(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119013301 A
(43)申请公布日 2024.11.22

(21)申请号 202380033835.4
(22)申请日 2023.03.14
(30)优先权数据
PCT/EP2022/056734 2022.03.15 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.10.12
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2023/056513 2023.03.14
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/174952 EN 2023.09.21
(71)申请人 根马布股份公司
地址 丹麦
申请人 生物技术公司
(72)发明人 安德烈亚·伊万
埃斯特·科尔内利娅·威廉明娜·布赖
拉尔斯·盖朗
大卫·P·E·萨泰恩 乌尔·沙欣
亚历山大·穆伊克
克里斯蒂娜·舍德尔
西纳·费勒梅尔-科普夫
巴尔特-扬·德克列乌克
理查德·希伯特
亚尼内·斯胡尔曼
阿兰·弗兰克·拉布赖恩
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 张福誉 韩晓帆
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C07K 16/30(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

权利要求书10页 说明书114页
序列表（电子公布） 附图25页

(54)发明名称

与EPCAM和/或CD137结合的结合剂

(57)摘要

本发明提供了与EpCAM和CD137结合的结合剂,其可用于治疗或预防肿瘤或癌症,或者用于阻止肿瘤或癌症的进展。

CN 119013301 A

1.结合剂,其包含与EpCAM结合的第一抗原结合区和与CD137结合的第二抗原结合区。

2.权利要求1所述的结合剂,其中所述EpCAM是人EpCAM。

3.权利要求1或2所述的结合剂,其中所述CD137是人CD137。

4.权利要求1至3中任一项所述的结合剂,其中所述与EpCAM结合的第一抗原结合区与肿瘤细胞上表达的EpCAM结合。

5.权利要求1至4中任一项所述的结合剂,其中所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有HCDR3序列的重链可变区(VH),所述HCDR3序列包含SEQ ID NO:4中所示序列。

6.权利要求1至5中任一项所述的结合剂,其中所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有HCDR2序列的重链可变区(VH),所述HCDR2序列包含SEQ ID NO:3中所示序列。

7.权利要求1至6中任一项所述的结合剂,其中所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有HCDR1序列的重链可变区(VH),所述HCDR1序列包含SEQ ID NO:2中所示序列。

8.权利要求1至7中任一项所述的结合剂,其中所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH),其中所述HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:2、3和4中所示序列。

9.权利要求1至8中任一项所述的结合剂,其中所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有LCDR3序列的轻链可变区(VL),所述LCDR3序列包含SEQ ID NO:8中所示序列。

10.权利要求1至9中任一项所述的结合剂,其中所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有LCDR2序列的轻链可变区(VL),所述LCDR2序列包含SEQ ID NO:7中所示序列。

11.权利要求1至10中任一项所述的结合剂,其中所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有LCDR1序列的轻链可变区(VL),所述LCDR1序列包含SEQ ID NO:6中所示序列。

12.权利要求1至11中任一项所述的结合剂,其中所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL),其中所述LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:6、7和8中所示序列。

13.权利要求1至12中任一项所述的结合剂,其中所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中所述HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:2、3和4中所示序列,并且所述LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:6、7和8中所示序列。

14.权利要求1至13中任一项所述的结合剂,其中所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH),所述重链可变区(VH)包含与SEQ ID NO:1中所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列。

15.权利要求1至14中任一项所述的结合剂,其中所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:1中所示序列的重链可变区(VH)。

16.权利要求1至15中任一项所述的结合剂,其中所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含轻链可变区(VL),所述轻链可变区(VL)包含与SEQ ID NO:5中所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列。

17.权利要求1至16中任一项所述的结合剂,其中所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:5中所示序列的轻链可变区(VL)。

18.权利要求1至17中任一项所述的结合剂,其中所述与EpCAM结合的第一抗原结合区

包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述VH包含SEQ ID NO:1中所示序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:5中所示序列。

19.权利要求1至18中任一项所述的结合剂,其中所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含这样的抗体的重链可变区和轻链可变区:其与包含权利要求5至18中任一项中所示的重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)的抗体竞争EpCAM结合和/或具有该抗体的EpCAM特异性。

20.权利要求1至19中任一项所述的结合剂,其中所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有HCDR3序列的重链可变区(VH),所述HCDR3序列包含SEQ ID NO:14中所示序列。

21.权利要求1至20中任一项所述的结合剂,其中所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有HCDR2序列的重链可变区(VH),所述HCDR2序列包含SEQ ID NO:13中所示序列。

22.权利要求1至21中任一项所述的结合剂,其中所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有HCDR1序列的重链可变区(VH),所述HCDR1序列包含SEQ ID NO:12中所示序列。

23.权利要求1至22中任一项所述的结合剂,其中所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH),其中所述HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:12、13和14中所示序列。

24.权利要求1至23中任一项所述的结合剂,其中所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有LCDR3序列的轻链可变区(VL),所述LCDR3序列包含SEQ ID NO:18中所示序列。

25.权利要求1至24中任一项所述的结合剂,其中所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有LCDR2序列的轻链可变区(VL),所述LCDR2序列包含SEQ ID NO:17中所示序列。

26.权利要求1至25中任一项所述的结合剂,其中所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有LCDR1序列的轻链可变区(VL),所述LCDR1序列包含SEQ ID NO:16中所示序列。

27.权利要求1至26中任一项所述的结合剂,其中所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL),其中所述LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和18中所示序列。

28.权利要求1至27中任一项所述的结合剂,其中所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中所述HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:12、13和14中所示序列,并且所述LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和18中所示序列。

29.权利要求1至28中任一项所述的结合剂,其中所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH),所述重链可变区(VH)包含与SEQ ID NO:11中所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列。

30.权利要求1至29中任一项所述的结合剂,其中所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有SEQ ID NO:11中所示序列的重链可变区(VH)。

31.权利要求1至30中任一项所述的结合剂,其中所述与CD137结合的第二抗原结合区包含轻链可变区(VL),所述轻链可变区(VL)包含与SEQ ID NO:15中所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列。

32.权利要求1至31中任一项所述的结合剂,其中所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有SEQ ID NO:15中所示序列的轻链可变区(VL)。

33.权利要求1至32中任一项所述的结合剂,其中所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述VH包含SEQ ID NO:11中所示序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:15中所示序列。

34.权利要求1至33中任一项所述的结合剂,其中所述与CD137结合的第二抗原结合区包含这样的抗体的重链可变区和轻链可变区:其与包含权利要求20至33中任一项中所示的重链可变区和/或轻链可变区的抗体竞争CD137结合和/或具有该抗体的CD137特异性。

35.权利要求1至34中任一项所述的结合剂,其中:

a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中所述HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:2、3和4中所示序列,并且所述LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:6、7和8中所示序列;并且

b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中所述HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:12、13和14中所示序列,并且所述LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和18中所示序列。

36.权利要求1至35中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂为全长抗体或抗体片段的形式。

37.权利要求1至36中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂包含Fc区。

38.权利要求1至37中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂是多特异性结合剂,例如双特异性结合剂。

39.权利要求1至38中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂是双特异性二价结合剂。

40.权利要求1至39中任一项所述的结合剂,其不包含除所述与EpCAM结合的第一抗原结合区之外的与EpCAM结合的抗原结合区,并且不包含除所述与CD137结合的第二抗原结合区之外的与CD137结合的抗原结合区。

41.权利要求1至40中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂是包含第一结合臂和第二结合臂的抗体,所述第一结合臂包含所述与EpCAM结合的第一抗原结合区,所述第二结合臂包含所述与CD137结合的第二抗原结合区,其中:

所述第一结合臂包含

i)含有第一重链可变区(VH)和第一重链恒定区(CH)的多肽,以及

ii)含有第一轻链可变区(VL)和第一轻链恒定区(CL)的多肽;

并且所述第二结合臂包含

iii)含有第二重链可变区(VH)和第二重链恒定区(CH)的多肽,以及

iv)含有第二轻链可变区(VL)和第二轻链恒定区(CL)的多肽。

42.权利要求41所述的结合剂,其中:

所述第一VH包含第一HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,并且所述第一VL包含第一LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中所述第一HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:2、3和4中所示序列,并且所述第一LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:6、7和8中所示序列;并且

所述第二VH包含第二HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,并且所述第二VL包含第二LCDR1、

LCDR2和LCDR3序列,其中所述第二HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:12、13和14中所示序列,并且所述第二LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和18中所示序列。

43.权利要求41或42所述的结合剂,其中:

所述第一VH包含与SEQ ID NO:1中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列,并且所述第一VL包含与SEQ ID NO:5中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列;并且

所述第二VH包含与SEQ ID NO:11中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列,并且所述第二VL包含与SEQ ID NO:15中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列。

44.权利要求41至43中任一项所述的结合剂,其中:

所述第一VH包含SEQ ID NO:1中所示氨基酸序列,并且所述第一VL包含SEQ ID NO:5中所示氨基酸序列;并且

所述第二VH包含SEQ ID NO:11中所示氨基酸序列,并且所述第二VL包含SEQ ID NO:15中所示氨基酸序列。

45.权利要求41至44中任一项所述的结合剂,其中所述第一和第二重链恒定区(CH)各自包含恒定重链1(CH1)区、铰链区、恒定重链2(CH2)区和恒定重链3(CH3)区中的一者或更多者,优选至少包含铰链区、CH2区和CH3区。

46.权利要求41至45中任一项所述的结合剂,其中所述第一和第二重链恒定区(CH)各自包含CH3区,并且其中这两个CH3区包含非对称突变。

47.权利要求41至46中任一项所述的结合剂,其中(i)在所述第一重链恒定区(CH)中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置中的氨基酸是L,并且在所述第二重链恒定区(CH)中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置中的氨基酸是R,或者(ii)在所述第一重链恒定区(CH)中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置中的氨基酸是R,并且在所述第二重链恒定区(CH)中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置中的氨基酸是L。

48.权利要求41至47中任一项所述的结合剂,其中与包含相同的第一和第二抗原结合区并含有人IgG1铰链区、CH2区和CH3区的两个重链恒定区(CH)的另一抗体相比,所述结合剂诱导Fc介导的效应物功能的程度更低。

49.权利要求41至48中任一项所述的结合剂,其中所述第一和第二重链恒定区(CH)被修饰,使得与除了包含未经修饰的第一和第二重链恒定区(CH)之外都相同的抗体相比,所述抗体诱导Fc介导的效应物功能的程度更低。

50.权利要求41至49中任一项所述的结合剂,其中在所述第一和第二重链恒定区(CH)中的至少一者中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235、D265、N297、P331和G236的位置中的一个或更多个氨基酸分别不是L、L、D、N、P和G。

51.权利要求50所述的结合剂,其中在所述第一和第二重链中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234和L235的位置分别是F和E。

52.权利要求50或51所述的结合剂,其中在所述第一和/或第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,和/或在所述第一和/或第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R。

53.权利要求50至52中任一项所述的结合剂,其中:

(i)在所述第一和第二重链恒定区二者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A;

(ii)在所述第一和第二重链恒定区二者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R;或者

(iii)在所述第一和第二重链恒定区中的一者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,并且在所述第一和第二重链恒定区中的另一者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R。

54.权利要求50至53中任一项所述的结合剂,其中所述第一和第二重链恒定区二者中对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234和L235的位置分别是F和E,并且其中(i)所述第一重链恒定区中对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置是L,并且所述第二重链恒定区中对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置是R,或者(ii)所述第一重链恒定区中对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置是R,并且所述第二重链恒定区中对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置是L。

55.权利要求50至54中任一项所述的结合剂,其中在所述第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,并且在所述第一重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R,并且其中(i)所述第一重链恒定区中对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置是L,并且所述第二重链恒定区中对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置是R,或者(ii)所述第一重链恒定区中对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置是R,并且所述第二重链恒定区中对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置是L。

56.权利要求50至55中任一项所述的结合剂,其中在所述第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,并且在所述第一重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R,并且其中所述第一重链恒定区中对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置是L,并且所述第二重链恒定区中对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置是R。

57.权利要求41至56中任一项所述的结合剂,其中:

a)所述第一重链的恒定区包含SEQ ID NO:54中所示氨基酸序列;并且

b)所述第二重链的恒定区包含SEQ ID NO:52中所示氨基酸序列。

58.权利要求1至57中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂是包含第一结合臂和第二结合臂的抗体,所述第一结合臂包含所述与EpCAM结合的第一抗原结合区,所述第二结合臂包含所述与CD137结合的第二抗原结合区,其中:

所述第一结合臂包含

i)含有第一重链可变区(VH)和第一重链恒定区(CH)的多肽,以及

ii)含有第一轻链可变区(VL)和第一轻链恒定区(CL)的多肽,

其中所述第一VH包含第一HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,并且所述第一VL包含第一LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中所述第一HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:2、3和4中所示序列,并且所述第一LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:6、7和8中所示序列;

并且所述第二结合臂包含

iii)含有第二重链可变区(VH)和第二重链恒定区(CH)的多肽,以及

iv)含有第二轻链可变区(VL)和第二轻链恒定区(CL)的多肽,

其中所述第二VH包含第二HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,并且所述第二VL包含第二LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中所述第二HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:12、13和14中所示序列,并且所述第二LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和18中所示序列;

其中在所述第一CH中,根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236分别是F、E和R,并且在所述第二CH中,根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265是F、E和A;并且

其中在所述第一CH中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置中的氨基酸是L,并且在所述第二CH中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置中的氨基酸是R。

59.权利要求1至58中任一项所述的结合剂,其包含:

i)第一重链,所述第一重链包含与SEQ ID NO:9中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列,

ii)第一轻链,所述第一轻链包含与SEQ ID NO:10中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列,

iii)第二重链,所述第二重链包含与SEQ ID NO:19中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列;以及

iv)第二轻链,所述第二轻链包含与SEQ ID NO:20中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列。

60.权利要求1至59中任一项所述的结合剂,其包含:

i)第一重链,所述第一重链包含SEQ ID NO:9中所示氨基酸序列,

ii)第一轻链,所述第一轻链包含SEQ ID NO:10中所示氨基酸序列,

iii)第二重链,所述第二重链包含SEQ ID NO:19中所示氨基酸序列;以及

iv)第二轻链,所述第二轻链包含SEQ ID NO:20中所示氨基酸序列。

61.结合剂,其包含第一结合臂和第二结合臂,所述第一结合臂包含第一抗原结合区和含有恒定重链2(CH2)区的第一重链恒定区,所述第二结合臂包含第二抗原结合区和含有恒定重链2(CH2)区的第二重链恒定区,

其中所述第一和第二抗原结合区中的至少一者与EpCAM结合,并且

其中在所述第一和第二重链恒定区中的至少一者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R。

62.权利要求61所述的结合剂,其中在所述第一和/或第二重链恒定区中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R。

63.权利要求61或62所述的结合剂,其中在所述第一和/或第二重链恒定区二者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R。

64.权利要求61或62所述的结合剂,其中在所述第一或第二重链恒定区中的一者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R,并且在所述第一或第二重链恒定区中的另一者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A。

65.权利要求61至64中任一项所述的结合剂,其中所述第一和第二抗原结合区二者都与EpCAM结合。

66.权利要求61至64中任一项所述的结合剂,其中所述第一和第二抗原结合区中的一者与EpCAM结合,并且所述第一和第二抗原结合区中的另一者与除EpCAM之外的抗原结合。

67.权利要求61至64和66中任一项所述的结合剂,其中所述第一和第二抗原结合区中的一者与EpCAM结合,并且所述第一和第二抗原结合区中的另一者与CD137结合。

68.结合剂,其包含第一结合臂和第二结合臂,所述第一结合臂包含第一抗原结合区和含有恒定重链2(CH2)区的第一重链恒定区,所述第二结合臂包含第二抗原结合区和含有恒定重链2(CH2)区的第二重链恒定区,

其中所述第一和第二抗原结合区中的至少一者与CD137结合,并且

其中在所述第一和第二重链恒定区中的至少一者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R。

69.权利要求68所述的结合剂,其中在所述第一和/或第二重链恒定区中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R。

70.权利要求68或69所述的结合剂,其中在所述第一和/或第二重链恒定区二者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R。

71.权利要求68或69所述的结合剂,其中在所述第一或第二重链恒定区中的一者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R,并且在所述第一或第二重链恒定区中的另一者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A。

72.权利要求68至71中任一项所述的结合剂,其中所述第一和第二抗原结合区二者都与CD137结合。

73.权利要求68至71中任一项所述的结合剂,其中所述第一和第二抗原结合区中的一者与CD137结合,并且所述第一和第二抗原结合区中的另一者与除CD137之外的抗原结合。

74.权利要求68至71和73中任一项所述的结合剂,其中所述第一和第二抗原结合区中的一者与CD137结合,并且所述第一和第二抗原结合区中的另一者与EpCAM结合。

75.权利要求61至67和74中任一项所述的结合剂,其中所述EpCAM是人EpCAM。

76.权利要求61至67、74和75中任一项所述的结合剂,其中所述与EpCAM结合的抗原结合区与肿瘤细胞上表达的EpCAM结合。

77.权利要求61至67和74至76中任一项所述的结合剂,其中所述与EpCAM结合的抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中所述HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:2、3和4中所示序列,并且所述LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分

别包含SEQ ID NO:6、7和8中所示序列。

78.权利要求61至67和74至77中任一项所述的结合剂,其中所述与EpCAM结合的抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述VH包含与SEQ ID NO:1中所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列,并且所述VL包含与SEQ ID NO:5中所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列。

79.权利要求61至67和74至78中任一项所述的结合剂,其中所述与EpCAM结合的抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述VH包含SEQ ID NO:1中所示序列,并且所述VL包含SEQ IDNO:5中所示序列。

80.权利要求67至79中任一项所述的结合剂,其中所述CD137是人CD137。

81.权利要求67至80中任一项所述的结合剂,其中所述与CD137结合的抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中所述HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:12、13和14中所示序列,并且所述LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和18中所示序列。

82.权利要求67至81中任一项所述的结合剂,其中所述与CD137结合的抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述VH包含与SEQ ID NO:11中所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列,并且所述VL包含与SEQ ID NO:15中所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列。

83.权利要求67至82中任一项所述的结合剂,其中所述与CD137结合的抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述VH包含SEQ ID NO:11中所示序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:15中所示序列。

84.权利要求61至64、66至71和73至83中任一项所述的结合剂,其包含与EpCAM结合的抗原结合区和与CD137结合的抗原结合区,其中:

a)所述与EpCAM结合的抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中所述HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:2、3和4中所示序列,并且所述LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:6、7和8中所示序列;并且

b)所述与CD137结合的抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中所述HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:12、13和14中所示序列,并且所述LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和18中所示序列。

85.权利要求61至84中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂是二价结合剂。

86.权利要求61至85中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂包含Fc区。

87.权利要求61至86中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂为抗体形式,例如全长抗体的形式。

88.权利要求61至64、66至71和73至87中任一项所述的结合剂,其包含第一结合臂和第二结合臂,所述第一结合臂包含与EpCAM结合的抗原结合区,所述第二结合臂包含与CD137

结合的抗原结合区,其中:

所述第一结合臂包含

i)含有第一重链可变区(VH)和第一重链恒定区(CH)的多肽,以及

ii)含有第一轻链可变区(VL)和第一轻链恒定区(CL)的多肽;

并且所述第二结合臂包含

iii)含有第二重链可变区(VH)和第二重链恒定区(CH)的多肽,以及

iv)含有第二轻链可变区(VL)和第二轻链恒定区(CL)的多肽。

89.权利要求88所述的结合剂,其中:

所述第一VH包含第一HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,并且所述第一VL包含第一LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中所述第一HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:2、3和4中所示序列,并且所述第一LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:6、7和8中所示序列;并且

所述第二VH包含第二HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,并且所述第二VL包含第二LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中所述第二HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:12、13和14中所示序列,并且所述第二LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和18中所示序列。

90.权利要求88或89所述的结合剂,其中:

所述第一VH包含与SEQ ID NO:1中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列,并且所述第一VL包含与SEQ ID NO:5中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列;并且

所述第二VH包含与SEQ ID NO:11中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列,并且所述第二VL包含与SEQ ID NO:15中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列。

91.权利要求88至90中任一项所述的结合剂,其中:

所述第一VH包含SEQ ID NO:1中所示氨基酸序列,并且所述第一VL包含SEQ ID NO:5中所示氨基酸序列;并且

所述第二VH包含SEQ ID NO:11中所示氨基酸序列,并且所述第二VL包含SEQ ID NO:15中所示氨基酸序列。

92.权利要求61至91中任一项所述的结合剂,其中所述第一和第二重链恒定区(CH)各自包含CH3区,并且其中这两个CH3区包含非对称突变。

93.权利要求92所述的结合剂,其中(i)在所述第一重链恒定区(CH)中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置中的氨基酸是L,并且在所述第二重链恒定区(CH)中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置中的氨基酸是R,或者(ii)在所述第一重链恒定区(CH)中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置中的氨基酸是R,并且在所述第二重链恒定区(CH)中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置中的氨基酸是L。

94.权利要求92或93所述的结合剂,其中在所述第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU

编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,并且在所述第一重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R,并且其中(i)所述第一重链恒定区中对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置是L,并且所述第二重链恒定区中对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置是R,或者(ii)所述第一重链恒定区中对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置是R,并且所述第二重链恒定区中对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置是L。

95.权利要求92至94中任一项所述的结合剂,其中在所述第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,并且在所述第一重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R,并且其中所述第一重链恒定区中对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置是L,并且所述第二重链恒定区中对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置是R。

96.多核苷酸或多核苷酸组,其编码权利要求1至95中任一项所述的结合剂。

97.药物组合物,其包含权利要求1至95中任一项所述的结合剂或权利要求96所述的多核苷酸。

98.用于治疗对象的方法,其包括向所述对象施用权利要求1至95中任一项所述的结合剂、权利要求96所述的多核苷酸或权利要求97所述的药物组合物。

99.权利要求98所述的方法,其是用于在对象中治疗或预防癌症的方法。

100.权利要求99所述的方法,其中所述对象是人。

101.权利要求1至95中任一项所述的结合剂、权利要求96所述的多核苷酸或权利要求97所述的药物组合物,其用于药物用途,例如用作药物。

102.权利要求101所述的结合剂、多核苷酸或药物组合物,其用于疾病或病症的治疗性或预防性治疗。

103.权利要求102所述的结合剂、多核苷酸或药物组合物,其中所述疾病或病症是癌症。

104.权利要求1至95中任一项所述的结合剂、权利要求96所述的多核苷酸或权利要求97所述的药物组合物,其用于在对象中治疗或预防癌症。

105.权利要求104所述的结合剂、多核苷酸或药物组合物,其中所述对象是人。

与EPCAM和/或CD137结合的结合剂

技术领域

[0001] 本发明涉及与EpCAM和CD137结合的结合剂。这样的结合剂可用于治疗或预防肿瘤或癌症。

背景技术

[0002] 上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule,EpCAM)是在上皮中介导Ca^{2+}-非依赖性同型细胞-细胞黏附的跨膜糖蛋白。EpCAM还参与细胞信号传导、迁移、增殖和分化。另外,EpCAM通过其上调c-Myc、E-FABP和细胞周期蛋白A&E的能力而具有致癌潜力。EpCAM可用作多种癌症的诊断标志物。此外,EpCAM显示出在癌的肿瘤发生和转移中发挥作用,并且,因此,其也可用作潜在的预后标志物以及用作潜在靶标以用于免疫治疗策略。

[0003] CD137(4-1BB)是TNFR家族的成员,并且是CD8+T细胞和CD4+T细胞、调节性T细胞(regulatory T cell,Treg)、自然杀伤(T)细胞(Natural Killer,NK[T]细胞)、B细胞和中性粒细胞上的共刺激分子。在T细胞上,CD137不是组成型表达的,而是在T细胞受体(T-cell receptor,TCR)激活时被诱导(例如,在肿瘤浸润淋巴细胞上[tumor infiltrating lymphocyte,TIL;Gros et al.,J.Clin Invest 2014;124(5):2246-59])。通过其天然配体4-1BBL或激动剂抗体的刺激导致使用TRAF-2和TRAF-1作为衔接子的信号传导。通过CD137的早期信号传导涉及K63多泛素化反应,其最终导致核因子(nuclear factor,NF)-κB和丝裂原活化蛋白(mitogen-activated protein,MAP)-激酶途径的激活。信号传导导致提高的T细胞共刺激、增殖、细胞因子产生、成熟和延长的CD8+T细胞存活。已表明针对CD137的激动性抗体在多种临床前模型中促进通过T细胞的抗肿瘤控制(Murillo et al.,Clin Cancer Res 2008;14(21):6895-906)。刺激CD137的抗体可诱导T细胞的存活和增殖,从而增强抗肿瘤免疫应答。刺激CD137的抗体在现有技术中已公开,并且包括人IgG4抗体乌瑞芦单抗(urelumab)(AU 2004279877)和人IgG2抗体乌托鲁单抗(utomilumab)(Fisher et al.,2012,Cancer Immunol.Immunother.61:1721-1733)。

[0004] 需要预防或治疗肿瘤或癌症的物质和方法。

发明内容

[0005] 在第一方面中,本公开内容提供了结合剂,其包含与EpCAM结合的第一抗原结合区和与CD137结合的第二抗原结合区。

[0006] 在一些实施方案中,EpCAM是人EpCAM。在一些实施方案中,CD137是人CD137。在一些实施方案中,人EpCAM包含SEQ ID NO:59中所示序列。在一些实施方案中,人CD137包含SEQ ID NO:62中所示序列。

[0007] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区与肿瘤细胞上表达的EpCAM结合。

[0008] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有HCDR3序列的重链可变区(VH),所述HCDR3序列包含SEQ ID NO:4中所示序列。在一些实施方案中,所述与

EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有HCDR2序列的重链可变区(VH),所述HCDR2序列包含SEQ ID NO:3中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有HCDR1序列的重链可变区(VH),所述HCDR1序列包含SEQ ID NO:2中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH),其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:2、3和4中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH),其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:64、65和66中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH),其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:74、3和66中所示序列。

[0009] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有LCDR3序列的轻链可变区(VL),所述LCDR3序列包含SEQ ID NO:8中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有LCDR2序列的轻链可变区(VL),所述LCDR2序列包含SEQ ID NO:7中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有LCDR1序列的轻链可变区(VL),所述LCDR1序列包含SEQ ID NO:6中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL),其中LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:6、7和8中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL),其中LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:67、68和8中所示序列。

[0010] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有HCDR3序列的重链可变区(VH)和含有LCDR3序列的轻链可变区(VL),其中HCDR3序列包含SEQ ID NO:4中所示序列,并且LCDR3序列包含SEQ ID NO:8中所示序列。

[0011] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:2、3和4中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:6、7和8中所示序列。

[0012] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:64、65和66中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:67、68和8中所示序列。

[0013] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:74、3和66中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:6、7和8中所示序列。

[0014] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:1的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:5的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0015] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH),所述重链可变区(VH)包含与SEQ ID NO:1中所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列。

[0016] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:1中所示序列的重链可变区(VH)。

[0017] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含轻链可变区(VL),所述轻链可变区(VL)包含与SEQ ID NO:5中所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列。

[0018] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:5中所示序列的轻链可变区(VL)。

[0019] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:1中所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列,并且VL包含与SEQ ID NO:5中所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:1中所示序列具有至少80%同一性的序列,并且VL包含与SEQ ID NO:5中所示序列具有至少80%同一性的序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:1中所示序列具有至少90%同一性的序列,并且VL包含与SEQ ID NO:5中所示序列具有至少90%同一性的序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:1中所示序列具有至少95%同一性的序列,并且VL包含与SEQ ID NO:5中所示序列具有至少95%同一性的序列。

[0020] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含SEQ ID NO:1中所示序列,并且VL包含SEQ ID NO:5中所示序列。

[0021] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含这样的抗体的重链可变区和轻链可变区:其与包含如上所示的重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)的抗体竞争EpCAM结合和/或具有该抗体的EpCAM特异性。

[0022] 在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有HCDR3序列的重链可变区(VH),所述HCDR3序列包含SEQ ID NO:14中所示序列。在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有HCDR2序列的重链可变区(VH),所述HCDR2序列包含SEQ ID NO:13中所示序列。在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有HCDR1序列的重链可变区(VH),所述HCDR1序列包含SEQ ID NO:12中所示序列。在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH),其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:12、13和14中所示序列。在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH),其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:69、70和71中所示序列。在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH),其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:75、13和

71中所示序列。

[0023] 在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有LCDR3序列的轻链可变区(VL),所述LCDR3序列包含SEQ ID NO:18中所示序列。在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有LCDR2序列的轻链可变区(VL),所述LCDR2序列包含SEQ ID NO:17中所示序列。在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有LCDR1序列的轻链可变区(VL),所述LCDR1序列包含SEQ ID NO:16中所示序列。在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL),其中LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和18中所示序列。在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL),其中LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:72、73和18中所示序列。

[0024] 在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有HCDR3序列的重链可变区(VH)和含有LCDR3序列的轻链可变区(VL),其中HCDR3序列包含SEQ ID NO:14中所示序列,并且LCDR3序列包含SEQ ID NO:18中所示序列。

[0025] 在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:12、13和14中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和18中所示序列。

[0026] 在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:69、70和71中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:72、73和18中所示序列。

[0027] 在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:75、13和71中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和18中所示序列。

[0028] 在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:11的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:15的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0029] 在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH),所述重链可变区(VH)包含与SEQ ID NO:11中所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列。

[0030] 在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有SEQ ID NO:11中所示序列的重链可变区(VH)。

[0031] 在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区包含轻链可变区(VL),所述轻链可变区(VL)包含与SEQ ID NO:15中所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至

少95％、至少97％、至少99％或100％同一性的序列。

[0032] 在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有SEQ ID NO:15中所示序列的轻链可变区(VL)。

[0033] 在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:11中所示序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少97％、至少99％或100％同一性的序列,并且VL包含与SEQ ID NO:15中所示序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少97％、至少99％或100％同一性的序列。在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:11中所示序列具有至少80％同一性的序列,并且VL包含与SEQ ID NO:15中所示序列具有至少80％同一性的序列。在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:11中所示序列具有至少90％同一性的序列,并且VL包含与SEQ ID NO:15中所示序列具有至少90％同一性的序列。在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:11中所示序列具有至少95％同一性的序列,并且VL包含与SEQ ID NO:15中所示序列具有至少95％同一性的序列。

[0034] 在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含SEQ ID NO:11中所示序列,并且VL包含SEQ ID NO:15中所示序列。

[0035] 在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区包含这样的抗体的重链可变区和轻链可变区:其与包含如上所示的重链可变区和/或轻链可变区的抗体竞争CD137结合和/或具有该抗体的CD137特异性。

[0036] 在一些实施方案中,

[0037] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:4中所示HCDR3序列的重链可变区(VH),并且

[0038] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有SEQ ID NO:14中所示HCDR3序列的重链可变区(VH)。

[0039] 在一些实施方案中,

[0040] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:8中所示LCDR3序列的轻链可变区(VL),并且

[0041] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有SEQ ID NO:18中所示LCDR3序列的轻链可变区(VL)。

[0042] 在一些实施方案中,

[0043] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:4中所示的HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:8中所示的LCDR3序列,并且

[0044] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:14中所示的HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:18中所示的LCDR3序列。

[0045] 在一些实施方案中,

[0046] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:2、3和4中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:6、7和8中所示序列;以及

[0047] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:12、13和14中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和18中所示序列。

[0048] 在一些实施方案中,

[0049] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:64、65和66中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:67、68和8中所示序列;以及

[0050] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:69、70和71中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:72、73和18中所示序列。

[0051] 在一些实施方案中,

[0052] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:74、3和66中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:6、7和8中所示序列;以及

[0053] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:75、13和71中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和18中所示序列。

[0054] 在一些实施方案中,

[0055] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:1的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:5的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;以及

[0056] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:11的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:15的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0057] 在一些实施方案中,

[0058] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:1中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:5中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列;以及

[0059] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:11中所示氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少97％或至少99％同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:15中所示氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少97％或至少99％同一性的氨基酸序列。

[0060] 在一些实施方案中,

[0061] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含SEQ ID NO:1中所示序列,并且VL包含SEQ ID NO:5中所示序列;并且

[0062] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含SEQ ID NO:11中所示序列,并且VL包含SEQ ID NO:15中所示序列。

[0063] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含这样的抗体的重链可变区和轻链可变区:其与包含如上所示的与EpCAM结合的第一抗原结合区的重链可变区或轻链可变区或其组合的抗体竞争EpCAM结合和/或具有该抗体的EpCAM特异性,并且所述与CD137结合的第二抗原结合区包含这样的抗体的重链可变区和轻链可变区:其与包含如上所示的与CD137结合的第二抗原结合区的重链可变区或轻链可变区或其组合的抗体竞争CD137结合和/或具有该抗体的CD137特异性。

[0064] 在一些实施方案中,可变区包含三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)和四个框架区(FR1、FR2、FR3和FR4)。

[0065] 在一些实施方案中,所述互补决定区和所述框架区从氨基端到羧基端以以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0066] 在一些实施方案中,结合剂为全长抗体或抗体片段的形式。

[0067] 在一些实施方案中,结合剂是多特异性结合剂,例如双特异性结合剂。

[0068] 在一些实施方案中,结合剂是多特异性抗体,例如双特异性抗体。

[0069] 在一些实施方案中,结合剂包含(i)第一重链可变区(VH)和第一轻链可变区(VL),其中所述第一重链可变区(VH)和所述第一轻链可变区(VL)形成所述与EpCAM结合的第一抗原结合区;以及

[0070] (ii)第二重链可变区(VH)和第二轻链可变区(VL),其中所述第二重链可变区(VH)和所述第二轻链可变区(VL)形成所述与CD137结合的第二抗原结合区。

[0071] 在一些实施方案中,结合剂包含

[0072] i)含有第一重链可变区(VH)和第一重链恒定区(CH)的多肽,以及含有第一轻链可变区(VL)和第一轻链恒定区(CL)的多肽,其中所述第一重链可变区(VH)和所述第一轻链可变区(VL)形成所述与EpCAM结合的第一抗原结合区;以及

[0073] ii)含有第二重链可变区(VH)和第二重链恒定区(CH)的多肽,以及含有第二轻链可变区(VL)和第二轻链恒定区(CL)的多肽,其中所述第二重链可变区(VH)和所述第二轻链可变区(VL)形成所述与CD137结合的第二抗原结合区。

[0074] 在一些实施方案中,结合剂是包含第一结合臂和第二结合臂的抗体,所述第一结合臂包含所述与EpCAM结合的第一抗原结合区,所述第二结合臂包含所述与CD137结合的第二抗原结合区,其中:

[0075] 第一结合臂包含

[0076] i)含有第一重链可变区(VH)和第一重链恒定区(CH)的多肽,以及ii)含有第一轻链可变区(VL)和第一轻链恒定区(CL)的多肽;

[0077] 并且第二结合臂包含

[0078] iii)含有第二重链可变区(VH)和第二重链恒定区(CH)的多肽,以及iv)含有第二轻链可变区(VL)和第二轻链恒定区(CL)的多肽。

[0079] 在一些实施方案中,结合剂是包含第一结合臂和第二结合臂的抗体,所述第一结合臂包含所述与EpCAM结合的第一抗原结合区,所述第二结合臂包含所述与CD137结合的第二抗原结合区,其中:

[0080] 所述第一结合臂包含

[0081] i)含有第一重链可变区(VH)和第一重链恒定区(CH)的第一重链,以及

[0082] ii)含有第一轻链可变区(VL)和第一轻链恒定区(CL)的第一轻链;并且第二结合臂包含

[0083] i)含有第二重链可变区(VH)和第二重链恒定区(CH)的第二重链,以及

[0084] ii)含有第二轻链可变区(VL)和第二轻链恒定区(CL)的第二轻链。

[0085] 在一些实施方案中,第一结合臂来源于全长抗体。在一些实施方案中,第一结合臂来源于单克隆抗体。在一些实施方案中,第一结合臂来源于全长IgG1,λ(lambda)或IgG1,κ(kappa)抗体。在一些实施方案中,第二结合臂来源于全长抗体。在一些实施方案中,第二结合臂来源于单克隆抗体。在一些实施方案中,第二结合臂来源于全长IgG1,λ(lambda)或IgG1,κ(kappa)抗体。在一些实施方案中,第一和第二结合臂来源于全长抗体,例如来源于全长IgG1,λ(lambda)或IgG1,κ(kappa)抗体。在一些实施方案中,第一和第二结合臂来源于单克隆抗体。

[0086] 在一些实施方案中,第一和第二重链恒定区(CH)各自包含恒定重链1(CH1)区、铰链区、恒定重链2(CH2)区和恒定重链3(CH3)区中的一者或更多者,优选至少包含铰链区、CH2区和CH3区。

[0087] 在一些实施方案中,第一和第二重链恒定区(CH)各自包含CH3区,并且其中这两个CH3区包含非对称突变。

[0088] 在一些实施方案中,在所述第一重链恒定区(CH)中,在对应于选自根据EU编号的人IgG1重链中T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409的位置的位置中的至少一个氨基酸已被替换,并且在所述第二重链恒定区(CH)中,在对应于选自根据EU编号的人IgG1重链中T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409的位置的位置中的至少一个氨基酸已被替换,并且其中所述第一重链和所述第二重链不在相同的位置中发生替换。

[0089] 在一些实施方案中,(i)在所述第一重链恒定区(CH)中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置中的氨基酸是L,并且在所述第二重链恒定区(CH)中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置中的氨基酸是R,或者(ii)在所述第一重链恒定区(CH)中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置中的氨基酸是R,并且在所述第二重链恒定区(CH)中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置中的氨基酸是L。

[0090] 在一些实施方案中,所述结合剂与包含相同的第一抗原结合区和第二抗原结合区以及含有人IgG1铰链区、CH2区和CH3区的两个重链恒定区(CH)的另一种抗体相比诱导Fc介导的效应物功能的程度更低。

[0091] 在一些实施方案中,所述第一重链恒定区和第二重链恒定区(CH)被修饰,使得该抗体与除了包含未经修饰的第一重链恒定区和第二重链恒定区(CH)之外都相同的抗体相比诱导Fc介导的效应物功能的程度更低。

[0092] 在一些实施方案中,所述未经修饰的第一重链恒定区和第二重链恒定区(CH)中的每一者都包含SEQ ID NO:47中所示氨基酸序列。

[0093] 在一些实施方案中,所述Fc介导的效应物功能通过与Fcγ受体结合、与C1q结合或诱导Fc介导的Fcγ受体交联来测量。

[0094] 在一些实施方案中,所述Fc介导的效应物功能通过与C1q结合来测量。

[0095] 在一些实施方案中,所述第一重链恒定区和第二重链恒定区已被修饰,使得C1q与所述抗体的结合与野生型抗体相比降低,优选降低至少70%、至少80%,至少90%、至少95%、至少97%或100%,其中C1q结合优选通过ELISA确定。

[0096] 在一些实施方案中,在所述第一重链恒定区和第二重链恒定区(CH)中的至少一者中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235、D265、N297、P331和G236的位置中的一个或更多个氨基酸分别不是L、L、D、N、P和G。

[0097] 在一些实施方案中,在所述第一重链和第二重链中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234和L235的位置分别是F和E。

[0098] 在一些实施方案中,在所述第一重链恒定区和/或第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,和/或在所述第一重链恒定区和/或第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R。

[0099] 在一些实施方案中,

[0100] (i)在所述第一和第二重链恒定区二者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A;

[0101] (ii)在所述第一和第二重链恒定区二者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R;或者

[0102] (iii)在所述第一和第二重链恒定区中的一者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,并且在所述第一和第二重链恒定区中的另一者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R。

[0103] 在一些实施方案中,第一重链恒定区和第二重链恒定区二者的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234和L235的位置分别是F和E,并且其中(i)第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置是L,并且第二重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置是R,或者(ii)第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置是R,并且第二重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置是L。

[0104] 在一些实施方案中,在所述第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,并且在所述第一重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R,并且其中(i)第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置是L,并且所述第

二重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置是R,或者(ii)第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置是R,并且所述第二重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置是L。

[0105] 在一些实施方案中,在所述第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,并且在所述第一重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R,并且其中第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置是L,并且所述第二重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置是R。

[0106] 在一些实施方案中,所述第一和/或第二重链的恒定区包含氨基酸序列,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:47中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%的同一性。

[0107] 在一些实施方案中,

[0108] a)所述第一重链的恒定区包含SEQ ID NO:54中所示氨基酸序列;并且

[0109] b)所述第二重链的恒定区包含SEQ ID NO:52中所示氨基酸序列。

[0110] 在一些实施方案中,所述结合剂包含kappa(κ)轻链恒定区。

[0111] 在一些实施方案中,所述结合剂包含lambda(λ)轻链恒定区。

[0112] 在一些实施方案中,所述第一轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区或lambda(λ)轻链恒定区。

[0113] 在一些实施方案中,所述第二轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区或lambda(λ)轻链恒定区。

[0114] 在一些实施方案中,

[0115] (i)所述第一轻链恒定区和所述第二轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区,

[0116] (ii)所述第一轻链恒定区和所述第二轻链恒定区是lambda(λ)轻链恒定区,

[0117] (iii)所述第一轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区,并且所述第二轻链恒定区是lambda(λ)轻链恒定区,或(iv)所述第一轻链恒定区是lambda(λ)轻链恒定区,并且所述第二轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区。

[0118] 在一些实施方案中,kappa(κ)轻链包含与SEQ ID NO:55中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列。

[0119] 在一些实施方案中,lambda(λ)轻链包含与SEQ ID NO:56中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列。

[0120] 在一些实施方案中,结合剂具有选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的同种型。在一个实施方案中,同种型选自人IgG1、人IgG2、人IgG3和人IgG4。

[0121] 在一些实施方案中,结合剂是全长IgG1抗体。

[0122] 在一些实施方案中,结合剂是IgG1m(f)同种异型的抗体。

[0123] 在一些实施方案中,结合剂是包含第一结合臂和第二结合臂的抗体,所述第一结合臂包含所述与EpCAM结合的第一抗原结合区,所述第二结合臂包含所述与CD137结合的第二抗原结合区,其中:

[0124] 第一结合臂包含

[0125] i)含有第一重链可变区(VH)和第一重链恒定区(CH)的多肽,以及ii)含有第一轻

链可变区(VL)和第一轻链恒定区(CL)的多肽,其中第一VH包含第一HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,并且第一VL包含第一LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中第一HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:2、3和4中所示序列,并且第一LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:6、7和8中所示序列;

[0126] 并且第二结合臂包含

[0127] iii)含有第二重链可变区(VH)和第二重链恒定区(CH)的多肽,以及iv)含有第二轻链可变区(VL)和第二轻链恒定区(CL)的多肽,其中第二VH包含第二HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,并且第二VL包含第二LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中第二HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:12、13和14中所示序列,并且第二LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和18中所示序列;

[0128] 其中在第一CH中,根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236分别是F、E和R,并且在第二CH中,根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265是F、E和A;并且

[0129] 其中在第一CH中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置中的氨基酸是L,并且在第二CH中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置中的氨基酸是R。

[0130] 在一些实施方案中,结合剂包含

[0131] i)第一重链,其包含与SEQ ID NO:9中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列,

[0132] ii)第一轻链,其包含与SEQ ID NO:10中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列,

[0133] iii)第二重链,其包含与SEQ ID NO:19中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列;以及

[0134] iv)第二轻链,其包含与SEQ ID NO:20中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列。

[0135] 在一些实施方案中,结合剂包含

[0136] i)第一重链,其包含SEQ ID NO:9中所示氨基酸序列,

[0137] ii)第一轻链,其包含SEQ ID NO:10中所示氨基酸序列,

[0138] iii)第二重链,其包含SEQ ID NO:19中所示氨基酸序列;以及

[0139] iv)第二轻链,其包含SEQ ID NO:20中所示氨基酸序列。

[0140] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有HCDR3序列的重链可变区(VH),所述HCDR3序列包含SEQ ID NO:78中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有HCDR2序列的重链可变区(VH),所述HCDR2序列包含SEQ ID NO:77中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有HCDR1序列的重链可变区(VH),所述HCDR1序列包含SEQ ID NO:76中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH),其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:76、77和78中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH),其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:82、83和84中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH),其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:87、77和

84中所示序列。

[0141] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有LCDR3序列的轻链可变区(VL),所述LCDR3序列包含SEQ ID NO:81中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有LCDR2序列的轻链可变区(VL),所述LCDR2序列包含SEQ ID NO:80中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有LCDR1序列的轻链可变区(VL),所述LCDR1序列包含SEQ ID NO:79中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL),其中LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:79、80和81中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL),其中LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:85、86和81中所示序列。

[0142] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有HCDR3序列的重链可变区(VH)和含有LCDR3序列的轻链可变区(VL),其中HCDR3序列包含SEQ ID NO:78中所示序列,并且LCDR3序列包含SEQ ID NO:81中所示序列。

[0143] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:76、77和78中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:79、80和81中所示序列。

[0144] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:82、83和84中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:85、86和81中所示序列。

[0145] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:87、77和84中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:79、80和81中所示序列。

[0146] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:21(第1至116位)的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:22(第1至112位)的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0147] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH),所述重链可变区(VH)包含与SEQ ID NO:21(第1至116位)中所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列。

[0148] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:21(第1至116位)中所示序列的重链可变区(VH)。

[0149] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含轻链可变区(VL),所

述轻链可变区(VL)包含与SEQ ID NO:22(第1至112位)中所示序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少97％、至少99％或100％同一性的序列。

[0150] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:22(第1至112位)中所示序列的轻链可变区(VL)。

[0151] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:21(第1至116位)中所示序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少97％、至少99％或100％同一性的序列,并且VL包含与SEQ ID NO:22(第1至112位)中所示序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少97％、至少99％或100％同一性的序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:21(第1至116位)中所示序列具有至少80％同一性的序列,并且VL包含与SEQ ID NO:22(第1至112位)中所示序列具有至少80％同一性的序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:21(第1至116位)中所示序列具有至少90％同一性的序列,并且VL包含与SEQ ID NO:22(第1至112位)中所示序列具有至少90％同一性的序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:21(第1至116位)中所示序列具有至少95％同一性的序列,并且VL包含与SEQ ID NO:22(第1至112位)中所示序列具有至少95％同一性的序列。

[0152] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含SEQ ID NO:21(第1至116位)中所示序列,并且VL包含SEQ ID NO:22(第1至112位)中所示序列。

[0153] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含这样的抗体的重链可变区和轻链可变区:其与包含如上所示的重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)的抗体竞争EpCAM结合和/或具有该抗体的EpCAM特异性。

[0154] 在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区如上所示。

[0155] 在一些实施方案中,

[0156] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:78中所示的HCDR3序列的重链可变区(VH),并且

[0157] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有SEQ ID NO:14中所示的HCDR3序列的重链可变区(VH)。

[0158] 在一些实施方案中,

[0159] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:81中所示LCDR3序列的轻链可变区(VL),并且

[0160] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有SEQ ID NO:18中所示LCDR3序列的轻链可变区(VL)。

[0161] 在一些实施方案中,

[0162] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:78中所示的HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:81中所示的LCDR3序列,并且

[0163] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:14中所示的HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:18中所示的LCDR3序列。

[0164] 在一些实施方案中,

[0165] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:76、77和78中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:79、80和81中所示序列;以及

[0166] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:12、13和14中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和18中所示序列。

[0167] 在一些实施方案中,

[0168] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:82、83和84中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:85、86和81中所示序列;以及

[0169] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:69、70和71中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:72、73和18中所示序列。

[0170] 在一些实施方案中,

[0171] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:87、77和84中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:79、80和81中所示序列;并且

[0172] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:75、13和71中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和18中所示序列。

[0173] 在一些实施方案中,

[0174] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:21(第1至116位)的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:22(第1至112位)的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;并且

[0175] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:11的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:15的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0176] 在一些实施方案中,

[0177] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),

其中VH包含与SEQ ID NO:21(第1至116位)中所示氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少97％或至少99％同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:22(第1至112位)中所示氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少97％或至少99％同一性的氨基酸序列;并且

[0178] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:11中所示氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少97％或至少99％同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:15中所示氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少97％或至少99％同一性的氨基酸序列。

[0179] 在一些实施方案中,

[0180] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含SEQ ID NO:21(第1至116位)中所示序列,并且VL包含SEQ ID NO:22(第1至112位)中所示序列;并且

[0181] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含SEQ ID NO:11中所示序列,并且VL包含SEQ ID NO:15中所示序列。

[0182] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含这样的抗体的重链可变区和轻链可变区:其与包含如上所示的与EpCAM结合的第一抗原结合区的重链可变区或轻链可变区或其组合的抗体竞争EpCAM结合和/或具有该抗体的EpCAM特异性,并且所述与CD137结合的第二抗原结合区包含这样的抗体的重链可变区和轻链可变区:其与包含如上所示的与CD137结合的第二抗原结合区的重链可变区或轻链可变区或其组合的抗体竞争CD137结合和/或具有该抗体的CD137特异性。

[0183] 在一些实施方案中,可变区包含三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)和四个框架区(FR1、FR2、FR3和FR4)。

[0184] 在一些实施方案中,所述互补决定区和所述框架区从氨基端到羧基端以以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0185] 在一些实施方案中,结合剂为全长抗体或抗体片段的形式。

[0186] 在一些实施方案中,结合剂是多特异性结合剂,例如双特异性结合剂。

[0187] 在一些实施方案中,结合剂是多特异性抗体,例如双特异性抗体。

[0188] 在一些实施方案中,结合剂包含(i)第一重链可变区(VH)和第一轻链可变区(VL),其中所述第一重链可变区(VH)和所述第一轻链可变区(VL)形成所述与EpCAM结合的第一抗原结合区;以及

[0189] (ii)第二重链可变区(VH)和第二轻链可变区(VL),其中所述第二重链可变区(VH)和所述第二轻链可变区(VL)形成所述与CD137结合的第二抗原结合区。

[0190] 在一些实施方案中,结合剂包含

[0191] i)含有第一重链可变区(VH)和第一重链恒定区(CH)的多肽,以及含有第一轻链可变区(VL)和第一轻链恒定区(CL)的多肽,其中所述第一重链可变区(VH)和所述第一轻链可变区(VL)形成所述与EpCAM结合的第一抗原结合区;以及

[0192] ii)含有第二重链可变区(VH)和第二重链恒定区(CH)的多肽,以及含有第二轻链可变区(VL)和第二轻链恒定区(CL)的多肽,其中所述第二重链可变区(VH)和所述第二轻链

可变区(VL)形成所述与CD137结合的第二抗原结合区。

[0193] 在一些实施方案中,结合剂是包含第一结合臂和第二结合臂的抗体,所述第一结合臂包含所述与EpCAM结合的第一抗原结合区,所述第二结合臂包含所述与CD137结合的第二抗原结合区,其中:

[0194] 第一结合臂包含

[0195] i)含有第一重链可变区(VH)和第一重链恒定区(CH)的多肽,以及ii)含有第一轻链可变区(VL)和第一轻链恒定区(CL)的多肽;

[0196] 并且第二结合臂包含

[0197] iii)含有第二重链可变区(VH)和第二重链恒定区(CH)的多肽,以及iv)含有第二轻链可变区(VL)和第二轻链恒定区(CL)的多肽。

[0198] 在一些实施方案中,结合剂是包含第一结合臂和第二结合臂的抗体,所述第一结合臂包含所述与EpCAM结合的第一抗原结合区,所述第二结合臂包含所述与CD137结合的第二抗原结合区,其中:

[0199] 第一结合臂包含

[0200] i)含有第一重链可变区(VH)和第一重链恒定区(CH)的第一重链,以及

[0201] ii)含有第一轻链可变区(VL)和第一轻链恒定区(CL)的第一轻链;并且第二结合臂包含

[0202] i)含有第二重链可变区(VH)和第二重链恒定区(CH)的第二重链,以及

[0203] ii)含有第二轻链可变区(VL)和第二轻链恒定区(CL)的第二轻链。

[0204] 在一些实施方案中,第一结合臂来源于全长抗体。在一些实施方案中,第一结合臂来源于单克隆抗体。在一些实施方案中,第一结合臂来源于全长IgG1,λ(lambda)或IgG1,κ(kappa)抗体。在一些实施方案中,第二结合臂来源于全长抗体。在一些实施方案中,第二结合臂来源于单克隆抗体。在一些实施方案中,第二结合臂来源于全长IgG1,λ(lambda)或IgG1,κ(kappa)抗体。在一些实施方案中,第一结合臂和第二结合臂来源于全长抗体,例如来源于全长IgG1,λ(lambda)或IgG1,κ(kappa)抗体。在一些实施方案中,第一结合臂和第二结合臂来源于单克隆抗体。

[0205] 在一些实施方案中,第一重链恒定区和第二重链恒定区(CH)中的每一者都包含恒定重链1(CH1)区、铰链区、恒定重链2(CH2)区和恒定重链3(CH3)区中的一者或更多者,优选至少包含铰链区、CH2区和CH3区。

[0206] 在一些实施方案中,第一重链恒定区和第二重链恒定区(CH)中的每一者都包含CH3区,并且其中这两个CH3区包含非对称突变。

[0207] 在一些实施方案中,在所述第一重链恒定区(CH)中,在对应于选自根据EU编号的人IgG1重链中T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409的位置的位置中的至少一个氨基酸已被替换,并且在所述第二重链恒定区(CH)中,在对应于选自根据EU编号的人IgG1重链中T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409的位置的位置中的至少一个氨基酸已被替换,并且其中所述第一重链和所述第二重链不在相同的位置中发生替换。

[0208] 在一些实施方案中,(i)在所述第一重链恒定区(CH)中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置中的氨基酸是L,并且在所述第二重链恒定区(CH)中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置中的氨基酸是R,或者(ii)在所述第一重链恒定区

(CH)中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置中的氨基酸是R,并且在所述第二重链恒定区(CH)中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置中的氨基酸是L。

[0209] 在一些实施方案中,所述结合剂与包含相同的第一抗原结合区和第二抗原结合区并含有人IgG1铰链区、CH2区和CH3区的两个重链恒定区(CH)的另一抗体相比诱导Fc介导的效应物功能的程度更低。

[0210] 在一些实施方案中,所述第一重链恒定区和第二重链恒定区(CH)被修饰,使得该抗体与除了包含未经修饰的第一重链恒定区和第二重链恒定区(CH)之外都相同的抗体相比,诱导Fc介导的效应物功能的程度更低。

[0211] 在一些实施方案中,所述未经修饰的第一重链恒定区和第二重链恒定区(CH)中的每一者都包含SEQ ID NO:47中所示氨基酸序列。

[0212] 在一些实施方案中,所述Fc介导的效应物功能通过与Fc γ受体结合、与C1q结合或诱导Fc介导的Fc γ受体交联来测量。

[0213] 在一些实施方案中,所述Fc介导的效应物功能通过与C1q结合来测量。

[0214] 在一些实施方案中,所述第一重链恒定区和第二重链恒定区已被修饰,使得C1q与所述抗体的结合与野生型抗体相比降低,优选降低至少70%、至少80%,至少90%、至少95%、至少97%或100%,其中C1q结合优选通过ELISA确定。

[0215] 在一些实施方案中,在所述第一重链恒定区和第二重链恒定区(CH)中的至少一者中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235、D265、N297、P331和G236的位置中的一个或更多个氨基酸分别不是L、L、D、N、P和G。

