(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 114450306 B
(45)授权公告日 2024.04.05

(21)申请号 202080053851.6
(22)申请日 2020.07.27
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114450306 A
(43)申请公布日 2022.05.06
(30)优先权数据
62/878,977 2019.07.26 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.01.25
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2020/009870 2020.07.27
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/020845 EN 2021.02.04
(73)专利权人 ABL生物公司
地址 韩国京畿道
专利权人 柳韩洋行
(72)发明人 龙睿胷 郑义静 郑惠真 朴庚秀 孙源晙 李良顺 金衍周 成恩实 金荣光 朴泳炖 朴敏智 严在铉 崔孝朱 宋武泳 李娜来 朴永奉 李垠政 李琅贞
(74)专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243
专利代理师 钟海胜 宋琴芝
(51)Int.Cl.
C07K 16/46(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 37/04(2006.01)
(56)对比文件
WO 2020102233 A1,2020.05.22
WO 2020107715 A1,2020.06.04
WO 2019129644 A1,2019.07.04
US 5928893 A,1999.07.27
CN 113166265 A,2021.07.23
CN 113166250 A,2021.07.23
Ryutaro Asano等.Structural considerations for functional anti-EGFR × anti-CD3 bispecific diabodies in light of domain order and binding affinity.Oncotarget..2018,13884-13893.
孙建.肿瘤免疫治疗——遇上最好的时代.药学进展.2015,(12),921-935.
审查员 梁艳莉

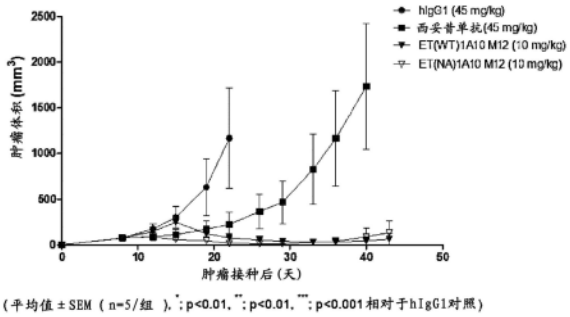
权利要求书3页 说明书51页
序列表（电子公布） 附图18页

(54)发明名称

抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体及其用途

(57)摘要

提供了一种抗4-1BB/抗EGFR双特异性抗体、药物组合物及使用其治疗和/或预防癌症的方法。



(平均值±SEM（n=5/组）,*:p<0.01,**:p<0.01,***:p<0.001相对于hIgG1对照)

CN 114450306 B

1.一种抗4-1BB/抗EGFR双特异性抗体,其包含:

(a)4-1BB靶向部分,其为抗4-1BB scFv,和

(b)EGFR靶向部分,其为抗EGFR抗体的全长形式,其中,所述抗4-1BB scFv连接到所述抗EGFR抗体的全长形式的C端,并且

其中,所述抗4-1BB scFv包含:

(1)H-CDR1,其由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成;

H-CDR2,其由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成;

H-CDR3,其由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成;

L-CDR1,其由SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成;

L-CDR2,其由SEQ ID NO:14的氨基酸序列组成;和

L-CDR3,其由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成;

(2)H-CDR1,其由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成;

H-CDR2,其由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成;

H-CDR3,其由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成;

L-CDR1,其由SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成;

L-CDR2,其由SEQ ID NO:14的氨基酸序列组成;和

L-CDR3,其由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成;

(3)H-CDR1,其由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成;

H-CDR2,其由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成;

H-CDR3,其由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成;

L-CDR1,其由SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成;

L-CDR2,其由SEQ ID NO:14的氨基酸序列组成;和

L-CDR3,其由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成;或

(4)H-CDR1,其由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成;

H-CDR2,其由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成;

H-CDR3,其由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成;

L-CDR1,其由SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成;

L-CDR2,其由SEQ ID NO:14的氨基酸序列组成;和

L-CDR3,其由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成,

所述抗EGFR抗体包含:

H-CDR1,其由SEQ ID NO:65的氨基酸序列组成;

H-CDR2,其由SEQ ID NO:66的氨基酸序列组成;

H-CDR3,其由SEQ ID NO:67的氨基酸序列组成;

L-CDR1,其由SEQ ID NO:68的氨基酸序列组成;

L-CDR2,其由SEQ ID NO:69的氨基酸序列组成;和

L-CDR3,其由SEQ ID NO:70的氨基酸序列组成。

2.根据权利要求1所述的抗4-1BB/抗EGFR双特异性抗体,其中,

(1)所述抗4-1BB scFv包含:

重链可变区,其包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含SEQ ID NO:30

的氨基酸序列;或

重链可变区,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列;

(2)所述抗4-1BB scFv包含:

重链可变区,其包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含SEQ ID NO:30或31的氨基酸序列;或

重链可变区,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含SEQ ID NO:33或34的氨基酸序列;

(3)所述抗4-1BB scFv包含:

重链可变区,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含SEQ ID NO:30或31的氨基酸序列;或

(4)所述抗4-1BB scFv包含:

重链可变区,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列;

重链可变区,其包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列;

重链可变区,其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列;或

重链可变区,其包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列。

3.根据权利要求1所述的抗4-1BB/抗EGFR双特异性抗体,其中,所述抗4-1BB scFv还包含重链可变区和轻链可变区之间的肽接头。

4.根据权利要求1所述的抗4-1BB/抗EGFR双特异性抗体,其中,所述抗EGFR抗体为西妥昔单抗。

5.根据权利要求1所述的抗4-1BB/抗EGFR双特异性抗体,其中,所述抗EGFR抗体包含:

重链可变区,其包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列;和

轻链可变区,其包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列。

6.根据权利要求1所述的抗4-1BB/抗EGFR双特异性抗体,其中,所述抗EGFR抗体包含:

重链,其包含SEQ ID NO:73或74的氨基酸序列;和

轻链,其包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列。

7.根据权利要求1所述的抗4-1BB/抗EGFR双特异性抗体,其中,所述抗4-1BB/抗EGFR双特异性抗体包含:

含有SEQ ID NO:76、77、78、79、80、81、82、83或84的氨基酸序列的多肽;和

含有SEQ ID NO:75的氨基酸序列的多肽。

8.根据权利要求1所述的抗4-1BB/抗EGFR双特异性抗体,其中,所述抗4-1BB/抗EGFR双特异性抗体包含:

含有SEQ ID NO:79的氨基酸序列的多肽;和

含有SEQ ID NO:75的氨基酸序列的多肽。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的抗4-1BB/抗EGFR双特异性抗体在制备用于治疗

癌症的药物中的用途,其中,所述癌症的特征在于EGFR过表达,并且其中,所述癌症为选自由皮肤癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、胃癌、胰腺癌、肺癌和头颈部癌组成的组中的一种或多种。

10.根据权利要求9所述的用途,其中,所述药物增强免疫应答。

抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体及其用途

技术领域

[0001] 提供了一种抗4-1BB/抗EGFR双特异性抗体、药物组合物及使用其治疗和/或预防癌症的方法。

背景技术

[0002] 4-1BB蛋白是TNF受体超家族(TNFRSF)的成员并且是一种共刺激分子,其在免疫细胞(固有免疫细胞和适应性免疫细胞两者)活化后表达。4-1BB在调节各种免疫细胞的活性中起重要作用。4-1BB激动剂增强免疫细胞的增殖和存活、细胞因子的分泌以及CD8 T细胞的细胞溶解活性。许多其他研究显示,4-1BB的活化增强了免疫应答,从而消除了小鼠体内的肿瘤。因此,提示4-1BB是癌症免疫学中有希望的靶分子。尽管抗4-1BB抗体具有抗肿瘤功效,但它们在临床应用中可引起严重的肝毒性。

[0003] EGFR蛋白是一种跨膜蛋白,其是细胞外蛋白配体的表皮生长因子家族(EGF家族)成员的受体,参与到与肿瘤相关的各种机制。EGFR是一种典型的受体酪氨酸激酶(RTK),存在于细胞表面,从而诱导癌细胞的增殖和渗透、血管生成等。

[0004] 同时,针对两种或更多种抗原的多特异性抗体已经开发出各种种类和形式,并预期作为与单克隆抗体相比具有优异治疗效果的新药抗体。

[0005] 因此,需要开发一种能够识别一种存在于癌细胞上而另一种存在于诸如免疫细胞的其他细胞上的两种不同抗原的多特异性抗体,以用于更有效的癌症治疗。

发明内容

[0006] 技术问题

[0007] 一种实施方式提供了抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体,该双特异性抗体包含:

[0008] (1)作为EGFR靶向部分的抗EGFR抗体或其抗原结合片段,其能够特异性识别和/或结合EGFR蛋白;和

[0009] (2)作为4-1BB靶向部分的抗4-1BB抗体或其抗原结合片段,其能够特异性识别和/或结合4-1BB蛋白。

[0010] 另一种实施方式提供了包含该双特异性抗体的药物组合物。该药物组合物可以进一步包含药学上可接受的载体。该药物组合物可用于治疗和/或预防癌症和/或用于增强免疫应答。

[0011] 另一种实施方式提供了用于治疗和/或预防癌症和/或用于增强免疫应答的药物组合物,该组合物包含双特异性抗体。

[0012] 另一种实施方式提供了一种在有需要的受试者中治疗和/或预防癌症的方法,该方法包括将药学有效量的双特异性抗体或药物组合物施用至受试者。该方法可以进一步包括在施用步骤之前鉴定需要治疗和/或预防癌症的受试者的步骤。

[0013] 另一种实施方式提供了一种在有需要的受试者中增强免疫应答的方法,该方法包括将药学有效量的双特异性抗体或药物组合物施用至受试者。该方法可以进一步包括在施

用步骤之前鉴定需要增强免疫应答的受试者的步骤。

[0014] 另一种实施方式提供了双特异性抗体或药物组合物用于治疗和/或预防癌症的用途。另一种实施方式提供了双特异性抗体在制备用于治疗和/或预防癌症的药物中的用途。

[0015] 另一种实施方式提供了双特异性抗体或药物组合物用于增强免疫应答的用途。另一种实施方式提供了双特异性抗体在制备用于增强免疫应答的药物中的用途。

[0016] 一种实施方式提供了编码双特异性抗体的多核苷酸。

[0017] 一种实施方式提供了包含多核苷酸的重组载体。重组载体可用作编码双特异性抗体的多核苷酸的表达载体。

[0018] 另一种实施方式提供了包含编码双特异性抗体的多核苷酸的细胞。细胞可以是用包含多核苷酸的重组载体转染的重组细胞。

[0019] 另一种实施方式提供了制备双特异性抗体的方法,包括在细胞中表达多核苷酸。表达多核苷酸的步骤可以通过在允许多核苷酸表达的条件下培养包含多核苷酸(例如该多核苷酸在重组载体中)的细胞来进行。

[0020] 解决技术问题的技术方案

[0021] 本公开涉及双特异性抗体及其用途,所述双特异性抗体中的每一种都包括对肿瘤相关抗原(TAA;EGFR)特异的抗体和对4-1BB特异的抗体。这些双特异性抗体仅在存在EGFR表达细胞的情况下活化4-1BB信号传导并增强强免疫细胞。由于特异性EGFR介导的免疫应答,预计与4-1BB单克隆抗体相比,使用双特异性抗体的肝毒性要小得多。

[0022] 在本公开中,提供了抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体及其用途,其中该抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体可以包含:

[0023] (1)作为EGFR靶向部分的抗EGFR抗体或其抗原结合片段,其能够特异性识别和/或结合EGFR蛋白,和

[0024] (2)作为4-1BB靶向部分的抗4-1BB抗体或其抗原结合片段,其能够特异性识别和/或结合4-1BB蛋白。

[0025] 在下文中,将更详细地描述本发明。

[0026] 定义

[0027] 如本文所用,“由序列组成”、“基本上由序列组成”或“包含序列”可以指包含该序列的任何情况,但它可能不旨在排除包含除了该序列之外的其他序列的情况。

[0028] 如本文所用,术语“包含由SEQ ID NO识别的氨基酸序列或由其组成的蛋白质或多肽”和“包含由SEQ ID NO识别的核酸序列或由其组成的基因或多核苷酸”可以指基本上由该氨基酸序列或核酸序列组成,或与该氨基酸序列或核酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性并保持其固有的活性和/或功能的蛋白质(或多肽)或基因(或多核苷酸)。

[0029] 如本文所用,术语“抗体”可以涵盖可以在生化上区别的各类多肽。本领域技术人员将理解,重链被分类为γ、μ、α、δ或ε及一些子类(例如γ1至γ4),轻链则被分类为κ或λ。该链的性质决定了抗体的“类别”分别为IgG、IgM、IgA、IgG或IgE。免疫球蛋白亚类(同种型)例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgG5等已被很好地表征,并且已知赋予功能专门化。

[0030] 完整的抗体包括两条全长轻链和两条全长重链,其中每条轻链通过二硫键连接到重链。该抗体具有重链恒定区和轻链恒定区。重链恒定区是γ、μ、α、δ或ε型,可进一步分类

为γ1、γ2、γ3、γ4、α1或α2。轻链恒定区是κ或λ类型。

[0031] 术语“重链”是指全长重链或其片段,包括足以提供对抗原的特异性的氨基酸序列的可变区VH、以及三个恒定区CH1、CH2和CH3、以及铰链。术语“轻链”是指全长轻链或其片段,包括足以提供对抗原的特异性的氨基酸序列的可变区VL、以及恒定区CL。

[0032] 术语“互补决定区(CDR)”是指在免疫球蛋白的重链或轻链的高可变区发现的氨基酸序列。重链和轻链可以分别包括三个CDR(CDRH1、CDRH2和CDRH3;以及CDRL1、CDRL2和CDRL3)。CDR可以提供在抗体与抗原或表位结合中起重要作用的残基。术语“特异性结合”或“特异性识别”为本领域普通技术人员所熟知,并且表示抗体和抗原彼此特异性相互作用以产生免疫活性。

[0033] 在本公开中,抗体可以包括但不限于多克隆抗体或单克隆抗体;和/或人抗体、人源化抗体、动物(例如,小鼠、兔等)源性抗体、或嵌合抗体(例如小鼠-人嵌合抗体)。

[0034] 通过用所需抗原对动物进行免疫而产生的动物源性抗体在施用于人以用于治疗目的时通常会引发免疫排斥反应,已经开发了嵌合抗体来抑制这种免疫排斥反应。嵌合抗体是通过使用基因工程方法将引起抗同种型反应的动物源性抗体的恒定区替换为人抗体的恒定区而形成的。与动物源性抗体相比,嵌合抗体的抗同种型反应显著改善,但动物源性氨基酸仍然存在于其可变区,因此它仍然含有由抗独特型反应引起的潜在副作用。因此人源化抗体已被开发用于改善此类副作用。这是通过将嵌合抗体可变区中的在抗原结合中起重要作用的CDR(互补决定区)移植到人抗体框架中而制造的。

[0035] 如本文所用,术语“抗原结合片段”是指衍生自完整免疫球蛋白结构的片段,该片段包括能够结合抗原的部分,例如CDR。例如,抗原结合片段可以是scFv、(scFv)2、Fab、Fab’或F(ab’)2,但不限于此。在本公开中,抗原结合片段可以是衍生自抗体的片段,包括至少一个互补决定区,例如选自scFv、(scFv)2、scFv-Fc、Fab、Fab’和F(ab’)2。

[0036] 在抗原结合片段中,Fab是具有轻链可变区和重链可变区、轻链恒定区和重链第一恒定区(C_{H1})的结构,其具有一个抗原结合位点.

[0037] Fab’与Fab的不同之处在于它在重链C_{H1}域的C端具有包含一个或多个半胱氨酸残基的铰链区。F(ab’)2抗体是通过Fab’铰链区的半胱氨酸残基的二硫键形成的。

[0038] Fv是仅具有重链可变区和轻链可变区的最小抗体片段,并且用于产生Fv片段的重组技术在相关领域中是众所周知的。双链Fv可以具有重链可变区与轻链可变区通过非共价键连接的结构,单链Fv(scFv)通常具有二聚体结构,如双链Fv,其中重链可变区和轻链可变区通过肽接头共价连接或它们在其C端彼此直接连接。

[0039] 抗原结合片段可以使用蛋白酶获得(例如,整个抗体用木瓜蛋白酶消化得到Fab片段,用胃蛋白酶消化得到F(ab’)2片段),可以通过基因重组技术制备。

[0040] 本公开的免疫球蛋白(例如人免疫球蛋白)或抗体分子可以是免疫球蛋白分子的任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、IgY等)或亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgG5、IgA1、IgA2等)。

[0041] 在抗体或抗体片段中,除了CDR或可变区之外的部分(例如恒定区)可以衍生自人抗体,特别地,它们可以衍生自IgG、IgA、IgD、IgE、IgM或IgY,例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0042] 抗体或抗原结合片段可以是化学或重组合成的(非天然存在的)。

[0043] 4-1BB靶向部分

[0044] 抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体可以包含抗4-1BB抗体或其抗原结合片段作为4-1BB靶向部分。

[0045] 术语“4-1BB”,也称为CD137或TNFRSF9(TNF受体超家族成员9),是TNF受体超家族(TNFRSF)的成员,并且是一种共刺激分子,其在免疫细胞(固有免疫细胞和适应性免疫细胞两者)活化后表达。4-1BB在调节各种免疫细胞的活性中起重要作用。如本文所用,4-1BB可以源自哺乳动物,例如智人(Homo sapiens)(人)(NCBI登录号NP_001552.2)。例如,人4-1BB蛋白(NP_001552.2)可以由氨基酸序列(SEQ ID NO:89)表示,如下所示:

[0046] 1mgnscyniva tlllvlnfer trslqdpcsn cpagtfcdnn rnqicspcpp nsfssaggqr

[0047] 61tcdicrqckg vfrtrkecss tsnaecdctp gfhclgagcs mceqdckqgq eltkkgckdc

[0048] 121cfgtfndqkr gicrpwtncs ldgksvlvng tkerdvvcgp spadlspgas svtppapare

[0049] 181pghspqiisf flaltstall fllffltlrf svvkrgrkkl lyifkqpfmr pvqttqeedg

[0050] 241cscrfpeeee ggcel

[0051] 在一种实施方式中,抗4-1BB抗体或其抗原结合片段可包含:

[0052] CDR(互补决定区)-H1(H-CDR1),其包含SEQ ID NO:1、2或3的氨基酸序列;

[0053] H-CDR2,其包含SEQ ID NO:4、5或6的氨基酸序列;

[0054] H-CDR3,其包含SEQ ID NO:7、8、9、10或11的氨基酸序列;

[0055] L-CDR1,其包含SEQ ID NO:12或13的氨基酸序列;

[0056] L-CDR2,其包含SEQ ID NO:14或15的氨基酸序列;和

[0057] L-CDR3,其包含SEQ ID NO:16或17的氨基酸序列。

[0058] 抗4-1BB抗体或抗原结合片段的CDR的氨基酸序列如表1所示:

[0059] [表1]

[0060]

SEQ ID NO	H-CDR1	SEQ ID NO	H-CDR2	SEQ ID NO	H-CDR3
1	SYDMS	4	WISYSGGSIYY ADSVKG	7	DGQRNSMREFDY
				8	DAQRNSMREFDY
				9	DAQRQSMREFDY
2	GYDMS	5	VIYPDDGNTY YADSVKG	10	HGGQKPTTKSSSAYG MDG
3	SYWMH	6	EINPGNGHTN YNEKFKS	11	SFTTARAFAY
SEQ ID NO	**L-CDR1**	**SEQ ID NO**	**L-CDR2**	**SEQ ID NO**	**L-CDR3**
12	SGSSSNIGNNY VT	14	ADSHRPS	16	ATWDYSLSGYV
13	RASQTISDYLH	15	YASQSIS	17	QDGHSFPPT

[0061]

[0062] 例如,抗4-1BB抗体或其抗原结合片段可包含:

[0063] 含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的H-CDR1,含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的H-CDR2,含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的H-CDR3,含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的L-CDR1、含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的L-CDR2和含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的L-

CDR3;

[0064] 含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的H-CDR1,含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的H-CDR2,含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的H-CDR3,含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的L-CDR1、含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的L-CDR2和含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的L-CDR3;

[0065] 含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的H-CDR1,含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的H-CDR2,含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的H-CDR3,含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的L-CDR1、含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的L-CDR2和含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的L-CDR3;

[0066] 含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的H-CDR1,含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的H-CDR2,含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的H-CDR3,含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的L-CDR1、含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的L-CDR2和含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的L-CDR3;

[0067] 含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的H-CDR1,含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的H-CDR2,含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的H-CDR3,含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的L-CDR1、含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的L-CDR2和含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的L-CDR3;

[0068] 含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的H-CDR1,含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的H-CDR2,含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的H-CDR3,含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的L-CDR1、含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的L-CDR2和含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的L-CDR3;

[0069] 含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的H-CDR1,含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的H-CDR2,含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的H-CDR3,含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的L-CDR1、含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的L-CDR2和含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的L-CDR3;

[0070] 含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的H-CDR1,含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的H-CDR2,含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的H-CDR3,含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的L-CDR1、含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的L-CDR2和含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的L-CDR3;

[0071] 含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的H-CDR1,含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的H-CDR2,含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的H-CDR3,含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的L-CDR1、含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的L-CDR2和含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的L-CDR3;或

[0072] 含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的H-CDR1,含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的H-CDR2,含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的H-CDR3,含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的L-CDR1、含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的L-CDR2和含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的L-CDR3。

[0073] 另一种实施方式中,抗4-1BB抗体或其抗原结合片段可包含:重链可变区,其包含:含有SEQ ID NO:1、2或3的氨基酸序列的H-CDR1、含有SEQ ID NO:4、5或6的氨基酸序列的H-

CDR2和含有SEQ ID NO:7、8、9、10或11的氨基酸序列的H-CDR3;和轻链可变区,其包含:含有SEQ ID NO:12或13的氨基酸序列的L-CDR1、含有SEQ ID NO:14或15的氨基酸序列的L-CDR2和含有SEQ ID NO:16或17的氨基酸序列的L-CDR3。

[0074] 在另一种实施方式中,抗4-1BB抗体或其抗原结合片段可包含:重链可变区,其包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:30、31、32、33、34或88的氨基酸序列。

[0075] 抗4-1BB抗体或抗原结合片段的可变区的氨基酸序列如表2所示:

[0076] [表2]

[0077]

