



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 113166268 B

(45) 授权公告日 2024. 07. 30

(21) 申请号 201980080509.2

(22) 申请日 2019.12.18

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 113166268 A

(43) 申请公布日 2021.07.23

(30) 优先权数据  
62/782,142 2018.12.19 US  
62/815,861 2019.03.08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2021.06.04

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2019/067109 2019.12.18

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02020/132024 EN 2020.06.25

(73) 专利权人 瑞泽恩制药公司  
地址 美国纽约州

(72) 发明人 A·J·墨菲 D·斯科克斯  
J·韦特 E·乌尔曼 A·赫尔曼

E·史密斯 L·哈伯  
G·D·扬科普洛斯 A·克劳福德

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所  
11247  
专利代理师 张莉 黄革生

(51) Int.Cl.  
C07K 16/30 (2006.01)  
C07K 16/28 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件  
US 2018112001 A1,2018.04.26  
C Renner,et al.Cure of xenografted  
human tumors by bispecific monoclonal  
antibodies and human T  
cells.Science.1994,第264卷(第5160期),第  
833-835页.

审查员 李雪莹

权利要求书2页 说明书63页  
序列表21页 附图24页

(54) 发明名称

双特异性抗MUC16 X抗CD28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MUC16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MUC16的肿瘤,如卵巢肿瘤的生长。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。

1. 一种分离的双特异性抗体,其包括:

a) 第一抗原结合结构域,所述第一抗原结合结构域结合人CD28,并包括:包含分别由SEQ ID NO: 20、22、24的氨基酸序列组成的HCDR1、HCDR2和HCDR3结构域的重链可变区(HCVR),和包含分别由SEQ ID NO: 12、14、16的氨基酸序列组成的LCDR1、LCDR2和LCDR3结构域的轻链可变区(LCVR);以及

b) 第二抗原结合结构域,所述第二抗原结合结构域特异性地结合人粘蛋白16膜抗原(MUC16),并包括:包含分别由SEQ ID NO: 4、6、8的氨基酸序列组成的HCDR1、HCDR2和HCDR3结构域的重链可变区(HCVR),和包含分别由SEQ ID NO: 12、14、16的氨基酸序列组成的LCDR1、LCDR2和LCDR3结构域的轻链可变区(LCVR)。

2. 一种分离的双特异性抗体,其包括:

a) 第一抗原结合结构域,所述第一抗原结合结构域结合人CD28,并包括:包含分别由SEQ ID NO: 44、46、48的氨基酸序列组成的HCDR1、HCDR2和HCDR3结构域的重链可变区(HCVR),和包含分别由SEQ ID NO: 36、38、40的氨基酸序列组成的LCDR1、LCDR2和LCDR3结构域的轻链可变区(LCVR);以及

b) 第二抗原结合结构域,所述第二抗原结合结构域特异性地结合人粘蛋白16膜抗原(MUC16),并包括:包含分别由SEQ ID NO: 28、30、32的氨基酸序列组成的HCDR1、HCDR2和HCDR3结构域的重链可变区(HCVR),和包含分别由SEQ ID NO: 36、38、40的氨基酸序列组成的LCDR1、LCDR2和LCDR3结构域的轻链可变区(LCVR)。

3. 根据权利要求1所述的分离的双特异性抗体,其包括:

a) 第一抗原结合结构域,所述第一抗原结合结构域结合人CD28,并包括SEQ ID NO: 18的氨基酸序列的HCVR和SEQ ID NO: 10的氨基酸序列的LCVR;以及

b) 第二抗原结合结构域,所述第二抗原结合结构域特异性地结合MUC16,并包括SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的HCVR 和SEQ ID NO: 10的氨基酸序列的LCVR。

4. 根据权利要求2所述的分离的双特异性抗体,其包括:

a) 第一抗原结合结构域,所述第一抗原结合结构域结合人CD28,并包括SEQ ID NO: 42的氨基酸序列的HCVR和SEQ ID NO: 34的氨基酸序列的LCVR;以及

b) 第二抗原结合结构域,所述第二抗原结合结构域特异性地结合MUC16,并包括SEQ ID NO: 26的氨基酸序列的HCVR 和SEQ ID NO: 34的氨基酸序列的LCVR。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的分离的双特异性抗体,其中

(a) 所述双特异性抗体以通过体外FACS结合测定所测量的小于 $10^{-5}$  M的 $EC_{50}$ 与人T细胞表面结合;

(b) 所述双特异性抗体以通过体外FACS结合测定所测量的小于 $6 \times 10^{-6}$  M的 $EC_{50}$ 与猕猴T细胞表面结合;

(c) 所述双特异性抗体以通过体外FACS结合测定所测量的小于 $10^{-9}$  M的 $EC_{50}$ 与表达MUC16的细胞系的表面结合;或

(d) 当结合抗MUC16xCD3双特异性抗体使用并在表达MUC16的靶细胞上测试时,所述双特异性抗体展现出共刺激效应。

6. 根据权利要求1-4中任一项所述的分离的双特异性抗体,其中所述双特异性抗体包含人IgG重链恒定区。

7. 根据权利要求6所述的分离的双特异性抗体,其中所述双特异性抗体的人IgG重链恒定区是同种型IgG1。

8. 根据权利要求6所述的分离的双特异性抗体,其中所述双特异性抗体的人IgG重链恒定区是同种型IgG4。

9. 根据权利要求6所述的分离的双特异性抗体,其包含第一重链和第二重链,其中所述第一重链包含第一CH3结构域且第二重链包含第二CH3结构域,其中所述第一CH3结构域或第二CH3结构域,但非两者,包含根据EU编号的H435R修饰和根据EU编号的Y436F修饰。

10. 根据权利要求6所述的分离的双特异性抗体,其中所述双特异性抗体包含改变Fc受体结合的嵌合铰链。

11. 一种药物组合物,其包括根据权利要求1到10中任一项所述的双特异性抗体和药学上可接受的载体或稀释剂。

12. 一种核酸分子,其包括对根据权利要求1到10中任一项所述的双特异性抗体进行编码的核苷酸序列。

13. 一种表达载体,其包括根据权利要求12所述的核酸分子。

14. 一种宿主细胞,其包括根据权利要求13所述的表达载体。

15. 一组核酸分子,其包含分别编码根据权利要求1-10中任一项的双特异性抗体分子的第一抗原结合结构域的HCVR、第二抗原结合结构域的HCVR、以及第一和第二抗原结合结构域的LCVR的核苷酸序列。

16. 分别包含权利要求15中所述的一组核酸分子的一组表达载体。

17. 包含权利要求1-10中任一项的双特异性抗体、权利要求15中所述的一组核酸分子、或权利要求16中所述的一组表达载体的宿主细胞。

18. 产生双特异性抗体的方法,包括在允许所述双特异性抗体产生的条件下培养权利要求17的宿主细胞,并回收由此产生的该双特异性抗体。

19. 权利要求18的方法,还包括将所述双特异性抗体与适宜载体配制为药物组合物。

20. 可通过权利要求18的方法获得的抗CD28和抗MUC16双特异性抗体。

21. 根据权利要求1到10中任一项所述的分离的双特异性抗体或根据权利要求11所述的药物组合物在制备与抗MUC-16和抗CD3双特异性抗体组合用于在受试者中治疗MUC16表达性卵巢癌的药物中的用途。

22. 根据权利要求21所述的用途,其中所述药物与其他治疗剂或治疗方案组合用于治疗MUC16表达性卵巢癌。

23. 根据权利要求22所述的用途,其中所述其他治疗剂或治疗方案包括抗肿瘤剂、放射疗法、抗体药物缀合物、检查点抑制剂或其组合。

24. 根据权利要求22所述的用途,其中所述其他治疗剂是抗PD-1抗体。

25. 根据权利要求24所述的用途,其中所述抗PD-1抗体是西米普利单抗(Cemiplimab)。

## 双特异性抗MUC16 X抗CD28抗体以及其用途

### [0001] 相关申请

[0002] 本申请涉及并且要求于2018年12月19日提交的美国临时申请第62/782,142号和于2019年3月8日提交的美国临时申请第62/815,861号的优先权。前述申请的全部内容通过引用明确地并入本文。

### [0003] 序列表

[0004] 本申请含有已经以ASCII格式电子提交的序列表,并且特此将其通过引用整体并入本文。创建于2019年12月18日的所述ASCII副本命名为10493W001\_118003\_49320\_SeqLst.txt并且大小为38,372字节。

### 技术领域

[0005] 本发明涉及结合CD28和如MUC16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,并在T细胞表面上表达。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 $\kappa$ 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。在1期研究中,0.1mg/kg的起始剂量是基于猕猴的50mg/kg的未观察到的副作用水平(“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,在猕猴或离体人PBMC研究中,通过毒理学研究未预测到TGN1412诱导的细胞因子风暴。

[0008] 粘蛋白16(MUC16),也被称为癌(cancer)抗原125、癌(carcinoma)抗原125、碳水化合物抗原125或CA-125,是高度糖基化的整合膜糖蛋白。MUC16包括三个主要结构域:细胞外N端结构域;散布有海胆精子、肠激酶和集聚蛋白(SEA)结构域的大串联重复结构域;以及包括一段跨膜区域和短胞质尾区的羧基端结构域。蛋白水解切割导致MUC16的细胞外部分脱落到血流中。MUC16在癌症(包含卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、非小细胞肺癌、肝内胆管癌-肿块

形成类型、子宫颈腺癌和胃肠道腺癌)以及包含炎性肠病、肝硬化、心力衰竭、腹膜感染和腹部手术的疾病和病状中过度表达。(Haridas,D.等人,2014,《美国实验生物学会联合会期刊(FASEB J.)》,28:4183-4199)。已经示出MUC16在癌细胞上的表达可以保护癌细胞免于免疫系统。(Felder,M.等人,2014,《分子癌症(Molecular Cancer)》,13:129)。

[0009] 已经研究了使用针对MUC16的抗体治疗卵巢癌的方法。然而,单克隆抗体奥戈伏单抗(oregovomab)和阿巴伏单抗(abgovomab)取得的成功有限。(Felder,同上、Das,S.和Batra,S.K.2015,《癌症研究(Cancer Res.)》75:4660-4674。)因此,本领域需要用于治疗癌症的改进的MUC16抗体。

[0010] 此外,结合CD28和靶抗原(如MUC16)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肿瘤细胞和T细胞介导的杀伤。

## 发明内容

[0011] 在第一方面,本发明提供了结合CD28和MUC16的双特异性抗原结合分子,在本文中也称为“抗CD28/抗MUC16双特异性分子”。所述抗CD28/抗MUC16双特异性分子的抗MUC16部分可用于靶向表达MUC16的肿瘤细胞(例如,卵巢肿瘤细胞),并且所述双特异性分子的抗CD28部分可用于活化T细胞。MUC16在肿瘤细胞和T细胞上的CD28的同时结合促进了活化的T细胞对靶肿瘤细胞的定向杀伤(细胞裂解)。因此,本发明的抗CD28/抗MUC16双特异性分子尤其可用于治疗与MUC16表达性肿瘤(例如,卵巢癌)相关或由其引起的疾病和病症。

[0012] 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MUC16第二抗原结合结构域。本发明包含抗CD28/抗MUC16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)。在本发明的某些例示性实施例中,抗CD28抗原结合域和抗MUC16抗原结合域各自包括不同的与共同LCVR配对的相异的HCVR。

[0013] 本发明提供了抗CD28/抗MUC16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3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3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3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MUC16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3中所示的重链CDR1-CDR2-CDR3氨基酸序列中的任何一个和/或如表3中所示的轻链CDR1-CDR2-CDR3氨基酸序列中的任何一个。

[0014] 根据某些实施例,本发明提供了抗CD28/抗MUC16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:18和42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。

[0015] 本发明还提供了抗CD28/抗MUC16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具有选自SEQ ID NO:10和34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。

[0016] 本发明还提供了抗CD28/抗MUC16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:18/10和42/34组成的组的HCVR和LCVR (HCVR/LCVR) 氨基酸序列对。

[0017] 本发明还提供了抗CD28/抗MUC16双特异性分子,其中特异性地结合CD28的所述第一抗原结合结构域包括:重链CDR3 (HCDR3) 结构域,所述HCDR3结构域具有选自SEQ ID NO:24和48组成的组的氨基酸序列或与其基本上类似的序列,所述基本上类似的序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性;以及轻链CDR3 (LCDR3) 结构域,所述LCDR3结构域具有选自SEQ ID NO:16和40组成的组的氨基酸序列或其基本上类似的序列,所述基本上类似的序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性。

[0018] 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选自SEQ ID NO:24/16和48/40组成的组的HCDR3/LCDR3氨基酸序列对。

[0019] 本发明还提供了抗CD28/抗MUC16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结构域具有选自SEQ ID NO:20和44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:22和46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;所述轻链CDR1 (LCDR1) 结构域具有选自以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:12和36,或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的其基本上类似的序列;所述轻链CDR2 (LCDR2) 结构域具有选自以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14和38,或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的其基本上类似的序列。

[0020] 本发明的某些非限制性、示例性抗CD28/抗MUC16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:20-22-24-12-14-16和44-46-48-36-38-40。

[0021] 本发明还提供了抗CD28/抗MUC16双特异性分子,其中特异性地结合MUC16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。

[0022] 本发明还提供了抗CD28/抗MUC16双特异性分子,其中特异性地结合MUC16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和34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。

[0023] 本发明还提供了抗CD28/抗MUC16双特异性分子,其中特异性地结合MUC16的第二抗原结合结构域包括选自SEQ ID NO:2/10和26/34组成的组的HCVR和LCVR (HCVR/LCVR) 氨基酸序列对。

[0024] 本发明还提供了抗CD28/抗MUC16双特异性分子,其中特异性地结合MUC16的所述第二抗原结合结构域包括:重链CDR3 (HCDR3) 结构域,所述重链CDR3结构域具有选自SEQ ID NO:8和32组成的组的氨基酸序列或与其基本上类似的序列,所述基本上类似的序列具

有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性;以及轻链CDR3(LCDR3)结构域,所述轻链CDR3结构域具有选自SEQ ID NO:16和40组成的组的氨基酸序列或其基本上类似的序列,所述基本上类似的序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性。

[0025] 在某些实施例中,特异性地结合MUC16的第二抗原结合结构域包括选自SEQ ID NO:8/16和32/40组成的组的HCDR3/LCDR3氨基酸序列对。

[0026] 本发明还提供了抗CD28/抗MUC16双特异性抗原结合分子,其中特异性地结合MUC16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28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30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;所述轻链CDR1(LCDR1)结构域具有选自以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:12和36,或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的其基本上类似的序列;所述轻链CDR2(LCDR2)结构域具有选自以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14和38,或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的其基本上类似的序列。

[0027] 本发明的某些非限制性、示例性抗CD28/抗MUC16双特异性抗原结合分子包含特异性地结合MUC16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28-30-32-36-38-40。

[0028] 在相关实施例中,本发明包含抗CD28/抗MUC16双特异性抗原结合分子,其中特异性地结合MUC16的第二抗原结合结构域包括选自SEQ ID NO:2/10和26/34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。

[0029] 另一方面,本发明提供了对本文公开的抗CD28/抗MUC16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2和/或表4中所示的多核苷酸序列的核酸分子以及包括如表2和/或表4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。

[0030] 本发明包含抗CD28/抗MUC16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MUC16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MUC16的双特异性抗原结合分子。

[0031] 本发明包含具有经修饰的糖基化模式的抗CD28/抗MUC16双特异性抗原结合分子。在一些应用中,例如,可使用修饰以去除不期望的糖基化位点,或者在寡糖链上存在缺乏岩藻糖部分的抗体,以增加抗体依赖性细胞毒性(ADCC)功能(参见Shield等人(2002)JBC277:26733)。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)。

[0032] 另一方面,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MUC16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MUC16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MUC16双特异性抗原结合分子组合的任何试剂。可以有利地与抗CD28/抗MUC16双特异性抗原结合分子组合的示例性试剂在本文的其它地方详细讨论。

[0033] 又另一方面,本发明提供了用于使用本发明的抗CD28/抗MUC16双特异性抗原结合分子靶向/杀伤表达MUC16的肿瘤细胞的治疗性方法,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MUC16双特异性抗原结合分子的药物组合物。

[0034] 本发明还包含本发明的抗CD28/抗MUC16双特异性抗原结合分子在制造用于治疗与MUC16表达相关或由其引起的疾病或病症的药物中的用途。

[0035] 又另一方面,本发明提供了用于使用本发明的抗CD28/抗MUC16双特异性抗原结合分子靶向/杀伤表达MUC16的肿瘤细胞的治疗性方法,其中所述抗CD28/抗MUC16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MUC16与抗CD3/抗MUC16抗体组合)。

[0036] 仍另一方面,本发明提供了用于使用本发明的抗CD28/抗MUC16双特异性抗原结合分子靶向/杀伤表达MUC16的肿瘤细胞的治疗性方法,其中所述抗CD28/抗MUC16双特异性抗原结合分子与靶向例如PD-1、PD-L1或CTLA-4的检查点抑制剂组合(例如,抗CD28/抗MUC16与抗PD-1抗体组合)。在某些实施例中,设想的是,本发明的抗CD28/抗MUC16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,设想的是,本发明的抗CD28/抗MUC16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,设想的是,本发明的抗CD28/抗MUC16抗体可以与靶向CTLA-4的药剂如易普利姆玛(Ipilimumab)(Yervoy®)组合。

[0037] 仍另一方面,本发明提供了用于使用本发明的抗CD28/抗MUC16双特异性抗原结合分子靶向/杀伤表达MUC16的肿瘤细胞的治疗性方法,其中所述抗CD28/抗MUC16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MUC16与抗CD3/抗MUC16双特异性抗体组合)和靶向PD-1、PDL-1或CTLA-4的检查点抑制剂(例如,与抗PD-1抗体组合的抗CD28/抗MUC16)结合。

[0038] 通过阅读随后的具体实施方式,其它实施例将变得显而易见。

## 附图说明

[0039] 图1是示出在具有引入的共刺激配体表达的工程化细胞系中肿瘤生长抑制的图。三个肿瘤细胞系B16F10.9、EL4和MC38被工程化为表达共刺激配体或GFP或空载体作为对照。将工程化肿瘤细胞注射到C57BL/6小鼠中。数据表示平均值±SEM。数据表示每组具有五(5)只小鼠的至少一项实验。

[0040] 所述图示出了肿瘤生长为对照的百分比,计算如下:

$$\frac{\text{肿瘤体积}}{\text{对照的肿瘤体积}} \times 100$$

[0042] 图2A到2I是示出了本发明的示例性抗MUC16xCD28在存在TCR刺激的情况下通过抗

MUC16xCD3和具有内源性MUC16 (PE01) 的癌症细胞系增强T细胞作用的示意图和图。图2B到2E是示出人PBMC的数据的图。图2F到2H是示出猕猴PBMC的数据的图。将人T细胞 (针对图2B到2E) 或猕猴T细胞 (针对图2F到2H) 与具有内源性MUC16表达的癌症靶细胞 (卵巢癌系PEO-1) 和所指示的双特异性抗体一起培养96小时。

[0043] 图2A是测定设置的示意图。

[0044] 图2B是示出肿瘤细胞杀伤的图。Y轴上的值是指PE01活细胞的百分比。

[0045] 图2C是示出IFN $\gamma$ 释放的图。

[0046] 图2D是示出CD4<sup>+</sup> T细胞计数和CD25<sup>+</sup>细胞的频率的图,表示为CD25<sup>+</sup>细胞在CD4<sup>+</sup> T细胞中的百分比。

[0047] 图2E是示出CD8<sup>+</sup> T细胞计数和CD25<sup>+</sup>细胞的频率的图,表示为CD25<sup>+</sup>细胞在CD8<sup>+</sup> T细胞中的百分比。

[0048] 图2F是示出肿瘤细胞杀伤的图。Y轴上的值是指PE01活细胞的百分比。

[0049] 图2G是示出CD4<sup>+</sup> T细胞计数和CD25<sup>+</sup>细胞的频率的图,表示为CD25<sup>+</sup>细胞在CD4<sup>+</sup> T细胞中的百分比。

[0050] 图2H是示出CD4<sup>+</sup> T细胞计数和CD8<sup>+</sup> T细胞计数和CD25<sup>+</sup>细胞的频率的图,表示为CD25<sup>+</sup>细胞在CD4<sup>+</sup> T细胞和CD8<sup>+</sup> T细胞中的百分比。

[0051] 图2I是示出通过流式细胞术测量的与细胞靶标结合的抗体的图。

[0052] 图3A-3C是示出本发明的示例性抗MUC16xCD28双特异性抗体通过抗MUC16xCD3诱导的T细胞活化来增强抗肿瘤免疫力的图。

[0053] 图3A是示出如通过平均辐射率 (Avg辐射率 [p/s/cm<sup>2</sup>/sr]) 随时间测量的肿瘤负荷的图。值表示组中值加上范围。通过曼-惠特尼检验 (Mann Whitney test) 针对每个时间点计算P值。对于MUC16xCD3和EGFRvIIIxCD3比较,\*,p<0.05或\*\*,p<0.01。对于MUC16xCD3+MUC16xCD28和EGFRvIIIxCD3比较,##,p<0.01。通过腹膜内注射将人PBMC移植的NSG小鼠植入OVCAR3-Luc。在第5天和第8天 (箭头) 通过IV对小鼠进行给药。小鼠接受2.5 $\mu$ g MUC16xCD3或2.5 $\mu$ g EGFRvIIIxCD3。还对一些小鼠以100 $\mu$ g施用了MUC16xCD28。在肿瘤植入后第4、8、12、15、20和25天,通过BLI通过监测随时间推移的生物发光评估肿瘤负荷。N=每组5只小鼠

[0054] 图3B提供了示出从图3A所示出的相同实验的第一次剂量后4小时从血液获得的血清细胞因子水平的图。用单向ANOVA计算P值。对于MUC16xCD3+MUC16xCD28和EGFRvIIIxCD3比较,##,p<0.01或####,p<0.0001。对于MUC16xCD3+MUC16xCD28和MUC16xCD3比较,@@@,p<0.005。对于MUC16xCD3+MUC16xCD28和EGFRvIIIxCD3+MUC16xCD28比较,^,p<0.01,^^,p<0.005,^^^P<0.0001。

[0055] 图3C提供了示出肿瘤负荷以及与第26天血清中CA-125水平的具有相关性的图。根据图3A所示出的相同实验,N=每组5只小鼠。

[0056] 图4A是示出如通过平均辐射率 (Avg辐射率 [p/s/cm<sup>2</sup>/sr]) 随时间测量的肿瘤负荷的图。值表示组中值加上范围。通过曼-惠特尼检验 (Mann Whitney test) 针对每个时间点计算P值。对于MUC16xCD3和EGFRvIIIxCD3比较,\*\*,p<0.01。对于MUC16xCD3+MUC16xCD28和EGFRvIIIxCD3比较,##,p<0.01。对于MUC16xCD3+MUC16xCD28和MUC16xCD3比较,@,p<0.05。通过腹膜内注射将人PBMC移植的NSG小鼠植入OVCAR3-Luc。用0.5mg/kg MUC16xCD3或0.5mg/kg EGFRvIIIxCD3通过IV处理小鼠。在第5天和第8天 (箭头) 还对一些小鼠以0.2mg/

kg施用了MUC16xCD28。在第4、8、11、14、21、28和34天,通过BLI通过监测随时间推移的生物发光评估肿瘤负荷。N=每组5或6只小鼠。

[0057] 图4B提供了示出从图4A所示出的相同实验的第一次剂量后4小时从血液获得的血清细胞因子水平的图。用单向ANOVA计算P值。对于MUC16xCD3和EGFRvIIIxCD3比较,\*, $p < 0.05$ ,对于MUC16xCD3+MUC16xCD28和EGFRvIIIxCD3比较,##, $p < 0.01$ 或###, $p < 0.001$ 或####, $p < 0.0001$ 。对于MUC16xCD3+MUC16xCD28和MUC16xCD3比较,@, $p < 0.05$ 或@@@, $p < 0.0001$ 。对于MUC16xCD3+MUC16xCD28和EGFRvIIIxCD3+MUC16xCD28比较,^^, $p < 0.001$ 或^^^ $p < 0.0001$ 。

[0058] 图5是示出随时间推移的存活率的图。将ID8-VEGF/hMUC16细胞植入对hCD3/hCD28/hMUC16人源化的小鼠的腹膜腔中。如箭头所指示的,在肿瘤植入后第3、6和10天用EGFRvIIIxCD3或MUC16xCD3以1mg/kg通过静脉内注射处理小鼠。还对一些小鼠以1 mg/kg施用了MUC16xCD28。通过对数秩检验针对每个时间点计算P值。对于MUC16xCD3和EGFRvIIIxCD3比较,\*\*, $p < 0.01$ 。对于MUC16xCD3+MUC16xCD28和EGFRvIIIxCD3比较,##, $p < 0.01$ 。对于MUC16xCD3+MUC16xCD28和MUC16xCD3比较,@, $p < 0.05$ 。

[0059] 图6A是示出随时间推移的肿瘤体积的图。将MC38/hMUC16肿瘤细胞皮下植入hCD3/hMUC16人源化小鼠中。如所指示的,从第0天(箭头)开始,每周两次以0.01mg/kg用抗MUC16xCD3、以0.5mg/kg用本发明的示例性抗MUC16xmCD28双特异性抗体处理小鼠。通过卡尺测量随时间推移监测肿瘤体积。所示值为平均值±SEM。数据表示三(3)个实验。每组N=7只小鼠。与同种型对照相比,使用双向ANOVA计算P值(对于MUC16xCD3+MUC16xmCD28和同种型对照比较,\*\*, $p < 0.01$ 并且\*\*\*\*, $p < 0.0001$ ;对于MUC16xCD3和同种型对照比较,#, $p < 0.05$ ;对于MUC16xmCD28和同种型对照比较,\$, $p < 0.05$ )。

[0060] 图6B提供了示出从图6A所示出的相同实验的指示的时间点处获得的血液的血清细胞因子水平的图。

[0061] 图6C和6D是示出细胞因子水平的图。在第7天给药后4小时,对小鼠进行血清细胞因子放血。与同种型\*\* $p < 0.01$ 和\*\*\*\* $p < 0.0001$ 相比,用单向ANOVA计算统计学显著性。n=每组7只小鼠。数据表示3个实验。

[0062] 图7是示出与CD28超激动剂相比,在不存在CD3刺激的情况下,使用干涂或湿涂方法将MUC16xCD28锚定到测定板不会诱导T细胞活化的图。

[0063] 图8A到8C是示出MUC16xCD28单独或组合疗法不诱导全身性T细胞活化的图。猕猴以1或10mg/kg接受单剂量的双特异性(括号内指示的)。另外一组接受总共4剂量,指示为重复给药。在给药后的指定时间(小时)收集血液。图8A:血清细胞因子,图8B:相对T细胞计数和图8C:示出了Ki67+和ICOS+T细胞的频率(相对于CD3的%)。数据表示平均值+/-SEM。N=每组3只动物。与同种型对照相比,通过双向ANOVA计算P值。(\*\*, $p < 0.01$ ;\*\*\*, $p < 0.001$ 并且\*\*\*\*, $p < 0.0001$ )。

[0064] 图9A和9B示出了在存在可溶性CA-125的情况下,MUCxCD28和MUC16xCD3双特异性抗体可以与MUC表达性细胞结合。在存在增加浓度的可溶性CA-125(图9A)或MUC16小块(MUC16nub)(图9B)的情况下,在流式细胞术缓冲液(PBS+1%FBS)中在4°C下,将OVCAR-3细胞在8nM的用Alexa647标记的指示抗体中温育30分钟。温育之后,用流式细胞术缓冲液洗涤细胞并且通过流式细胞术分析。

[0065] 图10是基于T细胞/抗原呈递细胞的报告基因生物测定的示意图。

[0066] 图11A和11B示出了在存在表达MUC16的刺激性抗原呈递细胞的情况下,bs24963D(也被称为REGN5668)增强了工程化T细胞中的NF- $\kappa$ B信号传导。简而言之,在存在3T3/h $\beta$ 2M/HLA-A2/NYES01p/hMUC16(图11A)和以3.33:1的报告细胞与刺激性3T3细胞比率的3T3/h $\beta$ 2M/HLA-A2/NYES01p细胞(图11B)的情况下,将J.RT3.T3.5/NF- $\kappa$ B-Luc/1G4AB/hCD8 $\alpha\beta$ /hCD28报告细胞与bs24963D或CD28非桥接对照双特异性抗体(非TAAxCD28)以一定浓度范围(39pM到10nM)温育,包含无抗体对照。NF- $\kappa$ B信号传导被检测为荧光素酶活性,并通过定量发光信号(以相对光单位(RLU)报告)进行测量。将来自重复孔中执行的测定的数据绘制为均值 $\pm$ SD。

[0067] 图12示出,在存在REGN4018(参见W02017/053856A1、BSMUC16/CD3-001为REGN4018)的情况下,bs24963D(也被称为REGN5668)通过OVCAR-3和PE01靶细胞介导了从人初级T细胞中的浓度依赖性IL-2释放。简而言之,在存在固定浓度(5nM)的REGN4018或CD3非桥接对照双特异性抗体(非TAAxCD3)和效应子:靶细胞比分别为10:1或4:1的人卵巢癌细胞系OVCAR-3或PE01的情况下,将富集的人初级T细胞与bs24963D或CD28非桥接对照双特异性抗体(非TAAxCD28)以一定浓度范围(7.6pM到500nM)温育,包含无抗体对照。数据来自重复孔中执行的测定并且绘制为均值 $\pm$ SD。根据制造商的方案,使用人IL-2免疫测定测量IL-2释放。

[0068] 图13示出,在存在REGN4018的情况下,bs24963D(也被称为REGN5668)通过OVCAR-3和PE01靶细胞介导浓度依赖性的人初级T细胞增殖增强。简而言之,在存在固定浓度(5nM)的REGN4018或CD3非桥接对照双特异性抗体(非TAAxCD3)和分别以10:1或4:1的效应子与靶细胞的比率的人卵巢癌细胞系OVCAR-3和PE01的情况下,将富集的人初级T细胞与bs24963D或CD28非桥接对照双特异性抗体(非TAAxCD28)以一定浓度范围(7.6pM到500nM)温育,包含无抗体对照。数据来自重复孔中执行的测定并且绘制为均值 $\pm$ SD。通过检测氚衰变(来自掺入分裂细胞的氚化胸腺嘧啶核苷)来测量T细胞增殖,并报告为CPM。

[0069] 图14示出,bs24963D(也被称为REGN5668)介导浓度依赖性IL-2释放,并且西米普利单抗与SW1990和SW1990/hPD-L1靶细胞的添加适度增加了从人初级T细胞的IL-2释放。简而言之,在存在固定浓度(20nM)的西米普利单抗或IgG4<sup>P</sup>对照和以2:1的效应子与靶细胞的比率的SW1990和SW1990/hPD-L1人胰腺癌细胞系的情况下,将富集的人初级T细胞与bs24963D或CD28非桥接对照双特异性抗体(非TAAxCD28)以一定浓度范围(7.6pM到500nM)温育,包含无抗体对照。数据来自重复孔中执行的测定并且绘制为均值 $\pm$ SD。根据制造商的方案,使用人IL-2免疫测定测量IL-2释放。使用双向ANOVA进行统计分析。当 $p < 0.05$ 时,差异被认为是统计学上显著的。与SW1990/hPD-L1细胞( $p < 0.0001$ )中的REGN5668+IgG4<sup>P</sup>对照相比,bs24963D+西米普利单抗展现IL-2释放在统计学上显著增加。

[0070] 图15示出,bs24963D(也被称为REGN5668)介导浓度依赖性的增殖增强,并且西米普利单抗的添加通过SW1990和SW1990/hPD-L1适度增加了人初级T细胞的增殖。简而言之,在存在固定浓度(20nM)的西米普利单抗或IgG4<sup>P</sup>对照和以2:1的效应子与靶细胞的比率的SW1990和SW1990/hPD-L1人胰腺癌细胞系的情况下,将富集的人初级T细胞与bs24963D或CD28非桥接对照双特异性抗体(非TAAxCD28)以一定浓度范围(7.6pM到500nM)温育,包含无抗体对照。数据来自重复孔中执行的测定并且绘制为均值 $\pm$ SD。通过检测氚衰变(来自掺入

分裂细胞的氘化胸腺嘧啶核苷)来测量T细胞增殖,并报告为CPM。使用双向ANOVA进行统计分析。当 $p < 0.05$ 时,差异被认为是统计学上显著的。与SW1990/hPD-L1细胞( $p < 0.0001$ )中的bs24963D+IgG4<sup>P</sup>对照相比,bs24963D+西米普利单抗展现出增殖在统计学上显著增加。

### 具体实施方式

[0071] 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。还应了解,在此所使用的术语仅用于描述具体实施例的目的,并且不打算为限制性的,因为本发明的范围仅受所附权利要求限制。

[0072] 除非另外定义,否则本文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,当用于提及具体所列举的数值时,术语“约”意指数值可以与所引用的值相差不超过1%。例如,如本文所使用的,表述“约100”包含99和101以及其之间的所有值(例如,99.1、99.2、99.3、99.4等)。

[0073] 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描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引用整体并入本文。

[0074] 定义

[0075] 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:50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。SEQ ID NO:52中示出了具有小鼠Fc的人CD28胞外结构域(N19-P152)。SEQ ID NO:53中示出了具有myc-myc-his标签的人CD28胞外结构域(N19-P152)。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,除非明确指出其来自非人物种。因此,表述“CD28”意指人CD28,除非被指定为来自非人物种,例如“小鼠CD28”、“猴CD28”等。SEQ ID NO:54中示出了具有myc-myc-his标签的小鼠CD28(登录号NP\_031668.3)胞外结构域。

[0076] 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。本发明的抗体及抗原结合片段可以结合可溶性CD28和/或在细胞表面表达的CD28。可溶性CD28包含天然CD28蛋白以及重组CD28蛋白变体,如例如单体和二聚体CD28构建体,其缺乏跨膜结构域或以其它方式与细胞膜无关。

[0077] 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”可以包括在这样一种细胞表面上表达的CD28蛋白或由其组成,所述细胞通常在其表面上不表达人CD28,但已被人工工程化为在其表面上表达CD28。

[0078] 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3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。

[0079] 如本文所使用的,除非指定为来自非人物种(例如,“小鼠MUC16”、“猴MUC16”等),否则术语“MUC16”是指人MUC16蛋白。人MUC16蛋白具有SEQ ID NO:49中所示的氨基酸序列,和/或具有NCBI登录号NP\_078966中所示的氨基酸序列。如SEQ ID NO:51中示出了具有myc-myc-his标签的人MUC16膜近端结构域(P13810-P14451)。

[0080] 如本文所使用的,“结合MUC16的抗体”或“抗MUC16抗体”包含可以结合可溶性MUC16和/或细胞表面表达的MUC16的抗体和其抗原结合片段。可溶性MUC16包含天然MUC16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MUC16蛋白变体,例如MUC16构建体。

[0081] 如本文所使用的,表述“抗MUC16抗体”包含具有单一特异性的单价抗体以及包括结合MUC16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MUC16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MUC16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。

[0082] 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。

[0083] 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,所述免疫球蛋白分子包括四条多肽链、通过二硫键相互连接的两条重(H)链和两条轻(L)链以及其多聚体(例如,IgM)。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 $V_L$ 区进一步细分为称作互补决定区(CDR)的高变区,其散布着更保守的称作构架区(FR)的区域。每个 $V_H$ 和 $V_L$ 由自氨基端到羧基端按以下顺序排列的三个CDR及四个FR构成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本发明的不同实施例中,抗CD28和/或抗MUC16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。可以基于两个或更多个CDR的并列分析来定义氨基酸共有序列。

[0084] 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,其特异性地结合抗原以形成复合物。抗体的抗原结合片段可以例如使用任何合适的标准技术从完整抗体分子衍生,如蛋白水解消化或涉及操纵和表达编码抗体可变以及任选地恒定结构域的DNA的重组基因工程技术。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。可以通过化学方法或通过分子生物学技术对DNA进行测序和操作,例如,将一个或多个可变结构域和/或恒定结构域排列成合适的构型、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。

[0085] 抗原结合片段的非限制性实例包含:(i) Fab片段;(ii) F(ab')<sub>2</sub>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

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。如本文所使用的,表述“抗原结合片段”还涵盖其它工程化的分子,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)、小模块免疫药物(SMIP)和鲨鱼可变IgNAR结构域。

[0086] 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,并且将通常包括与一个或多个框架序列相邻或在所述框架内的至少一个CDR。在具有与 $V_L$ 结构域相关联的 $V_H$ 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。

[0087] 在某些实施例中,抗体的抗原结合片段可以含有共价连接到至少一个恒定结构域的至少一个可变结构域。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中,包含上文所列出的任何示例性构型、可变结构域和恒定结构域可以彼此直接连结或可以通过完整或部分铰链或接头区域连结。铰链区可以由至少2个(例如,5、10、15、20、40、60或更多个)氨基酸组成,其导致单个多肽分子中相邻可变结构域和/或恒定结构域之间的柔性或半柔性连结。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)。

[0088] 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特异性地结合单独的抗原或同一抗原上的不同表位。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)适用于本发明抗体的抗原结合片段背景下。

[0089] 本发明的抗体可以通过补体依赖性细胞毒性反应(CDC)或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性反应(ADCC)起作用。“补体依赖性细胞毒性反应”(CDC)是指在存在补体的情况下本发明的抗体对抗原表达性细胞的裂解。“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性反应”(ADCC)是指细胞介导的反应,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,并且从而导致靶细胞的裂解。可以使用本领域熟知和可用的测定来测量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。

[0090] 在本发明的某些实施例中,本发明的抗CD28和/或抗MUC16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导入的突变),例如在CDR区中,特别是在CDR3区中。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。

[0091] 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序列上。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<sub>H</sub>区和V<sub>L</sub>区的氨基酸序列是这样的序列:虽然衍生自人种系V<sub>H</sub>序列和V<sub>L</sub>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。

[0092] 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,其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。

[0093] 以各种完整IgG同种型形式出现第二种形式的频率基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显著降低第二种形式的出现(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,以便提升期望的抗体形式的产率。

[0094] 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除去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。分离的抗体是已经经历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。

[0095] 本发明还包含结合CD28和/或MUC16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和表3中所示的HCVR/LCVR或CDR氨基酸序列中的任何一个。

[0096] 如与衍生出抗原结合蛋白或抗原结合结构域的对应该种系序列相比,本文的抗CD28和/或抗MUC16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及其抗原结合结构域,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个体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 $V_L$ 结构域内的框架和/或CDR残基的全部突变回在衍生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,例如,仅在FR1的前8个氨基酸内或在FR4的最后8个氨基酸内所发现的突变后的残基,或仅在CDR1、CDR2或CDR3中发现的突变后的残基。在其它实施例中,框架中和/或一个或多个CDR残基的一个或多个突变为不同种系序列(即,与最初衍生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,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特性,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性生物学特性(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。

[0097] 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和/或抗MUC16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3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。

[0098] 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,不同的抗体可以结合抗原上的不同区域,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。

[0099] 当提及核酸或其片段时,术语“基本同一性”或“基本上相同”表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)进行最佳比对时,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所测量的,如以下所讨论的。在某些情况下,具有与参考核酸分子基本同一性的核酸分子可以编码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。

[0100] 当应用于多肽时,术语“基本相似性”或“基本上类似”意指当如通过使用默认间隙权重的程序GAP或BESTFIT进行最佳比对时,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”是一个氨基酸残基被具有化学特性(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。总体而言,保守氨基酸取代不会实质上改变蛋白质的功能特性。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,以校正取代的保守性质。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. BioI.)》24:307-331。具有相似化学性质的侧链的氨基酸组的实例包含 (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:丝氨酸与苏氨酸; (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: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 (Science)》256:1443-1445。“适度保守”替代是PAM250对数似然矩阵中具有非负值的任何变化。