[0216] 在一些实施方案中,在所述第一重链和第二重链中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234和L235的位置分别是F和E。

[0217] 在一些实施方案中,在所述第一重链恒定区和/或第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,和/或在所述第一重链恒定区和/或第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R。

[0218] 在一些实施方案中,

[0219] (i)在所述第一和第二重链恒定区二者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A;

[0220] (ii)在所述第一和第二重链恒定区二者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R;或者

[0221] (iii)在所述第一和第二重链恒定区中的一者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,并且在所述第一和第二重链恒定区中的另一者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R。

[0222] 在一些实施方案中,第一重链恒定区和第二重链恒定区二者的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234和L235的位置分别是F和E,并且其中(i)第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置是L,并且第二重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置是R,或者(ii)第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置是R,并且第二重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中

F405的位置是L。

[0223] 在一些实施方案中,在所述第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,并且在所述第一重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R,并且其中(i)第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置是L,并且第二重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置是R,或者(ii)第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置是R,并且第二重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置是L。

[0224] 在一些实施方案中,在所述第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,并且在所述第一重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R,并且其中第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置是L,并且第二重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置是R。

[0225] 在一些实施方案中,所述第一和/或第二重链的恒定区包含氨基酸序列,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:47中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%的同一性。

[0226] 在一些实施方案中,

[0227] a)所述第一重链的恒定区包含SEQ ID NO:54中所示氨基酸序列;并且

[0228] b)所述第二重链的恒定区包含SEQ ID NO:52中所示氨基酸序列。

[0229] 在一些实施方案中,所述结合剂包含kappa(κ)轻链恒定区。

[0230] 在一些实施方案中,所述结合剂包含lambda(λ)轻链恒定区。

[0231] 在一些实施方案中,所述第一轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区或lambda(λ)轻链恒定区。

[0232] 在一些实施方案中,所述第二轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区或lambda(λ)轻链恒定区。

[0233] 在一些实施方案中,

[0234] (i)所述第一轻链恒定区和所述第二轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区,

[0235] (ii)所述第一轻链恒定区和所述第二轻链恒定区是lambda(λ)轻链恒定区,

[0236] (iii)所述第一轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区,并且所述第二轻链恒定区是lambda(λ)轻链恒定区,或者(iv)所述第一轻链恒定区是lambda(λ)轻链恒定区,并且所述第二轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区。

[0237] 在一些实施方案中,kappa(κ)轻链包含与SEQ ID NO:55中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列。

[0238] 在一些实施方案中,lambda(λ)轻链包含与SEQ ID NO:56中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列。

[0239] 在一些实施方案中,结合剂具有选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的同种型。在一个实施方案中,同种型选自人IgG1、人IgG2、人IgG3和人IgG4。

[0240] 在一些实施方案中,结合剂是全长IgG1抗体。

[0241] 在一些实施方案中,结合剂是IgG1m(f)同种异型的抗体。

[0242] 在一些实施方案中,结合剂是包含第一结合臂和第二结合臂的抗体,所述第一结合臂包含所述与EpCAM结合的第一抗原结合区,所述第二结合臂包含所述与CD137结合的第二抗原结合区,其中:

[0243] 第一结合臂包含

[0244] i)含有第一重链可变区(VH)和第一重链恒定区(CH)的多肽,以及ii)含有第一轻链可变区(VL)和第一轻链恒定区(CL)的多肽,其中第一VH包含第一HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,并且第一VL包含第一LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中第一HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:76、77和78中所示序列,并且第一LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:79、80和81中所示序列;

[0245] 并且第二结合臂包含

[0246] iii)含有第二重链可变区(VH)和第二重链恒定区(CH)的多肽,以及iv)含有第二轻链可变区(VL)和第二轻链恒定区(CL)的多肽,其中第二VH包含第二HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,并且第二VL包含第二LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中第二HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:12、13和14中所示序列,并且第二LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和18中所示序列;

[0247] 其中在第一CH中,根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236分别是F、E和R,并且在第二CH中,根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265是F、E和A;以及

[0248] 其中在第一CH中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置中的氨基酸是L,并且在第二CH中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置中的氨基酸是R。

[0249] 在一些实施方案中,结合剂包含

[0250] i)第一重链,其包含与SEQ ID NO:21中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列,

[0251] ii)第一轻链,其包含与SEQ ID NO:22中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列,

[0252] iii)第二重链,其包含与SEQ ID NO:19中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列;以及

[0253] iv)第二轻链,其包含与SEQ ID NO:20中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列。

[0254] 在一些实施方案中,结合剂包含

[0255] i)第一重链,其包含SEQ ID NO:21中所示氨基酸序列,

[0256] ii)第一轻链,其包含SEQ ID NO:22中所示氨基酸序列,

[0257] iii)第二重链,其包含SEQ ID NO:19中所示氨基酸序列;以及

[0258] iv)第二轻链,其包含SEQ ID NO:20中所示氨基酸序列。

[0259] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有LCDR3序列的轻链可变区(VL),所述LCDR3序列包含SEQ ID NO:90中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有LCDR2序列的轻链可变区(VL),所述LCDR2序列包含SEQ ID NO:89中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有LCDR1序列的轻链可变区(VL),所述LCDR1序列包含SEQ ID NO:88中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链

可变区(VL),其中LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:88、89和90中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL),其中LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:91、92和90中所示序列。

[0260] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有HCDR3序列的重链可变区(VH)和含有LCDR3序列的轻链可变区(VL),其中HCDR3序列包含SEQ ID NO:4中所示序列,并且LCDR3序列包含SEQ ID NO:90中所示序列。

[0261] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:2、3和4中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:88、89和90中所示序列。

[0262] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:64、65和66中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:91、92和90中所示序列。

[0263] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:74、3和66中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:88、89和90中所示序列。

[0264] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:25(第1至115位)的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:26(第1至111位)的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0265] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH),所述重链可变区(VH)包含与SEQ ID NO:25(第1至115位)中所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列。

[0266] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:25(第1至115位)中所示序列的重链可变区(VH)。

[0267] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含轻链可变区(VL),所述轻链可变区(VL)包含与SEQ ID NO:26(第1至111位)中所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列。

[0268] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:26(第1至111位)中所示序列的轻链可变区(VL)。

[0269] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:25(第1至115位)中所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列,并且VL包含与SEQ

ID NO:26(第1至111位)中所示序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少97％、至少99％或100％同一性的序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:25(第1至115位)中所示序列具有至少80％同一性的序列,并且VL包含与SEQ ID NO:26(第1至111位)中所示序列具有至少80％同一性的序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:25(第1至115位)中所示序列具有至少90％同一性的序列,并且VL包含与SEQ ID NO:26(第1至111位)中所示序列具有至少90％同一性的序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:25(第1至115位)中所示序列具有至少95％同一性的序列,并且VL包含与SEQ ID NO:26(第1至111位)中所示序列具有至少95％同一性的序列。

[0270] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含SEQ ID NO:25(第1至115位)中所示序列,并且VL包含SEQ ID NO:26(第1至111位)中所示序列。

[0271] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含这样的抗体的重链可变区和轻链可变区:其与包含如上所示的重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)的抗体竞争EpCAM结合和/或具有该抗体的EpCAM特异性。

[0272] 在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区如上所示。

[0273] 在一些实施方案中,

[0274] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:90中所示LCDR3序列的轻链可变区(VL),并且

[0275] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含含有SEQ ID NO:18中所示LCDR3序列的轻链可变区(VL)。

[0276] 在一些实施方案中,

[0277] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:4中所示的HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:90中所示的LCDR3序列,并且

[0278] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:14中所示的HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:18中所示的LCDR3序列。

[0279] 在一些实施方案中,

[0280] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:2、3和4中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:88、89和90中所示序列;并且

[0281] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:12、13和14中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和18中所示序列。

[0282] 在一些实施方案中,

[0283] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:64、65和66中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:91、92和90中所示序列;并且

[0284] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:69、70和71中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:72、73和18中所示序列。

[0285] 在一些实施方案中,

[0286] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:74、3和66中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:88、89和90中所示序列;并且

[0287] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:75、13和71中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和18中所示序列。

[0288] 在一些实施方案中,

[0289] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:25(第1至115位)的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:26(第1至111位)的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;并且

[0290] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:11的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:15的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0291] 在一些实施方案中,

[0292] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:25(第1至115位)中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:26(第1至111位)中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列;并且

[0293] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:11中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:15中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列。

[0294] 在一些实施方案中,

[0295] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含SEQ ID NO:25(第1至115位)中所示序列,并且VL包含SEQ ID NO:26(第1至111

位)中所示序列;并且

[0296] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含SEQ ID NO:11中所示序列,并且VL包含SEQ ID NO:15中所示序列。

[0297] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含这样的抗体的重链可变区和轻链可变区:其与包含如上所示的与EpCAM结合的第一抗原结合区的重链可变区或轻链可变区或其组合的抗体竞争EpCAM结合和/或具有该抗体的EpCAM特异性,并且所述与CD137结合的第二抗原结合区包含这样的抗体的重链可变区和轻链可变区:其与包含如上所示的与CD137结合的第二抗原结合区的重链可变区或轻链可变区或其组合的抗体竞争CD137结合和/或具有该抗体的CD137特异性。

[0298] 在一些实施方案中,可变区包含三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)和四个框架区(FR1、FR2、FR3和FR4)。

[0299] 在一些实施方案中,所述互补决定区和所述框架区从氨基端到羧基端以以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0300] 在一些实施方案中,结合剂为全长抗体或抗体片段的形式。

[0301] 在一些实施方案中,结合剂是多特异性结合剂,例如双特异性结合剂。

[0302] 在一些实施方案中,结合剂是多特异性抗体,例如双特异性抗体。

[0303] 在一些实施方案中,结合剂包含(i)第一重链可变区(VH)和第一轻链可变区(VL),其中所述第一重链可变区(VH)和所述第一轻链可变区(VL)形成所述与EpCAM结合的第一抗原结合区;并且

[0304] (ii)第二重链可变区(VH)和第二轻链可变区(VL),其中所述第二重链可变区(VH)和所述第二轻链可变区(VL)形成所述与CD137结合的第二抗原结合区。

[0305] 在一些实施方案中,结合剂包含

[0306] i)含有第一重链可变区(VH)和第一重链恒定区(CH)的多肽,以及含有第一轻链可变区(VL)和第一轻链恒定区(CL)的多肽,其中所述第一重链可变区(VH)和所述第一轻链可变区(VL)形成所述与EpCAM结合的第一抗原结合区;并且

[0307] ii)含有第二重链可变区(VH)和第二重链恒定区(CH)的多肽,以及含有第二轻链可变区(VL)和第二轻链恒定区(CL)的多肽,其中所述第二重链可变区(VH)和所述第二轻链可变区(VL)形成所述与CD137结合的第二抗原结合区。

[0308] 在一些实施方案中,结合剂是包含第一结合臂和第二结合臂的抗体,所述第一结合臂包含所述与EpCAM结合的第一抗原结合区,所述第二结合臂包含所述与CD137结合的第二抗原结合区,其中:

[0309] 第一结合臂包含

[0310] i)含有第一重链可变区(VH)和第一重链恒定区(CH)的多肽,以及ii)含有第一轻链可变区(VL)和第一轻链恒定区(CL)的多肽;

[0311] 并且第二结合臂包含

[0312] iii)含有第二重链可变区(VH)和第二重链恒定区(CH)的多肽,以及iv)含有第二轻链可变区(VL)和第二轻链恒定区(CL)的多肽。

[0313] 在一些实施方案中,结合剂是包含第一结合臂和第二结合臂的抗体,所述第一结合臂包含所述与EpCAM结合的第一抗原结合区,所述第二结合臂包含所述与CD137结合的第

二抗原结合区,其中:

[0314] 第一结合臂包含

[0315] i)含有第一重链可变区(VH)和第一重链恒定区(CH)的第一重链,以及

[0316] ii)含有第一轻链可变区(VL)和第一轻链恒定区(CL)的第一轻链;并且第二结合臂包含

[0317] i)含有第二重链可变区(VH)和第二重链恒定区(CH)的第二重链,以及

[0318] ii)含有第二轻链可变区(VL)和第二轻链恒定区(CL)的第二轻链。

[0319] 在一些实施方案中,第一结合臂来源于全长抗体。在一些实施方案中,第一结合臂来源于单克隆抗体。在一些实施方案中,第一结合臂来源于全长IgG1,λ(lambda)或IgG1,κ(kappa)抗体。在一些实施方案中,第二结合臂来源于全长抗体。在一些实施方案中,第二结合臂来源于单克隆抗体。在一些实施方案中,第二结合臂来源于全长IgG1,λ(lambda)或IgG1,κ(kappa)抗体。在一些实施方案中,第一结合臂和第二结合臂来源于全长抗体,例如来源于全长IgG1,λ(lambda)或IgG1,κ(kappa)抗体。在一些实施方案中,第一结合臂和第二结合臂来源于单克隆抗体。

[0320] 在一些实施方案中,第一重链恒定区和第二重链恒定区(CH)中的每一者都包含恒定重链1(CH1)区、铰链区、恒定重链2(CH2)区和恒定重链3(CH3)区中的一者或更多者,优选至少包含铰链区、CH2区和CH3区。

[0321] 在一些实施方案中,第一重链恒定区和第二重链恒定区(CH)中的每一者都包含CH3区,并且其中这两个CH3区包含非对称突变。

[0322] 在一些实施方案中,在所述第一重链恒定区(CH)中,在对应于选自根据EU编号的人IgG1重链中T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409的位置的位置中的至少一个氨基酸已被替换,并且在所述第二重链恒定区(CH)中,在对应于选自根据EU编号的人IgG1重链中T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409的位置的位置中的至少一个氨基酸已被替换,并且其中所述第一重链和所述第二重链不在相同的位置中发生替换。

[0323] 在一些实施方案中,(i)在所述第一重链恒定区(CH)中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置中的氨基酸是L,并且在所述第二重链恒定区(CH)中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置中的氨基酸是R,或者(ii)在所述第一重链恒定区(CH)中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置中的氨基酸是R,并且在所述第二重链恒定区(CH)中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置中的氨基酸是L。

[0324] 在一些实施方案中,所述结合剂与包含相同的第一抗原结合区和第二抗原结合区并含有人IgG1铰链区、CH2区和CH3区的两个重链恒定区(CH)的另一抗体相比,诱导Fc介导的效应物功能的程度更低。

[0325] 在一些实施方案中,所述第一重链恒定区和第二重链恒定区(CH)被修饰,使得该抗体与除了包含未经修饰的第一重链恒定区和第二重链恒定区(CH)之外都相同的抗体相比,诱导Fc介导的效应物功能的程度更低。

[0326] 在一些实施方案中,所述未经修饰的第一重链恒定区和第二重链恒定区(CH)中的每一者都包含SEQ ID NO:47中所示氨基酸序列。

[0327] 在一些实施方案中,所述Fc介导的效应物功能通过与Fcγ受体结合、与C1q结合或诱导Fc介导的Fcγ受体交联来测量。

[0328] 在一些实施方案中,所述Fc介导的效应物功能通过与C1q结合来测量。

[0329] 在一些实施方案中,所述第一重链恒定区和第二重链恒定区已被修饰,使得与野生型抗体相比,C1q与所述抗体的结合降低,优选降低至少70%、至少80%,至少90%、至少95%、至少97%或100%,其中C1q结合优选通过ELISA确定。

[0330] 在一些实施方案中,在所述第一重链恒定区和第二重链恒定区(CH)中的至少一者中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235、D265、N297、P331和G236的位置中的一个或更多个氨基酸分别不是L、L、D、N、P和G。

[0331] 在一些实施方案中,在所述第一重链和第二重链中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234和L235的位置分别是F和E。

[0332] 在一些实施方案中,在所述第一重链恒定区和/或第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,和/或在所述第一重链恒定区和/或第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R。

[0333] 在一些实施方案中,

[0334] (i)在所述第一和第二重链恒定区二者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A;

[0335] (ii)在所述第一和第二重链恒定区二者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R;或者

[0336] (iii)在所述第一和第二重链恒定区中的一者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,并且在所述第一和第二重链恒定区中的另一者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R。

[0337] 在一些实施方案中,所述第一和第二重链恒定区二者的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234和L235的位置分别是F和E,并且其中(i)第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置是L,并且第二重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置是R,或者(ii)第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置是R,并且第二重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置是L。

[0338] 在一些实施方案中,在所述第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,并且在所述第一重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R,并且其中(i)第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置是L,并且第二重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置是R,或者(ii)第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置是R,并且第二重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置是L。

[0339] 在一些实施方案中,在所述第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,并且在所述第一重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R,并且其中第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置是L,并且第二重链

恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置是R。

[0340] 在一些实施方案中,所述第一重链和/或第二重链的恒定区包含氨基酸序列,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:47中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%的同一性。

[0341] 在一些实施方案中,

[0342] a)所述第一重链的恒定区包含SEQ ID NO:54中所示氨基酸序列;以及

[0343] b)所述第二重链的恒定区包含SEQ ID NO:52中所示氨基酸序列。

[0344] 在一些实施方案中,所述结合剂包含kappa(κ)轻链恒定区。

[0345] 在一些实施方案中,所述结合剂包含lambda(λ)轻链恒定区。

[0346] 在一些实施方案中,所述第一轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区或lambda(λ)轻链恒定区。

[0347] 在一些实施方案中,所述第二轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区或lambda(λ)轻链恒定区。

[0348] 在一些实施方案中,

[0349] (i)所述第一轻链恒定区和所述第二轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区,

[0350] (ii)所述第一轻链恒定区和所述第二轻链恒定区是lambda(λ)轻链恒定区,

[0351] (iii)所述第一轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区,并且所述第二轻链恒定区是lambda(λ)轻链恒定区,或者(iv)所述第一轻链恒定区是lambda(λ)轻链恒定区,并且所述第二轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区。

[0352] 在一些实施方案中,kappa(κ)轻链包含与SEQ ID NO:55中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列。

[0353] 在一些实施方案中,lambda(λ)轻链包含与SEQ ID NO:56中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列。

[0354] 在一些实施方案中,结合剂具有选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的同种型。在一个实施方案中,同种型选自人IgG1、人IgG2、人IgG3和人IgG4。

[0355] 在一些实施方案中,结合剂是全长IgG1抗体。

[0356] 在一些实施方案中,结合剂是IgG1m(f)同种异型的抗体。

[0357] 在一些实施方案中,结合剂是包含第一结合臂和第二结合臂的抗体,所述第一结合臂包含所述与EpCAM结合的第一抗原结合区,所述第二结合臂包含所述与CD137结合的第二抗原结合区,其中:

[0358] 第一结合臂包含

[0359] i)含有第一重链可变区(VH)和第一重链恒定区(CH)的多肽,以及ii)含有第一轻链可变区(VL)和第一轻链恒定区(CL)的多肽,其中第一VH包含第一HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,并且第一VL包含第一LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中第一HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:2、3和4中所示序列,并且第一LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:88、89和90中所示序列;

[0360] 并且第二结合臂包含

[0361] iii)含有第二重链可变区(VH)和第二重链恒定区(CH)的多肽,以及iv)含有第二轻链可变区(VL)和第二轻链恒定区(CL)的多肽,其中第二VH包含第二HCDR1、HCDR2和HCDR3

序列,并且第二VL包含第二LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中第二HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:12、13和14中所示序列,并且第二LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和18中所示序列;

[0362] 其中在第一CH中,根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236分别是F、E和R,并且在第二CH中,根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265是F、E和A;并且

[0363] 其中在第一CH中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置中的氨基酸是L,并且在第二CH中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置中的氨基酸是R。

[0364] 在一些实施方案中,结合剂包含

[0365] i)第一重链,其包含与SEQ ID NO:25中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列,

[0366] ii)第一轻链,其包含与SEQ ID NO:26中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列,

[0367] iii)第二重链,其包含与SEQ ID NO:19中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列;以及

[0368] iv)第二轻链,其包含与SEQ ID NO:20中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列。

[0369] 在一些实施方案中,结合剂包含

[0370] i)第一重链,其包含SEQ ID NO:25中所示氨基酸序列,

[0371] ii)第一轻链,其包含SEQ ID NO:26中所示氨基酸序列,

[0372] iii)第二重链,其包含SEQ ID NO:19中所示氨基酸序列;以及

[0373] iv)第二轻链,其包含SEQ ID NO:20中所示氨基酸序列。

[0374] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有HCDR3序列的重链可变区(VH),所述HCDR3序列包含SEQ ID NO:4中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有HCDR2序列的重链可变区(VH),所述HCDR2序列包含SEQ ID NO:93中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有HCDR1序列的重链可变区(VH),所述HCDR1序列包含SEQ ID NO:2中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH),其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:2、93和4中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH),其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:64、96和66中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH),其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:74、93和66中所示序列。

[0375] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有LCDR3序列的轻链可变区(VL),所述LCDR3序列包含SEQ ID NO:8中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有LCDR2序列的轻链可变区(VL),所述LCDR2序列包含SEQ ID NO:95中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有LCDR1序列的轻链可变区(VL),所述LCDR1序列包含SEQ ID NO:94中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链

可变区(VL),其中LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:94、95和8中所示序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL),其中LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:97、98和8中所示序列。

[0376] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:2、93和4中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:94、95和8中所示序列。

[0377] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:64、96和66中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:97、98和8中所示序列。

[0378] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:74、93和66中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:94、95和8中所示序列。

[0379] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:27(第1至115位)的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:28(第1至108位)的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0380] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH),所述重链可变区(VH)包含与SEQ ID NO:27(第1至115位)中所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列。

[0381] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:27(第1至115位)中所示序列的重链可变区(VH)。

[0382] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含轻链可变区(VL),所述轻链可变区(VL)包含与SEQ ID NO:28(第1至108位)中所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列。

[0383] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:28(第1至108位)中所示序列的轻链可变区(VL)。

[0384] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:27(第1至115位)中所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列,并且VL包含与SEQ ID NO:28(第1至108位)中所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:27(第1至115位)中

所示序列具有至少80％同一性的序列,并且VL包含与SEQ ID NO:28(第1至108位)中所示序列具有至少80％同一性的序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:27(第1至115位)中所示序列具有至少90％同一性的序列,并且VL包含与SEQ ID NO:28(第1至108位)中所示序列具有至少90％同一性的序列。在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:27(第1至115位)中所示序列具有至少95％同一性的序列,并且VL包含与SEQ ID NO:28(第1至108位)中所示序列具有至少95％同一性的序列。

[0385] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含SEQ ID NO:27(第1至115位)中所示序列,并且VL包含SEQ ID NO:28(第1至108位)中所示序列。

[0386] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含这样的抗体的重链可变区和轻链可变区:其与包含如上所示的重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)的抗体竞争EpCAM结合和/或具有该抗体的EpCAM特异性。

[0387] 在一些实施方案中,所述与CD137结合的第二抗原结合区如上所示。

[0388] 在一些实施方案中,

[0389] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:2、93和4中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:94、95和8中所示序列;并且

[0390] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:12、13和14中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和18中所示序列。

[0391] 在一些实施方案中,

[0392] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:64、96和66中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:97、98和8中所示序列;并且

[0393] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:69、70和71中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:72、73和18中所示序列。

[0394] 在一些实施方案中,

[0395] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:74、93和66中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:94、95和8中所示序列;并且

[0396] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),

所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:75、13和71中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和18中所示序列。

[0397] 在一些实施方案中,

[0398] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:27(第1至115位)的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:28(第1至108位)的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;并且

[0399] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:11的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:15的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0400] 在一些实施方案中,

[0401] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:27(第1至115位)中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:28(第1至108位)中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列;并且

[0402] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:11中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:15中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列。

[0403] 在一些实施方案中,

[0404] a)所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含SEQ ID NO:27(第1至115位)中所示序列,并且VL包含SEQ ID NO:28(第1至108位)中所示序列;并且

[0405] b)所述与CD137结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含SEQ ID NO:11中所示序列,并且VL包含SEQ ID NO:15中所示序列。

[0406] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的第一抗原结合区包含这样的抗体的重链可变区和轻链可变区:其与包含如上所示的与EpCAM结合的第一抗原结合区的重链可变区或轻链可变区或其组合的抗体竞争EpCAM结合和/或具有该抗体的EpCAM特异性,并且所述与CD137结合的第二抗原结合区包含这样的抗体的重链可变区和轻链可变区:其与包含如上所示的与CD137结合的第二抗原结合区的重链可变区或轻链可变区或其组合的抗体竞争CD137结合和/或具有该抗体的CD137特异性。

[0407] 在一些实施方案中,可变区包含三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)和四个框架区(FR1、FR2、FR3和FR4)。

[0408] 在一些实施方案中,所述互补决定区和所述框架区从氨基端到羧基端以以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0409] 在一些实施方案中,结合剂为全长抗体或抗体片段的形式。

[0410] 在一些实施方案中,结合剂是多特异性结合剂,例如双特异性结合剂。

[0411] 在一些实施方案中,结合剂是多特异性抗体,例如双特异性抗体。

[0412] 在一些实施方案中,结合剂包含(i)第一重链可变区(VH)和第一轻链可变区(VL),其中所述第一重链可变区(VH)和所述第一轻链可变区(VL)形成所述与EpCAM结合的第一抗原结合区;以及

[0413] (ii)第二重链可变区(VH)和第二轻链可变区(VL),其中所述第二重链可变区(VH)和所述第二轻链可变区(VL)形成所述与CD137结合的第二抗原结合区。

[0414] 在一些实施方案中,结合剂包含

[0415] i)含有第一重链可变区(VH)和第一重链恒定区(CH)的多肽,以及含有第一轻链可变区(VL)和第一轻链恒定区(CL)的多肽,其中所述第一重链可变区(VH)和所述第一轻链可变区(VL)形成所述与EpCAM结合的第一抗原结合区;以及

[0416] ii)含有第二重链可变区(VH)和第二重链恒定区(CH)的多肽,以及含有第二轻链可变区(VL)和第二轻链恒定区(CL)的多肽,其中所述第二重链可变区(VH)和所述第二轻链可变区(VL)形成所述与CD137结合的第二抗原结合区。

[0417] 在一些实施方案中,结合剂是包含第一结合臂和第二结合臂的抗体,所述第一结合臂包含所述与EpCAM结合的第一抗原结合区,所述第二结合臂包含所述与CD137结合的第二抗原结合区,其中:

[0418] 第一结合臂包含

[0419] i)含有第一重链可变区(VH)和第一重链恒定区(CH)的多肽,以及ii)含有第一轻链可变区(VL)和第一轻链恒定区(CL)的多肽;

[0420] 并且第二结合臂包含

[0421] iii)含有第二重链可变区(VH)和第二重链恒定区(CH)的多肽,以及iv)含有第二轻链可变区(VL)和第二轻链恒定区(CL)的多肽。

[0422] 在一些实施方案中,结合剂是包含第一结合臂和第二结合臂的抗体,所述第一结合臂包含所述与EpCAM结合的第一抗原结合区,所述第二结合臂包含所述与CD137结合的第二抗原结合区,其中:

[0423] 第一结合臂包含

[0424] i)含有第一重链可变区(VH)和第一重链恒定区(CH)的第一重链,以及

[0425] ii)含有第一轻链可变区(VL)和第一轻链恒定区(CL)的第一轻链;并且第二结合臂包含

[0426] i)含有第二重链可变区(VH)和第二重链恒定区(CH)的第二重链,以及

[0427] ii)含有第二轻链可变区(VL)和第二轻链恒定区(CL)的第二轻链。

[0428] 在一些实施方案中,第一结合臂来源于全长抗体。在一些实施方案中,第一结合臂来源于单克隆抗体。在一些实施方案中,第一结合臂来源于全长IgG1,λ(lambda)或IgG1,κ(kappa)抗体。在一些实施方案中,第二结合臂来源于全长抗体。在一些实施方案中,第二结合臂来源于单克隆抗体。在一些实施方案中,第二结合臂来源于全长IgG1,λ(lambda)或IgG1,κ(kappa)抗体。在一些实施方案中,第一结合臂和第二结合臂来源于全长抗体,例如来源于全长IgG1,λ(lambda)或IgG1,κ(kappa)抗体。在一些实施方案中,第一结合臂和第二结合臂来源于单克隆抗体。

[0429] 在一些实施方案中,第一重链恒定区和第二重链恒定区(CH)中的每一者都包含恒

定重链1(CH1)区、铰链区、恒定重链2(CH2)区和恒定重链3(CH3)区中的一者或更多者,优选至少包含铰链区、CH2区和CH3区。

[0430] 在一些实施方案中,第一重链恒定区和第二重链恒定区(CH)中的每一者都包含CH3区,并且其中这两个CH3区包含非对称突变。

[0431] 在一些实施方案中,在所述第一重链恒定区(CH)中,在对应于选自根据EU编号的人IgG1重链中T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409的位置的位置中的至少一个氨基酸已被替换,并且在所述第二重链恒定区(CH)中,在对应于选自根据EU编号的人IgG1重链中T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409的位置的位置中的至少一个氨基酸已被替换,并且其中所述第一重链和所述第二重链不在相同的位置中发生替换。

[0432] 在一些实施方案中,(i)在所述第一重链恒定区(CH)中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置中的氨基酸是L,并且在所述第二重链恒定区(CH)中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置中的氨基酸是R,或者(ii)在所述第一重链恒定区(CH)中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置中的氨基酸是R,并且在所述第二重链恒定区(CH)中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置中的氨基酸是L。

[0433] 在一些实施方案中,所述结合剂与包含相同的第一抗原结合区和第二抗原结合区并含有人IgG1铰链区、CH2区和CH3区的两个重链恒定区(CH)的另一抗体相比,诱导Fc介导的效应物功能的程度更低。

[0434] 在一些实施方案中,所述第一重链恒定区和第二重链恒定区(CH)被修饰,使得该抗体与除了包含未经修饰的第一重链恒定区和第二重链恒定区(CH)之外都相同的抗体相比,诱导Fc介导的效应物功能的程度更低。

[0435] 在一些实施方案中,所述未经修饰的第一重链恒定区和第二重链恒定区(CH)中的每一者都包含SEQ ID NO:47中所示氨基酸序列。

[0436] 在一些实施方案中,所述Fc介导的效应物功能通过与Fcγ受体结合、与C1q结合或诱导Fc介导的Fcγ受体交联来测量。

[0437] 在一些实施方案中,所述Fc介导的效应物功能通过与C1q结合来测量。

[0438] 在一些实施方案中,所述第一重链恒定区和第二重链恒定区已被修饰,使得与野生型抗体相比,C1q与所述抗体的结合降低,优选降低至少70%、至少80%,至少90%、至少95%、至少97%或100%,其中C1q结合优选通过ELISA确定。

[0439] 在一些实施方案中,在所述第一重链恒定区和第二重链恒定区(CH)中的至少一者中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235、D265、N297、P331和G236的位置中的一个或更多个氨基酸分别不是L、L、D、N、P和G。

[0440] 在一些实施方案中,在所述第一重链和第二重链中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234和L235的位置分别是F和E。

[0441] 在一些实施方案中,在所述第一重链恒定区和/或第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,和/或在所述第一重链恒定区和/或第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R。

[0442] 在一些实施方案中,

[0443] (i)在所述第一和第二重链恒定区二者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的

位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A;

[0444] (ii)在所述第一和第二重链恒定区二者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R;或者

[0445] (iii)在所述第一和第二重链恒定区中的一者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,并且在所述第一和第二重链恒定区中的另一者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R。

[0446] 在一些实施方案中,第一重链恒定区和第二重链恒定区二者的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234和L235的位置分别是F和E,并且其中(i)第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置是L,并且第二重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置是R,或者(ii)第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置是R,并且第二重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置是L。

[0447] 在一些实施方案中,在所述第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,并且在所述第一重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R,并且其中(i)第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置是L,并且第二重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置是R,或者(ii)第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置是R,并且第二重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置是L。

[0448] 在一些实施方案中,在所述第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,并且在所述第一重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R,并且其中第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置是L,并且第二重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置是R。

[0449] 在一些实施方案中,所述第一重链和/或第二重链的恒定区包含氨基酸序列,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:47中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%的同一性。

[0450] 在一些实施方案中,

[0451] a)所述第一重链的恒定区包含SEQ ID NO:54中所示氨基酸序列;并且

[0452] b)所述第二重链的恒定区包含SEQ ID NO:52中所示氨基酸序列。

[0453] 在一些实施方案中,所述结合剂包含kappa(κ)轻链恒定区。

[0454] 在一些实施方案中,所述结合剂包含lambda(λ)轻链恒定区。

[0455] 在一些实施方案中,所述第一轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区或lambda(λ)轻链恒定区。

[0456] 在一些实施方案中,所述第二轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区或lambda(λ)轻链恒定区。

[0457] 在一些实施方案中,

[0458] (i)所述第一轻链恒定区和所述第二轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区,

[0459] (ii)所述第一轻链恒定区和所述第二轻链恒定区是lambda(λ)轻链恒定区,

[0460] (iii)所述第一轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区,并且所述第二轻链恒定区是lambda(λ)轻链恒定区,或者(iv)所述第一轻链恒定区是lambda(λ)轻链恒定区,并且所述第二轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区。

[0461] 在一些实施方案中,kappa(κ)轻链包含与SEQ ID NO:55中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列。

[0462] 在一些实施方案中,lambda(λ)轻链包含与SEQ ID NO:56中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列。

[0463] 在一些实施方案中,结合剂具有选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的同种型。在一个实施方案中,同种型选自人IgG1、人IgG2、人IgG3和人IgG4。

[0464] 在一些实施方案中,结合剂是全长IgG1抗体。

[0465] 在一些实施方案中,结合剂是IgG1m(f)同种异型的抗体。

[0466] 在一些实施方案中,结合剂是包含第一结合臂和第二结合臂的抗体,所述第一结合臂包含所述与EpCAM结合的第一抗原结合区,所述第二结合臂包含所述与CD137结合的第二抗原结合区,其中:

[0467] 第一结合臂包含

[0468] i)含有第一重链可变区(VH)和第一重链恒定区(CH)的多肽,以及ii)含有第一轻链可变区(VL)和第一轻链恒定区(CL)的多肽,其中第一VH包含第一HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,并且第一VL包含第一LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中第一HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:2、93和4中所示序列,并且第一LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:94、95和8中所示序列;

[0469] 并且第二结合臂包含

[0470] iii)含有第二重链可变区(VH)和第二重链恒定区(CH)的多肽,以及iv)含有第二轻链可变区(VL)和第二轻链恒定区(CL)的多肽,其中第二VH包含第二HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,并且第二VL包含第二LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中第二HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:12、13和14中所示序列,并且第二LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和18中所示序列;

[0471] 其中在第一CH中,根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236分别是F、E和R,并且在第二CH中,根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265是F、E和A;以及

[0472] 其中在第一CH中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置中的氨基酸是L,并且在第二CH中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置中的氨基酸是R。

[0473] 在一些实施方案中,结合剂包含

[0474] i)第一重链,其包含与SEQ ID NO:27中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列,

[0475] ii)第一轻链,其包含与SEQ ID NO:28中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列,

[0476] iii)第二重链,其包含与SEQ ID NO:19中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列;以及

[0477] iv)第二轻链,其包含与SEQ ID NO:20中所示氨基酸序列具有至少80%、至少

85％、至少90％、至少95％、至少97％或至少99％同一性的氨基酸序列。

[0478] 在一些实施方案中,结合剂包含

[0479] i)第一重链,其包含SEQ ID NO:27中所示氨基酸序列,

[0480] ii)第一轻链,其包含SEQ ID NO:28中所示氨基酸序列,

[0481] iii)第二重链,其包含SEQ ID NO:19中所示氨基酸序列;以及

[0482] iv)第二轻链,其包含SEQ ID NO:20中所示氨基酸序列。

[0483] 在另一个方面中,本公开内容提供了结合剂,其包含第一结合臂和第二结合臂,所述第一结合臂包含第一抗原结合区和含有恒定重链2(CH2)区的第一重链恒定区,所述第二结合臂包含第二抗原结合区和含有恒定重链2(CH2)区的第二重链恒定区,

[0484] 其中所述第一和第二抗原结合区中的至少一者与EpCAM结合,并且其中在所述第一和第二重链恒定区中的至少一者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R。

[0485] 在一些实施方案中,在所述第一重链恒定区和/或第二重链恒定区中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R。

[0486] 在一些实施方案中,在所述第一重链恒定区和/或第二重链恒定区二者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R。

[0487] 在一些实施方案中,在所述第一或第二重链恒定区中的一者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R,并且在所述第一或第二重链恒定区中的另一者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A。

[0488] 在一些实施方案中,所述第一和第二抗原结合区二者都与EpCAM结合。

[0489] 在一些实施方案中,所述第一和第二抗原结合区中的一者与EpCAM结合,并且所述第一和第二抗原结合区中的另一者与除EpCAM之外的抗原结合。

[0490] 在一些实施方案中,所述第一和第二抗原结合区中的一者与EpCAM结合,并且所述第一和第二抗原结合区中的另一者与CD137结合。

[0491] 在另一个方面中,本公开内容提供了结合剂,其包含第一结合臂和第二结合臂,所述第一结合臂包含第一抗原结合区和含有恒定重链2(CH2)区的第一重链恒定区,所述第二结合臂包含第二抗原结合区和含有恒定重链2(CH2)区的第二重链恒定区,

[0492] 其中所述第一和第二抗原结合区中的至少一者与CD137结合,并且其中在所述第一和第二重链恒定区中的至少一者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R。

[0493] 在一些实施方案中,在所述第一重链恒定区和/或第二重链恒定区中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R。

[0494] 在一些实施方案中,在所述第一重链恒定区和/或第二重链恒定区二者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R。

[0495] 在一些实施方案中,在所述第一或第二重链恒定区中的一者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R,并且在所述第一或第二重链恒定区中的另一者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A。

[0496] 在一些实施方案中,所述第一和第二抗原结合区二者都与CD137结合。

[0497] 在一些实施方案中,所述第一和第二抗原结合区中的一者与CD137结合,并且所述第一和第二抗原结合区中的另一者与除CD137之外的抗原结合。

[0498] 在一些实施方案中,所述第一和第二抗原结合区中的一者与CD137结合,并且所述第一和第二抗原结合区中的另一者与EpCAM结合。

[0499] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的抗原结合区和/或所述与CD137结合的抗原结合区如本文中所述。

[0500] 在一些实施方案中,EpCAM是人EpCAM。

[0501] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的抗原结合区与肿瘤细胞上表达的EpCAM结合。

[0502] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:2、3和4中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:6、7和8中所示序列。

[0503] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:1中所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列,并且VL包含与SEQ ID NO:5中所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列。

[0504] 在一些实施方案中,所述与EpCAM结合的抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含SEQ ID NO:1中所示序列,并且VL包含SEQ ID NO:5中所示序列。

[0505] 在一些实施方案中,CD137是人CD137。

[0506] 在一些实施方案中,所述与CD137结合的抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:12、13和14中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和18中所示序列。

[0507] 在一些实施方案中,所述与CD137结合的抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:11中所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列,并且VL包含与SEQ ID NO:15中所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列。

[0508] 在一些实施方案中,所述与CD137结合的抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含SEQ ID NO:11中所示序列,并且VL包含SEQ ID NO:15中所示序列。

[0509] 在一些实施方案中,结合剂包含与EpCAM结合的抗原结合区和与CD137结合的抗原结合区,其中:

[0510] a)所述与EpCAM结合的抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:2、3和4中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:6、7和8中所示序列;并且

[0511] b)所述与CD137结合的抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述

重链可变区(VH)包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:12、13和14中所示序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和18中所示序列。

[0512] 在一些实施方案中,结合剂是二价结合剂。

[0513] 在一些实施方案中,结合剂包含Fc区。

[0514] 在一些实施方案中,结合剂为抗体的形式,例如全长抗体的形式。

[0515] 在一些实施方案中,结合剂包含第一结合臂和第二结合臂,所述第一结合臂包含与EpCAM结合的抗原结合区,所述第二结合臂包含与CD137结合的抗原结合区,其中:

[0516] 第一结合臂包含

[0517] i)含有第一重链可变区(VH)和第一重链恒定区(CH)的多肽,以及ii)含有第一轻链可变区(VL)和第一轻链恒定区(CL)的多肽;

[0518] 并且第二结合臂包含

[0519] iii)含有第二重链可变区(VH)和第二重链恒定区(CH)的多肽,以及iv)含有第二轻链可变区(VL)和第二轻链恒定区(CL)的多肽。

[0520] 在一些实施方案中,

[0521] 第一VH包含第一HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,并且第一VL包含第一LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中第一HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:2、3和4中所示序列,并且第一LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:6、7和8中所示序列;以及

[0522] 第二VH包含第二HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,并且第二VL包含第二LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中第二HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含SEQ ID NO:12、13和14中所示序列,并且第二LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和18中所示序列。

[0523] 在一些实施方案中,

[0524] 第一VH包含与SEQ ID NO:1中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列,并且第一VL包含与SEQ ID NO:5中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列;以及

[0525] 第二VH包含与SEQ ID NO:11中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列,并且第二VL包含与SEQ ID NO:15中所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的氨基酸序列。

[0526] 在一些实施方案中,

[0527] 第一VH包含SEQ ID NO:1中所示氨基酸序列,并且第一VL包含SEQ ID NO:5中所示氨基酸序列;以及

[0528] 第二VH包含SEQ ID NO:11中所示氨基酸序列,并且第二VL包含SEQ ID NO:15中所示氨基酸序列。

[0529] 在一些实施方案中,第一重链恒定区和第二重链恒定区(CH)中的每一者都包含CH3区,并且其中这两个CH3区包含非对称突变。

[0530] 在一些实施方案中,(i)在所述第一重链恒定区(CH)中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置中的氨基酸是L,并且在所述第二重链恒定区(CH)中,在对应于根

据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置中的氨基酸是R,或者(ii)在所述第一重链恒定区(CH)中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置中的氨基酸是R,并且在所述第二重链恒定区(CH)中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置中的氨基酸是L。

[0531] 在一些实施方案中,在所述第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,并且在所述第一重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R,并且其中(i)第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置是L,并且第二重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置是R,或者(ii)第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置是R,并且第二重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置是L。

[0532] 在一些实施方案中,在所述第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,并且在所述第一重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R,并且其中第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置是L,并且第二重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置是R。

[0533] 在另一个方面中,本公开内容提供了多核苷酸或多核苷酸组,其编码如本文中所示的结合剂。

[0534] 在另一个方面中,本公开内容提供了药物组合物,其包含如本文中所示的结合剂或如本文中所示的多核苷酸。

[0535] 在另一个方面中,本公开内容提供了用于治疗对象的方法,其包括向对象施用如本文中所示的结合剂、如本文中所示的多核苷酸或如本文中所示的药物组合物。

[0536] 在一些实施方案中,所述方法是用于在对象中治疗或预防的癌症的方法。

[0537] 在一些实施方案中,所述对象是人。

[0538] 在另一个方面中,本公开内容提供了如本文中所示的结合剂、如本文中所示的多核苷酸或如本文中所示的药物组合物,其用于药物用途,例如用作药物。

[0539] 在一些实施方案中,如本文中所示的结合剂、如本文中所示的多核苷酸或如本文中所示的药物组合物用于疾病或病症的治疗性或预防性治疗。

[0540] 在一些实施方案中,所述疾病或病症是癌症。

[0541] 在另一方面中,本公开内容提供了如本文中所示的结合剂、如本文中所示的多核苷酸或如本文中所示的药物组合物,其用于在对象中治疗或预防癌症。

[0542] 在一些实施方案中,所述对象是人。

附图说明

[0543] 图1:肿瘤细胞上的相对EpCAM表达

[0544] 图1示出了如通过流式细胞术确定的T84、DiFi、HPAF-II、NCI-N87、Calu-3、NCI-H747和A549肿瘤细胞系上的相对EpCAM表达。示出的数据是每个肿瘤细胞系的Δ几何平均荧光强度(geometric mean fluorescence intensity,gMFI),如下计算:EpCAM抗体的几何平均荧光强度(APC)-非结合对照抗体的几何平均荧光(APC)。

[0545] 图2:二价EpCAM抗体及其单价对应物与DiFi、HPAF-II或A549细胞的结合。

[0546] 通过流式细胞术确定EpCAM抗体与DiFi、HPAF-II或A549细胞系的单价和二价结合。在所有实验中包含IgG1-b12-FEAL作为阴性对照(空心正方形)。示出的数据是一个代表性实验的重复测量的平均荧光强度(mean fluorescence intensity,MFI;R-藻红蛋白[PE])±标准偏差(SD)。

[0547] A.bsIgG1-b12-FEALxEpCAM-A37-FEAR(实心圆圈)和IgG1-EpCAM-A37-FEAR(空心三角形)抗体与DiFi、HPAF-II或A549细胞的结合。B.bsIgG1-b12-FEALxEpCAM-C52-FEAR(实心圆圈)和IgG1-EpCAM-C52-FEAR(空心三角形)抗体与DiFi、HPAF-II或A549细胞的结合。C.bsIgG1-v12-FEALxEpCAM-UBS-54-FEAR(实心圆圈)和IgG1-EpCAM-UBS-54-FEAR(空心三角形)抗体与DiFi、HPAF-II或A549细胞的结合。D.IgG1-EpCAM-323-A3-FEAR(空心三角形)抗体与DiFi或HPAF-II细胞的结合。

[0548] E.bsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-A37-FEAR和bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR以及非结合对照双特异性抗体bsIgG1-b12-FERL/CD137-HC7LC2-FEAR和bsIgG1-b12-FERL/b12-FEAR与DiFi细胞的结合。

[0549] 图3:EpCAM抗体与转染到CHO-S细胞中的全长人、食蟹猴或小鼠EpCAM的结合。

[0550] 使用用全长人、食蟹猴或小鼠EpCAM瞬时转染的CHO-S细胞来分析单价和二价EpCAM抗体的结合。作为阴性对照,评价与未经转染的CHO-WT细胞的结合。数据以两个技术重复的几何平均荧光强度(gMFI)R-PE值±SD表示。A.IgG1-EpCAM-UBS-54FEAR,IgG1-EpCAM-A37-FEAR,IgG1-EpCAM-C52-FEAR和IgG1-EpCAM-343-A3的结合。

[0551] B.bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-UBS-54-FEAR,bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR,bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-C52-FEAR,和bsIgG1-b12-FEAM-323-A3-FEAR的结合。

[0553] 图4:在基于细胞的报道测定中,通过EpCAMx4-1BB双特异性抗体对4-1BB依赖性萤光素酶活性的诱导。

[0554] 在存在连续稀释的BsIgG1-CD137-005-FEAR/EpCAM-323-A3-FEAL的情况下,将HEK293_NKF_h4-1BB_gfp_luc报道细胞与表达EpCAM的OV-90-SC12细胞共培养过夜,或单独培养(培养基)过夜。通过发光测量来定量萤光素酶活性。示出了相对于没有抗体的培养物(虚线)的萤光素酶活性的倍数诱导。误差棒示出了重复孔的SD。示出了来自三个中的一个代表性实验的数据。

[0555] 图5:在PBMC-DiFi细胞共培养物中,EpCAMx4-1BB双特异性抗体对体外PBMC增殖的增强。

[0556] 使用与经CFSE标记的PBMC共培养的表达EpCAM的DiFi细胞,在体外PBMC增殖测定中测试EpCAMx4-1BB双特异性抗体。将细胞在存在抗CD3(0.1μg/mL)的情况下在有或没有添加指定浓度的EpCAMx4-1BB或EpCAMxb12双特异性抗体或非结合对照IgG1-b12-FEAL下培养96小时。提取CFSE阳性细胞的数目并将其用于计算分裂指数。示出的数据是从一个代表性实验中获得的重复测量的平均分裂指数±SD。A.通过bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-UBS54-FEAR(实心三角形)和bsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-IbS54-FEAR(实心正方形)抗体诱导的PBMC增殖的分裂指数。B.通过bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-A37-FEAR(实心三角形)和bsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-A37-FEAR(实心正方形)抗体诱导的PBMC增殖的分裂指数。C.通过bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-C52-FEAR(实心三角形)和bsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-C52-FEAR(实心正方形)抗体诱导的PBMC增殖的分裂指数。D.通过

bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-23-A3-FEAR(实心三角形)和bsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-323-A3-FEAR(实心正方形)抗体诱导的PBMC增殖的分裂指数。

[0557] 图6:在PBMC-DiFi细胞共培养物中,通过EpCAMx4-1BB双特异性抗体对体外CD4+和CD8+T细胞增殖的增强。

[0558] 使用与经CFSE标记的PBMC共培养的表达EpCAM的DiFi细胞,在体外T细胞增殖测定中测试EpCAMx4-1BB双特异性抗体。将细胞在存在抗CD3(0.1μg/mL)的情况下在有或没有添加EpCAMx4-1BB(灰色柱)或EpCAMxb12(条纹柱)双特异性抗体(10μg/mL)或非结合对照IgG1-b12-FEAL(10μg/mL;空心柱)下培养96小时。通过流式细胞术评价CFSE阳性细胞的数目作为绝对CD4+(A)或CD8+(B)T细胞计数的量度,并计算分裂指数。示出的数据是从一个代表性实验中获得的重复测量的平均分裂指数±SD。

[0559] 图7:在使用多种肿瘤细胞系的PBMC-肿瘤细胞共培养物中,通过EpCAMx4-1BB双特异性抗体对体外PBMC增殖的增强。

[0560] 使用与经CFSE标记的PBMC共培养的表达EpCAM的T84、DiFi、HPAF-II、NCI-N87、Calu-3或NCI-H747肿瘤细胞,在体外PBMC增殖测定中测试EpCAMx4-1BB双特异性抗体。在存在抗CD3(0.1μg/mL)和指定浓度的EpCAMx4-1BB或EpCAMxb12双特异性抗体或非结合对照IgG1-b12-FEAL的情况下,将细胞培养96小时。通过流式细胞术评价CFSE阳性细胞的数目作为绝对PBMC计数的量度,并计算分裂指数。示出的数据是从一个代表性实验中获得的重复测量的平均分裂指数±SD,所述代表性实验使用(A)PBMC-T84共培养物、(B)PBMC-DiFi共培养物、(C)PBMC-HPAF-II共培养物、(D)PBMC-NCI-N87共培养物、(E)PBMC-Calu-3共培养物或(F)PBMC-NCI-H747共培养物。

[0561] 图8.通过具有含有惰性突变的Fc结构域的EpCAMx4-1BB双特异性抗体对DiFi肿瘤细胞共培养物中的人CD4+和CD8+T细胞体外增殖的增强。

[0562] 使用与经CFSE标记的人PBMC共培养的表达EpCAM的DiFi肿瘤细胞,在体外PBMC增殖测定中测试EpCAMx4-1BB双特异性抗体。在存在抗CD3(0.1μg/mL)和指定浓度的EpCAM-FERLx4-1BB-FEAR(实心菱形)、EpCAM-FEARx4-1BB-FEAL(实心正方形)、b12-FERLx4-1BB-FEAR(左半部分实心的三角形)、EpCAM-FERLxb12-FEAR(右半部分实心的三角形)双特异性抗体或非结合对照b12-FERLxb12-FEAR(空心三角形)的情况下,将细胞培养96小时。通过流式细胞术评价CFSE阳性(A)CD4+和(B)CD8+T细胞的数目作为绝对T细胞计数的量度,并计算分裂指数。示出的数据是从一个使用PBMC-DiFi共培养物的代表性实验中获得的重复测量的平均分裂指数±SD的非线性4参数可变斜率拟合。

[0563] 图9:在离体患者来源的肿瘤试样中,通过EpCAMx4-1BB双特异性抗体对肿瘤浸润淋巴细胞扩增的增强。

[0564] 将从非小细胞肺癌患者切除的肿瘤组织切割成1至2mm^3的块,并在存在IL-2(50U/mL)和0.2至5μg/mLBsIgG1-CD137-009-HC7LC2-BsIgG1-CD137-009-HC7LC2-或BsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-323-A3-FEAR的情况下或者仅IL-2(w/o Ab)的情况下培养14天。IL-2浓度在第7天和第10天分别逐步降低至33U/mL和15U/mL。通过流式细胞术确定培养之后的绝对细胞数目。示出了来源于所分析的两名患者中的一名示例性患者的培养物的总TIL、NK细胞、CD8+和CD4+T细胞数目。示出了来自3至4次单独重复的数据和重复的平均值。误差棒示出了SD。

[0565] 图10:EpCAMx4-1BB双特异性抗体在荷有hEpCAM过表达MC38肿瘤的hEpCAM小鼠中的抗肿瘤活性。

[0566] 将针对人EpCAM蛋白转基因的小鼠(hEpCAM小鼠)用5×10^5个过表达人EpCAM蛋白的MC38肿瘤细胞(MC38_hEpCAM)接种。当肿瘤达到约30mm^3的平均尺寸时开始处理。在肿瘤接种之后第12、17、21、24、28和31天(垂直虚线),将小鼠用100μgBsIgG2amm-EpCAM-323-A3-AALT/m4-1BB-3H3-AAKR或阴性对照抗体IgG2amm-b12-AAKR进行腹膜内处理。(A)示出了每组的平均肿瘤体积,误差棒示出了SEM。生长曲线包含最后测量的处死小鼠的肿瘤体积(末次观测值结转(last observation carried forward))。**,P<0.01;双因素重复测量ANOVA。(B)存活百分比。*,P<0.05;对数秩(Mantel-Cox)检验。

[0567] 图11.与二价EpCAM特异性和4-1BB特异性单克隆抗体的组合相比,通过EpCAMx4-1BB双特异性抗体增强了PBMC-DiFi肿瘤细胞共培养物中的人CD4+和CD8+T细胞增殖。

[0568] 使用与经CellTrace Violet(CTV)标记的人PBMC共培养的表达EpCAM的DiFi肿瘤细胞在体外PBMC增殖测定中将双特异性抗体bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR与二价IgG1-EpCAM-A37-FERL和IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR(单独或组合)进行比较。在存在抗CD3(0.1μg/mL;虚线)以及指定浓度的EpCAMx4-1BB、IgG1-EpCAM-A37-FERL和/或IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR的情况下将细胞培养96小时。通过CTV标记稀释的流式细胞术分析来评价CD4+和CD8+T增殖。示出的数据是从一个代表性实验获得的重复测量的平均扩增指数±SD。

[0569] 图12.与bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR和bsIgG1-b12-FERL/CD137-HC7LC2-FEAR的组合相比,通过EpCAMx4-1BB双特异性抗体增强了PBMC-DiFi肿瘤细胞共培养物中的人CD4+和CD8+T细胞增殖。

[0570] 使用与经CTV标记的人PBMC共培养的表达EpCAM的DiFi肿瘤细胞在体外PBMC增殖测定中将双特异性抗体bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR 与bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR 和bsIgG1-b12-FERL/CD137-HC7LC2-FEAR的组合进行比较。在存在抗CD3(0.1μg/mL; 虚线)与指定浓度的bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR 或 者bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR 和bsIgG1-b12-FERL/CD137-HC7LC2-FEAR的组合的情况下将细胞培养96小时。通过CTV标记稀释的流式细胞术分析来评价CD4+和CD8+T增殖。示出的数据是从一个代表性实验获得的重复测量的平均分裂细胞百分比±SD。

