(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110214152 B
(45)授权公告日 2025.06.13

(21)申请号 201780067582.7

(22)申请日 2017.10.16

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110214152 A

(43)申请公布日 2019.09.06

(30)优先权数据
62/408,271 2016.10.14 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.04.29

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/056814 2017.10.16

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/071913 EN 2018.04.19

(73)专利权人 丹娜法伯癌症研究所公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 韦恩·A·马拉斯科

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限责任公司 11240
专利代理师 陈知宇

(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C07K 16/46(2006.01)

(56)对比文件
WO 2013096346 A1,2013.06.27
US 7943740 B2,2011.05.17
US 8084026 B2,2011.12.27
US 2009028859 A1,2009.01.29
CA 3099509 A1,2013.01.10
CN 105492463 A,2016.04.13
WO 2015187835 A2,2015.12.10
Kristian M.Müller et al.,."A dimeric bispecific miniantibody combines two specificities with avidity".《FEBS Letters》.1998,第432卷(第1-2期),第45-49页.
Kristian M. Müller et al.,."A dimeric bispecific miniantibody combines two specificities with avidity".《FEBS Letters》.1998,第432卷(第1-2期),图1和第47页左栏第1段.

审查员 汪豪杰

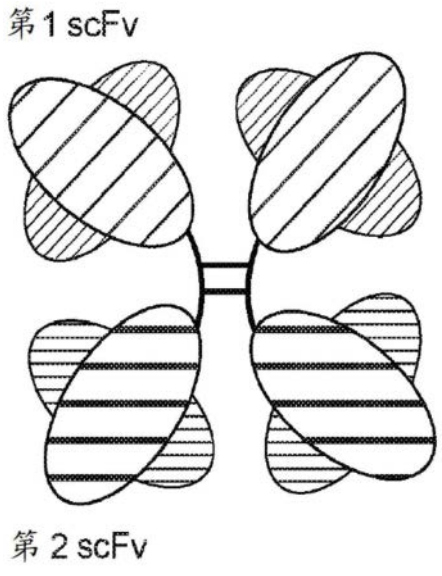
权利要求书2页 说明书49页
序列表（电子公布） 附图38页

(54)发明名称

模块化四聚体双特异性抗体平台

(57)摘要

本发明涉及一种四聚体双特异性抗体分子以及用于产生所述四聚体双特异性抗体分子的方法、所述四聚体双特异性抗体分子的用途和编码所述四聚体双特异性抗体分子的核酸分子。



CN 110214152 B

1.一种四价抗体分子,其中所述四价抗体分子是双特异性scFv片段的二聚体,其中,所述双特异性scFv片段包含针对第一抗原的第一结合位点、针对第二抗原的第二结合位点和接头-铰链-接头结构域,其中所述第一结合位点和所述第二结合位点经由所述接头-铰链-接头结构域连接在一起,其中,所述第一结合位点包含针对GITR特异的抗体或抗体片段,所述第二结合位点包含针对PD-L1特异的抗体或抗体片段,其中,所述接头-铰链-接头结构域由在两个末端均侧接接头氨基酸序列的根据SEQ ID NO : 1902的免疫球蛋白铰链区氨基酸序列组成,其中,所述接头氨基酸序列独立地包含氨基酸序列$(GGGS)_1$、$(GGGS)_4$或$(GGGS)_6$,并且其中,所述四价抗体分子不包含抗体恒定区或其部分;其中

所述针对GITR特异的抗体或抗体片段是具有SEQ ID NO: 1378的VH氨基酸序列和SEQ ID NO: 1380的VL氨基酸序列的序列;

所述针对PD-L1特异的抗体或抗体片段是具有SEQ ID NO: 1510的VH氨基酸序列和SEQ ID NO: 1512的VL氨基酸序列的序列。

2.如权利要求1所述的四价抗体分子,其中所述scFv片段是串联scFv。

3.一种用于获得根据权利要求1至2中任一项所述的四价抗体分子的核酸构建体,其包含编码以下的核酸分子:

可特异性地结合至第一抗原的抗体的轻链可变区和重链可变区,其中,所述第一抗原包括GITR,其中所述轻链可变区具有SEQ ID NO: 1380的VL氨基酸序列,所述重链可变区具有SEQ ID NO: 1378的VH氨基酸序列;

可特异性地结合至第二抗原的抗体的轻链可变区和重链可变区,其中,所述第二抗原包括PD-L1,其中所述轻链可变区具有SEQ ID NO: 1512的VL氨基酸序列,所述重链可变区具有SEQ ID NO: 1510的VH氨基酸序列;以及

接头-铰链-接头结构域,其中,所述接头-铰链-接头结构域由在两个末端均侧接接头氨基酸序列的根据SEQ ID NO : 1902的免疫球蛋白铰链区氨基酸序列组成,其中,所述接头氨基酸序列独立地包含氨基酸序列$(GGGS)_1$、$(GGGS)_4$或$(GGGS)_6$,并且其中,所述四价抗体分子不包含抗体恒定区或其部分。

4.一种载体,其包含如权利要求3所述的核酸构建体。

5.一种宿主细胞,其包含如权利要求4所述的载体。

6.如权利要求5所述的宿主细胞,其中所述细胞是T细胞、B细胞、或NK细胞。

7.如权利要求6所述的宿主细胞,其中所述T细胞是滤泡性T细胞。

8.一种嵌合抗原受体,所述嵌合抗原受体包含细胞内信号传导结构域、跨膜结构域和细胞外结构域,所述细胞外结构域包含如权利要求1所述的四价抗体分子。

9.如权利要求8所述的嵌合抗原受体,其中所述跨膜结构域还包含位于所述细胞外结构域与所述跨膜结构域之间的茎区。

10.如权利要求8所述的嵌合抗原受体,其中所述跨膜结构域包含CD28。

11.如权利要求8所述的嵌合抗原受体,其还包含位于所述跨膜结构域与所述细胞内信号传导结构域之间的一种或多种另外的共刺激分子。

12.如权利要求11所述的嵌合抗原受体,其中所述共刺激分子是CD28、4-1BB、ICOS或OX40。

13.如权利要求8所述的嵌合抗原受体,其中所述细胞内信号传导结构域包含CD3ζ链。

14.一种遗传工程化的细胞,其在细胞表面膜上表达并携带如权利要求8-13中任一项所述的嵌合抗原受体。

15.如权利要求14所述的遗传工程化的细胞,其中所述细胞是T细胞或NK细胞。

16.如权利要求15所述的遗传工程化的细胞,其中所述T细胞是CD4+或CD8+。

17.如权利要求16所述的遗传工程化的细胞,其包含CD4+和CD8+细胞的混合群体。

18.如权利要求1至2中任一项所述的四价抗体分子在制备用于治疗疾病或病症的药物中的应用,所述疾病或病症选自成胶质细胞瘤(GBM)、肌萎缩性侧索硬化、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病和亨廷顿氏病。

19.如权利要求18所述的应用,其中所述四价抗体分子识别CNS转运受体和/或由CNS转运受体结合。

20.如权利要求19所述的应用,其中所述CNS转运受体是转铁蛋白受体(TfR)、VCAM-1、CD98hc或胰岛素受体。

21.如权利要求18所述的应用,其中所述四价抗体分子增强跨血脑屏障的转运。

模块化四聚体双特异性抗体平台

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2016年10月14日提交的U.S.S.N.62/408,271的权益和优先权,其内容特此以引用的方式整体并入。

发明领域

[0003] 本发明总体上涉及四聚体双特异性抗体分子、产生所述四聚体双特异性抗体分子的方法和系统。

[0004] 政府权益

[0005] 本发明是在政府支持下根据授予的进行。政府享有本发明的某些权利。

[0006] 发明背景

[0007] 双特异性抗体(BsAb)是具有两种不同结合特异性的抗体或抗体样分子。BsAb在生物医学中,特别是在肿瘤的免疫疗法中具有广泛应用。目前,免疫疗法研究的重点是如何利用BsAb的细胞介导的细胞毒性来杀死肿瘤细胞。BsAb可以被设计为同时靶向肿瘤细胞和效应细胞,同时触发效应细胞对肿瘤细胞的破坏。

[0008] BsAb可以通过诸如化学工程化、细胞工程化和遗传工程化的方法来制备。遗传工程化的一个优点是可以容易地修饰抗体,这使得设计和产生许多不同形式的双特异性抗体片段,包括双抗体、串联ScFv和单链双抗体以及其衍生物。由于那些BsAb不具有IgG Fc结构域,所以它们的小尺寸增强它们渗透到肿瘤中,但它们在体内具有显著更短的半衰期并且还缺乏与抗体的恒定区相关的ADCC效应。

[0009] 为了改进稳定性和治疗潜力,在重链中进行重组遗传修饰以促进其异二聚化并产生含Fc的IgG样双特异性抗体的更高产率。已经使用若干合理的设计策略来工程化用于异二聚化的抗体CH3链,即二硫键、盐桥、钮入孔(knobs-into-holes)。用于在并置位置中产生钮和孔的基础是钮和孔相互作用将有利于异二聚体形成,而钮-钮和孔-孔相互作用将阻止由于有利的相互作用的缺失所致的同二聚体形成。虽然这种钮入孔方法解决了重链同二聚化问题,但它未解决关于来自两种不同抗体的轻链与重链之间的错配的问题。尽管有可能鉴定两种不同抗体的相同轻链,但使用可共享共同轻链的两种抗体序列进行BsAb构建的可能性非常有限。

[0010] 需要提供更易于制备、具有更好的临床稳定性和功效和/或降低的全身毒性的更好BsAb。

发明内容

[0011] 本发明提供了更易于制备、具有更好的临床稳定性和功效和/或降低的全身毒性的tBsAb。

[0012] 本发明的一个方面涉及一种四价抗体分子。所述四价抗体可以是双特异性scFv片段的二聚体,所述scFv片段包含针对第一抗原的第一结合位点、针对第二抗原的第二结合位点。所述两个结合位点可经由接头结构域连接在一起。在实施方案中,所述scFv片段是串

联scFv,所述接头结构域包含免疫球蛋白铰链区(例如,IgG1、IgG2、IgG3和IgG4铰链区)氨基酸序列。在实施方案中,所述免疫球蛋白铰链区氨基酸序列可侧接柔性接头氨基酸序列,例如具有氨基酸序列$(GGGS)_{X1-6}$、$(GGGGS)_{X1-6}$和GSAGSAAGSGEF。在实施方案中,所述接头结构域包含免疫球蛋白Fc结构域的至少一部分,例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4 Fc结构域。该免疫球蛋白Fc结构域的至少一部分可以是CH2结构域。该Fc结构域可与免疫球蛋白铰链区(例如,IgG1、IgG2、IgG3和IgG4铰链区)氨基酸序列的C-末端连接。所述接头结构域可在一个末端或在两个末端包含柔性接头氨基酸序列(例如,$((GGGS)_{X1-6}$、$(GGGGS)_{X1-6}$和GSAGSAAGSGEF)。

[0013] 另一方面,本发明涉及核酸构建体。所述构建体可包含编码以下的核酸分子:可特异性地结合至第一抗原的抗体的轻链可变区和重链可变区;可特异性地结合至第二抗原的抗体的轻链可变区和重链可变区;以及接头结构域。在实施方案中,所述接头结构域是免疫球蛋白铰链区(例如,IgG1、IgG2、IgG3和IgG4铰链区)氨基酸序列。在实施方案中,所述接头结构域是免疫球蛋白Fc结构域的至少一部分,例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4Fc结构域。该免疫球蛋白Fc结构域的至少一部分可以是CH2结构域。该Fc结构域可与免疫球蛋白铰链区(例如,IgG1、IgG2、IgG3和IgG4铰链区)氨基酸序列的C-末端连接。所述接头结构域可在一个末端或在两个末端包含柔性接头氨基酸序列(例如,(GGGS)X1-6、(GGGGS)X1-6和GSAGSAAGSGEF)。

[0014] 本发明的另一方面是一种载体,所述载体包含上述方面的核酸构建体。

[0015] 本发明的另一方面是一种宿主细胞(例如,T细胞、B细胞、滤泡性T细胞和NK细胞),所述宿主细胞包含上述方面的载体。

[0016] 本发明的一个方面是一种嵌合抗原受体(CAR)。所述CAR可包含细胞内信号传导结构域、跨膜结构域和细胞外结构域,所述细胞外结构域包含任何上述方面或实施方案的四价抗体分子。在实施方案中,所述跨膜结构域还包含位于所述细胞外结构域与所述跨膜结构域之间的茎区和/或所述跨膜结构域包含CD28。在实施方案中,所述CAR还包含位于所述跨膜结构域与所述细胞内信号传导结构域(例如,CD3ζ链)之间的一种或多种另外的共刺激分子(例如,CD28、4-1BB、ICOS和OX40)。

[0017] 本发明的另一方面是一种遗传工程化的细胞。所述遗传工程化的细胞可在其细胞表面膜上表达并携带上述方面或实施方案的嵌合抗原受体。在实施方案中,所述细胞是T细胞(例如,CD4+和/或CD8+)或NK细胞。所述细胞可包含CD4+和CD8+细胞的混合群体。

[0018] 本发明的一个方面是用于治疗疾病或病症的方法。所述方法可包括施用上述方面或实施方案的四价抗体分子。在实施方案中,所述疾病或病症是CNS相关疾病或病症,例如CNS癌症或神经退行性疾病。所述CNS癌症可以是成胶质细胞瘤(GBM)。所述神经退行性疾病可以是肌萎缩性侧索硬化、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病或亨廷顿氏病。在实施方案中,所述四价抗体分子识别CNS转运受体和/或由CNS转运受体结合,所述CNS转运受体例如转铁蛋白受体(TfR)、VCAM-1、CD98hc和胰岛素受体。在这一方面和任何上述方面或实施方案中,所述四价抗体分子增强跨血脑屏障的转运。

[0019] 任何上述方面和实施方案可与任何其它方面或实施方案组合。

[0020] 除非另外定义,否则本文中所用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。尽管可在本发明的实践中使用与本文所述的那些

方法和材料类似或等效的方法和材料,但是下文描述了合适的方法和材料。本文提及的所有公布、专利申请、专利以及其他参考文献明确地以引用的方式整体并入。在冲突的情况下,以包括定义在内的本说明书为准。此外,本文所述的材料、方法和实施例仅是说明性的,并且不意图具有限制性。

[0021] 本发明的其它特征和优点将由以下详细描述显而易见并涵盖。

附图说明

[0022] 图1是示出四聚体双特异性抗体(tBsAb)的设计和形成的说明。

[0023] 图2是pcDNA3.1\1scFv-铰链-scFv表达载体的示意性图示。

[0024] 图3A是示出使用NotI和BsiWI消化且然后插入表达四聚体的载体中的合成四聚体接头的SDS凝胶。图3B是示出根据本发明的tBsAb的纯化的SDS凝胶。

[0025] 图4A是示出用于检测tBsAb的抗体结合亲和力的方法的说明。图4B至图4C是示出当将板用CCR4-Fc(B)或用PD-L1-Fc(C)包被且然后与四价双特异性(抗CCR4和抗PD-L1)和对照抗体一起孵育时的数据的图。结果示出这种四价抗体可以剂量依赖性方式结合至CCR4-Fc和PD-L1-Fc两者。

[0026] 图5是示出抗CAIX-PD-L1双特异性mAb结合至CAIX-Fc融合蛋白的图。

[0027] 图6是示出抗CAIX-PD-L1双特异性mAb结合至PD-L1-Fc融合蛋白的图。

[0028] 图7A是接头长度可以改变以优化双特异性mAb结合的方式的说明。图7B是tBsAb序列的示意图。

[0029] 图8A.αGITR-αPD-L1 tBsAb接合。所述tBsAb结合至T细胞上的GITR蛋白和肿瘤细胞上的PD-L1蛋白。B.通过铰链区的半胱氨酸残基之间的链间二硫键形成实现的tBsAb形式的示意性图示。

[0030] 图9A.连接以形成tBsAb的两个scFv的基本结构。图9B.针对GITR和PD-L1的双特异性二聚体taFv。每个V_H和V_L对通过15个残基的接头连接以形成scFv。两个scFv通过接头-铰链-接头(55个残基)连接。所述铰链区具有两个半胱氨酸残基,从而允许两个taFv在氧化条件下通过二硫桥配对。

[0031] 图10A.串联scFv的基本结构。图10B.具有额外CH2结构域的针对GITR和PD-L1的三功能tBsAb。每个V_H和V_L对通过15个残基的接头连接。两个scFv通过接头-铰链-CH2-接头结构域连接。所述铰链区具有两个半胱氨酸残基,从而允许两个串联scFv在氧化条件下通过二硫桥配对。CH2结构域的N-末端可结合Fc-γ或C1q。所得形式是三功能tBsAb。

[0032] 图11αGITR-αPD-L1 tBsAb的作用机制。图11A.肿瘤细胞过表达PD-L1蛋白。PD-1/PD-L1相互作用抑制有效的T细胞活化并促进免疫遏制和适应性免疫抗性。图11B.αGITR-αPD-L1 tBsAb可增强免疫应答。αPD-L1臂阻断PD-1/PD-L1途径,并且因此可抑制T细胞耗竭并消除T reg抑制。αGITR臂充当共刺激物GITR受体的激动剂,从而导致GITR表达的上调,增强T细胞活化和增殖。

[0033] 图12αGITR-αPD-L1克隆过程的示意性图示。用SfiI和NotI限制酶消化供体载体和pcDNA 3.4表达载体。将V_HGITR-V_LGITR基因分离且随后彼此连接。最终质粒产生αGITR-αPD-L1克隆。

[0034] 图13对照质粒(1)克隆过程的示意性图示。用SfiI和NotI限制酶消化pcDNA3.1载

体和表达载体pcDNA 3.4。将V_HF10-V_LF10基因分离且随后连接至pcDNA 3.4表达载体。最终质粒产生αGITR-αPD-L1克隆。

[0035] 图14对照质粒(2)和(3)克隆过程的示意性图示。将分离的F10V_H和V_L DNA和接受者载体pcDNA 3.4用BsiWI和BamHI限制酶消化且随后彼此连接。最终质粒产生最终的αGITR1-αPD-L1和αGITR10-aPD-L1克隆。

[0036] 图15用于具有CH2的αGITR-αPD-L1构建体的克隆策略的示意性图示。通过定点诱变将HindIII限制位点引入pcDNA 3.4表达载体中。随后使分离的CH2片段和表达载体消化并彼此连接,以完成构建体具有CH2的αGITR-αPD-L1。

[0037] 图16接受者pcDNA 3.4载体、六种V_HGITR-V_LGITR插入物和一种V_HF10-V_LF10插入物的限制酶分析(REA)。示出在TAE缓冲液中电泳的DNA的溴化乙锭染色的1%琼脂糖凝胶。用SfiI和NotI限制酶消化所有质粒。泳道1:示出7.5kb消化的接受者pcDNA 3.4载体。500与1000bp之间的下部条带是先前使用的scFv插入物(来自Marasco实验室)。泳道2-6:下部条带代表800bp V_HGITR-接头-V_LGITR插入物。聚集在8kb处的较大条带是双重消化的后代载体。泳道7:800bp V_HF10-接头-V_LF10插入物在500与1000bp之间聚集的下部条带中可视化。泳道“bp”代表1kb DNA梯形条带(NEB)。

[0038] 图17V_HF10-接头-V_LF10cDNA和接受者pcDNA 3.4表达(分别含有V_HGITR1-V_LGITR1或V_HGITR10-V_LGITR10)的REA。示出在TAE缓冲液中电泳的DNA的溴化乙锭染色的1%琼脂糖凝胶。用BsiWI和BamHI限制酶消化接受者表达载体和插入物。泳道:示出聚集在800bp处的单一条带,其代表通过PCR分离的V_HF10-接头-V_LF10(scFv)。泳道2和3:上部两个条带可视化含有V_HGITR1-V_LGITR1(泳道2)和V_HGITR10-V_LGITR10(泳道3)的pcDNA3.4表达载体。两者均包含7500bp,并且可在正确梯形条带水平下检测到。聚集在500与1000bp之间的泳道2和3中的下部条带代表从其载体分离的消化的V_HPD-L1-V_LPD-L1片段。泳道“bp”对应于1kb DNA梯形条带(NEB)。

[0039] 图18通过SDS-PAGE分析纯化的tBsAb。示出在MES缓冲液中电泳的蛋白质的考马斯蓝染色的SDS凝胶。将3-5μg蛋白质样品在(A)还原和(B)非还原条件下负载于凝胶上并分离。泳道1-8:在非还原条件下,SDS PAGE揭示每种蛋白质的两个主要条带。较高条带具有在80kDa与115kDa之间的表观分子量,并且较低分子量条带在70与80kDa之间。在非还原SDS-凝胶分析中,可观察到一些弱但高分子量条带(>180kDa)。在还原条件下(10%DTT;70 10分钟)的SDS-凝胶分析仅展示表观分子量在70与80kDa之间的一个条带。泳道9:在非还原条件下,显示表观分子量略高于140kDa的单一条带。在还原条件下两个条带的可视化强调了展示分离的重链和轻链(50kDa和25kDa)的αGITR IgG的正确表达。泳道kDa代表在相应条件下(在MES缓冲液中4%-12%凝胶浓度运行)的基准预染色的蛋白质梯形条带(Invitrogen)。

[0040] 图19针对被动固定化的PD-L1抗原测试的αGITR-αPD-L1 tBsAb、F10-αPD-L1 tBsAb和αPD-L1 mAb的ELISA吸光度值。将每种αGITR-αPD-L1的浓度范围(0.0001mg/mL-1mg/mL;横轴)在PD-L1抗原上进行ELISA。结果显示450nm处吸光度的平均值和标准偏差(纵轴)。每种样品在每种浓度下一式三份运行。通过从添加一级抗体的孔中减去在一级抗体不存在下孵育的孔的平均信号来校正原始信号强度的本底信号。

[0041] 图20测试针对用丙酮-甲醇固定的表达GITR+的CF2细胞的αGITR1-αPD-L1和αGITR10-αPD-L1抗体结合的基于细胞的ELISA。F10-αPD-L1抗体代表阴性对照。使用从

3.3mg/mL至0.0046mg/mL范围内的一系列1:3稀释液测试所有抗体。针对每孔1000个GITR+CF2细胞测试所有抗体。每个条表示从一式三份样品获得的平均值(由条表示的偏差)。通过从添加一级抗体的孔中减去在一级抗体不存在下孵育的孔的平均信号来校正原始信号强度的本底信号。

[0042] 图21测试针对用8％多聚甲醛固定的表达GITR+的CF2细胞的αGITR1-αPD-L1和αGITR10-αPD-L1抗体结合的基于细胞的ELISA。F10-αPD-L1抗体代表阴性对照。使用从3.3mg/mL至0.0046mg/mL范围内的一系列1:3稀释液测试所有抗体。针对每孔1000个GITR+CF2细胞测试所有抗体。每个条表示从一式三份样品获得的平均值(由条表示的偏差)。通过从添加一级抗体的孔中减去在一级抗体不存在下孵育的孔的平均信号来校正原始信号强度的本底信号。

[0043] 图22测试针对用8％多聚甲醛固定的表达GITR+的CF2细胞的αGITR10-αPD-L1和商业αGITR10mAb抗体结合的基于细胞的ELISA。F10-αPD-L1抗体代表阴性对照。使用从5mg/mL至0.078mg/mL范围内的一系列1:2稀释液测试所有抗体。针对每孔10,000个GITR+CF2细胞测试所有抗体。每个条表示从一式三份样品获得的平均值(由条表示的偏差)。通过从添加一级抗体的孔中减去在一级抗体不存在下孵育的孔的平均信号来校正原始信号强度的本底信号。

[0044] 图23A.用GITR+CF2细胞测试的荧光活化的αGITR10-αPD-L1tBsAb(抗His Alexa488(APC)缀合的)的流式细胞术分析。图23B.用GITR+CF2细胞测试的荧光活化的αGITR10 IgG Ab(抗人IgG Fc(FITC缀合的)的流式细胞术分析。水平线指示荧光的强度信号,并且纵轴指示细胞计数。每个单独图片代表不同浓度的具有恒定细胞数的αGITR10-αPD-L1。

[0045] 图24A.用GITR+CF2细胞测试的荧光活化的αGITR1-αPD-L1 tBsAb(抗His Alexa488(APC)缀合的)的流式细胞术分析。图24B.用GITR+CF2细胞测试的荧光活化的αGITR10 IgG Ab(抗人IgG Fc(FITC缀合的)的流式细胞术分析。水平线指示荧光的强度信号,并且纵轴指示细胞计数。每个单独的图片代表不同浓度的具有恒定细胞数的αGITR10-αPD-L1(图24A)和αGITR10 IgG(图24B)。

[0046] 图25 16个克隆的限制酶分析(REA)。示出在TAE缓冲液中电泳的DNA的溴化乙锭染色的1％琼脂糖凝胶。用HindIII和BamHI限制酶消化所有质粒。在10号泳道中示出两个条带:聚集在6kb与8kb之间的条带代表消化的接受者pcDNA3.4载体(7.5kb)。500与1000bp之间的下部条带指示与用HindIII和BamHI限制酶分离的片段的800bp的预期理论大小非常接近。泳道“bp”代表1kb DNA梯形条带。

[0047] 图26克隆10(具有HindIII的GITR10-PDL1)和GITR10-PDL1(无HindIII限制位点)的REA。示出在TAE缓冲液中电泳的DNA的溴化乙锭染色的1％琼脂糖凝胶。将两种质粒用仅HindIII消化(泳道1)、仅NotI消化(泳道2)以及同时用HindIII和NotI消化(泳道3)。用单一酶消化10号克隆(泳道1和2)产生聚集在8000bp左右的一个条带。用两种酶消化10号克隆(泳道3)导致产生两个片段,其中较小尺寸的条带聚集在500bp以下。仅用HindIII限制位点消化αGITR10-αPD-L1(泳道1)揭示超螺旋质粒DNA。

[0048] 图27载体GITR10-PDL1(含有HindIII限制位点)和CH2片段的限制酶消化分析。示出在TAE缓冲液中电泳的DNA的溴化乙锭染色的1％琼脂糖凝胶。泳道1:用HindIII单次消化

αGITR-αPD-L1。泳道2:用HindIII消化的CH2片段产生聚集在梯形条带的500bp标记以下的条带。泳道“bp”对应于1kb DNA梯形条带。

[0049] 图28通过SDS-PAGE分析纯化的具有CH2的αGITR10-αPD-L1BsAb。示出在MES缓冲液中电泳的蛋白质的考马斯蓝染色的SDS凝胶。将3-5μg蛋白质样品在(R)还原和(NR)非还原条件下负载于凝胶上并分离。在非还原条件下,SDS PAGE揭示每种蛋白质的两个主要条带。较高的条带具有约140kDa的表观分子,并且较低的条带具有80kDa的分子量,与二聚体(150kDa)和单体(75kDa)BsAb的理论尺寸相关。在还原条件(10%DTT;70 10分钟)下的SDS-凝胶分析仅展示表观分子量在约80kDa之间的一个条带,并且增强可通过铰链区中其二硫桥减少的tBsAb的正确表达。泳道“kDa”代表在相应条件下(在MES缓冲液中4%-12%凝胶浓度运行)的基准预染色的蛋白质梯形条带(Invitrogen)。

[0050] 图29测试针对用8%多聚甲醛固定的表达GITR+的CF2细胞的具有CH2的αGITR10-αPD-L1和αGITR10 IgG抗体结合的基于细胞的ELISA。F10-αPD-L1抗体代表阴性对照。使用从5mg/mL至0.16mg/mL范围内的一系列1:2稀释液测试所有抗体。针对每孔10,000个GITR+CF2细胞测试所有抗体。每个条表示从一式三份样品获得的平均值(由条表示的偏差)。通过从添加一级抗体的孔中减去在一级抗体不存在下孵育的孔的平均信号来校正原始信号强度的本底信号。

[0051] 图30具有CH2的αGITR10-αPD-L1抗体的ADCC活性。在不同浓度下测量具有CH2的αGITR10-αPD-L1的ADCC活性。将所有抗体连续稀释(1:2),以20mg/mL最高浓度开始直至0.02mg/mL,并且针对每孔20,000个GITR+CF2细胞进行测试。效应细胞(GITR+CF2)与靶细胞(Wils-2)的比率是5:1。αGITR IgG代表阳性对照,并且F10-αPD-L1代表阴性对照。纵轴代表用发光读出定量的效应细胞中荧光素酶活性的原始值。每种样品在每种浓度下一式三份运行;平均标准偏差以括号表示。从获得的值中减去RPMI培养基中GITR+CF2细胞的本底。

[0052] 图31具有CH2的αGITR10-αPD-L1抗体经由小鼠补体介导的CDC活性。通过CDC测定确定的用αGITR10-αPD-L1 tBsAb和对照αGITR mAb(阳性)、αGITR10-αPD-L1(阴性)的连续稀释液获得的GITR+CF2细胞裂解的百分比。将所有抗体连续稀释(1:10),以20mg/mL最高浓度开始直至0.2mg/mL,并且针对每孔10,000个GITR+CF2细胞进行测试。纵轴表示裂解的百分比。其被计算为获得的样品信号与来自完全裂解的GITR+CF2细胞的信号强度的比率。每种样品在每种浓度下一式三份运行;平均标准偏差以括号表示。从获得的值中减去RPMI培养基中GITR+CF2细胞的本底。每个条表示从一式三份样品获得的简单平均值(由括号表示的偏差)。

[0053] 图32测试针对用8%多聚甲醛固定的CF2细胞(无GITR表达)的αGITR1-αPD-L1和αGITR10-αPD-L1抗体结合的基于细胞的ELISA。F10-αPD-L1抗体代表阴性对照。使用从3.3mg/mL至0.0046mg/mL范围内的一系列1:3稀释液测试所有抗体。针对每孔1000个GITR-CF2细胞测试所有抗体。每个条表示从一式三份样品获得的平均值(由条表示的偏差)。通过从添加一级抗体的孔中减去在一级抗体不存在下孵育的孔的平均信号来校正原始信号强度的本底信号。

[0054] 图33测试针对用8%多聚甲醛固定的CF2细胞(无GITR表达)的αGITR10-αPD-L1和αGITR10 IgG抗体结合的基于细胞的ELISA。F10-αPD-L1抗体代表阴性对照。使用从5mg/mL至0.078mg/mL范围内的一系列1:2稀释液测试所有抗体。针对每孔10,000个GITR-CF2细胞测

试所有抗体。每个条表示从一式三份样品获得的平均值(由条表示的偏差)。通过从添加一级抗体的孔中减去在一级抗体不存在下孵育的孔的平均信号来校正原始信号强度的本底信号。

[0055] 图34测试针对用8％多聚甲醛固定的GITR-CF2细胞的具有CH2的αGITR10-αPD-L1和αGITR10IG抗体结合的基于细胞的ELISA。F10-αPD-L1抗体代表阴性对照。使用从5mg/mL至0.16mg/mL范围内的一系列1:2稀释液测试所有抗体。针对每孔10,000个GITR+CF2细胞测试所有抗体。每个条表示从一式三份样品获得的平均值(由条表示的偏差)。通过从添加一级抗体的孔中减去在一级抗体不存在下孵育的孔的平均信号来校正原始信号强度的本底信号。

[0056] 图35荧光活化的αGITR1-αPD-L1抗体的流式细胞术分析的对照设置。泳道1至6示出GITR+CF2细胞的对照设置。泳道7至9是指GITR-CF2细胞的对照设置。

具体实施方式

[0057] 本发明涉及含有针对每种受体的两个结合位点的双特异性抗体(即四价双特异性抗体或“tBsAb”)、产生所述双特异性抗体的系统和方法。

[0058] 双特异性抗体(BsAb)作为治疗剂的临床开发由于难以通过传统方法制备足够数量和质量的材料而受到阻碍。近年来,已经开发了多种重组方法用于有效产生作为抗体片段和全长IgG样分子的BsAb。这些重组抗体分子具有双重抗原结合能力,在大多数情况下对其靶抗原中的每种具有单价。本发明提供了一种用于产生新颖的四价BsAb(tBsAb)的有效方法,所述四价BsAb具有针对其靶抗原中的每种的两个抗原结合位点;对scFV双特异性抗体进行遗传工程化并使两者融合在一起。

[0059] 与双特异性/二价抗体相比,所述tBsAb更有效地结合至其两种靶抗原,并且更有效地阻断配体与受体的结合。另外,所述tBsAb在哺乳动物细胞中的表达产生更高的生产水平和更好的抗体活性。重要的是,与单价双特异性抗体相比,所述tBsAb表现出更高的稳定性和更长的半衰期。单价双特异性抗体的一个缺点是它们的尺寸小,并且因此血清半衰期短,从而需要连续低剂量施用数周。相比之下,本发明的tBsAb的较长半衰期解决了这一问题,并且因此更适合于临床应用。tBsAb的这种设计和表达应适用于任何一对抗原特异性。

[0060] 优选地,所述tBsAb对BMCA、CAIX、CCR4、PD-L1、PD-L2、PD1、糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体(GITR)、严重急性呼吸综合征(SARS)、流感、黄病毒或中东呼吸综合症(MERS)。

[0061] 可用于构建根据本发明的tBsAb的示例性抗体包括在例如以下中公开的抗体:WO/2005/060520、WO/2006/089141、WO/2007/065027、WO/2009/086514、WO/2009/079259、WO/2011/153380、WO/2014/055897、WO 2015/143194、WO 2015/164865、WO 2013/166500、WO 2014/144061、WO 2016/057488、WO 2016/054638、WO/2016/164835、PCT/US2016/026232、PCT/US2017/050093、PCT/US2017/050327以及PCT/US2017/043504,其内容特此以引用的方式整体并入。

[0062] PDL1(68)

[0063] 示例性抗PDL1抗体包括具有以下的抗体:具有SEQ ID NO:1485的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1487的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1485的VH核苷酸序列和具有SEQ ID

NO:1487的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1489的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1491的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1493的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1495的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1497的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1499的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1501的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1503的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1505的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1507的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1509的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1511的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1513的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1515的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1517的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1519的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1521的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1523的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1525的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1527的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1529的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1531的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1533的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1535的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1537的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1539的VL核苷酸序列。

[0064] 示例性抗PDL1抗体包括具有以下的抗体:具有SEQ ID NO:970的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:971的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:1486的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1488的VL多肽序列;具有SEQ ID NO:1490的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1492的VL多肽序列;具有SEQ ID NO:1494的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1496的VL多肽序列;具有SEQ ID NO:1498的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1500的VL多肽序列;具有SEQ ID NO:1502的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1504的VL多肽序列;具有SEQ ID NO:1506的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1508的VL多肽序列;具有SEQ ID NO:1510的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1512的VL多肽序列;具有SEQ ID NO:1514的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1516的VL多肽序列;具有SEQ ID NO:1518的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1520的VL多肽序列;具有SEQ ID NO:1522的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1524的VL多肽序列;具有SEQ ID NO:1526的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1528的VL多肽序列;具有SEQ ID NO:1530的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1532的VL多肽序列;具有SEQ ID NO:1534的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1536的VL多肽序列;具有SEQ ID NO:1538的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1540的VL多肽序列。

[0065] 在其他实施方案中,所述抗PDL1抗体具有:重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列SEQ ID NO:1541、1554、1569的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列1584、1599、1610的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列1543、1556、1571的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列1586、1600、1612的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列1544、1557、1572的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列1587、1601、1613的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列1545、1558、1573的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列1588、1602、1614的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列1546、1559、1574的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列1589、1603、1615的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列1547、1560、1575的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列1590、1604、1616的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列1548、1561、1576的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列1591、1605、1617的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列1541、1562、1577的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列1592、1599、1618的三个CDR;或重链,所述重链

具有包含氨基酸序列1549、1563、1578的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列1593、1606、1619的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列1550、1564、1579的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列1594、1607、1620的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列1551、1565、1580的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列1595、1599、1621的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列1542、1566、1581的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列1596、1599、1622的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列1552、1567、1582的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列1597、1608、1623的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列1553、1568、1583的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列1598、1609、1624的三个CDR。

[0066] SARS(26)

[0067] 示例性SARS中和抗体包括具有以下的抗体:具有SEQ ID NO:1626的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1628的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1630的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1639的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1634的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1640的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1632的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1641的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1633的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1642的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1634的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1643的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1635的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1644的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1636的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1645的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1637的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1646的VL核苷酸序列。

[0068] CXCR4(33)

[0069] 示例性抗CXCR4抗体包括具有以下的抗体:具有SEQ ID NO:771的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:779的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:772的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:780的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:773的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:781的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:774的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:782的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:775的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:783的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:776的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:784的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:777的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:785的VL氨基酸序列;或具有SEQ ID NO:778的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:786的VL氨基酸序列。

