(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119233993 A
(43)申请公布日 2024.12.31

(21)申请号 202380039111.0

(22)申请日 2023.03.07

(30)优先权数据
63/317491 2022.03.07 US
63/323893 2022.03.25 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.11.07

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2023/000124 2023.03.07

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/170474 EN 2023.09.14

(71)申请人 诺夫免疫股份有限公司
地址 瑞士日内瓦

(72)发明人 S·玛约奇 K·马斯特纳克 L·尚 N·菲舍尔 X·肖谢

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 罗文锋 彭昶

(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C07K 16/30(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

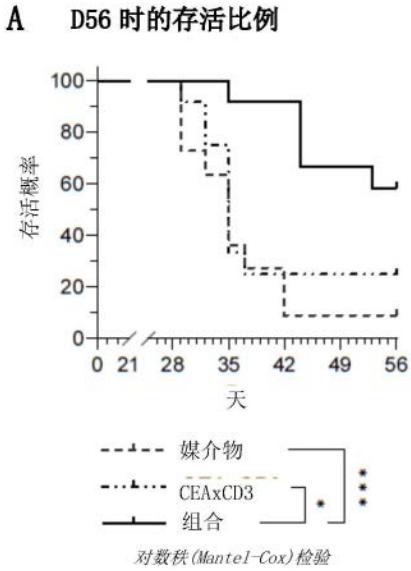
权利要求书6页 说明书69页
序列表（电子公布） 附图24页

(54)发明名称

用于靶向T细胞活化的CD28双特异性抗体

(57)摘要

本发明涉及与人CD28激动结合的抗体臂。本发明涉及使用本文描述的激动剂抗-CD28臂与人癌胚抗原(CEA)和人CD28结合的双特异性抗体。本发明涉及使用本文描述的激动剂抗-CD28臂与人间皮素(MSLN)和人CD28结合的双特异性抗体。



CN 119233993 A

1.一种双特异性抗体,所述双特异性抗体包含:

a.与CD28结合的第一抗原结合结构域;其中所述第一抗原结合结构域包含:

i.具有以下的第一重链可变区:包含(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列的互补决定区1(CDRH1)、包含(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的互补决定区2(CDRH2)和包含(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列的互补决定区3(CDRH3);和

ii.具有以下的第一轻链可变区:

1.包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDRL3;

2.包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDRL3;

3.包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDRL3;

4.包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDRL3;

5.包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDRL3;

6.包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDRL3;

7.包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的CDRL3;

8.包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的CDRL3;

9.包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ IDNO:48的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDRL3;

10.包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的CDRL3;

11.包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的CDRL3;

12.包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的CDRL3;

13.包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的CDRL3;

14.包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的CDRL3;

15.包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的CDRL3;或

16.包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的CDRL3;

17.包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的

CDRL2;和包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的CDRL3;

18.包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的CDRL3;或

19.包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列的CDRL3;和

b.结合肿瘤相关抗原(TAA)的第二抗原结合结构域,其中所述第二抗原结合结构域包含:

i.具有以下的第二重链可变区:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1;包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2;和包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3。

2.根据权利要求1所述的双特异性抗体,其中:

a.部分a.ii.1.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列;

b.部分a.ii.2.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列;

c.部分a.ii.3.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列;

d.部分a.ii.4.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列;

e.部分a.ii.5.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:84的氨基酸序列;

f.部分a.ii.6.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列;

g.部分a.ii.7.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列;

h.部分a.ii.8.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列;

i.部分a.ii.9.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列;

j.部分a.ii.10.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列;

k.部分a.ii.11.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;

l.部分a.ii.12.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列;

m.部分a.ii.13.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列;

n.部分a.ii.14.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;

o.部分a.ii.15.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;

p.部分a.ii.16.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列;

q.部分a.ii.17.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列;

r.部分a.ii.18.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列;或

s.部分a.ii.19.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列。

3.根据权利要求1-2中任一项所述的双特异性抗体,其中:

a.部分a.ii.1.的第一轻链包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列;

b.部分a.ii.2.的第一轻链包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列;

c.部分a.ii.3.的第一轻链包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列;

d.部分a.ii.4.的第一轻链包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列;

e.部分a.ii.5.的第一轻链包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列;

f.部分a.ii.6.的第一轻链包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列;

g.部分a.ii.7.的第一轻链包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列;

h.部分a.ii.8.的第一轻链包含SEQ ID NO:106的氨基酸序列;

i.部分a.ii.9.的第一轻链包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列;

j.部分a.ii.10.的第一轻链包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列;

k.部分a.ii.11.的第一轻链包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列;

l.部分a.ii.12.的第一轻链包含SEQ ID NO:110的氨基酸序列;

m.部分a.ii.13.的第一轻链包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列;

n.部分a.ii.14.的第一轻链包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列;

o.部分a.ii.15.的第一轻链包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列;

p.部分a.ii.16.的第一轻链包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列;

q.部分a.ii.17.的第一轻链包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列;

r.部分a.ii.18.的第一轻链包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列;或

s.部分a.ii.19.的第一轻链包含SEQ ID NO:117的氨基酸序列。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的双特异性抗体,其中所述TAA为CEA。

5.根据权利要求4所述的双特异性抗体,其中所述第二抗原结合结构域包含:

ii.具有以下的第二轻链可变区:

1.包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR3;

2.包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR3;或

3.包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR3。

6.根据权利要求4-5中任一项所述的双特异性抗体,其中:

a.部分b.ii.1.的第二轻链可变区包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列;

b.部分b.ii.2.的第二轻链可变区包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;或

c.部分b.ii.3.的第二轻链可变区包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

7.根据权利要求4-6中任一项所述的双特异性抗体,其中:

a.部分b.ii.1.的第二轻链包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列;

b.部分b.ii.2.的第二轻链包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列;或

c.部分b.ii.3.的第二轻链包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

8.根据权利要求1-3中任一项所述的双特异性抗体,其中所述TAA为间皮素(MSLN)。

9.根据权利要求8所述的双特异性抗体,其中所述第二抗原结合结构域包含:

ii.具有以下的第二轻链可变区:

1.包含SEQ ID NO:128的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ IDNO:129的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:130的氨基酸序列的CDR3;

2.包含SEQ ID NO:131的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:132的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:133的氨基酸序列的CDR3;

3.包含SEQ ID NO:134的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:136的氨基酸序列的CDR3;

4.包含SEQ ID NO:137的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列的CDR3;或

5.包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:141的氨基酸序列的

CDR2;和包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列的CDR3。

10.根据权利要求7-8中任一项所述的双特异性抗体,其中:

a.部分b.ii.1.的第二轻链可变区包含SEQ ID NO:143的氨基酸序列;

b.部分b.ii.2.的第二轻链可变区包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列;

c.部分b.ii.3.的第二轻链可变区包含SEQ ID NO:145的氨基酸序列;

d.部分b.ii.4.的第二轻链可变区包含SEQ ID NO:146的氨基酸序列;或

e.部分b.ii.5.的第二轻链可变区包含SEQ ID NO:147的氨基酸序列。

11.根据权利要求7-9中任一项所述的双特异性抗体,其中:

a.部分b.ii.1.的第二轻链包含SEQ ID NO:148的氨基酸序列;

b.部分b.ii.2.的第二轻链包含SEQ ID NO:149的氨基酸序列;

c.部分b.ii.3.的第二轻链包含SEQ ID NO:150的氨基酸序列。

d.部分b.ii.4.的第二轻链包含SEQ ID NO:151的氨基酸序列;或

e.部分b.ii.5.的第二轻链包含SEQ ID NO:152的氨基酸序列。

12.根据权利要求1-11中任一项所述的双特异性抗体,其中第一重链可变区和第二重链可变区包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

13.根据权利要求1-12中任一项所述的双特异性抗体,其中第一重链和第二重链包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

14.根据权利要求1-13中任一项所述的双特异性抗体,其中所述第一轻链为κ,所述第二轻链为λ。

15.根据权利要求1-14中任一项所述的双特异性抗体,其中所述第一轻链为λ,所述第二轻链为κ。

16.根据权利要求1-15中任一项所述的双特异性抗体,其中所述双特异性抗体包含Fc结构域,所述Fc结构域包含一个或多个氨基酸置换,所述氨基酸置换减少与激活Fc受体的结合和/或降低效应子功能。

17.根据权利要求16所述的双特异性抗体,其中所述氨基酸置换包含L234A和L235A置换。

18.根据权利要求16所述的双特异性抗体,其中所述氨基酸置换包含P329A、P329G或P329R置换。

19.根据权利要求1-18中任一项所述的双特异性抗体,其中所述抗体具有IgG同种型。

20.根据权利要求1-19中任一项所述的双特异性抗体,其中所述抗体为人。

21.根据权利要求1-20中任一项所述的双特异性抗体,其中所述组合物使得能够实现肿瘤特异性T细胞活化。

22.一种组合物,所述组合物包含根据权利要求1-21中任一项所述的双特异性抗体。

23.一种减少肿瘤细胞的增殖和/或杀伤肿瘤细胞的方法,所述方法包括使所述细胞与根据权利要求22所述的组合物接触。

24.一种在受试者中治疗癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求22所述的组合物。

25.一种抗体,所述抗体包含与CD28结合的抗原结合结构域;其中所述抗原结合结构域包含:

i.具有以下的第一重链可变区:包含(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列的互补决定区1(CDRH1)、包含(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的互补决定区2(CDRH2)和包含(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列的互补决定区3(CDRH3);和

ii.具有以下的第一轻链可变区:

1.包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDRL3;

2.包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDRL3;

3.包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDRL3;

4.包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ IDNO:33的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDRL3;

5.包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDRL3;

6.包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDRL3;

7.包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的CDRL3;

8.包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的CDRL3;

9.包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDRL3;

10.包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的CDRL3;

11.包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的CDRL3;

12.包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的CDRL3;

13.包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的CDRL3;

14.包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的CDRL3;

15.包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的CDRL3;或

16.包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的CDRL3;

17.包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的CDRL3;

18.包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的

CDRL2;和包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的CDRL3;或

19.包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列的CDRL3。

26.根据权利要求25所述的抗体,其中所述抗体为F(ab)片段、F(ab')2片段和Fv片段或单链Fv片段。

27.根据权利要求25所述的抗体,其中所述抗体是单特异性的。

28.根据权利要求25所述的抗体,其中所述抗体是单价的。

用于靶向T细胞活化的CD28双特异性抗体

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2022年3月7日提交的美国临时申请号63/317,491和2022年3月25日提交的美国临时申请号63/323,893的优先权和权益,这些临时申请中的每一个的内容均通过引用整体并入本文中。

[0003] 通过引用并入序列表

[0004] 电子序列表(NOVI_050_001WO_SeqList_ST26.xml;大小:129,730字节;创建日期:2023年3月6日)的内容通过引用整体并入本文中。

技术领域

[0005] 本发明总的涉及可用于生成双特异性抗体(bsAb)的具有确定的亲和力的激动剂完全人和κλ-体兼容CD28结合结构域。具体而言,CD28结合结构域与抗肿瘤相关抗原(TAA)结合结构域配对以生成TAAxCD28 bsAb,特别是CEAxCD28和MSLNxCD28双特异性抗体。

背景技术

[0006] 在过去的几年里,已经开发了新的方法来刺激身体自身的免疫细胞以更好地攻击和杀伤癌细胞。成功的癌症免疫疗法的实例有能够阻滞所谓的免疫检查点的单克隆抗体。目前已获批准的免疫检查点抑制剂(ICI)阻滞CTLA-4(例如,以商品名Yervoy出售的伊匹单抗)、PD-1(例如,以商品名Keytruda出售的派姆单抗和以商品名Libtayo出售的西米普利单抗)和PD-L1(例如,以商品名Tecentriq出售的阿替利珠单抗)。可以使用ICI在一系列癌症类型中获得持久的抗肿瘤反应。不幸的是,反应仅限于一定的患者亚群,并且已知许多癌症类型对ICI单一疗法具有内在抗性。

[0007] 其他已获批准的癌症免疫疗法包括T细胞双特异性抗体-经由T细胞上和嵌合抗原受体(CAR)T细胞上的CD3受体桥接T细胞以靶向表达肿瘤相关抗原(TAA)的细胞。尽管在恶性血液病中使用T细胞双特异性抗体或CAR T细胞的治疗观察到非常好的抗肿瘤反应,但迄今为止,这些方法在实体癌的情况下尚未取得重大突破,导致许多癌症患者没有治疗选择。

[0008] 因此,尽管这些免疫疗法在一些癌症类型中取得了成功,但很大一部分癌症患者缺乏有效的治疗选择,这凸显了对新治疗的需求。能够通过靶向T细胞上的共刺激信号来激活免疫系统的分子的使用尚未得到充分探索并可能为实体癌患者开辟新的治疗选择。

[0009] 需要可用于治疗实体癌的靶向T细胞活化的组合物和方法。本文提供了解决此需求的方法和组合物。

发明内容

[0010] 本公开提供了一种双特异性抗体,其包含:a.与CD28结合的第一抗原结合结构域;其中所述第一抗原结合结构域包含:i.具有以下的第一重链可变区:包含(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列的互补决定区1(CDRH1)、包含(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的互补决定区2(CDRH2)和包含(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列的互补决定区3(CDRH3);和ii.具有以下的第

一轻链可变区:1.包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDRL3;2.包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDRL3;3.包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDRL3;4.包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDRL3;5.包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDRL3;6.包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDRL3;7.包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的CDRL3;8.包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的CDRL3;9.包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDRL3;10.包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的CDRL3;11.包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的DRL2;和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的CDRL3;12.包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的CDRL3;13.包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的CDRL3;14.包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的CDRL3;15.包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的CDRL3;或16.包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的CDRL3;17.包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的CDRL3;18.包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的CDRL3;或19.包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列的CDRL3;和b.结合肿瘤相关抗原(TAA)的第二抗原结合结构域,其中所述第二抗原结合结构域包含:i.具有以下的第二重链可变区:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1;包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的DRH2;和包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3。

[0011] 在一些实施方案中,TAA为CEA。在一些方面,TAA为间皮素(MSLN)。

[0012] 在一些实施方案中,a.部分a.ii.1.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列;b.部分a.ii.2.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列;c.部分a.ii.3.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列;d.部分a.ii.4.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列;e.部分a.ii.5.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:84的氨基酸序列;f.部分a.ii.6.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列;g.部分a.ii.7.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列;h.部分a.ii.8.的第一轻链

可变区包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列;i.部分a.ii.9.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列;j.部分a.ii.10.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列;k.部分a.ii.11.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;l.部分a.ii.12.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列;m.部分a.ii.13.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列;n.部分a.ii.14.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;o.部分a.ii.15.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;p.部分a.ii.16.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列;q.部分a.ii.17.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列;r.部分a.ii.18.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列;或s.部分a.ii.19.的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列。

[0013] 在一些实施方案中,a.部分a.ii.1.的第一轻链包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列;b.部分a.ii.2.的第一轻链包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列;c.部分a.ii.3.的第一轻链包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列;d.部分a.ii.4.的第一轻链包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列;e.部分a.ii.5.的第一轻链包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列;f.部分a.ii.6.的第一轻链包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列;g.部分a.ii.7.的第一轻链包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列;h.部分a.ii.8.的第一轻链包含SEQ ID NO:106的氨基酸序列;i.部分a.ii.9.的第一轻链包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列;j.部分a.ii.10.的第一轻链包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列;k.部分a.ii.11.的第一轻链包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列;l.部分a.ii.12.的第一轻链包含SEQ ID NO:110的氨基酸序列;m.部分a.ii.13.的第一轻链包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列;n.部分a.ii.14.的第一轻链包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列;o.部分a.ii.15.的第一轻链包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列;p.部分a.ii.16.的第一轻链包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列;q.部分a.ii.17.的第一轻链包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列;r.部分a.ii.18.的第一轻链包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列;或s.部分a.ii.19.的第一轻链包含SEQ ID NO:117的氨基酸序列。

[0014] 在一些实施方案中,第二抗原结合结构域包含:ii.具有以下的第二轻链可变区:1.包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR3;2.包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR3;或3.包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR3。

[0015] 在一些实施方案中,a.部分b.ii.1.的第二轻链可变区包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列;b.部分b.ii.2.的第二轻链可变区包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;或c.部分b.ii.3.的第二轻链可变区包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

[0016] 在一些实施方案中,a.部分b.ii.1.的第二轻链包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列;b.部分b.ii.2.的第二轻链包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列;或c.部分b.ii.3.的第二轻链包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

[0017] 在一些实施方案中,第二抗原结合结构域包含:ii.具有以下的第二轻链可变区:1.包含SEQ ID NO:128的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:129的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:130的氨基酸序列的CDR3;2.包含SEQ ID NO:131的氨基酸序列的CDR1;包

含SEQ ID NO:132的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:133的氨基酸序列的CDR3;3.包含SEQ ID NO:134的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:136的氨基酸序列的CDR3;4.包含SEQ ID NO:137的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列的CDR3;或5.包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列的CDR1;

[0018] 包含SEQ ID NO:141的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列的CDR3。

[0019] 在一些实施方案中,a.部分b.ii.1.的第二轻链可变区包含SEQ ID NO:143的氨基酸序列;b.部分b.ii.2.的第二轻链可变区包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列;c.部分b.ii.3.的第二轻链可变区包含SEQ ID NO:145的氨基酸序列;d.部分b.ii.4.的第二轻链可变区包含SEQ ID NO:146的氨基酸序列;或e.部分b.ii.5.的第二轻链可变区包含SEQ ID NO:147的氨基酸序列。

[0020] 在一些实施方案中,a.部分b.ii.1.的第二轻链包含SEQ ID NO:148的氨基酸序列;b.部分b.ii.2.的第二轻链包含SEQ ID NO:149的氨基酸序列;c.部分b.ii.3.的第二轻链包含SEQ ID NO:150的氨基酸序列;d.部分b.ii.4.的第二轻链包含SEQ ID NO:151的氨基酸序列;或e.部分b.ii.5.的第二轻链包含SEQ ID NO:152的氨基酸序列。

[0021] 在一些实施方案中,第一重链可变区和第二重链可变区包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一重链和第二重链包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

[0022] 在一些实施方案中,第一轻链为κ,第二轻链为λ。在一些实施方案中,第一轻链为λ,第二轻链为κ。

[0023] 在一些实施方案中,双特异性抗体包含Fc结构域,该Fc结构域包含一个或多个氨基酸置换,所述氨基酸置换减少与激活Fc受体的结合和/或降低效应子功能。在一些实施方案中,氨基酸置换包括L234A和L235A置换。在一些实施方案中,氨基酸置换包括P329A、P329G或P329R置换。在一些实施方案中,抗体具有IgG同种型。在一些实施方案中,抗体为人。

[0024] 本公开提供了一种组合物,其包含本公开的双特异性抗体中的任何一种。在一些实施方案中,包含双特异性抗体的组合物使得能够实现肿瘤特异性T细胞活化。

[0025] 本公开提供了一种减少肿瘤细胞的增殖和/或杀伤肿瘤细胞的方法,其包括使细胞与本公开的组合物中的任何一种接触。

[0026] 本公开提供了一种在受试者中治疗癌症的方法,其包括向受试者施用本公开的组合物中的任何一种。

[0027] 本公开提供了一种抗体,其包含与CD28结合的抗原结合结构域;其中所述抗原结合结构域包含:1.包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDRL3;2.包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDRL3;3.包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDRL3;4.包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的

CDRL3;5.包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDRL1;

[0028] 包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDRL3;6.包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDRL2;和

[0029] 包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDRL3;7.包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的CDRL3;8.包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的CDRL3;9.包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDRL3;10.包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的CDRL1;

[0030] 包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的CDRL3;11.包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的DRL2;和

[0031] 包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的CDRL3;12.包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的CDRL3;13.包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的CDRL3;14.包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的CDRL3;15.包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的CDRL3;或16.包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的CDRL3;17.包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的CDRL3;18.包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的CDRL3;或19.包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列的CDRL3。

[0032] 在一些实施方案中,抗体为F(ab)片段、F(ab')2片段和Fv片段或单链Fv片段。在一些实施方案中,抗体是单特异性的。在一些实施方案中,抗体是单价的。

[0033] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员通常所理解相同的含义。下文将描述合适的方法和材料,但在本发明的实践中可使用与本文描述的那些类似或等同的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献明确地通过引用整体并入。在发生冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。另外,本文描述的材料、方法和实例仅是示意性的而不旨在限制。

[0034] 本发明的其他特征和优点将从以下详细描述和权利要求书中显而易见并涵盖在以下详细描述和权利要求书中。

附图说明

[0035] 图1A-1C为示出本发明的抗-CD28臂与表达CD28的Jurkat细胞的浓度依赖性结合的一系列图。抗-CD28臂作为二价单克隆抗体(hIgG1)进行测试。hIgG1:同种型对照;

TGN1412(hIgG4):阳性对照。图1A、1B和1C示出了在连续噬菌体展示选择活动期间确定的候选者。

[0036] 图2A-2D为示出本发明的CEAxCD28双特异性抗体与表达CD28的Jurkat细胞(图2A和图2B)、表达CEA的LS174T细胞(图2C)以及CD28和CEA双阴性TIB153细胞(图2D)的浓度依赖性结合的一系列图。使用高亲和力抗-CEA臂AC84、具有三个突变LALAPA的IgG1 Fc和不同亲和力的各种抗-CD28臂生成一组CEAxCD28 bsAb。hIgG1:同种型对照;TGN1412:阳性对照;1a28/AC84/N、CEA_CD28_V8和CEA_CD28_V15:CEAxCD28参考双特异性抗体。

[0037] 图3A-3D为示出在测试板上进行抗体的所谓湿法包被(图3A和3C)或干法包被(图3B和3D)后由本发明的CEAxCD28双特异性抗体介导的来自健康供体PBMC的人CD4+和CD8+T细胞的增殖(分别地,图3A和3C及3B和3D)的一系列图。以双特异性格式测试了一组抗-CD28臂的超激动剂活性。除了"AI19"外,本发明的所有抗-CD28臂均未在这种测定中显示出超激动剂活性。PBS:媒介物对照;TGN1412:阳性对照;1a28/AC84/N、CEA_CD28_V8和CEA_CD28_V15:CEAxC28参考双特异性抗体;mAb 14226P2、mAb V8和mAb V15:参考单克隆抗体。

[0038] 图4为示出本发明的CEAxCD28双特异性抗体的浓度依赖性IL-2报告细胞活化的一系列图,如通过在表达CEA的MKN-45细胞和固定浓度(1nM)的CEAxCD3的存在下通过发光读数所测量。观察到由本发明的CEAxCD28 bsAb诱导的不同水平的CD28共刺激,反映了这些抗-CD28臂的不同结合能力。DR=剂量反应;无靶标:CD3和CD28 bsAb在存在效应细胞/报告细胞但不存在TAA-阳性靶细胞的情况下温育。

[0039] 图5A-5D为示出当与CEAxCD3 bsAb组合时本发明的CEAxCD28双特异性抗体对LS174T细胞的T-细胞重靶向杀伤/裂解的一系列图。效应细胞为源自两个不同健康供体的PBMC(图5A和5B)。CEAxCD28 bsAb与CEAxCD3协同作用而杀伤CEA-阳性靶细胞。在不存在信号1的情况下不诱导杀伤(图5C和5D,数据分别用与图5A和5B中使用的相同PBMC供体获得)。Y4L3-1/N:非靶向CD3单价抗体;1a28/AC84/N:CEAxCD28参考双特异性抗体。使用的CD28 bsAb浓度:1μg/mL。

[0040] 图6A-6B为示出当与CEAxCD3 bsAb组合时本发明的CEAxCD28双特异性抗体对KATO-III(图6A)和HT-29(图6B)细胞的T-细胞重靶向杀伤/裂解的一系列图。用这些较低表达的细胞系也观察到CEAxCD3与CEAxCD28 bsAb之间在杀伤CEA-阳性靶细胞方面的协同作用。1a28/AC84/N:CEAxCD28参考双特异性抗体。使用的CD28 bsAb浓度:2.5μg/mL。

[0041] 图7A-7B为示出人CD4+和CD8+T细胞(分别地,图7A和7B)上T细胞活化标志物CD25的上调的一系列图。PBMC与CEA-阳性LS174T细胞在CEAxCD3单独存在(以触发T细胞活化信号1)或与本发明的CEAxCD28双特异性抗体组合地存在(提供T细胞活化信号2)的情况下共培养。CEAxCD3与CEAxCD28 bsAb的组合诱导比CEAxCD3单一疗法强得多的CD4+和CD8+T细胞两者的活化。1a28/AC84/N:CEAxCD28参考双特异性抗体。

[0042] 图8A-8B为示出人CD4+和CD8+T细胞(分别地,图8A和8B)的增殖的一系列图。PBMC与CEA-阳性LS174T细胞在CEAxCD3单独存在(以触发T细胞活化信号1)或与本发明的CEAxCD28双特异性抗体组合地存在(提供T细胞活化信号2)的情况下共培养。与CEAxCD3单一疗法相比,CEAxCD3与CEAxCD28 bsAb的组合大大增加了增殖性CD4+和CD8+T细胞的百分比。1a28/AC84/N:CEAxCD28参考双特异性抗体。

[0043] 图9A-9F为示出当在与CEAxCD3 bsAb组合时在PBMC与CEA-阳性LS174T肿瘤细胞共

培养后由本发明的CEAxCD28双特异性抗体介导的颗粒酶B(图9A)、IFN-γ(图9B)、TNF-α(图9C)、IL-2(图9D)、IL-6(图9E)、IL-10(图9F)的分泌的一系列图。当T细胞同时被CEAxCD28bsAb共刺激时,CEAxCD3对细胞因子的诱导增加。1a28/AC84/N:CEAxCD28参考双特异性抗体。

[0044] 图10为图11中示出的体内功效研究的实验设计的示意图,其中在NOG小鼠的LS174T:PBMC共移植模型中与CEAxCD3组合地测试了CEAxCD28双特异性抗体AI3AC84/N和AI5AC84/N。

[0045] 图11A-11B为示出图10描述的LS174T:PBMC共移植模型中CEAxCD28双特异性抗体AI3AC84/N和AI5AC84/N的体内抗肿瘤功效的一系列图。对所有治疗组示出了平均肿瘤体积(图11A)和个体小鼠中肿瘤的生长(图11B)。两种CEAxCD28 bsAb均增强了CEAxCD3的体内抗肿瘤活性。

[0046] 图12为图13示出的体内功效研究的实验设计的示意图,其中在NOG小鼠的LS174T:PBMC共移植模型中与CEAxCD3组合地测试了CEAxCD28双特异性抗体AI3AC84/N(一定的剂量范围内)和AI10AC84/N。

[0047] 图13A-13B为示出图12描述的LS174T:PBMC共移植模型中CEAxCD28双特异性抗体AI3AC84/N(一定的剂量范围内)和AI10AC84/N的体内抗肿瘤功效的一系列图。对所有治疗组示出了平均肿瘤体积(图13A)和个体小鼠中肿瘤的生长(图13B)。两种CEAxCD28bsAb均增强了CEAxCD3的体内抗肿瘤活性。然而,在等同的治疗服量下,抗体AI3AC84/N比AI10AC84/N导致更好的肿瘤控制。

[0048] 图14A-14D为示出本发明的MSLNxCD28双特异性抗体与表达MSLN的H226(图14A)和OVCAR-3(图14B)细胞、表达CD28的Jurkat细胞(图14C)以及CD28和MSLN双阴性TIB153细胞(图14D)的浓度依赖性结合的一系列图。使用与“AI5”或“AI10”抗-CD28臂偶联的高亲和力抗-MSLN臂O30、O35和O41生成了一组huIgG1-LALAPA MSLNxCD28bsAb。hIgG1:同种型对照。

[0049] 图15A-15F为示出MSLNxCD3与MSLNxCD28双特异性抗体组合对靶细胞杀伤(图15A和15D)、T细胞活化(图15B和15E)和T细胞增殖(图15C和15F)的影响的一系列图。MSLNxCD28 bsAb与HPN536类似物协同作用而杀伤MSLN-阳性靶细胞并诱导T细胞活化和增殖。当用Y4L3-1/N(一种无法提供T细胞活化信号1的非靶向CD3单价抗体)替换HPN536类似物时,不诱导杀伤、T细胞活化或T细胞增殖。

[0050] 图16A-16F为示出当在与HPN536类似物组合时在PBMC与MSLN-阳性H226肿瘤细胞共培养后由本发明的MSLNxCD28双特异性抗体介导的颗粒酶B(图16A)、IFN-γ(图16B)、TNF-α(图16C)、IL-2(图16D)、IL-6(图16E)、IL-10(图16F)的分泌的一系列图。当T细胞同时被MSLNxCD28 bsAb共刺激时,HPN536类似物对细胞因子的诱导大大增加。

[0051] 图17A-17D为示出本发明的示例性MSLNxCD28双特异性抗体与表达MSLN的H226(图17A)和OVCAR-3(图17B)细胞、表达CD28的Jurkat细胞(图17C)以及CD28和MSLN双阴性TIB153细胞(图17D)的浓度依赖性结合的一系列图。示出了使用与AI3抗-CD28臂偶联的高亲和力抗-MSLN臂O35和O41生成的示例性MSLNxCD28 bsAb。hIgG1:同种型对照。

[0052] 图18A-18D为示出在存在不同的E:T比率的情况下(10:1(图18A)、3:1(图18B)、1:1(图18C)和1:3(图18D))当在与HPN536类似物MSLNxCD3 bsAb组合时本发明的示例性MSLNxCD28双特异性抗体对OVCAR3细胞的T细胞重靶向杀伤/裂解的一系列图。MSLNxCD28

bsAb与MSLNxCD3协同作用而杀伤MSLN-阳性靶细胞。在E:T比率不利的情况下,协同作用尤其明显,此时该组合补偿了单独的MSLNxCD3 bsAb的功效损失。在不存在信号1(单独的CD28 bsAb)的情况下不诱导杀伤。使用的CD28 bsAb浓度:2.5μg/mL。

[0053] 图19A-19D为示出在存在不同的E:T比率的情况下(10:1(图19A)、3:1(图19B)、1:1(图19C)和1:3(图19D))当在与CEAxCD3组合时本发明的示例性CD28双特异性抗体对CEA/MSLN双阳性HPAC细胞的T细胞重靶向杀伤/裂解的一系列图。CEAxCD28和MSLNxCD28 bsAb均与CEAxCD3协同作用而杀伤靶细胞。在E:T比率不利的情况下,协同作用尤其明显,此时该组合补偿了单独的CEAxCD3 bsAb的功效损失。在不存在信号1(单独的CD28 bsAb)的情况下不诱导杀伤。使用的CD28 bsAb浓度:2.5μg/mL。

[0054] 图20A-20D为示出人CD4+和CD8+T细胞(分别地,图20A和20B)上T细胞活化标志物CD25的上调及人CD4+和CD8+T细胞(分别地,图20C和20D)的增殖的一系列图。PBMC与CEA/MSLN双阳性HPAC细胞在CEAxCD3单独存在(以触发T细胞活化信号1)或与本发明的CEAxCD28或MSLNxCD28双特异性抗体组合地存在(提供T细胞活化信号2)的情况下共培养。在所测试的不同E:T比率下,CEAxCD3与CD28bsAb的组合诱导了比CEAxCD3单一疗法强得多的CD4+和CD8+T细胞两者的活化。类似地,在所有测试的E:T比率下,与CEAxCD3单一疗法相比,CEAxCD3与CD28 bsAb的组合还导致了更高百分比的增殖性CD4+和CD8+T细胞。

[0055] 图21为图22示出的体内功效研究的实验设计的示意图,其中在67只皮下植入HPAF-II细胞的小鼠中与CEAxCD3组合地测试了CEAxCD28双特异性抗体AI3AC84/N。

[0056] 图22A-22B为示出图21描述的小鼠模型中CEAxCD28双特异性抗体AI3AC84/N的体内抗肿瘤功效的一系列图。对所有治疗组示出了植入后第56天时的存活比例(图22A)和个体小鼠中肿瘤的生长(图22B)。AI3AC84/N增强了CEAxCD3的体内抗肿瘤活性。

具体实施方式

[0057] 本发明部分地基于能够实现肿瘤依赖性T细胞活化和肿瘤细胞杀伤的双特异性抗体(bsAb)。具体而言,本发明基于在靶细胞的表面处表达的肿瘤相关抗原(TAA)的bsAb共接合来介导CD28簇集并因此介导肿瘤特异性T细胞活化。本发明还提供了CD28抗原结合结构域、抗原结合片段和抗体。

