



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201725215 A

(43) 公開日：中華民國 106 (2017) 年 07 月 16 日

(21) 申請案號：105141113

(22) 申請日：中華民國 105 (2016) 年 12 月 12 日

(51) Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30) 優先權：2015/12/14 美國

62/266,944

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

美國

(72) 發明人：強生 萊斯利 JOHNSON, LESLIE S. (US)；齊齊李 古蘭那達瑞迪 CHICHILI, GURUNADH REDDY (IN)；尚 坎帕納 SHAH, KALPANA (US)；拉莫特莫斯 羅斯 LA MOTTE-MOHS, ROSS (US)；摩爾 保羅 MOORE, PAUL A. (GB)；波維尼 愛利歐 BONVINI, EZIO (US)；寇尼格 史考特 KOENIG, SCOTT (US)

(74) 代理人：李文賢

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：24 項 圖式數：24 共 197 頁

(54) 名稱

對於 PD-1 和 CTLA-4 具有免疫反應性的雙特異性分子及其使用方法

BISPECIFIC MOLECULES HAVING IMMUNOREACTIVITY WITH PD-1 AND CTLA-4, AND METHODS OF USE THEREOF

(57) 摘要

本發明涉及雙特異性分子(例如，雙抗體、雙特異性抗體、三價結合分子等)，其具有對於 PD-1 的表位免疫特異性的至少一個表位-結合位點和對於 CTLA-4 的表位免疫特異性的至少一個表位-結合位點(即，“PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子”)。本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子能夠同時結合 PD-1 和結合 CTLA-4，尤其當這類分子排列在人細胞的表面上時。本發明涉及藥物組合物，其包含這類 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子，並且涉及包括這類雙特異性分子在治療癌症和其他疾病和病況中的用途的方法。本發明也涉及使用這類 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子刺激免疫應答的方法。

The present invention is directed to bispecific molecules (e.g., diabodies, bispecific antibodies, trivalent binding molecules, etc.) that possess at least one epitope-binding site that is immunospecific for an epitope of PD-1 and at least one epitope-binding site that is immunospecific for an epitope of CTLA-4 (i.e., a “PD-1 x CTLA-4 bispecific molecule”). The PD-1 x CTLA-4 bispecific molecules of the present invention are capable of simultaneously binding to PD-1 and to CTLA-4, particularly as such molecules are arrayed on the surfaces of human cells. The invention is directed to pharmaceutical compositions that contain such PD-1 x CTLA-4 bispecific molecules, and to methods involving the use of such bispecific molecules in the treatment of cancer and other diseases and conditions. The present invention also pertains to methods of using such PD-1 x CTLA-4 bispecific molecules to stimulate an immune response.

指定代表圖：

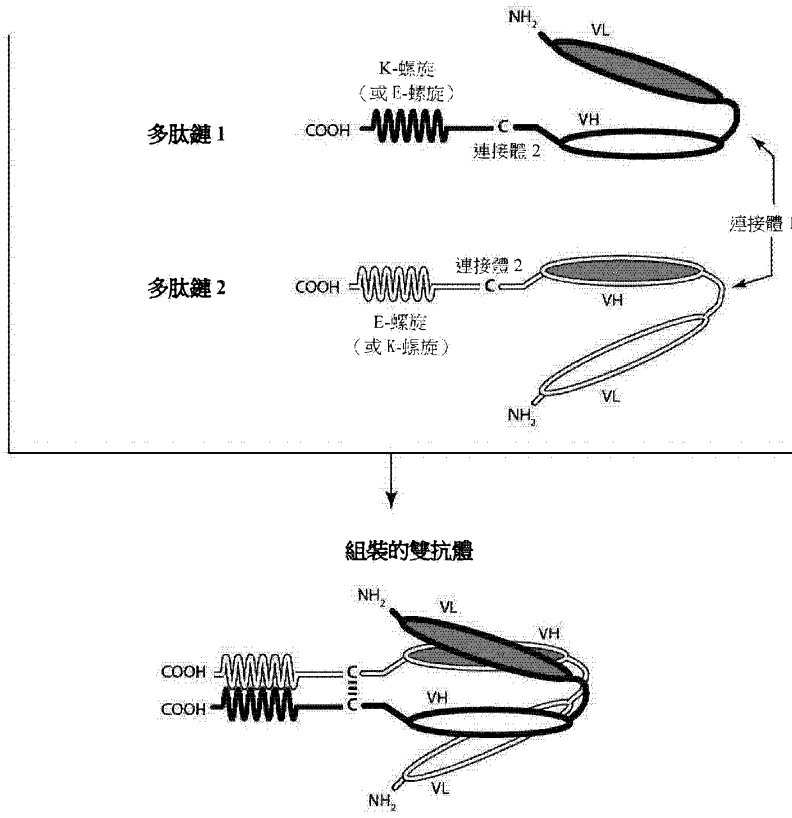


圖 1

【發明說明書】

【中文發明名稱】對於PD-1和CTLA-4具有免疫反應性的雙特異性分子及其使用方法

【英文發明名稱】 Bispecific Molecules Having Immunoreactivity with PD-1 and CTLA-4, and Methods of Use Thereof

【技術領域】

【0001】本申請是美國專利申請系列號 62/266,944 (2015 年 12 月 14 日提交；待決)的部分連續案，並且要求其優先權，該申請以其整體併入本文。

【0002】根據 37 C.F.R. 1.821 以及下面的條款，本申請包括一個或多個序列表，其以電腦可讀的介質公開(檔案名：1301_0134PCT_ST25.txt，2016 年 12 月 4 日創建，大小為 186,018 位元組)，該檔通過引用以其整體併入本文。

【0003】本發明涉及雙特異性分子(例如，雙抗體、雙特異性抗體、三價結合分子等)，其具有對於 PD-1 的表位免疫特異性的至少一個表位-結合位點和對於 CTLA-4 的表位免疫特異性的至少一個表位-結合位點(即，“PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子”)。本發明涉及這類 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子，其具有對於 PD-1 的一個(或兩個)表位免疫特異性的兩個表位-結合位點和對於 CTLA-4 的一個(或兩個)表位免疫特異性的兩個表位-結合位點。本發明也涉及這類 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子，其另外包括免疫球蛋白 Fc 區。本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子能夠同時結合至 PD-1 和結合至 CTLA-4，尤其當這類分子排列在人細胞的表面上時。本發明涉及藥物組合物，其包含這類 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子，並且涉及包括這類雙特異性分子在治療癌症和其他疾病和病況中的用途的方法。本發明也涉及使用這類 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子刺激免疫應答的方

法。

【先前技術】

【0004】 I. 免疫系統針對癌症的應答

【0005】 哺乳動物免疫系統天然準備著識別和消除癌細胞(Topalian, S.L.等(2015) “*Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy,*” *Cancer Cell* 27:450-461)。在健康的個體中，免疫系統處於靜態，受到各種不同的抑制受體和配體庫(repertoire)的抑制。這類免疫“檢查點”途徑對於保持自身耐受性是重要的(即，防止受試者成立針對他/她自身細胞的免疫系統攻擊(“自身免疫”反應)，並且在抗微生物或抗過敏免疫應答期間對於限制並生組織損傷也是重要的。在識別癌症抗原、檢測微生物病原體或過敏原的存在後，一系列啟動受體和配體誘導免疫系統的啟動。這類啟動導致巨噬細胞、天然殺傷細胞(NK)和抗原特異性、細胞毒性 T-細胞的啟動，並且促進各種細胞因數的釋放，所有這些都用於抵抗對受試者健康的感知威脅(Dong, C.等(2003) “*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,*” *Immunolog. Res.* 28(1):39-48 ; Viglietta, V.等(2007) “*Modulating Co-Stimulation,*” *Neurotherapeutics* 4:666-675 ; Korman, A.J.等(2007) “*Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy,*” *Adv. Immunol.* 90:297-339)。當補償的抑制免疫信號超過啟動免疫信號時，免疫系統能夠回到其正常的靜態。

【0006】 因此，癌症的疾病狀態(事實上，感染疾病的疾病狀態)可視為反映了對充分啟動受試者免疫系統的失敗。這樣的失敗可反映啟動免疫信號的不充分呈遞，或其可反映不能夠充分緩解受試者中的抑制免疫信號。在一些情況下，研究人員已經確定了癌症細胞指派免疫系統逃避免疫系統檢測(Topalian, S.L.等(2015) “*Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy,*” *Cancer Cell* 27:450-461)。

【0007】尤其重要的是抗原呈遞細胞的 B7.1 (CD80)和 B7.2 (CD86)配體和 CD4⁺ T 淋巴細胞的 CD28 和 CTLA-4 受體之間的結合(Sharpe, A.H.等(2002) “*The B7-CD28 Superfamily*,” *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126 ; Dong, C. 等(2003) “*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules*,” *Immunolog. Res.* 28(1):39-48 ; Lindley, P.S.等(2009) “*The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation*,” *Immunol. Rev.* 229:307-321) 。 B7.1 或 B7.2 與 CD28 的結合刺激 T-細胞啟動；B7.1 或 B7.2 與 CTLA-4 的結合抑制這樣的啟動(Dong, C.等(2003) “*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules*,” *Immunolog. Res.* 28(1):39-48 ; Lindley, P.S.等(2009) “*The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation*,” *Immunol. Rev.* 229:307-321 ; Greenwald, R.J.等(2005) “*The B7 Family Revisited*,” *Ann. Rev. Immunol.* 23:515-548) 。 CD28 在 T-細胞的表面上組成型表達(Gross, J.等(1992) “*Identification And Distribution Of The Costimulatory Receptor CD28 In The Mouse*,” *J. Immunol.* 149:380–388) ，而 CTLA-4 表達在 T-細胞啟動之後被快速上調(Linsley, P.等(1996) “*Intracellular Trafficking Of CTLA4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement*,” *Immunity* 4:535–543) 。因為 CTLA-4 是更高的親和性受體(Sharpe, A.H. 等(2002) “*The B7-CD28 Superfamily*,” *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126 ; Topalian, S.L.等(2015) “*Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy*,” *Cancer Cell* 27:450-461) ，因此結合首先啟動 T-細胞增殖(經 CD28) ，然後抑制 T-細胞增殖(經 CTLA-4 的初期表達) ，從而當不再需要增殖時，阻礙該作用。

【0008】 II. CTLA-4

【0009】結合蛋白質-4 的細胞毒性 T-淋巴細胞(CTLA-4 ; CD152)是 I 型單次穿膜蛋白質，其形成二硫化物連接的同源二聚體(Schwartz J.C.等(2001) “*Structural Basis For Co-Stimulation By The Human CTLA-4/B7-2 Complex*,” *Nature*

410:604-608)。編碼不同同等型(isoform)的可選的剪接變體已經被表徵，包括用作單體的可溶性同等型(Magistrelli G.等(1999) “*A Soluble Form Of CTLA-4 Generated By Alternative Splicing Is Expressed By Nonstimulated Human T Cells,*” Eur. J. Immunol. 29:3596-3602；Oaks M.K.等(2000) “*A Native Soluble Form Of CTLA-4,*” Cell Immunol 201:144-153)。

【0010】CTLA-4 主要是細胞內抗原，通過向細胞表面的有限運輸和快速內化，其表面表達受到密切調控(Alegre M-L 等(1996) “*Regulation Of Surface And Intracellular Expression Of CTLA4 On Mouse T Cells,*” J. Immunol. 157:4762–4770；Linsley, P.S.等(1996) “*Intracellular Trafficking Of CTLA-4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement,*” Immunity 4:535–543)。

CTLA-4 以低水準在幼稚效應 T-細胞的表面上表達(Alegre, M.L.等(1996) “*Regulation Of Surface And Intracellular Expression Of CTLA4 On Mouse T Cells,*” J Immunol 157:4762-70)，並且在 T 調節細胞上組成型表達(Wang, X.B.等(2002) “*Expression Of CTLA-4 By Human Monocytes,*” Scand. J. Immunol. 55:53-60)。

【0011】CTLA-4 的細胞外區域包括單細胞外 Ig(V)結構域，然後是跨膜(TM)區域和小的細胞內細胞質尾區(37 個氨基酸)。細胞內尾區包含兩個基於酪氨酸的基序，其與若干細胞內蛋白質，包括脂質激酶磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)、磷酸酶類 SHP-2 和 PP2A 以及網格蛋白適體蛋白 AP-1 和 AP-2 相互作用(Rudd, C.E.等(2003) “*Unifying Concepts In CD28, ICOS And CTLA4 Co-Receptor Signalling,*” Nat Rev Immunol. 3:544-56)。

CTLA-4 與 CD28 相關，兩個蛋白質在氨基酸水準具有約 29% 的同一性(Harper, K. (1991) “*CTLA-4 And CD28 Activated Lymphocyte Molecules Are Closely Related In Mouse And Human As To Sequence, Message Expression, Gene Structure, And Chromosomal Location,*” J. Immunol. 147:1037-1044)。

【0012】當幼稚 T 效應細胞通過其 T-細胞受體(TCR)被啟動時，CTLA-4 被招募至細胞表面(Linsley, P.S.等(1996) “*Intracellular Trafficking Of CTLA-4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement,*” *Immunity* 4:535-43)。當 CTLA-4 在 T-細胞表面上表達時，其與 CD28 (在 T-細胞上組成型表達)競爭 CD80/CD86，從而切斷通過 TCR 的進一步信號傳導，因此下調通過 TCR 信號傳導的任何進一步的 T-細胞應答(Carreno, B.M.等(2000) “*CTLA-4 (CD152) Can Inhibit T Cell Activation By Two Different Mechanisms Depending On Its Level Of Cell Surface Expression,*” *J Immunol* 165:1352-6；Chuang, E.等(1999) “*Regulation Of Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Molecule-4 By Src Kinases,*” *J Immunol* 162:1270-7)。因此，CTLA-4 用作 T 效應細胞啟動的負調節子，其使得效應子功能消失並且控制 T-細胞應答的效力和持久力(Linsley, P.S.等(1996) “*Intracellular Trafficking Of CTLA-4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement,*” *Immunity* 4:535-43)。

【0013】另外，CTLA-4 可在增強調節 T-細胞對針對癌症的免疫應答的負作用中起到作用(Tai, Y.T.等(2012) “*Potent in vitro And in vivo Activity Of An Fc-Engineered Humanized Anti-HM1.24 Antibody Against Multiple Myeloma via Augmented Effector Function,*” *Blood* 119:2074-82)。與 CD28 相比，CTLA-4 對於 B7 家族成員具有更高的親和力，因此其在 T-細胞上的表達控制 T-細胞的顯性 (dominant)負調節(Allison, J.P.等(1995) “*Manipulation Of Costimulatory Signals To Enhance Antitumor T-Cell Responses,*” *Curr Opin Immunol* 7:682-6)。還未充分理解 CTLA-4 有助於 T 調節細胞的抑制因數功能的機制，但是 CTLA-4 在 T 調節細胞上的表達增強了這些細胞的抑制功能(Tai, Y.T.等(2012) “*Potent in vitro And in vivo Activity Of An Fc-Engineered Humanized Anti-HM1.24 Antibody Against Multiple Myeloma via Augmented Effector Function,*” *Blood* 119:2074-82)。

【0014】據報導，CTLA-4 的阻斷增強了體外(Walunas, T.L.等(1994) “*CTLA-4 Can Function As A Negative Regulator Of T Cell Activation*,” *Immunity* 1:405-413)和體內(Kearney, E.R.等(1995) “*Antigen-Dependent Clonal Expansion Of A Trace Population Of Antigen-Specific CD4+ T Cells in vivo Is Dependent On CD28 Costimulation And Inhibited By CTLA-4*,” *J. Immunol.* 155:1032-1036)T-細胞應答，並且也提高了抗腫瘤免疫力(Leach, D.R.等(1996) “*Enhancement Of Antitumor Immunity By CTLA-4 Blockade*,” *Science* 271:1734-1736)。因此，已經推薦使用抗 CTLA-4 抗體阻斷 CTLA-4，以提供針對疾病，尤其是其中免疫刺激可能是有益的人類疾病的新療法，比如用於治療癌症和感染性疾病(見，Leach, D.R.等(1996) “*Enhancement Of Antitumor Immunity By CTLA-4 Blockade*,” *Science.* 271:1734-1736；和 PCT 公開號 WO 01/14424、WO 00/37504)。CTLA-4 功能的阻斷劑的開發已經關注于使用單克隆抗體，比如伊匹單抗(ipilimumab)(見，例如，Hodi, F.S.等(2003) “*Biologic Activity Of Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4 Antibody Blockade In Previously Vaccinated Metastatic Melanoma And Ovarian Carcinoma Patients*,” *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 100:4717-4717)和替西木單抗(tremelimumab)(Ribas, A.等(2005) “*Antitumor Activity In Melanoma And Anti-Self Responses In A Phase I Trial With The Anti-Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4 Monoclonal Antibody CP-675,206*,” *Oncologist* 12: 873-883)。

【0015】III. 程式性死亡-1 (“PD-1”)

【0016】程式性死亡-1 (“PD-1”，也稱為“CD279”)是廣泛負調節免疫應答的 T-細胞調節子的擴展的 CD28/CTLA-4 家族的 I 型膜蛋白質成員(Ishida, Y.等(1992) “*Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death*,” *EMBO J.* 11:3887-3895；美國專利申

請公開號 2007/0202100、2008/0311117、2009/00110667；美國專利號 6,808,710、7,101,550、7,488,802、7,635,757、7,722,868；PCT 公開號 WO 01/14557)。

【0017】PD-1 系統的受體-配體相互作用似乎比 CD28/CTLA-4 系統的那些甚至更複雜。PD-1 在啟動的 T-細胞、B-細胞和單核細胞的細胞表面上表達(Agata, Y.等(1996) “*Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes,*” *Int. Immunol.* 8(5):765-772；Yamazaki, T.等(2002) “*Expression Of Programmed Death 1 Ligands By Murine T-Cells And APC,*” *J. Immunol.* 169:5538-5545)並且以低水準在天然殺傷(NK) T-細胞中表達(Nishimura, H.等(2000) “*Facilitation Of Beta Selection And Modification Of Positive Selection In The Thymus Of PD-1-Deficient Mice,*” *J. Exp. Med.* 191:891-898；Martin-Orozco, N.等(2007) “*Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity,*” *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298)。

【0018】PD-1的細胞外區域由與CTLA-4中等同結構域具有23%同一性的單免疫球蛋白(Ig)V 結構域組成(Martin-Orozco, N.等(2007) “*Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity,*” *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298)。細胞外 IgV 結構域之後是跨膜區域和細胞內尾區。細胞內尾區包含位於基於免疫受體酪氨酸的抑制基序和基於免疫受體酪氨酸的轉換基序中的兩個磷酸化位點，這表明 PD-1 負調節 TCR 信號(Ishida, Y.等(1992) “*Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death,*” *EMBO J.* 11:3887-3895；Blank, C.等(2006) “*Contribution Of The PD-L1/PD-1 Pathway To T-Cell Exhaustion: An Update On Implications For Chronic Infections And Tumor Evasion Cancer,*” *Immunol. Immunother.* 56(5):739-745)。

【0019】通過結合 B7-H1 和 B7-DC，PD-1 介導其對免疫系統的抑制(也稱為 PD-L1 和 PD-L2，Flies, D.B.等 (2007) “*The New B7s: Playing a Pivotal Role in*

Tumor Immunity,” *J. Immunother.* 30(3):251-260 ; 美國專利號 6,803,192 、 7,794,710 ; 美國專利申請公開號 2005/0059051 、 2009/0055944 、 2009/0274666 、 2009/0313687 ; PCT 公佈號 WO 01/39722 、 WO 02/086083) 。

【0020】 B7-H1 和 B7-DC 在許多類型的人和鼠科動物組織，比如心臟、胎盤、肌肉、胎肝、脾、淋巴結和胸腺以及鼠科動物肝、肺、腎、胰腺的胰島細胞和小腸的表面上廣泛表達(Martin-Orozco, N.等(2007) “*Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity,*” *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298)。在人中，已經發現 B7-H1 蛋白質在人內皮細胞(Chen, Y.等(2005) “*Expression of B7-H1 in Inflammatory Renal Tubular Epithelial Cells,*” *Nephron. Exp. Nephrol.* 102:e81-e92 ; de Haij, S.等(2005) “*Renal Tubular Epithelial Cells Modulate T-Cell Responses Via ICOS-L And B7-H1*” *Kidney Int.* 68:2091-2102 ; Mazanet, M.M.等(2002) “*B7-H1 Is Expressed By Human Endothelial Cells And Suppresses T-Cell Cytokine Synthesis,*” *J. Immunol.* 169:3581-3588)、心肌(Brown, J.A.等(2003) “*Blockade Of Programmed Death-1 Ligands On Dendritic Cells Enhances T-Cell Activation And Cytokine Production,*” *J. Immunol.* 170:1257-1266)、合胞滋養層(syncytiotrophoblast)(Petroff, M.G. 等(2002) “*B7 Family Molecules: Novel Immunomodulators At The Maternal-Fetal Interface,*” *Placenta* 23:S95-S101)中表達。分子也由一些組織的駐留型巨噬細胞、已經被干擾素(IFN)- γ 或腫瘤壞死因數(TNF)- α 啟動的巨噬細胞表達(Latchman, Y.等(2001) “*PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-Cell Activation,*” *Nat. Immunol* 2:261-268)並在腫瘤中表達(Dong, H. (2003) “*B7-H1 Pathway And Its Role In The Evasion Of Tumor Immunity ,*” *J. Mol. Med.* 81:281-287)。

【0021】 已經發現 B7-H1 和 PD-1 之間的相互作用為 T 和 B-細胞提供了重要的負共刺激信號(Martin-Orozco, N.等(2007) “*Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity,*” *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298)並且用作細胞死亡的誘

導者(Ishida, Y.等(1992) “*Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death,*” *EMBO J.* 11:3887-3895 ; Subudhi, S.K. 等 (2005) “*The Balance Of Immune Responses: Costimulation Verse Coinhibition,*” *J. Molec. Med.* 83:193-202)。更具體而言，已經發現低濃度的 PD-1 受體和 B7-H1 配體之間的相互作用導致強烈抑制抗原特異性 CD8⁺ T-細胞增殖的抑制信號的傳輸；在更高的濃度下，與 PD-1 的相互作用不抑制 T 細胞增殖但是顯著減少多種細胞因數的產生(Sharpe, A.H.等(2002) “*The B7-CD28 Superfamily,*” *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126)。已經發現可溶性 B7-H1-Fc 融合蛋白抑制靜息和先前啟動的 CD4 和 CD8 T-細胞，以及甚至來自臍帶血的幼稚 T-細胞的 T 細胞增殖和細胞因數產生(Freeman, G.J.等(2000) “*Engagement Of The PD-1 Immunoinhibitory Receptor By A Novel B7 Family Member Leads To Negative Regulation Of Lymphocyte Activation,*” *J. Exp. Med.* 192:1-9 ; Latchman, Y.等(2001) “*PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-Cell Activation,*” *Nature Immunol.* 2:261-268 ; Carter, L.等(2002) “*PD-1:PD-L Inhibitory Pathway Affects Both CD4(+) and CD8(+) T-cells And Is Overcome By IL-2,*” *Eur. J. Immunol.* 32(3):634-643 ; Sharpe, A.H.等(2002) “*The B7-CD28 Superfamily,*” *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126)。

【0022】 B7-H1 和 PD-1 在抑制 T-細胞啟動和增殖中的作用已經提示這些生物分子可能用作用於治療炎症和癌症的治療性靶。因此，已經建議了抗 PD-1 抗體治療感染和腫瘤以及上調適應性免疫應答的用途(見，美國專利申請公開號 2010/0040614、2010/0028330、2004/0241745、2008/0311117、2009/0217401；美國專利號 7,521,051、7,563,869、7,595,048；PCT 公佈號 WO 2004/056875、WO 2008/083174)。下述文獻已經報導了能夠特異性結合 PD-1 的抗體：Agata, T.等 (1996) “*Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And*

B Lymphocytes,” *Int. Immunol.* 8(5):765-772 ; 和 Berger, R.等(2008) “*Phase I Safety And Pharmacokinetic Study Of CT-011, A Humanized Antibody Interacting With PD-1, In Patients With Advanced Hematologic Malignancies,*” *Clin. Cancer Res.* 14(10):3044-3051 (也見，美國專利號 8,008,449 和 8,552,154 ; 美國專利公開號 2007/0166281、2012/0114648、2012/0114649、2013/0017199、2013/0230514 和 2014/0044738 ; 和 PCT 專利公開號 WO 2003/099196、WO 2004/004771、WO 2004/056875、WO 2004/072286、WO 2006/121168、WO 2007/005874、WO 2008/083174、WO 2009/014708、WO 2009/073533、WO 2012/135408、WO 2012/145549 和 WO 2013/014668)。

【0023】但是，儘管所有這些現有技術的進步，仍需要改善的組合物，其能夠更有力地引導身體的免疫系統攻擊癌細胞或病原體感染的細胞，尤其以較低的治療性濃度和/或減少的副作用。儘管適應性免疫系統可以是抵抗癌症和疾病的有力防禦機制，但是其經常在腫瘤微環境中受到免疫抑制/逃避機制的阻礙，比如 PD-1 和 CTLA-4 的表達。此外，在腫瘤環境(milieu)中由腫瘤細胞、免疫細胞和基質細胞表達的共抑制分子可明顯減弱針對癌細胞的 T-細胞應答。另外，抗 CTLA-4 抗體的使用誘導稱為“免疫相關的不利事件”(irAE)的被認同的副作用。IrAE 包括結腸炎/腹瀉、皮炎、肝炎、內分泌病和炎性肌病。據報導，這些獨特的副作用的出現時由於在 CTLA-4 阻斷時打破了免疫耐受(Di Giacomo, A.M. 等(2010) “*The Emerging Toxicity Profiles Of Anti-CTLA-4 抗體 Across Clinical Indications,*” *Semin Oncol.* 37:499-507)。因此，克服這些局限的療法將是非常有益的。

【0024】如下面詳細地描述，本發明通過提供 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子解決了這樣的需要。這類雙特異性分子能夠結合存在於衰竭的和耐受的腫瘤浸潤淋巴細胞和其他細胞類型表面上的 PD-1 和 CTLA-4 分子，從而能夠損害這類

細胞-表面分子回應他們各自配體的能力。因此，本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子用於阻斷 PD-1-和 CTLA-4 介導的免疫系統抑制，以便促進免疫系統的啟動或繼續啟動。這些屬性允許這類雙特異性分子在刺激免疫系統方面，尤其在治療癌症和病原體相關的疾病和病況方面具有效應。本發明涉及這些和其他目標。

【發明內容】

【0025】本發明涉及雙特異性分子(例如，雙抗體、雙特異性抗體、三價結合分子等)，其具有對於 PD-1 的表位免疫特異性的至少一個表位-結合位點和對於 CTLA-4 的表位免疫特異性的至少一個表位-結合位點(即，“PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子”)。本發明涉及這類 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子，其具有對於 PD-1 的一個(或兩個)表位免疫特異性的兩個表位-結合位點和對於 CTLA-4 的一個(或兩個)表位免疫特異性的兩個表位-結合位點。本發明也涉及這類 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子，其另外包括免疫球蛋白 Fc 區。本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子能夠同時結合 PD-1 和 CTLA-4，尤其當這類分子排列在人細胞的表面上時。本發明涉及藥物組合物，其包含這類 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子，並且涉及包括使用這類雙特異性分子治療癌症和其他疾病和病況的方法。本發明也涉及使用這類 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子刺激免疫應答的方法。

【0026】詳細地，本發明提供了雙特異性分子，其具有能夠免疫特異性結合 PD-1 的表位(一個或多個)的一個或多個表位-結合位點和能夠免疫特異性結合 CTLA-4 的表位(一個或多個)的一個或多個表位-結合位點，其中分子包括：

- (A)結合 PD-1 的抗體的重鏈可變結構域和輕鏈可變結構域；和
- (B)結合 CTLA-4 的抗體的重鏈可變結構域和輕鏈可變結構域；

其中雙特異性結合分子是：

(i) 雙抗體，所述雙抗體是共價結合的複合物，其包括兩條、三條、四條或五條多肽鏈；或

(ii) 三價結合分子，所述三價結合分子是共價結合的複合物，其包括三條、四條、五條或更多條多肽鏈。

【0027】本發明涉及這類雙特異性分子的實施方式，其中雙特異性結合分子展示的活性相對於由兩個單特異性分子展示的這樣的活性增強了，在所述兩個單特異性分子中，其中一個單特異性分子具有結合 PD-1 的抗體的重鏈可變結構域和輕鏈可變結構域，另一個單特異性分子具有結合 CTLA-4 的抗體的重鏈可變結構域和輕鏈可變結構域。

【0028】本發明涉及所有這類雙特異性分子的實施方式，其中當施用至需要其的受試者時，相對於通過施用結合 CTLA-4 的單特異性抗體，比如伊匹單抗引起的這類 irAE，所述分子引起較少的免疫相關的不利事件(irAE)。

【0029】本發明另外涉及這類雙特異性分子的實施方式，其中分子包括 Fc 區。本發明另外涉及這類雙特異性分子的實施方式，其中 Fc 區是變異的 Fc 區，其包括：

(A) 降低變異的 Fc 區對 Fc γ R 的親和力的一個或多個氨基酸修飾；和/或

(B) 延長變異的 Fc 區的血清半衰期的一個或多個氨基酸修飾。

【0030】本發明另外涉及這類雙特異性分子的實施方式，其中降低變異的 Fc 區對 Fc γ R 的親和力的修飾包括下述取代：L234A；L235A；或 L234A 和 L235A，其中編號是如 Kabat 中 EU 索引的編號。

【0031】本發明另外涉及這類雙特異性分子的實施方式，其中延長變異的 Fc 區的血清半衰期的修飾包括下述取代：M252Y；M252Y 和 S254T；M252Y 和 T256E；M252Y、S254T 和 T256E；或 K288D 和 H435K，其中編號是如 Kabat

中 EU 索引的編號。

【0032】 本發明另外涉及所有這類雙特異性分子的實施方式，其中分子是雙抗體並且包括能夠免疫特異性結合 PD-1 的表位的兩個表位-結合位點和能夠免疫特異性結合 CTLA-4 的表位的兩個表位-結合位點。

【0033】 本發明另外涉及所有這類雙特異性分子的實施方式，其中分子是三價結合分子並且包括能夠免疫特異性結合 PD-1 的表位的兩個表位-結合位點和能夠免疫特異性結合 CTLA-4 的表位的一個表位-結合位點。

【0034】 本發明另外涉及所有這類雙特異性分子的實施方式，其中能夠結合 PD-1 和 CTLA-4 分子的分子存在于細胞表面上。

【0035】 本發明另外涉及所有這類雙特異性分子的實施方式，其中分子能夠同時結合 PD-1 和 CTLA-4。

【0036】 本發明另外涉及所有這類雙特異性分子的實施方式，其中分子促進免疫細胞的刺激，尤其是，其中免疫細胞的刺激導致：

- (A) 免疫細胞增殖；和/或
- (B) 免疫細胞產生和/或釋放至少一種細胞因數；和/或
- (C) 免疫細胞產生和/或釋放至少一種裂解分子；和/或
- (D) 至少一種啟動標誌物的免疫細胞表達。

【0037】 本發明另外涉及所有這類雙特異性分子的實施方式，其中免疫細胞是 T-淋巴細胞或 NK-細胞。

【0038】 本發明另外涉及所有這類雙特異性分子的實施方式，其中能夠免疫特異性結合 PD-1 的表位的表位-結合位點包括：

- (A) PD-1 mAb 1 的 VH 結構域(SEQ ID NO:47)和 PD-1 mAb 1 的 VL 結構域(SEQ ID NO:48)；或
- (B) PD-1 mAb 2 的 VH 結構域(SEQ ID NO:49)和 PD-1 mAb 2 的 VL 結構域

(SEQ ID NO:50)；或

(C) PD-1 mAb 3 的 VH 結構域(SEQ ID NO:51)和 PD-1 mAb 3 的 VL 結構域

(SEQ ID NO:52)；或

(D) PD-1 mAb 4 的 VH 結構域(SEQ ID NO:53)和 PD-1 mAb 4 的 VL 結構域

(SEQ ID NO:54)；或

(E) PD-1 mAb 5 的 VH 結構域(SEQ ID NO:55)和 PD-1 mAb 5 的 VL 結構域

(SEQ ID NO:56)；或

(F) PD-1 mAb 6 的 VH 結構域(SEQ ID NO:57)和 PD-1 mAb 6 的 VL 結構域

(SEQ ID NO:58)；或

(G) PD-1 mAb 6-I VH 的 VH 結構域(SEQ ID NO:86)和 PD-1 mAb 6-SQ VL 的 VL 結構域(SEQ ID NO:87)；或

(H) PD-1 mAb 7 的 VH 結構域(SEQ ID NO:59)和 PD-1 mAb 7 的 VL 結構域

(SEQ ID NO:60)；或

(I) PD-1 mAb 8 的 VH 結構域(SEQ ID NO:61)和 PD-1 mAb 8 的 VL 結構域

(SEQ ID NO:62)。

【0039】本發明另外涉及所有這類雙特異性分子的實施方式，其中能夠免疫特異性結合 CTLA-4 的表位的表位-結合位點包括：

(A) CTLA-4 mAb 1 的 VH 結構域(SEQ ID NO:76)和 CTLA-4 mAb 1 的 VL 結構域(SEQ ID NO:77)；或

(B) CTLA-4 mAb 2 的 VH 結構域(SEQ ID NO:78)和 CTLA-4 mAb 2 的 VL 結構域(SEQ ID NO:79)；或

(C) CTLA-4 mAb 3 的 VH 結構域(SEQ ID NO:90)和 CTLA-4 mAb 3 的 VL 結構域(SEQ ID NO:91)。

【0040】本發明另外涉及這類雙特異性分子的實施方式，其中：

(A) 能夠免疫特異性結合 PD-1 的表位的表位-結合位點包括 PD-1 mAb 6-I VH 的 VH 結構域(SEQ ID NO:86)和 PD-1 mAb 6-SQ 的 VL 結構域(SEQ ID NO:87)；和

(B) 能夠免疫特異性結合 CTLA-4 的表位的表位-結合位點(一個或多個)包括 CTLA-4 mAb 3 的 VH 結構域(SEQ ID NO:90)和 CTLA-4 mAb 3 的 VL 結構域 (SEQ ID NO:91)。

【0041】本發明另外涉及所有這類雙特異性分子的實施方式，其中分子包括：

(A) 具有 SEQ ID NO:95 的兩條多肽鏈，和具有 SEQ ID NO:96 的兩條多肽鏈；或

(B) 具有 SEQ ID NO:97 的兩條多肽鏈，和具有 SEQ ID NO:98 的兩條多肽鏈；或

(C) 具有 SEQ ID NO:99 的兩條多肽鏈，和具有 SEQ ID NO:100 的兩條多肽鏈；或

(D) 具有 SEQ ID NO:102 的兩條多肽鏈，和具有 SEQ ID NO:103 的兩條多肽鏈；或

(E) 具有 SEQ ID NO:101 的兩條多肽鏈，和具有 SEQ ID NO:100 的兩條多肽鏈；或

(F) 具有 SEQ ID NO:104 的一條多肽鏈，具有 SEQ ID NO:105 的一條多肽鏈，具有 SEQ ID NO:106 的一條多肽鏈，和具有 SEQ ID NO:107 的一條多肽鏈；或

(G) 具有 SEQ ID NO:108 的一條多肽鏈，具有 SEQ ID NO:105 的一條多肽鏈，具有 SEQ ID NO:109 的一條多肽鏈，和具有 SEQ ID NO:107 的一條多肽鏈。

【0042】本發明另外涉及這類雙特異性分子的實施方式，其中分子包括白蛋

白-結合結構域，尤其是去免疫化的白蛋白-結合結構域。

【0043】本發明另外涉及藥物組合物，其包括有效量的任何這類雙特異性分子和藥學上可接受的載體。

【0044】本發明另外涉及這類藥物組合物或任何上述雙特異性分子促進需要其的受試者的免疫介導的應答的刺激的用途，尤其地，其中這類分子促進免疫細胞的刺激，尤其是 NK-細胞和/或 T-淋巴細胞的刺激。本發明尤其涉及這樣的實施方式，其中這樣的刺激導致免疫細胞增殖、免疫細胞產生和/或細胞因數(例如，IFN γ 、IL-2、TNF α 等)的釋放，免疫細胞產生和/或裂解分子(例如，粒酶、穿孔蛋白等)的釋放，和/或啟動標誌物(例如，CD69、CD25、CD107a 等)的免疫細胞表達。本發明進一步涉及治療癌症或其他疾病的方法，其涉及使用或施用任何上述 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子，以刺激免疫介導的應答。本發明尤其涉及這樣的實施方式，其中任何上述 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的免疫刺激活性比聯合或組合施用單獨的抗 PD-1 抗體和單獨的抗 CTLA-4 抗體(尤其地，其中這類抗體對於這類分子是單特異性的)更有效。本發明也涉及這樣的實施方式，其中相對於通過聯合或組合施用單獨的抗 PD-1 抗體和單獨的抗 CTLA-4 抗體刺激的這類細胞展示的增殖、細胞因數(例如，IFN γ 、IL-2、TNF α 等)的產生和/或釋放、裂解分子的產生和/或釋放，和/或啟動標誌物的表達，被上述 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子刺激的免疫細胞，尤其是 NK-細胞和/或 T-淋巴細胞展示增強的增殖、改變的細胞因數(例如，IFN γ 、IL-2、TNF α 等)的產生和/或釋放、改變的裂解分子的產生和/或釋放，和/或改變的啟動標誌物的表達。本發明也涉及這樣的實施方式，其中上述 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子具有降低的 irAE 的發生率。本發明另外涉及這樣的實施方式，其中任何上述 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子被用於治療與受抑制的免疫系統相關的疾病或病況，尤其是癌症或感染。

【0045】本發明另外涉及治療與受抑制的免疫系統相關的疾病或病況的用途，或在治療這類疾病或病況中的用途。本發明尤其涉及在治療與受抑制的免疫系統相關的疾病或病況中的這類用途，或其中疾病或病況是癌症或感染(尤其地，感染特徵在於存在細菌、真菌、病毒或原生動物病原體)的用途。

【0046】本發明尤其涉及這類用途，其中：

(A)用途是治療癌症，並且癌症特徵在於存在選自由以下的細胞組成的組的癌症細胞：腎上腺腫瘤、AIDS 相關的癌症、軟組織腺泡狀肉瘤、星形細胞瘤、膀胱癌、骨癌、腦和脊髓癌、轉移性腦瘤、乳腺癌、頸動脈體瘤、宮頸癌、軟骨肉瘤、脊索瘤、嫌色細胞腎細胞癌、透明細胞癌、結腸癌、結直腸癌、皮膚良性纖維組織細胞瘤、促結締組織增生小圓細胞瘤、室管膜細胞瘤、尤文氏瘤、骨外粘液樣軟骨肉瘤、不完全性骨纖維生成、骨的纖維發育異常、膽囊癌或膽管癌、胃癌、妊娠滋養層疾病、生殖細胞瘤、頭頸癌、肝細胞癌、胰島細胞腫瘤、卡波西氏肉瘤、腎癌、白血病、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/惡性的脂肪瘤、肝癌、淋巴瘤、肺癌、成神經管細胞瘤、黑素瘤、腦膜瘤、多發性內分泌瘤、多發性骨髓瘤、骨髓增生異常綜合征、成神經細胞瘤、神經內分泌腫瘤、卵巢癌、胰腺癌、甲狀腺乳頭狀癌、甲狀旁腺瘤、兒科癌症、周圍神經鞘瘤、嗜鉻細胞瘤、垂體瘤、前列腺癌、眼色素層後黑素瘤(*posterious uveal melanoma*)、罕見血液學疾病、腎轉移癌症、橫紋肌樣瘤、橫紋肌肉瘤、肉瘤、皮膚癌、軟組織肉瘤、鱗狀細胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睪丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲狀腺轉移癌和子宮癌；或

(B)用途是治療感染，並且感染是慢性病毒、細菌、真菌和寄生蟲感染，特徵在於存在愛潑斯坦-巴爾病毒，甲肝病毒(HAV)；乙肝病毒(HBV)；丙肝病毒(HCV)；皰疹病毒(例如 HSV-1、HSV-2、HHV-6、CMV)、人免疫缺陷病毒(HIV)、水泡性口炎病毒(VSV)、芽孢桿菌綱(*Bacilli*)、檸檬酸桿菌屬(*Citrobacter*)、霍亂

(*Cholera*)、白喉(*Diphtheria*)、腸桿菌屬(*Enterobacter*)、淋球菌(*Gonococci*)、幽門螺旋桿菌(*Helicobacter pylori*)、克雷伯氏菌屬(*Klebsiella*)、軍團菌屬(*Legionella*)、腦膜炎球菌(*Meningococci*)、分歧桿菌(*mycobacteria*)、假單胞菌屬(*Pseudomonas*)、*Pneumonococci*、立克次氏體細菌(*rickettsia bacteria*)、沙門氏菌屬(*Salmonella*)、沙雷菌屬(*Serratia*)、葡萄球菌屬(*Staphylococci*)、鏈球菌屬(*Streptococci*)、破傷風(*Tetanus*)、曲黴菌屬(*Aspergillus*) (煙麴黴(*A. fumigatus*)、黑麴黴(*A. niger*)等)、皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)、念珠菌屬(*Candida*) (白色念珠菌(*C. albicans*)、克柔假絲酵母(*C. krusei*)、光滑念珠菌(*C. glabrata*)、熱帶念珠菌(*C. tropicalis*)等)、新生隱球菌(*Cryptococcus neoformans*)、毛黴目(*Mucorales*)的屬(毛黴屬(*mucor*)、犁頭黴屬(*absidia*)、根黴屬(*rhizopus*))、申克氏胞絲菌(*Sporothrix schenkii*)、巴西芽生菌(*Paracoccidioides brasiliensis*)、粗球黴菌(*Coccidioides immitis*)、荚膜組織胞漿菌(*Histoplasma capsulatum*)、細螺旋體病(*Leptospirosis*)、包柔氏螺旋體(*Borrelia burgdorferi*)、蠕蟲寄生蟲(鈎蟲、條蟲、吸蟲、扁形蟲(例如血吸蟲(*Schistosomia*)))、藍氏賈第蟲(*Giardia lamblia*)、旋毛蟲(*trichinella*)、脆雙核阿米巴(*Dientamoeba Fragilis*)、布氏錐蟲(*Trypanosoma brucei*)、克氏錐蟲(*Trypanosoma cruzi*)和杜氏利什曼蟲(*Leishmania donovani*)。

【0047】本發明尤其涉及在治療癌症中的這類用途，其中癌症是結直腸癌、肝細胞癌、神經膠質瘤、腎癌、乳腺癌、多發性骨髓瘤、膀胱癌、成神經細胞瘤；肉瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、胰腺癌、直腸癌、急性髓細胞樣白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性 B 成淋巴細胞白血病(B-ALL)、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、毛細胞白血病(HCL)、急性漿細胞樣樹突細胞腫瘤(BPDCN)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)，包括套細胞白血病(MCL)，和小淋巴細胞淋巴瘤(SLL)、霍奇金淋巴瘤、系統性肥大細胞增多症，或伯基特淋巴瘤。

