(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116948035 A
(43)申请公布日 2023.10.27

(21)申请号 202310922275.X
(22)申请日 2018.06.22
(30)优先权数据
62/524,557 2017.06.25 US
(62)分案原申请数据
201880039401.4 2018.06.22
(71)申请人 西雅图免疫公司
地址 美国华盛顿州雷德蒙德市东北95街15318号
申请人 成都百利多特生物药业有限责任公司
(72)发明人 朱义 欧勒·奥尔森 夏冬 大卫·耶利曼 卡特里娜·贝科娃 安妮玛丽·卢梭 比尔·布雷迪 布莱尔·伦肖 布莱恩·科瓦切维奇 梁玉 高泽人
(74)专利代理机构 北京京万通知识产权代理有限公司 11440
专利代理师 许天易 徐小琴
(51)Int.Cl.
C07K 16/46(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

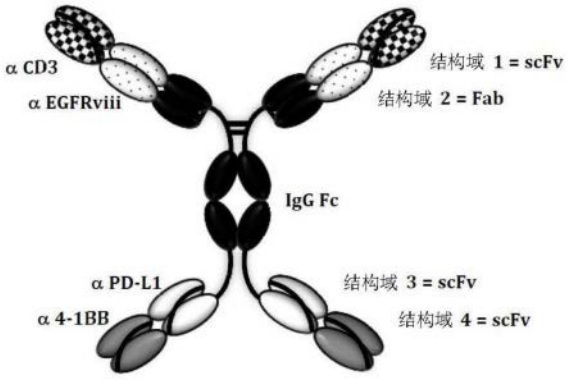
权利要求书1页 说明书36页
序列表（电子公布） 附图7页

(54)发明名称

多特异性抗体及其制备和使用方法

(57)摘要

本公开提供了具有N-末端和C-末端的四特异性抗体单体，其从N-末端到C-末端依次包含在N-末端的第一scFv结构域、Fab结构域、Fc结构域、第二scFv结构域和在C-末端的第三scFv，其中第一scFv结构域、Fab结构域、第二scFv结构域和第三scFv结构域各自具有针对不同抗原的结合特异性。在一个实施方案中，所述抗原是肿瘤抗原、免疫信号抗原或其组合。还提供了包含所公开的四特异性抗体的多特异性抗体。



CN 116948035 A

1.一种具有N-末端和C-末端的四特异性抗体单体,其从所述N-末端到所述C-末端依次包含:

在所述N-末端的第一scFv结构域、

Fab结构域、

Fc结构域、

第二scFv结构域、和

在所述C-末端的第三scFv结构域,

其中所述第一scFv结构域、所述Fab结构域、所述第二scFv结构域和所述第三scFv结构域各自具有针对不同抗原的结合特异性,并且其中所述抗原是肿瘤抗原、免疫信号抗原或其组合,其中所述第一scFv结构域、所述Fab结构域、所述第二scFv结构域和所述第三scFv结构域各自独立地具有针对选自4-1BB、PD-L1、ROR1和CD3的抗原的结合特异性。

2.根据权利要求1所述的四特异性抗体单体,其中所述第一scFv结构域具有针对4-1BB的结合特异性。

3.根据权利要求1所述的四特异性抗体单体,其中所述Fab结构域具有针对PD-L1的结合特异性。

4.根据权利要求1所述的四特异性抗体单体,其中所述第二scFv结构域具有针对ROR1的结合特异性。

5.根据权利要求1所述的四特异性抗体单体,其中所述第三scFv结构域具有针对CD3的结合特异性。

6.根据权利要求1所述的四特异性抗体单体,其中所述第一scFv结构域具有针对4-1BB的结合特异性,其中所述Fab结构域具有针对PD-L1的结合特异性,并且其中所述第二scFv结构域具有针对ROR1的结合特异性,并且其中所述第三scFv结构域具有针对CD3的结合特异性。

7.根据权利要求1所述的四特异性抗体单体,其中所述第一scFv结构域、所述第二scFv结构域或所述第三scFv结构域包含$gly\text{-}gly\text{-}gly\text{-}gly\text{-}ser(G4S)_n$接头,其中n是2、3或4。

8.一种四特异性抗体,其包含根据权利要求1所述的四特异性抗体单体。

9.一种分离的核酸,其编码根据权利要求1-7任一项的四特异性抗体单体或权利要求8的四特异性抗体。

10.一种包含根据权利要求9所述的分离的核酸的表达载体和宿主细胞。

11.一种生产权利要求1的四特异性抗体单体的方法,包括培养包含分离的核酸序列的宿主细胞,从而表达编码所述四特异性抗体单体的DNA序列,并纯化所述四特异性抗体单体。

12.一种药物组合物,其包含药学上可接受的载体和根据权利要求1-7任一项所述的四特异性抗体单体或权利要求8所述的抗体。

13.权利要求1-7任一项所述的四特异性抗体单体或权利要求8所述的抗体在制备治疗患有癌症的人类受试者的药物中的用途。

多特异性抗体及其制备和使用方法

[0001] 本申请是中国发明专利申请(申请号:2018800394014;发明名称:多特异性抗体及其制备和使用方法)的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请主张2017年6月25日提交的美国临时专利申请NO.62524557的权益,该申请通过引用以其整体明确地并入本文。

技术领域

[0004] 本公开一般涉及生物治疗技术领域,且更具体地涉及制备和使用多特异性抗体。

背景技术

[0005] 癌细胞发展各种策略以逃避免疫系统。免疫逃逸的潜在机制之一是免疫系统对癌细胞的识别降低。癌症特异性抗原的缺陷呈递或其缺乏导致免疫耐受和癌症进展。在有效的免疫识别的存在下,肿瘤使用其它机制以避免被免疫系统消除。免疫活性肿瘤产生抑制性微环境以下调免疫应答。多个参与者参与形成抑制性肿瘤微环境,包括肿瘤细胞、调节性T细胞、髓样衍生的抑制性细胞、基质细胞和其它细胞类型。通过从局部环境中分泌免疫抑制性细胞因子或消除必需的存活因子,免疫应答的抑制可以以细胞接触依赖性形式以及以接触非依赖性方式进行。细胞接触依赖性抑制依赖于细胞表面上表达的分子,例如,程序性死亡配体1(PD-L1)、T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)等[Dunn等,2004,免疫(Immunity),21(2):137-48;Adachi和Tamada,2015,Cancer Sci.,106(8):945-50]。

[0006] 随着肿瘤逃避免疫系统识别的机制继续被更好地了解,最近出现了靶向这些机制的新治疗方式。2011年3月25日,美国食品和药品管理局(FDA)批准了用于治疗不可切除或转移性黑素瘤的易普利姆玛单抗注射剂(Yervoy,Bristol-Myers Squibb)。Yrevoy与活化T细胞上表达的细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)结合并阻断抗原呈递细胞上CTLA-4与CD80/86的相互作用,从而阻断通过CTLA-4递送到T细胞中的阴性或抑制性信号,导致抗原特异性T细胞的再活化,这在许多患者中导致肿瘤的根除。2014年几年后,FDA批准Keytruda(派姆单抗(Pembrolizumab),默克公司)和Opdivo(纳武单抗(Nivolumab),百时美施贵宝)用于治疗晚期黑素瘤。这些单克隆抗体结合在活化和/或耗尽的T细胞上表达的PD-1,并阻断PD-1与在肿瘤上表达的PD-L1的相互作用,从而消除通过PD-1进入T细胞的抑制信号,导致抗原特异性T细胞的再活化,这在许多患者中再次导致肿瘤的根除。从那时起,已经进行了另外的临床试验,将单一单克隆抗体Yervoy与单克隆抗体Yervoy和Opdivo的组合在晚期黑素瘤的治疗中进行比较,晚期黑素瘤在用抗体组合治疗的患者中显示出总体存活和无进展存活的改善。(Hodi等人,2016,柳叶刀·肿瘤学(Lancet Oncol).17(11):1558-1568,Hellman等人,2018,肿瘤细胞(Cancer Cell)33(5):853-861)。然而,由于许多临床试验已经显示出使用对一种或多种免疫检查点分子具有特异性的单克隆抗体治疗癌症患者的极大益处,数据已经显示出只有那些具有产生被抗原特异性T细胞识别的新T细胞表位的高突变负荷的患者显示出临床应答(Snyder等人,2014,NEJM371:2189-2199)。具有低肿瘤

突变负荷的那些患者大部分不显示客观的临床反应(Snyder等人,2014,NEJM371:2189-2199,Hellman等人,2018,肿瘤细胞(Cancer Cell)33(5):853-861)。

[0007] 近年来,其它团队已经开发了不需要存在通过抗原呈递细胞的新表位呈递来活化T细胞的替代方法。一个实例是双特异性抗体的开发,其中对肿瘤相关抗原如CD19特异的抗体的结合结构域与T细胞上CD3特异的抗体结合结构域连接,从而产生双特异性T细胞结合剂或咬合分子。在2014年,FDA批准了称为博纳吐单抗(Blinatumomab)的双特异性抗体用于治疗前体B细胞急性成淋巴细胞白血病。Bl inatumomab将对白血病细胞上表达的CD19有特异性的scFv与对T细胞上表达的CD3有特异性的scFv连接起来(Bejnijamin和Stein 2016,Ther Adv Hematol7(3):142-146)。然而,尽管复发或顽固性急性淋巴细胞白血病(ALL)患者的初始应答率>50%,但许多患者在用Blinatumomab成功治疗后对Blinatumomab治疗有耐药性或复发。有证据表明,对Blinatumomab的耐药性或Blinatumomab治疗后的复发归因于在肿瘤细胞上表达的免疫检查点抑制分子的表达,如PD-L1,其通过在活化的T细胞上表达的PD-1驱动抑制信号(Feucht等人,2016,肿瘤标靶(Oncotarget7)(47):76902-76919)。在对耐受Blinatumomab治疗的患者的病例研究中,进行第二轮Blinatumomab治疗,但加入对PD-1特异并阻断T细胞表达的PD-1与肿瘤细胞表达的PD-L1的相互作用的单克隆抗体Pembrol izumab(Keytruda,默克公司),导致在这位患者中骨髓中肿瘤细胞的显著应答和从45%减少到小于5%(Feucht等人,2016,Oncotarget7(47):76902-76919)。这些结果表明,与任一单独的试剂相比,将双特异性咬合分子与一种或多种单克隆抗体组合可显著增加临床活性。

发明内容

[0008] 本公开尤其提供了四特异性抗体单体,含有四特异性单体的抗体,其抗原结合片段,多特异性抗体,包含所公开的抗体的免疫缀合物,制备所公开的单体、抗原结合片段和抗体的方法,以及使用所公开的分子治疗癌症的方法。

[0009] 一方面,本申请提供了四特异性抗体单体。在一个实施方案中,具有N-末端和C-末端的四特异性抗体单体从N-末端到C-末端依次包含N-末端的第一scFv结构域、Fab结构域、Fc结构域、第二scFv结构域和C-末端的第三scFv结构域。第一scFv结构域、Fab结构域、第二scFv结构域和第三scFv结构域各自具有针对不同抗原的结合特异性。

[0010] 在一个实施方案中,抗原包括肿瘤抗原、免疫信号传导抗原或其组合。在一个实施方案中,第一scFv结构域、Fab结构域、第二scFv结构域和第三scFv结构域各自具有针对肿瘤抗原或免疫信号传导抗原的结合特异性。在一个实施方案中,第一scFv结构域具有针对肿瘤抗原的结合特异性。在一个实施方案中,第一scFv结构域具有针对免疫信号抗原的结合特异性。在一个实施方案中,Fab结构域具有针对肿瘤抗原的结合特异性。在一个实施方案中,Fab结构域具有针对免疫信号抗原的结合特异性。在一个实施方案中,第二scFv结构域具有针对肿瘤抗原的结合特异性。在一个实施方案中,第二scFv结构域具有针对免疫信号抗原的结合特异性。在一个实施方案中,第三scFv结构域具有针对肿瘤抗原的结合特异性。在一个实施方案中,第三scFv结构域具有针对肿瘤抗原的结合特异性。

[0011] 在一个实施方案中,四特异性单体包括scFv结构域、Fab结构域、第二scFv结构域和第三scFv结构域,各自独立地具有针对抗原的结合特异性,所述抗原选自:ROR1、PD-L1、

CD3、CD28、4-1BB、CEA、HER2、EGFR VIII、EGFR、LMP1、LMP2A、Mesothelin、PSMA、EpCAM、glypimay-3、gpA33、GD2、TROP2、NKG2D、BCMA、CD19、CD20、CD33、CD123、CD22、CD30、PD-L1、PD1、OX40、4-1BB、GITR、TIGIT、TIM-3、LAG-3、CTLA4、CD40、VISTA、ICOS、BTLA、LIGHT、HVEM、CSF1R、CD73和CD39。在一个实施方案中，scFv结构域、Fab结构域、第二scFv结构域和第三scFv结构域各自独立地具有针对肿瘤特异性抗原的结合特异性，所述肿瘤特异性抗原包括但不限于ROR1、CEA、HER2、EGFR、EGFR VIII、LMP1、LMP2A、Mesothelin、PSMA、EpCAM、glypimay-3、gpA33、GD2、TROP2、BCMA、CD3、CD19、CD20、CD33、CD123、CD22、CD30，或免疫检查点调节剂，包括但不限于PD-L1、PD1、OX40、4-1BB、GITR、TIGIT、TIM-3、LAG-3、CTLA4、CD40、VISTA、ICOS、BTLA、Light、HVEM、CD73、CD39等。在一个实施例中，一组scFv结构域可以特异性结合免疫检查点调节剂或肿瘤抗原。在一个实施方案中，对CD3有特异性的scFv可以在重链或轻链的C或N末端。

[0012] 在一个实施方案中，第一scFv结构域、Fab结构域、第二scFv结构域和第三scFv结构域各自独立地具有针对选自CD3、EGRF VIII、PD-L1和4-1BB的抗原的结合特异性。在一个实施方案中，第一scFv结构域具有针对CD3的结合特异性。在一个实施方案中，Fab结构域具有针对EGRF VIII的结合特异性。在一个实施方案中，第二scFv结构域具有针对PD-L1的结合特异性。在一个实施方案中，第三scFv结构域具有针对4-1BB的结合特异性。在一个实施方案中，第一scFv结构域具有针对CD3的结合特异性，Fab结构域具有针对EGRF VIII的结合特异性，第二scFv结构域具有针对PD-L1的结合特异性，且第三scFv结构域具有针对4-1BB的结合特异性。

[0013] Fc结构域可以是人源化的。在一个实施方案中，Fc结构域是人IgG1 Fc。

[0014] scFv结构域可以包括将scFv结构域连接到抗体的重链或轻链的接头。在一个实施方案中，接头可以包括多于10个氨基酸。在一个实施方案中，接头可以包括超过15个氨基酸长。在一个实施方案中，接头可包括少于20个氨基酸。

[0015] 在一个实施方案中，接头可以包含gly-gly-gly-gly-ser(G4S)n接头，且n可以是1-20的整数。例如，n可以是2、4或6。在一个实施方案中，第一scFv结构域、第二scFv结构域或第三scFv结构域可以包含gly-gly-gly-gly-ser(G4S)n接头，其中n是2或4。

[0016] 在一个实施方案中，本申请提供了具有与以下氨基酸序列具有百分比同源性的氨基酸序列的四特异性抗体单体：SEQ ID NO.02、04、06、08、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58和60。所述同源性百分比不少于70％、80％、90％、95％、98％或99％。

[0017] 本申请还提供了抗原结合片段。在一个实施方案中，本申请提供scFv结构域。在一个实施方案中，scFv结构域包括与以下氨基酸序列具有百分比同源性的氨基酸序列：SEQ ID NO.02、04、06、08、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58和60，其中同源性百分比不小于70％、80％、90％、95％、98％或99％。在一个实施方案中，本申请提供Fab结构域。在一个实施方案中，fab结构域包括与以下氨基酸序列具有百分比同源性的氨基酸序列：SEQ ID NO.02、04、06、08、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58和60，其中百分比同源性不小于70％、80％、90％、95％、98％或99％。本文公开的抗原结合片段可用于构建四特异性抗体单体或多特异性抗体。

[0018] 一方面，本申请提供了多特异性抗体。在一个实施方案中，多特异性抗体包括四特异性抗体单体。在一个实施方案中，多特异性抗体包括本文公开的两种四特异性抗体单体。由于每个四特异性抗体单体具有四个抗原结合结构域，所公开的多特异性抗体可以包括8个抗原结合结构域。在一个实施方案中，这种多特异性抗体中的抗原结合结构域各自独立地具有针对不同抗原的结合特异性，从而提供八特异性抗体。在一个实施方案中，多特异性抗体是五特异性抗体。在一个实施方案中，多特异性抗体是五特异性抗体。在一个实施方案中，多特异性抗体是五特异性抗体、六特异性抗体。在一个实施方案中，多特异性抗体是五特异性抗体、七特异性抗体。

[0019] 在一个实施方案中，多特异性抗体包括四特异性抗体单体的二聚体，从而提供四特异性抗体。在一个实施方案中，本申请提供分离的、纯化的或非天然存在的多特异性抗体。在一个实施方案中，本申请提供了具有与SEQ ID NO.66和68具有百分比同源性的氨基酸序列的四特异性抗体。百分比同源性不小于70％、80％、90％、95％、98％或99％。

[0020] 本申请还提供了编码四特异性抗体单体、多特异性抗体或其抗原结合片段的分离的核酸序列。在一个实施方案中，核酸编码与具有以下氨基酸序列的四特异性抗体单体具有百分比同源性的氨基酸序列：SEQ ID NO.01、03、05、07、09、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57和59。所述同源性百分比不小于70％、80％、90％、95％、98％或99％。

[0021] 本申请还提供了包含本文公开的核酸序列的表达载体和宿主细胞。在一个实施方案中，所述宿主细胞包括表达载体。所述宿主细胞可以是原核细胞或真核细胞。

[0022] 本申请还提供了免疫缀合物。在一个实施方案中，免疫缀合物包括通过接头与本文公开的多特异性抗体连接的细胞毒性剂或显像剂。

[0023] 接头可以是可切割的或不可切割的。接头可包括共价键，诸如酯键、醚键、酰胺键、二硫键、酰亚胺键、砜键、磷酸键、磷酸酯键、肽键或其组合。在一个实施方案中，接头包含疏水性聚(乙二醇)接头。

[0024] 细胞毒性剂可包括化疗剂、生长抑制剂、来自卡利奇霉素(calicheamicin)类的细胞毒性剂、抗有丝分裂剂、毒素、放射性同位素、治疗剂或其组合。在一个实施方案中，细胞毒性剂选自卡利奇霉素、奥佐米星(ozogamicin)、单甲基澳瑞他汀E、美坦新(emtans ine)、其衍生物或组合。

[0025] 成像剂可以是用于成像目的的任何化合物。在一个实施方案中，成像剂可以是放射性核素、荧光剂、量子点或其组合。

[0026] 本申请还提供了药物组合物。在一个实施方案中，药物组合物包含药学上可接受的载体和本文公开的四特异性抗体单体。在一个实施方案中，药物组合物包含药学上可接受的载体和本文公开的多特异性抗体。在一个实施方案中，药物组合物包含药学上可接受的载体和本文公开的抗原结合片段。在一个实施方案中，药物组合物包含药学上可接受的载体和本文公开的免疫缀合物。