[0058] 本发明的bsAb的特征在于单激动剂CD28抗原结合结构域以实现CD28的单价共刺激和能够特异性地并单价地与肿瘤相关抗原结合的第二抗原结合结构域以将bsAb靶向递送至肿瘤微环境。本发明的bsAb在本文中被称为CD28xTAAbsAb或TAAxCD28 bsAb。

[0059] CD28是在T淋巴细胞的表面处表达的一种关键的共刺激受体。它属于共刺激分子的亚家族,特征在于细胞外可变免疫球蛋白样结构域。该分子家族中的其他成员包括CTLA-4、ICOS、PD-1和BTLA。

[0060] 在人类中,CD28在T淋巴细胞的细胞表面处表达为二硫键连接的同源二聚体,并在大约80%的人CD4+T细胞和50%的CD8+T细胞上发现。

[0061] 尽管缺乏内在酶活性,但CD28与其配体的接合会导致特定的磷酸化和转录信号传导,这最终会导致代谢变化并产生关键的细胞因子、趋化因子和存活信号,它们对于T细胞的长期扩增和分化至关重要。

[0062] CD28的主要配体有CD80(B7.1)和CD86(B7.2),它们主要在专职抗原呈递细胞

(APC)的表面处表达。CD80和CD86在其表达模式、多聚体状态和功能方面不同。因为CD28和CTLA-4高度同源,所以它们竞争相同的配体。然而,由于CTLA-4以比CD28高的亲和力结合这些配体,故CTLA-4与CD28竞争配体并最终抑制T细胞反应。

[0063] 已经提出了若干抗-CD28单克隆抗体用于CD28的治疗靶向。发现所鉴定的称为超激动剂(SA)抗体的抗-CD28抗体中的一部分即使在不存在TCR连接(信号1)的情况下也经由CD28在T细胞的表面处的簇集而诱导原代静息T细胞的完全活化。然而,此类SA抗-CD28抗体中的一种——TGN1412的首次人体内研究在经受治疗的所有健康志愿者中导致了严重的炎症反应以及慢性器官衰竭。体内和体外临床前安全性研究均未预测到细胞因子风暴是导致这些不良事件的原因。

[0064] 为了避免与SA抗体或与全身CD28共刺激相关的安全性问题,可以设计靶向肿瘤的CD28双特异性抗体来在肿瘤微环境内特异性地共刺激T细胞。通过将激动剂抗-CD28结合结构域与抗-TAA结合结构域配对,将生成能够将T细胞与表达所选TAA的恶性细胞桥接的分子。由于CD28 bsAb仅可与CD28单价结合,故在不存在TAA-阳性靶细胞的情况下,CD28将不能够成功簇集,从而阻止全身T细胞活化。

[0065] 此外,即使在存在允许CD28簇集在T细胞表面处的TAA-阳性癌细胞的情况下,也只有在经由TCR的原代T细胞刺激的存在下才能由TAAxCD28双特异性抗体释放T细胞的全部细胞毒性潜力。这与上述二价超激动剂CD28单克隆抗体形成对比。临床前研究已证实添加共刺激TAAxCD28 bsAb来治疗实体肿瘤的益处,其将增强双特异性T细胞接合剂或PD-(L)1检查点抑制剂的功效。激动剂TAAxCD28 bsAb的实例在WO2019246514、WO2020198009、WO2020132066、WO2020132024、WO2020127618、WO2021259890、WO2021155071和WO2022040482中有描述,这些分子中的一些目前正在临床试验中测试(ClinicalTrials.gov标识符:NCT04590326、NCT03972657、NCT04626635)。

[0066] TAA是本领域熟知的并包括例如神经胶质瘤相关抗原、癌胚抗原(CEA)、EGFRvIII、磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(GPC3)、cMet、IL-IIRa、IL-13Ra、EGFR、FAP、FcRH5、B7H3、Kit、CA LX、CS-1、MUC1、BCMA、bcr-abl、HER2、HER3、β-人绒毛膜促性腺激素、甲胎蛋白(AFP)、ALK、CD19、CD123、凝集素反应性AFP、Fos-相关抗原1、ADRB3、甲状腺球蛋白、EphA2、RAGE-1、RUI、RU2、SSX2、AKAP-4、LCK、OY-TESI、PAXS、SART3、CLL-1、岩藻糖基GM1、GloboH、MN-CA IX、EPCAM、EVT6-AML、TGSS、多唾液酸、PLAC1、RUI、RU2(AS)、肠羧基酯酶、lewisY、sLe、LY6K、muthsp70-2、MYCN、RhoC、TRP-2、CYPIBI、BORIS、前列腺酶(prostase)、前列腺特异性抗原(PSA)、PAX3、PAP、NY-ESO-1、LAGE-Ia、LMP2、NCAM、Ras突变体、gpIOO、前列腺蛋白(prostein)、OR51E2、PANX3、PSMA、PSCA、Her2/neu、hTERT、HMWMAA、HAVCR1、VEGFR2、PDGFR-β、生存素和端粒酶、天冬酰胺内肽酶、HPV E6,E7、精子蛋白17、SSEA-4、酪氨酸酶、TARP、WT1、前列腺癌肿瘤抗原-1(PCTA-1)、ML-IAP、MAGE、MAGE-A1、MAD-CT-1、MAD-CT-2、MelanA/MART 1、XAGE1、ELF2M、ERG(TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、中性粒细胞弹性蛋白酶、肉瘤易位断裂点、NY-BR-1、ephnnB2、CD20、CD22、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44v6、CD97、CD171、CD179a、FAP、IGF-I受体、GD2、邻-乙酰基-GD2、GD3、GM3、GPRC5D、GPR20、CXORF61、叶酸受体(FRa)、叶酸受体β、ROR1、Flt3、TAG72、TN Ag、Tie 2、TEM1、TEM7R、CLDN6、CLDN18.2、TSHR、UPK2和间皮素(MSLN)。

[0067] 在具体的实施方案中,TAA为CEA、PSMA、EpCAM、GPC3、MSLN、HER2、HER3或BCMA。在一

些实施方案中,TAA为CEA。在一些实施方案中,TAA为MSLN。

[0068] 癌胚抗原

[0069] 癌胚抗原(CEA、CEACAM5、CD66e)是癌胚抗原相关细胞粘附分子(CEACAM)家族的成员。CEACAM牵涉在多种生物过程中,包括但不限于细胞粘附、细胞内和细胞间信号传导、癌症进展、血管生成和转移。

[0070] CEA最初被发现为人类胃肠(GI)系统的特异性癌胚抗原。发现其在胎儿发育期间由GI组织高表达,但其表达在出生前急剧减少,并且在健康人中,通常发现CEA仅在胃肠上皮的上皮细胞的顶端侧上和在其他粘膜上皮如鼻咽、肺和泌尿生殖道上以低水平表达。这样的极化和受限表达在肿瘤发生过程中会丢失,并且CEA在多种上皮来源的实体肿瘤中过表达,包括结肠直肠癌、胰腺癌、胃癌、非小细胞肺癌和乳癌。

[0071] 对于开发基于抗体的疗法而言,CEA代表一种有前景的TAA,因为在癌细胞与正常上皮细胞之间观察到不同的表达模式和表达水平。正常上皮细胞仅在上皮细胞的顶端表面处表达CEA,该区域由于紧密衔接而将治疗性抗体排除在外。

[0072] 已开发了多种靶向CEA的单克隆抗体用于研究目的、用作诊断工具和用于治疗目的(参见例如WO2012117002)。在过去的几年中,已经描述了携带抗-CEA臂作为靶向臂的若干双特异性抗体,包括CEAxCD3双特异性抗体赛必妥单抗((Bacac等人,2016)和US20140242079)、MEDI-565((Oberst等人,2014)和WO2016036678A1)或WO2021053587中描述的那些,以及更新近地,CEAxCD28 bsAb(例如,WO2020127628A1和WO2020127618)和CEAxCD47 bsAb(例如,WO2021110647)。

[0073] 抗-CEA抗体

[0074] 下文描述了本公开的示例性抗-CEA抗体(例如,“AC22”、“AC61”、“AC84”)。表1示出了本文描述的抗体的氨基酸序列。

[0075] 在一些实施方案中,AC22抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;和轻链,该轻链包含:包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDRL3。

[0076] 在一些实施方案中,AC22抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的轻链可变区。

[0077] 在一些实施方案中,AC22双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链。

[0078] 在一些实施方案中,AC61抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;和轻链,该轻链包含:包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDRL2和

[0079] 包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDRL3。

[0080] 在一些实施方案中,AC61抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的轻链可变区。

[0081] 在一些实施方案中,AC61双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的轻链。

[0082] 在一些实施方案中,AC84抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;和轻链,该轻链包含:包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDRL3。

[0083] 在一些实施方案中,AC84抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链可变区。

[0084] 在一些实施方案中,AC84双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链。

[0085] 间皮素

[0086] 间皮素(MSLN)是一种糖基磷脂酰肌醇(GPI)-锚定膜蛋白,在正常组织中以相对低的水平表达。间皮素基因编码一种628个氨基酸的前体蛋白,该前体蛋白寻址到细胞膜,在这里其被加工成40kDa的膜结合成熟形式,从而释放称为巨核细胞增强因子(MPF)的31-kDa片段。

[0087] 发现间皮素在许多实体肿瘤中过表达,包括间皮瘤、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、三阴性乳癌和前列腺癌。间皮素被认为在癌细胞增殖、局部侵袭和肿瘤转移中发挥作用,并且其在肿瘤细胞上的表达与肿瘤侵袭性增加和临床转归不良相关。

[0088] 由于在癌细胞与健康组织之间观察到差异表达,故对于开发靶向间皮素的治疗剂而言,间皮素代表一种有利的TAA,其中一些治疗剂目前正在进行临床试验。

[0089] 抗-MSLN抗体

[0090] 下文描述了本公开的示例性抗-MSLN抗体(例如,“030”、“025”、“035”、“038”、“041”)。表1示出了本文描述的抗体的氨基酸序列。

[0091] 在一些实施方案中,030抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;和轻链,该轻链包含:包含SEQ ID NO:128的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:129的氨基酸序列的CDRL2和

[0092] 包含SEQ ID NO:130的氨基酸序列的CDRL3。

[0093] 在一些实施方案中,030抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:143的氨基酸序列的轻链可变区。

[0094] 在一些实施方案中,030双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:148的氨基酸序列的轻链。

[0095] 在一些实施方案中,025抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;和轻链,该轻链包含:包含SEQ ID NO:131的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:132的氨基酸序列的CDRL2和

[0096] 包含SEQ ID NO:133的氨基酸序列的CDRL3。

[0097] 在一些实施方案中,025抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列的轻链可变区。

[0098] 在一些实施方案中,025双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:149的氨基酸序列的轻链。

[0099] 在一些实施方案中,035抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;和轻链,该轻链包含:包含SEQ ID NO:134的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:136的氨基酸序列的CDRL3。

[0100] 在一些实施方案中,035抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:145的氨基酸序列的轻链可变区。

[0101] 在一些实施方案中,035双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:150的氨基酸序列的轻链。

[0102] 在一些实施方案中,038抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;和轻链,该轻链包含:包含SEQ ID NO:137的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列的CDRL3。

[0103] 在一些实施方案中,038抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:146的氨基酸序列的轻链可变区。

[0104] 在一些实施方案中,038双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:151的氨基酸序列的轻链。

[0105] 在一些实施方案中,041抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;和轻链,该轻链包含:包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:141的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列的CDRL3。

[0106] 在一些实施方案中,041抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:147的氨基酸序列的轻链可变区。

[0107] 在一些实施方案中,041双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:152的氨基酸序列的轻链。

[0108] 双特异性抗体

[0109] 根据本发明的bsAb抗体可以从头生成,也可以从现有的单特异性CD28抗体和TAA抗体工程化得到。本发明的双特异性抗体具有对CD28有特异性的一个抗原结合区和对TAA有特异性的第二抗原结合区。在一些实施方案中,TAA为CEA。在一些实施方案中,TAA为MSLN。在一些方面,双特异性抗体对于CD28、CEA和MSLN是单价的。

[0110] 本发明的bsAb可以基于先前描述的任何不同的抗体格式。一般而言,IgG-样格式是优选的,因为它们提供有利的性质诸如长的半衰期和潜在降低的免疫原性,但任何其他分子双特异性格式也可以用于本发明。在一些实施方案中,双特异性抗体共享共同的重链。在一些实施方案中,重链为天然重链(即,不含任何突变(“野生型”))。在一些实施方案中,重链包含至少一个突变(即,具有“LALA”突变或“LALAPA”突变)。任选地,双特异性抗体具有不同类型的轻链。例如,一条轻链为κ轻链,而另一条轻链为λ轻链(即,kl-体)。使用κ和λ选择树脂,不同的轻链允许轻松纯化双特异性抗体。

[0111] 抗体的重链和轻链氨基酸序列由其美国采用名称(USAN可例如经由美国医学协会https://www.ama-assn.org/或经由CAS登录号得到)确定。

[0112] 单特异性CD28和TAA结合可变结构域可例如从噬菌体展示文库从头选择,其中噬

菌体被工程化以表达人免疫球蛋白或其部分,诸如Fab、单链可变片段(scFv)或者未配对或配对的抗体可变区,并随后被工程化为双特异性格式。CD28和TAA可变结构域可以例如用噬菌体g3蛋白(scFv-g3融合蛋白)从将抗体重链和轻链可变区表达为融合蛋白的噬菌体展示文库分离出。

[0113] 筛选抗体文库以结合CD28抗体和TAA,并进一步表征所获得的阳性克隆。此类用于分离人抗体的噬菌体展示法在本领域是成熟的。参见例如:美国专利号5,223,409、5,403,484、5,571,698、5,427,908、5,580,717、5,969,108、6,172,197、5,885,793、6,521,404、6,544,731、6,555,313、6,582,915和6,593,081。使用本领域已知和本文描述的方法将所获得的从头可变区结合工程化为双特异性格式。

[0114] 另外,本发明的双特异性抗体可以使用以下技术制备,包括在2011年8月16日提交的WO 2012/023053中公开的那些,其内容据此全文以引用方式并入。WO 2012/023053中描述的方法生成结构上与人免疫球蛋白相同的双特异性抗体。这种类型的分子由两个拷贝的独特重链多肽、与恒定κ结构域融合的第一轻链可变区和与恒定λ结构域融合的第二轻链可变区组成。每个结合位点表现出不同的抗原特异性,重链和轻链都对所述抗原特异性有贡献。轻链可变区可以是λ或κ家族的并优选分别与λ和κ恒定结构域融合。这是优选的,以避免非天然多肽连接的生成。

[0115] 然而,也可以通过将κ轻链可变结构域与恒定λ结构域融合以获得第一特异性并将λ轻链可变结构域与恒定κ结构域融合以获得第二特异性来获得本发明的双特异性抗体。WO 2012/023053中描述的双特异性抗体被称为IgGκλ抗体或“κλ体”,这是一种新的全人双特异性IgG格式。这种κλ-体格式允许对具有不能与标准单克隆抗体区分开来的特性的不能与标准IgG分子区分开来的双特异性抗体进行亲和纯化,因此与先前的格式相比是有利的。

[0116] 除了上述方法外,本发明的双特异性抗体还可以根据国际专利公布号WO2011/131746中描述的方法在体外的无细胞环境中生成:通过在两个单特异性同源二聚体抗体的CH3区中引入不对称突变并在还原条件下从两个亲本单特异性同源二聚体抗体形成双特异性异源二聚体抗体以允许二硫键异构化。在所述方法中,将第一单特异性二价抗体和第二单特异性二价抗体工程化为在CH3结构域处具有某些将促进异源二聚体稳定性的置换;将抗体在足以允许铰链区中的半胱氨酸发生二硫键异构化的还原条件下一起温育;由此通过Fab臂交换生成双特异性抗体。

[0117] 本发明的抗体具有两个或更多个抗原结合结构域并且是双特异性的。本发明的双特异性抗体包括具有全长抗体结构或部分长度抗体结构的抗体如Fab。

[0118] 如本文所用,“全长抗体”是指具有两条全长抗体重链和两条全长抗体轻链的抗体。全长抗体重链(HC)由熟知的重链可变和恒定结构域VH、CH1、CH2和CH3组成。全长抗体轻链(LC)由熟知的轻链可变和恒定结构域VL和CL组成。全长抗体可能在一条或两条重链中缺少C-末端赖氨酸(K)。

[0119] 术语“Fab-臂”或“半分子”是指特异性结合抗原的一个重链-轻链对。

[0120] 本发明的全长双特异性抗体可例如以下生成:在两个单特异性二价抗体之间使用Fab臂交换(或半分子交换),通过在每个半分子中的重链CH3界面处引入置换以在体外的无细胞环境中或使用共表达促成具有不同特异性的两个抗体半分子的异源二聚体形成。Fab臂交换反应是二硫键异构化反应和CH3结构域解离-缔合的结果。亲本单特异性抗体的铰链

区中的重链二硫键被还原。亲本单特异性抗体中的一个的所得游离半胱氨酸与第二亲本单特异性抗体分子的半胱氨酸残基形成重链间二硫键,同时亲本抗体的CH3结构域通过解离-缔合进行释放和重新形成。Fab臂的CH3结构域可以被工程化以促成异源二聚化而不是同源二聚化。所得产物为具有两个Fab臂或半分子的双特异性抗体,这些Fab臂或半分子各自结合不同的表位。

[0121] 如本文所用,“同源二聚化”是指具有相同的CH3氨基酸序列的两条重链的相互作用。如本文所用,“同源二聚体”是指具有两条有着相同的CH3氨基酸序列的重链的抗体。

[0122] 如本文所用,“异源二聚化”是指具有不相同的CH3氨基酸序列的两条重链的相互作用。如本文所用,“异源二聚体”是指具有两条有着不相同的CH3氨基酸序列的重链的抗体。

[0123] 可使用“杵臼结构(knob-in-hole)”策略(参见例如PCT国际公布号WO 2006/028936)来生成全长双特异性抗体。简言之,形成人IgG中CH3结构域的界面的所选氨基酸可以在影响CH3结构域相互作用的位置处发生突变以促进异源二聚体形成。将具有小侧链(臼状结构(hole))的氨基酸引入到特异性结合第一抗原的抗体的重链中,并将具有大侧链(杵状结构(knob))的氨基酸引入到特异性结合第二抗原的抗体的重链中。在两种抗体的共表达之后,由于具有“臼状结构”的重链与具有“杵状结构”的重链的优先相互作用而形成异源二聚体。形成杵状结构和臼状结构的示例性CH3置换对为(表示为第一重链的第一CH3结构域中的修饰位置/第二重链的第二CH3结构域中的修饰位置):T366Y/F405A、T366W/F405W、F405W/Y407A、T394W/Y407T、T394S/Y407A、T366W/T394S、F405W/T394S和T366W/T366S_L368A_Y407V。

[0124] 可以使用其他策略,诸如使用静电相互作用通过在一个CH3表面处置换带正电荷的残基并在第二CH3表面处置换带负电荷的残基来促进重链异源二聚化,如美国专利公布号US2010/0015133、美国专利公布号US2009/0182127、美国专利公布号US2010/028637或美国专利公布号US2011/0123532中所述。在其他策略中,异源二聚化可以通过以下置换来促进(表示为第一重链的第一CH3结构域中的修饰位置/第二重链的第二CH3结构域中的修饰位置):L351Y_F405A_Y407V/T394W、T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V、T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V、L351Y_Y407A/T366A_K409F、L351Y_Y407A/T366V_K409F、Y407A/T366A_K409F或T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W,如美国专利公布号US2012/0149876或美国专利公布号US2013/0195849中所述。

[0125] 可用于工程化双特异性分子的示例性抗-细胞表面抗体包括例如本领域已知的抗-肿瘤相关抗原抗体,诸如帕妥珠单抗和曲妥珠单抗(HER-2);西妥昔单抗、耐昔妥珠单抗、帕尼单抗和埃万妥单抗(EGFR);拉贝珠单抗和赛必妥单抗(CEA);阿麦妥单抗(间皮素);考曲妥珠单抗(磷脂酰肌醇蛋白聚糖3);阿替利珠单抗、阿维鲁单抗和度伐利尤单抗(PD-L1);博纳吐单抗(CD19);本妥昔单抗(CD30);达雷木单抗(CD38);吉妥珠单抗(CD33);托西莫单抗(9CD22)或奥妥珠单抗、奥瑞珠单抗、奥法木单抗、利妥昔单抗和替伊莫单抗(CD20)。

[0126] 可用于工程化双特异性分子的示例性CD28、CEA和MSLN抗体包括本文公开的抗体。CD28抗原结合区可以源自的示例性抗-CD28抗体包括“AI3”、“AI5”、“AI7”、“AI8”、“AI9”、“AI10”、“AI11”、“AI12”、“AI13”、“AI14”、“AI15”、“AI16”、“AI17”、“AI18”、“AI19”、“AI20”、“AI21”、“AI22”或“AI23”抗体。CEA抗原结合区可以源自的示例性抗-CEA抗体包括“AC22”、

“AC61”或“AC84”抗体。MSLN抗原结合区可以源自的示例性抗-MSLN抗体包括“030”、“025”、“035”、“038”或“041”抗体。表1示出了本公开的抗体的区域的氨基酸序列。

[0127] 表1.本公开的示例性氨基酸序列

SEQ ID NO:	**名称**	**氨基酸序列**
SEQ ID NO: 1	共同重链 CDR-H1	GFTFSSYA
SEQ ID NO: 2	共同重链 CDR-H2	ISGSGGST
SEQ ID NO: 3	共同重链 CDR-H3	AKSYGAFDY
SEQ ID NO: 4	共同重链 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGST YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKSYGAFDYWGQGTLVTVS S
SEQ ID NO: 5	共同重链 HC（野生型）	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGST YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKSYGAFDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
SEQ ID NO: 6	共同重链 HC（**具有 LALA 突变**）	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGST YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKSYGAFDYWGQGTLVTVS

[0128]

[0129]

		SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA** GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
SEQ ID NO: 7	共同重链 HC（**具有 LALAPA 突变**）	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGST YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKSYGAFDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA** GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKAL**A**APIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
SEQ ID NO: 8	CEA 结合部分 AC22 CDR-L1	SSNIANGI
SEQ ID NO: 9	CEA 结合部分 AC22 CDR-L2	FDN
SEQ ID NO: 10	CEA 结合部分 AC22 CDR-L3	GTWDFSYGIV
SEQ ID	CEA 结合部分	QNIPRT

[0130]

NO: 11	AC61 CDR-L1	
SEQ ID NO: 12	CEA 结合部分 AC61 CDR-L2	DIS
SEQ ID NO: 13	CEA 结合部分 AC61 CDR-L3	QQVTLDPEEMT
SEQ ID NO: 14	CEA 结合部分 AC84 CDR-L1	SSNIGIGL
SEQ ID NO: 15	CEA 结合部分 AC84 CDR-L2	NVN
SEQ ID NO: 16	CEA 结合部分 AC84 CDR-L3	GTWDFSYRVD
SEQ ID NO: 17	CEA 结合部分 AC22 VL（轻链可变区）	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIAN GIVSWYQQLPGTAPKLLIYFDNLRPSGIPD RFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGT WDFSYGIVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 18	CEA 结合部分 AC61 VL（轻链可变区）	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNIPR TINWYQQKPGKAPKLLIYDISNLETGVPSR FSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQVT LDPEEMTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 19	CEA 结合部分 AC84 VL（轻链可变区）	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGI GLVSWYQQLPGTAPKLLIYNVNTRPSGIPD RFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGT WDFSYRVDFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 20	CEA 结合部分 AC22 LC（轻链）	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIAN GIVSWYQQLPGTAPKLLIYFDNLRPSGIPD RFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGT WDFSYGIVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKT VAPTECS
SEQ ID NO: 21	CEA 结合部分 AC61 LC（轻链）	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNIPR TINWYQQKPGKAPKLLIYDISNLETGVPSR FSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQVT LDPEEMTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS

[0131]

		DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
SEQ ID NO: 22	CEA 结合部分 AC84 LC（轻链）	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGI GLVSWYQQLPGTAPKLLIYNVNTRPSGIPD RFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGT WDFSYRVDFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKT VAPTECS
SEQ ID NO: 23	CD28 结合部分 AI3 CDR-L1	QSVLYSSNNKNY
SEQ ID NO: 24	CD28 结合部分 AI3 CDR-L2	WAS
SEQ ID NO: 25	CD28 结合部分 AI3 CDR-L3	QQNLRPPET
SEQ ID NO: 26	CD28 结合部分 AI5 CDR-L1	GDLLTFEGKTY
SEQ ID NO: 27	CD28 结合部分 AI5 CDR-L2	EVS
SEQ ID NO: 28	CD28 结合部分 AI5 CDR-L3	MQAHSTRFAFT
SEQ ID NO: 29	CD28 结合部分 AI7 CDR-L1	SSNIGSNT
SEQ ID NO: 30	CD28 结合部分 AI7 CDR-L2	SEN
SEQ ID NO: 31	CD28 结合部分 AI7 CDR-L3	AAWDLNPAIGYV
SEQ ID NO: 32	CD28 结合部分 AI8 CDR-L1	DDLLRFSGKTY
SEQ ID NO: 33	CD28 结合部分 AI8 CDR-L2	EVS
SEQ ID	CD28 结合部分	MQASRSKVAFT

[0132]

NO: 34	AI8 CDR-L3	
SEQ ID NO: 35	CD28 结合部分 AI9 CDR-L1	GDLLSFDGKTY
SEQ ID NO: 36	CD28 结合部分 AI9 CDR-L2	EVS
SEQ ID NO: 37	CD28 结合部分 AI9 CDR-L3	MQASKHRFGFT
SEQ ID NO: 38	CD28 结合部分 AI10 CDR-L1	GDLLEFAGKTY
SEQ ID NO: 39	CD28 结合部分 AI10 CDR-L2	EVS
SEQ ID NO: 40	CD28 结合部分 AI10 CDR-L3	MQAHGSKIGFT
SEQ ID NO: 41	CD28 结合部分 AI11 CDR-L1	QEIHSH
SEQ ID NO: 42	CD28 结合部分 AI11 CDR-L2	STS
SEQ ID NO: 43	CD28 结合部分 AI11 CDR-L3	QQGFRFAFST
SEQ ID NO: 44	CD28 结合部分 AI12 CDR-L1	QSILYSSSNRNY
SEQ ID NO: 45	CD28 结合部分 AI12 CDR-L2	WAS
SEQ ID NO: 46	CD28 结合部分 AI12 CDR-L3	QQNFRPPET
SEQ ID NO: 47	CD28 结合部分 AI13 CDR-L1	QSVLYSSNNKNY
SEQ ID NO: 48	CD28 结合部分 AI13 CDR-L2	WAS
SEQ ID NO: 49	CD28 结合部分 AI13 CDR-L3	QQNFRPPET
SEQ ID NO: 50	CD28 结合部分 AI14 CDR-L1	QAVFSLD
SEQ ID NO: 51	CD28 结合部分 AI14 CDR-L2	STS

[0133]

SEQ ID NO: 52	CD28 结合部分 AI14 CDR-L3	QQGPAFKPDVT
SEQ ID NO: 53	CD28 结合部分 AI15 CDR-L1	QSVSSY
SEQ ID NO: 54	CD28 结合部分 AI15 CDR-L2	DAS
SEQ ID NO: 55	CD28 结合部分 AI15 CDR-L3	HQRYRPPET
SEQ ID NO: 56	CD28 结合部分 AI16 CDR-L1	QSIGAY
SEQ ID NO: 57	CD28 结合部分 AI16 CDR-L2	HAS
SEQ ID NO: 58	CD28 结合部分 AI16 CDR-L3	QQYKDRPLT
SEQ ID NO: 59	CD28 结合部分 AI17 CDR-L1	GNLLTHDGKTY
SEQ ID NO: 60	CD28 结合部分 AI17 CDR-L2	EVS
SEQ ID NO: 61	CD28 结合部分 AI17 CDR-L3	MQANALKFGFT
SEQ ID NO: 62	CD28 结合部分 AI18 CDR-L1	SDLLRFEGKTY
SEQ ID NO: 63	CD28 结合部分 AI18 CDR-L2	EVS
SEQ ID NO: 64	CD28 结合部分 AI18 CDR-L3	MQAHASALKFT
SEQ ID NO: 65	CD28 结合部分 AI19 CDR-L1	GNLLTHGGKTY
SEQ ID NO: 66	CD28 结合部分 AI19 CDR-L2	EVS
SEQ ID NO: 67	CD28 结合部分 AI19 CDR-L3	MQAHADGFGFT
SEQ ID NO: 68	CD28 结合部分 AI20 CDR-L1	GDLLRFDGKTY
SEQ ID	CD28 结合部分	EVS

[0134]

NO: 69	AI20 CDR-L2	
SEQ ID NO: 70	CD28 结合部分 AI20 CDR-L3	MQASETAVRFT
SEQ ID NO: 71	CD28 结合部分 AI21 CDR-L1	TDLLTFEGKTY
SEQ ID NO: 72	CD28 结合部分 AI21 CDR-L2	EVS
SEQ ID NO: 73	CD28 结合部分 AI21 CDR-L3	MQAHSSKFKFT
SEQ ID NO: 74	CD28 结合部分 AI22 CDR-L1	GDLLSTDGKTY
SEQ ID NO: 75	CD28 结合部分 AI22 CDR-L2	EVS
SEQ ID NO: 76	CD28 结合部分 AI22 CDR-L3	MQASGSRFYFT
SEQ ID NO: 77	CD28 结合部分 AI23 CDR-L1	QTLLYKYDNKNY
SEQ ID NO: 78	CD28 结合部分 AI23 CDR-L2	WAS
SEQ ID NO: 79	CD28 结合部分 AI23 CDR-L3	HQYLYPAET
SEQ ID NO: 80	CD28 结合部分 AI3 VL（轻链可变区）	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL YSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDV AVYYCQQNLRPPETFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 81	CD28 结合部分 AI5 VL（轻链可变区）	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSGDLLT FEGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCMQAHSTRFAFTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 82	CD28 结合部分 AI7 VL（轻链可变区）	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGS NTVNWYQQLPGTAPKLLIYSENTRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCA AWDLNPAIGYVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 83	CD28 结合部分 AI8 VL（轻链可	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSDDLLR FSGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRFS

[0135]

	变区）	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCMQASRSKVAFTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 84	CD28 结合部分 AI9 VL（轻链可变区）	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSGDLLS FDGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQASKHRFGFTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 85	CD28 结合部分 AI10 VL（轻链可变区）	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSGDLLE FAGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQAHGSKIGFTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 86	CD28 结合部分 AI11 VL（轻链可变区）	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQEIHS HLSWYQQKPGKAPKLLIYSTSTLESGVPSR FSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQGF RFAFSTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 87	CD28 结合部分 AI12 VL（轻链可变区）	DIVMTQSPDSLGVSLGERATINCKSSQSILY SSSNRNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVG VYYCQQNFRPPETFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 88	CD28 结合部分 AI13 VL（轻链可变区）	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL YSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDV GVYYCQQNFRPPETFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 89	CD28 结合部分 AI14 VL（轻链可变区）	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQAVFS LDLHWYQQKPGQAPRLLIYSTSKRATGIPD RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ GPAFKPDVTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 90	CD28 结合部分 AI15 VL（轻链可变区）	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQR YRPPETFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 91	CD28 结合部分 AI16 VL（轻链可变区）	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIGA YLNWYQQKPGKAPKLLIYHASDLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YKDRPLTFGQGTKVEIK
SEQ ID	CD28 结合部分	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSGNLLT

[0136]

NO: 92	AI17 VL（轻链可变区）	HDGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQANALKFGFTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 93	CD28 结合部分 AI18 VL（轻链可变区）	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSSDLLR FEGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCMQAHASALKFTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 94	CD28 结合部分 AI19 VL（轻链可变区）	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSGNLLT HGGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQAHADGFGFTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 95	CD28 结合部分 AI20 VL（轻链可变区）	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSGDLLR FDGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQASETAVRFTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 96	CD28 结合部分 AI21 VL（轻链可变区）	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSTDLLT FEGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCMQAHSSKFKFTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 97	CD28 结合部分 AI22 VL（轻链可变区）	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSGDLLS TDGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQASGSRFYFTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 98	CD28 结合部分 AI23 VL（轻链可变区）	DIVMTQSPDSLAVSLGERAIINCKSSQTLLY KYDNKNYLAWYQHKPGQPPKLLFYWAST RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDV AVYYCHQYLYPAETFGQGTKLEIK
SEQ ID NO: 99	CD28 结合部分 AI3 LC（轻链）	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL YSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDV AVYYCQQNLRPPETFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC

[0137]