[0571] 图13.与bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR和bsIgG1-b12-FERL/CD137-HC7LC2-FEAR的组合相比,通过EpCAMx4-1BB双特异性抗体增强了PBMC-DiFi肿瘤细胞共培养物中的人CD4+和CD8+T细胞活化。

[0572] 使用与人PBMC共培养的表达EpCAM的DiFi肿瘤细胞在体外PBMC增殖测定中将EpCAMx4-1BB双特异性抗体bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR 与bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR 和bsIgG1-b12-FERL/CD137-HC7LC2-FEAR的组合进行比较。在存在抗CD3(0.1μg/mL; 虚线)与指定浓度的bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR 或 者bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR 和bsIgG1-b12-FERL/CD137-HC7LC2-FEAR的组合的情况下将细胞培养96小时。通过流式细胞术来确定表达CD25(A)或4-1BB(B)的CD4+和CD8+T细胞百分比以及CD25+群或4-1BB+群中的几何平均荧光强度(fluorescence intensity,FI)。示出的数据是从一个代表性实验获得的重复测量的平均值±SD。

[0573] 图14.与bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR和bsIgG1-b12-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR的组合相比,通过EpCAMx4-1BB双特异性抗体增强了癌症患者来源的PBMC-DiFi肿瘤细胞共培养物中的人CD4+和CD8+T细胞增殖。

[0574] 使用与经CTV标记的癌症患者来源的PBMC共培养的表达EpCAM的DiFi肿瘤细胞在体外增殖测定中将EpCAMx4-1BB双特异性抗体bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR 与bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR 和bsIgG1-b12-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR的组合进行比较。在存在抗CD3(0.1μg/mL;虚线)与指定浓度的bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR 或 者bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR 和bsIgG1-b12-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR的组合的情况下将细胞培养96小时。通过CTV标记稀释的流式细胞术分析来评价CD4+和CD8+T细胞增殖。示出的数据是从一个实验获得的重复测量的平均分裂细胞百分比±SD。

[0575] 图15.与bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR和bsIgG1-b12-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR的组合相比,通过EpCAMx4-1BB双特异性抗体增强了癌症患者来源的PBMC-DiFi肿瘤细胞共培养物中的人CD4+和CD8+T细胞活化。

[0576] 使用与癌症患者来源的PBMC共培养的表达EpCAM的DiFi肿瘤细胞在体外增殖测定中将EpCAMx4-1BB双特异性抗体bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR 与bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR 和bsIgG1-b12-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR的组合进行比较。在存在抗CD3(0.1μg/mL;虚线)与指定浓度的bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR 或 者bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR 和bsIgG1-b12-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR的组合的情况下将细胞培养96小时。通过流式细胞术来确定表达CD25(A)和4-1BB(B)的CD4+和CD8+T细胞百分比以及CD25+群或4-1BB+群中的几何平均荧光强度(FI)。示出的数据是从一个实验获得的重复测量的平均值±SD。

[0577] 图16.EpCAMx4-1BB双特异性抗体增强$CD8^+$T细胞的CD107a和GzmB表达。

[0578] 在存在bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR或对照抗体的情况下将表达CLDN6特异性TCR的PBMC来源的$CD8^+$T细胞与MDA-MB-231_hCLDN6_hEpCAM肿瘤细胞共培养2天。经由流式细胞术来分析$CD8^+$T细胞的CD107a和GzmB表达。(A)代表性流式细胞术图。(B至C)CD107a(C)和GzmB(D)表达水平的剂量响应曲线。示出的数据是来自经测试的六个供体之一的重复测量的平均值和SD。(D)归一化的CD107a和(E)GzmB表达水平(对于每个供体,将bsIgG1-b12-FERL/b12-FEAR表达水平设置为1)。示出了来自两个独立实验中评估的六个供体的合并数据。误差棒表示SD。****,P<0.0001;***,P<0.001;**,P<0.01;*,P<0.05;Friedman检验与Dunn多重比较检验。GMFI=几何平均荧光强度;GzmB=颗粒酶B;PBMC(peripheral blood mononuclear cell)=外周血单个核细胞;SD(standard deviation)=标准偏差。

[0579] 图17.EpCAMx4-1BB双特异性抗体增强$CD8^+$T细胞介导的针对肿瘤细胞的细胞毒性。

[0580] 在存在bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR或对照抗体的情况下将表达CLDN6特异性TCR的PBMC来源的$CD8^+$T细胞与MDA-MB-231_hCLDN6_hEpCAM肿瘤细胞共培养5至6天。细胞指数值来源于以2至3小时间隔进行的阻抗测量。(A)示出了来自一个代表性供体的共培养物中的细胞指数曲线。符号代表重复孔的平均细胞指数值。为了更好的可视

性,示出了来自每次第二阻抗测量(即,每隔4至6小时)的数据。(B)在整个共培养期间使用细胞指数数据进行AUC分析。相对于来自同一供体的经bsIgG1-ctrl-b12-FERL/b12-FEAR处理的培养物对每个处理条件的AUC进行归一化。示出了来自两个独立实验中评估的全部六个供体的合并数据。误差棒表示SD。***,P<0.001;**,P<0.01;*,P<0.05;Friedman检验与Dunn多重比较检验。

[0581] AUC(area under the curve)=曲线下面积;PBMC=外周血单个核细胞;SD=标准偏差。

[0582] 图18.具有不同Fc惰性突变(FER/FEA、FEA/FEA、FER/FER)的EpCAMx4-1BB双特异性抗体与Fcγ R的结合

[0583] 通过SPR来分析具有Fc惰性突变的多种组合(FER/FEA、FEA/FEA、FER/FER)的EpCAMx4-1BB双特异性抗体的结合,以及单克隆抗体IgG1-EpCAM-A37-FERL和IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR与固定的人重组Fcγ R蛋白的结合:Fcγ RIa、Fcγ RIIa-H131、Fcγ RIIa-R131、Fcγ RIIb、Fcγ RIIIa-F158和Fcγ RIIIa-V158。包含抗体IgG1-b12(野生型Fc)作为Fcγ R结合的阳性对照。通过将SPR分析物注射的瞬间的传感图设置为0RU来测量相对结合响应(以RU(响应单位,response unit)计)。在活性表面上分析的每个样品也在用于背景校正的平行参考表面上进行分析。示出的是一个实验的单次测量的数据。

[0584] 序列描述

[0585] 表1-序列

[0586]

SEQ ID NO:	参考	结构域	序列
1	IgG1-EpCAM-A37-FERL	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPFLHYWGQGTLVTVSS
2	IgG1-EpCAM-A37-FERL	VH_CDR1	GGTFSSYA
3	IgG1-EpCAM-A37-FERL	VH_CDR2	IIPIFGTA
4	IgG1-EpCAM-A37-FERL	VH_CDR3	ARDPFLHY
5	IgG1-EpCAM-A37-FERL	VL	EIELTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQTISNNYLAWYQQKRGQAPRLLIYAASSRATGIPDRFSGTGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCAQGELYPRQFGGGTKLEIK
6	IgG1-EpCAM-A37-FERL	VL_CDR1	QTISNNY
7	IgG1-EpCAM-A37-FERL	VL_CDR2	AAS
8	IgG1-EpCAM-A37-FERL	VL_CDR3	AQGELYPRQ
9	IgG1-EpCAM-A37-FERL	全重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPFLHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFERGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
10	IgG1-EpCAM-A37-FEAR / IgG1-EpCAM-A37-FERL	全轻链	EIELTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQTISNNYLAWYQQKRGQAPRLLIYAASSRATGIPDRFSGTGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCAQGELYPRQFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
11	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFSLNDYWMSWVRQAPGKGLEWVGYIDVGGSLYYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARGGLTYGFDLWGQGTLVTVSS
12	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	VH_CDR1	GFSLNDYW

[0587]

13	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	VH_CDR2	IDVGGSL
14	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	VH_CDR3	ARGGLTYGFDL
15	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	VL	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISSYLAWYQQKP GKAPKRLIYGASDLASGVPSRFSASGSGTDYTFTISSLQPED IATYYCHYYATISGLGVAFGGGTKVEIK
16	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	VL_CDR1	EDISSY
17	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	VL_CDR2	GAS
18	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	VL_CDR3	HYYATISGLGVA
19	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	全重链	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFSLNDYWMSWVR QAPGKGLEWVGYIDVGGSLYYAASVKGRFTISRDDSKSIA YLQMNSLKTEDTAVYYCARGGLTYGFDLWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
20	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR / IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL	全轻链	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISSYLAWYQQKP GKAPKRLIYGASDLASGVPSRFSASGSGTDYTFTISSLQPED IATYYCHYYATISGLGVAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
21	IgG1-EpCAM-323-A3-FEAL	全重链	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVRQ ASGEGLKWMGWINTYTGEPTYGEDFKGRFAFSLETSAST AYLQINNLKNEDTATYFCARFGNYVDYWGQGTTLTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG

[0588]

22	IgG1-EpCAM-323-A3/ IgG1-EpCAM-323-A3-FEAL / IgG1-EpCAM-323-A3-FEAR	全轻链	DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKNLLHSNGITYLYWY LQKPGQSPHLLIYQMSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISR VEAEDVGVYYCAQNLEIPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
23	IgG1-EpCAM-323-A3-FEAR	全重链	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVRQ ASGEGLKWMGWINTYTGEPTYGEDFKGRFAFSLETSAST AYLQINNLKNEDTATYFCARFGNYVDYWGQGTTLTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
24	IgG1-EpCAM-323-A3	全重链	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVRQ ASGEGLKWMGWINTYTGEPTYGEDFKGRFAFSLETSAST AYLQINNLKNEDTATYFCARFGNYVDYWGQGTTLTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
25	IgG1-EpCAM-UBS-54-FEAR	全重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCARDPFLHYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG
26	IgG1-EpCAM-UBS-54-FEAR	全轻链	EIELTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYL QKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYCMQALQTFTFGPGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC

[0589]

27	IgG1-EpCAM-C52-FEAR	全重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIVPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPFLHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
28	IgG1-EpCAM-C52-FEAR	全轻链	EIELTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCAQGELYPRQFGGGTKLDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
29	IgG1-EpCAM-A37-FEAR	全重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPFLHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
30	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL	全重链	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFSLNDYWMSWVRQAPGKGLEWVGYIDVGGSLYYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARGGLTYGFDLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0590]

31	IgG1-CD137-009-FEAR	全重链	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLNDYWMSWVRQA PGKGLEWIGYIDVGGSLYYASWAKGRFTISRTSTTVDLKM TSLTTEDTATYFCARGGLTYGFDLWGPGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG
32	IgG1-CD137-009-FEAR	全轻链	DIVMTQTPASVSEPVGGTVTINCQASEDISSYLAWYQQKP GQRPKRLIYGASDLASGVPSRFSASGSGTEYALTISDLESAD AATYYCHYYATISGLGVAFGGGTEVVVKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
33	IgG1-CD137-005-FEAR	全重链	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFTISDFHVTWVRQAP GKGLEWIGTIITSASTTAYATWARGRFTISKSSTTVNLKIVS PTTEDTATYFCARSTYTDTSGYYFDFWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG
34	IgG1-CD137-005-FEAR	全轻链	AQVLTQTASPVSAAVGGTVIINCQSSQSIYNGNRLSWYQ QKPGQPPKLLIYSASTLASGVSSRFKGSGSGTQFTLAISDV QSDDAATYYCLGSYDCDSADCFAFGGGTEVVVERTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
35	IgG1-b12-FEAR	全重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWVR QAPGQRFEWMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVTFTADTS ANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDNYY MDVWGKGTTVIVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVA VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0591]

36	IgG1-b12-FEAL	全重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWVR QAPGQRFEWMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVTFTADTS ANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDNYY MDVWGKGTTVIVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVA VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
37	IgG1-b12-FEAL / IgG1-b12-FEAR / IgG1-b12-FERL	全轻链	EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHSIRSRRVAWYQHKP GQAPRLVIHGVSNRASGISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPE DFALYYCQVYGASSYTFGQGTKLERKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
38	IgG1-b12-FERL	全重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWVR QAPGQRFEWMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVTFTADTS ANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDNYY MDVWGKGTTVIVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPEFERGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
39	IgG2amm-EpCAM-323-A3-AAKR	全重链	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVRQ ASGEGLKWMGWINTYTGEPTYGEDFKGRFAFSLETSAST AYLQINNLKNEDTATYFCARFGNYVDYWGQGTTLTVSSA KTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTW NSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITC NVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPS VFIFPPKIKDVLMISLSPMVTCVVVDVSEDDPDVQISWFV NNVEVLTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGK EFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEM TKKQVTLTCMVKDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPV LDSDGSYFMYSRLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHH TTKSFSRTPG
40	IgG2amm-EpCAM-323-A3-AAKR / IgG2amm-EpCAM-323-A3-AALT	全轻链	DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKNLLHSNGITYLYWY LQKPGQSPHLLIYQMSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISR VEAEDVGVYYCAQNLEIPRTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIF PPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNG VLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATH KTSTSPIVKSFNRNEC

[0592]

41	IgG2amm-EpCAM-323-A3-AALT	全重链	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVRQ ASGEGLKWMGWINTYTGEPTYGEDFKGRFAFSLETSAST AYLQINNLKNEDTATYFCARFGNYVDYWGQGTTLTVSSA KTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTW NSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITC NVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPS VFIFPPKIKDVLMISLSPMVTCVVVDVSEDDPDVQISWFV NNVEVLTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGK EFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEM TKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPV LDSDGSYLMYSKLTVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHH TTKSFSRTPG
42	IgG2amm-m4-1BB-3H3-AAKR	全重链	EMQLVESGGGLVQPGRSMKLSCAGSGFTLSDYGVAWVR QAPKKGLEWVAYISYAGGTTYYRESVKGRFTISRDNAKSTL YLQMDSLRSEDTATYYCTIDGYGGYSGSHWYFDFWGPGT MVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFP EPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTW PSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPN AAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPMVTCVVVDVSEDDPDV QISWFVNNVEVLTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQD WMSGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLP PPEEEMTKKQVTLTCMVKDFMPEDIYVEWTNNGKTELN YKNTEPVLDSDGSYFMYSRLRVEKKNWVERNSYSCSVVH EGLHNHHTTKSFSRTPG
43	IgG2amm-m4-1BB-3H3-AAKR	全轻链	DIQMTQSPSLLSASVGDRVTLNCRTSQNVYKNLAWYQQK LGEAPKLLIYNANSLQAGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DVATYFCQQYYSGNTFGAGTNLELKRADAAPTVSIFPPSSE QLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNS WTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTST SPIVKSFNRNEC
44	IgG2amm-b12-AALT	全重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWVR QAPGQRFEWMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVTFTADTS ANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDNYY MDVWGKGTTVIVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTL GCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSS SVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPC PPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPMVTCVVV DVSEDDPDVQISWFVNNVEVLTAQTQTHREDYNSTLRVV SALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWT NNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYLMYSKLTVEKKNWVERN SYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG
45	IgG2amm-b12-AALT / IgG2amm-b12-AAKR	全轻链	EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHSIRSRRVAWYQHKP GQAPRLVIHGVSNRASGISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPE DFALYYCQVYGASSYTFGQGTKLERKRADAAPTVSIFPPSS EQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLN SWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTS TSPIVKSFNRNEC

[0593]

46	IgG2amm-b12-AAKR	全重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWVR QAPGQRFEWMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVTFTADTS ANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDNYY MDVWGKGTTVIVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTL GCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSS SVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPC PPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPMVTCVVV DVSEDDPDVQISWFVNNVEVLTAQTQTHREDYNSTLRVV SALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVKDFMPEDIYVEWT NNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSRLRVEKKNWVERN SYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG
47	IgG1 恒定区		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
48	IgG1-FEA 恒定区	具有FEA替换（粗体）	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV**A**VSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
49	IgG1-FER 恒定区	具有FER替换（粗体）	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FER**GPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG

[0594]

50	IgG1-F405L 恒定区	具有F405L 替换（粗体）	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSF**L**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
51	IgG1-K409R 恒定区	具有K409R 替换（粗体）	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYS**R**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
52	IgG1-FEAR 恒定区	具有FEA替换 并且具有 K409R替换 （粗体）	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV**A**VSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYS**R**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
53	IgG1-FEAL 恒定区	具有FEA替换 并且具有 F405L替换 （粗体）	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV**A**VSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSF**L**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
54	IgG1-FERL 恒定区	具有FER替换 并且具有 F405L替换 （粗体）	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FER**GPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSF**L**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG

[0595]

55	κ 轻链恒定区	人 κ 轻链的恒定区	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
56	λ 轻链恒定区	人 λ 轻链的恒定区	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
57	IgG2amm-AAKR	具有AAKR替换替换（粗体）	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLT WNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSIT CNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPN**AA**GGP SVFIFPPKIKDVLMISLSPMVTCVVVDVSEDDPDVQISWFV NNVEVLTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGK EFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEM TKKQVTLTCMV**K**DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPV LDSDGSYFMYS**R**LRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHH TTKSFSRTPG
58	IgG2amm-AALT	具有AALT替换替换（粗体）	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLT WNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSIT CNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPN**AA**GGP SVFIFPPKIKDVLMISLSPMVTCVVVDVSEDDPDVQISWFV NNVEVLTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGK EFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEM TKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPV LDSDGSY**L**MYSKL**T**VEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHH TTKSFSRTPG
59	人 EpCAM	具有信号肽（粗体）的全长蛋白质序列	**MAPPQVLAFGLLLAAATATFAAA**QEECVCENYKLAVNCF VNNNRQCQCTSVGAQNTVICSKLAAKCLVMKAEMNGSK LGRRAKPEGALQNNDGLYDPDCDESGLFKAKQCNGTSM CWCVNTAGVRRTDKDTEITCSERVRTYWIIIELKHKAREKP YDSKSLRTALQKEITTRYQLDPKFITSILYENNVITIDLVQNS SQKTQNDVDIADVAYYFEKDVKGESLFHSKKMDLTVNGE QLDLDPGQTLIYYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVVVIAV VAGIVVLVISRKKRMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA
60	食蟹猴EpCAM	具有信号肽（粗体）的全长蛋白质序列	**MAPPQVLAFGLLLAAATASFAAA**QKECVCENYKLAVNCF LNDNGQCQCTSIGAQNTVLCSKLAAKCLVMKAEMNGSK LGRRAKPEGALQNNDGLYDPDCDESGLFKAKQCNGTSTC WCVNTAGVRRTDKDTEITCSERVRTYWIIIELKHKAREKPY DVQSLRTALEEAIKTRYQLDPKFITNILYEDNVITIDLVQNSS QKTQNDVDIADVAYYFEKDVKGESLFHSKKMDLRVNGEQ LDLDPGQTLIYYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVVVIAIV AGIVVLVISRKKRMAKYEKAEIKEMGEIHRELNA

[0596]

61	小鼠 EpCAM	具有信号肽（粗体）的全长蛋白质序列	**MAGPQALAFGLLLAVVTATLAAA**QRDCVCDNYKLATSCS LNEYGECQCTSYGTQNTVICSKLASKCLAMKAEMTHSKSG RRIKPEGAIQNNDGLYDPDCDEQGLFKAKQCNGTATCWC VNTAGVRRTDKDTEITCSERVRTYWIIIELKHKERESPYDH QSLQTALQEAFTSRYKLNQKFIKNIMYENNVITIDLMQNSS QKTQDDVDIADVAYYFEKDVKGESLFHSSKSMDLRVNGE PLDLDPGQTLIYYVDEKAPEFSMQGLTAGIIAVIVVVSLAVI AGIVVLVISTRKKSAKYEKAEIKEMGEIHRELNA
62	人 4-1BB	具有信号肽（粗体）的全长蛋白质序列	**MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRS**LQDPCSNCPAGTFCDN NRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECS STSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCK DCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVV CGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTAL LFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCEL
63	食蟹猴4-1BB	具有信号肽（粗体）的全长蛋白质序列	**MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRS**LQDLCSNCPAGTFCDN NRSQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFKTRKECSS TSNAECDCISGYHCLGAECSMCEQDCKQGQELTKKGCKD CCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVC GPSPADLSPGASSATPPAPAREPGHSPQIIFFLALTSTVVLF LLFFLVLRFSVVKRSRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCEL
64	IgG1-EpCAM-A37-FERL	VH_CDR1	SYAIS
65	IgG1-EpCAM-A37-FERL	VH_CDR2	GIIPIFGTANYAQKFQG
66	IgG1-EpCAM-A37-FERL	VH_CDR3	DPFLHY
67	IgG1-EpCAM-A37-FERL	VL_CDR1	RASQTISNNYLA
68	IgG1-EpCAM-A37-FERL	VL_CDR2	AASSRAT
69	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	VH_CDR1	DYWMS
70	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	VH_CDR2	YIDVGGSLYYAASVKG
71	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	VH_CDR3	GGLTYGFDL
72	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	VL_CDR1	QASEDISSYLA
73	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	VL_CDR2	GASDLAS
74	IgG1-EpCAM-A37-FERL	VH_CDR1	SYA
75	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	VH_CDR1	DYW
76		VH_CDR1	GYTFTNYG
77		VH_CDR2	INTYTGEP

[0597]

78		VH_CDR3	ARFGNYVDY
79		VL_CDR1	KNLLHSNGITY
80		VL_CDR2	QM
81		VL_CDR3	AQNLEIPRT
82		VH_CDR1	NYGMN
83		VH_CDR2	WINTYTGEPTYGEDFKG
84		VH_CDR3	FGNYVDY
85		VL_CDR1	RSSKNLLHSNGITYLY
86		VL_CDR2	QMSNLAS
87		VH_CDR1	NYG
88		VL_CDR1	QSLLHSNGYNY
89		VL_CDR2	LG
90		VL_CDR3	MQALQTFT
91		VL_CDR1	RSSQSLLHSNGYNYLD
92		VL_CDR2	LGSNRAS
93		VH_CDR2	IVPIFGTA
94		VL_CDR1	QSVSSSY
95		VL_CDR2	GA
96		VH_CDR2	GIVPIFGTANYAQKFQG
97		VL_CDR1	RASQSVSSSYLA
98		VL_CDR2	GASSRAT

具体实施方式

[0598] 尽管以下更详细地进一步描述了本公开内容,但是应理解,本公开内容不限于本文中所描述的具体的方法、方案和试剂,因为这些可变化。还应理解,本文中使用的术语仅出于描述一些具体实施方案的目的,而不旨在限制将仅受所附权利要求书限制的本公开内容的范围。除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语均具有与本领域普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0599] 在下文中,将更详细地描述本公开内容的要素。这些要素以具体实施方案列出,然而,应理解,它们可以以任何方式和任何数量组合以形成另外的实施方案。不应将多个描述的实施例和优选实施方案解释为将本公开内容仅限于明确描述的实施方案。本说明书应理解为支持和涵盖将明确描述的实施方案与任何数目的所公开和/或优选要素组合的实施方案。此外,除非上下文另有说明,否则本申请中所有描述的要素的任何排列和组合都应被视为被本申请的说明书公开。

[0600] 优选地,本文中使用的术语如“A multilingual glossary of biotechnological terms:(IUPAC Recommendations)”,H.G.W.Leuenberger,B.Nagel和H.Kölbl Eds.,Helvetica Chimica Acta,CH-4010Basel,Switzerland,(1995)中所述定义。

[0601] 除非另有指明,否则本公开内容的实践将采用本领域文献中阐明的常规化学、生物化学、细胞生物学、免疫学和重组DNA技术(参见例如

[0602] Organikum,Deutscher Verlag der Wissenschaften,Berlin1990;Streitwieser/Heathcook,"Organische Chemie",VCH,1990;Beyer/Walter,"Lehrbuch der Organischen Chemie",S.Hirzel Verlag Stuttgart,1988;Carey/Sundberg,"Organische Chemie",VCH,1995;March,"Advanced Organic Chemistry",John Wiley&Sons,1985;Römpp Chemie Lexikon,Falbe/Regitz(Hrsg.),Georg Thieme Verlag

Stuttgart,New York,1989;Molecular Cloning:A Laboratory Manual,2nd Edition,J.Sambrook et al.eds.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor 1989。

[0603] 除非本文中另外指明或者与上下文明显矛盾,否则本文中所述的所有方法均可以以任何合适的顺序进行。本文中提供的任何和所有实例或示例性语言(例如,“例如”)的使用仅旨在更好地举例说明本公开内容,并且不对另外要求保护的本公开内容的范围构成限制。本说明书中的语言均不应被解释为指明对实践本公开内容必需的任何未要求保护的要素。

[0604] 本文中值的范围的记载仅旨在用作单独引用落入该范围内的每个单独值的速记方法。除非本文另外说明,否则每个单独值均被并入到说明书中,如同在本文中单独地记载一样。

[0605] 在本说明书的整个文本中引用了若干文献。无论是上文还是下文,本文中引用的每篇文献(包括所有专利、专利申请、科学出版物、制造商说明书、指南等)均在此通过引用整体并入。本文中的内容均不应解释为承认本发明无权由于在先发明而先于这样的公开内容。

[0606] 定义

[0607] 下面将提供适用于本公开内容所有方面的定义。除非另外指出,否则以下术语具有以下含义。任何未经定义的术语均具有其领域公认的含义。

[0608] 在整个本说明书和随附的权利要求书中,除非上下文另有要求,否则词语“包含/包括”及变化形式将被理解为暗含包括所述的成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组,但不排除任何其他成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组。术语“基本上由.....组成”意指排除任何实质意义的其他成员、整数或步骤。术语“包含/包括”涵盖术语“基本上由……组成”,其继而又涵盖术语“由……组成”。因此,在本申请中每次出现时,术语“包含/包括”可用术语“基本上由……组成”或“由……组成”代替。同样,在本申请中每次出现时,术语“基本上由……组成”可用术语“由……组成”代替。

[0609] 除非在本文中另外指明或与上下文明显矛盾,否则在描述本公开内容的上下文中(尤其是在权利要求书的上下文中)使用的没有数量词修饰的名词及类似的引用解释为覆盖单数和复数二者。

[0610] 本文中使用的“和/或”被认为是两个指定特征或组分具有或不具有二者中另一者中的每一种的特定公开内容。例如,“X和/或Y”被认为是(i)X、(ii)Y以及(iii)X和Y中每一种的特定公开内容,就如同各自单独地在本文中列出一样。

[0611] 在本公开内容的上下文中,术语“约”表示本领域普通技术人员将理解的精度区间以仍然确保所讨论特征的技术效果。该术语通常表示与指定数值偏差±5%、±4%、±3%、±2%、±1%、±0.9%、±0.8%、±0.7%、±0.6%、±0.5%、±0.4%、±0.3%、±0.2%、±0.1%、±0.05%,并且例如±0.01%。如普通技术人员将理解的,给定技术效果的数值的具体的这样的偏差将取决于技术效果的性质。例如,自然或生物技术效果可通常比人为或改造技术效果具有更大的这样的偏差。

[0612] 本公开内容上下文中的术语“结合剂”是指能够与期望抗原结合的任何物质。在本公开内容的某些实施方案中,结合剂是抗体、抗体片段或其构建体。结合剂还可包含合成

的、经修饰的或非天然存在的部分,特别是非肽部分。这样的部分可例如连接期望的抗原结合官能团或区域,例如抗体或抗体片段。在一个实施方案中,结合剂是包含抗原结合CDR或可变区的合成构建体。

[0613] 术语“免疫球蛋白”涉及免疫球蛋白超家族的蛋白质,优选涉及抗原受体,例如抗体或B细胞受体(B cell receptor,BCR)。免疫球蛋白的特征在于具有特征性免疫球蛋白(immunoglobulin,Ig)折叠的结构性结构域(即免疫球蛋白结构域)。该术语涵盖膜结合的免疫球蛋白以及可溶性免疫球蛋白。膜结合的免疫球蛋白也称为表面免疫球蛋白或膜免疫球蛋白,其通常是BCR的一部分。可溶性免疫球蛋白通常称为抗体。

[0614] 免疫球蛋白的结构已被良好地表征。参见,例如,Fundamental Immunology Ch.7(Paul,W.,ed.,2^{nd} ed.Raven Press,N.Y.(1989))。简言之,免疫球蛋白通常包含通过二硫键连接的数条链,通常是两条相同的重链和两条相同的轻链。这些链主要由以下构成:免疫球蛋白结构域或免疫球蛋白区,例如V_L或VL(可变轻链)结构域/区、C_L或CL(恒定轻链)结构域/区、V_H或VH(可变重链)结构域/区以及C_H或CH(恒定重链)结构域/区,C_H1(CH1)、C_H2(CH2)、C_H3(CH3)和C_H4(CH4)。重链恒定区通常由三个结构域CH1、CH2和CH3构成。铰链区是重链的CH1与CH2结构域之间的区域,并且具有高度柔性。铰链区中的二硫键是IgG分子中两条重链之间相互作用的部分。每个轻链通常由VL和CL构成。轻链恒定区通常由一个结构域CL构成。VH和VL区可进一步细分成高变区(或高变区,其可以是序列高变的和/或结构上限定的环形式),也称为互补决定区(complementarity determining region,CDR),散布有更保守的区域,称为框架区(framework region,FR)。每个VH和VL通常由从氨基端至羧基端按以下顺序排列的三个CDR和四个FR构成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4(另参见Chothia and Lesk J.Mol.Biol.196,901-917(1987))。除非另有说明或与上下文相矛盾,否则本文中的CDR序列根据IMGT规则使用DomainGapAlign来鉴定(Lefranc MP.,Nucleic Acids Research 1999;27:209-212和Ehrenmann F.,Kaas Q.and Lefranc M.-P.Nucleic Acids Res.,38,D301-307(2010);另参见互联网http地址www.imgt.org。然而,应理解,本公开内容不限于仅根据IMGT规则确定的CDR序列。因此,重链可变区(VH)的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列(例如,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:11)或者轻链可变区(VL)的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列(例如,SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:15)应涵盖通过用于确定CDR序列的任何方法(例如根据IMGT规则或Kabat规则)确定的那些CDR序列。另外,还应包括通过用于确定CDR序列的不同方法(例如根据IMGT规则和Kabat规则)确定的代表CDR序列的重叠的序列。

[0615] 下表示出了根据IMGT规则和Kabat规则确定与SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:5或者SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:15相关的CDR序列的结果,并且还示出了所确定的CDR序列的重叠。

[0616]

SEQ ID NO: 1的CDR序列[SEQ ID NO在括号中]			
	IMGT	Kabat	重叠
HCDR1	GGTFSSYA [2]	SYAIS [64]	SYA [74]
HCDR2	IIPIFGTA [3]	GIIPIFGTANYAQKFQG [65]	IIPIFGTA [3]
HCDR3	ARDPFLHY [4]	DPFLHY [66]	DPFLHY [66]
SEQ ID NO: 5的CDR序列[SEQ ID NO在括号中]			
LCDR1	QTISNNY [6]	RASQTISNNYLA [67]	QTISNNY [6]
LCDR2	AAS [7]	AASSRAT [68]	AAS [7]
LCDR3	AQGELYPRQ [8]	AQGELYPRQ [8]	AQGELYPRQ [8]

SEQ ID NO: 11 的CDR序列[SEQ ID NO在括号中]			
	IMGT	Kabat	重叠
HCDR1	GFSLNDYW [12]	DYWMS [69]	DYW [75]
HCDR2	IDVGGSL [13]	YIDVGGSLYYAASVKG [70]	IDVGGSL [13]
HCDR3	ARGGLTYGFDL [14]	GGLTYGFDL [71]	GGLTYGFDL [71]
SEQ ID NO: 15 的CDR序列[SEQ ID NO在括号中]			
LCDR1	EDISSY [16]	QASEDISSYLA [72]	EDISSY [16]
LCDR2	GAS [17]	GASDLAS [73]	GAS [17]
LCDR3	HYYATISGLGVA [18]	HYYATISGLGVA [18]	HYYATISGLGVA [18]

[0617] 下表示出了根据IMGT规则和Kabat规则确定与SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22相关的CDR序列的结果,并且还示出了所确定的CDR序列的重叠。

[0618]

SEQ ID NO: 21 的CDR序列 [SEQ ID NO在括号中]			
	IMGT	Kabat	重叠
HCDR1	GYTFTNYG [76]	NYGMN [82]	NYG [87]
HCDR2	INTYTGEP [77]	WINTYTGEPTYGEDFKG [83]	INTYTGEP [77]
HCDR3	ARFGNYVDY [78]	FGNYVDY [84]	FGNYVDY [84]
SEQ ID NO: 22 的CDR序列 [SEQ ID NO在括号中]			
LCDR1	KNLLHSNGITY [79]	RSSKNLLHSNGITYLY [85]	KNLLHSNGITY [79]
LCDR2	QM [80]	QMSNLAS [86]	QM [80]
LCDR3	AQNLEIPRT [81]	AQNLEIPRT [81]	AQNLEIPRT [81]

[0619] 下表示出了根据IMGT规则和Kabat规则确定与SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26相关的CDR序列的结果,并且还示出了所确定的CDR序列的重叠。

SEQ ID NO: 25 的CDR序列[SEQ ID NO在括号中]			
	IMGT	Kabat	重叠
HCDR1	GGTFSSYA [2]	SYAIS [64]	SYA [74]
HCDR2	IIPIFGTA [3]	GIIPIFGTANYAQKFQG [65]	IIPIFGTA [3]
HCDR3	ARDPFLHY [4]	DPFLHY [66]	DPFLHY [66]
SEQ ID NO: 26 的CDR序列[SEQ ID NO在括号中]			
LCDR1	QSLLHSNGYNY [88]	RSSQSLLHSNGYNYLD [91]	QSLLHSNGYNY [88]
LCDR2	LG [89]	LGSNRAS [92]	LG [89]
LCDR3	MQALQTFT [90]	MQALQTFT [90]	MQALQTFT [90]

[0620]

[0621] 下表示出了根据IMGT规则和Kabat规则确定与SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28相关的CDR序列的结果,并且还示出了所确定的CDR序列的重叠。

SEQ ID NO: 27 的CDR序列[SEQ ID NO在括号中]			
	IMGT	Kabat	重叠
HCDR1	GGTFSSYA [2]	SYAIS [64]	SYA [74]
HCDR2	IVPIFGTA [93]	GIVPIFGTANYAQKFQG [96]	IVPIFGTA [93]
HCDR3	ARDPFLHY [4]	DPFLHY [66]	DPFLHY [66]
SEQ ID NO: 28 的CDR序列[SEQ ID NO在括号中]			
LCDR1	QSVSSSY [94]	RASQSVSSSYLA [97]	QSVSSSY [94]
LCDR2	GA [95]	GASSRAT [98]	GA [95]
LCDR3	AQGELYPRQ [8]	AQGELYPRQ [8]	AQGELYPRQ [8]

[0622]

[0623] 除非另有说明或与上下文相矛盾,否则本公开内容中关于恒定区中的氨基酸位置是根据EU编号的(Edelman et al.,Proc Natl Acad Sci USA.1969May;63(1):78-85;Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition.1991NIH Publication No.91-3242)。

[0624] 存在五种类型的哺乳动物免疫球蛋白重链,即α、δ、ε、γ和μ,其构成了不同种类的抗体,即IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。与可溶性免疫球蛋白的重链相反,膜或表面免疫球蛋白的重链在其羧基端包含跨膜结构域和短的胞质结构域。在哺乳动物中,有两种类型的轻链,即λ和κ。免疫球蛋白链包含可变区和恒定区。恒定区在免疫球蛋白的不同同种型内是基本上保守的,其中可变部分是高度多样化的并且负责抗原识别。

[0625] 术语“氨基酸”和“氨基酸残基”在本文中可互换使用,并且不应被理解为是限制性的。氨基酸是包含胺(-NH_2)和羧基(-COOH)官能团以及每个氨基酸特定的侧链(R基团)的有机化合物。在本公开内容的上下文中,氨基酸可基于结构和化学特征进行分类。因此,氨基

酸的类别可反映在下表中的一个或两个中：

[0626] 表2:基于R基团的结构和一般化学特征的主要分类

[0627]

类别	氨基酸
酸性残基	D 和 E
碱性残基	K、R 和 H
亲水性不带电荷的残基	S、T、N 和 Q
脂族不带电荷的残基	G、A、V、L 和 I
非极性不带电荷的残基	C、M 和 P

[0628]

芳族残基	F、Y 和 W

[0629] 表3:氨基酸残基的替代物理和功能分类

[0630]

类别	氨基酸
含残基的羟基	S 和 T
脂族残基	I、L、V 和 M
环烯基相关残基	F、H、W 和 Y
疏水性残基	A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、W 和 Y
带负电荷的残基	D 和 E
极性残基	C、D、E、H、K、N、Q、R、S 和 T
带正电荷的残基	H、K 和 R
小的残基	A、C、D、G、N、P、S、T 和 V
非常小的残基	A、G 和 S
涉及转角形成的残基	A、C、D、E、G、H、K、N、Q、R、S、P 和 T
柔性残基	Q、T、K、S、G、P、D、E 和 R

[0631] 出于本公开内容的目的,氨基酸序列(肽、蛋白质或多肽)的“变体”包含氨基酸插入变体、氨基酸添加变体、氨基酸缺失变体和/或氨基酸替换变体。术语“变体”包括所有突变体、剪接变体、翻译后修饰的变体、构象体、异构体、等位基因变体、物种变体和物种同源物,特别是天然存在的那些。术语“变体”特别地包括氨基酸序列的片段。

[0632] 氨基酸插入变体包含在特定氨基酸序列中插入单个或两个或更多个氨基酸。在具有插入的氨基酸序列变体的情况下,向氨基酸序列中的特定位点中插入一个或更多个氨基酸残基,但是随机插入并对所得产物进行合适的筛选也是可以的。

[0633] 氨基酸添加变体包括一个或更多个氨基酸(例如1、2、3、5、10、20、30、50或更多个氨基酸)的氨基端和/或羧基端融合。

[0634] 氨基酸缺失变体的特征在于从序列中除去一个或更多个氨基酸,例如,除去1、2、3、5、10、20、30、50或更多个氨基酸。所述缺失可在蛋白质的任何位置中。包含蛋白质N末端和/或C末端缺失的氨基酸缺失变体也称为N端和/或C端截短变体。

[0635] 氨基酸替换变体的特征在于序列中的至少一个残基被除去,并且在其位置插入另一残基。一个氨基酸对另一个氨基酸的替换可分类为保守或非保守替换。优先考虑的是修饰发生在氨基酸序列中在同源蛋白质或肽之间非保守的位置中和/或用具有相似特性的另一些氨基酸来替换氨基酸。优选地,肽和蛋白质变体中的氨基酸变化为保守氨基酸变化,即,替换带有类似的电荷或不带电荷的氨基酸。保守氨基酸变化涉及其侧链相关的氨基酸家族之一的替换。在本公开内容的上下文中,“保守替换”是一个氨基酸被另一个具有相似结构和/或化学特征的氨基酸替换,一个氨基酸残基对另一个如上述两个表中的任一个所限定的相同种类的氨基酸残基的这样的替换:例如,亮氨酸可以被异亮氨酸替换,因为它们二者都是脂族的、分支的疏水物。类似地,天冬氨酸可以被谷氨酸替换,因为它们二者都是小的带负电荷的残基。天然存在的氨基酸一般可分为四个家族:酸性氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸)、碱性氨基酸(赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、非极性氨基酸(丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)和不带电荷的极性氨基酸(甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸)。苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸有时一起被归类为芳族氨基酸。在一个实施方案中,保守氨基酸替换包括以下组内的替换:

[0636] -甘氨酸、丙氨酸;

[0637] -缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸;

[0638] -天冬氨酸、谷氨酸;

[0639] -天冬酰胺、谷氨酰胺;

[0640] -丝氨酸、苏氨酸;

[0641] -赖氨酸、精氨酸;以及

[0642] -苯丙氨酸、酪氨酸。

[0643] 本文中使用的术语“对应于……的位置的氨基酸”和类似的表述是指人IgG1重链中的氨基酸位置编号。通过与人IgG1比对,可发现其他免疫球蛋白中相应的氨基酸位置。因此,一个序列中“对应于”另一序列中的氨基酸或区段的氨基酸或区段是使用标准序列比对程序(例如通常默认设置的ALIGN、ClustalW或类似程序)与另一氨基酸或区段比对,并且与人IgG1重链具有至少50%、至少80%、至少90%或至少95%同一性的氨基酸或区段。如何比对序列或序列中的区段并由此确定序列中与根据本公开内容的氨基酸位置相对应的位置在本领域中被认为是公知的。

[0644] 本公开内容的上下文中的术语“抗体”(antibody,Ab)是指免疫球蛋白分子、免疫球蛋白分子的片段或其任一种的衍生物,其具有通常在生理条件下与抗原(特别是抗原上的表位)特异性结合的能力,优选地具有显著时段的半衰期,所述时段例如至少约30分钟、至少约45分钟、至少约一小时、至少约两小时、至少约四小时、至少约8小时、至少约12小时、约24小时或更多、约48小时或更多,约3、4、5、6、7或更多天等,或者任意其他相关的在功能上限定的时期(例如足以诱导、促进、增强、和/或调节与和抗原结合的抗体相关的生理应答的时间和/或足以使抗体募集效应物活性的时间)。特别地,术语“抗体”是指包含通过二硫键相互连接的至少两条重(heavy,H)链和两条轻(light,L)链的糖蛋白。术语“抗体”包括单

克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体以及前述任意的组合。每条重链包含重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)。每条轻链包含轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)。可变区和恒定区在本文中也分别称为可变结构域和恒定结构域。VH和VL区可进一步细分成称为互补决定区(CDR)的高变区,散布有称为框架区(FR)的更保守的区域。每个VH和VL由从氨基端至羧基端按以下顺序排列的三个CDR和四个FR构成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。VH的CDR称为HCDR1、HCDR2和HCDR3(或CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3),VL的CDR称为LCDR1、LCDR2和LCDR3(或CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3)。重链和轻链可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区包含重链恒定区(CH)和轻链恒定区(CL),其中CH可以进一步细分成恒定结构域CH1、铰链区以及恒定结构域CH2和CH3(从氨基端到羧基端按以下顺序排列:CH1、CH2、CH3)。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的多种细胞(例如,效应细胞)和补体系统的组分例如C1q。抗体可以是来源于天然来源或重组来源的完整免疫球蛋白,并且可以是完整免疫球蛋白的免疫活性部分。抗体通常是免疫球蛋白分子的四聚体。抗体可以以多种形式存在,包括例如多克隆抗体、单克隆抗体、Fv、Fab和$F(ab)_2$,以及单链抗体和人源化抗体。

[0645] 免疫球蛋白分子的重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。术语“结合区”和“抗原结合区”在本文中可互换使用,并且是指与抗原相互作用并且包含VH区和VL区二者的区域。本文中使用的抗体不仅包括单特异性抗体,而且还包括多特异性抗体,其包括多个,例如两个或更多个,例如三个或更多个不同的抗原结合区。

[0646] 如上所述,除非另有说明或与上下文明显矛盾,否则本文中的术语抗体包括是抗原结合片段的抗体片段,即保留与抗原特异性结合的能力的抗体片段。已表明,抗体的抗原结合功能可通过全长抗体的片段来进行。涵盖在术语“抗体”内的抗原结合片段的一些实例包括(i)Fab’或Fab片段,其由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段,或如WO 2007/059782(Genmab)中所述的单价抗体;(ii)$F(ab')_2$片段,其包含通过铰链区的二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)基本上由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv)基本上由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段,(v)dAb片段(Ward et al.,Nature 341,544-546(1989)),其基本上由VH结构域组成并且也称为结构域抗体(Holt et al;Trends Biotechnol.2003Nov;21(11):484-90);(vi)骆驼科或纳米抗体分子(Revets et al;Expert Opin Biol Ther.2005Jan;5(1):111-24)和(vii)分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由分开的基因编码,但它们可使用重组方法通过合成接头连接起来,使得它们能够成为单蛋白质链,其中VL和VH区配对形成单价分子(称为单链抗体或单链Fv(single chain Fv,scFv),参见例如Bird et al.,Science 242,423-426(1988)和Huston et al.,PNAS USA 85,5879-5883(1988))。除非另有说明或上下文明确指出,否则这样的单链抗体涵盖在术语抗体之内。尽管这样的片段通常被包括在抗体的含义之内,但是它们共同且各自独立地是本公开内容的独特特征,表现出不同的生物学特性和效用。在本公开内容情况下的这些和其他可用的抗体片段以及这样的片段的双特异性形式在本文中进一步讨论。还应理解,除非另有指明,否则术语抗体还包括多克隆抗体、单克隆抗体(monoclonal antibodie,mAb)、抗体样多肽,例如嵌合抗体和人源化抗体,以及通过任意已知技术(例如酶切割、肽合成和重组技术)提供的保留与抗原特异性结合的能力的抗体片段(抗原结合片段)。

[0647] 如此产生的抗体可具有任意同种型。本文中使用的术语“同种型”是指由重链恒定区基因编码的免疫球蛋白类别(例如IgG(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgD、IgA(例如IgA1、IgA2)、IgE、IgM或IgY)。当本文中提及特定同种型例如IgG1时,该术语不限于特定同种型序列例如特定IgG1序列,而是用于指示抗体在序列上更接近该同种型例如IgG1而不是其他同种型。因此,例如本文中公开的IgG1抗体可以是天然存在的IgG1抗体的序列变体,包括恒定区中的变体。

[0648] IgG1抗体可以以称为同种异型的多种多态性变体存在(综述于Jefferis and Lefranc 2009.mAbs Vol 1Issue 4 1-7中),其中的任一种都适用于本文中的一些实施方案。人群中常见的同种异型变体是由字母a、f、n、z或其组合命名的那些。在本文中的任一实施方案中,抗体可包含含有人IgG Fc区的重链Fc区。在另一些实施方案中,人IgG Fc区包含人IgG1。

[0649] 本公开内容的上下文中的术语“多特异性抗体”是指具有至少两个由不同抗体序列限定的不同抗原结合区的抗体。在一些实施方案中,所述不同的抗原结合区结合相同抗原上的不同表位。然而,在一些优选实施方案中,所述不同的抗原结合区结合不同的靶抗原。在一个实施方案中,所述多特异性抗体是“双特异性抗体”或“bs”。多特异性抗体,例如双特异性抗体可以是任何形式,包括下文中所述的任何双特异性或多特异性抗体形式。

[0650] 对于双特异性抗体,前缀BisG1和bsIgG1在本文中可互换使用。

[0651] 当在抗体的上下文中使用时,术语“全长”表示抗体不是片段,而是包含特定同种型的通常在自然界中发现的该同种型的所有结构域,例如IgG1抗体的VH、CH1、CH2、CH3、铰链、VL和CL结构域。

[0652] 本文中使用的术语“人抗体”旨在包括具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和框架区的抗体和具有人免疫球蛋白恒定结构域的抗体。本文中公开的人抗体可包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机诱变或位点特异性诱变或者通过体内体细胞突变引入的突变、插入或缺失)。然而,本文中使用的术语“人抗体”并不旨在包括其中来源于另一非人物种(例如小鼠)种系的CDR序列已接枝到人框架序列上的抗体。

[0653] 本文中使用的术语“嵌合抗体”是指其中可变区来源于非人物种(例如,来源于啮齿动物)并且恒定区来源于不同物种例如人的抗体。嵌合抗体可通过抗体工程来产生。“抗体工程”是一般用于不同种类的抗体修饰的术语,并且抗体工程的方法是技术人员公知的。特别地,嵌合抗体可通过使用如在Sambrook et al.,1989,Molecular Cloning:Alaboratory Manual,New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,Ch.15中所述的标准DNA技术来产生。因此,嵌合抗体可以是经遗传改造或经酶改造的重组抗体。产生嵌合抗体在技术人员的知识范围内,并因此,嵌合抗体的产生可通过除本文中所述那些之外的其他方法来进行。开发了用于人中治疗性应用的嵌合单克隆抗体,以降低非人抗体(例如啮齿动物抗体)的预期抗体免疫原性。它们通常可包含对目的抗原具有特异性的非人(例如鼠或兔)可变区,以及人恒定抗体重链和轻链结构域。在嵌合抗体的情况下使用的术语“可变区”或“可变结构域”是指包含免疫球蛋白的重链和轻链二者的CDR和框架区的区域,如下所述。

[0654] 本文中使用的术语“人源化抗体”是指经遗传改造的非人抗体,其包含人抗体恒定

结构域和被修饰以与人可变结构域具有高水平序列同源性的非人可变结构域。这可通过将一起形成抗原结合位点的六个非人抗体互补决定区(CDR)接枝到同源人接纳体框架区(FR)上来实现(参见WO 92/22653和EP 0 629 240)。为了完全重构亲本抗体的结合亲和力和特异性,可需要将来自亲本抗体(即非人抗体)的框架残基替换成人框架区(回复突变)。结构同源性建模可帮助鉴定框架区中对于抗体的结合特性重要的氨基酸残基。因此,人源化抗体可包含非人CDR序列、任选地包含针对非人氨基酸序列的一个或更多个氨基酸回复突变的主要人框架区,以及完全人恒定区。任选地,可应用不一定是回复突变的另外的氨基酸修饰以获得具有优选特征例如亲和力和生物化学特性的人源化抗体。

[0655] 本文中使用的“来源于”另一种蛋白质的蛋白质(例如亲本蛋白质)意指该蛋白质的一个或更多个氨基酸序列与另一种蛋白质或亲本蛋白质中的一个或更多个氨基酸序列相同或相似。例如,在来源于另一种抗体或亲本抗体、结合臂、抗原结合区或恒定区的抗体、结合臂、抗原结合区或恒定区等中,一个或更多个氨基酸序列与另一种抗体或亲本抗体、结合臂、抗原结合区或恒定区的氨基酸序列相同或相似。这样的一个或更多个氨基酸序列的一些实例包括但不限于VH和VL CDR和/或一个或更多个或所有框架区、VH、VL、CL、铰链或CH区的那些。例如,人源化抗体在本文中可被描述为“来源于”非人亲本抗体,其意味着至少VL和VH CDR序列与所述非人亲本抗体的VH和VL CDR序列相同或相似。嵌合抗体在本文中可被描述为“来源于”非人亲本抗体,其意味着通常VH和VL序列可与非人亲本抗体的VH和VL序列相同或相似。另一个实例是结合臂或抗原结合区,其在本文中可被描述为“来源于”特定的亲本抗体,意味着所述结合臂或抗原结合区通常包含与所述亲本抗体的结合臂或抗原结合区相同或相似的VH和/或VL CDR,或者VH和/或VL序列。然而,如本文中其他地方所述,可在CDR、恒定区或抗体中的其他地方、结合臂、抗原结合区等进行氨基酸修饰(例如突变)以引入期望的特征。当用于在来源于第一蛋白质或亲本蛋白质的一个或更多个序列的情况中时,“相似”氨基酸序列优选具有至少约50%,例如至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、或至少约97%、98%或99%的序列同一性。

[0656] 非人抗体可以在许多不同物种(例如小鼠、兔、鸡、豚鼠、美洲驼(llama)和山羊)中产生。

[0657] 单克隆抗体可通过多种技术产生,所述技术包括常规的单克隆抗体法,例如Kohler and Milstein,Nature 256:495(1975)的标准体细胞杂交技术。可使用其他用于产生单克隆抗体的技术,例如,B淋巴细胞的病毒或致癌转化或使用抗体基因文库的噬菌体展示技术,并且这样的方法是本领域技术人员公知的。

[0658] 在这样的非人物种中的杂交瘤产生是非常广泛认可的操作。用于分离经免疫接种动物/非人物种的脾细胞以进行融合的免疫接种方案和技术是本领域已知的。融合配偶体(例如,鼠骨髓瘤细胞)和融合方案也是已知的。

[0659] 当在本文中使用时,除非与上下文相矛盾,否则术语“Fab臂”或“臂”是指一个重链-轻链对,并且在本文中其与“半分子”可互换使用。

[0660] 术语“包含抗原结合区的结合臂”意指包含抗原结合区的抗体分子或片段。因此,结合臂可包含例如六个VH和VL CDR序列、VH和VL序列、Fab或Fab’片段或Fab臂。

[0661] 当在本文中使用时,除非与上下文相矛盾,否则术语“Fc区”是指由免疫球蛋白重链的两个Fc序列组成的抗体区,其中所述Fc序列至少包含铰链区、CH2结构域和CH3结构域。

在一个实施方案中,本文中使用的术语“Fc区”是指在从抗体的N-末端到C-末端的方向上包含至少铰链区、CH2区和CH3区的区域。抗体的Fc区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的多种细胞(例如效应细胞)和补体系统的组分。

[0662] 在本公开内容的上下文中,与抗体(包括多特异性抗体)相关使用的术语“诱导Fc介导的效应物功能的程度较低”意味着与包含(i)与所述抗体相同的CDR序列,特别是包含相同的第一抗原结合区和第二抗原结合区,和(ii)包含人IgG1铰链区,CH2区和CH3区的两条重链的人IgG1抗体相比,所述抗体诱导Fc介导的效应物功能的程度较低,这样的功能特别地选自IgG Fc受体(FcgammaR,Fcγ R)结合、C1q结合、ADCC或CDC的列表。

[0663] Fc介导的效应物功能可通过与Fcγ R结合、与C1q结合或者经由Fcγ R诱导Fc介导的交联来测量。

[0664] 本文中使用的术语“铰链区”是指免疫球蛋白重链的铰链区。因此,例如人IgG1抗体的铰链区对应于根据Kabat中所述EU编号(Kabat,E.A.etal.,Sequences of proteins of immunological interest.5th Edition-US Department of Health and Human Services,NIH publication No.91-3242,pp662,680,689(1991))的第216至230位氨基酸。然而,铰链区也可以是本文中所述的任何其他亚型。

[0665] 本文中使用的术语“CH1区”或“CH1结构域”是指免疫球蛋白重链的CH1区。因此,例如,人IgG1抗体的CH1区对应于根据如Kabat中所述的EU编号(同上)的第118至215位氨基酸。然而,CH1区也可以是如本文中所述的任何其他亚型。

[0666] 本文中使用的术语“CH2区”或“CH2结构域”是指免疫球蛋白重链的CH2区。因此,例如,人IgG1抗体的CH2区对应于根据如Kabat中所述的EU编号(同上)的第231至340位氨基酸。然而,CH2区也可以是如本文中所述的任何其他亚型。

[0667] 本文中使用的术语“CH3区”或“CH3结构域”是指免疫球蛋白重链的CH3区。因此,例如,人IgG1抗体的CH3区对应于根据如Kabat中所述的EU编号(同上)的第341至447位氨基酸。然而,CH3区也可以是如本文中所述的任何其他亚型。

[0668] 在本公开内容的上下文中,术语“单价抗体”意指抗体分子能够结合单个抗原分子,并因此不能够交联抗原。

[0669] “EpCAM抗体”或“抗EpCAM抗体”是如上所述的抗体,其与抗原EpCAM特异性结合。

[0670] “CD137抗体”或“抗CD137抗体”是如上所述的抗体,其与抗原CD137特异性结合。

[0671] “EpCAMxCD137抗体”或“抗EpCAMxCD137抗体”是双特异性抗体,其包含两个不同的抗原结合区,其中一个与抗原EpCAM特异性结合,并且另一个与抗原CD137特异性结合。

