGCGGFRLLLGTGTARCCRVHTTRCCRDYDECCSEWDCMCVQPEFHCG  
 10 20 30 40 50 60 70 80  
 MAQHGMGAFRALCGLLALCALSLGQRPTGGPGCGGFRLLLGTGTARCCRVHTTRCCRDYDECCSEWDCMCVQPEFHCG  
 .....S.....S.N.....  
 .....Q.....S.....  
 .....A.....S.....  
 .....L.....D.....  
 .....D.....D.....  
 .....D.....D.....  
 .....V.....D.....Y.....  
 .....D.....D.....V.....  
 .....D.....D.....  
 .....D.....D.....  
 .....S.....D.....D.....  
 .....D.....R.....  
 .....D.....R.....  
 .....R.....R.....  
 .....C.....C.....  
 .....T.....C.....  
 .....C.....C.....  
 .....A.....C.....  
 .....S.....C.....  
 .....R.....C.....  
 .....S.....C.Q.....  
 .....S.....S.....V.....G.....  
 .....K.....S.....V.....  
 .....L.....V.....  
 .....L.....I.....  
 .....L.....I.....

hUGITR  
 2124B07\_1155-Je 註釋序列  
 2124C01\_1155-Je 註釋序列  
 2124C02\_1155-Je 註釋序列  
 2124D03\_1155-Je 註釋序列  
 2124A01\_1155-Je 註釋序列  
 2124A03\_1155-Je 註釋序列  
 2124A05\_1155-Je 註釋序列  
 2124A11\_1155-Je 註釋序列  
 2124A12\_1155-Je 註釋序列  
 2124B01\_1155-Je 註釋序列  
 2124B04\_1155-Je 註釋序列  
 2124B12\_1155-Je 註釋序列  
 2124C03\_1155-Je 註釋序列  
 2124C08\_1155-Je 註釋序列  
 2124C12\_1155-Je 註釋序列  
 2124A02\_1155-Je 註釋序列  
 2124A09\_1155-Je 註釋序列  
 2124A10\_1155-Je 註釋序列  
 2124B08\_1155-Je 註釋序列  
 2124A04\_1155-Je 註釋序列  
 2124A07\_1155-Je 註釋序列  
 2124B05\_1155-Je 註釋序列  
 2124B06\_1155-Je 註釋序列  
 2124B09\_1155-Je 註釋序列  
 2124D04\_1155-Je 註釋序列  
 2124C10\_1155-Je 註釋序列  
 2124A08\_1155-Je 註釋序列  
 2124B02\_1155-Je 註釋序列  
 2124B03\_1155-Je 註釋序列  
 2124A06\_1155-Je 註釋序列  
 2124C04\_1155-Je 註釋序列  
 2124C09\_1155-Je 註釋序列

圖9A



突變體	構建編號	pab1876	pab1967	pab1975	pab1979	m6C8
T54A	4526	+	+	+	+	+
T55A	4527	+	+	+	+	+
R56A	4528	+	+	+	+	+
C57A	4529	+	+	+	+	+
C58A	4530	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
R59A	4531	+	+	+	+	+
D60A	4532	-	+/-	+/-	+/-	+
Y61A	4533	+	+	+	+	+
P62A	4534	+	+	+	+	+
G63A	4535	+/-	+/-	+/-	+/-	+
E64A	4536	+	+	+	+	+
E65A	4537	+	+	+	+	+
C66A	4538	+	+	+	+	+
C67A	4539	+	+	+	+	+
S68A	4540	+	+	+	+	+
E69A	4541	+	+	+	+	+
W70A	4542	+	+	+	+	+
D71A	4543	+	+	+	+	+
C72A	4544	+	+	+	+	+
M73A	4545	+	+	+	+	+
C74A	4546					
V75A	4547	+	+	+	+	+
Q76A	4548	+	+	+	+	+
P28A	4595	+	+	+	+	+
T29A	4596	+	+	+	+	+
G30A	4597	+	+	+	+	+
G31A	4598	+	+	+	+	+
P32A	4599	+	+	+	+	+

