



(21) 申请号 201980080109.1

G · D · 扬科普洛斯

(22) 申请日 2019.12.18

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

(65) 同一申请的已公布的文献号

专利代理师 陈文平 刘盈盈

申请公布号 CN 113164598 A

(43) 申请公布日 2021.07.23

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据

A61K 39/395 (2006.01)

62/781,689 2018.12.19 US

A61P 35/02 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C07K 16/28 (2006.01)

2021.06.03

C07K 16/30 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/US2019/067173 2019.12.18

CN 113286811 A, 2021.08.20

(87) PCT国际申请的公布数据

EP 3228325 A1, 2017.10.11

W02020/132066 EN 2020.06.25

H Bohlen等.Cytolysis of leukemic B-

(73) 专利权人 里珍纳龙药品有限公司

cells by T-cells activated via two

地址 美国纽约州

bispecific antibodies.《Cancer Res》.1993,

第53卷(第18期),摘要,第4312-4313页.

(72) 发明人 A · J · 墨菲 D · 思科科斯

审查员 何永培

J · 怀特 E · 厄尔曼 A · 赫尔曼

权利要求书1页 说明书68页

E · 史密斯 K · 奥尔森 J · 韦

序列表49页 附图17页

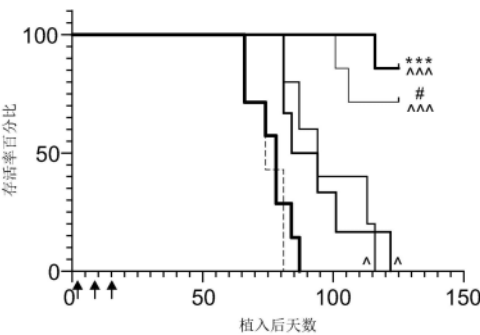
(54) 发明名称

双特异性抗CD28 X抗CD22抗体以及其用途

(57) 摘要

本发明提供了双特异性抗原结合分子,所述双特异性抗原结合分子包括特异性地结合人CD28的第一抗原结合结构域和特异性地结合人CD-22的第二抗原结合分子。在某些实施例中,本发明的双特异性抗原结合分子能够抑制表达CD-22的肿瘤如B细胞淋巴瘤的生长。本发明的抗体和双特异性抗原结合分子可用于治疗这样的疾病和病症:其中上调的或诱导的靶向性免疫应答是期望的和/或在治疗上有益的。

在次有效剂量的REGN1979存在的情况下用REGN5837治疗携带WSU-DLCL2肿瘤的NSG小鼠与比REGN5837或REGN1979单一疗法显著更大的存活率相关



— 1 mg/kg REGN5837 + 0.4 mg/kg REGN1979
— 1 mg/kg REGN5837 + 4 mg/kg REGN1979
— 1 mg/kg 非TAAxCD28 + 0.4 mg/kg REGN1979
— 1 mg/kg 非TAAxCD28 + 4 mg/kg REGN1979
- - 1 mg/kg REGN5837 + 4 mg/kg 非TAAxCD28
— 1 mg/kg 非TAAxCD28 + 4 mg/kg 非TAAxCD28

1. 一种分离的人双特异性抗体或其抗原结合片段,其包括:
 - a) 第一抗原结合结构域(D1),所述第一抗原结合结构域结合人CD28,包括含有SEQ ID NO:26/10的氨基酸序列的重链可变区(HCVR)/轻链可变区(LCVR)对;以及
 - b) 第二抗原结合结构域(D2),所述第二抗原结合结构域特异性地结合靶肿瘤细胞上的人CD22,包括含有SEQ ID NO:2/10的HCVR/LCVR对。
2. 根据权利要求1所述的分离的人双特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述第二抗原结合结构域(D2)结合人CD22上的表位,所述表位包括如SEQ ID NO:57和/或SEQ ID NO:58所示的氨基酸序列。
3. 根据权利要求1或2所述的分离的人双特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述双特异性抗体或其抗原结合片段以如在25℃下通过表面等离子体共振所测量的1nM至15nM的 K_D 结合人CD22。
4. 根据权利要求1或2所述的分离的人双特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述双特异性抗体或其抗原结合片段以如在25℃下通过表面等离子体共振所测量的10 μ M至45 μ M的 K_D 结合人CD28。
5. 根据权利要求1或2所述的分离的人双特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述双特异性抗体或其抗原结合片段以如通过体外FACS结合测定所测量的 1.3×10^{-6} 至 2.3×10^{-8} M的 EC_{50} 与表达人CD28的细胞的表面结合。
6. 根据权利要求1或2所述的分离的人双特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述双特异性抗体或其抗原结合片段以如通过体外FACS结合测定所测量的 1.3×10^{-6} 至 2.3×10^{-8} M的 EC_{50} 与表达人CD22的细胞的表面结合。
7. 根据权利要求1或2所述的分离的人双特异性抗体或其抗原结合片段,其中当结合抗CD20xCD3双特异性抗体使用时,所述双特异性抗体或其抗原结合片段展现出共刺激效应。
8. 根据权利要求7所述的分离的人双特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述共刺激效应选自自由以下组成的组:活化T细胞、诱导IL-2释放、诱导人PBMC中的CD25+上调以及增加CD22表达性细胞系上的人T细胞介导的细胞毒性,及其组合。
9. 一种药物组合物,其包括根据权利要求1到8中任一项所述的人双特异性抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体或稀释剂。
10. 一种核酸分子,其包括编码根据权利要求1到8中任一项所述的人双特异性抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列;或核酸分子的组,其包括分别编码根据权利要求1到8中任一项所述的人双特异性抗体或其抗原结合片段的第一抗原结合结构域的HCVR、第二抗原结合结构域的HCVR和第一和第二抗原结合结构域的LCVR的核苷酸序列。
11. 一种表达载体,其包括根据权利要求10所述的核酸分子;或表达载体的组,其分别包括根据权利要求10所述的核酸分子的组。
12. 一种宿主细胞,其包括根据权利要求10所述的核酸分子或核酸分子的组;或者根据权利要求11所述的表达载体或表达载体的组。
13. 一种产生抗CD22 x抗CD28人双特异性抗体或其抗原结合片段的方法,包括在允许产生所述人双特异性抗体或其抗原结合片段的条件下培养权利要求12所述的宿主细胞,并回收如此产生的人双特异性抗体或其抗原结合片段。

双特异性抗CD28 X抗CD22抗体以及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2018年12月19日提交的美国临时申请第62/781,689号的优先权的权益,所述美国临时申请的全部内容通过引用并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,所述序列表已经以ASCII格式以电子方式提交并且通过全文引用的方式特此并入。创建于2019年12月16日的所述ASCII副本命名为118003_49220_SL.txt并且大小为104,353字节。

技术领域

[0005] 本发明涉及结合CD28和如CD22等靶分子的双特异性抗原结合分子以及其使用方法。

背景技术

[0006] CD28是在T细胞的表面上表达的I型跨膜蛋白,所述I型跨膜蛋白具有组装成同源二聚体的单个细胞外Ig-V样结构域。CD28是CD80 (B7.1) 蛋白和CD86 (B7.2) 蛋白的受体并且由在抗原呈递细胞 (APC) 上表达的CD80或CD86活化。CD28与CD80或CD86的结合提供了对于T细胞活化和存活而言具有重要性的共刺激信号。除了T细胞受体 (TCR) 之外,通过CD28的T细胞刺激也为各种白细胞介素的产生提供了强效信号。CD28在TCR活化之后还加强细胞信号,如由NF κ B转录因子控制的通路。CD28共信号对于有效的T细胞活化如T细胞分化、增殖、细胞因子释放和细胞死亡而言具有重要性。

[0007] 已提出抗CD28抗体用于涉及T细胞的活化的治疗性目的。在2006年的临床试验中使用一种特定的抗CD28抗体TGN1412 (抗CD28超激动剂)。以0.1mg/kg的剂量向六名健康志愿者静脉给药TGN1412 (抗CD28超激动剂)。在两个小时内,所有六名患者均有显著的炎症应答 (细胞因子风暴),并且在十六个小时内,所有患者均出现多器官衰竭。用皮质类固醇治疗受试者,并且细胞因子水平在2-3天内恢复到正常水平。在1期研究 (与CRS相关) 中,0.1mg/kg的起始剂量是基于50mg/kg猕猴“NOAEL”的500倍的倍数 (Suntharalingam等人,1期试验中抗CD28单克隆抗体TGN1412的细胞因子风暴 (Cytokine Storm in a Phase 1 Trial of the Anti-CD28 Monoclonal Antibody TGN1412),《NEJM》355:1018-1028 (2006))。遗憾的是,TGN1412诱导了细胞因子风暴,这是通过毒理学研究在食蟹猴 (cynomolgus macaques) 中或通过离体人PBMC研究未预测到的。

[0008] Siglec家族成员CD22 (也被称为Siglec-2) 特异性地识别 α 2,6唾液酸并且是在B淋巴细胞 (B细胞) 上优先表达的跨膜蛋白。

[0009] CD22有许多先天功能,包含例如B细胞稳态、B细胞存活和迁移、阻尼TLR和CD40信号传导和通过胞质区中的免疫受体酪氨酸基抑制基序 (ITIM) 的磷酸化作用招募含SH2结构域的磷酸酶来抑制B细胞受体 (BCR) 信号传导以及有助于B细胞和其它细胞类型之间的细胞粘着。

[0010] 既没有在发育的早期阶段期间在B细胞的表面上发现CD22,也没有在干细胞中表达CD22。然而,所有B细胞淋巴瘤和白血病中的60-70%表达CD22。

[0011] 已经研究了用于治疗B细胞淋巴瘤和白血病的抗CD22抗体。然而,单克隆抗体依帕珠单抗(Epratuzumab)取得的成功有限。(Grant等人(2013)《癌症(Cancer)》119(21): 10.1002/cncr.28299)。

[0012] 因此,本领域中需要改进的抗CD22抗体。还需要安全用于在药物组合物中使用的抗CD28抗体。此外,结合CD28和靶抗原(如CD22)两者的双特异性抗原结合分子在这样的治疗环境中将会是有用的:其中期望对表达靶抗原的细胞进行特异性靶向和T细胞介导的杀伤。

发明内容

[0013] 在第一方面,本发明提供了结合CD28和靶抗原的双特异性抗原结合分子。根据某些示例性实施例,所述双特异性抗原结合分子结合CD28和CD22;这种双特异性抗原结合分子在本文中也称为“抗CD28/抗CD22双特异性分子”。所述抗CD28/抗CD22双特异性分子的抗CD22部分可用于靶向表达CD22的癌细胞(例如,癌性B细胞),并且所述双特异性分子的抗CD28部分可用于活化T细胞。癌细胞上的CD22和T细胞上的CD28的同时结合促进了通过活化的T细胞(例如,在T细胞的TCR活化之后)对靶向的癌细胞的定向杀伤(细胞裂解)。因此,本发明的抗CD28/抗CD22双特异性分子尤其可用于治疗与CD22表达性肿瘤相关或由其引起的疾病和病症(例如,B细胞增殖性病症,例如,B细胞淋巴瘤,例如弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、边缘带淋巴瘤)。

[0014] 根据本发明的此方面的双特异性抗原结合分子包括特异性地结合人CD28的第一抗原结合结构域和特异性地结合CD22第二抗原结合结构域。本发明包含抗CD28/抗CD22双特异性分子(例如,双特异性抗体),其中每个抗原结合结构域包括与轻链可变区(LCVR)配对的重链可变区(HCVR)。在本发明的某些示例性实施例中,抗CD28抗原结合结构域和抗CD22抗原结合结构域各自包括与共同LCVR配对的不同的独特HCVR。

[0015] 本发明提供了抗CD28/抗CD22双特异性分子,其中特异性地结合CD28的第一抗原结合结构域包括如表6中所示的HCVR氨基酸序列中的任何一个。特异性地结合CD28的第一抗原结合结构域还可以包括如表6中所示的LCVR氨基酸序列中的任何一个。根据某些实施例,特异性地结合CD28的第一抗原结合结构域包括如表6中所示的HCVR/LCVR氨基酸序列对中的任何一个。本发明还提供了抗CD28/抗CD22双特异性分子,其中特异性地结合CD28的第一抗原结合结构域包括如表6中所示的重链CDR1-CDR2-CDR3氨基酸序列中的任何一个和/或如表6中所示的轻链CDR1-CDR2-CDR3氨基酸序列中的任何一个。

[0016] 根据某些实施例,本发明提供了抗CD28/抗CD22双特异性分子,其中特异性地结合CD28的第一抗原结合结构域包括重链可变区(HCVR),所述HCVR具有选自SEQ ID NO:28和26组成的组的氨基酸序列或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上类似的序列。

[0017] 本发明还提供了抗CD28/抗CD22双特异性分子,其中特异性地结合CD28的第一抗原结合结构域包括轻链可变区(LCVR),所述LCVR具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上类似的序列。

[0018] 本发明还提供了抗CD28/抗CD22双特异性分子,其中特异性地结合CD28的第一抗原结合结构域包括选自SEQ ID NO:28/10和26/10组成的组的HCVR和LCVR(HCVR/LCVR)氨基酸序列对。

[0019] 本发明还提供了抗CD28/抗CD22双特异性分子,其中特异性地结合CD28的第一抗原结合结构域包括:重链CDR3(HCDR3)结构域,所述HCDR3结构域具有SEQ ID NO:32的氨基酸序列或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上类似的序列;以及轻链CDR3(LCDR3)结构域,所述LCDR3结构域具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的基本上类似的序列。

[0020] 在某些实施例中,特异性地结合CD28的第一抗原结合结构域包括SEQ ID NO:32/16的HCDR3/LCDR3氨基酸序列对。

[0021] 本发明还提供了抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子,其中特异性地结合CD28的第一抗原结合结构域包括:重链CDR1(HCDR1)结构域,所述HCDR1结构域具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上类似的序列;重链CDR2(HCDR2)结构域,所述HCDR2结构域具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上类似的序列;轻链CDR1(LCDR1)结构域,所述LCDR1结构域具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上类似的序列;以及轻链CDR2(LCDR2)结构域,所述LCDR2结构域具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上类似的序列。

[0022] 本发明的某些非限制性、示例性抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子包含特异性地结合CD28的第一抗原结合结构域,所述第一抗原结合结构域包括分别具有以下的氨基酸序列的HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3结构域:SEQ ID NO:28-30-32-12-14-16。

[0023] 本发明还提供了抗CD28/抗CD22双特异性分子,其中特异性地结合CD22的第二抗原结合结构域包括重链可变区(HCVR),所述HCVR具有选自SEQ ID NO:2和18组成的组的氨基酸序列或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上类似的序列。

[0024] 本发明还提供了抗CD28/抗CD22双特异性分子,其中特异性地结合CD22的第二抗原结合结构域包括轻链可变区(LCVR),所述LCVR具有选自SEQ ID NO:10的氨基酸序列或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上类似的序列。

[0025] 本发明还提供了抗CD28/抗CD22双特异性分子,其中特异性地结合CD22的第二抗原结合结构域包括选自SEQ ID NO:2/10和18/10组成的组的HCVR和LCVR(HCVR/LCVR)氨基酸序列对。

[0026] 本发明还提供了抗CD28/抗CD22双特异性分子,其中特异性地结合CD22的第二抗原结合结构域包括:重链CDR3(HCDR3)结构域,所述HCDR3结构域具有选自SEQ ID NO:8和24组成的组的氨基酸序列或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上类似的序列;以及轻链CDR3(LCDR3)结构域,所述LCDR3结构域具有选自SEQ ID NO:16的氨基酸序列或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上类似的序列。

[0027] 在某些实施例中,特异性地结合CD22的第二抗原结合结构域包括选自SEQ ID NO:8/16和24/16组成的组的HCDR3/LCDR3氨基酸序列对。

[0028] 本发明还提供了抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子,其中特异性地结合CD22的第二抗原结合结构域包括:重链CDR1 (HCDR1) 结构域,所述HCDR1结构域具有选自SEQ ID NO:4和20组成的组的氨基酸序列或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上类似的序列;重链CDR2 (HCDR2) 结构域,所述HCDR2结构域具有选自SEQ ID NO:6和22组成的组的氨基酸序列或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上类似的序列;轻链CDR1 (LCDR1) 结构域,所述LCDR1结构域具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上类似的序列;以及轻链CDR2 (LCDR2) 结构域,所述LCDR2结构域具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上类似的序列。

[0029] 本发明的某些非限制性、示例性抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子包含特异性地结合CD22的第二抗原结合结构域,所述第二抗原结合结构域包括分别具有选自以下组成的组的氨基酸序列的HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3结构域:SEQ ID NO:4-6-8-12-14-16和20-22-24-12-14-16。

[0030] 在相关实施例中,本发明包含抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子,其中特异性地结合CD22的第二抗原结合结构域包括选自SEQ ID NO:2/10和18/10组成的组的重链可变区和轻链可变区 (HCVR/LCVR) 序列内含有的重链和轻链CDR结构域。

[0031] 在另一个方面,本发明提供了对本文公开的抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子的HCVR、LCVR或CDR序列中的任何一个进行编码的核酸分子,所述核酸分子包含:包括如本文表7中所示的多核苷酸序列的核酸分子以及包括如表7中所示的多核苷酸序列中的两个或更多的核酸分子(以其任何功能组合或布置)。携带本发明的核酸的重组表达载体和引入了此类载体的宿主细胞也涵盖在本发明中,通过在允许产生抗体的条件下培养宿主细胞并回收产生的抗体来产生抗体的方法也是如此。

[0032] 本发明包含抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子,其中特异性地结合CD28的上述抗原结合结构域中的任何一个与特异性地结合CD22的上述抗原结合结构域中的任何一个组合、连接或以其它方式缔合,以形成结合CD28和CD22的双特异性抗原结合分子。

[0033] 本发明包含具有经修饰的糖基化模式的抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子。在一些应用中,用于去除不期望的糖基化位点的修饰可以是有用的,或者例如用于增加抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 功能的缺乏寡糖链上存在的岩藻糖部分的抗体(参见Shield等人(2002),《JBC》277:26733)。在其它应用中,可以进行半乳糖基化的修饰,以修饰补体依赖性细胞毒性 (CDC)。

[0034] 在另一个方面,本发明提供了一种药物组合物,其包括如本文所公开的抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子以及药学上可接受的载体。在相关方面,本发明的特征在于一种组合物,其是抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子和第二治疗剂的组合。在一个实施例中,第二治疗剂是有效地与抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子组合的任何药剂。可以有效地与抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子组合的示例性药剂在本文的其它地方详细讨论。

[0035] 在又另一个方面,本发明提供了用于使用本发明的抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子靶向/杀伤表达CD22的癌细胞的治疗性方法,其中所述治疗性方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的包括本发明的抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子的药物组合物。

[0036] 本发明还包含本发明的抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子在制造用于治疗与CD22表达相关或由其引起的疾病或病症的药物中的用途。

[0037] 在又另一个方面,本发明提供了用于使用本发明的抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子靶向/杀伤表达CD22的癌细胞的治疗性方法,其中所述抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子与同CD3结合的其它抗肿瘤双特异性抗原结合分子组合(例如,抗CD28/抗CD22与抗CD3/抗CD20抗体组合)。

[0038] 在仍另一个方面,本发明提供了用于使用本发明的抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子靶向/杀伤表达CD22的癌细胞的治疗性方法,其中所述抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子与靶向PD-1、PD-L1或CTLA-4的检查点抑制剂组合(例如,抗CD28/抗CD22与抗PD1抗体组合)。例如,在某些实施例中,本发明的抗CD28/抗CD22抗体可以与靶向PD-1的药剂如派姆单抗(Pembrolizumab) (**Keytruda®**)、纳武单抗(Nivolumab) (**Opdivo®**)或西米普利单抗(Cemiplimab) (**Libtayo®**)组合。在某些实施例中,本发明的抗CD28/抗CD22抗体可以与靶向PD-L1的药剂如阿特朱单抗(Atezolizumab) (**Tecentriq®**)、阿维鲁单抗(Avelumab) (**Bavencio®**)或度伐鲁单抗(Durvalumab) (**Imfinzi®**)组合。在某些实施例中,本发明的抗CD28/抗CD22抗体可以与靶向CTLA-4的药剂如易普利姆玛(Ipilimumab) (**Yervoy®**)组合。

[0039] 在仍另一个方面,本发明提供了用于使用本发明的抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子靶向/杀伤表达CD22的癌细胞的治疗性方法,其中所述抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子与同CD3结合的其它抗肿瘤双特异性抗原结合分子(例如,抗CD28/抗CD22与抗CD3/抗CD20双特异性抗体例如REGN1979(参见US9,657,102,其中抗CD20臂包括SEQ ID NO:1242/1258的HCVR/LCVR氨基酸对并且抗CD3臂包括SEQ ID NO:1250/1258的氨基酸对))组合和/或与靶向PD-1、PD-L1或CTLA-4的检查点抑制剂组合(即,抗CD28/抗CD22与抗PD-1抗体组合)。例如,在某些实施例中,本发明的抗CD28/抗CD22抗体可以与靶向PD-1的药剂如派姆单抗(**Keytruda®**)、纳武单抗(**Opdivo®**)或西米普利单抗(**Libtayo®**,参见例如US9,987,500,其中西米普利单抗包括SEQ ID NO:162/170的HCVR/LCVR氨基酸对))组合。在某些实施例中,本发明的抗CD28/抗CD22抗体可以与靶向PD-L1的药剂如阿特朱单抗(**Tecentriq®**)、阿维鲁单抗(**Bavencio®**)或度伐鲁单抗(**Imfinzi®**)组合。在某些实施例中,本发明的抗CD28/抗CD22抗体可以与靶向CTLA-4的药剂如易普利姆玛(**Yervoy®**)组合。

[0040] 通过阅读随后的详细描述,其它实施例将变得显而易见。

附图说明

[0041] 图1是描绘了抗CD28/抗CD22双特异性抗体与在细胞表面上表达CD28的人CD4⁺T细胞和表达人CD22的靶细胞的结合的一组图。

[0042] 图2A和2B是描绘了抗CD28/抗CD22双特异性抗体在原代T细胞刺激和CD22靶向表达存在的情况下示出增加的荧光素酶产生的一组图。图2A是描绘了如通过荧光素酶产生所评估的除了200pM恒定REGN1945 (阴性hIgG4同种型对照) 之外还与HEK293/hCD20、HEK293/hCD20/hCD22或Raji/CD80和CD86阴性细胞共温育的工程化报告T细胞的活化的一组图。图2B是描绘了如通过荧光素酶产生所评估的除了200pM恒定REGN2281 (抗CD20 x抗CD3) 之外还与HEK293/hCD20、HEK293/hCD20/hCD22或Raji/CD80和CD86阴性细胞共温育的工程化报告T细胞的活化的一组图。

[0043] 图3A和图3B是描绘了抗CD28/抗CD22双特异性抗体在原代T细胞刺激和CD22靶向表达存在的情况下增加IL-2产生的一组图。更具体地,图3A是描绘了如通过IL-2产生所评估的在2nM恒定REGN1945 (hIgG4同种型对照) 存在的情况下与HEK293/hCD20、HEK293/hCD20/hCD22或Raji/CD80和CD86阴性细胞共温育的CD4⁺T细胞的活化的一组图。图3B是描绘了如通过IL-2产生所评估的除了2nM恒定REGN2281 (抗CD20 x抗CD3) 之外还与HEK293/hCD20、HEK293/hCD20/hCD22或Raji/CD80和CD86阴性细胞共温育的CD4⁺T细胞的活化的一组图。

[0044] 图4是示出了在工程化以表达PD-L1的细胞中REGN5837与西米普利单抗的组合将IL-2释放增强超过仅REGN5837治疗的一组图。

[0045] 图5A是示出了REGN5837与西米普利单抗的组合在工程化以表达PD-L1的NALM6细胞存在的情况下增强IL-2释放的一组图。

[0046] 图5B是示出了在工程化以表达PD-L1的RAJI细胞中REGN5837与西米普利单抗的组合将IL-2释放增强超过单独的REGN5837治疗的一组图。

[0047] 图6是示出了在REGN1979 (抗CD20 x抗CD3) 存在的情况下用REGN5837治疗携带NALM-6-Luc肿瘤的小鼠与显著的肿瘤抑制相关的一组图。简而言之,向NSG小鼠 (每组n=6到9) 移植人PBMC、然后在移植后 (第0天) 12天植入NALM-6-luc B细胞白血病细胞。在植入后 (箭头) 8天、15天和22天向小鼠施用4mg/kg REGN5837+0.04mg/kg REGN1979 (散列圆形)、0.4mg/kg REGN5837+0.04mg/kg REGN1979 (封闭的直立三角形)、0.04mg/kg REGN5837+0.04mg/kg REGN1979 (菱形)、4mg/kg non-TAAxCD28+0.04mg/kg REGN1979 (正方形)、4mg/kg REGN5837+0.4mg/kg非-TAAxCD3 (开放圆形) 或4mg/kg非TAAxCD28+0.4mg/kg非TAAxCD3 (封闭的倒三角形)。在植入后6天、10天、14天、17天、20天和23天通过对肿瘤体积的生物发光成像来监测肿瘤生长。将组合数据表示为组平均值±SEM。使用双向ANOVA和图基事后检验 (Tukey's post hoc test) 确定统计学显著性。使用以下符号来指示相对于非TAAxCD28+非TAAxCD3对照的统计学显著差异:*, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001。

[0048] 图7A-7C是示出了REGN1979活化并指导人T细胞以剂量依赖性方式杀伤NALM6细胞的图。更具体地,图7A是描绘了在指示的抗体存在的情况下NALM6细胞的存活率百分比的图。图7B是描绘了表达CD25 (CD25⁺) 的CD8⁺细胞在指示的抗体存在的情况下的百分比的图。图7C是描绘了在指示的抗体存在的情况下如通过CellTrace Violet稀释所评估的CD25⁺CD8⁺细胞的增殖的图。

[0049] 图8A、8B和8C是示出了REGN1979活化并指导人T细胞以剂量依赖性方式杀伤WSU-DLCL2细胞的图。更具体地,图8A是示出了在指示的抗体存在的情况下WSU-DLCL2细胞的存活率百分比的图。图8B是描绘了表达CD25 (CD25⁺) 的CD8⁺细胞在指示的抗体存在的情况下

的百分比的图。图8C是描绘了表示为已分裂%的在指示的抗体存在的情况下的CD8+细胞增殖的图。

[0050] 图9是示出了在利用人PBMC和WSU-DLCL2细胞的测定中REGN1979诱导了人细胞因子IL-2、IL-4、IL-6和IL-10的释放的一组图。与仅由REGN1979诱导的细胞因子释放相比,在固定浓度的CD22 X CD28存在的情况下增强了用REGN1979观察到的细胞因子释放。

[0051] 图10A-10E是示出了REGN1979活化并指导人T细胞以剂量依赖性方式耗竭NHL的图。与具有单臂CD28对照抗体或没有共刺激对照的REGN1979相比,将固定浓度的CD22xCD28双特异性抗体添加到REGN1979使REGN1979的细胞毒性功效(EC50)增强了2.3倍和3.5倍。如分别通过CD8+和CD4+细胞上的CD25上调或CellTrace Violet稀释测量的,观察到的由REGN1979介导的靶细胞裂解与T细胞活化和增殖相关。更具体地,图10A是描绘了在指示的抗体存在的情况下来自患者骨髓的NHL细胞的存活率百分比的图。图10B是描绘了表达CD25(CD25+)的CD8+细胞在指示的抗体存在的情况下的百分比的图。图10C是描绘了在指示的抗体存在的情况下如通过CellTrace Violet稀释评估的CD8+细胞的增殖的图。图10D是描绘了表达CD25(CD25+)的CD4+细胞在指示的抗体存在的情况下的百分比的图。图10E是描绘了在指示的抗体存在的情况下如通过CellTrace Violet稀释评估的CD4+细胞的增殖的图。

[0052] 图11A-11E是示出了REGN5837以浓度依赖性方式增强了REGN1979介导细胞毒性的效力、CD25的细胞表面表达和T细胞增殖的图。简而言之,WSU-DLCL2细胞与淋巴细胞富集的人PBMC以1:5的靶细胞:PBMC比并且与抗CD20xCD3(REGN1979)在一定的浓度范围内(4.8fM到10nM)作为单一药剂(即,无REGN5837)或在固定浓度的REGN5837(范围为0.01到15 μ g/mL)存在的情况下在37 $^{\circ}$ C温育72小时。缺乏REGN1979的情况仅含有指示的浓度下的REGN5837并且绘制为0.04pM。使用活/死细胞染色(11A)通过流式细胞术检测活细胞。使用Violet Cell Tracker染料以及针对CD2、CD4、CD8和CD25的的荧光团标记抗体的表型混合物来检测T细胞活化(如CD25表达所测量的;11B、11D)和通过流式细胞术的CD4⁺和CD8⁺T细胞增殖(11C、11E)。

[0053] 更具体地,图11A是描绘了在所指示浓度的REGN5837下的死细胞%的图。图11B是描绘了在所指示浓度的REGN5837下的CD25+CD4+细胞的百分比的图。图11C是描绘了在所指示浓度的REGN5837下如通过CellTrace Violet稀释评估的CD4+细胞的增殖的图。图11D是描绘了CD25+CD8+细胞的百分比的图。图11E是描绘了在所指示浓度的REGN5837下如通过CellTrace Violet稀释评估的CD8+细胞的增殖的图。

[0054] 图12A-12G是示出了REGN5837在WSU-DLCL2 B细胞淋巴瘤细胞存在的情况下以浓度依赖性方式增强了来自人T细胞的REGN1979介导的细胞因子释放的效力和最大水平的图。简而言之,WSU-DLCL2细胞与淋巴细胞富集的人PBMC以1:5的靶细胞:PBMC比并且与抗CD20xCD3(REGN1979)在一定的浓度范围内(4.8fM到10nM)作为单一药剂(即,无REGN5837)或在固定浓度的REGN5837(范围为0.01到15 μ g/mL)存在的情况下在37 $^{\circ}$ C温育72小时。缺乏REGN1979的情况仅含有指示的浓度下的REGN5837并且绘制为0.04pM。使用BD流式细胞珠阵列人Th1/Th2/Th17细胞因子试剂盒评估上清液的(12A) IL-2、(12B) IL-4、(12C) IL-6、(12D) IL-10、(12E) TNF- α 、(12F) IFN- γ 和(12G) IL-17 α 的细胞因子释放。

[0055] 更具体地,图12A是描绘了在所指示浓度的REGN5837下在WSU-DLCL2细胞存在的情况下从人T细胞释放的IL-2的水平图。图12B是描绘了在所指示浓度的REGN5837下在WSU-

DLCL2细胞WSU-DLCL2细胞存在的情况下从人T细胞释放的IL-4的水平的图。图12C是描绘了在所指示浓度的REGN5837下在WSU-DLCL2细胞WSU-DLCL2细胞存在的情况下从人T细胞释放的IL-6的水平的图。图12D是描绘了在所指示浓度的REGN5837下在WSU-DLCL2细胞WSU-DLCL2细胞存在的情况下从人T细胞释放的IL-10的水平的图。图12E是描绘了在所指示浓度的REGN5837下在WSU-DLCL2细胞WSU-DLCL2细胞存在的情况下从人T细胞释放的TNF- α 的水平的图。图12F是描绘了在所指示浓度的REGN5837下在WSU-DLCL2细胞WSU-DLCL2细胞存在的情况下从人T细胞释放的IFN- γ 的水平的图。图12G是描绘了在所指示浓度的REGN5837下在WSU-DLCL2细胞WSU-DLCL2细胞存在的情况下从人T细胞释放的IL-17 α 的水平的图。

[0056] 图13A和13B是示出了在REGN1979以0.4或4mg/kg存在的情况下用REGN5837治疗携带WSU-DLCL2肿瘤的NSG小鼠与显著肿瘤抑制相关的图。简而言之,将WSU-DLCL2 B细胞淋巴瘤细胞和人PBMC的1:1混合物植入雌性NSG小鼠(每组n=6到7)(第0天)。在植入后第1天、第8天和第15天(箭头)向小鼠施用1mg/kg REGN5837和0.4mg/kg (13A)或4mg/kg (13B) REGN1979(或非桥接对照)的组合在植入后第7天、第10天、第14天、第16天、第28天、第31天、第35天、第38天、第43天、第46天、第49天、第53天、第57天和第63天通过卡尺测量来监测肿瘤生长。将组合数据表示为组平均值 $\pm$ SEM。使用双向ANOVA和图基事后检验确定统计学显著性。以下符号用于指示组之间的统计学上显著的差异:*, $p<0.05$;**, $p<0.01$;***, $p<0.001$;****, $p<0.0001$ 。星号指示REGN1979单一疗法与同种型对照之间的统计学显著性,井号指示REGN5837和REGN1979的组合与同种型对照之间的显著性,并且插入符号指示REGN1979单一疗法与REGN5837和REGN1979的组合之间的显著性。

[0057] 更具体地,图13A是描绘了施用了1mg/kg REGN5837和0.4mg/kg REGN1979(或非桥接对照,非TAAxCD3)的小鼠的肿瘤生长的图。图13B是描绘了施用了1mg/kg REGN5837和4mg/kg(或非桥接对照,非TAAxCD3)的小鼠的肿瘤生长的图。

[0058] 图14是示出了在次有效剂量的REGN1979存在的情况下用REGN5837治疗携带WSU-DLCL2肿瘤的小鼠与比REGN5837或REGN1979单一疗法显著更大的存活率相关的图。简而言之,将WSU-DLCL2 B细胞淋巴瘤细胞和人PBMC的1:1混合物植入雌性NSG小鼠(每组n=6到7)(第0天)。在植入后第1天、第8天和第15天(箭头)向小鼠施用REGN5837和REGN1979或对照的组合。使用Mantel-Cox检验确定统计学显著性。以下符号用于指示组之间的统计学上显著的差异:*, $p<0.05$;***, $p<0.001$ 。插入符号指示相比于同种型对照的统计学显著性,星号指示相比于0.4mg/kg REGN1979单一疗法的显著性,并且井号指示相比于4mg/kg REGN1979单一疗法的显著性。

具体实施方式

[0059] 在描述本发明之前,应当理解,本发明不限于所描述的特定方法和实验条件,因为此类方法和条件可以变化。还应当理解,本文所使用的术语仅出于描述特定实施例的目的,而并不旨在进行限制,因为本发明的范围仅由所附权利要求限制。

[0060] 除非另外定义,否则本文所使用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。如本文所使用的,当用于提及特定所列举数值时,术语“约”意味着值可以与所列举值相差不超过1%。例如,如本文所使用的,表述“约100”包含99和101以及介于两者之间的所有值(例如,99.1、99.2、99.3、99.4等)。

[0061] 尽管在本发明的实践或测试中可以使用类似于或等同于本文所述的方法和材料的任何方法和材料,但现在描述优选的方法和材料。本说明书中提及的所有专利、申请和非专利出版物均通过全文引用的方式并入本文。

[0062] 定义

[0063] 如本文所使用的,表述“CD28”是指作为共刺激受体在T细胞上表达的抗原。人CD28包括如SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列,和/或具有如NCBI登录号NP_006130.1中所示的氨基酸序列。除非明确指定为来自非人物种,否则本文对蛋白质、多肽和蛋白质片段的所有提及旨在指代相应蛋白质、多肽或蛋白质片段的人形式。因此,除非指定为来自非人物种例如“小鼠CD28”、“猴CD28”等,否则表述“CD28”意指人CD28。

[0064] 如本文所使用的,“结合CD28的抗体”或“抗CD28抗体”包含特异性地识别单体CD28的抗体和其抗原结合片段以及特异性地识别二聚体CD28的抗体和其抗原结合片段。本发明的抗体和抗原结合片段可以结合可溶性CD28和/或细胞表面表达的CD28。可溶性CD28包含天然CD28蛋白以及缺乏跨膜结构域或以其它方式与细胞膜未缔合的重组CD28蛋白变体,例如单体和二聚体CD28构建体。

[0065] 如本文所使用的,表述“细胞表面表达的CD28”意指在体外或体内在细胞的表面上表达使得CD28蛋白的至少一部分暴露于细胞膜的细胞外侧的并且可被抗体的抗原结合部分接近的一个或多个CD28蛋白。“细胞表面表达的CD28”包含在细胞的膜中的功能性T细胞共刺激受体的背景下所含有的CD28蛋白。表述“细胞表面表达的CD28”包含在细胞表面上作为同源二聚体的一部分表达的CD28蛋白。“细胞表面表达的CD28”可以包括在通常表达CD28蛋白的细胞表面上表达的CD28蛋白或由其组成。可替代地,“细胞表面表达的CD28”可以包括在这样的细胞的表面上表达的CD28蛋白或由其组成:所述细胞通常在其表面上不表达人CD28,但已被人工工程化成在其表面上表达CD28。

[0066] 如本文所使用的,表述“抗CD28抗体”包含具有单一特异性的单价抗体以及包括结合CD28的第一臂和结合第二(靶)抗原的第二臂的双特异性抗体,其中抗CD28臂包括如本文表1中所示的HCVR/LCVR或CDR序列中的任何一个。抗CD28双特异性抗体的实例在本文的其它地方描述。术语“抗原结合分子”包含抗体和抗体的抗原结合片段,包含例如双特异性抗体。

[0067] 如本文所使用的,除非指定为来自非人物种(例如,“小鼠CD22”、“猴CD22”等),否则术语“CD22”是指人CD22蛋白。人CD22蛋白具有如登录号CAA42006中所示的氨基酸序列。带有myc myc六组氨酸标签(“六组氨酸”被公开为SEQ ID NO:60)的重组人CD22 ecto(D20-R687)的序列在登录号NP_001762.2中示出并且还被示为SEQ ID NO:50。hCD22胞外结构域(D20-R687).hFc也可以从R&D系统公司(R&D Systems)购买,目录号为1968-SL-050。

[0068] 如本文所使用的,“结合CD22的抗体”或“抗CD22抗体”包含可以结合可溶性CD22和/或细胞表面表达的CD22的抗体和其抗原结合片段。可溶性CD22包含天然CD22蛋白以及缺乏跨膜结构域或以其它方式与细胞膜未缔合的重组CD22蛋白变体,例如CD22构建体。

[0069] 如本文所使用的,表述“抗CD22抗体”包含具有单一特异性的单价抗体以及包括结合CD22的第一臂和结合第二(靶)抗原的第二臂的双特异性抗体,其中抗CD22臂包括如本文表1中所示的HCVR/LCVR或CDR序列中的任何一个。抗CD22双特异性抗体的实例在本文的其它地方描述。术语“抗原结合分子”包含抗体和抗体的抗原结合片段,包含例如双特异性抗

体。

[0070] 术语“抗原结合分子”包含抗体和抗体的抗原结合片段,包含例如双特异性抗体。

[0071] 如本文所使用的,术语“抗体”意指包括与特定抗原(例如,CD28)特异性地结合或相互作用的至少一个互补决定区(CDR)的任何抗原结合分子或分子复合物。术语“抗体”包含免疫球蛋白分子及其多聚体(例如,IgM),所述免疫球蛋白分子包括通过二硫键相互连接的两条重(H)链和两条轻(L)链四条多肽链。每条重链包括重链可变区(在本文中缩写为HCVR或VH)和重链恒定区。重链恒定区包括三个结构域 C_H1 、 C_H2 和 C_H3 。每条轻链包括轻链可变区(在本文中缩写为LCVR或VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包括一个结构域(C_L1)。可以将 V_H 区和 V_L 区进一步细分为被称作互补决定区(CDR)的高变区,所述高变区散布有更保守的被称作框架区(FR)的区。每个 V_H 和 V_L 由按以下顺序从氨基端到羧基端布置的三个CDR和四个FR构成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本发明的不同实施例中,抗CD28抗体和/或抗CD22抗体(或其抗原结合部分)的FR可以与人种系序列相同或者可以是天然的或人工修饰的。可以基于对两个或更多个CDR的并列分析来定义氨基酸共有序列。

[0072] 如本文所使用的,术语“抗体”还包含完整抗体分子的抗原结合片段。如本文所使用的,术语抗体的“抗原结合部分”、抗体的“抗原结合片段”等包含特异性地结合抗原以形成复合物的任何天然存在的、可酶促获得的、合成的或基因工程化的多肽或糖蛋白。抗体的抗原结合片段可以例如使用任何合适的标准技术衍生自完整抗体分子,所述标准技术如涉及操纵和表达对抗体可变结构域和任选地恒定结构域进行编码的DNA的蛋白水解消化或重组基因工程技术。此类DNA是已知的和/或易于从例如商业来源、DNA文库(包含例如噬菌体-抗体文库)获得或可以合成。可以以化学方式或通过使用分子生物学技术对DNA进行测序和操纵,例如,以将一个或多个可变结构域和/或恒定结构域布置成合适的构型或引入密码子、产生半胱氨酸残基、修饰、添加或缺失氨基酸等。

[0073] 抗原结合片段的非限制性实例包含:(i) Fab片段;(ii) F(ab')₂片段;(iii) Fd片段;(iv) Fv片段;(v) 单链Fv(scFv)分子;(vi) dAb片段;以及(vii)由模拟抗体的高变区的氨基酸残基组成的最小识别单位(例如,分离的互补决定区(CDR),如CDR3肽)或受约束的FR3-CDR3-FR4肽。其它工程化分子如结构域特异性抗体、单结构域抗体、结构域缺失抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、双抗体、三抗体、四抗体、微抗体、纳米抗体(例如,单价纳米抗体、二价纳米抗体等)、小型模块化免疫药物(SMIP)和鲨鱼可变IgNAR结构域也涵盖在如本文所使用的表述“抗原结合片段”内。

[0074] 抗体的抗原结合片段通常包括至少一个可变结构域。可变结构域可以具有任何大小或氨基酸组成并且通常包括与一个或多个框架序列相邻或同框的至少一个CDR。在具有与 V_L 结构域缔合的 V_H 结构域的抗原结合片段中, V_H 结构域和 V_L 结构域可以以任何合适的布置相对于彼此定位。例如,可变区可以是二聚体并且含有 V_H - V_H 、 V_H - V_L 或 V_L - V_L 二聚体。可替代地,抗体的抗原结合片段可以含有单体 V_H 或 V_L 结构域。

[0075] 在某些实施例中,抗体的抗原结合片段可以含有至少一个与至少一个恒定结构域共价连接的可变结构域。可以在本发明的抗体的抗原结合片段内发现的可变结构域和恒定结构域的非限制性示例性构型包含:(i) V_H - C_H1 ;(ii) V_H - C_H2 ;(iii) V_H - C_H3 ;(iv) V_H - C_H1 - C_H2 ;(v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ;(vi) V_H - C_H2 - C_H3 ;(vii) V_H - C_L ;(viii) V_L - C_H1 ;(ix) V_L - C_H2 ;(x) V_L - C_H3 ;(xi) V_L - C_H1 - C_H2 ;(xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ;(xiii) V_L - C_H2 - C_H3 ;以及(xiv) V_L - C_L 。在可变区和恒定区的

任何构型(包含上文所列出的示例性构型中的任何示例性构型)中,可变结构域和恒定结构域可以彼此直接连接或可以通过完整或部分铰链或连接子区连接。铰链区可以由至少2个(例如,5个、10个、15个、20个、40个、60个或更多个)氨基酸组成,所述氨基酸导致单个多肽分子中的相邻可变结构域和/或恒定结构域之间的柔性或半柔性连接。此外,抗原结合片段可以包括上文所列出的彼此和/或与一个或多个单体V_H或V_L结构域非共价缔合(例如,通过一个或多个二硫键)的可变结构域和恒定结构域构型中的任何一个的同源二聚体或异源二聚体(或其它多聚体)。

[0076] 与完整抗体分子一样,抗原结合片段可以是单特异性的或多特异性的(例如,双特异性的)。抗体的多特异性抗原结合片段通常包括至少两个不同的可变结构域,其中每个可变结构域能够与单独的抗原或同一抗原上的不同表位特异性地结合。可以使用本领域可用的常规技术将任何多特异性抗体形式(包含本文公开的示例性双特异性抗体形式)适配成用于在本发明的抗体的抗原结合片段的背景下使用。

[0077] 本发明的抗体可以通过补体依赖性细胞毒性(CDC)或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)起作用。“补体依赖性细胞毒性”(CDC)是指在补体存在的情况下本发明的抗体对表达抗原的细胞的裂解。“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”(ADCC)是指这样的细胞介导的反应:其中表达Fc受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞(例如,自然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)识别靶细胞上的结合抗体并且由此导致靶细胞的裂解。可以使用本领域熟知和可用的测定测量CDC和ADCC。(参见例如,美国专利第5,500,362号和第5,821,337号以及Clynes等人,(1998),《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.(USA))》95:652-656)。抗体的恒定区对于抗体固定补体和介导细胞依赖性细胞毒性的能力是重要的。因此,可以基于抗体是否需要介导细胞毒性来选择抗体的同种型。

[0078] 在本发明的某些实施例中,本发明的抗CD28抗体和/或抗CD22抗体(单特异性或双特异性)是人抗体。如本文所使用的,术语“人抗体”旨在包含具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人抗体可以包含并非由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变而引入的突变),例如在CDR中,特别是在CDR3中。然而,如本文所使用的,术语“人抗体”不旨在包含其中衍生自如小鼠等另一种哺乳动物物种的种系的CDR序列已经移植到人框架序列上的抗体。