SEQ ID NO: 100	CD28 结合部分 AI5 LC（轻链）	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSGDLLT FEGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCMQAHSTRFAFTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 101	CD28 结合部分 AI7 LC（轻链）	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGS NTVNWYQQLPGTAPKLLIYSENTRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCA AWDLNPAIGYVFGGGTKLTVLGQPKAAPS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAV TVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKY AASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGST VEKTVAPTECS
SEQ ID NO: 102	CD28 结合部分 AI8 LC（轻链）	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSDDLLR FSGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCMQASRSKVAFTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 103	CD28 结合部分 AI9 LC（轻链）	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSGDLLS FDGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQASKHRFGFTFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 104	CD28 结合部分 AI10 LC（轻链）	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSGDLLE FAGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV

[0138]

		YYCMQAHGSKIGFTFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 105	CD28 结合部分 AI11 LC（轻链）	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQEIHS HLSWYQQKPGKAPKLLIYSTSTLESGVPSR FSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQGF RFAFSTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
SEQ ID NO: 106	CD28 结合部分 AI12 LC（轻链）	DIVMTQSPDSLGVSLGERATINCKSSQSILY SSSNRNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVG VYYCQQNFRPPETFGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 107	CD28 结合部分 AI13 LC（轻链）	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL YSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDV GVYYCQQNFRPPETFGGGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 108	CD28 结合部分 AI14 LC（轻链）	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQAVFS LDLHWYQQKPGQAPRLLIYSTSKRATGIPD RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ GPAFKPDVTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS

[0139]

		STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
SEQ ID NO: 109	CD28 结合部分 AI15 LC（轻链）	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQR YRPPETFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
SEQ ID NO: 110	CD28 结合部分 AI16 LC（轻链）	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIGA YLNWYQQKPGKAPKLLIYHASDLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YKDRPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
SEQ ID NO: 111	CD28 结合部分 AI17 LC（轻链）	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSGNLLT HDGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQANALKFGFTFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 112	CD28 结合部分 AI18 LC（轻链）	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSSDLLR FEGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCMQAHASALKFTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC

[0140]

SEQ ID NO: 113	CD28 结合部分 AI19 LC（轻链）	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSGNLLT HGGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQAHADGFGFTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 114	CD28 结合部分 AI20 LC（轻链）	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSGDLLR FDGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQASETAVRFTFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 115	CD28 结合部分 AI21 LC（轻链）	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSTDLLT FEGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCMQAHSSKFKFTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 116	CD28 结合部分 AI22 LC（轻链）	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSGDLLS TDGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQASGSRFYFTFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 117	CD28 结合部分 AI23 LC（轻链）	DIVMTQSPDSLAVSLGERAIINCKSSQTLLY KYDNKNYLAWYQHKPGQPPKLLFYWAST RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDV

[0141]

		AVYYCHQYLYPAETFGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 118	CEAxCD3 共同重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF NTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQM NSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFA YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 119	CEAxCD3κ 轻链	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVNS NLNWYQQKPGQAPRLLIYHSNNRPHGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQF DYFREYNTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
SEQ ID NO: 120	CEAxCD3λ 轻链	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVT TSNYANWFQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPG TPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEY YCALWYKQRWVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAV TVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKY

[0142]

		AASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGST VEKTVAPTECS
SEQ ID NO: 121	Y4κ轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISS YLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS YSTPNTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
SEQ ID NO: 122	1a28/AC84/N 重链 1（杵）VL CrossMab	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGI GLVSWYQQLPGTAPKLLIYNVNTRPSGIPD RFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGT WDFSYRVDFGGGTKLTVLSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWQSNGQTENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 123	1a28/AC84/N 重链 2（白）	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISS YYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGITHYNP SLKSRVTISVDTSKIQFSLKLSSVTAADTAV YYCARWGVRRDYYYYGMDVWGQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVEDYFPEPVTVTWNSGALSSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP

[0143]

		REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVC TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 124	1a28/AC84/N 轻链 1	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSS SYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPD RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ YGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
SEQ ID NO: 125	1a28/AC84/N 轻链 2 VHd CrossMab	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGST YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKSYGAFDYWGQGTLVTVS SASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 126	TGN1412 重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF TSYYIHWVRQAPGQGLEWIGCIYPGNVNT NYNEKFKDRATLTVDTSISTAYMELSRLRS DDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE

[0144]

		SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK
SEQ ID NO: 127	TGN1412 轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIY VWLNWYQQKPGKAPKLLIYKASNLHTGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
SEQ ID NO: 128	MSLN 结合部分 O30 CDR-L1	SSNIAHGP
SEQ ID NO: 129	MSLN 结合部分 O30 CDR-L2	ATN
SEQ ID NO: 130	MSLN 结合部分 O30 CDR-L3	AAYDLTGWFAYAV
SEQ ID NO: 131	MSLN 结合部分 O25 CDR-L1	SGISVKDYR
SEQ ID NO: 132	MSLN 结合部分 O25 CDR-L2	YKSNSDM
SEQ ID NO: 133	MSLN 结合部分 O25 CDR-L3	MIWHHGHGTSLV
SEQ ID NO: 134	MSLN 结合部分 O35 CDR-L1	SDIRVRDYR
SEQ ID	MSLN 结合部分	YKTDSDK

[0145]

NO: 135	O35 CDR-L2	
SEQ ID NO: 136	MSLN 结合部分 O35 CDR-L3	MIWHRTTGTSLV
SEQ ID NO: 137	MSLN 结合部分 O38 CDR-L1	SGINVRDYR
SEQ ID NO: 138	MSLN 结合部分 O38 CDR-L2	YKSASDK
SEQ ID NO: 139	MSLN 结合部分 O38 CDR-L3	MIWHHDSEGHAFV
SEQ ID NO: 140	MSLN 结合部分 O41 CDR-L1	KIGHRA
SEQ ID NO: 141	MSLN 结合部分 O41 CDR-L2	YTY
SEQ ID NO: 142	MSLN 结合部分 O41 CDR-L3	QVWDWYSEGGVV
SEQ ID NO: 143	MSLN 结合部分 O30 VL（轻链可变区）	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIAH GPVNWYQQLPGTAPKLLIYATNHRPSGVP DRFSGSKSGTTASLTISGLQSEDEADYYCA AYDLTGWFAYAVFGGGTKLTVLGQPKAA PSVTL
SEQ ID NO: 144	MSLN 结合部分 O25 VL（轻链可变区）	QPVLTQPASLSASPGASASLTCTLHSGISVK DYRIYWYQQKPGRPPQYLLRYKSNSDMQ QGSGVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSE DEADYYCMIWHHGHGTSLVFGGGTKLTV L
SEQ ID NO:	MSLN 结合部分 O35 VL（轻链可	QPVLTQPVSLSASPGASVSLTCTLRSDIRVR DYRIFWYQQKPGSPPQYLLRYKTDSDKQQ

[0146]

145	变区）	GSGVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDE ADYYCMIWHRTTGTSLVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 146	MSLN 结合部分 O38 VL（轻链可变区）	QPVLTQPASLSASPGASASLTCTLRSGINVR DYRIFWYQQKPGSPPQYLLRYKSASDKQQ GSGVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDE ADYYCMIWHHDSEGHAFVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 147	MSLN 结合部分 O41 VL（轻链可变区）	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNKIGHR AVHWYQQKPGQAPVLVIYYTYERPSGIPE RFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQ VWDWYSEGGVVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTL
SEQ ID NO: 148	MSLN 结合部分 O30 LC（轻链）	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIAH GPVNWYQQLPGTAPKLLIYATNHRPSGVP DRFSGSKSGTTASLTISGLQSEDEADYYCA AYDLTGWFAYAVFGGGTKLTVLGQPKAA PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA VTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNK YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGS TVEKTVAPTECS
SEQ ID NO: 149	MSLN 结合部分 O25 LC（轻链）	QPVLTQPASLSASPGASASLTCTLHSGISVK DYRIYWYQQKPGRPPQYLLRYKSNSDMQ QGSGVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSE DEADYYCMIWHHGHGTSLVFGGGTKLTV LGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO: 150	MSLN 结合部分 O35 LC（轻链）	QPVLTQPVSLSASPGASVSLTCTLRSDIRVR DYRIFWYQQKPGSPPQYLLRYKTDSDKQQ GSGVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDE ADYYCMIWHRTTGTSLVFGGGTKLTVLG QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS

[0147]

SEQ ID NO: 151	MSLN 结合部分 O38 LC（轻链）	QPVLTQPASLSASPGASASLTCTLRSGINVR DYRIFWYQQKPGSPPQYLLRYKSASDKQQ GSGVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDE ADYYCMIWHHDSEGHAFVFGGGTKLTVL GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQV THEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO: 152	MSLN 结合部分 O41 LC（轻链）	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNKIGHR AVHWYQQKPGQAPVLVIYYTYERPSGIPE RFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQ VWDWYSEGGVVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAV TVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKY AASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGST VEKTVAPTECS

[0148] 表2示出了本公开的示例性双特异性抗体。示出了每种抗体的命名法，并描述了本公开的κλ-体的单个κ轻链、λ轻链和重链区。“AI”表示抗-人CD28抗原结合区，“AC”表示抗-人CEA抗原结合区，“0”表示抗-人MSLN抗原结合区。/N表示具有LALAPA突变的重链。括号内示出了替代命名法。

[0149] 表2:本公开的示例性双特异性抗体

[0150]

BsAb 名称	κ 轻链	λ 轻链	重链
AI3AC84/N	AI3 (AI_1H5)	AC84 (AC1g6_1F1)	共同 VH 具有 LALAPA 突变
AI5AC84/N	AI5 (AI_1A9)		
AI8AC84/N	AI8 (AI_2A12)		
AI9AC84/N	AI9 (AI_1A7)		
AI10AC84/N	AI10 (AI_1B6)		
AI11AC84/N	AI11 (AI_1E11)		
AI12AC84/N	AI12 (AI_2E2)		
AI13AC84/N	AI13 (AI_2H10)		
AI14AC84/N	AI14 (AI_1B8)		
AI15AC84/N	AI15 (AI_2E3)		
AI16AC84/N	AI16 (AI_1G3)		

[0151]

AI17AC84/N AI18AC84/N AI19AC84/N AI20AC84/N AI21AC84/N AI22AC84/N AI23AC84/N	AI17 (AI_2C10) AI18 (AI_2G3) AI19 (AI_1G4) AI20 (AI_1A1) AI21 (AI_1F2) AI22 (AI_1F8) AI23 (AI_1D4)		
AC61AI7/N	AC61 (AC1b7_1B9)	AI7 (AI_1A12)	
AI3O30/N AI3O25/N AI3O35/N AI3O38/N AI3O41/N AI5O30/N AI5O25/N AI5O35/N AI5O38/N AI5O41/N AI10O30/N AI10O25/N AI10O35/N AI10O38/N AI10O41/N AI13O30/N AI13O25/N AI13O35/N AI13O38/N AI13O41/N	AI3 (AI_1H5) AI3 (AI_1H5) AI3 (AI_1H5) AI3 (AI_1H5) AI3 (AI_1H5) AI5 (AI_1A9) AI5 (AI_1A9) AI5 (AI_1A9) AI5 (AI_1A9) AI5 (AI_1A9) AI10 (AI_1B6) AI10 (AI_1B6) AI10 (AI_1B6) AI10 (AI_1B6) AI10 (AI_1B6) AI13 (AI_2H10) AI13 (AI_2H10) AI13 (AI_2H10) AI13 (AI_2H10) AI13 (AI_2H10)	O30 (O1b6_1D1) O25 (Ob8_1E1) O35 (Ob8_A10) O38 (Oh1_A4) O41 (Ob9_1A11) O30 (O1b6_1D1) O25 (Ob8_1E1) O35 (Ob8_A10) O38 (Oh1_A4) O41 (Ob9_1A11) O30 (O1b6_1D1) O25 (Ob8_1E1) O35 (Ob8_A10) O38 (Oh1_A4)	

[0152]

		O41 (Ob9_1A11) O30 (O1b6_1D1) O25 (Ob8_1E1) O35 (Ob8_A10) O38 (Oh1_A4) O41 (Ob9_1A11)	

[0153] 在一些实施方案中,AI3AC84/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDRL3;和

[0154] λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDRL3。

[0155] 在一些实施方案中,AI3AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0156] 在一些实施方案中,AI3AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的λ轻链。

[0157] 在一些实施方案中,AI5AC84/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDRL3;和

[0158] λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDRL3。

[0159] 在一些实施方案中,AI5AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0160] 在一些实施方案中,AI5AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的λ轻链。

[0161] 在一些实施方案中,AI8AC84/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDRL1、包含

SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDRL3;和

[0162] λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDRL3。

[0163] 在一些实施方案中,AI8AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0164] 在一些实施方案中,AI8AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的λ轻链。

[0165] 在一些实施方案中,AI9AC84/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDRL3。

[0166] 在一些实施方案中,AI9AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:84的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0167] 在一些实施方案中,AI9AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的λ轻链。

[0168] 在一些实施方案中,AI10AC84/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDRL3。

[0169] 在一些实施方案中,AI10AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0170] 在一些实施方案中,AI10AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的λ轻链。

[0171] 在一些实施方案中,AI11AC84/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDRL3。

[0172] 在一些实施方案中,AI11AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0173] 在一些实施方案中,AI11AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的λ轻链。

[0174] 在一些实施方案中,AI12AC84/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDRL3。

[0175] 在一些实施方案中,AI12AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0176] 在一些实施方案中,AI12AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:106的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的λ轻链。

[0177] 在一些实施方案中,AI13AC84/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDRL3。

[0178] 在一些实施方案中,AI13AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0179] 在一些实施方案中,AI13AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的λ轻链。

[0180] 在一些实施方案中,AI14AC84/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDRL3。

[0181] 在一些实施方案中,AI14AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0182] 在一些实施方案中,AI14AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的λ轻链。

[0183] 在一些实施方案中,AI15AC84/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDRL3。

[0184] 在一些实施方案中,AI15AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0185] 在一些实施方案中,AI15AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的λ轻链。

[0186] 在一些实施方案中,AI16AC84/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDRL3。

[0187] 在一些实施方案中,AI16AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0188] 在一些实施方案中,AI16AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:110的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的λ轻链。

[0189] 在一些实施方案中,AI17AC84/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDRL3。

[0190] 在一些实施方案中,AI17AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0191] 在一些实施方案中,AI17AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的λ轻链。

[0192] 在一些实施方案中,AI18AC84/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDRL3。

[0193] 在一些实施方案中,AI18AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0194] 在一些实施方案中,AI18AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的λ轻链。

[0195] 在一些实施方案中,AI19AC84/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDRL3。

[0196] 在一些实施方案中,AI19AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0197] 在一些实施方案中,AI19AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的λ轻链。

[0198] 在一些实施方案中,AI20AC84/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDRL3。

[0199] 在一些实施方案中,AI20AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0200] 在一些实施方案中,AI20AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的λ轻链。

[0201] 在一些实施方案中,AI21AC84/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的CDRL1、包含

SEQ ID NO:72的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDRL3。

[0202] 在一些实施方案中,AI21AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0203] 在一些实施方案中,AI21AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的λ轻链。

[0204] 在一些实施方案中,AI22AC84/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDRL3。

[0205] 在一些实施方案中,AI22AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0206] 在一些实施方案中,AI22AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的λ轻链。

[0207] 在一些实施方案中,AI23AC84/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDRL3。

[0208] 在一些实施方案中,AI23AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0209] 在一些实施方案中,AI23AC84/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:117的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的λ轻链。

[0210] 在一些实施方案中,AC61AI7/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDRL3。

[0211] 在一些实施方案中,AC61AI7/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0212] 在一些实施方案中,AC61AI7/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列的λ轻链。

[0213] 在一些实施方案中,AI3030/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:128的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:129的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:130的氨基酸序列的CDRL3。

[0214] 在一些实施方案中,AI3030/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:143的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0215] 在一些实施方案中,AI3030/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:148的氨基酸序列的λ轻链。

[0216] 在一些实施方案中,AI3025/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:131的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:132的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:133的氨基酸序列的CDRL3。

[0217] 在一些实施方案中,AI3025/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0218] 在一些实施方案中,AI3025/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:149的氨基酸序列的λ轻链。

[0219] 在一些实施方案中,AI3035/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:134的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:136的氨基酸序列的CDRL3。

[0220] 在一些实施方案中,AI3035/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:145的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0221] 在一些实施方案中,AI3035/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:150的氨基酸序列的λ轻链。

[0222] 在一些实施方案中,AI3038/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:137的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列的CDRL3。

[0223] 在一些实施方案中,AI3038/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:146的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0224] 在一些实施方案中,AI3038/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:151的氨基酸序列的λ轻链。

[0225] 在一些实施方案中,AI3041/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:141的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列的CDRL3。

[0226] 在一些实施方案中,AI3041/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:147的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0227] 在一些实施方案中,AI3041/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:152的氨基酸序列的λ轻链。

[0228] 在一些实施方案中,AI5030/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:128的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:129的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:130的氨基酸序列的CDRL3。

[0229] 在一些实施方案中,AI5030/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:143的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0230] 在一些实施方案中,AI5030/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:148的氨基酸序列的λ轻链。

[0231] 在一些实施方案中,AI5025/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:131的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:132的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:133的氨基酸序列的CDRL3。

[0232] 在一些实施方案中,AI5025/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0233] 在一些实施方案中,AI5025/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:149的氨基酸序列的λ轻链。

[0234] 在一些实施方案中,AI5035/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:134的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:136的氨基酸序列的CDRL3。

[0235] 在一些实施方案中,AI5035/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:145的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0236] 在一些实施方案中,AI5035/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:150的氨基酸序列的λ轻链。

[0237] 在一些实施方案中,AI5038/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:137的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列的CDRL3。

[0238] 在一些实施方案中,AI5038/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:146的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0239] 在一些实施方案中,AI5038/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:151的氨基酸序列的λ轻链。

[0240] 在一些实施方案中,AI5041/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDRL1、包含

SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:141的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列的CDRL3。

[0241] 在一些实施方案中,AI5041/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:147的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0242] 在一些实施方案中,AI5041/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:152的氨基酸序列的λ轻链。

[0243] 在一些实施方案中,AI10030/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:129的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:130的氨基酸序列的CDRL3。

[0244] 在一些实施方案中,AI10030/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:143的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0245] 在一些实施方案中,AI10030/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:148的氨基酸序列的λ轻链。

[0246] 在一些实施方案中,AI10025/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:131的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:132的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:133的氨基酸序列的CDRL3。

[0247] 在一些实施方案中,AI10025/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0248] 在一些实施方案中,AI10025/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:149的氨基酸序列的λ轻链。

[0249] 在一些实施方案中,AI10035/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:134的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:136的氨基酸序列的CDRL3。

[0250] 在一些实施方案中,AI10035/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:145的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0251] 在一些实施方案中,AI10035/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:150的氨基酸序列的λ轻链。

[0252] 在一些实施方案中,AI10038/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:137的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列的CDRL3。

[0253] 在一些实施方案中,AI10038/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:146的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0254] 在一些实施方案中,AI10038/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:151的氨基酸序列的λ轻链。

[0255] 在一些实施方案中,AI10041/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:141的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列的CDRL3。

[0256] 在一些实施方案中,AI10041/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:147的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0257] 在一些实施方案中,AI10041/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:152的氨基酸序列的λ轻链。

[0258] 在一些实施方案中,AI13030/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:128的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:129的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:130的氨基酸序列的CDRL3。

[0259] 在一些实施方案中,AI13030/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:143的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0260] 在一些实施方案中,AI13030/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:148的氨基酸序列的λ轻链。

[0261] 在一些实施方案中,AI13025/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:131的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:132的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:133的氨基酸序列的CDRL3。

[0262] 在一些实施方案中,AI13025/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0263] 在一些实施方案中,AI13025/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:149的氨基酸序列的λ轻链。

[0264] 在一些实施方案中,AI13035/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:134的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:136的氨基酸序列的CDRL3。

[0265] 在一些实施方案中,AI13035/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:145的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0266] 在一些实施方案中,AI13035/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:150的氨基酸序列的λ轻链。

[0267] 在一些实施方案中,AI13038/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:137的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列的CDRL3。

[0268] 在一些实施方案中,AI13038/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:146的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0269] 在一些实施方案中,AI13038/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:151的氨基酸序列的λ轻链。

[0270] 在一些实施方案中,AI13041/N双特异性抗体具有重链,该重链包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDRH3;κ轻链,该κ轻链包含:包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDRL3;和λ轻链,该λ轻链包含:包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:141的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列的CDRL3。

[0271] 在一些实施方案中,AI13041/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区、包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的κ轻链可变区和包含SEQ ID NO:147的氨基酸序列的λ轻链可变区。

[0272] 在一些实施方案中,AI13041/N双特异性抗体具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变和恒定区、包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列的κ轻链和包含SEQ ID NO:152的氨基酸序列的λ轻链。

[0273] 使用方法

[0274] 本发明的治疗制剂,其包含本发明的bsAb,用于治疗或缓解与癌症相关联的症状,所述癌症的非限制性实例有如白血病、淋巴瘤、乳癌、结肠癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、胶质瘤、肺癌和支气管癌、结肠直肠癌、胰腺癌、食管癌、肝癌、尿道膀胱癌、肾癌和肾盂癌、口腔癌和咽癌、子宫体癌和/或黑色素瘤。本发明还提供了治疗或缓解与癌症相关联的症状的方法。治疗方案通过使用标准方法鉴定受试者(例如,患有癌症(或有患上癌症的风险)的人类患者)来进行。

[0275] 治疗的有效性与用于诊断或治疗特定免疫相关病症的任何已知方法结合确定。免疫相关病症的一种或多种症状的缓解指示抗体赋予临床益处。

[0276] 药物组合物

[0277] 本发明的抗体(在本文中也称为“活性化合物”)及其衍生物、片段、类似物和同源物可以被掺入到适合于施用的药物组合物中。此类组合物通常包含抗体和药学上可接受的载体。如本文所用,术语“药学上可接受的载体”旨在包括与药物施用兼容的任何和所有溶剂、分散介质、涂料、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。合适的载体在最新版本的Remington's Pharmaceutical Sciences中有述,该版本是本领域的标准参考文本,以引用方式并入本文。此类载体或稀释剂的优选实例包括但不限于水、盐水、林格氏液、右旋糖溶液和5%人血清白蛋白。也可以使用脂质体和非水性媒介物诸如非挥发性油。此类介质和试剂用于药学活性物质的用途是本领域熟知的。除非任何常规的介质或试剂与活性化合物不相容,否则涵盖其在组合物中的使用。也可以向组合物中掺入补充的活性化合物。

[0278] 本发明的药物组合物被配制成与其预期施用途径相容。施用途径的实例包括肠胃外,例如静脉内、皮内、皮下、经口(例如,吸入)、透皮(即,局部)、透粘膜和直肠施用。用于肠胃外、皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可以包括以下组分:无菌稀释剂,诸如注射用水、盐水溶液、非挥发性油、聚乙二醇、丙三醇、丙二醇或其他合成溶剂;抗细菌剂,诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,诸如乙二胺四乙酸(EDTA);缓冲剂,诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;和调节张力的试剂,诸如氯化钠或右旋糖。pH可以用酸或碱诸如盐酸或氢氧化钠来调节。肠胃外制剂可以封装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0279] 适合于可注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(其中是水溶性的)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。对于静脉内施用,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(BASF,新泽西州帕西帕尼)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,组合物都必须是无菌的并且应是流体的至存在易于注射性的程度。其在制造和储存条件下必须是稳定的,并且必须防止微生物如细菌和真菌的污染作用。载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。适当的流动性可以例如通过使用涂层如卵磷脂、通过在分散体的情况下保持所需的颗粒尺寸以及通过使用表面活性剂来保持。可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等来实现微生物作用的防止。在许多情况下,优选在组合物中包括等渗剂,例如糖、多元醇(诸如甘露糖醇、山梨糖醇)、氯化钠。可以通过在组合物中包括延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来延长可注射组合物的吸收。

[0280] 无菌可注射溶液可以通过将活性化合物以所需的量与上文列举的一种成分或成分的组合一起并入在适当的溶剂中来制备,如果需要,随后进行过滤灭菌。通常,通过将活性化合物并入到无菌媒介物中来制备分散体,无菌媒介物含有基础的分散介质和来自上面列举的那些的所需其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,制备方法为真空干燥和冷冻干燥,其产生活性成分外加来自其先前无菌过滤的溶液的任何其他所需成分的粉末。

[0281] 口腔组合物通常包含惰性稀释剂或可食用载体。它们可以被封装在明胶胶囊中或压缩成片剂。就经口治疗施用的目的而言,可以将活性化合物与赋形剂合并并以片剂、含片或胶囊剂的形式使用。口腔组合物也可以使用流体载体制备为用作漱口水,其中所述流体载体中的化合物经口应用并且漱口并吐出或咽下。药学上兼容的结合剂和/或佐剂材料可以作为组合物的一部分包括在内。片剂、丸剂、胶囊剂、含片等可以含有任何以下成分或类似性质的化合物:粘结剂,诸如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂,诸如淀粉或乳糖;崩解剂,诸如海藻酸、Primogel或玉米淀粉;润滑剂,诸如硬脂酸镁或Sterotes;助流剂,诸如胶体二氧化硅;甜味剂,诸如蔗糖或糖精;或风味剂,诸如胡椒薄荷、水杨酸甲酯或橙子风味物。

[0282] 对于通过吸入施用,化合物以来自压力容器或分配器(其含有合适的推进剂,例如,诸如二氧化碳等气体)或喷雾器的气雾剂喷雾的形式递送。

[0283] 全身施用也可以通过透粘膜或透皮方式进行。对于透粘膜或透皮施用,在制剂中使用适合于待渗透的屏障的穿透剂。这样的穿透剂是本领域公知的,并且例如对于透粘膜施用,包括洗涤剂、胆盐和夫西地酸衍生物。透粘膜施用可以通过使用鼻喷雾剂或栓剂来实现。对于透皮施用,将活性化合物配制成如本领域公知的软膏、药膏、凝胶或乳膏。

[0284] 化合物也可以制备为栓剂(例如,使用常规栓剂基料诸如可可脂和其他甘油酯)或保留灌肠剂的形式以用于直肠递送。

[0285] 在一个实施方案中,活性化合物用保护化合物以防从体内快速消除的载体(诸如受控释放制剂,其包括植入物和微囊包封递送系统)制备。可以使用可生物降解的生物兼容性聚合物,诸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备此类制剂的方法对于本领域技术人员将是显而易见的。这些材料也可以从Alza Corporation

和Nova Pharmaceuticals,Inc.商购获得。脂质体悬浮液(其包括用针对病毒抗原的单克隆抗体靶向受感染细胞的脂质体)也可以用作药学上可接受的载体。这些可以根据本领域技术人员已知的方法制备,例如,如美国专利号4,522,811中所述。

[0286] 尤其有利的是,以容易施用和剂量均匀的剂量单位形式配制口腔或肠胃外组合物。如本文所用,剂量单位形式是指适合作为待治疗的受试者的单一剂量(unitary dosage)的物理分离单位;各单位含有预定量的活性化合物(其经计算以与所需的药物载体联合产生期望的治疗效果)。本发明的剂量单位形式的规格受控于并直接取决于活性化合物的独特的特征和待达到的特定治疗效果,以及在配混这样的活性化合物用于个体治疗的领域中固有的限制。

[0287] 药物组合物可以与施用说明书一起包括在容器、包装或分配器中。

[0288] 定义

[0289] 如本文(包括附随的权利要求书)中所用,单数形式的词诸如“一个”、“一种”和“该”包括其对应的复数指代,上下文另有明确规定除外。

[0290] 如本文所用,“mAb V8”是指如WO2020127618(通过引用整体并入)中所述的“分子11U:CD28(SA_变体8)(PG-LALA)、huIgG1 PG-LALA同种型中的CD28(SA_变体8)抗体”,其包含WO2020127618的SEQ ID NO:377和SEQ ID NO:378的氨基酸序列。

[0291] 如本文所用,“mAb V15”是指如WO2020127618(通过引用整体并入)中所述的“分子11W:CD28(SA_变体15)(PG-LALA)、huIgG1 PG-LALA同种型中的CD28(SA_变体15)抗体”,其包含WO2020127618的SEQ ID NO:381和SEQ ID NO:382的氨基酸序列。

[0292] 如本文所用,“CEA_CD28_V8”是指如WO2020127618(通过引用整体并入)中所述的“分子11B:CEA(A5H1EL1D)-CD28(SA变体8)1+1格式、双特异性huIgG1 PGLALA CrossFab分子,其在CD28(SA_变体8)Fab片段(杵)中具有带电修饰并在CEA(A5H1EL1D)Fab片段(臼)中具有VH/VL交换”,其包含WO2020127618的SEQ ID NO:351、352、355和356的氨基酸序列。

[0293] 如本文所用,“CEA_CD28_V15”是指如WO2020127618(通过引用整体并入)中所述的“分子11C:CEA(A5H1EL1D)-CD28(SA变体15)1+1格式、双特异性huIgG1 PGLALA CrossFab分子,其在CD28(SA_变体15)Fab片段(杵)中具有带电修饰并在CEA(A5H1EL1D)Fab片段(臼)中具有VH/VL交换”,其包含WO2020127618的SEQ ID NO:351、352、357和358的氨基酸序列。

[0294] 如本文所用,“mAb 14226P2”是指如WO2019246514(通过引用整体并入)中所述的“mAb14226P2(CD28亲本“A”)”,用于生成bs16429D(PSMA x CD28“A”)的抗-CD28臂,其包含WO2019246514的SEQ ID NO:81和83的氨基酸序列。

[0295] 如本文所用,“1a28/AC84/N”是指通过使用crossMAb/杵臼结构技术将mAb 14226P2的抗-CD28臂与抗-CEA臂AC84配对而产生并包含SEQ ID NO:122、123、124和125的氨基酸序列的基准CEAxCD28 bsAb。

[0296] 如本文所用,“TGN1412”是指如WO2006050949中所述的人IgG4同种型中的超激动剂(SA)抗-huCD28抗体,其包含SEQ ID NO:126和127的氨基酸序列。

[0297] 如本文所用,“HPN536类似物”是指如WO2018209304(通过引用整体并入)中所述的能够将T细胞复位向至MSLN-阳性靶细胞的三特异性MSLNxCD3xHSA分子,其包含WO2018209304的SEQ ID NO:100的氨基酸序列。

[0298] “亲和力”是指分子(例如,抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如,抗原)之

间的非共价相互作用的总和强度。除非另有说明,否则如本文所用,“结合亲和力”是指反映结合对(例如,抗体和抗原)的成员之间1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可以由解离常数(K_D)表示。亲和力可以通过本领域已知的常见方法测量,包括KinExA和Biacore。

[0299] 如本文所用,术语“抗体”包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、完全人抗体和嵌合抗体。

[0300] 如本文所用,除非另有说明,否则“抗原结合片段”是指抗体的抗原结合片段,即保留与全长抗体所结合的抗原结合的能力的抗体片段,例如保留一个或多个CDR区的片段。抗体结合片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv片段和单独的抗体重链或轻链,以及单独的重链或轻链可变区。

[0301] “Fab片段”由一条轻链以及一条重链的CH1和可变区组成。Fab分子的重链不能与另一个重链分子形成二硫键。“Fab片段”可以是抗体的木瓜蛋白酶切割的产物。

[0302] “Fc”区含有包含抗体的CH2和CH3结构域的两个重链片段。两个重链片段通过两个或更多个二硫键和通过CH3结构域的疏水相互作用保持在一起。

[0303] “Fab'片段”含有一条轻链和一条重链的一部分或片段,所述一部分或片段含有VH结构域和CH1结构域以及CH1与CH2结构域之间的区域,使得可以在两个Fab'片段的两条重链之间形成链间二硫键以形成$F(ab')_2$分子。

[0304] “F(ab')2片段”含有两条轻链和包含在CH1与CH2结构域之间的恒定区的一部分的两条重链,使得在两条重链之间形成链间二硫键。$F(ab')_2$片段因此由通过两条重链之间的二硫键保持在一起的两个Fab'片段组成。“F(ab')2片段”可以是抗体的胃蛋白酶切割的产物。“Fv区”包含来自重链和轻链两者的可变区,但缺乏恒定区。

[0305] “分离的抗体”是指纯化状态并且在这样的上下文中意味着分子大体上不含诸如核酸、蛋白质、脂质、碳水化合物等其他生物分子或诸如细胞碎屑和生长培养基等其他物质。通常,术语“分离的”不旨在指完全不存在此类物质或指不存在水、缓冲剂或盐,除非它们以实质性地干扰如本文所述的结合化合物的实验或治疗用途的量存在。