[0672] 本文中使用的术语“生物仿制药”(例如,经批准的参考产物/生物药物的生物仿制药)是指基于来自以下数据的与参考产物类似的生物产物:(a)分析研究,其表明虽然临床上无活性的组分具有微小差异,但是生物产物与参考产物高度类似;(b)动物研究(包括毒性评估);和/或者(c)一个或更多个临床研究(包括对免疫原性和药代动力学或药效学的评估),其足以表明在参考产物已获得批准并打算使用以及正在寻求批准的一个或更多个适当的使用条件下的安全性、纯度和效力(例如,在产物的安全性、纯度和效力方面,生物产物与参考产物之间没有临床意义上的差异)。在一些实施方案中,生物仿制药生物产物和参考产物针对提出的标签中规定、推荐或建议的一种或更多种使用条件采用相同的一种或更多种作用机制,但是仅在对于参考产物已知的一种或更多种作用机制的程度上。在一些实施

方案中,针对生物产物提出的标签中规定、推荐或建议的一种或更多种使用条件先前已被批准用于参考产物。在一些实施方案中,生物产物的施用途径、剂型和/或强度与参考产物的那些相同。生物仿制药可以是例如目前已知的与市售抗体具有相同的一级氨基酸序列的抗体,但可以在不同的细胞类型中或通过不同的产生、纯化或配制方法进行制备。

[0673] 本文中使用的术语“结合”或“能够结合”在抗体与预定抗原或表位结合的上下文中,通常是当使用生物层干涉术(bio-layer interferometry,BLI)确定时,或者例如当使用表面等离子体共振(surface plasmon resonance,SPR)技术在BIAcore 3000仪器中使用抗原作为配体并且抗体作为分析物确定时,以对应于以下的K_D的亲和力结合:约10^{-7}M或更小,例如约10^{-8}M或更小、例如约10^{-9}M或更小、约10^{-10}M或更小、或者约10^{-11}M或甚至更小。抗体以对应于以下的K_D的亲和力与预定抗原结合:与其与除预定抗原或紧密相关抗原之外的非特异性抗原(例如BSA、酪蛋白)结合的K_D相比为至少10倍低,例如至少100倍低,例如至少1,000倍低,例如至少10,000倍低,例如至少100,000倍低。亲和力高出的量取决于抗体的K_D,因此当抗体的K_D非常低(即,抗体高度特异性)时,则针对抗原的亲和力低于针对非特异性抗原的亲和力的程度可以是至少10,000倍。

[0674] 本文中使用的术语“k_d”(秒$^{-1}$)是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率常数。所述值也称为k_{off}值。

[0675] 本文中使用的术语“K_D”(M)是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。

[0676] 如果两种抗体与相同的抗原和相同的表位结合,则它们具有“相同的特异性”。待测抗体是否与某种抗原结合抗体识别相同的表位,即抗体是否与相同的表位结合,可通过本领域技术人员公知的不同方法进行测试。

[0677] 可通过交叉阻断测定来检测抗体之间的竞争。例如,竞争性ELISA测定可用作交叉阻断测定。例如,可将靶抗原包被在微量滴定板的孔上,并且可添加抗原结合抗体和候选竞争测试抗体。与孔中的抗原结合的抗原结合抗体的量与和其竞争与相同表位结合的候选竞争测试抗体的结合能力间接相关。具体地,候选竞争性测试抗体对相同表位的亲和力越大,则与抗原包被孔结合的抗原结合抗体的量就越小。与孔结合的抗原结合抗体的量可通过用可检测或可测量的标记物质标记抗体来测量。

[0678] 与另一种抗体(例如包含如本文中所述的重链和轻链可变区的抗体)竞争与抗原结合的抗体,或对另一种抗体(例如包含如本文中所述的重链和轻链可变区的抗体)的抗原具有特异性的抗体可以是包含如本文中所述的所述重链和/或轻链可变区的变体(例如如本文中所述的CDR中的修饰和/或一定程度的同一性)的抗体。

[0679] 本文中使用的“分离的多特异性抗体”旨在是指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的多特异性抗体(例如,与EpCAM和CD137特异性结合的分离的双特异性抗体,其基本上不含与EpCAM或CD137特异性结合的单特异性抗体)。

[0680] 本文中使用的术语“单克隆抗体”是指单一分子组成的抗体分子的制备物(preparation)。单克隆抗体组合物显示出对特定表位的单一的结合特异性和亲和力。

[0681] 当在本文中使用时,术语“第一CH3区与第二CH3区之间的异二聚体相互作用”是指在第一CH3/第二CH3异二聚体抗体中的第一CH3区与第二CH3区之间的相互作用。

[0682] 当在本文中使用时,术语“第一CH3区与第二CH3区的同二聚体相互作用”是指在第一CH3/第一CH3同二聚体抗体中的第一CH3区与另一个第一CH3区之间的相互作用以及在第

二CH3/第二CH3同二聚体抗体中的第二CH3区与另一个第二CH3区之间的相互作用。

[0683] 当在本文中使用时,术语“同二聚体抗体”是指包含两个第一Fab臂或半分子的抗体,其中所述Fab臂或半分子的氨基酸序列是相同的。

[0684] 当在本文中使用时,术语“异二聚体抗体”是指包含第一和第二Fab臂或半分子的抗体,其中所述第一和第二Fab臂或半分子的氨基酸序列是不同的。特别地,CH3区或抗原结合区,或者CH3区与所述第一Fab臂/半分子和第二Fab臂/半分子的抗原结合区是不同的。

[0685] 术语“还原条件”或“还原环境”是指这样的条件或环境,在其中底物(例如抗体铰链区中的半胱氨酸残基),更可能被还原而不是被氧化。

[0686] 本公开内容还描述了多特异性抗体(例如双特异性抗体),其包含实施例的双特异性抗体的VL区、VH区、或者一个或更多个CDR的功能性变体。在双特异性抗体的情况下,使用的VL、VH或CDR的功能性变体仍然允许双特异性抗体的每个抗原结合区保留亲本双特异性抗体的至少相当大比例(至少约50％、60％、70％、80％、90％、95％或更多)的亲和力和/或特异性/选择性,并且在一些情况下,这样的双特异性抗体可比亲本双特异性抗体具有更大的亲和力、选择性和/或特异性。

[0687] 这样的功能性变体通常保留与亲本双特异性抗体的显著序列同一性。两个序列之间的同一性百分比是序列共有的相同位置的数目的函数(即,同源性％＝相同位置的#/位置的总#×100),考虑到空位的数目和每个空位的长度,空位需要引入以实现两个序列的最佳比对。两个核苷酸或氨基酸序列之间的百分比同一性可例如使用已并入到ALIGN程序(版本2.0)中的E.Meyers和W.Miller,Comput.Appl.Biosci 4,11-17(1988)的算法,使用PAM120权重残基表(weight residue table)、为12的空位长度罚分以及为4的空位罚分来确定。另外,两个氨基酸序列之间的百分比同一性可使用Needleman and Wunsch,J.Mol.Biol.48,444-453(1970)算法来确定。

[0688] 在本公开内容的上下文中,除非另有说明,否则以下符号用于描述突变:i)在给定位置的氨基酸替换被写为例如K409R,这意指在蛋白质第409位的赖氨酸被精氨酸替换;和ii)对于特定变体,使用特定的三字母代码或单字母代码,包括代码Xaa和X以表示任何氨基酸残基。因此,在第409位用精氨酸替换赖氨酸被命名为:K409R,并且在第409位用任何氨基酸残基替换赖氨酸被命名为K409X。第409位赖氨酸缺失的情况用K409*表示。

[0689] 示例性变体包括主要通过保守替换而与亲本序列的VH和/或VL和/或CDR不同的变体;例如,变体中的12个,例如11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个替换是保守氨基酸残基替代。

[0690] 在本公开内容的上下文中,保守替换可被限定为氨基酸类别内的替换,如表2和3中所限定的。

[0691] 本文中所述抗体序列(例如VL区或VH区)的功能性变体或与本文中所述抗体序列(例如VL区或VH区)具有一定程度同源性或同一性的抗体序列优选地在非CDR序列中包含修饰或变异,而CDR序列优选地保持不变。

[0692] 本文中使用的术语“EpCAM”是指上皮细胞黏附分子,也被称为DIAR5、EGP-2、EGP314、EGP40、ESA、HNPCC8、KS1/4、KSA、M4S1、MIC18、MK-1、TACSTD1、TROP1、BerEp4、MOC-31、Ber-Ep4。EpCAM被认为具有许多不同的作用,并且显示在细胞黏附和癌症中发挥作用。在一个实施方案中,EpCAM是人EpCAM,其具有UniProt登录号P16422。人EpCAM的序列也在SEQ ID NO:59中示出。SEQ ID NO:59的第1至23位的氨基酸对应于人EpCAM的信号肽;而SEQ

ID NO:59的第24至265位的氨基酸对应于人EpCAM的胞外结构域;和蛋白质的其余部分,即来自SEQ ID NO:59的第266至288位和第289至314位的氨基酸分别是跨膜结构域和胞质结构域。

[0693] 本文使用的术语“CD137”是指CD137(4-1BB),也称为肿瘤坏死因子受体超家族成员9(tumor necrosis factor receptor superfamily member 9,TNFRSF9),其是配体TNFSF9/4-1BBL的受体。CD137(4-1BB)被认为参与T细胞活化。CD137的其他同义词包括但不限于4-1BB配体受体、CDw137、T细胞抗原4-1BB同源物和T细胞抗原ILA。在一个实施方案中,CD137(4-1BB)是人CD137(4-1BB),其具有UniProt登录号Q07011。人CD137的序列也在SEQ ID NO:37中示出。SEQ ID NO:37的第1至23位的氨基酸对应于人CD137的信号肽;而SEQ ID NO:37的第24至186位的氨基酸对应于人CD137的胞外结构域;和蛋白质的其余部分,即来自SEQ ID NO:37的第187至213位和第214至255位的氨基酸分别是跨膜结构域和胞质结构域。

[0694] “治疗周期”在本文中被定义为在因结合剂的药效学而增加的单独剂量的结合剂的影响范围内的时间段,或者换言之,是对象机体内所施用的结合剂基本上清除之后的时间段。在小的时间窗内(例如在2至24数小时内,例如2至12小时或在同一天)的多次小剂量可能等于较大的单次剂量。

[0695] 在本发明上下文中,术语“治疗”及其变化形式或“治疗性干预”涉及出于对抗病症(例如疾病或障碍)的目的对对象的管理和护理。该术语旨在包括针对对象所遭受的给定病症的全谱治疗,例如施用治疗有效的化合物以减轻症状或并发症,延缓疾病、障碍或病症的进展,减轻或缓解症状和并发症,和/或治愈或消除疾病、障碍或病症以及预防病症,其中预防应理解为出于对抗疾病、病症或障碍目的的对个体的管理和护理,并且包括施用活性化合物以防止症状或并发症的发作。在一个实施方案中,“治疗”是指出于减轻、改善、阻止、或根除(治愈)症状或疾病状态的目的,施用有效量的本公开内容的治疗活性结合剂,例如治疗活性抗体。

[0696] 对治疗的响应以及对用本公开内容的结合剂治疗的抗性、无响应和/或复发可根据实体瘤响应评价标准1.1版本(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors version 1.1,RECIST Criteria v1.1)来确定。

[0697] “最佳总体响应”是从治疗开始直至疾病进展/复发记录的最佳响应(自治疗开始以来所记录的最小测量值将用作PD的参考)。具有CR或PR的对象被认为是客观响应。具有CR、PR或SD的对象被认为处于疾病控制中。具有NE的对象被视为无响应者。最佳总体响应是从治疗开始直至疾病进展/复发记录的最佳响应(自治疗开始以来所记录的最小测量值将用作PD的参考)。具有CR、PR或SD的对象被认为处于疾病控制中。具有NE的对象被视为无响应者。

[0698] “响应持续时间(duration of response,DOR)”仅适用于所确认最佳总响应为CR或PR的对象,并且其被定义为从第一次记录客观肿瘤响应(CR或PR)到第一次PD或者到因潜在癌症死亡的日期的时间。

[0699] “无进展存活(progression-free survival,PFS)”被定义为从第1周期的第1天到第一次记录的进展或者到因任何原因而导致死亡的天数。

[0700] “总存活(overall survival,OS)”被定义为从第1周期第1天到因任何原因而导致死亡的天数。如果不知道对象已经死亡,那么将在已知对象存活的最晚日期(截止日期当天

或之前)删失OS。

[0701] 在本公开内容的上下文中,术语“治疗方案”是指旨在改善和保持健康的结构化治疗计划。

[0702] 术语“有效量”或“治疗有效量”是指在所需的剂量下和时段内有效实现所期望治疗结果的量。结合剂(例如抗体,如多特异性抗体或单克隆抗体)的治疗有效量可根据个体因素(例如疾病状态、年龄、性别和体重)以及结合剂在个体中引发期望响应的能力而变化。治疗有效量也是其中结合剂或其片段的任何毒性或有害作用被治疗有益作用超过的量。在初始剂量下患者中的反应不充分的情况下,可使用更高的剂量(或通过不同的、更局部的施用途径实现有效地更高的剂量)。在一定剂量的患者出现不期望的副作用的情况下,可使用更低的剂量(或通过不同的、更局部的施用途径实现有效地更低的剂量)。

[0703] 本文中使用的术语“癌症”包括以异常调节的细胞生长、增殖、分化、黏附和/或迁移为特征的疾病。“癌细胞”意指通过迅速、不受控制的细胞增殖而生长并且在引发新生长的刺激停止之后继续生长的异常细胞。

[0704] 根据本公开内容的术语“癌症”还包括癌症转移。“转移”意指癌细胞从其原始部位扩散到机体的其他部分。转移的形成是很复杂的过程,并且取决于恶性细胞从原发性肿瘤脱离,侵袭胞外基质,渗透内皮基底膜以进入体腔和血管,并然后在通过血液转运之后浸润靶器官。最终,在靶位点的新肿瘤,即继发肿瘤或转移性肿瘤的生长取决于血管生成。甚至在去除原发性肿瘤之后,也经常发生肿瘤转移,这是因为肿瘤细胞或组分可能保留并产生转移潜力。在一个实施方案中,根据本公开内容的术语“转移”涉及“远端转移”,其涉及远离原发性肿瘤和局部淋巴结系统的转移。

[0705] 本文中使用的术语例如“降低”、“抑制”、“干扰”和“负调节”意指引起水平总体降低例如约5%或更多、约10%或更多、约15%或更多、约20%或更多、约25%或更多、约30%或更多、约40%或更多、约50%或更多或者约75%或更多的能力。术语“抑制”或类似短语包括完全抑制或基本上完全抑制,即降低至零或基本上降低至零。

[0706] 在一个实施方案中,术语例如“提高”或“增强”涉及提高或增强至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约80%,或至少约100%。

[0707] 本文中使用的“生理pH”是指为7.5或约7.5的pH。

[0708] 本公开内容中使用的“重量%”是指重量百分比,其是测量物质量(以克(g)计)的浓度单位,表示为总组合物总重量(以克(g)计)的百分比。

[0709] 术语“冷冻”涉及液体的固化,通常伴随着热量的去除。

[0710] 术语“冻干”及其变化形式是指通过将物质冷冻并随后降低周围压力(例如,低于15Pa,例如低于10Pa、低于5Pa或1Pa或更低)以使物质中的冷冻介质直接从固相升华至气相而进行的物质的冷冻干燥。因此,术语“冻干(lyophilizing)”和“冷冻干燥(freeze-drying)”在本文中可互换使用。

[0711] 在本公开内容的上下文中的术语“重组”意指“通过遗传改造制备的”。在一个实施方案中,在本公开内容的上下文中的“重组物体”不是天然存在的。

[0712] 本文中使用的术语“天然存在的”是指物体可在自然界中存在的事实。例如,存在于生物体(包括病毒)中并且可从天然来源中分离且没有在实验室中被人故意修饰的肽或核酸是天然存在的。术语“在自然界中存在”意指“存在于自然界中”并且包括已知的物体以

及尚未从自然界发现和/或分离但可在将来从天然来源中发现和/或分离的物体。

[0713] 根据本公开内容,术语“肽”包含寡肽和多肽,并且是指包含通过肽键彼此连接的约两个或更多个、约3个或更多个、约4个或更多个、约6个或更多个、约8个或更多个、约10个或更多个、约13个或更多个、约16个或更多个、约20个或更多个,并且最高约50个、约100个、或约150个连续氨基酸的物质。术语“蛋白质”是指大肽,特别是具有至少约151个氨基酸的肽,但是术语“肽”和“蛋白质”在本文中通常作为同义词使用。

[0714] “治疗性蛋白质”当以治疗有效量向对象提供时,对该对象的病症或疾病状态具有积极或有利作用。在一个实施方案中,治疗性蛋白质具有治愈性或姑息治疗性(palliative)特性并且可被施用以改善、缓解、减轻、逆转疾病或障碍、延迟疾病或障碍发作,或者减轻疾病或障碍的一种或更多种症状的严重程度。治疗性蛋白质可以具有预防特性,并且可用于延迟疾病发作或减轻这样的疾病或病理状况的严重程度。术语“治疗性蛋白质”包括完整的蛋白质或肽,并且也可指其治疗活性片段。其还可包括蛋白质的治疗活性变体。治疗活性蛋白质的一些实例包括但不限于用于疫苗接种的抗原以及免疫刺激剂(例如细胞因子)。

[0715] 术语“部分(portion)”是指小部分(fraction)。对于特定结构例如氨基酸序列或蛋白质,术语其“部分”可指所述结构的连续或不连续小部分。

[0716] 术语“部分(part)”和“片段”在本文中可互换使用,并且是指连续元件。例如,结构(例如氨基酸序列或蛋白质)的部分是指所述结构的连续元件。当在组合物的上下文中使用时,术语“部分”意指组合物的一部分。例如,组合物的一部分可以是所述组合物的0.1%至99.9%(例如0.1%、0.5%、1%、5%、10%、50%、90%或99%)的任何部分。

[0717] 当提及氨基酸序列(肽或蛋白质)时,“片段”涉及氨基酸序列的一部分,即表示在N端和/或C端缩短的氨基酸序列的序列。在C端缩短的片段(N端片段)可例如通过翻译缺少开放阅读框的3’末端之截短的开放阅读框来获得。在N端缩短的片段(C端片段)可例如通过翻译缺少开放阅读框的5’末端之截短的开放阅读框来获得,只要截短的开放阅读框包含用于起始翻译的起始密码子即可。氨基酸序列的片段包含来自氨基酸序列的例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%的氨基酸残基。氨基酸序列的片段优选地包含来自氨基酸序列的至少6个、特别地至少8个、至少12个、至少15个、至少20个、至少30个、至少50个或至少100个连续氨基酸。

[0718] 根据本公开内容,肽或蛋白质的一部分或片段优选地具有其所来源的肽或蛋白质的至少一种功能特性。这样的功能特性包括药理活性、与其他肽或蛋白质的相互作用、酶活性、与抗体的相互作用以及核酸的选择性结合。例如,肽或蛋白质的药理活性片段具有片段所来源的肽或蛋白质的至少一种药理活性。肽或蛋白质的一部分或片段优选地包含肽或蛋白质的至少6个,特别是至少8个、至少10个、至少12个、至少15个、至少20个、至少30个或至少50个连续氨基酸的序列。肽或蛋白质的一部分或片段优选地包含肽或蛋白质的最高8个,特别是最高10个、最高12个、最高15个、最高20个、最高30个或最高55个连续氨基酸的序列。

[0719] 本文中的“变体”意指由于至少一个氨基酸修饰而不同于亲本氨基酸序列的氨基酸序列。亲本氨基酸序列可以是天然存在的或野生型(wild type,WT)氨基酸序列,或者可以是野生型氨基酸序列的经修饰形式。优选地,变体氨基酸序列与亲本氨基酸序列相比具有至少一个氨基酸修饰,例如与亲本相比,具有1至约20个氨基酸修饰,并且优选1至约10个

或者1至约5个氨基酸修饰。

[0720] 本文中的“野生型”或“WT”或“天然的”意指在自然界中存在的氨基酸序列,包括等位基因变异。野生型氨基酸序列、肽或蛋白质具有未经有意修饰的氨基酸序列。

[0721] 优选地,给定氨基酸序列与作为所述给定氨基酸序列的变体的氨基酸序列之间的相似性(优选同一性)程度将为至少约60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。优选地针对为参考氨基酸序列的全长的至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或约100%的氨基酸区域给出相似性或同一性的程度。例如,如果参考氨基酸序列由200个氨基酸组成,则相似性或同一性的程度优选地针对至少约20个、至少约40个、至少约60个、至少约80个、至少约100个、至少约120个、至少约140个、至少约160个、至少约180个或约200个氨基酸(在一些实施方案中为连续氨基酸)给出。在一些实施方案中,相似性或同一性的程度针对参考氨基酸序列的全长给出。可用本领域已知的工具进行确定序列相似性(优选序列同一性)的比对,优选地使用最佳序列比对,例如,使用Align,使用标准设定,优选EMBOSS::needle,矩阵:Blosum62,空位开放(Gap Open)10.0,空位延伸(Gap Extend)0.5来进行。

[0722] “序列相似性”表示相同的或代表保守氨基酸替换的氨基酸的百分比。两个氨基酸序列之间的“序列同一性”表示所述序列之间相同的氨基酸的百分比。两个核酸序列之间的“序列同一性”表示所述序列之间相同的核苷酸的百分比。

[0723] 术语“%相同”和“%同一性”或类似术语特别地旨在是指待比较的序列之间在最佳比对中相同的核苷酸或氨基酸的百分比。所述百分比是纯统计学的,并且两个序列之间的差异可以是但不一定是随机分布在待比较序列的整个长度上。两个序列的比较通常在关于区段或“比较窗口”最佳比对以确定相应序列的局部区域之后通过比较所述序列来进行。用于比较的最佳比对可人工进行,或者借助于Smith and Waterman,1981,Ads App.Math.2,482的局部同源性算法、借助于Needleman and Wunsch,1970,J.Mol.Biol.48,443的局部同源性算法、借助于Pearson and Lipman,1988,Proc.Natl Acad.Sci.USA88,2444的相似性检索算法、或者借助于使用所述算法的计算机程序(在Wisconsin Genetics Software Package,Genetics Computer Group,575Science Drive,Madison,Wis.中的GAP、BESTFIT、FASTA、BLAST P、BLAST N和TFASTA)来进行。在一些实施方案中,使用可在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)网站(例如,在blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)获得的BLASTN或BLASTP算法来确定两个序列的百分比同一性。在一些实施方案中,NCBI网站上BLASTN算法使用的算法参数包括:(i)预期阈值设置为10;(ii)字长设置为28;(iii)查询范围内的最大匹配设置为0;(iv)匹配/不匹配评分设置为1、-2;(v)空位成本(Gap Cost)设置为线性;以及(vi)针对正在使用的低复杂性区域的筛选程序(filter)。在一些实施方案中,NCBI网站上BLASTP算法使用的算法参数包括:(i)预期阈值设置为10;(ii)字长设置为3;(iii)查询范围内的最大匹配设置为0;(iv)矩阵设置为BLOSUM62;(v)空位成本设置为存在:11,延伸:1;以及(vi)条件组成评分矩阵调整。

[0724] 百分比同一性通过确定待比较序列所对应的相同位置的数目,将该数目除以所比较的位置数目(例如,参考序列中的位置数目),并将该结果乘以100来获得。

[0725] 在一些实施方案中,相似性或同一性程度针对是参考序列全长的至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或约100%的区域给出。例如,如果参考氨基酸序列由200个氨基酸残基组成,则同一性程度针对至少约100个、至少约120个、至少约140个、至少约160个、至少约180个、或约200个氨基酸残基(在一些实施方案中,为连续氨基酸残基)给出。在一些实施方案中,相似性或同一性的程度针对参考序列的全长给出。

[0726] 根据本公开内容,同源氨基酸序列显示出氨基酸残基的至少40%,特别地至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%,并且优选至少95%、至少98%或至少99%同一性。

[0727] 本文中所述的氨基酸序列变体可由技术人员例如通过重组DNA操作来容易地制备。例如,用于制备具有替换、添加、插入或缺失的肽或蛋白质的DNA序列的操作在Sambrook et al.(1989)中详细描述。此外,本文中所述的肽和氨基酸变体可借助于已知的肽合成技术例如如通过固相合成和类似方法来容易地制备。

[0728] 在一个实施方案中,氨基酸序列(肽或蛋白质)的片段或变体优选是“功能性片段”或“功能性变体”。术语氨基酸序列的“功能性片段”或“功能性变体”涉及以下任何片段或变体,其表现出与该片段或变体所来源的氨基酸序列的一个或更多个功能特性相同或相似的一个或更多个功能特性(即,其是功能等同的)。关于结合剂,一种特定的功能是由该片段或变体所来源的氨基酸序列所表现出的一种或更多种结合活性。本文中使用的术语“功能性片段”或“功能性变体”特别地是指这样的变体分子或序列,其包含与亲本分子或序列的氨基酸序列相比改变了一个或更多个氨基酸并且仍然能够实现亲本分子或序列的一种或更多种功能(例如,与靶抗原结合)的氨基酸序列。在一个实施方案中,亲本分子或序列的氨基酸序列中的修饰不显著影响或改变该分子或序列的特征。在一些不同的实施方案中,功能性片段或功能性变体的功能可降低但仍显著存在,例如,功能性变体的结合可为亲本分子或序列的至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。然而,在另一些实施方案中,与亲本分子或序列相比,功能性片段或功能性变体的功能可以是增强的。

[0729] “来源于”指定氨基酸序列(肽、蛋白质或多肽)的氨基酸序列(肽、蛋白质或多肽)是指第一氨基酸序列的来源。优选地,来源于特定氨基酸序列的氨基酸序列具有与该特定序列或其片段相同、基本上相同或同源的氨基酸序列。来源于特定氨基酸序列的氨基酸序列可以是该特定序列或其片段的变体。例如,本领域普通技术人员将理解,用于本文中的结合剂可被改变,使得它们的序列与它们所来源的天然存在或天然的序列不同,同时保留天然序列的期望活性。

[0730] “分离的”意指从天然状态中改变或脱离天然状态。例如,天然存在于活的动物中的核酸或肽不是“分离的”,但从其天然状态的共存材料中部分或完全分离的同样的核酸或肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白质可以以基本上纯化的形式存在,或者可存在于非天然环境,例如如宿主细胞中。在一个实施方案中,本文中所述的结合剂(例如抗体)是分离的。本文中使用的“分离的结合剂”旨在是指基本上不含具有不同抗原特异性的其他结合剂的结合剂。在一个实施方案中,与EpCAM和CD137特异性结合的分离的双特异性结合剂基本上不含与EpCAM或CD137特异性结合的单特异性抗体。在一个优选实施方案中,本公开内容中使用的结合剂是基本上纯化的形式。

[0731] 术语“遗传修饰”或简称“修饰”包括用核酸转染细胞。术语“转染”涉及将核酸,特

别是RNA引入到细胞中。出于本公开内容的目的,术语“转染”还包括将核酸引入到细胞中或者由这样的细胞摄取核酸,其中细胞可存在于对象例如患者中。因此,根据本公开内容,用于转染本文中所述核酸的细胞可存在于体外或体内,例如,细胞可形成患者的器官、组织和/或生物体的一部分。根据本公开内容,转染可以是瞬时或稳定的。对于转染的一些应用,在所转染的遗传物质仅瞬时表达时就已足够。RNA可被转染到细胞中以瞬时表达其编码的蛋白质。由于在转染过程中引入的核酸通常不会整合到核基因组中,因此外源核酸将通过有丝分裂而被稀释或者降解。允许核酸进行游离扩增的细胞极大降低了稀释率。如果期望所转染的核酸实际上保留在细胞及其子细胞的基因组中,则必须发生稳定的转染。这样的稳定的转染可通过使用用于转染的基于病毒的体系或基于转座子的体系来实现。一般而言,将编码抗原的核酸瞬时转染到细胞中。RNA可被转染到细胞中以瞬时表达其编码的蛋白质。

[0732] 根据本公开内容,肽或蛋白质的类似物是其所来源的所述肽或蛋白质的经修饰形式,并且具有所述肽或蛋白质的至少一种功能特性。例如,肽或蛋白质的药理活性类似物具有类似物所来源的肽或蛋白质的至少一种药理活性。这样的修饰包括任何化学修饰,并且包括与蛋白质或肽缔合的任何分子例如碳水化合物、脂质和/或蛋白质或肽的单个或多个替换、缺失和/或添加。在一个实施方案中,蛋白质或肽的“类似物”包括由糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、棕榈酰化、肉豆蔻酰化、异戊二烯化、脂化、烷基化、衍生化、引入保护/封闭基团、蛋白水解切割或者与抗体或其他细胞配体结合得到的那些经修饰形式。术语“类似物”还延伸到所述蛋白质和肽的所有功能化学等同物。

[0733] 本文中使用的“活化”或“刺激”是指已被充分刺激以诱导可检测的细胞增殖的免疫效应细胞(例如T细胞)的状态。活化也可与信号传导途径的启动、诱导的细胞因子产生和可检测的效应物功能相关。术语“活化的免疫效应细胞”尤其是指正在进行细胞分裂的免疫效应细胞。

[0734] 术语“致敏”是指其中免疫效应细胞(例如T细胞)首次与其特异性抗原接触并导致分化成效应细胞(例如效应T细胞)的过程。

[0735] 术语“克隆扩增”或“扩增”是指其中特定实体倍增的过程。在本公开内容的上下文中,该术语优选地在免疫应答的背景下使用,在所述免疫应答中免疫效应细胞被抗原刺激、增殖,并且识别所述抗原的特异性免疫效应细胞扩增。优选地,克隆扩增导致免疫效应细胞的分化。

[0736] 根据本公开内容的“抗原”涵盖可与抗体或T细胞受体结合的任何物质或分子结构。机体内抗原的存在可引起免疫应答。因此,“抗原”涵盖免疫应答或免疫机制所针对的任何物质。这也包括这样的情况,其中抗原被加工成抗原肽,并且免疫应答或免疫机制针对一种或更多种抗原肽,特别是如果在MHC分子的背景下呈递的话。特别地,“抗原”涉及与抗体或T淋巴细胞(T细胞)特异性反应的任何物质,优选肽或蛋白质。根据本公开内容,术语“抗原”包括包含至少一个表位(例如T细胞表位)的任何分子。优选地,在本公开内容的上下文中的抗原是任选地在加工之后诱导免疫反应的分子,该免疫反应优选特异性地针对该抗原(包括表达该抗原的细胞)。在一个实施方案中,抗原是疾病相关抗原,例如肿瘤抗原、病毒抗原或细菌抗原,或者来源于这样的抗原的表位。

[0737] 术语“表位”是指分子(例如抗原)中的抗原决定簇,即,分子中被免疫系统识别,例

如被抗体T细胞或B细胞识别的一部分或片段,特别是当在MHC分子的情况下呈递时。在一个实施方案中,“表位”意指能够特异性结合抗体的蛋白质决定簇。表位通常由分子的表面基团(例如,氨基酸或糖侧链)组成,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。构象表位与非构象表位的区别在于,在存在变性溶剂的情况下,与前者的结合会丧失,而与后者的结合则不会丧失。表位可包含直接参与结合的氨基酸残基和不直接参与结合的其他氨基酸残基,例如被特异性抗原结合肽有效阻断或覆盖的氨基酸残基(换言之,氨基酸残基在特异性抗原结合肽的覆盖区(footprint)内)。

[0738] 蛋白质的表位优选地包含所述蛋白质的连续或不连续部分,并且长度优选约为5至约100个氨基酸,优选约5至约50、更优选约8至约30、最优选约10至约25个氨基酸,例如,表位的长度可优选为9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸。在一个实施方案中,本公开内容的上下文中的表位是T细胞表位。

[0739] 本文中使用的术语“任选的”或“任选地”意指随后描述的事件、状况或情况可发生或可不发生,并且所述描述包括其中所述事件、状况或情况发生的实例以及其中所述事件、状况或情况不发生的实例。

[0740] 本文中使用的术语“连接的”、“融合的”或“融合/融合体”可互换使用。这些术语是指将两个或更多个元件或组分或结构域连接在一起。

[0741] 术语“疾病”(在本文中也称为“障碍”)是指影响个体身体的异常状况。疾病通常被解释为与特定症状和体征相关的医学病症。疾病可以由最初来自外部来源的因素引起,例如感染性疾病,或者疾病可以由内部功能障碍引起,例如自身免疫病。在人中,“疾病”通常被更广泛地用于是指引起患病个体的疼痛、功能障碍、痛苦、社会问题或死亡或者与该个体接触的那些的类似问题的任何病症。从广义上讲,疾病有时包括损伤、残疾、障碍、综合征、感染、孤立的症状、异常行为以及结构和功能的非典型变化,而在另一些情况下和出于其他目的,这些可被视为是可区分的类别。疾病通常不仅在身体上而且在情感上影响个体,因为对许多疾病的感染和经历可改变个体对生命的看法和个体的性格。

[0742] 术语“治疗性治疗”涉及改善个体的健康状况和/或延长(提高)个体寿命的任何治疗。所述治疗可以在个体中消除疾病、在个体中阻止或减慢疾病的发生、在个体中抑制或减慢疾病的发生、在个体中降低症状的频率或严重程度,和/或在目前患有或以前患有疾病的个体中降低复发。

[0743] 术语“预防性处理”或“防止性处理”涉及旨在防止疾病在个体中发生的任何治疗。术语“预防性处理”或“防止性处理”在本文中可互换使用。类似地,在疾病进展(例如肿瘤或癌症的进展)的上下文中,术语“用于防止的方法”涉及旨在防止个体中疾病进展的任何方法。

[0744] 术语“个体”和“对象”在本文中可互换使用。它们是指可能患有疾病或病症(例如,癌症)或易于患有疾病或病症(例如,癌症)的人或另一些哺乳动物(例如,小鼠、大鼠、兔、犬、猫、牛、猪、绵羊、马或灵长类)或任何其他非哺乳动物(包括鸟类(鸡)、鱼或任何其他动物物种)。除非另有说明,否则术语“个体”和“对象”不表示特定年龄,并因此涵盖成人、老年人、儿童和新生儿。在本公开内容的一些实施方案中,“个体”或“对象”是“患者”。

[0745] 术语“患者”意指治疗的个体或对象,特别是患病的个体或对象。

[0746] 本文中使用的术语“多核苷酸”或“核酸”旨在包含DNA和RNA,例如基因组DNA、

cDNA、mRNA、重组产生的和化学合成的分子。核酸可以是单链或双链的。RNA包含体外转录的RNA(in vitro transcribed RNA,IVT RNA)或合成的RNA。

[0747] 核酸可包含在载体中。本文中使用的术语“载体”包括技术人员已知的任何载体,其包括质粒载体、黏粒载体、噬菌体载体(例如λ噬菌体)、病毒载体(例如逆转录病毒、腺病毒或杆状病毒载体)、或人工染色体载体(例如细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome,BAC)、酵母人工染色体(yeast artificial chromosome,YAC)或P1人工染色体(P1 artificial chromosome,PAC))。所述载体包含表达载体以及克隆载体。表达载体包含质粒以及病毒载体并且一般包含期望编码序列和用于在特定宿主生物体(例如,细菌、酵母、植物、昆虫或哺乳动物)中或在体外表达系统中表达可操作地连接的编码序列所必需的合适的DNA序列。克隆载体一般用于改造和扩增特定的期望DNA片段,并可缺乏表达所期望DNA片段所需要的功能性序列。

[0748] 在本公开内容的一个实施方案中,核酸在被治疗以提供所编码肽或蛋白质的对象的细胞中表达。在一个实施方案中,核酸在对象的细胞中瞬时表达。因此,在一个实施方案中,核酸未整合到细胞的基因组中。在一个实施方案中,核酸是RNA,优选体外转录的RNA。

[0749] 本文中所述的核酸可以是重组和/或分离的分子。

[0750] 在本公开内容中,术语“RNA”涉及包含核糖核苷酸残基的核酸分子。在一些优选实施方案中,RNA包含所有或大部分核糖核苷酸残基。本文中使用的“核糖核苷酸”是指在β-D-呋喃核糖基的2’位具有羟基的核苷酸。RNA涵盖但不限于双链RNA、单链RNA、分离的RNA(例如部分纯化的RNA)、基本上纯的RNA、合成的RNA、重组产生的RNA以及通过添加、缺失、替换和/或改变一个或更多个核苷酸而不同于天然存在的RNA之经修饰RNA。这样的改变可以是指将非核苷酸物质添加至内部RNA核苷酸或RNA的末端。本文中还考虑了RNA中的核苷酸可以是非标准核苷酸,例如化学合成的核苷酸或脱氧核苷酸。对于本公开内容,这些改变的RNA被认为是天然存在的RNA的类似物。

[0751] 在本公开内容的某些实施方案中,RNA是信使RNA(messenger RNA,mRNA),其涉及编码肽或蛋白质的RNA转录物。如本领域中认可的,mRNA通常包含5’非翻译区(5’untranslated region,5’-UTR)、肽编码区和3’非翻译区(3’untranslated region,3’-UTR)。在一些实施方案中,RNA通过体外转录或化学合成产生。在一个实施方案中,mRNA通过使用DNA模板进行体外转录产生,其中DNA是指包含脱氧核糖核苷酸的核酸。

[0752] 在一个实施方案中,RNA是体外转录的RNA(IVT-RNA),并且可通过合适DNA模板的体外转录获得。用于控制转录的启动子可以是任何RNA聚合酶的任何启动子。用于体外转录的DNA模板可通过克隆核酸特别是cDNA并将其引入到用于体外转录的合适载体中而获得。cDNA可通过RNA的逆转录获得。

[0753] 在一个实施方案中,本文中所述的RNA可具有经修饰核苷。在一些实施方案中,RNA包含代替至少一个(例如,每个)尿苷的经修饰核苷。

[0754] 在一些实施方案中,经修饰核苷独立地选自假尿苷(ψ)、N1-甲基-假尿苷(m1ψ)和5-甲基-尿苷(m5U)。

[0755] 在一些实施方案中,代替RNA中一个或更多个尿苷的经修饰核苷可以是以下中的任一个或更多个:3-甲基-尿苷(m^3U)、5-甲氧基-尿苷(mo^5U)、5-氮杂-尿苷、6-氮杂-尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-尿苷(s^2U)、4-硫代-尿苷(s^4U)、4-硫代-假尿苷、2-硫代-假尿

苷、5-羟基-尿苷(ho^{5}U)、5-氨基烯丙基-尿苷、5-卤代-尿苷(例如,5-碘代-尿苷或5-溴代-尿苷)、尿苷5-羟乙酸(cmo^{5}U)、尿苷5-羟乙酸甲酯(mcmo^{5}U)、5-羧基甲基-尿苷(cm^{5}U)、1-羧基甲基-假尿苷、5-羧基羟甲基-尿苷(chm^{5}U)、5-羧基羟甲基-尿苷甲酯(mchm^{5}U)、5-甲氧基羰基甲基-尿苷(mcm^{5}U)、5-甲氧基羰基甲基-2-硫代-尿苷(mcm^{5}s^{2}U)、5-氨基甲基-2-硫代-尿苷(nm^{5}s^{2}U)、5-甲基氨基甲基-尿苷(mnm^{5}U)、1-乙基-假尿苷、5-甲基氨基甲基-2-硫代-尿苷(mnm^{5}s^{2}U)、5-甲基氨基甲基-2-硒代-尿苷(mnm^{5}se^{2}U)、5-氨甲酰基甲基-尿苷(ncm^{5}U)、5-羧基甲基氨基甲基-尿苷(cmnm^{5}U)、5-羧基甲基氨基甲基-2-硫代-尿苷(cmnm^{5}s^{2}U)、5-丙炔基-尿苷、1-丙炔基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-尿苷(τm^{5}U)、1-牛磺酸甲基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-2-硫代-尿苷(τm5s2U)、1-牛磺酸甲基-4-硫代-假尿苷)、5-甲基-2-硫代-尿苷(m^{5}s^{2}U)、1-甲基-4-硫代-假尿苷(m^{1}s^{4}ψ)、4-硫代-1-甲基-假尿苷、3-甲基-假尿苷(m^{3}ψ)、2-硫代-1-甲基-假尿苷、1-甲基-1-脱氮杂-假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-脱氮杂-假尿苷、二氢尿苷(D)、二氢假尿苷、5,6-二氢尿苷、5-甲基-二氢尿苷(m^{5}D)、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-甲氧基-尿苷、2-甲氧基-4-硫代-尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、N1-甲基-假尿苷、3-(3-氨基-3-羧基丙基)尿苷(acp^{3}U)、1-甲基-3-(3-氨基-3-羧基丙基)假尿苷(acp^{3}ψ)、5-(异戊烯基氨基甲基)尿苷(inm^{5}U)、5-(异戊烯基氨基甲基)-2-硫代-尿苷(inm^{5}s^{2}U)、α-硫代-尿苷、2'-O-甲基-尿苷(Um)、5,2'-O-二甲基-尿苷(m^{5}Um)、2'-O-甲基-假尿苷(ψm)、2-硫代-2'-O-甲基-尿苷(s^{2}Um)、5-甲氧基羰基甲基-2'-O-甲基-尿苷(mcm^{5}Um)、5-氨甲酰基甲基-2'-O-甲基-尿苷(ncm^{5}Um)、5-羧基甲基氨基甲基-2'-O-甲基-尿苷(cmnm^{5}Um)、3,2'-O-二甲基-尿苷(m^{3}Um)、5-(异戊烯基氨基甲基)-2'-O-甲基-尿苷(inm^{5}Um)、1-硫代-尿苷、脱氧胸苷、2'-F-阿糖-尿苷、2'-F-尿苷、2'-OH-阿糖-尿苷、5-(2-甲氧羰基乙烯基)尿苷、5-[3-(1-E-丙烯基氨基)尿苷、或本领域中已知的任何其他经修饰尿苷。

[0756] 在一些实施方案中,根据本公开内容的RNA包含5'-帽。在一个实施方案中,本公开内容的RNA不具有未加帽的5'-三磷酸。在一个实施方案中,RNA可被5'-帽类似物修饰。术语"5'-帽"是指见于mRNA分子的5'-末端的结构,并且通常由通过5'至5'三磷酸键联与mRNA连接的鸟苷核苷酸组成。在一个实施方案中,该鸟苷在第7位处被甲基化。提供具有5'-帽或5'-帽类似物的RNA可通过体外转录来实现,其中5'-帽共转录表达到RNA链中,或者可使用加帽酶与RNA进行转录后连接。

[0757] 在一些实施方案中,RNA包含帽0、帽1或帽2。根据本公开内容,术语"帽0"意指结构"m^{7}GpppN",其中N是在第2'位带有OH部分的任何核苷。根据本公开内容,术语"帽1"意指结构"m^{7}GpppNm",其中Nm是在2'位带有OCH_3部分的任何核苷。根据本公开内容,术语"帽2"意指结构"m^{7}GpppNmNm",其中Nm各自独立地是在第2'位带有OCH_3部分的任何核苷。

[0758] 在一些实施方案中,RNA包含选自以下的5'-帽结构:$m_2^{7,2'\text{-}O}$G(5')ppSp(5')G(特别是其D1非对映体)、$m_2^{7,3'\text{-}O}$G(5')ppp(5')G、和$m_2^{7,3'\text{-}O}$Gppp($m_1^{2'\text{-}O}$)ApG。

[0759] 在一些实施方案中,根据本公开内容的RNA包含5'-UTR和/或3'-UTR。术语"非翻译区"或"UTR"涉及DNA分子中被转录但未被翻译成氨基酸序列的区域,或者涉及RNA分子(例如mRNA分子)中的相应区域。非翻译区(UTR)可存在于开放阅读框的5'(上游)(5'-UTR)和/或开放阅读框的3'(下游)(3'-UTR)。5'-UTR(如果存在的话)位于5'末端,在蛋白质编码区的起始密码子的上游。5'-UTR位于5'-帽(如果存在的话)的下游,例如直接与5'-帽相邻。

3’-UTR(如果存在的话)位于3’末端,在蛋白质编码区的终止密码子的下游,但是术语“3’-UTR”优选地不包含poly(A)序列。因此,3’-UTR位于poly(A)序列(如果存在的话)的上游,例如直接与poly(A)序列相邻。

[0760] 在一些实施方案中,根据本公开内容的RNA包含3’-poly(A)序列。本文中使用的术语“poly(A)序列”或“poly-A尾”是指腺苷酸残基的不间断或间断的序列,其通常位于RNA分子的3’末端。poly(A)序列为本领域技术人员已知的,并且在本文所述的RNA中可紧接3’UTR。poly(A)序列可以是任何长度的。在一些实施方案中,poly(A)序列包含以下或由以下组成:至少20、至少30、至少40、至少80或至少100且至多500、至多400、至多300、至多200或至多150个核苷酸,并且特别地是约110个核苷酸。在一些实施方案中,poly(A)序列仅由A核苷酸组成。在一些实施方案中,poly(A)序列基本上由A核苷酸组成,但被四种核苷酸(A、C、G和U)的随机序列间断,如通过引用在此并入的WO 2016/005324 A1中所公开的。这样的随机序列的长度可为5至50、10至30或10至20个核苷酸。poly(A)盒在DNA水平上显示出质粒DNA在大肠杆菌(E.coli)中的不断增殖,并且在RNA水平上仍然与关于支持RNA稳定性和翻译效率的有益特性相关,所述poly(A)盒存在于DNA编码链中,DNA编码链基本上由dA核苷酸组成但被具有平均分布的四种核苷酸(dA、dC、dG、dT)且长度为例如5至50个核苷酸的的随机序列间断。在一些实施方案中,除A核苷酸之外无核苷酸在其3’末端侧接有poly(A)序列,即,poly(A)序列在其3’末端未被除A之外的核苷酸掩蔽或跟随。

[0761] 在本公开内容的上下文中,术语“转录”涉及其中DNA序列中的遗传密码被转录成RNA的过程。随后,RNA可翻译成肽或蛋白质。

[0762] “编码”是指多核苷酸(例如基因、cDNA或mRNA)中以用作合成生物过程中其他聚合物和大分子的模板的特定核苷酸序列之固有特性,所述其他聚合物和大分子具有限定的核苷酸序列(即,rRNA、tRNA和mRNA)或限定的氨基酸序列和由其产生的生物学特性。因此,如果与该基因对应的mRNA的转录和翻译在细胞或其他生物系统中产生蛋白质,则该基因编码该蛋白质。编码链(其核苷酸序列与mRNA序列相同并且通常在序列表中提供)和非编码链(其用作基因或cDNA的转录模板)二者均可称为编码该基因或cDNA的蛋白质或其他产物。类似地,如果RNA(例如mRNA)的翻译在细胞或其他生物系统中产生蛋白质,则该RNA编码该蛋白质。

[0763] RNA可以是裸的或包装的,例如在颗粒例如蛋白质和/或脂质颗粒(例如脂质纳米粒)中制备。

[0764] 本文中使用的“内源性”是指来自生物体、细胞、组织或系统或者产生于生物体、细胞、组织或系统内部的任何物质。

[0765] 本文中使用的术语“外源性”是指从生物体、细胞、组织或系统外部引入或产生的任何物质。

[0766] 本文中使用的术语“表达”定义为特定核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0767] Fc区在其C端可具有赖氨酸。该赖氨酸的来源是存在于人中的天然存在的序列,这些Fc区来源于所述序列。在细胞培养产生重组抗体期间,该末端赖氨酸可被内源性羧肽酶的蛋白水解切割掉,产生具有相同序列但缺少C端赖氨酸的恒定区。出于抗体的制备目的,编码该末端赖氨酸的DNA可从该序列中省略,使得产生没有赖氨酸的抗体。由编码或不编码末端赖氨酸的核酸序列产生的抗体在序列和功能上基本上相同,因为当例如使用在基于

CHO的产生系统中产生的抗体时,末端赖氨酸的加工程度通常是高的(Dick,L.W.et al.Biotechnol.Bioeng.2008;100:1132-1143)。因此,应理解,根据本发明的蛋白质(例如抗体)可在编码或具有或者不在编码或具有末端赖氨酸的情况下产生。

[0768] 本公开内容的一些方面和实施方案

[0769] 与EpCAM和CD137结合的结合剂

[0770] 在第一方面中,本公开内容提供了包含与EpCAM结合的第一结合区和与CD137结合的第二结合区的结合剂。

[0771] 本文中公开的结合剂原则上可以是任何同种型的抗体。同种型的选择通常通过期望的Fc介导的效应物功能(例如ADCC诱导)来指导,或通过对缺乏Fc介导的效应物功能的抗体("惰性"抗体)的需要来指导。示例性同种型是IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。可使用人轻链恒定区(κ或λ)中任一者。本文中所述的抗体的效应物功能可通过同种型转换成例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE或IgM抗体而改变以用于多种治疗用途。在一个实施方案中,本文中所述的抗体的两条重链都是IgG1同种型,例如IgG1、κ。任选地,重链可在铰链区和/或CH3区进行修饰,如本文中别处所述。

[0772] 优选地,每个抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),并且其中所述可变区各自包含三个CDR序列,分别为CDR1、CDR2和CDR3,以及四个框架序列,分别为FR1、FR2、FR3和FR4。此外,优选地,抗体包含两个重链恒定区(CH)和两个轻链恒定区(CL)。

[0773] 在一个实施方案中,结合剂是全长抗体,例如全长IgG1抗体。例如,在一个实施方案中,结合剂(例如双特异性抗体)包含两个半分子,其各自包含抗原结合区。

[0774] 双特异性抗体的许多不同形式是本领域已知的,并且由Kontermann;Drug Discov Today,2015Jul;20(7):838-47和MAbs,2012Mar-Apr;4(2):182-97综述。所有这些形式都涵盖在本文中。根据本公开内容的双特异性抗体不限于任何特定的双特异性形式或产生其的方法。

[0775] 可用于本公开内容的双特异性抗体分子的一些实例包括(i)单抗体,其具有包含不同抗原结合区的两个臂;(ii)单链抗体,其对两个不同表位具有特异性,例如通过由额外肽接头串联连接的两个scFv;(iii)双可变结构域抗体(dual-variable-domain antibody,DVD-Ig),其中每条轻链和重链包含通过短肽键联串联的两个可变结构域(Wu et al.,Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin(DVD-Ig™)Molecule,在Antibody Engineering,Springer Berlin Heidelberg(2010)中);(iv)化学连接的双特异性(Fab')2片段;(v)Tandab,其是两个单链双抗体的融合体,产生对每个靶抗原均具有两个结合位点的四价双特异性抗体;(vi)柔性抗体(flexibody),其是scFv与双抗体的组合,产生多价分子;(vii)所谓的"对接与锁定(dock and lock)"分子,其基于蛋白激酶A中的"二聚化和对接结构域",当将所述分子应用于Fab时,可产生由与不同Fab片段连接的两个相同Fab片段组成的三价双特异性结合蛋白;(viii)所谓的蝎形分子(Scorpion molecule),其包含例如与人Fab臂的两个末端融合的两个scFv;以及(ix)双抗体。

[0776] 在一个实施方案中,本文中所述的结合剂是双抗体或交叉抗体(cross-body)。在一个实施方案中,结合剂是通过受控的Fab臂交换获得的双特异性抗体(例如在WO2011131746(Genmab)中所述)。

[0777] 不同类别的结合剂的一些实例包括但不限于(i)IgG样分子,其具有互补CH3结构

域以迫使异二聚化;(ii)重组IgG样双靶向分子,其中所述分子的两侧各自包含至少两种不同抗体的Fab片段或Fab片段的一部分;(iii)IgG融合分子,其中全长IgG抗体与额外的Fab片段或Fab片段的一部分融合;(iv)Fc融合分子,其中单链Fv分子或稳定的双抗体与重链恒定结构域、Fc区或其一部分融合;(v)Fab融合分子,其中不同的Fab片段融合在一起,与重链恒定结构域、Fc区或其一部分融合;以及(vi)基于ScFv和双抗体的抗体和重链抗体(例如,结构域抗体,纳米抗体),其中不同的单链Fv分子或不同的双抗体或不同的重链抗体(例如,结构域抗体,纳米抗体)彼此融合或者与和重链恒定结构域、Fc区或其一部分融合的另一种蛋白质或载体分子融合。

[0778] 具有互补CH3结构域分子的IgG样分子的一些实例包括但不限于Triomab/Quadroma分子(Trion Pharma/Fresenius Biotech;Roche,WO2011069104)、所谓的结进孔(Knob-into-Hole)分子(Genentech,WO9850431)、CrossMAb(Roche,WO2011117329)和静电匹配分子(Amgen,EP1870459和WO2009089004;Chugai,US201000155133;Oncomed,WO2010129304)、LUZ-Y分子(Genentech,Wranik et al.J.Biol.Chem.2012,287(52):43331-9,doi:10.1074/jbc.M112.397869.Epub 2012Nov 1)、DIG体和PIG体分子(Pharmabcine,WO2010134666,WO2014081202)、链交换工程化结构域体(Strand Exchange Engineered Domain body,SEEDbody)分子(EMD Serono,WO2007110205)、Biclonics分子(Merus,WO2013157953)、Fc Δ Adp分子(Regeneron,WO201015792)、双特异性IgG1和IgG2分子(Pfizer/Rinat,WO11143545)、Azymetric支架分子(Zymeworks/Merck,WO2012058768)分子、mAb-Fv分子(Xencor,WO2011028952)、二价双特异性抗体(WO2009080254)和DuoBody®分子(Genmab,WO2011131746)。

[0779] 重组IgG样双靶向分子的一些实例包括但不限于双靶向(Dual Targeting,DT)-Ig分子(WO2009058383)、二合一抗体(Two-in-one Antibody)(Genentech;Bostrom,et al 2009.Science 323,1610-1614.)、交联Mab(Karmanos Cancer Center)、mAb2(F-Star,WO2008003116)、Zybody分子(Zyngenia;LaFleur et al.MAbs.2013Mar-Apr;5(2):208-18)、用共同轻链的方法(Crucell/Merus,US7,262,028)、κλ体(NovImmune,WO2012023053)和CovX体(CovX/Pfizer;Doppalapudi,V.R.,et al 2007.Bioorg.Med.Chem.Lett.17,501-506.)。

[0780] IgG融合分子的一些实例包括但不限于双可变结构域(Dual Variable Domain,DVD)-Ig分子(Abbott,US7,612,181)、双结构域双头抗体(Unilever;Sanofi Aventis,WO20100226923)、IgG样双特异性分子(ImClone/Eli Lilly,Lewis et al.Nat Biotechnol.2014Feb;32(2):191-8)、Ts2Ab(MedImmune/AZ;Dimasi et al.J Mol Biol.2009Oct30;393(3):672-92)和BsAb分子(Zymogenetics,WO2010111625)、HERCULES分子(Biogen Idec,US007951918)、scFv融合分子(Novartis)、scFv融合分子(Changzhou Adam Biotech Inc,CN 102250246)和TvAb分子(Roche,WO2012025525,WO2012025530)。

[0781] Fc融合分子的一些实例包括但不限于ScFv/Fc融合体(Pearce et al.,Biochem Mol Biol Int.1997Sep;42(6):1179-88)、SCORPION分子(Emergent BioSolutions/Trubion,Blankenship JW,et al.AACR 100th Annual meeting2009(摘要#5465);Zymogenetics/BMS,WO2010111625)、双亲和力再靶向技术(Dual Affinity Retargeting Technology)(Fc-DART)分子(MacroGenics,WO2008157379,WO2010080538)和双(ScFv)2-