[0070] 在其他实施方案中,所述抗CXCR4抗体具有:重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列SEQ ID NO:803、804、805的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列806、807、808的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列809、810、811的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列812、813、814的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列815、816、817的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列818、819、820的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列827、828、829的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列830、831、832的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列833、834、835的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列836、837、838的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列839、840、841的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列842、843、844的三个CDR。

[0071] 碳酸酐酶IX(40)

[0072] 示例性抗CAIX抗体包括具有以下的抗体:具有SEQ ID NO:845的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:846的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:847的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:868的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:848的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:869的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:849的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:870的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:850的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:871的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:851的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:872的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:852的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:873的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:853的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:874的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:854的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:875的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:855的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:876的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:856的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:877的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:857的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:878的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:858的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:879的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:859的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:880的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:860的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:881的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:861的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:882的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:862的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:883的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:863的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:884的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:864的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:885的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:865的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:886的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:866的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:887的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:867的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:888的VL氨基酸序列。

[0073] 在其他实施方案中,所述抗CA IX抗体具有:重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列SEQ ID NO:803、804、805的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列806、807、808的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列899、915、909的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列905、906、952的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列899、915、909的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列935、943、953的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列899、915、909的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列935、906、954的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列910、916、923的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列936、944、955的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列899、915、909的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列936、944、956的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列911、917、924的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列937、945、957的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列899、915、909的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列935、946、958的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列899、915、909的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列938、946、959的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列899、915、909的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列905、946、960的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列899、918、925的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列937、947、955的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列899、918、926的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列937、945、957的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列912、919、927的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列937、943、

961的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列899、918、928的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列937、906、960的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列899、918、928的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列937、906、960的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列913、920、929的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列939、948、962的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列899、918、930的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列935、944、955的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列899、921、931的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列935、944、955的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列912、919、932的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列940、949、963的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列899、915、909的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列935、943、960的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列914、922、933的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列941、950、964的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列912、918、934的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列942、951、965的三个CDR。

[0074] CC-趋化因子受体4(CCR4)(048)

[0075] 示例性CC-趋化因子受体4(CCR4)抗体包括具有以下的抗体:具有SEQ ID NO:969的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:971的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:969的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:972的V_L核苷酸序列。

[0076] 示例性CCR4抗体包括具有以下的抗体:具有SEQ ID NO:970的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:971的VL氨基酸序列。

[0077] 在其他实施方案中,所述CCR4抗体具有重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列SEQ ID NO:973、974、975的三个CDR;和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列976、977、978的三个CDR。

[0078] 中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)。(85)

[0079] 示例性抗中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)抗体包括具有以下的抗体:具有SEQ ID NO:677的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:679的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:681的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:683的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:685的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:687的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:689的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:692的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:693的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:695的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:697的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:699的VL核苷酸序列;以及具有SEQ ID NO:701的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:703的VL核苷酸序列。

[0080] 示例性抗中东呼吸综合症冠状病毒(MERS-CoV)抗体包括具有以下的抗体:VH氨基酸序列SEQ ID NO:678和具有SEQ ID NO:680的VL氨基酸序列;VH氨基酸序列SEQ ID NO:682和具有SEQ ID NO:684的VL氨基酸序列;VH氨基酸序列SEQ ID NO:686和具有SEQ ID NO:688的VL氨基酸序列;VH氨基酸序列SEQ ID NO:690和具有SEQ ID NO:692的VL氨基酸序列;VH氨基酸序列SEQ ID NO:694和具有SEQ ID NO:696的VL氨基酸序列;VH氨基酸序列SEQ ID NO:698和具有SEQ ID NO:700的VL氨基酸序列;以及VH氨基酸序列SEQ ID NO:702和具有SEQ ID NO:704的VL氨基酸序列。

[0081] 在其他实施方案中,所述抗中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)抗体具有:重链,所述重链具有包含氨基酸序列705、706和707的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸

序列722、723和724的三个CDR;重链,所述重链具有包含氨基酸序列708、709和710的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列725、726和727的三个CDR;重链,所述重链具有包含氨基酸序列711、712和713的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列728、729和730的三个CDR;重链,所述重链具有包含氨基酸序列711、735和715的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列731、732和733的三个CDR;重链,所述重链具有包含氨基酸序列711、735和716的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列737、738和739的三个CDR;重链,所述重链具有包含氨基酸序列717、718和719的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列736、742和743的三个CDR;以及重链,所述重链具有包含氨基酸序列714、720和721的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列740、729和741的三个CDR。

[0082] GITR(93)

[0083] 示例性抗人GITR抗体包括具有以下的抗体:具有SEQ ID NO:1361的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1363的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1365的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1367的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1369的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1371的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1381的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1375的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1377的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1379的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1381的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1383的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1385的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1387的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1389的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1391的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1393的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1395的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1397的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1398的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1401的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1403的VL核苷酸序列。

[0084] 示例性抗人GITR抗体包括具有以下的抗体:具有SEQ ID NO:1362的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1364的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:1366的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1368的VL多肽序列;具有SEQ ID NO:1371的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1372的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:1382的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1376的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:1378的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1380的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1382的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1384的VL多肽序列;具有SEQ ID NO:1386的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1388的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:1390的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1392的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:1394的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1396的VL多肽序列;具有SEQ ID NO:1399的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1400的VL氨基酸序列;或具有SEQ ID NO:1402的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1404的VL氨基酸序列。

[0085] 在其他实施方案中,所述抗人GITR抗体具有:重链,所述重链具有包含氨基酸序列1405、1406和1407的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列1408、1409和1410的三个CDR;重链,所述重链具有包含氨基酸序列1411、1412和1413的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列1414、1415和1416的三个CDR;重链,所述重链具有包含氨基酸序列1417、1418和1419的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列1420、1421和1422的三个CDR;重链,所述重链具有包含氨基酸序列1423、1424和1425的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列1426、1427和1428的三个CDR;重链,所述重链具有包

含氨基酸序列1429、1430和1431的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列1432、1433和1434的三个CDR;重链,所述重链具有包含氨基酸序列1435、1436和1437的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列1438、1439和1440的三个CDR;重链,所述重链具有包含氨基酸序列1441、1442和1443的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列1444、1445和1446的三个CDR;重链,所述重链具有包含氨基酸序列1447、1448和1449的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列1450、1451和1452的三个CDR;重链,所述重链具有包含氨基酸序列1453、1454和1455的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列1456、1457和1458的三个CDR;重链,所述重链具有包含氨基酸序列1459、1460和1461的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列1462、1463和1464的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列1465、1466和1467的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列1468、1469和1470的三个CDR。

[0086] 黄病毒(73)

[0087] 示例性抗西尼罗河病毒包膜蛋白E(WNE)抗体包括具有VH核苷酸序列的抗体,所述VH核苷酸序列具有:具有SEQ ID NO:1224的VH氨基酸序列;以及具有SEQ ID NO:1226的VL氨基酸序列。

[0088] 示例性抗西尼罗河病毒包膜蛋白E(WNE)抗体包括具有以下的抗体:具有SEQ ID NO:1225的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1227的VL核苷酸序列。

[0089] 在其他实施方案中,所述抗西尼罗河病毒包膜蛋白E(WNE)抗体具有:重链,所述重链具有包含氨基酸序列1244、1245和1246的三个CDR;以及轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列1247、1248和1249的三个CDR。

[0090] CCR4(65)

[0091] 示例性抗CC趋化因子受体4(CCR4)抗体包括具有以下的抗体:具有SEQ ID NO:1329的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1331的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1333的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1335的V_L核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1337的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1192的V_L核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1341的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1343的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1357的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1359的VL核苷酸序列。

[0092] 示例性抗CC趋化因子受体4(CCR4)抗体包括具有以下的抗体:具有SEQ ID NO:1330的V_H氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1332的V_L氨基酸序列;具有SEQ ID NO:1334的V_H氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1336的V_L氨基酸序列;具有SEQ ID NO:1338的V_H氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1340的V_L氨基酸序列;具有SEQ ID NO:1342的V_H氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1344的V_L氨基酸序列;或具有SEQ ID NO:1358的V_H氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1360的V_L氨基酸序列。

[0093] 在其他实施方案中,所述抗CC趋化因子受体4(CCR4)抗体具有:重链,所述重链具有包含氨基酸序列1203、1208和1211的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列1207、1209和1216的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列1204、1208和1212的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列1207、1209和1217的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列1204、1208和1213的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列1207、1209和1217的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列1205、

1208和1214的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列1207、1209和1218的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列1206、1208和1210的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列1207、1209和1220的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列1202、1208和1210的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列1207、1209和1219的三个CDR。

[0094] 人免疫球蛋白重链可变区种系基因VH1-69(57)

[0095] 示例性抗人免疫球蛋白重链可变区种系基因VH1-69抗体包括具有以下的抗体:具有SEQ ID NO:1153的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1155的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1163的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1155的VL核苷酸序列。

[0096] 示例性抗人免疫球蛋白重链可变区种系基因VH1-69抗体包括具有以下的抗体:具有SEQ ID NO:1154的V_H氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1156的V_L氨基酸序列;或具有SEQ ID NO:1164的V_H氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1156的V_L氨基酸序列。

[0097] 在其他实施方案中,所述抗人免疫球蛋白重链可变区种系基因VH1-69抗体具有:重链,所述重链具有包含氨基酸序列1157、1158和1159的三个CDR;以及轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列1160、1161和1162的三个CDR。

[0098] 流感(49)

[0099] 示例性抗流感抗体包括具有以下的抗体:具有SEQ ID NO:981的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:983的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:985的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:989的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:987的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:991的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:993的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:997的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:995的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:999的VK核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1001的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1005的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1003的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1007的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1009的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1011的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1013的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1015的VL核苷酸序列;以及具有SEQ ID NO:1017的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1019的VK核苷酸序列;具有SEQ ID NO:1020的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1022的VL核苷酸序列。

[0100] 示例性抗流感抗体包括具有以下的抗体:具有SEQ ID NO:982的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:984的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:986的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:988的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:986的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:990的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:992的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:994的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:992的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:996的VK氨基酸序列;具有SEQ ID NO:998的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1000的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:998的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1002的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:1004的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1006的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:1008的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1010的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:1012的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1014的VK氨基酸序列;以及具有SEQ ID NO:1016的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1018的VL氨基酸序列。

[0101] 在其他实施方案中,所述抗流感抗体具有:重链,所述重链具有包含氨基酸序列

1023、1031和1039的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列1047、1059和1071的三个CDR;重链,所述重链具有包含氨基酸序列1023、1032和1040的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列1048、1060和1072的三个CDR;重链,所述重链具有包含氨基酸序列1025、1032和1040的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列1057、1069和1081的三个CDR;重链,所述重链具有包含氨基酸序列1026、1033和1041的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列1049、1061和1073的三个CDR;重链,所述重链具有包含氨基酸序列1026、1033和1041的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列1054、1066和1078的三个CDR;重链,所述重链具有包含氨基酸序列1027、1034和1042的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列1050、1062和1074的三个CDR;重链,所述重链具有包含氨基酸序列1027、1034和1042的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列1056、1068和1080的三个CDR;重链,所述重链具有包含氨基酸序列1028、1035和1043的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列1051、1063和1065的三个CDR;重链,所述重链具有包含氨基酸序列1028、1036和1044的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列1052、1064和1076的三个CDR;重链,所述重链具有包含氨基酸序列1029、1037和1045的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列1053、1065和1077的三个CDR;或重链,所述重链具有包含氨基酸序列1030、1038和1046的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含氨基酸序列1058、1070和1082的三个CDR。

[0102] 流感(78)

[0103] 示例性抗流感抗体包括具有以下的抗体:具有SEQ ID NO:397的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:398的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:399的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:400的V_L核苷酸序列;具有SEQ ID NO:401的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:402的V_L核苷酸序列;具有SEQ ID NO:403的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:404的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:405的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:406的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:407的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:408的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:409的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:410的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:411的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:412的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:413的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:414的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:415的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:416的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:417的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:418的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:419的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:420的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:421的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:422的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:423的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:424的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:425的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:426的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:427的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:428的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:429的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:430的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:431的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:432的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:433的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:434的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:435的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:436的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:437的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:438的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:439的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:440的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:441的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:442的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:541的VH核苷酸序列

和具有SEQ ID NO:542的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:543的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:544的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:545的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:546的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:547的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:548的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:549的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:550的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:551的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:552的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:553的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:554的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:555的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:556的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:557的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:558的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:559的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:560的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:561的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:562的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:563的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:564的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:565的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:566的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:567的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:568的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:569的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:570的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:571的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:572的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:573的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:574的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:575的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:576的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:577的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:578的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:579的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:580的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:581的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:582的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:583的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:584的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:585的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:586的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:587的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:588的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:589的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:590的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:591的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:592的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:593的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:594的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:595的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:596的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:597的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:598的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:599的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:600的VL核苷酸序列。

[0104] 示例性抗流感抗体包括具有以下的抗体:具有SEQ ID NO:469的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:470的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:471的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:472的VL多肽序列;具有SEQ ID NO:473的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:474的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:475的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:476的VL氨基酸序列;或具有SEQ ID NO:477的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:478的VL核苷酸序列;具有SEQ ID NO:479的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:480的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:481的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:482的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:483的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:484的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:485的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:486的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:487的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:488的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:489的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:490的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:491的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:492的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:493的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:494的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:495的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:496的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:497的VH氨基酸序列和具有

SEQ ID NO:498的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:499的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:500的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:501的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:502的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:503的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:504的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:505的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:506的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:507的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:508的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:509的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:510的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:511的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:512的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:513的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:514的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:515的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:516的VL氨基酸序列;;具有SEQ ID NO:517的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:518的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:519的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:520的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:521的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:522的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:523的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:524的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:525的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:526的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:527的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:528的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:529的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:530的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:531的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:532的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:533的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:534的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:535的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:536的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:537的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:538的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:539的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:540的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:601的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:602的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:603的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:604的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:605的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:606的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:607的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:608的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:609的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:610的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:611的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:612的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:613的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:614的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:615的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:616的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:617的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:618的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:619的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:620的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:621的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:622的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:623的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:624的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:625的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:626的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:627的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:628的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:629的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:630的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:631的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:632的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:633的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:634的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:635的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:636的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:637的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:638的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:639的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:640的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:641的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:642的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:643的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:644的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:645的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:646的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:647的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:648的VL氨基酸序列;具有

SEQ ID NO:649的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:650的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:651的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:652的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:653的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:654的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:655的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:656的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:657的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:658的VL氨基酸序列;具有SEQ ID NO:659的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:660的VL氨基酸序列。

[0105] 在其他实施方案中,所述抗流感抗体具有:重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列SEQ ID NO:1、37、73的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列109、145、181的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列2、38、74的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列110、146、182的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列3、39、75的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列111、147、183的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列4、40、76的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列112、148、184的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列5、41、77的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列113、149、185的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列6、42、78的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列114、150、186的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列7、43、79的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列115、151、187的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列8、44、80的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列116、152、188的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列9、45、81的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列117、153、189的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列9、45、81的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列117、153、189的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列10、46、82的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列118、154、190的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列11、47、83的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列119、155、191的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列12、48、84的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列120、156、192的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列13、49、85的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列121、157、193的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列14、50、86的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列122、158、194的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列15、51、87的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列123、159、195的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列16、52、88的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列124、160、196的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列17、53、89的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列125、161、197的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列18、54、90的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列126、162、198的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列19、55、91的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列127、163、199的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列20、56、92的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列128、164、200的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列21、57、93的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列129、165、201的三个

CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列22、58、94的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列130、166、202的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列23、59、95的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列131、167、203的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列24、60、96的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列132、168、204的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列25、61、95的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列133、169、205的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列26、62、96的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列134、170、206的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列27、63、97的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列135、171、207的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列28、64、98的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列136、172、208的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列29、65、99的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列137、173、209的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列30、66、100的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列138、174、210的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列31、67、101的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列139、175、211的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列32、68、102的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列140、176、212的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列33、69、103的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列141、177、213的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列34、70、104的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列142、178、214的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列35、71、105的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列143、179、215的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列36、72、106的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列144、180、216的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列217、247、277的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列307、337、367的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列218、248、278的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列308、338、368的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列219、249、279的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列309、339、369的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列220、250、280的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列310、340、370的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列221、251、281的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列311、341、371的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列222、252、282的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列312、342、372的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列223、253、283的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列313、343、373的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列224、254、284的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列314、344、374的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列225、255、285的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列315、345、375的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列226、256、286的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列316、346、376的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列227、257、287的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列317、

347、377的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列228、258、288的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列318、348、378的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列229、259、289的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列319、349、379的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列230、260、290的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列320、350、380的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列231、261、291的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列321、351、381的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列232、262、292的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列322、352、382的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列233、263、293的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列323、353、383的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列234、273、294的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列324、354、384的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列235、274、295的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列325、355、385的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列236、275、296的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列326、356、386的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列237、276、297的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列327、357、387的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列237、277、298的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列328、358、388的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列238、278、299的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列329、359、389的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列239、279、300的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列330、360、390的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列240、280、301的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列331、361、391的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列241、281、302的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列332、362、392的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列242、282、303的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列333、363、393的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列243、283、304的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列334、364、394的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列244、284、305的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列335、365、395的三个CDR;或重链,所述重链具有分别包含氨基酸序列245、285、306的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别包含氨基酸序列336、366、396的三个CDR。

[0106] 其他抗流感抗体包括具有以下表1中所示的氨基酸或核酸序列的那些。

表 1A. 抗体 3I14V 可变区核酸序列
3I14 的 V_H 链 (SEQ ID NO:1665)
CAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGT GCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG CTGGAGTGGGTGGCAATTATATCATTTGATGGAAGTAAAAAATATTATGCAAACTCCGTGAAGGGC CGATCCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTCTCTGCAAATGAACAGCCTGGGACCT GAGGACACGGCTCTATATTACTGTGCGAAACTGCCCTCCCCGTATTACTTTGATAGTCGGTTCGTG TGGGTCGCCGCCAGCGCATTTCACTTCTGGGGCCAGGGAATCCTGGTCACCGTCTCTTCA
3I14的 V_L 链(SEQ ID NO:1667)
AATTTTATGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGC TCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAGGTAATACTGTACACTGGTTCCAGCAGCTCCCAGGAACGGCC CCCAAACTCCTCATCTATACTAATAGTCTGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCC AAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTAC TGTGCAGCATGGGATGACAGCCTAAATGGTCAGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA

[0107]

表 1B. 抗体 3I14V 可变区氨基酸序列
3I14的 V_H 链 (SEQ ID NO: 1666)
QVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFTFSNYG**MHWVRQAPGKGLEWVAI**ISFDGSKK**YY ANSVKGRSTISRDNSKNTLSLQMNSLGPEDTALYY**CAKLPSPYYFDSRFVWVAASAFHFW** GQGILVTVSS
3I14的 V_L 链 (SEQ ID NO:1668)
NFMLTQPPSASGTPGQRVTISCSGS**SSNIGGNT**VHWFQQLPGTAPKLLIY**TNS**LRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYY**CAAWDDSLNGQVF**GGGTKLTVL

表 1C. 抗体 3I14V_LD94N 可变区核酸序列
3I14V_LD94N 的 V_L 链 (SEQ ID NO:1669)
AATTTTATGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGC TCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAGGTAATACTGTACACTGGTTCCAGCAGCTCCCAGGAACGGCC CCCAAACTCCTCATCTATACTAATAGTCTGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCC AAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTAC

TGTGCAGCATGGGATAACAGCCTAAATGGTCAGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA

表 1C. 抗体 3I14V_LD94N 可变区核酸序列
3I14V_LD94N 的 V_L 链 (SEQ ID NO:1670)
NFMLTQPPSASGTPGQRVTISCSGS**SSNIGGNT**VHWFQQLPGTAPKLLIY**TNS**LRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYY**CAAWDNSLNGQVF**GGGTKLTVL

[0108] 3I14和3I14V_LD94N中和流感抗体的重链和轻链互补决定区的氨基酸序列在以下表2中示出。

[0109] 表2

[0110]

HCDR1	GFTFSNYG	(SEQ ID NO:1671)
HCDR2	ISFDGSKK	(SEQ ID NO:1672)
HCDR3	CAKLPSPYYFDSRFVWVA ASAFHFW	(SEQ ID NO:1673)
LCDR1	SSNIGGNT	(SEQ ID NO:1674)
LCDR2	TNS	(SEQ ID NO:1675)
LCDR3	CAAWDDSLNGQVF	(SEQ ID NO:1676)
3I14V_LD94N LCDR3	CAAWDNSLNGQVF	(SEQ ID NO:1677)

[0111] CC-趋化因子受体4 CCR4(94)

[0112] 示例性抗CCR4抗体包括具有以下的抗体:具有SEQ ID NO:1678的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1679的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1680的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1681的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1682的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1683的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1684的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1685的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1686的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO::1687的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1688的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1689的VL核苷酸序列。

[0113] 示例性抗CCR4抗体包括具有以下的抗体:具有SEQ ID NO:1690的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1691的VL氨基酸序列;或具有SEQ ID NO:1692的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1693的VL氨基酸序列;或具有SEQ ID NO:1694的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1695的VL氨基酸序列;或具有SEQ ID NO:1696的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1697的VL氨基酸序列;或具有SEQ ID NO:1698的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO::1699的VL氨基酸序列;或具有SEQ ID NO:1700的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1701的VL氨基酸序列。

[0114] 在其他实施方案中,所述抗流感抗体具有:重链,所述重链具有分别具有SEQ ID NO:1702、1703,1704的氨基酸序列的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别具有SEQ ID NO:1705、1706、1707的氨基酸序列的三个CDR;或重链,所述重链具有分别具有SEQ ID NO:1708、1709、1710的氨基酸序列的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别具有SEQ ID NO:1711、1712、1713的氨基酸序列的三个CDR;或重链,所述重链具有分别具有SEQ ID NO:1714、1715、1716的氨基酸序列的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别具有SEQ ID NO:1717、1718、1719的氨基酸序列的三个CDR;或重链,所述重链具有分别具有SEQ ID NO:1720、1721、1722的氨基酸序列的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别具有SEQ ID NO:1723、1724、1725的氨基酸序列的三个CDR;或重链,所述重链具有分别具有SEQ ID NO:1726、1727、1728的氨基酸序列的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别具有SEQ ID NO:1729、1730、1731的氨基酸序列的三个CDR;或重链,所述重链具有分别具有SEQ ID NO:1732、1733、1734的氨基酸序列的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别具有SEQ ID NO:1735、1736、1737的氨基酸序列的三个CDR;或重链,所述重链具有分别具有SEQ ID NO:1738、1739、1740的氨基酸序列的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别具有SEQ ID NO:1741、1742、1743的氨基酸序列的三个CDR。

[0115] 人免疫球蛋白重链可变区种系基因(VH1-69)(133)

[0116] 示例性抗人免疫球蛋白重链可变区种系基因VH1-69抗体包含具有SEQ ID NO:1744的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1745的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1748的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1749的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1752的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1753的VL核苷酸序列。

[0117] 示例性抗人免疫球蛋白重链可变区种系基因VH1-69抗体包含具有SEQ ID NO:1746的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1747的VL氨基酸序列;或具有SEQ ID NO:1750的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1751的VL氨基酸序列;或具有SEQ ID NO:1754的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1755的VL氨基酸序列。

[0118] 在其他实施方案中,所述抗人免疫球蛋白重链可变区种系基因VH1-69抗体具有:重链,所述重链具有分别具有SEQ ID NO:1756、1757、1758的氨基酸序列的三个CDR;以及轻

链,所述轻链具有分别具有SEQ ID NO:1759、1760、1761的氨基酸序列的三个CDR。

[0119] 寨卡病毒抗体(140)

[0120] 靶向并中和寨卡病毒的示例性抗体包括具有以下的抗体:具有SEQ ID NO:1762的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1763的VL核苷酸序列。

[0121] 靶向并中和寨卡病毒的示例性抗体包括具有以下的抗体:具有SEQ ID NO:1764的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1765的VL氨基酸序列。

[0122] 在其他实施方案中,靶向并中和寨卡病毒的抗体具有重链,所述重链具有分别具有SEQ ID NO:1766、1767、1768的氨基酸序列的三个CDR;以及轻链,所述轻链具有分别具有SEQ ID NO:1769、1770、1771的氨基酸序列的三个的CDR。

[0123] 糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体(GITR)(141)

[0124] 示例性抗糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体(GITR)抗体包含:具有SEQ ID NO:1772的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1773的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1774的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1775的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1776的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1777的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1778的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1779的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1780的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1781的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1782的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1783的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1784的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1785的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1786的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1787的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1788的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1789的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1790的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1791的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1792的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1793的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1794的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1795的VL核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1796的VH核苷酸序列和具有SEQ ID NO:1797的VL核苷酸序列。

[0125] 示例性抗糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体(GITR)抗体包含具有SEQ ID NO:1798的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1799的VL氨基酸序列;或具有SEQ ID NO:1800的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1801的VL氨基酸序列;或具有SEQ ID NO:1802的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1803的VL氨基酸序列;或具有SEQ ID NO:1804的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1805的VL氨基酸序列;或具有SEQ ID NO:1806的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1807的VL氨基酸序列;或具有SEQ ID NO:1808的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1809的VL氨基酸序列;或具有SEQ ID NO:1810的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1811的VL氨基酸序列;或具有SEQ ID NO:1812的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1813的VL氨基酸序列;或具有SEQ ID NO:1814的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1815的VL氨基酸序列;或具有SEQ ID NO:1816的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1817的VL氨基酸序列;或具有SEQ ID NO:1818的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1819的VL氨基酸序列;或具有SEQ ID NO:1820的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1821的VL氨基酸序列;或具有SEQ ID NO:1822的VH氨基酸序列和具有SEQ ID NO:1823的VL氨基酸序列。

[0126] 在其他实施方案中,抗糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体(GITR)抗体具有重链,所述重链具有分别具有SEQ ID NO:1824、1825、1826的氨基酸序列的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别具有SEQ ID NO:1827、1828、1829的氨基酸序列的三个CDR;或重链,所述

重链具有分别具有SEQ ID NO:1830、1831、1832的氨基酸序列的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别具有SEQ ID NO:1833、1834、1835的氨基酸序列的三个CDR;或重链,所述重链具有分别具有SEQ ID NO:1836、1837、1838的氨基酸序列的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别具有SEQ ID NO:1839、1840、1841的氨基酸序列的三个CDR;或重链,所述重链具有分别具有SEQ ID NO:1842、1843、1844的氨基酸序列的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别具有SEQ ID NO:1845、1846、1847的氨基酸序列的三个CDR;或重链,所述重链具有分别具有SEQ ID NO:1848、1849、1850的氨基酸序列的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别具有SEQ ID NO:1851、1852、1853的氨基酸序列的三个CDR;或重链,所述重链具有分别具有SEQ ID NO:1854、1855、1856的氨基酸序列的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别具有SEQ ID NO:1857、1858、1859的氨基酸序列的三个CDR;或重链,所述重链具有分别具有SEQ ID NO:1860、1861、1862的氨基酸序列的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别具有SEQ ID NO:1863、1864、1865的氨基酸序列的三个CDR;或重链,所述重链具有分别具有SEQ ID NO:1866、1867、1868的氨基酸序列的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别具有SEQ ID NO:1869、1870、1871的氨基酸序列的三个CDR;或重链,所述重链具有分别具有SEQ ID NO:1872、1873、1874的氨基酸序列的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别具有SEQ ID NO:1875、1876、1877的氨基酸序列的三个CDR;或重链,所述重链具有分别具有SEQ ID NO:1878、1879、1880的氨基酸序列的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别具有SEQ ID NO:1881、1882、1883的氨基酸序列的三个CDR;或重链,所述重链具有分别具有SEQ ID NO:1884、1885、1886的氨基酸序列的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别具有SEQ ID NO:1887、1888、1889的氨基酸序列的三个CDR;或重链,所述重链具有分别具有SEQ ID NO:1890、1891、1892的氨基酸序列的三个CDR,和轻链,所述轻链具有分别具有SEQ ID NO:1893、1894、1895的氨基酸序列的三个CDR;或重链,所述重链具有分别具有SEQ ID NO:1896、1897、1898的氨基酸序列的三个CDR,和轻链,所述轻链具有包含SEQ ID NO:1899、1900、1901的氨基酸序列的三个CDR。

[0127] 所述四价抗体是双特异性scFv片段的二聚体,所述scFv片段具有第一抗原的第一结合位点、第二抗原的第二结合位点。所述scFv优选地是串联scFv。所述两个结合位点的可变结构域经由接头结构域连接在一起。在优选的实施方案中,所述接头结构域包含免疫球蛋白铰链区氨基酸序列。铰链区是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4铰链区。示例性铰链区氨基酸序列包含EPKSCDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:1902);ERKCCVECPPCP(SEQ ID NO:1903);以及ESKYGPPCPSCP(SEQ ID NO:1904)。

[0128] 在一些实施方案中,所述接头结构域还包含免疫球蛋白Fc结构域的至少一部分。免疫球蛋白Fc结构域的至少一部分是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc结构域。免疫球蛋白Fc结构域的至少一部分与铰链区的C-末端连接。免疫球蛋白Fc结构域的至少一部分是指例如免疫球蛋白CH2结构域氨基酸序列、CH3结构域氨基酸序列、CH4结构域氨基酸序列或其任何组合。

[0129] 包含免疫球蛋白Fc结构域的至少一部分(例如CH2结构域)提供第三功能性结合位点(即Fc效应子功能),从而产生三功能双特异性抗体。因此,可能希望修饰关于效应子功能的至少一部分,以便增强例如tBsAb的有效性。例如,可以将氨基酸取代、插入或缺失引入免疫球蛋白Fc结构域的至少一部分中以产生具有改善的内化能力和/或增加的补体介导的细

胞杀伤和抗体依赖性细胞细胞毒性(ADCC)的tBsAb。或者,免疫球蛋白Fc结构域的至少一部分被糖基化,以改善tBsAb的稳定性和溶解度。例如,免疫球蛋白Fc结构域的至少一部分在对应于氨基酸位置297处的天冬酰胺的氨基酸处糖基化。虽然糖基化对于稳定性是重要的,但是CH2碳水化合物的去岩藻糖基化还可增加对Fc γ R的结合亲和力并导致ADCC的进一步加强。

[0130] 在某些实施方案中,本发明的tBsAb可包含Fc变体,所述Fc变体包含氨基酸取代,所述氨基酸取代改变抗体的抗原非依赖性效应子功能,特别是抗体的循环半衰期。此类抗体在与缺乏这些取代的抗体比较时表现出与FcRn的结合增加或减少,因此分别具有增加或减少的血清半衰期。预期具有改善的对FcRn的亲和力的Fc变体具有更长的血清半衰期,并且此类分子在治疗哺乳动物的方法中具有有用的应用,其中需要施用的抗体的长半衰期,例如以治疗慢性疾病或病症。相比之下,预期具有降低的FcRn结合亲和力的Fc变体具有较短的半衰期,并且此类分子也可用于例如施用至哺乳动物,其中缩短的循环时间可能是有利的,例如,用于体内诊断成像或在起始抗体长期存在于循环中时具有毒副作用的情况下。在一个实施方案中,Fc结构域在Fc结构域的"FcRn结合环"内具有一个或多个氨基酸取代。FcRn结合环由氨基酸残基280-299组成(根据EU编号)。在国际PCT公布号WO05/047327中公开了改变FcRn结合活性的示例性氨基酸取代,所述国际PCT公布以引用的方式并入本文。在某些示例性实施方案中,本发明的抗体或其片段包含具有以下取代中的一种或多种的Fc结构域:V284E、H285E、N286D、K290E和S304D(EU编号)。

[0131] 优选地,所述Fc结构域的至少一部分是CH2结构域氨基酸序列。示例性CH2结构域氨基酸序列包含APELLGGPDVFLF(SEQ ID NO:1905)。

[0132] 在其他方面,所述免疫球蛋白铰链区氨基酸序列或免疫球蛋白铰链区/Fc结构域氨基酸序列侧接柔性接头氨基酸序列。柔性接头氨基酸序列包括例如$(GGGS)_{X=1-6}$、$(GGGGS)_{X=1-6}$或GSAGSAAGSGEF。

[0133] 通过添加多个重复序列(例如,四个或更多个)来增加接头将主要产生单体scFv,因此它可增加对表位的可及性。可选择接头的长度和组成以优化稳定性和功能活性,并且将靶蛋白上表位的形貌考虑在内。

[0134] 本发明还包括一种核酸构建体,所述核酸构建体包括编码以下的核酸分子:特异性地结合至第一抗原的抗体的轻链和重链可变区;特异性地结合至第二抗原的抗体的轻链和重链可变区;以及接头结构域。

[0135] 在另一方面,本发明提供了一种遗传工程化的细胞,所述细胞表达并附着在本发明的细胞表面膜tBsAb上。所述细胞是T细胞、B细胞、滤泡性T细胞或NK细胞。所述T细胞是CD4+或CD8+。所述细胞是CD4+和CD8+细胞的混合群体。将所述细胞进一步工程化以表达并分泌tBsAb。

[0136] 载体包含根据本发明的核酸构建体,并且宿主细胞(例如哺乳动物细胞)表达本发明的载体。

[0137] 嵌合抗原受体

[0138] 本发明的tBsAb可用于产生嵌合抗原受体(CAR)。所述CAR通常包含至少一种跨膜多肽,所述至少一种跨膜多肽包含至少一个包含本发明的tBsAb的细胞外配体结合结构域;一种跨膜多肽,所述跨膜多肽包含至少一个细胞内信号传导结构域。

[0139] 在优选的实施方案中,所述跨膜结构域还包含在所述细胞外配体结合结构域与所述跨膜结构域之间的茎区。本文使用的术语“茎区”通常是指起作用来将跨膜结构域连接至细胞外配体结合结构域的任何寡肽或多肽。特别地,茎区用于为细胞外配体结合结构域提供更大的灵活性和可接近性。茎区结构域可包含至多300个氨基酸,优选地10至100个氨基酸并且最优选地25至50个氨基酸。茎区可源自天然存在的分子的全部或部分,如来自CD8、CD4或CD28的细胞外区域的全部或部分,或来自抗体恒定区的全部或部分。或者,所述茎区可以是对应于天然存在的茎序列的合成序列,或者可以是完全合成的茎序列。在优选的实施方案中,所述茎区是人CD8α链的一部分

[0140] 本发明的CAR的信号转导结构域或细胞内信号传导结构域负责细胞外配体结合结构域与靶标结合后的细胞内信号传导,从而产生免疫细胞的活化和免疫应答。换句话说,信号转导结构域负责活化其中表达CAR的免疫细胞的至少一种正常效应子功能。例如,T细胞的效应子功能可以是细胞裂解活性或辅助活性,包括细胞因子的分泌。因此,术语“信号传导结构域”是指蛋白质的转导效应子信号功能信号并且指导细胞执行专门功能的部分。

[0141] 信号转导结构域包含两种不同类别的细胞质信号传导序列,即起始抗原依赖性初级活化的那些以及以抗原非依赖性方式起作用以提供次级或共刺激信号的那些。初级细胞质信号传导序列可包含信号传导基序,所述信号传导基序被称为ITAM的基于免疫受体酪氨酸的活化基序。ITAM是在多种受体的胞质内尾部中发现的明确定义的信号传导基序,其充当syk/zap70类别酪氨酸激酶的结合位点。本发明中使用的ITAM的实例可包括,作为非限制性实例,源自TCRζ、FcRγ、FcRβ、FcRε、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些。在优选的实施方案中,所述CAR的信号传导转导结构域可包含CD13ζ信号传导结构域,或FcεRIβ或γ链的胞质内结构域。在另一个优选的实施方案中,信号传导由CD3ζ与由CD28和/或肿瘤坏死因子受体(TNFr)(如例如4-1BB或OX40)提供的共刺激一起提供。

[0142] 在特定实施方案中,本发明CAR的细胞内信号传导结构域包含共刺激信号分子。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域含有串联的2、3、4或更多个共刺激分子。共刺激分子是除了抗原受体或其配体之外的为有效免疫应答所需的细胞表面分子。

[0143] “共刺激配体”是指特异性地结合T细胞上的同源共刺激分子地抗原呈递细胞上的分子,从而提供除了由例如TCR/CD3复合物与负载有肽的MHC分子的结合提供的主要信号之外的信号,所述信号介导T细胞应答,包括但不限于增殖、活化、分化等。共刺激配体可包括但不限于CD7、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、诱导型共刺激配体(ICOS-L)、细胞间粘附分子(ICAM、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、M1CB、HVEM、淋巴毒素β受体、3/TR6、ILT3、ILT4、结合Toll配体受体的激动剂或抗体以及与B7-H3特异性地结合的配体。共刺激配体还尤其涵盖与T细胞上存在的共刺激分子特异性结合的抗体,如但不限于CD27、CD28、4-IBB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、与CD83特异性地结合的配体。