[0306] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指大体上同质的抗体群体,即,除了可以以微量存在的可能天然发生的突变之外,构成该群体的抗体分子在氨基酸序列上是相同的。相反,常规(多克隆)抗体制剂通常包括在其可变结构域中具有不同氨基酸序列的多种不同抗体,这些抗体通常对不同的表位具有特异性。修饰语“单克隆”指示抗体的特性是从大体上同质的抗体群体获得的,而不应被解释为需要通过任何特定的方法来产生抗体。例如,待根据本发明使用的单克隆抗体可以通过Kohler等人(1975)Nature 256:495首次描述的杂交瘤方法或者可以通过重组DNA方法(参见例如美国专利号4,816,567)制备。“单克隆抗体”也可以使用例如Clackson等人,(1991)Nature 352:624-628和Marks等人,(1991)J.Mol.Biol.222:581-597中描述的技术从噬菌体抗体库分离。也参见Presta(2005)J.Allergy Clin.Immunol.116:731。

[0307] 术语“完全人抗体”是指只包含人免疫球蛋白蛋白序列的抗体。如果在小鼠中、在小鼠细胞中或在来源于小鼠细胞的杂交瘤中产生,则完全人抗体可以含有鼠碳水化合物链。类似地,“小鼠抗体”是指只包含小鼠免疫球蛋白序列的抗体。或者,如果在大鼠中、在大鼠细胞中或在来源于大鼠细胞的杂交瘤中产生,则完全人抗体可以含有大鼠碳水化合物

链。类似地,“大鼠抗体”是指只包含大鼠免疫球蛋白序列的抗体。

[0308] 一般而言,基本的“抗体”结构单元包含四聚体。在单特异性抗体中,每个四聚体包括两对相同的多肽链,每对具有一条“轻”链(约25kDa)和一条“重”链(约50-70kDa)。每条链的氨基末端部分包括主要负责抗原识别的约100至110个或更多个氨基酸的“可变区”或“可变结构域”。重链的羧基末端部分可以限定主要负责效应子功能的恒定区。

[0309] 通常,人恒定轻链划分为κ轻链和λ轻链。此外,人恒定重链通常划分为μ、δ、γ、α或ε,并且将抗体的同种型分别定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。这些IgG的亚型包括例如IgG1和IgG4。

[0310] 如本文所用,“可变区”、“可变结构域”、“V区”或“V链”意指IgG链的序列在不同抗体之间可变的链段。抗体的“可变区”是指抗体轻链的可变区或抗体重链的可变区,单独或组合。重链的可变区可被称为“V_H”。轻链的可变区可被称为“V_L”。通常,重链和轻链两者的可变区包含三个高变区,也称为互补决定区(CDR),其位于相对保守的框架区(FR)内。CDR通常通过框架区进行比对,使得能够与特异性表位结合。一般而言,从N-末端到C-末端,轻链和重链可变结构域两者都包含FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。氨基酸向每个结构域的分配通常根据下述定义:Sequences of Proteins of Immunological Interest,Kabat等人;National Institutes of Health,Bethesda,Md.;第5版;NIH Publ.No.91-3242(1991);Kabat(1978)Adv.Prot.Chem.32:1-75;Kabat等人,(1977)J.Biol.Chem.252:6609-6616;Chothia等人,(1987)J Mol.Biol.196:901-917或Chothia等人,(1989)Nature342:878-883。

[0311] “CDR”是指抗体V_H.β-sheet框架的非框架区内的三个高变区(H1、H2或H3)中的一个,或抗体V_Lβ-sheet框架的非框架区内的三个高变区(L1、L2或L3)中的一个。因此,CDR是穿插在框架区序列内的可变区序列。CDR区是本领域技术人员熟知的并已被例如Kabat定义为抗体可变结构域内具有最大高变性的区。CDR区序列也已被Chothia在结构上定义为不是保守的.β-sheet框架的一部分的那些残基,并因此能够适应不同的构象。这两个术语在本领域都是公认的。CDR区序列也已由AbM、Contact和IMGT来定义。CDR在典型抗体可变区内的位置已通过许多结构的比较来确定(Al-Lazikani等人,1997,J.Mol.Biol.273:927-48;Morea等人,2000,Methods 20:267-79)。因为不同抗体中高变区内残基的数目不同,故在典型可变区编号方案(Al-Lazikani等人,出处同上)中,相对于典型位置的额外残基通常在残基数目旁用a、b、c等编号。这样的命名法同样为本领域技术人员所熟知。编号系统(包括例如Kabat编号和IMGT唯一编号系统)之间的对应关系是本领域技术人员熟知的。在一些实施方案中,CDR为如由Kabat编号系统所定义。在其他实施方案中,CDR为如由IMGT编号系统所定义。在还其他的实施方案中,CDR为如由AbM编号系统所定义。在仍其他的实施方案中,CDR为如由Chothia编号系统所定义。在还其他的实施方案中,CDR为如由Contact编号系统所定义。

[0312] 序列同一性是指当对两个序列进行最佳比对时两个多肽的氨基酸在等价位置处相同的程度。

[0313] 序列相似性包括相同的残基和不相同的生物化学上相关的氨基酸。上文讨论了共享相似的性质并且可以互换的生物化学上相关的氨基酸。

[0314] “保守修饰的变体”或“保守性置换”是指使用具有相似特征(例如,电荷、侧链尺

寸、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等)的其他氨基酸置换蛋白质中的氨基酸,使得通常可以做出这样的变化而不改变蛋白的生物活性。本领域技术人员认识到,一般而言,在多肽的非必需区中的单个氨基酸置换不会大大改变生物活性(参见例如Watson等人,(1987) Molecular Biology of the Gene,The Benjamin/Cummings Pub.Co.,p.224(第4版))。另外,结构或功能上相似的氨基酸的置换不太可能破坏生物活性。

[0315] 如本文所用,术语“表位”是指抗体或抗原结合片段与之结合的抗原上的区或区域。本文公开的抗体或其抗原结合片段与表位的结合意指抗体或其抗原结合片段与表位内的一个或多个氨基酸残基结合。

[0316] “分离的”核酸分子或多核苷酸意指DNA或RNA(例如,基因组的)、mRNA、cDNA、或合成来源或其某种组合,其不与其中分离的多核苷酸见于自然界中的多核苷酸的全部或一部分缔合,或者与其在自然界中不连接的多核苷酸连接。就本公开的目的而言,应理解,“包含”(或类似用语)特定核苷酸序列的“多核苷酸”不涵盖完整的染色体。除了指定的序列之外,“包含”特定核酸序列的分离的多核苷酸可以包含多达十个或甚至多达二十个或更多个其他蛋白质或者其部分或片段的编码序列,或者可以包含控制所叙述的核酸序列的编码区表达的可操作地连接的调控序列,和/或可以包含载体序列。

[0317] 短语“控制序列”是指特定宿主生物体中可操作地连接的编码序列的表达所必需的或有助于特定宿主生物体中可操作地连接的编码序列的表达的多核苷酸序列。适合于原核生物的控制序列例如包括启动子,任选地操纵子序列,和核糖体结合位点。已知真核细胞使用启动子、多聚腺苷酸化信号和增强子。在本发明的一个实施方案中,多核苷酸可操作地连接至启动子,诸如病毒启动子、CMV启动子、SV40启动子或非病毒启动子或延伸因子(EF)-1启动子;和/或内含子。

[0318] 当其与另一多核苷酸处于功能关系时,核酸是“可操作地连接的”。例如,如果其表达为参与多肽分泌的前蛋白,则前序列或分泌前导序列的DNA与多肽的DNA可操作地连接;如果其影响序列的转录,则启动子或增强子与编码序列可操作地连接;或者如果其被定位成便于翻译,则核糖体结合位点与编码序列可操作地连接。通常,但并不总是,“可操作地连接”意指所连接的多核苷酸序列是连续的,并且就分泌前导序列而言,其是连续的并且在阅读阶段。然而,增强子不必是连续的。连接(linking)通过在方便的限制性位点处进行连接(ligation)来完成。如果不存在这样的位点,则根据常规实践使用合成的寡核苷酸适配体或接头。

[0319] 如本文所用,表达“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用,并且所有这样的名称均包括子代。因而,词语“转化体”和“转化的细胞”包括原代受试者细胞和来源于其的培养物,而与转移的次数无关。还应理解,由于有意或无意的突变,故并非所有子代都具有完全相同的DNA内容物。包括与筛选出其的原始转化细胞具有相同功能或生物活性的突变子代。如果旨在使用不同的名称,则应从上下文可以清楚地看出。

[0320] 宿主细胞包括真核和原核宿主细胞,包括哺乳动物细胞。除了其他以外,宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NSO、SP2细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(例如,Hep G2)、A549细胞、3T3细胞和HEK-293细胞。哺乳动物宿主细胞包括人、小鼠、大鼠、犬、猴、猪、山羊、牛、马和仓鼠细胞。可以使用的其他细胞系有昆虫细胞系(例如,草地贪夜蛾(Spodoptera frugiperda)或粉纹夜蛾(Trichoplusia ni))、两

栖动物细胞、细菌细胞、植物细胞和真菌细胞。真菌细胞包括酵母和丝状真菌细胞,包括例如巴氏毕赤酵母(Pichia pastoris)、芬兰毕赤酵母(Pichia finlandica)、海藻毕赤酵母(Pichia trehalophia)、科克拉马毕赤酵母(Pichia koclamae)、膜状毕赤酵母(Pichia membranaefaciens)、小毕赤酵母(Pichia minuta)(Ogataea minuta、Pichia lindnen)、仙人掌毕赤酵母(Pichia opuntiae)、耐热毕赤酵母(Pichia thermotolerans)、柳毕赤酵母(Pichia salictaria)、Pichia guercuum、皮杰普毕赤酵母(Pichia pijperi)、具柄毕赤酵母(Pichia stiptis)、甲醇毕赤酵母(Pichia methanolica)、毕赤酵母属、酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)、酿酒酵母属、多形汉逊酵母(Hansenula polymorpha)、克鲁维酵母属、乳酸克鲁维酵母(Kluyveromyces lactis)、白色念珠菌(Candida albicans)、构巢曲霉(Aspergillus nidulans)、黑曲霉(Aspergillus niger)、米曲霉(Aspergillus oryzae)、里氏木霉(Trichoderma reesei)、勒克氏菌(Chrysosporium lucknowense)、镰刀菌属(Fusarium sp.)、禾谷镰刀菌(Fusarium gramineum)、菜镰刀菌(Fusarium venenatum)、小立碗藓(Physcomitrella patens)和粗糙脉孢菌(Neurospora crassa)。毕赤酵母属、任何酿酒酵母属、多形汉逊酵母(Hansenula polymorpha)、任何克鲁维酵母属、白色念珠菌(Candida albicans)、任何曲霉属、里氏木霉(Trichoderma reesei)、勒克氏菌(Chrysosporium lucknowense)、任何镰刀菌属、解脂耶氏酵母(Yarrowia lipolytica)和粗糙脉孢菌(Neurospora crassa)。本发明包括任何宿主细胞(例如,CHO细胞或毕赤酵母细胞,例如巴氏毕赤酵母(Pichia pastoris)),其含有抗-ILT4抗体或其抗原结合片段,或含有编码这样的抗体或片段的多核苷酸或含有包含所述多核苷酸的载体。

[0321] “治疗(treat/treating)”意指向具有疾病的一种或多种症状的受试者施用本发明的抗体或其抗原结合片段,所述抗体和抗原结合片段对该疾病有效,例如在治疗患有癌症或感染性疾病的受试者中,或在治疗疑似患有癌症或感染性疾病的受试者中,所述药剂对其具有治疗活性。通常地,以“有效量”或“有效剂量”施用抗体或片段,其将在所治疗的受试者或群体中缓解一种或多种症状(例如,癌症或感染性疾病的症状),无论是通过诱导这样的症状的消退或消除,还是通过抑制这样的症状的进展(例如,以任何临床可测量的程度抑制癌症症状,诸如肿瘤生长或转移)。抗体或片段的有效量可能会随因素诸如疾病分期、年龄和患者体重以及药物在受试者中引发所需反应的能力而异。

[0322] 实施例

[0323] 实施例1:使用含有固定的可变重结构域的人SCFV文库进行CD28FV的噬菌体展示选择

[0324] Vaughan等人(Nat.Biotech.1996,14:309-314)中描述了用于构建和处理M13噬菌体上展示的人scFv文库的一般程序,该文献据此全文以引用方式并入。用于选择和筛选的文库编码scFv,它们均共享相同的VH结构域并仅在VL结构域中多样化。US2012/0184716和WO 2012/023053中描述了用于生成固定VH文库的方法及其用于鉴定和组装双特异性抗体的用途,这些专利中的每一个据此全文以引用方式并入。下文描述了鉴定与人CD28(huCD28)结合的scFv的程序。在具有生物素化huCD28蛋白的溶液中和/或在表达huCD28的细胞上进行选择。选择策略包括至多4轮选择:(i)在重组蛋白上,(ii)交替重组蛋白和细胞,(iii)在重组蛋白上2轮,然后在细胞上2轮。

[0325] 蛋白质选择

[0326] 用含有2％(w/v)脱脂乳的PBS封闭scFv噬菌体文库的等分试样。首先在链霉亲和素/中性亲和素磁珠(Dynabeads™MyOne™链霉亲和素T1磁珠或Sera-Mag SpeedBeads Neutravidin™包被磁颗粒)上取消选择封闭的噬菌体,然后与200nM、100nM、50nM或5nM的生物素化重组人CD28(CD8-H82E5,Acro Biosystems)一起预温育。然后用封闭的磁珠(用于取消选择的相同种类)捕获噬菌体+抗原混合物,用PBS/0.1％Tween®20洗涤五次并用仅PBS洗涤两次。用1mg/mL胰蛋白酶洗脱噬菌体,并在加入AEBSF来封闭胰蛋白酶活性后,直接加到以指数生长的TG1细胞中。对受感染的TG1的等分试样进行连续稀释以滴定选择产出物。然后回收产出物并用于下一轮选择。

[0327] 细胞表面选择

[0328] 用含有10％ FBS的PBS封闭含有噬菌体的上清液。首先在CD28NEG TIB-153细胞(ATCC TIB 153)上取消选择封闭的噬菌体,然后在CD28POS Jurkat细胞(Jurkat Clone E6-1,ATCC TIB 152)上选择。将细胞沉淀并用含有10％ FBS的PBS洗涤五次,然后用仅PBS洗涤一次。用1mg/mL胰蛋白酶洗脱噬菌体,并在加入AEBSF来封闭胰蛋白酶活性后,直接加到以指数生长的TG1细胞中。对受感染的TG1的等分试样进行连续稀释以滴定选择产出物。然后回收产出物并用于下一轮选择。

[0329] 实施例2:筛选与人CD28结合/不结合的SCFV

[0330] 使用生物素化的huCD28-His(或生物素化的huCEA_ECD作为阴性对照)通过ELISA或使用CD28POS(Jurkat)和CD28NEG(TIB-153)细胞通过流式细胞术来测试与CD28结合的scFv的筛选。

[0331] 对于结合ELISA,用在PBS中的1％酪蛋白封闭中性亲和素包被板。以5nM捕获生物素化的huCD28-His和生物素化的huCEA_ECD。将含有所选scFv的新鲜制备的周质提取物的稀释液施加到板并使用小鼠抗-c-myc抗体和驴抗小鼠IgG HRP抗体的组合进行检测。使用微孔板分光亮度计测量在加入™B后生成的450nm处的OD。如果不能够与不相关的huCEA蛋白结合并且如果huCD28上的OD450比背景OD450高至少3倍,则将命中物归类为特异性结合剂。

[0332] 对于流式细胞术结合测定,收获细胞,洗涤并以150’000或200’000个细胞/孔分配到V形底96孔板中。将含有所选scFv的新鲜制备的周质提取物的稀释液与小鼠抗-c-myc抗体一起预温育并加到细胞中。温育后,洗涤细胞,与山羊抗小鼠IgG-APC检测抗体一起温育,并在iQUE3筛选设备(Sartorious)中分析。如果至少5％的细胞在CD28POS Jurkat细胞上显示出比背景的GeoMFI高3倍的结合信号并且如果在CD28NEG TIB-153细胞上未观察到这样的信号,则将命中物归类为阳性和特异性。

[0333] 在从单个克隆提取DNA后对阳性和特异性命中物测序。

[0334] 实施例3:固定的VH候选物重新格式化为IGG和在哺乳动物细胞中瞬时表达

[0335] 在筛选和测序之后,将具有所需结合性质的scFv候选物重新格式化为IgG并通过瞬时转染到PEAK细胞中来表达。将所选scFv的VH和VL序列用特异性寡核苷酸扩增并克隆到含有重链和轻链恒定区的表达载体中。通过测序验证表达载体并根据制造商的说明使用Lipofectamine 2000(Thermo Fisher Scientific)转染到哺乳动物细胞中。简言之,在T75烧瓶中在25ml含有胎牛血清的培养基中培养$4x10^6$个PEAK细胞。将转染的细胞在37℃下培养5-6天,使用Octet RED96仪器定量IgG的产生。收获上清液,根据制造商的说明在FcXL亲和树脂(Thermo Fisher Scientific)上进行IgG纯化。简言之,将来自转染的细胞的上清液

与适量的FcXL树脂一起在4℃下温育过夜。在用PBS洗涤树脂后,将样品上样到Amicon Pro柱上,然后在50mM甘氨酸(pH 3.5)中洗脱IgG。然后将洗脱的IgG级分用Amicon 50kDa针对组氨酸NaCl pH 6.0缓冲剂进行透析并通过在280nm处的吸收定量IgG含量。根据制造商的说明(Agilent Technologies),使用Agilent Bioanalyzer 2100通过电泳验证纯度和IgG完整性。

[0336] 实施例4:抗-CD28 MAB与CD28-阳性JURKAT细胞的结合

[0337] 使用CD28-阳性Jurkat细胞(Jurkat克隆E6-1,ATCC TIB 152)通过流式细胞术评估本发明的抗-CD28抗体臂的结合能力(以二价mAb的形式测试)。

[0338] 收获细胞、检查活力并计数。将200'000个细胞与在FACS缓冲液(PBS2% BSA,0.1% NaN3)中稀释的增加浓度的抗体一起于4℃温育15分钟。用冷FACS缓冲液洗涤细胞两次,并与合适的抗-人IgG二抗一起再于4℃再温育15分钟。用冷FACS缓冲液洗涤细胞两次,并与相容的活力标志物一起重悬于150μl FACS缓冲液中。使用Cytoflex平台(Beckman Coulter)通过流式细胞术测量抗体与活细胞的结合。用FlowJo™v10软件(BD Life Sciences)分析数据,并使用GraphPad Prism 9软件绘制剂量-反应结合曲线。

[0339] 图1A-1C示出了一系列κλ-体兼容性抗CD28臂的所得结合曲线。超激动剂抗CD28 mAb TGN1412和不相关的hIgG1 mAb分别用作阳性和同种型对照,并在所有示出的实验中用于比较。三张图上示出的代表在连续噬菌体展示活动期间鉴定出的抗-CD28候选物的广谱结合曲线凸显了通过噬菌体展示鉴定出了一组对CD28具有不同结合亲和力的抗-CD28抗体臂的事实。

[0340] 实施例5:携带Λ和K轻链的双特异性抗体的表达和纯化

[0341] 在同一细胞中同时表达一条重链和两条轻链可以导致三种不同抗体的组装。同时表达可以以不同的方式实现,诸如表达待共表达的链中之一的多个载体的转染或通过使用驱动多个基因表达的载体。

[0342] 这里,将两条轻链克隆到先前生成的载体pNoviκHλ中以允许一条重链、一条κ轻链和一条λ轻链的共表达,如US20120184716和WO2012023053中所述,其中每一篇均据此全文以引用方式并入。这三个基因的表达由人巨细胞病毒启动子(hCMV)驱动,并且载体还含有谷氨酰胺合成酶基因(GS),该基因使得能够选择和建立稳定的细胞系。将抗-CD28 IgG和抗-CEA IgG的共同VH和VL基因克隆到载体pNoviκHλ中,以在哺乳动物细胞中瞬时表达。将Expi293细胞在具有合适数量的细胞和培养基体积的适当锥形烧瓶中悬浮培养。使用PEI将质粒DNA转染到Expi293细胞中。使用Octet RED96在生产过程中测量转染的细胞的上清液中的抗体浓度。根据抗体浓度,在转染后5至7天收获上清液,并在添加硅藻土(Sartorius)后通过过滤进行澄清。纯化基于三步纯化过程。首先,用PBS洗涤CaptureSelect™FcXL亲和基质(Thermo Fisher Scientific),然后加到澄清的上清液中。在+4℃和20rpm下温育过夜后,将上清液以2000g离心10分钟,储存流过物(flow through),并用PBS洗涤树脂两次。然后,将树脂转移到Amicon Pro柱上,并使用pH 3.5的含有50mM甘氨酸的溶液进行洗脱。生成若干洗脱级分,用Tris-HCl pH7.4中和并合并。使用Nanodrop分光亮度计(NanoDrop Technologies)定量含有总人IgG(双特异性抗体和两种单特异性抗体)的合并物。将一小部分试样储存起来以供进一步分析,剩余样品在室温和20rpm下与适当体积的CaptureSelect™KappaXL亲和基质(Thermo Fisher Scientific)一起温育30分钟。如上所

述进行树脂回收和洗涤、洗脱及中和步骤。使用CaptureSelect™λFab亲和基质(Thermo Fisher Scientific)、应用与κ纯化步骤相同的过程进行最后一个亲和纯化步骤。或者,纯化基于两步纯化过程,其中仅使用CaptureSelect™KappaXL亲和基质和CaptureSelect™λFab亲和基质。合并所有洗脱级分,并使用50kDa Amicon Ultra离心过滤单元(Merck Millipore)用His-NaCl pH 6.0制剂缓冲剂脱盐。使用Nanodrop定量最终产物。

[0343] 如制造商(Agilent Technologies)所述,使用Agilent 2100Bioanalyzer和Protein 80试剂盒,在变性和还原条件下通过电泳分析经纯化的双特异性抗体。通过SEC-UPLC确定聚集水平。使用鲎变形细胞溶解物试验(LAL;Charles River Laboratories)测试所有样品的内毒素污染。表2汇总了所生成的CEAxCD28和MSLNxCD28κλ-双特异性抗体。

[0344] 实施例6:CEAXCD28双特异性抗体的体外表征

[0345] 测试了CEAxCD28 bsAb与CD28-阳性Jurkat细胞、CEA-阳性LS174T细胞或CEA和CD28双阴性TIB153细胞的结合。为了证实CD28xCEAκλ-体与靶细胞的结合,进行了一系列基于流式细胞术的实验。

[0346] 可以使用的细胞的实例包括CEA-阳性细胞系如结直肠腺癌细胞系LS174T、CD28-阳性细胞系如白血病Jurkat T细胞以及CEA和CD28双阴性细胞系如白血病TIB153细胞。如实施例4中所述进行细胞染色和结合评估。

[0347] 使用Jurkat、LS174T和TIB153细胞获得的本发明的CEAxCD28 bsAb的结合曲线分别在图2A、2B、2C和2D中示出。在κλ-体之上,引入了其他抗体作为参考抗体:hIgG1表示hIgG1 Fc的不相关单克隆抗体,其充当同种型对照;1a28/AC84/N表示LALAPA-突变huIgG1,基于WO2019246514A1中描述的抗-CD28抗体臂mAb14226P2的1+1双特异性分子,其使用WO2021110647中描述的抗-CEA臂AC84作为靶向臂并包含SEQ ID NO:122、123、124和125的氨基酸序列;而CEA_CD28_V8和CEA_CD28_V15对应于WO2020127618中描述的CEAxCD28双特异性抗体,在其中分别称为分子11B和分子11C。

[0348] Jurkat细胞上的结合强调了本发明的所选抗-CD28臂对huCD28的结合亲和力的范围,这与已公布的抗-CD28抗体臂一致或具有较低的结合亲和力(图2A和2B)。LS174T细胞上的结合凸显了共享相同的抗-CEA臂的抗体如何与细胞类似地结合,其中所有含AC84的抗体(高亲和力抗-CEA臂)均显示出等同的剂量-范围曲线,其次是两种CEA_CD28(V8和V15),这两者都含有相同的中等亲和力抗-CEA臂,最后是基于较低亲和力抗-CEA臂AC61的唯一分子AC61AI7/N(图2C)。TIB-153上不存在结合信号表明本发明的所有结合臂都对指定的靶标具有特异性(图2D)。

[0349] 实施例7:湿板和干板包被T-细胞增殖测定

[0350] 为了排除具有超激动剂活性的抗-CD28臂,使用湿板和干板包被T-细胞增殖测定评估了在不存在信号1的情况下CD28 bsAb诱导T细胞增殖的能力。

[0351] 用在PBS中稀释至10μg/ml的抗体包被96-孔聚丙烯板过夜,或在4℃下用100μl抗体溶液(湿法包被)进行或于室温、未密封地在II类层流柜中(以允许缓冲液蒸发=干法包被)用50μL抗体溶液进行。在任一包被程序之后,用PBS洗涤板两次。同时,根据制造商的说明,用CellTrace Violet细胞增殖试剂盒(ThermoFischer Scientific)对从健康供体获得的血沉棕黄层分离出的PBMC进行染色。将100'000个经染色的PBMC细胞以200uL/孔的最终体积加到96-孔板中并在37℃+5% CO2下温育6天。然后如实施例4和6b中所详述的收获细

胞并使用抗-CD4-APC(ThermoFischer,17-0049-41)和抗-CD8-PerCP-Cy5.5(BioLegend,301032)染色以进行流式细胞术评估。使用CytoFLEX(Beckman Coulter)通过流式细胞术测量CellTrace Violet染色的水平来计算活CD4+和CD8+T细胞的增殖速率,并通过FlowJo软件评价两种包被程序的结果(图3A-3D)。CD28 SA抗体TGN1412充当阳性对照,同时在不存在任何抗体(仅PBS)的情况下测定T细胞的背景增殖速率。三种CEAxCD28 bsAb 1a28/AC84/N、CEA_CD28_V8和CEA_CD28_V15(如上所述)及其各自的亲本抗-CD28单克隆抗体mAb 14226P2、mAb V8和mAb V15被纳入作为参考抗体。

[0352] 除了诱导了轻度但显着的T细胞增殖的候选物AI19AC84/N外,所有其他测试的候选物都导致了与用两种包被程序由媒介物对照(PBS)所诱导的一致的CD4+和CD8+T细胞增殖,从而排除了这些抗-CD28臂的不需要的超激动性质。候选物AI19AC84/N被谨慎地排除在进一步分析之外。

[0353] 与本发明的所有抗-CD28臂(AI19臂除外)相反,WO2020127618中描述的抗-CD28臂V8和V15表现出一些超激动活性,无论是作为单克隆抗体(mAb V8和mAb V15)还是作为双特异性CEAxCD28抗体(CEAxCD28 V8和CEAxCD28 V15),如通过在两种实验条件(湿法和干法包被)下对静息CD4+和CD8+T细胞的增殖的诱导所确定。未观察到抗-CD28臂14226P2的超激动活性,无论是作为单克隆抗体(mAb 14226P2)还是作为bsAb 1a28/AC84/N的一部分。

[0354] 实施例8:T细胞活化生物测定(IL-2启动子)

[0355] 一旦排除了可能的超激动活性,就使用双特异性格式的IL-2报告系统即CEAxCD28 bsAb来评估一系列抗-CD28臂使T细胞表面处的CD28共刺激受体激动的能力。

[0356] Promega(J1651)开发的T细胞活化生物测定(IL-2)试剂盒含有工程化的Jurkat T细胞,这些细胞表达由IL-2启动子驱动的荧光素酶报告基因。在CD3和CD28刺激物两者的存在下,受体介导的信号传导会诱导IL-2通路的激活,这会导致工程化Jurkat T细胞的发光。由于CD28 bsAb需要T细胞信号1提供者和TAA-阳性靶细胞系两者来共刺激T细胞,故该测定在CEA-阳性MKN-45细胞和CEAxCD3(一种CEAxCD3双特异性κλ-体,其包含SEQ ID NO:118的共同重链HC、SEQ ID NO:119的κ轻链、SEQ IDNO:120的λ轻链,最初描述于WO2021053587中)的存在下进行。

[0357] 简言之:将37,500个肿瘤靶细胞(MKN-45)与75000个IL-2报告细胞(E:T=2:1)一起在单独的固定剂量(1nM)的CEAxCD3或其与增加浓度的CEAxCD28双特异性抗体的组合的存在下于37℃温育6小时。或者,将CEAxCD3替换为Y4L3-1/N,这是一种非靶向的抗-CD3 bsAb,包含SEQ ID NO:118的共同重链HC、SEQ ID NO:121的κ轻链、SEQ ID NO:120的λ轻链。测量前,将板于室温平衡15分钟。向细胞添加75ul底物(Bio-Glo试剂,Promega)并在于室温避光温育5-10分钟后用SpectraMax i3X发光计(Molecular Devices)测量发光(相对发光单位)。

[0358] 在存在基础CD3刺激(1nM CEAxCD3)的情况下,随着CEAxCD28bsAb浓度的增加,观察到IL-2启动子介导的发光的浓度依赖性升高,表明了经由bsAb的抗-CD28臂的适当CD28刺激,从而导致增强的T细胞活化。在不存在靶细胞的情况下或在将CEAxCD3替换为Y4L3-1/N(一种无法递送T细胞活化信号1的非靶向CD3 bsAb)时,没有观察到T细胞活化(图4)。

[0359] 该报告基因测定法证实,本发明的CEAxCD28双特异性抗体仅在存在(1)CEA-阳性靶细胞和(2)原代T细胞活化(信号1)的情况下才可以增强T细胞反应。

[0360] 实施例9:由CEAXCD28双特异性抗体介导的T-细胞依赖性细胞毒性(TDCC)

[0361] CEA阳性和CEA阴性细胞系的TDCC

[0362] 使用人PBMC或经纯化的原代T-细胞作为效应细胞,与CEAxCD3bsAb组合地评估了本发明的CEAxCD28双特异性抗体诱导的不同CEA-阳性和CEA-阴性肿瘤细胞系的T-细胞依赖性细胞毒性(TDCC)。

[0363] 在用PBS洗涤两次后,用胰蛋白酶或细胞解离溶液分离靶细胞。离心步骤后,将细胞重悬于测定培养基中,调节至所需浓度,并铺板在96-孔板中。

[0364] 效应细胞可以是人外周血单核细胞(PBMC)或经纯化的T-细胞。使用SepMate™管(Stemcell Technologies)和Lymphoprep™缓冲液(Stemcell Technologies)来从源自健康人供体的血沉棕黄层中分离出PBMC。如果使用经纯化的T-细胞作为效应细胞,则进行额外的纯化步骤,其中使用T-细胞免疫磁性阴性选择试剂盒(STEMCELL Technologies)来从PBMC中阴性分离T-细胞。

[0365] 对于TDCC测定,当使用PBMC作为效应细胞时,它们以10:1的最终E:T比率(除非另有说明)添加到靶细胞中;当使用经纯化的T-细胞时,使用5:1的最终E:T比率。将一定剂量范围的CEAxCD3和固定剂量的本发明的CEAxCD28抗体(2.5、1.0、0.5或0.1μg/mL)添加到预铺板的靶细胞和效应细胞中。或者,可以使用非靶向的CD3 bsAb(Y4L3-1/N)代替CEAxCD3。在于37℃、5% CO2下温育24小时、48小时、72小时或6天后,通过定量(除非另有说明)由凋亡/坏死细胞(细胞毒性检测试剂盒PLUS(LDH),Roche)释放到培养基中的LDH来评估靶细胞杀伤。通过将靶细胞与试剂盒提供的裂解液一起温育来获得最大LDH释放(=100%裂解)。自发性LDH释放(=0%裂解)是指与效应细胞共温育而不添加任何抗体的靶细胞。使用GraphPad Prism 9绘制TDCC曲线(图5A-5D和6A-6B)。或者,不使用LDH释放,而使用基于ATP定量的测定(Promega,CellTiter-Glo®活力测定#G7571)。在这种情况下,在摇动平台上摇动板以将PBMC重悬于上清液中。然后用PBS洗涤板两次以去除所有PBMC。同时,重构来自试剂盒的试剂并在室温下稳定10分钟。随后,在每个孔中加入100μL重构的试剂并在室温下温育10分钟,避免直射光。使用微孔板读数器以发光采集模式(Spectra i3Max)测量来自孔中剩余活靶细胞中所含的三磷酸腺苷(ATP)的发光信号。使用下式计算特异性裂解的百分比:特异性裂解%=[1-(样品值)/(效应物+靶标)]×100,其中效应物+靶标对应于在不存在抗体时的基线值。然后用GraphPad Prism软件分析特异性裂解结果。