[0079] 在一些实施例中,本发明的抗体可以是重组人抗体。如本文所使用的,术语“重组人抗体”旨在包含通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有人抗体,如使用转染到宿主细胞内的重组表达载体表达的抗体(在下文中进一步描述)、从重组的组合人抗体文库中分离的抗体(在下文中进一步描述)、从人免疫球蛋白基因转基因动物(例如,小鼠)中分离的抗体(参见例如,Taylor等人,(1992),《核酸研究(Nucl.Acids Res.)》,20:6287-6295)或通过任何其它方式制备、表达、产生或分离的抗体,所述其它方式涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接到其它DNA序列。此类重组人抗体具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而,在某些实施例中,对此类重组人抗体进行体外诱变(或当使用人Ig序列转基因动物时,进行体内体细胞诱变),并且因此重组抗体的V_H区和V_L区的氨基酸序列是这样的序列:虽然衍生自人种系V_H序列和V_L序列并与之相关,但在体内可能并非天然存在于人抗体种系库中。

[0080] 人抗体可以以与铰链异质性相关的两种形式存在。在一种形式中,免疫球蛋白分子包括约150-160kDa的稳定四链构建体,其中二聚体通过链间重链二硫键保持在一起。在第二种形式中,二聚体不通过链间二硫键连接,并且形成约75-80kDa的分子,所述分子由共价偶联的轻链和重链(半抗体)构成。即使在亲和纯化之后,这些形式也极难分离。

[0081] 在各种完整IgG同种型中出现第二种形式的频率是由于但不限于与抗体的铰链区同种型相关的结构差异。人IgG4铰链的铰链区中的单个氨基酸取代可以将第二种形式的出现显著地降低(Angal等人,(1993),《分子免疫学(Molecular Immunology)》30:105)到通常使用人IgG1铰链所观察到的水平。本发明涵盖在铰链区、CH2区或CH3区具有一个或多个突变的抗体,所述突变可能是例如在生产中所期望的,以便提高期望的抗体形式的产率。

[0082] 本发明的抗体可以是分离的抗体。如本文所使用的,“分离的抗体”意指已经从其天然环境的至少一种组分中鉴定和分离和/或回收的抗体。例如,已经从生物体的至少一种组分或从天然存在或天然产生抗体的组织或细胞中分离或去除的抗体是用于本发明的目的的“分离的抗体”。分离的抗体还包含重组细胞内的原位抗体。分离的抗体是已经进行至少一个纯化或分离步骤的抗体。根据某些实施例,分离的抗体可以基本上不含其它细胞物质和/或化学品。

[0083] 本发明还包含结合CD28和/或CD22的单臂抗体。如本文所使用的,“单臂抗体”意指包括单抗体重链和单抗体轻链的抗原结合分子。本发明的单臂抗体可以包括表1中所示的HCVR/LCVR或CDR氨基酸序列中的任何一个。

[0084] 如与衍生出抗原结合蛋白或抗原结合结构域的对应种系序列相比,本文的抗CD28抗体和/或抗CD22抗体或其抗原结合结构域可以在重链和轻链可变结构域的框架和/或CDR区中包括一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失。通过将本文所公开的氨基酸序列与可从例如公共抗体序列数据库获得的种系序列进行比较,可以容易地确定此类突变。本发明包含衍生自本文公开的氨基酸序列中的任何一个的抗体和其抗原结合结构域,其中一个或多个框架和/或CDR区内的一个或多个氨基酸突变为衍生出抗体的种系序列的一个或多个对应的残基或突变为另一个人种系序列的一个或多个对应的残基或突变为一个或多个对应的种系残基的保守氨基酸取代(此类序列变化在本文中统称为“种系突变”)。从本文公开的重链和轻链可变区序列开始,本领域普通技术人员可以容易地产生包括一个或多个单独种系突变或其组合的许多抗体和抗原结合片段。在某些实施例中, V_H 结构域和/或 V_L 结构域内的所有框架和/或CDR残基突变回在衍生出抗体的原始种系序列中所发现的残基。在其它实施例中,仅将某些残基突变回原始种系序列,所述残基例如仅在FR1的前8个氨基酸内或在FR4的最后8个氨基酸内发现的突变后残基或者仅在CDR1、CDR2或CDR3内发现的突变后残基。在其它实施例中,一个或多个框架和/或CDR残基中的一个或多个突变为不同种系序列(即,与最初衍生出抗体的种系序列不同的种系序列)的一个或多个对应的残基。此外,本发明的抗体或其抗原结合结构域可以含有框架和/或CDR区内的两个或更多个种系突变的任何组合,例如,其中某些单独残基突变为特定种系序列的对应残基,而与原始种系序列不同的某些其它残基维持不变或突变为不同种系序列的对应残基。一旦获得,就可以容易地测试含有一个或多个种系突变的抗体或其抗原结合片段的一种或多种期望的性质,如改善的结合特异性、增加的结合亲和力、改善或增强的拮抗或激动生物学性质(视情况而定)、降低的免疫原性等。以这种通用方式获得的抗体或其抗原结合片段涵盖在本发明内。

[0085] 本发明还包含包括本文公开的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中的任何一个的变体的抗CD28抗体和/或抗CD22抗体和抗原结合分子。包含在本发明的此方面内的示例性变体包含具有一个或多个保守取代的本文公开的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中的任何一个的变体。例如,本发明包含具有HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列的抗CD28抗体和抗原结合分子,相对于如本文表6中所示的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中的任何一个,所述HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列具有例如10个或更少、8个或更少、6个或更少、4个或更少等的保守氨基酸取代。

[0086] 术语“表位”是指与称为互补位的抗体分子的可变区中的特定抗原结合位点相互作用的抗原决定簇。单个抗原可以具有多于一个表位。因此,不同的抗体可以与抗原上的不同区域结合并且可以具有不同的生物学效应。表位可以是构象的或线性的。构象表位通过来自线性多肽链的不同区段的空间上并列的氨基酸产生。线性表位是由多肽链中的相邻氨基酸残基产生的表位。在某些情况下,表位可以包含抗原上的糖、磷酸基或磺酰基的部分。

[0087] 当提及核酸或其片段时,术语“基本同一性”或“基本上相同”指示,当通过适当的核苷酸插入或缺失与另一个核酸(或其互补链)最佳比对时,核苷酸序列同一性为核苷酸碱基的至少约95%,并且更优选地,至少约96%、97%、98%或99%,如通过如FASTA、BLAST或Gap等任何众所周知的序列同一性算法测量的,如下文所讨论的。在某些情况下,与参考核酸分子具有基本同一性的核酸分子可以对具有与由参考核酸分子编码的多肽相同或基本上类似的氨基酸序列的多肽进行编码。

[0088] 当应用于多肽时,术语“基本相似性”或“基本上类似”意味着当如通过使用默认空位权重的程序GAP或BESTFIT最佳比对时,两个肽序列共享至少95%的序列同一性,甚至更优选地至少98%或99%的序列同一性。优选地,不相同的残基位置因保守氨基酸取代而不同。“保守氨基酸取代”是氨基酸残基被具有化学性质(例如,电荷或疏水性)类似的侧链(R基团)的另一个氨基酸残基取代的氨基酸取代。通常,保守氨基酸取代不会实质上改变蛋白质的功能性质。在两个或更多个氨基酸序列因保守取代而彼此不同的情况下,可以向上调整序列同一性百分比或相似性程度,以校正取代的保守本质。用于作出此调整的方法是本领域技术人员所熟知的。参见例如,Pearson (1994)《分子生物学方法(Methods Mol.Biol.)》24:307-331。具有化学性质类似的侧链的氨基酸基团的实例包含(1)脂肪族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;(2)脂肪族羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;(3)含酰胺的侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;(4)芳香族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;(5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;(6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸;以及(7)含硫侧链是半胱氨酸和蛋氨酸。优选的保守氨基酸取代基是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。可替代地,保守替代是在Gonnet等人(1992),《科学(Science)》256:1443-1445中公开的PAM250对数似然矩阵中具有正值的任何变化。“适度保守”替代是在PAM250对数似然矩阵中具有非负值的任何变化。

[0089] 通常使用序列分析软件测量也称为序列同一性的多肽的序列相似性。蛋白质分析软件使用分配给包含保守氨基酸取代在内的各种取代、缺失和其它修饰的相似性度量来匹配类似的序列。例如,GCG软件含有如Gap和Bestfit等程序,所述程序可以与默认参数一起使用,以确定紧密相关的多肽如来自不同生物体物种的同源多肽之间或野生型蛋白质与其

突变蛋白之间的序列同源性或序列同一性。参见例如6.1版GCG。还可以使用使用默认或推荐的参数的FASTA(6.1版GCG中的程序)来比较多肽序列。FASTA(例如,FASTA2和FASTA3)提供了询问序列与搜索序列之间的最佳重叠区的比对和序列同一性百分比(Pearson(2000)同上)。当比较本发明的序列与含有来自不同生物体的大量序列的数据库时,另一个优选的算法是使用默认参数的计算机程序BLAST,尤其是BLASTP或TBLASTN。参见例如,Altschul等人(1990)《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》215:403-410以及Altschul等人(1997)《核酸研究》25:3389-402。

[0090] 术语“细胞增殖性病症”和“增殖性病症”是指与从利用本发明的抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子或方法的治疗中受益的一定程度的异常细胞增殖相关的病症。这包含慢性和急性病症,包含使哺乳动物易患所讨论病症的那些病理病状。在一个实施例中,细胞增殖性病症是在哺乳动物中通常以不受调节的细胞生长/增殖为特征的生理病状癌症。

[0091] 如本文所使用的,“肿瘤”是指所有赘生性细胞生长和增殖(无论是恶性的还是良性的)以及所有癌前和癌性细胞和组织。术语“癌症”、“癌性”、“细胞增殖性病症”、“增殖性病症”和“肿瘤”如本文所引用的并不相互排斥。

[0092] “B细胞增殖性病症”包含霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)、非霍奇金淋巴瘤(NHL),如侵袭性NHL、复发侵袭性NHL、低度/滤泡性NHL、小淋巴细胞(SL)NHL、中度/滤泡性NHL、中度弥漫性NHL、高度免疫母细胞性NHL、高度淋巴母细胞性NHL、高度小型非切割细胞NHL、大体积疾病NHL、包含复发性惰性NHL和利妥昔单抗难治性惰性NHL的惰性NHL;难治性NH、难治性惰性NHL、套细胞淋巴瘤、艾滋病相关淋巴瘤和华氏巨球蛋白血症(Waldenström's Macroglobulinemia)、淋巴细胞显性霍奇金疾病(LPHD)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL);白血病,包含急性淋巴母细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、毛细胞白血病、慢性髓细胞白血病;以及其它血液系统恶性肿瘤。

[0093] 如本文所使用的,术语“非霍奇金淋巴瘤”或“NHL”是指淋巴系统的癌症而不是霍奇金淋巴瘤。霍奇金淋巴瘤通常可以与非霍奇金淋巴瘤区别开来:霍奇金淋巴瘤中存在里德-斯泰伯格氏细胞(Reed-Sternberg cell),而非霍奇金淋巴瘤中不存在所述细胞。如本文所使用的术语所涵盖的非霍奇金淋巴瘤的实例包含根据本领域已知的分类方案由本领域的技术人员(例如,肿瘤学家或病理学家)如此识别的任何淋巴瘤,如修订的欧美淋巴瘤(Revised European-American Lymphoma,REAL)方案,如《临床血液学彩色图谱(Color Atlas of Clinical Hematology)》(第3版),A.Victor Hoffbrand和John E.Pettit(编)(哈考特出版社公司(Harcourt Publishers Ltd.),2000)所描述的。具体地,参见图11.57、11.58和11.59中的列表。更具体的实例包含但不限于复发性或难治性NHL、前线低度NHL、III/IV期NHL、化疗耐药NHL、前体B淋巴母细胞白血病和/或淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、B细胞慢性淋巴细胞白血病和/或幼淋巴细胞白血病和/或小淋巴细胞淋巴瘤、B细胞幼淋巴细胞淋巴瘤、免疫细胞瘤和/或淋巴浆细胞性淋巴瘤、淋巴浆细胞性淋巴瘤、边缘区B细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、结外边缘区-MALT淋巴瘤、结节边缘区淋巴瘤、毛细胞白血病、浆细胞瘤和/或浆细胞骨髓瘤、低度/滤泡性淋巴瘤、中度/滤泡性NHL、套细胞淋巴瘤、滤泡中心淋巴瘤(滤泡性)、中度弥漫性NHL、弥漫性大B细胞淋巴瘤、侵袭性NHL(包含侵袭性前线NHL和侵袭性复发NHL)、自体干细胞植入后复发或难治的NHL、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、高度免疫母细胞性NHL、高度淋巴母细胞性NHL、高度小型非切割细胞NHL、大

体积疾病NHL、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、前体(外周)大颗粒淋巴细胞白血病、蕈样肉芽肿病和/或塞扎里综合征(Sezary syndrome)、皮肤(表皮)淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤、血管中心性淋巴瘤。

[0094] 双特异性抗原结合分子

[0095] 本发明的抗体可以是单特异性的、双特异性的或多特异性的。多特异性抗体可以对一个靶多肽的不同表位具有特异性或者可以含有对多于一个靶多肽具有特异性的抗原结合结构域。参见例如, Tutt等人, 1991, 《免疫学期刊(J. Immunol.)》147:60-69; Kufer等人, 2004, 《生物技术趋势(Trends Biotechnol.)》22:238-244。本发明的抗CD28抗体和/或抗CD22抗体可以与另一种功能分子例如另一种肽或蛋白质连接或共表达。例如, 抗体或其片段可以与一个或多个其它分子实体如另一个抗体或抗体片段功能性地连接(例如, 通过化学偶联、遗传融合、非共价缔合或以其它方式), 以产生具有第二结合特异性的双特异性或多特异性抗体。

[0096] 本文使用的表述“抗CD28抗体”和/或“抗CD22抗体”旨在包含单特异性抗CD28抗体和/或单特异性抗CD22抗体两者以及包括CD28结合臂或CD22结合臂和结合靶抗原的臂的双特异性抗体。因此, 本发明包含双特异性抗体, 其中免疫球蛋白的一个臂结合人CD28或CD22, 并且免疫球蛋白的另一个臂对靶抗原具有特异性。CD28或CD22双特异性抗体的另一个臂所结合的靶抗原可以是在细胞、组织、器官、微生物或病毒上或附近表达的任何抗原, 期望针对所述抗原的靶向性免疫应答。CD28结合臂可以包括如本文的表1中所示的HCVR/LCVR或CDR氨基酸序列中的任何一个。CD22结合臂可以包括如本文表1中所示的HCVR/LCVR或CDR氨基酸序列中的任何一个。在某些实施例中, CD28结合臂结合人CD28并诱导人T细胞增殖。

[0097] 在本发明的其中抗体的一个臂结合CD28并且另一个臂结合靶抗原的双特异性抗体的背景下, 靶抗原可以是肿瘤相关抗原, 如CD22。

[0098] 根据某些示例性实施例, 本发明包含特异性地结合CD28和CD22的双特异性抗原结合分子。此类分子在本文中可以被称为例如“抗CD28/抗CD22”或“抗CD28xCD22”或“CD28xCD22”或“抗CD22/抗CD28”或“抗CD22xCD28”或“CD22xCD28”双特异性分子或“ α CD22 x α CD28”或“ α CD28 x α CD22”或其它类似的术语。

[0099] 根据某些示例性实施例, 双特异性抗原结合分子(例如, 双特异性抗体)可以具有效应臂和靶向臂。效应臂可以是与效应细胞(例如, T细胞)上的抗原结合的第一抗原结合结构域(例如, 抗CD28抗体)。靶向臂可以是与靶细胞(例如, 肿瘤细胞)上的抗原结合的第二抗原结合结构域(例如, 抗CD22抗体)。根据某些示例性实施例, 效应臂与CD28结合, 并且靶向臂与CD22结合。双特异性抗CD28/CD22可以向效应细胞(例如, T细胞)提供共刺激信号。效应臂在没有聚类的情況下没有刺激T细胞的作用。单独的效应臂几乎没有刺激T细胞的作用, 除非与靶向臂组合。肿瘤靶向臂可以具有不完善的肿瘤特异性。作为靶向臂的靶标的抗原(例如, CD22)可以在肿瘤细胞的一部分上表达。可以通过与同抗CD3双特异性抗原结合分子(例如, 抗CD3/CD20双特异性抗体)的组合重叠来增加肿瘤靶向臂的特异性。

[0100] 如本文所使用的, 表述“抗原结合分子”意指包括至少一个互补决定区(CDR)或由其组成的蛋白质、多肽或分子复合物, 所述互补决定区单独地或与一个或多个另外的CDR和/或框架区(FR)组合地与特定抗原特异性地结合。在某些实施例中, 抗原结合分子是抗体

或抗体的片段,如在本文其它地方定义的那些术语。

[0101] 如本文所使用的,表述“双特异性抗原结合分子”意指包括至少第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的蛋白质、多肽或分子复合物。双特异性抗原结合分子内的每个抗原结合结构域包括至少一个CDR,所述至少一个CDR单独地或与一个或多个另外的CDR和/或FR组合地与特定抗原特异性地结合。在本发明的背景下,第一抗原结合结构域特异性地结合第一抗原(例如,CD28),并且第二抗原结合结构域特异性地结合第二不同抗原(例如,CD22)。

[0102] 在本发明的某些示例性实施例中,双特异性抗原结合分子是双特异性抗体。双特异性抗体的每个抗原结合结构域包括重链可变结构域(HCVR)和轻链可变结构域(LCVR)。在包括第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的双特异性抗原结合分子(例如,双特异性抗体)的背景下,第一抗原结合结构域的CDR可以用前缀“D1”表示,并且第二抗原结合结构域的CDR可以用前缀“D2”表示。因此,第一抗原结合结构域的CDR在本文中可以被称为D1-HCDR1、D1-HCDR2和D1-HCDR3;并且第二抗原结合结构域的CDR在本文中可以被称为D2-HCDR1、D2-HCDR2和D2-HCDR3。

[0103] 第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域可以彼此直接或间接连接以形成本发明的双特异性抗原结合分子。可替代地,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域可以各自与单独的多聚化结构域连接。一个多聚化结构域与另一个多聚化结构域的缔合促进了两个抗原结合结构域之间的缔合,由此形成双特异性抗原结合分子。如本文所使用的,“多聚化结构域”是能够与具有相同或类似结构或构成的第二多聚化结构域缔合的任何大分子、蛋白质、多肽、肽或氨基酸。例如,多聚化结构域可以是包括免疫球蛋白C_H3结构域的多肽。多聚化组分的非限制性实例是免疫球蛋白的Fc部分(包括C_H2-C_H3结构域),例如,选自同种型IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的IgG以及每个同种型组内的任何同种异型的Fc结构域。

[0104] 本发明的双特异性抗原结合分子通常包括两个多聚化结构域,例如,各自独立地是单独的抗体重链的一部分的两个Fc结构域。第一多聚化结构域和第二多聚化结构域可以是同一IgG同种型,例如IgG1/IgG1、IgG2/IgG2、IgG4/IgG4。可替代地,第一多聚化结构域和第二多聚化结构域可以是不同的IgG同种型,例如IgG1/IgG2、IgG1/IgG4、IgG2/IgG4等。

[0105] 在某些实施例中,多聚化结构域是Fc片段或含有至少一个半胱氨酸残基的长度为1到约200个氨基酸的氨基酸序列。在其它实施例中,多聚化结构域是半胱氨酸残基或含半胱氨酸的短肽。其它多聚化结构域包含包括亮氨酸拉链、螺旋环基序或卷曲螺旋基序或者由其组成的肽或多肽。

[0106] 可以使用任何双特异性抗体形式或技术来制备本发明的双特异性抗原结合分子。例如,可以将具有第一抗原结合特异性的抗体或其片段与一个或多个其它分子实体如具有第二抗原结合特异性的另一种抗体或抗体片段等功能性地连接(例如,通过化学偶联、遗传融合、非共价缔合或以其它方式),以产生双特异性抗原结合分子。可以在本发明的背景下使用的具体示例性双特异性形式包含但不限于例如,基于scFv的或双抗体双特异性形式、IgG-scFv融合、双可变结构域(OV0)-Ig、四杂交瘤(Quadroma)、结节入孔(knobs-into-holes)、共同轻链(例如,具有结节入孔的共同轻链等)、CrossMab、CrossFab、(SEED) body、亮氨酸拉链、Oubody、IgG1/IgG2、双作用Fab(OAF)-IgG以及Mab²双特异性形式(关于前述形式的综述,参见例如Klein等人2012,《mAbs》4:6,1-11以及其中引用的参考文献)。

[0107] 在本发明的双特异性抗原结合分子的背景下,与野生型、天然存在形式的Fc结构域相比,多聚化结构域例如Fc结构域可以包括一个或多个氨基酸变化(例如,插入、缺失或取代)。例如,本发明包含双特异性抗原结合分子,其在Fc结构域中包括一个或多个修饰,从而产生在Fc与FcRn之间具有经修饰的结合相互作用(例如,增强或减弱)的经修饰的Fc结构域。在一个实施例中,双特异性抗原结合分子包括C_H2区或C_H3区中的修饰,其中所述修饰增加了Fc结构域在酸性环境中(例如,在pH范围为约5.5到约6.0的内体中)对FcRn的亲和力。此类Fc修饰的非限制性实例包含例如:第250位(例如,E或Q)处的修饰;第250位和第428位(例如,L或F)处的修饰;第252位(例如,LN/FIW或T)、第254位(例如,S或T)和第256位(例如,S/R/Q/E/EID或T)处的修饰;或第428位和/或第433位(例如,UR/S/P/Q或K)和/或第434位(例如,H/F或V)处的修饰;或第250位和/或第428位处的修饰;或第307位或第308位(例如,308F、V308F)和第434位处的修饰。在一个实施例中,修饰包括428L(例如,M428L)和434S(例如,N434S)修饰;428L、2591(例如,V2591)和308F(例如,V308F)修饰;433K(例如,H433K)和434(例如,434Y)修饰;252、254和256(例如,252Y、254T和256E)修饰;250Q和428L修饰(例如,T250Q和M428L);以及307和/或308修饰(例如,308F或308P)。

[0108] 本发明还包含双特异性抗原结合分子,其包括第一C_H3结构域和第二Ig C_H3结构域,其中第一和第二Ig C_H3结构域彼此相差至少一个氨基酸,并且其中与缺乏氨基酸差异的双特异性抗体相比,至少一个氨基酸差异降低了双特异性抗体与蛋白A的结合。在一个实施例中,第一Ig C_H3结构域结合蛋白A,并且第二Ig C_H3结构域含有降低或消除蛋白A结合的突变,如H95R修饰(通过IMGT外显子编号;H435R,通过EU编号)。第二C_H3可以进一步包括Y96F修饰(通过IMGT;Y436F,通过EU)。可以在第二CH3内找到的另外的修饰包含:在IgG1抗体的情况下,D16E、L18M、N44S、K52N、V57M和V821(通过IMGT;D356E、L358M、N384S、K392N、V397M和V4221,通过EU);在IgG2抗体的情况下,N44S、K52N和V821(IMGT;N384S、K392N和V4221,通过EU);以及在IgG4抗体的情况下,Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q和V821(通过IMGT;Q355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q和V4221,通过EU)。

[0109] 在某些实施例中,Fc结构域可以是嵌合的,从而组合衍生自多于一种免疫球蛋白同种型的Fc序列。例如,嵌合Fc结构域可以包括衍生自人IgG1、人IgG2或人IgG4 C_H2区的C_H2序列的一部分或全部以及衍生自人IgG1、人IgG2或人IgG4的C_H3序列的一部分或全部。嵌合Fc结构域还可以含有嵌合铰链区。例如,嵌合铰链可以包括衍生自人IgG1铰链区、人IgG2铰链区或人IgG4铰链区的“上铰链”序列与衍生自人IgG1铰链区、人IgG2铰链区或人IgG4铰链区的“下铰链”序列的组合。可以包含在本文所示的抗原结合分子中的任何一个中的嵌合Fc结构域的特定实例包括从N端到C端:[1gG4 C_H1]-[1gG4上铰链]-[1gG2下铰链]-[1gG4 CH2]-[1gG4 C_H3]。可以包含在本文所示的抗原结合分子中的任何一个中的嵌合Fc结构域的另一个实例包括从N端到C端:[1gG1 C_H1]-[1gG1上铰链]-[1gG2下铰链]-[1gG4 C_H2]-[1gG1 C_H3]。可以包含在本发明的抗原结合分子中的任何一个中的嵌合Fc结构域的这些和其它实例描述于W02014/022540A1中,所述文献的全部内容通过引用并入本文。具有这些通用结构布置的嵌合Fc结构域和其变体可以具有改变的Fc受体结合,所述改变的Fc受体结合进而影响Fc效应子功能。

[0110] 序列变体

[0111] 如与衍生出单独抗原结合结构域的对应种系序列相比,本发明的抗体和双特异性

抗原结合分子可以在重链和轻链可变结构域的框架和/或CDR区中包括一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失。通过将本文公开的氨基酸序列与可从例如公共抗体序列数据库获得的种系序列进行比较,可以容易地确定此类突变。本发明的抗原结合分子可以包括衍生自本文公开的示例性氨基酸序列中的任何一个的抗原结合片段,其中一个或多个框架和/或CDR区内的一个或多个氨基酸突变为衍生出抗体的种系序列的一个或多个对应的残基或突变为另一个人种系序列的一个或多个对应的残基或突变为一个或多个对应的种系残基的保守氨基酸取代(此类序列变化在本文中统称为“种系突变”)。从本文公开的重链和轻链可变区序列开始,本领域普通技术人员可以容易地产生包括一个或多个单独种系突变或其组合的许多抗体和抗原结合片段。在某些实施例中, V_H 结构域和/或 V_L 结构域内的所有框架和/或CDR残基突变回在最初衍生出抗原结合结构域的原始种系序列中所发现的残基。在其它实施例中,仅将某些残基突变回原始种系序列,所述残基例如仅在FR1的前8个氨基酸内或在FR4的最后8个氨基酸内发现的突变后残基或者仅在CDR1、CDR2或CDR3内发现的突变后残基。在其它实施例中,一个或多个框架和/或CDR残基中的一个或多个突变为不同种系序列(即,与最初衍生出抗原结合结构域的种系序列不同的种系序列)的一个或多个对应的残基。此外,抗原结合结构域可以含有框架和/或CDR区内的两个或更多个种系突变的任何组合,例如,其中某些单独残基突变为特定种系序列的对应残基,而与原始种系序列不同的某些其它残基维持不变或突变为不同种系序列的对应残基。一旦获得,就可以容易地测试含有一个或多个种系突变的抗原结合结构域的一种或多种期望的性质,如改善的结合特异性、增加的结合亲和力、改善或增强的拮抗或激动生物学性质(视情况而定)、降低的免疫原性等。包括以这种通用方式获得的抗原结合结构域的双特异性抗原结合分子涵盖在本发明内。

[0112] 本发明还包含抗原结合分子,其中一个或两个抗原结合结构域包括具有一个或多个保守取代的本文公开的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中的任何一个的变体。例如,本发明包含抗原结合分子,其包括具有HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列的抗原结合结构域,相对于本文公开的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中的任何一个,所述HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列具有例如10个或更少、8个或更少、6个或更少、4个或更少等的保守氨基酸取代。“保守氨基酸取代”是氨基酸残基被具有化学性质(例如,电荷或疏水性)类似的侧链(R基团)的另一个氨基酸残基取代的氨基酸取代。通常,保守氨基酸取代不会实质上改变蛋白质的功能性质。具有化学性质类似的侧链的氨基酸基团的实例包含(1)脂肪族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;(2)脂肪族羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;(3)含酰胺的侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;(4)芳香族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;(5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;(6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸;以及(7)含硫侧链是半胱氨酸和蛋氨酸。优选的保守氨基酸取代基是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。可替代地,保守替代是在以下文献中公开的PAM250对数似然矩阵中具有正值的任何变化:Gonnet等人(1992)《科学》,256:1443-1445。“适度保守”替代是在PAM250对数似然矩阵中具有非负值的任何变化。

[0113] 本发明还包含抗原结合分子,其包括具有与本文公开的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中的任何一个基本相同的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列的抗原结合结构域。当提及氨基酸序列时,术语“基本同一性”或“基本上相同”意味着当如通过使用默认空位权重的

程序GAP或BESTFIT进行最佳比对时,两个氨基酸序列共享至少95%的序列同一性,甚至更优选地,至少98%或99%的序列同一性。优选地,不相同的残基位置因保守氨基酸取代而不同。在两个或更多个氨基酸序列因保守取代而彼此不同的情况下,可以向上调整序列同一性百分比或相似性程度,以校正取代的保守本质。用于作出此调整的方法是本领域技术人员所熟知的。参见例如,Pearson(1994)《分子生物学方法》24:307-331。

[0114] 通常使用序列分析软件测量也称为序列同一性的多肽的序列相似性。蛋白质分析软件使用分配给包含保守氨基酸取代在内的各种取代、缺失和其它修饰的相似性度量来匹配类似的序列。例如,GCG软件含有如Gap和Bestfit等程序,所述程序可以与默认参数一起使用,以确定紧密相关的多肽如来自不同生物体物种的同源多肽之间或野生型蛋白质与其突变蛋白之间的序列同源性或序列同一性。参见例如6.1版GCG。还可以使用使用默认或推荐的参数的FASTA(6.1版GCG中的程序)来比较多肽序列。FASTA(例如,FASTA2和FASTA3)提供了询问序列与搜索序列之间的最佳重叠区的比对和序列同一性百分比(Pearson(2000)同上)。当比较本发明的序列与含有来自不同生物体的大量序列的数据库时,另一个优选的算法是使用默认参数的计算机程序BLAST,尤其是BLASTP或TBLASTN。参见例如,Altschul等人(1990)《分子生物学杂志》215:403-410以及Altschul等人(1997)《核酸研究》25:3389-402。

[0115] pH依赖性结合

[0116] 本发明包含具有pH依赖性结合特性的抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子。例如,如与中性pH相比,本发明的抗CD28抗体在酸性pH下可以表现出与CD28的结合降低。可替代地,如与中性pH相比,本发明的抗CD22抗体在酸性pH下可以表现出与CD22的结合增强。表述“酸性pH”包含小于约6.2例如约6.0、5.95、5.9、5.85、5.8、5.75、5.7、5.65、5.6、5.55、5.5、5.45、5.4、5.35、5.3、5.25、5.2、5.15、5.1、5.05、5.0或更小的pH值。如本文所使用的,表述“中性pH”意指pH为约7.0到约7.4。表述“中性pH”包含约7.0、7.05、7.1、7.15、7.2、7.25、7.3、7.35和7.4的pH值。

[0117] 在某些情况下,“如与中性pH相比,在酸性pH下……结合降低”是就在酸性pH下抗体与其抗原结合的 K_D 值与在中性pH下抗体与其抗原结合的 K_D 值的比率而言表述的(或反之亦然)。例如,如果抗体或其抗原结合片段表现出约3.0或更大的酸性/中性 K_D 比率,则出于本发明的目的,可以认为抗体或其抗原结合片段表现出“如与中性pH相比,在酸性pH下与CD28的结合降低”。在某些示例性实施例中,本发明的抗体或抗原结合片段的酸性/中性 K_D 比率可以为约3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、13.5、14.0、14.5、15.0、20.0、25.0、30.0、40.0、50.0、60.0、70.0、100.0或更大。

[0118] 具有pH依赖性结合特性的抗体可以例如通过筛选如与中性pH相比在酸性pH下与特定抗原的结合降低(或增强)的抗体群来获得。另外,氨基酸水平上的抗原结合结构域的修饰可以产生具有pH依赖性特性的抗体。例如,通过用组氨酸残基取代抗原结合结构域(例如,在CDR内)的一个或多个氨基酸,可以获得在相对于中性pH的酸性pH下与抗原的结合降低的抗体。

[0119] 包括Fc变体的抗体

[0120] 根据本发明的某些实施例,提供了包括Fc结构域的抗CD28/抗CD22双特异性抗原

结合分子,所述Fc结构域包括例如如与中性pH相比在酸性pH下增强或减弱抗体与FcRn受体的结合的一个或多个突变。例如,本发明包含在Fc结构域的C_H2区或C_H3区中包括突变的抗体和抗原结合分子,其中一个或多个突变增加Fc结构域在酸性环境中(例如,在pH范围为约5.5到约6.0的内体中)对FcRn的亲合力。当施用于动物时,此类突变可以导致抗体的血清半衰期增加。此类Fc修饰的非限制性实例包含例如:第250位(例如,E或Q)处的修饰;第250位和第428位(例如,L或F)处的修饰;第252位(例如,L/Y/F/W或T)、第254位(例如,S或T)和第256位(例如,S/R/Q/E/D或T)处的修饰;或第428位和/或第433位(例如,H/L/R/S/P/Q或K)和/或第434位(例如,H/F或Y)处的修饰;或第250位和/或第428位处的修饰;或第307位或第308位(例如,308F、V308F)和第434位处的修饰。在一个实施例中,修饰包括428L(例如,M428L)和434S(例如,N434S)修饰;428L、259I(例如,V259I)和308F(例如,V308F)修饰;433K(例如,H433K)和434(例如,434Y)修饰;252、254和256(例如,252Y、254T和256E)修饰;250Q和428L修饰(例如,T250Q和M428L);以及307和/或308修饰(例如,308F或308P)。

[0121] 例如,本发明包含包括Fc结构域的抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子,所述Fc结构域包括选自由以下组成的组的一个或多个突变对或突变组:250Q和248L(例如,T250Q和M248L);252Y、254T和256E(例如,M252Y、S254T和T256E);428L和434S(例如,M428L和N434S);以及433K和434F(例如,H433K和N434F)。在本发明的范围内设想了前述Fc结构域突变的所有可能的组合和本文公开的抗体可变结构域内的其它突变。

[0122] 抗体和抗原结合分子的生物学特性

[0123] 本发明包含以高亲和力结合人CD28和/或CD22的抗体和其抗原结合片段。本发明还包含以中等或低亲和力结合人CD28和/或CD22的抗体和其抗原结合片段,这取决于治疗背景和所期望的特定靶向性质。例如,在其中一个臂结合CD28并且另一个臂结合靶抗原(例如,CD22)的双特异性抗原结合分子的背景下,可能令人期望的是,靶抗原结合臂以高亲和力结合靶抗原,而抗CD28臂仅以中等或低亲和力结合CD28。以这种方式,可以实现抗原结合分子对表达靶抗原的细胞的优先靶向,同时避免一般/非靶向性CD28结合以及随之产生的与之相关的不良副作用。

[0124] 根据某些实施例,本发明包含抗体和抗体的抗原结合片段,其以小于约15nM的K_D结合人CD22(例如,在25℃下),如例如使用本文实例5中限定的测定形式通过表面等离子体共振测量的。在某些实施例中,本发明的抗体或抗原结合片段以小于约15nM、小于约14nM、小于约13nM、小于约12nM、小于约11nM、小于约10nM、小于约9nM、小于约8nM、小于约7nM、小于约6nM、小于约5nM、小于约4nM、小于约3nM、小于约2nM或小于约1nM的K_D结合人CD22,如例如使用本文实例5中限定的测定形式或基本上类似的测定通过表面等离子体共振测量的。

[0125] 根据某些实施例,本发明包含抗体和抗体的抗原结合片段,其以小于约60μM的K_D结合猴CD22(例如,在25℃下),如例如使用本文实例5中限定的测定形式通过表面等离子体共振测量的。在某些实施例中,本发明的抗体或抗原结合片段以小于约60μM、小于约59μM、小于约58μM、小于约57μM、小于约56μM、小于约55μM、小于约54μM、小于约53μM、小于约52μM、小于约51μM、小于约50μM、小于约49μM、小于约48μM、小于约47μM、小于约46μM、小于约45μM、小于约44μM、小于约43μM、小于约42μM、小于约41μM、小于约40μM、小于约39μM、小于约38μM、小于约37μM、小于约36μM、小于约35μM、小于约34μM、小于约33μM、小于约32μM、小于约31μM、小于约30μM、小于约25μM、小于约20μM、小于约15μM或小于约10μM的K_D结合猴CD22,如例如

使用本文实例5中限定的测定形式或基本上类似的测定通过表面等离子体共振测量的。

[0126] 根据某些实施例,本发明包含抗体和抗体的抗原结合片段,其以小于约45 μ M的 K_D 结合人CD28(例如,在25 $^{\circ}$ C下),如例如使用本文实例5中限定的测定形式通过表面等离子体共振测量的。在某些实施例中,本发明的抗体或抗原结合片段以小于约45 μ M、小于约44 μ M、小于约43 μ M、小于约42 μ M、小于约41 μ M、小于约40 μ M、小于约39 μ M、小于约38 μ M、小于约37 μ M、小于约36 μ M、小于约35 μ M、小于约34 μ M、小于约33 μ M、小于约32 μ M、小于约31 μ M、小于约30 μ M、小于约25 μ M、小于约20 μ M、小于约15 μ M或小于约10 μ M的 K_D 结合人CD28,如例如使用本文实例5中限定的测定形式或基本上类似的测定通过表面等离子体共振测量的。

[0127] 本发明还包含结合人CD22的抗体和其抗原结合片段,其中解离半衰期($t^{1/2}$)大于约7.5分钟,如例如使用本文实例5中限定的测定形式或基本上类似的测定在25 $^{\circ}$ C下通过表面等离子体共振测量的。在某些实施例中,本发明的抗体或抗原结合片段以以下 $t^{1/2}$ 结合人CD22:大于约7分钟、大于约10分钟、大于约15分钟、大于约20分钟、大于约25分钟、大于约30分钟、大于约35分钟、大于约40分钟、大于约45分钟、大于约50分钟、大于约55分钟、大于约60分钟、大于约65分钟、大于约70分钟、大于约75分钟或大于约100分钟,如例如使用本文实例5中限定的测定形式或基本上类似的测定在25 $^{\circ}$ C下通过表面等离子体共振测量的。

[0128] 本发明还包含结合猴CD22的抗体和其抗原结合片段,其中解离半衰期($t^{1/2}$)大于约4.3分钟,如例如使用本文实例中限定的测定形式或基本上类似的测定在37 $^{\circ}$ C下通过表面等离子体共振测量的。在某些实施例中,本发明的抗体或抗原结合片段以以下 $t^{1/2}$ 结合CD28:大于约4分钟、大于约5分钟、大于约6分钟、大于约7分钟、大于约8分钟、大于约9分钟、大于约10分钟、大于约15分钟、大于约20分钟、大于约25分钟、大于约30分钟、大于约35分钟、大于约40分钟、大于约45分钟或大于约50分钟,如例如使用本文实例5中限定的测定形式或基本上类似的测定在25 $^{\circ}$ C下通过表面等离子体共振测量的。

[0129] 本发明还包含结合人CD28的抗体和其抗原结合片段,其中解离半衰期($t^{1/2}$)大于约2.3分钟,如例如使用本文实例5中限定的测定形式或基本上类似的测定在25 $^{\circ}$ C下通过表面等离子体共振测量的。在某些实施例中,本发明的抗体或抗原结合片段以以下 $t^{1/2}$ 结合CD28:大于约2分钟、大于约5分钟、大于约10分钟、大于约20分钟、大于约30分钟、大于约40分钟、大于约50分钟、大于约60分钟、大于约70分钟、大于约80分钟、大于约90分钟、大于约100分钟、大于约200分钟、大于约300分钟、大于约400分钟、大于约500分钟、大于约600分钟、大于约700分钟、大于约800分钟、大于约900分钟、大于约1000分钟或大于约1200分钟,如例如使用本文实例中限定的测定形式或基本上类似的测定在25 $^{\circ}$ C或37 $^{\circ}$ C下通过表面等离子体共振测量的。

[0130] 本发明还包含能够与人CD28以及人和猴CD22结合的双特异性抗原结合分子(例如,双特异性抗体)。根据某些实施例,本发明的双特异性抗原结合分子与表达CD28和/或CD22的细胞特异性地相互作用。可以通过荧光活化细胞分选(FACS)来评估双特异性抗原结合分子结合表达CD28和/或CD22的细胞的程度,如本文实例6中所展示的。例如,本发明包含特异性地结合表达CD28但不表达CD22(例如,T细胞)的人细胞系或猕猴细胞以及表达CD22但不表达CD28(例如,B细胞或Na1m6细胞)的人细胞系或猕猴细胞的双特异性抗原结合分子。本发明包含结合上述细胞和细胞系中的任何一个的双特异性抗原结合分子,其中 EC_{50} 值约为 1.3×10^{-6} 到约 2.3×10^{-8} M或更小,如使用如实例6中所示的FACS测定或基本上类似的测

定确定的。

[0131] 本发明包含能够与人CD28和/或人CD22结合的双特异性抗原结合分子(例如,双特异性抗体)。根据某些实施例,本发明的双特异性抗原结合分子与表达CD28和/或CD22的细胞特异性地相互作用。可以通过流式细胞术来评估双特异性抗原结合分子结合表达CD28和/或CD22的细胞的程度,如本文实例7中所展示的。例如,本发明包含特异性地结合表达CD28但不表达CD22(例如,T细胞)的人细胞以及表达CD22但不表达CD28(例如,用人CD22转导的HEK293细胞以及被基因修饰以缺失CD80和CD86的Raji B细胞)的人细胞系的双特异性抗原结合分子。本发明包含结合上述细胞和细胞系中的任何一个的双特异性抗原结合分子,其中 EC_{50} 值为约 1.14×10^{-8} 到约 9.76×10^{-9} M或更小,如通过实例7中所示的流式细胞术或基本上类似的测定确定的。

[0132] 本发明还提供了诱导或增强对肿瘤细胞进行CD20xCD3 T细胞介导的杀伤的效力的抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子。例如,本发明包含诱导或增加对肿瘤细胞进行CD20xCD3 T细胞介导的杀伤的效力的抗CD28xCD22抗体,其中 EC_{50} 小于约 1.48×10^{-10} M,如例如使用本文实例8中限定的测定形式(例如,在抗CD20xCD3抗体和抗CD28xCD22抗体存在的情况下评估人PBMC对Raji细胞的杀伤程度)或基本上类似的测定在体外T细胞介导的肿瘤细胞杀伤测定中所测量的。在某些实施例中,本发明的抗体或抗原结合片段诱导T细胞介导的肿瘤细胞杀伤(例如,对Raji细胞的PBMC介导的杀伤),其中 EC_{50} 值小于约150pM、小于约100pM、小于约75pM、小于约50pM、小于约25pM、小于约10pM、小于约5.0pM、小于约4.0pM、小于约3.0pM、小于约2.5pM、小于约2.0pM或小于约1.5pM,如例如使用本文实例8中限定的测定形式或基本上类似的测定通过体外T细胞介导的肿瘤细胞杀伤测定测量的。

[0133] 本发明还包含抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子,其表现出选自以下组成的组的一个或多个特性:活化T细胞、诱导IL-2释放、诱导人PBMC中的CD25+上调以及增加人T细胞介导的对表达CD22的细胞系的细胞毒性(参见例如本文实例9)。本发明还包含当与结合CD20和CD3的双特异性抗体(如但不限于REGN1979)组合时增强对表达CD22的肿瘤细胞的杀伤的抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子。本发明还包含当与结合PD-1的抗体(如但不限于西米普利单抗)组合时增强对表达CD22的肿瘤细胞的杀伤的抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子。(参见实例10-15)。

[0134] 表位作图和相关技术

[0135] 本发明的抗原结合分子所结合的CD28或CD22上的表位可以由CD28蛋白或CD22蛋白的3个或更多个(例如,3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或更多个)氨基酸的单个连续序列组成。可替代地,表位可以由CD28或CD22的多个非连续氨基酸(或氨基酸序列)组成。本发明的抗体可以与CD28单体内含有的氨基酸相互作用或者可以与CD28二聚体的两条不同CD28链上的氨基酸相互作用。如本文所使用的,术语“表位”是指与被称为互补位的抗体分子的可变区中的特定抗原结合位点相互作用的抗原决定簇。单个抗原可以具有多于一个表位。因此,不同的抗体可以与抗原上的不同区域结合并且可以具有不同的生物学效应。表位可以是构象的或线性的。构象表位通过来自线性多肽链的不同区段的空间上并列的氨基酸产生。线性表位是由多肽链中的相邻氨基酸残基产生的表位。在某些情况下,表位可以包含抗原上的糖、磷酸基或磺酰基的部分。

[0136] 可以使用本领域普通技术人员已知的各种技术来确定抗体的抗原结合结构域是否在多肽或蛋白质内“与一个或多个氨基酸相互作用”。可以用于确定特定抗体或抗原结合结构域的表位或结合结构域的示例性技术包含例如：常规交叉阻断测定，如在以下文献中描述的常规交叉阻断测定：《抗体 (Antibodies)》，Harlow和Lane (纽约冷泉港的冷泉港出版社 (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY)；点诱变 (例如，丙氨酸扫描诱变、精氨酸扫描诱变等)；肽印迹分析 (Reineke, 2004, 《分子生物学方法》248:443-463)；蛋白酶保护；以及肽切割分析。另外，可以采用如表位切除、表位提取以及抗原的化学修饰等方法 (Tomer, 2000, 《蛋白质科学 (Protein Science)》9:487-496)。可以用于鉴定与抗体相互作用的多肽内的氨基酸的另一种方法是通过质谱法检测的氢/氘交换。一般而言，氢/氘交换方法涉及对所关注的蛋白质进行氘标记，然后将抗体与经氘标记的蛋白质结合。接下来，将蛋白质/抗体复合物转移到水中，以允许在除抗体保护的残基 (其保持为经氘标记的) 之外的所有残基处发生氢-氘交换。在解离抗体后，对靶蛋白进行蛋白酶切割和质谱法分析，由此揭示对应于与抗体相互作用的特定氨基酸的经氘标记的残基。参见例如，Ehring (1999) 《分析生物化学 (Analytical Biochemistry)》267 (2):252-259；Engen和Smith (2001) 《分析化学 (Anal. Chem.)》73:256A-265A。也可以使用X射线晶体结构分析来鉴定与抗体相互作用的多肽内的氨基酸。