[0101] 通常使用序列分析软件来测量多肽的序列相似性,也被称为序列同一性。蛋白质分析软件使用分配给各种取代、缺失和其它修饰 (包含保守氨基酸取代) 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的参数或推荐的参数的FASTA来比较多肽序列,所述FASTA为6.1版GCG中的程序。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域的对齐和序列一致性百分比 (Pearson (2000), 同上文)。当比较本发明的序列与含有大量来自不同生物体的序列的数据库时,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。

[0102] 双特异性抗原结合分子

[0103] 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种靶多肽的不同表位具有特异性,或者可以含有对多于一种的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,《生物科技趋势 (Trends Biotechnol.)》,22:238-244。本发明的抗CD28和/或抗MUC16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。

[0104] 本文使用的表述“抗CD28抗体”和/或“抗MUC16抗体”旨在包含单特异性抗CD28抗体和/或抗MUC16抗体两者以及包括CD28结合臂或MUC16结合臂和结合靶抗原的第二臂的双特异性抗体。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MUC16,并且免疫球蛋白的另一个臂对靶抗原具有特异性。CD28或MUC16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3中所列出的任何HCVR/LCVR或CDR氨基酸序列。MUC16结合臂可以包括如本文的表1中所列出的任何HCVR/LCVR或CDR氨基酸序列。在某些实施例中,CD28结合臂结合人CD28并诱导人T细胞增殖。

[0105] 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MUC16。

[0106] 根据某些示例性实施例,本发明包含特异性地结合CD28和MUC16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MUC16”或“抗CD28xMUC16”或“CD28xMUC16”或“抗MUC16/抗CD28”或“抗MUC16xCD28”或“MUC16xCD28”双特异性分子或其它类似的术语。

[0107] 如图所示出的,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MUC16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MUC16结合。双特异性抗CD28/MUC16可以向效应细胞(例如,T细胞)提供共刺激信号。效应臂在没有聚集的情况下没有刺激T细胞的作用。在聚集时,单独的效应臂几乎没有刺激T细胞的作用。效应臂通过与靶向臂组合来刺激T细胞。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,MUC16)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/MUC16双特异性抗体)的组合重叠来增加肿瘤靶向臂的特异性。

[0108] 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)或由所述至少一个互补决定区组成的蛋白质、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)组合地特异性地结合特定抗原。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。

[0109] 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组合地特异性地结合特定抗原。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,MUC16)。

[0110] 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。

[0111] 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连接到单独的多聚化结构域。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,从而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”是具有与具有相同或相似结构或构成的第二多聚化结构域缔合的能力的任何大分子、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<sub>H</sub>3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<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3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型的Fc结构域。

[0112] 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,如例如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,如例如IgG1/IgG2、IgG1/IgG4、IgG2/IgG4等。

[0113] 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由所述亮氨酸拉链、螺旋环基序或卷曲螺旋基序组成的肽或多肽。

[0114] 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,具有第一抗原结合特异性的抗体或其片段可以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个抗体或抗体片段)功能性连接(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、(SEE0) body、亮氨酸拉链、Oubody、IgG1/IgG2、双作用Fab (OAF)-IgG以及Mab<sup>2</sup>双特异性形式(参见例如Klein等人2012,mAbs 4:6,1-11,以及其中引用的参考文献,用于回顾前述形式)。

[0115] 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,所述修饰带来在Fc与FcRn之间具有修饰的结合相互作用(例如,增强或减弱)的修饰后的Fc结构域。在一个实施例中,双特异性抗原结合分子包括C<sub>H</sub>2区或C<sub>H</sub>3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的亲合力。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、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)。

[0116] 本发明还包含双特异性抗原结合分子,其包括第一C<sub>H</sub>3结构域和第二Ig C<sub>H</sub>3结构域,其中第一和第二Ig C<sub>H</sub>3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<sub>H</sub>3结构域结合蛋白A,并且第二Ig C<sub>H</sub>3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<sub>H</sub>3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、L 18M、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)。

[0117] 在某些实施例中,Fc结构域可以是嵌合的,其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<sub>H</sub>2区的C<sub>H</sub>2序列的部分或全部以及衍生自人IgG1、人IgG2或人IgG4的C<sub>H</sub>3序列的部分或全部。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,其与衍生自人IgG1铰链区、人IgG2铰链区或人IgG4铰链区的“下铰链”序列组合。可以包含在本文所列出的任何抗原结合分子中的嵌合Fc结构域的具体实例包括,从N-到C-末端:[IgG4 C<sub>H</sub>1]-[IgG4上铰链]-[IgG2下铰链]-[IgG4 CH2]-[IgG4 C<sub>H</sub>3]。可以包含在本文所列出的任何抗原结合分子中的嵌合Fc结构域的另一种实例包括,从N-到C-末端:[IgG1 C<sub>H</sub>1]-[IgG1上铰链]-[IgG2下铰链]-[IgG4 C<sub>H</sub>2]-[IgG1 C<sub>H</sub>3]。WO2014/022540 A1中描述了可以包含在本发明的任何抗原结合分子中的嵌合Fc结构域的这些和其它实例,具有这些一般结构布置的嵌合Fc结构域及其变体可以具有改变的Fc受体结合,这反过来影响Fc效应功能。

#### [0118] 序列变体

[0119] 与衍生单个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个体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<sub>H</sub>结构域和/或V<sub>L</sub>结构域内的框架和/或CDR残基的全部突变回在最初衍生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,例如,仅在FR1的前8个氨基酸内或在FR4的最后8个氨基酸内所发现的突变后的残基,或仅在CDR1、CDR2或CDR3中发现的突变后的残基。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,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特性,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性生物学特性(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。

[0120] 本发明还包含抗原结合分子,其中抗原结合结构域中的一个或两个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,相对于本文公开的任何HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列,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”是一个氨基酸残基被具有化学特性(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。总体而言,保守氨基酸取代不会实质上改变蛋白质的功能特性。具有相似化学性质的侧链的氨基酸组的实例包含(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:丝氨酸与苏氨酸;(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: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》,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PAM250对数似然矩阵中具有非负值的任何变化。

[0121] 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”意指当如通过使用默认间隙权重的程序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,以校正取代的保守性质。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。

[0122] 通常使用序列分析软件来测量多肽的序列相似性,也被称为序列同一性。蛋白质分析软件使用分配给各种取代、缺失和其它修饰(包含保守氨基酸取代)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来比较多肽序列,所述FASTA为6.1版GCG中的程序。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域的对齐和序列一致性百分比(Pearson(2000),同上文)。当比较本发明的序列与含有大量来自不同生物体的序列的数据库时,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。

[0123] pH依赖性结合

[0124] 本发明包含具有pH依赖性结合特性的抗CD28/抗MUC16双特异性抗原结合分子。例如,与中性pH相比,本发明的抗CD28抗体在酸性pH下可以展现出与CD28的结合降低。可替代地,与中性pH值相比,本发明的抗MUC16抗体在酸性pH值下可以呈现增强的与MUC16的结合。

表述“酸性pH”包含小于约6.2的pH值,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。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。

[0125] 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展现出约3.0或更大的酸性/中性 $K_D$ 比率,则为了本发明的目的可以认为抗体或其抗原结合片段展现出“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。

[0126] 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。

[0127] 包括Fc变体的抗体

[0128] 根据本发明的某些实施例,提供了包括Fc结构域的抗CD28/抗MUC16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的亲和力。当此类突变施用于动物时,其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)位处的修饰;或在第428和/或第433为(例如,H/L/R/S/P/Q或K)和/或第434(例如,H/F或Y)位处的修饰;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)。

[0129] 例如,本发明包含包括Fc结构域的抗CD28/抗MUC16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)。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都在本发明的范围内。

[0130] 抗体和抗原结合分子的生物学特性

[0131] 本发明包含以高亲和力结合人CD28和/或MUC16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MUC16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,在双特异性抗原结合分子,其中一个臂结合CD28而另一个臂结合靶抗原(例如,MUC16)的背景下,可以期望靶抗原结合臂以高亲和力结合靶抗原高,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。

[0132] 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165nM的 $K_D$ 结合人CD28(例如,在37°C下),如例如使用本文实例4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150nM、小于约130nM、小于约120nM、小于约100nM、小于约50nM、小于约80nM、小于约60nM、小于约40nM或小于约30nM的 $K_D$ 结合CD28,如例如使用本文实例4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。

[0133] 本发明还包含结合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2.1分钟,如例如使用本文实例4中限定的测定形式或基本上类似的测定在37°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4中限定的测定形式或基本上类似的测定在25°C或37°C下通过表面等离子体共振测量的。

[0134] 本发明包含能够同时与人CD28和人MUC16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MUC16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MUC16的细胞的程度,如本文实例5中所展示的。例如,本发明包含双特异性抗原结合分子,其特异性地结合表达CD28但不表达MUC16的人或猕猴细胞(例如,T细胞),和表达MUC16但不表达CD28的人卵巢癌细胞系(例如,OVCAR-3或PEO1)。本发明包含以约 $9.2 \times 10^{-6}$ 到约 $2.8 \times 10^{-10}$ M或更小的 $EC_{50}$ 值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,如使用如实例4中所示的FACS测定或基本上类似的测定确定的。

[0135] 本发明还提供了诱导或增加肿瘤细胞的T细胞介导的杀伤的抗CD28/抗MUC16双特异性抗原结合分子。例如,本发明包含以小于约392pM的 $EC_{50}$ 诱导或增加肿瘤细胞的T细胞介导的杀伤的抗CD28xMUC16抗体,如例如使用本文实例7中限定的测定形式(例如,在存在抗CD28xMUC16抗体的情况下评估人或猕猴PBMC对PEO1肿瘤细胞的杀伤程度)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以小于约200pM、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、小于约1.5pM或小于约1.45pM的 $EC_{50}$ 值诱导T细胞介导的肿瘤细胞杀伤(例如,对PEO1细胞的PBMC介导的杀伤),如例如使用本文实例7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。

[0136] 本发明还包含抗CD28/抗MUC16双特异性抗原结合分子,其以介于1.0pM与10 $\mu$ M之

间的EC<sub>50</sub>值与CD28表达性人和/或猕猴T细胞结合。在某些实施例中,抗CD28/抗MUC16双特异性抗原结合分子以介于9.2μM与120nM之间的EC<sub>50</sub>值与CD28表达性人和/或猕猴T细胞结合。例如,本发明包含抗CD28/抗MUC16双特异性抗原结合分子,其以约1pM、约10pM、约100pM、约500pM、约1nM、约2nM、约5nM、约10nM、约20nM、约30nM、约40nM、约50nM、约60nM、约70nM、约80nM、约90nM、约100nM、约200nM、约300nM、约500nM、约800nM、约1000nM、约2μM、约4μM、约6μM、约8μM、约10μM或更大的EC<sub>50</sub>值与CD28表达性人T细胞结合。

[0137] 本发明还包含抗CD28/抗MUC16双特异性抗原结合分子,其表现出选自自由以下组成的组的一个或多个特性:(a) 活化T细胞,诱导IL-2释放以及人PBMC中的CD25+和PD-1上调(参见例如本文的实例6和7);(b) 增加人或猕猴T细胞介导的对表达MUC16的细胞系的细胞毒性(参见例如本文的实例7);(c) 在表达MUC16的细胞系上诱导初始灵长类T细胞介导的细胞毒性(参见例如本文的实例7);(e) 耗竭小鼠的肿瘤细胞(例如,本文的实例8);(f) 增强小鼠的肿瘤清除(例如,本文的实例8);(g) 不诱导猕猴的全身性T细胞活化。

[0138] 本发明包含能够耗竭受试者的肿瘤细胞的抗CD28/抗MUC16双特异性抗原结合分子(参见例如,实例9)。例如,根据某些实施例,提供了抗CD28/抗MUC16双特异性抗原结合分子,其中向受试者双次施用双特异性抗原结合分子(例如,以约5.0mg/kg、约2.5mg/kg、约1.0mg/kg、约0.5mg/kg、约0.2mg/kg、约0.1mg/kg、约0.05mg/kg、约0.02mg/kg、约0.01mg/kg或更少的剂量)导致受试者的肿瘤细胞数量减少。根据某些实施例,提供了抗CD28/抗MUC16双特异性抗原结合分子,其中向受试者双次施用双特异性抗原结合分子(例如,以约2500mg/kg、约1000mg/kg、约500mg/kg、约200mg/kg、约100mg/kg、约50mg/kg、约25mg/kg或更少的剂量)导致受试者的肿瘤细胞数量减少。

[0139] 表位作图和相关技术

[0140] 本发明的抗原结合分子所结合的CD28或MUC16上的表位可以由CD28蛋白或MUC16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MUC16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单体中含有的氨基酸相互作用,或者可以与CD28二聚体的两个不同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,不同的抗体可以结合抗原上的不同区域,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。

[0141] 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:常规交叉阻断测定法,如在以下文献中描述的常规交叉阻断测定法:《抗体(Antibodies)》,Harlow和Lane(冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Press),冷泉港(Cold Spring Harb.),纽约(N.Y.));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分析, 从而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。

[0142] 本发明进一步包含抗CD28和抗MUC16抗体, 其与同本文所述的特定示例性抗体(例如, 包括本文表1和3中所示的氨基酸序列中的任何一个的抗体)中的任何一个所结合相同的表位结合。同样, 本发明还包含抗CD28和/或抗MUC16抗体, 其与本文所述的特定示例性抗体(例如, 包括本文表1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/或MUC16结合。

[0143] 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MUC16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所结合相同的表位结合, 和/或其中第二抗原结合结构域与MUC16上的与本文所描述的特定示例性MUC16特异性抗原结合结构域中的任何一个所结合相同的表位结合。

[0144] 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MUC16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MUC16特异性抗原结合结构域中的任何一个竞争与MUC16结合。

[0145] 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所结合相同的表位结合或与本发明的参考抗原结合分子竞争结合。例如, 为了确定测试抗体是否与CD28(或MUC16)上的与本发明的参考双特异性抗原结合分子所结合相同的表位结合, 首先允许参考双特异性分子与CD28蛋白(或MUC16蛋白)结合。接下来, 评估测试抗体与CD28(或MUC16)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MUC16)结合, 则可以得出结论, 测试抗体与CD28(或MUC16)的不同于参考双特异性抗原结合分子的表位结合。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MUC16)分子结合, 那么测试抗体可以与CD28(或MUC16)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的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所结合相同的表位结合或者空间阻断(或其它现象)是否导致所观察到的结合缺乏。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法进行这种实验。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结合同一表位。如果仅减少或消除一种抗原结合蛋白的结合的氨基酸突变的一个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”。

[0146] 为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,上文所描述的结合方法以两种定向进行:在第一种定向中,使参考抗原结合分子在饱和条件下与CD28蛋白(或MUC16蛋白)结合,然后评估测试抗体与CD28(或MUC16)分子的结合。在第二种定向中,使测试抗体在饱和条件下与CD28(或MUC16)分子结合,然后评估参考抗原结合分子与CD28(或MUC16)分子的结合。如果在两种定向上只有第一个(饱和的)抗原结合分子能够与CD28(或MUC16)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MUC16)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所结合相同的表位结合,但是可以通过结合重叠或相邻的表位来空间阻断参考抗体的结合。

[0147] 抗原结合域的制备及双特异性分子的构建

[0148] 可以通过本领域已知的任何抗体产生技术制备对特定抗原具有特异性的抗原结合结构域。一旦获得,对两种不同抗原(例如,CD28和MUC16)特异的两种不同的抗原结合结构域可以相对于彼此适当地排列,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一种或多种个体组分(例如,重链和轻链)衍生自嵌合抗体、人源化抗体或完全人抗体。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(或任何其它人抗体生成技术),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MUC16)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、表位等的所期望的特性。用所期望的人恒定区替代小鼠恒定区以产生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。

[0149] 可以使用经基因工程化的动物来制造人双特异性抗原结合分子。例如,可以使用无法重排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。可以使用这种经基因修饰的小鼠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,所述重链与相同的轻链缔合,所述轻链包括衍生自两个不同的人轻链可变区基因区段之一的可变结构域。(有关这种工程化的小鼠及其产生双特异性抗原结合分子的用途的详细讨论,参见例如US 2011/0195454)。

[0150] 生物等效物

[0151] 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MUC16的能力的氨基酸序列的抗原结合分子。当与亲本序列比较时,此类变体分子包括氨基酸的一个或多个添加、缺失或取代,但展现出与所述抗原结合分子的生物活性基本相同的生物活

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,但编码基本上与本发明所述的抗原结合分子生物等效的抗原结合分子。上文讨论了此类变体氨基酸和DNA序列的实例。

[0152] 本发明包含与本文所示的任何示例性抗原结合分子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相似的实验条件下以相同的摩尔剂量施用(单次剂量或多次剂量)时吸收速率和吸收程度不显示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,因为有意并且反映在标记上的这种吸收速率差异在例如长期使用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。

[0153] 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。

[0154] 在一个实施例中,与不存在参考产品和生物产品之间的转换的持续治疗相比,如果患者可以在参考产品和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。

[0155] 在一个实施例中,如果两种抗原结合蛋白均通过针对一个或多个使用条件的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。

[0156] 生物等效性可以通过体内和体外方法来证明。生物等效性测量包含,例如,(a)在人或其它哺乳动物中的体内试验,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预测的体外试验;(c)在人或其它哺乳动物中的体内试验,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。

[0157] 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必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键。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。

[0158] 物种选择性和物种交叉反应性

[0159] 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MUC16结合但不与来自其它物种的MUC16结合的抗原结合分子。本发明还包含与人CD28和来自一种或多种非人物种的CD28结合的抗原结合分子;和/或与人MUC16和来自一种或多种非人物种的MUC16结合的抗原结合分子。

[0160] 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MUC16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MUC16中的一种或多种结

合或不与其结合。例如,在本发明的具体示例性实施例中,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MUC16的第二抗原结合结构域。

**[0161] 免疫缀合物**

**[0162]** 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)。

**[0163] 治疗配方和给药**

**[0164]** 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配制。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)》,(马克出版公司(Mack Publishing Company),伊斯顿,宾夕法尼亚州。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“用于肠胃外制剂的赋形剂的汇编(Compendium of excipients for parenteral formulations)”PDA(1998)《药物科学与技术杂志(J Pharm Sci Technol)》52:238-311。

**[0165]** 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、病症、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用于成年患者的治疗目的时,可能是有利的是,通常以约0.01mg/kg到约20mg/kg体重、更优选地,约0.02mg/kg到约7mg/kg体重、约0.03mg/kg到约5mg/kg体重或约0.05mg/kg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。根据病症的严重程度,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,并相应地调整剂量。此外,可以使用本领域熟知的方法进行剂量的种间类推(例如,Mordenti等人,1991,《药学研究(Pharmaceut.Res.)》8:1351)。

**[0166]** 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.BioI.Chem.)》262:4429-4432)。引入的方法包含但不限于皮内、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。可以通过任何方便的途径施用组合物,例如通过输注或团注、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,并且可以将其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。

**[0167]** 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,就可以轻易地丢弃空药筒,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装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。

[0168] 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。实例包括但不限于AUTOPEN<sup>TM</sup> (英国伍德斯托克的欧文芒福德公司 (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK))、DISETRONIC<sup>TM</sup>笔 (瑞士波道夫的Disetronic医疗系统公司 (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland))、HUMALOG MIX 75/25<sup>TM</sup>笔、HUMALOG<sup>TM</sup>笔、HUMALIN 70/30<sup>TM</sup>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 NOVOPEN<sup>TM</sup> (丹麦哥本哈根的诺和诺德公司 (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark))、NOVOPEN JUNIOR<sup>TM</sup> (丹麦哥本哈根的诺和诺德公司)、BD<sup>TM</sup>笔 (新泽西州富兰克林湖的贝迪医疗公司 (Becton Dickinson))、OPTIPEN<sup>TM</sup>、OPTIPEN PRO<sup>TM</sup>、OPTIPEN STARLET<sup>TM</sup>以及OPTICLIK<sup>TM</sup> (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括但不限于SOLOSTAR<sup>TM</sup>笔 (赛诺菲公司)、FLEXPEN<sup>TM</sup> (诺和诺德公司) 以及KWIKPEN<sup>TM</sup> (礼来公司)、SURECLICK<sup>TM</sup>自动注射器 (加利福尼亚州的千橡市安进公司 (Amgen, Thousand Oaks, CA))、PENLET<sup>TM</sup> (德国斯图加特的Haselmeier公司 (Haselmeier, Stuttgart, Germany))、EPIPEN (Dey公司 (Dey, L.P.)) 以及HUMIRA<sup>TM</sup>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。

[0169] 在某些情况下,可以在控释系统中递送药物组合物。在一个实施例中,可以使用泵 (参见Langer, 同上文; Sefton, 1987, 《CRC: 生物医学工程评论 (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, CRC出版社, 波卡拉顿, 佛罗里达州。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小部分 (参见例如, Goodson, 1984, 《控释医学应用》, 同上文, 第2卷, 第115-138页)。其它受控释放系统在Langer, 1990, 《科学》249:1527-1533的评论中讨论。

[0170] 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。可以通过已知的方法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, 其可以与适当的增溶剂 (如醇 (例如, 乙醇)、多元醇 (例如, 丙二醇、聚乙二醇))、非离子表面活性剂 [例如, 聚山梨醇酯80、HC0-50 (氢化蓖麻油的聚氧乙烯 (50mol) 加合物)] 等组合使用。作为油性介质, 可以采用例如芝麻油、大豆油等, 其可以与如苯甲酸苄酯、苯甲醇等增溶剂组合使用。如此制备的注射剂优选地填充在适当的安瓿中。

[0171] 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于配合一定剂量的活性成分的单位剂量的剂型。这种单位剂量的剂型包含例如片剂、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, 优选地上述抗体的含量为约5mg到约100mg, 对于其它剂型, 约10mg到约250mg。

[0172] 抗原结合分子的治疗用途

[0173] 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, MUC16) 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任何抗体或双特异性抗原结合分子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MUC16活性的抑制或降低或者MUC16+细胞的耗竭的人或非人动物。

[0174] 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MUC16双特异性抗原结合分子可以用于治疗、预防和/或改善与MUC16表达或活性或者MUC16+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MUC16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MUC16的细胞包含例如致瘤性卵巢细胞。

[0175] 本发明的抗原结合分子可以用于治疗例如结肠癌、肺癌、乳腺癌、肾癌和膀胱癌亚型中出现的原发性和/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卵巢癌。

[0176] 本发明还包含用于治疗受试者中的残留癌症的方法。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中的一个或多个癌细胞的存在或持续存在。

[0177] 根据某些方面,本发明提供了用于治疗与MUC16表达(例如,表达MUC16的癌症,如卵巢癌)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卵巢癌的方法,所述方法包括在受试者已经接受针对患有癌症例如卵巢癌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MUC16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MUC16双特异性抗原结合分子)(例如,以提供卵巢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。设想的是,可以结合其它双特异性抗原结合分子如结合抗MUC16/抗CD3双特异性抗体使用本发明的抗CD28/抗MUC16抗体。还设想的是,本发明的双特异性抗体将与检查点抑制剂结合使用,例如,靶向PD-1和CTLA-4以及其它靶标的检查点抑制剂。将靶向同一肿瘤抗原(例如,MUC16)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使用。

[0178] 表达MUC16的示例性癌症包含但不限于卵巢癌、乳腺癌、子宫内膜癌、胰腺癌、非小细胞肺癌,肝内胆管癌-瘤形成型、子宫宫颈腺癌和胃腺癌。

[0179] 组合疗法和调配物

[0180] 本发明包含包括本文所述的任何示例性抗体和双特异性抗原结合分子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。

[0181] 可以与本发明的抗原结合分子组合或组合施用的示例性另外的治疗剂包含例如,化学疗法、放射疗法、靶向PD-1(例如,抗PD-1抗体,如派姆单抗、纳武单抗或西米普利单抗(参见US9,987,500))、CTLA-4、LAG3、TIM3等的检查点抑制剂、靶向如GITR、OX40、4-1BB等分

子的共刺激激动剂二价抗体、CD3x双特异性抗体(参见例如W02017/053856A1、W02014/047231A1、W02018/067331A1和W02018/058001A1)、靶向MUC16 X CD3的其它抗体(参见例如W02017/053856A1)以及其它共刺激性CD28双特异性抗体。

[0182] 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、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抗体,所述抗体与如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。本发明的药物组合物(例如,包括如本文所公开的抗CD28/抗MUC16双特异性抗原结合分子的药物组合物)还可以作为包括一种或多种选自以下的治疗组合的治疗方案的一部分施用:“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)。

[0183] 本发明还包含治疗组合,所述治疗组合包括本文提及的任何抗原结合分子和VEGF、Ang2、DLL4、EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EGFRv111、cMet、IGF1R、g-raf、PDGFR- $\alpha$ 、PDGFR- $\beta$ 、FOLH1、PRLR、STEAP1、STEAP2、TMPRSS2、MSLN、CA9、uroplakin或任何上述细胞因子中的一个或多个的抑制剂,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')<sub>2</sub>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一起组合施用和/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。

[0184] 本发明包含包括本文所述的任何抗原结合分子与一种或多种化学治疗剂的组合的组合物和治疗调配物。化学治疗剂的实例包含:烷化剂,如噻替派(thiotepa)和环磷酰胺(Cytosan<sup>TM</sup>);烷基磺酸酯,例如白消安、英丙舒凡和泊舒凡;氮杂环丙烷,如苯佐多巴、卡波醌、美妥多巴、和脲多巴;亚乙基亚胺和甲基胺类(methylamelamines),包含六甲蜜胺、曲他胺、替派、三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲密胺(trimethylolomelamine);氮芥例如苯丁酸氮芥、萘氮芥、胆磷酰胺(cholophosphamide)、雌氮芥、依弗酰胺、氮芥、盐酸甲氧氮芥、美法仑、新氮芥、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲洛磷胺、乌拉莫司汀;亚硝基脲例如卡莫司汀、氯脲菌素、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、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、去甲氧基柔红霉素、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;抗代谢药例如氨甲蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物例如二甲叶酸、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;雄激素类例如卡普睾酮、丙酸屈他雄酮、环硫

雄醇、美雄烷、睾内酯;抗-肾上腺例如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充剂例如亚叶酸(frolic acid);醋葡萄糖内酯;醛磷酸胺糖苷;氨基乙酰丙酸;安吡啶;百垂布西;比生群;依达曲沙;defofamine;地美可辛;地吡醌;依氟鸟氨酸;依利醋铵;依托格鲁;硝酸镓;羟基豚;香菇多糖;氯尼达明;米托胍脲;米托蒽醌;莫派达醇;二胺硝吡啶;喷司他丁;蛋氨酸芥;吡柔比星;鬼臼酸;2-乙基酰肼;丙卡巴肼;PSK<sup>TM</sup>;丙亚胺;西佐喃;螺锗;细交链孢菌酮酸;三环乙亚胺醌;2,2',2"-三氯三乙胺;乌拉坦;长春地辛;达卡巴嗪;甘露莫司汀;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");环磷酸胺;噻替派;紫杉烷类,例如紫杉醇(Taxol<sup>TM</sup>,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(Taxotere<sup>TM</sup>,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;铂类似物例如顺铂和卡铂;长春碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酸胺;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;和药学上可接受的盐、酸或以上任一种的衍生物。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、芳香酶抑制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;以及以上任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0185] 可以在施用本发明的抗原结合分子之前、同时或之后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)。

[0186] 本发明包含药物组合物,其中本发明的抗原结合分子与一种或多种如本文其它地方所描述的另外的治疗活性组分一起共同调制。

[0187] 施用方案

[0188] 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MUC16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”意指在不同时间点,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,向受试者施用于、每个剂量的抗原结合分子。本发明包含以下方法:其包括向患者依次施用单一初始剂量的抗原结合分子,然后施用一种或多种第二剂量的抗原结合分子,并且任选地随后施用一种或多种第三剂量的抗原结合分子。

[0189] 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,适当地调高或降低)。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”,然后以较低频率施用后续剂量(例如,“维持剂量”)。

[0190] 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、 $1\frac{1}{2}$ 、2、 $2\frac{1}{2}$ 、3、 $3\frac{1}{2}$ 、4、 $4\frac{1}{2}$ 、5、 $5\frac{1}{2}$ 、6、 $6\frac{1}{2}$ 、7、 $7\frac{1}{2}$ 、8、 $8\frac{1}{2}$ 、9、 $9\frac{1}{2}$ 、10、 $10\frac{1}{2}$ 、11、 $11\frac{1}{2}$ 、12、 $12\frac{1}{2}$ 、13、 $13\frac{1}{2}$ 、14、 $14\frac{1}{2}$ 、15、 $15\frac{1}{2}$ 、16、 $16\frac{1}{2}$ 、17、 $17\frac{1}{2}$ 、18、 $18\frac{1}{2}$ 、19、 $19\frac{1}{2}$ 、20、 $20\frac{1}{2}$ 、21、 $21\frac{1}{2}$ 、22、 $22\frac{1}{2}$ 、23、 $23\frac{1}{2}$ 、24、 $24\frac{1}{2}$ 、25、 $25\frac{1}{2}$ 、26、 $26\frac{1}{2}$ 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所述序列中的下一个剂量之前施用给患者的抗原结合分子的剂量。

[0191] 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MUC16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。

[0192] 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。施用频率也可以在医师的治疗过程中根据临床检查后个体患者的需要进行调整。

[0193] 在一个实施例中,将抗原结合分子(例如,特异性地结合MUC16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。

[0194] 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。

[0195] 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。这些引用值的中间值与范围也意在成为本发明的部分。

[0196] 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。

#### [0197] 抗体的诊断用途

[0198] 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MUC16或者CD28表达性或MUC16表达性的细胞。例如,可以使用抗CD28 x MUC16抗体或其片段来诊断以CD28或MUC16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MUC16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二级抗体组合用于诊断应用。可检测标记或报告分子可以是放射性同位素,如<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S或<sup>125</sup>I;如异硫氰酸荧光素或罗丹明等荧光或化学发光部分;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MUC16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MUC16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MUC16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MUC16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MUC16水平,以初步建立基线或标准CD28或MUC16水平。然后可以将此基线CD28或MUC16水平与从疑似患有CD28或MUC16相关疾病或病状的个体获得的样品中测量到的CD28或MUC16水平进行比较。

#### [0199] 实例

[0200] 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,但是应该考虑一些实验误差和偏差。除非另外指明,否则份数是重量份,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。

#### [0201] 背景技术

[0202] 在T细胞受体(TCR)/CD3复合物与肽-MHC复合物接合时启动T细胞活化(“信号1”);然后,通过第二“共刺激”受体(如T细胞上的CD28受体)与靶细胞上其一个或多个同源配体接合而增强活化(信号2)。最近描述的基于CD3的“双特异性抗体”通过以下发挥作用:替代常规的信号1,通过用双特异性的一个臂结合肿瘤特异性抗原(TSA)将T细胞连接到肿瘤细胞,并且用另一个臂桥接TCR/CD3。虽然这些所谓的TSAxCD3双特异性中的一些已经在癌症患者中展示出有前景的抗肿瘤疗效,但是其活性仍有待优化。如本文其它地方所述,本发明引入了一类新颖的双特异性抗体,所述双特异性抗体通过将第二个TSA桥接到T细胞上的共刺激CD28受体来模拟信号2。这些双特异性抗体被称为TSAxCD28双特异性。如本文所描述的,本发明的一种示例性抗体对卵巢癌抗原(例如,MUC16)具有特异性。与广泛活化T细胞并在早期临床试验中导致严重毒性的CD28超激动剂不同,这些TSAxCD28双特异性抗体在单独用于基因人源化免疫活性小鼠模型或灵长类动物时,示出有限的活性且无毒性。然而,当与TSAxCD3双特异性组合时,本发明的示例性抗体增强了T细胞与其靶细胞之间的人工突触,加强了T细胞活化,并且显著改善了多种异种和同种肿瘤模型中CD3双特异性的抗肿瘤活性。将此类新颖的CD28共刺激双特异性抗体与新兴的TSAxCD3双特异性抗体组合,可以提供

具有潜在增强抗肿瘤疗效的耐受性良好的“现成”抗体疗法。

[0203] T细胞识别和杀伤其细胞靶标(如病毒感染的细胞或肿瘤细胞)的能力取决于一系列协调的相互作用。其中最重要的是TCR复合物(所述复合物包含相关联的CD3 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ 链)对靶细胞的识别和结合;这种相互作用被称为用于T细胞活化的“信号1”。TCR可以识别存在于在靶细胞表面表达的MHC蛋白凹槽中的病毒或肿瘤肽。这种结合通常是低亲和力的;因此成功的触发信号1要求许多TCR复合物沿着T细胞与其靶细胞之间的界面聚集,并且此界面被称为免疫突触(J.B.Huppa、M.M.Davis,“T细胞-抗原识别和免疫突触(T-cell-antigen recognition and the immunological synapse)”《自然评论:免疫学(Nat Rev Immunol)》3,973-983(2003))。然后通过与如CD28等共刺激受体的另外的相互作用来进一步促进T细胞活化和增殖(“信号2”)(J.H.Esensten、Y.A.Helou、G.Chopra、A.Weiss、J.A.Bluestone,“CD28共刺激:从机制到治疗(CD28 Costimulation:From Mechanism to Therapy)”《免疫性(Immunity)》44,973-988(2016))。当T细胞通过TCR复合物识别靶细胞并通过CD28与其在专业抗原呈递细胞或靶细胞上的一个或多个同源配体(CD80/B7.1和/或CD86/B7.2)结合来接合信号2时,T细胞的活化被增强。如同信号1,CD28介导的信号2被认为是通过在免疫突触处共聚集而发生的。

[0204] 在过去的二十年中,靶向肿瘤特异性抗原(TSA)的常规单克隆抗体已经被用作抗肿瘤治疗剂(G.Salles等人,“B细胞血液恶性肿瘤中的利妥昔单抗:20年临床经验综述(Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies:A Review of 20Years of Clinical Experience)”《治疗进展(Adv Ther)》34,2232-2273(2017);M.V.Mateos等人,“用于未治疗的骨髓瘤的达雷木单抗加硼替佐米、美法仑和泼尼松(Daratumumab plus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone for Untreated Myeloma)”《新英格兰医学期刊(N Engl J Med)》378,518-528(2018);W.Eiermann、G.“国际赫赛汀研究,曲妥珠单抗与化学疗法组合用于治疗HER2阳性转移性乳腺癌:关键的试验数据(International Herceptin Study, Trastuzumab combined with chemotherapy for the treatment of HER2-positive metastatic breast cancer:pivotal trial data)”《肿瘤学年鉴(Ann Oncol)》12增刊1, S57-62(2001);J.M.Connors等人,“本妥昔单抗与化学疗法用于第III阶段或第IV阶段霍奇金淋巴瘤(Brentuximab Vedotin with Chemotherapy for Stage III or IV Hodgkin's Lymphoma.)”《新英格兰医学期刊》378,331-344(2018);V.Dieras等人,“曲妥珠单抗美坦新与卡培他滨加拉帕替尼在先前治疗过HER2阳性晚期乳腺癌(EMILIA)的患者中:对来自随机的开放标签的3期试验的最终总存活率结果的描述性分析(Trastuzumab emtansine versus capecitabine plus lapatinib in patients with previously treated HER2-positive advanced breast cancer(EMILIA):a descriptive analysis of final overall survival results from a randomised, open-label, phase 3 trial)”《柳叶刀肿瘤学(Lancet Oncol)》18,732-742(2017))。然而,此类抗体诱导T细胞介导的细胞毒性的能力有限,而是通过促进抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)或通过向肿瘤细胞递送毒素来发挥作用。最近,一类新型双特异性抗体(TSA $\times$ CD3)兴起,其可以通过替代机制将T细胞连接到肿瘤细胞并活化CD3/TCR复合物(通常通过CD3的 $\epsilon$ 链)来有效地触发T细胞介导的肿瘤细胞杀伤,从而模拟信号1。最近,这种双特异性抗体的早期版本(一个臂与白血病细胞上的CD19结合,而另一个臂与CD3结合)获得了B细胞急性淋巴细胞白

血病的监管批准(R.Bargou等人,“通过非常低剂量的T细胞接合抗体使癌症患者中的肿瘤消退(Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell engaging antibody.)”《科学》321,974-977(2008);H.Kantarjian等人,“博纳吐单抗与化学疗法用于晚期急性淋巴细胞白血病(Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia.)”《新英格兰医学期刊》376,836-847(2017))。最近,已经示出双特异性的更先进的版本针对非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's Lymphomas)具有良好的活性,所述双特异性靶向这些淋巴瘤上的CD20(E.J.Smith等人,“触发T细胞对B细胞的杀伤的一种新颖的天然形式的双特异性抗体在小鼠肿瘤模型和猕猴中具有稳健的活性(A novel, native-format bispecific antibody triggering T-cell killing of B cells is robustly active in mouse tumor models and cynomolgus monkeys.)”《科技报告(Sci Rep)》5,17943(2015);L.L.Sun等人,“用于治疗B细胞恶性肿瘤的抗CD20/CD3T细胞依赖性双特异性抗体(Anti-CD20/CD3 T cell-dependent bispecific antibody for the treatment of B cell malignancies)”《科学转化医学(Sci Transl Med)》7,287ra270(2015);M.Bacac等人,“用奥比努单抗预处理的CD20-TCB作为下一代血液恶性肿瘤治疗(CD20-TCB with Obinutuzumab Pretreatment as Next-Generation Treatment of Hematologic Malignancies)”《临床癌症研究(Clin Cancer Res)》24, 4785-4797(2018);R.Bannerji等人,“抗CD20 x抗CD3双特异性抗体REGN1979在复发性/难治性滤泡性淋巴瘤(FL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)和其它B细胞非霍奇金氏淋巴瘤(B-NHL)亚型患者中的新兴临床活性(Emerging Clinical Activity of REGN1979, an Anti-CD20 x Anti-CD3 Bispecific Antibody, in Patients with Relapsed/Refractory Follicular Lymphoma(FL), Diffuse Large B-Cell Lymphoma(DLBCL), and Other B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma(B-NHL) Subtypes)”《美国血液学学会(American Society of Hematology)》, (2018);L.Budde等人,“全长双特异性CD20/CD3抗体Mosunetuzumab在复发性/难治性B细胞非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)中展示出临床活性:1期研究的中期安全性和疗效结果(Mosunetuzumab, a Full-Length Bispecific CD20/CD3 Antibody, Displays Clinical Activity in Relapsed/Refractory B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma(NHL): Interim Safety and Efficacy Results from a Phase 1 Study)”《美国血液学学会》, (2018))。然而,尽管TSAxCD3双特异性抗体正在成为血液恶性肿瘤免疫疗法的一个重要的新类别,但交叉研究比较(A.Zhukovsky、R.J.Morse、M.V.Maus,“双特异性抗体和CAR:利用T细胞重新定向的广义免疫疗法(Bispecific antibodies and CARs: generalized immunotherapeutics harnessing T cell redirection)”《当前免疫学观点(Curr Opin Immunol)》40, 24-35(2016))表明,在一些情况下,所述双特异性抗体可能无法实现在个性化嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)疗法中观察到的疗效水平。

[0205] CAR-T疗法具有强大疗效的原因之一是,嵌合抗原受体(CAR)被工程化为在与其位于肿瘤细胞上的靶标结合时提供信号1(通过CD3 $\zeta$ 细胞结构域的一部分)和信号2(例如,通过CD28细胞结构域的一部分)。最近,FDA批准了两种用于B细胞恶性肿瘤的CAR-T细胞疗法,所述两种疗法都是通过结合和靶向抗原CD19而发挥作用的(S.S.Neelapu等人,“难治性大B细胞淋巴瘤中的阿基仑赛CAR-T细胞疗法(Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B Cell Lymphoma)”《新英格兰医学期刊》377,2531-2544

