



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119451993 A

(43) 申请公布日 2025. 02. 14

(21) 申请号 202380050580.2

(22) 申请日 2023.05.03

(30) 优先权数据

63/338,115 2022.05.04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.12.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/066567 2023.05.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/215799 EN 2023.11.09

(71) 申请人 佳努克斯治疗公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 大卫·坎贝尔

托马斯·R·迪莱蒙多

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

专利代理师 王玉桂 武晶晶

(51) Int.Cl.

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

G12N 15/13 (2006.01)

G12N 15/62 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

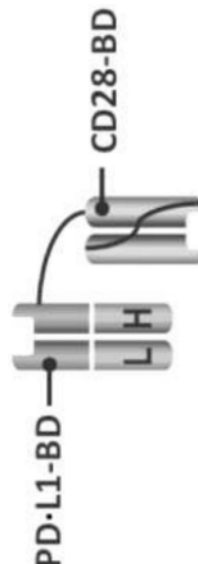
权利要求书9页 说明书142页
序列表(电子公布) 附图107页

(54) 发明名称

用于靶向CD28和PD-L1的肿瘤激活多特异性抗体及其使用方法

(57) 摘要

本文提供了选择性结合至CD28和PD-L1的抗体、其药物组合物以及核酸、使用方法以及用于制备和发现其的方法。



1. 一种根据以下式的分离的多特异性抗体： $P_1-L_1-A_1-L-B$ (式I)，其中 A_1 包含CD28结合结构域；B包含PD-L1结合结构域；L包含连接 A_1 与B的接头； P_1 包含结合至 A_1 的肽，并且 L_1 包含连接 A_1 与 P_1 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物，其中 P_1 包含根据 $X_1-X_2-X_3-C-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-C-X_{11}-X_{12}$ 的氨基酸序列，其中 X_1 选自M、I、L和V； X_2 选自D、H、N、A、F、S、T、Y和V； X_3 选自W、L和F； X_4 选自P、A和L； X_5 选自R、T、I、M、S、K、L、V、W、F、A、P和D； X_6 选自E、D、Y、H、S、F、A、N、T、I、P和V； X_7 选自L、M、R、S、Q和H； X_8 选自W和Q； X_9 选自H、N、D、A、S、Y、T、F、V、L和I； X_{10} 选自E、V、L、D、Y、R、Q、H、F、K、A、M和N； X_{11} 选自F、Y、L、W和V；并且 X_{12} 选自N、A、F、S、Y、H、D、T和L。

2. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体，其中 X_1 选自M、I和L； X_2 选自D、H、N和A； X_3 是W； X_4 是P； X_5 选自R、T、I、M、S和K； X_6 选自E、D、Y、H、S和F； X_7 选自L、M和R； X_8 是W； X_9 选自H、N、D、A、S和V； X_{10} 选自E、V、L、D和H； X_{11} 选自F、Y和L；并且 X_{12} 选自N、A、F、S和Y。

3. 如权利要求2所述的分离的多特异性抗体，其中 X_1 是M； X_2 选自D和H； X_3 是W； X_4 是P； X_5 选自R、T和I； X_6 选自E、D和Y； X_7 选自L、M和R； X_8 是W； X_9 选自H、N、D和V； X_{10} 选自E、V、L、D和H； X_{11} 是F；并且 X_{12} 选自N、A和F。

4. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体，其中 P_1 包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:32具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。

5. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体，其中 P_1 包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

6. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体，其中 P_1 包含根据SEQ ID NO:138的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:138具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。

7. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体，其中 P_1 包含根据SEQ ID NO:138的氨基酸序列。

8. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体，其中 P_1 削弱 A_1 与CD28的结合。

9. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体，其中 P_1 通过离子相互作用、静电相互作用、疏水相互作用、 π -堆积相互作用和H键相互作用或其组合结合至 A_1 。

10. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体，其中 P_1 在抗原结合位点或其附近结合至 A_1 。

11. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体，其中当 L_1 被所述肿瘤特异性蛋白酶切割时， P_1 与 A_1 解结合，从而使 A_1 暴露于CD28。

12. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体，其中 P_1 与CD28具有小于75%的序列同一性。

13. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体，其中 P_1 包含与CD28共享小于10%的序列同一性的从头生成氨基酸序列。

14. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体，其中 P_1 包含经修饰氨基酸或非天然氨基酸或经修饰非天然氨基酸，或其组合。

15. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体，其中 P_1 不包含白蛋白或白蛋白片段。

16. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体，其中 P_1 不包含白蛋白结合结构域。

17. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体，其中 L_1 是具有至少5个至不多于50个氨基酸的肽序列。

18. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体，其中 L_1 是具有至少10个至不多于30个氨

基酸的肽序列。

19. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中 L_1 是具有至少10个氨基酸的肽序列。

20. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中 L_1 是具有至少18个氨基酸的肽序列。

21. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中 L_1 是具有至少26个氨基酸的肽序列。

22. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中 L_1 包含包括 $(G_2S)_n$ 的式,其中n是1至3的整数(SEQ ID NO:228)。

23. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中 L_1 包含包括 $(G_2S)_n$ 的式,其中n是至少为1的整数。

24. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中 L_1 包含选自以下的式: $(G_2S)_n$ 、 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO:58)、 $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO:59)、 $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO:60)和 $(GSSGGS)_n$ (SEQ ID NO:61),其中n是至少为1的整数。

25. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述肿瘤特异性蛋白酶选自金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶。

26. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中 L_1 包含尿激酶可切割氨基酸序列、膜型丝氨酸蛋白酶可切割氨基酸序列或基质金属蛋白酶可切割氨基酸序列。

27. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中 L_1 包含根据SEQ ID NO:18-19、62-88的序列。

28. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中 L_1 结合至 A_1 的N-末端。

29. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中 L_1 结合至 A_1 的C-末端。

30. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述CD28结合结构域包含单链可变片段、单结构域抗体、Fab或Fab'。

31. 如权利要求30所述的分离的多特异性抗体,其中所述CD28结合结构域包含所述单链可变片段。

32. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述PD-L1结合结构域包含单链可变片段、单结构域抗体、Fab或Fab'。