[0137] 本发明进一步包含抗CD28和抗CD22抗体，其与同本文所述的特定示例性抗体 (例如，包括本文表6中所示的氨基酸序列中的任何一个的抗体) 中的任何一个相同的表位结合。

[0138] 根据某些实施例，本发明提供了结合人CD22上的表位的抗体和抗体的抗原结合片段，所述表位包括SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35和/或SEQ ID NO:36的一个或多个氨基酸，如通过实例3和4中所示的质谱法检测到的氢氘交换确定的。

[0139] 同样，本发明还包含抗CD28和/或抗CD22抗体，其与本文所述的特定示例性抗体 (例如，包括本文表6中所示的氨基酸序列中的任何一个的抗体) 中的任何一个竞争与CD28和/CD22结合。

[0140] 本发明还包含双特异性抗原结合分子，其包括特异性地结合人CD28的第一抗原结合结构域和特异性地结合人CD22的第二抗原结合片段，其中第一抗原结合结构域与CD28上的与本文所描述的特定示例性CD28特异性抗原结合结构域中的任何一个相同的表位结合，和/或其中第二抗原结合结构域与CD22上的与本文所描述的特定示例性CD22特异性抗原结合结构域中的任何一个相同的表位结合。

[0141] 同样，本发明还包含双特异性抗原结合分子，其包括特异性地结合人CD28的第一抗原结合结构域和特异性地结合人CD22的第二抗原结合片段，其中第一抗原结合结构域与本文所描述的特定示例性CD28特异性抗原结合结构域中的任何一个竞争与CD28结合，和/或其中第二抗原结合结构域与本文所描述的特定示例性CD22特异性抗原结合结构域中的任何一个竞争与CD22结合。

[0142] 通过使用本领域中已知的常规方法，可以容易地确定特定的抗原结合分子 (例如，抗体) 或其抗原结合结构域是否与同本发明的参考抗原结合分子相同的表位结合或竞争与本发明的参考抗原结合分子结合。例如，为了确定测试抗体是否与CD28 (或CD22) 上的同本发明的参考双特异性抗原结合分子相同的表位结合，首先允许参考双特异性分子与CD28蛋

白(或CD22蛋白)结合。接下来,评估测试抗体与CD28(或CD22)分子结合的能力。如果测试抗体在与参考双特异性抗原结合分子饱和结合后能够与CD28(或CD22)结合,则可以得出结论,测试抗体与CD28(或CD22)中的与参考双特异性抗原结合分子不同的表位结合。另一方面,如果测试抗体在与参考双特异性抗原结合分子饱和结合后无法与CD28(或CD22)分子结合,那么测试抗体可以与CD28(或CD22)中的与本发明的参考双特异性抗原结合分子所结合的表位相同的表位结合。然后可以进行另外的常规实验(例如,肽突变和结合分析)以确认所观察到的测试抗体结合缺乏是否实际上是由于与同参考双特异性抗原结合分子相同的表位结合或者空间阻断(或另一种现象)是否是所观察到的结合的缺乏的原因。可以使用ELISA、RIA、Biacore、流式细胞术或本领域可用的任何其它定量或定性抗体结合测定执行这种实验。根据本发明的某些实施例,如果一种抗原结合蛋白的例如1倍、5倍、10倍、20倍或100倍过量抑制另一种抗原结合蛋白的至少50%,但优选地75%、90%或甚至99%的结合(如在竞争性结合测定中所测量的),则两种抗原结合蛋白与同一(或重叠)表位结合(参见例如,Junghans等人,《癌症研究(Cancer Res.)》1990:50:1495-1502)。可替代地,如果抗原中的减少或消除一种抗原结合蛋白的结合的基本上所有氨基酸突变均减少或消除另一种抗原结合蛋白的结合,则认为两种抗原结合蛋白与同一表位结合。如果减少或消除一种抗原结合蛋白的结合的氨基酸突变的仅子集减少或消除另一种抗原结合蛋白的结合,则认为两种抗原结合蛋白具有“重叠表位”。

[0143] 为了确定抗体或其抗原结合结构域是否与参考抗原结合分子竞争结合,以两种朝向执行上述结合方法:在第一种朝向中,允许参考抗原结合分子在饱和条件下与CD28蛋白(或CD22蛋白)结合,然后评估测试抗体与CD28(或CD22)分子的结合。在第二种朝向中,允许测试抗体在饱和条件下与CD28(或CD22)分子结合,然后评估参考抗原结合分子与CD28(或CD22)分子的结合。如果在两种朝向上仅第一(饱和的)抗原结合分子能够与CD28(或CD22)分子结合,那么可以得出结论,测试抗体和参考抗原结合分子竞争与CD28(或CD22)结合。如本领域普通技术人员所理解的,与参考抗原结合分子竞争结合的抗体可能不一定与同参考抗体相同的表位结合,但是可以通过结合重叠或相邻表位来空间上阻断参考抗体的结合。

[0144] 抗原结合结构域的制备和双特异性分子的构建

[0145] 对特定抗原具有特异性的抗原结合结构域可以通过本领域已知的任何抗体生成技术来制备。一旦获得,对两种不同抗原(例如,CD28和CD22)具有特异性的两种不同的抗原结合结构域就可以相对于彼此适当地布置,以使用常规方法产生本发明的双特异性抗原结合分子。(本文其它地方提供了对可以用于构建本发明的双特异性抗原结合分子的示例性双特异性抗体形式的讨论)。在某些实施例中,本发明的多特异性抗原结合分子的单独组分(例如,重链和轻链)中的一个或多个衍生自嵌合抗体、人源化抗体或完全人抗体。用于制备此类抗体的方法是本领域熟知的。例如,可以使用VELOCIMMUNE™技术制备本发明的双特异性抗原结合分子的重链和/或轻链中的一个或多个。使用VELOCIMMUNE™技术(或任何它他人抗体生成技术),首先分离出具有人可变区和小鼠恒定区的针对特定抗原(例如,CD28或CD22)的高亲和力嵌合抗体。对抗体进行表征和选择以获得包含亲和力、选择性、表位等的期望特性。用期望的人恒定区替代小鼠恒定区,以生成可以掺入本发明的双特异性抗原结合分子中的完全人重链和/或轻链。

[0146] 可以使用经基因工程化的动物来制备人双特异性抗原结合分子。例如,可以使用

无法重新布置和表达内源性小鼠免疫球蛋白轻链可变序列的经基因修饰的小鼠,其中小鼠仅表达由人免疫球蛋白序列编码的一个或两个人轻链可变结构域,所述人免疫球蛋白序列与内源性小鼠 κ 基因座处的小鼠 κ 恒定基因可操作地连接。这种经遗传修饰的小鼠可以用于产生包括两条不同的重链的完全人双特异性抗原结合分子,所述重链与包括衍生自两个不同人轻链可变区基因区段中的一个的可变结构域的相同轻链缔合。(关于此工程化小鼠和其用于产生双特异性抗原结合分子的用途的详细讨论,参见例如US2011/0195454,所述文献的全部内容通过引用并入本文)。

[0147] 生物等效性

[0148] 本发明涵盖具有不同于所描述抗体的氨基酸序列但保留结合CD28和/或CD22的能力的氨基酸序列的抗原结合分子。与亲本序列相比,此类变体分子包括氨基酸的一个或多个添加、缺失或取代,但表现出与所描述抗原结合分子的生物活性基本上等效的生物活性。同样,本发明的对抗原结合分子进行编码的DNA序列涵盖这样的序列:与所公开的序列相比,其包括核苷酸的一个或多个添加、缺失或取代,但对与本发明的所描述抗原结合分子基本上生物等效的抗原结合分子进行编码。上文讨论了此类变体氨基酸和DNA序列的实例。

[0149] 本发明包含与本文所示的示例性抗原结合分子中的任何一个生物等效的抗原结合分子。如果例如两种抗原结合蛋白或抗体是在类似的实验条件下以相同的摩尔剂量(单剂量或多剂量)施用时吸收速率和吸收程度未显示出显著差异的药物等效物或药物替代物,则认为所述两种抗原结合蛋白或抗体是生物等效的。如果一些抗体在其吸收程度上等效但在其吸收速率上不等效,则认为所述抗体是等效物或药物替代物,并且可以认为所述抗体是生物等效的,因为有意的并且反映在标记上的这种吸收速率差异在例如长期使用时对于达到有效的身体药物浓度并非是必需的并且对于所研究的特定药物产品而言被认为是医学上无关紧要的。

[0150] 在一个实施例中,如果两种抗原结合蛋白的安全性、纯度和效力不存在临床上有意义的差异,则所述两种抗原结合蛋白是生物等效的。

[0151] 在一个实施例中,与不存在参考产品与生物产品之间的转换的持续疗法相比,如果患者可以在参考产品与生物产品之间转换一次或多次而没有预期的副作用风险增加(包含免疫原性的临床显著变化或有效性降低),则两种抗原结合蛋白是生物等效的。

[0152] 在一个实施例中,如果两种抗原结合蛋白均针对一个或多个使用条件通过一种或多种共同作用机制起作用(只要这些机制是已知的),则所述两种抗原结合蛋白是生物等效的。

[0153] 生物等效性可以通过体内和体外方法来证明。生物等效性度量包含例如:(a)在人或其它哺乳动物中的体内测试,其中在血液、血浆、血清或其它生物流体中测量抗体或其代谢物的浓度随时间的变化;(b)与人体内生物利用度数据相关并且可合理地预测的体外测试;(c)在人或其它哺乳动物中的体内测试,其中测量抗体(或其靶标)的适当急性药理作用随时间的变化;以及(d)在建立抗体的安全性、功效或生物利用度或生物等效性的控制良好的临床试验中。

[0154] 可以通过例如对残基或序列进行各种取代或缺失非生物活性所需的末端或内部残基或序列来构建本文所示的示例性双特异性抗原结合分子的生物等效变体。例如,可以缺失非生物活性所必需的半胱氨酸残基或用其它氨基酸替代,以防止在复性时形成不必要

的或不正确的分子内二硫桥。在其它背景下,生物等效抗体可以包含本文所示的示例性双特异性抗原结合分子,所述示例性双特异性抗原结合分子包括修饰抗体的糖基化特性的氨基酸变化,例如消除或去除糖基化的突变。

[0155] 物种选择性和物种交叉反应性

[0156] 根据某些实施例,本发明提供了与人CD28结合但不与来自其它物种的CD28结合的抗原结合分子。本发明还提供了与人CD22结合但不与来自其它物种的CD22结合的抗原结合分子。本发明还包含与人CD28结合并且与来自一个或多个非人物种的CD28结合的抗原结合分子;和/或与人CD22结合并且与来自一个或多个非人物种的CD22结合的抗原结合分子。

[0157] 根据本发明的某些示例性实施例,提供了抗原结合分子,所述抗原结合分子与人CD28和/或人CD22结合并且视情况而定可以与小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、沙鼠、猪、猫、狗、兔子、山羊、绵羊、牛、马、骆驼、猕猴、狨猴、恒河猴或黑猩猩CD28和或CD22中的一种或多种结合或不与其结合。例如,在本发明的特定示例性实施例中,提供了双特异性抗原结合分子,其包括结合人CD28和猕猴CD28的第一抗原结合结构域以及特异性地结合人CD22的第二抗原结合结构域。

[0158] 免疫缀合物

[0159] 本发明涵盖与治疗部分缀合的抗原结合分子(“免疫缀合物”),如细胞毒素、化学治疗药物、免疫抑制剂或放射性同位素。细胞毒性剂包含对细胞有害的任何药剂。用于形成免疫缀合物的合适的细胞毒性剂和化学治疗剂的实例是本领域已知的(参见例如,WO 05/103081,所述文献的全部内容通过引用并入本文)。

[0160] 治疗性调配物和施用

[0161] 本发明提供了包括本发明的抗原结合分子的药物组合物。本发明的药物组合物与合适的载体、赋形剂和提供经改善的转移、递送、耐受性等的其它药剂一起调配。在所有药物化学家已知的处方集中可以找到许多合适的调配物:《雷明顿氏药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,宾夕法尼亚州伊斯顿的马克出版公司(Mack Publishing Company, Easton, PA)。这些调配物包含例如粉末、糊剂、软膏、凝胶剂、蜡、油、脂质、含有囊泡的脂质(阳离子或阴离子)(如LIPOFECTIN™,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命科技公司(Life Technologies, Carlsbad, CA))、DNA缀合物、无水吸附糊剂、水包油和油包水乳剂、乳剂碳蜡(各种分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶和含有碳蜡的半固体混合物。还参见Powell等人“肠胃外调配物用赋形剂汇编(Compendium of excipients for parenteral formulations)”PDA(1998)《药物科学与技术杂志(J Pharm Sci Technol)》52:238-311。

[0162] 施用于患者的抗原结合分子的剂量可以根据患者的年龄和体型、目标疾病、病状、施用途径等而变化。通常根据体重或体表面积计算优选的剂量。当本发明的双特异性抗原结合分子出于治疗目的用于成年患者中时,通常以约0.01到约20mg/kg体重、更优选地约0.02到约7mg/kg体重、约0.03到约5mg/kg体重或约0.05到约3mg/kg体重的单剂量静脉内施用本发明的双特异性抗原结合分子可以是有利的。根据病状的严重程度,可以调整治疗的频率和持续时间。可以凭经验确定用于施用双特异性抗原结合分子的有效剂量和时间表;例如,可以通过定期评估来监测患者进展,并且相应地调整剂量。此外,可以使用本领域熟知的方法执行剂量的种间类推(例如,Mordenti等人,1991,《药学研究(Pharmaceut. Res.)》,8:1351)。

[0163] 各种递送系统是已知的并且可以用于施用本发明的药物组合物,例如,包封在脂质体、微颗粒、微胶囊、能够表达突变病毒的重组细胞、受体介导的胞吞作用中(参见例如,Wu等人,1987,《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》262:4429-4432)。引入的方法包含但不限于真皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。组合物可以通过任何方便的途径例如通过输注或快速浓注、通过经由上皮或皮肤粘膜内层(例如,口腔粘膜、直肠和肠道粘膜等)吸收来施用并且可以与其它生物活性剂一起施用。施用可以是全身性的或局部的。

[0164] 可以用标准针头和注射器皮下或静脉内递送本发明的药物组合物。另外,就皮下递送而言,笔递送装置易于应用于递送本发明的药物组合物。这种笔递送装置可以是可重复使用的或一次性的。可重复使用的笔递送装置通常利用含有药物组合物的可更换药筒。一旦已经施用了药筒内的全部药物组合物,并且药筒是空的,就可以容易地丢弃空药筒并且用含有药物组合物的新药筒更换。然后可以重复使用笔递送装置。在一次性笔递送装置中,没有可更换的药筒。相反,一次性笔递送装置预填充有固持在装置内的贮存器中的药物组合物。一旦贮存器中的药物组合物清空,就丢弃整个装置。

[0165] 许多可重复使用的笔递送装置和自动注射器递送装置应用于皮下递送本发明的药物组合物。实例包含但不限于AUTOPENTM(英国伍德斯托克的欧文芒福德公司(Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK))、DISETRONICTM笔(瑞士波道夫的Disetronic医疗系统公司(Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland))、HUMALOG MIX 75/25TM笔、HUMALOGTM笔、HUMALIN 70/30TM笔(印第安纳州印第安纳波利斯的礼来公司(Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN))、I、II和III NOVOPENTM(丹麦哥本哈根的诺和诺德公司(Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark))、NOVOPEN JUNIORTM(丹麦哥本哈根的诺和诺德公司)、BDTM笔(新泽西州富兰克林湖的贝迪医疗公司(Becton Dickinson))、OPTIPENTM、OPTIPEN PROTM、OPTIPEN STARLETTM以及OPTICLIKTM(德国法兰克福的赛诺菲公司(Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany)),仅举几例。应用于皮下递送本发明的药物组合物的一次性笔递送装置的实例包含但不限于SOLOSTARTM笔(赛诺菲公司)、FLEXPENTM(诺和诺德公司)以及KWIKPENTM(礼来公司)、SURECLICKTM自动注射器(加利福尼亚州的千橡市安进公司(Amgen, Thousand Oaks, CA))、PENLETTM(德国斯图加特的Haselmeier公司(Haselmeier, Stuttgart, Germany))、EPIPEN(Dey公司(Dey, L.P.))以及HUMIRATM笔(伊利诺伊州雅培科技园的雅培实验室(Abbott Labs, Abbott Park IL)),仅举几例。

[0166] 在某些情况下,药物组合物可以在受控释放系统中递送。在一个实施例中,可以使用泵(参见Langer,同上;Sefton,1987,《CRC:生物工程关键评论(CRC Crit. Ref Biomed. Eng.)》14:201)。在另一个实施例中,可以使用聚合物材料;参见《控释医学应用(Medical Applications of Controlled Release)》,Langer和Wise(编辑),1974,佛罗里达州波卡拉顿d CRC出版社(CRC Pres., Boca Raton, Florida)。在又一个实施例中,控释系统可以放置在组合物的靶标附近,因此仅需要全身剂量的一部分(参见例如,Goodson, 1984,《控释医学应用(Medical Applications of Controlled Release)》同上,第2卷,第115-138页)。其它控释系统在Langer,1990,《科学》249:1527-1533的评论中讨论。

[0167] 可注射制剂可以包含用于静脉内、皮下、皮内和肌内注射、滴注等的剂型。可以通过公开已知的方法来制备这些可注射制剂。例如,可以例如通过将上述抗体或其盐溶解、悬

浮或乳化在无菌水性介质或常规用于注射的油性介质中来制备可注射制剂。作为用于注射的水性介质,存在例如生理盐水、含有葡萄糖的等渗溶液以及其它助剂等,其可以与如醇(例如,乙醇)、多元醇(例如,丙二醇、聚乙二醇)等合适的增溶剂、非离子表面活性剂[例如,聚山梨醇酯80、HCO-50(氢化蓖麻油的聚氧乙烯(50mol)加合物)]等组合地使用。作为油性介质,采用例如芝麻油、大豆油等,其可以与如苯甲酸苄酯、苯甲醇等增溶剂等组合地使用。如此制备的注射剂优选地填充在合适的安瓿中。

[0168] 有利地是,将上述用于口服或肠胃外使用的药物组合物制备成适合于配合一定剂量的活性成分的单位剂量剂型。这种单位剂量剂型包含例如片剂、丸剂、胶囊剂、注射剂(安瓿)、栓剂等。所含的上述抗体的量通常为每单位剂量剂型约5mg到约500mg;特别是在注射形式下,优选的是,上述抗体的含量为约5mg到约100mg并且对于其它剂型为约10mg到约250mg。

[0169] 抗原结合分子的治疗性用途

[0170] 本发明包含包括向有需要的受试者施用治疗性组合物的方法,所述治疗性组合物包括抗CD28抗体或特异性地结合CD28和靶抗原(例如,CD22)的双特异性抗原结合分子。治疗性组合物可以包括本文所公开的抗体或双特异性抗原结合分子中的任何一个以及药学上可接受的载体或稀释剂。如本文所使用的,表述“有需要的受试者”意指表现出一种或多种癌症症状或征兆(例如,表现出肿瘤或患有本文在下文提及的癌症中的任何一种癌症的受试者)或者以其它方式受益于CD22活性的抑制或降低或者CD22+细胞的耗竭的人或非人动物。

[0171] 本发明的抗体和双特异性抗原结合分子(以及包括其的治疗性组合物)尤其可用于治疗其中刺激、活化和/或靶向免疫应答将会有益的任何疾病或病症。具体地,本发明的抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子可以用于治疗、预防和/或改善与CD22表达或活性或者CD22+细胞增殖相关或由其介导的任何疾病或病症。实现本发明的治疗性方法的作用机制包含在效应细胞例如T细胞存在的情况下杀伤表达CD22的细胞。可以使用本发明的双特异性抗原结合分子抑制或杀伤的表达CD22的细胞包含例如癌性B细胞。

[0172] 本发明的抗原结合分子可以用于治疗例如血液、骨髓、淋巴结(例如,胸腺、脾脏)、结肠、肝脏、肺、乳腺、肾癌、中枢神经系统和膀胱癌中出现的原发性和/或转移性肿瘤。根据某些示例性实施例,本发明的双特异性抗原结合分子用于治疗B细胞增殖性病症。

[0173] 本发明还包含用于治疗受试者的残留癌症的方法。如本文所使用的,术语“残留癌症”意指在用抗癌疗法治疗后受试者的一个或多个癌细胞的存在或持续存在。

[0174] 根据某些方面,本发明提供了用于治疗与CD22表达(例如,B细胞增殖性病症)相关的疾病或病症的方法,所述方法包括在示出受试者对其它类型的抗癌疗法无应答后向受试者施用本文其它地方描述的双特异性抗原结合分子中的一种或多种。例如,本发明包含用于治疗B细胞增殖性病症的方法,所述方法包括在受试者已经接受针对患有癌症例如B细胞增殖性病症的患者的标准护理后1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周或4周、2个月、4个月、6个月、8个月、1年或更长时间向患者施用抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子。在其它方面,最初在一个或多个时间点处向受试者施用包括IgG4 Fc结构域的本发明的双特异性抗原结合分子(抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子)(例如,以提供前列腺癌细胞的稳健初始耗竭),之后在随后的时间点处施用包括不同IgG结构域如IgG1 Fc结构域的等效

双特异性抗原结合分子。可以设想的是,可以结合其它双特异性抗原结合分子如结合抗CD20/抗CD3双特异性抗体使用本发明的抗CD28/抗CD22抗体。还可以设想的是,结合检查点抑制剂例如靶向PD-1和CTLA-4以及其它靶标的检查点抑制剂使用本发明的双特异性抗体。将靶向同一肿瘤抗原(例如,CD22)的两种双特异性抗体组合可以是有利的,但是其中一种双特异性抗体靶向T细胞上的CD3,而另一种双特异性抗体靶向如CD28等共刺激分子。此组合可以单独用于增强肿瘤细胞杀伤或者可以与检查点抑制剂组合地使用。

[0175] 组合疗法和调配物

[0176] 本发明包含包括本文所述的示例性抗体和双特异性抗原结合分子中的任何一种与一种或多种另外的治疗活性组分的组合的组合物和治疗性调配物以及包括向有需要的受试者施用此类组合的治疗方法。

[0177] 可以与本发明的抗原结合分子组合或组合施用的另外的示例性治疗剂包含例如化学疗法、放射疗法、靶向PD-1的检查点抑制剂(例如,如派姆单抗、纳武单抗或西米普利单抗等抗PD-1抗体,参见US9,987,500,SEQ ID NO 162/170的HCVR/LCVR)、CTLA-4、LAG3、TIM3等、如GITR、OX40、4-1BB等靶向分子的共刺激激动剂二价抗体、CD3x双特异性抗体(参见例如US9,657,102(REGN1979)、W02017/053856A1、W02014/047231A1、W02018/067331A1和W02018/058001A1)、靶向CD22 X CD3、CD22 X CD28或靶向CD20 X CD3的其它抗体以及其它共刺激CD28x双特异性抗体。

[0178] 可以与本发明的抗体有益地组合施用的其它药剂包含例如他莫昔芬(tamoxifen)、芳香酶抑制剂和细胞因子抑制剂,包含小分子细胞因子抑制剂和与如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18等细胞因子或其各自的受体结合的抗体。本发明的药物组合物(例如,包括如本文所公开的抗CD28/抗CD22双特异性抗原结合分子的药物组合物)还可以作为治疗性方案的一部分施用,所述治疗性方案包括选自以下的一种或多种治疗组合:“ICE”:异环磷酰胺(例如,Ifex®)、卡铂(例如,Paraplatin®)、依托泊苷(例如,Etopophos®、Toposar®、VePesid®、VP-16);“DHAP”:地塞米松(例如,Decadron®)、阿糖胞苷(例如,Cytosar-U®、胞嘧啶阿拉伯糖苷、ara-C)、顺铂(例如,Platinol®-AQ);以及“ESHAP”:依托泊苷(例如,Etopophos®、Toposar®、VePesid®、VP-16)、甲基强的松龙(例如,Medrol®)、高剂量阿糖胞苷、顺铂(例如,Platinol®-AQ)。

[0179] 本发明还包含治疗组合,所述治疗组合包括本文提及的抗原结合分子中的任何一种和VEGF、Ang2、DLL4、EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EGFRv111、cMet、IGF1 R、B-raf、PDGFR- α 、PDGFR- β 、FOLH1、PRLR、STEAP1、STEAP2、TMPRSS2、MSLN、CA9、尿溶蛋白(uroplakin)中的一个或多个或上述细胞因子中的任何一个的抑制剂,其中所述抑制剂是适体、反义分子、核酶、siRNA、肽体、纳米抗体或抗体片段(例如,Fab片段;F(ab')₂片段;Fd片段;Fv片段;scFv;dAb片段;或其它工程化分子,如双抗体、三抗体、四抗体、微抗体和最小识别单元)。本发明的抗原结合分子还可以与抗病毒剂、抗生素、镇痛药、皮质类固醇和/或NSAID组合施用和/或共同调配。本发明的抗原结合分子还可以作为治疗方案的一部分施用,所述治疗方案还包含放射治疗和/或常规化学疗法,或用生物制品(包含检查点抑制剂或其它双特异性抗体)治疗。

[0180] 本发明包含包括本文所述的抗原结合分子中的任何一种与一种或多种化学治疗

剂的组合的组合物和治疗性调配物。化学治疗剂的实例包含：烷化剂，如噻替派(thiotepa)和环磷酰胺(CytosanTM)；烷基磺酸盐，如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶类，如苯佐多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥多巴(meturedopa)和脲多巴(uredopa)；乙烯亚胺类和甲基胺类，包含六甲蜜胺、三亚乙基密胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲密胺(trimethylolomelamine)；氮芥类(nitrogen mustards)，如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯磷酰胺(cholophosphamide)、雌氮芥、异环磷酰胺、氮芥(mechlorethamine)、盐酸甲氧氮芥、美法仑、新恩比兴、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲洛磷胺、乌拉莫司汀；亚硝基脲(nitrosurea)，如卡莫司汀、氯脲霉素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀；抗生素，如阿克拉霉素、放线菌素、安曲霉素、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C(cactinomycin)、卡奇霉素、卡拉比星、洋红霉素、嗜癌菌素、色霉素、放线菌素D、柔红霉素、地托比星、6-二氮-5-氧代-L-正亮氨酸、阿霉素、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素类、菌酚酸、诺加霉素、橄榄霉素类、培洛霉素、泊非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑菌素、链脲菌素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星；抗代谢物类，如氨甲蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU)；叶酸类似物，如二甲叶酸、氨甲蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙；嘌呤类似物，如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤；嘧啶类似物，如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮杂尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷；雄激素类，如卡普睾酮、丙酸屈他雄酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯；抗肾上腺类，如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦；叶酸补充剂，如亚叶酸；醋葡萄糖内酯；醛磷酰胺糖苷；氨基乙酰丙酸；安吡啶；百垂布西(bestrabucil)；比生群；依达曲沙；地磷酰胺(defofamine)；地美可辛；地吡醌；依氟鸟氨酸；依利醋铵；依托格鲁；硝酸镓；羟基脲；香菇多糖；氯尼达明；米托胍脲；米托蒽醌；莫哌达醇；二胺硝吡啶；喷司他丁；蛋氨酸；吡柔比星；鬼臼酸；2-乙基酰肼；丙卡巴肼；PSKTM；丙亚胺；西佐喃；锗螺胺；细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid)；三亚胺醌；2,2',2''-三氯三乙胺；尿烷；长春地辛；达卡巴嗪；甘露醇氮芥；二溴甘露醇；二溴卫矛醇；哌泊溴烷；盖克托辛(gacytosine)；阿拉伯糖苷("Ara-C")；环磷酰胺；噻替派；紫杉烷类，例如紫杉醇(TaxolTM，新泽西州普林斯顿的百时美施贵宝公司肿瘤学部门(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.))和多烯紫杉醇(TaxotereTM，法国安内特安东尼公司(Aventis Antony, France))苯丁酸氮芥；吉西他滨；6-硫鸟嘌呤；巯基嘌呤；甲氨蝶呤；铂类似物，如顺铂和卡铂；长春碱；铂；依托泊苷(VP-16)；异环磷酰胺；丝裂霉素C；米托蒽醌；长春新碱；长春瑞滨；诺维本；诺安托；替尼泊苷；道诺霉素；氨蝶呤；希罗达；伊班膦酸盐；CPT-11；拓扑异构酶抑制剂RFS 2000；二氟甲基鸟氨酸(DMFO)；视黄酸；拉霉素(esperamicin)；卡培他滨；以及以上中的任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。此定义还包含用于调节或抑制对肿瘤的激素作用的抗激素剂，如：抗雌激素类，包含例如他莫西芬、雷洛昔芬(raloxifene)、芳香酶抑制性4(5)-咪唑、4-羟基他莫西芬、曲沃昔芬、雷洛昔芬(keoxifene)、LY 117018、奥那司酮和托瑞米芬(法乐通)；和抗雄激素类，如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林；以及以上中的任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0181] 可以在施用本发明的抗原结合分子之前、同时或之后立刻施用一种或多种另外的治疗活性组分；(出于本公开的目的，此类施用方案被认为是抗原结合分子“与另外的治疗活性组分组合”施用)。

[0182] 本发明包含药物组合物,其中本发明的抗原结合分子与如本文其它地方所描述的一种或多种另外的治疗活性组分一起共同调配。

[0183] 施用方案

[0184] 根据本发明的某些实施例,可以在限定的时间过程内向受试者施用多剂量的抗原结合分子(例如,抗CD28抗体或特异性地结合CD22和CD28的双特异性抗原结合分子)。根据本发明的此方面的方法包括向受试者依次施用多剂量的本发明的抗原结合分子。如本文所使用的,“依次施用”意味着在不同时间点例如在隔开预定间隔(例如,数小时、数天、数周或数月)的不同日期向受试者施用每个剂量的抗原结合分子。本发明包含包括以下的方法:向患者依次施用单一初始剂量的抗原结合分子、然后是一个或多个第二剂量的抗原结合分子并且任选地然后是一个或多个第三剂量的抗原结合分子。

[0185] 术语“初始剂量”、“第二剂量”和“第三剂量”是指施用本发明的抗原结合分子的时间序列。因此,“初始剂量”是在治疗方案开始时施用的剂量(也被称为“基线剂量”);“第二剂量”是在初始剂量之后施用的剂量;并且“第三剂量”是在第二剂量之后施用的剂量。初始剂量、第二剂量和第三剂量可以均含有相同量的抗原结合分子,但是在施用频率方面通常可能彼此不同。然而,在某些实施例中,在治疗过程期间,初始剂量、第二剂量和/或第三剂量中含有的抗原结合分子的量彼此不同(例如,被适当地调高或调低)。在某些实施例中,在治疗方案开始时施用两个或更多个(例如,2个、3个、4个或5个)剂量作为“负荷剂量”,然后是以较低频率为基础施用的后续剂量(例如,“维持剂量”)。

[0186] 在本发明的一个示例性实施例中,在上一剂量后1到26(例如,1、1¹/₂、2、2¹/₂、3、3¹/₂、4、4¹/₂、5、5¹/₂、6、6¹/₂、7、7¹/₂、8、8¹/₂、9、9¹/₂、10、10¹/₂、11、11¹/₂、12、12¹/₂、13、13¹/₂、14、14¹/₂、15、15¹/₂、16、16¹/₂、17、17¹/₂、18、18¹/₂、19、19¹/₂、20、20¹/₂、21、21¹/₂、22、22¹/₂、23、23¹/₂、24、24¹/₂、25、25¹/₂、26、26¹/₂或更多)周施用每个第二剂量和/或第三剂量。如本文所使用的,短语“上一剂量”意指在多次施用的序列中,在没有中间剂量的情况下在施用所述序列中的下一个剂量之前施用于患者的抗原结合分子的剂量。

[0187] 根据本发明的此方面的方法可以包括向患者施用任何数量的第二剂量和/或第三剂量的抗原结合分子(例如,抗CD28抗体或特异性地结合CD22和CD28的双特异性抗原结合分子)。例如,在某些实施例中,仅向患者施用单个第二剂量。在其它实施例中,向患者施用两个或更多个(例如,2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或更多个)第二剂量。同样,在某些实施例中,仅向患者施用单个第三剂量。在其它实施例中,向患者施用两个或更多个(例如,2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或更多个)第三剂量。

[0188] 在涉及多个第二剂量的实施例中,每个第二剂量可以按与其它第二剂量相同的频率施用。例如,可以在上一剂量后1到2周向患者施用每个第二剂量。类似地,在涉及多个第三剂量的实施例中,每个第三剂量可以按与其它第三剂量相同的频率施用。例如,可以在上一剂量后2到4周向患者施用每个第三剂量。可替代地,向患者施用第二剂量和/或第三剂量的频率可以在治疗方案的过程中变化。施用频率也可以在由医师治疗的过程期间根据临床检查后个体患者的需要进行调整。

[0189] 在一个实施例中,将抗原结合分子(例如,特异性地结合CD22和CD28的双特异性抗原结合分子)以基于体重的剂量施用于受试者。“基于体重的剂量”(例如,以mg/kg为单位的剂量)是根据受试者的体重改变的抗体或其抗原结合片段或双特异性抗原结合分子的剂

量。

[0190] 在另一个实施例中,将抗体或其抗原结合片段或双特异性抗原结合分子以固定剂量施用于受试者。“固定剂量”(例如,以mg为单位的剂量)意味着将一个剂量的抗体或其抗原结合片段或双特异性抗原结合分子用于所有受试者,而不论任何特定受试者相关因素如体重如何。在一个特定实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段或双特异性抗原结合分子的固定剂量是基于预定的体重或年龄。

[0191] 通常,抗原结合分子本发明的合适剂量的范围可以为约0.001到约200.0毫克每千克接受者体重,通常范围为约1到50mg每千克体重。例如,抗体或其抗原结合片段或双特异性抗原结合分子可以按每单剂量约0.1mg/kg、约0.2mg/kg、约0.5mg/kg、约1mg/kg、约1.5mg/kg、约2mg/kg、约3mg/kg、约5mg/kg、约10mg/kg、约15mg/kg、约20mg/kg、约25mg/kg、约30mg/kg、约40mg/kg、约50mg/kg施用。所陈述值的中间值和范围也旨在是本发明的一部分。

[0192] 在一些实施例中,将本发明的抗原结合分子按约25mg到约2500mg之间的固定剂量施用。在一些实施例中,本发明的抗原结合分子按以下固定剂量施用:约25mg、约30mg、约50mg、约75mg、约100mg、约125mg、约150mg、约175mg、200mg、约225mg、约250mg、约275mg、约300mg、约325mg、约350mg、约375mg、约400mg、约425mg、约450mg、约475mg、约500mg、约525mg、约550mg、约575mg、约600mg、约625mg、约650mg、约675mg、约700mg、约725mg、约750mg、约775mg、约800mg、约825mg、约850mg、约875mg、约900mg、约925mg、约950mg、约975mg、约1000mg、约1500mg、约2000mg或约2500mg。所陈述值的中间值和范围也旨在是本发明的一部分。

[0193] 抗体的诊断用途

[0194] 也可以例如出于诊断目的使用本发明的双特异性抗体来检测和/或测量样品中的CD28或CD22或者CD28表达性或CD22表达性细胞。例如,可以使用抗抗CD28 x抗CD22抗体或其片段来诊断以CD28或CD22的异常表达(例如,过度表达、表达不足、缺乏表达等)为特征的病状或疾病。用于CD28或CD22的示例性诊断测定可以包括例如使从患者获得的样品与本发明的抗体接触,其中用可检测的标记或报告分子来标记所述抗体。可替代地,未标记的抗体可以与本身被可检测地标记的第二抗体组合用于诊断应用。可检测的标记或报告分子可以是:放射性同位素,如³H、¹⁴C、³²P、³⁵S或¹²⁵I;荧光或化学发光部分,如异硫氰酸荧光素或罗丹明;或酶,如碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶或荧光素酶。可以用于检测或测量样品中的CD28或CD22的特定示例性测定包含酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)和荧光活化细胞分选(FACS)。可以用于根据本发明的CD28或CD22诊断测定中的样品包含可从在正常或病理条件下含有可检测量的CD28或CD22蛋白或其片段的患者获得的任何组织或流体样品。通常,将测量从健康患者(例如,未患有与异常CD28或CD22水平或活性相关的疾病或病状的患者)获得的特定样品中CD28或CD22水平,以初步建立基线或标准CD28或CD22水平。然后可以将此基线CD28或CD22水平与从疑似患有CD28或CD22相关疾病或病状的个体获得的样品中测量到的CD28或CD22水平进行比较。

[0195] 实例

[0196] 提出以下实例,以向本领域普通技术人员提供关于如何制备和使用本发明的方法和组合物的完整公开和描述,并且以下实例不旨在限制发明人认为是其发明的范围。已经

努力确保关于所使用的数字(例如,量、温度等)的准确性,但是应当考虑一些实验误差和偏差。除非另外指示,否则份数是重量份数,分子量是平均分子量,温度是摄氏度,并且压力是或接近大气压。

[0197] 实例1:抗CD22xCD28抗体的构建

[0198] 抗CD28抗体的生成

[0199] 通过用与小鼠IgG2a的Fc部分融合的人CD28蛋白或用表达CD28的细胞或用对CD28进行编码的DNA对VELOCIMMUNE®小鼠(即,包括对人免疫球蛋白重链和κ轻链可变区进行编码的DNA的工程化小鼠)进行免疫来获得抗CD28抗体。通过CD28特异性免疫测定来监测抗体免疫应答。当达到期望的免疫应答时,收获脾细胞并使其与小鼠骨髓瘤细胞融合,以保持其活力并形成杂交瘤细胞系。筛选并选择杂交瘤细胞系以鉴定产生CD28特异性抗体的细胞系。使用此技术获得了几种抗CD28嵌合抗体(即,具有人可变结构域和小鼠恒定结构域的抗体)。另外,如US 2007/0280945A1中所描述的,直接从抗原阳性B细胞中分离出几种完全人抗CD28抗体,而不与骨髓瘤细胞融合。

[0200] 根据此实例的方法生成的示例性抗CD28抗体的某些生物学性质在下文所示的实例中详细描述。

[0201] 抗CD22抗体的生成

[0202] 通过用人CD22抗原(例如,参见hCD22 ecto(D20-R687).hFc,R&D系统公司,目录号1968-SL-050;登录号CAA42006)(还参见图3)对经基因修饰的小鼠(VELOCIMMUNE®小鼠,参见上文)进行免疫或通过用人CD22抗原对包括对人免疫球蛋白重链和κ轻链可变区进行编码的DNA的工程化小鼠进行免疫来获得抗CD22抗体。

[0203] 免疫后,从每只小鼠收获脾细胞,并且将其(1)与小鼠骨髓瘤细胞融合以保持其活力并形成杂交瘤细胞并筛选其CD22特异性或(2)使用人CD22片段作为结合和鉴定反应性抗体(抗原阳性B细胞)的分选试剂进行B细胞分选(如US 2007/0280945A1中所描述的)。

[0204] 最初分离出具有人可变区和小鼠恒定区的针对CD22的嵌合抗体。对抗体进行表征和选择以获得包含亲和力、选择性等期望的特性。如果需要,则用期望的人恒定区例如野生型或经修饰的IgG1或IgG4恒定区来替代小鼠恒定区,以生成完全人抗CD22抗体。虽然所选择的恒定区可以根据具体用途而变化,但是高亲和力抗原结合和靶标特异性特性存在于可变区中。

[0205] 结合CD28和CD22的双特异性抗体的生成

[0206] 使用标准方法构建包括抗CD22特异性结合结构域和抗CD28特异性结合结构域的双特异性抗体,其中抗CD22抗原结合结构域和抗CD28抗原结合结构域各自包括与共同LCVR配对的不同的独特HCVR。在一些情况下,利用来自抗CD28抗体的重链、来自抗CD22抗体的重链和共同轻链构建双特异性抗体(参见表1)。

[0207] 根据本实例产生的双特异性抗体包括两个单独的抗原结合结构域(即,结合臂)。第一抗原结合结构域包括衍生自抗CD28抗体的重链可变区(“CD28-VH”),并且第二抗原结合结构域包括衍生自抗CD22抗体的重链可变区(“CD22-VH”)。抗CD22抗CD28两者共享共同的轻链。CD28-VH/CD22-VH配对产生了特异性地识别T细胞上的CD28和肿瘤细胞上的CD22的抗原结合结构域。

[0208] 实例2:重链和轻链可变区氨基酸和核酸序列

[0209] 表1列示了本发明的所选抗CD22抗体的重链和轻链可变区以及CDR的氨基酸序列标识符。对应的核酸序列标识符列示于表2中。

[0210] 表1:CD22抗体的氨基酸序列标识符

抗体名称	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb33037P2	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb33041P2	18	20	22	24	10	12	14	16

[0212] 表2:CD22抗体的核酸序列标识符

抗体名称	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb33037P2	1	3	5	7	9	11	13	15

mAb33041P2	17	19	21	23	9	11	13	15
------------	----	----	----	----	---	----	----	----

[0215] 表3列示了本发明的所选抗CD28抗体的重链和轻链可变区 (HCVR和LCVR)、CDR的氨基酸序列标识符。对应的核酸序列标识符列示于表4中。

[0216] 表3:CD28抗体的氨基酸序列标识符

抗体名称	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb14226P2	26	28	30	32	10	12	14	16

[0218] 表4:CD28抗体的核酸序列标识符

抗体名称	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb14226P2	25	27	29	31	9	11	13	15

[0220] 表5中列示了构建的各种抗CD22x抗CD28双特异性抗体的组分部分汇总。表6和7列示了双特异性抗体的HCVR、LCVR、CDR以及重链和轻链序列标识符。

[0221] 表5:抗CD22 x抗CD28双特异性抗体的组分部分汇总

双特异性抗体标识符	抗 CD22	抗 CD28	共同轻链可变区
	抗原结合结构域	抗原结合结构域	
	重链可变区	重链可变区	
REGN5837	mAb33037P2	mAb14226P2	ULC3-20
REGN5838	mAb33041P2	mAb14226P2	ULC3-20

[0223] 表6示出了本文例证的用于双特异性抗CD22 x抗CD28抗体的氨基酸序列标识符。对应的核酸序列标识符列示于表7中。

[0224] 表6:抗CD22 x抗CD28双特异性抗体的氨基酸序列

双特异性抗体标识符	抗 CD28 第一抗原结合结构域 (D1)				抗 CD22 第二抗原结合结构域 (D2)				共同轻链可变区			
	D1-HCVR	D1-HCDR1	D1-HCDR2	D1-HCDR3	D2-HCVR	D2-HCDR1	D2-HCDR2	D2-HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
REGN5837	26	28	30	32	2	4	6	8	10	12	14	16
REGN5838	26	28	30	32	18	20	22	24	10	12	14	16

[0226] 表7:抗CD22 x抗CD28双特异性抗体的核酸序列

双特异性抗体标识符	抗 CD28 第一抗原结合结构域 (D1)				抗 CD22 第二抗原结合结构域 (D2)				共同轻链可变区			
	D1-HCVR	D1-HCDR1	D1-HCDR2	D1-HCDR3	D2-HCVR	D2-HCDR1	D2-HCDR2	D2-HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
REGN5837	25	27	29	31	1	3	5	7	9	11	13	15
REGN5838	25	27	29	31	17	19	21	23	9	11	13	15

[0228] 实例3:通过氢氘交换对REGN5837与CD22的结合的表位作图

[0229] 执行质谱法H/D交换表位作图(HDX-MS)以便确定CD22(重组人CD22,SEQ ID NO:50)中的与H4sH33037P2(参见表1,SEQ ID NO:2/10的HCVR/LCVR对)(抗hCD22单克隆抗体;REGN5837的亲本抗hCD22抗体)相互作用的氨基酸残基。在例如以下文献中列示了H/D交换方法的一般说明:Ehring(1999)《分析生物化学》267(2):252-259;以及Engen和Smith(2001)《分析化学》73:256A-265A。

[0230] 在集成的HDX/MS平台上执行HDX-MS实验,所述平台由用于氘标记和淬火的Leaptec HDX PAL系统、用于样品消解和上样的Waters Acquity M-Class(辅助溶剂管理器)、用于解析梯度的Waters Acquity M-Class(μ 二元溶剂管理器)和用于肽质量测量的Thermo Q Exactive HF质谱仪组成。

[0231] 将标记溶液制备成pD 7.0的在D₂O中的PBS缓冲液(10mM磷酸盐缓冲液、140mM NaCl和3mM KCl,相当于pH 7.4,温度为25℃)。对于氘标记,在各个时间点,将与H4sH33037P2(参见上文)以1:0.6摩尔比(Ag-Ab复合物)预混合的11 μ L CD22.mmH(REGN5140(SEQ ID NO:50)或56.7 μ M CD22.mmH在20℃下与44 μ L D₂O标记溶液一起温育,一式两份(例如,未氘化对照=0秒;经氘标记的5分钟和10分钟)。通过向每个样品中添加55 μ L预冷却的淬灭缓冲液(0.5M TCEP-HCl、8M尿素和1%甲酸)以在20℃下温育5分钟来淬灭氘化反应。然后将淬灭的样品注射到Waters HDX管理器中,以进行在线胃蛋白酶/蛋白酶XIII消化。通过C8柱(1.0mm x 50mm,诺华生测定公司(NovaBioassays))从10%-32%B(流动相A:0.5%甲酸,在水中;流动相B:0.1%甲酸,在乙腈中)中以13分钟的梯度分离消化的肽。通过Q Exactive HF质谱法在LC-MS/MS或LC-MS模式下分析洗脱的肽。