(2017); S.J.Schuster等人,“难治性B细胞淋巴瘤中的嵌合抗原受体T细胞(Chimeric antigen receptor T cells in refractory B-cell lymphomas)”《新英格兰医学期刊》377,2545-2554(2017))。CAR-T细胞方法可能与严重的副作用(如细胞因子释放综合征(CRS)和神经毒性)相关联(S.S.Neelapu等人,“嵌合抗原受体T细胞疗法-毒性的评估和管理(Chimeric antigen receptor T-cell therapy-assessment and management of toxicities)”《临床肿瘤学自然评论(Nat Rev Clin Oncol)15,47-62(2018); J.Gust等人,“在CD19 CAR-T细胞的过继性免疫疗法之后,神经毒性中的内皮活化和血脑屏障破坏(Endothelial Activation and Blood-Brain Barrier Disruption in Neurotoxicity after Adoptive Immunotherapy with CD19CAR-T Cells)”《癌症发现(Cancer Discov)》7,1404-1419(2017); A.Shimabukuro-Vornhagen等人,“细胞因子释放综合征(Cytokine release syndrome)”《癌症免疫疗法杂志(J Immunother Cancer)》6,56(2018)); 并且由于高度个性化的制造工艺和对预处理化学疗法方案的要求(S.S.Neelapu等人,“难治性大B细胞淋巴瘤中的阿基仑赛CAR-T细胞疗法”《新英格兰医学期刊》377,2531-2544(2017); S.J.Schuster等人,“难治性B细胞淋巴瘤中的嵌合抗原受体T细胞”《新英格兰医学期刊》377,2545-2554(2017); P.Salmikangas、N.Kinsella、P.Chamberlain,“用于癌症免疫疗法的嵌合抗原受体T细胞(CART-细胞)-行业的移动靶标?(Chimeric Antigen Receptor T-Cells(CART-Cells)for Cancer Immunotherapy-Moving Target for Industry?)”《药学研究(Pharm Res)》35,152(2018)),许多患者被认为不是合适的候选人。

[0206] 如果可以进一步优化其抗肿瘤活性,特别是如果可以在不牺牲耐受性的情况下完成,或甚至增加肿瘤细胞相对于正常细胞的特异性,则TSAxCD3双特异性抗体作为针对更广泛患者群体的相对良好耐受性和“现成”治疗方案的优势将得到增强。为此目的,假设将TSAxCD3双特异性抗体与一类新颖的独立活化信号2的双特异性抗体配对可以提供潜在的增强的疗效以及增强特异性的机会。因此,设计了第二类双特异性抗体。这些双特异性抗体可以与同一肿瘤特异性抗原上的第二表位或第二个单独的肿瘤抗原接合,其中共刺激受体CD28(TSAxCD28双特异性抗体)在T细胞上表达。推断将TSA1xCD3与TSA2xCD28组合应当允许通过触发信号1和信号2来引导和增强T细胞的替代活化,其特异性仅靶向表达两个表位或两种抗原的肿瘤细胞,从而允许更大的抗肿瘤活性以及增加特异性的机会。

[0207] 本文描述了针对卵巢癌的TSAxCD28共刺激双特异性抗体(MUC16xCD28,其结合MUC16,即在某些癌症中以高水平表达的大型整体膜糖蛋白(H.Suh、K.Pillai、D.L.Morris,“胰腺癌中的粘蛋白:生物学作用,在致癌作用中的意义以及在诊断和疗法中的应用(Mucins in pancreatic cancer:biological role,implications in carcinogenesis and applications in diagnosis and therapy)”《美国癌症研究杂志(Am J Cancer Res)》7,1372-1383(2017)),并且其被切割以释放卵巢肿瘤标志物CA-125(I.Mylonas等人,“正常、增生和恶性子宫内膜组织中肿瘤标志物CA-125的免疫组织化学表达(Immunohistochemical expression of the tumour marker CA-125 in normal, hyperplastic and malignant endometrial tissue)”《抗癌研究(Anticancer Res)》23, 1075-1080(2003))。经基因人源化的免疫活性小鼠以及猕猴中的毒理学研究表明,这些双特异性抗体作为单一药剂展示出有限的活性且无毒性。然而,这些新颖的共刺激双特异性可以有效地与一类新兴的TSAxCD3双特异性组合,以加强异种和同基因肿瘤模型中的抗肿

瘤应答。总的来说,这些数据表明,将此类新颖的基于CD28的双特异性抗体(TSAxCD28)与基于CD3的双特异性抗体(TSAxCD3)组合可以提供具有显著增强的且协同的抗肿瘤活性的耐受性良好的“现成”生物制品解决方案。

[0208] 实例1.抗MUC16xCD28抗体的构建

[0209] 抗CD28抗体的产生

[0210] 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特异性免疫测定法监测抗体免疫应答。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。

[0211] 根据此实例的方法产生的示例性抗CD28抗体的某些生物学特性在下文阐述的实例中详细描述。

[0212] 抗MUC16抗体的产生

[0213] 抗MUC16抗体通过以下获得:用人MUC16抗原免疫经遗传修饰的小鼠或用人MUC16抗原免疫包括编码人免疫球蛋白重链和κ轻链可变区的DNA的工程小鼠。

[0214] 经基因修饰的小鼠用hMUC16小块(涵盖Mucin-16(SEQ ID:49)的最后五个SEA结构域的截短格式)免疫或用hMUC16表达性细胞系(如OVCA-3细胞)免疫。在免疫接种之后,从各小鼠收集脾细胞,并且(1)与小鼠骨髓瘤细胞融合以保持其活力并形成融合瘤细胞,并且针对MUC16特异性进行筛选,或(2)B细胞分选(如US 2007/0280945A1中所描述),使用人MUC16片段作为结合和鉴别反应性抗体(抗原阳性B细胞)的分选剂。

[0215] 最初分离出具有人可变区和小鼠恒定区的针对MUC16的嵌合抗体。针对所需特征(包含亲和力、选择性等)表征和选择抗体。如果需要,用所需人恒定区(例如野生型或经修饰的IgG1或IgG4恒定区)置换小鼠恒定区,以产生完全人抗MUC16抗体。虽然所选择的恒定区可以根据具体用途而变化,但高亲和力抗原结合和靶特异性特性存在于可变区中。

[0216] 根据此实例的方法产生的示例性抗MUC16抗体的某些生物学特性在下文阐述的实例中详细描述。

[0217] 产生结合CD28和MUC16的双特异性抗体

[0218] 使用标准方法构建包括抗MUC16特异性地结合结构域和抗CD28特异性结合结构域的双特异性抗体,其中抗MUC16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MUC16抗体的重链和共同轻链构建双特异性抗体(参见表5)。

[0219] 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MUC16抗体的重链可变区(“MUC16-VH”)。抗MUC16抗CD28两者共享共同的轻链。CD28-VH/MUC16-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MUC16的抗原结合结构域。

[0220] 实例2.重链和轻链可变区氨基酸和核酸序列

[0221] 表1列示了本发明的所选抗MUC16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于表2中。

[0222] 表1:MUC 16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 |
| mAb8799P2 | 2          | 4     | 6     | 8     | 10   | 12    | 14    | 16    |
| mAb8794P2 | 26         | 28    | 30    | 32    | 34   | 36    | 38    | 40    |

[0224] 表2:MUC16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 |
| mAb8799P2 | 1          | 3     | 5     | 7     | 9    | 11    | 13    | 15    |
| mAb8794P2 | 25         | 27    | 29    | 31    | 33   | 35    | 37    | 39    |

[0226] 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于表4中。

[0227] 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 | 18         | 20    | 22    | 24    | 10   | 12    | 14    | 16    |
| mAb14216P2 | 42         | 44    | 46    | 48    | 34   | 36    | 38    | 40    |

[0229] 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 | 17         | 19    | 21    | 23    | 9    | 11    | 13    | 15    |
| mAb14216P2 | 41         | 43    | 45    | 47    | 33   | 35    | 37    | 39    |

[0231] 表5中列示了构建的各种抗MUC16xCD3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。

[0232] 表5:抗MUC16 x抗CD28双特异性抗体的组成部分的汇总

| 双特异性抗体标识符 | 抗 MUC16   | 抗 CD28     | 共同<br>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      |             |
| bs24963D  | mAb8799P2 | mAb14226P2 | ULC3-20     |
| bs32897D  | mAb8794P2 | mAb14216P2 | ULC1-39     |

[0234] 表6示出了本文例证的用于双特异性抗MUC16 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于表7中。

[0235] 表6:抗MUC16 x抗CD28双特异性抗体的氨基酸序列

[0236]

| 双特异性<br>抗体标识<br>符 | 抗 CD28<br>第一抗原结合结构域 (D1) |       |       |       | 抗 MUC16<br>第二抗原结合结构域 (D2) |       |       |       | 共同<br>轻链可变区 |       |       |       |
|-------------------|--------------------------|-------|-------|-------|---------------------------|-------|-------|-------|-------------|-------|-------|-------|
|                   | HCVR                     | HCDR1 | HCDR2 | HCDR3 | HCVR                      | HCDR1 | HCDR2 | HCDR3 | LCVR        | LCDR1 | LCDR2 | LCDR3 |
|                   | bs24963D                 | 18    | 20    | 22    | 24                        | 2     | 4     | 6     | 8           | 10    | 12    | 14    |
| bs32897D          | 42                       | 44    | 46    | 48    | 26                        | 28    | 30    | 32    | 34          | 36    | 38    | 40    |

[0237] 表7:抗MUC16 x抗CD28双特异性抗体的核酸序列

| [0238] 双特异性抗体标识符 | 抗 CD28<br>第一抗原结合结构域 (D1) |       |       |       | 抗 MUC16<br>第二抗原结合结构域 (D2) |       |       |       | 共同<br>轻链可变区 |       |       |       |
|------------------|--------------------------|-------|-------|-------|---------------------------|-------|-------|-------|-------------|-------|-------|-------|
|                  | HCVR                     | HCDR1 | HCDR2 | HCDR3 | HCVR                      | HCDR1 | HCDR2 | HCDR3 | LCVR        | LCDR1 | LCDR2 | LCDR3 |
| bs24963D         | 17                       | 19    | 21    | 23    | 1                         | 3     | 5     | 7     | 9           | 11    | 13    | 15    |
| bs32897D         | 41                       | 43    | 45    | 47    | 25                        | 27    | 29    | 31    | 33          | 35    | 37    | 39    |

[0239] 实例3.CD28是强效的共刺激受体

[0240] 为了确定哪些共刺激受体在提供对T细胞活化重要的共刺激信号方面是有效的,通过在一组同基因肿瘤上强制表达共刺激配体进行的共刺激通路的盲法筛选(表8和图1)再次将CD28与4-1BB一起确立为最强效的共刺激受体之一。表8总结了盲法筛选中无肿瘤小鼠的数量。在三种不同的肿瘤细胞系上进行了测定,这些细胞系被工程化以表达七个不同的共刺激配体。每个细胞中的数量表示总共5只小鼠中无肿瘤的小鼠的数量。

[0241] 表8:具有引入的共刺激配体的工程化细胞系中的肿瘤生长抑制

| [0242] | 共刺激配体       | 共刺激受体 | 淋巴瘤 (EL4) | 癌 (MC38) | 黑色素瘤 (B16F10.9) |
|--------|-------------|-------|-----------|----------|-----------------|
|        | 4-1BBL      | 4-BB  | 3         | 4        | 1               |
|        | CD80 (B7.1) | CD28  | 2         | 2        | 2               |
|        | CD86 (B7.2) | CD28  | 1         | 0        | 2               |
|        | CD70        | CD27  | 5         | 0        |                 |
|        | OX40L       | OX40  | 0         | 0        | 2               |
|        | CD40        | CD40L | 0         | 1        | 0               |
|        | ICOSL       | ICOS  | 0         | 0        | 0               |
|        | 空载体         |       | 0         | 0        | 0               |
|        | 未转染的亲代细胞    |       | 0         | 0        |                 |

[0243] 实例4.抗MUC16xCD28双特异性抗体的表面等离子体共振衍生的结合亲和力和动力学常数

[0244] 为了确定本发明的示例性抗-MUC16xCD28双特异性单克隆抗体的结合动力学,测定了抗MUC16xCD28双特异性抗体与MUC16和/或CD28的表面等离子共振衍生的结合亲和力和动力学常数。

[0245] 使用Biacore T-200仪器,使用实时表面等离子共振生物传感器,确定与本发明纯化的示例性抗MUC16xCD28双特异性单克隆抗体结合的hMUC16.mmh (SEQ ID NO:51)、hCD28.mmh (SEQ ID NO:53) 和mCD28.mmh (鼠CD28.mmh; SEQ ID NO:54) 的平衡解离常数 ( $K_D$  值)。通过与单克隆小鼠抗人Fc抗体的胺偶联衍生CM5 Biacore传感器表面,以捕获本发明的纯化的示例性抗MUC16xCD28双特异性抗体。测试了两个示例性双特异性抗体bs24963D和REGN4615。REGN4615是识别人MUC16和鼠CD28的抗体/scFv,并且有时也被称为抗MUC16xmsCD28抗体。REGN4615中的MUC16臂利用VH和VK-ULC 1-39序列,如针对mAb8794P2在表1中所示出的。mCD28 (PV-1) 在US2004/0116675中进行了描述,其中轻链为SEQ ID NO:11 (还参见US2004/0116675中的图15A),重链为SEQ ID NO:13 (参见图15),对于本文所描述的实验,将其重新格式化为scFv。

[0246] 在由pH为7.4的0.01M HEPES、pH为7.4的0.15M NaCl 0.05% v/v表面活性剂P20 (HBS-ET运行缓冲液) 组成的缓冲液中执行此SPR结合研究。在HBS-ET运行缓冲液中制备了不同浓度的带有C末端myc-myc-6xHis标签的hMUC16 (hMUC16.mmh)、带有C-末端myc-myc-6xHis标签的hCD28 (hCD28.mmh)、带有C-末端myc-myc-6xHis标签的mCD28 (mCD28.mmh),范围为3.33nM到90nM (对于hMuc16) 或22.2nM到600nM (对于hCD28或mCD28) 作为3倍稀释,用于

通过抗MUC16xCD28双特异性抗体和抗MUC16xmCD28双特异性抗体进行亲和力测定。

[0247] 首先,通过与单克隆小鼠抗人Fc抗体的胺偶联衍生MASS-2大容量胺传感器表面,以捕获大约500-900RU的抗MUC16xCD28或抗MUC16xmCD28双特异性单克隆抗体。1RU(应答单位)表示每 $\text{mm}^2$ 1pg的蛋白质,如由制造商限定的。在HBS-ET运行缓冲液中制备了不同浓度的带有C末端myc-myc-6xHis标签的hMUC16(hMUC16.mmh)、带有C-末端myc-myc-6xHis标签的hCD28(hCD28.mmh)、带有C-末端myc-myc-6xHis标签的mCD28(mCD28.mmh),范围为3.33nM到90nM(对于hMuc16)或22.2nM到600nM(对于hCD28或mCD28)作为3倍稀释并且以50 $\mu\text{L}$ /分钟的流速在抗人Fc捕获的抗MUC16xCD28或抗MUC 16xmCD28双特异性单克隆抗体表面上注射5分钟。在HBS-ET运行缓冲液中监测结合的hMUC16、hCD28和mCD28试剂的解离,持续10分钟。缔合率( $k_a$ )常数和解离率( $k_d$ )常数通过使用Scrubber评估软件版本2.0c将实时结合传感图拟合到具有质量传输限制的1:1结合模型来确定。结合解离平衡常数( $K_D$ )和解离半衰期( $t_{1/2}$ )是根据动力学速率常数如下计算的:

$$[0248] \quad K_D (M) = \frac{kd}{ka}, \quad \text{并且} \quad t_{1/2} (\text{分钟}) = \frac{\ln(2)}{60 * kd}$$

[0249] 在下文表9-12中示出了在37°C下与纯化的hMUC16、hCD28、mCD28重组蛋白结合的示例性双特异性抗体的结合动力学参数。

[0250] 表9:抗MUC16xCD28抗体对hMUC16的Biacore结合亲和力

| AbPID                  | mAB 捕获 (RU) | 90 nM hMUC16.mmh 结合 (RU) | Ka (1/Ms)  | Kd (1/s)   | K <sub>D</sub> (M) | T <sub>1/2</sub> (分钟) |
|------------------------|-------------|--------------------------|------------|------------|--------------------|-----------------------|
| [0251] bs24963D (实验 1) | 987.1 ± 9.9 | 365.0                    | 4.41E + 05 | 4.12E - 04 | 9.33E - 10         | 28.0                  |
| bs24963D (实验 2)        | 211.7 ± 1.2 | 120.0                    | 2.38E + 05 | 2.18E - 04 | 9.12E - 10         | 53.1                  |

[0252] 表10:抗MUC16xCD28抗体对hCD28的Biacore结合亲和力

| AbPID           | mAB 捕获 (RU) | 600 nM hCD28.mmh 结合 (RU) | Ka (1/Ms)  | Kd (1/s)   | K <sub>D</sub> (M) | T <sub>1/2</sub> (分钟) |
|-----------------|-------------|--------------------------|------------|------------|--------------------|-----------------------|
| [0253] bs24963D | 985.4±2.7   | 88.9                     | 3.27E + 04 | 5.38E - 03 | 1.65E - 07         | 2.1                   |

[0254] 表11:抗MUC16xmsCD28抗体对hMUC16的Biacore结合亲和力

| AbPID           | mAB 捕获 (RU) | 90 nM hMUC16.mmh 结合 (RU) | Ka (1/Ms)  | Kd (1/s)   | K <sub>D</sub> (M) | T <sub>1/2</sub> (分钟) |
|-----------------|-------------|--------------------------|------------|------------|--------------------|-----------------------|
| [0255] REGN4615 | 1041.0±10.0 | 513.3                    | 6.29E + 05 | 4.72E - 04 | 7.49E - 10         | 24.5                  |

[0256] 表12:抗MUC16xmsCD28抗体对mCD28的Biacore结合亲和力

| AbPID           | mAB 捕获 (RU)  | 90 nM hMUC16.mmh 结合 (RU) | Ka (1/Ms)  | Kd (1/s)   | K <sub>D</sub> (M) | T <sub>1/2</sub> (分钟) |
|-----------------|--------------|--------------------------|------------|------------|--------------------|-----------------------|
| [0257] REGN4615 | 1021.8 ± 4.0 | 25.8                     | 2.07E + 04 | 7.77E - 05 | 3.76E - 09         | 148.6                 |

[0258] 实例5. 抗MUC16xCD28双特异性单克隆抗体与T细胞和靶细胞的结合

[0259] 为了确定本发明的示例性双特异性抗体与人和猕猴T细胞和靶细胞的结合,利用流式细胞术分析来确定MUC16xCD28双特异性抗体与OVACR-3、PE01、阴性对照Raji细胞、人

和猕猴T细胞的结合,然后用藻红蛋白(PE)标记或Alexa-647标记的抗人IgG抗体进行检测。简而言之,  $1 \times 10^5$  个细胞/孔在4℃下与示例性MUC16xCD28双特异性抗体或IgG4同种型对照的连续稀释液一起温育30分钟,所述同种型对照与人抗原结合而与人或猕猴CD28无交叉反应,针对人和猕猴T细胞,范围为133nM到32.6pM,而针对表达Muc16的细胞和阴性对照Raji细胞,范围为133nM到8.14pM。温育之后,用含有1%过滤FBS的冷PBS洗涤细胞两次,并将PE缀合的或Alexa647缀合的抗人第二抗体分别添加到表达MUC16的细胞或人/猕猴T细胞中并另外温育30分钟。将活/死染料添加到人和猕猴T细胞温育中。使用不含抗体或仅含第二抗体的孔作为对照。

[0260] 与表达MUC16的细胞一起温育之后,洗涤细胞,重悬于200μL含有1%过滤FBS的冷PBS中,并且在BD FACS Canto II上通过流式细胞术分析。

[0261] 与人或猕猴T细胞一起温育之后,洗涤细胞,并且在亮染色缓冲液中用抗CD2、抗CD16、抗CD4和抗CD8抗体的混合物染色,在4℃下另外温育20分钟。洗涤之后,将细胞重悬于200μL含1%过滤FBS的冷PBS中,在活/CD2+/CD4+/CD16-或活/CD2+/CD8+/CD16-门中进行门控,并且在BD FACS LSR-Fortessa-X20上通过流式细胞术进行分析。

[0262] 通过流式细胞术测试示例性MUC16xCD28双特异性抗体与人T细胞表面的结合。bs24963D以  $2.61 \times 10^{-7}$  M的EC<sub>50</sub>值与CD4+T细胞结合。bs24963D以  $2.53 \times 10^{-7}$  M的EC<sub>50</sub>值与CD8+T细胞结合。bs32897D以  $9.16 \times 10^{-6}$  M的EC<sub>50</sub>值与CD4+T细胞弱结合。bs32897D还以  $7.58 \times 10^{-6}$  M的EC<sub>50</sub>值与CD8+T细胞弱结合。结果汇总于表13中。

[0263] 表13:抗MUC16xCD28与人T细胞的结合

| 抗体PiD    | EC <sub>50</sub> 人CD4+T细胞FACS [M] | EC <sub>50</sub> 人CD8+T细胞FACS [M] |
|----------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| bs24963D | 2.61E-07M                         | 2.53E-07M                         |
| bs32897D | 9.16E-06M                         | 7.58E-06M                         |
| 同种型对照    | 无结合                               | 无结合                               |

[0265] 通过流式细胞术测试示例性MUC16xCD28双特异性抗体与猕猴T细胞表面的结合。示例性bs24963D以  $2.03 \times 10^{-7}$  M的EC<sub>50</sub>值与CD4+T细胞结合。bs24963D以  $1.22 \times 10^{-7}$  M的EC<sub>50</sub>值与CD8+T细胞结合。示例性bs32897D分别以

[0266]  $2.87 \times 10^{-10}$  M和  $5.96 \times 10^{-10}$  M的EC<sub>50</sub>值与OVCAR-3和PEO1细胞结合。示例性bs24963D不展现出与MUC16阴性对照RAJI细胞的任何结合。结果汇总于表14中。

[0267] 表14:抗MUC16xCD28与猕猴T细胞的结合

| 抗体PiD    | EC <sub>50</sub> 猕猴CD4+T细胞FACS [M] | EC <sub>50</sub> 猕猴CD8+T细胞FACS [M] |
|----------|------------------------------------|------------------------------------|
| bs24963D | 2.03E-07M                          | 1.22E-07M                          |
| bs32897D | 5.70E-06M                          | 3.02E-06M                          |
| 同种型对照    | 无结合                                | 无结合                                |

[0269] 通过流式细胞术测试示例性MUC16xCD28双特异性抗体与表达MUC16的细胞系表面的结合。bs24963D分别以  $6.09 \times 10^{-10}$  M和  $4.67 \times 10^{-10}$  M的EC<sub>50</sub>值与OVCAR-3和PEO1结合。bs32897D不展现出与MUC16阴性对照RAJI细胞的任何结合。bs24963D分别以  $2.87 \times 10^{-10}$  M和  $5.96 \times 10^{-10}$  M的EC<sub>50</sub>值与OVCAR-3和PEO1结合。bs24963D不展现出与MUC16阴性对照RAJI细胞的任何结合。同种型对照抗体不展现出与人或猕猴T细胞的任何结合,也不与表达MUC16的细胞系结合。结果汇总于表15中。

[0270] 表15:抗MUC16xCD28与表达MUC16的细胞的结合

|        | 抗体 PiD   | EC <sub>50</sub> OVCAR-3 细胞<br>FACS [M] | EC <sub>50</sub> PEO1 细胞<br>FACS [M] | EC <sub>50</sub> Raji 细胞 FACS<br>[M] |
|--------|----------|-----------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| [0271] | bs24963D | 6.09E - 10M                             | 4.67E - 10M                          | 无结合                                  |
|        | bs32897D | 2.87E - 10M                             | 5.96E - 10M                          | 无结合                                  |
|        | 同种型对照    | 无结合                                     | 无结合                                  | 无结合                                  |

[0272] 实例6.MUC16xCD28双特异性抗体的初级生物测定

[0273] T细胞活化是通过刺激T细胞受体 (TCR) 实现的,所述受体识别抗原呈递细胞 (APC) 上由I类或II类主要组织相容性复合物 (MHC I或MHC II) 蛋白质呈递的特定肽 (Goldrath等人,“选择和维持多样T细胞库 (Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire)”,《自然 (Nature) 》402,255-262 (1999))。活化的TCR反过来启动一系列信号传导事件,所述信号传导事件可以由报告基因监测,由各种转录因子 (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 $\kappa$ -轻链增强子 (NF $\kappa$ B)) 驱动。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,“B7-CD28超家族 (The B7-CD28 Superfamily)”,《免疫学自然评论 (Nat.Rev.Immunol.) 》,2 (2):116-26 (2002))。共刺激分子CD28由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 $\kappa$ 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) 很重要 (Smeets等人,“由T细胞受体/CD28共刺激诱导的NF $\kappa$ B活化由蛋白激酶C- $\theta$ 介导 (NF $\kappa$ B activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C- $\theta$ )”,《美国国家科学院院刊 (PNAS) 》,97 (7):3394-3399 (2012))。

[0274] 为了鉴定在存在初级刺激和MUC16靶标表达的情况下增强T细胞活性的抗体,在使用人初级T细胞的基于细胞的测定中表征了本发明的示例性抗MUC16xCD28双特异性抗体。所述测定评估了抗MUC16/CD28双特异性抗体在存在和不存在初级刺激以及在存在和不存在靶标表达的情况下的行为。

[0275] 使用初级人CD4<sup>+</sup>T细胞的IL-2功能测定:

[0276] 开发初级CD4<sup>+</sup>T细胞/APC功能测定,以评估在与抗MUC16 x CD28双特异性抗体接合时CD28活化对IL-2产生的影响。

[0277] a) 人初级CD4<sup>+</sup>T细胞分离:

[0278] 从健康的供体白细胞包中分离人外周血单核细胞 (PBMC)。按照制造商的推荐方案使用50mL SepMate<sup>TM</sup>管通过密度梯度离心来完成PBMC分离。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稀释的白血球。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<sup>+</sup>T细胞。将分离的CD4<sup>+</sup>T细胞冷冻在含有10% DMSO的FBS中,其中浓度为每小瓶 $5 \times 10^6$ 个细胞。

[0279] b) 来自利用CD28抗体处理的初级CD4<sup>+</sup>T细胞的IL-2释放:

[0280] 在此测定中,通过CD3分子的交联,与T细胞受体 (TCR) 复合,使用 $\alpha$ Muc16 x $\alpha$ CD3双特异性抗体 (REGN4018) 与人靶细胞、OVCAR3或PEO-1温育,在细胞表面表达Muc16,人初级CD4<sup>+</sup>T细胞被活化。REGN4018的Muc16臂与表达Muc16的靶细胞的结合驱动CD3分子的聚集,

并且提供第一信号,这是在不存在或没有添加同种异体响应的情况下刺激T细胞所必需的。然而,在此测定中,为了完成T细胞活化并增加IL-2释放水平,必须通过交联CD28分子提供共同刺激。在此,双特异性CD28抗体与CD4<sup>+</sup>T细胞上的CD28和OVCAR3或PEO-1细胞上的Muc16相互作用,并且驱动共刺激分子CD28的群集-活化。组合的TCR和CD28接合导致释放到培养基中的IL-2产量有所增强。使用来自珀金埃尔默公司(PerkinElmer)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。

[0281] 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来自供体104的人CD4<sup>+</sup>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 $1 \times 10^5$ 个细胞/孔的浓度平板接种在96孔圆底平板中。在初级刺激培养基中用丝裂霉素C处理OVCAR3和PEO-1细胞,对于OVCAR3,使用25 $\mu$ g/mL丝裂霉素C并且对于PEO-1细胞,使用10 $\mu$ g/mL丝裂霉素C。在37°C、5%CO<sub>2</sub>下温育1小时之后,将靶细胞用洗涤缓冲液(PBS+2%FBS)洗涤3次并添加到最终浓度为每孔 $1 \times 10^4$ 个OVCAR3或 $2.5 \times 10^4$ 个PEO-1细胞的含有CD4<sup>+</sup>T细胞的孔中。随后,在存在5nM恒定的REGN4018( $\alpha$ Muc16 x  $\alpha$ CD3)或阴性对照抗体(hIgG4同种型对照=H4sH)的情况下,将3pM到200nM范围内的1:4连续稀释的CD28双特异性或对照抗体添加到孔中。10点稀释液的终点不含CD28抗体,这是背景信号。将平板在37°C、5%CO<sub>2</sub>下温育72小时之后,将其离心以沉淀细胞,并且收集20 $\mu$ L培养基上清液。由此,根据制造商的方案,在人IL-2AlphaLISA测定中测试了5 $\mu$ L。在多标签酶标仪Envision上获取测量值,并绘制原始RLU(相对光单位)值。一式两份地对所有连续稀释液进行测试。

[0282] 通过使用GraphPad Prism<sup>TM</sup>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EC<sub>50</sub>值。使用以下等式计算最大诱导倍数:

$$[0283] \quad \text{诱导倍数} = \frac{\text{在测试的剂量范围内的最大平均 RLU 值}}{\text{平均 IL-2 值 (背景)}}$$

[0284] 在存在在靶细胞上表达的初级刺激(抗MUC16 x CD3)和MUC16的情况下hMUC16xhCD28增强了CD4<sup>+</sup>T细胞的活化(如通过IL-2释放所测量的)。

[0285] c) 使用初级人CD4<sup>+</sup>T细胞的IL-2功能测定的结果:

[0286] 在不存在或存在TCR刺激性双特异性抗体(REGN4018=抗Muc16 x抗CD3)的情况下,在功能IL-2释放测定中使用与在细胞表面上表达内源性Muc16的靶细胞(OVCAR3和PEO-1细胞)温育的分离的人CD4<sup>+</sup>T细胞评估了抗Muc16 x抗CD28双特异性抗体通过分离的CD4<sup>+</sup>T细胞上的CD28提供共刺激的能力。

[0287] 表16和17汇总了除5nM恒定的hIgG4 H4sH同种型对照或REGN4018抗Muc16 x抗CD3之外,与OVCAR3或PEO-1细胞共温育的CD4<sup>+</sup>T细胞的诱导倍数。

[0288] 当在不存在定向TCR刺激的情况下,通过REGN4018使用恒定量的H4sH同种型对照将分离的CD4<sup>+</sup>T细胞与OVCAR3或PEO-1靶细胞温育时,在CD28亲本抗体、双特异性抗Muc16 x抗CD28抗体(bs32897D和bs24963D)和阴性H4sH同种型对照抗体之间的检测的IL-2量类似。(表16)

[0289] 相反,在用抗Muc16 x抗CD3(REGN4018)处理的样品中检测到IL-2水平增加。在这些条件下,如果将人CD4<sup>+</sup>T细胞与OVCAR3或PEO-1细胞共温育,则两种CD28双特异性抗体的IL-2水平要比其相应的亲本CD28抗体增加更多。如所预期的,同种型对照没有观察到最小

的IL-2释放。(表17)

[0290] 如果将OVCAR3用作靶细胞,则针对CD28双特异性抗体(bs32897D:5.63x并且 $EC_{50}=606\text{pM}$ 和bs24963D:5.32x并且 $EC_{50}=401\text{pM}$ )测量到类似的剂量依赖性IL-2释放。而对于PEO-1细胞,在两个双特异性分子之间可以观察到IL-2水平的诱导倍数差异。在此,bs24963D(10.94x并且 $EC_{50}=996\text{pM}$ )比bs32897D(5.22x并且由于剂量响应曲线未达到饱和无法确定 $EC_{50}$ )产生更高的IL-2值。

[0291] 在没有TCR刺激的情况下,通过同种异体响应或由抗MUC16xCD3驱动,在存在OVCAR3或PEO-1细胞的情况下,在含有恒定量的同种型对照的孔中,用CD28抗体未观察到可测量的IL-2释放(表16)。表16汇总了与OVCAR3或PEO-1和5nM恒定同种型对照共温育的 $CD4^+$ T细胞的IL-2释放的 $EC_{50}$ 值和诱导倍数。

[0292] 表16:在5nM IgG4同种型对照存在的情况下来自初级人 $CD4^+$ T细胞的IL-2释放的 $EC_{50}$ 和诱导倍数结果:

|        | 抗体                       | OVCAR3        |      | PEO-1         |      |
|--------|--------------------------|---------------|------|---------------|------|
|        |                          | $EC_{50}$ [M] | 诱导倍数 | $EC_{50}$ [M] | 诱导倍数 |
| [0293] | bs32897D                 | N/C           | 1.06 | N/C           | 1.12 |
|        | bs24963D                 | N/C           | 1.33 | N/C           | 1.12 |
|        | 亲本 1 hCD28 (对于 bs32897D) | N/C           | 1.10 | N/C           | 1.30 |
|        | 亲本 2 hCD28 (对于 bs24963D) | N/C           | 1.12 | N/C           | 1.03 |
|        | H4sH 同种型对照               | N/C           | 1.12 | N/C           | 1.48 |

[0294] 表16. 与OVCAR3或PEO-1和5nM恒定H4sH同种型对照共温育的 $CD4^+$ T细胞相对于背景信号的IL-2释放的表列的 $EC_{50}$ 值和最大诱导倍数。

[0295] N/C=未计算

[0296] 相反,在用抗MUC16xCD3处理的样品中检测到可测量的IL-2水平(RLU)。在这些条件下,如果将人 $CD4^+$ T细胞与OVCAR3或PEO-1细胞共温育,则两种CD28双特异性抗体的IL-2水平要比其亲本CD28抗体增加更多。如所预期的,同种型对照没有观察到IL-2释放(表17)。表17汇总了与OVCAR3或PEO-1和5nM恒定5nM抗MUC16xCD3共温育的 $CD4^+$ T细胞的IL-2释放的 $EC_{50}$ 值和诱导倍数。

[0297] 表17:在5nM REGN4018(抗Muc16 x抗CD3)存在的情况下来自初级人 $CD4^+$ T细胞的IL-2释放的 $EC_{50}$ 和诱导倍数结果:

|        | 抗体                      | OVCAR3        |      | PEO-1         |       |
|--------|-------------------------|---------------|------|---------------|-------|
|        |                         | $EC_{50}$ [M] | 诱导倍数 | $EC_{50}$ [M] | 诱导倍数  |
| [0298] | bs32897D                | 6.07E - 10    | 5.63 | N/D           | 5.22  |
|        | bs24963D                | 4.01E - 10    | 5.32 | 9.96E - 10    | 10.94 |
|        | 亲本 1 hCD28(对于 bs32897D) | N/D           | 1.58 | N/D           | 1.42  |
|        | 亲本 2 hCD28(对于 bs24963D) | N/D           | 2.46 | 1.07E - 10    | 2.05  |
|        | H4sH 同种型对照              | N/C           | 1.09 | N/C           | 1.11  |

[0299] 表17. 与OVCAR3或PEO-1和5nM恒定REGN4018(抗Muc16 x抗CD3)共温育的 $CD4^+$ T细胞的背景信号上的列表的IL-2释放的 $EC_{50}$ 值和最大诱导倍数。缩写:N/D=未确定,因为剂量响应曲线未达到饱和或未示出钟形;N/C=未计算

[0300] 实例7.在存在抗MUC16xCD3的TCR刺激的情况下,抗MUC16xCD28双特异性抗体加强

T细胞活化和对卵巢肿瘤细胞的细胞毒性

[0301] 为了检查本发明的示例性抗MUC16xCD28双特异性抗体是否可以增强抗MUC16xCD3介导的T细胞活化和对卵巢肿瘤细胞的细胞毒性, FACS用于在单独使用MUC16xCD3或与MUC16xCD28组合进行滴定剂量的体外共培养后检查肿瘤细胞和表型T细胞的活力(图2A)。将含有T细胞的人外周血单核(PBMC)细胞与表达内源性MUC16水平的PEO-1卵巢癌细胞共培养(Coscia, F.等人,《自然通讯(Nat. Commun.)》(2016), 8月26日; 7:12645)。

[0302] 进行了两项基于FACS的细胞毒性研究。在第一项研究中, 在存在或不存在抗MUC16 x CD28刺激的情况下, 在存在人外周血单核细胞(PBMC)和抗MUC16xCD3的情况下对MUC16+细胞进行基于FACS的细胞毒性(基于FACS的MUC16细胞+人PBMC+/-MUC16xCD28刺激的细胞毒性(MUC16xCD28 x Muc16xCD3矩阵设置))。除使用猕猴PBMC代替人PBMC之外, 第二项研究与第一项研究相同(基于FACS的MUC16细胞+猕猴PBMC+/-MUC16xCD28刺激的细胞毒性(MUC16xCD28 x Muc16xCD3矩阵设置))。

[0303] 实验程序

[0304] 为了在存在本发明的抗MUC16xCD3抗体和示例性抗MUC16xCD28抗体的组合的情况下监测MUC16+细胞的杀伤, 用1 $\mu$ M的紫罗兰色细胞跟踪器标记内源表达MUC16的细胞系(PEO1, MUC16<sup>+</sup>)并且在37°C下过夜接种。单独地, 将人PBMC(纽约血液中心(NewYork Blood Center)或猕猴PBMC(新泽西州克兰福德(Cranford)科文斯(Covance))以1 $\times$ 10<sup>6</sup>个细胞/mL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、树突状细胞和一些单核细胞来富集淋巴细胞。第二天, 在37°C下, 单独或与固定浓度(2.5 $\mu$ g/ml)的示例性抗MUC16xCD28双特异性组合, 将靶细胞与未粘附的细胞耗竭的初始人PBMC(效应细胞/靶细胞比为4:1)和连续稀释的抗MUC16xCD3或基于CD3的非靶向双特异性(bs17664D)共温育96小时。温育后, 使用胰蛋白酶-EDTA解离缓冲液从细胞培养板中移出细胞, 并且通过流式细胞术(FACS)进行分析。

[0305] 对于FACS分析, 将细胞用活力远红细胞跟踪仪(英杰公司(Invitrogen))和直接缀合到CD2、CD4、CD8和CD25(BD)的抗体进行染色。用校准珠运行样品以进行细胞计数。为了评估杀伤的特异性, 将靶细胞门控为紫罗兰色细胞跟踪器阳性群体。如下计算活靶细胞的百分比: 活细胞的百分比(%) = (R1/R2)\*100, 其中R1 = 存在抗体的情况下活靶细胞的百分比(%), 并且R2 = 不存在测试抗体的情况下活靶细胞的百分比(%)。通过CD2<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>或CD2<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T细胞中活化的(CD25<sup>+</sup>)T细胞的百分比来测量T细胞活化。通过将细胞与直接缀合到CD2、CD4、CD8、CD25和PD-1的抗体一起温育并报告PD-1+T细胞占总T细胞(CD2<sup>+</sup>)的百分比来评估PD-1标志物的上调。通过计算每个校准珠的活CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>细胞的数量来测量T细胞计数。按照制造商的方案, 使用BD流式细胞术珠阵列(CBA)人Th1/Th2/Th17细胞因子试剂盒来分析培养基中积累的细胞因子的水平。

[0306] 结果、汇总和结论:

[0307] 测试了抗MUC16xCD3双特异性抗体作为单一药剂诱导初始人T细胞杀伤表达人MUC16的PEO1靶细胞的能力, 或在存在共刺激性MUC16xCD28抗体的情况下的能力。抗MUC16xCD3双特异性抗体活化并定向人T细胞耗竭PEO1细胞。此外, 单独的MUC16xCD3诱导PEO-1癌细胞的中度T细胞杀伤, 以剂量依赖性方式将其活力降低到~60%(图2B和表18)。在存在抗MUC16xCD3双特异性抗体的情况下观察到靶细胞杀伤, 并且以皮摩尔(pM)水平的

EC<sub>50</sub>以剂量依赖性方式杀伤PEO1细胞(图2B)。当不存在抗MUC16xCD3时,未观察到靶细胞杀伤(图2B)。观察到的靶细胞裂解与CD2+T细胞上CD25+和PD-1+细胞的上调相关联,同样与皮摩尔(pM)水平中的EC<sub>50</sub>相关联(表18)。

[0308] 抗MUC16xCD3诱导人细胞因子的释放。在本发明的示例性抗MUC16xCD28共刺激分子bs24963D和bs32897D存在的情况下,用抗MUC16xCD3作为单一药剂观察到的细胞毒性活性得到增强。

