



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 120112552 A

(43) 申请公布日 2025. 06. 06

(21) 申请号 202380044740.2	(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
(22) 申请日 2023.04.10	专利代理师 封新琴
(66) 本国优先权数据 PCT/CN2022/085838 2022.04.08 CN	(51) Int.Cl. C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/32 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2024.12.03	
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/CN2023/087277 2023.04.10	
(87) PCT国际申请的公布数据 W02023/193817 EN 2023.10.12	
(71) 申请人 天演药业公司 地址 新加坡莱佛士码头16号丰隆大厦#33-03	
(72) 发明人 罗培志 杜方勇 李艳 刘桂中	权利要求书9页 说明书97页 序列表(电子公布) 附图33页

(54) 发明名称
抗CD28抗体及其使用方法

(57) 摘要
本公开涉及与人CD137结合的抗CD28抗体及其抗原结合片段,组成其的组合物,及其在延迟和/或预防肿瘤生长的用途。

1. 一种抗原结合蛋白或其抗原结合片段, 包含CD28结合部分, 其中CD28结合部分结合人CD28并与食蟹猕猴和小鼠CD28交叉反应。

2. 如权利要求1的抗原结合蛋白或其片段, 其中CD28结合部分结合至CD28表位, 其包含人CD28 (SEQ ID NO:1) 的51-122氨基酸残基。

3. 如权利要求2的抗原结合蛋白或其片段, 其中CD28表位包含SEQ ID NO:1的51、52、54、55、98-101、110-111、113-114和118-122氨基酸残基。

4. 如权利要求1至3中任一项的抗原结合蛋白或其片段, 其中CD28结合部分包含抗体重链可变区 (V_H) 和抗体轻链可变区 (V_L), 且其中 V_H 和 V_L 包含所示的重链互补决定区 (CDRs) 1-3和轻链CDR1-3,

分别为SEQ ID NOs:5-10,

分别为SEQ ID NOs:15、6、16、17-19,

分别为SEQ ID NOs:24、6、25、26-28,

分别为SEQ ID NOs:33、6、35-38,

分别为SEQ ID NOs:43、6、44、45、9和46,

分别为SEQ ID NOs:33、51-53、300和10,

分别为SEQ ID NOs:24、58、59、60、300和61,

分别为SEQ ID NOs:66-69、300和70,

分别为SEQ ID NOs:24、6、75、76、18和28,

分别为SEQ ID NOs:24、58、81、82、27和83,

分别为SEQ ID NOs:88-91、300和70,

分别为SEQ ID NOs:24、96-98、9和70,

分别为SEQ ID NOs:103-106、18和83,

分别为SEQ ID NOs:111、6、112、113、18和114,

分别为SEQ ID NOs:15、6、119、120、9和121,

分别为SEQ ID NOs:126、67、127、128、18和129,

分别为SEQ ID NOs:134、6、135、136、27和83,

分别为SEQ ID NOs:43、58、141、142、300和143,

分别为SEQ ID NOs:148、6、149、150、300和83,

分别为SEQ ID NOs:15、155、16、156、27和70,

分别为SEQ ID NOs:161、6、162、163、300和164,

分别为SEQ ID NOs:5、96、307、76、308和46,

分别为SEQ ID NOs:5、96、309、310、9和311,

分别为SEQ ID NOs:43、96、312、76、9和28,

分别为SEQ ID NOs:43、96、307、310、9和313,

分别为SEQ ID NOs:314、315、309、76、9和313,

分别为SEQ ID NOs:33、316、312、8、308和313,

分别为SEQ ID NOs:314、96、317、76、308和318,

分别为SEQ ID NOs:43、316、312、8、9和10,

分别为SEQ ID NOs:43、6、319、320、9和10,

分别为SEQ ID NOs:5、67、307、310、308和28,
分别为SEQ ID NOs:43、6、321、8、9和10,
分别为SEQ ID NOs:314、316、322、8、9和10,
分别为SEQ ID NOs:33、6、321、8、9和10,
分别为SEQ ID NOs:5、6、317、8、9和10,
分别为SEQ ID NOs:5、6、323、8、9和10,或
分别为SEQ ID NOs:5、6、324、8、9和10。

5. 抗原结合蛋白或其抗原结合片段, 包含结合人CD28的CD28结合部分, 其中CD28结合部分包含抗体重链可变结构域(V_H)和抗体轻链可变结构域(V_L), 且其中 V_H 和 V_L 包含所示的重链互补决定区(CDRs)1-3和轻链CDR1-3,

分别为SEQ ID NOs:5-10,
分别为SEQ ID NOs:15、6、16、17-19,
分别为SEQ ID NOs:24、6、25、26-28,
分别为SEQ ID NOs:33、6、35-38,
分别为SEQ ID NOs:43、6、44、45、9和46,
分别为SEQ ID NOs:33、51-53、300和10,
分别为SEQ ID NOs:24、58、59、60、300和61,
分别为SEQ ID NOs:66-69、300和70,
分别为SEQ ID NOs:24、6、75、76、18和28,
分别为SEQ ID NOs:24、58、81、82、27和83,
分别为SEQ ID NOs:88-91、300和70,
分别为SEQ ID NOs:24、96-98、9和70,
分别为SEQ ID NOs:103-106、18和83,
分别为SEQ ID NOs:111、6、112、113、18和114,
分别为SEQ ID NOs:15、6、119、120、9和121,
分别为SEQ ID NOs:126、67、127、128、18和129,
分别为SEQ ID NOs:134、6、135、136、27和83,
分别为SEQ ID NOs:43、58、141、142、300和143,
分别为SEQ ID NOs:148、6、149、150、300和83,
分别为SEQ ID NOs:15、155、16、156、27和70,
分别为SEQ ID NOs:161、6、162、163、300和164,
分别为SEQ ID NOs:5、96、307、76、308和46,
分别为SEQ ID NOs:5、96、309、310、9和311,
分别为SEQ ID NOs:43、96、312、76、9和28,
分别为SEQ ID NOs:43、96、307、310、9和313,
分别为SEQ ID NOs:314、315、309、76、9和313,
分别为SEQ ID NOs:33、316、312、8、308和313,
分别为SEQ ID NOs:314、96、317、76、308和318,
分别为SEQ ID NOs:43、316、312、8、9和10,

分别为SEQ ID NOs:43、6、319、320、9和10，
分别为SEQ ID NOs:5、67、307、310、308和28，分别为SEQ ID NOs:43、6、321、8、9和10，
分别为SEQ ID NOs:314、316、322、8、9和10，
分别为SEQ ID NOs:33、6、321、8、9和10，
分别为SEQ ID NOs:5、6、317、8、9和10，
分别为SEQ ID NOs:5、6、323、8、9和10，或
分别为SEQ ID NOs:5、6、324、8、9和10。
6. 如权利要求4或5的抗原结合蛋白或其片段，其中CD28结合部分包含所示的V_H和V_L，
分别为SEQ ID NOs:11和12，
分别为SEQ ID NOs:20和21，
分别为SEQ ID NOs:29和30，
分别为SEQ ID NOs:39和40，
分别为SEQ ID NOs:47和48，
分别为SEQ ID NOs:54和55，
分别为SEQ ID NOs:62和63，
分别为SEQ ID NOs:71和72，
分别为SEQ ID NOs:77和78，
分别为SEQ ID NOs:84和85，
分别为SEQ ID NOs:92和93，
分别为SEQ ID NOs:99和100，
分别为SEQ ID NOs:107和108，
分别为SEQ ID NOs:115和116，
分别为SEQ ID NOs:122和123，
分别为SEQ ID NOs:130和131，
分别为SEQ ID NOs:137和138，
分别为SEQ ID NOs:144和145，
分别为SEQ ID NOs:151和152，
分别为SEQ ID NOs:157和158，
分别为SEQ ID NOs:165和166，
分别为SEQ ID NOs:362和363，
分别为SEQ ID NOs:364和365，
分别为SEQ ID NOs:366和367，
分别为SEQ ID NOs:368和369，
分别为SEQ ID NOs:370和371，
分别为SEQ ID NOs:372和373，
分别为SEQ ID NOs:374和375，
分别为SEQ ID NOs:376和12，
分别为SEQ ID NOs:377和378，
分别为SEQ ID NOs:379和380，

分别为SEQ ID NOs:381和12,
分别为SEQ ID NOs:382和12,
分别为SEQ ID NOs:383和12,
分别为SEQ ID NOs:384和12,
分别为SEQ ID NOs:385和12,或
分别为SEQ ID NOs:386和12。

7.如权利要求4或5的抗原结合蛋白,包含所示的抗体重链和抗体轻链,

分别为SEQ ID NOs:13和14,
分别为SEQ ID NOs:22和23,
分别为SEQ ID NOs:31和32,
分别为SEQ ID NOs:41和42,
分别为SEQ ID NOs:49和50,
分别为SEQ ID NOs:56和57,
分别为SEQ ID NOs:64和65,
分别为SEQ ID NOs:73和74,
分别为SEQ ID NOs:79和80,
分别为SEQ ID NOs:86和87,
分别为SEQ ID NOs:94和95,
分别为SEQ ID NOs:101和102,
分别为SEQ ID NOs:109和110,
分别为SEQ ID NOs:117和118,
分别为SEQ ID NOs:124和125,
分别为SEQ ID NOs:141和142,
分别为SEQ ID NOs:132和133,
分别为SEQ ID NOs:139和140,
分别为SEQ ID NOs:146和147,
分别为SEQ ID NOs:153和154,
分别为SEQ ID NOs:159和160,或
分别为SEQ ID NOs:167和168。

8.如权利要求1至7中任一项的抗原结合蛋白或其片段,其中抗原结合蛋白或其片段不具有超级激动活性。

9.如权利要求1至8中任一项的抗原结合蛋白或其片段,另包含靶向肿瘤相关抗原(TAA)的第二抗原结合部分。

10.如权利要求9的抗原结合蛋白或其片段,其中TAA为HER2、B7-H3或TROP-2。

11.如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段,包含HER2结合部分,其含有分别如SEQ ID NOs:262-264和258-260中所示的HCDR1-3和LCDR1-3,或分别如SEQ ID NOs:265和261中所示的V_H和V_L。

12.如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段,包含B7-H3结合部分,其含有分别如SEQ ID NOs:290-292以及287、18和288中所示的HCDR1-3和LCDR1-3,或

分别如SEQ ID NOs:293和289中所示的 V_H 和 V_L 。

13. 如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段, 包含TROP-2结合部分, 其含有分别如SEQ ID NOs:280-282以及277、259和278中所示的HCDR1-3和LCDR1-3, 或分别如SEQ ID NOs:283和279中所示的 V_H 和 V_L 。

14. 如权利要求1至13中任一项的抗原结合蛋白或其片段, 其中CD28结合部分和TAA结合部分的任意一个或两个为单链Fv(scFv)、Fv、scFab或Fab。

15. 如权利要求11的抗原结合蛋白或其片段, 其中HER2结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:169和170的抗体轻链和抗体重链, 且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:171的重链或含有SEQ ID NO:266的scFv融合多肽。

16. 如权利要求11的抗原结合蛋白或其片段, 其中HER2结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:169和170的抗体轻链和抗体重链, 且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:172的重链或含有SEQ ID NO:266的scFv融合多肽。

17. 如权利要求11的抗原结合蛋白或其片段, 其中HER2结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:271和276的抗体轻链和抗体重链, 且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:171的重链或含有SEQ ID NO:266的scFv融合多肽。

18. 如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段, 其中HER2结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:331和332的抗体轻链和抗体重链, 且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:327的重链。

19. 如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段, 其中HER2结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:331和332的抗体轻链和抗体重链, 且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:333的重链。

20. 如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段, 其中HER2结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:331和332的抗体轻链和抗体重链, 且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:334的重链。

21. 如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段, 其中HER2结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:331和332的抗体轻链和抗体重链, 且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:335的重链。

22. 如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段, 其中HER2结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:331和332的抗体轻链和抗体重链, 且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:336的重链。

23. 如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段, 其中HER2结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:331和332的抗体轻链和抗体重链, 且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:337的重链。

24. 如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段, 其中HER2结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:331和332的抗体轻链和抗体重链, 且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:338的重链。

25. 如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段, 其中HER2结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:331和332的抗体轻链和抗体重链, 且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:339的重链。

26. 如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段,其中HER2结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:331和332的抗体轻链和抗体重链,且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:340的重链。

27. 如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段,其中HER2结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:331和332的抗体轻链和抗体重链,且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:341的重链。

28. 如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段,其中HER2结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:331和332的抗体轻链和抗体重链,且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:342的重链。

29. 如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段,其中HER2结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:331和332的抗体轻链和抗体重链,且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:343的重链。

30. 如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段,其中HER2结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:331和332的抗体轻链和抗体重链,且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:344的重链。

31. 如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段,其中HER2结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:331和332的抗体轻链和抗体重链,且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:345的重链。

32. 如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段,其中HER2结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:331和332的抗体轻链和抗体重链,且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:346的重链。

33. 如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段,其中HER2结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:331和332的抗体轻链和抗体重链,且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:347的重链。

34. 如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段,其中HER2结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:331和332的抗体轻链和抗体重链,且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:348的重链。

35. 如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段,其中HER2结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:331和332的抗体轻链和抗体重链,且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:349的重链。

36. 如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段,其中HER2结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:331和332的抗体轻链和抗体重链,且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:350的重链。

37. 如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段,其中HER2结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:331和332的抗体轻链和抗体重链,且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:351的重链。

38. 如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段,其中HER2结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:331和332的抗体轻链和抗体重链,且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:352的重链。

39. 如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段,其中HER2结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:331和332的抗体轻链和抗体重链,且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:353的重链。

40. 如权利要求12的抗原结合蛋白或其片段,其中B7-H3结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:175和176的抗体轻链和抗体重链,且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:171的重链或含有SEQ ID NO:266的scFv融合多肽。

41. 如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段,其中B7-H3结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:354和355的抗体轻链和抗体重链,且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:327的重链。

42. 如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段,其中B7-H3结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:354和355的抗体轻链和抗体重链,且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:356的重链。

43. 如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段,其中B7-H3结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:354和355的抗体轻链和抗体重链,且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:357的重链。

44. 如权利要求10的抗原结合蛋白或其片段,其中B7-H3结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:354和355的抗体轻链和抗体重链,且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:358的重链。

45. 如权利要求13的抗原结合蛋白或其片段,其中TROP2结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:173和174的抗体轻链和抗体重链,且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:171的重链或含有SEQ ID NO:266的scFv融合多肽。

46. 如权利要求1至45中任一项的抗原结合蛋白或其片段,另包含靶向免疫检查点抑制剂的另一抗原结合部分。

47. 如权利要求46的抗原结合蛋白,其中免疫检查点抑制剂为PD-L1。

48. 如权利要求47的抗原结合蛋白或其片段,其中PD-L1结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:325和326的抗体轻链和抗体重链,且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:327的重链。

49. 如权利要求47的抗原结合蛋白或其片段,其中PD-L1结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:325和326的抗体轻链和抗体重链,且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:328的重链。

50. 如权利要求47的抗原结合蛋白或其片段,其中PD-L1结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:325和326的抗体轻链和抗体重链,且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:329的重链。

51. 如权利要求47的抗原结合蛋白或其片段,其中PD-L1结合部分包含分别含有SEQ ID NOs:325和326的抗体轻链和抗体重链,且其中CD28结合部分包含含有SEQ ID NO:330的重链。

52. 如权利要求1至51中任一项的抗原结合蛋白或其片段,另包含Fc区。

53. 如权利要求52的抗原结合蛋白或其片段,其中Fc区为人IgG1子类。

54. 如权利要求52的抗原结合蛋白或其片段,其中Fc区为人IgG4子类。

55. 如权利要求52至54中任一项的抗原结合蛋白或其片段, 其中Fc区具有降低或无效应功能、降低或无抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 效应和/或降低或无交联效应。

56. 如权利要求1至55中任一项的抗原结合蛋白或其片段, 包含第一CH3结构域和第二CH3结构域, 其中:

i) 第一CH3结构域包含在位置390的半胱氨酸 (C) 残基且第二CH3结构域包含在位置400的半胱氨酸残基, 或第一CH3结构域包含在位置400的半胱氨酸残基且第二CH3结构域包含在位置390的半胱氨酸残基; 或

ii) 第一CH3结构域包含在位置392的半胱氨酸残基且第二CH3结构域包含在位置397的半胱氨酸残基, 或第一CH3结构域包含在位置397的半胱氨酸残基且第二CH3结构域包含在位置392的半胱氨酸残基; 或

iii) 第一CH3结构域包含在位置392的半胱氨酸残基且第二CH3结构域包含在位置400的半胱氨酸残基, 或第一CH3结构域包含在位置400的半胱氨酸残基且第二CH3结构域包含在位置392的半胱氨酸残基; 且其中氨基酸残基编号是基于Eu编号。

57. 如权利要求56的抗原结合蛋白或其片段, 其中:

i) 第一CH3结构域另包含在位置357的带正电荷的残基且第二CH3结构域另包含在位置351的带负电荷的残基, 或第一CH3结构域另包含在位置351的带负电荷的残基且第二CH3结构域另包含在位置357的带正电荷的残基; 或

ii) 第一CH3结构域另包含在位置411的带正电荷的残基且第二CH3结构域另包含在位置370的带负电荷的残基, 或第一CH3结构域另包含在位置370的带负电荷的残基且第二CH3结构域另包含在位置411的带正电荷的残基; 或

iii) 第一CH3结构域另包含在位置364的带正电荷的残基且第二CH3结构域另包含在位置370的带负电荷的残基, 或第一CH3结构域另包含在位置370的带负电荷的残基且第二CH3结构域另包含在位置364的带正电荷的残基; 或i) 与ii) 的组合, 或i) 与iii) 的组合; 且其中氨基酸残基编号是基于Eu编号。

58. 如权利要求57的抗原结合蛋白或其片段, 其中第一CH3结构域包含D/E356K、E357K、S364K和S400C取代以及第二CH3结构域包含L351D、K370D、N390C和K439D取代, 或第一CH3结构域包含L351D、K370D、N390C和K439D取代以及第二CH3结构域包含D/E356K、E357K、S364K和S400C取代 (Eu编号)。

59. 如权利要求58的抗原结合蛋白或其片段, 其中CH3结构域另包含N297A取代 (Eu编号)。

60. 如权利要求1至60中任一项的抗原结合蛋白或其片段, 另包含至少一个遮蔽性肽, 其中遮蔽性肽 (MP) 连接至VL的N端, 其中MP从N末端至C末端包含遮蔽性单元 (MU) 和具有或不具有裂解位点的连接单元 (LU)。

61. 如权利要求60的抗原结合蛋白或其片段, 且其中MU包含选自SEQ ID NOs: 173-206组成的组的序列。

62. 如权利要求61的抗原结合蛋白或其片段, 其中MP另包含与MU的N端连接的N端单元 (NU)。

63. 如权利要求62的抗原结合蛋白或其片段, 其中N端单元长约1-10个氨基酸残基。

64. 如权利要求63的抗原结合蛋白或其片段, 其中N端单元包含E或EVGSY。

65. 如权利要求60至64中任一项的抗原结合蛋白或其片段,其中LU包含裂解位点。

66. 如权利要求65的抗原结合蛋白或其片段,其中所述第一裂解位点为选自以下蛋白酶的蛋白酶裂解位点组成的组:尿激酶型纤维蛋白溶酶原活化因子/uPA、基质金属蛋白酶-1/MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-8、MMP-9、MMP-14、烟草蚀刻病毒蛋白酶/TEV蛋白酶、纤维蛋白溶酶、凝血酶、因子X、PSA、PSMA、组织蛋白酶D、组织蛋白酶K、组织蛋白酶S、ADAM10、ADAM12、ADAMTS、卡斯帕酶-1、卡斯帕酶-2、卡斯帕酶-3、卡斯帕酶-4、卡斯帕酶-5、卡斯帕酶-6、卡斯帕酶-7、卡斯帕酶-8、卡斯帕酶-9、卡斯帕酶-10、卡斯帕酶-11、卡斯帕酶-12、卡斯帕酶-13、卡斯帕酶-14和TACE。

67. 如权利要求60至66中任一项的抗原结合蛋白或其片段,其中至少一个遮蔽性肽连接至B7-H3、HER2或TROP2结合部分或CD28结合部分,可选地,其中抗原结合蛋白或其片段包含分别结合B7-H3、HER2或TROP2结合部分和CD28结合部分的两个遮蔽性肽。

68. 如权利要求1至67中任一项的抗原结合蛋白或其片段,另包含缀合治疗剂部分,可选地,其中治疗剂部分为放射性部分或细胞毒性部分。

69. 药物组合物包含如权利要求1至68中任一项的抗原结合蛋白或其片段和药学上可接受的载体。

70. 核酸分子或编码如权利要求1至68中任一项的抗原结合蛋白或其片段的核酸分子。

71. 一种宿主细胞包含如权利要求70的核苷酸序列。

72. 一种产生抗原结合蛋白或其抗原结合片段的方法,包括:

在允许抗原结合蛋白或其片段表达的条件下培养如权利要求71的宿主细胞,和自培养基中分离抗原结合蛋白或其片段。

73. 一种治疗有需要患者癌症的方法,包括向患者施用治疗有效量的如权利要求1至68中任一项的抗原结合蛋白或其片段或如权利要求69的药物组合物。

74. 如权利要求73的方法,另包括向患者施用另外抗癌治疗剂。

75. 如权利要求74的方法,其中另外抗癌治疗剂为靶向CD3和肿瘤抗原的双特异性抗体,可选地,其中肿瘤抗原与TAA相同或不同。

76. 如权利要求75的抗原结合蛋白或其片段,其中TAA为B7-H3、HER2或TROP2。

77. 如权利要求74的方法,其中另外抗癌治疗剂为免疫检查点抑制剂,可选地,为抗PD-1、抗CTLA-4或抗PD-L1抗体。

78. 如权利要求73至77中任一项的方法,其中患者具有实体瘤或血液恶性肿瘤,可选地,选自乳腺癌、胃癌、肺癌、卵巢癌、肾癌、胰腺癌和结肠癌。

79. 使用如权利要求1至68中任一项的抗原结合蛋白或其片段制造用于治疗癌症的药物,可选地,如权利要求73至78中任一项的方法。

80. 如权利要求1至68中任一项的抗原结合蛋白或其片段,或如权利要求69的药物组合物,用于治疗癌症,可选地,如权利要求73至78中任一项的方法。

抗CD28抗体及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2023年4月8日提交的PCT/CN2022/085838的优先权,其全文以引用的方式并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有以电子方式递交的XML格式序列表并且所述序列表全文以引用的方式并入本文。2023年4月6日创建并命名为123687_W0003_SL.xml的序列表电子拷贝,大小为488,908bytes。

背景技术

[0005] CD28是T细胞上的共刺激信号分子,并且在其活化、增殖和存活中起关键作用。CD28共刺激信号分子活化具有增强抗肿瘤T细胞免疫力的潜力。然而,靶向CD28的全身T细胞活化疗法已引起有害的细胞因子风暴和多器官衰竭(Suntharalingam等人,N Engl J Med. (2006) 355(10):1018-28)。因此,有必要改进CD28靶向疗法,以避免与全身CD28活化相关的严重自身免疫不良事件。

发明内容

[0006] 本发明提供靶向肿瘤相关抗原(例如,B7-H3、HER2、TR0P2或PD-L1)和CD28的新颖结合分子,和包含一个或多个此类结合分子的药物组合物,以及使用此类结合分子和药物组合物治疗癌症。相较于当前可获得的癌症治疗(包括抗体治疗),本发明的结合分子预计可提供更优的临床反应。

[0007] 在一些方面中,本发明提供抗原结合蛋白(例如抗体或其抗原结合片段),包含CD28结合部分,其中CD28结合部分结合人CD28并与食蟹猕猴和小鼠CD28交叉反应。在一些实施方案中,CD28结合部分结合至CD28抗原表位,其包含人CD28(SEQ ID NO:1)的51-122氨基酸残基。在特定实施方案中,CD28抗原表位包含SEQ ID NO:1的51、52、54、55、98-101、110-111、113-114和118-122氨基酸残基。

[0008] 在一些实施方案中,本发明提供抗原结合蛋白(例如抗体或其抗原结合片段),其包含结合人CD28的CD28结合部分,其中CD28结合部分包含抗体重链可变区(V_H)和抗体轻链可变区(V_L),且其中 V_H 和 V_L 包含所示的重链互补决定区(CDRs)1-3和轻链CDR1-3,分别为SEQ ID NOs:5-10,分别为SEQ ID NOs:15、6、16、17-19,分别为SEQ ID NOs:24、6、25、26-28,分别为SEQ ID NOs:33、6、35-38,分别为SEQ ID NOs:43、6、44、45、9和46,分别为SEQ ID NOs:33、51-53、300和10,分别为SEQ ID NOs:24、58、59、60、300和61,分别为SEQ ID NOs:66-69、300和70,分别为SEQ ID NOs:24、6、75、76、18和28,分别为SEQ ID NOs:24、58、81、82、27和83,分别为SEQ ID NOs:88-91、300和70,分别为SEQ ID NOs:24、96-98、9和70,分别为SEQ ID NOs:103-106、18和83,分别为SEQ ID NOs:111、6、112、113、18和114,分别为SEQ ID NOs:15、6、119、120、9和121,分别为SEQ ID NOs:126、67、127、128、18和129,分别为SEQ ID NOs:134、6、135、136、27和83,分别为SEQ ID NOs:43、58、141、142、300和143,分别为SEQ ID

NOs:148、6、149、150、300和83,分别为SEQ ID NOs:15、155、16、156、27和70,或SEQ ID NOs:161、6、162、163、300和164。

[0009] 在一些实施方案中,CD28结合部分包含所示的 V_H 和 V_L ,分别为SEQ ID NOs:11和12,分别为SEQ ID NOs:20和21,分别为SEQ ID NOs:29和30,分别为SEQ ID NOs:39和40,分别为SEQ ID NOs:47和48,分别为SEQ ID NOs:54和55,分别为SEQ ID NOs:62和63,分别为SEQ ID NOs:71和72,分别为SEQ ID NOs:77和78,分别为SEQ ID NOs:84和85,分别为SEQ ID NOs:92和93,分别为SEQ ID NOs:99和100,分别为SEQ ID NOs:107和108,分别为SEQ ID NOs:115和116,分别为SEQ ID NOs:122和123,分别为SEQ ID NOs:130和131,分别为SEQ ID NOs:137和138,分别为SEQ ID NOs:144和145,分别为SEQ ID NOs:151和152,分别为SEQ ID NOs:157和158,分别为SEQ ID NOs:165和166,分别为SEQ ID NOs:362和363,分别为SEQ ID NOs:364和365,分别为SEQ ID NOs:366和367,分别为SEQ ID NOs:368和369,分别为SEQ ID NOs:370和371,分别为SEQ ID NOs:372和373,分别为SEQ ID NOs:374和375,分别为SEQ ID NOs:376和12,分别为SEQ ID NOs:377和378,分别为SEQ ID NOs:379和380,分别为SEQ ID NOs:381和12,分别为SEQ ID NOs:382和12,分别为SEQ ID NOs:383和12,分别为SEQ ID NOs:384和12,分别为SEQ ID NOs:385和12,或分别为SEQ ID NOs:386和12。

[0010] 在一些实施方案中,CD28结合部分包含所示的重链(HC)和轻链(LC),分别为SEQ ID NOs:13和14,分别为SEQ ID NOs:22和23,分别为SEQ ID NOs:31和32,分别为SEQ ID NOs:41和42,分别为SEQ ID NOs:49和50,分别为SEQ ID NOs:56和57,分别为SEQ ID NOs:64和65,分别为SEQ ID NOs:73和74,分别为SEQ ID NOs:79和80,分别为SEQ ID NOs:86和87,分别为SEQ ID NOs:94和95,分别为SEQ ID NOs:101和102,分别为SEQ ID NOs:109和110,分别为SEQ ID NOs:117和118,分别为SEQ ID NOs:124和125,分别为SEQ ID NOs:141和142,分别为SEQ ID NOs:132和133,分别为SEQ ID NOs:139和140,分别为SEQ ID NOs:146和147,分别为SEQ ID NOs:153和154,分别为SEQ ID NOs:159和160,或分别为SEQ ID NOs:167和168。

[0011] 在一些方面中,本发明还提供了药物组合物,其包含抗原结合蛋白(例如本文所述抗体或其抗原结合片段)和药学上可接受的载体;编码抗原结合蛋白的核酸分子;包含核酸分子的表达载体;和包含载体的宿主细胞,其中宿主细胞可为原核细胞或真核细胞(例如哺乳动物细胞)。

[0012] 在一些方面中,本发明还提供了一种产生抗原结合蛋白(例如本文所述抗体或其抗原结合片段)的方法,包括在允许抗原结合蛋白表达的条件下培养宿主细胞,和自培养基中分离抗原结合蛋白。

[0013] 在一些方面中,本发明还提供了一种治疗有需要患者癌症的方法,包括向患者施用治疗有效量的抗原结合蛋白,例如本文所述抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,方法另包含向患者施用另外抗癌治疗剂。在进一步的实施方案中,另外抗癌治疗剂为靶向CD3和肿瘤相关抗原(TAA)的双特异性抗体(bsAb)。在特定实施方案中,TAA为B7-H3、HER2或TROP2。在一些实施方案中,另外抗癌治疗剂为免疫检查点抑制剂,可选地,为抗PD-1、抗CTLA4或抗PD-L1抗体。

[0014] 本文还提供了本发明的抗原结合蛋白(例如抗体或其抗原结合片段),或药物组合物,其用于治疗有需要患者癌症;使用本发明的抗原结合蛋白(例如抗体或其抗原结合片

段)制造用于治疗有需要患者癌症的药物;和制品(例如,试剂盒),其含有本发明抗原结合蛋白(例如抗体或其片段)的一个或多个给药单元。

[0015] 本发明的其它特征、目的和优点在以下详细描述中显而易见。然而,应了解,详细描述在指示本发明的实施方案和方面的同时,仅以说明而非限制的方式给出。根据详细描述,本领域技术人员将清楚地理解本发明范围内的多种变化和修改。

附图说明

[0016] 图1为显示一组抗CD28抗体与重组CD28(人和小鼠)蛋白结合亲和力检测。

[0017] 图2为显示抗CD28 IgG与人CD3+T细胞的结合。

[0018] 图3为显示一组IgG与人CD28-CD80(右上图和左上图)和CTLA-4CD80对(底部图)配体阻断检测。

[0019] 图4A为T细胞增殖的检测,显示相较于CD28超级激动剂TAC2386(TGN1412),IgG不会诱导全身T细胞活化。

[0020] 图4B为显示通过CellTiter-Glo®(CTG)读出T细胞活化共刺激检测-增殖。

[0021] 图4C为显示T细胞活化共刺激检测IFN- γ 的释放。

[0022] 图5A为显示使用OKT3抗CD28测试抗体通过CTG读出T细胞的活化和增殖检测-增殖。

[0023] 图5B为显示T细胞活化和增殖检测IL-2的释放。

[0024] 图6为显示抗HER2抗体和双特异性抗体(BsAb)与SK-OV3细胞的结合。还显示了包含标绘值的表。

[0025] 图7为显示Jurkat-NF κ B荧光素酶报告基因检测测量抗HER2 $\times$ CD28 BsAb(TY27566或TY27807)与固定浓度的抗HER2 $\times$ CD3 BsAb(TY25238)组合,和抗HER2 $\times$ CD3 BsAb与固定浓度的抗HER2 $\times$ CD28 BsAb组合时在最大信号值和EC₅₀值对NF κ B信号的传导刺激效应。还显示了包含标绘值的表。

[0026] 图8为显示具有相同或不同HER2抗原表位的CD28 BsAb和CD3BsAb的MCF-7细胞的杀伤检测以及包含标绘值的表。

[0027] 图9为一组显示在肿瘤细胞系上测量抗TROP2双特异性抗体浓度-依赖性结合活性的检测。

[0028] 图10A为显示Jurkat-NF κ B荧光素酶报告基因检测于H292细胞测量双特异性抗体在最大信号值和EC₅₀值对NF κ B信号传导刺激效应。还显示了包含标绘值的表。

[0029] 图10B为显示Jurkat-NF κ B荧光素酶报告基因检测于H292细胞测量双特异性抗体在最大信号值和EC₅₀值对NF κ B信号传导刺激效应。还显示了包含标绘值的表。

[0030] 图11为一组显示PD-L1和B7H3在MDA-MB-231细胞上共表达的流式细胞图。

[0031] 图12为显示B7H3 IgG和B7H3 $\times$ CD28 bsAb与MDA-MB-231细胞的结合检测。还显示了包含标绘值的表。

[0032] 图13A和13B为显示单向MLR检测测试B7H3 $\times$ CD28 bsAb与抗PD-1或抗PD-L1组合阻断mAb对初始人T细胞活化活性,通过IL-2分泌(图13A)和IFN- γ 分泌(图13B)测量。

[0033] 图14为显示体外检测,其在MCF-7肿瘤细胞系上测量基于抗CD3或基于抗CD28靶向HER2的bsAb或其组合肿瘤杀伤活性。还显示了包含标绘值的表。

[0034] 图15为显示体外检测,其在EMT6-HER2肿瘤细胞系上测量基于抗CD3或基于抗CD28靶向HER2的bsAb或其组合的肿瘤杀伤活性。还显示了包含标绘值的表。

[0035] 图16为一组显示测量IL-6和IFN- γ 全身细胞因子释放(左上图和右上图),和测量CD3+T细胞与总CD45+T细胞的百分比(底部图)的检测,WT小鼠用TCE处理。

[0036] 图17显示SK-OV3+PBMC异种移植肿瘤模型中HER2xCD3bsAb和B7H3xCD28 bsAb单独或组合体内功效研究和图。

[0037] 图18为一组显示EMT6-HER2模型中B7H3xCD28或HER2xCD28 bsAb体内功效研究。

[0038] 图19为显示抗CD28可活化抗体结合至重组人CD28遮蔽效率的ELISA测量值。

[0039] 图20为显示抗CD28可活化抗体结合至重组人CD28遮蔽效率的ELISA测量值。

[0040] 图21(SEQ ID NOs:359-361)为显示人与小鼠CD28不同结合残基的表。

[0041] 图22A为显示抗PD-L1 $\times$ CD28 bsAb TY29815和TY30413与人CD28的结合。

[0042] 图22B为显示抗PD-L1 $\times$ CD28 bsAb TY29815、TY30406、TY30410和TY30413与小鼠CD28的结合。

[0043] 图23A为显示抗HER2 $\times$ CD28 bsAb TY27566、TY28652、TY28653、TY28654、TY28655、TY28656、TY28657、TY28658、TY28659、TY28660和TY28661与人CD28的结合。

[0044] 图23B为显示抗HER2 $\times$ CD28 bsAb TY29109、TY29306、TY29307、TY29308、TY29309、TY29310、TY29311、TY29312、TY29313、TY29314和TY29315与人CD28的结合。

[0045] 图24A为显示抗B7H3 $\times$ CD28 bsAb TY29021、TY30120、TY30121和TY30123与人CD28的结合。

[0046] 图24B为显示抗B7H3 $\times$ CD28 bsAb TY29021、TY30120、TY30121和TY30123与小鼠CD28的结合。

[0047] 图25为显示小鼠T细胞结合检测测量抗B7H3 $\times$ CD28 bsAb TY29021、TY30120、TY30121和TY30123在最大信号值、EC₅₀值和AUC值对T细胞的结合效应。还显示了包含标绘值的表。

具体实施方式

[0048] I. 定义

[0049] 在详细描述本公开之前,应当理解,本公开不限于特定的组合物或生物系统,其当然可以变化。还将理解,本文所使用的术语仅是出于描述特定实施方案的目的,并且不旨在具有限制性。

[0050] 如本文所用的术语“约”是指相应值的易于为本技术领域中的熟练人士所知的通常误差范围。在本文中提及“约”某一值或参数包括(并且描述)有关那个值或参数本身的实施方案。

[0051] 应了解,本文所述的本公开的方面和实施方案包括“包含”、“由……组成”以及“基本上由……组成”方面和实施方案。

[0052] 如本文所用,术语“和/或”,短语例如“A和/或B”旨在包括A和B二者;A或B;A(单独);和B(单独)。类似地,如本文所用,术语“和/或”,短语例如“A、B和/或C”旨在涵盖以下实施方案的每一种:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

[0053] 术语“抗体”涵盖多种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、经遮蔽抗体(例如,可活化或不可活化抗体)、多特异性抗体(例如,双特异性抗体,包括经遮蔽双特异性抗体)和抗体片段(例如,单链可变片段或scFv),只要其展示所需生物活性(例如,以期望的特异性和亲和力结合靶抗原的能力)。

[0054] 术语“抗体”涵盖多种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、经遮蔽抗体(例如,可活化或不可活化抗体)和多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。术语“抗体”还包括,但不限于,嵌合抗体、人源化抗体和全长人抗体。

[0055] 在一些实施方案中,术语“抗体”是指具有由两条相同的重(H)链和两条相同的轻(L)链组成的基本四多肽链结构的抗原结合蛋白(即,免疫球蛋白)。各L链通过一个共价二硫键连接至H链,同时两条H链取决于H链同种型通过一个或多个二硫键彼此连接。每条重链在N末端具有可变区(也称为可变结构域)(在本文缩写为 V_H),接着是恒定区。重链恒定区包含三个结构域: C_H1 、 C_H2 和 C_H3 。每条轻链在N末端具有可变区(也称为可变结构域)(在本文缩写为 V_L),接着是在其另一端的恒定区。轻链恒定区包含一个结构域, C_L 。将 V_L 与 V_H 比对并且将 C_L 与重链的第一恒定结构域(C_H1)比对。 V_H 和 V_L 的配对一起形成单一抗原结合位点。

[0056] V_H 和 V_L 可进一步细分成互补决定区(CDR)和框架区(FW)。CDR具有最高的序列变异性和/或参与抗原识别。CDR和FR按照FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4的顺序散布。CDR还包含“特异性决定残基”或“SDR”,其为接触抗原的残基。SDR含于CDR中称为缩短-CDR(abbreviated-CDR)或a-CDR的区内。示例性a-CDR(a-LCDR1、a-LCDR2、a-LCDR3、a-HCDR1、a-HCDR2和a-HCDR3)各自出现在轻链的31-34、50-55、89-96,以及重链的31-35、50-58和95-102氨基酸残基处。参见Almagro和Fransson,Front.Biosci.(2008)13:1619-33。除非另有指示,否则可变区残基在本文中是根据Kabat等人,J Biol Chem.(1977)252:6609-16;Kabat等人,U.S.Dept.of Health and Human Services,“Sequences of proteins of immunological interest”(1991)来编号。

[0057] 下表1提供了根据本领域已知的多种算法的示范性CDR定义。

[0058] 表1.CDR定义

[0059]

	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³	IMGT ⁴	AHo ⁵
HCDR1	31-35	26-32	30-35	27-38	25-40
HCDR2	50-65	53-55	47-58	56-65	58-77
HCDR3	95-102	96-101	93-101	105-117	109-137
LCDR1	24-34	26-32	30-36	27-38	25-40
LCDR2	50-56	50-52	46-55	56-65	58-77
LCDR3	89-97	91-96	89-96	105-117	109-137

[0060] ¹残基编号遵循Kabat等人的命名法,同上。

[0061] ²残基编号遵循Chothia等人,J.Mol.Biol.(1987)196:901-917;Al-Lazikani B.等人,J.Mol.Biol.,(1997)273:927-948的命名法。

[0062] ³残基编号遵循MacCallum等人,J.Mol.Biol.(1996)262:732-745;Abhinandan和Martin,Mol.Immunol.,(2008)45:3832-3839的命名法。

[0063] ⁴残基编号遵循Lefranc M.P.等人,Dev.Comp.Immunol.,(2003)27:55-77;和Honegger和Plückthun,J.Mol.Biol.,(2001)309:657-670的命名法。

[0064] ⁵残基编号遵循Honegger和Plückthun, J. Mol. Biol., (2001) 309:657-670的命名法。

[0065] 来自任何脊椎动物物种的L链可基于其恒定结构域的氨基酸序列指定为两种明显不同类型(称为 κ 和 λ)中的一者。取决于其重链的恒定结构域(C_H)的氨基酸序列,抗体可指定为不同的种类或同种型。存在五类抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其分别具有被命名为 α (alpha)、 δ (delta)、 ϵ (epsilon)、 γ (gamma)和 μ (mu)的重链。IgG类抗体可以分别通过 γ 重链Y1-Y4进一步分类为四个子类IgG₁、IgG₂、IgG₃和IgG₄。

[0066] 术语“抗原结合片段”或“抗原结合部分”在本文中可交换使用,是指保留结合至抗体抗原的能力的抗体的部分。抗体的“抗原结合片段”的实例包括但不限于,(i)Fab片段,由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_H 结构域组成的单价片段,通过木瓜蛋白酶消化获得;(ii) $F(ab')_2$ 片段,包含由铰链区的二硫键连接的两个Fab片段的二价片段,通过胃蛋白酶消化获得;(iii)由抗体的单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的Fv片段,(iv)单链Fv(scFv)片段,其包含彼此融合的抗体的 V_H 和 V_L 结构域;和(v)单链Fab(scFab)片段,其包含含有 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_H 结构域的单链多肽。

[0067] 术语“经遮蔽抗体”是指包含遮蔽性肽的抗体(包括多特异性抗体)或其抗原结合片段干扰、阻碍、降低(能力)、阻止、抑制结合至其靶标,或与抗体的抗原结合结构域竞争结合至其靶标。经遮蔽抗体可以通过将遮蔽性肽连接到抗体的抗原结合结构域来产生。在一些实施方案中,经遮蔽抗体或其抗原结合片段在未活化状态下(例如,被遮蔽性肽抑制或遮蔽)对靶标表现出第一结合亲和力,并在活化状态下(例如,未被遮蔽性肽抑制或遮蔽(例如,从抗体上裂解的遮蔽性肽))对靶标表现出第二结合亲和力,其中第二结合亲和力大于第一结合亲和力。经遮蔽抗体可以通过将包含可活化部分(例如,连接单元的可裂解位点或“LU”)的遮蔽性肽连接到抗体的抗原结合结构域来产生。在一些实施方案中,经遮蔽抗体,或其经遮蔽抗原结合片段为多特异性抗体,其包含对T细胞表面分子(例如,CD28、CD3)和肿瘤细胞表面抗原(例如,HER2、B7H3、TROP2等)具有特异性的结合域。在一些实施方案中,经遮蔽抗体为二价,并且在两个结合域中的一个上具有单价遮蔽。在一些实施方案中,经遮蔽抗体为二价,并且在两个结合域中的每一个上都具有遮蔽。例如,对于单价经遮蔽抗体,抗体的一个结合域被融合或缀合遮蔽性肽遮蔽。对于双特异性抗体,一个或两个结合域可被具有特异性但不同的遮蔽性肽遮蔽。同时靶向癌细胞和T细胞的未经活化双特异性抗体可具有遮蔽两个结合域的结合位点,以抑制(或最小化)与抗原表达癌细胞和T细胞的结合。然而,在活化状态下,遮蔽性部分被裂解以允许抗体在肿瘤微环境(TME)中与肿瘤抗原和T细胞表面分子(例如,CD28)结合。在此种情况下,经活化双特异性抗体选择性地接合T细胞,杀死靶向肿瘤抗原表达的癌细胞。

[0068] 术语“遮蔽性肽”是指抑制抗原结合结构域与其靶标抗原结合的肽,并且通常从N末端至C末端包含遮蔽性单元(MU)和连接单元(LU)。遮蔽性肽的C末端通常与抗原结合结构域的 V_H 或 V_L 的N末端相连。在一些实施方案中,遮蔽性肽或其一部分干扰或抑制抗原结合结构域与其靶标的结合如此有效使得抗原结合结构域与其靶标结合极低和/或在检测限以下(例如,在ELISA或流式细胞术测定中不可检测结合)。本文所用的经遮蔽抗体或多肽可以包含一个或多个连接体,例如,在LU内、置于MU和LU之间、LU和 V_H 或 V_L 之间或 V_H 和Fc铰链区之间。

[0069] 遮蔽性肽的LU可以包含至少一个可裂解位点。所述裂解位点一般包含可裂解的氨

基酸序列,例如,用作能形成可还原二硫键的酵素和/或半胱氨酸-半胱氨酸对的底物。因而,当术语“裂解”、“可裂解”、“经裂解”和类似者结合裂解位点使用时,那些术语涵盖例如通过蛋白酶的酶促裂解,以及半胱氨酸-半胱氨酸对之间的二硫键通过可由暴露在还原剂产生的二硫键的还原的中断。所述裂解位点的氨基酸序列可与所述MU重叠或包含在所述MU内。经遮蔽抗体或经遮蔽多肽可以包含配置为介导抗体或多肽活化的裂解位点。例如,当可活化抗体的裂解位点为完整时(例如,未通过对应酵素裂解,和/或含有未经还原的半胱氨酸-半胱氨酸二硫键),所述遮蔽性肽或其一部分可能干预或抑制抗原结合结构域结合至其靶标。在一些实施方案中,遮蔽性肽的LU不包含可裂解位点。

[0070] 术语“遮蔽效率”是指遮蔽性肽抑制抗原结合结构域与靶标抗原结合的效率。遮蔽效率可以通过包含抗原结合结构域的经遮蔽抗体或经遮蔽多肽的结合亲和力相对于包含抗原结合结构域(例如,从抗体上裂解的遮蔽性肽)的未经遮蔽抗体或未经遮蔽多肽的结合亲和力的差异或比率来测量。例如,遮蔽效率可以通过经遮蔽抗体的未活化状态(例如,抑制、遮蔽和/或未裂解)与靶标抗原结合的 EC_{50} 或 K_D 除以未经遮蔽抗体的活化状态(例如,未抑制、未遮蔽和/或裂解)与靶标抗原结合的 EC_{50} 或 K_D ,或亲本抗体(例如,未连接遮蔽性肽)与靶标抗原结合的 EC_{50} 或 K_D 来测量。可以通过ELISA测量或Jurkat NFAT报告子分析测定 EC_{50} 值,例如美国专利公开第US2021/0207126A1号所述。 K_D 值可以通过,例如,使用表面等离子体共振测量。

[0071] 术语“表位”是指抗原上与抗体(或其抗原结合片段)相结合的部分。可由通过蛋白质的三级折叠来并置的连续氨基酸或不连续氨基酸形成表位。由连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时保留,而通过三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丢失。表位可包括处于独特空间构象的不同数量的氨基酸。确定表位的空间构象的方法包括,例如,x射线晶体学、2维核磁共振、与质谱组合的氘氢交换,或定点诱变,或与抗原以及具有其结合抗体及其变体的其复合物结构的计算机建模组合使用的所有方法。参见,例如,Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology中,第66卷,G.E.Morris编辑(1996)。一旦确定了抗原的期望表位,就可以例如使用本文所述的技术生成针对所述表位的抗体。抗体的生成和表征也可阐明关于期望表位的信息。由此信息,接着可以竞争性地筛选结合相同表位的抗体。实现这一点的方法是进行交叉竞争研究,以寻找彼此竞争结合的抗体,即竞争结合抗原的抗体。基于其交叉竞争“分拣(binning)”抗体的高通量方法描述于PCT公布号W0 03/48731中。

[0072] 术语“种系”是指抗体基因和基因片段的核苷酸序列,因为它们通过生殖细胞从亲代传给后代。种系序列与成熟B细胞中编码抗体的核苷酸序列不同,后者在B细胞成熟过程中已经被重组和超突变事件改变。

[0073] 术语“糖基化位点”是指被真核细胞识别为糖残基附接位置的氨基酸残基。其中碳水化合物(例如寡糖)所附接的氨基酸通常是天冬酰胺(N-连接)、丝氨酸(O-连接)和苏氨酸(O-连接)残基。特定的附接位点通常由氨基酸序列表示,本文称为“糖基化位点序列”。N-连接糖基化的糖基化位点序列是:-Asn-X-Ser-或-Asn-X-Thr-,其中X可以是除脯氨酸之外的任何常规氨基酸。术语“N-连接”和“O-连接”是指充当糖分子和氨基酸残基之间附接位点的化学基团。N-连接的糖通过氨基基团连接;O-连接的糖通过羟基连接。术语“聚糖占据”是指与糖基化位点连接的碳水化合物部分的存在(即,聚糖位点被占据)。在多肽上存在至少两

