



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119173539 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 20

(21) 申请号 202380024591.3

(22) 申请日 2023.01.09

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2022/070870 2022.01.09 CN

PCT/CN2022/117334 2022.09.06 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.08.30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2023/071334 2023.01.09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/131329 EN 2023.07.13

(71) 申请人 天境生物科技(上海)有限公司

地址 201210 上海市浦东新区中国(上海)

自由贸易试验区上科路88号1幢西塔

八楼802室

(72) 发明人 蒋雯卿 李键 陈曦 刘岩

郭炳诗

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司

11314

专利代理师 程伟 程云

(51) Int. Cl.

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

权利要求书3页 说明书42页

序列表(电子公布) 附图25页

(54) 发明名称

多特异性构建体及其用途

(57) 摘要

提供了靶向claudin 6(CLDN6)和4-1BB的双特异性和多特异性抗体。在不存在表达CLDN6的细胞时,这些抗体可以与4-1BB结合,但不能激活4-1BB信号传导。然而,在存在表达CLDN6的细胞时,这些抗体可以触发CLDN6依赖性4-1BB信号传导,从而对表达CLDN6的肿瘤细胞产生有效的免疫反应。

1. 一种多特异性构建体,其包含:
 - (1) 与claudin-6特异性结合的第一抗体部分(“CLDN6”);和
 - (2) 与4-1BB特异性结合的第二抗体部分。
2. 根据权利要求0所述的多特异性构建体,其中所述第一抗体部分选自全长抗体、Fab、Fab’、F(ab’)₂、scFv和sdAb。
3. 根据权利要求0或0所述的多特异性构建体,其中所述第一抗体部分包含:
 - (1) HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其在重链可变区(VH)内分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述重链可变区包含SEQ ID No:7中所示的序列;和
 - (2) LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其在轻链可变区(VL)内分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID No:8中所示的序列。
4. 根据权利要求0-0中任一项所述的多特异性构建体,其中所述第一抗体部分包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中:
 - (a) 所述VH包含:
 - (i) HC-CDR1,其包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,
 - (ii) HC-CDR2,其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,和
 - (iii) HC-CDR3,其包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,并且;
 - (b) 所述VL包含:
 - (i) LC-CDR1,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,
 - (ii) LC-CDR2,其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,和
 - (iii) LC-CDR3,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。
5. 根据权利要求0-0中任一项所述的多特异性构建体,其中所述第一抗体部分包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),并且其中:
 - (1) 所述VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:7包含至少约80%的序列同一性;和/或
 - (2) 所述VL包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:8包含至少约80%的序列同一性。
6. 根据权利要求0-2中任一项所述的多特异性构建体,其中所述第一抗体部分包含:
 - (1) HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其在重链可变区(VH)内分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述重链可变区包含SEQ ID No:18中所示的序列;和
 - (2) LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其在轻链可变区(VL)内分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:19中所示的序列。
7. 根据权利要求0-2和6中任一项所述的多特异性构建体,其中所述第一抗体部分包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中:
 - (1) 所述VH包含:
 - (i) HC-CDR1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,
 - (ii) HC-CDR2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,和
 - (iii) HC-CDR3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,并且;
 - (2) 所述VL包含:
 - (i) LC-CDR1,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,

- (ii) LC-CDR2, 其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列, 和
- (iii) LC-CDR3, 其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

8. 根据权利要求1-2和6-7中任一项所述的多特异性构建体, 其中所述第一抗体部分包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 并且其中:

(1) 所述VH包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列或其变体, 所述变体与SEQ ID NO:18具有至少约80%的序列同一性; 和/或

(2) 所述VL包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列或其变体, 所述变体与SEQ ID NO:19具有至少约80%的序列同一性。

9. 根据权利要求0-8中任一项所述的多特异性构建体, 其中所述第一抗体部分与CLDN6的结合触发所述第二抗体部分激活4-1BB。

10. 根据权利要求9所述的多特异性构建体, 其中所述第二抗体部分与4-1BB的CRD 3/4区域特异性结合。

11. 根据权利要求0-10中任一项所述的多特异性构建体, 其中所述第二抗体部分选自全长抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv和sdAb。

12. 根据权利要求11所述的多特异性构建体, 其中所述第二抗体部分是sdAb。

13. 根据权利要求12所述的多特异性构建体, 其中所述sdAb在单个单体可变抗体结构域内包含sdAb-CDR1、sdAb-CDR2和sdAb-CDR3, 其分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列, 所述单个单体可变抗体结构域包含SEQ ID NO:27中所示的氨基酸序列。

14. 根据权利要求12所述的多特异性构建体, 其中所述sdAb包含:

- (1) sdAb-CDR1, 其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列;
- (2) sdAb-CDR2, 其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列; 和
- (3) sdAb-CDR3, 其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

15. 根据权利要求0-14中任一项所述的多特异性构建体, 其中所述第二抗体部分包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列或其变体, 所述变体与SEQ ID NO:27具有至少约80%的序列同一性。

16. 根据权利要求0-15中任一项所述的多特异性构建体, 其中所述多特异性构建体是双特异性抗体或双特异性结合片段。

17. 根据权利要求0-5和9-16中任一项所述的多特异性构建体, 其中:

(1) 所述第一抗体部分包含:

(a) HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3, 其在重链可变区 (VH) 内分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列, 所述重链可变区包含SEQ ID No:7中所示的序列;

(b) LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3, 其在轻链可变区 (VL) 内分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列, 所述轻链可变区包含SEQ ID No:8中所示的序列, 并且

(2) 所述第二抗体部分在单个单体可变抗体结构域内包含sdAb-CDR1、sdAb-CDR2和sdAb-CDR3, 其分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列, 所述单个单体可变抗体结构域包含SEQ ID NO:27中所示的氨基酸序列。

18. 一种药物组合物, 其包含权利要求0-17中任一项的多特异性构建体, 以及药学上可接受的载剂。

19. 一种核酸, 其编码权利要求0-17中任一项的多特异性构建体。

20. 一种载体,其包含权利要求19的核酸。
21. 一种宿主细胞,其包含权利要求19的核酸或权利要求20的载体。
22. 一种治疗有需要的受试者的疾病或病症的方法,其包括向受试者施用有效量的权利要求0-17中任一项的多特异性构建体或权利要求18的药物组合物。
23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述疾病或病症是癌症。
24. 权利要求0-17中任一项的多特异性构建体在制备药物中的用途,所述药物用于治疗有需要的受试者的疾病或病症。
25. 一种多特异性构建体,其包含:
 - (1) 与肿瘤抗原特异性结合的第一抗体部分;和
 - (2) 与4-1BB特异性结合的第二抗体部分,其中所述第一抗体部分与所述肿瘤抗原的结合触发所述第二抗体部分激活4-1BB。
26. 根据权利要求0所述的多特异性构建体,其中在第一抗体部分与肿瘤抗原结合后,所述第二抗体部分对4-1BB的激活增强至少10倍。
27. 根据权利要求0或0所述的多特异性构建体,其中所述第二抗体部分与4-1BB的CRD 3/4区域特异性结合。
28. 根据权利要求0-0中任一项所述的多特异性构建体,其中所述第二抗体部分是sdAb。
29. 根据权利要求0所述的多特异性构建体,其中所述sdAb在单个单体可变抗体结构域内包含sdAb-CDR1、sdAb-CDR2和sdAb-CDR3,其分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述单个单体可变抗体结构域包含SEQ ID NO:27中所示的氨基酸序列。
30. 根据权利要求0所述的多特异性构建体,其中所述sdAb包含:
 - (1) sdAb-CDR1,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列;
 - (2) sdAb-CDR2,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列;和
 - (3) sdAb-CDR3,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。
31. 根据权利要求0-0中任一项所述的多特异性构建体,其中所述肿瘤抗原是CLDN6。
32. 一种多特异性构建体,其包含两个重链组分和两个轻链组分,其中:
 - (a) 每个重链组分包含SEQ ID NO:28中所示的序列,并且每个轻链组分包含SEQ ID NO:29中所示的序列;
 - (b) 每个重链组分包含SEQ ID NO:30中所示的序列,并且每个轻链组分包含SEQ ID NO:31中所示的序列;
 - (c) 每个重链组分包含SEQ ID NO:32中所示的序列,并且每个轻链组分包含SEQ ID NO:33中所示的序列;
 - (d) 每个重链组分包含SEQ ID NO:34中所示的序列,并且每个轻链组分包含SEQ ID NO:35中所示的序列;
 - (e) 每个重链组分包含SEQ ID NO:36中所示的序列,并且每个轻链组分包含SEQ ID NO:37中所示的序列;或
 - (f) 每个重链组分包含SEQ ID NO:38中所示的序列,并且每个轻链组分包含SEQ ID NO:39中所示的序列。

多特异性构建体及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2022年1月9日提交的国际申请号PCT/CN2022/070870的优先权,其内容通过引用全文并入本文。

技术领域

[0003] 本申请涉及多特异性分子,例如抗CLDN6/抗4-1BB双特异性抗体,及其用途,包括治疗疾病或病症。

背景技术

[0004] Claudin是形成细胞紧密连接的重要组分的一类蛋白质。Claudin-6 (CLDN6) 是参与紧密连接形成的一种四跨膜蛋白。在成人正常组织中,CLDN6 mRNA和蛋白不存在。另一方面,在多种人实体癌(如睾丸癌、卵巢癌、子宫癌和肺腺癌)中频繁检测到高CLDN6转录本水平。据报道,与mRNA水平一致,CLDN6蛋白在这些人癌症中是高且均一的。

[0005] 4-1BB (CD137, 肿瘤坏死因子受体超家族9) 是TNF受体超家族 (TNFRSF) 的成员,且是一种共刺激分子,其在免疫细胞(先天免疫细胞和适应性免疫细胞)激活后表达。4-1BB在调节各种免疫细胞的活性方面起着重要作用。4-1BB激动剂增强免疫细胞增殖、存活、细胞因子分泌和CD8⁺ T细胞的细胞溶解活性。诸多其他研究表明,激活4-1BB会增强免疫反应以消除小鼠的肿瘤。因此,表明了4-1BB在癌症免疫学中是有前景的靶标分子。

[0006] 本文提及的所有出版物、专利、专利申请和已公布专利申请的公开内容均通过引用全文并入本文。

发明内容

[0007] 在一方面,本文提供了多特异性构建体,其包含:与肿瘤抗原特异性结合的第一抗体部分;和与4-1BB特异性结合的第二抗体部分,其中所述第一抗体部分与所述肿瘤抗原的结合触发所述第二抗体部分激活4-1BB。在一些实施方案中,第二抗体部分与4-1BB的CRD 3/4区域特异性结合。

[0008] 在一些实施方案中,本文提供了多特异性构建体,其包含与肿瘤抗原特异性结合的第一抗体部分;和与4-1BB特异性结合的第二抗体部分,其中所述第一抗体部分与所述肿瘤抗原的结合触发所述第二抗体部分激活4-1BB。在一些实施方案中,在第一抗体部分与肿瘤抗原结合后,第二抗体部分对4-1BB的激活增强至少约2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍或1000倍中的任一种,包括这些值之间的任何范围。在一些实施方案中,在不与肿瘤抗原结合的情况下,多特异性构建体确实激活了4-1BB信号传导。在一些实施方案中,在不与肿瘤抗原结合的情况下,第二部分不激活4-1BB信号传导。

[0009] 在一些实施方案中,提供了多特异性构建体,其包含a) 与claudin-6 (“CLDN6”) 特异性结合的第一抗体部分;和b) 与4-1BB特异性结合的第二抗体部分。在一些实施方案中,

第一抗体部分包含全长抗体,所述全长抗体包含两条重链和两条轻链。

[0010] 本文提供了多特异性构建体,其包含:(1)与claudin-6(“CLDN6”)特异性结合的第一抗体部分;和(2)与4-1BB特异性结合的第二抗体部分。

[0011] 在一些实施方案中,第一抗体部分选自全长抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv和sdAb。在一些实施方案中,其中所述第一抗体部分包含:(1)HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其在重链可变区(VH)内分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述重链可变区包含SEQ ID No:7中所示的序列;和(2)LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其在轻链可变区(VL)内分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID No:8中所示的序列。在一些实施方案中,第一抗体部分包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中:(a)所述VH包含:(i)HC-CDR1,其包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,(ii)HC-CDR2,其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,和(iii)HC-CDR3,其包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,并且(b)所述VL包含:(i)LC-CDR1,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,(ii)LC-CDR2,其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,和(iii)LC-CDR3,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗体部分包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),并且其中:(1)所述VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:7包含至少约80%的序列同一性;和/或(2)所述VL包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:8包含至少约80%的序列同一性。在一些实施方案中,第一抗体部分包含:(1)HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其在重链可变区(VH)内分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述重链可变区包含SEQ ID No:18中所示的序列;和(2)LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其在轻链可变区(VL)内分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:19中所示的序列。在一些实施方案中,第一抗体部分包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中:(1)所述VH包含:(i)HC-CDR1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,(ii)HC-CDR2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,和(iii)HC-CDR3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,并且(2)所述VL包含:(i)LC-CDR1,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,(ii)LC-CDR2,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,和(iii)LC-CDR3,其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗体部分包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),并且其中:(1)所述VH包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:18具有至少约80%的序列同一性;和/或(2)所述VL包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:19具有至少约80%的序列同一性。在一些实施方案中,第一抗体部分与CLDN6的结合触发第二抗体部分激活4-1BB。

[0012] 在一些实施方案中,所述第二抗体部分与4-1BB的CRD 3/4区域特异性结合。在一些实施方案中,第二抗体部分选自全长抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv和sdAb。在一些实施方案中,第二抗体部分是sdAb。在一些实施方案中,sdAb在单个单体可变抗体结构域内包含sdAb-CDR1、sdAb-CDR2和sdAb-CDR3,其分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述单个单体可变抗体结构域包含SEQ ID NO:27中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,sdAb包含:(1)sAb-CDR1,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列;(2)sAb-CDR2,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列;和(3)sAb-CDR3,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二抗体部分包括SEQ ID NO:27的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:27具有至少约80%的序列同一性。

[0013] 在一些实施方案中,多特异性构建体是双特异性抗体或双特异性结合片段。在一些实施方案中,(1)第一抗体部分包含:(a)HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其在重链可变区(VH)内分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述重链可变区包含SEQ ID No:7中所示的序列;(b)LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其在轻链可变区(VL)内分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID No:8中所示的序列,并且(2)第二抗体部分在单个单体可变抗体结构域内包含sdAb-CDR1、sdAb-CDR2和sdAb-CDR3,其分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述单个单体可变抗体结构域包含SEQ ID NO:27中所示的氨基酸序列。

[0014] 在一些实施方案中,提供了药物组合物,其包含本文所述的多特异性构建体和药物可接受的载体。

[0015] 在一些实施方案中,提供了核酸,其编码本文所述的多特异性构建体。在一些实施方案中,提供了载体,其包含这种核酸。在一些实施方案中,提供了宿主细胞,其包含这种核酸或这种载体。

[0016] 本文还提供了治疗有需要的受试者的疾病或病症的方法,其包括向所述受试者施用有效量的本文所述的多特异性构建体或本文所述的药物组合物。本文还提供了本文所述的多特异性构建体在制备用于治疗有需要的受试者的疾病或病症的药物中的用途。在一些实施方案中,疾病或病症是癌症。

[0017] 在一些实施方案中,提供了多特异性构建体,其包含:(1)与肿瘤抗原特异性结合的第一抗体部分;和(2)与4-1BB特异性结合的第二抗体部分,其中所述第一抗体部分与所述肿瘤抗原的结合触发所述第二抗体部分激活4-1BB。在一些实施方案中,在第一抗体部分与肿瘤抗原结合后,第二抗体部分对4-1BB的激活增强至少10倍。在一些实施方案中,所述第二抗体部分与4-1BB的CRD 3/4区域特异性结合。在一些实施方案中,第二抗体部分是sdAb。在一些实施方案中,sdAb在单个单体可变抗体结构域内包含sdAb-CDR1、sdAb-CDR2和sdAb-CDR3,其分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述单个单体可变抗体结构域包含SEQ ID NO:27中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,sdAb包含:(1)sdAb-CDR1,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列;(2)sdAb-CDR2,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列;和(3)sdAb-CDR3,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原是CLDN6。

[0018] 本文还提供了多特异性构建体,其包含两个重链组分和两个轻链组分,其中:(a)每个重链组分包含SEQ ID NO:28和/或SEQ ID NO:44中所示的序列,并且每个轻链组分包含SEQ ID NO:29中所示的序列;(b)每个重链组分包含SEQ ID NO:30中所示的序列,并且每个轻链组分包含SEQ ID NO:31中所示的序列;(c)每个重链组分包含SEQ ID NO:32中所示的序列,并且每个轻链组分包含SEQ ID NO:33中所示的序列;(d)每个重链组分包含SEQ ID NO:34中所示的序列,并且每个轻链组分包含SEQ ID NO:35中所示的序列;(e)每个重链组分包含SEQ ID NO:36中所示的序列,并且每个轻链组分包含SEQ ID NO:37中所示的序列;或(f)每个重链组分包含SEQ ID NO:38中所示的序列,并且每个轻链组分包含SEQ ID NO:39中所示的序列。

[0019] 本申请提供了试剂盒,其包含本文所述的多特异性构建体和/或本文所述的药物以及包装附页或说明书,其用于使用所述多特异性构建体(或药物组合物)治疗疾病或病症(例如癌症)。

[0020] 将理解的是,本文所述的各种实施方案中的一种、一些或全部特性可以被组合以形成本发明的其他实施方案。本发明的这些和其他方面对于本领域技术人员将变得显而易见。本发明的这些和其他实施方案通过下面的详细描述作进一步描述。

附图说明

[0021] 图1A-图1B说明了本文公开的CLDN6 X 4-1BB双特异性抗体(BsAb)与CLDN6的结合亲和力。

[0022] 图2A-图2C说明了本文公开的CLDN6 X 4-1BB BsAb与表达CLDN6的细胞的结合亲和力。

[0023] 图3A-图3D说明了本文公开的CLDN6 X 4-1BB BsAb与4-1BB的结合亲和力。

[0024] 图4A-图4B说明了本文公开的CLDN6 X 4-1BB BsAb与可溶性4-1BB和表达4-1BB的细胞的结合。

[0025] 图5A-图5D说明了本文公开的CLDN6 X 4-1BB BsAb的CLDN6依赖性4-1BB激活。

[0026] 图6A-图6H说明了通过本文公开的CLDN6 X 4-1BB BsAb激活PBMC。

[0027] 图7A-图7B说明了在用本文公开的CLDN6 X 4-1BB BsAb治疗后,携带CT26鼠结直肠癌肿瘤的hu4-1BB小鼠中的肿瘤抑制作用。

[0028] 图8说明了在本申请的CLDN6X4-1BB BsAb治疗后的肝功能。

[0029] 图9A-图9B说明了在用本文公开的CLDN6 X 4-1BB BsAb治疗后,携带MC38鼠结肠腺癌肿瘤的hu4-1BB小鼠中的肿瘤抑制作用。

具体实施方式

[0030] 定义

[0031] 术语“抗体”在其最广泛的意义上使用,并且涵盖各种抗体结构,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)、全长抗体及其抗原结合片段,只要它们表现出所需的抗原结合活性即可。术语“抗体部分”是指全长抗体或其抗原结合片段。

[0032] 全长抗体包含两条重链和两条轻链。轻链和重链的可变区负责抗原结合。重链和轻链的可变结构域可以分别称为“VH”和“VL”。两条链中的可变区一般含有三个高度可变的环,称为互补决定区(CDR)(轻链(LC)CDR包括LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,重链(HC)CDR包括HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3)。可以通过Kabat、Chothia或Al-Lazikani的惯例来定义或鉴定本文公开的抗体和抗原结合片段的CDR边界(Al-Lazikani 1997;Chothia 1985;Chothia 1987;Chothia1989;Kabat 1987;Kabat 1991)。重链或轻链的三个CDR位于称为框架区(FR)的侧翼延伸之间,所述框架区比CDR更高度保守,并形成支架以支撑高变环。重链和轻链的恒定区不参与抗原结合,但表现出各种效应子(effector)功能。基于其重链恒定区的氨基酸序列对抗体进行分类。抗体的五个主要类别或同种型是IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其特征分别是存在 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 重链。主要抗体类别中的数个分为亚类,如IgG1(γ 1重链)、IgG2(γ 2重链)、IgG3(γ 3重链)、IgG4(γ 4重链)、IgA1(α 1重链)或IgA2(α 2重链)。

[0033] 如本文所用,术语“抗原结合片段”是指抗体片段,包括例如双特异抗体(diabody)、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、二硫键稳定性Fv片段(dsFv)、(dsFv)₂、双特异性

dsFv (dsFv-dsFv')、二硫键稳定性双特异抗体(ds diabody)、单链Fv(scFv)、scFv二聚体(二价双特异抗体)、由抗体的包含一个或多个CDR的部分形成的多特异性抗体、单结构域抗体(例如骆驼化单结构域抗体)、纳米抗体、结构域抗体、二价结构域抗体、或与抗原结合但不包含完整抗体结构的任何其他抗体片段。抗原结合片段能够与亲本抗体或亲本抗体片段(例如亲本scFv)所结合的相同抗原结合。在一些实施方案中,抗原结合片段可以包含来自特定人抗体的一个或多个CDR,其被移植到来自一种或多种不同人抗体的框架区。

[0034] “单链Fv”也缩写为“sFv”或“scFv”,是包含连接至单条多肽链中的VH和VL抗体结构域的抗体片段。在一些实施方案中,scFv多肽进一步包含VH和VL结构域之间的多肽接头,其使得scFv能够形成用于抗原结合的所需结构。关于scFv的综述,参见Plückthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第113卷, Rosenburg和Moore编辑, Springer-Verlag, New York, 269-315页(1994)。

[0035] 如本文所用,术语“CDR”或“互补决定区”旨在表示在重链和轻链多肽的可变区内发现的非连续抗原结合位点。这些特定区域已由Kabat等人, *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616 (1977); Kabat等人, U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of proteins of immunological interest” (1991); Chothia等人, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Al-Lazikani B. 等人, *J. Mol. Biol.*, 273:927-948 (1997); MacCallum等人, *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996); Abhinandan和Martin, *Mol. Immunol.*, 45:3832-3839 (2008); Lefranc M.P. 等人, *Dev. Comp. Immunol.*, 27:55-77 (2003); 以及Honegger和Plückthun, *J. Mol. Biol.*, 309:657-670 (2001) 描述,其中定义包括当彼此比较时氨基酸残基的重叠或子集。然而,应用任一定义来提及抗体或移植抗体或其变体的CDR,均旨在落入如本文所定义并使用的术语范围内。下表1中列出了如每个以上引用的参考文献所定义的涵盖CDR的氨基酸残基,作为比较。CDR预测算法和接口是本领域已知的,包括例如Abhinandan和Martin, *Mol. Immunol.*, 45:3832-3839 (2008); Ehrenmann F. 等人, *Nucleic Acids Res.*, 38:D301-D307 (2010); 和Adolf-Bryfogle J. 等人, *Nucleic Acids Res.*, 43:D432-D438 (2015)。本段中引用的参考文献的内容通过引用全文并入本文,以用于本申请并可能包括在本文的一个或多个权利要求中。