33. 如权利要求32所述的分离的多特异性抗体,其中所述PD-L1结合结构域包含所述Fab或所述Fab'。

34. 如权利要求32所述的分离的多特异性抗体,其中所述PD-L1结合结构域包含所述Fab或所述Fab'并且所述CD28结合结构域包含所述单链可变片段。

35. 如权利要求32所述的分离的多特异性抗体,其中包含所述Fab或所述Fab'的所述PD-L1结合结构域包含Fab重链多肽和Fab轻链多肽,所述Fab重链多肽包含Fab重链可变结构域,所述Fab轻链多肽包含Fab轻链可变结构域。

36. 如权利要求35所述的分离的多特异性抗体,其中包含所述单链可变片段的所述CD28结合结构域包含scFv重链可变结构域和scFv轻链可变结构域。

37. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述接头连接 A_1 的C-末端与B的N-末端。

38. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述接头连接 A_1 的N-末端与B的C-末端。

39. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述接头连接 A_1 的C-末端与所述

Fab重链多肽的N-末端。

40. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述接头连接A₁的N-末端与所述Fab重链多肽的C-末端。

41. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述接头连接A₁的C-末端与所述Fab轻链多肽的N-末端。

42. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述接头连接A₁的N-末端与所述Fab轻链多肽的C-末端。

43. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述接头连接所述Fab轻链多肽与所述scFv轻链可变结构域。

44. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述接头连接所述Fab轻链多肽与所述scFv重链可变结构域。

45. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述接头连接所述Fab重链多肽与所述scFv轻链可变结构域。

46. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述接头连接所述Fab重链多肽与所述scFv重链可变结构域。

47. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述接头连接所述Fab轻链多肽与所述scFv轻链可变结构域的N-末端。

48. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述接头连接所述Fab轻链多肽与所述scFv轻链可变结构域的C-末端。

49. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述接头连接所述Fab轻链多肽与所述scFv重链可变结构域的N-末端。

50. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述接头连接所述Fab轻链多肽与所述scFv重链可变结构域的C-末端。

51. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述接头连接所述Fab重链多肽与所述scFv轻链可变结构域的N-末端。

52. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述接头连接所述Fab重链多肽与所述scFv轻链可变结构域的C-末端。

53. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述接头连接所述Fab重链多肽与所述scFv重链可变结构域的N-末端。

54. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述接头连接所述Fab重链多肽与所述scFv重链可变结构域的C-末端。

55. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述接头的长度为至少5个氨基酸。

56. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述接头包含(G₂S)_n、(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:58)、(GGGS)_n(SEQ ID NO:59)、(GGGGS)_n(SEQ ID NO:60)和(GSSGGS)_n(SEQ ID NO:61),其中n是至少为1的整数。

57. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中L包含包括(G₂S)_n的式,其中n是1至3的整数(SEQ ID NO:228)。

58. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述L包含SEQ ID NO:18(GGGGSGGGGSGGGGS)或SEQ ID NO:19(GGGGS)的氨基酸序列。

59. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述scFv重链可变结构域包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中所述scFv重链可变结构域的所述HC-CDR1、所述HC-CDR2和所述HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:1;HC-CDR2:SEQ ID NO:2;HC-CDR3:SEQ ID NO:3,并且其中所述CDR包含所述HC-CDR1、HC-CDR2或HC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修饰。

60. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述scFv轻链可变结构域包含互补决定区(CDR):LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中所述scFv轻链可变结构域的所述LC-CDR1、所述LC-CDR2和所述LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:4;LC-CDR2:SEQ ID NO:5(KA);和LC-CDR3:SEQ ID NO:6,并且其中所述CDR包含所述LC-CDR1、LC-CDR2或LC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修饰。

61. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中A₁包含互补决定区(CDR):LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中A₁的所述LC-CDR1、所述LC-CDR2和所述LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:4;LC-CDR2:SEQ ID NO:5(KA);和LC-CDR3:SEQ ID NO:6;其中A₁包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中A₁的所述HC-CDR1、所述HC-CDR2和所述HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:1;HC-CDR2:SEQ ID NO:2;HC-CDR3:SEQ ID NO:3。

62. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述Fab重链可变结构域包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中所述Fab重链可变结构域的所述HC-CDR1、所述HC-CDR2和所述HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:10;HC-CDR2:SEQ ID NO:11;HC-CDR3:SEQ ID NO:12;并且其中所述CDR包含所述HC-CDR1、HC-CDR2或HC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修饰。

63. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述Fab轻链可变结构域包含互补决定区(CDR):LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中所述Fab轻链可变结构域的所述LC-CDR1、所述LC-CDR2和所述LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:13;LC-CDR2:SEQ ID NO:14(DA);和LC-CDR3:SEQ ID NO:15;并且其中所述CDR包含所述LC-CDR1、LC-CDR2或LC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修饰。

64. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中B包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中B的所述HC-CDR1、所述HC-CDR2和所述HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:10;HC-CDR2:SEQ ID NO:11;HC-CDR3:SEQ ID NO:12;并且其中B包含互补决定区(CDR):LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中B的所述LC-CDR1、所述LC-CDR2和所述LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:13;LC-CDR2:SEQ ID NO:14(DA);和LC-CDR3:SEQ ID NO:15。

65. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述scFv重链可变结构域包含与根据SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

66. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述scFv重链可变结构域包含SEQ ID NO:7的至少75个连续氨基酸残基的氨基酸序列。

67. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述scFv重链可变结构域包含SEQ ID NO:7的至少110个连续氨基酸残基的氨基酸序列。

68. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述scFv重链可变结构域包含SEQ ID NO:7的至少110个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID NO:7的所述至少110个连续氨基酸残基具有至少80%序列同一性。

69. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述scFv重链可变结构域包含根据SEQ ID N0:7的氨基酸序列。

70. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述scFv轻链可变结构域包含与根据SEQ ID N0:8的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

71. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述scFv轻链可变结构域包含SEQ ID N0:8的至少75个连续氨基酸残基的氨基酸序列。

72. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述scFv轻链可变结构域包含SEQ ID N0:8的至少100个连续氨基酸残基的氨基酸序列。

73. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述scFv轻链可变结构域包含SEQ ID N0:8的至少100个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID N0:8的所述至少100个连续氨基酸残基具有至少80%序列同一性。

74. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述scFv轻链可变结构域包含根据SEQ ID N0:8的氨基酸序列。

75. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述scFv包含与根据SEQ ID N0:9的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

76. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述scFv包含SEQ ID N0:9的至少175个连续氨基酸残基的氨基酸序列。

77. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述scFv包含SEQ ID N0:9的至少210个连续氨基酸残基的氨基酸序列。

78. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述scFv包含SEQ ID N0:9的至少210个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID N0:9的所述至少210个连续氨基酸残基具有至少80%序列同一性。

79. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述scFv包含根据SEQ ID N0:9的氨基酸序列。

80. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述Fab重链多肽包含与根据SEQ ID N0:17的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

81. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述Fab重链多肽包含SEQ ID N0:17的至少175个连续氨基酸残基的氨基酸序列。

82. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述Fab重链多肽包含SEQ ID N0:17的至少215个连续氨基酸残基的氨基酸序列。

83. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述Fab重链多肽包含SEQ ID N0:17的至少215个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID N0:17的所述至少215个连续氨基酸残基具有至少80%序列同一性。

84. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述Fab重链多肽包含根据SEQ ID N0:17的氨基酸序列。

85. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述Fab轻链多肽包含与根据SEQ ID N0:16的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

86. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述Fab轻链多肽包含SEQ ID N0:16的至少175个连续氨基酸残基的氨基酸序列。

87. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述Fab轻链多肽包含SEQ ID NO:16的至少200个连续氨基酸残基的氨基酸序列。

88. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述Fab轻链多肽包含SEQ ID NO:16的至少200个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID NO:16的所述至少200个连续氨基酸残基具有至少80%序列同一性。

89. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述Fab轻链多肽包含根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

90. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述接头连接所述Fab重链多肽与所述scFv轻链可变结构域的C-末端,并且其中所述Fab轻链多肽包含与根据SEQ ID NO:20的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列,并且连接至所述scFv轻链可变结构域的C-末端的所述Fab重链多肽的氨基酸序列包含与根据SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

91. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述接头连接所述Fab重链多肽与所述scFv轻链可变结构域的C-末端,并且其中所述Fab轻链多肽包含根据SEQ ID NO:20的氨基酸序列,并且连接至所述scFv轻链可变结构域的C-末端的所述Fab重链多肽的氨基酸序列包含根据SEQ ID NO:21的氨基酸序列。

92. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述接头连接所述Fab轻链多肽与所述scFv轻链可变结构域的C-末端,并且其中所述Fab重链多肽包含与根据SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列,并且连接至所述scFv轻链可变结构域的C-末端的所述Fab轻链多肽的氨基酸序列包含与根据SEQ ID NO:22的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

93. 如权利要求36所述的分离的多特异性抗体,其中所述接头连接所述Fab轻链多肽与所述scFv轻链可变结构域的C-末端,并且其中所述Fab重链多肽包含根据SEQ ID NO:23的氨基酸序列,并且连接至所述scFv轻链可变结构域的C-末端的所述Fab轻链多肽的氨基酸序列包含根据SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

94. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述多特异性抗体进一步包含半衰期延长分子(H_1)。

95. 如权利要求94所述的分离的多特异性抗体,其中 H_1 连接至 P_1 。

96. 如权利要求94所述的分离的多特异性抗体,其中 H_1 不阻断 A_1 结合至CD28。

97. 如权利要求94所述的分离的多特异性抗体,其中 H_1 不阻断B结合至PD-L1。

98. 如权利要求94所述的分离的多特异性抗体, H_1 包含连接 H_1 与 P_1 的联接部分(L_5)。

99. 如权利要求94所述的分离的多特异性抗体,其中所述半衰期延长分子(H_1)对PD-L1不具有结合亲和力。

100. 如权利要求94所述的分离的多特异性抗体,其中所述半衰期延长分子(H_1)对CD28不具有结合亲和力。

101. 如权利要求94所述的分离的多特异性抗体,其中所述半衰期延长分子(H_1)不保护所述多特异性抗体免受CD28的影响。

102. 如权利要求94所述的分离的多特异性抗体,其中 H_1 包含根据SEQ ID NO:54-57的序列。

103. 如权利要求94所述的分离的多特异性抗体,其中H₁包含具有重复序列基序的氨基酸序列。

104. 如权利要求94所述的分离的多特异性抗体,其中H₁包含具有高度有序二级结构的氨基酸序列。

105. 如权利要求94所述的分离的多特异性抗体,其中H₁包含聚合物。

106. 如权利要求105所述的分离的多特异性抗体,其中所述聚合物是聚乙二醇(PEG)。

107. 如权利要求94所述的分离的多特异性抗体,其中H₁包含白蛋白。

108. 如权利要求94所述的分离的多特异性抗体,其中H₁包含Fc结构域。

109. 如权利要求107所述的分离的多特异性抗体,其中所述白蛋白是血清白蛋白。

110. 如权利要求107所述的分离的多特异性抗体,其中所述白蛋白是人血清白蛋白。

111. 如权利要求94所述的分离的多特异性抗体,其中H₁包含多肽、配体或小分子。

112. 如权利要求111所述的分离的多特异性抗体,其中所述多肽、所述配体或所述小分子结合血清蛋白或其片段、循环免疫球蛋白或其片段、或CD35/CR1。

113. 如权利要求112所述的分离的多特异性抗体,其中所述血清蛋白包括甲状腺素结合蛋白、转甲状腺素蛋白、1-酸性糖蛋白、转铁蛋白、转铁蛋白受体或其转铁蛋白结合部分、纤维蛋白原或白蛋白。

114. 如权利要求112所述的分离的多特异性抗体,其中所述循环免疫球蛋白分子包含IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、sIgA、IgM或IgD。

115. 如权利要求112所述的分离的多特异性抗体,其中所述血清蛋白是白蛋白。

116. 如权利要求112所述的分离的多特异性抗体,其中所述多肽是抗体。

117. 如权利要求112所述的分离的多特异性抗体,其中所述抗体包括单结构域抗体、单链可变片段、Fab或Fab'。

118. 如权利要求117所述的分离的多特异性抗体,其中所述单结构域抗体包括结合至白蛋白的单结构域抗体。

119. 如权利要求118所述的分离的多特异性抗体,其中所述单结构域抗体是人抗体或人源化抗体。

120. 如权利要求117所述的分离的多特异性抗体,其中所述单结构域抗体选自645gH1gL1、645dsgH5gL4、23-13-A01-sc02、A10m3或其片段、DOM7r-31、DOM7h-11-15、Alb-1、Alb-8、Alb-23、10G、10E和SA21。