个潜在糖基化位点的情况下,碳水化合物部分可以不占据(0-聚糖位点占据)、占据一个位点(1-聚糖位点占据)或两个位点(2-聚糖位点占据)。

[0074] 术语“宿主细胞”是指可被工程改造来产生目标蛋白质、蛋白质片段或肽的细胞系统。宿主细胞包括不限于培养细胞,例如源于啮齿动物(大鼠、小鼠、豚鼠或仓鼠)的哺乳动物培养细胞诸如CHO、BHK、NSO、SP2/0、YB2/0;人细胞,例如HEK293F细胞、HEK293T细胞;或人组织或杂交瘤细胞、酵母细胞、昆虫细胞(例如S2细胞)、细菌细胞(例如大肠杆菌(E.coli)细胞)以及包含在转基因动物或培养组织内的细胞。所述术语不仅涵盖特定主题细胞,而且还涵盖这种细胞的子代。因为某些修饰可由于突变或环境影响而发生在继代中,所以所述子代可能不与亲本细胞相同,但仍然被包括在术语“宿主细胞”的范围内。

[0075] “人抗体”是具有对应于由人或人细胞产生或源于非人来源的抗体的氨基酸序列的氨基酸序列的抗体,所述非人来源利用人抗体谱系或其他人抗体编码序列。人抗体的这个定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0076] 术语“人源化抗体”是指包含来源于人抗体序列的氨基酸残基的嵌合抗体。人源化抗体可包含来自非人动物或合成抗体的一些或所有CDR,而抗体的框架和恒定区包含来源于人抗体序列的氨基酸残基。

[0077] 术语“示例性抗体”是指本文中所述抗体中的任一者。这些抗体可处于任何类别(例如,IgA、IgD、IgE、IgG和IgM)。因此,以上鉴定的每种抗体涵盖处于所有五个类别的具有相同V_L区和V_H区氨基酸序列的抗体。此外,处于IgG类别的抗体可处于任何子类(例如,IgG₁、IgG₂、IgG₃和IgG₄)。因此,处于IgG子类的以上鉴定的每种抗体涵盖处于所有四个子类的具有相同V_L区和V_H区氨基酸序列的抗体。处于五个类别以及处于四个IgG子类的人抗体的重链恒定区的氨基酸序列在本领域中是已知的。

[0078] “经分离”抗体或结合分子是已与它的天然环境的组分分离的抗体或结合分子。在一些实施方案中,抗体被纯化至大于95%或99%纯度,如通过例如电泳(例如SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳)或色谱(例如离子交换或反相HPLC)所测定。对于用于评估抗体纯度的方法的综述,参见例如Flatman等,J.Chromatogr.B 848:79-87(2007)。术语“k_a”是指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率常数,而术语“k_d”是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率常数。

[0079] 术语“K_D”是指特定抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。它由k_d与k_a的比率(即,k_d/k_a)获得,并且表示为摩尔浓度(M)。K_D用作抗体与它的结合配偶体的结合的亲和力的量度。K_D越小,抗体越紧密结合,或抗体与抗原之间的亲和力越高。举例来说,相比于具有微摩尔浓度(μM)解离常数的抗体,具有纳摩尔浓度(nM)解离常数的抗体更紧密结合特定抗原。抗体的K_D值可使用本领域中完善建立的方法确定。一种用于确定抗体的K_D的方法是通过使用ELISA。例如,使用ELISA的检测程序。

[0080] 术语“哺乳动物”是指哺乳纲的任何动物物种。哺乳动物的实例包括:人;实验室动物诸如大鼠、小鼠、仓鼠、兔、非人灵长类动物和豚鼠;家养动物诸如猫、狗、牛、绵羊、山羊、马和猪;以及圈养野生动物诸如狮子、老虎、大象等。

[0081] 关于哺乳动物中的某一疾病病状的术语“预防(prevent或preventing)”是指预防或延迟疾病的发作,或预防其临床或亚临床症状的出现。

[0082] 如本文所用,两个多肽序列之间的“序列一致性”指示在所述序列之间相同的氨基

酸的百分比。多肽的氨基酸序列一致性可以使用已知计算机程序诸如Bestfit、FASTA或BLAST常规地确定(参见,例如Pearson, *Methods Enzymol.* (1990) 183:63-98; Pearson, *Methods Mol. Biol.* (2000) 132:185-219; Altschul等人, *J. Mol. Biol.* (1990) 215:403-10; Altschul等人, *Nucleic Acids Res.* (1997) 25:3389-3402)。当使用Bestfit或任何其他序列比对程序确定特定序列是否与参考氨基酸序列具有例如95%一致性时,设定参数,使得在参考氨基酸序列的全长上计算一致性的百分比并且允许参考序列中的氨基酸残基的总数的同源性的间隔最高至5%。确定多肽之间的一致性百分比的这一上述方法适用于本文公开的所有蛋白质、其片段或变体。

[0083] 如本文所用,术语“结合”、“特异性结合”或“对……具有特异性”是指靶标与抗体之间的可测量和可重现相互作用诸如结合,此在包括生物分子的分子的异质群体存在下,确定所述靶标的存在。举例来说,结合或特异性结合靶标(其可为表位)的抗体是相比于它结合其他靶标,以更大亲和力、亲合力,更易于和/或以更久持续时间结合这个靶标的抗体。在一个实施方案中,抗体与无关靶标结合的程度小于所述抗体与靶标结合的约10%,例如通过放射免疫测定(RIA)所测量。在某些实施方案中,特异性结合靶标的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 或 $\leq 0.1\text{nM}$ 的解离常数(Kd)。在某些实施方案中,抗体特异性结合蛋白质上在来自不同物种的蛋白质之间保守的表位。在另一实施方案中,特异性结合可包括但不要求排他性结合。例如,若本文所述经遮蔽抗CD28抗体结合至人CD28的 EC_{50} 低于如在体外分析中其结合不同抗原的 EC_{50} 的10%,则称本文所述经遮蔽抗CD28抗体选择性结合至人CD137。

[0084] 关于哺乳动物中的某一疾病病状的术语“治疗(treat、treating或treatment)”是指在患有该疾病病状的哺乳动物中导致期望或有益的效应。期望或有益的效应可包括疾病的一种或多种症状(即,肿瘤生长和/或转移,或由免疫细胞的数量和/或活性介导的其他作用等)的频率或严重程度降低,或疾病、病状或病症的进一步发展的停止或抑制。在治疗哺乳动物的癌症的上下文中,期望或有益的效应可包括癌细胞的进一步生长或扩散的抑制、癌细胞的死亡、癌症复发的抑制、癌症相关疼痛的减少,或哺乳动物存活率的提高。所述作用可以是主观或客观的。例如,如果哺乳动物是人,那么人可将精力或活力改善或疼痛减少记录为改善的自觉症状或对疗法的响应。可替代地,临床医生可基于体检、实验室参数、肿瘤标志物或影像学发现注意到肿瘤大小或肿瘤负荷的减小。对于对治疗的响应,临床医生可观察的一些实验室征象包括测试的标准化,诸如白血细胞计数、红血细胞计数、血小板计数、红细胞沉降率以及各种酶水平。另外,临床医生可观察到可检测肿瘤标志物的减少。可替代地,可使用其他测试评估客观改善,诸如声像图、核磁共振测试以及正电子发射测试。

[0085] 术语“载体”是指能够运送外来核酸分子的核酸分子。外来核酸分子通过重组技术诸如连接或重组来连接于载体核酸分子。这允许在宿主细胞或生物体中繁殖、选择、进一步操作或表达外来核酸分子。载体可为质粒、噬菌体、转座子、粘粒、染色体、病毒或病毒粒子。一种类型的载体可在引入宿主细胞中后整合至宿主细胞的基因组中,并且由此连同宿主基因组一起复制(例如非游离型哺乳动物载体)。另一类的载体能够在它所引入的宿主细胞中自主复制(例如具有细菌复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体)。能够引导它们所操作性地连接的可表达外来核酸的表的另一特定类型的载体通常被称为“表达载体”。表达载体通常具有驱动可表达外来核酸的表的控制序列。被称为“转录载体”的较简单载体仅

能够被转录而非翻译：它们可在靶标细胞中复制而非表达。术语“载体”涵盖所有类型的载体，无论它们的功能如何。能够引导它们所操作性地连接的可表达核酸的表达的载体通常被称为“表达载体”。“载体”的其他实例可包括展示载体（例如引导所编码多肽在病毒或细胞（诸如细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞和/或哺乳动物细胞）的表面上表达和展示的载体）。

[0086] 如本文所用，“受试者”、“患者”或“个体”可指人或非人动物。“非人动物”可指不分类为人的任何动物，诸如家养动物、农场动物或动物园动物、运动动物、玩赏动物（诸如狗、马、猫、母牛等）以及研究中使用的动物。研究动物可不加限制地指代线虫、节肢动物、脊椎动物、哺乳动物、蛙、啮齿动物（例如小鼠或大鼠）、鱼（例如斑马鱼或河豚鱼）、鸟（例如鸡）、狗、猫以及非人灵长类动物（例如恒河猴、食蟹猴、黑猩猩等）。在一些实施方案中，受试者、患者或个体是人。

[0087] “有效量”是指至少以下数量：在必要剂量下以及持续必要时期，所述数量有效实现一种或多种包括治疗或防治结果的所需或所指示作用。有效量可以一次或多次施用来提供。出于本公开的目的，抗体、药物、化合物或药物组合物的有效量是足以直接或间接实现防治性或治疗性治疗的量。如在临床情形下所了解，药物、化合物或药物组合物的有效量可或可不与另一药物、化合物或药物组合物联合实现（例如如以单一疗法或组合疗法形式施用的有效量）。因此，可在施用一种或多种治疗剂的情形下考虑“有效量”，并且如果与一种或多种其他药剂联合，可实现或实现了合乎需要结果，那么单一药剂可被视为以有效量给予。

[0088] 本文引用的所有参考文献，包括专利申请和出版物，其全文以引用的方式并入本文中。

[0089] II. 抗体

[0090] 本发明的某些方面是关于单特异性抗体（例如，传统、非遮蔽单特异性抗体）、多特异性抗体（例如，非遮蔽多特异性抗体）、经遮蔽抗体（例如，可活化单特异性或多特异性抗体）、其抗原结合片段、或此类抗体的衍生物。

[0091] A. Fc区和C_H3结构域

[0092] 在一些实施方案中，本文所述抗体（例如，多特异性抗体）包含一个或多个抗体恒定区，例如人重链恒定区和/或人轻链恒定区。在一些实施方案中，人重链恒定区属于选自IgA、IgG和IgD的同型。在一些实施方案中，人轻链恒定区属于选自κ和λ的同型。在一些实施方案中，抗体包含人IgG恒定区。在一些实施方案中，抗体包含人IgG₄重链恒定区。在一些实施方案中，抗体包含人IgG₁重链恒定区。在一些此类实施方案中，抗体在人IgG₄恒定区中包含S228P突变。

[0093] 效应功能是否为所需的可视意图用于抗体的特定处理方法而定。在一些实施方案中，当效应功能为所需的时，选择包含人IgG₁重链恒定区或人IgG₃重链恒定区的抗体。在一些实施方案中，当效应功能不为所需之时，选择包含人IgG₄或IgG₂重链恒定区的抗体。在一些实施方案中，抗体包含含有降低效应功能的一个或多个突变的人IgG₁重链恒定区。在一些实施方案中，抗体包含含有N297A取代的IgG₁重链恒定区。

[0094] 本文所描述的多特异性抗体（包括可活化多特异性抗体）可包含C_H3结构域，其具有一个或多个经工程改造的二硫键、一个或多个经工程改造的（例如重排或逆转）盐桥或其组合。除非另外说明，否则本文的所有氨基酸残基编号是基于Eu编号，并且氨基酸取代是在

野生型(或天然存在的) C_H3 结构域序列中的对应氨基酸位置相对于野生型(或天然存在的)序列。应了解,本文所描述的突变或取代适用于所有IgG亚类和同种异型。IgG同种异型已描述于例如Jefferis和Lefranc mAbs (2009) 1:4, 1-7中,所述参考文献以全文引用的方式并入本文中。在一些实施方案中,本文所描述的氨基酸突变或取代是相对于IgG₁的野生型 C_H3 结构域序列,诸如IgG₁同种异型G1m、1(a)、2(x)、3(f)或17(z)。在一些实施方案中,本文所描述的氨基酸突变或取代是相对于IgG₄的野生型 C_H3 结构域序列。举例来说,相对于一种人IgG₁同种异型的野生型 C_H3 结构域(Uniprot编号P01857)的D356K取代等效于相对于第二人IgG₁同种异型的野生型 C_H3 结构域或人IgG₄的野生型 C_H3 结构域的E356K取代。示例性 C_H3 结构域突变显示于表2和3中。在一些实施方案中,本文所描述的氨基酸突变或取代是相对于野生型Fc区序列,例如IgG₁ Fc区或IgG₄ Fc区。具有突变的 C_H3 序列描述在WO 2021/148006中,其全文以引用的方式并入本文中。在下表和说明书的其它部分, C_H3 突变注释中撇号表示第二 C_H3 结构域中的残基。例如,在N390C-S400'C中,S400C突变位于第二 C_H3 结构域。

[0095] 表2.Fc突变

设计	突变(第一 C_H3 结构域-第二 C_H3 结构域)
二硫键	N390C-S400'C
	S400C-N390'C
	K392C-V397'C
	V397C-K392'C
	K392C-S400'C
	S400C-K392'C
电荷设计	E357K:T411K-L351'D:K370'D
	E357K:S364K-L351'D:K370'D
	D356K:E357K:S364K-L351'D:K370'D:K439'D
电荷+二硫键设计	E357K:S364K:N390C-L351'D:K370'D:S400'C
	E357K:S364K:S400C-L351'D:K370'D:N390'C
	D356K:E357K:S364K:N390C-L351'D:K370'D:S400'C:K439'D
	D356K:E357K:S364K:S400C-L351'D:K370'D:N390'C:K439'D

[0097] 表3.Fc突变ID

突变 ID	突变(第一 C_H3 结构域-第二 C_H3 结构域)
TRF01	T366S, L368A, Y407V, Y349C-T366'W, S354'C
TRF02	T350V, L351Y, F405A, Y407V-T350'V, T366'L, K392'L, T394'W
TRF03	K196Q, S228P, F296Y, E356K, R409K, H435R, L445P-K196'Q, S228'P, F296'Y, R409'K, K439'E, L445'P
TYM01	T366S, L368A, Y407V, N390C-T366'W, S400'C

突变 ID	突变(第一 C _H 3 结构域-第二 C _H 3 结构域)
TYM02	T366S, L368A, Y407V, S400C-T366'W, N390'C
TYM03	Y349C, L368V, Y407V-S354'C, T366'W
TYM04	L368V, Y407V-T366'W
TYM05	L368V, Y407V, N390C-T366'W, S400'C
TYM06	L368V, Y407V, S400C-T366'W, N390'C
[0099] TYM07	E357K:T411K-L351'D:K370'D
TYM08	E357K:S364K-L351'D:K370'D
TYM09	D or E356K:E357K:S364K-L351'D:K370'D:K439'D
TYM10	E357K:S364K:N390C-L351'D:K370'D:S400'C
TYM11	E357K:S364K:S400C-L351'D:K370'D:N390'C
TYM12	D or E356K:E357K:S364K:N390C-L351'D:K370'D:S400'C:K439'D
TYM13	D or E356K:E357K:S364K:S400C-L351'D:K370'D:N390'C:K439'D

[0100] 在一些实施方案中,多特异性抗体(例如,可活化多特异性抗体)包含第一C_H3结构域中的C390与第二C_H3结构域中的C400之间、第一C_H3结构域中的C392与第二C_H3结构域中的C397之间、或第一C_H3结构域中的C392与第二C_H3结构域中的C400之间的经工程改造的二硫键。在一些实施方案中,与野生型C_H3结构域相比,多特异性抗体(例如,可活化多特异性抗体)包含重排的盐桥网络,例如在第一C_H3结构域中的357位与411位和第二C_H3结构域中的351位与370位之间(例如,E357K:T411K-L351'D:K370'D),或在第一C_H3结构域中的357位与364位和第二C_H3结构域中的351位与370位之间(例如,E357K:S364K-L351'D:K370'D)。在一些实施方案中,与野生型C_H3结构域相比,多特异性抗体在第一C_H3结构域中的356位与第二C_H3结构域中的439位之间包含反向盐桥(例如,D356-K439')。具有C_H3突变的抗体可具有高产率、优良稳定性(例如,对在高温下或因冷冻-解冻循环所致的聚集和沉淀具有抗性)和强效活性。

[0101] 在一些实施方案中,多特异性抗体(例如,可活化多特异性抗体)包含C_H3结构域,其具有一个或多个经工程改造的残基,这些经工程改造的残基如本文所述促进异二聚体形成。本文还涵盖了包含多个由包含第一经工程改造的C_H3结构域的第一多肽和包含第二经工程改造的C_H3结构域的第二多肽形成的异二聚体的异源多聚体。

[0102] 在一些实施方案中,多特异性抗体(例如,可活化多特异性抗体)包含:i) 第一C_H3结构域包含在位置390的半胱氨酸(C)残基并且第二C_H3结构域包含在位置400的半胱氨酸残基,或第一C_H3结构域包含在位置400的半胱氨酸残基并且第二C_H3结构域包含在位置390的半胱氨酸残基;或ii) 第一C_H3结构域包含在位置392的半胱氨酸残基并且第二C_H3结构域包含在位置397的半胱氨酸残基,或第一C_H3结构域包含在位置397的半胱氨酸残基并且第二C_H3结构域包含在位置392的半胱氨酸残基;或iii) 第一C_H3结构域包含在位置392的半胱氨酸残基并且第二C_H3结构域包含在位置400的半胱氨酸残基,或第一C_H3结构域包含在位置400的半胱氨酸残基并且第二C_H3结构域包含在位置392的半胱氨酸残基;并且其中氨基酸残基编号是基于Eu编号。

[0103] 在一些实施方案中,多特异性抗体(例如,可活化多特异性抗体)包含:含有第一C_H3结构域的第一多肽和含有第二C_H3结构域的第二多肽,其中:i) 第一C_H3结构域还包含在位置357的带正电荷的残基并且第二C_H3结构域还包含在位置351的带负电荷的残基,或第一C_H3结构域还包含在位置351的带负电荷的残基并且第二C_H3结构域还包含在位置357的带

正电荷的残基;或ii)第一C_H3结构域还包含在位置411的带正电荷的残基并且第二C_H3结构域还包含在位置370的带负电荷的残基,或第一C_H3结构域还包含在位置370的带负电荷的残基并且第二C_H3结构域还包含在位置411的带正电荷的残基;或iii)第一C_H3结构域还包含在位置364的带正电荷的残基并且第二C_H3结构域还包含在位置370的带负电荷的残基,或第一C_H3结构域还包含在位置370的带负电荷的残基并且第二C_H3结构域还包含在位置364的带正电荷的残基;或i)与ii)的组合,或i)与iii)的组合,并且其中氨基酸残基编号是基于Eu编号。

[0104] 在一些实施方案中,第一C_H3结构域还包含在位置356的带正电荷的残基并且第二C_H3结构域还包含在位置439的带负电荷的残基,或第一C_H3结构域还包含在位置439的带负电荷的残基并且第二C_H3结构域还包含在位置356的带正电荷的残基,并且其中氨基酸残基编号是基于Eu编号。

[0105] 在一些实施方案中,多特异性抗体(例如,可活化多特异性抗体)包含:含有第一C_H3结构域的第一多肽和含有第二C_H3结构域的第二多肽,其中:i)第一C_H3结构域包含在位置390的半胱氨酸(C)残基并且第二C_H3结构域包含在位置400的半胱氨酸残基,或第一C_H3结构域包含在位置400的半胱氨酸残基并且第二C_H3结构域包含在位置390的半胱氨酸残基;或ii)第一C_H3结构域包含在位置392的半胱氨酸残基并且第二C_H3结构域包含在位置397的半胱氨酸残基,或第一C_H3结构域包含在位置397的半胱氨酸残基并且第二C_H3结构域包含在位置392的半胱氨酸残基;或iii)第一C_H3结构域包含在位置392的半胱氨酸残基并且第二C_H3结构域包含在位置400的半胱氨酸残基,或第一C_H3结构域包含在位置400的半胱氨酸残基并且第二C_H3结构域包含在位置392的半胱氨酸残基;并且其中:a)第一C_H3结构域还包含在位置357的带正电荷的残基并且第二C_H3结构域还包含在位置351的带负电荷的残基,或第一C_H3结构域还包含在位置351的带负电荷的残基并且第二C_H3结构域还包含在位置357的带正电荷的残基;或b)第一C_H3结构域还包含在位置411的带正电荷的残基并且第二C_H3结构域还包含在位置370的带负电荷的残基,或第一C_H3结构域还包含在位置370的带负电荷的残基并且第二C_H3结构域还包含在位置411的带正电荷的残基;或c)第一C_H3结构域还包含在位置364的带正电荷的残基并且第二C_H3结构域还包含在位置370的带负电荷的残基,或第一C_H3结构域还包含在位置370的带负电荷的残基并且第二C_H3结构域还包含在位置364的带正电荷的残基;或a)与b)的组合,或a)与c)的组合;其中氨基酸残基编号是基于Eu编号。

[0106] 在一些实施方案中,第一C_H3结构域还包含在位置356的带正电荷的残基并且第二C_H3结构域还包含在位置439的带负电荷的残基,或第一C_H3结构域还包含在位置439的带负电荷的残基并且第二C_H3结构域还包含在位置356的带正电荷的残基,并且其中氨基酸残基编号是基于Eu编号。

[0107] C_H3结构域可衍生自任何天然存在的免疫球蛋白分子。在一些实施方案中,C_H3结构域衍生自IgG₁分子、IgG₂分子、IgG₃分子或IgG₄分子。在一些实施方案中,C_H3结构域为人C_H3结构域。在一些实施方案中,C_H3结构域衍生自人IgG₁分子。

[0108] 在一些实施方案中,多特异性抗体(例如,可活化多特异性抗体)包含:含有第一C_H3结构域的第一多肽和含有第二C_H3结构域的第二多肽,其中:i)第一C_H3结构域包含N390C取代并且第二C_H3结构域包含S400C取代,或第一C_H3结构域包含S400C取代并且第二C_H3结构域包含N390C取代;或ii)第一C_H3结构域包含K392C取代并且第二C_H3结构域包含V397C取代,

或第一C_H3结构域包含V397C取代并且第二C_H3结构域包含K392C取代;或iii) 第一C_H3结构域包含K392C取代并且第二C_H3结构域包含S400C取代,或第一C_H3结构域包含S400C取代并且第二C_H3结构域包含K392C取代。

[0109] 在一些实施方案中,多特异性抗体(例如,可活化多特异性抗体)包含:含有第一C_H3结构域的第一多肽和含有第二C_H3结构域的第二多肽,其中:i) 第一C_H3结构域包含E357K和T411K取代并且第二C_H3结构域包含L351D和K370D取代,或第一C_H3结构域包含L351D和K370D取代并且第二C_H3结构域包含E357K和T411K取代;或ii) 第一C_H3结构域包含E357K和S364K取代并且第二C_H3结构域包含L351D和K370D取代,或第一C_H3结构域包含L351D和K370D取代并且第二C_H3结构域包含E357K和S364K取代;或iii) 第一C_H3结构域包含D356K、E357K和S364K取代并且第二C_H3结构域包含L351D、K370D和K439D取代,或第一C_H3结构域包含L351D、K370D和K439D取代并且第二C_H3结构域包含D356K、E357K和S364K取代。

[0110] 在一些实施方案中,多特异性抗体(例如,可活化多特异性抗体)包含:含有第一C_H3结构域的第一多肽和含有第二C_H3结构域的第二多肽,其中第一C_H3结构域包含E357K、S364K和N390C取代并且第二C_H3结构域包含L351D、K370D和S400C取代,或第一C_H3结构域包含L351D、K370D和S400C取代并且第二C_H3结构域包含E357K、S364K和N390C取代。

[0111] 在一些实施方案中,多特异性抗体(例如,可活化多特异性抗体)包含:含有第一C_H3结构域的第一多肽和含有第二C_H3结构域的第二多肽,其中第一C_H3结构域包含E357K、S364K和S400C取代并且第二C_H3结构域包含L351D、K370D和N390C取代,或第一C_H3结构域包含L351D、K370D和N390C取代并且第二C_H3结构域包含E357K、S364K和S400C取代。

[0112] 在一些实施方案中,多特异性抗体(例如,可活化多特异性抗体)包含:含有第一C_H3结构域的第一多肽和含有第二C_H3结构域的第二多肽,其中第一C_H3结构域包含D356K、E357K、S364K和S400C取代并且第二C_H3结构域包含L351D、K370D、N390C和K439D取代,或第一C_H3结构域包含L351D、K370D、N390C和K439D取代并且第二C_H3结构域包含D356K、E357K、S364K和S400C取代。

[0113] 在一些实施方案中,多特异性抗体(例如,可活化多特异性抗体)包含:含有第一C_H3结构域的第一多肽和含有第二C_H3结构域的第二多肽,其中第一C_H3结构域包含D356K、E357K、S364K和N390C取代并且第二C_H3结构域包含L351D、K370D、K439D和S400C取代,或第一C_H3结构域包含L351D、K370D、K439D和S400C取代并且第二C_H3结构域包含D356K、E357K、S364K和N390C取代。

[0114] 在一些实施方案中,多特异性抗体(例如,可活化多特异性抗体)包含含有经工程改造的C_H3结构域的IgG Fc区。Fc区可衍生自任何适合的Fc亚类,包括但不限于IgG₁、IgG₂、IgG₃和IgG₄亚类。

[0115] B. 半胱氨酸突变

[0116] 在一些实施方案中,本文所描述的多特异性抗体(例如,本文描述的可活化多特异性抗体)包含含有第一C_H3结构域的第一多肽和含有第二C_H3结构域的第二多肽,其中第一C_H3结构域包含第一经工程改造的半胱氨酸残基并且第二C_H3结构域包含第二经工程改造的半胱氨酸残基,其中第一经工程改造的半胱氨酸残基和第二半胱氨酸残基形成二硫键。

[0117] 在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含在位置390的C并且第二C_H3结构域包含在位置400的C,或第一C_H3结构域包含在位置400的C并且第二C_H3结构域包含在位置390的C。在

一些实施方案中,第一C_H3结构域包含N390C取代并且第二C_H3结构域包含S400C取代,或第一C_H3结构域包含S400C取代并且第二C_H3结构域包含N390C取代。

[0118] 在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含在位置392的C并且第二C_H3结构域包含在位置397的C,或第一C_H3结构域包含在位置397的C并且第二C_H3结构域包含在位置392的C。在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含K392C取代并且第二C_H3结构域包含V397C取代,或第一C_H3结构域包含V397C取代并且第二C_H3结构域包含K392C取代。

[0119] 在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含在位置392的C并且第二C_H3结构域包含在位置400的C,或第一C_H3结构域包含在位置400的C并且第二C_H3结构域包含在位置392的C。在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含K392C取代并且第二C_H3结构域包含S400C取代,或第一C_H3结构域包含S400C取代并且第二C_H3结构域包含K392C取代。

[0120] C. 盐桥突变

[0121] 在一些实施方案中,本文所描述的多特异性抗体(例如,本文所描述的可活化多特异性抗体)包含含有第一C_H3结构域的第一多肽和含有第二C_H3结构域的第二多肽,其中第一C_H3结构域包含经工程改造的带正电荷的残基并且第二C_H3结构域包含经工程改造的带负电荷的残基,其中经工程改造的带正电荷的残基和经工程改造的带负电荷的残基形成盐桥。相对于野生型C_H3结构域,经工程改造的盐桥可在C_H3结构域之间引入新的盐桥,使两个或更多个氨基酸残基间的盐桥网状结构重排,或逆转形成盐桥的氨基酸残基上的电荷(即,“逆转”盐桥)。在一些实施方案中,经工程改造的带正电荷的残基将野生型C_H3结构域中的带负电荷的残基用带正电荷的残基取代。在一些实施方案中,经工程改造的带正电荷的残基将野生型C_H3结构域中的带正电荷的残基用带负电荷的残基取代。重排和逆转盐桥可使得包含经工程改造的C_H3结构域的异二聚体和同二聚体的等电点(PI)改变,由此允许在纯化工艺中更好地分离异二聚体与同二聚体。

[0122] 在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含在位置357的带正电荷的残基并且第二C_H3结构域包含在位置351的带负电荷的残基,或第一C_H3结构域包含在位置351的带负电荷的残基并且第二C_H3结构域包含在位置357的带正电荷的残基。在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含在位置357的K并且第二C_H3结构域包含在位置351的D,或第一C_H3结构域包含在位置351的D并且第二C_H3结构域包含在位置357的K。在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含在位置357的K并且第二C_H3结构域包含在位置351的E,或第一C_H3结构域包含在位置351的E并且第二C_H3结构域包含在位置357的K。在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含在位置357的R并且第二C_H3结构域包含在位置351的D,或第一C_H3结构域包含在位置351的D并且第二C_H3结构域包含在位置357的R。在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含在位置357的R并且第二C_H3结构域包含在位置351的E,或第一C_H3结构域包含在位置351的E并且第二C_H3结构域包含在位置357的R。在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含E357K取代并且第二C_H3结构域包含L351D取代,或第一C_H3结构域包含L351D取代并且第二C_H3结构域包含E357K取代。

[0123] 在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含在位置411的带正电荷的残基并且第二C_H3结构域包含在位置370的带负电荷的残基,或第一C_H3结构域包含在位置370的带负电荷的残基并且第二C_H3结构域包含在位置411的带正电荷的残基。在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含在位置411的K并且第二C_H3结构域包含在位置370的D,或第一C_H3结构域包含在位置370的D并且第二C_H3结构域包含在位置411的K。在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含在

位置411的K并且第二C_H3结构域包含在位置370的E,或第一C_H3结构域包含在位置370的E并且第二C_H3结构域包含在位置411的K。在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含在位置411的R并且第二C_H3结构域包含在位置370的D,或第一C_H3结构域包含在位置370的D并且第二C_H3结构域包含在位置411的R。在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含在位置411的R并且第二C_H3结构域包含在位置370的E,或第一C_H3结构域包含在位置370的E并且第二C_H3结构域包含在位置411的R。在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含T411K取代并且第二C_H3结构域包含K370D取代,或第一C_H3结构域包含K370D取代并且第二C_H3结构域包含T411K取代。

[0124] 在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含在位置364的带正电荷的残基并且第二C_H3结构域包含在位置370的带负电荷的残基,或第一C_H3结构域包含在位置370的带负电荷的残基并且第二C_H3结构域包含在位置364的带正电荷的残基。在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含在位置364的K并且第二C_H3结构域包含在位置370的D,或第一C_H3结构域包含在位置370的D并且第二C_H3结构域包含在位置364的K。在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含在位置364的K并且第二C_H3结构域包含在位置370的E,或第一C_H3结构域包含在位置370的E并且第二C_H3结构域包含在位置364的K。在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含在位置364的R并且第二C_H3结构域包含在位置370的D,或第一C_H3结构域包含在位置370的D并且第二C_H3结构域包含在位置364的R。在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含在位置364的R并且第二C_H3结构域包含在位置370的E,或第一C_H3结构域包含在位置370的E并且第二C_H3结构域包含在位置364的R。在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含S364K取代并且第二C_H3结构域包含K370D取代,或第一C_H3结构域包含K370D取代并且第二C_H3结构域包含S364K取代。

[0125] 在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含在位置356的带正电荷的残基并且第二C_H3结构域包含在位置439的带负电荷的残基,或第一C_H3结构域包含在位置439的带负电荷的残基并且第二C_H3结构域包含在位置356的带正电荷的残基。在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含在位置356的K并且第二C_H3结构域包含在位置439的D,或第一C_H3结构域包含在位置439的D并且第二C_H3结构域包含在位置356的K。在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含在位置356的K并且第二C_H3结构域包含在位置439的E,或第一C_H3结构域包含在位置439的E并且第二C_H3结构域包含在位置356的K。在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含在位置356的R并且第二C_H3结构域包含在位置439的D,或第一C_H3结构域包含在位置439的D并且第二C_H3结构域包含在位置356的R。在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含在位置356的R并且第二C_H3结构域包含在位置439的E,或第一C_H3结构域包含在位置439的E并且第二C_H3结构域包含在位置356的R。在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含D356K取代并且第二C_H3结构域包含K439D取代,或第一C_H3结构域包含K439D取代并且第二C_H3结构域包含D356K取代。

[0126] 本文所描述的经工程改造的盐桥中的任一者可彼此组合。在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含在位置357的带正电荷的残基和在位置411的带正电荷的残基并且第二C_H3结构域包含在位置351的带负电荷的残基和在位置370的带负电荷的残基,或第一C_H3结构域包含在位置351的带负电荷的残基和在位置370的带负电荷的残基并且第二C_H3结构域包含在位置357的带正电荷的残基和在位置411的带正电荷的残基。在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含E357K和T411K取代并且第二C_H3结构域包含L351D和K370D取代,或第一C_H3结构域包含L351D和K370D取代并且第二C_H3结构域包含E357K和T411K取代。

[0127] 在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含在位置357的带正电荷的残基和在位置

364的带正电荷的残基并且第二C_H3结构域包含在位置351的带负电荷的残基和在位置370的带负电荷的残基,或第一C_H3结构域包含在位置351的带负电荷的残基和在位置370的带负电荷的残基并且第二C_H3结构域包含在位置357的带正电荷的残基和在位置364的带正电荷的残基。在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含E357K和S364K取代并且第二C_H3结构域包含L351D和K370D取代,或第一C_H3结构域包含L351D和K370D取代并且第二C_H3结构域包含E357K和S364K取代。

[0128] 在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含在位置356的带正电荷的残基、在位置357的带正电荷的残基和在位置364的带正电荷的残基并且第二C_H3结构域包含在位置351的带负电荷的残基、在位置370的带负电荷的残基和在位置439的带负电荷的残基,或第一C_H3结构域包含在位置351的带负电荷的残基、在位置370的带负电荷的残基和在位置439的带负电荷的残基并且第二C_H3结构域包含在位置356的带正电荷的残基、在位置357的带正电荷的残基和在位置364的带正电荷的残基。在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含D356K、E357K和S364K取代并且第二C_H3结构域包含L351D、K370D和K439D取代,或第一C_H3结构域包含L351D、K370D和K439D取代并且第二C_H3结构域包含D356K、E357K和S364K取代。

[0129] D. 其他突变

[0130] 本文所描述的C_H3结构域或Fc区还可包含下表4中所列的经工程改造的二硫键和/或盐桥。

[0131] 表4. 示例性Fc突变

[0132]

第一多肽链中的突变	第二多肽链中的突变
F405L	K409R
S364H、F405A	Y349T、T394F
S364K、E357Q	L368D、K370S
T366W	T366S、L368A、Y407V
S354C、T366W	Y349C、T366S、L368A、Y407V
T350、L351、F405、Y407 T350 为 T350V、T350I、T350L 或 T350M L351 为 L351Y F450 为 F450A、F450V、F450T 或 F450S Y407 为 Y407V、Y407A 或 Y407I	T350、T366、K392、T394 T350 为 T350V、T350I、T350L 或 T350M T366 为 T366L、T366I、T366V 或 T366M K392 为 K392F、K392L 或 K392M T394 为 T394W
D399K、E356K	K409D、K392D
D221E、P228E、L368E	D221R、P228R、K409R
C223E、E225E、P228E、L368E	C223R、E225R、P228R、K409R
H435R	无
K196Q、S228P、F296Y、E356K、R409K、H435R、L445P	K196Q、S228P、F296Y、R409K、K439E、L445P
K409W	D399V/F405T
K360E	Q347R
Y349C/K360E/K409W	Q347R/S354C/D399V/F405T
K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
Y349S/K409W	E357W/D399V/F405T
Y349S/S354C/K409W	Y349C/E357W/D399V/F405T
T366K	L351D
Y349E 或 D 和 L368E	L351D
Y349C/T366W	D356C/T366S/L368A/Y407V/F405K
Y349C/T366W/F405K	D356C/T366S/L368A/Y407V
Y349C/T366W/K409E	D356C/T366S/L368A/Y407V/F405K
Y349C/T366W/K409A	D356C/T366S/L368A/Y407V/F405K

[0133]

第一多肽链中的突变	第二多肽链中的突变
S364K	L368D
S364K	K370S
F405K	K409F
F405R	K409F
S364K/K409F	L368D/F405R
S364K/K409F	K370S/F405R
S364K/K409W	K370S/F405R
K370E 或 E356K 和 K409R	E357K 和 K409R 或 K370E
S354I/S364L/Y407V	Q347V/Y349I/T350K/L351Q/T366W/L368I/Y407V
Y349I	S354I/E357Q/M/G/S364L/T366S/L368A/Y407V
P395K/P396K/V397K	T394D/P395D/P396D
F405E/Y407E/K409E	F405K/Y407K
M428S/N434S/Y436H	H435R

[0134] 在一些实施方案中,第一C_H3结构域还包含在位置392的C并且第二C_H3结构域包含在位置399的C,或第一C_H3结构域包含在位置399的C并且第二C_H3结构域包含在位置392的C。

在一些实施方案中,第一C_H3结构域还包含K392C取代并且第二C_H3结构域还包含D399C取代,或第一C_H3结构域还包含D399C取代并且第二C_H3结构域还包含K392C取代。

[0135] 在一些实施方案中,第一C_H3结构域还包含在位置394的C并且第二C_H3结构域包含在位置354的C,或第一C_H3结构域包含在位置354的C并且第二C_H3结构域包含在位置394的C。在一些实施方案中,第一C_H3结构域还包含Y394C取代并且第二C_H3结构域还包含S354C取代,或第一C_H3结构域还包含S354C取代并且第二C_H3结构域还包含Y394C取代。

[0136] 在一些实施方案中,第一C_H3结构域还包含在位置356的C并且第二C_H3结构域包含在位置349的C,或第一C_H3结构域包含在位置349的C并且第二C_H3结构域包含在位置356的C。在一些实施方案中,第一C_H3结构域还包含D356C取代并且第二C_H3结构域还包含Y349C取代,或第一C_H3结构域还包含Y349C取代并且第二C_H3结构域还包含D356C取代。

[0137] 在一些实施方案中,第一C_H3结构域还包含K392D和K409D取代并且第二C_H3结构域还包含D356K和D399K取代,或第一C_H3结构域还包含D356K和D399K取代并且第二C_H3结构域还包含K392D和K409D取代。

[0138] 在一些实施方案中,第一C_H3结构域还包含L368D和K370S取代并且第二C_H3结构域还包含E357Q和S364K取代,或第一C_H3结构域还包含E357Q和S364K取代并且第二C_H3结构域还包含L368D和K370S取代。

[0139] 在一些实施方案中,第一C_H3结构域还包含L351K和T366K取代并且第二C_H3结构域还包含L351D和L368E取代,或第一C_H3结构域还包含L351D和L368E取代并且第二C_H3结构域还包含L351K和T366K取代。

[0140] 在一些实施方案中,第一C_H3结构域还包含P395K、P396K和V397K取代并且第二C_H3结构域包含T394D、P395D和P396D取代,或第一C_H3结构域还包含T394D、P395D和P396D取代并且第二C_H3结构域还包含P395K、P396K和V397K取代。

[0141] 在一些实施方案中,第一C_H3结构域还包含F405E、Y407E和K409E取代并且第二C_H3结构域包含F405K和Y407K取代,或第一C_H3结构域还包含F405K和Y407K取代并且第二C_H3结构域还包含F405E、Y407E和K409E取代。

[0142] 在一些实施方案中,第一C_H3结构域还包含T336S、L368A和Y407V取代并且第二C_H3结构域还包含T366W取代,或第一C_H3结构域还包含T366W取代并且第二C_H3结构域还包含T336S、L368A和Y407V取代。

[0143] 在一些实施方案中,第一C_H3结构域包含L368V和Y407V取代并且第二C_H3结构域包含T366W取代,或第一C_H3结构域包含T366W取代并且第二C_H3结构域包含L368V和Y407V取代。

[0144] III. CD28结合分子

[0145] 本公开提供了与人CD28结合的分离的结合分子,包括抗CD28抗体、及其抗CD28抗原结合片段。在一些实施方案中,结合分子包括关于表位结合所描述的抗体和关于互补决定区(CDR)、可变区(V_L、V_H)和IgG(例如,IgG₄)轻链和重链的具体氨基酸序列所描述的抗体。

[0146] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与SEQ ID NO:1的氨基酸残基34-108内的一个或多个氨基酸残基结合。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段与SEQ ID NO:1的氨基酸残基51-122内的一个或多个氨基酸残基结合。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段与选自SEQ ID NO:1的氨基酸残基51、52、54、55、98-101、110-111、113-114和118-122组成的组的一个或多个氨基酸残基结合。测量抗体或抗原结合片段结合靶抗原的能力

的方法可使用本领域已知的任何方法进行,包括例如,通过表面等离子体共振、ELISA、等温滴定定量热法、过滤结合测定、EMSA等。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段结合靶抗原的能力通过ELISA或Octet®RED96测量(参见例如,以下实施例3)。

[0147] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段以约500nM或更小(例如,约500nM或更小、约400nM或更小、约300nM或更小、约200nM或更小、约150nM或更小、约100nM或更小、约90nM或更小、约80nM或更小、约75nM或更小、约70nM或更小、约60nM或更小、约50nM或更小、约40nM或更小、约30nM或更小、约25nM或更小、约20nM或更小、约10nM或更小、约1nM或更小、约0.1nM或更小等)的 K_D 与人CD28结合。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段以约100nM或更小的 K_D 与人CD28结合。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段以约50nM或更小的 K_D 与人CD28结合。测量抗体或抗原结合片段的 K_D 的方法可使用本领域已知的任何方法进行,包括例如,通过表面等离子体共振、ELISA、等温滴定定量热法、过滤结合测定、EMSA等。在一些实施方案中, K_D 通过Octet®RED96系统测量(参见例如,以下实施例3)。

[0148] A. 抗CD28抗体

[0149] 在一些实施方案中,本公开提供一种经分离单克隆抗体,其在SEQ ID NO:1的氨基酸残基33-37、80-83、92-96和100-104的抗原表位上与人CD28结合。在特定实施方案中,本公开提供一种经分离抗体,其在SEQ ID NO:1的氨基酸残基33、34、36和37、80-83、92和93、95和96以及100-104代表的抗原表位上与人CD28结合。在一些实施方案中,抗体以10nM或更小的 K_D 结合人CD28,如通过Octet®RED96系统测量。在某些实施方案中,除结合人抗原表位外,本公开的抗体可与选自食蟹猕猴、小鼠、大鼠和狗的至少一种非人物种交叉反应。在某些实施方案中,本公开的抗体具有跨物种结合小鼠、人和猴子的优点,然而本公开的基准对照TAC2386和TAC2387不具有此范围的物种交叉反应性。在特定实施方案中,基准对照TAC2386和TAC2387结合人抗原表位但不结合小鼠抗原表位(参见本文表7)。本公开抗体的物种交叉反应性还能提供使用小鼠模拟抗体安全性、活性和功能的额外优势。因此,相较于本公开的TAC2386和TAC2387,使用本公开的抗体更易进行动物建模。

[0150] 在特定实施方案中,经分离抗CD28单克隆抗体包含SEQ ID NO:5的HCDR1、SEQ ID NO:6的HCDR2和SEQ ID NO:7的HCDR3,以及SEQ ID NO:8的LCDR1、SEQ ID NO:9的LCDR2和SEQ ID NO:10的LCDR3。在特定实施方案中,经分离单克隆抗体包含SEQ ID NO:11的重链可变区和SEQ ID NO:12的轻链可变区。在特定实施方案中,经分离单克隆抗体包含SEQ ID NO:13的重链和SEQ ID NO:14的轻链。

[0151] 本文所述CD28抗体可为任一类别,例如IgG、IgM、IgE、IgA或IgD。CD28抗体较佳地是IgG类别,例如IgG₁、IgG₂、IgG₃或IgG₄子类。抗CD28抗体可使用本领域已知的方法自一个类别或子类转化成另一类别或子类。产生期望类别或子类的抗体的示例性方法包括以下步骤:分离编码抗CD28抗体重链的核酸和编码CD28抗体轻链的核酸,分离编码V_H区的序列,将V_H序列连结至编码期望类别或子类的重链恒定区的序列,在细胞中表达轻链基因和重链构建体,并收集CD28抗体。

[0152] 本文所述的CD28抗体可以属于任何种类,诸如IgG、IgM、IgE、IgA或IgD。优选的是,抗CD28抗体属于IgG类,诸如IgG₁、IgG₂、IgG₃或IgG₄亚类。可以使用本领域已知的方法将抗CD28抗体从一个种类或亚类转换为另一种类或亚类。用于产生属于期望种类或亚类的抗体的示例性方法包括以下步骤:分离编码抗CD28抗体的重链的核酸和编码CD28抗体的轻链的

核酸;分离编码V_H区的序列;将V_H序列与编码期望种类或亚类的重链恒定区的序列连接;在细胞中表达轻链基因和重链构建体;以及收集CD28抗体。

[0153] 此外,本公开提供的抗体可以是单克隆或多克隆,但优选为单克隆。

[0154] 本公开的抗体可以通过本领域已知的技术产生,包括常规单克隆抗体方法,例如,标准体细胞杂交技术(参见例如,Kohler和Milstein,Nature (1975) 256:495、B淋巴细胞的病毒或致癌转化,或重组抗体技术,如下文详细描述。

[0155] 杂交瘤产生是一种极其完善建立的程序。用于制备杂交瘤的常见动物系统是鼠系统。用于分离供融合用的经免疫脾细胞的免疫方案和技术在本领域中是已知的。融合配偶体(例如鼠骨髓瘤细胞)和融合程序也是已知的。一种可用于制备由本公开提供的人CD28抗体的熟知方法涉及使用XenoMouseTM动物系统。XenoMouseTM小鼠是包含人免疫球蛋白重链和轻链基因座的大型片段,并且在小鼠抗体产生方面有缺陷的经工程改造小鼠品系。参见例如Green等,Nature Genetics (1994) 7:13-21和W02003/040170。用CD28抗原使动物免疫。CD28抗原是经分离和/或经纯化CD28,优选地CD28。它可为CD28的片段,诸如CD28的细胞外结构域,尤其是包含SEQ ID NO:1的氨基酸残基34、34、36和37、80-83、92和93、95和96、以及100-104的CD28细胞外结构域片段。动物的免疫可通过本领域中已知的任何方法进行。参见例如Harlow和Lane,Antibodies:ALaboratory Manual,New York:Cold Spring Harbor Press,1990。用于使非人动物诸如小鼠、大鼠、绵羊、山羊、猪、牛和马免疫的方法在本领域中是熟知的。参见例如Harlow和Lane(上文)以及美国专利号5,994,619。CD28抗原可与佐剂一起施用以刺激免疫应答。示例性佐剂包括完全或不完全弗氏佐剂(Freund's adjuvant)、RIBI(胞壁酰二肽)或ISCOM(免疫刺激性复合物)。在用CD28抗原使动物免疫之后,从分离自经免疫动物的细胞制备抗体产生性永生细胞系。在免疫之后,将动物处死,并且使淋巴结和/或脾B细胞永生。使细胞永生化的方法包括但不限于用致癌基因对它们进行转移,用致癌病毒感染它们,在选择永生化细胞的条件下培养它们,使它们经受致癌性或突变性化合物,使它们与永生化细胞例如骨髓瘤细胞融合,以及使肿瘤抑制基因失活。参见例如Harlow和Lane,上文。如果使用与骨髓瘤细胞融合,那么骨髓瘤细胞优选地不分泌免疫球蛋白多肽(非分泌细胞系)。使用CD28、其一部分或表达CD28的细胞筛选永生细胞。选择、克隆CD28抗体产生性细胞例如杂交瘤,并且关于合乎需要特征加以进一步筛选,所述特征包括稳健生长、高抗体产量和合乎需要抗体特征,如以下进一步所讨论。杂交瘤可在体内在同种同基因动物中,在缺乏免疫系统的动物例如裸小鼠中,或在体外在细胞培养中扩增。选择、克隆和扩增杂交瘤的方法为本领域普通技术人员所熟知。