[0036] 表1:CDR定义

	<u>Kabat¹</u>	<u>Chothia²</u>	<u>MacCallum³</u>	<u>IMGT⁴</u>	<u>AHo⁵</u>	
	VH CDR1	31-35	26-32	30-35	27-38	25-40
	VH CDR2	50-65	53-55	47-58	56-65	58-77
[0037]	VH CDR3	95-102	96-101	93-101	105-117	109-137
	VL CDR1	24-34	26-32	30-36	27-38	25-40
	VL CDR2	50-56	50-52	46-55	56-65	58-77
	VL CDR3	89-97	91-96	89-96	105-117	109-137

[0038] ¹残基编号按照Kabat等人(同上)的命名法

[0039] ²残基编号按照Chothia等人(同上)的命名法

[0040] ³残基编号按照MacCallum等人(同上)的命名法

[0041] ⁴残基编号按照Lefranc等人(同上)的命名法

[0042] ⁵残基编号按照Honegger和Plückthun(同上)的命名法

[0043] “如Kabat的可变结构域残基编号”或“如Kabat的氨基酸位置编号”及其变体,是指

Kabat等人(同上)中用于抗体编制的重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。使用该编号系统,实际的线性氨基酸序列可以含有较少的或额外的氨基酸,对应于可变结构域的FR或高变区(HVR)的缩短或插入其中。例如,重链可变结构域可以包含在H2的残基52之后的单个氨基酸插入部分(根据Kabat的残基52a)和在重链FR残基82之后的插入残基(例如根据Kabat的残基82a、82b和82c等)。对于给定抗体,可以通过比对抗体序列的同源区域与“标准”Kabat编号序列来确定Kabat残基编号。

[0044] 除非本文另有说明,否则免疫球蛋白重链中残基的编号为如Kabat等人(同上)中的EU索引编号,但略有修改。简要地,我们在重链CDR1之前的超可变环中添加了5个残基。“如Kabat的EU索引编号”是指人IgG1 EU抗体的残基编号。

[0045] “框架”或“FR”残基是本文定义的CDR残基以外的那些可变结构域残基。

[0046] 非人(例如啮齿动物)抗体的“人源化”形式是嵌合抗体,其含有源自非人抗体的最小序列。在大多数情况下,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体高变区(HVR)的残基被替换为来自非人物种(如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物)(供体抗体)高变区的具有所需抗体特异性、亲和力和能力的残基。在一些情况下,人免疫球蛋白的框架区(FR)残基被替换为相应的非人残基。此外,人源化抗体可以包含在受体抗体或供体抗体中不存在的残基。进行这些修饰是为了进一步完善抗体性能。一般地,人源化抗体将基本上包含至少一个、通常是两个可变结构域的全部,其中全部或基本上全部的高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环,并且全部或基本上全部的FR对应于人免疫球蛋白序列的FR。人源化抗体任选地还将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的一部分。关于进一步的详细信息,参见Jones等人,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature 332:323-329(1988);和Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992)。

[0047] “人抗体”是具有对应于由人产生的和/或已使用如本文所公开的用于制造人抗体的任何技术制造的抗体的氨基酸序列的抗体。人抗体的该定义特别排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。可以使用本领域已知的各种技术(包括噬菌体展示文库)产生人抗体。Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,227:381(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.,222:581(1991)。还可用于制备人单克隆抗体的是Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,77页(1985);Boerner等人,J.Immunol.,147(1):86-95(1991)中描述的方法。还参见van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.,5:368-74(2001)。可以通过将抗原施用于转基因动物来制备人抗体,所述动物已被修饰以响应抗原性攻击而产生此类抗体,但已使其内源基因座失效,例如免疫的xeno小鼠(关于XENOMOUSE™技术,参见例如美国专利第6,075,181号和第6,150,584号)。关于通过人B细胞杂交瘤技术生成的人抗体,还参见例如Li等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,103:3557-3562(2006)。

[0048] 关于本文鉴定的多肽和抗体序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”或“同源性”被定义为:在对齐序列后,考虑任何保守替换作为序列同一性的一部分时,候选序列中与被比较多肽中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。可以以本领域技术人员能力范围内的各种方式实现出于确定氨基酸序列同一性百分比的目的的比对,例如使用公开可获得的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN、Megalign(DNASTAR)或MUSCLE软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括在被比对序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。然而,出于本文的目的,使用序列比较计算机程序MUSCLE生成%氨基酸序列同一性值

(Edgar, R.C., *Nucleic Acids Research* 32 (5):1792-1797, 2004; Edgar, R.C., *BMC Bioinformatics* 5(1):113, 2004)。

[0049] “同源”是指两个多肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性或序列同一性。当两个比较序列中的一个位置都被相同的碱基或氨基酸单体亚基占据时,例如,如果两个DNA分子各自的一个位置都被腺嘌呤占据,则分子在该位置是同源的。两个序列之间的同源性百分比是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较位置数乘以100的函数。例如,如果两个序列中10个位置中有6个是匹配的或同源的,则这两个序列60%同源。例如,DNA序列ATTGCC和TATGGC共有50%的同源性。一般地,当比对两个序列时,进行比较以给出最大同源性。

[0050] 术语“恒定结构域”是指免疫球蛋白分子的一部分,其相对于免疫球蛋白的另一部分(即可变结构域,其含有抗原结合位点)具有更保守的氨基酸序列。恒定结构域含有重链的C_H1、C_H2和C_H3结构域(统称为C_H)和轻链的C_L结构域。

[0051] 来自任何哺乳动物物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”都可以基于其恒定结构域的氨基酸序列分配至两个明显不同的类别之一,称为kappa(“κ”)和lambda(“λ”)。

[0052] “CH1结构域”(也称为“H1”结构域的“C1”)通常从约氨基酸118延伸至约氨基酸215(EU编号系统)。

[0053] “铰链区”一般定义为IgG中的区域,其对应于人IgG1的Glu216至Pro230(Burton, *Molec. Immunol.* 22:161-206(1985))。通过将形成重链间S-S键的第一个和最后一个半胱氨酸残基置于相同位置,可以将其他IgG同种型的铰链区与IgG1序列比对。

[0054] 人IgG Fc区的“CH2结构域”(也称为“C2”结构域)通常从约氨基酸231延伸至约氨基酸340。CH2结构域的独特之处在于其不与另一个结构域紧密配对。相反,两个N-连接的支链碳水化合物链插入完整的天然IgG分子的两个CH2结构域之间。据推测,碳水化合物可以为结构域-结构域配对提供替代物,并有助于稳定CH2结构域。Burton, *Molec Immunol.* 22:161-206(1985)。

[0055] “CH3结构域”(也称为“C3”结构域)包含Fc区中残基C-末端至CH2结构域的延伸(即从约氨基酸残基341至抗体序列的C-末端,通常位于IgG的氨基酸残基446或447)。

[0056] 本文中的术语“Fc区”或“片段可结晶区”用于定义免疫球蛋白重链的C-末端区域,包括天然序列Fc区和变异Fc区。尽管免疫球蛋白重链Fc区的边界可能会变化,但通常将人IgG重链Fc区定义为从Cys226位的氨基酸残基或从Pro230延伸至其羧基末端。例如,可以在抗体的产生或纯化过程中,或者通过重组工程改造编码抗体重链的核酸,去除Fc区的C-末端赖氨酸(根据EU编号系统的残基447)。因此,完整抗体的组成可以包含去除所有K447残基的抗体群体、没有去除K447残基的抗体群体、以及具有和不具有K447残基的抗体混合物的抗体群体。用于本文所述抗体的合适的天然序列Fc区包括人IgG1、IgG2(IgG2A、IgG2B)、IgG3和IgG4。

[0057] “Fc受体”或“FcR”描述了结合抗体Fc区的受体。优选的FcR是天然序列人FcR。此外,优选的FcR是结合IgG抗体(γ受体)的抗体,并且包括Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII亚类的受体,包括这些受体的等位基因变体和可变剪接形式,Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA(“激活受体”)和Fc γ RIIB(“抑制受体”),其具有相似的氨基酸序列,所述序列主要在其细胞质结构域中有所不同。激活受体Fc γ RIIA在其细胞质结构域中含有免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)。抑制受体Fc γ RIIB在其细胞质结构域中含有免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIM)。(参

见M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997) 。) FcR在Ravetch和Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel等人, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); 和de Haas等人, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995) 中综述。其他FcR, 包括将来要鉴定的FcR, 都涵盖在本文的术语“FcR”中。

[0058] 如本文所用, 术语“表位”是指抗原上的原子或氨基酸的特定群组, 抗体或抗体部分与其结合。如果两种抗体或抗体部分表现出对抗原的竞争性结合, 则它们可以在抗原内结合相同的表位。

[0059] 如本文所用, 在存在等摩尔浓度的第一抗体或其片段时, 当第一抗体或其片段抑制第二抗体或其片段的靶标抗原结合至少约50% (如至少约55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%中的任一种) 时, 第一抗体或其片段与第二抗体或其片段“竞争”结合靶标抗原, 反之亦然。PCT公布号W0 03/48731中描述了用于“分箱(binining)”抗体的高通量过程, 其基于所述抗体的交叉竞争。

[0060] 如本文所用, 术语“特异性结合”、“特异性识别”和“对……具有特异性”是指可测量且可重现的相互作用, 如靶标和抗体或抗体部分之间的结合, 其决定了在存在异质分子群体 (包括生物分子) 时靶标的存在。例如, 特异性识别靶标 (其可以是表位) 的抗体或抗体部分是这样的抗体或抗体部分, 与它与其他靶标的结合相比, 它与该靶标的结合具有更高的亲和力、亲合力、更容易和/或持续时间更长。在一些实施方案中, 如通过例如放射免疫测定法 (RIA) 所测量的, 抗体与不相关靶标的结合程度小于抗体与靶标结合的约10%。在一些实施方案中, 特异性结合靶标的抗体的解离常数 (K_D) 为 $\leq 10^{-5}M$ 、 $\leq 10^{-6}M$ 、 $\leq 10^{-7}M$ 、 $\leq 10^{-8}M$ 、 $\leq 10^{-9}M$ 、 $\leq 10^{-10}M$ 、 $\leq 10^{-11}M$ 或 $\leq 10^{-12}M$ 。在一些实施方案中, 抗体特异性结合蛋白质上的表位, 所述表位在来自不同物种的蛋白质中是保守的。在一些实施方案中, 特异性结合可以包括, 但不必须排他性结合。可以通过本领域已知的方法, 通过实验确定抗体或抗原结合结构域的结合特异性。此类方法包括但不限于蛋白质印迹、ELISA-、RIA-、ECL-、IRMA-、EIA-、BIACORE™测试和肽扫描。

[0061] “分离的”抗体 (或构建体) 是已从其产生环境的组分 (例如天然的或重组的) 中鉴定、分离和/或回收的抗体 (或构建体)。优选地, 分离的多肽不与来自其产生环境的所有其他组分相关联。

[0062] 本文所述的编码构建体、抗体或其抗原结合片段的“分离的”核酸分子是这样的核酸分子, 其从至少一种污染核酸分子中鉴定并分离, 在其产生的环境中所述分离的核酸分子通常与所述污染核酸分子相关联。优选地, 分离的核酸不与与产生环境相关联的所有组分相关联。编码本文所述的多肽和抗体的分离的核酸分子的形式与其自然界中发现的形式或设置不同。因此, 分离的核酸分子与天然存在于细胞中的编码本文所述的多肽和抗体的核酸不同。分离的核酸包括通常含有该核酸分子的细胞中含有的核酸分子, 但该核酸分子存在于染色体外或存在于与其天然染色体位置不同的染色体位置。

[0063] 当核酸被置于与另一个核酸序列的功能关系中时, 它是“可操作地连接”的。例如, 如果前序列或分泌前导序列的DNA被表达为参与多肽分泌的前蛋白, 则它与所述多肽的DNA可操作地连接; 如果启动子或增强子影响编码序列的转录, 则它与所述序列可操作地连接; 或者如果核糖体结合位点被置于便于翻译的位置, 则它与编码序列可操作地连接。一般地, “可操作地连接”是指被连接的DNA序列是连续的, 并且在分泌前导序列的情况下是连续的

并且在阅读框中。然而,增强子并不必须是连续的。通过在方便的限制性位点进行连接来完成连接。如果不存在此类位点,则按照常规做法使用合成寡核苷酸衔接物(adaptor)或接头。

[0064] 如本文所用,术语“载体”是指能够传播与其连接的另一个核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体,以及掺入宿主细胞基因组中的载体(所述载体已被引入所述宿主细胞中)。某些载体能够指导与其通过操作(operatively)连接的核酸的表达。此类载体在此称为“表达载体”。

[0065] 如本文所用,术语“转染”或“转化”或“转导”是指将外源性核酸转移或引入至宿主细胞中的过程。“转染的”或“转化的”或“转导的”细胞是已用外源性核酸转染、转化或转导的细胞。该细胞包括原代受试者细胞及其后代。

[0066] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,并且是指已引入外源性核酸的细胞,包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化细胞”,其包括初始的转化细胞和源于其的后代,不考虑传代次数。后代的核酸含量可能与亲代细胞不完全相同,并且可以含有突变。具有与在最初的转化细胞中筛选或选择的相同功能或生物活性的突变后代包括在本文中。

[0067] 如本文所用,“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”是用于获得有益的或所需的结果(包括临床结果)的方法。出于本申请的目的,有益的或所需的临床结果包括但不限于以下一种或多种:缓解由疾病引起的一种或多种症状,减轻疾病的程度,使疾病稳定(例如预防或延缓疾病的恶化),预防或延缓疾病的扩散(例如转移),预防或延缓疾病的复发,延缓或减慢疾病的进展,改善疾病状态,提供疾病的缓解(部分或全部),减少治疗疾病所需的一种或多种其他药物的剂量,延缓疾病的进展,增加或改善生活质量,增加体重增长,和/或延长生存期。“治疗”还涵盖了减少癌症的病理后果(例如肿瘤体积)。本申请的方法考虑了治疗的这些方面中的任何一个或多个。

[0068] 在癌症的背景下,术语“治疗”包括以下任何或全部:抑制癌细胞的生长,抑制癌细胞的复制,减轻整体肿瘤负荷以及改善与疾病相关联的一种或多种症状。

[0069] 术语“抑制(inhibition)”或“抑制(inhibit)”是指任何表型特征的减少或停止,或该特征的发生率、程度或可能性的减少或停止。“减少”或“抑制”是指与参考的活性、功能和/或量相比,降低、减少或停止活性、功能和/或量。在某些实施方案中,“减少”或“抑制”是指引起20%或更大的整体降低的能力。在另一个实施方案中,“减少”或“抑制”是指引起50%或更大的整体降低的能力。在又一个实施方案中,“减少”或“抑制”是指能够引起75%、85%、90%、95%或更大的整体降低的能力。

[0070] 术语“激动(agonizing)”或“激动(agonize)”是指任何表型特征或该特征的发生率、程度或可能性的增加或增强。“增加”或“增强”是指与参考的活性、功能和/或量相比,降低、减少或停止活性、功能和/或量。在某些实施方案中,“增加”或“增强”是指导致例如活性、功能和/或量总体增加至少约1倍或更多的能力。在另一个实施方案中,“增加”或“增强”是指与参考相比,导致例如活性、功能和/或量总体增加至少约5倍或更多的能力。在又一个实施方案中,“增加”或“增强”是指与参考相比,导致例如活性、功能和/或量总体增加至少约2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍或1000倍的能力,包括这些值之间的任何范围,或与参考相比,大于约100倍。

[0071] 如本文所用,“参考”是指用于比较目的的任何样品、标准品或水平。可以从健康和/或未患病的样品中获得参考。在一些示例中,可以从未处理的样品中获得参考。在一些示例中,从个体的未患病或未处理的样品中获得参考。在一些示例中,从一个或多个健康个体中获得参考,所述健康个体不是该个体或患者。

[0072] 如本文所用,“延缓疾病的发展”是指推迟、阻碍、减缓、减慢、稳定、抑制和/或延迟疾病(如癌症)的发展。这种延迟的时间长度可以不同,具体取决于疾病史和/或受治疗的个体。对于本领域技术人员显而易见的是,充分或显著的延缓实际上涵盖了预防,因为个体不会发展出疾病。例如,可以延缓晚期癌症(如转移的发展)。

[0073] 如本文所用,“预防”包括针对个体的疾病的发生或复发提供预防,所述个体可能易患所述疾病,但尚未被诊断为患有所述疾病。

[0074] 如本文所用,“抑制”功能或活性是当与除了感兴趣的条件或参数以外其他相同的条件相比时,或者可替代地与另一种条件相比,减少所述功能或活性。例如,与不存在抗体时肿瘤的生长速率相比,抑制肿瘤生长的抗体会降低肿瘤的生长速率。

[0075] 如本文所用,“基于”包括评估、确定或测量如本文所述的个体的特征(并且优选地,选择适合接受治疗的个体)。当claudin-18异常的状态“用作”选择、评估、测量或确定如本文所述的治疗方法的“基础”时,临床医生使用在治疗之前和/或在治疗期间确定的CLDN6异常,以及获得的状态(包括存在、不存在、表达水平、活性水平和/或CLDN6的磷酸化水平)来评估以下任一项:(a)个体最初接受治疗的可能或预料的适合性;(b)个体最初接受治疗的可能或预料的不适合性;(c)对治疗的反应;(d)个体继续接受治疗的可能或预料的适合性;(e)个体继续接受治疗的可能或预料的不适合性;(f)调整剂量;或(g)预测临床获益的可能性。

[0076] 术语“受试者”、“个体”和“患者”在本文中可互换使用,以指代哺乳动物,包括但不限于人、牛、马、猫科动物、犬科动物、啮齿动物或灵长类动物。在一些实施方案中,所述个体是人。

[0077] 据理解,本文所述的本申请实施方案包括“由……组成”和/或“基本上由……组成”的实施方案。

[0078] 本文提及“约”一个值或参数包括(并描述)指向该值或参数本身的变化。例如,提及“约X”的描述包括对“X”的描述。

[0079] 如本文所用,提及“不是”一个值或参数一般意味着并描述“不同于”一个值或参数。例如,一个方法不用于治疗X型癌症意味着该方法用于治疗X型以外的癌症。

[0080] 本文所用的术语“约X-Y”与“约X至约Y”具有相同的含义。

[0081] 如本文和所附权利要求中使用的,除非上下文另有明确规定,否则单数形式“(a)”、“一个”和“所述(the)”包括复数所指对象。

[0082] 抗体结合亲和力

[0083] 可以通过本领域已知的方法,通过实验确定本文所述的多特异性构建体的抗体部分的结合特异性。此类方法包括但不限于蛋白质印迹、ELISA-、RIA-、ECL-、IRMA-、EIA-、BIAcore™测试和肽扫描。

[0084] 在一些实施方案中,通过解离常数 K_D 来测量结合亲和力。可以通过本领域已知的任何分析技术来确定解离常数,包括生物化学或生物物理技术,如荧光激活细胞分选

(FACS)、流式细胞术、酶联免疫吸附测定(ELISA)、表面等离子体共振(SPR)、生物膜层干涉法(BioLayer interferometry)(参见例如ForteBio的Octet系统)、介观尺度发现测定(meso scalediscover assay)(参见例如MSD-SET)、等温滴定量热法(ITC)、差示扫描量热法(DSC)、圆二色性(CD)、停流分析、以及比色或荧光蛋白熔解分析;或细胞结合测定。

[0085] 在一些实施方案中,抗体部分和靶标抗原(例如CLDN6或4-1BB)之间结合的 K_D 为约 10^{-7} M至约 10^{-12} M,约 10^{-7} M至约 10^{-8} M,约 10^{-8} M至约 10^{-9} M,约 10^{-9} M至约 10^{-10} M,约 10^{-10} M至约 10^{-11} M,约 10^{-11} M至约 10^{-12} M,约 10^{-7} M至约 10^{-12} M,约 10^{-8} M至约 10^{-12} M,约 10^{-9} M至约 10^{-12} M,约 10^{-10} M至约 10^{-12} M,约 10^{-7} M至约 10^{-11} M,约 10^{-8} M至约 10^{-11} M,约 10^{-9} M至约 10^{-11} M,约 10^{-7} M至约 10^{-10} M,约 10^{-8} M至约 10^{-10} M,或约 10^{-7} M至约 10^{-9} M。在一些实施方案中,抗体部分和靶标抗原(例如CLDN6或4-1BB)之间结合的 K_D 强于约 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M或 10^{-12} M中的任一个。在一些实施方案中,靶标抗原(例如CLDN6或4-1BB)是人抗原。

[0086] 在一些实施方案中,抗体部分和靶标抗原(例如CLDN6或4-1BB)之间结合的 K_{on} 为约 $10^3 M^{-1}s^{-1}$ 至约 $10^8 M^{-1}s^{-1}$,约 $10^3 M^{-1}s^{-1}$ 至约 $10^4 M^{-1}s^{-1}$,约 $10^4 M^{-1}s^{-1}$ 至约 $10^5 M^{-1}s^{-1}$,约 $10^5 M^{-1}s^{-1}$ 至约 $10^6 M^{-1}s^{-1}$,约 $10^6 M^{-1}s^{-1}$ 至约 $10^7 M^{-1}s^{-1}$,或约 $10^7 M^{-1}s^{-1}$ 至约 $10^8 M^{-1}s^{-1}$ 。在一些实施方案中,抗体部分和靶标抗原(例如CLDN6或4-1BB)之间结合的 K_{on} 为约 $10^3 M^{-1}s^{-1}$ 至约 $10^5 M^{-1}s^{-1}$,约 $10^4 M^{-1}s^{-1}$ 至约 $10^6 M^{-1}s^{-1}$,约 $10^5 M^{-1}s^{-1}$ 至约 $10^7 M^{-1}s^{-1}$,约 $10^6 M^{-1}s^{-1}$ 至约 $10^8 M^{-1}s^{-1}$,约 $10^4 M^{-1}s^{-1}$ 至约 $10^7 M^{-1}s^{-1}$,或约 $10^5 M^{-1}s^{-1}$ 至约 $10^8 M^{-1}s^{-1}$ 。在一些实施方案中,抗体部分和靶标抗原(例如CLDN6或4-1BB)之间结合的 K_{on} 不超过约 $10^3 M^{-1}s^{-1}$ 、 $10^4 M^{-1}s^{-1}$ 、 $10^5 M^{-1}s^{-1}$ 、 $10^6 M^{-1}s^{-1}$ 、 $10^7 M^{-1}s^{-1}$ 或 $10^8 M^{-1}s^{-1}$ 中的任一个。在一些实施方案中,靶标抗原(例如CLDN6或4-1BB)是人抗原。