121. 如权利要求117所述的分离的多特异性抗体,其中所述单结构域抗体包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中所述单结构域抗体的所述HC-CDR1、所述HC-CDR2和所述HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:54、HC-CDR2:SEQ ID NO:55和HC-CDR3:SEQ ID NO:56;并且其中所述CDR包含所述HC-CDR1、HC-CDR2或HC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修饰。

122. 如权利要求94所述的分离的多特异性抗体,其中H₁包含根据SEQ ID NO:57的氨基酸序列。

123. 如权利要求94所述的分离的多特异性抗体,其中H₁包含与SEQ ID NO:57具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

124. 如权利要求94所述的分离的多特异性抗体,其中H₁包含与SEQ ID NO:57具有至少

95%序列同一性的氨基酸序列。

125. 如权利要求94所述的分离的多特异性抗体,其中H₁包含与SEQ ID NO:57具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

126. 如权利要求94所述的分离的多特异性抗体,其中H₁包含经修饰氨基酸或非天然氨基酸或经修饰非天然氨基酸,或其组合。

127. 如权利要求126所述的分离的多特异性抗体,其中所述经修饰氨基酸或经修饰非天然氨基酸包含翻译后修饰。

128. 如权利要求94所述的分离的多特异性抗体,其中H₁包含连接H₁与P₁的联接部分(L₅)。

129. 如权利要求128所述的分离的多特异性抗体,其中L₅是具有至少5个至不多于50个氨基酸的肽序列。

130. 如权利要求128所述的分离的多特异性抗体,其中L₅是具有至少26个氨基酸的肽序列。

131. 如权利要求128所述的分离的多特异性抗体,其中L₅包含选自以下的式:(G₂S)_n、(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:58)、(GGGS)_n(SEQ ID NO:59)、(GGGGS)_n(SEQ ID NO:60)和(GSSGGS)_n(SEQ ID NO:61),其中n是至少为1的整数。

132. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149-170具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

133. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149-170具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

134. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149-170具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

135. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149和150具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

136. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149和150具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

137. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:151和152具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

138. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:151和152具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

139. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:153和154具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

140. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:153和154具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

141. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:155和156具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

142. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:155和156具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

143. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述分离的多特异性抗体包含与

SEQ ID NO:157和158具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

144. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:157和158具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

145. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:159和160具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

146. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:159和160具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

147. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:161和162具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

148. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:161和162具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

149. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:163和164具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

150. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:163和164具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

151. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:165和166具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

152. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:165和166具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

153. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:167和168具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

154. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:167和168具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

155. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:169和170具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

156. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:169和170具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

157. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:208和209具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

158. 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体,其中所述分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:208和209具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

159. 一种分离的重组核酸分子,其编码如权利要求1所述的分离的多特异性抗体的多肽。

160. 一种药物组合物,其包含:

(a) 如权利要求1所述的分离的多特异性抗体;和

(b) 药学上可接受的赋形剂。

用于靶向CD28和PD-L1的肿瘤激活多特异性抗体及其使用方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求于2022年5月4日提交的美国临时申请号63/338,115的权益,该申请通过引用以其全文并入。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,其按XML格式以电子方式递交并特此通过引用整体并入。所述XML副本创建于2023年4月13日,且名称为52426-741_601_SL.xml并且大小为578,045字节。

发明内容

[0005] 本文公开了根据以下式的分离的多特异性抗体: $P_1-L_1-A_1-L-B$ (式I),其中 A_1 包含CD28结合结构域; B 包含PD-L1结合结构域; L 包含连接 A_1 与 B 的接头; P_1 包含结合至 A_1 的肽,并且 L_1 包含连接 A_1 与 P_1 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物,其中 P_1 包含根据SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。在一些实施方案中,多特异性抗体是根据以下式: $P_1-L_1-A_1-L-B-L_2-P_2$ (式Ia),其中 P_2 包含结合至 B 的肽,并且 L_2 包含连接 B 与 P_2 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物。在一些实施方案中, P_1 包含根据SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的氨基酸序列。在一些实施方案中, P_1 包含根据SEQ ID NO:42-53的任一者的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:42-53的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。在一些实施方案中, P_1 包含根据SEQ ID NO:42-53的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中, P_1 包含根据表20的氨基酸序列的任一者的氨基酸序列或相对于表20的氨基酸序列的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。在一些实施方案中, P_1 包含根据表20的氨基酸序列的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中, P_1 包含根据SEQ ID NO:128-147的任一者的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:128-147的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。在一些实施方案中, P_1 包含根据SEQ ID NO:128-147的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中, P_1 包含根据 $X_1-X_2-X_3-C-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-C-X_{11}-X_{12}$ 的氨基酸序列,其中 X_1 选自M、I、L和V; X_2 选自D、H、N、A、F、S、T、Y和V; X_3 选自W、L和F; X_4 选自P、A和L; X_5 选自R、T、I、M、S、K、L、V、W、F、A、P和D; X_6 选自E、D、Y、H、S、F、A、N、T、I、P和V; X_7 选自L、M、R、S、Q和H; X_8 选自W和Q; X_9 选自H、N、D、A、S、Y、T、F、V、L和I; X_{10} 选自E、V、L、D、Y、R、Q、H、F、K、A、M和N; X_{11} 选自F、Y、L、W和V;并且 X_{12} 选自N、A、F、S、Y、H、D、T和L。在一些实施方案中, X_1 选自M、I和L; X_2 选自D、H、N和A; X_3 是W; X_4 是P; X_5 选自R、T、I、M、S和K; X_6 选自E、D、Y、H、S和F; X_7 选自L、M和R; X_8 是W; X_9 选自H、N、D、A、S和V; X_{10} 选自E、V、L、D和H; X_{11} 选自F、Y和L;并且 X_{12} 选自N、A、F、S和Y。在一些实施方案中, X_1 是M; X_2 选自D和H; X_3 是W; X_4 是P; X_5 选自R、T和I; X_6 选自E、D和Y; X_7 选自L、M和R; X_8 是W; X_9 选自H、N、D和V; X_{10} 选自E、V、L、D和H; X_{11} 是F;并且 X_{12} 选自N、A和F。在一些实施方案中, P_1 包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:32具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。在一些实施方案中, P_1 包含根