[0144] “共刺激分子”是指T细胞上的同源结合配偶体,其与共刺激配体特异性地结合,从而介导细胞的共刺激应答,如但不限于增殖。共刺激分子包括但不限于MHC 1类分子、BTLA和Toll配体受体。共刺激分子的实例包括CD27、CD28、CD8、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、以及与CD83特异性地结合的配体等。在另一个特定实施方案中,所述信号转导结构域是TNFR相关因子2

(TRAF2)结合基序,共刺激TNFR成员家族的胞质内尾部。共刺激TNFR家族成员的细胞质尾部含有由主要保守基序(P/S/A)X(Q/E)E)或次要基序(PXQXXD)组成的TRAF2结合基序,其中X是任何氨基酸。TRAF蛋白质响应于受体三聚化而募集至许多TNFR的细胞内尾部。

[0145] 适当的跨膜多肽的区别特征包括在免疫细胞表面、特别是淋巴细胞或自然杀伤(NK)细胞的表面处表达的能力,以及一起相互作用以指导免疫细胞针对预定靶细胞的细胞应答的能力。包含细胞外配体结合结构域和/或信号转导结构域的本发明CAR的不同跨膜多肽一起相互作用以在与靶配体结合后参与信号转导并诱导免疫应答。跨膜结构域可源自天然来源或合成来源。跨膜结构域可源自任何膜结合或跨膜蛋白质,尽管优选最佳适应嵌合体的某些跨膜结构域,例如,在靶结合不存在下促进自身聚集或促进CART细胞基础活化的增加的那些跨膜结构域,这可能导致过早耗竭。

[0146] 本文使用的术语"……的一部分"是指分子的任何子集,即较短的肽。或者,可通过编码多肽的DNA中的突变来制备多肽的氨基酸序列功能变体。此类变体或功能变体包含例如氨基酸序列内残基的缺失、插入或取代。还可进行缺失、插入和取代的任何组合以获得最终构建体,其限制条件是最终构建体具有所需活性,尤其是表现出特异性抗靶细胞免疫活性。本发明的CAR在宿主细胞内的功能性可在适于证明所述CAR结合特定靶标时的信号传导潜力的测定中检测。本领域技术人员可获得此类测定。例如,这种测定允许检测在靶标结合时触发的信号传导途径,如涉及测量钙离子释放的增加、细胞内酪氨酸磷酸化、肌醇磷酸转换或由此实现的白细胞介素(IL)2、干扰素γ、GM-CSF、IL-3、IL-4产生的测定。

[0147] 使用方法

[0148] 根据本发明的tBsAb、表达所述tBsAb的细胞或CAR可用于治疗有需要的患者的癌症、病毒感染或自身免疫性病症。在另一个实施方案中,根据本发明的tBsAb、表达所述tBsAb的细胞或CAR可用于制造用于治疗有需要的患者的癌症、病毒感染或自身免疫性病症的药物。

[0149] 所述治疗可以是改善、治愈或预防。它可以是自体免疫疗法的一部分,或是同种异体免疫疗法治疗的一部分。自体是指用于产生tBsAb或表达所述tBsAb的细胞的细胞、细胞系或细胞群体来源于患者或来源于人白细胞抗原(HLA)相容性供体。同种异体是指用于产生tBsAb或表达所述tBsAb的细胞的细胞或细胞群体不是来源于患者而是来源于供体。

[0150] 治疗可用于治疗被诊断为患有癌症、病毒感染、自身免疫性病症或移植物抗宿主病(GvHD)的患者。可治疗的癌症包括未血管化或尚未大体上血管化的肿瘤以及血管化的肿瘤。癌症可包括非实体瘤(如血液肿瘤,例如白血病和淋巴瘤)或者可包括实体瘤。待使用本发明的CAR治疗的癌症类型包括但不限于癌、母细胞瘤和肉瘤、以及某些白血病和淋巴恶性肿瘤、良性和恶性肿瘤、以及恶性肿瘤,例如肉瘤、癌和黑素瘤。也包括成人肿瘤/癌症和儿科肿瘤/癌症。

[0151] 它可以是与针对癌症的一种或多种疗法组合的治疗,所述针对癌症的一种或多种疗法选自抗体疗法、化学疗法、细胞因子疗法、树突细胞疗法、基因疗法、激素疗法、激光疗法和放射疗法的组。

[0152] 在另一个实施方案中,本发明的组合物与骨髓移植、使用化疗剂(诸如氟达拉滨、外部波束放射治疗(XRT)、环磷酰胺)或抗体(诸如OKT3或CAM PATH)的T细胞清除疗法结合(例如,之前、同时或之后)向患者施用。

[0153] 定义

[0154] 应当注意,术语“一个/种(a/an)”实体是指一个或多个所述实体;例如,“双特异性抗体”被理解为表示一种或多种双特异性抗体。因此,术语“一个/种”(或“一/个种”)、“一个/种或多个/种”和“至少一个/种”在本文中可互换使用。

[0155] 如本文所用,术语“多肽”意图涵盖单数“多肽”以及复数“多肽”,并且是指由通过酰胺键(也称为肽键)线性连接的单体(氨基酸)组成的分子。术语“多肽”是指具有两个或更多个氨基酸的任何一个或多个链,并且不是指产物的具体长度。因此,肽、二肽、三肽、寡肽、“蛋白质”、“氨基酸链”或用于指具有两个或更多个氨基酸的一个或多个链的任何其他术语包含在“多肽”的定义中,并且术语“多肽”可代替这些术语中的任何一个、或可与其互换使用。术语“多肽”还意图指多肽的表达后修饰产物,所述修饰包括但不限于糖基化、乙酰化、磷酰化、酰胺化、通过已知保护/阻断基团而衍生化、蛋白水解性裂解、或被非天然存在的氨基酸修饰。多肽可源自天然生物来源或由重组技术产生,但不必从指定核酸序列翻译。它可以任何方式产生,包括通过化学合成。

[0156] 如本文关于细胞、核酸如DNA或RNA使用的术语“分离的”是指分子与分别存在于大分子的天然来源中的其它DNA或RNA分离。如本文所用的术语“分离的”还指当通过重组DNA技术产生时基本上不含细胞材料、病毒材料或培养基,或者当化学合成时基本上不含化学前体或其他化学品的核酸或肽。此外,“分离的核酸”意指包括非天然存在为片段并且不会以自然状态存在的核酸片段。术语“分离的”在本文中还用于指从其他细胞蛋白质或组织中分离的细胞或多肽。分离的多肽意在涵盖纯化的多肽和重组多肽。

[0157] 如本文所用,与多肽或多核苷酸有关的术语“重组”意指并非天然存在的多肽或多核苷酸的形式,其非限制性实例可通过将通常不会天然存在的多核苷酸或多肽组合在一起来产生。

[0158] “同源性”或“同一性”或“相似性”是指两个肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性。同源性可通过比较各序列中可为比较目的来比对的位置而确定。当所比较序列中的位置被相同的碱基或氨基酸占据时,那么这些分子在那个位置上是同源的。序列之间的同源性程度随着序列共有的匹配或同源位置的数目而变化。“无关”或“非同源的”序列与本公开的序列之一共有小于40%的同一性,但优选小于25%的同一性。

[0159] 与另一个序列具有一定百分比(例如60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)的“序列同一性”的多核苷酸或多核苷酸区(或多肽或多肽区)是指在比较两个序列时,一定百分比的碱基(或氨基酸)在比对时是相同的。这种比对和同源性或序列同一性百分比可使用本领域中已知的软件程序来确定,例如在Ausubel等人编辑(2007)Current Protocols in Molecular Biology中描述的那些软件程序。优选地,缺省参数用于比对。一种比对程序是BLAST,其使用缺省参数。特别地,程序是BLASTN和BLASTP,使用以下缺省参数:遗传密码=标准;过滤器=无;链=两个;截断值=60;期望值=10;矩阵=BLOSUM62;描述=50个序列;排序方式=高评分;数据库=非冗余,GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS翻译+SwissProtein+SPupdate+PIR。这些程序的细节可在2008年5月21日最后访问的万维网(www)ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi找到。生物学上等效的多核苷酸是具有上述指定百分比同源性并且编码具有相同或相似生物活性的多肽的那些多核苷酸。

[0160] 术语“等效核酸或多核苷酸”是指具有与核酸或其补体的核苷酸序列具有一定程度的同源性或序列同一性的核苷酸序列的核酸。双链核酸的同源物意图包括具有与其补体具有一定程度的同源性的核苷酸序列的核酸。在一个方面,核酸的同源物能够与核酸或其补体杂交。同样,“等效多肽”是指与参考多肽的氨基酸序列具有一定程度的同源性或序列同一性的多肽。在一些方面,序列同一性是至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。在一些方面,等效序列保留参考序列的活性(例如,表位结合)或结构(例如,盐桥)。

[0161] 杂交反应可在不同“严格性”的条件下进行。通常,低严格性杂交反应在约40下在约10x SSC或等效离子强度/温度的溶液中进行。中等严格性杂交通常在约50下在约6x SSC中进行,并且高严格性杂交反应通常在约60下在约1x SSC中进行。杂交反应也可在本领域技术人员熟知的“生理条件”下进行。生理条件的非限制性实例是通常在细胞中发现的Mg^{2}+的温度、离子强度、pH和浓度。

[0162] 多核苷酸由四个核苷酸碱基的特定序列组成:腺嘌呤(A);胞嘧啶(C);鸟嘌呤(G);胸腺嘧啶(T);并且当多核苷酸是RNA时,尿嘧啶(U)代替胸腺嘧啶。因此,术语“多核苷酸序列”是多核苷酸分子的字母表示。这种字母表示可被输入到具有中央处理单元的计算机中的数据库,并且用于生物信息学应用,例如功能基因组学和同源性检索。术语“多态性”是指多于一种形式的基因或其部分的共存。存在至少两种不同形式,即两种不同核苷酸序列的基因的一部分被称为“基因的多态性区域”。多态性区域可以是单个核苷酸,其身份在不同等位基因中不同。

[0163] 术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”是可互换使用的并且是指任何长度的聚合形式核苷酸,无论是脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物。多核苷酸可具有任何三维结构,并且可执行已知的或未知的任何功能。以下是多核苷酸的非限制性实例:基因或基因片段(例如,探针、引物、EST或SAGE标签)、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转运RNA、核糖体RNA、核酶、cDNA、dsRNA、siRNA、miRNA、重组多核苷酸、支链多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离DNA、任何序列的分离RNA、核酸探针以及引物。多核苷酸可包含修饰的核苷酸,如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物。如果存在,可在多核苷酸的装配之前或之后给予对核苷酸结构的修饰。核苷酸的序列可被非核苷酸组分间断。多核苷酸可在聚合之后进行进一步修饰,如通过与标记组分缀合。所述术语也指双链和单链分子。除非另有说明或要求,作为多核苷酸的本公开的任何实施方案包含双链形式和已知或预测构成双链形式的两个互补单链形式中的每一个。

[0164] 应用于多核苷酸的术语“编码”是指如下多核苷酸:如果所述多核苷酸在其天然状态下或通过本领域技术人员公知的方法操作时,可被转录和/或翻译以产生一种多肽和/或其片段的mRNA,那么所述多核苷酸被说成“编码”所述多肽。反义链是这种核酸分子的补体,并且编码序列可从其中推断出。

[0165] 如本文所用,术语“可检测标记”意指直接或间接可检测的化合物或组合物,所述化合物或组合物直接或间接地缀合至待检测的组合物,例如多核苷酸或蛋白质如抗体,以产生“标记的”组合物。所述术语还包括将在插入序列表达时提供信号,如绿色荧光蛋白(GFP)等的与多核苷酸缀合的序列。标记可以是可检测的(例如,放射性同位素标记或荧光标记)或在酶标记的情况下可催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。标记可适用于小规模检测或更适合于高通量筛选。因此,合适的标记包括但不限于放射性同位素、荧光

染料、化学发光化合物、染料和蛋白质，包括酶。可简单地检测标记或者可定量标记。简单检测的响应通常包括仅仅确认存在的响应，而定量的响应通常包括具有可量化(例如，可数字报告的)值的响应，如强度、极化和/或其他属性。在发光或荧光测定中，可使用与实际参与结合的测定组分缔合的发光团或荧光团直接地或使用与另一种(例如，报告分子或指示剂)组分缔合的发光团或荧光团间接地产生可检测的响应。

[0166] 如本文所用，“抗体”或“抗原结合多肽”是指特异性地识别并结合至抗原的多肽或多肽复合物。抗体可以是完整抗体和其任何抗原结合片段或单链。因此，术语“抗体”包括任何含蛋白质或肽的分子，所述分子包含具有结合至抗原的生物活性的免疫球蛋白分子的至少一部分。此类的实例包括但不限于重链或轻链或其配体结合部分的互补决定区(CDR)、重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、框架(FR)区或其任何部分，或结合蛋白的至少一部分。

[0167] 如本文所用，术语“抗体片段”或“抗原结合片段”是抗体的一部分，如$F(ab')_2$、$F(ab)_2$、Fab'、Fab、Fv、scFv等。无论结构如何，抗体片段与完整抗体所识别的相同抗原结合。术语“抗体片段”包括适体、镜像异构体(spiegelmer)和双抗体。术语“抗体片段”还包括通过与特定抗原结合以形成复合物而充当抗体的任何合成或遗传工程化的蛋白质。

[0168] “单链可变片段”或“scFv”是指免疫球蛋白的重链(V_H)和轻链(V_L)的可变区的融合蛋白。在一些方面，所述区域与10至约25个氨基酸的短接头肽连接。所述接头可富含甘氨酸以获得柔性，以及丝氨酸或苏氨酸以获得溶解性，并且可连接V_H的N-末端与V_L的C-末端，反之亦然。尽管除去恒定区并引入接头，但这种蛋白保留原始免疫球蛋白的特异性。ScFv分子是本领域已知的并且例如描述于美国专利号5,892,019中。

[0169] “串联scFv”由通过短接头连接的两个scFv组成，所述短接头允许两个单独的抗原结合单元自由旋转，从而产生柔性结构。

[0170] 术语抗体涵盖可在生物化学上区分的各种广泛类别的多肽。本领域技术人员将了解，重链被分类为γ、μ、α、δ或ε，在它们之中具有一些亚类(例如，γ1至γ4)。这种链的性质决定了抗体的“类别”分别为IgG、IgM、IgA IgG或IgE。免疫球蛋白亚类(同种型)例如IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgG_5等被充分表征，并且已知可赋予功能特化。鉴于本公开，熟练的技术人员易于辨别出这些类别和同种型各自的修饰型式，并且因此处于本公开的范围内。所有免疫球蛋白类别明显在本公开的范围内，以下论述通常将涉及IgG类别的免疫球蛋白分子。关于IgG，标准免疫球蛋白分子包含分子量大约23,000道尔顿的两个相同轻链多肽和分子量53,000至70,000的两个相同重链多肽。这四条链通常由二硫键以“Y”构型连接在一起，其中轻链从“Y”的开口处开始并且一直通过可变区与重链括在一起。

[0171] 本公开的抗体或其抗原结合多肽、变体或衍生物包括，但不限于：多克隆抗体、单克隆抗体、多特异性抗体、人抗体、人源化抗体、灵长类化抗体或嵌合抗体、单链抗体、表位结合片段(例如Fab、Fab'和$F(ab)_2$、Fd、Fv、单链Fv(scFv)、单链抗体、二硫键连接的Fv(sdFv)、包含V_K或V_H结构域的片段、由Fab表达文库产生的片段以及抗独特型(抗Id)抗体(包括，例如，本文公开的LIGHT抗体的抗Id抗体)。本公开的免疫球蛋白或抗体分子可具有免疫球蛋白分子的任何类型(例如，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。

[0172] 轻链被分类为κ或λ。每个重链类别可与κ或λ轻链结合。通常，轻链和重链彼此共价

键合,并且当免疫球蛋白由杂交瘤、B细胞或遗传工程化的宿主细胞产生时,两条重链的“尾”部分通过共价二硫键或非共价键联彼此键合。在重链中,氨基酸序列从Y构型的分叉端的N-末端延伸至每条链底部的C-末端。

[0173] 轻链和重链两者均划分到具有结构和功能同源性的区域之中。术语“恒定”和“可变”是在功能上使用。在此方面,应了解轻(V_K)链和重(V_H)链部分二者的可变结构域决定抗原识别和特异性。相反地,轻链(CK)和重链(CH1、CH2或CH3)的恒定结构域赋予重要的生物特性,诸如分泌、经胎盘移动性、Fc受体结合、补体结合等。按照惯例,恒定区结构域的编号随着它们变得更远离抗体的抗原结合位点或氨基末端而增加。N-末端部分是可变区并且在C-末端部分处是恒定区;CH3结构域和CK结构域实际上分别包含重链和轻链的羧基-末端。

[0174] 如上所指明,可变区允许抗体选择性识别和特异性结合抗原上的表位。即,抗体的V_K结构域和V_H结构域或互补决定区(CDR)的子集组合以形成限定三维抗原结合位点的可变区。这种四级抗体结构形成存在于Y的每条臂的末端处的抗原结合位点。更具体地,抗原结合位点由V_H和V_K链中的每一个上的三个CDR限定,即CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3)。在一些例子中,例如,源自骆驼科动物种类或基于骆驼科动物免疫球蛋白的工程化的某些免疫球蛋白分子(完整的免疫球蛋白分子)可仅由重链组成,不具有轻链。参见例如Hamers-Casterman等人,Nature 363:446-448(1993)。

[0175] 在天然存在的抗体中,存在于每个抗原结合结构域中的六个“互补决定区”或“CDR”是短的、非连续的氨基酸序列,所述氨基酸被特别地定位以在抗体在水性环境中呈现其三维构型时形成抗原结合结构域。被称为“框架”区的抗原结合结构域中的其余氨基酸显示较小分子间变化性。框架区大部分采用b-折叠构象,并且CDR形成连接并且在一些情况下形成β-折叠结构的一部分的环。因此,框架区起作用以便形成支架,所述支架提供通过链间、非共价相互作用将CDR以正确取向来进行定位。由所定位的CDR形成的抗原结合结构域限定与免疫反应性抗原上的表位互补的表面。这种互补表面促进抗体与其同源表位的非共价结合。分别构成CDR和框架区的氨基酸可由本领域普通技术人员针对任何给定的重链或轻链可变区来容易地鉴别,因为它们已经得到了精确地定义(参见“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”Kabat,E.,等人,美国卫生和公众服务部,(1983);以及Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.,196:901-917(1987),所述文献以引用的方式整体并入本文)。

[0176] 在其中本领域内使用和/或接受的术语存在两种或更多种定义的情况下,如本文所使用的术语的定义旨在包括所有此类意义,除非明确地相反说明。具体实例是使用术语“互补决定区”(“CDR”)来描述在重链与轻链多肽两者的可变区中所发现的非连续抗原组合位点。这种特定区域已经由Kabat等人,美国卫生和公众服务部,“Sequences of Proteins of Immunological Interest”(1983)和Chothia等人,J.Mol.Biol.196:901-917(1987)描述,所述文献以引用的方式整体并入本文。根据Kabat和Chothia的CDR定义包括当彼此比较时氨基酸残基的重叠或子集。然而,应用任一定义来指抗体或其变体的CDR旨在处于如本文所定义和使用的术语的范围内。如通过以上引用的参考文献中的每个所定义的涵盖CDR的适当的氨基酸残基作为比较被列举在以下表中。涵盖特定CDR的准确残基编号将取决于CDR的序列和大小而改变。本领域技术人员通常可确定什么残基包含给定抗体的可变区氨基酸序列的具体CDR。

[0177] Kabat等还定义了适用于任何抗体的用于可变结构域序列的编号系统。本领域普通技术人员可明确地对任何可变结构域序列指定这种“Kabat编号”系统,而不依赖于超过序列本身的任何实验数据。如本文所用,“Kabat编号”是指由Kabat等人,美国卫生和公众服务部,“Sequence of Proteins of Immunological Interest”(1983)所阐明的编号系统。

[0178] 除了上表之外,Kabat编号系统如下描述CDR区域:CDR-H1在大约氨基酸31处(即,在第一个半胱氨酸残基之后大约9个残基处)开始,包括大约5-7个氨基酸,并且在下一个酪氨酸残基处结束。CDR-H2在CDR-H1末端之后的第十五个残基处开始,包括大约16-19个氨基酸,并且在下一个精氨酸或赖氨酸残基处结束。CDR-H3在CDR-H2末端之后的大约第三十三个氨基酸残基处开始;包括3-25个氨基酸;并且在序列W-G-X-G处结束,其中X是任何氨基酸。CDR-L1在大约残基24(即,在半胱氨酸残基之后)处开始;包括大约10-17个残基;并且在下一个色氨酸残基处结束。CDR-L2在CDR-L1末端之后大约第十六个残基处开始,并且包括大约7个残基。CDR-L3在CDR-L2末端之后(即,在半胱酸残基后)的大约第三十三个残基处开始;包括大约7-11个残基并且在序列W-G-X-G处结束,其中X是任何氨基酸。

[0179] 本文公开的抗体可来自任何动物来源,包括鸟类和哺乳动物。优选地,所述抗体是人类、鼠类、驴、兔、山羊、豚鼠、骆驼、美洲驼、马或鸡抗体。在另一个实施方案中,可变区可以是来源于软骨鱼(condricthoid)(例如,来自鲨鱼)。

[0180] 如本文所用,术语“重链恒定区”包括源自免疫球蛋白重链的氨基酸序列。包含重链恒定区的多肽包含以下中的至少一种:CH1结构域、铰链(例如,上、中和/或下铰链区)结构域、CH2结构域、CH3结构域或其变体或片段。例如,在本公开中使用的抗原结合多肽可包含:包含CH1结构域的多肽链;包含CH1结构域、铰链结构域的至少一部分以及CH2结构域的多肽链;包含CH1结构域和CH3结构域的多肽链;包含CH1结构域、铰链结构域的至少一部分以及CH3结构域的多肽链或包含CH1结构域、铰链结构域的至少一部分、CH2结构域以及CH3结构域的多肽链。在另一个实施方案中,本公开的多肽包括包含CH3结构域的多肽链。此外,在本公开中使用的抗体可缺乏CH2结构域的至少一部分(例如,CH2结构域的全部或部分)。如上文所阐述,本领域普通技术人员将理解重链恒定区可进行修饰以使得它们的氨基酸序列与天然存在的免疫球蛋白分子不同。

[0181] 本文公开的抗体的重链恒定区可源自不同的免疫球蛋白分子。例如,多肽的重链恒定区可包含源自IgG分子的CH1结构域和源自IgG_3分子的铰链区。在另一个实例中,重链恒定区可包含部分源自IgG分子和部分源自IgG_3分子的铰链区。在另一个实例中,重链部分可包含部分源自IgG分子和部分源自IgG_4分子的嵌合铰链。

[0182] 如本文所用,术语“轻链恒定区”包含源自免疫球蛋白轻链的氨基酸序列。优选地,轻链恒定区包含恒定κ结构域或恒定λ结构域中的至少一个。

[0183] “轻链-重链对”是指可通过轻链的CL结构域和重链的CH1结构域之间的二硫键形成二聚体的轻链和重链的集合。

[0184] 如先前所指明,各种免疫球蛋白类别的恒定区的亚单位结构和三维构型是众所周知的。如本文所用,术语“V_H结构域”包括免疫球蛋白重链的氨基末端可变结构域,并且术语“CH1结构域”包括免疫球蛋白重链的第一(最氨基末端)恒定区结构域。CH1结构域与V_H结构域相邻并且是免疫球蛋白重链分子的铰链区的氨基末端。

[0185] 如本文所用,术语“CH2结构域”包括使用常规编号方案例如从抗体的约残基244延

伸至残基360的重链分子的部分(残基244至残基360,Kabat编号系统;并且残基231至残基340,EU编号系统;参见Kabat等人,美国卫生和公众服务部,“Sequences of Proteins of Immunological Interest”(1983)。CH2结构域的独特在于它不与另一个结构域紧密配对。而两条N-连接的支链碳水化合物链介于完整的天然IgG分子的两个CH2结构域之间。还被充分记载的是CH3结构域从CH2结构域延伸至IgG分子的C-末端并且包含大约108个残基。

[0186] 如本文所用,术语“铰链区”包括使CH1结构域与CH2结构域连接的重链分子的部分。这个铰链区包含大约25个残基并且是柔性的,从而允许两个N-末端抗原结合区独立地移动。铰链区可再分成三个相异的结构域:上、中和下铰链结构域(Roux等人,J.Immunol.161:4083(1998))。

[0187] 如本文所用,术语“二硫键”包括在两个硫原子之间形成的共价键。氨基酸半胱氨酸包含可与第二硫醇基形成二硫键或二硫桥的硫醇基。在大多数天然存在的IgG分子中,CH1区和CK区由二硫键连接并且两条重链在使用Kabat编号系统(位置226或229,EU编号系统)的对应于239和242的位置上由两个二硫键连接。

[0188] 如本文所用,术语“嵌合抗体”将意指其中免疫反应性区或位点获自或衍生自第一物种并且恒定区(所述恒定区可以是完整的、部分的或根据本公开修饰的)获自第二物种的任何抗体。在某些实施方案中,靶结合区或位点将来自非人来源(例如小鼠或灵长类动物)并且恒定区是来自人。

[0189] 如本文所用,“人源化百分比”通过确定人源化结构域与种系结构域之间的框架氨基酸差异(即,非CDR差异)的数量,从氨基酸总数中减去所述数量,且然后除以氨基酸总数并乘以100来计算。

[0190] “特异性地结合”或“与……具有特异性”通常意指抗体经由其抗原结合结构域与表位结合,并且结合需要在抗原结合结构域与表位之间有一些互补性。根据这一定义,当抗体经由其抗原结合结构域比它将与随机、不相关的表位结合更容易地与表位结合时,所述抗体被称为与所述表位“特异性地结合”。本文使用术语“特异性”来限定相对亲和性,通过所述相对亲和性某一抗体与某一表位结合。例如,可以认为抗体“A”比抗体“B”对给定表位具有更高的特异性,或者可以说抗体“A”以比它对相关表位“D”更高的特异性结合至表位“C”。

[0191] 如本文所用,术语“治疗(treat)”或“治疗(treatment)”是指治疗性治疗和预防性或防治性措施,其中目的是为了预防或减缓(减轻)不希望的生理学变化或病症,如癌症的进展。有益的或所需的临床结果包括但不限于症状的减轻、疾病程度的减小、疾病状态的稳定(即不恶化)、疾病进程的延缓或减慢、疾病状态的改善或缓和,以及缓解(无论是部分缓解或是全部缓解),无论是可检测或是不可检测。“治疗”还可意指与未接受治疗时预期的存活相比延长存活。需要治疗的那些包括已患有病状或病症的那些以及易于患上病状或病症的那些或打算预防病状或病症的那些。

[0192] “受试者”或“个体”或“动物”或“患者”或“哺乳动物”是指需要诊断、预后或治疗的任何受试者,特别是哺乳动物受试者。哺乳动物受试者包括人、家养动物、农场动物、以及动物园、体育或宠物动物,诸如狗、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、牛、奶牛、熊等。

[0193] 如本文所用,诸如“需要治疗的患者”或“需要治疗的受试者”的短语包括将受益于施用(例如用于检测、用于诊断程序和/或用于治疗的)本公开的抗体或组合物的受试者,如

哺乳动物受试者。

[0194] 本公开描述了双特异性抗体的开发,所述双特异性抗体可应用于癌症疗法。为了实现这一目标,产生了对GITR蛋白和PD-L1蛋白具有双重特异性的两种四聚体双特异性抗体(tBsAb)。这些构建体的一个优点是它们将通过活化T细胞并消除调控性T细胞遏制来增强抗肿瘤应答。还描述了抗CCR4-抗PDL1 tBsAb(图3和4)和抗CAIX-抗PDL1(图5和6)。

[0195] 在此描述了pcDNA3.4哺乳动物表达载体中两种不同形式的串联scFv片段二聚化单元。在第一构建体中,所述串联scFv包含源自不同亲本抗体的两个scFv。αGITR scFv和αPD-L1 scFv通过两个柔性接头之间的IgG1铰链区串联连接。第一构建体具有VH GITR10-接头-VL GITR10-接头-铰链-接头-VH PD-L1-接头-VL PD-L1的结构,并且其序列通过DNA测序进行确认。第二种形式与第一种形式等效地构建。然而,它包括在铰链与一个接头区之间引入的额外结构域,例如CH2结构域。第二构建体具有VH GITR-接头-VL GITR-接头-铰链-CH2-接头-VH PD-L1-接头-VL PD-L1的结构。与第一构建体相比,第二构建体包含Fc结构域,可能产生三功能tBsAb。

[0196] 通过在HEK细胞中瞬时转染成功表达两种tBsAb,并使用Ni-NTA琼脂糖通过亲和色谱法进行纯化。

[0197] 通过SDS-PAGE评价纯化的蛋白质,并且结果显示在还原条件下,tBsAb的所有蛋白质谱表现出一个单一条带并且与串联scFv(taFv)的理论值一致:对于αGITR-αPD-L1 taFv为65kDa并且对于具有CH2的αGITR-αPD-L1 taFv为75kDA。在非还原条件下,αGITR-αPD-L1(130kDa)和具有CH2的αGITR-αPD-L1(150kDa)tBsAb的预测分子量与表观分子量相匹配(参见图18)。

[0198] ELISA和流式细胞术证明了新设计的tBsAb的生物学活性。在ELISA中,所产生的BsAb的αPD-L1臂的保留的结合活性在体外保留,并且显示出与αPD-L1 mAb相似的结合活性。由于αGITR-αPD-L1抗体所不结合的CCR4未显示任何信号,因此排除了tBsAb的非特异性结合。此外,观察到对于产生的BsAb(αGITR-αPD-L1和具有CH2的αGITR-αPD-L1),αGITR臂与GITR蛋白的类似结合活性。同样从此臂中排除非特异性结合,因为αGITR-αPD-L1抗体未显示出对GITR-CF2细胞的任何结合特异性。当将αGITR IgG与每种BsAb进行比较时,αGITR IgG在ELISA实验中显示更高的结合,从而表明tBsAb的亲和力较低。然而,取决于抗原结合位点的空间排列以及抗原表面分布,tBsAb的双价可增加亲合力,这可补偿弱结合。

[0199] 用GITR+CF2细胞测试的αGITR-αPD-L1的流式细胞术分析表明,当在细胞上表达时,新颖的tBsAb以其天然构象识别GITR蛋白。观察到αGITR-αPD-L1 tBsAb与GITR mAb相比的类似结合亲和力。因此,ELISA和流式细胞术分析证明了αGITR10-αPD-L1和具有CH2的αGITR10-αPD-L1当在细胞上表达时特异性地识别相应抗原的能力,体内的情况也如此。这些表征研究表现出αGITR-αPD-L1和具有CH2的αGITR-αPD-L1的类似结合行为。

[0200] 具有CH2的αGITR10-αPD-L1的一个重要方面在于其在诱导补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)中的功能。当靶向肿瘤细胞进行破坏时,这些进一步发挥了tBsAb的有益作用。

[0201] 在ADCC分析中,使用GITR+CF2作为靶细胞并且使用WIL2-S作为效应细胞(E/T=5:1),αGITR10-αPD-L1和具有CH2的αGITR10-αPD-L1展示出人意料的结果。对于αGITR10-αPD-L1和具有CH2的αGITR10-αPD-L1抗体,荧光素酶活性的原始信号在更高抗体浓度的情况下

降低,并且显著低于单一靶标和效应细胞的信号(参见图30)。

[0202] 本文描述的方法允许产生仅涉及一个克隆步骤的tBsAb。所述tBsAb在仅约150kDa的小尺寸分子中保持对GITR蛋白和PD-L1抗原的双重亲和力。此类tBsAb对于有效的癌症治疗剂至关重要。

[0203] 实施例

[0204] 实施例1:αGITR-αPD-L1四聚体双特异性抗体(tBsAb)的克隆。

[0205] 克隆策略

[0206] 目标是克隆含有源自不同的亲本抗体并通过柔性接头连接的两个重组单链可变片段(scFv)的质粒。虽然scFv之一是针对GITR蛋白,但另一种是针对PD-L1。这种质粒将产生两个scFv,所述scFv通过接头-铰链-接头结构域共价连接并产生四聚体双特异性抗体(αGITR-αPD-L1 tBsAb)。

[0207] 哺乳动物表达载体pcDNA3.4质粒是构建体的基础(V_HGITR-接头-V_LGITR-接头-铰链-接头-V_HPD-L1-接头-V_LPD-L1)。pcDNA 3.4表达载体的基本结构预先含有与N-末端6x-His标签融合的V_H^X-接头-V_L^X-接头-铰链-接头-V_HPD-L1-接头-V_LPD-L1基因(图12)。

[0208] 限制酶消化和连接

[0209] 将六个αGITR scFv基因序列单独克隆到pcDNA 3.4表达载体中。将六个V_HGITR-接头-V_LGITR基因序列标记为V_HGITRL1-V_LGITRL1、V_HGITRL10-V_LGITRL10、V_HGITRL11-V_LGITRL11、V_HGITRL14-V_LGITRL14、V_HGITRL15-V_LGITRL15和V_HGITRL17-V_LGITRL17。所有六个αGITR基因序列侧接SfiI和NotI限制性位点,并通过消化从对应的供体质粒中分离(表1)。类似地,pcDNA3.4表达载体也用SfiI和NotI限制酶进行消化。在1%琼脂糖凝胶上对消化的载体和片段进行分析,并使用QIAquick凝胶提取试剂盒进行纯化。使用T4连接试剂盒将来自SfiI和NotI消化的粘性插入物以5倍摩尔比连接到相应的载体pcDNA 3.4中。每次连接反应使用50纳克接受者载体。连接产物产生V_HGITR-接头-V_LGITR-接头-铰链-接头-V_HPD-L1-接头-V_LPD-L1的最终构型(图12)。

[0210] 各自构建三个额外的克隆以产生对照抗体。选择F10基因作为“对照组”;因为V_HF10-V_LF10结合结构域对GITR和PD-L1蛋白均不具有结合亲和力。因此,此结构域被定义为阴性对照。F10是针对流感HA蛋白的经验证的抗体。为了保持相同的抗体形式,其基因序列仅分别代替V_HGITR1-接头-V_LGITR1或V_HPD-L1-接头-V_LPD-L1。三种对照质粒表现出以下测序顺序:

[0211] (1)V_HF10-接头-V_LF10-接头-铰链-接头-V_HPD-L1-接头-V_LPD-L1(F10-αPD-L1)

[0212] (2)V_HGITR1-接头-V_LGITR1-接头-铰链-接头-V_HF10-接头-V_LF10(αGITR1-F10)

[0213] (3)V_HGITR10-接头-V_LGITR10-接头-铰链-接头-V_HF10-接头-V_LF10(αGITR10-F10)

[0214] 质粒(1)的构建:

[0215] 通过用SfiI和NotI RE消化从pcDNA 3.1载体中分离V_HF10-接头-V_LF10基因。至于表达载体,使用相同的pcDNA3.4载体(图13)。它在所需的插入位点含有SfiI和NotI限制性位点,并且因此用相应的限制酶消化。通过将两种消化产物彼此连接而获得最终质粒。使用T4连接试剂盒在16下进行连接过夜。

[0216] 用于构建质粒(2)和(3)的步骤:

[0217] 为了替代先前构建体中的αPD-L1scFv,设计并合成了正向和反向引物以分别引入

BsiWI和BamHI限制性位点以及V_HF10-接头-V_LF10片段的5'和3'。在PCR扩增后,将含有V_HF10-接头-V_LF10的PCR产物和pcDNA3.4表达载体用BsiWI和BamHI消化,并用于替代先前构建的表达质粒(V_HGITR^1-接头-V_LGITR^1-接头-铰链-接头-V_HPD-L1-接头-V_LPD-L1和V_HGITR^{10}-接头-V_LGITR^{10}-接头-铰链-接头-V_HPD-L1-接头-V_LPD-L1)中编码V_HPD-L1-接头-V_LPD-L1的DNA片段。将消化的表达载体和插入物使用QIAquick凝胶提取试剂盒进行凝胶纯化(1%琼脂糖),且随后通过快速连接(5分钟,在室温下)彼此连接。这一程序产生质粒(2)和(3)(图14)。