[0366] CEAxCD28 bsAb与CEAxCD3 bsAb协同作用而杀伤表达26'000CEA/细胞的CEA-阳性LS174T靶细胞(图5A-5D)。图中示出了在存在一定剂量范围的CEAxCD3和1μg/mL固定剂量的CEAxCD28抗体的情况下由两个PBMC供体诱导的杀伤。可以以在测试的最大浓度下较低的EC50或较高的总体杀伤或两者观察到协同作用。重要的是,如果把CEAxCD3替换为Y4L3-1/N(一种无法向效应细胞递送信号1的非靶向CD3 bsAb),则CEAxCD28 bsAb不诱导杀伤,这凸显了原代T细胞刺激(信号1)对CD28 bsAb的活性的重要性。BsAbs 1a28/AC84/N和CEA_CD28_V8(如上所述)被纳入作为参考CEAxCD28 bsAb并显示出与测试的κλ-体相当的杀伤,但候选物AI11AC84/N除外,其始终导致较弱的体外活性。

[0367] CEAxCD3 bsAb与CEAxCD28 bsAb之间的协同作用不是细胞系特异性的,因为分别表达15'000和~1'000CEA/细胞的KATO-III和HT-29细胞被CEAxCD3(以剂量反应)和CEAxCD28(2.5μg/mL)bsAb组合比被单独的CEAxCD3 bsAb更高效地杀伤(图6A-5B)。纳入了

bsAb 1a28/AC84/N(如上所述)作为参考CEAxCD28 bsAb。

[0368] 在CEAxCD3和CEAxCD28 bsAb的组合诱导表达CEA的肿瘤细胞的杀伤后T-细胞活化标志物的上调

[0369] CEAxCD3 bsAb诱导的CEA-阳性肿瘤细胞的杀伤基于T细胞活化。CD28共刺激可以进一步提高T细胞的活化状态。因此,使用识别特定T细胞活化标志物如CD69(早期活化标志物)或CD25(晚期活化标志物)的抗体通过流式细胞术量化了CEAxCD28κλ-体在存在适当的信号1的情况下增强T细胞活化的能力。

[0370] 为了评估杀伤测定结束时T细胞的活化状态(在实施例9a中详述),遵循以下步骤:将漂浮的细胞(包括CD4+和CD8+T-细胞两者)转移到新的V形底96孔板中。通过离心去除上清液,并用冷FACS缓冲液(PBS2%BSA、0.1% NaN3)洗涤细胞两次,然后与Fc-封闭试剂(BD Biosciences)一起于4℃温育15分钟。在用FACS缓冲液洗涤两次后,将细胞与以下抗体一起于4℃温育15分钟:抗-CD69-FITC(BioLegend)、抗-CD8-PerCP-Cy5.5(BioLegend)、抗-CD25-PE(BioLegend)和抗-CD4-APC(ThermoFisher)。洗涤细胞并使用Cytoflex平台(Beckman Coulter)通过流式细胞术进行分析。使用FlowJo™v10软件(BD Life Sciences)分析数据。图7A-7B中示出了其中在一定剂量范围的CEAxCD3与1ug/mL固定剂量的CEAxCD28 bsAb的存在下以10:1的E:T比率将LS174T细胞与PBMC共培养72小时的实验的结果。

[0371] 通过定量CD4+和CD8+T细胞两者的表面处的晚期活化标志物CD25来测量T细胞活化(分别地,图7A和7B)。与用CEAxCD3的单一处理相比,CEAxCD3和CEAxCD28 bsAb的组合在更大程度上活化了CD4+和CD8+T细胞两者,对于组合处理,CD25染色远更亮。纳入了bsAb1a28/AC84/N(如上所述)作为参考CEAxCD28 bsAb。

[0372] 在存在CEAxCD3 bsAb的情况下由CEAxCD28 bsAb介导的CD28共刺激对T细胞增殖的影响。

[0373] 分析了CEAxCD28 bsAb在CEA-阳性肿瘤靶细胞的存在下增强CEAxCD3在诱导T细胞增殖方面的作用的能力。根据制造商的说明,用CellTrace Violet细胞增殖试剂盒(ThermoFischer Scientific)对新鲜分离的人PBMC染色,洗涤并在一定剂量范围的CEAxCD3和所指示的固定剂量的CEAxCD28 bsAb的存在下以10:1的最终E:T比率(除非另有说明)与靶细胞一起共培养五至六天。共培养后,收获效应细胞,洗涤,用合适的活力标志物染色以排除死细胞,并用抗-CD4-APC(ThermoFischer,17-0049-41)和抗-CD8-PerCP-Cy5.5(BioLegend,301032)染色以鉴定感兴趣的群体。使用CytoFLEX(Beckman Coulter)通过流式细胞术测量活CD4+或CD8+T细胞上CellTrace Violet染色强度的水平来计算T细胞的增殖速率。通过FlowJo软件评价数据并使用GraphPad Prism绘图(图8A-8B)。

[0374] 增殖性CD4+和CD8+T细胞的百分比分别在图8A和8B中示出。通过添加2.5μg/mL CEAxCD28 bsAb,CEAxCD3 bsAb诱导T细胞增殖的能力大大增强,并且CD4+和CD8+T细胞对组合处理的反应同等地好。

[0375] 通过用CEAxCD28 bsAb共刺激CD28增强表达CEA的肿瘤细胞的杀伤后在上清液中释放的细胞因子

[0376] 通过在TDCC测定结束时定量上清液中选定的细胞因子来评估本发明的CD28双特异性抗体在CEAxCD3的存在下杀伤表达CEA的肿瘤细胞后增强T细胞释放细胞因子的能力。在如实施例9中所述共培养CEA-阳性靶细胞和含T细胞的PBMC之后,通过离心收获培养物上

清液并于-80℃冷冻保存,直至进一步分析。使用Mesoscale Discovery平台通过使用多重试剂盒对细胞因子/酶如颗粒酶B、IL2、IL6、IL10、TNFα和IFNγ定量。图9A-9F中示出了其中在一定剂量范围的CEAxCD3与1μg/mL固定剂量的CEAxCD28的存在下以5:1的E:T比率将LS174T细胞与PBMC共培养72小时的实验的结果。纳入了bsAb 1a28/AC84/N(如上所述)作为参考CEAxCD28 bsAb。

[0377] 用CEAxCD3进行单一药剂处理导致T细胞中等程度释放细胞因子,而CEAxCD3与任何测试的CEAxCD28 bsAb的组合处理大大增加了所有测量的细胞因子,这反映在先前观察到的更好的T细胞活化和增殖上。

[0378] 实施例10:在人源化小鼠肿瘤模型中评价CD28 BSAB介导的T细胞共刺激对CEAXCD3 T-细胞重靶向BSAB的抗肿瘤活性的影响

[0379] AI3AC84/N和AI5AC84/N在PBMC-人源化小鼠肿瘤模型中的抗肿瘤活性

[0380] 本功效研究旨在评估两种携带中等亲和力抗-CD28(AI3和AI5)的CEAxCD28κλ-体在与CEAxCD3组合时的抗肿瘤作用。

[0381] 实验设计汇总在图10中,其中还示出了治疗组和治疗方案。简言之:将$1x10^6$ LS174T细胞与$1x10^6$ PBMC(E:T=1:1)皮下共植入到7-8周龄的NOG小鼠(NOD/Shi-scid/OL-2Rγnull小鼠,Taconic Biosciences)中,并在随机分组后在植入7天后开始治疗。每周两次以10mg/kg共注射CEAxCD3和CEAxCD28 bsAb,共注射6次。每周2至3次监测小鼠的肿瘤发展并用数显卡尺测量肿瘤,直至实验终点(肿瘤体积=1500mm^3或GvHD症状发作)。使用式(长x宽^2)x 0.5计算肿瘤体积。图11A-11B示出了每组(图11A)和小鼠(图11B)的肿瘤生长动力学(平均值+SEM)。

[0382] 在用CEAxCD3治疗的小鼠中,仅观察到相对于媒介物组的轻微肿瘤生长抑制。然而,AI3AC84/N和AI5AC84/N两者与CEAxCD3的组合均诱导了完全肿瘤消退,在植入后第28天(治疗完成时)触诊时检测不到肿瘤。实验在第41天停止:CEAxCD3+AI5AC84/N组的小鼠仍然无肿瘤,而CEAxCD3+AI3AC84/N组则相反,其中2只小鼠复发并具有缓慢生长的肿瘤。

[0383] AI3AC84/N(在剂量范围内测试)和AI10AC84/N在PBMC-人源化小鼠肿瘤模型中的抗肿瘤活性

[0384] 该功效研究旨在评估与CEAxCD3组合,一定剂量范围的携带中等亲和力抗-CD28臂(AI3)的CEAxCD28κλ-体的抗肿瘤作用,并将其与携带较低亲和力抗-CD28臂(AI10)的CEAxCD28κλ-体抗肿瘤作用进行比较。

[0385] 实验设计汇总在图12中,其中还示出了治疗组和治疗方案。简言之:将$1x10^6$ LS174T细胞与$1x10^6$ PBMC(E:T=1:1)皮下共植入到7-8周龄的NOG小鼠(NOD/Shi-scid/OL-2Rγnull小鼠,Taconic Biosciences)中,并在随机分组后在植入7天后开始治疗。每周两次以所指示的剂量共注射CEAxCD3和CEAxCD28 bsAb,共注射6次。每周2至3次监测小鼠的肿瘤发展并用数显卡尺测量肿瘤,直至实验终点(肿瘤体积=1500mm^3或GvHD症状发作)。使用式(长x宽^2)x 0.5计算肿瘤体积。图13A-13B示出了每组(图13A)和小鼠(图13B)的肿瘤生长动力学(平均值+SEM)。

[0386] 在用CEAxCD3治疗的小鼠中仅观察到相对于媒介物组的轻微肿瘤生长抑制,而CD28 bsAb与CEAxCD3的所有组合都诱导了重要但不同的抗肿瘤活性。更具体地,最高剂量的AI3AC84/N(10mg/kg)在6/8的小鼠中导致了完全肿瘤消退,其余2只小鼠中有可触及但不

可测量的肿瘤;中间剂量的AI3AC84/N(2mg/kg)导致了强效肿瘤控制并且没有复发的肿瘤,所有肿瘤体积最终都下降至<50mm^3(仅在1只小鼠中观察到完全肿瘤根除);最低剂量(0.4mg/kg)导致了不同的肿瘤控制,一半小鼠的肿瘤被根除,而另一半小鼠的治疗仅导致肿瘤生长延迟。用10mg/kg AI10AC84/N(一种含有较低亲和力抗-CD28臂(AI10)的CEAxCD28 bsAb)进行的治疗功效总体上不如用同等剂量的AI3AC84/N进行的治疗,其中2只小鼠仅观察到肿瘤生长延迟,并且仅在3只小鼠中观察到完全肿瘤根除。

[0387] 实施例11:MSLNXCD28双特异性抗体的体外表征

[0388] MSLNxCD28 bsAb与CD28-阳性Jurkat细胞、MSLN-阳性H226和OVCAR-3细胞或MSLN和CD28双阴性TIB153细胞的结合。

[0389] 为了证实MSLNxCD28κλ-体与靶细胞的结合,进行了一系列基于流式细胞术的实验。

[0390] 可以使用的细胞的实例包括MSLN-阳性细胞系如间皮瘤细胞系H226或卵巢腺癌细胞系OVCAR-3、CD28-阳性细胞系如白血病Jurkat T细胞以及MSLN和CD28双阴性细胞系如白血病TIB153细胞。H226和OVCAR-3细胞的间皮素细胞表面表达分别测得为180’000和68’000MSLN/细胞。如实施例4中所述进行细胞染色和结合评估。

[0391] 使用H226、OVCAR-3、Jurkat和TIB153细胞获得的本发明的MSLNxCD28 bsAb的结合曲线分别在图14A、14B、14C和14D中示出。本发明的另外的MSLNxCD28 bsAb与H226、OVCAR-3、Jurkat和TIB153细胞的结合曲线分别在图17A、17B、17C和17D中示出。hIgG1表示hIgG1 Fc的不相关单克隆抗体,其充当同种型对照。

[0392] 与H226和OVCAR-3细胞的结合强调了共享相同抗-MSLN臂的抗体如何相似地并且以高亲和力与MSLN-阳性细胞结合(图14A和14B以及图17A和17B)。与Jurkat细胞的结合反映了AI5与AI10臂的结合亲和力的差异(图14C),但凸显了AI5与AI3臂的结合亲和力的相似性(图17C),这与用本发明的CEAxCD28 bsAb生成的数据一致。TIB-153上不存在结合信号表明本发明的所有结合臂都对指定的靶标具有特异性(图14D和17D)。

[0393] 实施例12:由MSLNXCD28双特异性抗体介导的T-细胞依赖性细胞毒性(TDCC)

[0394] MSLN阳性细胞系的TDCC

[0395] 如实施例9中所述评估由本发明的MSLNxCD28双特异性抗体诱导的不同MSLN-阳性细胞系的T-细胞依赖性细胞毒性(TDCC)。与HPN536类似物(一种能够将T细胞复位向至MSLN-阳性靶细胞的三特异性MSLNxCD3xHSA分子)组合地测试了MSLNxCD28 bsAb。图15A和15D示出了以H226细胞作为靶标、用一定剂量范围的HPN536类似物和1或0.1μg/mL固定剂量的MSLNxCD28 bsAb获得的TDCC曲线。图18A-18D示出了以OVCAR3细胞作为靶标(在不同的E:T比率下)、用一定剂量范围的HPN536类似物和2.5μg/mL固定剂量的MSLNxCD28 bsAb获得的TDCC曲线。

[0396] MSLNxCD28 bsAb与HPN536类似物协同作用而杀伤MSLN-阳性H226靶细胞。在任一测试浓度(1与0.1μg/mL)下,对大多数MSLNxCD28 bsAb都可以观察到协同作用,但最显着的是携带035或041作为靶向抗-MSLN臂的bsAb。AI5035和AI5041在0.1以及1ug/ml下获得了几乎相同的特异性裂解最大值(50％至60％之间),而用较低亲和力的AI10臂获得的最大裂解在40％至60％之间。重要的是,如果把HPN536类似物替换为Y4L3-1/N(一种无法向效应细胞递送信号1的非靶向CD3bsAb),则MSLNxCD28 bsAb不诱导杀伤,这凸显了原代T细胞刺激(信

号1)对CD28 bsAb的活性的重要性。

[0397] 值得注意的是,降低E:T比率(从10:1到3:1,再到1:1,最后到1:3,图18A-18D)降低了HPN536类似物的杀伤潜力。如果在E:T比率为10:1和3:1时,在HPN536类似物剂量范围的最高浓度下超过90%的靶细胞被杀伤,而在E:T比率等于1:1和1:3时,在最高MSLNxCD3浓度下分别只有70%和26%的靶细胞被杀伤。添加本发明的MSLNxCD28 bsAb补偿了这种活性的降低,在E:T=1:1下完全恢复了HPN536类似物的活性,并在E:T=1:3下导致高达60%的靶细胞被杀伤。

[0398] 在MSLNxCD3和MSLNxCD28 bsAb的组合诱导表达MSLN的肿瘤细胞的杀伤后T-细胞活化标志物的上调

[0399] 如实施例9中所述使用识别特定T细胞活化标志物的抗体通过流式细胞术量化了MSLNxCD28κλ-体在存在适当的信号1的情况下增强T细胞活化的能力。图15B和15E中示出了其中在一定剂量范围的MSLNxCD3(HPN536类似物)与1μg/mL或0.1μg/mL固定剂量的CD28 bsAb的存在下以10:1的E:T比率将H226细胞与PBMC共培养48小时的实验的结果。

[0400] 与用HPN536类似物的单一处理相比,MSLNxCD3和MSLNxCD28bsAb的组合在更大程度上活化了CD4+T细胞,对于大多数组合处理,CD25染色更亮。观察到T细胞活化水平之间的差异取决于所测试的CD28bsAb的剂量,其中1μg/mL比0.1μg/mL导致更好的T细胞活化。还证实了抗-MSLN和抗-CD28臂两者的重要性:基于035和041的bsAb比基于030的bsAb更好地活化T细胞,并且中等亲和力AI5臂比低亲和力AI10臂更好地诱导T细胞活化。

[0401] 在存在MSLNxCD3的情况下由MSLNxCD28 bsAb介导的CD28共刺激对T细胞增殖的影响。

[0402] 如实施例9中所述分析了MSLNxCD28 bsAb在MSLN-阳性肿瘤靶细胞的存在下增强MSLNxCD3在诱导T细胞增殖方面的作用的能力。增殖性CD4+T细胞的百分比在图15C和15F中示出。通过添加MSLNxCD28bsAb,HPN536类似物诱导T细胞增殖的能力大大增强,但以1μg/mL的剂量使用携带035或041作为靶向臂的AI5基bsAb获得了最大效果。

[0403] 通过用MSLNxCD28 bsAb共刺激CD28增强表达MSLN的肿瘤细胞的杀伤后在上清液中释放的细胞因子

[0404] 如实施例9中所述,通过在TDCC测定结束时定量上清液中选定的细胞因子来评估本发明的MSLNxCD28双特异性抗体在MSLNxCD3(HPN536类似物)的存在下杀伤表达MSLN的肿瘤细胞后增强T-细胞释放细胞因子的能力。图16A-16F中示出了其中在一定剂量范围的HPN536类似物与1或0.1μg/mL固定剂量的MSLNxCD28的存在下以10:1的E:T比率将H226细胞与PBMC共培养48小时的实验的结果。

[0405] 用HPN536类似物进行单一药剂处理导致T细胞中等程度释放细胞因子,而HPN536类似物与任何测试的MSLNxCD28 bsAb的组合处理大大增加了所有测量的细胞因子,尤其是IL-2,这反映在先前观察到的更好的T细胞活化和增殖上。

[0406] 实施例13:由靶向不同TAA的TAAXCD3和TAAXCD28双特异性抗体组合介导的T-细胞依赖性细胞毒性(TDCC)。

[0407] CEA/MSLN双阳性细胞的TDCC

[0408] 如实施例9中所述,使用CellTiter-Glo®活力测定作为读数,评估了由本发明的MSLNxCD28双特异性抗体诱导的CEA/MSLN双阳性细胞系(HPAC细胞,280'000CEA/细胞和14'

000CEA/细胞)的T-细胞依赖性细胞毒性(TDCC)。与CEAxCD3组合地测试了CD28 bsAb。图19A-19D示出了以HPAC细胞作为靶标(在不同的E:T比率下)、用一定剂量范围的CEAxCD3和2.5μg/mL固定剂量的CEAxCD28或MSLNxCD28 bsAb获得的TDCC曲线。

[0409] CEAxCD28和MSLNxCD28 bsAb都与CEAxCD3同样好地协同作用而杀伤CEA/MSLN双阳性HPAC靶细胞,表明TAAxCD28 bsAb可以成功地与靶向不同TAA的TAAxCD3 bsAb配对。在所有测试的E:T比率下均可观察到协同作用,但在较低的E:T比率下最为突出,其中CD28 bsAb的添加补偿了CEAxCD3的较低活性。

[0410] 重要的是,当单独测试时(即,在不存在信号1的情况下),CD28bsAb不诱导杀伤,这凸显了原代T细胞刺激(信号1)对CD28 bsAb的活性的重要性。

[0411] 由靶向不同TAA的CD3和CD28 bsAb组合诱导的T-细胞活化和T细胞增殖

[0412] 在图19中示出的TDCC实验后定量了CD28κλ-体在存在适当的信号1的情况下增强T细胞活化和增殖的能力。图20A和20B中分别示出了CD4+和CD8+T细胞的T细胞活化数据,而图20C和20D分别示出了CD4+和CD8+T细胞的T细胞增殖。示出了所测试的不同E:T比率并在图的顶部清楚地标记。

[0413] 与用CEAxCD3的单一处理相比,CEAxCD3与CEAxCD28或MSLNxCD28 bsAb的组合在更大程度上活化了CD4+T细胞,对于两种组合处理并且在整个不同的E:T比率下,CD25-阳性T细胞更多。CD3与CD28 bsAb之间在活化CD8+T细胞方面的协同作用在较低的E:T比率下更为明显,因为在E:T>1时,CEAxCD3 bsAb本身就很好地诱导CD8+T细胞活化。用两种bsAb观察到了相似的T细胞活化水平,表明TAAxCD28bsAb可以成功地与靶向不同TAA的TAAxCD3 bsAb配对。

[0414] T细胞的增殖潜力反映在当使用组合时观察到的更高T细胞活化上,并导致了在整个所测试的4种E:T比率下由组合诱导的T细胞增殖增强。值得注意的是,单独的CEAxCD3在E:T比率等于或低于1时仅极少地诱导T细胞增殖,这凸显了与CD28 bsAb组合即便在不利的E:T比率下也诱导T细胞增殖的益处。

[0415] 实施例13:在BRGSF-HIS小鼠中评价CD28 BSAB介导的T细胞共刺激对CEAXCD3 T-细胞重靶向BSAB的抗肿瘤活性的影响

[0416] 本功效研究旨在评估AI3AC84/N在与CEAxCD3组合时在皮下植入CEA+HPAF-II肿瘤的BRGSF-HIS小鼠中的抗肿瘤作用。实验设计汇总在图22中,其中示出了治疗组和治疗方案。简言之:将1.5x10^{6}个HPAF-II细胞皮下植入用4个不同的CD34+造血干细胞供体(9只小鼠/供体,每个治疗组每个供体3只小鼠)人源化的BRGSF-HIS小鼠(genOway)中。在随机分组后在植入7天后(平均肿瘤体积~85mm^3)开始治疗。每周两次以10mg/kg共注射CEAxCD3和CEAxCD28 bsAb,共注射6次。每周2至3次监测小鼠的肿瘤发展并用数显卡尺测量肿瘤,直至实验终点(肿瘤体积=1500mm^3)。使用式(长x宽^2)x 0.5计算肿瘤体积。图23A示出了植入后第56天时的存活比例,而图23B示出了每个治疗组中个别小鼠的肿瘤生长动力学。

[0417] 对于用CEAxCD3治疗的小鼠,仅测量到相对于媒介物组的轻微存活优势。然而,AI3AC84/N与CEAxCD3的组合在第56天时(实验终止时)诱导了较低的肿瘤生长动力学和较高的存活机会:CEAxCD3+AI3AC84/N组中8/12的小鼠还尚未达到肿瘤终点,相反,媒介物组和CEAxCD3组中分别仅1/12和3/12的小鼠还尚未达到肿瘤终点。

[0418] 其他实施方案

[0419] 虽然已结合其具体实施方式描述了本发明,但前述描述意在示意而非限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求的范围限定。其他方面、优点和修改在以下权利要求的范围内。

[0420] 本公开的另外的实施方案包括以下:

[0421] 实施方案1.一种双特异性抗体,所述双特异性抗体包含:

[0422] a.与CD28结合的第一抗原结合结构域;其中所述第一抗原结合结构域包含:

[0423] i.具有以下的第一重链可变区:包含(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列的互补决定区1(CDRH1)、包含(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的互补决定区2(CDRH2)和包含(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列的互补决定区3(CDRH3);和

[0424] ii.具有以下的第一轻链可变区:

[0425] 1.包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDRL3;或

[0426] 2.包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDRL3;或

[0427] 3.包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDRL3;或

[0428] 4.包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDRL3;或

[0429] 5.包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDRL3

[0430] 6.包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDRL3;或

[0431] 7.包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的CDRL3;或

[0432] 8.包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的CDRL3;或

[0433] 9.包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDRL3;或

[0434] 10.包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的CDRL3;或

[0435] 11.包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的CDRL3;或

[0436] 12.包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的CDRL3;或

[0437] 13.包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的CDRL3;或

[0438] 14.包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的CDRL3;或

[0439] 15.包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的

CDRL2;和包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的CDRL3;或

[0440] 16.包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的CDRL3;或

[0441] 17.包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的CDRL3;或

[0442] 18.包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的CDRL3;或

[0443] 19.包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列的CDRL3;和

[0444] b.结合肿瘤相关抗原(TAA)的第二抗原结合结构域,其中所述第二抗原结合结构域包含:

[0445] i.具有以下的第二重链可变区:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR3。

[0446] 实施方案2.根据权利要求1所述的双特异性抗体,其中所述TAA为CEA。

[0447] 实施方案3.根据权利要求2所述的双特异性抗体,其中所述第二抗原结合结构域包含:

[0448] c.具有以下的第二轻链可变区:

[0449] i.包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR3;

[0450] ii.包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR3;

[0451] iii.包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR3。

[0452] 实施方案4.根据前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体,其中所述第一重链可变区和所述第二重链可变区包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0453] 实施方案5.根据前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体,其中所述第一重链和所述第二重链包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

[0454] 实施方案6.根据权利要求1所述的双特异性抗体,其中

[0455] d.部分ii(1)的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列;

[0456] e.部分ii(2)的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列;

[0457] f.部分ii(3)的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列;

[0458] g.部分ii(4)的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列;

[0459] h.部分ii(5)的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:84的氨基酸序列

[0460] i.部分ii(6)的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列;

[0461] j.部分ii(7)的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列;

[0462] k.部分ii(8)的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列;

[0463] l.部分ii(9)的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列;

[0464] m.部分ii(10)的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列;

[0465] n.部分ii(11)的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;

[0466] o.部分ii(12)的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列;

[0467] p.部分ii(13)的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列;

[0468] q.部分ii(14)的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;

[0469] r.部分ii(15)的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;

[0470] s.部分ii(16)的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列;

[0471] t.部分ii(17)的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列;

[0472] u.部分ii(18)的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列;和

[0473] v.部分ii(19)的第一轻链可变区包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列。

[0474] 实施方案7.根据权利要求1所述的双特异性抗体,其中

[0475] a.部分ii(1)的第一轻链包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列;

[0476] b.部分ii(2)的第一轻链包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列;

[0477] c.部分ii(3)的第一轻链包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列;

[0478] d.部分ii(4)的第一轻链包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列;

[0479] e.部分ii(5)的第一轻链包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列;

[0480] f.部分ii(6)的第一轻链包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列;

[0481] g.部分ii(7)的第一轻链包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列

[0482] h.部分ii(8)的第一轻链包含SEQ ID NO:106的氨基酸序列;

[0483] i.部分ii(9)的第一轻链包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列;

[0484] j.部分ii(10)的第一轻链包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列;

[0485] k.部分ii(11)的第一轻链包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列;

[0486] l.部分ii(12)的第一轻链包含SEQ ID NO:110的氨基酸序列;

[0487] m.部分ii(13)的第一轻链包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列;

[0488] n.部分ii(14)的第一轻链包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列;

[0489] o.部分ii(15)的第一轻链包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列;

[0490] p.部分ii(16)的第一轻链包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列;

[0491] q.部分ii(17)的第一轻链包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列;

[0492] r.部分ii(18)的第一轻链包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列;和

[0493] s.部分ii(19)的第一轻链包含SEQ ID NO:117的氨基酸序列。

[0494] 实施方案8.根据权利要求3所述的双特异性抗体,其中:

[0495] a.部分a(i)的第二轻链可变区包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列;

[0496] b.部分a(ii)的第二轻链可变区包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;和

[0497] c.部分a(iii)的第二轻链可变区包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

[0498] 实施方案9.根据权利要求3所述的双特异性抗体,其中:

[0499] a.部分a(i)的第二轻链包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列;

[0500] b.部分a(ii)的第二轻链包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列;和

[0501] c.部分a(iii)的第二轻链包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

[0502] 实施方案10.根据前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体,其中所述第一轻链为κ,所述第二轻链为λ。

[0503] 实施方案11.根据前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体,其中所述第一轻

链为λ,所述第二轻链为κ。

[0504] 实施方案12.根据权利要求1所述的双特异性抗体,其中所述双特异性抗体包含Fc结构域,该Fc结构域包含一个或多个氨基酸置换,所述氨基酸置换减少与激活Fc受体的结合和/或降低效应子功能。

[0505] 实施方案13.根据权利要求12所述的双特异性抗体,其中所述氨基酸置换包含L234A和L235A置换。

[0506] 实施方案14.根据权利要求12所述的双特异性抗体,其中所述氨基酸置换包含P329A、P329G或P329R置换。

[0507] 实施方案15.根据前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体,其中所述抗体具有IgG同种型。

[0508] 实施方案16.根据前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体,其中所述抗体为人。

[0509] 实施方案17.根据前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体,其中所述组合物使得能够实现肿瘤特异性T细胞活化。

[0510] 实施方案18.一种组合物,所述组合物包含根据前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体。

[0511] 实施方案19.根据权利要求18所述的组合物,所述组合物还包含CD3xCEA双特异性抗体。

[0512] 实施方案20.根据权利要求19所述的组合物,其中所述CD3 x CEA双特异性抗体包含两条包含SEQ ID NO:118的氨基酸序列的重链、包含SEQ ID NO:119的氨基酸序列的第一轻链和包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的第二轻链。

[0513] 实施方案21.一种减少肿瘤细胞的增殖和/或杀伤肿瘤细胞的方法,所述方法包括使所述细胞与根据权利要求18-20中任一项所述的组合物接触。

[0514] 实施方案22.一种在受试者中治疗癌症的方法,所述方法包括向受试者施用根据权利要求18-20中任一项所述的组合物。

[0515] 实施方案23.一种抗体,所述抗体包含与CD28结合的抗原结合结构域;其中所述抗原结合结构域包含:

[0516] i.具有以下的重链可变区:包含(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列的互补决定区1(CDRH1)、包含(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的互补决定区2(CDRH2)和包含(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列的互补决定区3(CDRH3);和

[0517] ii.具有以下的轻链可变区:

[0518] 1.包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDRL3;或

[0519] 2.包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDRL3;或

[0520] 3.包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDRL3;或

[0521] 4.包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDRL3;或

[0522] 5.包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDRL3;

[0523] 6.包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDRL3;或

[0524] 7.包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的CDRL3;或

[0525] 8.包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的CDRL3;或

[0526] 9.包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDRL3;或

[0527] 10.包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的CDRL3;或

[0528] 11.包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的CDRL3;或

[0529] 12.包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的CDRL3;或

[0530] 13.包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的CDRL3;或

[0531] 14.包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的CDRL3;或

[0532] 15.包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的CDRL3;或

[0533] 16.包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ IDNO:69的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的CDRL3;或

[0534] 17.包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的CDRL3;或

[0535] 18.包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的CDRL3;或

[0536] 19.包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的CDRL1;包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的CDRL2;和包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列的CDRL3。