[0156] 本公开的抗体还可使用噬菌体展示或酵母展示方法制备。本领域中建立了用于分离人抗体的所述展示方法,例如Knappik等人,“Fully Synthetic Human Combinatorial Antibody Libraries (HuCAL) Based on Modular Consensus Frameworks and CDRs Randomized with Trinucleotides.”J.Mol.Biol. (2000) 296,57-86;和Feldhaus等人,“Flow-cytometric isolation of human antibodies from a non-immune Saccharomyces cerevisiae surface display library”Nat Biotechnol (2003) 21:163-170。

[0157] B. 抗原结合片段

[0158] 在一些其他方面,本公开提供了由本公开提供的任何CD28抗体的抗原结合片段。

[0159] 抗原结合片段可包含抗体的任何序列。在一些实施方案中,抗原结合片段包含(1)抗CD28抗体的轻链;(2)CD28抗体的重链;(3)来自抗CD28抗体的轻链的可变区;(4)来自CD28抗体的重链的可变区;(5)抗CD28抗体的一个或多个CDR(两个、三个、四个、五个或六个CDR);或(6)来自抗CD28抗体的轻链的三个CDR和来自抗CD28抗体的重链的三个CDR的氨基酸序列。

[0160] 在其他特定实施方案中,抗CD28抗体的抗原结合片段包括:(i) Fab片段,其是由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_H1 结构域组成的单价片段;(ii) $F(ab')_2$ 片段,其是包含由二硫桥在铰链区处连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由 V_H 和 C_H1 结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体的单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的Fv片段;(v) dAb片段(Ward等人,Nature(1989)341:544-546),其由 V_H 结构域组成;(vi) 经分离CDR,和(vii) 单链抗体(scFv),其是包含抗体的 V_L 区连接于抗体的 V_H 区的多肽。Bird等人,Science(1988)242:423-426和Huston等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1988)85:5879-5883。

[0161] 在一些实施方案中,本公开的抗CD28抗体或抗体片段包含与如SEQ ID NO:11、20、29、39、47、54、62、71、77、84、92、99、107、115、122、130、137、144、151、157和165中的任一者中所述的氨基酸序列至少65%、至少75%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%同一性的 V_H 区。在一些实施方案中,本公开的抗CD28抗体或抗体片段包含与如SEQ ID NO:12、21、30、40、48、55、63、72、78、85、93、100、108、116、123、131、138、145、152、158和166中的任一者中所述的氨基酸序列至少65%、至少75%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%同一性的 V_L 区。在一些实施方案中,本公开的抗CD28抗体或抗体片段包含与如SEQ ID NO:5、15、24、33、43、66、88、103、111、126、134、148和161中的任一者中所述的氨基酸序列至少65%、至少75%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%同一性的HCDR1氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开的抗CD28抗体或抗体片段包含与如SEQ ID NO:6、51、58、67、89、96、104和155中的任一者中所述的氨基酸序列至少65%、至少75%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%同一性的HCDR2氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开的抗CD28抗体或抗体片段包含与如SEQ ID NO:7、16、25、35、44、52、59、81、90、97、105、112、119、127、135、141、149和162中的任一者中所述的氨基酸序列至少65%、至少75%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%同一性的HCDR3氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开的抗CD28抗体或抗体片段包含与如SEQ ID NO:8、17、26、36、45、53、60、76、82、91、98、106、113、120、128、136、142、150、156和163中的任一者中所述的氨基酸序列至少65%、至少75%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%同一性的LCDR1氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开的抗CD28抗体或抗体片段包含与如SEQ ID NO:9、18、27、37和300中的任一者中所述的氨基酸序列至少65%、至少75%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%同一性的LCDR2氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开的抗CD28抗体或抗体片段包含与如SEQ ID NO:10、19、28、38、46、61、70、83、114、121、129、143和164中的任一者中所述的氨基酸序列至少65%、至少75%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%同一性的LCDR3氨基酸序列。

[0162] 在一些实施方案中,本公开的抗体包含与如SEQ ID NO:13、22、31、41、49、56、64、

73、79、86、94、101、109、117、124、141、132、139、146、153、159和167中的任一者中所述的氨基酸序列至少65%、至少75%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%同一性的重链。

[0163] 在一些实施方案中,本公开的抗体包含与如SEQ ID NO:14、23、32、42、50、57、65、74、80、87、95、102、110、118、125、142、133、140、147、154、160和168中的任一者中所述的氨基酸序列至少65%、至少75%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%同一性的轻链。

[0164] IV. 多特异性抗体

[0165] 还提供了多特异性抗体,其对应本文所述可活化多特异性抗体或经遮蔽多特异性抗体。本申请的一个方面提供可活化的多特异性抗体(包括可活化双特异性T细胞衔接体(TCE)分子),其能够结合至T细胞和靶细胞(诸如肿瘤细胞)二者。由于其中靶脱肿瘤效应,传统TCE分子与高细胞毒性相关,包括对中枢神经系统(CNS)的毒性和细胞因子风暴。因此,本领域需要能结合T细胞和靶细胞(诸如具有增强的特异性和降低的副作用的肿瘤细胞)的抗体。

[0166] 在一些实施方案中,多特异性抗体为双特异性(bsAb)。在一些实施方案中,多特异性抗体为三特异性(tsAb)。

[0167] 在特定实施方案中,本公开的双特异性抗体对T细胞表面CD28具有特异性。在一些实施方案中,多特异性抗体为特异性结合TAA和CD28的肿瘤相关抗原(TAA) xCD28双特异性抗体。在一些实施方案中,本公开的抗体为IgG抗体,例如,包含IgG Fc区(例如,人IgG Fc区)。

[0168] 在一些实施方案中,多特异性抗体结合至T细胞表面的CD28。在一些实施方案中,多特异性抗体为特异性结合至TAA和CD28的肿瘤相关抗原(TAA) xCD28双特异性抗体。在一些实施方案中,多特异性抗体不包含任何遮蔽性部分或可裂解部分。在一些实施方案中,多特异性抗体是在一个或多个可裂解部分裂解后获得。

[0169] 在一些实施方案中,多特异性抗体结合至T细胞表面的CD3。在一些实施方案中,多特异性抗体为特异性结合至TAA和CD3的肿瘤相关抗原(TAA) xCD3双特异性抗体。在一些实施方案中,多特异性抗体以弱亲和力特异性结合CD3,例如通过ELISA检测测定的EC₅₀至少为10nM(例如,至少100nM),和/或Kd至少为50nM。在一些实施方案中,多特异性抗体不包含任何遮蔽性部分或可裂解部分。在一些实施方案中,多特异性抗体是在一个或多个可裂解部分裂解后获得。

[0170] 在一些实施方案中,提供一种多特异性抗体包含:a)第一抗原结合片段,其包含特异性结合靶抗原(例如,肿瘤抗原,如B7-H3、HER2或TROP2)的抗体的VH1和VL1;和b)第二抗原结合片段,其包含特异性结合CD3的抗CD3抗体的VH2和VL2,其中第一和/或第二抗原结合片段融合至第一和/或第二遮蔽性肽(MP1/MP2)。在一些实施方案中,提供一种多特异性抗体包含:a)第一抗原结合片段,其包含特异性结合靶抗原(例如,肿瘤抗原,如B7-H3、HER2或TROP2)的抗体的VH1和VL1;和b)第二抗原结合片段,其包含特异性结合CD28的抗CD28抗体的VH2和VL2,其中第一和/或第二抗原结合片段融合至第一和/或第二遮蔽性肽(MP1/MP2)。

[0171] 在一些实施方案中,第一抗原结合片段选自Fab、Fv、scFab和scFv组成的组。在一些实施方案中,第一抗原结合片段为Fab。在一些实施方案中,第二抗原结合片段选自自由

Fab、Fv、scFab和scFv组成的组。在一些实施方案中,第二抗原结合片段为scFv,其从N末端至C末端包含 V_L2 、可选用的连接子和 V_H2 。在一些实施方案中,第一抗原结合片段为Fab并且第二抗原结合片段为Fab。在一些实施方案中,第一抗原结合片段为Fab并且第二抗原结合片段为scFv。

[0172] 本文所描述的包含经工程改造的 C_H3 结构域二硫键和/或盐桥的抗体还可包含一个或多个杵入臼(knob-into-hole)残基。“杵入臼”或“KIH”是指本领域已知的制备双特异性抗体的方法,也称为“突起入空腔(protuberance-into-cavity)”方法(例如,参见美国专利第5,731,168号)。在此方法中,两种免疫球蛋白多肽(例如重链多肽)各自包含界面。一种免疫球蛋白多肽的界面与另一免疫球蛋白多肽上的相应界面相互作用,藉此容许所述两种免疫球蛋白多肽缔合。这些界面可经工程改造,使得位于一种免疫球蛋白多肽的界面中的“杵”或“突起”(这些术语在本文中可互换使用)与位于另一免疫球蛋白多肽的界面中的“臼”或“空腔”(这些术语在本文中可互换使用)相对应。在一些实施方案中,臼与杵具有相同或相似大小并且经适当定位,使得当两个界面相互作用时,一个界面的杵可定位在另一界面的相应臼中。不希望受理论束缚,认为此稳定异源多聚体,并且相对于其他物质(例如同源多聚体)而言,有利于形成异源多聚体。在一些实施方案中,KIH方法与本文所描述的经工程改造的二硫键和/或盐桥组合使用,以促进两种不同免疫球蛋白多肽的异源多聚化,此产生包含对不同表位具有结合特异性的两种免疫球蛋白多肽的双特异性抗体。在一些实施方案中,本文所描述的可活化多特异性抗体的 C_H3 结构域不包含KIH残基。

[0173] 在一些实施方案中,提供了靶向CD28和肿瘤抗原(例如,B7-H3、HER2、TROP2或PD-L1)的双特异性抗体,其包含第一多肽、第二多肽和第三多肽,其中:

[0174] (i) 第一多肽包含由下式表示的结构:

[0175] V_H1-C_H1 -铰链- C_H2 -第一 C_H3 ;

[0176] (ii) 第二多肽包含由下式表示的结构:

[0177] scFv-铰链- C_H2 -第二 $CH3$;并且

[0178] (iii) 第三多肽包含由下式表示的结构:

[0179] V_L1-C_L ;

[0180] 其中:

[0181] V_L1 为第一免疫球蛋白轻链可变结构域;

[0182] V_H1 为第一免疫球蛋白重链可变结构域;

[0183] scFv为单链可变片段,包含第二免疫球蛋白轻链可变结构域(V_L2)和第二免疫球蛋白重链可变结构域(V_H2);

[0184] C_L 为免疫球蛋白轻链恒定结构域;

[0185] C_H1 为免疫球蛋白重链恒定结构域1;

[0186] C_H2 为免疫球蛋白重链恒定结构域2;并且

[0187] 铰链为连接 C_H1 结构域和 C_H2 结构域的免疫球蛋白铰链区;

[0188] 其中 V_L1 与 V_H1 相缔合以形成特异性结合肿瘤抗原(例如,B7-H3、HER2、TROP2或PD-L1)的第一Fv;且其中scFv特异性结合CD28。在一些实施方案中,scFv通过ELISA测定,以0.1nM至1000nM范围的半最大结合抗体浓度(EC_{50})结合CD28(例如,如实施例3所述)。在一些实施方案中,scFv通过Octet®RED96检测测定,以低于10nM(例如,在1nM至0.1pM之间)的半

最大结合抗体浓度 (EC_{50}) 结合CD28 (例如,如实施例3所述)。在特定实施方案中,scFv以低于10nM的解离常数 (Kd) 结合CD28。

[0189] 在一些实施方案中,提供了靶向CD28和肿瘤抗原 (例如,B7-H3、HER2或TROP2) 的双特异性抗体,其包含第一多肽、第二多肽、第三多肽和第四多肽,其中:

[0190] (i) 第一多肽包含由下式表示的结构:

[0191] V_H1-C_H1 -铰链- C_H2 -第一CH3;

[0192] (ii) 第二多肽包含由下式表示的结构:

[0193] V_H2-C_H1 -铰链- C_H2 -第二CH3;

[0194] (iii) 第三多肽包含由下式表示的结构:

[0195] V_L1-C_L ; 并且

[0196] (iv) 第四多肽包含由下式表示的结构:

[0197] V_L2-C_L ;

[0198] 其中:

[0199] V_L1 为第一免疫球蛋白轻链可变结构域;

[0200] V_H1 为第一免疫球蛋白重链可变结构域;

[0201] V_L2 为第二免疫球蛋白轻链可变结构域;

[0202] V_H2 为第二免疫球蛋白重链可变结构域;

[0203] C_L 为免疫球蛋白轻链恒定结构域;

[0204] C_H1 为免疫球蛋白重链恒定结构域1;

[0205] C_H2 为免疫球蛋白重链恒定结构域2; 并且

[0206] 铰链为连接 C_H1 结构域和 C_H2 结构域的免疫球蛋白铰链区;

[0207] 其中 V_L1 与 V_H1 相缔合以形成特异性结合肿瘤抗原 (例如,B7-H3、HER2、TROP2或PD-L1) 的第一Fv; 且其中 V_L2 与 V_H2 相缔合以形成特异性结合CD28的第二Fv。在一些实施方案中,scFv通过ELISA检测测定,以0.1nM至1000nM范围的半最大结合抗体浓度 (EC_{50}) 结合CD28 (例如,如实施例3所述)。在一些实施方案中,第二Fv通过Octet®RED96检测测定,以低于10nM (例如,在1nM至0.1pM之间) 的半最大结合抗体浓度 (EC_{50}) 结合CD28 (例如,如实施例3所述)。在特定实施方案中,第二Fv以低于10nM的解离常数 (Kd) 结合CD28。

[0208] 在一些实施方案中,提供多特异性抗体,其包含:

[0209] a) 第一抗原结合片段,其包含特异性结合靶抗原 (例如,肿瘤抗原,如B7-H3、HER2或TROP2) 的抗体的 V_H1 和 V_L1 ; 和

[0210] b) 第二抗原结合片段,其包含特异性结合CD28的抗CD28抗体的 V_H2 和 V_L2 ,其中第二抗原结合片段融合至第一遮蔽性肽 (MP1)。

[0211] 在一些实施方案中,提供多特异性抗体,其包含:

[0212] a) 第一抗原结合片段,其包含特异性结合靶抗原 (例如,肿瘤抗原,如B7-H3、HER2或TROP2) 的抗体的 V_H1 和 V_L1 ,其中第一抗原结合片段融合至第一遮蔽性肽 (MP1); 和

[0213] b) 第二抗原结合片段,其包含特异性结合CD28的抗CD28抗体的 V_H2 和 V_L2 ,其中第二抗原结合片段融合至第二遮蔽性肽 (MP2)。

[0214] 在一些实施方案中,第一抗原结合片段选自Fab、Fv、scFab和scFv组成的组。在一些实施方案中,第一抗原结合片段为Fab。在一些实施方案中,第二抗原结合片段选自自由

Fab、Fv、scFab和scFv组成的组。在一些实施方案中,第二抗原结合片段为scFv,其从N末端至C末端包含 V_L2 、可选用的连接子和 V_H2 。

[0215] 在一些实施方案中,提供了多特异性抗体,其包含第一多肽、第二多肽和第三多肽,其中:

[0216] (i) 第一多肽包含由下式表示的结构:

[0217] V_H1-C_H1 -铰链- C_H2 -第一 C_H3 ;

[0218] (ii) 第二多肽包含由下式表示的结构:

[0219] $MP1-V_L2-V_H2$ -铰链- C_H2 -第二 C_H3 ;并且

[0220] (iii) 第三多肽包含由下式表示的结构:

[0221] V_L1-C_L ;

[0222] 其中:

[0223] V_L1 为第一免疫球蛋白轻链可变结构域;

[0224] V_H1 为第一免疫球蛋白重链可变结构域;

[0225] V_L2 为第二免疫球蛋白轻链可变结构域;

[0226] V_H2 为第二免疫球蛋白重链可变结构域;

[0227] C_L 为免疫球蛋白轻链恒定结构域;

[0228] C_H1 为免疫球蛋白重链恒定结构域1;

[0229] C_H2 为免疫球蛋白重链恒定结构域2;

[0230] 第一 C_H3 为第一免疫球蛋白重链恒定结构域3;

[0231] 第二 C_H3 为第二免疫球蛋白重链恒定结构域3;

[0232] 铰链为连接 C_H1 结构域和 C_H2 结构域的免疫球蛋白铰链区;

[0233] $MP1$ 为第一遮蔽性肽; $MP1$ 从N末端至C末端包含N端单元(NU)、遮蔽性单元(MU)和连接单元(LU);所述遮蔽性肽的LU可不包含裂解位点,或包含至少一个裂解位点。

[0234] 在一些实施方案中,提供了多特异性抗体,其包含第一多肽、第二多肽和第三多肽,其中:

[0235] (i) 第一多肽包含由下式表示的结构:

[0236] V_H1-C_H1 -铰链- C_H2 -第一 C_H3 ;

[0237] (ii) 第二多肽包含由下式表示的结构:

[0238] $MP2-V_L2-V_H2$ -铰链- C_H2 -第二 C_H3 ;并且

[0239] (iii) 第三多肽包含由下式表示的结构:

[0240] $MP1-V_L1-C_L$;

[0241] 其中:

[0242] V_L1 为第一免疫球蛋白轻链可变结构域;

[0243] V_H1 为第一免疫球蛋白重链可变结构域;

[0244] V_L2 为第二免疫球蛋白轻链可变结构域;

[0245] V_H2 为第二免疫球蛋白重链可变结构域;

[0246] C_L 为免疫球蛋白轻链恒定结构域;

[0247] C_H1 为免疫球蛋白重链恒定结构域1;

[0248] C_H2 为免疫球蛋白重链恒定结构域2;

- [0249] 第一C_H3为第一免疫球蛋白重链恒定结构域3;
- [0250] 第二C_H3为第二免疫球蛋白重链恒定结构域3;
- [0251] 铰链为连接C_H1结构域和C_H2结构域的免疫球蛋白铰链区;
- [0252] MP1为遮蔽性肽;MP1从N末端至C末端包含N端单元(NU)、遮蔽性单元(MU)和连接单元(LU);所述遮蔽性肽的LU可不包含、包含至少一个或多个裂解位点。
- [0253] MP2为遮蔽性肽;MP2从N末端至C末端包含N端单元(NU)、遮蔽性单元(MU)和连接单元(LU);所述遮蔽性肽的LU可不包含裂解位点,或包含至少一个裂解位点。
- [0254] 在一些实施方案中,双特异性抗体结合至第一和第二靶标,其中第一靶标为CD28,并且所述双特异性抗体包含含有选自SEQ ID NOs:5、15、24、33、43、66、88、103、111、126、134、148和161组成的组的氨基酸序列的HCDR1;含有选自SEQ ID NOs:6、51、58、67、89、96、104和155组成的组的氨基酸序列的HCDR2;和含有选自SEQ ID NOs:7、16、25、35、44、52、59、81、90、97、105、112、119、127、135、141、149和162的氨基酸序列的HCDR3;以及含有选自SEQ ID NOs:8、17、26、36、45、53、60、76、82、91、98、106、113、120、128、136、142、150、156和163组成的组的氨基酸序列的LCDR1;含有选自SEQ ID NOs:9、18、27、37和300组成的组的氨基酸序列的LCDR2;和含有选自SEQ ID NOs:10、19、28、38、46、61、70、83、114、121、129、143和164组成的组的氨基酸序列的LCDR3。在一些实施方案中,双特异性抗体结合至第一和第二靶标,其中第一靶标为人CD28,且其中双特异性抗体包含含有选自SEQ ID NOs:11、20、29、39、47、54、62、71、77、84、92、99、107、115、122、130、137、144、151、157和165组成的组的氨基酸序列的重链可变区,和含有选自SEQ ID NOs:12、21、30、40、48、55、63、72、78、85、93、100、108、116、123、131、138、145、152、158和166组成的组的氨基酸序列的轻链可变区。
- [0255] 在一些实施方案中,双特异性抗体结合至第一和第二靶标,其中第一靶标为CD28并且第二靶标为B7H3,其中双特异性抗体包含CD28结合部分,其包含选自SEQ ID NOs:11、12和171组成的组的氨基酸序列,且其中双特异性抗体包含含有SEQ ID NO:176中所示的氨基酸序列的重链,和含有SEQ ID NO:175中所示的氨基酸序列的轻链。在特定实施方案中,双特异性抗体结合至第一和第二靶标,其中第一靶标为CD28并且第二靶标为B7H3,其中双特异性抗体包含含有SEQ ID NO:171中所示的氨基酸序列的重链,含有SEQ ID NO:1176中所示的氨基酸序列的第二重链,和含有SEQ ID NO:175中所示的氨基酸序列的轻链。
- [0256] 在一些实施方案中,双特异性抗体结合至第一和第二靶标,其中第一靶标为CD28并且第二靶标为HER2,其中双特异性抗体包含CD28结合部分,其包含SEQ ID NO:172中所示的氨基酸序列,且其中双特异性抗体包含含有SEQ ID NO:170中所示的氨基酸序列的重链,和含有SEQ ID NO:169中所示的氨基酸序列的轻链。在特定实施方案中,双特异性抗体结合至第一和第二靶标,其中第一靶标为CD28并且第二靶标为HER2,其中双特异性抗体包含含有SEQ ID NO:172中所示的氨基酸序列的重链,含有SEQ ID NO:170中所示的氨基酸序列的第二重链,和含有SEQ ID NO:169中所示的氨基酸序列的轻链。
- [0257] 在一些实施方案中,双特异性抗体结合至第一和第二靶标,其中第一靶标为CD28并且第二靶标为HER2,其中双特异性抗体包含CD28结合部分,其包含SEQ ID NO:11、12、171中所示的氨基酸序列,含有SEQ ID NO:170中所示的氨基酸序列的重链,和含有SEQ ID NO:169中所示的氨基酸序列的轻链。在特定实施方案中,双特异性抗体结合至第一和第二靶

标,其中第一靶标为CD28并且第二靶标为HER2,其中双特异性抗体包含含有SEQ ID NO:171中所示的氨基酸序列的重链,含有SEQ ID NO:170中所示的氨基酸序列的第二重链,和含有SEQ ID NO:169中所示的氨基酸序列的轻链。

[0258] 在一些实施方案中,双特异性抗体结合至第一和第二靶标,其中第一靶标为人CD28并且第二靶标为TROP2,其中双特异性抗体包含CD28结合部分,其包含选自由SEQ ID NOs:13、14和171组成的组的氨基酸序列,且其中双特异性抗体包含含有SEQ ID NO:174中所示的氨基酸序列的重链,和含有SEQ ID NO:173中所示的氨基酸序列的轻链。在特定实施方案中,双特异性抗体结合至第一和第二靶标,其中第一靶标为CD28并且第二靶标为TROP2,其中双特异性抗体包含含有SEQ ID NO:171中所示的氨基酸序列的重链,含有SEQ ID NO:174中所示的氨基酸序列的第二重链,和含有SEQ ID NO:173中所示的氨基酸序列的轻链。

[0259] 在特定实施方案中,双特异性抗体结合至第一和第二靶标,其中第一靶标为CD3并且第二靶标为B7-H3,且其中双特异性抗体包含含有SEQ ID NO:177中所示的氨基酸序列的重链或SEQ ID NO:299中所示的scFv融合多肽,含有SEQ ID NO:176中所示的氨基酸序列的重链,和含有SEQ ID NO:175中所示的氨基酸序列的轻链。

[0260] 在特定实施方案中,双特异性抗体结合至第一和第二靶标,其中第一靶标为CD3并且第二靶标为TROP2。

[0261] 在特定实施方案中,双特异性抗体结合至第一和第二靶标,其中第一靶标为人CD28,且其中双特异性抗体包含选自由SEQ ID NOs:13、22、31、41、49、56、64、73、79、86、94、101、109、117、124、141、132、139、146、153、159和167组成的组的重链氨基酸序列,和选自由SEQ ID NOs:14、23、32、42、50、57、65、74、80、87、95、102、110、118、125、142、133、140、147、154、160和168组成的组的轻链氨基酸序列。

[0262] V. 经遮蔽抗体

[0263] 在一些实施方案中,本公开提供经遮蔽抗体,其可为针对特定靶标的经遮蔽单克隆抗体或多特异性(例如,双特异性)抗体。在一些实施方案中,本文提供的经遮蔽抗体包含全长抗体轻链,例如, κ 或 λ 轻链。另外或可替代地,在一些实施方案中,抗体包含全长抗体重链。抗体的重链可为任何类别,诸如IgG、IgM、IgE、IgA或IgD。在一些实施方案中,抗体重链为IgG类别,诸如IgG₁、IgG₂、IgG₃或IgG₄子类别。可使用本领域已知的方法将抗体重链自一种类别或子类别转变成另一种类别或子类别。在一些实施方案中,经遮蔽抗体为或包含含有Fc区(例如,人Fc区或其变体)的全长抗体。在一些实施方案中,人Fc区为人IgG₁ Fc区、人IgG₂ Fc区、人IgG₄ Fc区,或前述任一项的变体。在一些实施方案中,相对于衍生Fc区变体的野生型人Fc区,Fc区变体包含一个或多个氨基酸取代、插入或删除。在一些实施方案中,经遮蔽抗体包含人IgG₁ Fc区变体。在一些实施方案中,IgG₁ Fc变体包含增加Fc变体与Fc γ RIIb亲和力的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中,人IgG₁ Fc区变体包含选自由G236D;L328F;S239D;S267E;G236D和S267E;S239D和S267E;S267E和L328S;以及S267E和L328F组成的组的取代,其中氨基酸编号根据EU索引(参见,例如Edelman等人,Proc Natl Acad Sci USA(1969)63:78-85)。前述取代在Chu等人Mol Immunol.(2008)45(15):3926-33中描述。另外或可替代地,在一些实施方案中,人IgG₁ Fc区变体包含选自由E233D和P238D;G237D和P238D;H268D和P238D;P271G和P238D;A330R和P238D;E233D,P238D和A330R;E233D,

P231G, P238D和A330R; G237D, H268D, P238D和P271G; G237D, P238D, P271G和A330R; E233D, H268D, P238D, P271G和A330R; G237D, H268D, P238D, P271G和A330R; 以及E233D, G237D, P238D, H268D, P271G和A330R组成的组的取代, 其中氨基酸编号根据EU索引。前述取代在Mimoto等人Protein Eng Des Sel. (2013) 26(10):589-98中描述。另外或可替代地, 在一些实施方案中, 人IgG₁ Fc区变体包含S2657A取代(参见Buschor等人Int Arch Allergy Immunol. (2014) 163(3):206-14), 其中氨基酸编号根据EU索引。另外或可替代地, 在一些实施方案中, 人IgG₁ Fc区变体包含T437R和/或K248E取代(参见Zhang等人MAbs. (2017) 9(7):1129-1142), 其中氨基酸编号根据EU索引。在一些实施方案中, 经遮蔽抗体包含人IgG₄ Fc区变体。在一些实施方案中, IgG₄ Fc区变体包含增加Fc变体与Fc γ RIIb亲和力的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中, 人IgG₄ Fc区变体包含选自由G236D; L328F; S239D; S267E; G236D和S267E; S239D和S267E; S267E和L328S; 以及S267E和L328F组成的组的取代, 其中氨基酸编号根据EU索引。另外或可替代地, 在一些实施方案中, 人IgG₄ Fc区变体包含选自由E233D和P238D; G237D和P238D; H268D和P238D; P271G和P238D; A330R和P238D; E233D, P238D和A330R; E233D, P231G, P238D和A330R; G237D, H268D, P238D和P271G; G237D, P238D, P271G和A330R; E233D, H268D, P238D, P271G和A330R; G237D, H268D, P238D, P271G和A330R; 以及E233D, G237D, P238D, H268D, P271G和A330R组成的组的取代, 其中氨基酸编号根据EU索引。另外或可替代地, 在一些实施方案中, 人IgG₄ Fc区变体包含S2657A取代, 其中氨基酸编号根据EU索引。另外或可替代地, 在一些实施方案中, 人IgG₁ Fc区变体包含T437R和/或K248E取代, 其中氨基酸编号根据EU索引。

[0264] 在一些实施方案中, 本文所述经遮蔽抗体另包含人IgG₁结构域或其变体含有一个或多个取代突变。在一些实施方案中, IgG₁变体包含选自由G236D; L328F; S239D; S267E; G236D和S267E; S239D和S267E; S267E和L328S; 以及S267E和L328F; E233D和P238D; G237D和P238D; H268D和P238D; P271G和P238D; A330R和P238D; E233D, P238D和A330R; E233D, P231G, P238D和A330R; G237D, H268D, P238D和P271G; G237D, P238D, P271G和A330R; E233D, H268D, P238D, P271G和A330R; G237D, H268D, P238D, P271G和A330R; 以及E233D, G237D, P238D, H268D, P271G和A330R; S2657A; T437R; K248E; 以及T437R和K248E组成的组的取代, 其中氨基酸编号根据EU索引。在一些实施方案中, 本文所述经遮蔽抗体另包含人IgG₄结构域或其变体含有一个或多个取代突变。在一些实施方案中, IgG₄变体包含选自由G236D; L328F; S239D; S267E; G236D和S267E; S239D和S267E; S267E和L328S; 以及S267E和L328F; E233D和P238D; G237D和P238D; H268D和P238D; P271G和P238D; A330R和P238D; E233D, P238D和A330R; E233D, P231G, P238D和A330R; G237D, H268D, P238D和P271G; G237D, P238D, P271G和A330R; E233D, H268D, P238D, P271G和A330R; G237D, H268D, P238D, P271G和A330R; 以及E233D, G237D, P238D, H268D, P271G和A330R; S2657A; T437R; K248E; 以及T437R和K248E组成的组的取代, 其中氨基酸编号根据EU索引。

[0265] 在一些实施方案中, 术语“经遮蔽抗体”是指抗体片段, 例如, 经遮蔽抗CD28抗体的经遮蔽抗原结合片段。在一些实施方案中, 所述抗体片段为或包含Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、scFv(参见Bird等人(1988) Science 242:423-426和Huston等人(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)、(scFv)₂、线性抗体、单链抗体、微型抗体(minibody)或双特异抗体(diabody)。

[0266] 在一些实施方案中,本文所述的经遮蔽抗CD28抗体与来自不同物种的CD28交叉反应,从而允许经遮蔽抗CD28抗体用于临床前和临床研究。在一些实施方案中,本文所述的经遮蔽抗CD28抗体活化后(例如,经遮蔽抗体通过裂解(例如,蛋白酶裂解)活化后)结合人CD28、食蟹猴CD28、鼠类(小鼠)CD28和/或大鼠CD28中两种或更多种。在一些实施方案中,经遮蔽抗CD28抗体活化后(例如,经遮蔽抗体通过裂解(例如,蛋白酶裂解)活化后)结合人CD28、食蟹猴CD28、鼠类(小鼠)CD28和大鼠CD28。

[0267] 在一些实施方案中,本文所述的经遮蔽抗CD28抗体具有背景依赖性(例如,在某些背景下(诸如在富含蛋白酶的肿瘤微环境中)经活化(仅能结合其靶标))。在一些实施方案中,本文所述的经遮蔽抗CD28抗体提供超过更多传统非遮蔽抗体的提高的安全性(例如,显示降低的毒性,不诱导许多器官的重量的显著改变,不改变肝脏组织病理学、血液学和/或血液生物化学等)。在一些实施方案中,本文所述的经遮蔽抗CD28抗体展示出与传统非遮蔽抗CD28抗体类似的药物动力学性质(例如,具有类似的体内半衰期)。在一些实施方案中,本文所述的经遮蔽抗CD28抗体相较于更多传统非遮蔽抗CD28抗体展示改善的药物动力学性质(例如,具有更长体内半衰期)。

[0268] 在一些实施方案中,本文所述的经遮蔽抗CD28抗体的抗体重链可变区(V_H)和抗体轻链可变区(V_L)形成结合hCD28的抗原结合结构域(ABD)。在一些实施方案中,本文所述的经遮蔽抗CD28抗体的遮蔽性单元(MU)结合至ABD和相较于缺少MU的对应抗CD28抗体结合至hCD28和/或相较于ABD结合至hCD28减少或抑制经遮蔽抗CD28抗体结合至hCD28。

[0269] 在一些实施方案中,在从本文提供的经遮蔽抗体中去除MU之前,遮蔽性单元具有至少约2.0的遮蔽效率(例如,至少约2.0,至少约3.0,至少约4.0,至少约5.0,至少约6.0,至少约7.0,至少约8.0,至少约9.0,至少约10,至少约25,至少约50,至少约75,至少约100,至少约150,至少约200,至少约300,至少约400,至少约500,至少约600,至少约700,至少约800,至少约900,至少约1000,至少约1100,至少约1200,至少约1300,至少约1400,至少约1500等,包括这些值之间的任何范围)。例如,在一些实施方案中,经遮蔽抗CD28抗体的遮蔽效率测量为包含遮蔽性单元(MU)的经遮蔽抗CD28抗体与hCD28结合(例如,在经遮蔽抗体活化前)相对于缺少MU的抗CD28抗体结合hCD28的亲和力差异。在另一实例中,遮蔽效率测量为包含MU的经遮蔽抗CD28抗体对hCD28的亲和力(例如,在通过裂解(例如,蛋白酶裂解)活化经遮蔽抗体前)相对于未遮蔽抗CD28抗体(例如,通过裂解(例如,蛋白酶裂解)活化经遮蔽抗体后)对hCD28的亲和力差异。在一些实施方案中,遮蔽效率可以通过包含MU的经遮蔽抗体(例如,在活化前)的 EC_{50} 除以对相同靶标特异性缺少遮蔽性肽或经遮蔽单元的相应抗体的 EC_{50} 来测量。在一些实施方案中, EC_{50} 通过ELISA来测量。在一些实施方案中,经遮蔽抗体的遮蔽性单元(MU)结合至ABD,并预防经遮蔽多肽结合至其靶标。在特定实施方案中,靶标为CD28。在其他实施方案中,靶标为CD3、B7-H3、HER2、或TROP2。

[0270] 在一些实施方案中,与同一靶标但无遮蔽性肽或遮蔽性单元的相应特异性抗体相比,当遮蔽性单元从抗体中去除时(例如,通过一种或多种在连接单元内裂解的蛋白酶处理活化后),本公开的经遮蔽抗体的亲和力增加至少约2倍(例如,至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约4.5倍、至少约5倍、至少约5.5倍、至少约6倍、至少约6.5倍、至少约7倍、至少约7.5倍、至少约8倍、至少约8.5倍、至少约9倍、至少约9.5倍、至少约10倍、至少约25倍、至少约50倍、至少约75倍、至少约100倍、至少约250倍、至少约500

倍、至少约750倍、或至少约1000倍、或更多,包括前述值之间的任何范围)。在一些实施方案中,本文所述的经遮蔽抗体的 EC_{50} 通过一种或多种连接单元内裂解的蛋白酶处理活化后减少至少约2倍(例如,至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约4.5倍、至少约5倍、至少约5.5倍、至少约6倍、至少约6.5倍、至少约7倍、至少约7.5倍、至少约8倍、至少约8.5倍、至少约9倍、至少约9.5倍、至少约10倍、至少约25倍、至少约50倍、至少约75倍、至少约100倍、至少约250倍、至少约500倍、至少约750倍、或至少约1000倍、或更多,包括前述值之间的任何范围)(例如,通过ELISA或FACS检测测量)。

[0271] 在一些实施方案中,当遮蔽性单元结合至本文所述的经遮蔽抗体的ABD时,抗体对其靶标的 K_D 约为遮蔽性单元从经遮蔽抗CD28抗体的ABD去除时(例如经连接单元内裂解的蛋白酶处理后)抗体的 K_D 的2倍(例如,约2、约2.5、约3、约3.5、约4、约4.5、约5、约5.5、约6、约6.5、约7、约7.5、约8、约8.5、约9、约9.5、约10、约25、约50、约75、约100、约250、约500、约750、或约1000或更多,包括前述值之间的任何范围)。在一些实施方案中,当遮蔽性单元结合至本文所述的经遮蔽抗体的ABD时,抗体对其靶标的 K_D 约为对相同靶标特异性缺乏遮蔽性肽或遮蔽性单元的相应抗体的 K_D 的2倍(例如,约2、约2.5、约3、约3.5、约4、约4.5、约5、约5.5、约6、约6.5、约7、约7.5、约8、约8.5、约9、约9.5、约10、约25、约50、约75、约100、约250、约500、约750、或约1000或更多,包括前述值之间的任何范围)。

[0272] 在一些实施方案中,所述遮蔽性单元空间阻碍经遮蔽结合多肽结合至其靶标和/或变构阻碍经遮蔽结合多肽结合至其靶标。

[0273] 在一些实施方案中,遮蔽性单元对本文所述经遮蔽抗体(例如,抗CD28)对ABD的解离常数高于经遮蔽抗体对其靶标(例如,hCD28;当经遮蔽抗体处于活化形式,例如通过蛋白酶处理后)的解离常数。在一些实施方案中,遮蔽性单元对本文所述经遮蔽抗体(例如,抗CD28)的ABD的解离常数高于经遮蔽抗体对其靶标(例如,hCD28;当经遮蔽抗体处于活化形式,例如通过蛋白酶处理后)的解离常数约2(例如,约2、约2.5、约3、约3.5、约4、约4.5、约5、约5.5、约6、约6.5、约7、约7.5、约8、约8.5、约9、约9.5、约10、约25、约50、约75、约100、约250、约500、约750、或约1000或更多,包括前述值之间的任何范围)倍。在一些实施方案中,遮蔽性单元对本文所述经遮蔽抗体(例如,抗CD28)对ABD的解离常数约等于经遮蔽抗体对其靶标(例如,hCD28;当经遮蔽抗体处于活化形式,例如通过蛋白酶处理后)的解离常数。在一些实施方案中,当遮蔽性抗体尚未被活化(例如,通过一种或多种在连接单元内裂解的蛋白酶处理后)时,遮蔽性单元(MU)结合至本文所述经遮蔽抗体(例如,抗CD28)的ABD并预防抗体结合至其靶标(例如,hCD28)。在一些实施方案中,活化诱导裂解位点内的多肽的裂解。在一些实施方案中,活化诱导多肽的构形变化(例如,遮蔽性单元(MU)的取代),其导致遮蔽性肽不再防止多肽结合至其靶标。

[0274] A. 单臂经遮蔽抗体

[0275] 在一些实施方案中,提供经遮蔽单克隆抗体,其包含遮蔽性肽(MP)和结合CD28的抗体,其中抗体包含重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L),其中MP连接至 V_L 的N端,其中MP从N末端至C末端包含遮蔽性单元(MU),和连接单元(LU),其中MP包含选自由SEQ ID NOs:215-248组成的组的氨基酸序列;且其中抗体 V_H 区包含选自由SEQ ID NOs:5、15、24、33、43、66、88、103、111、126、134、148和161组成的组的HCDR1氨基酸序列;选自由SEQ ID NOs:6、51、58、67、89、96、104和155组成的组的HCDR2氨基酸序列;和选自由SEQ ID NOs:7、16、25、35、

44、52、59、81、90、97、105、112、119、127、135、141、149和162组成的组的HCDR3氨基酸序列；以及抗体V_L区包含选自由SEQ ID NOs:8、17、26、36、45、53、60、76、82、91、98、106、113、120、128、136、142、150、156和163组成的组的LCDR1氨基酸序列；选自由SEQ ID NOs:9、18、27、37和300组成的组的LCDR2氨基酸序列；和选自由SEQ ID NOs:10、19、28、38、46、61、70、83、114、121、129、143和164组成的组的LCDR3氨基酸序列。

[0276] 在一些实施方案中,提供经遮蔽单克隆抗体,其包含遮蔽性肽(MP)和结合CD28的抗体,其中抗体包含重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L),其中MP连接至V_L的N端,其中MP从N末端至C末端包含遮蔽性单元(MU),和连接单元(LU),其中MP包含选自由SEQ ID NOs:215-248组成的组的氨基酸序列;且其中抗体重链可变区包含选自由SEQ ID NOs:11、20、29、39、47、54、62、71、77、84、92、99、107、115、122、130、137、144、151、157和165组成的组的氨基酸序列;和轻链可变区包含选自由SEQ ID NOs:12、21、30、40、48、55、63、72、78、85、93、100、108、116、123、131、138、145、152、158和166组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供经遮蔽单克隆抗体,其包含遮蔽性肽(MP)和结合人CD28的抗体,其中抗体包含重链和轻链,其中MP连接至LC的N端,其中MP从N末端至C末端包含遮蔽性单元(MU),和连接单元(LU),其中MP包含选自由SEQ ID NOs:215-248组成的组的氨基酸序列,其中抗体HC包含选自由SEQ ID NOs:13、22、31、41、49、56、64、73、79、86、94、101、109、117、124、141、132、139、146、153、159和167组成的组的氨基酸序列,且其中抗体LC包含选自由SEQ ID NOs:14、23、32、42、50、57、65、74、80、87、95、102、110、118、125、142、133、140、147、154、160和168组成的组的氨基酸序列。

[0277] B. 单臂经遮蔽多特异性抗体

[0278] 在一些实施方案中,还提供了对第一和第二靶标特异性的经遮蔽双特异性单克隆抗体,其中第一靶标为CD28,其中抗体包含遮蔽性肽(MP)和CD28结合部分,其中抗体包含重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L),其中MP连接至V_L的N端,其中MP从N末端至C末端包含遮蔽性单元(MU)和连接单元(LU),其中MP包含选自由SEQ ID NOs:215-248组成的组的氨基酸序列,其中CD28结合部分包含V_H区,其含有SEQ ID NO:5的HCDR1、SEQ ID NO:6的HCDR2和SEQ ID NO:7的HCDR3,以及V_L区,其含有SEQ ID NO:8的LCDR1、SEQ ID NO:9的LCDR2和SEQ ID NO:10的LCDR3,且其中第二靶标为B7-H3、HER2或TROP2蛋白。

[0279] 在一些实施方案中,还提供了对第一和第二靶标特异性的经遮蔽双特异性单克隆抗体,其中第一靶标为CD28,其中抗体包含遮蔽性肽(MP)和CD28结合部分,其中抗体包含重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L),其中MP连接至V_L的N端,其中MP从N末端至C末端包含遮蔽性单元(MU)和连接单元(LU),其中MP包含选自由SEQ ID NOs:215-248组成的组的氨基酸序列,且其中CD28结合部分包含含有选自由SEQ ID NOs:11、20、29、39、47、54、62、71、77、84、92、99、107、115、122、130、137、144、151、157和165组成的组的氨基酸序列的重链可变区;和含有选自由SEQ ID NOs:12、21、30、40、48、55、63、72、78、85、93、100、108、116、123、131、138、145、152、158和166组成的组的氨基酸序列的轻链可变区,且其中第二靶标为B7-H3、HER2或TROP2蛋白。

[0280] C. 双臂经遮蔽多特异性抗体

[0281] 在特定实施方案中,还提供了对第一和第二靶标特异性的经遮蔽双特异性单克隆抗体,其中第一靶标为CD28并且第二靶标为选自HER2、B7-H3和TROP2的肿瘤相关抗原,其中

抗体包含两个遮蔽性肽(MP)。

[0282] VI. 遮蔽性肽

[0283] 在一些实施方案中,MP还包含N端单元。在一些实施方案中,N端单元长度在约1至10个氨基酸之间。在一些实施方案中,N端单元包含SEQ ID NO:210。在一些实施方案中,LU包含至少一个第一裂解位点(CS₁) (例如,第一蛋白酶裂解位点)。在一些实施方案中,LU还包含第二裂解位点(CS₂)。在一些实施方案中,第一和/或第二裂解位点为蛋白酶裂解位点。在一些实施方案中,第一和第二裂解位点相同。在一些实施方案中,第一和第二裂解位点不同。可使用由本领域中已知的任何蛋白酶(例如已知与包含裂解位点的多肽的靶标共同局部化的蛋白酶)识别和/或裂解的任何适合的蛋白酶裂解位点,包括例如由尿激酶型纤溶酶原活化剂(uPA);基质金属蛋白酶(例如MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14、MMP-15、MMP-16、MMP-17、MMP-19、MMP-20、MMP-23、MMP-24、MMP-26和/或MMP-27);烟草蚀刻病毒(TEV)蛋白酶;纤维蛋白溶酶;凝血酶;PSA;PSMA;ADAMS/ADAMTS(例如ADAM 8、ADAM 9、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAMDEC1、ADAMTS1、ADAMTS4和/或ADAMTS5));半胱天冬酶(例如半胱天冬酶-1、半胱天冬酶-2、半胱天冬酶-3、半胱天冬酶-4、半胱天冬酶-5、半胱天冬酶-6、半胱天冬酶-7、半胱天冬酶-8、半胱天冬酶-9、半胱天冬酶-10、半胱天冬酶-11、半胱天冬酶-12、半胱天冬酶-13和/或半胱天冬酶-14);天冬氨酸蛋白酶(例如RACE和/或肾素);天冬氨酸组织蛋白酶(例如组织蛋白酶D和/或组织蛋白酶E);半胱氨酸组织蛋白酶(例如组织蛋白酶B、组织蛋白酶C、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L、组织蛋白酶S、组织蛋白酶V/L2和/或组织蛋白酶X/Z/P);半胱氨酸蛋白酶(例如克鲁兹蛋白酶(Cruzipain)、豆荚蛋白和/或Otubain-2);KLK(例如KLK4、KLK5、KLK6、KLK7、KLK8、KLK10、KLK11、KLK13和/或KLK14);金属蛋白酶(例如甲基多巴、脑啡肽酶、PSMA和/或BMP-1);丝氨酸蛋白酶(例如活化蛋白质C、组织蛋白酶A、组织蛋白酶G、胃促胰酶和/或凝血因子蛋白酶(诸如FVIIa、FIXa、FXa、FX1a、FXIIa));弹性酶;颗粒酶B;胍基苯甲酸酯酶;HtrA1;人类嗜中性粒细胞弹性酶;乳铁传递蛋白;马拉普星(marapsin);NS3/4A;PACE4;tPA;类胰蛋白酶;II型跨膜丝氨酸蛋白酶(TTSP)(例如DESC1、DPP-4、FAP、Hepsin、间质蛋白酶-2、MT-SP1/间质蛋白酶、TMPRSS2、TMPRSS3和/或TMPRSS4)等识别和/或裂解的蛋白酶裂解位点。在一些实施方案中,第一蛋白酶裂解位点为选自以下的蛋白酶的裂解位点:uPA、MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-8、MMP-9、MMP-14、TEV蛋白酶、纤维蛋白溶酶、凝血酶、因子X、PSA、PSMA、组织蛋白酶D、组织蛋白酶K、组织蛋白酶S、ADAM10、ADAM12、ADAMTS、半胱天冬酶-1、半胱天冬酶-2、半胱天冬酶-3、半胱天冬酶-4、半胱天冬酶-5、半胱天冬酶-6、半胱天冬酶-7、半胱天冬酶-8、半胱天冬酶-9、半胱天冬酶-10、半胱天冬酶-11、半胱天冬酶-12、半胱天冬酶-13、半胱天冬酶-14和TACE。在一些实施方案中,第一蛋白酶裂解位点为选自以下的蛋白酶的裂解位点:uPA、MMP-2、MMP-9和/或TEV蛋白酶。

[0284] 在一些实施方案中,LU另包含第一连接子(L₁)。在一些实施方案中,第一连接子(L₁)为第一裂解位点(CS₁) (例如,第一蛋白酶裂解位点)的C端。在一些实施方案中,LU从N末端至C末端包含(CS₁)-L₁的结构。在一些实施方案中,LU另包含第二连接子(L₂)。在一些实施方案中,L₂为第二裂解位点的C端。在一些实施方案中,LU从N末端至C末端包含(CS₁)-L₁-(CS₂)-L₂的结构。在一些实施方案中,L₁和L₂为本领域已知的任何适宜连接子(例如,柔性接头),包括但不限于例如,甘氨酸聚合物(G)_n,其中n为至少1(例如,至少1、至少2、至少3、至

少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10等)的整数;甘氨酸-丝氨酸聚合物(GS)_n,其中n为至少1(例如,至少1、至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10等)的整数,诸如SEQ ID NOs:249-257;甘氨酸-丙氨酸聚合物;丙氨酸-丝氨酸聚合物;以及类似者。连接子序列可为任何长度,诸如约1个氨基酸(例如,甘氨酸或丝氨酸)至约20个氨基酸(例如,20个氨基酸甘氨酸聚合物或甘氨酸-丝氨酸聚合物)、约1个氨基酸至约15个氨基酸、约3个氨基酸至约12个氨基酸、约4个氨基酸至约10个氨基酸、约5个氨基酸至约9个氨基酸、约6个氨基酸至约8个氨基酸等。在一些实施方案中,连接子为长度约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20个氨基酸中的任一者。