【圖式簡單說明】

【0048】圖 1 提供了具有兩個表位-結合位點的代表性共價結合的雙抗體的示意圖，其包括兩條多肽鏈，每條多肽鏈各具有 E-螺旋或 K-螺旋異源二聚體促進結構域(下面提供了可選的異源二聚體促進結構域)。半胱氨酸殘基可存在於連接體和/或異源二聚體促進結構域中，如**圖 3B** 中顯示。識別相同表位的 VL 和 VH 結構域使用相同的陰影或填充式樣顯示。

【0049】圖 2 提供了具有兩個表位-結合位點的代表性共價結合的雙抗體分子的示意圖，其包括兩條多肽鏈，每條多肽鏈各具有 CH2 和 CH3 結構域，使得締合的鏈形成所有的或部分 Fc 區。識別相同表位的 VL 和 VH 結構域使用相同的陰影或填充式樣顯示。

【0050】圖 3A-3C 提供了顯示具有四個表位元-結合位點的代表性共價結合的四價雙抗體的示意圖，其包括兩對多肽鏈(即，總共四條多肽鏈)。每對的一條多肽具有 CH2 和 CH3 結構域，以便締合的鏈形成所有的或部分 Fc 區。識別相同表位的 VL 和 VH 結構域使用相同的陰影或填充式樣顯示。兩對多肽鏈可以相同。在其中兩對多肽鏈相同並且 VL 和 VH 結構域識別不同表位元的這類實施方式中(如**圖 3A-3B** 中顯示)，所得分子具有四個表位結合位點，並且就每個結合的表位而言是雙特異性的和二價的。在其中 VL 和 VH 結構域識別相同的表位元的這樣的實施方式中(例如，相同的 VL 結構域 CDR 和相同的 VH 結構域 CDR 用在兩條鏈上)，所得分子具有四個表位結合位點，並且就單個表位而言是單特異性的和四價的。可選地，兩對多肽可以不同。在其中兩對多肽鏈不同並且每對多肽的 VL 和 VH 結構域識別不同的表位元的這類實施方式中(如通過**圖 3C** 中不同的陰影和式樣顯示)，所得分子具有四個表位-結合位點，並且就每個結合的表

位而言，是四特異性的和單價的。**圖 3A** 顯示了包含 Fc 區的雙抗體，其包含包括半胱氨酸殘基的肽異源二聚體促進結構域。**圖 3B** 顯示了包含 Fc 區的雙抗體，其包含包括半胱氨酸殘基的 E-螺旋和 K-螺旋異源二聚體促進結構域和連接體 (具有任選的半胱氨酸殘基)。**圖 3C** 顯示了包含 Fc 區的雙抗體，其包含抗體 CH1 和 CL 結構域。

【0051】 **圖 4A** 和 **4B** 提供了包括三條多肽鏈的、具有兩個表位結合位點的代表性共價結合的雙抗體分子的示意圖。多肽鏈中的兩條各具有 CH2 和 CH3 結構域，以便締合的鏈形成所有或部分 Fc 區域。包括 VL 和 VH 結構域的多肽鏈進一步包括異源二聚體促進結構域。識別相同表位的 VL 和 VH 結構域使用相同的陰影或填充圖案顯示。

【0052】 **圖 5** 提供了包括五條多肽鏈的、具有四個表位結合位點的代表性共價結合的雙抗體分子的示意圖。多肽鏈中的兩條各具有 CH2 和 CH3 結構域，以便締合的鏈形成包括所有或部分 Fc 區域的 Fc 區域。包括連接的 VL 和 VH 結構域的多肽鏈進一步包括異源二聚體促進結構域。識別相同表位的 VL 和 VH 結構域使用相同的陰影或填充圖案顯示。

【0053】 **圖 6A-6F** 提供了包含 Fc 區域的代表性三價結合分子的示意圖，所述三價結合分子具有三個表位結合位點。**圖 6A** 和 **6B** 分別示意性闡釋了三價結合分子的結構域，所述三價結合分子包括具有不同結構域取向的兩個雙抗體型結合結構域和 Fab 型結合結構域，其中雙抗體型結合結構域在 Fc 區域的 N-末端或 C-末端。**圖 6A** 和 **6B** 中的分子包括四條鏈。**圖 6C** 和 **6D** 分別示意性闡釋了三價結合分子的結構域，所述三價結合分子包括在 Fc 區域的 N-末端的兩個雙抗體型結合結構域，和連接的 Fab 型結合結構域，或 scFv 型結合結構域。**圖 6E** 和 **6F** 中的三價結合分子分別示意性地闡釋了三價結合分子的結構域，所述三價結合分子包括在 Fc 區的 C-末端的兩個雙抗體型結合結構域，和其中輕鏈和重鏈

經多肽間隔體連接的 Fab 型結合結構域，或 scFv 型結合結構域。圖 6C-6F 中的三價結合分子包括三條鏈。識別相同表位的 VL 和 VH 結構域使用相同的陰影或填充式樣顯示。

【0054】圖 7 通過顯示示例性雙特異性分子(PD-1 x LAG-3 雙特異性分子，命名為 DART A)能夠刺激細胞因數產生，達到比在聯合或組合施用親本抗 PD-1 和抗 LAG-3 抗體後觀察到的水準更高的水準，闡釋了本發明的原理。顯示了來自用 SEB (0.5 ng/mL)刺激和用示例性雙特異性分子(PD-1 x LAG-3 雙特異性分子 DART A)或用抗 PD-1 和抗 LAG-3 抗體單獨或組合處理的代表性供體的 PBMC 的 IFN γ 分泌特徵。

【0055】圖 8A-8D 顯示了 ELISA 研究的結果，其測量了連續稀釋的結合分子與人 CTLA-4 和人 PD-1 的結合。圖 8A-8B 顯示了 CTLA-4 mAb 3 G4P、DART D、TRIDENT A 或 DARTB 與已經塗覆到支撐板上的可溶性 hCTLA-4-Avi-His (1 μ g/mL) (圖 8A)或 hPD-1-His (1 μ g/mL) (圖 8B)的結合曲線。山羊抗人-Fc-HRP (1:10,000)用作二級檢測分子以檢測結合。圖 8C-8D 顯示了關於改變取向和結合結構域對結合的影響的研究的結果。在存在已經塗覆到支撐板上的可溶性人 PD-1 (圖 8C)或可溶性人 CTLA-4-Avi-His (圖 8D)的情況下，溫育包括 CTLA-4 mAb 1 (例如，DART B)和 CTLA-4 mAb 3 (例如，DART C 和 DART D)的 CTLA-4 結合結構域的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子。山羊抗人-Fc γ -HRP 用作二級檢測分子，以使用 PICO 化學發光底物檢測結合。

【0056】圖 9A-9E 顯示了對 DART D、TRIDENT A、PD-1 mAb 6 G4P 和 CTLA-4 mAb 3 G4P 和對照三叉分子(trident)(具有針對 RSV 的兩個結合位點和針對 CTLA-4 的一個結合位點)單獨或以組合方式阻斷結合配體與 PD-1 和 CTLA-1 結合的能力的評估的結果。使用 ELISA 試驗，在存在等量的不相干抗原的情況下(圖 9A)和在存在等量的 CTLA-4 的情況下(圖 9B)，評估對 PD-L1 結合 PD-1

的阻斷，並且，在存在等量的不相干抗原的情況下(圖 9C)和在存在等量的 PD-1 的情況下(圖 9D)和在存在四倍 PD-1 的情況下(圖 9E)評估對 B7-1 結合 CTLA-4 的阻斷。

【0057】圖 10A-10B 顯示了對 DART B、DART D、TRIDENT A、抗 CTLA-4 抗體 CTLA-4 mAb 1、CTLA-4 mAb 3 G4P 和 hIgG 對照抗體結合表達食蟹猴 CTLA-4 (圖 10A)或人 CTLA-4 (圖 10B)的 CHO 細胞的能力的評估的結果。使用抗人 Fc 二級抗體檢測結合。

【0058】圖 11A-11B 顯示了對 DART C、DART D、DART E、TRIDENT A、抗 CTLA-4 抗體 CTLA-4 mAb 1、CTLA-4 mAb 3 G1AA 和抗 PD-1 抗體 PD-1 mAb 6 G4P 結合 Jurkat 細胞(其在它們的表面上表達 huCTLA-4 而不是 PD-1)的能力的評估的結果。使用抗人 FC 二級抗體檢測 DART 和 TRIDENT 分子與人 CTLA-4 的結合(FACS)。圖 11A 顯示了 DART C、DART D、DART E、CTLA-4 mAb 1、CTLA-4 mAb 3 G1AA 和 PD-1 mAb 6 G4P 的結果。圖 11B 顯示了 CTLA-4 mAb 1、CTLA-4 mAb 3 G1AA、PD-1 mAb 6 G4P 和 TRIDENT A 的結果。

【0059】圖 12A-12B 顯示了在基於細胞的試驗中，對於 DART D、TRIDENT A 和抗 CTLA-4 抗體 CTLA-4 mAb 1、CTLA-4 mAb 3 G1AA 阻斷 CTLA-4 配體 B7-1 和 B7-2 的能力的評估的結果。在存在 Jurkat 細胞和人工抗原呈遞細胞(Promega)的情況下溫育 B7-1 和 B7-2 的 His 標記的衍生物。使用抗 His 抗體檢測 His-B7-1 和 His-B7-2 的結合。該評估的結果顯示在圖 12A (His-B7-1)和圖 12B (His-B7-2)中。

【0060】圖 13 顯示了對 DART C、DART D、TRIDENT A、CTLA-4 mAb 3 G1AA 和 PD-1 mAb 6 G4P 逆轉(reverse)CTLA-4 免疫檢查點抑制信號的能力的評估的結果，如在 IL-2/Luc-Jurkat-CTLA-4 報告試驗中通過增加的螢光素酶表達所顯示的。在 37°C，在存在所列舉的結合分子(R:S=1:0.3)的情況下溫育

IL-2/Luc-Jurkat-CTLA-4 細胞 30 min，之後添加人工抗原呈遞 Raji 細胞並且繼續溫育 6 小時。通過螢光素酶試驗測定 CTLA-4 免疫檢查點抑制信號的逆轉。

【0061】圖 14 顯示了對 DART D、TRIDENT A、PD-1 mAb 6 G4P 和 CTLA-4 mAb 3 G1AA 結合表達 PD-1 但是不表達 CTLA-4 的 NSO 細胞的能力的評估的結果。在存在細胞的情況下溫育結合分子並且測量細胞的平均螢光指數。

【0062】圖 15A-15B 顯示了在基於細胞的試驗中，對 DART D、TRIDENT A、PD-1 mAb 6 G4P 和 CTLA-4 mAb 3 G1AA 阻斷 PD-1 以及其配體 PD-L1 和 PD-L2 之間結合的能力的評估的結果。在存在這類結合分子的情況下溫育 PD-L1-PE 或 PD-L2-PE 並且使用 FACS 評估它們結合 NSO-PD-1 細胞的能力。圖 15A (PD-L1)；圖 15B (PD-L2)。

【0063】圖 16 顯示了對 DART D、TRIDENT A、CTLA-4 mAb 3 G1AA 和 PD-1 mAb 6 G4P 阻斷由 PD-1/PD-L1 相互作用導致的免疫抑制的能力的評估的結果。在存在 PD-L1⁺ CHO 和 Jurkat 效應細胞的情況下溫育結合分子，並且通過追蹤 CD3 介導的啟動的程度評估結合分子阻斷免疫抑制(通過阻斷 PD-1/PD-L1 相互作用)的能力(如通過在 NFAT-luc/PD-1 Jurkat 試驗中增加的螢光素酶表達所顯示的；Promega)。

【0064】圖 17 顯示了在酶-片段互補試驗中通過 DiscoverX 對 DART D、TRIDENT A 和陰性對照抗體共連接 PD-1 和 CTLA-4 的能力的評估的結果。將 DiscoverX CP5 鋪板培養基中的 U2OS CTLA-4(1-195)-PK PD-1(1-199)-EA 細胞系 #9 的等分試樣一式四份以 5,000 個細胞/孔鋪在 384 孔平板上。使細胞在 37 °C / 5% CO₂ 附著 4 小時。然後，將每種結合分子的 11 點、1:3 稀釋系列添加至 PD-1-CTLA-4 細胞並且將 DART D 和 TRIDENT A 樣品添加至 PD-1-LAG-3 細胞。使平板在 37 °C / 5% CO₂ 溫育過夜(16 hrs)。將 PathHunter 檢測試劑添加至孔，其接著在室溫在黑暗中溫育 1 小時，然後在 Envision 光度計上讀取平板。

【0065】圖 18 顯示了對 DART D、TRIDENT A、CTLA-4 mAb 3 G1AA、PD-1 mAb 6 G4P 以及 CTLA-4 mAb 3 G1AA/PD-1 mAb 6 G4P 的組合(Ab Combo 1)增強混合的淋巴細胞反應應答的能力的評估的結果。通過用 GM-CSF (在溫育期間第 1 天提供)和 IL-4 (在溫育期間第 7 天提供)處理 CD14⁺單核細胞產生單核細胞衍生的樹突細胞。在溫育期間第 8 天，通過用單核細胞衍生的樹突細胞(在溫育期間第 8 天提供)和抗 CTLA-4 和抗 PD-1 結合分子(在溫育期間第 8 天提供)溫育 CD4⁺ T 細胞而引起 MLR。IFN- γ 的釋放繪製在圖 18 中。發現雙特異性 DART D 和 TRIDENT A 分子兩者相同程度地增強 MLR 應答或比單獨的親本抗體的組合稍好。呈現的資料包括七個系列(均與不同的結合分子相關：hIgG4 對照；PD-1 mAb 6 G4P；CTLA-4 mAb 3 G1AA；CTLA-4 mAb 3 G1AA/PD-1 mAb 6 G4P 的組合(Ab Combo 1)；DART D；TRIDENT A；和 hIgG1 對照，分別從左到右)；每個系列包括 6 個柱子(均與提供的分子的不同濃度相關：0.016、0.08、0.4、2、10 或 50 nM，分別從左到右)。

【0066】圖 19A-19D 顯示了使用金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)腸毒素 B 型(SEB)再刺激試驗，施用 DART D、TRIDENT A、CTLA-4 mAb 3 G1AA、PD-1 mAb 6 G4P 和 CTLA-4 mAb 1/PD-1 mAb 1 的組合(Ab Combo 1)對 T-細胞應答的作用。圖 19A-19B 顯示了在沒有 SEB 刺激(圖 19A)或存在 SEB 刺激(圖 19B)的情況下，通過這類 PBMC 的 PD-1 對比 CTLA-1 的表達的螢光-啟動細胞分選(FACS)點圖。圖 19C 顯示了 SEB 刺激對 IFN- γ 分泌的作用。用金黃色葡萄球菌腸毒素 B 型(SEB)以 0.5 ng/ml 刺激 PBMC 48 小時。接著，收穫細胞、洗滌並且在 96 孔平板中與各種濃度的抗體和新鮮的 SEB 重新鋪平板，達另外的 48 小時。接著，收穫上清液並且通過流式細胞術 ELISA 分析 IFN- γ 產生。雙特異性 DART 和 TRIDENT 蛋白質兩者均顯示 IFN- γ 應答的增加，這概括了用單獨的親本 mAb 的組合觀察到的應答。在 PBMC 用高濃度(500 ng/mL)的 SEB 培養 72 小時的 SEB

刺激試驗中觀察到了類似的結果。呈現出六個系列，每個與不同的結合分子相關。每個系列包括七個柱子，其涉及用 25 nM、6.25 nM、1.56 nM、0.39 nM、0.09 nM、0.02 nM 或 0.006 nM 結合分子獲得的結果(分別從左到右)。圖 19D 顯示了代表性供體的 IL-2 的釋放。用 0.5 ng/ml SEB 刺激 PBMC 48 小時，收穫、洗滌並且在 96 孔板中與新鮮 SEB 和 DART D、TRIDENT A、CTLA-4 mAb 3 G1AA、PD-1 mAb 6 G4P 或 CTLA-4 mAb 3 G1AA / PD-1 mAb 6 G4P 的組合(Ab Combo 1)任意之一一起重新鋪平板，達另外的 48 小時，並且測量釋放的 IL-2。呈現了七個系列，每個與不同的結合分子或狀況相關。每個系列包括三個柱子，其涉及用 0.5 nM、5 nM 或 50 nM 結合分子獲得的結果(分別從左到右)。當組合使用抗體時，以指示的濃度添加每種抗體，從而添加的抗體的總體濃度加倍。

【0067】圖 20A-20B 顯示了 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在移植物抗宿主疾病(GVHD)的植入 PBMC 的 NOG 鼠模型中的活性。在研究天(圖 20A)對已經以 50 mg/kg 或 500 mg/kg 的劑量接受 DART D 的小鼠經 FACS 進行 CD3+ T 細胞計數(圖 20A)。在研究過程期間監測存活率並且以存活百分數繪製在圖 20B 中。

【0068】圖 21A-21C 顯示了已經在研究的第 1、8 和 15 天以 50 mg/kg 接受 DART D (圖 21A)的食蟹猴，在研究的第 1、8 和 15 天以 75 mg/kg 接受 DART D 食蟹猴(圖 21B)或在第 1 天以 5 mg/kg 接受 Trident A 的食蟹猴(圖 21C)的血清濃度-時間曲線(使用 6 位元字母數位編碼)。

【0069】圖 22A-22B 顯示了 DART D 的施用對於治療的食蟹猴中絕對淋巴細胞計數(ALC)的影響。圖 22A 顯示了以數千細胞/ μ l (th/ μ l)計的 ALC。圖 22B 顯示了歸一化至第 1 天(D1)的 ALC 的百分數改變。

【0070】圖 23A-23B 顯示了在已經接受以 50 mg/kg 施用的 DART D (圖 23A)或以 75 mg/kg 施用的 DART D (圖 23B)的食蟹猴中，CD4+ T 細胞增殖和 T 細胞上的 PD-1 佔據(occupancy)。

【0071】圖 24A-24B 顯示了在已經接受以 50 mg/kg 施用的 DART D (圖 24A) 或以 75 mg/kg 施用的 DART D (圖 24B) 的食蟹猴中 DART D 施用對 CD4⁺ T 細胞增殖的影響。

【實施方式】

【0072】本發明涉及雙特異性分子(例如，雙抗體、雙特異性抗體、三價結合分子等)，其具有對於 PD-1 的表位免疫特異性的至少一個表位-結合位點和對於 CTLA-4 的表位免疫特異性的至少一個表位-結合位點(即，“PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子”)。本發明涉及這類 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子，其具有對於 PD-1 的一個(或兩個)表位免疫特異性的兩個表位-結合位點和對於 CTLA-4 的一個(或兩個)表位免疫特異性的兩個表位-結合位點。本發明也涉及這類 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子，其另外包括免疫球蛋白 Fc 區。本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子能夠同時結合 PD-1 和 CTLA-4，尤其當這類分子排列在人細胞的表面上時。本發明涉及藥物組合物，其包含這類 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子，並且涉及包括這類雙特異性分子在治療癌症和其他疾病和病況中的用途的方法。本發明也涉及使用這類 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子刺激免疫應答的方法。

【0073】T-細胞啟動需要兩種不同的信號(Viglietta, V.等(2007) “*Modulating Co-Stimulation*,” *Neurotherapeutics* 4:666-675 ; Korman, A.J.等(2007) “*Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy*,” *Adv. Immunol.* 90:297-339)。通過在 T-細胞的表面上表達的 T-細胞受體(TCR)分子提供第一信號，所述 T-細胞受體(TCR)分子已經識別已經與在抗原呈遞細胞(APC)表面上表達的人白細胞抗原(HLA)關聯的肽抗原。通過在 APC 上表達的共刺激配體：B7-1 和 B7-2 和它們相應的在 T-細胞上表達受體：CD28 和 CTLA-4 的相關對的相互作用提供第二信號。

【0074】 B7-1 和 B7-2 分子與 CD28 的結合刺激 T-細胞增殖並另外誘導 CTLA-4 增加的表達。CTLA-4 是與 B7-1 和 B7-2 競爭結合 CD28 的負調節因數。因此，該過程在兩個階段中對疾病作出回應：初始階段涉及刺激 T-細胞增殖；隨後的階段“逐漸減少”免疫應答並且使受試者回到靜息免疫狀態。結合 CD28 的抗體可模擬 B7-1 或 B7-2 的結合，並且因此誘導或增強 T-細胞效應子功能和根除腫瘤的免疫性的產生；這類抗體是共刺激的。相反，阻斷 CTLA-4 結合 B7-1 和 B7-2 的抗體可防止 T-細胞回到靜息狀態；因此，這類 T-細胞維持持續的增殖，這可導致自身免疫性和免疫相關的不利事件(irAE)的產生(Wang, L.等(March 7, 2011) “*VISTA, A Novel Mouse Ig Superfamily Ligand That Negatively Regulates T-Cell Responses,*” *J. Exp. Med.* 10.1084/jem.20100619:1-16；Lepencies, B.等(2008) “*The Role Of Negative Costimulators During Parasitic Infections,*” *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 8:279-288)。尤其重要地是抗原呈遞細胞的 B7.1 (CD80)和 B7.2 (CD86)配體和 CD4⁺ T 淋巴細胞的 CD28 和 CTLA-4 受體之間的結合(Sharpe, A.H. 等(2002) “*The B7-CD28 Superfamily,*” *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126；Dong, C. 等(2003) “*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,*” *Immunolog. Res.* 28(1):39-48；Lindley, P.S.等(2009) “*The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation,*” *Immunol. Rev.* 229:307-321)。B7.1 或 B7.2 與 CD28 的結合刺激了 T-細胞啟動；B7.1 或 B7.2 與 CTLA-4 的結合抑制了這類啟動(Dong, C. 等(2003) “*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,*” *Immunolog. Res.* 28(1):39-48；Lindley, P.S.等(2009) “*The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation,*” *Immunol. Rev.* 229:307-321；Greenwald, R.J. 等(2005) “*The B7 Family Revisited,*” *Ann. Rev. Immunol.* 23:515-548)。CD28 在 T-細胞的表面上組成型表達(Gross, J.等(1992) “*Identification And Distribution Of The Costimulatory Receptor CD28 In The Mouse,*” *J. Immunol.*

149:380–388), 而 CTLA-4 表達在 T-細胞啟動之後被快速上調(Linsley, P.等(1996) “*Intracellular Trafficking Of CTLA4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement*,” *Immunity* 4:535–543)。因為 CTLA-4 是較高親和性受體(Sharpe, A.H.等(2002) “*The B7-CD28 Superfamily*,” *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126), 結合首先啟動 T-細胞增殖(經 CD28), 然後抑制 T-細胞增殖(經 CTLA-4 的初期表達), 從而當不再需要增殖時阻礙該作用。

【0075】與上述相互作用同時, 第二組受體和結合配體用於抑制免疫系統, 從而用作閘(brake), 以緩解 CD28/B7-1/B7-2 介導的免疫應答的增強。這類輔助應答涉及在 T-細胞的表面上表達的程式性細胞死亡-1 蛋白質(PD-1)受體與相應的配體: 在抗原呈遞細胞(APCs)上表達的 PD-L1 和在上皮細胞上表達的 PD-L2 的結合(Chen L.等(2013) “*Molecular Mechanisms Of T-Cell Co-Stimulation And Co-Inhibition*,” *Nature Reviews Immunology* 13(4):227-242)。與結合 CD28 以直接刺激 T-細胞應答的激動劑抗體相反, 結合 PD-1 或 PD-L1 的抗體拮抗或阻斷 PD-1/PD-L1 接合(engagement)並且因此通過防止負信號向 T-細胞的遞送而維持 T-細胞啟動。這樣, 結合 PD-1 或 PD-L1 的抗體擴大或維持了 T-細胞增殖、細胞毒性和/或細胞因數分泌。總之, 激動劑抗體, 比如抗 CD28, 靶向正信號途徑, 因此是共刺激因數, 而拮抗抗體, 比如抗 CTLA-4 和抗 PD-1, 靶向負信號途徑並且被稱為檢查點抑制劑。

【0076】如上所提供, CTLA-4 和 PD-1 代表典型的檢查點抑制劑, 其對於 T-細胞啟動發揮不同的抑制作用。本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子能夠結合存在於淋巴細胞的表面的 PD-1 和 CTLA-4 細胞-表面分子, 從而破壞這類細胞-表面分子相應它們各自受體的能力。不受任何理論或機制限制, 發明人認為 PD-1 結合可釋放 T-細胞抑制(例如, 在腫瘤位點和/或由於感染)並且 CTLA-1 結合可刺激多克隆啟動和刺激。因此, 本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子能

夠減弱 PD-1 和 CTLA-4 介導的免疫系統抑制，並且促進持續的免疫系統啟動。本發明已經證明，靶向兩個免疫調節途徑的雙特異性分子比單獨的抗體的組合更有效。本發明也提供了 PD-1:CTLA-4 結合比例為 1:1、1:2、2:2 和 2:1 的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子，其允許完全阻斷 PD-1 和 CTLA-4 以及當與 PD-1 共表達時偏向 CTLA-4 的阻斷。因此，本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子與單獨的抗 PD-1 和抗 CTLA-4 抗體的組合相比，提供了出乎意料的優勢。另外，本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子可提供具有降低的 irAE 風險的免疫刺激。

【0077】I. 抗體和它們的結合結構域

【0078】本發明的抗體是免疫球蛋白分子，其能夠通過位於免疫球蛋白分子的可變結構域中的至少一個抗原識別位點而特異性結合至靶，比如碳水化合物、多核苷酸、脂質、多肽等。如本文所使用，術語“**抗體**”指單克隆抗體、多特異性抗體、人抗體、人源化抗體、合成抗體、嵌合抗體、多克隆抗體、駱駝源化(camelized)抗體、單鏈 Fvs (scFv)、單鏈抗體、Fab 片段、F(ab')片段、二硫化物連接的雙特異性 Fvs (sdFv)、胞內抗體和任何上述的表位結合片段。尤其地，術語“**抗體**”包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性片段，即，包含表位結合位點的分子。免疫球蛋白分子可以是任何類型(例如，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY)，類別(例如，IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁ 和 IgA₂)或亞類。如本文所使用，相對於其他 IgG 同種型，如果 Fc 區的氨基酸序列與特定的 IgG 同種型最同源，則認為 Fc 區屬於該 IgG 同種型、類別或亞類。除了它們在診斷中已知的用途，已經證明抗體可用作治療劑。抗體能夠免疫特異性結合多肽或蛋白質或非蛋白質分子，因為在這樣的分子上存在特定的結構域或部分或構象(“**表位**”)。包含表位的分子可具有免疫原性活性，以便其在動物中引起抗體產生反應；這類分子稱為“**抗原**”。最近數十年已經看到對抗體的治療潛能的興趣的復興，並且抗體已經成為一種主要類型的生物技術衍生的藥物(Chan, C.E.等(2009)

“*The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases*,” Singapore Med. J. 50(7):663-666)。超過 200 種基於抗體的藥物已經被批准使用或正在開發。

【0079】術語“**單克隆抗體**”指同質型(homogeneous)抗體群體，其中單克隆抗體包括參與抗原的選擇性結合的氨基酸(天然產生的和非天然產生的)。單克隆抗體是高度特異性的，直接針對單個表位(或抗原位點)。術語“單克隆抗體”不僅僅包括完整的單克隆抗體和全長單克隆抗體，而且也包括其片段(比如 Fab、Fab'、F(ab')₂ Fv)、單鏈(scFv)、其突變體、包括抗體部分的融合蛋白、人源化的單克隆抗體、嵌合單克隆抗體和包括具有結合抗原的必要的特異性和能力的抗原識別位點的免疫球蛋白分子的任何其他修飾構造(configuration)。就抗體的來源或製備其的方式(例如，通過雜交瘤、噬菌體選擇、重組表達、轉基因動物等)而言，不旨在是限制性的。術語包括完整的免疫球蛋白以及上面根據“抗體”的定義描述的片段等。製備單克隆抗體的方法是本領域已知的。可採用的一種方法是 Kohler, G.等(1975) “*Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity*,” Nature 256:495-497 的方法或其改良。典型地，單克隆抗體在小鼠、大鼠或兔子中開發。通過用免疫原性量的細胞、細胞提取物或包含期望的表位的蛋白質製品免疫動物而產生抗體。免疫原可以是但不限於原代細胞、培養細胞系、癌細胞、蛋白質、肽、核酸或組織。用於免疫的細胞可被培養一段時間(例如，至少 24 小時)，然後將它們用作免疫原。細胞它們本身或聯合非變性佐劑，比如 Ribi，可用作免疫原(見，例如，Jennings, V.M. (1995) “*Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production*,” ILAR J. 37(3):119-125)。一般而言，在用作免疫原時，細胞應保持完整並且優選地有活性。相比於破裂的細胞，完整的細胞可允許抗原被免疫的動物更好地檢測。變性或烈性佐劑，例如，弗氏佐劑的使用，可使細胞破裂，因此，其應用受阻。免疫原可以週期性間隔被多次施用，諸如兩週一次或一週一次，或者可以以維持在動物(例如，在組織重組體中)

中的生存力這樣的方式被施用。可選地，對於期望的致病表位是免疫特異性的現有單克隆抗體和任意其他等價抗體可被測序，並通過本領域中已知的任意手段重組產生。在一個實施方式中，對這樣的抗體測序，然後將多核苷酸序列克隆至載體用於表達或增殖。編碼感興趣的抗體的序列可在宿主細胞中保持在載體中，並且，可然後擴展和冷凍宿主細胞，用於將來的使用。這樣的抗體的多核苷酸序列可用于基因操作，以產生本發明的單特異性或多特異性(例如，雙特異性、三特異性和四特異性)分子以及親和力優化的嵌合抗體、人源化抗體和/或犬源化(caninized)抗體，以改善抗體的親和力或其他特徵。人源化抗體的一般原理涉及保留抗體的抗原結合的部分的基本序列，同時用人抗體序列交換抗體的非人剩餘部分。

【0080】天然抗體(比如 IgG 抗體)包括與兩條重鏈複合的兩條輕鏈。每條輕鏈包含可變結構域(VL)和恒定結構域(CL)。每條重鏈包含可變結構域(VH)，三個恒定結構域(CH1、CH2 和 CH3)，和位於 CH1 和 CH2 結構域之間的鉸鏈區。天然產生的免疫球蛋白(例如，IgG)的基本結構單元因此是具有兩條輕鏈和兩條重鏈的四聚體，通常作為約 150,000 Da 的糖蛋白被表達。每條鏈的氨基端(“N-末端”)部分包括主要負責抗原識別的約 100 至 110 或更多氨基酸的可變結構域。每條鏈的羧基端(“C-末端”)部分限定了恒定區，其中輕鏈具有單個恒定結構域而重鏈通常具有三個恒定結構域和鉸鏈區。因此，IgG 分子的輕鏈的結構是 n-VL-CL-c 並且 IgG 重鏈的結構是 n-VH-CH1-H-CH2-CH3-c (其中 H 是鉸鏈區，n 和 c 分別表示多肽的 N-末端和 C-末端)。IgG 分子的可變結構域由互補決定區(CDR)和稱為框架區段(FR)的非 CDR 區段組成，所述互補決定區(CDR)包含與表位接觸的殘基，所述框架區段一般維持結構和決定 CDR 環的定位，以便允許這類接觸(儘管某些框架殘基也可接觸抗原)。因此，VL 和 VH 結構域具有結構 n-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-c。是(或可用作)抗體輕鏈的第一、第二

和第三 CDR 的多肽在本文分別命名為 **CDR_L1 結構域**、**CDR_L2 結構域**和 **CDR_L3 結構域**。類似地，是(或可用作)抗體重鏈的第一、第二和第三 CDR 的多肽在本文分別命名為 **CDR_H1 結構域**、**CDR_H2 結構域**和 **CDR_H3 結構域**。因此，術語 CDR_L1 結構域、CDR_L2 結構域、CDR_L3 結構域、CDR_H1 結構域、CDR_H2 結構域和 CDR_H3 結構域指當併入到蛋白質中時使得該蛋白質能夠結合特異性表位的多肽，無論這樣的蛋白質是否是具有輕鏈和重鏈的抗體或雙抗體或單鏈結合分子(例如，scFv、BiTe 等)或是另一類型的蛋白質。因此，如本文所使用，術語“**表位結合片段**”意指能夠免疫特異性結合表位的抗體的片段，並且術語“**表位結合位點**”指包含表位元結合片段的分子的部分。表位結合位點可包含這類抗體的 1、2、3、4、5 或所有 6 個 CDR 結構域，並且儘管能夠免疫特異性結合這類表位，但可展示對與這樣的抗體的表位不同的這樣的表位的特異性、親和力或選擇性。但是，優選地，表位結合片段將包含這類抗體的所有 6 個 CDR 結構域。抗體的表位結合片段可以是單個多肽鏈(例如，scFv)，或可包括兩條或更多條多肽鏈，每條鏈均具有氨基末端和羧基末端(例如，雙抗體、Fab 片段、Fab₂ 片段等)。除非具體指出，否則本文所述的蛋白質分子的結構域的順序是從 N-末端至 C-末端方向。

【0081】本發明尤其包括 PD-1 x CTLA-4 雙特異性結合分子，其包括抗 PD-1 抗體的一個、兩個或大於兩個單鏈可變結構域片段(“scFv”)和抗 CTLA-4 抗體的一個、兩個或大於兩個單鏈可變結構域片段。通過使用短的连接肽連接輕鏈和重鏈可變結構域製備單鏈可變結構域片段。可修飾連接體，以提供另外的功能，比如允許藥物附著或附著至固體載體。可經重組或合成產生單鏈變體。為了合成產生 scFv，可使用自動合成儀。為了重組產生 scFv，可將包含編碼 scFv 的多核苷酸的適當的質粒引入到適當的宿主細胞中，所述宿主細胞是真核細胞，比如酵母細胞、植物細胞、昆蟲細胞或哺乳動物細胞，或原核細胞，比如大腸埃

希氏菌(*E. coli*)。可通過常規操作比如多核苷酸的連接製備編碼感興趣的 scFv 的多核苷酸。可使用本領域已知的標準蛋白質純化技術分離所得 scFv。

【0082】本發明也尤其包括 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子，其包括人源化的抗 PD-1 和抗 CTLA-4 抗體。術語“人源化”抗體指一般使用重組技術製備的嵌合分子，其具有來自非人物種的免疫球蛋白的抗原結合位點和基於人免疫球蛋白的結構和/或序列的分子的剩餘免疫球蛋白結構。這類抗體的可變結構域的多核苷酸序列可用於遺傳操作，以產生這類衍生物和改善這類抗體的親和力或其他特徵。人源化抗體的一般原則涉及保留抗體的抗原結合部分的基本序列，同時用人抗體序列交換抗體的非人剩餘部分。人源化單克隆抗體有四個基本步驟。這些是：(1)確定開始抗體輕鏈和重鏈可變結構域的核苷酸和預測的氨基酸序列；(2)設計人源化抗體或犬源化抗體，即，決定在人源化或犬源化過程中使用哪種抗體框架區域；(3)實際人源化或犬源化方法/技術；和(4)轉染和表達人源化抗體。見，例如，美國專利號 4,816,567、5,807,715、5,866,692 和 6,331,415。

【0083】抗原結合位元點可包括融合到恒定結構域融合上的完整的可變結構域或僅僅包括移植至適當框架區的這類可變結構域的互補決定區(CDR)。抗原結合位點可以是野生型或通過一個或多個氨基酸取代被修飾。這消除了人個體中作為免疫原的恒定區，但是仍保留對外源可變結構域的免疫應答的可能性 (LoBuglio, A.F.等(1989) “*Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response,*” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224)。另一種方法不僅僅關注提供源自人的恒定區，而且也修飾可變結構域，以便重塑它們使其盡可能地與人形式接近。已知重鏈和輕鏈的可變結構域都包含三個互補決定區(CDR)，側翼是四個框架區(FR)，所述互補決定區(CDR)對所討論的抗原回應不同並且決定結合能力，所述框架區(FR)在給定物種中相對保守並且推定其為 CDR 提供支架。當針對特定抗原製備非人抗體時，通過將源自非人抗體的

CDR 移植在待修飾的人抗體中存在的 FR 上可“重塑”或“人源化”可變結構域。已經報導了該方法應用於各種抗體：Sato, K. 等(1993) *Cancer Res* 53:851-856. Riechmann, L. 等 (1988) “*Reshaping Human Antibodies for Therapy,*” *Nature* 332:323-327；Verhoeyen, M.等(1988) “*Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity,*” *Science* 239:1534-1536；Kettleborough, C. A. 等(1991) “*Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation,*” *Protein Engineering* 4:773-3783；Maeda, H. 等 (1991) “*Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity,*” *Human Antibodies Hybridoma* 2:124-134；Gorman, S. D. 等(1991) “*Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody,*” *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:4181-4185；Tempest, P.R.等(1991) “*Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo,*” *Bio/Technology* 9:266-271；Co, M. S.等(1991) “*Humanized Antibodies For Antiviral Therapy,*” *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:2869-2873；Carter, P.等(1992) “*Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy,*” *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 89:4285-4289；和 Co, M.S.等(1992) “*Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen,*” *J. Immunol.* 148:1149-1154。在一些實施方式中，人源化抗體保留所有的 CDR 序列(例如，人源化鼠抗體，其包含來自小鼠抗體的所有六個 CDR)。在其他實施方式中，人源化抗體具有一個或多個 CDR (一個、兩個、三個、四個、五個或六個)，其序列相對於初始抗體不同。

【0084】已經描述了包括源自非人免疫球蛋白的抗原結合位點的許多“人源化”抗體分子，包括具有齧齒動物或修飾的齧齒動物可變結構域和它們與人恒定結構域融合的相關的互補決定區(CDR)的嵌合抗體(見，例如，Winter 等(1991) “*Man-made Antibodies,*” *Nature* 349:293-299；Lobuglio 等(1989) “*Mouse/Human*

Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224 (1989), Shaw 等(1987) “*Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody (17-1A) To A Colon Cancer Tumor-Associated Antigen,*” J. Immunol. 138:4534-4538, and Brown 等(1987) “*Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/Human Chimeric Monoclonal Antibody,*” Cancer Res. 47:3577-3583)。其他參考文獻描述了移植至人支撐框架區 (FR)的齧齒動物 CDR，其然後與適當的人抗體恒定結構域融合(見，例如，Riechmann, L. 等(1988) “*Reshaping Human Antibodies for Therapy,*” Nature 332:323-327；Verhoeyen, M.等(1988) “*Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity,*” Science 239:1534-1536；和 Jones 等(1986) “*Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse,*” Nature 321:522-525)。另外的參考文獻描述了由重組修飾的齧齒動物框架區支撐的齧齒動物 CDR。見，例如，歐洲專利公開號 519,596。這些“人源化的”分子被設計，以使對齧齒動物抗人抗體分子的不利免疫應答最小化，所述不利免疫應答限制了這些部分在人接受者中治療應用的持續時間和效力。也可使用的人源化抗體的其他方法，其公開在以下文獻中：Daugherty 等(1991) “*Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins,*” Nucl. Acids Res. 19:2471-2476 和美國專利號 6,180,377、6,054,297、5,997,867 和 5,866,692。

【0085】II. Fc γ 受體(Fc γ R)

【0086】兩條重鏈的 CH2 和 CH3 結構域相互作用，以形成 **Fc 區域**，其是被細胞 **Fc 受體**，包括但不限於 Fc γ 受體(Fc γ R)，識別的結構域。如本文所使用，術語“Fc 區域”用於限定 IgG 重鏈的 C-末端區域。示例性人 IgG1 的 CH2-CH3 結

構域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:1) :

```

231      240      250      260      270      280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
      290      300      310      320      330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
      340      350      360      370      380
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
      390      400      410      420      430
WESNGQPENN YKTPPVLDL DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
      440      447
ALHNHYTQKS LSLSPGX

```

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

【0087】 示例性人 IgG2 的 CH2-CH3 結構域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:2):

```

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

```

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

【0088】 示例性人 IgG3 的 CH2-CH3 結構域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:3):

```

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

```

440 447
ALHNRFTQKS LSLSPGX

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

【0089】 示例性人 IgG4 的 CH2-CH3 結構域的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:4**):

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

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

【0090】 遍及本說明書，IgG 重鏈的恒定區中殘基的編號是如在 Kabat 等, SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 第五版. Public Health Service, NH1, MD (1991) (“Kabat”)中的 EU 索引的編號，其通過參考明確併入本文。術語“如在 Kabat 的 EU 索引”指人 IgG1 EU 抗體的編號。通過鏈中氨基酸的位置命名來自免疫球蛋白的成熟重鏈和輕鏈的可變結構域的氨基酸。Kabat 描述了抗體的許多氨基酸序列，鑒定了每個亞組的氨基酸共有序列，並且為每個氨基酸賦予殘基編號，並且，如 Kabat 定義的來鑒定 CDR(應當理解，如 Chothia, C. & Lesk, A. M. ((1987) “*Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins,*” J. Mol. Biol. 196:901-917)限定的 CDR_{H1} 在之前的五個殘基開始)。通過參考保守的氨基酸比對所討論的抗體與 Kabat 中的共有序列中的一條，Kabat 的編號方案可擴展至未包括在其綱要中的抗體。用於賦予殘基編號的該方法已經成為本領域的標準並且容易鑒定在不同抗體，包括嵌合或人源化的變體中等同位置處的氨基酸。例如，在人抗體輕鏈 50 位的氨基酸佔據與在小鼠

抗體輕鏈的 50 位氨基酸的等同位置。

【0091】在抗體恒定區中的許多不同位置(例如，Fc 位置，包括但不限於 270、272、312、315、356 和 358 位，如在 Kabat 闡釋的 EU 索引編號)處已經觀察到了多態性，因此示出的序列和現有技術的序列之間可能存在輕微的差別。已經充分表徵了人免疫球蛋白的多態性形式。目前，已知 18 個 Gm 同種異型：G1m(1、2、3、17)或 G1m(a、x、f、z)、G2m(23)或 G2m(n)、G3m(5、6、10、11、13、14、15、16、21、24、26、27、28)或 G3m(b1、c3、b3、b0、b3、b4、s、t、g1、c5、u、v、g5)(Lefranc, 等, “*The Human IgG Subclasses: Molecular Analysis Of Structure, Function And Regulation.*” Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990); Lefranc, G. 等 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211)。具體考慮本發明的抗體可併入任何免疫球蛋白基因的任何同種異型(allotype)、異同種異型(isoallotype)或單倍型(haplotype)，並且不限於本文提供的序列的同種異型、異同種異型或單倍型。此外，在一些表達體系中，CH3 結構域的 C-末端氨基酸殘基(上面粗體顯示的)可在翻譯後去除。因此，CH3 結構域的 C-末端殘基是本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子中的任選的氨基酸殘基。本發明具體考慮缺少 CH3 結構域的 C-末端殘基的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子。本發明也具體考慮包括 CH3 結構域的 C-末端賴氨酸殘基的這類構建體。