据SEQ ID NO:32的氨基酸序列。在一些实施方案中, P_1 包含根据SEQ ID NO:138的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:138具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。在一些实施方案中, P_1 包含根据SEQ ID NO:138的氨基酸序列。在一些实施方案中, P_1 削弱 A_1 与CD28的结合。在一些实施方案中, P_1 通过离子相互作用、静电相互作用、疏水相互作用、 π -堆积相互作用和H键相互作用或其组合结合至 A_1 。在一些实施方案中, P_1 在抗原结合位点或其附近结合至 A_1 。在一些实施方案中,当 L_1 被肿瘤特异性蛋白酶切割时, P_1 与 A_1 解结合,从而使 A_1 暴露于CD28。在一些实施方案中, P_1 与CD28具有小于75%的序列同一性。在一些实施方案中, P_1 与CD28具有小于80%的序列同一性。在一些实施方案中, P_1 与CD28具有小于85%的序列同一性。在一些实施方案中, P_1 与CD28具有小于90%的序列同一性。在一些实施方案中, P_1 与CD28具有小于95%的序列同一性。在一些实施方案中, P_1 包含与CD28共享小于10%的序列同一性的从头生成(de novo)氨基酸序列。在一些实施方案中, P_2 削弱B与PD-L1的结合。在一些实施方案中, P_2 通过离子相互作用、静电相互作用、疏水相互作用、 π -堆积相互作用和H键相互作用或其组合结合至B。在一些实施方案中, P_2 在抗原结合位点或其附近结合至B。在一些实施方案中,当 L_2 被肿瘤特异性蛋白酶切割时, P_2 与B解结合,从而使B暴露于PD-L1。在一些实施方案中, P_2 与PD-L1具有小于70%的序列同一性。在一些实施方案中, P_2 与PD-L1具有小于75%的序列同一性。在一些实施方案中, P_2 与PD-L1具有小于80%的序列同一性。在一些实施方案中, P_2 与PD-L1具有小于85%的序列同一性。在一些实施方案中, P_2 与PD-L1具有小于90%的序列同一性。在一些实施方案中, P_2 与PD-L1具有小于95%的序列同一性。在一些实施方案中, P_2 包含与PD-L1共享小于10%的序列同一性的从头生成氨基酸序列。在一些实施方案中, P_2 包含长度为至少5个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_2 包含长度为至少6个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_2 包含长度为至少10个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_2 包含长度为至少10个氨基酸并且长度为不多于20个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_2 包含长度为至少16个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_2 包含长度为不多于40个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_1 或 P_2 包含至少两个半胱氨酸氨基酸残基。在一些实施方案中, P_1 或 P_2 包含环肽或线性肽。在一些实施方案中, P_1 或 P_2 包含环肽。在一些实施方案中, P_1 或 P_2 包含线性肽。在一些实施方案中, P_1 或 P_2 包含经修饰氨基酸或非天然氨基酸或经修饰非天然氨基酸,或其组合。在一些实施方案中, P_1 或 P_2 不包含白蛋白或白蛋白片段。在一些实施方案中, P_1 或 P_2 不包含白蛋白结合结构域。在一些实施方案中, L_1 或 L_2 是具有至少5个至不多于50个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_1 或 L_2 是具有至少10个至不多于30个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_1 或 L_2 是具有至少10个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_1 或 L_2 是具有至少18个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_1 或 L_2 是具有至少26个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_1 或 L_2 包含包括 $(G_2S)_n$ 的式,其中n是1至3的整数(SEQ ID NO:228)。在一些实施方案中, L_1 或 L_2 包含包括 $(G_2S)_n$ 的式,其中n是至少为1的整数。在一些实施方案中, L_1 或 L_2 包含选自以下的式: $(G_2S)_n$ 、 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO:58)、 $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO:59)、 $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO:60)和 $(GSSGGS)_n$ (SEQ ID NO:61),其中n是至少为1的整数。在一些实施方案中,肿瘤特异性蛋白酶选自金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶。在一些实施方案中, L_1 或 L_2 包含尿激酶可切割氨基酸序列、膜型丝氨酸蛋白酶(matriptase)可切割氨基酸序列或基质金属蛋白酶可切割氨基酸序列。在一些实施方案中, L_1 或 L_2 包含根据SEQ ID NO:18-19、62-88