[0218] 用于构建对照质粒构建体的引物设计

[0219] 如上所述,设计两种引物用于对照质粒(2)和(3)以分离V_HF10-接头-V_LF10。设计正向引物(5'-3')以结合在DNA互补链的3'端;设计反向引物(3'-5')以结合在主DNA链的3'端上并反向互补。引物长约20bp,最佳解链温度在62与65之间,并且偏差不超过±1。正向引物(含有BsiWI限制位点(1号)和反向引物(含有BamHI限制位点(2号))由Genewiz合成。对于PCR反应,100ng DNA模板(pcDNA3.1)用于热循环中。将PCR产物根据制造商方案用QIAquick PCR纯化试剂盒纯化,并在1%琼脂糖凝胶上进行分析。

[0220] 实施例2:含有CH2结构域的αGITR10-αPD-L1四聚体双特异性抗体(tBsAb)的克隆

[0221] 克隆策略

[0222] 此实施例的目的是将来自IgG1的CH2结构域引入先前构建的质粒中,从而产生V_HGITR-接头-V_LGITR-接头-铰链-CH2-接头-V_HPD-L1-接头-V_LPD-L1的基本结构。CH2的添加增加了效应子功能,从而产生三功能tBsAb。

[0223] 含有αGITR10-αPDL1的pcDNA3.4表达载体用作用于构建新质粒的模板。通过IgG1铰链区与接头$(GGGGS)_6$之间的定点诱变引入新的限制位点HindIII。这种新构建的限制位点用作IgG1恒定CH2结构域的克隆位点(参见图15)。出于若干原因选择HindIII限制位点。HindIII限制位点在质粒中是独特的,并且其基因组序列与其相邻的编码区不相似。然而,HindIII具有一些缺点,如相对长的长度(6个核苷酸)可能降低诱变功效。

[0224] IgG1质粒用作模板以分离CH2结构域。使用含有限制位点HindIII的引物通过PCR扩增CH2序列。用相应的限制酶消化pcDNA 3.4表达载体(V_HGITR^{10}-接头-V_LGITR^{10}-接头-铰链-HindIII*-V_HPD-L1-接头-V_LPD-L1)和扩增的CH2片段。使用QIAquick凝胶提取试剂盒对消化的载体和片段进行凝胶纯化(1%琼脂糖)。使用快速连接试剂盒将来自HindIII消化物的粘性插入物以二十倍插入物连接到载体(pcDNA3.4)中,从而产生新质粒V_HGITR^{10}-接头-V_LGITR^{10}-接头-铰链-CH2-接头-V_HPD-L1-接头-V_LPD-L1的构建。

[0225] 定点诱变

[0226] 按照制造商的方案,使用QuikChange发光定点诱变试剂盒(Aligent technologies®)完成GITR10-PDL1载体的诱变。合成两种寡核苷酸引物,每种引物与载体的相对链互补。两种引物均含有HindIII作为所需突变。

[0227] 设计引物以在侧接7至10个碱基的引物中间显示HindIII突变。在温度循环期间,寡核苷酸引物用于通过PfuUltra HF DNA聚合酶延伸。这种方法能够产生含有交错切口的突变质粒。在下一个温度循环期间,用DpnI处理产物以消化含有甲基化和半甲基化DNA的亲本DNA模板。作为对照,使用4.5-kp pWhitescript质粒来测试突变质粒。pWhitescript质粒在谷氨酰胺密码子将出现在pBluescript II的β-半乳糖苷酶基因的位置处编码终止密码

子(TAA),通常在含有IPTG和Xgal的LB-氨苄青霉素琼脂板上消除菌落的蓝色。然而,寡核苷酸对照引物在pWhitescript 4.5-kb对照质粒上产生点突变,所述点突变将终止密码子的T残基回复为C,从而在含有IPTG和X-gal的培养基上产生蓝色表型。在循环后,添加2μL DpnI限制酶(37,5分钟)以消化亲本dsDNA。然后将诱变质粒转化到XL10Gold®超感受态细胞中并展布在含有80μg/ml X-gal和20mM IPTG的LB-氨苄青霉素琼脂板上(37;>16小时)。在第二天,将16个克隆从LB-氨苄青霉素板中挑取,使用QIAprep旋转小型制备试剂盒纯化,并用HindIII和NotI限制酶消化以鉴别成功突变的克隆。将10号阳性克隆(具有HindIII的GITR10-PDL1)进行另一次消化,以将其与原始质粒GITR10-PDL1(无HindIII)进行比较。将每种样品用HindIII或BamHI单独消化,并且同时用HindIII和BamHI-HF一起消化,从而产生总计六次消化(参见以下表1)。

[0228] 表1|总计六次限制酶消化的参数和体积

[0229]

消化参数	具有 HindIII 限制位点的 GITR10-PDL1			GITR10-PDL1		
	1	2	3	1	2	3
质粒(2.0 μg) [μL]	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1
10x Cutsmart (NEB®) [μL]	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
HindIII-HF (20,000U/mL, NEB®) [μL]	0.5	-	0.5	0.5	-	0.5
BamHI-HF 20,000U/ mL [μL]	-	0.5	0.5	-	0.5	0.5
ddH2O (Mili-Q®) [μL]	ad. 30	ad. 30	ad. 30	ad. 30	ad. 30	ad. 30

[0230] 将六个样品在37下孵育2小时,并在1%琼脂糖凝胶中进行分析。

[0231] 含有阳性突变的10号克隆的细菌在37下在120mL YT培养基中扩增过夜,然后使用QIAGEN Plasmid Maxi试剂盒进行质粒DNA纯化。通过测序(Genewiz®,使用预先设计的引物)确认含有HindIII限制位点的正确构建体。制备甘油储备液并将其储存在-80。将含有HindIII结构域的接受者质粒和CH2片段用HindIII消化且随后彼此连接。根据本文所述的方案通过热脉冲将连接产物转化到XL10-Gold®超感受态细胞中。通过测序验证正确的质粒(Genewiz®)。

[0232] 转化

[0233] 通过热脉冲将连接产物转化到XL10-Gold®超感受态细胞中。将这些细胞在冰上轻轻解冻。对于每次转化,将45μL细胞与2μL B-巯基乙醇和1.5μL感兴趣的DNA混合。将转化反应物孵育30分钟,然后在42水浴中加热脉冲40秒。向每个管中添加0.5mL的S.O.C培养基(Life Technologies®)并在37下孵育1小时。转化反应在LB-氨苄青霉素板上在37生长过夜。

[0234] 单独挑取每个连接样品的若干菌落,并将其在1.5mL 2-YT培养基中生长8小时。使用如制造商指定的QIAprep旋转小型制备试剂盒纯化挑取的克隆的质粒。通过测序(Genewiz®)验证正确的质粒。将阳性克隆的细菌在120mL YT培养基(37,240rpm)中生长过

夜,并使用QIAGEN Plasmid Maxi试剂盒(按照制造商的方案)纯化质粒DNA。通过将400μL甘油和600μL培养物添加到冷冻管小瓶中制备甘油储备液,且然后将其储存在-80。

[0235] 细胞培养和转染

[0236] 对于蛋白质表达,293F人细胞系293F获自Life Technologies®,并且293T粘附细胞系获自ATCC细胞库。对于基于细胞的ELISA测定,在Marasco实验室中产生CF2-GITR细胞系以在细胞表面上表达GITR。

[0237] 悬浮的293F细胞用于蛋白质表达

[0238] 将293F细胞(源自人胚肾细胞;HEK细胞)的悬浮培养物在37和5%CO_2下保持在爱伦美氏烧瓶(Corning®)和293自由式培养基(Life Technologies®)中。将细胞在对数生长期期间传代,并用新鲜培养基稀释至最佳密度(200,000个细胞/mL)以继续生长。

[0239] 293T和CF2-GITR粘附细胞

[0240] 将粘附的293T或CF2-GITR细胞在37在5%CO_2中维持在补充有10%FBS(胎牛血清)(Life Technologies®)和1%SP(丙酮酸钠)(Life Technologies®)的75cm 2烧瓶(Cellstar)和DMEM培养基(Life Technologies®)中。将细胞以80%-100%汇合传代,并用新鲜培养基稀释至最佳接种密度(2x10^6个细胞)以继续生长。

[0241] 转染

[0242] 为了产生四聚体双特异性抗体(tBsAb)(αGITR1-αPD-L1、αGITR 10-αPD-L1、αGITR11-αPD-L1、αGITR14-αPD-L1、αGITR15-αPD-L1、αGITR17-αPDL1和αGITR10-αPD-L1(具有CH2))和对照抗体(αGITR 1-F10、αGITR10-F10、F1-αPD-L1、αGITR IgG),用相应的质粒转染293F或293T细胞。

[0243] 293F HEK细胞中聚乙烯亚胺(PEI)介导的瞬时转染

[0244] 在转染前一天,使细胞变为最终浓度为6x10^5个细胞/mL,总体积为300mL。在转染当天,细胞密度在1.0x10^6与1.4x10^6个细胞/mL之间。制备对应质粒用于转染。转染复合物的总电荷由转染试剂与DNA的比率确定。由DNA主链中的磷酸根贡献的负电荷被转染试剂的正电荷抵消。这允许良好的复合物形成以及中和由带负电的细胞膜赋予DNA的静电排斥。1:1比率的质粒:PEI允许聚合物与DNA的完全结合以及发生完全缩合以保护货物;然而,过量的PEI对于克服阴离子细胞表面的抑制作用至关重要。对于每百万个细胞,使用1μg质粒和3μg PEI进行转染,并各自分别稀释到15mL Opti-MEM(还原血清培养基)(Life Technologies®)中。将稀释的PEI添加至质粒中并在室温下孵育20分钟。中和效率随着暴露于PEI-DNA复合物的时间而增加;然而,过长时间暴露于脂质试剂可能是有毒的。将PEI/质粒复合物倒入293F悬浮细胞(1x10^6个细胞/mL;每烧瓶300mL)中,并在37、140rpm下孵育6天。

[0245] 293T HEK细胞中聚乙烯亚胺(PEI)介导的瞬时转染

[0246] 使用PEI细胞转染293T HEK遵循与上文针对293F悬浮HEK细胞所描述的相同方案,具有几个小的变化。在组织培养皿(200mm)稀释的补充有10%FBS的DMEM培养基中以80%汇合生长的293T细胞上进行转染。对于40μg DNA,使用200μg PEI(1:5比率),并各自分别在1mL Opti-MEM(还原血清培养基)(Life Technologies®)中稀释。将稀释的PEI添加至质粒中并在室温下储存20分钟。将DNA/PEI复合物轻轻地、逐滴添加到培养皿中以防止细胞脱离

和死亡。然后将细胞在37下孵育2天。

[0247] 实施例3:蛋白质纯化

[0248] 双特异性抗体抗体的Ni-NTA纯化

[0249] 收获293HEK细胞的悬浮液并将其在5000rpm、4下离心35分钟。为了经由其N-末端6xHis-标签纯化双特异性抗体,将过滤的上清液(0.22μm PEV,Costar®)与1mL的Ni-NTA琼脂糖(Qiagen)一起孵育2小时(240rpm,RT)。将上清液在15ml Ni-NTA琼脂糖重力流动柱上通过两次。在洗涤后,用四柱体积的Ni-NTA洗涤缓冲液(0.02M咪唑,0.3M NaCl,1M Tris HCl(pH=7.0))洗涤含有珠粒的柱,用13mL的Ni-NTA洗脱缓冲液(0.5M咪唑,0.3NaCl,0.02Tris HCl(pH=7.0))缓慢洗脱蛋白质。使用离心过滤单元100,000MW(Amicon®),通过PBS缓冲液交换洗脱的蛋白质的缓冲液。用NanoDrop ND-1000测量tBsAb的产率。

[0250] αGITR IgG抗体的蛋白A纯化

[0251] 从293HEK细胞的悬浮液收获αGITR IgG抗体,并将其在5000rpm、4下离心35分钟。为了经由Fc结构域纯化αGITR IgG抗体,将过滤的上清液与1mL蛋白A(GE Lifesciences)一起孵育(室温,振荡)2小时,然后在15ml重力流动柱(Biorad)上通过两次,接着10mL PBS用于洗涤。用2ml TEA(100nM)洗脱αGITR IgG,并向洗脱液中添加200μL的Tris-HCl(1M,(pH=7))以中和TEA。将另外2mL PBS添加到柱上,并用洗脱的蛋白质收集到管中。

[0252] 实施例4:蛋白质表征

[0253] SDS-PAGE分析

[0254] 根据NuPAGE NuPAGE®技术指南(Invitrogen),SDS-PAGE分析用于验证蛋白质的纯度。NuPAGE Bis-Tris凝胶(4%-12%)(Novex)用于MES SDS运行缓冲液中,总蛋白质量在3μg与5μg之间。将蛋白质样品与含有十二烷基硫酸盐的4x LDS样品缓冲液(Novex)混合,以使蛋白质变性。在还原条件下,将蛋白质样品另外在100下煮沸10分钟。然后将样品负载到MES SDS运行缓冲液中的Novex Bis-Tris凝胶上。将凝胶在Xcell SureLock Mini-Cell中在200V下运行35分钟,且然后用简单的simplyBlue™Safe Stain(Novex)用考马斯G-250染色进行加工。

[0255] αGITR-αPD-L1在被动吸附的可溶性PD-L1抗原上的直接ELISA将Maxisorb 96孔板(Costar®)用100μL的PBS中的5μg/mL PD-L1兔Fc抗原和CCR4蛋白(阴性对照)在室温下包被过夜。在第二天,将板用PBS洗涤3次并在室温下用200μL封闭溶液(PBS中的2%B SA)封闭2小时。将所述板用PBS洗涤3次。将一级抗体αGITR1-αP D-L1、αGITR10-αPD-L1、αGITR11-αPD-L1、αGITR14-αPD-L1、αGI TR15-αPD-L1、αGITR17-αPD-L1、F10-αPD-L1 BsAB和商业抗小鼠PD-L1 mAb(Biolegend)在具有可变浓度的1X PBS中制备,并添加至孔(100μL)中,在室温下孵育2小时。所测试的最高抗体浓度是1μg/mL,且然后以10倍方式连续稀释,直至1x 10^{-5}μg/mL稀释度。每种样品在每种浓度下一式三份运行。设置了若干对照并将其列在以下表中(表2)。将96孔板(Costar)用1X PBS缓冲液洗涤三次。将二级抗体(6xHis-HRP(Thermoscientific)和山羊抗小鼠IgGFc,HRP缀合物(Thermoscientific)的溶液在1X PBS中稀释(1:2000和1:5000)。将二级抗体(100μL)添加至各孔,并在室温下孵育2小时。最后,将各孔用PBS洗涤4次。将96孔板用100μL TBM底物溶液(Thermosci entific)显影;在显影后添加100μL磷酸终止溶液(Thermoscientific)。将终点OD数据用Bio-Rad Benchmark

Plus在450nm处记录,并用Microplate Manager 5.2.1软件进行分析。

[0256] 表2|关于用于被动吸附的PD-1抗原上αGITR-αPD-L1的直接ELISA的测试样品和对照的实验概述

[0257]

抗原	测试-类型	一级 AB	二级 AB	目的	预期信号
PD-L1 兔 Fc 融合蛋白	样品	αGITR-αPD-L1 四聚体双特异性抗体	抗 6xHis-HRP (Thermoscientific)	样品测试	阳性
		商业小鼠抗人 PD-L1 mAb (Biolegend)	山羊抗小鼠 IgG Fc, HRP 缀合物 (Thermoscientific)	PD-1 兔 Fc 可被标记的标准和验证	阳性
	对照	无	抗 6xHis-HRP (Thermoscientific)	测量非特异性结合	阴性
		无	山羊抗小鼠 IgG Fc, HRP 缀合物 (Thermoscientific)	测量非特异性结合	阴性
CCR4-人 Fc		商业抗小鼠 PD-L1 mAb (Biolegend)	抗 6xHis-HRP (Thermoscientific)	样品的特异性结合的验证	阴性
	对照	无	抗 6xHis-HRP (Thermoscientific)	测量非特异性结合	阴性
		无	山羊抗小鼠 IgG Fc, HRP 缀合物	测量非特异性结合	阴性

[0258] $GITR^{+}$CF2上αGITR-αPD-L1 BsAb的基于细胞的ELISA

[0259] 对于基于细胞的ELISA,测试了αGITR1-αPD-L1、αGITR10-αP D-L1和具有CH2的αGITR10-αPD-L1抗体在GITR+CF2细胞上的保留的结合能力。总共建立了四个ELISA实验。

[0260] 分析了αGITR1-F10和αGITR10-F10四聚体双特异性抗体(tBsAb)的第一基于细胞的ELISA。对于GITR+CF2和GITR-CF2细胞(阴性对照)接种,将每孔1,000个细胞添加在200μL的1%DNEM培养基中并孵育过夜以允许附着。在第二天,将细胞用100μL丙酮-甲醇溶液(1:1比率)固定,并在室温下孵育20分钟。从板中吸出丙酮-甲醇溶液,并用1X PBS洗涤细胞三次。根据2.6.2章中提及的ELISA方案进行一般测定程序和开发。以可变浓度测试一级抗体αGITR1-αPD-L1和αGITR10-αPD-L1。将tBsAb在1X孵育缓冲液中连续稀释三分之一;最高浓度为3.33mg/mL,并且最低浓度为0.0411mg/mL。设置了若干对照并将其列在以下表上(表3)。

[0261] 表3|关于用于GITR+CF2细胞上αGITR1-αPD-L1和αGITR10-αPD-L1的基于细胞的ELISA的测试样品和对照的实验概述

[0262]

抗原	测试-类型	一级AB	二级AB	目的	预期信号
GITR+CF2	样品	αGITR1-αPD-L1	抗6xHis-HRP (Thermoscientific)	样品测试	阳性
		αGITR10-αPD-L1	抗6xHis-HRP (Thermoscientific)	样品测试	阳性
		F10-αPDL1	抗6xHis-HRP (Thermoscientific)	阴性对照	阴性
	对照	无	抗6xHis-HRP (Thermoscientific)	非特异性结合	阴性
GITR-CF2	样品	αGITR1-αPD-L1	抗6xHis-HRP (Thermoscientific)	样品测试	阴性
		αGITR10-αPD-L1	抗6xHis-HRP (Thermoscientific)	样品测试	阴性
		F10-αPDL1	抗6xHis-HRP (Thermoscientific)	样品	阴性
	对照1	无	抗6xHis-HRP (Thermoscientific)	非特异性结合	阴性

[0263] 在评价基于细胞的ELISA的结果(图20)之后,使用与上述相同的程序重复第二基于细胞的ELISA的实验,除了用8%多聚甲醛固定细胞。

[0264] 进行第三基于细胞的ELISA以比较αGITR10-αPD-L1 tBsAb与商业人αGITR mAb。对于$GITR^+CF2$和$GITR^-CF2$细胞(阴性对照)接种,将每孔10,000个细胞添加在200μL的1%DNEM培养基中并孵育过夜以允许附着。在第二天,将细胞用100μL的8%多聚甲醛固定,并在室温下孵育20分钟。从板中吸出多聚甲醛溶液,并用1X PBS洗涤细胞三次。根据本文提及的ELISA方案进行一般测定程序和开发。以可变浓度测试一级抗体αGITR10-αPD-L1和αGITR mAb。将抗体在1X孵育缓冲液中连续稀释(1:2);最高浓度为5mg/mL,并且最低浓度为0.078mg/mL。设置了若干对照并将其列在以下表上(表4)。

[0265] 表4|关于用于GITR+CF2细胞上αGITR10-αPD-L1和αGITR mAb的基于细胞的ELISA的测试样品和对照的实验概述

[0266]

抗原	测试-类型	一级 AB	二级 AB	目的	预期信号
GITR+CF2	样品	αGITR10-αPD-L1	His-HRP	样品测试	阳性
		商业 GITR mAb(纯化的抗 hu CD357)(Biolegend)	山羊抗小鼠 IgG Fc, HRP 缀合物 (Thermoscientific)	标准	阳性
		F10-αPDL1	His-HRP	对照	阴性
		无	His-HRP	测量非特异性结合	阴性
	对照	无	山羊抗小鼠 IgG Fc, HRP 缀合物 (Thermoscientific)	测量非特异性结合	阴性
GITR-CF2	样品	αGITR10-αPD-L1	His-HRP	样品测试	阴性
		商业 GITR mAb(纯化的抗 hu CD357)(Biolegend)	山羊抗小鼠 IgG Fc, HRP 缀合物 (Thermoscientific)	标准	阴性
		F10-αPDL1	His-HRP	对照	阴性
		无	His-HRP	测量非特异性结合	阴性
	对照	无	山羊抗小鼠 IgG Fc, HRP 缀合物 (Thermoscientific)	测量非特异性结合	阴性

[0267] 进行第四ELISA以将具有CH2的αGITR10-αPD-L1 tBsAb与商业αGITR mAb进行比较。测定程序与第三ELISA(如上所提及)相同。

[0268] αGITR1-αPD-L1和αGITR10-αPD-L1的流式细胞术分析

[0269] 通过荧光活化的细胞分选FACS分析,对GITR+CF2细胞上αGITR的生物活性进行分析。将细胞GITR+CF2细胞和GITR-CF2在75cm^{2}烧瓶(Cellstar)中生长,直至它们达到约80%汇合。将它们通过在PBS中添加1:10稀释的胰蛋白酶与0.25%胰蛋白酶-EDTA(Life Technologies)脱离并重新悬浮,且然后添加至FACS缓冲液(PBS,1%FBS,2mM EDTA)中的96

孔圆底板中。在下一步骤中,将αGITR1-αPD-L1和αGITR10-αPD-L1以可变浓度在4下添加1小时。所测试的最高抗体浓度是100μg/mL,且然后以2倍方式连续稀释,直至0.05μg/mL稀释度。用His标签Alexa Fluor 488-缀合的(Biotechne)检测一级抗体。将二级抗体在PBS(Life Technologies)中稀释,并添加至各孔30分钟。然后将细胞用PBS缓冲液洗涤三次,并重新悬浮于FACS缓冲液中。用FACS Calibur分析总计10,000个事件。通过FlowJo10.1软件分析结果。进行了若干对照,并将其列于以下表中。(表5)

[0270] 表5|关于用于GITR+CF2细胞和GITR-CF2细胞上αGITR1-αPD-L1α和GITR10-αPD-L1的FACS分析的对照样品的实验概述

抗原	测试-类型	一级 AB	二级 AB	目的	预期信号
GITR+CF2	对照	无	Alexa 488;抗 -His (APC)	二级 AB 的非特异性结合	阴性
		F10-αPD-L1	Alexa 488;抗 -His (APC)	排除 PD-L1 与 GITR+ CF2 的结合	阴性
		αGITR1 mAb	抗人 IgG Fc (FITC)	验证 αGITR 臂可识别 GITR 结合位点	阳性
		无	抗人 IgG Fc (FITC)	二级的非特异性结合	阴性
		商业小鼠 αGITR IgG	抗小鼠 IgG Fc (FITC)	验证 CF2 细胞表达 GITR	阳性
		无	抗小鼠 IgG Fc (FITC)	二级的非特异性结合	阴性
		无	Alexa 488;抗 -His (APC)	二级的非特异性结合	阴性
GITR-CF2	对照	F10-αPD-L1	Alexa 488;抗 -His (APC)	排除 PD-L1 与 GITR+ CF2 的结合	阴性
		αGITR1 IgG	抗人 IgG Fc (FITC)	验证 αGITR 臂特异性地结合至 GITR+ CF2 细胞	阴性

[0271]

[0272] 实施例5:功能研究

[0273] GITR+CF2细胞上具有CH2的αGITR-αPDL1的ADCC测定

[0274] 将GITR+CF2细胞上具有CH2的αGITR-αPD-L1的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性使用ADCC报告基因生物测定完整试剂盒(WIL2-S)(Promega)分析,并根据制造商的方案实施。目的是测试具有CH2的αGITR10-αPD-L1的ADCC。使用具有Fc γ受体和应答元件驱动的荧光素酶基因的ADCC报告细胞(WIL2-S)进行测定。

[0275] 将细胞GITR$^+$CF2细胞和GITR$^-$CF2在75cm^{2}烧瓶(Cellstar)中生长,直至它们达到约80%汇合。通过在PBS中添加1:10稀释的0.25%胰蛋白酶-EDTA(Life Technologies)来使它们脱离,并测试其存活力。将GITR$^+$CF2细胞用作靶细胞,并以在RPMI 1640培养基(Life Technologies®;无血清)中稀释的每孔2x10^{4}个细胞的密度涂铺于96孔细胞平底微孔板(PerkinElmer)中。将αGITR10-αPD-L1(具有CH2)和对照(αGITR10-IgG(阳性对照)和GITR10-PD-L1和F10-PDL1(阴性对照)在ADCC测定培养基中连续稀释。以浓度依赖性方式,以20mg/mL(最高浓度)开始,然随后分别2mg/mL、0.2mg/mL和0.02mg/mL(1:10连续稀释)添加四种抗体,并将其在室温下孵育5分钟。在孵育后,将效应细胞WIL2-S悬浮于ADCC测定培养基中,并以每孔10x10^{6}个细胞添加至靶细胞/抗体混合物中,效应细胞与靶细胞的比率设定为5:1(E/T)。在37(5%CO_2)下孵育大约6小时后,向所述孔中添加等体积的Bio-Gio荧光素酶测定试剂(Promega)并孵育(室温,10分钟)。使用Polarstar Omega测量细胞的发光。测定一式三份地进行。使用Excel绘制所有数据。

[0276] GITR$^+$CF2细胞上具有CH2的αGITR-α-PDL1的CDC测定

[0277] 为了测试具有CH2的αGITR10-α-PDL1 tBsAb的补体依赖性细胞毒性(CDC),使用结合细胞中包含的DNA的CellTox绿色染料(Promega)在CellTox™绿色细胞毒性测定(Promega)中使用幼兔补体(Cedarlane Laboratories)。通过染料与死细胞DNA的结合产生的荧光信号与细胞毒性成正比。根据制造商的方案进行测定。用于测试补体依赖性细胞毒性的实验程序和设置类似于上述CDC测试,除了用CellTox™绿色细胞毒性测定(Promega)进行的测定开发和分析。测试补体依赖性细胞毒性的抗体是αGITR10-αPDL1和具有CH2的αGITR10-α-PDL1四聚体双特异性抗体(tBsAb)。αGITR mAb用于阳性对照,并且F10-αPD-L1用作阴性对照。

[0278] 在37(5%CO_2)下孵育大约4小时后,向所述孔中添加等体积的CellTox绿色染料测定试剂(Promega)并孵育(室温,10分钟)。使用Polarstar Omega测量荧光。测定一式三份地进三次。使用Excel绘制所有数据。

[0279] 实施例6:αGITR-αPD-L1 BsAb的分离和表征

[0280] 表达载体的产生

[0281] 总共构建了六个载体(αGITR-αPD-L1)以产生所需的tBsAb和另外三个载体以用于产生对照Ab(αGITR1-F10、αGITR10-F10和F10-αPD-L1)。根据上述克隆策略产生表达载体。

[0282] 用SfiI和NotI限制酶消化接受者表达载体pcDNA3.4和所有供体载体(6个V_HGITR-接头-V_LGITR插入物和1个V_HF10-V_LF10插入物),并将片段在1%琼脂糖凝胶上分离,用溴化乙锭染色。七种消化的SfiI和NotI消化模式与理论计算值一致。消化的接受者载体pcDNA3.4载体包含7500bp,并且可在梯形条带的正确水平(泳道;8000bp)检测到。泳道1中较小的片段展示在500与1000bp之间,并且对应于先前使用的scFv的V_H^X-接头-V_L^X。GITR插入物(泳道2-6)和F10插入物(泳道7)聚集在500与1000bp之间。在8000bp(泳道2-7)水平下观察到的

较大条带代表相应的后代载体。

[0283] 构建了另外两种对照质粒(2)和(3)。用BsiWI和BamHI Res消化编码αGITR1-αPDL1和αGITR10-αPDL1scFv的接受者表达载体pcDNA3.4,以用V_HF10-接头-V_LF10片段替代V_HPD-L1-接头-V_LPD-L1片段。为了从pcDNA3.1供体载体中分离V_HF10-接头-V_LF10片段,设计了正向和反向引物(1号和2号),其含有BsiWI和BamHI限制位点。在使用PCR分离cDNA后,将其用BsiWI和BamHI RE消化。所有3种消化物的凝胶分析与理论数一致。如所预期的,F10片段的PCR仅在相对于梯形条带的正确位置处显示一个条带。两个消化的接受者载体(分别含有V_HGITR1-V_LGITR1或V_HGITR10-V_LGITR10)的大小大约8000bp,并且与载体的理论大小(7500bp)相匹配。

[0284] 从琼脂糖凝胶中提取并纯化所有消化的片段,并进行对应的连接反应。成功构建了产生的质粒并通过测序(Genewiz)确认。

[0285] GITR-PDL1双特异性抗体和αGITR-IgG的表达

[0286] αGITR-αPD-L1蛋白在293F HEK细胞中表达,并经由Ni-NTA纯化分离。αGITR IgG蛋白在HEK 293F细胞中表达,并经由蛋白A纯化分离。通过NanoDrop分光光度计测量的产率列于表6中。

[0287] 表6|293F HEK表达的抗体产率

抗体	每300 mL细胞培养物的产率[mg]	抗体	每300 mL细胞培养物[mg]
αGITR1-αPD-L1	3.3	αGITR17-αPD-L1	2.5
αGITR10-αPD-L1	5.5	F10-αPD-L1	1.1
αGITR11-αPD-L1	2.8	αGITR1-F10	1.4
αGITR14-αPD-L1	1.7	αGITR10-F10	1.5
αGITR15-αPD-L1	2.7	αGITR IgG	2.9

[0288]

[0289] SDS-PAGE分析

[0290] 通过SDS-PAGE分析tBsAbαGITR1-αPDL1、αGITR10-αPDL1、αGITR11-αPDL1、αGITR14-αPDL1、αGITR15-αPDL1、αGITR17-αPDL1和F10-αPD-L1的纯度。将3μg-5μg之间的蛋白质样品负载到凝胶上,电泳分离并用考马斯蓝染色。

[0291] 值得注意的是,在非还原条件下,存在特别引起注意的两个条带。上部条带位于115kDa和140kDa范围内。此条带在每种蛋白质谱中的定量优势和其表观分子大小与αGITR-αPD-L1四聚体双特异性抗体(tBsAb)(130kDa)的接近表明成功的抗体产生。下部条带位于70与80kDa之间,并且因此可解释大量的单体串联scFv(65kDa)。除此之外,可观察到140kDa以上的一些较弱的条带,从而表明聚集体的形成。

[0292] 在还原条件下,在70与80kDa之间可观察到仅一个条带,这表明tBsAb的二硫键还原为串联scFv(65kDa)。表观与理论计算值之间的偏差分子量可源于翻译后修饰(如糖基化和磷酸化)以及在它正在通过SDS PAGE时的蛋白质构象。负载到凝胶上的差异量可解释αGITR-αPD-L1 tBsAb之间的条带强度的差异。

[0293] 此外,还通过SDS-PAGE分析了αGITR-IgG的纯度。在非还原条件下,所述分析表现出表观分子量为140kDa的一个条带,并且近似等于αGITR IgG(150kDa)的理论计算分子量。还原的SDS分析揭示两个条带,其提出αGITR IgG的成功二硫键还原,从而产生重链(50kDa)和轻链(25kDa)。

[0294] 被动吸附的PD-L1抗原上αGITR-αPD-L1 BsAb的直接ELISA

[0295] 进行αGITR-αPD-L1 BsAb的直接ELISA以表征它们对PD-L1抗原的反应性。如图19所示,可在所有αGITR-αPD-L1 tBsAb中观察到对PD-L1抗原的反应性,而未观察到对CCR4的非特异性粘性(未示出)。对于所有浓度的所有αGITR-αPD-L1 tBsAb,读出信号非常相似。在最高浓度下测量到最高ELISA信号。此外,αGITR-αPD-L1tBsAb结合的吸光度值与商业αPD-L1 mAb的吸光度值相当,并且强度信号在较低浓度情况下降低。ELISA在较高浓度下不显示饱和度,并且在浓度低于0.01mg/mL下具有非常弱的信号。

[0296] GITR+CF2上αGITR-αPD-L1 tBsAb的基于细胞的ELISA

[0297] 在αGITR IgG的先前研究中,αGITR1 IgG和αGITR10 IgG被证明具有最佳特征,其是在此的项目将以下实验缩小至αGITR10-αP D-L1和αGITR1-αPD-L1 tBsAb的原因。基于细胞的酶联免疫吸附测定(ELISA)用于测试针对GITR+CF2细胞的不同浓度的αGITR1-αPD-L1、αGITR10-αPD-L1以分析它们的反应性。如图20所示,对于αGITR1-αPD-L1和αGITR10-αPD-L1抗体,可观察到对GITR+CF2的反应性。αGITR1-αPD-L1和αGITR10-αPD-L1的OD值取决于它们各自的浓度。与预期一致,在较高的浓度下测量到较强的信号;然后随着浓度降低而逐渐减弱。

[0298] 在所有浓度下,αGITR10-αPD-L1的信号强度优于αGITR1-αPD-L1的信号强度。出人意料的是,阴性对照F10-αPD-L1抗体不仅显示吸光度,而且似乎以浓度依赖性方式表现。对于αGITR1-αPD-L1和F10-αPD-L1,在0.1235mg/mL的阈值以下未检测到读出信号。总之,平均值的标准偏差异常高。

[0299] 由于先前ELISA的出人意料的结果(参见图20),重复实验。设置保持相同,除了GITR+CF2细胞用8%多聚甲醛而不是丙酮-甲醇溶液固定。这第二种方法的结果揭示了αGITR1-αPD-L1和αGITR10-αPD-L1抗体的类似信号读出观察结果,但具有略高的吸光度值(参见图21)。然而,F10-αPD-L1抗体继续展示信号活性,并且其吸光度仍取决于所使用的浓度。当与GITR-CF2细胞一起孵育时,tBsAb未显示结合。参见图32。

[0300] 进行第三基于细胞的ELISA以比较αGITR10-αPD-L1抗体与商业αGITR IgG。在GITR+CF2细胞中观察到两种抗体的反应性(图22),但在GITR-CF2细胞中未观察到(参见图33)。再次,αGITR10-αPD-L1的结果与先前记录的数据相匹配。在所有浓度下,αGITR mAb的信号强度优于αGITR10-αPD-L1的信号强度。出人意料的是,在较高浓度下,可能未观察到信号读出的饱和。对照抗体F10-αPD-L1(阴性对照)显示针对GITR+CF2细胞的浓度依赖性信号活性,但针对CF2细胞(无GITR+表达)未显示。参见图33。

[0301] GITR+细胞上αGITR-αPD-L1 BsAb的流式细胞术分析

[0302] 流式细胞术分析评估αGITR1-αPD-L1和αGITR10-αPD-L1抗体与GITR+CF2细胞的结合(图23和24)。结果显示,两种抗体(与APC标记的His-标签Alexa Fluor 488共染色)可特异性地结合GITR+CF2。此外,tBsAb不具有针对GITR-CF2的反应性(图34)。注意,一些非特异性结合由如对照中所示的二级抗体引起(图34)。两种抗体彼此的比较表明它们在相同条件

下展示相似的结合。因此,仅选择αGITR10-αPD-L1 tBsAb用于进一步表征。当与tBsAb比较时,αGITR1 IgG和αGITR10 IgG的标准测量揭示相似的结合特性。

[0303] 实施例7:具有CH2的αGITR-αPD-L1 bsAb的分离和表征

[0304] 细菌表达载体的产生

[0305] 在先前的研究中,αGITR10mAb被证明表现出最佳特征,这是选择αGITR10-αPD-L1作为用于工程化含有CH2结构域的新构建体的表达载体的原因。根据上述克隆策略产生载体,从而产生基因顺序V_HGITR-接头-V_LGITR-接头-铰链-CH2-接头-V_HPD-L1-接头-V_LPD-L1。

[0306] 定点诱变使得能够将HindIII限制位点引入IgG1铰链区与接头$(GGGGS)_6$之间的接受者pcDNA 3.4载体中。在转化到大肠杆菌菌株XL10-Gold®超感受态细胞中后,挑取16个克隆,然后进行DNA纯化。使用HindIII和BamHI限制酶的限制酶消化分析在1%琼脂糖凝胶上展示,测试HindIII限制性位点的正确引入(参见图25)。在16个克隆中,仅10号克隆显示两个条带。聚集在500与1000bp之间的较小条带的大小对应于HindIII和BamHI消化的理论大小(800bp)。由于HindIII和BamHI代表质粒中的独特限制位点,因此这一结果表明HindIII成功引入10号克隆的细胞DNA中。