[0309] 发现添加本发明的示例性抗MUC16xCD28增加了由MUC16xCD3诱导的细胞毒性的效力和深度,从而导致PEO-1癌细胞的活力进一步降低到小于20%(大于T细胞杀伤的3倍增加)(图2B)。此外,本发明的示例性抗MUC16xCD28将由MUC16xCD3诱导的IFN $\gamma$ 释放水平提高了10倍以上(图2C)。MUC16xCD28和MUC16xCD3组合扩大了CD4和CD8 T细胞并增加了活化标记CD25的表达水平(图2D-E)。值得注意的是,MUC16xCD28与非靶向CD3双特异性抗体的组合不会诱导T细胞的细胞毒性或活化(图2B)。

[0310] 总之,与用MUC16xCD3作为单一药剂观察到的情况相比,共刺激增加了T细胞活化、PD-1上调和细胞因子释放。表18和19以及图2A-2E总结了使用人PBMC的实验结果。

[0311] 表18:在人PBMC存在的情况下,抗MUC16xCD28对抗MUC16xCD3对PEO1细胞的细胞毒性的作用

| PiD                            | PEO1 杀伤<br>EC <sub>50</sub> [M] | PEO1 最小%活<br>性 | T 细胞活化 EC <sub>50</sub> [M]<br>(CD8+/CD25+) | PD-1 上调最大%<br>(CD4+/PD1+) |
|--------------------------------|---------------------------------|----------------|---------------------------------------------|---------------------------|
| MUC16xCD3                      | 1.27E - 10                      | 57%            | 2.94E - 10                                  | 27.2%                     |
| [0312] MUC16xCD3 +<br>bs24963D | 1.07E - 10 到<br>5.31E - 11      | 9.8%           | 1.86E - 10 到 3.94E -<br>11                  | 65.7%                     |
| MUC16xCD3 +<br>bs32897D        | 2.6E - 10 到<br>7.40E - 11       | 17.7%          | 4.82E - 10 到 4.42E -<br>11                  | 58.4%                     |

[0313] 还测试了抗MUC16xCD3双特异性抗体作为单一药剂诱导初始猕猴T细胞杀伤表达人MUC16的靶细胞的能力,或在存在共刺激性抗MUC16xCD28双特异性抗体的情况下的能力。使用PBMC进行了相同的测定,并从猕猴获得了类似的结果(图2F-H)。图2I示出,本发明的示例性抗MUC16xCD28双特异性抗体与细胞靶标结合,如通过流式细胞术所测量的。这些结果表明,本发明的抗MUC16xCD28双特异性抗体不仅可以通过增殖和细胞因子释放的方式,而且可以通过细胞毒性的方式有效地增强MUC16xCD3介导的T细胞活化。在所选的抗体滴定中,抗MUC16xCD3双特异性抗体活化人T细胞,但不引导T细胞耗竭PEO1细胞(表19)。与本发明的示例性抗MUC16xCD28抗体的共刺激导致了T细胞活化增加、细胞毒性活性增强并且T细胞上的PD-1标志物上调(表19)。

[0314] 表19:在猕猴PBMC存在的情况下,抗MUC16xCD28对抗MUC16xCD3对PEO1细胞的细胞毒性的作用

| PiD                            | PEO1 杀伤<br>EC <sub>50</sub> [M] | PEO1 最小<br>%活性 | T 细胞活化 EC <sub>50</sub> [M]<br>(CD8+/CD25+) | PD-1 上调最大%<br>(CD4+/PD1+) |
|--------------------------------|---------------------------------|----------------|---------------------------------------------|---------------------------|
| MUC16xCD3                      | 2.09E - 10                      | 69%            | 1.59E - 10                                  | 24.4%                     |
| [0315] MUC16xCD3 +<br>bs24963D | 1.29E - 10 到<br>3.34E - 11      | 18.1%          | 1.04E - 10 到 9.07E11                        | 44.3%                     |
| MUC16xCD3 +<br>bs32897D        | 3.92E - 10 到<br>1.09E - 10      | 29.7%          | 2.81E - 10 到 7.67E - 11                     | 40.3%                     |

[0316] 实例8. 抗MUC16xCD28抗体的体内研究

[0317] 组合肿瘤抗原靶向的抗CD3xMUC16和抗CD28xMUC16双特异性抗体增强小鼠模型中的肿瘤清除率。如下文详细所示,与仅施用抗CD3xMUC16或对照同种型的小鼠相比,施用抗CD3xMUC16和本发明示例性抗CD28xMUC16的小鼠中OVCAR-3肿瘤的生长被显著抑制。

[0318] 为了检查MUC16xCD28是否可以在体内增强MUC16xCD3的抗肿瘤功效,如下文详细描述,使用了两种不同的肿瘤模型,即肿瘤异种性腹水模型和肿瘤同系小鼠模型。

[0319] 肿瘤异种性腹水模型

[0320] 在肿瘤异种性腹水模型中,将表达内源性高水平MUC16的人起源的高级浆液性癌OVCAR-3卵巢癌细胞腹膜内植入预先植入人PBMC的NSG小鼠中(Crawford A,Haber L,Kelly MP,Vazzana K,Canova L,Ram P,Pawashe A,Finney J,Jalal S,Chiu D,Colleton CA,Garnova E,Makonnen S,Hickey C,Krueger P,Delfino F,Potocky T,Kuhnert J,Godin S,Retter MW,Duramad P,MacDonald D,Olson WC,Fairhurst J,Huang T,Martin J,Lin JC,Smith E,Thurston G,Kirshner JR.“用于治疗卵巢癌的Mucin 16双特异性T细胞接合抗体(A Mucin 16bispecific T cell-engaging antibody for the treatment of ovarian cancer)”《科学转化医学(Science Translational Medicine)》2019年6月19日:第11卷,第497期,eaau7534)。OVCAR-3细胞使用萤光素酶报道基因进行了工程化,以利用体内生物发光(BLI)追踪肿瘤随时间的生长情况

[0321] 实验程序

[0322] 如在以下中所描述的进行实验(Crawford A,Haber L,Kelly MP,Vazzana K,Canova L,Ram P,Pawashe A,Finney J,Jalal S,Chiu D,Colleton CA,Garnova E,Makonnen S,Hickey C,Krueger P,Delfino F,Potocky T,Kuhnert J,Godin S,Retter MW,Duramad P,MacDonald D,Olson WC,Fairhurst J,Huang T,Martin J,Lin JC,Smith E,Thurston G,Kirshner JR.“用于治疗卵巢癌的Mucin 16双特异性T细胞接合抗体”《科学转化医学》2019年6月19日:第11卷,第497期,eaau7534)。简而言之,给小鼠IP注射150mg/kg悬浮在PBS中的荧光素酶底物D-荧光素(珀金埃尔默公司)。在十分钟之后,使用Xenogen IVIS系统(珀金埃尔默公司)在异氟醚麻醉下进行小鼠的BLI成像。在D视野、1.5cm个体高度和中等分组水平下进行影像获取持续0.5分钟暴露时间。使用Living Image软件(Xenogen公司(Xenogen);加利福尼亚州阿拉米达)提取BLI信号。在每个肿瘤块周围绘制所关注的区域,并记录光子强度为 $p/s/cm^2/sr$ (光子每秒每平方厘米每球面度)。未接受OVCAR-3/Luc细胞的小鼠用作BLI活性的基线读数。每天对这些没有肿瘤的基线小鼠(N=3)进行成像,并将检测下限(LOD)计算为所有成像的无肿瘤小鼠的平均BLI读数。

[0323] 向八到十(8-10)周龄的NSG(NOD SCID $\gamma$ 链敲除)小鼠(杰克逊实验室,马里兰州(Jackson Laboratory,MD))注射 $5 \times 10^6$ 人PBMC(ReachBio公司(ReachBio),西雅图,华盛顿)。十到十四(10-14)天之后,小鼠经尾静脉放血以确定人T细胞植入。在转移PBMC的两周内,在两周内(第0天)腹膜内(IP)施用了先前在体内传代的OVCAR-3/Luc细胞系的 $2 \times 10^6$ 腹水细胞。通过流式细胞术检查小鼠的T细胞植入,然后使用BLI将其分配至各组,以确保类似的肿瘤负荷。对于两个研究,植入肿瘤四天后,将小鼠分为5只动物一组,每只的中值BLI为 $1.49 \times 10^5$ 或 $3.03 \times 10^5 p/s/cm^2/sr$ 。在第5天和第8天用指定的双特异性或对照抗体处理小鼠。通过静脉内(IV)注射两次向小鼠施用抗MUC16xCD3或CD3结合对照(有或没有本发明的示例性抗MUC16xCD28(bs24963D))。在整个研究过程中多次成像以追踪肿瘤生长。

[0324] 在指定的时间点还从血液中获得血清细胞因子水平。在指定的时间点处,通过颌下穿刺将血液收集到微量血清收集管(BD 365967)中。按照制造商的说明(马里兰州罗克维尔市玫索尺度诊断有限公司(Meso Scale Diagnostics,Rockville,MA)),使用V-plex人促炎-10Plex试剂盒来分析细胞因子水平。

[0325] 所有程序均按照NIH《实验动物的护理和使用指南(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)》进行。所述方案已由再生元制药机构动物护理和使用委员会(Regeneron Pharmaceuticals Institutional Animal Care and Use Committee)批准。总共完成了每组5只小鼠的2项研究。

[0326] 结果、汇总和结论

[0327] 对于异种肿瘤研究,使用了两种模型。对于第一异种模型,在移植人PBMC十三天(第0天)之后,向NSG小鼠腹膜内(IP)注射预先活体内传代的OVCAR-3/Luc细胞。在第5天和第8天对小鼠进行IV处理。小鼠接受12.5 $\mu$ g抗MUC16xCD3或12.5 $\mu$ g CD3结合对照(hIgG4<sup>P-PVA</sup>同种型)。还向一些小鼠以100 $\mu$ g施用本发明的示例性抗MUC16xCD28(bs24963D)。在肿瘤植入后第4、8、12、15、20和25天,通过BLI评估肿瘤负荷。当没有抗MUC16xCD3的情况下施用示例性bs24963D时,未观察到减少的BLI明显肿瘤。与之相反,尽管用12.5 $\mu$ g抗MUC16xCD3处理显著减少了BLI明显肿瘤,但是本发明的示例性抗MUC16xCD28比单独的抗MUC16xCD3显著增强了疗效(表20-22)。

[0328] 表20汇总了第一个OVCAR-3/Luc异种模型中肿瘤植入后第4天的生物发光水平。

[0329] 表20:OVCAR-3/Luc模型肿瘤移植后第4天的生物发光水平

|        | 抗体 ( $\mu$ g)                         | 植入后第 4 天的平均辐射率[p/s/cm <sup>2</sup> /sr]<br>(中值 $\pm$ SEM) |
|--------|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| [0330] | CD3 结合对照 (12.5)                       | $1.51 \times 10^5 \pm 2.81 \times 10^4$                   |
|        | 抗 MUC16xCD3 (12.5)                    | $1.5 \times 10^5 \pm 1.05 \times 10^4$                    |
|        | CD3 结合对照 (12.5) + 抗 MUC16xCD28 (100)  | $1.53 \times 10^5 \pm 2.01 \times 10^4$                   |
| [0331] | 抗 MUC16xCD3(12.5) + 抗 MUC16xCD28(100) | $1.27 \times 10^5 \pm 2.29 \times 10^4$                   |

[0332] 表21汇总了第一个OVCAR-3/Luc异种模型中肿瘤植入后第25天的生物发光水平。

[0333] 表21:OVCAR-3/Luc模型肿瘤移植后第25天的生物发光水平

|        | 抗体 ( $\mu$ g)                           | 植入后第 25 天的平均辐射率[p/s/cm <sup>2</sup> /sr] (中值 $\pm$ SEM) |
|--------|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| [0334] | CD3 结合对照 (12.5)                         | $7.71 \times 10^6 \pm 1.07 \times 10^6$                 |
|        | 抗 MUC16xCD3 (12.5)                      | $7.44 \times 10^3 \pm 3.11 \times 10^3$                 |
|        | CD3 结合对照 (12.5) + 抗 MUC16xCD28 (100)    | $6.04 \times 10^6 \pm 8.32 \times 10^5$                 |
|        | 抗 MUC16xCD3 (12.5) + 抗 MUC16xCD28 (100) | $1.31 \times 10^3 \pm 3.05 \times 10^1$                 |

[0335] 表22汇总了在第一个OVCAR-3/Luc异种模型中肿瘤植入后第4天与第25天之间的BLI的倍数变化。

[0336] 表22:OVCAR-3/Luc模型肿瘤植入后第4天与第25天之间的BLI的倍数变化

| [0337] | 抗体 (μg)                                    | 植入后第 4 天到第 25 天平均辐射率[p/s/cm <sup>2</sup> /sr]的倍数变化<br>(中值±SD) |
|--------|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
|        | CD3 结合对照 (12.5)                            | 50.72 ± 29.67                                                 |
|        | 抗 MUC16xCD3 (12.5)                         | -0.94 ± 0.05                                                  |
|        | CD3 结合对照 (12.5) + 抗<br>MUC16xCD28 (100)    | 35.38 ± 8.18                                                  |
|        | 抗 MUC16xCD3 (12.5) + 抗<br>MUC16xCD28 (100) | -0.99 ± 0.00                                                  |

[0338] 对于第二异种模型,在移植入PBMC十天(第0天)之后,向NSG小鼠注射预先活体内传代的OVCAR-3/Luc细胞。在第5天和第8天,对小鼠静脉注射0.5mg/kg抗MUC16xCD3抗体,或施用0.5mg/kg CD3结合对照。在肿瘤植入后第4、8、11、14、21、28和34天,通过BLI评估肿瘤负荷。还向一些小鼠以0.2mg/kg、1mg/kg或5mg/kg施用本发明的示例性抗MUC16xCD28(bs24963D)。当在没有抗MUC16xCD3的情况下施用,示例性bs24963D没有降低肿瘤负荷。与之相反,尽管用0.5mg/kg抗MUC16xCD3处理显著减少了BLI明显肿瘤,但是示例性抗MUC16xCD28比单独的抗MUC16xCD3增强了疗效(表23-25和图4A)。

[0339] 表23汇总了第二个OVCAR-3/Luc异种模型中肿瘤植入后第4天的生物发光水平。

[0340] 表23:OVCAR-3/Luc模型肿瘤移植后第4天的生物发光水平

| [0341] | 抗体 (mg/kg)                                | 植入后第 4 天的平均辐射率[p/s/cm <sup>2</sup> /sr] (中值 ± SEM) |
|--------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------|
|        | CD3 结合对照 (0.5)                            | $3.65 \times 10^5 \pm 5.50 \times 10^4$            |
|        | 抗 MUC16xCD3 (0.5)                         | $3.76 \times 10^5 \pm 2.40 \times 10^4$            |
|        | CD3 结合对照 (0.5) + 抗<br>MUC16xCD28 (5)      | $2.71 \times 10^5 \pm 2.65 \times 10^4$            |
|        | 抗 MUC16xCD3 (0.5) + 抗<br>MUC16xCD28 (5)   | $3.18 \times 10^5 \pm 4.45 \times 10^4$            |
|        | 抗 MUC16xCD3 (0.5) + 抗<br>MUC16xCD28 (1)   | $3.07 \times 10^5 \pm 4.37 \times 10^4$            |
|        | 抗 MUC16xCD3 (0.5) + 抗<br>MUC16xCD28 (0.2) | $2.86 \times 10^5 \pm 4.95 \times 10^4$            |

[0342] 表24汇总了第二个OVCAR-3/Luc异种模型中肿瘤植入后第25天的生物发光水平。

[0343] 表24:OVCAR-3/Luc模型肿瘤移植后第34天的生物发光水平

| [0344] | 抗体 (mg/kg)                                | 植入后第 34 天的平均辐射率[p/s/cm <sup>2</sup> /sr] (中值± SEM) |
|--------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------|
|        | CD3 结合对照 (0.5)                            | $1.79 \times 10^7 \pm 2.17 \times 10^6$            |
|        | 抗 MUC16xCD3 (0.5)                         | $9.60 \times 10^4 \pm 4.55 \times 10^4$            |
|        | 抗 MUC16xCD3 (0.5) + 抗<br>MUC16xCD28 (5)   | $2.34 \times 10^7 \pm 1.12 \times 10^6$            |
|        | 抗 MUC16xCD3 (0.5) + 抗<br>MUC16xCD28 (5)   | $2.45 \times 10^3 \pm 4.49 \times 10^3$            |
|        | 抗 MUC16xCD3 (0.5) + 抗<br>MUC16xCD28 (1)   | $1.62 \times 10^3 \pm 2.32 \times 10^3$            |
|        | 抗 MUC16xCD3 (0.5) + 抗<br>MUC16xCD28 (0.2) | $1.29 \times 10^3 \pm 4.77 \times 10^1$            |

[0345] 表25汇总了在第二个OVCAR-3/Luc异种模型中肿瘤植入后第4天与第34天之间的BLI的倍数变化。

[0346] 表25:OVCAR-3/Luc模型肿瘤植入后第4天与第34天之间的BLI的倍数变化

| [0347] | 抗体 (mg/kg)                               | 植入后第 4 天到第 34 天平均辐射率[p/s/cm <sup>2</sup> /sr]的倍数变化(中值±SD) |
|--------|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
|        | CD3 结合对照 (0.5)                           | 51.35 ± 27.59                                             |
|        | 抗 MUC16xCD3 (0.5)                        | -0.64 ± 0.31                                              |
|        | 抗 MUC16xCD3(0.5) +<br>抗 MUC16xCD28 (5)   | 64.62 ± 36.38                                             |
|        | 抗 MUC16xCD3(0.5) +<br>抗 MUC16xCD28 (5)   | -0.97 ± 0.04                                              |
|        | 抗 MUC16xCD3(0.5) +<br>抗 MUC16xCD28 (1)   | -0.99 ± 0.02                                              |
|        | 抗 MUC16xCD3(0.5) +<br>抗 MUC16xCD28 (0.2) | -1.00 ± 0.00                                              |

[0348] 使用不同剂量的第二异种模型的其它结果示出在图3A中。与用CD3结合对照抗体(EGFRvIIIxCD3)处理的小鼠相比,在肿瘤植入后第5天和第8天用2.5μg MUC16xCD3处理的小鼠的肿瘤负荷显著降低,但不能完全清除OVCAR-3/Luc肿瘤细胞(图3A)。将2.5μgMUC16xCD3与100μg MUC16xCD28组合进一步抑制肿瘤生长,并随着时间推移更持久地排斥肿瘤细胞(图3A)。在同一实验中,还获得了血清细胞因子水平。图3B示出了用不同抗体和/或抗体组合处理的小鼠中的细胞因子水平(pg/ml)。图3C示出了肿瘤负荷以及与第26天血清中CA-125水平的相关性。

[0349] 为了测试CD28-和CD3-双特异性在体内促进肿瘤杀伤,使用了建立良好的异种腹膜内卵巢OVCAR-3肿瘤模型。在此模型中,将肿瘤细胞引入用人PBMC重建的免疫缺陷小鼠中。像其它卵巢癌细胞系一样,OVCAR-3细胞表达MUC16。植入前,将OVCAR-3细胞与萤光素酶报道基因一起工程化,以利用生物发光(BLI)随时间推移体内追踪肿瘤生长。在用EGFRvIIIxCD3双特异性(不与这些细胞结合的对照CD3-双特异性)和仅用MUC16xCD28双特异性处理的小鼠中,植入的OVCAR-3肿瘤生长不减(图3A)。尽管单独的MUC16xCD3双特异性表现出显著的抗肿瘤活性,但它并未完全清除OVCAR-3肿瘤(图3A),而在MUC16xCD3双特异性中添加MUC16xCD28双特异性比单独的MUC16xCD3增强了体内抗肿瘤作用(图3A)。与增强的抗肿瘤活性一致,两种双特异性的组合也增加了循环细胞因子的分泌(图3B)。

[0350] 在蛋白水解切割释放卵巢癌预后生物标志物CA-125之后,MUC16双特异性与卵巢癌细胞表面上MUC16的剩余“小块(nub)”(裂解并释放CA-125后细胞表面残留)结合(I.Mylonas等人,“正常、增生和恶性子宫内膜组织中肿瘤标志物CA-125的免疫组织化学表达(Immunohistochemical expression of the tumour marker CA-125 in normal, hyperplastic and malignant endometrial tissue)”《抗癌研究》23,1075-1080(2003)),但不结合可溶性CA-125(图9A和9B)。为了确定MUC16xCD28双特异性是否干扰了将CA-125用作卵巢肿瘤负荷生物标志物的能力,测量了小鼠的CA-125水平。无论治疗如何,CA-125水平与肿瘤负荷相关。如先前针对MUC16xCD3双特异性所证明的,在用双特异性组合处理的小鼠中观察到了最低CA-125水平(图3C)。

[0351] 同基因小鼠模型

[0352] 实验程序

[0353] 同基因研究在遗传修饰的小鼠中进行以表达人CD3以及用于使用VelociGene®技术的MC38研究的人MUC16的一部分,如先前所描述的(Valenzuela等人,(2003)《自然生物技

术(Nat.Biotechnol.)》六月;21(6):652-9), (Crawford A、Haber L、Kelly MP、Vazzana K、Canova L、Ram P、Pawashe A、Finney J、Jalal S、Chiu D、Colleton CA、Garnova E、Makonnen S、Hickey C、Krueger P、Delfino F、Potocky T、Kuhnert J、Godin S、Retter MW、Duramad P、MacDonald D、Olson WC、Fairhurst J、Huang T、Martin J、Lin JC、Smith E、Thurston G、Kirshner JR. “用于治疗卵巢癌的Mucin 16双特异性T细胞接合抗体”《科学转化医学》2019年6月19日:第11卷,第497期,eaau7534)。表达人CD3、人CD28和一部分人MUC16的小鼠用于ID8-VEGF研究。为了使CD3人源化,设计了靶向载体,所述载体用对应的人区域的基因替代了小鼠CD3基因的细胞外部分( $\gamma\delta\epsilon$ )。为了使CD28人源化,设计了靶向载体,所述载体用对应的人区域的基因替代了小鼠CD28基因的细胞外部分。对于MUC16,小鼠的SEA重复13-17被人SEA重复12-16替代。对于每只人源化小鼠,通过如先前所描述的等位基因缺失测定法鉴定了F1H4(C57BL/6 $\times$ 129个杂交体)胚胎干(ES)细胞克隆中的正确基因靶向(Poueymirou等人(2007),《自然生物技术》一月;25(1):91-9)。将被靶向的ES细胞注射到8细胞阶段的Swiss Webster胚胎中,以产生完全F0代杂合小鼠,用于与C57BL/6N小鼠(泰康利公司(Taconic),纽约美国伦斯勒理工学院)进行纯合性育种。然后将表达CD3的人细胞外部分( $\gamma\delta\epsilon$ )、CD28的人细胞外部分和人MUC16的一部分的小鼠(被称为hCD3/hMuc16或hCD3/hCD28/hMUC16人源化小鼠)进行纯合性育种。

[0354] 为了检查在具有免疫能力的模型中的功效,产生了敲入小鼠。此小鼠的T细胞表达人CD3并且取代鼠MUC16,表达嵌合分子,其含有人MUC16的一部分,本发明的示例性双特异性抗体在其中结合。因此,抗MUC16xCD3分子可以用于此研究中。为了研究添加靶向CD28双特异性分子是否可以增强这些小鼠的功效,还产生了替代双特异性抗体。替代抗体识别人MUC16,但不识别鼠CD28,以检查CD28共刺激的作用,并且有时被称为抗MUC16xmCD28。对于同源肿瘤模型,使用工程化以表达人MUC16的一部分的MC38细胞系。小鼠皮下(SC)植入了MC38/huMUC16细胞,并在植入当天用0.01mg/kg的抗MUC16xCD3处理,每周两次,直到第21天。用0.01mg/kg的抗MUC16xCD3处理产生显著的抗肿瘤功效并且添加MUC16xmCD28增强此作用。(参见图6A、6B、6C和6D)。同基因肿瘤的植入和测量

[0355] 在对应的小鼠基因座中,将表达人CD3和MUC16的人鼠嵌合体的小鼠皮下植入 $1 \times 10^6$  MC38/huMUC16细胞。在整个研究中,在有或没有识别人MUC16和小鼠CD28的替代双特异性抗体的情况下,每周两次向小鼠腹膜内(IP)施用抗MUC16xCD3或同种型对照(IP)直到第21天。在植入当天开始处理。用测径规每周测量肿瘤生长两次。在肿瘤植入50天之后处死小鼠。

[0356] 同基因肿瘤生长和抑制的计算

[0357] 为了通过外部测径规测定肿瘤体积,测定最大纵向直径(长度)和最大横向直径(宽度)。由下式计算基于测径规测量的肿瘤体积:体积=(长度 $\times$ 宽度<sup>2</sup>)/2。使用X和Y直径的卡尺测量随时间推移监测肿瘤生长。当肿瘤大小大于2000mm<sup>3</sup>时,对小鼠实施安乐死。使用不成对非参数Mann-Whitney t测试来测定统计显著性。

[0358] 结果

[0359] 表26汇总了在不同处理下MC38/huMUC16模型中的肿瘤大小。

[0360] 表26:MC38/huMUC16模型第21天的肿瘤大小(mm<sup>3</sup>)

| [0361] | 抗体 ( $\mu\text{g}$ )                     | 肿瘤大小 ( $\text{mm}^3$ ) (均值 $\pm$ SEM) |
|--------|------------------------------------------|---------------------------------------|
|        | 同种型对照 (0.5)                              | 1191 $\pm$ 424                        |
|        | 抗 MUC16xCD3 (0.01)                       | 639.5 $\pm$ 186.8                     |
|        | 抗 MUC16xmCD28 (0.5)                      | 648.5 $\pm$ 129.7                     |
|        | 抗 MUC16xCD3 (0.01) + 抗 MUC16xmCD28 (0.5) | 167.3 $\pm$ 71.9                      |

[0362] 测试了本发明的示例性抗MUC16xCD28双特异性抗体是否可以在具有完整免疫系统的小鼠的同系小鼠模型中增强MUC16xCD3的抗肿瘤功效。使用Velocigene技术对小鼠进行基因工程化,使其表达人CD3和人MUC16代替小鼠基因(Crawford A、Haber L、Kelly MP、Vazzana K、Canova L、Ram P、Pawashe A、Finney J、Jalal S、Chiu D、Colleton CA、Garnova E、Makonnen S、Hickey C、Krueger P、Delfino F、Potocky T、Kuhnert J、Godin S、Retter MW、Duramad P、MacDonald D、Olson WC、Fairhurst J、Huang I、Martin J、Lin JC、Smith E、Ihurst G、Kirshner JR. “用于治疗卵巢癌的Mucin 16双特异性T细胞接合抗体”《科学转化医学》2019年6月19日:第11卷,第497期,eaau7534)。将MC38结肠癌细胞系工程化为表达人MUC16(pLVX.EF1a.MUC16,MC38/hMUC16),然后皮下植入。从植入当天(第0天)开始,使用同种型对照(Iso Ctrl)、0.01mg/kg MUC16xCD3、0.5mg/kg MUC16xmCD28或组合每周2次腹膜内注射小鼠。随时间推移监测肿瘤生长(图6A)。MUC16xCD3或MUC16xCD28单一疗法显著抑制肿瘤生长。MUC16xCD3和MUC16xCD28组合治疗进一步抑制了肿瘤生长(表26)。在同一实验中,还获得了血清细胞因子水平。图6B示出了用不同抗体和/或抗体组合处理的小鼠中的细胞因子水平。

[0363] 合适的人源化小鼠MC38/hMUC16接受了植入的肿瘤细胞,并且用对照、单个CD3-或CD28-双特异性或组合进行治疗(图6A、6C和6D)。在MUC16肿瘤模型中,CD3-和CD28-双特异性的组合提供了最佳的抗肿瘤响应(图6A),这在细胞因子生成的测定中也已注意到(图6C和6D)。

[0364] 为研究添加靶向MUC16xCD28的前导分子是否可增强同基因模型的功效,表达人CD3并代替鼠MUC16的小鼠,代替鼠CD28的人CD28和含有一部分人MUC16的嵌合分子,其中使用了本发明的示例性双特异性抗体。ID8-VEGF细胞系被工程化成表达人MUC16(ID8-VEGF/hMUC16),并进行腹膜内植入。在肿瘤植入后第3、6和10天单独用1mg/kg EGFRvIIIxCD3或MUC16xCD3或与MUC16xCD28组合对小鼠给药。使用体重增加监测肿瘤生长(图5)。肿瘤生长被MUC16xCD3抑制,并且与MUC16xCD28的组合进一步延迟了肿瘤生长。

[0365] 值得注意的是,不同于先前的CD28双特异性具有非常有限的单一药剂活性(参见上文)的体外和体内分析,此同质MC38/MUC16模型中的CD28双特异性作为单一药剂具有更显著的活性。这表明在这些MC38模型中,“信号1”已经在某种程度上被活化。与此相一致的是,先前已经表明MC38肿瘤细胞表达高水平的重新活化的内源性逆转录病毒蛋白,如p15E,并且C57BL6小鼠可以产生识别和响应这种新表位的内源性T细胞(J.C.Yang、D.Perry-Lalley,“内源性鼠逆转录病毒的包膜蛋白是多种鼠肿瘤的肿瘤相关T细胞抗原(The envelope protein of an endogenous murine retrovirus is a tumor-associated T-cell antigen for multiple murine tumors)”《免疫疗法杂志(J Immunother)》23,177-183(2000);H.J.Zeh,第3版,D.Perry-Lalley、M.E.Dudley、S.A.Rosenberg、J.C.Yang,“两种自身抗原的高亲和力CTL表现出优异的体外和体内抗肿瘤疗效(High avidity CTLs for

two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy)》《免疫学期刊》162,989-994(1999))。事实上,已经证实在本发明的MC38模型中,可以容易地检测到响应于此p15E新抗原的瘤内T细胞(数据未示出)。因此,在此MUC16同基因肿瘤模型中,CD28双特异性可以增强内源性TCR/CD3依赖性T细胞响应,然后可以通过CD3双特异性提供另外的“信号1”活化来进一步增强所述响应。

[0366] 长期以来已经认识到,通过TCR复合物(“信号1”)的T细胞活化可以通过共刺激信号显著增强,如当T细胞上的CD28受体与其在靶细胞上的配体(CD80/B7.1和CD86/B7.2)接合时介导的共刺激信号(“信号2”)(J.H.Esensten、Y.A.Helou、G.Chopra、A.Weiss、J.A.Bluestone,“CD28共刺激:从机制到治疗”《免疫性》44,973-988(2016))。与数据一致,首先通过B7配体在肿瘤细胞上过度表达的研究证明了CD28-共刺激增强T细胞抗肿瘤活性的潜力(R.H.Schwartz,“T淋巴细胞的共刺激:CD28、CTLA-4和B7/BB1在白细胞介素-2产生和免疫疗法中的作用(Costimulation of T lymphocytes:the role of CD28,CTLA-4,and B7/BB1in interleukin-2 production and immunotherapy)”《细胞(Cell)》71,1065-1068(1992);L.Chen等人,“T淋巴细胞分子CD28和CTLA-4的B7反受体对抗肿瘤免疫的共刺激(Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4)”《细胞》71,1093-1102(1992)),其显示出对这种B7表达性肿瘤的T细胞排斥的改善。这种潜力激发了在人体试验中评估CD28活化性抗体的努力。可悲的是,由于大量细胞因子释放综合征(CRS)导致的多器官衰竭,2006年对这种抗体(TGN1412)的试验导致所有六名人类志愿者出现危及生命的并发症(G.Suntharalingam等人,“抗CD28单克隆抗体TGN1412的1期试验中的细胞因子风暴(Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412)”《新英格兰医学期刊》355,1018-1028(2006))。这场灾难导致停止了对人中CD28活化性抗体的任何进一步测试。

[0367] 除非聚集在肿瘤细胞表面上,否则不会直接活化CD28的CD28双特异性抗体提供了仅在肿瘤部位促进共刺激的可能性,而没有常规CD28激活抗体的全身毒性。此类CD28双特异性的最初版本在20世纪90年代提出并进行了评估(C.Renner等人,“通过双特异性单克隆抗体和人T细胞治愈异种移植的人肿瘤(Cure of xenografted human tumors by bispecific monoclonal antibodies and human T cells)”《科学》264,833-835(1994);G.Jung等人,“组合2种双特异性抗体片段和静息自体淋巴细胞对神经胶质瘤患者进行局部免疫疗法:原位t细胞活化和治疗功效的证据(Local immunotherapy of glioma patients with a combination of 2bispecific antibody fragments and resting autologous lymphocytes:evidence for in situ t-cell activation and therapeutic efficacy)”《国际癌症杂志(Int J Cancer)》91,225-230(2001);M.Brandl、L.Grosse-Hovest、E.Holler、H.J.Kolb、G.Jung,“具有CD20 X CD28特异性的双特异性抗体片段允许针对患有B细胞谱系白血病和淋巴瘤的患者外周血和骨髓培养物中恶性细胞的自体 and 同种异体T细胞活化(Bispecific antibody fragments with CD20 X CD28 specificity allow effective autologous and allogeneic T-cell activation against malignant cells in peripheral blood and bone marrow cultures from patients with B-cell lineage leukemia and lymphoma)”《实验血液学(Exp Hematol)》27,1264-1270(1999));

然而,当时可用的早期技术需要化学交联或杂交/杂交瘤融合来创建拟议的生物疗法,并导致次优试剂的产生,其自身具有强大的活性,而与肿瘤细胞上的聚集无关(联想到常规的CD28抗体,大概是由于这些双特异性抗体的非特异性聚集)。此外,这些早期方法还需要在体外预先活化T细胞,以观察体内的任何抗肿瘤活性。与TGN1412 CD28活化抗体的灾难性临床结果,以及这些早期CD28双特异性方法的局限性一起阻止了对这些方法的进一步探索。

[0368] 本文描述了一类新颖的CD28共刺激双特异性抗体,其可以通过提供共刺激“信号2”来显著且安全地促进抗肿瘤活性。这些CD28双特异性抗体自身活性有限(在不存在“信号1”的情况下),但在“信号1”的情况下可以显著增强抗肿瘤活性,如可以通过将这些CD28双特异性抗体与一类新兴的CD3双特异性抗体配对来提供(或者如果这些CD28双特异性抗体用于已经存在肿瘤特异性T细胞内源性群体的环境中)。这种新的CD28双特异性方法的产生、测试和成功取决于(1)对于这些CD3双特异性,利用新型双特异性平台,所述平台最初是为产生CD3双特异性而开发的,并且最近在以下方面得到了验证:技术上(E.J.Smith等人,“触发B细胞的T细胞杀伤的新型、天然形式的双特异性抗体在小鼠肿瘤模型和猕猴中具有强大的活性(A novel, native-format bispecific antibody triggering T-cell killing of B cells is robustly active in mouse tumor models and cynomolgus monkeys)”《科技报告》5,17943(2015))和临床上(A.Crawford等人,“REGN4018,用于治疗卵巢癌的新型MUC16xCD3双特异性T细胞接合剂(REGN4018, a novel MUC16xCD3 bispecific T-cell engager for the treatment of ovarian cancer)”《美国癌症研究协会年会会议论文集2018(Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2018)》,(2018)) (Clinicaltrials.gov:NCT02290951, Clinicaltrials.gov:NCT03564340),并且然后对其进行修饰,以有效产生在特定“信号1”不存在的情况下显示最小活性的CD28-双特异性;(2)异种和同基因遗传人源化(D.M.Valenzuela等人,“与高分辨率表达分析偶联的小鼠基因组的高通量工程化(High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis)”《自然生物技术》21,652-659(2003);W.T.Poueymirou等人,“完全来源于靶向基因的胚胎干细胞的F0代小鼠允许立即表型分析(F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses)”《自然生物技术》25,91-99(2007))动物肿瘤模型的发展以单独评估这些CD28双特异性抗体,并与CD3双特异性组合评估;以及(3)对细胞因子释放综合征及其临床发展的更深入的了解(A.Shimabukuro-Vornhagen等人,“细胞因子释放综合征(Cytokine release syndrome)”《癌症免疫疗法杂志》6,56(2018);D.W.Lee等人,“细胞因子释放综合征的诊断和治疗的最新概念(Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome)”《血液(Blood)》124,188-195(2014);C.L.Bonifant、H.J.Jackson、R.J.Brentjens、K.J.Curran,“CAR T细胞疗法的毒性和管理(Toxicity and management in CAR T-cell therapy)”《分子疗法-溶瘤(Mol Ther Oncolytics)》3,16011(2016))猴子模型的验证,其中可以将这些CD28双特异性的任何潜在毒性与常规CD28活化抗体的毒性进行比较。

[0369] 本文描述了靶向卵巢癌TSA的TSAxCD28共刺激双特异性抗体(MUC16xCD28)的产生和测试。结果表明,在不存在“信号1”的情况下,这些CD28双特异性抗体在体外或体内具有

最小的活性。然而,这些CD28双特异性抗体可以与CD3双特异性抗体配对,以形成含有肿瘤抗原以及TCR和CD28复合物的人工“免疫突触”。此外,当在体外与合适的CD3双特异性抗体配对时,这些CD28双特异性抗体可以以抗原依赖性方式有效且特异性地促进T细胞活化和肿瘤细胞杀伤。此外,在同基因肿瘤模型中,这些CD28双特异性还以肿瘤抗原特异性方式有效地增强体内CD3双特异性的抗肿瘤活性;在这种模型中,除非肿瘤特异性T细胞已经存在,否则CD28双特异性具有最小的单一药剂活性,并且在这种环境中,所述双特异性抗体似乎以肿瘤抗原依赖性方式增强了这种特异性活性。另外,TSAxCD28和TSAxCD3组合疗法在体内显著驱动了肿瘤内活化/记忆T细胞表型的扩展。最后,经基因人源化的免疫活性小鼠以及食蟹猴中的毒理学研究表明,与常规CD28活化性抗体直接相比,这些双特异性抗体作为单一药剂展示出有限的活性且无毒性。

[0370] 通常,在免疫肿瘤学领域中,人特异性临床候选物的表征限于在具有移植的人免疫细胞的异种肿瘤模型中进行测试。尽管这些异种模型(如利用的OVCAR3模型)可能非常有用,但它们也有局限性。在这种异种模型中使用的小鼠在其正常组织中不表达人肿瘤靶标,由此排除了在靶标的正常组织表达环境中对测试药剂的评估。事实上,如果靶标在正常组织中通常也以高水平表达,这可能会通过从肿瘤转移测试药剂来限制抗肿瘤疗效,并可能对这些正常组织产生毒性-在正常情况下无法在异种模型中评估这些毒性。另外的限制可能涉及转移到免疫缺陷小鼠的移植人外周血单核细胞(PBMC)的活性,这可能与免疫活性系统中发现的正常宿主T细胞的活性不同。为了克服这些限制并提供更好的用于测试人特异性临床候选物的模型,产生了双重和三重基因人源化小鼠。在这些模型中,对肿瘤抗原进行基因人源化以允许其在适当的宿主组织(对于MUC16)中正常表达,并且对CD3和/或CD28组分进行基因人源化以使免疫活性宿主细胞响应于人特异性临床候选物。在这些经基因人源化的免疫活性同基因动物模型中,发现MUC16肿瘤靶标的CD28双特异性增强了其适当的CD3双特异性的抗肿瘤活性。在多个临床前模型中,不同的TSAxCD28双特异性(例如,MUC16和PSMA(数据未示出))对抗肿瘤疗效的类似增强表明,此治疗模式是稳健的,并不限于特定的肿瘤模型,并且作为免疫疗法的新组合靶类可以具有更广泛的用途。总的来说,这些发现强调了TSAxCD28双特异性可以与TSAxCD3双特异性协同作用,并且可以提供一种生物解决方案,所述生物解决方案以相当安全且耐受性良好的方式显著增强经过充分研究的TSAxCD3双特异性的疗效,从而证明在人体试验中的测试是合理的。