的序列。在一些实施方案中, L_1 结合至 A_1 的 N-末端。在一些实施方案中, L_1 结合至 A_1 的 C-末端。在一些实施方案中, L_2 结合至 B 的 N-末端。在一些实施方案中, L_2 结合至 B 的 C-末端。在一些实施方案中, CD28 结合结构域包含单链可变片段、单结构域抗体、Fab 或 Fab'。在一些实施方案中, CD28 结合结构域包含单链可变片段。在一些实施方案中, CD28 结合结构域包含单结构域抗体。在一些实施方案中, CD28 结合结构域包含 Fab 或 Fab'。在一些实施方案中, PD-L1 结合结构域包含单链可变片段、单结构域抗体、Fab 或 Fab'。在一些实施方案中, PD-L1 结合结构域包含 Fab 或 Fab'。在一些实施方案中, PD-L1 结合结构域包含 Fab 或 Fab' 并且 CD28 结合结构域包含单链可变片段。在一些实施方案中, 包含 Fab 或 Fab' 的 PD-L1 结合结构域包含 Fab 重链多肽和 Fab 轻链多肽, 该 Fab 重链多肽包含 Fab 重链可变结构域, 该 Fab 轻链多肽包含 Fab 轻链可变结构域。在一些实施方案中, 包含单链可变片段的 CD28 结合结构域包含 scFv 重链可变结构域和 scFv 轻链可变结构域。在一些实施方案中, 接头连接 A_1 的 C-末端与 B 的 N-末端。在一些实施方案中, 接头连接 A_1 的 N-末端与 B 的 C-末端。在一些实施方案中, 接头连接 A_1 的 C-末端与 Fab 重链多肽的 N-末端。在一些实施方案中, 接头连接 A_1 的 N-末端与 Fab 重链多肽的 C-末端。在一些实施方案中, 接头连接 A_1 的 C-末端与 Fab 轻链多肽的 N-末端。在一些实施方案中, 接头连接 A_1 的 N-末端与 Fab 轻链多肽的 C-末端。在一些实施方案中, 接头连接 Fab 轻链多肽与 scFv 轻链可变结构域。在一些实施方案中, 接头连接 Fab 轻链多肽与 scFv 重链可变结构域。在一些实施方案中, 接头连接 Fab 重链多肽与 scFv 轻链可变结构域。在一些实施方案中, 接头连接 Fab 重链多肽与 scFv 重链可变结构域。在一些实施方案中, 接头连接 Fab 轻链多肽与 scFv 轻链可变结构域的 N-末端。在一些实施方案中, 接头连接 Fab 轻链多肽与 scFv 轻链可变结构域的 C-末端。在一些实施方案中, 接头连接 Fab 轻链多肽与 scFv 重链可变结构域的 N-末端。在一些实施方案中, 接头连接 Fab 轻链多肽与 scFv 重链可变结构域的 C-末端。在一些实施方案中, 接头连接 Fab 重链多肽与 scFv 轻链可变结构域的 N-末端。在一些实施方案中, 接头连接 Fab 重链多肽与 scFv 轻链可变结构域的 C-末端。在一些实施方案中, 接头连接 Fab 重链多肽与 scFv 重链可变结构域的 N-末端。在一些实施方案中, 接头的长度为至少 5 个氨基酸。在一些实施方案中, 接头的长度为不多于 30 个氨基酸。在一些实施方案中, 接头的长度为至少 5 个氨基酸并且不多于 30 个氨基酸。在一些实施方案中, 接头的长度为 5 个氨基酸。在一些实施方案中, 接头的长度为 15 个氨基酸。在一些实施方案中, 接头包含 $(G_2S)_n$ 、 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO:58)、 $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO:59)、 $(GGGGGS)_n$ (SEQ ID NO:60) 和 $(GSSGGS)_n$ (SEQ ID NO:61), 其中 n 是至少为 1 的整数。在一些实施方案中, L 包含包括 $(G_2S)_n$ 的式, 其中 n 是 1 至 3 的整数 (SEQ ID NO:228)。在一些实施方案中, L 包含 SEQ ID NO:18 (GGGGSGGGSGGGGS) 或 SEQ ID NO:19 (GGGGGS) 的氨基酸序列。在一些实施方案中, scFv 重链可变结构域包含互补决定区 (CDR): HC-CDR1、HC-CDR2 和 HC-CDR3, 其中 scFv 重链可变结构域的 HC-CDR1、HC-CDR2 和 HC-CDR3 包含: HC-CDR1: SEQ ID NO:1; HC-CDR2: SEQ ID NO:2; HC-CDR3: SEQ ID NO:3, 并且其中所述 CDR 包含所述 HC-CDR1、HC-CDR2 或 HC-CDR3 的至少一个中的 0-2 个氨基酸修饰。在一些实施方案中, scFv 轻链可变结构域包含互补决定区 (CDR): LC-CDR1、LC-CDR2 和 LC-CDR3, 其中 scFv 轻链可变结构域的 LC-CDR1、LC-CDR2 和 LC-CDR3 包含: LC-CDR1: SEQ ID NO:4; LC-CDR2: SEQ ID NO:5 (KA); 和 LC-CDR3: SEQ ID NO:6, 并且其中 CDR 包含所述 LC-CDR1、LC-CDR2 或 LC-CDR3 的至少一个中的 0-2 个氨基酸修饰。在一些实施方案中, A_1 包含互补决定

区 (CDR) :LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中A₁的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:4;LC-CDR2:SEQ ID NO:5(KA);和LC-CDR3:SEQ ID NO:6;其中A₁包含互补决定区 (CDR) :HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中A₁的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:1;HC-CDR2:SEQ ID NO:2;HC-CDR3:SEQ ID NO:3。在一些实施方案中,Fab重链可变结构域包含互补决定区 (CDR) :HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中Fab重链可变结构域的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:10;HC-CDR2:SEQ ID NO:11;HC-CDR3:SEQ ID NO:12;并且其中所述CDR包含所述HC-CDR1、HC-CDR2或HC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修饰。在一些实施方案中,Fab轻链可变结构域包含互补决定区 (CDR) :LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中Fab轻链可变结构域的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:13;LC-CDR2:SEQ ID NO:14(DA);和LC-CDR3:SEQ ID NO:15;并且其中CDR包含所述LC-CDR1、LC-CDR2或LC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修饰。在一些实施方案中,B包含互补决定区 (CDR) :HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中B的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:10;HC-CDR2:SEQ ID NO:11;HC-CDR3:SEQ ID NO:12;并且其中B包含互补决定区 (CDR) :LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中B的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:13;LC-CDR2:SEQ ID NO:14(DA);和LC-CDR3:SEQ ID NO:15。在一些实施方案中,scFv重链可变结构域包含与根据SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv重链可变结构域包含SEQ ID NO:7的至少75个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv重链可变结构域包含SEQ ID NO:7的至少110个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv重链可变结构域包含SEQ ID NO:7的至少110个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID NO:7的至少110个连续氨基酸残基具有至少80%序列同一性。在一些实施方案中,scFv重链可变结构域包含根据SEQ ID NO:7的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv轻链可变结构域包含与根据SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv轻链可变结构域包含SEQ ID NO:8的至少75个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv轻链可变结构域包含SEQ ID NO:8的至少100个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv轻链可变结构域包含SEQ ID NO:8的至少100个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID NO:8的至少100个连续氨基酸残基具有至少80%序列同一性。在一些实施方案中,scFv轻链可变结构域包含根据SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv包含与根据SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:9的至少175个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:9的至少210个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:9的至少210个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID NO:9的至少210个连续氨基酸残基具有至少80%序列同一性。在一些实施方案中,scFv包含根据SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fab重链多肽包含与根据SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fab重链多肽包含SEQ ID NO:17的至少175个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fab重链多肽包含SEQ ID NO:17的至少215个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fab重链多肽包含SEQ ID NO:17的至少215个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID NO:17的至少215个连续氨基酸残基具有至少80%序列同