Fab分子(国家抗体医学研究中心-中国(National Research Center for Antibody Medicine-China))。

[0782] Fab融合双特异性抗体的一些实例包括但不限于F(ab)2分子(Medarex/AMGEN;Deo et al J Immunol.1998Feb 15;160(4):1677-86.)、Dual-Action或Bis-Fab分子(Genentech,Bostrom,et al 2009.Science 323,1610-1614.)、对接与锁定(Dock-and-Lock,DNL)分子(ImmunoMedics,WO2003074569,WO2005004809)、二价双特异性分子(Biotecnol,Schoonjans,J Immunol.2000Dec 15;165(12):7050-7.)和Fab-Fv分子(UCB-Celltech,WO 2009040562 A1)。

[0783] 基于ScFv、双抗体的抗体和结构域抗体的一些实例包括但不限于双特异性T细胞接合物(Bispecific T Cell Engager,BiTE)分子(Micromet,WO2005061547)、串联双抗体分子(Tandem Diabody,TandAb)(Affimed)Le Gall et al.,Protein Eng Des Sel.2004Apr;17(4):357-66.)、双亲和力再靶向技术(DART)分子(MacroGenics,WO2008157379,WO2010080538)、单链双抗体分子(Lawrence,FEBS Lett.1998Apr 3;425(3):479-84)、TCR样抗体(AIT,ReceptorLogics)、人血清白蛋白ScFv融合体(Merrimack,WO2010059315)和COMBODY分子(Epigen Biotech,Zhu et al.Immunol Cell Biol.2010Aug;88(6):667-75.)、双靶向纳米抗体(Ablynx,Hmila et al.,FASEB J.2010)和双靶向仅重链结构域抗体。

[0784] 在一个方面中,本公开内容的双特异性抗体包含第一Fc序列和第二Fc序列,所述第一Fc序列包含第一CH3区,所述第二Fc序列包含第二CH3区,其中第一CH3区和第二CH3区的序列不同并且使得所述第一CH3区与第二CH3区之间的异二聚体相互作用比所述第一CH3区和第二CH3区各自的同二聚体相互作用更强。WO2011131746和WO2013060867(Genmab)中提供了关于这些相互作用以及它们如何可实现的更多详细信息,其在此通过引用并入。

[0785] 如本文中进一步描述的,可使用基于仅在CH3区含有少数保守的不对称突变的一种同二聚体起始EpCAM抗体和一种同二聚体起始CD137抗体的特定方法以高产率获得稳定的双特异性EpCAMxCD137抗体。非对称突变意指所述第一CH3区和第二CH3区的序列在不同位置包含氨基酸替换。

[0786] 在一个实施方案中,本文中公开的任何实施方案中限定的双特异性抗体包含在选自以下的位置处具有氨基酸替换的第一CH3区:人IgG1重链中的第366、368、370、399、405、407和409位,以及在选自以下的位置处具有氨基酸替换的第二CH3区:人IgG1重链中的第366、368、370、399、405、407和409位,并且其中第一CH3区和第二CH3区没有在相同位置被替换。

[0787] 在一个实施方案中,本文中公开的任何实施方案中限定的双特异性抗体包含所述第一CH3区和第二CH3区的序列,该序列含有不对称突变,即在两个CH3区中不同位置处的突变,例如在一个CH3区中在第405位的突变和在另一个CH3区中在第409位的突变。在一个实施方案中,第405位的突变是F405L。在一个实施方案中,第409位的突变是K409R。

[0788] 在一个实施方案中,双特异性抗体包含第一重链和第二重链,其中所述第一重链和所述第二重链各自包含至少铰链区、CH2区和CH3区,其中(i)在所述第一重链中,在对应于人IgG1重链中的F405的位置处的氨基酸是L,并且在所述第二重链中,在对应于人IgG1重链中的K409的位置处的氨基酸是R,或者(ii)在所述第一重链中,在对应于人IgG1重链中的

K409的位置处的氨基酸是R,并且在所述第二重链中,在对应于人IgG1重链中的F405的位置处的氨基酸是L。

[0789] 传统方法例如杂交杂交瘤和化学缀合方法(Marvin and Zhu(2005)Acta Pharmacol Sin 26:649)可用于制备本文中所述的双特异性抗体。由不同重链和轻链组成的两种抗体在宿主细胞中的共表达导致除了期望的双特异性抗体之外可能的抗体产物的混合物,其随后可通过例如亲和色谱或类似方法分离。

[0790] 也可使用有利于在不同抗体构建体共表达之后形成功能性双特异性产物的策略,例如Lindhofer et al.(1995J Immunol 155:219)所述的方法。由于优先的物种限制的重/轻链配对,产生不同抗体的大鼠和小鼠杂交瘤的融合导致数量有限的异二聚体蛋白。促进异二聚体优先于同二聚体形成的另一种策略是“结进孔”策略,其中在第一重链多肽上引入突起(protuberance)并在第二重链多肽中引入相应的腔,使得突起可位于这两条重链界面的腔中,以促进异二聚体的形成并阻碍同二聚体的形成。“突起”是通过用较大的侧链代替来自第一多肽界面的小氨基酸侧链而构建的。与突起尺寸相同或相似的补偿“腔”是在第二多肽的界面中通过用较小的氨基酸侧链代替大的氨基酸侧链产生的(美国专利5,731,168)。EP1870459(Chugai)和WO2009089004(Amgen)描述了在宿主细胞中共表达不同抗体结构域之后有利于异二聚体形成的其他策略。在这些方法中,在两个CH3结构域中构成CH3-CH3界面的一个或更多个残基被带电荷的氨基酸代替,使得同二聚体的形成在静电上是不利的,而异二聚体在静电上是有利的。WO2007110205(Merck)描述了另一种策略,其中利用IgA和IgG CH3结构域之间的差异来促进异二聚化。

[0791] WO2008119353(Genmab)中已经描述了另一种用于产生双特异性抗体的体外方法,其中双特异性抗体通过在还原条件下孵育之后两个单特异性IgG4或IgG4样抗体之间的“Fab臂”或“半分子”交换(交换重链和连接的轻链)来形成。所得产物是具有两个可包含不同序列的Fab臂的双特异性抗体。

[0792] 用于制备本公开内容的双特异性EpCAMxCD137抗体的优选方法包括WO2011131746和WO2013060867(Genmab)中所述的方法,其包括以下步骤:

[0793] a)提供包含Fc区的一抗,所述Fc区包含第一CH3区;

[0794] b)提供包含第二Fc区的二抗,所述Fc区包含第二CH3区,其中一抗是EpCAM抗体并且二抗是CD137抗体,或反之亦然;

[0795] 其中所述第一CH3区和第二CH3区的序列不同并且使得所述第一CH3区与第二CH3区之间的异二聚体相互作用比所述第一CH3区和第二CH3区各自的同二聚体相互作用更强;

[0796] c)在还原条件下将所述一抗与所述二抗一起孵育;以及

[0797] d)获得所述双特异性EpCAMxCD137抗体。

[0798] 类似地,提供了用于产生根据本公开内容的抗体的方法,其包括以下步骤:

[0799] a)培养产生一抗的宿主细胞,并从培养物中纯化所述一抗,所述一抗包含如本文中限定的能够与人EpCAM结合的抗原结合区;

[0800] b)培养产生二抗的宿主细胞,并从培养物中纯化所述二抗,所述二抗包含如本文中限定的能够与人CD137结合的抗原结合区;

[0801] c)在足以使铰链区中的半胱氨酸经历二硫键异构化的还原条件下将所述一抗与所述二抗一起孵育,以及

[0802] d)获得所述双特异性抗体。

[0803] 在本公开内容的一个实施方案中,在足以使铰链区中的半胱氨酸经历二硫键异构化的还原条件下将所述一抗与所述二抗一起孵育,其中在所得异二聚体中的所述一抗与二抗之间的异二聚体相互作用是这样的:在37℃下在24小时之后在0.5mM GSH下不会发生Fab臂交换。

[0804] 不受理论的限制,在步骤c)中,亲本抗体的铰链区中的重链二硫键被还原并且随后所得半胱氨酸能够与另一个亲本抗体分子(最初具有不同的特异性)的半胱氨酸残基形成重链间二硫键。在该方法的一个实施方案中,步骤c)中的还原条件包括添加还原剂,例如选自以下的还原剂:2-巯基乙胺(2-mercaptoethylamine,2-MEA)、二硫苏糖醇(dithiothreitol,DTT)、二硫赤藓糖醇(dithioerythritol,DTE)、谷胱甘肽、三(2-羧基乙基)膦(TCEP)、L-半胱氨酸和β-巯基乙醇,优选地选自以下的还原剂:2-巯基乙胺、二硫苏糖醇和三(2-羧基乙基)膦。在另一实施方案中,步骤c)包括恢复条件以变为非还原性或低还原性,例如通过去除还原剂,例如通过脱盐。

[0805] 如上所述,在一个实施方案中,同二聚体起始抗体的第一CH3区和第二CH3区的序列是不同的并且使得所述第一CH3区和第二CH3区之间的异二聚体相互作用比所述第一CH3区和第二CH3区各自的同二聚体相互作用更强。WO2011131746和WO2013060867(Genmab)中提供了关于这些相互作用以及如何实现它们的更多详细信息,其在此通过引用整体并入。

[0806] 特别地,可使用基于分别结合EpCAM和CD137并且在CH3区中仅含有少数不对称突变的两种同二聚体起始抗体的上述方法以高产率获得稳定的双特异性EpCAMxCD137抗体。非对称突变意指所述第一CH3区和第二CH3区的序列在不同位置包含氨基酸替换。

[0807] 在一些实施方案中,根据本公开内容的结合剂除了包含抗原结合区之外,还包含由两条重链的Fc序列组成的Fc区。

[0808] 第一Fc序列和第二Fc序列各自可以具有任何同种型,包括但不限于IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,并且可包含一个或更多个突变或修饰。在一个实施方案中,第一Fc序列和第二Fc序列中的每一个具有IgG1同种型或来源于其,任选地具有一个或更多个突变或修饰。在一个实施方案中,第一Fc序列和第二Fc序列中的每一个具有IgG4同种型或来源于其,任选地具有一个或更多个突变或修饰。在另一个实施方案中,Fc序列中的一个具有IgG1同种型,而另一个具有IgG4同种型,或者来源于这样的各自的同种型,任选地具有一个或更多个突变或修饰。

[0809] 在一个实施方案中,一个或两个Fc序列是效应物功能缺陷的。例如,Fc序列可以是IgG1同种型或非IgG1同种型,例如IgG2、IgG3或IgG4,其已经突变使得介导效应物功能(例如ADCC)的能力已降低或甚至被消除。

[0810] 本文中使用的术语“效应物功能”包括由免疫系统组分介导的任何功能,这些功能导致例如杀伤患病细胞例如肿瘤细胞,或者抑制肿瘤生长和/或抑制肿瘤发生,包括抑制肿瘤散播和转移。优选地,本公开内容的上下文中的效应物功能是T细胞介导的效应物功能。这样的功能包括ADCC、ADCP或CDC。

[0811] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity,ADCC)

[0812] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)是细胞毒性效应细胞通过非吞噬过程杀

伤抗体包被的靶细胞,其特征在于释放细胞毒性颗粒的内容物或表达细胞死亡诱导分子。ADCC独立于免疫补体系统,免疫补体系统也裂解靶标,但不需要任何其他细胞。ADCC是通过靶标结合抗体(属于IgG或IgA或IgE类)与某些Fc受体(FcR)的相互作用触发的,FcR是存在于效应细胞表面上的结合免疫球蛋白(Ig)的Fc区的糖蛋白。介导ADCC的效应细胞包括自然杀伤(NK)细胞、单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和树突细胞。ADCC是一种快速效应机制,其效力取决于许多参数(靶细胞表面上的抗原的密度和稳定性;抗体亲和力和FcR结合亲和力)。涉及人IgG1(治疗性抗体最常用的IgG亚类)的ADCC高度依赖于其Fc部分的糖基化谱和Fcγ受体的多态性。

[0813] 抗体依赖性细胞吞噬作用(Antibody-dependent cellular phagocytosis,ADCP)

[0814] ADCP是许多抗体治疗的一种重要作用机制。它被定义为这样的高度调节的过程,通过该过程,抗体通过将其Fc结构域与吞噬细胞上的特定受体连接并引发吞噬作用来消除结合的靶标。与ADCC不同,ADCP可以由单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和树突细胞通过FcγRIIa、FcγRI和FcγRIIIa介导,其中巨噬细胞上的FcγRIIa(CD32a)代表主要途径。补体依赖性细胞毒性(Complement-dependent cytotoxicity,CDC)

[0815] CDC是可通过抗体指导的另一种细胞杀伤方法。IgM是用于补体活化的最有效的同种型。IgG1和IgG3二者在通过经典补体活化途径指导CDC方面也非常有效。优选地,在该级联中,抗原-抗体复合体的形成导致紧邻参与的抗体分子(例如,IgG分子)的C_H2结构域的多个C1q结合位点暴露出来(C1q是补体C1的三种亚组分之一)。优选地,这些暴露的C1q结合位点将先前的低亲和力C1q-IgG相互作用转化成一种高亲合力相互作用,这触发了涉及一系列其他补体蛋白的级联事件,并且导致效应细胞趋化剂/活化剂C3a和C5a的蛋白水解释放。优选地,该补体级联最终形成膜攻击复合物,其在细胞膜中产生孔,有利于水和溶质自由地进入和离开细胞。

[0816] 本文中所述的抗体可在Fc区中包含修饰。当抗体包含这样的修饰时,其可变为惰性或非活化抗体。本文中使用的术语“惰性”、“惰性的”或“非活化”是指这样的Fc区,所述Fc区至少不能通过单个抗体的两个Fc区诱导FcR介导的靶抗原交联、诱导Fc介导的FcR交联或结合任何Fcγ受体,或者不能够结合C1q。使用单特异性形式的抗体有利地测试人源化或嵌合EpCAM或CD137抗体的Fc区的惰性。

[0817] 可构建数种变体以使抗体的Fc区对与Fcγ(gamma)受体和C1q的相互作用无活性以用于治疗性抗体的开发。这样的变体的一些实例在本文中进行了描述。

[0818] 因此,在本文中所述的抗体的一个实施方案中,所述抗体包含第一重链和第二重链,其中一条或两条重链被修饰,使得抗体相对于不同之处在于包含未经修饰的第一重链和第二重链的抗体诱导Fc介导的效应物功能的程度更小。所述Fc介导的效应物功能可通过确定、通过与Fcγ受体结合、通过与C1q结合或通过诱导Fc介导的FcR交联来测量。

[0819] 在另一个这样的实施方案中,重链恒定序列和轻链恒定序列已被修饰,使得C1q与所述抗体的结合与未经修饰的抗体相比降低至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少97%或100%,其中C1q结合通过ELISA确定。

[0820] 因此,Fc区中在与C1q和Fcγ受体的相互作用中发挥主导作用的氨基酸可被修饰。

[0821] 可被修饰的氨基酸位置的一些实例,例如在IgG1同种型抗体中,包括位置L234、L235、G236、D265和P331。其组合(例如L234F/L235E/D265A或L234F/L235E/G236R)可导致与

人CD64、CD32、CD16和C1q的结合显著降低。

[0822] L234F和L235E氨基酸替换可导致Fc区与Fcγ受体和C1q的相互作用被消除(Canfield et al.,1991,J.Exp.Med.(173):1483-91;Duncan et al.,1988,Nature(332):738-40)。因此,在一个实施方案中,对应于L234和L235的位置处的氨基酸可分别是F和E。D265A或G236R氨基酸替换可降低与所有Fcγ受体的结合并阻止ADCC(Shields et al.,2001,J.Biol.Chem.(276):6591-604;Wilkinson et al.,2021,PloS one(16(12))e0260954)。因此,在一个实施方案中,对应于D265的位置处的氨基酸可以是A或者对应于G236的位置处的氨基酸可以是R。

[0823] 在本公开内容的一个实施方案中,在所述第一重链和所述第二重链二者中,对应于人IgG1重链中的位置L234和L235的位置处的氨基酸分别是F和E。

[0824] 在一个实施方案中,在所述第一重链和所述第二重链中的一者或两者中,对应于人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置处的氨基酸分别是F、E和A。

[0825] 在一个实施方案中,在所述第一重链和所述第二重链中的一者或两者中,对应于人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置处的氨基酸分别是F、E和R。

[0826] L234F-L235E-D265A非活化突变(在本文中也称为FEA或FEA形式)已显示出具有优异的安全性谱和强有力抑制Fc介导的效应物功能的能力。然而,观察到对于作为补体依赖性细胞毒性(CDC)的强效诱导剂的IgG1抗体,其携带FEA突变可以显示一些残留的CDC。此外,观察到与野生型IgG1 Fc区相比,具有FEA形式的重组表达抗体由于其N-聚糖的另外加工可表现出增加的糖基化异质性,并且这些抗体也显示出对由低pH条件诱导的聚集更敏感。同时,当突变L234F、L235E和G236R(在本文中也称为FEA或FEA形式)在IgG1抗体中组合时,这得到能够避免潜在的残留CDC活性、提供野生型样糖基化并且改善对低pH条件的耐受性的改进的惰性形式。因此,FER形式是高度有利的非活化抗体形式,其非常适合于临床开发和临床使用。对于双特异性抗体,相对于惰性形式替换,该FER惰性形式也可以以异二聚体形式组合,例如,双特异性抗体可由以下构成:携带惰性形式替换的一条链,而另一条链可包含不同的惰性形式替换(例如FEA)。因此,FER惰性形式非常适合于例如与现有的候选抗体进行组合,所述候选抗体已经历临床使用的开发而无需重新设计和重新进行所有需要的测定,从而允许利用技术(例如受控的Fab臂交换)来快速产生双特异性抗体。

[0827] 在一个特别优选的实施方案中,在所述第一重链和所述第二重链中的一者中,对应于人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置处的氨基酸分别是F、E和A,并且在所述第一重链和所述第二重链中的另一者中,对应于人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置处的氨基酸分别是F、E和R。

[0828] 在另一个特别优选的实施方案中,结合剂是包含第一重链和第二重链的双特异性抗体,其中第一重链和第二重链二者的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234和L235的位置分别是F和E,并且其中(i)第一重链的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置是L,并且第二重链的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置是R,或者(ii)第一重链的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置是R,并且第二重链的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置是L。

[0829] 在另一个特别优选的实施方案中,结合剂是包含第一重链和第二重链的双特异性抗体,其中

[0830] (1)第一重链和第二重链二者的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,

[0831] (2)第一重链和第二重链二者的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R,或者

[0832] (3)第一重链和第二重链中的一者的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,并且第一重链和第二重链中的另一者的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R,

[0833] 并且其中(i)第一重链的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置是L,并且第二重链的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置是R,或者(ii)第一重链的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置是R,并且第二重链的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置是L。

[0834] 具有三个氨基酸替换L234F、L235E和D265A以及另外地K409R或F405L突变的组合的抗体变体在本文中分别带有后缀“FEAR”或“FEAL”。

[0835] 具有三个氨基酸替换L234F、L235E和G236R以及另外地K409R或F405L突变的组合的抗体变体在本文中分别带有后缀“FERR”或“FERL”。

[0836] 在一个优选实施方案中,本文中所述的双特异性抗体包含:

[0837] (i)来源于IgG1-EpCAM-FEAL的半分子抗体和来源于IgG1-CD137-FEAR的半分子抗体,

[0838] (ii)来源于IgG1-EpCAM-FEAR的半分子抗体和来源于IgG1-CD137-FEAL的半分子抗体,

[0839] (iii)来源于IgG1-EpCAM-FERL的半分子抗体和来源于IgG1-CD137-FEAR的半分子抗体,或者(iv)来源于IgG1-EpCAM-FEAR的半分子抗体和来源于IgG1-CD137-FERL的半分子抗体。

[0840] 在另一个实施方案中,本文中所述的结合剂或抗体与一种或更多种治疗性部分连接或缀合,所述治疗性部分例如细胞因子、免疫抑制剂、免疫刺激分子和/或放射性同位素。这样的缀合物在本文中称为“免疫缀合物”或“药物缀合物”。包含一种或更多种细胞毒素的免疫缀合物被称为“免疫毒素”。

[0841] 在一个实施方案中,第一Fc序列和/或第二Fc序列与药物或前药缀合或者包含其的接受体基团。这样的接受体基团可以例如是非天然氨基酸。

[0842] 在与EpCAM和CD137结合的结合剂的一个实施方案中,EpCAM是人EpCAM,特别地是包含SEQ ID NO:59中所示的序列的人EpCAM。在与EpCAM和CD137结合的结合剂的一个实施方案中,CD137是人CD137,特别地是包含SEQ ID NO:62中所示的序列的人CD137。在一个实施方案中,EpCAM是人EpCAM并且CD137是人CD137。在一个实施方案中,EpCAM是包含SEQ ID NO:59中所示的序列的人EpCAM,并且CD137是包含SEQ ID NO:62中所示的序列的人CD137。

[0843] 在结合剂的一个实施方案中,

[0844] a)与人EpCAM结合的第一结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:1的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:5的CDR1、CDR2和CDR3序列;并且

[0845] b)与人CD137结合的第二结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重

链可变区(VH)包含SEQ ID NO:11的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:15的CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0846] 在结合剂的一个实施方案中,

[0847] a)与人EpCAM结合的第一结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:2、3和4中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:6、7和8中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0848] 并且

[0849] b)与人CD137结合的第二结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:12、13和14中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:16、17和18中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0850] 在结合剂的一个实施方案中,

[0851] a)与人EpCAM结合的第一结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)区域,所述重链可变区(VH)包含与SEQ ID NO:1具有至少90%、至少95%、至少97%、至少99%、或100%序列同一性的氨基酸序列,所述轻链可变区(VL)区域包含与SEQ ID NO:5具有至少90%、至少95%、至少97%、至少99%、或100%序列同一性的氨基酸序列,并且

[0852] b)与人CD137结合的第二结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)区域,所述重链可变区(VH)包含与SEQ ID NO:11具有至少90%、至少95%、至少97%、至少99%、或100%序列同一性的氨基酸序列,所述轻链可变区(VL)区域包含与SEQ ID NO:15具有至少90%、至少95%、至少97%、至少99%、或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0853] 在结合剂的一个实施方案中,

[0854] a)与人EpCAM结合的第一结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)区域,所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列,所述轻链可变区(VL)区域包含SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列;并且

[0855] b)与人CD137结合的第二结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)区域,所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列,所述轻链可变区(VL)区域包含SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列。

[0856] 特别地,结合剂可以是抗体,例如多特异性抗体,例如双特异性抗体。此外,结合剂可以是全长抗体或抗体片段的形式。

[0857] 进一步优选地,结合剂是人抗体或人源化抗体。

[0858] 每个可变区可包含三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)和四个框架区(FR1、FR2、FR3和FR4)。

[0859] 互补决定区(CDR)和框架区(FR)可从氨基端到羧基端以以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0860] 在一个实施方案中,结合剂包含:

[0861] i)含有第一重链可变区(VH)(所述第一结合区的VH)和第一重链恒定区(CH)的多肽,以及

[0862] ii)含有第二重链可变区(VH)(所述第二结合区的VH)和第二重链恒定区(CH)的多肽。

[0863] 在一个实施方案中,结合剂包含:

[0864] i)含有第一轻链可变区(VL)(所述第一结合区的VL)并且还含有第一轻链恒定区(CL)的多肽,以及

[0865] ii)含有第二轻链可变区(VL)(所述第二结合区的VL)并且还含有第二轻链恒定区(CL)的多肽。

[0866] 在一个实施方案中,结合剂是包含第一结合臂和第二结合臂的抗体,其中所述第一结合臂包含:

[0867] i)含有所述第一重链可变区(VH)和所述第一重链恒定区(CH)的多肽,以及

[0868] ii)含有所述第一轻链可变区(VL)和所述第一轻链恒定区(CL)的多肽;并且所述第二结合臂包含:

[0869] iii)含有所述第二重链可变区(VH)和所述第二重链恒定区(CH)的多肽,以及

[0870] iv)含有所述第二轻链可变区(VL)和所述第二轻链恒定区(CL)的多肽。

[0871] 在一个实施方案中,结合剂包含i)含有能够与EpCAM结合的所述抗原结合区的第一重链和第一轻链,所述第一重链包含第一重链恒定区,并且所述第一轻链包含第一轻链恒定区;以及ii)含有能够与CD137结合的所述抗原结合区的第二重链和第二轻链,所述第二重链包含第二重链恒定区,并且所述第二轻链包含第二轻链恒定区。

[0872] 第一重链恒定区(CH)和第二重链恒定区(CH)各自可包含恒定重链1(CH1)区、铰链区、恒定重链2(CH2)区和恒定重链3(CH3)区中的一者或更多者,优选地包含至少铰链区、CH2区和CH3区。

[0873] 第一重链恒定区(CH)和第二重链恒定区(CH)各自可包含CH3区,其中这两个CH3区包含非对称突变。非对称突变意指所述第一CH3区和第二CH3区的序列在不同位置包含氨基酸替换。例如,所述第一CH3区和第二CH3区中的一个在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的第405位的位置处包含突变,并且所述第一CH3区和第二CH3区中的另一个在对应于根据EU编号的人IgG1重链中的第409位的位置处包含突变。

[0874] 在所述第一重链恒定区(CH)中,与选自对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409的位置处的至少一个氨基酸可已被替换,并且在所述第二重链恒定区(CH)中,与选自对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409的位置处的至少一个氨基酸可已被替换。在一些具体实施方案中,第一重链和第二重链不在相同的位置替换(即,第一重链和第二重链包含非对称突变)。

[0875] 在结合剂的一个实施方案中,(i)在所述第一重链恒定区(CH)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置处的氨基酸是L,并且在所述第二重链恒定区(CH)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置处的氨基酸是R,或者(ii)在所述第一重链中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置处的氨基酸是R,并且在所述第二重链中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置处的氨基酸是L。

[0876] 在一个实施方案中,与包含相同的第一抗原结合区和第二抗原结合区以及包含人IgG1铰链区、CH2区和CH3区的两个重链恒定区(CH)的另一抗体相比,结合剂诱导Fc介导的效应物功能的程度更低。

[0877] 在结合剂的一个具体实施方案中,所述第一重链恒定区(CH)和第二重链恒定区(CH)被修饰,使得与除了包含未经修饰的第一重链恒定区(CH)和第二重链恒定区(CH)之外

都相同的抗体相比,抗体诱导Fc介导的效应物功能的程度更低。特别地,所述未经修饰的第一重链恒定区(CH)和第二重链恒定区(CH)各自或二者均包含SEQ ID NO:47中所示的氨基酸序列,由SEQ ID NO:47中所示的氨基酸序列组成,或者基本上由SEQ ID NO:47中所示的氨基酸序列组成。

[0878] Fc介导的效应物功能可通过测量结合剂与Fcγ受体的结合、与C1q的结合、或者诱导Fc介导的Fcγ受体的交联来确定。特别地,Fc介导的效应物功能可通过测量结合剂与C1q的结合来确定。

[0879] 结合剂的第一重链恒定区和第二重链恒定区已被修饰,使得与野生型抗体相比,C1q与所述抗体的结合降低,优选地降低至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少97%或100%,其中C1q结合优选地通过ELISA确定。

[0880] 在结合剂的一个实施方案中,在所述第一重链恒定区(CH)和第二重链恒定区(CH)中的至少一个中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235、G236、D265、N297和P331的位置处的一个或更多个氨基酸分别不是L、L、G、D、N和P。

[0881] 在结合剂的一个实施方案中,在所述第一重链和所述第二重链中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234和L235的位置分别可以是F和E。

[0882] 特别地,在所述第一重链恒定区(HC)和/或第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别可以是F、E和R,和/或者在所述第一重链恒定区(HC)和/或第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别可以是F、E和A。在一个实施方案中,在所述第一重链恒定区(HC)和第二重链恒定区(HC)中的一个中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别可以是F、E和R,并且在所述第一重链恒定区(HC)和第二重链恒定区(HC)中的另一个中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别可以是F、E和A。在一个实施方案中,在所述第一重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别可以是F、E和R,并且在所述第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别可以是F、E和A。

[0883] 在结合剂的一个实施方案中,第一重链恒定区和第二重链恒定区二者的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234和L235的位置分别是F和E,其中:(i)第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置是L,并且第二重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置是R,或者(ii)第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置是R,并且第二重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置是L。

[0884] 在结合剂的一个实施方案中,第一重链恒定区和第二重链恒定区二者的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,第一重链恒定区和第二重链恒定区二者的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R,或者第一重链恒定区和第二重链恒定区中的一个的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,并且第一重链恒定区和第二重链恒定区中的另一个的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和G236的位置分别是F、E和R,其中(i)第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的

位置是L,并且第二重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置是R,或者(ii)第一重链的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的K409的位置是R,并且第二重链的对应于根据EU编号的人IgG1重链中的F405的位置是L。

[0885] 在一个实施方案中,结合剂包含kappa(κ)轻链恒定区。

[0886] 在一个实施方案中,结合剂包含lambda(λ)轻链恒定区。

[0887] 在结合剂的一个实施方案中,第一轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区或lambda(λ)轻链恒定区。

[0888] 在结合剂的一个实施方案中,第二轻链恒定区是lambda(λ)轻链恒定区或kappa(κ)轻链恒定区。

[0889] 在结合剂的一个实施方案中,第一轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区并且第二轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区。在结合剂的一个实施方案中,第一轻链恒定区是lambda(λ)轻链恒定区并且第二轻链恒定区是lambda(λ)轻链恒定区。在结合剂的一个实施方案中,第一轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区并且第二轻链恒定区是lambda(λ)轻链恒定区,或者第一轻链恒定区是lambda(λ)轻链恒定区并且第二轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区。

[0890] 在一个实施方案中,结合剂(特别是抗体)是选自IgG1、IgG2、IgG3以及IgG4的同种型。特别地,结合剂可以是全长IgG1抗体。在一些优选实施方案中,结合剂(特别是抗体)是IgG1m(f)同种异型。

[0891] 与EpCAM和CD137结合的结合剂的用途

[0892] 本文中公开的结合剂可用于治疗肿瘤或癌症。在一个实施方案中,肿瘤或癌症是表达EpCAM的肿瘤或癌症。在一个实施方案中,EpCAM是人EpCAM,特别是包含SEQ ID NO:59中所示的序列的人EpCAM。

[0893] 根据本公开内容待治疗的对象优选是人对象。

[0894] 在一个优选实施方案中,待治疗的肿瘤或癌症是实体瘤或癌症。肿瘤或癌症可以是转移性肿瘤或癌症。

[0895] 优选地,肿瘤或癌症可选自黑素瘤、卵巢癌、肺癌(例如,非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC))、结直肠癌、头颈癌、胃癌、乳腺癌、肾癌、尿路上皮癌、膀胱癌、食管癌、胰腺癌、肝癌、胸腺瘤和胸腺癌、脑癌、胶质瘤、肾上腺皮质癌、甲状腺癌、其他皮肤癌、肉瘤、多发性骨髓瘤、白血病、淋巴瘤、骨髓增生异常综合征、子宫内膜癌、前列腺癌、阴茎癌、宫颈癌、霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)、梅克尔细胞癌(Merkel cell carcinoma)以及间皮瘤。更优选地,肿瘤或癌症选自黑素瘤、肺癌、结直肠癌、胰腺癌和头颈癌。

[0896] 在一些具体实施方案中,肿瘤或癌症选自肺癌(例如非小细胞肺癌(NSCLC))、尿路上皮癌(膀胱癌、输尿管癌、尿道癌或肾盂癌)、子宫内膜癌(endometrial cancer,EC)、胸腺癌(例如三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer,TNBC))、头颈鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma of the head and neck,SCCHN)(例如口腔癌、咽癌或喉癌)以及宫颈癌。

[0897] 在一些实施方案中,在每剂和/或每个治疗周期中施用的结合剂的量为:

[0898] 约0.3至5mg/kg体重或总共约25至400mg;和/或者约2.1×10^{-9}至3.4×10^{-8}mol/kg

体重或总计约1.7×10^{-7}至2.7×10^{-6}mol。

[0899] 根据这些实施方案,基于施用结合剂的对象的中位体重为80kg,以mg/kg限定的剂量可转换为固定剂量(flat dose),并且反之亦然。

[0900] 在每剂和/或每个治疗周期中施用的结合剂的量可具体为约0.3至4.0mg/kg体重或总计约25至320mg;和/或者约2.1×10^{-9}至2.7×10^{-8}mol/kg体重或总计约1.7×10^{-7}至2.2×10^{-6}mol。

[0901] 在每剂和/或每个治疗周期中施用的结合剂的量可具体为约0.38至4.0mg/kg体重或总计约30至320mg;和/或者约2.6×10^{-9}至2.7×10^{-8}mol/kg体重或总计约2.4×10^{-7}至2.2×10^{-6}mol。

[0902] 在每剂和/或每个治疗周期中施用的结合剂的量可具体为约0.5至3.3mg/kg体重或总计约40至260mg;和/或者约3.4×10^{-9}至2.2×10^{-8}mol/kg体重或总计约2.7×10^{-7}至1.8×10^{-6}mol。

[0903] 在每剂和/或每个治疗周期中施用的结合剂的量可具体为约0.6至2.5mg/kg体重或总计约50至200mg;和/或者约4.3×10^{-9}至1.7×10^{-8}mol/kg体重或总计约3.4×10^{-7}至1.4×10^{-6}mol。

[0904] 在每剂和/或每个治疗周期中施用的结合剂的量可具体为约0.8至1.8mg/kg体重或总计约60至140mg;和/或者约5.1×10^{-9}至1.2×10^{-8}mol/kg体重或总计约4.1×10^{-7}至9.5×10^{-7}mol。

[0905] 在每剂和/或每个治疗周期中施用的结合剂的量可具体为约0.9至1.8mg/kg体重或总计约70至140mg;和/或者约6.0×10^{-9}至1.2×10^{-8}mol/kg体重或总计约4.8×10^{-7}至9.5×10^{-7}mol。

[0906] 在每剂和/或每个治疗周期中施用的结合剂的量可具体为约1至1.5mg/kg体重或总计约80至120mg;和/或者约6.8×10^{-9}至1.0×10^{-8}mol/kg体重或总计约5.5×10^{-7}至8.2×10^{-7}mol。

[0907] 在每剂和/或每个治疗周期中施用的结合剂的量可具体为约1.1至1.4mg/kg体重或总计约90至110mg;和/或者约7.7×10^{-9}至9.4×10^{-9}mol/kg体重或总计约6.1×10^{-7}至7.5×10^{-7}mol。

[0908] 在每剂和/或每个治疗周期中施用的结合剂的量可具体为约1.2至1.3mg/kg体重或总计约95至105mg;和/或者约6.8×10^{-9}至8.9×10^{-9}mol/kg体重或总计约6.5×10^{-7}至7.2×10^{-7}mol。

[0909] 在每剂和/或每个治疗周期中施用的结合剂的量可具体为约0.8至1.5mg/kg体重或总计约65至120mg;和/或者约5.5×10^{-9}至1.0×10^{-8}mol/kg体重或总计约4.4×10^{-7}至8.2×10^{-7}mol。

[0910] 在每剂和/或每个治疗周期中施用的结合剂的量可具体为约0.9至1.3mg/kg体重或总计约70至100mg;和/或者

[0911] 约6.0×10^{-9}至8.5×10^{-9}mol/kg体重或总计约4.8×10^{-7}至6.8×10^{-7}mol。约0.9至1.1mg/kg体重或总计约75至90mg;和/或者约6.4×10^{-9}至7.7×10^{-9}mol/kg体重或总计约5.1×10^{-7}至6.1×10^{-7}mol。

[0912] 此外,在每剂和/或每个治疗周期中施用的结合剂的量可具体为0.3至4.0mg/kg体

重或总计25至320mg;和/或者

[0913] 2.1×10^{-9}至2.7×10^{-8}mol/kg体重或总计1.7×10^{-7}至2.2×10^{-6}mol。

[0914] 在每剂和/或每个治疗周期中施用的结合剂的量可具体为0.38至4.0mg/kg体重或总计30至320mg;和/或者

[0915] 2.6×10^{-9}至2.7×10^{-8}mol/kg体重或总计2.4×10^{-7}至2.2×10^{-6}mol。

[0916] 在每剂和/或每个治疗周期中施用的结合剂的量可具体为0.5至3.3mg/kg体重或总计40至260mg;和/或者

[0917] 3.4×10^{-9}至2.2×10^{-8}mol/kg体重或总计2.7×10^{-7}至1.8×10^{-6}mol。

[0918] 在每剂和/或每个治疗周期中施用的结合剂的量可具体为0.6至2.5mg/kg体重或总计50至200mg;和/或者

[0919] 4.3×10^{-9}至1.7×10^{-8}mol/kg体重或总计3.4×10^{-7}至1.4×10^{-6}mol。

[0920] 在每剂和/或每个治疗周期中施用的结合剂的量可具体为0.8至1.8mg/kg体重或总计60至140mg;和/或者

[0921] 5.1×10^{-9}至1.2×10^{-8}mol/kg体重或总计4.1×10^{-7}至9.5×10^{-7}mol。

[0922] 在每剂和/或每个治疗周期中施用的结合剂的量可具体为0.9至1.8mg/kg体重或总计70至140mg;和/或者

[0923] 6.0×10^{-9}至1.2×10^{-8}mol/kg体重或总计4.8×10^{-7}至9.5×10^{-7}mol。

[0924] 在每剂和/或每个治疗周期中施用的结合剂的量可具体为1至1.5mg/kg体重或总计80至120mg;和/或者

[0925] 6.8×10^{-9}至1.0×10^{-8}mol/kg体重或总计5.5×10^{-7}至8.2×10^{-7}mol。

[0926] 在每剂和/或每个治疗周期中施用的结合剂的量可具体为1.1至1.4mg/kg体重或总计90至110mg;和/或者

[0927] 7.7×10^{-9}至9.4×10^{-9}mol/kg体重或总计6.1×10^{-7}至7.5×10^{-7}mol。

[0928] 在每剂和/或每个治疗周期中施用的结合剂的量可具体为1.2至1.3mg/kg体重或总计95至105mg;和/或者

[0929] 6.8×10^{-9}至8.9×10^{-9}mol/kg体重或总计6.5×10^{-7}至7.2×10^{-7}mol。

[0930] 在每剂和/或每个治疗周期中施用的结合剂的量可具体为0.8至1.5mg/kg体重或总计65至120mg;和/或者

[0931] 5.5×10^{-9}至1.0×10^{-8}mol/kg体重或总计4.4×10^{-7}至8.2×10^{-7}mol。

[0932] 在每剂和/或每个治疗周期中施用的结合剂的量可具体为0.9至1.3mg/kg体重或总计70至100mg;和/或者

[0933] 6.0×10^{-9}至8.5×10^{-9}mol/kg体重或总计4.8×10^{-7}至6.8×10^{-7}mol。

[0934] 在每剂和/或每个治疗周期中施用的结合剂的量可具体为0.9至1.1mg/kg体重或总计75至90mg;和/或者

[0935] 6.4×10^{-9}至7.7×10^{-9}mol/kg体重或总计5.1×10^{-7}至6.1×10^{-7}mol。

[0936] 在每剂和/或每个治疗周期中施用的结合剂的量可以为约1.1mg/kg体重或总计约80mg;和/或者

[0937] 约6.8×10^{-9}mol/kg体重或总计约5.5×10^{-7}mol。

[0938] 在每剂和/或每个治疗周期中施用的结合剂的量可以为1.1mg/kg体重或总计

80mg;和/或者

[0939] 6.8×10^{-9}mol/kg体重或总计5.5×10^{-7}mol。

[0940] 目前优选的是,在每剂和/或每个治疗周期中施用的结合剂的量为:约1.25mg/kg体重或总计约100mg;和/或者

[0941] 约8.5×10^{-9}mol/kg体重或总计约6.8×10^{-7}mol。

[0942] 同样优选的是,在每剂和/或每个治疗周期中施用的结合剂的量为:1.25mg/kg体重或总计100mg;和/或者

[0943] 8.5×10^{-9}mol/kg体重或总计6.8×10^{-7}mol。

[0944] 结合剂可以以任何方式以及通过本领域已知的任何途径施用。在一个优选实施方案中,全身性施用结合剂,例如肠胃外施用,特别是静脉内施用。

[0945] 结合剂可以如本文中所述的任何合适的药物组合物的形式施用。在一个优选实施方案中,结合剂以输注的形式施用。

[0946] 结合剂可通过使用静脉内(IV)输注来施用,例如通过在最少30分钟内,例如在最少60分钟内使用静脉内输注来施用,例如通过在30至120分钟内使用静脉内输注来施用。优选地,结合剂通过在30分钟内使用静脉内(IV)输注来施用。

[0947] 本文中所述的结合剂可以以本身或者以编码该结合剂的核酸的形式施用。

[0948] 结合剂或编码该结合剂的核酸可以以任何合适的形式(例如,像这样裸的或者以包含该结合剂或核酸的合适的颗粒的形式包装的)施用。然而,优选的是,该结合剂或核酸以任何合适的本文中所述的药物组合物的形式施用。

[0949] 该结合剂可以与一种或更多种另外的治疗剂一起共施用。在一些实施方案中,一种或更多种另外的治疗剂包含一种或更多种化学治疗剂,特别是如本文中所述的通常用于治疗肿瘤或癌症的那些化学治疗剂。例如,一种或更多种化学治疗剂包括基于铂的化合物(例如,顺铂、奥沙利铂(oxaliplatin)和卡铂)、基于紫杉烷的化合物(例如,紫杉醇和nab-紫杉醇)、核苷类似物(例如,5-氟尿嘧啶和吉西他滨(gemcitabine))及其组合(例如,顺铂/卡铂+5-氟尿嘧啶或nab-紫杉醇+吉西他滨)。

[0950] 组合物或药物组合物可与载体、赋形剂和/或稀释剂以及适用于药物组合物的任何其他组分(包括已知的辅料)根据常规技术例如在Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第19版,Gennaro,Ed.,Mack Publishing Co.,Easton,PA,1995中公开的那些一起配制。可药用载体或稀释剂以及任何已知的辅料和赋形剂应该适用于结合剂和/或核酸和/或者一种或更多种另外的治疗剂(如果存在的话)以及所选择的施用方式。基于对所选择的化合物或药物组合物的期望生物特性缺乏显著负面影响来确定药物组合物的载体和其他组分的合适性。

[0951] 组合物,特别是药物组合物,可包含稀释剂、填充剂、盐、缓冲液、洗涤剂(例如,非离子洗涤剂,例如吐温20或吐温80)、稳定剂(例如,糖或无蛋白氨基酸)、防腐剂、增溶剂和/或适合于包含在药物组合物中的其他材料。

[0952] 本公开内容的药物组合物可包含一种或更多种可药用载体、赋形剂和/或稀释剂。用于治疗用途的可药用载体、赋形剂或稀释剂在制药领域中是公知的,并且例如在Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co.(A.R Gennaro edit.1985)中描述。

[0953] 可根据预期施用途径和标准药物实践来选择药用载体、赋形剂或稀释剂。

[0954] 术语“载体”是指可以是天然的、合成的、有机的、无机的组分，在其中将活性组分组合以促进、增强或实现药物组合物的施用。本文中使用的载体可以是适合于施用于对象的一种或更多种相容的固体或液体填充剂、稀释剂或包封物质。合适的载体包括但不限于：无菌水、林格液(Ringer)、乳酸林格液、无菌氯化钠溶液、等张盐水、聚亚烷基二醇、氢化萘并且特别是生物相容性丙交酯聚合物、丙交酯/乙交酯共聚物或聚氧乙烯/聚氧丙烯共聚物。在一个实施方案中，本公开内容的药物组合物包含等张盐水。

[0955] 可用于(药物)组合物的合适的水性和非水性载体的一些实例包括水、盐水、磷酸缓冲盐水、乙醇、右旋糖、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油(例如橄榄油、玉米油、花生油、棉籽油和芝麻油)、羧甲基纤维素胶体溶液、黄蓍胶和可注射的有机酯(例如油酸乙酯)和/或多种缓冲液。其他载体在制药领域是公知的。

[0956] 可药用载体包括无菌水溶液或分散体和用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。这样的介质和试剂在药物活性物质中的使用是本领域中已知的。除非任何常规介质或药剂与活性化合物不相容，否则考虑其在(药物)组合物中的使用。

[0957] 本文中使用的术语“赋形剂”是指可存在于本公开内容的(药物)组合物中但不是活性成分的物质。赋形剂的实例包括但不限于载体、黏合剂、稀释剂、润滑剂、增稠剂、表面活性剂、防腐剂、稳定剂、乳化剂、缓冲液、矫味剂或着色剂。

[0958] 术语“稀释剂”涉及稀释剂和/或稀化剂(thinning agent)。此外，术语“稀释剂”包括流体、液体或固体悬浮剂和/或混合介质中的任一种或更多种。合适的稀释剂的一些实例包括乙醇、甘油和水。

[0959] 用于本公开内容的药物组合物中的合适的防腐剂包括但不限于：苯扎氯铵、氯丁醇、对羟基苯甲酸酯和硫柳汞。

[0960] (药物)组合物还可包含可药用抗氧化剂，例如(1)水溶性抗氧化剂，例如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等；(2)油溶性抗氧化剂，例如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基羟基茴香醚(BHA)、丁基羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、α-生育酚等；以及(3)金属-螯合剂，例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

[0961] (药物)组合物还可在组合物中包含等张剂，例如糖、多元醇，例如甘露糖醇、山梨糖醇、甘油或氯化钠。

[0962] (药物)组合物还可包含适合于所选择的施用途径的一种或更多种辅料，例如防腐剂、润湿剂、乳化剂、分散剂、防腐剂或缓冲液，其可提高组合物的保质期或有效性。本文中使用的组合物可用将保护化合物免于快速释放的载体来制备，例如控释制剂，包括植入物、经皮贴剂和微囊化递送系统。这样的载体可包括明胶，单硬脂酸甘油酯，二硬脂酸甘油酯，可生物降解的、生物相容的聚合物(例如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和单独的或与蜡一起的聚乳酸)，或本领域公知的其他物质。用于制备这样的制剂的方法通常是本领域技术人员已知的，参见例如Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems,J.R.Robinson,ed.,Marcel Dekker,Inc.,New York,1978。

[0963] “可药用盐”包括例如，酸加成盐，其可例如通过使用可药用酸，例如盐酸、硫酸、富马酸、马来酸、琥珀酸、乙酸、苯甲酸、柠檬酸、酒石酸、碳酸或磷酸形成。此外，合适的可药用盐可包括碱金属盐(例如，钠盐或钾盐)；碱土金属盐(例如，钙盐或镁盐)；铵(NH_4^+)；以及与

合适的有机配体(例如,使用反荷阴离子例如卤化物、氢氧根、羧酸根、硫酸根、磷酸根、硝酸根、烷基磺酸根和芳基磺酸根形成的季铵和胺阳离子)形成的盐。可药用盐的一些示例性实例包括但不限于:乙酸盐、己二酸盐、藻酸盐、精氨酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、碳酸氢盐、硫酸氢盐、酒石酸氢盐、硼酸盐、溴化物、丁酸盐、乙二胺四乙酸钙、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、右旋樟脑磺酸盐、碳酸盐、氯化物、柠檬酸盐、克拉维酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、二盐酸盐、十二烷基硫酸盐、依地酸盐(edetate)、乙二磺酸盐、依托酸盐(estolate)、乙磺酸盐(esylate)、乙磺酸盐(ethanesulfonate)、甲酸盐、富马酸盐、半乳酸盐(galactate)、半乳糖醛酸盐、葡萄糖酸盐、葡庚糖酸盐、葡糖酸盐、谷氨酸盐、甘油磷酸盐、乙醇酰阿散酸盐(glycolylarsanilate)、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、已基间苯二酚盐、海巴明(hydrabamine)、氢溴酸盐、盐酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙磺酸盐、羟基萘酸盐、碘化物、异丁酸盐、异硫氰酸盐、乳酸盐、乳糖醛酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、甲烷磺酸盐、甲基硫酸盐、粘酸盐、2-萘磺酸盐、萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、N-甲基葡萄糖铵盐、油酸盐、草酸盐、扑酸盐(双羟萘酸盐)、棕榈酸盐、泛酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐/二磷酸盐、邻苯二甲酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、聚半乳糖醛酸盐、丙酸盐、水杨酸盐、硬脂酸盐、硫酸盐、辛二酸盐、琥珀酸盐、鞣酸盐、酒石酸盐、茶氯酸盐、甲苯磺酸盐、三乙基碘盐(triethiodide)、十一烷酸盐、戊酸盐等(参见,例如,S.M.Berge etal.,“Pharmaceutical Salts”,J.Pharm.Sci.,66,第1至19页(1977))。非可药用盐可用于制备可药用盐,并且包括在本公开内容中。

[0964] 在一个实施方案中,本文中使用的结合剂可被配制以确保在体内适当分布。用于肠胃外施用的可药用载体包括无菌水溶液或分散体以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。这样的介质和药剂用于药物活性物质的用途是本领域中已知的。除非任何常规介质或药剂与活性化合物不相容,否则考虑其在组合物中的使用。其他活性或治疗化合物也可并入到组合物中。

[0965] 注射用药物组合物通常必须是无菌的并且在制备和储存条件下是稳定的。组合物可被配制为溶液剂、微乳剂、脂质体或适合于高药物浓度的其他有序结构。载体可以是水性或非水性溶剂或分散介质,其包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油(例如橄榄油)和可注射的有机酯(例如油酸乙酯)。例如,可通过使用包衣(例如卵磷脂)、通过在分散体的情况下维持所需的颗粒尺寸和通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。在许多情况下,将优选在组合物中包含等张剂,例如糖、多元醇(例如甘油、甘露糖醇、山梨糖醇)或氯化钠。通过在组合物中包含延迟吸收的药剂(例如单硬脂酸盐和明胶)可实现可注射组合物的延长吸收。无菌可注射溶液可通过将活性化合物以所需的量与例如如上文列举的成分之一或组合(根据需要)一起并入在合适的溶剂中,随后灭菌微滤来制备。通常,通过将活性化合物并入到无菌载剂中来制备分散体,所述载剂包含基本的分散介质和所需的例如来自上文列举的那些的其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,制备方法的实例是真空干燥和冷冻干燥(冻干),其产生活性成分加上来自其先前无菌过滤溶液的任何另外的期望成分的粉末。

[0966] 无菌可注射溶液可通过将活性化合物以所需的量与上文列举的成分之一或组合(根据需要)一起并入到合适的溶剂中,随后灭菌微滤来制备。通常,通过将活性化合物并入到无菌载剂中来制备分散体,所述载剂包含基本分散介质和所需的来自上文列举的那些的

其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,制备方法的实例是真空干燥和冷冻干燥(冻干),其产生活性成分加上来自其先前无菌过滤溶液的任何另外的期望成分的粉末。

[0967] 在某些实施方案中,将结合剂配制在含有组氨酸、蔗糖和聚山梨酯-80并且pH为约5至约6(例如5至6)的组合物或制剂中。特别地,结合剂可以在含有约20mM组氨酸、约250mM蔗糖、约0.02%聚山梨酯-80并且pH为约5.5的组合物或制剂中,例如含有20mM组氨酸、250mM蔗糖、0.02%聚山梨酯-80并且pH为5.5的组合物或制剂。在一些具体实施方案中,制剂可包含约10至约30mg结合剂/mL,例如10至30mg结合剂/mL,特别是约20mg结合剂/mL,例如20mg结合剂/mL。

[0968] 结合剂可在如上文限定的组合物中提供,并且随后可在施用之前在0.9% NaCl(盐水)中稀释。

[0969] 根据本公开内容的药物组合物通常以“药学有效量”和以“可药用制剂”施加。

[0970] 术语“可药用”是指不与药物组合物的活性组分的作用相互作用的物质的无毒性。

[0971] 本文中引用的文件和研究的引证并不旨在承认任何前述内容是相关的现有技术。关于这些文件内容的所有陈述都是基于申请人可获得的信息,并且不构成对这些文件内容正确性的任何承认。

[0972] 呈现该描述(包括以下实施例)以使本领域普通技术人员能够制备和使用多个实施方案。对特定装置、技术和应用的描述仅作为实例提供。对本文中所述实例的多种修改对于本领域普通技术人员而言将是明显的,并且在不脱离多个实施方案的精神和范围的情况下,本文中定义的一般原理可应用于另一些实例和应用。因此,多个实施方案不旨在限于本文中所描述和示出的实例,而是符合与权利要求书相一致的范围。

[0973] 实施例

[0974] 实施例1:通过2-MEA诱导的Fab臂交换的EpCAMx4-1BB双特异性抗体的产生

[0975] 在实施例中使用以下抗体:

[0976] EpCAM抗体

[0977] 已在专利号EP 1 479 696A1(Crucell Holland BV)中公开了UBS-54的VH和VL序列,并且基于这些序列的抗体在本文中称为“IgG1-EpCAM-UBS-54”。已在专利号EP 1 479 696A1(Crucell Holland BV)中公开了A37的VH和VL序列,并且基于这些序列的抗体在本文中称为“IgG1-EpCAM-A37”。已在EP 1 479 696A1(Crucell Holland BV)中公开了C52的VH和VL序列,并且基于这些序列的抗体在本文中称为“IgG1-EpCAM-C52”。已在专利号US 7,648,703 B2(GlaxoSmithKline LLC)中公开了323/A3的整个κ轻链和重链序列,并且基于323/A3的VH和VL序列的抗体在本文中称为“IgG1-EpCAM-323-A3”。

[0978] 4-1BB抗体

[0979] 如WO2018/011421(Genmab A/S;BioNTech AG)的实施例1和表1中所述的CD137抗体克隆005。CD137抗体克隆005在本文中称为“IgG1-CD137-005”。

[0980] 如WO2018/011421(Genmab A/S;BioNTech AG)的实施例1和表1中所述的CD137抗体克隆009。CD137抗体克隆009在本文中称为“IgG1-CD137-009”。

[0981] 如WO2018/011421(Genmab A/S;BioNTech AG)的实施例7和表1中所述的CD137-009人源化抗体(HC7和LC2)。名称4-1BB-009-HC7LC2在本文中称为“IgG1-CD137-009-

HC7LC2”。

[0982] 抗体表达

[0983] 将抗体序列克隆到pcDNA3.3表达载体(Invitrogen,US)中并且在Fc结构域中表达为IgG1、κ或IgG1、λ(在有或没有Fc沉默技术和/或DuoBody®技术氨基酸替换的情况下)(参见下文)。在无血清条件下,通过使用ExpiFectamineTM 293(Thermo Fisher Scientific;目录号A14525)将相关重链和轻链表达载体在Expi293FTM细胞(Thermo Fisher Scientific,US;目录号A14527)中共转染来产生所有抗体,基本上如通过制造商所述。

[0984] 双特异性抗体的产生

[0985] 使用DuoBody®平台技术在体外产生双特异性抗体,所述技术即经2-MEA诱导的受控Fab臂交换(controlled Fab-arm exchange,cFAE),如WO2011147986、WO2011131746和WO2013060867(Genmab),Labrijn etal.,PNAS2013,110:5145-50和Gramer et al.,MAbs 2013,5:962-973中所述。为了使得能够通过该方法产生双特异性抗体,产生了在CH3结构域中携带有单个突变的IgG1分子:在一个亲本IgG1抗体中为F405L突变,在另一个亲本IgG1抗体中为K409R突变。除了这些突变之外,亲本IgG1抗体还包含导致Fc结构域不能够与IgG Fc受体(Fcγ受体)和/或补体因子相互作用的替换,所述补体因子例如C1q:L234F、L235E、D265A(FEA;US2015/0337049)或L234F、L235E、G236R(FER)。

[0986] Fc沉默技术突变和DuoBody®技术突变的组合命名如下:

[0987] L234F、L235E、D265A和F405L:FEAL

[0988] L234F、L235E、D265A和K409R:FEARL234F、L235E、G236R和F405L:FERL。

[0989] 通过经2-MEA诱导的受控Fab臂交换(cFAE)(如Labrijn et al.,Sci Rep 2017,7:2476中所述)在体外产生了小鼠双特异性抗体。为了使得能够通过该方法产生双特异性抗体,产生了在CH3结构域中携带有双匹配点突变的小鼠IgG2a分子(IgG2amm):在一个亲本IgG2amm抗体中为F405L/R411T(LT)突变,在另一个亲本IgG2amm抗体中为T370K/K409R(KR)突变。除了这些突变之外,亲本IgG2amm抗体包含产生不能够与IgG Fc受体(Fcγ受体)和/或补体因子相互作用的Fc结构域的替换,所述补体因子例如C1q:L234A、L235A,如Labrijn et al.,Sci Rep 2017,7:2476中所述。

[0990] 对于小鼠双特异性抗体,沉默突变和cFAE突变的组合命名如下:

[0991] L234A、L235A、F405L/R411T:AALT

[0992] L234A、L235A、T370K/K409R:AAKR。

[0993] 亲本抗体的重链(HC)和轻链(LC)序列在以下SEQ ID NO中示出:

IgG1-EpCAM-UBS-54-FEAR	SEQ ID NO: 25 (HC) 和 SEQ ID NO: 26 (LC).
IgG1-EpCAM-A37-FEAR	SEQ ID NO: 29 (HC) 和 SEQ ID NO: 10 (LC).
IgG1-EpCAM-A37-FERL	SEQ ID NO: 9 (HC) 和 SEQ ID NO: 10 (LC).
IgG1-EpCAM-C52-FEAR	SEQ ID NO: 27 (HC) 和 SEQ ID NO: 28 (LC).
IgG1-EpCAM-323-A3	SEQ ID NO: 24 (HC) 和 SEQ ID NO: 22 (LC).