[0371] TSAxCD3双特异性表示一类有前景的新兴免疫疗法,但在许多情况下,进一步优化抗肿瘤活性肯定是重要的。正如CAR-T方法采用人工活化“信号1”和“信号2”的嵌合受体从而提高其抗肿瘤活性一样(E.A.Zhukovsky,R.J.Morse,M.V.Maus,“双特异性抗体和CAR:利用T细胞重新定向的广义免疫疗法(Bispecific antibodies and CARs:generalized immunotherapeutics harnessing T cell redirection)”《当前免疫学观点》40,24-35(2016);S.L.Maude等人,“患有B细胞淋巴细胞白血病的儿童和年轻成人中的司利弗明(Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia)”《新英格兰医学期刊》378,439-448(2018)),现在显示了将CD3特异性抗体(提供“信号1”)与CD28双特异性抗体(其提供“信号2”)组合以增强抗肿瘤活性的潜在益处。除了这种方法可能比CAR-T疗法具有的实际益处之外-因为其不需要为每个患者单独定制的费力的细胞疗法准备,也不需要通常与副作用相关联的毒性化学疗法对患者预先进行

“淋巴耗竭”,以使患者可以接受这种细胞疗法(A.Shimabukuro-Vornhagen等人,“细胞因子释放综合征”《癌症免疫疗法杂志》6,56(2018);C.H.June、R.S.O'Connor、O.U.Kawalekar、S.Ghassemi、M.C.Milone,“用于人癌症的CAR T细胞免疫疗法(CAR T cell immunotherapy for human cancer)”《科学》359,1361-1365(2018))。根据本发明的双特异性方法提供了增加疗效以及增加安全性和作用特异性的潜力。也就是说,通过将针对一种抗原的CD3双特异性抗体与针对第二抗原的CD28双特异性抗体配对,可以利用“组合靶向”的优势-仅在表达两种抗原的肿瘤细胞上才会出现增加的疗效,从而将T细胞杀伤仅集中于表达两种抗原的肿瘤细胞,同时限制仅表达所述抗原中的一种抗原的正常组织中的“脱靶毒性”。总的来说,本文所呈现的数据表明,将基于CD28的双特异性与基于CD3的双特异性组合可以提供具有显著增强的且协同的抗肿瘤活性的耐受性良好的“现成”生物制品解决方案。今年将在人体试验中对这种可能性进行初步测试。

[0372] 实例9.与猕猴中的CD28超激动剂相比,单独的MUC16xCD28或组合疗法不会诱导全身性T细胞活化

[0373] 本发明的示例性MUC16xCD28抗体增强了猕猴T细胞的MUC16xCD3活化(图2F-2H)。为了确定单独或与抗MUC16xCD3组合的本发明的示例性抗MUC16xCD28双特异性抗体的安全性和耐受性,在猕猴中进行了单剂量毒性研究。如表27所指示的,将雌性或雄性猕猴分配到治疗组。

[0374] 猕猴研究是根据IACUC指南进行的。雄性猕猴(3只动物/组)通过静脉输注接受单剂量的每种试验品,持续大约30分钟(组合疗法作为单独输注施用,总计1小时)。毒性评估基于临床观察结果、定性食物消耗量、体重、神经系统检查、生命体征(体温、心率、脉搏血氧饱和度和呼吸率)以及临床和解剖病理学。采集血液和组织样品用于细胞因子分析、免疫表型分析、组织病理学和毒物动力学评估。在罗氏分子公司(Roche Modular)P 800系统上分析CRP水平。通过Meso Scale Diagnostics(马里兰州罗克维尔市的MSD)测量细胞因子。对于外周血流式细胞术,将血液采集到EDTA钾管中,裂解,用抗CD3、抗Ki67和抗ICOS(BD生物科学公司(BD Biosciences))染色,并且使用FACS Canto II进行分析。

[0375] 动物通过静脉输注接受单剂量的每种试验品,持续大约30分钟(组合疗法作为单独输注施用,总计1小时)。毒性评估基于临床观察结果、定性食物消耗量、体重、神经系统检查、生命体征(体温、心率、脉搏血氧饱和度和呼吸率)以及临床和解剖病理学。采集血液样品用于细胞因子分析、FACS免疫表型分析和毒物动力学评估。在以1或10mg/kg,以1或10mg/kg的MUC16xCD3或组合处理单剂量施用本发明的示例性抗MUC16xCD28后,未观察到显著的细胞因子释放、T细胞边缘化或T细胞活化标志物上调。表27汇总了不同的读数,包含绝对T细胞数、T细胞活化标志物(ki67)、CRP和在指示时间点从单个动物获得的血液中的血清细胞因子水平。进一步地,使用干涂和湿涂人T细胞增殖测定验证这些发现,这表明与CD28超激动剂抗体相反,使用干涂或湿涂方法将MUC16xCD28锚定在测定板上不会在没有CD3刺激的情况下诱导T细胞活化(图7)。实际上,发现与CD28超激动剂抗体相比,本发明的示例性抗MUC16xCD28双特异性抗体以及亲本二价CD28抗体未能诱导人T细胞增殖。总的来说,在猴子中的探索性单剂量毒理学研究和基于体外人T细胞的测定表明,本发明的示例性抗MUC16xCD28双特异性抗体是安全的且耐受性良好。

[0376] 表27:猕猴毒性研究综述

[0377]

| 分子                                                                                                                                    | 描述                                      | 剂量<br>(mg/<br>kg) | 动物<br>数 | 第 1<br>天-临<br>床观察 | 任何<br>观察<br>第 2-4<br>天 | (E3/ $\mu$ L) |          | T 细胞<br>Ki67+<br>(E3/ $\mu$ L) |          | CRP<br>(mg/dL) | 给药后 5 小时的血浆细胞因子 (pg/mL) |      |      |           |           |       |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------|---------|-------------------|------------------------|---------------|----------|--------------------------------|----------|----------------|-------------------------|------|------|-----------|-----------|-------|------|
|                                                                                                                                       |                                         |                   |         |                   |                        | 预测<br>测试      | 5 小<br>时 | 预测<br>测试                       | 72<br>小时 |                | 24 小时                   | IL-6 | IL-8 | IL-1<br>0 | IFN-<br>g | TNF-a | IL-2 |
| REGN4018                                                                                                                              | 抗 Muc16<br>x CD3<br>(hIgG4)             | 1                 | 1501    | -                 | -                      | 2.28          | 1.67     | 0.11                           | 0.10     | 13.8           | 10                      | 2    | 3    | BLQ       | BLQ       | 7     | BLQ  |
|                                                                                                                                       |                                         |                   | 1502    | -                 | -                      | 3.12          | 1.71     | 0.25                           | 0.29     | 7.9            | 24                      | 2    | 4    | BLQ       | 4         | BLQ   | BLQ  |
|                                                                                                                                       |                                         |                   | 1503    | -                 | -                      | 3.84          | 1.58     | 0.21                           | 0.17     | 6              | 5                       | 2    | BLQ  | BLQ       | BLQ       | 3     | BLQ  |
| bs24963D                                                                                                                              | 抗 Muc16<br>x CD28<br>(hIgG4)            | 1                 | 2501    | -                 | -                      | 3.07          | 2.40     | 0.13                           | 0.20     | 0.4            | 3                       | 3    | BLQ  | BLQ       | 4         | 3     | BLQ  |
|                                                                                                                                       |                                         |                   | 2502    | -                 | -                      | 1.97          | 2.73     | 0.10                           | 0.15     | 0.1            | 4                       | 3    | 3    | BLQ       | 4         | 4     | BLQ  |
|                                                                                                                                       |                                         |                   | 2503    | -                 | -                      | 1.64          | 3.05     | 0.10                           | 0.19     | 0.2            | 7                       | 3    | 4    | 46        | 6         | 4     | BLQ  |
| REGN4018<br>+<br>bs24963D                                                                                                             | 抗 Muc16<br>x CD3 +<br>抗 Muc16<br>x CD28 | 1 + 1             | 3501    | -                 | -                      | 2.89          | 1.98     | 0.19                           | 0.10     | 13.3           | 24                      | 3    | 4    | 47        | 4         | 13    | BLQ  |
|                                                                                                                                       |                                         |                   | 3502    | -                 | -                      | 1.62          | 1.18     | 0.10                           | 0.06     | 13.3           | 22                      | 3    | BLQ  | 80        | 5         | 7     | BLQ  |
|                                                                                                                                       |                                         |                   | 3503    | -                 | -                      | 1.80          | 1.37     | 0.10                           | 0.09     | 9.8            | 7                       | BLQ  | BLQ  | BLQ       | 4         | 9     | BLQ  |
| REGN4018                                                                                                                              | 抗 Muc16<br>x CD3<br>(hIgG4)             | 10                | 4501    | -                 | -                      | 2.48          | 0.89     | 0.13                           | 0.12     | 14.2           | 11                      | 4    | 4    | 28        | 4         | 3     | BLQ  |
|                                                                                                                                       |                                         |                   | 4502    | -                 | -                      | 1.16          | 0.52     | 0.10                           | 0.12     | 7.6            | 7                       | 4    | 4    | 31        | BLQ       | 6     | BLQ  |
|                                                                                                                                       |                                         |                   | 4503    | -                 | -                      | 3.75          | 1.01     | 0.23                           | 0.21     | 2.5            | 5                       | 4    | 4    | 38        | 4         | 4     | BLQ  |
| bs24963D                                                                                                                              | 抗 Muc16<br>x CD28<br>(hIgG4)            | 10                | 9501    | -                 | -                      | 1.86          | 2.91     | 0.09                           | 0.17     | 0.1            | 4                       | 4    | 4    | BLQ       | 5         | 3     | BLQ  |
|                                                                                                                                       |                                         |                   | 9502    | -                 | -                      | 0.57          | 0.96     | 0.04                           | 0.07     | 0.2            | 9                       | 4    | 4    | BLQ       | BLQ       | 4     | BLQ  |
|                                                                                                                                       |                                         |                   | 9503    | -                 | -                      | 1.49          | 2.98     | 0.18                           | 0.19     | 0.5            | 7                       | 4    | 5    | BLQ       | 4         | 3     | BLQ  |
| REGN4018<br>+<br>bs24963D                                                                                                             | 抗 Muc16<br>x CD3 +<br>抗 Muc16<br>x CD28 | 10 + 10           | 6501    | -                 | -                      | 3.58          | 0.75     | 0.21                           | 0.09     | 14.3           | 31                      | 5    | 3    | BLQ       | BLQ       | 7     | BLQ  |
|                                                                                                                                       |                                         |                   | 6502    | -                 | -                      | 3.98          | 1.29     | 0.31                           | 0.29     | 14.6           | 73                      | 5    | 3    | BLQ       | BLQ       | 38    | BLQ  |
|                                                                                                                                       |                                         |                   | 6503    | -                 | -                      | 2.01          | 0.79     | 0.17                           | 0.10     | 5.3            | 7                       | 3    | 3    | BLQ       | 4         | BLQ   | BLQ  |
| REGN4018<br>+<br>bs24963D                                                                                                             | 抗 Muc16<br>x CD3 +<br>抗 Muc16<br>x CD28 | 1 + 10            | 5501    | -                 | -                      | 1.70          | 1.37     | 0.14                           | 0.23     | 14.2           | 6                       | 4    | 4    | 36        | BLQ       | 6     | BLQ  |
|                                                                                                                                       |                                         |                   | 5502    | -                 | -                      | 3.11          | 3.24     | 0.18                           | 0.17     | 5.5            | 7                       | 5    | 4    | BLQ       | BLQ       | 4     | BLQ  |
|                                                                                                                                       |                                         |                   | 5503    | -                 | -                      | 2.38          | 1.85     | 0.20                           | 0.19     | 6.2            | 31                      | 4    | 4    | BLQ       | BLQ       | 2     | BLQ  |
| REGN4018<br>+<br>bs24963D                                                                                                             | 抗 Muc16<br>x CD3 +<br>抗 Muc16<br>x CD28 | 1 + 1, 重复给药       | 8501    | -                 | -                      | 3.36          | 1.04     | 0.26                           | 0.05     | 14.4           | 12                      | 4    | 4    | BLQ       | 3         | 11    | BLQ  |
|                                                                                                                                       |                                         |                   | 8502    | -                 | -                      | 2.49          | 2.09     | 0.14                           | 0.06     | 11.7           | 9                       | 4    | 5    | BLQ       | 5         | 7     | BLQ  |
|                                                                                                                                       |                                         |                   | 8503    | -                 | -                      | 5.93          | 4.73     | 0.31                           | 0.15     | 14.6           | 25                      | 4    | 4    | BLQ       | 4         | 4     | BLQ  |
| BLQ: 低于定量限制                                                                                                                           |                                         |                   |         |                   |                        |               |          |                                |          |                |                         |      |      |           |           |       |      |
| LLOQ (定量下限): IFN-g = 37 pg/ml; TNF-a = 3 pg/ml; IL-2 = 2.4 pg/ml; IL-6 = 2 pg/ml; IL-8 = 1.7 pg/mL; IL-4 = 1.8 pg/mL; IL-10 = 3 pg/ml |                                         |                   |         |                   |                        |               |          |                                |          |                |                         |      |      |           |           |       |      |

BLQ: 低于定量限制

LLOQ (定量下限): IFN-g = 37 pg/ml; TNF-a = 3 pg/ml; IL-2 = 2.4 pg/ml; IL-6 = 2 pg/ml; IL-8 = 1.7 pg/mL; IL-4 = 1.8 pg/mL; IL-10 = 3 pg/ml

[0378] 收集血液样品用于细胞因子和流式细胞术免疫表型分析。虽然施用于猴子的 CD28-SA 诱导了显著的细胞因子释放、淋巴细胞边缘化和 T 细胞活化,但值得注意的是,施用 MUC16xCD28 后未观察到细胞因子释放、T 细胞边缘化或 T 细胞活化 (图 8A-8C 和表 27)。总体而言,这些初步观察结果表明,TSAxCD28 双特异性在灵长类动物中具有良好的耐受性,并且不会诱导如通过 CD28-SA 所见的细胞因子释放和 T 细胞活化 (数据未示出)。应该注意的是,先前在猴子中使用 CD28-SA 进行的研究未能预测在人中所见的深层细胞因子释放和 T 细胞活化 (Tegenaro AG, [www.circare.org/foia5/tgn1412investigatorbrochure.pdf](http://www.circare.org/foia5/tgn1412investigatorbrochure.pdf)),并且这归因于猴子中 CD28 的较低表达 (D. Eastwood 等人,“CD4+效应记忆 T 细胞上 CD28 表达的物种差异解释了单克隆抗体 TGN1412 试验失败 (Monoclonal antibody TGN1412 trial failure explained by species differences in CD28 expression on CD4+effector memory T-cells)”《英国药理学杂志 (Br J Pharmacol)》161, 512-526 (2010))。尽管猕猴的耐受性研究可能无法预测人的 CRS,但 CD28-SA 在猴子中注意到的强烈信号表明, Tegenaro 等人错过了这一点,仅仅是因为他们没有检查可以稳健地观察到这些响应的适当的早期时间点。

[0379] 实例 10: bs24963D (MUC16 X CD28 Ab, 也被称为 REGN5668) 和 REGN4018 (MUC16 X CD3) 结合表达人或猕猴 MUC16 的细胞系, 结合来自人或猕猴 PBMC 的初级细胞和 T 细胞系

[0380] 材料和方法-实验程序汇总

[0381] 流式细胞术分析用于确定bs24963D与内源性表达人MUC16的人卵巢癌细胞系(OVCAR-3和PE01)的结合以及bs24963D和REGN4018与工程化为表达人或猕猴MUC16的小鼠ID8细胞、与工程化为表达人MUC16的3T3细胞、人和猕猴T细胞,以及工程化的报告基因T细胞系的结合。

[0382] 简而言之,将 $1 \times 10^5$ 个细胞/孔与抗体的连续稀释液在4℃下温育30分钟,所述抗体包含bs24963D、REGN4018和对照抗体(IgG4<sup>P-PVA</sup>非结合对照mAb、CD28非桥接对照双特异性抗体或亲本CD28或CD3对照)。

[0383] 对于人和猕猴初级T细胞和工程化报告基因T细胞,抗体稀释液范围为12.2pM到200nM,而对于MUC16<sup>+</sup>靶细胞,范围为8.1pM到133nM。

[0384] 温育之后,将细胞用含有1%过滤FBS的冷PBS洗涤两次,然后用藻红蛋白(PE)标记的抗人IgG(MUC16<sup>+</sup>细胞)或Alexa647标记的抗人IgG(CD28<sup>+</sup>细胞)检测。

[0385] 将近红外(IR)反应性活/死染料添加到人和猕猴T细胞中。不含抗体或仅含二抗的孔作为对照。

[0386] 与MUC16<sup>+</sup>细胞或J.RT3.T3.5/NF-κB-Luc/1G4AB/hCD8αβ/hCD28细胞系温育之后,将细胞洗涤,重悬于200μL FACS缓冲液(含有1%过滤FBS和1mM EDTA的冷PBS)中,并且在BD FACS Canto II上通过流式细胞术分析。

[0387] 与人或猕猴T细胞温育之后,将细胞洗涤,并且用抗CD2、抗CD16、抗CD4和抗CD8的混合物在FACS缓冲液中在4℃下染色20分钟。洗涤之后,将细胞重悬在FACS缓冲液,并且对活/CD2<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD16<sup>-</sup>或活/CD2<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD16<sup>-</sup>进行门控,并且通过流式细胞术在BD LSRFortessa X-20上分析。

[0388] 为了确定EC<sub>50</sub>,利用GraphPad Prism使用9点响应曲线上的四参数逻辑方程分析测得的MFI值。最大MFI的增加倍数通过检测到的最高MFI与仅含有第二抗体的孔的MFI之比来确定。

[0389] 流式细胞术还用于确定bs24963D和市售抗PD-L1抗体与MUC16<sup>+</sup>人胰腺癌细胞SW1990和SW1990/hPD-L1细胞的结合。简而言之,将 $2 \times 10^5$ 个细胞与5μL(66.7nM)bs24963D、抗PD-L1(2.5μL)或与AlexaFluor647(bs24963D)或APC(抗PD-L1)缀合的非结合对照抗体在冰上温育30分钟。用染色缓冲液洗涤细胞一次,离心,并且用D-PBS洗涤。用100μL以1:1000稀释的活/死固定紫活性染料对细胞进行染色,并且在室温下温育15分钟。将细胞在染色缓冲液中洗涤3次,并重悬于100μL 1:1染色缓冲液和cytofix溶液中,并使用Cytoflex细胞仪通过流式细胞术进行分析。通过将所关注的抗体的MFI除以单独的活性的MFI来计算活性的结合倍数。

[0390] 材料与方法

[0391] NF-κB荧光素酶报告基因生物测定

[0392] 如图10所示,在工程化的基于T细胞/抗原呈递细胞的报告基因测定中评估了bs24963D增强TCR介导的信号传导的能力。TCR识别特定的MHC/肽复合物并通过多种转录因子活化T细胞,如活化蛋白1(AP-1)、活化T细胞的核因子(NFAT)或活化B细胞的核因子κ轻链-增强子(NF-κB)(Goldrath,1999;《自然》402:255-62)(Shapiro,1998;《免疫学期刊》;161(12):6455-8)。T细胞响应通过共刺激受体(如CD28)的参与进一步完善,后者进而被其内源性配体CD80或CD86活化,并且随后增强细胞信号,如TCR活化之后由NF-κB转录因子控

制的途径。

[0393] 在此测定中,工程化T细胞通过1G4 TCR (IG4AB) 直接活化,其识别与工程化抗原呈递3T3细胞上显示的人MHC I类分子、HLA-A2和h $\beta$ 2M复合的NY-ES0-1 157-165肽 (NYES01p) (Robbins,2008;《免疫学期刊》;180(9):6116-31)。TCR活化导致萤光素酶的产生,这是由工程化报告基因T细胞中的NF- $\kappa$ B转录因子驱动的。CD8通过将淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶 (Lck) 募集到TCR/CD3复合物中来促进TCR/MHC相互作用并促进T细胞活化,从而通过基于细胞内免疫受体酪氨酸的活化基序 (ITAM) 的磷酸化来增强TCR信号传导 (Cole,2012;《免疫学 (Immunology) 》;137(2):139-48) (Guirado,2002;《生化与生理研究通讯 (Biochem.Biophys.Res.Comm.) 》291(3):574-81)。

[0394] 在 $1.5 \times 10^4$ 个抗原呈递细胞存在的情况下,将bs24963D、非桥接对照 (非TAAxCD28双特异性抗体) 或非-结合对照 (39pM到10nM) 的两倍连续稀释液每孔一式两份添加到 $5 \times 10^4$ 个工程化报告基因T细胞 (J.RT3.T3.5/NF- $\kappa$ B-Luc/1G4AB/hCD8 $\alpha\beta$ /hCD28) 中,所述抗原呈递细胞是MUC16<sup>-</sup> (3T3/h $\beta$ 2M/HLA-A2/NYES01p) 或MUC16<sup>+</sup> (3T3/h $\beta$ 2M/HLA-A2/NYES01p/hMUC16)。在完全培养基 (补充有10%FBS的RPMI以及青霉素、链霉素和L-谷氨酰胺的混合物) 中进行抗体稀释和生物测定。包含不含有抗体的孔作为另外的对照,并且用于计算活性的倍数增加和EC<sub>50</sub>值。将板在37°C和5%CO<sub>2</sub>下温育5小时,然后将ONE-Glo萤光素酶底物 (100  $\mu$ L) 添加到每个孔中。使用ENVISION酶标仪将萤光素酶活性记录为发光信号,如相对光单位 (RLU) 表示。利用GraphPad Prism使用10点响应曲线上的4参数逻辑方程分析检测到的RLU值。

[0395] 将最大活化信号确定为在测试抗体浓度范围内检测到的平均最大RLU响应。活性的增加倍数计算为在测试抗体浓度范围内记录的最高平均RLU值与抗体不存在的情况下记录的平均RLU值之比。

[0396] 用于T细胞增殖和IL-2释放的T细胞活化测定

[0397] 在恒定浓度的REGN4018 (在人卵巢癌细胞系OVCAR-3和PEO1中评估) 或恒定浓度的西米普利单抗 (在人胰腺癌细胞系[SW1990和SW1990/hPD-L1]中评估) 存在的情况下,使用T细胞活化测定通过来自3个或2个供体的富集的人初级T细胞来分别确定bs24963D介导IL-2释放和T细胞增殖的能力。

[0398] 人初级T细胞分离

[0399] 从4个健康供体白血球包中分离出人PBMC。对于供体555014和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 Plaque 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。在以 $400 \times g$ 离心30分钟之后,关闭制动,将单核细胞层转移到新的试管中,用含2%FBS的PBS稀释5倍,并且以 $300 \times g$ 离心8分钟。对于供体555131和555129,使用来自干细胞技术公司 (Stem Cell Technologies) 的EasySep Direct Human PBMC分离试剂盒并遵循制造商的方案,从健康供体的外周血中分离PBMC。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°C水浴中解冻并在含有50U/mL Benzonase<sup>®</sup>核酸酶的刺激培养基 (补充有10%FBS、HEPES、NaPyr、NEAA和0.01mM  $\beta$ -巯基乙醇[BME]的X-VIVO15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。

[0400] 人OVCAR-3、PE01、SW1990、SW1990/hPD-L1细胞和人初级T细胞的T细胞活化测定

[0401] 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<sup>+</sup>T细胞以 $1 \times 10^5$ 个细胞/孔的浓度平板接种在96孔圆底平板中。用25 $\mu$ g/mL (OVCAR-3)、10 $\mu$ g/mL (PE01) 或30 $\mu$ g/mL (SW1990和SW1990/hPD-L1) 丝裂霉素C处理OVCAR-3、PE01、SW1990或SW1990/hPD-L1细胞以阻止增殖。在37°C、5%CO<sub>2</sub>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,然后最终重悬于刺激培养基中。对于OVCAR-3、PE01和两种SW1990细胞,分别以最终浓度 $1 \times 10^4$ 、 $2.5 \times 10^4$ 个细胞或 $5 \times 10^4$ 个细胞,将OVCAR-3、PE01、SW1990和SW1990/hPD-L1细胞添加到含有CD3<sup>+</sup>T细胞的孔中。将恒定浓度的REGN4018或CD3非桥接对照双特异性抗体(5nM) 或西米普利单抗或非结合IgG4<sup>P</sup>对照(20nM) 添加到含有OVCAR-3、PE01、SW1990或SW1990/hPD-L1细胞的孔中。随后,将bs24963D、非TAAxCD28对照或非结合对照、抗体以1:4稀释系列从7.6pM滴定到500nM,并且添加到孔中。10点浓度曲线的终点不含有抗体,并用于计算活性的倍数增加。在37°C、5%CO<sub>2</sub>下将板温育72(OVCAR-3和PE01) 或96(SW1990和SW1990/hPD-L1) 小时之后,在用[甲基-<sup>3</sup>H]-胸腺嘧啶处理之前,收集50 $\mu$ L培养基上清液以测量IL-2的释放,以定量增殖。

[0402] 对于IL-2释放,根据制造商的方案使用人IL-2AlphaLISA试剂盒测试了5 $\mu$ L(用于使用OVCAR-3和PE01细胞的测定) 或20 $\mu$ L(用于使用SW1990和SW1990/hPD-L1细胞的测定) 上清液。IL-2测量值是在珀金埃尔默公司的多标记酶标仪Envision上获取的,并且报告为相对荧光单位(RFU)。

[0403] 对于增殖测定,将在刺激培养基中稀释到2mCi/mL的50 $\mu$ L[甲基-<sup>3</sup>H]-胸腺嘧啶添加到孔中并且将板温育6小时(用于使用OVCAR-3和PE01细胞的测定) 或16小时(用于使用SW1990和SW1990/hPD-L1细胞的测定)。[甲基-<sup>3</sup>H]-胸腺嘧啶将以更高的量掺入分裂细胞中。温育之后,将细胞收集到滤板上,并且准备在微孔板闪烁和发光计数器TopCount NXT仪器上进行测量。

[0404] 一式三份地对所有连续稀释液的IL-2释放和增殖进行测试。使用GraphPad Prism<sup>TM</sup>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EC<sub>50</sub>值。给出IL-2释放和增殖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。相对于无抗体介导的最大IL-2释放或增殖,计算了由bs24963D介导的最大IL-2释放或T细胞增殖的倍数增加。

[0405] 在测定中评估了bs24963D活化T细胞的能力,其中刺激性抗原呈递细胞提供信号1。此测定使用了J.RT3.T3.5报告基因T细胞,其工程化为表达人CD8、人CD28、文献描述的识别与HLA-A2复合的NY-ESO-1肽(NYES01p)的TCR(1G4),以及NF- $\kappa$ B-荧光素酶报告基因。提供信号1的刺激性抗原呈递细胞是工程化为在有或没有人MUC16(hMUC16)的情况下表达HLA-A2、h $\beta$ 2M和NYES01p的3T3细胞。与bs24963D并行测试了CD28非桥接对照双特异性抗体(非TAAxCD28) 和非结合对照mAb(IgG4<sup>P-PVA</sup>)。使用发光试剂测量NF- $\kappa$ B信号传导,以检测荧光素酶报告基因活性。结果汇总在表28中。

[0406] 在此测试系统中,在MUC16<sup>+</sup>抗原呈递细胞存在的情况下,bs24963D介导了报告基因T细胞中NF- $\kappa$ B信号传导的浓度依赖性增加;使用缺少MUC16表达的细胞未见活性(图11A和11B)。CD28非桥接对照双特异性抗体未观察到NF- $\kappa$ B信号传导的增加。

[0407] 表28:bs24963D介导的NF- $\kappa$ B-荧光素酶活化的汇总

| [0408] | 抗体         | 抗原呈递细胞 (+/- MUC16)             |                    |      |                         |                    |
|--------|------------|--------------------------------|--------------------|------|-------------------------|--------------------|
|        |            | 3T3/hβ2M/HLA-A2/NYESO1p/hMUC16 |                    |      | 3T3/hβ2M/HLA-A2/NYESO1p |                    |
|        |            | EC <sub>50</sub> (M)           | 最大RLU <sup>a</sup> | 增加倍数 | EC <sub>50</sub> (M)    | 最大RLU <sup>a</sup> |
|        | bs24963D   | $2.88 \times 10^{-10}$         | 254,300            | 2.11 | ND                      | 65,920             |
|        | 非 TAAxCD28 | ND                             | 133,220            | 1.24 | ND                      | 64,740             |

[0409] <sup>a</sup>最大RLU是在测试抗体浓度范围 (39pM到10nM) 内观察到的最高平均RLU值。

[0410] <sup>b</sup>相对于无抗体介导的最大RLU, 计算由bs24963D或非TAAxCD28介导的最大RLU的增加倍数。

[0411] 缩写:ND, 未确定, 因为未观察到萤光素酶活性的浓度依赖性增加

[0412] 实例11. 在REGN4018 (抗MUC16 X抗CD3) 或西米普利单抗 (PD-1拮抗剂抗体) 存在或不存在的条件下评估bs24963D (抗MUC16 X抗CD28) 介导的IL-2释放和人初级T细胞的增殖

[0413] 在2种不同的MUC16<sup>+</sup>人卵巢癌细胞系 (OVCAR-3和PEO1) 存在的条件下, 评估了如由IL-2释放和T细胞增殖所确定的bs24963D活化人初级T细胞的能力。由于这些细胞无法从同种异体响应中提供足够的信号1, 因此包含了固定浓度的REGN4018 (MUC16 X CD3双特异性抗体) 来提供信号1。OVCAR-3和PEO1细胞的结果汇总在表29中, 用于IL-2的释放和在表30中用于增殖。

[0414] 在工程化为过度表达人PD-L1 (SW1990/hPD-L1) 的MUC16<sup>+</sup>人胰腺癌细胞系 (SW1990) 和SW1990存在的条件下, 评估了如由IL-2释放和T细胞增殖所确定的bs24963D活化人初级T细胞的能力。两种细胞系均提供足以充当信号1的同种异体响应。另外, 还评估了固定浓度的西米普利单抗 (20nM) 增强bs24963D作用的能力。SW1990和SW1990/hPD-L1细胞的结果汇总在表31中, 用于IL-2的释放和在表32中用于增殖。

[0415] 在带有OVCAR-3和PEO1靶细胞的REGN4018存在或不存在的条件下bs24963D (REGN5668) 增强人初级T细胞的IL-2释放和增殖的能力

[0416] 当与OVCAR-3和PEO1癌细胞温育时, bs24963D仅在REGN4018存在的条件下介导人T细胞的IL-2释放 (图12) 和增殖 (图13) 的浓度依赖性增强。在REGN4018存在或不存在的条件下, CD3和CD28非桥接对照双特异性抗体均未增强IL-2的释放。

[0417] 在此测定中, 单独的5nM REGN4018不会增加IL-2的释放, 但相对于非结合对照, T细胞的增殖会适度增强。

[0418] 表29: 在带有OVCAR-3和PEO1靶细胞的REGN4018存在或不存在的条件下bs24963D介导的人初级T细胞的IL-2释放的增强的汇总

[0419]

| 靶细胞系    | 供体        | 固定浓度下的 Ab<br>(5 nM) | 不同浓度下测试的抗体<br>(7.6 pM 到 500 nM) | 人初级 T 细胞的 IL-2 释放       |                               |                             |
|---------|-----------|---------------------|---------------------------------|-------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
|         |           |                     |                                 | EC <sub>50</sub><br>(M) | 最大 IL-2 <sup>a</sup><br>(RFU) | 增加倍数 <sup>b</sup><br>(IL-2) |
| OVCAR-3 | 供体 555014 | REGN4018            | bs24963D                        | $7.07 \times 10^{-10}$  | 46,931                        | 20.01                       |
|         |           |                     | 非 TAAxCD28                      | NC                      | 4,741                         | 1.89                        |
|         |           | 非 TAAxCD3           | bs24963D                        | NC                      | 1,361                         | 2.75                        |
|         |           |                     | 非 TAAxCD28                      | NC                      | 3,033                         | 6.62                        |
|         | 供体 555109 | REGN4018            | bs24963D                        | $1.22 \times 10^{-9}$   | 36,725                        | 32.10                       |
|         |           |                     | 非 TAAxCD28                      | NC                      | 1,638                         | 1.38                        |
|         |           | 非 TAAxCD3           | bs24963D                        | ND                      | 893                           | 1.82                        |
|         |           |                     | 非 TAAxCD28                      | NC                      | 1,403                         | 2.84                        |
|         | 供体 555131 | REGN4018            | bs24963D                        | $5.90 \times 10^{-10}$  | 46,209                        | 13.08                       |
|         |           |                     | 非 TAAxCD28                      | NC                      | 4,443                         | 1.33                        |
|         |           | 非 TAAxCD3           | bs24963D                        | NC                      | 1,814                         | 2.71                        |
|         |           |                     | 非 TAAxCD28                      | NC                      | 3,136                         | 5.95                        |

[0420]

| 靶细胞系 | 供体        | 固定浓度下的 Ab<br>(5 nM) | 不同浓度下测试的抗体<br>(7.6 pM 到 500 nM) | 人初级 T 细胞的 IL-2 释放       |                               |                             |
|------|-----------|---------------------|---------------------------------|-------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
|      |           |                     |                                 | EC <sub>50</sub><br>(M) | 最大 IL-2 <sup>a</sup><br>(RFU) | 增加倍数 <sup>b</sup><br>(IL-2) |
| PEO1 | 供体 555014 | REGN4018            | bs24963D                        | $1.95 \times 10^{-9}$   | 31024                         | 30.30                       |
|      |           |                     | 非 TAAxCD28                      | NC                      | 2312                          | 2.16                        |
|      |           | 非 TAAxCD3           | bs24963D                        | NC                      | 2490                          | 5.56                        |
|      |           |                     | 非 TAAxCD28                      | NC                      | 2776                          | 6.12                        |
|      | 供体 555109 | REGN4018            | bs24963D                        | $3.10 \times 10^{-9}$   | 16,421                        | 20.03                       |
|      |           |                     | 非 TAAxCD28                      | ND                      | 897                           | 1.33                        |
|      |           | 非 TAAxCD3           | bs24963D                        | NC                      | 2,039                         | 4.36                        |
|      |           |                     | 非 TAAxCD28                      | NC                      | 1,360                         | 2.35                        |
|      | 供体 555014 | REGN4018            | bs24963D                        | $2.42 \times 10^{-9}$   | 29,217                        | 25.70                       |
|      |           |                     | 非 TAAxCD28                      | NC                      | 2,175                         | 1.82                        |
|      |           | 非 TAAxCD3           | bs24963D                        | NC                      | 2,911                         | 5.77                        |
|      |           |                     | 非 TAAxCD28                      | NC                      | 2,443                         | 4.42                        |

[0421] <sup>a</sup>最大IL-2浓度是在测试抗体浓度范围内记录的最高平均IL-2释放值。

[0422] <sup>b</sup>相对于无抗体介导的最大IL-2释放,计算在REGN4018存在或不存的情况下,由bs24963D介导的最大IL-2释放的增加倍数。

[0423] 缩写:NC,未计算,因为数据未拟合4参数逻辑方程;未确定,因为未观察到IL-2释放的浓度依赖性增加。

[0424] 表30:在带有OVCAR-3和PEO1靶细胞的REGN4018存在或不存在的条件下bs24963D介导的人初级T细胞的增殖的增强的汇总

| 靶细胞系                  | 供体        | 固定浓度下的 Ab (5 nM) | 不同浓度下测试的抗体 (7.6 pM 到 500 nM) | T 细胞增殖                   |                         |                        |
|-----------------------|-----------|------------------|------------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|
|                       |           |                  |                              | EC <sub>50</sub> (M)     | 最大增殖 <sup>a</sup> (CPM) | 增加倍数 <sup>b</sup> (增殖) |
| [0425]<br><br>OVCAR-3 | 供体 555014 | REGN4018         | bs24963D                     | 8.89 × 10 <sup>-11</sup> | 13,968                  | 2.03                   |
|                       |           |                  | 非 TAAxCD28                   | NC                       | 11,260                  | 1.59                   |
|                       |           | 非 TAAxCD3        | bs24963D                     | NC                       | 336                     | 1.38                   |
|                       |           |                  | 非 TAAxCD28                   | NC                       | 579                     | 1.60                   |
|                       | 供体 555109 | REGN4018         | bs24963D                     | 9.45 × 10 <sup>-11</sup> | 14,818                  | 3.18                   |
|                       |           |                  | 非 TAAxCD28                   | 4.61 × 10 <sup>-8</sup>  | 8,141                   | 1.66                   |
|                       |           | 非 TAAxCD3        | bs24963D                     | ND                       | 416                     | 1.37                   |
|                       |           |                  | 非 TAAxCD28                   | ND                       | 475                     | 1.33                   |
|                       | 供体        | REGN4018         | bs24963D                     | 2.47 × 10 <sup>-11</sup> | 13,607                  | 1.66                   |
|                       |           |                  | bs24963D                     | 2.47 × 10 <sup>-11</sup> | 13,607                  | 1.66                   |
| [0426]                | 555131    | 非 TAAxCD3        | 非 TAAxCD28                   | NC                       | 10,154                  | 1.16                   |
|                       |           |                  | bs24963D                     | NC                       | 622                     | 1.82                   |
|                       |           | 非 TAAxCD3        | 非 TAAxCD28                   | NC                       | 562                     | 1.68                   |
|                       |           |                  | bs24963D                     | NC                       | 603                     | 2.58                   |
|                       | 供体 555014 | REGN4018         | bs24963D                     | 1.73 × 10 <sup>-10</sup> | 9,605                   | 3.27                   |
|                       |           |                  | 非 TAAxCD28                   | NC                       | 6,953                   | 2.26                   |
|                       |           | 非 TAAxCD3        | bs24963D                     | NC                       | 603                     | 2.58                   |
|                       |           |                  | 非 TAAxCD28                   | NC                       | 551                     | 3.09                   |
|                       | 供体 555109 | REGN4018         | bs24963D                     | 4.04 × 10 <sup>-10</sup> | 10,304                  | 8.42                   |
|                       |           |                  | 非 TAAxCD28                   | NC                       | 4,888                   | 4.62                   |
|                       |           | 非 TAAxCD3        | bs24963D                     | NC                       | 733                     | 2.84                   |
|                       |           |                  | 非 TAAxCD28                   | NC                       | 419                     | 1.72                   |
|                       | 供体 555014 | REGN4018         | bs24963D                     | 2.22 × 10 <sup>-10</sup> | 10,335                  | 3.69                   |
|                       |           |                  | 非 TAAxCD28                   | 4.22 × 10 <sup>-8</sup>  | 5,631                   | 2.06                   |
|                       |           | 非 TAAxCD3        | bs24963D                     | NC                       | 835                     | 4.44                   |
|                       |           |                  | 非 TAAxCD28                   | NC                       | 523                     | 2.29                   |

[0427] <sup>a</sup>最大增殖是在测试抗体浓度范围内记录的最高平均CPM值。

[0428] <sup>b</sup>相对于在bs24963D或非TAAxCD28对照不存在的情况下介导的最大增殖,计算了在REGN4018存在或不存在的条件下,由bs24963D介导的最大T细胞增殖的增加倍数。

[0429] 缩写:NC,未计算,因为数据未拟合4参数逻辑方程;ND,未确定,因为未观察到增殖的浓度依赖性增加

[0430] 在带有SW1990和SW1990/hPD-L1靶细胞的西米普利单抗存在或不存在的条件下bs24963D(REGN5668)增强人初级T细胞的IL-2释放和增殖的能力

[0431] 当与SW1990和SW1990/hPD-L1 MUC16<sup>+</sup>人胰腺癌细胞温育时,bs24963D在西米普利单抗存在和不存在的条件下介导人T细胞的IL-2释放(图14)和增殖(图15)的浓度依赖性增强。在bs24963D存在的情况下,SW1990细胞中人PD-L1的过度表达抑制了IL-2和T细胞的增殖,并且通过添加西米普利单抗可适度增加I这些。在SW1990和SW1990/hPD-L1细胞的存在的情况下,高浓度的CD28非桥接对照双特异性抗体介导了某些IL-2释放。在bs24963D不存在的情况下,西米普利单抗相对于CD28非桥接对照双特异性抗体不会增加IL-2释放或T细胞增殖。