圖10A

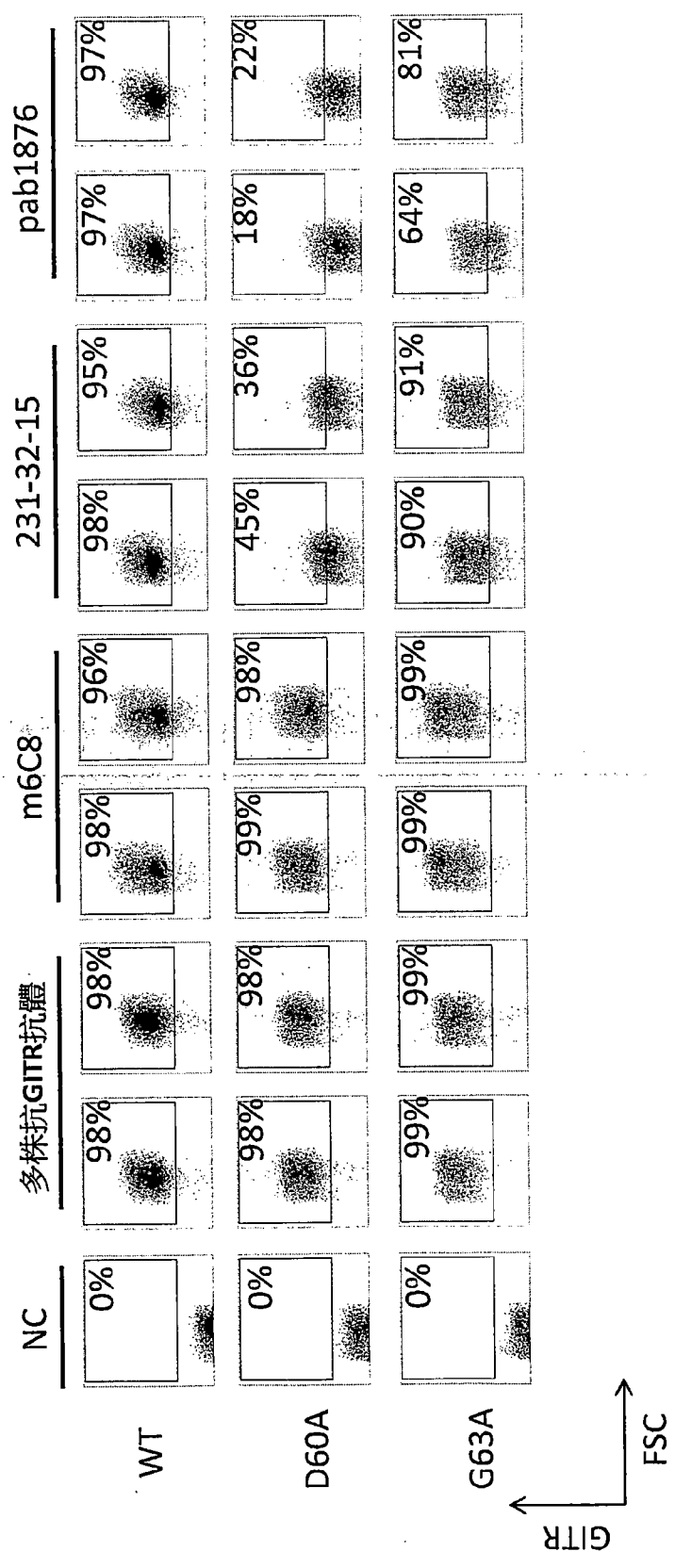


圖10B



	MARHGAMCAGTLCCLALLCAASLGQRPTGGPGCGPGRLLLGTGKDARCCRVHPTRCRDYDPECCSEWDCVCVQPEFH	10	20	30	40	50	60	70	80
人類 G1TR	MAQHGMGAFRALCGLALLCALSLGQRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYDPECCSEWDCMCVQPEFH	80							
V1M/Q62P/S63G 石蟹獼猴G1TR	..R...C..CGT..C...A.....A.....K.....P.....V.....	80							
V1M 石蟹獼猴G1TR	..R...C..CGT..C...A.....A.....K.....P.....Q.S.....V.....	80							
	CGNP CCTTCQHHPCCSGGQGVQPQGFSGFRVDCALGTFSRGHGHCCKPMTDCTQFGFLTVPFGNKTHNAVCPGSPPA	90	100	110	120	130	140	150	160
人類 G1TR	CGDP CCTTCRHHPCCPPGQGVQSGKFSFGQCIDCASGTFSGGHEGHCKPMTDCTQFGFLTVPFGNKTHNAVCPGSPPA	160							
V1M/Q62P/S63G 石蟹獼猴G1TR	..N.....Q.....S.....P.....R.V...L...R.D.....	160							
V1M 石蟹獼猴G1TR	..N.....Q.....S.....P.....R.V...L...R.D.....	160							
	EPPGWLTIIVLLAVAAACVLLLTSACLGLHIMQLG-----KTQLLLEVPPSTEDASSCQFPPEEERGERLAEEKGRLLGDLW	170	180	190	200	210	220	230	240
人類 G1TR	EPLGLTWVLLAVAAACVLLLTSACLGLHIMQLRSQCMWPRETQLLLEVPPSTEDARSQFPPEEERGERSAEEKGRLLGDLW	240							
V1M/Q62P/S63G 石蟹獼猴G1TR	..P...I.....G.....K.....S.....L.....	233							
V1M 石蟹獼猴G1TR	..P...I.....G.....K.....S.....L.....	233							
V-									
V.									242
..									235
.									234