一性。在一些实施方案中,Fab重链多肽包含根据SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fab轻链多肽包含与根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fab轻链多肽包含SEQ ID NO:16的至少175个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fab轻链多肽包含SEQ ID NO:16的至少200个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fab轻链多肽包含SEQ ID NO:16的至少200个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID NO:16的至少200个连续氨基酸残基具有至少80%序列同一性。在一些实施方案中,Fab轻链多肽包含根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,接头连接Fab重链多肽与scFv轻链可变结构域的C-末端,并且其中Fab轻链多肽包含与根据SEQ ID NO:20的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列,并且连接至scFv轻链可变结构域的C-末端的Fab重链多肽的氨基酸序列包含与根据SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,接头连接Fab重链多肽与scFv轻链可变结构域的C-末端,并且其中Fab轻链多肽包含根据SEQ ID NO:20的氨基酸序列,并且连接至scFv轻链可变结构域的C-末端的Fab重链多肽的氨基酸序列包含根据SEQ ID NO:21的氨基酸序列。在一些实施方案中,接头连接Fab轻链多肽与scFv轻链可变结构域的C-末端,并且其中Fab重链多肽包含与根据SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列,并且连接至scFv轻链可变结构域的C-末端的Fab轻链多肽的氨基酸序列包含与根据SEQ ID NO:22的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,接头连接Fab轻链多肽与scFv轻链可变结构域的C-末端,并且其中Fab重链多肽包含根据SEQ ID NO:23的氨基酸序列,并且连接至scFv轻链可变结构域的C-末端的Fab轻链多肽的氨基酸序列包含根据SEQ ID NO:22的氨基酸序列。在一些实施方案中,多特异性抗体进一步包含半衰期延长分子(H_1)。在一些实施方案中, H_1 连接至 P_1 。在一些实施方案中, H_1 连接至 P_2 。在一些实施方案中, H_1 不阻断 A_1 结合至CD28。在一些实施方案中, H_1 不阻断B结合至PD-L1。在一些实施方案中, H_1 包含连接 H_1 与 P_1 或 H_1 与 P_2 的联接部分(L_5)。在一些实施方案中,半衰期延长分子(H_1)对PD-L1不具有结合亲和力。在一些实施方案中,半衰期延长分子(H_1)对CD28不具有结合亲和力。在一些实施方案中,半衰期延长分子(H_1)不保护多特异性抗体免受CD28的影响。在一些实施方案中, H_1 包含根据SEQ ID NO:54-57的序列。在一些实施方案中, H_1 包含具有重复序列基序的氨基酸序列。在一些实施方案中, H_1 包含具有高度有序二级结构的氨基酸序列。在一些实施方案中, H_1 包含聚合物。如权利要求148所述的分离的多特异性抗体,其中聚合物是聚乙二醇(PEG)。在一些实施方案中, H_1 包含白蛋白。在一些实施方案中, H_1 包含Fc结构域。在一些实施方案中,白蛋白是血清白蛋白。在一些实施方案中,白蛋白是人血清白蛋白。在一些实施方案中, H_1 包含多肽、配体或小分子。在一些实施方案中,多肽、配体或小分子结合血清蛋白或其片段、循环免疫球蛋白或其片段、或CD35/CR1。在一些实施方案中,血清蛋白包括甲状腺素结合蛋白、转甲状腺素蛋白、1-酸性糖蛋白、转铁蛋白、转铁蛋白受体或其转铁蛋白结合部分、纤维蛋白原或白蛋白。在一些实施方案中,循环免疫球蛋白分子包含IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、sIgA、IgM或IgD。在一些实施方案中,血清蛋白是白蛋白。在一些实施方案中,多肽是抗体。在一些实施方案中,抗体包括单结构域抗体、单链可变片段、Fab或Fab'。在一些实施方案中,单结构域抗体包括结合至白蛋白的单结构域抗体。在一些实施方案中,单结构域抗体是人抗体或人源化抗体。在一些实施方案中,单结构域抗体选自645gH1gL1、645dsgH5gL4、23-13-A01-sc02、A10m3或其

片段、DOM7r-31、DOM7h-11-15、A1b-1、A1b-8、A1b-23、10G、10E和SA21。在一些实施方案中，单结构域抗体包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3，其中单结构域抗体的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:54、HC-CDR2:SEQ ID NO:55和HC-CDR3:SEQ ID NO:56;并且其中CDR包含HC-CDR1、HC-CDR2或HC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修饰。在一些实施方案中，H₁包含根据SEQ ID NO:57的氨基酸序列。在一些实施方案中，H₁包含与SEQ ID NO:57具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，H₁包含与SEQ ID NO:57具有至少85%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，H₁包含与SEQ ID NO:57具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，H₁包含与SEQ ID NO:57具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，H₁包含与SEQ ID NO:57具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，H₁包含经修饰氨基酸或非天然氨基酸或经修饰非天然氨基酸，或其组合。在一些实施方案中，经修饰氨基酸或经修饰非天然氨基酸包含翻译后修饰。在一些实施方案中，H₁包含连接H1与P1或P2的联接部分(L₅)。在一些实施方案中，L₅是具有至少5个至不多于50个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中，L₅是具有至少10个至不多于30个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中，L₅是具有至少10个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中，L₅是具有至少18个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中，L₅是具有至少26个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中，L₅包含选自以下的式:(G₂S)_n、(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:58)、(GGGS)_n(SEQ ID NO:59)、(GGGGS)_n(SEQ ID NO:60)和(GSSGGS)_n(SEQ ID NO:61)，其中n是至少为1的整数。在一些实施方案中，分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149-170具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149-170具有至少85%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149-170具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149-170具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149-170具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149和150具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149和150具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:151和152具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:151和152具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:153和154具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:153和154具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:155和156具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:155和156具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:157和158具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:157和158具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:159和160具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:159和160具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，分离的多特异性抗体包含

与SEQ ID NO:161和162具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:161和162具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:163和164具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:163和164具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:165和166具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:165和166具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:167和168具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:167和168具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:169和170具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:169和170具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:208和209具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:208和209具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0006] 本文公开了分离的重组核酸分子,其编码以上实施方案中任一者的分离的多特异性抗体的多肽。