[0027] 在一个实施方案中，药物组合物还包括治疗剂。治疗剂的实例包括但不限于放射性同位素、放射性核素、毒素、化疗剂或其组合。在一个实施方案中，治疗剂包含抗体、酶或其组合。在一个实施方案中，治疗剂包括抗雌激素剂，受体酪氨酸激酶抑制剂，激酶抑制剂，细胞周期抑制剂，DNA、RNA或蛋白质合成抑制剂，RAS抑制剂或其组合。在一个实施方案中，

治疗剂包含检查点抑制剂。在一个实施方案中，治疗剂包括以下的的抑制剂：PD1、PDL1、CTLA4、4-1BB、OX40、GITR、ICOS、LIGHT、TIM3、LAG3、TIGIT、CD40、CD27、HVEM、BTLA、VISTA、B7H4、CSF1R、NKG2D、CD73、其衍生物或组合。

[0028] 在另一方面，本申请提供了制备四特异性抗体单体、多特异性抗体、其抗原结合片段及其免疫缀合物的方法。

[0029] 在一个实施方案中，所述方法包括培养含有本文公开的核酸序列的宿主细胞以便表达编码抗体的DNA序列以及纯化抗体的步骤。在一个实施方案中，抗体是三特异性抗体。

[0030] 在另一方面，本申请提供了将四特异性抗体单体、多特异性抗体、其抗原结合片段及其免疫缀合物用于癌症治疗的方法。在一个实施方案中，该方法包括将四特异性抗体单体、多特异性抗体、其抗原结合片段、及其免疫缀合物、或其药物组合物施用给需要这种治疗的受试者的步骤。在一个实施方案中，该方法包括向受试者施用有效量的四特异性抗体的步骤。

[0031] 在一个实施方案中，该方法包括直接向肿瘤部位注射有效量的多特异性单体、多特异性抗体、免疫缀合物、其抗原结合片段。

[0032] 可以预防或治疗多种癌症。在一个实施方案中，癌症可以具有表达ROR1、CEA、HER2、EGFR、EGFR VIII、LMP1、LMP2A、间皮素、PSMA、EpCAM、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、gpA33、GD2、TROP2、NKG2D、BCMA、CD19、CD20、CD33、CD123、CD22或CD30的细胞。癌症的实例包括不限于乳腺癌、结肠直肠癌、肛门癌、胰腺癌、胆囊癌、胆管癌、头颈癌、鼻咽癌、皮肤癌、黑素瘤、卵巢癌、前列腺癌、尿道癌、肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、脑肿瘤、神经胶质瘤、成神经细胞瘤、食道癌、胃癌、肝癌、肾癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫内膜癌、甲状腺癌、眼癌、肉瘤、骨癌、白血病、骨髓瘤或淋巴瘤。

[0033] 在一个实施方案中，该方法可以进一步包括共同施用有效量的治疗剂。在一个实施方案中，治疗剂包括抗体、化疗剂、酶或其组合。在一个实施方案中，治疗剂包括抗雌激素剂，受体酪氨酸激酶抑制剂，激酶抑制剂，细胞周期抑制剂，DNA、RNA或蛋白质合成抑制剂，RAS抑制剂或其组合。在一个实施方案中，治疗剂可以包括检查点抑制剂。在一个实施方案中，治疗剂包括PD1、PD-L1、CTLA4、4-1BB、OX40、GITR、ICOS、LIGHT、TIM3、LAG3、TIGIT、CD40、CD27、HVEM、BTLA、VISTA、B7H4、CSF1R、NKG2D、CD73、衍生物或其组合的抑制剂。

[0034] 在一个实施方案中，治疗剂可包括卡培他滨、顺铂、环磷酰胺、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、阿霉素、环磷酰胺、氮芥、长春新碱、丙卡巴肼、泼尼松龙、博来霉素、长春碱、达卡巴嗪、依托泊苷、表柔比星、培美曲塞、叶酸、吉西他滨、奥沙利铂、伊立替康、托泊替康、喜树碱、多西他赛、紫杉醇、氟维司群、他莫昔芬、来曲唑、依西美坦、阿那曲唑、氨鲁米特、睾内酯、伏氯唑、福美司坦、法倔唑、埃罗替尼、拉法替尼、达沙替尼、吉非替尼、奥西美替尼、范德坦尼、阿法替尼、伊马替尼、帕唑帕尼、拉帕替尼、舒尼替尼、尼洛替尼、索拉非尼、NaB-帕拉他赛、依维莫司、替西罗莫司、达拉非尼、维莫拉非尼、曲美替尼、长春他叶酸、阿帕替尼、克立唑替尼、哌福辛(periforsine)、奥拉帕利、硼替佐米、托法替尼、曲妥珠单抗、其衍生物或组合。

[0035] 受试者可以是人。在一个实施方案中，受试者可能患有癌症。本申请还提供了包含有效浓度的本文公开的多特异性抗体、单体或免疫缀合物的溶液。在一个实施方案中，溶液是受试者的血浆。

[0036] 通过以下结合附图对本发明的示例性实施例的详细描述，本发明的目的和优点将

变得显而易见。从下面的详细描述中，其它实施例对于本领域技术人员来说是显而易见的，其中通过说明预期的最佳模式来描述实施例。可以认识到，其它和不同的实施例是可能的，并且实施例的若干细节能够在各种显而易见的方面进行修改，所有这些都不脱离它们的精神和范围。因此，附图和详细描述应被认为本质上是说明性的而非限制性的。

[0037] 具体地，本申请涉及如下技术方案：

[0038] 1.一种具有N-末端和C-末端的四特异性抗体单体，其从所述N-末端到所述C-末端依次包含：

[0039] 在所述N-末端的第一scFv结构域、

[0040] Fab结构域、

[0041] Fc结构域、

[0042] 第二scFv结构域、和

[0043] 在所述C-末端的第三scFv结构域，

[0044] 其中所述第一scFv结构域、所述Fab结构域、所述第二scFv结构域和所述第三scFv结构域各自具有针对不同抗原的结合特异性，并且其中所述抗原是肿瘤抗原、免疫信号抗原或其组合，其中所述第一scFv结构域、所述Fab结构域、所述第二scFv结构域和所述第三scFv结构域各自独立地具有针对选自CD3、EGRF VIII、CD19、PD-L1、ROR1和4-1BB的抗原的结合特异性。

[0045] 2.根据技术方案1所述的四特异性抗体单体，其中所述第一scFv结构域具有针对CD3或4-1BB的结合特异性。

[0046] 3.根据技术方案1所述的四特异性抗体单体，其中所述Fab结构域具有针对EGRF VIII或CD19的结合特异性。

[0047] 4.根据技术方案1所述的四特异性抗体单体，其中所述第二scFv结构域具有针对PD-L1或ROR1的结合特异性。

[0048] 5.根据技术方案1所述的四特异性抗体单体，其中所述第三scFv结构域具有针对4-1BB或CD3的结合特异性。

[0049] 6.根据技术方案1所述的四特异性抗体单体，其中所述第一scFv结构域具有针对4-1BB的结合特异性，其中所述Fab结构域具有针对PD-L1的结合特异性，并且其中所述第二scFv结构域具有针对ROR1的结合特异性，并且其中所述第三scFv结构域具有针对CD3的结合特异性。

[0050] 7.根据技术方案1所述的四特异性抗体单体，其中所述第一scFv结构域、所述第二scFv结构域或所述第三scFv结构域包含gly-gly-gly-gly-ser$(G4S)_n$接头，其中n是2、3或4。

[0051] 8.一种四特异性抗体，其包含根据技术方案1所述的四特异性抗体单体。

[0052] 9.一种分离的核酸，其编码根据技术方案1-7任一项的四特异性抗体单体或技术方案8的四特异性抗体。

[0053] 10.一种包含根据技术方案9所述的分离的核酸的表达载体。

[0054] 更具体地，本申请涉及：

[0055] 1.一种具有N-末端和C-末端的四特异性抗体单体，其从所述N-末端到所述C-末端依次包含：

[0056] 在所述N-末端的第一scFv结构域、

[0057] Fab结构域、

[0058] Fc结构域、

[0059] 第二scFv结构域、和

[0060] 在所述C-末端的第三scFv结构域，

[0061] 其中所述第一scFv结构域、所述Fab结构域、所述第二scFv结构域和所述第三scFv结构域各自具有针对不同抗原的结合特异性，其中所述第一scFv结构域具有针对4-1BB的结合特异性，其中所述Fab结构域具有针对PD-L1的结合特异性，并且其中所述第二scFv结构域具有针对ROR1的结合特异性，并且其中所述第三scFv结构域具有针对CD3的结合特异性，其中，所述第一scFv结构域包含SYHMQ、TISSGGNVYYASSARG、DSGYSDPM所示的重链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列，QASQNIRTYLS、AAANLAS、QSTYLGTDYVGGA所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列；所述Fab结构域包含NTYDMI、IITYSGSRYYANWAKG、DYMSGSHL所示的重链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列，YSFLAWY、SASSLAS、QQGYGKNNVDNA所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列；所述第二scFv结构域包含GFTISRYHMT、HIYVNNDDTDYASSAKG、LDVGGGGAYIGDI所示的重链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列，QSSQSVYNNNDLA、YASTLAS、AGGYDTDGLDTFA所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列；所述第三scFv结构域包含TNAMS、VITGRDITYYASWAKG、DGGSSAITSNN所示的重链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列，QASESISSWLA、EASKLAS、QGYFYFISRTYVNS所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列。

[0062] 2.根据技术方案1所述的四特异性抗体单体，其中所述第一scFv结构域、所述第二scFv结构域或所述第三scFv结构域包含gly-gly-gly-gly-ser$(G4S)_n$接头，其中n是2、3或4。

[0063] 3.根据技术方案1所述的四特异性抗体单体，所述第一scFv结构域包含SEQ ID NO.26和28所示的重链可变区氨基酸序列和轻链可变区氨基酸序列；所述Fab结构域包含SEQ ID NO.10和12所示的重链可变区氨基酸序列和轻链可变区氨基酸序列；所述第二scFv结构域包含SEQ ID NO.38和40所示的重链可变区氨基酸序列和轻链可变区氨基酸序列；所述第三scFv结构域包含SEQ ID NO.2和4所示的重链可变区氨基酸序列和轻链可变区氨基酸序列。

[0064] 4.根据技术方案1所述的四特异性抗体单体，所述第一scFv结构域包含分别与SEQ ID NO.26和28不小于98％同源性的重链可变区氨基酸序列和轻链可变区氨基酸；所述Fab结构域包含分别与SEQ ID NO.10和12不小于98％同源性的重链可变区氨基酸序列和轻链可变区氨基酸；所述第二scFv结构域包含分别与SEQ ID NO.38和40不小于98％同源性的重链可变区氨基酸序列和轻链可变区氨基酸；所述第三scFv结构域包含分别与SEQ ID NO.2和4不小于98％同源性的重链可变区氨基酸序列和轻链可变区氨基酸。

[0065] 5.一种分离的核酸，其编码根据技术方案1-4任一项的四特异性抗体单体。

[0066] 6.根据技术方案5的核酸，包含与如下任一核苷酸序列具有百分比同源性的核苷酸序列：SEQ ID NO.25、27、09、11、29、31、37、39，其中所述同源性百分比不小于98％。

[0067] 7.一种包含根据技术方案5或6所述的分离的核酸的表达载体。

[0068] 8.一种包含根据技术方案5或6所述的分离的核酸的宿主细胞，其中所述宿主细胞是原核细胞或真核细胞。

[0069] 9.一种生产技术方案1的四特异性抗体单体的方法,包括培养包含分离的核酸序列的宿主细胞,从而表达编码所述四特异性抗体单体的DNA序列,并纯化所述四特异性抗体单体。

[0070] 10.技术方案9的方法,其中所述分离的核酸序列包含与如下任一核苷酸序列具有百分比同源性的核苷酸序列:SEQ ID NO.25、27、09、11、29、31、37、39,其中所述同源性百分比不小于98%。

[0071] 11.一种药物组合物,其包含药学上可接受的载体和根据技术方案1-4任一项所述的四特异性抗体单体。

[0072] 12.技术方案1-4任一项所述的四特异性抗体单体在制备治疗患有癌症的人类受试者的药物中的用途。

附图说明

[0073] 结合附图,根据以下描述和所附权利要求书,本发明的前述和其他特征将变得更加完全显而易见。应理解,这些附图仅描绘了根据本公开安排的多个实施方案,并且因此不应被认为是对其范围的限制,将通过使用附图以额外的特性和细节来描述本公开,在附图中:

[0074] 图1是具有结构域1-4作为抗原结合结构域的四特异性抗体的示意图。CD3×EGFRvIII×PD-L1×4-1BB四特异性抗体显示为根据一个实施方案的实例。

[0075] 图2描绘了显示针对用EGFRvIII转染的星形细胞瘤细胞系U87的重定向PBMC(外周血单核细胞)细胞毒性的实验结果。所用四特异性抗体的肿瘤裂解活性列于表1。

[0076] 图3描绘了显示针对急性淋巴细胞白血病细胞系Kasumi-2的重定向PBMC(外周血单核细胞)细胞毒性的实验结果。

[0077] 图4描绘了显示针对用EGFRvIII转染的星形细胞瘤细胞系U87的重定向PBMC(外周血单核细胞)细胞毒性的实验结果。显示了不同4-1BB结构域的功能活性和PD-L1和4-1BB结构域的功能影响。

[0078] 图5是示出根据一些实施方案结合人ROR1转染的CHO细胞的四特异性抗体的FACS分析的实验结果。

[0079] 图6是示出根据一些实施方案结合人4-1BB转染的CHO细胞的四特异性抗体的FACS分析的实验结果的描绘。

[0080] 图7是示出根据一些实施方案结合人PD-L1转染的CHO细胞的四特异性抗体的FACS分析的实验结果的描绘。

[0081] 图8是示出根据一些实施方案以外周血单核细胞作为效应物并且以B-ALL细胞系Kasumi2作为靶标、由具有针对ROR1的Ig结构域有特异性的结合结构域323H7的四特异性抗体介导的重定向T细胞细胞毒性(RTCC)测定的实验结果的描绘。

[0082] 图8是示出根据一些实施方案以外周血单核细胞作为效应物并且以B-ALL细胞系Kasumi2作为靶标、由具有针对ROR1的Ig结构域有特异性的结合结构域323H7的四特异性抗体介导的重定向T细胞细胞毒性(RTCC)测定的实验结果的描绘。

[0083] 图9是示出根据一些实施方案以CD8+、CD45RO+记忆T细胞作为效应物并且以B-ALL细胞系Kasumi2作为靶标、由具有针对ROR1的Ig结构域有特异性的结合结构域323H7的四特

异性抗体介导的重定向T细胞细胞毒性(RTCC)测定的实验结果的描绘。

[0084] 图10是示出根据一些实施方案以CD8+、CD45RA+初始(naïve)T细胞作为效应物并且以B-ALL细胞系Kasumi2作为靶标、由具有针对ROR1的Ig结构域有特异性的结合结构域323H7的四特异性抗体介导的重定向T细胞细胞毒性(RTCC)测定的实验结果的描绘。

[0085] 图11是示出根据一些实施方案以外周血单核细胞作为效应物并且以B-ALL细胞系Kasumi2作为靶标、由具有针对ROR1的卷曲结构域有特异性的结合结构域338H4的四特异性抗体介导的重定向T细胞细胞毒性(RTCC)测定的实验结果的描绘。

[0086] 图12是示出根据一些实施方案以CD8+、CD45RO+记忆T细胞作为效应物并且以B-ALL细胞系Kasumi2作为靶标、由具有针对ROR1的卷曲结构域有特异性的结合结构域338H4的四特异性抗体介导的重定向T细胞细胞毒性(RTCC)测定的实验结果的描绘。

[0087] 图13是示出根据一些实施方案以CD8+、CD45RA+初始T细胞作为效应物并且以B-ALL细胞系Kasumi2作为靶标、由具有针对ROR1的卷曲结构域有特异性的结合结构域338H4的四特异性抗体介导的重定向T细胞细胞毒性(RTCC)测定的实验结果的描绘。

具体实施方式

[0088] 在以下详细描述中,参考了构成本文一部分的附图。在附图中,除非上下文另有说明,否则类似的符号通常标识类似的成分。在具体实施方式、附图和权利要求中描述的说明性实施方式并不意味着是限制性的。可利用其他实施方案,且可作出其他改变,而不背离本文所呈现的标的物的精神或范围。将容易理解的是,如在此总体描述的并且在附图中示出的本公开的这些方面可以被安排、替代、组合、分开、并且被设计成多种不同的构型,所有这些在此明确地预期。

[0089] 本公开尤其提供了分离的抗体,制备所述抗体、四特异性或多特异性分子的方法,由所述抗体或抗原结合片段组成的抗体-药物缀合物和/或免疫缀合物,含有所述抗体、四特异性或多特异性分子、抗体-药物缀合物和/或免疫缀合物的药物组合物,其制备方法,以及使用所公开的分子或组合物治疗癌症的方法。

[0090] 术语“抗体”以最广泛的意义使用,具体包括单一单克隆抗体(包括激动剂和拮抗剂抗体)、具有多表位特异性的抗体组合物、以及抗体片段(例如Fab、F(ab')$_2$和Fv),只要它们表现出所需的生物活性。在一些实施方案中,抗体可以是单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、单链抗体、四特异性抗体或双效抗体、人源化抗体、人抗体和人源化抗体及其活性片段。与已知抗原结合的分子的活性片段的实例包括Fab、F(ab')$_2$、scFv和Fv片段,以及Fab免疫球蛋白表达文库的产物和任何上述抗体和片段的表位结合片段。在一些实施方案中,抗体可以包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即含有免疫特异性结合抗原的结合位点的分子。免疫球蛋白可以是任何类型(IgG、IgM、IgD、IgE、IgA和IgY)或类(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或免疫球蛋白分子的亚类。在一个实施方案中,抗体可以是完整抗体和衍生自该完整抗体的任何抗原结合片段。典型的抗体是指典型地包含两条重(H)链和两条轻链(L)的异四聚体蛋白。每条重链由重链可变区(缩写为VH)和重链恒定区组成。每条轻链由轻链可变区(缩写为VL)和轻链恒定区组成。VH和VL区可进一步细分为超变互补决定区(CDR)的结构域,和称为构架区(FR)的更为保守的区域。每个可变区(VH或VL)通常由三个CDR和四个FR组成,按以下顺序排列:从氨基末端到羧基末端为FR1、CDR1、

FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在轻链和重链的可变区内存在与抗原相互作用的结合区。

[0091] 如本文所用，术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体，即除了可能以少量存在的天然存在的突变之外，包含该群体的单个抗体是相同的。单克隆抗体针对单个抗原位点具有高度特异性。此外，与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制剂相反，每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除了它们的特异性之外，单克隆抗体的优点可在于它们由杂交瘤培养物合成，不被其它免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表示所获得的抗体的特性来自基本上同质的抗体群，并且不应被解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如，根据本公开内容使用的单克隆抗体可以通过首先由Kohler和Milstein，自然，256:495(1975)描述的杂交瘤方法制备，或者可以通过重组DNA方法制备(参见，例如，美国专利NO.4,816,567)。