[0432] 表31:在带有SW1990和SW1990/hPD-L1靶细胞的西米普利单抗存在或不存在的条件下

况下bs24963D介导的人初级T细胞的IL-2释放的增强的汇总

| 靶细胞系          | 供体           | 固定浓度下的 Ab<br>(20 nM) | 不同浓度下测试的抗体<br>(7.6 pM 到 500 nM) | 人初级 T 细胞的 IL-2 释放      |                               |                          |
|---------------|--------------|----------------------|---------------------------------|------------------------|-------------------------------|--------------------------|
|               |              |                      |                                 | EC <sub>50</sub> (M)   | 最大 IL-2 <sup>a</sup><br>(RFU) | 增加倍数 <sup>b</sup> (IL-2) |
| SW1990        | 供体<br>555109 | 西米普利单抗               | bs24963D                        | $2.98 \times 10^{-9}$  | 3,773                         | 3.31                     |
|               |              |                      | 非 TAAxCD28                      | ND                     | 1,415                         | 1.98                     |
|               |              | IgG4 <sup>P</sup> 对照 | bs24963D                        | $2.31 \times 10^{-9}$  | 2,922                         | 4.83                     |
|               |              |                      | 非 TAAxCD28                      | ND                     | 944                           | 1.31                     |
|               | 供体<br>555129 | 西米普利单抗               | bs24963D                        | $8.60 \times 10^{-10}$ | 4,833                         | 3.39                     |
|               |              |                      | 非 TAAxCD28                      | NC                     | 2,927                         | 2.28                     |
|               |              | IgG4 <sup>P</sup> 对照 | bs24963D                        | $1.21 \times 10^{-9}$  | 3,589                         | 2.89                     |
|               |              |                      | 非 TAAxCD28                      | NC                     | 2,027                         | 1.51                     |
| SW1990/hPD-L1 | 供体<br>555109 | 西米普利单抗               | bs24963D                        | $1.01 \times 10^{-9}$  | 1,692                         | 2.73                     |
|               |              |                      | 非 TAAxCD28                      | NC                     | 1,102                         | 1.60                     |
|               |              | IgG4 <sup>P</sup> 对照 | bs24963D                        | $2.55 \times 10^{-9}$  | 1,053                         | 1.70                     |
|               |              |                      | 非 TAAxCD28                      | ND                     | 616                           | 1.23                     |
|               | 供体<br>555129 | 西米普利单抗               | bs24963D                        | $1.41 \times 10^{-9}$  | 3,391                         | 2.33                     |
|               |              |                      | 非 TAAxCD28                      | NC                     | 1,977                         | 1.57                     |
|               |              | IgG4 <sup>P</sup> 对照 | bs24963D                        | $2.22 \times 10^{-9}$  | 2,161                         | 2.14                     |
|               |              |                      | 非 TAAxCD28                      | ND                     | 1,459                         | 1.49                     |

[0434] <sup>a</sup>最大IL-2浓度是在测试抗体浓度范围内记录的最高平均IL-2释放值。

[0435] <sup>b</sup>相对于无抗体介导的最大IL-2释放,计算在西米普利单抗存在或不存的情况下,由bs24963D介导的最大IL-2释放的增加倍数。

[0436] 缩写:NC,未计算,因为数据未拟合4参数逻辑方程;ND,未确定,因为未观察到IL-2释放的浓度依赖性增加

[0437] 表32:在带有SW1990和SW1990/hPD-L1靶细胞的西米普利单抗存在或不存在的条件下bs24963D介导的人初级T细胞的增殖的增强的汇总

| 靶细胞系   | 供体           | 固定浓度下的 Ab<br>(20 nM) | 不同浓度下测试的抗体<br>(7.6 pM 到 500 nM) | T 细胞增殖                 |                            |                           |
|--------|--------------|----------------------|---------------------------------|------------------------|----------------------------|---------------------------|
|        |              |                      |                                 | EC <sub>50</sub> (M)   | 最大增殖 <sup>a</sup><br>(CPM) | 增加倍数 <sup>b</sup><br>(增殖) |
| SW1990 | 供体<br>555109 | 西米普利单抗               | bs24963D                        | $1.68 \times 10^{-9}$  | 557                        | 4.52                      |
|        |              |                      | 非 TAAxCD28                      | ND                     | 161                        | 1.41                      |
|        |              | IgG4 <sup>P</sup> 对照 | bs24963D                        | $2.86 \times 10^{-9}$  | 421                        | 4.36                      |
|        |              |                      | 非 TAAxCD28                      | ND                     | 123                        | 1.46                      |
|        | 供体<br>555129 | 西米普利单抗               | bs24963D                        | $4.59 \times 10^{-10}$ | 545                        | 2.47                      |
|        |              |                      | 非 TAAxCD28                      | ND                     | 279                        | 1.66                      |
|        |              | IgG4 <sup>P</sup> 对照 | bs24963D                        | $4.83 \times 10^{-10}$ | 569                        | 2.17                      |
|        |              |                      | 非 TAAxCD28                      | ND                     | 353                        | 1.46                      |

[0439]

| 靶细胞系              | 供体           | 固定浓度下的Ab<br>(20 nM)  | 不同浓度下测试的抗体<br>(7.6 pM 到 500 nM) | T 细胞增殖                |                            |                           |
|-------------------|--------------|----------------------|---------------------------------|-----------------------|----------------------------|---------------------------|
|                   |              |                      |                                 | EC <sub>50</sub> (M)  | 最大增殖 <sup>a</sup><br>(CPM) | 增加倍数 <sup>b</sup><br>(增殖) |
| SW1990<br>/hPD-L1 | 供体<br>555109 | 西米普利单抗               | bs24963D                        | $1.40 \times 10^{-9}$ | 279                        | 4.70                      |
|                   |              |                      | 非 TAAxCD28                      | ND                    | 151                        | 1.98                      |
|                   |              | IgG4 <sup>P</sup> 对照 | bs24963D                        | $1.54 \times 10^{-9}$ | 140                        | 2.35                      |
|                   |              |                      | 非 TAAxCD28                      | ND                    | 84.0                       | 1.42                      |
|                   | 供体<br>555129 | 西米普利单抗               | bs24963D                        | $2.53 \times 10^{-9}$ | 601                        | 3.20                      |
|                   |              |                      | 非 TAAxCD28                      | NC                    | 222                        | 1.73                      |
|                   |              | IgG4 <sup>P</sup> 对照 | bs24963D                        | $1.66 \times 10^{-9}$ | 333                        | 2.74                      |
|                   |              |                      | 非 TAAxCD28                      | ND                    | 146                        | 1.62                      |

[0440] <sup>a</sup>最大增殖是在测试抗体浓度范围内记录的最高平均CPM值。

[0441] <sup>b</sup>相对于在bs24963D或非TAAxCD28对照不存在的情况下介导的最大增殖,计算了在西米普利单抗存在或不存在的条件下,由bs24963D介导的最大T细胞增殖的增加倍数。

[0442] 缩写:NC,未计算,因为数据未拟合4参数逻辑方程;ND,未确定,因为未观察到增殖的浓度依赖性增加

[0443] 本发明不限于本文所描述的具体实施例的范围。事实上,除了本文所述的那些之外,本发明的各种修改对于本领域技术人员来说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书的范围内。

## 序列表

&lt;110&gt; 瑞泽恩制药公司 (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.)

&lt;120&gt; 双特异性抗 MUC16 X 抗 CD28 抗体以及其用途

&lt;130&gt; 10493-W001/118003-49320

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; 62/815, 861

&lt;151&gt; 2019-03-19

&lt;150&gt; 62/782, 142

&lt;151&gt; 2018-12-19

&lt;160&gt; 54

&lt;170&gt; Windows 用 FastSEQ 版本 4.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 387

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成

&lt;400&gt; 1

[0001]

gaggtgcagc tggtagagtc tgggggaggc ttggaacagc cagggcggtc cctgagactc 60  
 tctgtacag cttctggatt cgccttgggt gatcatacta tgagctgggt ccgccaggct 120  
 ccaggaagg ggctggagtg ggtaggtttc attagaagta gagcttatgg tgggacaaca 180  
 gaatacgccg cgtctgtgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc caaaagcatc 240  
 gcctatctgc aaatggacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ttgtactagc 300  
 gggggatatg atagtagtct tcattactac tattactacc acggtatgga cgtctggggc 360  
 cgagggacca cggtcaccgt ctctctca 387

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 129

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成

&lt;400&gt; 2

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

Ala Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
                             85                            90                            95  
 Tyr Cys Thr Ser Gly Gly Tyr Asp Ser Ser Leu His Tyr Tyr Tyr Tyr  
                             100                            105                            110  
 Tyr His Gly Met Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Thr Val Thr Val Ser  
                             115                            120                            125  
 Ser

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 3

ggattcgcct ttggtgatca tact

24

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

[0002]

<400> 4

Gly Phe Ala Phe Gly Asp His Thr

1

5

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 5

attagaagta gagcttatgg tgggacaaca

30

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 6

Ile Arg Ser Arg Ala Tyr Gly Gly Thr Thr

1

5

10

<210> 7

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 7

actagcgggg gatatgatag tagtcttcat tactactatt actaccacgg tatggacgtc 60

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 8

Thr Ser Gly Gly Tyr Asp Ser Ser Leu His Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr His

1

5

10

15

Gly Met Asp Val

20

<210> 9

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

[0003] <400> 9

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccaggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gattcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcaccttg gacgttcggc 300

caagggacca aggtggaaat caaa 324

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<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  |
|        | 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 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | <220>      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | <223>      | 合成   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | <400>      | 11   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | cagagtgtta |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 21  |
|        | <210>      | 12   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | <211>      | 7    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | <212>      | PRT  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | <213>      | 人工序列 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | <220>      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | <223>      | 合成   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | <400>      | 12   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | Gln        | Ser  | Val | Ser | Ser | Ser | Tyr |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | 1          |      |     |     | 5   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0004] | <210>      | 13   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | <211>      | 9    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | <212>      | DNA  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | <213>      | 人工序列 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | <220>      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | <223>      | 合成   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | <400>      | 13   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | ggtgcatcc  |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 9   |
|        | <210>      | 14   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | <211>      | 3    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | <212>      | PRT  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | <213>      | 人工序列 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | <220>      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | <223>      | 合成   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | <400>      | 14   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | Gly        | Ala  | Ser |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | 1          |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | <210>      | 15   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | <211>      | 27   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | <212>      | DNA  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | <213>      | 人工序列 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | <220>      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | <223>      | 合成   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

|        |                                                                        |    |
|--------|------------------------------------------------------------------------|----|
| [0005] | <400> 15                                                               |    |
|        | cagcagtatg gtagctcacc ttggacg                                          | 27 |
|        | <210> 16                                                               |    |
|        | <211> 9                                                                |    |
|        | <212> PRT                                                              |    |
|        | <213> 人工序列                                                             |    |
|        | <220>                                                                  |    |
|        | <223> 合成                                                               |    |
|        | <400> 16                                                               |    |
|        | Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr                                    |    |
|        | 1 5                                                                    |    |
|        | <210> 17                                                               |    |
|        | <211> 366                                                              |    |
|        | <212> DNA                                                              |    |
|        | <213> 人工序列                                                             |    |
|        | <220>                                                                  |    |
|        | <223> 合成                                                               |    |
|        | <400> 17                                                               |    |
|        | caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60   |    |
|        | acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 120  |    |
|        | ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggatcac cactacaac 180   |    |
|        | ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagatcca gttctccctg 240  |    |
|        | aagctgagtt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag atgggggggtt 300 |    |
|        | cggagggact actactacta cggtatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360  |    |
|        | tcctca 366                                                             |    |
|        | <210> 18                                                               |    |
|        | <211> 122                                                              |    |
|        | <212> PRT                                                              |    |
|        | <213> 人工序列                                                             |    |
|        | <220>                                                                  |    |
|        | <223> 合成                                                               |    |
|        | <400> 18                                                               |    |
|        | 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              |  |     |  |     |
|        |  | 115                                                  |  | 120 |  |     |
|        |  | <210> 19                                             |  |     |  |     |
|        |  | <211> 24                                             |  |     |  |     |
|        |  | <212> DNA                                            |  |     |  |     |
|        |  | <213> 人工序列                                           |  |     |  |     |
|        |  | <220>                                                |  |     |  |     |
|        |  | <223> 合成                                             |  |     |  |     |
|        |  | <400> 19                                             |  |     |  |     |
|        |  | ggtggctcca tcagtagtta ctac                           |  |     |  | 24  |
|        |  | <210> 20                                             |  |     |  |     |
|        |  | <211> 8                                              |  |     |  |     |
|        |  | <212> PRT                                            |  |     |  |     |
|        |  | <213> 人工序列                                           |  |     |  |     |
|        |  | <220>                                                |  |     |  |     |
|        |  | <223> 合成                                             |  |     |  |     |
|        |  | <400> 20                                             |  |     |  |     |
|        |  | Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr                      |  |     |  |     |
|        |  | 1 5                                                  |  |     |  |     |
|        |  | <210> 21                                             |  |     |  |     |
|        |  | <211> 21                                             |  |     |  |     |
| [0006] |  | <212> DNA                                            |  |     |  |     |
|        |  | <213> 人工序列                                           |  |     |  |     |
|        |  | <220>                                                |  |     |  |     |
|        |  | <223> 合成                                             |  |     |  |     |
|        |  | <400> 21                                             |  |     |  |     |
|        |  | atctattaca gtgggatcac c                              |  |     |  | 21  |
|        |  | <210> 22                                             |  |     |  |     |
|        |  | <211> 7                                              |  |     |  |     |
|        |  | <212> PRT                                            |  |     |  |     |
|        |  | <213> 人工序列                                           |  |     |  |     |
|        |  | <220>                                                |  |     |  |     |
|        |  | <223> 合成                                             |  |     |  |     |
|        |  | <400> 22                                             |  |     |  |     |
|        |  | Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr                          |  |     |  |     |
|        |  | 1 5                                                  |  |     |  |     |
|        |  | <210> 23                                             |  |     |  |     |
|        |  | <211> 48                                             |  |     |  |     |
|        |  | <212> DNA                                            |  |     |  |     |
|        |  | <213> 人工序列                                           |  |     |  |     |
|        |  | <220>                                                |  |     |  |     |
|        |  | <223> 合成                                             |  |     |  |     |
|        |  | <400> 23                                             |  |     |  |     |
|        |  | gcgagatggg gggttcggag ggactactac tactacgcta tggacgtc |  |     |  | 48  |

<210> 24  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成  
 <400> 24  
 Ala Arg Trp Gly Val Arg Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10 15  
 <210> 25  
 <211> 360  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成  
 <400> 25  
 cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccitccgt gactactcca tgagctggat cgcagagct 120  
 ccaggaagg ggctggagtg ggtttcatac gttacttttt ttaatagtgc catatactac 180  
 gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ctactgtat 240  
 ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gagagaaaga 300  
 gagcctattg tggggggcctt tgactactgg ggccaggga ccttggtcac cgtctcctca 360  
 [0007] <210> 26  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成  
 <400> 26  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asp Tyr  
 20 25 30  
 Ser Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Tyr Val Thr Phe Phe Asn Ser Ala Ile Tyr 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 Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Glu Arg Glu Pro Ile Val Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

|        | 115                                       | 120 |
|--------|-------------------------------------------|-----|
|        | <210> 27                                  |     |
|        | <211> 24                                  |     |
|        | <212> DNA                                 |     |
|        | <213> 人工序列                                |     |
|        | <220>                                     |     |
|        | <223> 合成                                  |     |
|        | <400> 27                                  |     |
|        | ggattcacct tccgtgacta ctcc                | 24  |
|        | <210> 28                                  |     |
|        | <211> 8                                   |     |
|        | <212> PRT                                 |     |
|        | <213> 人工序列                                |     |
|        | <220>                                     |     |
|        | <223> 合成                                  |     |
|        | <400> 28                                  |     |
|        | Gly Phe Thr Phe Arg Asp Tyr Ser           |     |
|        | 1 5                                       |     |
|        | <210> 29                                  |     |
|        | <211> 24                                  |     |
|        | <212> DNA                                 |     |
| [0008] | <213> 人工序列                                |     |
|        | <220>                                     |     |
|        | <223> 合成                                  |     |
|        | <400> 29                                  |     |
|        | gttacttttt ttaatagtc cata                 | 24  |
|        | <210> 30                                  |     |
|        | <211> 8                                   |     |
|        | <212> PRT                                 |     |
|        | <213> 人工序列                                |     |
|        | <220>                                     |     |
|        | <223> 合成                                  |     |
|        | <400> 30                                  |     |
|        | Val Thr Phe Phe Asn Ser Ala Ile           |     |
|        | 1 5                                       |     |
|        | <210> 31                                  |     |
|        | <211> 39                                  |     |
|        | <212> DNA                                 |     |
|        | <213> 人工序列                                |     |
|        | <220>                                     |     |
|        | <223> 合成                                  |     |
|        | <400> 31                                  |     |
|        | gcgagagaaa gagagcctat tgtggggggc ttgactac | 39  |
|        | <210> 32                                  |     |
|        | <211> 13                                  |     |

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成

&lt;400&gt; 32

Ala Arg Glu Arg Glu Pro Ile Val Gly Gly Phe Asp Tyr

1

5

10

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 324

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成

&lt;400&gt; 33

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgtca 180  
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactetca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300  
 caagggacac gactggagat taaa 324

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 108

[0009]

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成

&lt;400&gt; 34

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 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

80

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

100

105

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

|        |                                  |    |
|--------|----------------------------------|----|
|        | <220>                            |    |
|        | <223> 合成                         |    |
|        | <400> 35                         |    |
|        | cagagcatta gcagctat              | 18 |
|        | <210> 36                         |    |
|        | <211> 6                          |    |
|        | <212> PRT                        |    |
|        | <213> 人工序列                       |    |
|        | <220>                            |    |
|        | <223> 合成                         |    |
|        | <400> 36                         |    |
|        | Gln Ser Ile Ser Ser Tyr          |    |
|        | 1 5                              |    |
|        | <210> 37                         |    |
|        | <211> 9                          |    |
|        | <212> DNA                        |    |
|        | <213> 人工序列                       |    |
|        | <220>                            |    |
|        | <223> 合成                         |    |
|        | <400> 37                         |    |
|        | gctgcatcc                        | 9  |
|        | <210> 38                         |    |
| [0010] | <211> 3                          |    |
|        | <212> PRT                        |    |
|        | <213> 人工序列                       |    |
|        | <220>                            |    |
|        | <223> 合成                         |    |
|        | <400> 38                         |    |
|        | Ala Ala Ser                      |    |
|        | 1                                |    |
|        | <210> 39                         |    |
|        | <211> 30                         |    |
|        | <212> DNA                        |    |
|        | <213> 人工序列                       |    |
|        | <220>                            |    |
|        | <223> 合成                         |    |
|        | <400> 39                         |    |
|        | caacagagtt acagtacccc tccgatcacc | 30 |
|        | <210> 40                         |    |
|        | <211> 10                         |    |
|        | <212> PRT                        |    |
|        | <213> 人工序列                       |    |
|        | <220>                            |    |
|        | <223> 合成                         |    |
|        | <400> 40                         |    |

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr

1 5 10

<210> 41

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 41

gagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60  
tcctgtgcag cctccggatt caccctcagt aggaataata tgcactgggt ccgccagget 120  
ccaggaagg gactggaata tgtttcaggt attagtagta atgggggtcg cacatattat 180  
gcagactctg tgaaggcag attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgtgtat 240  
cttcaaattg gcggcctgag agctgcggac atggctgtgt atttctgtac gagagatgac 300  
gagctgcttt cctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcactgtctc ctca 354

<210> 42

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 42

[0011] 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 Phe Ser Arg Asn

20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val

35 40 45

Ser Gly Ile Ser Ser Asn Gly Gly Arg Thr Tyr 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 Gly Gly Leu Arg Ala Ala Asp Met Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Thr Arg Asp Asp Glu Leu Leu Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 43

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 43

|        |                                             |    |
|--------|---------------------------------------------|----|
|        | ggattcacct tcagtaggaa taat                  | 24 |
|        | <210> 44                                    |    |
|        | <211> 8                                     |    |
|        | <212> PRT                                   |    |
|        | <213> 人工序列                                  |    |
|        | <220>                                       |    |
|        | <223> 合成                                    |    |
|        | <400> 44                                    |    |
|        | Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn Asn             |    |
|        | 1 5                                         |    |
|        | <210> 45                                    |    |
|        | <211> 24                                    |    |
|        | <212> DNA                                   |    |
|        | <213> 人工序列                                  |    |
|        | <220>                                       |    |
|        | <223> 合成                                    |    |
|        | <400> 45                                    |    |
|        | attagtagta atgggggtcg caca                  | 24 |
|        | <210> 46                                    |    |
|        | <211> 8                                     |    |
|        | <212> PRT                                   |    |
|        | <213> 人工序列                                  |    |
| [0012] | <220>                                       |    |
|        | <223> 合成                                    |    |
|        | <400> 46                                    |    |
|        | Ile Ser Ser Asn Gly Gly Arg Thr             |    |
|        | 1 5                                         |    |
|        | <210> 47                                    |    |
|        | <211> 33                                    |    |
|        | <212> DNA                                   |    |
|        | <213> 人工序列                                  |    |
|        | <220>                                       |    |
|        | <223> 合成                                    |    |
|        | <400> 47                                    |    |
|        | acgagagatg acgagctgct ttcctttgac tac        | 33 |
|        | <210> 48                                    |    |
|        | <211> 11                                    |    |
|        | <212> PRT                                   |    |
|        | <213> 人工序列                                  |    |
|        | <220>                                       |    |
|        | <223> 合成                                    |    |
|        | <400> 48                                    |    |
|        | Thr Arg Asp Asp Glu Leu Leu Ser Phe Asp Tyr |    |
|        | 1 5 10                                      |    |
|        | <210> 49                                    |    |

&lt;211&gt; 875

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hMUC16 膜近端结构域

(P13810-P14451).mFc; 登录号 NP\_078966

&lt;400&gt; 49

Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu  
1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly  
20 25 30

Cys Arg Leu Thr Leu Leu Arg Pro Glu Lys Asp Gly Glu Ala Thr Gly  
35 40 45

Val Asp Ala Ile Cys Thr His Arg Pro Asp Pro Thr Gly Pro Gly Leu  
50 55 60

Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Leu Glu Leu Ser Gln Leu Thr His Ser Ile  
65 70 75 80

Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asp Ser Leu Tyr Val Asn  
85 90 95

Gly Phe Thr His Arg Ser Ser Val Pro Thr Thr Ser Thr Gly Val Val  
100 105 110

Ser Glu Glu Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Asn Asn Leu Arg Tyr  
115 120 125

[0013]

Met Ala Asp Met Gly Gln Pro Gly Ser Leu Lys Phe Asn Ile Thr Asp  
130 135 140

Asn Val Met Gln His Leu Leu Ser Pro Leu Phe Gln Arg Ser Ser Leu  
145 150 155 160

Gly Ala Arg Tyr Thr Gly Cys Arg Val Ile Ala Leu Arg Ser Val Lys  
165 170 175

Asn Gly Ala Glu Thr Arg Val Asp Leu Leu Cys Thr Tyr Leu Gln Pro  
180 185 190

Leu Ser Gly Pro Gly Leu Pro Ile Lys Gln Val Phe His Glu Leu Ser  
195 200 205

Gln Gln Thr His Gly Ile Thr Arg Leu Gly Pro Tyr Ser Leu Asp Lys  
210 215 220

Asp Ser Leu Tyr Leu Asn Gly Tyr Asn Glu Pro Gly Pro Asp Glu Pro  
225 230 235 240