[0087] 在一些实施方案中,抗体部分和靶标抗原(例如CLDN6或4-1BB)之间结合的 K_{off} 为约 $1s^{-1}$ 至约 $10^{-6}s^{-1}$ 、约 $1s^{-1}$ 至约 $10^{-2}s^{-1}$ 、约 $10^{-2}s^{-1}$ 至约 $10^{-3}s^{-1}$ 、约 $10^{-3}s^{-1}$ 至约 $10^{-4}s^{-1}$ 、约 $10^{-4}s^{-1}$ 至约 $10^{-5}s^{-1}$,约 $10^{-5}s^{-1}$ 至约 $10^{-6}s^{-1}$,约 $1s^{-1}$ 至约 $10^{-5}s^{-1}$,约 $10^{-2}s^{-1}$ 至约 $10^{-6}s^{-1}$,约 $10^{-3}s^{-1}$ 至约 $10^{-6}s^{-1}$,约 $10^{-4}s^{-1}$ 至约 $10^{-6}s^{-1}$,约 $10^{-2}s^{-1}$ 至约 $10^{-5}s^{-1}$,或约 $10^{-3}s^{-1}$ 至约 $10^{-5}s^{-1}$ 。在一些实施方案中,抗体部分和靶标抗原(例如CLDN6或4-1BB)之间结合的 K_{off} 至少约为 $1s^{-1}$ 、 $10^{-2}s^{-1}$ 、 $10^{-3}s^{-1}$ 、 $10^{-4}s^{-1}$ 、 $10^{-5}s^{-1}$ 或 $10^{-6}s^{-1}$ 中的任一个。在一些实施方案中,靶标抗原(例如CLDN6或4-1BB)是人抗原。

[0088] 嵌合抗体或人源化抗体

[0089] 在一些实施方案中,本申请的多特异性构建体的一个或多个抗体部分是嵌合抗体。某些嵌合抗体在例如美国专利第4,816,567号;和Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984)中描述。在一些实施方案中,嵌合抗体包含非人可变区(例如源自小鼠的可变区)和人恒定区。在一些实施方案中,嵌合抗体是一种“类别转换”抗体,其中类别或亚类已从亲本抗体的类别或亚类发生改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0090] 在一些实施方案中,嵌合抗体是人源化抗体。通常,对非人抗体进行人源化,以降低对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。一般地,人源化抗体包含一个或多个可变结构域,其中HVR(例如CDR)(或其部分)源自非人抗体,而FR(或其部分)源自人抗体序列。人源化抗体任选地还将包含人恒定区的至少一部分。在一些实施方案中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如HVR残基所源自的抗体)的相应残基取代,例如,以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0091] 人源化抗体及其制造方法例如在Almagro和Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008) 中综述, 并且例如在以下中描述: Riechmann等人, *Nature* 332:323-329 (1988); Queen等人, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); 美国专利第5,821,337、7,527,791、6,982,321和7,087,409号; Kashmiri等人, *Methods* 36:25-34 (2005) (描述SDR(a-CDR) 移植); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (描述“表面重修 (resurfacing)”); Dall'Acqua等人, *Methods* 36:43-60 (2005) (描述“FR改组 (shuffling)”); 和Osborn等人, *Methods* 36:61-68 (2005) 和Klimka等人, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (描述FR改组的“定向选择”方法)。

[0092] 可以用于人源化的人框架区包括但不限于: 使用“最佳拟合”方法选择的框架区 (参见例如Sims等人 *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); 源自人抗体的共有序列的框架区, 所述人抗体为轻链或重链可变区的特定亚组 (参见例如Carter等人 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); 和Presta等人 *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); 人成熟 (体细胞突变) 框架区域或人种系框架区 (参见例如Almagro和Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); 以及源自筛选FR文库的框架区 (参见例如Baca等人, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) 和Rosok等人, *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996))。

[0093] 人抗体

[0094] 在一些实施方案中, 本申请的多特异性构建体的一个或多个抗体部分是人抗体 (称为人结构域抗体, 或人DAb)。可以使用本领域已知的各种技术来产生人抗体。人抗体在 van Dijk和van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74 (2001), Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008) 和Chen, *Mol. Immunol.* 47(4):912-21 (2010) 中一般地描述。能够产生全人单结构域抗体 (或DAb) 的转基因小鼠或大鼠是本领域已知的。参见例如US20090307787A1、美国专利第8,754,287号、US20150289489A1、US20100122358A1和W02004049794。

[0095] 可以通过将免疫原施用于转基因动物来制备人抗体 (例如人DAb), 所述转基因动物已被修饰, 以响应抗原挑战而产生完整人抗体或具有人可变区的完整抗体。此类动物通常含有人免疫球蛋白基因座的全部或一部分, 其替换了内源性免疫球蛋白基因座, 或者其存在于染色体外或随机并入动物的染色体中。在此类转基因小鼠中, 一般已使内源性免疫球蛋白基因座失活。关于用于从转基因动物中获得人抗体的方法的综述, 参见Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005)。另外参见例如, 美国专利第6,075,181和6,150,584号, 其描述XENOMOUSE™技术; 美国专利第5,770,429号, 其描述HuMab®技术; 美国专利第7,041,870号, 其描述K-MOUSE®技术, 以及美国专利申请公开第US2007/0061900号, 其描述VELOCIMOUSE®技术。来自此类动物产生的完整抗体的人可变区可以被进一步修饰, 例如通过与不同的人恒定区组合来修饰。

[0096] 也可以通过基于杂交瘤的方法制造人抗体 (例如人DAb)。已经描述了人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系用于产生人单克隆抗体 (参见例如Kozbor *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur等人, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 51-63页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 和Boerner等人, *J. Immunol.*, 147:86 (1991))。通过人B细胞杂交瘤技术生成的人抗体也在Li等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) 中描述。另外的方法包括例如美国专利第

7,189,826号(描述从杂交瘤细胞系中产生单克隆人IgM抗体)和Ni,Xiandai Mianyixue,26(4):265-268(2006)(描述人-人杂交瘤)中描述的那些方法。人杂交瘤技术(Trioma技术)也在Vollmers和Brandlein,Histology and Histopathology,20(3):927-937(2005)以及Vollmers和Brandlein,Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology,27(3):185-91(2005)中描述。

[0097] 也可以通过分离选自人源噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列来生成抗体(例如人DAb)。然后,可以将此类可变结构域序列与所需人恒定结构域组合。下面描述从抗体文库中选择人抗体的技术。

[0098] 替换、插入和缺失变体

[0099] 在一些实施方案中,包含一个或多个氨基酸替换的抗体变体包括在本文所述的多特异性构建体中。替换诱变的感兴趣位点包括HVR(或CDR)和FR。保守替换示于表2的“优选替换”标题下。更实质性的改变提供于表2的“示例性替换”标题下,并且如下文关于氨基酸侧链类别所进一步描述。可以将氨基酸替换引入感兴趣的抗体中,并筛选产物以获得所需活性,例如,保留/改善的抗原结合、降低的免疫原性或改善的ADCC或CDC。

[0100] 表2.氨基酸替换

[0101]

原始残基	示例性替换	优选替换
Ala (A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg (R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn (N)	Gln;His;Asp,Lys;Arg	Gln
Asp (D)	Glu;Asn	Glu
Cys (C)	Ser;Ala	Ser
Gln (Q)	Asn;Glu	Asn
Glu (E)	Asp;Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg
Ile (I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe;正亮氨酸	Leu
Leu (L)	Norleucine;Ile;Val;Met;Ala;Phe	Ile
Lys (K)	Arg;Gln;Asn	Arg
Met (M)	Leu;Phe;Ile	Leu
Phe (F)	Trp;Leu;Val;Ile;Ala;Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val;Ser	Ser
Trp (W)	Tyr;Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp;Phe;Thr;Ser	Phe
Val (V)	Ile;Leu;Met;Phe;Ala;Norleucine	Leu

[0102] 可以根据常见侧链特性对氨基酸进行分组:(1)疏水性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;(2)中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;(3)酸性:Asp、Glu;(4)碱性:His、Lys、Arg;(5)影响链取向的残基:Gly、Pro;和(6)芳香族:Trp、Tyr、Phe。

[0103] 非保守替换将涉及将这些类别之一的成员交换为另一个类别。

[0104] 一种类型的替换变体涉及替换亲本抗体(例如人源化抗体或人抗体)的一个或多个高变区残基。一般地,相对于亲本抗体,被选择用于进一步研究的所得变体的某些生物学特性将被修饰(例如改善)(例如增加的亲和力、降低的免疫原性)和/或将基本保留亲本抗体的某些生物学特性。示例性的替换变体是亲和力成熟抗体,其可以方便地生成,例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术来生成,如本文所述的那些技术。简要地,一个或多个HVR残基发生突变,并将变体抗体展示在噬菌体上并筛选特定的生物活性(例如结合亲和力)。

[0105] 可以在HVR中进行改变(例如替换),例如进行改变以改善抗体亲和力。此类改变可以在HVR“热点(hotspot)”中进行,即在体细胞成熟过程中发生高频率突变的密码子所编码的残基(参见例如Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)),和/或在SDR(a-CDR)中进行,并测试所得变体VH或VL的结合亲和力。通过构建二级文库并从中重新选择而实现的亲和力成熟已在例如Hoogenboom等人, *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien等人编辑, Human Press, Totowa, NJ, (2001))中描述。在亲和力成熟的一些实施方案中,通过各种方法(例如易错PCR、链改组或寡核苷酸定向诱变)中的任一种将多样性引入被选择用于成熟的可变基因中。然后产生第二文库。然后对文库进行筛选,以鉴定具有所需亲和力的任何抗体变体。引入多样性的另一种方法涉及HVR定向方法,其中对数个HVR残基(例如一次4-6个残基)进行随机化。可以具体鉴定参与抗原结合的HVR残基,例如使用丙氨酸扫描诱变或建模来鉴定。特别是CDR-H3和CDR-L3经常被靶向。

[0106] 在一些实施方案中,可以在一个或多个HVR内发生替换、插入或缺失,只要此类改变不会实质性降低抗体结合抗原的能力即可。例如,可以在HVR中进行不会实质性降低结合亲和力的保守改变(例如本文提供的保守替换)。此类改变可以在HVR“热点”或CDR之外。在上面提供的变体VHH序列的一些实施方案中,每个HVR未改变,或含有不超过一个、两个或三个氨基酸替换。

[0107] 如Cunningham和Wells(1989) *Science*, 244:1081-1085所描述的,用于鉴定可以被靶向而诱变的抗体残基或区域的有用方法称为“丙氨酸扫描诱变”。在该方法中,鉴定一个残基或一组靶标残基(例如带电荷的残基,如Arg、Asp、His、Lys和Glu)并替换为中性或带负电荷的氨基酸(例如丙氨酸或聚丙氨酸),以确定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可以在显示出对初始替换的功能敏感性的氨基酸位置引入进一步替换。可替代地或额外地,通过抗原-抗体复合物的晶体结构来鉴定抗体和抗原之间的接触点。此类接触残基和邻近残基可以作为替换候选物而被靶向或消除。可以对变体进行筛选,以确定它们是否含有所需特性。

[0108] 氨基酸序列插入包括氨基和/或羧基末端融合物,其长度从一个残基到含有一百个或更多残基的多肽不等,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的示例包括具有N-末端甲硫氨酰残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括抗体的N-或C-末端与酶(例如用于ADEPT)或多肽融合,这会增加抗体的血清半衰期。

[0109] 糖基化变体

[0110] 在一些实施方案中,本申请的多特异性构建体的一个或多个抗体部分被改变以增加或减少构建体被糖基化的程度。通过改变氨基酸序列,使得产生或去除一个或多个糖基

化位点,可以方便地实现抗体的糖基化位点添加或缺失。

[0111] 当抗体部分包含Fc区时,与其连接的碳水化合物可以被改变。由哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含分支的双触角(biantennary)寡糖,其一般通过N-键与Fc区C_H2结构域的Asn297连接。参见例如Wright等人TIBTECH 15:26-32(1997)。寡糖可以包括各种碳水化合物,例如甘露糖、N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及与双触角寡糖结构的“茎”中的GlcNAc连接的岩藻糖。在一些实施方案中,可以对抗体部分中的寡糖进行修饰,以产生具有某些改进特性的抗体变体。

[0112] 在一些实施方案中,抗体部分具有碳水化合物结构,其缺乏与Fc区(直接或间接)连接的岩藻糖。例如,这种抗体中岩藻糖的量可以从1%至80%,从1%至65%,从5%至65%或从20%至40%。通过以下来确定岩藻糖的量:例如在W0 2008/077546中所述,如通过MALDI-TOF质谱法所测量的,相对于与Asn 297连接的糖结构(例如复合物、混杂物(hybrid)和高甘露糖结构)的总和,计算糖链内Asn297处岩藻糖的平均量。Asn297是指位于Fc区约第297位(Fc区残基的EU编号)的天冬酰胺残基;然而,由于抗体的微小序列变化,Asn297也可以位于第297位的上游或下游约±3个氨基酸处,即位于第294和300位之间。此类岩藻糖基化变体可以具有改善的ADCC功能。参见例如美国专利公布号US 2003/0157108(Presta, L.);US2004/0093621(Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd)。与“去岩藻糖基化”或“岩藻糖缺陷型”抗体变体相关的公布的示例包括:US 2003/0157108;W0 2000/61739;W0 2001/29246;US2003/0115614;US 2002/0164328;US2004/0093621;US2004/0132140;US2004/0110704;US 2004/0110282;US2004/0109865;W0 2003/085119;W0 2003/084570;W0 2005/035586;W0 2005/035778;W02005/053742;W02002/031140;Okazaki等人J.Mol.Biol.336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki等人Biotech.Bioeng.87:614(2004)。能够产生去岩藻糖基化抗体的细胞系的示例包括蛋白质岩藻糖基化缺陷的Lec13 CHO细胞(Ripka等人Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);美国专利申请号US2003/0157108 A1, Presta,L;以及W0 2004/056312 A1,Adams等人,尤其是实施例11),以及敲除细胞系,如α-1,6-岩藻糖基转移酶基因FUT8敲除的CHO细胞(参见例如Yamane-Ohnuki等人Biotech.Bioeng.87:614(2004);Kanda,Y.等人,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006);和W02003/085107)。

[0113] 在一些实施方案中,抗体部分具有切分为二的寡糖,例如其中与抗体Fc区连接的双触角寡糖被GlcNAc切分为二。此类抗体变体可以具有减少的岩藻糖基化和/或改善的ADCC功能。此类抗体变体的示例例如在W0 2003/011878(Jean-Mairet等人);美国专利第6,602,684号(Umana等人);和US2005/0123546(Umana等人)中描述。还提供了在与Fc区连接的寡糖中有至少一个半乳糖残基的抗体变体。此类抗体变体可以具有改善的CDC功能。此类抗体变体例如在W0 1997/30087(Patel等人);W0 1998/58964(Raju,S.);和W0 1999/22764(Raju,S.)中描述。

[0114] Fc区变体

[0115] 在一些实施方案中,可以将一个或多个氨基酸修饰引入抗体部分的Fc区中,从而生成Fc区变体。Fc区变体可以包含人Fc区序列(例如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区),所述序列包含一个或多个氨基酸位置的氨基酸修饰(例如替换)。

[0116] 在一些实施方案中,Fc片段具有一些但不是全部的效应子功能,这使其成为用于

应用的所需候选物,在所述应用中,抗体部分在体内的半衰期很重要,但某些效应子功能(如补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞毒性(ADCC))是不必要的或有害的。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定以确认CDC和/或ADCC活性的减少/耗尽。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定,以确保抗体缺乏Fc γ R结合(因此很可能缺乏ADCC活性),但保留FcRn结合能力。介导ADCC的主要细胞即NK细胞仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。造血细胞上的FcR表达在Ravetch和Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991) 第464页的表2中总结。评估感兴趣分子的ADCC活性的体外测定的非限制性示例在美国专利第5,500,362号(参见例如Hellstrom, I.等人 *Proc. Nat' l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986))和Hellstrom, I等人, *Proc. Nat' l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5,821,337 (参见Bruggemann, M.等人, *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987))中描述。可替代地,可以采用非放射性测定方法(参见例如,用于流式细胞术的ACTI™非放射性细胞毒性测定(Cell Technology, Inc. Mountain View, CA);和CytoTox 96®非放射性细胞毒性测定(Promega, Madison, WI))。可用于此类测定的效应子细胞包括外周血单个核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。可替代地或额外地,可以在体内评估感兴趣分子的ADCC活性,例如在动物模型中评估,如Clynes等人 *Proc. Nat' l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998)所公开的动物模型。也可以进行C1q结合测定,以确认抗体不能结合C1q且因此缺乏CDC活性。例如参见WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体激活,可以进行CDC测定(例如参见Gazzano-Santoro等人, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M. S.等人, *Blood* 101:1045-1052 (2003);以及Cragg, M. S.和M. J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004))。也可以使用本领域已知的方法进行FcRn结合和体内清除率/半衰期确定(参见例如Petkova, S. B.等人, *Int' l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006))。

[0117] 效应子功能降低的抗体包括Fc区残基238、265、269、270、297、327和329中的一个或多个有替换的那些抗体(美国专利第6,737,056号),其中氨基酸编号根据EU索引编号。参见例如Kabat等人(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242。此类Fc突变体包括在氨基酸第265、269、270、297和327位(其中氨基酸编号根据EU索引编号)中的两个或更多个位置有替换的Fc突变体,包括所谓的“DANA”Fc突变体,其残基265和297被替换为丙氨酸(美国专利第7,332,581号),其中氨基酸编号根据EU索引编号。

[0118] 描述了与FcR的结合改善或减弱的某些抗体变体。(参见例如美国专利第6,737,056号;WO 2004/056312和Shields等人, *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001))。

[0119] 在一些实施方案中,Fc片段是IgG1 Fc片段。在一些实施方案中,IgG1 Fc片段包含L234A突变和/或L235A突变。在一些实施方案中,Fc片段是IgG2或IgG4Fc片段。在一些实施方案中,Fc片段是包含S228P、F234A和/或L235A突变的IgG4 Fc片段。

[0120] 在一些实施方案中,抗体部分包含具有一个或多个氨基酸替换的Fc区,所述氨基酸替换改善ADCC,例如在Fc区第298、333和/或334位的替换(残基的EU编号)。

[0121] 在一些实施方案中,在Fc区进行改变,这导致改变的(即改善的或减弱的)C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC),例如,如美国专利第6,194,551号、WO 99/51642和Idusogie等人 *J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000) 所述。

[0122] 在一些实施方案中,抗体部分变体包含变体Fc区,其包含一个或多个氨基酸替换,

所述氨基酸替换改变半衰期和/或改变与新生儿Fc受体 (FcRn) 的结合。新生儿Fc受体 (FcRn) 负责将母体IgG转移至胎儿 (Guyer等人, J. Immunol. 117:587 (1976) 和Kim等人, J. Immunol. 24:249 (1994)), 具有增加的半衰期和改善的与FcRn的结合的抗体在US2005/0014934A1 (Hinton等人) 中描述。那些抗体包含Fc区, 其中有一个或多个替换, 所述替换改变Fc区与FcRn的结合。此类Fc变体包括在一个或多个Fc区残基处有替换 (例如Fc区残基434的替换) 的那些变体 (美国专利第7,371,826号)。

[0123] 关于Fc区变体的其他示例, 另外参见Duncan&Winter, Nature 322:738-40 (1988); 美国专利第5,648,260号; 美国专利第5,624,821号; 和WO 94/29351。

[0124] 半胱氨酸工程改造抗体变体

[0125] 在一些实施方案中, 可能希望产生半胱氨酸工程改造抗体部分, 例如“thioMAb”, 其中本文的多特异性构建体中的一个或多个抗体部分的一个或多个残基被替换为半胱氨酸残基。在具体的实施方案中, 替换残基发生在抗体的可接近位点。通过将这些残基替换为半胱氨酸, 从而将反应性硫醇基团定位在抗体的可接近位点, 并且可以用于将抗体与其他部分 (如药物部分或接头-药物部分) 缀合, 以产生免疫缀合物, 如本文进一步所述。在一些实施方案中, 以下残基中的任何一个或多个可以被替换为半胱氨酸: 重链的A118 (EU编号); 和重链Fc区的S400 (EU编号)。可以如例如美国专利第7,521,541号中所述, 生成半胱氨酸工程改造抗体部分。

[0126] 抗CLDN6抗体部分

[0127] 本申请所述的多特异性构建体的抗CLDN6抗体部分包括与claudin-6 (“CLDN6”) 特异性结合的任何抗体部分。

[0128] Claudin 6 (CLDN6)

[0129] Claudin是一类紧密连接膜蛋白, 其在上皮细胞和内皮细胞中表达并形成细胞旁屏障和孔隙, 其决定紧密连接通透性。Claudin已被公认为癌症发生、进展和转移的关键调节因子, 根据其不同的组织依赖性表达模式, 在多种癌症中发挥不同的作用 (Tabaries等人 (2017). “The role of claudins in cancer metastasis.” Oncogene 36, 1176-1190)。Claudin-6 (CLDN6) 是claudin家族的成员, 并且是紧密连接分子, 其在上皮或内皮细胞层中的细胞间黏附中起着至关重要的作用。它编码四跨膜蛋白, 大小为220个氨基酸, 且分子量为23292Da。CLDN6已被鉴定为细胞黏附信号传导的起源, 通过靶向核受体超家族的分子并管理其基因表达来参与核受体活性的调节 (Sugimoto等人 (2019). “Cell adhesion signals regulate the nuclear receptor activity.” Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 116, 24600-24609)。CLDN6似乎在20种类型的人癌症中显著上调 (Zhang等人 (2021) Front. Cell. Dev. Biol. 9:726656)。在一些实施方案中, CLDN6是人CLDN6 (“hCLDN6”)。在一些实施方案中, hCLDN6包含SEQ ID NO:40中所示的氨基酸序列或其变体 (例如翻译后修饰的变体和/或构象变体)。

[0130] 示例性抗CLDN6抗体部分

[0131] 在一些实施方案中, 抗CLDN6抗体部分与包含a) 重链可变区 (V_H) 和轻链可变区 (V_L) 的抗体部分竞争结合CLDN6, 其中:a) 所述 V_H 包含:i) HC-CDR1, 其包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列, ii) HC-CDR2, 其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列, 和iii) HC-CDR3, 其包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列, 并且b) 所述 V_L 包含:i) LC-CDR1, 其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列, ii) LC-