圖 IIA

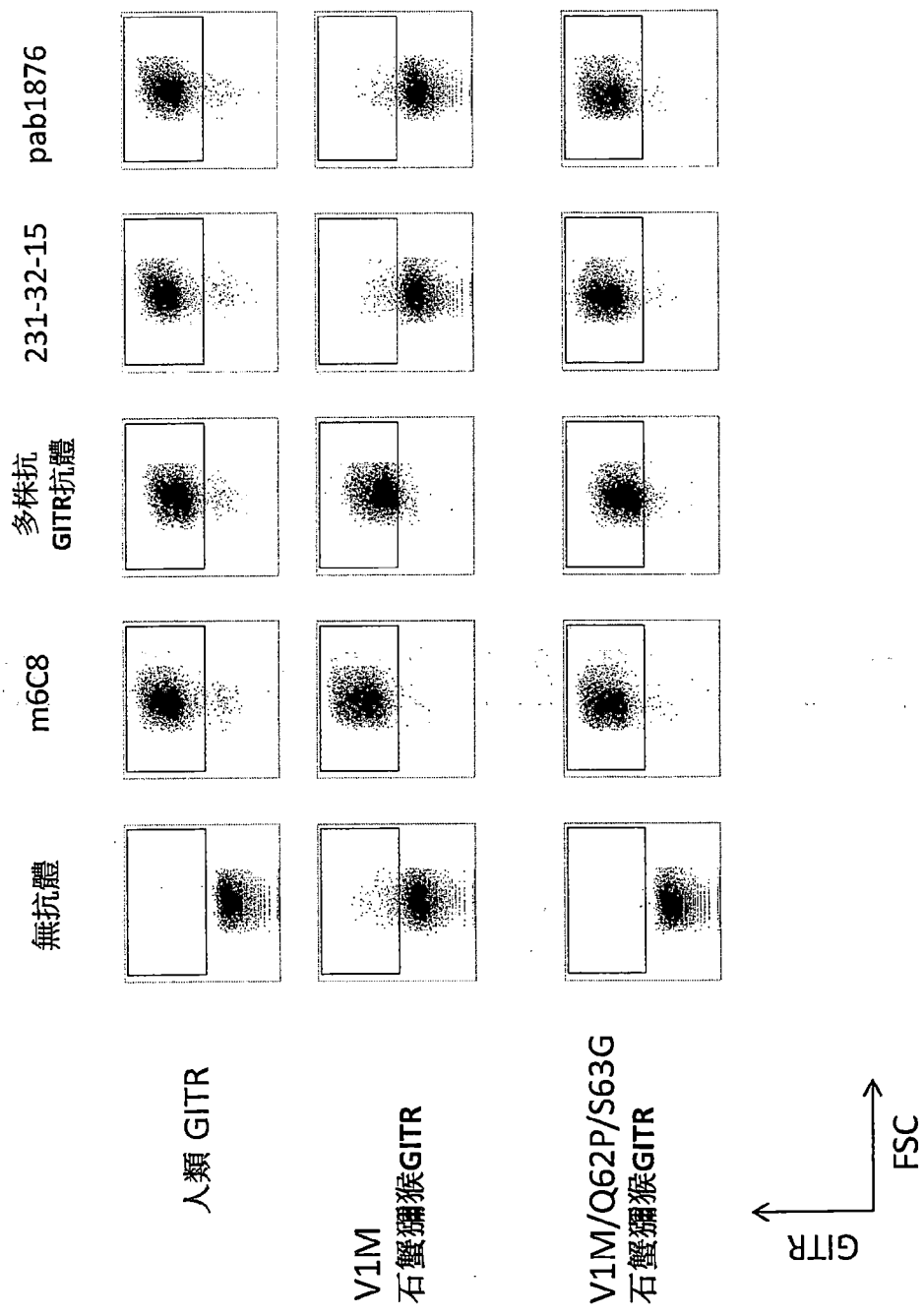


圖11B

	pab1949w	pab2049	pab1928
W58A	-	+	-
N60A	-	-	+
R62A	-	-	+
R80A	-	-	+
L88A	-	-	+
P93A	-	-	+
P99A	-	+	+
P115A	-	+	+

圖12