Pro Thr Thr Pro Lys Pro Ala Thr Thr Phe Leu Pro Pro Leu Ser Glu  
245 250 255

Ala Thr Thr Ala Met Gly Tyr His Leu Lys Thr Leu Thr Leu Asn Phe  
260 265 270

Thr Ile Ser Asn Leu Gln Tyr Ser Pro Asp Met Gly Lys Gly Ser Ala  
275 280 285

Thr Phe Asn Ser Thr Glu Gly Val Leu Gln His Leu Leu Arg Pro Leu  
290 295 300

Phe Gln Lys Ser Ser Met Gly Pro Phe Tyr Leu Gly Cys Gln Leu Ile  
 305 310 315 320  
 Ser Leu Arg Pro Glu Lys Asp Gly Ala Ala Thr Gly Val Asp Thr Thr  
 325 330 335  
 Cys Thr Tyr His Pro Asp Pro Val Gly Pro Gly Leu Asp Ile Gln Gln  
 340 345 350  
 Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr His Gly Val Thr Gln Leu Gly  
 355 360 365  
 Phe Tyr Val Leu Asp Arg Asp Ser Leu Phe Ile Asn Gly Tyr Ala Pro  
 370 375 380  
 Gln Asn Leu Ser Ile Arg Gly Glu Tyr Gln Ile Asn Phe His Ile Val  
 385 390 395 400  
 Asn Trp Asn Leu Ser Asn Pro Asp Pro Thr Ser Ser Glu Tyr Ile Thr  
 405 410 415  
 Leu Leu Arg Asp Ile Gln Asp Lys Val Thr Thr Leu Tyr Lys Gly Ser  
 420 425 430  
 Gln Leu His Asp Thr Phe Arg Phe Cys Leu Val Thr Asn Leu Thr Met  
 435 440 445  
 Asp Ser Val Leu Val Thr Val Lys Ala Leu Phe Ser Ser Asn Leu Asp  
 450 455 460  
 Pro Ser Leu Val Glu Gln Val Phe Leu Asp Lys Thr Leu Asn Ala Ser  
 465 470 475 480  
 [0014] Phe His Trp Leu Gly Ser Thr Tyr Gln Leu Val Asp Ile His Val Thr  
 485 490 495  
 Glu Met Glu Ser Ser Val Tyr Gln Pro Thr Ser Ser Ser Ser Thr Gln  
 500 505 510  
 His Phe Tyr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Pro Tyr Ser Gln Asp  
 515 520 525  
 Lys Ala Gln Pro Gly Thr Thr Asn Tyr Gln Arg Asn Lys Arg Asn Ile  
 530 535 540  
 Glu Asp Ala Leu Asn Gln Leu Phe Arg Asn Ser Ser Ile Lys Ser Tyr  
 545 550 555 560  
 Phe Ser Asp Cys Gln Val Ser Thr Phe Arg Ser Val Pro Asn Arg His  
 565 570 575  
 His Thr Gly Val Asp Ser Leu Cys Asn Phe Ser Pro Leu Ala Arg Arg  
 580 585 590  
 Val Asp Arg Val Ala Ile Tyr Glu Glu Phe Leu Arg Met Thr Arg Asn  
 595 600 605  
 Gly Thr Gln Leu Gln Asn Phe Thr Leu Asp Arg Ser Ser Val Leu Val  
 610 615 620  
 Asp Gly Tyr Ser Pro Asn Arg Asn Glu Pro Leu Thr Gly Asn Ser Asp  
 625 630 635 640  
 Leu Pro Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys  
 645 650 655  
 Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro

```

        660              665              670
Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr
        675              680              685
Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser
        690              695              700
Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His
705              710              715              720
Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile
        725              730              735
Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn
        740              745              750
Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys
        755              760              765
Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu
        770              775              780
Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe
785              790              795              800
Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu
        805              810              815
Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr
        820              825              830
Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg
[0015]      835              840              845
Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His
        850              855              860
Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
865              870              875
<210> 50
<211> 367
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hCD28 胞外(N19-P152).mFc; 登录号 NP_006130
<400> 50
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              80
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 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 | 175 |
|        | Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp |     |     |
|        | 180                                                             | 185 | 190 |
|        | 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 | 255 |
|        | Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro |     |     |
| [0016] | 260                                                             | 265 | 270 |
|        | 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 | 335 |
|        | 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> 51                                                        |     |     |
|        | <211> 669                                                       |     |     |
|        | <212> PRT                                                       |     |     |
|        | <213> 人工序列                                                      |     |     |
|        | <220>                                                           |     |     |
|        | <223> hMUC16 膜近端结构域                                             |     |     |
|        | (P13810-P14451). mmH                                            |     |     |
|        | <400> 51                                                        |     |     |
|        | Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu |     |     |
|        | 1                                                               | 5   | 10  |
|        |                                                                 |     | 15  |

Arg Pro Leu Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys  
 20 25 30  
 Arg Leu Thr Leu Leu Arg Pro Glu Lys Asp Gly Glu Ala Thr Gly Val  
 35 40 45  
 Asp Ala Ile Cys Thr His Arg Pro Asp Pro Thr Gly Pro Gly Leu Asp  
 50 55 60  
 Arg Glu Gln Leu Tyr Leu Glu Leu Ser Gln Leu Thr His Ser Ile Thr  
 65 70 75 80  
 Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asp Ser Leu Tyr Val Asn Gly  
 85 90 95  
 Phe Thr His Arg Ser Ser Val Pro Thr Thr Ser Thr Gly Val Val Ser  
 100 105 110  
 Glu Glu Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Asn Asn Leu Arg Tyr Met  
 115 120 125  
 Ala Asp Met Gly Gln Pro Gly Ser Leu Lys Phe Asn Ile Thr Asp Asn  
 130 135 140  
 Val Met Gln His Leu Leu Ser Pro Leu Phe Gln Arg Ser Ser Leu Gly  
 145 150 155 160  
 Ala Arg Tyr Thr Gly Cys Arg Val Ile Ala Leu Arg Ser Val Lys Asn  
 165 170 175  
 Gly Ala Glu Thr Arg Val Asp Leu Leu Cys Thr Tyr Leu Gln Pro Leu  
 180 185 190  
 Ser Gly Pro Gly Leu Pro Ile Lys Gln Val Phe His Glu Leu Ser Gln  
 195 200 205  
 Gln Thr His Gly Ile Thr Arg Leu Gly Pro Tyr Ser Leu Asp Lys Asp  
 210 215 220  
 Ser Leu Tyr Leu Asn Gly Tyr Asn Glu Pro Gly Pro Asp Glu Pro Pro  
 225 230 235 240  
 Thr Thr Pro Lys Pro Ala Thr Thr Phe Leu Pro Pro Leu Ser Glu Ala  
 245 250 255  
 Thr Thr Ala Met Gly Tyr His Leu Lys Thr Leu Thr Leu Asn Phe Thr  
 260 265 270  
 Ile Ser Asn Leu Gln Tyr Ser Pro Asp Met Gly Lys Gly Ser Ala Thr  
 275 280 285  
 Phe Asn Ser Thr Glu Gly Val Leu Gln His Leu Leu Arg Pro Leu Phe  
 290 295 300  
 Gln Lys Ser Ser Met Gly Pro Phe Tyr Leu Gly Cys Gln Leu Ile Ser  
 305 310 315 320  
 Leu Arg Pro Glu Lys Asp Gly Ala Ala Thr Gly Val Asp Thr Thr Cys  
 325 330 335  
 Thr Tyr His Pro Asp Pro Val Gly Pro Gly Leu Asp Ile Gln Gln Leu  
 340 345 350  
 Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr His Gly Val Thr Gln Leu Gly Phe  
 355 360 365  
 Tyr Val Leu Asp Arg Asp Ser Leu Phe Ile Asn Gly Tyr Ala Pro Glu

|        |                                                                 |     |     |     |
|--------|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
|        | 370                                                             | 375 | 380 |     |