CDR2,其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,和iii)LC-CDR3,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CLDN6抗体部分与包含a)重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)的抗体部分竞争结合CLDN6,其中:a)所述 V_H 包含:i)HC-CDR1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,ii)HC-CDR2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,和iii)HC-CDR3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,并且b)所述 V_L 包含:i)LC-CDR1,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,ii)LC-CDR2,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,和iii)LC-CDR3,其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0132] 本申请所述的抗CLDN6抗体部分包括与CLDN6特异性结合的任何抗体部分。在一些实施方案中,本申请的抗CLDN6抗体部分包含:a)HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其在重链可变区(VH)内分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述重链可变区包含SEQ ID No:7中所示的序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:7中所示的序列具有至少约80% (包括例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一种,或大于99%)的序列同一性;和b)LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其在轻链可变区(VL)内分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:8中所示的序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:8中所示的序列具有至少约80% (包括例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一种,或大于99%)的序列同一性。在一些实施方案中,这种抗CLDN6抗体部分对CLDN6(例如人CLDN6)的亲和力与以下抗CLDN6抗体部分的亲和力相当(例如相同):其在重链可变区(VH)内包含CDR1、CDR2和CDR3,所述重链可变区包含SEQ ID No:7中所示的序列,并且在轻链可变区(VL)内包含CDR1、CDR2和CDR3,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:8中所示的序列。

[0133] 在一些实施方案中,抗CLDN6抗体部分包含:a)HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其在重链可变区(VH)内分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述重链可变区包含SEQ ID No:18中所示的序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:18中所示的序列具有至少约80% (包括例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一种,或大于99%)的序列同一性;和b)LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其在轻链可变区(VL)内分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:19中所示的序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:19中所示的序列具有至少约80% (包括例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一种,或大于99%)的序列同一性。在一些实施方案中,这种抗CLDN6抗体部分对CLDN6(例如人CLDN6)的亲和力与以下抗CLDN6抗体部分的亲和力相当(例如相同):其在重链可变区(VH)内包含CDR1、CDR2和CDR3,所述重链可变区包含SEQ ID No:18中所示的序列,并且在轻链可变区(VL)内包含CDR1、CDR2和CDR3,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:19中所示的序列。

[0134] 在一些实施方案中,抗CLDN6抗体部分包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中:a)所述VH包含:i)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HC-CDR1或其变体,所述变体在HC-CDR1中包含至多约3个(如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换,ii)包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HC-CDR2或其变体,所述变体在HC-CDR2中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换,以及iii)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HC-CDR3或其变体,所述变体在HC-CDR3中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;并且b)所述VL包含:

i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的LC-CDR1或其变体,所述变体在LC-CDR1中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换,ii) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的LC-CDR2或其变体,所述变体在LC-CDR2中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换,以及iii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的LC-CDR3或其变体,所述变体在LC-CDR3中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换。

[0135] 在一些实施方案中,抗CLDN6抗体部分包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中:a)所述VH包含:i) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HC-CDR1或其变体,所述变体在HC-CDR1中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换,ii) 包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HC-CDR2或其变体,所述变体在HC-CDR2中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换,以及iii) 包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HC-CDR3或其变体,所述变体在HC-CDR3中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;并且b)所述VL包含:i) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的LC-CDR1或其变体,所述变体在LC-CDR1中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换,ii) 包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的LC-CDR2或其变体,所述变体在LC-CDR2中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换,以及iii) 包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的LC-CDR3或其变体,所述变体在LC-CDR3中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换。

[0136] 在一些实施方案中,抗CLDN6抗体部分包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中:所述VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:7具有至少约80%(包括例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一种,或大于99%)的序列同一性;和/或所述VL包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:8具有至少约80%(包括例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一种,或大于99%)的序列同一性。在一些实施方案中,这种抗CLDN6抗体部分对CLDN6(例如人CLDN6)的亲合力与以下抗CLDN6抗体部分的亲合力相当(例如相同):其包含VH和VL,所述VH包含SEQ ID No:7中所示的序列,所述VL包含SEQ ID NO:8中所示的序列。

[0137] 在一些实施方案中,抗CLDN6抗体部分包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中:所述VH包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:18具有至少约80%(包括例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一种,或大于99%)的序列同一性;和/或所述VL包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:19具有至少约80%(包括例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一种,或大于99%)的序列同一性。在一些实施方案中,这种抗CLDN6抗体部分对CLDN6(例如人CLDN6)的亲合力与以下抗CLDN6抗体部分的亲合力相当(例如相同):其包含VH和VL,所述VH包含SEQ ID No:18中所示的序列,所述VL包含SEQ ID NO:19中所示的序列。

[0138] 本申请的抗CLDN6抗体部分可以是本领域已知的任何合适形式。在一些实施方案中,抗CLDN6抗体部分可以选自全长抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv和sdAb。

[0139] 在一些实施方案中,抗CLDN6抗体部分包含全长抗体,所述全长抗体包含两条重链和两条轻链。在一些实施方案中,全长抗体具有Fc片段,所述Fc片段选自来自IgG、IgA、IgD、IgE、IgM的Fc片段及其组合和混合物。在一些实施方案中,Fc片段选自来自IgG1、IgG2、

IgG3、IgG4的Fc片段及其组合和混合物。在一些实施方案中,Fc片段是IgG1或IgG4 Fc片段。

[0140] 在一些实施方案中,与野生型Fc相比,Fc片段具有降低的Fc γ R结合亲和力。在一些实施方案中,Fc片段包含选自N297A、N297Q、N297G或L235E的一个或多个替换。在一些实施方案中,Fc片段是IgG1片段,其包含选自N297A、N297Q、N297G、L235E和/或L234A/L235A的一个或多个替换。在一些实施方案中,Fc片段是包含N297A的IgG1片段。在一些实施方案中,Fc片段是包含N297A、N297Q、N297G、L235E和/或F234A/L235A的IgG4片段。在一些实施方案中,Fc片段是包含N297A的IgG4片段。在一些实施方案中,Fc片段包含SEQ ID NO:42中所示的氨基酸序列。

[0141] 在一些实施方案中,抗CLDN6抗体部分包含全长抗体,其包含两条重链和两条轻链,其中所述重链包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:42的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:42具有至少约80% (包括例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一种,或大于99%)的序列同一性;和/或所述轻链包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:11具有至少约80% (包括例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一种,或大于99%)的序列同一性。在一些实施方案中,这种抗CLDN6抗体部分对CLDN6 (例如人CLDN6) 的亲和力与以下抗CLDN6抗体部分的亲和力相当 (例如相同):其包含两条重链和两条轻链,每条重链包含SEQ ID NO:9和/或SEQ ID NO:42,每条轻链包含SEQ ID NO:11。

[0142] 在一些实施方案中,抗CLDN6抗体部分包含全长抗体,其包含两条重链和两条轻链,其中所述重链包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:43的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:43具有至少约80% (包括例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一种,或大于99%)的序列同一性;和/或所述轻链包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:11具有至少约80% (包括例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一种,或大于99%)的序列同一性。在一些实施方案中,这种抗CLDN6抗体部分对CLDN6 (例如人CLDN6) 的亲和力与以下抗CLDN6抗体部分的亲和力相当 (例如相同):其包含两条重链和两条轻链,每条重链包含SEQ ID NO:10和/或SEQ ID NO:43,每条轻链包含SEQ ID NO:11。

[0143] 在一些实施方案中,抗CLDN6抗体部分包含全长抗体,其包含两条重链和两条轻链,其中所述重链包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:20包含至少约80% (包括例如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一种)的序列同一性;和/或所述轻链包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:22包含至少约80% (包括例如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一种)的序列同一性。在一些实施方案中,这种抗CLDN6抗体部分对CLDN6 (例如人CLDN6) 的亲和力与以下抗CLDN6抗体部分的亲和力相当 (例如相同):其包含两条重链和两条轻链,每条重链包含SEQ ID NO:20,每条轻链包含SEQ ID NO:22。

[0144] 在一些实施方案中,抗CLDN6抗体部分包含全长抗体,其包含两条重链和两条轻链,其中所述重链包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:21具有至少约80% (包括例如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一

种)的序列同一性;和/或所述轻链包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:22具有至少约80% (包括例如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一种)的序列同一性。在一些实施方案中,这种抗CLDN6抗体部分对CLDN6(例如人CLDN6)的亲合力与以下抗CLDN6抗体部分的亲合力相当(例如相同):其包含两条重链和两条轻链,每条重链包含SEQ ID NO:21,每条轻链包含SEQ ID NO:22。

[0145] 抗4-1BB抗体部分

[0146] 本申请所述的多特异性构建体的抗4-1BB抗体部分包括与4-1BB特异性结合的任何抗体部分。在一些实施方案中,4-1BB是人4-1BB(“h4-1BB”)。h4-1BB是I型跨膜受体,具有四个富含半胱氨酸的细胞外结构域(“CRD”,即CRD1、CDR2、CRD3和CRD4),然后是短的跨膜结构域和C-末端细胞质区域。h4-1BB的CRD2和CRD3与配体4-1BBL相互作用(Bitra等人(2018) J Biol Chem.293(26):9958-9969)。与其他TNFR相比,h4-1BB以二硫键连接的二聚体形式存在,并且二聚化可能通过在h4-1BB的CRD4内发现的未配对半胱氨酸(Cys¹²¹)发生。在一些实施方案中,h4-1BB包含SEQ ID NO:41中所示的序列或其变体(例如翻译后修饰的变体和/或构象变体)。在一些实施方案中,抗4-1BB抗体部分与4-1BB的CRD3/CRD4区域结合。

[0147] 抗4-1BB抗体部分可以是本领域已知的任何合适形式。在一些实施方案中,抗4-1BB抗体部分选自全长抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv和sdAb。在一些实施方案中,抗4-1BB抗体部分包含与4-1BB结合的单结构域抗体。

[0148] 示例性抗4-1BB抗体部分

[0149] 在一些实施方案中,抗4-1BB抗体部分包含单结构域抗体(sdAb),其在单个单体可变抗体结构域内包含sdAb-CDR1、sdAb-CDR2和sdAb-CDR3,其分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述单个单体可变抗体结构域具有SEQ ID NO:27中所示的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:27中所示的序列具有至少约80% (包括例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一种,或大于99%)的序列同一性。在一些实施方案中,这种抗4-1BB抗体部分对4-1BB(例如人4-1BB)的亲合力与包含SEQ ID NO:27的抗4-1BB抗体部分的亲合力相当(例如相同)。

[0150] 在一些实施方案中,抗4-1BB抗体部分包含单结构域抗体(sdAb),其包含:a)包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的sdAb-CDR1或其变体,所述变体在sdAb-CDR1中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;b)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的sdAb-CDR2或其变体,所述变体在sdAb-CDR2中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;和c)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的sdAb-CDR3或其变体,所述变体在sdAb-CDR3中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换。

[0151] 在一些实施方案中,抗4-1BB抗体部分包含单结构域抗体(sdAb),其包含:a) sdAb-CDR1,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列;sdAb-CDR2,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列;和sdAb-CDR3,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[0152] 在一些实施方案中,抗4-1BB抗体部分包含单结构域抗体(sdAb),其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:27中所示的序列具有至少约80% (包括例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一种,或大于99%)的序列同一性。在一些实施方案中,这种抗4-1BB抗体部分对4-1BB(例如人4-1BB)的亲合力与包含SEQ ID NO:27的抗4-1BB抗体部分的亲合力相当

(例如相同)。

[0153] 多特异性构建体

[0154] 在一方面,本文提供了多特异性构建体,其包含:与肿瘤抗原特异性结合的第一抗体部分;和与4-1BB特异性结合的第二抗体部分,其中所述第一抗体部分与所述肿瘤抗原的结合触发所述第二抗体部分激活4-1BB。在一些实施方案中,所述第二抗体部分与4-1BB的CRD 3/4区域特异性结合。

[0155] 在一些实施方案中,本文提供了多特异性构建体,其包含与肿瘤抗原特异性结合的第一抗体部分;和与4-1BB特异性结合的第二抗体部分,其中所述第一抗体部分与所述肿瘤抗原的结合触发所述第二抗体部分激活4-1BB。在一些实施方案中,在第一抗体部分与肿瘤抗原结合后,第二抗体部分对4-1BB的激活增强至少2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍或1000倍中的任一种,包括这些值之间的任何范围。在一些实施方案中,在不与肿瘤抗原结合的情况下,多特异性构建体确实激活了4-1BB信号传导。在一些实施方案中,在不与肿瘤抗原结合的情况下,第二部分不激活4-1BB信号传导。

[0156] 在本申请的多特异性构建体的一些实施方案中,第二抗体部分是sdAb。在一些实施方案中,sdAb在单个单体可变抗体结构域内包含sdAb-CDR1、sdAb-CDR2和sdAb-CDR3,其分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述单个单体可变抗体结构域包含SEQ ID NO: 27中所示的氨基酸序列。

[0157] 在一些实施方案中,sdAb包含:包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的sdAb-CDR1或其变体,所述变体在sdAb-CDR1中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的sdAb-CDR2或其变体,所述变体在sdAb-CDR2中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;和包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的sdAb-CDR3或其变体,所述变体在sdAb-CDR3中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换。

[0158] 在一些实施方案中,sdAb包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:27中所示的序列具有至少约80% (包括例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一种,或大于99%)的序列同一性。在一些实施方案中,这种sdAb对4-1BB(例如人4-1BB)的亲和力与包含SEQ ID NO:27的sdAb的亲和力相当(例如相同)。

[0159] 与第一抗体部分特异性结合的肿瘤抗原可以是本领域已知的任何合适的肿瘤抗原。在一些实施方案中,肿瘤抗原是CLDN6。

[0160] 在一些实施方案中,本申请提供了与CLDN6和4-1BB两者结合的多特异性构建体。在一些实施方案中,本文所述的多特异性构建体是双特异性抗体,其包含抗CLDN6抗体部分和抗4-1BB抗体部分。抗CLDN6抗体部分和抗4-1BB抗体部分可以是本文所述的那些抗体部分中的任一种。

[0161] 在本申请的多特异性构建体的一些实施方案中,本文所述的多特异性构建体是包含抗CLDN6抗体部分和抗4-1BB抗体部分的多特异性构建体(例如双特异性抗体),其中所述抗CLDN6抗体部分包含:(1)HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其在重链可变区(VH)内分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述重链可变区包含SEQ ID No:7中所示的序列或其变

体,所述变体与SEQ ID NO:7具有至少约80% (包括例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一种,或大于99%)的序列同一性;(2)LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其在轻链可变区(VL)内分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID No:8中所示的序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:8具有至少约80% (包括例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一种,或大于99%)的序列同一性。在一些实施方案中,这种抗CLDN6抗体部分对CLDN6(例如人CLDN6)的亲合力与以下抗CLDN6抗体部分的亲合力相当(例如相同):其包含SEQ ID NO:7中所示的VH的CDR-1、CDR-2和CDR-3,以及SEQ ID NO:8中所示的VL的CDR-1、CDR-2和CDR-3。在一些实施方案中,抗4-1BB抗体部分包含sdAb,其包含:包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的sdAb-CDR1或其变体,所述变体在sdAb-CDR1中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的sdAb-CDR2或其变体,所述变体在sdAb-CDR2中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;和包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的sdAb-CDR3或其变体,所述变体在sdAb-CDR3中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换。在一些实施方案中,抗4-1BB抗体部分包含:包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的sdAb或其变体,所述变体与SEQ ID NO:27具有至少约80% (例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%中的任一种,或大于99%的序列同一性,包括这些值之间的任何范围)的序列同一性。

[0162] 在一些实施方案中,本文所述的多特异性构建体是包含抗CLDN6抗体部分和抗4-1BB抗体部分的多特异性构建体(例如双特异性抗体),其中所述抗CLDN6抗体部分包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述VH包含:(i)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HC-CDR1或其变体,所述变体在HC-CDR1中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换,(ii)包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HC-CDR2或其变体,所述变体在HC-CDR2中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;以及(iii)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HC-CDR3或其变体,所述变体在HC-CDR3中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;并且所述VL包含:(i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的LC-CDR1或其变体,所述变体在LC-CDR1中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;(ii)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的LC-CDR2或其变体,所述变体在LC-CDR2中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;以及(iii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的LC-CDR3或其变体,所述变体在LC-CDR3中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换。在一些实施方案中,抗4-1BB抗体部分包含sdAb,其包含:包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的sdAb-CDR1或其变体,所述变体在sdAb-CDR1中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的sdAb-CDR2或其变体,所述变体在sdAb-CDR2中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;和包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的sdAb-CDR3或其变体,所述变体在sdAb-CDR3中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换。在一些实施方案中,抗4-1BB抗体部分包含:包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的sdAb或其变体,所述变体与SEQ ID NO:27具有至少约80% (例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%中的任一种,或大于99%的序列同一性,包括这些值之间的任何范围)的序列同一性。

[0163] 在一些实施方案中,本文所述的多特异性构建体是包含抗CLDN6抗体部分和抗4-1BB抗体部分的多特异性构建体(例如双特异性抗体),其中所述抗CLDN6抗体部分包含:所述VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:7具有至少约80%(包括例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一种,或大于99%)的序列同一性;和/或所述VL包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:8具有至少约80%(包括例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一种,或大于99%)的序列同一性。在一些实施方案中,这种抗CLDN6抗体部分对CLDN6(例如人CLDN6)的亲合力与以下抗CLDN6抗体部分的亲合力相当(例如相同):其包含SEQ ID NO:7中所示的VH,和SEQ ID NO:8中所示的VL。在一些实施方案中,抗4-1BB抗体部分包含sdAb,其包含:包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的sdAb-CDR1或其变体,所述变体在sdAb-CDR1中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的sdAb-CDR2或其变体,所述变体在sdAb-CDR2中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;和包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的sdAb-CDR3或其变体,所述变体在sdAb-CDR3中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换。在一些实施方案中,抗4-1BB抗体部分包含:包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的sdAb或其变体,所述变体与SEQ ID NO:27具有至少约80%(例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%中的任一种,或大于99%的序列同一性,包括这些值之间的任何范围)的序列同一性。

[0164] 在一些实施方案中,本文所述的多特异性构建体是包含抗CLDN6抗体部分和抗4-1BB抗体部分的多特异性构建体(例如双特异性抗体),其中所述抗CLDN6抗体部分包含:(1) HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其在重链可变区(VH)内分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述重链可变区包含SEQ ID No:18中所示的序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:18具有至少约80%(包括例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一种,或大于99%)的序列同一性;(2) LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其在轻链可变区(VL)内分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID No:19中所示的序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:19具有至少约80%(包括例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一种,或大于99%)的序列同一性。在一些实施方案中,这种抗CLDN6抗体部分对CLDN6(例如人CLDN6)的亲合力与以下抗CLDN6抗体部分的亲合力相当(例如相同):其包含SEQ ID NO:18中所示的VH的CDR-1、CDR-2和CDR-3,以及SEQ ID NO:19中所示的VL的CDR-1、CDR-2和CDR-3。在一些实施方案中,抗4-1BB抗体部分包含sdAb,其包含:包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的sdAb-CDR1或其变体,所述变体在sdAb-CDR1中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的sdAb-CDR2或其变体,所述变体在sdAb-CDR2中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;和包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的sdAb-CDR3或其变体,所述变体在sdAb-CDR3中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换。在一些实施方案中,抗4-1BB抗体部分包含:包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的sdAb或其变体,所述变体与SEQ ID NO:27具有至少约80%(例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、

96%、97%、98%、99%中的任一种,或大于99%的序列同一性,包括这些值之间的任何范围)的序列同一性。

[0165] 在一些实施方案中,本文所述的多特异性构建体是包含抗CLDN6抗体部分和抗4-1BB抗体部分的多特异性构建体(例如双特异性抗体),其中所述抗CLDN6抗体部分包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述VH包含:(i)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HC-CDR1或其变体,所述变体在HC-CDR1中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换,(ii)包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HC-CDR2或其变体,所述变体在HC-CDR2中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换,以及(iii)包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HC-CDR3或其变体,所述变体在HC-CDR3中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;并且所述VL包含:(i)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的LC-CDR1或其变体,所述变体在LC-CDR1中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;(ii)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的LC-CDR2或其变体,所述变体在LC-CDR2中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;以及(iii)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的LC-CDR3或其变体,所述变体在LC-CDR3中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换。在一些实施方案中,抗4-1BB抗体部分包含sdAb,其包含:包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的sdAb-CDR1或其变体,所述变体在sdAb-CDR1中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的sdAb-CDR2或其变体,所述变体在sdAb-CDR2中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;和包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的sdAb-CDR3或其变体,所述变体在sdAb-CDR3中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换。在一些实施方案中,抗4-1BB抗体部分包含:包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的sdAb或其变体,所述变体与SEQ ID NO:27具有至少约80%(例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%中的任一种,或大于99%的序列同一性,包括这些值之间的任何范围)的序列同一性。

[0166] 在本申请的多特异性构建体的一些实施方案中,本文所述的多特异性构建体是包含抗CLDN6抗体部分和抗4-1BB抗体部分的多特异性构建体(例如双特异性抗体),其中所述抗CLDN6抗体部分包含:所述VH包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:18具有至少约80%(例如包括至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一种,或大于99%)的序列同一性;和/或所述VL包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:19具有至少约80%(包括例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一种,或大于99%)的序列同一性。在一些实施方案中,这种抗CLDN6抗体部分对CLDN6(例如人CLDN6)的亲和力与以下抗CLDN6抗体部分的亲和力相当(例如相同):其包含SEQ ID NO:18中所示的VH,和SEQ ID NO:19中所示的VL。在一些实施方案中,抗4-1BB抗体部分包含sdAb,其包含:包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的sdAb-CDR1或其变体,所述变体在sdAb-CDR1中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的sdAb-CDR2或其变体,所述变体在sdAb-CDR2中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;和包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的sdAb-CDR3或其变体,所述变体在sdAb-CDR3中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换。在一些实施方案中,抗4-1BB抗体部分包含:包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的sdAb或其变

体,所述变体与SEQ ID NO:27具有至少约80% (例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%中的任一种,或大于99%的序列同一性,包括这些值之间的任何范围)的序列同一性。

[0167] 在本申请的多特异性构建体的一些实施方案中,本文所述的多特异性构建体是包含抗CLDN6抗体部分和抗4-1BB抗体部分的多特异性构建体(例如双特异性抗体),其中所述抗CLDN6抗体部分包含:所述VH包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;和/或所述VL包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗4-1BB抗体部分包含sdAb,其包含:包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的sdAb-CDR1或其变体,所述变体在sdAb-CDR1中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的sdAb-CDR2或其变体,所述变体在sdAb-CDR2中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;和包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的sdAb-CDR3或其变体,所述变体在sdAb-CDR3中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换。在一些实施方案中,抗4-1BB抗体部分包含:包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的sdAb或其变体,所述变体与SEQ ID NO:27具有至少约80% (例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%中的任一种,或大于99%的序列同一性,包括这些值之间的任何范围)的序列同一性。