[0092] 单克隆抗体可包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白)，其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定种类或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，而所述链的剩余部分与衍生自另一种类或属于另一抗体类别或亚类的抗体以及这些抗体的片段中的相应序列相同或同源，只要它们表现出所需的生物活性即可(美国专利NO.4,816,567；和Morrison等，Proc.Natl.Acad.Sci.美国,81:6851 -6855[1984])。

[0093] 单克隆抗体可以使用各种方法产生，包括小鼠杂交瘤或噬菌体展示(参见Siegel.Transfus.Clin.Biol.9:15-22(2002)综述)或直接来自原代B细胞的抗体的分子克隆(参见Tiller.新型生物技术(New BiotechNO.1).28:453-7(2011))。在本发明中通过用人PD-L1蛋白和在细胞表面瞬时表达人PD-L1的细胞免疫兔来产生抗体。已知兔产生高亲和力、多样性和特异性的抗体(Weber等人Exp.Mol.Med.49:E305)。体外培养来自免疫动物的B细胞并筛选抗PD-L1抗体的产生。使用重组DNA技术分离抗体可变基因，重组表达所得抗体，并进一步筛选所需特征，例如抑制PD-L1与PD-1结合的能力，与非人灵长类PD-L1结合的能力和增强人T细胞活化的能力。这种抗体发现的一般方法类似于Seeber等PLOS One.9:E86184(2014)描述的方法。

[0094] 术语“抗原或表位结合部分或片段”是指能够结合抗原(在这种情况下是PD-L1)的抗体片段。这些片段可以具有完整抗体的抗原结合功能和附加功能。结合片段的实例包括但不限于单链Fv片段(scFv)或Fab片段，所述单链Fv片段(scFv)由通过合成接头连接在单多肽链中的抗体的单臂的VL和VH结构域组成，所述Fab片段是由VL、恒定轻链(CL)、VH和恒定重链1(CH1)结构域组成的单价片段。抗体片段可以是甚至更小的亚片段并且可以由与单个CDR结构域一样小的结构域组成，特别是来自VL和/或VH结构域的CDR3区(例如参见Beiboer等人，J.Mol.Biol.296:833-49(2000))。使用本领域技术人员已知的常规方法产生抗体片段。可以使用与完整抗体相同的技术筛选抗体片段的效用。

[0095] “抗原或表位结合片段”可以通过许多本领域已知的技术衍生自本公开的抗体。例如，可以用酶如胃蛋白酶切割纯化的单克隆抗体，并进行HPLC凝胶过滤。然后可收集含有Fab片段的适当级分并通过膜过滤等浓缩。进一步关于分离抗体活性片段的一般技术的进一步描述，参见例如Khaw,B.A.等.J.nucl.Med.23:1011-1019(1982)；Rousseaux等人.方法酶学(Methods Enzymology)，121:663-69，学术出版社(Academic Press)，1986。

[0096] 抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个相同的抗原结合片段，称为“Fab”片段，每个片段具有单个抗原结合位点，和残余的“Fc”片段，其名称反映其易于结晶的能力。胃蛋白酶处理

产生具有两个抗原结合位点并且仍然能够交联抗原的$F(ab')_2$片段。

[0097] Fab片段可含有轻链的恒定域和重链的第一恒定域(CH1)。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于在重链CH1结构域的羧基末端添加了一些残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH在本文中是指Fab',其中恒定结构域的半胱氨酸残基带有游离巯基。F(ab')2抗体片段最初产生为Fab'片段对,它们之间具有铰链半胱氨酸。另外,抗体片段的化学偶联也是已知的。

[0098] "Fv"是含有完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。该区域由紧密非共价结合的一个重链和一个轻链可变域的二聚体组成。在这种构型中,每个可变域的三个CDR相互作用以限定VH-VL二聚体表面上的抗原结合位点。总起来说,六个CDR赋予抗体抗原结合特异性。然而,即使单个可变结构域(或只包含对抗原特异的三个CDR的Fv的一半)也具有识别和结合抗原的能力,尽管亲和力低于整个结合位点。

[0099] 基于其恒定结构域的氨基酸序列,来自任何脊椎动物物种的抗体(免疫球蛋白)的"轻链"可以归属于两种明显不同的类型之一,称为kappa(κ)和lambda(λ)。

[0100] 根据其重链恒定域的氨基酸序列,免疫球蛋白可分为不同的类别。免疫球蛋白有五大类:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其中一些可以进一步分为亚类(同种型),例如IgG-1、IgG-2、IgG-3和IgG-4;IgA-1和IgA-2。对应于不同类免疫球蛋白的重链恒定区分别称为α、δ、ε、γ和μ。不同类免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是众所周知的。

[0101] "人源化抗体"是指一类工程化抗体,其CDR衍生自非人供体免疫球蛋白,分子的剩余免疫球蛋白衍生部分衍生自一种(或多种)人免疫球蛋白。在一些实施方案中,可以改变框架支持残基以保持结合亲和力。获得"人源化抗体"的方法是本领域技术人员熟知的。(参见例如Queen等,Proc.Natl Acad Sci USA,86:10029-10032(1989),Hodgson等,Bio/TechNO.logy,9:421(1991))。

[0102] 如本文所用,术语"多肽"、"肽"和"蛋白质"是可互换的,并且定义为意指由通过肽键连接的氨基酸组成的生物分子。

[0103] 如本文所用的术语"一"、"一个"和"该"被定义为意指"一个或多个"并且包括复数,除非上下文不适当。

[0104] "分离的"是指不含其天然存在的至少一些组分的生物分子。"分离的"当用于描述本文公开的各种多肽时,是指已经从其表达的细胞或细胞培养物中鉴定和分离和/或回收的多肽。通常,可通过至少一个纯化步骤制备分离的多肽。"分离的抗体"是指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体。

[0105] "重组"是指使用重组核酸技术在外源宿主细胞中产生抗体。

[0106] 术语"抗原"是指可以在生物体、特别是动物、更特别是包括人在内的哺乳动物中诱导免疫应答的实体或其片段。该术语包括免疫原及其负责抗原性或抗原决定簇的区域。

[0107] 同样如本文所用,术语"免疫原性"是指引发或增强针对免疫原性剂的抗体,T细胞或其它反应性免疫细胞的产生并有助于人或动物中的免疫应答的物质。当个体针对本公开的施用的免疫原性组合物产生足够的抗体、T细胞和其它反应性免疫细胞以缓和或减轻待治疗的病症时,发生免疫应答。

[0108] "特异性结合"或"与…特异性结合"或"针对…有特异性"特定抗原或表位是指与非特异性相互作用显著不同的结合。特异性结合可以例如通过测定与对照分子的结合相比

的分子的结合来测量,所述对照分子通常是具有不具有结合活性的类似结构的分子。例如,特异性结合可通过与类似于靶的对照分子竞争来确定。

[0109] 对特定抗原或表位的特异性结合可例如通过抗体对抗原或表位的KD为以下来表现:至少约10^{-4}M、至少约10^{-5}M、至少约10^{-6}M、至少约10^{-6}M、至少约10^{-7}M、至少约10^{-8}M、至少约10^{-9}M、或者至少约10^{-10}M、至少约10^{-11}M、至少约10^{-12}M或更高,其中KD是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。典型地,特异性结合抗原的抗体相对于抗原或表位对于对照可以具有20-、50-、100-、500-、1000-、5,000-、10,000-或更多倍的KD。

[0110] 同样,对于特定抗原或表位的特异性结合可以例如通过抗体对于抗原或表位的KA或Ka相对于对照对于表位至少为以下来表现:20-、50-、100-、500-、1000-、5,000-、10,000-或更多倍,其中KA或Ka是指特定抗体-抗原相互作用的结合速率。

[0111] 两个序列之间的“同源性”由序列同一性决定。如果相互比较的两个序列长度不同,则序列同一性优选是指与较长序列的核苷酸残基相同的较短序列的核苷酸残基的百分比。可以使用计算机程序常规地确定序列同一性。在给定序列与本公开的上述序列之间的比较中出现的偏差可以由例如添加、缺失、取代、插入或重组引起。

[0112] 一方面,本申请提供了四特异性抗体单体、其抗原结合片段和多特异性抗体。在一个实施方案中,本申请提供了四特异性抗体。

[0113] 在一个实施方案中,本公开提供了具有针对四种不同抗原靶的结合特异性的四特异性抗体。在一个实施方案中,抗原靶是肿瘤特异性抗原、T细胞受体CD3组分或免疫检查点分子。四特异性抗体可直接与机体的内源性T细胞结合以杀死肿瘤细胞,而不依赖于MHC对抗原特异性T细胞受体的肿瘤抗原呈递。在一些实施方案中,四特异性抗体的免疫检查点调节组分可以克服免疫抑制性肿瘤微环境以完全激活肿瘤微环境内耗尽的T细胞。

[0114] 四特异性抗体具有直接与T细胞结合同时调节免疫检查点或抑制Treg或其它抑制性免疫细胞或用针对肿瘤抗原的组分靶向肿瘤的独特性质。这对于咬合或CAR-T治疗不合适的患者可能是有益的。在一个实施方案中,四特异性抗体可以在实体肿瘤中显示临床益处,其中类似咬合技术或CAR-T治疗由于抑制性肿瘤微环境的限制还显示临床益处。

[0115] 在一个实施方案中,本申请提供了具有4个不同结合结构域的工程化抗体或“四特异性”抗体。一个结合结构域对T细胞上的CD3有特异性,第二个结合结构域对肿瘤相关抗原有特异性,包括但不限于ROR1、CEA、HER2、EGFR、EGFRvIII、LMP1、LMP2A、间皮素、PSMA、EpCAM、glypimay-3、gpA33、GD2、TROP2、BCMA、CD19、CD20、CD33、CD123、CD22、CD30,和第三和第四结合结构域,其对两种不同免疫检查点调节剂有特异性,例如PDL1、PD1、OX40、4-1BB、GITR、TIGIT、TIM-3、LAG-3、CTLA4、CD40、VISTA、ICOS、BTLA、Light、HVEM、CD73、CD39等。

[0116] 本文公开的四特异性分子的实例(图1)靶向人ROR1(SEQ ID 33-48)、人CD19(SEQ ID 53-56)或EGFR vIII(SEQ ID 49-52)作为肿瘤相关抗原。这些靶向的四特异性蛋白中的每一种还携带抗人PD-L1(SEQ ID 9-16),抗人4-1BB(SEQ ID 21-32)和抗人CD3结合结构域(SEQ ID 1-8)。将这些结合结构域转化为scFv、VLVH,用于放置在肽(图1)的N-端结构域1(D1)、或scFv、VHVL,用于放置在肽的C-端结构域3(D3)和4(D4)。

[0117] 在一个实施方案中,本文所述的scFv分子含有20个氨基酸的柔性gly-gly-gly-gly-ser(G4S)X4接头,其可操作地连接VH和VL,而与V区取向(LH或HL)无关。四特异性蛋白中的剩余位置,结构域2(D2),由IgG1重链VH-CH1-铰链-CH2-CH3及其相应的轻链VL-CL组

成,其可以是κ链或λ链。D1和D2通过10个氨基酸(G4S)×2接头遗传地连接,D2、D3和D4同样产生连续的～150kDa重链单体肽。当与合适的轻链共转染时,可以通过IgG1Fc(蛋白A/蛋白G)纯化最终的对称四特异性肽并分析以评估功能活性。预先构建重链和轻链基因"盒",使得可以使用限制性酶切位点(重链的HindIII/NheI和轻链的HindIII/BsiWI)或诸如Gibson装配的"无限制性克隆"(SGI-DNA,拉荷亚,加利福尼亚州),输注Infusion(Takara Bio美国)或NEBuilder(NEB,伊普斯威奇,马萨诸塞州)克隆V区,后者在此使用。

[0118] 四特异性蛋白通过包括设计完整分子、合成和克隆每个结构域的核苷酸序列,在哺乳动物细胞中表达和纯化终产物的方法产生。使用Geneous 10.2.3软件包(生物材料(Biomaterials),奥克兰,新西兰州)装配核苷酸序列,并将其分解成其用于基因合成的组成结构域(金唯智(Genewiz),南普莱恩菲尔德,新泽西州)。

[0119] 在该实施例中,将SI-35E18(SEQ ID 65和67)分成其组分结构域,其中抗-4-1BBscFv VLVH占据D1,抗人PD-L1克隆PL230C6占据D2(Fab位置),抗人ROR1 Ig结构域特异性克隆323H7 VHVL scFv占据D3,以及抗人CD3 scFv VHVL占据C-末端D4。使用基于NEBuilder Web的工具,根据其在较大蛋白质中的位置将5'和3'核苷酸附加到每个结构域上,使得每个结构域与它的侧翼结构域重叠20-30个核苷酸,这些核苷酸指导位点特异性重组,从而在单个基因装配步骤中遗传融合每个结构域。由于四特异性核苷酸序列中有大量同源区,N-末端结构域1和2与C-末端D3和D4分开装配。然后在第二个NEBuilder反应中将N-和C-末端片段组装在一起。

[0120] 将一小等分试样转化到大肠杆菌DH10b(英杰(Invitrogen),卡尔斯巴德,加利福尼亚)中并铺在TB+羧苄青霉素100μg/ml平板(天惠华(TekNO.va),霍利斯特,加利福尼亚)上并在37℃温育过夜。选择所得菌落并将2ml过夜培养物接种于TB+羧苄青霉素中。从过夜培养物中制备DNA(Thermo-Fisher,卡尔斯巴德,加利福尼亚),随后使用侧翼于每个结构域的测序引物(Sigma,圣路易,密苏里州)测序(Genewiz,南普莱恩菲尔德,新泽西)。在一些实施方案中,在Geneious中组装和分析DNA序列。

[0121] 另一方面,本申请提供了包含多特异性抗体单体、多特异性抗体、抗原结合片段及其免疫缀合物的药物组合物,以及使用所公开的抗体或药物组合物治疗癌症的方法。

[0122] 与任何现有疗法相比,使用所公开的四特异性抗体单体、多特异性抗体或组合物用于治疗目的的优点尤其包括:1)IgG Fc结构域的包含可以赋予与双特异性咬分子相比在血清中更长半衰期的特征;2)包含对免疫检查点调节剂具有特异性的两个结合结构域,可以抑制抑制途径并且同时参与共刺激途径;和3)将T细胞上的CD3与肿瘤相关抗原交联,从而"重定向"T细胞以杀死肿瘤,而不需要从患者体内除去T细胞,并且在将它们重新引入患者体内之前,如对于嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)所做的,对它们进行遗传修饰以使其对肿瘤细胞具有特异性。

[0123] 药物组合物的配制可以根据本领域普通技术人员已知的标准方法完成。

[0124] 在一个实施方案中,根据本公开的抗体和单体可以以生理学上可接受的制剂制备,并且可以使用已知技术包含药学上可接受的载体、稀释剂和/或赋形剂。例如,根据本公开的抗体可包括任何功能等效抗体或其功能部分,特别地,包括任何功能等效抗体或其功能部分的单克隆抗体与药学上可接受的载体、稀释剂和/或赋形剂组合以形成治疗组合物。根据本公开的药物组合物的配制可以根据本领域普通技术人员已知的标准方法来完成。

[0125] 关于用于向例如需要治疗的人类患者的受试者施用的合适组合物的制剂而言，根据所选择的施用途径，本文公开的抗体可以与本领域已知的药学上可接受的载体混合或组合。对本文公开的抗体的施用方式没有特别限制，并且合适的施用途径和合适的组合物的选择是本领域已知的，无需过多的实验。

[0126] 合适的药物载体、稀释剂和/或赋形剂是本领域熟知的，包括例如磷酸盐缓冲盐溶液、水、乳剂如油/水乳剂。

[0127] “药学上可接受的”是指那些化合物、材料、组合物和剂型，它们在合理的医学判断范围内适合用于与人或动物的组织接触而没有过度的毒性、刺激或其它问题或并发症，与合理的益处/风险比相称。

[0128] 在一个实施方案中，药物组合物可以包括蛋白质载体，例如举例而言，血清白蛋白或免疫球蛋白，特别是人源的。根据预期用途，其它生物活性剂可以存在于本公开的药物组合物中。在一个实施方案中，蛋白质药物活性物质可以每剂量1ng至10mg的量存在。通常，施用方案应当在0.1μg至10mg根据本公开的抗体的范围内，特别是在1.0μg至10mg的范围内，并且更特别地在1.0μg与100μg之间的范围内，所有落入这些范围内的独立数值也是本公开的一部分。如果通过连续输注进行施用，则更合适的剂量可以在0.01μg至10mg单位/千克体重/小时的范围内，所有落入这些范围内的独立数值也是本公开的一部分。

[0129] 组合物可以以固体、液体或气雾剂的形式以合适的药学有效剂量施用于受试者。固体组合物的实例包括丸剂、乳膏和可植入的剂量单位。丸剂可以口服施用。治疗乳膏可以局部施用。可植入的剂量单位可以局部施用，例如在肿瘤部位施用，或者可以植入用于治疗组合物的系统释放，例如皮下施用。液体组合物的实例包括适于肌内、皮下、静脉内、动脉内注射的制剂，以及用于局部和眼内施用的制剂。气溶胶制剂的实例包括用于向肺施用的吸入剂制剂。

[0130] 本领域普通技术人员众所周知，组合物的剂量将取决于各种因素，例如所治疗的病症，所使用的特定组合物，和其它临床因素，例如患者的体重、大小、性别和一般健康状况、体表面积、所施用的特定化合物或组合物、同时施用的其它药物和施用途径。

[0131] 术语“治疗有效量”或“有效量”是指当施用于人或动物时引起足以在所述人或动物中产生治疗效果(例如改善受试者的疾病)的应答的抗体的量。有效量易于由本领域普通技术人员按照常规方法确定。当疾病是癌症时，有效量的药物可以抑制(例如，在一定程度上减慢、抑制或停止)一种或多种以下示例性特征，包括但不限于癌细胞生长、癌细胞增殖、癌细胞运动性、癌细胞渗入周围器官、肿瘤转移和肿瘤生长。当所述疾病是癌症时，所述药物的有效量可替代地在施用于受试者时进行以下中的一种或多种：减缓或停止肿瘤生长，减小肿瘤大小(例如，体积或质量)，在一定程度上缓解与癌症相关的一种或多种症状，延长无进展存活，导致客观反应(包括，例如，部分反应或完全反应)，和增加总存活时间。在药物可以防止生长和/或杀死现有癌细胞的程度上，它是细胞抑制的和/或细胞毒性的。

[0132] 本领域技术人员能够确定其中公开的抗体的有效量或浓度以有效治疗诸如癌症的病症。其它参数，例如药物组合物中各种组分的比例、施用剂量和频率，可由本领域技术人员获得而无需过多实验。例如，用于注射的合适溶液可含有但不限于约1至约20、约1至约10mg抗体/ml。示例性剂量可以是但不限于约0.1至约约20、约1至约5mg/Kg体重。示例性的施用频率可以是但不限于每天一次或每周三次。