SEQ ID NO	靶向 4-1BB 的重链可变区
18	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWV SWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDGQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS
19	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWV SWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDAQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS
20	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWV SWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDAQRQSMREFDYWGQGTLVTVSS
21	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKGLEWV SVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDAAVYYC AKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSS
22	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKGLEWV SVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSS
23	QVQLQQSGAEVIKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWI GEINPGNGHTNYNEKFKSRATLTGDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA RSFTTARAFAYWGQGTLVTVSS
24	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWV SWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDGQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS
25	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWV SWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDAQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS
26	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWV SWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDAQRQSMREFDYWGQGTLVTVSS
27	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWV SVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDAAVYYC AKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSS
28	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWV SVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSS
29	QVQLQQSGAEVIKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWVRQAPGQCLEWI GEINPGNGHTNYNEKFKSRATLTGDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA RSFTTARAFAYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO	靶向 4-1BB 的轻链可变区

[0078]

30	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIY ADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGY VFGGGTKLTVL
31	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIY ADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGY VFGGGTKLTVL
32	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASQTISDYLHWYQQKPDQAPKLLIKY ASQSISGIPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQDGHSFPPTFGQGT KLEIKR
33	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIY ADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGY VFGCGTKLTVL
34	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIY ADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGY VFGCGTKLTVL
88	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASQTISDYLHWYQQKPDQAPKLLIKY ASQSISGIPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQDGHSFPPTFGCGT KLEIKR

[0079] 例如,抗4-1BB抗体或其抗原结合片段可包含:

[0080] 含有SEQ ID NO:18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29的氨基酸序列的重链可变区以及含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的轻链可变区;

[0081] 含有SEQ ID NO:18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29的氨基酸序列的重链可变区以及含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的轻链可变区;

[0082] 含有SEQ ID NO:18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29的氨基酸序列的重链可变区以及含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的轻链可变区;

[0083] 含有SEQ ID NO:18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29的氨基酸序列的重链可变区以及含有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的轻链可变区;

[0084] 含有SEQ ID NO:18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29的氨基酸序列的重链可变区以及含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的轻链可变区;或

[0085] 含有SEQ ID NO:18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29的氨基酸序列的重链可变区以及含有SEQ ID NO:88的氨基酸序列的轻链可变区。

[0086] 抗4-1BB抗体或抗原结合片段的可变区的框架的氨基酸序列如表3所示:

[0087] [表3]

[0088]

SEQ ID NO	H-FR1	SEQ ID NO	H-FR2	SEQ ID NO	H-FR3	SEQ ID NO	H-FR4
35	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	37	WVRQAPGKGLEWVS	41	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	45	WGQGTLVTVSS
35	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	37	WVRQAPGKGLEWVS	42	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAK	45	WGQGTLVTVSS
35	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	37	WVRQAPGKGLEWVS	43	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	45	WGQGTLVTVSS
36	QVQLQQSGAEVIKPGASVKLSCKASGYTFS	38	WVRQAPGQGLEWIG	44	RATLTGDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR	45	WGQGTLVTVSS
35	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	39	WVRQAPGKCLEWVS	41	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	45	WGQGTLVTVSS
35	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	39	WVRQAPGKCLEWVS	42	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAK	45	WGQGTLVTVSS
35	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	39	WVRQAPGKCLEWVS	43	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	45	WGQGTLVTVSS
36	QVQLQQSGAEVIKPGASVK	40	WVRQAPGQCLEWI	44	RATLTGDTSTSTVYMELS	45	WGQGTLVTVSS

[0089]

	LSCKASGYTFS		G		SLRSEDTAVYYCAR		
SEQ ID NO	**L-FR1**	**SEQ ID NO**	**L-FR2**	**SEQ ID NO**	**L-FR3**	**SEQ ID NO**	**LFR4**
46	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISC	49	WYQQLPGTAPKLLIY	51	GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	53	FGGGTKLTVL
47	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC	49	WYQQLPGTAPKLLIY	51	GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	53	FGGGTKLTVL
48	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITC	50	WYQQKPDQAPKLLIK	52	GIPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYC	54	FGQGTKLEIKR
46	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISC	49	WYQQLPGTAPKLLIY	51	GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	55	FGCGTKLTVL
47	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC	49	WYQQLPGTAPKLLIY	51	GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	55	FGCGTKLTVL

[0090] 在另一种实施方式中,抗4-1BB抗体或其抗原结合片段可包含:重链,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:56、57、58、59、60或61的氨基酸序列;和轻链,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:62、63或64的氨基酸序列。例如,抗4-1BB抗体或其抗原结合片段可包含:

[0091] 重链,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:56、57、58、59、60或61的氨基酸序列;和轻链,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:62的氨基酸序列;

[0092] 重链,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:56、57、58、59、60或61的氨基酸序列;和轻链,包含以下或基本上由以下组成:SEQ IDNO:63的氨基酸序列;或

[0093] 重链,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:56、57、58、59、60或61的氨基酸序列;和轻链,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:64的氨基酸序列。

[0094] 在另一种实施方式中,抗4-1BB抗体或其抗原结合片段可以是scFv(单链可变片段),所述scFv包括:

[0095] 重链可变区,包含:含有SEQ ID NO:1、2或3的氨基酸序列的H-CDR1、含有SEQ ID NO:4、5或6的氨基酸序列的H-CDR2、和含有SEQ ID NO:7、8、9、10或11的氨基酸序列的H-CDR3;和

[0096] 轻链可变区,包含:含有SEQ ID NO:12或13的氨基酸序列的L-CDR1、含有SEQ ID NO:14或15的氨基酸序列的L-CDR2、和含有SEQ ID NO:16或17的氨基酸序列的L-CDR3,

[0097] 其中重链可变区和轻链可变区可以以任何顺序直接(即,无接头地)或通过肽接头

彼此连接。

[0098] 例如,抗4-1BB scFv可包括:

[0099] 重链可变区,其包含SEQ ID NO:18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29的氨基酸序列;和

[0100] 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:30、31、32、33、34或88的氨基酸序列或基本上由SEQ ID NO:30、31、32、33、34或88的氨基酸序列组成,

[0101] 其中重链可变区和轻链可变区可以以任何顺序直接或通过肽接头彼此连接。

[0102] 例如,抗4-1BB scFv可包括:

[0103] 重链,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:24、25、26、27、28或29的氨基酸序列;和轻链,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:33的氨基酸序列;

[0104] 重链,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:24、25、26、27、28或29的氨基酸序列;和轻链,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:34的氨基酸序列;或

[0105] 重链可变区,包含SEQ ID NO:24、25、26、27、28或29的氨基酸序列;以及轻链可变区,包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列,

[0106] 其中重链可变区和轻链可变区可以以任何顺序直接或通过肽接头彼此连接。

[0107] 在本公开中,抗4-1BB scFv以任意顺序包含重链可变区和轻链可变区。例如,抗4-1BB scFv可以在从N端到C端的方向上包含轻链可变区和重链可变区。可替代地,抗4-1BB scFv可以在从N端到C端的方向上包含重链可变区和轻链可变区。

[0108] EGFR靶向部分

[0109] 抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体可以包含抗EGFR抗体或其抗原结合片段作为EGFR靶向部分。

[0110] “EGFR(表皮生长因子受体;在人类中也称为ErbB-1或HER1)”是一种跨膜蛋白,它是胞外蛋白配体的表皮生长因子家族(EGF家族)成员的受体。表皮生长因子受体是ErbB受体家族的成员,其是以下四种密切相关的受体酪氨酸激酶的亚家族:EGFR(ErbB-1)、HER2/neu(ErbB-2)、Her3(ErbB-3)和Her4(ErbB-4)。在许多癌症类型中,影响EGFR表达或活性的突变可能导致癌症。例如,EGFR蛋白可以是以GenBank登录号NP_001333826.1、NP_001333827.1等保藏的多肽,其分别由以GenBank登录号NM_001346897.2、NM_001346898.2等保藏的核苷酸序列(mRNA)编码。

[0111] 在一种实施方式中,抗EGFR抗体可以是西妥昔单抗。将EGFR识别为抗原的抗EGFR抗体的抗原结合区可以是抗EGFR抗体西妥昔单抗的scFv、(scFv)2、Fab、Fab'或F(ab')2。

[0112] 抗EGFR抗体或其抗原结合片段可以是抗EGFR抗体或包含西妥昔单抗的6个CDR的其抗原结合片段。

[0113] 在一种实施方式中,抗EGFR抗体或抗EGFR抗体的抗原结合片段(例如,scFv、(scFv)2、Fab、Fab'或F(ab')2)可以是西妥昔单抗或其抗原结合片段或其变体。

[0114] 例如,抗EGFR抗体或其抗原结合片段可以包含:

[0115] H-CDR1,其包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列;

[0116] H-CDR2,其包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列;

[0117] H-CDR3,其包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列;

[0118] L-CDR1,其包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列;

[0119] L-CDR2,其包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列;和

[0120] L-CDR3,其包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列。

[0121] 抗EGFR抗体或抗原结合片段的CDR的氨基酸序列如表4所示:

[0122] [表4]

[0123]

SEQ ID NO	H-CDR1	SEQ ID NO	H-CDR2	SEQ ID NO	H-CDR3
65	NYGVH	66	VIWSGGNTDYNTPFTS	67	ALTYYDYEFAY
SEQ ID NO	L-CDR1L-CDR	SEQ ID NO	L-CDR2L-CDR	SEQ ID NO	L-CDR3L-CDR
68	RASQSIGTNIH	69	YASESIS	70	QQNNNWPTT

[0124] 另一种实施方式中,抗EGFR抗体或其抗原结合片段可包含:重链可变区,包含:含有SEQ ID NO:65的氨基酸序列的H-CDR1、含有SEQ ID NO:66的氨基酸序列的H-CDR2和含有SEQ ID NO:67的氨基酸序列的H-CDR3;和轻链可变区,包含:含有SEQ ID NO:68的氨基酸序列的L-CDR1、含有SEQ ID NO:69的氨基酸序列的L-CDR2和含有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的L-CDR3。在另一种实施方式中,抗EGFR抗体或其抗原结合片段可包含:重链可变区,包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列或基本上由SEQ ID NO:71的氨基酸序列组成:和轻链可变区,包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列或基本上由SEQ ID NO:72的氨基酸序列组成。

[0125] 抗EGFR抗体或抗原结合片段的可变区的氨基酸序列如表5所示:

[0126] [表5]

[0127]

SEQ ID NO	靶向 EGFR 的重链可变区
71	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLG VIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARA LTYYDYEFAYWGQGTLVTVS

[0128]

SEQ ID NO	靶向 EGFR 的轻链可变区
72	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYAS ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTK LELKR

[0129] 在另一种实施方式中,抗EGFR抗体或其抗原结合片段可包含:重链,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:73或74的氨基酸序列;和轻链,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:75的氨基酸序列。在另一种实施方式中,抗EGFR抗体或其抗原结合片段可以是scFv(单链可变片段),所述scFv包括:

[0130] 重链可变区,包含:含有SEQ ID NO:65的氨基酸序列的H-CDR1、含有SEQ ID NO:66的氨基酸序列的H-CDR2、和含有SEQ ID NO:67的氨基酸序列的H-CDR3;和

[0131] 轻链可变区,包含:含有SEQ ID NO:68的氨基酸序列的L-CDR1、含有SEQ ID NO:69的氨基酸序列的L-CDR2、和含有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的L-CDR3,

[0132] 其中重链可变区和轻链可变区可以以任何顺序直接(即,无接头地)或通过肽接头彼此连接。

[0133] 在另一种实施方式中,抗EGFR抗体或其抗原结合片段可以是scFv(单链可变片段),所述scFv包括:

[0134] 重链可变区,其包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列或基本上由SEQ ID NO:71的氨基酸序列组成;和

[0135] 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列或基本上由SEQ ID NO:72的氨基酸序列组成,

[0136] 其中重链可变区和轻链可变区可以以任何顺序直接或通过肽接头彼此连接。

[0137] 在本公开中,抗EGFR scFv以任意顺序包含重链可变区和轻链可变区。例如,抗EGFR scFv可以在从N端到C端的方向上包含轻链可变区和重链可变区。可替代地,抗EGFR scFv可以在从N端到C端的方向上包含重链可变区和轻链可变区。

[0138] 双特异性抗体

[0139] 本公开提供了抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体,该抗体包含:

[0140] (1)作为EGFR靶向部分的抗EGFR抗体或其抗原结合片段,其能够特异性识别和/或结合EGFR蛋白,和

[0141] (2)作为4-1BB靶向部分的抗4-1BB抗体或其抗原结合片段,其能够特异性识别和/或结合4-1BB蛋白。

[0142] 抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体可仅当与表达EGFR的肿瘤细胞交联时活化4-1BB信号传导。此外,双特异性抗体中所包含的抗4-1BB抗体或其抗原结合片段的特征可以是,仅在肿瘤微环境(TME)中定位和/或激活,和/或与现有的抗4-1BB抗体相比显著地降低肝脏毒性,同时维持免疫应答增强和/或肿瘤治疗的功效。

[0143] 在一种实施方式中,双特异性抗体可以包含全长抗EGFR抗体和抗4-1BB抗体的抗原结合片段(例如,scFv),其中抗4-1BB抗体的抗原结合片段可以直接或通过肽接头与全长抗EGFR抗体的N-末端、C-末端或其两者连接。在一种实施方式中,双特异性抗体可以包含全长抗4-1BB抗体和抗EGFR抗体的抗原结合片段(例如,scFv),其中抗EGFR抗体的抗原结合片段可以直接或通过肽接头与全长抗4-1BB抗体的N-末端、C-末端或其两者连接。

[0144] 在一种实施方式中,双特异抗体中所包含的scFv可以任意顺序包含重链可变区和轻链可变区。例如,双特异性抗体中所包含的scFv可以在从N端到C端的方向上包含轻链可变区和重链可变区,以及任选地包含在它们之间的肽接头,或者可替代地,双特异性抗体中所包含的scFv可以在从N端到C端的方向上包含重链可变区和轻链可变区,以及任选地包含在它们之间的肽接头。

[0145] 当双特异性抗体包括全长抗EGFR抗体和抗4-1BB scFv时,双特异性抗体可以包括:

[0146] (i)第一多肽,在从N端到C端的方向上包含:

[0147] 抗EGFR抗体的重链,

[0148] 任选地,肽接头(第一肽接头),和

[0149] 抗4-1BB scFv;和

[0150] (ii)第二多肽,包含抗EGFR抗体的轻链,其中抗4-1BB scFv可在从N端到C端的方向上包含:抗4-1BB抗体的轻链可变区,

[0151] 任选地,肽接头(第二肽接头),和

[0152] 抗4-1BB抗体的重链可变区。

[0153] 可替代地,双特异性抗体可包括:

[0154] (i)第一多肽,在从N端到C端的方向上包含:

[0155] 抗4-1BB scFv,

[0156] 任选地,肽接头(第一肽接头),和

[0157] 抗EGFR抗体的重链;和

[0158] (ii)第二多肽,包含抗EGFR抗体的轻链,其中抗4-1BB scFv可在从N端到C端的方向上包含:抗4-1BB抗体的轻链可变区,

[0159] 任选地,肽接头(第二肽接头),和

[0160] 抗4-1BB抗体的重链可变区。

[0161] 可替代地,双特异性抗体可包括:

[0162] (i)第一多肽,在从N端到C端的方向上包含:

[0163] 抗EGFR抗体的重链,

[0164] 任选地,肽接头(第一肽接头),和

[0165] 抗4-1BB scFv;和

[0166] (ii)第二多肽,包含抗EGFR抗体的轻链,其中抗4-1BB scFv可在从N端到C端的方向上包含:抗4-1BB抗体的重链可变区,

[0167] 任选地,肽接头(第二肽接头),和

[0168] 抗4-1BB抗体的轻链可变区。

[0169] 可替代地,双特异性抗体可包括:

[0170] (i)第一多肽,在从N端到C端的方向上包含:

[0171] 抗4-1BB scFv,

[0172] 任选地,肽接头(第一肽接头),和

[0173] 抗EGFR抗体的重链;和

[0174] (ii)第二多肽,包含抗EGFR抗体的轻链,

[0175] 其中抗4-1BB scFv可在从N端到C端的方向上包含:

[0176] 抗4-1BB抗体的重链可变区,

[0177] 任选地,肽接头(第二肽接头),和

[0178] 抗4-1BB抗体的轻链可变区。

[0179] 当双特异性抗体包括全长抗4-1BB抗体和抗EGFR scFv时,双特异性抗体可包括:

[0180] (i)第一多肽,在从N端到C端的方向上包含:

[0181] 抗4-1BB抗体的重链,

[0182] 任选地,肽接头(第一肽接头),和

[0183] 抗EGFR scFv;和

[0184] (ii)第二多肽,包含抗4-1BB抗体的轻链,

[0185] 其中抗EGFR scFv可在从N端到C端的方向上包含:

[0186] 抗EGFR抗体的轻链可变区,

[0187] 任选地,肽接头(第二肽接头),和

[0188] 抗EGFR抗体的重链可变区。

[0189] 可替代地,双特异性抗体可包括:

[0190] (i)第一多肽,在从N端到C端的方向上包含:

[0191] 抗EGFR scFv,

[0192] 任选地,肽接头(第一肽接头),和

[0193] 抗4-1BB抗体的重链;和

[0194] (ii)第二多肽,包含抗4-1BB抗体的轻链,

[0195] 其中抗EGFR scFv可在从N端到C端的方向上包含:

[0196] 抗EGFR抗体的轻链可变区,

[0197] 任选地,肽接头(第二肽接头),和

[0198] 抗EGFR抗体的重链可变区。

[0199] 可替代地,双特异性抗体可包括:

[0200] (i)第一多肽,在从N端到C端的方向上包含:

[0201] 抗4-1BB抗体的重链,

[0202] 任选地,肽接头(第一肽接头),和

[0203] 抗EGFR scFv;和

[0204] (ii)第二多肽,包含抗4-1BB抗体的轻链,

[0205] 其中抗EGFR scFv可在从N端到C端的方向上包含:

[0206] 抗EGFR抗体的重链可变区,

[0207] 任选地,肽接头(第二肽接头),和

[0208] 抗EGFR抗体的轻链可变区。

[0209] 可替代地,双特异性抗体可包括:

[0210] (i)第一多肽,在从N端到C端的方向上包含:

[0211] 抗EGFR scFv,

[0212] 任选地,肽接头(第一肽接头),和

[0213] 抗4-1BB抗体的重链;和

[0214] (ii)第二多肽,包含抗4-1BB抗体的轻链,

[0215] 其中抗EGFR scFv可在从N端到C端的方向上包含:

[0216] 抗EGFR抗体的重链可变区,

[0217] 任选地,肽接头(第二肽接头),和

[0218] 抗EGFR抗体的轻链可变区。

[0219] 第一肽接头和第二肽接头可以在双特异性抗体中独立地存在或不存在,并且彼此相同或不同。

[0220] 在另一种实施方式中,双特异性抗体中所包含的EGFR靶向部分和4-1BB靶向部分两者都可以是全长抗体或包含直接或通过肽接头相互连接的重链CDR、轻链CDR或其组合的抗原结合片段。

[0221] 假设每种抗体都可以结合4-1BB(例如人4-1BB)和EGFR(例如人EGFR)两者,可以将本文所公开的CDR序列或V_H(重链可变区)和V_L(轻链可变区)序列“混合并匹配”以产生其他的抗EGFR/抗4-1BB结合双特异性分子。

[0222] 肽接头

[0223] 对于高纯度抗体,双特异性抗体可以包含在第一多肽中的重链和scFv之间的肽接头(第一肽接头),和/或在scFv中的重链可变区和轻链可变区之间的肽接头(第二肽接头)。

[0224] 如本文所用,术语“肽接头”可以指包括1至100个氨基酸,特别是2至50个氨基酸的寡肽,每个氨基酸可以是任何种类的氨基酸,而没有任何限制。可以在有或没有适当修饰的情况下使用任何常规的肽接头以符合特定目的。在具体的实施方式中,肽接头可包含例如Gly、Asn和/或Ser残基,和/或包含中性氨基酸如Thr和/或Ala。适用于肽接头的氨基酸序列可以是相关领域已知的。肽接头的长度可以在不影响多肽和/或scFv功能的限度内适当确定。例如,肽接头可通过包括总共约1至约100个氨基酸、约2至约50个氨基酸或约5至约25个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个)氨基酸而形成,每个氨基酸独立地选自由Gly、Asn、Ser、Thr和Ala组成的组。在一种实施方式中,肽接头可以表示为$(G_mS_1)_n$(m、1和n分别是“G”、“S”和“(G_mS_1)”的数量,并且独立地选自约1至约10,特别是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10)。在一种实施方式中,肽接头可以是(GGGGS)2、(GGGGS)3、(GGGGS)4或(GS)9的氨基酸,但不限于此。

[0225] 医学用途

[0226] 提供了双特异性抗体用于增强免疫应答和/或治疗和/或预防癌症的医学用途。

[0227] 更具体地,一实施方式提供了包含双特异性抗体作为活性成分的药物组合物。该药物组合物可以进一步包含药学上可接受的载体。该药物组合物可用于增强免疫应答,和/或用于治疗和/或预防癌症。

[0228] 另一种实施方式提供了用于治疗和/或预防癌症的药物组合物,所述组合物包含双特异性抗体作为活性成分。

[0229] 另一种实施方式提供了一种在有需要的受试者中治疗和/或预防癌症的方法,该方法包括将药学有效量的双特异性抗体或药物组合物施用至受试者。该方法可以进一步具有在施用步骤之前鉴定需要治疗和/或预防癌症的受试者的步骤。

[0230] 另一种实施方式提供了双特异性抗体或药物组合物用于治疗和/或预防癌症的用途。另一种实施方式提供了双特异性抗体在制备用于治疗和/或预防癌症的药物中的用途。

[0231] 在一些实施方式中,癌症的特征可以是EGFR表达或EGFR过表达(与正常相比)。

[0232] 另一种实施方式提供了用于增强免疫应答的药物组合物,所述组合物包含双特异性抗体作为活性成分。

[0233] 另一种实施方式提供了一种在有需要的受试者中增强免疫应答的方法,该方法包括将药学有效量的双特异性抗体或药物组合物施用至受试者。该方法可以进一步包括在施用步骤之前鉴定需要增强免疫应答的受试者的步骤。

[0234] 另一种实施方式提供了双特异性抗体或药物组合物用于增强免疫应答的用途。另一种实施方式提供了双特异性抗体在制备用于增强免疫应答的药物中的用途。

[0235] 在一些实施方式中,双特异性抗体或药物组合物可以在存在EGFR的条件下增强免疫应答。例如,在增强免疫应答的方法中,受试者可以具有表达EGFR或过表达EGFR的细胞(例如,表达EGFR或过表达EGFR的癌细胞)。