[0285] 在一些实施方案中,LU包含选自SEQ ID NOs:213和213组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,遮蔽性肽(MP)从N末端至C末端包含(MU)-(LU)的结构,其中LU包含(CS₁)-L₁或(CS₁)-L₁-(CS₂)-L₂的结构。在一些实施方案中,本揭示案的遮蔽性肽包含选自SEQ ID NOs:215-248组成的组的氨基酸序列。

[0286] 在一些实施方案中,遮蔽性肽(MP)包含SEQ ID NOs:178-211中任一者所示的MU和SEQ ID NO:213或214中所示的LU。在一些实施方案中,MP包含SEQ ID NOs:215-248中任一者所示的序列。

[0287] VII. 抗体产生

[0288] 本公开的另一方面提供一种或多种经分离核酸分子,其包含编码本文所述抗CD28抗体的氨基酸序列的核苷酸序列,包括经遮蔽抗CD28抗体。在一些实施方案中,提供一种或多种经分离核酸分子,其包含编码本文中所描述的多特异性抗体的氨基酸序列的核苷酸序列,包括经遮蔽多特异性抗体。由核苷酸序列编码的氨基酸序列可为本文所述抗体的任何部分(诸如CDR、包含一个、两个或三个CDR的序列、重链可变区、轻链可变区),或可为全长重链或全长轻链。本公开的核酸可为例如DNA或RNA,并且可或可不含有内含子序列。通常,核酸是cDNA分子。

[0289] 在一些实施方案中,本发明提供经分离核酸分子,其包含编码氨基酸序列的核苷酸序列或由所述核苷酸序列组成,例如,本文中所述抗体的重链可变区和/或轻链可变区,或例如,本文中所述抗体的全长重链或全长轻链。

[0290] 可使用任何合适的分子生物学技术(例如,PCR扩增或cDNA克隆技术)获得本发明的核酸。针对获自文库筛选的本文所述抗体,可以从文库中回收编码所述抗体的核酸。

[0291] 可以通过将编码V_H的DNA操作性地连接至编码重链恒定区(C_H1、C_H2和C_H3)的另一DNA分子而将编码V_H区的分离DNA转换成全长重链基因。人重链恒定区基因的序列是本领域已知的(参见例如,Kabat等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,美国卫生与公共服务部,NIH出版物第91-3242号),并且涵盖这些区域的DNA片段可以通过标准PCR扩增获得。重链恒定区可以是IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区,但最优选的是不具有ADCC效应的IgG₄或IgG₂恒定区。IgG₄恒定区序列可以是已知存在于不同个体中的各种等位基因或同种异型中的任一个。这些同种异型代表IgG₄恒定区中天然存在的氨基酸取代。对于Fab片段重链基因,可以将编码V_H的DNA操作性地连接至仅编码重链C_H1恒定区的另一DNA分子。

[0292] 可以通过将编码V_L的DNA操作性地连接至编码轻链恒定区C_L的另一DNA分子而将编码V_L区的分离DNA转换成全长轻链基因(以及Fab轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列是本

领域已知的(参见例如,Kabat等人(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*,第5版,美国卫生与公共服务部,NIH出版物第91-3242号),并且涵盖这些区域的DNA片段可以通过标准PCR扩增获得。轻链恒定区可以是 κ 或 λ 恒定区。

[0293] 为了产生scFv基因,将编码 V_H 和 V_L 的DNA片段操作性地连接至编码柔性接头,例如编码氨基酸序列 $(Gly_4-Ser)_3$ 的另一片段,使得 V_H 和 V_L 序列可以表达为具有通过柔性接头连接的 V_L 和 V_H 区的连续的单链蛋白质(参见例如,Bird等人, *Science* (1988) 242:423-426; Huston等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85:5879-5883;和McCafferty等人, *Nature* (1990) 348:552-554)。

[0294] 本公开另提供包含本文中所述的一种或多种核酸分子的载体。在一些实施方案中,载体为可用于表达本文所述抗体或此种抗体的抗原结合片段的表达载体。在一些实施方案中,本文提供载体,其中第一载体包含编码如本文所述的重链可变区的多核苷酸序列,并且第二载体包含编码如本文所述的轻链可变区的多核苷酸序列。在一些实施方案中,单一载体包含编码如本文所述的重链可变区和如本文所述的轻链可变区的多核苷酸。

[0295] 为表达本公开的结合分子,将编码部分或全长轻链和重链的DNA插入表达载体中,以使DNA分子操作性地连接于转录和翻译控制序列。在这个情形下,术语“操作性地连接”意指将抗体基因连接至载体中以使所述载体内的转录和翻译控制序列发挥它们调控DNA分子的转录和翻译的预定功能。选择表达载体和表达控制序列以可与所用表达宿主细胞相容。可将抗体轻链基因和抗体重链基因插入单独载体中,或更通常,可将两个基因插入同一表达载体中。通过任何适合方法(例如抗体基因片段和载体上的互补限制位点的连接,或基于同源性重组的DNA连接)来将抗体基因插入表达载体中。本文所述的抗体的轻链可变区和重链可变区可用于通过以下方式来创建任何抗体同种型和子类的全长抗体基因:将它们插入已编码所需同种型和子类的重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中,以使 V_H 区段操作性地连接于载体内的一个或多个 C_H 区段,并且 V_L 区段操作性地连接于载体内的 C_L 区段。另外或替代地,重组表达载体可编码有助于抗体链从宿主细胞分泌的信号肽。可将抗体链基因克隆至载体中以使信号肽同框连接于抗体链基因的氨基末端。信号肽可为免疫球蛋白信号肽或异源性信号肽(即来自非免疫球蛋白的信号肽)。

[0296] 除抗体链基因之外,本公开的表达载体通常还携带控制抗体链基因在宿主细胞中的表达的调控序列。术语“调控序列”意图包括启动子、增强子和控制抗体链基因的转录或翻译的其他表达控制元件(例如多腺苷酸化信号)。所述调控序列例如描述于Goeddel (*Gene Expression Technology. Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)) 中。本领域技术人员应了解,对表达载体的设计,包括对调控序列的选择,可取决于诸如对待转化的宿主细胞的选择、所需蛋白质表达水平等的因素。用于哺乳动物宿主细胞表达的调控序列的实例包括引导在哺乳动物细胞中进行高水平蛋白质表达的病毒元件,诸如源于巨细胞病毒(CMV)、猿猴病毒40(SV40)、腺病毒(例如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))和多瘤病毒的启动子和/或增强子。或者,可使用非病毒调控序列,诸如泛素启动子或 β -球蛋白启动子。此外,调控元件由来自不同来源的序列组成,诸如SR启动子系统,其含有来自SV40早期启动子和1型人T细胞白血病病毒的长末端重复序列的序列(Takebe, Y.等 *Mol. Cell. Biol.* (1988) 8:466-72)。

[0297] 除抗体链基因和调控序列之外,表达载体还可携带额外序列,如增强子组件,转录

终止序列,调控载体在宿主细胞中的复制的序列(例如,复制起点)和可选择标记基因。可选择标记基因有助于选择已向其中引入载体的宿主细胞(参见例如美国专利号4,399,216、4,634,665和5,179,017,全都由Axe1等人完成)。举例来说,通常,可选择标记基因对已向其中引入载体的宿主细胞赋予对药物诸如G418、潮霉素或甲氨蝶呤的耐药性。可选择标记基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(联合甲氨蝶呤选择/扩增一起用于dhfr-宿主细胞中)和neo基因(用于G418选择)。

[0298] 对于轻链和重链的表达,通过任何适合技术来将一种或多种编码重链和轻链的表达载体转染至宿主细胞中。术语“转染”的各种形式意图涵盖通常用于将外源性DNA引入原核或真核宿主细胞中的广泛多种技术,例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-右旋糖酐转染等。尽管有可能在原核或真核宿主细胞中表达本文所述的抗体,但在真核细胞,例如哺乳动物宿主细胞中表达抗体是最典型的。

[0299] 本公开还提供一种含有由本公开提供的核酸分子或载体的宿主细胞。宿主细胞可实际上是有表达载体可用的任何细胞。它可为例如高等真核宿主细胞诸如哺乳动物细胞、低等真核宿主细胞诸如酵母细胞,并且可为原核细胞诸如细菌细胞。将重组核酸构建物引入宿主细胞中可通过磷酸钙转染、DEAE、右旋糖酐介导的转染、电穿孔或噬菌体感染来实现。

[0300] 适于转化的原核宿主包括大肠杆菌、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)以及假单胞菌属(*Pseudomonas*)、链霉菌属(*Streptomyces*)和葡萄球菌属(*Staphylococcus*)内的各种物种。

[0301] 用于表达本公开的结合分子的哺乳动物宿主细胞包括例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(包括dhfr-CHO细胞,描述于Urlaub和Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77:4216-20,与DHFR可选择标记物一起使用,例如,如Kaufman和Sharp, J. Mol. Biol. (1982) 159:601-21中所述)、NS0骨髓瘤细胞、COS细胞和Sp2细胞。特别地,对于与NS0骨髓瘤或CHO细胞一起使用,另一表达系统是W0 87/04462、W0 89/01036和EP338841中公开的GS(谷氨酰胺合成酶)基因表达系统。

[0302] 本公开的抗体(或其抗原结合片段)可使用此项技术中任何已知的方法来产生。抗体产生的示例性技术见美国专利第4,816,567号;然而仅出于说明目的提供此示例性技术,且不在限制。当将编码本文所述抗体的核酸或表达载体引入到宿主细胞中时,通过将宿主细胞培养一段足以允许抗体在宿主细胞中表达或使抗体分泌到宿主细胞所生长的培养基中的时间来产生抗体。因此,在一些实施方案中,提供一种生产本文所述的抗体的方法,此方法包括在合适的表达抗体的条件下培养包含一种或多种编码抗体(例如,上文中提供)的核酸或载体的宿主细胞。在一些实施方案中,所述方法另包含从宿主细胞(或宿主细胞培养基)中回收抗体。可使用任何合适的蛋白质纯化方法从培养基中回收抗体。

[0303] VIII. 药物组合物

[0304] 在一些实施方案中,本公开提供一种组合物,其包含本文所述的一种或多种抗体。在一些实施方案中,组合物是包含本文所述的抗体和药学上可接受的载体的药物组合物。组合物可通过本领域中已知的常规方法制备。

[0305] 术语“药学上可接受的载体”是指适合在用于递送多肽(例如,本文所述抗体)的制剂中使用的任何非活性物质。载体可为防粘剂、结合剂、包衣剂、崩解剂、填料或稀释剂、防

腐剂(诸如抗氧化剂、抗细菌剂或抗真菌剂)、甜味剂、吸收延迟剂、润湿剂、乳化剂、缓冲剂和类似物。适合的药学上可接受的载体的实例包括水、乙醇、多元醇(诸如甘油、丙二醇、聚乙二醇和类似物)右旋糖、植物油(诸如橄榄油)、盐水、缓冲液、缓冲盐水和等张剂,诸如糖、多元醇、山梨糖醇和氯化钠。

[0306] 组合物可呈任何适合的形式,诸如液体、半固体和固体剂型。液体剂型的实例包括溶液(例如可注射溶液和难溶溶液)、微乳液、脂质体、分散体或悬浮液。固体剂型的实例包括片剂、丸剂、胶囊、微胶囊和粉剂。适合用于递送本文所述抗体的组合物的一种特定形式为用于注射或输注的无菌液体,诸如溶液、悬浮液或分散体。无菌溶液可通过将抗体以所需量并入适当的载体中,随后进行灭菌型微量过滤来制备。分散体可通过将抗体并入含有基础分散介质及其他载体的无菌媒介物中来制备。在用于制备无菌液体的无菌粉剂的情况下,制备方法包括真空干燥和冷冻干燥(冻干),以自事先经无菌过滤的溶液得到活性成分加上任何其他所需成分的粉剂。组合物的各种剂型可通过本领域中已知的常规技术来制备。

[0307] 组合物中所包括的抗体的相对量将视许多因素而变化,诸如所用的特定多肽和载体、剂型以及所需释放和药效动力学特征。单一剂型中抗体的量将通常为产生治疗作用的量,但也可较少的量。通常,相对于剂型的总重量,此量将在约0.01%至约99%、约0.1%至约70%或约1%至约30%范围内。

[0308] 除了本文所述抗体外,一种或多种另外治疗剂可包含在组合物中。在一些实施方案中,所述至少一种另外治疗剂是选自由病毒基因疗法、免疫检查点抑制剂、靶向疗法、放射疗法和化学疗法组成的组。在一些实施方案中,所述至少一种另外治疗剂是选自由以下组成的组:泊马莱斯特(pomalyst)、雷利米德(revlimid)、来那度胺(lenalidomide)、泊马度胺(pomalidomide)、沙利度胺(thalidomide)、DNA烷基化含铂衍生物、顺铂(cisplatin)、5-氟尿嘧啶、环磷酰胺(cyclophosphamide)、抗CTLA4抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗CD20抗体、抗CD40抗体、抗DR5抗体、抗CD1d抗体、抗TIM3抗体、抗SLAMF7抗体、抗KIR受体抗体、抗OX40抗体、抗HER2抗体、抗ErbB-2抗体、抗EGFR抗体、西妥昔单抗(cetuximab)、利妥昔单抗(rituximab)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、帕母单抗(pembrolizumab)、放射疗法、单次剂量放射、分次放射、局灶性放射、全器官放射、IL-12、IFN α 、GM-CSF、嵌合抗原受体、继承性转移的T细胞、抗癌疫苗和溶瘤性病毒。包括在组合物中的额外治疗剂的适合量可易于由本领域技术人员选择,并且将视许多因素而变化,诸如所用特定药剂和载体、剂型、以及所需释放和药物效应动力学特征。包括在单一剂型中的额外治疗剂的量将通常是药剂的产生治疗作用的那个量,但也可更小量。

[0309] 可进一步修饰本文所述的抗体。在一些实施方案中,这些抗体连接于额外分子实体。额外分子实体的实例包括药物制剂、肽或蛋白质、检测剂或标记、以及抗体。

[0310] 在一些实施方案中,本文所述抗体连接于药物制剂。药物制剂的实例包括细胞毒性剂或其他癌症治疗剂以及放射性同位素。细胞毒性剂的特定实例包括紫杉醇(taxol)、细胞松弛素B(cytochalasin B)、短杆菌肽D(gramicidin D)、溴化乙锭(ethidium bromide)、吐根碱(emetine)、丝裂霉素(mitomycin)、依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenoposide)、长春新碱(vincristine)、长春花碱(vinblastine)、秋水仙碱(colchicin)、多柔比星(doxorubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、二羟基蒽蒽菌素二酮(dihydroxy anthracin

dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、米拉霉素(mithramycin)、放线菌素D(actinomycin D)、1-脱氢睾酮(1-dehydrotestosterone)、糖皮质激素(glucocorticoids)、普鲁卡因(procaine)、四卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛尔(propranolol)和嘌呤霉素(puromycin)以及它们的类似物或同系物。治疗剂还包括例如抗代谢剂(antimetabolite)(例如甲氨蝶呤(methotrexate)、6-巯基嘌呤(6-mercaptopurine)、6-硫鸟嘌呤(6-thioguanine)、阿糖胞苷(cytarabine)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)、达卡巴嗪(decarbazine))、烷基化剂(例如二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、塞替派(thioepa)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、美法仑(melphalan)、卡莫司汀(carmustine)(BSNU)和洛莫司汀(lomustine)(CCNU)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、白消安(busulfan)、二溴甘露醇(dibromomannitol)、链脲佐菌素(streptozotocin)、丝裂霉素C(mitomycinC)和顺式二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环霉素(anthracycline)(例如柔红霉素(先前称为道诺霉素)和多柔比星)、抗生素(例如更生霉素(dactinomycin)(先前称为放线菌素(actinomycin))、博莱霉素(bleomycin)、米拉霉素(mithramycin)和安曲霉素(anthracycline)(AMC))、以及抗有丝分裂剂(例如长春新碱和长春花碱)。可缀合于抗体以进行诊断或治疗使用的放射性同位素的实例包括但不限于碘¹³¹、钆¹¹¹、钇⁹⁰和镥¹⁷⁷。用于使多肽连接于药物制剂的方法在本领域中是已知的,诸如使用各种接头技术。接头类型的实例包括胺、硫醚、酯、二硫醚和含肽接头。对于用于使治疗剂连接于抗体的接头和方法的进一步讨论,参见例如Saito等人,Adv. Drug Deliv. Rev. (2003) 55:199-15; Trail等人, Cancer Immunol. Immunother. (2003) 52:328-37; Payne, Cancer Cell (2003) 3:207-12; Allen, Nat. Rev. Cancer (2002) 2:750-63; Pastan和Kreitman, Curr. Opin. Investig. Drugs (2002) 3:1089-91; Senter和Springer Adv. Drug Deliv. Rev. (2001) 53:247-64。

[0311] 本文所描述的抗体和/或组合物(例如,药物组合物)中的任一种均可用于制备药剂(例如,用于治疗有需要的受试者的癌症或延迟其进展的药剂)。

[0312] IX. 治疗方法

[0313] 本文所述的抗体和药物组合物可用于治疗目的,诸如治疗癌症或增强其他癌症疗法的功效。因此,在一些实施方案中,本公开提供使用本文所述抗体或药物组合物的方法。在一些实施方案中,本公开提供一种治疗受试者(例如,人受试者)癌症的方法,包括向受试者施用有效量的本文所述抗体。在一些实施方案中,所述癌症为乳腺癌、肝癌、或结肠直肠癌、胃癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌、或肾癌。

[0314] 在实践治疗方法中,本文所述经遮蔽抗CD28抗体可单独施用,例如,作为单一疗法或与一种或多种另外治疗剂或疗法组合施用。因此,在另一方面,本公开提供了一种组合法,其包括与一种或多种另外的疗法或治疗剂组合的结合分子,以用于分开、依序或同时施用。在一些实施方案中,术语“另外的疗法”是指不采用本文所述抗体作为治疗剂的疗法。在一些实施方案中,术语“另外的治疗剂”是指除了本文所述抗体外的任何治疗剂。在一些实施方案中,本发明提供一种治疗受试者(例如,人受试者)癌症的方法,其包含对所述受试者施用有效量的本文中所述的抗体(例如,抗CD28抗体或靶向CD28和一个或多个其它靶标的多特异性抗体)和有效量的抗PD-1抗体。在一些实施方案中,本发明提供一种治疗受试者(例如,人受试者)癌症的方法,其包含对所述受试者施用有效量的本文中所述的抗体(例如,抗CD28抗体或靶向CD28和一个或多个其它靶标的多特异性抗体)和有效量的抗CTLA4抗

体。在一些实施方案中,所述抗CTLA4抗体为经遮蔽抗CTLA4抗体。

[0315] X. 试剂盒和制品

[0316] 在一些实施方案中,提供了一种试剂盒,其包含一个或多个本文所述的抗体(例如,抗CD28抗体或靶向CD28和一个或多个其它靶标的多特异性抗体)。在一些实施方案中,试剂盒还包括包装插页,所述包装插页包含使用本文所述抗体的说明书。在一些实施方案中,制品或试剂盒包含一种容器,其包含一个或多个本文所述的经遮蔽抗体或组合物。在某些实施方案中,制品或试剂盒包含一种容器,其包含编码一(或多)个本文所述的经遮蔽抗体的核酸。在一些实施方案中,试剂盒包括生产本文所述的抗体的细胞系的细胞。在一些实施方案中,试剂盒包括一个或多个CD28(例如人CD28、食蟹猴CD28、小鼠CD28、大鼠CD28或前述任一片段)或CD28⁺细胞的阳性对照。在一些实施方案中,试剂盒包括阴性对照,例如几乎不含CD28的表面或溶液,或不表达CD28的细胞。

[0317] 在某些实施方案中,制品或试剂盒包含容器和在容器上或与容器相关联的标签或包装插页。合适的容器包括例如瓶、小瓶、注射器、IV溶液袋、试管等。容器可由多种材料形成,例如玻璃或塑料。容器容纳本文所用的本文所述抗体(或包含此抗体的组合物),所述抗体本身或与另一组合物组合施用,可有效治疗、推迟进程、和/或预防受试者(例如,人受试者)癌症。容器可具有无菌入口(例如,容器可为静脉内溶液袋或具有可通过皮下注射针头刺穿的塞子的小瓶)。在一些实施方案中,所述标签或包装插页表示所述组合物用于治疗受试者(例如,人受试者)乳腺癌、肝癌或结肠直肠癌。

[0318] 另外,制品或试剂盒可包含(a)含有组合物在内的第一容器,其中组合物包含本文所述的抗体(或其免疫活性片段);和(b)含有组合物在内的第二容器,其中组合物包含另外的细胞毒性剂或额外治疗剂。在一些实施方案中,第二容器含有包含抗PD-1抗体的组合物,和包含指示抗体和抗PD-L1用于治疗有需要的受试者(例如,人受试者)结肠癌的标签或包装插页的制品,例如,根据本文提供的方法。在一些实施方案中,第二容器含有包含抗CTLA4抗体(例如,经遮蔽抗CTLA-4抗体)的组合物,和包含指示本文所述抗体和抗CTLA4抗体(例如,经遮蔽抗CTLA-4抗体)用于治疗有需要的受试者(例如,人受试者)结肠癌的标签或包装插页的制品,例如,根据本文提供的方法。

[0319] 另外,制品还可进一步包含其他容器,所述其他容器包含药学上可接受的缓冲剂,例如抑菌注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)和右旋糖溶液。其还可以包括自商业和用户的立场中期望的其他材料,包含其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针和注射器。

[0320] 先前书面描述被视为足以使得本领域技术人员能够实施本公开。以下实施例仅出于说明性目的而提供,并且不意图以任何方式限制本公开的范围。实际上,除本文显示和描述的那些修改之外,根据先前描述,本公开的各种修改将变得为本领域技术人员显而易见,并且落在随附权利要求的范围内。

[0321] 除非本文另外定义,否则与本揭示案结合使用的科学和技术术语应具有普通熟习此项技术者通常理解的含义。示例性方法和材料描述如下,尽管与本文所述方法和材料相似或等效的方法和材料还可用于本公开的实践或测试。如有冲突,以本说明书(包括定义)为准。此外,除非上下文另外要求,否则单数术语应包括复数,并且复数术语应包括单数。在本说明书和实施例中,字语“具有(have)”和“包含(comprise)”,或变体诸如“具有(has)”、

“具有(having)”、“包含(comprises)”或“包含(comprising)”应被理解为包含所述整数或整数组,但不包含任何其它整数或整数组。本文引用的所有参考资料(包括专利申请、专利和非专利公布以及UniProtKB/Swiss-Prot登录号),都以引用的方式整体并入本文,所述引用的程度就好像明确地和个别地指示将各个别参考资料以引用的方式整体并入一样。尽管本文引用了许多文献,但所述引用并不构成承认此类文献中的任何一个构成本领域公知常识的一部分。如本文中所用,术语“近似”或“大约”被应用于一个或多个感兴趣的值是指类似于所述参考值的值。在某些实施方案中,除非另有说明或从上下文中看出,术语是指在所述参考值任一方向(大于或小于),落在10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小范围内的值。

[0322] 根据本公开,从属权利要求中的反向引用是指对反向引用所指示的每一项权利要求组合进行直接和明确披露的速记。本文公开的任何化合物皆可用于此处的任何治疗方法,其中待治疗个体如本文任何地方所定义。此外,本文标题为便于组织而创建,并不旨在以任何方式限制要求保护的发明的范围。

[0323] 为更好地理解本发明,列举下述实施例。仅出于说明目的提供此类实施例,并且不旨在以任何方式限制本发明的范围。

[0324] 实施例

[0325] 实施例1:产生特异性结合人CD28的初级Fab

[0326] 专有噬菌粒文库用于针对人CD28抗原的筛选。进行了总计3或4轮筛选。在最后一轮筛选后,通过ELISA测试个体克隆的培养上清液以鉴定特异性识别人CD28(例如,初级命中物)。当ELISA信号为背景至少两倍时,克隆被定义为阳性。阳性克隆被挑选定序,并将独特命中物相应的Fab在大肠杆菌中表达并亲和纯化。其对人CD28的亲合力通过Octet® RED96系统(ForteBio)测量。简而言之,使用浸渍和读取抗人IgG Fc捕获(AHC)生物传感器(ForteBio)捕获人或小鼠CD28-Fc融合蛋白,并浸入含有经纯化Fab的孔中,这些Fab在ForteBio动态缓冲液(10mM HEPES,150mM NaCl,3mM EDTA,0.005% v/v Surfactant P20, pH 7.4)中稀释5至10倍。将获取的数据用Octet数据分析软件7.1(ForteBio)处理,并将动力学数据拟合至1:1朗缪尔(Langmuir)结合模型。

[0327] 通过ELISA进一步表征人和小鼠CD28物种交叉反应的初级Fab命中物,且自这些初级命中物,将一组46个独特序列Fab转化成具有核心铰链突变S241P(Kabat编号方案)的IgG₄同型mAb,以进行详细的生物物理和功能性表征(表5)。

[0328] 实施例2: IgG₄转化和表达

[0329] 将表5所列经工程改造的人抗CD28 IgG₄同型mAb的重链和轻链克隆至哺乳动物表达载体pcDNA3.3(ThermoFisher Scientific)中。根据制造商的说明,将携带一条重链和一条轻链的质粒对瞬时转染至HEK293细胞。孵育后,收集上清液,离心并过滤澄清,并将IgG₄同型mAb通过MabSelect™ SuRe™蛋白A亲和色谱法(GE Healthcare)捕获。

[0330] 将mAb洗脱并中和,并将洗脱缓冲液交换至恢复缓冲液(20mM组氨酸, pH 5.5)中。通过UV-分光光度法测定蛋白质浓度,并在变性、还原和非还原条件下通过SDS-PAGE或SEC-HPLC分析IgG纯度。

[0331] 表5. 人抗CD28 IgG₄单克隆抗体列表

[0332]

序号	IgG ID	同型/突变
1	TY24853	hIgG4/ S241P
2	TY24854	hIgG4/ S241P
3	TY24855	hIgG4/ S241P
4	TY24856	hIgG4/ S241P
5	TY24857	hIgG4/ S241P
6	TY24858	hIgG4/ S241P
7	TY24859	hIgG4/ S241P
8	TY24860	hIgG4/ S241P
9	TY24861	hIgG4/ S241P
10	TY24862	hIgG4/ S241P
11	TY24863	hIgG4/ S241P
12	TY24864	hIgG4/ S241P
13	TY24865	hIgG4/ S241P
14	TY24866	hIgG4/ S241P
15	TY24867	hIgG4/ S241P
16	TY24868	hIgG4/ S241P
17	TY24869	hIgG4/ S241P
18	TY24870	hIgG4/ S241P
19	TY24871	hIgG4/ S241P
20	TY24872	hIgG4/ S241P
21	TY24873	hIgG4/ S241P
22	TY24874	hIgG4/ S241P
23	TY24875	hIgG4/ S241P
24	TY24876	hIgG4/ S241P
25	TY24877	hIgG4/ S241P
26	TY24878	hIgG4/ S241P
27	TY24879	hIgG4/ S241P
28	TY24880	hIgG4/ S241P
29	TY24881	hIgG4/ S241P
30	TY24882	hIgG4/ S241P
31	TY24883	hIgG4/ S241P
32	TY24884	hIgG4/ S241P
33	TY24885	hIgG4/ S241P
34	TY24886	hIgG4/ S241P

[0333]

序号	IgG ID	同型/突变
35	TY24887	hIgG4/ S241P
36	TY24888	hIgG4/ S241P
37	TY24889	hIgG4/ S241P
38	TY24890	hIgG4/ S241P
39	TY24891	hIgG4/ S241P
40	TY24892	hIgG4/ S241P
41	TY24772	hIgG4/ S241P
42	TY24773	hIgG4/ S241P
43	TY24774	hIgG4/ S241P
44	TY24775	hIgG4/ S241P
45	TY24776	hIgG4/ S241P
46	TY24777	hIgG4/ S241P

[0334] 实施例3:抗CD28抗体的结合特性

[0335] 通过Octet®RED96系统 (ForteBio)、ELISA和CytoFlex流式细胞仪 (Beckman) 测量抗CD28 mAb组与人、食蟹猕猴和小鼠CD28以及人CTLA4的结合亲和力。抗CD28抗体TAC2386 (也称为TGN1412, 如W02006/050949A2专利所述) 和TAC2387 (如W02019/246514A2专利所述) 被用作基准对照。

[0336] 通过Octet RED96系统与人CD28和CTLA4的结合亲和力

[0337] 使用Octet®RED96系统 (ForteBio) 评估抗CD28 mAb组与人CD28和CTLA4的结合动力学。简而言之, 将mAb在动力学缓冲液 (补充有0.02% Tween 20和0.1% BSA的PBS) 中稀释至15µg/mL, 并通过浸渍和读取AHC生物传感器 (ForteBio) 平行捕获。然后允许将传感器与His标记的人CD28和CTLA4蛋白质 (100nM) 缔合300秒, 并在动力学缓冲液中再缔合300秒。使用Octet®数据分析软件7.1 (ForteBio) 将缔合和解离曲线拟合至1:1朗缪尔结合模型。

[0338] 如表6所示, 通过Octet®RED96系统测量, 抗CD28测试组和基准mAb对人CD28展示出高结合亲和力 (<10nM)。此外, 测试mAb TY24773、TY24853、TY24854、TY24860、TY24865和TY24871以及基准对照mAb未对人CTLA4展示出可检测的亲和力。

[0339] 表6. 与人CD28和CTLA4的结合亲和力

[0340]

mAb ID	人 CD28			人 CTLA4		
	KD (nM)	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (nM)	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)
TAC2386	<0.001	9.625E+04	<1.0E-07	ND		
TAC2387	4.873	7.071E+04	3.446E-04			
TY24773	8.285	3.848E+04	3.188E-04			
TY24853	3.955	4.159E+04	1.645E-04			
TY24854	5.434	6.488E+04	3.526E-04			
TY24855	7.927	7.918E+04	6.277E-04	4.022	7.596E+05	3.055E-03
TY24856	7.805	6.887E+04	5.376E-04	5.127	3.036E+05	1.557E-03
TY24857	8.639	7.294E+04	6.301E-04	5.442	6.515E+05	3.546E-03
TY24858	9.882	7.101E+04	7.017E-04	7.904	3.055E+05	2.415E-03
TY24859	2.684	7.081E+04	1.900E-04	6.631	4.687E+05	3.108E-03
TY24860	6.664	6.323E+04	4.213E-04	ND		
TY24864	4.413	9.418E+04	4.157E-04	5.501	5.168E+05	2.843E-03
TY24865	<0.001	5.958E+04	<1.0E-07	ND		
TY24866	<0.001	5.804E+04	<1.0E-07	7.645	5.238E+05	4.004E-03
TY24869	2.733	4.676E+04	1.278E-04	1.198	3.793E+05	4.544E-04
TY24871	4.993	7.011E+04	3.501E-04	ND		
TY24876	<0.001	3.251E+04	<1.0E-07	4.280	1.366E+05	5.848E-04
TY24877	7.191	2.686E+04	1.931E-04	13.20	2.353E+05	3.105E-03
TY24878	4.214	9.747E+04	4.108E-04	0.9686	4.233E+05	4.100E-04
TY24879	<0.001	5.939E+04	<1.0E-07	7.165	4.369E+05	3.130E-03
TY24881	5.246	1.262E+05	6.618E-04	2.353	1.114E+06	2.622E-03
TY24884	2.420	6.836E+04	1.655E-04	6.359	6.409E+05	4.076E-03
TY24890	4.440	9.846E+04	4.371E-04	3.133	1.099E+06	3.444E-03

[0341] ND: 未检测到

[0342] 使用ELISA测量与人和小鼠CD28的亲合力

[0343] 将重组人和小鼠CD28-Fc在PBS中稀释至2 μ g/mL并在4 $^{\circ}$ C下包被在Nunc MaxiSorpTM 高蛋白结合能力96孔ELISA板(ThermoFisher Scientific)上过夜。在37 $^{\circ}$ C下将板用补充有3%脱脂乳的PBS阻断1小时。洗涤后,将50 μ L抗CD28测试mAb组的3倍连续稀释添加至各孔。在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时后,将板洗涤4次,并将100 μ L辣根过氧化物酶(HRP)-结合的抗人IgG (Fab特异性) (1:6000稀释)二抗添加至各孔。将板在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时,洗涤四次,及然后将50 μ L TMB底物(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)溶液添加至各孔,并将板在室温下孵育。向每孔中加入50 μ L硫酸终止液停止反应后,测量450nm处的吸光度。通过GraphPad Prism 7 (Windows版本,GraphPad Software,La Jolla California USA,www.graphpad.com)的非对称S形(四参数逻辑方程)模型拟合ELISA数据评价EC₅₀。

[0344] 如表7和图1所示,抗CD28测试mAb组与两个基准对照对人CD28展示出相似的亲合力。此外,测试mAb(除TY24890外)与小鼠CD28结合,而两个基准对照不与小鼠CD28结合。

[0345] 表7. 通过ELISA测量与重组CD28的结合亲和力

[0346]

mAb ID	EC ₅₀ (nM)	
	人 CD28	小鼠 CD28
TAC2386	0.78	ND
TAC2387	>1.65	ND
TY24859	1.34	>44.44
TY24865	0.58	>4.94
TY24866	0.57	>1.65
TY24869	0.87	>14.81
TY24876	1.02	3.93
TY24878	1.06	>14.81
TY24879	0.9	>1.65
TY24884	1.02	>44.44
TY24890	1.55	ND

[0347] ND:未检测到

[0348] 抗CD28抗体在Jurkat细胞中的结合活性

[0349] 将Jurkat (克隆E6-1) 细胞以 1.0×10^5 (50 μ L/孔) 接种于96孔板中,与连续稀释的基准阳性对照、同型阴性对照抗体和一组抗CD28测试mAb (100、20、4、0.8、0.16和0.032nM) 于2%胎牛血清/Dulbecco的PBS (FBS/DPBS) 中在4°C下孵育30分钟。接下来,将细胞用DPBS洗涤两次并在4°C下与APC-抗人IgG Fc二抗 (1 μ g/mL, 100 μ L/孔, Biolegend) 进一步孵育30分钟。最后,将细胞用DPBS洗涤两次并悬浮在FACS缓冲液中用于流式细胞术分析。为进行分析,使用FlowJo 10软件 (FlowJo LLC) 绘制平均荧光强度 (MFI) 值与浓度图,并通过GraphPad Prism 7 (Windows版本, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) 的四参数非线性回归进一步拟合数据以获取EC₅₀值。

[0350] 如表8所示,除TY24775和TY24867外,在Jurkat细胞上,其他所有抗CD28测试mAb均与CD28分子展示出高结合活性 (EC₅₀值范围为0.38至10.42nM)。此外,测量的结合活性与两个基准对照相当。

[0351] 表8.通过流式细胞术测量表达于Jurkat细胞的CD28的结合亲和力

[0352]

Ab ID	EC ₅₀ (nM)	Ab ID	EC ₅₀ (nM)	Ab ID	EC ₅₀ (nM)
TAC2386	1.10	TY24863	2.60	TY24881	0.38
TAC2387	0.81	TY24864	0.54	TY24882	2.24
TY24772	0.74	TY24865	0.46	TY24883	5.92
TY24773	0.71	TY24866	0.70	TY24884	1.09
TY24774	3.35	TY24867	ND	TY24885	5.77
TY24775	ND	TY24868	2.08	TY24886	10.42
TY24776	1.83	TY24869	1.07	TY24887	3.17
TY24777	1.50	TY24870	3.95	TY24888	0.58
TY24853	0.43	TY24871	0.89	TY24889	2.32
TY24854	0.60	TY24872	1.07	TY24890	0.59
TY24855	0.61	TY24873	2.08	TY24891	0.62
TY24856	0.76	TY24874	1.65	TY24892	1.30

TY24857	0.75	TY24875	1.72	同型对照	ND
TY24858	0.70	TY24876	0.38		
TY24859	0.97	TY24877	0.79		
TY24860	0.78	TY24878	0.39		
TY24861	2.25	TY24879	1.17		
TY24862	2.82	TY24880	1.62		

[0353] ND:未检测到

[0354] 通过流式细胞术测量抗CD28抗体与人T细胞的体外结合

[0355] 使用EasySep™人初始总T细胞分离试剂盒 (STEMCELL Technologies) 将人CD3⁺T细胞自冷冻保存的外周血单核细胞 (PBMC) 中分离。将经分离人T细胞以 1.0×10^5 个细胞/孔添加至96孔板,并在冰上将100nM基准对照、同型阴性对照抗体和一组抗CD28测试mAb在FACS缓冲液中孵育30分钟。接下来,将细胞用PBS洗涤三次并在冰上与PE标记的二抗进一步孵育30分钟。最后,将细胞用PBS洗涤三次并重悬浮于FACS缓冲液中用于流式细胞术分析。为进行分析,使用FlowJo 10软件 (FlowJo LLC) 计算MFI值,并通过GraphPad Prism 7 (Windows版本, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) 绘制几何平均MFI值与mAb图。

[0356] 如图2所示,相较于基准对照TAC2386和TAC2387,除TY24772外,所有测试mAb均展示相当的MFI值。TY24772结合约为基准对照的两倍。

[0357] 实施例4:使用Elisa的配体竞争

[0358] 通过ELISA测试抗体阻断CD28或CTLA4结合至其天然配体CD80的能力。

[0359] 如图3和表9所示,相较于对照抗CTLA4抗体TY21580,基准对照TAC2386和TAC2387以及所有经测试抗CD28测试mAb均阻断CD28与CD80的结合,而不阻断CTLA4与CD80的结合。

[0360] 表9. 抗CD28或抗CTLA4抗体对人CD28-CD80和CTLA4-CD80对的IC₅₀

样品 ID	IC ₅₀ (nM)	
	CD28/CD80	CTLA4/CD80
TAC2386	0.48	-
TAC2387	0.12	-
TY24859	0.42	-
TY24865	0.68	-
TY24866	0.27	-
TY24890	0.21	-
TY24869	0.55	ND
TY24876	0.54	ND
TY24878	0.35	ND

样品 ID	IC ₅₀ (nM)	
	CD28/CD80	CTLA4/CD80
TY24879	0.42	ND
TY24884	0.28	ND
TY21580	ND	37.24

[0363] 实施例5:干式涂覆人T细胞增殖检测中超级激动剂的评估

[0364] 通过**CellTiter-Glo®**荧光细胞活力检测(Promega)测量基准对照TAC2386和TAC2387、同型阴性对照抗体、以及一组抗CD28测试mAb诱导淋巴细胞增殖的水平。在此测定中,将100nM测试mAb以50 μ L/孔一式三份添加至96孔微孔板,并直接风干到孔壁上。接下来,将微孔板用PBS洗涤两次。将极冷保藏的PBMC恢复,并用10% FBS/RPMI1640将细胞密度调节至 5.0×10^5 个细胞/mL,并将 1.0×10^5 PBMC(200 μ L/孔)添加至预包被微孔板。将细胞在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂中孵育72小时,且然后使用**CellTiter-Glo®**检测评估淋巴细胞增殖。

[0365] 如图4A所示,固定的基准对照TAC2386(一种已知的CD28超级激动剂)诱导淋巴细胞增殖的水平明显高于所有测试mAb。相较于TAC2386,基准对照TAC2387和抗CD28测试mAb(包括TAC2387、TY24865、TY24866、TY24876、TY24878、TY24879和TY24884)在体外展示出较弱的超级激动活性。

[0366] 实施例6:抗CD28抗体对体外人T细胞活化的影响

[0367] T细胞活化共刺激检测:IFN- γ 释放

[0368] 通过ELISA检测IFN- γ 细胞因子分泌测量抗CD28 mAb作为激动型T细胞共刺激剂在体外活化人T细胞的生物活性。Ultra-LEAF™纯化抗人CD28抗体(Biolegend)用作阳性对照。

[0369] 使用EasySep™人初始总T细胞分离试剂盒(STEMCELL Technologies)将人CD3⁺T细胞自冷冻保存的PBMC中分离。将经分离细胞在连续稀释的基准对照、同型阴性对照抗体、商业化抗人CD28阳性对照抗体和一组抗CD28测试mAb(0.1、1、10和100nM)的存在下在预包被次优浓度(10nM, 50 μ L/孔)抗人CD3抗体(OKT3)的96孔组织培养板(1.0×10^5 /孔)中培养。将细胞在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂中孵育120小时,且然后收集细胞上清液通过ELISA进行IFN- γ 细胞因子分析,通过**CellTiter-Glo®**测量T细胞增殖。

[0370] 如图4B和4C所示,相较于同型对照抗体,抗CD28 mAb显示出浓度依赖性生物活性,包括T细胞增殖和IFN- γ 细胞因子分泌。通常,抗CD28 mAb对人T细胞活化的影响与两种基准对照抗体相当或更有效。

[0371] T细胞活化共刺激检测:IL-2释放

[0372] 通过**CellTiter-Glo®**荧光细胞活力检测(Promega)测量T细胞增殖和ELISA测量IL-2细胞因子分泌测量抗CD28 mAb作为激动型T细胞共刺激剂在体外活化人T细胞的生物活性。Ultra-LEAF™纯化抗人CD28抗体(Biolegend)用作阳性对照。

[0373] 使用EasySep™人初始总T细胞分离试剂盒(STEMCELL Technologies)将人T细胞自亚洲供体的新鲜PBMC中分离。将细胞在连续稀释的基准对照TAC2387、同型阴性对照抗体、商业化抗人CD28阳性对照抗体和一组抗CD28测试mAb的存在下在预包被次优浓度(5nM)抗人CD3抗体(OKT3)的96孔组织培养板(1.0×10^5 个细胞/孔)中培养。将细胞在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂中孵育72小时,且然后收集细胞上清液通过ELISA进行IL-2细胞因子分析,并使用**CellTiter-Glo®**检测测量T细胞增殖水平。

[0374] 如图5A至B所示,相较于同型对照抗体,抗CD28抗体显示出浓度依赖性生物活性,包括T细胞增殖和IL-2细胞因子分泌。TY24859、TY24865、TY24866和TY24890对人T细胞活化的影响与基准对照TAC2387相当。未预包被的抗CD3阴性对照组未显示出可检测的T细胞增殖和IL-2细胞因子分泌。

[0375] 实施例7:抗HER2×CD28双特异性抗体构建和功能表征

[0376] 抗HER2×CD28双特异性抗体的产生

[0377] 使用TYM13 Fc突变(D或E356K:E357K:S364K:S400CL351'D:K370'D:N390'C:K439'D;根据IgG1 C_H3结构域的Kabat编号方案)对异二聚双特异性框架进行工程改造。将轻链-重链半抗体和单链可变片段(scFv)-Fc链组合形成具有TYM13突变的异-Fc结构域的双特异性抗体(BsAb)。

[0378] 将编码BsAb重链、轻链和scFv-Fc链的质粒瞬时转染至哺乳动物细胞中。转染7天后,在14000g下离心30分钟收获含有双特异性抗体的细胞,培养上清液且经无菌过滤器(0.22μm)过滤。使用MabSelect™ SuRe™预填充管柱(GE Healthcare)通过蛋白A亲和色谱将抗体纯化且随后在20mM组氨酸(pH 5.5)缓冲液中进行缓冲液交换。

[0379] 选择使用TY24865(高亲和力CD28)和TY24865突变体(低亲和力CD28)框架构建CD28 BsAb。构建体描述于表10中。

[0380] 表10. 抗HER2×CD28双特异性抗体设计

[0381]	BsAb ID	Fab 臂(抗 HER2)	scFv 臂(抗 CD28)
	TY27566	Perjeta®	TY24865
	TY27881	Perjeta®	TY24865 突变体
	TY27807	Herceptin®	TY24865

[0382] 通过FACS测量与SK-OV-3细胞的结合

[0383] 使用流式细胞术测量抗HER2×CD28 BsAb(TY27566)、抗HER2×CD3 BsAb(TY25238,还描述于PCT/CN2021/076626中,其全文以引用的方式并入本文中)和抗HER2 mAb对Perjeta®(TAC2319)或Herceptin®(TAC2320)的浓度依赖性结合活性。Perjeta®(TAC2319)与Herceptin®(TAC2320)结合至不同HER2二聚化结构域的抗原表位。

[0384] 培养SK-OV-3细胞并以 8.0×10^4 个细胞/孔添加至96孔板中,并在4°C下与连续稀释的测试BsAb在2% FBS/RPMI1640缓冲液中孵育60分钟。接下来,将细胞用DPBS洗涤两次,并在4°C下与二级APC-抗人IgG Fc抗体(1:400稀释)进一步孵育30分钟。最后,将细胞用DPBS洗涤两次并重悬浮于FACS缓冲液中用于流式细胞术分析。为进行分析,使用FlowJo 10软件(FlowJo LLC)绘制MFI值与浓度图,并通过GraphPad Prism 7(Windows版本,GraphPad Software,La Jolla California USA,www.graphpad.com)的四参数非线性回归进一步拟合数据以获取EC₅₀值。同型抗体用作阴性对照。

[0385] 如图6所示,相较于抗HER2 mAb与Perjeta®(TAC2319)或Herceptin®(TAC2320),抗HER2×CD28或抗HER2×CD3 BsAb与SK-OV-3细胞展示出非常相似的结合亲和力。

[0386] T细胞受体和CD28受体信号传导的刺激活性

[0387] 通过抗HER2×CD3 BsAb、抗HER2×CD28 BsAb或其组合评价T细胞受体(TCR)和CD28受体信号传导的刺激活性。在此测定中,TCR和CD28同时活化导致NFκB的转录活性增强,进而诱导报告基因的产生。同型抗体作为阴性对照。

[0388] 将Jurkat-NFκB-Nluc效应(E)报告细胞(5×10^4 个细胞/孔)与SK-OV-3靶(T)细胞(1×10^4 个细胞/孔,E:T=5:1)共培养,内源性表达HER2抗原。将连续稀释的抗HER2×CD3 BsAb或具有固定浓度的抗HER2×CD28 BsAb(10nM)的同型对照抗体,或相反,将连续稀释的

抗HER2 $\times$ CD28 BsAb或具有固定浓度的抗HER2 $\times$ CD3 BsAb (0.01nM) 的同型对照抗体,添加至报告细胞系统中,以评估其在刺激下游荧光素酶活性方面的综合效应。将共培养细胞在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂中孵育6小时。然后,将100 μ L Nano-Glo[®]荧光素酶检测系统 (Promega) 试剂添加至细胞中,并将细胞裂解10分钟。收集上清液 (100 μ L) 用于使用SpectraMax[®]i3x多模式微孔板读取器 (分子组件) 的发光测量。

[0389] 如图7所示,抗HER2 $\times$ CD28 BsAb (TY27566) 与固定浓度的抗HER2 $\times$ CD3 BsAb (TY25238) 组合,和抗HER2 $\times$ CD3 BsAb与固定浓度的抗HER2 $\times$ CD28 BsAb组合,在最大信号值和EC₅₀值方面展示出协同或增强刺激效应。

[0390] 具有相同或不同TAA抗原表位的抗HER2 $\times$ CD28 BsAb和抗HER2 $\times$ CD3 BsAb的细胞毒性

[0391] 使用乳酸脱氢酶 (LDH) 释放检测法测量MCF-7肿瘤细胞系上抗HER2 $\times$ CD3 BsAb (TY25238) 单独或与抗HER2 $\times$ CD28 BsAb (TY27566或TY27807) 组合的体外细胞毒性活性。TY25238与TY27566结合至不同HER2二聚化结构域的肿瘤相关抗原 (TAA) 抗原表位,但与TY27807结合至相同的TAA抗原表位。

[0392] 将人T细胞自冷冻保存的PBMC中分离。在37 $^{\circ}$ C下将培养的MCF-7肿瘤靶细胞 (1 $\times$ 10⁴个细胞/孔) 与连续稀释的抗CD3 BsAb FG14127单独或与固定浓度 (1 μ g/mL) 的结合不同TAA抗原表位的两种抗CD28 BsAb (TY27566或TY27807) 组合孵育30分钟。然后,添加经分离人T效应细胞 (2 $\times$ 10⁴个细胞/孔), 并在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂下孵育72小时 (E:T=2:1)。通过CytoTox96[®]非放射性细胞毒性检测 (Promega) 定量基于杀伤MCF-7靶细胞释放LDH至上清液中的细胞毒性。