[0307] 对10号克隆进行另外的凝胶分析,以将其与原始GITR10-PDL1(不含HindIII限制位点)进行比较;参见图26。10号克隆(具有HindI II的GITR10-PDL1)和GITR10-PDL1(无HindIII)各自单独地经历三次消化。第一次消化仅用HindIII限制酶进行,第二次消化仅用NotI限制酶进行,并且第三次消化用HindIII和NotI限制酶两者进行。用单一酶消化10号克隆产生开环构象,并聚集在8000bp左右。相比之下,用HindIII和NotI限制酶对10号克隆的双重消化产生两个条带。下部条带聚集在500bp以下,并且对应于HindIII/NotI消化片段(117bp)的理论计算值。所述αGITR10-αPD-L1质粒不包含HindIII限制位点,这是HindIII单一消化的凝胶分析揭示(如预期的那样)超螺旋质粒DNA的原因。这些结果有力地表明HindIII限制位点的正确引入。

[0308] 10号克隆的测序结果(Genewiz)证实在铰链与接头结构域之间正确引入HindIII。然而,在定点诱变期间发生了总计六个(GGGGS)重复序列的五个接头重复的缺失。因此,新构建体仅表现出接头序列的一个重复而不是六个接头重复。然而,决定用这种新产生的质粒继续质粒构建,所述质粒含有铰链区,然后是一个单一接头重复序列(GGGGS)。

[0309] 设计了两种引物(正向和反向)以从IgG1质粒中分离CH2结构域。每种引物包含HindIII限制位点。将接受者载体GITR10-PDL1(含有HindIII位点)和CH2片段用HindIII限制酶单一消化,并在1%琼脂糖凝胶中进行分析(图27)。两种消化均产生与理论计算值匹配的片段大小:对于具有HindIII的接受者载体GITR10-PDL1为7.5bp,并且对于CH2片段为350bp。

[0310] 因此,成功构建了具有CH2的pcDNA 3.4表达载体αGITR10-αPD-L1,并将其通过测序进行了确认(Genewiz)。

[0311] SDS-PAGE分析

[0312] 具有CH2的αGITR10-αPD-L1蛋白在293T HEK细胞中表达,并经由Ni-NTA纯化分离。总计100mL培养基产生200ng蛋白质产量(NanoDrop分析)。通过SDS-PAGE分析具有CH2的GITR10-PDL1 tBsAb的纯度(图28)。将总计3μg的蛋白质样品负载到凝胶上,电泳分离并用考马斯蓝染色。值得注意的是,在非还原条件下,存在特别引起注意的两个条带。上部条带

略高于140kDa。此条带的定量优势和其表观分子大小与具有CH2的αGITR10-αPD-L1 tBsAb(150kDa)的表观分子大小接近表明成功的抗体产生。下部条带具有80kDa的表观分子量,并且因此可解释含有不二聚化的CH2(75kDa)的大量串联scFv。在还原条件下,在80k Da处仅可见一个条带,这表明tBsAb的二硫键还原为串联scFv(75kDa)。

[0313] GITR$^+$CF2上具有CH2的αGITR-αPD-L1四聚体双特异性抗体(tBsAb)的基于细胞的ELISA

[0314] 进行基于细胞的酶联免疫吸附测定(ELISA)以测试针对GITR$^+$CF2的不同浓度的具有CH2的αGITR10-αPD-L1来分析它们的信号强度。

[0315] 如图29所示,在具有CH2的αGITR10-αPD-L1抗体中可观察到对GITR$^+$CF2的反应性,而未注意到与GITR$^-$CF2的非特异性粘性;参见图35。具有CH2的αGITR10-αPD-L1的OD值取决于它们各自的浓度。与预期一致,在最高的浓度下测量到最强的信号;然后随着浓度降低而逐渐减弱。在大多数浓度下,αGITR IgG的信号强度优于具有CH2的αGITR10-αPD-L1的信号强度。出人意料的是,在较高浓度下,可能未观察到信号读出的饱和。对照抗体(F10-αPD-L1)在最高浓度(5μg/mL)下进行测试,并且如先前所见(图22和21)具有一些反应性。

[0316] 实施例8:具有CH2的αGITR-αPD-L1 BsAb的功能研究

[0317] 在建立功能数据的初始尝试中,测试了具有CH2的αGITR-αPD-L1 BsAb的补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。但是,结果尚无定论。

[0318] GITR+CF2上具有CH2的αGITR-αPD-L1 BsAb的ADCC报告基因测定

[0319] 使用GITR+CF2细胞(靶细胞)和WIL2-S(效应细胞)(E/T=5:1)测试具有CH2的αGITR10-αPD-L1 BsAb的ADCC活性。通过作为NFAT途径活化的结果产生的荧光素酶定量ADCC中的抗体生物活性,并且用发光读出定量其在效应细胞中的活性。在ADCC分析中,αGITR10-αPD-L1和具有CH2的αGITR10-αPD-L1展示出人意料的结果(图30)。与单独的靶细胞和效应细胞相比,阴性对照F10-αPD-L1展示针对ADCC的相似信号强度,并且对于可变浓度是无偏的。在另一方面,阳性对照αGITR IgG如预期的那样表现出在较高浓度下的增加值。出人意料的是,对于αGITR10-αPD-L1和具有CH2的αGITR10-αPD-L1,ADCC信号强度在较高浓度情况下降低,并且在20μg/mL tBsAb下显著低于仅靶细胞和效应细胞的信号。

[0320] 在可变浓度下测量具有CH2的ααGITR10-αPD-L1的ADCC活性。将所有抗体连续稀释(1:2),以20mg/mL最高浓度开始直至0.02mg/mL,并且针对每孔20,000个GITR+CF2细胞进行测试。效应细胞(GITR+CF2)与靶细胞(Wils-2)的比率是5:1。αGITR IgG代表阳性对照,并且F10-αPD-L1代表阴性对照。纵轴代表用发光读出定量的效应细胞中荧光素酶活性的原始值。每种样品在每种浓度下一式三份运行;平均标准偏差以括号表示。从获得的值中减去RPMI培养基中GITR+CF2细胞的本底。

[0321] GITR+CF2细胞上具有CH2的αGITR10-αPD-L1 BsAb的CDC分析

[0322] 通过测量与包含的DNA结合的荧光CellTox Green的量,测试具有CH2的αGITR10-αPD-L1抗体针对表达GITR的CF2细胞的补体依赖性细胞毒性。裂解百分比被计算为从样品获得的信号强度与来自完全裂解的GITR+CF2细胞的信号强度的比率(图31)。

[0323] 阴性对照F10-αPD-L1 BsAb展示与阳性对照αGITR IgG相似的细胞毒性百分比。具有CH2的αGITR10-αPD-L1在65%与70%范围之间的所有浓度下表现出相似的细胞毒性水平,并且似乎不是浓度依赖性的。两种测量的抗体都不具有显著更高的细胞毒性百分比。这

些发现很大程度上与预期结果相矛盾;这些不一致的可能原因是使用的GITR+CF2细胞的潜在低存活力。

[0324] 其他实施方案

[0325] 虽然本发明已经结合其详细说明来描述,但是前述描述意图具有说明性而非限制本发明范围,其由附加权利要求范围来界定。其它方面、优点和修改在以下权利要求书的范围内。

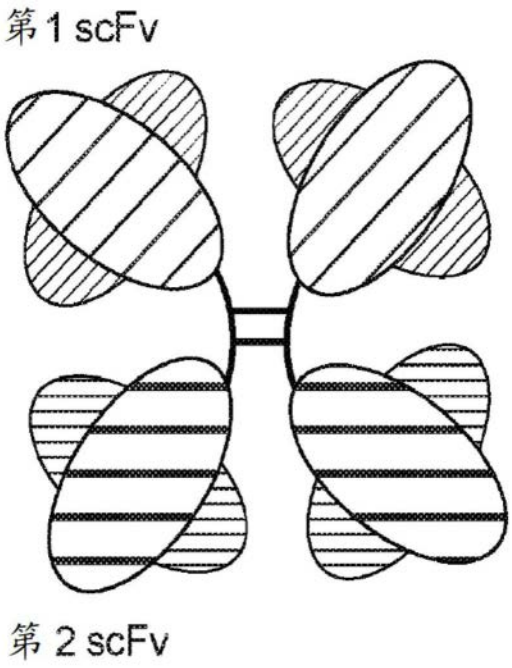


图1

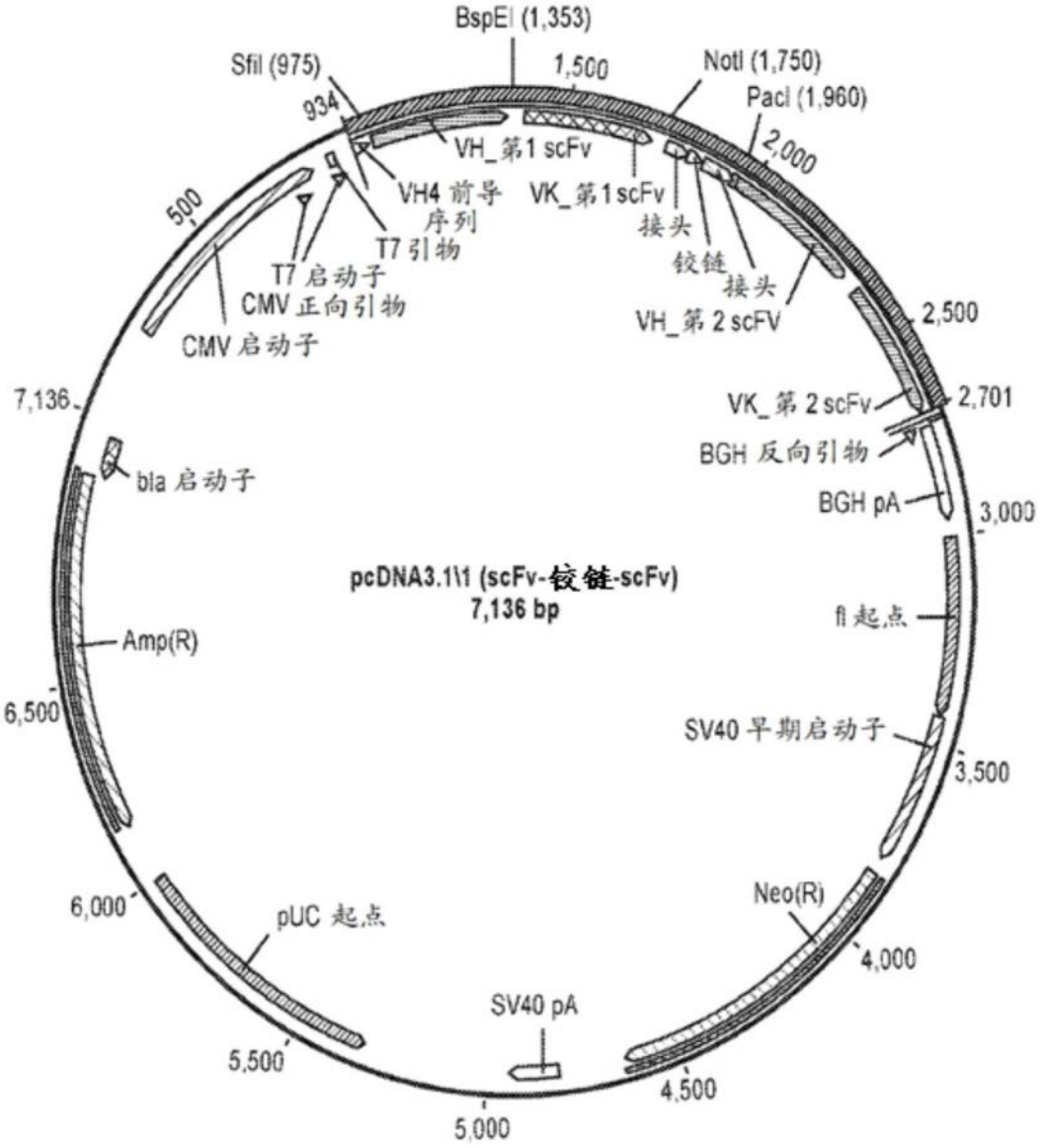

BspEI (1,353)
1,500
SfiI (975)
934
NotI (1,750)
PacI (1,960)
2,000
VH_第1 scFv
VH4 前导序列
VK_第1 scFv
接头
铰链
接头
VH_第 2 scFV
T7 引物
T7 启动子
CMV 正向引物
CMV 启动子
500
2,500
7,136
VK_第 2 scFv
2,701
BGH 反向引物
BGH pA
3,000
bla 启动子
pcDNA3.1\1 (scFv-铰链-scFv)
7,136 bp
f1 起点
Amp(R)
6,500
SV40 早期启动子
3,500
Neo(R)
6,000
pUC 起点
4,000
SV40 pA
5,500
4,500
5,000

图2

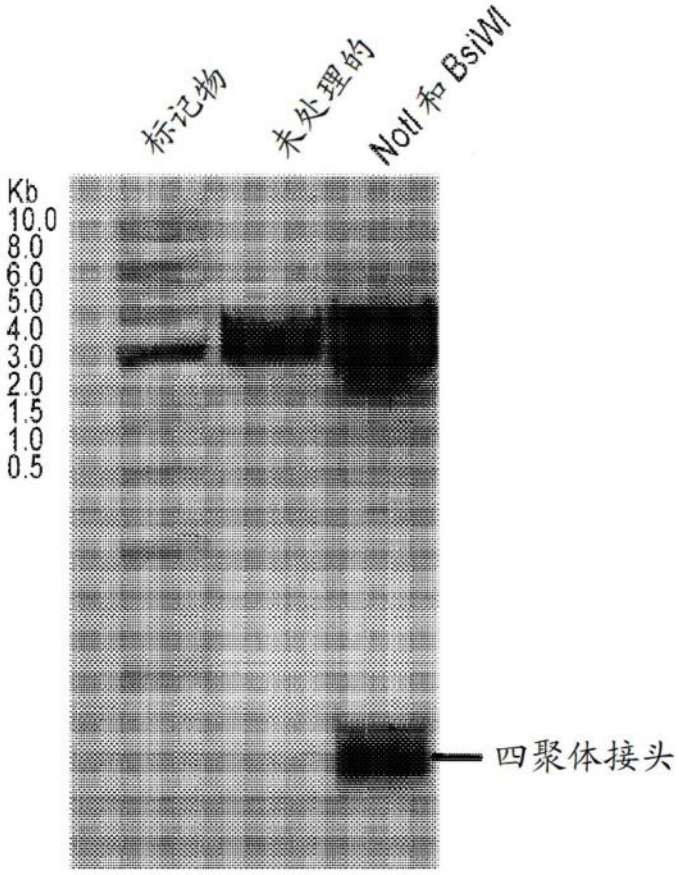

标记物
未处理的
NotI和BsiWI
Kb
10.0
8.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.5
1.0
0.5
四聚体接头

图3A

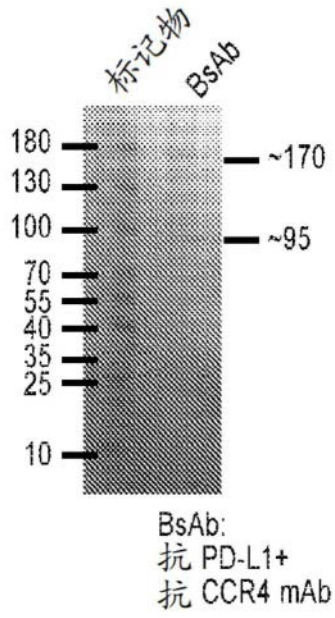

标记物
BsAb
180
130
100
70
55
40
35
25
10
~170
~95
BsAb:
抗 PD-L1+
抗 CCR4 mAb

图3B

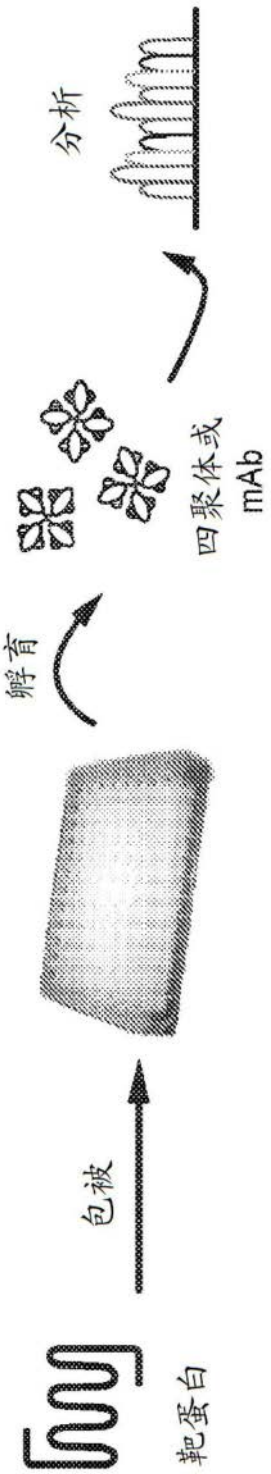


图4A

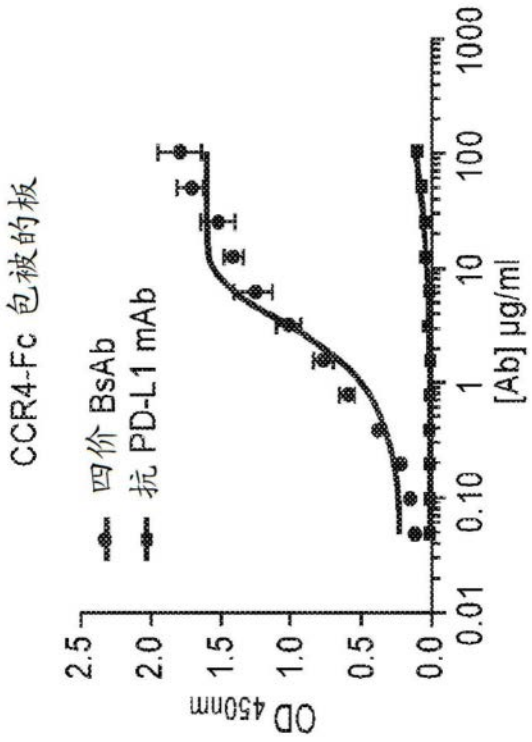

CCR4-Fc 包被的板
四价 BsAb
抗 PD-L1 mAb
OD 450nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.01
0.10
1
10
100
1000
[Ab] μg/ml

图4B

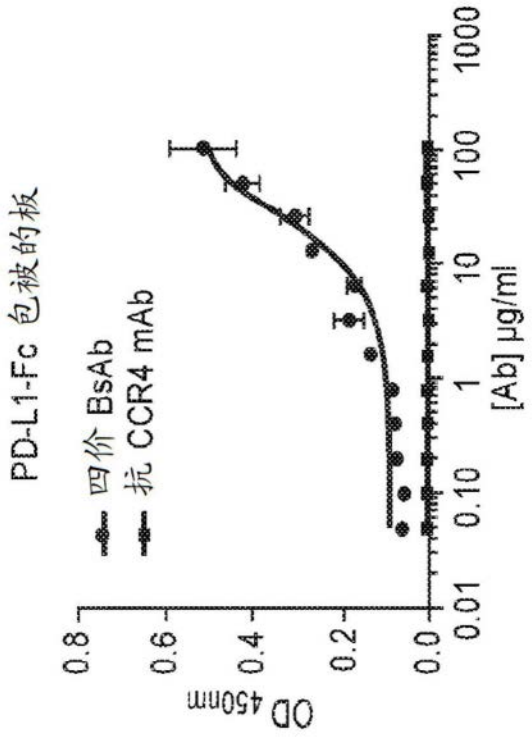

PD-L1-Fc 包被的板
四价 BsAb
抗 CCR4 mAb
OD 450nm
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.01
0.10
1
10
100
1000
[Ab] μg/ml

图4C

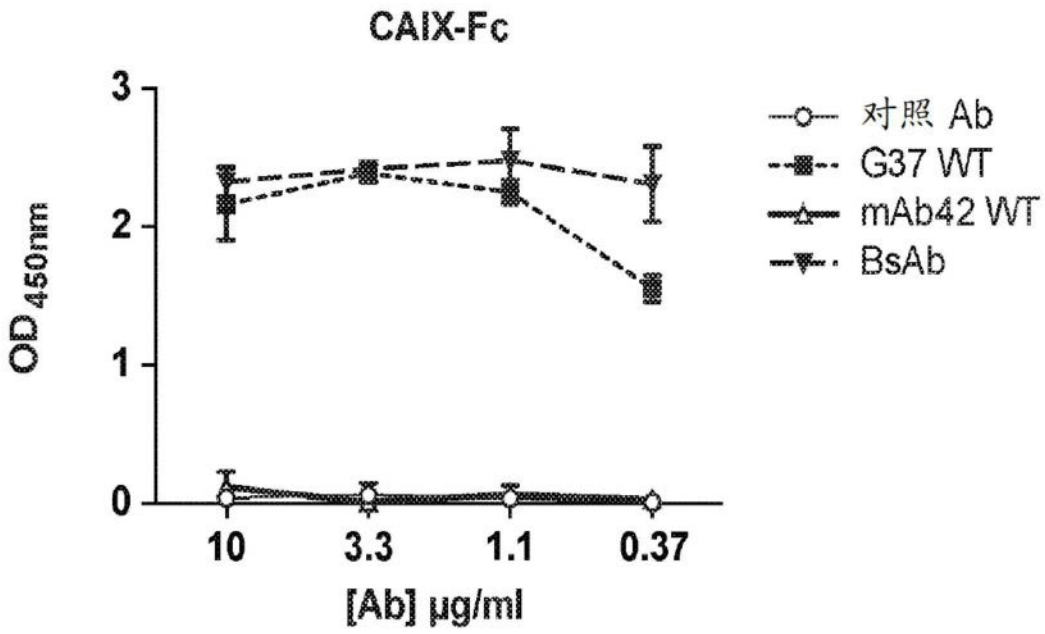

CAIX-Fc
OD450nm
3
2
1
0
10
3.3
1.1
0.37
[Ab] μg/ml
对照 Ab
G37 WT
mAb42 WT
BsAb

图5

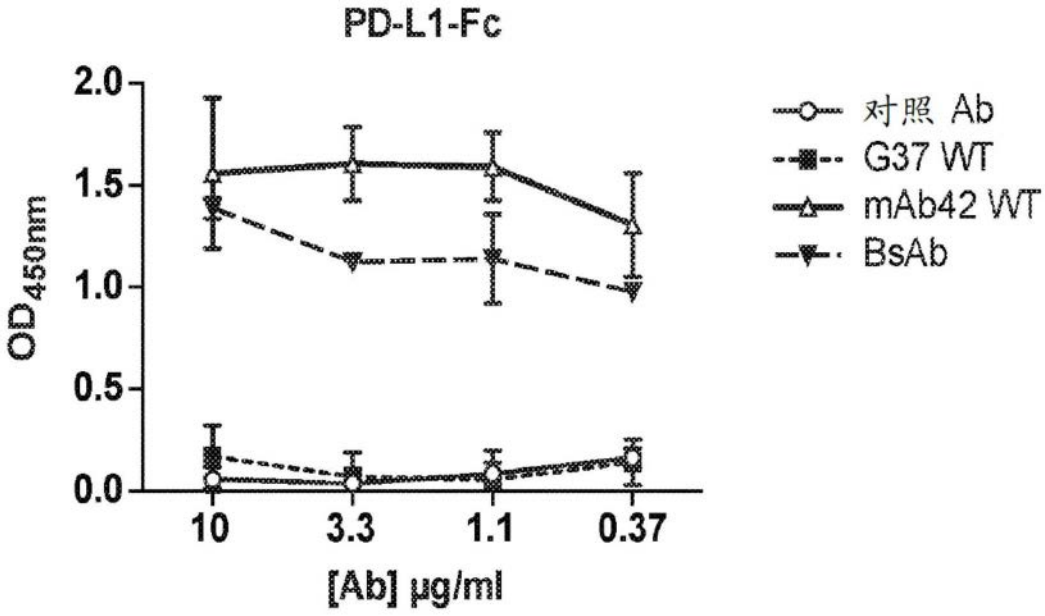

PD-L1-Fc
OD450nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10
3.3
1.1
0.37
[Ab] μg/ml
对照 Ab
G37 WT
mAb42 WT
BsAb

图6

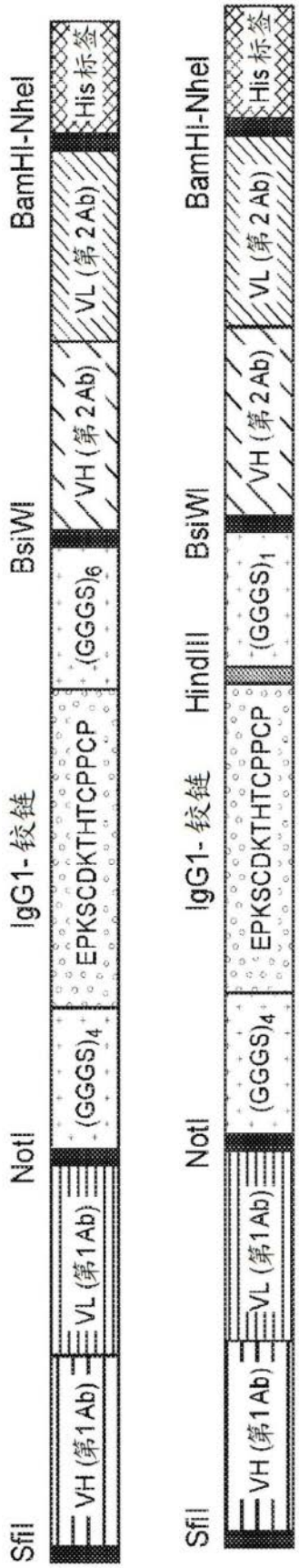

SfiI
NotI
VH (第1Ab)
VL (第1Ab)
(GGGS)4
IgG1-铰链
EPKSCDKTHTCPPCP
BsiWI
(GGGS)6
VH (第2Ab)
VL (第2Ab)
His标签
BamHI-NheI
SfiI
NotI
VH (第1Ab)
VL (第1Ab)
(GGGS)4
IgG1-铰链
EPKSCDKTHTCPPCP
HindIII
(GGGS)1
BsiWI
VH (第2Ab)
VL (第2Ab)
His标签
BamHI-NheI

图7A

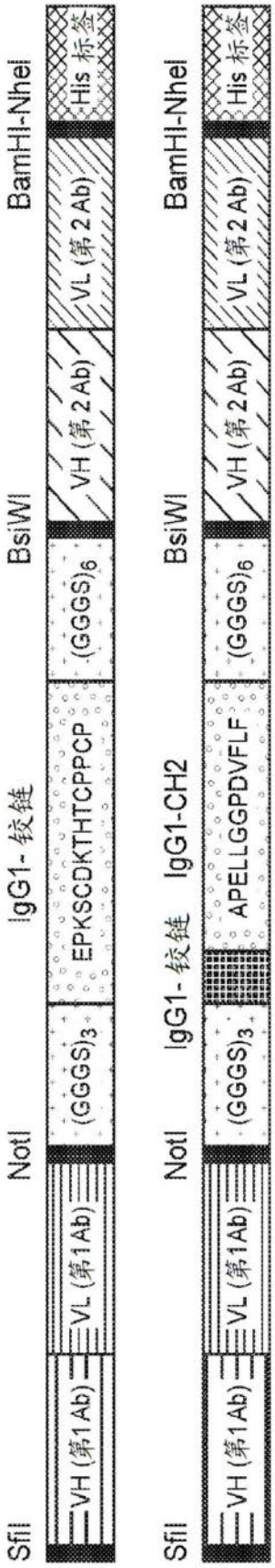

SfiI
VH (第1Ab)
VL (第1Ab)
NotI
(GGGS)3
IgG1- 铰链
EPKSCDKTHTCPPCP
(GGGS)6
BsiWI
VH (第2Ab)
VL (第2Ab)
BamHI-NheI
His 标签
SfiI
VH (第1Ab)
VL (第1Ab)
NotI
(GGGS)3
IgG1- 铰链
IgG1-CH2
APELLGGPDVFLF
(GGGS)6
BsiWI
VH (第2Ab)
VL (第2Ab)
BamHI-NheI
His 标签

图7B

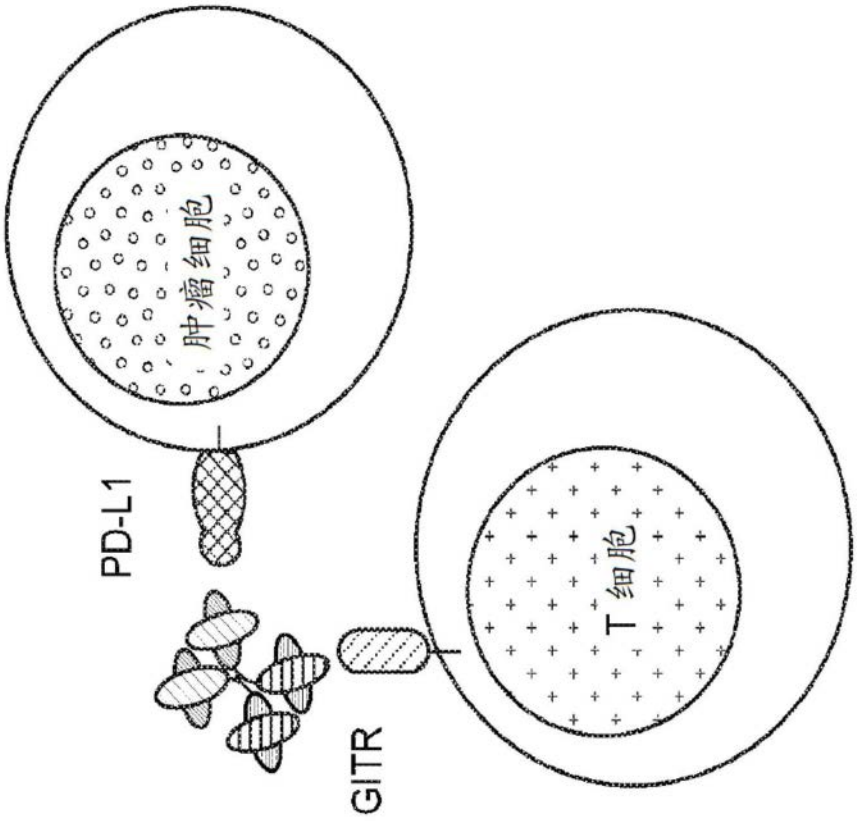

肿瘤细胞
PD-L1
GITR
T 细胞

图8A

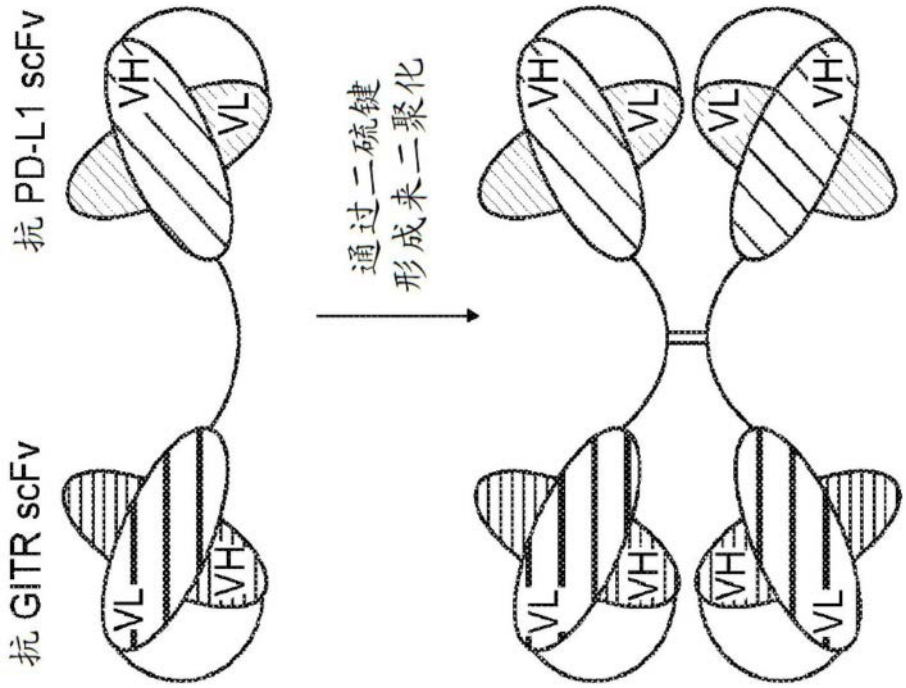

抗 PD-L1 scFv
抗 GITR scFv
VH
VL
VL
VH
通过二硫键
形成来二聚化
VH
VL
VL
VH
VL
VH
VH
VL

图8B

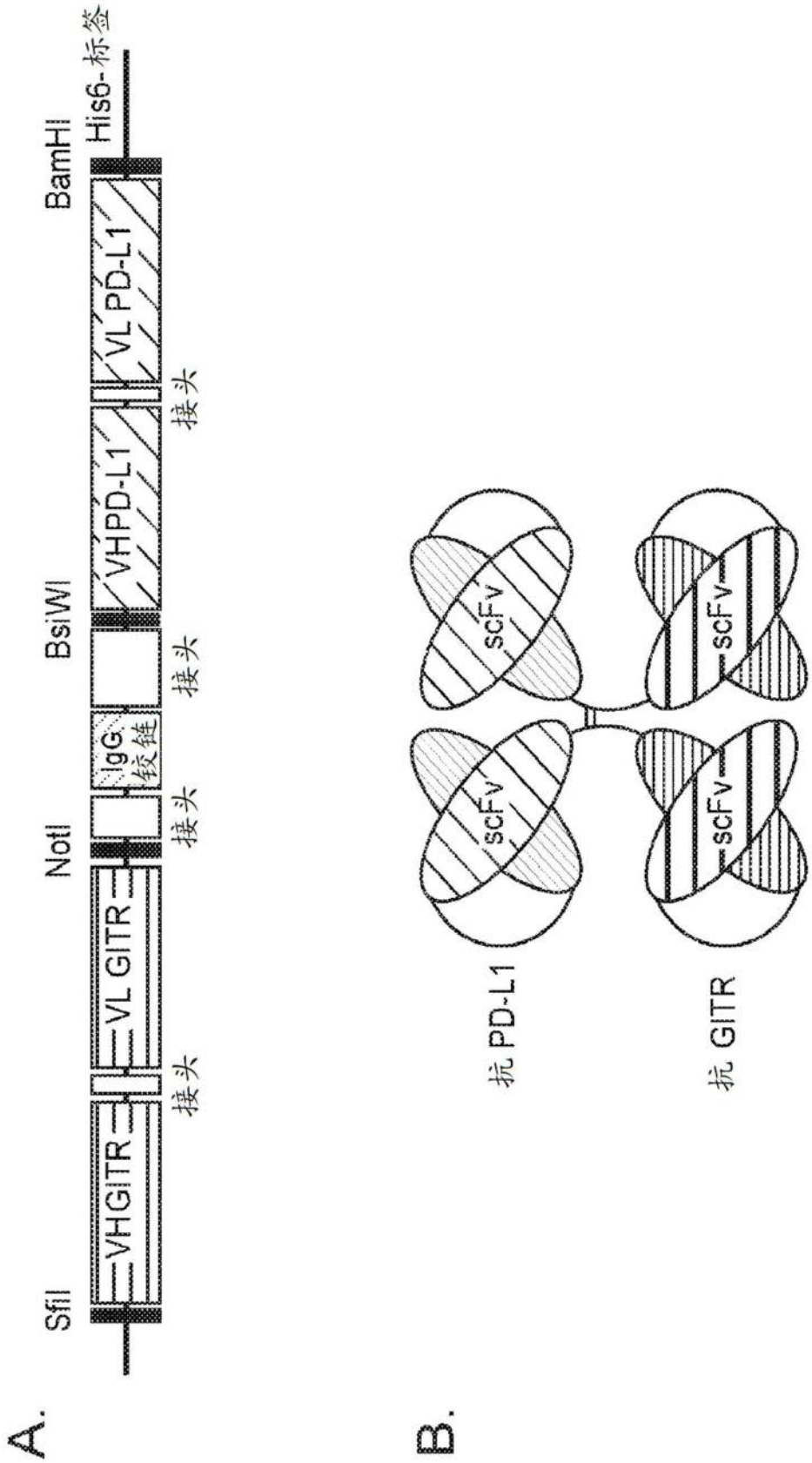

A.
SfiI
VHGITR
接头
NotI
VL GITR
接头
IgG
铰链
接头
BsiWI
VHPD-L1
接头
BamHI
VL PD-L1
His6-标签
B.
scFv
scFv
抗 PD-L1
scFv
scFv
抗 GITR