[0236] 双特异性抗体或药物组合物所预防和/或治疗的癌症可能与4-1BB和/或EGFR,尤其是EGFR表达或EGFR过表达的癌症有关。癌症可以选自实体癌和血癌。所述癌症可以是但不限于选自由乳腺癌、结肠癌、胃癌、肺癌(例如,肺鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺

癌、肺腺癌)、腹膜癌、皮肤癌、鳞状细胞癌、皮肤或眼球黑色素瘤、直肠癌、肛门附近的癌症、食道癌、小肠肿瘤、内分泌腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌症、软组织肉瘤、尿道癌、慢性或急性白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、肝癌、胃肠道癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞腺瘤、大肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺肿瘤、肾癌、宫颈癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、头颈部癌、脑癌、胆道癌、胆囊癌等组成的组中的一种或多种。癌症可以是原发性癌症或转移性癌症。

[0237] 如本文所用,术语“癌症的预防和/或治疗”可以指癌细胞死亡、癌细胞增殖的抑制、与癌症相关的症状的缓解、癌症转移的抑制等。

[0238] 如本文所用,术语“免疫应答的增强”可以指4-1BB信号激活、与4-1BB相关的任何免疫应答的增强,例如4-1BB诱导的信号活化(例如,4-1BB诱导的NF-kB信号活化)、细胞因子释放增加、诸如T细胞的免疫细胞杀伤靶细胞等,但不限于此。在一些实施方式中,本公开提供的双特异性抗体对免疫应答的增强可以在EGFR的存在下发生。

[0239] 除了作为活性成分的双特异性抗体之外,药物组合物还可包含药学上可接受的载体、稀释剂和/或赋形剂。药学上可接受的载体、稀释剂和/或赋形剂可以是选自常用于配制抗体的那些中的任何一种。例如,药学上可接受的载体可以是选自由乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、淀粉、阿拉伯树胶、磷酸钙、藻酸盐、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁和矿物油组成的组中的一种或多种,但不限于此。

[0240] 药物组合物还可包含选自由润滑剂、润湿剂、甜味剂、增味剂、乳化剂、悬浮剂、防腐剂等组成的组中的一种或多种。

[0241] 双特异性抗体或药物组合物可以口服或经非胃肠道施用至受试者。非胃肠道施用可以是静脉内注射、皮下注射、肌肉注射、腹膜内注射、内皮施用、局部施用、鼻内施用、肺内施用或直肠施用。由于口服施用导致蛋白质或肽被消化,因此必须将用于口服施用的组合物中的活性成分包衣或配制以防止在胃中消化。另外,可以使用使活性成分能够递送至靶细胞(例如癌细胞)的任选装置来施用组合物。

[0242] 如本文所用,术语“药学有效量”可以指活性成分双特异性抗体可以在预防或治疗癌症中发挥药学上有意义的作用的量。双特异性抗体的药学有效量,或由双特异性抗体的量指示的药物组合物的合适剂量,可以取决于各种因素以各种方式规定,例如患者的年龄、体重、性别、病理状况、饮食、排泄速度和/或反应敏感性、剂型、施用时间、施用途径、施用方式等。例如,双特异性抗体的药学有效量或药物组合物的成人合适剂量可以在每天约0.001至约1000mg(双特异性抗体的量)/kg(体重)、约0.01至约100mg/kg、或0.1至50mg/kg的范围内。

[0243] 施用双特异性抗体或药物组合物的受试者可以是选自哺乳动物中的一种,例如人、猴、大鼠、小鼠、狗、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、牛、奶牛等,或由其获得的细胞或组织,但不限于此,它可以是患有癌症的受试者。

[0244] 药物组合物可以与药学上可接受的载体和/或赋形剂通过本领域技术人员容易实施的方法配制成单位剂型或多次剂型。剂型可以是油溶液或水性介质、混悬剂、糖浆、乳化溶液、提取物、粉剂、颗粒剂、片剂或胶囊剂,并且可以进一步包括分散剂或稳定剂。

[0245] 多核苷酸、重组载体和抗体的制备

[0246] 一种实施方式提供了编码双特异性抗体的多核苷酸。例如,多肽可包含:编码直接连接或通过肽接头连接的本文所述的抗EGFR抗体的重链和本文所述的抗4-1BB抗体的scFv的第一多核苷酸;以及编码抗EGFR抗体的轻链的第二多核苷酸。可替代地,多肽可包含:编码直接连接或通过肽接头连接的本文所述的抗4-1BB抗体的重链和本文所述的抗EGFR抗体的scFv的第一多核苷酸;以及编码抗4-1BB抗体的轻链的第二多核苷酸。

[0247] 另一种实施方式提供了包含多核苷酸的载体。例如,重组载体可以包含一起在一个载体中或分别在两个载体中的第一多核苷酸和第二多核苷酸。另一种实施方式提供了包含第一多核苷酸和第二多核苷酸的重组细胞。例如,重组细胞可以是用重组载体转染的细胞。

[0248] 另一种实施方式提供了制备双特异性抗体的方法,包括在细胞中表达多核苷酸,例如第一多核苷酸和第二多核苷酸。表达多核苷酸的步骤可以通过在允许多核苷酸表达的条件下培养包含多核苷酸(例如该多核苷酸在重组载体中)的细胞来进行。该方法可以进一步包括在表达或培养步骤之后,从细胞培养物中分离和/或纯化抗4-1BB抗体或其抗原结合片段。

[0249] 术语“载体”是指用于在宿主细胞中表达靶基因的工具,例如质粒载体、粘粒载体和病毒载体,例如噬菌体载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体和腺相关病毒载体。重组载体可以由本领域常用的质粒(例如pSC101、pGV1106、pACYC177、ColE1、pKT230、pME290、pBR322、pUC8/9、pUC6、pBD9、pHC79、pIJ61、pLAFR1、pHV14、pGEX系列、pET系列和pUC19)、噬菌体(例如λgt4λB、λ-Charon、λΔz1和M13)或通过操纵病毒(例如SV40等)来构建。

[0250] 在重组载体中,多核苷酸可以可操作地连接至启动子。术语“可操作地连接”旨在涉及靶核苷酸序列与表达调节序列(例如,启动子序列)之间的功能性连接。当“可操作地连接”时,调节元件可以控制靶核苷酸的转录和/或翻译。

[0251] 通常可以将重组载体构建为克隆载体或表达载体。对于重组表达载体,可以使用相关领域通常可用于在植物、动物或微生物细胞中表达外源蛋白质的载体。本领域熟知的各种方法可用于构建重组载体。

[0252] 为了在宿主如原核或真核细胞中使用,可以相应地构建重组载体。例如,当将载体构建为用于原核宿主中的表达载体时,该载体通常包括用于转录的强启动子(例如pLκλ启动子,CMV启动子,trp启动子,lac启动子,tac启动子,T7启动子等),用于起始翻译的核糖体结合位点以及转录/翻译终止序列。另一方面,用于真核宿主的表达载体包括真核细胞中可操作的复制起点,例如f1复制起点、SV40复制起点、pMB1复制起点、腺病毒复制起点(adeno origin of replication)、AAV复制起点和BBV复制起点,但不限于此。另外,表达载体通常包括源自哺乳动物细胞基因组的启动子(例如,金属硫蛋白启动子)或源自哺乳动物病毒的启动子(例如,腺病毒晚期启动子、牛痘病毒7.5K启动子、SV40启动子、巨细胞病毒启动子和HSV的tk启动子)以及作为转录终止序列的聚腺苷酸化序列。

[0253] 可以通过将重组载体导入合适的宿主细胞中来制备重组细胞。在本公开中可以使用本领域已知的任何宿主细胞,只要该细胞允许以稳定的方式顺序克隆和表达重组载体。可用于本公开的原核宿主细胞的实例选自大肠杆菌、芽孢杆菌属、例如枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)和苏云金芽孢杆菌(Bacillus thuringiensis),以及肠杆菌科菌株例如鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)、粘质沙雷氏菌(Serratia marcescens)

和各种假单胞菌属物种。可用于转化的真核宿主细胞可选自但不限于啤酒酵母(Saccharomyce cerevisiae)、昆虫细胞和动物细胞,例如Sp2/0、CHO(中国仓鼠卵巢)-K1、CHO DG44、PER.C6、W138、BHK、COS-7、293、HepG2、Huh7、3T3、RIN和MDCK。

[0254] 可以使用相关领域熟知的方法将多核苷酸或携带该多核苷酸的重组载体导入(转染)到宿主细胞中。例如,当宿主细胞是原核细胞时,可以使用$CaCl_2$或电穿孔方法进行此转染。对于真核宿主细胞,可以使用但不限于显微注射、磷酸钙沉淀、电穿孔、脂质体介导的转染或颗粒轰击来实现遗传导入。

[0255] 为了选择转化的宿主细胞,可以根据本领域熟知的方法利用与选择标记相关的表型。例如,当选择标记是赋予对特定抗生素抗性的基因时,宿主细胞可以在培养基中存在抗生素的情况下生长,从而选择了目的转化体。

[0256] 另一种实施方式提供了生产双特异性抗体的方法,该方法包括在宿主细胞中表达多核苷酸或重组载体的步骤。在一种实施方式中,生产方法可包括培养携带有多核苷酸或重组载体的重组细胞,并任选地从培养基中分离和/或纯化抗体。

[0257] 有益效果

[0258] 本公开涉及双特异性抗体及其用途,所述双特异性抗体中的每一种都包括对肿瘤相关抗原(TAA;EGFR)特异的抗体和对4-1BB特异的抗体。这些双特异性抗体仅在存在EGFR表达细胞的情况下活化4-1BB信号传导并增强强免疫细胞。由于特异性EGFR介导的免疫应答,预计与4-1BB单克隆抗体相比,使用双特异性抗体的肝毒性要小得多。

附图说明

[0259] 图1a是显示通过ELISA测量的抗4-1BB抗体的抗原(人4-1BB)结合活性的图。

[0260] 图1b是显示通过ELISA测量的抗4-1BB抗体的细胞结合活性的图。

[0261] 图2a是显示通过ELISA测量的抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体的抗原(人EGFR)结合活性的图。

[0262] 图2b是显示通过ELISA测量的抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体的抗原(人EGFR)结合活性的图。

[0263] 图3a是显示通过ELISA测量的抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体的抗原(人4-1BB)结合活性的图。

[0264] 图3b是显示通过ELISA测量的抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体的抗原(人4-1BB)结合活性的图。

[0265] 图4a是显示抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体在MDA-MB231细胞系(EGFR高表达细胞)中的4-1BB信号活化水平的图。

[0266] 图4b是显示抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体在BT-474细胞系(EGFR阴性细胞)中的4-1BB信号活化水平的图。

[0267] 图5a是显示抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体在表达EGFR的A431细胞系中的4-1BB信号活化水平的图。

[0268] 图5b是显示抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体在表达EGFR的HCC1954细胞系中的4-1BB信号活化水平的图。

[0269] 图5c是显示抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体在表达EGFR的Calu-3细胞系中的4-1BB

信号活化水平的图。

[0270] 图5d是显示抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体在表达EGFR的DLD-1细胞系中的4-1BB信号活化水平的图。

[0271] 图5e是显示抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体在表达EGFR的SK-BR-3细胞系中的4-1BB信号活化水平的图。

[0272] 图5f是显示抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体在表达EGFR的NCI-N87细胞系中的4-1BB信号活化水平的图。

[0273] 图5g是显示抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体在表达EGFR的MDA-MB-231细胞系中的4-1BB信号活化水平的图。

[0274] 图5h是显示抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体在表达EGFR的Panc-1细胞系中的4-1BB信号活化水平的图。

[0275] 图6a是显示抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体在不表达EGFR的CHO-k1细胞系中的4-1BB信号活化水平的图。

[0276] 图6b是显示抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体在不表达EGFR的SW620细胞系中的4-1BB信号活化水平的图。

[0277] 图6c是显示抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体在不表达EGFR的MC38细胞系中的4-1BB信号活化水平的图。

[0278] 图6d是显示抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体在不表达EGFR的Jurkat细胞系中的4-1BB信号活化水平的图。

[0279] 图7a-7c是显示不同细胞系中抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体(7a、7b)和对照抗体(7c)的EGFR sABC和4-1BB诱导的NF-kB信号传导之间的相关性的图。

[0280] 图8a和8b是显示用抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体处理的表达EGFR的DLD-1细胞释放的IFN-γ水平的图。

[0281] 图9a-9d是显示用抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体处理的表达EGFR的DLD-1细胞的存活率百分比的图。

[0282] 图10是显示抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体在携带DLD-1的hPBMC移植小鼠中的体内抗肿瘤活性的图。

[0283] 图11a和11b是显示抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体在携带人EGFR/MC38肿瘤的4-1BB敲入小鼠中的体内抗肿瘤活性的图。

[0284] 图12是显示抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体在经抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体治愈、并用人EGFR/MC38肿瘤细胞和B16 F10肿瘤细胞再次攻击的小鼠中的体内抗肿瘤活性的图。

[0285] 图13是显示抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)效果的图。

[0286] 图14a是显示抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体的Fcγ RIIb依赖性4-1BB生物测定结果的图。

[0287] 图14b是显示抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体的Fcγ RIIb非依赖性4-1BB生物测定结果的图。

具体实施方式

[0288] 在下文中,将通过实施例详细描述本发明。

[0289] 以下实施例仅用于举例说明本发明,并不被解释为对本发明的限制。

[0290] 实施例1.抗4-1BB抗体

[0291] 1.1制备针对4-1BB的完整人类克隆抗体

[0292] 通过针对4-1BB的噬菌体文库(从KBio Health获得)免疫管淘选,筛选全长IgG形式的完整人单克隆抗4-1BB抗体。为了淘选针对靶分子的噬菌体文库,使用4-1BB(NCBI登录号NP_001552.2)包被的免疫管共进行4轮淘选。

[0293] 将来自三轮淘选过程的细菌菌落在SB-羧苄青霉素(Biomatik cat#A2311-5g)的96深孔板中生长直至混浊,此时将10^{11}pfu的VCSM13辅助噬菌体(K-Bio Health)添加到每个孔中。在37℃下轻轻摇动(80rpm)感染1小时后,添加70μg/mL卡那霉素,并将细胞在30℃下以200rpm摇动培养过夜。

[0294] 第二天,将板离心并将含有噬菌体的上清液添加至用在PBST(含吐温20 的磷酸盐缓冲盐水)中的3%(v/v)BSA(牛血清白蛋白)封闭的4-1BB抗原包被的ELISA板中。在室温下温育1小时后,将板用PBST洗涤3次,并添加抗M13抗体(Sino Biological cat#11973-MM05)。将板温育1小时,用PBST洗涤3次,并使用四甲基联苯胺(TMB)测量结合活性。

[0295] 扩增4-1BB特异性结合物以用于质粒DNA测序。分析轻链和重链可变区(VL和VH)序列以鉴定独特序列并确定序列多样性,如表6至表13所示(下划线依次为:CDR1、CDR2和CDR3)。以BMUR(BMS的乌瑞芦单抗,美国专利第7,288,638号)表示的抗4-1BB抗体用于比较以下实施例中的激动活性。

[0296] [表6]

[0297]

1A10	氨基酸序列(N'→C')
重链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEW VSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDGQRNSMREFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK

	TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 56)
重链 可变区（VH）	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEW VSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDGQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 18)
H-CDR1	SYDMS (SEQ ID NO: 1)
H-CDR2	WISYSGGSIYYADSVKG (SEQ ID NO: 4)
H-CDR3	DGQRNSMREFDY (SEQ ID NO: 7)
轻链	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIY ADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGY VFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPAECS (SEQ ID NO: 62)
轻链 可变区（VL）	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIY ADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGY VFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 30)
L-CDR1	SGSSSNIGNNYVT (SEQ ID NO: 12)
L-CDR2	ADSHRPS (SEQ ID NO: 14)
L-CDR3	ATWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 16)

[0298]

[0299] [表7]

1A10 M4	**氨基酸序列（N'→C'）**
重链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEW VSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDAQRNSMREFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 57)

[0300]

[0301]

重链 可变区（VH）	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEW VSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDAQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 19)
H-CDR1	SYDMS (SEQ ID NO: 1)
H-CDR2	WISYSGGSIYYADSVKG (SEQ ID NO: 4)
H-CDR3	DAQRNSMREFDY (SEQ ID NO: 8)
轻链	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIY ADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGY VFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPAECS (SEQ ID NO: 62)
轻链 可变区（VL）	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIY ADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGY VFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 30)
L-CDR1	SGSSSNIGNNYVT (SEQ ID NO: 12)
L-CDR2	ADSHRPS (SEQ ID NO: 14)
L-CDR3	ATWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 16)

[0302] [表8]

[0303]

1A10 M11	**氨基酸序列（N'→C'）**
重链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEW VSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDAQRQSMREFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 58)
重链 可变区（VH）	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEW VSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDAQRQSMREFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 20)
H-CDR1	SYDMS (SEQ ID NO: 1)
H-CDR2	WISYSGGSIYYADSVKG (SEQ ID NO: 4)

H-CDR3	DAQRQSMREFDY (SEQ ID NO: 9)
轻链	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIY ADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGY VFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPAECS (SEQ ID NO: 62)
轻链 可变区（VL）	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIY ADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGY VFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 30)
L-CDR1	SGSSSNIGNNYVT (SEQ ID NO: 12)
L-CDR2	ADSHRPS (SEQ ID NO: 14)
L-CDR3	ATWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 16)

[0304]

[0305] [表9]

1A10 M12	**氨基酸序列（N'→C'）**
重链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEW VSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDAQRNSMREFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 57)
重链 可变区（VH）	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEW VSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDAQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 19)
H-CDR1	SYDMS (SEQ ID NO: 1)
H-CDR2	WISYSGGSIYYADSVKG (SEQ ID NO: 4)
H-CDR3	DAQRNSMREFDY (SEQ ID NO: 8)
轻链	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIY ADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGY VFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPAECS (SEQ ID NO: 63)

[0306]

[0307]

轻链 可变区（VL）	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIY ADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGY VFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 31)
L-CDR1	SGSSSNIGNNYVT (SEQ ID NO: 12)
L-CDR2	ADSHRPS (SEQ ID NO: 14)
L-CDR3	ATWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 16)

[0308] [表10]

[0309]

1A10 M13	**氨基酸序列（N'→C'）**
重链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEW VSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDAQRQSMREFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 58)
重链 可变区（VH）	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEW VSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDAQRQSMREFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 20)
H-CDR1	SYDMS (SEQ ID NO: 1)
H-CDR2	WISYSGGSIYYADSVKG (SEQ ID NO: 4)
H-CDR3	DAQRQSMREFDY (SEQ ID NO: 9)
轻链	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIY ADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGY VFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPAECS (SEQ ID NO: 63)
轻链 可变区（VL）	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIY ADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGY VFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 31)
L-CDR1	SGSSSNIGNNYVT (SEQ ID NO: 12)
L-CDR2	ADSHRPS (SEQ ID NO: 14)

[0310]

L-CDR3	ATWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 16)

[0311] [表11]

[0312]

1A12	氨基酸序列（N'→C'）
重链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKGLEW VSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDAAVYY CAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 59)
重链 可变区（VH）	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKGLEW VSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDAAVYY CAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 21)
H-CDR1	GYDMS (SEQ ID NO: 2)
H-CDR2	VIYPDDGNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 5)
H-CDR3	HGGQKPTTKSSSAYGMDG (SEQ ID NO: 10)
轻链	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIY ADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGY VFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPAECS (SEQ ID NO: 62)
轻链 可变区（VL）	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIY ADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGY VFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 30)
L-CDR1	SGSSSNIGNNYVT (SEQ ID NO: 12)
L-CDR2	ADSHRPS (SEQ ID NO: 14)
L-CDR3	ATWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 16)

[0313] [表12]

[0314]

1A12 M1	氨基酸序列（N'→C'）

[0315]

重链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKGLEW VSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 60)
重链 可变区（VH）	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKGLEW VSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 22)
H-CDR1	GYDMS (SEQ ID NO: 2)
H-CDR2	VIYPDDGNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 5)
H-CDR3	HGGQKPTTKSSSAYGMDG (SEQ ID NO: 10)
轻链	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIY ADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGY VFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPAECS (SEQ ID NO: 63)
轻链 可变区（VL）	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIY ADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGY VFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 31)
L-CDR1	SGSSSNIGNNYVT (SEQ ID NO: 12)
L-CDR2	ADSHRPS (SEQ ID NO: 14)
L-CDR3	ATWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 16)

[0316] [表13]

[0317]

AB41	**氨基酸序列（N'→C'）**
重链	QVQLQQSGAEVIKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLE WIGEINPGNGHTNYNEKFKSRATLTGDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYY CARSFTTARAFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP

[0318]

	PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 61)
重链 可变区（VH）	QVQLQQSGAEVIKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLE WIGEINPGNGHTNYNEKFKSRATLTGDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYY CARSFTTARAFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 23)
H-CDR1	SYWMH (SEQ ID NO: 3)
H-CDR2	EINPGNGHTNYNEKFKS (SEQ ID NO: 6)
H-CDR3	SFTTARAFAY (SEQ ID NO: 11)
轻链	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASQTISDYLHWYQQKPDQAPKLLIK YASQSISGIPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQDGHSFPPTFGQ GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 64)
轻链 可变区（VL）	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASQTISDYLHWYQQKPDQAPKLLIK YASQSISGIPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQDGHSFPPTFGQ GTKLEIKR (SEQ ID NO: 32)
L-CDR1	RASQTISDYLH (SEQ ID NO: 13)
L-CDR2	YASQSIS (SEQ ID NO: 15)
L-CDR3	QDGHSFPPT (SEQ ID NO: 17)

[0319] 1.2.针对4-1BB的scFv抗体的制备

[0320] 使用实施例1.1的表6至表13中所示的针对4-1BB的完整人单克隆抗体的可变区，制备了具有(N')-VL-接头-VH-(C')结构的抗4-1BB scFv抗体，其中重链可变区第44位的氨基酸残基“G”被“C”取代，轻链可变区第103位的氨基酸残基“G”被“C”取代。scFv中从“G”到“C”的这种氨基酸取代可有助于增加包含scFv作为一个靶标特异性部分的双特异性抗体的稳定性。表14至表19示出了制备的抗4-1BB scFv的氨基酸序列，尽管本领域技术人员可以在以下实施方式中应用氨基酸序列的改变或修饰以满足特定目的，包括应用各种类型的肽接头，例如(GGGGS)2、(GGGGS)3、(GGGGS)4或(GS)9。