[0133] 组合物可以通过标准施用途径施用。通常，组合物可以通过局部、口服、直肠、鼻、皮内、腹膜内或肠胃外(例如静脉内、皮下或肌内)途径施用。此外，可以将组合物掺入诸如生物可降解聚合物的缓释基质中，将聚合物植入需要递送的部位附近，例如肿瘤部位。该方法包括施用单剂量、以预定时间间隔施用重复剂量和持续施用预定时间。

[0134] 尽管许多形式的施用是可能的，但是示例性的施用形式可以是用于注射的溶液，特别是用于静脉内或动脉内注射的溶液。通常，用于注射的合适的药物组合物可以包括药学上合适的载体或赋形剂，例如但不限于缓冲剂、表面活性剂或稳定剂。缓冲剂的实例可以包括但不限于乙酸盐、磷酸盐或柠檬酸盐缓冲剂。表面活性剂的实例可以包括但不限于聚山梨醇酯。稳定剂的实例可以包括但不限于人白蛋白。

[0135] 在一个实施方案中，施用可以是肠胃外施用，例如静脉内施用。用于肠胃外施用的制剂包括无菌水性或非水性溶液、悬浮液和乳液。非水溶剂包括但不限于丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油和可注射有机酯如油酸乙酯。水性溶剂可以选自水、醇/水溶液、乳液或悬浮液(包括盐水和缓冲介质)。肠胃外载体包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸化林格氏或不挥发性油。静脉内载体包括流体和营养补充剂、电解质补充剂(例如基于林格氏葡萄糖的那些)等。还可以存在防腐剂，例如抗菌剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体等。

[0136] 抗体单体、抗体、抗原结合片段及其免疫缀合物可与治疗剂或包含治疗剂的组合物组合用于治疗目的。

[0137] 在一些实施方案中，多特异性抗体分子以有效量与一种或多种另外的治疗剂组合使用。另外的治疗剂包括抗体、化疗剂、酶或其组合。在一些实施方案中，另外的治疗剂可以是抗雌激素剂，受体酪氨酸激酶抑制剂，激酶抑制剂，细胞周期抑制剂，DNA、RNA或蛋白质合成抑制剂，RAS抑制剂或其组合。在一些实施方案中，附加的治疗剂可以是检查点抑制剂。在一些实施方案中，治疗剂包括以下的的抑制剂：PD1、PDL1、CTLA4、4-1BB、OX40、GITR、ICOS、LIGHT、TIM3、LAG3、TIGIT、CD40、CD27、HVEM、BTLA、VISTA、B7H4、CSF1R、NKG2D、CD73、其衍生物或组合。

[0138] 在一个实施方案中，所述治疗剂可以包括卡培他滨、顺铂、曲妥珠单抗、氟维司群、他莫昔芬、来曲唑、依西美坦、阿那曲唑、氨鲁米特、睾内酯、伏氯唑、福美司坦、法倔唑、来曲唑、埃罗替尼、拉法替尼、达沙替尼，吉非替尼、伊马替尼、帕唑匹尼、拉帕替尼、舒尼替尼、尼罗替尼、索拉非尼、NaB-帕拉他赛、其衍生物或组合。在一个实施方案中，治疗剂可包括卡培他滨、顺铂、环磷酰胺、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、阿霉素、环磷酰胺、氮芥、长春新碱、丙卡巴肼、泼尼松龙、博来霉素、长春碱、达卡巴嗪、依托泊苷、表柔比星、培美曲塞、叶酸、吉西他滨、奥沙利铂、伊立替康、托泊替康、喜树碱、多西他赛、紫杉醇、氟维司群、他莫昔芬、来曲唑、依西美坦、阿那曲唑、氨鲁米特、睾内酯、伏氯唑、法罗唑、福美司坦、法倔唑、埃罗替尼、拉法替尼、达沙替尼、吉非替尼、奥西美替尼、范德替尼、阿法替尼、伊马替尼、帕佐匹尼、拉帕替尼、舒尼替尼、尼洛替尼、索拉非尼、NaB-帕拉他赛、依维莫司、替西罗莫司、达布非尼、维莫拉非尼、曲美替尼、长春他叶酸、阿帕替尼、克里唑替尼、哌福辛(periforsine)、奥拉帕利、硼替佐米、托法替尼、其衍生物或组合。

[0139] 癌症，包括乳腺癌、结肠直肠癌、胰腺癌、头颈癌、黑素瘤、卵巢癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、神经胶质瘤、食管癌、鼻咽癌、肛门癌、直肠癌、胃癌、膀胱癌、宫颈癌或脑癌，可表

达癌症相关基因。用特异性单克隆抗体或抗原结合片段抑制癌症相关活性可以对癌症具有治疗效果。此外，施用治疗有效量的包含对癌症相关蛋白特异的单克隆抗体或抗原结合片段的组合物可通过细胞毒性剂的作用治愈、预防、改善和延迟癌症的发展或转移。

[0140] 通过参考本文包括的特定实施方案和实施例的以下详细描述，可以更容易地理解本公开。尽管已经参考本发明的某些实施例的具体细节描述了本发明，但是并不意味着这些细节应当被认为是对本发明范围的限制。

[0141] 实施例

[0142] 实施例1)四特异性抗体与EGFRvIII抗原的结合

[0143] 使用FACS方法评估表1中所列的四特异性抗体与U87细胞系表面上表达的EGFRvIII抗原的结合。将四特异性抗体与U87细胞系温育，然后用直接缀合Alexa Fluor 647荧光染料的第二抗人抗体检测。在流式细胞仪BD LSRFortessa上分析四特异性抗体的细胞结合。所有测试的抗体以KD在单个数位和亚纳摩尔范围内与抗原结合(表2)。观察到的结合差异在3倍范围内，并且可能由分子内结合结构域的位置以及与相邻结构域的相互作用驱动。

[0144] 表1显示了具有EGFRvIII肿瘤抗原结合结构域的四特异性抗体实例。表2显示了与U87细胞系中表达的EGFRvIII抗原的结合。通过流式细胞术评估表1中所列的四特异性抗体与EGFRvIII抗原的结合。

[0145] 表1.具有EGFRvIII肿瘤抗原结合结构域的四特异性抗体。

[0146]

抗体ID	抗体结构域结构							
SI-39E29	806	×	284A10	×	PL221	×	420H5	
SI-39E18	284A10	×	806	×	PL221	×	420H5	
SI-39E13	420H5	×	PL230	×	284A10	×	806	
SI-39E4	PL230	×	806	×	284A10	×	420H5	
SI-39E10	420H5	×	PL230	×	806	×	284A10	
SI-39E23	PL230	×	806	×	420H5	×	284A10	

[0147] 表2.与CHO细胞系中表达的EGFRvIII抗原的结合。

[0148]

	CHO-EGFRviii结合							
抗体ID	抗体结构域结构							EC50 (nM)
SI-39E29	806	×	284A10	×	PL221	×	420H5	0.489
SI-39E18	284A10	×	806	×	PL221	×	420H5	0.7549
SI-39E13	420H5	×	PL230	×	284A10	×	806	1.244
SI-39E4	PL230	×	806	×	284A10	×	420H5	1.115
SI-39E10	420H5	×	PL230	×	806	×	284A10	1.542
SI-39E23	PL230	×	806	×	420H5	×	284A10	0.9222

[0149] 实施例2)：四特异性抗体与EGFRvIII、4-1BB、PD-L1和CD3蛋白抗原的结合

[0150] 在Fortebio Octet RED96仪器上通过表面等离子共振评价表1所列四特异性抗体对它们各自抗原的结合亲和力和动力学。抗原固定在传感器芯片表面上，且测试的抗体流过固定的抗原。所有分子显示与抗原的高结合(表3)。SI-39E29、SI-39E18和SI-39E23显示

出比测试的其它抗体更低的与CD3 e/d抗原的结合。表3显示了表1所列四特异性抗体与EGFRvIII、4-1BB、PD-L1和CD3抗原的结合。

[0151] 表3.与EGFRvIII、4-1BB、PD-L1和CD3抗原的结合。

[0152] 表3A.

[0153]

		EGFRVIII结合				4-1BB 结合			
抗体ID	抗体结构域结构	应答	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis (1/s)	应答	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis (1/s)
SI-39E29	806 ×284A10 ×PL221 ×420H5	1.4113	1.0E-12	1.38E+05	<1.0E-07	1.9181	5.94E-10	2.32E+05	1.38E-04
SI-39E18	284A10 ×806 ×PL221 ×420H5	1.4606	1.0E-12	1.19E+05	1.0E-07	2.0165	3.93E-10	2.35E+05	9.24E-05
SI-39E13	420H5 ×PL230 ×284A10 ×806	1.2317	1.0E-12	9.90E+04	1.0E-07	2.4703	1.17E-10	2.27E+05	2.65E-05

[0154]

SI-39E4	PL230 ×806 ×284A10 ×420H5	1.4058	1.0E-12	8.43E+04	1.0E-07	2.417	3.54E-10	1.67E+05	5.91E-05
SI-39E10	420H5 ×PL230 ×806 ×284A10	1.1414	1.0E-12	8.63E+04	1.0E-07	2.6348	3.56E-11	2.09E+05	7.43E-06
SI-39E23	PL230 ×806 ×420H5 ×284A10	1.3408	1.0E-12	1.41E+05	1.0E-07	2.0159	6.96E-10	2.03E+05	1.41E-04

[0155] 表3B.

[0156]

		PD-L1 结合				CD3 e/d 结合			
抗体ID	抗体结构域结构	应答	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	应答	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
SI-39E29	806 ×284A10 ×PL221 ×420H5	1.7228	2.83E-10	3.76E+05	1.06E-04	1.8493	4.75E-10	1.66E+05	7.86E-05
SI-39E18	284A10 ×806 ×PL221 ×420H5	1.8256	1.68E-10	3.79E+05	6.37E-05	1.7586	6.32E-10	1.74E+05	1.10E-04
SI-39E13	420H5 ×PL230 ×284A10 ×806	1.9223	8.01E-11	4.15E+05	3.32E-05	1.8019	<1.0E-12	1.04E+05	<1.0E-07
SI-39E4	PL230 ×806 ×284A10 ×420H5	2.1532	7.23E-11	3.33E+05	2.41E-05	1.965	<1.0E-12	8.61E+04	<1.0E-07
SI-39E10	420H5 ×PL230 ×806 ×284A10	1.9364	6.85E-11	3.81E+05	2.61E-05	2.2404	<1.0E-12	1.10E+05	<1.0E-07
SI-39E23	PL230 ×806 ×420H5 ×284A10	1.9024	4.02E-11	4.83E+05	1.94E-05	2.6545	2.07E-10	1.23E+05	2.54E-05

[0157] 实施例3)针对转染EGFRvIII的星形细胞瘤细胞系U87的重定向PBMC细胞毒性

[0158] 评估表1中所列的四特异性抗体重定向PBMC裂解用EGFRvIII肿瘤细胞系(U87vIII)转染的U87的能力。通过Ficoll梯度分离PBMC。U87vIII肿瘤细胞系稳定表达通过慢病毒转导(Sartorius)递送的核定位红色荧光蛋白(RFP)。U87vIII肿瘤细胞与PBMC共培养。通过计数RFP标记的肿瘤细胞核评价肿瘤细胞的裂解。在活细胞成像仪IncuCyte(Sartorius)上获得图像。SI-39E18和SI-39E13四特异性抗体在96小时显示出最高的效力，随后是SI-39E10。SI-39E4、SI-39E23和SI-39E29在本研究中显示出比表1中所列的其它抗体更低的效力(图2)。

[0159] 实施例4)针对急性淋巴细胞白血病细胞系Kasumi-2的重定向PBMC细胞毒性

[0160] 评估表4中所列的四特异性抗体裂解白血病的能力。通过Ficoll梯度分离PBMC。Kasumi-2肿瘤细胞与PBMC共培养。通过计数共培养96小时后存在的活肿瘤细胞的数目，在BD LSRFortesa流式细胞仪上评估肿瘤细胞裂解。四特异性抗体SI-38E14在本研究中显示最有效的活性，随后是SI-38E38(图3)。表4显示了具有CD19肿瘤抗原识别结构域的四特异性抗体实例。

[0161] 表4.具有CD19肿瘤抗原识别结构域的四特异性抗体。

[0162]

抗体ID	抗体结构域结构
SI-38E14	PL230×466F6×21D4×284A10
SI-38E38	PD224×466F6×21D4×284A10
SI-38E5	466F6×PL230×284A10×21D4

[0163]

SI-38E20	466F6×21D4×284A10×PL221
SI-38E35	21D4×284A10×466F6×PL221

[0164] 实施例5)针对转染EGFRvIII的星形细胞瘤U87的重定向PBMC细胞毒性,不同4-1BB结构域的功能活性及PD-L1和4-1BB结构域的功能影响

[0165] 评估表5中所列的四特异性抗体重定向PBMC裂解用EGFRvIII肿瘤细胞系(U87vIII)转染的U87的能力。通过Ficoll梯度分离PBMC。U87vIII肿瘤细胞系稳定表达通过慢病毒转导(Sartorius)递送的核定位红色荧光蛋白(RFP)。U87vIII肿瘤细胞与PBMC共培养。肿瘤细胞的裂解通过计数RFP标记的肿瘤细胞核来评估。在活细胞成像仪IncuCyte(Sartorius)上获得图像。温育96小时后评价抗体的活性。具有不同4-1BB结构域-SI-39E4、SI-39E2和SI-39E3的抗体显示相似的活性(图4)。PD-L1和4-1BB结构域被沉默(非功能性)FITC结构域、SI-39E1和SI-39E5取代的抗体显示裂解活性降低。该观察证实了4-1BB和PD-L1结构域的功能贡献。表5显示了具有EGFRvIII肿瘤抗原结合结构域的四特异性抗体实例。FITC对照抗体.

[0166] 表5.具有EGFRvIII肿瘤抗原结合结构域的四特异性抗体.FITC对照抗体.

[0167]

抗体ID	抗体结构域结构
SI-39E4	PL230×806×284A10×420H5
SI-39E3	PL230×806×284A10×466F6
SI-39E2	PL230×806×284A10×460C3
SI-39E5	FITC ×806×284A10×420H5
SI-39E1	PL230×806×284A10×FITC

[0168] 实施例6)与人ROR1转染的CHO细胞结合的四特异性抗体的FACS分析

[0169] 测试表1和表2中所列的四特异性抗体与稳定表达全长人ROR1的中国仓鼠卵巢细胞(CHO)细胞的结合。制备2X终浓度的抗体,在50μl PBS/2%FBS中的96孔板的3个孔中按1:5滴定,然后加入在50μl PBS/2%FBS中的5,000ROR1-CHO细胞。将该混合物在冰上温育30分钟,用200μl PBS/2%FBS洗涤一次,然后加入储备液1:1000稀释度的第二抗体PE山羊抗人IgG Fc,并将该混合物在冰上温育30分钟。将细胞用2×200μl PBS/2%FBS洗涤,再悬浮于50μl PBS/2%FBS中,并在BD LSRFORTESSA上分析,结合谱如图5所示。具有对ROR1的Ig结构域有特异性的323H7结合结构域的四特异性抗体SI-35E18、19和20显示出比具有对ROR1的卷曲结构域有特异性的338H4结合结构域的四特异性抗体SI-3521、22和23更高的结合,且具有对ROR1的kringle结构域有特异性的330F11结合结构域的四特异性抗体SI-3524、25和

26不结合。

[0170] 实施例7)与人41BB转染的CHO细胞结合的四特异性抗体的FACS分析

[0171] 测试表6中列出的四特异性抗体与稳定表达全长人ROR1的中国仓鼠卵巢细胞(CHO)细胞的结合。制备2X终浓度的抗体,在50μl PBS/2%FBS中的96孔板的3个孔中按1:5滴定,然后加入在50μl PBS/2%FBS中的5,000ROR1-CHO细胞。将该混合物在冰上温育30分钟,用200μl PBS/2%FBS洗涤一次,然后加入储备液1:1000稀释度的第二抗体PE山羊抗人IgG Fc,并将该混合物在冰上温育30分钟。将细胞用2×200μl PBS/2%FBS洗涤,再悬浮于50μl PBS/2%FBS中,并在BD LSRFortessa上分析,结合谱如图6所示。除对照SI-27E12外的所有四特异性抗体含有41BB结合结构域460C3、420H5或466F6,并以不同强度与表达41BB的CHO细胞结合。表6显示了示例性四特异性抗体列表。

[0172] 表6.四特异性抗体列表。

[0173]

		结构域1		结构域2			结构域3		结构域4	
ID = SI-xx		LH-scFv	人源化变体	fab	人源化变体	FC	HL-scFv	人源化变体	HL-scFv	人源化变体
39	E02	PL230C6	L2H3	806	-		284A10	H1L1	460C3	H1L1
39	E03	PL230C6	L2H3	806	-		284A10	H1L1	466F6	H2L5
39	E18	284A10	L1H1	806	-	n2	PL221G5	H1L1	420H5	H3L3
39	E13	420H5	L3H3	PL230C6	H3L2	n2	284A10	H1L1	806	
39	E10	420H5	L3H3	PL230C6	H3L2	n2	806	-	284A10	H1L1
39	E29	806	-	284A10	H1L1	n2	PL221G5	H1L1	420H5	H3L3
39	E04	PL230C6	L2H3	806	-	n2	284A10	H1L1	420H5	H3L3
39	E23	PL230C6	L2H3	806	-	n2	420H5	H3L3	284A10	H1L1
38	E14	PL230C6	L2H3	466F6	H2L5	n2	21D4	-	284A10	H1L1
38	E38	PD224D1	L2H2	466F6	H2L5	n2	21D4	-	284A10	H1L1
38	E05	466F6	L5H2	PL230C6	H3L2	n2	284A10	H1L1	21D4	-
38	E20	466F6	L5H2	21D4	-	n2	284A10	H1L1	PL221G5	H1L1
39	E05	4-4-20 (FITC)	-	806	-	n2	284A10	H1L1	420H5	H3L3
39	E01	PL230C6	L2H3	806	-	n2	284A10	H1L1	4-4-20 (FITC)	-
35	E02	460C3	L1H1	PL230C6	H3L2	n2	324C6	H2L1	4-4-20 (FITC)	-
35	E12	4-4-20 (FITC)	-	PL230C6	H3L2	n2	324C6	H2L1	480C8	H1L1
35	E13	460C3	L1H1	PL230C6	H3L2	n2	4-4-20 (FITC)	-	480C8	H1L1
35	E15	460C3	L1H1	4-4-20 (FITC)	-	n2	324C6	H2L1	480C8	H1L1
35	E18	460C3	L1H1	PL230C6	H3L2	n2	323H7	H4L1	284A10	H1L1
35	E19	420H5	L3H3	PL230C6	H3L2	n2	323H7	H4L1	284A10	H1L1
35	E20	466F6	L5H2	PL230C6	H3L2	n2	323H7	H4L1	284A10	H1L1
35	E21	460C3	L1H1	PL230C6	H3L2	n2	338H4	H3L4	284A10	H1L1

[0174]