图9

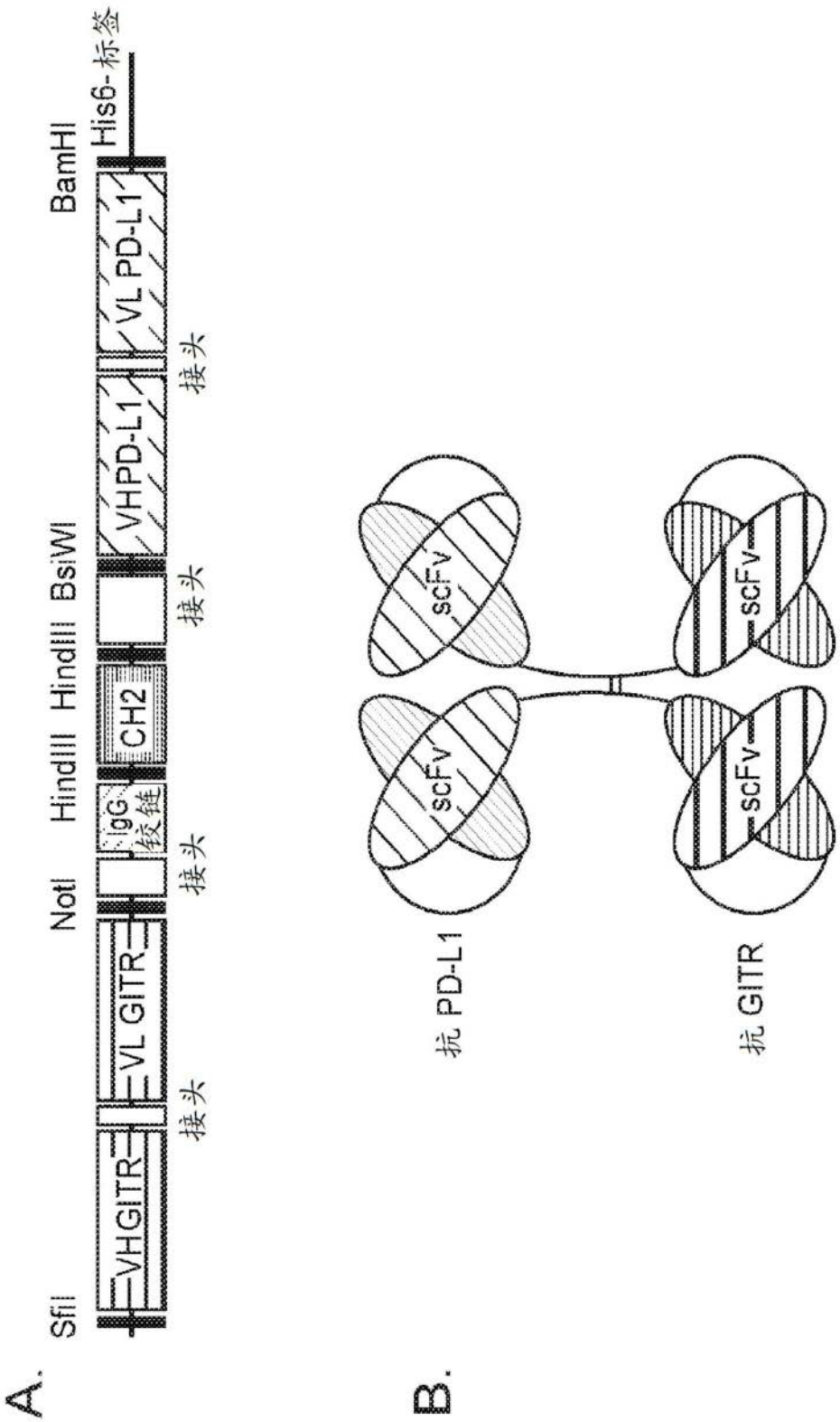

A.
SfiI
VHGITR
接头
NotI
VL GITR
HindIII
IgG
铰链
HindIII
CH2
BsiWI
接头
VHPD-L1
接头
BamHI
VL PD-L1
His6-标签
B.
scFv
scFv
抗 PD-L1
scFv
scFv
抗 GITR

图10

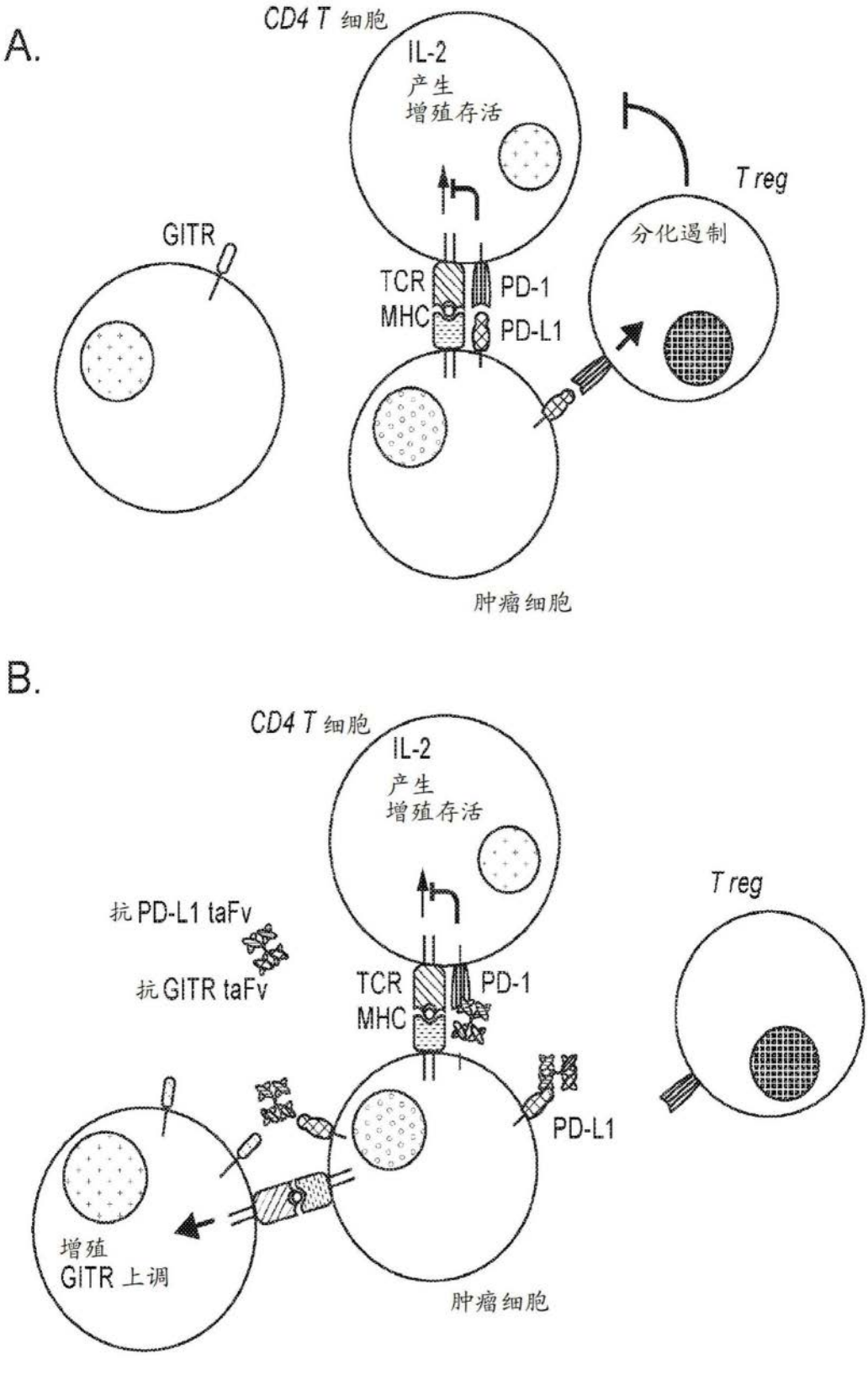

A.
CD4 T 细胞
IL-2
产生
增殖存活
T reg
分化遏制
GITR
TCR
MHC
PD-1
PD-L1
肿瘤细胞
B.
CD4 T 细胞
IL-2
产生
增殖存活
T reg
抗 PD-L1 taFv
抗 GITR taFv
TCR
MHC
PD-1
PD-L1
增殖
GITR 上调
肿瘤细胞

图11

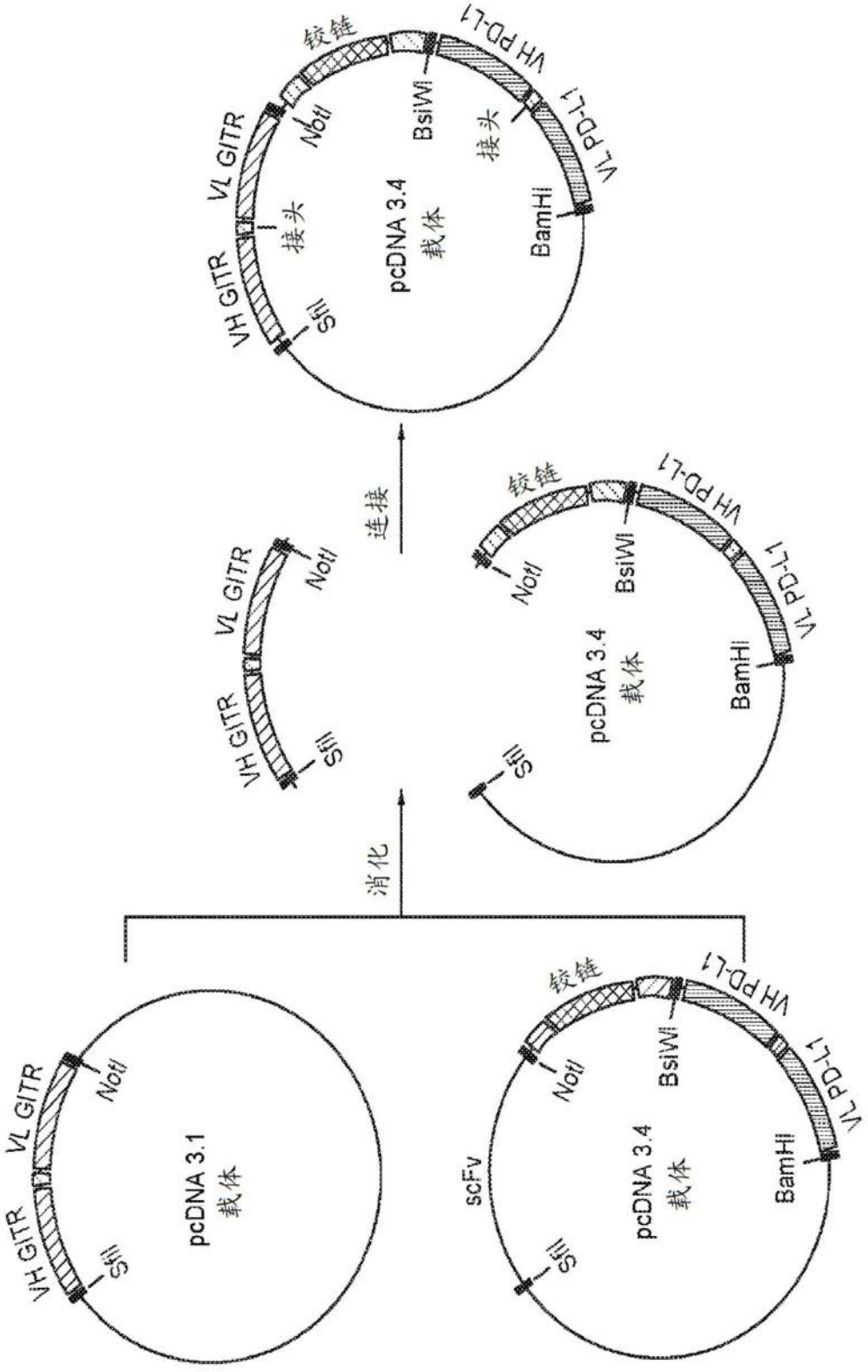

铰链
VH PD-L1
VL PD-L1
BsiWI
NotI
接头
BamHI
pcDNA 3.4
载体
VL GITR
VH GITR
SfiI
连接
消化
pcDNA 3.1
scFv

图12

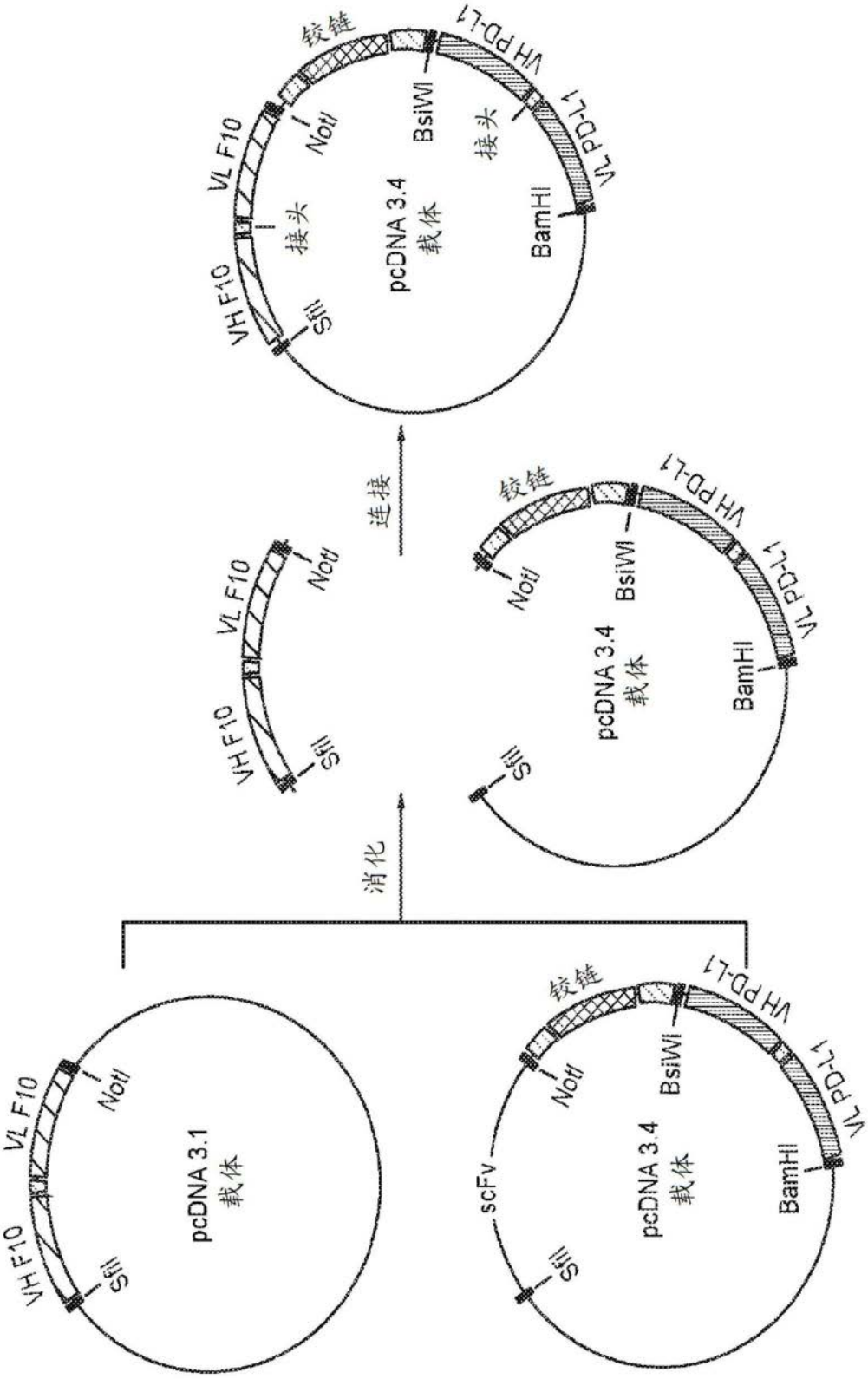

铰链
VH PD-L1
VL PD-L1
VL F10
NotI
BsiWI
接头
pcDNA 3.4
载体
BamHI
VH F10
SfiI
连接
消化
pcDNA 3.1
scFv

图13

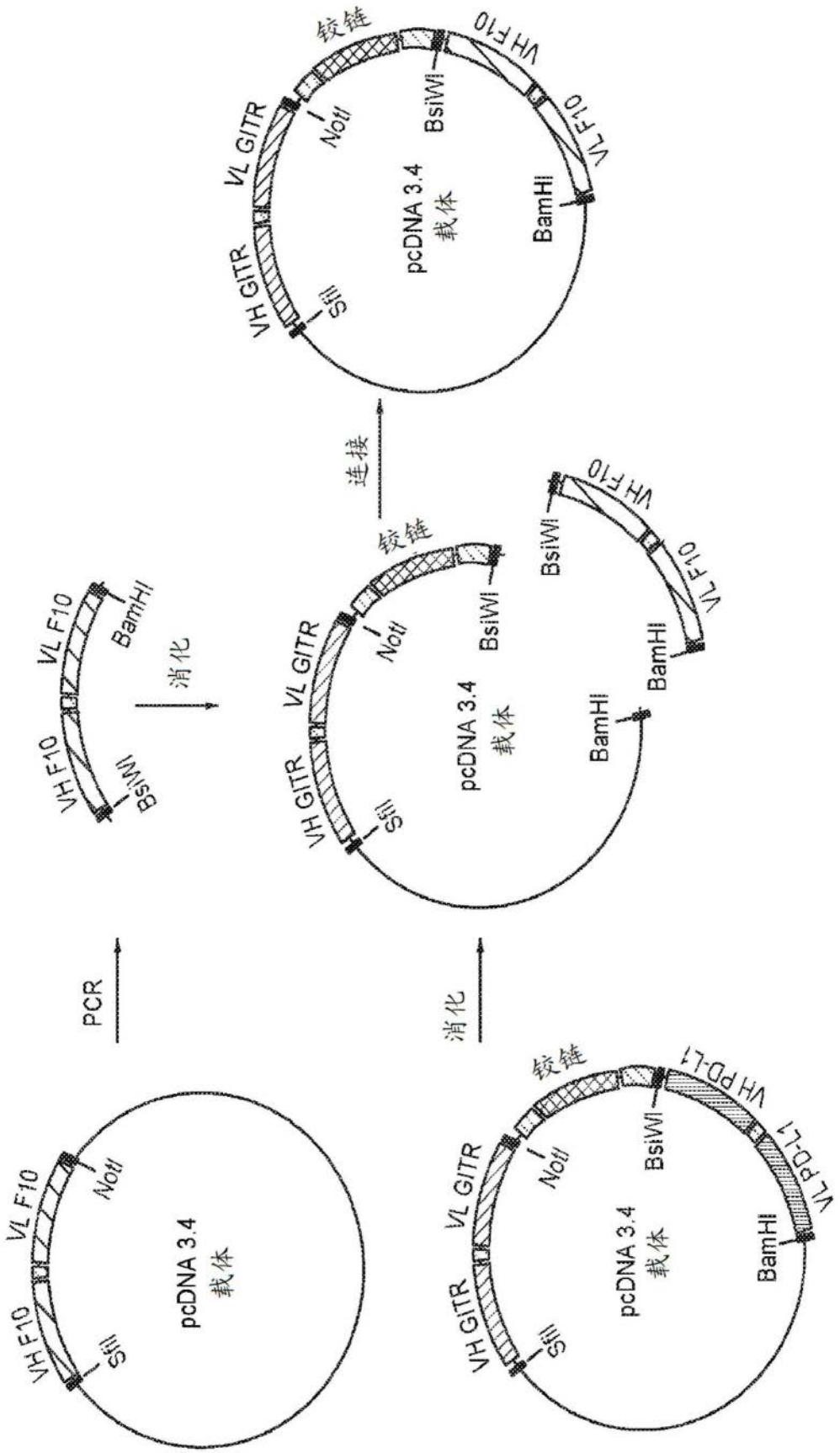

铰链
VH F10
VL F10
VL GITR
NotI
BsiWI
pcDNA 3.4
载体
BamHI
VH GITR
SfiI
连接
消化
PCR
VL PD-L1
VH PD-L1

图14

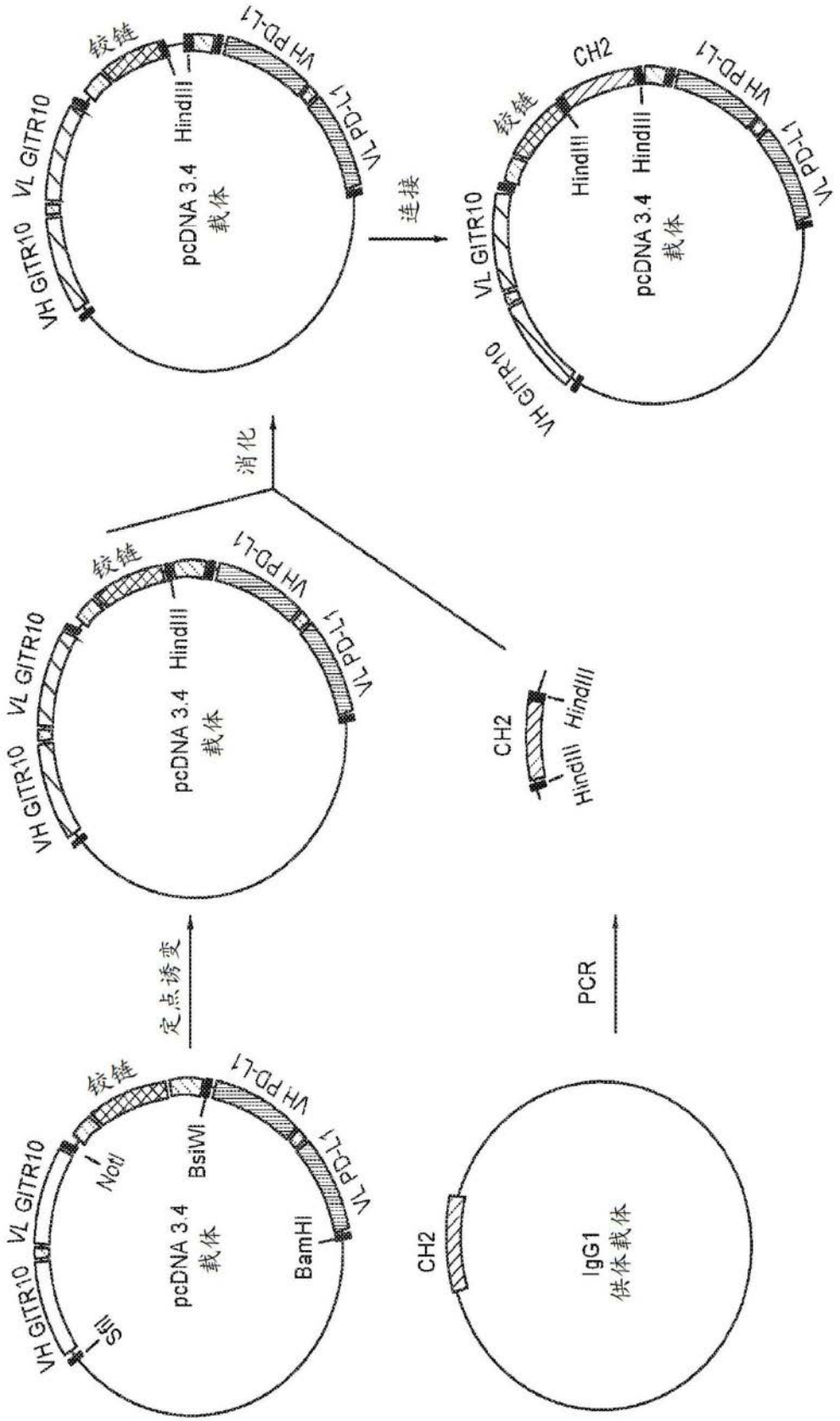

铰链
VH PD-L1
VL PD-L1
VL GITR10
VH GITR10
HindIII
pcDNA 3.4
载体
连接
CH2
消化
定点诱变
PCR
NotI
BsiWI
BamHI
SfiI
IgG1
供体载体

图15

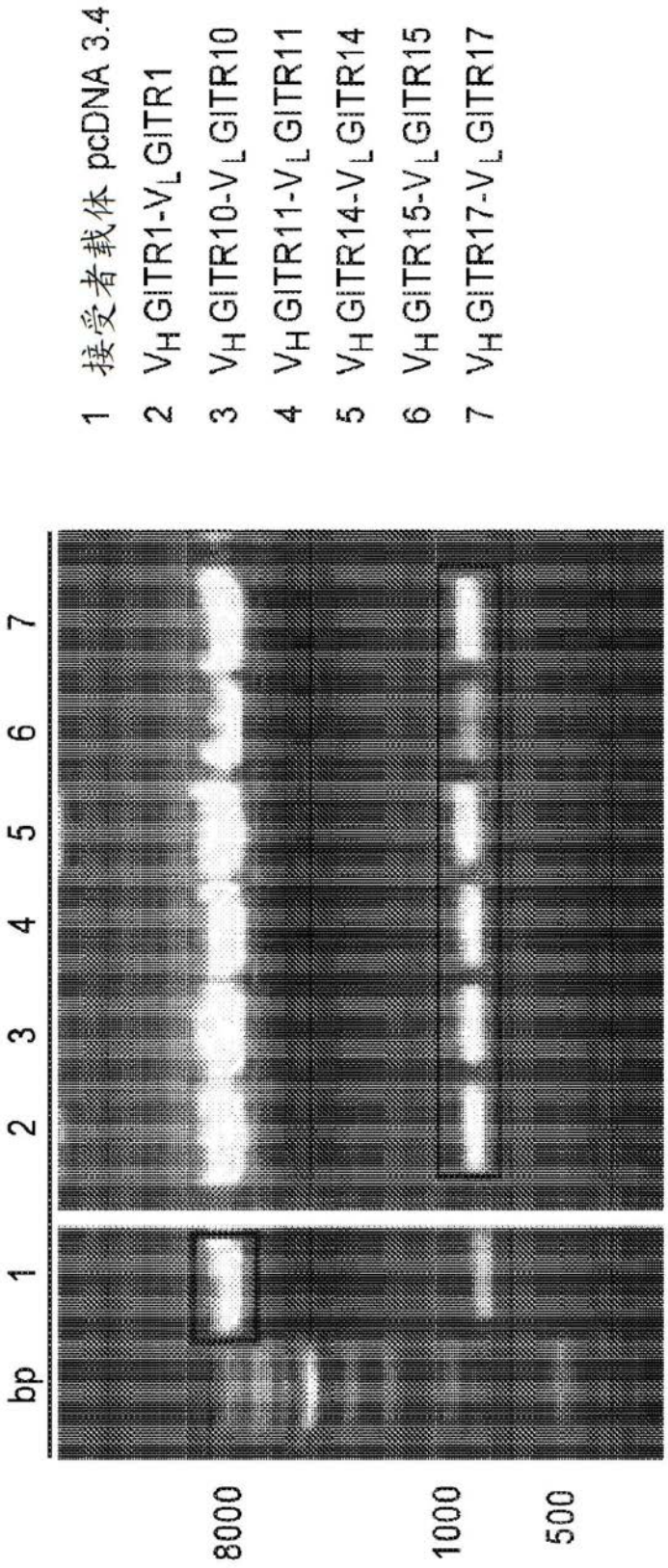

1 接受者载体 pcDNA 3.4
2 V_HGITR1-V_LGITR1
3 V_HGITR10-V_LGITR10
4 V_HGITR11-V_LGITR11
5 V_HGITR14-V_LGITR14
6 V_HGITR15-V_LGITR15
7 V_HGITR17-V_LGITR17
bp
1
2
3
4
5
6
7
8000
1000
500

图16

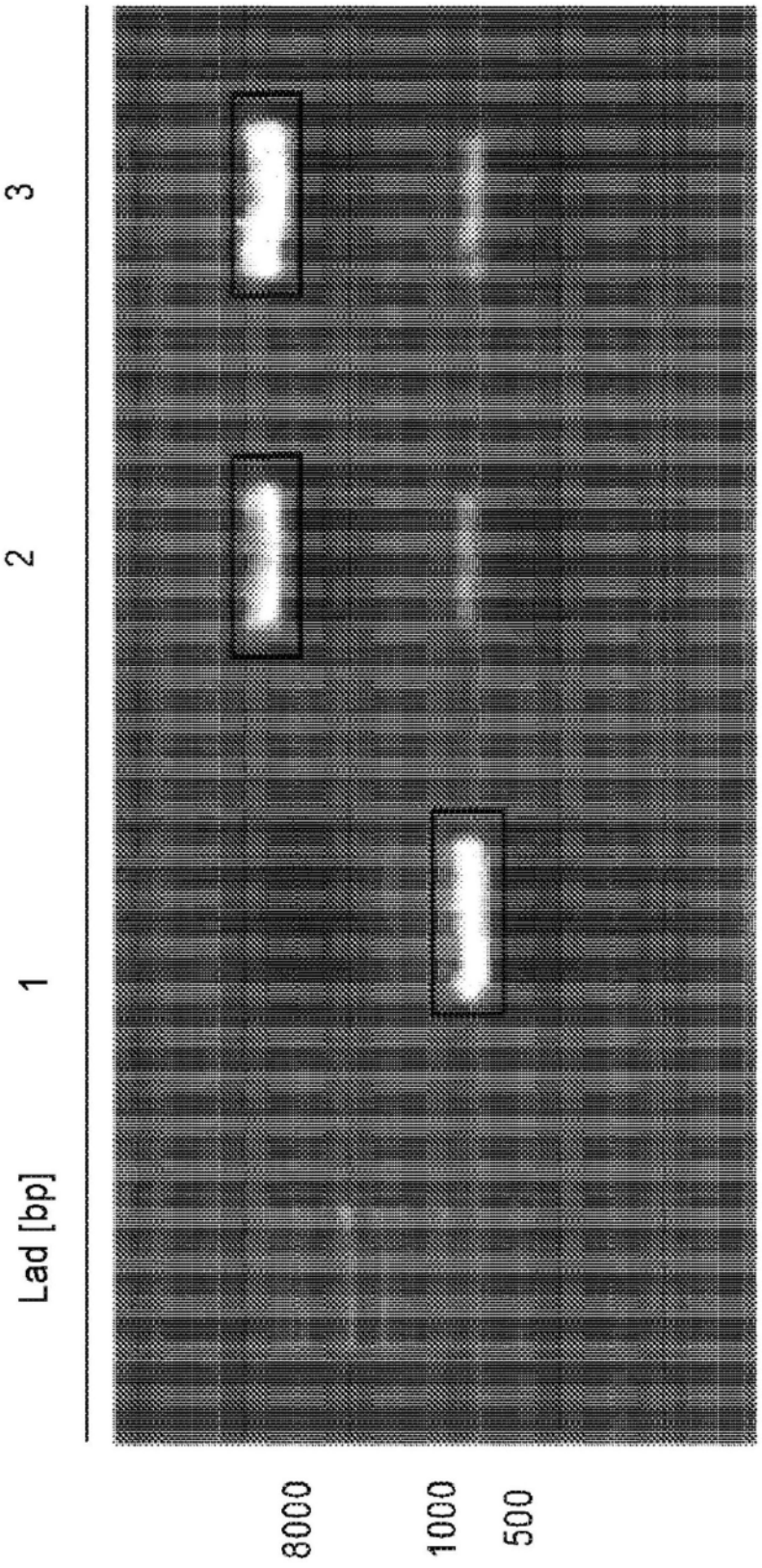


图17

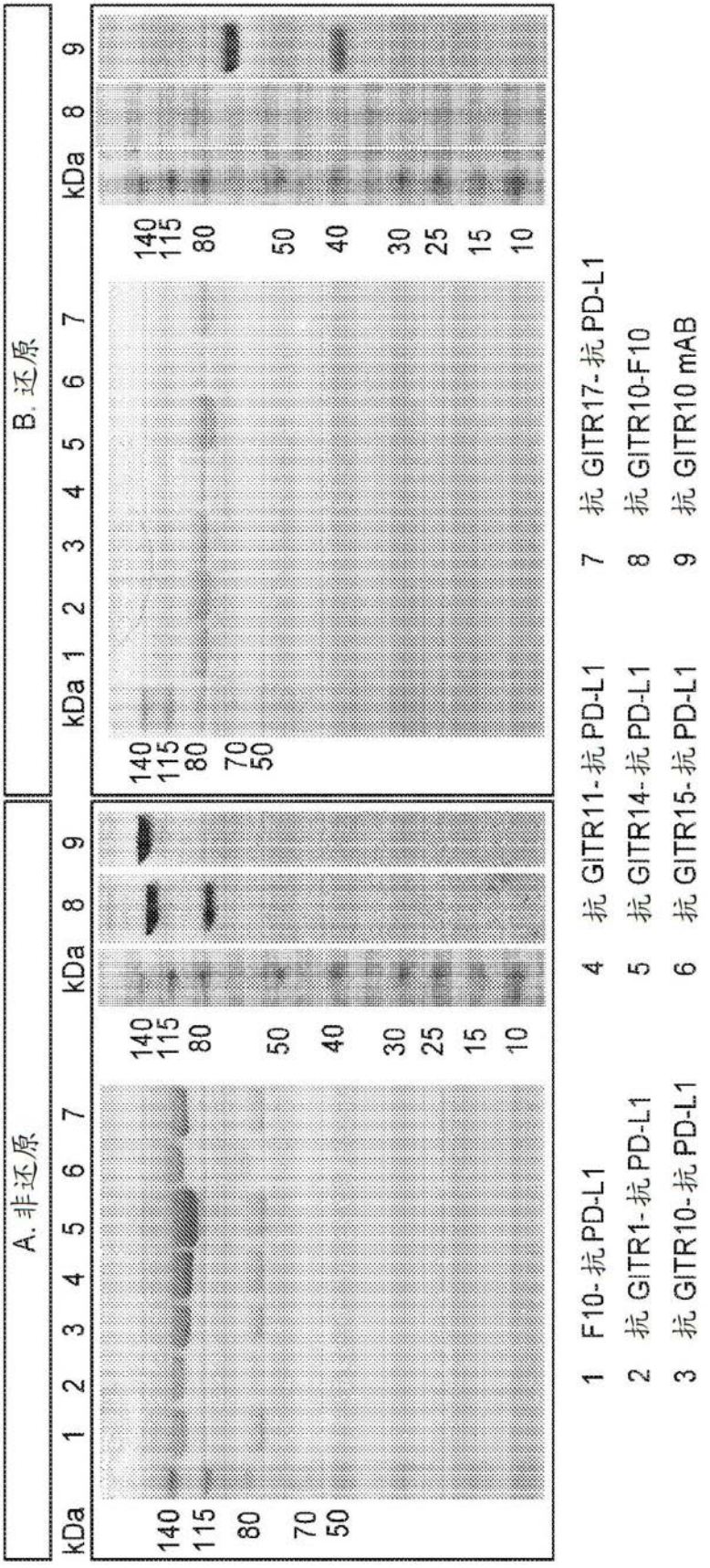

A. 非还原
B. 还原
kDa
1 2 3 4 5 6 7 8 9
140
115
80
70
50
40
30
25
15
10
1 F10-抗PD-L1
2 抗 GITR1-抗 PD-L1
3 抗 GITR10-抗 PD-L1
4 抗 GITR11-抗 PD-L1
5 抗 GITR14-抗 PD-L1
6 抗 GITR15-抗 PD-L1
7 抗 GITR17-抗 PD-L1
8 抗 GITR10-F10
9 抗 GITR10 mAB