[0232] 使用Byonic搜索引擎(蛋白质度量公司(Protein Metrics))针对包含CD22和其随机化序列的数据库搜索未氘化的CD22样品的LC-MS/MS数据。使用非特异性酶消化和人糖基化作为常见的变量修饰,将搜索参数(在ELN中)设置为默认值。然后将鉴定出的肽的列表导入HDX工作台软件(版本3.3)中,以计算通过LC-MS从所有氘化样品中检测到的每种肽的氘摄取量。对于给定的肽,使用每个时间点处的质心质量(强度加权平均质量)来计算氘摄取量(D)和氘摄取量百分比(%D)(参见下文)。

[0233]	$\frac{\text{氘摄取量 (D 摄取量)}}{\text{氘摄取量百分比 (D\%)}}$	$= \frac{\text{平均质量 (氘化)} - \text{平均质量 (未氘化)}}{\text{每个时间点处的肽的 D 摄取量} \times 100\%}$
		$= \frac{\text{肽的最大 D 摄取量 (在 ELN 中定义)}}{\text{肽的最大 D 摄取量 (在 ELN 中定义)}}$

[0234] 从单独的hCD22.mmH和与H4sH33037P2(SEQ ID NO:2/10的HCVR/LCVR对)样品复合的hCD22.mmH两者中鉴定出总共427种来自hCD22.mmH的肽(SEQ ID NO:50),这表示hCD22的序列覆盖率为92.0%。表现出高于5%的D摄取量值差异百分比的任何肽均被定义为受到显著保护(表8)。对于hCD22.mmH,对应于氨基酸481-505(NVQYAPRDVRVRKIKPLSEIHSGNS;SEQ ID NO:57)和523-537(FWEKNGRLLGKESQLNF;SEQ ID NO:58)的肽受H4sH33037P2显著保护。

[0235] 表8:与H4sH33037P2结合时具有显著保护的所选CD22.mmH肽

[0236]

		5 分钟			10 分钟			
		REGN5140	REGN5140		REGN5140	REGN5140		
			+			+		
CD22			H4sH33037P2			H4sH33037P2		
残基	电荷 (+)	质心 MH ⁺	质心 MH ⁺	ΔD	质心 MH	质心 MH ⁺	ΔD	ΔD%
481-492	2	1477.27	1476.94	-0.33	1477.51	1477.01	-0.50	-5.7
481-497	4	2059.98	2059.38	-0.60	2060.24	2059.62	-0.62	-5.9
481-499	4	2277.09	2276.48	-0.61	2277.33	2276.65	-0.68	-5.4
482-490	3	1108.33	1108.02	-0.32	1108.46	1108.20	-0.26	-5.99
484-492	3	1136.43	1136.22	-0.22	1136.56	1136.29	-0.27	-5.08
484-499	4	1935.26	1934.65	-0.61	1935.40	1934.69	-0.70	-6.82
488-505	3	2043.24	2042.65	-0.60	2043.42	2042.69	-0.73	-5.52
489-497	3	1113.62	1113.13	-0.49	1113.71	1113.17	-0.53	-10.63
489-499	3	1330.85	1330.31	-0.54	1330.93	1330.32	-0.61	-8.96
489-505	2	1927.04	1926.45	-0.59	1927.17	1926.46	-0.70	-5.76
489-505	3	1928.14	1927.55	-0.59	1928.26	1927.61	-0.65	-5.56
491-499	2	1074.18	1073.78	-0.41	1074.19	1073.74	-0.45	-8.94
491-499	3	1075.28	1074.83	-0.45	1075.31	1074.80	-0.51	-9.97
491-505	2	1671.53	1671.05	-0.48	1671.59	1671.11	-0.48	-5.02
491-505	3	1672.53	1672.04	-0.48	1672.59	1672.10	-0.49	-5.09
491-505	4	1673.57	1673.08	-0.50	1673.64	1673.14	-0.50	-5.19
493-505	2	1415.81	1415.33	-0.48	1415.87	1415.40	-0.47	-5.91
523-531	2	1167.25	1166.91	-0.34	1167.40	1166.97	-0.43	-6.87
523-531	3	1168.23	1167.88	-0.36	1168.41	1167.93	-0.48	-7.48
523-534	4	1484.62	1484.25	-0.37	1484.68	1484.12	-0.56	-5.80
523-536	3	1699.57	1699.11	-0.46	1699.77	1699.24	-0.53	-5.16
524-534	3	1336.24	1335.83	-0.41	1336.31	1335.93	-0.38	-5.50
526-537	2	1348.48	1348.17	-0.32	1348.76	1348.27	-0.49	-5.03
527-537	2	1220.04	1219.62	-0.42	1220.31	1219.81	-0.50	-6.44
528-534	2	776.80	776.55	-0.26	776.92	776.60	-0.32	-7.19
528-536	2	992.76	992.44	-0.32	992.95	992.57	-0.38	-6.30
528-537	2	1105.90	1105.60	-0.30	1106.06	1105.71	-0.35	-5.11
528-537	3	1106.65	1106.35	-0.30	1106.83	1106.47	-0.37	-5.20

[0237] 实例4:通过氘氘交换对H4sH33041P2与CD22的结合的表位作图

[0238] 执行质谱法H/D交换肽表位作图(HDX-MS)以便确定与H4sH33041P2(具有SEQ ID NO:18/10的HCVR/LCVR对的抗hCD22单克隆抗体)(REGN5838的亲本抗hCD22)相互作用的CD22(重组人CD22,SEQ ID NO:50)的氨基酸残基。在例如以下文献中列示了H/D交换方法的一般说明:Ehring(1999)《分析生物化学》267(2):252-259;以及Engen和Smith(2001)《分析化学》73:256A-265A。

[0239] 在集成的HDX/MS平台上执行HDX-MS实验,所述平台由用于氘标记和淬火的Leaptec HDX PAL系统、用于样品消解和上样的Waters Acquity M-Class(辅助溶剂管理器)、用于解析梯度的Waters Acquity M-Class(μ二元溶剂管理器)和用于肽质量测量的Thermo Q Exactive HF质谱仪组成。

[0240] 将标记溶液制备成pD 7.0的在D₂O中的PBS缓冲液(10mM磷酸盐缓冲液、140mM NaCl和3mM KCl,相当于pH 7.4,温度为25℃)。对于氘标记,在各个时间点,将与H4sH33041P2以1:0.6摩尔比(Ag-Ab复合物)预混合的11μL CD22.mmH(REGN5140(SEQ ID NO:50)或56.7μM CD22.mmH在20℃下与44μL D₂O标记溶液一起温育,一式两份(例如,未氘

化对照=0秒;经氘标记的5分钟和10分钟)。通过向每个样品中添加55 μ L预冷却的淬灭缓冲液(0.5M TCEP-HCl、8M尿素和1%甲酸)以在20℃下温育5分钟来淬灭氘化反应。然后将淬灭的样品注射到Waters HDX管理器中,以进行在线胃蛋白酶/蛋白酶XIII消化。通过C8柱(1.0mm x 50mm,诺华生测定公司)从10%-32%B(流动相A:0.5%甲酸,在水中;流动相B:0.1%甲酸,在乙腈中)中以13分钟的梯度分离消化的肽。通过Q Exactive HF质谱法在LC-MS/MS或LC-MS模式下分析洗脱的肽。

[0241] 使用Byonic搜索引擎(蛋白质度量公司)针对包含CD22和其随机化序列的数据库搜索未氘化的CD22样品的LC-MS/MS数据。使用非特异性酶消化和人糖基化作为常见的变量修饰,将搜索参数(在ELN中)设置为默认值。然后将鉴定出的肽的列表导入HDX工作台软件(版本3.3)中,以计算通过LC-MS从所有氘化样品中检测到的每种肽的氘摄取量。对于给定的肽,使用每个时间点处的质心质量(强度加权平均质量)来计算氘摄取量(D)和氘摄取量百分比(D%),如下文所示。

[0242]	氘摄取量 (D 摄取量)	=	平均质量 (氘化) - 平均质量 (未氘化)
	氘摄取量百分比 (D%)	=	$\frac{\text{每个时间点处的肽的 D 摄取量} \times 100\%}{\text{肽的最大 D 摄取量 (在 ELN 中定义)}}$

[0243] 从单独的hCD22.mmH和与H4sH33041P2样品复合的hCD22.mmH两者中鉴定出总共454种来自hCD22.mmH(SEQ ID NO:50)的肽,这表示hCD22的序列覆盖率为90.5%。表现出高于5%的D摄取量值差异百分比的任何肽均被定义为受到显著保护。对于hCD22.mmH,对应于氨基酸246-277(CEVSSSNPEYTTVSWLKDGTSLLKKQNTFTLNL;SEQ ID NO:59)的肽受H4sH33041P2显著保护。表9提供了来自与H4sH33041P2结合时具有显著保护的所选肽的结果。

[0244] 表9:与H4sH33041P2结合时具有显著保护的所选CD22.mmH肽

[0245]

		5 分钟			10 分钟			
		REGN5140	REGN5140		REGN5140	REGN5140		
			+			+		
CD22			H4sH33041P2			H4sH33041P2		
残基	电荷 (+)	质心 MH ⁺	质心 MH ⁺	ΔD	质心 MH ⁺	质心 MH ⁺	ΔD	ΔD%
246-260	2	1695.69	1693.75	-1.94	1695.81	1693.88	-1.94	-20.2
247-255	1	1014.95	1013.86	-1.09	1015.09	1013.90	-1.19	-23.7
248-255	1	885.67	884.67	-1.00	885.72	884.68	-1.03	-25.4
248-257	1	1088.87	1087.06	-1.81	1088.95	1087.08	-1.86	-32.8
248-258	1	1188.86	1186.62	-2.24	1188.80	1186.76	-2.03	-33.4
248-260	1	1462.34	1460.14	-2.20	1462.56	1460.37	-2.19	-27.5
248-260	2	1462.38	1460.87	-1.51	1462.50	1461.05	-1.45	-18.5
248-267	2	2179.41	2177.73	-1.68	2179.48	2177.78	-1.70	-12.4
250-255	1	698.73	698.06	-0.68	698.74	698.07	-0.67	-28.2
256-260	1	595.67	595.38	-0.29	595.77	595.43	-0.34	-13.2
256-277	3	2506.39	2505.08	-1.31	2506.57	2505.28	-1.28	-8.1
258-277	3	2303.55	2302.37	-1.18	2303.70	2302.61	-1.09	-7.9
258-277	4	2304.39	2303.05	-1.34	2304.54	2303.17	-1.37	-9.4
259-274	3	1863.23	1862.24	-1.00	1863.34	1862.39	-0.95	-8.7
259-276	3	2090.99	2089.88	-1.11	2091.03	2090.10	-0.93	-8.0
259-277	2	2202.69	2201.88	-0.82	2202.82	2201.99	-0.83	-6.1
259-277	3	2204.00	2202.93	-1.07	2204.07	2203.10	-0.97	-7.5
260-267	2	923.71	923.41	-0.30	923.83	923.53	-0.30	-6.2
261-267	1	736.43	736.18	-0.25	736.55	736.26	-0.29	-6.7
261-267	2	737.43	737.18	-0.26	737.55	737.28	-0.28	-6.7
261-272	2	1339.48	1338.86	-0.62	1339.58	1338.99	-0.59	-7.5
261-272	3	1340.56	1339.91	-0.65	1340.66	1340.07	-0.59	-7.8
261-273	2	1487.02	1486.00	-1.02	1487.11	1486.15	-0.96	-11.2
261-273	3	1488.10	1487.01	-1.09	1488.13	1487.19	-0.94	-11.5
261-274	2	1588.74	1587.70	-1.04	1588.85	1587.90	-0.94	-10.3
261-276	2	1816.39	1815.41	-0.98	1816.48	1815.57	-0.92	-8.5
261-277	2	1929.27	1929.31	-1.04	1928.23	1928.38	-0.93	-8.2
261-277	3	1930.39	1929.37	-1.01	1930.45	1929.55	-0.89	-7.9
261-277	4	1931.34	1930.30	-1.05	1931.40	1930.46	-0.94	-8.3
262-267	1	622.98	622.71	-0.27	623.08	622.80	-0.27	-8.4
262-274	3	1475.17	1474.20	-0.97	1475.28	1473.08	-2.20	-18.0
262-275	4	1590.80	1589.66	-1.13	1590.89	1589.77	-1.12	-11.7
262-276	3	1704.03	1701.62	-2.41	1704.09	1701.66	-2.43	-23.3
262-277	2	1816.39	1815.41	-0.98	1816.48	1815.57	-0.92	-8.5
262-277	3	1817.40	1816.38	-1.02	1817.50	1816.57	-0.93	-8.7

[0246]

264-273	2		1129.77	-1.28	1128.49	1129.74	-0.96		-17.5
264-274	2		1231.69	-0.29	1231.40	1231.77	-0.52		-5.6
267-276	2		1212.11	-0.73	1211.38	1212.10	-0.63		-10.6
267-277	2		1325.86	-0.74	1325.12	1325.83	-0.61		-9.4
268-273	2		769.65	-0.83	768.82	769.64	-0.76		-24.9
268-274	1		870.35	-0.89	869.46	870.28	-0.73		-20.2
268-274	2		871.36	-0.83	870.53	871.34	-0.73		-19.4
268-276	2		1099.07	-0.79	1098.29	1099.07	-0.70		-13.3
268-277	1		1211.10	-0.66	1210.45	1211.10	-0.65		-10.2
268-277	2		1212.11	-0.73	1211.38	1212.10	-0.63		-10.6
268-277	3		1212.84	-0.73	1212.11	1212.81	-0.64		-10.7

[0247] 实例5:CD22 xCD28双特异性抗体的表面等离子体共振得到的结合亲和力和动力

学常数

[0248] 使用利用Biacore T-200或Biacore 4000仪器的实时表面等离子体共振生物传感器确定hCD22.mmH(SEQ ID NO:50)和mfCD22.mmH(SEQ ID NO:51)与纯化的抗CD22xCD28双特异性mAb或抗CD22双价亲本mAb(参见表1,mAB33037P2;HCVR/LCVR;SEQ ID NO:2/10)和mAb33041P2HCVR/LCVR;SEQ ID NO:18/10)结合的平衡解离常数(K_D 值)。通过与单克隆小鼠抗人Fc抗体(REGN2567;HCVR/LCVR;SEQ ID NO:33/34)的胺偶联来衍生化CM5 Biacore传感器表面,以捕获纯化的抗CD22xCD28双特异性或抗CD22亲本mAb(关于mAb33037P2 and mAb33041P2,参见表1和2)。在由0.01M HEPES pH 7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.05% v/v表面活性剂P20(HBS-EP运行缓冲液)构成的缓冲液中执行此Biacore结合研究。将在HBS-EP运行缓冲液(范围为90nM到3.33nM或0.37nM,3倍稀释)中制备的具有C端myc.myc六组氨酸标签(如SEQ ID NO:60所公开的“六组氨酸”)的不同浓度的hCD22(SEQ ID NO:50)和mfCD22(SEQ ID NO:51)以30微升/分钟的流速注射在mAb捕获表面上。监测CD22.mmH(SEQ ID NO:50)与捕获的单克隆抗体的缔合,持续5分钟,并且监测CD22.mmH在HBS-EP运行缓冲液中的解离,持续10分钟。在25℃下执行所有结合动力学实验。通过使用Scrubber 2.0c曲线拟合软件将实时传感图拟合为1:1结合模型来确定动力学缔合(k_a)和解离(k_d)速率常数。从动力学速率常数计算结合解离平衡常数(K_D)和解离半衰期($t^{1/2}$)为:

$$[0249] \quad K_D (M) = k_d / k_a \text{ 和 } t^{1/2} (\text{分钟}) = 0.693 / k_d / 60$$

[0250] 在25℃下人和cyno CD22与纯化的mAb结合的结合动力学参数在下文示出在表10-12中。

[0251] 使用利用Biacore T-200仪器的实时表面等离子体共振生物传感器确定hCD28.mmH(SEQ ID NO:54)纯化的抗CD22xCD28双特异性mAb或抗CD28双价亲本mAb(关于mAb14226P2,参见表3和4)的平衡解离常数(K_D 值)。通过与单克隆小鼠抗人Fc抗体(REGN2567;HCVR/LCVR SEQ ID NO:33/34)的胺偶联来衍生化CM4 Biacore传感器表面,以捕获纯化的抗CD22xCD28双特异性或抗CD28亲本mAb(参见上文)。在由0.01M HEPES pH 7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.05% v/v表面活性剂P20(HBS-EP运行缓冲液)构成的缓冲液中执行此Biacore结合研究。将在HBS-EP运行缓冲液(范围为600nM到2.47nM,3倍稀释)中制备的具有C端myc.myc六组氨酸标签(如SEQ ID NO:60所公开的“六组氨酸”)的不同浓度的hCD28以50微升/分钟的流速注射在mAb捕获表面上。监测CD28.mmH(SEQ ID NO:54)与捕获的单克隆抗体的缔合,持续5分钟,并且监测CD28.mmH在HBS-EP运行缓冲液中的解离,持续10分钟。在25℃下执行所有结合动力学实验。通过使用Scrubber 2.0c曲线拟合软件将实时传感图拟合为1:1结合模型来确定动力学缔合(k_a)和解离(k_d)速率常数。从动力学速率常数计算结合解离平衡常数(K_D)和解离半衰期($t^{1/2}$)为:

$$[0252] \quad K_D (M) = k_d / k_a \text{ 和 } t^{1/2} (\text{分钟}) = 0.693 / k_d / 60$$

[0253] 在25℃下人CD28与纯化的mAb结合的结合动力学参数在下文示出在表13中。

[0254] 表10:在25℃下人CD22.mmH与抗CD22xCD28双特异性mAb的结合动力学

REGN 号/Ab PID 号	批次号	常用名	mAb 捕获 (RU)	90 nM hCD22.mmH 结合 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t^{1/2}$ (分钟)
REGN5837	REGN5837-L3	CD22xCD28 mAb	379.1 ± 2.4	100.5	1.70E+05	1.49E-03	8.75E-09	7.8
H4sH33037P2	H4sH33037P2-L2	CD22 mAb	358.3 ± 2.0	192.6	1.95E+05	1.48E-03	7.60E-09	7.8
REGN5838	REGN5838-L4	CD22xCD28 mAb	475.3 ± 5.3	26.7	2.11E+04	3.02E-04	1.43E-08	38.2
H4sH33041P2	H4sH33041P2-L2	CD22 mAb	581.7 ± 1.9	61.5	2.05E+04	1.93E-04	9.43E-09	59.8

[0255]

[0256] 表11:在25℃下猴CD22.mmH(XP_005588899.1)与抗CD22xCD28双特异性mAb的结合动力学

REGN 号/Ab PID 号	批次号	常用名	mAb 捕获 (RU)	90 nM REGN5280 结合 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (分钟)
[0257] H4sH33037P2	H4sH33037P2-L2	CD22 mAb	423.8 ± 3.6	112.8	6.55E+04	2.66E-03	4.06E-08	4.3
H4sH33041P2	H4sH33041P2-L2	CD22 mAb	500.9 ± 0.9	13.2	6.83E+03	2.91E-04	4.26E-08	39.8

[0258] 表12:在25℃下猴CD22.mmH(EHH59463.1)与抗CD22xCD28双特异性mAb的结合动力学

REGN 号/Ab PID 号	批次号	常用名	mAb 捕获 (RU)	84 nM REGN5281 结合 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (分钟)
[0259] H4sH33037P2	H4sH33037P2-L2	CD22 mAb	426.4 ± 1.6	127.5	8.07E+04	2.87E-03	3.56E-08	4.0
[0260] H4sH33041P2	H4sH33041P2-L2	CD22 mAb	499.7 ± 3.5	10.9	6.59E+03	3.90E-04	5.92E-08	29.6

[0261] 表13:在25℃下人CD28.mmH与抗CD22xCD28双特异性mAb的结合动力学

REGN 号/Ab PID 号	批次号	常用名	mAb 捕获 (RU)	600 nM hCD28.mmH 结合 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (分钟)
[0262] REGN5837	REGN5837-L3	CD22xCD28 mAb	1060.7 ± 7.0	72.9	1.39E+04	4.73E-03	3.41E-07	2.4
REGN5838	REGN5838-L4	CD22xCD28 mAb	1289.2 ± 10.5	77.0	1.23E+04	4.96E-03	4.04E-07	2.3
REGN5705	REGN5705-L2	CD28 mAb	564.5 ± 5.2	88.4	1.31E+04	4.80E-03	3.65E-07	2.4

[0263] 实例6:使用流式细胞术的抗CD28和抗CD22xCD28双特异性抗体与靶细胞系(Nalm6)、效应细胞系(Jurkat)以及食蟹猴T细胞和B细胞的结合特异性

[0264] 利用流式细胞分析来确定CD22xCD28双特异性抗体与表达Nalm6细胞的人CD22和表达Jurkat细胞的人CD28以及与食蟹猴T(CD28+)细胞和B(CD22+)细胞的结合。简而言之,将Jurkat细胞和Nalm6细胞的 1×10^5 个细胞/孔与范围为133nM到61pM的CD22xCD28双特异性抗体或H4sH15260P(以无交叉反应性将人抗原与人或猕猴CD28或CD22结合的同种型对照人IgG4抗体)的连续稀释液在4℃下一起温育30分钟。用单一67nM浓度的抗体来温育食蟹猴PBMC。温育后,用含有1%过滤FBS的冷PBS洗涤细胞两次,并将PE缀合的抗人第二抗体添加到细胞中并再温育30分钟。将另外的表型抗体混合物(抗CD2、抗CD20、抗CD16、抗CD14)添加到具有食蟹猴PBMC的孔中。使用不含抗体或仅含第二抗体的孔作为对照。

[0265] 在与第二抗体一起温育之后,洗涤细胞、将其重悬于200μL含有1%过滤FBS的冷PBS中并在BD LSR_Fortessa上通过流式细胞术进行分析。将食蟹猴T细胞鉴定为CD2+/CD16-并且将B细胞鉴定为CD20+。使用4参数非线性回归分析在Prism软件中计算FACS结合的 EC_{50} 值。

[0266] 表14提供了CD22xCD28双特异性抗体与表达CD22的细胞系表面的结合数据,如通过流式细胞术确定的。表14还提供了CD22xCD28双特异性抗体与表达人CD28的细胞系表面的结合数据,如通过流式细胞术确定的。

[0267] REGN5837与Nalm6细胞以 $1.3E-08M$ 的 EC_{50} 值结合。REGN5838与Nalm6细胞以 $1.8E-08M$ 的 EC_{50} 值结合。同种型对照抗体未表现出与表达CD22的细胞系的任何结合。

[0268] REGN5837与Jurkat细胞以 $2.1E-08M$ 的 EC_{50} 值结合。REGN5838与Jurkat细胞以 $2.3E-08M$ 的 EC_{50} 值结合。同种型对照抗体未表现出与表达CD28的细胞系的任何结合。

[0269] 表15提供了CD22xCD28双特异性抗体与食蟹猴(柬埔寨来源) T细胞和B细胞的表面的数据的结合,如通过流式细胞术确定的。

[0270] REGN5837与所测试的12只食蟹猴中的12只的B细胞以及所测试的12只食蟹猴中的11只的T细胞结合。与CD20+B细胞的结合的范围为第二抗体的12.6-30.3倍,其中中位数是15.7倍。与CD2+/CD16-T细胞的结合的范围为第二抗体的1.2-5.2倍,其中中位数是3.5倍。将阳性结合定义为比二级抗体大1.2倍。REGN5838与所测试的12只食蟹猴中的12只的B细胞以及所测试的12只食蟹猴中的11只的T细胞结合。与CD20+B细胞的结合的范围为第二抗体的6.5-13.5倍,其中中位数是9.3倍。与CD2+/CD16-T细胞的结合的范围为第二抗体的1.2-4.7倍,其中中位数是3.8倍。将阳性结合定义为比第二抗体大1.2倍。同种型对照抗体未表现出与猕猴T或B细胞的任何结合。

[0271] 表14:工程化靶细胞和效应细胞上的流式细胞术实验的结合和结合倍数结果。

抗体 PiD	Jurkat FACS[M]	Jurkat FACS 倍数	Nalm6 FACS[M]	Nalm6 FACS 倍数
REGN5837	2.1E-08	198	1.3E-08	12.2
REGN5838	2.3E-08	203	1.8E-08	11.7
同种型对照	无结合	1	无结合	1

[0273] 表15:猕猴(柬埔寨来源) T和B细胞上的流式细胞术实验的结合倍数结果。

	B 细胞结合 (相对于第二抗体的倍数)			T 细胞结合 (相对于第二抗体的倍数)		
	REGN5837	REGN5838	同种型对照	REGN5837	REGN5838	同种型对照
Cyno 1	22.4	12.2	1.3	4.3	4.3	1.2
Cyno 2	28	13.4	1.1	5.2	3.9	1.2
Cyno 3	22.5	13.5	1	5.2	4.7	1
Cyno 4	15.4	7.9	1	1.5	1.4	0.9
Cyno 5	13.2	7.4	1	2.9	2.8	1.1
Cyno 6	30.3	17	1	3.5	3.7	1.2
Cyno 7	19.8	11.9	1	4.1	4	1
Cyno 8	10.6	6.5	1.2	3.5	4	1.2
Cyno 9	12.8	7.2	1.1	2.6	3	1.1
Cyno 10	16	10.2	1.4	3.5	3.8	1.1
Cyno 11	14.5	8.4	1.2	1.5	1.4	1
Cyno 12	12.6	7.5	1	1.2	1.2	0.8
中位数	15.7	9.3	1.05	3.5	3.75	1.1

[0275] 实例7:使用流式细胞术的抗CD28和抗CD22xCD28双特异性抗体与人CD4⁺T细胞和工程化的靶细胞的结合特异性

[0276] 使用流式细胞术分析来研究CD22 x CD28双特异性(REGN5837;REGN5838)和对照抗体与表达人CD28(人CD4⁺T细胞)的效应细胞和表达人CD22(HEK293/hCD20/hCD22和Raji/CD80和CD86阴性B细胞)的靶细胞的结合。包含HEK293/hCD20细胞作为CD28和CD22的阴性细胞系。

[0277] 从自健康供体白细胞包中获得的人外周血单核细胞(PBMC)分离出人CD4⁺T细胞。按照制造商的推荐方案使用50mL SepMate™管通过密度梯度离心来完成PBMC分离。简而言之,将15mL Ficoll-Paque PLUS在50mL SepMate管中分层,然后添加用D-PBS+2%FBS以1:2

稀释的30mL白细胞。根据SepMate制造商的方案进行后续步骤。随后按照制造商的说明书使用来自美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotec)的人CD4微珠试剂盒从PBMC中分离CD4⁺T细胞。将分离的CD4⁺T细胞冷冻在含有10%DMSO的FBS中,浓度为每小瓶 5×10^6 个细胞。

[0278] 如下制备包含HEK293细胞系和人Raji B细胞的靶细胞。

[0279] 用人CD22(登录号NP_001762.2的氨基酸M1到A847)转导表达人CD20(登录号NP_068769.2的氨基酸M1到P297)的稳定HEK293细胞系(ATCC,#CRL-1573)。将人CD22阳性细胞通过荧光活化细胞分选(FACS)进行分离并进行单克隆。将所得的克隆细胞系(HEK293/hCD20/hCD22克隆E4)维持在补充有500g/mL G418的DMEM+10%+P/S/G+NEAA中。

[0280] 使用CRISPR技术通过缺失CD80和CD86来基因修饰人Raji B细胞(ATCC#CCL-86),所述细胞在细胞表面上内源性地表达CD20、CD22、Fc γ 受体(Fc γ R)、CD80和CD86。CD80和CD86是已知的CD28配体。将工程化的Raji/CD80和CD86阴性细胞维持在补充有HEPES和丙酮酸钠的RPMI+10%FBS+青霉素+链霉素+谷氨酰胺中。

[0281] 如下对细胞进行染色。

[0282] 简而言之,将人CD4⁺T细胞、HEK293/hCD20、HEK293/hCD20/hCD22以及Raji/CD80和CD86阴性细胞重悬于含有D-PBS+2%FBS的染色缓冲液中。将Raji细胞与小鼠IgG(最终浓度为625mg/mL)一起温育,以阻断内源性Fc γ 受体。简而言之,在96孔平板中,将 2×10^5 个细胞/孔在4°C下用范围为6.1pM到100nM的抗体连续稀释液温育30-60分钟。包含的阴性细胞样品不含抗体。将细胞用冷染色缓冲液洗涤一次并用别藻蓝蛋白(APC)标记的抗人第二抗体温育30-45分钟。温育之后,将细胞用没有FBS的冷D-PBS缓冲液洗涤一次并根据制造商的说明书用活/死可固定绿色死细胞染色(LIVE/DEAD Fixable Green Dead Cell Stain)(英杰公司(Invitrogen))进行温育以区分活细胞和死细胞。然后根据制造商的说明书将细胞固定在BD Cytofix缓冲液中、洗涤、重悬于染色缓冲液中并通过流式细胞术在iQue Screener流式细胞仪上进行分析。为了确定EC₅₀,利用GraphPad Prism使用9点应答曲线上的四参数逻辑方程分析几何平均荧光强度(MFI)值。使用以下方程计算结合倍数:

$$[0283] \quad \text{结合倍数} = \frac{\text{在测试的剂量范围内的最大几何 MFI 值}}{\text{背景的几何 MFI 值}[0 \text{ nM}]}$$

[0284] 通过流式细胞术在原代人CD4⁺T细胞上和过表达(HEK293/hCD20/hCD22)或内源地(Raji/CD80和CD86阴性)表达CD22的工程化细胞上评估CD22 x CD28双特异性抗体与人CD22和CD28结合的能力。包含阴性细胞系作为对照(HEK293/hCD20)。

[0285] 图1和表16中汇总了EC₅₀/结合倍数。

[0286] 表16:人CD4⁺T细胞和工程化的靶细胞上的流式细胞术实验的EC₅₀和结合倍数结果:

抗体	HEK293/hCD20		HEK293/hCD20/hCD22		Raji/CD80 和 CD86 阴性		人 CD4 ⁺ T 细胞	
	EC ₅₀ [M]	结合倍数	EC ₅₀ [M]	结合倍数	EC ₅₀ [M]	结合倍数	EC ₅₀ [M]	结合倍数
[0287] REGN5837	ND	1.07	NC	16.44	9.76E-09	38.35	NC	9.25
REGN5838	ND	1.11	1.14E-08	34.90	1.49E-08	81.74	NC	10.63
REGN5705	ND	1.11	ND	1.00	ND	1.04	4.13E-09	37.48
单臂 CD28 对照	ND	1.05	ND	1.11	ND	1.07	n/c	10.97
同种型对照	NC	1.82	ND	1.15	ND	1.08	ND	1.11

[0288] 缩写:NC=无法计算(针对其中结合没有达到饱和的曲线表示);ND=未确定

[0289] 表16. 抗体与人CD4⁺T细胞以及如HEK293/hCD20、HEK293/hCD20/hCD22或Raji/CD80和CD86阴性B细胞等工程化细胞系的表列EC₅₀和结合倍数值。

[0290] 如所预期的,CD28抗体(亲本(REGN5705;HCVR/LCVR SEQ ID NO:35/36)或其双特异性形式(REGN5837、REGN5838和单臂CD28对照(SEQ ID NO:48))均未与阴性HEK293/hCD20细胞结合。由于非特异性结合,因此利用同种型对照抗体在最高浓度下检测到大约1.8倍的弱结合(图1和表16)。

[0291] 在HEK293/hCD20/hCD22(REGN5837为16.44倍并且REGN5838为34.9倍,其中EC₅₀为大约11.4nM)上以及在Raji/CD80和CD86阴性细胞(REGN5837为38.35倍,其中EC₅₀为大约9.76nM;并且REGN5838为81.74倍,其中EC₅₀为大约14.9nM)上观察到抗CD22 x抗CD28抗体的结合。用单臂CD28对照和同种型对照未检测到显著结合(图1和表16)。

[0292] 在原代人CD4⁺T细胞上检测到靶向人CD28的抗体的结合。亲本CD28抗体REGN5705相对于背景以大约4.13nM的EC₅₀结合37.48倍,而双特异性抗体REGN5837、REGN5838和单臂对照分别示出9.25倍、10.63倍和10.97倍的结合。如所预期的,同种型对照未与细胞结合(图1和表16)。

[0293] 实例8:通过抗CD20xCD3双特异性抗体的抗CD22xCD28双特异性抗体共刺激增强靶向的细胞毒性、T细胞活化和细胞因子释放

[0294] 在靶向被工程化以缺乏CD80和CD86表达的Raji细胞(Raji-80/86DKO)的96小时细胞毒性测定中评估CD20xCD3靶向的杀伤的CD22xCD28增强。简而言之,将人PBMC以1×10⁶个细胞/毫升平板接种在补充的RPMI培养基中并在37℃下温育过夜,以通过耗竭粘附的巨噬细胞、树突细胞和一些单核细胞来富集淋巴细胞。第二天,用1μM荧光跟踪染料CFDA-SE来标记Raji-80/86DKO细胞,并且用1μM荧光跟踪染料CellTrace Violet来标记粘附细胞耗竭的原初PBMC。将标记的靶细胞和PBMC(效应细胞/靶细胞比为10:1)与CD20xCD3双特异性抗体REGN1979(具有包含SEQ ID NO:42的一个重链臂、包含SEQ ID NO:43的另一个重链臂和SEQ ID NO:44的轻链)的连续稀释液(浓度范围:5nM到0.64pM)和2.5ug/ml(16.7nM)固定浓度的CD22xCD28共刺激分子REGN5837或REGN5838、单臂对照CD28双特异性(REGN5678)或IgG4同种型对照(H4sH10154P3,具有SEQ ID NO:37/38的HCVR/LCVR对的同种型对照)以在37℃下温育96小时。从平板收获细胞并在FACS BD LSRFortessa-X20上通过FACS进行分析。关于FACS分析,利用可固定活/死远红反应性(英杰公司)染料对细胞进行染色。紧接在FACS分析之前将20,000个计数珠添加到每个孔中,并且针对每个样品收集10,000个珠。为了评估杀伤的特异性,在活CFDA-SE标记的群体上对细胞进行门控。记录活群体百分比并将其用于计算存活率。

[0295] 通过将细胞与同CD2、CD4、CD8和CD25直接缀合的抗体一起温育来评估T细胞活化。将表达CD25的CD8⁺细胞的百分比报告为T细胞活化度量。另外,随着T细胞的增殖,对CellTraceViolet进行稀释,这导致如FACS所测量的MFI较低。因此将T细胞增殖报告为CD8⁺T细胞上CellTraceViolet的MFI的减少。使用4参数非线性回归分析在Prism软件中计算缺乏CD80和CD86表达和结合的靶Raji细胞的EC₅₀值。

[0296] 收集来自此测定的上清液以用于细胞因子水平的分析。按照制造商的说明书使用流式细胞珠阵列(CBA)试剂盒对IL-17a、IFN γ 、TNF α 、IL-10、IL-6、IL-4和IL-2的浓度进行分析。从试剂盒标准品所生成的曲线中插入细胞因子水平并将细胞因子水平报告为pg/mL。在Prism软件中使用4参数非线性回归分析计算最大细胞因子水平。

[0297] 测试用于评估抗CD20xCD3双特异性抗体REGN1979(参见上文)与共刺激CD22xCD28抗体或单臂CD28或同种型对照抗体组合地诱导未刺激的人T细胞杀伤表达人CD20和CD22的靶细胞的能力的测定的结果。

[0298] REGN1979活化并指导人T细胞以剂量依赖性方式耗竭缺乏CD80和CD86表达的Raji细胞。与REGN1979和单臂CD28或同种型对照抗体相比,将固定浓度的CD22xCD28双特异性抗体添加到REGN1979使REGN1979的细胞毒性功效(EC₅₀)增强3.5-6.4倍(表17)。

[0299] 如分别通过CD8⁺细胞上的CD25上调或CellTrace Violet稀释测量的,观察到的由REGN1979介导的靶细胞裂解与T细胞活化和增殖相关。与REGN1979和单臂CD28或同种型对照抗体相比,将固定浓度的CD22xCD28双特异性抗体添加到REGN1979使REGN1979诱导T细胞活化和增殖的效力分别增强2.1到2.6倍和7.4-8.4倍(表17)。

[0300] REGN1979诱导人细胞因子的释放。利用REGN1979与CD22xCD28双特异性抗体组合地观察到的释放的细胞因子在固定浓度的CD22xCD28共刺激分子与固定浓度的单臂CD28或同种型对照抗体存在的情况下有所增强(表18)。

[0301] 总之,与利用CD20xCD3同对照抗体组合地观察到的相比,共刺激增加了靶向的细胞毒性、T细胞活化和细胞因子释放的效力。

[0302] 表17:细胞毒性和T细胞活化的EC₅₀值(3次实验的平均值)

抗体	细胞杀伤		T 细胞活化 (CD8 ⁺ /CD25 ⁺)		T 细胞分裂 (CD8 ⁺ 细胞的 CellTrace MFI)	
	EC ₅₀ [M]	相比于 IgG4 的 EC ₅₀ 倍数	EC ₅₀ [M]	相比于 IgG4 的 EC ₅₀ 倍数	EC ₅₀ [M]	相比于 IgG4 的 EC ₅₀ 倍数
REGN5837	1.48E-10	3.5	1.58E-11	2.1	4.81E-12	7.4
REGN5838	8.12E-11	6.4	1.28E-11	2.6	4.23E-12	8.4
单臂 CD28	6.37E-10	0.8	3.46E-11	1.0	3.03E-11	1.2
IgG4 同种型	5.22E-10	1.0	3.32E-11	1.0	3.55E-11	1.0

[0304] 表18:细胞因子释放 (pg/ml)

	REGN5837	REGN5838	单臂CD28	IgG4同种型
IL-4	46	50	33	29
IL-6	907	810	248	283
IL-2	531	270	36	39
IL-10	1917	2555	739	375
TNF α	277	339	100	66

IFNg	1847	1956	267	160
IL-17A	154	172	41	35

[0306] 实例9:CD22双特异性抗体的生物测定

[0307] 通过刺激T细胞受体 (TCR) 来实现T细胞活化,所述TCR识别在抗原呈递细胞 (APC) 上由I类或II类主要组织相容性复合物 (MHC I或MHC II) 蛋白呈递的特定肽 (Goldrath等人1999)。活化的TCR进而发起一系列信号传导事件,所述信号传导事件可以由各种转录因子所驱动的报告基因监测,所述各种转录因子如活化蛋白1 (AP-1)、活化的T细胞的核因子 (NFAT) 或活化的B细胞的核因子 κ -轻链-增强子 (NF κ B)。然后,通过在T细胞上组成型地或可诱导地表达的共受体 (如CD28、CTLA-4 (细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4)、PD-1 (程序性细胞死亡蛋白1)、LAG-3 (淋巴细胞活化基因3) 或其它分子) 的接合来进一步细化T细胞应答 (Sharpe等人2002)。共刺激分子CD28由其在APC上表达的内源性配体CD80或CD86活化。CD28在TCR活化之后加强细胞信号,如由NF κ B转录因子控制的通路。CD28共信号对于有效的T细胞活化如T细胞分化、增殖、细胞因子释放和细胞死亡具有重要性 (Smeets等人2012)。

[0308] 使用原代人CD4⁺T细胞在基于荧光素酶的报告基因生物测定和IL-2功能测定中表征抗CD22xCD28双特异性抗体。

[0309] 基于荧光素酶的报告基因测定:

[0310] 开发T细胞/APC (抗原呈递细胞) 的基于荧光素酶的报告基因测定,以在评估与抗CD28 x抗CD22双特异性抗体接合时CD28活化对NF κ B活性的影响。

[0311] 报告T细胞的工程化:

[0312] 依据制造商的说明书通过用NF κ B-荧光素酶 (NF κ B-Luc) 慢病毒报告基因 (来自凯杰公司 (Qiagen)) 转导永生人Jurkat T细胞 (ATCC#TIB-152) 来工程化克隆的报告T细胞系。将克隆的报告基因系 (Jurkat/NF κ B-Luc克隆1C11) 维持在补充有1 μ g/mL嘌呤霉素的RPMI+10%FBS+青霉素+链霉素+谷氨酰胺中。

[0313] APC的工程化:

[0314] 用人CD22 (登录号NP_001762.2的氨基酸M1到A847) 转导表达人CD20 (登录号NP_068769.2的氨基酸M1到P297) 的稳定HEK293细胞系 (ATCC, #CRL-1573)。将人CD22阳性细胞通过荧光活化细胞分选 (FACS) 进行分离并进行单克隆。将所得的克隆细胞系 (HEK293/hCD20/hCD22克隆E4) 维持在补充有500 μ g/mL G418的DMEM+10%+P/S/G+NEAA中。

[0315] 使用CRISPR技术通过缺失CD80和CD86来基因修饰人Raji B细胞 (ATCC#CCL-86), 所述细胞在细胞表面上内源地表达CD20、CD22、Fc γ 受体 (Fc γ R)、CD80和CD86。CD80和CD86是已知的CD28配体。将工程化的Raji/CD80和CD86阴性细胞维持在补充有HEPES和丙酮酸钠的RPMI+10%FBS+青霉素+链霉素+谷氨酰胺中。

[0316] T细胞/APC刺激:

[0317] 在此实验中,通过两种双特异性抗体来刺激工程化的报告T细胞。通过靶向工程化的报告T细胞上的CD3分子以及HEK293上或Raji/CD80和CD86阴性B细胞上的CD20的T细胞活化双特异性抗体REGN2281 (具有包含EQ ID NO:39的一个重链臂、包含SEQ ID NO:40的一个重链臂和SEQ ID NO:41的轻链臂的抗CD20 x抗CD3抗体) 来递送第一刺激。第一刺激绕过了对TCR通过其天然配体来进行活化的需要,所述天然配体是MHC分子上显示的特定肽。第二刺激由CD28双特异性抗体 (即,抗CD28 x抗CD22双特异性抗体) 驱动。此抗体通过其在APC上

表达的配体CD80/CD86来模仿T细胞上的CD28活化。所述抗体与T细胞上的CD28和HEK293细胞上或Raji/CD80和CD86阴性B细胞上的CD22互相作用并驱动工程化的报告T细胞上的CD28的活化。TCR和CD28的同时活化导致NF κ B的转录活性增强,这增加了报告基因荧光素酶的产生。

[0318] 荧光素酶测定设置:

[0319] 将补充有10%FBS和P/S/G的RPMI1640作为测定介质用于制备用于筛选抗CD22 x抗CD28双特异性抗体的细胞悬浮液和抗体稀释液。

[0320] 筛选前一天,在细胞培养基中将工程化报告T细胞培养至 0.5×10^6 个细胞/毫升。在恒定200pM REGN2281(抗CD20 x抗CD3,参见上文)或REGN1945(具有SEQ ID NO:45/46的HCVR/LCVR对的hIgG4同种型对照)存在的情况下,测试1:3连续稀释的抗CD28 x抗CD22双特异性抗体和对照。10点稀释液的范围介于15pM到100nM之间,其中最终稀释液不含CD28抗体。

[0321] 按以下顺序添加试剂:1) 将固定浓度的最终200pM REGN2281(抗CD20 x抗CD3,参见上文)或REGN1945(hIgG4同种型对照,参见上文)添加到96孔白色平底平板的每个孔中;2) 将重悬至 4×10^5 个细胞/毫升(最终细胞浓度为 1×10^4 个细胞/孔)的HEK293细胞或重悬至 2×10^6 个细胞/毫升(最终细胞浓度为 5×10^4 个细胞/孔)的Raji/CD80和CD86阴性B细胞添加到对应的平板;3) 将连续稀释的抗体添加到对应的孔;4) 将过夜培养的报告T细胞重悬至 2×10^6 /mL并添加到平板中,其中最终浓度为 5×10^4 个细胞/孔。将平板在37°C/5%CO₂下温育4到6个小时,之后添加100 μ L ONE-GloTM(普洛麦格公司(Promega))试剂以裂解细胞并检测荧光素酶活性。在多标记平板读取器Envision(珀金埃尔默公司(PerkinElmer))上以相对光单位(RLU)捕获发射的光。一式两份地对所有连续稀释液进行测试。

[0322] 通过使用GraphPad PrismTM软件将数据拟合到10点剂量-应答曲线上的四参数逻辑方程来确定抗体的EC₅₀值。使用以下方程计算诱导倍数:

$$\text{诱导倍数} = \frac{\text{在测试的剂量范围内的最大平均 RLU 值}}{\text{背景的平均 RLU 值}[0 \text{ nM}]}$$

[0324] 使用原代人CD4⁺T细胞的IL-2功能测定:

[0325] 开发原代CD4⁺T细胞/APC功能测定,以评估在与抗CD22 x抗CD28双特异性抗体接合时CD28活化对IL-2产生的影响。

[0326] 人原代CD4⁺T细胞分离:

[0327] 从健康供体白细胞包中分离出人外周血单核细胞(PBMC)。按照制造商的推荐方案使用50mL SepMateTM管通过密度梯度离心来完成PBMC分离。简而言之,将15mL FicollPaque PLUS在50mL SepMate管中分层,然后添加用D-PBS+2%FBS以1:2稀释的30mL白细胞。根据SepMate制造商的方案进行后续步骤。随后按照制造商的说明书使用来自美天旎生物技术公司的人CD4微珠试剂盒从PBMC中分离CD4⁺T细胞。将分离的CD4⁺T细胞冷冻在含有10%DMSO的FBS中,其中浓度为每小瓶 5×10^6 个细胞。

[0328] 来自利用CD28抗体处理的原代CD4⁺T细胞的IL-2释放:

[0329] 在此测定中,使用抗CD20 x抗CD3双特异性抗体(REGN2281,参见上文)与工程化以表达人CD20的HEK293细胞或表达Raji细胞的内源性CD20组合地通过原代CD4⁺T细胞的表面上交联CD3来活化原代CD4⁺T细胞,其中CD80和CD86已使用CRISPR技术沉默(Raji/CD80和

CD86阴性细胞)。REGN2281的CD20臂与CD20表达性细胞的结合驱动CD3受体的聚类,从而提供了T细胞刺激所必需的第一信号。重要的是,在一些情况下,原代白细胞与基因上不同的细胞的共培养造成同种异体决定簇的不相容并且导致T细胞活化。这可以在不存在抗CD20 x抗CD3双特异性抗体的外源性添加的情况下提供足够的初级刺激。不论初级刺激如何,为了检测可定量的IL-2释放,可以通过使CD28分子交联而提供的共刺激是必需的。这里,双特异性CD28抗体(即,抗CD28 x抗CD22双特异性抗体)与CD4⁺T细胞上的CD28以及HEK293/hCD20或RAJI/CD80和CD86阴性细胞上的CD22相互作用并驱动CD28的聚类活化。组合的TCR和CD28接合导致释放到细胞培养基中的IL-2产量有所增强。使用来自珀金埃尔默公司的均质免洗涤AlphaLisa试剂盒从细胞上清液中检测IL-2并对其进行定量。

[0330] 在测定当天,在刺激培养基(补充有10%FBS、HEPES、NaPyr、NEAA和含有50U/ml全能核酸酶的0.01mM BME的X-VIVO 15细胞培养基)中解冻先前分离并冷冻的人CD4⁺T细胞。将细胞以1200rpm离心10分钟、重新悬浮于刺激培养基中并且以 1×10^5 个细胞/孔的浓度平板接种在96孔圆底平板中。用15μg/mL丝裂霉素C在初级刺激培养基中处理浓度为 10×10^6 个细胞/毫升的工程化以单独地或与人CD22组合地表达人CD20的HEK293细胞。在初级刺激培养基中用20μg/mL丝裂霉素C处理浓度为 10×10^6 个细胞/毫升的Raji/CD80和CD86。在37℃、5%CO₂下温育1小时之后,将HEK293和Raji细胞用含有2%FBS的D-PBS洗涤3次并添加到最终浓度为 1×10^4 个细胞每孔HEK293细胞或 5×10^4 个细胞每孔Raji/CD80和CD86阴性细胞的含有CD4⁺T细胞的孔。随后,将范围为15pM到100nM的1:3连续稀释的抗CD28 x抗CD22双特异性或对照抗体添加到2nM REGN2281(抗CD20 x抗CD3)或REGN1945(阴性hIgG4同种型对照,参见上文)存在的孔中。10点稀释液的最终点不含CD28抗体。将平板在37℃、5%CO₂下温育72小时之后,将其离心以沉淀细胞,并且收集40μL培养基上清液。由此,根据制造商的方案在人IL-2AlphaLISA测定中对5μL进行测试。获得关于绘制的多标记平板读取器Envision和原始RFU(相对荧光单位)值的测量。一式两份地对所有连续稀释液进行测试。

[0331] 通过使用GraphPad PrismTM软件将数据拟合到10点剂量-应答曲线上的四参数逻辑方程来确定抗体的EC₅₀值。使用以下方程计算诱导倍数:

$$[0332] \quad \text{诱导倍数} = \frac{\text{在测试的剂量范围内的最大平均 RFU 值}}{\text{背景的平均 RFU 值}[0 \text{ nM}]}$$

[0333] 结果汇总和结论:

[0334] 基于荧光素酶的报告基因测定:

[0335] 在使用荧光素酶活性作为读数的基于报告细胞的生物测定中,评估抗CD22 x抗CD28双特异性抗体在CD22靶标表达不存在或存在的情况下通过T细胞上的CD28提供共刺激的能力。

[0336] 图2中(A和B)中示出了活化曲线,表19和20中汇总了除了200pM恒定REGN1945(hIgG4同种型对照)或REGN2281(抗CD20 x抗CD3)之外还与HEK293/hCD20或HEK293/hCD20/hCD22细胞共温育的工程化报告T细胞的EC₅₀和诱导倍数。

[0337] 当用200pM REGN1945处理报告T细胞和HEK293衍生的APC时,在不存在TCR刺激的情况下,CD28双特异性抗体均未示出荧光素酶活性增加,而不管测定中使用的HEK293系如何。观察到仅HEK293/hCD20细胞(2.18倍)和HEK293/hCD20/hCD22细胞(2.05倍)的亲本CD28抗体(REGN5705)的荧光素酶活化增加。单臂CD28和同种型对照抗体在这种情况下没有产生

荧光素酶应答(表19和图2)。

[0338] 当报告T细胞和HEK293衍生的APC用200pM REGN2281处理时,抗CD22 x抗CD28双特异性抗体(REGN5837和REGN5838)均与CD22表达性HEK293诱导强荧光素酶活性,这通过EC₅₀和诱导倍数增加来指示。单臂CD28对照抗体和亲本CD28抗体(REGN5705;参见HCVR/LCVR SEQ ID NO:35/36)在两个HEK293系上示出了类似的活性。同种型对照抗体在这种情况下没有产生荧光素酶应答(表20和图2)。

[0339] 当报告T细胞和Raji/CD80和CD86阴性用200pM REGN1945处理时,抗CD22 x抗CD28双特异性抗体(REGN5837和REGN5838)和亲本CD28抗体均诱导荧光素酶活性,而单臂CD28对照抗体和同种型对照没有示出活性(表19和图2)。

[0340] 当报告T细胞和Raji/CD80和CD86阴性用200pM REGN2281处理时,所有CD28双特异性抗体(REGN5837和REGN5838)和单臂CD28对照抗体(包含亲本CD28抗体)诱导荧光素酶活性。仅抗CD22 x抗CD28和亲本CD28抗体的EC₅₀值可以确定,而单臂CD28抗体的EC₅₀值不能确定,这是由于没有达到饱和水平。利用同种型对照没有检测到活化(表20和图2)。

[0341] 使用原代人CD4⁺T细胞的IL-2功能测定:

[0342] 在测量IL-2细胞因子产生的功能性原代CD4⁺T细胞测定中,评估抗CD22 x CD28双特异性抗体在CD22靶标表达不存在或存在情况下通过T细胞上的CD28提供共刺激的能力。

[0343] 图3(A和B)中示出了活化曲线,表21中汇总了在2nM恒定REGN1945(hIgG4同种型对照)或REGN2281(抗CD20 x抗CD3)存在的情况下与HEK293/hCD20、HEK293/hCD20/hCD22或Raji/CD80和CD86阴性细胞共温育的CD4⁺T细胞的EC₅₀和诱导倍数。

[0344] 在含有具有恒定量的REGN1945的HEK293/hCD20或HEK293/hCD20/CD22细胞的孔中,没有观察到可测量的IL-2释放,这是由于不存在足够的同种异体初级T细胞刺激(图3)。然而,在含有具有恒定量的REGN1945的Raji/CD80和CD86阴性细胞的孔中,检测到IL-2释放,这是由于显著的同种异体应答提供了足够的初级刺激,即使在不存在抗体介导的CD3聚类的情况下也是如此(图3和表21)。

[0345] 当添加了恒定2nM浓度的REGN2281和亲本CD28 mab(REGN5705,参见上文)时,在含有HEK293/hCD20或HEK293/hCD20/CD22细胞的样品中检测到可测量的IL-2水平。与双价CD28 mAb形成对比,当抗CD22 x抗CD28双特异性mAb添加到含有HEK293/hCD20细胞和REGN2281的孔中时,IL2释放没有显著增强。仅在HEK293/hCD20/CD22细胞和REGN2281存在的情况下,抗CD22 x抗CD28双特异性mAb显著增强IL-2释放(图3和表22)。

[0346] 下文列示了表19-22。

[0347] 表19呈现了与HEK293/hCD20、HEK293/hCD20/hCD22或RAJI/CD80和CD86阴性细胞以及200pM恒定REGN1945(同种型对照)共温育的工程化T细胞中的荧光素酶活性的表列EC₅₀值、最大值和诱导倍数。

[0348] 表20呈现了与HEK293/hCD20、HEK293/hCD20/hCD22或Raji/CD80和CD86阴性细胞和200pM恒定REGN2281(抗CD20 x抗CD3)共温育的工程化T细胞中的荧光素酶活性的表列EC₅₀值、最大值和诱导倍数。

[0349] 表21呈现了来自与HEK293/hCD20、HEK293/hCD20/hCD22或RAJI/CD80和CD86阴性细胞以及2nM恒定REGN1945(同种型对照)共温育的CD4⁺T细胞的IL-2释放的表列EC₅₀值、最大值和诱导倍数。

[0350] 表22呈现了来自与HEK293/hCD20、HEK293/hCD20/hCD22或Raji/CD80和CD86阴性细胞和2nM恒定REGN2281 (CD20 $\times$ 抗CD3) 共温育的CD4⁺T细胞的IL-2释放的表列EC₅₀值、最大值和诱导倍数值。

[0351] 表19:在利用200pM REGN1945 (同种型对照) 不存在TCR刺激的情况下工程化报告T细胞中的荧光素酶活性的EC₅₀值、最大值和诱导倍数值:

抗体	HEK293/hCD20			HEK293/hCD20/hCD22			Raji/CD80 和 CD86 阴性		
	EC ₅₀ [M]	诱导倍数	最大 RLU	EC ₅₀ [M]	诱导倍数	最大 RLU	EC ₅₀ [M]	诱导倍数	最大 RLU
REGN5837	ND	1.01	11860	ND	1.11	13280	1.66E-09	1.29	16020
REGN5838	ND	1.04	11980	ND	1.05	12480	2.55E-09	2.06	26500
REGN5705	6.23E-09	2.18	24980	8.45E-09	2.05	25060	7.88E-09	2.57	33180
单臂 CD28	ND	1.00	11700	ND	1.05	12880	ND	1.05	13720
同种型对照	ND	1.04	11180	ND	1.04	12160	ND	1.04	12540

[0353] 缩写:ND=未确定

[0354] 表20:在利用200pM REGN2281 (α CD20 $\times$ α CD3) 存在TCR刺激的情况下工程化报告T细胞中的荧光素酶活性的EC₅₀值、最大值和诱导倍数值:

抗体	HEK293/hCD20			HEK293/hCD20/hCD22			Raji/CD80 和 CD86 阴性		
	EC ₅₀ [M]	诱导倍数	最大 RLU	EC ₅₀ [M]	诱导倍数	最大 RLU	EC ₅₀ [M]	诱导倍数	最大 RLU
REGN5837	NC	1.40	250140	6.44E-10	8.46	799220	1.43E-09	4.46	754820
REGN5838	NC	1.65	256380	1.89E-09	4.53	398720	1.33E-09	11.02	1725640
REGN5705	2.63E-10	3.55	408680	7.7E-11	2.06	171300	4.33E-10	4.15	568740
单臂 CD28	NC	3.56	454560	1.29E-08	2.82	228840	NC	4.46	642220
同种型对照	ND	1.09	212580	ND	1.08	103940	ND	1.05	175540

[0356] 缩写:NC=无法计算 (针对其中应答没有达到饱和的曲线表示);ND=未确定。

[0357] 表21:在2nM REGN1945 (同种型对照) 存在的情况下来自原代人CD4⁺T细胞的IL-2释放的EC₅₀值、最大值和诱导倍数值。

抗体	HEK293/hCD20			HEK293/hCD20/hCD22			Raji/CD80 和 CD86 阴性		
	EC ₅₀ [M]	诱导倍数	最大 RFU	EC ₅₀ [M]	诱导倍数	最大 RFU	EC ₅₀ [M]	诱导倍数	最大 RFU
REGN5837	ND	1.07	2.01E+03	ND	1.00	1.74E+03	6.31E-11	5.07	6.18E+04
REGN5838	ND	1.24	2.22E+03	ND	1.00	1.89E+03	4.23E-10	3.05	5.38E+04
REGN5705	ND	1.11	2.29E+03	ND	1.71	2.95E+03	1.11E-10	3.56	4.95E+04
单臂 CD28	ND	1.32	1.76E+03	ND	1.91	2.27E+03	NC	2.43	4.35E+04
同种型对照	ND	1.19	2.29E+03	ND	1.47	1.87E+03	ND	1.00	1.51E+04

[0359] 缩写:NC=无法计算 (针对其中应答没有达到饱和的曲线表示);ND=未确定。

[0360] 表22:在2nM REGN2281 (α CD20 $\times$ α CD3) 存在的情况下来自原代人CD4⁺T细胞的IL-2释放的EC₅₀值、最大值和诱导倍数值。

抗体	HEK293/hCD20			HEK293/hCD20/hCD22			Raji/CD80 和 CD86 阴性		
	EC50[M]	诱导倍数	最大 RFU	EC50[M]	诱导倍数	最大 RFU	EC50[M]	诱导倍数	最大 RFU
[0361] REGN5837	NC	4.68	1.21E+04	2.35E-10	55.61	1.01E+05	4.66E-11	5.11	2.40E+05
REGN5838	NC	6.82	1.31E+04	6.85E-10	53.73	9.63E+04	8.93E-11	6.32	2.54E+05
REGN5705	2.23E-09	30.80	6.89E+04	4.07E-09	32.24	5.74E+04	4.51E-11	6.15	2.49E+05
单臂 CD28	NC	19.45	3.99E+04	NC	6.85	1.89E+04	NC	4.45	1.79E+05
同种型对照	ND	1.22	2.22E+03	ND	1.00	3.20E+03	ND	1.00	4.54E+04

[0362] 缩写:NC=无法计算(针对其中应答没有达到饱和的曲线表示);ND=未确定。

[0363] 实例10:抗CD22 X抗CD28抗体的组合加上西米普利单抗对来自工程化以表达PD-L1的细胞的IL-2释放的效果

[0364] 材料与方法

[0365] APC的工程化:

[0366] RAJI细胞

[0367] RAJI是从11岁男性(ATCC® CCL-86™)分离的B淋巴细胞细胞系。将RAJI维持在RPMI+10%FBS+P/S/G+NaPyr+HEPES中。

[0368] RAJI/CD80和CD86阴性

[0369] 使用CRISPR/Cas9系统消除RAJI细胞中的CD80和CD86的表达。

[0370] NALM6克隆G5

[0371] NALM6克隆是从19岁男性分离的急性淋巴母细胞白血病(ALL)细胞系[NALM6克隆G5(ATCC, #CRL-3273)]。将NALM6细胞维持在RPMI+10%FBS+P/S/G中。

[0372] WSU-DLCL2

[0373] WSU-DLCL2是从41岁白人男性的胸腔积液分离出来的人DLBCL细胞系(莱布尼兹研究所-DSMZ(Leibnitz Institute-DSMZ),目录号ACC 575)。

[0374] PD-L1工程化细胞系

[0375] 将NALM-6、RAJI CD80和CD86阴性(RAJI/CD80-CD86-)和WSU-DLCL2细胞系进行基因工程化以稳定地表达人PD-L1(登录号NP_054862.1的氨基酸M1-T290)。将所得的细胞系NALM6/PD-L1、RAJI/CD80-CD86-/PD-L1和WSU-DLCL2/PD-L1维持在它们各自的培养基中,所述培养基补充有用于RAJI/CD80-CD86-的0.5μg/mL嘌呤霉素以及用于NALM-6/PD-L1和WSU-DLCL2/PD-L1细胞的1μg/mL嘌呤霉素。

[0376] 用于T细胞增殖和IL-2释放的T细胞活化测定

[0377] 使用人原代T细胞和同种异体B细胞淋巴瘤细胞系([NALM-6、NALM-6/PD-L1、RAJI/CD80-CD86-、RAJI/CD80-CD86-/PD-L1、WSU-DLCL2、WSU-DLCL2/PD-L1])在固定浓度的西米普利单抗存在的情况下评估REGN5837对IL-2释放的影响。原代白细胞与基因上不同的细胞的共培养造成同种异体决定簇的不相容并且可能导致T细胞活化。关于使用NALM-6和RAJI/CD80-CD86-(+/-PD-L1)细胞的测定,利用来自3个供体的富集的人原代T细胞执行T细胞活化测定,而利用WSU-DLCL2(+/-PD-L1)细胞的测定使用来自1个供体的T细胞。

[0378] 在用于测试REGN5837+REGN2810组合处理的T细胞活化测定中使用的T细胞的分离。

[0379] 关于利用NALM-6和RAJI/CD80-CD86-细胞的实验,CD3+T细胞从3个供体PBMC

(555109、555130和555131)中分离出来,而来自一个供体(555175)的PBMC用于利用WSU-DLCL2细胞的测定。关于供体555109,使用密度梯度离心将PBMC从外周血中分离出来。简而言之,将15ml Ficoll-Paque PLUS添加到50ml圆锥管中,并且随后将与含有2%FBS的PBS以1:1稀释的30ml血在顶部分层。在关掉制动器的情况下以400x g离心30分钟之后,将单核细胞层转移到新鲜管中、利用含有2%FBS的PBS稀释5倍并以300x g离心8分钟。关于供体555130、555131和555175,按照制造商方案使用来自干细胞技术公司(Stem Cell Technologies)的EasySep直接人PBMC分离试剂盒(EasySep Direct Human PBMC Isolation Kit)将PBMC来自健康供体的外周血中分离出来。将分离的PBMC冷冻在含有10%DMSO的FBS中。关于CD3+T细胞分离,将PBMC冷冻小瓶在37℃水浴中解冻并在含有50U/ml全能核酸酶的刺激培养基(补充有10%FBS、HEPES、NaPyr、NEAA和0.01mM BME的X-VIVO 15细胞培养基)中稀释。按照制造商方案,将细胞以1200rpm离心10分钟、重悬于EasySep缓冲液中并使用干细胞技术公司EasySep T细胞分离试剂盒进行分离。

[0380] 来自利用CD28抗体处理的原代CD3⁺T细胞的IL-2释放:

[0381] 利用人OVCAR-3、PE01、NALM-6、RAJI/CD80-CD86-和WSU-DLCL2细胞(+/-PD-L1)的T细胞活化测定

[0382] 将重悬于刺激培养基(补充有10%FBS、HEPES、NaPyr、NEAA和0.01mM BME的X-VIVO 15细胞培养基)中的CD3+T细胞以 1×10^5 个细胞/孔的浓度平板接种在96孔圆底平板中。利用20 μ g/mL(RAJI)或15 μ g/mL(NALM-6和WSU-DLCL2)丝裂霉素C处理具有或没有PD-L1(+/-PD-L1)的NALM-6、RAJI/CD80-CD86-、WSU-DLCL2细胞,以抑制增殖。在37℃、5%CO₂下温育1小时之后,用含有2%FBS的D-PBS将经过丝裂霉素C处理的细胞洗涤3次,然后重悬于刺激培养基中。将NALM-6、RAJI/CD80-CD86-和WSU-DLCL2细胞(+/-PD-L1)细胞添加到含有对于RAJI和WSU-DLCL2细胞最终浓度为 2.5×10^4 个细胞/孔并且对于NALM-6细胞最终浓度为 5×10^4 个细胞/孔的CD3+T细胞的孔中。将恒定浓度的西米普利单抗或非结合IgG4^P对照(20nM)添加到孔中。在使用WSU-DLCL2(+/-PD-L1)细胞的测定中,将恒定浓度的贝拉西普(belatacept)(hCTLA4.hIgG1)或非结合IgG1对照(50nM)添加到孔中。随后,将REGN5837或非TAAxCD28对照抗体从3.1pM到200nM以1:4稀释系列进行滴定以用于NALM-6(+/-PD-L1)细胞并且从0.6pM到1000nM以1:6稀释系列进行滴定以用于WSU-DLCL2和RAJI/CD80-CD86- (+/-PD-L1)细胞并添加到孔中。10点浓度曲线的最终点不含REGN5837或非TAAxCD28对照抗体。在37℃、5%CO₂下温育平板72小时(WSU-DLCL2(+/-PD-L1))或96小时(NALM-6和RAJI/CD80-CD86- (+/-PD-L1))之后,收集50 μ L培养基上清液以测量IL-2释放。

[0383] 关于IL-2释放,根据制造商的方案,使用人IL-2 α LISA试剂盒对5 μ L上清液进行测试。在珀金埃尔默公司的多标记平板读取器Envision上获取IL-2测量结果。已知的IL-2浓度的标准曲线包含在内并且用于衍生pg/ml值。

[0384] 一式三份地对所有连续稀释液的IL-2释放进行测试。使用GraphPad PrismTM软件从10点剂量-应答曲线上的4参数逻辑方程确定抗体的EC50值。给出IL-2释放的最大水平作为在测试的剂量范围内检测到的平均最大应答。另外,针对使用WSU-DLCL2细胞的测定所报告的数据包含在1000nM滴定的抗体不存在或存在的情况下生成的IL-2值,以捕获随着非TAAxCD28抗体浓度的增加观察到的IL-2减少。

[0385] 结果汇总和结论:

[0386] 使用原代人CD3+T细胞的IL-2功能测定:

[0387] 在测量IL-2细胞因子产生的功能性原代CD3+T细胞测定中,评估抗CD22 x抗CD28双特异性抗体在内源性地表达CD22的B细胞淋巴细胞细胞系存在的情况下通过T细胞上CD28提供共刺激的能力。

[0388] 图5A和5B中示出了与NALM-6 (+/-PD-L1) (图5A) 或RAJI/CD80-CD86- (+/-PD-L1) (图5B) 温育的T细胞的活化曲线。在20nM恒定hIgG4^P同种型对照或西米普利单抗存在的情况下,表23A中针对与NALM-6 (+/-PD-L1) 细胞温育的CD3+T细胞的EC50和最大IL-2值并且表23B中针对与RAJI/CD80-CD86- (+/-PD-L1) 温育的CD3+T细胞汇总了EC50和最大IL-2值。关于与WSU-DLCL2 (+/-PD-L1) 细胞温育的CD3+T细胞,图4中示出了活化曲线。表24中针对在20nM恒定hIgG4^P同种型对照或西米普利单抗存在的情况下以及在50nM恒定hIgG1同种型对照或CTLA-4受体贝拉西普存在的情况下与WSU-DLCL2 (+/-PD-L1) 细胞温育的T细胞汇总了EC50和IL-2值 (针对0nM或1000nM REGN5837或非TAAxCD28报告的)。

[0389] 在人原代T细胞和同种异体B细胞淋巴细胞细胞系RAJI/CD80-CD86-和NALM-6存在的情况下,REGN5837介导了IL-2释放的浓度依赖性增加。非TAAxCD28对照抗体以高抗体浓度略微增加IL-2。在RAJI/CD80-CD86-或NALM-6细胞上不存在PD-L1的情况下,添加20nM西米普利单抗对IL-2释放没有影响。与同非PD-L1表达性细胞温育的T细胞相比,在表达PD-L1的RAJI/CD80-CD86-或NALM-6细胞存在的情况下,响应于单独利用REGN5837的处理释放的最大IL-2有所减少。在具有NALM-6/PD-L1细胞的条件下,添加西米普利单抗最低限度地增强了REGN5837介导的IL-2释放,然而在RAJI/CD80-CD86-/PD-L1细胞存在的情况下,这将IL-2释放显著地增强到在具有RAJI/CD80-CD86-细胞 (缺乏PD-L1) 的条件下所观察到的水平。

[0390] 在人原代T细胞和同种异体B细胞淋巴细胞细胞系WSU-DLCL2存在的情况下,没有观察到IL-2释放的浓度依赖性增加。相反地,观察到非TAAxCD28对照抗体以浓度依赖性方式降低IL-2释放。与很少到不表达CD28配体的NALM-6和RAJI/CD80-CD86-细胞不同,已知WSU-DLCL2细胞系表达CD28配体。在已知REGN5837的CD28结合臂以及因此非TAAxCD28抗体的CD28臂与CD28配体竞争与CD28结合时,非TAAxCD28对照抗体通过在WSU-DLCL2细胞上表达的CD28配体阻断CD28活化,这导致IL-2释放降低。与非TAAxCD28对照不同,IL-2没有被REGN5837降低,因为其通过其CD22结合臂锚定到WSU-DLCL2细胞的能力允许其表现得类似于CD28配体,从而基本上替代所述配体。与不表达PD-L1的WSU-DLCL2细胞相比,在WSU-DLCL2/PD-L1细胞存在的情况下,基础IL-2释放有所降低。在西米普利单抗不存在的情况下单独添加REGN5837导致IL-2释放略微增强。在添加20nM西米普利单抗时,基础活性有所增强并且可以进一步利用剂量滴定REGN5837来略微增强,从而使REGN5837和西米普利单抗的组合的最大IL-2释放比单独的处理更高。如利用WSU-DLCL2细胞所观察到的,在非TAAxCD28存在的情况下WSU-DLCL2/PD-L1细胞的温育导致IL-2水平降低,而不论西米普利单抗或hIgG4^P同种型对照存在与否。为了进一步探索CD28配体表达在掩饰REGN5837的影响方面的影响,添加50nM可溶性CTLA-4受体贝拉西普或hIgG1匹配的同种型对照。贝拉西普与CD28配体、CD80和CD86以高亲和力结合并阻断它们的相互作用并且因此阻断CD28的活化。在50nM贝拉西普存在的情况下,基础IL-2释放显著减少,因为CD28配体不能结合CD28并提供共刺激信号传导。在这些条件下,REGN5837仍然能够接合CD28并提供共刺激,这由IL-2释放的剂

量依赖性增强指出。尽管添加20nM西米普利单抗本身不会增强在贝拉西普存在的情况下的IL-2释放,但是西米普利单抗与增加剂量的REGN5837的组合使在工程化以过表达PD-L1的细胞存在的情况下的最大IL-2释放与单独的REGN5837相比有所增加。

[0391] 表23A:在工程化以表达PD-L1的NALM-6细胞中,REGN5837与西米普利单抗的组合使IL-2释放增强超过单独的REGN5837处理

[0392]

原代 T 细胞 + NALM-6 (+/- PD-L1)				最大[pg/ml]	EC ₅₀ [M]
供体 555109 T 细胞	NALM-6	REGN5837	西米普利单抗	199.50	8.22E-10
			hlgG4 ^P	217.80	7.54E-10
		非 TAA x CD28	西米普利单抗	21.71	ND
			hlgG4 ^P	24.74	ND
	NALM-6/hPD-L1	REGN5837	西米普利单抗	68.34	7.42E-10
			hlgG4 ^P	40.26	6.70E-10
		非 TAA x CD28	西米普利单抗	10.07	ND
			hlgG4 ^P	11.80	ND
供体 555130 T 细胞	NALM-6	REGN5837	西米普利单抗	281.00	8.31 E-10
			hlgG4 ^P	261.30	7.18E-10
		非 TAA x CD28	西米普利单抗	27.51	ND
			hlgG4 ^P	25.18	ND
	NALM-6/hPD-L1	REGN5837	西米普利单抗	123.20	7.50E-10
			hlgG4 ^P	75.29	8.72E-10
		非 TAA x CD28	西米普利单抗	10.29	ND
			hlgG4 ^P	3.31	ND
供体	NALM-6	REGN5837	西米普利单抗	294.20	9.96E-10

[0393]

555131 T 细胞			hlgG4 ^P	264.90	1.05E-09
			非 TAA x CD28	西米普利单抗	21.13
		hlgG4 ^P		25.45	ND
		NALM-6/hPD-L1	REGN5837	西米普利单抗	90.17
	hlgG4 ^P			50.99	8.95E-10
	非 TAA x CD28		西米普利单抗	11.35	ND
			hlgG4 ^P	6.57	ND

[0394] ND:未确定,因为没有观察到浓度依赖性应答。

[0395] 表23B:在工程化以表达PD-L1的RAJI/CD80⁺CD86细胞中,REGN5837与西米普利单抗的组合使IL-2释放增强超过单独的REGN5837处理

[0396]

原代 T 细胞 + RAJI/CD80 CD86 (+/- PD-L1)				最大[pg/ml]	EC ₅₀ [M]
供体 555109 T 细胞	RAJI/CD80 ⁺ CD86 ⁺	REGN5837	西米普利单抗	1258.00	1.41E-10
			hlgG4 ^P	1149.00	1.28E-10
		非 TAA x GD28	西米普利单抗	503.70	NC
			hlgG4 ^P	454.90	9.49E-08
	RAJI/CD80 ⁺ CD86 ⁺ /PD-L1	REGN5837	西米普利单抗	910.70	1.97E-10
			hlgG4 ^P	230.60	3.86E-11
		非 TAA x CD28	西米普利单抗	518.80	NC
			hlgG4 ^P	84.41	8.20E-08
供体 555130 T 细胞	RAJI/CD80 ⁺ CD86 ⁺	REGN5837	西米普利单抗	791.90	9.31E-11
			hlgG4 ^P	711.60	5.04E-11
		非 TAA x CD28	西米普利单抗	489.70	NC
			hlgG4 ^P	370.00	NC
	RAJI/CD80 ⁺ CD86 ⁺ /PD-L1	REGN5837	西米普利单抗	664.30	6.15E-11
			hlgG4 ^P	182.10	5.24E-11
		非 TAA x CD28	西米普利单抗	426.80	NC
			hlgG4 ^P	85.29	7.24E-08
供体 555131 T 细胞	RAJI/CD80 ⁺ CD86 ⁺	REGN5837	西米普利单抗	437.40	1.28E-10
			hlgG4 ^P	426.10	9.31E-11
		非 TAA x GD28	西米普利单抗	162.20	5.97E-08
			hlgG4 ^P	156.60	7.92E-08
	RAJI/CD80 ⁺ CD86 ⁺ /PD-L1	REGN5837	西米普利单抗	406.00	3.16E-10
			hlgG4 ^P	132.40	2.58E-10
		非 TAA x CD28	西米普利单抗	94.94	NC
			hlgG4 ^P	37.24	NC

[0397] NC:未计算,因为数据未拟合4参数逻辑方程。

[0398] 表24:在表达PD-L1的WSU-DLCL2细胞中,REGN5837与西米普利单抗的组合使IL-2释放增强超过单独的REGN5837处理

[0399] 原代 T 细胞 + WSU-DLCL2 (+/- PD-L1)

100 nM 时的 IL-2[pg/ml]	0 nM 时的 IL-2[pg/ml]	EC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]
--------------------------	------------------------	----------------------	----------------------

[0400]

供体 5551751- 细胞	WSU-DLCL2	REGN5837	西米普利 单抗	2276.35	3217.69		ND
			hlgG4 ^P	2284.28	2482.54		ND
		非 TAA x CD28	西米普利 单抗	609.01	3299.38		4.81E-09
			hlgG4 ^P	616.95	3552.86		8.54E-09
	WSU- DLCL2/PD-L1	REGN5837	西米普利 单抗	723.06	642.64	NC	
			hlgG4 ^P	209.84	124.81	1.39E-12	
		非 TAA x CD28	西米普利 单抗	66.17	444.51		2.87E-09
			hlgG4 ^P	15.47	82.91		NC
供体 555175 T细胞 + 50 nM 贝 拉西普	RAJI/CD80 ⁺ CD86 ⁺	REGN5837	西米普利 单抗	2061.29	112.64	6.95E-13	
			hlgG4 ^P	1809.89	71.65	1.45E-12	
		非 TAA x CD28	西米普利 单抗	502.33	164.55	NC	
			hlgG4 ^P	402.66	109.02	NC	
	RAJI/CD80 ⁺ CD86 ⁺ /PD-L1	REGN5837	西米普利 单抗	792.06	22.40	1.59E-12	
			hlgG4 ^P	238.23	5.19	3.39E-12	
		非 TAA x CD28	西米普利 单抗	128.69	24.44	NC	
			hlgG4 ^P	14.49	1.72	NC	

[0401] ND: 未确定, 因为没有观察到浓度依赖性应答。

[0402] NC: 未计算, 因为数据未拟合4参数逻辑方程。

[0403] 实例11: 在REGN1979存在或不存在的条件下施用REGN5837的抗肿瘤功效

[0404] 引言

[0405] REGN5837是被设计成用于通过桥接CD22⁺B细胞与CD28⁺T细胞来靶向B细胞NHL (例如, DLBCL) 的基于人IgG4的双特异性抗体 (bsAb)。由REGN5837提供的“信号2”与提供“信号1” (例如, 通过经由TCR或CD3聚类的原代T细胞刺激来递送信号) 的其它药剂如CD20xCD3双特异性抗体 (bsAb) REGN1979组合可以提供扩增的T细胞活化和T细胞介导的对B细胞NHL的杀伤, 从而加深对CD20xCD3的应答。此外, REGN5837可以对CD20xCD3单一疗法无应答的患者提供增加的功效。

[0406] 下文所描述的研究评估了在次有效剂量的CD20xCD3 bsAb (REGN1979) 存在或不存在的条件下向携带已确立B细胞白血病肿瘤8天的免疫缺陷NSG小鼠施用CD22xCD28 bsAb REGN5837的抗肿瘤功效。

[0407] 简而言之, 向小鼠 (每组n=6到9) 腹膜内 (IP) 移植人外周血单核细胞 (PBMC) 并在12天之后静脉内 (IV) 植入人NALM-6B细胞白血病细胞, 所述人NALM-6 B细胞白血病细胞被工程化以表达荧光素酶从而实现生物发光成像 (NALM-6-luc)。将0.04mg/kg、0.4mg/kg和4mg/kg REGN5837与0.04mg/kg固定剂量的REGN1979组合的抗肿瘤功效与REGN5837和REGN1979单一疗法并且与非桥接IgG4^{P-PVA}对照bsAb进行比较。小鼠在植入NALM-6-luc细胞之后8天、15天和22天通过腹膜内 (IP) 注射接受多个剂量的抗体。在整个实验期间, 每周评估两次肿瘤负荷。

[0408] 材料与方法

[0409] 人衍生的细胞系

[0410] NALM-6-luc: NALM-6细胞系是从19岁男性患者(DSMZ, 目录号ACC 128)分离的急性淋巴母细胞白血病细胞系; 用EF1a-荧光素酶-2A-GFP-Puro慢病毒(基因靶标公司(GenTarget))来修饰此系以便于体内肿瘤细胞生长成像。

[0411] PBMC: 从ReachBio公司目录号0500-401供体号0180905(肿瘤生长实验)和0180621(血清抗体试验)获得人PBMC

[0412] 实验设计

[0413] 测试系统

[0414] 在所有实验中使用雌性NSG小鼠(年龄为8-9周龄)。向所有小鼠IP移入人PBMC并且然后在移植后12天IV植入NALM-6-luc B细胞白血病细胞。实验设计在表25中详述。在整个研究期间, 通过一周两次生物发光成像来监测肿瘤生长。对于所有的实验, 将小鼠收容在标准条件下的再生元公司(Regeneron)动物设施中。所有实验根据再生元公司的机构动物护理和使用委员会(the Institutional Animal Care and Use Committee)的准则执行。

[0415] NSG小鼠的移植

[0416] 向雌性免疫缺陷NSG小鼠IP移植 4×10^7 个人PBMC。通过眶后采血以及经由流式细胞术评估全血中的所有活细胞中的人CD45⁺细胞的百分比, 在移植后11天检查T细胞水平; 移植水平的范围为0.16%到16% hCD45⁺细胞。随后为经过PBMC移植的NSG小鼠植入NALM-6-luc细胞。

[0417] NALM-6-Luc培养条件和肿瘤植入

[0418] 用EF1a-荧光素酶-2A-GFP-Puro慢病毒(基因靶标公司)来修饰NALM-6细胞系以便于体内肿瘤细胞生长成像。将细胞系维持在于嘌呤霉素选择下补充有PSG(青霉素、链霉素和谷氨酰胺)的10%FBS的RPMI中。

[0419] 通过离心收集NALM-6-luc细胞并以 2.5×10^7 个细胞/毫升将其重悬于PBS中。在植入PBMC之后第12天向NSG小鼠IV注射200 μ l (5×10^6 个细胞)NALM-6-luc细胞。

[0420] 用于肿瘤测量的抗体给药

[0421] 在用测试物品或对照给药之前, 将小鼠分配到根据肿瘤负荷和T细胞移植水平分层的组。按照表25所陈述的剂量在植入(为了体内功效)后第8天、第15天和第22天通过IP注射作为单一疗法或组合地施用抗体(REGN5837、REGN1979、REGN5671[非TAAxCD28非桥接对照bsAb]或H4sH17664D[非TAAxCD3非桥接对照bsAb])。

[0422] 表25: 用于评估肿瘤生长的实验设计

组	每组 N 个	REGN5837 或非 TAAxCD28 的剂量	REGN1979 或非 TAAxCD3 的剂量	Ab 剂量时间表 (IP 注射)	测量肿瘤体积的天数
[0423]	REGN5837 + REGN1979	8	4 mg/kg	NALM-6-luc 细胞植入后第 8 天、第 15 天和第 22 天	植入后第 6 天、第 10 天、第 14 天、第 17 天、第 20 天和第 23 天
	REGN5837 + REGN1979	8 ^a	0.4 mg/kg		
	REGN5837 + REGN1979	9	0.04 mg/kg		
	REGN5837 + 非 TAAxCD3	8 ^a	4 mg/kg		
	非 TAAxCD28 + REGN1979	8	4 mg/kg		
	非 TAAxCD28 + 非 TAAxCD3	9 ^a	4 mg/kg		

[0424] ^a来自此组的一只小鼠在实验期间在早期死亡并且被排除在外。这些小鼠的死亡不是由于肿瘤负荷并且也不可能涉及用测试物品给药,因为对照组中也有一只小鼠死亡

[0425] 肿瘤测量和所指定终点

[0426] 使用IVIS光谱仪器每周两次对植入有NALM-6-luc肿瘤的小鼠进行成像,并且使用Living Image软件分析数据。成像之前,向小鼠IP注射萤光素底物。十分钟之后,用异氟烷和经过定量的生物发光(总通量,表示为光子每秒[p/s])将小鼠麻醉。根据IACUC标准,当小鼠开始表现出移植物抗宿主疾病(GVHD)的迹象时(评估为体重减轻 $\geq 20\%$),实验结束。

[0427] 肿瘤生长的统计分析

[0428] 使用双向方差分析(ANOVA)、然后使用图基事后检验对肿瘤体积随时间推移的结果进行分析以用于多次比较。当 $p < 0.05$ 时,差异被视为在统计学上具有显著性。使用GraphPad Prism软件(版本8)执行统计分析。

[0429] 结果

[0430] 在REGN1979存在或不存在的情况下施用REGN5837的抗肿瘤功效

[0431] 携带NALM-6-luc肿瘤的免疫缺陷NSG小鼠接受如本文所描述的抗体或非桥接对照的IP注射。

[0432] 在携带肿瘤的小鼠中,与非桥接对照bsAb(非TAAxCD28和非TAAxCD3 bsAb)相比,在植入后第23天在0.04mg/kg REGN1979存在的情况下用0.04mg/kg、0.4mg/kg和4mg/kg REGN5837治疗导致了对肿瘤生长的统计学显著抑制(分别为 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 和 $p < 0.001$) (图6)。在植入后第20天,针对0.4mg/kg和4mg/kg组(两个组均为 $p < 0.05$)观察到对肿瘤生长的显著抑制。与非桥接对照bsAb相比,REGN5837(4mg/kg)和REGN1979(0.04mg/kg)单一疗法均未显著减少肿瘤生长。任何REGN5837+REGN1979组合剂量与bsAb单一疗法之间的差异未达到统计学显著性。在整个给药期期间,在用非桥接对照bsAb给药时观察到肿瘤快速生长,并且在第23天,将所有小鼠安乐死。在所有组中,在实验结束时在至少一只小鼠中观察到GVHD(评估为体重减少 $\geq 20\%$)。

[0433] 在使用不同组小鼠的独立实验中,在以下时间点采集血液以确定血清抗体浓度:在第7天给药后1小时、4小时、在第14天和第21天给药前1小时和给药后4小时以及在第29天一次。在第14天和第21天给药前1小时确定给药期期间血清中抗体的低谷浓度。在存在

0.04mg/kg REGN1979的情况下施用0.04mg/kg、0.4mg/kg和4mg/kg REGN5837剂量与范围分别为定量限值以下 (BLQ) 到0.1µg/mL、1.6µg/mL到2.3µg/mL以及16.5µg/mL到21.1µg/mL的在血清中的REGN5837的低谷浓度相关。在所有情况下,血清中REGN1979的低谷浓度是BLQ (数据未示出)。

[0434] 结论

[0435] 在存在0.04mg/kg REGN1979的情况下0.04mg/kg、0.4mg/kg和4mg/kg REGN5837剂量有效抑制小鼠中的NALM-6B细胞白血病肿瘤生长。相对于对照,利用4mg/kg REGN5837或0.04mg/kg REGN1979单一疗法未观察到显著抑制肿瘤。

[0436] 实例12:CD22细胞+人PBMC+/-CD22xCD28共刺激双特异性抗体 (固定CD22xCD28、滴定CD20xCD3) 上的基于FACS的细胞毒性

[0437] 材料与方法

[0438] 在靶向Nalm6或WSU-DLCL2细胞的96小时细胞毒性测定中评估CD20xCD3靶向的杀伤的CD22xCD28增强。简而言之,将人PBMC以 1×10^6 个细胞/毫升平板接种在补充的RPMI培养基中并在37°C下温育过夜,以通过耗竭粘附的巨噬细胞、树突细胞和一些单核细胞来富集淋巴细胞。第二天,用1µM荧光跟踪染料CFDA-SE来标记Nalm6或WSU-DLCL2细胞,并且用1µM荧光跟踪染料CellTrace Violet来标记粘附细胞耗尽的原初PBMC。在有或没有2.5ug/ml (16.7nM) 固定浓度的CD22xCD28 REGN5837的情况下,将标记的靶细胞和PBMC (Nalm6的效应细胞/靶细胞比为4:1,WSU-DLCL2的效应细胞/靶细胞比为5:1) 与CD20xCD3双特异性抗体REGN1979的连续稀释液 (浓度范围:5nM到0.64pM) 一起温育。在靶向Nalm6细胞的测定中,添加2.5ug/ml (16.7nM) 恒定量的CD22xCD28 REGN5838、单臂对照CD28双特异性 (REGN5678) 或IgG4同种型对照 (H4sH10154P3)。在37°C下温育96小时之后,从平板收获细胞并在FACS BD LSRFortessa-X20上通过FACS进行分析。关于FACS分析,利用可固定活/死远红反应性 (英杰公司) 染料对细胞进行染色。紧接在FACS分析之前将20,000个计数珠添加到每个孔中,并且针对每个样品收集10,000个珠。为了评估杀伤的特异性,在活CFDA-SE标记的群体上对细胞进行门控。记录活靶细胞的百分比或数量并将其用于计算存活率。

[0439] 通过将细胞与同CD2、CD4、CD8和CD25直接缀合的抗体一起温育来评估T细胞活化。将表达CD25的CD8+细胞的百分比报告为T细胞活化度量。另外,随着T细胞的增殖,对CellTraceViolet进行稀释,这导致如FACS所测量的MFI较低。因此T,将细胞增殖报告为CD8+T细胞上的CellTraceViolet MFI的减少或已减少CellTraceViolet MFI的CD8+细胞的百分比。

[0440] 收集来自此测定的上清液以用于细胞因子水平的分析。按照制造商的说明书使用流式细胞珠阵列 (CBA) 试剂盒对IL 17a、IFN γ 、TNF α 、IL-10、IL-6、IL-4和IL-2的浓度进行分析。从试剂盒标准品所生成的曲线中插入细胞因子水平并将细胞因子水平报告为pg/mL。在Prism软件中使用4参数非线性回归分析计算靶细胞杀伤、T细胞活化、增殖和细胞因子水平以及最大细胞因子水平的EC50值。

[0441] 结果、汇总和结论:

[0442] 测试抗CD20xCD3双特异性抗体REGN1979与共刺激CD22xCD28抗体或者单臂CD28或同种型对照抗体组合地诱导原初人T细胞杀伤表达人CD20和CD22的靶细胞的能力。

[0443] REGN1979活化并指导人T细胞以剂量依赖性方式杀伤Nalm6 (图7) 或WSU-DLCL2 (图

8) 细胞。将固定浓度的CD22xCD28双特异性抗体添加到REGN1979使REGN1979针对Na1m6细胞的细胞毒性功效 (EC50) 与利用单臂CD28或同种型对照抗体的REGN1979相比增强4.7-5.2倍 (表26) 或针对WSU-DLCL2细胞与单独的REGN1979相比增强17.5倍 (表27)。

[0444] 如分别通过CD8+细胞上的CD25上调或CellTrace Violet稀释测量的,观察到的由REGN1979介导的靶细胞裂解与T细胞活化和增殖相关 (图7、图8)。将固定浓度的CD22xCD28双特异性抗体添加到REGN1979使REGN1979诱导的T细胞活化和增殖的效力在Na1m6细胞存在的情况下与利用单臂CD28或同种型对照抗体的REGN1979相比分别增强2.3-2.6倍和5.4-7.1倍 (表26) 并且在WSU-DLCL2细胞存在的情况下与单独的REGN1979相比分别增强8.2倍和16.1倍 (表27)。