[0321] [表14]

[0322]

1A10 (scFv)	氨基酸序列（N'→C'）
轻链可变区（VL）	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLI YADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSL SGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 33)
接头	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
重链可变区（VH）	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLE WVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDGQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 24)

[0323] [表15]

[0324]

1A10 M4 (scFv)	氨基酸序列（N'→C'）
轻链可变区（VL）	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 33)
接头	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:87)
重链可变区（VH）	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 25)

[0325] [表16]

[0326]

1A10 M12 (scFv)	氨基酸序列（N'→C'）
轻链可变区（VL）	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 34)
接头	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
重链可变区（VH）	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 25)

[0327] [表17]

[0328]

1A12 (scFv)	氨基酸序列（N'→C'）
轻链可变区（VL）	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 33)
接头	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
重链可变区	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLE

[0329]

（VH）	WVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 27)

[0330] [表18]

[0331]

1A12 M1 (scFv)	氨基酸序列（N'→C'）
轻链可变区（VL）	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 34)
接头	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
重链可变区（VH）	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 28)

[0332] [表19]

[0333]

AB41 (scFv)	氨基酸序列（N'→C'）
轻链可变区（VL）	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASQTISDYLHWYQQKPDQAPKLLI KYASQSISGIPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQDGHSFPPTF GCGTKLEIKR (SEQ ID NO: 88)
接头	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
重链可变区（VH）	QVQLQQSGAEVIKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWVRQAPGQCL EWIGEINPGNGHTNYNEKFKSRATLTGDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCARSFTTARAFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 29)

[0334] 1.3.针对人4-1BB的抗4-1BB抗体(全长IgG形式)的抗原结合能力

[0335] (1)通过ELISA测量的抗原结合活性

[0336] 为了评估抗原结合活性,将实施例1.1中制备的候选抗体进行ELISA测试。简而言之,将微量滴定板用在PBS中的0.1μg/ml的人4-1BB-Fc蛋白(Sino Biological)以100μl/孔的浓度在4℃下包被过夜,然后用100μl/孔的5％(v/v)BSA封闭。将从10μg/ml开始5倍稀释的人源化抗体(1A10、1A12和AB41)添加到每个孔中,并在室温(RT)下温育1-2小时。将板用PBS/吐温洗涤,然后与缀合有辣根过氧化物酶(HRP)(Thermo)的山羊抗人IgG抗体在室温下温育1小时。洗涤后,将板用TMB底物显影,并通过分光光度计在OD 450至630nm处分析。

[0337] 所获得的结果在图1a中显示。如图1a所示,所有测试的抗4-1BB抗体都显示出4-1BB结合能力。

[0338] (2)通过FACS测量的细胞结合活性

[0339] 为了评估细胞结合活性,通过荧光激活细胞分选(FACS)分析候选抗体与哺乳动物表达的4-1BB的结合。简而言之,将表面上表达4-1BB的Jurkat细胞,GloResponseTM NFκB-luc2/4-1BB Jurkat细胞系(Promega;3x10^5个细胞)与抗体(1A10和1A12;各10ug/mL)一起温育。用FACS缓冲液(在PBS中的1％(v/v)BSA)洗涤后,将FITC-抗人IgG抗体(Sigma,F9512,浓度:2.0mg/ml)添加到每个孔中,并在4℃下温育1小时。FITC的平均荧光强度(MFI)由FACSCalibur(BD Biosciences)评估。

[0340] 所获得的结果在图1b中显示。如图1b所示,所测试的所有抗4-1BB抗体显示出与在细胞表面表达的4-1BB的结合能力,并且可以有效地与哺乳动物细胞上表达的4-1BB结合。

[0341] 实施例2.抗EGFR抗体的制备

[0342] 作为抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体的EGFR靶向部分,使用西妥昔单抗(ERBITUX®:BMS",DrugBank登录号DB00002;人IgG1Kappa单克隆抗体)或其抗原结合片段,例如scFv。

[0343] 西妥昔单抗的序列总结如下:

[0344] 重链:

[0345] QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:90)

[0346] 轻链:

[0347] DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:75)

[0348] 包含在双特异性抗体中的抗EGFR抗体的恒定区可以通过向人IgG1中引入多于一种突变或变化来修饰,表20中说明了一种示例性实施方式(下文中,表示为“ET(WT)”):

[0349] [表20]

[0350]

ET(WT)	序列
重链	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO: 73)
轻链	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)

[0351] 包含在双特异性抗体中的抗EGFR抗体的恒定区可以通过向人IgG1中引入多于一种突变或变化来修饰,下表21中示出了一种示例性实施方式EGFR(NA或N297A):

[0352] [表21]

[0353]

ET(NA)(N297A)	序列
重链	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIY YCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)
轻链	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIK YASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTF GAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)

[0354] 实施例3.抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体的制备

[0355] 以全长IgG(抗EGFR抗体)-scFv(抗4-1BB抗体)形式或以全长IgG(抗4-1BB抗体)-scFv(抗EGFR抗体)形式,制备各种抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体候选物:本实施例中,分别示例性选择实施例2和实施例1.2中制备的抗EGFR IgG和4-1BB scFv克隆,以制备IgG-scFv融合形式的抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体(一种抗原的scFv抗体片段与另一种抗原的IgG的C端融合)。当EGFR被放置在完整的IgG部分时,使用具有ADCC减少突变骨架的IgG1(N297A突变;Cancer Cell,vol.19,issue 1,pp.101-113等),当4-1BB被放置在完整的IgG部分时,使用IgG4。

[0356] 将具有编码抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体的IgG抗体重链的核苷酸序列的DNA片段1插入pcDNA 3.4(Invitrogen,A14697;质粒1),和将具有编码抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体的IgG抗体轻链的核苷酸序列的DNA片段2插入pcDNA 3.4(Invitrogen,A14697;质粒2)。其后,使用编码由(GGGGS)3组成的具有15个氨基酸长度的接头肽的DNA片段4或使用编码由(GS)9组成的具有18个氨基酸长度的接头肽的DNA片段5,将编码scFv的DNA片段3融合在对应于插入质粒1中的IgG抗体的Fc区的C端的DNA片段1的部分,以构建用于表达双特异性抗体的载体。此外,为了稳定scFv,如实施例1.2中所述,应用附加修饰以产生将VL103-VH44(VL103:VL在103位具有G→C突变;VH 44:VH在44位具有G→C突变)分别融合到轻链的C-末端和重链的C-末端的二硫键。

[0357] 在制备的双特异性抗体中,用于制备一些示例性双特异性抗体的重链、轻链、scFv和DNA片段的序列示于表22至30中。为了提高稳定性和效力、降低免疫原性等目的,可以在下面呈现的抗体中应用氨基酸序列中的一个或多个点突变。

[0358] [表22]

[0359]

EGFR(NA)x1A10 双特异性抗体-1			氨基酸序列（N'→C'）
重链组件	①抗 EGFR 抗体的重链		QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVR QSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKS QVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)
	②接头		GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 85)
	③ 抗 4-1BB 抗体的 scFv	VL	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQ LPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 33)
		接头	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWV RQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGQRNSMREFDYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 24)
	重链组件(①+②+③)		QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVR QSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKS QVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGT

[0360]

		LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGG SGGGGSGGGGSQSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSN IGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGS KSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCG TKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWV SWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDGQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 76)
轻链组件	抗 EGFR 抗体的轻链	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRT NGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESE DIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)

[0361] [表23]

[0362]

EGFR(NA)x1A10 双特异性抗体-2			氨基酸序列（N'→C'）
重链组件	①抗 EGFR 抗体的重链		QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVR QSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKS QVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)
	②接头		GSGSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 86)
	③ 抗	VL	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQ

[0363]

	4-1BB 抗体的 scFv		LPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 33)
		接头	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWV RQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGQRNSMREFDYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 24)
	重链组件(①+②+③)		QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVR QSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKS QVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSGSG SGSGSGSGSGSGSQSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSS NIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSG SKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGC GTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEW VSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARDGQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 77)
轻链组件	抗 EGFR 抗体的轻链		DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRT NGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESE DIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)

[0364] [表24]

[0365]

EGFR(NA)x1A10 M4 双特异性抗体		氨基酸序列（N'→C'）
重链组件	①抗 EGFR 抗体的重链	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSP GKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFK MNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS

[0366]

			GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK (SEQ ID NO: 74)
	②接头		GSGSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 86)
	③ 抗4-1BB 抗体的 scFv	VL	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLP GTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED EADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 33)
		接头	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQA PGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDAQRNSMREFDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO: 25)
	重链组件(①+②+③)		QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSP GKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFK MNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGKGSGSGSGSGSGSGSGSGSQSVLTQPPSASGTPGRRVTIS CSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDR FSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGC GTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWIS YSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDAQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 78)
	轻链组件	抗 EGFR 抗体的轻链	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGS PRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYY CQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC (SEQ ID NO: 75)

[0367] [表25]

[0368]

EGFR(NA)x1A10 M12 双特异性抗体			氨基酸序列（N'→C'）
重链组件	①抗 EGFR 抗体的重链		QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVR QSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKS QVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)
	②接头		GSGSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 86)
	③ 抗 4-1BB 抗体的 scFv	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQ QLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS GLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 34)
		接头	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWV RQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRNSMREFDYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 25)
	重链组件(①+②+③)		QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVR QSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKS QVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSGSG SGSGSGSGSGSGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSS NIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSG SKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGC GTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEW

		VSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 79)
轻链组件	抗 EGFR 抗体的轻链	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)

[0369]

[0370] [表26]

EGFR(NA)x1A12 双特异性抗体-1			氨基酸序列（N'→C'）
重链组件	①抗 EGFR 抗体的重链		QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)
	②接头		GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 85)
	③ 抗 4-1BB 抗体的 scFv	VL	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 33)
		接头	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 27)
	重链组件(①+②+③)		QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP

[0371]

[0372]

		PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGG SGGGGSGGGGSQSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSN IGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGS KSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCG TKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEW VSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDAAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 80)
轻链组件	抗 EGFR 抗体的轻链	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRT NGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESE DIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)

[0373] [表27]

[0374]

EGFR(NA)x1A12 双特异性抗体-2			氨基酸序列（N'→C'）
重链组件	①抗 EGFR 抗体的重链		QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQ SPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQV FFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)
	②接头		GSGSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 86)
	③ 抗 4-1BB 抗体的 scFv	VL	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQL PGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLR SEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 33)
		接头	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)

[0375]

		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVR QAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYG MDGWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 27)
	重链组件(①+②+③)		QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQ SPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQV FFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSGSGSGSGSGSGSGS GSQSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQ QLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAKH GGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 81)
轻链组件	抗 EGFR 抗体的轻链		DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTN GSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIA DYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)

[0376] [表28]

[0377]

EGFR(NA)x1A12M1 双特异性抗体		氨基酸序列（N'→C'）
重链组件	①抗 EGFR 抗体的重链	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWV RQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNS KSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ

[0378]

			YASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 74)
	②接头		GSGSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 86)
	③ 抗 4-1BB 抗体的 scFv	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQ QLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI SGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 34)
		接头	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSW VRQAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGGQKPTTKS SSAYGMDGWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 28)
	重链组件(①+②+③)		QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWV RQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNS KSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGKGSGSGSGSGSGSGSGSGSQSVLTQPPSASGTPG QRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADS HRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAT WDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYD MSWVRQAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGGQKP TTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 82)
	轻链组件	抗 EGFR 抗体的轻链	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVE SEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)

[0379] [表29]

[0380]

EGFR(WT)x1A10 M12 双特异性抗体			氨基酸序列（N'→C'）
重链组件	①抗 EGFR 抗体的重链		QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWV RQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNS KSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 73)
	②接头		GSGSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 86)
	③ 抗 4-1BB 抗体的 scFv	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQ QLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI SGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 34)
		接头	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRNSMREFD YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 25)
	重链组件(①+②+③)		QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWV RQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNS KSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGKGSGSGSGSGSGSGSGSGSQSVLTQPPSASGTPG QRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADS HRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAT WDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYD

		MSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRNSM REFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 83)
轻链组件	抗 EGFR 抗体的轻链	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVE SEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)

[0381]

[0382] [表30]

EGFR(WT)x1A12 M1 双特异性抗体			氨基酸序列（N'→C'）
重链组件	①抗 EGFR 抗体的重链		QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWV RQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNS KSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 73)
	②接头		GSGSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 86)
	③ 抗 4-1BB 抗体的 scFv	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQ QLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI SGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 34)
		接头	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSW VRQAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGGQKPTTKS SSAYGMDGWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 28)
	重链组件(①+②+③)		QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWV RQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNS KSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD

[0383]

[0384]

		KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGKGSGSGSGSGSGSGSGSGSQSVLTQPPSASGTPG QRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADS HRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAT WDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYD MSWVRQAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGGQKP TTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 84)
轻链组件	抗 EGFR 抗体的轻链	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVE SEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)

[0385] 实施例4.双特异性抗体(BsAbs)的结合亲和力测试

[0386] 4.1.与人EGFR结合

[0387] 双特异性抗体的EGFR结合亲和力参照实施例1.3(1)通过ELISA进行。

[0388] 简而言之,将96孔微量滴定板(Nunc-Immuno Plates,NUNC)用1μg/ml浓度的人EGFR-His蛋白的PBS溶液(Sino Biological,10001-H08B)以100μl/孔在4℃下包被过夜,然后用封闭缓冲液(200μl/孔的1% BSA(牛血清白蛋白(Gibco,30063572))的PBS溶液)在37℃下封闭2小时。将实施例3中制备的从0.1μM开始的六倍稀释的抗-EGFR/抗-4-1BB双特异性抗体添加到每个孔中,并在37℃温育1小时。用PBS/0.05%吐温20洗涤板,然后在37℃下与HRP缀合的Fab多克隆抗体试剂(Pierce,31414)温育1小时。洗涤后,将板用TMB(四甲基联苯胺,Sigma,T0440)底物显影,并通过分光光度计在OD 450-650nm处分析。

[0389] 获得的结果如图2a和图2b所示。如图2a和图2b所示,所有测试的抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体均可与人EGFR蛋白以高亲和力结合,这与对照抗EGFR抗体相似。

[0390] 4.2.与人4-1BB结合

[0391] 双特异性抗体的4-1BB结合亲和力参照实施例1.3(1)通过ELISA进行。

[0392] 简而言之,将96孔微量滴定板(Nunc-Immuno Plates,NUNC)用1μg/ml浓度的人4-1BB-His蛋白(Sino Biological,10041-H08H)的PBS溶液以100μl/孔在4℃下包被过夜,然后用100μl/孔的1% BSA(牛血清白蛋白(Gibco,30063572))的PBS溶液在37℃下封闭2小时。将实施例3中制备的从0.1μM开始的六倍稀释的抗-EGFR/抗-4-1BB双特异性抗体添加到每个孔中,并在37℃温育1小时。用PBS/0.05%吐温20洗涤板,然后在37℃下与HRP缀合的Fab多克隆抗体试剂(Pierce,31414)温育1小时。洗涤后,将板用TMB(四甲基联苯胺,Sigma,T0440)底物显影,并通过分光光度计在OD 450-650nm处分析。

[0393] 获得的结果如图3a和图3b所示。如图3a和图3b所示,所有测试的抗EGFR/抗4-1BB

双特异性抗体均能以高亲和力与人4-1BB蛋白结合,而抗EGFR抗体不与人4-1BB蛋白结合。

[0394] 图2a、图2b、图3a和图3b的结果在下表31中进行了量化和总结:

[0395] [表31]

[0396]

EC_{50}(nM)	EGFR	4-1BB
抗EGFR	0.054	NA
EGFR(WT)x1A10M12	0.063	0.033
EGFR(NA)x1A10	0.067	0.042
EGFR(NA)x1A10M4	0.063	0.033
EGFR(NA)x1A10M12	0.060	0.037
EGFR(WT)x1A12M1	0.068	0.058
EGFR(NA)x1A12	0.065	0.050
EGFR(NA)x1A12M1	0.055	0.060

[0397] 如表31所示,所有测试的抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体均能以高亲和力结合人EGFR和人4-1BB蛋白。

[0398] 4.3.与各种细胞表面表达的人EGFR结合

[0399] 双特异性抗体对表面上表达EGFR的各种细胞的结合亲和力参考实施例1.3(2)通过FACS分析进行。

[0400] EGFR在多种癌细胞中表达,已报道诸如在皮肤癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、胃癌、胰腺癌、头颈部癌等多种实体癌中过表达。

[0401] 在本实验中,使用了如下各种癌细胞系:A431(ATCC®CRL-1555™,表皮样癌)、BT474(ATCC®HTB-20™,导管癌)、HCC1954(ATCC®CRL-2338™,TNMIIA期,3级,导管癌),Jimt-1(DSMZ ACC 589,乳腺癌),Hela(ATCC®CCL-2™,宫颈腺癌),DLD-1(ATCC®CCL-221™,Dukes C型,结直肠腺癌)、Kato III(ATCC®HTB-103™,胃癌)、NCI-N87(ATCC®CRL-5822™,人胃癌)、MDA-MB-231(ATCC®HTB-26™,人乳腺癌)、CFPAC-1(ATCC®CRL-1918™,胰腺导管腺癌)、Panc-1(ATCC®CRL-1469™,胰腺上皮样癌)、A253(ATCC®HTB-41™,颌下腺表皮样癌)、Detroit562(ATCC®CCL-138™,咽癌),FaDu(ATCC®HTB-43™,咽鳞状细胞癌)、SCC9(ATCC®CRL-1629™,舌鳞状细胞癌)、SCC15(ATCC®CRL-1623™,舌鳞状细胞癌)、SCC25(ATCC®CRL-1628™,舌鳞状细胞癌)。对于所述细胞系,使用本发明的抗体通过FACS(FACSCalibur,BD Biosciences)分析与EGFR的结合。

[0402] 具体而言,将各细胞系解离并在PBS中洗涤后,计数细胞数并设定为$2x10^5$个细胞/200μl FACS缓冲液,然后以10μg/mL处理抗EGFRx4-1BB抗体,并在4℃下反应1小时。反应后,将细胞在FACS缓冲液中洗涤,然后将FITC标记的恒定区(Fc)特异性抗体(山羊抗人IgG FITC缀合物,Fc特异性,Sigma,F9512,浓度:2.0mg/ml)悬浮于2μl/$1x10^5$个细胞/200μl FACS缓冲液中,4℃下反应1小时。反应后,在FACS缓冲液中洗涤细胞,使用FACSCalibur装置进行分析。阴性对照组仅用FITC标记的恒定区(Fc)特异性抗体处理。为了比较癌细胞系中EGFR的表达程度,将实验组峰移结果除以阴性对照组峰移结果(平均荧光强度比MFI比:测试抗体的MFI/第二抗体的MFI)。

[0403] 所得结果如下表32所示:

[0404] [表32]

[0405]

癌细胞系		MFI 比		
		抗 EGFR	EGFRx1A10	EGFRx1A12
皮肤癌	A431	153	148	148
乳腺癌	BT474	4	4	4
	HCC1954	11	11	11
	Jimt-1	14	14	14
	MDA-MB-231	24	24	24
宫颈癌	Hela	10	10	10
结肠癌	DLD-1	8	8	8
胃癌	Kato III	7	7	7
	NCI-N87	7	7	7
胰腺癌	CFPAC-1	13	12	12
	Panc-1	22	21	21
头颈部癌	A253	40	41	40
	Detroit562	14	14	13
	FaDu	ND	32	34
	SCC9	17	19	18
	SCC15	49	51	50
	SCC25	25	25	24

[0406]

[0407] (MFI比:第一抗体的MFI/第二抗体的MFI)(ND:未确定)

[0408] 如表32所示,所有测试的抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体都可以结合细胞表面表达的人EGFR蛋白。

[0409] 实施例5.BsAbs与4-1BB(SPR)的结合亲和力

[0410] 在SPR实验中,在其上已通过胺偶联固定了抗人Fab抗体(GE Healthcare,28958325)的Biocore®Series S Sensor Chip CM5(GE Healthcare,BR100530)上,在流动池2、3和4上分别捕获抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体,保持流动池1作为参考。重组人4-1BB蛋白(ACROBiosystems,41B-H5227)以400、200、100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56和0.78nM的浓度以30μl/min流过芯片300秒,随后进行400秒的解离阶段。用10mM甘氨酸-HCl(pH 2.0)(GE Healthcare,BR100355)进行再生。

[0411] 所得结果如下表33所示:

[0412] [表33]

[0413]

抗体	KD(M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
EGFR(WT)x1A10 M12	2.43E-09	2.89E+05	7.03E-04
EGFR(NA)x1A10M12	2.85E-09	2.87E+05	8.15E-04
EGFR(WT)x1A12M1	1.34E-08	5.15E+04	6.89E-04
EGFR(NA)x1A12M1	1.97E-08	3.35E+04	6.58E-04

[0414] 如表33所示,测试的抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体显示高4-1BB结合亲和力。

[0415] 实施例6.4-1BB信号活化

[0416] 6.1.BsAbs对比单特异性抗体

[0417] 在本实施例中,为了测量4-1BB信号活化,使用经遗传改造以稳定表达人4-1BB和响应元件下游的荧光素酶的GloResponseTM NFκB-luc2/4-1BB Jurkat细胞系(Promega)作为效应细胞,使用表达或不表达EGFR的癌细胞作为靶细胞。简而言之,将MDA-MB-231(表达EGFR;2.5X10^{4}个细胞)或BT-474(不表达EGFR;2.5X10^{4}个细胞)作为靶细胞在96孔测定板中铺板并培养过夜。在测定当天,将待测试的抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体(实施例3;100nM或4nM,5倍稀释)和效应Jurkat细胞(2.5X10^{4}细胞)添加到板中。温育6小时后,添加Bio-GloTM试剂(Promega)并使用酶标仪测量发光。

[0418] 所得结果如下图4a(MDA-MB-231细胞系)和4b(BT-474细胞系)所示。在图4a和4b中,BMUR(BMS的乌瑞芦单抗,美国专利第7,288,638号)表示用于比较激动活性的抗4-1BB抗体。如图4a和4b所示,抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体仅在与EGFR高表达细胞共培养时才导致4-1BB信号的强烈活化。Fc交联的抗4-1BB单克隆抗体显示出最小的活性。