【0092】如上所述，天然 IgG 抗體的 Fc 區能夠結合細胞 Fc γ 受體(Fc γ R)。這類結合導致啟動或抑制信號向免疫系統的傳導。導致截然相反的功能的這類結合的能力反映了不同 Fc γ R 之間的結構差異，尤其反映了結合的 Fc γ R 是否具有基於免疫受體酪氨酸的啟動基序(ITAM)或基於免疫受體酪氨酸的抑制基序(ITIM)。不同細胞質酶向這些結構的募集控制了 Fc γ R-介導的細胞應答的結果。包含 ITAM 的 Fc γ Rs 包括 Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIIA，並且，當結合 Fc 區時啟動免疫系統。Fc γ RIIB 是唯一目前已知的包含 ITIM 的天然 Fc γ R；當結合 Fc 區

時，其用於阻礙或抑制免疫系統。人嗜中性粒細胞表達 FcγRIIA 基因。通過免疫複合物或特異性抗體交聯的 FcγRIIA 聚類用於使 ITAM 與促進 ITAM 磷酸化的受體相關的激酶聚集。ITAM 磷酸化充當 Syk 激酶的停泊位點，Syk 激酶的啟動導致下游底物(例如，PI₃K)的啟動。細胞啟動導致促炎性介質的釋放。FcγRIIB 基因在 B 淋巴細胞上表達；其細胞外結構域與 FcγRIIA 是 96%一致的，並且以不能區分的方式結合 IgG 複合物。ITIM 在 FcγRIIB 的胞質結構域中的存在限定了 FcγR 的這種抑制性亞類。最近，確定了這種抑制的分子基礎。當與啟動 FcγR 共連接時，FcγRIIB 中的 ITIM 變成磷酸化的，並且吸引肌醇聚磷酸鹽 5'-磷酸酶 (SHIP)的 SH2 結構域，肌醇聚磷酸鹽 5'-磷酸酶(SHIP)水解由於含 ITAM 的 FcγR 介導的酪氨酸激酶啟動而釋放的磷酸肌醇信使，從而防止細胞內 Ca⁺⁺的流入。因此，FcγRIIB 的交聯抑制對 FcγR 連接的啟動應答並抑制細胞應答。B-細胞啟動、B-細胞增殖和抗體分泌因此被中止。

【0093】 III. 雙特異性抗體、多特異性雙抗體和 DART®雙抗體

【0094】 抗體結合抗原的表位的能力取決於抗體的 VL 和 VH 結構域的存在和氨基酸序列。抗體的輕鏈和重鏈的相互作用，尤其地，其 VL 和 VH 結構域的相互作用，形成天然抗體，諸如 IgG，的兩個表位結合位點之一。天然抗體能夠結合僅僅一個表位種類(即，它們是單特異性的)，但是它們可結合該種類的多個拷貝(即，展示雙價或多價)。

【0095】 抗體和本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的結合結構域以“**免疫特異性**”方式結合表位元。如本文所使用，如果抗體、雙抗體或其他表位結合分子，相對於可選的表位，與另一分子的區域(即，表位)更經常、更快速、以更長的持久性和/或以更大的親和力反應或締合，則認為抗體、雙抗體或其他表位結合分子“**免疫特異性**”結合該表位。例如，免疫特異性結合病毒表位元的抗體是，相比其免疫特異性結合其他病毒表位元或非病毒表位元，以更大的親和

力、親合力、更容易和/或以更大的持久性結合該病毒表位元的抗體。通過閱讀該定義，應理解，例如，免疫特異性結合第一靶的抗體(或部分或表位元)可特異性或非特異性或優選或非優選結合第二靶。因此，“免疫特異性結合”不必要求(儘管其可包括)排他性結合。一般而言，但不是必要的，提及結合意思是“免疫特異性”結合。如果兩個分子的結合展示受體結合它們各自配體的特異性，則認為兩個分子能夠彼此以“**物理特異性**”方式結合。

【0096】本發明的一個方面反映了這樣的認識，抗體的功能可通過產生可同時結合一個或多個 PD-1 的表位並且也結合一個或多個 CTLA-4 的表位的基於多特異性抗體的分子而增強。對於具有針對 PD-1 的表位免疫特異性的大於一個表位-結合位點分子，這類表位可彼此相同、重疊或彼此不同；與一個這類表位結合可競爭或不競爭與另一個這類表位結合。同樣地，對於具有針對 CTLA-4 的表位免疫特異性的大於一個表位-結合位點分子，這類表位可彼此相同、重疊或彼此不同；與一個這類表位結合可競爭或不競爭與第二個這類表位結合。明確考慮這類特徵可獨立地變化，以產生 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子，其例如，具有：

(1) 結合兩個相同 PD-1 的表位的能力和結合下述的能力：

(a) 兩個相同的 CTLA-4 的表位；或

(b) 兩個重疊的 CTLA-4 的表位；或

(c) 兩個不同的 CTLA-4 的表位；

或

(2) 結合兩個重疊的 PD-1 的表位的能力和結合下述的能力：

(a) 兩個相同的 CTLA-4 的表位；或

(b) 兩個重疊的 CTLA-4 的表位；或

(c) 兩個不同的 CTLA-4 的表位；

或

(3) 結合兩個不同的 PD-1 的表位的能力和結合下述的能力：

(a) 兩個相同的 CTLA-4 的表位；或

(b) 兩個重疊的 CTLA-4 的表位；或

(c) 兩個不同的 CTLA-4 的表位。

【0097】為了提供比天然抗體具有更大能力的分子，已經開發了各種重組雙特異性抗體形式(見，例如，PCT 公佈號 WO 2008/003116、WO 2009/132876、WO 2008/003103、WO 2007/146968、WO 2009/018386、WO 2012/009544、WO 2013/070565)，其大部分使用連接肽，所述連接肽與其他表位結合片段(例如，scFv、VL、VH 等)融合或在抗體核心中(IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM)或與多個表位結合片段(例如，兩個 Fab 片段或 scFvs)融合。可選的形式使用連接肽，以將表位結合片段(例如，scFv、VL、VH 等)與二聚化結構域，比如 CH2-CH3 結構域，或可選的多肽融合(WO 2005/070966、WO 2006/107786A WO 2006/107617A、WO 2007/046893)。PCT 公開號 WO 2013/174873、WO 2011/133886 和 WO 2010/136172 公開了三特異性抗體，其中 CL 和 CH1 結構域由其各自的天然位置被轉變，並且 VL 和 VH 結構域已經被多樣化(WO 2008/027236、WO 2010/108127)，以允許它們結合大於一種抗原。PCT 公開號 WO 2013/163427 和 WO 2013/119903 公開了修飾 CH2 結構域，以包含包括結合結構域的融合蛋白加合物。PCT 公開號 WO 2010/028797、WO2010028796 和 WO 2010/028795 公開了重組抗體，其 Fc 區已經用另外的 VL 和 VH 結構域替換，以便形成三價結合分子。PCT 公開號 WO 2003/025018 和 WO2003012069 公開了重組雙抗體，其單個鏈包含 scFv 結構域。PCT 公開號 WO 2013/006544 公開了多價 Fab 分子，其作為單多肽鏈被合成，然後經歷蛋白酶解，以產生異源二聚化結構。PCT 公開號 WO 2014/022540、WO 2013/003652、WO 2012/162583、WO 2012/156430、

WO 2011/086091、WO 2008/024188、WO 2007/024715、WO 2007/075270、WO 1998/002463、WO 1992/022583 和 WO 1991/003493 公開了添加另外的結合結構域或功能集團至抗體或抗體部分(例如，添加雙抗體至抗體的輕鏈或添加另外的 VL 和 VH 結構域至抗體的輕鏈和重鏈或添加異源融合蛋白或彼此連結多個 Fab 結構域)。

【0098】現有技術已經另外注意到產生在能夠結合兩個或多個不同表位種類(即，除了雙價或多價之外顯示雙特異性或多特異性)方面不同于這樣的天然抗體的雙抗體的能力(見，例如，Holliger 等(1993) “*Diabodies*: *Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments*,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448、US 2004/0058400 (Hollinger 等)；US 2004/0220388/WO 02/02781 (Mertens 等)；Alt 等(1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94；Lu, D.等(2005) “*A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity*,” J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672；WO 02/02781 (Mertens 等)；Olafsen, T.等(2004) “*Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications*,” Protein Eng. Des. Sel. 17(1):21-27；Wu, A.等(2001) “*Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange*,” Protein Engineering 14(2):1025-1033；Asano 等(2004) “*A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain*,” Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992；Takemura, S.等(2000) “*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*,” Protein Eng. 13(8):583-588；Baeuerle, P.A.等(2009) “*Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy*,” Cancer Res. 69(12):4941-4944)。

【0099】 雙抗體的設計是基於被稱為單鏈可變結構域片段(scFv)的抗體衍生物。這樣的分子利用短連接肽連接輕鏈和/或重鏈可變結構域而製備。B Bird 等(1988) (“*Single-Chain Antigen-Binding Proteins*,” *Science* 242:423-426)描述了連接肽的例子，其在一個可變區的羧基末端和另一可變區的氨基末端之間橋接約 3.5 nm。已經設計和使用了其他序列的連接體(Bird 等(1988) “*Single-Chain Antigen-Binding Proteins*,” *Science* 242:423-426)。連接體進而可被修飾用於另外的功能，比如藥物的附著或附著至固體載體。可重組或合成產生單鏈變體。為了合成產生 scFv，可使用自動合成儀。為了重組體產生 scFv，可將包含編碼 scFv 的多核苷酸的合適質粒引入適當的宿主細胞中，所述宿主細胞可以是真核細胞，比如酵母細胞、植物細胞、昆蟲細胞或哺乳動物細胞，或原核細胞，比如大腸埃希氏菌。可通過常規操作比如多核苷酸的連接製備編碼感興趣的 scFv 的多核苷酸。可使用本領域已知的標準蛋白質純化技術分離所得 scFv。

【0100】 雙特異性結合分子(例如，非單特異性雙抗體)的供應提供相比抗體的明顯優勢，包括但不限於足以共連接和/或共定位表達不同表位的不同細胞的“反式(trans)”結合能力和/或足以共連接和/或共定位由相同細胞表達的不同分子的“順式(cis)”結合能力。因此，雙特異性結合分子(例如，非單特異性雙抗體)具有廣泛的應用，包括治療和免疫診斷。在各種應用中，雙特異性在設計和工程化雙抗體方面允許大的靈活性，提供對多聚抗原的增強的親合力、不同抗原的交聯和對特定細胞類型的導向靶向，這取決於兩個靶抗原的存在。由於其增加的價、低離解速率和從迴圈中快速清除(對於小尺寸的雙抗體，為~50 kDa 或以下)，本領域中已知的雙抗體分子在腫瘤成像領域還顯示特別的用途(Fitzgerald 等(1997) “*Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In Pichia pastoris*,” *Protein Eng.* 10:1221)。

【0101】 產生雙特異性雙抗體的能力已經導致它們(以“反式”)將兩個細胞共

連接在一起的用途，例如，通過共連接在不同的細胞表面上存在的受體(例如，將細胞毒性 T-細胞與腫瘤細胞交聯) (Staerz 等(1985) “*Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells,*” *Nature* 314:628-631；和 Holliger 等(1996) “*Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody,*” *Protein Eng.* 9:299-305；Marvin 等(2005) “*Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies,*” *Acta Pharmacol. Sin.* 26:649-658)。可選地，或另外，雙特異性雙抗體可用於(與“順式”)共連接存在於相同細胞表面上的分子，比如受體等。共連接不同的細胞和/或受體可用於調節效應子功能和/或免疫細胞信號傳導。但是，上述優勢需要突出的成本。這類非單特異性雙抗體的形成需要成功組裝兩個或更多個獨特和不同的多肽(即，這樣的形成需要通過不同多肽鏈種類的異源二聚化而形成雙抗體)。該事實與單特異性雙抗體不同，其通過一致的多肽鏈的同源二聚化而形成。由於至少兩個不同的多肽(即，兩個多肽種類)必須被提供以形成非單特異性雙抗體並且由於這樣的多肽的同源二聚化導致失活分子(Takemura, S.等(2000) “*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,*” *Protein Eng.* 13(8):583-588)，這樣的多肽的產生必須以防止相同種類的多肽之間的共價結合的方式完成(即，以防止同源二聚化) (Takemura, S.等(2000) “*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,*” *Protein Eng.* 13(8):583-588)。所以，現有技術教導了這類多肽的非共價締合(見，例如，Olafsen 等(2004) “*Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications,*” *Prot. Engr. Des. Sel.* 17:21-27；Asano 等(2004) “*A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain,*” Abstract 3P-683, *J. Biochem.* 76(8):992；Takemura, S.等(2000) “*Construction Of A Diabody (Small*

Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,” Protein Eng. 13(8):583-588 ; Lu, D.等(2005) “*A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity,” J. Biol. Chem.* 280(20):19665-19672)。

【0102】但是，現有技術已經認識到由非共價締合的多肽組成的雙特異性雙抗體不穩定並且容易解離成非功能單體(見，例如，Lu, D.等(2005) “*A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity,” J. Biol. Chem.* 280(20):19665-19672)。

【0103】面對這樣的挑戰，本領域已經成功地開發了穩定的、共價結合的異源二聚非單特異性雙抗體，稱為 **DART® (雙親和力重靶向試劑)** 雙抗體；見，例如，美國專利公開號 2013-0295121、2010-0174053 和 2009-0060910；歐洲專利公開號 EP 2714079、EP 2601216、EP 2376109、EP 2158221；和 PCT 公開號 WO 2012/162068、WO 2012/018687、WO 2010/080538；和 Sloan, D.D.等(2015) “*Targeting HIV Reservoir in Infected CD4 T Cells by Dual-Affinity Re-targeting Molecules (DARTs) that Bind HIV Envelope and Recruit Cytotoxic T Cells,*” *PLoS Pathog.* 11(11):e1005233. doi: 10.1371/journal.ppat.1005233；Al Hussaini, M.等(2015) “*Targeting CD123 In AML Using A T-Cell Directed Dual-Affinity Re-Targeting (DART®) Platform,*” *Blood* pii: blood-2014-05-575704；Chichili, G.R.等(2015) “*A CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To Myelogenous Leukemia: Preclinical Activity And Safety In Nonhuman Primates,*” *Sci. Transl. Med.* 7(289):289ra82；Moore, P.A.等(2011) “*Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma,*” *Blood*

117(17):4542-4551 ; Veri, M.C.等(2010) “*Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold,*” *Arthritis Rheum.* 62(7):1933-1943 ; Johnson, S.等(2010) “*Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion,*” *J. Mol. Biol.* 399(3):436-449)。這樣的雙抗體包括兩條或多條共價複合的多肽並涉及將一個或多個半胱氨酸殘基工程化到每個應用的多肽種類中，其允許形成二硫鍵，從而將一對或多對這類多肽鏈彼此共價結合。例如，將半胱氨酸殘基添加至這樣的構建體的 C-末端已經被證明允許涉及的多肽鏈之間的二硫結合，穩定了產生的雙抗體，而不干擾雙抗體的結合特性。

【0104】已經描述了這類分子的許多變型(見，例如，美國專利公開號 2015/0175697、2014/0255407、2014/0099318、2013/0295121、2010/0174053；2009/0060910；2007-0004909；歐洲專利公開號 EP 2714079、EP 2601216、EP 2376109、EP 2158221、EP 1868650；和 PCT 公開號 WO 2012/162068、WO 2012/018687、WO 2010/080538、WO 2006/113665)並且提供在本文中。

【0105】用於期望四價分子而不需要 Fc 的應用的可選的構建體在本領域中是已知的，包括但不限於四價串聯抗體，也稱為“**TandAbs**”(見，例如美國專利公開號 2005-0079170、2007-0031436、2010-0099853、2011-020667、2013-0189263；歐洲專利公開號 EP 1078004、EP 2371866、EP 2361936 和 EP 1293514；PCT 公開號 WO 1999/057150、WO 2003/025018，和 WO 2013/013700)，其通過每個具有 VH1、VL2、VH2 和 VL2 結構域的兩條相同鏈的同源二聚化而形成。

【0106】 III. 優選的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子

【0107】本發明的一個實施方式涉及 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子，其能夠

結合“**第一表位**”和“**第二表位**”，這類表位彼此不同。這類雙特異性分子包括能夠結合第一表位的“**VL1**”/“**VH1**”結構域和能夠結合第二表位的“**VL2**”/“**VH2**”結構域。符號“**VL1**”和“**VH1**”分別表示結合這類雙特異性分子的“第一”表位元的輕鏈可變結構域和重鏈可變結構域。類似地，符號“**VL2**”和“**VH2**”分別表示結合這類雙特異性分子的“第二”表位元的輕鏈可變結構域和重鏈可變結構域。具體的表位是否命名為第一或第二表位無所謂；這類符號僅僅與本發明的結合分子的多肽鏈的結構域的存在和取向相關。在一個實施方式中，一種這類表位是人 PD-1 的表位並且另一種這類表位是 CTLA-4 的表位。在某些實施方式中，雙特異性分子包括多於兩個表位-結合位點。這類雙特異性分子將結合至少一個 PD-1 的表位和至少一個 CTLA-4 的表位並且可進一步結合另外的 PD-1 的表位和/或另外的 CTLA-4 的表位。

【0108】本發明尤其涉及具有是它們能夠協同結合至少一個 PD-1 的表位和至少一個 CTLA-4 的表位的抗體的表位-結合片段的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子(例如，雙特異性抗體，雙特異性雙抗體，三價結合分子等)。協同選擇這類分子的多肽結構域的 VL 和 VH 結構域，以便相同多肽鏈的 VL 結構域和 VH 結構域不能形成能夠結合 PD-1 或 CTLA-4 的表位-結合位點。另外協同這樣的選擇，從而構成這類 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的多肽鏈組裝形成對於至少一個 PD-1 的表位特異性的至少一個功能性抗原結合位點和對於至少一個 CTLA-4 的表位特異性的至少一個功能性抗原結合位點。

【0109】本發明尤其涉及這類 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子，其相對於兩個單特異性分子的這類活性展示增強的活性，在所述兩個單特異性分子中，其中一個具有結合 PD-1 的抗體的重鏈可變結構域和輕鏈可變結構域和其中另一個具有結合 CTLA-4 的抗體的重鏈可變結構域和輕鏈可變結構域。這類活性的例子包括減弱 PD-1 的活性、減弱 CTLA-4 的活性、增強免疫系統啟動、增強效應子功

能、增強抗腫瘤活性。如本文所使用，這樣的活性的減弱指 PD-1 和/或 CTLA-4 抑制活性下降 10%或更多、下降 20%或更多、下降 50%或更多、下降 80%或更多或下降 90%或更多，或完全消除這類 PD-1 和/或 CTLA-4 抑制活性。如本文所使用，這樣的活性的增強指，相對於其中一個具有結合 PD-1 的抗體的重鏈可變結構域和輕鏈可變結構域和其中另一個具有結合 CTLA-4 的抗體的重鏈可變結構域和輕鏈可變結構域的兩個單特異性分子展示的活性，通過 PD-1 和/或 CTLA-4 的表達存在介導的或受 PD-1 和/或 CTLA-4 表達或存在影響的免疫系統-啟動活性增強 10%或更多、增強 20%或更多、增強 50%或更多、增強 80%或更多、或增強 90%或更多。免疫系統-啟動活性的例子包括但不限於免疫細胞(例如，T-淋巴細胞、NK-細胞)增殖、免疫細胞產生和/或細胞因數的釋放、免疫細胞產生和/或裂解分子(例如，粒酶、穿孔蛋白等)的釋放和/或啟動標誌物的免疫細胞表達。在啟動免疫系統時釋放的細胞因數是本領域已知的，其包括但不限於：IFN γ 、IL-2 和 TNF α (見，例如，Janeway Janeway, C.A.等 2011) Immunobiology” 第 8 版，Garland Science Publishing, NY；Banyer, J.L. (2000) “Cytokines in innate and adaptive immunity,” Rev Immunogenet. 2:359-373)。免疫細胞表達的啟動標誌物是本領域已知的並且包括但不限於 CD69、CD25 和 CD107a (見，例如，Janeway, C.A.等(2011) Immunobiology” 第 8 版 Garland Science Publishing, NY；Shipkova, M. 和 Wieland, E. (2012) “Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation,” Clin Chim Acta 413:1338-1349)。

【0110】 A. PD-1 x CTLA-4 雙特異性抗體

【0111】 本發明包括能夠同時結合 PD-1 和 CTLA-4 的雙特異性抗體。在一些實施方式中，使用下面描述的任何方法產生能夠同時結合 PD-1 和 CTLA-4 的雙特異性抗體：PCT 公開號 WO 1998/002463、WO 2005/070966、WO 2006/107786、WO 2007/024715、WO 2007/075270、WO 2006/107617、WO 2007/046893、WO

2007/146968、WO 2008/003103、WO 2008/003116、WO 2008/027236、WO 2008/024188、WO 2009/132876、WO 2009/018386、WO 2010/028797、WO2010028796、WO 2010/028795、WO 2010/108127、WO 2010/136172、WO 2011/086091、WO 2011/133886、WO 2012/009544、WO 2013/003652、WO 2013/070565、WO 2012/162583、WO 2012/156430、WO 2013/174873 和 WO 2014/022540，其每一篇通過引用以其整體併入本文。

【0112】 B. 缺少 Fc 區的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性雙抗體

【0113】 本發明的一個實施方式涉及雙特異性雙抗體，其包括第一多肽鏈和第二多肽鏈，並且最優選地由第一多肽鏈和第二多肽鏈構成，所述第一多肽鏈和第二多肽鏈的序列允許多肽鏈彼此共價結合，以形成能夠同時結合 PD-1 和 CTLA-4 的共價締合的雙抗體。

【0114】 雙特異性雙抗體的這類實施方式的第一多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括 N-末端、能夠結合 PD-1 或 CTLA-4 的單克隆抗體的 VL 結構域(即，VL_{PD-1} 或 VL_{CTLA-4})、第一間插間隔體肽(連接體 1)、能夠結合 CTLA-4 (如果這類第一多肽鏈包含 VL_{PD-1})或 PD-1 (如果這類第一多肽鏈包含 VL_{CTLA-4})的單克隆抗體的 VH 結構域、任選地包含半胱氨酸殘基的第二間插間隔體肽(連接體 2)、異源二聚體促進結構域和 C-末端(圖 1)。

【0115】 雙特異性雙抗體的該實施方式的第二多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括 N-末端、能夠結合 PD-1 或 CTLA-4 的單克隆抗體的 VL 結構域(即，VL_{PD-1} 或 VL_{CTLA-4}，並且是未被選擇包括在該雙抗體的第一多肽鏈中的 VL 結構域)、間插間隔體肽(連接體 1)、能夠結合 CTLA-4(如果這類第二多肽鏈包含 VL_{PD-1})或 PD-1 (如果這類第二多肽鏈包含 VL_{CTLA-4})的單克隆抗體的 VH 結構域、任選地包含半胱氨酸殘基的第二間插間隔體肽(連接體 2)、異源二聚體促進結構域和 C-末端(圖 1)。

【0116】第一多肽鏈的 VL 結構域與第二多肽鏈的 VH 結構域相互作用，以形成對於第一抗原(即，PD-1 或 CTLA-4)特異性的第一功能性抗原-結合位點。同樣地，第二多肽鏈的 VL 結構域與第一多肽鏈的 VH 結構域相互作用，以便形成對於第二抗原(即，CTLA-4 或 PD-1)特異性的第二功能性抗原-結合位點。因此，協同選擇第一和第二多肽鏈的 VL 和 VH 結構域，以便雙抗體的兩條多肽鏈總共包括能夠結合 PD-1 的表位和 CTLA-4 的表位的 VL 和 VH 結構域(即，它們總共包括 VL_{PD-1}/VH_{PD-1} 和 VL_{CTLA-4}/VH_{CTLA-4})。

【0117】最優選地，選擇間插連接體肽(連接體 1，其分開這類 VL 和 VH 結構域)的長度，以基本上或完全防止多肽鏈的 VL 和 VH 結構域彼此結合(例如由 0、1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 個間插連接體氨基酸殘基組成)。因此，第一多肽鏈的 VL 和 VH 結構域基本上或完全不能彼此結合。同樣地，第二多肽鏈的 VL 和 VH 結構域基本上或完全不能彼此結合。優選的間插間隔體肽(連接體 1)具有序列(SEQ ID NO:5)：GGGSGGGG。

【0118】基於促進這類二聚化的一個或多個多肽結構域(即，“異源二聚體促進結構域”)的選擇來選擇第二間插間隔體肽(連接體 2)的長度和組成。典型地，第二間插間隔體肽(連接體 2)包括 3-20 個氨基酸殘基。尤其地，當採用的異源二聚體促進結構域(一個或多個)包括/不包括半胱氨酸殘基時，使用包含半胱氨酸的第二間插間隔體肽(連接體 2)。包含半胱氨酸的第二間插間隔體肽(連接體 2)將包含 1、2、3 或更多個半胱氨酸。優選的包含半胱氨酸的間隔體肽(連接體 2)具有序列 SEQ ID NO:6：GGCGGG。可選地，連接體 2 不包括半胱氨酸(例如，GGG、GGGS (SEQ ID NO:7)、LGGGSG (SEQ ID NO:8)、GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:9)、ASTKG (SEQ ID NO:10)、LEPKSS (SEQ ID NO:11)、APSSS (SEQ ID NO:12)等)並且使用包含半胱氨酸的異源二聚體促進結構域，如下面所描述。任選地，使用包含半胱氨酸的連接體 2 和包含半胱氨酸的異源二聚體促進結構域。

【0119】異源二聚體促進結構域在一條多肽鏈上可以是 GVEPKSC (SEQ ID NO:13)或 VEPKSC (SEQ ID NO:14)或 AEPKSC (SEQ ID NO:15)，並且，在另一條多肽鏈上可以是 GFNRGEC (SEQ ID NO:16)或 FNRGEC (SEQ ID NO:17) (US2007/0004909)。

【0120】在優選的實施方式中，異源二聚體促進結構域將包括具有相反電荷的串聯重複的螺旋結構域，例如，“E-螺旋”螺旋結構域(SEQ ID NO:18：EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK)，其谷氨酸殘基在 pH 7 形成負電荷，和“K-螺旋”結構域 (SEQ ID NO:19：KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE)，其賴氨酸殘基在 pH 7 形成正電荷。這類帶電結構域的存在促進了第一和第二多肽之間的締合，因此有助於異源二聚體形成。可以使用包括上述 E-螺旋和 K-螺旋序列的修飾的異源二聚體促進結構域，以便包括一個或多個半胱氨酸殘基。這類半胱氨酸殘基的存在允許在一條多肽鏈上存在的螺旋與另一多肽鏈上存在的互補螺旋成為共價結合的，從而彼此共價結合多肽鏈並且增加雙抗體的穩定性。這樣的尤其優選的例子是異源二聚體促進結構域包括修飾的 E-螺旋，其具有氨基酸序列 EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:20)，和修飾的 K-螺旋，其具有氨基酸序列 KVAACKKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:21)。

【0121】如 WO 2012/018687 中公開，為了提高雙抗體的體內藥物代謝動力學特性，雙抗體可被修飾，以在雙抗體的一個或多個末端處包含血清結合蛋白的多肽部分。最優選地，血清結合蛋白的這類多肽部分設置在雙抗體的 C-末端。白蛋白是血漿中最豐富的蛋白質並且在人中半衰期是 19 天。白蛋白具有若干小分子結合位點，這允許其非共價結合其他蛋白，從而延長它們的血清半衰期。鏈球菌屬(*Streptococcus*)菌株 G148 的蛋白質 G 的白蛋白結合結構域 3 (ABD3)由

形成穩定的三螺旋束的 46 個氨基酸殘基組成並且具有廣泛的白蛋白結合特異性 (Johansson, M.U.等(2002) “*Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules,*” J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120。因此，對於改善雙抗體的體內藥物代謝動力學特性，尤其優選的血清結合蛋白的多肽部分是來自鏈球菌蛋白質 G 的白蛋白結合結構域(ABD)，更優選地，鏈球菌屬菌株 G148 的蛋白質 G 的白蛋白結合結構域 3 (ABD3) (SEQ ID NO:22) : LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLIDNAKS AEGVKALIDE ILAALP。

【0122】如在 WO 2012/162068 (通過引用併入本文)中公開，SEQ ID NO:22 的“去免疫化”的變體具有削弱或消除 II 類 MHC 結合的能力。基于组合突变結果，对于形成这样的去免疫化的 ABD，如下取代的组合被认为是优选的取代：66D/70S +71A、66S/70S +71A、66S/70S +79A、64A/65A/71A、64A/65A/71A+66S、64A/65A/71A+66D、64A/65A/71A+66E、64A/65A/79A+66S、64A/65A/79A+66D、64A/65A/79A+66E。变异的 ABD 具有修饰 L64A、I65A 和 D79A 或修饰 N66S、T70S 和 D79A。具有下述氨基酸序列：

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLID₆₆NAKS₇₀ A₇₁EGVKALIDE ILAALP (SEQ ID NO:23) ,

或氨基酸序列：

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNA₆₄A₆₅NNAKT VEGVKALIA₇₉E ILAALP (SEQ ID NO:24) ,

或氨基酸序列：

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLIS₆₆NAKS₇₀ VEGVKALIA₇₉E ILAALP (SEQ ID NO:25) ,

的變異的去免疫化的 ABD 是尤其優選的，因為這類去免疫化的 ABD 展示基本上野生型結合，同時提供削弱的 II 類 MHC 結合。因此，具有 ABD 的這類

雙抗體的第一多肽鏈包含第三連接體(連接體 3)，其優選地位於這類多肽鏈的 E 螺旋(或 K 螺旋)結構域的 C-末端，以便插在 E 螺旋(或 K 螺旋)結構域和 ABD (其優選地是去免疫化的 ABD)之間。用於這類連接體 3 的優選的序列是 **SEQ ID NO:7** : GGGG。

【0123】 C. 包含 Fc 區的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性雙抗體

【0124】 本發明的一個實施方式涉及能夠同時結合 PD-1 和 CTLA-4 的包括 Fc 區的雙特異性雙抗體。添加 IgG CH2-CH3 結構域至雙抗體多肽鏈之一或兩條中，以便雙抗體鏈的複合導致形成 Fc 區，延長了生物半衰期和/或改變了雙抗體的價。將 IgG CH2-CH3 結構域併入到兩條雙抗體多肽上允許形成雙鏈雙特異性包含 Fc-區域的雙抗體(圖 2)。

【0125】 可選地，僅僅在一條雙抗體多肽上併入 IgG CH2-CH3 結構域允許形成更複雜的、包含 Fc 區的四鏈雙特異性雙抗體(圖 3A-3C)。圖 3C 顯示具有恒定輕鏈(CL)結構域和恒定重鏈 CH1 結構域的代表性四鏈雙抗體，然而，可以可選地採用這類結構域片段以及其他多肽(見，例如，圖 3A 和 3B，美國專利公開號 2013-0295121、2010-0174053 和 2009-0060910；歐洲專利公開號 EP 2714079、EP 2601216、EP 2376109、EP 2158221；和 PCT 公開號 WO 2012/162068、WO 2012/018687、WO 2010/080538)。因此，例如，代替 CH1 結構域，可採用源自人 IgG 的鉸鏈區的、具有氨基酸序列 GVEPKSC (SEQ ID NO:13) VEPKSC (SEQ ID NO:14)或 AEPKSC (SEQ ID NO:15)的肽，並且代替 CL 結構域，可採用人 κ 輕鏈的 C-末端 6 個氨基酸 GFNRGEC (SEQ ID NO:16)或 FNRGEC (SEQ ID NO:17)。包含代表性肽的四鏈雙抗體顯示在圖 3A 中。可選地，或另外，可採用肽包括具有相反電荷的串聯螺旋結構域的肽，比如“E-螺旋”螺旋結構域 (SEQ ID NO:18 : EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK 或 SEQ ID NO:19 : EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK)；和“K-螺旋”結構域(SEQ

ID NO:20 : KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE 或 **SEQ ID NO:21** : KVAACKKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE)。代表性的、包含螺旋結構域的四鏈雙抗體顯示在圖 3B 中。

【0126】本發明的包含 Fc 區的雙特異性分子可包括另外的間插間隔體肽(連接體)，一般而言，這類連接體被併入在肽異源二聚體促進結構域(例如，E-螺旋或 K-螺旋)和 CH2-CH3 結構域之間和/或 CH2-CH3 結構域和可變結構域(即，VH 或 VL)之間。典型地，另外的連接體將包括 3-20 個氨基酸殘基。可在本發明的包含 Fc 區的雙特異性雙抗體分子中採用的連接體包括：GGGS (SEQ ID NO:7)、LGGGSG (SEQ ID NO:8)、GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:9)、ASTKG (SEQ ID NO:10)、DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:26)、EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:27)、LEPKSS (SEQ ID NO:11)、APSSS (SEQ ID NO:28)和 APSSSPME (SEQ ID NO:29)、LEPKSADKTHTCPPC (SEQ ID NO:30)、GGC 和 GGG。SEQ ID NO:11 可代替 GGG 或 GGC 使用，以易於克隆。另外，氨基酸 GGG 或 SEQ ID NO:11 之後緊接著是 SEQ ID NO:26，以形成可選的連接體：GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:31)；和 LEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:32)。除了連接體以外或代替連接體，本發明的包含 Fc 區的雙特異性分子還可併入 IgG 鉸鏈區。示例性鉸鏈區包括：來自 IgG1 的 EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:33)、來自 IgG2 的 ERKCCVECPCPCP (SEQ ID NO:34)、來自 IgG4 的 ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO:35)和 ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:36)，包括穩定化 S228P 取代以減少鏈交換的 IgG4 鉸鏈變體(如 Kabat 中闡釋的 EU 索引編號)。

【0127】如圖 3A-3C 中提供，本發明的包含 Fc 區的雙特異性雙抗體可包括四條不同的鏈。這類雙抗體的第一和第三多肽鏈包含三個結構域：(i)包含 VL1 的結構域、(ii)包含 VH2 的結構域、(iii)異源二聚體-促進結構域、和(iv)包含 CH2-CH3 序列的結構域。第二和第四多肽鏈包含：(i)包含 VL2 的結構域、(ii)

包含 VH1 的結構域和(iii)異源二聚體-促進結構域，其中異源二聚體-促進結構域促進第一/第三多肽鏈與第二/第四多肽鏈的二聚化。第三和第四多肽鏈的 VL 和/或 VH 結構域，以及第一和第二多肽鏈的 VL 和/或 VH 結構域可以相同或不同，以便允許單特異性、雙特異性或四特異性的四價結合。符號“VL3”和“VH3”分別表示結合這類雙抗體的“第三”表位元的輕鏈可變結構域和可變重鏈結構域。類似地，符號“VL4”和“VH4”分別表示結合這類雙抗體的“第四”表位元的輕鏈可變結構域和可變重鏈結構域。本發明的包含 Fc 區的、代表性四鏈雙特異性雙抗體的多肽鏈的一般結構提供在表 1 中：

表 1		
雙特異性的	第二鏈	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	第一鏈	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	第一鏈	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	第二鏈	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
四特異性的	第二鏈	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	第一鏈	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	第三鏈	NH ₂ -VL3-VH4-HPD-CH2-CH3-COOH
	第四鏈	NH ₂ -VL4-VH3-HPD-COOH

HPD = 異源二聚體促進結構域

【0128】在具體的實施方式中，本發明的雙抗體是雙特異性的、四價(即，具有四個表位-結合位點)、包含 Fc 的雙抗體，其由總共四條多肽鏈構成(圖 3A-3C)。本發明的雙特異性、四價、包含 Fc 的雙抗體包括對於 PD-1 免疫特異性的兩個表位-結合位點(其可能夠結合相同的 PD-1 的表位或不同的 PD-1 的表位)，和對於 CTLA-4 免疫特異性的兩個表位-結合位點(其可能夠結合相同的 CTLA-4 的表位或不同的 CTLA-4 的表位)。

【0129】在進一步的實施方式中，包含 Fc 區的雙特異性雙抗體可包括三條多肽鏈。這類雙抗體的第一多肽包含三個結構域：(i)包含 VL1 的結構域、(ii)包含 VH2 的結構域和(iii)包含 CH2-CH3 序列的結構域。這類雙抗體的第二多肽包

含：(i)包含 VL2 的結構域、(ii)包含 VH1 的結構域和(iii)促進與雙抗體的第一多肽鏈異源二聚化和共價結合的結構域。這類雙抗體的第三多肽包括 CH2-CH3 序列。因此，這類雙抗體的第一和第二多肽鏈締合在一起，以形成能夠結合第一表位(即，PD-1 或 CTLA-4)的 VL1/VH1 結合位點，以及能夠結合第二表位(即，CTLA-4 或 PD-1)的 VL2/VH2 結合位點。第一和第二多肽通過涉及在它們各自的第三結構域中的半胱氨酸殘基的二硫鍵彼此結合。值得注意的是，第一和第三多肽鏈彼此複合，以形成經二硫鍵穩定的 Fc 區。這類雙特异性雙抗體具有增強的效價。**圖 4A 和 4B** 闡釋了這類雙抗體的結構。這類包含 Fc 區的雙特异性的雙抗體可具有兩個取向之一(表 2):

第一 取向	第三鏈	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -COOH
	第一鏈	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH ₂ -CH ₃ -COOH
	第二鏈	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
第二 取向	第三鏈	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -COOH
	第一鏈	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -VL1-VH2-HPD-COOH
	第二鏈	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH

HPD = 異源二聚體促進結構域

【0130】 在具體的實施方式中，本發明的雙抗體是雙特异性、二價(即，具有兩個表位-結合位點)、包含 Fc 的雙抗體，其由總共三條多肽鏈構成(圖 4A-4B)。本發明的雙特异性、二價、包含 Fc 的雙抗體包括對於 PD-1 免疫特异性的一個表位-結合位點，和對於 CTLA-4 特异性的一個表位-結合位點。

【0131】 在進一步的實施方式中，包含 Fc 區的雙特异性雙抗體可包括總共五條多肽鏈。在具體的實施方式中，五條多肽鏈的兩條具有相同的氨基酸序列。這類雙抗體的第一多肽鏈包含：(i)包含 VH1 的結構域、(ii)包含 CH1 的結構域和(iii)包含 CH2-CH3 序列的結構域。第一多肽鏈可以是抗體的重鏈，其包含 VH1

和重鏈恒定結構域。這類雙抗體的第二和第五條多肽鏈包含：(i)包含 VL1 的結構域和(ii)包含 CL 的結構域。這類雙抗體的第二和/或第五多肽鏈可以是抗體的輕鏈，其包含與第一/第三多肽鏈的 VH1 互補的 VL1。第一、第二和/或第五多肽鏈可分離自天然產生的抗體。可選地，它們可以是重組構建的。這類雙抗體的第三多肽鏈包含：(i)包含 VH1 的結構域、(ii)包含 CH1 的結構域、(iii)包含 CH2-CH3 序列的結構域、(iv)包含 VL2 的結構域、(v)包含 VH3 的結構域和(vi)異源二聚體-促進結構域，其中異源二聚體-促進結構域促進第三鏈與第四鏈的二聚化。這類雙抗體的第四多肽包含：(i)包含 VL3 的結構域、(ii)包含 VH2 的結構域和(iii)促進與雙抗體的第三多肽鏈異源二聚化和共價結合的結構域。

【0132】因此，這類雙抗體的第一和第二，以及第三和第五多肽鏈締合在一起，以形成能夠結合第一表位的兩個 VL1/VH1 結合位點。這類雙抗體的第三和第四多肽鏈締合在一起，以形成能夠結合第二表位的 VL2/VH2 結合位點，以及能夠結合第三表位的 VL3/VH3 結合位點。第一和第三多肽通過涉及在它們各自恒定區中的半胱氨酸殘基的二硫鍵彼此結合。值得注意的是，第一和第三多肽鏈彼此複合，以形成 Fc 區。這類雙特異性雙抗體具有增強的效價。圖 5 圖解了這類雙抗體的結構。應當理解，VL1/VH1、VL2/VH2 和 VL3/VH3 結構域可以相同或不同，以便允許單特異性、雙特異性或三特異性的結合。但是，如本文所提供，優選地選擇這些結構域，以便結合 PD-1 和 CTLA-4。

【0133】選擇多肽鏈的 VL 和 VH 結構域，以便形成對於期望的表位特異性的 VL/VH 結合位點。通過多肽鏈的締合形成的 VL/VH 結合位點可以相同或不同，以便允許單特異性、雙特異性、三特異性或四特異性的四價結合。尤其地，可選擇 VL 和 VH 結構域，以便雙特異性雙抗體可包括針對第一表位的兩個結合位點和針對第二表位的兩個結合位點，或針對第一表位的三個結合位點和針對第二表位的一個結合位點，或針對第一表位的兩個結合位點，針對第二表位的

一個結合位點和針對第三表位的一個結合位點(如圖 5 中所描繪)。本發明的代表性包含 Fc 區的五鏈雙抗體的多肽鏈的一般結構提供在表 3 中:

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

HPD = 異源二聚體促進結構域

【0134】在具體的實施方式中，本發明的雙抗體是雙特異性、四價(即，具有四個表位-結合位點)、包含 Fc 的雙抗體，其由總共五條多肽鏈構成，具有對於 PD-1 免疫特異性的兩個表位-結合位點(其可能夠結合相同的 PD-1 的表位或不同的 PD-1 的表位)，和對於 CTLA-4 特異性的兩個表位-結合位點(其可能夠結合相同的 CTLA-4 的表位或不同的 CTLA-4 的表位)。在另一實施方式中，本發明的雙特異性、四價、包含 Fc 的雙抗體包括對於 PD-1 免疫特異性的三個表位-結合位點(其可能夠結合相同的 PD-1 的表位或兩個或三個不同的 PD-1 的表位)，和對於 CTLA-4 特異性的一個表位-結合位點。在另一實施方式中，本發明的雙特異性、四價、包含 Fc 的雙抗體包括對於 PD-1 免疫特異性的一個表位-結合位點，和對於 CTLA-4 特異性的三個表位-結合位點(其可能夠結合相同的 CTLA-4 的表