[0994]

IgG1-EpCAM-323-A3-FEAL	SEQ ID NO: 21 (HC) 和 SEQ ID NO: 22 (LC).
IgG1-EpCAM-323-A3-FEAR	SEQ ID NO: 23 (HC) 和 SEQ ID NO: 22 (LC).
IgG1-CD137-005-FEAR	SEQ ID NO: 33 (HC) 和 SEQ ID NO: 34 (LC).
IgG1-CD137-009-FEAR	SEQ ID NO: 31 (HC) 和 SEQ ID NO: 32 (LC).
IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	SEQ ID NO: 19 (HC) 和 SEQ ID NO: 20 (LC).
IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL	SEQ ID NO: 30 (HC) 和 SEQ ID NO: 20 (LC).
IgG2amm-EpCAM-323-A3-AAKR	SEQ ID NO: 39 (HC) 和 SEQ ID NO: 40 (LC).
IgG2amm-EpCAM-323-A3-AALT	SEQ ID NO: 41 (HC) 和 SEQ ID NO: 40 (LC).
IgG2amm-m4-1BB-3H3-AAKR	SEQ ID NO: 42 (HC) 和 SEQ ID NO: 43 (LC).

[0995] 为了产生双特异性抗体,将两个亲本抗体以等摩尔比在PBS缓冲液(磷酸缓冲盐水;8.7mM HPO_4^{2-}、1.8mM $H_2PO_4^-$、163.9mM Na+、140.3mM Cl-,pH 7.4)中混合。添加2-巯基乙胺-HCl(2-MEA)至最终浓度为75mM并将反应混合物在31℃下孵育5小时。通过使用10kDa截留分子量的Slide-A-Lyzer盒(Thermo Fisher Scientific)根据制造商的方案将2-MEA透析至PBS缓冲液中来将其移除。将样品在4℃下储存过夜以允许二硫键的再氧化和完整双特异性抗体的形成。如通过电喷雾电离质谱(electrospray ionization mass spectrometry,ESI-MS)质谱评估的,cFAE的效力>95%,如通过Gramer et al.(MAbs.2013Nov 1;5(6):962-973.)所述。

[0996] 非结合对照抗体b12

[0997] IgG1-b12是HIV-1gp120特异性抗体(Barbas,CF.J Mol Biol.1993Apr5;230(3):812-23),其作为单特异性和双特异性抗体的阴性、非结合对照抗体用于一些实例中。

[0998] 亲本抗体的重链(HC)和轻链(LC)序列在以下SEQ ID NO中示出:

IgG1-b12-FEAL	SEQ ID NO: 36 (HC) 和 SEQ ID NO: 37 (LC).
IgG1-b12-FEAR	SEQ ID NO: 35 (HC) 和 SEQ ID NO: 37 (LC).
IgG1-b12-FERL	SEQ ID NO: 38 (HC) 和 SEQ ID NO: 37 (LC).
IgG2amm-b12-AALT	SEQ ID NO: 44 (HC) 和 SEQ ID NO: 45 (LC).
IgG2amm-b12-AAKR	SEQ ID NO: 46 (HC) 和 SEQ ID NO: 45 (LC).

[0999] 实施例2-使用生物层干涉术对EpCAM特异性抗体的结合亲和力的确定方法

[1000] 在Octet HTX仪器(FortéBio)上通过无标记的生物层干涉术来确定EpCAM特异性抗体的靶结合亲和力。

[1001] 在30℃下在以1,000RPM摇动时进行实验。通过将抗Penta-HIS(HIS1K)生物传感器(FortéBio,目录号18-5120)暴露于pH 1.5的10mM甘氨酸(Sigma-Aldrich,目录号15527)缓冲液5秒,随后在样品稀释剂(FortéBio,目录号18-1104)中中和5秒来进行预调整;两个步

骤均重复2次。使抗Penta-HIS生物传感器装载有100nM(2.8μg/mL)重组人EpCAM(R&D systems,目录号9277-EP)或重组食蟹猴EpCAM(R&D systems,目录号10451-EP),持续600秒。在样品稀释剂中进行基线测量(300秒)之后,在样品稀释剂中用两倍稀释步骤使用1.56nM至100nM的浓度范围来确定功能上单价的抗体的缔合(200秒)和解离(1,000秒)。功能上单价的EpCAM抗体是这样的双特异性分子,其包含一个EpCAM特异性Fab臂和非结合对照Fab臂(基于实施例1中所述的HIV gp120特异性b12抗体),从而确保在该测定中与EpCAM的结合是功能上单价的。基于所使用抗体的氨基酸序列的分子质量(146.0至148.6kDa)是用于计算的。对于每个抗体,使用参考传感器,所述参考传感器用样品稀释剂而不是抗体来孵育。

[1002] 使用数据采集软件V12.0(FortéBio)对数据进行采集并用数据分析软件v12(FortéBio)进行分析。通过减去参考传感器来校正每个抗体的数据迹线(data trace)。将Y轴与基线的最后10秒对齐。对解离和Savitzky-Golay滤波进行了步骤间校正对齐。响应<0.05nm的数据迹线被排除在分析之外。使用目的窗口进行200秒的缔合以及时间设置为50秒和200秒的解离,用1:1全局完整拟合模型(Global Full fit model)对数据进行拟合(在表4和表5中示出)。

[1003] 基于曲线拟合和最高R^2值的目视检查对用于所报道数据的解离时间进行选择。将对应于R^2<0.98的曲线拟合的数据排除在分析之外。

[1004] “K_D”(M)是指抗体-抗原相互作用的平衡解离常数,并且通过k_d除以k_a获得。“k_d”(秒$^{-1}$)是指抗体-抗原相互作用的解离速率常数。其有时也被称为k_{off}值或解离速率(off-rate)。“k_a”($M^{-1}\times$秒$^{-1}$)是指抗体-抗原相互作用的缔合速率常数。这有时也被称为k_{on}值或结合速率(on-rate)。

[1005] 结果

[1006] 表4示出了如通过生物层干涉术所确定的双特异性、功能上单价的EpCAM抗体对重组人EpCAM的缔合速率常数k_a(1/Ms)、解离速率常数k_d(1/s)和平衡解离常数K_D(M)。抗体对人EpCAM的亲和力为3.2至55nM。

[1007] 表5示出了如通过生物层干涉术所确定的EpCAM抗体对食蟹猴EpCAM的缔合速率常数k_a(1/Ms)、解离速率常数k_d(1/s)和平衡解离常数K_D(M)。仅BisG1-b12-FEAL/EpCAM-A37-FEAR显示出与食蟹猴EpCAM结合的可靠结果,其中亲和力为41nM。尽管对于BisG1-b12-FEAL/EpCAM-A37-FEAR,观察到在与食蟹猴结合的动力学方面与人EpCAM相比有差异(与食蟹猴EpCAM结合具有更快的结合速率和解离速率),但在亲和力(K_D)方面仅存在2倍差异。

[1008] 表4:如通过无标记的生物层干涉术所确定的双特异性、功能上单价的EpCAM抗体对人EpCAM胞外结构域的结合亲和力。

[1009]

抗体	响应	拟合时间（秒）	全 R^2	结合速率 k_a (1/Ms)	解离速率 k_d (1/s)	K_D (M)
BisG1-b12-FEAL/EpCAM-UBS-54-FEAR	0.60	50	1.00	5.3×10^5	3.0×10^{-2}	5.5×10^{-8}
BisG1-b12-FEAL/EpCAM-A37-FEAR	1.44	50	1.00	3.2×10^5	6.3×10^{-3}	2.0×10^{-8}
BisG1-b12-FEAL/EpCAM-C52-FEAR	0.73	50	1.00	4.6×10^5	2.2×10^{-2}	4.8×10^{-8}
BisG2amm-EpCAM-323-A3-AALT/m4-1BB-3H3-AAKR	1.21	200	1.00	3.4×10^5	1.1×10^{-3}	3.2×10^{-9}

[1010] 表5:如通过无标记的生物层干涉术所确定的双特异性、功能上单价的EpCAM抗体对食蟹猴EpCAM胞外结构域的结合亲和力。

抗体	响应	拟合时间（秒）	全 R^2	结合速率 k_a (1/Ms)	解离速率 k_d (1/s)	K_D (M)
BisG1-b12-FEAL/EpCAM-UBS-54-FEAR	0.11	50	0.90	全 $R^2 < 0.98$		

[1011]

BisG1-b12-FEAL/EpCAM-A37-FEAR	0.59	50	1.00	5.5×10^5	2.3×10^{-2}	4.1×10^{-8}
BisG1-b12-FEAL/EpCAM-C52-FEAR	0.28	50	0.97	全 R^2 <0.98		
BisG2amm-EpCAM-323-A3-AALT/m4-1BB-3H3-AAKR	0.02	N/A	N/A	响应 <0.05		

[1012] 实施例3--如通过生物层干涉术所确定的EpCAM抗体的交叉阻断方法

[1013] 在Octet HTX仪器(FortéBio)上通过BLI来进行经典夹心形式的抗体交叉阻断分析(表位分箱)。在30℃下在以1,000RPM摇动时进行实验。

[1014] 用20mM EDC(N-[3-二甲基氨基丙基]-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐;FortéBio,18-1033)与10mM s-NHS(N-羟基磺基琥珀酰亚胺钠盐;FortéBio,18-1067)的溶液将胺反应性第二代(Amine Reactive 2nd Generation,AR2G)生物传感器(FortéBio,目录号18-5092)激活300秒。使激活的AR2G传感器装载有pH 6.0的10mM乙酸钠(FortéBio,目录号18-1070)

中的20μg/mL第一EpCAM抗体600秒,并将该传感器用pH 8.5的1M乙醇胺(FortéBio目录号18-1071)猝灭300秒。

[1015] 在样品稀释剂(FortéBio,目录号18-1104)中进行基线测量(50秒)之后,使含有经固定化抗体的AR2G生物传感器装载有重组人EpCAM(100nM或2.8μg/mL稀释于样品稀释剂中;R&D systems,目录号9277-EP)300秒。将基于氨基酸序列的人EpCAM的理论分子质量(28kDa)用于计算。确定了EpCAM二抗(10μg/mL于样品稀释剂中)的缔合(300秒)。

[1016] 使用数据采集软件v12.0.1.8(FortéBio)对数据进行采集并用数据分析HT软件v12.0.1.55(FortéBio)进行分析。通过减去参考曲线(样品稀释剂而不是二抗)来校正数据迹线,以校正来自经固定化一抗的人EpCAM的解离。将Y轴与缔合步骤的起点对齐并应用Savitzky-Golay滤波。以矩阵形式对二抗的经校正缔合响应进行作图。一般而言,对于二抗,响应>0.1nm被认为是二抗结合的指示,并因此指示一抗与二抗之间不存在结合竞争或存在不完全结合竞争。相比之下,-0.1nm至0.1nm的响应被认为是阻断抗体对。

[1017] 结果

[1018] 针对抗体IgG1-EpCAM-323-A3-FEAR、IgG1-EpCAM-C52-FEAR、IgG1-EpCAM-UBS-54-FEAR和IgG1-EpCAM-A37-FEAR进行了交叉阻断结合竞争实验。所有EpCAM抗体均阻断了另外的EpCAM抗体与重组人EpCAM的结合(表6)。

[1019] 表6:如通过生物层干涉术所确定的抗体交叉阻断。

[1020]

	IgG1-EpCAM-323-A3-FEAR	IgG1-EpCAM-C52-FEAR	IgG1-EpCAM-UBS-54-FEAR	IgG1-EpCAM-A37-FEAR
IgG1-EpCAM-323-A3-FEAR	0.00	-0.01	0.00	-0.01
IgG1-EpCAM-C52-FEAR	-0.02	-0.02	-0.01	0.00
IgG1-EpCAM-UBS-54-FEAR	-0.01	0.00	-0.02	0.00
IgG1-EpCAM-A37-FEAR	-0.02	-0.03	-0.03	-0.04

[1021] 第一列示出了经固定化抗体(一抗)并且第一行示出了溶液中的抗体(二抗)。示出了溶液中抗体的经校正缔合响应。由深灰色指示抗体的交叉阻断。

[1022] 实施例4-人肿瘤细胞系上EpCAM的表达

[1023] 方法

[1024] 为了对肿瘤细胞系关于EpCAM表达进行排序,使用了流式细胞术对在以下人肿瘤细胞系上的相对EpCAM表面表达水平进行评价:T84(结肠腺癌的肺转移;ATCC,目录号CLL-248)、DiFi(直肠癌;由Thomas Valerius Christian Albrechts University,Kiel,Germany友情提供)、HPAF-II(胰腺腺癌;ATCC,目录号CRL-1997)、NCI-N87(胃癌;ATCC,目录号CRL-5822)、Calu-3(非小细胞肺癌;ATCC,目录号HTB-55)、NCI-H747(结直肠腺癌;ATCC,目录号CLL-252)、和A549(非小细胞肺腺癌;ATCC,目录号CLL-185)。

[1025] 在4℃下将细胞(5×10^4个细胞/孔)与以下一起在聚苯乙烯96孔圆底板(Greiner bio-one,目录号650180)中孵育30分钟:在50μL FACS缓冲液(补充有0.1%牛血清白蛋白[BSA,级分V,Roche,目录号10735086001]和0.02% NaN_3[Bio-world,目录号41920044-3]的磷酸缓冲盐水[PBS;Lonza,目录号BE17-517Q])中的别藻蓝蛋白(allophycocyanin,APC)缀合的抗EpCAM抗体(克隆EBA-1,IgG1λ;BD Bioscience,目录号347200)、APC缀合的非结合对照抗体(克隆11711,IgG1k;R&DSystems,目录IC002A),或者无抗体的50μL FACS缓冲液

(补充有0.1％牛血清白蛋白[BSA,级分V,Roche,目录号10735086001]和0.02％NaN_3[Bioworld,目录号41920044-3]的磷酸缓冲盐水[PBS;Lonza,目录号BE17-517Q])。将细胞在FACS缓冲液中洗涤并通过在FACSCelesta流式细胞仪(BD Biosciences,USA)上的流式细胞术进行分析。对于每个细胞系,通过使用Graphpad Prism软件和Microsoft Office Excel从用抗EpCAM抗体染色的细胞的几何平均MFI中减去与非结合对照抗体一起孵育的细胞的几何平均MFI来计算Δ几何平均荧光强度(geometric mean fluorescence intensity,GeoMFI)。

[1026] 结果

[1027] 图1示出了如使用流式细胞术所确定的在肿瘤细胞系上的相对EpCAM表达,确认了EpCAM在所有测试细胞系上的表达。基于EpCAM表达将肿瘤细胞系排序为以下:T84>DiFi>HPAF-II>NCI-N87>Calu-3>NCI-H747>>A549。

[1028] 实施例5-EpCAM抗体与EpCAM阳性人肿瘤细胞的结合

[1029] 方法

[1030] 通过流式细胞术分析二价EpCAM抗体或携带一个EpCAM结合臂的双特异性抗体与表达EpCAM的人肿瘤细胞系DiFi、HPAF-II和A549的结合。在4℃下将细胞(3×10^4至5×10^4个细胞/孔)与以下一起在聚苯乙烯96孔圆底板(Greiner bio-one,目录号650180)中孵育30分钟:在50μL PBS(图2A至C;Hyclone GE Healthcare,目录号SH3A3830.03)或FACS缓冲液(图2D、2E)中的系列稀释的二价或单价EpCAM抗体(图2A至2D:在5倍稀释步骤中为0.005ng/mL至50μg/mL;图2E:在3倍稀释步骤中为0.5ng/mL至30μg/mL)。将细胞在FACS缓冲液中洗涤一次(A至D)或两次(E)之后,在4℃下与以下一起在黑暗中孵育30分钟:50μL R-藻红蛋白(R-Phycoerythrin,R-PE)AffiniPure F(ab')$_2$片段山羊抗人IgG(Jackson ImmunoResearch,目录号109-116-098;以1:500稀释于FACS缓冲液中[A至D]或以1:200稀释于FACS缓冲液中[E])。接下来,将细胞在FACS缓冲液中洗涤一次(A至D)或两次(E),重悬于100μL FACS缓冲液并在BD LSRFortessa FACS(BD Biosciences,USA)、Celesta(BD Biosciences,USA)或iQue(Sartorius,Germany)上进行分析。使用GraphPad Prism V7.02软件(GraphPad Software,San Diego,CA,USA)用非线性回归(具有可变斜率的S形剂量响应)对结合曲线进行分析。

[1031] 结果

[1032] 图2示出了单特异性、二价(单克隆)EpCAM抗体(A)IgG1-EpCAM-A37-FEAR、(B)IgG1-EpCAM-C52-FEAR和(C)IgG1-EpCAM-UBS-54-FEAR显示出与表达人EpCAM的DiFi、HPAF-II和A549肿瘤细胞剂量依赖性结合。与IgG1-EpCAM-A37-FEAR、IgG1-EpCAM-C52-FEAR或IgG1-EpCAM-UBS-54-FEAR相比,双特异性、单价EpCAMxb12抗体(A)bsIgG1-b12-FEALxEpCAM-A37-FEAR、(B)bsIgG1-b12-FEALxEpCAM-C52-FEAR和(C)bsIgG1-b12-FEALxEpCAM-UBS-54-FEAR分别显示出更高抗体浓度下的结合。与DiFi、HPAF-II和A549肿瘤细胞的最大结合与它们各自的单特异性、二价EpCAM对应物相当。此外,单特异性、二价EpCAM抗体IgG1-323-A3-FEAR显示出与DiFi和HPAF-II肿瘤细胞(D)剂量依赖性的结合。包含在这些实验中的阴性对照抗体IgG1-b12-FEAL未显示出与DiFi、HPAF-II和A549肿瘤细胞的结合。

[1033] 接下来,对包含相同可变结构域但不同之处在于其Fc结构域的两种双特异性

EpCAMx4-1BB抗体的结合DiFi肿瘤细胞的能力进行了研究:一种抗体包含在两条重链(HC)中具有L234F/L235E/D265A(FEA)惰性突变的Fc结构域,而另一种抗体包含在4-1BB结合臂的HC中的FEA惰性突变和在EpCAM结合臂的HC中的L234F/L235E/G236R(FER)惰性突变。如通过EC50值(分别为3.841nM vs 3.961nM;图2E)表明的,这两种双特异性抗体显示出相当的结合。包含在这些实验中的阴性对照抗体bsIgG1-b12-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR和bsIgG1-b12-FERL/b12-FEAR未显示出与DiFi肿瘤细胞的结合,表明EpCAMx4-1BB双特异性抗体的结合对EpCAM具有特异性。

[1034] 实施例6-EpCAM抗体与经人、食蟹猴或小鼠EpCAM转染的CHO细胞的结合

[1035] 将中国仓鼠卵巢(Chinese Hamster Ovary,CHO)-S细胞(1.0×10^6个细胞/mL;ThermoFisher Scientific,目录号R800-07)在Freestyle™ CHO表达培养基(ThermoFisher Scientific,目录号12651022)中培养。将培养基用50单位青霉素和50μg/mL链霉素(Pen/Strep;Lonza,目录号DE17-603E)补充,随后用编码全长人(SEQ ID:59)、食蟹猴(SEQ ID:60)或小鼠EpCAM(SEQ ID:61;对于所有构建体为1.25μg/mL)的构建体进行转染。转染使用Freestyle Max™转染试剂(ThermoFisher Scientific,目录号16447100)和OptiPRO™ SFM培养基(ThermoFisher Scientific,目录号12309019)根据制造商的说明进行。在转染之后,在37℃、85%湿度、8% CO_2下将细胞孵育24小时同时摇动,并随后在补充有10% DMSO的Freestyle™ CHO表达培养基中冷冻直至进一步使用。

[1036] 通过流式细胞术分析EpCAM抗体与用全长人、食蟹猴或小鼠EpCAM瞬时转染的CHO-S细胞的结合。将细胞在补充有10%含铁的供体牛血清(DBSI(Donor Bovine Serum with Iron);Life technologies,目录号20371)的Roswell Memorial Park Institute 1640培养基(RPMI;Lonza,目录号12-115F)中解冻。在4℃下将细胞(3×10^4个细胞/孔)与在50μL PBS/0.1%BSA/0.02%叠氮化物(FACS缓冲液)中的系列稀释的EpCAM抗体(在5倍稀释步骤中为0.0001至50μg/mL)一起在聚苯乙烯96孔圆底板(Greiner bio-one,目录号650180)中孵育30分钟。在FACS缓冲液中洗涤两次之后,在4℃下将细胞在50μL R-藻红蛋白(PE)缀合的山羊抗人IgG F(ab')$_2$(1:500于FACS缓冲液中;Jackson ImmunoResearch Laboratories,目录号109-116-098)中孵育30分钟。将细胞在FACS缓冲液中洗涤两次,重悬于补充有TO-PRO™-3碘化物(1:20000稀释;Invitrogen,目录号T3605)的20μL FACS缓冲液中并在iQue screener(Intellicyt Corporation,USA)上进行分析。使用GraphPad Prism V8.4.1软件(GraphPad Software,San Diego,CA,USA)通过非线性回归(具有可变斜率的S形剂量响应)对结合曲线进行分析。

[1037] 图3A示出了二价EpCAM结合抗体IgG1-EpCAM-UBS-54-FEAR、IgG1-EpCAM-A37-FEAR、IgG1-EpCAM-C52-FEAR和IgG1-EpCAM-323-A3与用全长人、食蟹猴和小鼠EpCAM转染的CHO-S细胞的剂量依赖性结合。类似地,图3B示出了单价EpCAM结合抗体bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-UBS-54-FEAR 、bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR 、bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-C52-FEAR 和bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-323-A3-FEAR与用全长人、食蟹猴和小鼠EpCAM转染的CHO-S细胞的剂量依赖性结合。相比之下,未观察到单价或二价EpCAM抗体与未经转染的CHO-WT细胞的结合。

[1038] 实施例7-基于细胞的报道物测定用于确定EpCAMx4-1BB双特异性抗体的4-1BB激动剂活性以及激动剂活性对靶交联的依赖性。

[1039] 为了确定Fc惰性EpCAMx4-1BB双特异性抗体的4-1BB激动剂活性,将在NF-κB响应元件(HEK293_NFK_gfp_luc细胞)的控制下表达萤光素酶的报道物细胞系用人4-1BB(HEK293_NFK_h4-1BB_gfp_luc细胞)进行转导。为了确定4-1BB激动剂活性对靶交联的依赖性,使用仅报道物细胞系或者与表达EpCAM的OV-90-SC12细胞共培养的报道物细胞系来进行报道物测定。

[1040] 通过以下来产生HEK293_NFK_h4-1BB_gfp_luc细胞:使人4-1BB通过转座子介导的转染进入到HEK293_NFK_gfp_luc细胞(BioCat GmbH,目录号TR860A-1)中,随后进行杀稻瘟素(blasticidin)选择。将细胞以3×10^4个细胞/孔接种在96孔白色平底板(Fisher Scientific,目录号10072151)中并在补充有10%非热灭活的FBS(Biochrom,目录号S0115)的DMEM(Thermo Fisher Scientific,目录号31966-047)中过夜培养。在第二天,在具有0.5%非热灭活的FBS的DMEM中制备系列稀释的BsIgG1-CD137-005-FEAR/EpCAM-323-A3-FEAL并将其添加至含有HEK293_NKF_h4-1BB_gfp_luc细胞(3倍稀释系列,最终浓度为8.2至0.01μg/mL)的孔中。将具有0.5%非热灭活的FBS的DMEM中的OV-90-SC12细胞(OV-90的亚克隆,ATCC,目录号CRL-11730)(3×10^4个细胞/孔)或将仅培养基添加至孔,并将板过夜孵育。在第二天,弃去培养上清液,并将50μL RPMI 1640培养基(Life Technologies GmbH,目录号61870-010)与50μLBio-Glo™萤光素酶测定底物(Promega,目录号G7940)一起添加至每个孔。将板避光孵育10分钟。使用Tecan Infinite F200 Pro读板仪测量发光。

[1041] 在8.2至0.01μg/mL的3倍系列稀释下分析BsIgG1-CD137-005-FEAR/EpCAM-323-A3-FEAL的4-1BB激动剂活性(图4)。仅在存在表达EpCAM的OV-90-SC12细胞的情况下观察到萤光素酶发光的剂量依赖性增加。这些结果显示Fc惰性EpCAM×4-1BB双特异性抗体在体外表现出条件性4-1BB激动剂活性。

[1042] 实施例8-通过含有惰性突变的EpCAMx4-1BB双特异性抗体诱导PBMC-肿瘤细胞共培养物中CD4+和CD8+T细胞增殖的能力

[1043] 方法

[1044] 在表达EpCAM的肿瘤细胞系和原代人外周血单个核细胞(PBMC)的体外共培养物中评估EpCAMx4-1BB双特异性抗体通过4-1BB共刺激提高PBMC增殖的能力,所述原代人外周血单个核细胞使用Ficoll梯度(Corning;淋巴细胞分离培养基,目录号25-072-CI)从健康人供体血沉棕黄层(buffy coat)(Sanquin,Amsterdam,The Netherlands)中分离出来。评估了具有在两条重链(HC)中包含FEA惰性突变的Fc结构域的EpCAMx4-1BB双特异性抗体,以及具有在4-1BB结合臂的HC中包含FEA惰性突变和在EpCAM结合臂的HC中包含FER惰性突变的Fc结构域的EpCAMx4-1BB双特异性抗体二者增强PBMC增殖的能力。

[1045] 在第一组实验中(图5至7),在37℃下将表达EpCAM的肿瘤细胞(DiFi、T84、HPAF-II、NCI-N87、Calu-3或NCI-H747;如上文中所述)以6,250个细胞/孔的密度接种在聚苯乙烯96孔平底板(Greiner bio-one,目录号655180)中于T细胞培养基(补充有5%人血清[Sanquin Blood Bank,目录号B0626]和1% Pen/Strep,Lonza,目录号DE17-603E的Iscove改良Dulbecco培养基[IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium);Lonza,目录号12-722F])中并使其黏附4小时。在37℃下将PBMC在PBS(磷酸缓冲盐水(phosphate-buffered saline),Hyclone,目录号SH3A383003)中用0.5μM CellTrace™ CFSE(羧基荧光素琥珀酰亚胺基酯(carboxyfluorescein succinimidyl ester);ThermoFisher Scientific;目录号

C34554A)标记20分钟。在洗涤之后,将PBMC在T细胞培养基中静置0.5至1.5小时并再次洗涤,将PBMC与抗CD3抗体(0.1μg/mL;克隆UCHT1;Stemcell,目录号60011)混合并以16:1的比率添加至肿瘤细胞(100,000个细胞/孔)。添加双特异性EpCAMx4-1BB、EpCAMxb12或非结合对照抗体(在5倍稀释中的最终浓度系列稀释为:8至25,000ng/mL[图5和7],或单一浓度为10μg/mL[图6])并在37℃下将板孵育96小时。接下来,将含有PBMC的150μL上清液转移至96孔圆底板。将细胞在PBS中洗涤之后,在室温下将PBMC用50μL BD Horizon™可固定生存力染色剂510(FVS510(Fixable Viability Stain 510);1:5000稀释于PBS中;BD Biosciences;目录号564406)避光染色20分钟。在评价CD4+和CD8+T细胞亚群增殖的实验中,在4℃下将细胞另外用以下避光染色30分钟:在50μL FACS缓冲液中的经brilliant violet(BV)785标记的抗CD19(克隆SJ25C1,1:50;BioLegend,目录号363028)、经APC-eF780标记的抗CD4(克隆OKT4,1:50;eBioscience,目录号47-0048-42)、经AF700标记的抗CD8(克隆RPA-T8,1:100;BioLegend,目录号301028)、和经BV605标记的抗CD14(克隆:M5E2,1:200;BioLegend,目录号301834)抗体。在洗涤细胞之后,将细胞重悬于30至60μL FACS缓冲液(补充有0.1%牛血清白蛋白[BSA,级分V,Roche,目录号10735086001]、0.02%NaN3[Bio-world,目录号41920044-3]和2mM EDTA[Sigma-Aldrich,目录号BCCB3789]的PBS[Lonza,BE17-517Q])并在iQue流式细胞仪上使用Intellicyt软件(图5和7)或在BD Symphony流式细胞仪上使用FlowJo软件(图6)进行分析。

[1046] 第二组实验基本上如以上所述进行,除了以下例外之外。双特异性EpCAMx4-1BB、EpCAMxb12或非结合对照抗体的最终浓度系列稀释为0.32至25,000ng/mL(图8)。在将细胞用50μLBD Horizon™可固定生存力染色剂510(1:5000稀释于PBS中)染色之后,将板在室温下避光孵育30分钟。在4℃下将细胞另外用以下避光染色30分钟:在50μL FACS缓冲液中的经brilliant violet(BV)785标记的抗CD19(克隆SJ25C1,1:80)、经APC-eF780标记的抗CD4(克隆OKT4,1:100)、经AF700标记的抗CD8(克隆RPA-T8,1:100;BioLegend,目录号301028)、和经PE-Cy7标记的抗CD14(克隆:M5E2,1:50;BD,目录号557742)抗体。在洗涤之后,将细胞重悬于80μL FACS缓冲液并在iQue流式细胞仪上使用BD Symphony流式细胞仪使用FlowJo软件(图8)进行分析。对于PBMC增殖的评价,针对淋巴细胞(基于FSC/SSC)和活细胞(FVS510-群)对细胞进行设门。对于CD4+或CD8+T细胞的评价,针对淋巴细胞(基于FSC/SSC)、活细胞(FVS510-群)、T细胞(CD14-CD19-群)以及最终CD4+或CD8+T细胞(分别是CD4+CD8-或CD4-CD8+群)对PBMC进行设门。测量经CFSE染色的细胞以评估PBMC、CD4+或CD8+T细胞增殖。使用下式用Microsoft Office Excel来计算代表每种细胞的平均分裂数目的分裂指数(Division Index)并且用Graphpad Prism对其进行可视化:

[1047] $\sum(x_i/2i*i)/\sum(x_i/2i)$,其中i是峰的数目,其中未分裂的峰是0,第一分裂的是1等,并且x_i是对应峰的细胞数目。

[1048] 结果

[1049] 在表达EpCAM的DiFi肿瘤细胞系和PBMC的体外共培养物中评估了EpCAMx4-1BB双特异性抗体通过4-1BB共刺激以提高T细胞增殖的能力。图5示出了bsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-UBS54-FEAR(A)、bsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-A37-FEAR(B)、bsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-C52-FEAR(C)和bsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-323-A3-FEAR(D)增强了经CFSE标记的细胞的剂量依赖性增殖(显示为分裂指

数增加)。由所有四种EpCAMx4-1BB抗体诱导的分裂指数的最大增加是相当的。相比之下,双特异性EpCAMxb12抗体bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-UBS54-FEAR(A)、bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-A37-FEAR (B) 、bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-C52-FEAR (C) 和bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-323-A3-FEAR(D)未增强增殖,因为分裂指数与同种型对照抗体IgG1-b12-FEAL相当。

[1050] 此外,通过对这些T细胞亚群专门设门来评价EpCAMx4-1BB双特异性抗体对CD4+和CD8+T细胞增殖的作用。图6示出EpCAMx4-1BB双特异性抗体bsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-UBS54-FEAR、bsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-A37-FEAR和bsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-C52-FEAR增强了(A)CD4+和(B)CD8+T细胞二者的增殖(显示为分裂指数增加)。相比之下,双特异性EpCAMxb12抗体bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-UBS54-FEAR、bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-A37-FEAR、bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-C52-FEAR未影响CD4+或CD8+T细胞增殖,因为分裂指数与同种型对照抗体IgG1-b12-FEAL相当。

[1051] 接下来,使用选择的具有一系列EpCAM表达水平(在实施例4中描述)的肿瘤细胞系来进一步评价EpCAMx4-1BB抗体对PBMC增殖的作用。图7示出在存在T84、DiFi、HPAF-II、NCI-N87、Calu-3或NCI-H747肿瘤细胞的情况下,EpCAMx4-1BB双特异性抗体bsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-A37-FEAR和bsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-323-A3-FEAR增强了PBMC增殖(显示为分裂指数增加)。相比之下,双特异性EpCAMxb12抗体bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-A37-FEAR和bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-323-A3-FEAR未影响任何PBMC-肿瘤细胞共培养物的增殖,因为分裂指数与同种型对照抗体IgG1-b12-FEAL相当。这些结果表明EpCAMx-4-1BB bsAb能够提高所有经测试肿瘤细胞系中活化的PBMC的增殖,其中在此处所测试范围内对EpCAM表达没有明显的影响。

[1052] 将具有在两条HC中包含FEA突变的Fc结构域的EpCAMx4-1BB双特异性抗体,或者具有在一条HC中包含FEA突变和在另一条HC中包含FER突变的Fc结构域的EpCAMx4-1BB双特异性抗体增强活化的CD4+和CD8+T细胞增殖的能力进行比较(图8)。在PBMC与DiFi肿瘤细胞的共培养物和浓度系列的bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR 或bsIgG1-EpCAM-A37-FEAR/CD137-009-HC7LC2-FEAL一起孵育96小时之后,观察到CD4+和CD8+T细胞增殖的水平高度相当。这表明当在两条HC之一中将FEA惰性突变与FER惰性突变进行交换时,EpCAMx4-1BB双特异性抗体增强T细胞增殖的能力未改变。

[1053] 总之,EpCAMx4-1BB双特异性抗体增强了与具有一系列EpCAM表达水平的肿瘤细胞共培养的活化的PBMC的增殖,包括CD4+和CD8+T细胞二者的增殖。对于在两条HC中均包含FEA惰性突变的EpCAMx4-1BB双特异性抗体或者在一条HC中包含FEA惰性突变而在另一条HC中包含FER惰性突变的EpCAMx4-1BB双特异性抗体,增强T细胞增殖的能力相当。

[1054] 实施例9--离体TIL扩增测定用于确定EpCAM×4-1BB双特异性抗体诱导肿瘤浸润T细胞和NK细胞增殖的能力。

[1055] 为了确定EpCAM×4-1BB双特异性抗体对TIL亚群的作用,使用来自人非小细胞肺癌患者手术切除的原发性肿瘤组织进行离体TIL扩增测定。

[1056] 将冷冻保存的肿瘤组织片段解冻并分成约1mm^{3}的片段。将片段接种到24孔板(Greiner,目录号662160;2个片段/孔,12至16个孔/条件)中至补充有以下的X-VIVO™ 15培养基(Lonza,目录号BE02-060Q)中:2%人血清白蛋白(CLS Behring,PZN-00504775)、1%青霉素/链霉素(Thermo Fisher Scientific,目录号15140-122)、1%两性霉素B(Thermo

Fisher Scientific,目录号152-900-26)和50U/mL白介素(IL)-2(Proleukin-S,Novartis Pharma GmbH,PZN-02238131)。将双特异性抗体(BsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-323-A3-FEAR或BsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-A37-FEAR)添加至孔(0.2或5μg/mL最终浓度)。将片段培养3天。在第3天添加包含IL-2和抗体(与上述相同的浓度)的新鲜培养基。在剩余的培养期期间,通过显微镜定期监测TIL生长和TIL微簇的形成。在第7天,通过将原始24孔板的两个孔的内容物转移到新鲜6孔板(Greiner,目录号657160)的一个孔中来将细胞合并。添加包含IL-2(33U/mL最终浓度)的新鲜培养基。在第10天,由包含IL-2(15U/mL最终浓度)的新鲜培养基代替每个孔中培养上清液的一半。在第14天,通过流式细胞术分析的处理条件来收获并合并细胞。

[1057] 将来自所收获细胞的每个处理组的100μL的等分试样用以下抗人抗体进行染色:V500缀合的抗CD45(BD Biosciences,目录号560777)、Brilliant Violet(BV)786缀合的抗CD56(BD Biosciences,目录号740979)、Pacific Blue缀合的抗CD3(BD Biosciences,目录号558117)、PerCP-eFluor780缀合的抗CD4(Thermo Fisher Scientific,目录号46-0047-42)和BV605缀合的抗CD8α(BD Biosciences,目录号564116)。另外,将细胞用可固定生存力染料eFluor780(Thermo Fisher Scientific,目录号65-0865-14)染色。在采集之前,将30μL的参考珠(CountBright™绝对计数珠(Absolute Counting Bead),Invitrogen,目录号C36950)添加至每份样品。在FACS Celesta流式细胞仪(BD Biosciences)上收集数据。

[1058] 使用Flowjo软件版本10.7.1分析流式细胞术数据。使用下式确定绝对细胞数目:

[1059] $$细胞数目 = \frac{事件计数（细胞）}{事件计数（珠）} \times 珠浓度 \times 样品体积$$

[1060] 在离体TIL扩增测定中,与无抗体对照相比,在用EpCAM×4-1BB双特异性抗体处理的培养物中所有TIL(CD45$^+$)以及CD4+T细胞、CD8+T细胞和NK细胞的数目都增加(图9)。与5μg/mL相比,在用0.2μg/mL EpCAM×4-1BB双特异性抗体处理的培养物中细胞数目的增加更加明显。这些结果显示EpCAM×4-1BB双特异性抗体可离体增强来自人肿瘤样本的CD8+T细胞、CD4+T细胞和NK细胞的扩增。

[1061] 实施例10--处理荷MC38肿瘤的小鼠以确定EpCAM×4-1BB双特异性抗体的体内抗肿瘤活性。

[1062] 为了评估EpCAM×4-1BB双特异性抗体的抗肿瘤活性,使用了荷过表达人EpCAM的MC38肿瘤(MC38_hEpCAM)的人EpCAM-转基因小鼠(Jackson Laboratory,品系B6.FVB-Tg(TACSTD1)02Leij/J)的体内模型。通过将人EpCAM逆转录病毒转导到MC38细胞(Kerafast,目录号ENH204-FP)中来产生MC38_hEpCAM细胞。

[1063] 将年龄和性别匹配的小鼠用100μL PBS(Thermo Fisher Scientific,目录号141-902-50)中的5×10^{5}MC38_hEpCAM细胞进行皮下接种。使用卡尺每周至少两次地评价肿瘤生长,从卡尺测量结果计算肿瘤体积为([长度]×[宽度]^2)/2,其中长度为最长肿瘤尺寸并且宽度为垂直于长度的最长肿瘤尺寸。当肿瘤达到约30mm^{3}的中值尺寸时,开始用BsIgG2amm-EpCAM-323-A3-AALT/m4-1BB-3H3-AAKR或同种型对照抗体IgG2amm-b12-AAKR进行处理。在肿瘤接种之后的第12、17、21、24、28和31天,将小鼠用200μL PBS中的100μg相应抗体进行腹膜内处理。每周三次测量小鼠的体重。当肿瘤体积超过1,500mm^{3}或当小鼠达到其他人道终点(例如体重减轻≥20%、肿瘤溃疡(>75%)或出现疾病的临床体征)时对单个动物进行安

乐死。

[1064] 与经同种型对照处理的小鼠相比,用BsIgG2amm-EpCAM-323-A3-AALT/m4-1BB-3H3-AAKR处理的小鼠中MC38_hEpCAM肿瘤的生长显著降低(图10)。另外,经BisIgG2amm-EpCAM-323-A3-AALT/m4-1BB-3H3-AAKR处理的小鼠的存活也显著提高。这些结果显示EpCAM×4-1BB双特异性抗体在体内表现出抗肿瘤活性。

[1065] 实施例11PBMC-肿瘤细胞共培养物中EpCAMx4-1BB双特异性抗体与EpCAM特异性抗体和4-1BB特异性抗体的组合的比较

[1066] 在EpCAMx4-1BB双特异性抗体与IgG1-EpCAM-A37-FERL和IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR抗体的组合或者bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR和bsIgG1-b12-FERL/CD137-HC7LC2-FEAR抗体的组合之间,比较在PBMC-肿瘤细胞共培养物中增强CD4+和CD8+T细胞增殖和活化(通过T细胞活化标志物CD25和4-1BB的表达来限定)的能力。

[1067] 方法

[1068] 在表达EpCAM的DiFi肿瘤细胞和PBMC的体外共培养物中评估EpCAMx4-1BB双特异性抗体增强CD4+和CD8+T细胞增殖和活化的能力,所述PBMC从健康人供体血沉棕黄层(Sanquin,Amsterdam,The Netherlands)中纯化。

[1069] 在第一组实验中,将bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR增强CD4+和CD8+T细胞增殖的能力与二价单克隆抗体IgG1-EpCAM-A37-FERL和IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR的组合进行比较(图11)。这些实验基本上如实施例8中所述进行,除了以下例外之外。在37℃下将PBMC用PBS中的0.5μM CellTrace™ Violet(CTV;1:10,000,ThermoFisher Scientific;目录号C34557)避光标记20分钟。IgG1-EpCAM-A37-FERL、IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR(单独或组合)和bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR的最终浓度为0.3或3μg/mL(对于组合:每种抗体的为0.3或3μg/mL)。在与抗体一起孵育96小时并洗涤之后,在4℃下将细胞用50μLBD Horizon™可固定生存力染色剂510(FVS510;1:1000稀释于PBS中;BD Biosciences;目录号564406)避光染色30分钟。接下来,在4℃下将细胞用以下避光染色30分钟:在50μL FACS缓冲液中的经BV785标记的抗CD19(克隆SJ25C1,1:80;BioLegend,目录号363028)、经APC-eF780标记的抗CD4(克隆OKT4,1:100;eBioscience,目录号47-0048-42)、经AF700标记的抗CD8(克隆RPA-T8,1:100;BioLegend,目录号301028)和经PE-Cy7标记的抗CD14(克隆:M5E2,1:50;BD Biosciences,目录号557742)抗体。在洗涤之后,将细胞重悬于80μL FACS缓冲液中并且在BD FACSCelesta™细胞分析仪(BD Biosciences)上采集并使用FlowJo软件进行分析。对于CD4+或CD8+T细胞的评价,针对淋巴细胞和单一细胞(基于FSC/SSC)、活细胞(FVS510-群)、T细胞(CD14-CD19-群)以及最终CD4+或CD8+T细胞(分别是CD4+CD8-或CD4-CD8+群)对PBMC进行设门。测量经CTV染色的细胞以评估CD4+或CD8+T细胞增殖。将分裂细胞百分比确定为已经历细胞分裂(基于CTV稀释)的细胞占总CD4+或总CD8+T细胞群的百分比。扩增指数值按照以下来计算:

[1070] 扩增指数=细胞总数目/培养起始时的细胞数目=(G0+G1+G2+G3+G4+G5+G6+G7)/(G0+G1:2+G2:4+G3:8+G4:16+G5:32+G6:64+G7:128)

[1071] Gn=第n代峰中的细胞数目(其中n=0至7)

[1072] 在第二组实验中,将EpCAMx4-1BB双特异性抗体增强CD4+和CD8+T细胞增殖和活化的能力与单价EpCAM特异性和4-1BB特异性bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR和bsIgG1-

b12-FERL/CD137-HC7LC2-FEAR的组合的进行比较(图12和图13)。这些实验基本上如实施例8中所述进行,除了以下例外之外。在37℃下将PBMC用PBS中的0.5μM CellTrace™ Violet (CTV,1:10,000,ThermoFisher Scientific;目录号C34557)避光标记20分钟。系列稀释的双特异性EpCAMx4-1BB的最终浓度为0.0005至3μg/mL。bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR和bsIgG1-b12-FERL/CD137-HC7LC2-FEAR的组合的最终浓度为每种抗体3μg/mL。在与抗体一起孵育96小时并洗涤之后,在4℃下将PBMC用50μLBD Horizon™可固定生存力染色剂575V (FVS575;1:1000稀释于PBS中;BD Biosciences;目录号565694)避光染色30分钟。接下来,在4℃下将细胞用以下避光染色30分钟:在50μL FACS缓冲液中的经BV785标记的抗CD19(克隆SJ25C1,1:80;BioLegend,目录号363028)、经APC-eF780标记的抗CD4(克隆OKT4,1:100;eBioscience,目录号47-0048-42)、经AF700标记的抗CD8(克隆RPA-T8,1:100;BioLegend,目录号301028)、经APC标记的抗4-1BB(克隆:4B4-1,1:40,Biolegend,目录号309810)、经PE标记的抗CD25(克隆:M-A251,1:200,Biolegend,目录号356104)和经PE-Cy7标记的抗CD14(克隆:M5E2,1:50;BD Biosciences,目录号557742)抗体。在洗涤之后,将细胞重悬于80μL FACS缓冲液并在BD LSRFortessa FACS(BD Biosciences,USA)上采集并使用FlowJo软件进行分析。对于CD4+或CD8+T细胞的评价,针对淋巴细胞和单一细胞(基于FSC/SSC)、活细胞(FVS575-群)、T细胞(CD14-CD19-群)以及最终CD4+或CD8+T细胞(分别是CD4+CD8-或CD4-CD8+群)对PBMC进行设门。测量经CTV染色的细胞以评估CD4+或CD8+T细胞增殖。由于无法计算这些实验的扩增指数,因此作为代替报告了分裂细胞的百分比,并将其确定为已经历细胞分裂(基于CTV稀释)的细胞占总CD4+或总CD8+T细胞群的百分比。在CD4+和CD8+T细胞群中确定%CD25+或%4-1BB+细胞或者CD25+群或4-1BB+群的几何平均荧光强度(fluorescent intensity,FI)。

[1073] 结果

[1074] 在表达EpCAM的DiFi肿瘤细胞和PBMC的体外共培养物中评估EpCAMx4-1BB双特异性抗体增强CD4+和CD8+T细胞增殖和活化的能力。将用EpCAMx4-1BB双特异性抗体与用EpCAM特异性和4-1BB特异性抗体(单价或双价,单独或组合)处理的T细胞的增殖和活化进行比较。

[1075] 图11示出了与二价单克隆抗体IgG1-EpCAM-A37-FERL和IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR(单独或组合)相比,bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR增强了经CTV标记的CD4+和CD8+T细胞的增殖,如通过扩增指数的增加所示。在所有经测试PBMC供体中,bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR始终显示出CD4+和CD8+T细胞增殖的最高增加(数据未显示)。

[1076] 图12示出了bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR剂量依赖性地增强了经CTV标记的CD4+和CD8+T细胞的增殖,如通过分裂细胞百分比的增加所示。相比之下,单价EpCAM特异性和4-1BB特异性抗体bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR和bsIgG1-b12-FERL/CD137-HC7LC2-FEAR的组合未增强CD4+或CD8+T细胞增殖,因为分裂细胞的百分比和与DiFi肿瘤细胞共培养而不添加抗体的经抗CD3刺激的PBMC相当。

[1077] 图13示出了bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR剂量依赖性地增强了CD4+和CD8+T细胞的活化,如通过T细胞活化标志物CD25和4-1BB的表达增加所示。通过bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR增加了表达CD25和4-1BB的CD4+和CD8+T

细胞的百分比以及CD25+群或4-1BB+群的几何平均FI二者。相比之下,单价EpCAM特异性和4-1BB特异性抗体bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR和bsIgG1-b12-FERL/CD137-HC7LC2-FEAR的组合未增强CD4+和CD8+T细胞的活化,因为表达CD25和4-1BB的细胞的百分比以及CD25+群或4-1BB+群的几何平均FI和与DiFi肿瘤细胞共培养而不添加抗体的经抗CD3刺激的PBMC相当。

[1078] 总之,与二价或单价EpCAM特异性和4-1BB特异性抗体的组合相比,EpCAMx4-1BB双特异性抗体显示出增强了PBMC-肿瘤细胞共培养物中CD4+和CD8+T细胞的增殖和活化。

[1079] 实施例12-EpCAMx4-1BB双特异性抗体对使用癌症患者来源的PBMC的PBMC-肿瘤细胞共培养物中T细胞的增殖和活化的作用

[1080] 使用来源于癌症患者的PBMC来评价EpCAMx4-1BB双特异性抗体增强PBMC-肿瘤细胞共培养物中CD4+和CD8+T细胞的增殖和活化(通过T细胞活化标志物CD25和4-1BB的表达来限定)的能力。

[1081] 方法

[1082] 在表达EpCAM的DiFi肿瘤细胞与癌症患者来源的PBMC(Discovery Life Sciences)的体外共培养物中评估EpCAMx4-1BB双特异性抗体增强CD4+和CD8+T细胞增殖和活化的能力。这些实验基本上如实施例8中所述进行,除了以下例外之外。

[1083] PBMC来源于接受化学治疗和其他治疗并在血液收集时表现出疾病稳定的结直肠癌症患者。在37℃下将PBMC用PBS中的0.5μMCellTrace™ Violet(CTV;1:10,000,ThermoFisher Scientific;目录号C34557)避光标记20分钟。bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR的最终浓度为0.0004至3μg/mL并且bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR和bsIgG1-b12-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR的组合的最终浓度为每种抗体3μg/mL。在与抗体一起孵育96小时(37℃,5% CO_2)并用PBS洗涤之后,在4℃下将细胞用50μL BD Horizon™可固定生存力染色剂510(FVS510;1:1000稀释于PBS中;BD Biosciences;目录号564406)避光染色30分钟。接下来,在4℃下将细胞用以下避光染色30分钟:在50μL FACS缓冲液中的经BV785标记的抗CD19(克隆SJ25C1,1:80;BioLegend,目录号363028)、经APC-eF780标记的抗CD4(克隆OKT4,1:100;eBioscience,目录号47-0048-42)、经AF700标记的抗CD8(克隆RPA-T8,1:100;BioLegend,目录号301028)、经APC标记的抗4-1BB(克隆:4B4-1,1:40,Biolegend,目录号309810)、经PE标记的抗CD25(克隆:M-A251,1:200,Biolegend,目录号356104)和经PE-Cy7标记的抗CD14(克隆:M5E2,1:50;BD Biosciences,目录号557742)抗体。在洗涤之后,将细胞重悬于80μL FACS缓冲液并在BD LSRFortessa FACS(BD Biosciences,USA)上采集并使用FlowJo软件进行分析。对于CD4+或CD8+T细胞的评价,针对淋巴细胞和单一细胞(基于FSC/SSC)、活细胞(FVS510-群)、T细胞(CD14-CD19-群)以及最终CD4+或CD8+T细胞(分别是CD4+CD8-或CD4-CD8+群)对PBMC进行设门。测量经CTV染色的细胞以评估CD4+或CD8+T细胞增殖。将分裂细胞百分比确定为已经历细胞分裂(基于CTV稀释)的细胞占总CD4+或总CD8+T细胞群的百分比。在CD4+和CD8+T细胞群中确定%CD25+或%4-1BB+细胞或者CD25+群或4-1BB+群的几何平均荧光强度(FI)。

[1084] 结果

[1085] 在表达EpCAM的DiFi肿瘤细胞与结直肠癌症患者来源的PBMC的体外共培养物中评估EpCAMx4-1BB双特异性抗体增强CD4+和CD8+T细胞增殖和活化的能力并与单价EpCAM特异

性和4-1BB特异性抗体的组合的进行比较。

[1086] 图14示出了bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR剂量依赖性地增强了经CTV标记的CD4+和CD8+T细胞的增殖,如通过分裂细胞百分比的增加所示。相比之下,3μg/mL的单价EpCAM特异性和4-1BB特异性抗体bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR和bsIgG1-b12-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR的组合未增强CD4+或CD8+T细胞增殖。

[1087] 图15示出了bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR剂量依赖性地增强了CD4+和CD8+T细胞的活化,如通过T细胞活化标志物CD25和4-1BB的增加所示。通过bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR增加了表达CD25或4-1BB的CD4+和CD8+T细胞的百分比以及CD25+群或4-1BB+群的几何平均FI二者。相比之下,单价EpCAM特异性和4-1BB特异性抗体bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR和bsIgG1-b12-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR的组合未增强CD4+和CD8+T细胞的活化,因为表达CD25或4-1BB的细胞的百分比以及两种标志物的几何平均FI和与DiFi肿瘤细胞共培养而不添加抗体的经抗CD3刺激的PBMC相当。

[1088] 总之,与单价EpCAM特异性和4-1BB特异性抗体的组合相比,EpCAMx4-1BB双特异性抗体显示出增强了癌症患者来源的PBMC与DiFi肿瘤细胞的共培养物中CD4+和CD8+T细胞的增殖和活化。

[1089] 实施例13-体外杀伤测定用于确定EpCAMx4-1BB双特异性抗体增强T细胞介导的针对肿瘤细胞的细胞毒性的能力

[1090] 在与作为靶细胞的肿瘤细胞的共培养物中研究DuoBody EpCAMx4-1BB对人$CD8^+$T细胞的细胞毒性活性的作用。通过流式细胞术评估$CD8^+$T细胞的细胞毒性相关分子颗粒酶B(GzmB)和CD107a的表达。使用xCELLigence系统通过实时细胞分析来评价靶细胞杀伤。将人乳腺癌细胞系MDA-MB-231(ATCC®,HTB-26™)用模型抗原密蛋白-6和人EpCAM(MDA-MB-231_hCLDN6_hEpCAM细胞)稳定转导并用作靶细胞系。