[0419] 6.2.各种EGFR表达细胞中的4-1BB活化

[0420] 在本实施例中,为了测量4-1BB信号活化,使用经遗传改造以稳定表达人4-1BB和响应元件下游的荧光素酶的GloResponseTM NFκB-luc2/4-1BB Jurkat细胞系(Promega)作为效应细胞,使用表达或不表达EGFR的癌细胞作为靶细胞。简而言之,将表达EGFR(A-431、HCC1954、Calu-3、DLD-1、SK-BR-3、NCI-N87、MDA-MB-231、Panc-1)或不表达EGFR(CHO-k1、SW620、MC38、Jurkat)的癌细胞(每个2.5x10^{4}个细胞/孔)在96孔测定板中铺板并培养过夜。在测定当天,将待测试的抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体(实施例3;100nM或4nM,5倍稀释)和效应Jurkat细胞添加到板中。温育6小时后,添加Bio-Glo^{TM}试剂并使用酶标仪测量发光。

[0421] 获得的结果如图5a-5h(EGFR表达细胞)和图6a-6d(EGFR不表达细胞)所示。如图5a-5h和6a-6d所示,抗EGFR/抗4-1BB仅在与EGFR表达细胞共培养时,双特异性抗体才会导致4-1BB信号的强烈活化。

[0422] 6.3.EGFR定量

[0423] 根据制造商的建议,使用QIFIKIT定量试剂盒(Dako)对各种癌细胞系的EGFR细胞表面表达水平进行定量。简而言之,细胞用饱和浓度的未标记的抗EGFR小鼠单克隆抗体(Abcam)或纯化的小鼠IgG2b同种型对照(Abcam)染色。洗涤后,试剂盒中的染色细胞和校准珠同时用试剂盒中的相同FITC缀合的山羊抗小鼠IgG二抗进行标记。在流式细胞仪上分析标记的细胞和校准珠。使用来自校准珠的MFI值进行线性回归。从该回归线外推ABC(抗体结合能力),并且通过用抗EGFR抗体的ABC减去同种型对照抗体的ABC来确定sABC(特异性ABC)。

[0424] 所得结果如表34所示。

[0425] [表34]

[0426]

细胞系		EGFR sABC
A-431	ATCC, CRL-1555	682,147
PANC-1	ATCC, CRL-1469	197,813
MDA-MB-231	ATCC, HTB-26	134,628
HCC1954	ATCC, CRL-2338	48,486
Calu-3	ATCC, HTB-55	45,666
DLD-1	ATCC, CCL-221	20,509
SK-BR-3	ATCC, HTB-30	19,778
NCI-N87	ATCC, CRL-5822	9,968
SW620	ATCC, CCL-227	137
CHO-K1	ATCC, CCL-61	22
JURKAT	ATCC, TIB-152	13
MC38	Kerafast, NH204	4

[0427] 如表34所示,测定了9个癌细胞系的sABC。

[0428] 6.4.EGFR sABC与4-1BB诱导的NF-kB信号传导之间的相关性

[0429] 将实施例6.3中测量的EGFR水平标准化为MDA-MB231表达的EGFR水平。在实施例6.2的4-1BB NF-kB萤光素酶报告基因测定中,双特异性抗体的4-1BB活化水平被确定为与对照相比的最大倍数变化水平。共有区域表示线性拟合的置信区间。

[0430] 获得的结果如图7a-7c所示。如图7a-7c所示,与BMUR相比,抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体对4-1BB的活化显示出与EGFR细胞表面表达的强相关性(图7c)。

[0431] 实施例7.T细胞免疫应答

[0432] 7.1.对细胞因子释放的影响

[0433] 为了测试双特异性抗体刺激人外周血单核细胞(PBMC)反应的能力,测量了上清液中IFN-γ的浓度。使用抗人CD3抗体(BioLegend,5ug/mL)刺激的人PBMC作为效应细胞。使用表达EGFR的DLD-1细胞作为靶细胞。在该系统中,PBMC在人抗CD3抗体的存在下与DLD-1共培养。将双特异性抗体(实施例3)(从20nM(=4ug/mL)开始,稀释10次(dose))和它们的对应单特异性抗体(从26.67nM(=4ug/mL)开始,稀释10次)添加到混合培养物中。在具有5%CO_2的湿润室中于37℃培养72小时后,通过人IFN-γQuantikine试剂盒(R&D system,SIF50)测量上清液中IFN-γ的浓度。

[0434] 获得的结果如图8a和8b所示。如图8a和8b所示,在EGFR高表达细胞存在下,所有测试的双特异性抗体比每种单克隆抗体的组合诱导更多的细胞因子释放。

[0435] 7.2.对靶细胞生长的影响

[0436] 为了测试双特异性抗体刺激人PBMC反应的能力,使用了靶细胞裂解试验。用人抗CD3抗体刺激的人PBMC用作效应细胞。使用表达EGFR的DLD-1细胞作为靶细胞。在该系统中,PBMC在人抗CD3抗体(BioLegend,5ug/mL)的存在下与DLD-1共培养。将双特异性抗体(从20nM(=4ug/mL)开始,稀释10次)和它们的对应单特异性抗体(从26.67nM(=4ug/mL)开始,稀释10次)添加到混合培养物中。培养后,通过细胞计数试剂盒8(Dojindo,CK04-20)测量DLD-1的存活率。

[0437] 获得的结果如图9a-9d所示。如图9a-9d所示,与存在EGFR高表达细胞的每种单特异性抗体的组合相比,所有测试的双特异性抗体都显示出优越的癌细胞死亡活性。

[0438] 实施例8.携带DLD-1的hPBMC移植小鼠中的体内抗肿瘤功效

[0439] 为了测试抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体的体内抗肿瘤功效,使用了PBMC人源化NPG小鼠。6-8周龄的NPG小鼠静脉注射1x10^7个人PBMC,并在PBMC注射后5天将5x10^6个DLD-1癌细胞接种到小鼠的右胁腹。在肿瘤植入后第6天,根据肿瘤体积,将携带DLD-1的人源化小鼠随机分配到每个测试组(n=8/组),每组的平均肿瘤体积约为85mm^3。人IgG1对照抗体、西妥昔单抗、乌瑞芦单抗和抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体ET(NA)x1A10以10或60mg/kg的剂量每周两次腹膜内施用。在实验过程中,用数显卡尺测量肿瘤大小,当肿瘤体积达到3000mm^3或发生体重比治疗开始时减轻超过20%时,对动物进行安乐死。

[0440] 生存率结果如图10所示。如图10所示,乌瑞芦单抗引起的副作用包括体重减轻以及轻微的抗肿瘤作用。而用60mg/kg剂量的ET(NA)X1A10治疗的小鼠比应用其他治疗的小鼠表现出更优越的存活率。

[0441] 实施例9.4-1BB敲入小鼠中的体内抗肿瘤功效

[0442] 9.1.抗肿瘤活性

[0443] 已在人EGFR/MC38荷瘤4-1BB敲入小鼠(Biocytogen)中评估了抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体的体内抗肿瘤功效。人EGFR/MC38细胞系由SIRION BIOTECH基于MC38-WT生成,EGFR表达得到证实。将5x10^5个EGFR/MC38细胞接种到小鼠的右胁腹。在肿瘤接种后第8天,根据肿瘤体积(约80mm^3),将小鼠随机分配到每个测试组(n=5/组)。人IgG1抗体、西妥昔单抗和抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体(ET(WT)x1A10 M12、ET(NA)x1A10 M12)以10mg/kg的剂量每周两次向小鼠腹膜内施用,持续4周。用数显卡尺测量肿瘤大小。

[0444] 得到的结果如图11所示。如图11所示,与西妥昔单抗相比,抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体在人EGFR/MC38肿瘤中显示出优越的抗肿瘤功效。大多数用ET(WT)x1A10 M12和ET(NA)x1A10 M12治疗的小鼠已被治愈。

[0445] 9.2.对肿瘤特异性记忆T细胞的效果的评价

[0446] 在肿瘤注射后100天,用人EGFR/MC38肿瘤细胞(Biocytogen)和B16F10肿瘤细胞(ATCC)再次攻击ET(WT)x1A10 M12和ET(NA)x1A10 M12治愈的小鼠。在再次攻击研究期间,未给小鼠施用任何药物。用数显卡尺测量肿瘤大小。

[0447] 得到的结果如图12所示。如图12所示,未观察到人EGFR/MC38肿瘤发展。此外,EGFR(WT)x1A10 M12和EGFR(NA)x1A10 M12治疗抑制了B16F10肿瘤的生长。

[0448] 实施例10.抗体依赖性细胞毒性(ADCC)活性(NA骨架对比WT)

[0449] 10.1.NK细胞介导的ADCC

[0450] 在本实施例中,使用人外周血来源的CD56+NK细胞作为效应细胞,使用CellTrace Violet(Thermo Fisher Scientific)标记的表达EGFR的DLD-1细胞(ATCC)作为靶细胞。在37℃下,以5:1的效应物靶标比将细胞与50nM抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体(实施例3)共培养。4小时后,用死活细胞鉴定染料(Fixable Viability Dye)(eBioscienceTM)对细胞进行染色,然后通过流式细胞术分析死亡靶细胞的比例。

[0451] 得到的结果如下图13所示。如图13所示,抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体的IgG1型(WT)显示出由NK细胞介导的显著ADCC效应。

[0452] 10.2.4-1BB信号活化依赖于Fc γ RIIb参与

[0453] 在本实施例中,将表达FcγRIIb(Promega)的CHO-K1细胞铺在96孔测定板中并培养过夜。在测定当天,将Jurkat/4-1BB细胞(Promega)铺在96孔板中。在表达FcγRIIb(Promega)的CHO-K1细胞存在(依赖于FcγRIIb)或不存在(不依赖于FcγRIIb)的情况下,用一定滴度的抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体温育细胞。诱导6小时后,添加Bio-Glo™萤光素酶检测试剂并使用SpectraMax L光度计(Molecular Devices)测定发光。用GraphPad Prism®软件进行四参数逻辑曲线分析。

[0454] 所得结果示于下表35(FcγRIIb依赖性4-1BB生物测定)和表36(FcγRIIb非依赖性4-1BB生物测定)以及图14a(FcγRIIb依赖性4-1BB生物测定)和图14b(FcγRIIb非依赖性4-1BB生物测定)中。

[0455] [表35]

[0456]

FcγRIIb 依赖性 4-1BB 生物测定		
	诱导倍数(RLU)	EC_{50} (nM)
乌瑞芦单抗	189.7	0.2395
EGFR(WT)X1A10 M12	< 2	不适用
EGFR(NA)X1A10 M12	< 2	不适用

[0457]

EGFR(WT)X1A12 M1	< 2	不适用
EGFR(NA)X1A12 M1	< 2	不适用

[0458] [表36]

[0459]

FcγRIIb 非依赖性 4-1BB 生物测定		
	诱导倍数(RLU)	EC_{50} (nM)
乌瑞芦单抗	14.11	0.5369
EGFR(WT)X1A10 M12	< 2	不适用
EGFR(NA)X1A10 M12	< 2	不适用
EGFR(WT)X1A12 M1	< 2	不适用
EGFR(NA)X1A12 M1	< 2	不适用

[0460] 如表35和表36以及图14a和图14b所示,根据Fc γ RIIb CHO-K1细胞的存在,乌瑞芦单抗治疗组显示出顶部RLU的14.2倍的差异和EC_{50}的2.3倍差异。与乌瑞芦单抗相比,无论是否存在Fc γ RIIb CHO-K1细胞,四种抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体显示出非常低的RLU。这些数据表明,与临床研究(NCT00309023、NCT00612664、NCT014712210)中具有重度毒性的乌瑞芦单抗相比,所有测试的抗EGFR/抗4-1BB双特异性抗体都具有潜在的益处。

[0461] 本文引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请和专利,均以相同的程度通过引用并入本文,其程度就好像每个参考文献单独且具体地指示通过引用并入并在本文中全文阐述一样。

[0462] 除非本文另有说明或与上下文明显矛盾,否则在描述本发明的上下文中(特别在后文权利要求上下文中)所使用的术语“一个/一种(a/an)”、“所述(the)”和“至少一个”、“一种或多种”以及类似的指代词应解释为涵盖单数和复数两者。除非本文另有说明或与上下文明显矛盾,否则在一个或多个项目的清单之前所使用的术语“至少一个”(或“一种或多

种”)(例如,“A和B中的至少一个”)应解释为意指选自所列项目的一个项目(A和B)或者两个或更多个所列项目的任意组合(A和B)。除非另有说明,否则术语“包括”、“具有”、“包含”和“含有”将被解释为开放式术语(即,意思是“包括但不限于”)。除非本文另外指出,否则本文中对数值范围的叙述仅仅旨在用作单独指代落入范围内的各独立数值的一种速记方法,并且各独立数值包含在说明书内,如同其在本文中单独叙述一样。除非本文另有说明或另与上下文明显矛盾,否则可以任意合适的顺序进行本文所述的所有方法。除非另外要求保护,否则本文所提供的任意和所有实施例或者示例性语言(例如,“例如”)的使用仅仅旨在更好地说明本发明而不提出对本发明范围的限制。说明书中任何语言均不应解释为将任何未要求保护的要素表示对实施本发明是必要的。

[0463] 本文描述了本发明的优选实施方式,包括本发明人已知的进行本发明的最佳方式。通过阅读前述说明书,那些优选的实施方式的变体对于本领域技术人员来说会变得明显。本发明人预期本领域技术人员适当使用这些变体,并且本发明人意图使本发明以并不限于本文具体描述的另外方式实施。因此,本发明包括本文所附权利要求中所述的主题的所有修改和等同方案,如适用的法律所允许的。此外,除非本文另有说明或另与上下文明显矛盾,否则本发明涵盖上述要素以其所有可能的变体的任意组合。

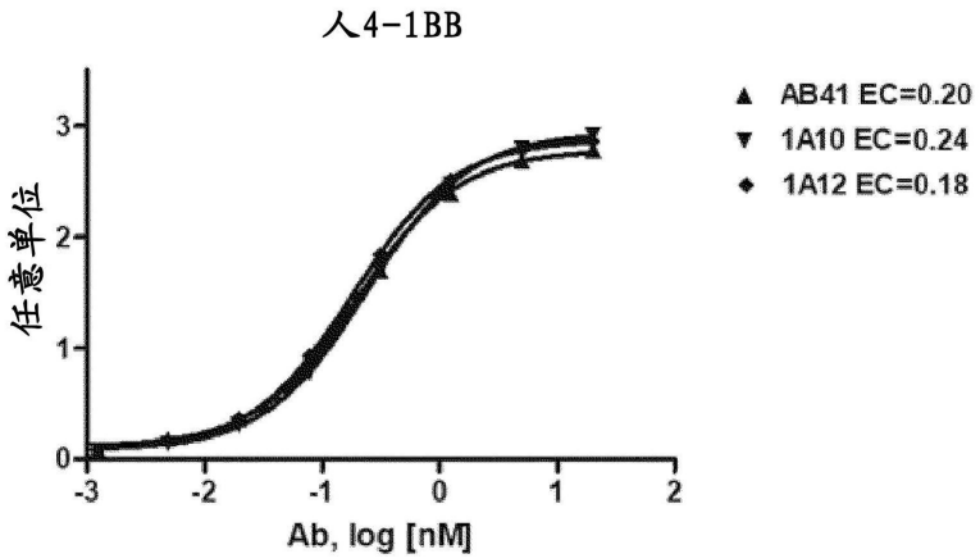

人4-1BB
AB41 EC=0.20
1A10 EC=0.24
1A12 EC=0.18
任意单位
Ab, log [nM]

图1a

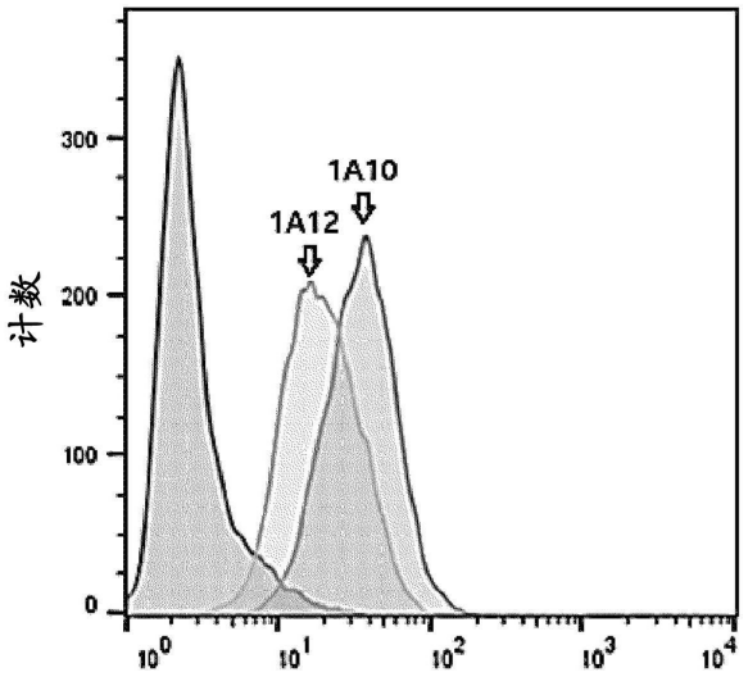

1A10
1A12
计数

图1b

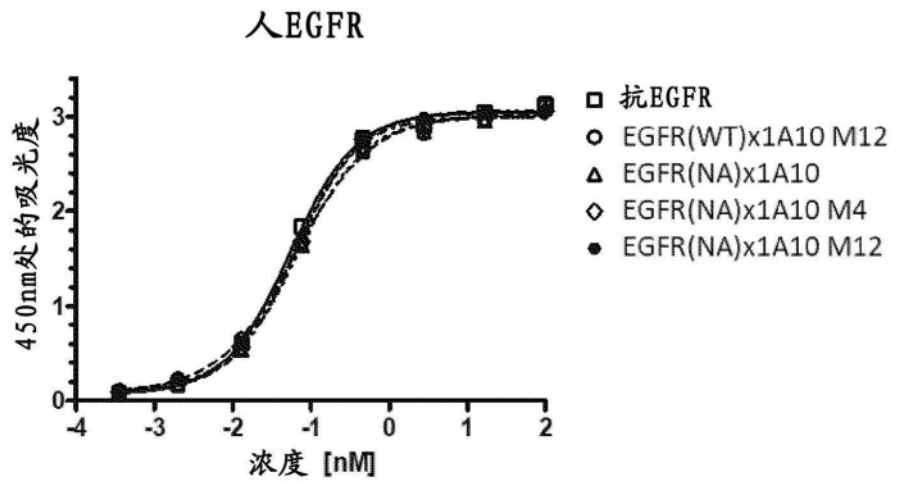

人EGFR
450nm处的吸光度
浓度 [nM]
抗EGFR
EGFR(WT)x1A10 M12
EGFR(NA)x1A10
EGFR(NA)x1A10 M4
EGFR(NA)x1A10 M12

图2a

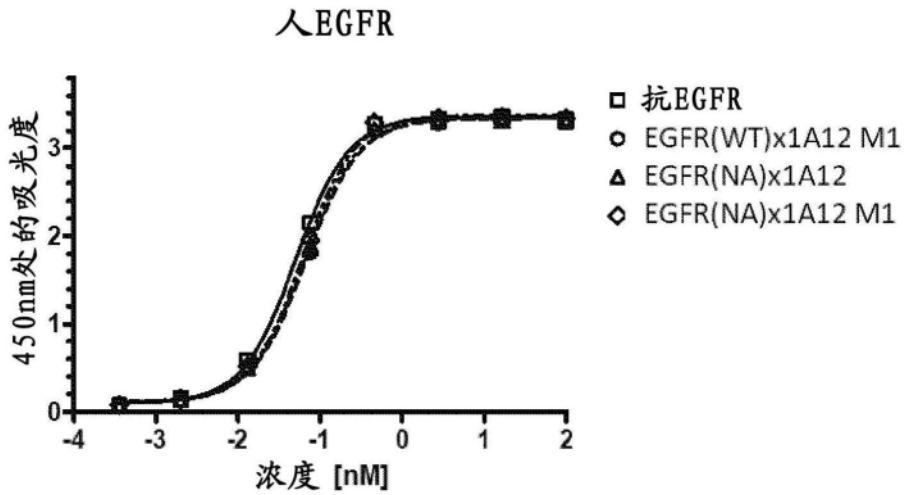

人EGFR
450nm处的吸光度
浓度 [nM]
抗EGFR
EGFR(WT)x1A12 M1
EGFR(NA)x1A12
EGFR(NA)x1A12 M1

图2b

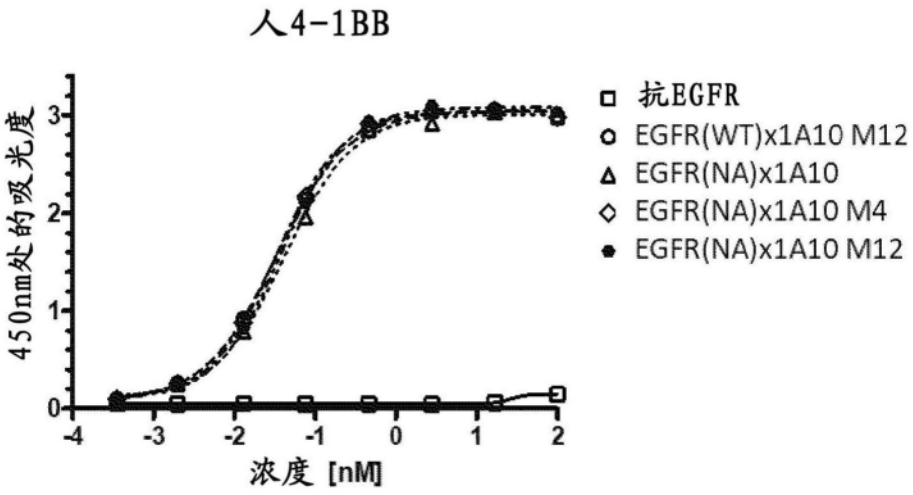

人4-1BB
450nm处的吸光度
浓度 [nM]
抗EGFR
EGFR(WT)x1A10 M12
EGFR(NA)x1A10
EGFR(NA)x1A10 M4
EGFR(NA)x1A10 M12