位或兩個或三個不同的 CTLA-4 的表位)。

【0135】 D. 包含 Fc 區的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性三價結合分子

【0136】 本發明的進一步實施方式涉及包括 Fc 區的雙特異性三價結合分子，其包括能夠同時結合 PD-1 的表位和 CTLA-4 上存在的表位。這類雙特異性三價結合分子包括三個表位-結合位點，其中兩個是雙抗體型結合結構域，其提供結合位點 A 和結合位點 B，並且其中一個是 Fab 型結合結構域(或 scFv 型結合結構域)，其提供結合位點 C (見，例如，**圖 6A-6F**，和 PCT 公佈號：PCT/US15/33081；和 PCT/US15/33076)。這類雙特異性三價分子因此包括能夠結合第一表位的“VL1”/“VH1”結構域和能夠結合第二表位的“VL2”/“VH2”結構域和能夠結合這類三價分子的“第三”表位的“VL3”和“VH3”結構域。“雙抗體型結合結構域”是雙抗體，尤其是 DART®雙抗體中存在的表位-結合位點的類型，如上所述。每個“Fab 型結合結構域”和“scFv 型結合結構域”是通過免疫球蛋白輕鏈的 VL 結構域和免疫球蛋白重鏈的互補 VH 結構域相互作用形成的表位-結合位點。Fab 型結合結構域與雙抗體型結合結構域的差異在於形成 Fab 型結合結構域的兩條多肽鏈僅僅包括單個表位-結合位元點，而形成雙抗體型結合結構域的兩條多肽鏈包括至少兩個表位-結合位點。類似地，scFv 型結合結構域與雙抗體型結合結構域的差異也在於它們僅僅包括單個表位-結合位點。因此，如本文使用的 Fab 型和 scFv 型結合結構域與雙抗體型結合結構域不同。

【0137】 典型地，本發明的三價結合分子包括四條不同的多肽鏈(見**圖 6A-6B**)，但是，例如，通過彼此融合這類多肽鏈(例如，經肽鏈)或通過分開這類多肽鏈，以形成另外的多肽鏈，或通過經二硫鍵締合更少的或另外的多肽鏈，分子可包括更少或更多數量的多肽鏈。**圖 6C-6F** 通過示意性描繪具有三條多肽鏈的這類分子闡釋了本發明的這個方面。如**圖 6A-6F** 中提供的，本發明的三價結合分子可具有可選的取向，其中雙抗體型結合結構域在 Fc 區的 N-末端(**圖**

6A、6C 和 6D)或 C-末端(圖 6B、6E 和 6F)。

【0138】在某些實施方式中，本發明的這類三價結合分子的第一多肽鏈包含：(i)包含 VL1 的結構域、(ii)包含 VH2 的結構域、(iii)異源二聚體-促進結構域和(iv)包含 CH2-CH3 序列的結構域。VL1 和 VL2 結構域位於包含 CH2-CH3 的結構域的 N-末端或 C-末端，如表 4 (也見圖 6A 和 6B)中所顯示。這類實施方式的第二多肽鏈包含：(i)包含 VL2 的結構域、(ii)包含 VH1 的結構域和(iii)異源二聚體-促進結構域。這類實施方式的第三多肽鏈包含：(i)包含 VH3 的結構域、(ii)包含 CH1 的結構域和(iii)包含 CH2-CH3 序列的結構域。第三多肽鏈可以是包含 VH3 和重鏈恒定區的抗體的重鏈，或包含這樣的結構域的多肽。這類實施方式的第四多肽包含：(i)包含 VL3 的結構域和(ii)包含 CL 的結構域。第四多肽鏈可以是包含與第三多肽鏈的 VH3 互補的 VL3 的抗體的輕鏈，或包含這樣的結構域的多肽。第三或第四多肽鏈可分離自天然產生的抗體。可選地，它們可經重組、合成通過其方式而構建。

【0139】第一和第二多肽鏈的輕鏈可變結構域通過間插間隔體肽與這類多肽鏈的重鏈可變結構域分開，所述間插間隔體肽長度太短而不允許它們的 VL1/VH2 (或它們的 VL2/VH1)結構域締合在一起形成能夠結合第一或第二表位的表位結合位點。用於該目的的優選間插間隔體肽(連接體 1)具有序列(SEQ ID NO: 9)：GGGSGGGG。三價結合分子的其他結構域可通過任選地包括半胱氨酸殘基的一個或多個間插間隔體肽(連接體)分開。尤其地，如上面提供，這類連接體通常被併入在可變結構域(即，VH 或 VL)和肽異源二聚體促進結構域(例如，E-螺旋或 K-螺旋)之間和這類肽異源二聚體促進結構域(例如，E-螺旋或 K-螺旋)和 CH2-CH3 結構域之間。上面提供了用於產生三價結合分子的示例性連接體，並且其也提供在 PCT 公佈號：PCT/US15/33081 和 PCT/US15/33076 中。因此，這類三價結合分子的第一和第二多肽鏈締合在一起，形成能夠結合第一表位的

VL1/VH1 結合位點，以及能夠結合第二表位的 VL2/VH2 結合位點。這類三價結合分子的第三和第四多肽鏈締合在一起而形成能夠結合第三表位的 VL3/VH3 結合位點。

【0140】如上述，本發明的三價結合分子可包括三條多肽。包括三條多肽鏈的三價結合分子可通過將第四多肽 N-末端的結構域連接至第三多肽的包含 VH3 的結構域(例如，使用間插間隔體肽(**連接體 4**))而獲得。可選地，使用包含下述結構域的本發明的三價結合分子的第三多肽鏈：(i)包含 VL3 的結構域、(ii)包含 VH3 的結構域和(iii)包含 CH2-CH3 序列的結構域，其中 VL3 和 VH3 通過間插間隔體肽彼此間隔開，所述間插間隔體肽足夠長(至少 9 個或更多個氨基酸殘基)，以便允許這些結構域的締合形成表位-結合位點。對於該目的，一個優選的間插間隔體肽具有序列：GGGGSGGGSGGGGS (**SEQ ID NO:37**)。

【0141】應當理解，這類三價結合分子的 VL1/VH1、VL2/VH2 和 VL3/VH3 結構域可以不同，以便允許雙特異性或三特異性的結合。但是，如本文提供的，選擇這些結構域以便提供能夠結合 PD-1 和 CTLA-4 的三價結合分子。

【0142】尤其地，可選擇 VL 和 VH 結構域，以便三價結合分子包括針對 PD-1 的兩個結合位點(其可能夠結合相同的 PD-1 的表位或不同的 PD-1 的表位)和針對 CTLA-4 的一個結合位點，或針對 PD-1 的一個結合位點和針對 CTLA-4 的兩個結合位點(其可能夠結合相同的 CTLA-4 的表位或不同的 CTLA-4 的表位)，或針對 PD-1 的一個結合位點、針對 CTLA-4 的一個結合位點和針對不是 PD-1 或 CTLA-4 的第三抗原的一個結合位點。本發明代表性三價結合分子的多肽鏈的一般結構提供在**圖 6A-6F**和**表 4**中：

表 4		
四鏈 第一取向	第二鏈	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	第一鏈	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	第三鏈	NH ₂ -VH3-CH1-CH2-CH3-COOH

表 4		
	第二鏈	NH ₂ -VL3-CL-COOH
四鏈 第二取向	第二鏈	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	第一鏈	NH ₂ -CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH
	第三鏈	NH ₂ -VH3-CH1-CH2-CH3-COOH
	第二鏈	NH ₂ -VL3-CL-COOH
三鏈 第一取向	第二鏈	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	第一鏈	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	第三鏈	NH ₂ -VL3-VH3-HPD-CH2-CH3-COOH
三鏈 第二取向	第二鏈	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	第一鏈	NH ₂ -CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH
	第三鏈	NH ₂ -VL3-VH3-HPD-CH2-CH3-COOH

HPD = 異源二聚體促進結構域

【0143】本發明的一個實施方式涉及雙特異性三價結合分子，其包括針對 PD-1 的兩個表位-結合位點和針對 CTLA-4 的一個表位-結合位點。

【0144】針對 PD-1 的兩個表位-結合位點可結合相同的表位或不同的表位。本發明的另一實施方式涉及雙特異性三價結合分子，其包括針對 PD-1 的一個表位-結合位點和針對 CTLA-4 的兩個表位-結合位點。針對 CTLA-4 的兩個表位-結合位點可結合相同的 CTLA-4 的表位或不同的 CTLA-4 的表位。如上面提供，這類雙特異性三價結合分子可包括三、四、五或更多條多肽鏈。

【0145】V. 恒定結構域和 Fc 區

【0146】本文提供了用於產生本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子(例如，抗體、雙抗體、三價結合分子等)的抗體恒定結構域。

【0147】優選的 CL 結構域是人 IgG CL κ 結構域。示例性人 CL κ 結構域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:38)：

```
RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK
SFNRGEC
```

【0148】可選地，示例性 CL 結構域是人 IgG CL λ 結構域。示例性人 CL λ 結構域的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:39**)：

QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGA VTTVA WKADSSPVKA
GVETTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP
TECS

【0149】如本文提供的，本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子可包括 Fc 區。本發明的這類分子的 Fc 區可以屬於任何同種型(例如，IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4)。本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子可進一步包括 CH1 結構域和/或鉸鏈區。當存在時，CH1 結構域和/或鉸鏈區可以屬於任何同種型(例如，IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4)，並且優選地與期望的 Fc 區屬於相同的同種型。

【0150】示例性 CH1 結構域是人 IgG1 CH 結構域。示例性人 IgG1 CH1 結構域的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:40**)：

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRV

【0151】示例性 CH1 結構域是人 IgG2 CH 結構域。示例性人 IgG2 CH1 結構域的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:41**)：

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVNHDKPS NTKVDKTV

【0152】示例性 CH1 結構域是人 IgG4 CH1 結構域。示例性人 IgG4 CH1 結構域的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:42**)：

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVNHDKPS NTKVDKRV

【0153】一個示例性鉸鏈區是人 IgG1 鉸鏈區。示例性人 IgG1 鉸鏈區的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:33**)：EPKSCDKTHTCPPCP。

【0154】另一示例性鉸鏈區是人 IgG2 鉸鏈區。示例性人 IgG2 鉸鏈區的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:34**)：ERKCCVECPCP。

【0155】另一示例性鉸鏈區是人 IgG4 鉸鏈區。示例性人 IgG4 鉸鏈區的氨基酸序列是(SEQ ID NO:35)：ESKYGPPCPSCP。如本文所描述，IgG4 鉸鏈區可包括穩定化突變比如 S228P 取代。示例性穩定化 IgG4 鉸鏈區的氨基酸序列是(SEQ ID NO:36)：ESKYGPPCPPCP。

【0156】本發明的包含 Fc 區的分(例如，抗體、雙抗體、三價分子等)的 Fc 區可以是完整的 Fc 區(例如，完整的 IgG Fc 區)或僅僅 Fc 區的片段。任選地，本發明的包含 Fc 區的分子的 Fc 區缺少 C-末端賴氨酸氨基酸殘基。

【0157】在傳統的免疫功能中，抗體-抗原複合物與免疫系統的細胞的相互作用產生各種各樣的應答，範圍從效應子功能，比如抗體依賴性細胞毒性、肥大細胞脫粒和吞噬，到免疫調節信號，比如調節淋巴細胞增殖和抗體分泌。所有這些相互作用通過抗體或免疫複合物的 Fc 區與造血細胞上專用細胞表面受體的結合來啟動。由抗體和免疫複合物引發的細胞應答的多樣性由三種 Fc 受體：FcγRI (CD64)、FcγRII (CD32)和 FcγRIII (CD16)的結構異質性造成。FcγRI (CD64)、FcγRIIA (CD32A)和 FcγRIII (CD16)是啟動(即，免疫系統增強)性受體；FcγRIIB (CD32B)是抑制(即，免疫系統抑制)性受體。另外，與新生 Fc 受體(FcRn)的相互作用介導 IgG 分子從內體至細胞表面的再迴圈並且釋放進入血液中。上面呈現了示例性野生型 IgG1 (SEQ ID NO:1)、IgG2 (SEQ ID NO:2)、IgG3 (SEQ ID NO:3)和 IgG4 (SEQ ID NO:4)的氨基酸序列。

【0158】Fc 區的修飾可導致改變的表型，例如改變的血清半衰期、改變的穩定性、改變的對細胞酶的易感性或改變的效應子功能。因此，就效應子功能而言，可期望修飾本發明的包含 Fc 區的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子，例如，以便增強這類分子治療癌症的效力。在某些情況下，例如在作用機制涉及阻斷或拮抗，但是不殺傷攜帶靶抗原的細胞的抗體的情況下，期望降低或消除效應子功能。當涉及非期望的細胞，比如腫瘤和外源細胞時，其中 FcγRs 以低水準表

達，例如，具有低水準的 Fc γ RIIB 腫瘤特異性 B 細胞(例如，非霍奇金淋巴瘤、CLL 和伯基特淋巴瘤)，一般期望增加的效應子功能。本發明的分子具有這樣的賦予的或改變的效應子功能活性，可用於治療和/或預防其中期望增強的效應子功能活性效力的疾病、病症或感染。

【0159】因此，在某些實施方式中，本發明的包含 Fc 區的分子的 Fc 區可以是工程化的變異的 Fc 區。儘管本發明雙特異性包含 Fc 區的分子的 Fc 區可以具有結合一個或多個 Fc 受體(例如，Fc γ R)的能力，但是更優選地這類變異的 Fc 區具有對 Fc γ RIA (CD64)、Fc γ RIIA (CD32A)、Fc γ RIIB (CD32B)、Fc γ RIIIA (CD16a) 或 Fc γ RIIIB (CD16b)改變的結合(相對於野生型 Fc 區展示的結合)，例如，具有與啟動性受體增強的結合和/或具有對抑制性受體基本上降低的結合能力或沒有結合抑制性受體的能力。因此，本發明包含 Fc 區的分子的 Fc 區可包括完整的 Fc 區的一些或所有 CH2 結構域和/或一些或所有 CH3 結構域，或可包括變異的 CH2 和/或變異的 CH3 序列(其相對於完整的 Fc 區的 CH2 或 CH3 結構域，可包括，例如，一個或多個插入和/或一個或多個缺失)。這類 Fc 區可包括非 Fc 多肽部分，或可包括非天然完整 Fc 區的部分，或可包括非天然產生的取向的 CH2 和/或 CH3 結構域(比如，例如，兩個 CH2 結構域或兩個 CH3 結構域，或者在 N-末端至 C-末端方向上，連接至 CH2 結構域的 CH3 結構域等)。

【0160】鑒定為改變效應子功能的 Fc 區修飾是本領域已知的，包括增加與啟動性受體(例如，Fc γ RIIA (CD16A)的結合的修飾和減少與抑制性受體(例如，Fc γ RIIB (CD32B)結合的修飾(例如，Fc γ RIIB (CD32B) (見，例如，Stavenhagen, J.B. 等(2007) “*Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fc γ Receptors,*” *Cancer Res.* 57(18):8882-8890)。表 5 列舉了示例性修飾的示例性單、雙、三、四和五取代(相對於 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列)，

其增加了與啟動性受體的結合和/或降低了與抑制性受體的結合。

表 5			
優選的啟動性 Fc 區的變異			
單-位點變異			
F243L	R292G	D270E	R292P
Y300L	P396L		
雙位點變異			
F243L 和 R292P	F243L 和 Y300L	F243L 和 P396L	R292P 和 Y300L
D270E 和 P396L	R292P 和 V305I	P396L 和 Q419H	P247L 和 N421K
R292P 和 P396L	Y300L 和 P396L	R255L 和 P396L	R292P 和 P305I
K392T 和 P396L			
三位點變異			
F243L、P247L 和 N421K		P247L、D270E 和 N421K	
F243L、R292P 和 Y300L		R255L、D270E 和 P396L	
F243L、R292P 和 V305I		D270E、G316D 和 R416G	
F243L、R292P 和 P396L		D270E、K392T 和 P396L	
F243L、Y300L 和 P396L		D270E、P396L 和 Q419H	
V284M、R292L 和 K370N		R292P、Y300L 和 P396L	
四位點變異			
L234F、F243L、R292P 和 Y300L		F243L、P247L、D270E 和 N421K	
L234F、F243L、R292P 和 Y300L		F243L、R255L、D270E 和 P396L	
L235I、F243L、R292P 和 Y300L		F243L、D270E、G316D 和 R416G	
L235Q、F243L、R292P 和 Y300L		F243L、D270E、K392T 和 P396L	
P247L、D270E、Y300L 和 N421K		F243L、R292P、Y300L、和 P396L	
R255L、D270E、R292G 和 P396L		F243L、R292P、V305I 和 P396L	
R255L、D270E、Y300L 和 P396L		F243L、D270E、P396L 和 Q419H	
D270E、G316D、P396L 和 R416G			
五位點變異			
L235V、F243L、R292P、Y300L 和 P396L		F243L、R292P、V305I、Y300L 和 P396L	
L235P、F243L、R292P、Y300L 和 P396L			

【0161】具有具有與 CD32B 降低的結合和/或與 CD16A 增加的結合的人 IgG1 Fc 區的示例性變體包含 F243L、R292P、Y300L、V305I 或 P296L 取代。這些氨基酸取代可以以任何組合存在於人 IgG1 Fc 區中。在一個實施方式中，人 IgG1 Fc 區變體包含 F243L、R292P 和 Y300L 取代。在另一實施方式中，人 IgG1 Fc 區變體包含 F243L、R292P、Y300L、V305I 和 P296L 取代。

【0162】在某些實施方式中，本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的 Fc 區優選地展示對 FcγRIA (CD64)、FcγRIIA (CD32A)、FcγRIIB (CD32B)、FcγRIIIA (CD16a)或 FcγRIIIB (CD16b)降低的(或基本上沒有)結合(相對於野生型 IgG1 Fc 區(SEQ ID NO: 1)展示的結合)。在具體的實施方式中，本發明的包括 IgG Fc 區的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子展示降低的 ADCC 效應子功能。在優選的實施方式中，這類 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的 CH2-CH3 結構域包括下述的任何 1、2、3 或 4 個取代：L234A、L235A、D265A、N297Q 和 N297G。在另一實施方式中，CH2-CH3 結構域包含 N297Q 取代、N297G 取代、L234A 和 L235A 替換或 D265A 取代，因為這些突變消除了 FcR 結合。可選地，使用固有地展示對 FcγRIIIA (CD16a)降低的(或基本上沒有)結合和/或降低的效應子功能(相對於野生型 IgG1 Fc 區(SEQ ID NO: 1)展示的結合和效應子功能)的天然產生的 Fc 區的 CH2-CH3 結構域。在具體的實施方式中，本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子包括 IgG2 Fc 區(SEQ ID NO:2)或 IgG4 Fc 區(SEQ ID:NO:4)。當使用 IgG4 Fc 區時，本發明也包括引入穩定化突變，比如上述的鉸鏈區 S228P 取代(見，例如，SEQ ID NO: 36)。因為 N297G、N297Q、L234A、L235A 和 D265A 取代消除了效應子功能，在期望效應子功能的情況下，優選地將不採用這些取代。

【0163】對於具有降低的或消除的效應子功能的本發明的包含 Fc 區的分子的 CH2 和 CH3 結構域，優選的 IgG1 序列包括取代 L234A/L235A (SEQ ID NO:43)：

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
 ALHNHYTQKS LSLSPGX

其中，X 是賴氨酸(K)或不存在。

【0164】可通過增加 Fc 區對於 FcRn 的結合親和力而延長包括 Fc 區的蛋白質的血清半衰期。如本文使用的術語“半衰期”意思是分子的藥物代謝動力學性質，是對在其施用之後分子的平均生存時間的衡量。半衰期可表示為從受試者的身體(例如，人患者或其他哺乳動物)或其特定區室消除百分之五十(50%)的已知量的分子需要的時間，例如，如在血清中測量的，即，迴圈半衰期，或在其他組織中測量的。一般而言，半衰期的增加導致施用的分子在迴圈中的平均停留時間(MRT)的增加。

【0165】在一些實施方式中，本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子包括變異的 Fc 區，其中變異的 Fc 區相對於野生型 Fc 區包括至少一個氨基酸修飾，使得分子具有延長的半衰期(相對於包括野生型 Fc 區的分)。在一些實施方式中，本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子包括變異的 IgG Fc 區，其中變異的 Fc 區在選自下述的一個或多個位置處包括延長半衰期的氨基酸取代：238、250、252、254、256、257、256、265、272、286、288、303、305、307、308、309、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、428、433、434、435 和 436。能夠延長包含 Fc 區的分子的半衰期的許多突變是本領域已知的，包括，例如 M252Y、S254T、T256E 和其組合。例如，見美國專利號 6,277,375、7,083,784、7,217,797、8,088,376；美國公開號 2002/0147311、2007/0148164；和國際公開號 WO 98/23289、WO 2009/058492 和 WO 2010/033279 中描述的突變，其通過引用以它們的整體併入本文。具有延長的半衰期的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子也包括具有在 Fc 區殘基 250、252、254、256、257、288、307、308、309、311、378、428、433、434、435 和 436 中的兩個或更多個處包括取代的變異的 Fc 區的那些。尤其地，兩個或更多個取代選自：T250Q、M252Y、S254T、T256E、K288D、T307Q、V308P、A378V、M428L、N434A、H435K 和 Y436I。

【0166】在具體的實施方式中，PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子具有變異的 IgG

Fc 區，其包括下述取代：

(A) M252Y、S254T 和 T256E；

(B) M252Y 和 S254T；

(C) M252Y 和 T256E；

(D) T250Q 和 M428L；

(E) T307Q 和 N434A；

(F) A378V 和 N434A；

(G) N434A 和 Y436I；

(H) V308P 和 N434A；或

(I) K288D 和 H435K。

【0167】在優選的實施方式中，PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子具有變異的 IgG Fc 區，其包括下述的任何 1、2 或 3 個取代：M252Y、S254T 和 T256E。本發明進一步包括具有變異的 Fc 區的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子，所述變異的 Fc 區包括：

(A) 改變效應子功能和/或 Fc γ R 的一個或多個突變；和

(B) 延長血清半衰期的一個或多個突變。

【0168】對於具有增加的血清半衰期的本發明的包含 Fc 區的分子的 CH2 和 CH3 結構域，優選的 IgG1 序列包括取代 M252Y、S254T 和 T256E (**SEQ ID NO:80**)：

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
 PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGX

其中，X 是賴氨酸(K)或不存在。

【0169】如將注意到，**SEQ ID NO:80** 的 CH2-CH3 結構域包括用丙氨酸在

234 和 235 位的取代，並且因此形成展示與 FcγRIA (CD64)、FcγRIIA (CD32A)、FcγRIIB (CD32B)、FcγRIIIA (CD16a)或 FcγRIIIB (CD16b)降低的(或基本上沒有)結合的 Fc 區(相對於由野生型 Fc 區(SEQ ID NO:1)展示的結合)。本發明也包括這類 IgG1 CH2-CH3 結構域，其包括野生型丙氨酸殘基，修飾 Fc 區的效應子功能和/或 FcγR 結合活性的可選的和/或另外的取代。

【0170】對於具有延長的血清半衰期的本發明的包含 Fc 區的分子的 CH2 和 CH3 結構域，優選的 IgG4 序列包括取代 M252Y、S254T 和 T256E (SEQ ID NO:81)：

```
APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK
PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT
LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL
TVDKSRWQEG NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS LSLSLGX
```

其中，X 是賴氨酸(K)或不存在。

【0171】對於其含有 Fc 區的第一和第三多肽鏈不一致的某些抗體、雙抗體和三價結合分子，期望減少或防止兩個第一多肽鏈的 CH2-CH3 結構域之間或兩個第三多肽鏈的 CH2-CH3 結構域之間發生同源二聚化。這類多肽鏈的 CH2 和/或 CH3 結構域不需要序列相同，並且有利地被修飾以促進兩條多肽鏈之間的複合。例如，氨基酸取代(優選以包括形成“杵(knob)”的大側基的氨基酸例如色氨酸進行取代)可被引入 CH2 或 CH3 結構域中，以便空間干擾將防止與類似的突變結構域的相互作用並將迫使突變的結構域與其中互補或適應性突變已經被工程化的結構域——即“臼(hole)” (例如，用甘氨酸取代)——配對。這樣的突變組可被工程化到任意對的、包括形成 Fc 區的 CH2-CH3 結構域的多肽中，以促進異源二聚化。蛋白質工程化以相對於同源二聚化利於異源二聚化的方法在本領域中是悉知的，尤其就工程化免疫球蛋白樣分子而言，這些都包括在本文中(見例如，Ridgway 等(1996) “‘Knobs-Into-Holes’ Engineering Of Antibody CH3

Domains For Heavy Chain Heterodimerization,” Protein Engr. 9:617-621 ; Atwell 等 (1997) “*Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library,*” J. Mol. Biol. 270: 26-35; 和 Xie 等(2005) “*A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis,*” J. Immunol. Methods 296:95-101 ; 其每一篇通過引用以其整體併入本文)。

【0172】通過修飾 IgG Fc 區以包含修飾 T366W 而產生優選的杵。通過修飾 IgG Fc 區以包含修飾 T366S、L368A 和 Y407V 而產生優選的臼。為了有助於從最終的雙特異性的、異源二聚化的、包含 Fc 區的分分子中純化含臼的第三多肽鏈同源二聚體，優選地通過在 435 位的氨基酸取代(H435R)突變第三多肽鏈的含臼的 CH2 和 CH3 結構域的蛋白質 A 結合位點。因此，含臼的第三多肽鏈同源二聚體不結合蛋白質 A，而雙特異性的異源二聚體經在第一多肽鏈上的蛋白質 A 結合位點而保持其結合蛋白質 A 的能力。在可選的實施方式中，含臼的第三多肽鏈可併入在 434 和 435 位的氨基酸取代(N434A/N435K)。

【0173】對於本發明包含 Fc 區域的分分子的第一多肽鏈的 CH2 和 CH3 結構域，優選的 IgG1 氨基酸序列具有“包含杵的”序列(SEQ ID NO:44)：

```
APEAAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL
TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGX
```

其中 X 是賴氨酸(K)或不存在。

【0174】對於具有兩條多肽鏈的本發明的包含 Fc 區域的分分子的第三多肽鏈(或具有三、四或五條多肽鏈的包含 Fc 區域的分分子的第三多肽鏈)的 CH2 和 CH3 結構域，優選的 IgG1 氨基酸序列具有“包含臼的”序列(SEQ ID NO:45)：

```
APEAAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
```

LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL
TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNRY^TQKS LSLSPGX

其中 X 是賴氨酸(K)或不存在。

【0175】如將注意到，SEQ ID NO:44 和 SEQ ID NO:45 的 CH2-CH3 結構域包括在 234 和 235 位用丙氨酸的取代，並且因此形成展示與 FcγRIA (CD64)、FcγRIIA (CD32A)、FcγRIIB (CD32B)、FcγRIIIA (CD16a)或 FcγRIIIB (CD16b)降低的(或基本上沒有)結合的 Fc 區(相對於野生型 Fc 區(SEQ ID NO:1)展示的結合)。本發明也包括這類 IgG1 CH2-CH3 結構域，其包括野生型丙氨酸殘基，修飾 Fc 區的效應子功能和/或 FcγR 結合活性的可選的和/或另外取代。本發明也包括這類 CH2-CH3 結構域，其進一步包括一個或多個延長半衰期的氨基酸取代。尤其地，如上面提供，本發明包括這類包含白的和這類包含杵的 CH2-CH3 結構域，其進一步包括 M252Y/S254T/T256E。

【0176】對於本發明包含 Fc 區的分子的第一多肽鏈的進一步包括 M252Y/S254T/T256E 的 CH2 和 CH3 結構域，優選的 IgG1 氨基酸序列具有“包含杵的”序列(SEQ ID NO:82)：

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL
TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGX

其中 X 是賴氨酸(K)或不存在。

【0177】對於本發明具有兩條多肽鏈的、包含 Fc 區的分子的第二多肽鏈(或具有三、四或五條多肽鏈的包含 Fc 區的分子的第三多肽鏈)的進一步包括 M252Y/S254T/T256E 的 CH2 和 CH3 結構域，優選的 IgG1 氨基酸序列具有“包含白的”序列(SEQ ID NO:83)：

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL

TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSPGX

其中 X 是賴氨酸(K)或不存在。

【0178】對於本發明的包含 Fc 區的分子的第一多肽鏈的包括 M252Y/S254T/T256E 的 CH2 和 CH3 結構域，優選的 IgG4 氨基酸序列具有“包含杵的”序列(**SEQ ID NO:84**)：

APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK
 PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT
 LPPSQEEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL
 TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGX

其中 X 是賴氨酸(K)或不存在。

【0179】對於本發明具有兩條多肽鏈的、包含 Fc 區的分子的第二多肽鏈(或具有三、四或五條多肽鏈的包含 Fc 區的分子的第三多肽鏈)的包括 M252Y/S254T/T256E 的 CH2 和 CH3 結構域，優選的 IgG4 氨基酸序列具有“包含白的”序列(**SEQ ID NO:85**)：

APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK
 PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT
 LPPSQEEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSRL
 TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSLGX

其中 X 是賴氨酸(K)或不存在。

【0180】如將注意到，**SEQ ID NO:84** 和 **SEQ ID NO:85** 的 CH2-CH3 結構域包括 M252Y/S254T/T256E 取代，並且因此形成展示延長的血清半衰期的 IgG4 Fc 區。本發明也包括 IgG4 CH2-CH3 結構域，其包括野生型 M252/S254/T256 殘基。

【0181】優選地，第一多肽鏈具有“包含杵的”CH2-CH3 序列，比如 **SEQ ID NO:44** 的序列。但是，如將認識到，“包含白的”CH2-CH3 結構域(例如，**SEQ ID NO:45**)可用於第一多肽鏈中，在這類情況下，“包含杵的”CH2-CH3 結構域(例如，**SEQ ID NO:44**)用於本發明具有兩條多肽鏈的、包含 Fc 區的分子的第二多肽鏈中(或用於具有三、四或五條多肽鏈的包含 Fc 區的分子的第三多肽鏈中)。

【0182】在其他實施方式中，本發明包括 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子，其包括使用本領域已知的突變已經被工程化成相對於同源二聚化利於異源二聚化的 CH2 和/或 CH3 結構域，比如 PCT 公開號 WO 2007/110205、WO 2011/143545、WO 2012/058768、WO 2013/06867 中公開的那些，其所有通過引用以其整體併入本文。

【0183】VI. 抗 PD-1 結合能力

【0184】對於 PD-1 免疫特異性的抗體是已知的(見，例如，美國專利申請號 62/198,867、62/239,559、62/255,140；美國專利號 8,008,449、8,552,154；PCT 專利公開 WO 2012/135408、WO 2012/145549 和 WO 2013/014668)。可用于產生本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的優選的 PD-1 結合能力能夠結合人 PD-1 (CD279)的連續或不連續(例如，構象)部分(表位)並且優選地也展示結合一個或多個非人物種，尤其是靈長類物種(和尤其是靈長類物種，比如食蟹猴)的 PD-1 分子的能力。可通過分離使用 PD-1 或其肽片段引起的分泌抗體的雜交瘤來製備另外期望的抗體。代表性人 PD-1 多肽(NCBI 序列 NP_005009.2；包括 20 個氨基酸殘基信號序列，加底線顯示)和 268 個氨基酸殘基成熟蛋白質)具有氨基酸序列 (SEQ ID NO:46)：

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

【0185】可用于產生本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的優選的抗 PD-1 結合分子(例如，抗體)具有下述抗體的 VL 和/或 VH 結構域：抗人 PD-1 單克隆抗體“PD-1 mAb 1”(尼魯單抗(nivolumab)，CAS 登記號:946414-94-4，也稱為 5C4、BMS-936558、ONO-4538、MDX-1106 並且由 Bristol-Myers Squibb 以

OPDIVO®售賣)；“**PD-1 mAb 2**”(派姆單抗(pembrolizumab)，(之前稱為蘭羅利珠單抗(lambrolizumab))，CAS 登記號:1374853-91-4，也稱為 MK-3475、SCH-900475，並且由 Merck 以 KEYTRUDA®售賣)；“**PD-1 mAb 3**”(EH12.2H7；Dana Farber)，“**PD-1 mAb 4**”(皮地珠單抗，CAS 登記號：1036730-42-3，也稱為 CT-011，CureTech,)，或表 6 中的任何抗 PD-1 抗體；並且更優選地具有這類抗 PD-1 單克隆抗體的 VL 區的 1、2 或所有 3 個 CDR_L和/或 VH 結構域的 1、2 或所有 3 個 CDR_H。最近已經鑒定了可用于本發明的方法和組合物的、具有獨特的結合特徵的另外的抗 PD-1 抗體(見，美國專利申請號 62/198,867、62/239,559、62/255,140)。尤其地，優選的是具有下述抗體的人源化的 VH 和/或 VL 結構域的 PD-1-結合分子：抗 PD-1 抗體“**PD-1 mAb 5**”(hPD-1 mAb 2，MacroGenics)；“**PD-1 mAb 6**”(hPD-1 mAb 7，MacroGenics)；“**PD-1 mAb 7**”(hPD-1 mAb 9，MacroGenics)；或“**PD-1 mAb 8**”(hPD-1 mAb 15，MacroGenics)；和更優選地具有這類人源化的抗 PD-1 單克隆抗體的 VL 區的 1、2 或所有 3 個 CDR_L和/或 VH 結構域的 1、2 或所有 3 個 CDR_H。

【0186】 A. PD-1 mAb 1

【0187】 PD-1 mAb 1 的 VH 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:47**)顯示在下方(CDR_H 殘基加底線顯示)。

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV
IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLLVT
 VSS

【0188】 PD-1 mAb 1 的 VL 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:48**)顯示在下方(CDR_L 殘基加底線顯示)。

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ
 GTKVEIK

【0189】 B. PD-1 mAb 2

【0190】 PD-1 mAb 2 的 VH 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:49**)顯示在下方
(CDR_H 殘基加底線顯示)。

QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT **NYMYWVRQA** PGQGLEWMGG
INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARR**D**
YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS

【0191】 PD-1 mAb 2 的 VL 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:50**)顯示在下方
(CDR_L 殘基加底線顯示)。

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSC**RASKGVS TSGYSYLHWY** QQKPGQAPRL
LIY**LASYLES** GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YC**QHSRDLPL**
TFGGGTKVEIK

【0192】 C. PD-1 mAb 3

【0193】 PD-1 mAb 3 的 VH 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:51**)顯示在下方
(CDR_H 殘基加底線顯示)。

QVQLQQSGAE LAKPGASVQM SCKASGYSFT **SSWIHWVKQR** PGQGLEWIGY
IYPSTGFTEY NQKFKDKATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCAR**RWR**
DSSGYHAMDY WGQGTSVTVSS

【0194】 PD-1 mAb 3 的 VL 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:52**)顯示在下方
(CDR_L 殘基加底線顯示)。

DIVLTQSPAS LTVSLGQRAT ISC**RASQSVS TSGYSYMHWY** QQKPGQPPKL
LIK**FGSNLES** GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDTATY YC**QHSWEIPY**
TFGGGTKLEI K

【0195】 D. PD-1 mAb 4

【0196】 PD-1 mAb 4 的 VH 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:53**)顯示在下方
(CDR_H 殘基加底線顯示)。

QVQLVQSGSE LKKPGASVKI SCKASGYTFT **NYGMN**WVRQA PGQGLQWMGW
INTDSGESTY AEEFKGRFVF SLDTSVNTAY LQITSLTAED TGMVFCVR**VG**
YDALDYWGQG TLVTVSS

【0197】 PD-1 mAb 4 的 VL 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:54)顯示在下方
(CDR_L 殘基加底線顯示)。

EIVLTQSPSS LSASVGDRTV ITCSARSSVS YMHWFQQKPG KAPKLWIYRT
SNLASGVPSR FSGSGSGTSY CLTINSLQPE DFATYYCQQR SSFPLTFGGG
TKLEIK

【0198】 E. PD-1 mAb 5

【0199】 PD-1 mAb 5 的 VH 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:55)顯示在下方
(CDR_H 殘基加底線顯示)。

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFVFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY
ISSGSMSISY ADTVKGRRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRTEG TALYYCASLS
DYFDYWGQGT TTVVSS

【0200】 PD-1 mAb 5 的 VL 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:56)顯示在下方
(CDR_L 殘基加底線顯示)。

DVVMVTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSSQSLV HSTGNTYLHW YLQKPGQSPQ
LLIYRVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSQTHVP
WTFGQGTKLE IK

【0201】 F. PD-1 mAb 6

【0202】 PD-1 mAb 6 的 VH 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:57)顯示在下方
(CDR_H 殘基加底線顯示)。

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEW₁GV
IHPDSETWL DQFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREEH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSS

其中 X₁ 是 I 或 A

【0203】 PD-1 mAb 6 的 VL 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:58)顯示在下方
(CDR_L 殘基加底線顯示)。

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRAX₁ESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASN₂GS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI K

其中：X₁是 N 或 S 和 X₂是 Q 或 R；或

X₁是 N 並且 X₂是 Q；或

X₁是 S 並且 X₂是 Q；或

X₁是 S 並且 X₂是 R

【0204】 在具體的實施方式中，PD-1 mAb 6 的氨基酸序列包括：

(a) **SEQ ID NO:57**，其中 X₁是 I；和 **SEQ ID NO:58**，其中 X₁是 N 並且 X₂是 Q；或

(b) **SEQ ID NO:57**，其中 X₁是 I；和 **SEQ ID NO:58**，其中 X₁是 S 並且 X₂是 Q。

【0205】 命名為“**PD-1 mAb 6-I VH**”的示例性抗 PD-1 VH 結構域包括 **SEQ ID NO:57**，其中 X₁是 I 並且具有氨基酸序列(**SEQ ID NO:86**)：

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

【0206】 命名為“**PD-1 mAb 6-SQ VL**”的示例性抗 PD-1 VL 結構域包括 **SEQ ID NO:58**，其中 X₁是 S 並且 X₂是 Q 並且具有氨基酸序列(**SEQ ID NO:87**)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI K

【0207】 具有 PD-1 mAb 6-I VH 結構域和 PD-1 mAb 6-SQ VL 結構域的示例性抗 PD-1 抗體命名為“**PD-1 mAb 6-ISQ**”。

【0208】 G. PD-1 mAb 7

【0209】 PD-1 mAb 7 的 VH 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:59**)顯示在下方 (CDR_H 殘基加底線顯示)。

EVQLVESGGG LX₁RPGGSLKL SCAASGFTFS SYLVX₂WVRQA PGKGLEWX₃AT
ISGGGGNTYY SDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSX₄RAED TATYYCARYYG
FDGAWFAYWG QGTLVTVSS

其中：X₁是V或A；X₂是S或G；X₃是V或T；X₄是L或A；或

X₁是V，X₂是S，X₃是V，和X₄是L；或

X₁是A，X₂是G，X₃是T，和X₄是A

【0210】 PD-1 mAb 7 的 VL 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:60**)顯示在下方
(CDR_L 殘基加底線顯示)。

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITC**RASENIY X₁YLA**WYQQKP GKAPKLLIY**X₂**
AKTLAAGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYC**QH HYAVPWT**FGQ
GTKLEIK

其中：X₁是S或N和X₂是N或D；或X₁是S并且X₂是N；或

X₁是N并且X₂是D

【0211】 在具體的實施方式中，PD-1 mAb 7 包括：

(a) **SEQ ID NO:59**，其中 X₁是V，X₂是S，X₃是V，和X₄是L；和 **SEQ ID NO:60**，其中 X₁是S並且X₂是N；或

(b) **SEQ ID NO:59**，其中 X₁是A，X₂是G，X₃是T，和X₄是A；和 **SEQ ID NO:60**，其中 X₁是N並且X₂是D。

【0212】 H. PD-1 mAb 8

【0213】 PD-1 mAb 8 的 VH 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:61**)顯示在下方
(CDR_H 殘基加底線顯示)。

EVQLVESGGG LVRPGGSLRL SCAASGFTFS **SYLIS**WVRQA PGKGLEWVAA
ISGGGADTY **ADSVKGR**RFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TATYYC**ARRG**
TYAMDYWGQG TLVTVSS

【0214】 PD-1 mAb 8 的 VL 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:62**)顯示在下方
(CDR_L 殘基加底線顯示)。

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

【0215】 I. 另外的抗 PD-1 抗体

【0216】可用于產生本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的另外的抗 PD-1 抗體提供在表 6 中。

表 6：另外抗 PD-1 抗體	
PD-1 抗體	參考文獻/來源
PD1-17；PD1-28；PD1-33；PD1-35；和 PD1-F2	美國專利號 7,488,802；7,521,051；和 8,088,905；PCT 專利公開 WO 2004/056875
17D8；2D3；4H1；5C4；4A11；7D3；和 5F4	美國專利號 8,008,449；8,779,105；和 9,084,776；PCT 專利公開 WO 2006/121168
hPD-1.08A；hPD-1.09A；109A；K09A；409A；h409A11；h409A16；h409A17；密碼子優化的 109A；和密碼子優化的 409A	美國專利號 8,354,509；8,900,587；和 5,952,136；PCT 專利公開 WO 2008/156712
1E3；1E8；和 1H3	美國專利公開 2014/0044738；PCT 專利公開 WO 2012/145493
9A2；10B11；6E9；APE1922；APE1923；APE1924；APE1950；APE1963；和 APE2058	PCT 專利公開 WO 2014/179664
GA1；GA2；GB1；GB6；GH1；A2；C7；H7；SH-A4；SH-A9；RG1H10；RG1H11；RG2H7；RG2H10；RG3E12；RG4A6；RG5D9；RG1H10-H2A-22-1S；RG1H10-H2A-27-2S；RG1H10-3C；RG1H10-16C；RG1H10-17C；RG1H10-19C；RG1H10-21C；和 RG1H10-23C2	美國專利公開 2014/0356363；PCT 專利公開 WO 2014/194302
H1M7789N；H1M7799N；H1M7800N；H2M7780N；H2M7788N；H2M7790N；H2M7791N；H2M7794N；H2M7795N；H2M7796N；H2M7798N；H4H9019P；H4xH9034P2；H4xH9035P2；H4xH9037P2；H4xH9045P2；H4xH9048P2；H4H9057P2；H4H9068P2；H4xH9119P2；H4xH9120P2；H4Xh9128p2；H4Xh9135p2；H4Xh9145p2；H4Xh8992p；H4Xh8999p；和 H4Xh9008p；	美國專利公開 2015/0203579；PCT 專利公開 WO 2015/112800
PD-1 mAb 1；PD-1 mAb 2；hPD-1 mAb 2；PD-1 mAb 3；PD-1 mAb 4；PD-1 mAb 5；PD-1 mAb 6；PD-1 mAb 7；hPD-1 mAb 7；PD-1 mAb 8；PD-1 mAb 9；hPD-1 mAb 9；PD-1 mAb 10；PD-1 mAb 11；PD-1 mAb 12；PD-1 mAb 13；PD-1 mAb 14；PD-1 mAb 15；和 hPD-1 mAb 15	美國專利申請號 62/198,867 和 62/239,559

【0217】 J. 示例性抗 PD-1 抗體

【0218】 命名為“PD-1 mAb 6 G4P”的示例性抗 PD-1 抗體包括：具有 PD-1 mAb 6I 的 VH 結構域(SEQ ID NO:86)、IgG4 CH1 結構域(SEQ ID NO:42)、穩定化的 IgG 4 鉸鏈(SEQ ID NO:36)和缺少 C-末端賴氨酸的 IgG4 CH2-CH3 結構域(SEQ ID NO:4)的重鏈；和具有 PD-1 mAb 6SQ 的 VL 結構域(SEQ ID NO:87)和 κ CL (SEQ ID NO:38)的輕鏈。