[0537] 实施方案24.根据权利要求23所述的抗体,其中所述抗体为F(ab)片段、F(ab')2片段和Fv片段或单链Fv片段。

[0538] 实施方案25.根据权利要求23所述的抗体,其中所述抗体是单特异性的。

[0539] 实施方案26.根据权利要求23所述的抗体,其中所述抗体是单价的。

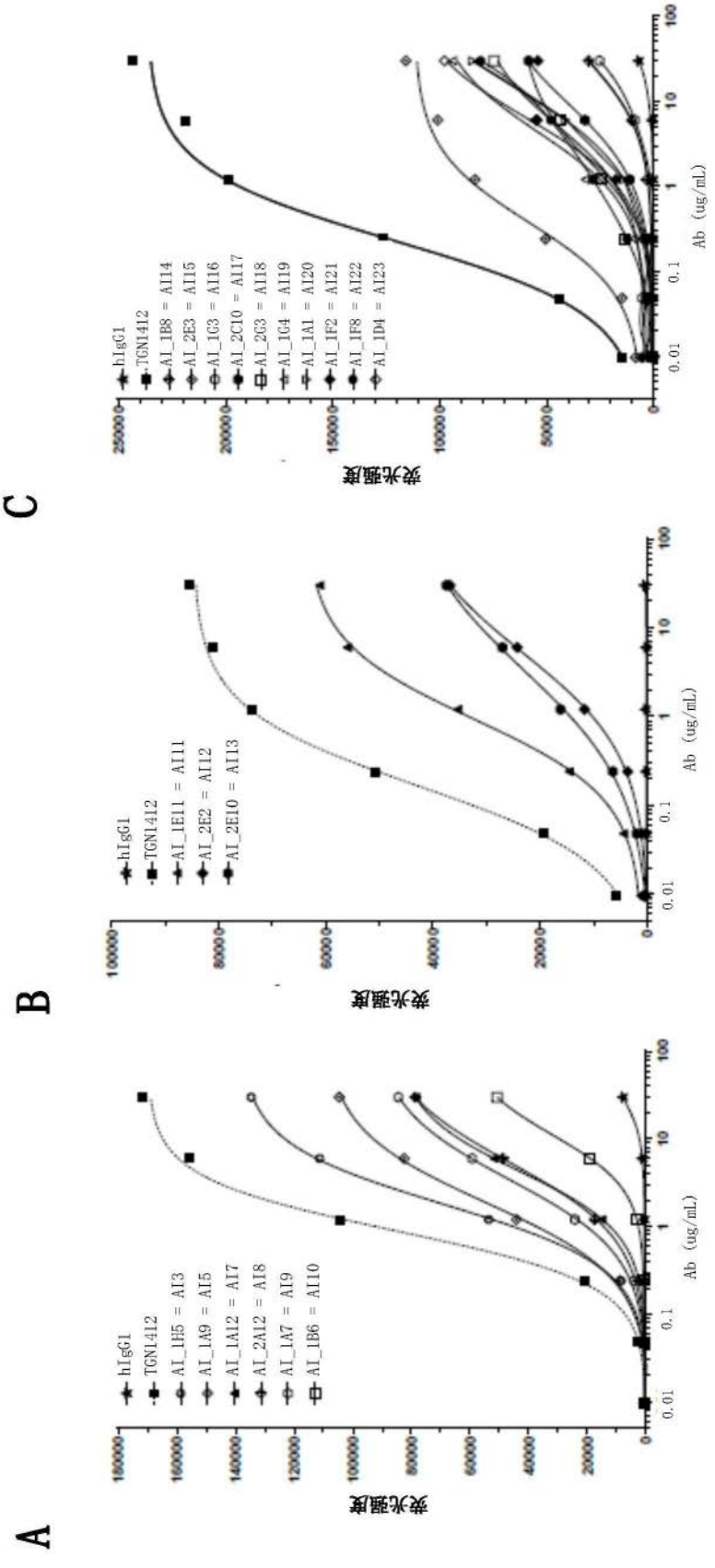

A
B
C
荧光强度
Ab (ug/mL)
hIgG1
TGN1412
AI_1H5 = AI3
AI_1A9 = AI5
AI_1A12 = AI7
AI_2A12 = AI8
AI_1A7 = AI9
AI_1B6 = AI10
AI_1E11 = AI11
AI_2E2 = AI12
AI_2E10 = AI13
AI_1B8 = AI14
AI_2E3 = AI15
AI_1G3 = AI16
AI_2C10 = AI17
AI_2G3 = AI18
AI_1G4 = AI19
AI_1A1 = AI20
AI_1F2 = AI21
AI_1F8 = AI22
AI_1D4 = AI23

图1

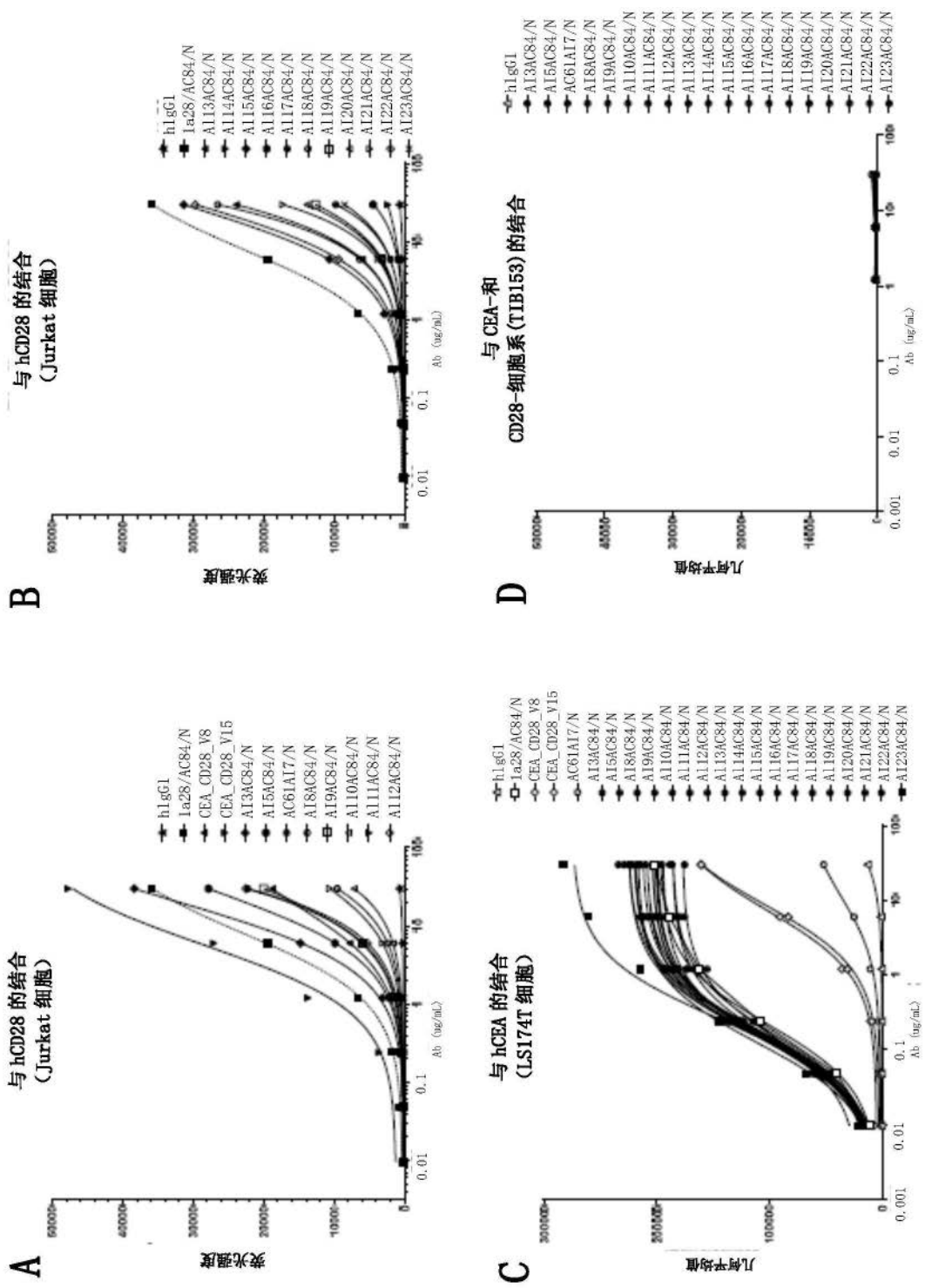

A
与 hCD28 的结合
(Jurkat 细胞)
荧光强度
Ab (ug/mL)
hIgG1
1a28/AC84/N
CEA_CD28_V8
CEA_CD28_V15
AI3AC84/N
AI5AC84/N
AC61AI7/N
AI8AC84/N
AI9AC84/N
AI10AC84/N
AI11AC84/N
AI12AC84/N
B
与 hCD28 的结合
(Jurkat 细胞)
荧光强度
Ab (ug/mL)
hIgG1
1a28/AC84/N
AI13AC84/N
AI14AC84/N
AI15AC84/N
AI16AC84/N
AI17AC84/N
AI18AC84/N
AI19AC84/N
AI20AC84/N
AI21AC84/N
AI22AC84/N
AI23AC84/N
C
与 hCEA 的结合
(LS174T 细胞)
几何平均值
Ab (ug/mL)
hIgG1
1a28/AC84/N
CEA_CD28_V8
CEA_CD28_V15
AC61AI7/N
AI3AC84/N
AI5AC84/N
AI8AC84/N
AI9AC84/N
AI10AC84/N
AI11AC84/N
AI12AC84/N
AI13AC84/N
AI14AC84/N
AI15AC84/N
AI16AC84/N
AI17AC84/N
AI18AC84/N
AI19AC84/N
AI20AC84/N
AI21AC84/N
AI22AC84/N
AI23AC84/N
D
与 CEA-和
CD28-细胞系(TIB153)的结合
几何平均值
Ab (ug/mL)
hIgG1
AI3AC84/N
AI5AC84/N
AC61AI7/N
AI8AC84/N
AI9AC84/N
AI10AC84/N
AI11AC84/N
AI12AC84/N
AI13AC84/N
AI14AC84/N
AI15AC84/N
AI16AC84/N
AI17AC84/N
AI18AC84/N
AI19AC84/N
AI20AC84/N
AI21AC84/N
AI22AC84/N
AI23AC84/N

图2

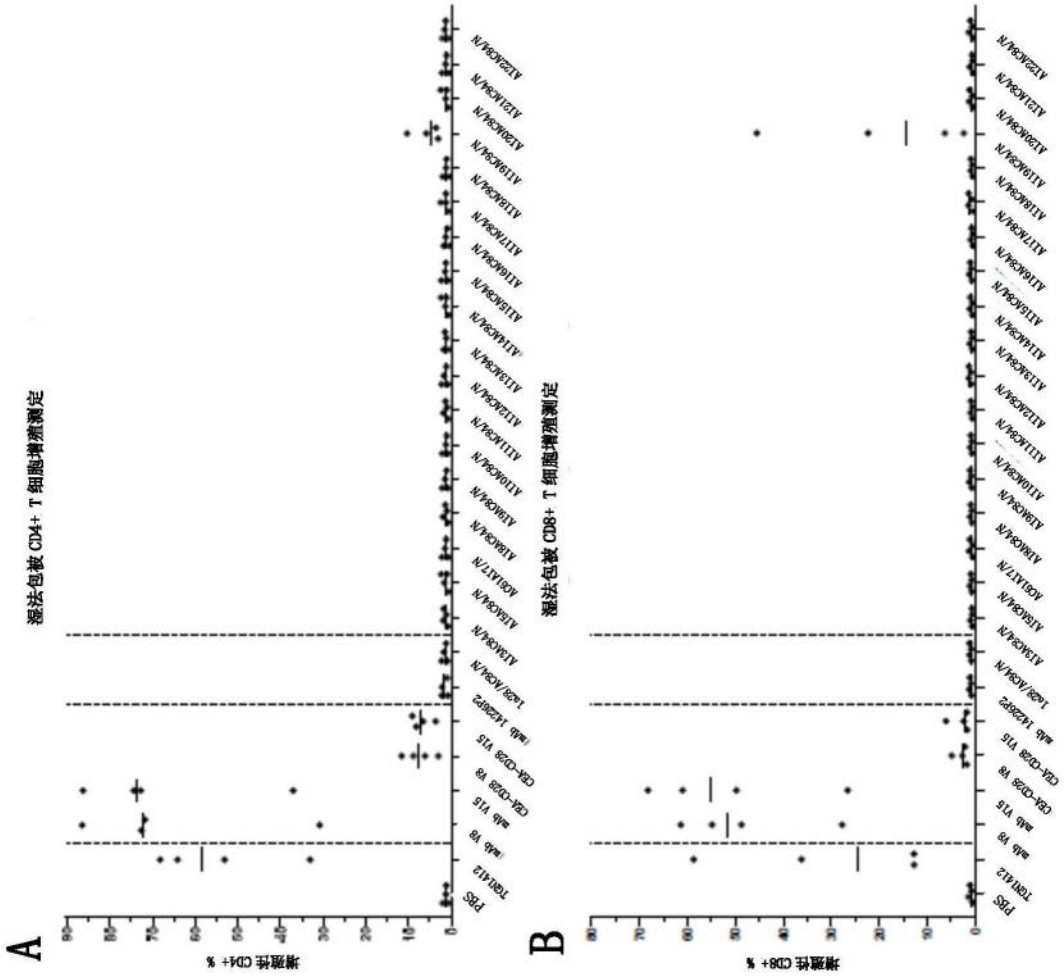

A
B
PBS
TQB1412
mAb V8
mAb V15
CAR-CD28 V8
CAR-CD28 V15
mAb 142SEP2
142SP/AC94/N
A13AC94/N
A15AC94/N
A05A17/N
A18AC94/N
A08AC94/N
A10AC94/N
A13AC94/N
A15AC94/N
A11AC94/N
A12AC94/N
A13AC94/N
A14AC94/N
A15AC94/N
A16AC94/N
A17AC94/N
A18AC94/N
A19AC94/N
A20AC94/N
A21AC94/N
A22AC94/N
增殖性 CD4+ %
增殖性 CD8+ %

图3

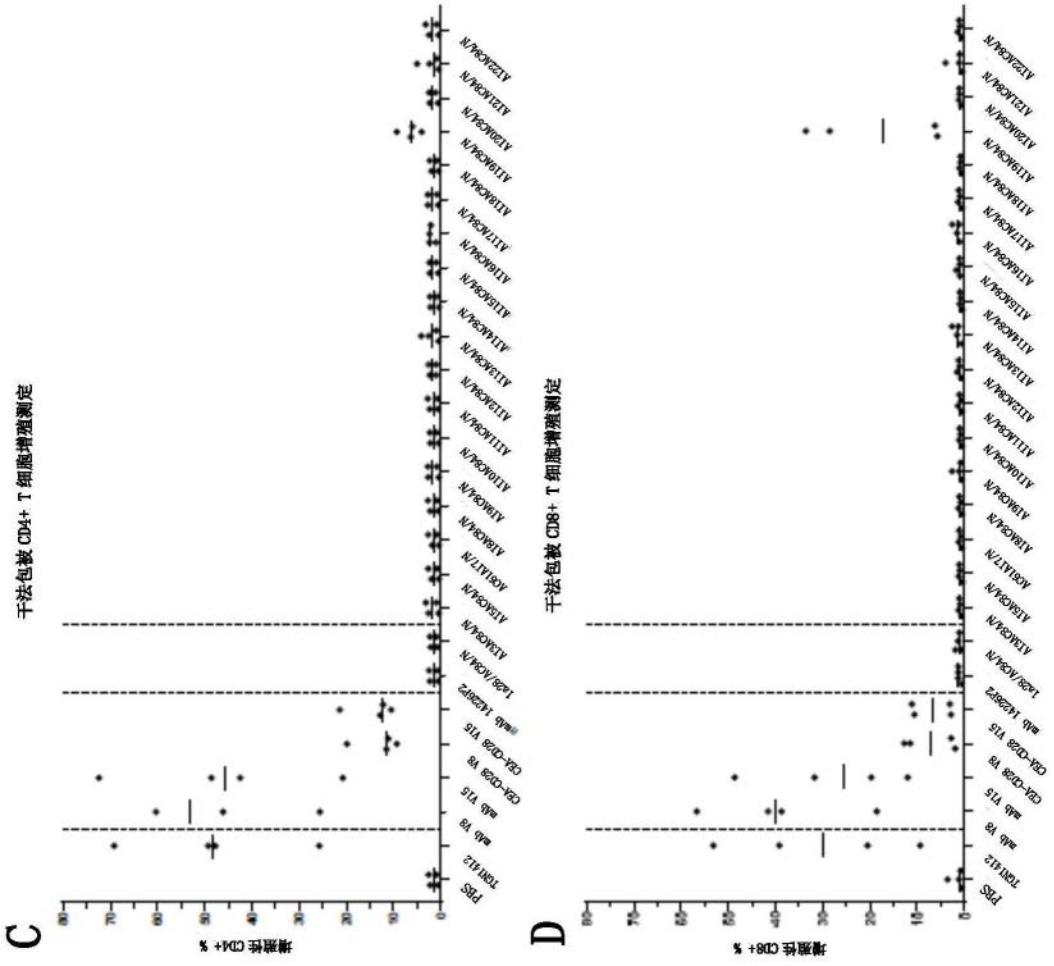

C
干法包被 CD4+ T 细胞增殖测定
增殖性 CD4+ %
PBS
TSM1412
mAb V9
mAb V15
CSA-CD28 V9
CSA-CD28 V15
mAb 14259F2
14259/AC94/N
A13AC94/N
A13AK94/N
AC01A17/N
A13AG94/N
A19AC94/N
A10AC94/N
A11LC94/N
A12HC94/N
A14AC94/N
A11BC94/N
A11BK94/N
A16AC94/N
A11TC94/N
A19BC94/N
A20BC94/N
A21LC94/N
A12ZAC94/N
D
干法包被 CD8+ T 细胞增殖测定
增殖性 CD8+ %
PBS
TSM1412
mAb V9
mAb V15
CSA-CD28 V9
CSA-CD28 V15
mAb 14259F2
14259/AC94/N
A13AC94/N
A13AK94/N
AC01A17/N
A13AG94/N
A19AC94/N
A10AC94/N
A11LC94/N
A12HC94/N
A14AC94/N
A11BC94/N
A11BK94/N
A16AC94/N
A11TC94/N
A19BC94/N
A20BC94/N
A21LC94/N
A12ZAC94/N

图3

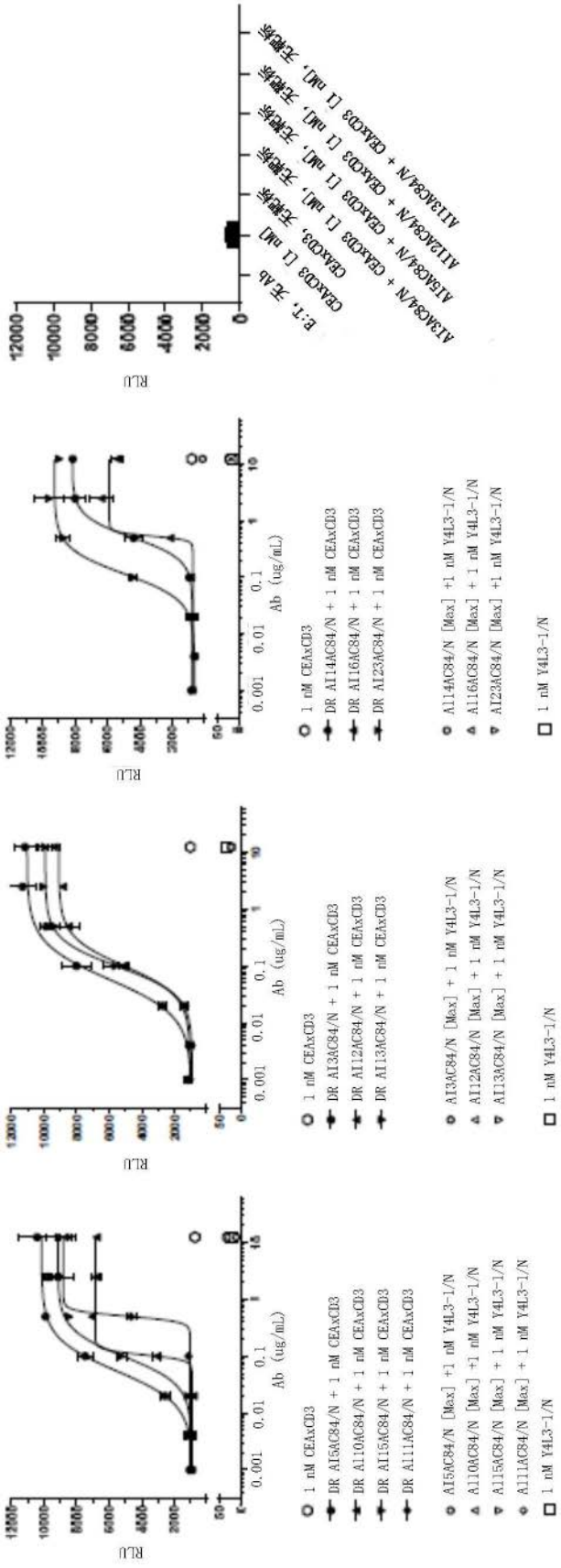

RLU
Ab (ug/mL)
E:T, 无Ab
CEAxCD3 [1 nM], 无靶标
CEAxCD3, 无靶标
A13AC84/N + CEAxCD3 [1 nM], 无靶标
A112AC84/N + CEAxCD3 [1 nM], 无靶标
A13AC84/N + CEAxCD3 [1 nM], 无靶标
1 nM CEAxCD3
DR AI14AC84/N + 1 nM CEAxCD3
DR AI16AC84/N + 1 nM CEAxCD3
DR AI23AC84/N + 1 nM CEAxCD3
A114AC84/N [Max] +1 nM Y4L3-1/N
A116AC84/N [Max] + 1 nM Y4L3-1/N
AI23AC84/N [Max] +1 nM Y4L3-1/N
1 nM Y4L3-1/N
DR AI3AC84/N + 1 nM CEAxCD3
DR AI12AC84/N + 1 nM CEAxCD3
DR AI13AC84/N + 1 nM CEAxCD3
AI3AC84/N [Max] + 1 nM Y4L3-1/N
AI12AC84/N [Max] + 1 nM Y4L3-1/N
AI13AC84/N [Max] + 1 nM Y4L3-1/N
DR AI5AC84/N + 1 nM CEAxCD3
DR AI10AC84/N + 1 nM CEAxCD3
DR AI15AC84/N + 1 nM CEAxCD3
DR AI11AC84/N + 1 nM CEAxCD3
AI5AC84/N [Max] +1 nM Y4L3-1/N
A110AC84/N [Max] +1 nM Y4L3-1/N
A115AC84/N [Max] + 1 nM Y4L3-1/N
A111AC84/N [Max] + 1 nM Y4L3-1/N

图4

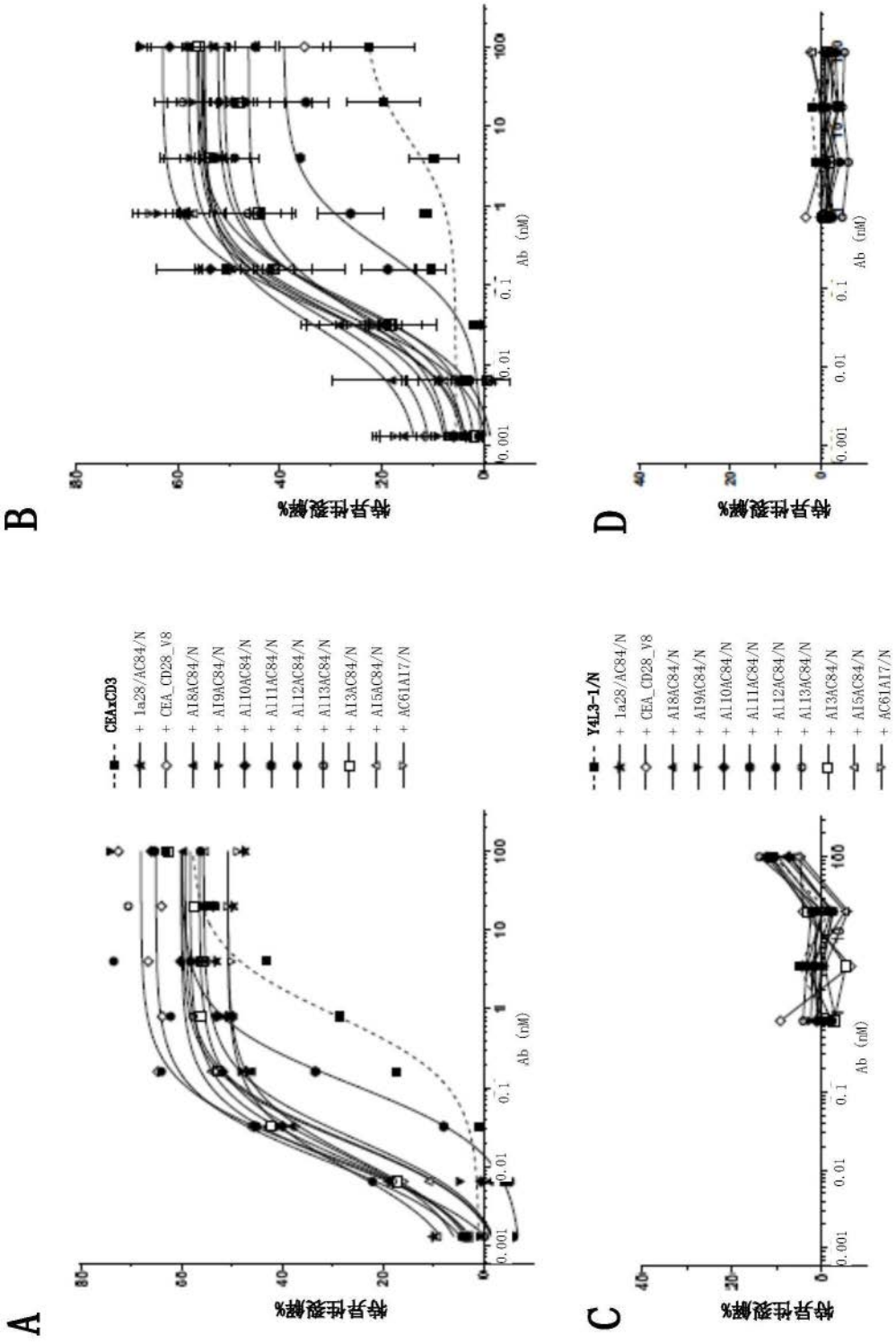

A
B
C
D
特异性裂解%
Ab (nM)
CEAxCD3
Y4L3-1/N
+ 1a28/AC84/N
+ CEA_CD28_V8
+ AI8AC84/N
+ AI9AC84/N
+ A110AC84/N
+ A111AC84/N
+ A112AC84/N
+ A113AC84/N
+ AI3AC84/N
+ AI5AC84/N
+ AC61AI7/N

图5

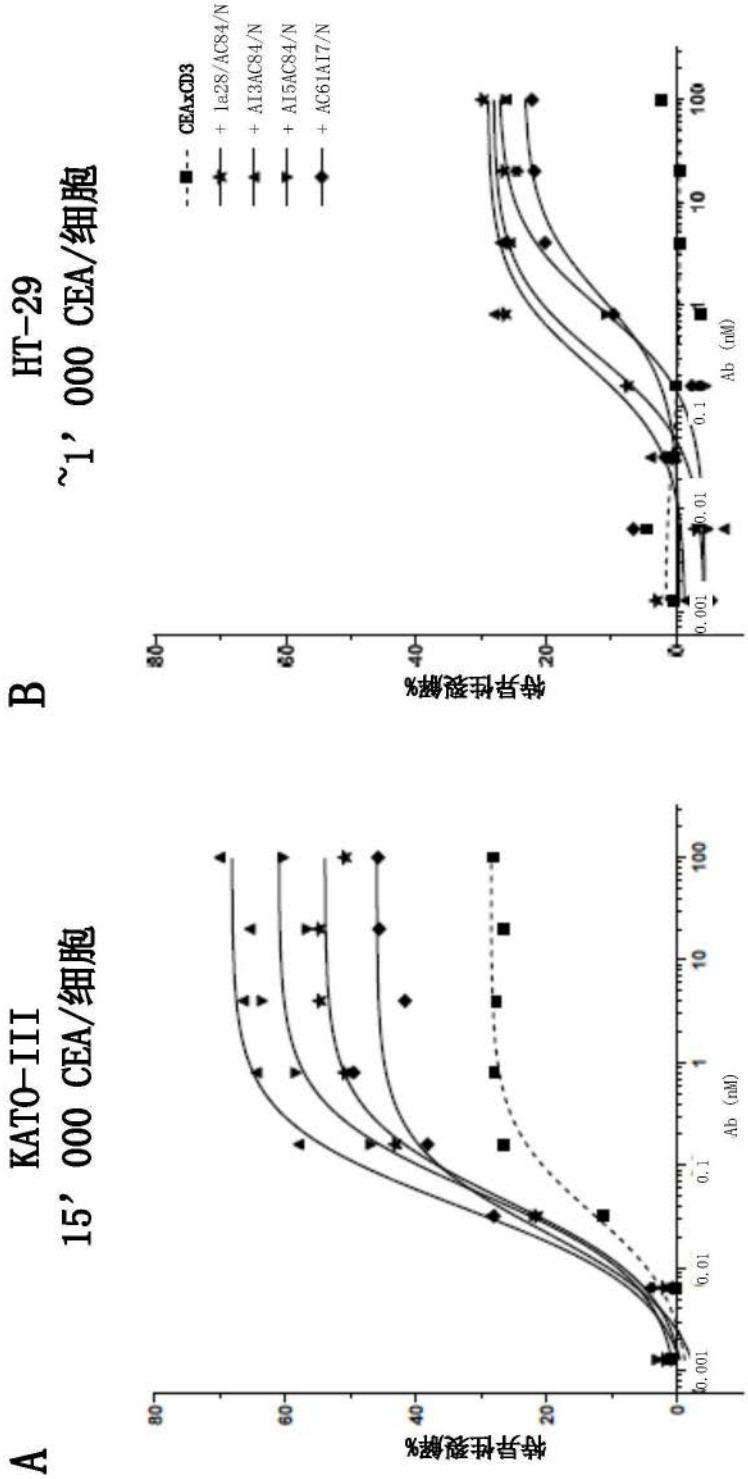

A
KATO-III
15’000 CEA/细胞
特异性裂解%
Ab (nM)
B
HT-29
~1’000 CEA/细胞
CEAxCD3
+ 1a28/AC84/N
+ AI3AC84/N
+ AI5AC84/N
+ AC61AI7/N
特异性裂解%
Ab (nM)

图6

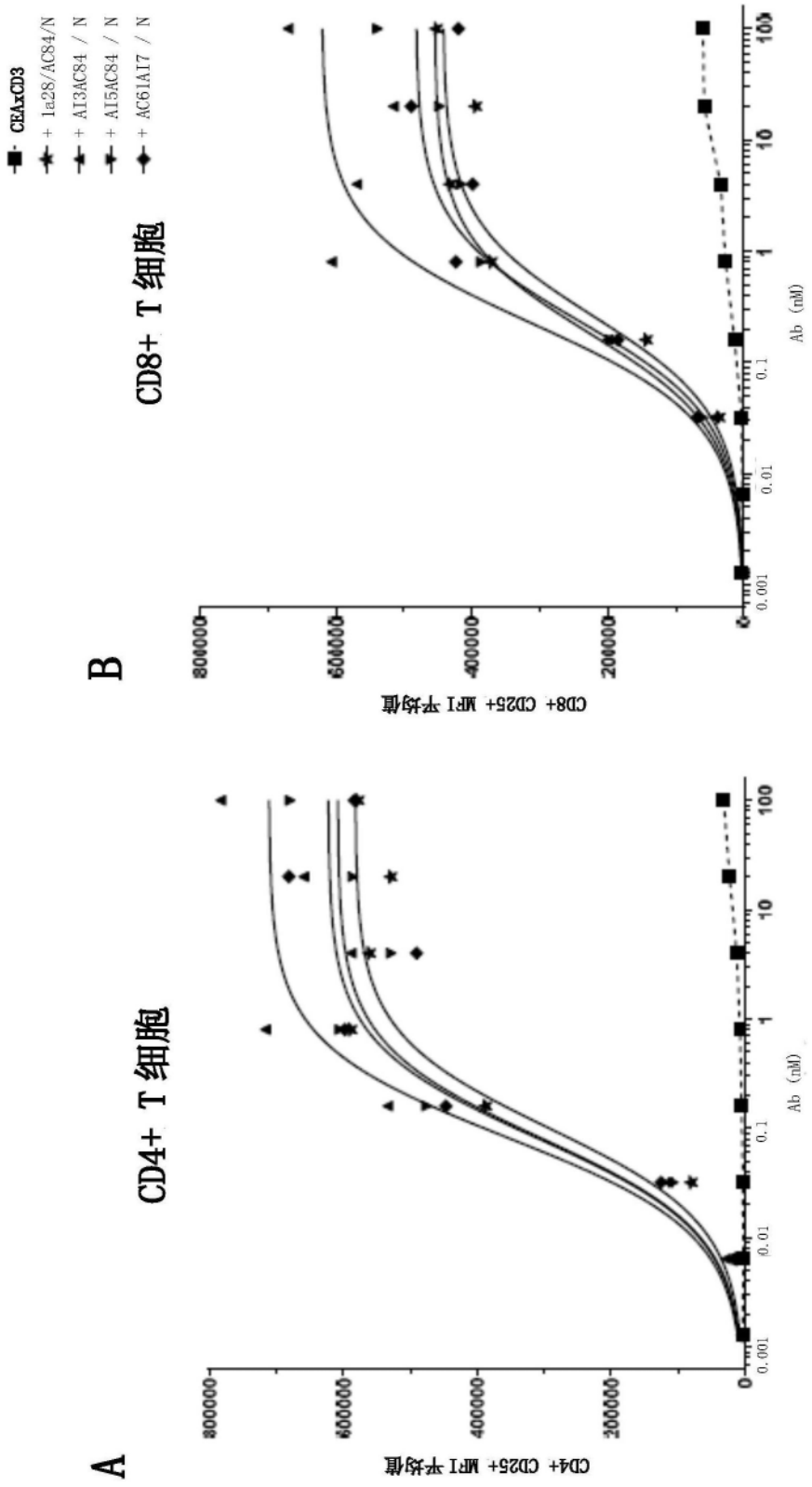

A
CD4+ T细胞
CD4+ CD25+ MFI平均值
800000
600000
400000
200000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Ab (nM)
B
CD8+ T细胞
CD8+ CD25+ MFI平均值
800000
600000
400000
200000
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Ab (nM)
CEAxCD3
+ 1a28/AC84/N
+ AI3AC84 / N
+ AI5AC84 / N
+ AC61AI7 / N