图3a

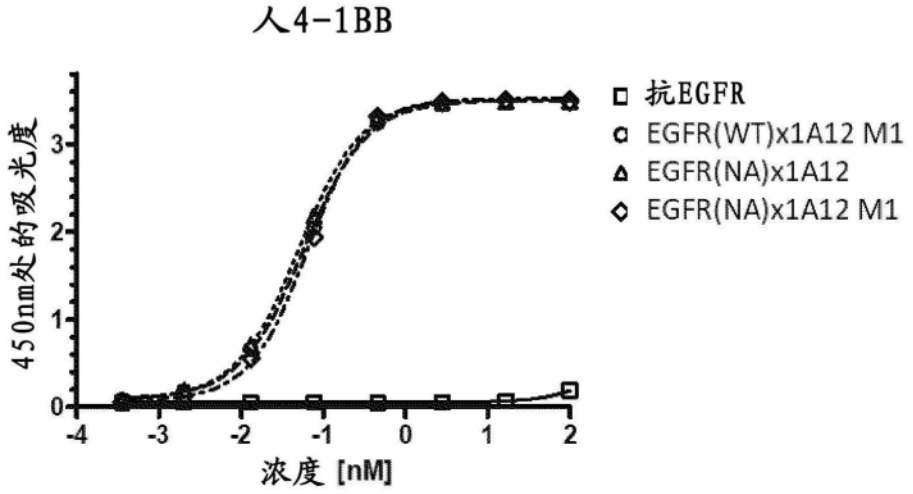

人4-1BB
450nm处的吸光度
浓度 [nM]
抗EGFR
EGFR(WT)x1A12 M1
EGFR(NA)x1A12
EGFR(NA)x1A12 M1

图3b

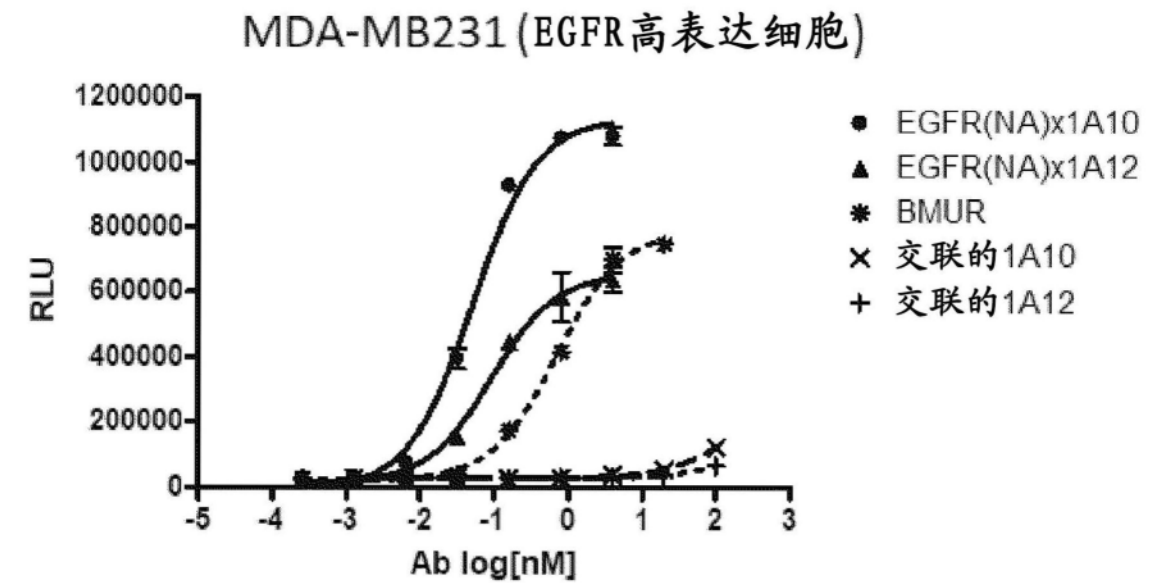

MDA-MB231 (EGFR高表达细胞)
RLU
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
Ab log[nM]
EGFR(NA)x1A10
EGFR(NA)x1A12
BMUR
交联的1A10
交联的1A12

图4a

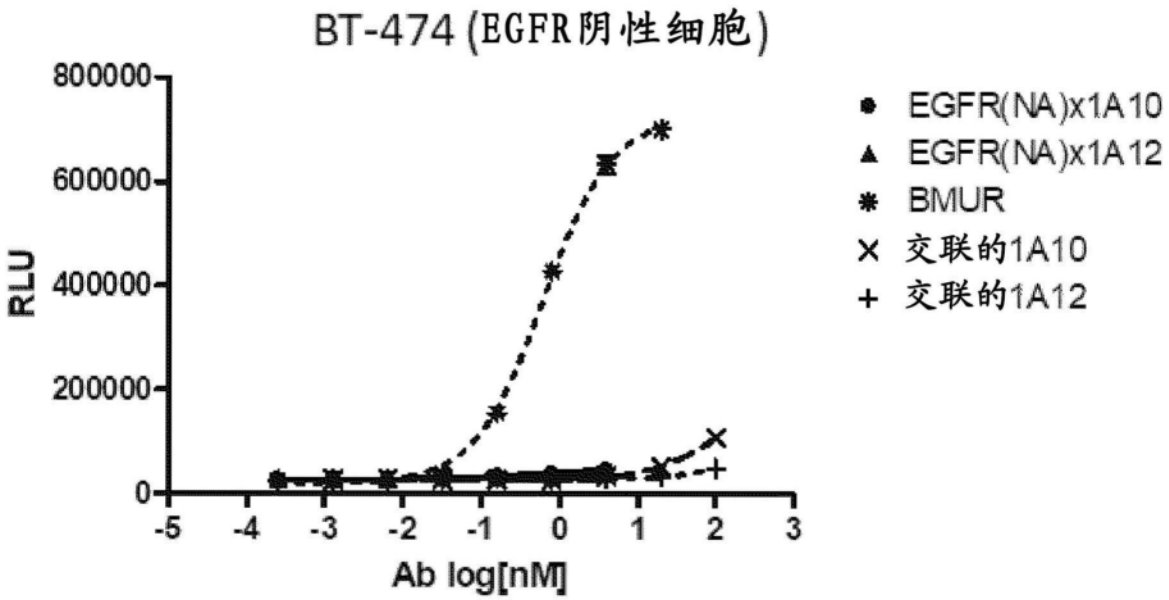

BT-474 (EGFR阴性细胞)
RLU
800000
600000
400000
200000
0
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
Ab log[nM]
EGFR(NA)x1A10
EGFR(NA)x1A12
BMUR
交联的1A10
交联的1A12

图4b

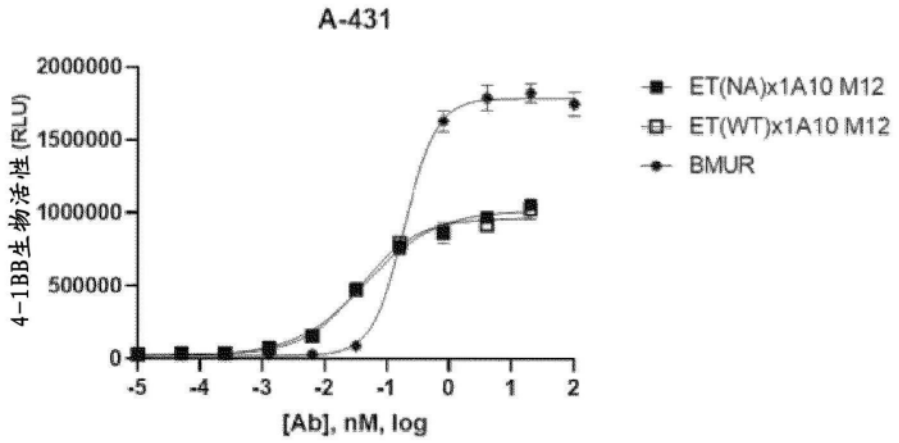

A-431
4-1BB生物活性 (RLU)
2000000
1500000
1000000
500000
0
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
[Ab], nM, log
ET(NA)x1A10 M12
ET(WT)x1A10 M12
BMUR

图5a

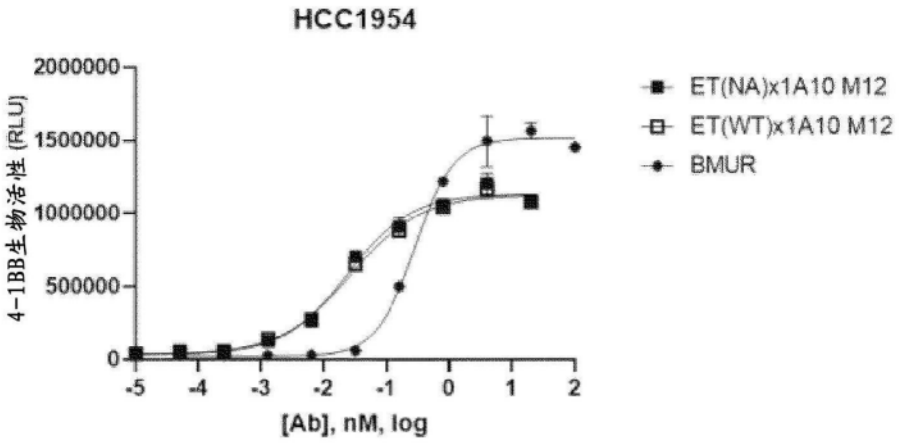

HCC1954
4-1BB生物活性 (RLU)
2000000
1500000
1000000
500000
0
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
[Ab], nM, log
ET(NA)x1A10 M12
ET(WT)x1A10 M12
BMUR

图5b

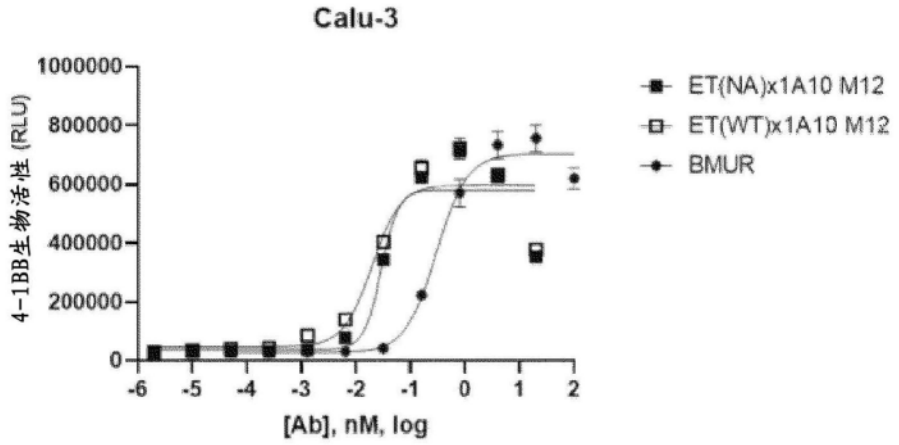

Calu-3
4-1BB生物活性 (RLU)
1000000
800000
600000
400000
200000
0
-6
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
[Ab], nM, log
ET(NA)x1A10 M12
ET(WT)x1A10 M12
BMUR

图5c

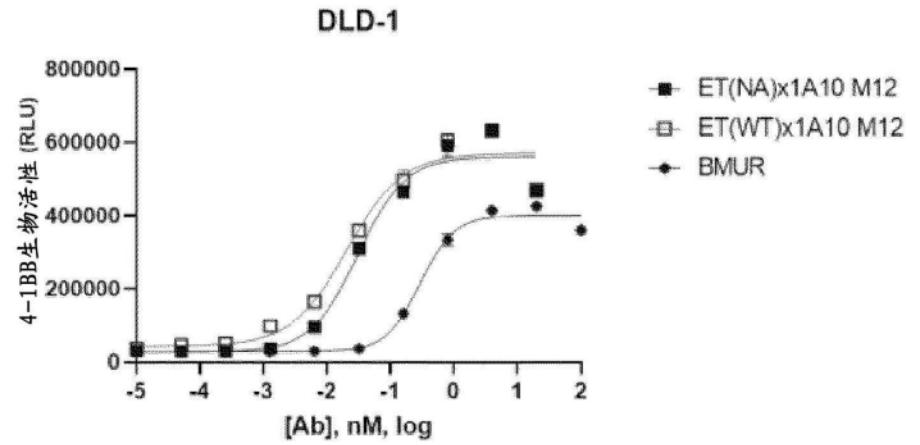

DLD-1
4-1BB生物活性 (RLU)
800000
600000
400000
200000
0
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
[Ab], nM, log
ET(NA)x1A10 M12
ET(WT)x1A10 M12
BMUR

图5d

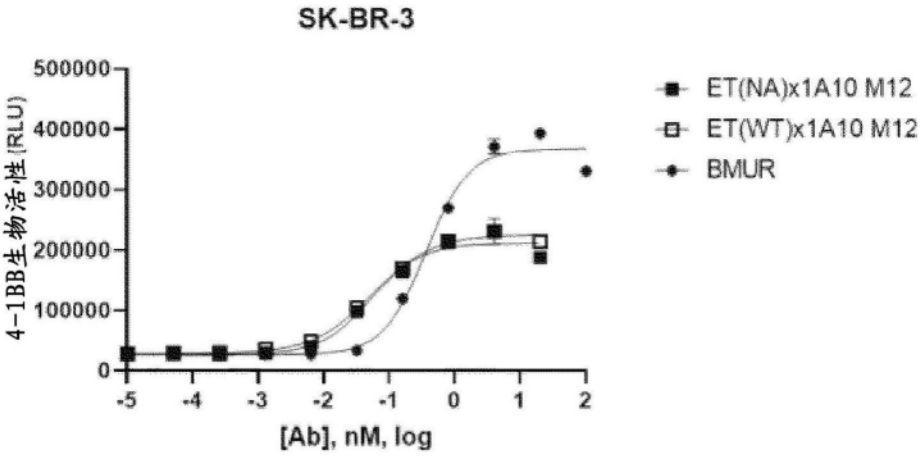

SK-BR-3
4-1BB生物活性 (RLU)
500000
400000
300000
200000
100000
0
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
[Ab], nM, log
ET(NA)x1A10 M12
ET(WT)x1A10 M12
BMUR

图5e

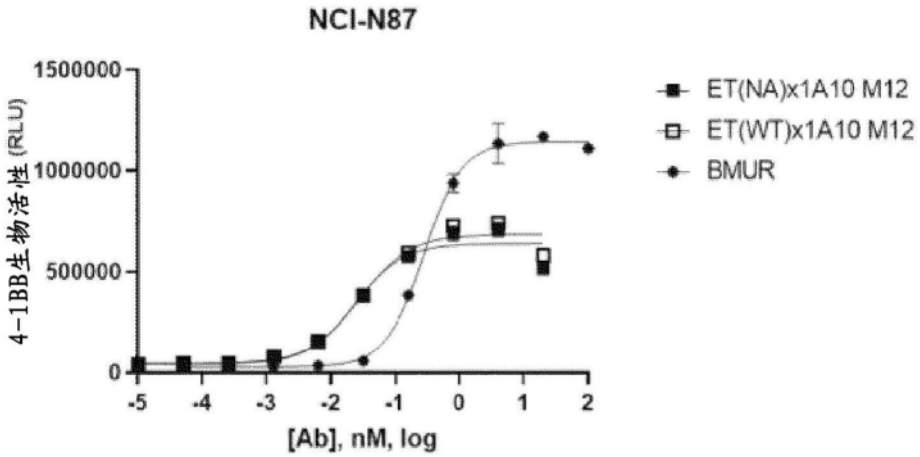

NCI-N87
4-1BB生物活性 (RLU)
1500000
1000000
500000
0
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
[Ab], nM, log
ET(NA)x1A10 M12
ET(WT)x1A10 M12
BMUR

图5f

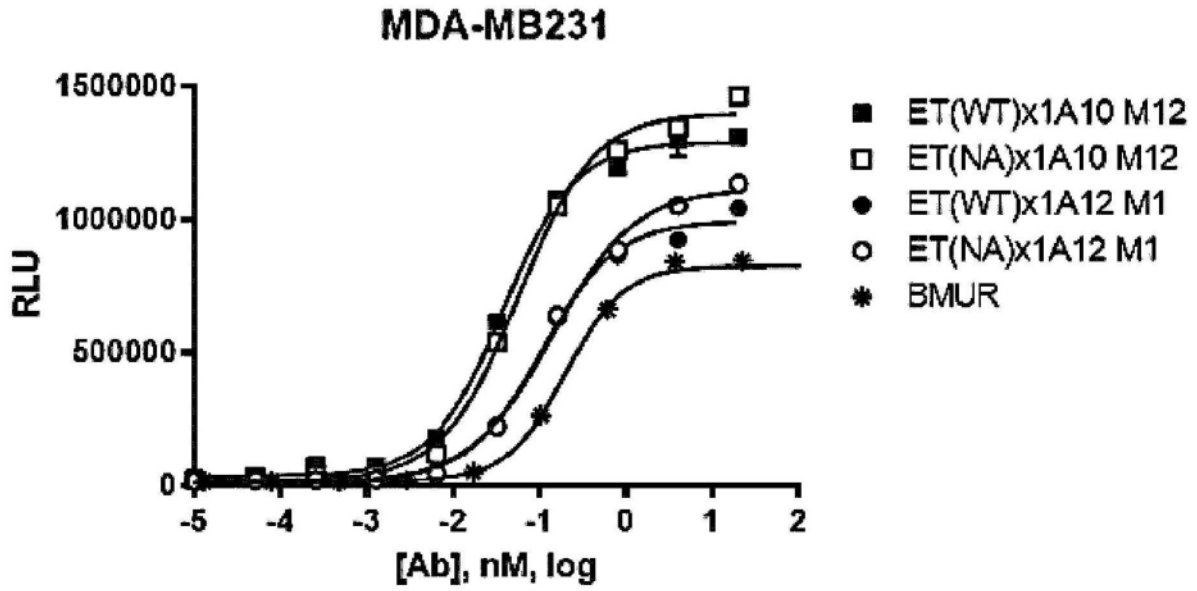

MDA-MB231
1500000
1000000
500000
0
RLU
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
[Ab], nM, log
ET(WT)x1A10 M12
ET(NA)x1A10 M12
ET(WT)x1A12 M1
ET(NA)x1A12 M1
BMUR

图5g

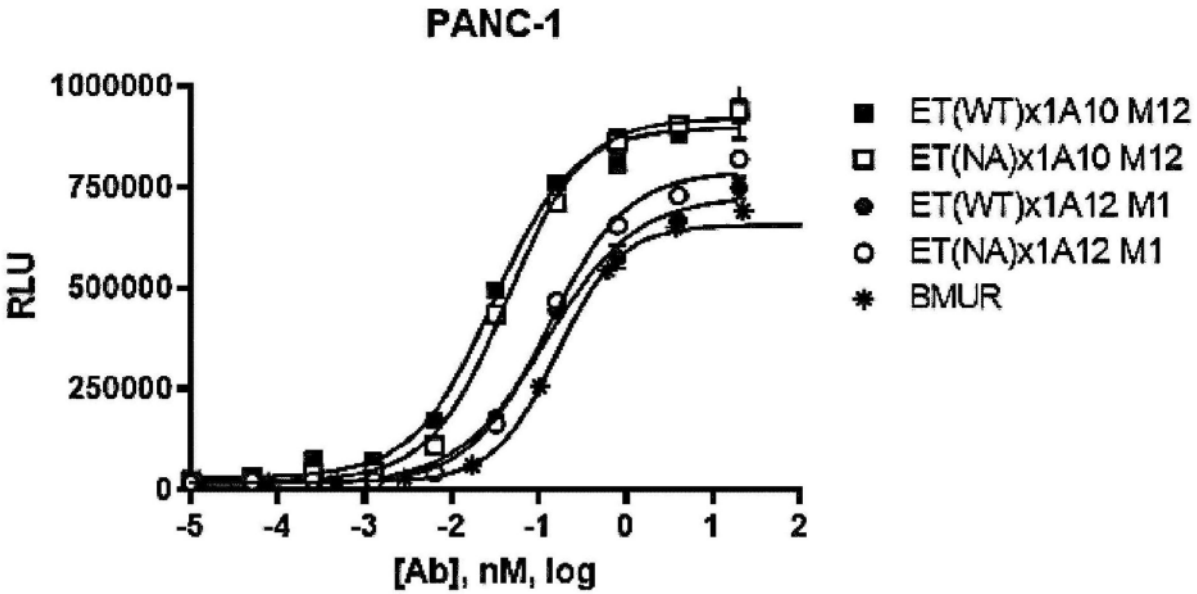

PANC-1
1000000
750000
500000
250000
0
RLU
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
[Ab], nM, log
ET(WT)x1A10 M12
ET(NA)x1A10 M12
ET(WT)x1A12 M1
ET(NA)x1A12 M1
BMUR

图5h

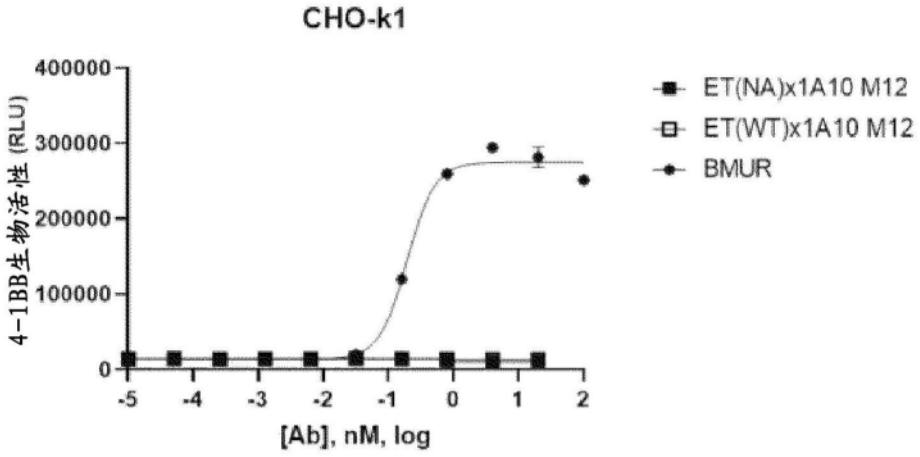

CHO-k1
4-1BB生物活性 (RLU)
400000
300000
200000
100000
0
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
[Ab], nM, log
ET(NA)x1A10 M12
ET(WT)x1A10 M12
BMUR