图18

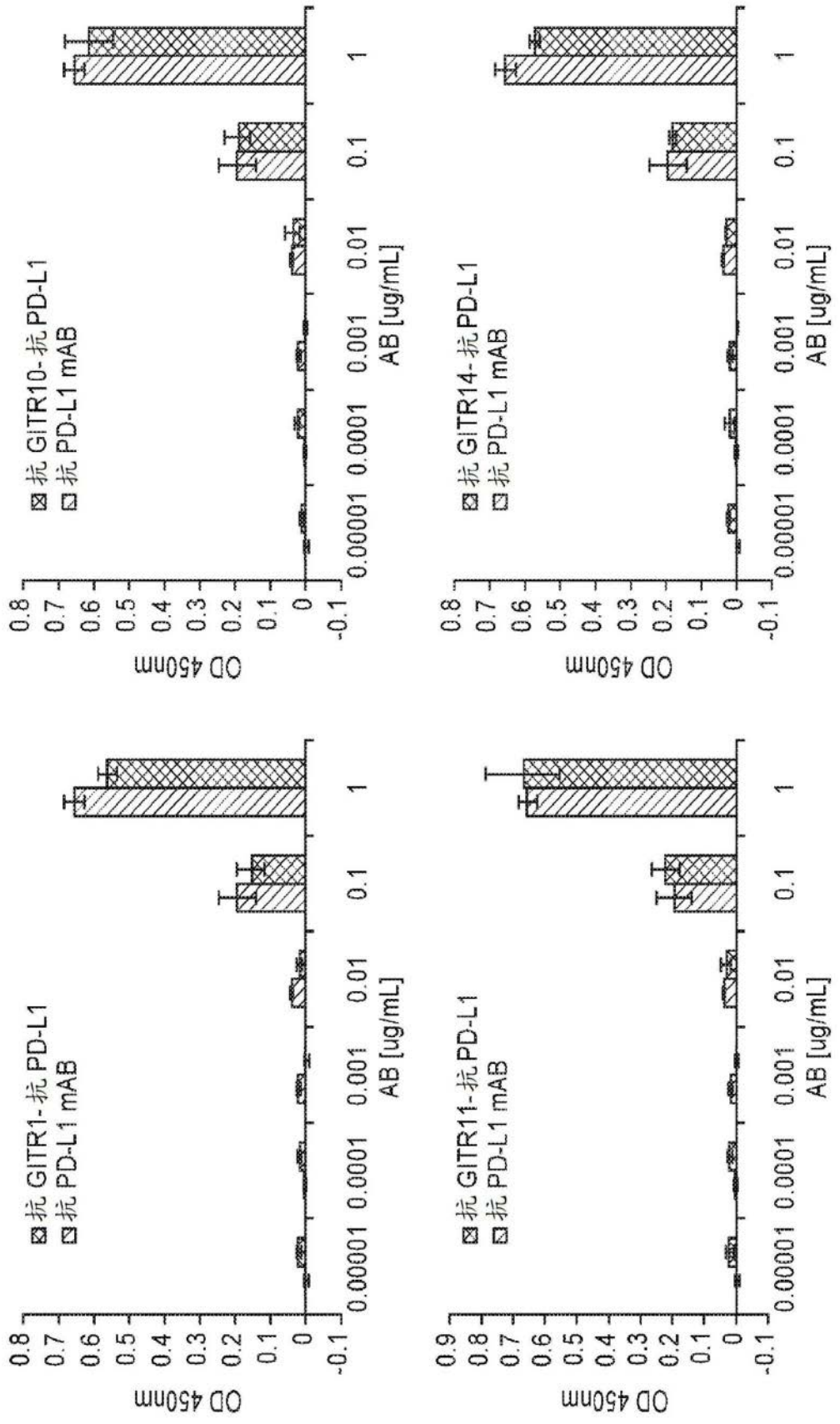

抗 GITR10-抗 PD-L1
抗 PD-L1 mAB
OD 450nm
AB [ug/mL]
0.00001 0.0001 0.001 0.01 0.1 1
抗 GITR14-抗 PD-L1
抗 PD-L1 mAB
OD 450nm
AB [ug/mL]
0.00001 0.0001 0.001 0.01 0.1 1
抗 GITR1-抗 PD-L1
抗 PD-L1 mAB
OD 450nm
AB [ug/mL]
0.00001 0.0001 0.001 0.01 0.1 1
抗 GITR11-抗 PD-L1
抗 PD-L1 mAB
OD 450nm
AB [ug/mL]
0.00001 0.0001 0.001 0.01 0.1 1

图19

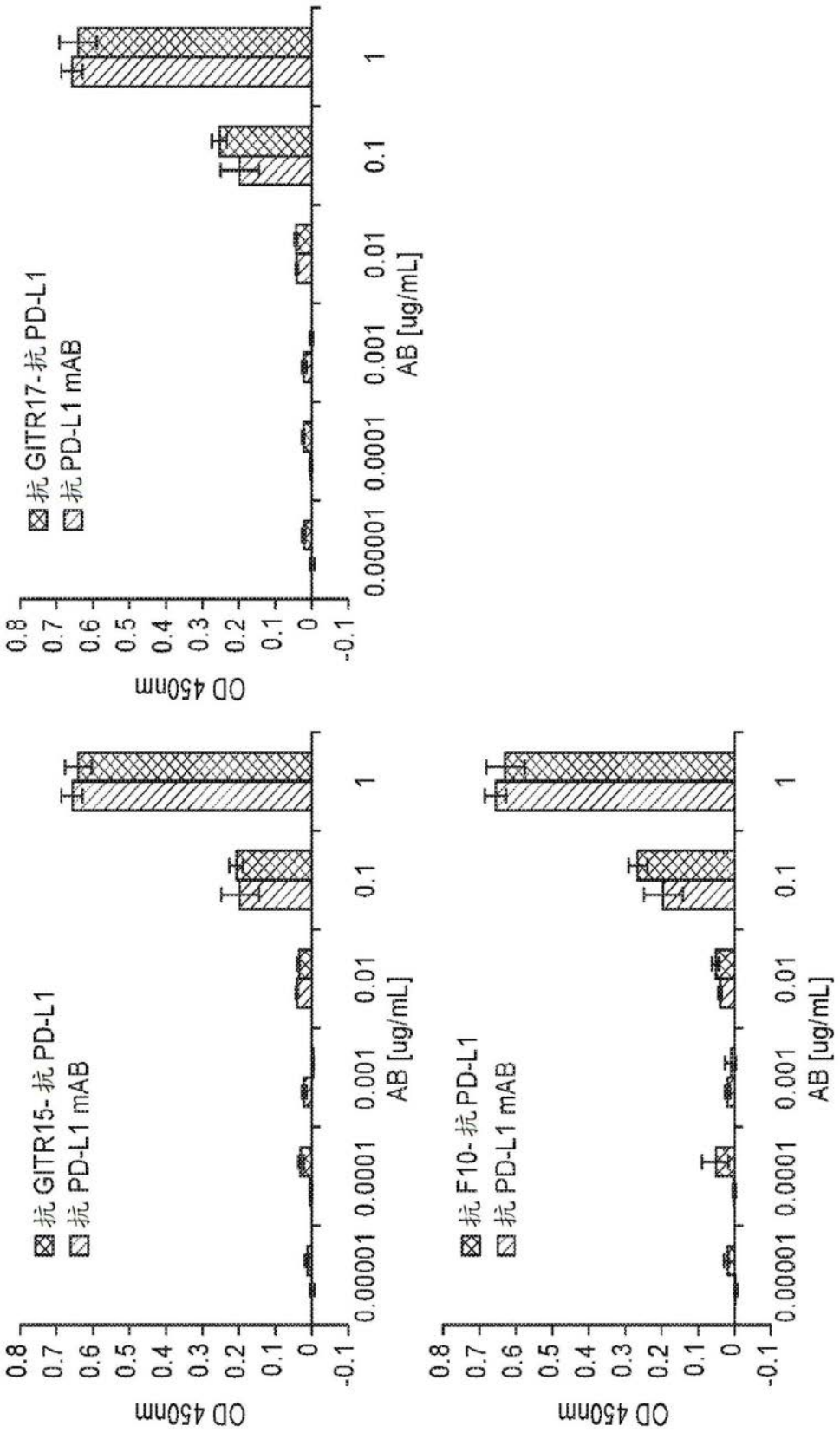

抗 GITR17-抗 PD-L1
抗 PD-L1 mAB
OD 450nm
AB [ug/mL]
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
抗 GITR15-抗 PD-L1
抗 PD-L1 mAB
OD 450nm
AB [ug/mL]
抗 F10-抗 PD-L1
抗 PD-L1 mAB
OD 450nm
AB [ug/mL]

图19(续)

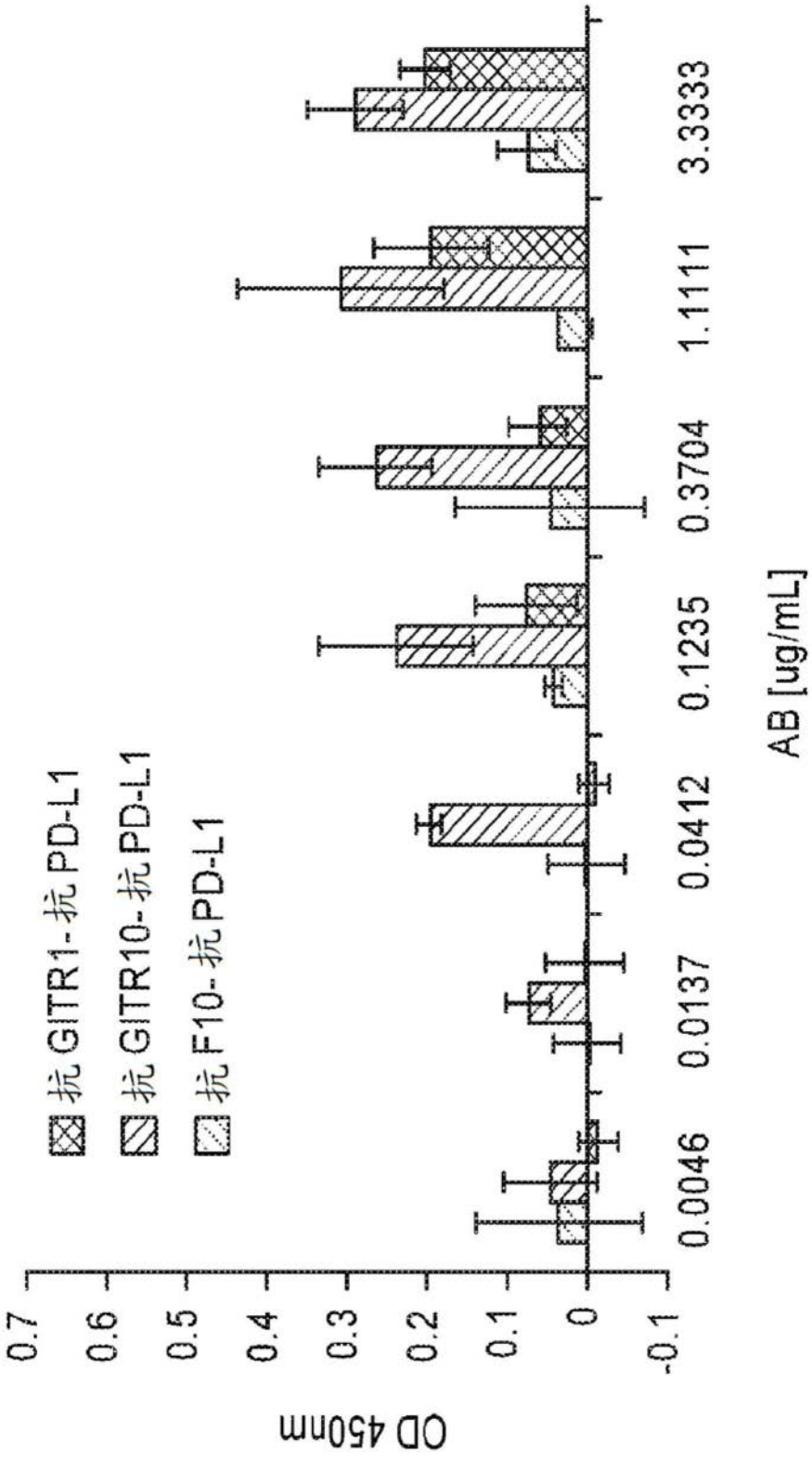

OD 450nm
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
0.0046
0.0137
0.0412
0.1235
0.3704
1.1111
3.3333
AB [ug/mL]
抗 GITR1-抗 PD-L1
抗 GITR10-抗 PD-L1
抗 F10-抗 PD-L1

图20

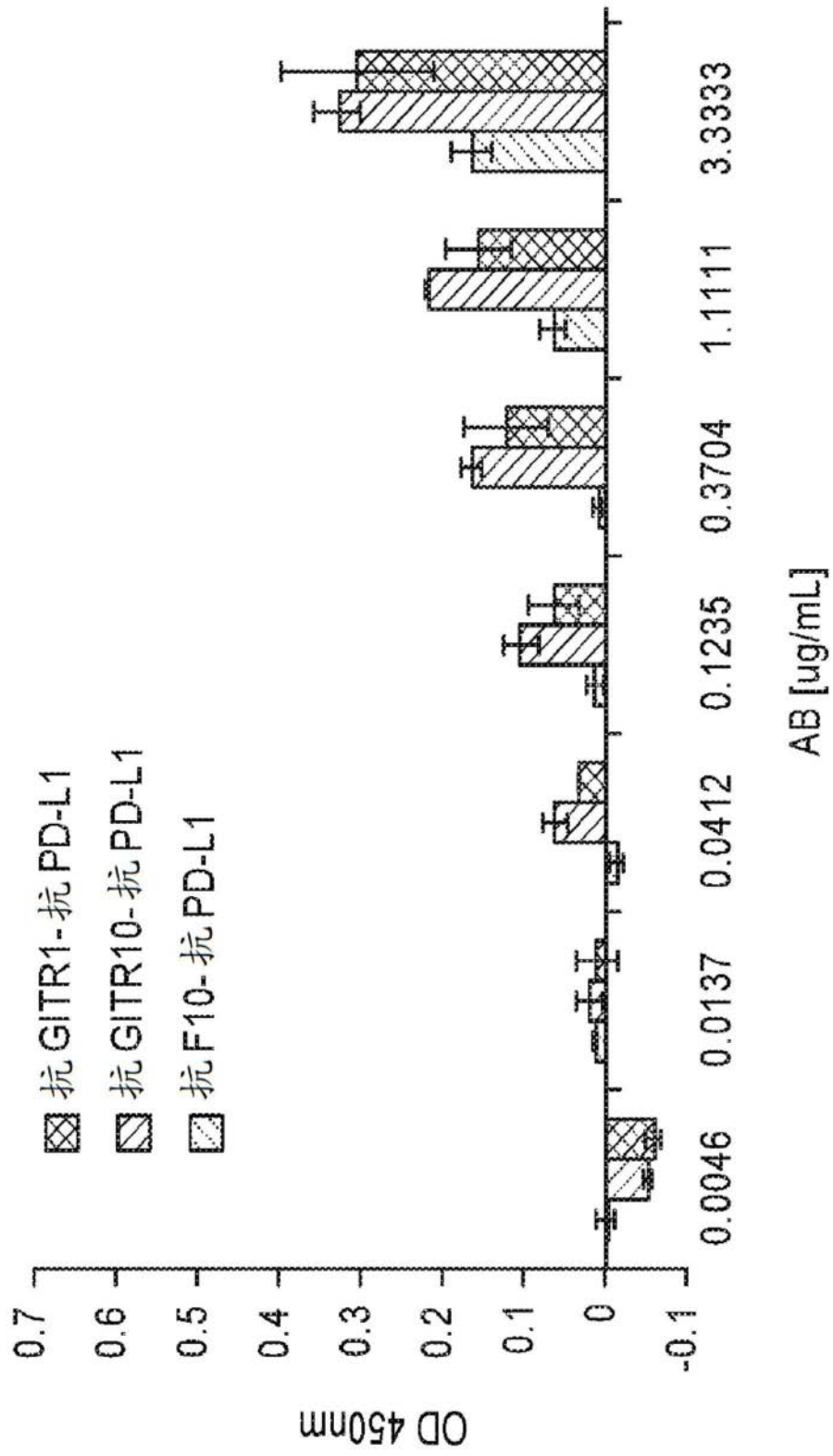

抗 GITR1-抗 PD-L1
抗 GITR10-抗 PD-L1
抗 F10-抗 PD-L1
OD 450nm
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
0.0046
0.0137
0.0412
0.1235
0.3704
1.1111
3.3333
AB [ug/mL]

图21

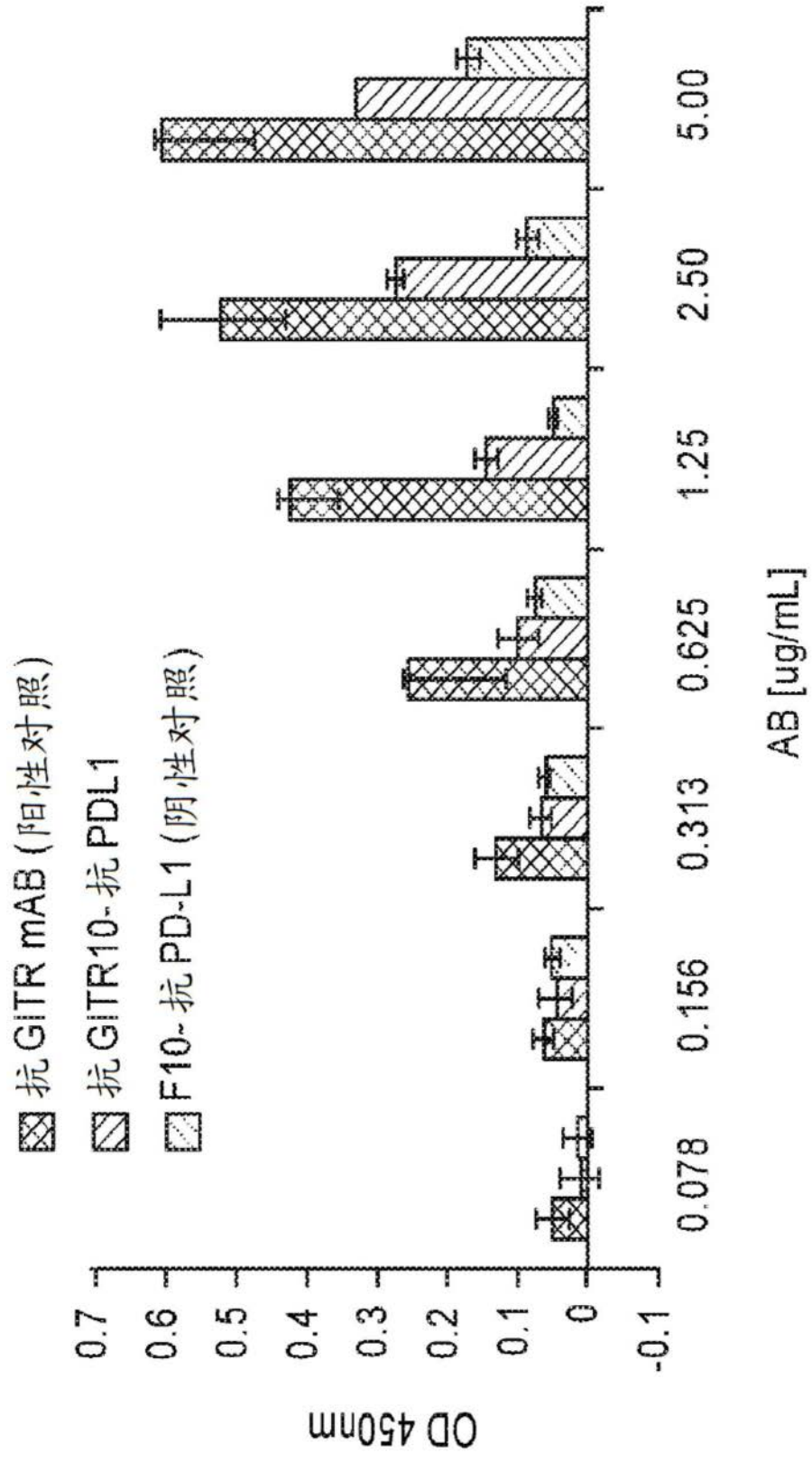

抗GITR mAB (阳性对照)
抗GITR10-抗PDL1
F10-抗PD-L1 (阴性对照)
OD 450nm
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
0.078
0.156
0.313
0.625
1.25
2.50
5.00
AB [ug/mL]

图22

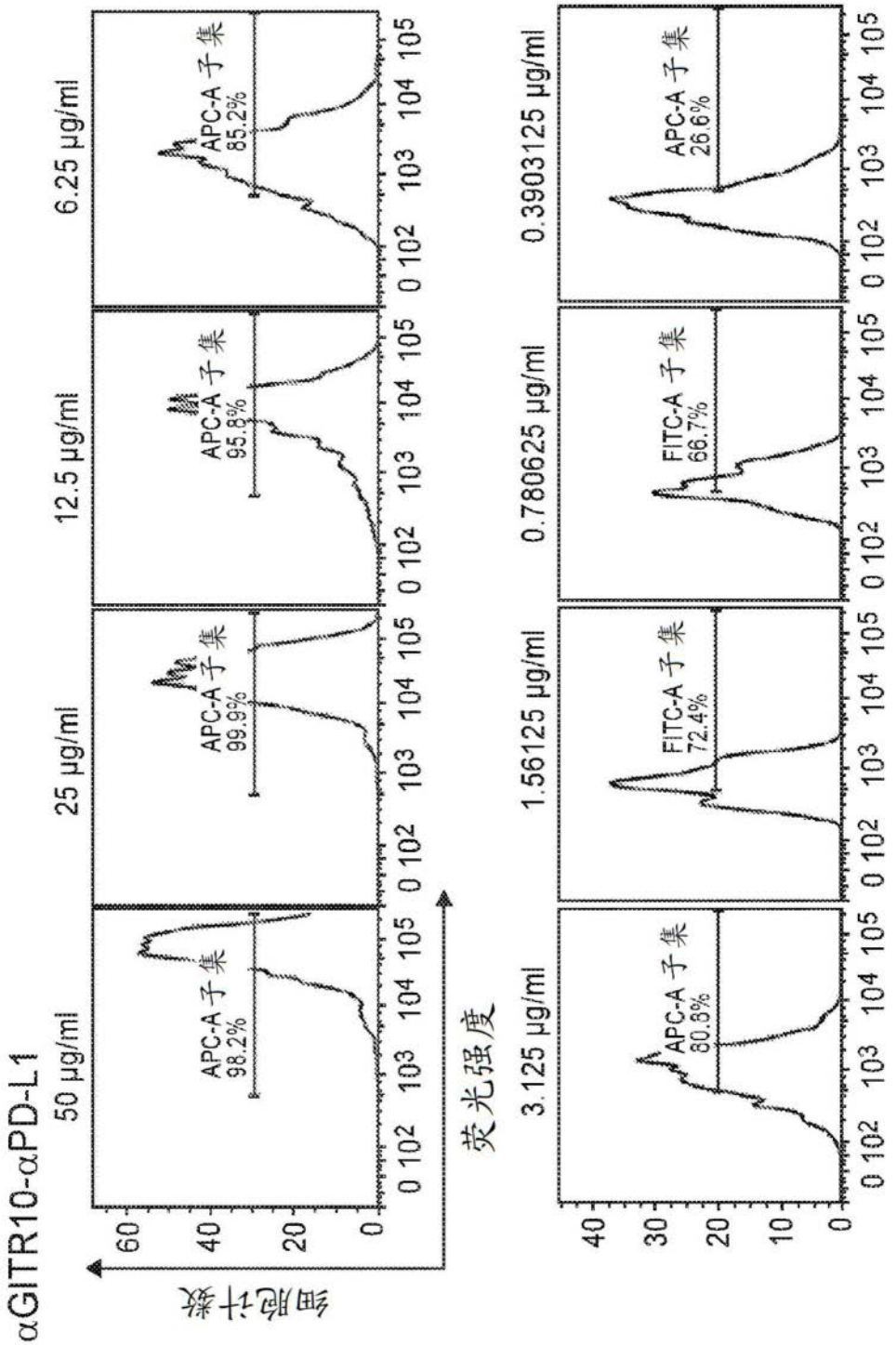

αGITR10-αPD-L1
50 μg/ml
25 μg/ml
12.5 μg/ml
6.25 μg/ml
3.125 μg/ml
1.56125 μg/ml
0.780625 μg/ml
0.3903125 μg/ml
APC-A 子集
98.2%
APC-A 子集
99.9%
APC-A 子集
95.8%
APC-A 子集
85.2%
APC-A 子集
80.3%
FITC-A 子集
72.4%
FITC-A 子集
66.7%
APC-A 子集
26.6%
细胞计数
荧光强度
0 10² 10³ 10⁴ 10⁵

图23A

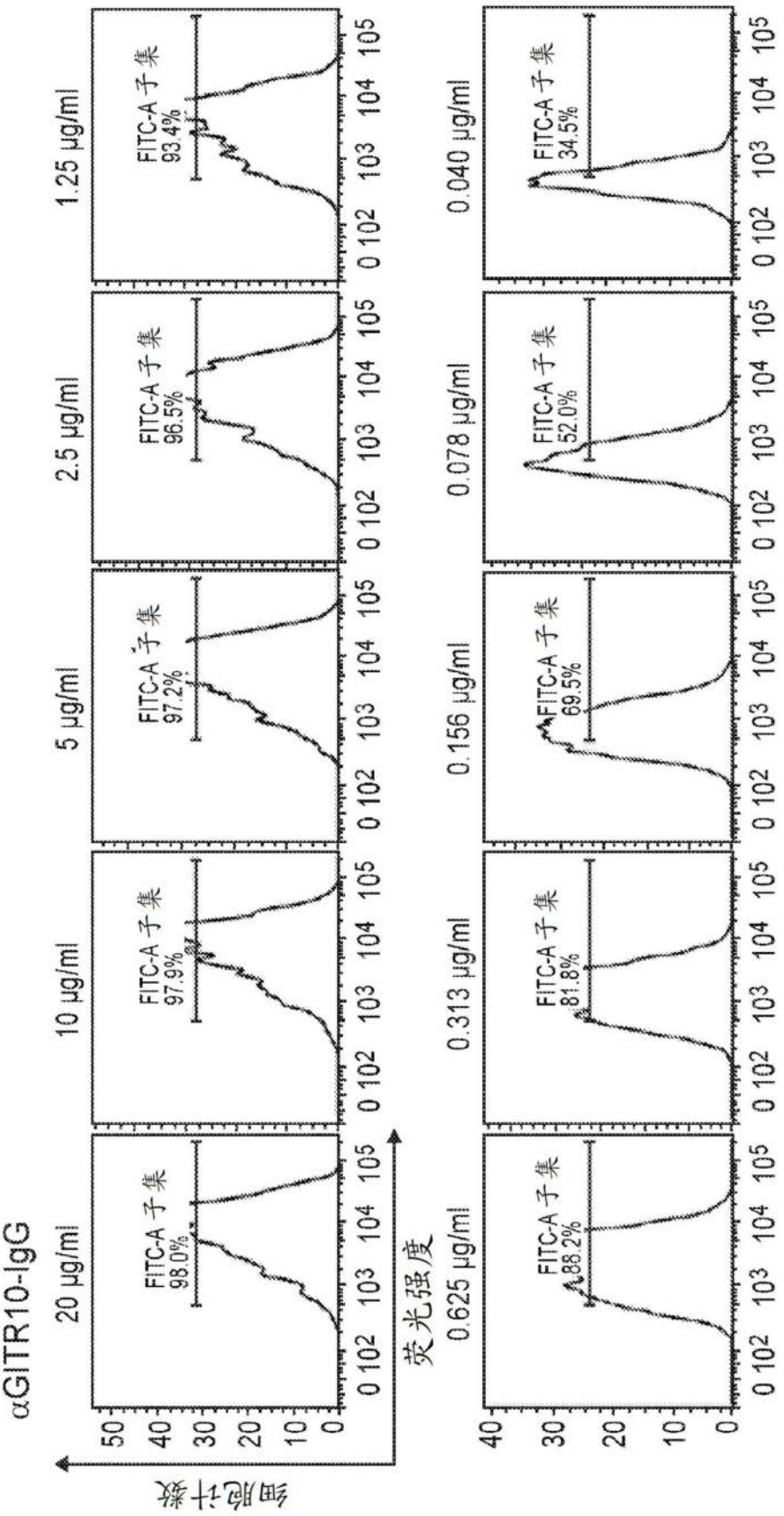

αGITR10-IgG
20 μg/ml
10 μg/ml
5 μg/ml
2.5 μg/ml
1.25 μg/ml
0.625 μg/ml
0.313 μg/ml
0.156 μg/ml
0.078 μg/ml
0.040 μg/ml
FITC-A 子集
98.0%
97.9%
97.2%
96.5%
93.4%
88.2%
81.8%
69.5%
52.0%
34.5%
细胞计数
荧光强度
0 10² 10³ 10⁴ 10⁵

图23B

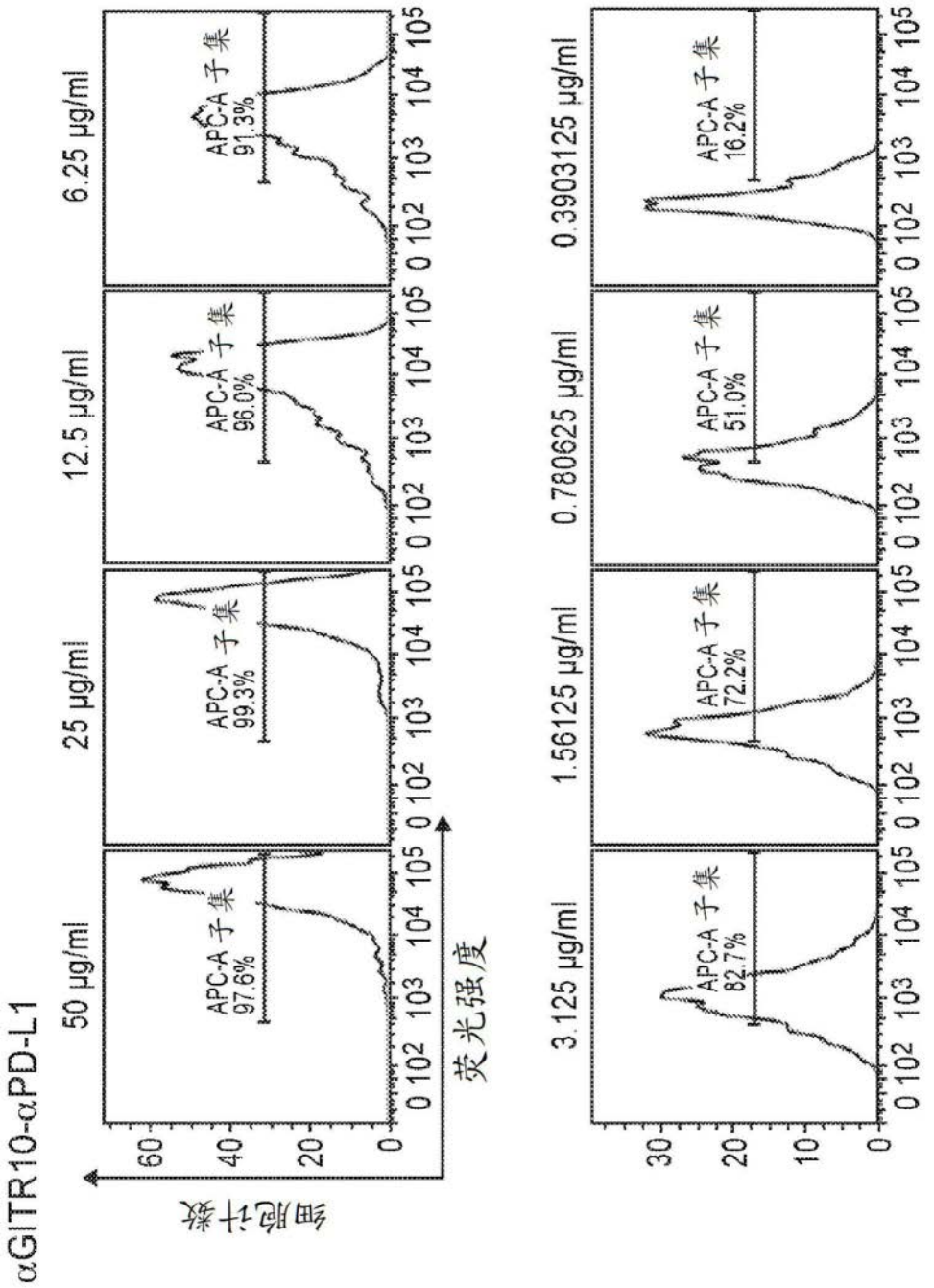

αGITR10-αPD-L1
50 μg/ml
25 μg/ml
12.5 μg/ml
6.25 μg/ml
3.125 μg/ml
1.56125 μg/ml
0.780625 μg/ml
0.3903125 μg/ml
APC-A 子集
97.6%
99.3%
96.0%
91.3%
82.7%
72.2%
51.0%
16.2%
细胞计数
荧光强度
0
20
40
60
10
30
0 102 103 104 105

图24A

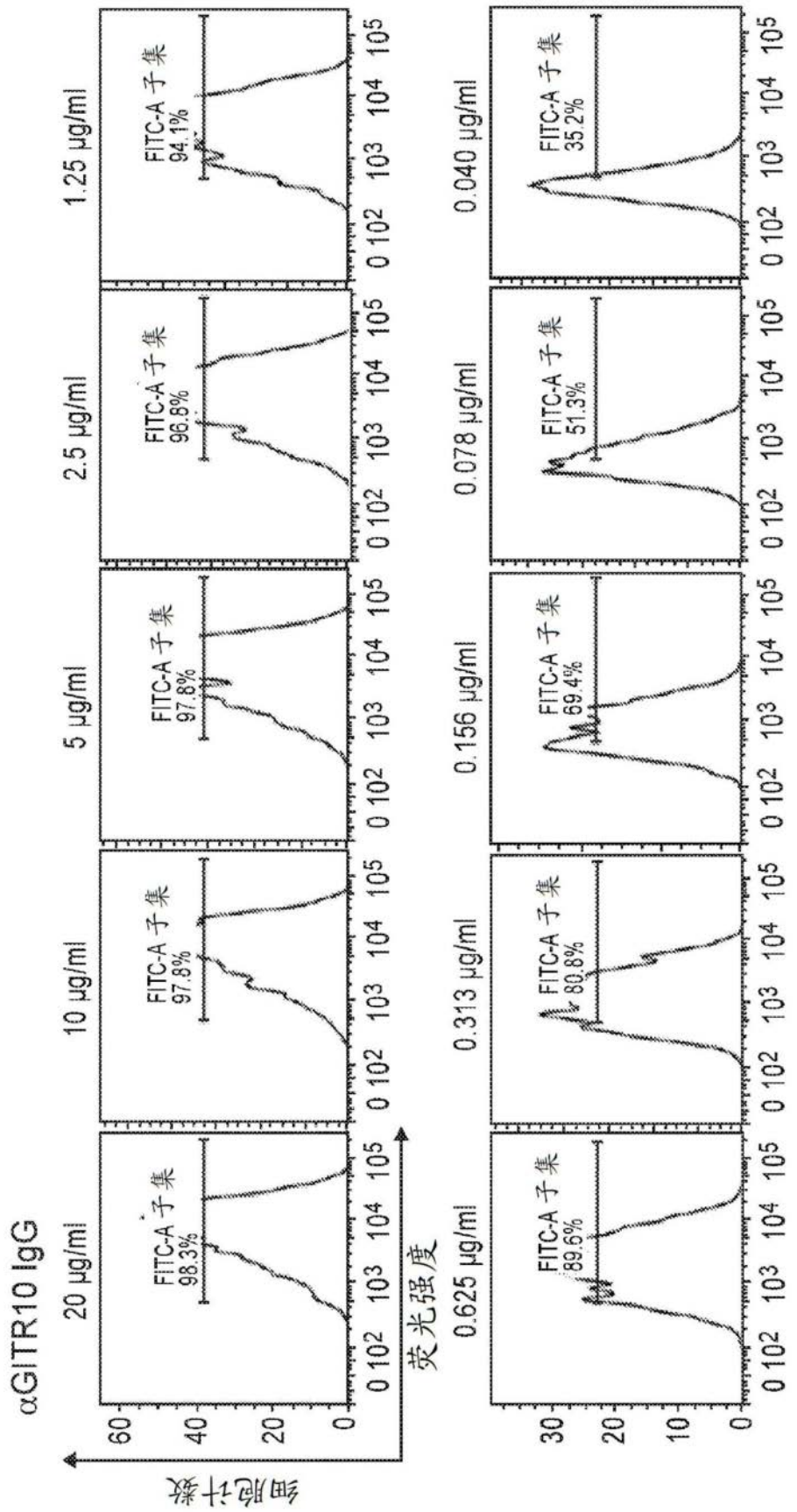

αGITR10 IgG
20 μg/ml
10 μg/ml
5 μg/ml
2.5 μg/ml
1.25 μg/ml
0.625 μg/ml
0.313 μg/ml
0.156 μg/ml
0.078 μg/ml
0.040 μg/ml
FITC-A 子集
98.3%
97.8%
97.8%
96.8%
94.1%
89.6%
80.8%
69.4%
51.3%
35.2%
细胞计数
荧光强度