[0393] 如图8所示,作为单药剂,抗HER2 $\times$ CD3 BsAb (TY25238) 在MCF-7靶细胞上引发有效浓度依赖性细胞毒性。针对不同TAA抗原表位的抗HER2 $\times$ CD28 BsAb (TY27566) 和抗HER2 $\times$ CD3 BsAb (TY25238) 的组合,进一步增强体外肿瘤杀伤活性的EC₅₀。然而,相较于单独使用抗HER2 $\times$ CD3 BsAb (TY25238) 处理,添加具有相同TAA抗原表位的抗HER2 $\times$ CD28 BsAb (TY27807) 显著降低MCF-7肿瘤细胞的EC₅₀和最大裂解。同型抗体作为单药检测的阴性对照。

[0394] 实施例8:抗TROP2 $\times$ CD28或抗TROP2 $\times$ CD3 BsAb构建和功能表征

[0395] 使用如实施例7所述的TYM13 Fc突变体对抗肿瘤相关钙信号转导蛋白2 (TROP2) $\times$ CD28或抗TROP2 $\times$ CD3异二聚双特异性框架进行设计。抗TROP2 $\times$ CD28 BsAb的构建体描述于表11中。

[0396] 抗TROP2 $\times$ CD3 BsAb的构建体描述于表12中。

[0397] 表11. 抗TROP2 $\times$ CD28双特异性抗体设计

[0398]	BsAb ID	Fab臂 (抗TROP2)	scFv臂 (抗CD28)
	TY27571	TY25616	TY24865

[0399] 表12. 抗TROP2 $\times$ CD3双特异性抗体设计

[0400]	BsAb ID	Fab臂 (抗TROP2)	scFv臂 (抗CD3)
	TY25839	TY25616	TY24742

[0401] 基于CD3或CD28的双特异性与具有高、中或低TROP2表达的肿瘤细胞系的结合

[0402] 使用流式细胞术测量抗TROP2 BsAb在具有高、中或低TROP2表达的不同肿瘤细胞

系上的浓度依赖性结合活性。同型抗体作为阴性对照。

[0403] 将H292、NCI-N87或HT29细胞培养并以 1.0×10^5 个细胞/孔接种于96孔板中,并在4℃下与连续稀释的测试抗TROP2 BsAb在2%FBS/RPMI1640缓冲液中孵育30分钟。接下来,将细胞用DPBS洗涤两次,并在4℃下与二级抗人IgG抗体(APC-抗人IgG Fc抗体,H292细胞1:300稀释;APC-F(ab')₂片段山羊抗人IgG(H+L),NCI-N87和HT29细胞1:500稀释)进一步孵育30分钟。最后,将细胞用DPBS洗涤两次并重悬浮于FACS缓冲液中用于流式细胞术分析。为进行分析,使用FlowJo 10软件(FlowJo LLC)绘制MFI值与浓度图,并通过GraphPad Prism 7(Windows版本)的四参数非线性回归进一步拟合数据以获取EC₅₀值。

[0404] 如图9和表13所示,TY25839和TY27571在具有高、中或低TROP2表达的三种不同肿瘤细胞系上TROP2臂结合活性相似。

[0405] 表13. 抗TROP2双特异性抗体在肿瘤细胞系上的EC₅₀值

BsAb ID	H292			NCI-N87			HT-29		
	EC ₅₀ (nM)	范围	AUC	EC ₅₀ (nM)	范围	AUC	EC ₅₀ (nM)	范围	AUC
TY25839	0.813	149008	418398	0.901	612873	1715321	0.693	52548	156975
TY27571	0.822	156304	465058	0.911	589022	1644423	0.559	52992	162739

[0407] TCR和CD28受体信号传导的刺激活性

[0408] 通过抗TROP2×CD3 BsAb、抗TROP2×CD28 BsAb或其组合评价TCR和CD28受体信号传导的刺激活性。TCR和CD28同时活化导致NFκB的转录活性增强,进而诱导报告基因的产生。

[0409] 将Jurkat-NFκB-Nluc效应报告细胞(5×10^4 个细胞/孔)与H292靶细胞(E:T=5:1)共培养。将连续稀释的抗TROP2×CD3 BsAb与固定浓度的抗TROP2×CD28 BsAb(5nM),或相反,将连续稀释的抗TROP2×CD28 BsAb与固定浓度的抗TROP2×CD3 BsAb(0.01nM)添加至报告细胞系统中,以评估其在刺激下游荧光素酶活性方面的综合活性。将共培养细胞在37℃、5% CO₂中孵育6小时。然后,将100μL Nano-Glo荧光素酶检测系统(Promega)试剂添加至细胞中,并将细胞裂解10分钟。收集上清液(100μL)用于使用SpectraMax i3x多模式微孔板读取器(分子组件)的发光测量。

[0410] 如图10所示,基于CD28 BsAb的单药剂展示出非常弱的报告基因活性。然而,抗TROP2×CD3和抗TROP2×CD28 BsAb的组合在最大信号值或EC₅₀值方面展示出协同或增强刺激效应。

[0411] 实施例9:B7H3×CD28双特异性抗体构建和功能表征

[0412] 构建了B7H3×CD28 BsAb。构建体描述于表14中。

[0413] B7H3×CD3 BsAb构建体描述于表15中。

[0414] 表14.B7H3×CD28双特异性抗体设计

BsAb ID	Fab臂(抗B7H3)	scFv臂(抗CD28)
TY27556	TY21601	TY24865

[0416] 表15.B7H3×CD3双特异性抗体设计

BsAb ID	Fab臂(抗B7H3)	scFv臂(抗CD3)
---------	-------------	-------------

TY26999	TY21601	中等亲和力CD3
---------	---------	----------

[0418] 通过FACS测量与MDA-MB-231细胞的结合

[0419] 使用流式细胞术(图11)测量抗B7H3×CD28 BsAb TY27556及其亲本抗B7H3 mAb TY21601在MDA-MB-231细胞的浓度依赖性结合活性。同型抗体作为阴性对照。

[0420] 将MDA-MB-231细胞培养并以 1.0×10^5 个细胞/孔接种于96孔板中,并在4°C下与连续稀释的测试BsAb在2% FBS/RPMI1640缓冲液中孵育60分钟。接下来,将细胞用DPBS洗涤两次,并在4°C下与二级APC-抗人IgG Fc抗体(1:400稀释)进一步孵育30分钟。最后,将细胞用DPBS洗涤两次并重悬浮于FACS缓冲液中用于流式细胞术分析。为进行分析,使用FlowJo 10软件(FlowJo LLC)绘制MFI值与浓度图,并通过GraphPad Prism 7(Windows版本)的四参数非线性回归进一步拟合数据以获取EC₅₀值。

[0421] 如图12所示,抗B7H3 mAb TY21601对MDA-MB-231靶细胞显示出次-nM(0.4525nM)的结合亲和力,且BsAb TY27556对靶细胞的结合活性降低了约28倍(12.84nM)。

[0422] B7H3xCD28双特异性抗体增强PD-1或PD-L1阻断体外诱导T细胞活化的能力

[0423] 通过ELISA用IFN- γ 和IL-2的分泌测量抗PD-1阻断mAb与B7H3xCD28双特异性Ab组合对体外初始人T细胞活化的影响。本文使用改良的混合淋巴细胞反应(MLR)模拟生理PD-L1表达和TCR/CD3刺激。为产生单向MLR检测,将来自健康供体(D#XC11147W)的人T细胞(1×10^5 个细胞/孔)在单独存在不同测试抗体(B7H3xCD28或同型对照)或与抗PD-1(pembrolizumab, **Keytruda®**)或抗PD-L1(atezolizumab, **Tecentriq®**)组合的情况下与异基因MDA-MB-231细胞(E:T=5:1)孵育。然后将细胞在37°C、5% CO₂培养箱中共培养120小时。用Elisa试剂盒定量由经活化T细胞上清液中分泌的IL-2(72小时)和IFN- γ (120小时)细胞因子。

[0424] 如图13A至13B所示,在所述MLR检测中,添加100nM PD-1/PD-L1 mAb或滴定B7H3xCD28导致无或仅有轻微细胞因子释放。然而,相较于单药疗法,B7H3xCD28与100nM PD-1/PD-L1 mAb组合显著增加T细胞活化。此类结果证明,B7H3xCD28双特异性在肿瘤细胞存在下能协同结合PD-1/PD-L1阻断剂,以促进T细胞活化,内源性表达PD-L1和B7H3。

[0425] 共刺激双特异性抗体在双向结合时在体外增强对MCF-7细胞的T细胞细胞毒性

[0426] 使用LDH释放细胞毒性检测法测量基于抗CD3,或基于抗CD28 BsAb或其组合在MCF-7肿瘤细胞系上的体外肿瘤细胞杀伤活性。

[0427] 将人T细胞自冷冻保存的PBMC中分离。在37°C下将MCF-7细胞(1×10^4 个细胞/孔)与连续稀释的抗HER2×CD3 BsAb TY25238或与固定浓度的高亲和力CD28臂抗HER2×CD28 BsAb TY27566、抗CD28×B7H3 TY27556、或低亲和力CD28臂抗HER2×CD28 BsAb TY27881(1 μ g/mL或10 μ g/mL)组合孵育30分钟,并加入人T细胞(2×10^4 个细胞/孔)在37°C、5% CO₂中孵育72小时(E:T=2:1)。使用CytoTox **96®**非放射性细胞毒性检测(Promega)定量基于杀伤MCF-7靶细胞上清液中释放LDH的细胞毒性。

[0428] 如图14所示,作为单药剂,基于CD28 BsAb在MCF-7靶细胞上未引起细胞毒性。相反,作为单药剂,抗CD3 BsAb TY25238显示出浓度依赖性效应,且针对HER2的BsAb引起最高细胞毒性,伴随54.47%的MCF-7细胞裂解。抗CD3和抗CD28 BsAb的组合进一步增强了体外肿瘤细胞杀伤活性,表现为EC₅₀降低。相较于单独使用抗CD3 BsAb TY25238处理,添加具有高亲和力CD28臂的抗CD28BsAb TY27566显著增强约10倍(EC₅₀)的肿瘤细胞裂解。然而,当与

具有低亲和力CD28臂的抗CD28 BsAb TY27881组合时,未检测到增强的细胞毒性。

[0429] 共刺激双特异性抗体在双向结合时在体外增强对EMT-6-HER2细胞的T细胞细胞毒性

[0430] 使用LDH释放细胞毒性检测法测量基于抗CD3或基于抗CD28BsAb或其组合在EMT-6-HER2肿瘤细胞系上的体外肿瘤细胞杀伤活性。

[0431] 使用EasySep™人初始总T细胞分离试剂盒(STEMCELL Technologies)将人T细胞自新鲜PBMC中分离。在37℃下将EMT-6-HER2(5×10^3 个细胞/孔)靶细胞与连续稀释的抗HER2×CD3 BsAb(TY25238)或与固定浓度的抗B7H3×CD3 BsAb TY27556(8nM)组合孵育30分钟,或相反,在37℃下将EMT-6-HER2(5×10^3 个细胞/孔)细胞与连续稀释的抗B7H3×CD3 BsAb(TY26999)或与固定浓度的抗HER2×CD28 BsAb TY27566(8或0.8nM)组合孵育30分钟。接下来,加入经分离人T效应细胞(2×10^4 个细胞/孔)并在37℃、5% CO₂中孵育72小时(E:T=2:1)。使用CytoTox 96®非放射性细胞毒性检测(Promega)定量基于杀伤EMT-6-HER2靶细胞上清液中释放LDH的细胞毒性。同型抗体作为阴性对照用于单药剂检测。

[0432] 如图15所示,作为单药剂,TY27556(抗B7H3×CD28)或TY27566(抗HER2×CD28)未对EMT-6-HER2细胞展示出杀伤效能。相较于TY25238,TY25238与TY27556组合导致EC₅₀降低约2倍,且最大杀伤增加约3倍(从17%增加至50%)。

[0433] 相较于TY26999,TY26999与TY27566组合导致EC₅₀降低约1.3倍,且最大杀伤增加约2倍(从23%增加至47%)。

[0434] 基于抗CD3或抗CD28的双特异性抗体或其组合的体内全身细胞因子释放风险

[0435] 使用ELISA测量基于抗小鼠CD3或抗CD28 BsAb单独或组合在BALB/c小鼠模型中体内全身细胞因子释放风险(IL-6和IFN- γ)。

[0436] 将BALB/c小鼠随机分为四组(每组3只小鼠),并分别注射抗小鼠CD3 mAb(145-2C11克隆,1mg/kg)、抗B7H3×CD28(TY27556,2mg/kg)、抗B7H3×CD3(TY27042,其中CD3臂衍生自小鼠特异性145-2C11克隆,2mg/kg)或其组合(TY27556,2mg/kg与TY27042,2mg/kg)。在注射前和注射后的不同时间点(给药前3.5和24小时)收集小鼠血清和全血。通过ELISA经IL-6和IFN- γ 评估全身细胞因子释放风险。通过流式细胞术在每个时间点测定CD3⁺T细胞与总外周T细胞的百分比。

[0437] 如图16所示,测试抗体处理3.5小时后,小鼠施用抗mCD3或抗B7H3×CD3(TY27042)导致细胞因子释放(IL-6和IFN- γ)显著降低。测试抗体处理后,抗B7H3×CD28(TY27556)处理的小鼠未显示出可检测的细胞因子释放。此外,与单药剂抗B7H3×CD3(TY27042)相比,抗B7H3×CD3(TY27042)与抗B7H3×CD28(TY27556)组合未显示出增强的细胞因子释放风险。在单药剂抗小鼠CD3、抗B7H3×CD3(TY27042)和抗B7H3×CD28(TY27556)组以及抗B7H3×CD3(TY27042)与抗B7H3×CD28(TY27556)组合组中,外周CD3⁺T细胞急剧减少至几乎为零。注射后3.5小时,仅有约2%至3%的CD3⁺T细胞保留在外周血中。

[0438] 实施例10:体内功效研究

[0439] SK-OV3模型中B7H3xCD28 BsAb单药疗法和与HER2xCD3BsAb组合疗法体内功效研究

[0440] 通过腹膜注射向免疫缺陷M-NSG小鼠(n=8只/组,雌性,7至8周龄)移植 5×10^6 个PBMC。7天后,向小鼠皮下接种 2×10^6 个SK-OV3细胞。当肿瘤接种后第8天平均肿瘤体积达到

约90mm³时,开始治疗。通过腹膜注射向小鼠施用5mg/kg hIgG₁同型对照、0.2mg/kg抗HER2×CD3双特异性双链经遮蔽抗体、5mg/kg抗B7H3×CD28双特异性抗体TY27556或0.2mg/kg TY27151与5mg/kg TY27556的组合。TY27151先前在PCT/CN2021/076626中描述。每周两次向小鼠施用所述Ab,达总计五个剂量。一周两次监测肿瘤生长,并报告为随时间的平均肿瘤体积±s.e.m。

[0441] 如图17所示,双链经遮蔽抗HER2×CD3双特异性抗体TY27151与抗B7H3×CD28双特异性抗体TY27556在所述模型中显示出较强的协同抗肿瘤效应。

[0442] EMT6-HER2小鼠乳腺癌同源模型中CD28 BsAb体内功效研究

[0443] 向BALB/c小鼠(n=5只/组,雌性,8至9周龄)皮下接种5×10⁵个EMT-HER2细胞。当肿瘤接种后第7天平均肿瘤体积达到约110mm³时,开始治疗。通过腹膜注射向小鼠施用媒介物、0.5mg/kg和0.05mg/kg抗B7H3×CD28 BsAb TY27556,或0.2mg/kg抗HER2×CD28双特异性抗体TY27566。每周两次向小鼠施用所述Ab,达总计四个剂量。一周两次监测肿瘤生长,并报告为随时间的平均肿瘤体积±s.e.m。

[0444] 如图18所示,抗B7H3×CD28双特异性抗体TY27556在所述模型中显示出剂量依赖性抗肿瘤效应。如图18所示,抗HER2×CD28双特异性抗体TY27566显示出较强的抗肿瘤效应。

[0445] 实施例11:识别经遮蔽抗CD28抗体的自阻断肽的方法

[0446] 经遮蔽抗CD28抗体的产生

[0447] 已设计并执行了一种筛选系统,其用于有效发现具有良好可开发性的可有效遮蔽未经遮蔽亲本抗CD28抗体的遮蔽性部分。在此系统中,靶抗CD28 scFv首先在酵母表面展示,并且经证实功能结合至其CD28抗原。然后将来自改良MP肽文库的遮蔽性肽(MP)直接融合至靶抗CD28 scFv的轻链的N端,并构建在酵母表面上展示融合蛋白的酵母文库。然后所述酵母文库经历若干轮基于FACS的筛选:1)将具有与抗原低结合的酵母克隆浓化,2)将经浓化酵母克隆用蛋白酶处理以移除N端MP,和3)选择展示与抗原高结合的克隆。5至6轮分选后,自此类克隆提取质粒并通过DNA定序证实MP序列。在MP的存在下,呈scFv形式的选定经遮蔽抗CD28抗体克隆展示与抗原的少结合。然而,当将酵母细胞用烟草蚀纹病毒核酸内含物——一种内肽酶(TEV)处理以移除MP时,与抗原的结合急剧增加。将作为裂解位点的TEV识别位点并入MP中,与应用TEV蛋白酶组合验证选定克隆显著增加MP选择的成功率。

[0448] 为识别MP序列,使用质粒提取试剂盒(Generay)自选定酵母克隆提取穿梭质粒,并转型至活性大肠杆菌细胞。制备质粒,并将编码MP的区域定序和比对。如所预期,可将此类序列分成若干组,指示通过分选轮的清除浓化。选定MP的遮蔽效率如下表16所示,且每个MP的序列如下述序列部分所示。

[0449] 将经遮蔽抗CD28 scFv蛋白转变成IgG₄同型mAb。经遮蔽IgG₄mAb被改造为包括MP,所述MP具有单个不变基质金属蛋白酶(MMP)裂解位点,其以与在酵母表面上展示相同的方式融合至轻链的N端。将重链和轻链分开克隆至哺乳动物表达载体pCDNA3.3(Thermo Fisher Scientific)。亲本抗CD28抗体(TY24865)的V_H和V_L序列列于以下序列部分。

[0450] 将质粒对瞬时转染至HEK293F细胞中。6天后,收集上清液,通过离心和过滤澄清,并将IgG用标准蛋白A亲和色谱法(MabSelect SuRe,GE Healthcare)纯化。将IgG洗脱并中和,并缓冲交换至20mM组氨酸,pH 5.5缓冲液中。通过UV-分光光度法测定蛋白质浓度,并在

变性、还原和非还原条件下通过SDS-PAGE或EC-HPLC分析IgG纯度。蛋白质浓度通过紫外分光亮度测定法来测定,并且在变性、还原性和非还原性条件下通过SDS-PAGE或SEC-HPLC来分析IgG纯度。重要的是,经遮蔽抗体在HEK293细胞中的表达水平类似于或低于它们的亲本抗体,并且它们在蛋白A树脂之后的纯化产率也类似,从而表明遮蔽性肽和裂解肽的存在不对抗体在哺乳动物细胞中的表达具有显著负性影响。

[0451] 表16. 遮蔽性肽

[0452]

IgG ID	ELISA遮蔽效率	IgG ID	ELISA遮蔽效率	IgG ID	ELISA遮蔽效率
TY26142	3062	TY26152	1867	TY26162	ND
TY26143	ND	TY26153	1825	TY26163	ND
TY26144	ND	TY26154	ND	TY26164	ND
TY26145	1430	TY26155	368	TY26165	ND
TY26146	2179	TY26156	670	TY26166	ND
TY26147	4882	TY26157	ND	TY26167	1427
TY26148	ND	TY26158	887	TY26168	2567
TY26149	3841	TY26159	468	TY26169	1818
TY26150	1027	TY26160	1461	TY26170	ND
TY26151	2476	TY26161	1484	TY26171	406

[0453] 遮蔽效率的测量

[0454] 当通过ELISA测量遮蔽效率时,将重组人CD28-Fc在PBS中稀释至2 μ g/mL并在4 $^{\circ}$ C下包被在MaxiSorpTM高蛋白结合能力96孔ELISA板(ThermoFisher Scientific)上过夜。在37 $^{\circ}$ C下将板用补充有3%脱脂乳的PBS阻断1小时。洗涤后,将100 μ L抗CD28测试mAb的3倍连续稀释添加至各孔。37 $^{\circ}$ C下孵育1小时后,将板洗涤四次,并将100 μ L辣根过氧化物酶(HRP)结合的抗人IgG(Fab特异性)(1:6000稀释)二抗添加至各孔。将板在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时,洗涤四次,且然后将50 μ L TMB底物(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)溶液添加至各孔,并将板在室温下孵育。向每孔中加入50 μ L硫酸终止液停止反应后,测量450nm处的吸光度。使用GraphPad Prism 6(Windows版本,GraphPad Software,La Jolla California USA, www.graphpad.com)的S形(四参数逻辑方程)模型拟合ELISA数据来评价EC₅₀。

[0455] 选定经遮蔽抗CD28测试mAb的遮蔽效率通过经遮蔽mAb的结合的EC₅₀除以未经遮蔽亲本mAb(TY24865)的EC₅₀来计算,并在表17中列出。如图19所示,相较于亲本mAb,所有可活化mAb显示与其抗原的急剧减少的结合,且经计算的遮蔽效率范围自368至高于4000。此类结果指示当在哺乳动物细胞中表达时,自改良的MP肽文库识别的多个MP维持其遮蔽效率且作为全IgG分子的部分。

[0456] 表17. 经遮蔽抗CD28抗体的SEC纯度和遮蔽效率

[0457]

IgG ID	SEC 纯度		遮蔽效率
	HMW(%)	LMW(%)	
TY26142	2	0	3062
TY26143	>2.0	0	ND
TY26144	24.6	0	ND
TY26145	4.5	0	1430
TY26146	3.6	0.2	2179
TY26147	1.9	0	4882
TY26148	1.9	0.1	ND
TY26149	1.4	0.1	3841
TY26150	1.9	0	1027
TY26151	1.7	0	2476
TY26152	2.1	0	1867
TY26153	1.7	0	1825
TY26154	14.2	0	ND
TY26155	1.8	0	368
TY26156	2.7	0	670
TY26157	无主峰		ND
TY26158	低峰		887
TY26159	36.6	0	468
TY26160	1.4	0	1461
TY26161	1.8	0	1484
TY26162	0.9	0	ND
TY26163	1.1	0	ND
TY26164	2.5	0	ND
TY26165	2.8	0	ND
TY26166	58.5	0	ND
TY26167	2.2	0.3	1427
TY26168	20.8	0	2567
TY26169	非对称主峰		1818
TY26170	3.9	0.8	ND
TY26171	5.9	0	406

[0458] 选定抗CD28可活化抗体的优化

[0459] 对于两个先导经遮蔽抗CD28 mAb (TY26149和TY26152), 在其MP上进行了修饰, 包括去除一些N端残基, 并在TY26149序列的“D”和“G”残基之间添加“S”氨基酸残基(表18中TY26149的粗体和底线残基)。如图20所示, 新型经遮蔽抗体的表达和遮蔽效率未受到显著影响。

[0460] 表18. 遮蔽性肽序列的修饰

[0461]	IgG ID	遮蔽性肽+裂解肽序列:	SEQ ID NO:
	TY26149	EVGSYAATYSDCYSDPYACH <u>D</u> GGGPLGLAGSGGS	301
	TY28338	EAATYSDCYSDPYACHDSGGGPLGLAGSGGS	302
	TY28339	EYSDCYSDPYACHDSGGGPLGLAGSGGS	303
	TY26152	EVGSYA AFSPACYTDPYSCHAGGGPLGLAGSGGS	304
	TY28341	EAAFSPACYTDPYSCHAGGGPLGLAGSGGS	305
	TY28342	ESPACYTDPYSCHAGGGPLGLAGSGGS	306

[0462] 实施例12:表位作图

[0463] 为了确定测试抗体在氨基酸残基水平上的结合区域,制备了一系列的人CD28细胞外结构域的突变体(表19)。使用这些CD28突变质粒转染HEK293F细胞。抗体与人CD28突变体的结合通过流式细胞术分析进行评估。结果汇总在表19中,连同这些抗体与处于感兴趣的差异(differentiation)的人、猴和小鼠CD28的交叉反应性。TY24865与人、猴和小鼠CD28交叉反应,然而TAC2386和TAC2387不结合至小鼠CD28。突变构建体意在将TY24863所结合的表位与参考抗体TAC2386和TAC2387区分开。清楚地是, TY24865保持与RE49AA、VY68AA、YS79AA和KT81AA的结合能力,其指示TY24865不结合至RE49、VY68、YS79和KT81残基,且这些残基位于人和小鼠CD28非保守区域。然而TY24865丧失对FR51AA、SL54AA、YL98AA、QN100AA、YF110AA、KI113AA、YP118AA、PPP119AAA、PP120AA、PY121AA和Y122A突变的结合能力,表明其结合抗原表位在这些区域内,例如SEQ ID NO.:1的氨基酸残基51、52、54、55、98-101、110-111、113-114、118-122。

[0464] 表19.表位作图

[0465]	突变体	TY24865	TAC2386	TAC2387
	Hu_WT	+	+	+
	Cyno_WT	+	+	+
	小鼠_WT	+	-	-
	Hu_RE49AA	+	+	-
	Hu_FR51AA	-	-	-
	Hu_SL54AA	-	-	-
	Hu_VY68AA	+	+	-
	Hu_Y69A	+	+	-
	Hu_YS79AA	+	-	+
	Hu_KT81AA	+	-	+
	Hu_YL98AA	-	-	-
	Hu_QN100AA	-	-	-
	Hu_YF110AA	-	-	-
	Hu_KI113AA	-	-	-
	Hu_M117A	+	+	-

Hu_YP118AA	-	+	-
Hu_PPP119AAA	-	+	-
Hu_PP120AA	-	+	-
Hu_PY121AA	-	+	-
Hu_Y122A	-	+	+

[0466] 实施例13:TY24865变体

[0467] 采用两种方法产生TY24865变体。将不同点突变引入TY24865scFv的YYYY序列中,并通过基于酵母的成熟文库筛选发现新批次TY24865 scFv变体。以Fab-scFv-Fc形式构建抗TAA×CD28双特异性抗体,并使用ELISA测量这些bsAb的CD28亲和力。

[0468] 以抗PD-L1 TY21421 Fab(见W0 2019/185035)和TY24865 scFv(VH-VL形式)或其变体的Fab-scFv-Fc形式构建抗PD-L1×CD28双特异性抗体。这些bsAb中部分与CD28的亲和力汇总在表20以及图22A和22B中;TY29815为野生型bsAb,且TY30413与TY29815具有相似的亲和力,然而其他bsAb具有更高或更低的亲和力。

[0469] 表20. 具有TY24865变体的抗PD-L1×CD28 BsAb的构建和表征

BsAb	CD28 scFv	表达量 (mg/L)	SEC 纯度		单点 ELISA	ELISA EC ₅₀ (nM)
			HMW(%)	LMW(%)		
TY29815	VH-VL(YYYY)	54.1	6.4	0.6		22.26
TY30406	VH-VL(YDYY)	37.5	7.2	1.6	更高	
TY30410	VH-VL(YYEY)	23.2	9.5	1.7	更低	
TY30413	VH-VL(YYHY)	60.2	2.8	0.5	未改变	26.81

[0471] 使用VH-VL或VL-VH形式的TY24865 scFv变体构建抗HER2×CD28 bsAb或抗B7-H3×CD28 bsAb。如表21所示,这些bsAb显示出正常表达量和SEC纯度。如图23A和23B所示,通过ELISA测量这些bsAb的CD28亲和力。这些scFv变体显示出多变的亲和力,范围自0.954至417nM,且VL-VH形式的scFv比VH-VL形式的scFv具有更高的亲和力。表22以及图24A和24B中,一些变体对人和小鼠显示出高亲和力,且该亲和力在小鼠T细胞结合检测中得到进一步证实(图25)。

[0472] 表21. 具有TY24865变体的抗HER2×CD28 BsAb的构建和表征

BsAb ID	CD28 scFv (VL-VH)	表达量 (mg/L)	SEC 纯度		EC ₅₀ (nM)
			HMW(%)	LMW(%)	
TY27566	WT	61.7	4.4	0.0	3.89
TY28652	BC8227	60.5	NA	NAA	3.68
TY28653	BC8228	42.2	6.8	0.1	7.30
TY28654	BC8230	59.6	3	0	68.41
TY28655	BC8233	55.2	3.4	0.2	8.14
TY28656	BC8235	70.6	2.7	0	127.7
TY28657	BC8237	67.1	3.3	0	5.29
TY28658	BC8240	67.3	4.9	0	78.02

[0474]

TY28659	BC8242	64	3.4	0.3	0.954
TY28660	BC8257	67.5	4.9	0.4	3.77
TY28661	BC8263	62.8	4.9	0	52.57
BsAb ID	CD28 scFv (VH-VL)	表达量 (mg/L)	SEC 纯度		EC ₅₀ (nM)
			HMW(%)	LMW(%)	
TY29109	WT	73.4	5.1	0.0	30.33
TY29306	BC8227	63.7	1.4	0.6	9.27
TY29307	BC8228	69.3	1.4	0	27.79
TY29308	BC8230	34.1	2.4	0	417.3
TY29309	BC8233	38.6	2	0	27.7
TY29310	BC8235	50.4	2.7	0	348.9
TY29311	BC8237	25.4	3	2.1	91.28
TY29312	BC8240	43.0	2.6	0	624.1
TY29313	BC8242	36.0	2.4	1.8	6.97
TY29314	BC8257	96.5	4	0.9	27.51
TY29315	BC8263	60.5	1.3	0	291.2

[0475] 表22. 具有TY24865变体的抗B7-H3×CD28 BsAb的构建和表征

[0476]

BsAb ID	CD28 scFv (VH-VL)	人 CD28 EC ₅₀ (nM)	小鼠 CD28 EC ₅₀ (nM)
TY29021	WT	36.39	NM
TY30120	BC10599	3.026	74.18
TY30121	BC10601	5.731	108.3
TY30123	BC10621	3.588	96.41

[0477] 仅出于说明目的提供上述非限制性实施例,以便更全面地理解所公开的主题。这些实施例不应被解释为限制本说明书中描述的任何实施例,包括那些涉及抗体、药物组合或用于治疗癌症、神经退行性疾病或传染病的方法和用途。

[0478] 序列

[0479] 本文公开的序列在下表中列出且SEQ ID NOs (SEQ) 在左栏中显示。

[0480]

SEQ	描述	序列
1	人 CD28	MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYS YNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVYGNYSQQLQVYSKTGFN CDGKLGNESVTFYLQNLVYNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKS NGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWLVVVGGVLACYSLLVT VAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRD FAAYRS
2	恒河猴 CD28	MLRLLLALNLLPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYS YNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVYGNYSQQLQVYSKTGFN CDGKLGNESVTFYLQNLVYNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKS NGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWLVVVGGVLACYSLLVT VAFCIFWMRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPR DFAAYRS
3	食蟹猕猴 CD28	MLRLLLALNLLPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYS YNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVYGNYSQQLQVYSKTGFN CDGKLGNESVTFYLQNLVYNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKS NGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWLVVVGGVLACYSLLVT VAFCIFWMRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPR DFAAYRS
4	小鼠 CD28	MTLRLFLALNFFSVQVTENKILVKQSPLLVDNSNEVSLSCRY YNLLAKEFRASLYKGVNSDVEVCVGNGNFTYQPQFRSNAEFN CDGDFDNETVTFRLWNLHVNHDTIYFCKIEFMYPYLDNERS NGTIIHIKEKHLCHTQSSPKLFWLVVVAGVLFYGLLVTV CUIWTNSRRNRLQSDYMNMTPRRPGPTRKPYQPYAPARDF AYRP
未经遮蔽抗 CD28 抗体		
抗 CD28 mAb (TY24865)		
5	HCDR1	TGGVGVS
6	HCDR2	EIYHSGSTYYSPSLKS
7	HCDR3	YEYYYYDFDY
8	LCDR1	RASQSVDFHGISFLH
9	LCDR2	AASSLQS
10	LCDR3	QQSYRSPRT
11	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTGGVGVS WIRQAPGKGLEWIGEYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDN SKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCARYEYYYYDFDYWGQ GTLVTVSS
12	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSVDFHGISFL HWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQSYRSPRTFGQGTKVEIK
13	HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTGGVGVS WIRQAPGKGLEWIGEYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDN SKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCARYEYYYYDFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSV

[0481]

		FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLK
14	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSVDFHGISFLHWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYRSPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
抗 CD28 mAb (TY24853)		
15	HCDR1	SGHHWS
6	HCDR2	EIYHSGSTYYSPSLKS
16	HCDR3	KDDYYAFDY
17	LCDR1	RASESVDFYGISFLH
18	LCDR2	AASTLQS
19	LCDR3	QQSYRTPIT
20	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITSGHHWSWIRQAPGKGLEWIGEIIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDNKNTLYLQLNSLR AEDTAVYYCARKDDYYAFDYWGQGLTVTVSS
21	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASESVDFYGISFLHWYQQKP GKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYRTPITFGQGTKVEIK
22	HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITSGHHWSWIRQAPGKGLEWIGEIIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDNKNTLYLQLNSLR AEDTAVYYCARKDDYYAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLK
23	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASESVDFYGISFLHWYQQKP GKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYRTPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
抗 CD28 mAb (TY24854)		
24	HCDR1	SGYHWG
6	HCDR2	EIYHSGSTYYSPSLKS
25	HCDR3	RRGDGYFDF
26	LCDR1	RASQSVDFLGISFLH
27	LCDR2	DASNRAT
28	LCDR3	QQSYRTPIT
29	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITSGYHWGWIRQAPGKGLEWIGEIIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDNKNTLYLQLNSLR AEDTAVYYCARRRGDGYFDFWGQGLTVTVSS
30	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSVDFLGISFLHWYQQKP

[0482]

		GKAPKLLIYDASN RATGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQSYRTPLTFGQGTKVEIK
31	HC	EVQLVESGGGLVQP GGSRLRLSCAASGYSITSYHGWIRQAP GKGLEWIGEIIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDN SKNTLYLQLNSL RAEDTAVYYCARRRGDGYFDFWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDK RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHE ALHNHYTQKSLSLGLK
32	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSVDFLGISFLHWYQQKP GKAPKLLIYDASN RATGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQSYRTPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
抗 CD28 mAb (TY24859)		
33	HCDR1	TGGVGVG
6	HCDR2	EIYHSGSTYYSPSLKS
35	HCDR3	YGYSYYALDY
36	LCDR1	SASSSVGYVQ
37	LCDR2	DASNLET
38	LCDR3	QQSYTSPRT
39	VH	EVQLVESGGGLVQP GGSRLRLSCAASGFSLSLSTGGVGVGWIRQA PGKGLEWIGEIIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDN SKNTLYLQLNS LRAEDTAVYYCARYGYSYYALDYWGQGLTVTVSS
40	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCSASSSVGYVQWYQQKPGKAP KLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QSYTSPRTFGQGTKVEIK
41	HC	EVQLVESGGGLVQP GGSRLRLSCAASGFSLSLSTGGVGVGWIRQA PGKGLEWIGEIIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDN SKNTLYLQLNS LRAEDTAVYYCARYGYSYYALDYWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTK VDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCTVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLGLK
42	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCSASSSVGYVQWYQQKPGKAP KLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QSYTSPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
抗 CD28 mAb (TY24860)		
43	HCDR1	TSGVGVS
6	HCDR2	EIYHSGSTYYSPSLKS
44	HCDR3	KGYYYAFDY
45	LCDR1	RASQDIGSFLA
9	LCDR2	AASSLQS
46	LCDR3	QQSYRSPPT

[0483]

47	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTSGVGVSWIRQAP GKGLEWIGEIIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDNKNTLYLQLNSL RAEDTAVYYCARKGYYYYAFDYWGPGTLTVTVSS
48	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDIGSFLAWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QSYRSPPTFGQGTKVEIK
49	HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTSGVGVSWIRQAP GKGLEWIGEIIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDNKNTLYLQLNSL RAEDTAVYYCARKGYYYYAFDYWGPGTLTVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK
50	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDIGSFLAWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QSYRSPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
抗 CD28 mAb (TY24866)		
33	HCDR1	TGGVGVG
51	HCDR2	EIYHSGSTYYPPSLKS
52	HCDR3	YEYSSYGLDY
53	LCDR1	RASQDIRKFLA
300	LCDR2	DASSLES
10	LCDR3	QSYRSPRT
54	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTGGVGVGWIRQA PGKGLEWIGEIIYHSGSTYYPPSLKSRVTISRDNKNTLYLQLNS LRAEDTAVYYCARYEYSSYGLDYWGQGTTLTVTVSS
55	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDIRKFLAWYQQKPGKAP KLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QSYRSPRTFGQGTKVEIK
56	HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTGGVGVGWIRQA PGKGLEWIGEIIYHSGSTYYPPSLKSRVTISRDNKNTLYLQLNS LRAEDTAVYYCARYEYSSYGLDYWGQGTTLTVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK
57	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDIRKFLAWYQQKPGKAP KLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QSYRSPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
抗 CD28 mAb (TY24869)		
24	HCDR1	SGYHWG
58	HCDR2	AIYHSGSTYYSPSLKS
59	HCDR3	SGLVYYAFDY

[0484]

60	LCDR1	RASQGIGSYLA
300	LCDR2	DASSLES
61	LCDR3	QYSTSPLT
62	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSISSGYHWGWIRQAP GQGLEWIGAIYHSGSTYYSPSLKSRVTITADKSTSTAYMELSSL RSED TAVYYCARSGLVYYAFDYWGQGLTVTVSS
63	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGIGSYLAWYQQKPGKA PKLLIYDASSLESVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC QYSTSPLTFGQGTKVEIK
64	HC	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSISSGYHWGWIRQAP GQGLEWIGAIYHSGSTYYSPSLKSRVTITADKSTSTAYMELSSL RSED TAVYYCARSGLVYYAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLK
65	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGIGSYLAWYQQKPGKA PKLLIYDASSLESVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC QYSTSPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTY LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
抗 CD28 mAb (TY24871)		
66	HCDR1	SYAIIH
67	HCDR2	SIYHSGSTYYSPSLKS
68	HCDR3	DVYGSYALDV
69	LCDR1	RASQSVD F D G I S F L H
300	LCDR2	DASSLES
70	LCDR3	QQSYRSPIT
71	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFSSYAIHWVRQAPG QGLEWIGSIYHSGSTYYSPSLKSRVTITADKSTSTAYMELSSLR SED TAVYYCARDVYGSYALDVWGQGLTVTVSS
72	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSVD F D G I S F L H W Y Q Q K P GKAPKLLIYDASSLESVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFAT YYCQQSYRSPITFGQGTKVEIK
73	HC	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFSSYAIHWVRQAPG QGLEWIGSIYHSGSTYYSPSLKSRVTITADKSTSTAYMELSSLR SED TAVYYCARDVYGSYALDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDK RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLGLK
74	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSVD F D G I S F L H W Y Q Q K P GKAPKLLIYDASSLESVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFAT YYCQQSYRSPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGE C

[0485]

抗 CD28 mAb (TY24773)		
24	HCDR1	SGYHWG
6	HCDR2	EIYHSGSTYYSPSLKS
75	HCDR3	KDYYYALDY
76	LCDR1	RASQSVDFYGKSFLH
18	LCDR2	AASTLQS
28	LCDR3	QSYRTPLT
77	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSISSGYHWGWIRQAP GKGLEWIGEIIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDNKNTLYLQLNSL RAEDTAVYYCARKDYYYALDYWGQGTLLTVSS
78	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSVDFYGKSFLHWYQQK PGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYQCQSYRTPLTFGQGTKEIK
79	HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSISSGYHWGWIRQAP GKGLEWIGEIIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDNKNTLYLQLNSL RAEDTAVYYCARKDYYYALDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLK
80	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSVDFYGKSFLHWYQQK PGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYQCQSYRTPLTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
抗 CD28 mAb (TY24876)		
24	HCDR1	SGYHWG
58	HCDR2	AIYHSGSTYYSPSLKS
81	HCDR3	GPLSYAFDY
82	LCDR1	RASQSVSRYLA
27	LCDR2	DASNRAT
83	LCDR3	QYYRSPIT
84	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSITSGYHWGWIRQAP GQGLEWIGAIYHSGSTYYSPSLKSRVTITADKSTSTAYMELSSL RSEDVAVYYCARGPLSYAFDYWGQGTLLTVSS
85	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSVSRYLAWYQQKPGKA PKLLIYDASNRATGIPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QYYRSPITFGQGTKEIK
86	HC	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSITSGYHWGWIRQAP GQGLEWIGAIYHSGSTYYSPSLKSRVTITADKSTSTAYMELSSL RSEDVAVYYCARGPLSYAFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLK
87	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSVSRYLAWYQQKPGKA

[0486]

		PKLLIYDASNRATGIPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QYYRSPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
抗 CD28 mAb (TY24878)		
88	HCDR1	TGGVAVA
89	HCDR2	QIYYSGSTYYNPSLKS
90	HCDR3	SSAHYYFDV
91	LCDR1	RASESVDFQGISFLD
300	LCDR2	DASSLES
70	LCDR3	QSYRSPIT
92	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFSLSLTGGVAVAWIRQA PGQGLEWIGQIYYSGSTYYNPSLKSRTITADKSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARSSAHYYFDVWGQGLTVTVSS
93	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASESVDFQGISFLDWYQQKP GKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQSYRSPITFGQGTKVEIK
94	HC	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFSLSLTGGVAVAWIRQA PGQGLEWIGQIYYSGSTYYNPSLKSRTITADKSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARSSAHYYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLK
95	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASESVDFQGISFLDWYQQKP GKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQSYRSPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGE C
抗 CD28 mAb (TY24879)		
24	HCDR1	SGYHWG
96	HCDR2	SIYHSGSTYYNPSLKS
97	HCDR3	SGLRYYAFDV
98	LCDR1	AASQDVSTAVA
9	LCDR2	AASSLQS
70	LCDR3	QSYRSPIT
99	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSISSGYHWGWIRQAP GQGLEWIGSIYHSGSTYYNPSLKSRTITADKSTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCARSGLRYYAFDVWGQGLTVTVSS
100	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCAASQDVSTAVAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QSYRSPITFGQGTKVEIK
101	HC	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSISSGYHWGWIRQAP GQGLEWIGSIYHSGSTYYNPSLKSRTITADKSTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCARSGLRYYAFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP

[0487]

		REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLGK
102	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCAASQDVSTAVAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYC QQSYRSPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
抗 CD28 mAb (TY24884)		
103	HCDR1	GYAIH
104	HCDR2	QIYHSGSTYYNPSLKS
105	HCDR3	SGYGGYDFDY
106	LCDR1	RASQSVPRRYLA
18	LCDR2	AASTLQS
83	LCDR3	QQYYRSPIT
107	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFSGYAIHWVRQAPG QGLEWIGQIYHSGSTYYNPSLKSRTITADKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCARSGYGGYDFDYWGQGLTVTVSS
108	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSVPRRYLAWYQQKPGK APKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYY CQQYYRSPITFGQGTKVEIK
109	HC	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFSGYAIHWVRQAPG QGLEWIGQIYHSGSTYYNPSLKSRTITADKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCARSGYGGYDFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDK RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLGLGK
110	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSVPRRYLAWYQQKPGK APKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYY CQQYYRSPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
抗 CD28 mAb (TY24890)		
111	HCDR1	SGHHWG
6	HCDR2	EIYHSGSTYYSPSLKS
112	HCDR3	RELGYAYFDY
113	LCDR1	RASQDIRKYLA
18	LCDR2	AASTLQS
114	LCDR3	QQYYRTPLT
115	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSISSGHHWGWRQAP GKGLEWIGEIYHSGSTYYSPSLKSRTISRDNKNTLYLQLNSL RAEDTAVYYCARRELGYAYFDYWGQGLTVTVSS
116	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIRKYLAWYQQKPGQA PRLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYC QQYYRTPLTFGQGTKVEIK
117	HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSISSGHHWGWRQAP GKGLEWIGEIYHSGSTYYSPSLKSRTISRDNKNTLYLQLNSL RAEDTAVYYCARRELGYAYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVD

[0488]

		KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVHLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
118	LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIRKYLAWYQQKPGQAPRLLIYAASLTQSGVPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQYYRTPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
抗 CD28 mAb (TY24856)		
15	HCDR1	SGHHWS
6	HCDR2	EIYHSGSTYYSPSLKS
119	HCDR3	RDFGASYFDY
120	LCDR1	RASQGVGPWLA
9	LCDR2	AASSLQS
121	LCDR3	QQYYSYST
122	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSISSGHHWSWIRQAPGKGLEWIGEIIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDNKNTLYLQLNSLR AEDTAVYYCARRDFGASYFDYWGQGTLLTVSS
123	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGVGPWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYSYSTFGQGTKVEIK
124	HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSISSGHHWSWIRQAPGKGLEWIGEIIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDNKNTLYLQLNSLR AEDTAVYYCARRDFGASYFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVHLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
125	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGVGPWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYSYSTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
抗 CD28 mAb (TY24881)		
126	HCDR1	TGGVGV
67	HCDR2	SIYHSGSTYYSPSLKS
127	HCDR3	YDYGYSFDV
128	LCDR1	RASQSVDFDAFSFLA
18	LCDR2	AASLTQS
129	LCDR3	QQSYSAST
130	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFSLSLTGGVGVTVIRQAPGQGLEWIGSIYHSGSTYYSPSLKSRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYDYGYSFDVWGQGTLLTVSS
131	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVDFDAFSFLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSASTFGQGTKVEIK
132	HC	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFSLSLTGGVGVTVIRQAPGQGLEWIGSIYHSGSTYYSPSLKSRVTITADKSTSTAYMELSS

[0489]

		LRSEDTAVYYCARYDYGYYSFVWVGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLK
133	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSVDFDAFSLAWYQQKP GKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQSYSASTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
抗 CD28 mAb (TY24858)		
134	HCDR1	SGHHWT
6	HCDR2	EIYHSGSTYYSPSLKS
135	HCDR3	RDYGSSYFDY
136	LCDR1	RASQSVSRFLA
27	LCDR2	DASNRAT
83	LCDR3	QQYYRSPIT
137	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSISSGHHWTWIRQAPG KGLEWIGEIIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDNKNTLYLQLNSLR AEDTAVYYCARRDYGSSYFDYWGQGLTVTVSS
138	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSVSRFLAWYQQKPGK APKLLIYDASNRTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYYRSPITFGQGTKVEIK
139	HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSISSGHHWTWIRQAPG KGLEWIGEIIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDNKNTLYLQLNSLR AEDTAVYYCARRDYGSSYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDK RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHE ALHNHYTQKSLSLGLK
140	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSVSRFLAWYQQKPGK APKLLIYDASNRTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYYRSPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
抗 CD28 mAb (TY24864)		
43	HCDR1	TSGVGVS
58	HCDR2	AIYHSGSTYYSPSLKS
141	HCDR3	YGYSYYAFDY
142	LCDR1	RASQTIGSFLN
300	LCDR2	DASSLES
143	LCDR3	QQSYSYQT
144	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTSGVGVS WIRQAP GKGLEWIGAIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDNKNTLYLQLNSL RAEDTAVYYCARYGYSYYAFDYWGQGLTVTVSS
145	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQTIGSFLN WYQQKPGKAP KLLIYDASSLES GVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ

[0490]

		QSYSYQTFGQGTKVEIK
146	HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTSGVGVSWIRQAP GKGLEWIGAIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDN SKNTLYLQLNSL RAEDTAVYYCARYGYSYAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLK
147	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQTIGSFLN WYQQKPGKAP KLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QSYSYQTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
抗 CD28 mAb (TY24877)		
148	HCDR1	NYGIH
6	HCDR2	EIYHSGSTYYSPSLKS
149	HCDR3	GPLSYALDY
150	LCDR1	RASQSIRRFNL
300	LCDR2	DASSLES
83	LCDR3	QYYRSPIT
151	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYGIHWVRQAPG QGLEWIGEIYHSGSTYYSPSLKSRVTITADKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCARGPLSYALDYWGQGLTVTVSS
152	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSIRRFNL WYQQKPGKAP KLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QYYRSPITFGQGTKVEIK
153	HC	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYGIHWVRQAPG QGLEWIGEIYHSGSTYYSPSLKSRVTITADKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCARGPLSYALDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDK RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHE ALHNHYTQKSLSLGLK
154	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSIRRFNL WYQQKPGKAP KLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QYYRSPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLS SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
抗 CD28 mAb (TY24855)		
15	HCDR1	SGHHWS
155	HCDR2	DIYHSGSTYYNPSLKS
16	HCDR3	KDDYYAFDY
156	LCDR1	RAPQSVDFHGKSFLH
27	LCDR2	DASNRAT
70	LCDR3	QQSYRSPIT
157	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITS GHHWSWIRQAPG KGLEWIGDIYHSGSTYYNPSLKSRVTISRDN SKNTLYLQLNSLR