【0219】 PD-1 mAb 6 G4P 的完整重鏈的氨基酸序列(SEQ ID NO:88)顯示在下方。

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL
DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA
STKGPSVFPL APCSRSTSES TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFP AVLQSSG
LYSLSSVVTV PSSSLGTKTY TCNVDHKPSN TKVDKRVESK YGPPCPPCPA PEFLGGPSVF
LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSQEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTYR
VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVS NKGLPSS IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSQEEMTKN
QVSLTCLVKG FYP S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N
VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSLG

【0220】 PD-1 mAb 6 G4P 的完整輕鏈的氨基酸序列(SEQ ID NO:89)顯示在下方。

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

【0221】 VII. 抗 CTLA-4 结合能力

【0222】 對於 CTLA-4 免疫特異性的抗體是已知的(見，例如，美國專利號 6,984,720、6,682,736、7,034,121、7,109,003、7,132,281、7,411,057、7,605,238、7,807,797、7,824,679、8,017,114、8,143,379、8,318,916、8,491,895、8,784,815 和 8,883,984；美國專利公開 2009/0123477、2009/0252741 和 2014/0105914；PCT

專利公開號 WO 00/37504、WO 01/14424、WO 01/54732、WO 2006/029219、WO 2006/066568 和 WO 2012/120125；和表 7)。可用于產生本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的優選的 CTLA-4 結合能力能夠結合人 CTLA-4 的連續或不連續(例如，構象)部分(表位)並且優選地也展示結合一個或多個非人物種，尤其是靈長類物種(和尤其是靈長類物種，比如食蟹猴)的 CTLA-4 分子的能力。可通過分離使用 CTLA-4 或其肽片段產生的分泌抗體的雜交瘤製備另外期望的抗體。代表性人 CTLA-4 多肽(NCBI 序列 NP_005205.2；包括成熟蛋白的 35 個氨基酸殘基信號序列(加底線顯示)和 188 個氨基酸殘基)具有氨基酸序列(SEQ ID NO:75)：

MACLGFORHK AQLNLATRTW PCTLLFFLLF IPVFCKAMHV AQPAVVLASS
 RGIASFVCEY ASPGKATEVR VTVLRQADSQ VTEVCAATYM MGNELTFLDD
 SICTGTSSGN QVNLTIQGLR AMDTGLYICK VELMYPPPY Y LGIGNGTQIY
 VIDPEPCPDS DFLLWILAAV SSGLFFYSFL LTAVSLSKML KKRSPLTTGV
 YVKMPPEPE CEKQFQPYFI PIN

【0223】可用于產生本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的優選的抗 CTLA-4 結合分子(例如，抗體)具有下述抗體的 VL 和/或 VH 結構域：抗人 CTLA-4 單克隆抗體“**CTLA-4 mAb 1**”(伊匹單抗(ipilimumab)，CAS 登記號：477202-00-9，也稱為 MDX010，並且由 Bristol-Myers Squibb 以 YERVOY® 售賣)；“**CTLA-4 mAb 2**”(替西木單抗，CAS 登記號：745013-59-6，也稱為 CP-675206)；“**CTLA-4 mAb 3**”(如表 7 中提供的 4B6)或表 7 中的任何其他抗 CTLA-4 抗體；並且更優選地具有這類抗 CTLA-4 單克隆抗體的 VL 區的 1、2 或所有 3 個 CDR_L 和/或 VH 結構域的 1、2 或所有 3 個 CDR_H。

【0224】 A. CTLA-4 mAb 1

【0225】 CTLA-4 mAb 1 的 VH 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:76)顯示在下方(CDR_H 殘基加底線顯示)。

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF

ISYDGNNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG
WLGPFDYWGQ GTLVTVSS

【0226】 CTLA-4 mAb 1 的 VL 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:77)顯示在下方(CDR_L 殘基加底線顯示)。

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQOK PGQAPRLLIY
GAFSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG
 QGTKVEIK

【0227】 B. CTLA-4 mAb 2

【0228】 CTLA-4 mAb 2 的 VH 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:78)顯示在下方(CDR_H 殘基加底線顯示)。

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV
IWYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDP
RGATLYYYYY GMDVWGQGT VTVSS

【0229】 CTLA-4 mAb 2 的 VL 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:79)顯示在下方(CDR_L 殘基加底線顯示)。

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIN SYLDWYQOKP GKAPKLLIYA
ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YYSTPFTFGP
 GTKVEIK

【0230】 C. CTLA-4 mAb 3

【0231】 CTLA-4 mAb 3 的 VH 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:90)顯示在下方(CDR_H 殘基加底線顯示)。

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTFE
ISYDGSNKHY ADSVKGRFTV SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG
WLGPFDYWGQ GTLVTVSS

【0232】 CTLA-4 mAb 3 的 VL 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:91)顯示在下方(CDR_L 殘基加底線顯示)。

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSFLAWYQOK PGQAPRLLIY
GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG
 QGTKVEIK

【0233】D. 另外的抗 CTLA-4 抗体

【0234】 可用于產生本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的另外的抗 CTLA-4 抗體提供在表 7 中。

表 7：另外的抗 CTLA-4 抗體	
CTLA-4 抗體	參考文獻/來源
mAb 26	美國專利號 7,034,121；PCT 專利公開 WO 01/54732
10D1；1E2；和 4B6	美國專利號 6,984,720；7,605,238；8,017,114；8,318,916；和 8,784,815；PCT 專利公開 WO 01/14424
2.1.3；3.1.1；4.1.1；4.8.1；4.9.1；4.10.2；4.13.1；4.14.3；6.1.1；11.2.1；11.6.1；11.7.1；12.2.1；12.3.1；12.3.1.1；12.9.1；和 12.9.1.1	美國專利號 6,682,736；7,109,003；7,132,281；7,411,057；7,807,797；7,824,679；8,143,379；8,491,895；和 8,883,984；PCT 專利公開 WO 00/37504
3B10；8H5；8H5-1B1；3B10-4F7；7B9-1A3；2C7-1G10；3B10-6E3；和 8H5-1A1	美國專利公開 2014/0105914；PCT 專利公開 WO 2012/120125
3.7F10A2；4.3F6B5；4.4A7F4；4.6C1E3；4.7A8H8；4.7E11F1；4.8H10H5；TGN2122；和 TGN2422	美國專利公開 2009/0123477；PCT 專利公開 WO 2006/066568
L3D10；L1B11；K4G4；KM10；和 YL2	美國專利公開 2009/0252741；PCT 專利公開 WO 2006/029219

【0235】E. 示例性抗 CTLA-4 抗體

【0236】 命名為“CTLA-4 mAb 3 G1AA”的示例性抗 CTLA-4 抗體包括具有 CTLA-4 mAb 3 的 VH 結構域(SEQ ID NO:90)、IgG1 CH1 結構域(SEQ ID NO:40)、IgG1 鉸鏈(SEQ ID NO:33)和 IgG1 CH2-CH3 結構域取代 L234A/L235A (SEQ ID NO:43)的重鏈。

【0237】 CTLA-4 mAb 3 G1AA 的完整重鏈的氨基酸序列(SEQ ID NO:92)顯示在下方。

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF ISYDGSNKHY
ADSVKGRFTV SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG WLGPFDYWGQ GTLVTVSSAS
TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSVHT FPAVLQSSGL

YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAAGGPS
 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT
 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK

【0238】 命名為“**CTLA-4 mAb 3 G4P**”的可選的示例性抗 CTLA-4 抗體包括具有 CTLA-4 mAb 3 的 VH 結構域(**SEQ ID NO:90**)、IgG4 CH1 結構域(**SEQ ID NO:42**)、穩定化的 IgG4 鉸鏈(**SEQ ID NO:36**)和缺少 C-末端賴氨酸的 IgG4 CH2-CH3 結構域(**SEQ ID NO:4**)的重鏈。CTLA-4 mAb 3 G4P 的完整重鏈的氨基酸序列顯示在下方(**SEQ ID NO:93**)。

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF
 ISYDGSNKHY ADSVKGRFTV SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG
 WLGPFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY
 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTKTYT
 CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM
 ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV
 VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF
 PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG
 SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSL SLSL

【0239】 CTLA-4 mAb 3 G1AA 和 CTLA-4 mAb 3 G4P 的完整輕鏈的氨基酸序列(**SEQ ID NO:94**)顯示在下方。

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSFLAWYQQK PGQAPRLLIY
 GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG
 QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK
 VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTL TLSKADYEKH KUYACEVTHQ
 GLSSPVTKSF NRGEC

【0240】 示例性抗 CTLA-4 抗體 CTLA-4 mAb 3 G1AA 和 CTLA-4 mAb 3 G4P 都包括具有 CTLA-4 mAb 3(**SEQ ID NO:91**)的 VL 結構和 κ CL (**SEQ ID NO:38**) 域的輕鏈。

【0241】 VIII. 示例性 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子

【0242】 A. 具有 E/K-螺旋的包含 Fc 區的示例性四鏈雙抗體

【0243】 產生三個包括 E/K-螺旋異源二聚體促進結構域的、包含 Fc 區的示例性 PD-1 x CTLA-4 雙特異性四鏈雙抗體(命名為“**DART B**”、“**DART C**”和“**DART D**”)。下面詳述這些包含 Fc 區的雙抗體的結構。這些示例性 PD-1 x CTLA-4 雙抗體旨在闡釋，決不限制本發明的範圍。

【0244】 1. DART B

【0245】 DARTB 是包含 Fc 區的雙特異性四鏈雙抗體，其具有對於 PD-1 特異性的兩個結合位點、對於 CTLA-4 特異性的兩個結合位元點、被工程化用於延長半衰期的變異的 IgG4 Fc 區和 E/K-螺旋異源二聚體促進結構域。DARTB 的第一和第三多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端、能夠結合 CTLA-4 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{CTLA-4}CTLA-4 mAb 1 VL) (SEQ ID NO:77)、間插連接體肽(**連接體 1**:GGGSGGGG (SEQ ID NO:5))、能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{PD-1}PD-1 mAb 6-I VH) (SEQ ID NO:86)、包含半胱氨酸的間插連接體肽(**連接體 2**:GGCGGG (SEQ ID NO:6))、包含半胱氨酸的促進異源二聚體的(E-螺旋)結構域(EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:20))、穩定化的 IgG4 鉸鏈區(SEQ ID NO:36)、包含取代 M252Y/S254T/T256E 和缺少 C-末端殘基的 IgG4 CH2-CH3 結構域的變體(SEQ ID NO:81)和 C-末端。

【0246】 DARTB 的第一和第三多肽鏈的氨基酸序列是(SEQ ID NO:95)：

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY
 GAFSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG
 QGTKVEIKGG GSGGGGQVQL VQSGAEVKKP GASVKVSCKA SGYSFTSYWM
 NWRQAPGQG LEWIGVIHPS DSETWLDQKF KDRVTITVDK STSTAYMELS
 SLRSEDVAVY YCAREHYGTS PFAYWGQGTL VTVSSGGCGG GEVAACEKEV
 AALEKEVAAL EKEVAALEKE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD
 TLYITREPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST
 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY
 TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD

SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLG

【0247】 DART B 的第二和第四多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端、能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{PD-1}PD-1 mAb 6-SQ VL) (SEQ ID NO:87)、間插連接體肽(連接體 1:GGGSGGGG (SEQ ID NO:5))、能夠結合 CTLA-4 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{CTLA-4}CTLA-4 mAb 1 VH) (SEQ ID NO:76)、包含半胱氨酸的間插連接體肽(連接體 2:GGCGGG (SEQ ID NO:6))、包含半胱氨酸的促進異源二聚體的 (K-螺旋) 結構域 (KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:21)和 C-末端。

【0248】 DART B 的第二和第四多肽鏈的氨基酸序列是(SEQ ID NO:96)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSS
YTMHWVRQAP GKGLEWVTFI SYDGNNKYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL
QMNSLRAEDT AIYYCARTGW LGPFDYWGG TLVTVSSGGC GGGKVAACKE
KVAALKEKVA ALKEKVAALK E

【0249】 2. DART C

【0250】 DARTC 是包含 Fc 區的雙特異性四鏈雙抗體，其具有對於 PD-1 特異性的兩個結合位點、對於 CTLA-4 特異性的兩個結合位元點、被工程化用於延長半衰期的變異的 IgG4 Fc 區和 E/K-螺旋異源二聚體促進結構域。DARTC 的第一和第三多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端、能夠結合 CTLA-4 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{CTLA-4}CTLA-4 mAb 3 VL) (SEQ ID NO:91)、間插連接體肽(連接體 1:GGGSGGGG (SEQ ID NO:5))、能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{PD-1}PD-1 mAb 6-I VH) (SEQ ID NO:86)、包含半胱氨酸的間插連接體肽(連接體 2:GGCGGG (SEQ ID NO:6))、包含半胱氨酸的異源二聚體促進 (E-螺旋) 結構域(EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:20))、穩定化的 IgG4 鉸鏈區(SEQ ID NO:36)、包括取代 M252Y/S254T/T256E 並且缺少 C-末端殘基的

IgG4 CH2-CH3 結構域的變體(SEQ ID NO:81)和 C-末端。

【0251】 DART C 的第一和第三多肽鏈的氨基酸序列是(SEQ ID NO:97)：

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSFLAWYQQK PGQAPRLLIY
 GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG
 QGTKVEIKGG GSGGGGQVQL VQSGAEVKKP GASVKVSCKA SGYSFTSYWM
 NWVRQAPGQG LEWIGVIHPS DSETWLDQKF KDRVTITVDK STSTAYMELS
 SLRSED TAVY YCAREHYGTS PFAYWGQGTL VTVSSGGCGG GEVAACEKEV
 AALEKEVAAL EKEVAALEKE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD
 TLYITREPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST
 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIKTISKA KGQPREPQVY
 TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD
 SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLG

【0252】 DART C 的第二和第四多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端、能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{PD-1}PD-1 mAb 6-SQ VL) (SEQ ID NO:87)、間插連接體肽(連接體 1:GGGSGGGG (SEQ ID NO:5))、能夠結合 CTLA-4 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{CTLA-4}CTLA-4 mAb 3 VH) (SEQ ID NO:90)、包含半胱氨酸的間插連接體肽(連接體 2:GGCGGG (SEQ ID NO:6))、包含半胱氨酸的促進異源二聚體的 (K-螺旋) 結構域 (KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:21)和 C-末端。

【0253】 DART C 的第二和第四多肽鏈的氨基酸序列是(SEQ ID NO:98)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
 TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSS
 YTMHWVRQAP GKGLEWVTFI SYDGSNKHYA DSVKGRFTVS RDNSKNTLYL
 QMNSLRAEDT AIYYCARTGW LGPFDYWGQG TLVTVSSGGC GGGKVAACKE
 KVAALKEKVA ALKEKVAALK E

【0254】 3. DARTD

【0255】 DARTD 是包含 Fc 區的雙特異性四鏈雙抗體，其具有對於 PD-1 特異性的兩個結合位點、對於 CTLA-4 特異性的兩個結合位元點、被工程化用於延

長半衰期的變異的 IgG4 Fc 區和 E/K-螺旋異源二聚體促進結構域。DART D 的第一和第三多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端、能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{PD-1}PD-1 mAb 6-SQ VL) (SEQ ID NO:87)、間插連接體肽(連接體 1:GGGSGGGG (SEQ ID NO:5))、能夠結合 CTLA-4 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{CTLA-4}CTLA-4 mAb 3 VH) (SEQ ID NO:90)、包含半胱氨酸的間插連接體肽(連接體 2:GGCGGG (SEQ ID NO:6))、包含半胱氨酸的促進異源二聚體的(E-螺旋)結構域(EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:20))、穩定化的 IgG4 鉸鏈區(SEQ ID NO:36)、包括取代 M252Y/S254T/T256E 並且缺少 C-末端殘基的 IgG4 CH2-CH3 結構域的變體(SEQ ID NO:81)和 C-末端。

【0256】 DART D 的第一和第三多肽鏈的氨基酸序列是(SEQ ID NO:99)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QOKPGQPPKL
 LIHAASNQGS GVPSRFGSGG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
 TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSS
 YTMHWVRQAP GKGLEWVTFI SYDGSNKHYA DSVKGRFTVS RDNSKNTLYL
 QMNSLRAEDT AIYYCARTGW LGPFDYWGQG TLVTVSSGGC GGGEVAACEK
 EVAALEKEVA ALEKEVAALE KESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP
 KDTLYITREP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKQPPEPQ
 VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV
 LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLG

【0257】 DART D 的第二和第四多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端、能夠結合 CTLA-4 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{CTLA-4}CTLA-4 mAb 3 VL) (SEQ ID NO:91)、間插連接體肽(連接體 1:GGGSGGGG (SEQ ID NO:5))、能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{PD-1}PD-1 mAb 6-I VH) (SEQ ID NO:86)、包含半胱氨酸的間插連接體肽(連接體 2:GGCGGG (SEQ ID NO:6))、包含半胱氨酸的異源二聚體促進(K-螺旋)結構域(KVAACEK-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:21)和 C-末端。

【0258】 DART D 的第二和第四多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:100**)：

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSFLAWYQQK PGQAPRLLIY
 GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG
 QGTKVEIKGG GSGGGGQVQL VQSGAEVKKP GASVKVSCA SGYSFTSYWM
 NWVRQAPGQG LEWIGVIHPS DSETWLDQKF KDRVITITVDK STSTAYMELS
 SLRSEDTAVY YCAREHYGTS PFAYWGQGTL VTVSSGGCGG GKVAACKEKV
 AALKEKVAAL KEKVAALKE

【0259】 4. DARTF

【0260】 DARTF 是包含 Fc 區的雙特異性四鏈雙抗體，其具有對於 PD-1 特異性的兩個結合位點、對於 CTLA-4 特異性的兩個結合位元點、被工程化以降低/消除效應子功能並且延長半衰期的變異的 IgG1 Fc 區和 E/K-螺旋異源二聚體促進結構域。DART F 的第一和第三多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端、能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{PD-1}PD-1 mAb 6-SQ VL) (**SEQ ID NO:87**)、間插連接體肽(**連接體 1**:GGGSGGGG (**SEQ ID NO:5**))、能夠結合 CTLA-4 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{CTLA-4}CTLA-4 mAb 3 VH) (**SEQ ID NO:90**)、包含半胱氨酸的間插連接體肽(**連接體 2**:GGCGGG (**SEQ ID NO:6**))、包含半胱氨酸的異源二聚體促進 (E-螺旋) 結構域 (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:20**))、IgG1 鉸鏈區(**SEQ ID NO:33**)、包括取代 L235A/L235A/M252Y/S254T/T256E 並且缺少 C-末端殘基的 IgG1 CH2-CH3 結構域的變異的(**SEQ ID NO:80**)和 C-末端。

【0261】 DART F 的第一和第三多肽鏈的氨基酸序列(**SEQ ID NO:101**)是：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
 TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSS
 YTMHWVRQAP GKGLEWVTFI SYDGSNKHYA DSVKGRFTVS RDNSKNTLYL
 QMNSLRAEDT AIYYCARTGW LGPFDYWGQG TLVTVSSGGC GGGEVAACEK
 EVAALEKEVA ALEKEVAALE KLEPKSADKT HTCPCPAPE AAGGPSVFLF
 PPKPKDTLYI TREPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNATKPRE
 EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP

REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
 TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
 SPG

【0262】 DART F 的第二和第四多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端、能夠結合 CTLA-4 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{CTLA-4} CTLA-4 mAb 3 VL) (SEQ ID NO:91)、間插連接體肽(連接體 1:GGGSGGGG (SEQ ID NO:5))、能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{PD-1} PD-1 mAb 6-I VH) (SEQ ID NO:86)、包含半胱氨酸的間插連接體肽(連接體 2:GGCGGG (SEQ ID NO:6))、包含半胱氨酸的異源二聚體促進(K-螺旋)結構域(KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:21)和 C-末端。

【0263】 DART F 的第二和第四多肽鏈的氨基酸序列與 DART D 的第二和第四多肽鏈的序列相同(SEQ ID NO:100)。

【0264】 B. 具有 CL/CH1 結構域的包含 Fc 區的示例性四鏈雙抗體：DART E

【0265】 產生命名為“DART E”、包括 CL/CH1 結構域的、包含 Fc 區的示例性 PD-1 x CTLA-4 雙特異性四鏈雙抗體。下麵詳述該包含 Fc 區的雙抗體的結構。該示例性 PD-1 x CTLA-4 雙抗體旨在闡釋但決不限制本發明的範圍。

【0266】 DART E 是包含 Fc 區的雙特異性四鏈雙抗體，其具有對於 PD-1 特異性的兩個結合位點、對於 CTLA-4 特異性的兩個結合位點、CL/CH1 結構域和被工程化用於延長半衰期的變異的 IgG4 Fc 區。DART E 的第一和第三多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端、能夠結合 CTLA-4 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{CTLA-4} CTLA-4 mAb 3 VL) (SEQ ID NO:91)、間插連接體肽(連接體 1:GGGSGGGG (SEQ ID NO:5))、能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{PD-1} PD-1 mAb 6-I VH) (SEQ ID NO:86)、間插連接體肽(連接體 2:LGGGSG (SEQ ID NO:8))、IgG4 CH1 結構域(SEQ ID NO:42)、穩定化的 IgG4 鉸鏈區(SEQ

ID NO : 36)、包括取代 M252Y/S254T/T256E 並且缺少 C-末端殘基的 IgG4 CH2-CH3 結構域的變體(**SEQ ID NO:81**)和 C-末端。

【0267】 DART E 的第一和第三多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:102**) :

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSFLAWYQQK PGQAPRLLIY
 GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWFPG
 QGTKVEIKGG GSGGGGQVQL VQSGAEVKKP GASVKVSCKA SGYSFTSYWM
 NWVRQAPGQG LEWIGVIHPS DSETWLDQKF KDRVTITVDK STSTAYMELS
 SLRSEDTAVY YCAREHYGTS PFAYWGQGTL VTVSSLGGGS GASTKGPSVF
 PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS
 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDPK SNTKVDKRV SKYGPPCPPC
 PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLYITREPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV
 DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP
 SSIKTTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
 EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH
 EALHNHYTQK SLSLSLG

【0268】 DART E 的第二和第四多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端、能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{PD-1}PD-1 mAb 6-SQ VL) (**SEQ ID NO:87**)、間插連接體肽(**連接體 1**:GGGSGGGG (**SEQ ID NO:5**))、能夠結合 CTLA-4 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{CTLA-4}CTLA-4 mAb 3 VH) (**SEQ ID NO:90**)、間插連接體肽(**連接體 2**:LGGSG (**SEQ ID NO:8**))、κ CL 結構域(**SEQ ID NO:38**)和 C-末端。

【0269】 DART E 的第二和第四多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:103**) :

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
 TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSS
 YTMHWVRQAP GKGLEWVTFI SYDGSNKHYA DSVKGRFTVS RDNSKNTLYL
 QMNSLRAEDT AIYYCARTGW LGPFDYWGQG TLVTVSSLGG GSGRTVAAPS
 VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNMFYPREA KVQWKVDNAL QSGNSQESVT
 EQDSKDSTYS LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

【0270】 C. 包含 Fc 區的示例性三價結合分子

【0271】 產生包含 Fc 區的兩個示例性 PD-1 x CTLA-4 雙特異性四鏈三價結

合分子(命名為“**TRIDENT A**”和“**TRIDENT B**”)。下面詳述這些包含 Fc 區之三價結合分子的結構。下面也呈現了可產生的命名為“**TRIDENT C**”的三鏈變體。這些示例性 PD-1 x CTLA-4 三價結合分子旨在闡釋但決不限制本發明的範圍。

【0272】 1. **TRIDENT A**

【0273】 **TRIDENT A** 是包含 Fc 區的雙特異性四鏈三價結合分子，其具有對於 PD-1 特異性的兩個結合位點、對於 CTLA-4 特異性的一個結合位元點、被工程化的用於延長半衰期的變異的包含杵/臼的 IgG4 Fc 區、E/K-螺旋異源二聚體促進結構域和 CL/CH1 結構域。**TRIDENT A** 的第一多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{PD-1} PD-1 mAb 6-SQ VL) (**SEQ ID NO:87**)、間插連接體肽(**連接體 1**:GGGSGGGG (**SEQ ID NO:5**))、能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{PD-1} PD-1 mAb 6-I VH) (**SEQ ID NO:86**)、包含半胱氨酸的間插連接體肽(**連接體 2**:GGCGGG (**SEQ ID NO:6**))、包含半胱氨酸的異源二聚體促進(E-螺旋)結構域(EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:20**))、穩定化的 IgG4 鉸鏈區(**SEQ ID NO : 36**)、包括取代 M252Y/S254T/T256E 並且缺少 C-末端殘基的包含杵的 IgG4 CH2-CH3 結構域(**SEQ ID NO:84**)和 C-末端。

【0274】 **TRIDENT A** 的第一多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:104**)：

```
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYSFTS
YWMNWVRQAP GQGLEWIGVI HPSDSETWLD QKFKDRVITIT VDKSTSTAYM
ELSSLRSEDV AVYYCAREHY GTSPFAYWGQ GTLVTVSSGG CGGGEVAACE
KEVAALEKEV AALEKEVAAL EKESKYGPPC PPCPAPEFLG GPSVFLFPPK
PKDTLYITRE PEVTCVVVDV SQEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF
NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPSSIEKTI SKAKGQPREP
QVYTLPPSQE EMTKNQVSLW CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPPP
VLDSGDSFLL YSRLTVDKSR WQEGNVFSCS VMHEALHNHY TQKLSLSLGL
```

【0275】 TRIDENT A 的第二多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端、能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{PD-1}PD-1 mAb 6-SQ VL) (SEQ ID NO:87)、間插連接體肽(連接體 1:GGGSGGGG (SEQ ID NO:5))、能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{PD-1} PD-1 mAb 6-I VH) (SEQ ID NO:86)、包含半胱氨酸的間插連接體肽(連接體 2:GGCGGG (SEQ ID NO:6))、包含半胱氨酸的異源二聚體促進(K-螺旋)結構域(KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:21))和 C-末端。

【0276】 TRIDENT A 的第二多肽鏈的氨基酸序列是(SEQ ID NO:105)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
 TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPASVKVS CKASGYSFTS
 YWMNWVRQAP GQGLEWIGVI HPSDSETWLD QKFKDRVITIT VDKSTSTAYM
 ELSSLRSEDV AVYYCAREHY GTSPFAYWGQ GTLVTVSSGG CGGGKVAACK
 EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE

【0277】 TRIDENT A 的第三多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端、能夠結合 CTLA-4 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{CTLA-4}CTLA-4 mAb 3 VH) (SEQ ID NO:90)、IgG4 CH1 結構域(SEQ ID NO:42)、穩定化的 IgG4 鉸鏈區(SEQ ID NO:36)、包括取代 M252Y/S254T/T256E 並且缺少 C-末端殘基的包含白的 IgG4 CH2-CH3 結構域(SEQ ID NO:81)和 C-末端。

【0278】 TRIDENT A 的第三多肽鏈的氨基酸序列(SEQ ID NO:106)：

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF
 ISYDGSNKHY ADSVKGRFTV SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG
 WLGPFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY
 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTKTYT
 CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLY
 ITREPEVTCV VVDVSDQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV
 VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF
 PSQEEMTKNQ VSLSCAVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG
 SFFFLVSRLLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNRYSYQKSLV LSLG

【0279】 TRIDENT A 的第四多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端、能夠結合 CTLA-4 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{CTLA-4}CTLA-4 mAb 3 VL) (SEQ ID NO:91)、κ CL 結構域(SEQ ID NO:38)和 C-末端。

【0280】 TRIDENT A 的第四多肽鏈的氨基酸序列是(SEQ ID NO:107)：

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSFLAWYQQK PGQAPRLLIY
GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG
QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPBREAKVQWK
VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSTL TLSKADYEKH KVIACEVTHQ
GLSSPVTKSF NRGEC

【0281】 2. TRIDENT B

【0282】 TRIDENT B 是包含 Fc 區的雙特異性四鏈三價結合分子，其具有對於 PD-1 特異性的兩個結合位點、對於 CTLA-4 特異性的一個結合位元點、被工程化以降低/消除效應子功能並且延長半衰期的變異的包含杵/臼的 IgG1 Fc 區、E/K-螺旋異源二聚體促進結構域和 CL/CH1 結構域。TRIDENT B 的第一多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{PD-1} PD-1 mAb 6-SQ VL) (SEQ ID NO:87)、間插連接體肽(連接體 1:GGGSGGGG (SEQ ID NO:5))、能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{PD-1} PD-1 mAb 6-I VH) (SEQ ID NO:86)、包含半胱氨酸的間插連接體肽(連接體 2:GGCGGG (SEQ ID NO:6))、包含半胱氨酸的異源二聚體促進 (E-螺旋) 結構域(EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:20))、連接體(SEQ ID NO:31)、包括取代 L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E 並且缺少 C-末端殘基的包含杵的 IgG1 CH2-CH3 結構域(SEQ ID NO:82)和 C-末端。

【0283】 TRIDENT B 的第一多肽鏈的氨基酸序列是(SEQ ID NO:108)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYSFTS
YWMNWVRQAP GQGLEWIGVI HPSDSETWLD QKFKDRVTIT VDKSTSTAYM

ELSSLRSEDT AVYYCAREHY GTSPFAYWGQ GTLVTVSSGG CGGGEVAACE
 KEVAALEKEV AALEKEVAAL EKGGGDKTHT CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP
 KPKDTLYITR EPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NQYVDGVEVH NAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
 PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL WCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP
 PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP
 GK

【0284】 TRIDENT B 的第二多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端、能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{PD-1} PD-1 mAb 6-SQ VL) (SEQ ID NO:87)、間插連接體肽(連接體 1:GGGSGGG (SEQ ID NO:5))、能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{PD-1} PD-1 mAb 6-I VH) (SEQ ID NO:86)、包含半胱氨酸的間插連接體肽(連接體 2:GGCGGG (SEQ ID NO:6))、包含半胱氨酸的異源二聚體促進(K-螺旋)結構域(KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:21))和 C-末端。

【0285】 TRIDENT B 的第二多肽鏈的氨基酸序列與 TRIDENT A 的第二多肽鏈的序列相同(SEQ ID NO:105)：

【0286】 TRIDENT B 的第三多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端、能夠結合 CTLA-4 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{CTLA-4} CTLA-4 mAb 3 VH) (SEQ ID NO:90)、IgG1 CH1 結構域(SEQ ID NO:40)、IgG1 鉸鏈區(SEQ ID NO:33)、包括取代 L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E 並且缺少 C-末端殘基的包含白的 IgG1 CH2-CH3 結構域(SEQ ID NO:83)和 C-末端。

【0287】 TRIDENT B 的第三多肽鏈的氨基酸序列是(SEQ ID NO:109)：

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF
 ISYDGSNKHY ADSVKGRFTV SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG
 WLGPFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD
 TLYITREPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY

TLPPSREEMT KNQVSLSCAV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD
SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPGK

【0288】 TRIDENT B 的第四多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：N-末端、能夠結合 CTLA-4 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{CTLA-4} CTLA-4 mAb 3 VL) (**SEQ ID NO:91**)、κ CL 結構域(**SEQ ID NO:38**)和 C-末端。

【0289】 TRIDENT B 的第四多肽鏈的氨基酸序列與 TRIDENT A 的第二多肽鏈的序列相同(**SEQ ID NO:107**)。

【0290】 3. TRIDENT C

【0291】 如本文提供的，可通過將兩個分開的多肽鏈的結合結構域組合成(例如，融合編碼多核苷酸等)到一條鏈中而產生包括三條多肽鏈的三價結合分子。可產生一種包含 Fc 區的雙特異性三鏈三價結合分子，其具有對於 PD-1 特異性的兩個結合位點、對於 CTLA-4 特異性的一個結合位元點、被工程化用於延長半衰期的變異的包含杵/臼的 IgG4 Fc 區，和 E/K-螺旋異源二聚體促進結構域(“**TRIDENT C**”)。TRIDENT C 的第一和第二多肽鏈可以與上面提供的 TRIDENT A 的那些第一和第二多肽鏈相同。

【0292】 在第一和第二鏈與 TRIDENT A 的那些相同的情況下，TRIDENT C 的第三多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上可包括：N-末端、能夠結合 CTLA-4 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{CTLA-4} CTLA-4 mAb 3 VL) (**SEQ ID NO:91**)、間插間隔體肽(GGGGSGGGGSGGGGS (**SEQ ID NO:37**))、能夠結合 CTLA-4 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{CTLA-4} CTLA-4 mAb 3 VH) (**SEQ ID NO:90**)、穩定化的 IgG4 鉸鏈區(**SEQ ID NO : 36**)；包括取代 M252Y/S254T/T256E 並且缺少 C-末端殘基的包含臼的 IgG4 CH2-CH3 結構域(**SEQ ID NO:85**)和 C-末端。

【0293】 因此，TRIDENT C 的第三多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:110**):
EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSFLAWYQQK PGQAPRLLIY
GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG
QGTKVEIKGG GSGGGGSGG GGSQVQLVES GGGVVQPGRS LRLSCAASGF

TFSSYTMHWV RQAPGKGLEW VTFISYDGSN KHYADSVKGR FTVSRDNSKN
TLYLQMNSLR AEDTAIYYCA RTGWLGPFDY WGQGTLVTVS SESKYGPCCP
PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP KDTLYITREP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW
YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG
LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLSC AVKGFYPSDI
AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LDSDGSFFLV SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV
MHEALHNRYT QKSLSLSLG

【0294】IX.生產方法

【0295】本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子最優選地通過重組表達編碼這類多肽的核酸分子而產生，如本領域熟知的。

【0296】可使用固相肽合法成常規製備本發明的多肽(Merrifield, B. (1986) “*Solid Phase Synthesis*,” Science 232(4748):341-347 ; Houghten, R.A. (1985) “*General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids*,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82(15):5131-5135 ; Ganesan, A. (2006) “*Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century*,” Mini Rev. Med. Chem. 6(1):3-10)。

【0297】在可選的方案中，可重組製備抗體和使用本領域已知的任何方法表達。可如下經重組製備抗體：首先從宿主動物分離製備的抗體，獲得基因序列，和使用基因序列在宿主細胞(例如，CHO 細胞)中重組表達抗體。可採用的另一方法是在植物(例如，煙草)或轉基因奶中表達抗體序列。用於在植物或奶中重組表達抗體的適當的方法已經被公開了(見，例如 Peeters 等(2001) “*Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants*,” Vaccine 19:2756; Lonberg, N.等(1995) “*Human Antibodies From Transgenic Mice*,” Int. Rev. Immunol 13:65-93 ; 和 Pollock 等(1999) “*Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies*,” J. Immunol Methods 231:147-157)。製備抗體衍生物，例如，人源化抗體、單鏈抗體等的適當的方法是本領域已知的，並且已經在上面描述過了。

在另一可選方案中，可通過噬菌體展示技術重組製備抗體(見，例如，美國專利號 5,565,332、5,580,717、5,733,743、6,265,150；和 Winter, G.等(1994) “*Making Antibodies By Phage Display Technology*,” *Annu. Rev. Immunol.* 12.433-455)。

【0298】包含感興趣的多核苷酸(例如，編碼本發明的 PD-1 xCTLA-4 雙特異性分子的多肽鏈的多核苷酸)的載體可通過一些適當手段中的任意手段被引入到宿主細胞中，所述適當手段包括電穿孔；採用氯化鈣、銣氯化物、磷酸鈣、DEAE-葡聚糖或其他物質的轉染；微彈轟擊(microprojectile bombardment)；脂轉染；和感染(例如，在載體是感染劑諸如痘苗病毒的情況下)。引入載體或多核苷酸的選擇常常取決於宿主細胞的特徵。

【0299】能夠過表達異源 DNA 的任何宿主細胞均可用於表達感興趣的多肽或蛋白質的目的。合適的哺乳動物宿主細胞的非限制性例子包括但不限於 COS、HeLa 和 CHO 細胞。

【0300】本發明包括多肽，其包括本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的氨基酸序列。可通過本領域已知的程式製備本發明的多肽。可通過抗體的蛋白水解或其他降解、如上述的重組方法(即，單個或融合多肽)或化學合成來產生多肽。抗體的多肽，尤其地，上至約 50 個氨基酸的較短的多肽，通過化學合成被常規製備。化學合成方法在本領域中是已知的，並且是商業上可得到的。

【0301】本發明包括 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的變體，包括不明顯影響這類分子的特性的功能上等同的多肽以及具有增強的或降低的活性的變體。多肽的修飾在本領域中是常規操作，因而不需要在本文詳細描述。修飾的多肽的實例包括這樣的多肽：其具有氨基酸殘基的保守取代、未明顯有害改變功能活性的氨基酸的一個或多個缺失或添加，或使用化學類似物。可彼此保守取代的氨基酸殘基包括但不限於：甘氨酸/丙氨酸；絲氨酸/蘇氨酸；纈氨酸/異亮氨酸/亮氨酸；天冬醯胺/穀氨醯胺；天冬氨酸/谷氨酸；賴氨酸/精氨酸；和苯基丙氨酸

酪氨酸。這些多肽還包括糖基化和非糖基化多肽以及具有其它翻譯後修飾的多肽，所述其它翻譯後修飾，諸如例如，用不同糖進行糖基化、乙醯化和磷酸化。優選地，氨基酸取代應該是保守的，即，取代的氨基酸會具有與原始氨基酸類似的化學性質。這樣的保守取代在本領域中是已知的，並且已經在上文提供實例。氨基酸修飾範圍可從改變或修飾一個或多個氨基酸到區域諸如可變結構域的完全重新設計(redesign)。可變結構域中的變化可改變結合親和力和/或特異性。修飾的其它方法包括利用本領域中已知的偶合技術，包括但不限於酶促手段、氧化取代和螯合。修飾可用於例如，連接標籤用於免疫分析，諸如連接放射性部分用於放射免疫分析。修飾的多肽利用本領域中確定的方法製備，並且可利用本領域中已知的標準測定來篩選。

【0302】 本發明包括融合蛋白，其包括本發明的一種或多種多肽或抗體。在一個實施方式中，提供了融合多肽，其包括輕鏈、重鏈或輕鏈和重鏈二者。在另一實施方式中，提供的融合多肽包括輕鏈、重鏈或輕鏈和重鏈二者。在另一實施方式中，融合多肽包含異源免疫球蛋白恒定區。在另一實施方式中，融合多肽包含由公共保藏的雜交瘤產生的抗體的輕鏈可變結構域和重鏈可變結構域。為了本發明的目的，抗體融合蛋白包含特異性結合 PD-1 和/或 CTLA-4 的一個或多個多肽結構域和其在天然分子中未連接的另外的氨基酸序列，所述另外的氨基酸序列例如，異源序列或來自另一區域的同源序列。

【0303】 X. 本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙分子的用途

【0304】 本發明包括組合物，其包括藥物組合物，所述藥物組合物包含本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子(例如，雙特異性抗體、雙特異性雙抗體、三價結合分子等)、源自這類分子的多肽、包括編碼這類分子或多肽的序列的多核苷酸，和如本文所描述的其他試劑。

【0305】 如上所討論，PD-1 和 CTLA-4 在負調節免疫應答(例如，免疫細胞

增殖、功能和穩態)中起到重要的作用。本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子具有抑制 PD-1 功能的能力，因此逆轉 PD-1 介導的免疫系統抑制。另外，本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子具有抑制 CTLA-4 功能的能力，因此通過阻斷 PD-1 和 CTLA-4 介導的免疫系統抑制而加強免疫系統。本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子也允許完全阻斷 PD-1 和 CTLA-4，以及當與 PD-1 共表達時偏向 CTLA-4 的阻斷。因此，本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子可用于緩解受試者的 T-細胞衰竭和/或增強免疫應答(例如，T-細胞和/或 NK-細胞介導的免疫應答)。尤其地，本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子可用于治療與不期望的受抑制的免疫系統相關的任何疾病或病況，包括癌症和與病原體的存在相關的疾病(例如，細菌、真菌、病毒或原生動物感染)。

【0306】 可由本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子治療的癌症包括特徵在於存在選自下述的細胞的癌症細胞的癌症：腎上腺腫瘤、AIDS 相關的癌症、軟組織腺泡狀肉瘤、星形細胞瘤、膀胱癌、骨癌、腦和脊髓癌、轉移性腦瘤、乳腺癌、頸動脈體瘤、宮頸癌、軟骨肉瘤、脊索瘤、嫌色細胞腎細胞癌、透明細胞癌、結腸癌、結直腸癌、皮膚良性纖維組織細胞瘤、促結締組織增生小圓細胞瘤、室管膜細胞瘤、尤文氏瘤、骨外粘液樣軟骨肉瘤、不完全性骨纖維生成、骨的纖維發育異常、膽囊癌或膽管癌、胃癌、妊娠滋養層疾病、生殖細胞瘤、頭頸癌、肝細胞癌、胰島細胞腫瘤、卡波西氏肉瘤、腎癌、白血病、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/惡性的脂肪瘤、肝癌、淋巴瘤、肺癌、成神經管細胞瘤、黑素瘤、腦膜瘤、多發性內分泌瘤、多發性骨髓瘤、骨髓增生異常綜合征、成神經細胞瘤、神經內分泌腫瘤、卵巢癌、胰腺癌、甲狀腺乳頭狀癌、甲狀旁腺瘤、兒科癌症、周圍神經鞘瘤、嗜鉻細胞瘤、垂體瘤、前列腺癌、眼色素層後黑素瘤、罕見血液學疾病、腎轉移癌症、橫紋肌樣瘤、橫紋肌肉瘤、肉瘤、皮膚癌、軟組織肉瘤、鱗狀細胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睪丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、

甲狀腺轉移癌和子宮癌。

【0307】尤其地，本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子可用于治療結直腸癌、肝細胞癌、神經膠質瘤、腎癌、乳腺癌、多發性骨髓瘤、膀胱癌、成神經細胞瘤；肉瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、胰腺癌和直腸癌。

【0308】可通過本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子治療的感染包括慢性病毒、細菌、真菌和寄生蟲感染。可通過本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子治療的慢性感染包括愛潑斯坦-巴爾病毒、甲肝病毒(HAV)；乙肝病毒(HBV)；丙肝病毒(HCV)；疱疹病毒(例如 HSV-1、HSV-2、HHV-6、CMV)、人免疫缺陷病毒(HIV)、水泡性口炎病毒(VSV)、芽孢桿菌綱、檸檬酸桿菌屬、霍亂、白喉、腸桿菌屬、淋球菌、幽門螺旋桿菌、克雷伯氏菌屬、軍團菌屬、腦膜炎球菌、分歧桿菌、假單胞菌屬、*Pneumococci*、立克次氏體細菌、沙門氏菌屬、沙雷菌屬、葡萄球菌屬、鏈球菌屬、破傷風、曲黴菌屬(煙麴黴、黑麴黴等)、皮炎芽生菌、念珠菌屬白色念珠菌、克柔假絲酵母、光滑念珠菌、熱帶念珠菌等)、新生隱球菌、毛黴目的屬、犁頭黴屬、根黴屬)、申克氏胞絲菌、巴西芽生菌、粗球黴菌、莢膜組織胞漿菌、細螺旋體病、包柔氏螺旋體、蠕蟲寄生蟲(鉤蟲、條蟲、吸蟲、扁形蟲(例如血吸蟲)、藍氏賈第蟲、旋毛蟲、脆雙核阿米巴、布氏錐蟲、克氏錐蟲和杜氏利什曼蟲)。