[0168] 在一些实施方案中,本文所述的多特异性构建体是包含抗CLDN6抗体部分和抗4-1BB抗体部分的多特异性构建体(例如双特异性抗体),并且所述抗4-1BB抗体部分与4-1BB的CRD 3/4区域特异性结合。在一些实施方案中,本文所述的多特异性构建体是包含抗CLDN6抗体部分和抗4-1BB抗体部分的多特异性构建体(例如双特异性抗体),并且所述抗4-1BB抗体部分包含sdAb。

[0169] 在一些实施方案中,本文所述的多特异性构建体是包含抗CLDN6抗体部分和抗4-1BB抗体部分的多特异性构建体(例如双特异性抗体),其中所述抗4-1BB抗体部分包含sdAb,并且所述sdAb在单个单体可变抗体结构域内包含sdAb-CDR1、sdAb-CDR2和sdAb-CDR3,其分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述单个单体可变抗体结构域包含SEQ ID NO:27中所示的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:27具有至少约80%的序列同一性(例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%中的任一种,或大于99%的序列同一性,包括这些值之间的任何范围)。在一些实施方案中,这种抗4-1BB抗体部分对4-1BB(例如人4-1BB)的亲和力与包含SEQ ID NO:27的抗4-1BB抗体部分的亲和力相当(例如相同)。

[0170] 在一些实施方案中,本文所述的多特异性构建体是包含抗CLDN6抗体部分和抗4-1BB抗体部分的多特异性构建体(例如双特异性抗体),其中所述抗4-1BB抗体部分包含sdAb,并且所述sdAb包含:包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的sdAb-CDR1或其变体,所述变体在sdAb-CDR1中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的sdAb-CDR2或其变体,所述变体在sdAb-CDR2中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换;和包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的sdAb-CDR3或其变体,所述变体在sdAb-CDR3中包含至多约3个(例如约1、2、3个中的任一种)氨基酸替换。

[0171] 在一些实施方案中,本文所述的多特异性构建体是包含抗CLDN6抗体部分和抗4-1BB抗体部分的多特异性构建体(例如双特异性抗体),其中所述抗4-1BB抗体部分包含

sdAb,并且所述sdAb包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:27具有至少约80% (例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%中的任一种,或大于99%的序列同一性,包括这些值之间的任何范围)的序列同一性。在一些实施方案中,这种抗4-1BB抗体部分对4-1BB (例如人4-1BB)的亲合力与包含SEQ ID NO:27的抗4-1BB抗体部分的亲合力相当 (例如相同)。

[0172] 在一些实施方案中,提供了多特异性构建体 (例如双特异性抗体),其包含抗CLDN6抗体部分和抗4-1BB抗体部分,所述抗CLDN6抗体部分包含与CLDN6 (例如人CLDN6) 特异性结合的抗体 (例如全长抗体),所述抗4-1BB抗体部分包含与4-1BB (例如人4-1BB) 结合的抗体 (例如单结构域抗体),其中所述抗CLDN6抗体部分包含: (1) HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其在重链可变区 (VH) 内分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述重链可变区包含SEQ ID No:7中所示的序列;和 (2) LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其在轻链可变区 (VL) 内分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID No:8中所示的序列;并且所述抗4-1BB抗体部分包含sdAb,并且所述sdAb在单个单体可变抗体结构域内包含sdAb-CDR1、sdAb-CDR2和sdAb-CDR3,其分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述单个单体可变抗体结构域包含SEQ ID NO:27中所示的氨基酸序列。

[0173] 在一些实施方案中,提供了多特异性构建体 (例如双特异性抗体),其包含抗CLDN6抗体部分和抗4-1BB抗体部分,所述抗CLDN6抗体部分包含与CLDN6 (例如人CLDN6) 特异性结合的抗体 (例如全长抗体),所述抗4-1BB抗体部分包含与4-1BB (例如人4-1BB) 结合的抗体 (例如单结构域抗体),其中所述抗CLDN6抗体部分包含: (1) HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其在重链可变区 (VH) 内分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述重链可变区包含SEQ ID No:18中所示的序列;和 (2) LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其在轻链可变区 (VL) 内分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID No:19中所示的序列;并且所述抗4-1BB抗体部分包含sdAb,并且所述sdAb在单个单体可变抗体结构域内包含sdAb-CDR1、sdAb-CDR2和sdAb-CDR3,其分别包含CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述单个单体可变抗体结构域包含SEQ ID NO:27中所示的氨基酸序列。

[0174] 在一些实施方案中,提供了多特异性构建体 (例如双特异性抗体),其包含抗CLDN6抗体部分和抗4-1BB抗体部分,所述抗CLDN6抗体部分包含与CLDN6 (例如人CLDN6) 特异性结合的抗体 (例如全长抗体),所述抗4-1BB抗体部分包含与4-1BB (例如人4-1BB) 结合的抗体 (例如单结构域抗体),其中所述抗CLDN6抗体部分包含:所述VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:7具有至少约80% (例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%中的任一种,或大于99%的序列同一性,包括这些值之间的任何范围)的序列同一性;和/或所述VL包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:8具有至少约80% (例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%中的任一种,或大于99%的序列同一性,包括这些值之间的任何范围)的序列同一性;并且所述抗4-1BB抗体部分包含sdAb,并且所述sdAb包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:27具有至少约80% (例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%中的任一种,或大于99%的序列同一性,包括这些值之间的任何范围)的序列同一性。在一些实施方案中,这种多特异性构建体 (例如双特异性抗体) 对

CLDN6和4-1BB的亲合力与以下多特异性构建体的亲合力相当(例如相同):其包含抗CLDN6抗体部分和抗4-1BB抗体部分,所述抗CLDN6抗体部分包含全长抗体,所述全长抗体包含SEQ ID NO:7中所示的VH和SEQ ID NO:8中所示的VL,所述抗4-1BB抗体部分包含单结构域抗体,所述单结构域抗体包含SEQ ID NO:27中所示的序列。

[0175] 在一些实施方案中,提供了多特异性构建体(例如双特异性抗体),其包含抗CLDN6抗体部分和抗4-1BB抗体部分,所述抗CLDN6抗体部分包含与CLDN6(例如人CLDN6)特异性结合的抗体(例如全长抗体),所述抗4-1BB抗体部分包含与4-1BB(例如人4-1BB)结合的抗体(例如单结构域抗体),其中所述抗CLDN6抗体部分包含:所述VH包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:18具有至少约80%(例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%中的任一种,或大于99%的序列同一性,包括这些值之间的任何范围)的序列同一性;和/或所述VL包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:19具有至少约80%(例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%中的任一种,或大于99%的序列同一性,包括这些值之间的任何范围)的序列同一性;并且所述抗4-1BB抗体部分包含sdAb,并且所述sdAb包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:27具有至少约80%(例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%中的任一种,或大于99%的序列同一性,包括这些值之间的任何范围)的序列同一性。在一些实施方案中,这种多特异性构建体(例如双特异性抗体)对CLDN6和4-1BB的亲合力与以下多特异性构建体的亲合力相当(例如相同):其包含抗CLDN6抗体部分和抗4-1BB抗体部分,所述抗CLDN6抗体部分包含全长抗体,所述全长抗体包含SEQ ID NO:18中所示的VH和SEQ ID NO:19中所示的VL,所述抗4-1BB抗体部分包含单结构域抗体,所述单结构域抗体包含SEQ ID NO:27中所示的序列。

[0176] 在一些实施方案中,提供了多特异性构建体(例如双特异性抗体),其包含抗CLDN6抗体部分和抗4-1BB抗体部分,所述抗CLDN6抗体部分包含与CLDN6(例如人CLDN6)特异性结合的抗体(例如全长抗体),所述抗4-1BB抗体部分与4-1BB特异性结合,其中所述抗4-1BB抗体部分与所述抗CLDN6抗体(例如全长抗CLDN6抗体)的一条或两条重链的N-末端融合。在一些实施方案中,提供了多特异性构建体(例如双特异性抗体),其包含抗CLDN6抗体部分和抗4-1BB抗体部分,所述抗CLDN6抗体部分包含与CLDN6特异性结合的抗体(例如全长抗体),所述抗4-1BB抗体部分与4-1BB特异性结合,其中所述抗4-1BB抗体部分与所述抗CLDN6抗体(例如全长抗CLDN6抗体)的一条或两条重链的C-末端融合。在一些实施方案中,提供了多特异性构建体(例如双特异性抗体),其包含抗CLDN6抗体部分和抗4-1BB抗体部分,所述抗CLDN6抗体部分包含与CLDN6特异性结合的抗体(例如全长抗体),所述抗4-1BB抗体部分与4-1BB特异性结合,其中所述抗4-1BB抗体部分与所述抗CLDN6抗体(例如全长抗CLDN6抗体)的一条或两条轻链的N-末端融合。在一些实施方案中,提供了多特异性构建体(例如双特异性抗体),其包含抗CLDN6抗体部分和抗4-1BB抗体部分,所述抗CLDN6抗体部分包含与CLDN6特异性结合的抗体(例如全长抗体),其中所述抗4-1BB抗体部分与所述抗CLDN6抗体(例如全长抗CLDN6抗体)的一条或两条轻链的C-末端融合。

[0177] 在一些实施方案中,提供了多特异性构建体(例如双特异性抗体),其包含抗CLDN6抗体部分和抗4-1BB抗体部分,所述抗CLDN6抗体部分包含与CLDN6(例如人CLDN6)特异性结

合的抗体(例如全长抗体),所述抗4-1BB抗体部分包含与4-1BB(例如人4-1BB)结合的单结构域抗体,其中所述单结构域抗体与所述抗CLDN抗体(例如全长抗CLDN抗体)的一条或两条重链的N-末端融合。在一些实施方案中,提供了多特异性构建体(例如双特异性抗体),其包含抗CLDN6抗体部分和抗4-1BB抗体部分,所述抗CLDN6抗体部分包含与CLDN6特异性结合的抗体(例如全长抗体),所述抗4-1BB抗体部分包含与4-1BB结合的单结构域抗体,其中所述单结构域抗体与所述抗CLDN抗体(例如全长抗CLDN抗体)的一条或两条重链的C-末端融合。在一些实施方案中,提供了多特异性构建体(例如双特异性抗体),其包含抗CLDN6抗体部分和抗4-1BB抗体部分,所述抗CLDN6抗体部分包含与CLDN6特异性结合的抗体(例如全长抗体),所述抗4-1BB抗体部分包含与4-1BB结合的单结构域抗体,其中所述单结构域抗体与所述抗CLDN6抗体(例如全长抗CLDN6抗体)的一条或两条轻链的N-末端融合。在一些实施方案中,提供了多特异性构建体(例如双特异性抗体),其包含抗CLDN6抗体部分和抗4-1BB抗体部分,所述抗CLDN6抗体部分包含与CLDN6特异性结合的抗体(例如全长抗体),所述抗4-1BB抗体部分包含与4-1BB结合的单结构域抗体,其中所述单结构域抗体与所述抗CLDN6抗体(例如全长抗CLDN6抗体)的一条或两条轻链的C-末端融合。

[0178] 在一些实施方案中,抗4-1BB抗体部分通过接头与抗CLDN6抗体部分融合。在一些实施方案中,接头是肽接头。在一些实施方案中,接头的长度为约四至约五十个氨基酸。在一些实施方案中,接头选自(GS)_n、(GGGS)_n、(GGGGS)_n和(GSGGS)_n。在一些实施方案中,n为0-8。在一些实施方案中,接头包含GGGSGGGSGGGGS的氨基酸序列。

[0179] 在一些实施方案中,本文提供了多特异性构建体,其包含重链组分和轻链组分,其中所述重链组分包含SEQ ID NO:28、30、32、34、36、38、44或45的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:28、30、32、34、36、38、44或45具有至少约80%(例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%中的任一种,或大于99%的序列同一性,包括这些值之间的任何范围)的序列同一性;和/或所述轻链包含SEQ ID NO:29、31、33、35、37、39的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:29、31、33、35、37、39具有至少约80%(例如至少约80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%中的任一种,或大于99%的序列同一性,包括这些值之间的任何范围)的序列同一性。

[0180] 在一些实施方案中,本文提供了多特异性构建体,其包含重链组分和轻链组分,其中所述重链组分包含SEQ ID NO:28、30、32、34、36、38、44或45的氨基酸序列;和/或所述轻链包含SEQ ID NO:SEQ ID NO:29、31、33、35、37、39的氨基酸序列。

[0181] 在一些实施方案中,提供了多特异性构建体,其包含两个重链组分和两个轻链组分,其中:(a)每个重链组分包含SEQ ID NO:28和/或44中所示的序列,并且每个轻链组分包含SEQ ID NO:29中所示的序列;(b)每个重链组分包含SEQ ID NO:30和/或SEQ ID NO:45中所示的序列,并且每个轻链组分包含SEQ ID NO:31中所示的序列;(c)每个重链组分包含SEQ ID NO:32中所示的序列,并且每个轻链组分包含SEQ ID NO:33中所示的序列;(d)每个重链组分包含SEQ ID NO:34中所示的序列,并且每个轻链组分包含SEQ ID NO:35中所示的序列;(e)每个重链组分包含SEQ ID NO:36中所示的序列,并且每个轻链组分包含SEQ ID NO:37中所示的序列;或(f)每个重链组分包含SEQ ID NO:38中所示的序列,并且每个轻链组分包含SEQ ID NO:39中所示的序列。

[0182] 在一些实施方案中,本文提供了多特异性构建体,其包含与CLDN6特异性结合的第一抗体部分;和与4-1BB特异性结合的第二抗体部分,其中所述第一抗体部分与CLDN6的结合触发所述第二抗体部分激活4-1BB。在一些实施方案中,在第一抗体部分与CLDN6结合之后,第二抗体部分对4-1BB的激活增强至少2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍或1000倍。在一些实施方案中,在不与CLDN6结合的情况下,多特异性构建体不激活4-1BB信号传导。在一些实施方案中,在不与CLDN6结合的情况下,第二部分确实激活了4-1BB信号传导。

[0183] 4-1BB信号传导激活是激动剂抗体(如乌托鲁单抗(utomilumab,PF-05082566)和乌瑞芦单抗(urelumab,BMS-663513))的预期机制。然而,一些本公开的抗体的抗4-1BB部分不需要这种活性。实际上,在一些实施方案中,优选在不存在CLDN6结合时,本抗体的抗4-1BB部分不能独立激活4-1BB。如实验实施例所表明的,有趣地,当抗CLDN6部分与细胞上的CLDN6蛋白结合时,这种CLDN6结合可以触发4-1BB信号传导激活。

[0184] 已知的抗4-1BB激动剂抗体通常与剂量限制性在靶(on-target)肝毒性相关联,与这些抗体相比,本公开的抗体被认为远远更安全。在组织(如肝脏)中,其中CLDN6在健康条件下不表达,预期本公开的抗体将不会触发细胞毒性免疫反应,因为它们不会激活4-1BB信号传导。在表达和/或可触及CLDN6的肿瘤组织中,相比之下,本抗体可以启动对肿瘤细胞的强效免疫反应。因此,与目前临床上正在开发的具有在靶/固有毒性的那些抗4-1BB抗体不同,本公开的抗体在治疗癌症方面可以同时有效且安全。

[0185] 核酸

[0186] 还考虑了编码本文所述的多特异性构建体或各种抗体部分的核酸分子。在一些实施方案中,提供了编码多特异性构建体的一种或多种多肽或各种抗体部分的核酸(或一组核酸)。在一些实施方案中,提供了编码多特异性构建体(例如抗CLDN6/抗4-1BB双特异性抗体)或其多肽部分的核酸(或一组核酸)。

[0187] 在此还考虑了包含多特异性构建体(例如抗CLDN6/抗4-1BB双特异性抗体)、核酸或载体的分离的宿主细胞,所述核酸编码多特异性构建体的多肽组分,所述载体包含编码本文所述的多特异性构建体(例如抗CLDN6/抗4-1BB双特异性抗体)的多肽组分的核酸。

[0188] 本申请还包括这些核酸序列的变体。例如,变体包括在至少中等严格杂交条件下与核酸序列杂交的核苷酸序列,所述核酸序列编码本文所述的多特异性构建体(例如抗CLDN6/抗4-1BB双特异性抗体)或各种抗体部分。

[0189] 本申请还提供载体,其中插入本申请的核酸。

[0190] 可以将核酸克隆至多种类型的载体中。例如,可以将核酸克隆至载体中,包括但不限于质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和黏粒。特别感兴趣的载体包括表达载体、复制载体、探针生成载体和测序载体。

[0191] 此外,可以以病毒载体的形式将表达载体提供给细胞。病毒载体技术是本领域众所周知的,并且例如在Sambrook等人(2001年,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York)以及其他病毒学和分子生物学手册中描述。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和慢病毒。一般地,合适的载体含有至少一种生物体中有功能的复制起点、启动子序列、方便的限制性核酸内切酶位点以及一个或多个可选择标记物(参见例如WO 01/96584;WO 01/29058;和美国

专利第6,326,193号)。

[0192] 治疗方法

[0193] 此处还提供了治疗个体的疾病或病症的方法。所述方法包括将本文所述的多特异性构建体(例如抗CLDN6/抗4-1BB双特异性抗体)施用于个体(例如哺乳动物,如人)。在一些实施方案中,个体是哺乳动物(例如人、非人灵长类动物、大鼠、小鼠、牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫等)。在一些实施方案中,个体是人。在一些实施方案中,个体是临床患者、临床试验志愿者、实验动物等。

[0194] 在所述方法的一些实施方案中,疾病或病症是增殖性疾患。在一些实施方案中,细胞增殖性疾患是癌症。在一些实施方案中,癌症是实体瘤、黑色素瘤、肾癌、卵巢癌、结直肠癌、头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)、非小细胞肺癌或非霍奇金淋巴瘤(NHL)。

[0195] 组合物、试剂盒和制品

[0196] 本文还提供包含本文所述的多特异性构建体(例如抗CLDN6/抗4-1BB双特异性抗体)中的任一种的组合物(如制剂),编码多特异性构建体中的任一种或其一部分的核酸,包含编码多特异性构建体之一的核酸的载体,或包含所述核酸或所述载体的宿主细胞。

[0197] 可以通过将具有所需纯度的多特异性构建体与任选的药理学上可接受的载剂(carrier)、赋形剂或稳定剂混合,来获得本文所述的多特异性构建体(例如抗CLDN6/抗4-1BB双特异性抗体)的合适制剂(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编辑(1980))。

[0198] 还提供包含本文所述的多特异性构建体(例如抗CLDN6/抗4-1BB双特异性抗体)中的任一种的试剂盒。试剂盒可以用于本文所述的任何治疗方法。

[0199] 本申请的试剂盒采用合适的包装。合适的包装包括但不限于小瓶、瓶、罐、柔性包装(例如密封的麦拉膜(Mylar)或塑料袋)等。试剂盒可以任选地提供额外的组分,如缓冲液和解释性信息。

[0200] 因此,本申请还提供了制品。制品可以包含容器和在容器上或与容器相关联的标签或包装说明书。合适的容器包括小瓶(如密封小瓶)、瓶、罐、柔性包装等。一般地,容器中装有组合物,并且可以具有无菌的入口(例如,容器可以是具有皮下注射针可刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶)。

[0201] 本领域技术人员将认识到,在本发明的范围和精神范围内可以有数个实施方案。现在将参考以下非限制性实施例更详细地描述本发明。以下实施例进一步说明了本发明,但是当然不应被解释为以任何方式限制其范围。

[0202] 实施例

[0203] 以下实施例的提出是为了向本领域的普通技术人员提供如何制造和使用本发明的完整公开和描述,且并非旨在限制发明人视为其发明的范围,也并非旨在表示以下实验是全部或仅有的进行的实验。已经努力确保所用数字(例如量、温度等)的准确性,但应当考虑一些实验误差和偏差。以下实施例旨在仅作为本申请的示例,因此不应当被视为以任何方式限制本申请。以下实施例和详细说明仅供说明,而非限制。

[0204] 实施例1:CLDN6 X 4-1BB双特异性抗体的制备

[0205] 设计并制备了下表3中所示的示例性CLDN6 X 4-1BB双特异性抗体。

[0206] 表3. 示例性CLDN6 X 4-1BB双特异性抗体

CLDN6-1 IgG1 N297A X 4-1BB (CLDN6-1 X 4-1BB NA, 4-1BB sdAb 与 CLDN-6-1 抗体部分重链的 C-末端融合, 在 IgG1 Fc 区中具有 N297A)		
重链组分 (SEQ ID NO: 28)	CLDN6-1 的重链 (SEQ ID NO: 10)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE WMGYISYSGSNNYNPSLKNRVTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVY YCARGGYFDYWGQGTILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	接头 (SEQ ID NO: 23)	GGGGSGGGSGGGGS
	4-1BB sdAb (SEQ ID NO: 27)	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTYSSNCMGWFRQAPGKGLE GVAICTGGGSPSYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAADLLRAGTPLSSYEFNYWGQGTILVTVSS
轻链组分 (SEQ ID NO: 29)	CLDN6-1 的轻链 (SEQ ID NO: 11)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNTNNQKNYLAWYQQKPG QPPKLLIYFESTRESGVPDFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQ HYNAPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
CLDN6-1 IgG1 WT X 4-1BB (CLDN6-1 X 4-1BB WT, 4-1BB sdAb 与 CLDN-6-1 抗体部分重链的 C-末端融合, 具有野生型 IgG1)		
重链组分 (SEQ ID NO: 30)	CLDN6-1 的重链 (SEQ ID NO: 9)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE WMGYISYSGSNNYNPSLKNRVTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVY YCARGGYFDYWGQGTILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	接头 (SEQ ID NO: 23)	GGGGSGGGSGGGGS
	4-1BB sdAb (SEQ ID NO: 27)	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTYSSNCMGWFRQAPGKGLE GVAICTGGGSPSYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAADLLRAGTPLSSYEFNYWGQGTILVTVSS
轻链组分 (SEQ ID NO: 31)	CLDN6-1 的轻链 (SEQ ID NO: 11)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNTNNQKNYLAWYQQKPG QPPKLLIYFESTRESGVPDFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQ HYNAPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
4-1BB X CLDN6-1 IgG1 WT (4-1BB X CLDN6-1 WT, 4-1BB sdAb 与 CLDN-6-1 抗体部分重链的 N-末端融合, 具有野生型 IgG1)		

[0207]

[0208]