[0491]

		AEDTAVYYCARKDDYYAFDYWGQGLTVTVSS
158	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRAPQSVDFHGSFLHWYQQKPGKAPKLLIYDASNRATGIPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYRSPITFGQGTKVEIK
159	HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITSGHHWSWIRQAPGKGLEWIGDIYHSGSTYYNPSLKSRTISRDN SKNTLYLQLNSLR AEDTAVYYCARKDDYYAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLK
160	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRAPQSVDFHGSFLHWYQQKPGKAPKLLIYDASNRATGIPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYRSPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
抗 CD28 mAb (TY24857)		
161	HCDR1	TSGVAVG
6	HCDR2	EIYHSGSTYYSPSLKS
162	HCDR3	HGYHYALDY
163	LCDR1	PASQDVGTA
300	LCDR2	DASSLES
164	LCDR3	QQYYSSPPT
165	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTSGVAVGWIRQAPGKGLEWIGEIIYHSGSTYYSPSLKSRTISRDN SKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCARHGYHYALDYWGQGLTVTVSS
166	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCPASQDVGTA VAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYSSPPTFGQGTKVEIK
167	HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTSGVAVGWIRQAPGKGLEWIGEIIYHSGSTYYSPSLKSRTISRDN SKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCARHGYHYALDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLK
168	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCPASQDVGTA VAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYSSPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
未经遮蔽双特异性抗体		
HER2×CD28 双特异性抗体—(亲本—TY24865)		
TY27566		
169	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDV SIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC

		QYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
170	HC-A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDWRQAPG KGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRKKLTKNQVKLTCLVKGFPYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDGDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
171	HC-B	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSVDFHGISFLHWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQQSYRSPRTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSLTGGVGVSWIRQAP GKGLEWIGEIIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDNKNTLYLQNLN RAEDTAVYYCARYEYDYDFDYWGQGTLLTVSSEPKSSDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVDVDS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY DPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQPENYK TPPVLDSDGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMEALHNH YTQDSLSLSPGK
TY27881		
169	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSGVAVYQQKPGKA PKLLIYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
170	HC-A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDWRQAPG KGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRKKLTKNQVKLTCLVKGFPYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDGDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
172	HC-B	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSVDFYGKSFLHWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYCQQSYRSPRTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSLTGGVGVSWIRQA PGKGLEWIGEIIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDNKNTLYLQNLN LRVEDTAVYYCARDEYDYAFDYWGQGTLLTVSSEPKSSDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQPENYK TPPVLDSDGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMEALHN HYTQDSLSLSPGK

[0492]

[0493]

TROP2×CD28 双特异性抗体		
TY27571		
173	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDVSI(A)AWYQQKPGKA PKLLIYSASYRYTGVPARFSGSGSGTDFTLTIS(L)LPEDFATYYC QQHYITPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS(T)YS LSSTLTLSKADYE(K)HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
174	HC-A	QVQL(L)QSGSELKPKGASVKV(S)CKASGYTFTNYGINWVRQAPG QGLEW(L)LGWIHTYTG(E)PTYTDDFKGRFV(S)SLDTSVSTAYLQ(I)SS LKADDTAVYYCARGGFGSSYWF(D)VWGQGLTVTVSSAST(K)G PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP(V)TVSWNSGAL(T)S GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV(V)TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK(P)KDTLMI SRTPEVTCV(V)VDVSHEDPEVKFNWY(V)DVGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQD(W)LNGKEYKCKV(S)NKALPAPIEK(T)I SKAKGQPREPQVYTLPPSRKKLT(K)NQVKLTCLV(K)GFYPSDIAV EWESNGQPENNYK(T)TPPVLD(D)CDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSC(S)VMHEALHNHYTQ(K)SLSLSPGK
171	HC-B	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSVDFHGISFLHWYQQK(P) GKAPKLLIY(A)ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS(L)LPEDFAT YYCQQSYRSPRTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGG(S) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS(C)AASGFS(L)STGGVGVSWIRQAP GKGLEWIGEIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDN(S)KNTLYLQ(L)NSL RAEDTAVYYCARYEY(Y)YDFDYWGQGLTVTVSSEP(K)SSDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK(P)KDTLMI(S)RTPEVTCV(V)VDVS HEDPEVKFNWY(V)DVGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTV LHQD(W)LNGKEYKCKV(S)NKALPAPIEK(T)ISKAKGQPREPQVY(T) DPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQPENCY(K)T TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC(S)VMHEALHNH YTQDSL(S)SLSPGK
B7H3×CD28 双特异性抗体		
TY27556		
175	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSIRKYL(N)WYQQKPGKAP KLLIY(A)ASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS(L)LPEDFATYFCS QGTHVPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS(T)SYL SSTLTLSKADYE(K)HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
176	HC-A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS(C)AASGFTFSGYGIHWVRQAPG KGLEWIGWISPSGGDTKYAQKFQGRVTISRDN(S)KNTLYLQ(L)NS LRAEDTAVYYCARGGTVVYFDYWGGQGLTVTVSSAST(K)GPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP(V)TVSWNSGAL(T)SGVH TFPAVLQSSGLYSLSSV(V)TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK(V)D KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK(P)KDTLMI(S)RT PEVTCV(V)VDVSHEDPEVKFNWY(V)DVGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVVSVLTVLHQD(W)LNGKEYKCKV(S)NKALPAPIEK(T)ISKA KGQPREPQVYTLPPSRKKLT(K)NQVKLTCLV(K)GFYPSDIAVEWE SNGQPENNYK(T)TPPVLD(D)CDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQ(K)SLSLSPGK
171	HC-B	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSVDFHGISFLHWYQQK(P) GKAPKLLIY(A)ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS(L)LPEDFAT YYCQQSYRSPRTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGG(S) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS(C)AASGFS(L)STGGVGVSWIRQAP GKGLEWIGEIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDN(S)KNTLYLQ(L)NSL RAEDTAVYYCARYEY(Y)YDFDYWGQGLTVTVSSEP(K)SSDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK(P)KDTLMI(S)RTPEVTCV(V)VDVS

[0494]

		HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT DPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQPENCYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNH YTQDSLSPGK
TY26999		
175	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSIRKYLWYQQKPGKAP KLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYFCS QGTHVPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
176	HC-A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGIHWVRQAPG KGLEWIGWISPSGGDTKYAQKFQGRVTISRDNSKNTLYLQLNS LRAEDTAVYYCARGGTVVYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRKRLTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMEALHNHHTQKSLSPGK
177	HC-B	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYPNWVQQKP GQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDE AEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAINWVR QAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYAESVKGRFTISRDDSKNT LYLQINSLRAEDTAVYYCVRHGNFGTSYVSWFAYWGQGLV TVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWE SNGQPENCYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMEALHNHHTQDSLSPGK

[0495]

遮蔽性单元(MU)	
SEQ ID NO:	序列
178	ASDLYVCAHDPYFCHS
179	PNVFDTCYVDPYSCTI
180	YAAAPSCPPANYCAD
181	HHADPLCFAQHSACNT
182	YDTHDYCLIHYSCTD
183	ADFAPYCYADPYCHD
184	DIASDSCYYHPNHCDT
185	AATYSDCYSDPYACHD
186	PTYDHDCAVYNNFCNA
187	HNHALTCYTDPYACHS
188	AAFSPACYTDPYSCHA
189	TPHPDACFVDPYHCHT
190	APSDAYCYADPYACHT
191	AVDDDPCYTDPYQCTA

[0496]

192	THSDAVCAPDHAYCLY
193	PYIYVDCYAPPFCAAY
194	YFCAEGVPIVLCIG
195	DYCEGPPAFFYCAK
196	FPCEPLADPFLCRQ
197	LVCEDVPFPAACRA
198	ALCEFYAFPYFCAR
199	IVCKYFDDPFLCRR
200	YFCPVRVPLAVCLR
201	PSCP DYVPFPVCAQ
202	VACAKAFAYVYCLV
203	VLCGDSVPFLLCEP
204	ILCPEGVPVVFVCL
205	SDCGLGVPLLVLCK
206	TDCGIPFPVDDCLS
207	HIPDHYCAADHHYCY
208	AATYSDCYSDPYACHD
209	YSDCYSDPYACHD
210	AAFSPACYTDPYSCHA
211	SPACYTDPYSCHA

[0497]

遮蔽性肽组分		
SEQ ID NO:	描述	序列
212	N-terminal Unit	EVGSY
213	Linkage Unit(LU)	GGGPLGLAGSGGS
214	Linkage Unit(LU)	SGGGPLGLAGSGGS

[0498]

SEQ ID NO:	样本 ID 名称	遮蔽性肽+裂解肽序列:	SEQ ID NO			
			LC	HC	MU	LU
215	TY26142	<u>EVGSYASDLYVCAHDPYFCHSGGGPLGLAGSGGS</u>	14	13	171	213
216	TY26143	<u>EVGSYPNVFDTCYVDPYSCTIGGGPLGLAGSGGS</u>	14	13	172	213
217	TY26144	<u>EVGSYAAAPSCPPANYCADGGGPLGLAGSGGS</u>	14	13	173	213
218	TY26145	<u>EVGSYHHADPLCFAQHSACNTGGGPLGLAGSGGS</u>	14	13	174	213
219	TY26146	<u>EVGSYDTHDYCLIHYHSCDTGGGPLGLAGSGGS</u>	14	13	175	213
220	TY26147	<u>EVGSYADFAPYCYADPYCHDGGGPLGLAGSGGS</u>	14	13	176	213
221	TY26148	<u>EVGSYDIASDSCYYHPNHCDTGGGPLGLAGSGGS</u>	14	13	177	213
222	TY26149	<u>EVGSYAATYSDCYSDPYACHDGGGPLGLAGSGGS</u>	14	13	178	213

[0499]

SEQ ID NO:	样本 ID 名称	遮蔽性肽+裂解肽序列:	SEQ ID NO			
223	TY26150	<u>EVGSYPTYDHDCAVYNNFCNAGGGPLG</u> <u>LAGSGGS</u>	14	13	179	213
224	TY26151	<u>EVGSYHNHALTCYTDPYACHSGGGPLG</u> <u>LAGSGGS</u>	14	13	180	213
225	TY26152	<u>EVGSYAAFSPACYTDPYSCHAGGGPLGL</u> <u>AGSGGS</u>	14	13	181	213
226	TY26153	<u>EVGSYTPHPDACFVDPYHCHTGGGPLG</u> <u>LAGSGGS</u>	14	13	182	213
227	TY26154	<u>EVGSYAPSDAYCYADPYACHTGGGPLGL</u> <u>AGSGGS</u>	14	13	183	213
228	TY26155	<u>EVGSYAVDDDPCTDPYQCTAGGGPLG</u> <u>LAGSGGS</u>	14	13	184	213
229	TY26156	<u>EVGSYTHSDAVCAPDHAYCLYGGGPLGL</u> <u>AGSGGS</u>	14	13	185	213
230	TY26157	<u>EVGSYPYIYVDCYAPFFFCAYGGGPLGL</u> <u>AGSGGS</u>	14	13	186	213
231	TY26158	<u>EVGSYYFCAEGVPIVLCIGGGPLGLAG</u> <u>SGGS</u>	14	13	187	213
232	TY26159	<u>EVGSYDYCEGPPAFFYCAKGGGPLGLA</u> <u>GSGGS</u>	14	13	188	213
233	TY26160	<u>EVGSYFPCPEPLADPFPCRQGGGPLGLAG</u> <u>SGGS</u>	14	13	189	213
234	TY26161	<u>EVGSYLVCEDVPFPAACRAGGGPLGLAG</u> <u>SGGS</u>	14	13	190	213
235	TY26162	<u>EVGSYALCEFYAFPYFCARGGGPLGLAG</u> <u>SGGS</u>	14	13	191	213
236	TY26163	<u>EVGSYIVCKYFDDPFPCRGGGPLGLAG</u> <u>SGGS</u>	14	13	192	213
237	TY26164	<u>EVGSYFPCPVRVPLAVCLRGGGPLGLAG</u> <u>SGGS</u>	14	13	193	213
238	TY26165	<u>EVGSYPSCPDYVPFPVCAQGGGPLGLAG</u> <u>SGGS</u>	14	13	194	213
239	TY26166	<u>EVGSYVACAKAFAYVYCLVGGGPLGLA</u> <u>GSGGS</u>	14	13	195	213
240	TY26167	<u>EVGSYVLCGDSVPFLLCEPGGGPLGLAG</u> <u>SGGS</u>	14	13	196	213
241	TY26168	<u>EVGSYILCPEGVPVVFVCLGGGPLGLAG</u> <u>SGGS</u>	14	13	197	213
242	TY26169	<u>EVGSYSDCGLGVPLLCLKGGGPLGLA</u> <u>GSGGS</u>	14	13	198	213
243	TY26170	<u>EVGSYTDCGIPFPVDDCLSGGGPLGLAG</u> <u>SGGS</u>	14	13	199	213
244	TY26171	<u>EVGSYHIPDHYCAADHHYCYGGGPLG</u> <u>LAGSGGS</u>	14	13	200	213
245	TY28338	<u>EAATYSDCYSDPYACHDSGGGPLGLAG</u> <u>SGGS</u>	14	13	201	214

[0500]

SEQ ID NO:	样本 ID 名称	遮蔽性肽+裂解肽序列:	SEQ ID NO			
246	TY28339	<u>EYSDCYSDPYACHDSGGG</u> <u>PLGLAGSGG</u> <u>S</u>	14	13	202	214
247	TY28341	<u>EAAFSPACYTDPY</u> <u>SCHAGGG</u> <u>PLGLAGS</u> <u>GG</u> <u>S</u>	14	13	203	213
248	TY28342	<u>ESPACYTDPY</u> <u>SCHAGGG</u> <u>PLGLAGS</u> <u>GG</u> <u>S</u>	14	13	204	213

[0501]

SEQ	柔性接头
249	GGGGS
250	GGGGT
251	SGGS
252	GGSG
253	GGSGG
254	GSGSG
255	GSGGG
256	GGGSG
257	GSSSG

[0502]

经遮蔽双特异性抗体		
HER2×CD28 双特异性抗体—(亲本—TY24865)		
TY27566		
258	LCDR1	KASQDVSIQVA
259	LCDR2	SASYRYT
260	LCDR3	QYYIYPYT
261	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIQVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGTKVEIK
262	HCDR1-A	DYTMD
263	HCDR2-A	DVNPNSGSGSIYNQRFKG
264	HCDR3-A	NLGPSFYFDY
265	VH-A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDVVRQAPGKGLIEWVADVNPNSGSGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLLTVSS
5	HCDR1-B	TGGVGVVS
6	HCDR2-B	EIYHSGSTYYSPSLKS
7	HCDR3-B	YEYYYYDFDY
8	LCDR1-B	RASQSVDFHGISFLH
9	LCDR2-B	AASSLQS
10	LCDR3-B	QSYRSPRT
266	scFv-B	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVDFHGISFLHWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYRSPRTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFLSTGGVGVSWIRQAPGKGLEWIGEIIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDNKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCARYEYYYYDFDYWGQGTLLTVSS
TY27807		
267	LCDR1	RASQDVNTAVA
268	LCDR2	SASFLYS
269	LCDR3	QHYTTPPT

[0503]

270	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKL LIYSASFVLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQHYTTP PTFGQGTKVEIK
271	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKL LIYSASFVLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQHYTTP PTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
272	HCDR1-A	DTYIH
273	HCDR2-A	RIYPTNGYTRYADSVKG
274	HCDR3-A	WGGDGFYAMDY
275	VH-A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSS
276	HC-A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKKLTKNQVKLT CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
5	HCDR1-B	TGGVGVS
6	HCDR2-B	EIYHSGSTYYSPSLKS
7	HCDR3-B	YEYYYYDFDY
8	LCDR1-B	RASQSVDFHGISFLH
9	LCDR2-B	AASSLQS
10	LCDR3-B	QQSYRSPRT
266	scFv-B	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSVDFHGISFLHWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSRSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQSYR SPRTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFSLSLTGGVGVSQWIRQAPGKGLEWIGEYHSGST YYSPSLKSRVTISRDNSTLYLQLNSLRAEDTAVYYCARYEYYYY DFDYWGQGTLLTVSS
171	HC-B	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSVDFHGISFLHWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSRSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQSYR SPRTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFSLSLTGGVGVSQWIRQAPGKGLEWIGEYHSGST YYSPSLKSRVTISRDNSTLYLQLNSLRAEDTAVYYCARYEYYYY DFDYWGQGTLLTVSSSEPSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQP ENCYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQDSLSLSPGK
TROP2×CD28 双特异性抗体		
TY27571		
277	LCDR1-A	RASQDVSIAVA
259	LCDR2-A	SASYRYT
278	LCDR3-A	QQHYITPLT
279	VL-A	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDVSIAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASYRYTGVPARFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQHYITPL TFGQGTKVEIK

[0504]

280	HCDR1-A	NYGIN
281	HCDR2-A	WIHTYTGEPTYTDDFKG
282	HCDR3-A	GGFGSSYWYFDV
283	VH-A	QVQLLQSGSELKPKPGASVKVSCASGYTFTNYGINWVRQAPGQGLE WLGWHTYTGEPTYTDDFKGRFVSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAV YYCARGGFGSSYWYFDVWGQGLTVTVSS
5	HCDR1-B	TGGVGVS
6	HCDR2-B	EIYHSGSTYYSPSLKS
7	HCDR3-B	YEYYYYDFDY
8	LCDR1-B	RASQSVDFHGISFLH
9	LCDR2-B	AASSLQS
10	LCDR3-B	QSYRSPRT
266	scFv-B	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSVDFHGISFLHWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYR SPRTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFSLSLTGGVGVSQWIRQAPGKGLEWIGEYHSGST YYSPSLKSRVTISRDNKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCARYEYYYY DFDYWGQGLTVTVSS
B7H3×CD28 双特异性抗体		
TY27556		
287	LCDR1-A	RASQSIRKYLN
18	LCDR2-A	AASTLQS
288	LCDR3-A	QGTHVPFT
289	VL-A	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSIRKYLNWYQQKPGKAPKLLI YAASTLQSGVPSRFSGSGGTDFLTISLQPEDFATYFCSQGTHVPFT FGQGTKVEIK
290	HCDR1-A	GYGIH
291	HCDR2-A	WISPSGGDTKYAQKFQG
292	HCDR3-A	GGTVVYFDY
293	VH-A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGIHWVRQAPGKGLE WIGWISPSGGDTKYAQKFQGRVTISRDNKNTLYLQLNSLRAEDTA VYYCARGGTVVYFDYWGQGLTVTVSS
5	HCDR1-B	TGGVGVS
6	HCDR2-B	EIYHSGSTYYSPSLKS
7	HCDR3-B	YEYYYYDFDY
8	LCDR1-B	RASQSVDFHGISFLH
9	LCDR2-B	AASSLQS
10	LCDR3-B	QSYRSPRT
266	scFv-B	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSVDFHGISFLHWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYR SPRTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFSLSLTGGVGVSQWIRQAPGKGLEWIGEYHSGST YYSPSLKSRVTISRDNKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCARYEYYYY DFDYWGQGLTVTVSS
B7H3×CD3 双特异性抗体		
TY26999		
287	LCDR1-A	RASQSIRKYLN
18	LCDR2-A	AASTLQS
288	LCDR3-A	QGTHVPFT
289	VL-A	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSIRKYLNWYQQKPGKAPKLLI YAASTLQSGVPSRFSGSGGTDFLTISLQPEDFATYFCSQGTHVPFT FGQGTKVEIK
290	HCDR1-A	GYGIH
291	HCDR2-A	WISPSGGDTKYAQKFQG

[0505]

292	HCDR3-A	GGTVVYFDY
293	VH-A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGIHWVRQAPGKGLE WIGWISPSGGDTKYAQKFQGRVTISRDN SKNTLYLQLNSLRAEDTA VYYCARGGTVVYFDYW GQGTLTVSS
5	HCDR1-B	TYAIN
294	HCDR2-B	RIRSKYNNYATYYAESVKG
295	HCDR3-B	HGNFGTSYVSWFAY
296	LCDR1-B	GSSTGAVTTSNYPN
297	LCDR2-B	GTNKRAP
298	LCDR3-B	ALWYSNLWV
299	scFv-B	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYPNWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCAL WYSNLWVFGG GTKLTVLGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAINWVRQAPGKGLEWVGRIRS KYN NYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQINSLRAEDTAVYYCV RHGNFGTSYVSWFAYWGQGTLTVSS

[0506]

SEQ NO:	ID	IgG ID	遮蔽性肽+裂解肽序列:
301		TY26149	EVGSYAATYSDCYSDPYACH <u>DG</u> GGGPLGLAGSGGS
302		TY28338	EAATYSDCYSDPYACHDSGGGPLGLAGSGGS
303		TY28339	EYSDCYSDPYACHDSGGGPLGLAGSGGS
304		TY26152	EVGSYA AFSPACYTDPY SCHAGGGPLGLAGSGGS
305		TY28341	EAAFSPACYTDPY SCHAGGGPLGLAGSGGS
306		TY28342	ESPCY TDPY SCHAGGGPLGLAGSGGS

[0507]

TY24865 变体		
SEQ ID NO:	描述	序列
TY28652		
5	HCDR1	TGGVGVS
96	HCDR2	SIYHSGSTYYNPSLKS
307	HCDR3	YEYDYA FDY
76	LCDR1	RASQSVDFY GKSFLH
308	LCDR2	AASSLES
46	LCDR3	QSYRSPPT
362	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLS TGGVGVS WIRQAPGKGLE WIGSIYHSGSTYYNPSLKS RVTISRDN SKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYC ARYEYDYA FDYWGQGTLTVSS
363	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVDFY GKSFLHWYQQKPGKAPK LLIYAASSLES GVP SRFSGSGTDFLT ISSLQPEDFATYYCQSYRSPPT TFGQGTKVEIK
TY28653		
5	HCDR1	TGGVGVS
96	HCDR2	SIYHSGSTYYNPSLKS
309	HCDR3	YEGYYALDY
310	LCDR1	RASQSVDFY GISFLH
9	LCDR2	AASSLQS

[0508]

311	LCDR3	QQSYRTPPT
364	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTGGVGVSWIRQAPGKGLE WIGSIYHSGSTYYNPSLKSRTISRDN SKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYC ARYEYGYALDYWGQGLTVTVSS
365	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSVDFYGISFLHWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYRTP TFGQGTKVEIK
TY28654		
43	HCDR1	TSGVGVS
96	HCDR2	SIYHSGSTYYNPSLKS
312	HCDR3	YEYGYAFDY
76	LCDR1	RASQSVDFYGKSFLH
9	LCDR2	AASSLQS
28	LCDR3	QQSYRTPLT
366	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTGGVGVSWIRQAPGKGLE WIGSIYHSGSTYYNPSLKSRTISRDN SKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYC ARYEYGYAFDYWGQGLTVTVSS
367	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSVDFYGKSFLHWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYRTP LTFGQGTKVEIK
TY28655		
43	HCDR1	TSGVGVS
96	HCDR2	SIYHSGSTYYNPSLKS
307	HCDR3	YEYDYAFDY
310	LCDR1	RASQSVDFYGISFLH
9	LCDR2	AASSLQS
313	LCDR3	QQSYRTPRT
368	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTGGVGVSWIRQAPGKGLE WIGSIYHSGSTYYNPSLKSRTISRDN SKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYC ARYEYDYAFDYWGQGLTVTVSS
369	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSVDFYGISFLHWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYRTP RTFGQGTKVEIK
TY28656		
314	HCDR1	TSGVGVG
315	HCDR2	EIYHSGSTNYNPSLKS
309	HCDR3	YEYGYALDY
76	LCDR1	RASQSVDFYGKSFLH
9	LCDR2	AASSLQS
313	LCDR3	QQSYRTPRT
370	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTGGVGVGWIRQAPGKGLE WIGEIYHSGSTNYNPSLKSRTISRDN SKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYC ARYEYGYALDYWGQGLTVTVSS
371	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSVDFYGKSFLHWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYRTP RTFGQGTKVEIK
TY28657		
33	HCDR1	TGGVGVG
316	HCDR2	EIYHSGSTYYNPSLKS
312	HCDR3	YEYGYAFDY
8	LCDR1	RASQSVDFHGISFLH
308	LCDR2	AASSLES
313	LCDR3	QQSYRTPRT
372	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTGGVGVGWIRQAPGKGLE

[0509]

		WIGEIIHSGSTYYNPSLKS RV TISRDNSKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYC ARYEYGYA FDYWGQGLVTVSS
373	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVDFHGISFLHWYQQKPGKAPK LLIYAASSLES GVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYRTPR TFGQGTKVEIK
TY28658		
314	HCDR1	TSGVGVG
96	HCDR2	SIYHSGSTYYNPSLKS
317	HCDR3	YEYDYYDFDY
76	LCDR1	RASQSVDFYGKSFLH
308	LCDR2	AASSLES
318	LCDR3	QQSYRSPLT
374	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFSLS TSGVGVGWIRQAPGKGLE WIGSIYHSGSTYYNPSLKS RV TISRDNSKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYC ARYEYDYYDFDYWGQGLVTVSS
375	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVDFYGKSFLHWYQQKPGKAPK LLIYAASSLES GVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYRSPL TFGQGTKVEIK
TY28659		
43	HCDR1	TSGVGVS
316	HCDR2	EIIYHSGSTYYNPSLKS
312	HCDR3	YEYGYA FDY
8	LCDR1	RASQSVDFHGISFLH
9	LCDR2	AASSLQS
10	LCDR3	QQSYRSPT
376	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFSLS TSGVGVSWIRQAPGKGLE WIGEIIHSGSTYYNPSLKS RV TISRDNSKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYC ARYEYGYA FDYWGQGLVTVSS
12	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVDFHGISFLHWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYRSP RTFGQGTKVEIK
TY28660		
43	HCDR1	TSGVGVS
6	HCDR2	EIIYHSGSTYYSPSLKS
319	HCDR3	YEYYSYAFDY
320	LCDR1	RASQSVDFHGKSFLH
9	LCDR2	AASSLQS
10	LCDR3	QQSYRSPT
377	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFSLS TSGVGVSWIRQAPGKGLE WIGEIIHSGSTYYSPSLKS RV TISRDNSKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYC ARYEYYSYAFDYWGQGLVTVSS
378	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVDFHGKSFLHWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYRSP RTFGQGTKVEIK
TY28661		
5	HCDR1	TGGVGVS
67	HCDR2	SIYHSGSTYYSPSLKS
307	HCDR3	YEYDYYAFDY
310	LCDR1	RASQSVDFYGISFLH
308	LCDR2	AASSLES
28	LCDR3	QQSYRTPLT
379	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFSLS TGGVGVSWIRQAPGKGLE WIGSIYHSGSTYYSPSLKS RV TISRDNSKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYC ARYEYDYYAFDYWGQGLVTVSS

[0510]

380	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVDFYGISFLHWYQQKPGKAPK LLIYAASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYRTPL TFGQGTKVEIK
TY30120		
43	HCDR1	TSGVGVS
6	HCDR2	EIYHSGSTYYSPSLKS
321	HCDR3	YGYYYYDFDY
8	LCDR1	RASQSVDFHGISFLH
9	LCDR2	AASSLQS
10	LCDR3	QQSYRSPRT
381	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTSGVGVSWIRQAPGKGLE WIGEIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDNNSKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYC ARYGYYYYDFDYWGQGTLLTVSS
12	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVDFHGISFLHWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYRSP RTFGQGTKVEIK
TY30121		
314	HCDR1	TSGVGVS
316	HCDR2	EIYHSGSTYYNPSLKS
322	HCDR3	YKYDYYDFDY
8	LCDR1	RASQSVDFHGISFLH
9	LCDR2	AASSLQS
10	LCDR3	QQSYRSPRT
382	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTSGVGVGWIRQAPGKGLE WIGEIYHSGSTYYNPSLKSRVTISRDNNSKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYC ARYKYDYYDFDYWGQGTLLTVSS
12	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVDFHGISFLHWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYRSP RTFGQGTKVEIK
TY30123		
33	HCDR1	TGGVGVS
6	HCDR2	EIYHSGSTYYSPSLKS
321	HCDR3	YGYYYYDFDY
8	LCDR1	RASQSVDFHGISFLH
9	LCDR2	AASSLQS
10	LCDR3	QQSYRSPRT
383	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTGGVGVSIRQAPGKGLE WIGEIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDNNSKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYC ARYGYYYYDFDYWGQGTLLTVSS
12	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVDFHGISFLHWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYRSP RTFGQGTKVEIK
TY30406		
5	HCDR1	TGGVGVS
6	HCDR2	EIYHSGSTYYSPSLKS
317	HCDR3	YEYDYYDFDY
8	LCDR1	RASQSVDFHGISFLH
9	LCDR2	AASSLQS
10	LCDR3	QQSYRSPRT
384	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTGGVGVSIRQAPGKGLE WIGEIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDNNSKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYC ARYEYDYYDFDYWGQGTLLTVSS
12	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVDFHGISFLHWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYRSP

[0511]

		RTFGQGTKVEIK
TY30410		
5	HCDR1	TGGVGVS
6	HCDR2	EIYHSGSTYYSPSLKS
323	HCDR3	YEYIEYDFDY
8	LCDR1	RASQSVDFHGISFLH
9	LCDR2	AASSLQS
10	LCDR3	QQSYRSPRT
385	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTGGVGVSQIRQAPGKGL WIGEIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDNSTLYLQLNSLRAEDTAVYYC ARYEYIEYDFDYWGQGLTVTVSS
12	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSVDFHGISFLHWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYRSP RTFGQGTKVEIK
TY30413		
5	HCDR1	TGGVGVS
6	HCDR2	EIYHSGSTYYSPSLKS
324	HCDR3	YEYHYDFDY
8	LCDR1	RASQSVDFHGISFLH
9	LCDR2	AASSLQS
10	LCDR3	QQSYRSPRT
386	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTGGVGVSQIRQAPGKGL WIGEIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDNSTLYLQLNSLRAEDTAVYYC ARYEYHYDFDYWGQGLTVTVSS
12	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSVDFHGISFLHWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYRSP RTFGQGTKVEIK

[0512]

SEQ ID NO:	PD-L1xCD28 双特异性抗体(VH-VL)	
	TY29815(WT)	
325	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSIPLNFWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHYISWPRQ FTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKH KVVACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
326	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSISSGYYWGQIRQAPGKGL EWIGIYPSGGGTNYAQKFQGRVTISRDNSTLYLQLNSLRAEDTA VYYCARGGGLGFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKRLTKNQVCLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDGDSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK*
327	HC_B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTGGVGVSQIRQAPGKG LEWIGEIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDNSTLYLQLNSLRAEDTAV YYCARYEYIEYDFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSDIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSVDFHGISFLHWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQS YRSPRTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQP

[0513]

		ENCYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQDSLSPGK*
TY30406		
325	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIPSFLNWWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYISWPRQ FTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKH KVVACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
326	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSISSGYYWGWRQAPGKGL EWIGIYPSGGGTNYAQKFQGRVTISRDNKNTLYLQLNSLRAEDTA VYYCARGGGLGFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKRLTKNQVCLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDCDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
328	HC_B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTGGVGVSWIRQAPGKG LEWIGEIIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDNKNTLYLQLNSLRAEDTA YYCARYEYDYDFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GSDIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVDFHGISFLHWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS YRSPRTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQP ENCYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQDSLSPGK*
TY30410		
325	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIPSFLNWWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYISWPRQF TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
326	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSISSGYYWGWRQAPGKGL EWIGIYPSGGGTNYAQKFQGRVTISRDNKNTLYLQLNSLRAEDTA VYYCARGGGLGFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKRLTKNQVCLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDCDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
329	HC_B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTGGVGVSWIRQAPGKGL EWIGEIIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDNKNTLYLQLNSLRAEDTAVY YCARYEYDYDFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVDFHGISFLHWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYR SPRTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQPEN YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY

[0514]

		TQDSLSPGK*
TY30413		
325	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIPSLNWFYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYISWPRQ FTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK KVVACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
326	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSISSGYYWGWRQAPGKGL EWIGIIYPSGGGTNYAQKFQGRVTISRDNKNTLYLQLNSLRAEDTA VYYCARGGGLGFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKKLTKNQVKLTVLKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK*
330	HC_B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTGGVGVSWIRQAPGKG LEWIGEIIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDNKNTLYLQLNSLRAEDTA VYYCARYEYYHYDFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSDIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVDFHGISFLHWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS YRSPRTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQP ENCYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHN HYTQDSLSPGK*
HER2xCD28 双特异性抗体(VL-VH)		
TY27566(WT)		
331	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSGVAWYQQKPGKAPKLL IYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYIYPY TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
332	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGL WVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKKLTKNQVKLTVL KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK*
333	HC_B	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVDFHGISFLHWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYR SPRTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFSLSSTGGVGVSWIRQAPGKGLEWIGEIIYHSGST YYSPSLKSRVTISRDNKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCARYEYYYY DFDYWGQGLTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQP ENCYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHN

[0515]

		NHYTQDSLSPGK*
TY28652		
331	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLL IYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPY TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
332	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLE WVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKCLTKNQVCLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDLDCGSSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
334	HC_B	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVDFYGKSFHWHYQQKPGKA PKLLIYAASSLESVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSY RSPPTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFSLSLTGGVGVSWIRQAPGKGLEWIGSIYHSGS TYNPSLKSRTVIRSDNSKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCARYEYDY YAFDYWGQGLTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNG QPENCKYKTTTPVLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQDSLSPGK*
TY28653		
331	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLL IYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPY TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
332	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLE WVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKCLTKNQVCLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDLDCGSSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
335	HC_B	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVDFYGISFHLWHYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYR TPPTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFSLSLTGGVGVSWIRQAPGKGLEWIGSIYHSGST YYNPSLKSRTVIRSDNSKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCARYEYGY ALDYWGQGLTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQP ENCYKTTTPVLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQDSLSPGK*

[0516]

TY28654		
331	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLL IYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPY TFGQGTKVEIKRTVAAPSIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
332	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLE WVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKRLTKNQVKLTVCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
336	HC_B	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVDFYGKSFHLHWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSY RTPLTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFSLSSTSGVGVSWIRQAPGKGLEWIGSIYHSGST YYNPSLKSRTISRDNKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCARYEYGY AFDYWGQGLTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQP ENCYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQDSLSLSPGK*
TY28655		
331	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLL IYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPY TFGQGTKVEIKRTVAAPSIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
332	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLE WVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKRLTKNQVKLTVCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
337	HC_B	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVDFYGISFHLHWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYR TPRTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFSLSSTSGVGVSWIRQAPGKGLEWIGSIYHSGSTY YNPSLKSRTISRDNKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCARYEYDYA FDYWGQGLTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLNISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQPE NCYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQDSLSLSPGK*
TY28656		

331	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLL IYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPY TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
332	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLE WVADVPNPSSGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKRLTKNQVCLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
338	HC_B	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSVDFYGKSFHWHYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSY RTPRTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFSLSSTSGVGVGWIRQAPGKGLEWIGEYHSGS TNYNPSLKSRTISRDNKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCARYEYGY YALDYWGQGLTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNG QPENYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQDSLSLSPGK*
TY28657		
331	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLL IYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPY TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
332	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLE WVADVPNPSSGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKRLTKNQVCLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
339	HC_B	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSVDFHGISFLHWYQQKPGKAP KLLIYAASSLESVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYR TPRTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFSLSSTGGVGVGWIRQAPGKGLEWIGEYHSGS YYNPSLKSRTISRDNKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCARYEYGY AFDYWGQGLTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQP ENCYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQDSLSLSPGK*
TY28658		
331	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLL

[0517]

[0518]

		IYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYIYPY TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
332	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLE WVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKKLTKNQVCLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
340	HC_B	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVDFYGKSFHWHYQKPGKAP KLLIYAASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSY RSPLTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFSLSSTSGVGVGWIRQAPGKGLEWIGSIYHSGS TYYNPSLKSRTISRDNKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCARYEYDY YDFDYWGQGLTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNG QPENYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQDSLSLSPGK*
TY28659		
331	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQKPGKAPKLL IYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYIYPY TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
332	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLE WVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKKLTKNQVCLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
341	HC_B	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVDFHGISFLHWHYQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYR SPRTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFSLSSTSGVGVSWIRQAPGKGLEWIGIEIYHSGSTY YNPSLKSRTISRDNKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCARYEYGYA FDYWGQGLTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQPE NCYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQDSLSLSPGK*
TY28660		
331	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQKPGKAPKLL IYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYIYPY

[0519]

		TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
332	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLE WVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKCLTKNQVKLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
342	HC_B	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSVDFHGKSFHLHWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSY RSPRTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFSLSSTSGVGVSWIRQAPGKGLEWIGEIYHSGST YYSPSLKSRVTISRDNSKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCARYEYYSYA FDYWGQGLTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQPE NCYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQDSLSLSPGK*
TY28661		
331	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLL IYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPY TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
332	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLE WVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKCLTKNQVKLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
343	HC_B	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSVDFYGISFHLHWYQQKPGKAP KLLIYAASSLESVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYR TPLTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFSLSSTGGVGVSWIRQAPGKGLEWIGSIYHSGST YYSPSLKSRVTISRDNSKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCARYEYDYY AFDYWGQGLTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQP ENCYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQDSLSLSPGK*
HER2XCD28 双特异性抗体(VH-VL)		
TY29109(WT)		
331	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLL IYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPY

[0520]

		TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
332	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLE WVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKCLTKNQVKLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
327	HC_B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSTGGVGVSWIRQAPGKG LEWIGEIIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDNSKNTLYLQNLRAEDTAV YYCARYEYDYDFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSDIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSVDFHGISFLHWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS YRSPRTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQP ENCYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQDSLSLSPGK*
TY29306		
331	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSIQVAWYQQKPGKAPKLL IYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPY TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
332	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLE WVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKCLTKNQVKLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
344	HC_B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSTGGVGVSWIRQAPGKG LEWIGSIYHSGSTYYNPSLKSRVTISRDNSKNTLYLQNLRAEDTAV YYCARYEYDYAFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSDIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSVDFYGKSFLHWYQQKPG KAPKLLIYAASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SYRSPPTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNG QPENYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQDSLSLSPGK*
TY29307		
331	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSIQVAWYQQKPGKAPKLL IYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPY TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA

[0521]

		KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC*
332	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLE WVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKCLTKNQVKLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
345	HC_B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSTGGVGVSWIRQAPGKG LEWIGSIYHSGSTYYNPSLKSRTISRDNSKNTLYLQNLRAEDTAV YYCARYEYGYAALDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSDIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSVDFYGISFLHWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQS YRTPPTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQP ENCYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQDSLSLSPGK*
TY29308		
331	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSIQVAWYQQKPGKAPKLL IYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPY TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC*
332	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLE WVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKCLTKNQVKLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
346	HC_B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSTGGVGVSWIRQAPGKGL EWIGSIYHSGSTYYNPSLKSRTISRDNSKNTLYLQNLRAEDTAVY YCARYEYGYAFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSVDFYGKSFHLHWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQS YRTPPTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQP ENCYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQDSLSLSPGK*
TY29309		
331	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSIQVAWYQQKPGKAPKLL IYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPY TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEHK

[0522]

		VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
332	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLE WVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKKLTKNQVKLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD CDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
347	HC_B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTSGVGVSWIRQAPGKGL EWIGSIYHSGSTYYNPSLKSRTVITSRDNSKNTLYLQLNSLRAEDTAVY YCARYEYDYAFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSVDFYGISFLHWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSY RTPRTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQPE NCYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQDSLSLSPGK*
TY29310		
331	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLL IYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPY TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
332	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLE WVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKKLTKNQVKLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD CDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
348	HC_B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTSGVGVGWIRQAPGKG LEWIGEIYHSGSTNYNPSLKSRTVITSRDNSKNTLYLQLNSLRAEDTAV YYCARYEYGYALDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GSDIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSVDFYGKSFLHWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ SYRTPRTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNG QPENNCYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQDSLSLSPGK*
TY29311		
331	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLL IYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPY TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

[0523]

332	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLE WVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKKLTKNQVKLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD CDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
349	HC_B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTGGVGVGWIRQAPGKG LEWIGEIYHSGSTYYNP SLKSRVTISRDN SKNTLYLQLNSLRAEDTA VYYCARYEYGYAFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGG GSDIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSVDFHGISFLHWYQQKPGK APKLLIYAASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQS YRTPRTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQP ENCYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQDSLSLSPGK*
TY29312		
331	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLL IYSASYRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPY TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
332	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLE WVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKKLTKNQVKLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD CDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
350	HC_B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTSGVGVGWIRQAPGKG LEWIGSIYHSGSTYYNP SLKSRVTISRDN SKNTLYLQLNSLRAEDTA VYYCARYEYDYYDFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGG GSDIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSVDFYFGKSFLHWYQQKPG KAPKLLIYAASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ SYRSPLTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNG QPENYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQDSLSLSPGK*
TY29313		
331	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLL IYSASYRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPY TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
332	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLE

[0524]

		WVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKKLTKNQVKLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
351	HC_B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSTSGVGVSWIRQAPGKGL EWIGEYHSGSTYYNPSLKSRTVTSRDNSKNTLYLQNLRAEDTAVY YCARYEYGYAFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG SDIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSVDFHGISFLHWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSY RSPRTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQPE NCYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQDSLSLSPGK*
TY29314		
331	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLL IYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPY TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
332	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLE WVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKKLTKNQVKLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
352	HC_B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSTSGVGVSWIRQAPGKGL EWIGEYHSGSTYYSPSLKSRTVTSRDNSKNTLYLQNLRAEDTAVY YCARYEYYSYAFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGGS DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSVDFHGKSFLHWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSY RSPRTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQPE NCYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQDSLSLSPGK*
TY29315		
331	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLL IYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPY TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
332	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLE WVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTA

[0525]

		VYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKKLTKNQVKLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
353	HC_B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSTGGVGVSWIRQAPGKG LEWIGSIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDN SKNTLYLQLNSLRAEDTAV YYCARYEYDYAFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGG GSDIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSVDFYGISFLHWYQQKPGK APKLLIYAASSLESVPSPRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQS YRTPLTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAK GQPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQP ENCYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQDSLSPGK*
B7H3XCD28 双特异性抗体(VH-VL)		
TY29021(WT)		
354	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSIRKYLNWYQQKPGKAPKLLI YAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCSQGTHVPFT FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC*
355	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGIHWVRQAPGKGLE WIGWISPSGGDTKYAQKFQGRVTISRDN SKNTLYLQLNSLRAEDTAV YYCARGGTVVYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKKLTKNQVKLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
327	HC_B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSTGGVGVSWIRQAPGKG LEWIGEIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDN SKNTLYLQLNSLRAEDTAV YYCARYEYDYAFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GSDIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSVDFHGISFLHWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQS YRSPRTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAK GQPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQP ENCYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQDSLSPGK*
TY30120		
354	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSIRKYLNWYQQKPGKAPKLLI YAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCSQGTHVPFT FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC*
355	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGIHWVRQAPGKGLE WIGWISPSGGDTKYAQKFQGRVTISRDN SKNTLYLQLNSLRAEDTAV

[0526]

		YYCARGGTVVYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKKLTKNQVKLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDGDSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
356	HC_B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSTSGVGVSWIRQAPGKGL EWIGEIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDNSTNTLYLQLNSLRAEDTAVY YCARYGYYYDFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSVDFHGISFLHWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSY RSPRTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKG QPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQPE NCYKTTPPVLDSDGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQDSLSLSPGK*
TY30121		
354	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSIRKYLNWYQQKPGKAPKLLI YAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCSQGTHVPFT FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
355	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGIHWVRQAPGKGLE WIGWISPSGGDTKYAQKFQGRVTISRDNSTNTLYLQLNSLRAEDTAV YYCARGGTVVYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKKLTKNQVKLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDGDSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
357	HC_B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSTSGVGVGWIRQAPGKG LEWIGEIYHSGSTYYNPSLKSRTISRDNSTNTLYLQLNSLRAEDTAV YYCARYKYDYYDFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GSDIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSVDFHGISFLHWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQS YRSPRTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAK GQPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQP ENCYKTTPPVLDSDGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQDSLSLSPGK*
TY30123		
354	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSIRKYLNWYQQKPGKAPKLLI YAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCSQGTHVPFT FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
355	HC_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGIHWVRQAPGKGLE WIGWISPSGGDTKYAQKFQGRVTISRDNSTNTLYLQLNSLRAEDTAV YYCARGGTVVYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG

[0527]

		TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKKLTKNQVKLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
358	HC_B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSTGGVGVGWIRQAPGKG LEWIGEIYHSGSTYYSPSLKSRVTISRDNSKNTLYQLNSLRAEDTAV YYCARYGYYYDFDYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSDIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVDFHGISFLHWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS YRSPRTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAK GQPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVEWESNGQP ENCYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQDSLSPGK*