[0445] 在利用人PBMC和WSU-DLCL2细胞的测定中,REGN1979诱导人细胞因子的释放。与由仅REGN1979诱导的细胞因子释放相比,在固定浓度的CD22xCD28存在的情况下利用REGN1979观察到的释放的细胞因子有所增强 (表28、图9)。

[0446] 总之,与单独地或与对照抗体组合地利用CD20xCD3所观察到的相比,共刺激增加了靶向的细胞毒性、T细胞活化和细胞因子释放的效力。

[0447] 表列数据汇总:

[0448] 表26:利用Na1m6靶标的细胞毒性和T细胞活化的EC50值 (1个实验)

Ab	细胞杀伤		T 细胞活化 (CD8+/CD25+)		T 细胞增殖 (CD8+细胞的 CellTrace MFI)	
	EC50[M]	相比于 IgG4 的 EC50 倍数	EC50[M]	相比于 IgG4 的 EC50 倍数	EC50[M]	相比于 IgG4 的 EC50 倍数
REGN5837	3.89E-11	4.7	4.05E-11	2.3	3.83E-11	5.4
REGN5838	3.57E-11	5.2	3.60E-11	2.6	2.87E-11	7.1
单臂 CD28	1.88E-10	1.0	9.20E-11	1.0	1.97E-10	1.0
IgG4 同种型	1.84E-10	1.0	9.28E-11	1.0	2.05E-10	1.0

[0450] 表27:利用WSU-DLCL2靶标的细胞毒性和T细胞活化的EC50值 (2次实验的平均值)

Ab	细胞杀伤		T 细胞活化 (CD8+/CD25+)		T 细胞增殖 (CD8 的已分 裂%)	
	EC50[M]	相比于仅 REGN1979 的 EC50 倍数	EC50[M]	相比于仅 REGN1979 的 EC50 倍数	EC50[M]	相比于仅 REGN1979 的 EC50 倍数
REGN5837	1.39E-13	17.5	1.28E-12	8.2	7.10E-13	16.1
无 Ab	2.33E-12	1.0	1.22E-11	1.0	1.23E-11	1.0

[0452] 表28:来自WSU-DLCL2细胞毒性测定的细胞因子释放 (2个实验的平均值)

IL-2	REGN5837		无 Ab	
	EC50	1.82E-11	5.85E-10	
	最大 (pg/ml)	3022	564	
	倍数 (最大)	6.4	1.0	
IL-4	EC50	1.24E-11	8.69E-11	

[0454]		最大 (pg/ml)	65.035	34.855
		倍数 (最大)	1.9	1.0
		EC50	2.31E-11	8.66E-11
	IL-6	最大 (pg/ml)	194.36	116.085
		倍数 (最大)	1.8	1.0
		EC50	1.35E-10	1.30E-10
	IL-10	最大 (pg/ml)	686.15	520.7
		倍数 (最大)	1.3	1.0
		EC50	3.84E-11	2.09E-10
	TNFa	最大 (pg/ml)	327.85	84.55
		倍数 (最大)	4.1	1.0
		EC50	1.06E-10	2.78E-10
	IFNg	最大 (pg/ml)	470.7	195.5
		倍数 (最大)	2.4	1.0
		EC50	2.56E-10	2.74E-10
	IL-17a	最大 (pg/ml)	19.775	15.091
		倍数 (最大)	1.4	1.0

[0455] 实例13:NHL+人PBMC+/-CD22xCD28刺激(固定CD22xCD28、滴定CD20xCD3)上的基于FACS的细胞毒性

[0456] 实验程序

[0457] 在靶向在人基质细胞(HS-5)存在的情况下从具有自体PBMC的原代NHL患者活检中分离出来的NHL细胞的96小时细胞毒性测定中评估CD20xCD3靶向杀伤的CD22xCD28增强。简而言之,将HS-5细胞以每孔5000个细胞平板接种在平底96孔平板中并温育过夜。第二天,用1uM荧光跟踪染料CellTrace Violet对来自NHL患者的PBMC进行标记。将骨髓和标记的PBMC(效应细胞/靶细胞比为10:1)平板接种在具有基质细胞的孔中并在37°C下与CD20xCD3双特异性抗体REGN1979的连续稀释液(浓度范围:6.7nM到10.7pM)和2.5ug/ml(16.7nM)固定浓度的CD22xCD28共刺激分子REGN5837或单臂对照CD28双特异性(REGN5678)一起温育96个小时。从平板收获细胞并在FACS BD LSRFortessa-X20上通过FACS进行分析。关于FACS分析,利用抗体混合物(CD45、CD19、CD4、CD8、CD25)和可固定活/死近IR反应性染料(英杰公司)对细胞进行染色。紧接在FACS分析之前将20,000个计数珠添加到每个孔中,并且针对每个样品收集10,000个珠。为了评估杀伤的特异性,在活CD45+Violet阴性CD19+群体上对细胞进行门控。基于相对于未处理孔中的靶细胞数量归一化的经过处理的孔中的靶细胞数量来计算存活率。

[0458] 将T细胞门控为活CD45+Violet标记的CD4+或CD8+群体。将表达CD25的CD8+和CD4+细胞的百分比报告为T细胞活化的度量。另外,随着T细胞的增殖,对CellTraceViolet进行稀释,这导致如FACS所测量的MFI较低。因此,将T细胞增殖报告为CD8+和CD4+T细胞上的CellTraceViolet的MFI的减少。

[0459] 在Prism软件中使用4参数非线性回归分析计算靶向杀伤以及T细胞活化和增殖的EC50值。

[0460] 结果汇总和结论:

[0461] 测试抗CD20xCD3双特异性抗体REGN1979与共刺激CD22xCD28抗体或单臂CD28对照抗体组合地诱导原初自体T细胞杀伤来自患者骨髓的NHL细胞的能力。

[0462] REGN1979活化并指导人T细胞以剂量依赖性方式耗竭NHL。与利用单臂CD28对照抗

体或没有共刺激对照的REGN1979相比,将固定浓度的CD22xCD28双特异性抗体添加到REGN1979使REGN1979的细胞毒性功效(EC50)提高了2.3和3.5倍(表29)。

[0463] 如分别通过CD8⁺和CD4⁺细胞上的CD25上调或CellTrace Violet稀释测量的,观察到的由REGN1979介导的靶细胞裂解与T细胞活化和增殖相关。与利用单臂CD28或没有共刺激对照的REGN1979相比,将固定浓度的CD22xCD28双特异性抗体添加到REGN1979使REGN1979诱导的T细胞活化和增殖的效力分别增强2.8到4.2倍和2.8-4.8倍(表29和图10)。

[0464] 总之,与利用CD20xCD3与对照抗体组合地观察到的相比,共刺激增加了靶向的细胞毒性和T细胞活化的效力。

[0465] 表列数据汇总:

[0466] 表29:细胞毒性和T细胞活化的EC50值

Ab	细胞杀伤 EC50[M]	T 细胞活化 (CD25 ⁺) EC50[M]		T 细胞分裂 (T 细胞的 CellTrace MFI) EC50[M]	
		CD8 T 细胞	CD4 T 细胞	CD8 T 细胞	CD4 T 细胞
		CD8 T 细胞	CD4 T 细胞	CD8 T 细胞	CD4 T 细胞
REGN5837	7.81E-12	1.35E-11	6.96E-12	1.52E-11	8.54E-12
单臂 CD28	1.80E-11	4.01E-11	2.95E-11	4.71E-11	4.13E-11
无共刺激	2.72E-11	3.77E-11	2.74E-11	4.27E-11	3.93E-11

[0468] 实例14:在弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL) 模型中单独的和与REGN1979组合的REGN5837的抗肿瘤功效的体外表征和体内评估

[0469] 研究引言和结果汇总的材料与方法

[0470] 进行体外和体内研究以评估:

[0471] (1)REGN5837通过桥接CD28⁺T细胞与CD22⁺靶细胞来增强原代T细胞活化的能力。使用针对靶细胞的细胞毒性、T细胞活化的细胞表面标志物的表达、T细胞增殖和如读数等细胞因子释放水平评估T细胞活化。在桥接T细胞和CD20⁺靶细胞上的CD3分子并导致T细胞活化的CD20xCD3 bsAb REGN1979存在或不存在的情况下执行实验。

[0472] (2)在存在或不存在0.4mg/kg或4mg/kg REGN1979的情况下向携带DLBCL肿瘤的免疫缺陷NSG小鼠施用的CD22xCD28 bsAb REGN5837的抗肿瘤功效。

[0473] 在一定的浓度范围内组合地测试REGN5837和REGN1979,以评估REGN5837对REGN1979介导的针对人DLBCL细胞系 (WSU-DLCL2) 的T细胞细胞毒性、后期T细胞活化标志物 (CD25) 的上调、T细胞增殖和来自原代人T细胞的细胞因子释放的影响。REGN5837以浓度依赖性方式增强REGN1979介导T细胞细胞毒性、CD4⁺和CD8⁺T细胞上的CD25细胞表面表达以及CD4⁺和CD8⁺T细胞增殖的效力。类似地,REGN5837以浓度依赖性方式增强REGN1979介导细胞因子释放的效力。在范围为77.2pM到100nM的浓度下,REGN5837增加REGN1979介导的针对靶细胞的T细胞细胞毒性的效力;在范围为77.2pM到2.78nM的浓度下,REGN5837增加REGN1979介导的T细胞活化和增殖的效力,但是更高浓度的REGN5837并未进一步增加REGN1979的效力(表30)。在添加REGN5837时,最大量的REGN1979介导的靶细胞杀伤和T细胞增殖没有大幅度增加,然而REGN5837以浓度依赖性方式增强了REGN1979介导的IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、TNF- α 、IFN- γ 和IL-17 α 释放的最大水平。

[0474] 向免疫缺陷NSG小鼠 (每组n=6到7) 皮下 (SC) 植入比率为1:1的WSU-DLCL2细胞和人PBMC。将1mg/kg REGN5837与0.4mg/kg或4mg/kg剂量的REGN1979组合的抗肿瘤功效与REGN5837和REGN1979单一疗法并且与非桥接IgG4^{P-PVA}对照bsAb进行比较。植入WSU-DLCL2细

胞之后1天、8天和15天,小鼠通过腹膜内(IP)注射接受多个剂量的抗体。植入后第28天,与REGN5837或REGN1979单一疗法以及非桥接对照bsAb相比,在0.4mg/kg或4mg/kg REGN1979存在的情况下用1mg/kg REGN5837治疗导致对WSU-DLCL2肿瘤生长的统计学上显著抑制。REGN1979单一疗法导致对肿瘤生长的适度抑制,然而REGN5837单一疗法相对于非桥接对照无效果。

[0475] 总之,当在体外在一定的浓度范围内组合地测试REGN5837和REGN1979时,REGN5837增强了REGN1979在CD22⁺WSU-DLCL2细胞存在的情况下介导人T细胞活化的效力。在REGN5837存在的情况下,增加了REGN1979介导的细胞因子释放的最大水平,而不是细胞毒性、T细胞活化或增殖。相对于单独的REGN5837或REGN1979单一疗法,在体内,在0.4mg/kg或4mg/kg REGN1979存在的情况下1mg/kg REGN5837有效抑制小鼠中的WSU-DLCL2 B细胞淋巴瘤肿瘤生长。

[0476] 表30:REGN5837使用人PBMC对REGN1979介导的T细胞活化(通过针对靶细胞的细胞毒性、CD25表达和T细胞增殖测量)的影响汇总

		REGN5837 的固定浓度						
		1.00 x 10 ⁻⁷	1.67 x 10 ⁻⁸	2.78 x 10 ⁻⁹	4.63 x 10 ⁻¹⁰	7.72 x 10 ⁻¹¹	0	
WSU-DLCL2 细胞杀伤	REGN1979 EC ₅₀ (M) ^a	8.53 x 10 ⁻¹⁴	1.85 x 10 ⁻¹³	3.98 x 10 ⁻¹³	3.46 x 10 ⁻¹³	8.37 x 10 ⁻¹³	2.89 x 10 ⁻¹²	
	最大细胞毒性%	81.5	79.8	80.6	87.5	82.1	83.2	
	变化倍数(EC ₅₀) ^b	33.9	15.7	7.3	8.3	3.5	1.0	
CD4 ⁺ T 细胞活化 (CD25 ⁺ %)	REGN1979 EC ₅₀ (M)	1.16 x 10 ⁻¹³	8.70 x 10 ⁻¹⁴	7.11 x 10 ⁻¹⁴	1.46 x 10 ⁻¹³	2.08 x 10 ⁻¹³	9.17 x 10 ⁻¹³	
	最大 CD25 ⁺ 细胞%	94.1	95.6	94.2	91.9	91.7	92.4	
	变化倍数(EC ₅₀)	7.9		10.5	12.9	6.3	4.4	1.0
CD8 ⁺ T 细胞活化 (CD25 ⁺ %)	REGN1979 EC ₅₀ (M)	6.32 x 10 ⁻¹³		5.88 x 10 ⁻¹³	2.68 x 10 ⁻¹³	9.01 x 10 ⁻¹³	1.64 x 10 ⁻¹²	3.38 x 10 ⁻¹²
	最大 CD25 ⁺ 细胞%	89		90.9	89.7	86.2	88.4	87.1
	变化倍数(EC ₅₀)	5.3		5.7	12.6	3.8	2.1	1.0
CD4 ⁺ T 细胞增殖	REGN1979 EC ₅₀ (M)	8.42 x 10 ⁻¹³		9.31 x 10 ⁻¹³	4.25 x 10 ⁻¹³	1.25 x 10 ⁻¹²	2.36 x 10 ⁻¹²	1.63 x 10 ⁻¹¹
	最大增殖%	54.72		54.09	54.79	52.06	44.73	38.67
	变化倍数(EC ₅₀) ^a	19.3		17.5	38.3	13.1	6.9	1.0
CD8 ⁺ T 细胞增殖	REGN1979 EC ₅₀ (M)	1.55 x 10 ⁻¹²		8.31 x 10 ⁻¹³	7.09 x 10 ⁻¹³	3.43 x 10 ⁻¹²	8.36 x 10 ⁻¹²	1.97 x 10 ⁻¹¹
	最大增殖%	59.1		58.9	60.2	56.4	53.2	51.1
	变化倍数(EC ₅₀) ^a	12.7		23.7	27.8	5.7	2.4	1.0

[0478] ^a.在范围为4.8fM到10nM的浓度下测试REGN1979

[0479] ^b.将EC₅₀的变化倍数计算为EC₅₀(无REGN5837)/EC₅₀([M]REGN5837)

[0480] 实例15:REGN5837对REGN1979介导的人T细胞活化的影响的评估以及在WSU-DLCL2细胞存在的情况下在一定的浓度范围内组合地测试REGN5837和REGN1979。

[0481] 在体内和体外都进行了研究以通过测量以下参数来评估人CD22xCD28 bsAb REGN5837在次有效剂量的人CD20xCD3 bsAb (REGN1979) 存在或不存在的条件下在植入人PBMC和WSU-DLCL2细胞后的NSG小鼠中的抗肿瘤功效:a) 针对CD22⁺靶细胞的T细胞细胞毒性;b) T细胞活化标志物CD25在CD4⁺和CD8⁺T细胞的细胞表面上的上调;c) T细胞增殖;d) 细胞因子释放(IL-4、IL-2、IL-6、IL-10、TNF- α 、IFN- γ 和IL-17A)

[0482] 材料与方法

[0483] 细胞系

[0484] WSU-DLCL2:WSU-DLCL2是从41岁白人男性的胸腔积液分离出来的人DLBCL细胞系(莱布尼兹研究所-DSMZ,目录号ACC 575)。

[0485] 人PBMC

[0486] 关于细胞毒性、T细胞活化、T细胞增殖和细胞因子释放,从纽约血液中心(the New York Blood Center)获得来自人供体的leukopak细胞(供体号1500A)。

[0487] 关于体内小鼠实验,从ReachBio公司获得人PBMC(目录号0500-401)。

[0488] 实验设计

[0489] 在一定的浓度范围内组合地测试REGN5837和REGN1979以评估REGN5837对REGN1979介导的针对WSU-DLCL2细胞的T细胞细胞毒性、T细胞增殖、后期T细胞活化标志物(CD25)的细胞表面表达以及来自人T细胞的细胞因子释放的影响。如本文所描述的,确定靶细胞杀伤、T细胞活化和T细胞增殖的百分比。

[0490] 如本文所描述的,评估使用WSU-DLCL2细胞和PBMC在DLBCL模型中单独的以及和REGN1979组合的REGN5837的抗肿瘤功效。参见表31。

[0491] REGN5837对REGN1979介导T细胞活化的效力的影响的体外评估

[0492] 人原代T细胞分离

[0493] 按照制造商推荐的方案使用50mL SepMate™管通过密度梯度离心从健康供体白细胞包中分离人外周血单核细胞(PBMC)。简而言之,将15mL FicollPaque PLUS分层到50mL SepMate管中,然后添加30mL用D-PBS以1:2稀释的全血。在关掉制动器的情况下将管在室温下以1200x g离心10分钟。将含有等离子体和PBMC的顶层倾倒入新鲜管中。根据SepMate制造商的方案进行后续步骤。将分离的PBMC以 250×10^6 个细胞/毫升的浓度于含有10% DMSO的FBS中冷冻在5mL冷冻小瓶中。将PBMC在37°C水浴中解冻并以10mL每1亿个PBMC重悬于含有50U/mL全能核酸酶的刺激培养基(补充有10% FBS、HEPES、NaPyr、NEAA和0.01mM BME的X-VIVO 15细胞培养基)中并以300x g离心10分钟。按照制造商的推荐说明书使用来自干细胞技术公司的EasySep™人CD3⁺T细胞分离试剂盒从粒状PBMC中分离出CD3⁺T细胞。

[0494] 使用PBMC的基于流式细胞术的T细胞活化测定

[0495] 使用WSU-DLCL2靶细胞和人PBMC作为效应细胞,计算REGN5837增强通过同种异体初次刺激或利用通过REGN1979提供的“信号1”介导的T细胞活化的能力。如本文所描述的,对PBMC进行淋巴细胞富集。如本文所描述的,将靶细胞和效应细胞与测试物品和对照抗体温育。如本文所描述的,执行流式细胞术以评估T细胞细胞毒性、增殖和T细胞活化标志物的上调。另外,如本文所描述,评估REGN5837对REGN1979介导的细胞因子释放的影响。测试非TAAxCD28 bsAb(含有与REGN5837相同的CD28结合臂以及非结合臂)作为REGN5837的非桥接对照。

[0496] PBMC的淋巴细胞富集

[0497] 以 1×10^6 个细胞/毫升将人PBMC平板接种在完全培养基(补充有10% FBS、盘尼西林-链霉素-谷氨酰胺的RPMI细胞培养基)中并在37°C时温育过夜以通过耗竭如巨噬细胞、树突细胞和一些单核细胞等粘附细胞来富集淋巴细胞。

[0498] PBMC和靶细胞与测试物品的温育

[0499] 收获淋巴细胞富集的PBMC并用1μM Violet Cell Tracker荧光跟踪染料进行标

记。用1 μ M荧光染料Vybrant CFDA-SE对WSU-DLCL2靶细胞进行标记。

[0500] 随后,将标记染料的PBMC与标记染料的靶细胞以5:1的比率平板接种在在圆底96孔平板中(WSU-DLCL2为5x10³个靶细胞/孔)。

[0501] 将平板接种的PBMC和靶细胞与测试物品或其范围为12.9pM到100nM(REGN5837或非TAAxCD28)和4.8fM到10nM(REGN1979或非TAAxCD3)的最终浓度下的对照在37℃下温育72小时。

[0502] 流式细胞术分析

[0503] 在与测试物品和对照温育之后,用活/死染色剂并且用针对CD2、CD4、CD8和CD25的荧光团标记的抗体的混合物对染料标记的细胞进行染色。添加计数珠(20 μ L每孔),紧接着在BD Celesta流式细胞仪上进行样品分析。使用流式细胞术数据来确定靶细胞存活率、T细胞增殖和T细胞活化标志物的上调。使用GraphPad Prism软件从9点剂量-应答曲线上的四参数逻辑方程确定EC₅₀值。确定用于细胞毒性、T细胞活化(CD25上调)和增殖的最大应答,作为通过Prism曲线拟合生成的最大应答平台(maximum response plateau)。将EC₅₀相对于对照的相对变化计算为EC50_{No REGN5837}/EC50_{[M] REGN5837},并且将最大细胞因子释放的相对变化计算为最大_{[M] REGN5837}/最大_{No REGN5837}。

[0504] 靶细胞存活率

[0505] 将每个实验条件下的活靶细胞的百分比计算为相对于收集的珠的数量/孔归一化的活的CFDA-SE标记的靶细胞数量/孔。将靶细胞存活率百分比确定为任何实验条件下的活靶细胞的数量与无抗体对照条件下的活靶细胞(在仅PBMC存在的情况下的靶细胞)的数量之比。

[0506] 在以此方式报告的情况下,将每个实验条件下的针对靶细胞的细胞毒性百分比确定为100减去存活率百分比(如上文所描述的那样计算)。

[0507] CD4⁺和CD8⁺T细胞上的CD25表达

[0508] 通过在活CD2⁺和CD4⁺或CD8⁺细胞上进行门控来评估CD25(晚期活化T细胞的标志物)的上调。报告表达CD25的活化的T细胞占表达CD4或CD8的T细胞总数的百分比。

[0509] CD4⁺和CD8⁺T细胞的增殖

[0510] 通过计算分裂的细胞占CD4⁺或CD8⁺T细胞总数的百分比使用流式细胞术评估原代CD4⁺和CD8⁺T细胞增殖。使用Violet Cell Tracker染色的细胞的荧光强度作为细胞分裂读数,因为随着每一轮分裂。每个细胞的荧光强度下降2倍。

[0511] 细胞因子释放分析

[0512] 根据制造商的说明书使用BD流式细胞珠阵列人Th1/Th2/Th17细胞因子试剂盒对细胞培养上清液内的细胞因子(IL-4、IL-2、IL-6、IL-10、TNF- α 、IFN- γ 和IL-17A)的水平进行定量。

[0513] 使用WSU-DLCL2细胞异种移植物的DLBCL体内模型

[0514] 在所有实验中使用雌性NSG小鼠。向所有小鼠SC植入WSU-DLCL2 B细胞淋巴瘤细胞并用抗体进行IP给药。在整个研究期间,使用卡尺每周测量肿瘤体积若干次。对于所有的实验,将小鼠收容在标准条件下的再生元公司动物设施中。所有实验根据再生元公司的机构动物护理和使用委员会(IACUC)的准则执行。

[0515] WSU-DLCL2细胞培养条件和肿瘤植入

[0516] 从莱布尼兹研究所-DSMZ获得WSU-DLCL2细胞系,并将其维持在具有补充有盘尼西林、链霉素、谷氨酰胺和1mM HEPES的10%FBS的RPMI-1640培养基中。

[0517] 收集WSU-DLCL2细胞 (3×10^6 个细胞) 并将其与 5×10^5 个PBMC混合并重悬于PBS和GFR基质胶(基质胶)的1:1混合物中。向雌性NSG小鼠的右肋腹SC注射100 μ L细胞混合物。

[0518] 用于肿瘤测量的抗体给药

[0519] 在用测试物品或对照给药之前,将小鼠分配到根据肿瘤负荷分层的组。

[0520] 在植入后第1天、第8天和第15天以表31所陈述的剂量通过IP注射以单一疗法或组合地施用抗体(REGN5837、REGN1979、REGN5671[非TAAxCD28非桥接对照bsAb]或H4sH17664D[非TAAxCD3非桥接对照bsAb])。

[0521] 表31:用于评估肿瘤生长和存活率的实验设计

组	每组 N 个	REGN5837 或非 TAAxCD28 的剂量	REGN1979 或非 TAAxCD3 的剂量	bsAb 给药方案 (IP 注射)	测量肿瘤体积的天数
[0522]	REGN5837 + REGN1979	7	0.4 mg/kg	WSU-DLCL2 细胞植入后第 1 天、第 8 天和第 15 天	植入后第 7 天、第 10 天、第 14 天、第 16 天、第 28 天、第 31 天、
	REGN5837 + REGN1979	7	4 mg/kg		
	REGN5837 + 非 TAAxCD3	7	4 mg/kg		

组	每组 N 个	REGN5837 或非 TAAxCD28 的剂量	REGN1979 或非 TAAxCD3 的剂量	bsAb 给药方案 (IP 注射)	测量肿瘤体积的天数
[0523]	非 TAAxCD28 + REGN1979	6	0.4 mg/kg		第 35 天、第 38 天、第 43 天、第 46 天、第 49 天、第 53 天、第 57 天和第 63 天
	非 TAAxCD28 + REGN1979	6 ^a	4 mg/kg		
	非 TAAxCD28 + 非 TAAxCD3	7	4 mg/kg		

[0524] ^a.一只小鼠在实验期间死亡并被排除在外。

[0525] 肿瘤测量和所指定终点

[0526] 使用肿瘤X和Y直径的卡尺测量结果(长度和宽度垂直测量结果)随时间推移监测肿瘤生长。计算肿瘤体积 ($X \times Y \times [X/2]$, 其中X是较短直径)。当肿瘤达到指定的肿瘤终点(肿瘤直径>20mm或肿瘤溃疡)时,将小鼠安乐死。此终点符合IACUC标准。

[0527] 肿瘤生长和存活率的统计分析

[0528] 使用双向方差分析(ANOVA)、然后使用图基事后检验对肿瘤体积随时间推移的结果进行分析以用于多次比较。跨所有组使用Mantel-Cox测试分析随时间推移的存活率结果,并且运行Mantel-Cox测试以进行逐个单独组的比较。当 $p < 0.05$ 时,差异被视为在统计学上具有显著性。使用GraphPad Prism 8软件执行统计分析。

[0529] 结果

[0530] REGN5837对REGN1979介导针对WSU-DLCL2靶细胞的T细胞细胞毒性和来自人PBMC的细胞因子释放的能力的影响

[0531] 在一定的浓度范围内组合地测试REGN5837和REGN1979,以评估REGN5837对

REGN1979介导的针对WSU-DLCL2细胞的细胞毒性、T细胞活化、T细胞增殖以及来自人PBMC的T细胞的细胞因子释放的影响,如先前所描述的。表30示出了REGN5837对REGN1979介导的针对WSU-DLCL2细胞的细胞毒性、T细胞活化和T细胞增殖的影响。表32中汇总了展现出REGN5837对细胞因子释放的影响的来自2个人供体的数值结果。

[0532] REGN5837对REGN1979介导的细胞毒性和人T细胞增殖的影响

[0533] 通过评估REGN1979介导的针对WSU-DLCL2靶细胞的细胞毒性、REGN1979介导的T细胞活化以及REGN1979介导的对来自人PBMC的人CD4⁺和CD8⁺T细胞的增殖来评估增加浓度的REGN5837对REGN1979的效力(EC₅₀)和功效(最大应答)的影响。REGN5837以浓度依赖性方式增强REGN1979介导针对WSU-DLCL2细胞的细胞毒性、T细胞活化(测量为CD4⁺和CD8⁺T细胞上的CD25表达)和CD4⁺和CD8⁺T细胞增殖的效力。在范围为77.2pM到100nM的浓度下,REGN5837增加REGN1979介导的针对靶细胞的T细胞细胞毒性的效力;在范围为77.2pM到2.78nM的浓度下,REGN5837增加REGN1979介导的T细胞活化和增殖的效力,但是更高浓度的REGN5837并未进一步增加REGN1979的效力。这些数据以图形方式在图11和表30中表示。

[0534] 在REGN5837存在的情况下REGN1979介导的来自人PBMC的细胞因子释放

[0535] 评估增加浓度的REGN5837对REGN1979介导的来自人PBMC的细胞因子释放的效力和最大应答的影响。在人PBMC和WSU-DLCL2细胞存在的情况下,增加浓度的REGN5837以浓度依赖性方式增强REGN1979介导的IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、TNF- α 、IFN- γ 和IL-17A释放的最大水平(图12)。此外,增加浓度的REGN5837示出了增强REGN1979介导细胞因子释放的效力的趋势。图12和表32中汇总了EC₅₀值、最大细胞因子水平和高于由REGN1979介导的背景细胞因子水平(无REGN5837)的相对增加。

[0536] 表32

[0537]

		REGN5387 的固定浓度					
		1.0×10^{-7}	1.67×10^{-8}	2.78×10^{-9}	4.63×10^{-10}	7.72×10^{-11}	0
IL-4	REGN1979 EC ₅₀ (M) ^a	1.66×10^{-11}	1.53×10^{-11}	1.28×10^{-11}	1.89×10^{-11}	3.77×10^{-10}	9.99×10^{-10}
	最大 CKR (pg/mL) ^b	2,637	2,793	2,705	1,560	935	775
	变化倍数 (CKR) ^c	3.4	3.6	3.5	2.0	1.2	1.0
IL-2	REGN1979 EC ₅₀ (M)	2.81×10^{-11}	1.96×10^{-11}	5.18×10^{-12}	5.36×10^{-11}	3.89×10^{-8}	1.25×10^{-10}
	最大 CKR (pg/mL)	79.3	75.4	63.2	70.3	116	36.2
	变化倍数 (CKR)	2.2	2.1	1.7	1.9	3.2	1.0
IL-6	REGN1979 EC ₅₀ (M)	5.13×10^{-11}	7.89×10^{-12}	2.68×10^{-11}	1.45×10^{-12}	1.61×10^{-10}	7.42×10^{-11}
	最大 CKR (pg/mL)	366	304	367	246	210	190
	变化倍数 (CKR)	1.9	1.6	1.9	1.3	1.1	1.0
IL-10	REGN1979 EC ₅₀ (M)	3.54×10^{-11}	1.04×10^{-10}	2.43×10^{-10}	5.29×10^{-11}	3.34×10^{-11}	9.95×10^{-11}
	最大 CKR (pg/mL)	528	683	835	633	450	512
	变化倍数 (CKR)	1.0	1.3	1.6	1.2	0.9	1.0

[0538]

TNFα	REGN1979 EC₅₀ (M)	5.03 X 10 ⁻¹²	8.69 X 10 ⁻¹³	3.45 X 10 ⁻¹²	2.08 X 10 ⁻⁰³	1.62 X 10 ⁻¹⁰	2.43 X 10 ⁻¹⁰
	最大 CKR (pg/mL)	236	129	170	NC	35.4	29.6
	变化倍数 (CKR)	8.0	4.4	5.8	NC	1.2	1.0
IFNγ	REGN1979 EC₅₀ (M)	1.17 X 10 ⁻¹⁰	5.34 X 10 ⁻¹¹	2.00 X 10 ⁻¹⁰	6.72 X 10 ⁻¹¹	6.57 X 10 ⁻¹¹	1.82 X 10 ⁻¹⁰
	最大 CKR (pg/mL)	525	537	693	348	167	2.06
	变化倍数 (CKR)	2.6	2.6	3.4	1.7	0.8	1.0
IL-17A	REGN1979 EC₅₀ (M)	3.22 X 10 ⁻¹⁰	1.11 X 10 ⁻¹⁰	7.60 X 10 ⁻¹¹	4.63 X 10 ⁻¹⁰	1.86 X 10 ⁻¹⁰	2.50 X 10 ⁻¹⁰
	最大 CKR (pg/mL)	26.6	25.2	20.6	33.3	21.9	20.5
	变化倍数 (CKR)	1.3	1.2	1.0	1.6	1.1	1.0
^a 在范围为 4.8 fM 到 10 nM 的浓度下测试 REGN1979。 ^b 将最大 CKR 报告为由 PRISM 曲线拟合确定的最大平台。 ^c 将血清中最大细胞因子水平的变化倍数计算为最大 CKR([M] REGN5837)/最大 CKR(无 REGN5837) 缩写: CKR, 细胞因子释放; NC, 未计算, 因为细胞因子释放水平在测试的 REGN1979 浓度范围内没有达到饱和水平或剂量-应答曲线无法拟合。							

[0539] 在次有效剂量的REGN1979存在或不存在的条件下施用REGN5837的抗肿瘤功效

[0540] 携带WSU-DLCL2肿瘤的免疫缺陷NSG小鼠接受抗体或非桥接对照的IP注射,如本文先前所描述的。

[0541] 在携带肿瘤的小鼠中,在第28天(最后抗体剂量后6天),与非桥接对照bsAb(非TAAxCD28和非TAAxCD3 bsAb)相比,在0.4mg/kg或4mg/kg REGN1979存在的情况下用1mg/kg REGN5837治疗导致统对肿瘤生长的计学上显著抑制(图13A和13B)。在第46天,相对于REGN1979单一疗法,1mg/kg REGN5837和0.4mg/kg REGN1979的组合导致肿瘤体积显著减小。

[0542] 在第28天,相对于非桥接对照,0.4mg/kg和4mg/kg REGN1979单一疗法导致适度肿瘤抑制,然而REGN5837单一疗法无效果。在整个给药期期间,在用非桥接对照bsAb给药时观察到肿瘤快速生长,并且在第125天,将所有小鼠安乐死。

[0543] Mantel-Cox测试跨所有组检测存活率的统计学上显著差异($p=0.0001$),并且执行另外的Mantel-Cox测试以进行逐个组的比较。与用非桥接对照抗体给药的小鼠(无存活率)(图14)相比,观察到用1mg/kg REGN5837与0.4mg/kg或4mg/kg REGN1979组合地给药的小鼠的存活率显著增加(分别为85%和70%的存活率)。

[0544] 此外,与用REGN5837或REGN1979单一疗法给药的小鼠相比,观察到用1mg/kg REGN5837与0.4mg/kg或4mg/kg REGN1979组合地给药的小鼠的存活率显著增加。

[0545] 本发明不应限于本文所述的具体实施例的范围。事实上,除了本文所述的那些修改之外,本发明的各种修改对于本领域的技术人员来说也将从前面的描述和附图中变得显而易见。此类修改旨在落入所附权利要求的范围内。

序列表

<110> REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

〈120〉 双特异性抗 CD28 X 抗 CD22 抗体以及其用途

<130> 118003-49220

<140>

<141>

<150> 62/781, 689

<151> 2018-12-19

<160> 74

<170> PatentIn 版本 3.5

 $\langle 210 \rangle$ 1

<211> 375

<212> DNA

〈213〉 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

$\langle 221 \rangle$ source

<223> /注 = “人工序列的说明：合成多核苷酸”

 $\langle 400 \rangle$ 1

[0001]	gaggatgcagc tggatgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc	60
	tctgttaagg gttctggata caactttgcc acgtactgga ttgcctgggt gcgccagatg	120
	cccgggaaag gcctggagtt gatgggaatc atctatcctg gtgactctga gaccacatac	180
	aaccgcctct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag taacgcctac	240
	ctgcagtgga gcagcctgaa ggccctcgac accgccatgt attattgtgc gagagtagga	300
	ggatattgta gtggtaccag ttgccacaac tggttcgacc cctggggcct gggaaccctg	360
	gtcaccgtct cctca	375

<210> 2

<211> 125

<212> PRT

〈213〉 人工序列 (Artificial Sequence)

 $\langle 220 \rangle$

$\langle 221 \rangle$ source

〈223〉 /注 = “人工序列的说明：合成多肽”

 $\langle 400 \rangle$ 2

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Asn Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Glu Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Asn Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Val Gly Gly Tyr Cys Ser Gly Thr Ser Cys His Asn Trp Phe
 100 105 110
 Asp Pro Trp Gly Leu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <221> source
 <223> /注 = “人工序列的说明：合成寡核苷酸”

[0002]

<400> 3
 ggatacaact ttgccacgta ctgg

24

<210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <221> source
 <223> /注 = “人工序列的说明：合成肽”

<400> 4
 Gly Tyr Asn Phe Ala Thr Tyr Trp
 1 5

<210> 5
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
 <221> source
 <223> /注 = “人工序列的说明：合成寡核苷酸”

<400> 5
 atctatcctg gtgactctga gacc

24

<210> 6
 <211> 8
 <212> PRT

	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> source	
	<223> /注 = “人工序列的说明：合成肽”	
	<400> 6	
	Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Glu Thr	
	1 5	
	<210> 7	
	<211> 54	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> source	
	<223> /注 = “人工序列的说明：合成寡核苷酸”	
	<400> 7	
	gcgagagtag gaggatattg tagtggtacc agttgccaca actggttcga cccc	54
	<210> 8	
	<211> 18	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
[0003]	<221> source	
	<223> /注 = “人工序列的说明：合成肽”	
	<400> 8	
	Ala Arg Val Gly Gly Tyr Cys Ser Gly Thr Ser Cys His Asn Trp Phe	
	1 5 10 15	
	Asp Pro	
	<210> 9	
	<211> 324	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> source	
	<223> /注 = “人工序列的说明：合成多核苷酸”	
	<400> 9	
	gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
	ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa	120
	cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca	180
	gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
	cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gtcaccttg gacgttcggc	300

caagggacca aggtggaaat caaa

324

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> source

<223> /注 = “人工序列的说明: 合成多肽”

<400> 10

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

[0004]

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> source

<223> /注 = “人工序列的说明: 合成寡核苷酸”

<400> 11

cagagtgtta gcagcagcta c

21

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> source

<223> /注 = “人工序列的说明: 合成肽”

<400> 12

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
 1 5

	<210> 13 <211> 9 <212> DNA <213> 人工序列 (Artificial Sequence) <220> <221> source <223> /注 = “人工序列的说明: 合成寡核苷酸” <400> 13 ggtgcatcc	9
	<210> 14 <211> 3 <212> PRT <213> 人工序列 (Artificial Sequence) <220> <221> source <223> /注 = “人工序列的说明: 合成肽” <400> 14 Gly Ala Ser 1	
[0005]	<210> 15 <211> 27 <212> DNA <213> 人工序列 (Artificial Sequence) <220> <221> source <223> /注 = “人工序列的说明: 合成寡核苷酸” <400> 15 cagcagtatg gtagctcacc ttggacg	27
	<210> 16 <211> 9 <212> PRT <213> 人工序列 (Artificial Sequence) <220> <221> source <223> /注 = “人工序列的说明: 合成肽” <400> 16 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr 1 5	
	<210> 17 <211> 381 <212> DNA <213> 人工序列 (Artificial Sequence) <220> <221> source <223> /注 = “人工序列的说明: 合成多核苷酸”	

<400> 17	
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc cggggggggtc cctgaaactc	60
tcctgtgcag cctctgggtt cacccttcagt ggctctgata tgcactgggt ccgccaggct	120
tccgggaaag ggctggagtg ggttggccgt attagaaacc aacctaatag ttacgcgaca	180
gcatatgctg cgtcggtgaa aggcaggttc accatctcca gagatgattc aaagaacacg	240
gcgcatttgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacgg ccgtgtattt ttgtactaga	300
caaaagcagg tcgtttataa ttaccatcac tactacggtg tggacgtctg gggccaaggg	360
accacggtca ccgtctcctc a	381
<210> 18	
<211> 127	
<212> PRT	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<221> source	
<223> /注 = “人工序列的说明：合成多肽”	
<400> 18	
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
[0006] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser	
20 25 30	
Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
Gly Arg Ile Arg Asn Gln Pro Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala	
50 55 60	
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr	
65 70 75 80	
Ala His Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr	
85 90 95	
Phe Cys Thr Arg Gln Lys Gln Val Val Tyr Asn Tyr His His Tyr Tyr	
100 105 110	
Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
115 120 125	
<210> 19	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<221> source	
<223> /注 = “人工序列的说明：合成寡核苷酸”	

<400> 19
 gggttcacct tcagtggtc tgat

<210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
 <221> source
 <223> /注 = “人工序列的说明：合成肽”

<400> 20
 Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser Asp
 1 5

<210> 21
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
 <221> source
 <223> /注 = “人工序列的说明：合成寡核苷酸”

<400> 21
 attagaaacc aacctaataag ttacgcgaca

[0007] <210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
 <221> source
 <223> /注 = “人工序列的说明：合成肽”

<400> 22
 Ile Arg Asn Gln Pro Asn Ser Tyr Ala Thr
 1 5 10

<210> 23
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
 <221> source
 <223> /注 = “人工序列的说明：合成寡核苷酸”

<400> 23
 actagacaaa agcaggtcgt ttataattac catcactact acggtatgga cgtc

<210> 24
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
 <221> source
 <223> /注 = “人工序列的说明：合成肽”

<400> 24
 Thr Arg Gln Lys Gln Val Val Tyr Asn Tyr His His Tyr Tyr Gly Met
 1 5 10 15
 Asp Val

<210> 25
 <211> 366
 <212> DNA
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
 <221> source
 <223> /注 = “人工序列的说明：合成的
 CD28-HCVR-NA”

<400> 25
 cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 120
 ccaggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggatcac ccactacaac 180
 [0008] ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagatcca gttctccctg 240
 aagctgagtt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag atgggggggtt 300
 cggagggact actactacta cggtatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

<210> 26
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
 <221> source
 <223> /注 = “人工序列的说明：合成的
 CD28-HCVR-AA”

<400> 26
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr His Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

	50	55	60	
	Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Ile Gln Phe Ser Leu			
	65	70	75	80
	Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
		85	90	95
	Arg Trp Gly Val Arg Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp			
		100	105	110
	Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
		115	120	
	<210> 27			
	<211> 24			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)			
	<220>			
	<221> source			
	<223> /注 = “人工序列的说明: 合成的 CD28-HCDR1-NA”			
	<400> 27			
	ggtggctcca tcagtagtta ctac			24
[0009]	<210> 28			
	<211> 8			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)			
	<220>			
	<221> source			
	<223> /注 = “人工序列的说明: 合成的 CD28-HCDR1-AA”			
	<400> 28			
	Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr			
	1	5		
	<210> 29			
	<211> 21			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)			
	<220>			
	<221> source			
	<223> /注 = “人工序列的说明: 合成的 CD28-HCDR2-NA”			
	<400> 29			
	atctattaca gtgggatcac c			21
	<210> 30			
	<211> 7			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)			

<220>
 <221> source
 <223> /注 = “人工序列的说明：合成的
 CD28-HCDR2-AA”

<400> 30
 Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr
 1 5

<210> 31
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
 <221> source
 <223> /注 = “人工序列的说明：合成的
 CD28- HCDR3-NA”

<400> 31
 cgagatgggg ggttcggagg gactactact actacggtat ggacgtc 47

<210> 32
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

[0010] <220>
 <221> source
 <223> /注 = “人工序列的说明：合成的
 CD28- HCDR3-AA”

<400> 32
 Ala Arg Trp Gly Val Arg Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15

<210> 33
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
 <221> source
 <223> /注 = “人工序列的说明：合成的 10369N_VH(小鼠).mIgG1”

<400> 33
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60

	Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr	
	65 70 75 80	
	Leu Gln Phe Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85 90 95	
	Ala Ile Asn Phe Gly Ser Asn Tyr Asp Ala Ile Asp Tyr Trp Gly Gln	
	100 105 110	
	Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val	
	115 120 125	
	Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr	
	130 135 140	
	Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr	
	145 150 155 160	
	Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val	
	165 170 175	
	Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser	
	180 185 190	
	Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala	
	195 200 205	
[0011]	Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys	
	210 215 220	
	Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe	
	225 230 235 240	
	Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val	
	245 250 255	
	Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe	
	260 265 270	
	Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro	
	275 280 285	
	Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro	
	290 295 300	
	Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val	
	305 310 315 320	
	Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr	
	325 330 335	
	Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys	
	340 345 350	
	Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp	
	355 360 365	

Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser
385 390 395 400

Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala
405 410 415

Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His
420 425 430

His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 34

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> source

<223> /注 = “人工序列的说明：合成的 10369N_VK(小鼠).mk”

<400> 34

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

[0012] Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Ile
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ile Ile Asn Ser Val Glu Thr
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asp Ser Trp Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 35

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> source

<223> /注 = “人工序列的说明：合成的 14226P2_VH(人).hIgG4 隐形/星”

<400> 35

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

[0013] Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr His Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Ile Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Trp Gly Val Arg Arg Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
195 200 205

	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	
	210						215					220					
	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	
	225					230					235					240	
	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
					245					250					255		
	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	
					260					265					270		
	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	
					275					280				285			
	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	
		290					295					300					
	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	
	305					310					315					320	
	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	
					325					330					335		
	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	
					340					345					350		
[0014]	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	
			355					360					365				
	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	
		370					375					380					
	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	
	385					390					395					400	
	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	
					405					410					415		
	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	
					420				425					430			
	Leu	His	Asn	Arg	Phe	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	
			435					440					445				
	<210>	36															
	<211>	214															
	<212>	PRT															
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)															
	<220>																
	<221>	source															
	<223>	/注 = “人工序列的说明: 合成的 3-20 GL VK.h κ”															
	<400>	36															
	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
	1				5					10					15		

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 [0015] Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu
 210
 <210> 37
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <221> source
 <223> /注 = “人工序列的说明：合成的 10154P_VH(人).hIgG4 隐形”
 <400> 37
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

[0016]

Ser	Ala	Ile	Asn	Tyr	Arg	Ala	Ala	Asn	Thr	Trp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Asp	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Gln	Asp	Arg	Val	Ile	Ile	Lys	Asp	Tyr	Tyr	Val	Met	Asp	Val	Trp	100	105	110	
Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	115	120	125	
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	130	135	140	
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	145	150	155	160
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	165	170	175	
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	180	185	190	
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	195	200	205	
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	210	215	220	
Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	225	230	235	240
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	245	250	255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	260	265	270	
Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	275	280	285	
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	290	295	300	
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	305	310	315	320
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	325	330	335	
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	340	345	350	
Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys				