[1091] 方法

[1092] 将MDA-MB-231_hCLDN6_hEpCAM细胞以1.5×10^4个细胞/孔接种在96孔平底板(Greiner,目录号#655180)和xCELLigence E板(Agilent,目录号#05232368001)中于补充有10%胎牛血清(FBS(fetal bovine serum);Sigma-Aldrich,目录号#F7524)的100μL Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM,Thermo Fisher Scientific,目录号#31966-047)中。使细胞在室温下沉降30分钟。将96孔平底板(对于流式细胞术分析)和E板(对于实时细胞分析)分别在培养箱或xCELLigence实时细胞分析仪器(Acea Biosciences)中孵育1天(在两种情况下均为37℃,5% CO_2)。

[1093] 通过磁激活细胞分选(magnetic-activated cell sorting,MACS)使用CD8微珠(Miltenyi Biotec,目录号#130-045-201)从来源于HLA-A*02:01阳性健康人供体的PBMC中纯化$CD8^+$T细胞。在500V、3毫秒和1脉冲下将经纯化$CD8^+$T细胞用编码CLDN6特异性TCR的α和β链的RNA(TCR#12α,TCR#12β;每个为10μg RNA)进行电穿孔。紧接在电穿孔之后,将补充有5%合并人血清(PHS(pooled human serum);One Lambda Inc.,目录号#A25761)的预温热的IMDM GlutaMAX(Life Technologies GmbH,目录号#31980030)添加至细胞。将经电穿孔的T细胞转移至6孔板并孵育过夜(37℃,5% CO_2)。在第二天,如通过流式细胞术所确定的电穿孔效率为>85%。

[1094] 在过夜孵育之后,将$CD8^+$T细胞重悬于具有10％ FBS的DMEM中。将$CD8^+$T细胞添加至包含在前一天接种的MDA-MB-231_hCLDN6_hEpCAM细胞的孔(96孔板和E板二者)中。每个孔添加7.5×10^4个$CD8^+$T细胞,得到效应物:靶标比率为5:1。作为对照,在不添加T细胞的情况下,对MDA-MB-231_hCLDN6_hEpCAM细胞进行培养。将bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR或对照抗体在具有10％ FBS的DMEM中稀释并添加至孔。作为对照,使用了包含与一个非结合Fab臂配对的一个EpCAM特异性Fab臂或一个4-1BB特异性Fab臂(分别是bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR和bsIgG1-b12-FERLxCD137-009-HC7LC2-FEAR)的Fc惰性单价双特异性抗体以及Fc惰性非结合抗体bsIgG1-b12-FERL/b12-FEAR。以0.0032至3.2μg/mL的最终浓度来测试bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR,而以3.2μg/mL的单一最终浓度来测试对照抗体。最终体积为200μL/孔。

[1095] 将经荧光染料标记的抗CD107a抗体(Biolegend,目录号#328611;最终稀释为1:2,500)添加至96孔板的孔而不添加至E板的孔。将96孔板中的细胞在培养箱中培养(37℃,5％ CO_2)2天。在培养的最后4小时期间,添加20μL的Golgi-Plug(BD Biosciences,目录号#555029,最终稀释为1:1,100)。在培养结束时,将细胞用经荧光染料标记的抗CD8α抗体(BD Biosciences,目录号#564116,1:400稀释于具有2％ EDTA [Sigma-Aldrich,目录号#03690]和5％ FBS[Sigma-Aldrich,目录号#F7524]的Dulbecco磷酸缓冲盐水[DPBS(Dulbecco's phosphate-buffered saline),Thermo Fisher,目录号#14190250]中)染色,在2％ Histofix(Carl Roth GmbH,目录号#P087.4,在PBS中稀释)中固定,并用经荧光染料标记的抗GzmB抗体(BD Biosciences,目录号#561142;1:300稀释于透化缓冲液[Thermo Fisher,目录号#00-8333-56]中)进行胞内染色。在BD FACS Celesta流式细胞仪(BD Biosciences)上采集流式细胞术数据并用FlowJo(Tree Star Inc.)进行分析。

[1096] 将E板中的细胞在xCELLigence实时细胞分析仪器中无干扰培养5至6天,其中以2至3小时间隔进行阻抗测量。阻抗测量结果以细胞指数值表示。细胞指数与黏附肿瘤细胞单层的总面积相关。因此,与仅肿瘤细胞相比T细胞/肿瘤细胞共培养物中的细胞指数更低指示肿瘤细胞杀伤。将每个条件的细胞指数相对于T细胞/肿瘤细胞共培养物开始的时间点归一化。使用GraphPad Prism将随时间的归一化细胞指数曲线进行可视化。

[1097] 对于供体中和整个测定时间段中的实时细胞分析数据的合并评价,使用GraphPad Prism来计算曲线下面积(AUC)。将共培养从开始到结束的归一化细胞指数数据用于AUC分析。将每个处理组的AUC相对于用bsIgG1-b12-FERL/b12-FEAR处理的共培养物的AUC归一化。

[1098] 结果

[1099] 图16A示出了当与表达其同源抗原的肿瘤细胞共培养时,$CD8^+$T细胞上调了CD107a和GzmB表达。图16示出了bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR剂量依赖性地增强了CD107a和GzmB表达,而单价对照抗体bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR和bsIgG1-b12-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR相对于非结合对照抗体bsIgG1-b12-FERL/b12-FEAR未提高表达水平。表7示出了bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR介导的CD107a和GzmB表达增加的EC_{50}值在以下亚纳摩尔范围内:对于CD107a为0.18±0.10nM,并且对于GzmB为0.12±0.02nM(n＝5至6个供体的平均值±SD)。在bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR浓度为0.2和0.8μg/mL时,CD107a和GzmB表达水平与两种单价对照抗体相

比在统计学上显著提高。

[1100] 图17示出了如通过与单独培养的肿瘤细胞相比用非结合对照抗体bsIgG1-b12-FERL/b12-FEAR处理的$CD8^+$T细胞/肿瘤细胞共培养物的细胞指数值更低表明的,经抗原刺激的$CD8^+$T细胞表现出针对MDA-MB-231_hCLDN6_hEpCAM细胞的细胞毒性活性。与bsIgG-b12-FERL/b12-FEAR相比,bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR剂量依赖性地增强了$CD8^+$T细胞介导的细胞毒性活性,其中观察到浓度≥0.2μg/mL时的作用最大。相比之下,单价对照抗体bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR和bsIgG1-b12-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR对细胞毒性活性不具有相当大的作用。在bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR浓度为0.2和0.8μg/mL时,细胞毒性活性与两种单价对照抗体相比在统计学上显著提高。

[1101] 表7.$CD8^+$T细胞的CD107a和GzmB表达的EC_{50}值

供体编号	EC_{50} CD107a GMFI (μg/mL)	EC_{50} GzmB GMFI (μg/mL)
1	0.0503	0.0179
2	0.0300	0.0176
3	0.0217	0.0204
4	0.0120	0.0121

[1102]

供体编号	EC_{50} CD107a GMFI (μg/mL)	EC_{50} GzmB GMFI (μg/mL)
5	N/A[a]	0.0201
6	0.0210	0.0224
平均值 ± SD (μg/mL)	0.0270 ± 0.0145	0.0184 ± 0.0036
平均值 ± SD (nM)	0.1834 ± 0.0986	0.1226 ± 0.0237

[1103] [a)]未确定EC_{50}值,因为未获得S型剂量响应曲线。

[1104] EC50=半数最大有效浓度;GMFI=几何平均荧光强度;GzmB=颗粒酶B;N/A=不适用;SD=标准偏差。

[1105] 实施例14-具有不同Fc惰性突变(FER/FEA、FEA/FEA、FER/FER)的EpCAMx4-1BB双特异性抗体与FcγR和FcRn的结合

[1106] 通过表面等离子体共振(SPR)分析EpCAMx4-1BB双特异性抗体中Fc惰性突变的不同组合(FER/FEA、FEA/FEA、FER/FER)对FcγR和FcRn结合的作用。

[1107] 方法

[1108] 通过SPR使用Biacore 8K SPR系统来分析具有多种Fc惰性突变(FER/FEA、FEA/FEA、FER/FER)的EpCAMx4-1BB双特异性抗体与固定化的人重组FcγR变体(FcγRIa、FcγRIIa、FcγRIIb和FcγRIIIa)的结合。使用胺偶联和His捕获试剂盒(Cytiva,目录号BR100050和目录号29234602)根据制造商的说明将Biacore系列S传感器芯片CM5(Cytiva,目录号29104988)用抗组氨酸(His)抗体共价包被。

[1109] 将经His标记的FcγR蛋白的等分试样(表8)在HBS-EP+(Cytiva,目录号BR100669)中稀释并用于以10μL/分钟的流量和60秒的接触时间捕获到经抗His包被的传感器芯片的

表面上。这得到的捕获水平为约215至365个共振单位(resonance unit,RU)。

[1110] 在HBS-EP+缓冲液的三个初始循环之后,使用如表9中所示的抗体范围,注射抗体(IgG1-EpCAM-A37-FERL、IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR 、bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR 、bsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-A37-FEAR 、bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FERR、IgG1-b12)以生成结合曲线。在具有捕获的FcγR的表面(活性表面)上分析的每个样品也在不具有捕获的FcγR的平行流动池(参考表面)上进行分析,所述不具有捕获的FcγR的平行流动池(参考表面)用于背景校正。

[1111] 在每个循环结束时,使用pH 1.5的10mM甘氨酸HCl(Cytiva,目录号BR100354)使表面再生。使用Biacore Insight评价软件(Cytiva)生成传感图并将四参数逻辑拟合应用于终点测量(结合平台期相对于捕获后的基线)以计算EpCAMx4-1BB双特异性抗体与具有野生型Fc区的IgG1-b12抗体的相对结合。

[1112] 表8.用于SPR的重组人FcγR蛋白

[1113]

名称	描述	SinoBiological 目录号	包被浓度
FcγRIa	CD64蛋白,人,重组(His标签),生物素化	10256-H08S-B	70 nM
FcγRIIa-H131	CD32A蛋白,人,重组(167 His,His标签)	10374-H08H1	160 nM
FcγRIIa-R131	CD32A蛋白,人,重组(167 Arg,His & AVI标签)	10364-H27H	70 nM
FcγRIIb	CD32B/Fcgr2b蛋白,人,重组(His & AVI标签)	10259-H27H	70 nM
FcγRIIIa-V158	CD16a蛋白,人,重组(176 Val,His & AVI标签)	10389-H27H1	110 nM
FcγRIIIa-F158	CD16a蛋白,人,重组(ECD,176 Phe,His & AVI标签)	10389-H27H	150 nM

[1114] 表9.SPR中单个FcγR的测试条件

[1115]

FcγR	所测试的抗体浓度范围		
	起始浓度 (nM)	最低浓度 (nM)	倍数稀释
FcγRIa	3,000	0.02	1:3
FcγRIIa-H131	10,000	0.42	1:2.5
FcγRIIa-R131	10,000	0.42	1:2.5
FcγRIIb	10,000	4.88	1:2
FcγRIIIa-V158	10,000	0.06	1:3
FcγRIIIa-F158	10,000	0.42	1:2.5

[1116] 在单独的实验中,使用动力学测定对上述方法进行以下改变来通过SPR测试与新生儿Fc受体(neonatal Fc receptor,FcRn)的结合。将经His标记的FcRn(SinoBiological,目录号CT009-H08H-B)在PBS-P+缓冲液(Cytiva,目录号28995084)中稀释至5nM(对于pH 6.0)或7.3nM(对于pH 7.4)。对于IgG1-b12,抗体浓度曲线为0至100nM,而对于bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR、IgG1-EpCAM-A37-FERL和IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR,抗体浓度曲线为0至500nM。在pH 6.0(在酸性条件下,其中IgG与FcRn结合)时

进行三次实验并在pH 7.4(在该pH下未预期与IgG结合)时进行两次实验。

[1117] 结果

[1118] 图18示出了未检测到bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR、bsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-A37-FEAR 、bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FERR与FcγRIa、FcγRIIa(H131或R131变体)、FcγRIIb和FcγRIIIa(F158或V158变体)的结合。另外,单克隆抗体IgG1-EpCAM-A37-FERL和IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR也未显示与这些FcγR的任何结合。相比之下,阳性对照抗体IgG1-b12显示出与所有测试的FcγR剂量依赖性结合。

[1119] 表10示出了bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR、IgG1-EpCAM-A37-FERL和IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR与FcRn的结合被保留,其平均结合亲和力(K_D)分别为312nM、230nM和375nM。确定了具有野生型IgG1骨架的IgG1-b12的亲和力为29nM(K_D)。在pH7.4时,未观察到任何测试抗体与FcRn结合。

[1120] 总之,当与FcRn结合被保留时,包含不同惰性突变(FER/FEA、FEA/FEA或FER/FER)的EpCAMx4-1BB双特异性抗体通过SPR未显示出与FcγR结合。

[1121] 表10.具有不同Fc惰性突变(FER/FEA、FEA或FER)的抗体与FcRn的结合

[1122]

抗体	缔合常数 (k_a) ($M^{-1}s^{-1}$)	解离常数 (k_d) (s^{-1})	平均结合亲和力 (K_D)
bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR	1.59E+05	4.89E-02	312 nM
IgG1-EpCAM-A37-FERL	1.80E+05	4.13E-02	230 nM
IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	1.43E+05	5.39E-02	375 nM
IgG1-b12	1.10E+06	3.22E-02	29 nM

[1123] 实施例15-食蟹猴中bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR的非临床毒理学研究

[1124] 在食蟹猴中进行针对bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR的毒理学评估。通过检查临床体征、体重、ECG、毒物代谢动力学、免疫表型分型、临床化学参数(包括脂肪酶和淀粉酶)、大体尸检和组织病理学对毒性进行评估。初步结果表明,当以每周间隔静脉内给予bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR多至5次时,多至50mg/kg的剂量具有良好的耐受性。仅在第三次和随后的输注之后的4小时观察到血浆IL-6、MCP-1和MIP-1b水平的非不良瞬时提高,其在给药之后24小时消失。总之,多至50mg/kg对任何测试的参数都没有不良作用,并因此显示出bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR得到可接受的非临床安全性谱,支持在首次人体临床试验中对其进行进一步测试。

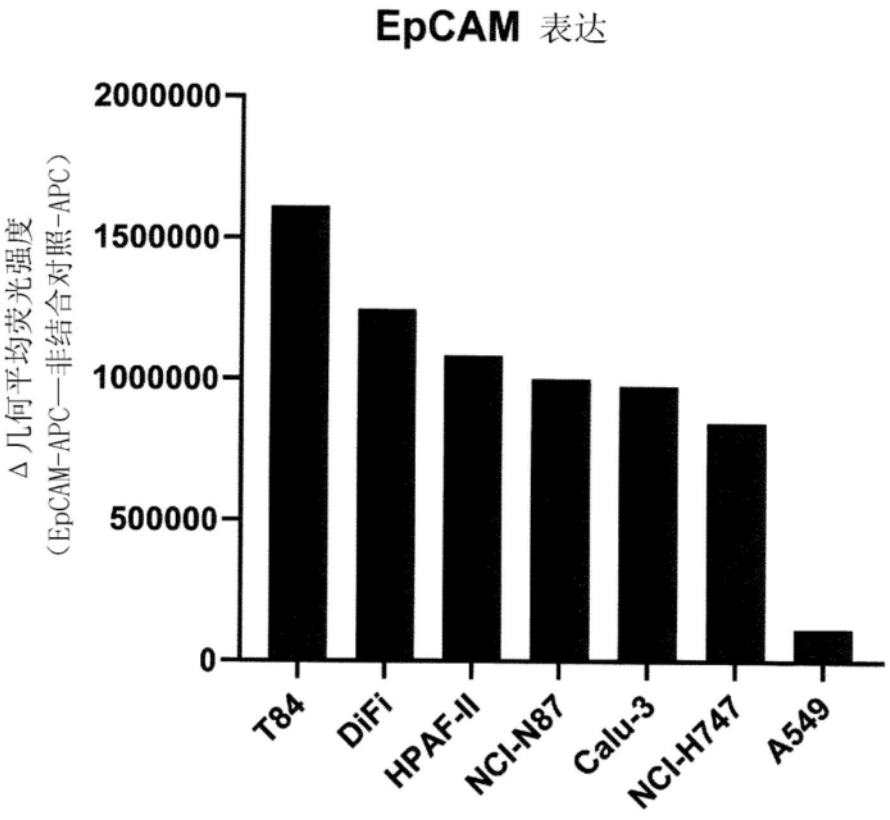

EpCAM 表达
Δ几何平均荧光强度
(EpCAM-APC—非结合对照-APC)
2000000
1500000
1000000
500000
0
T84
DiFi
HPAF-II
NCI-N87
Calu-3
NCI-H747
A549

图1

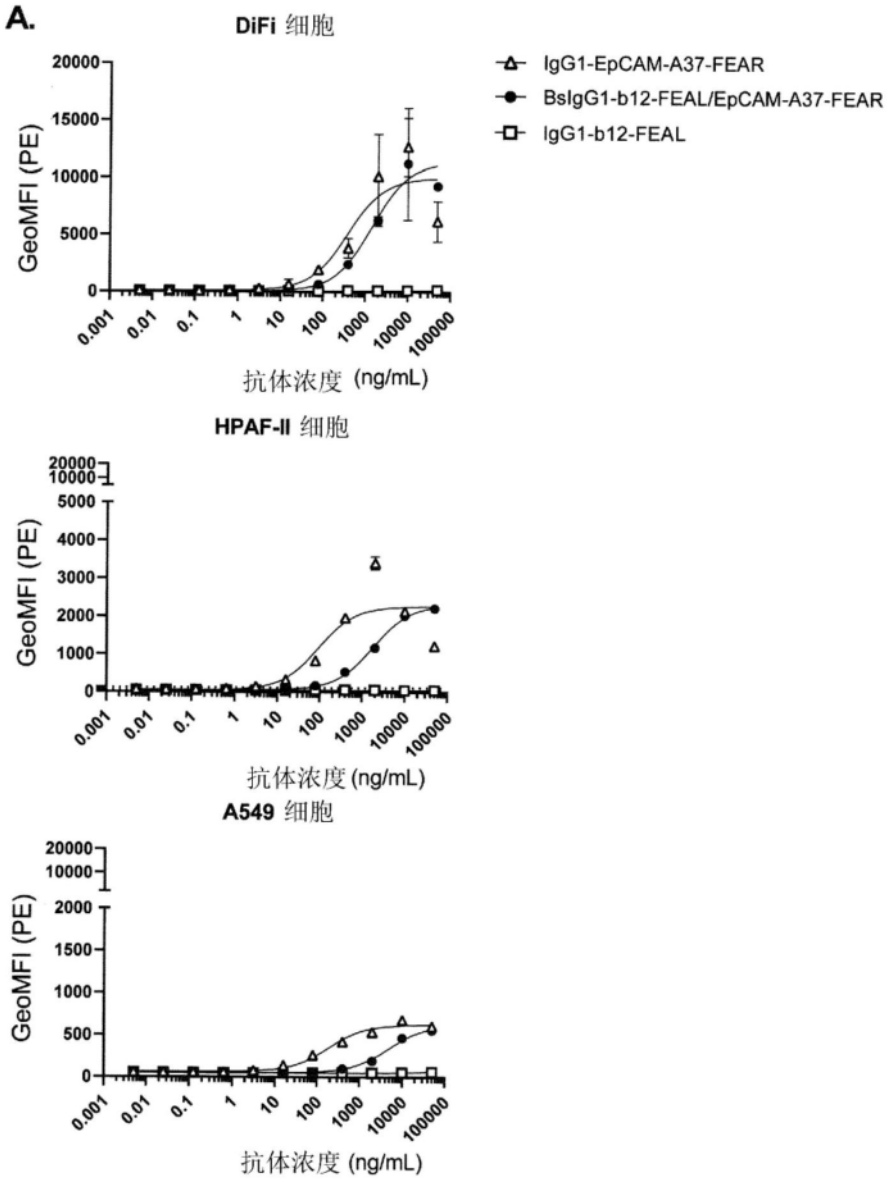

A.
DiFi 细胞
IgG1-EpCAM-A37-FEAR
BsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-A37-FEAR
IgG1-b12-FEAL
GeoMFI (PE)
抗体浓度 (ng/mL)
HPAF-II 细胞
GeoMFI (PE)
抗体浓度 (ng/mL)
A549 细胞
GeoMFI (PE)
抗体浓度 (ng/mL)

图2

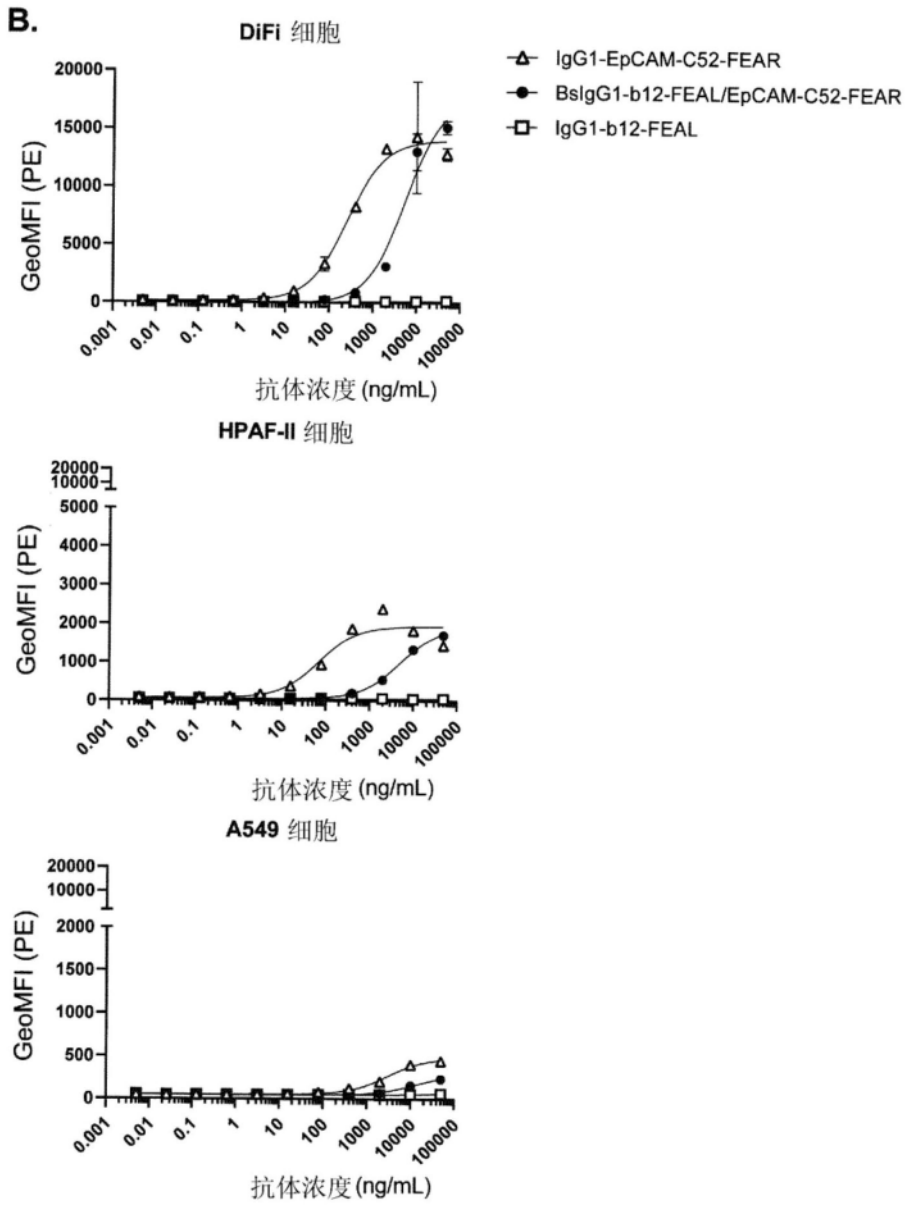

B.
DiFi 细胞
IgG1-EpCAM-C52-FEAR
BsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-C52-FEAR
IgG1-b12-FEAL
GeoMFI (PE)
抗体浓度 (ng/mL)
HPAF-II 细胞
A549 细胞

图2

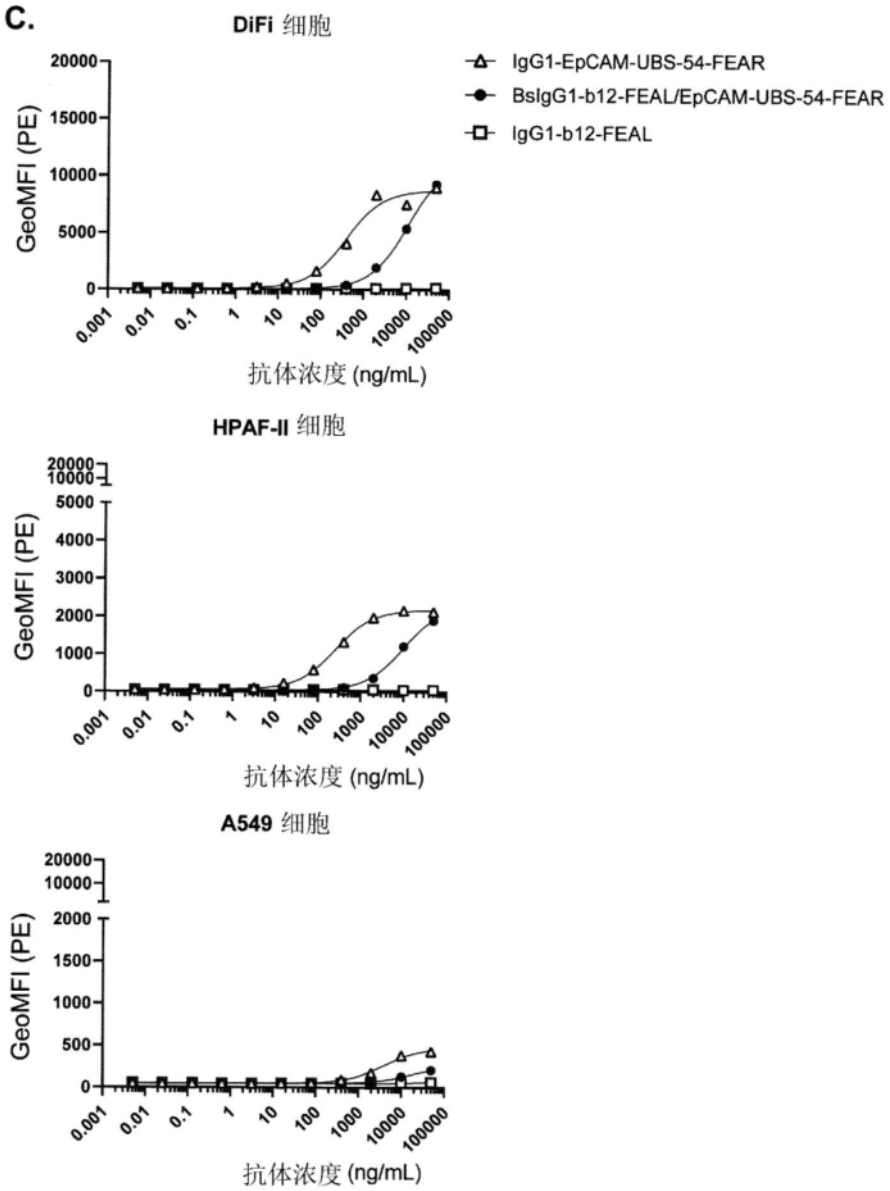

C.
DiFi 细胞
IgG1-EpCAM-UBS-54-FEAR
BsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-UBS-54-FEAR
IgG1-b12-FEAL
GeoMFI (PE)
抗体浓度 (ng/mL)
HPAF-II 细胞
GeoMFI (PE)
抗体浓度 (ng/mL)
A549 细胞
GeoMFI (PE)
抗体浓度 (ng/mL)

图2

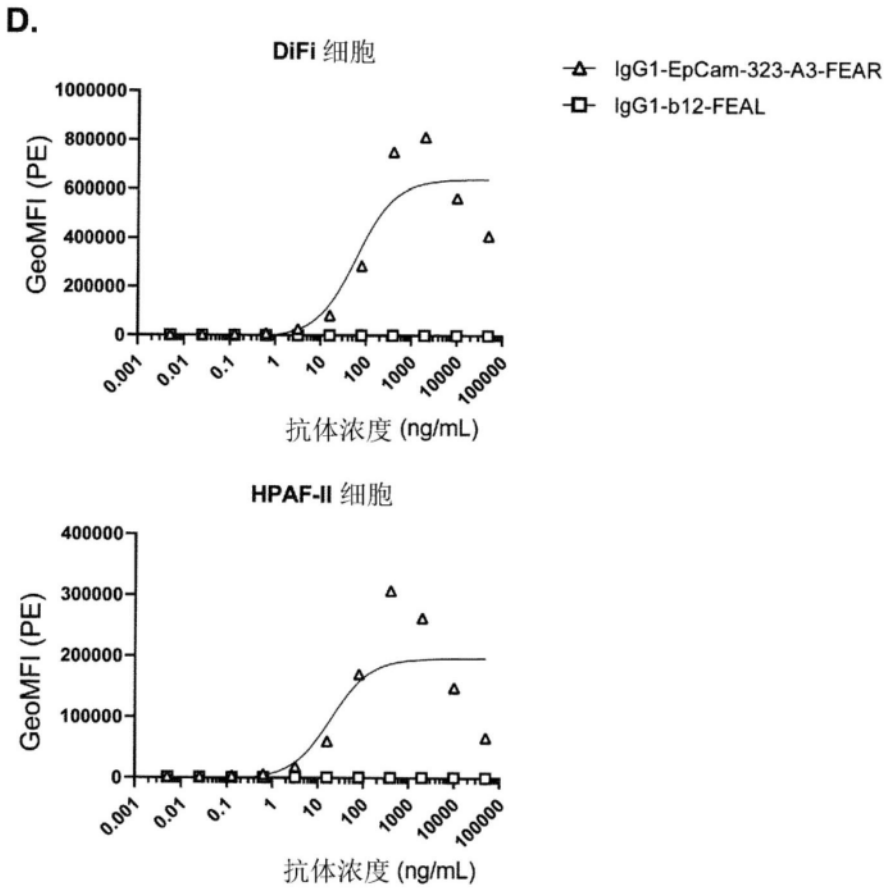

D.
DiFi 细胞
IgG1-EpCam-323-A3-FEAR
IgG1-b12-FEAL
GeoMFI (PE)
1000000
800000
600000
400000
200000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
抗体浓度 (ng/mL)
HPAF-II 细胞
GeoMFI (PE)
400000
300000
200000
100000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
抗体浓度 (ng/mL)

图2

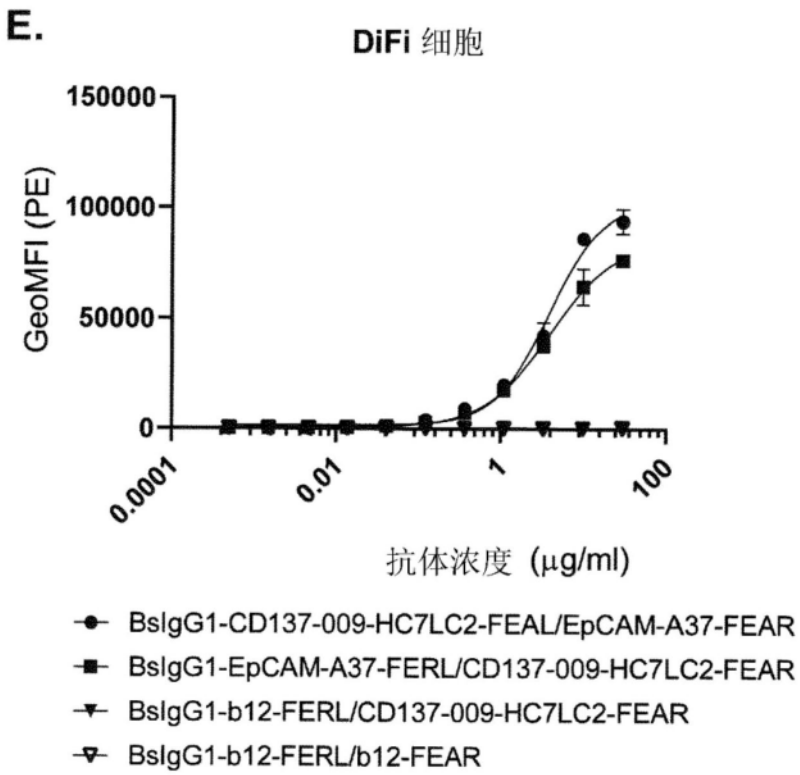

E.
DiFi 细胞
150000
100000
50000
0
GeoMFI (PE)
0.0001
0.01
1
100
抗体浓度 (μg/ml)
BsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-A37-FEAR
BsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR
BsIgG1-b12-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR
BsIgG1-b12-FERL/b12-FEAR

图2

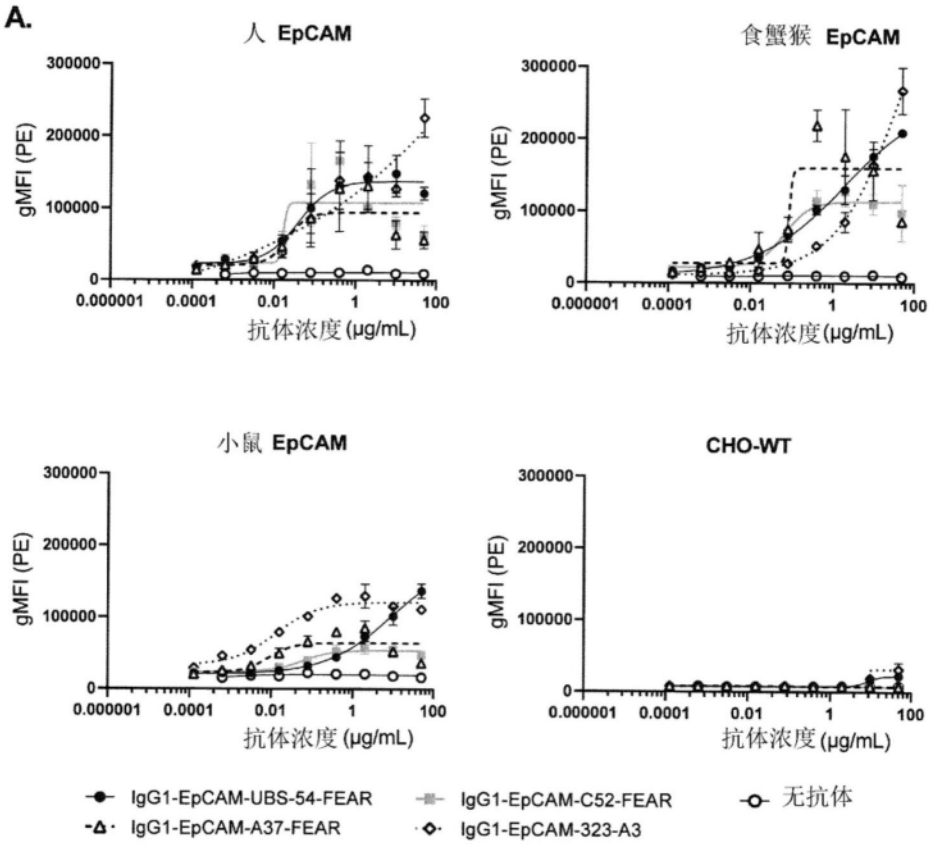

A.
人 EpCAM
食蟹猴 EpCAM
小鼠 EpCAM
CHO-WT
gMFI (PE)
抗体浓度(μg/mL)
IgG1-EpCAM-UBS-54-FEAR
IgG1-EpCAM-C52-FEAR
无抗体
IgG1-EpCAM-A37-FEAR
IgG1-EpCAM-323-A3

图3

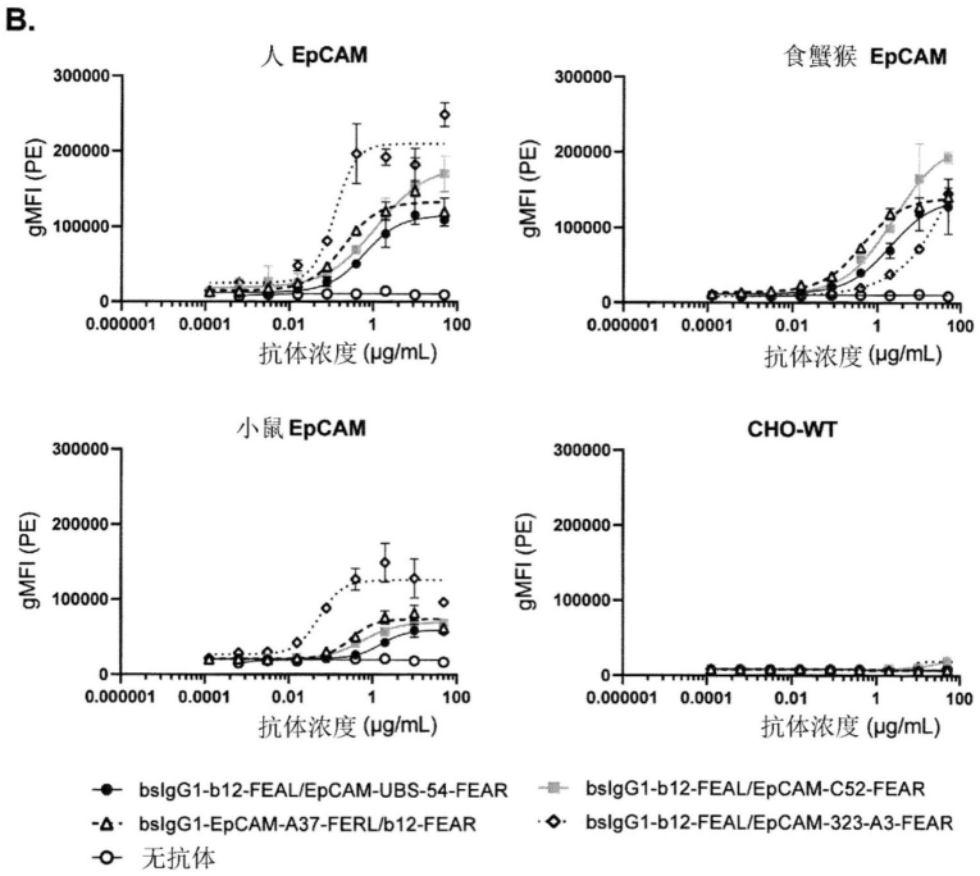

B.
人 EpCAM
食蟹猴 EpCAM
小鼠 EpCAM
CHO-WT
gMFI (PE)
抗体浓度 (μg/mL)
bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-UBS-54-FEAR
bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-C52-FEAR
bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR
bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-323-A3-FEAR
无抗体

图3

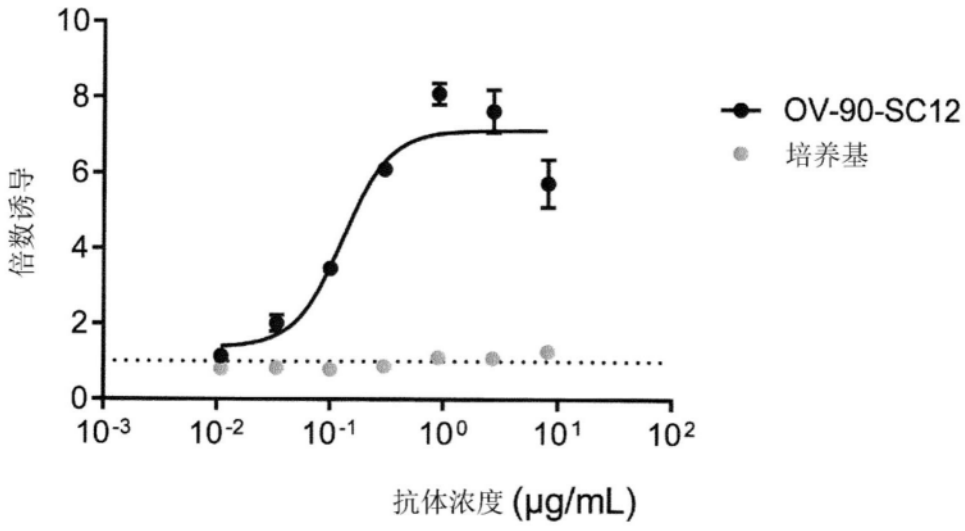

倍数诱导
抗体浓度 (μg/mL)
OV-90-SC12
培养基

图4

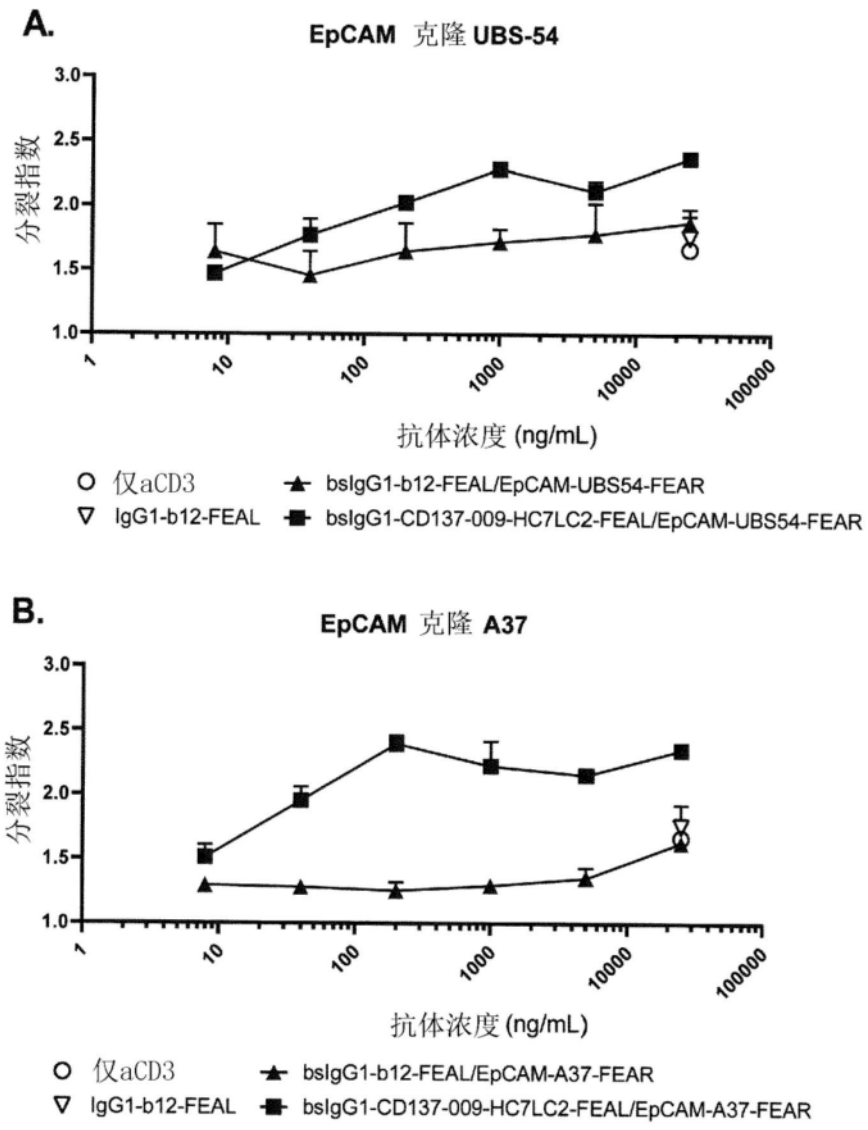

A.
EpCAM 克隆 UBS-54
分裂指数
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
1
10
100
1000
10000
100000
抗体浓度 (ng/mL)
仅aCD3
bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-UBS54-FEAR
IgG1-b12-FEAL
bsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-UBS54-FEAR
B.
EpCAM 克隆 A37
分裂指数
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
1
10
100
1000
10000
100000
抗体浓度 (ng/mL)
仅aCD3
bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-A37-FEAR
IgG1-b12-FEAL
bsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-A37-FEAR

图5

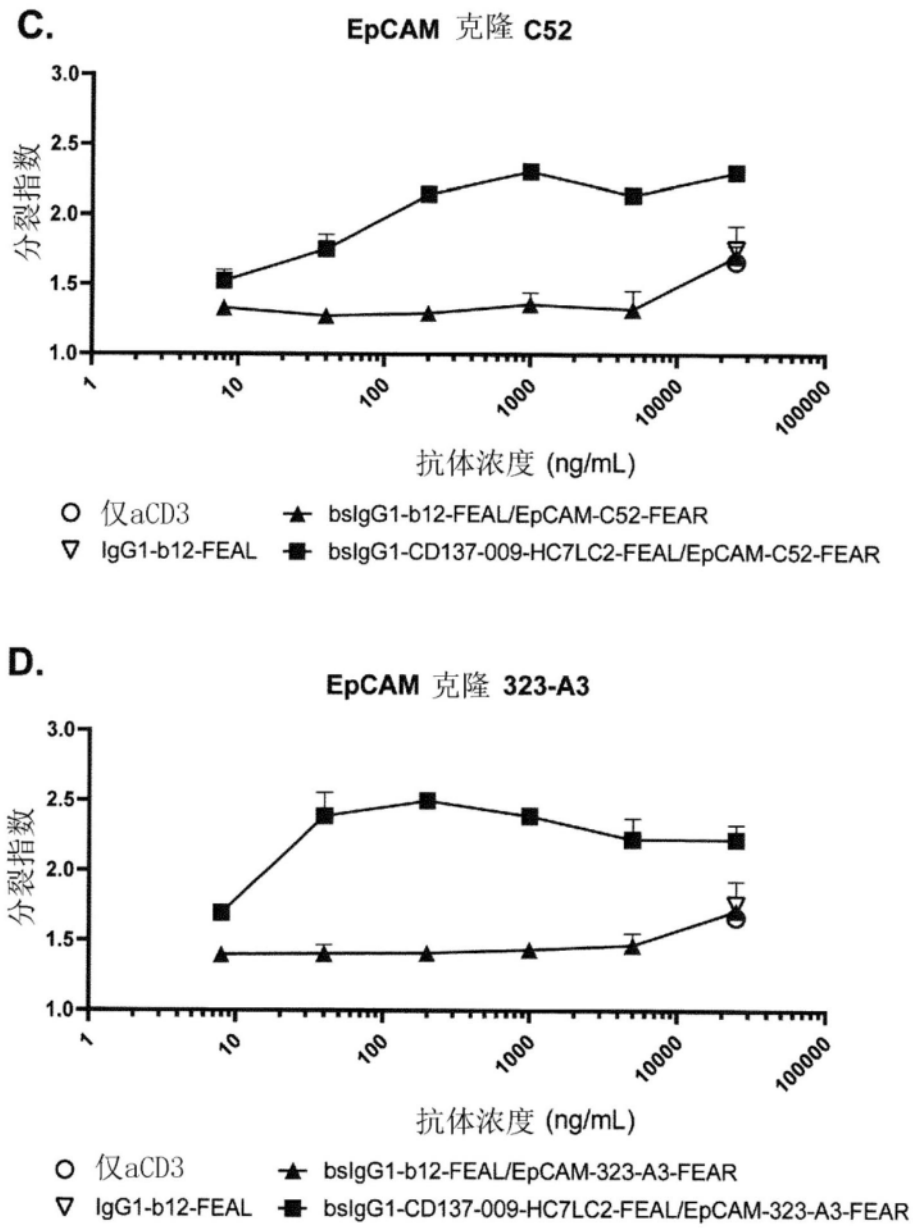

C.
EpCAM 克隆 C52
分裂指数
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
1
10
100
1000
10000
100000
抗体浓度 (ng/mL)
仅aCD3
bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-C52-FEAR
IgG1-b12-FEAL
bsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-C52-FEAR
D.
EpCAM 克隆 323-A3
分裂指数
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
1
10
100
1000
10000
100000
抗体浓度 (ng/mL)
仅aCD3
bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-323-A3-FEAR
IgG1-b12-FEAL
bsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-323-A3-FEAR

图5

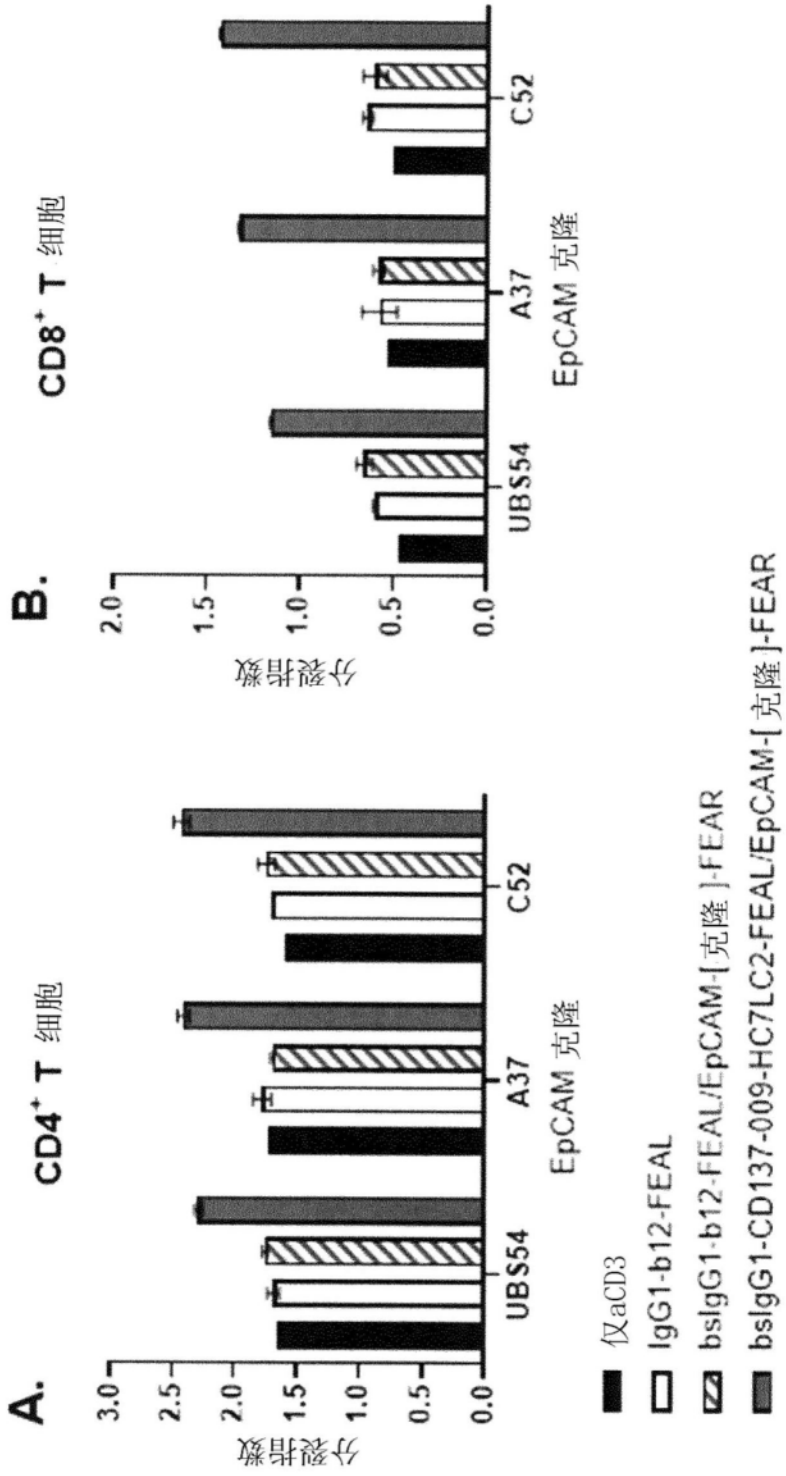

A.
CD4+ T 细胞
分裂指数
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
UBS54
A37
C52
EpCAM 克隆
B.
CD8+ T 细胞
分裂指数
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
UBS54
A37
C52
EpCAM 克隆
仅aCD3
IgG1-b12-FEAL
bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-[克隆]-FEAR
bsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-[克隆]-FEAR

图6

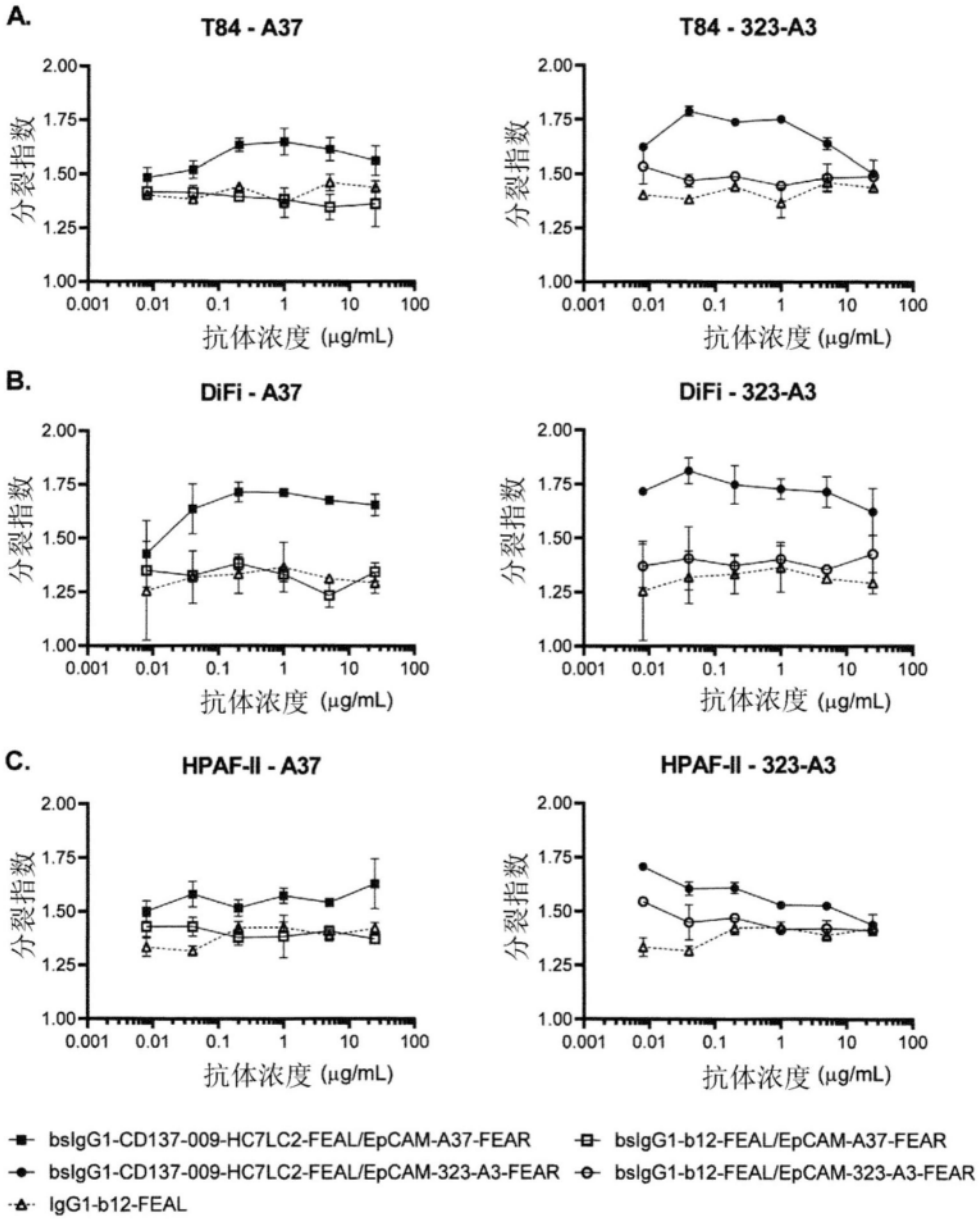

A.
T84 - A37
T84 - 323-A3
B.
DiFi - A37
DiFi - 323-A3
C.
HPAF-II - A37
HPAF-II - 323-A3
分裂指数
抗体浓度 (μg/mL)
2.00
1.75
1.50
1.25
1.00
0.001
0.01
0.1
1
10
100
bsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-A37-FEAR
bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-A37-FEAR
bsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-323-A3-FEAR
bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-323-A3-FEAR
IgG1-b12-FEAL