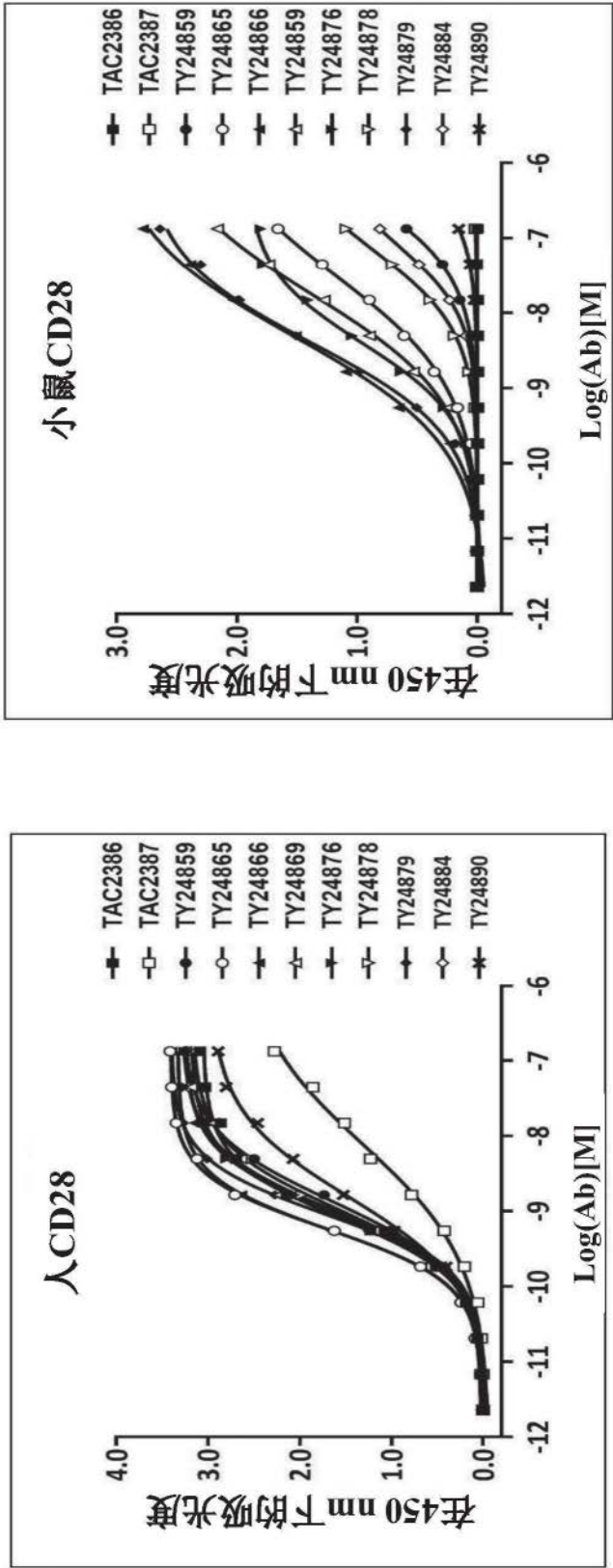


图1

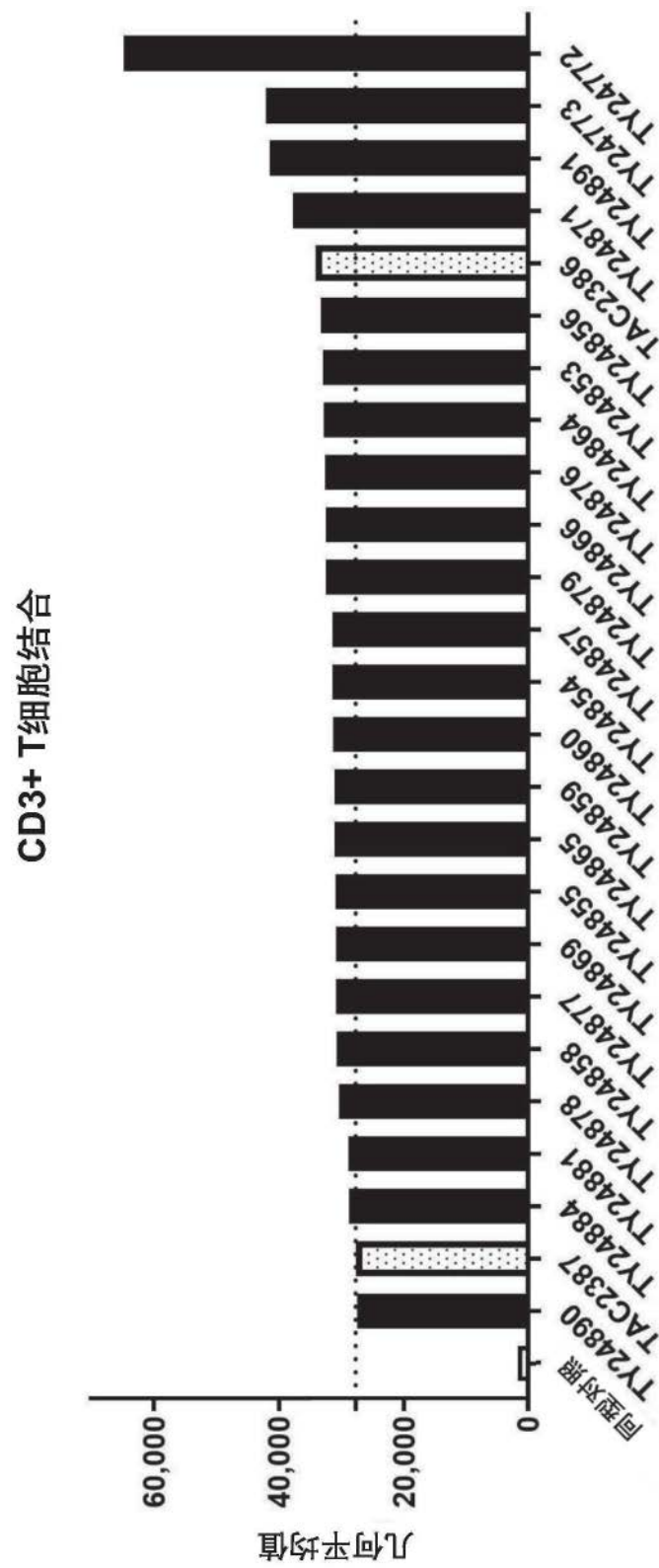


图2

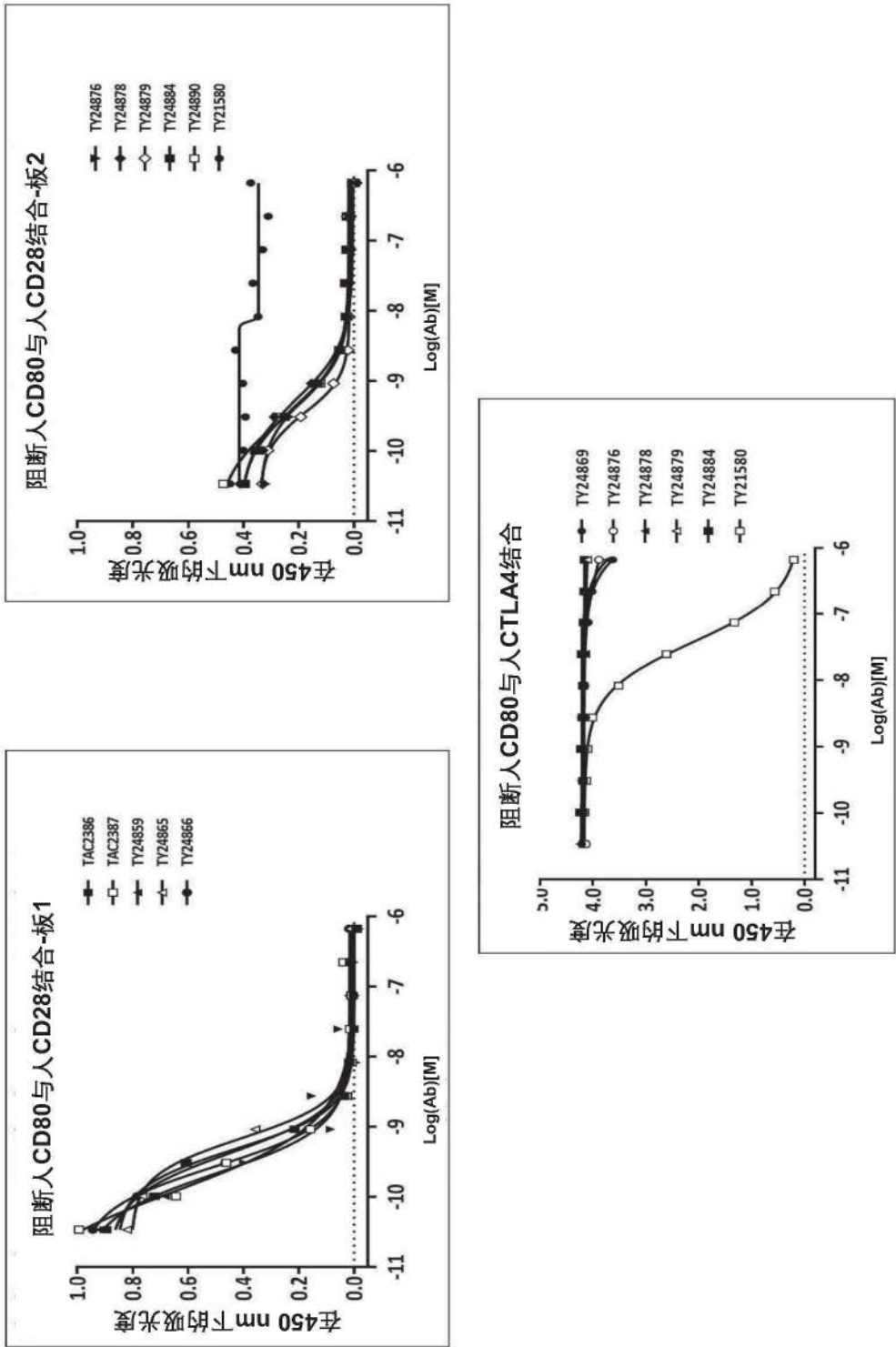


图3

干板PBMC CTG, 供体2044

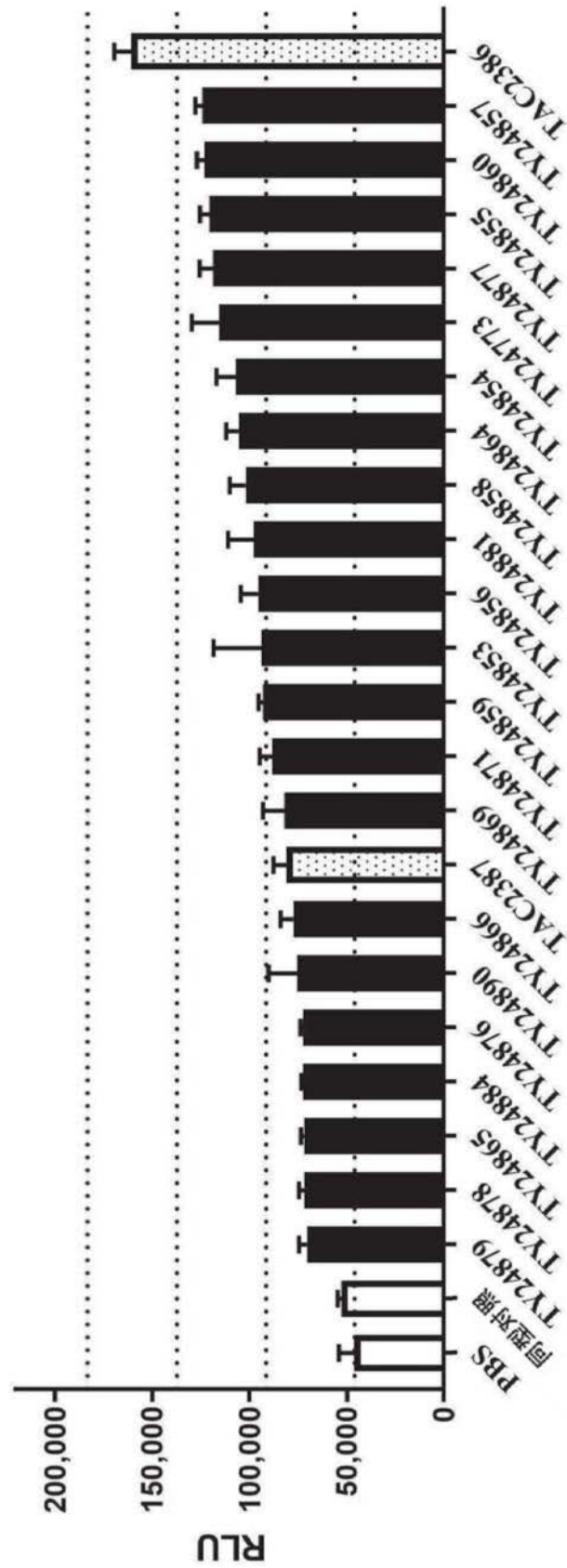


图4A

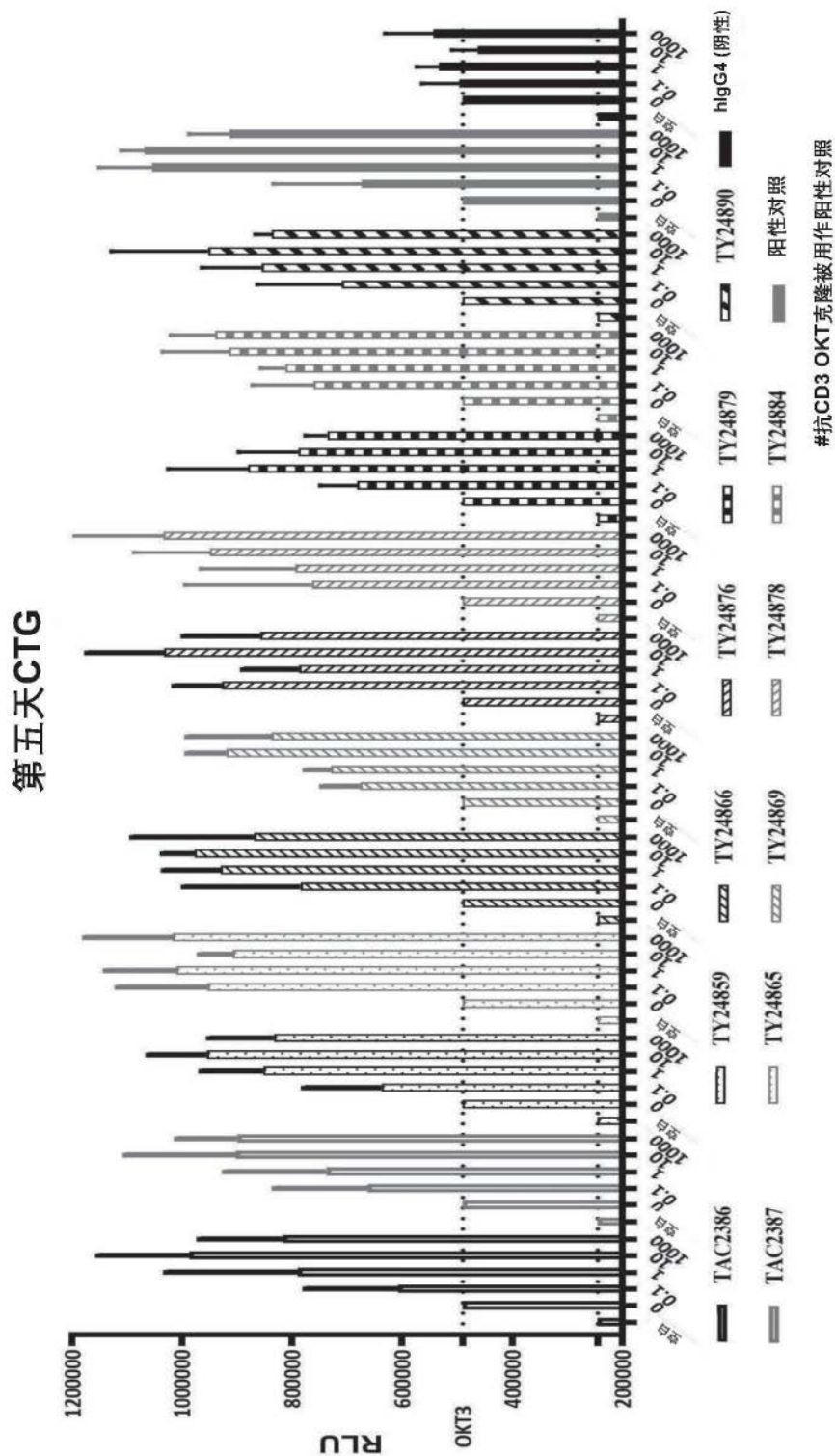


图4B

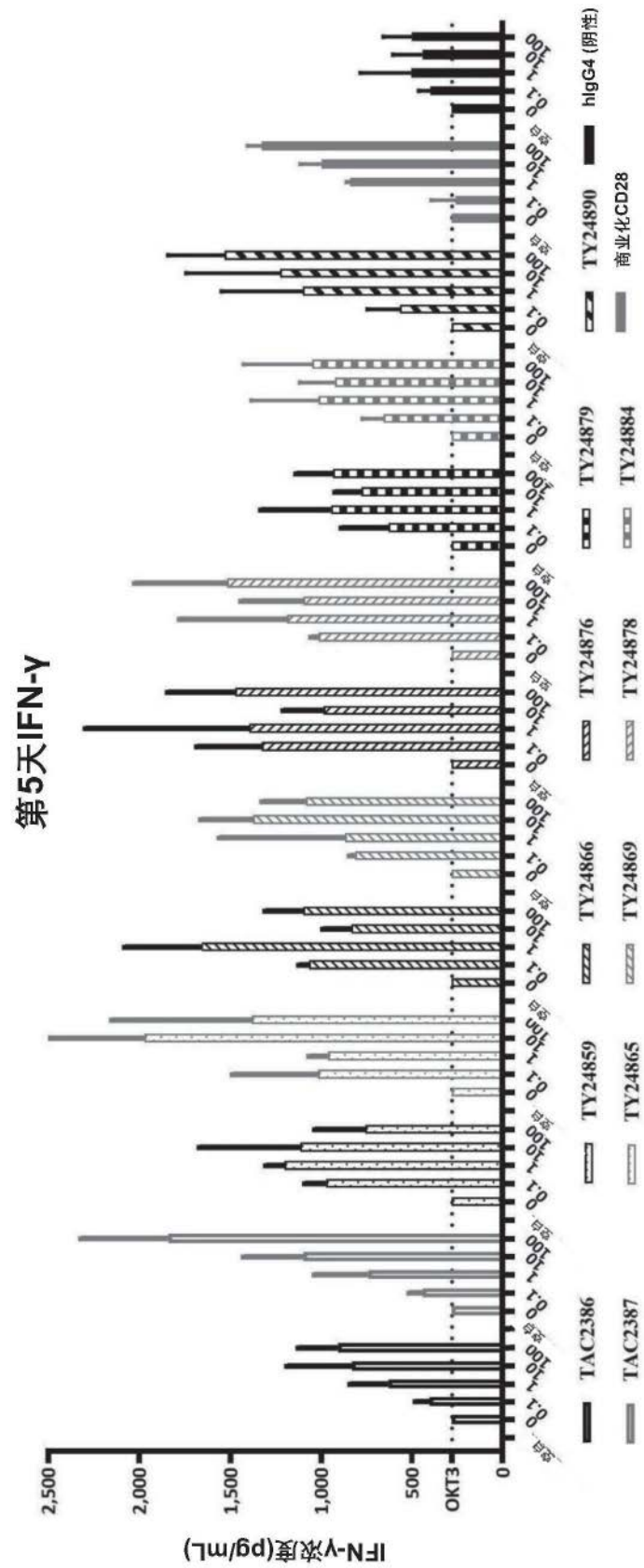


图4C

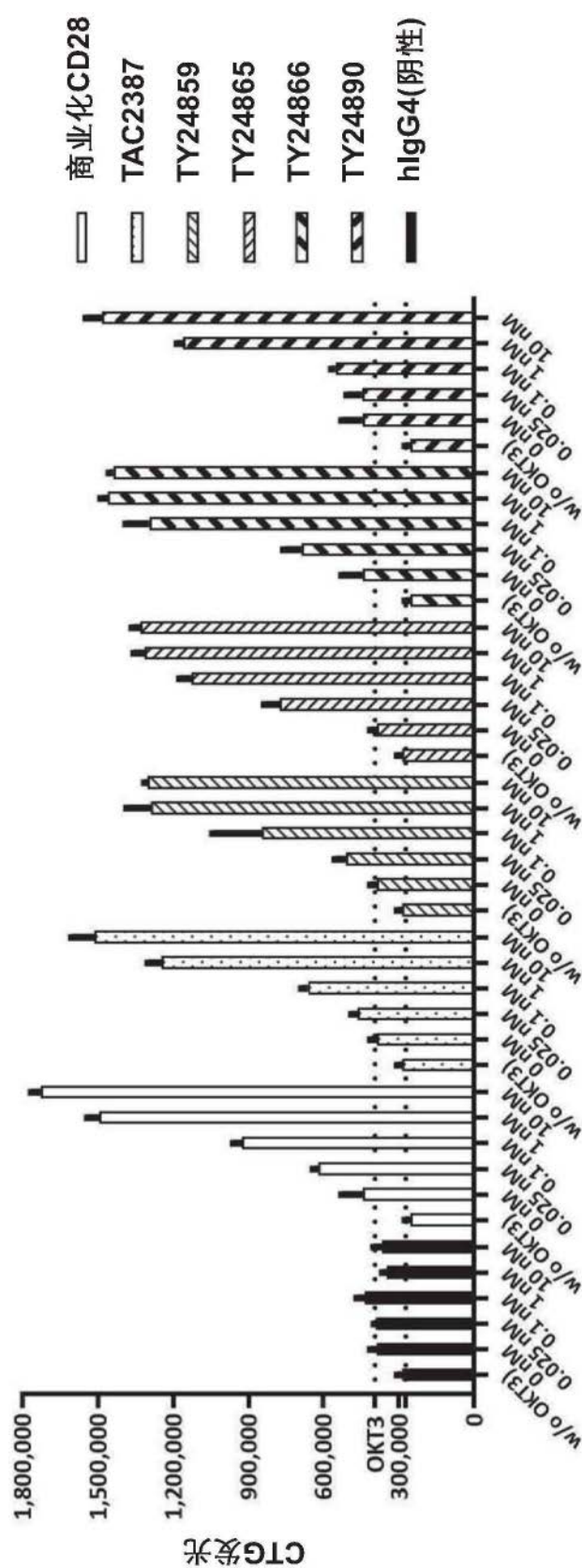


图5A

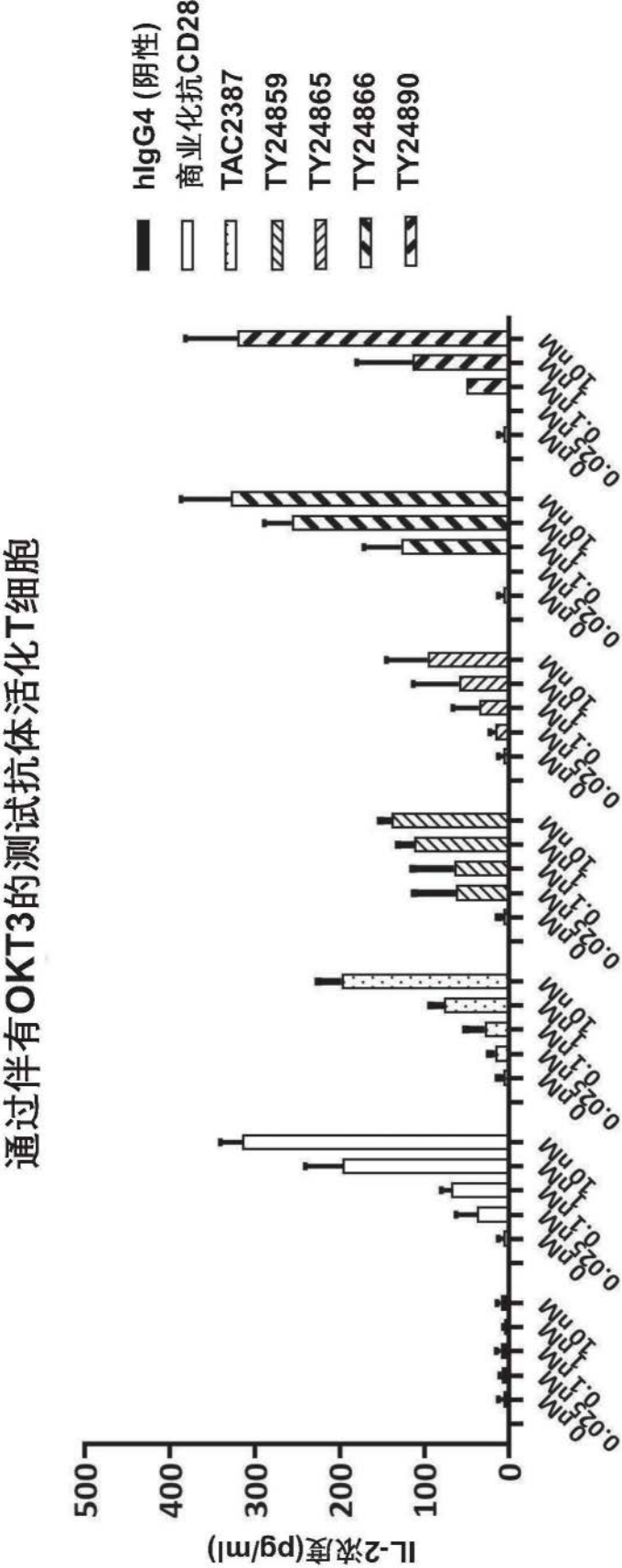
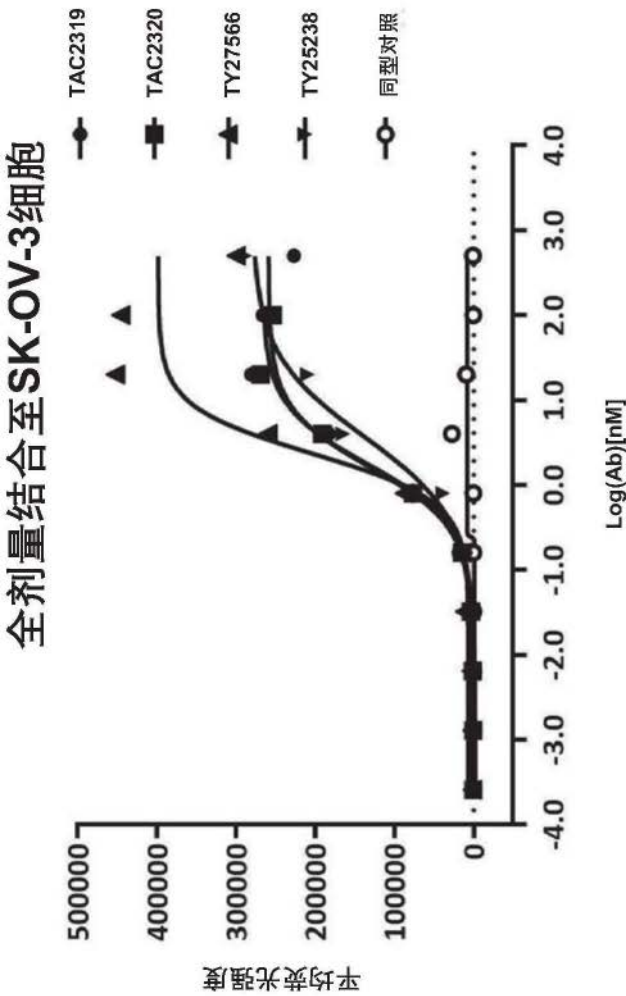
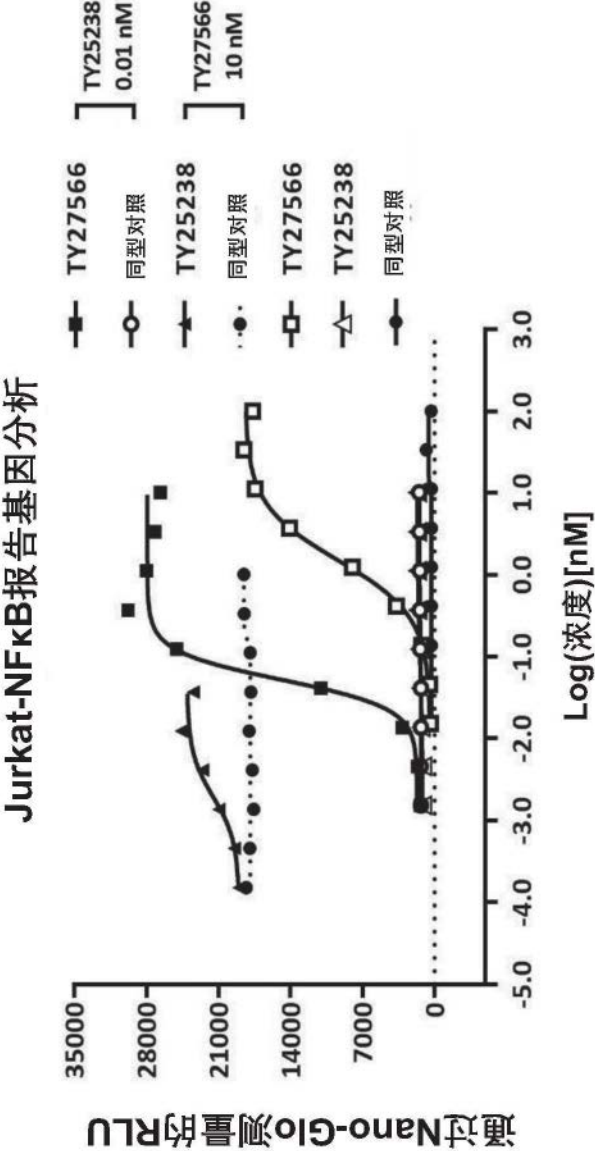


图5B



Abs	EC ₅₀ (nM)	最大
TAC2319	1.617	256422
TAC2320	1.75	265535
TY27566	2.318	391919
TY25238	3.739	281926

图6



Ab ID	EC ₅₀ (nM)	最大RLU
TY27566	1.501	18864
TY25238	0.0827	1747
同型对照	NA	869
TY27566+0.01 nM TY25238	0.0519	29940
同型对照+0.01 nM TY25238	NA	1549
TY25238+10 nM TY27566	0.0019	24879
同型对照+10 nM TY27566	NA	18657

图7

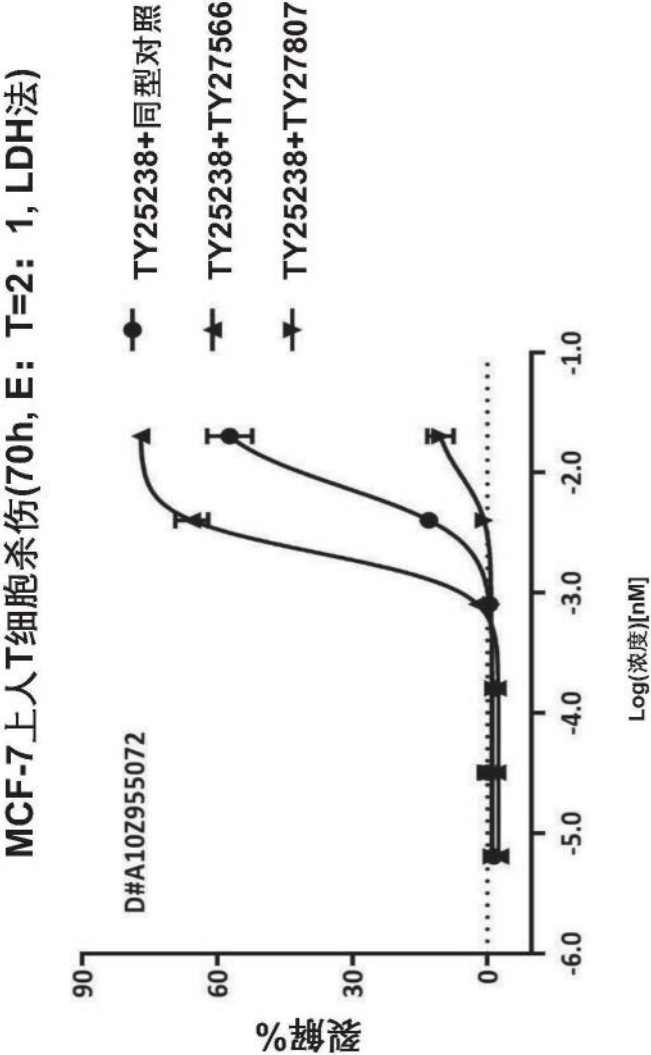


图8

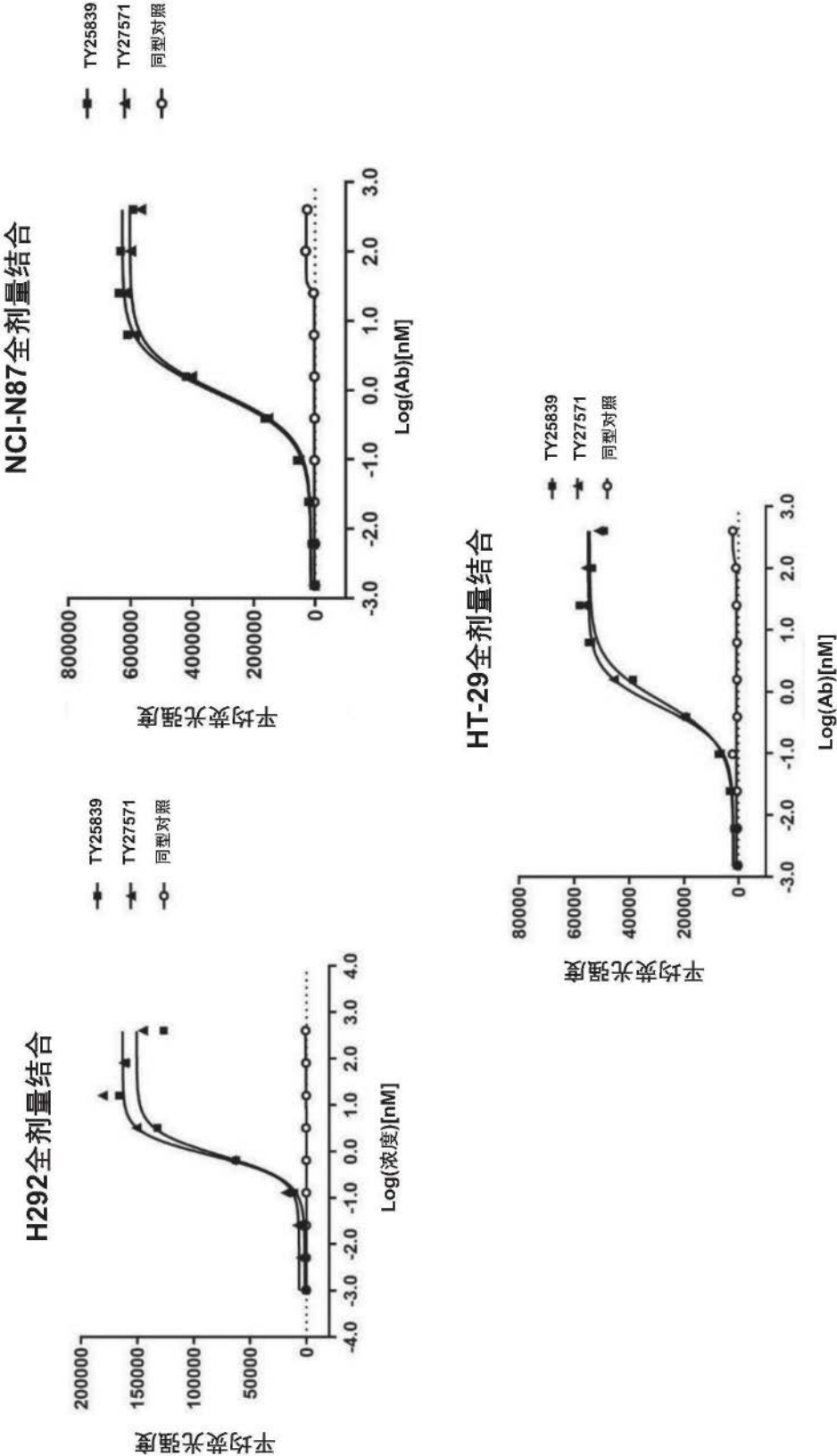


图9

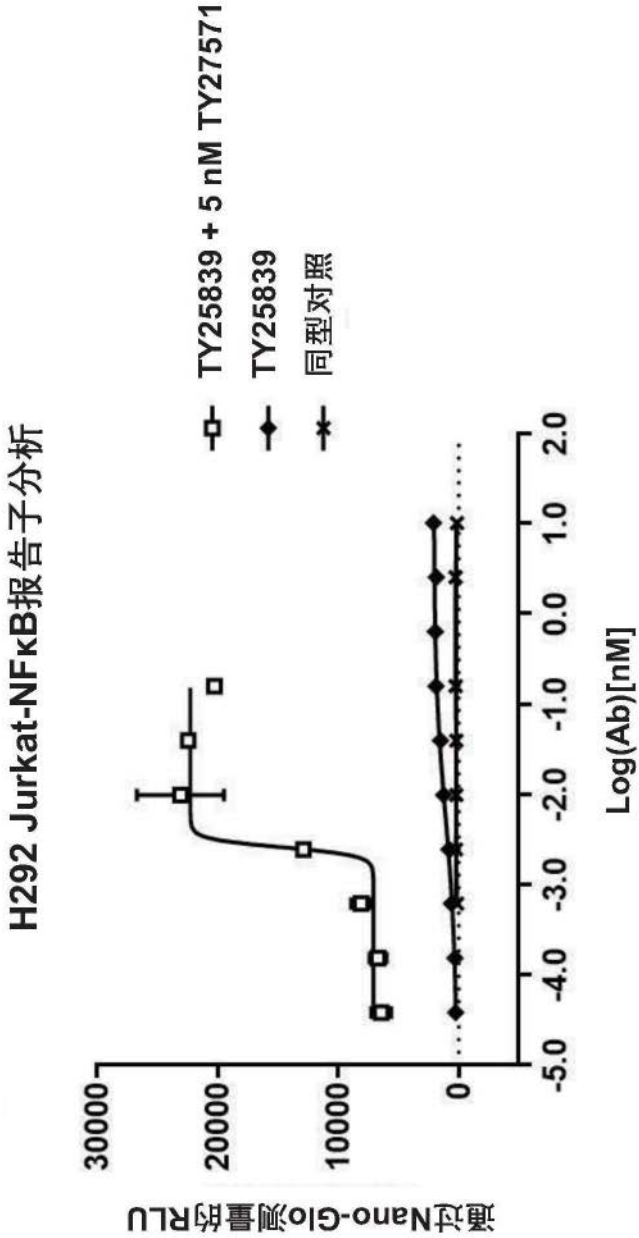


图10A

TAs		EC50 (nM)	范围
TROP2xCD3	TROP2xCD28		
TY25839	5 nM TY27571 CD28	0.00257	15186
TY25839	/	0.00585	1913

H292 Jurkat-NFkB报告子分析

图10B

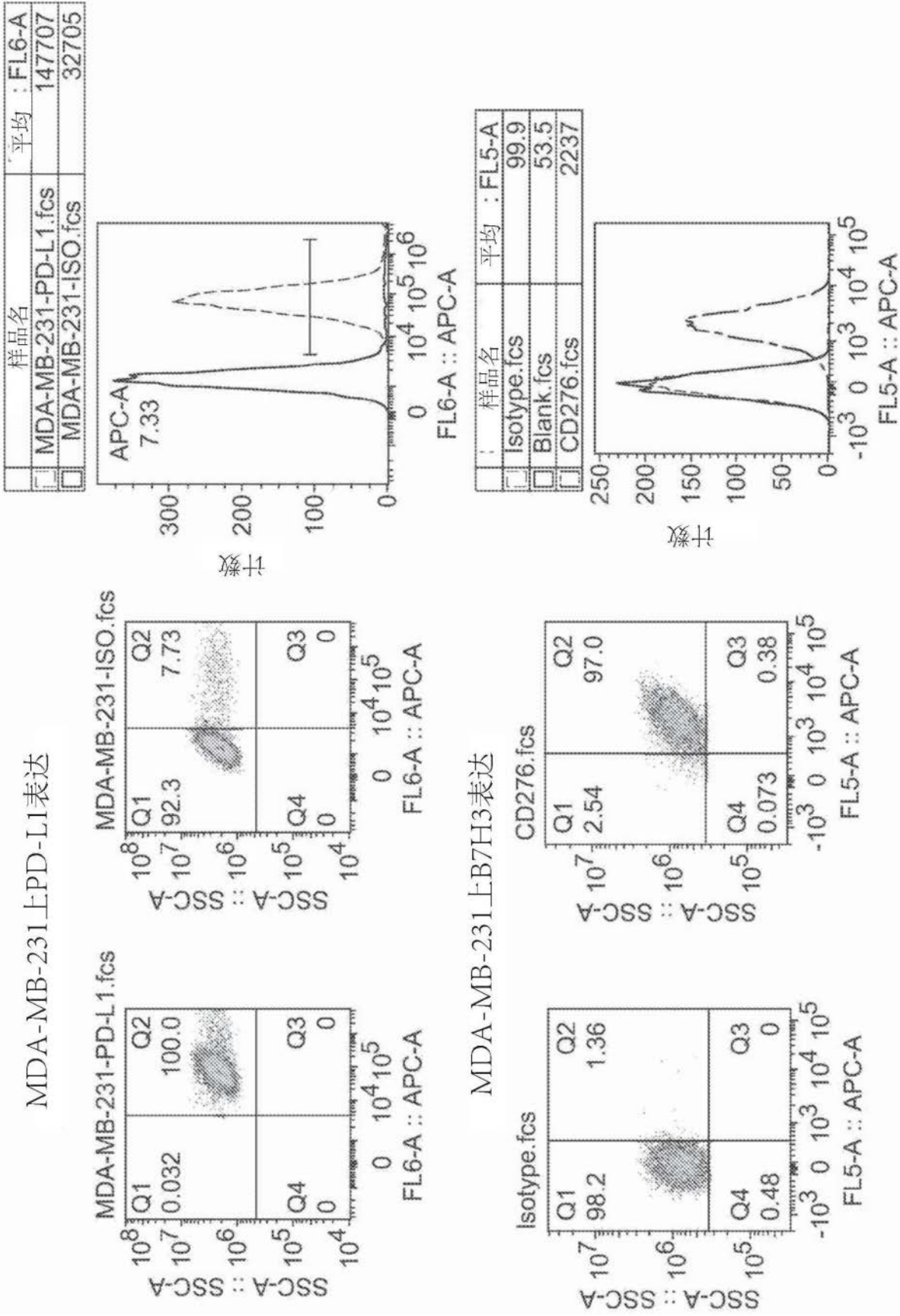


图11

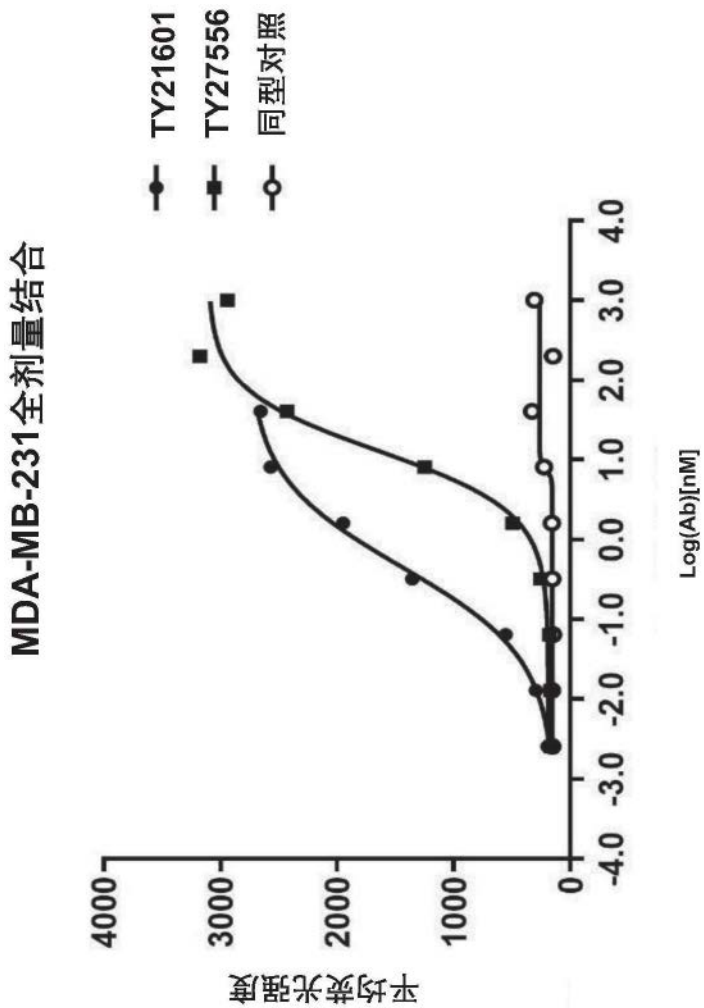


图12

Abs	EC ₅₀ (nM)	最大
TY21601	0.4525	2658
TY27556	12.84	3177

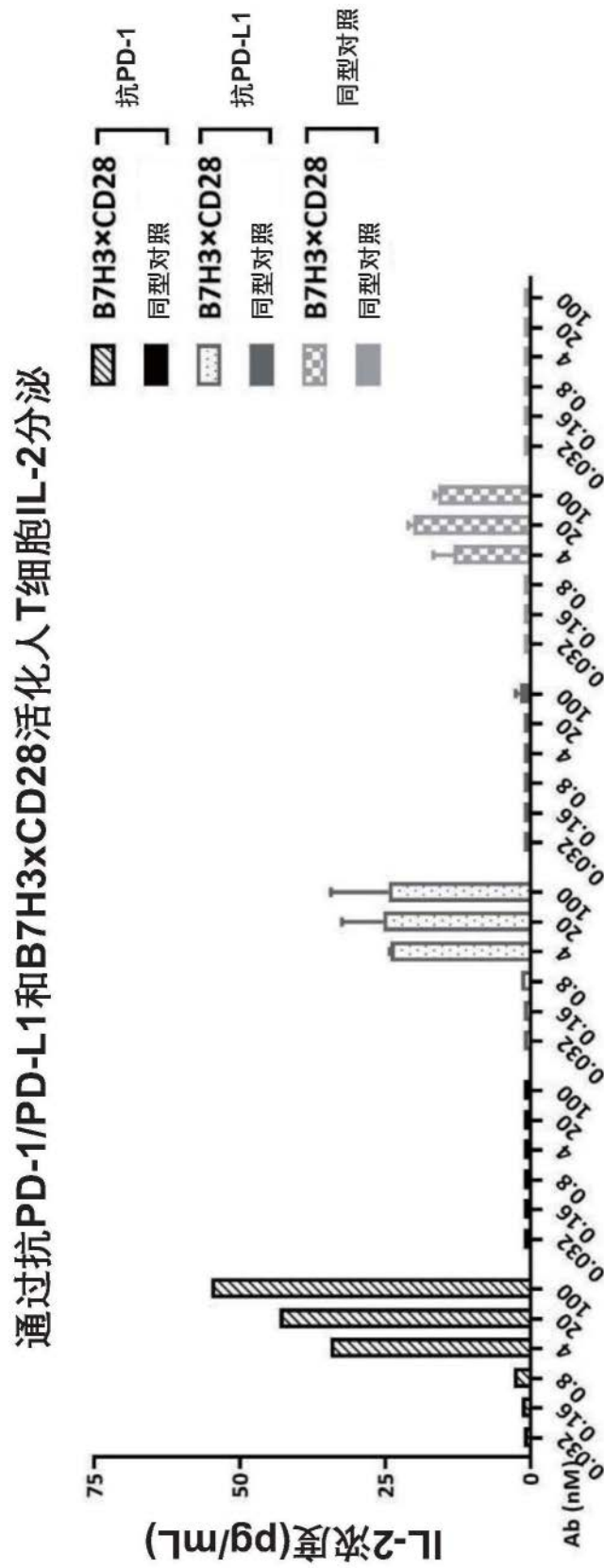


图13A

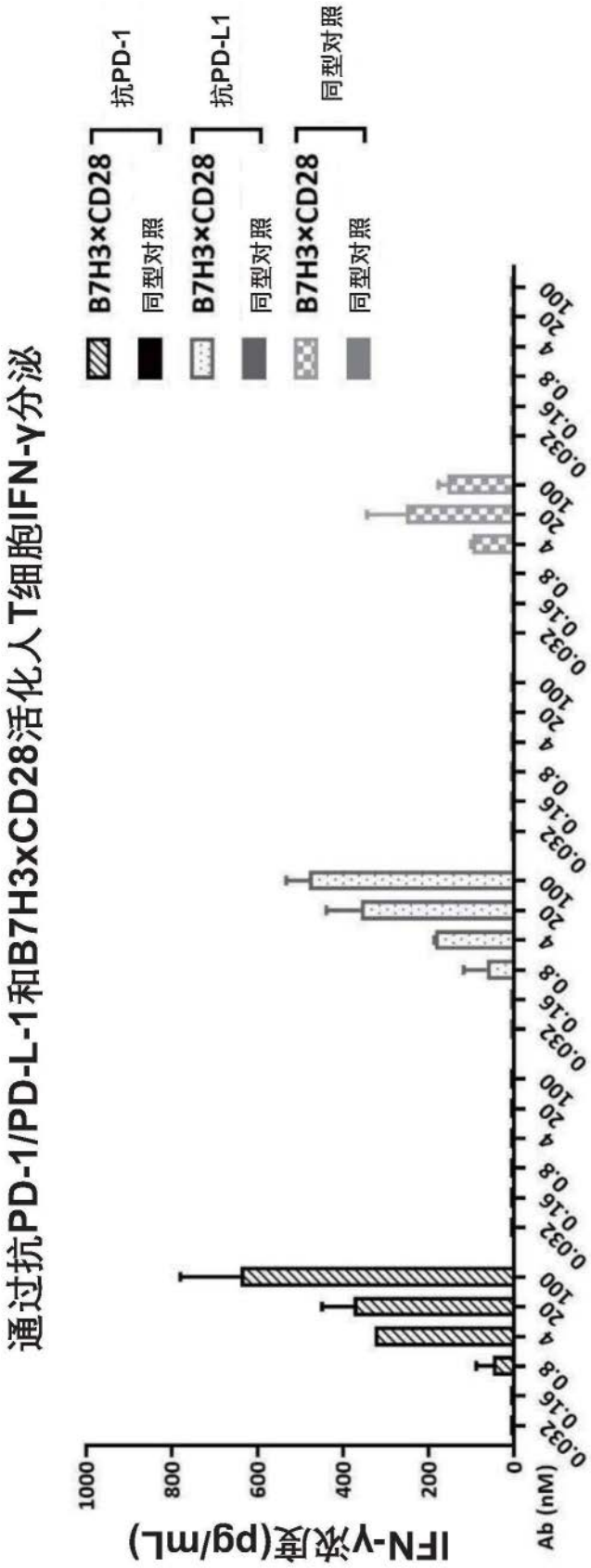
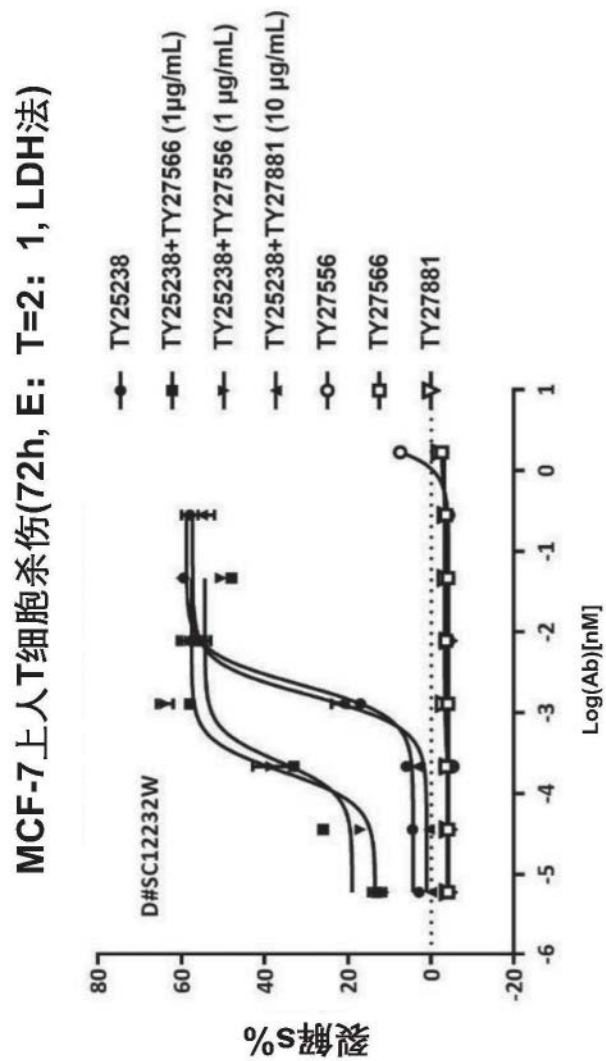