图6a

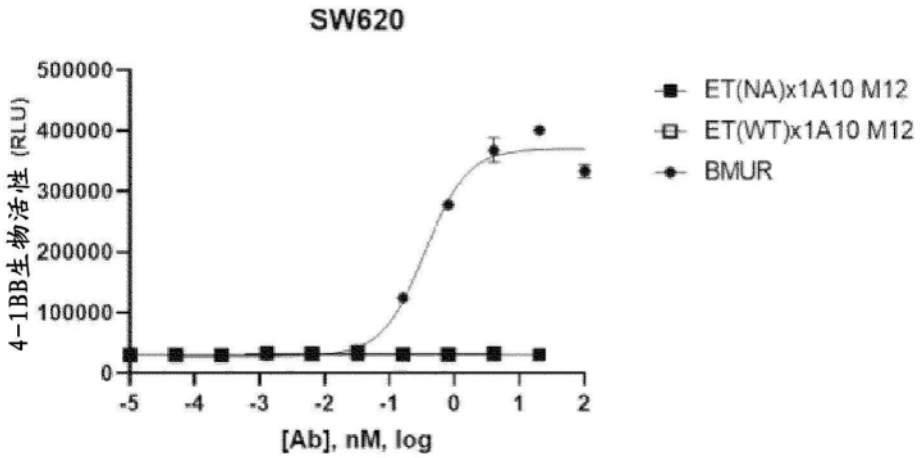

SW620
4-1BB生物活性 (RLU)
500000
400000
300000
200000
100000
0
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
[Ab], nM, log
ET(NA)x1A10 M12
ET(WT)x1A10 M12
BMUR

图6b

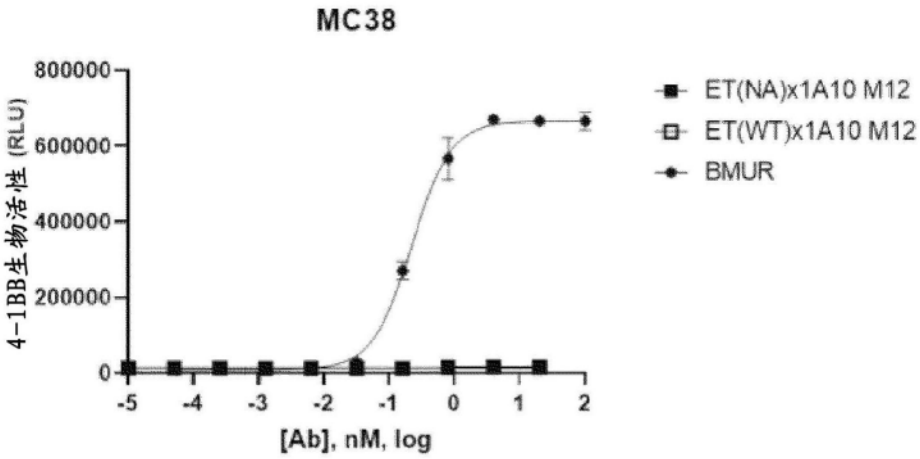

MC38
4-1BB生物活性 (RLU)
800000
600000
400000
200000
0
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
[Ab], nM, log
ET(NA)x1A10 M12
ET(WT)x1A10 M12
BMUR

图6c

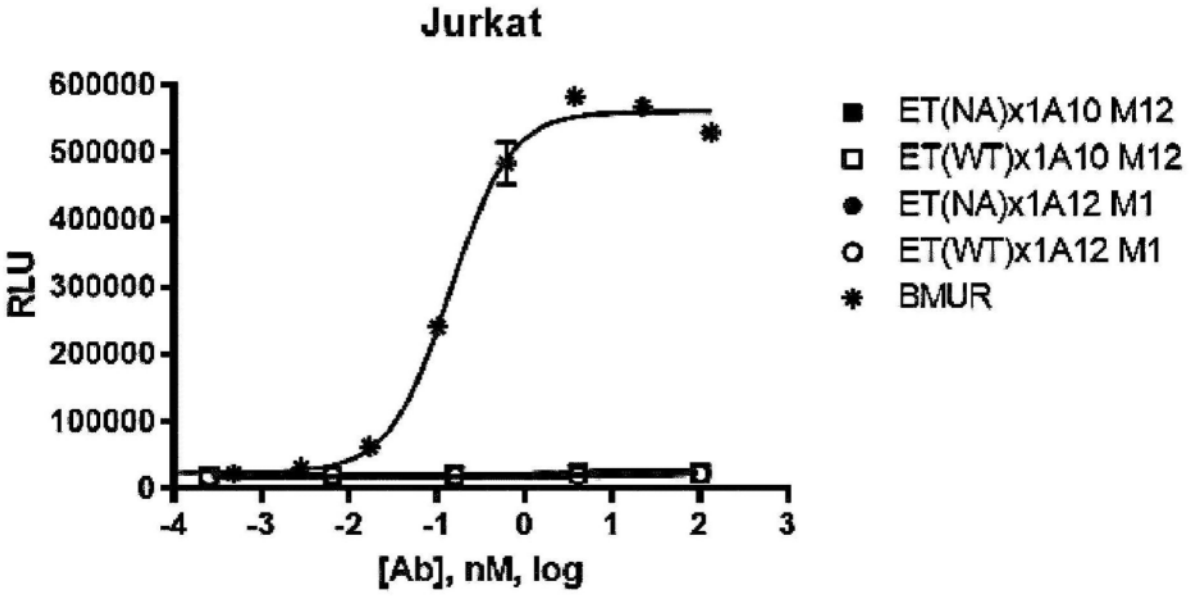

Jurkat
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
RLU
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
[Ab], nM, log
ET(NA)x1A10 M12
ET(WT)x1A10 M12
ET(NA)x1A12 M1
ET(WT)x1A12 M1
BMUR

图6d

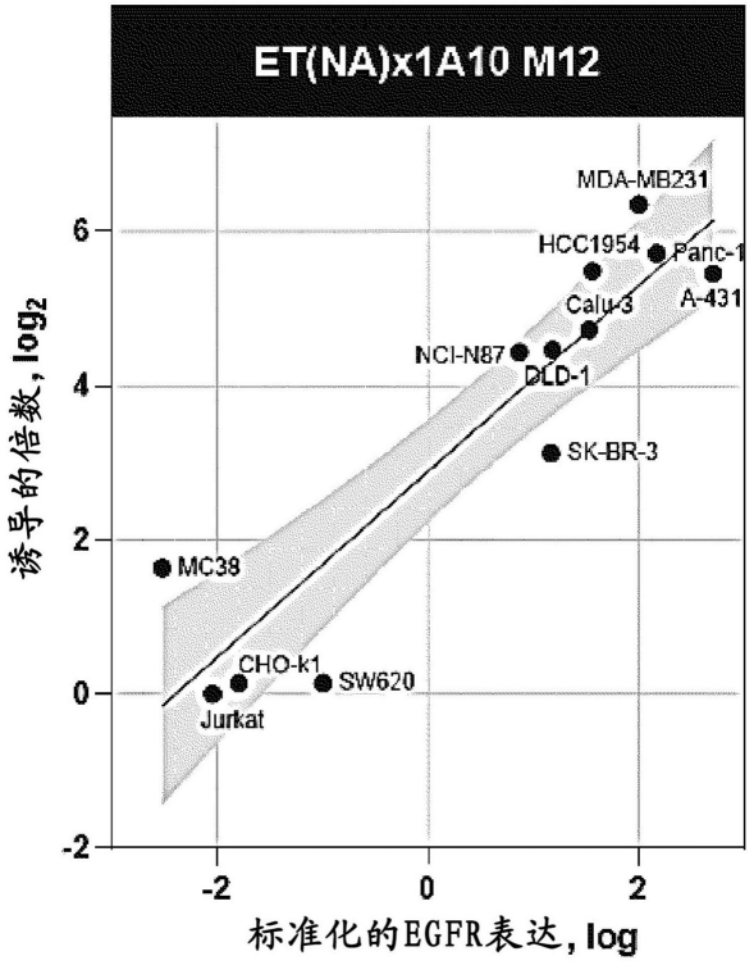

ET(NA)x1A10 M12
MDA-MB231
HCC1954
Panc-1
A-431
Calu-3
NCI-N87
DLD-1
SK-BR-3
MC38
CHO-k1
SW620
Jurkat
6
4
2
0
-2
-2
0
2
诱导的倍数, log2
标准化的EGFR表达, log

图7a

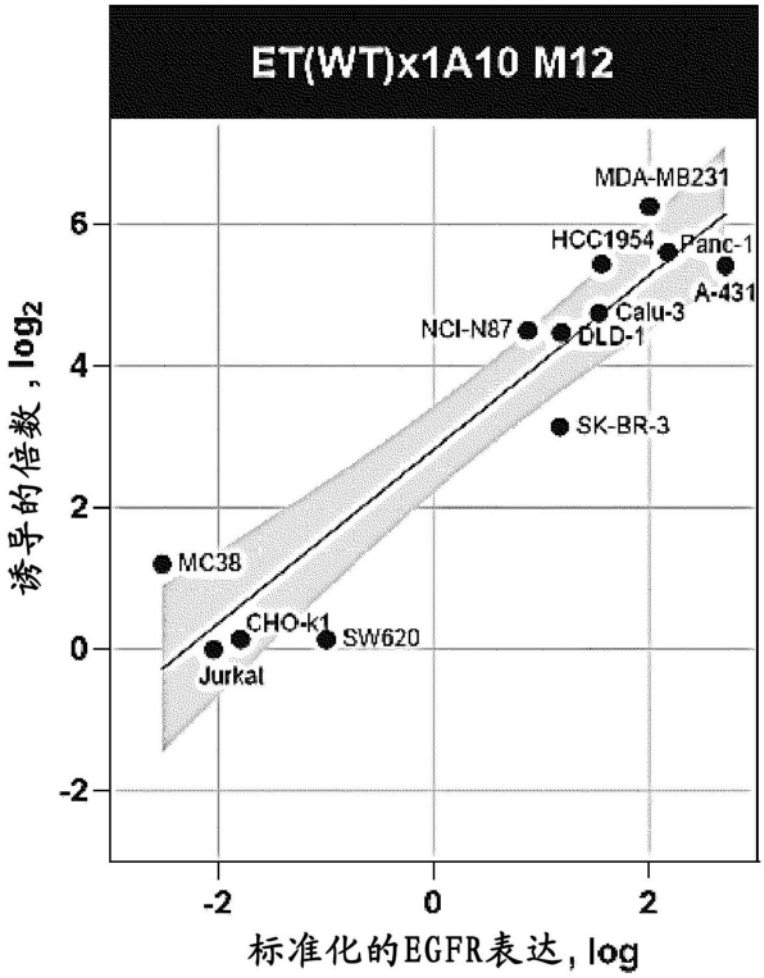

ET(WT)x1A10 M12
MDA-MB231
HCC1954
Panc-1
A-431
Calu-3
NCI-N87
DLD-1
SK-BR-3
MC38
CHO-k1
SW620
Jurkat
6
4
2
0
-2
-2
0
2
诱导的倍数，log2
标准化的EGFR表达，log

图7b

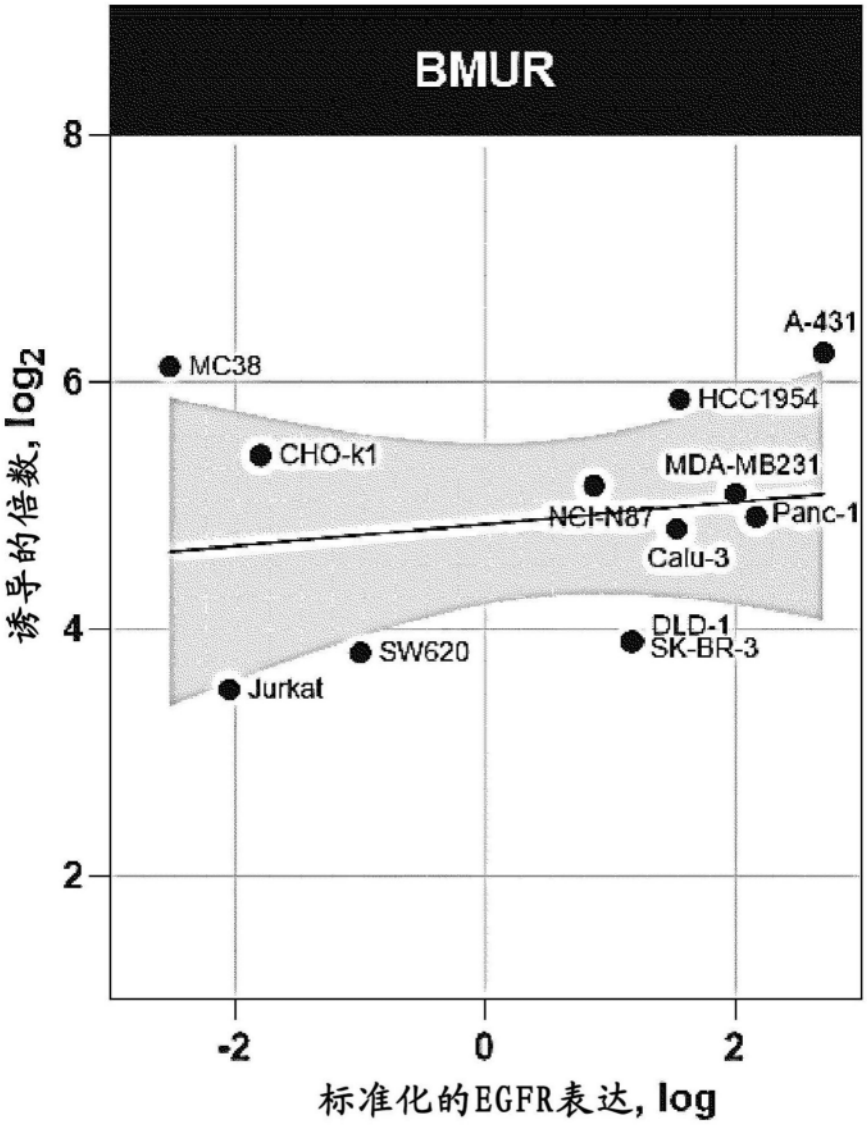

BMUR
8
6
4
2
-2
0
2
诱导的倍数, log2
标准化的EGFR表达, log
A-431
MC38
HCC1954
CHO-k1
MDA-MB231
NCI-N87
Panc-1
Calu-3
DLD-1
SK-BR-3
SW620
Jurkat

图7c

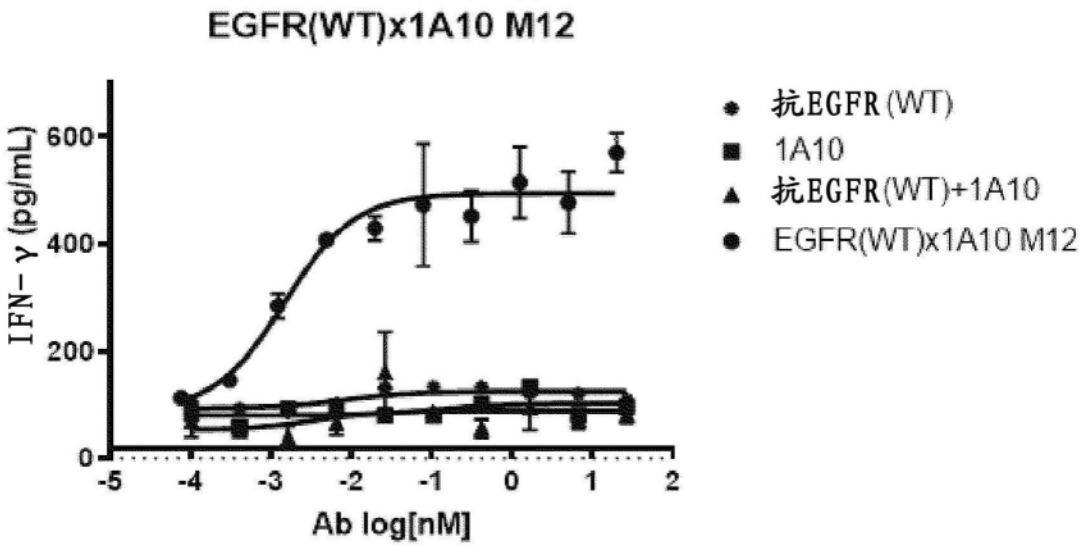

EGFR(WT)x1A10 M12
IFN-γ (pg/mL)
600
400
200
0
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Ab log[nM]
抗EGFR(WT)
1A10
抗EGFR(WT)+1A10
EGFR(WT)x1A10 M12

图8a

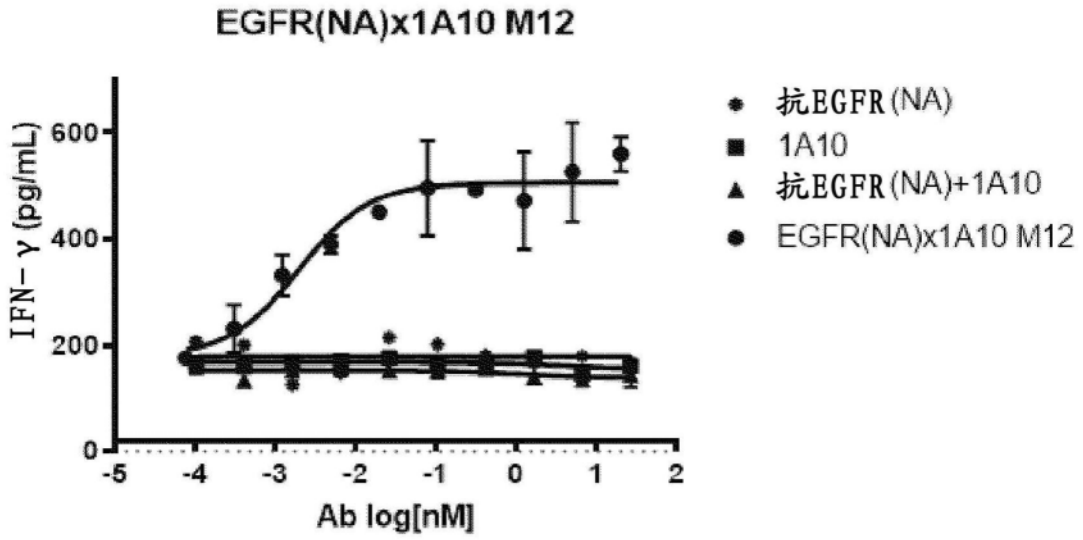

EGFR(NA)x1A10 M12
IFN-γ (pg/mL)
600
400
200
0
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Ab log[nM]
抗EGFR(NA)
1A10
抗EGFR(NA)+1A10
EGFR(NA)x1A10 M12

图8b

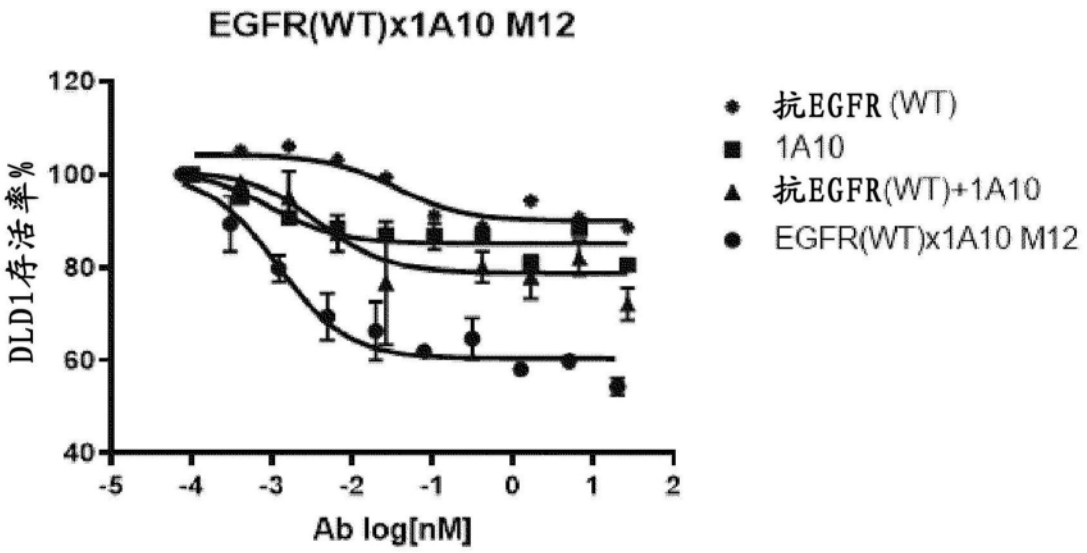

EGFR(WT)x1A10 M12
DLD1存活率%
120
100
80
60
40
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Ab log[nM]
抗EGFR (WT)
1A10
抗EGFR(WT)+1A10
EGFR(WT)x1A10 M12

图9a

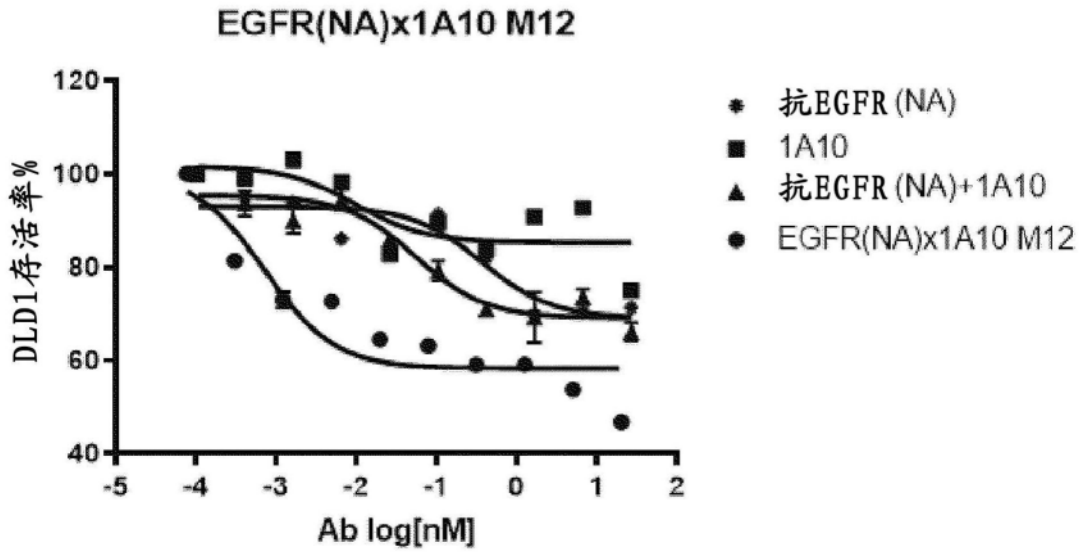

EGFR(NA)x1A10 M12
DLD1存活率%
120
100
80
60
40
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Ab log[nM]
抗EGFR (NA)
1A10
抗EGFR (NA)+1A10
EGFR(NA)x1A10 M12