重链组分 (SEQ ID NO: 32)	4-1BB sdAb (SEQ ID NO: 27)	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTYSN <u>NC</u> MGWFRQAPGKGLE GVA <u>VI</u> CTGGGSPSYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAAD <u>LL</u> RAGTPLSSYEFNYWGQGTIVTVSS
	接头 (SEQ ID NO: 23)	GGGGSGGGSGGGGS
	CLDN6-1 的重链 (SEQ ID NO: 9)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE WMG <u>YIS</u> YSGSNYNPSL <u>KN</u> RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARGGYYFDYWGQGTIVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSV MHEALHNHYTQKSLSPGK
轻链组分 (SEQ ID NO: 33)	CLDN6 的轻链 (SEQ ID NO: 11)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNTNNQKNYLAWYQQKPG QPPKLLIY <u>FA</u> STRESGVPRDFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQ <u>HY</u> NAPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
4-1BB X CLDN6-1 IgG1 WT (4-1BB X CLDN6-1 L WT, 4-1BB sdAb 与 CLDN-6-1 抗体部分轻链的 N-末端融合, 具有野生型 IgG1)		
重链组分 (SEQ ID NO: 34)	CLDN6-1 的重链 (SEQ ID NO: 9)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE WMG <u>YIS</u> YSGSNYNPSL <u>KN</u> RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARGGYYFDYWGQGTIVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSV MHEALHNHYTQKSLSPGK
轻链组分 (SEQ ID NO: 35)	4-1BB sdAb (SEQ ID NO: 27)	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTYSN <u>NC</u> MGWFRQAPGKGLE GVA <u>VI</u> CTGGGSPSYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAAD <u>LL</u> RAGTPLSSYEFNYWGQGTIVTVSS
	接头 (SEQ ID NO: 23)	GGGGSGGGSGGGGS
	CLDN6-1 的轻链 (SEQ ID NO: 11)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNTNNQKNYLAWYQQKPG QPPKLLIY <u>FA</u> STRESGVPRDFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQ <u>HY</u> NAPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
CLDN6-3 IgG1 N297A X 4-1BB (CLDN6-3 X 4-1BB NA, 4-1BB sdAb 与 CLDN-6-3 抗体部分重链的 C-末端融合, 在 IgG1 Fc 区中具有 N297A)		

[0209]

重链组分 (SEQ ID NO: 36)	CLDN6-3 重链 (SEQ ID NO: 21)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYGM SWVRQAPGKGLE WVATISRDASYTFPDSVKG RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCVRLGDNDRGYAM DYWGQ GTILVTSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	接头 (SEQ ID NO: 23)	GGGGSGGGGSGGGGS
	4-1BB sdAb (SEQ ID NO: 27)	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTYSSNCMGWFRQAPGKGLE GVA VICTGGGSPSYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAADLLRAGTPLSSYEFNYWGQGTILVTSS
轻链组分 (SEQ ID NO: 37)	CLDN6-3 的轻链 (SEQ ID NO: 22)	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSVVHVNANTYLEWYQQRPGQ SPRLLIYK VSNRFP GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQ GSHVPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFPYREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
CLDN6-3 IgG1 WT X 4-1BB (CLDN6-3 X 4-1BB WT, 4-1BB sdAb 与 CLDN-6-3 抗体部分重链的 C-末端融合, 具有野生型 IgG1)		
重链组分 (SEQ ID NO: 38)	CLDN6-3 的重链 (SEQ ID NO: 20)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYGM SWVRQAPGKGLE WVATISRDASYTFPDSVKG RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCVRLGDNDRGYAM DYWGQ GTILVTSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	接头 (SEQ ID NO: 23)	GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 23)
	4-1BB sdAb (SEQ ID NO: 27)	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTYSSNCMGWFRQAPGKGLE GVA VICTGGGSPSYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAADLLRAGTPLSSYEFNYWGQGTILVTSS
轻链组分 (SEQ ID NO: 39)	CLDN6-3 的轻链 (SEQ ID NO: 22)	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSVVHVNANTYLEWYQQRPGQ SPRLLIYK VSNRFP GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQ GSHVPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFPYREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0210] 实施例2.CLDN6 X 4-1BB BsAb的抗原结合活性

[0211] 2.1CLDN6 X 4-1BB BsAb与CLDN6的结合亲和力

[0212] 通过表面等离子体共振 (SPR) 检测CLDN6-1 x 4-1BB NA和CLDN6-1 X 4-1BB WT (如实施例1中所制备) 对人CLDN6的结合亲和力。如图1A和图1B所示,CLDN6-1 x 4-1BB NA和CLDN6-1 x 4-1BB WT与CLDN6病毒样颗粒 (VLP) 结合, K_D 分别为 2.36×10^{-9} M 和 1.61×10^{-9} M。

[0213] 制备了稳定表达人CLDN6的CHO-K1细胞系(CHO-K1-CLDN6),以评价CLDN6-1 x 4-1BB NA和CLDN6-1 x 4-1BB WT与CLDN6的结合能力。亲本CLDN6-1抗体用作对照。简要地,在4℃将CHO-K1-CLDN6细胞与不同浓度的BsAb在FACS缓冲液中孵育30分钟。然后,在洗涤后加入藻红蛋白(PE)缀合抗人IgG抗体,并在4℃进一步孵育细胞30分钟。通过FACS评价PE的平均荧光强度(MFI)。如图2A所示,CLDN6-1 x 4-1BB NA和CLDN6-1 x 4-1BB WT均以浓度依赖性方式与表达CLDN6的细胞结合。

[0214] OVCAR3和OV90是具有内源性CLDN6表达的人卵巢癌细胞系。如图2B和图2C所示,CLDN6-1 x 4-1BB NA和CLDN6-1 x 4-1BB WT均能够与OVCAR3和OV90结合。总体而言,包含抗CLDN6-1抗体部分的BsAb对人CLDN6的结合亲和力与亲本CLDN6-1抗体对人CLDN6的结合亲和力相当。结合信号与OVCAR3和OV90细胞表面的CLDN6表达水平密切相关。

[0215] 2.2CLDN6 X 4-1BB BsAb与4-1BB的结合亲和力

[0216] 通过SPR检测CLDN6-1 x 4-1BB NA和CLDN6-1 x 4-1BB WT对人4-1BB的结合亲和力。如图3A-图3D所示,CLDN6-1 x 4-1BB NA和CLDN6-1 x 4-1BB WT与单体人4-1BB结合, K_D 分别为 $1.64 \times 10^{-8}M$ 和 $1.57 \times 10^{-8}M$ 。同时检测与IgG1 Fc片段缀合的亲本抗4-1BB sdAb抗体(4-1BB sdAb-Fc)对4-1BB的亲和力,并发现 K_D 为 $4.393 \times 10^{-9}M$,表明BsAb中的4-1BB抗体部分对4-1BB的亲和力与4-1BB sdAb-Fc对4-1BB的亲和力相当。

[0217] 通过ELISA分析CLDN6-1 x 4-1BB NA和CLDN6-1 x 4-1BB WT与可溶性重组人4-1BB的结合。如图4A所示,CLDN6-1 x 4-1BB NA和CLDN6-1 x 4-1BB WT均以浓度依赖性方式与重组人4-1BB结合,EC50分别为0.129nM和0.078nM。此类EC50与4-1BB sdAb-Fc的EC50相当。此外,通过FACS评价CLDN6-1x 4-1BB NA和CLDN6-1 x 4-1BB WT与表达4-1BB的HEK293细胞的结合。如图4B所示,CLDN6-1 x 4-1BB NA和CLDN6-1 x 4-1BB WT均能够与4-1BB结合,EC50分别为0.406nM和0.347nM。此类EC50与4-1BB sdAb-Fc的EC50相当。

[0218] 实施例3.CLDN6-1 x 4-1BB BsAb的功能活性

[0219] 3.1基于细胞系的CLDN6 X 4-1BB BsAb功能表征

[0220] 为了测试CLDN6 X 4-1BB双特异性抗体激活4-1BB信号传导的能力,将稳定表达4-1BB和NFκB荧光素酶报告基因的GloResponse™ NFκB-luc2/4-1BB Jurkat细胞系用作效应子细胞,并将表达CLDN6的细胞(CHO-K1 CLDN6、OVCAR3或OV90)用作靶标细胞。不表达CLDN6的RK0结肠癌细胞用作阴性对照。

[0221] 简要地,将GloResponse™ NFκB-luc2/4-1BB Jurkat细胞(密度为每孔 5.0×10^4 个细胞)与 5.0×10^4 个靶标细胞在白色96孔板中混合。将抗体连续稀释并加入板中。在37℃孵育6小时后测量发光。如图5A至图5D所示,无论CLDN6表达与否,乌瑞芦单抗诱导了4-1BB激活,而本申请的4-1BB sdAb-Fc尽管能够与4-1BB结合,但在相同的实验设置下没有激动剂活性。类似地,CLDN6-1 x 4-1BB NA和CLDN6-1 x 4-1BB WT在存在所有表达CLDN6的靶标细胞时诱导NFκB活性,而与CLDN6表达水平无关。相反,当不表达CLDN6的RK0细胞用作靶标细胞时,与乌瑞芦单抗相比,CLDN6-1 x 4-1BB NA和CLDN6-1 x 4-1BB WT导致显著较低的4-1BB激活,如图5D所示。

[0222] 3.2CLDN6 X 4-1BB BsAb促进人外周血单个核细胞(PBMC)免疫反应的活性

[0223] 将预激活的人PBMC与表达CLDN6的细胞或RK0共培养,效应子与靶标(effector-to-target,E:T)比率为10:1。将不同浓度的抗体加入混合培养物中。48小时后,使用均相

HTRF测定来测量培养基中IL-2或IFN γ 的水平。

[0224] 如图6A-图6F所示,当PBMC与表达CLDN6的靶标细胞共培养时,CLDN6-1X 4-1BB NA和CLDN6-1 X 4-1BB WT刺激IL-2和IFN γ 的产生。然而,在存在不表达CLDN6的RKO时,CLDN6-1 X 4-1BB NA和CLDN6-1 X 4-1BB WT不刺激PBMC产生IL-2或IFN γ ,如图6G和图6H所示,表明CLDN6-1 X 4-1BB NA和CLDN6-1 X 4-1BB WT的活性依赖于肿瘤抗原的存在。相反,4-1BB sdAb-Fc在该测定中无活性。

[0225] 实施例4.CLDN6-1 x 4-1BB BsAb抑制肿瘤生长

[0226] 4.1CT26同基因鼠结直肠癌模型

[0227] CT26是N-亚硝基-N-甲基氨基甲酸乙酯(NNMU)诱导的未分化结肠癌细胞系,由患有侵袭性结肠癌的BALB/c小鼠建立。将内源性表达CLDN6的CT26细胞皮下植入BALB/c人源化4-1BB小鼠中。当肿瘤生长至平均100mm³时,用(a)人IgG、(b)CLDN6-1 x 4-1BB NA(2mg/kg)、(c)CLDN6-1 x 4-1BB WT(2mg/kg)或(d)亲本CLDN6-1抗体和4-1BB sdAb-Fc的组合(1.8mg/kg和0.7mg/kg)腹膜内治疗小鼠。每周施用治疗两次,总共6次给药。通过体积测量监测肿瘤生长。如图7A和图7B所示,CLDN6-1 x 4-1BB WT和CLDN6-1 x 4-1BB NA均表现出抗肿瘤活性,其中CLDN6-1 x 4-1BB WT实现了甚至更强的活性,肿瘤生长抑制(TGI)为75%。

[0228] 4.2MC38同基因鼠结直肠腺癌模型

[0229] 从患有结肠腺癌的小鼠中分离MC38致瘤上皮细胞系。将被工程改造以表达人CLDN6的MC38细胞皮下植入C57BL/6人源化4-1BB小鼠中。当肿瘤生长至平均100mm³时,用(a)载体(对照)、(b)CLDN6-1 x 4-1BB NA(1.5mg/kg)、(c)CLDN6-1 x 4-1BB WT(1.5mg/kg)或(d)CLDN6-1 x 4-1BB WT(4.5mg/kg)腹膜内治疗小鼠。每周施用治疗一次,总共3次给药。参见图9A。通过体积测量监测肿瘤生长。如图9B所示,CLDN6-1 x 4-1BB NA表现出显著的抗肿瘤活性,而CLDN6-1 x 4-1BB WT治疗在相同剂量下实现了更显著的肿瘤生长抑制,并在较高剂量下导致肿瘤完全消退。

[0230] 实施例5.CLDN6 X 4-1BB BsAb的肝毒性评价

[0231] 如在乌瑞芦单抗的临床开发中所观察到的,t4-1BB激动剂抗体疗法的主要问题是剂量限制性肝毒性。最常见的不良事件是丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)升高和疲劳。因此,进一步评价了CLDN6-1 x 4-1BB WT和CLDN6-1x 4-1BB NA的肝毒性。

[0232] 简要地,在每周两次用不同剂量的CLDN6-1 x 4-1BB WT或CLDN6-1 x 4-1BB NA治疗后,从hu4-1BB小鼠中收集血样用于ALT和AST测量。如图8所示,未观察到ALT和AST显著升高,表明肝毒性的风险很小,其他4-1BB激动剂抗体通常诱导该肝毒性。

[0233] 本公开在范围上不受所描述的具体实施方案的限制,这些具体实施方案旨在作为本公开的各个方面的单一说明,并且功能上等同的任何组合物或方法均在本公开的范围。对于本领域技术人员来说将显而易见的是,可以对本公开的方法和组合物进行各种修改和变化,而不偏离本公开的精神或范围。因此,本公开旨在涵盖本公开的修改和变化,只要它们属于所附权利要求及其等同物的范围内即可。

[0234] 本说明书中提及的所有出版物和专利申请均通过引用并入本文,其程度与具体且单独地指出每个单独的出版物或专利申请通过引用并入的程度相同。

[0235] 本发明已经通过本发明人发现或提出的具体实施方案进行了描述,以包含用于实

践本发明的优选模式。本领域技术人员将理解的是,鉴于本公开,可以对示例的具体实施方案进行许多修改和改变,而不偏离本发明的预期范围。例如,由于密码子冗余,可以对构成基础的DNA序列进行改变,而不影响蛋白质序列。此外,由于生物功能等效性的考虑,可以对蛋白质结构进行改变,而不影响生物作用的种类或量。所有此类修改都旨在包括在所附权利要求的范围内。

[0236] 氨基酸序列的总结表

SEQ ID NO:	序列	描述
1	SGYYWN	CLDN6-1 VH-CDR1
2	YISYSGSNNNYNPSLKN	CLDN6-1 VH-CDR2
3	GGYYFDY	CLDN6-1 VH-CDR3
4	KSSQSLLNTNNQKNYLA	CLDN6-1 VL-CDR1
5	FASTRES	CLDN6-1 VL-CDR2
6	QQHYNAPRT	CLDN6-1 VL-CDR3
7	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEW MGYISYSGSNNNYNPSLKNRVITSRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYC ARGGYYFDYWGQGTLLTVSS	CLDN6-1 VH
8	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNTNNQKNYLAWYQQKPG QPPKLLIYFASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQH YNAPRTFGGGTKVEIK	CLDN6-1 VL
9	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEW MGYISYSGSNNNYNPSLKNRVITSRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYC ARGGYYFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	CLDN6-1 WT的HC
10	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEW MGYISYSGSNNNYNPSLKNRVITSRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYC ARGGYYFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	CLDN6-1 N297A 的HC
11	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNTNNQKNYLAWYQQKPG QPPKLLIYFASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQH YNAPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	CLDN6-1的LC
12	IYGMS	CLDN6-3 VH-CDR1

[0237]

[0238]

13	TISRDAYTYFPDSVKG	CLDN6-3 VH-CDR2
14	LGDNDRGYAMDY	CLDN6-3 VH-CDR3
15	RSSQSVVHVNTYLE	CLDN6-3 VL-CDR1
16	KVSNRFP	CLDN6-3 VL-CDR2
17	FQGSHPRT	CLDN6-3 VL-CDR3
18	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYGMSWVRQAPGKGLEW VATISRDAYTYFPDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CVRLGDNDRGYAMDYWGQGTLLTVSS	CLDN6-3 VH
19	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSVVHVNTYLEWYQQRPGQS PRLIYKVSNRFPVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGS HVPRTFGGGTKVEIK	CLDN6-3 VL
20	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYGMSWVRQAPGKGLEW VATISRDAYTYFPDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CVRLGDNDRGYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	CLDN6-3 WT的HC
21	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYGMSWVRQAPGKGLEW VATISRDAYTYFPDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CVRLGDNDRGYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	CLDN6-3 N297A 的HC
22	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSVVHVNTYLEWYQQRPGQS PRLIYKVSNRFPVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGS HVPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	CLDN6-3的LC
23	GGGGSGGGSGGGGS	接头
24	SNCMG	4-1BB CDR1
25	VICTGGGSPSYADSVKG	4-1BB CDR2
26	DLLRAGTPLSSYEFNY	4-1BB CDR3

[0239]

27	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTYSSNCMGWFRQAPGKGLEG VA <u>VICTGGGSPSYADSVKGRFTISRDN</u> AKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAAD <u>LLRAGTPLSSYEFNYWGQ</u> GLTVTVSS	4-1BB VHH
28	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEW MGYISYSGSNYNPSLKNRVTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYC ARGGYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGSGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQPGGSL RLSCAASGYTYSSNCMGWFRQAPGKGLEGVA <u>VICTGGGSPSYADSVK</u> <u>GRFTISRDN</u> AKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAD <u>LLRAGTPLSSYEFN</u> <u>YWGQ</u> GLTVTVSS	重链组分
29	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNTNNQKNYLAWYQQKPG QPPKLLIY <u>FASTRES</u> GVPDFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFC <u>QQH</u> <u>YNAPRT</u> FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	轻链组分
30	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEW MGYISYSGSNYNPSLKNRVTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYC ARGGYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGSGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQPGGSL RLSCAASGYTYSSNCMGWFRQAPGKGLEGVA <u>VICTGGGSPSYADSVK</u> <u>GRFTISRDN</u> AKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAD <u>LLRAGTPLSSYEFN</u> <u>YWGQ</u> GLTVTVSS	重链组分
31	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNTNNQKNYLAWYQQKPG QPPKLLIY <u>FASTRES</u> GVPDFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFC <u>QQH</u> <u>YNAPRT</u> FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	轻链组分
32	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTYSSNCMGWFRQAPGKGLEG VA <u>VICTGGGSPSYADSVKGRFTISRDN</u> AKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAAD <u>LLRAGTPLSSYEFNYWGQ</u> GLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQ VQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEWM GYISYSGSNYNPSLKNRVTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCA RGGYYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA	重链组分

[0240]

	KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	
33	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNTNNQKNYLAWYQQKPG QPPKLLIYFASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQOH YNAPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	轻链组分
34	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEW MGYISYSGSNYNPSLKNRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARGGYFDYWGQGTLTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	重链组分
35	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTYSSNCMGWFRQAPGKGLEW VAVICTGGGSPSYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAADLLRAGTPLSSYEFNYWGQGTLTVTSSGGGGSGGGSGGGGSD IVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNTNNQKNYLAWYQQKPGQP PKLLIYFASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQOH YNAPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	轻链组分
36	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYGMSWVRQAPGKGLEW VATISRDAYTYFPDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CVRLGDNDRGYAMDYWGQGTLTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGSGGGSGGGSQVQLQESGG GLVQPGGSLRLSCAASGYTYSSNCMGWFRQAPGKGLEGVAVICTGGG SPSYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADLLR AGTPLSSYEFNYWGQGTLTVTSS	重链组分
37	DVVMQTSPSLPVTLGQPASISCRSSQSVVHVNTYLEWYQQRPGQS PRLLIYKVSNRFPVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGS HVPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	轻链组分
38	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYGMSWVRQAPGKGLEW VATISRDAYTYFPDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CVRLGDNDRGYAMDYWGQGTLTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV	重链组分

[0241]

	<p>TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNYHTQKSLSPGKGGGSGGGSGGGSGGVQLQESGGLVQPGGSLRLSCAASGYTYSSNCMGWFRQAPGKLEGVAVICTGGGSPSYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADLLRAGTPLSSYEFNYWGQGTILVTVSS</p>	
39	<p>DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSVVHVNTYLEWYQQRPGQS <u>PRLLIYKVS</u><u>NRFP</u>GPVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGS HVPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC</p>	轻链组分
40	<p>MASAGMQILGVVLTLGWNGLVSCALPMWKVTAFIGNSIVVAQVV WEGWMSCVVQSTGQMCKVYDSLALPQDLQAARALCVIALVAL FGLLVYLAKAKCTTCVEEKDSKARLVLTSGIVFVISGVLTLIPVCWTAH AIIRDFYNPLVAEAQKRELGA^{SL}YLGWAASGLLLGGGLLCCTCPSGG SQGPSHYMARYSTAPASIRGPSEYPTKNYV</p>	CLDN6
41	<p>LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVF RTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKD CCGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSP GASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLFFLTLRFSVVGRGRK KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCEL</p>	4-1BB
42	<p>QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEW MGYISYSGSN^{NY}NPSLKNRV^{TI}SRDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYC ARGGYYFDYWGQGTILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALH NHYTQKSSLS^{SPG}</p>	CLDN6-1 WT的HC
43	<p>QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEW MGYISYSGSN^{NY}NPSLKNRV^{TI}SRDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYC ARGGYYFDYWGQGTILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALH NHYTQKSSLS^{SPG}</p>	CLDN6-1 N297A 的HC
44	<p>QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEW MGYISYSGSN^{NY}NPSLKNRV^{TI}SRDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYC ARGGYYFDYWGQGTILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ</p>	重链组分

[0242]

	PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLR LSCAASGYTYSSNCMGWFRQAPGKGLEGVAVICTGGGSPSYADSVKG RFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADLLRAGTPLSSYEFNY WGQGTLVTVSS	
45	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEW MGYISYSGSNNYNPSLKNRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARGGYYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLIHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLR LSCAASGYTYSSNCMGWFRQAPGKGLEGVAVICTGGGSPSYADSVKG RFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADLLRAGTPLSSYEFNY WGQGTLVTVSS	重链组分