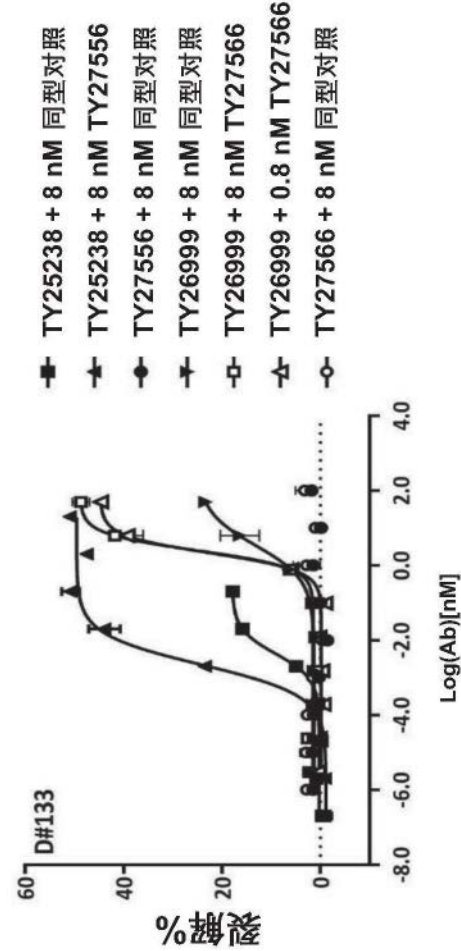
图13B



MCF-7 (72h)	EC ₅₀ (pM)	范围
TY25238	2.22	54.47
TY25238+1μg/mL TY27566	0.24	34.71
TY25238+1μg/mL TY27566	0.20	43.57
TY25238+10μg/mL TY27881	1.68	56.82

图14

EMT6-HER2上入T细胞杀伤(72h, LDH法)



Ab ID	EC ₅₀ (nM)	范围
TY25238 + 8 nM 同型对照	0.004355	17.70
TY25238 + 8 nM TY27556	0.002221	50.72
Ab ID	EC ₅₀ (nM)	范围
TY26999 + 8 nM 同型对照	3.428	23.71
TY26999 + 8 nM TY27566	2.512	47.38
TY26999 + 0.8 nM TY27566	2.132	44.92
Ab ID	EC ₅₀ (nM)	范围
TY27556 + 8 nM 同型对照	NA	NA
TY27566 + 8 nM 同型对照	NA	NA

图15

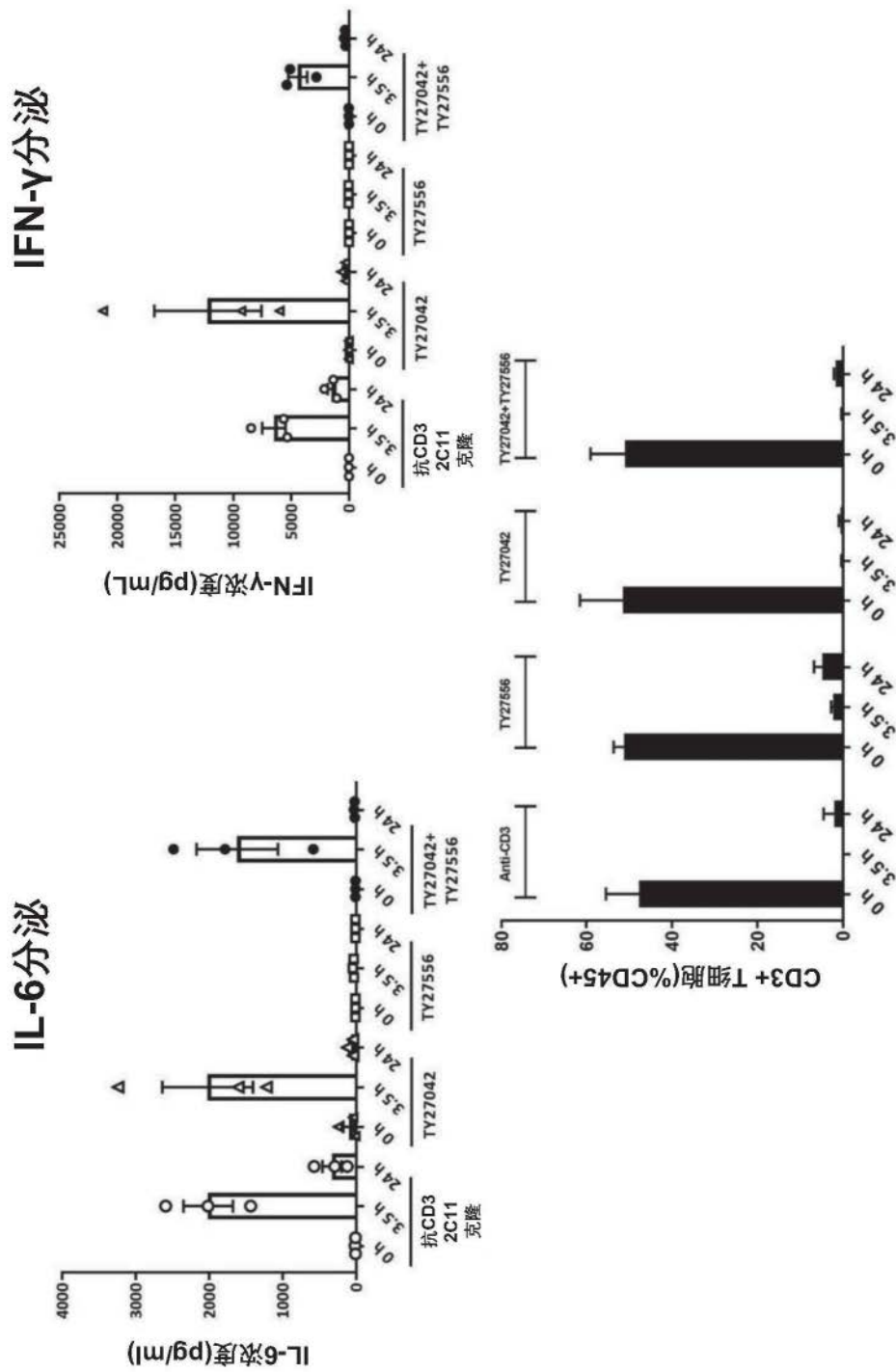


图16

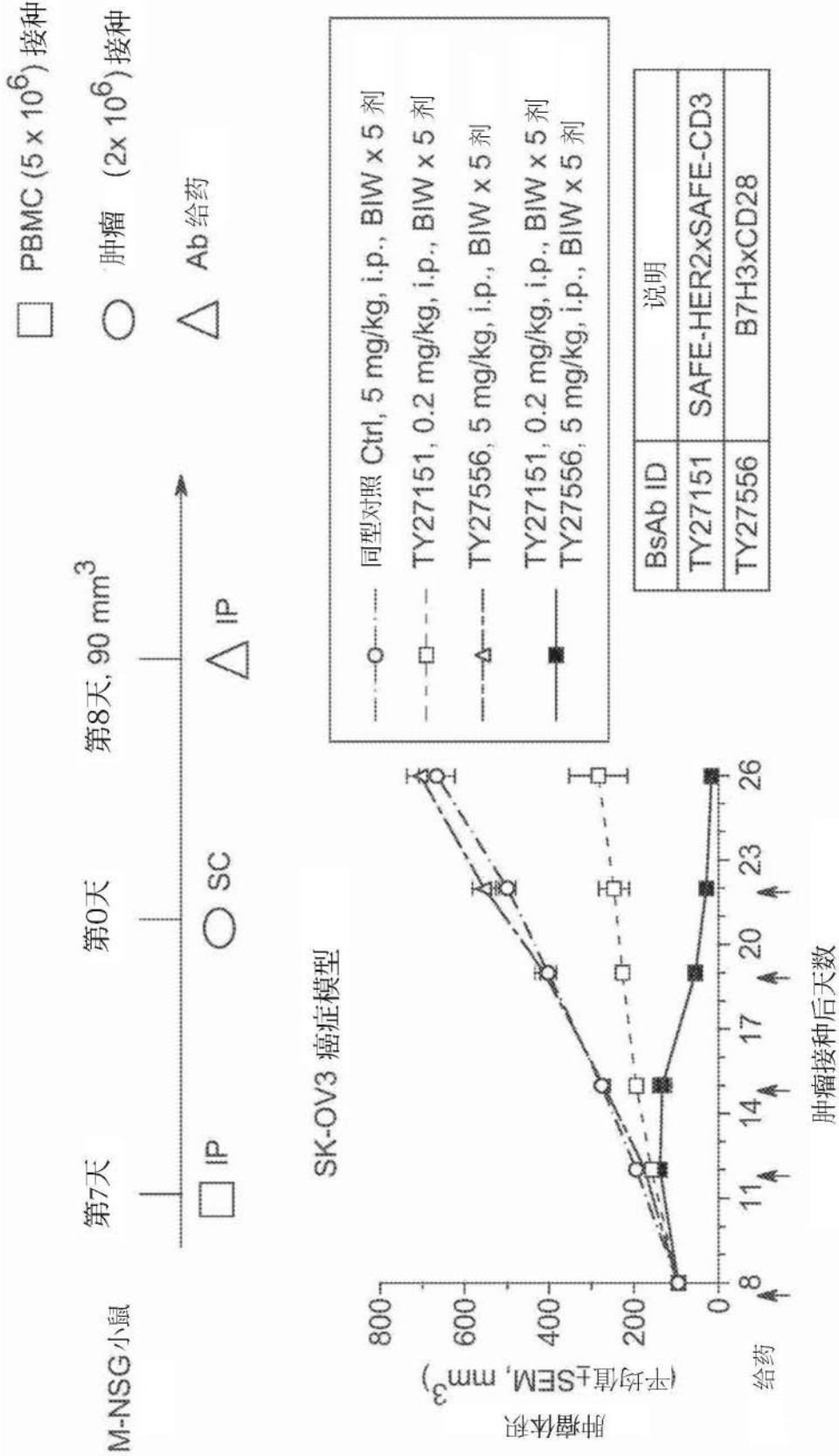


图17

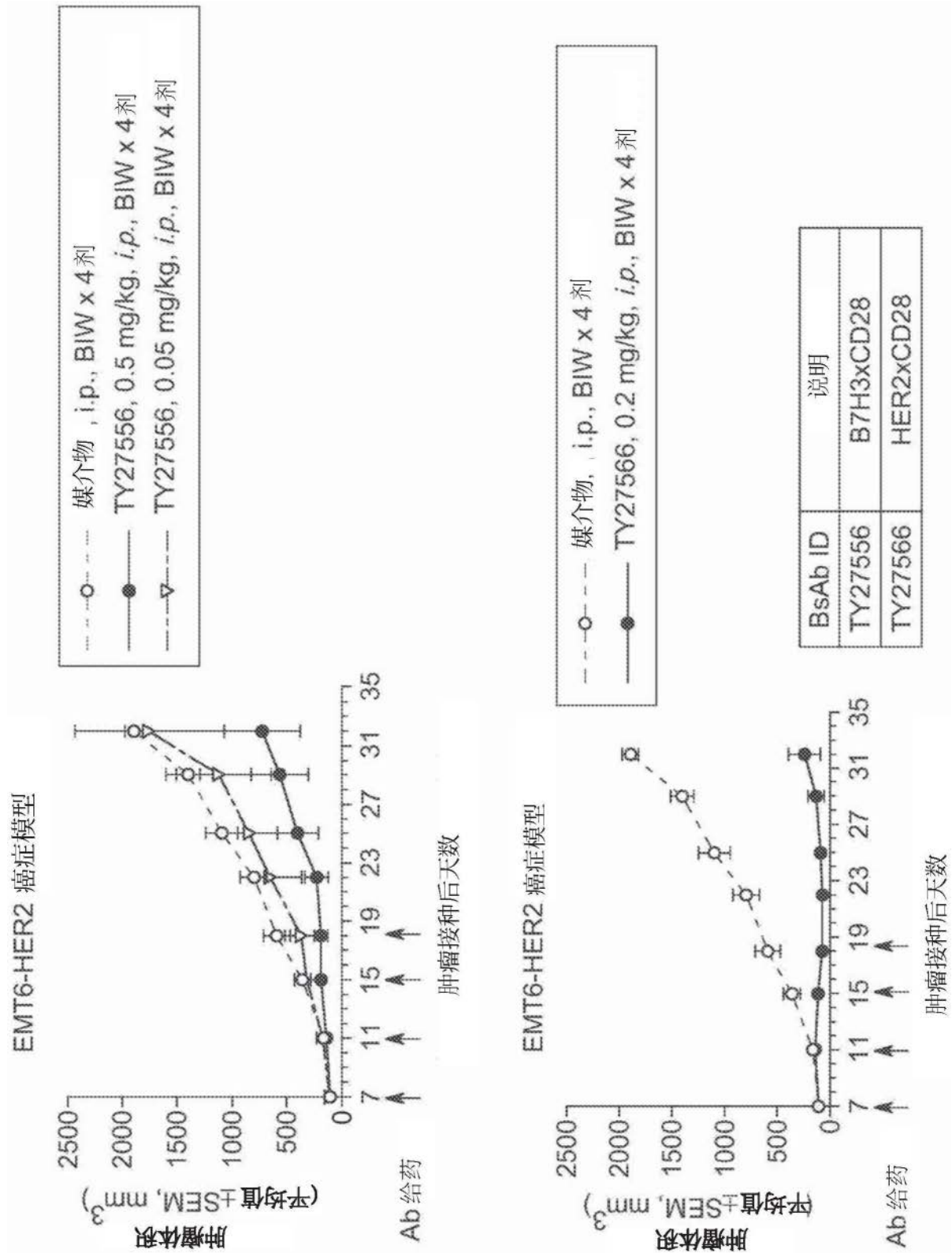


图18

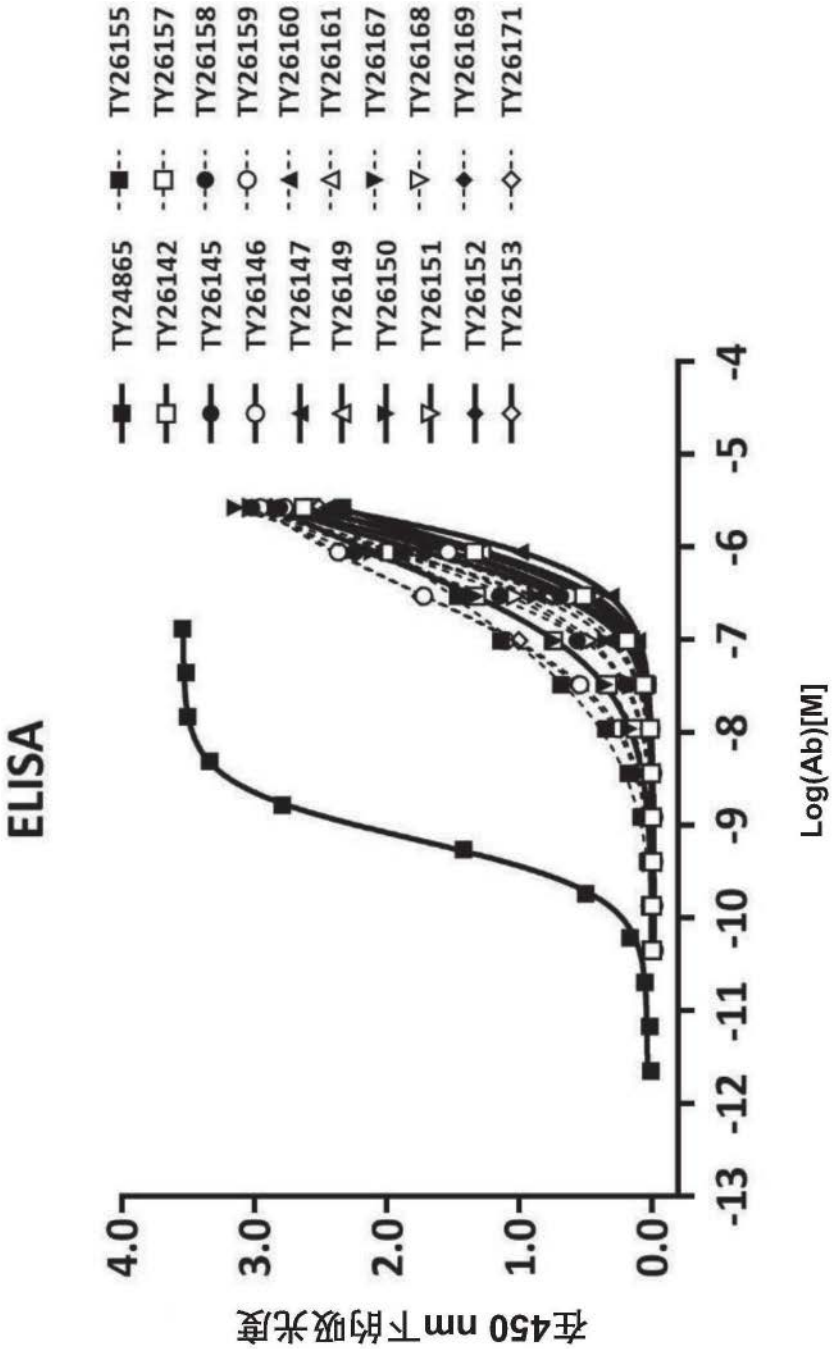


图19

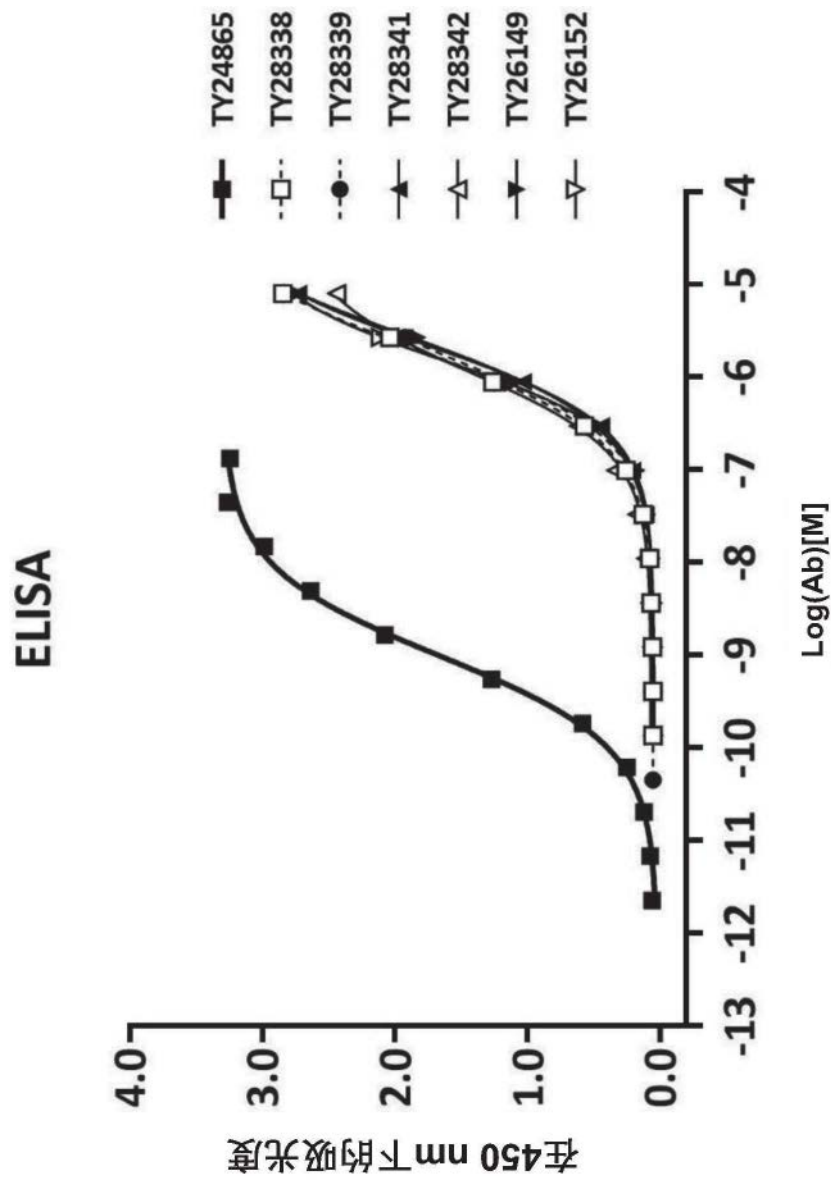


图20

序列编号	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
sp P10747 CD28_人	N	K	I	L	V	K	Q	S	P	M	L	V	A	Y	D	N	A	V	N	L	S	C	K	Y	S
sp P31041 CD28_小鼠	N	K	I	L	V	K	Q	S	P	L	L	V	V	D	S	N	E	V	S	L	S	C	R	Y	S
TY24865	N	K	I	L	V	K	Q	S	P	M	L	V	A	Y	D	N	A	V	N	L	S	C	K	Y	S

序列编号	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68
sp P10747 CD28_人	Y	N	L	F	S	R	E	F	R	A	S	L	H	K	G	L	D	S	A	V	E	V	C	V	V
sp P31041 CD28_小鼠	Y	N	L	L	A	K	E	F	R	A	S	L	Y	K	G	V	N	S	D	V	E	V	C	V	G
TY24865	Y	N	L	F	S	R	E	F	R	A	S	L	H	K	G	L	D	S	A	V	E	V	C	V	V

序列编号	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93
sp P10747 CD28_人	Y	G	N	Y	S	Q	Q	L	Q	V	Y	S	K	T	G	F	N	C	D	G	K	L	G	N	E
sp P31041 CD28_小鼠	N	G	N	F	T	Y	Q	P	Q	F	R	S	N	A	E	F	N	C	D	G	D	F	D	N	E
TY24865	Y	G	N	Y	S	Q	Q	L	Q	V	Y	S	K	T	G	F	N	C	D	G	K	L	G	N	E

序列编号	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118
sp P10747 CD28_人	S	V	T	F	Y	L	Q	N	L	Y	V	N	Q	T	D	I	Y	F	C	K	I	E	V	M	Y
sp P31041 CD28_小鼠	T	V	T	F	R	L	W	N	L	H	V	N	H	T	D	I	Y	F	C	K	I	E	F	M	Y
TY24865	S	V	T	F	Y	L	Q	N	L	Y	V	N	Q	T	D	I	Y	F	C	K	I	E	V	M	Y

序列编号	119	120	121	122	123	124	125	126
sp P10747 CD28_人	P	P	P	Y	L	D	N	E
sp P31041 CD28_小鼠	P	P	P	Y	L	D	N	E
TY24865	P	P	P	Y	L	D	N	E

来自人和小鼠CD28的不同残基

结合位点

图21

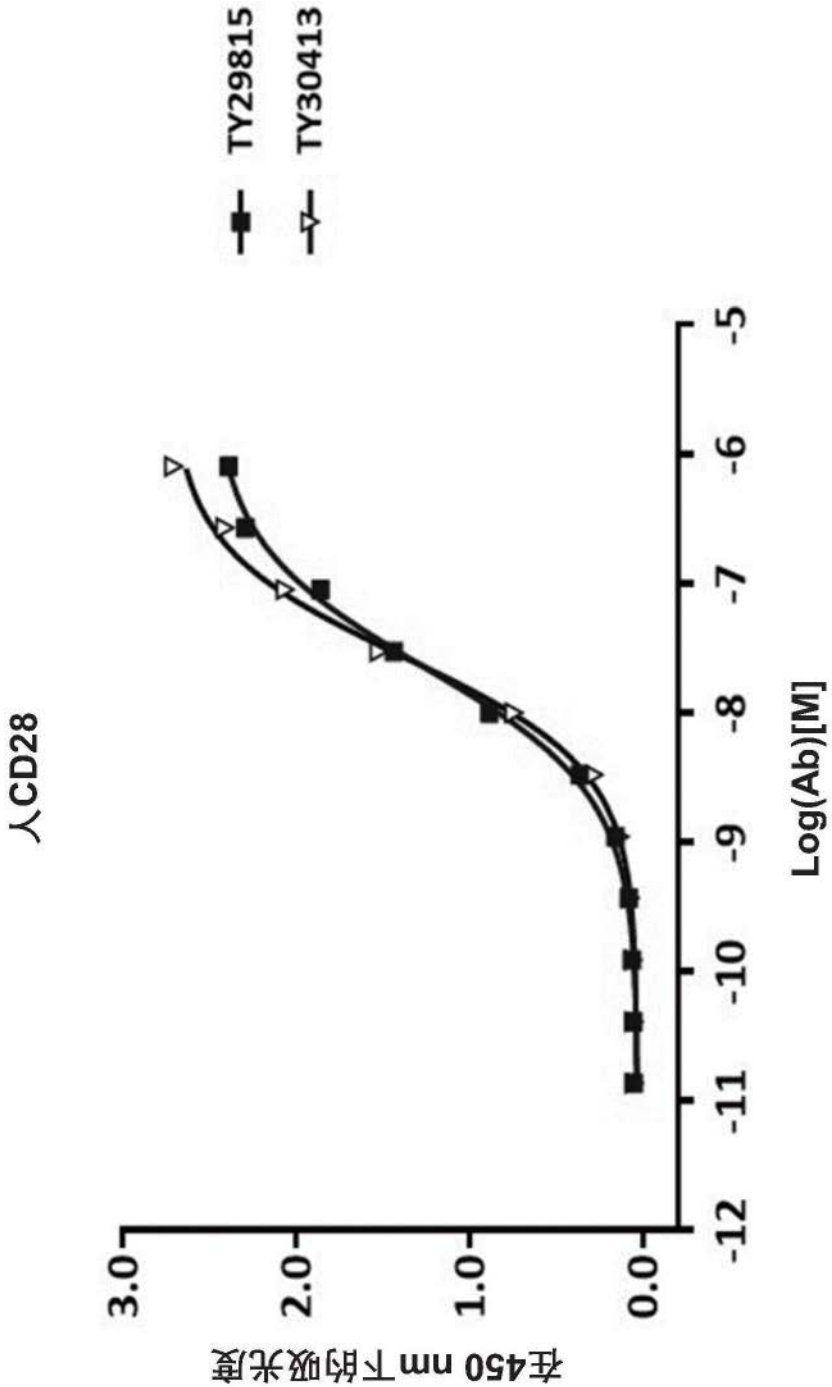


图22A

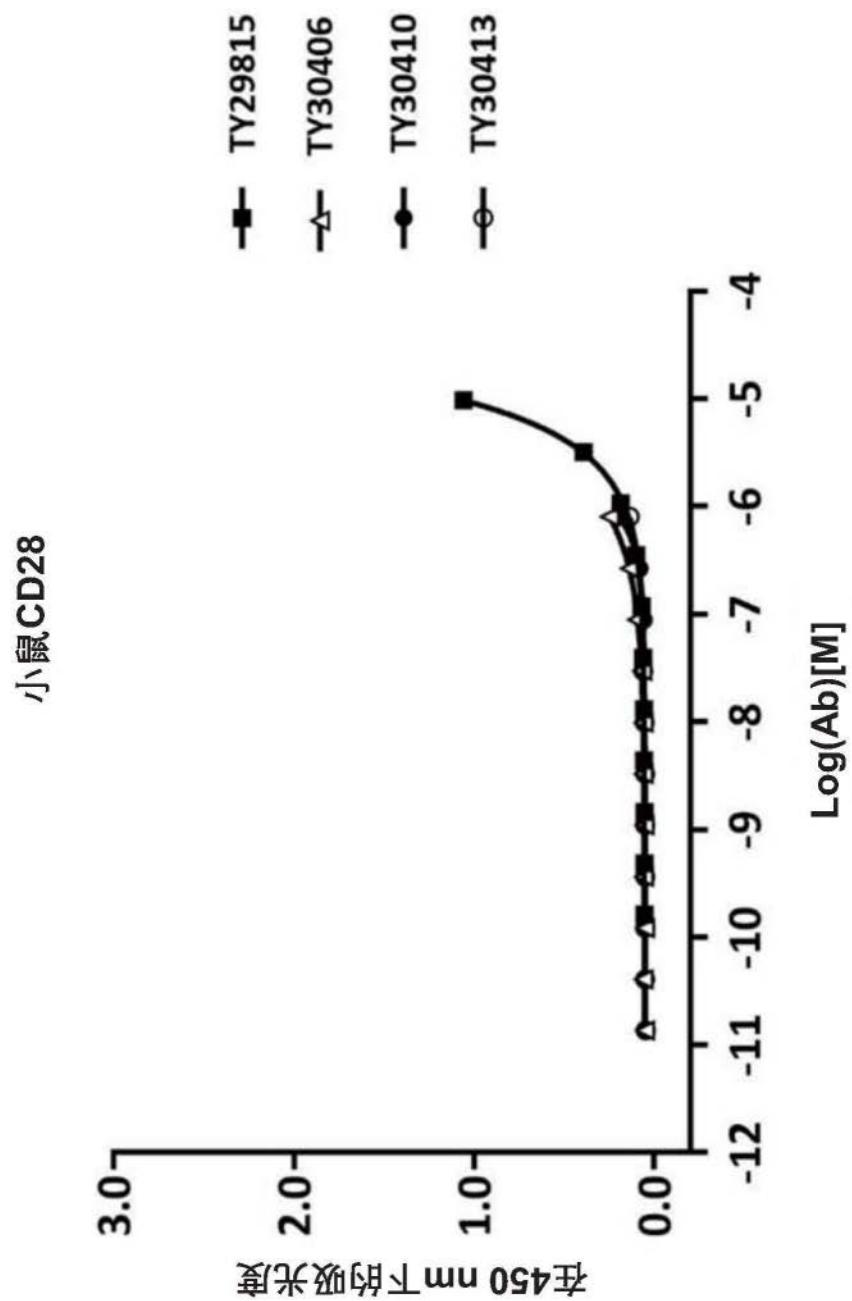


图22B

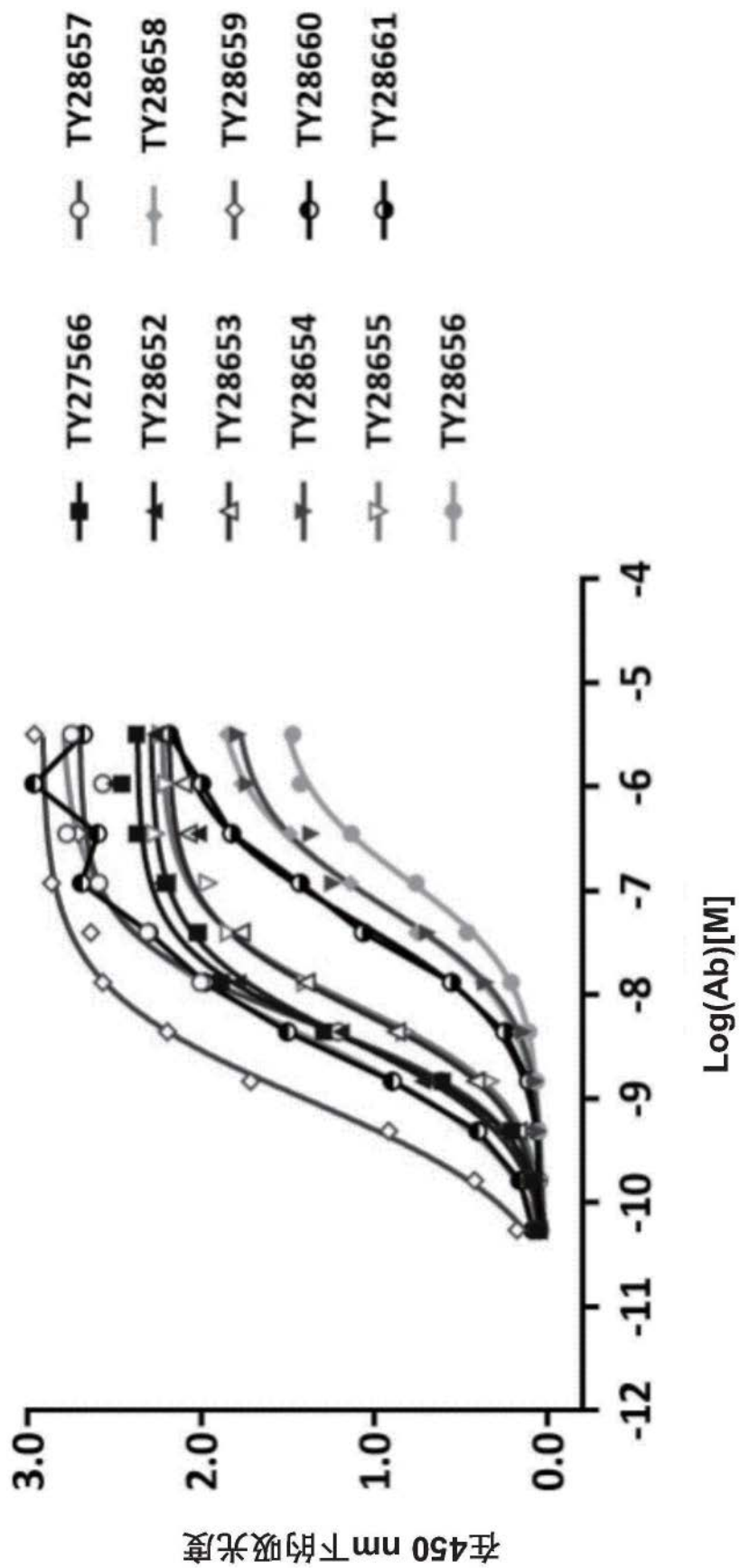


图23A

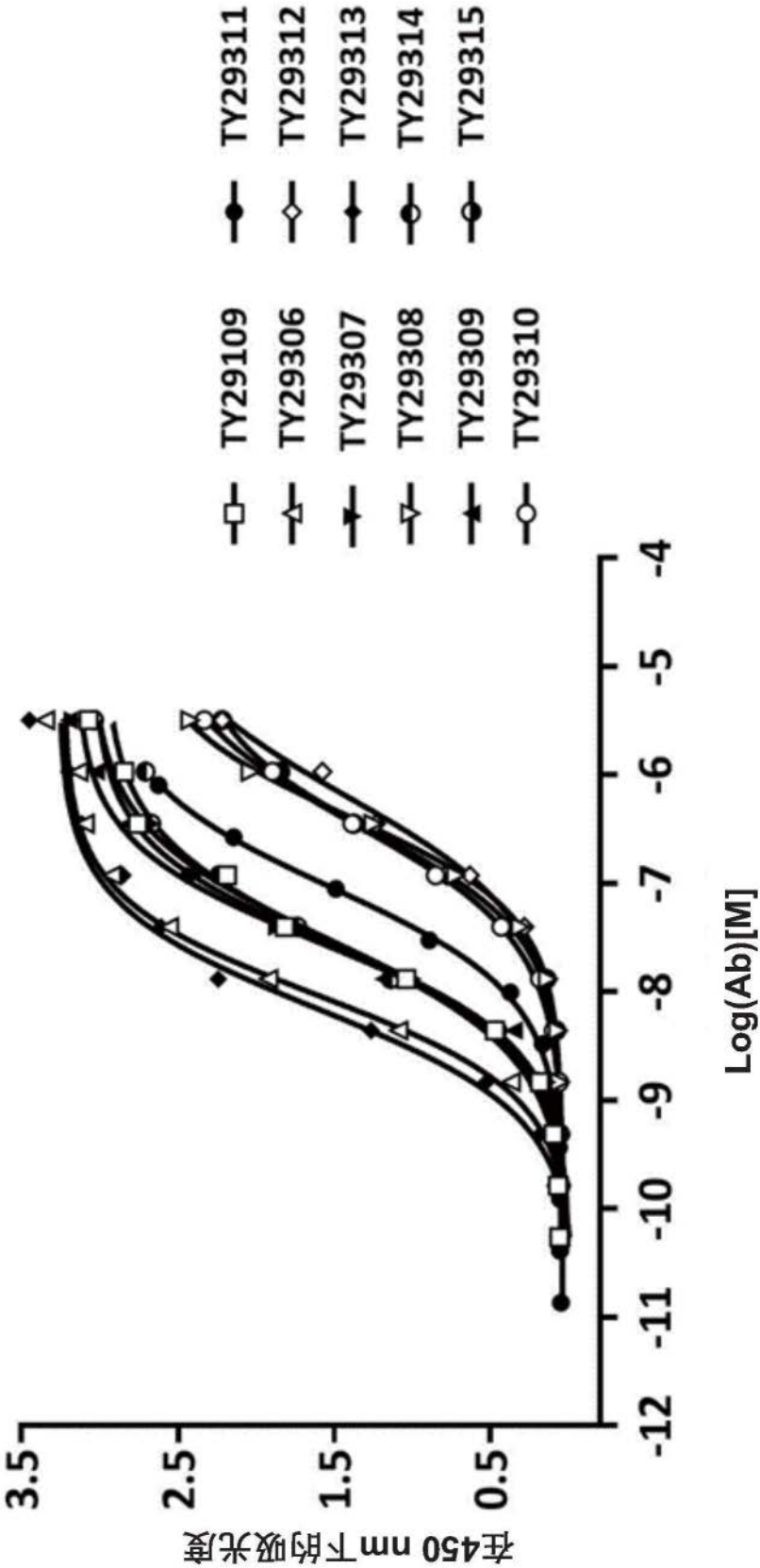


图23B

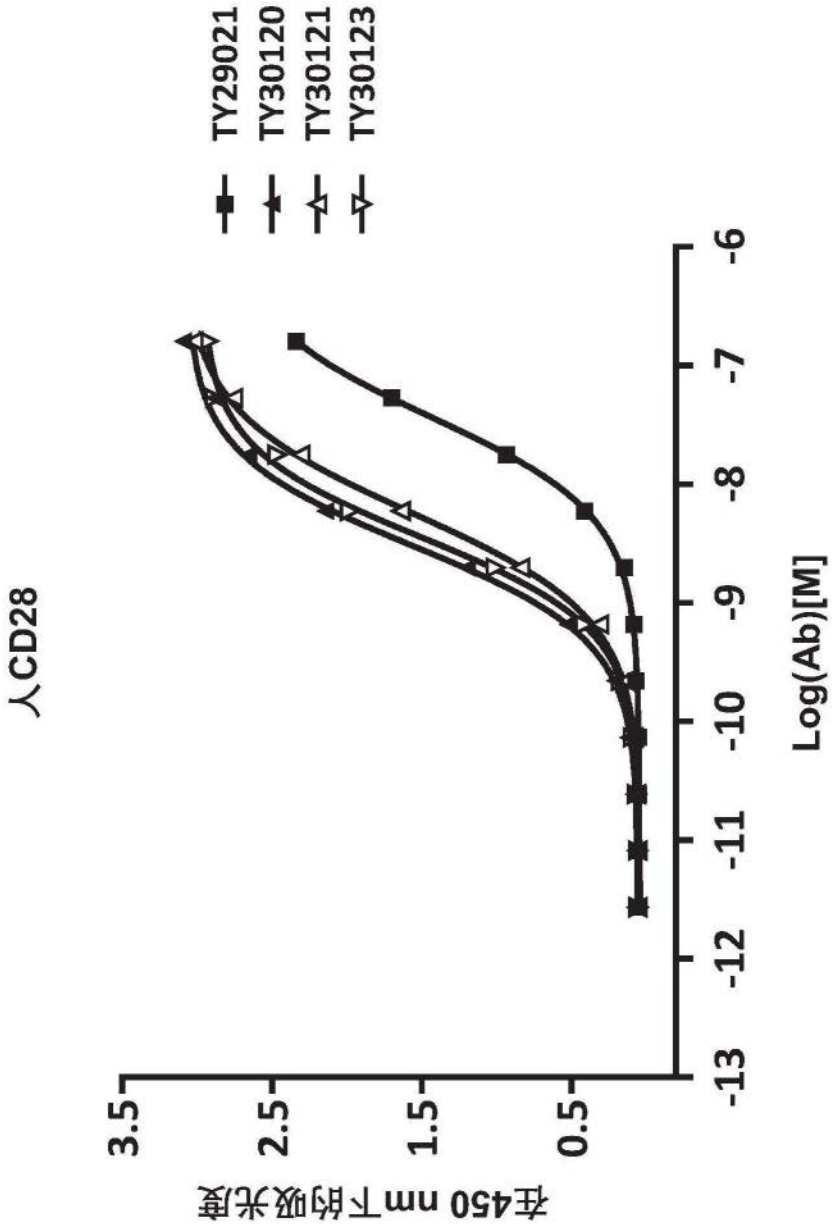


图24A

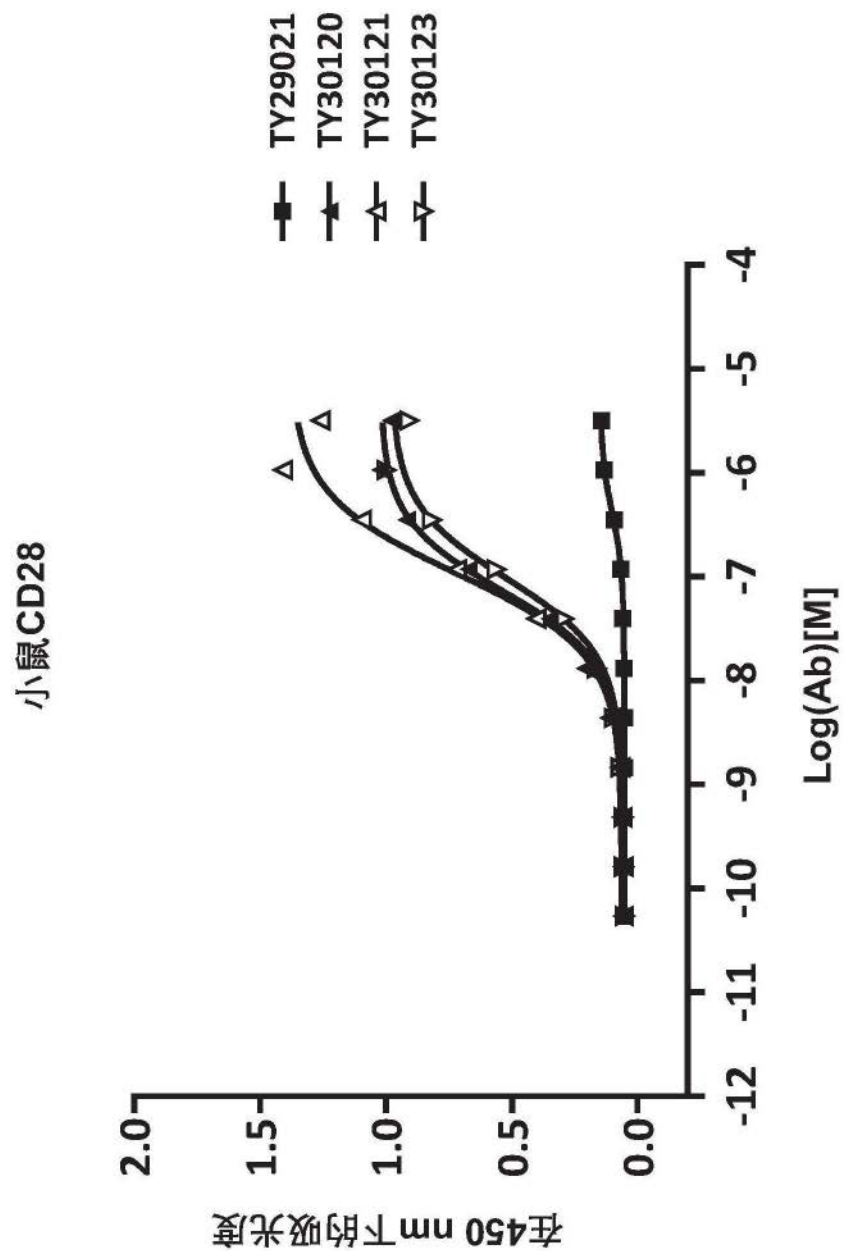
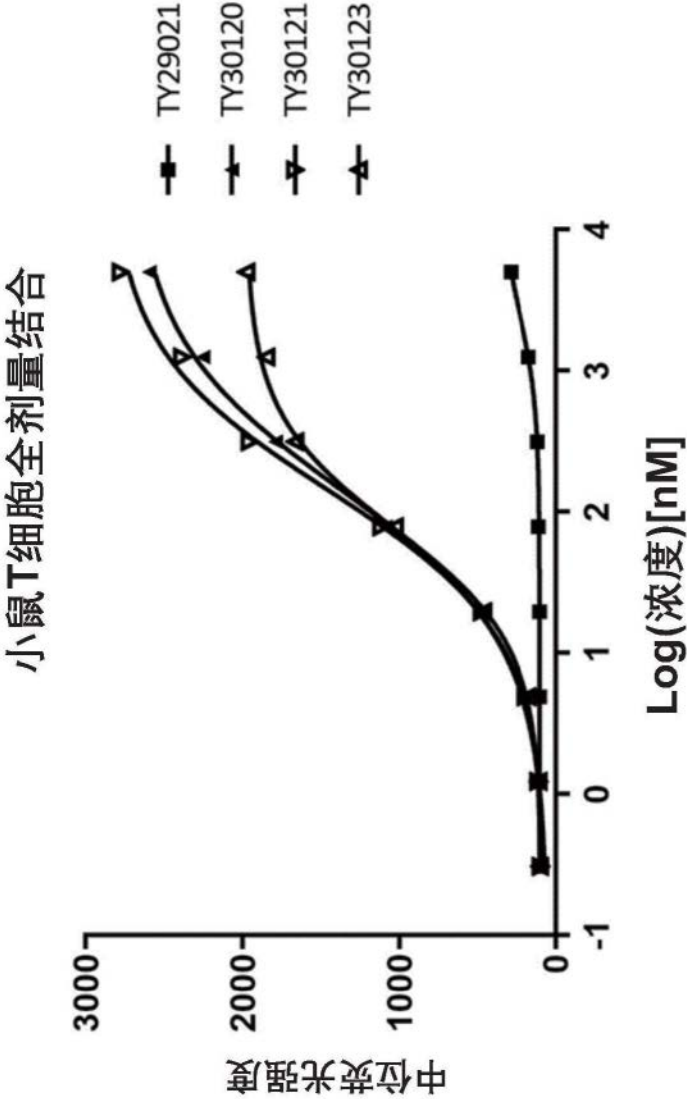


图24B



	EC ₅₀ (nM)	最大MFI	AUC
TY29021	NA	364.1	548.8
TY30120	144.8	2711	4375
TY30121	142.5	2857	4619
TY30123	76.18	1981	3822

图25