图24B

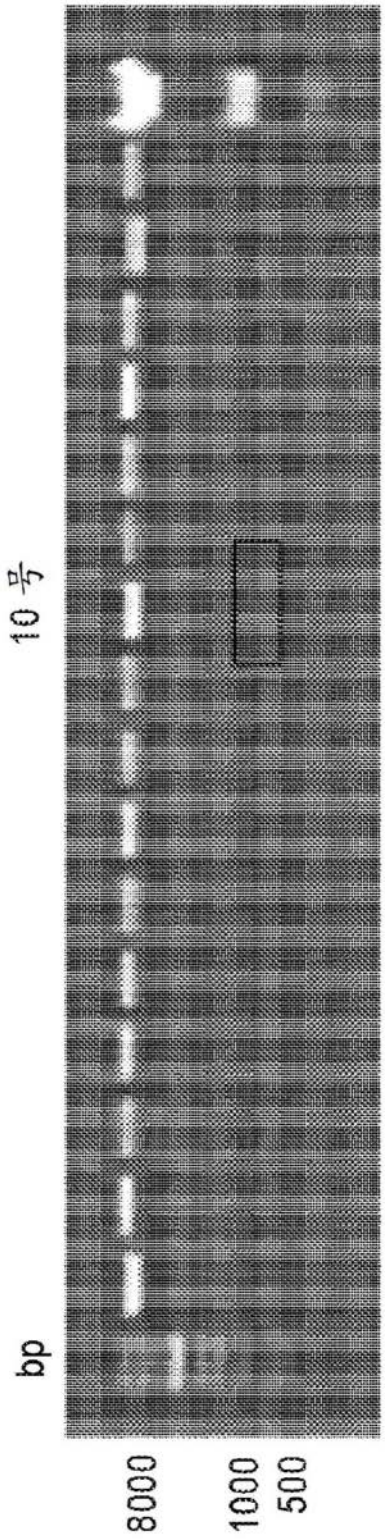


图25

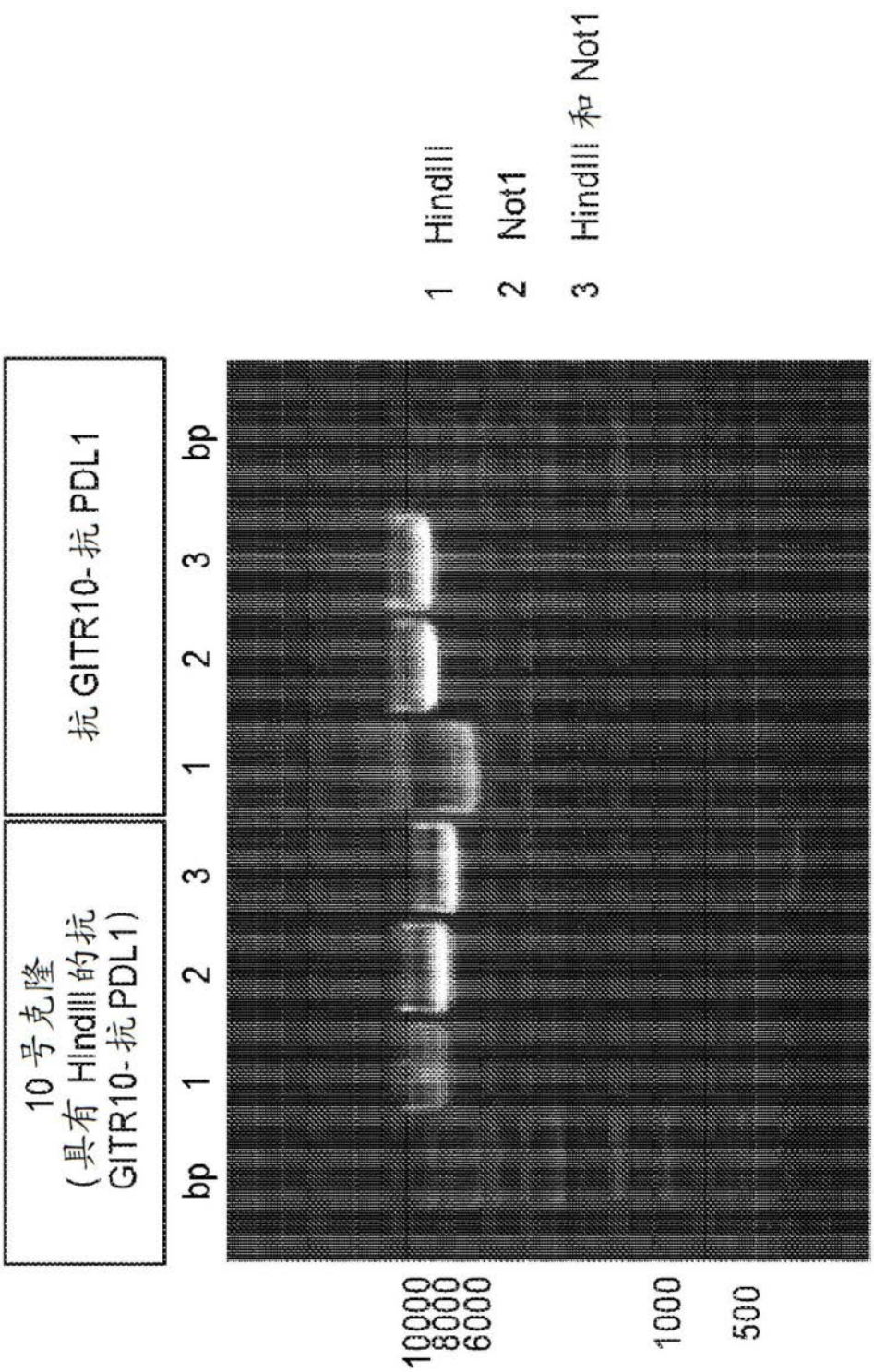

10号克隆
(具有HindIII的抗GITR10-抗PDL1)
抗GITR10-抗PDL1
bp 1 2 3 1 2 3 bp
10000
8000
6000
1000
500
1 HindIII
2 Not1
3 HindIII 和 Not1

图26

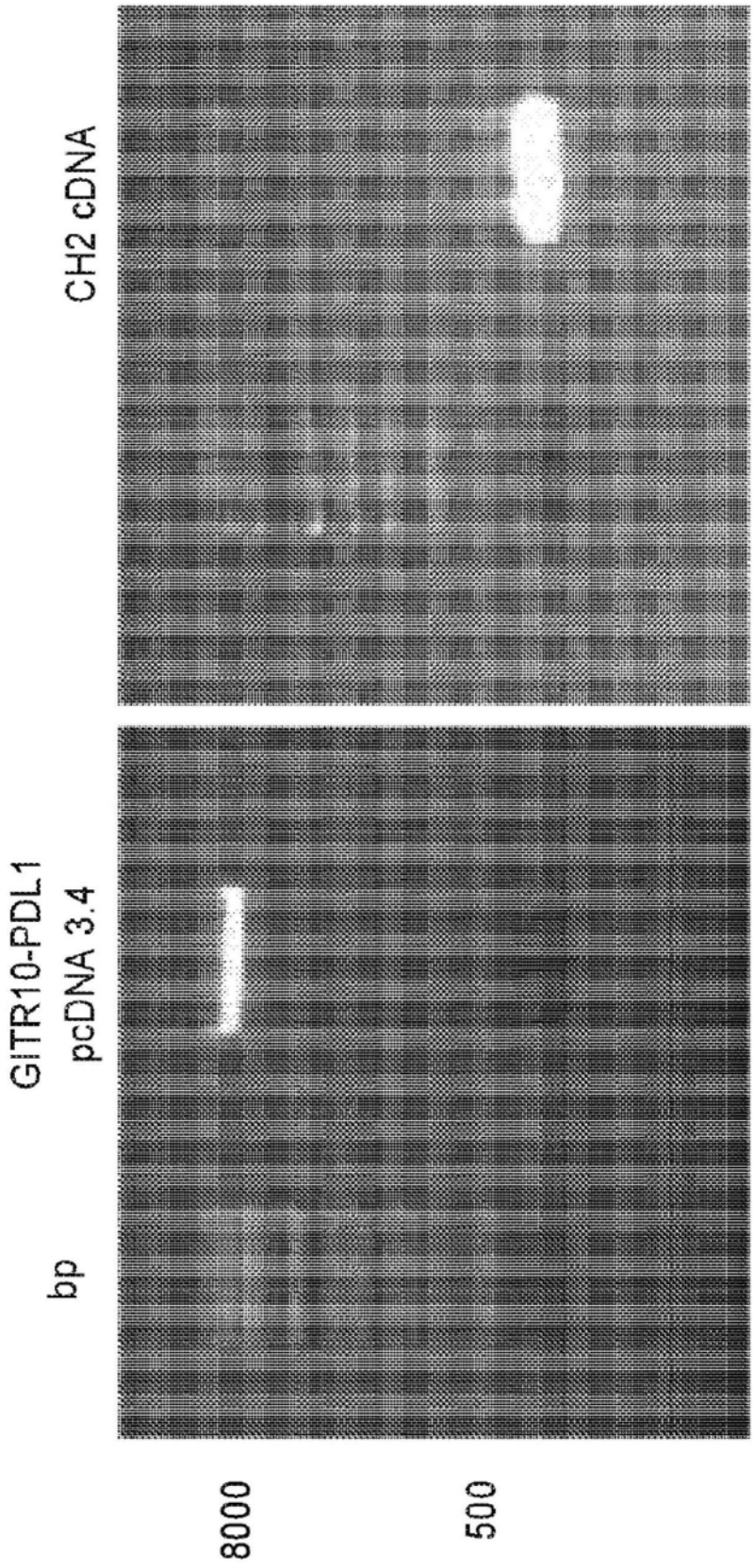


图27

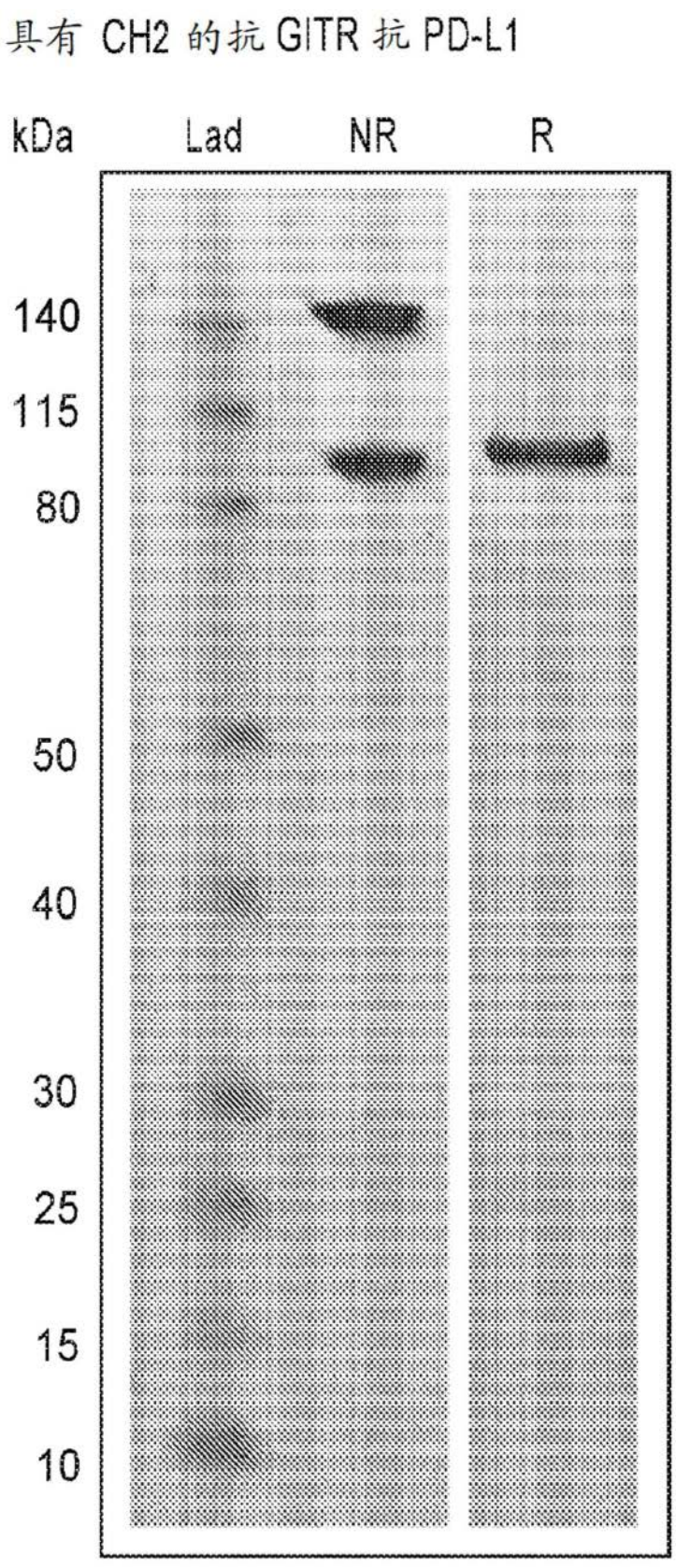


图28

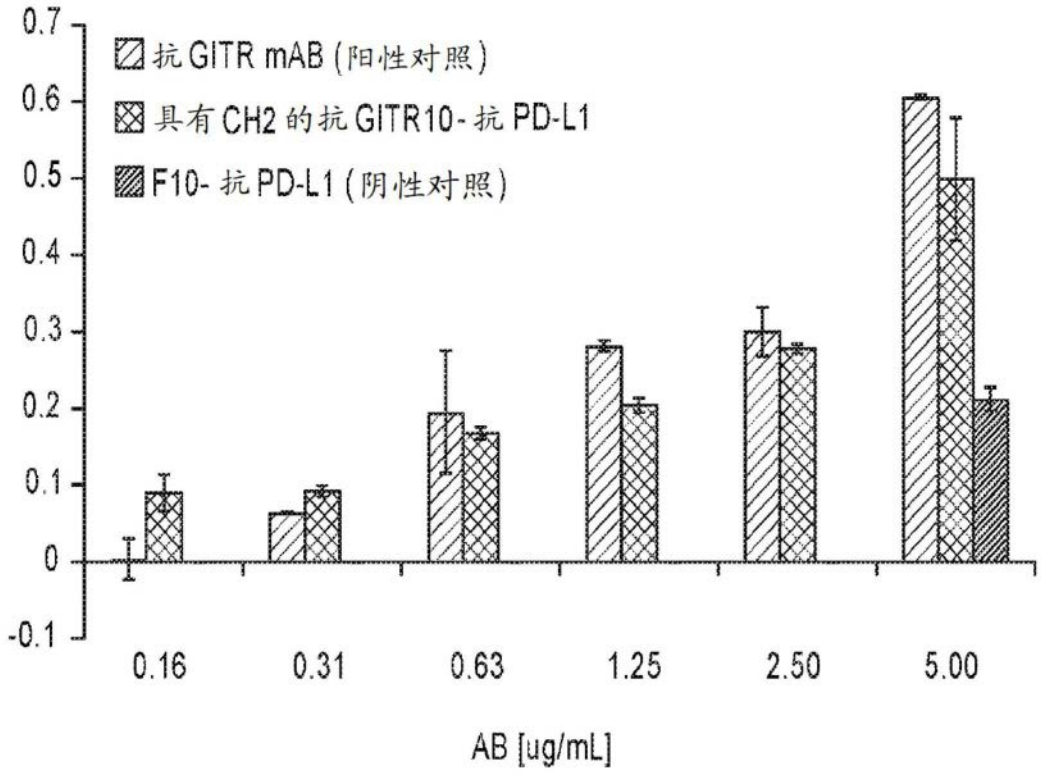

0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
抗 GITR mAB (阳性对照)
具有 CH2 的抗 GITR10- 抗 PD-L1
F10- 抗 PD-L1 (阴性对照)
0.16
0.31
0.63
1.25
2.50
5.00
AB [ug/mL]

图29

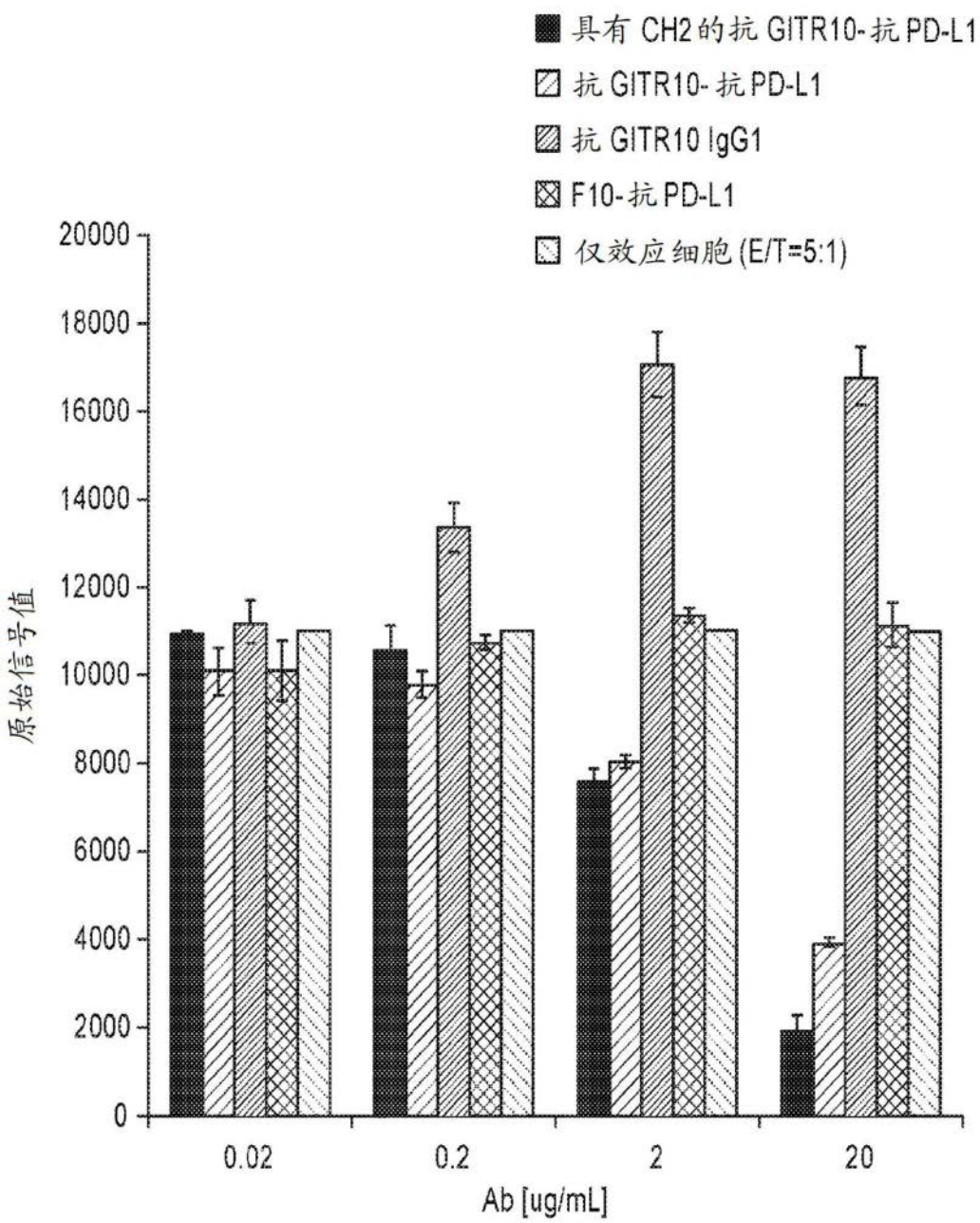

具有 CH2 的抗 GITR10-抗 PD-L1
抗 GITR10-抗 PD-L1
抗 GITR10 IgG1
F10-抗 PD-L1
仅效应细胞 (E/T=5:1)
原始信号值
20000
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0.02
0.2
2
20
Ab [ug/mL]

图30

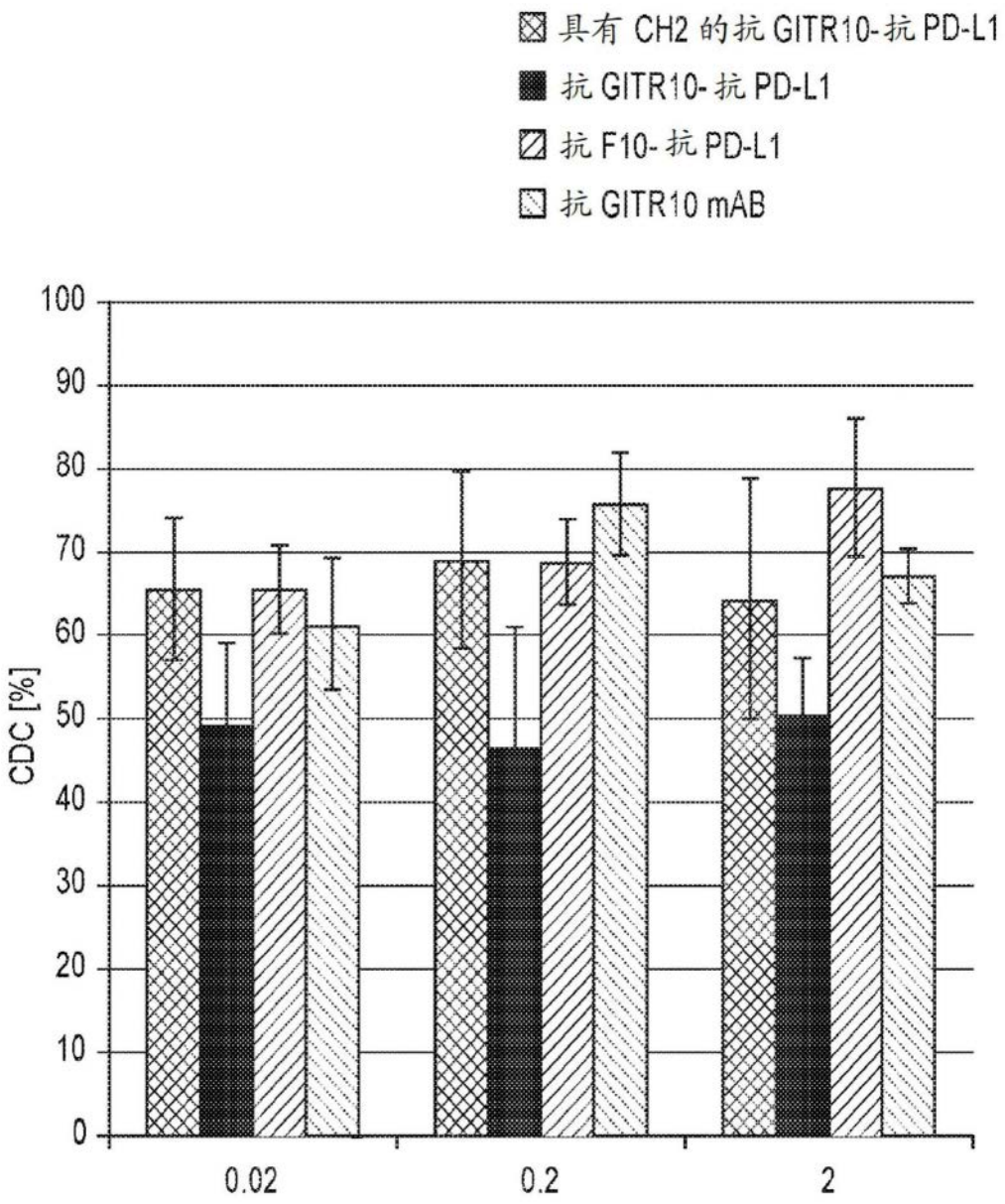

具有 CH2 的抗 GITR10-抗 PD-L1
抗 GITR10-抗 PD-L1
抗 F10-抗 PD-L1
抗 GITR10 mAB
CDC [%]
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.02
0.2
2

图31

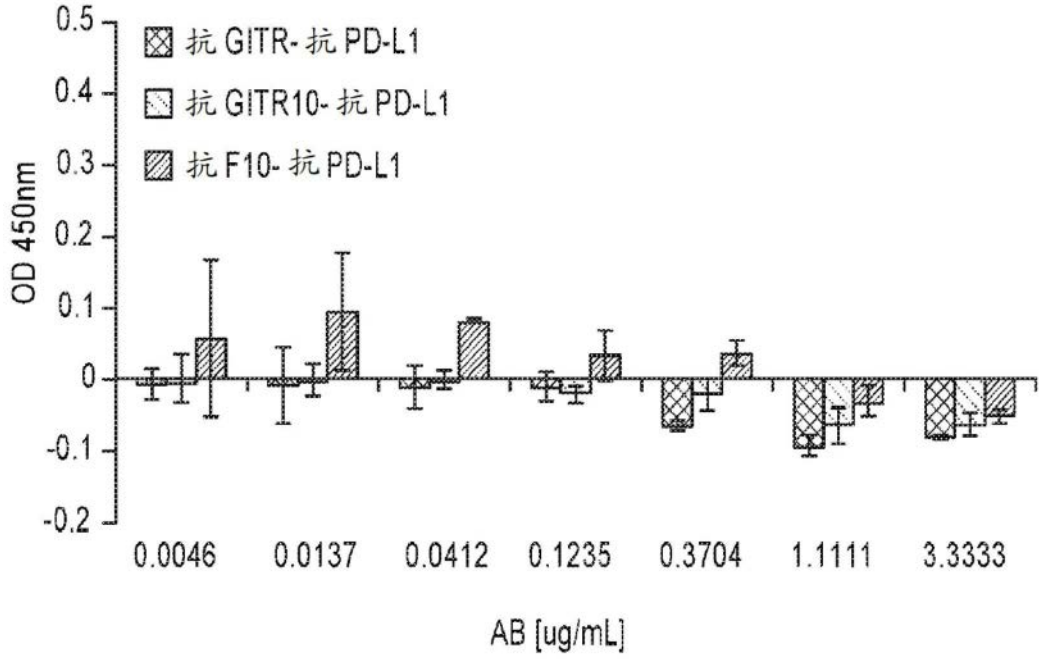

0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
-0.2
OD 450nm
抗 GITR- 抗 PD-L1
抗 GITR10- 抗 PD-L1
抗 F10- 抗 PD-L1
0.0046
0.0137
0.0412
0.1235
0.3704
1.1111
3.3333
AB [ug/mL]

图32

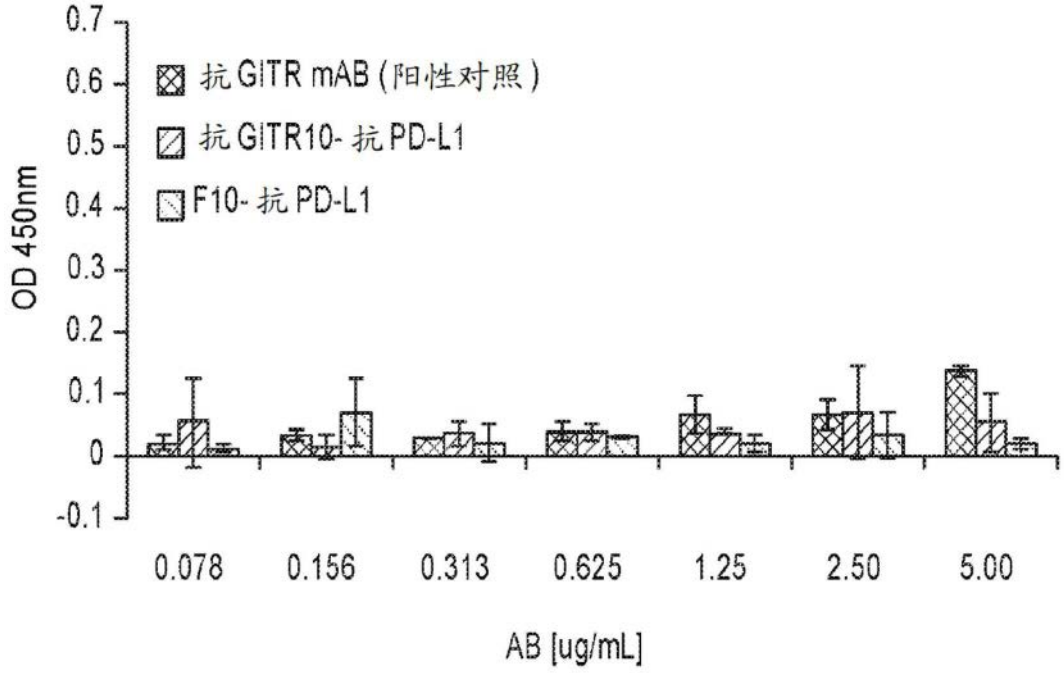

0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
OD 450nm
抗 GITR mAB (阳性对照)
抗 GITR10- 抗 PD-L1
F10- 抗 PD-L1
0.078
0.156
0.313
0.625
1.25
2.50
5.00
AB [ug/mL]

图33

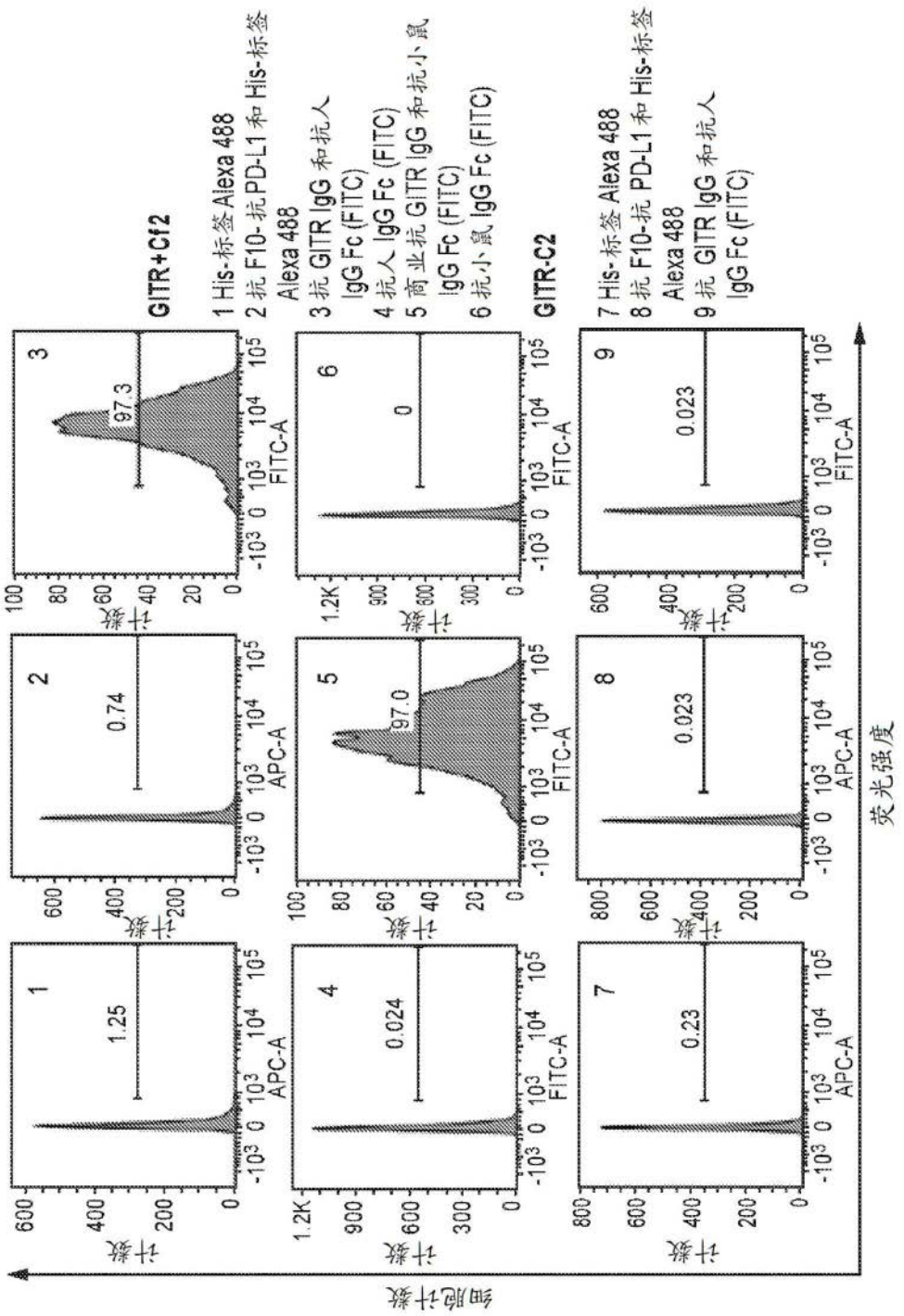

GITR+CI2
GITR-C2
1 His-标签 Alexa 488
2 抗 F10-抗 PD-L1 和 His-标签 Alexa 488
3 抗 GITR IgG 和抗人 IgG Fc (FITC)
4 抗人 IgG Fc (FITC)
5 商业抗 GITR IgG 和抗小鼠 IgG Fc (FITC)
6 抗小鼠 IgG Fc (FITC)
7 His-标签 Alexa 488
8 抗 F10-抗 PD-L1 和 His-标签 Alexa 488
9 抗 GITR IgG 和抗人 IgG Fc (FITC)
细胞计数
荧光强度
计数
APC-A
FITC-A
1.25
0.74
97.3
0.024
97.0
0
0.23
0.023
0.023

图34

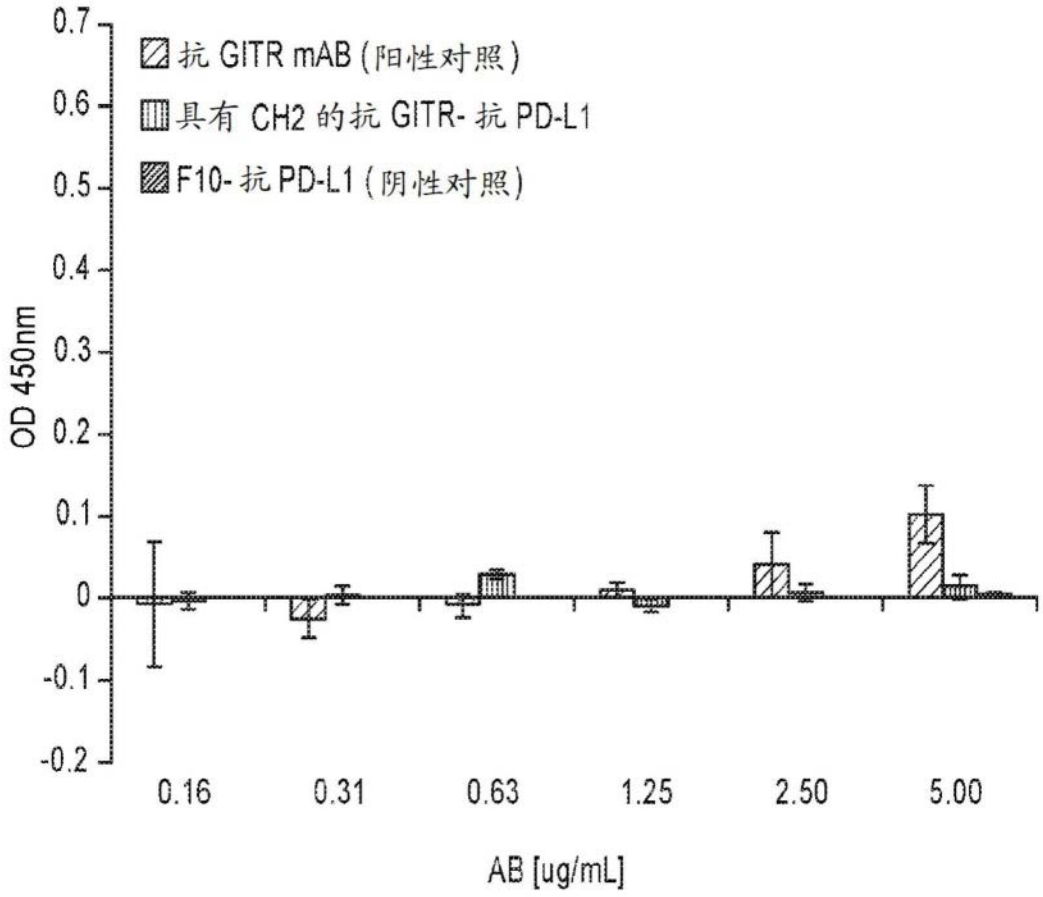

0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
-0.2
OD 450nm
抗 GITR mAB (阳性对照)
具有 CH2 的抗 GITR- 抗 PD-L1
F10- 抗 PD-L1 (阴性对照)
0.16
0.31
0.63
1.25
2.50
5.00
AB [ug/mL]

图35