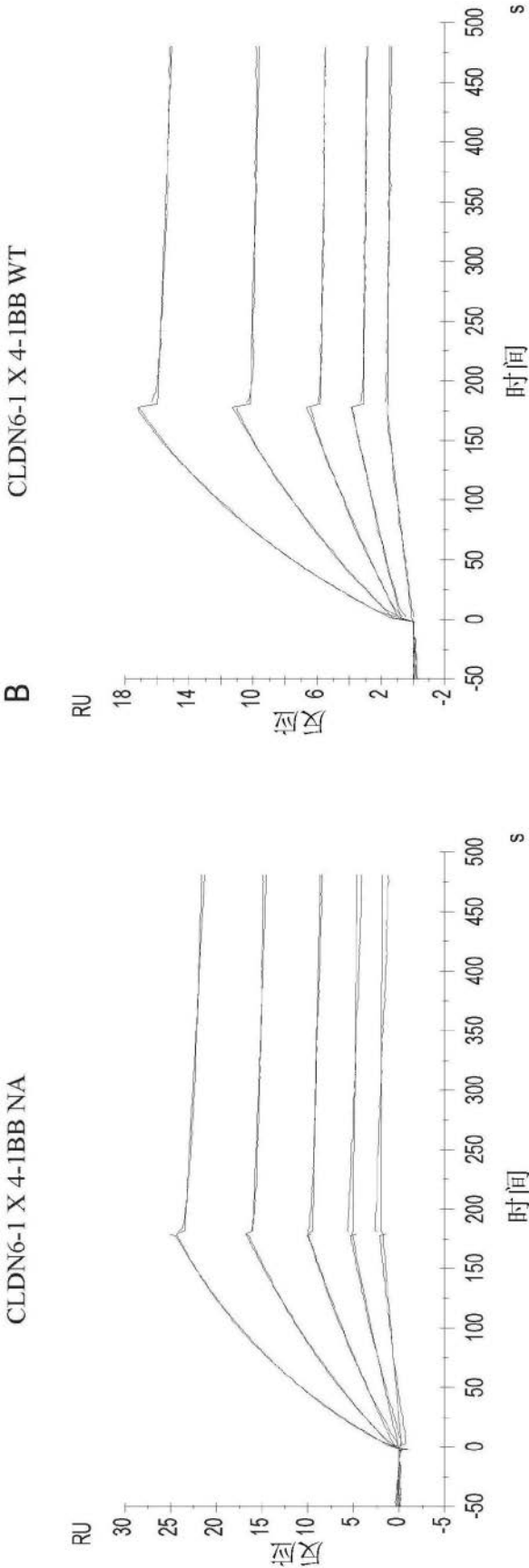


图 1A

图 1B

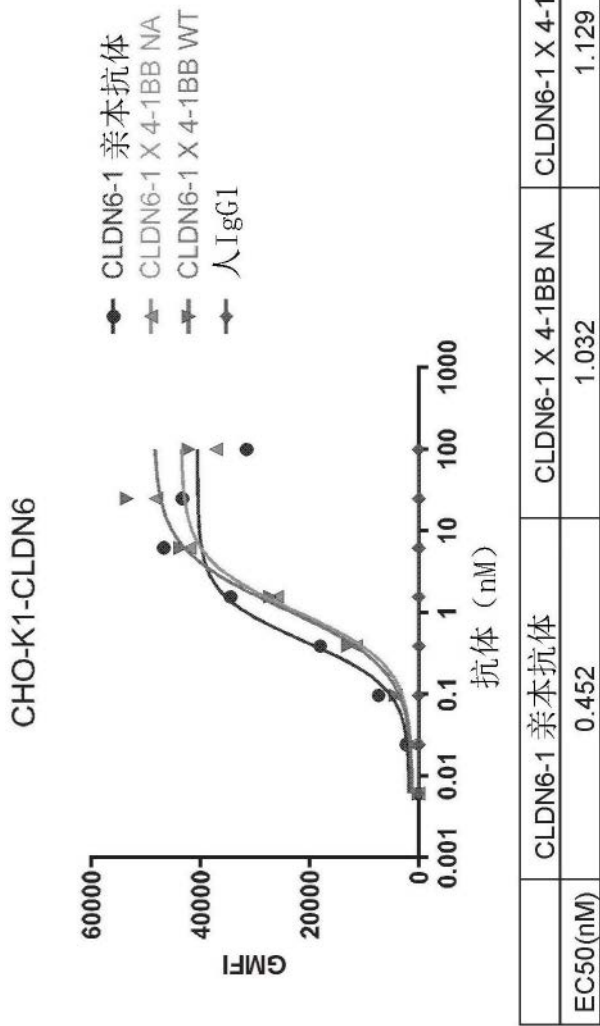


图2A

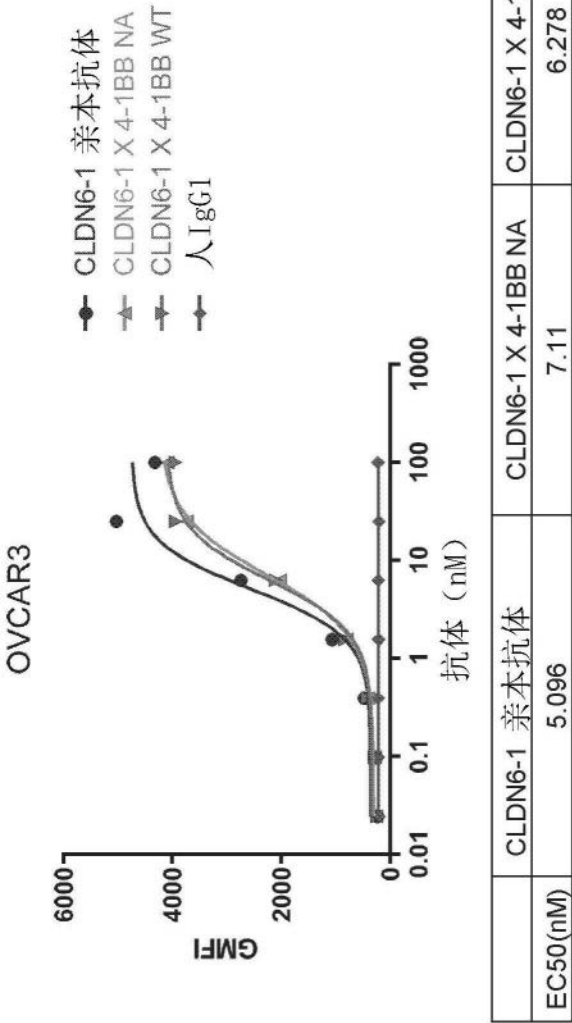
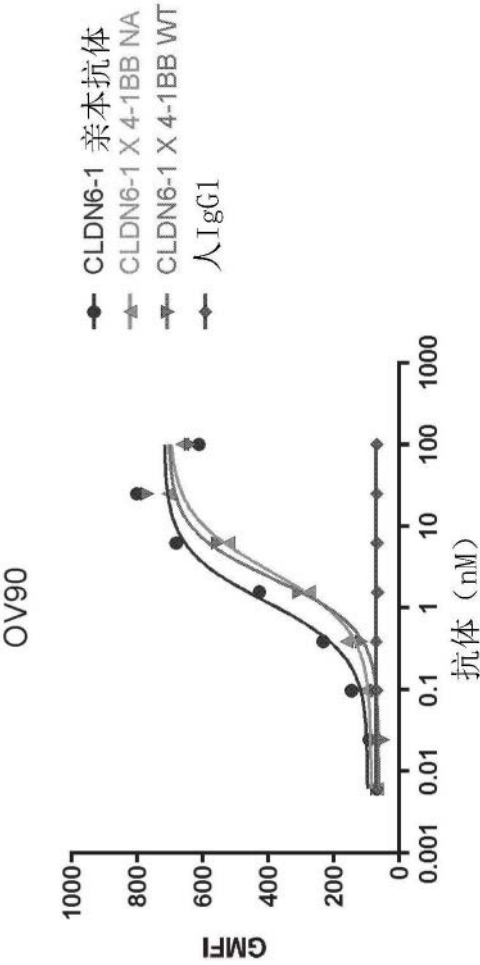


图2B



	CLDN6-1 亲本抗体	CLDN6-1 X 4-1BB NA	CLDN6-1 X 4-1BB WT
EC50(nM)	1.196	2.837	2.271

图2C

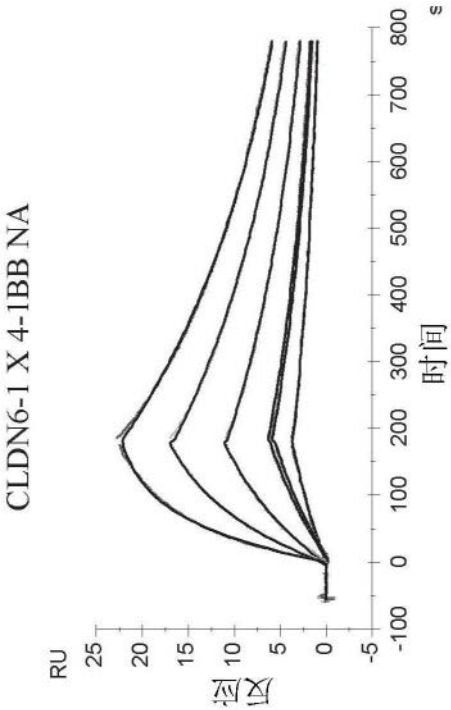


图3A

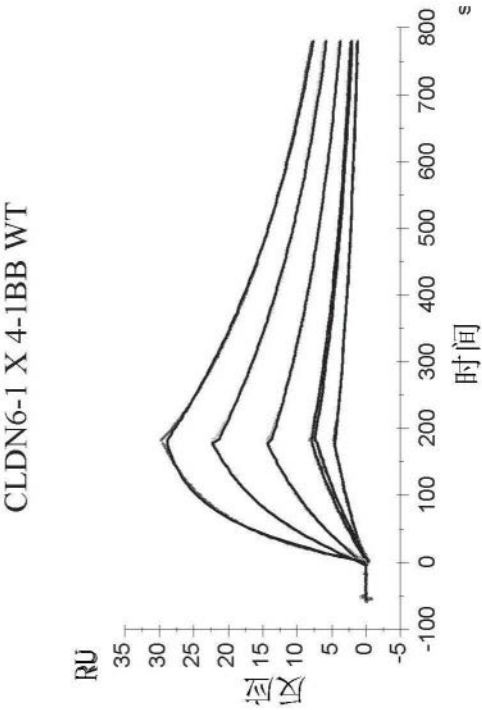


图3B

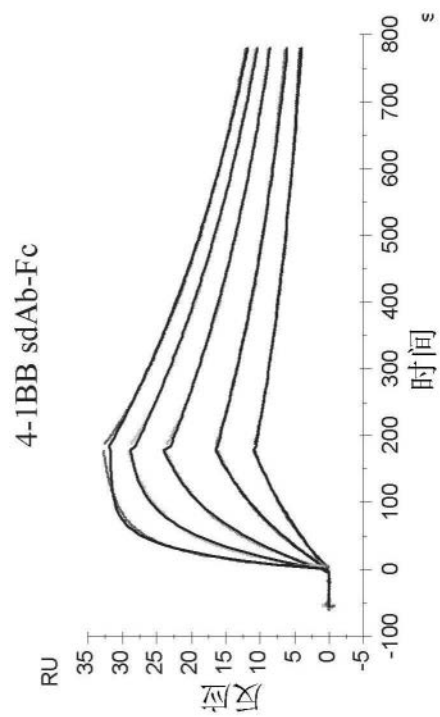
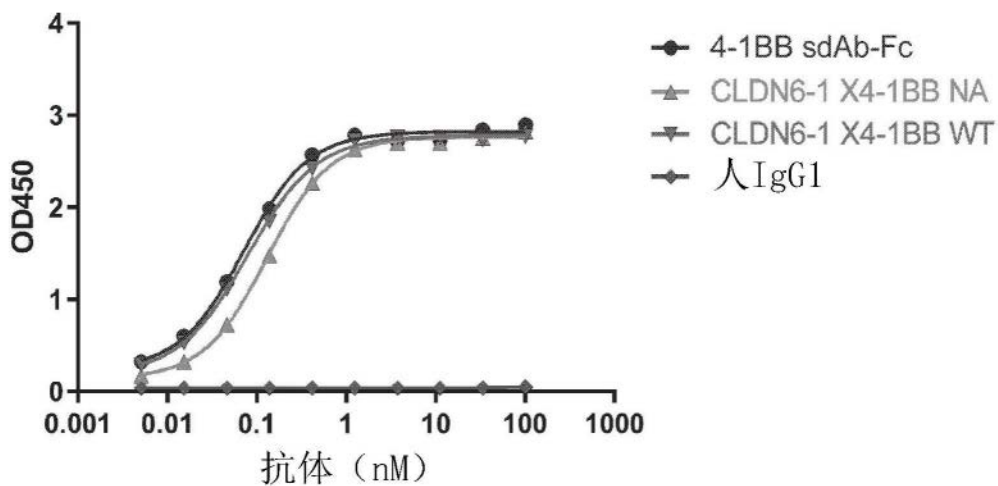


图3C

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
CLDN6-1 X 4-1BB NA	1.36E+05	2.24E-04	1.64E-08
CLDN6-1 X 4-1BB WT	1.47E+05	2.32E-04	1.57E-08
4-1BB sdAb-Fc	3.83E+05	1.68E-04	4.39E-09