【0309】 XI. 藥物組合物

【0310】本發明的組合物包括原料藥物組合物，其可用於製造藥物組合物(例如，不純的或非無菌組合物)和可用於製備單位劑型的藥物組合物(即，適於施用至受試者或患者的組合物)。這類組合物包括預防上或治療上有效量的本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子，或這類劑和藥學上可接受的載體的組合。優選地，本發明的組合物包括預防上或治療上有效量的本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子和藥學上可接受的載體。本發明也包括這類藥物組合物，其另外包

括對特定的癌症抗原特異性的第二治療性抗體(例如，腫瘤特異性單克隆抗體)，和藥學上可接受的載體。

【0311】 在具體的實施方式中，術語“藥學上可接受的”表示獲得聯邦政府或州政府管理機構的許可或列於美國藥典(U.S. Pharmacopeia)或其他通常獲得認可的藥典中，供用於動物，特別是用於人類。術語“載體”指與治療劑一起施用的稀釋劑、佐劑(例如弗氏佐劑(完全和不完全)、賦形劑或媒介。一般而言，本發明組合物的成分被單獨提供或以單位劑型混合在一起，例如作為標明活性劑的量的密封容器中的凍乾粉或無水濃縮物，所述密封容器如安瓿或小袋(sachette)。當通過輸注施用組合物時，其可以用含有無菌的藥學級水或鹽水的輸注瓶分配。如果通過注射施用所述組合物，則可以提供一安瓿注射用無菌水或鹽水，以便可以在施用前混合所述成分。

【0312】 本發明也提供藥物包裝或試劑盒，其包括一個或多個容器，所述容器填充本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子，單獨地或與這類藥學上可接受的載體一起。另外，用於治療疾病的一種或多種其他預防劑或治療劑也可包括在藥物包裝或試劑盒中。本發明也提供了這樣的藥物包裝或試劑盒，其包括一個或多個容器，所述容器填充本發明藥物組合物的一種或多種成分。任選地與這類容器(一個或多個)關聯的可以是管理藥物或生物產品的製造、使用或銷售的政府機構規定的形式的佈告(notice)，所述佈告反映了管理機構許可用於人類施用的製造、使用或銷售。

【0313】 本發明提供了可用於上述方法的試劑盒。試劑盒可包括任何本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子。試劑盒可在一個或多個容器中進一步包括可用於治療癌症的一種或多種其他預防劑和/或治療劑。

【0314】 XII. 施用方法

【0315】通過向受試者施用有效量的本發明的融合蛋白或綴合分子或包括本發明的融合蛋白或綴合分子的藥學組合物，可以提供本發明的組合物用來治療、預防和改善與疾病、病症或感染相關的一種或多種症狀。在優選的方面，這類組合物基本上是純的(即，基本上不含限制其效果或產生不期望的副作用的物質)。在具體實施方式中，受試者是動物，優選哺乳動物，如非靈長類(例如牛、馬、貓科動物、犬科動物、齧齒動物等)或靈長類(例如，猴子，如食蟹猴、人等)。在優選的實施方式中，受試者是人。

【0316】各種送遞系統是已知的，並且可以用於施用本發明的組合物，例如封裝於脂質體中、微粒、微膠囊、能表達抗體或融合蛋白的重組細胞、受體介導的內吞作用(見，例如，Wu 等(1987) “*Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System,*” J. Biol. Chem. 262:4429-4432)、構建核酸作為逆轉錄病毒或其他載體的一部分等。

【0317】施用本發明的分子的方法包括但不限於腸胃外施用(例如皮內、肌肉、腹腔內、靜脈內以及皮下)、硬膜外以及粘膜(例如鼻內和口腔途徑)。在具體實施方式中，本發明的 PD-1 x CTLA4 結合分子經肌肉、靜脈內或皮下施用。組合物可以通過任何方便途徑施用，例如通過輸注或彈丸注射、通過上皮或黏膜皮膚被覆(lining)(例如口腔粘膜、直腸和腸粘膜等)吸收，並且可以與其他生物活性劑一起施用。給藥可以是全身的或局部的。另外，也可以應用肺給藥，例如通過使用吸入器或噴霧器，並且與霧化劑一起配製。見，例如，美國專利號 6,019,968、5,985,320、5,985,309、5,934,272、5,874,064、5,855,913、5,290,540 和 4,880,078；和 PCT 公佈號 WO 92/19244、WO 97/32572、WO 97/44013、WO 98/31346 和 WO 99/66903，其每一篇通過引用以其整體併入本文。

【0318】本發明也使得本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的製劑包裝在密封容器中，比如指示分子的數量的安瓿或小袋中。在一個實施方式中，這樣

的分子作為凍幹無菌粉或無水濃縮物提供於密封容器中，並且可以用例如水或鹽水重構至適當濃度，用於施用於受試者。優選地，本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子作為無菌凍幹粉末提供在密封容器中。

【0319】本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的凍幹製劑應在它們的初始容器中儲存在 2°C 和 8°C 之間，並且分子應該在重構之後 12 小時內，優選地 6 小時內、5 小時內、3 小時內或 1 小時內施用。在可選的實施方式中，這樣的分子以液體形式提供在指示分子、融合蛋白或綴合分子的量和濃度的密封容器中。優選地，這類 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在以液體形式提供時，被供應在密封容器中。

【0320】可通過標準臨床技術確定本發明的這類製劑有效治療、預防或改善與病症相關的一個或多個症狀的量。製劑中採用的精確劑量還將取決於施用的路徑和病況的嚴重性，並且應根據從業者的判斷和每個患者的情況決定。有效的劑量可從源自體外或動物模型測試系統的劑量回應曲線推斷。

【0321】如本文所使用，在一個實施方式中，“**有效量**”的藥物組合物是足夠實現有益或期望的結果的量，所述結果包括但不限於臨床結果，比如減少源自疾病的症狀、減少感染的症狀(例如，病毒量、發燒、疼痛、敗血症等)或癌症的症狀(例如，癌細胞的增殖、腫瘤存在、腫瘤轉移等)，從而提高遭受疾的患者生命品質，降低治療疾病需要的其他藥物治療的劑量、比如經靶向和/或內化增強另一藥物的作用、延遲疾病的進展，和/或延長個體的生存。

【0322】可在一次或多次施用中施加有效量。為了本發明的目的，藥物、化合物或藥物組合物的有效量是這樣的量，所述量足以：直接或間接地殺傷和/或減少癌症細胞的增殖，和/或消除、降低和/或延遲從癌症的原發位點(primary site)轉移的發展；或減少感染病原體的增殖(或影響)和降低和/或延遲病原體介導的疾病的发展。在一些實施方式中，藥物、化合物或藥物組合物的有效量可聯合

或不聯合另一藥物、化合物或藥物組合物實現。因此，“有效量”可在施用一種或多種化療劑的背景下考慮，並且如聯合一種或多種其他劑，可實現或實現期望的結果，則單劑可視為以有效量施用。儘管個體的需要不同，但是測定每種組分的有效量的最佳範圍是本領域技術人員已知的。

【0323】對於本發明包括的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子，優選地基於接收受試者的體重(kg)確定施用至患者的劑量。對於本發明包括的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子，施用至患者的劑量通常是約 0.01 µg/kg 至約 150 mg/kg 受試者的體重或更多。

【0324】可通過修飾比如，例如脂質化而增強分子的吸收和組織滲透，來減少或改變施用的本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的劑量和頻率。

【0325】對於用作單劑療法，可計算向患者施用的本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的劑量。可選地，分子可與其他治療組合物聯合使用，並且向患者施用的劑量小於當所述分子用作單劑療法時的劑量。

【0326】本發明的藥物組合物可被局部施用至需要治療的區域；這可通過例如，但不限於下述方式實現：局部注入、通過注射、或通過植入物的手段，所述植入物是多孔的、非多孔的或膠狀材料，包括膜，比如矽橡膠膜或纖維。優選地，當施用本發明的分子時，必須注意使用不吸收該分子的材料。

【0327】本發明的組合物可在泡狀體(vesicle)，尤其是脂質體中遞送(見 Langer (1990) “*New Methods Of Drug Delivery*,” *Science* 249:1527-1533)；Treat 等, 在 *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein 和 Fidler (編輯), Liss, New York, pp. 353- 365 (1989)中；Lopez-Berestein,同上, pp. 317-327)。

【0328】在本發明的組合物是編碼本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的核酸的情況下，核酸可被體內施用，以通過如下方式促進其編碼的 PD-1 x

CTLA-4 雙特異性分子的表達：將其構建為適當的核酸表達載體的一部分並且施用其從而其成為細胞內的，例如，通過使用逆轉錄病毒載體(見美國專利號 4,980,286)，或通過直接注射，或通過使用微粒轟擊(例如，基因槍；生物彈道技術(Biolistic), Dupont)，或用脂質或細胞表面受體或轉染試劑包被，或通過與已知進入核的同源框樣肽聯合施用(見例如，Joliot 等(1991) “*Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis*,” Proc. Natl. Acad.Sci. (U.S.A.) 88:1864-1868)等。可選地，可以將核酸引入細胞內並通過同源重組整合到宿主細胞 DNA 中，以進行表達。

【0329】 用治療或預防有效量的本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子治療受試者可包括單治療，或優選地，可包括一系列治療。在優選的實施例中，用這類雙抗體治療受試者每週一次，持續約 1 至 10 周，優選地 2 至 8 周，更優選地約 3 至 7 周，和甚至更優選地持續約 4、5 或 6 周。本發明的藥物組合物可每天施用一次、每天施用兩次或每天施用三次。可選地，藥物組合物可每週施用一次、每週兩次、每兩週一次、每月一次、每六週一次、每兩個月一次、每年兩次或每年一次。也將認識到，用於治療的分子的有效劑量可隨著具體治療的療程而增加或降低。

【0330】 XIII. 示例性實施方式

【0331】 本發明尤其涉及實施方式 E1-E26：

E1. 一種雙特異性分子，其具有能夠免疫特異性結合 PD-1 的表位(一個或多個)的一個或多個表位-結合位點和能夠免疫特異性結合 CTLA-4 的表位(一個或多個)的一個或多個表位-結合位點，其中這類分子包括：

(A) 結合 PD-1 的抗體的重鏈可變結構域和輕鏈可變結構域；和

(B) 結合 CTLA-4 的抗體的重鏈可變結構域和輕鏈可變結構域；

其中這類分子是：

(i) 雙抗體，這類雙抗體是共價結合的複合物，其包括兩條、三條、四條或五條多肽鏈；或

(ii) 三價結合分子，這類三價結合分子是共價結合的複合物，其包括三條、四條、五條或更多條多肽鏈。

E2. 實施方式 E1 的雙特異性分子，其中這類分子相對於兩個單特異性分子展示的這類活性展示增強的活性，所述兩個單特異性分子其中一個具有結合 PD-1 的這類抗體的這類重鏈可變結構域和這類輕鏈可變結構域和其中另一個具有結合 CTLA-4 的這類抗體的這類重鏈可變結構域和這類輕鏈可變結構域。

E3. 實施方式 E1 或 E2 的雙特異性分子，其中相對於施用結合 CTLA-4 的單特異性抗體引起的這類 irAE，這類分子在施用至需要其的受試者時引起更少的免疫相關的不利事件(irAE)。

E4. 實施方式 E3 的雙特異性分子，其中結合 CTLA-4 的所述單特異性抗體是伊匹單抗。

E5. 實施方式 E1-E4 中的任何一個的雙特異性分子，其中這類分子包括 Fc 區。

E6. 實施方式 E5 的雙特異性分子，其中這類 Fc 區是變異的 Fc 區，其包括：

(A) 降低變異的 Fc 區對 Fc γ R 的親和力的一個或多個氨基酸修飾；和/或

(B) 延長變異的 Fc 區的血清半衰期的一個或多個氨基酸修飾。

E7. 實施方式 E6 的雙特異性分子，其中降低變異的 Fc 區對 Fc γ R 的親和力的這類修飾包括下述取代：L234A；L235A；或 L234A 和 L235A，其中這樣的編號是如 Kabat 中的 EU 索引中的編號。

E8. 實施方式 E6 或 E7 的雙特異性分子，其中延長變異的 Fc 區的血清半衰期的這類修飾包括下述取代：M252Y；M252Y 和 S254T；M252Y 和 T256E；M252Y、S254T 和 T256E；或 K288D 和 H435K，其中這樣的編號是如 Kabat 中

的 EU 索引中的編號。

E9. 實施方式 E1-E8 的任何一個中的雙特異性分子，其中這類分子是這類雙抗體並且包括能夠免疫特異性結合 PD-1 的表位的兩個表位-結合位點和能夠免疫特異性結合 CTLA-4 的表位的兩個表位-結合位點。

E10. 實施方式 E1-E8 的任何一個中的雙特異性分子，其中這類分子是這類三價結合分子並且包括能夠免疫特異性結合 PD-1 的表位的兩個表位-結合位點和能夠免疫特異性結合 CTLA-4 的表位的一個表位-結合位點。

E11. 實施方式 E1-E10 的任何一個中的雙特異性分子，其中能夠結合 PD-1 和 CTLA-4 分子的這類分子存在于細胞表面上。

E12. 實施方式 E1-E11 的任何一個中的雙特異性分子，其中這類分子能夠同時結合 PD-1 和 CTLA-4。

E13. 實施方式 E1-E12 的任何一個中的雙特異性分子，其中這類分子促進免疫細胞的刺激。

E14. 實施方式 E13 的雙特異性分子，其中免疫細胞的這樣的刺激導致：

- (A) 免疫細胞增殖；和/或
- (B) 免疫細胞產生和/或至少一種細胞因數的釋放；和/或
- (C) 免疫細胞產生和/或至少一種裂解分子的釋放；和/或
- (D) 至少一種啟動標誌物的免疫細胞表達。

E15. 實施方式 E13 或 E14 的雙特異性分子，其中這類免疫細胞是 T-淋巴細胞或 NK-細胞。

E16. 實施方式 E1-E15 的任何一個中的雙特異性分子，其中能夠免疫特異性結合 PD-1 的表位的這類表位-結合位點包括：

(A) PD-1 mAb 1 的 VH 結構域(**SEQ ID NO:47**)和 PD-1 mAb 1 的 VL 結構域(**SEQ ID NO:48**)；或

(B) PD-1 mAb 2 的 VH 結構域(**SEQ ID NO:49**)和 PD-1 mAb 2 的 VL 結構域(**SEQ ID NO:50**)；或

(C) PD-1 mAb 3 的 VH 結構域(**SEQ ID NO:51**)和 PD-1 mAb 3 的 VL 結構域(**SEQ ID NO:52**)；或

(D) PD-1 mAb 4 的 VH 結構域(**SEQ ID NO:53**)和 PD-1 mAb 4 的 VL 結構域(**SEQ ID NO:54**)；或

(E) PD-1 mAb 5 的 VH 結構域(**SEQ ID NO:55**)和 PD-1 mAb 5 的 VL 結構域(**SEQ ID NO:56**)；或

(F) PD-1 mAb 6 的 VH 結構域(**SEQ ID NO:57**)和 PD-1 mAb 6 的 VL 結構域(**SEQ ID NO:58**)；或

(G) PD-1 mAb 6-I VH 的 VH 結構域(**SEQ ID NO:86**)和 PD-1 mAb 6-SQ VL 的 VL 結構域(**SEQ ID NO:87**)；或

(H) PD-1 mAb 7 的 VH 結構域(**SEQ ID NO:59**)和 PD-1 mAb 7 的 VL 結構域(**SEQ ID NO:60**)；或

(I) PD-1 mAb 8 的 VH 結構域(**SEQ ID NO:61**)和 PD-1 mAb 8 的 VL 結構域(**SEQ ID NO:62**)。

E17. 實施方式 E1-E16 的任何一個中的雙特異性分子，其中能夠免疫特異性結合 CTLA-4 的表位的這類表位-結合位點包括：

(A) CTLA-4 mAb 1 的 VH 結構域(**SEQ ID NO:76**)和 CTLA-4 mAb 1 的 VL 結構域(**SEQ ID NO:77**)；或

(B) CTLA-4 mAb 2 的 VH 結構域(**SEQ ID NO:78**)和 CTLA-4 mAb 2 的 VL 結構域(**SEQ ID NO:79**)；或

(C) CTLA-4 mAb 3 的 VH 結構域(**SEQ ID NO:90**)和 CTLA-4 mAb 3 的 VL 結構域(**SEQ ID NO:91**)。

E18. 實施方式 17 的雙特異性分子，其中：

(A) 能夠免疫特異性結合 PD-1 的表位的這類表位-結合位點包括 PD-1 mAb 6-I VH 的 VH 結構域(SEQ ID NO:86)和 PD-1 mAb 6-SQ 的 VL 結構域(SEQ ID NO:87)；和

(B) 能夠免疫特異性結合 CTLA-4 的表位的這類表位-結合位點包括 CTLA-4 mAb 3 的 VH 結構域(SEQ ID NO:90)和 CTLA-4 mAb 3 的 VL 結構域(SEQ ID NO:91)。

E19. 實施方式 E1-E18 的任何一個中的雙特異性分子，其中這類分子包括：

(A) 具有 SEQ ID NO:95 的兩條多肽鏈，和具有 SEQ ID NO:96 的兩條多肽鏈；或

(B) 具有 SEQ ID NO:97 的兩條多肽鏈，和具有 SEQ ID NO:98 的兩條多肽鏈；或

(C) 具有 SEQ ID NO:99 的兩條多肽鏈，和具有 SEQ ID NO:100 的兩條多肽鏈；或

(D) 具有 SEQ ID NO:102 的兩條多肽鏈，和具有 SEQ ID NO:103 的兩條多肽鏈；或

(E) 具有 SEQ ID NO:101 的兩條多肽鏈，和具有 SEQ ID NO:100 的兩條多肽鏈；或

(F) 具有 SEQ ID NO:104 的一條多肽鏈，具有 SEQ ID NO:105 的一條多肽鏈，具有 SEQ ID NO:106 的一條多肽鏈，和具有 SEQ ID NO:107 的一條多肽鏈；或

(G) 具有 SEQ ID NO:108 的一條多肽鏈，具有 SEQ ID NO:105 的一條多肽鏈，具有 SEQ ID NO:109 的一條多肽鏈，和具有 SEQ ID NO:107 的一條多肽鏈。

E20. 一種藥物組合物，其包括有效量的實施方式 E1-E19 的任何一個中的雙

特異性分子和藥學上可接受的載體。

E21. 實施方式 E1-E19 的任何一個中的雙特異性分子，其中這類分子用於促進刺激需要其的受試者的免疫介導的應答。

E22. 實施方式 E1-E19 的任何一個中的雙特異性分子，其中這類分子用於治療與受抑制免疫系統相關的疾病或病況。

E23. 實施方式 E22 的雙特異性分子，其中疾病或病況是癌症或感染。

E24. 實施方式 E23 的雙特異性分子，其中這類癌症特徵在於存在選自下述的細胞的癌症細胞：腎上腺腫瘤、AIDS 相關的癌症、軟組織腺泡狀肉瘤、星形細胞瘤、膀胱癌、骨癌、腦和脊髓癌、轉移性腦瘤、乳腺癌、頸動脈體瘤、宮頸癌、軟骨肉瘤、脊索瘤、嫌色細胞腎細胞癌、透明細胞癌、結腸癌、結直腸癌、皮膚良性纖維組織細胞瘤、促結締組織增生小圓細胞瘤、室管膜細胞瘤、尤文氏瘤、骨外粘液樣軟骨肉瘤、不完全性骨纖維生成、骨的纖維發育異常、膽囊癌或膽管癌、胃癌、妊娠滋養層疾病、生殖細胞瘤、頭頸癌、肝細胞癌、胰島細胞腫瘤、卡波西氏肉瘤、腎癌、白血病、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/惡性的脂肪瘤、肝癌、淋巴瘤、肺癌、成神經管細胞瘤、黑素瘤、腦膜瘤、多發性內分泌瘤、多發性骨髓瘤、骨髓增生異常綜合征、成神經細胞瘤、神經內分泌腫瘤、卵巢癌、胰腺癌、甲狀腺乳頭狀癌、甲狀旁腺瘤、兒科癌症、周圍神經鞘瘤、嗜鉻細胞瘤、垂體瘤、前列腺癌、眼色素層後黑素瘤、罕見血液學疾病、腎轉移癌症、橫紋肌樣瘤、橫紋肌肉瘤、肉瘤、皮膚癌、軟組織肉瘤、鱗狀細胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睪丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲狀腺轉移癌和子宮癌。

E25. 實施方式 E24 的雙特異性分子，其中這類感染特徵在於存在細菌、真菌、病毒或原生動物病原體。

E26. 實施方式 E25 的雙特異性分子，其中這類感染特徵在於存在愛滋斯坦-

巴爾病毒、甲肝病毒(HAV)；乙肝病毒(HBV)；丙肝病毒(HCV)；疱疹病毒(例如 HSV-1、HSV-2、HHV-6、CMV)、人免疫缺陷病毒(HIV)、水泡性口炎病毒(VSV)、芽孢桿菌綱、檸檬酸桿菌屬、霍亂、白喉、腸桿菌屬、淋球菌、幽門螺旋桿菌、克雷伯氏菌屬、軍團菌屬、腦膜炎球菌、分歧桿菌、假單胞菌屬、*Pneumococci*、立克次氏體細菌、沙門氏菌屬、沙雷菌屬、葡萄球菌屬、鏈球菌屬、破傷風、曲黴菌屬(煙麴黴、黑麴黴等)、皮炎芽生菌、念珠菌屬白色念珠菌、克柔假絲酵母、光滑念珠菌、熱帶念珠菌等)、新生隱球菌、毛黴目的屬、犁頭黴屬、根黴屬)、申克氏胞絲菌、巴西芽生菌、粗球黴菌、莢膜組織胞漿菌、細螺旋體病、包柔氏螺旋體、蠕蟲寄生蟲(鈎蟲、條蟲、吸蟲、扁形蟲(例如血吸蟲)、藍氏賈第蟲、旋毛蟲、脆雙核阿米巴、布氏錐蟲、克氏錐蟲和杜氏利什曼蟲。

【0332】實施例

【0333】現在已經大體上描述了本發明，通過參考下述實施例其將更容易理解。下述實施例闡釋了組合物在本發明的診斷或治療方法中的各種方法。實施例旨在闡釋但決不限制本發明的範圍。

【0334】實施例 1

【0335】雙特異性分子提供增強的免疫應答刺激

【0336】產生對於調節兩個免疫調節途徑 PD-1 和 LAG-3 的獨特細胞表面蛋白質具有特異性的雙特異性分子並且命名為“**DART A**”。

【0337】**DART A** 是包含 Fc 區的雙特異性四鏈雙抗體，其具有對於 PD-1 特異性的兩個結合位點、對於 LAG-3 特異性的兩個結合位元點、被工程化用於延長半衰期的變異的 IgG4 Fc 區和包含半胱氨酸的 E/K-螺旋異源二聚體促進結構域。如下面更詳細地描述，**DART A** 包括人源化抗 PD-1 抗體(hPD-1 mAb 6)和人源化抗 LAG-3 抗體(hLAG-3 mAb 1)的結合特異性(即，VH 和 VL 結構域)。**DART A** 的第一和第三多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:63**)：

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

【0338】 在 **SEQ ID NO:63** 中，氨基酸殘基 1-107 對應能夠結合 LAG-3 (hLAG-3 mAb 1)的人源化單克隆抗體的 VL 結構域的氨基酸序列；殘基 108-115 對應間插間隔體肽(**連接體 1:GGGSGGGG (SEQ ID NO:5)**)；殘基 116-234 對應能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VH 結構域(hPD-1 mAb 6，**SEQ ID NO:57**，其中 X₁ 是 I)；殘基 235-240 對應間插間隔體肽(**連接體 2:GGCGGG (SEQ ID NO:6)**)；殘基 241-268 對應包含半胱氨酸的異源二聚體促進(E-螺旋)結構域(EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:20**))；殘基 269-280 對應穩定化的 IgG4 鉸鏈區(**SEQ ID NO:36**)；殘基 281-496 對應包括取代 M252Y/S254T/T256E 並且缺少 C-末端殘基的 IgG4 CH2-CH3 結構域的變體。

【0339】 DART A 的第二和第四多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:64**)：

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

【0340】 在 **SEQ ID NO:64** 中，氨基酸殘基 1-111 對應能夠結合 PD-1 的單克隆抗體的 VL 結構域(hPD-1 mAb 6，**SEQ ID NO:58** 其中 X₁ 是 S 並且 X₂ 是 Q)的氨基酸序列；殘基 112-119 對應間插間隔體肽(**連接體 1:GGGSGGGG (SEQ ID**

NO:5));殘基 120-237 對應能夠結合 LAG-3 的人源化單克隆抗體 (hLAG-3 mAb 1) 的 VH 結構域;殘基 238-243 對應包含半胱氨酸的間隔體連接體肽(**連接體 2:GGCGGG (SEQ ID NO:6)**);殘基 244-271 對應包含半胱氨酸的異源二聚體促進 (K-螺旋) 結構域 (KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO:21**))。

【0341】 在金黃色葡萄球菌腸毒素 B 型(“**SEB**”)試驗中檢測 DART A 刺激 T-細胞的能力。SEB 是微生物超抗原，其能夠啟動 SEB-應答供體中大量的 T-細胞 (5-30%)。SEB 結合肽結合槽(peptide binding groove)外面的 MHC II，因此是 MHC II 依賴性的，但是是不受限制的和 TCR 介導的。T 細胞的 SEB-刺激導致寡克隆 T 細胞增殖和細胞因數產生(儘管可觀察到供體變化性)。在 SEB-刺激 48 小時內，PBMC 上調 PD-1 和 LAG-3，其中在 96-孔板中伴隨 SEB-刺激的二次培養後第 5 天，進一步增強。SEB-刺激 PBMC 之後，免疫檢查點蛋白質 PD-1 和 LAG-3 的上調限制了 SEB 再次刺激時的細胞因數釋放。檢測 DART A 通過檢查點抑制增強細胞因數釋放的能力並且與單獨或組合的親本抗 PD-1 和抗 LAG-3 抗體的活性比較。

【0342】 簡言之，使用 Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare)密度梯度離心方法，根據製造商的指導，從在健康供體知情同意的情況下獲得自健康供體的全血 (Biological Specialty Corporation)純化 PBMC，然後使用 Dynabeads® Untouched Human T Cells Kit (Dynabeads® Untouched 人 T 細胞試劑盒)(Life Technologies)，根據製造商的指導，純化 T 細胞。在 T-25 大燒瓶中的 RPMI-培養基+ 10%熱失活的 FBS + 1%青黴素/鏈黴素中單獨培養純化的 PBMC，2-3 天，或與 SEB (Sigma-Aldrich)，0.5ng/mL (初次刺激)，一起培養 2-3 天。在第一輪的 SEB-刺激結束時，用 PBS 洗滌 PBMC 兩次，並且在 96 孔組織培養板中立即以 $1-5 \times 10^5$ 細胞/孔的濃度鋪平板，其在單獨的培養中、在具有對照抗體的培養基中、在具

有 0.5 ng/mL 的 SEB (二次刺激)和無抗體的培養基中,或在具有 SEB 和 DART A、對照 IgG 或抗 PD-1 抗體 +/- 抗 LAG-3 mAb 的培養基中,並且培養另外的 2-3 天。在二次刺激結束時,收穫上清液,以使用針對 IFN γ 、TNF α 、IL-10 和 IL-4 的人 DuoSet ELIS Kits (R&D Systems), 根據製造商的指導, 測量細胞因數分泌。

【0343】 在這些試驗中, DART A (PD-1 x LAG-3 雙特異性分子)和抗 PD-1 和抗 LAG-3 抗體被使用的濃度為 0.0061、0.024、0.09、0.39、1.56、6.25 或 25 nM。對於這些研究, 在使用抗體的組合時, 以指示的濃度提供每種抗體, 因此總的抗體濃度是每種抗體使用的濃度的兩倍(即, 0.0122、0.048、0.18、0.78、3.12、12.5 或 50 nM)。圖 7 顯示了來自代表性供體(D: 56041)的 SEB-刺激的 PBMC 的 IFN γ 分泌特徵。對於包括來自可選的 PD-1 和 LAG-3 抗體的 VH/VL 結構域的 PD-1 x LAG-3 雙特異性分子, 並且對於具有可選結構的 PD-1 x LAG-3 雙特異性分子, 看到了類似的結果(見, 例如, 圖 3C, 和對於許多供體。

【0344】 這些研究的結果表明, 當再次刺激時, PD-1 x LAG-3 雙特異性分子顯著增強了來自 SEB-刺激 PBMC 的 IFN γ 產生。這些結果顯示, 靶向兩個免疫調節途徑的雙特異性分子比靶向相同途徑的單獨的抗體的組合更有效。

【0345】 實施例 2

【0346】 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子

【0347】 可使用本文提供的和本領域已知的方法產生對於 PD-1 和 CTLA-4 具有特異性的雙特異性分子。表 8 中提供了若干 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的多肽鏈的一般結構。尤其地, 可產生包括兩條多肽鏈的雙特異性二價雙抗體分子, 其具有針對 PD-1 的一個結合位點和針對 CTLA-4 的一個結合位點, 其中多肽鏈具有變型 I 的一般結構(也見, 例如, 圖 1)。可產生包括三條多肽鏈的雙特異性二價雙抗體分子, 其具有針對 PD-1 的一個結合位點、針對 CTLA-4 的一個結合位點和 Fc 區, 其中多肽鏈具有變型 II 的一般結構(也見, 例如, 圖 4A)。可

產生包括四條多肽鏈的雙特異性四價雙抗體分子，其具有針對 PD-1 的兩個相同的結合位點、針對 CTLA-4 的兩個相同結合位點和 Fc 區，其中多肽鏈具有變型 III 或 IV 的一般結構(也見，例如，圖 3A-3C)。另外，可產生包括四條多肽鏈的雙特異性三價分子，其具有針對 PD-1 的兩個結合位點和針對 CTLA-4 的一個結合位點(或針對 CTLA-4 的兩個結合位點和針對 PD-1 的一個結合位點)和 Fc 區，其中多肽鏈具有變型 V 的一般結構(也見，例如，圖 6A)。另外，可產生包括四條多肽鏈的雙特異性二價抗體分子，其具有針對 PD-1 的一個結合位點、針對 CTLA-4 的一個結合位點和 Fc 區，其中多肽鏈具有變型 VI 的一般結構(也見，例如，美國專利號 7,695,936 和 PCT 專利公開 WO 2011/143545)。

表 8

變型	多肽鏈	結構域
I	第一	(VL1) — (連接體 1) — (VH2) — (連接體 2) — (HPD)
	第二	(VL2) — (連接體 1) — (VH1) — (連接體 2) — (HPD)
II	第一	(VL1) — (連接體 1) — (VH2) — (連接體 2) — (HPD) — (連接體 3) — (修飾的 CH2-CH3 結構域)
	第二	(VL2) — (連接體 1) — (VH1) — (連接體 2) — (HPD)
	第三	(連接體 3) — (修飾的 CH2-CH3 結構域)
III	第一和第三	(VL1) — (連接體 1) — (VH2) — (連接體 2) — (HPD) — (連接體 3) — (CH2-CH3 結構域)
	第二和第四	(VL2) — (連接體 1) — (VH1) — (連接體 2) — (HPD)
IV	第一和第三	(VL1) — (連接體 1) — (VH2) — (連接體 2) — (CH1) — (鉸鏈) — (CH2-CH3 結構域)
	第二和第四	(VL2) — (連接體 1) — (VH1) — (連接體 2) — (CL)
V	第一	(VL1) — (連接體 1) — (VH2) — (連接體 2) — (HPD) — (連接體 3) — (修飾的 CH2-CH3 結構域)
	第二	(VL2) — (連接體 1) — (VH1) — (連接體 2) — (HPD)
	第三	(VH3) — (CH1) — (鉸鏈) — (修飾的 CH2-CH3 結構域)
	第四	(VL3) — (CL)
VI	第一	(VL1) — (連接體 1) — (VH2) — (連接體 2) — (HPD) — (連接體 3) — (修飾的 CH2-CH3 結構域)
	第二	(VL2) — (連接體 1) — (VH1) — (連接體 2) — (HPD)

表 8		
變型	多肽鏈	結構域
	第三	(VL3) — (連接體 4) — (VH3) — (CH1) — (鉸鏈) — (修飾的 CH2-CH3 結構域)
VII	第一	(VH1) — (CH1) — (鉸鏈) — (修飾的 CH2-CH3 結構域)
	第二	(VL1) — (CL)
	第三	(VH2) — (CH1) — (鉸鏈) — (修飾的 CH2-CH3 結構域)
	第四	(VL2) — (CL)

HPD = 異源二聚體促進結構域

【0348】對於表 8 中提供的雙特異性分子的每種變型：

VL1 和 VH1 是抗 PD-1 抗體的可變結構域並且 VL2 和 VH2 是抗 CTLA-4 抗體的可變結構域；或

VL1 和 VH1 是抗 CTLA-4 抗體的可變結構域並且 VL2 和 VH2 是抗 PD-1 抗體的可變結構域。

對於變型 V 和 VI: VL3 和 VH3 是抗 PD-1 抗體的可變結構域或是抗 CTLA-4 抗體的可變結構域。

【0349】上面提供了可用於產生這類雙特異性分子的連接體、異源二聚體促進結構域和恒定區(例如，CH1、鉸鏈、CH2-CH3 結構域)。尤其地，如本文詳細描述的，對於第一和第三多肽鏈不同的分子，修飾 CH2-CH3 結構域，以促進異源二聚化並且減少或防止同源二聚化，例如通過修飾一條鏈上的 CH2-CH3 結構域以包括“白”和修飾在另一條鏈上的 CH2-CH3 結構域以包括“杵”。如上所詳述，鉸鏈和/或 CH2-CH3 結構域可包括氨基酸取代，其穩定雙特異性分子和/或改變效應子功能和/或延長血清半衰期。

【0350】實施例 3

【0351】通用雙特異性銜接子(adaptor)(“UBA”)分子

【0352】可選地，可構建雙特異性分子(例如，雙特異性抗體、雙特異性雙抗體、三價結合分子等)，其包括特異性結合 PD-1 (或 CTLA-4)的一個表位-結合位

點和特異性結合半抗原，例如螢光素異硫氰酸酯(也稱為螢光異硫氰酸酯或 FITC)的第二表位-結合位點。這類雙特異性分子用作通用雙特異性銜接子(“UBA”)分子，能夠共連接對於 PD-1 (或 CTLA-4)特異性的結合結構域與對於 CTLA-4 (或 PD-1)特異性的螢光素-綴合的結合分子(例如，抗體、scFv 等)。例如，這類通用雙特異性銜接子分子的 FITC-反應性臂可用於結合 FITC 標記的抗體，所述 FITC 標記的抗體結合 CTLA-4 (或 PD-1)，從而產生適於結合 PD-1 和 CTLA-4 的通用雙特異性銜接子分子。這類通用雙特異性銜接子分子可用于快速評估雙特異性分子。

【0353】抗螢光素抗體，4-4-20 (“mAb 4-4-20”)可用作 FITC-特異性結合結構域的來源(Gruber, M.等(1994) “*Efficient Tumor Cell Lysis Mediated By A Bispecific Single Chain Antibody Expressed In Escherichia coli,*” J. Immunol. 152(11) : 5368-5374)。

【0354】mAb 4-4-20 的重鏈可變結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:65) (CDR_H 殘基加底線)：

EVKLDETGGG LVQPGRPMKL SCVASGFTFS DYWMNNVVRQS PEKGLEWVAQ
IRNKPYNYET YYSDSVKGRF TISRDDSKSS VYLQMNLRV EDMGIYYCTG
SYGMDYWGQ GTSVTVSS

【0355】mAb 4-4-20 的輕鏈可變結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:66) (CDR_L 殘基加底線)：

DVVMQTTPFS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNGNTYLRW YLQKPGQSPK
 VLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP
WTFGGGTKLE IK

【0356】可使用本文提供的任何雙特異性形式(見，例如，表 1、2、3 和 4)。優選的雙特異性分子僅僅包括一個半抗原(例如，螢光素)結合位元點並且結合單半抗原標記的抗體，從而在所得複合物中展示 1:1 比例的通用銜接子雙特異性分

子與半抗原標記的抗體。可使用，例如，抗 PD-1 抗體和抗螢光素抗體的 VL 和 VH 結構域構建這類通用雙特異性銜接子分子。優選地，這類通用雙特異性銜接子分子是共價結合的雙抗體或三價結合分子，其包括兩條、三條、四條、五條或更多條多肽鏈。下面提供了可構建的代表性通用雙特異性銜接子分子。

【0357】 A. UBA 1

【0358】 可產生的一種通用雙特異性銜接子分子是包括兩條多肽鏈的共價結合的雙抗體，其包括一個 PD-1 表位-結合位點和一個螢光素結合位點(“**UBA 1**”)。

【0359】 UBA 1 的第一多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括 N-末端、mAb 4-4-20 的 VL 結構域(**SEQ ID NO:66**)、間插間隔體肽(**連接體 1**，GGGSGGGG (**SEQ ID NO:5**))、PD-1 mAb 6 的 VH 結構域(**SEQ ID NO:57**，其中 X₁ 是 I))、間插間隔體肽(**連接體 2**，GGCGGG(**SEQ ID NO:6**))、E-螺旋異源二聚體促進結構域：EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK(**SEQ ID NO:18**)和 C-末端。

【0360】 因此，**UBA 1** 的第一多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:67**)：

```
DVVM TQT PFS  LPVSLGDQAS  ISCRSSQSLV  HSN GNTYLRW  YLQKPGQSPK
VLIYKVS NRF  SGVPDRFSGS  GSGTDFTLKI  SRVEAEDLGV  YFCSQSTHVP
WTFGGG TKLE  IKGGGSGGGG  QVQLVQSGAE  VKKPGASVKV  SCKASGYSFT
SYWMN WVRQA  PGQGLEWIGV  IHPSDSETWL  DQKFKDRVTI  TVDKSTSTAY
MELSSL RSED  TAVYYCAREH  YGTSPFAYWG  QGTLVTVSSG  GCGGGEVAAL
EKEVAAL EKE  VAAL EKEVAA  LEK
```

【0361】 UBA 1 的第二多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括 N-末端、PD-1 mAb 6 的 VL 結構域(**SEQ ID NO:58**，其中 X₁ 是 S 並且 X₂ 是 Q))、間插間隔體肽(**連接體 1**，GGGSGGGG (**SEQ ID NO:5**))、mAb 4-4-20 的 VH 結構域(**SEQ ID NO:65**)、間插間隔體肽(**連接體 2**，GGCGGG(**SEQ ID NO:6**))、K-螺旋異源二聚體促進結構域：KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE(**SEQ ID NO:19**)和

C-末端。

【0362】因此，**UBA 1** 的第二多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:68**)：

```
EIVLTQSPAT  LSLSPGERAT  LSCRASESVD  NYGMSFMNWF  QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS  GVPSRFSGSG  SGTDFTLTIS  SLEPEDFAVY  FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI  KGGGSGGGG  EVKLDETGGG  LVQPGRPMKL  SCVASGFTFS
DYWMNWVRQS  PEKGLEWVAQ  IRNKPYNYET  YYSDSVKGRF  TISRDDSKSS
VYLQMNLRV  EDMGIYYCTG  SYYGMDYWGQ  GTSVTVSSGG  CGGGKVAALK
EKVAALKEKV  AALKEKVAAL  KE
```

【0363】**B. UBA 2**

【0364】如上面提供，將 IgG CH2-CH3 結構域併入到雙抗體，比如 **UBA 1** 的一條多肽鏈上允許形成更複雜的包含 Fc 區的四鏈雙特異性雙抗體。因此可產生的第二通用雙特異性銜接子分子是包括四條多肽鏈的共價結合的雙抗體，其包括兩個 PD-1 表位-結合位點、兩個螢光素結合位點和 Fc 區(“**UBA 2**”)。注意 **UBA 2** 可經兩個螢光素結合位點結合兩個螢光素標記的分子。

【0365】**UBA 2** 的第一和第三多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括 N-末端、mAb 4-4-20 的 VL 結構域(**SEQ ID NO:66**)、間插間隔體肽(**連接體 1**，GGGSGGGG (**SEQ ID NO:5**))、PD-1 mAb 6 的 VH 結構域(**SEQ ID NO:57**，其中 X₁ 是 I))、間插間隔體肽(**連接體 2**，GGCGGG(**SEQ ID NO:7**))、E-螺旋異源二聚體促進結構域：EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK(**SEQ ID NO:18**))、間插間隔體肽(**連接體 3**，GGGDKHTCPPCP (**SEQ ID NO:31**))、包括取代 L234A/L235A 的 IgG1 Fc 區(**SEQ ID NO:43**)，其中 X 是 K)，和 C-末端。

【0366】因此，**UBA 2** 的第一和第三多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:69**)：

```
DVVMQTQPFSS  LPVSLGDQAS  ISCRSSQSLV  HSNQNTYLRW  YLQKPGQSPK
VLIYKVSNRFF  SGVPDRFSGS  GSGTDFTLKI  SRVEAEDLGV  YFCSQSTHVP
WTFGGGTKLE  IKGGGSGGGG  QVQLVQSGAE  VKKPGASVKV  SCKASGYSFT
SYWMNWVRQA  PGQGLEWIGV  IHPSDSETWL  DQKFKDRVTI  TVDKSTSTAY
```

MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSG GCGGGEVAAL
 EKEVAALEKE VAALLEKEVAA LEKGGGDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP
 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
 PPVLDSGDSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL S PGK

【0367】 **UBA 2** 的第二和第四多肽鏈與 **UBA 1** 的第二多肽鏈相同。因此，**UBA 2** 的第二和第四多肽鏈每條均具有 **SEQ ID NO:68** 的氨基酸序列。

【0368】 C. **UBA 3**

【0369】 可產生的第三通用雙特異性銜接子分子是包括三條多肽鏈的共價結合的雙抗體，其包括一個 **PD-1** 表位-結合位點、一個螢光素結合位點和 **Fc** 區 (“**UBA 3**”)。