图7

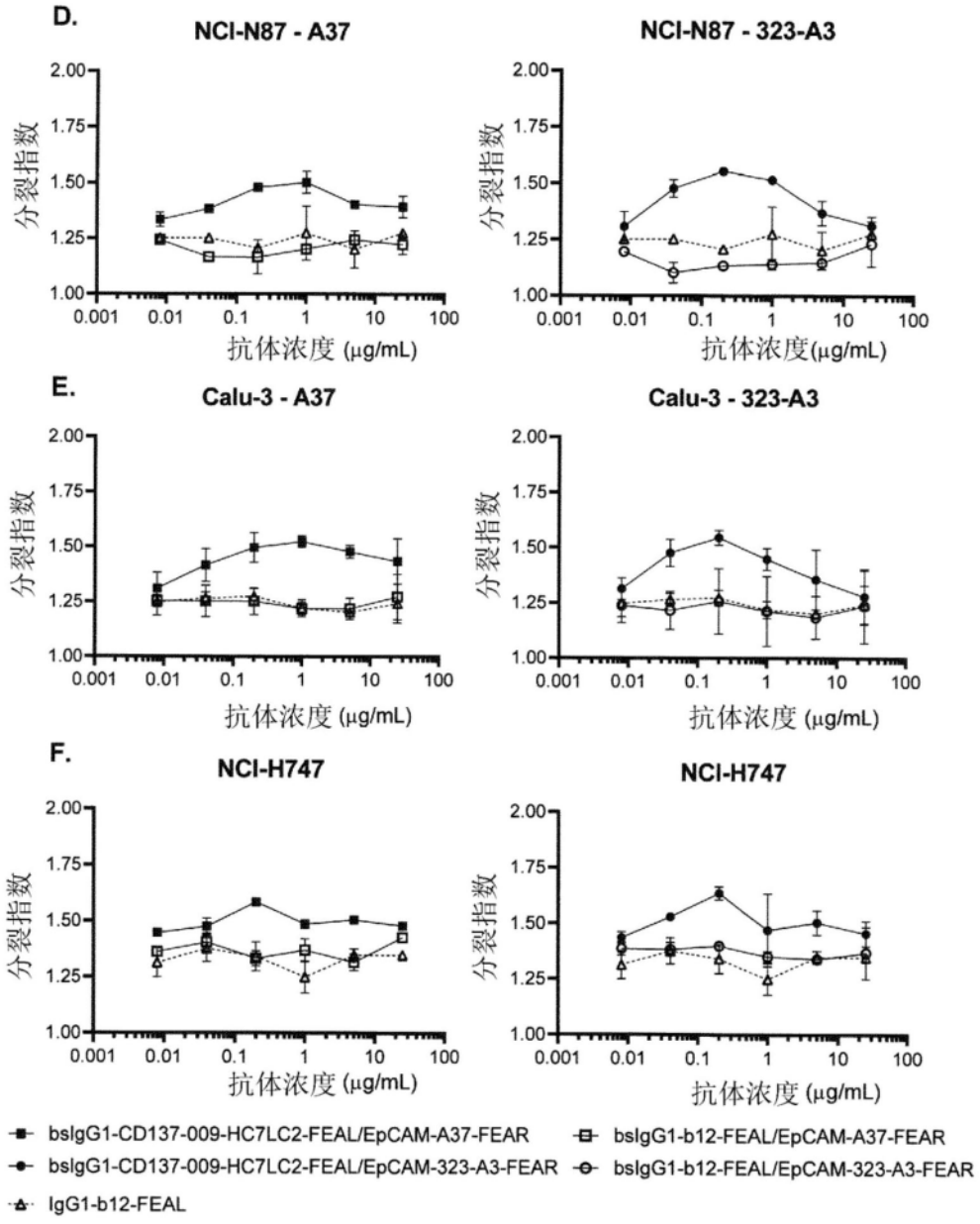

D.
NCI-N87 - A37
NCI-N87 - 323-A3
E.
Calu-3 - A37
Calu-3 - 323-A3
F.
NCI-H747
NCI-H747
分裂指数
抗体浓度 (μg/mL)
bsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-A37-FEAR
bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-A37-FEAR
bsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-323-A3-FEAR
bsIgG1-b12-FEAL/EpCAM-323-A3-FEAR
IgG1-b12-FEAL

图7

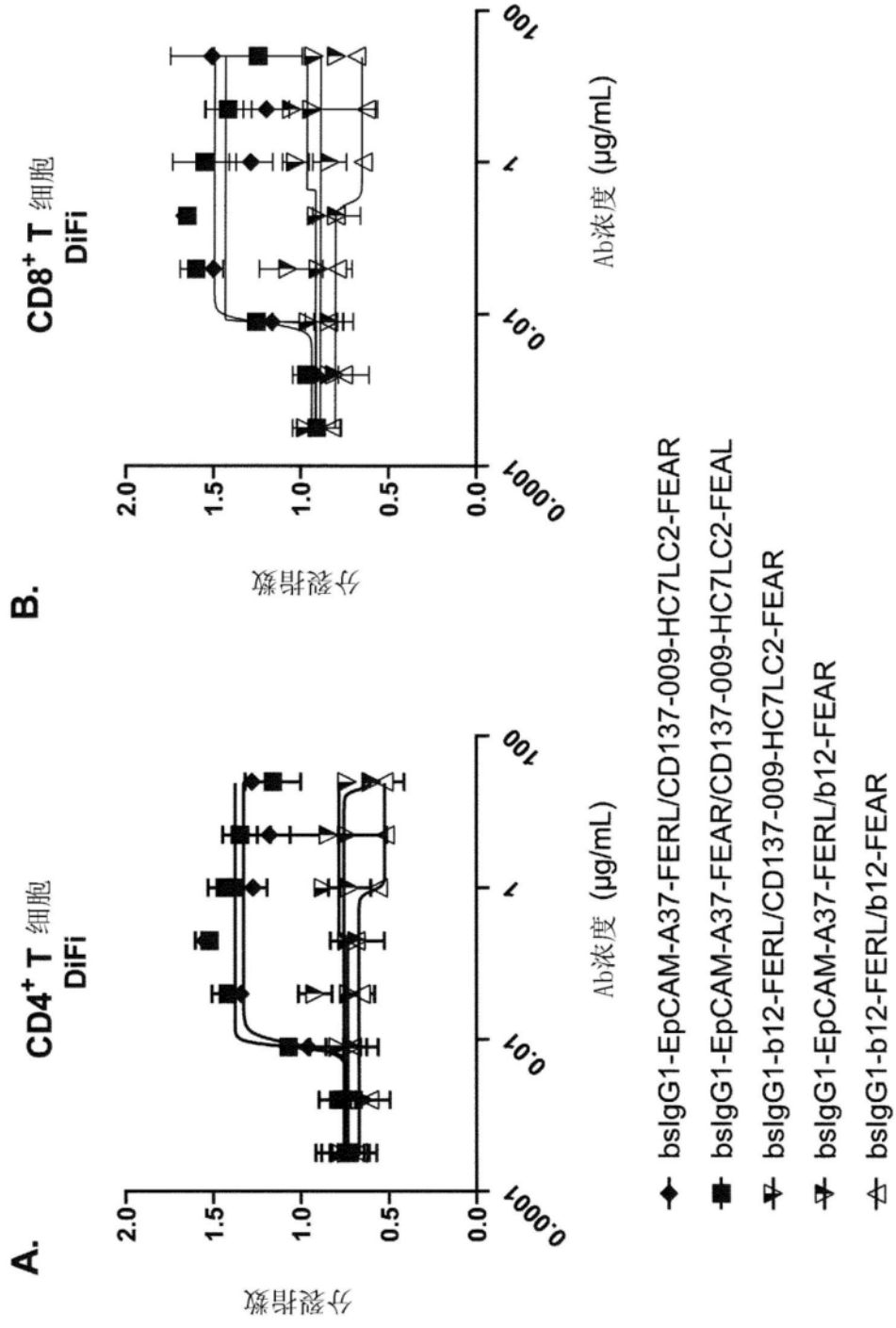

A.
CD4+ T 细胞
DiFi
分裂指数
Ab浓度 (μg/mL)
B.
CD8+ T 细胞
DiFi
分裂指数
Ab浓度 (μg/mL)
bslgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR
bslgG1-EpCAM-A37-FEAR/CD137-009-HC7LC2-FEAL
bslgG1-b12-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR
bslgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR
bslgG1-b12-FERL/b12-FEAR

图8

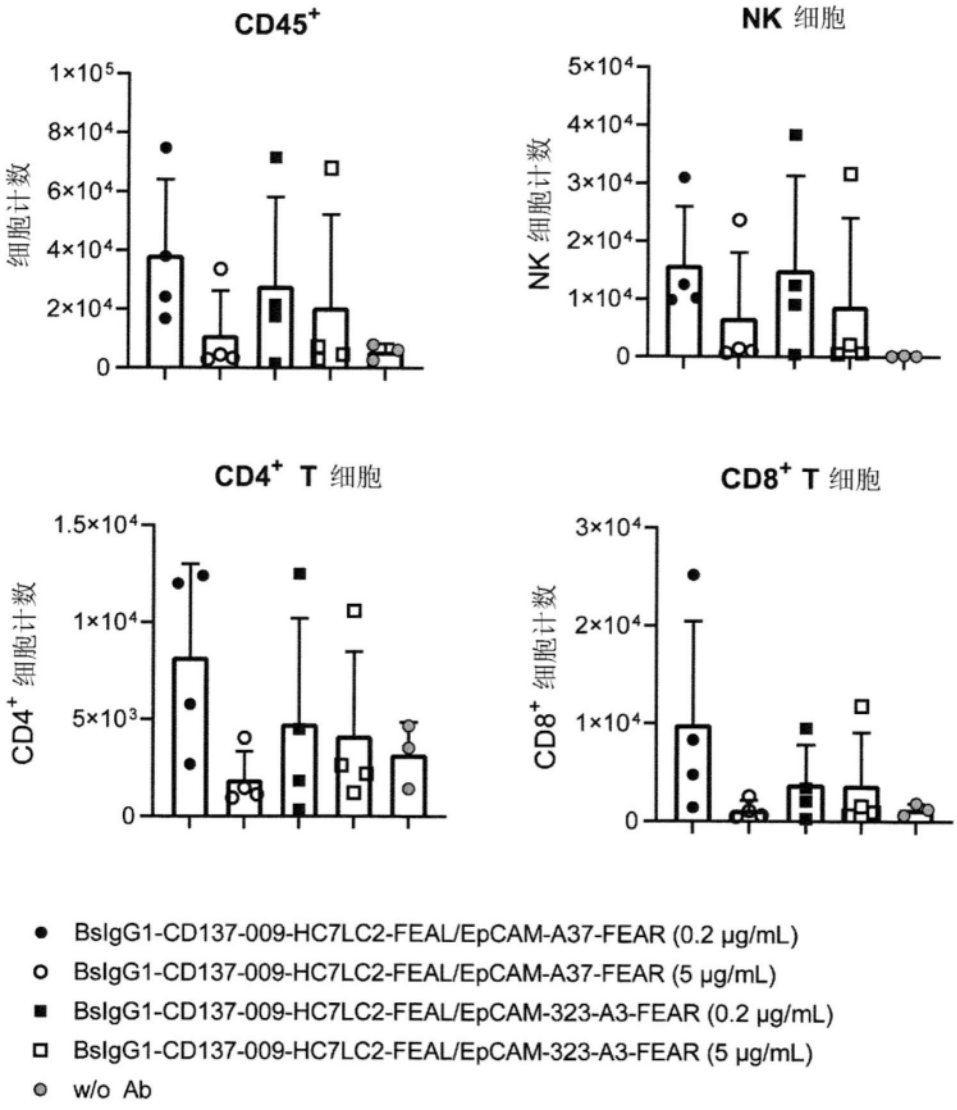

CD45+
细胞计数
1×10⁵
8×10⁴
6×10⁴
4×10⁴
2×10⁴
0
NK 细胞
NK 细胞计数
5×10⁴
4×10⁴
3×10⁴
2×10⁴
1×10⁴
0
CD4+ T 细胞
CD4+ 细胞计数
1.5×10⁴
1×10⁴
5×10³
0
CD8+ T 细胞
CD8+ 细胞计数
3×10⁴
2×10⁴
1×10⁴
0
BsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-A37-FEAR (0.2 μg/mL)
BsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-A37-FEAR (5 μg/mL)
BsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-323-A3-FEAR (0.2 μg/mL)
BsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-323-A3-FEAR (5 μg/mL)
w/o Ab

图9

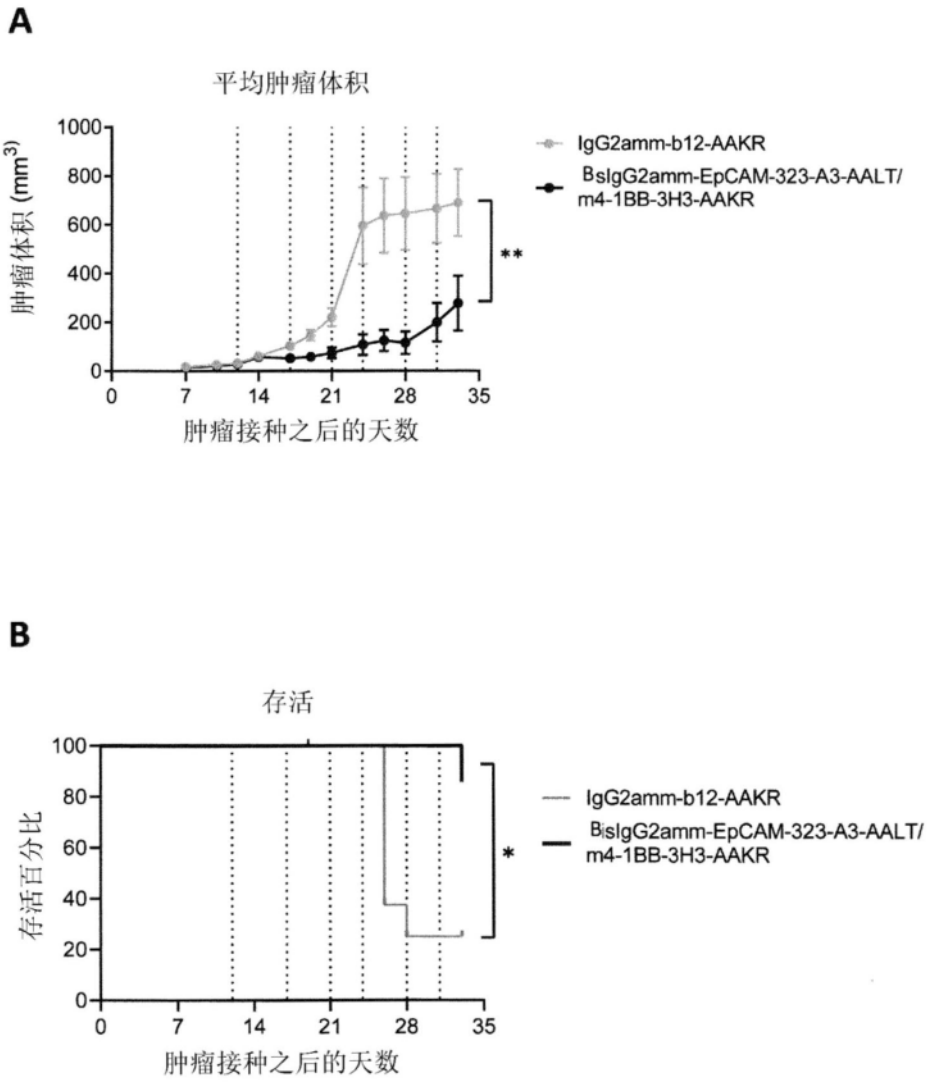

A
平均肿瘤体积
肿瘤体积 (mm3)
1000
800
600
400
200
0
0
7
14
21
28
35
肿瘤接种之后的天数
IgG2amm-b12-AAKR
BsIgG2amm-EpCAM-323-A3-AALT/
m4-1BB-3H3-AAKR
**
B
存活
存活百分比
100
80
60
40
20
0
0
7
14
21
28
35
肿瘤接种之后的天数
IgG2amm-b12-AAKR
BsIgG2amm-EpCAM-323-A3-AALT/
m4-1BB-3H3-AAKR
*

图10

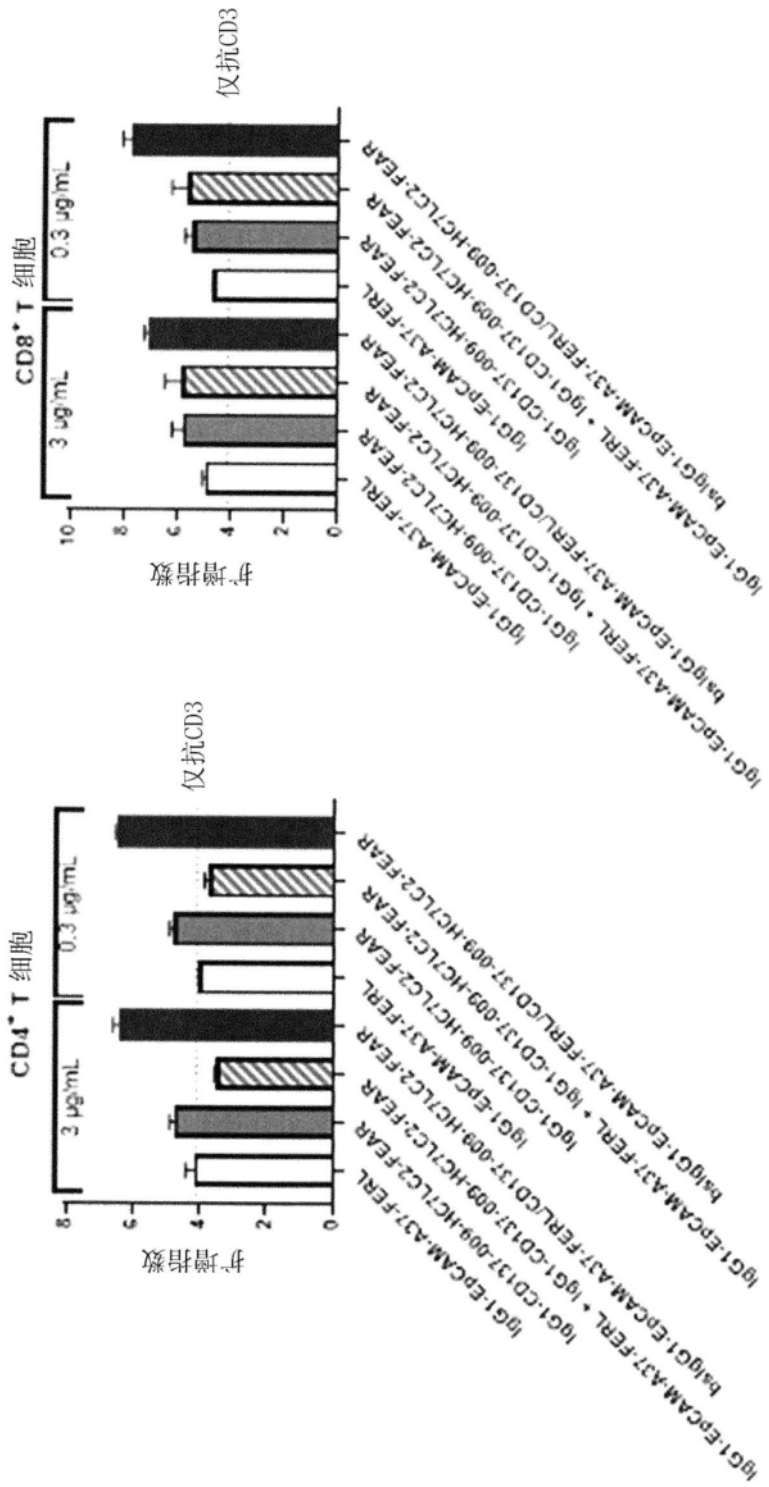

CD8+ T 细胞
CD4+ T 细胞
3 μg/mL
0.3 μg/mL
扩增指数
仅抗CD3
IgG1-EpCAM-A37-FERL
IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR
IgG1-EpCAM-A37-FERL • IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR
bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR

图11

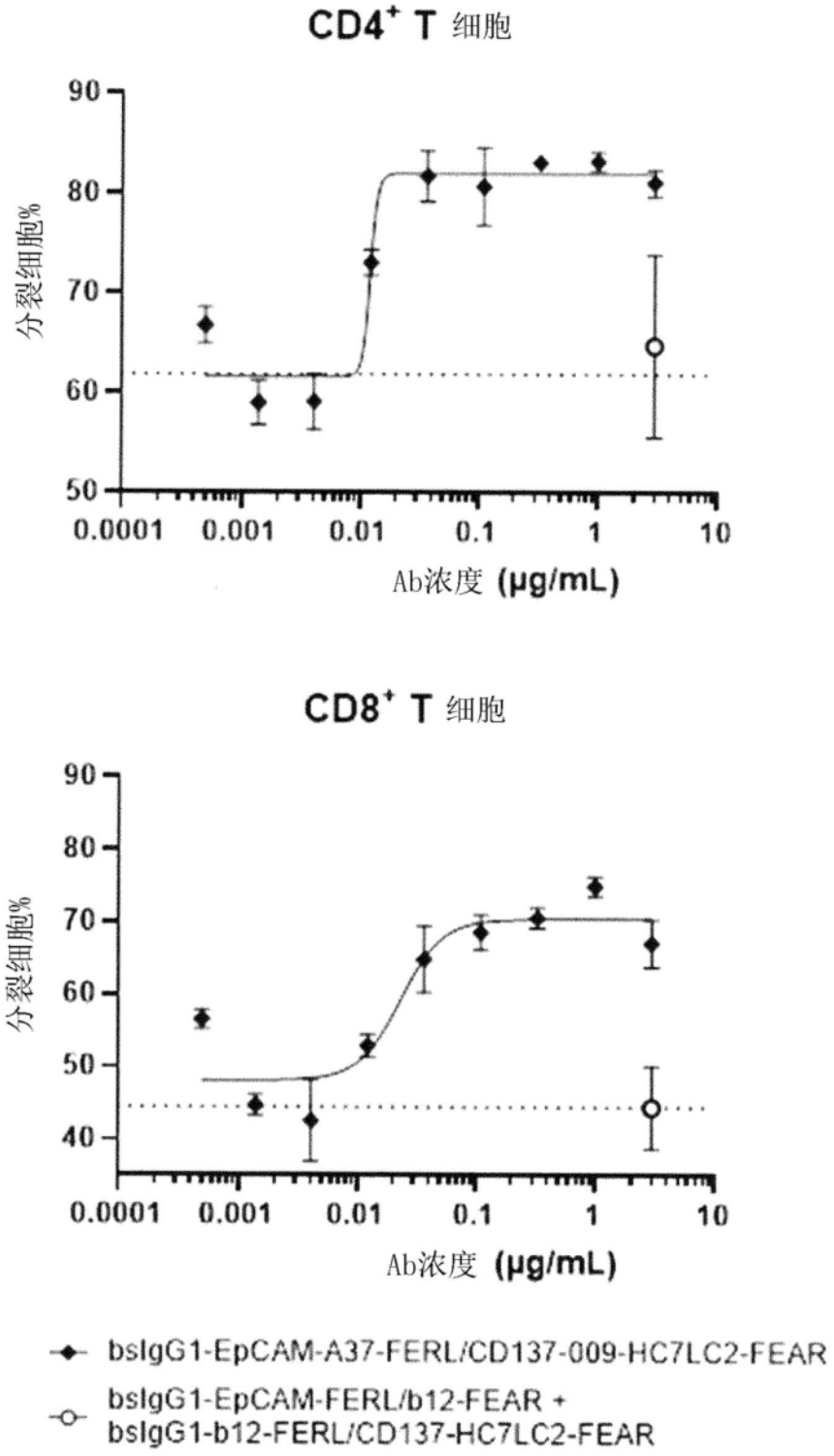

CD4+ T 细胞
分裂细胞%
90
80
70
60
50
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
Ab浓度 (μg/mL)
CD8+ T 细胞
分裂细胞%
90
80
70
60
50
40
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
Ab浓度 (μg/mL)
bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR
bsIgG1-EpCAM-FERL/b12-FEAR +
bsIgG1-b12-FERL/CD137-HC7LC2-FEAR

图12

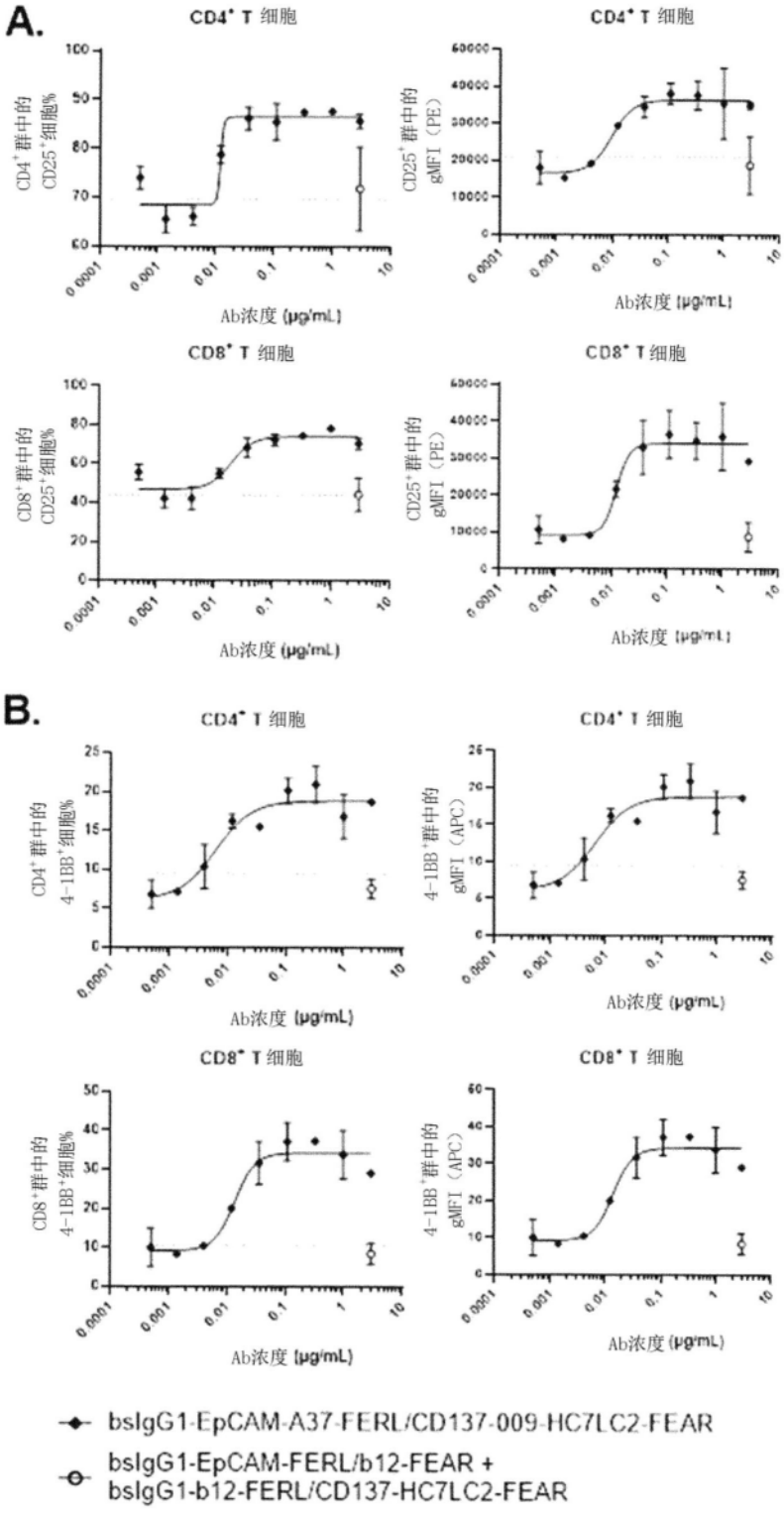

A.
CD4+ T 细胞
CD4+群中的CD25+细胞%
Ab浓度 (μg/mL)
CD4+ T 细胞
CD25+群中的gMFI（PE）
Ab浓度 (μg/mL)
CD8+ T 细胞
CD8+群中的CD25+细胞%
Ab浓度 (μg/mL)
CD8+ T 细胞
CD25+群中的gMFI（PE）
Ab浓度 (μg/mL)
B.
CD4+ T 细胞
CD4+群中的4-1BB+细胞%
Ab浓度 (μg/mL)
CD4+ T 细胞
4-1BB+群中的gMFI（APC）
Ab浓度 (μg/mL)
CD8+ T 细胞
CD8+群中的4-1BB+细胞%
Ab浓度 (μg/mL)
CD8+ T 细胞
4-1BB+群中的gMFI（APC）
Ab浓度 (μg/mL)
bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR
bsIgG1-EpCAM-FERL/b12-FEAR +
bsIgG1-b12-FERL/CD137-HC7LC2-FEAR

图13

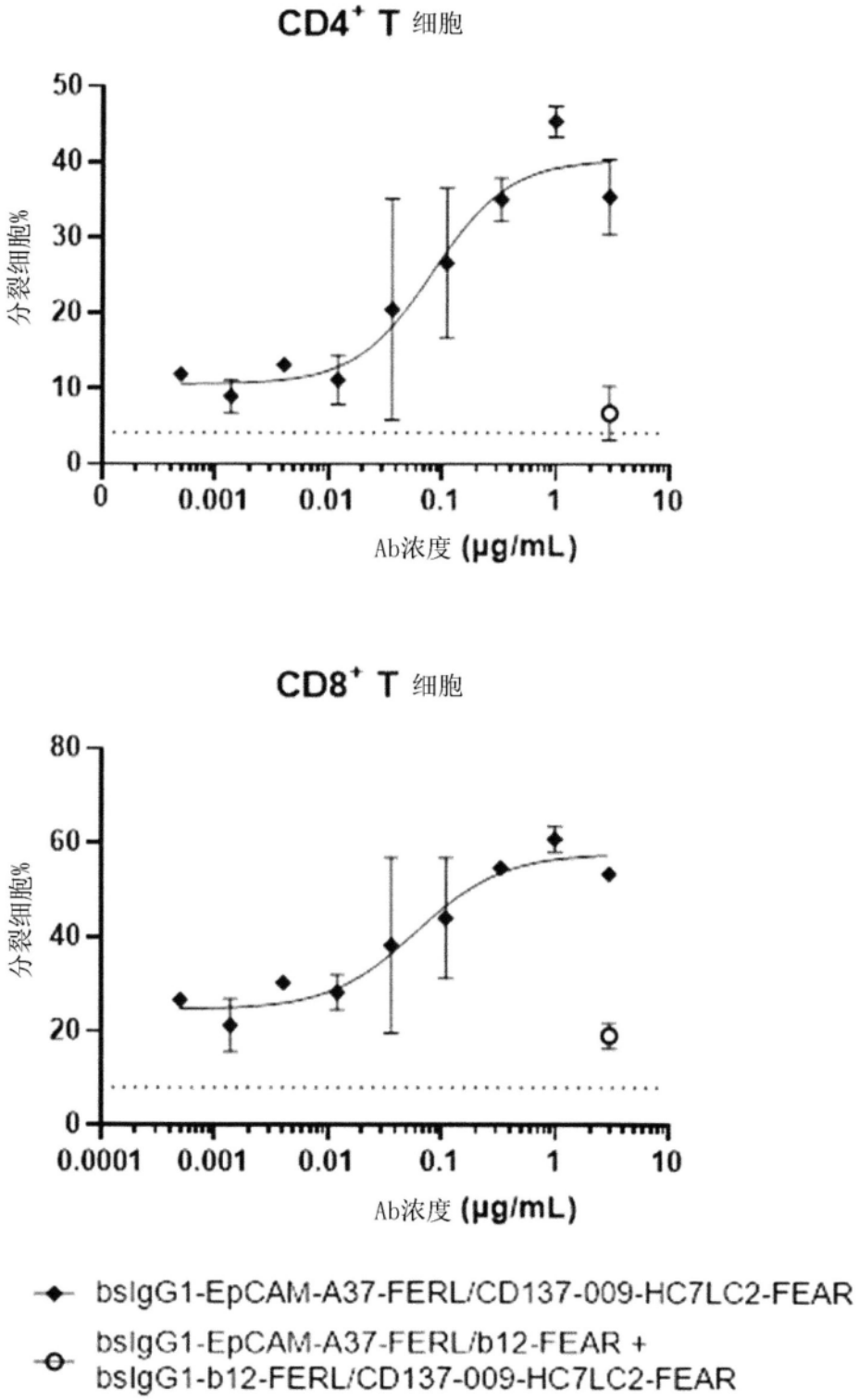

CD4+ T 细胞
分裂细胞%
50
40
30
20
10
0
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Ab浓度 (μg/mL)
CD8+ T 细胞
分裂细胞%
80
60
40
20
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
Ab浓度 (μg/mL)
bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR
bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR +
bsIgG1-b12-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR

图14

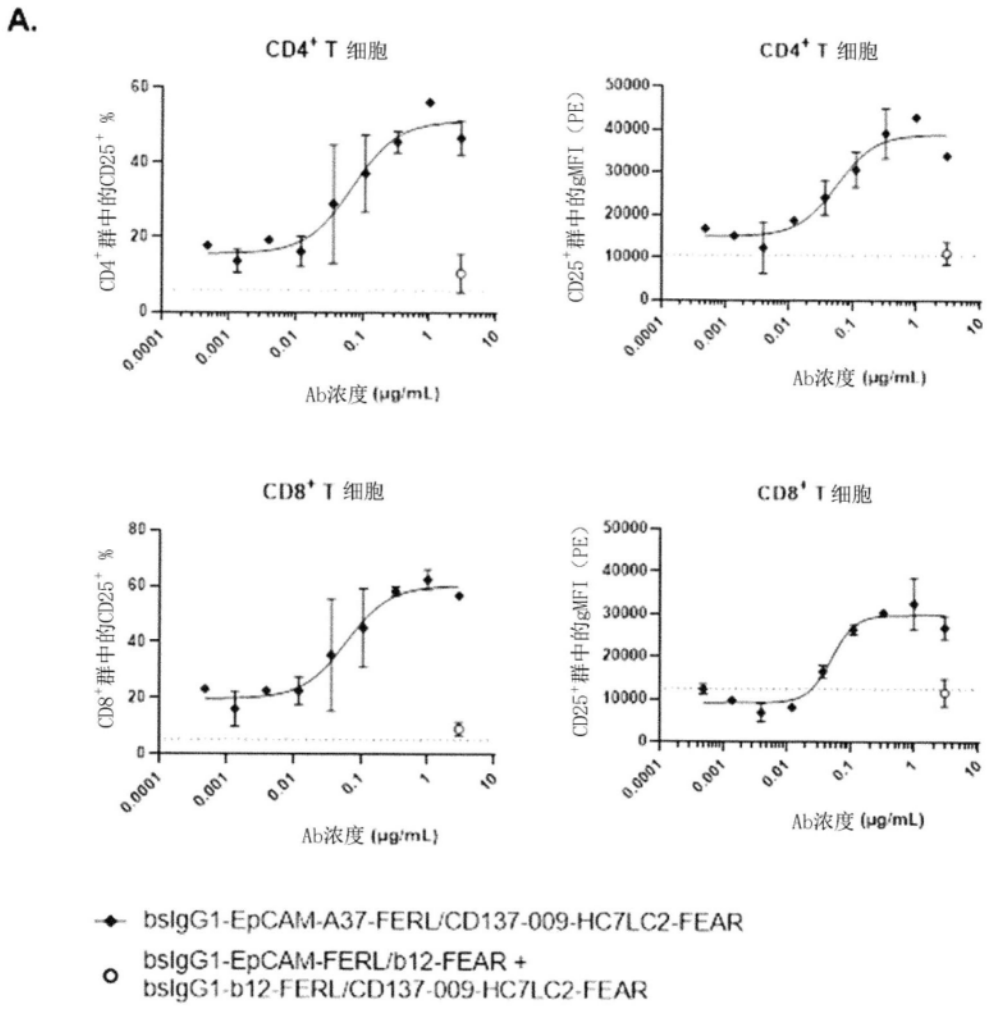

A.
CD4+ T 细胞
CD4+群中的CD25+ %
Ab浓度 (μg/mL)
CD4+ T 细胞
CD25+群中的gMFI（PE）
Ab浓度 (μg/mL)
CD8+ T 细胞
CD8+群中的CD25+ %
Ab浓度 (μg/mL)
CD8+ T 细胞
CD25+群中的gMFI（PE）
Ab浓度 (μg/mL)
bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR
bsIgG1-EpCAM-FERL/b12-FEAR +
bsIgG1-b12-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR

图15

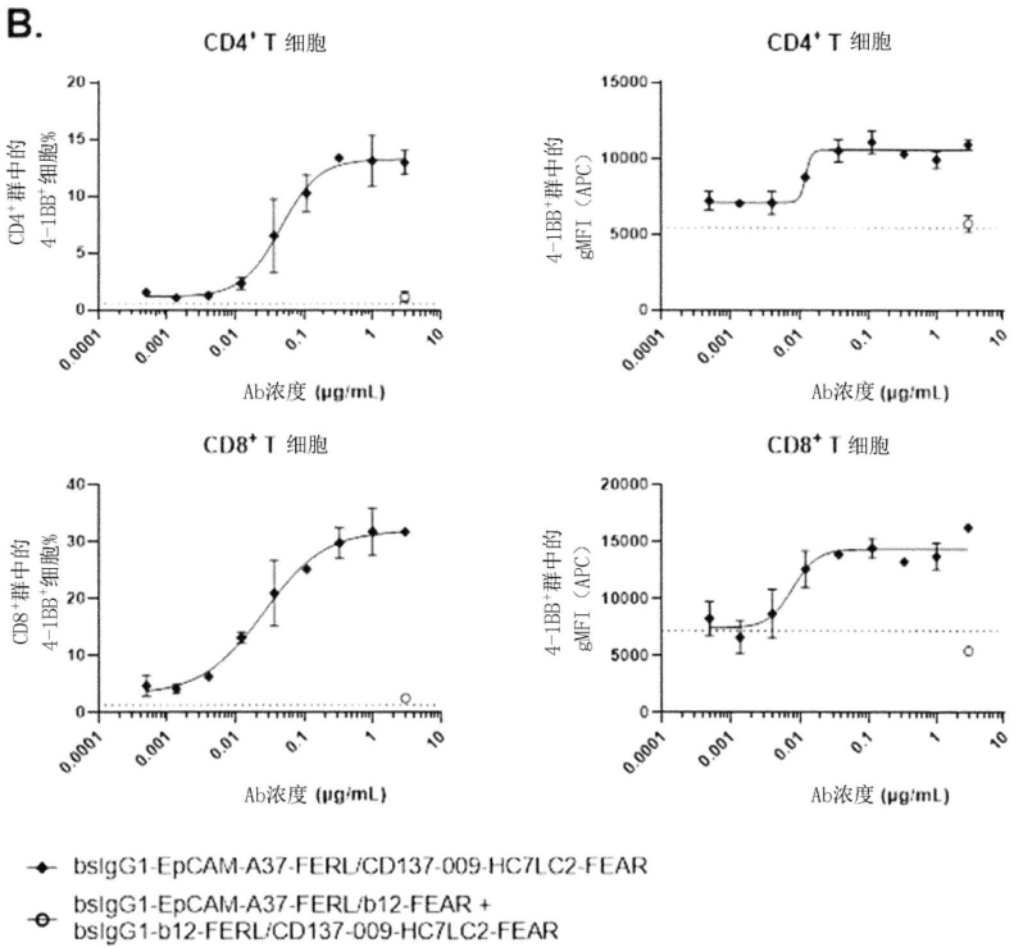

B.
CD4+ T 细胞
CD4+群中的4-1BB+细胞%
Ab浓度 (μg/mL)
CD4+ T 细胞
4-1BB+群中的gMFI（APC）
Ab浓度 (μg/mL)
CD8+ T 细胞
CD8+群中的4-1BB+细胞%
Ab浓度 (μg/mL)
CD8+ T 细胞
4-1BB+群中的gMFI（APC）
Ab浓度 (μg/mL)
bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR
bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR +
bsIgG1-b12-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR

图15

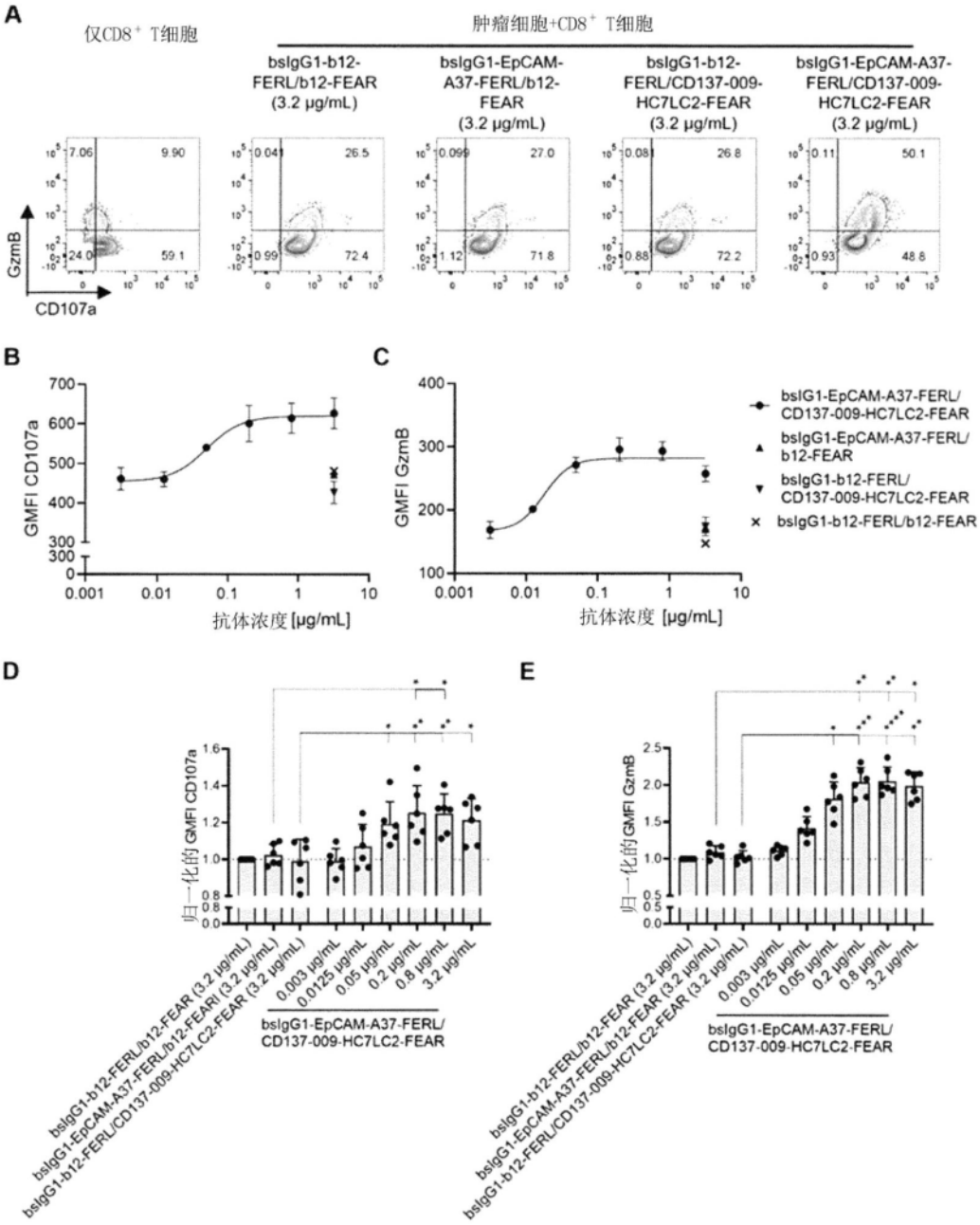

A
仅CD8+ T细胞
肿瘤细胞+CD8+ T细胞
bsIgG1-b12-FERL/b12-FEAR (3.2 μg/mL)
bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR (3.2 μg/mL)
bsIgG1-b12-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR (3.2 μg/mL)
bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR (3.2 μg/mL)
7.06
9.90
24.0
59.1
0.04
26.5
0.99
72.4
0.09
27.0
1.12
71.8
0.08
26.8
0.88
72.2
0.11
50.1
0.93
48.8
GzmB
CD107a
B
GMFI CD107a
抗体浓度[μg/mL]
C
GMFI GzmB
抗体浓度 [μg/mL]
bsIG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR
bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR
bsIgG1-b12-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR
bsIgG1-b12-FERL/b12-FEAR
D
归一化的GMFI CD107a
bsIgG1-b12-FERL/b12-FEAR (3.2 μg/mL)
bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR (3.2 μg/mL)
bsIgG1-b12-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR (3.2 μg/mL)
0.003 μg/mL
0.0125 μg/mL
0.05 μg/mL
0.2 μg/mL
0.8 μg/mL
3.2 μg/mL
bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR
E
归一化的GMFI GzmB
bsIgG1-b12-FERL/b12-FEAR (3.2 μg/mL)
bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR (3.2 μg/mL)
bsIgG1-b12-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR (3.2 μg/mL)
0.003 μg/mL
0.0125 μg/mL
0.05 μg/mL
0.2 μg/mL
0.8 μg/mL
3.2 μg/mL
bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR

图16

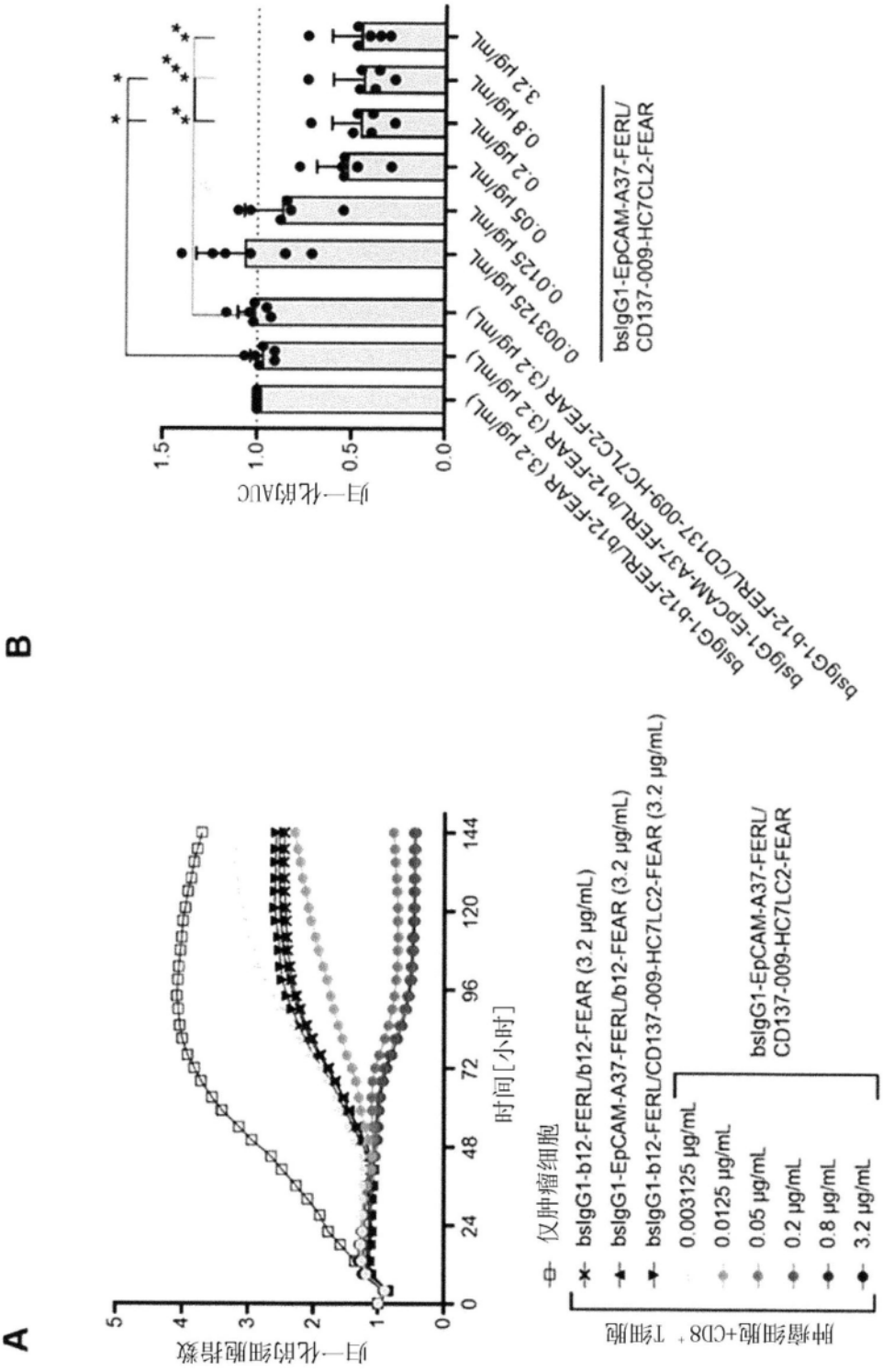

A
归一化的细胞指数
时间[小时]
仅肿瘤细胞
bsIgG1-b12-FERL/b12-FEAR (3.2 μg/mL)
bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR (3.2 μg/mL)
bsIgG1-b12-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR (3.2 μg/mL)
0.003125 μg/mL
0.0125 μg/mL
0.05 μg/mL
0.2 μg/mL
0.8 μg/mL
3.2 μg/mL
bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/
CD137-009-HC7CL2-FEAR
肿瘤细胞+CD8+ T细胞
B
归一化的AUC
bsIgG1-b12-FERL/b12-FEAR (3.2 μg/mL)
bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR (3.2 μg/mL)
bsIgG1-b12-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR (3.2 μg/mL)

图17

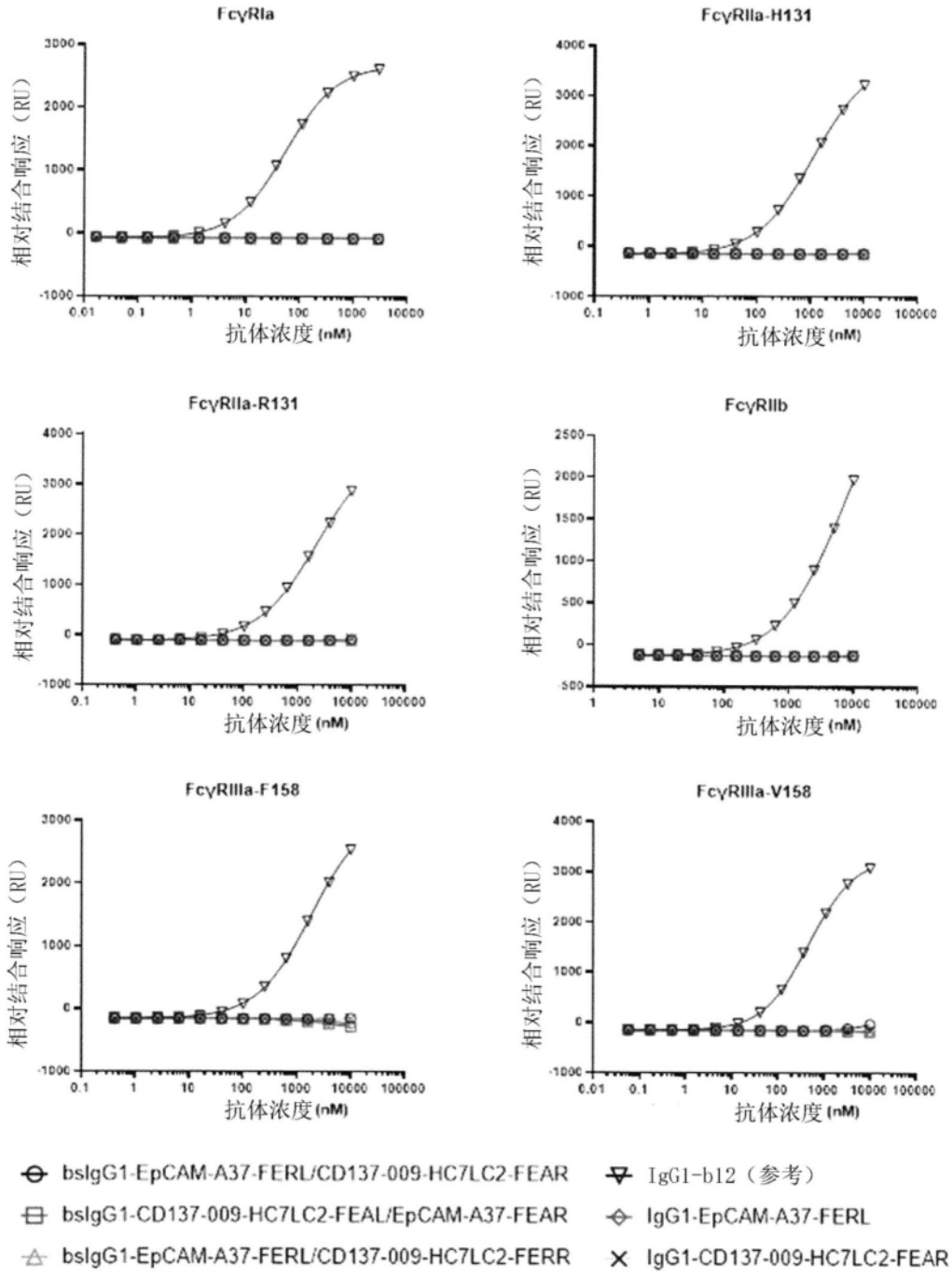

FcγRIa
FcγRIIa-H131
FcγRIIa-R131
FcγRIIb
FcγRIIIa-F158
FcγRIIIa-V158
相对结合响应（RU）
抗体浓度(nM)
bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR
bsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-A37-FEAR
bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FERR
IgG1-b12（参考）
IgG1-EpCAM-A37-FERL
IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR

图18