图3D

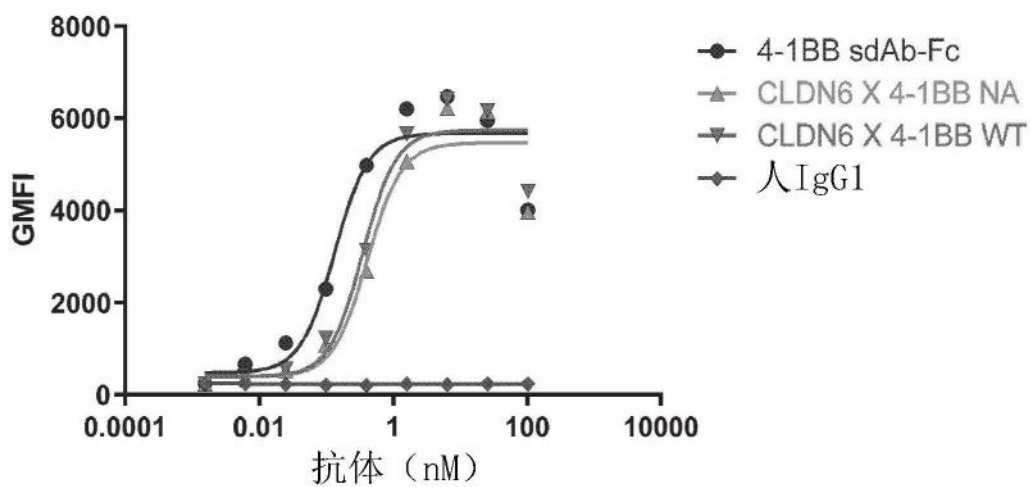
4-1BB Elisa结合



	4-1BB sdAb-Fc	CLDN6-1 X 4-1BB NA	CLDN6-1 X 4-1BB WT
EC50(nM)	0.071	0.129	0.078

图4A

HEK293T-4-1BB细胞结合



	4-1BB sdAb-Fc	CLDN6-1 X 4-1BB NA	CLDN6-1 X 4-1BB WT
EC50(nM)	0.131	0.406	0.347

图4B

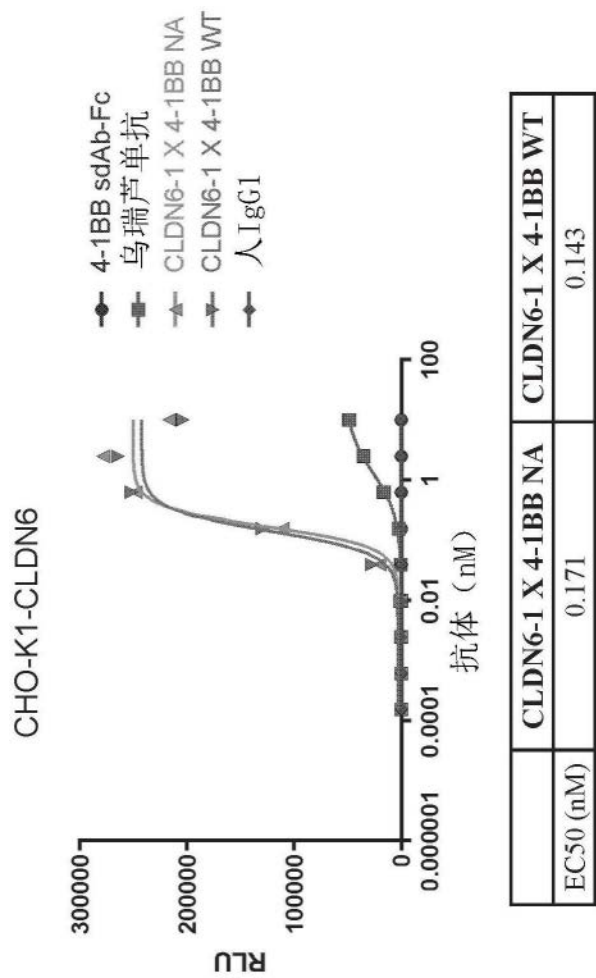


图5A

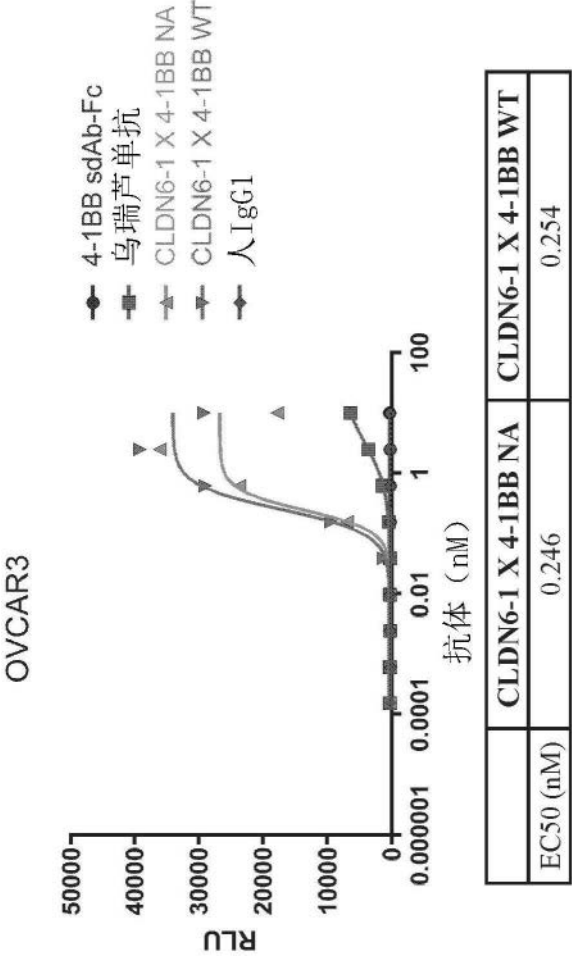


图5B

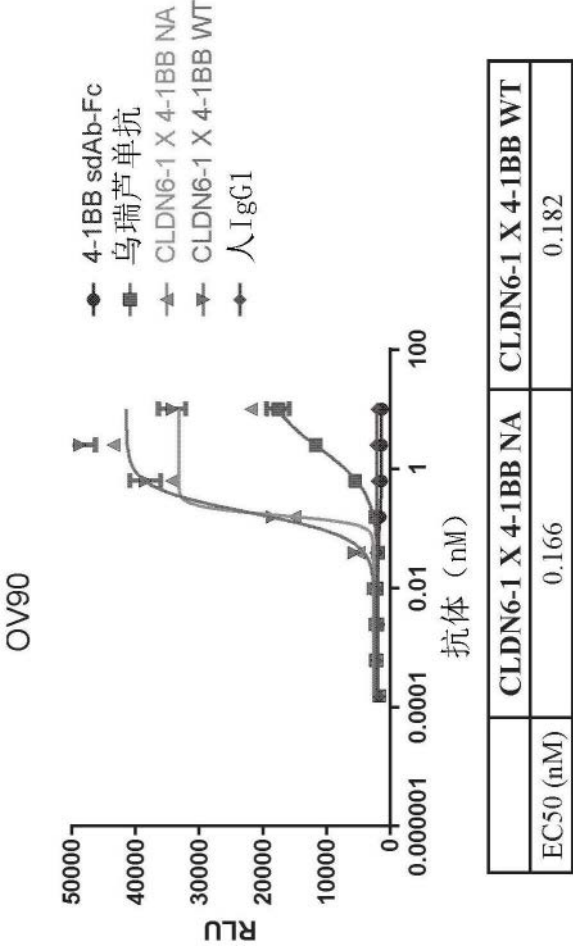


图5C

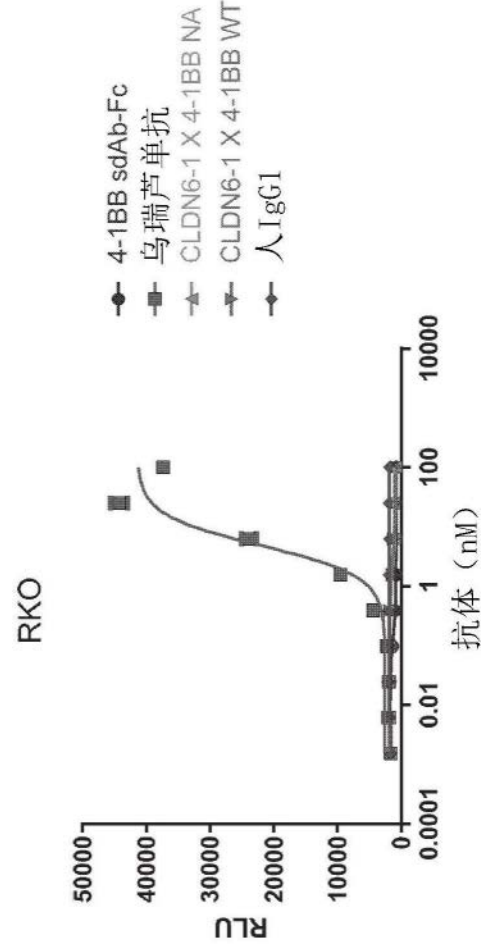


图5D

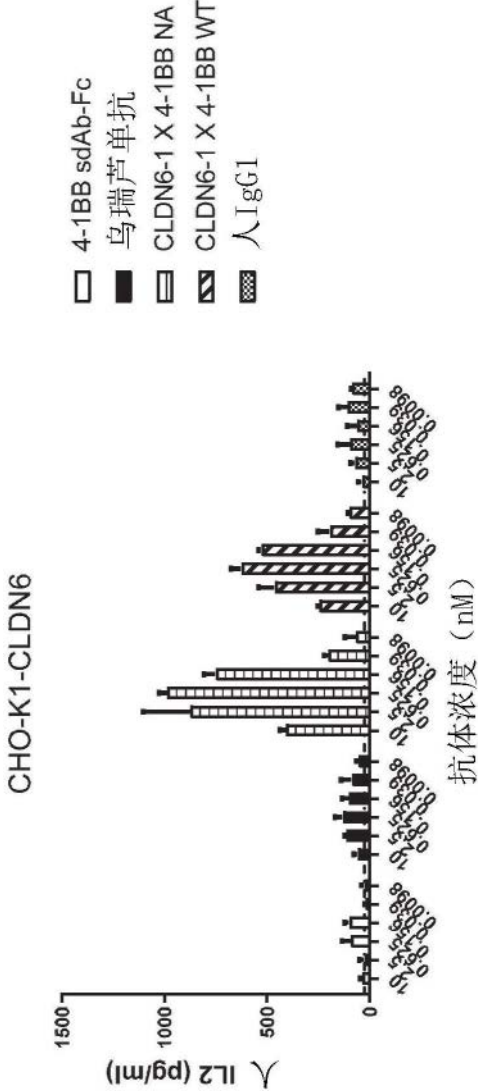


图6A

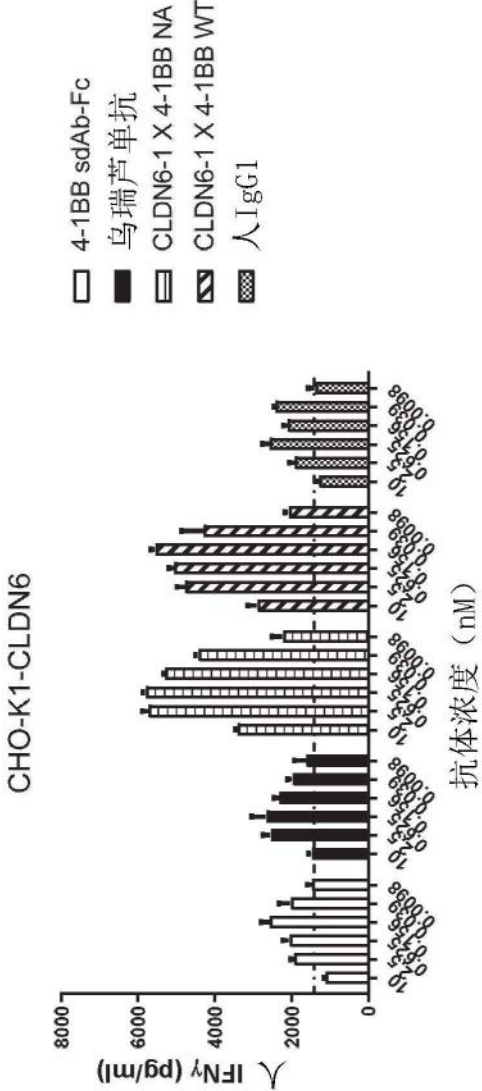


图6B

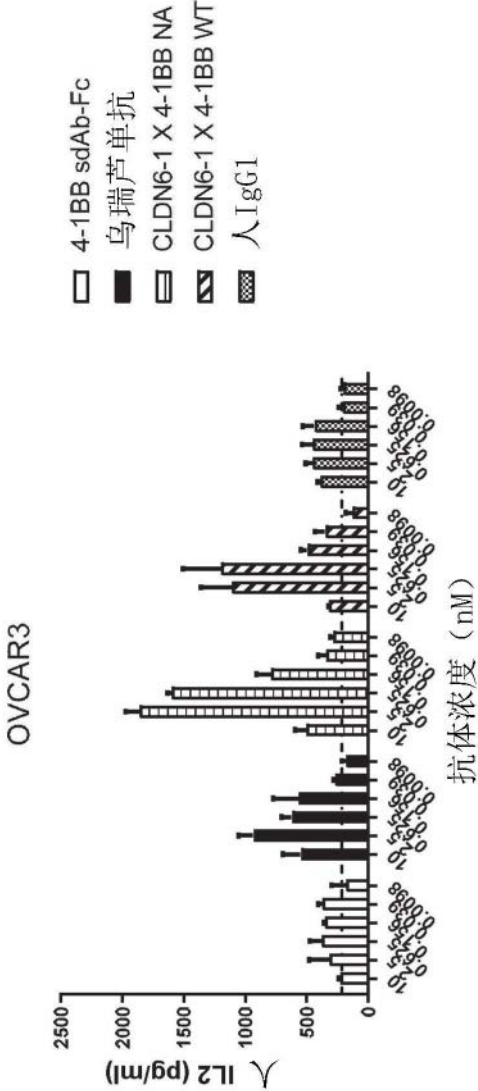


图6C

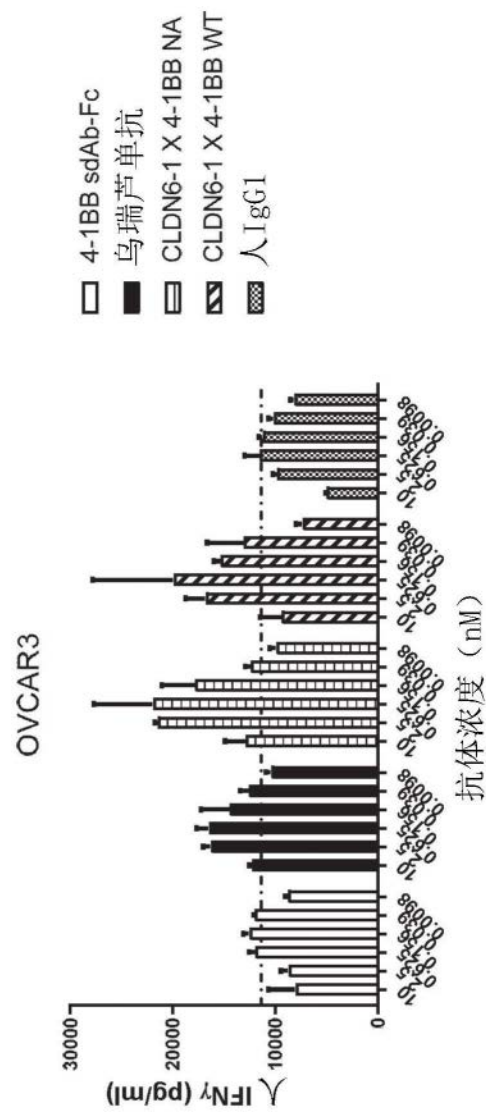


图6D

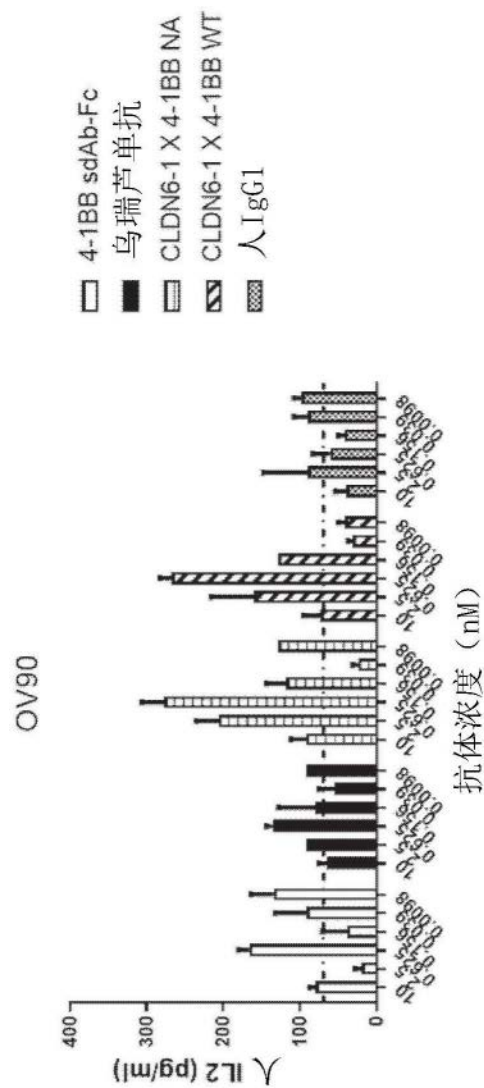


图6E

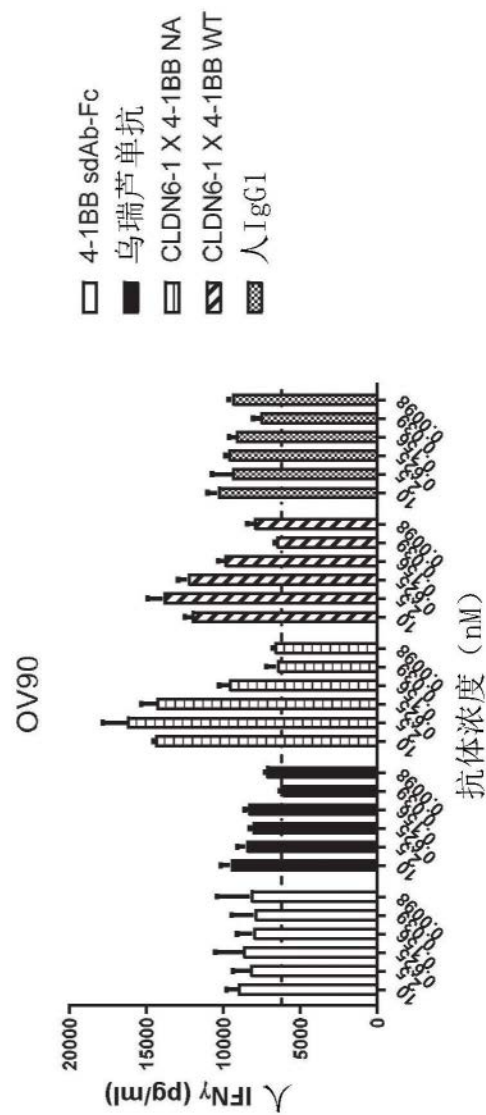


图6F

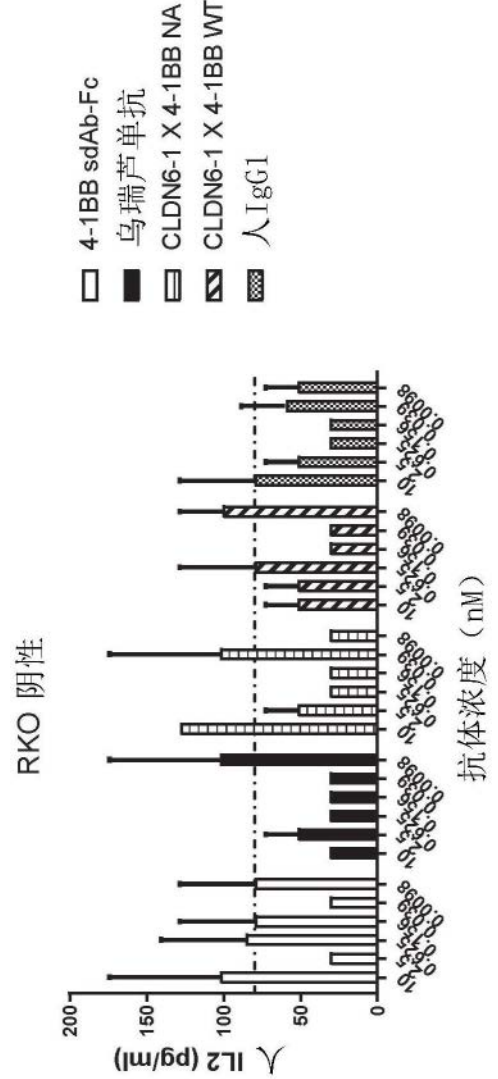


图6G

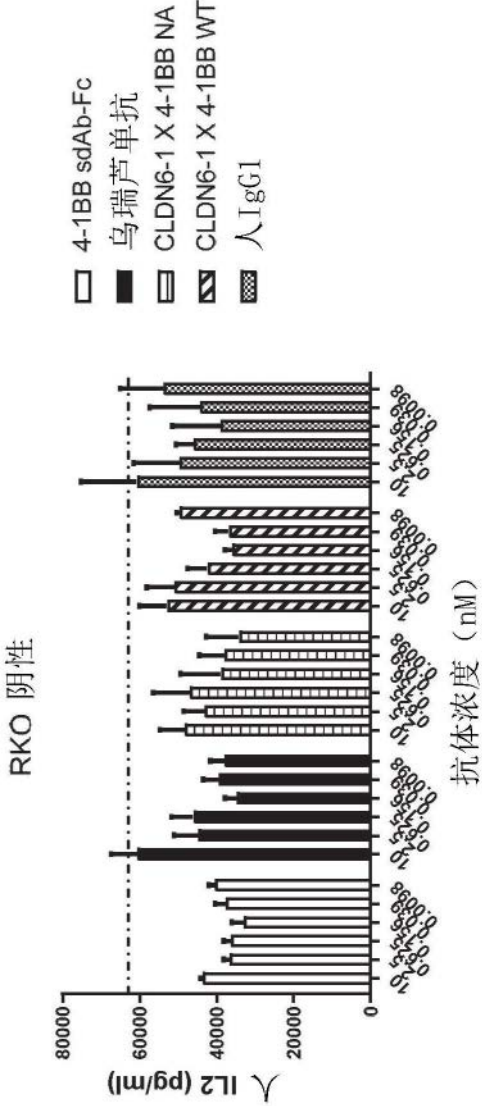


图6H

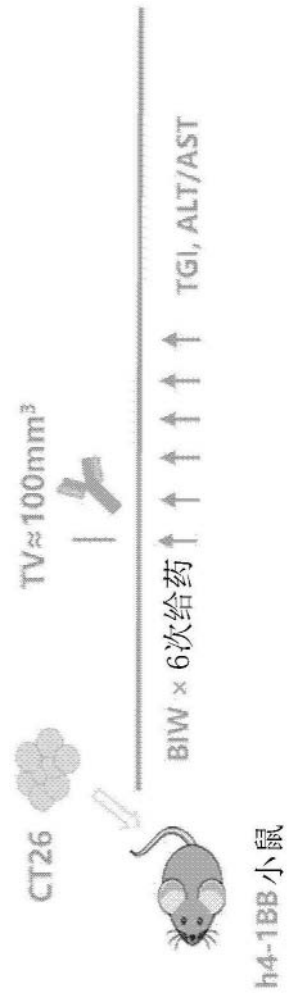


图7A

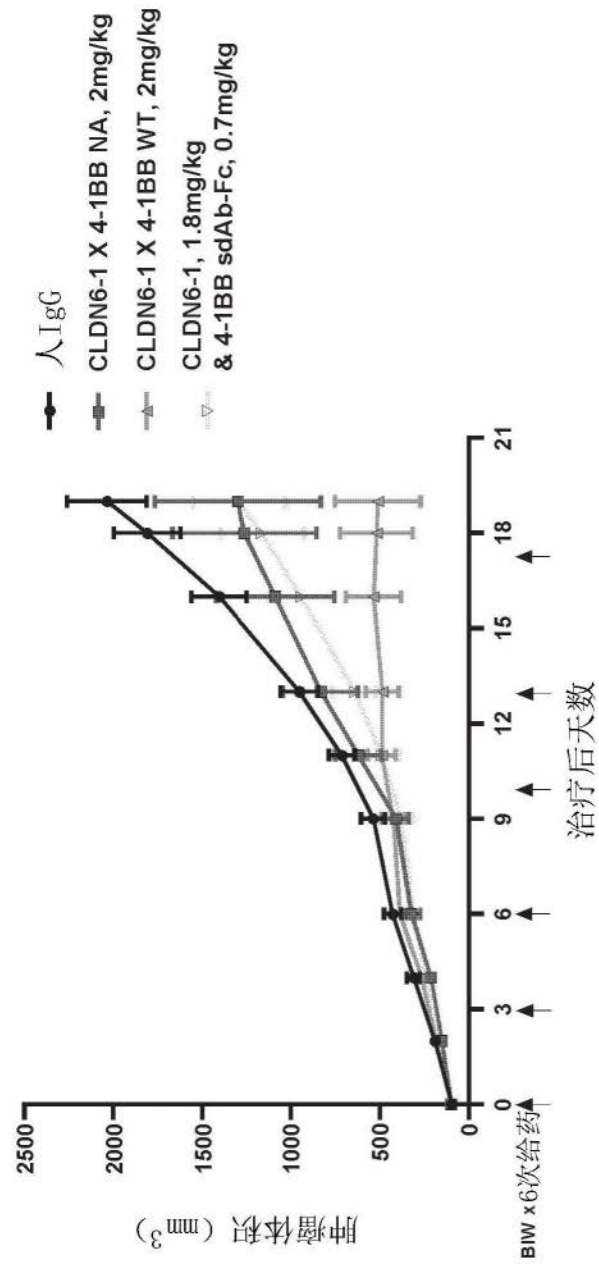


图7B

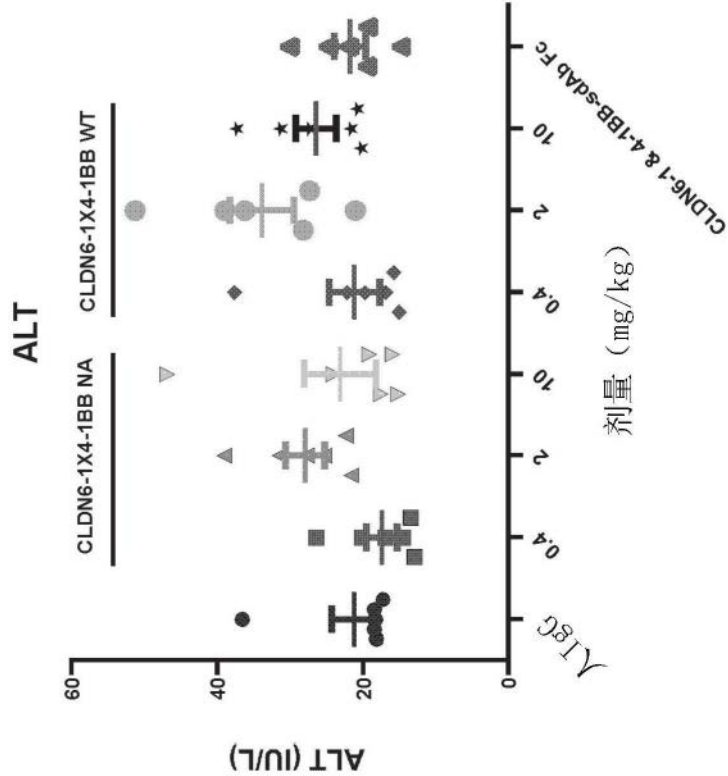


图8A

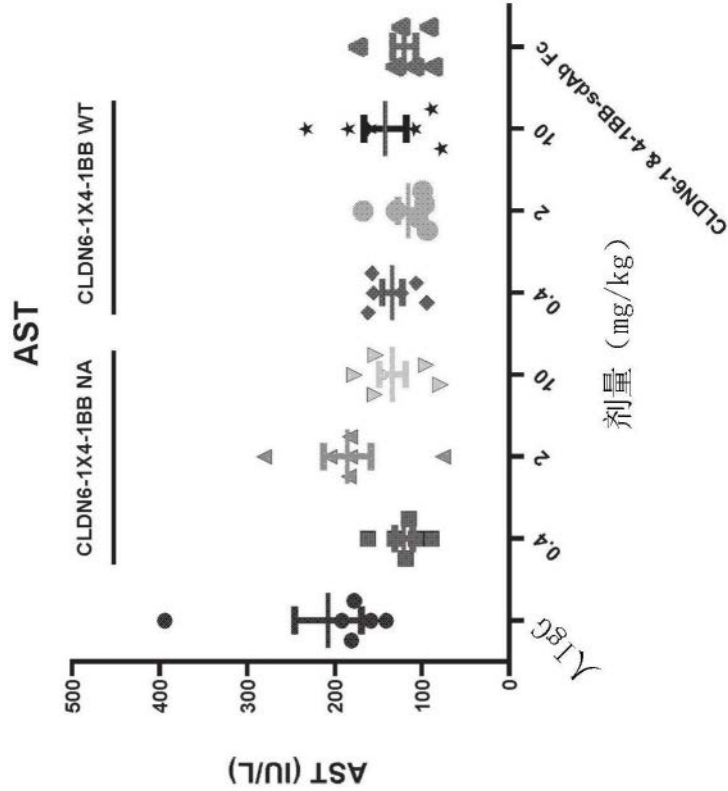


图8B

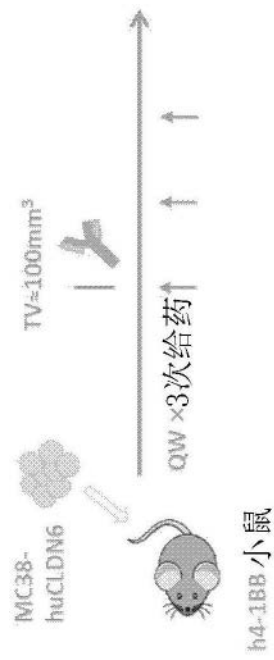


图9A

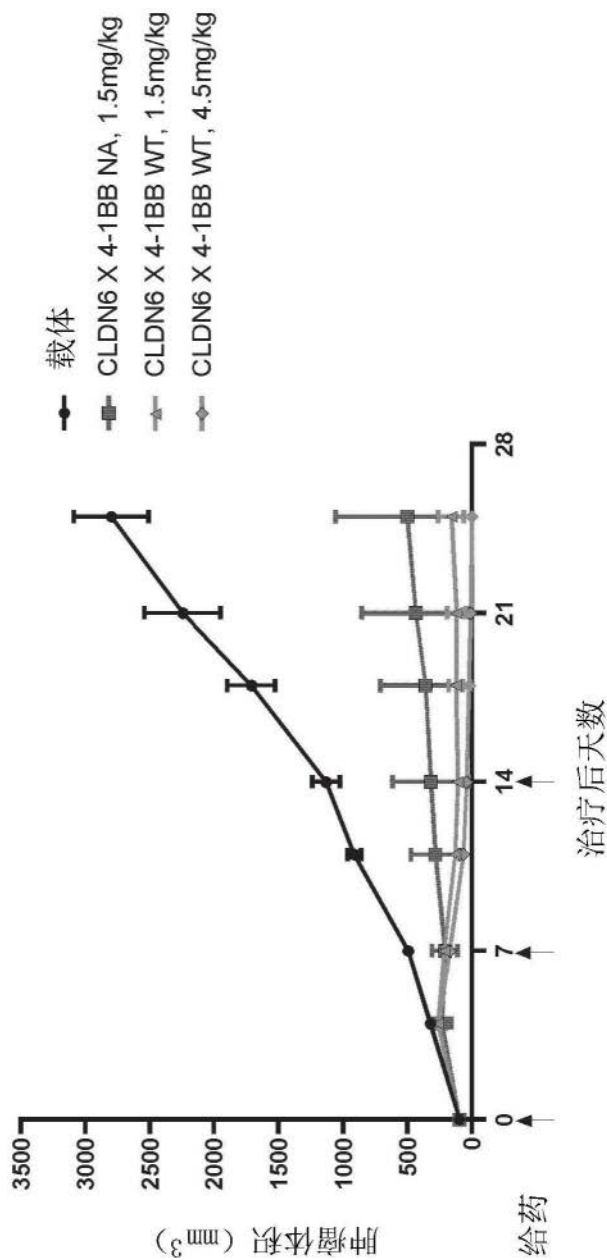


图9B