【0370】 **UBA 3** 的第一多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括 N-末端、mAb 4-4-20 的 VL 結構域(**SEQ ID NO:66**)、間插間隔體肽(**連接體 1**，GGGSGGGG (**SEQ ID NO:5**))、**PD-1** mAb 6 的 VH 結構域(**SEQ ID NO:57**，其中 X₁ 是 I))、間插間隔體肽(**連接體 2**，GGCGGG(**SEQ ID NO:6**))、E-螺旋異源二聚體促進結構域：EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:18**)、間插間隔體肽(**連接體 3**，GGGDKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:31**))、包括取代 L234A/L235A 的“包含杵的”IgG1 **Fc** 區(**SEQ ID NO:44**，其中 X 是 K))，和 C-末端。

【0371】 因此，**UBA 3** 的第一多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:70**)：

DVVMQTQPF S LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNNGNTYLRW YLQKPGQSPK
 VLIYKVS NRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP
 WTFGGG TKLE IKGGGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT
 SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY
 MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSG GCGGGEVAAL
 EKEVAALEKE VAALLEKEVAA LEKGGGDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP
 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR

EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
 PPVLDSGDSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL S PGK

【0372】 **UBA 3** 的第二多肽鏈可以與 **UBA 1** 的第二多肽鏈相同。因此，**UBA 3** 的第二多肽鏈具有 **SEQ ID NO:68** 的氨基酸序列。

【0373】 **UBA 3** 的第三多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括 N-末端、間隔體肽(連接體 3，DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:26))、包括取代 L234A/L235A 的“包含白的”IgG1 Fc 區(SEQ ID NO:45，其中 X 是 K))，和 C-末端。

【0374】 因此，**UBA 3** 的第三多肽鏈的氨基酸序列是(SEQ ID NO:71)：

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

【0375】 D. **UBA 4**

【0376】 可產生的第四通用雙特異性銜接子分子是包括四條多肽鏈的共價結合的三價結合分子，其包括兩個 PD-1 表位-結合位點、一個螢光素結合位點和 Fc 區(“**UBA 4**”)。

【0377】 **UBA 4** 的第一多肽鏈與 **UBA 3** 的第一多肽鏈相同。因此，**UBA 4** 的第一多肽鏈具有 **SEQ ID NO:70** 的氨基酸序列。

【0378】 **UBA 4** 的第二多肽鏈與 **UBA 1** 的第二多肽鏈相同。因此，**UBA 4** 具有 **SEQ ID NO:68** 的氨基酸序列。

【0379】 **UBA 4** 的第三多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括 PD-1 mAb 6 的 VH 結構域(SEQ ID NO:57，其中 X₁ 是 I))、IgG1 CH1 結構域(SEQ ID NO:40)、IgG1 鉸鏈區(SEQ ID NO:33)、包括取代 L234A/L235A 的“包含白的”IgG1 Fc 區(SEQ ID NO:45，其中 X 是 K))，和 C-末端。

【0380】 因此，**UBA 4** 的第三多肽鏈的氨基酸序列是(SEQ ID NO:72)：

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV
 IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
 YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVAVLQSSG LYSLSVTVTV PSSSLGTQTY
 ICNVNHKPSN TKVDKRVPEK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK
 DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
 YTLPPSREEM TKNQVSLSCA VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL
 DSDGSFFLVV KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNRYTQ KSLSLSPGK

【0381】UBA 4 的第四多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括 PD-1 mAb 6 的 VL 結構域(SEQ ID NO:58, 其中 X₁ 是 S 並且 X₂ 是 Q)、CL 結構域(例如, IgG κ 結構域(SEQ ID NO:38)), 和 C-末端。

【0382】因此, UBA 4 的第四多肽鏈的氨基酸序列是(SEQ ID NO:73):

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

【0383】E. UBA 5

【0384】可產生的第五通用雙特異性銜接子分子是包括三條多肽鏈的共價結合的三價結合分子, 其包括兩個 PD-1 表位-結合位點、一個螢光素結合位點和 Fc 區(“UBA 5”) (見, 例如, 圖 6C-6D)。

【0385】UBA 5 的第一多肽鏈與 UBA 3 的第一多肽鏈相同。因此, UBA 5 的第一多肽鏈具有 SEQ ID NO:70 的氨基酸序列。

【0386】UBA 5 的第二多肽鏈與 UBA 1 的第二多肽相同。因此, UBA 5 的第二多肽鏈具有 SEQ ID NO:68 的氨基酸序列。

【0387】UBA 5 的第三多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括 PD-1 mAb 6 的 VL 結構域(SEQ ID NO:58, 其中 X₁ 是 S 並且 X₂ 是 Q)、間插間隔體肽(連接體 4,

GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:37))、PD-1 mAb 6 的 VH 結構域(SEQ ID NO:57，其中 X₁ 是 I))、IgG1 CH1 結構域(SEQ ID NO:40)、IgG1 鉸鏈區(SEQ ID NO:33)、包括取代 L234A/L235A 的“包含白的”IgG1 Fc 區(SEQ ID NO:45，其中 X 是 K))，和 C-末端。

【0388】 因此，UBA 5 的第三多肽鏈的氨基酸序列是(SEQ ID NO:74)：

```

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGKVEI KGGGSGGGG SGGGGSQVQL VQSGAEVKKP GASVKVSCKA
SGYSFTSYWM NWVRQAPGQG LEWIGVIHPS DSETWLDQKF KDRVTITVDK
STSTAYMELS SLRSEDVAVY YCAREHYGTS PFAYWGQGTI VTVSSASTKG
PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KRVEPKSCDK
THTCPPCPAP EAAGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKEYKCK
VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSREEMTKNQ VSLSCAVKGF
YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLVSKLTV DKSRWQQGNV
FSCSVMHEAL HNRYSYQKSL LSPGK

```

【0389】 使用常規方法，可用螢光素標記抗 CTLA-4 抗體。當在存在上面提供的、具有結合 PD-1 表位-結合位點和結合螢光素的表位-結合位點的通用雙特異性銜接子分子的情況下溫育這類標記的分子時，它們形成 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子，其可如下面描述地被測試。

【0390】 鑒於本文提供的教導，將認識到不同的 VH 結構域、VL 結構域、連接體、異源二聚體促進結構域和/或 IgG 恒定結構域可用於產生可選的通用雙特異性銜接子分子。例如，抗 CTLA-4 抗體和/或不同抗 PD-1 抗體的 VH 和 VL 結構域可替代採用的抗 PD-1 抗體的 VH 和 VL 結構域被使用，以產生可選的或等價的通用雙特異性銜接子分子。可選地，抗 CTLA-4 抗體的 VH 和 VL 結構域可代替抗螢光素抗體的 VH 和 VL 結構域被使用，以產生具有上面提供的變型 I、

II、III、V 和 VI 的一般結構的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子。這類 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子可直接用於下面描述的試驗中。

【0391】實施例 4

【0392】試驗

【0393】 可以任何各種方式表徵本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子。尤其地，可分析本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子它們免疫特異性結合 PD-1 和 CTLA-4 分子(例如，如細胞表面上呈現的等)的能力，和/或可測定與抗原的相互作用的結合動力學。在雙特異性分子包括 Fc 區(或其部分)的情況下，可分析它們展示 Fc-FcγR 相互作用的能力，例如，Fc 區(或其部分)與 FcγR 的特異性結合、效應子功能的介導、信號傳導等。可使用本領域已知的體外和體內試驗測定本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的免疫調節活性和/或體內抗腫瘤效力。

【0394】A. 製備免疫細胞和表達 PD-1 和/或 CTLA-4 的細胞

【0395】1. 從人全血分離 PBMC 和免疫細胞亞群

【0396】 從全血分離來自健康人供體的 PBMC，例如，使用 Ficoll 梯度離心。簡言之，用無菌磷酸鹽緩衝液(PBS) 1:1 稀釋全血。使稀釋的血液(35 mL)在 50 mL 管中的 15 ml 的 Ficoll-Paque™ Plus 上分層並且使管在 400 x g (1320 rpm)離心 30 分鐘，制動停止(brake off)。將兩相之間的血沉棕黃層收集至 50 mL 管中，並且在 600 x g (1620 rpm)離心 5 分鐘。丟棄上清液並且用 PBS 洗滌細胞小球 3 次(例如，通過使管在 600 x g (1620 rpm)離心 5 分鐘)。使用台盼藍染料測定存活的細胞計數。將 PBMC 再懸浮在完全培養基(例如，RPMI 1640, 10% FBS, 1% pen/strep)中並且在 37°C 用 5% CO₂ 溫育過夜，或進一步被處理，以分離期望的免疫細胞亞群，比如 T 細胞，(例如，T regs、CD8、CD4)、NK 細胞、樹突細胞和單核細胞，如下面所描述。

【0397】使用商用製備試劑盒(例如，Untouched™人 T 細胞分離試劑盒，用於分離 T-細胞、CD4 T-細胞、CD8 T-細胞、單核細胞、樹突細胞(Life Technologies/ThermoFisher Scientific)；DYNABEADS® Regulatory CD4+/CD35+ T 細胞試劑盒，用於分離 T 調節細胞(CD4+/CD25+) (ThermoFisher)等)，根據製造商的指導，容易從 PBMC 分離具體的免疫細胞亞群。分離之後，將免疫細胞亞群(例如，T 細胞)再懸浮在適當的完全培養基(例如，RPMI 1640，10% FBS，1% 青黴素/鏈黴素，其可被補充以細胞因數(例如，IL-2、GM-CSF、IL-4、TNF- α 等)中，並且在 37°C 用 5% CO₂ 溫育過夜。如本文提供的，這類純化的亞群可用於評估 PD-1 和/或 CTLA-4 的細胞表面表達並且用於評估本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的免疫刺激活性。

【0398】2. 從食蟹猴或獼猴(Rhesus Monkey)全血分離 PBMC

【0399】從全血分離來自食蟹猴或獼猴的 PMBC，例如使用 Ficoll 梯度離心。簡言之，用無菌 PBS 以 1:3 稀釋全血。將稀釋的血液(35 mL)在 50 mL 聚丙烯離心機管中的 15 ml 的 90% Ficoll-Paque™ Plus (90 mL Ficoll + 10 mL PBS) 上分層並且在室溫以 9931 x g (2000 rpm)離心 30 分鐘，制動停止。收集兩個相之間的血沉棕黃層並且轉移至乾淨的 50 mL 管中，並且通過使管以 600 x g (1620 rpm)離心 5 分鐘用 45 mL PBS 洗滌。丟棄上清液並且將小球用 PBS 清洗 3x。接著，將食蟹猴或獼猴 PBMC 再懸浮在 30 ml 的完全培養基中並且通過台盼藍染料排阻法測定存活的細胞計數。

【0400】使用商用製備試劑盒(例如，全(Pan)T-細胞、CD4+ T-細胞和 CD4+/CD25+ Treg 分離試劑盒(Miltenyl Biotech))，根據製造商的指導，容易從非人靈長類 PBMC 分離具體的免疫細胞亞群。可選地，使用非人靈長類特異性的或交叉-活性 mAb 的流式細胞術分選可用於分選。

【0401】3. 從分離的人單核細胞產生人不成熟或成熟的骨髓衍生的樹突細

胞(mDC) 細胞

【0402】使用商業製備試劑盒(例如，Untouched™人單核細胞試劑盒(Life Technologies/ThermoFisher Scientific)，根據製造商的指導，從供體衍生的純化 PBMC 分離人單核細胞。通過在存在重組人粒細胞巨噬細胞-集落刺激因數(例如，hGM-CSF; Peprotech, 100 ng/ml)和重組人白介素-4 (hIL-4; Peprotech, 40 ng/ml)的情況下，培養單核細胞(例如，在 α 最小基本培養基，其具有核苷(α MEM)培養基+ 2%人 AB-陰性血清+ 1%青黴素/鏈黴素) 5-7 天，誘導分離的人單核細胞分化成人不成熟的 mDC。收穫不成熟的 mDC 並且通過使管在 600 x g (1620 rpm)離心 5 分鐘用 PBS 洗滌，以在異源混合淋巴細胞反應(allo-MLR)試驗中的用作刺激細胞，比如下面詳述的那些實驗。

【0403】在某些 allo-MLR 實驗中，通過添加 TNF α 或另外的細胞因數(IFN γ 、IL-1 β)和促分裂原(LPS)的混合物用於培養另外兩天，誘導不成熟 mDC 分化(見，例如，Han, T. (2009) “*Evaluation of 3 Clinical Dendritic Cell Maturation Protocols Containing LPS and IFN-gamma,*” J Immunother 32:399)。可通過流式細胞術，使用一種或多種下述抗體評估 mDC 的純度、成熟和啟動：抗 CD14、抗 CD80、抗 CD83、抗 CD86、抗 HLA-DR；和適當的同種型對照。可在 FACSCalibur/Fortessa (Becton Dickinson/BD Biosciences)上獲取來自這類評估的流式細胞術資料並且使用 FlowJo 軟體(TreeStar)分析。

【0404】4. PD-1 和 CTLA-4 的表達

【0405】可使用本領域已知的方法產生表達 PD-1 和/或 CTLA-4 的細胞。例如，細胞(例如，NSO、Jurkat、CHO 等)可使用包含適當的基因(例如，人 PD-1 基因)的逆轉錄病毒載體被工程化，以表達 PD-1 和/或 CTLA-4。可選地，免疫細胞可被刺激，以誘導或增加 PD-1 和/或 CTLA-4 的表達。簡言之，將如上述分離的純化的免疫細胞(例如，PBMC、T-細胞、樹突細胞等)在存在或不存在促分裂

原的情況下培養 2-6 天，並且在未處理的(幼稚)和刺激細胞上，例如使用流式細胞術檢驗 PD-1 和/或 CTLA-4 的表達。商用抗 PD-1 和抗 CTLA-4 抗體可用於初步評估在幼稚細胞上和回應促分裂原刺激的運算式樣。另外，或任選地，可使用本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子。

【0406】 可用於這類研究的促分裂原是本領域熟知的，並且包括但不限於：CD3/CD28 珠、脂多糖(LPS)、金黃色葡萄球菌腸毒素 A-E 型(例如，SEB)、佛波醇肉豆蔻酸乙酸酯(PMA)、植物凝集素(PHA)、伴刀豆球蛋白 A (conA)、美洲商陸促分裂原(PWM)等。鑒定為誘導/增強 PD-1 和/或 CTLA-4 的表達的促分裂原(一種或多種)可用於功能試驗，以評估本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的刺激活性。見，例如本文所述的“SEB”和“MLR”試驗。

【0407】 B. 結合試驗

【0408】 可用於分析與 PD-1 或 CTLA-4 分子的免疫特異性結合、結合交叉反應性或 Fc-FcγR 相互作用的免疫試驗包括但不限於使用下述技術的競爭性和非競爭性試驗體系：比如蛋白質印跡、放射性免疫測定、ELISA(酶聯免疫吸附試驗)、“夾心”免疫試驗、免疫沉澱試驗、沉澱素反應、凝膠擴散沉澱素反應、免疫層析試驗、免疫擴散試驗、凝集試驗、補體固定試驗、免疫放射測定試驗、螢光免疫試驗和蛋白質 A 免疫試驗等。(見，例如，Ausubel 等, 2008, *Current Protocols in Molecular Biology*)。通常通過標準抗體-抗原試驗，比如 Biacore 競爭性試驗、飽和度試驗或免疫試驗比如 ELISA 或 RIA，測量或測定對於靶抗原的結合親和力。使用本領域技術人員已知的任何技術的螢光啟動細胞分選(FACS)用於基於免疫學或功能的試驗，以表徵本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子。

【0409】 例如，可如上述製備 PBMC。其中期望的免疫細胞亞集(例如，T 調節、T 助細胞、APC 等)可分離自純化的 PBMC。然後，通過如下面描述的共染色和 FACS 分析，針對在各種細胞亞集(例如，T 調節、T 助細胞、APC 等)上的

PD-1 和 CTLA-4 表達，檢驗分離的細胞。

【0410】1. 細胞表面結合(飽和度試驗)

【0411】在基於飽和度/稀釋度的試驗中，使用表達 PD-1 和/或 CTLA-4 的細胞(靶細胞)可測量 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子結合在細胞表面上表達的 PD-1 和/或 CTLA-4 的能力。這類細胞可以是被刺激以表達 PD-1 和/或 CTLA-4 的免疫細胞，或被工程化以穩定超表達 PD-1 和/或 CTLA-4 分子的細胞系(例如，NSO 細胞)。簡言之，收穫培養的靶細胞(例如，被工程化以表達 PD1⁺的 NSO 細胞)，並且再懸浮(例如，約 5×10^6 細胞/ml)在封閉緩衝液(例如，FACS 緩衝液+ 10%人 AB 血清)中。以等摩爾濃度(例如，總共 200 μ l 中的 20nM)開始，製備 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子，抗 PD-1 抗體、抗 CTLA-4 或抗 PD-1 和抗 CTLA-4 抗體的組合，用於在單獨的微量滴定板中稀釋，然後連續稀釋(例如，1:4、1:5、1:10 等)5-12 次，以產生 5-12 點曲線。憑經驗確定在所有實驗中的最高開始濃度。將相同體積(例如，50 μ l)的每種稀釋物添加至新的微量滴定板中，並且將靶細胞添加至每個孔(例如， 0.25×10^6 細胞/孔)中，並且溫育(例如，在 4-25°C，達 30-120 分鐘)。洗滌細胞 1-3 次(例如，使微量滴定板在 600 x g (1620 rpm)旋轉 5 分鐘，然後用封閉緩衝液洗滌並且使其再次旋轉)並且再懸浮在封閉緩衝液中。對於二次級色，選擇適當的二級試劑，例如山羊抗人 Fc-APC 可用於檢測人初級抗體，而山羊抗小鼠 IgG Fc Alexa Fluor 647 用於檢測小鼠初級抗體。將選擇的二級試劑在封閉緩衝液中稀釋，並且基於單二級試劑的濃度，製備原料液，並且將相同體積/孔的二級混合物等分至單個孔並且溫育(例如，在 4-25°C，達 30-120 分鐘)。如上述洗滌細胞並且再懸浮在封閉緩衝液中。通過流式細胞術分析染色的細胞。可在 FACSCalibur/Fortessa (Becton Dickinson/Fortessa)上獲取流式細胞術資料，使用 FlowJo 軟體(TreeStar)作為平均螢光強度進行分析，並且繪圖以及使用 Prism6 軟體(Graphpad)中的 log(激動劑) vs. 應答-變數斜率(四參數)函數進行擬

合。

【0412】3. 受體/配體結合和信號傳導試驗

【0413】下面更詳細地提供可用于分析本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子調節(例如，阻斷、抑制、刺激等)配體結合和信號傳導的能力的試驗。

【0414】a. PD-1 受體/配體結合

【0415】可使用表達 PD-1 的細胞(靶細胞)評估 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子抑制 PD-1 結合 PD-L1 和/或 PD-L2 的能力。這類細胞可以是被刺激以表達 PD-1 的免疫細胞，或被工程化而表達 PD-1 分子的細胞系，例如用人 PD-1 基因經逆轉錄病毒轉導的 NSO-細胞。簡言之，收穫表達 PD-1 的細胞(例如，NSO/PDCD1 (NSO-PD1⁺))並且再懸浮(例如，約 1.5×10^6 細胞/ml)在封閉緩衝液(例如，FACS 緩衝液+ 10%人 Ab 血清)中，並且將其鋪在微量滴定板中(例如， 0.25×10^6 細胞/孔)。以等摩爾濃度(例如，總共 200 μ l 中的 20nM)開始，製備 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子、抗 PD-1 抗體、抗 CTLA-4，或抗 PD-1 和抗 CTLA-4 抗體的組合，用於在單獨的微量滴定板中稀釋並且連續稀釋(例如，1:4、1:5、1:10 等)5-12 次，以產生 5-12 點曲線。根據經驗確定在所有實驗中的最高開始濃度。將相同體積(例如，50 μ l)的每種稀釋物添加至包含靶細胞的微量滴定板的每個孔中。為了評估對 PD-L1 結合的抑制，將可溶性 PD-L1 融合蛋白(例如，hPD-L1 (B7H1) TEV-hIgG1-Fc-生物素(Ancell))添加至每個孔中，未染色的陰性對照孔除外，並且溫育(例如，在 4-25°C，達 30-120 分鐘)。為了評估對 PD-L2 結合的抑制，將可溶性 PD-L2 融合蛋白(例如，CD273 (PD-L2) muIgG/生物素(Ancell))添加至每個孔中，未染色的陰性對照孔除外，並且溫育(例如，在 4-25°C，達 30-120 分鐘)。洗滌細胞 1-3 次(例如，使微量滴定板在 600 x g (1620 rpm)旋轉 5 分鐘，然後用封閉緩衝液洗滌，並且使其再次旋轉)。將細胞再懸浮在封閉緩衝液中。除了未染色的陰性對照孔以外，添加用於檢測 PD-L1 或 PD-L2 融合蛋白的合適的二級

試劑(例如，鏈黴抗生物素-PE 標記的二級試劑(eBiosciences))並且溫育(例如，在 4-25°C，達 15-120 分鐘)。如上述洗滌細胞並且再懸浮在封閉緩衝液中。可通過流式細胞術分析染色的細胞。可在 FACSCalibur/Fortessa (Becton Dickinson/Fortessa)上獲取流式細胞術資料，並且使用 FlowJo 軟體(TreeStar)，分析標記的 sPD-L1 或 sPD-L2 在存在 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子、抗 PD-1 抗體、抗 CTLA-4，或抗 PD-1 和抗 CTLA-4 抗體的組合的情況下損失的平均螢光強度，並且繪圖以及使用 Prism6 軟體(Graphpad)中的 log(激動劑) vs. 應答-變數斜率(四參數)函數進行擬合。

【0416】 b. CTLA-4 受體/配體結合

【0417】 可使用表達 CTLA-4 的細胞(靶細胞)評估 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子抑制 CTLA-4 結合 CD80 和/或 CD86 的能力。這類細胞可以是被刺激以表達 CTLA-4 的免疫細胞，或被工程化而表達 CTLA-4 的細胞系，例如用人 CTLA-4 基因經逆轉錄轉導的 NSO-細胞。簡言之，收穫表達 CTLA-4 的細胞並且再懸浮在封閉緩衝液(例如，FACS 緩衝液+ 10%人 Ab 血清)中並且在微量滴定板中鋪板(例如， 0.25×10^6 - 1.0×10^6 細胞/孔)。以等摩爾濃度(例如，總共 200 μ l 中的 20nM)開始，製備 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子、抗 PD-1 抗體、抗 CTLA-4 或抗 PD-1 和抗 CTLA-4 抗體的組合，用於在單獨的微量滴定板中稀釋並且連續稀釋(例如，1:4、1:5、1:10 等) 5-12 次，而產生 5-12 點曲線。根據經驗確定在所有實驗中的最高開始濃度。將相同體積(例如，50 μ l)的每種稀釋物添加至包含靶細胞的微量滴定板的每個孔中。為了評估對 CD80 結合的抑制，將可溶性 CD80 融合蛋白(例如，hCD80-muIg-生物素(ADIPOGEN®))添加至每個孔，未染色的陰性對照孔除外，並且溫育(例如，在 4-25°C，達 30-120 分鐘)。為了評估對 CD86 結合的抑制，將可溶性 CD86 融合蛋白(例如，hCD86-muIg-生物素(ADIPOGEN®))添加至每個孔，未染色的陰性對照孔除外，並且溫育(例如，在 4-25°C，達 30-120

分鐘)。將細胞洗滌 1-3 次(例如，使微量滴定板在 600 x g (1620 rpm)旋轉 5 分鐘，然後用封閉緩衝液洗滌，並且使其再次旋轉)。將細胞再懸浮在封閉緩衝液中。除了未染色的陰性對照孔，添加用於檢測 CD80 或 CD86 融合蛋白的合適的二級試劑(例如，鏈黴抗生物素-PE 標記的二級試劑(eBiosciences))，並且溫育(例如，在 4-25°C，達 15-120 分鐘)。如上述洗滌細胞並且再懸浮在封閉緩衝液中。可通過流式細胞術分析染色的細胞。可在 FACSCalibur/Fortessa (Becton Dickinson/Fortessa)上獲取流式細胞術資料，並且使用 FlowJo 軟體(TreeStar)分析標記的 CD86 或 CD80 在存在 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子、抗 PD-1 抗體、抗 CTLA-4，或抗 PD-1 和抗 CTLA-4 抗體的組合的情況下損失的平均螢光強度，並且繪圖和使用 Prism6 軟體(Graphpad)中的 log(激動劑) vs. 應答-變數斜率(四參數)函數進行擬合。

【0418】C. 報告試驗

【0419】可使用 Promega 開發的商業報告系統，根據製造商的指導，評估 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在阻斷 PD-1 與 PD-L1 的相互作用中的功能活性。簡言之，使用被工程化而用作刺激系(stimulator line)或報告細胞系的兩個細胞系。從 CHO-親本系工程化刺激系，以表達 PD-L1 分子和 T 細胞啟動劑，其是結合膜的抗 CD3 激動劑 mAb [CHO/PDL1 細胞]。報告細胞系從 CD3 陽性 Jurkat 親本系被工程化，以在啟動的 T-細胞(NFAT) [NFAT-luc2/PD-1 Jurkat 細胞]的核因數的轉錄控制下表達螢光素酶報告構建體。當一起培養時，在 CHO-PDL1 細胞系上表達的抗 CD3 激動劑通過經 Jurkat-NFAT-luc/PD-1 細胞系上存在的 TCR/CD3 信號傳導複合物的接合而介導的 NFAT 信號傳導途徑來驅動螢光素酶表達。在沒有抗 PD-1 或抗 PD-L1 抗體的情況下，螢光素酶以相對於 TCR/CD3 信號傳導的水準表達，但是通過用作閘的 PD-1/PD-L1 抑制軸的存在而被下調或抑制。在存在抑制 PD-1/PD-L1 信號傳導的分子(例如，抗 PD-1 或抗 PD-L1 抗體)

的情況下，該抑制軸或“閘”被釋放，允許可測量的增強的螢光素酶表達。因此，可通過培養 CHO/PDL1 與 NFAT-luc2/PD1 Jurkat (3H-D5)而評估 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的 PD-1 抑制活性。簡言之，將 CHO-PDL1 在微量滴定板中鋪板(例如，以 4.0×10^4 細胞/孔)並且培養過夜(例如，在包含 10% FBS + 100ug/mL 潮黴素 B + 500ug/mL G418 的 RPMI 培養基中)。第二天，製備試驗緩衝液(例如，製備 RPMI + 2% FBS 以及試驗緩衝液中 5-12 點連續稀釋的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子，或抗 PD-1 抗體，其具有等摩爾當量(例如，100-200 nM)的最高稀釋點和 5-12 次連續稀釋(例如，1:4、1:5、1:10 等)。以下述順序，從包含粘附 CHO/PDL1 細胞的微量滴定板去除培養基的一部分細胞，並且將每種稀釋物的等分試樣添加至 CHO/PDL1 細胞中。收穫培養的 NFAT-luc2/PD-1 Jurkat 細胞並且再懸浮在試驗緩衝液中，並且將其添加(例如，以 $40 \mu\text{l}$ /孔的 5.0×10^4 細胞/孔)至 CHO/PDL1 細胞中。溫育共培養物(例如，在 37°C ，達 6 小時)。在溫育結束時，重構 Bio-Glo 底物(Promega)並且將其添加至環境溫度平衡的微量滴定板中。溫育之後(例如，5-10 分鐘)，在 VICTOR™ X4 Multilabel 板閱讀器(Perkin Elmer #2030-0040)上，在 450nm 讀取每個孔的光密度，以發光相對光單位(RLU)作為讀數。然後可將資料繪圖並且使用 Prism6 軟體(Graphpad)中的 $\log(\text{激動劑})$ vs. 應答-變數斜率(四參數)函數進行擬合。

【0420】類似的報告試驗可用於 CTLA-4 信號傳導(例如，CTLA-4 阻斷生物測定試劑盒(Promega))和/或可容易被產生，以分析 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在阻斷 CTLA-4 與其各自配體的相互作用中的功能活性。

【0421】 D. 免疫調節試驗

【0422】可用于分析本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的免疫調節活性的試驗包括促分裂原刺激試驗，比如上面詳述的“SEB”試驗，和混合淋巴細胞反應(MLR)試驗，比如下面更詳細提供的那些。預期本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特

異性分子調節 PD-1 和 CTLA-4 抑制途徑的能力在試驗中與單獨抗 PD1 和抗 CTLA-4 抗體或這類抗體的組合比較提供了增強的刺激。

【0423】 如上述通過在 Ficoll-Paque™ 梯度上離心從相同(自體)的血液或不相關(異源的)患者(一個或多個)健康的供體(一個或多個)血液分離 PBMC 或 T 細胞，並且再懸浮在完全培養基中。對於採用 mDC 的 allo-MLR 試驗，如上所述純化單核細胞並且使其成熟。對於單因素(單向) allo-MLR 試驗，將效應器細胞(例如，PBMC)與刺激細胞在微量滴定板中共培養。根據上下文，刺激細胞是 DC，自體 PBMC (對於 auto-MLR，即，陰性對照)，或異源的 PBMC (對於 allo-MLR，即，陽性對照)。效應器:刺激細胞的比例通常是 1:1 或 2:1，但是也可以改變。在存在等摩爾量的連續(例如，1:4、1:5、1:10 等)稀釋的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子、抗 PD-1 抗體、抗 CTLA-4、抗 PD-1 和抗 CTLA-4 抗體的組合或相應的同種型 mAb 的情況下進行共培養。可如上述製備連續抗體稀釋物。另外，在這類實驗中用或不用抗 CD3 +/- 抗 CD28 mAb 刺激的單細胞群對照可用作對照。刺激細胞(刺激劑)被預先照射(例如，以 45 戈瑞[Gy] (4500 rads) 使用 Gammacell® 3000 Elan 血液/細胞輻射器(Theratronics))，以防止刺激細胞的增殖並且允許測量僅僅應答細胞(效應器)的增殖。5-7 天(調整該時間，以確保試驗期間 PD-1 和 CTLA-4 的表達)之後，添加 [³H]-胸苷(例如，1 μCi/孔(Perkin Elmer))，持續另外的 18-48 個小時。在(例如，在 TOPCount NXT β-閃爍計數器(Perkin Elmer))中測量併入 DNA 的放射能。結果表示為每分鐘的平均計數(cpm)或表示為刺激指數(SI)，其允許比較來自不同供體的結果。如下計算 SI：刺激的細胞的平均計數/分鐘(cpm)除以非刺激的細胞的平均 cpm。對於 PBMC-誘導的刺激，當 SI ≥ 3 時，並且對於 DC-誘導的刺激，SI ≥ 6 時，MLR 應答被認為是正的。可選地，可使用基於 CEFSE 的增殖試驗測量增殖(Boks, M.A., 等(2010) “*An optimized CFSE based T-cell suppression assay to evaluate the suppressive capacity of regulatory T-cells induced by*

human tolerogenic dendritic cells,” Scand J Immunol 72:158–168)。

【0424】可用于評估本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的免疫刺激活性的另外的 MLR 試驗是本領域已知的。見，例如，Davies, J.K.等(2011)“*Induction of alloantigen-specific anergy in human peripheral blood mononuclear cells by alloantigen stimulation with co-stimulatory signal blockade,*” Journal of Visualized Experiments : JoVE, (49), 2673 ; Kruisbeek, A.M.,等(2004)“*Proliferative Assays for T cell Function,*” Current Protocols in Immunology, 60:III:3.12.1-3.12.20 ; Wallgren, A.C.等(2006)“*The Direct Pathway Of Human T-Cell Allorecognition Is Not Tolerized By Stimulation With Allogeneic Peripheral Blood Mononuclear Cells Irradiates With High-Dose Ultraviolet,*” Ba. Scand J of Immunol 63:90-96 ; Levitsky, J.等(2009)“*The Human 'Treg MLR' Immune Monitoring for Foxp3+ T regulatory cell generation,*” Transplantation 88:1303-11。

【0425】E. 體內抗腫瘤試驗

【0426】可在本領域已知的各種動物模型中評估本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的抗腫瘤活性。用本發明的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子進行治療預期抑制腫瘤形成和/或腫瘤生長，達到的程度比用單獨抗 PD1 和抗 CTLA-4 抗體或這類抗體的組合達到的程度更大。

【0427】鼠科異種移植腫瘤模型尤其有用。簡言之，小鼠被植入以感興趣的癌症細胞系或腫瘤細胞，並且用以下進行治療：(i) PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子(ii)抗 PD-1 抗體(iii)抗 CTLA-4 抗體(iv) 抗 PD-1 和抗 CTLA-4 抗體的組合，和(vi)無治療對照，其可以是單獨媒介和/或不相干的抗體。治療可在植入之前開始(例如，1 天之前(即，第-1 天))；在植入的同一天開始(即，第 0 天)，或在形成腫瘤之後開始(例如，第 7 天)。動物可接收單次治療或可接收多次治療(例如，植入後每週一次)。隨著時間的推移監測動物，以確定這些分子對腫瘤形成和/或生

長的體內作用。可通過測量腫瘤並且確定腫瘤體積(高度 x 寬度 x 長度)來監測腫瘤的生長。顯示完全的腫瘤退化的被治療的動物可用於通過激發試驗檢驗腫瘤特異性免疫性，所述激發試驗使用相同的或腫瘤細胞並且使用不相干的腫瘤細胞作為對照。另外，可修飾這些模型，以包括與護理治療的標準，比如化學療法、輻射等的聯合治療。

【0428】可在這類異種移植模型中使用的許多可移植的癌細胞系是本領域已知的，包括但不限於：MDST8、SW480 和 SW620 結直腸癌細胞；AGS 胃癌細胞；UACC-62、A2058 和 LOX IMVI 黑素瘤細胞；22rv 前列腺癌細胞；AsPC-1 和 BxPc-3 胰腺癌細胞；Caki-1、A498 和 786-0 腎癌細胞；HT-1197 膀胱癌細胞；4T1、MDA-MB-231、乳腺癌細胞；A549、WX322 肺癌細胞；HT1080 纖維肉瘤細胞；HBL-2 人套細胞淋巴瘤細胞；Raji 伯基特淋巴瘤細胞。尤其優選的是患者衍生的異種移植(PDX)模型。這類癌細胞系或患者衍生的腫瘤被移植到免疫系統受損的小鼠品種(例如，裸鼠、Scid 小鼠、NOD 小鼠、Rag 1 缺陷型小鼠(null mice)等(見，例如，Belizario, J.E., (2009) “*Immunodeficient Mouse Models: An Over view,*” Bentham Open 1874-2262/09)或人源化的小鼠，比如轉基因人 HLA-A2 小鼠(見，例如，Shultz, L.D.,等(2012) “*Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges,*” Nature Rev Immunol 12:786-798)中，如上所述。另外，為了評估調節免疫檢查點的分子，可用人免疫系統組分(例如，用人 PBMC、幹細胞、免疫祖細胞等重構)移植免疫缺陷小鼠，然後或同時植入期望的腫瘤細胞，並且進行治療，如上面詳細描述的。

【0429】 實施例 5

【0430】 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子結合研究

【0431】產生若干 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子，包括包含 Fc 區的雙抗體和包括四條多肽鏈的包含 Fc 區的三價分子。產生了具有四條多肽鏈並且包括

E/K-螺旋異源二聚體促進結構域的二個雙抗體，並且給與命名“**DART B**”、“**DART C**”和“**DART D**”。產生具有四條鏈並且包括 CH1/CL 結構域的一個雙抗體，並且給與命名“**DART E**”。產生具有四條鏈並且包括 E/K-螺旋異源二聚體促進結構域和 CH1/CL 結構域的二個三價結合分子，並且給與命名“**TRIDENT A**”和“**TRIDENT B**”。

【0432】另外，產生了對於 PD-1 或 CTLA-4 具有特異性的若干抗體。產生了對於 PD-1 特異性的一個抗體，並且給與命名“**PD-1 mAb 6 G4P**”。產生對於 CTLA-4 特異性的三個抗體，並且給與命名“**CTLA-4 mAb 1**”、“**CTLA-4 mAb 3 G1AA**”和“**CTLA-4 mAb 3 G4P**”。

【0433】這些 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子、抗 PD-1 抗體、抗 CTLA-4 抗體的結構和氨基酸序列提供在上面並且總結在下面表 9 中。

表 9					
名稱	可變結構域	Fc*	鏈	SEQ ID NOs:	其他組分
DART B	CTLA-4 mAb 1 PD-1 mAb 6-ISQ	IgG4 (YTE)	1	95	E/K-螺旋；見圖 3B
			2	96	
			3	95	
			4	96	
DART C	CTLA-4 mAb 3 PD-1 mAb 6-ISQ	IgG4	1	97	E/K-螺旋；見圖 3B
			2	98	
			3	97	
			4	98	
DART D	PD-1 mAb 6-ISQ CTLA-4 mAb 3	IgG4 (YTE)	1	99	E/K-螺旋；見圖 3B
			2	100	
			3	99	
			4	100	
DART E	CTLA-4 mAb 3 PD-1 mAb 6-ISQ	IgG4 (YTE)	1	102	CL/CH1；見圖 3C
			2	103	
			3	102	
			4	103	
DART F	PD-1 mAb 6-ISQ CTLA-4 mAb 3	IgG1 (AA/YTE)	1	101	E/K-螺旋；見圖 3B
			2	100	
			3	101	
			4	100	

表 9					
名稱	可變結構域	Fc [‡]	鏈	SEQ ID NOs:	其他組分
TRIDENT A	PD-1 mAb 6-ISQ CTLA-4 mAb 3	IgG4 (YTE)	1	104	E/K-螺旋和 CL/CH1; 見圖 6A
			2	105	
			3	106	
			4	107	
TRIDENT B	PD-1 mAb 6-ISQ CTLA-4 mAb 3	IgG1 (AA/YTE)	1	108	E/K-螺旋和 CL/CH1; 見圖 6A
			2	105	
			3	109	
			4	107	
PD-1 mAb 6 G4P	PD-1 mAb 6-ISQ	IgG4	1	88	天然抗體結構
			2	89	
			3	88	
			4	89	
CTLA-4 mAb 1	CTLA-4 mAb 1 (伊匹單抗複製品)	IgG1	4	**	天然抗體結構
CTLA-4 mAb 3 G1AA	CTLA-4 mAb 3	IgG1 (AA)	1	92	天然抗體結構
			2	94	
			3	92	
			4	94	
CTLA-4 mAb 3 G4P	CTLA-4 mAb 3	IgG4	1	93	天然抗體結構
			2	94	
			3	93	
			4	94	

‡ 併入 IgG4 Fc 區的分也併入穩定化的 IgG4 鉸鏈區。

** 與伊匹單抗相同的氨基酸序列(見, 例如, IMGT 3D 和 2D 結構資料庫登陸號 8568_H 和 8568_L)

【0434】通過併入不同的 VH 和 VL 結構域, 可容易產生包括可選的 PD-1 和/或 CTLA-4 表位-結合位點的另外 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子。類似地, 可如本文提供地, 產生包括可選的連接體、Fc 區和/或具有可選的結構的分子(見, 例如, 表 8)。

【0435】A. ELISA 結合研究

【0436】進行 ELISA 研究, 以測量連續稀釋的結合分子(抗體 CTLA-4 mAb 3 G4P、DART D、TRIDENT A 或 DARTB)與已經被塗布到支撐板上的可溶性 hCTLA-4-Avi-His (1 µg/mL)或 hPD-1-His (1 µg/mL)的結合。山羊抗人-Fc-HRP

(1:10,000)用作檢測結合的二級檢測分子。這類研究的結果顯示在表 10 和圖 8A-8B 中。資料顯示，具有針對 PD-1 和 CTLA-4 的兩個結合位點的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子(例如，DART D 和 DART B)展示與 PD-1 和 CTLA-4 的結合，所述結合與它們各自的親本抗 PD-1 和抗 CTLA-4 抗體的結合類似。具有針對 PD-1 的兩個結合位點和針對 CTLA-4 的一個結合位點的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子(例如，TRIDENT A)展示與 PD-1 的結合，所述結合與親本抗 PD-1 抗體的結合類似，並且展示與 CTLA-4 降低的結合(相對於親本抗體的結合)，原因是包括針對 CTLA-4 的僅僅單個結合位點的三價分子降低的親合力。對於具有 IgG1 CH1 和/或 IgG1 (AA/YTE) Fc 區的 DART F 和 TRIDENT B，觀察到了類似的結合結果。

構建體	CTLA-4 結合的 EC ₅₀ (nM)	PD-1 結合的 EC ₅₀ (nM)
CTLA-4 mAb 3 G4P	0.4	N/A
PD-1 mAb 6 G4P	N/A	0.3
DART D	0.4	0.3
TRIDENT A	1.0	0.4
DART B	0.4	0.4

【0437】通過在存在已經被塗覆到支撐板上的可溶性人 PD-1 (圖 8C)，或可溶性人 CTLA-4-Avi-His (圖 8D)的情況下，溫育包括 CTLA-4 mAb 1 (例如，DART B)和 CTLA-4 mAb 3 (例如，DART C 和 DART D)的 CTLA-4 結合結構域的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子，研究改變取向和結合結構域對結合的影響。山羊抗人 -Fcγ-HRP 被用作二級檢測分子，以使用 PICO 化學發光底物檢測結合。結果表明，包括 CTLA-4 mAb 1 (例如，DART B)和 CTLA-4 mAb 3 (例如，DART C 和 DART D)的 CTLA-4 結合結構域的 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子展示與 CTLA-4 類似的結合。未發現結合結構域的取向(即，在第一或第二鏈上的定位)顯著改變與 PD-1 或 CTLA-4 的結合(比較 DART C 和 DART D 的結合)。

【0438】 B. ELISA 阻斷研究

【0439】 進行一系列 ELISA 試驗，以評估本發明的雙特異性分子阻斷與 PD-1 和 CTLA-1，單獨地或組合，的配體結合的能力。在存在等量的不相干抗原的情況下和在存在等量的 CTLA-4 的情況下評估對 PD-L1 與 PD-1 的結合的阻斷。將板塗布以 1:1 混合的 His 標記的可溶性人 PD-1 (shPD-1) 和 His 標記的不相干抗原 (irrAg) (各自 2 $\mu\text{g/ml}$)，或 1:1 混合的 shPD-1 和 His 標記的可溶性人 CTLA-4 (shCTLA-4) (各自 2 $\mu\text{g/ml}$)。以指示的濃度，將 PD-1 mAb 6 G4P、DART D、TRIDENT A 或對照 TRIDENT (具有針對 RSV 的兩個結合位點和針對 CTLA-4 的一個結合位點) 與 6 $\mu\text{g/ml}$ 生物素標記的 PD-L1 預先混合 5 分鐘，並且添加至板中。使用鏈黴抗生物素 HRP (1:3,000) 檢測 PD-L1 結合。該評估的結果呈現在圖 9A-9B 中。發現測試的所有 PD-1 結合分子能夠抑制 PD-L1 結合至 PD-1。