图7

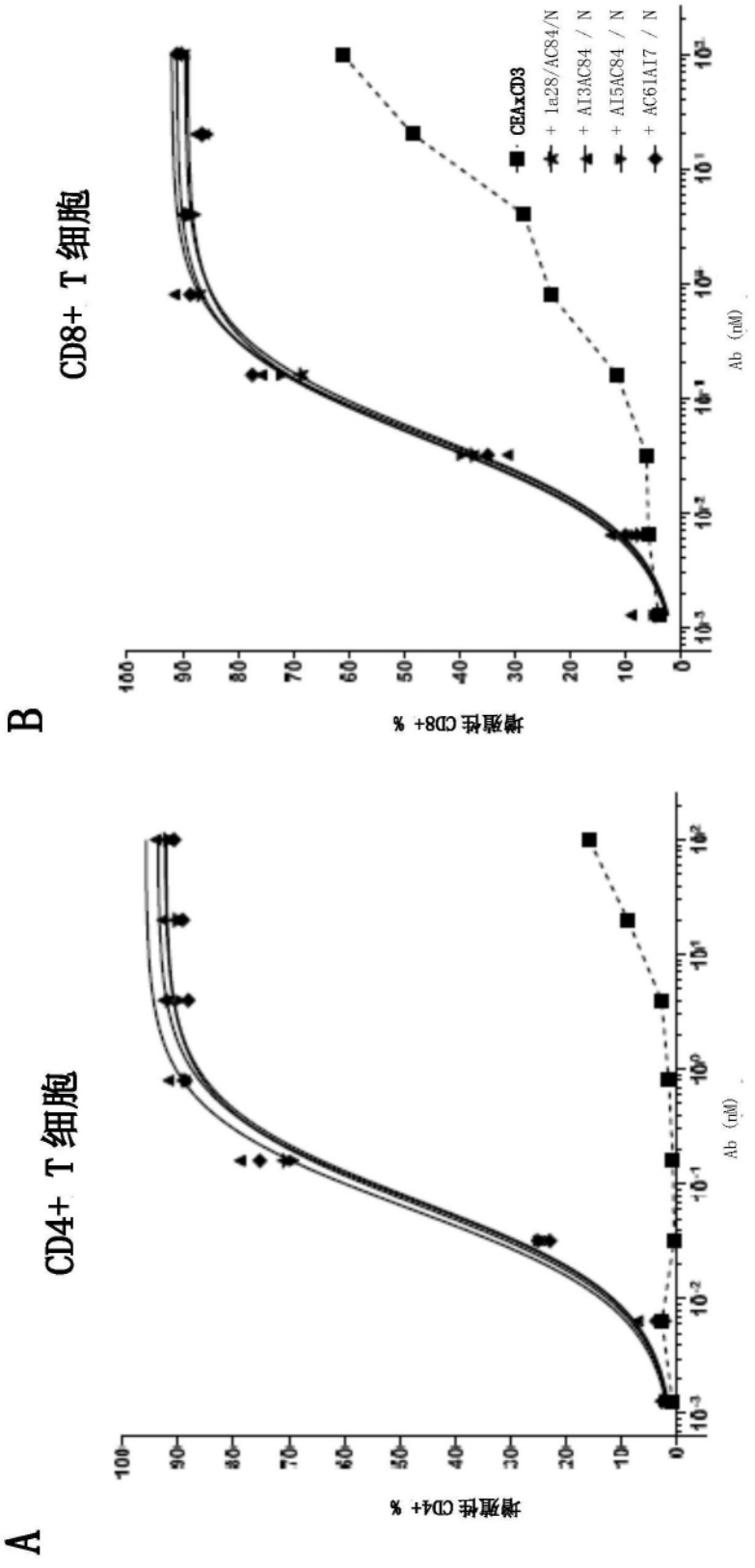

A
CD4+ T 细胞
增殖性 CD4+ %
Ab (nM)
B
CD8+ T 细胞
增殖性 CD8+ %
Ab (nM)
CEAxCD3
+ Ia28/AC84/N
+ AI3AC84 / N
+ AI5AC84 / N
+ AC61AI7 / N

图8

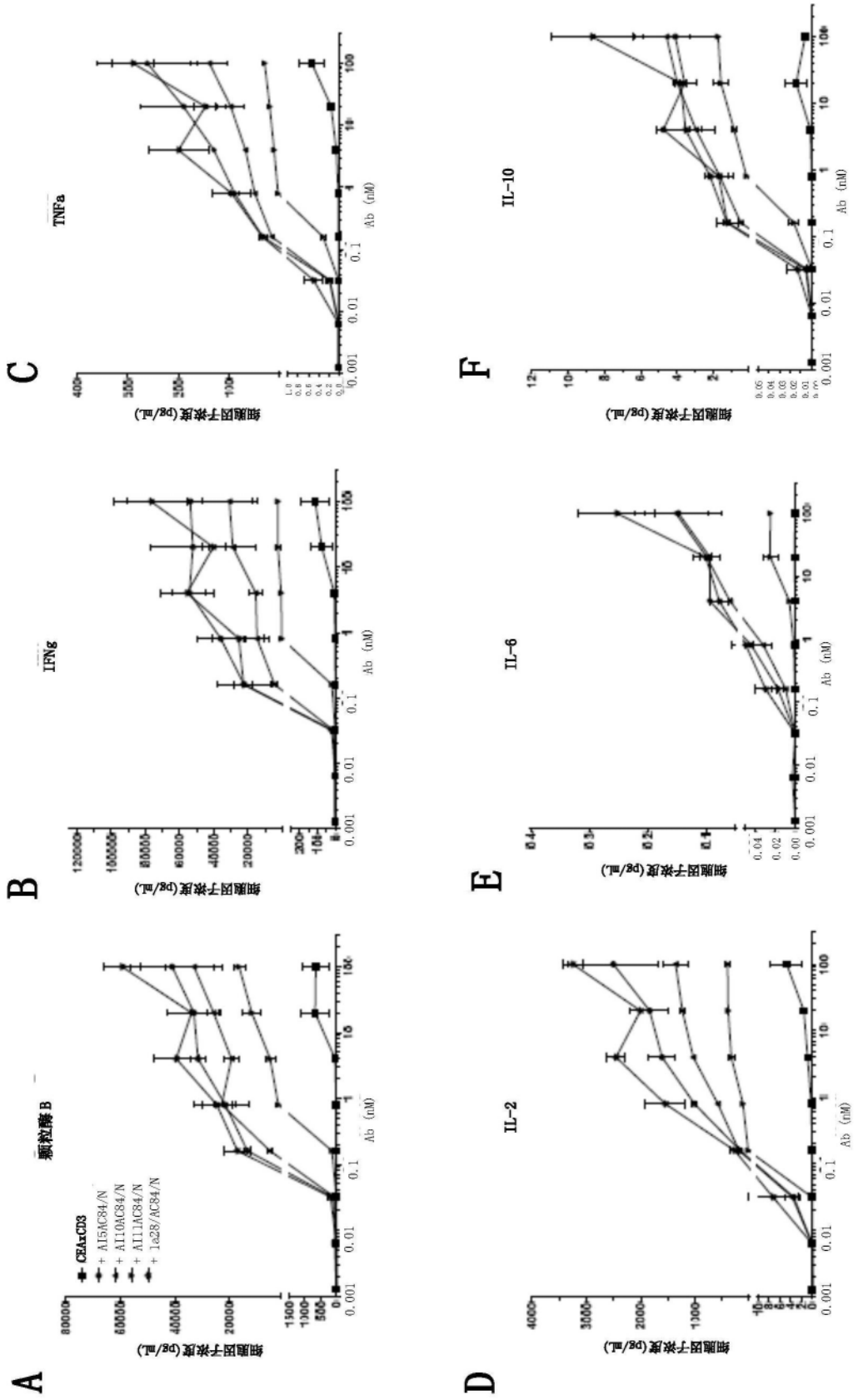

A
B
C
D
E
F
颗粒酶B
IFNg
TNFa
IL-2
IL-6
IL-10
细胞因子浓度(pg/mL)
Ab (nM)
CEAxCD3
+ A15AC84/N
+ A110AC84/N
+ A111AC84/N
+ 1a28/AC84/N

图9

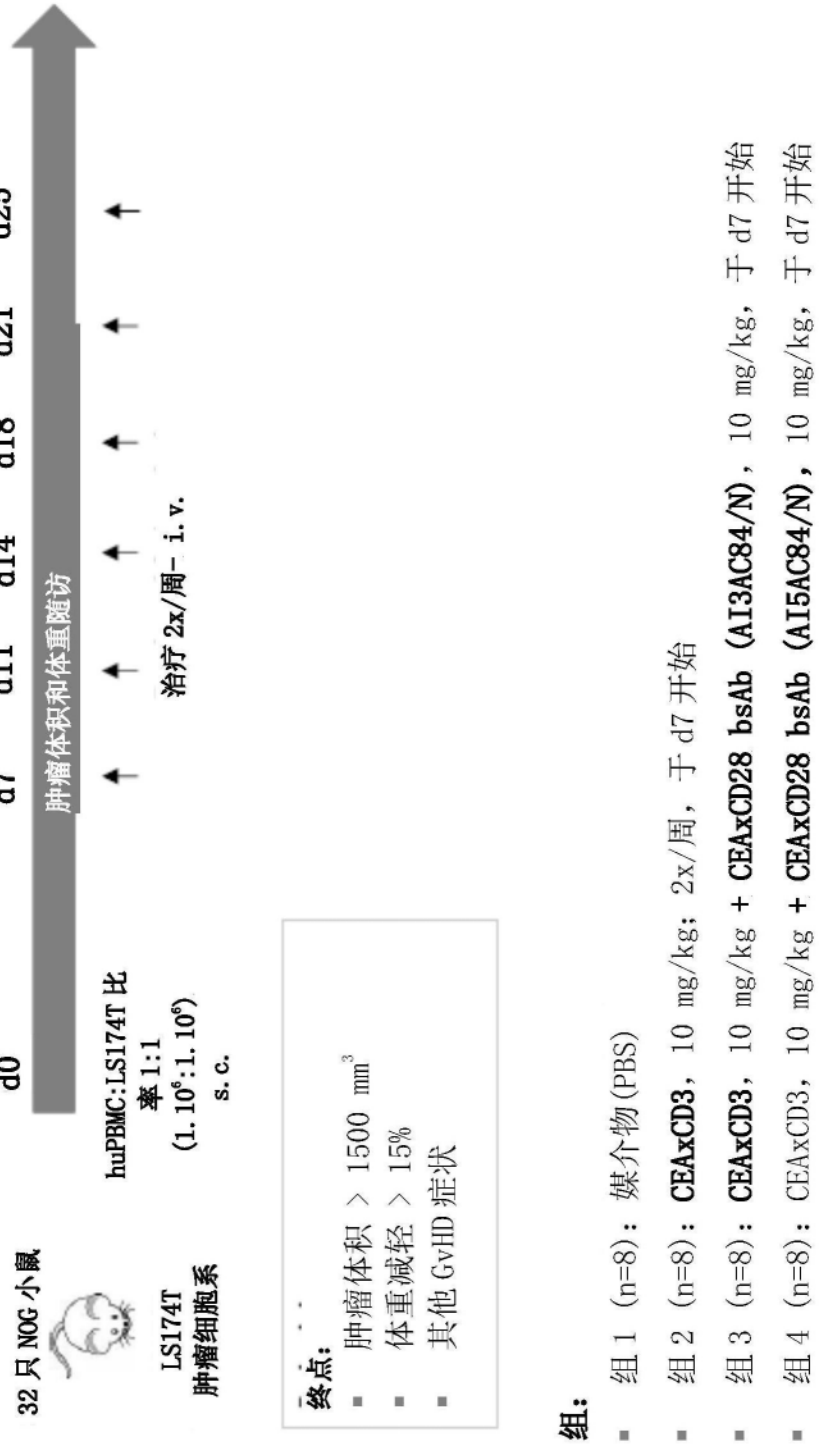

d0
d7
d11
d14
d18
d21
d25
肿瘤体积和体重随访
32 只 NOG 小鼠
LS174T
肿瘤细胞系
huPBMC:LS174T 比率 1:1
(1.10^6:1.10^6)
s.c.
治疗 2x/周- i.v.
终点：
肿瘤体积 > 1500 mm^3
体重减轻 > 15%
其他 GvHD 症状
组：
组 1 (n=8)：媒介物(PBS)
组 2 (n=8)：CEAxCD3，10 mg/kg；2x/周，于 d7 开始
组 3 (n=8)：CEAxCD3，10 mg/kg + CEAxCD28 bsAb (AI3AC84/N)，10 mg/kg，于 d7 开始
组 4 (n=8)：CEAxCD3，10 mg/kg + CEAxCD28 bsAb (AI5AC84/N)，10 mg/kg，于 d7 开始

图10

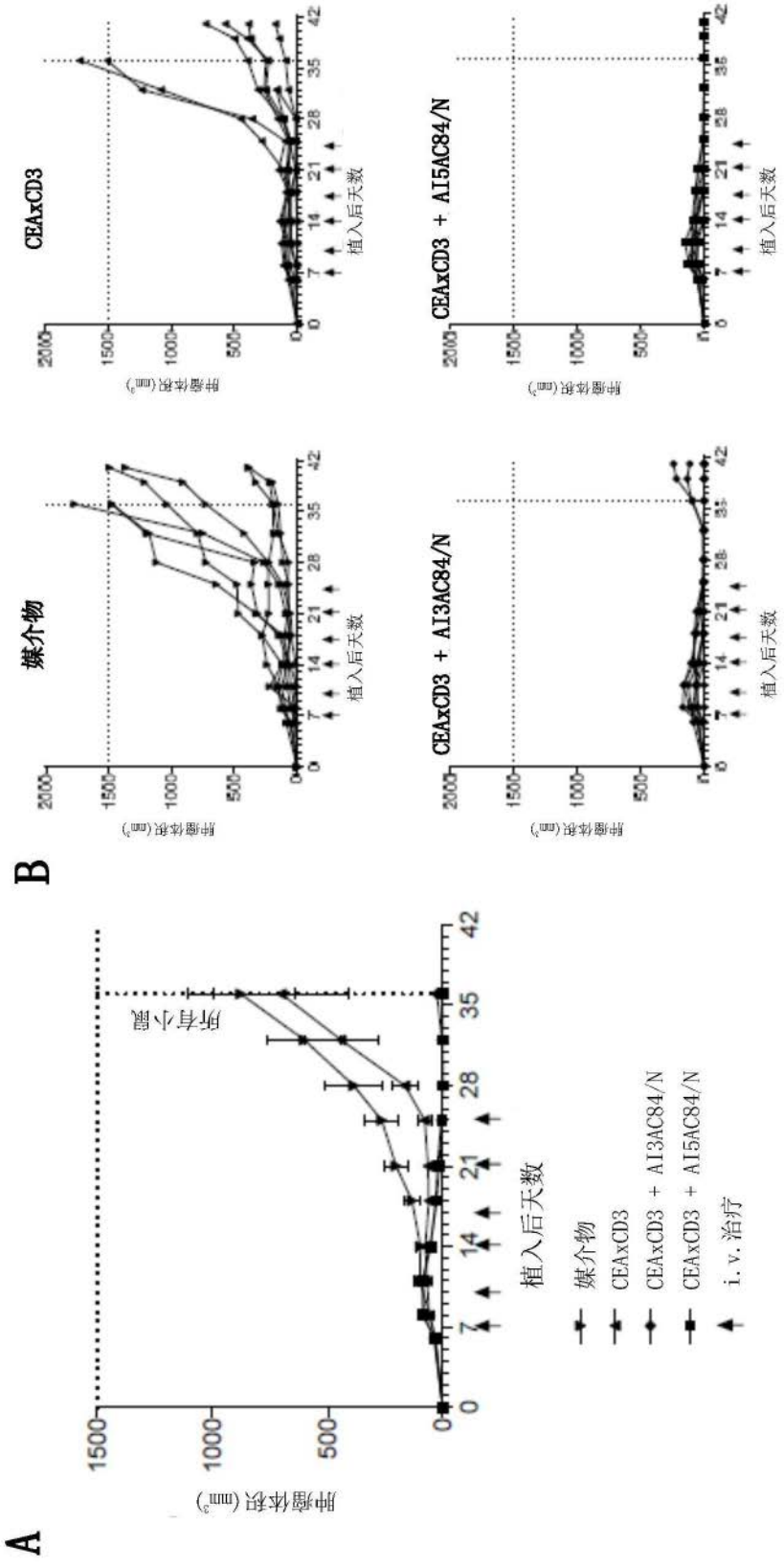

A
肿瘤体积 (mm³)
1500
1000
500
0
0
7
14
21
28
35
42
植入后天数
所有小鼠
媒介物
CEAxCD3
CEAxCD3 + AI3AC84/N
CEAxCD3 + AI5AC84/N
i. v. 治疗
B
媒介物
CEAxCD3
CEAxCD3 + AI3AC84/N
CEAxCD3 + AI5AC84/N
肿瘤体积(mm³)
植入后天数

图11

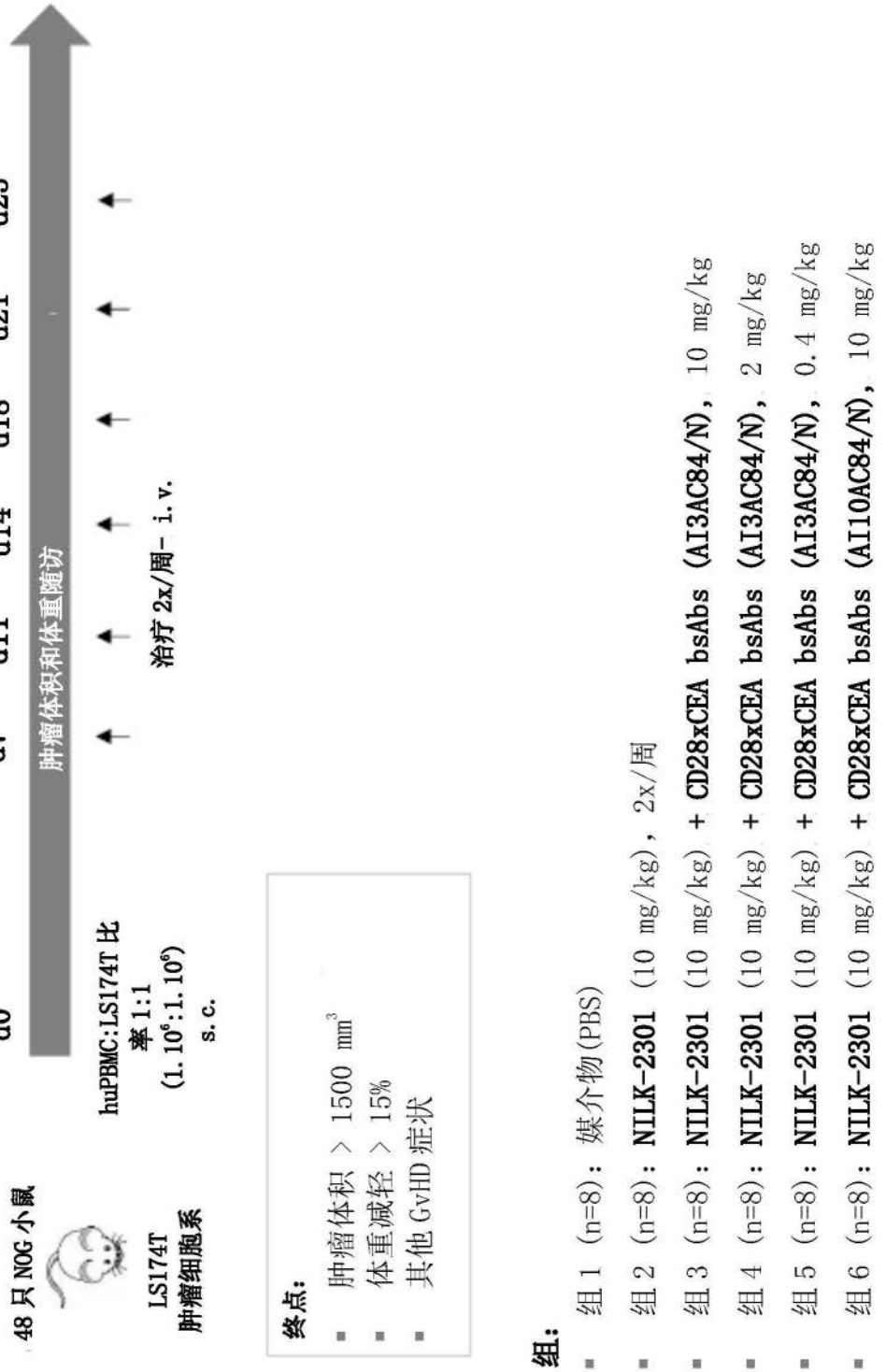

d0
d7
d11
d14
d18
d21
d25
肿瘤体积和体重随访
48 只 NOG 小鼠
LS174T
肿瘤细胞系
huPBMC:LS174T 比率 1:1
(1.10^6:1.10^6)
s.c.
治疗 2x/周- i.v.
终点:
肿瘤体积 > 1500 mm^3
体重减轻 > 15%
其他 GvHD 症状
组:
组 1 (n=8): 媒介物(PBS)
组 2 (n=8): NILK-2301 (10 mg/kg), 2x/周
组 3 (n=8): NILK-2301 (10 mg/kg) + CD28xCEA bsAbs (AI3AC84/N), 10 mg/kg
组 4 (n=8): NILK-2301 (10 mg/kg) + CD28xCEA bsAbs (AI3AC84/N), 2 mg/kg
组 5 (n=8): NILK-2301 (10 mg/kg) + CD28xCEA bsAbs (AI3AC84/N), 0.4 mg/kg
组 6 (n=8): NILK-2301 (10 mg/kg) + CD28xCEA bsAbs (AI10AC84/N), 10 mg/kg

图12

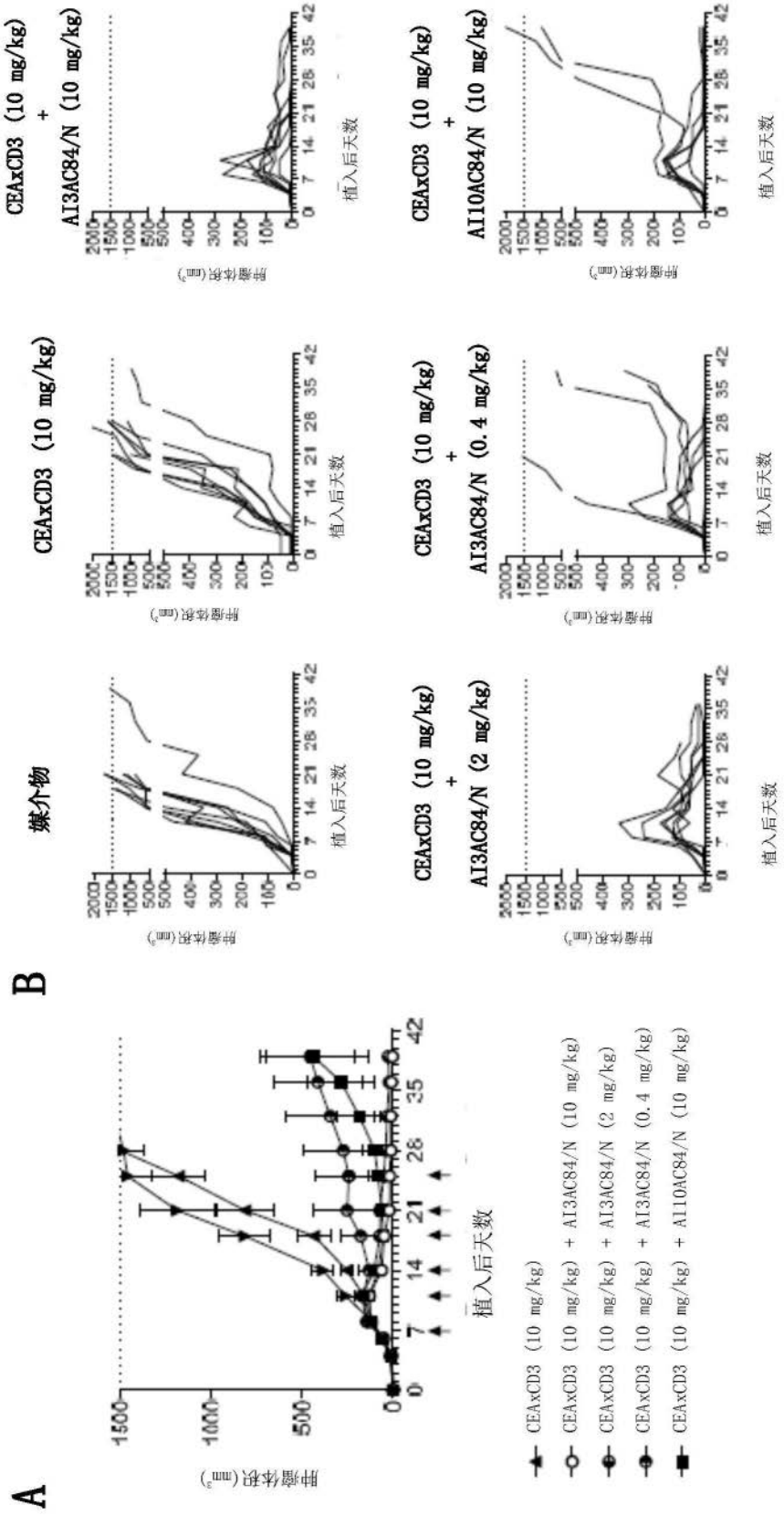

A
肿瘤体积(mm³)
植入后天数
CEAxCD3 (10 mg/kg)
CEAxCD3 (10 mg/kg) + AI3AC84/N (10 mg/kg)
CEAxCD3 (10 mg/kg) + AI3AC84/N (2 mg/kg)
CEAxCD3 (10 mg/kg) + AI3AC84/N (0.4 mg/kg)
CEAxCD3 (10 mg/kg) + AI10AC84/N (10 mg/kg)
B
媒介物
CEAxCD3 (10 mg/kg)
CEAxCD3 (10 mg/kg) + AI3AC84/N (10 mg/kg)
CEAxCD3 (10 mg/kg) + AI3AC84/N (2 mg/kg)
CEAxCD3 (10 mg/kg) + AI3AC84/N (0.4 mg/kg)
CEAxCD3 (10 mg/kg) + AI10AC84/N (10 mg/kg)

图13

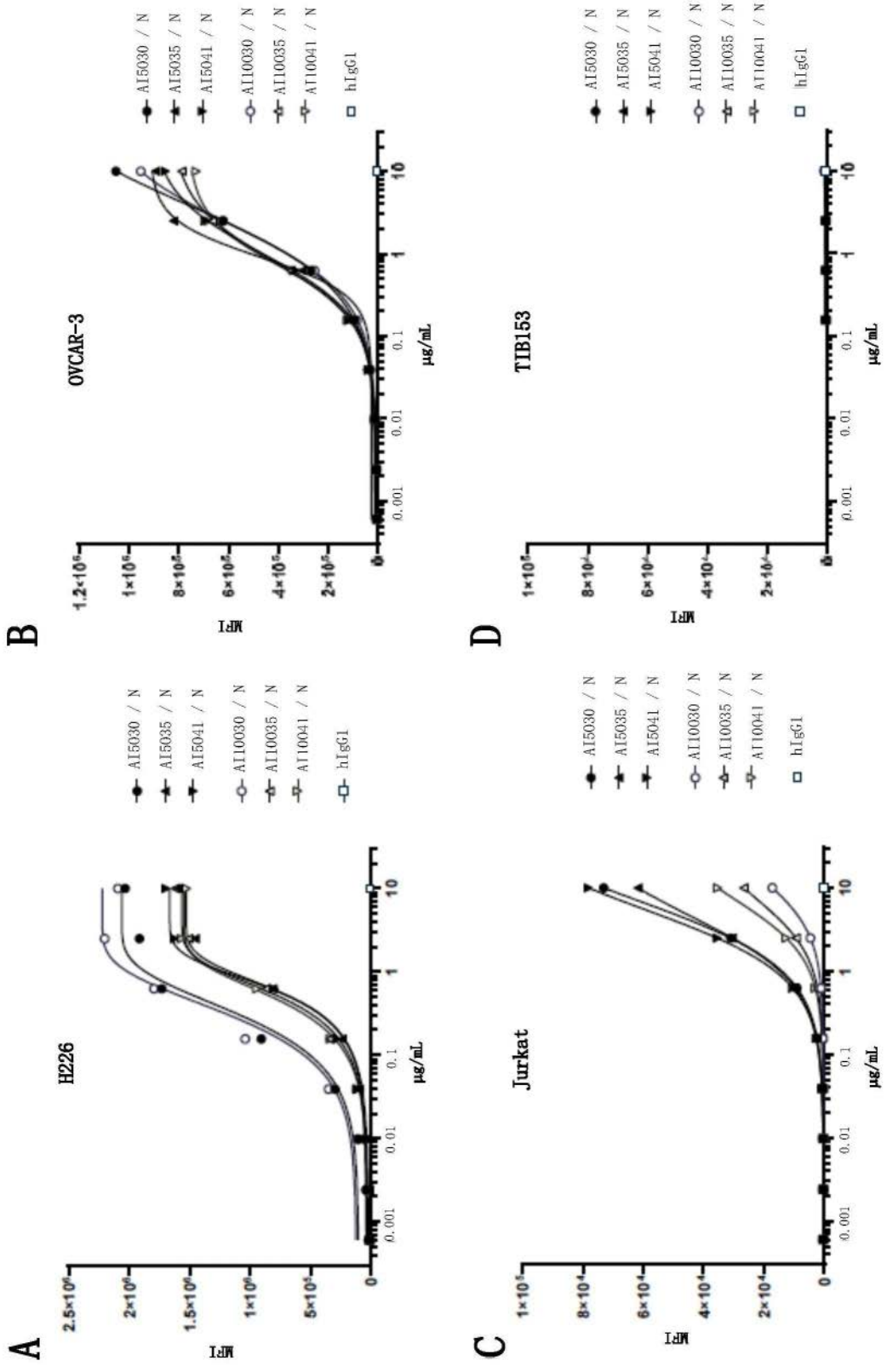

A
H226
B
OVCAR-3
C
Jurkat
D
TIB153
MFI
μg/mL
AI5030 / N
AI5035 / N
AI5041 / N
AI10030 / N
AI10035 / N
AI10041 / N
hIgG1