35	E22	420H5	L3H3	PL230C6	H3L2	n2	338H4	H3L4	284A10	H1L1
35	E23	466F6	L5H2	PL230C6	H3L2	n2	338H4	H3L4	284A10	H1L1
35	E24	460C3	L1H1	PL230C6	H3L2	n2	330F11	H1L1	284A10	H1L1
35	E25	420H5	L3H3	PL230C6	H3L2	n2	330F11	H1L1	284A10	H1L1
35	E26	466F6	L5H2	PL230C6	H3L2	n2	330F11	H1L1	284A10	H1L1
35	E36	4-4-20 (FITC)	-	PL230C6	H3L2	n2	338H4	H3L4	284A10	H1L1
35	E37	460C3	L1H1	4-4-20 (FITC)	-	n2	338H4	H3L4	284A10	H1L1
35	E38	460C3	L1H1	PL230C6	H3L2	n2	4-4-20 (FITC)	-	284A10	H1L1
35	E39	460C3	L1H1	PL230C6	H3L2	n2	338H4	H3L4	4-4-20 (FITC)	-

[0175] 实施例8)与人PD-L1转染的CHO细胞结合的四特异性抗体的FACS分析

[0176] 测试表6中列出的四特异性抗体与稳定表达全长人ROR1的中国仓鼠卵巢细胞(CHO)细胞的结合。制备2X终浓度的抗体,在50μl PBS/2%FBS中的96孔板的3个孔中按1:5滴定,然后加入在50μl PBS/2%FBS中的5,000ROR1-CHO细胞。将该混合物在冰上温育30分钟,用200μl PBS/2%FBS洗涤一次,然后加入储备液1:1000稀释度的第二抗体PE山羊抗人IgG Fc,并将该混合物在冰上温育30分钟。将细胞用2×200μl PBS/2%FBS洗涤,再悬浮于50μl PBS/2%FBS中,并在BD LSRFORTESSA上分析,结合谱如图7所示。除了对照SI-27E15之外的所有四特异性抗体都含有相同的PD-L1结合结构域PL230C6,并且显示出与表达PD-L1的CHO细胞非常相似的结合强度。

[0177] 实施例9)以“外周血单核细胞为效应物,B-急性淋巴细胞白血病(B-ALL)细胞系Kasumi-2为靶标的重定向T细胞细胞毒性(RTCC)测定

[0178] 使用人外周血单核细胞(PBMC)作为效应物,测试表6中所列的四特异性抗体针对B-ALL细胞系Kasumi2的RTCC活性。Kasumi2靶细胞,5×10e6,用CFSE(Invitrogen,#C34554)以0.5μM在10ml培养基中于37℃标记20分钟。将细胞用50ml培养基洗涤3次,然后重悬浮于10ml中,然后再次计数。以2X终浓度制备抗体,并在200μl RPMI+10%FBS中在96孔板的10个孔中按1:3滴定。通过标准Ficoll密度梯度从“leukopak”纯化人PBMC,所述“leukopak”是从正常人外周血收集的富集白细胞单采产物。在最终目标96孔板中,通过向测定的各孔中加入100μl靶细胞(5,000)、50μl PBMC(25,000)和100μl每种抗体稀释液,合并靶细胞、PBMC和连续滴定的抗体。将测定板在37℃温育约72小时,然后收集每个测定孔的内容物并分析残留的CFSE标记的靶细胞的数目。如图8所示,四特异性抗体都含有相同的PD-L1结合结构域PL230C6,相同的ROR1结合结构域323H7和相同的CD3结合结构域284A10,但具有41BB结合结构域460C3、420H5和466F6之一,并且与除了对照SI-27E12之外的对照相比显示出更高的RTCC活性,对照SI-27E12不具有41BB结合结构域,但是似乎具有与四特异性抗体SI-35E18、19和20类似的效力。

[0179] 实施例10)以CD8+、CD45RO+记忆T细胞为效应物,B-急性淋巴细胞白血病(B-ALL)细胞系Kasumi-2为靶标的重定向T细胞毒性(RTCC)测定

[0180] 使用人CD8+、CD45RO+记忆T细胞作为效应物,测试表6中所列的四特异性抗体针对B-ALL细胞系Kasumi2的RTCC活性。Kasumi2靶细胞,5×10e6,用CFSE(Invitrogen,#C34554)以0.5μM在10ml培养基中于37℃标记20分钟。将细胞用50ml培养基洗涤3次,然后重悬浮于

10ml中，然后再次计数。以2X终浓度制备抗体，并在200μl RPMI+10％FBS中在96孔板的10个孔中按1:3滴定。根据制造商的方案，使用EasySep™人记忆CD8+T细胞富集试剂盒(StemCell TechNO.logies，#19159)，从来自正常供体的外周血单核细胞富集人CD8+、CD45RO+记忆T细胞。通过FACS分析确定最终细胞群为98％CD8+、CD45RO+T细胞(数据未显示)。在最终的目标96孔板中，通过向测定的每个孔中加入100μl靶细胞(5,000)、50μl CD8+、CD45RO+记忆T细胞(25,000)和100μl每种抗体稀释液，合并靶细胞、T细胞和连续滴定的抗体。将测定板在37℃温育约72小时，然后收集每个测定孔的内容物并分析残留的CFSE标记的靶细胞的数目。如图9所示，四特异性抗体都含有相同的PD-L1结合结构域PL230C6，相同的ROR1结合结构域323H7和相同的CD3结合结构域284A10，但具有41BB结合结构域460C3、420H5和466F6之一，并且与不含有41BB、PD-L1、ROR1或CD3结合结构域之一的对照相比显示出更高的RTCC活性。

[0181] 实施例11)以CD8+、CD45RA+初始T细胞为效应物，B-急性淋巴细胞白血病(B-ALL)细胞系Kasumi-2为靶标的重定向T细胞毒性(RTCC)测定

[0182] 使用人CD8+、CD45RA+记忆T细胞作为效应物，测试表6中所列的四特异性抗体针对B-ALL细胞系Kasumi2的RTCC活性。Kasumi2靶细胞，5×10e6，用CFSE(Invitrogen，#C34554)以0.5μM在10ml培养基中于37℃标记20分钟。将细胞用50ml培养基洗涤3次，然后重悬浮于10ml中，然后再次计数。以2X终浓度制备抗体，并在200μl RPMI+10％FBS中在96孔板的10个孔中按1:3滴定。根据制造商的方案，使用EasySep™人初始CD8+T细胞分离试剂盒(干细胞技术(StemCell TechNO.logies)，#19258)，从来自正常供体的外周血单核细胞富集人CD8+、CD45RA+记忆T细胞。通过FACS分析确定最终细胞群为98％CD8+、CD45RA+T细胞(数据未显示)。在最终的目标96孔板中，通过向测定的各孔中加入100μl靶细胞(5,000)，50μl CD8+，CD45RO+T细胞(25,000)和100μl每种抗体稀释液，合并靶细胞、T细胞和连续滴定的抗体。将测定板在37℃温育约72小时，然后收集每个测定孔的内容物并分析残留的CFSE标记的靶细胞的数目。如图10所示，四特异性抗体都含有相同的PD-L1结合结构域PL230C6，相同的ROR1结合结构域323H7和相同的CD3结合结构域284A10，但具有41BB结合结构域460C3、420H5和466F6之一，并且与不含有41BB、PD-L1、ROR1或CD3结合结构域之一的对照相比显示出更高的RTCC活性。

[0183] 实施例12)以外周血单核细胞为效应物和B-急性淋巴细胞白血病(B-ALL)细胞系Kasumi-2为靶标的重定向T细胞细胞毒性(RTCC)测定

[0184] 使用人外周血单核细胞(PBMC)作为效应物，测试表6中所列的四特异性抗体针对B-ALL细胞系Kasumi2的RTCC活性。Kasumi2靶细胞，5×10e6，用CFSE(Invitrogen，#C34554)以0.5μM在10ml培养基中于37℃标记20分钟。将细胞用50ml培养基洗涤3次，然后重悬浮于10ml中，然后再次计数。以2X终浓度制备抗体，并在200μl RPMI+10％FBS中在96孔板的10个孔中按1:3滴定。通过标准Ficoll密度梯度从“leukopak”纯化人PBMC，所述“leukopak”是从正常人外周血收集的富集白细胞单采产物。在最终目标96孔板中，通过向测定的各孔中加入100μl靶细胞(5,000)、50μl PBMC(25,000)和100μl每种抗体稀释液，合并靶细胞、PBMC和连续滴定的抗体。将测定板在37℃温育约72小时，然后收集每个测定孔的内容物并分析残留的CFSE标记的靶细胞的数目。如图11所示，四特异性抗体都含有相同的PD-L1结合结构域PL230C6，相同的ROR1结合结构域338H4和相同的CD3结合结构域284A10，但具有41BB结合结构域460C3、420H5和466F6之一，并且与除了对照SI-35E36之外的对照相比显示出更高的

RTCC活性，对照SI-35E36不具有41BB结合结构域，但是似乎具有与四特异性抗体SI-35E18、19和20类似的效力。

[0185] 实施例13)以CD8+、CD45RO+记忆T细胞为效应物，B-急性淋巴细胞白血病(B-ALL)细胞系Kasumi-2为靶标的重定向T细胞毒性(RTCC)测定

[0186] 使用人CD8+、CD45RO+记忆T细胞作为效应物，测试表6中所列的四特异性抗体针对B-ALL细胞系Kasumi2的RTCC活性。Kasumi2靶细胞，5×10e6，用CFSE(Invitrogen，#C34554)以0.5μM在10ml培养基中于37℃标记20分钟。将细胞用50ml培养基洗涤3次，然后重悬浮于10ml中，然后再次计数。以2X终浓度制备抗体，并在200μl RPMI+10％FBS中在96孔板的10个孔中按1:3滴定。根据制造商的方案，使用EasySep™人记忆CD8+T细胞富集试剂盒(StemCell TechNO.logies，#19159)，从来自正常供体的外周血单核细胞富集人CD8+、CD45RO+记忆T细胞。通过FACS分析确定最终细胞群为98％CD8+、CD45RO+T细胞(数据未显示)。在最终的目标96孔板中，通过向测定的每个孔中加入100μl靶细胞(5,000)、50μl CD8+、CD45RO+记忆T细胞(25,000)和100μl每种抗体稀释液，合并靶细胞、T细胞和连续滴定的抗体。将测定板在37℃温育约72小时，然后收集每个测定孔的内容物并分析残留的CFSE标记的靶细胞的数目。如图12所示，四特异性抗体都含有相同的PD-L1结合结构域PL230C6，相同的ROR1结合结构域338H4和相同的CD3结合结构域284A10，但是具有41BB结合结构域460C3、420H5和466F6之一，并且与不含有41BB、PD-L1、ROR1或CD3结合结构域之一的对照相比显示出更高的RTCC活性。

[0187] 实施例14)以CD8+、CD45RA+初始T细胞为效应物，B-急性淋巴细胞白血病(B-ALL)细胞系Kasumi-2为靶标的重定向T细胞毒性(RTCC)测定

[0188] 使用人CD8+、CD45RA+记忆T细胞作为效应物，测试表6中所列的四特异性抗体针对B-ALL细胞系Kasumi2的RTCC活性。Kasumi2靶细胞，5×10e6，用CFSE(Invitrogen，#C34554)以0.5μM在10ml培养基中于37℃标记20分钟。将细胞用50ml培养基洗涤3次，然后重悬浮于10ml中，然后再次计数。以2X终浓度制备抗体，并在200μl RPMI+10％FBS中在96孔板的10个孔中按1:3滴定。根据制造商的方案，使用EasySep™人初始CD8+T细胞分离试剂盒(干细胞技术(StemCell TechNO.logies)，#19258)，从来自正常供体的外周血单核细胞富集人CD8+、CD45RA+记忆T细胞。通过FACS分析确定最终细胞群为98％CD8+、CD45RA+T细胞(数据未显示)。在最终的目标96孔板中，通过向测定的各孔中加入100μl靶细胞(5,000)，50μl CD8+，CD45RO+T细胞(25,000)和100μl每种抗体稀释液，合并靶细胞、T细胞和连续滴定的抗体。将测定板在37℃温育约72小时，然后收集每个测定孔的内容物并分析残留的CFSE标记的靶细胞的数目。如图13所示，四特异性抗体都含有相同的PD-L1结合结构域PL230C6，相同的ROR1结合结构域338H4和相同的CD3结合结构域284A10，但是具有41BB结合结构域460C3、420H5和466F6之一，但是与不含有41BB、PD-L1、ROR1或CD3结合结构域之一的对照相比，没有显示更大的RTCC活性。这与实施例6中描述的和图10中显示的对CD8+、CD45RA+初始T细胞确实显示RTCC活性的四特异性抗体形成对比。

[0189] 虽然已参考特定实施例或实例描述了本发明，但应了解，所述实施例是说明性的且本发明的范围不限于此。本公开的替代实施例对于本公开所属领域的普通技术人员来说是显而易见的。这些替代实施例被认为包括在本公开的范围内。因此，本发明的范围由所附权利要求书限定且由上文描述支持。

[0190] 本公开中引用或提及的所有参考文献在此全文引入作为参考。

[0191] 序列表

[0192] 氨基酸序列中CDR加下划线

[0193] >SEQ ID:01抗-CD3 284A10 VHv1 nt

[0194] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCATCAGTACCAATGCAATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGAGTCATTACTGGTCGTGATATCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGCGCGACGGTGGATCATCTGCTATTACTAGTAACAACATTTGGGGCCAAGGAACTCTGGTCACCGTTTCTTCA

[0195] >SEQ ID:02抗-CD3 284A10 VHv1 aa

[0196] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISTNAMSWVRQAPGKGLEWIGVITGRDITYYASWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGSSAITSNNIWGQGTLVTVSS

[0197] >SEQ ID:03抗-CD3 284A10 VLv1 nt

[0198] GACGTCGTGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAATTGCCAAGCCAGTGAGAGCATTAGCAGTTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGAAGCATCCAAACTGGCATCTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAAGGCTATTTTTATTTTATTAGTCGTACTTATGTAAATTCTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

[0199] >SEQ ID:04抗-CD3 284A10 VLv1 aa

[0200] DVVMTQSPSTLSASVGDRVTINCQASESISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYEASKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQGYFYFISRTYVNSFGGGTKVEIK

[0201] >SEQ ID:05抗-CD3 480C8 VHv1 nt

[0202] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAATCGACCTCAGTAGCAATGCAATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGAGTCATTACTGGTCGTGATATCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGCGCGACGGTGGATCATCTGCTATTAATAGTAAGAACATTTGGGGCCAAGGAACTCTGGTCACCGTTTCTTCA

[0203] >SEQ ID:06抗-CD3 480C8 VHv1 aa

[0204] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSSNAMSWVRQAPGKGLEWIGVITGRDITYYASWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGSSAINSKNIWGQGTLVTVSS

[0205] >SEQ ID:07抗-CD3 480C8 VLv1 ntGACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAAGCCAGTGAGAGCATTAGCAGTTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGAAGCATCCAAACTGGCATCTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAAGGCTATTTTTATTTTATTAGTCGTACTTATGTAAATGCTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

[0206] >SEQ ID:08抗-CD3 480C8 VLv1 aa

[0207] DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASESISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYEASKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQGYFYFISRTYVNAFGGGTKVEIK

[0208] >SEQ ID:09抗-PD-L1 PL230C6 VHv3 nt

[0209] CAGTCGGTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCC TCTGGAATCGACCTTAATACCTACGACATGATCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTAGAGTGGGTTGGAAT CATTACTTATAGTGGTAGTAGATACTACGCGAACTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAAAGACAATACCAAGA ACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCCAGAGATTATATGAGT GGTTCCCACTTGTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCTAGT

[0210] >SEQ ID:10抗-PD-L1 PL230C6 VHv3 aa

[0211] QSVEESGGGLVQPGGSLRLSCTASGIDLNTYDMIWVRQAPGKGLEWVGIITYSGSRYYANWAKGRFTIS KDNTKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYMSGSHLWGQGTLVTVSS

[0212] >SEQ ID:11抗-PD-L1 PL230C6 VLv2 nt

[0213] GCCTATGATATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAAGTGT CAGGCCAGTGAGGACATTTATAGCTTCTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCCA TTCTGCATCCTCTCTGGCATCTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGGTTATGGTAAAAATAATGTTGATAATGCT TTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

[0214] >SEQ ID:12抗-PD-L1 PL230C6 VLv2 aa

[0215] AYDMTQSPSSVSASVGDRVTIKCQASEDIYSFLAWYQQKPGKAPKLLIHSASSLASGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYGKNNVDNAFGGGTKVEIK

[0216] >SEQ ID:13抗-PD-L1 PL221G5 VHv1 nt

[0217] GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA GCCTCTGGATTCTCCTTCAGTAGCGGGTACGACATGTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGAT CGCATGCATTGCTGCTGGTAGTGCTGGTATCACTTACGACGCGAACTGGGCGAAAGGCCGGTTCACCATCTCCAGAG ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGA TCGGCGTTTTCGTTCGACTACGCCATGGACCTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

[0218] >SEQ ID:14抗-PD-L1 PL221G5 VHv1 aa

[0219] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSGYDMCWVRQAPGKGLEWIACIAAGSAGITYDANWAKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSAFSFDYAMDLWGQGTLVTVSS

[0220] >SEQ ID:15抗-PD-L1 PL221G5 VLv1 nt

[0221] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC CAGGCCAGTCAGAGCATTAGTTCCCACTTAAACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA TAAGGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTTACTCTCACCA TCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGGGTTATAGTTGGGGTAATGTTGATAATGTT TTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

[0222] >SEQ ID:16抗-PD-L1 PL221G5 VLv1 aa

[0223] DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSISSHLNWYQQKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGT EFTLTISSLQPDDFATYYCQQGYSWGNVDNVFGGGTKVEIK

[0224] >SEQ ID:17抗-PD-1PD224D1 VHv2 nt

[0225] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACA GCCTCTGGATTCTCCCTAAGTAGCTATGCAATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTACATCGG CTACATTGGTGATACTACTGGCATAGCCTACGCGAGCTGGGCGAATGGCAGATTCACCATCTCCAAAGACAATACCA

AGAACACGGTGGATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTGGTCC
TACTTAGACATCTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

[0226] >SEQ ID:18抗-PD-1PD224D1 VHv2 aa

[0227] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSYAMSWVRQAPGKGLEYIGYIGDTTGIAYASWANGRFTI
SKDNTKNTVDLQMNSLRAEDTAVYYCARGWSYLDIWGQGTLVTVSS

[0228] >SEQ ID:19抗-PD-1PD224D1 VLv2 nt

[0229] GCCCTTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
CAGGCCAGTCAGAACATTTACAGCAATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCTCCTGATCTA
TCAGGCCTCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGGTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCA
TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAGGCGGTTATTATAGTGCTGCCCTTAATACTTTC
GGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

[0230] >SEQ ID:20抗-PD-1PD224D1 VLv2 aa

[0231] ALVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNIYSNLAWYQQKPGKVPKLLIYQASTLASGVPSRFSGSGYGT
DFTLTISSLQPEDVATYYCQGGYYSAALNTFGGGTKVEIK