【0440】 在存在等量的不相干抗原的情況下和在存在等量的或四倍的 PD-1 的情況下評估對 B7-1 與 CTLA-4 的結合的阻斷。將板塗布以 1:1 混合的 shCTLA-4 和 irrAg (各自 2 $\mu\text{g/ml}$)、1:1 混合的 shCTLA-4 shPD-1 (各自 2 $\mu\text{g/ml}$)、或 1:4 混合的 shCTLA-4 (0.8 $\mu\text{g/ml}$) 和 shPD-1 (3.2 $\mu\text{g/ml}$)。將 PD-1 mAb 6 G4P、DART D、TRIDENT A、CTLA-4 mAb 3 G4P 或對照 TRIDENT，以指示的濃度與 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 生物素標記的 B7-1 預先混合 5 分鐘，並且添加至板中。使用鏈黴抗生物素 HRP (1:3,000) 檢測 B7-1 結合。該評估的結果呈現在圖 9C-9E 中。發現測試的所有 CTLA-4 結合分子能夠抑制 B7-1 結合至 CTLA-4。發現通過其與固定的 PD-1 相互作用的 PD-1 結合臂的相互作用增強了對 B7-1 結合的 TRIDENT A 阻斷(與不結合 PD-1 的對照 TRIDENT 相比) (圖 9D)。而且，在更好地模擬在刺激細胞上看到的相對表達水準的 1:4 CTLA-4:PD-1 條件下(見，圖 19A)，發現對 B7-1 結合的 TRIDENT A 阻斷進一步被增強(即，與不結合 PD-1 的對照 TRIDENT 的曲線相比，TRIDENT A 曲線進一步偏移) (圖 9E)。

【0441】這些 ELISA 研究的結果表明，測試的所有 PD-1 結合分子能夠抑制 PD-L1 結合至 PD-1 (圖 9A-9B)。所有這類分子對於 PD-1 是二價的並且展示類似的抑制特徵。測試的所有 CTLA-4 結合分子能夠抑制 B7-1 結合至固定的 CTLA-4 (圖 9C-9E)，其中，在存在 PD-1 的情況下，包括兩個 PD-1 結合位點和一個 CTLA-4 結合位點的分子展示更有效的抑制(圖 9D-9E)。因此，包括單 CTLA-4 結合位點的三價分子展示對於 CTLA-4 配體偏向 PD-1 的阻斷，表明可通過調節價而調整 CTLA-4 相互作用。

【0442】C. BIACORE®研究

【0443】使用 BIACORE®分析研究 DART A、TRIDENT A 和 CTLA-4 mAb1 與人 CTLA-4 和食蟹猴 CTLA-4 的結合親和力。簡言之，將 His 標記的可溶性 CTLA-4(與包含組氨酸的肽融合的人或食蟹猴 CTLA-4 的細胞外部分)捕獲在固定的抗 5 His(anti- PentaHis)上，然後使不同濃度(12.5-200 nM)的 CTLA-4 結合分子經過固定的 CTLA-4 蛋白質。經 BIACORE®分析測定結合的動力學(通過 1:1 Langmuir 結合模型的親和力(同時 k_a/k_d)；或通過分開的 k_a/k_d 1:1 擬合的親合力)。從這些研究計算的 k_a 、 k_d 和 K_D 呈現在表 11 中。

分子	人 CTLA-4			食蟹猴 CTLA-4		
	k_a ($\times 10^5$)	k_d ($\times 10^{-4}$)	KD (nM)	k_a ($\times 10^5$)	k_d ($\times 10^{-3}$)	KD (nM)
CTLA-4 mAb 1*	6.6	8.9	1.4	10	1.3	1.3
DART D*	2.3	7.1	3.1	3.5	1.7	4.9
TRIDENT A [‡]	1.2	32	26.7	2.5	65	260

*通過分開的 k_a/k_d 1:1 擬合的親合力

*通過 1:1 Langmuir 結合模型的親和力

【0444】DART D 對於 CTLA-4 是二價的，並且展示的對於人和食蟹猴 CTLA-4 的結合親和力是 CTLA-4 mAb 1 的約 2 至 4 倍以內。TRIDENT A 對於 CTLA-4 是單價的，如鑒於其降低的親合力所預期的，對於人和食蟹猴 CTLA-4

展示更低的親和力。

【0445】使用 BIACORE®分析來研究 DART A、TRIDENT A、PD-1 mAb 6 G4P 和 CTLA-4 mAb 3 G1AA 與人 PD-1 的結合親和力。將結合分子捕獲在固定的 F(ab)₂ 山羊抗人 Fc 上，然後使不同濃度(6.25-100 nM)的 His 標記的可溶性人 PD-1 經過固定的結合分子，並且經 BIACORE®分析(Langmuir 1:1 結合擬合)測定結合的動力學。來自這些研究的計算的 k_a 、 k_d 和 KD 呈現在表 12 中(n.d.，不可檢測的)。

表 12			
分子	人 PD-1		
	k_a ($\times 10^5$)	k_d ($\times 10^{-4}$)	KD (nM)
CTLA-4 mAb 3 G1AA	n.d.	n.d.	n.d.
PD-1 mAb 6 G4P	6.2	6.7	1.1
DART D	4.8	8.1	1.7
TRIDENT A	5.2	6.8	1.3

【0446】DART A、TRIDENT A、PD-1 mAb 6 G4P 對於 PD-1 各自是二價的，並且展示相當的結合親和力。如預期的，CTLA-4 mAb 3 G1AA 對於人 PD-1 不展示任何可檢測的結合。

【0447】D. 基於 CTLA-4 細胞的試驗

【0448】評估 DART B、DART D、TRIDENT A、抗 CTLA-4 抗體 CTLA-4 mAb 1、CTLA-4 mAb 3 G4P 和 hIgG 對照抗體與表達食蟹猴 CTLA-4 (cynoCTLA-4) 或人 CTLA-4 (huCTLA-4) 的 CHO 細胞的結合。該評估的結果顯示在圖 10A-10B 中。在存在表達食蟹猴 CTLA-4 (圖 10A) 或人 CTLA-4 (圖 10B) 的 CHO 細胞的情況下溫育結合分子。使用抗人 Fc 二級抗體檢測與這類細胞的結合。結果顯示，測試的所有分子能夠結合在 CHO 細胞的表面上表達的人和食蟹猴 CTLA-4。抗 CTLA-4 抗體展示與 huCTLA-4 類似的結合特徵；二價、雙特異性分子 DART B

和 DART D 展示比三價結合分子稍微下降的結合。對於 CTLA-4 是單價的 TRIDENT A 比對於 CTLA-4 具有更高價的分子展示更低的結合。對照抗體不結合。對於與 cynoCTLA-4 的結合，可看到類似的結果。

【0449】評估 DART C、DART D、DART E、TRIDENT A、抗 CTLA-4 抗體 CTLA-4 mAb 1、CTLA-4 mAb 3 G1AA 和抗 PD-1 抗體 PD-1 mAb 6 G4P 與在它們的表面上表達 huCTLA-4 但是不表達 PD-1 的 Jurkat 細胞的結合。使用抗人 FC 二級 Ab (FACS) 檢測 DART 和 TRIDENT 分子與人 CTLA-4 的結合。評估的結果顯示在表 13 和圖 11A (DART C、DART D、DART E、CTLA-4 mAb 1、CTLA-4 mAb 3 G1AA 和 PD-1 mAb 6 G4P) 和圖 11B (CTLA-4 mAb 1、CTLA-4 mAb 3 G1AA、PD-1 mAb 6 G4P 和 TRIDENT A) 中。如在圖 11A-11B 中顯示，PD-1 抗體不結合 CTLA-4，但是測試的所有 CTLA-4 結合分子能夠結合在 Jurkat 細胞的表面上表達的 huCTLA-4。抗 CTLA-4 抗體展示類似的結合特徵；相比三價結合分子，二價雙特異性分子 DART C、DART D 和 DART E 展示與 Jurkat 細胞稍微降低的結合。對於 CTLA-4 是單價的 TRIDENT A 比對於 CTLA-4 具有更高價鍵的分子展示更低的結合。

分子	EC50 (nM)
CTLA-4 mAb 1	0.4215
PD-1 mAb 6 G4P	6.557
CTLA-4 mAb 3 G1AA	0.3728
DART E	1.269
DART C	0.7575
DART D	0.8829
TRIDENT A	4.638

【0450】評估 DART D、TRIDENT A 和抗 CTLA-4 抗體 CTLA-4 mAb 1、CTLA-4 mAb 3 G1AA 它們阻斷 CTLA-4 配體 B7-1 和 B7-2 的能力。在存在 CTLA-4 Jurkat 細胞的情況下溫育 B7-1 和 B7-2 的 His 標記的衍生物。使用抗 His

抗體檢測 His-B7-1 和 His-B7-2 的結合。該評估的結果顯示在圖 12A (His-B7-1) 和圖 12B (His-B7-2) 中。發現測試的所有分子能夠抑制 B7-1 和 B7-2 結合在 Jurkat 細胞的表面上表達的 CTLA-4。抗 CTLA-4 抗體展示類似的抑制特性；二價雙特異性分子 DART D 是比三價結合分子效力稍低的抑制劑。對於 CTLA-4 單價的 TRIDENT A 比對於 CTLA-4 具有較高價的任何分子效力更低。對照抗體根本不抑制。上述 ELISA 研究提示，TRIDENT A，和具有兩個 PD-1 結合位點和一個 CTLA-4 結合位點的類似分子在存在 PD-1 的情況下是更有效的抑制劑。

【0451】IL-2/Luc Jurkat 細胞 CTLA-4 報告試驗用於評估 DART C、DART D、TRIDENT A、CTLA-4 mAb 3 G1AA 和 PD-1 mAb 6 G4P 逆轉 CTLA-4 免疫檢查點抑制信號的能力，所述抑制信號如通過增加的螢光素酶表達所展示。所以，在存在這類分子(R:S= 1 : 0.3)的情況下，在 37 °C, 溫育 IL-2/Luc-Jurkat-CTLA-4 細胞 30 分鐘，其後添加人工抗原呈遞 Raji 細胞，並且繼續溫育 6 小時。人工抗原呈遞細胞啟動 Jurkat 報告細胞上的 TCR/CD3 複合物。評估的結果顯示在圖 13 中。測試的所有 CTLA-4 結合分子能夠逆轉 CTLA-4 免疫檢查點抑制信號，如通過螢光素酶試驗所測定的。對於 CTLA-4 是單價的 TRIDENT A 在該試驗中比對於 CTLA-4 具有更高價的任何分子效力更低。對照抗體根本不抑制。上述的 ELISA 研究提示，TRIDENT A，和具有兩個 PD-1 結合位點和一個 CTLA-4 結合位點的類似分子在存在 PD-1 的情況下更有效。

【0452】E. 基於 PD-1 細胞的試驗

【0453】評估 DART D、TRIDENT A、PD-1 mAb 6 G4P 和 CTLA-4 mAb 3 G1AA 它們結合表達 PD-1 但是不表達 CTLA-4 的 NSO 細胞的能力。使結合分子在存在細胞的情況下溫育並且測量細胞的平均螢光指數。該評估的結果呈現在圖 14 中。如預期的，CTLA-4 抗體不結合，發現所有的雙特異性結合分子能夠結合在 NSO 細胞的表面上表達的 PD-1。所有的雙特異性分子對於 PD-1 是二價

的並且展示與 NSO 細胞類似的結合。

【0454】評估 DART D、TRIDENT A、PD-1 mAb 6 G4P，和 CTLA-4 mAb 3 G1AA 它們阻斷細胞表面上表達的 PD-1 和其配體 PD-L1 和 PD-L2 之間結合的能力。使 PD-L1-PE 或 PD-L2-PE 在存在這類結合分子的情況下溫育並且使用 FACS 評估他們結合 NSO-PD-1 細胞的能力。該評估的結果呈現在圖 15A (PD-L1)和圖 15B (PD-L2)中。如預期的，CTLA-4 抗體不抑制，測試的所有 PD-1 結合分子能夠抑制 PD-L1 (圖 15A)和 PD-L2 (圖 15B)與 NSO 細胞的表面上表達的 PD-1 的結合。所有的 PD-1 結合分子對於 PD-1 是二價的並且展示類似的抑制特性。

【0455】也在 PD-1 阻斷報告試驗中評估 DART D、TRIDENT A、CTLA-4 mAb 3 G1AA 和 PD-1 mAb 6 G4P。在存在 PD-L1⁺ CHO 和 Jurkat 效應細胞的情況下溫育這類結合分子，並且通過跟蹤 CD3 介導的啟動的程度評估結合分子阻斷免疫抑制(通過阻斷 PD-1/PD-L1 相互作用)的能力(如通過 NFAT-luc/PD-1 Jurkat 試驗中增加的螢光素酶表達所顯示；Promega)。該評估的結果呈現在圖 16 中。測試的所有 PD-1 結合分子能夠逆轉 PD-1 免疫檢查點抑制信號，如通過增加的螢光素酶表達所顯示的。所有的 PD-1 結合分子對於 PD-1 是二價的並且展示類似的抑制 PD-1 阻斷 T 細胞信號傳導的能力。在該系統中，CTLA-4 抗體根本不抑制。

【0456】F. 基於 CTLA-4/PD-1 細胞的試驗

【0457】通過 DiscoverX，檢驗 DART D、TRIDENT A 和陰性對照抗體它們在酶-片段互補試驗中共連接 PD-1 和 CTLA-4 的能力。簡言之，一式四份將 U2OS CTLA-4(1-195)-PK PD-1(1-199)-EA 細胞系#9 的等分試樣以 5,000 細胞/孔鋪在 384 孔板上的 DiscoverX CP5 平板培養基中。使細胞在 37 °C / 5% CO₂ 附著 4 小時。接著，將每個結合分子的 11 點 1:3 稀釋系列添加至 PD-1-CTLA-4 細胞中。在 37 °C / 5% CO₂ 將平板溫育過夜(16 小時)。將 PathHunter 檢測試劑添加至孔

中，其然後在室溫在黑暗中被溫育 1 小時，接著在 Envision 光度計上讀取平板。該評估的結果呈現在表 14 和圖 17 (U2OS CTLA-4(1-195)-PK PD-1(1-199)-EA 細胞系#9)中。雙特異性 DART D 和 TRIDENT A 分子在共表達兩種受體的細胞中都顯示相當的 PD-1 和 CTLA-4 的共銜接，如通過酶-片段互補所顯示的，表明本發明的雙特異性分子能夠同時結合 PD-1 和 CTLA-4，並且進一步表明，當表達兩種受體時，通過 PD-1 的錨定補償了 TRIDENT 分子下降的 CTLA-4 親合力。該發現與上述 ELISA 抑制研究一致。陰性對照未引起 PD1-CTLA4 細胞系中信號的顯著增加。用更高濃度的 TRIDENT A 溫育在 U2OS PD1-CTLA4 二聚化細胞系(S:B=12.7)中引起強的信號增加。PD-1 – CTLA-4 細胞系中在劑量響應測試中用 DART D 應答的量級更小(S:B=9.2)但是 EC50 值對於這兩種分子類似 (EC50=20 pM)。

	陰性對照	TRIDENT A	DART D
HillSlope	~15.99	1.103	0.8095
EC50 (nM)	~6.883 x 10 ⁻¹⁰	2.123 x 10 ⁻¹¹	2.090 x 10 ⁻¹¹

【0458】評估了 DART D、TRIDENT A、CTLA-4 mAb 3 G1AA、PD-1 mAb 6 G4P 和 CTLA-4 mAb 3 G1AA/PD-1 mAb 6 G4P 的組合(Ab Combo 1)增強混合淋巴細胞反應(MLR)的應答的能力。通過用 GM-CSF (100 ng/ml)和 IL-4 (10 ng/ml)處理 CD14+單核細胞(使用 Miltenyi 陽性選擇試劑盒從 PBMC 分離)，然後培養細胞 7 天，產生單核細胞衍生的樹突細胞。在第 7 天，收穫細胞並且將其鋪到 96 孔板中，然後培養 24 小時。在第 8 天，以 200,000 細胞/孔添加 CD4+ T-細胞(使用 Myltenyi 試劑盒通過陰性選擇分離)和測試品並且培養 3 天。然後，使用用於 IFN- γ 的人 DuoSet ELIS 試劑盒(R&D Systems)，根據製造商的指導，測量培養上清液中的 IFN-g 水準。當組合使用抗體時，以指示濃度添加每種抗體，以便添加

的抗體的總濃度加倍。IFN- γ 的釋放繪圖在圖 18 中。發現兩種雙特異性 DART D 和 TRIDENT A 分子都相同程度地增強 MLR 應答，或比單獨的親本抗體的組合稍好。

【0459】在金黃色葡萄球菌腸毒素 B 型(SEB)再刺激試驗中，也評估了 DART D、TRIDENT A、CTLA-4 mAb 3 G1AA、PD-1 mAb 6 G4P 和 CTLA-4 mAb 1/PD-1 mAb 1 的組合(Ab Combo 1)通過檢查點抑制增強細胞因數釋放的能力。一般而言，從健康的供體的全血純化 PBMC (例如，根據製造商的指導，使用 Ficoll-Paque Plus 密度梯度離心方法(GE Healthcare))。在 T-25 大燒瓶中的 RPMI-培養基+ 10% 熱失活的 FBS + 1%青黴素/鏈黴素中，單獨地或與 0.5 ng/mL(初次刺激)的 SEB (例如，Sigma-Aldrich)一起，培養純化的 PBMC，達 2-3 天。在第一輪 SEB-刺激結束時，用 PBS 洗滌 PBMC 兩次並且立即在 96 孔組織培養板中以 $1-5 \times 10^5$ 細胞/孔的濃度鋪平板，僅在培養基中、在具有對照或測試品的培養基中、在具有 0.5 ng/mL 的 SEB(二次刺激)並且沒有抗體的培養基中，或在具有 SEB 和對照 IgG 或測試品的培養基中，並且培養另外的 2-3 天。在二次刺激結束時，收穫上清液，以測量細胞因數分泌(例如，根據製造商的指導，使用針對 IFN γ 、IL-2、TNF α 、IL-10 和 IL-4 的人 DuoSet ELIS 試劑盒 (R&D Systems))。

【0460】圖 19A-19B 顯示了在不存在(圖 19A)或存在(圖 19B) SEB 刺激的情況下，通過這類 PBMC 的 PD-1 vs. CTLA-1 的表達的螢光-啟動細胞分選(FACS)點圖。圖 19C 顯示了 SEB 刺激對 IFN- γ 分泌的作用。用 0.5 ng/ml 的金黃色葡萄球菌腸毒素 B 型(SEB) 刺激 PBMC 48 小時。接著，收穫細胞、洗滌並且與各種濃度的抗體和新鮮 SEB 重新鋪在 96 孔平板中，達另外的 48 小時。然後，收穫上清液，並且通過流式細胞術 ELISA 分析 IFN- γ 產生。兩種雙特異性 DART 和 TRIDENT 蛋白顯示 IFN- γ 應答的增加，這概括了用單獨親本 mAb 的組合觀察到的應答。在 SEB 刺激試驗中看到了類似的結果，其中 PBMC 用高濃度(500 ng/mL)

的 SEB 培養 72 小時。為了進一步研究 PD1 x CTLA-4 雙特異性分子對 T-細胞應答的影響，用 0.5 ng/ml SEB 的刺激 PBMC 48 小時、收穫、洗滌、並且與新鮮 SEB 和 DART D、TRIDENT A、CTLA-4 mAb 3 G1AA、PD-1 mAb 6 G4P 或 CTLA-4 mAb 3 G1AA / PD-1 mAb 6 G4P 的組合(Ab Combo 1)任意之一一起在 96 孔板中重新鋪板，達另外的 48 小時，然後測量釋放的 IL-2 (圖 19D)。圖 19A-19D 顯示了 PD1 x CTLA-4 雙特異性分子的施用明顯增強了 T-細胞應答。當組合使用抗體時，以指示的濃度添加每種抗體，從而抗體的總濃度加倍。

【0461】實施例 6

【0462】體內研究

【0463】A. PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在 GVHD 鼠科模型中的活性

【0464】在移植物抗宿主疾病(GVHD)的 PBMC 移植的 NOG 鼠科模型中評估代表性 PD1 x CTLA-4 雙特異性二價分子 DART D 的活性。研究方案呈現在表 15 中。

組	N/性別	處理	劑量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	路徑/方案	細胞植入
1.	7/F	DART D	500	IV/Q7D x 7	PBMC (IP, 1E7)
2.	7/F	DART D	50	IV/Q7D x 7	PBMC (IP, 1E7)
3.	7/F	DART D	5	IV/Q7D x 7	PBMC (IP, 1E7)
4.	7/F	媒介	0	IV/Q7D x 7	PBMC (IP, 1E7)

【0465】經 FACS 在研究的第 14 天進行 CD3+ T 細胞計數並且繪圖在圖 20A 中。在研究過程期間監測存活，並且作為存活百分數繪圖在圖 20B 中。在用 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DART D 處理的動物中看到了增加的 T 細胞擴展和加速的 GVHD，與 T 細胞免疫應答的增強一致。

【0466】 B. PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的毒理學和藥代動力學研究

【0467】 在食蟹猴中，在非 GLP (實驗室管理規範(good laboratory practice)) 給藥研究中，評估代表性 PD1 x CTLA-4 雙特異性二價分子 DART D，和代表性 PD1 x CTLA-4 雙特異性三價分子 TRIDENT A 的安全性特徵。另外，檢驗了若干標誌物藥效學活性。

【0468】 在該研究中，評估當通過多次靜脈內輸注施用時，PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的潛在毒性。研究方案呈現在**表 16** 中。

組	測試品	劑量(mg/kg)	給藥天	動物數量
1	對照	0	1、8、15	1M 1F
2	DART D	50	1、8、15	3M 3F
3	DART D	75	15、22、29	3M 3F
4	TRIDENT A	5	1	2M 1F

【0469】 因此，在 50 mg/kg 劑量和遞增至 75 mg/kg 之間，提供了 2-周間隔。在該研究中評估下述參數和端點(endpoint)：臨床症狀、體重、食品消耗、體溫、臨床病理學參數(對於組 1-3，給藥前、給藥後 23 小時的凝聚、臨床化學和血液學；對於組 4，直至(out to)第 22 天的凝聚、臨床化學和血液學)、生物分析和毒代動力學參數、流式細胞術(給藥前和給藥後 23 小時)、細胞因數(給藥後 2、6、22 小時)。對於組 4，僅僅在第 8、15 和 22 天評估抗藥物-抗體。僅僅對於組 1-3，在第三次給藥後 48 小時進行屍檢。也如下描述檢查 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的體內結合和活性。

【0470】 所有的動物均存活，直到按計劃安樂死。在接收高達 75 mg/kg/周 3 次劑量的動物中沒有不利的臨床觀察。尤其，沒有觀察到腹瀉。組織病理學也不顯著。在治療組中，觀察到了球蛋白水準的增加，並且在組 2-3 中觀察到脾和胸腺的器官重量增加(見**表 17**，組 4 未被屍檢)，如在刺激免疫系統時所預期的。

每個治療組的血清濃度-時間曲線顯示在圖 21A-21C 中，並且與食蟹猴中包括人 Fc 區分子一致。

組	測試品	劑量(mg/kg)	脾：體重	胸腺：體重
1	對照	0	0.080 (平均值，n=2)	0.035 (平均值，n=2)
2	DART D	50	0.239 (平均值，n=6)	0.088 (平均值，n=6)
3	DART D	75	0.225 (平均值，n=6)	0.084 (平均值，n=6)

【0471】已經報導了用抗 CTLA-4 抗體伊匹單抗處理後絕對淋巴細胞計數 (ALC) 的增加好像與臨床益處以及總體存活相關(見，例如，Ku, G.Y.,等 (2010) “Single-Institution Experience With Ipilimumab In Advanced Melanoma Patients In The Compassionate Use Setting: Lymphocyte Count After 2 Doses Correlates With Survival” Cancer 116(7):1767-1775)，指示 ALC 可能是有用的藥效學(PD)端點。在處理前和處理後第 2、8、9、15 和 16 天檢驗每個上述組中的 ALC 計數。通過在 CD4+/PD-1+和 CD8+/PD-1+ T 細胞群中，在針對每個猴子血液樣品的兩個條件下，測量抗人 IgG4 Alexa 488+ 事件的平均螢光強度(MFI)，測定 PD-1+ T 細胞上 DART D 或 TRIDENT A 結合位點的佔據。在一個條件下，在存在過多 DART D 或 TRIDENT A 的情況下獲得的 MFI 值用於確定每個細胞群體中 PD-1+ 細胞上最大 DART D 或 TRIDENT A 結合強度。在第二條件下，在存在過多陰性對照的情況下獲得的 MFI 值用於確定在樣品收集時在 DART D 或 TRIDENT A-處理動物中展示的每個細胞群體中 PD-1+ 細胞的結合強度。兩個條件之間的差異用於如下計算 DART D 或 TRIDENT A 處理的動物中 PD-1+ T 細胞亞集上 DART D 或 TRIDENT A 結合位點的佔據%：

$$\text{PD-1+ T 細胞亞集上 DART D 或 TRIDENT A 結合位點的佔據\%} = \left[\frac{\text{在存在過多 AFX1367 的情況下} \quad \text{抗-HuIgG4+ 事件的 MFI}}{\text{在存在過多 DART D 或 TRIDENT A 的情況下} \quad \text{抗-HuIgG4+ 事件的 MFI}} \right] \cdot 100$$

【0472】將絕對計數和歸一化至第 1 天的變化百分數繪製在圖 22A (數千細胞/ μl (th/ μl))和圖 22B (歸一化至第 1 天的 ALC 的變化百分數(D1))中。每個 DART D 處理組在處理之後隨即展示 ALC 計數的初始下降，隨後 ALC 增加至高出基線很多的水準。對於僅僅接受一個較低的劑量的 TRIDENT A 處理組，觀察到類似的趨勢。

【0473】另外，對上述組 1-3，檢驗 CD4+ T 細胞增殖和 T 細胞上的 PD-1 佔據。簡言之，通過 FACS 分析 CD3+/PD-1+ T 細胞，以評估被 DART D 結合的細胞百分數。將 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 40 微升的陰性對照分子(呼吸道合胞病毒(RSV) x 螢光素 IgG4- κ Fc DART)或測試品(DART D 或 TRIDENT A)添加至 96 深孔板。然後，將 100 微升充分混合的抗凝聚全血添加至每個孔中，使用移液管充分混合，並且在環境溫度，在黑暗中溫育 45 至 75 分鐘。然後，將 1000 微升的 1x BD FACS 裂解液添加至每個孔中，並且使用移液管混合；然後，在環境溫度，在黑暗中溫育板，達另外的 10 至 20 分鐘。然後，使板在 400 x g 離心 5 分鐘並且丟棄上清液。在每個孔中添加 1000 微升的 FACS 緩衝液並且如洗滌步驟進行混合。然後，使板在 400 x g 離心 5 分鐘並且丟棄上清液。將細胞小球用 20 微升的 Panel 1 抗體混合物再懸浮並且在環境溫度溫育 30 至 60 分鐘。如在之前的洗滌步驟中洗滌板。在溫育結束時，再次洗滌板並且最終將細胞小球再懸浮在 300 微升的 FACS 緩衝液中並且用 BD FACSCanto II 細胞分析儀分析樣品。分析的結果顯示在圖 23A-23B 中。

【0474】如圖 23A (針對以 50 mg/kg 施用的 DART D)和圖 23B (針對以 75 mg/kg 施用的 DART D)顯示，PD-1 佔據(即，被 DART D 結合)在整個針對組 2 和 3 的處理期間最大。通過 FACS 評估增殖 CD4+ T 細胞的 Ki-67(針對增殖的細胞標誌物)的共表達。

【0475】將 20 微升的抗體混合物 A (包含結合細胞表面標誌物: CD45、CD3、CD4 和 CD8 的抗體) 添加至 96 深孔板中。然後，將 50 微升充分混合的抗凝聚全血添加至每個孔中，使用移液管充分混合，並且在環境溫度，在黑暗中溫育 15 至 45 分鐘。然後，將 500 微升的 1x BD FACS 裂解液添加至每個孔中並且使用移液管混合；然後，在環境溫度，在黑暗中溫育平板，達另外的 10 至 20 分鐘。使板在 1200 rpm 離心 5 分鐘並且丟棄上清液。接著，將 500 微升的 FACS 緩衝液添加到每個孔中並且如洗滌步驟進行混合。然後，使板在 1200 rpm 離心 5 分鐘並且丟棄上清液。將細胞小球再懸浮在抗體混合物 B (包含結合細胞內標誌物，Ki 67 的抗體) 或再懸浮在 iso 抗體製劑(包含細胞內標誌物的同種型對照) 中，並且在黑暗中溫育 15 至 45 分鐘。洗滌之後，將細胞小球再懸浮在 300 微升的 FACS 緩衝液中並且用 BD FACSCanto II 細胞分析儀分析樣品。從 T 細胞細胞內染色圖，將 CD4+ 和 CD8+ 細胞的百分數確定為總 CD45+ 白細胞設門細胞的分數。計數設門 CD4+ 細胞中的 Ki 67+ 的細胞事件並且 CD4+/Ki 67+ T 細胞(增殖性 CD4 T 細胞) 的百分數被確定為總 CD4+ 細胞的分數。以類似的方式，CD8+/Ki 67+ T 細胞(增殖性 CD8 T 細胞) 的百分數被確定為總 CD8+ 細胞的分數。分析的結果顯示在圖 24A-24B 中。

【0476】如圖 24A-24B 中顯示，在整個處理期間，在處理組 2 和 3 中，CD4+ T 細胞的增殖明顯增強。該研究的結果指示，以高達 75 mg/kg 的濃度施用 PD1 x CTLA-4 雙特異性分子在食蟹猴中耐受良好。高出 5 mg/kg 劑量許多，在 5 mg/kg 劑量的情況下，對於用伊匹單抗治療的食蟹猴已經報導了不利事件。分子展示了有利的藥物代謝動力學特徵並且觀察到了許多標誌物藥效學活性，包括增加的淋巴細胞計數、增加的球蛋白水準、增加的脾和胸腺器官重量、增加的 T 細胞增殖(T 細胞計數和 Ki-67 表達二者) 和 T 細胞上最大的 PD-1 佔據。

【0477】本說明書提到的所有出版物和專利通過參考併入本文，達到如同具

體和單獨指出每個單個出版物或專利申請通過參考以其整體併入的相同程度。儘管已經結合其具體實施方式描述了本發明，但是應當理解，其能夠被進一步修改，並且本申請旨在覆蓋大體上根據本發明原理並且包括與本公開的偏離的本發明的任何變型、用途或改變，只要在本發明所屬領域的已知或習慣實踐內並且如可應用至本文之前所闡釋的本質特徵。

【符號說明】

【0478】 無



201725215

申請日: 105/12/12

IPC分類: *G07K 16/28* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

【發明摘要】

【中文發明名稱】對於PD-1和CTLA-4具有免疫反應性的雙特異性分子及其使用方法

【英文發明名稱】 Bispecific Molecules Having Immunoreactivity with PD-1 and CTLA-4, and Methods of Use Thereof

【中文】

本發明涉及雙特異性分子(例如, 雙抗體、雙特異性抗體、三價結合分子等), 其具有對於PD-1的表位免疫特異性的至少一個表位-結合位點和對於CTLA-4的表位免疫特異性的至少一個表位-結合位點(即, “PD-1 x CTLA-4雙特異性分子”)。本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子能夠同時結合PD-1和結合CTLA-4, 尤其當這類分子排列在人細胞的表面上時。本發明涉及藥物組合物, 其包含這類PD-1 x CTLA-4雙特異性分子, 並且涉及包括這類雙特異性分子在治療癌症和其他疾病和病況中的用途的方法。本發明也涉及使用這類PD-1 x CTLA-4雙特異性分子刺激免疫應答的方法。

【英文】

The present invention is directed to bispecific molecules (e.g., diabodies, bispecific antibodies, trivalent binding molecules, etc.) that possess at least one epitope-binding site that is immunospecific for an epitope of PD-1 and at least one epitope-binding site that is immunospecific for an epitope of CTLA-4 (i.e., a “PD-1 x CTLA-4 bispecific molecule”). The PD-1 x CTLA-4 bispecific molecules of the present invention are

capable of simultaneously binding to PD-1 and to CTLA-4, particularly as such molecules are arrayed on the surfaces of human cells. The invention is directed to pharmaceutical compositions that contain such PD-1 x CTLA-4 bispecific molecules, and to methods involving the use of such bispecific molecules in the treatment of cancer and other diseases and conditions. The present invention also pertains to methods of using such PD-1 x CTLA-4 bispecific molecules to stimulate an immune response.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種雙特異性分子，其具有能夠免疫特異性結合至 PD-1 的表位(一個或多個)的一個或多個表位-結合位點和能夠免疫特異性結合至 CTLA-4的表位(一個或多個)的一個或多個表位-結合位點，其中所述分子包括：

(A)結合 PD-1 的抗體的重鏈可變結構域和輕鏈可變結構域；和

(B)結合 CTLA-4 的抗體的重鏈可變結構域和輕鏈可變結構域；

其中所述分子是：

(i)雙抗體，所述雙抗體是共價結合的包括兩條、三條、四條或五條多肽鏈的複合物；或

(ii)三價結合分子，所述三價結合分子是共價結合的包括三條、四條、五條或更多條多肽鏈的複合物。

【第2項】 如請求項 1 所述的雙特異性分子，其中相對於兩個單特異性分子展示的這類活性，所述分子展示增強的活性，所述兩個單特異性分子中的一個具有結合 PD-1 的所述抗體的所述重鏈可變結構域和所述輕鏈可變結構域和其中另一個具有結合 CTLA-4 的所述抗體的所述重鏈可變結構域和所述輕鏈可變結構域。

【第3項】 如請求項 1 或 2 所述的雙特異性分子，其中相對於通過施用結合 CTLA-4 的單特異性抗體引起的這類 irAE，所述分子當施用至需要其的受試者時引起更少的免疫相關的不利事件(irAE)。

【第4項】 如請求項 1 至 3 中任一項所述的雙特異性分子，其中所述分子包括 Fc 區。

【第5項】 如請求項 4 所述的雙特異性分子，其中所述 Fc 區是變異的 Fc 區，其包括：

(A)降低所述變異的 Fc 區對 Fc γ R 的親和力的一個或多個氨基酸修飾；和/或

(B)延長所述變異的 Fc 區的血清半衰期的一個或多個氨基酸修飾。

【第6項】 如請求項 5 所述的雙特異性分子，其中降低變異的 Fc 區對 FcγR 的親和力的所述修飾包括下述的取代：L234A；L235A；或 L234A 和 L235A，其中所述編號是如 Kabat 中的 EU 索引中的編號。

【第7項】 如請求項 5 或 6 所述的雙特異性分子，其中延長變異的 Fc 區的血清半衰期的所述修飾包括下述的取代：M252Y；M252Y 和 S254T；M252Y 和 T256E；M252Y、S254T 和 T256E；或 K288D 和 H435K，其中所述編號是如 Kabat 中的 EU 索引中的編號。

【第8項】 如請求項 1 至 7 中任一項所述的雙特異性分子，其中所述分子是所述雙抗體並且包括能夠免疫特異性結合至 PD-1 的表位的兩個表位-結合位點和能夠免疫特異性結合至 CTLA-4 的表位的兩個表位-結合位點。

【第9項】 如請求項 1 至 7 中任一項所述的雙特異性分子，其中所述分子是所述三價結合分子並且包括能夠免疫特異性結合至 PD-1 的表位的兩個表位-結合位點和能夠免疫特異性結合至 CTLA-4 的表位的一個表位-結合位點。

【第10項】 如請求項 1 至 9 中任一項所述的雙特異性分子，其中所述分子能夠結合至存在於細胞表面上的 PD-1 和 CTLA-4 分子。

【第11項】 如請求項 1 至 10 中任一項所述的雙特異性分子，其中所述分子能夠同時結合 PD-1 和 CTLA-4。

【第12項】 如請求項 1 至 11 中任一項所述的雙特異性分子，其中所述分子促進免疫細胞的刺激。

【第13項】 如請求項 12 所述的雙特異性分子，其中所述免疫細胞的刺激導致：

(A)免疫細胞增殖；和/或

(B)免疫細胞產生和/或釋放至少一種細胞因數；和/或

(C)免疫細胞產生和/或釋放至少一種裂解分子；和/或

(D)至少一種啟動標誌物的免疫細胞表達。

【第14項】 如請求項 12 或 13 所述的雙特異性分子，其中所述免疫細胞是 T-淋巴細胞或 NK-細胞。

【第15項】 如請求項 1 至 14 中任一項所述的雙特異性分子，其中能夠免疫特異性結合至 PD-1 的表位的所述表位-結合位點包括：

(A) PD-1 mAb 1 的 VH 結構域(SEQ ID NO:47)和 PD-1 mAb 1 的 VL 結構域(SEQ ID NO:48)；或

(B) PD-1 mAb 2 的 VH 結構域(SEQ ID NO:49)和 PD-1 mAb 2 的 VL 結構域(SEQ ID NO:50)；或

(C) PD-1 mAb 3 的 VH 結構域(SEQ ID NO:51)和 PD-1 mAb 3 的 VL 結構域(SEQ ID NO:52)；或

(D) PD-1 mAb 4 的 VH 結構域(SEQ ID NO:53)和 PD-1 mAb 4 的 VL 結構域(SEQ ID NO:54)；或

(E) PD-1 mAb 5 的 VH 結構域(SEQ ID NO:55)和 PD-1 mAb 5 的 VL 結構域(SEQ ID NO:56)；或

(F) PD-1 mAb 6 的 VH 結構域(SEQ ID NO:57)和 PD-1 mAb 6 的 VL 結構域(SEQ ID NO:58)；或

(G) PD-1 mAb 6-I VH 的 VH 結構域(SEQ ID NO:86)和 PD-1 mAb 6-SQ VL 的 VL 結構域(SEQ ID NO:87)；或

(H) PD-1 mAb 7 的 VH 結構域(SEQ ID NO:59)和 PD-1 mAb 7 的 VL 結構域(SEQ ID NO:60)；或

(I) PD-1 mAb 8 的 VH 結構域(SEQ ID NO:61)和 PD-1 mAb 8 的 VL 結構域(SEQ ID NO:62)。

【第16項】 如請求項 1 至 15 中任一項所述的雙特異性分子，其中能夠免疫特異性結合至 CTLA-4 的表位的所述表位-結合位點包括：

(A) CTLA-4 mAb 1 的 VH 結構域(SEQ ID NO:76)和 CTLA-4 mAb 1 的 VL 結構域(SEQ ID NO:77)；或

(B) CTLA-4 mAb 2 的 VH 結構域(SEQ ID NO:78)和 CTLA-4 mAb 2 的 VL 結構域(SEQ ID NO:79)；或

(C) CTLA-4 mAb 3 的 VH 結構域(SEQ ID NO:90)和 CTLA-4 mAb 3 的 VL 結構域(SEQ ID NO:91)。

【第17項】 如請求項 16 所述的雙特異性分子，其中：

(A)能夠免疫特異性結合至 PD-1 的表位的所述表位-結合位點包括 PD-1 mAb 6-I VH 的 VH 結構域(SEQ ID NO:86)和 PD-1 mAb 6-SQ 的 VL 結構域(SEQ ID NO:87)；
和

(B)能夠免疫特異性結合至 CTLA-4 的表位的所述表位-結合位點包括 CTLA-4 mAb 3 的 VH 結構域(SEQ ID NO:90)和 CTLA-4 mAb 3 的 VL 結構域(SEQ ID NO:91)。

【第18項】 如請求項 1 至 17 中任一項所述的雙特異性分子，其中所述分子包括：

(A)具有 SEQ ID NO:95 的兩條多肽鏈和具有 SEQ ID NO:96 的兩條多肽鏈；或

(B)具有 SEQ ID NO:97 的兩條多肽鏈和具有 SEQ ID NO:98 的兩條多肽鏈；或

(C)具有 SEQ ID NO:99 的兩條多肽鏈和具有 SEQ ID NO:100 的兩條多肽鏈；或

(D)具有 SEQ ID NO:102 的兩條多肽鏈和具有 SEQ ID NO:103 的兩條多肽鏈；或

(E)具有 SEQ ID NO:101 的兩條多肽鏈和具有 SEQ ID NO:100 的兩條多肽鏈；或

(F)具有 SEQ ID NO:104 的一條多肽鏈、具有 SEQ ID NO:105 的一條多肽鏈、具有 SEQ ID NO:106 的一條多肽鏈和具有 SEQ ID NO:107 的一條多肽鏈；或

(G)具有 SEQ ID NO:108 的一條多肽鏈、具有 SEQ ID NO:105 的一條多肽鏈、具有

SEQ ID NO:109 的一條多肽鏈和具有 SEQ ID NO:107 的一條多肽鏈。

【第19項】 如一種藥物組合物，其包括有效量的請求項 1-18 中任一項所述的雙特異性分子和藥學上可接受的載體。

【第20項】 如請求項 1 至 18 中任一項所述的雙特異性分子，其中所述分子用於促進刺激需要其的受試者的免疫介導的應答。

【第21項】 如請求項 1 至 18 中任一項所述的雙特異性分子，其中所述分子用於治療與受抑制的免疫系統相關的疾病或病況。

【第22項】 如請求項 21 所述的雙特異性分子，其中所述疾病或病況是癌症或感染。

【第23項】 如請求項 22 所述的雙特異性分子，其中所述癌症特徵在於存在選自下述的細胞的癌症細胞：腎上腺腫瘤、AIDS 相關的癌症、軟組織腺泡狀肉瘤、星形細胞瘤、膀胱癌、骨癌、腦和脊髓癌、轉移性腦瘤、乳腺癌、頸動脈體瘤、宮頸癌、軟骨肉瘤、脊索瘤、嫌色細胞腎細胞癌、透明細胞癌、結腸癌、結直腸癌、皮膚良性纖維組織細胞瘤、促結締組織增生小圓細胞瘤、室管膜細胞瘤、尤文氏瘤、骨外粘液樣軟骨肉瘤、不完全性骨纖維生成、骨的纖維發育異常、膽囊癌或膽管癌、胃癌、妊娠滋養層疾病、生殖細胞瘤、頭頸癌、肝細胞癌、胰島細胞腫瘤、卡波西氏肉瘤、腎癌、白血病、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/惡性的脂肪瘤、肝癌、淋巴瘤、肺癌、成神經管細胞瘤、黑素瘤、腦膜瘤、多發性內分泌瘤、多發性骨髓瘤、骨髓增生異常綜合征、成神經細胞瘤、神經內分泌腫瘤、卵巢癌、胰腺癌、甲狀腺乳頭狀癌、甲狀旁腺瘤、兒科癌症、周圍神經鞘瘤、嗜鉻細胞瘤、垂體瘤、前列腺癌、眼色素層後黑素瘤、罕見血液學疾病、腎轉移癌症、橫紋肌樣瘤、橫紋肌肉瘤、肉瘤、皮膚癌、軟組織肉瘤、鱗狀細胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睪丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲狀腺轉移癌和子宮癌。

【第24項】 如請求項 22 所述的雙特異性分子，其中所述感染特徵在於存在

細菌、真菌、病毒或原生動物病原體。