图14

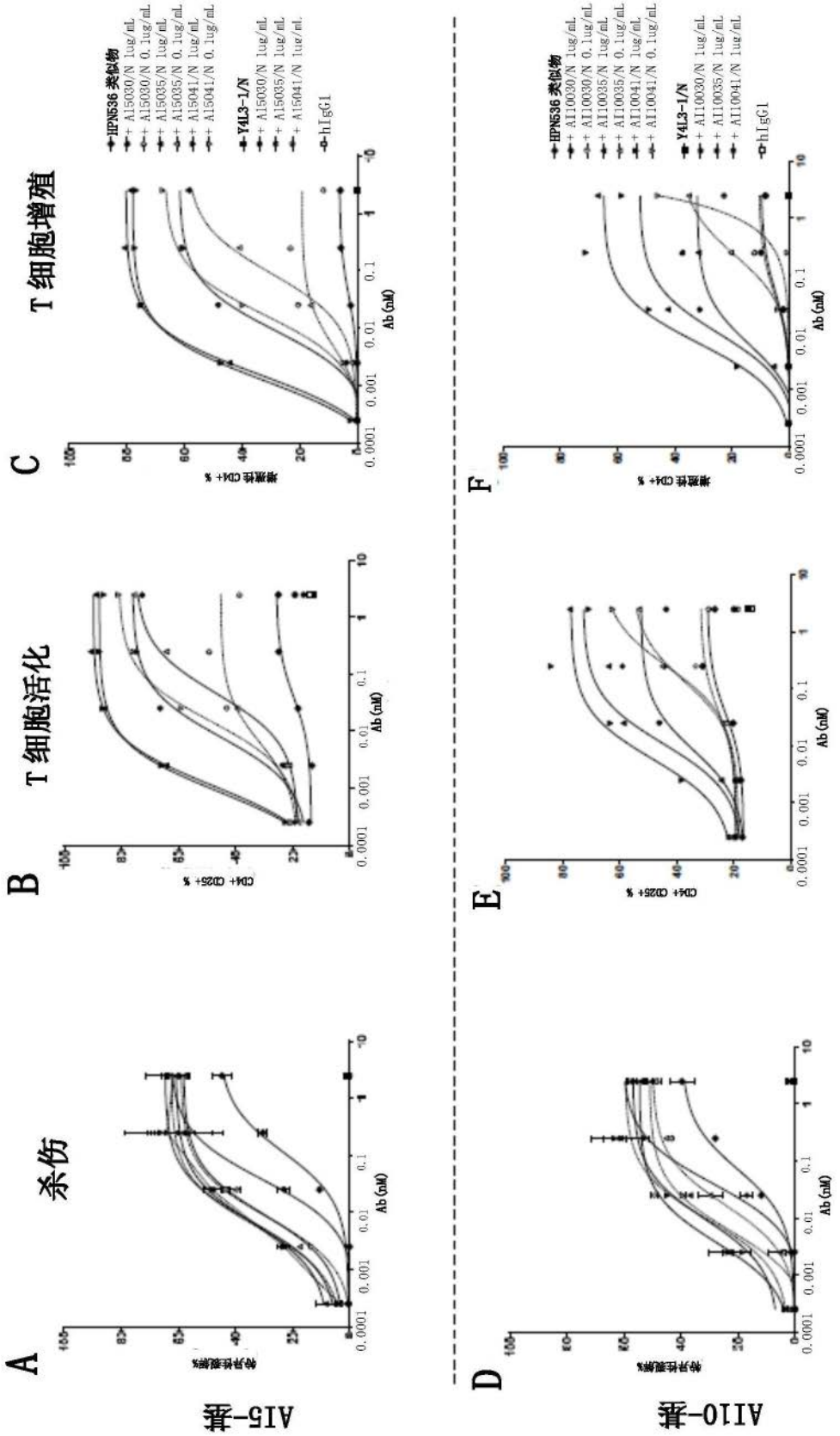

A
杀伤
AI5-基
B
T细胞活化
C
T细胞增殖
HPN536 类似物
+ AI5030/N 1ug/mL
+ AI5030/N 0.1ug/mL
+ AI5035/N 1ug/mL
+ AI5035/N 0.1ug/mL
+ AI5041/N 1ug/mL
+ AI5041/N 0.1ug/mL
Y4L3-1/N
+ AI5030/N 1ug/mL
+ AI5035/N 1ug/mL
+ AI5041/N 1ug/mL
hIgG1
Ab (nM)
D
E
F
AI10-基
HPN536 类似物
+ AI10030/N 1ug/mL
+ AI10030/N 0.1ug/mL
+ AI10035/N 1ug/mL
+ AI10035/N 0.1ug/mL
+ AI10041/N 1ug/mL
+ AI10041/N 0.1ug/mL
Y4L3-1/N
+ AI10030/N 1ug/mL
+ AI10035/N 1ug/mL
+ AI10041/N 1ug/mL
hIgG1

图15

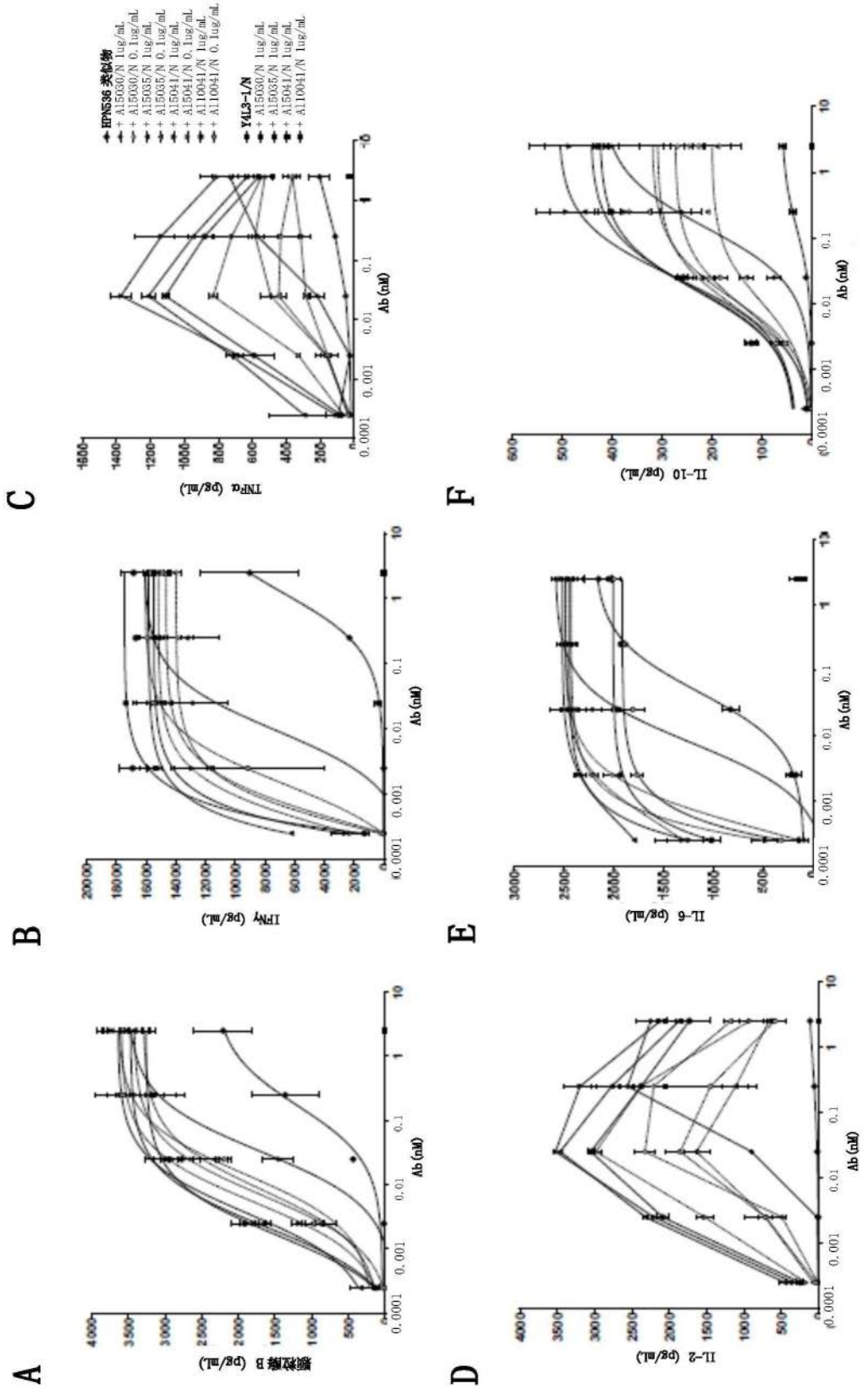

A
B
C
D
E
F
Ab (nM)
IFNγ (pg/mL)
TNFα (pg/mL)
IL-2 (pg/mL)
IL-6 (pg/mL)
IL-10 (pg/mL)
HPN536 类似物
Y4L3-1/N

图16

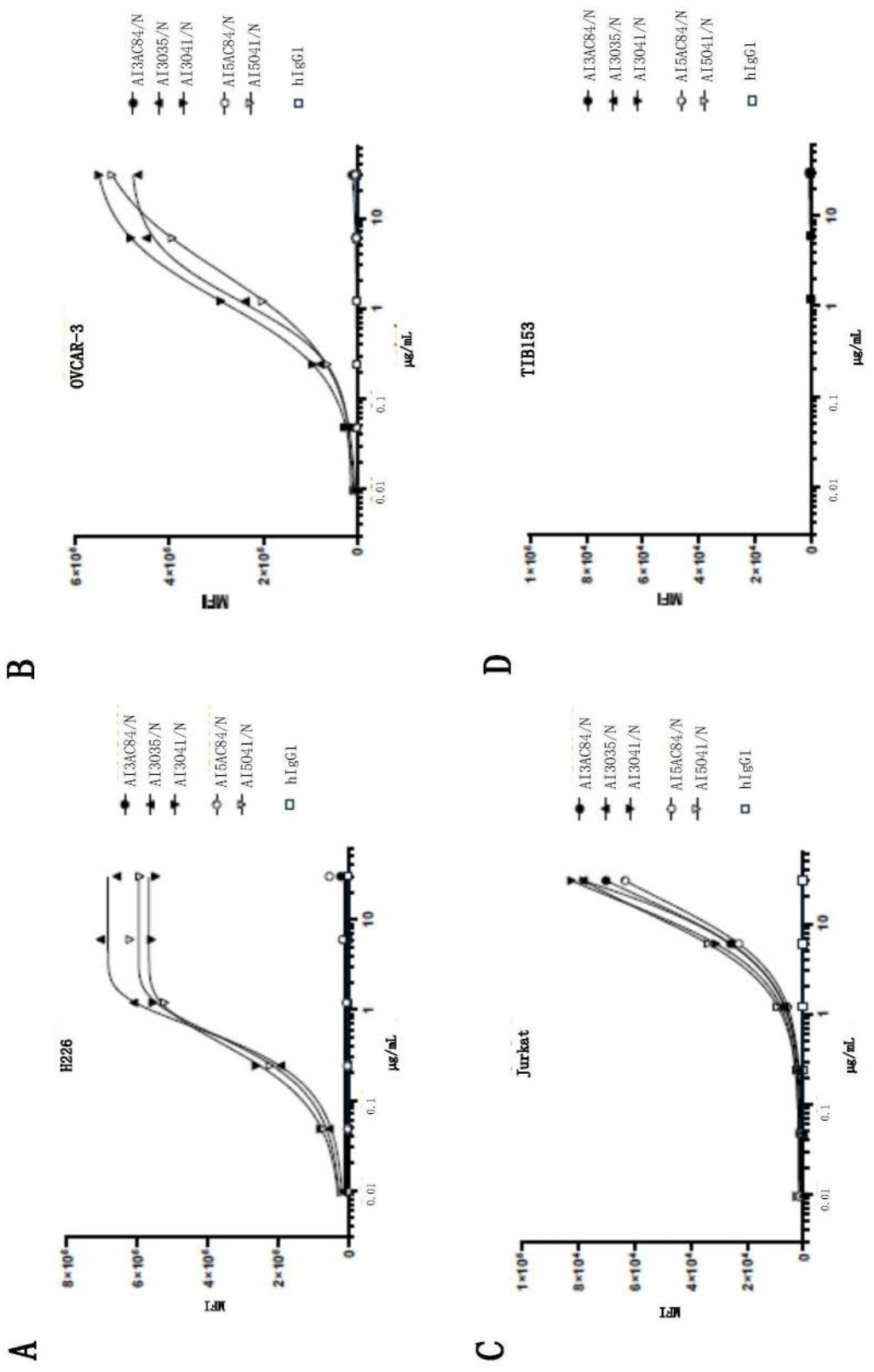

A
B
C
D
H226
OVCAR-3
Jurkat
TIB153
AI3AC84/N
AI3035/N
AI3041/N
AI5AC84/N
AI5041/N
hIgG1
MFI
μg/mL

图17

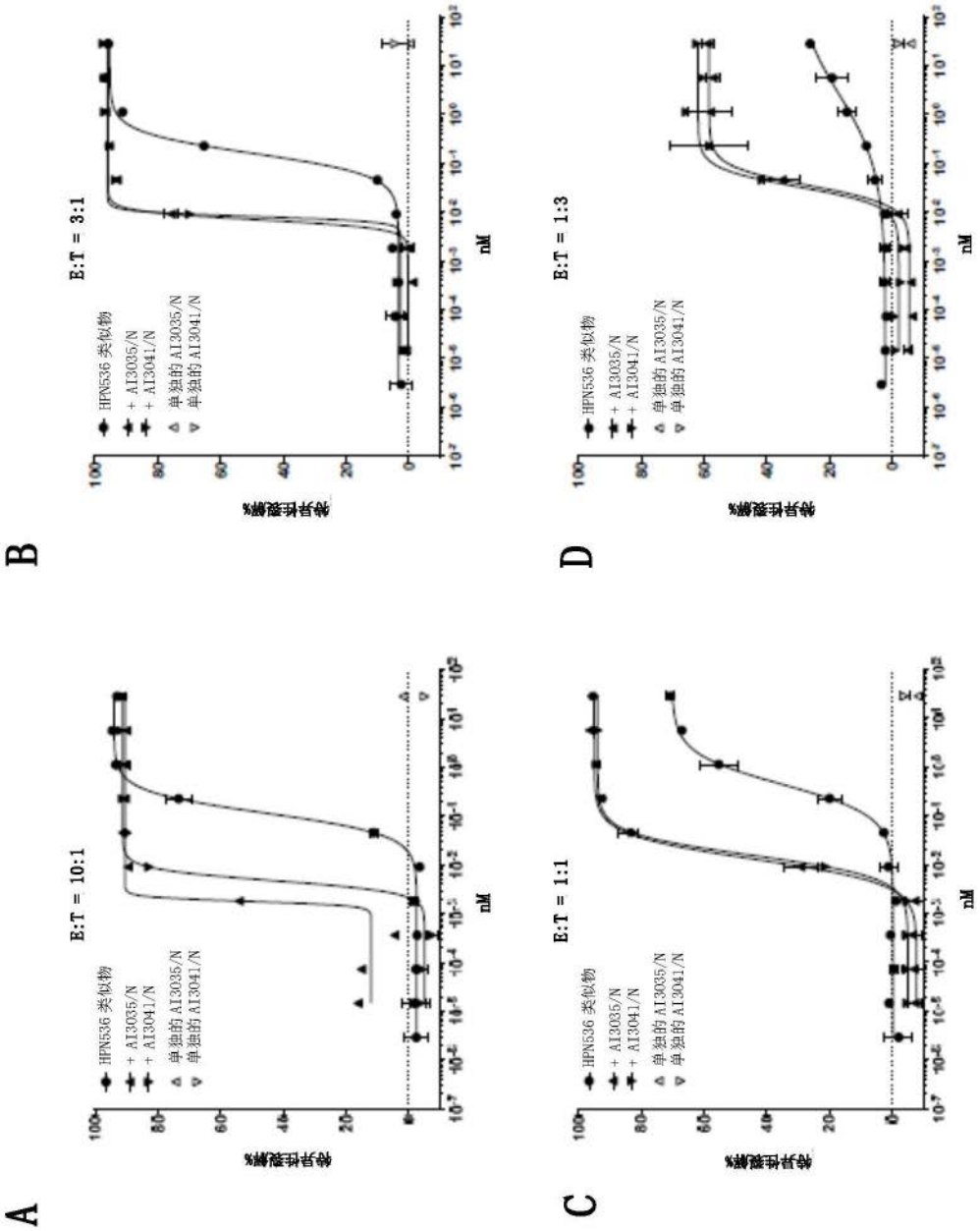

A
B
C
D
E:T = 10:1
E:T = 3:1
E:T = 1:1
E:T = 1:3
HPN536 类似物
+ AI3035/N
+ AI3041/N
单独的 AI3035/N
单独的 AI3041/N
特异性裂解%
nM

图18

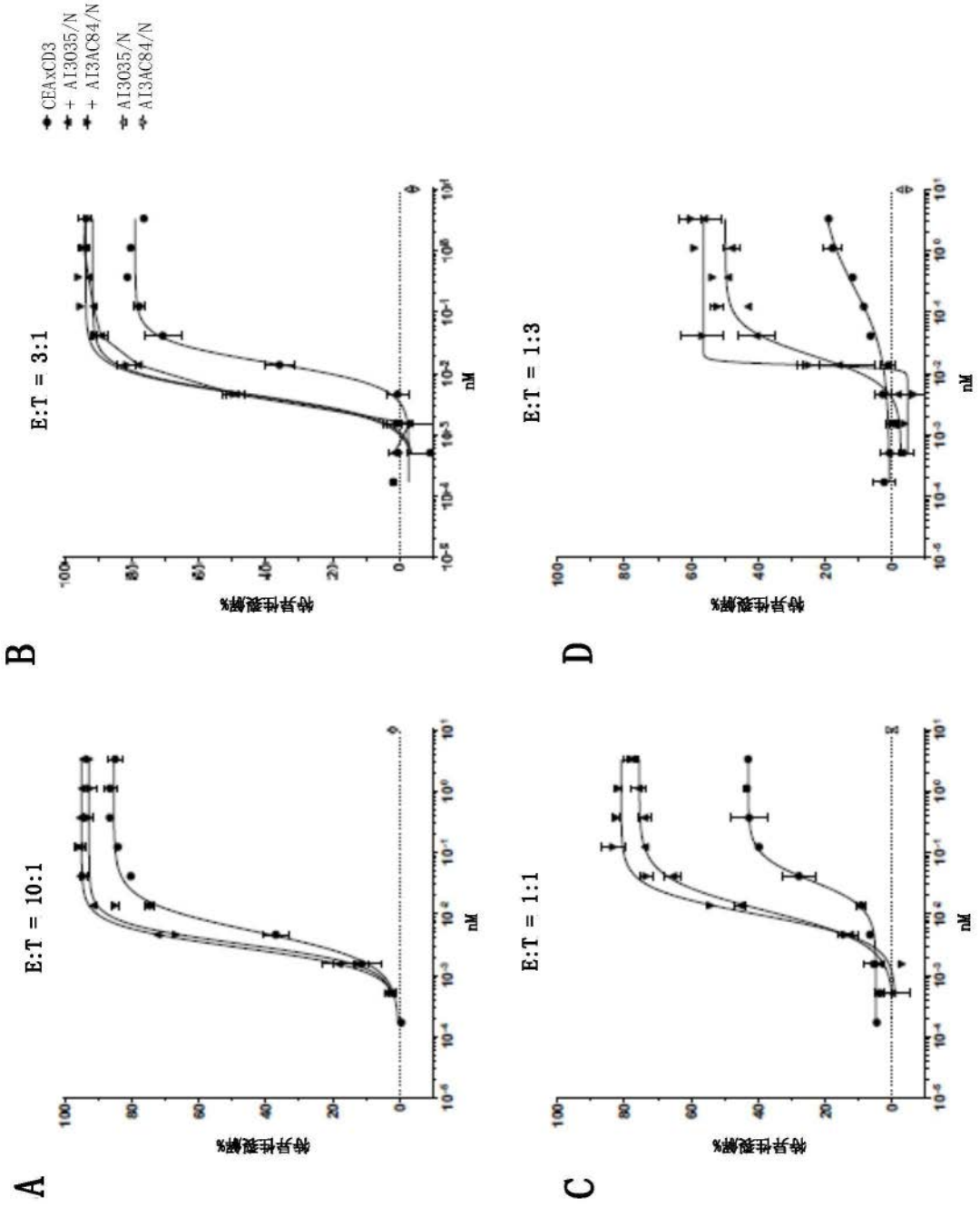

CEAxCD3
+ AI3035/N
+ AI3AC84/N
AI3035/N
AI3AC84/N
A
E:T = 10:1
B
E:T = 3:1
C
E:T = 1:1
D
E:T = 1:3
特异性裂解%
nM

图19

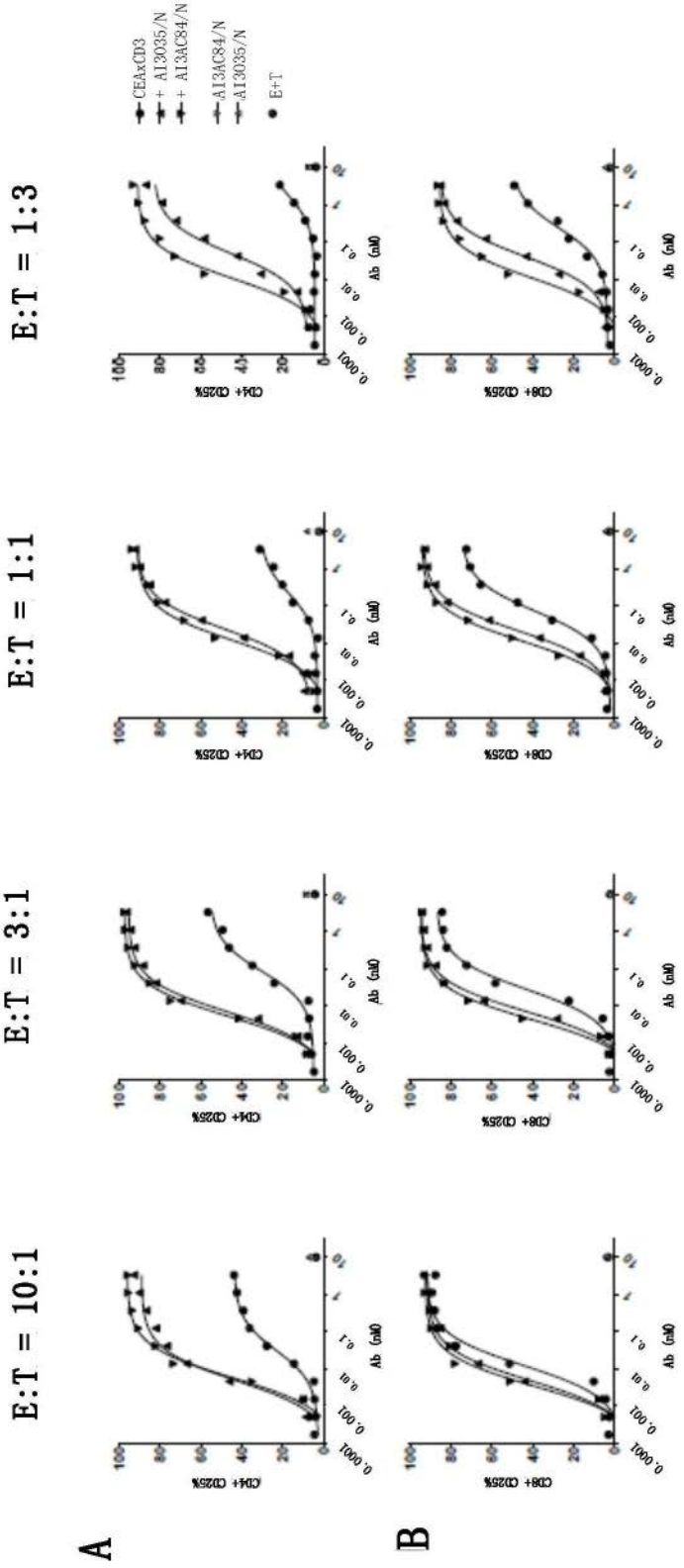

E:T = 10:1
E:T = 3:1
E:T = 1:1
E:T = 1:3
A
B
CEAxCD3
+ AI3035/N
+ AI3AC84/N
AI3AC84/N
AI3035/N
E+T
CD4+ CD25%
CD8+ CD25%
Ab (nM)

图20

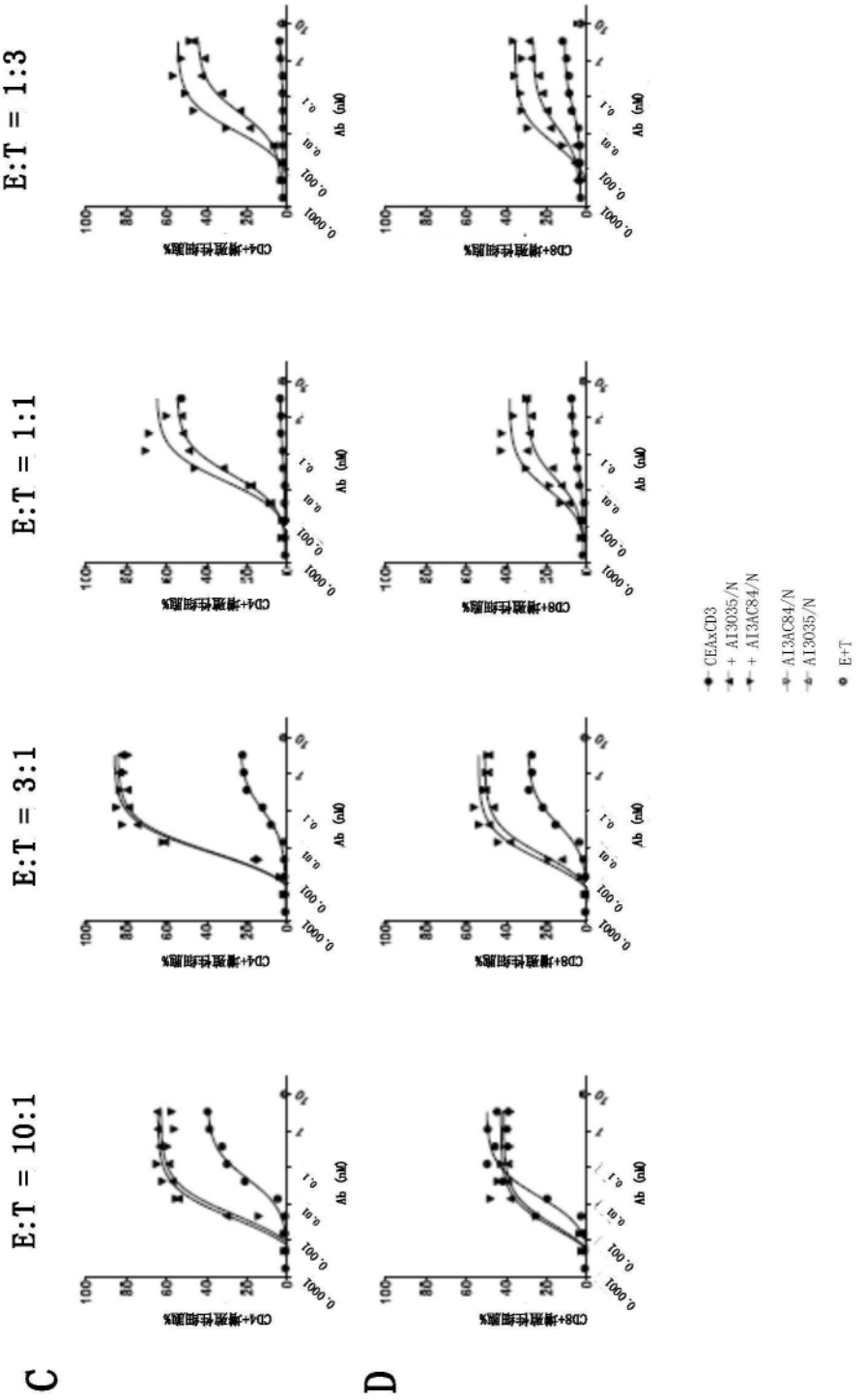
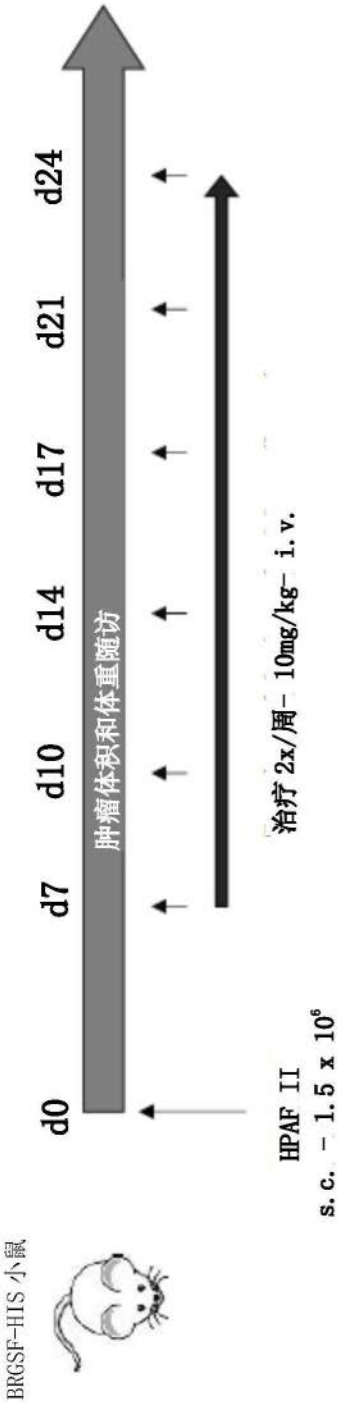

C
D
E:T = 10:1
E:T = 3:1
E:T = 1:1
E:T = 1:3
CD4+增殖性细胞%
CD8+增殖性细胞%
Ab (nM)
CEAxCD3
+ A13035/N
+ A13AC84/N
A13AC84/N
A13035/N
E+T

图20



组		供体 A	供体 B	供体 C	供体 D
1	媒介物	3	3	3	3
2	CEAxCD3	3	3	3	3
3	CEAxCD3 + AI3AC84/N	3	3	3	3

图21

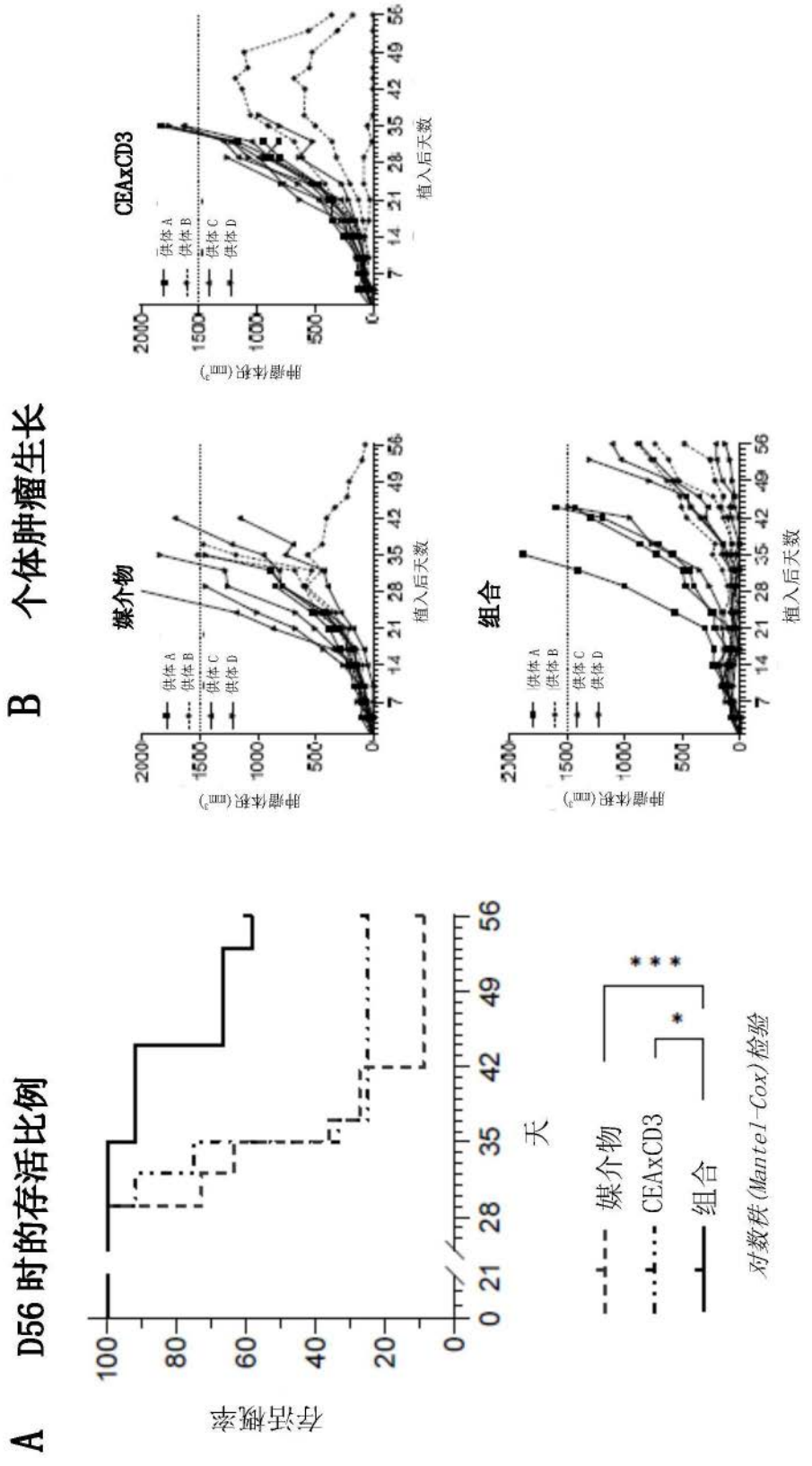

A
D56 时的存活比例
存活概率
天
媒介物
CEAxCD3
组合
对数秩 (Mantel-Cox) 检验
B
个体肿瘤生长
肿瘤体积 (mm³)
植入后天数
供体 A
供体 B
供体 C
供体 D

图22