[0232] >SEQ ID:21抗-4-1BB 420H5 VHv3 nt

[0233] CAGTCGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCTCCTTCAGTAGCAACTACTGGATATGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGC
ATGCATTTATGTTGGTAGTAGTGGTGACACTTACTACGCGAGCTCCGCGAAAGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACA
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGAGAT
AGTAGTAGTTATTATATGTTTAACTTGTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

[0234] >SEQ ID:22抗-4-1BB 420H5 VHv3 aa

[0235] QSLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSNYWICWVRQAPGKGLEWIACIYVGSSGDTYYASSAKGRF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSSSYYMFNLWGQGTLVTVSS

[0236] >SEQ ID:23抗-4-1BB 420H5 VLv3 nt

[0237] GCCCTTGTGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAATTGC
CAGGCCAGTGAGGACATTGATACCTATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTT
TTATGCATCCGATCTGGCATCTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACCA
TCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAAGGCGGTTACTATACTAGTAGTGCTGATACGAGG
GGTGCTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

[0238] >SEQ ID:24抗-4-1BB 420H5 VLv3 aa

[0239] ALVMTQSPSTLSASVGDRVTINCQASEDIDTYLAWYQQKPGKAPKLLIFYASDLASGVPSRFSGSGSGT
EFTLTISSLQPDDFATYYCQGGYYTSSADTRGAFGGGTKVEIK

[0240] >SEQ ID:25抗-4-1BB 466F6 VHv2 nt

[0241] CGGTCGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCC
TCTGGATTCACCATCAGTAGCTACCACATGCAGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTACATCGGAAC
CATTAGTAGTGGTGGTAATGTATACTACGCGAGCTCCGCGAGAGGCAGATTCACCATCTCCAGACCCTCGTCCAAGA
ACACGGTGGATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGACTCTGGTTAT
AGTGATCCTATGTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

[0242] >SEQ ID:26抗-4-1BB 466F6 VHv2 aa

[0243] RSLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTISSYHMQWVRQAPGKGLEYIGTISSGGNVYYASSARGRFTIS RPSSKNTVDLQMNSLRAEDTAVYYCARDSGYSDPMWGQGTLVTVSS

[0244] >SEQ ID:27抗-4-1BB 466F6 VLv5 nt

[0245] GACGTTGTGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACCTGT CAGGCCAGTCAGAACATTAGGACTTACTTATCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA TGCTGCAGCCAATCTGGCATCTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA TCAGCGACCTGGAGCCTGGCGATGCTGCAACTTACTATTGTCAGTCTACCTATCTTGGTACTGATTATGTTGGCGGT GCTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

[0246] >SEQ ID:28抗-4-1BB 466F6 VLv5 aa

[0247] DVVMTQSPSSVSASVGDRVTITCQASQNIRTYLSWYQQKPGKAPKLLIYAAANLASGVPSRFSGSGSGT DFTLTISDLEPGDAATYYCQSTYLGTDYVGGAFGGGTKVEIK

[0248] >SEQ ID:29抗-4-1BB 460C3 VHv1 nt

[0249] GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA GCCTCTGGAATCGACTTCAGTAGGAGATACTACATGTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGAT CGCATGCATATATACTGGTAGCCGCGATACTCCTCACTACGCGAGCTCCGCGAAAGGCCGGTTCACCATCTCCAGAG ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGA GAAGGTAGCCTGTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

[0250] >SEQ ID:30抗-4-1BB 460C3 VHv1 aa

[0251] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSRRYYMCWVRQAPGKGLEWIACIYTGSRDTPHYASSAKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGSLWGQGTLVTVSS

[0252] >SEQ ID:31抗-4-1BB 460C3 VLv1 nt

[0253] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC CAGTCCAGTCAGAGTGTTTATAGTAACTGGTTCTCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGAT CTATTCTGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCA CCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCGCAGGCGGTTACAATACTGTTATTGATACTTTT GCTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

[0254] >SEQ ID:32抗-4-1BB 460C3 VLv1 aa

[0255] DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCQSSQSVYSNWFSWYQQKPGKAPKLLIYSASTLASGVPSRFSGSGSG TEFTLTISSLQPDDFATYYCAGGYNTVIDTFAFGGGTKVEIK

[0256] >SEQ ID:33抗-ROR1 324C6 VHv2 nt

[0257] CAGTCGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACTGCC TCTGGATTCTCCCTCAGTAGGTACTACATGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGAAC CATTTATACTAGTGGTAGTACATGGTACGCGAGCTGGACAAAAGGCAGATTCACCATCTCCAAAGACAATACCAAGA ACACGGTGGATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGATCCTATTATGGC GGTGATAAGACTGGTTTAGGCATCTGGGGCCAGGGAACTCTGGTTACCGTCTCTTCA

[0258] >SEQ ID:34抗-ROR1 324C6 VHv2 nt

[0259] QSLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSRYYMTWVRQAPGKGLEWIGTIYTSGSTWYASWTKGRFTIS KDNTKNTVDLQMNSLRAEDTAVYYCARSYYGGDKTGLGIWGQGTLVTVSS

[0260] >SEQ ID:35抗-ROR1 324C6 VLv1 nt

[0261] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC CAGGCCAGTCAGAGCATTGATAGTTGGTTATCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA TCAGGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCA TCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAATCTGCTTATGGTGTTAGTGGTACTAGTAGTTAT TTATATACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

[0262] >SEQ ID:36抗-ROR1 324C6 VLv1 aa

[0263] DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSIDSWLSWYQQKPGKAPKLLIYQASTLASGVPSRFSGSGSGT EFTLTISSLQPDDFATYYCQSAYGVSGTSSYLYTFGGGTKVEIK

[0264] >SEQ ID:37抗-ROR1 323H7 VHv4 nt

[0265] GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA GCCTCTGGATTCACCATCAGTCGCTACCACATGACTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGG ACATATTTATGTTAATAATGATGACACAGACTACGCGAGCTCCGCGAAAGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATT CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCGAGATTGGAT GTTGGTGGTGGTGGTGCTTATATTGGGGACATCTGGGGCCAGGGAACTCTGGTTACCGTCTCTTCA

[0266] >SEQ ID:38抗-ROR1 323H7 VHv4 aa

[0267] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISRYHMTWVRQAPGKGLEWIGHIYVNNDDTDYASSAKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTATYFCARLDVGGGGAYIGDIWGQGTLVTVSS

[0268] >SEQ ID:39抗-ROR1 323H7 VLv1 nt

[0269] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC CAGTCCAGTCAGAGTGTTTATAACAACAACGACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCTCCT GATCTATTATGCTTCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTC TCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTGCAGGCGGTTATGATACGGATGGTCTTGAT ACGTTTGCTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

[0270] >SEQ ID:40抗-ROR1 323H7 VLv1 aa

[0271] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVYNNNDLAWYQQKPGKVPKLLIYYASTLASGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDVATYYCAGGYDTDGLDTFAFGGGTKVEIK

[0272] >SEQ ID:41抗-ROR1 338H4 VHv3 nt

[0273] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACT GCCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGCTATGCAATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAGGGGGCTGGAGTGGATCGG AATCATTTATGCTAGTGGTAGCACATACTACGCGAGCTCGGCGAAAGGCAGATTCACCATCTCCAAAGACAATACCA AGAACACGGTGGATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAATTTATGAC GGCATGGACCTCTGGGGCCAGGGAACTCTGGTTACCGTCTCTTCA

[0274] >SEQ ID:42抗-ROR1 338H4 VHv3 aa

[0275] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSYAMSWVRQAPGRGLEWIGIIYASGSTYYASSAKGRFTI SKDNTKNTVDLQMNSLRAEDTAVYYCARIYDGMDLWGQGTLVTVSS

[0276] >SEQ ID:43抗-ROR1 338H4 VLv4 nt

[0277] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAATTGC CAGGCCAGTCAGAACATTTACAGCTACTTATCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCGCCTGATCTA TCTGGCATCTACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTACACTCTCACCA

TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAAGCAATTATAACGGTAATTATGGTTTCGGCGGA
GGGACCAAGGTGGAGATCAAA

[0278] >SEQ ID:44抗-ROR1 338H4 VLv4 aa

[0279] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTINCQASQNIYSYLSWYQQKPGKVPKRLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGT
DYTLTISSLQPEDVATYYCQSNYNGNYGFGGGTKVEIK

[0280] >SEQ ID:45抗-ROR1 330F11 VHv1 nt

[0281] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA
GCCTCTGGATTCTCCCTCAATAACTACTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGG
AACCATTAGTAGTGGTGCGTATACATGGTTCGCCACCTGGGCGACAGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCA
AGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGATATTCTTCT
ACTACTGATTGGACCTACTTTAACATCTGGGGCCAGGGAACTCTGGTTACCGTCTCTTCA

[0282] >SEQ ID:46抗-ROR1 330F11 VHv1 aa

[0283] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLNNYWMSWVRQAPGKGLEWIGTISSGAYTWFATWATGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYSSTTDWTYFNIWGQGTLVTVSS

[0284] >SEQ ID:47抗-ROR1 330F11 VLv1 nt

[0285] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
CAGGCCAGTCAGAGCATTAATAACTACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA
TAGGGCATCCACTCTGGAATCTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACCA
TCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAAAGCTATAATGGTGTTGGTAGGACTGCTTTCGGC
GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

[0286] >SEQ ID:48抗-ROR1 330F11 VLv1 aa

[0287] DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSINNYLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLESGVPSRFSGSGSGT
EFTLTISSLQPDDFATYYCQSYNGVGRTAFGGGTKVEIK

[0288] >SEQ ID:49抗-EGFRvIII mAb 806VH nt

[0289] GATGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTAGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCACCTGCACT
GTCACTGGCTACTCAATCACCAGTGATTTTGCCTGGAACTGGATTCGGCAGTTTCCAGGAAACAAGCTGGAGTGGAT
GGGCTACATAAGTTATAGTGGTAACACTAGGTACAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCGCGACACAT
CCAAGAACCAATTCTTCCTGCAGTTGAACTCTGTGACTATTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGTAACGGCGGGA
CGCGGGTTTCCTTATTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

[0290] >SEQ ID:50抗-EGFRvIII mAb 806VH aa

[0291] DVQLQESGPSLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDFAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGNTRYNPSLKSRIS
ITRDTSKNQFFLQLNSVTIEDTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSA

[0292] >SEQ ID:51抗-EGFRvIII mAb 806VL nt

[0293] GACATCCTGATGACCCAATCTCCATCCTCCATGTCTGTATCTCTGGGAGACACAGTCAGCATCACTTGC
CATTCAAGTCAGGACATTAACAGTAATATAGGGTGGTTGCAGCAGAGACCAGGGAAATCATTTAAGGGCCTGATCTA
TCATGGAACCAACTTGGACGATGAAGTTCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGAGCCGATTATTCTCTCACCA
TCAGCAGCCTGGAATCTGAAGATTTTGCAGACTATTACTGTGTACAGTATGCTCAGTTTCCGTGGACGTTCGGTGGA
GGCACCAAGCTGGAAATCAAA

[0294] >SEQ ID:52抗-EGFRvIII mAb 806VL aa

[0295] DILMTQSPSSMSVSLGDTVSITCHSSQDINSNIGWLQQRPGKSFKGLIYHGTNLDDEVPSRFSGSGSG ADYSLTISSLESE DFADYYCVQYAQFPWTFGGGTKLEIK

[0296] >SEQ ID:53抗-CD19 21D4 VH nt

[0297] GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAGAAACCAGGAGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAG GGTTCTGGATACAGCTTTAGCAGTTCATGGATCGGCTGGGTGCGCCAGGCACCTGGGAAAGGCCTGGAATGGATGGG GATCATCTATCCTGATGACTCTGATACCAGATACAGTCCATCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGT CCATCAGGACTGCCTACCTGCAGTGGAGTAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCTATGTATTACTGTGCGAGACATGTT ACTATGATTTGGGGAGTTATTATTGACTTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0298] >SEQ ID:54抗-CD19 21D4 VH aa

[0299] EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFSSSWIGWVRQAPGKGLEWMGIIYPDDSDTRYSPSFQGQVT ISADKSIRTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHVTMIWGVIIDFWGQGTLVTVSS

[0300] >SEQ ID:55抗-CD19 21D4 VL nt

[0301] GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC CGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTA TGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCATTCACTTTCGGCCCT GGGACCAAAGTGGATATCAAA

[0302] >SEQ ID:56抗-CD19 21D4 VL aa

[0303] AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPED FATYYCQQFNSYPFTFGPGTKVDIK

[0304] >SEQ ID:57抗-FITC 4-4-20VH nt

[0305] GAGGTGAAGCTGGATGAGACTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGGAGGCCCATGAAACTCTCCTGTGTT GCCTCTGGATTCACTTTTAGTGACTACTGGATGAACTGGGTCCGCCAGTCTCCAGAGAAAGGACTGGAGTGGGTAGC ACAAATTAGAAACAAACCTTATAATTATGAAACATATTATTCAGATTCTGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAG ATGATTCCAAAAGTAGTGTCTACCTGCAAATGAACAACTTAAGAGTTGAAGACATGGGTATCTATTACTGTACGGGT TCTTACTATGGTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

[0306] >SEQ ID:58抗-FITC 4-4-20VH aa

[0307] EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGR FTISRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSVTVSS

[0308] >SEQ ID:59抗-FITC 4-4-20VL nt

[0309] GATGTCGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGC AGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAAACACCTATTTACGTTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCC AAAGGTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAG ATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCG TGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

[0310] >SEQ ID:60抗-FITC 4-4-20VL aa

[0311] DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLRWYLQKPGQSPKVLIYKVSNRFSGVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIK

[0312] >SEQ ID:61人IgG1缺失(null)(具有ADCC/CDC缺失突变(null mutation)的G1m-

fa)nt

[0313] GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG
GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGG
CGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA
GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCC
AAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCGGGGGCACCGTCAGTCTTCCTCTT
CCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG
AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG
CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA
GTGCGCGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGT
GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT
TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[0314] >SEQ ID:62人IgG1无效(具有ADCC/CDC无效突变的G1m-fa)aa

[0315] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0316] >SEQ ID:63人Igκnt

[0317] CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCC
TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC
GGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGA
GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG
AGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0318] >SEQ ID:64人Igκaa

[0319] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0320] >SEQ ID:65SI-35E18(60C3-L1H1-scFv×PL230C6-Fab×323H7-H4L1-scFv×
284A10-H1L1-scFv)重链nt

[0321] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
CAGTCCAGTCAGAGTGTTTATAGTAACTGGTTCTCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGAT
CTATTCTGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCA
CCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCGCAGGCGGTTACAATACTGTTATTGATACTTTT
GCTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAGGCGGTGGCGGTAGTGGGGGAGGCGGTTCTGGCGGCGGAGGGTC
CGGCGGTGGAGGATCAGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCT
CCTGTGCAGCCTCTGGAATCGACTTCAGTAGGAGATACTACATGTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG
GAGTGGATCGCATGCATATATACTGGTAGCCGCGATACTCCTCACTACGCGAGCTCCGCGAAAGGCCGGTTCACCAT

CTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACT
GTGCGAGAGAAGGTAGCCTGTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGGCGGTGGAGGGTCCGGCGGTGGT
GGATCCCAGTCGGTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCCTC
TGGAATCGACCTTAATACCTACGACATGATCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTAGAGTGGGTTGGAATCA
TTACTTATAGTGGTAGTAGATACTACGCGAACTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAAAGACAATACCAAGAAC
ACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCCAGAGATTATATGAGTGG
TTCCCACTTGTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCTAGTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG
CACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG
ACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA
CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC
CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCA
CCTGAAGCCGCGGGGGCACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCC
TGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG
AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC
CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCGCGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAA
AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTATACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCA
AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCAC
CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA
CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGCGGTGGAGGGTCCGGCGGTGGTGGATCCGAGGTGCAGCTGTTGGAG
TCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCATCAGTCGCTA
CCACATGACTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGACATATTTATGTTAATAATGATGACA
CAGACTACGCGAGCTCCGCGAAAGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATG
AACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCGAGATTGGATGTTGGTGGTGGTGGTGCTTATATTGG
GGACATCTGGGGCCAGGGAACTCTGGTTACCGTCTCTTCAGGCGGTGGCGGTAGTGGGGGAGGCGGTTCTGGCGGCG
GAGGGTCCGGCGGTGGAGGATCAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA
GTCACCATCACTTGCCAGTCCAGTCAGAGTGTTTATAACAACAACGACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAA
AGTTCCTAAGCTCCTGATCTATTATGCTTCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGGTTCAGTGGCAGTGGATCTG
GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTGCAGGCGGTTATGAT
ACGGATGGTCTTGATACGTTTGCTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAGGCGGTGGAGGGTCCGGCGGTGG
TGGATCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG
CCTCTGGATTCACCATCAGTACCAATGCAATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGA
GTCATTACTGGTCGTGATATCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAA
GAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGCGCGACGGTGGAT
CATCTGCTATTACTAGTAACAACATTTGGGGCCAAGGAACTCTGGTCACCGTTTCTTCAGGCGGTGGCGGTAGTGGG
GGAGGCGGTTCTGGCGGCGGAGGGTCCGGCGGTGGAGGATCAGACGTCGTGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTC
TGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAATTGCCAAGCCAGTGAGAGCATTAGCAGTTGGTTAGCCTGGTATCAGC
AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGAAGCATCCAAACTGGCATCTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGC
GGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCA

AGGCTATTTTTATTTTATTAGTCGTACTTATGTAAATTCTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

[0322] >SEQ ID:66SI-35E18(460C3-L1H1-scFv×PL230C6-Fab×323H7-H4L1-scFv×284A10-H1L1-scFv)重链aa

[0323] DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCQSSQSVYSNWFSWYQQKPGKAPKLLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCAGGYNTVIDTFAFGGGTKVEIK(抗-4-1BB 460C3 VLv1)

[0324] GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(Gly_4Ser)x4接头

[0325] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSRRYYMCWVRQAPGKGLEWIACIYTGSRDTPHYASSAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGSLWGQGTLVTVSS(抗-4-1BB 460C3 VHv1)

[0326] GGGGSGGGGS(Gly_4Ser)x2接头

[0327] QSVEESGGGLVQPGGSLRLSCTASGIDLNTYDMIWVRQAPGKGLEWVGIITYSGSRYYANWAKGRFTISKDNTKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYMSGSHLWGQGTLVTVSS(抗-PD-L1 PL230C6 VHv3)

[0328] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(人IgG1无效)

[0329] GGGGSGGGGS(Gly_4Ser)x2接头

[0330] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISRYHMTWVRQAPGKGLEWIGHIYVNNDDTDYASSAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTATYFCARLDVGGGGAYIGDIWGQGTLVTVSS(抗-ROR1 323H7 VHv4)

[0331] GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(Gly_4Ser)x4接头

[0332] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVYNNNDLAWYQQKPGKVPKLLIYYASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCAGGYDTDGLDTFAFGGGTKVEIK(抗-ROR1 323H7 VLv1)