|        | Asn Leu Ser Ile Arg Gly Glu Tyr Gln Ile Asn Phe His Ile Val Asn |     |     |     |
|        | 385                                                             | 390 | 395 | 400 |
|        | Trp Asn Leu Ser Asn Pro Asp Pro Thr Ser Ser Glu Tyr Ile Thr Leu |     |     |     |
|        | 405                                                             | 410 | 415 |     |
|        | Leu Arg Asp Ile Gln Asp Lys Val Thr Thr Leu Tyr Lys Gly Ser Gln |     |     |     |
|        | 420                                                             | 425 | 430 |     |
|        | Leu His Asp Thr Phe Arg Phe Cys Leu Val Thr Asn Leu Thr Met Asp |     |     |     |
|        | 435                                                             | 440 | 445 |     |
|        | Ser Val Leu Val Thr Val Lys Ala Leu Phe Ser Ser Asn Leu Asp Pro |     |     |     |
|        | 450                                                             | 455 | 460 |     |
|        | Ser Leu Val Glu Gln Val Phe Leu Asp Lys Thr Leu Asn Ala Ser Phe |     |     |     |
|        | 465                                                             | 470 | 475 | 480 |
|        | His Trp Leu Gly Ser Thr Tyr Gln Leu Val Asp Ile His Val Thr Glu |     |     |     |
|        | 485                                                             | 490 | 495 |     |
|        | Met Glu Ser Ser Val Tyr Gln Pro Thr Ser Ser Ser Ser Thr Gln His |     |     |     |
|        | 500                                                             | 505 | 510 |     |
|        | Phe Tyr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Pro Tyr Ser Gln Asp Lys |     |     |     |
|        | 515                                                             | 520 | 525 |     |
|        | Ala Gln Pro Gly Thr Thr Asn Tyr Gln Arg Asn Lys Arg Asn Ile Glu |     |     |     |
|        | 530                                                             | 535 | 540 |     |
|        | Asp Ala Leu Asn Gln Leu Phe Arg Asn Ser Ser Ile Lys Ser Tyr Phe |     |     |     |
| [0018] | 545                                                             | 550 | 555 | 560 |
|        | Ser Asp Cys Gln Val Ser Thr Phe Arg Ser Val Pro Asn Arg His His |     |     |     |
|        | 565                                                             | 570 | 575 |     |
|        | Thr Gly Val Asp Ser Leu Cys Asn Phe Ser Pro Leu Ala Arg Arg Val |     |     |     |
|        | 580                                                             | 585 | 590 |     |
|        | Asp Arg Val Ala Ile Tyr Glu Glu Phe Leu Arg Met Thr Arg Asn Gly |     |     |     |
|        | 595                                                             | 600 | 605 |     |
|        | Thr Gln Leu Gln Asn Phe Thr Leu Asp Arg Ser Ser Val Leu Val Asp |     |     |     |
|        | 610                                                             | 615 | 620 |     |
|        | Gly Tyr Ser Pro Asn Arg Asn Glu Pro Leu Thr Gly Asn Ser Asp Leu |     |     |     |
|        | 625                                                             | 630 | 635 | 640 |
|        | Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys |     |     |     |
|        | 645                                                             | 650 | 655 |     |
|        | Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His             |     |     |     |
|        | 660                                                             | 665 |     |     |
|        | <210> 52                                                        |     |     |     |
|        | <211> 367                                                       |     |     |     |
|        | <212> PRT                                                       |     |     |     |
|        | <213> 人工序列                                                      |     |     |     |
|        | <220>                                                           |     |     |     |
|        | <223> hCD28 胞外(N19-P152). mFc                                   |     |     |     |
|        | <400> 52                                                        |     |     |     |
|        | 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  | 80  |
| 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 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 | 160 |
| Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser |     |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |     |
| Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp |     |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |     |
| 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 | 240 |
| Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile |     |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |     |
| Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro |     |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |     |
| 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 | 320 |
| Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn |     |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |     |
| 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 |     |

[0019]

<210> 53  
 <211> 162  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> hCD28 胞外(N19-P152). mmH  
 <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 80  
 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  
 [0020]  
 <210> 54  
 <211> 159  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 小鼠 CD28 (登录号 NP\_031668.3)  
 mCD28 胞外(N20-L150). mmH  
 <400> 54  
 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

[0021]

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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 |     |
| Gln | Lys | Leu | Ile | Ser | Glu | Glu | Asp | Leu | His | His | His | His | His | His | His |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     |     |

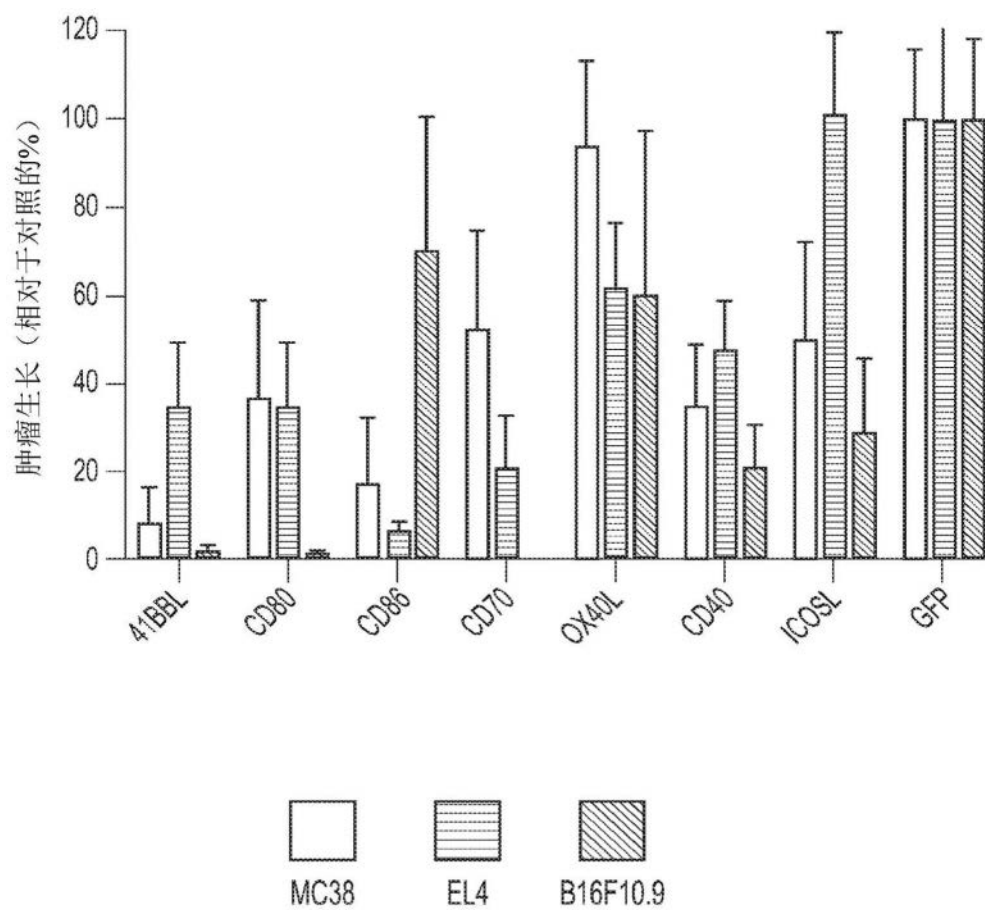


图1

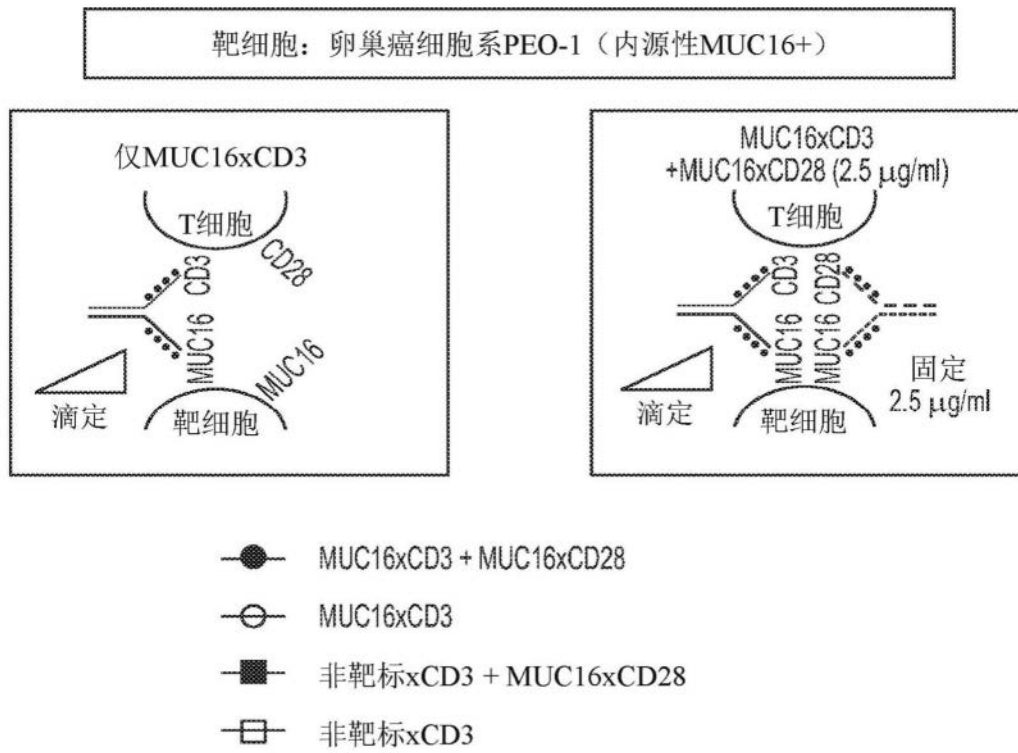


图2A

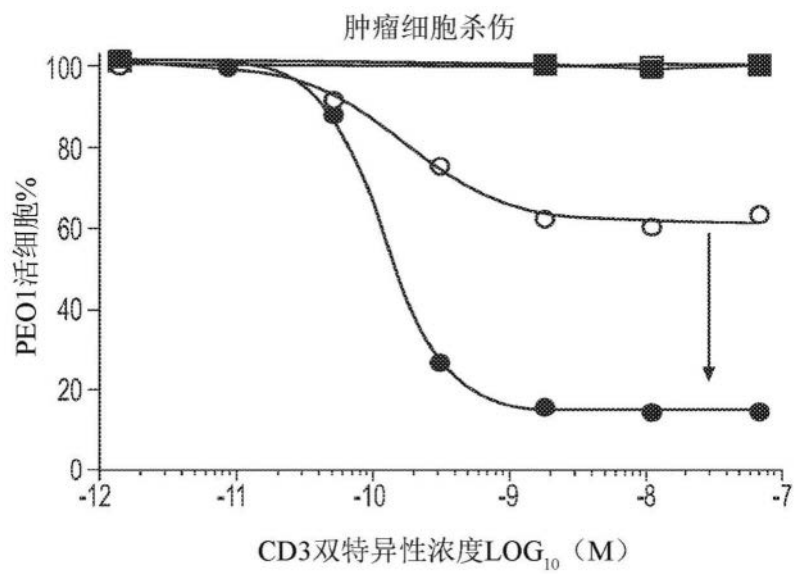


图2B

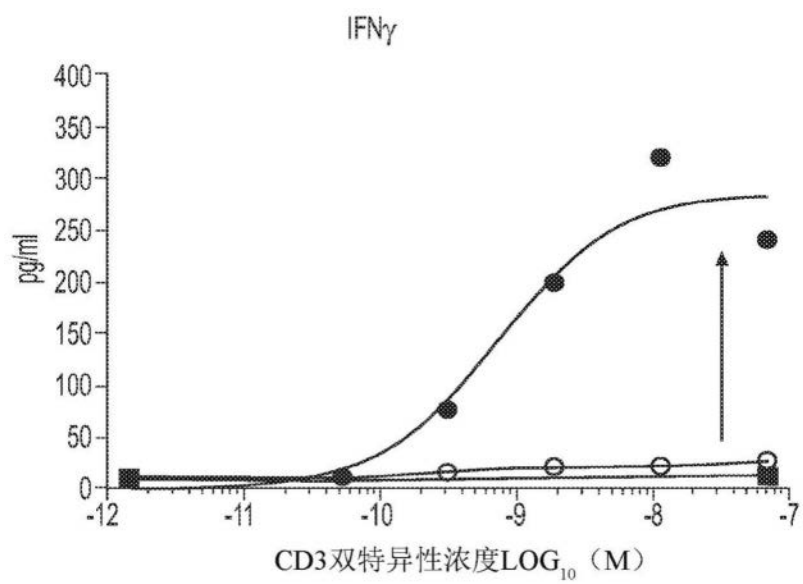


图2C

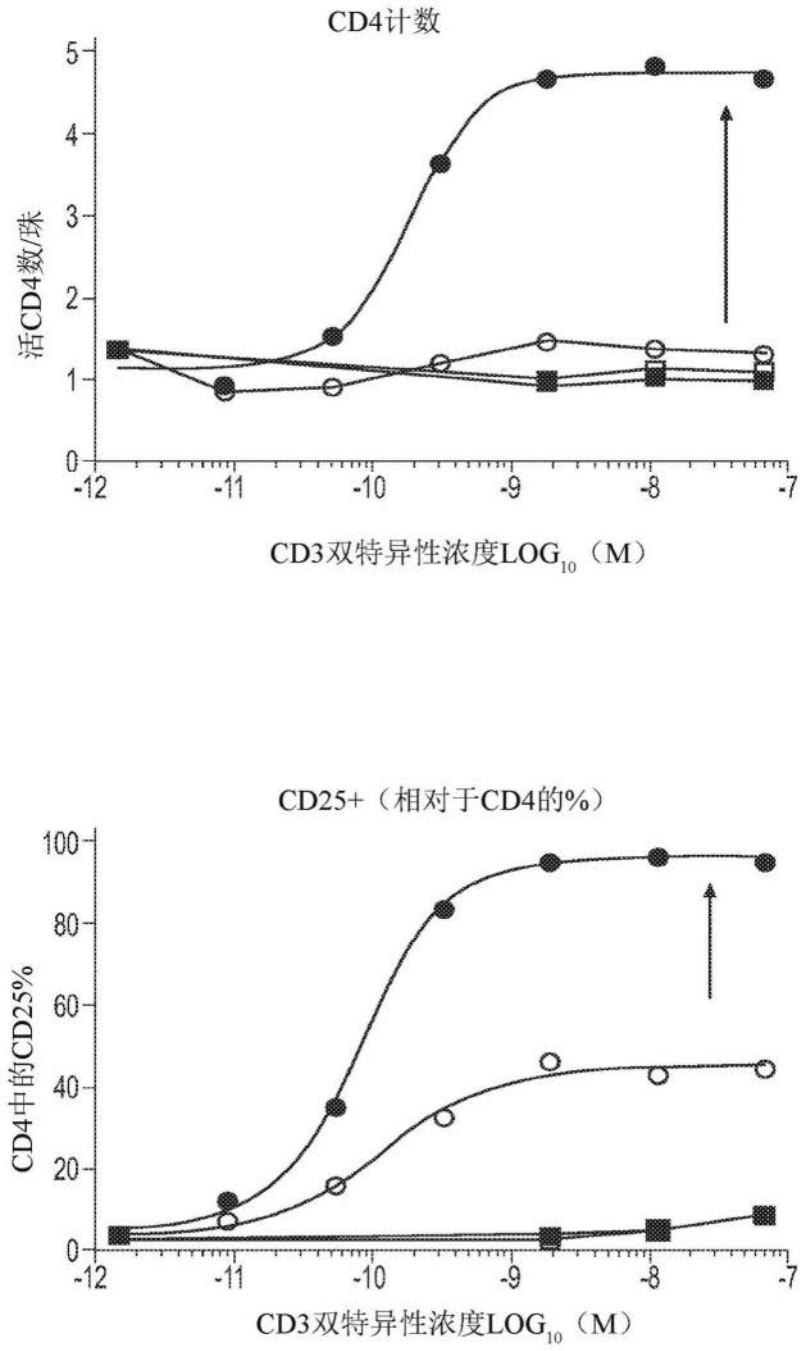


图2D

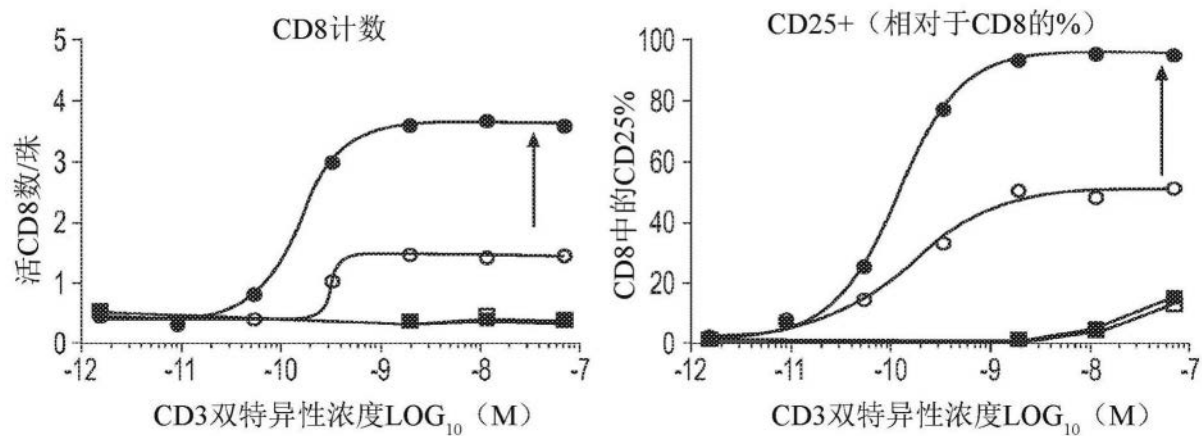


图2E

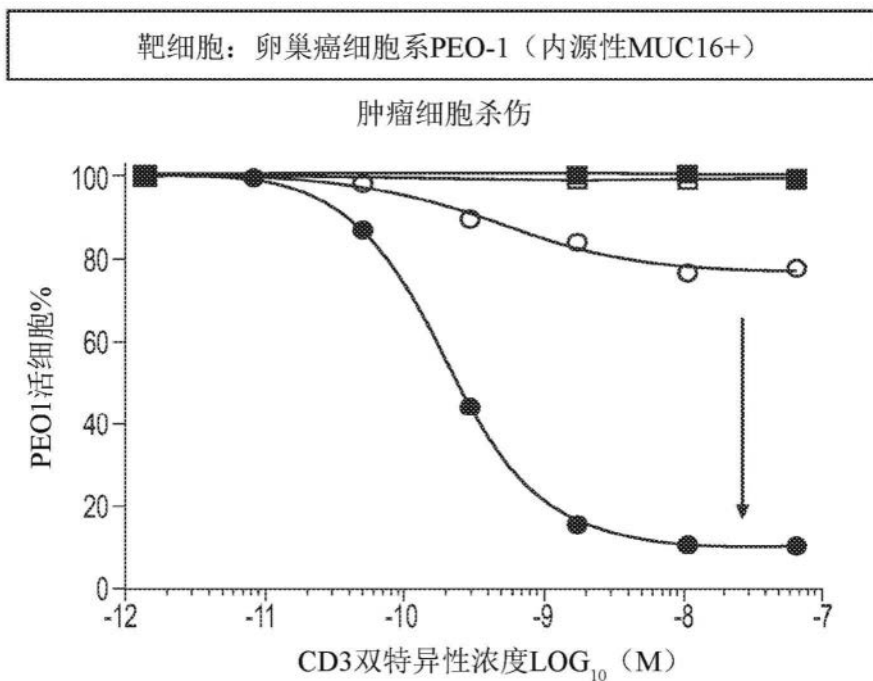


图2F

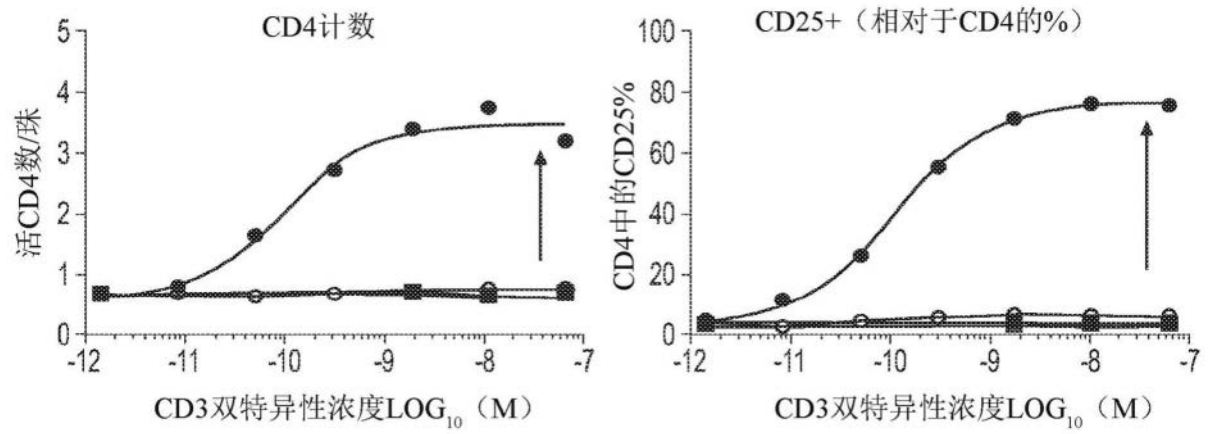


图2G

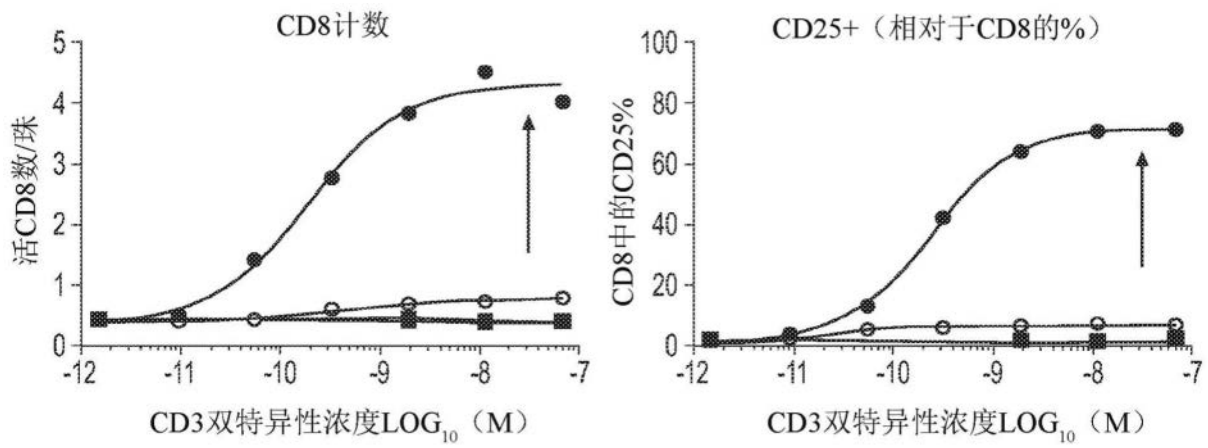
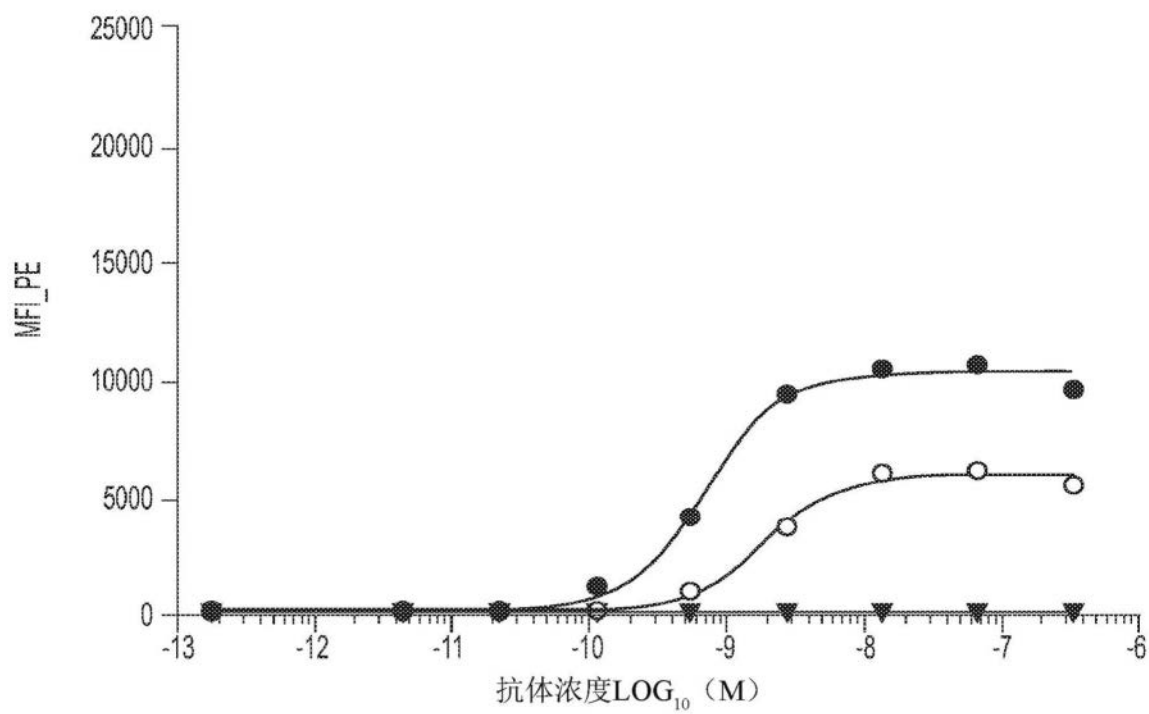


图2H

FACS结合



● MUC16xCD28  
○ MUC16xCD3  
▼ CD3结合对照

|            | EC50        |
|------------|-------------|
| MUC16xCD28 | 6.789E-010  |
| MUC16xCD3  | 1.843E-009  |
| CD3结合对照    | ~2.274E-009 |

图2I

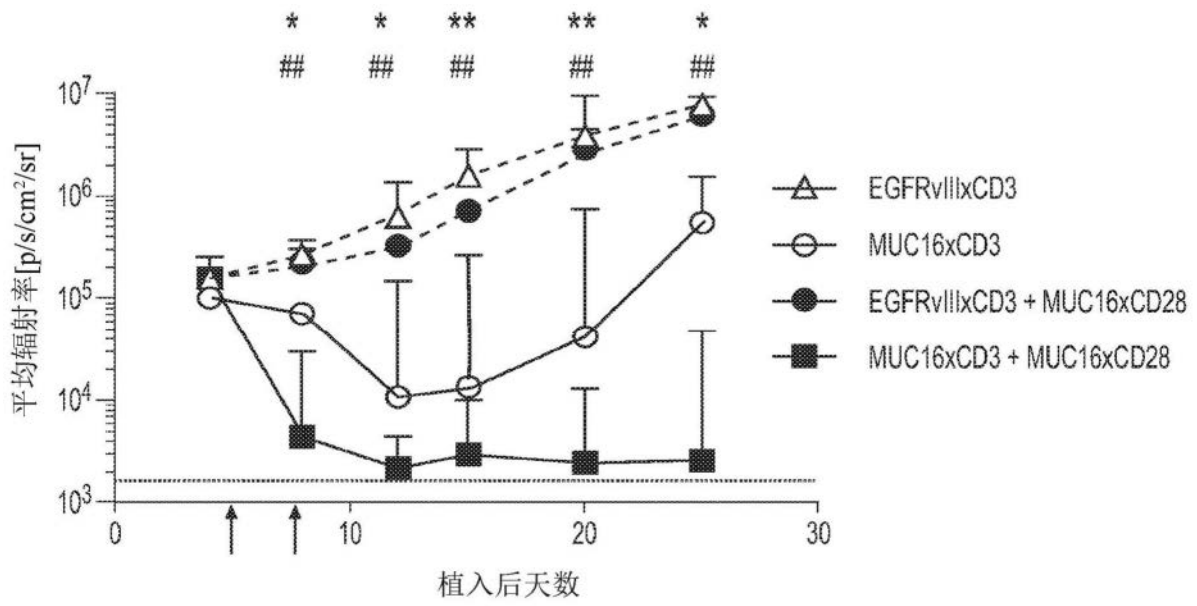


图3A

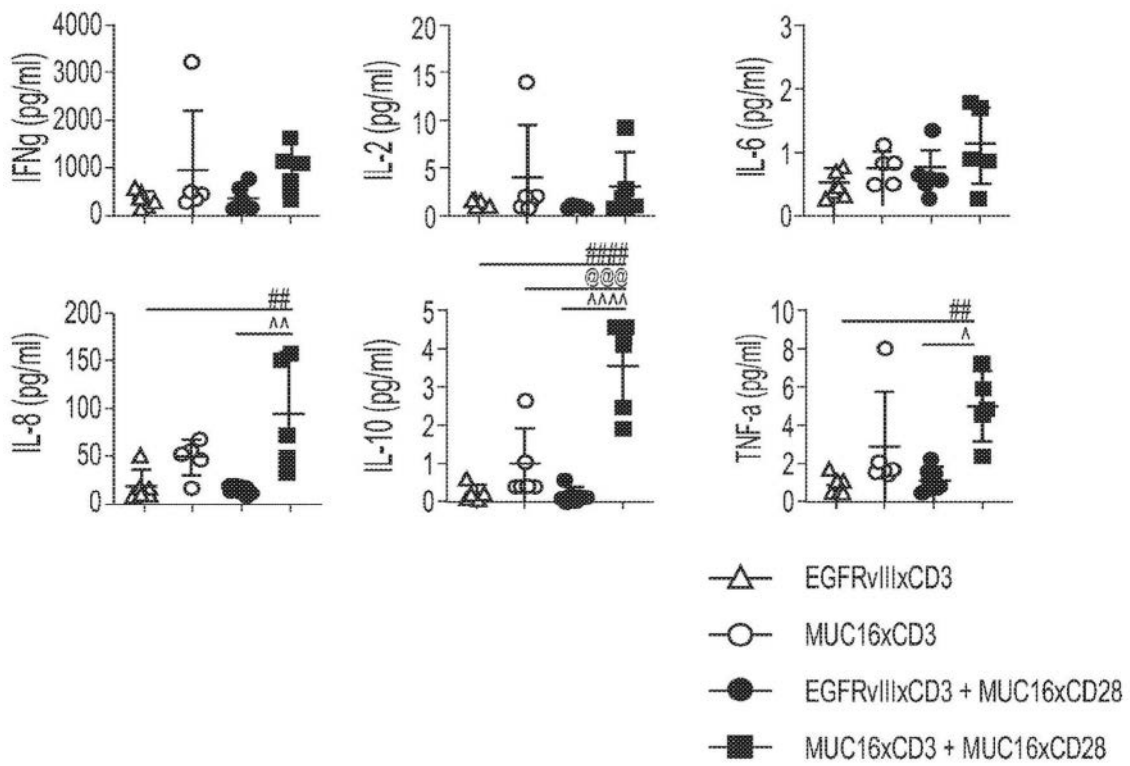


图3B

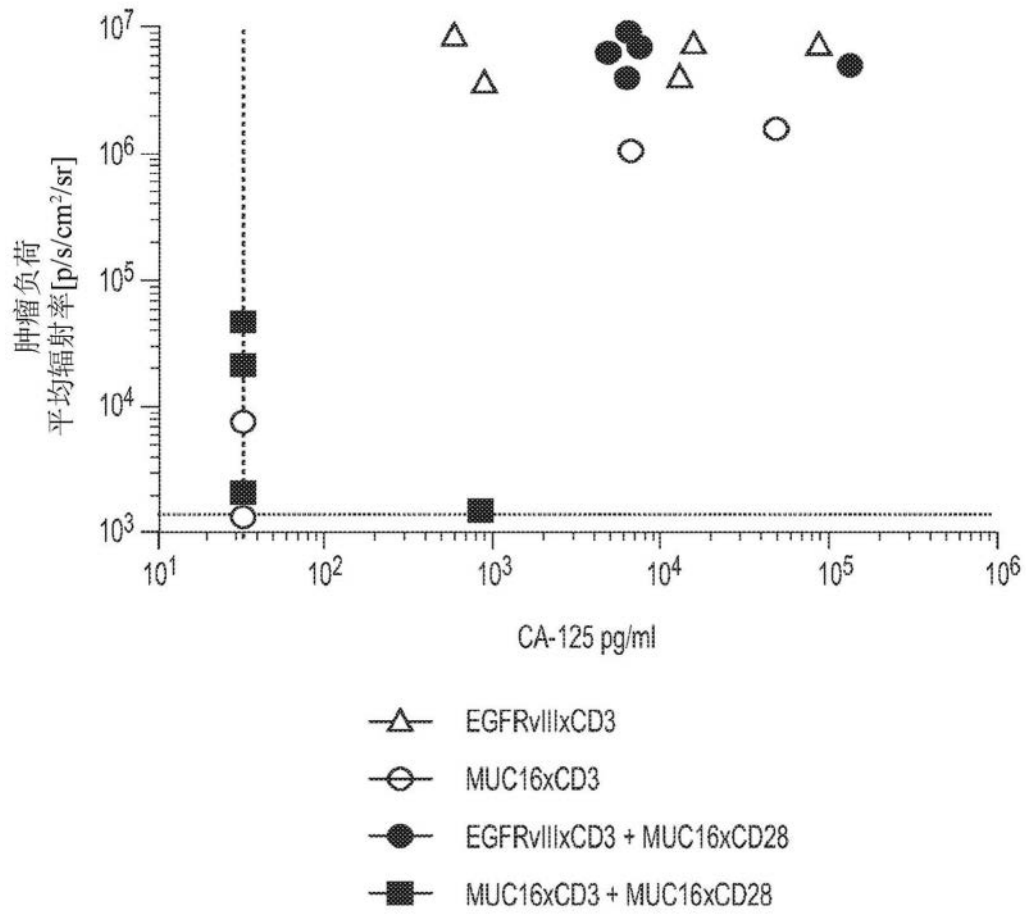


图3C

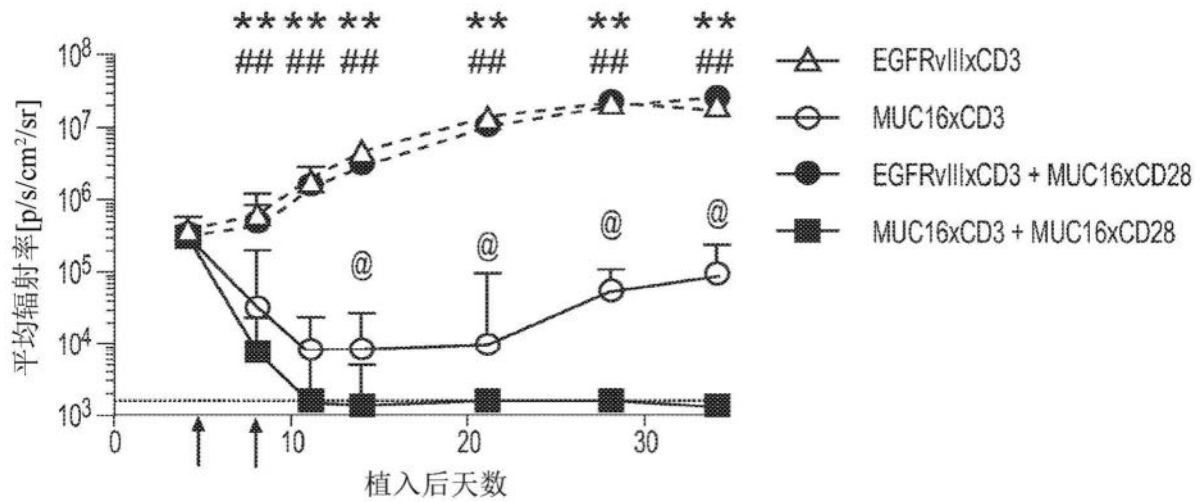


图4A

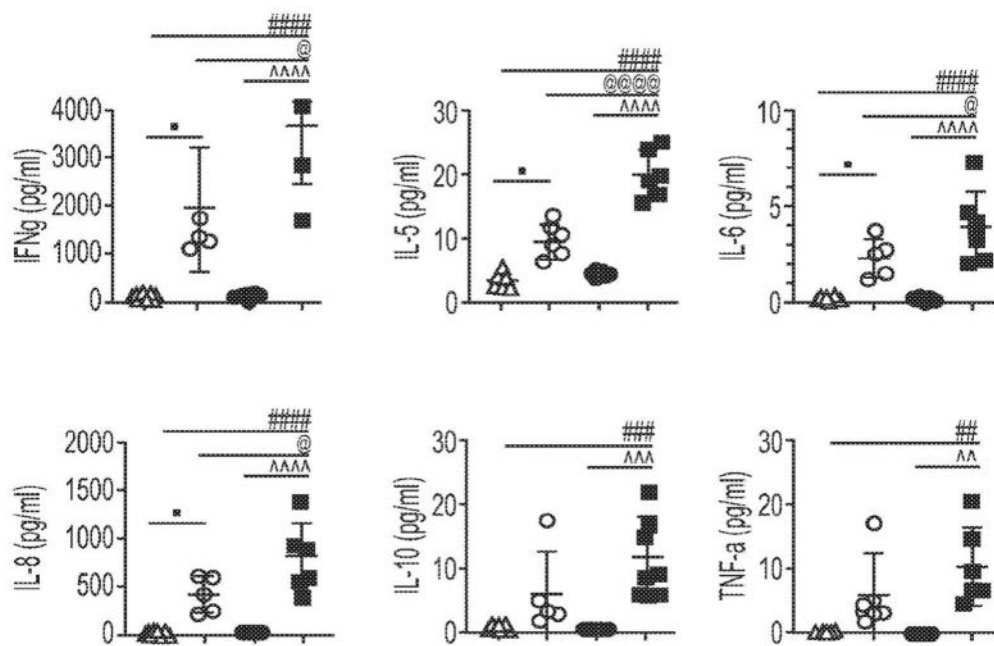


图4B

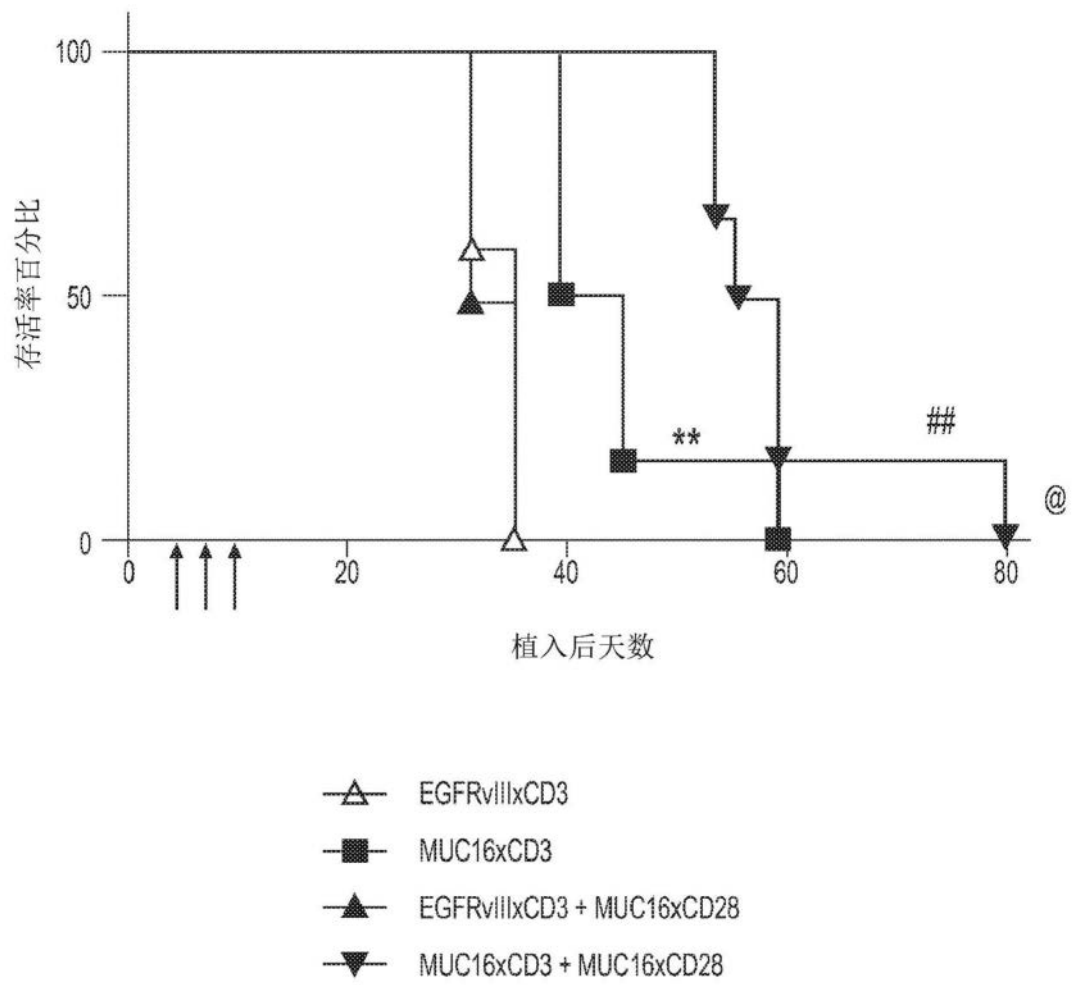


图5

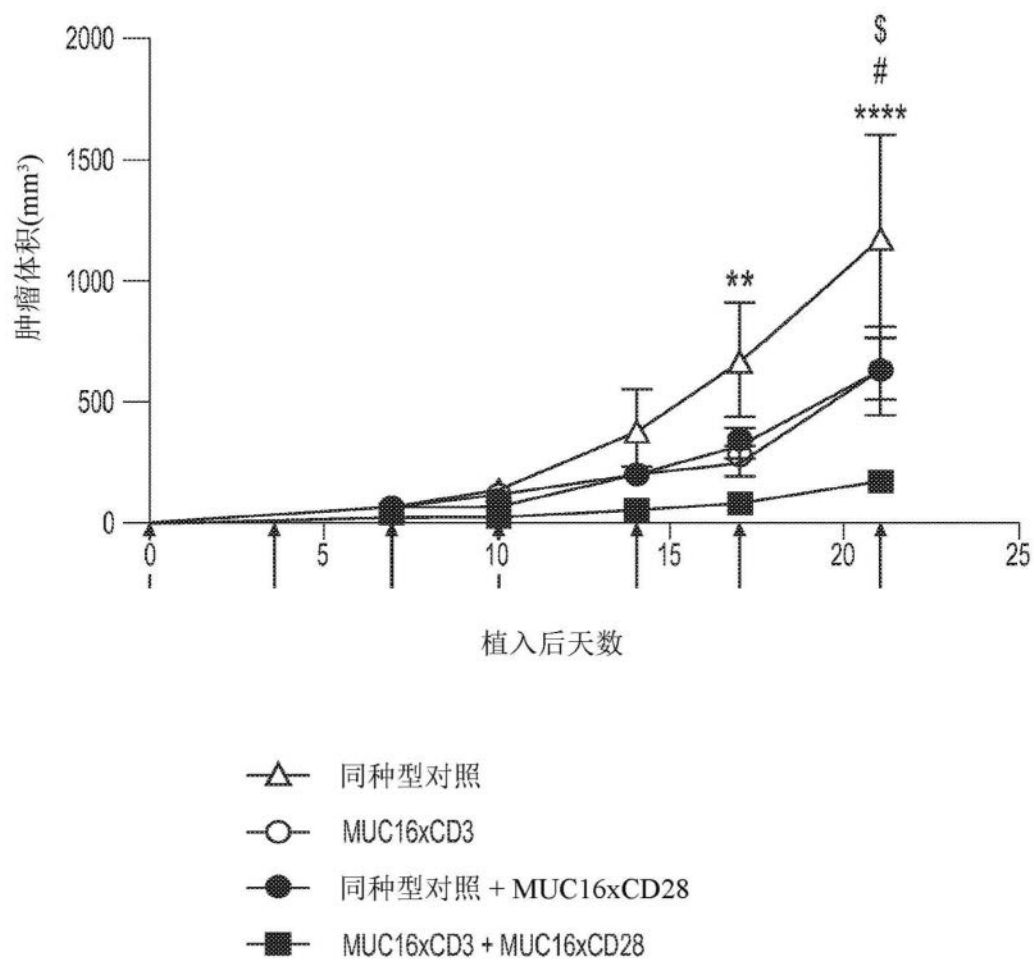


图6A

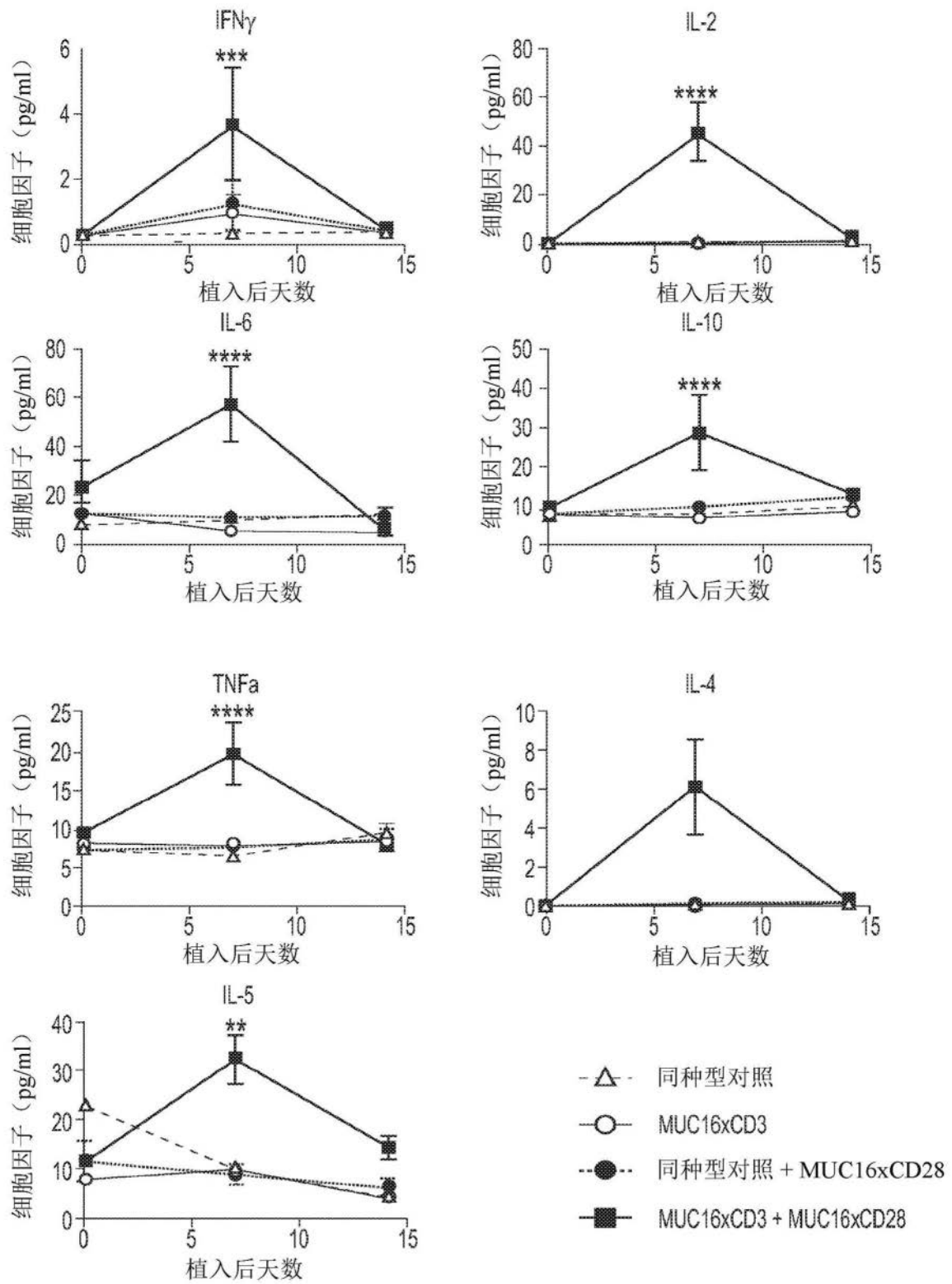


图6B

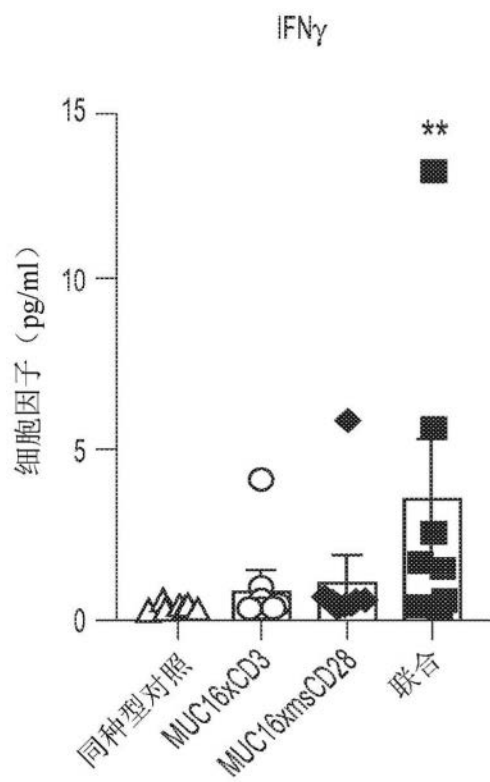


图6C

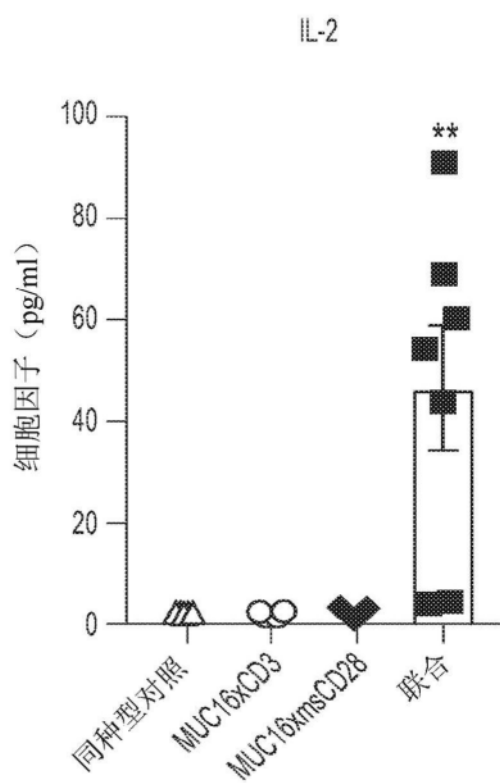


图6D

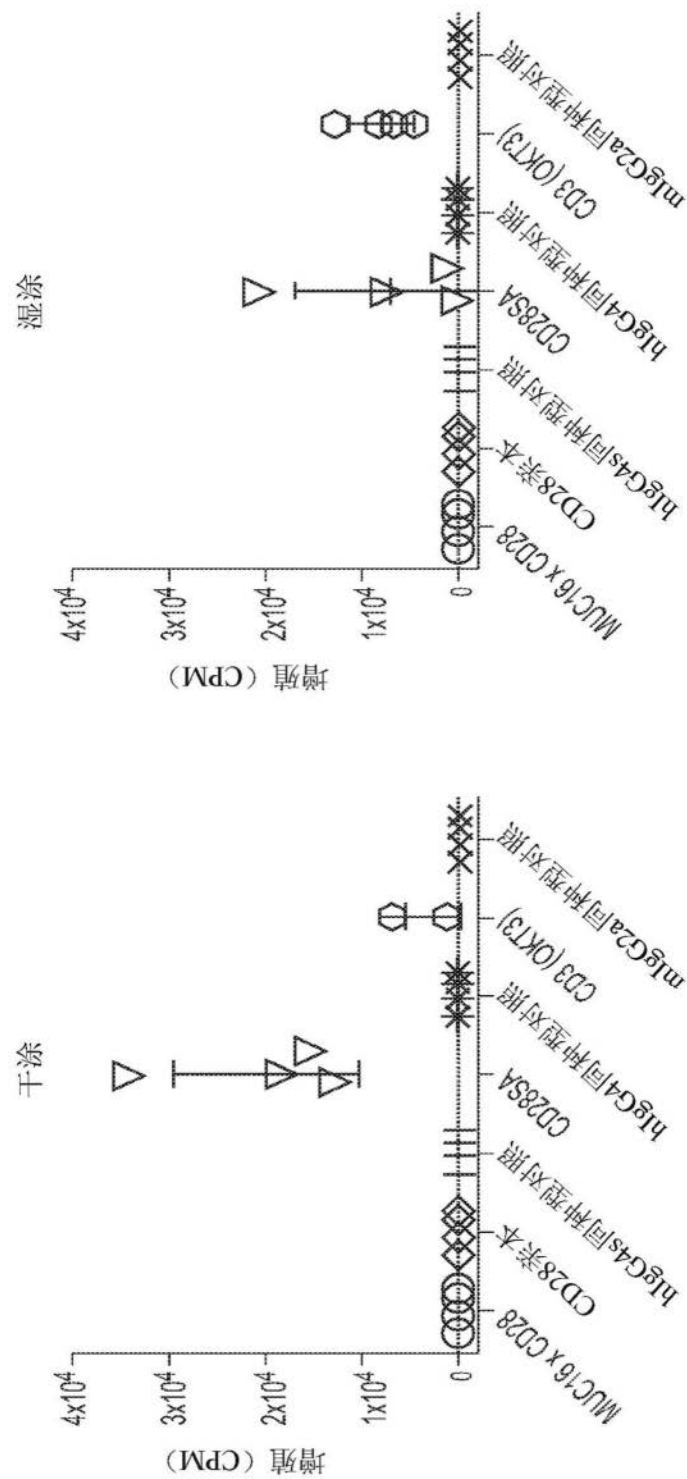


图7

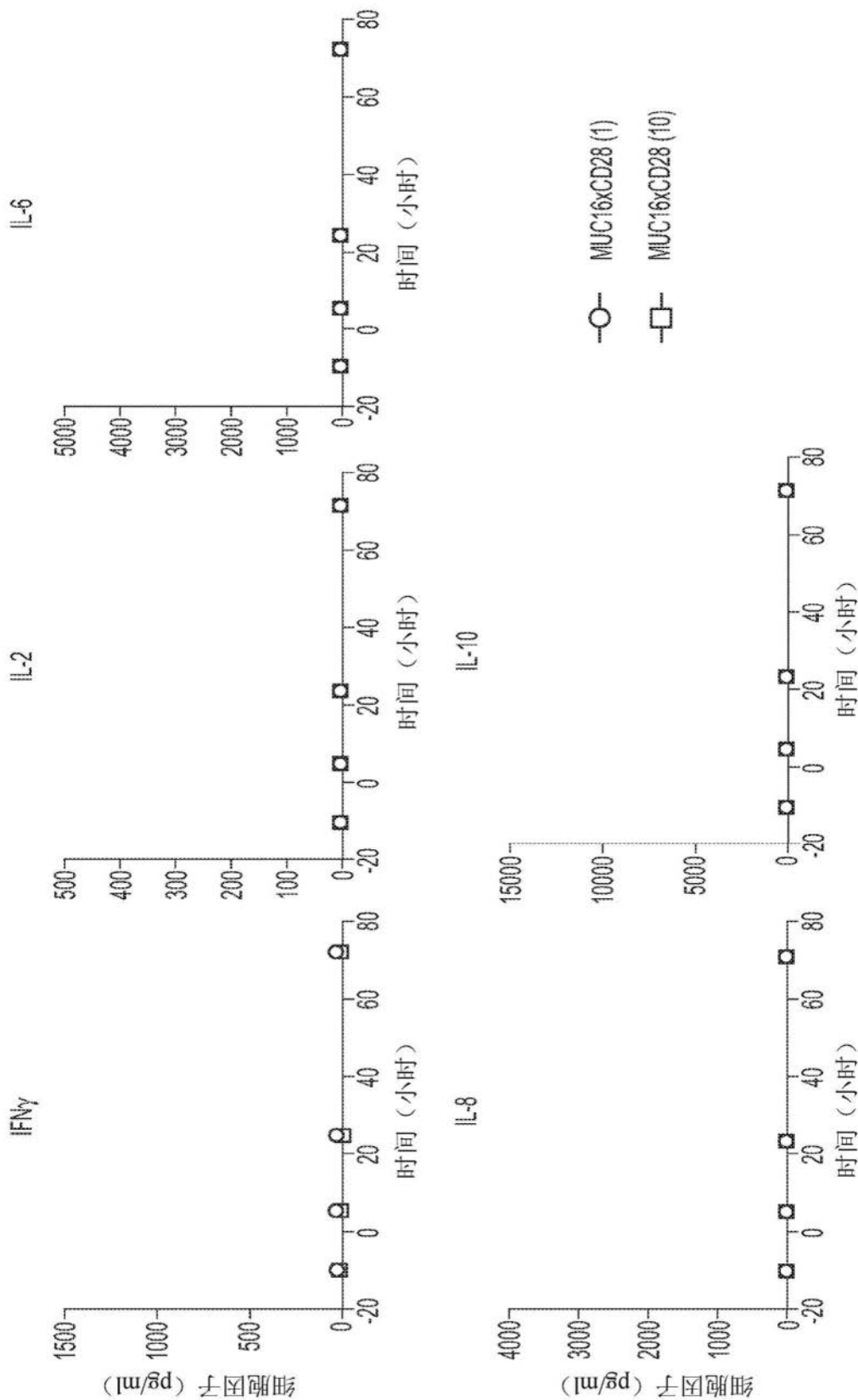


图8A

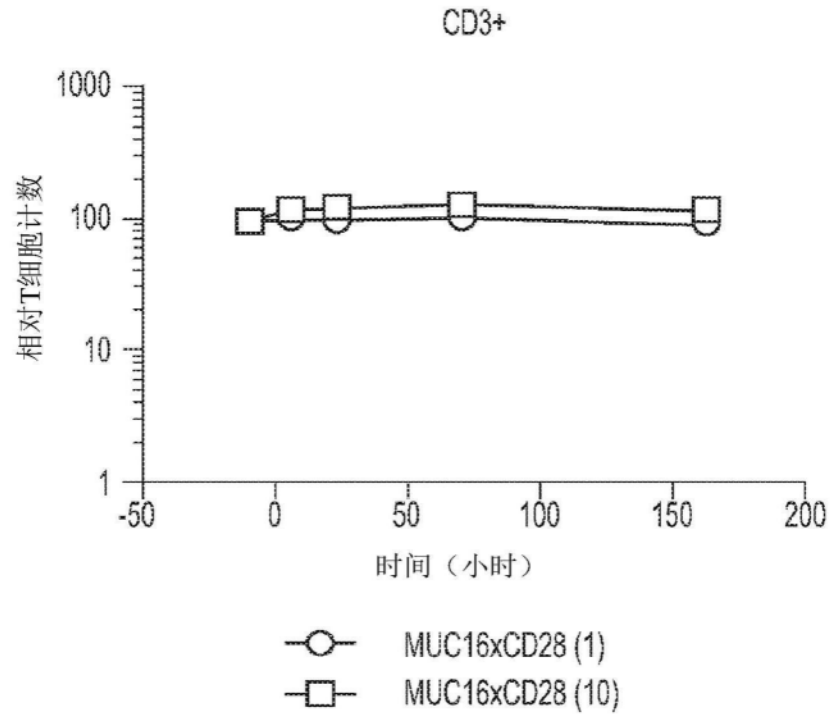


图8B

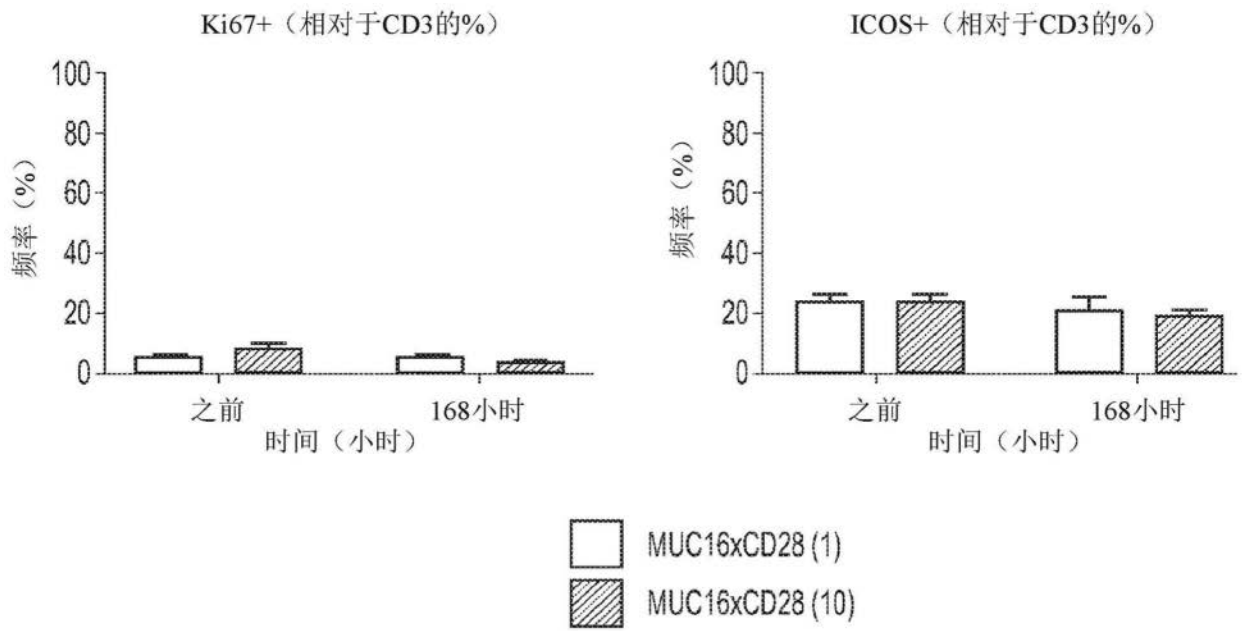


图8C

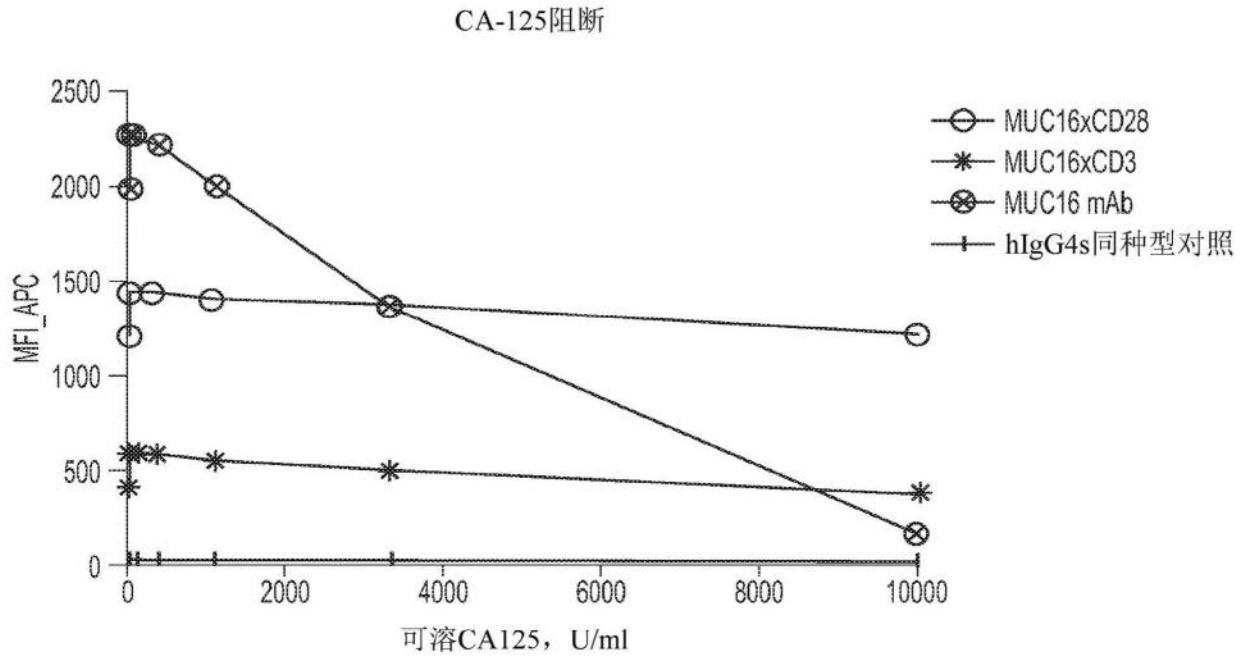


图9A

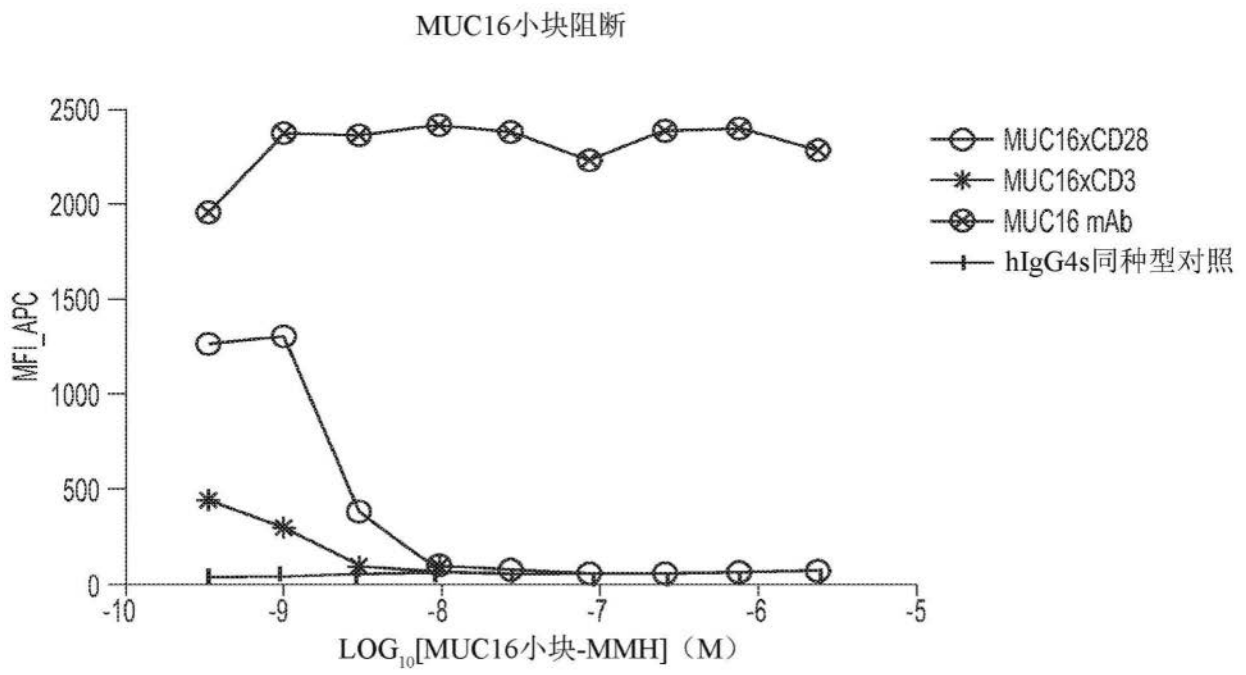


图9B

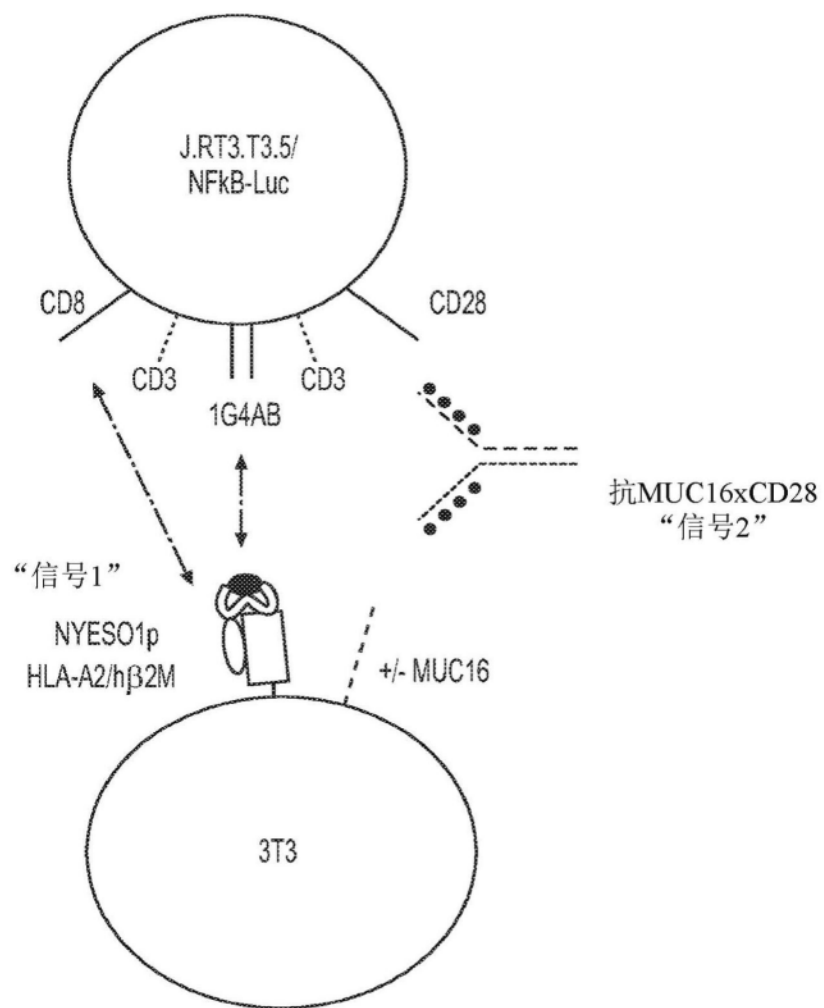


图10

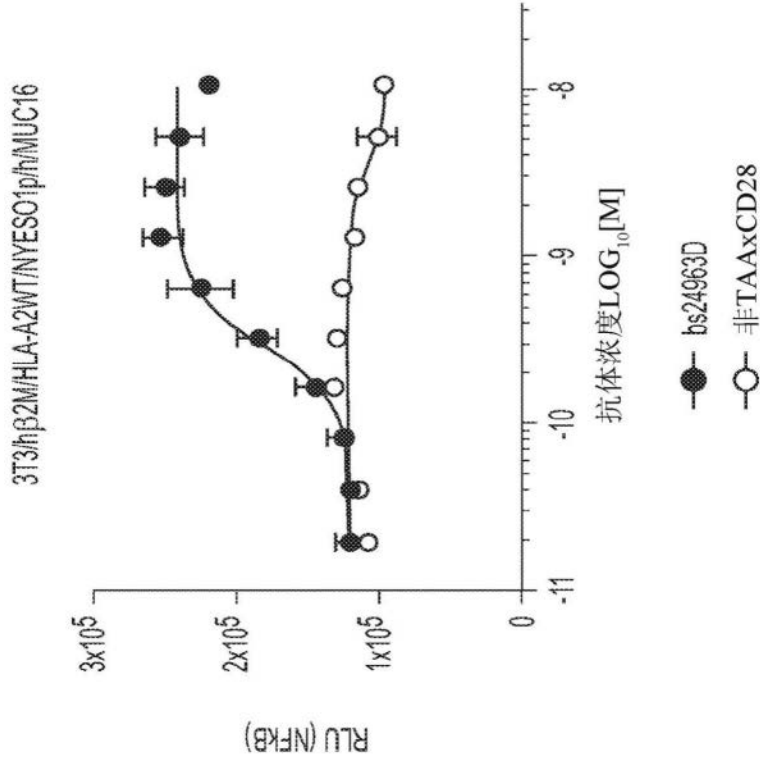


图11A

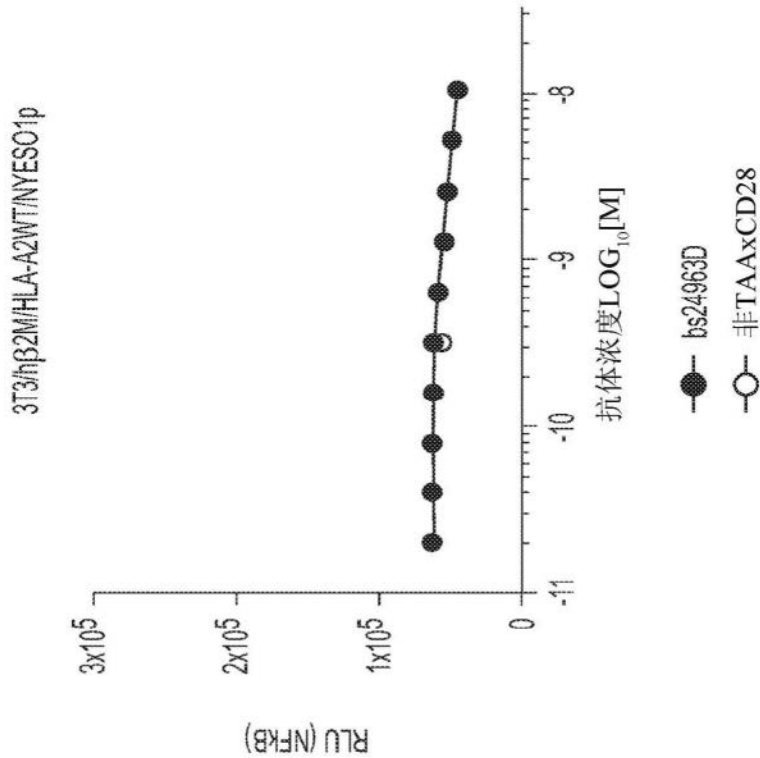


图11B

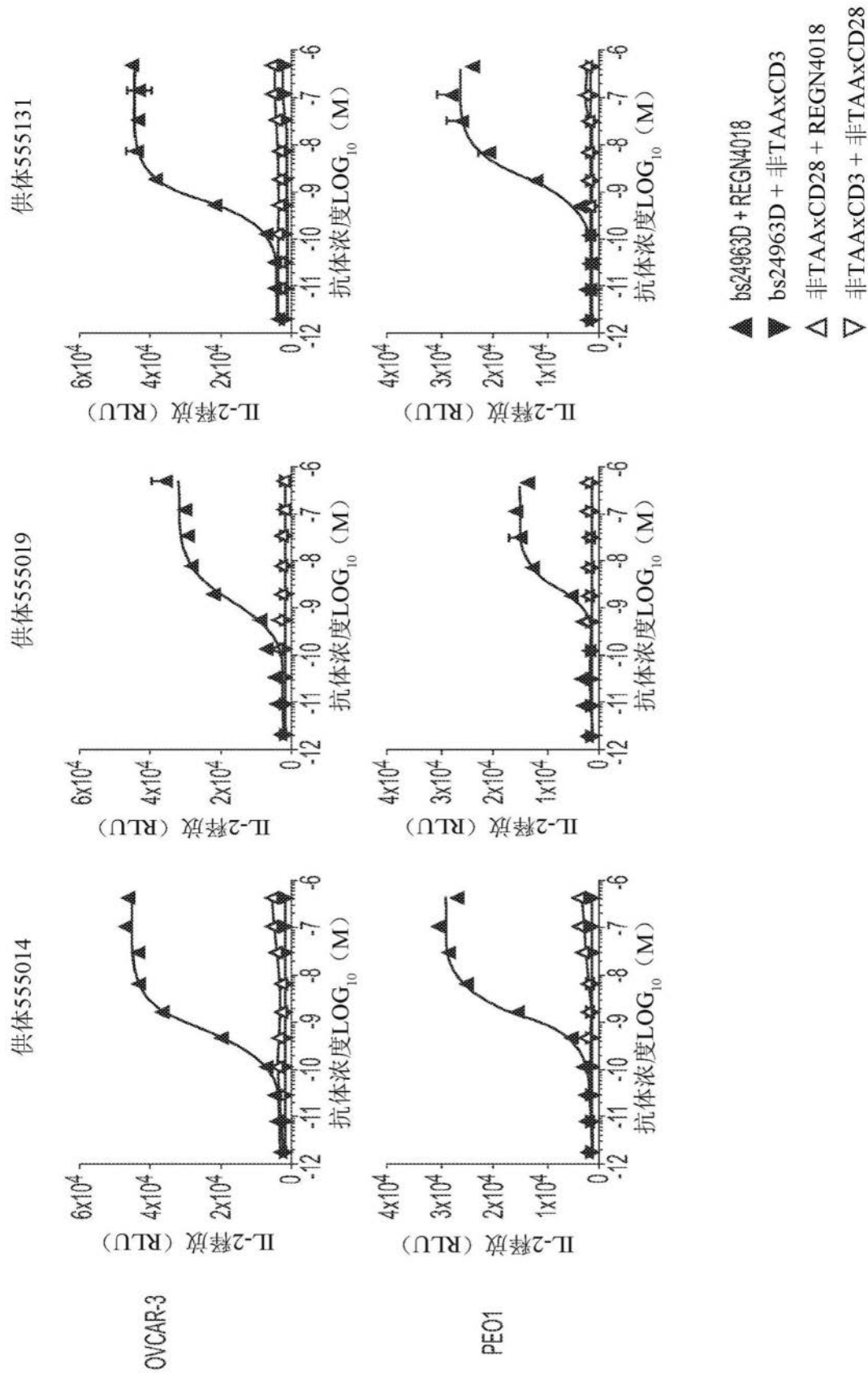


图12

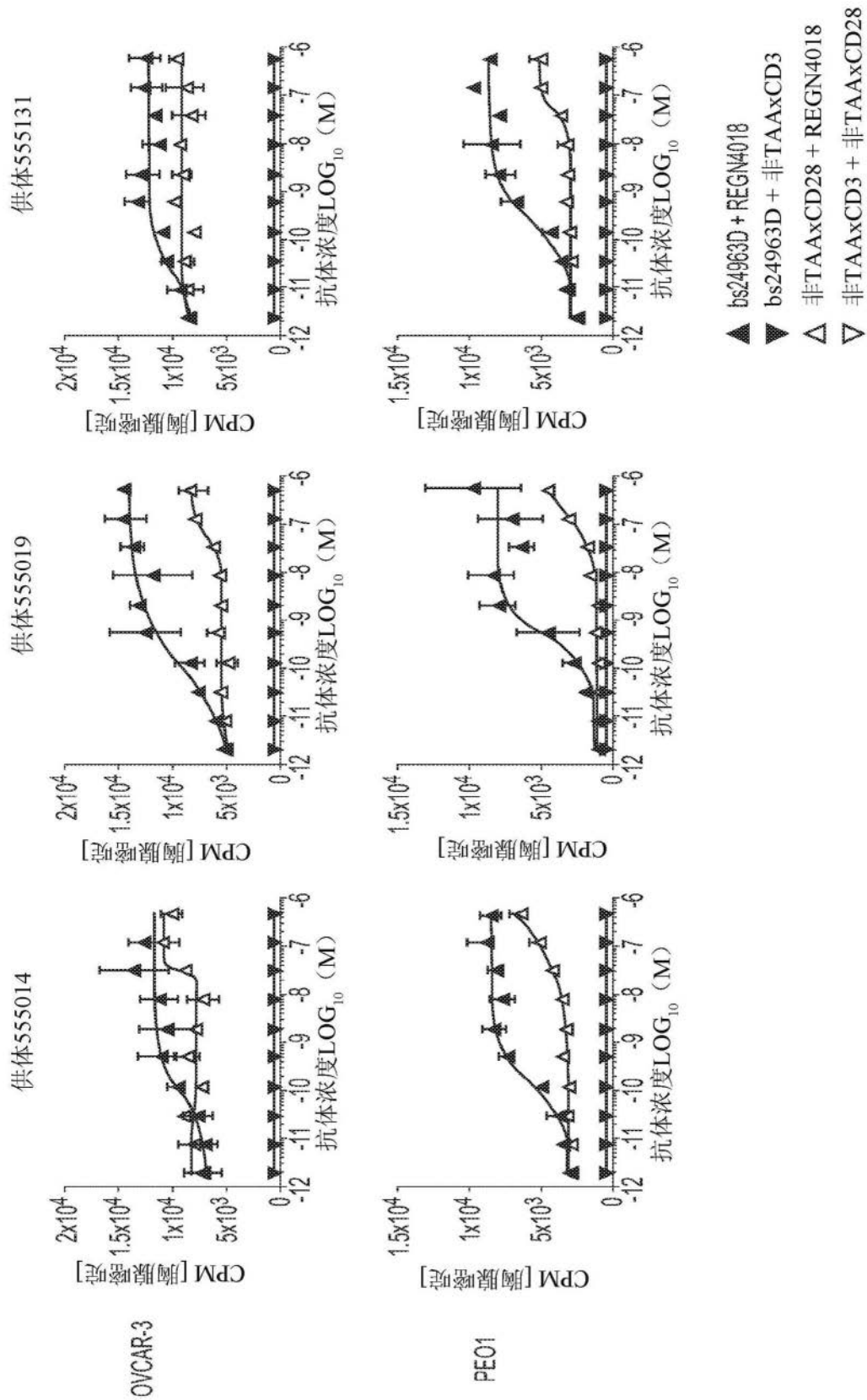


图13

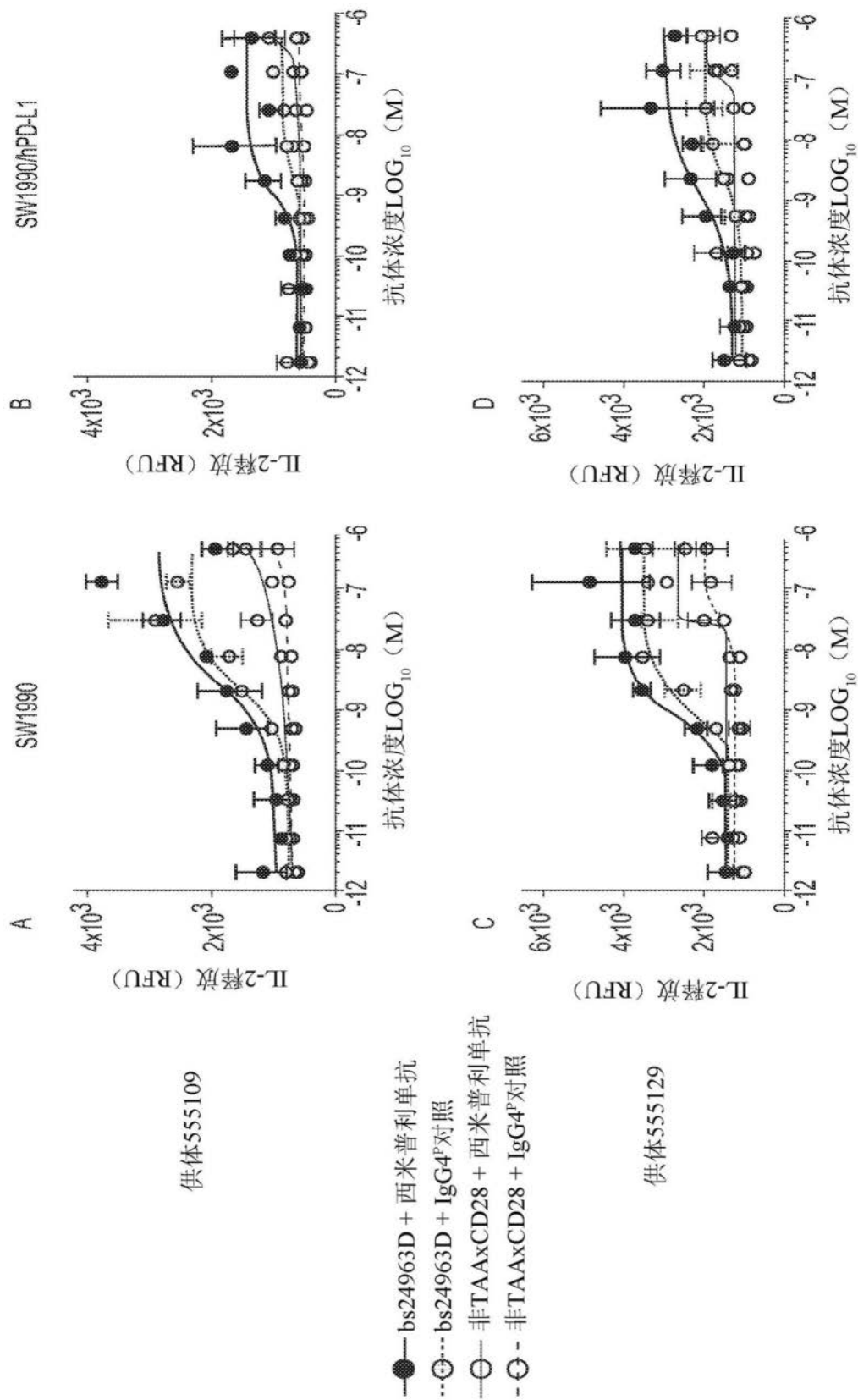


图14

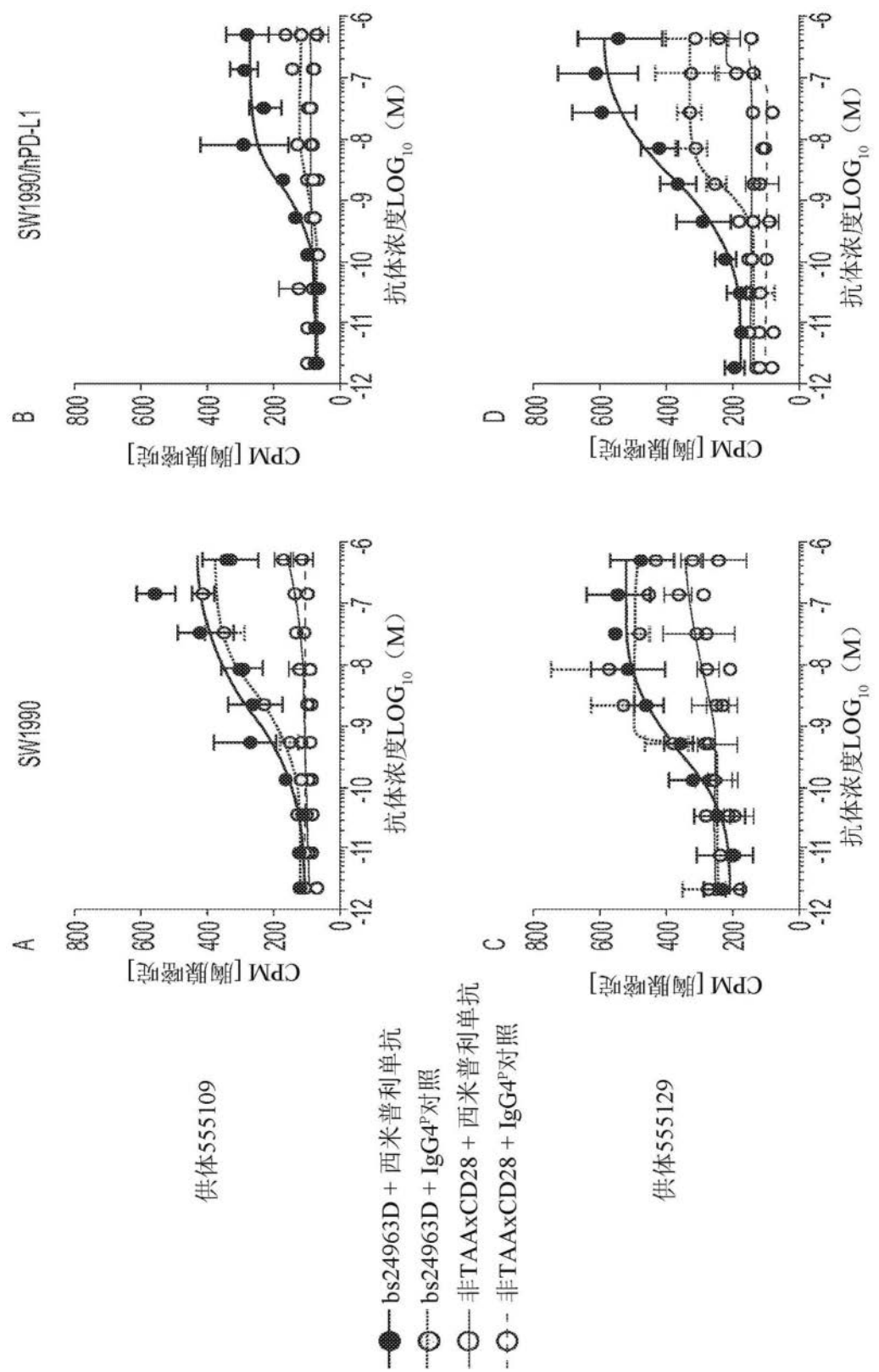


图15