	355	360	365
	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
	370	375	380
	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
	385	390	395
	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser		
	405	410	415
	Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
	420	425	430
	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
	435	440	445
	<210> 38		
	<211> 215		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
	<220>		
	<221> source		
	<223> /注 = “人工序列的说明: 合成的 1-39 GL (PP) VK.h κ ”		
	<400> 38		
[0017]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
	1	5	10
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr		
	20	25	30
	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
	35	40	45
	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
	50	55	60
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
	65	70	75
	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro		
	85	90	95
	Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala		
	100	105	110
	Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser		
	115	120	125
	Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu		
	130	135	140
	Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser		
	145	150	155
	Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu		

	165	170	175
	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val		
	180	185	190
	Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys		
	195	200	205
	Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	210	215	
	<210> 39		
	<211> 454		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
	<220>		
	<221> source		
	<223> /注 = “人工序列的说明：合成的 VAC3B9_VH(人).hIgG4”		
	<400> 39		
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg		
	1	5	10
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr		
	20	25	30
	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35	40	45
[0018]	Ser Val Ile Ser Trp Asn Ser Asp Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val		
	50	55	60
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
	65	70	75
	Leu Gln Met His Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys		
	85	90	95
	Ala Lys Asp Asn His Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Gln Tyr		
	100	105	110
	Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala		
	115	120	125
	Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser		
	130	135	140
	Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe		
	145	150	155
	Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly		
	165	170	175
	Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu		
	180	185	190
	Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr		

	195	200	205
	Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg		
	210	215	220
	Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu		
	225	230	235 240
	Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
		245	250 255
	Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
		260	265 270
	Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
		275	280 285
	Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn		
		290	295 300
	Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp		
		305	310 315 320
	Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro		
		325	330 335
	Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
		340	345 350
[0019]	Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn		
		355	360 365
	Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
		370	375 380
	Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
		385	390 395 400
	Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg		
		405	410 415
	Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys		
		420	425 430
	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
		435	440 445
	Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
	450		
	<210> 40		
	<211> 450		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
	<220>		
	<221> source		
	<223> /注 = “人工序列的说明：合成的 FAAR9F07_VH(人).hIgG4 星”		

<400> 40
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Asn Ser Gly Tyr Gly His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ala Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 130 135 140
 [0020] Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 195 200 205
 Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
 210 215 220
 Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 [0021] 450
 <210> 41
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <221> source
 <223> /注 = “人工序列的说明: 合成的 FAAR9F07_VK(人).h κ ”
 <400> 41
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ile Asn Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 42
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

[0022]

<220>
 <221> source
 <223> /注 = “人工序列的说明：合成的 VAC3B9_VH(人).hIgG4 隐形”

<400> 42
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Ser Trp Asn Ser Asp Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met His Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Asn His Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Gln Tyr
 100 105 110
 Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120 125

	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	
	130						135					140					
	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	
	145					150					155					160	
	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	
					165					170						175	
	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	
				180					185					190			
	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	
			195					200						205			
	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	
	210						215					220					
	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	
	225					230				235						240	
	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	
					245					250					255		
	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	
				260					265						270		
[0023]	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	
			275					280					285				
	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	
	290						295					300					
	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	
	305					310					315					320	
	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	
					325					330					335		
	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	
				340					345						350		
	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	
		355						360					365				
	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	
		370					375					380					
	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	
	385					390					395					400	
	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	
					405					410					415		
	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	
				420					425					430			

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445

Leu Ser Leu Gly Lys
 450

<210> 43
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
 <221> source
 <223> /注 = “人工序列的说明：合成的 FAAR9F07_VH(人).hIgG4 隐形/星”

<400> 43
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

[0024] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Asn Ser Gly Tyr Gly His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ala Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 195 200 205
 Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
 210 215 220

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 [0025] Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440 445
 Lys
 <210> 44
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <221> source
 <223> /注 = “人工序列的说明: 合成的 FAAR9F07_VH(人).h κ”
 <400> 44
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Asn	
				20					25						30		
	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	
			35					40					45				
	Tyr	Gly	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	
		50					55					60					
	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	
	65					70					75					80	
	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Tyr	Ile	Asn	Trp	Pro	Leu	
					85					90					95		
	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	
				100					105					110			
	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	
			115					120					125				
	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	
			130				135					140					
	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	
	145					150					155					160	
[0026]	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	
					165					170					175		
	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	
				180					185					190			
	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	
			195					200					205				
	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys											
				210													
	<210>	45															
	<211>	447															
	<212>	PRT															
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)															
	<220>																
	<221>	source															
	<223>	/注 = “人工序列的说明: 合成的 1238N_VH(人).hIgG4”															
	<400>	45															
	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	
	1				5					10				15			
	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr	
				20					25				30				
	Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
		35					40						45				

[0027]

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys		
50	55	60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu		
65	70	75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala		
	85	90 95
Arg His Arg Val Thr Arg Thr Ala Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln		
	100	105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
	115	120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala		
	130	135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
145	150	155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
	165	170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
	180	185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys		
	195	200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro		
	210	215 220
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val		
225	230	235 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
	245	250 255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu		
	260	265 270
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
	275	280 285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
	290	295 300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
305	310	315 320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile		
	325	330 335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
	340	345 350
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		

	355	360	365
	Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
	370	375	380
	Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
	385	390	395 400
	Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
	405	410	415
	Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
	420	425	430
	His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
	435	440	445
	<210> 46		
	<211> 214		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
	<220>		
	<221> source		
	<223> /注 = “人工序列的说明: 合成的 1238N VK(人).h κ ”		
	<400> 46		
[0028]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
	1 5 10 15		
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr		
	20 25 30		
	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly Lys Ala Pro Lys Phe Leu Ile		
	35 40 45		
	Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly		
	50 55 60		
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
	65 70 75 80		
	Glu Asp Val Gly Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Gly Asp Leu Pro Tyr		
	85 90 95		
	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
	100 105 110		
	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
	115 120 125		
	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
	130 135 140		
	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
	145 150 155 160		
	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		

	165	170	175
	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
	180	185	190
	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
	195	200	205
	Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	210		
	<210> 47		
	<211> 450		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
	<220>		
	<221> source		
	<223> /注 = “人工序列的说明：合成的 11838P2_VH(人).hIgG4 隐形 (PSMA) ”		
	<400> 47		
	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg		
	1	5	10
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
	20	25	30
	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35	40	45
[0029]	Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Phe Tyr Ser Asp Ser Val		
	50	55	60
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Lys Met Leu Phe		
	65	70	75
	Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90	95
	Ala Arg Asp Gln Tyr Tyr Asp Phe Leu Thr Asp His Gly Val Phe Asp		
	100	105	110
	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys		
	115	120	125
	Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu		
	130	135	140
	Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro		
	145	150	155
	Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr		
	165	170	175
	Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val		
	180	185	190
	Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn		

	195	200	205
	Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser 210	215	220
	Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly 225	230	235 240
	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile 245	250	255
	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu 260	265	270
	Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His 275	280	285
	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg 290	295	300
	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys 305	310	315 320
	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu 325	330	335
	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr 340	345	350
[0030]	Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu 355	360	365
	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp 370	375	380
	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val 385	390	395 400
	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp 405	410	415
	Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His 420	425	430
	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu 435	440	445
	Gly Lys 450		
	<210> 48		
	<211> 448		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
	<220>		
	<221> source		
	<223> /注 = “人工序列的说明：合成的 14226P2_VH(人).hIgG4 隐形/星 (CD28)”		

<400> 48
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr His Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Ile Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Trp Gly Val Arg Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 130 135 140
 [0031] Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 210 215 220
 Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

[0032]

<210> 49
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <221> source
 <223> /注 = “人工序列的说明: 合成的 3-20 GL VK.h κ”

<400> 49
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 50

<211> 696

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> source

[0033] <223> /注 = “人工序列的说明：合成的 REGN5140 hCD22 ecto (D20-R687).mmH”

<400> 50

Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu Thr Leu Tyr Ala Trp
1 5 10 15

Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr Tyr Arg Ala Leu Asp Gly
20 25 30

Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr Asn Lys Asn
35 40 45

Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg Leu Tyr Glu Ser Thr Lys Asp Gly
50 55 60

Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly Asp Lys Asn
65 70 75 80

Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Leu Asn Asp Ser Gly
85 90 95

Gln Leu Gly Leu Arg Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg
100 105 110

Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His Ile Gln Leu
115 120 125

Pro Pro Glu Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu
130 135 140

	Asn	Phe	Ser	Cys	Tyr	Gly	Tyr	Pro	Ile	Gln	Leu	Gln	Trp	Leu	Leu	Glu	
	145					150					155					160	
	Gly	Val	Pro	Met	Arg	Gln	Ala	Ala	Val	Thr	Ser	Thr	Ser	Leu	Thr	Ile	
					165					170						175	
	Lys	Ser	Val	Phe	Thr	Arg	Ser	Glu	Leu	Lys	Phe	Ser	Pro	Gln	Trp	Ser	
				180					185						190		
	His	His	Gly	Lys	Ile	Val	Thr	Cys	Gln	Leu	Gln	Asp	Ala	Asp	Gly	Lys	
			195					200					205				
	Phe	Leu	Ser	Asn	Asp	Thr	Val	Gln	Leu	Asn	Val	Lys	His	Thr	Pro	Lys	
		210					215					220					
	Leu	Glu	Ile	Lys	Val	Thr	Pro	Ser	Asp	Ala	Ile	Val	Arg	Glu	Gly	Asp	
	225					230					235					240	
	Ser	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Glu	Val	Ser	Ser	Ser	Asn	Pro	Glu	Tyr	Thr	
					245					250						255	
	Thr	Val	Ser	Trp	Leu	Lys	Asp	Gly	Thr	Ser	Leu	Lys	Lys	Gln	Asn	Thr	
				260					265						270		
	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Arg	Glu	Val	Thr	Lys	Asp	Gln	Ser	Gly	Lys	Tyr	
			275					280					285				
[0034]	Cys	Cys	Gln	Val	Ser	Asn	Asp	Val	Gly	Pro	Gly	Arg	Ser	Glu	Glu	Val	
		290					295					300					
	Phe	Leu	Gln	Val	Gln	Tyr	Ala	Pro	Glu	Pro	Ser	Thr	Val	Gln	Ile	Leu	
	305					310					315					320	
	His	Ser	Pro	Ala	Val	Glu	Gly	Ser	Gln	Val	Glu	Phe	Leu	Cys	Met	Ser	
					325					330						335	
	Leu	Ala	Asn	Pro	Leu	Pro	Thr	Asn	Tyr	Thr	Trp	Tyr	His	Asn	Gly	Lys	
				340					345						350		
	Glu	Met	Gln	Gly	Arg	Thr	Glu	Glu	Lys	Val	His	Ile	Pro	Lys	Ile	Leu	
		355						360					365				
	Pro	Trp	His	Ala	Gly	Thr	Tyr	Ser	Cys	Val	Ala	Glu	Asn	Ile	Leu	Gly	
		370					375					380					
	Thr	Gly	Gln	Arg	Gly	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Asp	Val	Gln	Tyr	Pro	Pro	
	385					390					395					400	
	Lys	Lys	Val	Thr	Thr	Val	Ile	Gln	Asn	Pro	Met	Pro	Ile	Arg	Glu	Gly	
					405					410						415	
	Asp	Thr	Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ser	Asn	Pro	Ser	Val	
				420					425					430			
	Thr	Arg	Tyr	Glu	Trp	Lys	Pro	His	Gly	Ala	Trp	Glu	Glu	Pro	Ser	Leu	
			435					440					445				

	Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr Thr Ile Ala	
	450	455 460
	Cys Ala Ala Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro Val Ala Leu	
	465	470 475 480
	Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys Ile Lys Pro	
		485 490 495
	Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln Cys Asp Phe	
		500 505 510
	Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu Lys Asn Gly	
		515 520 525
	Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro	
		530 535 540
	Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln	
		545 550 555 560
	Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg	
		565 570 575
	Leu Arg Val Ser Met Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu Gly Lys Ser	
		580 585 590
[0035]	Ala Thr Leu Thr Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser His Tyr	
		595 600 605
	Thr Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro Tyr His Ser Gln Lys	
		610 615 620
	Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys	
		625 630 635 640
	Gln Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu	
		645 650 655
	Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Glu Gln Lys Leu	
		660 665 670
	Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu	
		675 680 685
	Asp Leu His His His His His His	
		690 695
	<210> 51	
	<211> 697	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> source	
	<223> /注 = “人工序列的说明: 合成的 REGN5280 mfCD22 ecto (D18-R686).mmH”	
	<400> 51	

[0036]

Asp	Ser	Ser	Lys	Trp	Asn	Ile	Glu	His	Pro	Gly	Thr	Ile	Tyr	Ala	Trp	1	5	10	15
Glu	Gly	Ala	Cys	Val	Trp	Val	Pro	Cys	Thr	Tyr	Arg	Val	Leu	Asp	Gly	20	25	30	
Ala	Leu	Glu	Thr	Phe	Ile	Leu	Phe	His	Asn	Pro	Glu	Tyr	Asn	Gln	Asn	35	40	45	
Met	Ser	Lys	Phe	Glu	Gly	Thr	Arg	Leu	Tyr	Glu	Ser	Thr	Lys	Asp	Gly	50	55	60	
Lys	Val	Pro	Ser	Gly	Gln	Lys	Arg	Val	Gln	Phe	Leu	Gly	Asn	Lys	Ile	65	70	75	80
Asn	Asn	Asn	Cys	Thr	Leu	Ser	Ile	His	Pro	Val	His	Val	Asn	Asp	Ser	85	90	95	
Gly	Gln	Leu	Gly	Leu	Arg	Met	Val	Ser	Lys	Thr	Glu	Lys	Trp	Met	Glu	100	105	110	
Arg	Ile	His	Leu	Asn	Val	Ser	Glu	Arg	Pro	Phe	Pro	Pro	Arg	Ile	Gln	115	120	125	
Leu	Pro	Pro	Lys	Leu	Gln	Glu	Ser	Gln	Glu	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Leu	130	135	140	
Leu	Asn	Phe	Ser	Cys	Tyr	Gly	Tyr	Gln	Ile	Gln	Leu	Gln	Trp	Leu	Leu	145	150	155	160
Glu	Gly	Ala	Pro	Met	Arg	Gln	Ala	Ala	Val	Thr	Leu	Thr	Ser	Leu	Ser	165	170	175	
Thr	Lys	Ser	Val	Phe	Thr	Arg	Ser	Glu	Leu	Lys	Phe	Ser	Pro	Gln	Trp	180	185	190	
Ser	His	His	Gly	Lys	Ile	Val	Thr	Cys	Glu	Leu	His	Asp	Val	Asp	Gly	195	200	205	
Lys	Val	Leu	Ser	Glu	Asp	Met	Val	Gln	Leu	Asn	Val	Lys	His	Thr	Pro	210	215	220	
Lys	Leu	Thr	Ile	Glu	Val	Thr	Pro	Asn	Glu	Thr	Ile	Val	Arg	Lys	Gly	225	230	235	240
Asp	Ser	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Lys	Val	Asn	Ser	Ser	Asn	Pro	Glu	Tyr	245	250	255	
Thr	Thr	Val	Ser	Trp	Leu	Lys	Asp	Gly	Ile	Leu	Leu	Lys	Glu	Gln	Asn	260	265	270	
Thr	Leu	Met	Leu	Thr	Leu	His	Lys	Val	Thr	Lys	Ser	Gln	Ser	Gly	Arg	275	280	285	
Tyr	Cys	Cys	Arg	Val	Ser	Asn	Asp	Val	Gly	Pro	Ala	Thr	Ser	Glu	Lys	290	295	300	
Val	Phe	Leu	Gln	Val	Gln	Tyr	Ala	Pro	Glu	Pro	Ser	Arg	Val	Gln	Ile				

305	310	315	320
Ser Gln Ser Pro Ala Val Glu Gly Ser Glu Val Asn Phe Leu Cys Ile			
325	330	335	
Ser Pro Ala Asn Pro Leu Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His Asn Gly			
340	345	350	
Lys Glu Val Gln Gly Arg Thr Glu Lys Gln Phe Gln Ile Gln Lys Ile			
355	360	365	
Leu Pro Trp His Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Glu Ala Glu Asn Ile Leu			
370	375	380	
Gly Ile Gly Glu Arg Gly Pro Gly Thr Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro			
385	390	395	400
Pro Lys Lys Val Thr Met Val Ile Glu Asn Pro Thr Pro Ile Arg Glu			
405	410	415	
Gly Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Ser Ser Ser Asn Pro Ile			
420	425	430	
Val Asn His Tyr Glu Trp Arg Pro Arg Gly Ala Trp Glu Glu Pro Ser			
435	440	445	
Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Ile Gly Trp Asn Asn Thr Ala Val			
450	455	460	
[0037] Ala Cys Ala Ala Cys Asn Asn Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro Val Thr			
465	470	475	480
Leu Asn Val Leu Tyr Ala Pro Arg Gly Val Arg Val Arg Lys Ile Lys			
485	490	495	
Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln Cys Asp			
500	505	510	
Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu Lys Asn			
515	520	525	
Gly Ser Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser			
530	535	540	
Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly			
545	550	555	560
Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg			
565	570	575	
Arg Leu Arg Val Ser Met Ser Gln Gly Asn Gln Val Met Glu Gly Lys			
580	585	590	
Thr Ala Thr Leu Thr Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Tyr Ser			
595	600	605	
Tyr Ala Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro Tyr Ser Gly Arg			
610	615	620	

Met Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp
625 630 635 640

Cys Gln Gly Thr Asn Arg Val Gly Lys Gly His Ser Pro Leu Ile Thr
645 650 655

Leu Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Gln Thr Ile Gly Arg Arg Glu Gln Lys
660 665 670

Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
675 680 685

Glu Asp Leu His His His His His His
690 695

<210> 52

<211> 696

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> source

<223> /注 = “人工序列的说明：合成的 REGN5281 mfCD22 ecto (D20-R687).mmH”

<400> 52

Asp Ser Ser Lys Trp Asn Ile Glu His Pro Gly Thr Ile Tyr Ala Trp
1 5 10 15

[0038] Glu Gly Ala Cys Val Trp Val Pro Cys Thr Tyr Arg Val Leu Asp Gly
20 25 30

Ala Leu Glu Thr Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr Asn Gln Asn
35 40 45

Met Ser Lys Phe Glu Gly Thr Arg Leu Tyr Glu Asn Thr Lys Asp Gly
50 55 60

Lys Leu Pro Ser Gly Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly Asn Lys Ile
65 70 75 80

Asn Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Val Asn Asp Ser Gly
85 90 95

Gln Leu Gly Leu Arg Met Val Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg
100 105 110

Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro Arg Ile Gln Leu
115 120 125

Pro Pro Lys Leu Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu
130 135 140

Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Gln Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu
145 150 155 160

Gly Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Ser Thr
165 170 175

	Lys	Ser	Val	Phe	Thr	Arg	Ser	Glu	Leu	Lys	Phe	Ser	Pro	Gln	Trp	Ser	
				180					185					190			
	His	His	Gly	Lys	Ile	Val	Thr	Cys	Glu	Leu	His	Asp	Val	Asp	Gly	Lys	
			195					200					205				
	Val	Leu	Ser	Glu	Asp	Met	Val	Gln	Leu	Asn	Val	Lys	His	Thr	Pro	Lys	
		210					215					220					
	Leu	Thr	Ile	Glu	Val	Thr	Pro	Asn	Glu	Thr	Thr	Val	Arg	Lys	Gly	Asp	
	225					230					235					240	
	Ser	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Lys	Val	Asn	Ser	Ser	Asn	Pro	Glu	Tyr	Thr	
				245					250						255		
	Thr	Val	Ser	Trp	Leu	Lys	Asp	Gly	Ile	Pro	Leu	Lys	Glu	Gln	Asn	Thr	
			260					265						270			
	Leu	Met	Leu	Thr	Leu	His	Lys	Val	Thr	Lys	Ser	Gln	Ser	Gly	Arg	Tyr	
		275					280					285					
	Cys	Cys	Arg	Val	Ser	Asn	Asp	Val	Gly	Pro	Ala	Thr	Ser	Glu	Lys	Val	
		290					295					300					
	Phe	Leu	Gln	Val	Gln	Tyr	Ala	Pro	Glu	Ser	Ser	Arg	Val	Gln	Ile	Ser	
	305				310					315					320		
[0039]	Gln	Ser	Pro	Ala	Val	Glu	Gly	Ser	Glu	Val	Asn	Phe	Leu	Cys	Ile	Ser	
				325					330					335			
	Pro	Ala	Asn	Pro	Leu	Pro	Thr	Asn	Tyr	Thr	Trp	Tyr	His	Asn	Gly	Lys	
			340					345					350				
	Glu	Val	Gln	Gly	Arg	Thr	Glu	Lys	Gln	Phe	Gln	Ile	Gln	Lys	Ile	Leu	
		355					360					365					
	Pro	Trp	His	Ala	Gly	Thr	Tyr	Ser	Cys	Glu	Ala	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	
		370				375					380						
	Ile	Gly	Glu	Arg	Gly	Pro	Gly	Thr	Glu	Leu	Asp	Val	Gln	Tyr	Pro	Pro	
	385				390					395					400		
	Lys	Lys	Val	Thr	Met	Val	Ile	Glu	Asn	Pro	Thr	Pro	Ile	Arg	Glu	Gly	
				405					410				415				
	Asp	Thr	Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Asn	Tyr	Ser	Ser	Ser	Asn	Pro	Ile	Val	
			420					425					430				
	Asn	His	Tyr	Glu	Trp	Arg	Pro	Arg	Gly	Ala	Trp	Glu	Glu	Pro	Ser	Leu	
			435				440					445					
	Gly	Val	Leu	Lys	Ile	Gln	Asn	Ile	Gly	Trp	Asn	Asn	Thr	Ala	Val	Ala	
		450				455					460						
	Cys	Ala	Ala	Cys	Asn	Asn	Trp	Cys	Ser	Trp	Ala	Ser	Pro	Val	Thr	Leu	
	465				470				475						480		

	Asn Val Leu Tyr Ala Pro Arg Gly Val Arg Val Arg Lys Ile Lys Pro	
	485	490 495
	Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln Cys Asp Phe	
	500	505 510
	Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu Lys Asn Gly	
	515	520 525
	Ser Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro	
	530	535 540
	Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln	
	545	550 555 560
	Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg	
	565	570 575
	Leu Arg Val Ser Met Ser Gln Gly Asn Gln Val Met Glu Gly Lys Thr	
	580	585 590
	Ala Thr Leu Ile Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Tyr Ser Tyr	
	595	600 605
	Ala Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro Tyr Ser Gly Arg Met	
	610	615 620
[0040]	Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys	
	625	630 635 640
	Gln Gly Thr Asn Arg Val Gly Lys Gly His Ser Pro Leu Ile Thr Leu	
	645	650 655
	Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Gln Thr Ile Gly Arg Arg Glu Gln Lys Leu	
	660	665 670
	Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu	
	675	680 685
	Asp Leu His His His His His His	
	690	695
	<210> 53	
	<211> 367	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> source	
	<223> /注 = “人工序列的说明: 合成的 REGN2012 hCD28 ecto (N19-P152).mFc”	
	<400> 53	
	Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr Asp Asn	
	1	5 10 15
	Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser Arg Glu	
	20	25 30

Phe	Arg	Ala	Ser	Leu	His	Lys	Gly	Leu	Asp	Ser	Ala	Val	Glu	Val	Cys
35						40						45			
Val	Val	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Ser	Gln	Gln	Leu	Gln	Val	Tyr	Ser	Lys	Thr
50						55						60			
Gly	Phe	Asn	Cys	Asp	Gly	Lys	Leu	Gly	Asn	Glu	Ser	Val	Thr	Phe	Tyr
65						70						75			
Leu	Gln	Asn	Leu	Tyr	Val	Asn	Gln	Thr	Asp	Ile	Tyr	Phe	Cys	Lys	Ile
			85						90						
Glu	Val	Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Leu	Asp	Asn	Glu	Lys	Ser	Asn	Gly
			100						105						
Thr	Ile	Ile	His	Val	Lys	Gly	Lys	His	Leu	Cys	Pro	Ser	Pro	Leu	Phe
			115						120						
Pro	Gly	Pro	Ser	Lys	Pro	Glu	Pro	Arg	Gly	Pro	Thr	Ile	Lys	Pro	Cys
130						135						140			
Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
145						150						155			
Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu	Ser
			165						170						
Pro	Ile	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp
			180						185						
Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln
195						200						205			
Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val	Ser
210						215						220			
Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys
225						230						235			
Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile
			245						250						
Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro
			260						265						
Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Met
275						280						285			
Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	Trp	Thr	Asn	Asn
290						295						300			
Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
305						310						315			
Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	Glu	Lys	Lys	Asn
			325						330						
Trp	Val	Glu	Arg	Asn	Ser	Tyr	Ser	Cys	Ser	Val	Val	His	Glu	Gly	Leu

	340	345	350
	His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys		
	355	360	365
	<210> 54		
	<211> 162		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
	<220>		
	<221> source		
	<223> /注 = “人工序列的说明: 合成的 REGN2011 hCD28 ecto (N19-P152).mmH”		
	<400> 54		
	Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr Asp Asn		
	1	5	10
	Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser Arg Glu		
	20	25	30
	Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu Val Cys		
	35	40	45
	Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser Lys Thr		
	50	55	60
	Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr Phe Tyr		
[0042]	65	70	75
	Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys Lys Ile		
	85	90	95
	Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly		
	100	105	110
	Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe		
	115	120	125
	Pro Gly Pro Ser Lys Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu		
	130	135	140
	Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His		
	145	150	155
	160		
	His His		
	<210> 55		
	<211> 159		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
	<220>		
	<221> source		
	<223> /注 = “人工序列的说明: 合成的 REGN3595 mCD28 ecto (N20-L150).mmH”		
	<400> 55		

```

Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Leu Leu Val Val Asp Ser Asn
1           5           10           15

Glu Val Ser Leu Ser Cys Arg Tyr Ser Tyr Asn Leu Leu Ala Lys Glu
          20           25           30

Phe Arg Ala Ser Leu Tyr Lys Gly Val Asn Ser Asp Val Glu Val Cys
          35           40           45

Val Gly Asn Gly Asn Phe Thr Tyr Gln Pro Gln Phe Arg Ser Asn Ala
          50           55           60

Glu Phe Asn Cys Asp Gly Asp Phe Asp Asn Glu Thr Val Thr Phe Arg
65           70           75           80

Leu Trp Asn Leu His Val Asn His Thr Asp Ile Tyr Phe Cys Lys Ile
          85           90           95

Glu Phe Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Arg Ser Asn Gly
          100          105          110

Thr Ile Ile His Ile Lys Glu Lys His Leu Cys His Thr Gln Ser Ser
          115          120          125

Pro Lys Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu
          130          135          140

[0043] Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
          145          150          155

<210> 56
<211> 847
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注 = “人工序列的说明：合成的人 CD22 氨基酸序列：登录号 CAA42006”

<400> 56
Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr Leu
1           5           10           15

Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu Thr Leu
          20           25           30

Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr Tyr Arg Ala
          35           40           45

Leu Asp Gly Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr
          50           55           60

Asn Lys Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg Leu Tyr Glu Ser Thr
65           70           75           80

Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly
          85           90           95

```

[0044]

Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Leu Asn	100	105	110
Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp	115	120	125
Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His	130	135	140
Ile Gln Leu Pro Pro Glu Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr	145	150	155
Cys Leu Leu Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp	165	170	175
Leu Leu Glu Gly Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser	180	185	190
Leu Thr Ile Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro	195	200	205
Gln Trp Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala	210	215	220
Asp Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His	225	230	235
Thr Pro Lys Leu Glu Ile Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val Arg	245	250	255
Glu Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser Asn Pro	260	265	270
Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser Leu Lys Lys	275	280	285
Gln Asn Thr Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr Lys Asp Gln Ser	290	295	300
Gly Lys Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val Gly Pro Gly Arg Ser	305	310	315
Glu Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala Pro Glu Pro Ser Thr Val	325	330	335
Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu Gly Ser Gln Val Glu Phe Leu	340	345	350
Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His	355	360	365
Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly Arg Thr Glu Glu Lys Val His Ile Pro	370	375	380
Lys Ile Leu Pro Trp His Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn	385	390	395
Ile Leu Gly Thr Gly Gln Arg Gly Pro Gly Ala Glu Leu Asp Val Gln			

	405	410	415
	Tyr Pro Pro Lys Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile 420	425	430
	Arg Glu Gly Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn 435	440	445
	Pro Ser Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu 450	455	460
	Pro Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr 465	470	475
	Thr Ile Ala Cys Ala Arg Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro 485	490	495
	Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys 500	505	510
	Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln 515	520	525
	Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu 530	535	540
	Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser 545	550	555
[0045]	Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser 565	570	575
	Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala 580	585	590
	Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu 595	600	605
	Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val 610	615	620
	Ser His Tyr Thr Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro His His 625	630	635
	Ser Gln Lys Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala 645	650	655
	Tyr Trp Cys Gln Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu 660	665	670
	Ser Thr Leu Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val 675	680	685
	Ala Val Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Ile Cys 690	695	700
	Gly Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly 705	710	715
			720

Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys Lys
725 730 735

Val Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly Cys Tyr
740 745 750

Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Thr Leu Arg Phe Pro
755 760 765

Glu Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Ser Ser Glu Met Gln
770 775 780

Arg Pro Pro Arg Thr Cys Asp Asp Thr Val Thr Tyr Ser Ala Leu His
785 790 795 800

Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val Ile Pro Asp Phe Pro Glu
805 810 815

Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu
820 825 830

Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val Asp Tyr Val Ile Leu Lys His
835 840 845

<210> 57

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

[0046]

<220>

<221> source

<223> /注 = “人工序列的说明：由 REGN5837 (mAb33037P2) 结合的 CD22 的合成表位”

<400> 57

Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys Ile Lys Pro
1 5 10 15

Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser
20 25

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> source

<223> /注 = “人工序列的说明：由 REGN5837 (mAb33037P2) 结合的 CD22 的合成表位”

<400> 58

Phe Trp Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn
1 5 10 15

Phe

<210> 59

<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注 = “人工序列的说明：由 REGN58378 (mAb33041P2) 结合的 CD22 的合成表位”

<400> 59
Cys Glu Val Ser Ser Ser Asn Pro Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu
1 5 10 15

Lys Asp Gly Thr Ser Leu Lys Lys Gln Asn Thr Phe Thr Leu Asn Leu
 20 25 30

<210> 60
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> 注 = “人工序列的说明：合成的 6xHis 标签”

<400> 60
His His His His His His
1 5

[0047] <210> 61

<400> 61
000

<210> 62

<400> 62
000

<210> 63

<400> 63
000

<210> 64

<400> 64
000

<210> 65

<400> 65
000

<210> 66

<400> 66
000

[0048]

<210> 67

<400> 67
000

<210> 68

<400> 68
000

<210> 69

<400> 69
000

<210> 70

<400> 70
000

<210> 71

<400> 71
000

<210> 72

<400> 72
000

<210> 73

<400> 73
000

<210> 74

<211> 220

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 74

Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val
1 5 10 15Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr
20 25 30Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser
35 40 45Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu
50 55 60Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser
65 70 75 80Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr
85 90 95

[0049]

Phe	Tyr	Leu	Gln	Asn	Leu	Tyr	Val	Asn	Gln	Thr	Asp	Ile	Tyr	Phe	Cys
		100						105					110		
Lys	Ile	Glu	Val	Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Leu	Asp	Asn	Glu	Lys	Ser
		115					120					125			
Asn	Gly	Thr	Ile	Ile	His	Val	Lys	Gly	Lys	His	Leu	Cys	Pro	Ser	Pro
		130				135					140				
Leu	Phe	Pro	Gly	Pro	Ser	Lys	Pro	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly
145					150					155					160
Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile
			165						170					175	
Phe	Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met
		180						185					190		
Asn	Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro
		195					200					205			
Tyr	Ala	Pro	Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser				
	210					215					220				

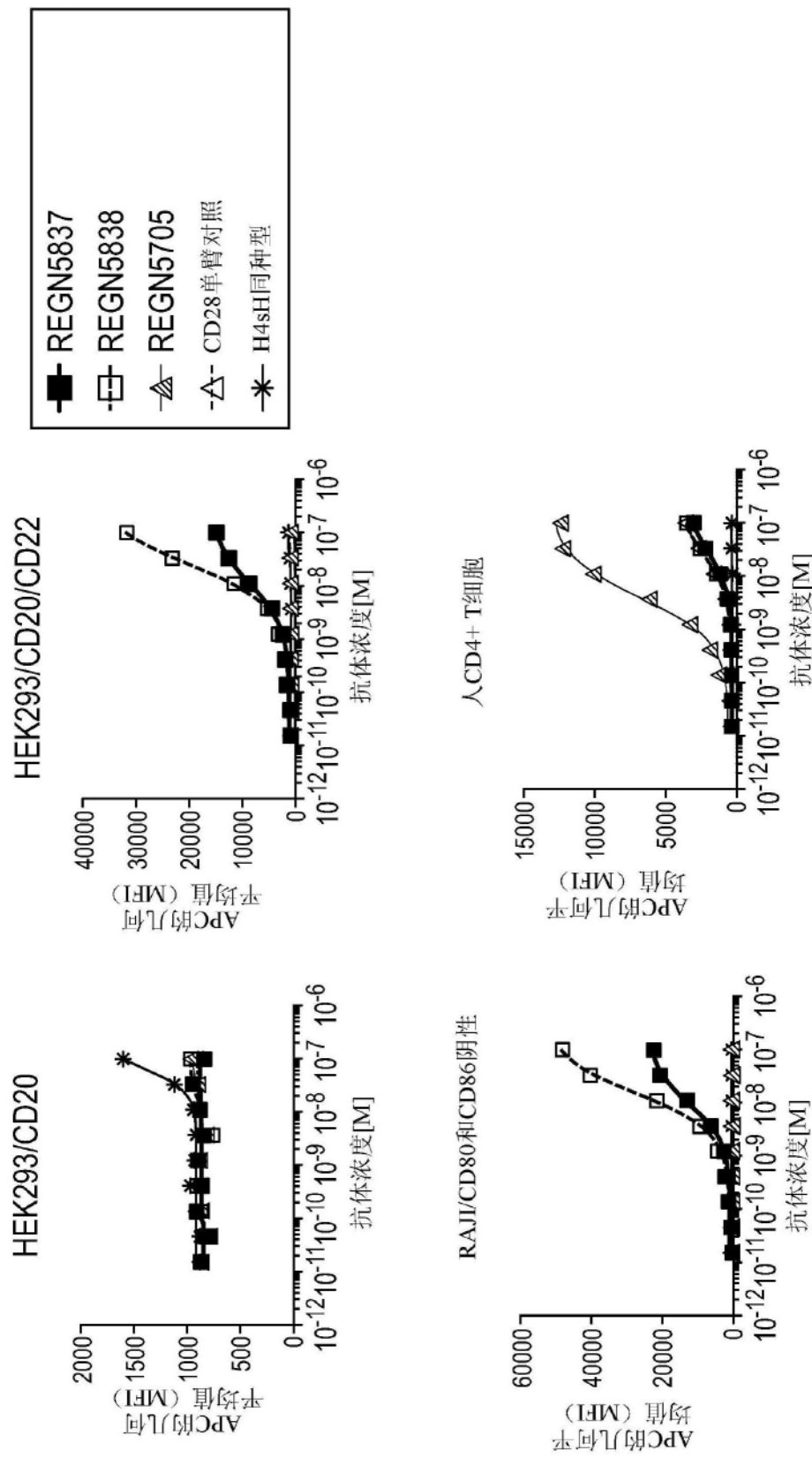


图1

CD28双特异性抗体在原代T细胞刺激和CD22靶表达存在的情况下增加荧光素酶的产生。

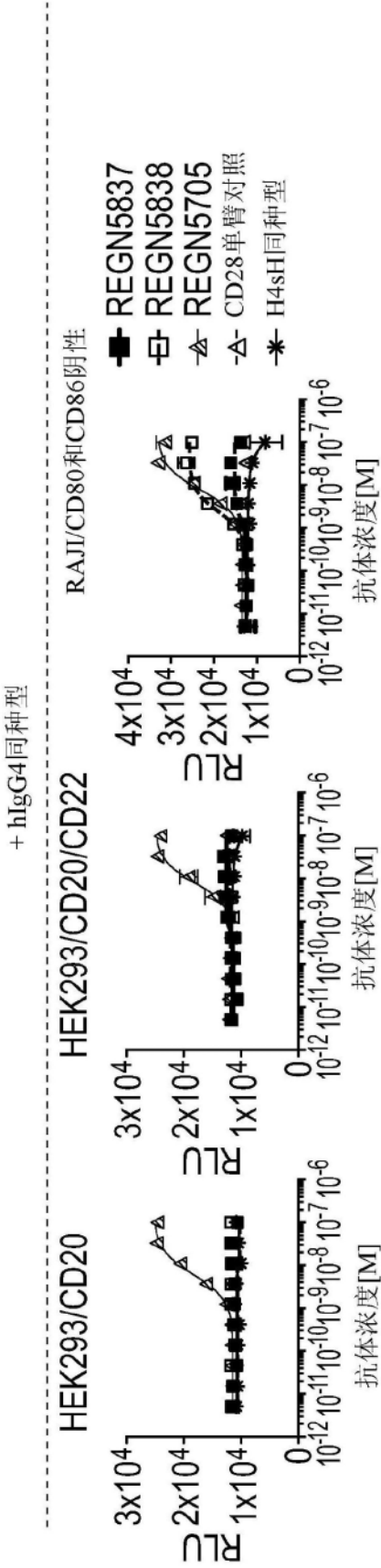


图2A

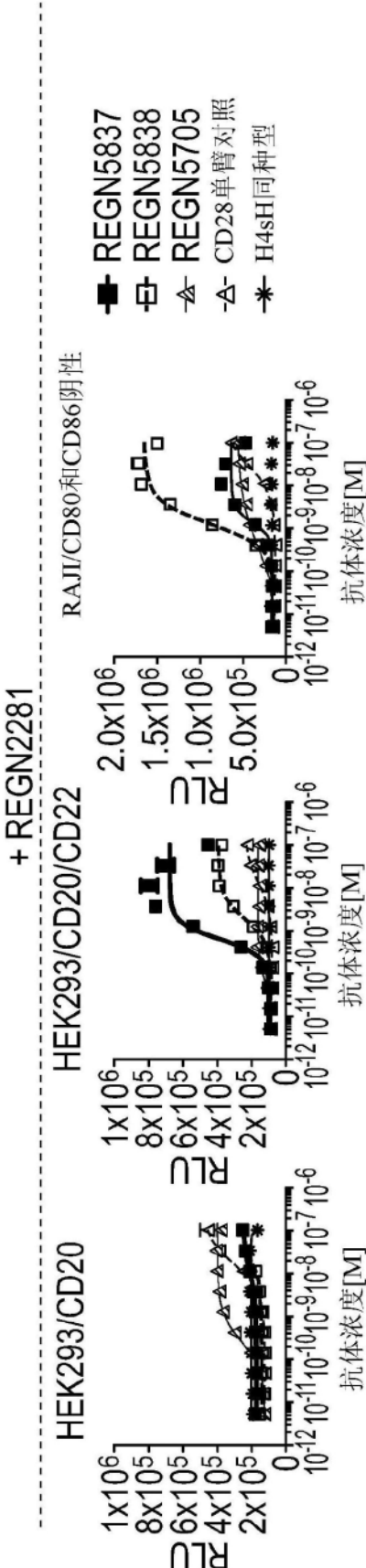


图2B

CD28双特异性抗体在原代T细胞刺激和CD22靶标表达存在的情况下增加IL-2的产生。

+ hlgG4同种型

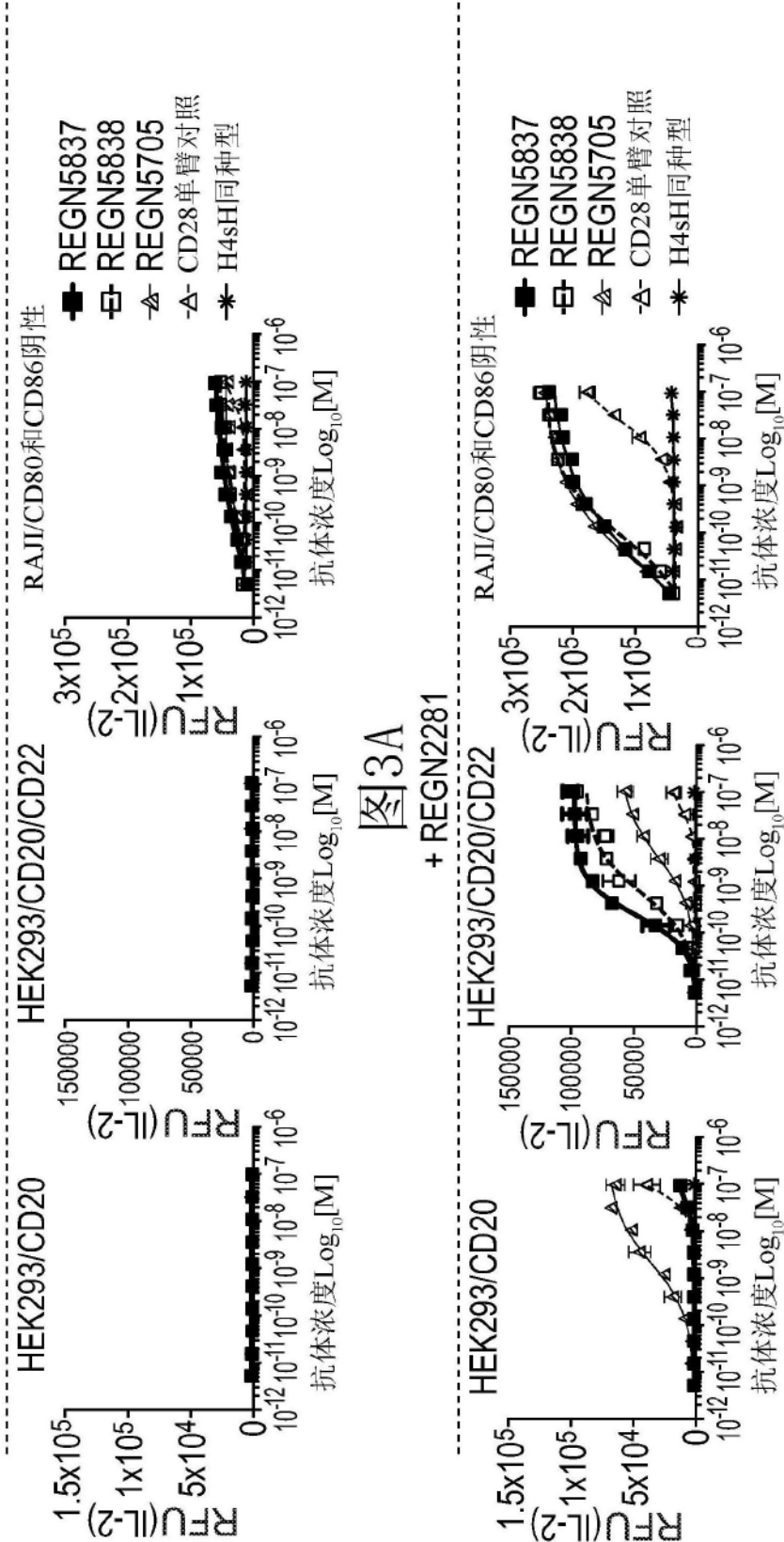
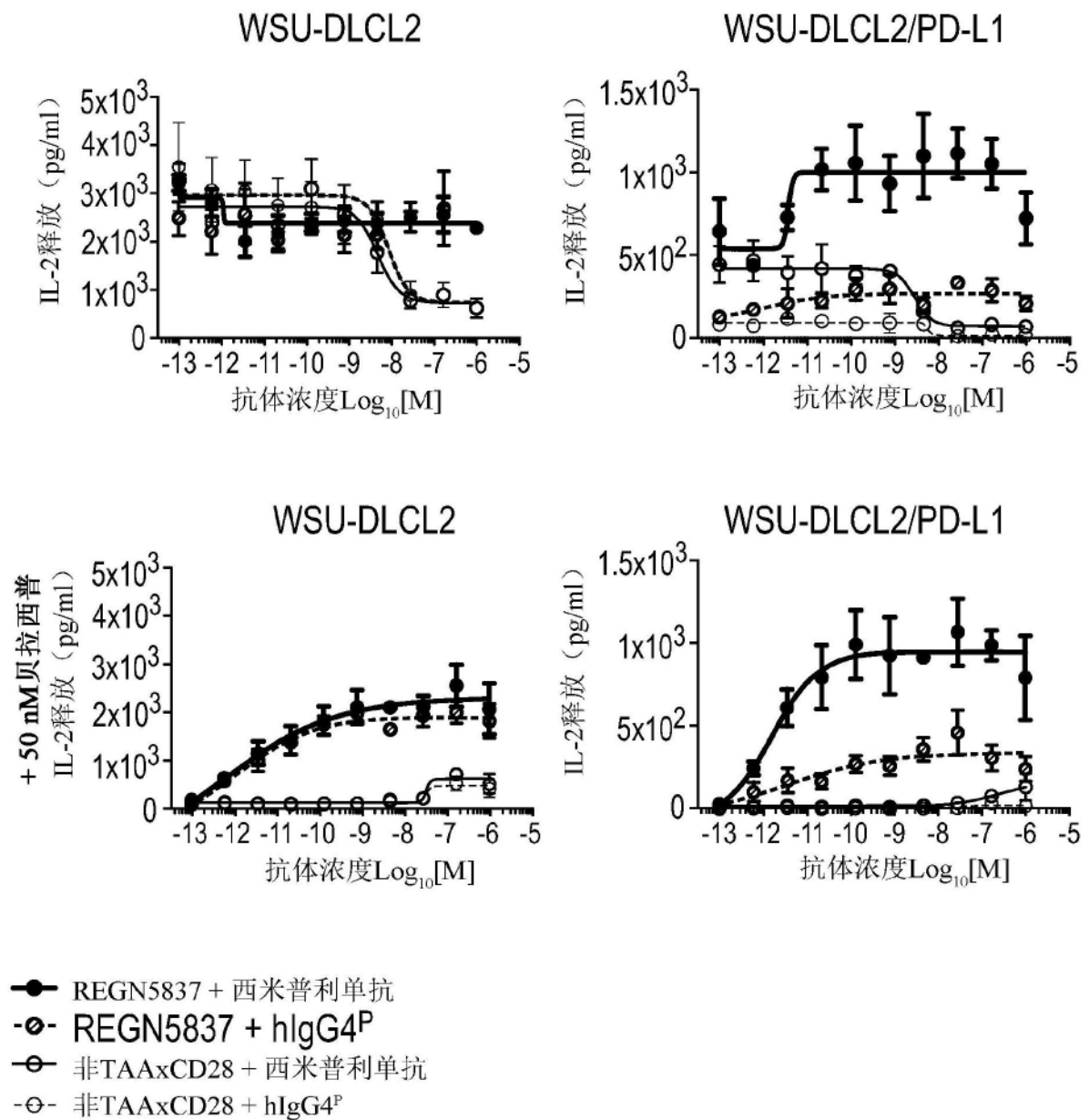