[0333] GGGGSGGGGS(Gly_4Ser)x2接头

[0334] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISTNAMSWVRQAPGKGLEWIGVITGRDITYYASWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGSSAITSNNIWGQGTLVTVSS(抗-CD3 284A10 VHv1)

[0335] GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(Gly_4Ser)x4接头

[0336] DVVMTQSPSTLSASVGDRVTINCQASESISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYEASKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQGYFYFISRTYVNSFGGGTKVEIK(抗-CD3 284A10 VLv1)

[0337] >SEQ ID:67SI-35E18(460C3-L1H1-scFv×PL230C6-Fab×323H7-H4L1-scFv×284A10-H1L1-scFv)轻链nt

[0338] GCCTATGATATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAAGTGTCAGGCCAGTGAGGACATTTATAGCTTCTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCCATTCTGCATCCTCTCTGGCATCTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGGTTATGGTAAAAATAATGTTGATAATGCTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0339] >SEQ ID:68SI-35E18(460C3-L1H1-scFv×PL230C6-Fab×323H7-H4L1-scFv×284A10-H1L1-scFv)轻链aa

[0340] AYDMTQSPSSVSASVGDRVTIKCQASEDIYSFLAWYQQKPGKAPKLLIHSASSLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYGKNNVDNAFGGGTKVEIK(抗-PD-L1 PL230C6 VLv2)

[0341] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(人Igκ)

[0342] 其他序列：

[0343]

抗原	抗体	VH/VL	生物体	专利	序列号	公司
FITC	4-4-20	VH	人造	US 2009/0042291 A1	14	Xencor
FITC	4-4-20	VL	人造	US 2009/0042291 A1	13	Xencor
CD19	21D4	VH	人	US 2009/0142349 A1	1	麦迪雷克斯
CD19	21D4	VL	人	US 2009/0142349 A1	9	麦迪雷克斯

[0344]

EGFRvIII	mAb 806	VH	鼠	US 2009/0137782 A1	11	卢德维格研究所
EGFRvIII	mAb 806	VL	鼠	US 2009/0137782 A1	12	卢德维格研究所

[0345] 注意:EGFRvIII系统免疫序列缺失C端精氨酸。序列索引：

[0346]

SEQ ID	描述
1	抗-CD3 284A10 VHv1 nt
2	抗-CD3 284A10 VHv1 aa
3	抗-CD3 284A10 VLv1 nt
4	抗-CD3 284A10 VLv1 aa
5	抗-CD3 480C8 VHv1 nt
6	抗-CD3 480C8 VHv1 aa
7	抗-CD3 480C8 VLv1 nt
8	抗-CD3 480C8 VLv1 aa
9	抗-PD-L1 PL230C6 VHv3 nt
10	抗-PD-L1 PL230C6 VHv3 aa
11	抗-PD-L1 PL230C6 VLv2 nt
12	抗-PD-L1 PL230C6 VLv2 aa
13	抗-PD-L1 PL221G5 VHv1 nt
14	抗-PD-L1 PL221G5 VHv1 aa
15	抗-PD-L1 PL221G5 VLv1 nt
16	抗-PD-L1 PL221G5 VLv1 aa
17	抗-PD-1 PD224D1 VHv2 nt
18	抗-PD-1 PD224D1 VHv2 aa
19	抗-PD-1 PD224D1 VLv2 nt
20	抗-PD-1 PD224D1 VLv2 aa
21	抗-4-1BB 420H5 VHv3 nt
22	抗-4-1BB 420H5 VHv3 aa
23	抗-4-1BB 420H5 VLv3 nt
24	抗-4-1BB 420H5 VHLv3 aa
25	抗-4-1BB 466F6 VHv2 nt
26	抗-4-1BB 466F6 VHv2 aa
27	抗-4-1BB 466F6 VLv5 nt
28	抗-4-1BB 466F6 VLv5 aa
29	抗-4-1BB 460C3 VHv1 nt
30	抗-4-1BB 460C3 VHv1 aa
31	抗-4-1BB 460C3 VLv1 nt
32	抗-4-1BB 460C3 VLv1 aa

[0347]

33	抗-ROR1 324C6 VHv2 nt
34	抗-ROR1 324C6 VHv2 aa
35	抗-ROR1 324C6 VLv1 nt
36	抗-ROR1 324C6 VLv1 aa
37	抗-ROR1 323H7 VHv4 nt
38	抗-ROR1 323H7 VHv4 aa
39	抗-ROR1 323H7 VLv1 nt
40	抗-ROR1 323H7 VLv1 aa
41	抗-ROR1 338H4 VHv3 nt
42	抗-ROR1 338H4 VHv3 aa
43	抗-ROR1 338H4 VLv4 nt
44	抗-ROR1 338H4 VLv4 aa
45	抗-ROR1 330F11 VHv1 nt
46	抗-ROR1 330F11 VHv1 aa
47	抗-ROR1 330F11 VLv1 nt
48	抗-ROR1 330F11 VLv1 aa
49	抗-EGFRvIII mAb 806 VH nt
50	抗-EGFRvIII mAb 806 VH aa
51	抗-EGFRvIII mAb 806 VL nt
52	抗-EGFRvIII mAb 806 VL aa
53	抗-CD19 21D4 VH nt
54	抗-CD19 21D4 VH aa
55	抗-CD19 21D4 VL nt
56	抗-CD19 21D4 VL aa
57	抗-FITC 4-4-20 VH nt
58	抗-FITC 4-4-20 VH aa
59	抗-FITC 4-4-20 VL nt
60	抗-FITC 4-4-20 VL aa
61	人IgG1无效（具有ADCC/CDC无效突变的G1m-fa）nt
62	人IgG1无效（具有ADCC/CDC无效突变的G1m-fa）aa
63	人Igκ nt
64	人Igκ aa
65	SI-35E18 (60C3-L1H1-scFv×PL230C6-Fab×323H7-H4L1-scFv×284A10-H1L1-scFv) 重链 nt

[0348]

66	SI-35E18 (60C3-L1H1-scFv×PL230C6-Fab×323H7-H4L1-scFv×284A10-H1L1-scFv) 重链 aa
67	SI-35E18 (60C3-L1H1-scFv×PL230C6-Fab×323H7-H4L1-scFv×284A10-H1L1-scFv) 轻链 nt
68	SI-35E18 (60C3-L1H1-scFv×PL230C6-Fab×323H7-H4L1-scFv×284A10-H1L1-scFv) 轻链 aa

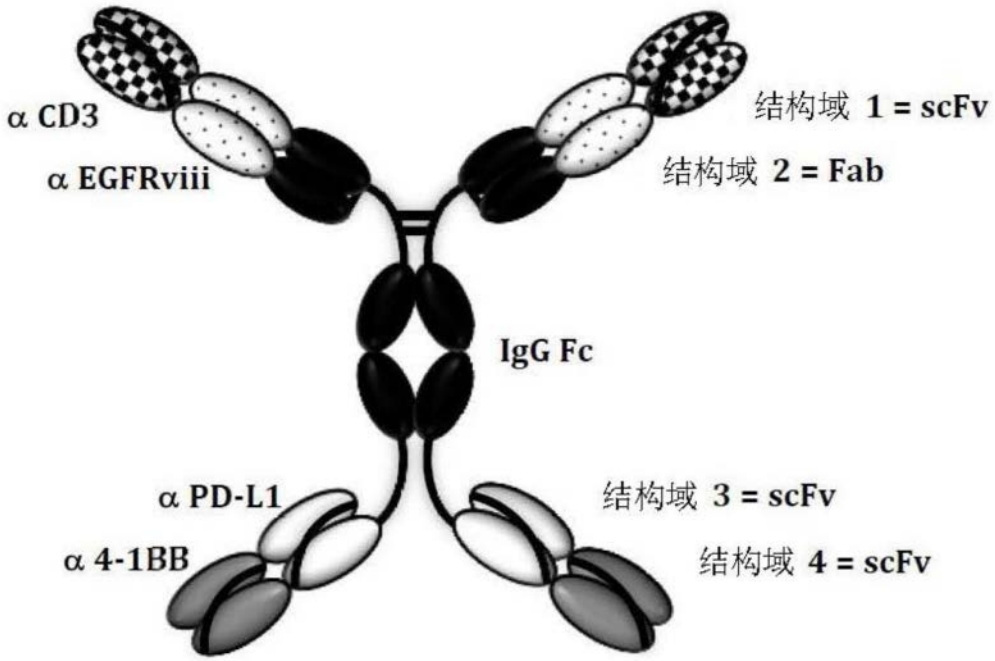

α CD3
α EGFRviii
结构域 1 = scFv
结构域 2 = Fab
IgG Fc
α PD-L1
α 4-1BB
结构域 3 = scFv
结构域 4 = scFv

图1

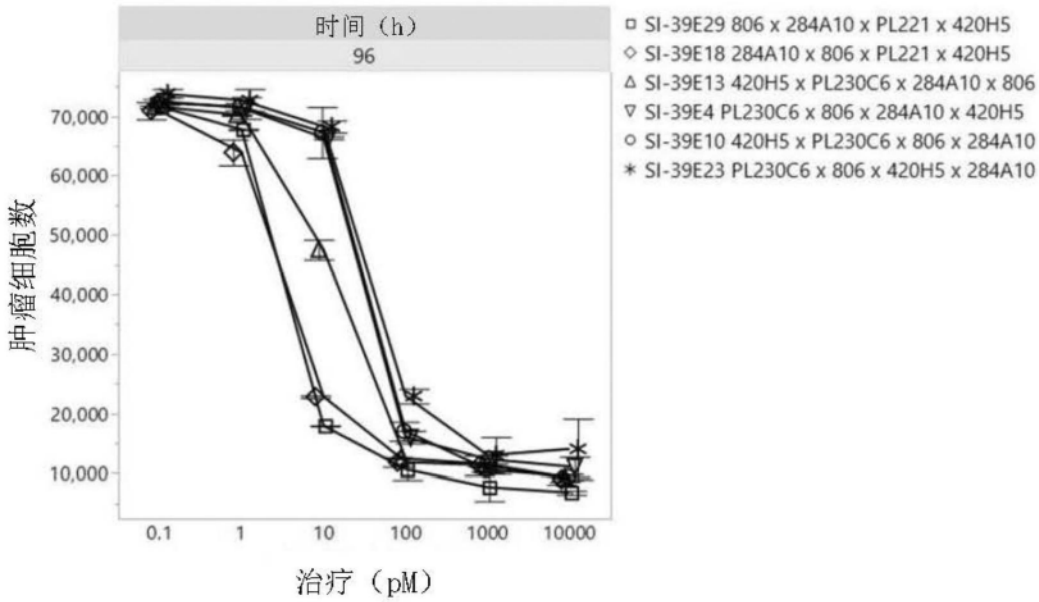

时间（h）
96
肿瘤细胞数
70,000
60,000
50,000
40,000
30,000
20,000
10,000
0.1
1
10
100
1000
10000
治疗（pM）
SI-39E29 806 x 284A10 x PL221 x 420H5
SI-39E18 284A10 x 806 x PL221 x 420H5
SI-39E13 420H5 x PL230C6 x 284A10 x 806
SI-39E4 PL230C6 x 806 x 284A10 x 420H5
SI-39E10 420H5 x PL230C6 x 806 x 284A10
SI-39E23 PL230C6 x 806 x 420H5 x 284A10

图2

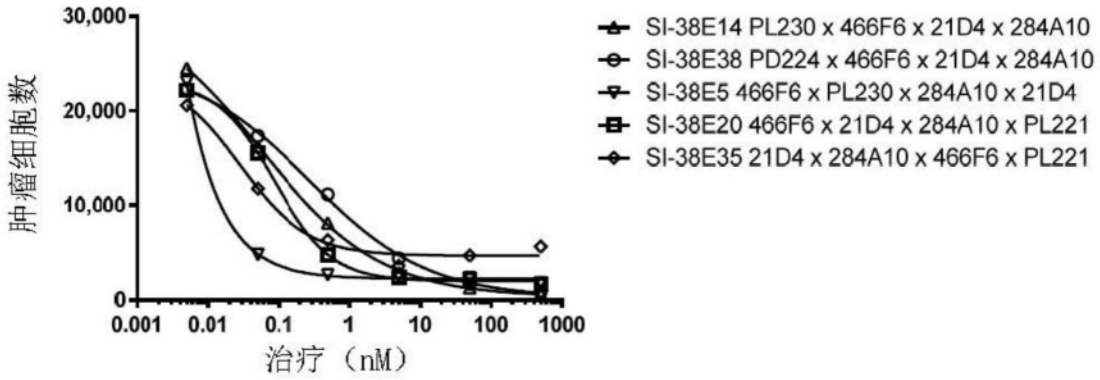

30,000
20,000
10,000
0
肿瘤细胞数
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
治疗（nM）
SI-38E14 PL230 x 466F6 x 21D4 x 284A10
SI-38E38 PD224 x 466F6 x 21D4 x 284A10
SI-38E5 466F6 x PL230 x 284A10 x 21D4
SI-38E20 466F6 x 21D4 x 284A10 x PL221
SI-38E35 21D4 x 284A10 x 466F6 x PL221

图3

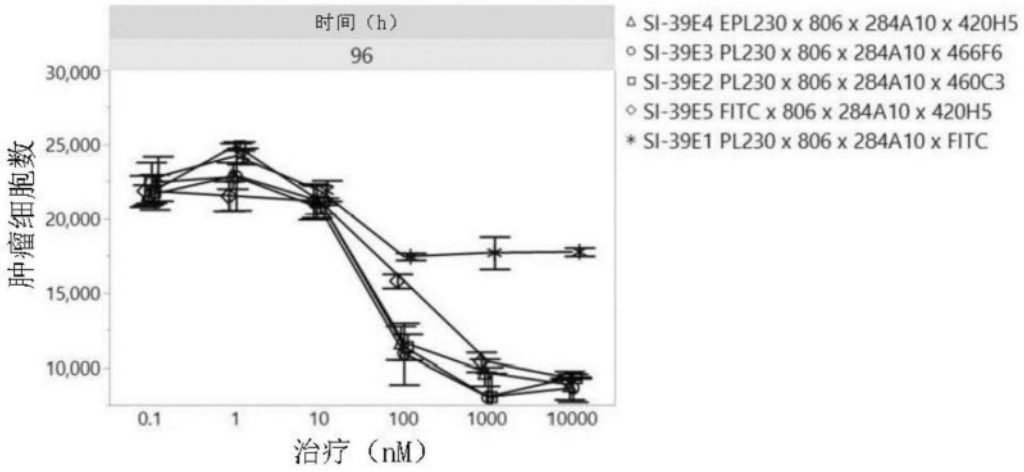

时间（h）
96
30,000
25,000
20,000
15,000
10,000
肿瘤细胞数
0.1
1
10
100
1000
10000
治疗（nM）
SI-39E4 EPL230 x 806 x 284A10 x 420H5
SI-39E3 PL230 x 806 x 284A10 x 466F6
SI-39E2 PL230 x 806 x 284A10 x 460C3
SI-39E5 FITC x 806 x 284A10 x 420H5
SI-39E1 PL230 x 806 x 284A10 x FITC

图4

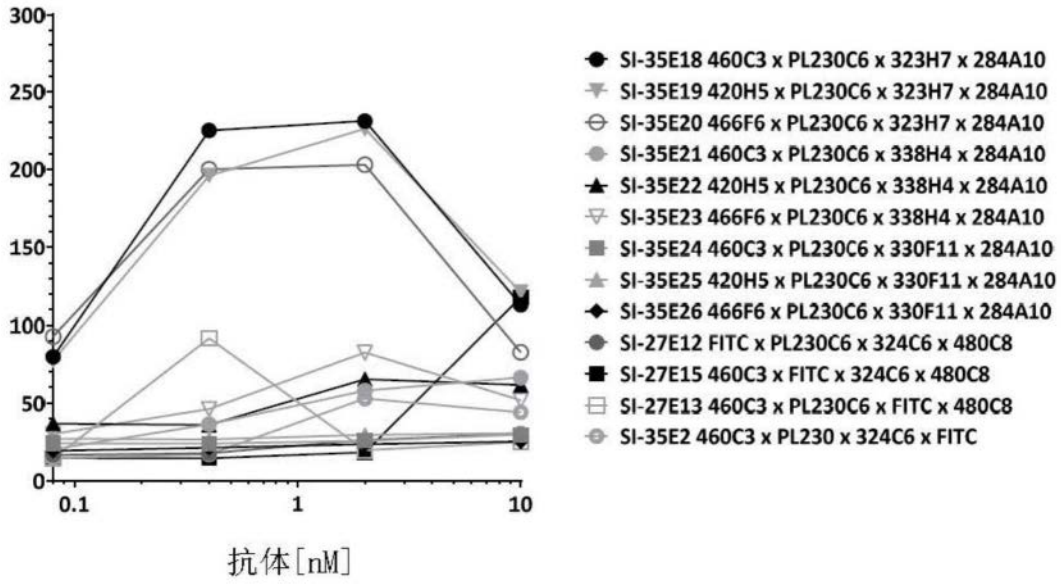

300
250
200
150
100
50
0
0.1
1
10
抗体[nM]
SI-35E18 460C3 x PL230C6 x 323H7 x 284A10
SI-35E19 420H5 x PL230C6 x 323H7 x 284A10
SI-35E20 466F6 x PL230C6 x 323H7 x 284A10
SI-35E21 460C3 x PL230C6 x 338H4 x 284A10
SI-35E22 420H5 x PL230C6 x 338H4 x 284A10
SI-35E23 466F6 x PL230C6 x 338H4 x 284A10
SI-35E24 460C3 x PL230C6 x 330F11 x 284A10
SI-35E25 420H5 x PL230C6 x 330F11 x 284A10
SI-35E26 466F6 x PL230C6 x 330F11 x 284A10
SI-27E12 FITC x PL230C6 x 324C6 x 480C8
SI-27E15 460C3 x FITC x 324C6 x 480C8
SI-27E13 460C3 x PL230C6 x FITC x 480C8
SI-35E2 460C3 x PL230 x 324C6 x FITC