图9b

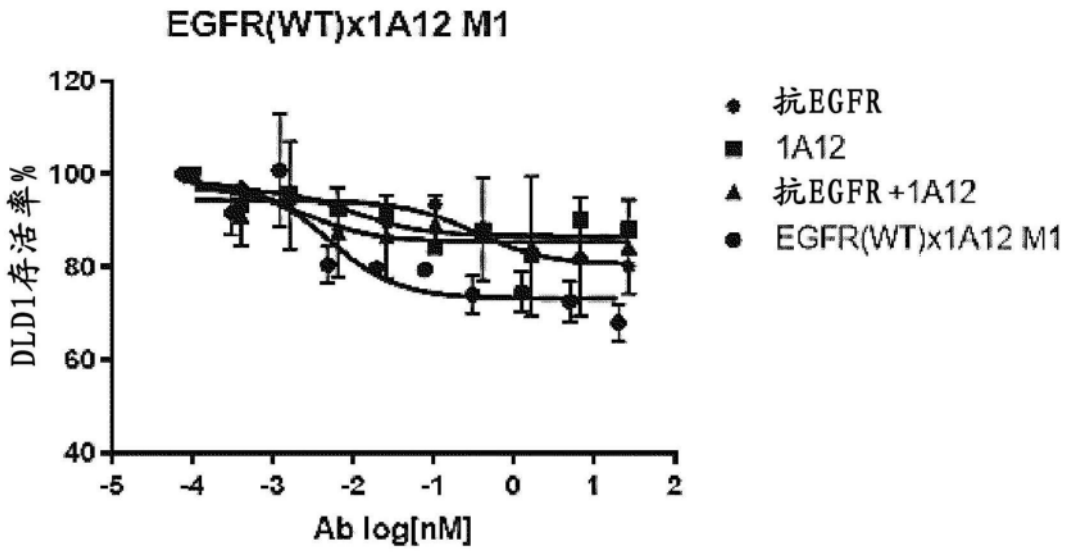

EGFR(WT)x1A12 M1
DLD1存活率%
120
100
80
60
40
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Ab log[nM]
抗EGFR
1A12
抗EGFR+1A12
EGFR(WT)x1A12 M1

图9c

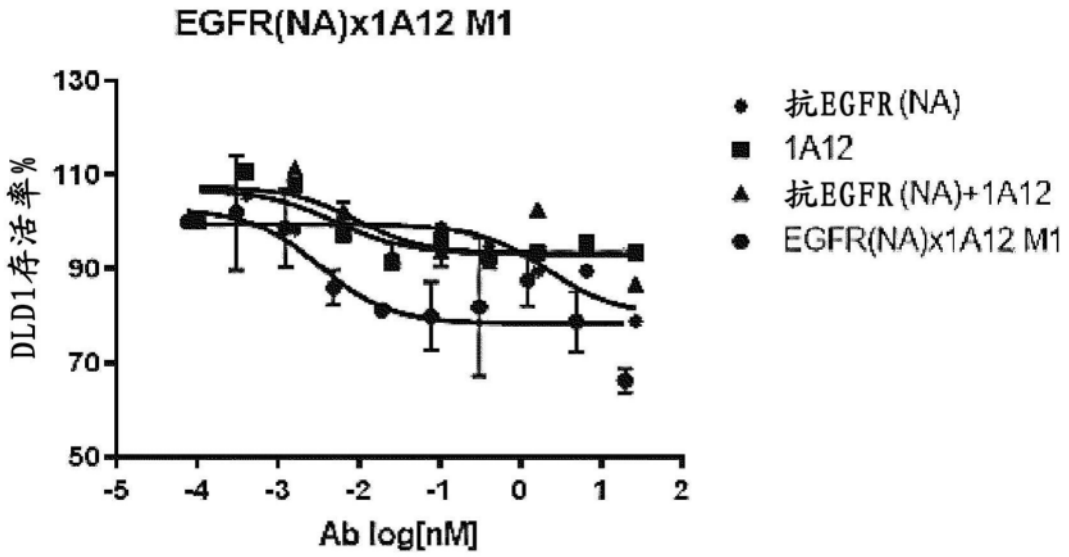

EGFR(NA)x1A12 M1
DLD1存活率%
130
110
90
70
50
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Ab log[nM]
抗EGFR(NA)
1A12
抗EGFR(NA)+1A12
EGFR(NA)x1A12 M1

图9d

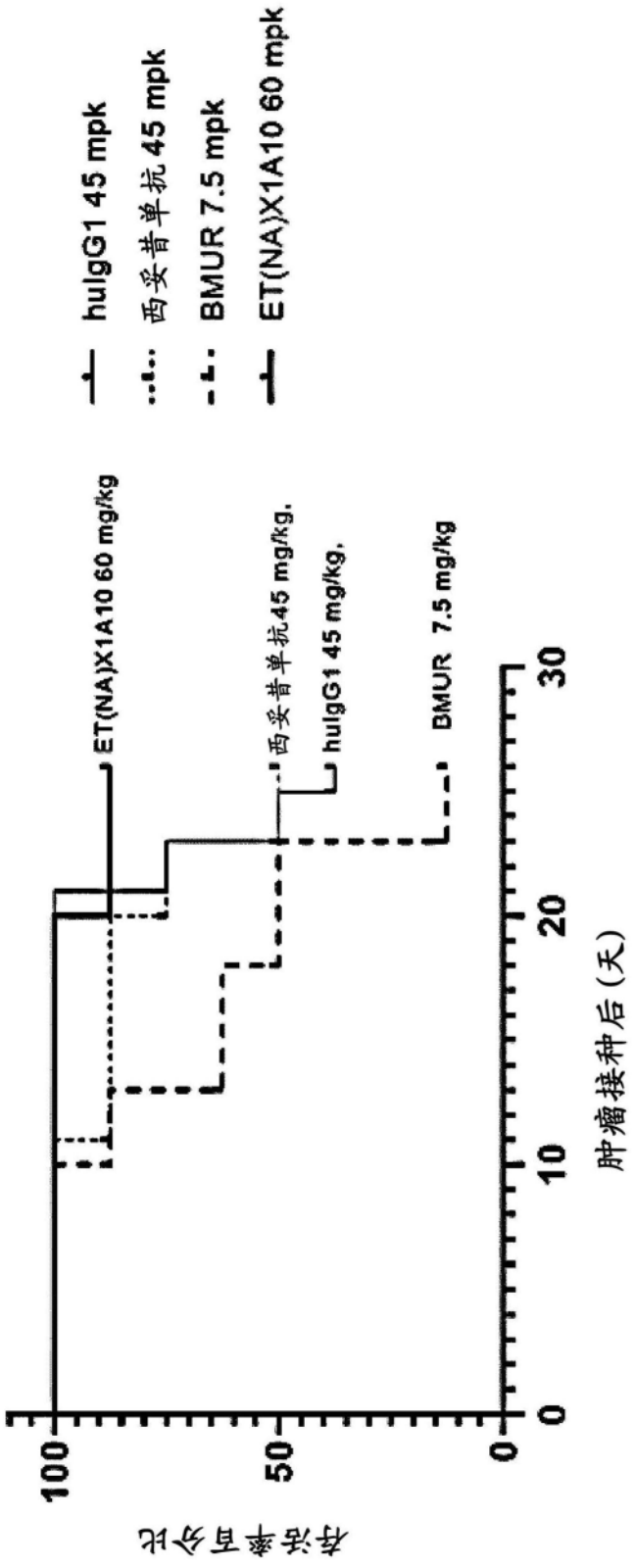
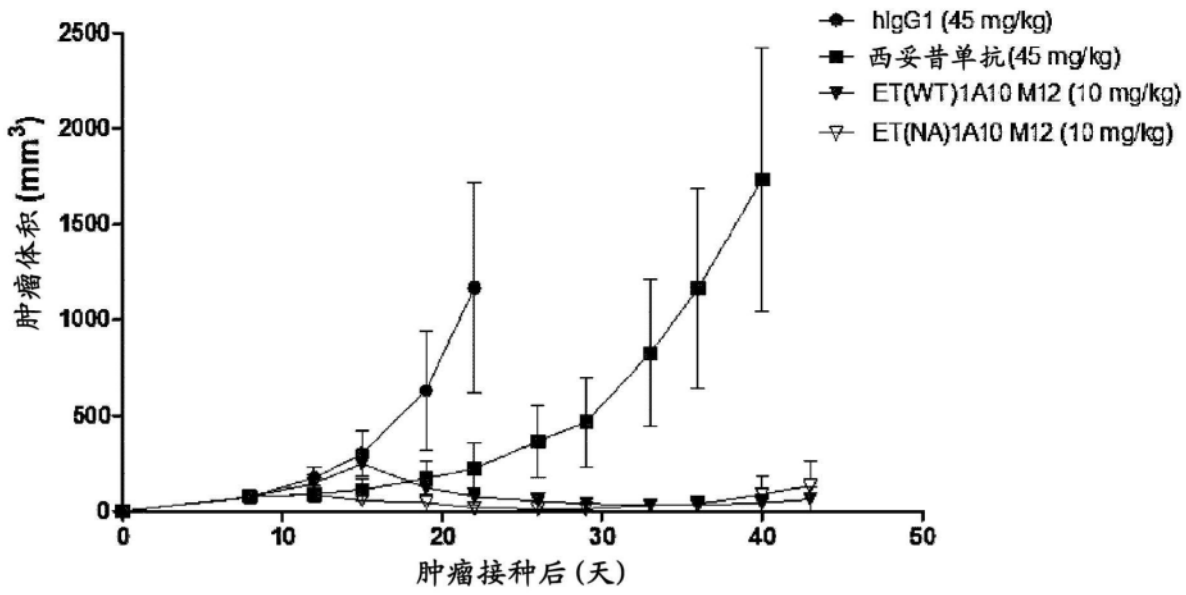

hulgG1 45 mpk
西妥昔单抗 45 mpk
BMUR 7.5 mpk
ET(NA)X1A10 60 mpk
ET(NA)X1A10 60 mg/kg
西妥昔单抗45 mg/kg,
hulgG1 45 mg/kg,
BMUR 7.5 mg/kg
100
50
0
0
10
20
30
存活率百分比
肿瘤接种后(天)

图10



(平均值 ± SEM (n=5/组), *; p<0.01, **; p<0.01, ***; p<0.001 相对于hIgG1对照)

图11a

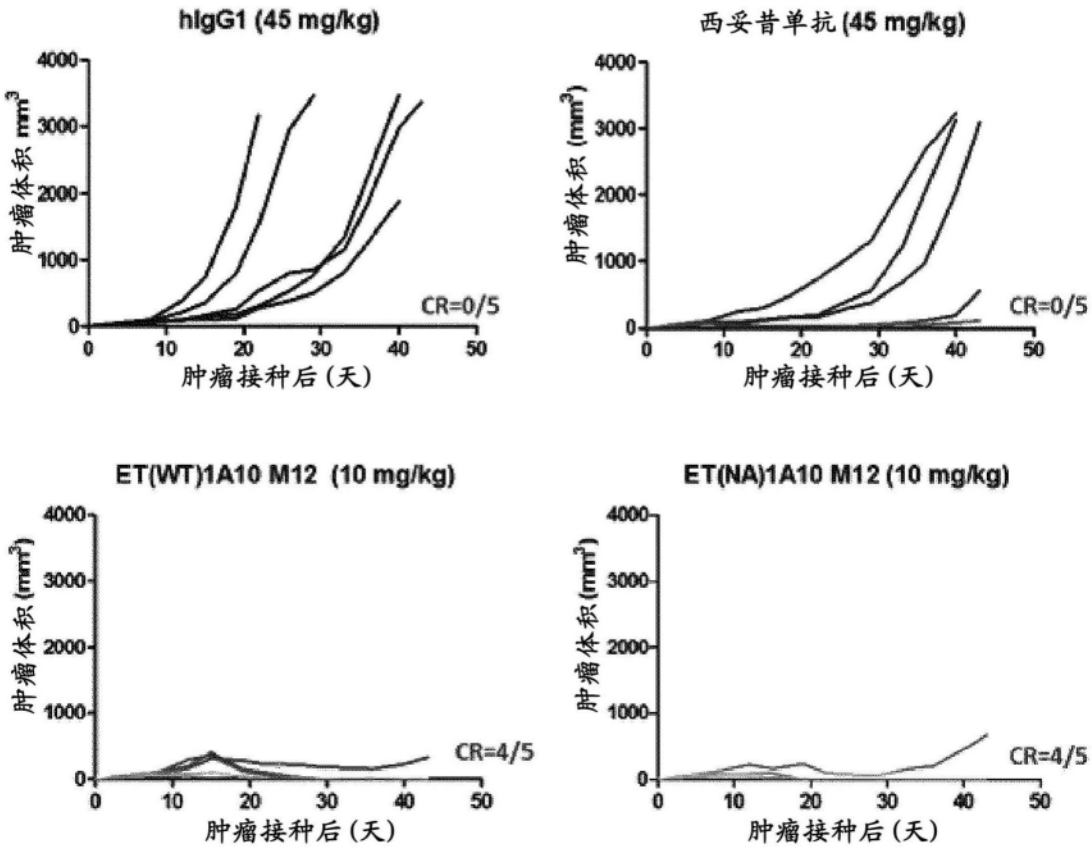


图11b

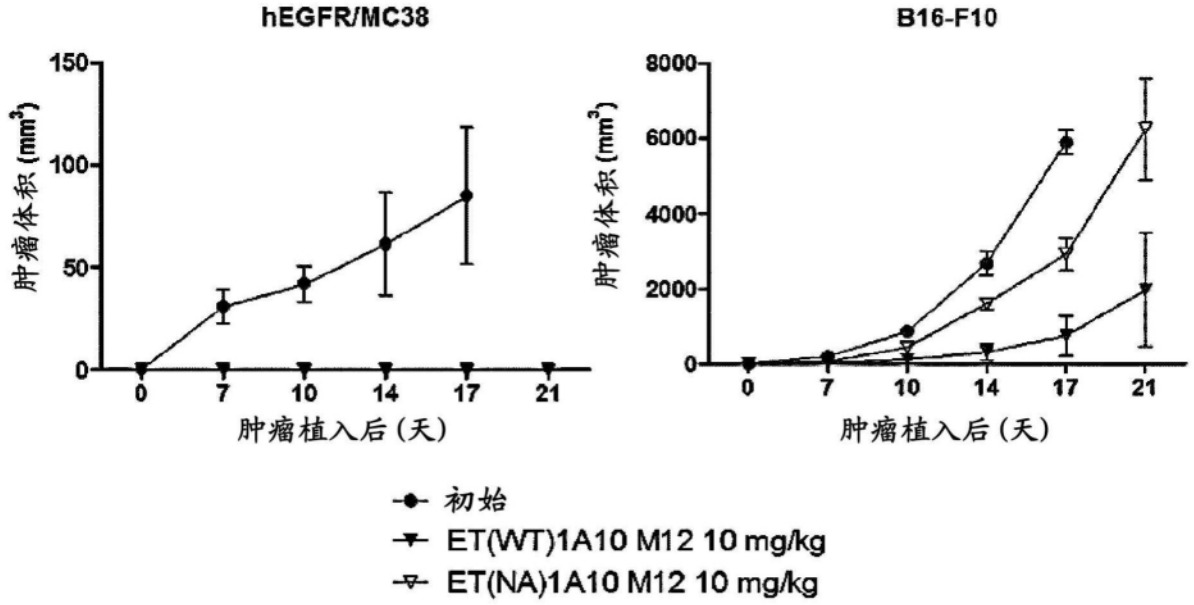

hEGFR/MC38
B16-F10
肿瘤体积 (mm³)
肿瘤植入后 (天)
初始
ET(WT)1A10 M12 10 mg/kg
ET(NA)1A10 M12 10 mg/kg

图12

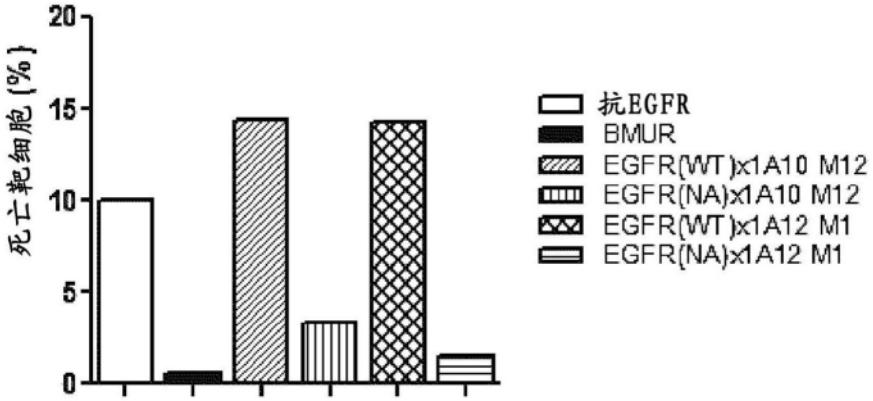

死亡靶细胞 (%)
抗EGFR
BMUR
EGFR(WT)x1A10 M12
EGFR(NA)x1A10 M12
EGFR(WT)x1A12 M1
EGFR(NA)x1A12 M1

图13

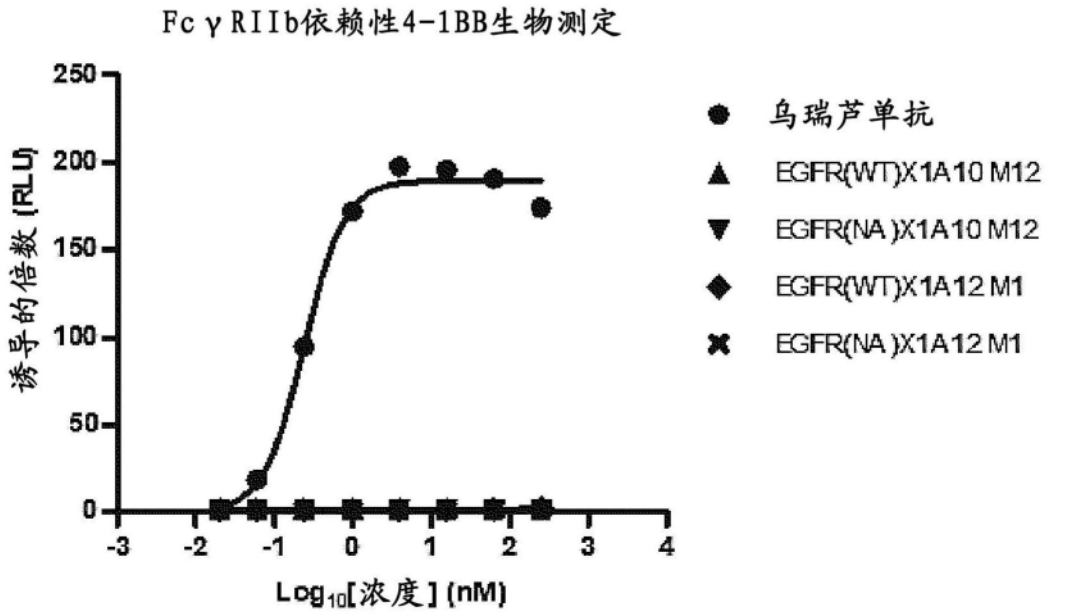

FcγRIIb依赖性4-1BB生物测定
250
200
150
100
50
0
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
诱导的倍数 (RLU)
Log10[浓度] (nM)
乌瑞芦单抗
EGFR(WT)X1A10 M12
EGFR(NA)X1A10 M12
EGFR(WT)X1A12 M1
EGFR(NA)X1A12 M1

图14a

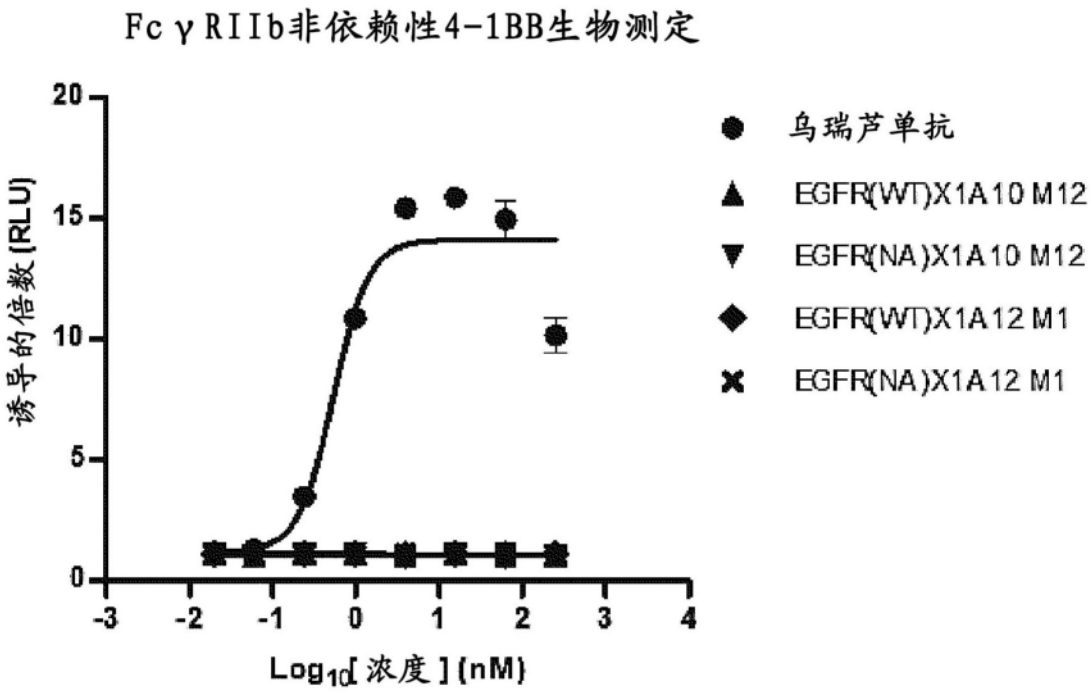

FcγRIIb非依赖性4-1BB生物测定
20
15
10
5
0
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
诱导的倍数 (RLU)
Log10[浓度] (nM)
乌瑞芦单抗
EGFR(WT)X1A10 M12
EGFR(NA)X1A10 M12
EGFR(WT)X1A12 M1
EGFR(NA)X1A12 M1

图14b