图3A
+ REGN2281

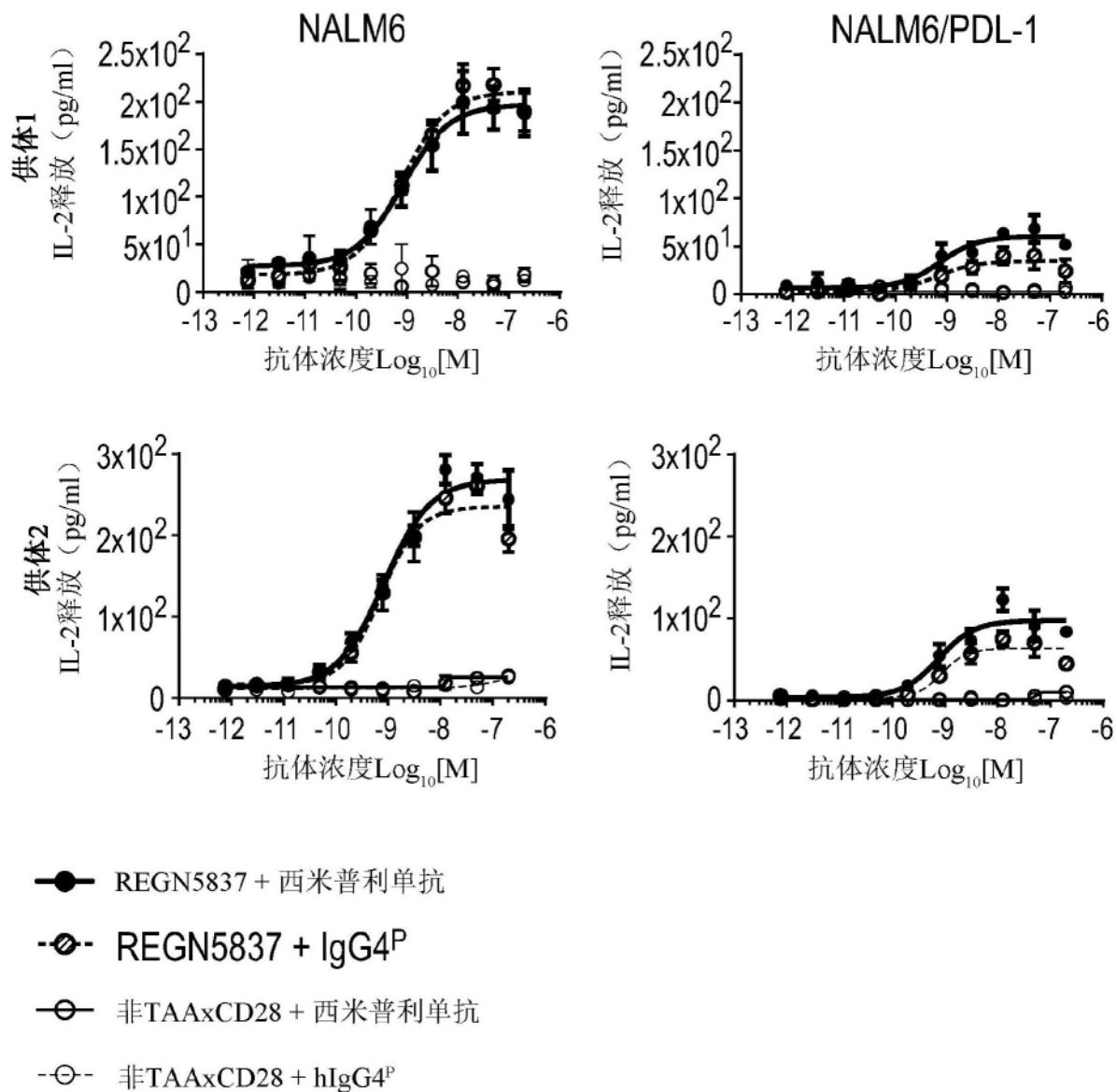
图3B



REGN5837 + 西米普利单抗的组合在表达PD-L1的WSU-DLCL2存在的情况下增强最大IL-2释放，在贝拉西普存在的情况下最显著。

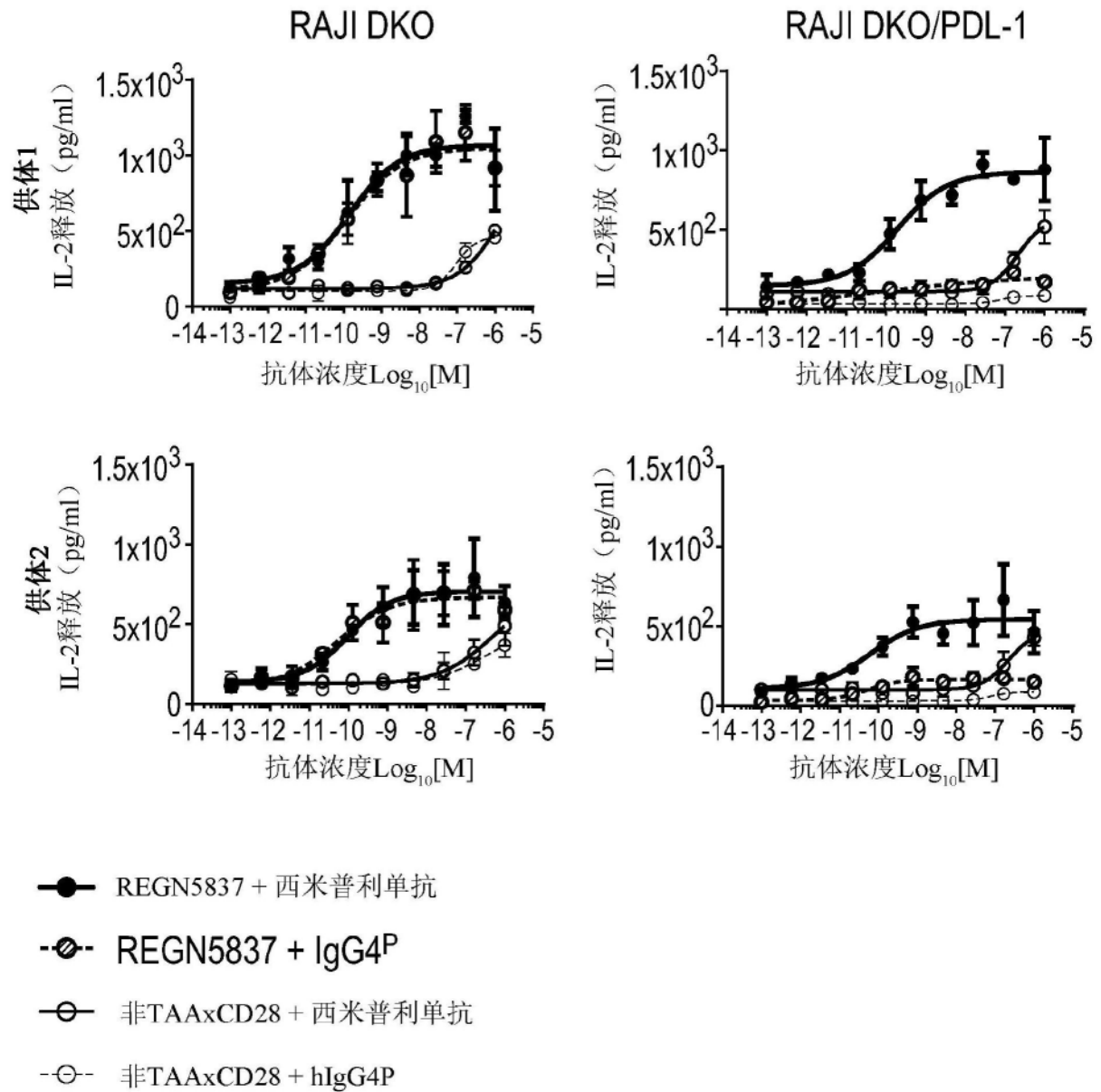
图4

IL-2释放



REGN5837与西米普利单抗的组合在工程化以表达PD-L1的NALM6细胞中使IL-2释放增强超过单独的REGN5837治疗

图5A



REGN5837与西米普利单抗的组合在工程化以表达PD-L1的RAJI细胞中使IL-2释放增强超过单独的REGN5837治疗

图5B

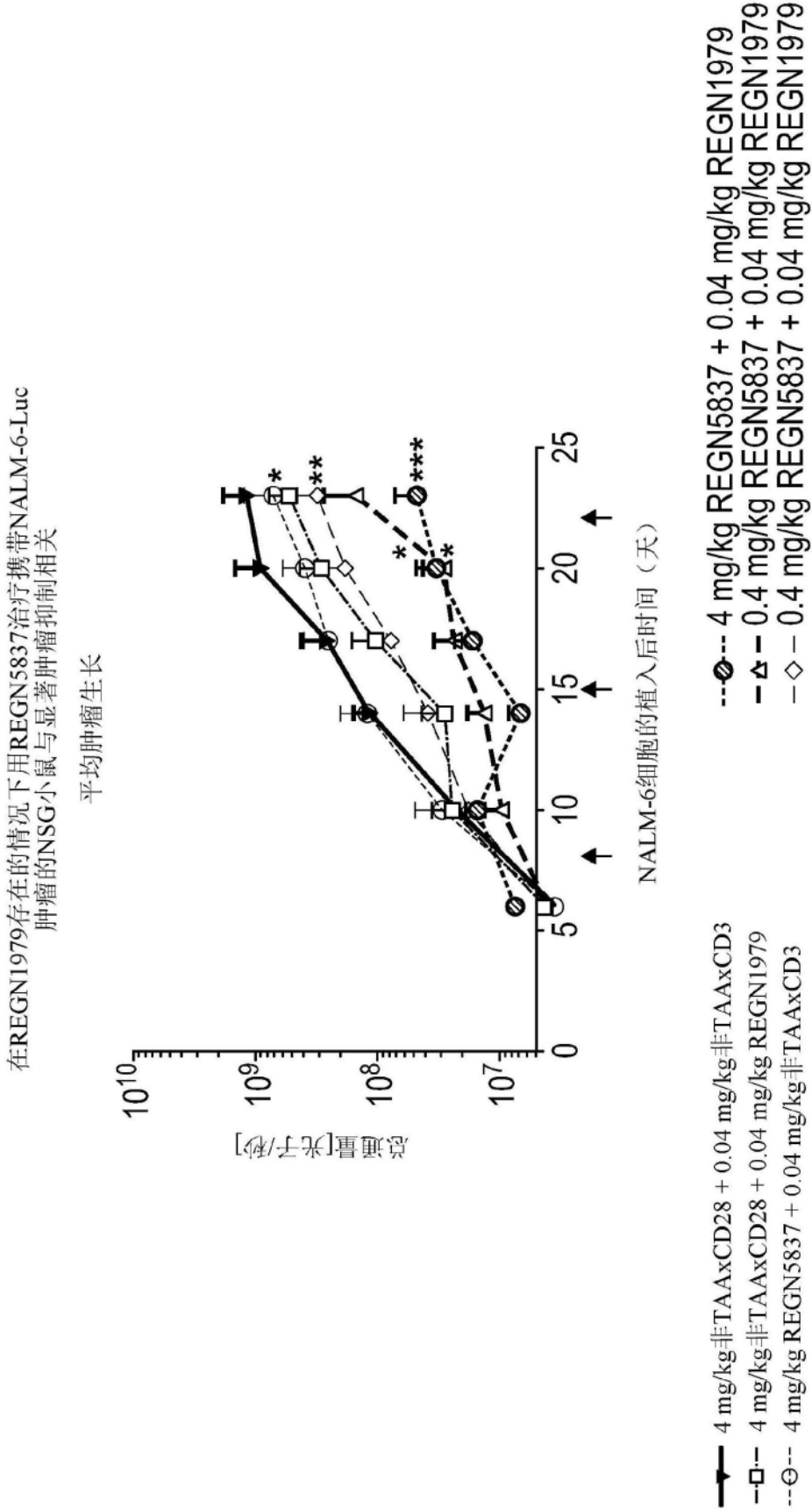


图6

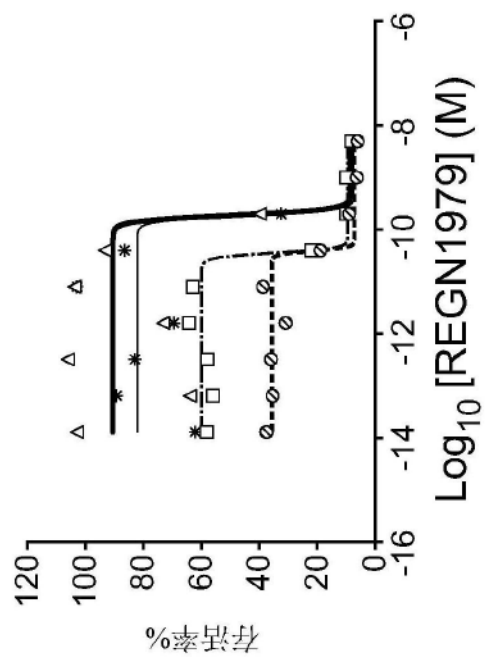


图7A

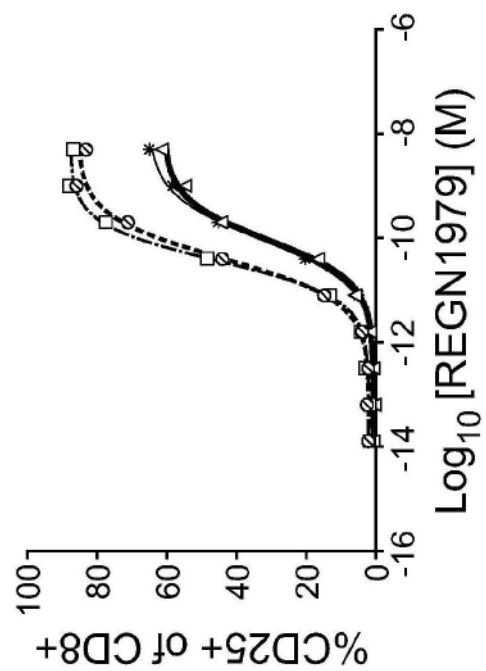


图7B

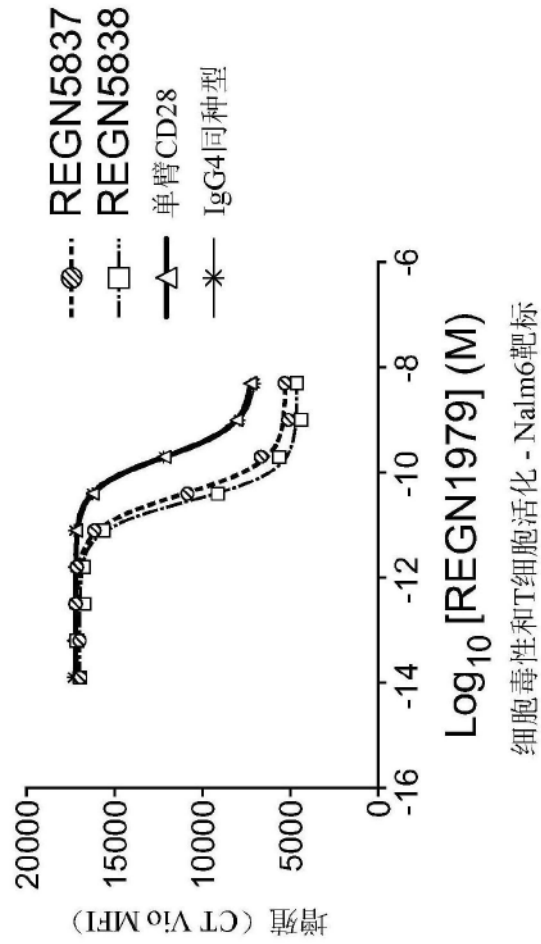


图7C

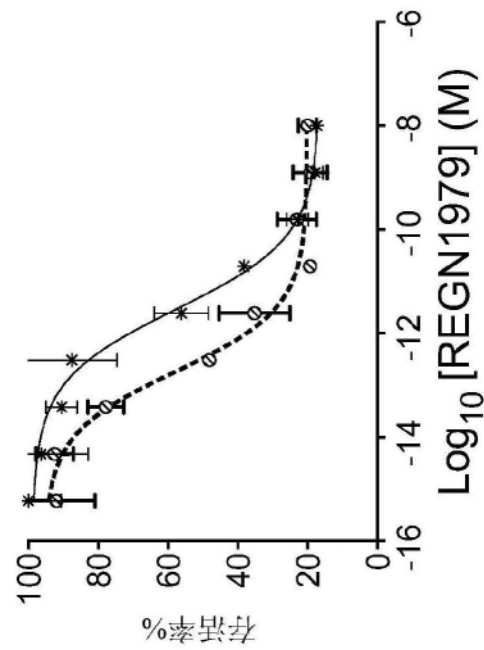


图8A

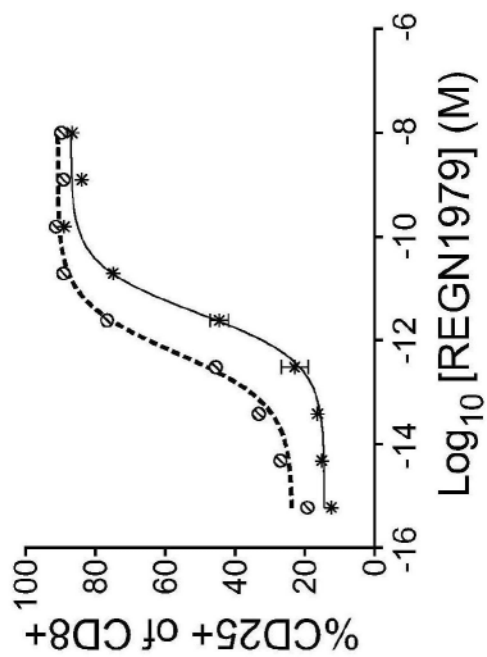


图8B

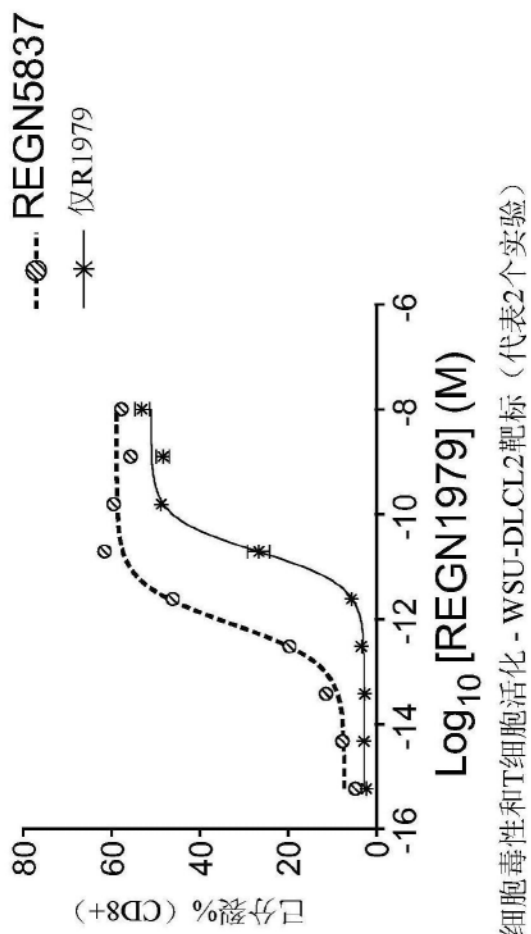
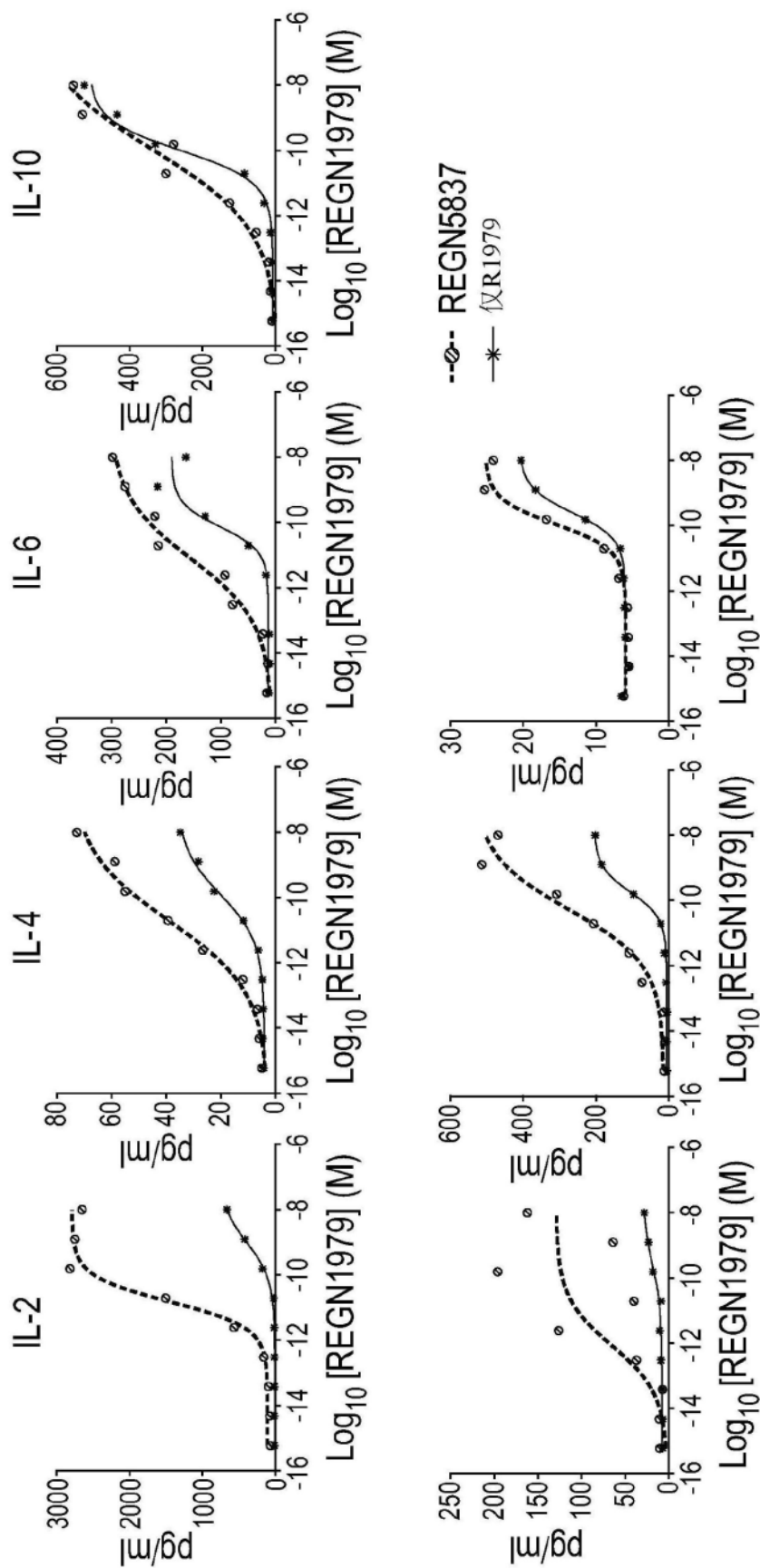


图8C



来自WSU-DLCL2细胞毒性测定的细胞因子释放（代表2个实验）

图9

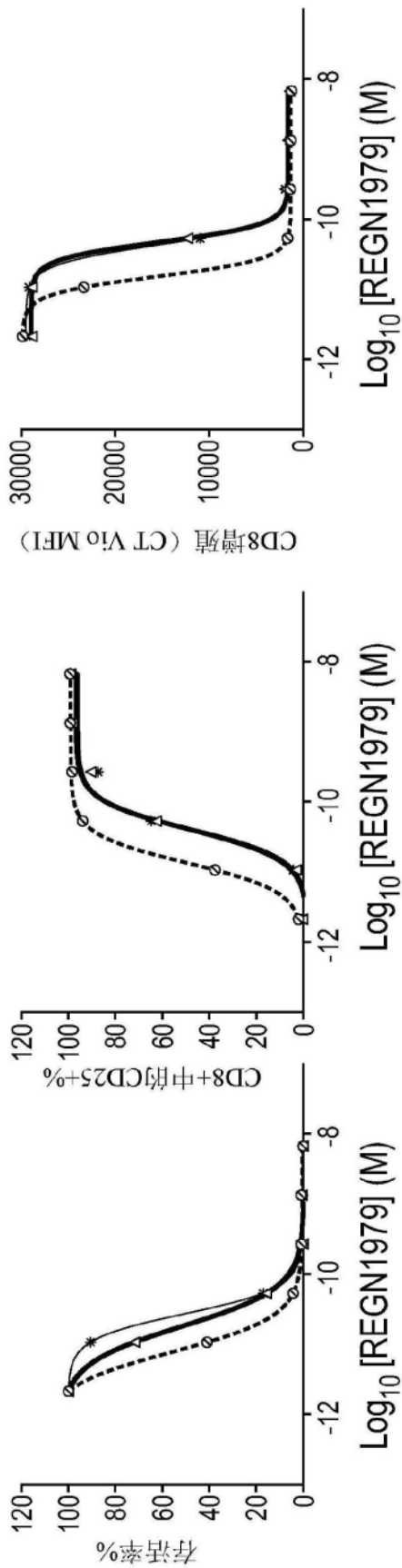


图10A

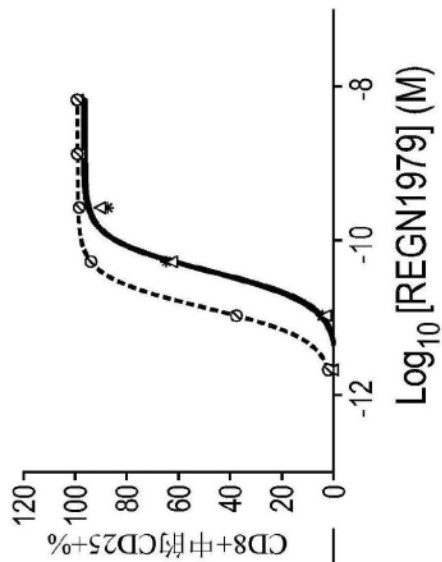


图10B

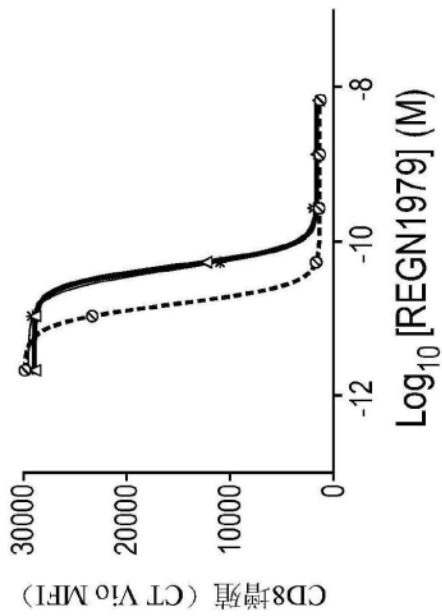


图10C

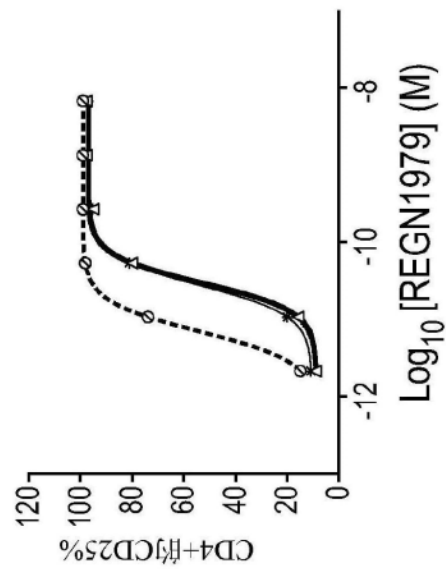
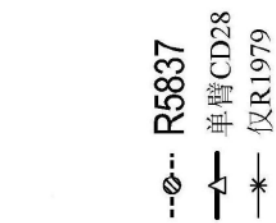


图10D

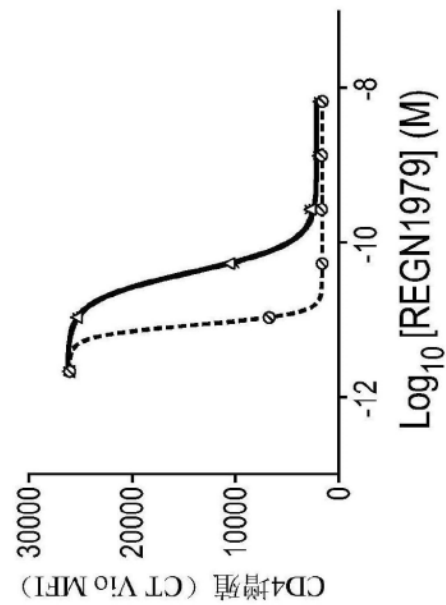


图10E

细胞毒性、T细胞活化和增殖

REGN5837以浓度依赖性方式增强REGN1979介导的细胞毒性、CD25的细胞表面表达和T细胞增殖的效力

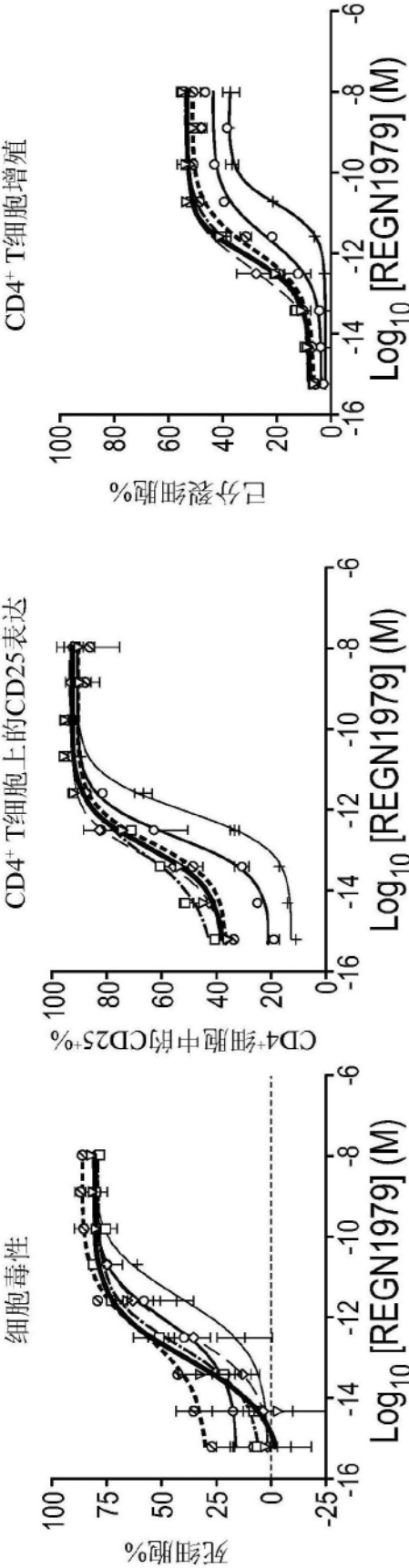


图11A

图11B

图11C

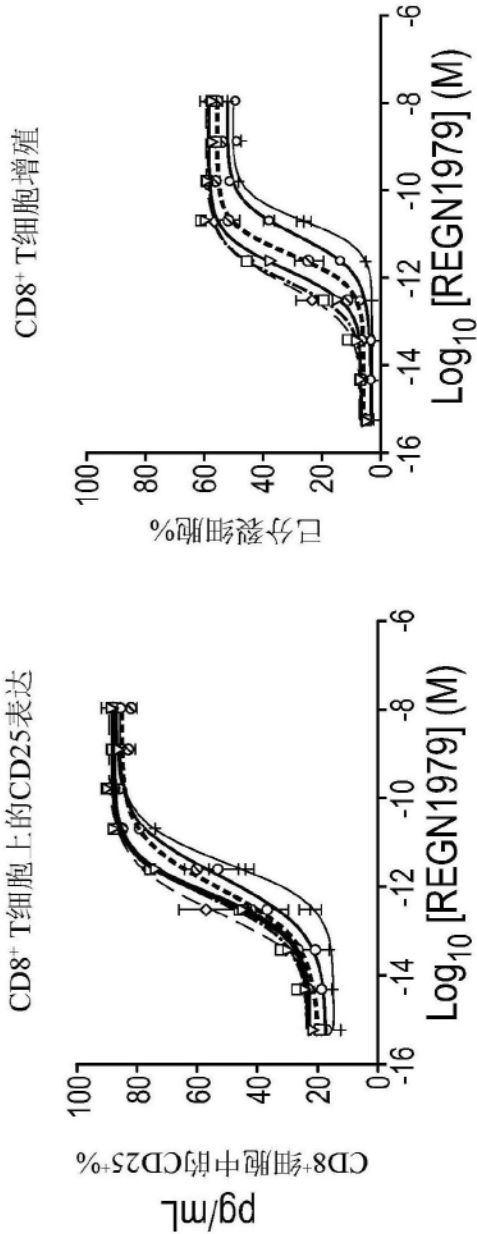


图11D

图11E

在WSU-DLCL2 B细胞淋巴瘤细胞存在的情况下，REGN5837以浓度依赖性方式增强REGN1979介导的来自人T细胞的细胞因子释放的效力和最大水平

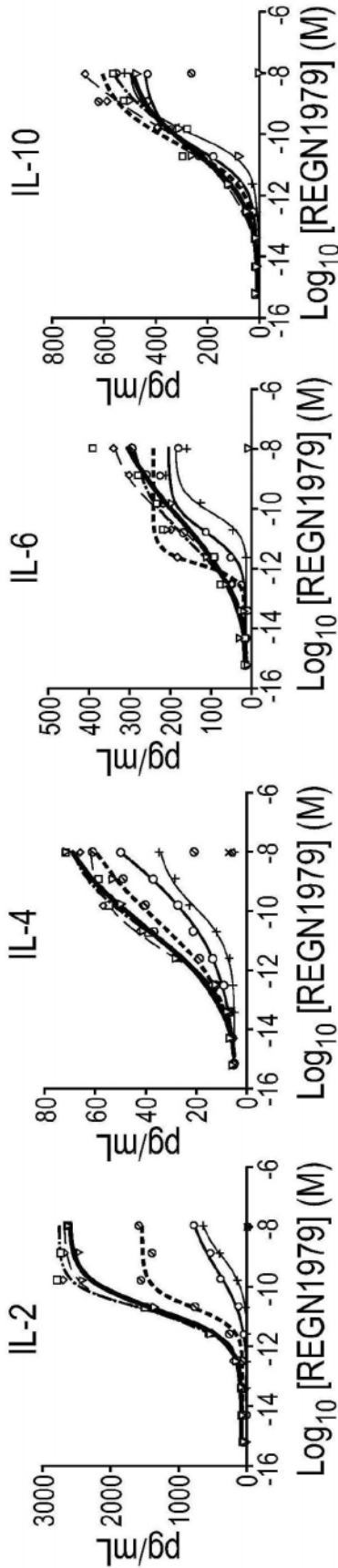


图12A

图12B

图12C

图12D

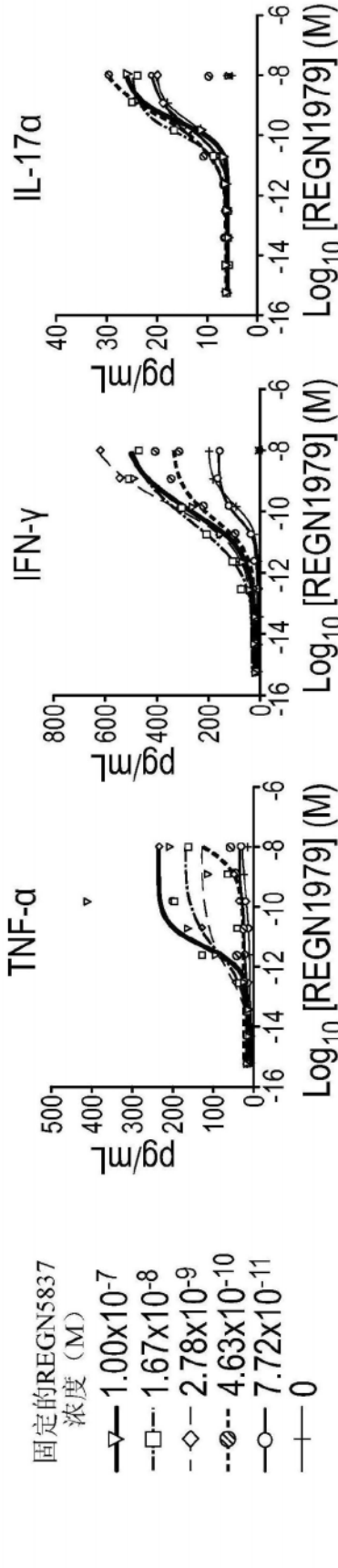


图12E

图12F

图12G

固定的REGN5837
浓度 (M)
—△— 1.00x10⁻⁷
-□- 1.67x10⁻⁸
-◇- 2.78x10⁻⁹
-●- 4.63x10⁻¹⁰
-○- 7.72x10⁻¹¹
-+ 0

在次有效剂量的REGN1979存在的情况下用REGN5837治疗
携带WSU-DLCL2肿瘤的小鼠与显著肿瘤抑制相关

平均肿瘤生长

0.4 mg/kg REGN1979

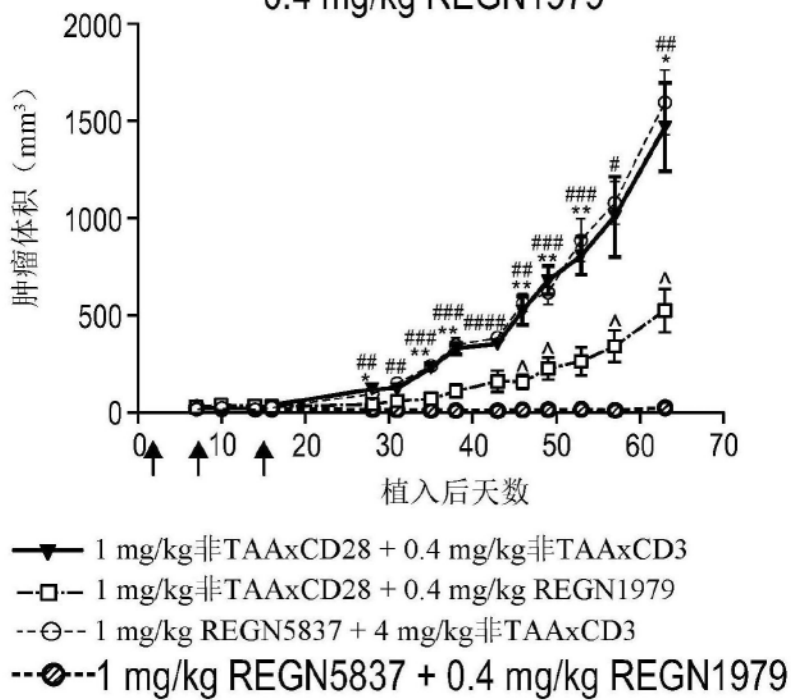


图13A

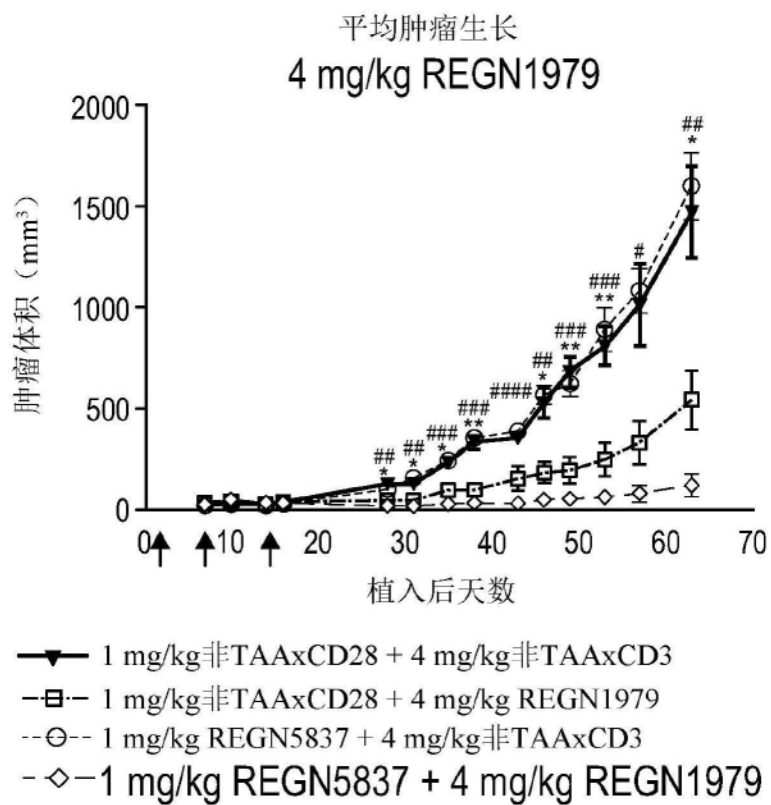


图13B

在次有效剂量的REGN1979存在的情况下用REGN5837治疗携带WSU-DLCL2肿瘤的NSG小鼠与比REGN5837或REGN1979单一疗法显著更大的存活率相关

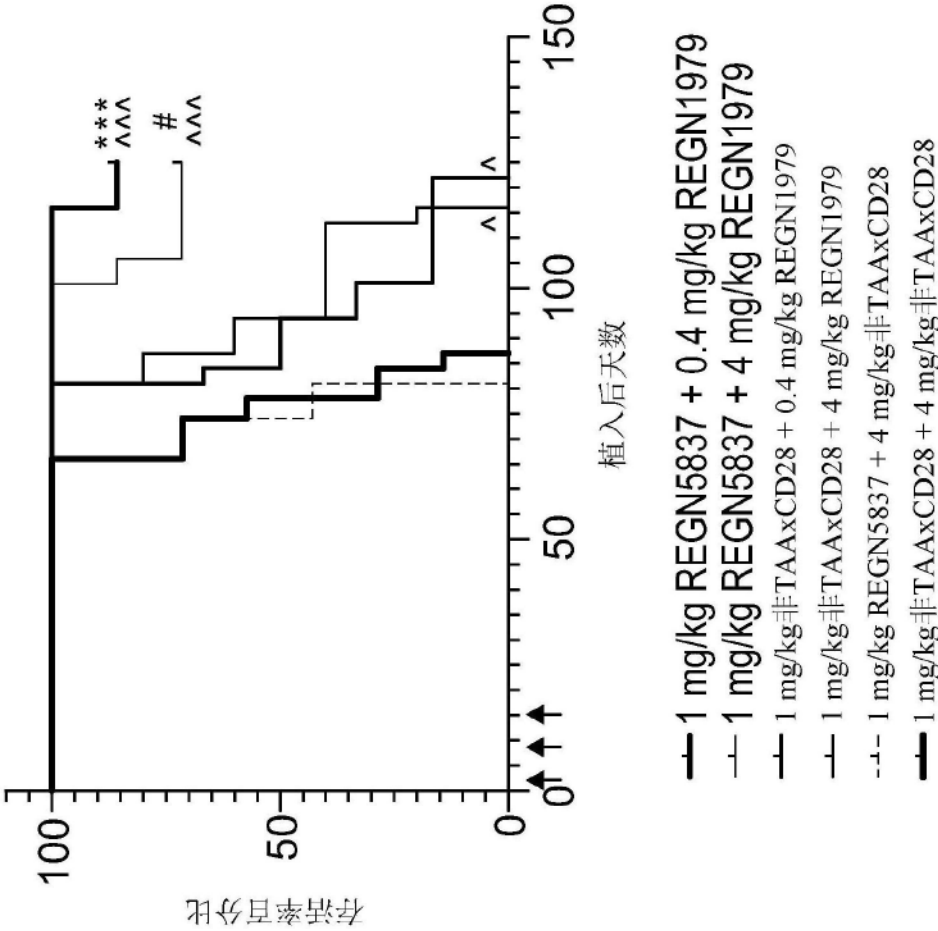


图14