图5

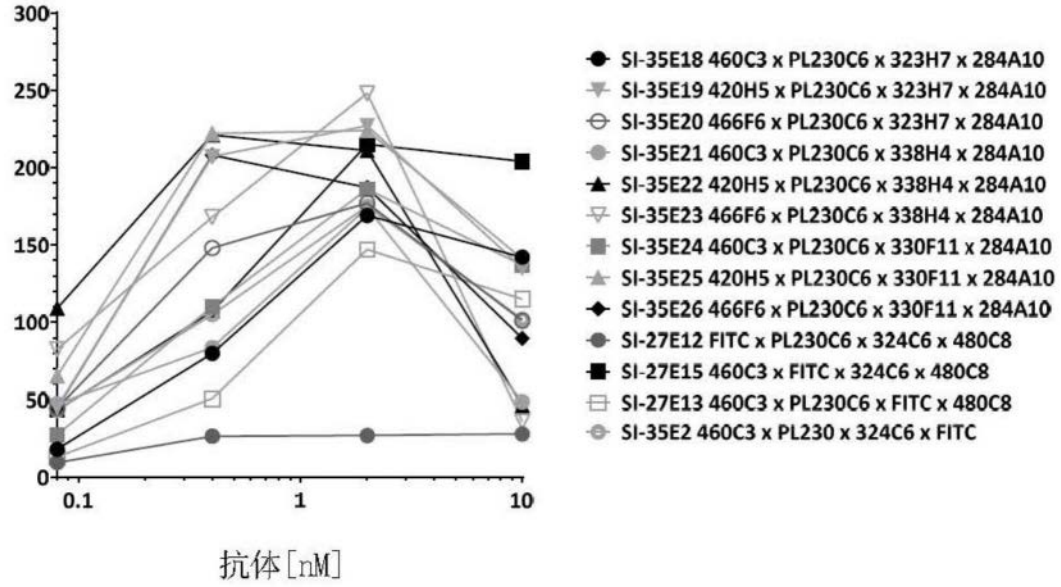

300
250
200
150
100
50
0
0.1
1
10
抗体[nM]
SI-35E18 460C3 x PL230C6 x 323H7 x 284A10
SI-35E19 420H5 x PL230C6 x 323H7 x 284A10
SI-35E20 466F6 x PL230C6 x 323H7 x 284A10
SI-35E21 460C3 x PL230C6 x 338H4 x 284A10
SI-35E22 420H5 x PL230C6 x 338H4 x 284A10
SI-35E23 466F6 x PL230C6 x 338H4 x 284A10
SI-35E24 460C3 x PL230C6 x 330F11 x 284A10
SI-35E25 420H5 x PL230C6 x 330F11 x 284A10
SI-35E26 466F6 x PL230C6 x 330F11 x 284A10
SI-27E12 FITC x PL230C6 x 324C6 x 480C8
SI-27E15 460C3 x FITC x 324C6 x 480C8
SI-27E13 460C3 x PL230C6 x FITC x 480C8
SI-35E2 460C3 x PL230 x 324C6 x FITC

图6

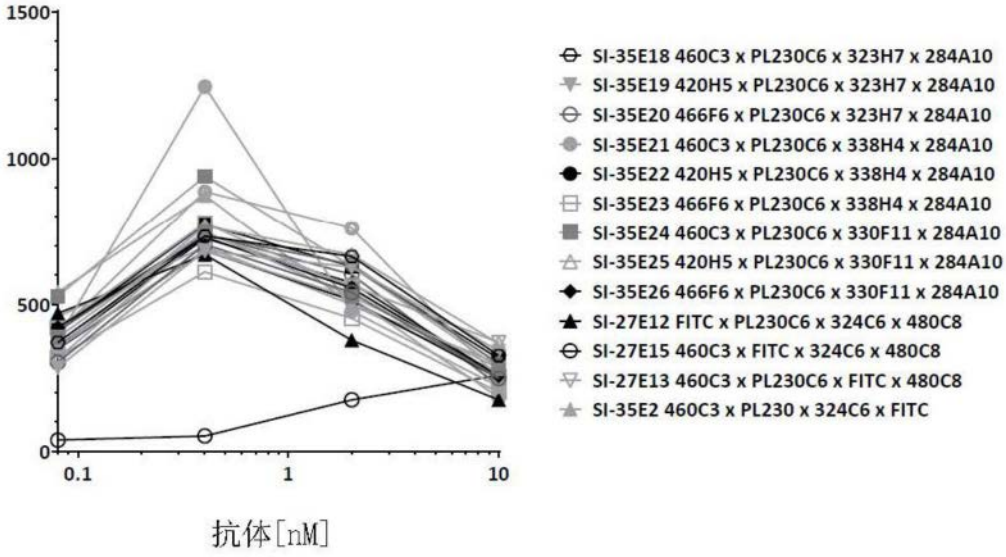

1500
1000
500
0
0.1
1
10
抗体[nM]
SI-35E18 460C3 x PL230C6 x 323H7 x 284A10
SI-35E19 420H5 x PL230C6 x 323H7 x 284A10
SI-35E20 466F6 x PL230C6 x 323H7 x 284A10
SI-35E21 460C3 x PL230C6 x 338H4 x 284A10
SI-35E22 420H5 x PL230C6 x 338H4 x 284A10
SI-35E23 466F6 x PL230C6 x 338H4 x 284A10
SI-35E24 460C3 x PL230C6 x 330F11 x 284A10
SI-35E25 420H5 x PL230C6 x 330F11 x 284A10
SI-35E26 466F6 x PL230C6 x 330F11 x 284A10
SI-27E12 FITC x PL230C6 x 324C6 x 480C8
SI-27E15 460C3 x FITC x 324C6 x 480C8
SI-27E13 460C3 x PL230C6 x FITC x 480C8
SI-35E2 460C3 x PL230 x 324C6 x FITC

图7

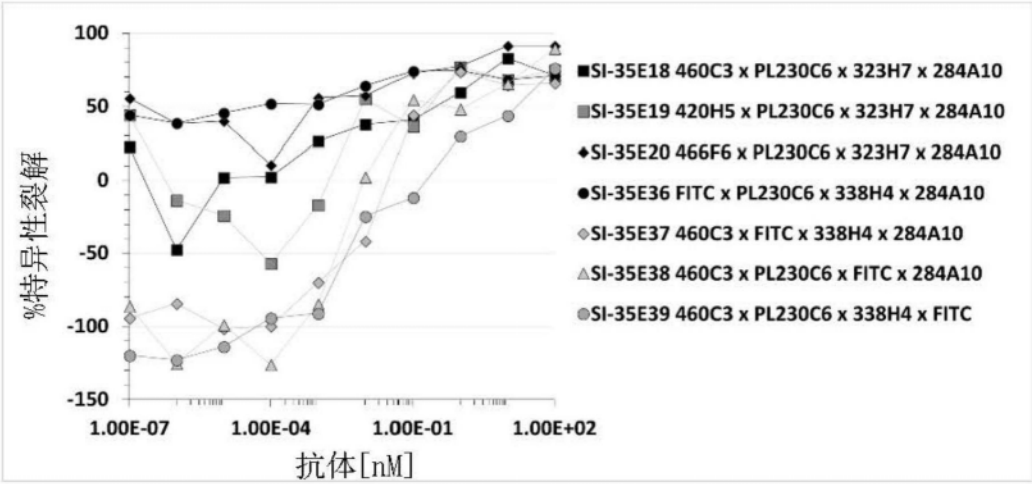

100
50
0
-50
-100
-150
%特异性裂解
1.00E-07
1.00E-04
1.00E-01
1.00E+02
抗体[nM]
SI-35E18 460C3 x PL230C6 x 323H7 x 284A10
SI-35E19 420H5 x PL230C6 x 323H7 x 284A10
SI-35E20 466F6 x PL230C6 x 323H7 x 284A10
SI-35E36 FITC x PL230C6 x 338H4 x 284A10
SI-35E37 460C3 x FITC x 338H4 x 284A10
SI-35E38 460C3 x PL230C6 x FITC x 284A10
SI-35E39 460C3 x PL230C6 x 338H4 x FITC

图8

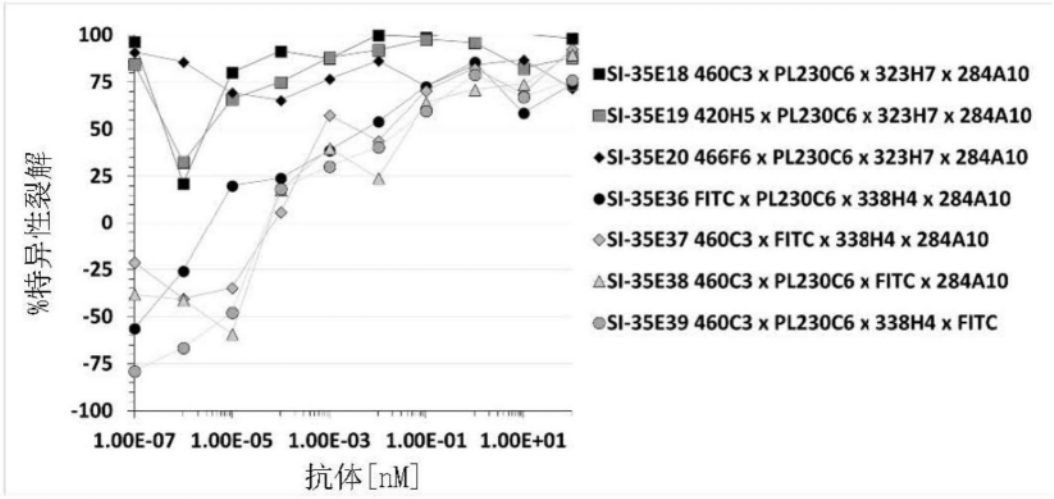

100
75
50
25
0
-25
-50
-75
-100
%特异性裂解
1.00E-07
1.00E-05
1.00E-03
1.00E-01
1.00E+01
抗体[nM]
SI-35E18 460C3 x PL230C6 x 323H7 x 284A10
SI-35E19 420H5 x PL230C6 x 323H7 x 284A10
SI-35E20 466F6 x PL230C6 x 323H7 x 284A10
SI-35E36 FITC x PL230C6 x 338H4 x 284A10
SI-35E37 460C3 x FITC x 338H4 x 284A10
SI-35E38 460C3 x PL230C6 x FITC x 284A10
SI-35E39 460C3 x PL230C6 x 338H4 x FITC

图9

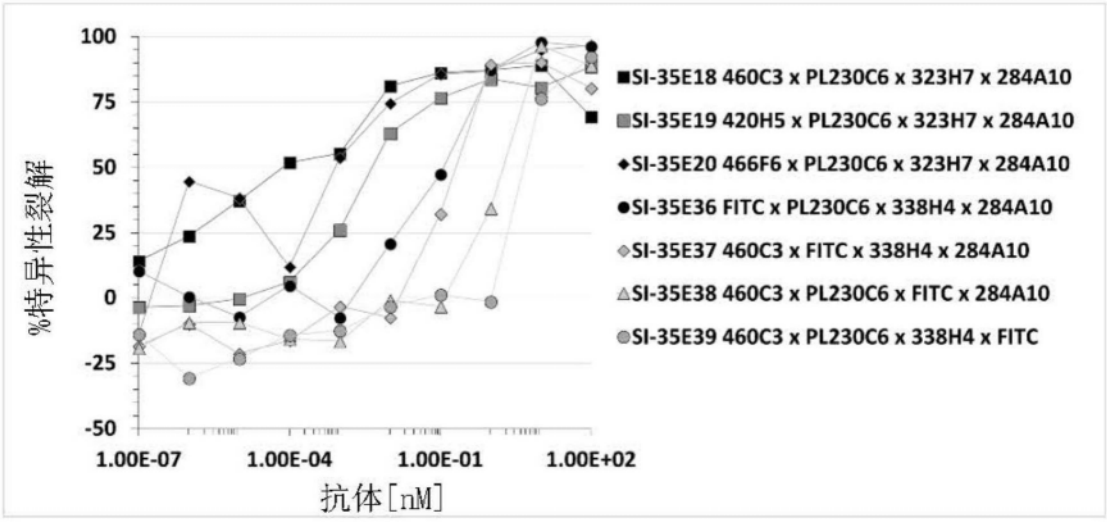

100
75
50
25
0
-25
-50
%特异性裂解
1.00E-07
1.00E-04
1.00E-01
1.00E+02
抗体[nM]
SI-35E18 460C3 x PL230C6 x 323H7 x 284A10
SI-35E19 420H5 x PL230C6 x 323H7 x 284A10
SI-35E20 466F6 x PL230C6 x 323H7 x 284A10
SI-35E36 FITC x PL230C6 x 338H4 x 284A10
SI-35E37 460C3 x FITC x 338H4 x 284A10
SI-35E38 460C3 x PL230C6 x FITC x 284A10
SI-35E39 460C3 x PL230C6 x 338H4 x FITC

图10

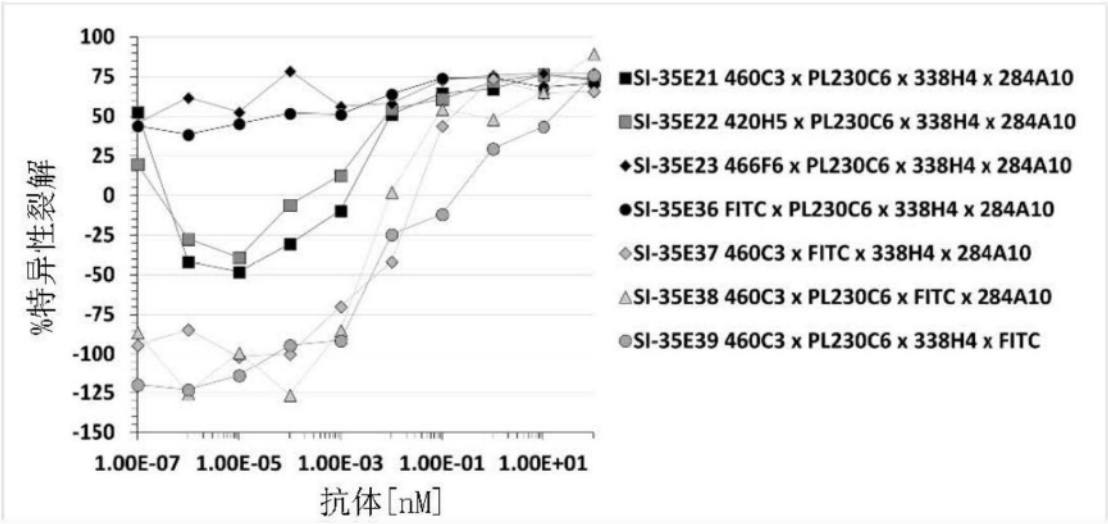

100
75
50
25
0
-25
-50
-75
-100
-125
-150
%特异性裂解
1.00E-07
1.00E-05
1.00E-03
1.00E-01
1.00E+01
抗体[nM]
SI-35E21 460C3 x PL230C6 x 338H4 x 284A10
SI-35E22 420H5 x PL230C6 x 338H4 x 284A10
SI-35E23 466F6 x PL230C6 x 338H4 x 284A10
SI-35E36 FITC x PL230C6 x 338H4 x 284A10
SI-35E37 460C3 x FITC x 338H4 x 284A10
SI-35E38 460C3 x PL230C6 x FITC x 284A10
SI-35E39 460C3 x PL230C6 x 338H4 x FITC

图11

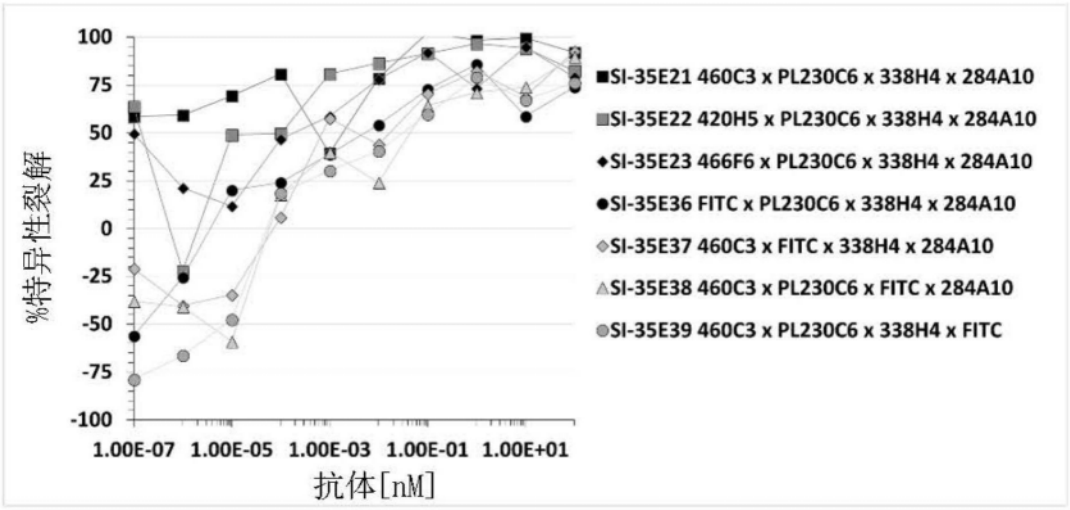

100
75
50
25
0
-25
-50
-75
-100
%特异性裂解
1.00E-07
1.00E-05
1.00E-03
1.00E-01
1.00E+01
抗体[nM]
SI-35E21 460C3 x PL230C6 x 338H4 x 284A10
SI-35E22 420H5 x PL230C6 x 338H4 x 284A10
SI-35E23 466F6 x PL230C6 x 338H4 x 284A10
SI-35E36 FITC x PL230C6 x 338H4 x 284A10
SI-35E37 460C3 x FITC x 338H4 x 284A10
SI-35E38 460C3 x PL230C6 x FITC x 284A10
SI-35E39 460C3 x PL230C6 x 338H4 x FITC

图12

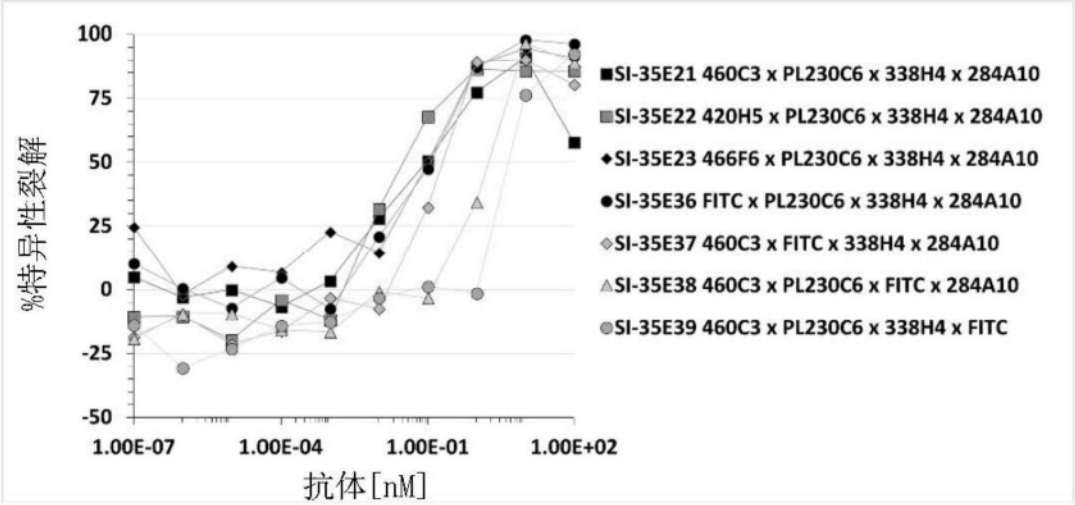

100
75
50
25
0
-25
-50
%特异性裂解
1.00E-07
1.00E-04
1.00E-01
1.00E+02
抗体[nM]
SI-35E21 460C3 x PL230C6 x 338H4 x 284A10
SI-35E22 420H5 x PL230C6 x 338H4 x 284A10
SI-35E23 466F6 x PL230C6 x 338H4 x 284A10
SI-35E36 FITC x PL230C6 x 338H4 x 284A10
SI-35E37 460C3 x FITC x 338H4 x 284A10
SI-35E38 460C3 x PL230C6 x FITC x 284A10
SI-35E39 460C3 x PL230C6 x 338H4 x FITC

图13