[0007] 本文公开了药物组合物,其包含:(a)以上实施方案中任一者的分离的多特异性抗体;和(b)药学上可接受的赋形剂。

[0008] 本文公开了药物组合物,其包含:(a)以上实施方案中任一者的分离的多特异性抗体、(b)抗癌疗法和(c)药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,抗癌疗法包括小分子、基于细胞的治疗或基于抗体的治疗。在一些实施方案中,基于抗体的治疗是T细胞衔接器。在一些实施方案中,T细胞衔接器包含根据以下的式: $D_1-L_0-E_1$ (式II),其中 D_1 包含结合至效应细胞抗原的效应细胞结合结构域, E_1 包含结合至肿瘤抗原的肿瘤抗原结合结构域,并且 L_0 包含连接 D_1 与 E_1 的接头。在一些实施方案中, D_1 包含单链可变片段、单结构域抗体、Fab片段或Fab'。在一些实施方案中, D_1 包含单链可变片段。在一些实施方案中, E_1 包含单链可变片段、单结构域抗体、Fab片段或Fab'。在一些实施方案中, E_1 包含Fab片段。在一些实施方案中,效应细胞抗原包含CD3。在一些实施方案中,效应细胞结合结构域包含选自以下的互补决定区(CDR):莫罗单抗(muromonab)-CD3(OKT3)、奥昔组单抗(otelixizumab)(TRX4)、替利组单抗(teplizumab)(MGA031)、维西珠单抗(visilizumab)(Nuvion)、SP34、X35、VIT3、BMA030(BW264/56)、CLB-T3/3、CRIS7、YTH12.5、F111-409、CLB-T3.4.2、TR-66、WT32、SPv-T3b、11D8、XIII-141、XIII-46、XIII-87、12F6、T3/RW2-8C8、T3/RW2-4B6、OKT3D、M-T301、SMC2、F101.01、UCHT-1、WT-31、15865、15865v12、15865v16和15865v19。在一些实施方案中,效应细胞结合结构域包含根据SEQ ID NO:89-101的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括表皮生长因子受体(EGFR)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)或肿瘤相关钙信号转导器2(在本文中称为TROP2)。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括EGFR。在一些实施方案中,肿瘤抗原结合结构域包含根据SEQ ID NO:102-111的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括EGFR,并且肿瘤结合结构域包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,以及LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:

105;HC-CDR2:SEQ ID NO:106;HC-CDR3:SEQ ID NO:107;并且其中LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:102;LC-CDR2:SEQ ID NO:103 (YAS);和LC-CDR3:SEQ ID NO:104。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括EGFR,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:181和182具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括EGFR,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:181和182的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括EGFR,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:181和182具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括EGFR,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:214和215的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括TROP2。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括TROP2,并且肿瘤结合结构域包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,以及LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含HC-CDR1:SEQ ID NO:112;HC-CDR2:SEQ ID NO:113;HC-CDR3:SEQ ID NO:114;并且其中LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:115;LC-CDR2:SEQ ID NO:116 (SAS);和LC-CDR3:SEQ ID NO:117。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括TROP2,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:187-192具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括TROP2,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:187-192的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原结合结构域包含根据SEQ ID NO:112-119的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括PSMA。在一些实施方案中,肿瘤抗原结合结构域包含根据SEQ ID NO:120-127的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括PSMA,并且肿瘤结合结构域包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,以及LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含HC-CDR1:SEQ ID NO:120;HC-CDR2:SEQ ID NO:121;HC-CDR3:SEQ ID NO:122;并且其中LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:123;LC-CDR2:SEQ ID NO:124 (EA);和LC-CDR3:SEQ ID NO:125。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括PSMA,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:173和174具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括PSMA,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:173和174的氨基酸序列。在一些实施方案中,T细胞衔接器分子在肿瘤微环境中被选择性激活。在一些实施方案中,T细胞衔接器是根据以下子式: $P_3-L_3-D_1-L_0-E_1$ (式IIa),其中 D_1 包含CD3结合结构域; E_1 包含肿瘤抗原结合结构域; L_0 包含连接 D_1 与 E_1 的接头; P_3 包含结合至 D_1 的肽,并且 L_3 包含连接 D_1 与 P_3 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物。在一些实施方案中,T细胞衔接器是根据以下子式: $D_1-L_0-E_1-L_4-P_4$ (式IIb),其中 D_1 包含CD3结合结构域; E_1 包含肿瘤抗原结合结构域; L_0 包含连接 D_1 与 E_1 的接头; P_4 包含结合至 E_1 的肽,并且 L_4 包含连接 E_1 与 P_4 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物。在一些实施方案中,T细胞衔接器是根据以下子式: $P_3-L_3-D_1-L_0-E_1-L_4-P_4$ (式IIc),其中 D_1 包含CD3结合结构域; E_1 包含肿瘤抗原结合结构域; L_0 包含连接 D_1 与 E_1 的接头; P_3 包含结合至 D_1 的肽,并且 L_3 包含连接 D_1 与 P_3 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物; P_4 包含结合至 E_1 的肽,并且 L_4 包含连接 E_1 与 P_4 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物。在一些实施方案中,T细胞衔接器包含 H_1 。在一些实施方案中, H_1 包含根据SEQ ID NO:54-57的序列。在一些实施方案中, H_1 包含单结构域抗体。在一些实施方案中,单结构域抗体包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中单结构域抗体的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:54、HC-CDR2:SEQ ID NO:55和HC-CDR3:SEQ ID NO:56。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 是具有至少5个至不多于50个氨基酸的肽序列。在一些

实施方案中, L_3 或 L_4 是具有至少10个至不多于30个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 是具有至少10个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 是具有至少18个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 是具有至少26个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 包含包括 $(G_2S)_n$ 的式, 其中 n 是1至3的整数 (SEQ ID NO:228)。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 包含包括 $(G_2S)_n$ 的式, 其中 n 是至少为1的整数。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 包含选自以下的式: $(G_2S)_n$ 、 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO:58)、 $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO:59)、 $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO:60) 和 $(GSSGGS)_n$ (SEQ ID NO:61), 其中 n 是至少为1的整数。在一些实施方案中, 肿瘤特异性蛋白酶选自金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 包含尿激酶可切割氨基酸序列、膜型丝氨酸蛋白酶可切割氨基酸序列或基质金属蛋白酶可切割氨基酸序列。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 包含根据 SEQ ID NO:18-19、62-88 的序列。在一些实施方案中, L_3 结合至 D_1 的 N-末端。在一些实施方案中, L_3 结合至 D_1 的 C-末端。在一些实施方案中, L_4 结合至 E_1 的 N-末端。在一些实施方案中, L_4 结合至 E_1 的 C-末端。在一些实施方案中, 当 L_3 被肿瘤特异性蛋白酶切割时, P_3 与 D_1 解结合, 从而使 D_1 暴露于 CD3。在一些实施方案中, 当 L_4 被肿瘤特异性蛋白酶切割时, P_4 与 E_1 解结合, 从而使 E_1 暴露于肿瘤抗原。在一些实施方案中, P_3 削弱 D_1 与 CD3 的结合。在一些实施方案中, P_3 通过离子相互作用、静电相互作用、疏水相互作用、 π -堆积相互作用和 H 键相互作用或其组合结合至 D_1 。在一些实施方案中, P_3 在抗原结合位点或其附近结合至 D_1 。在一些实施方案中, 当 L_3 被肿瘤特异性蛋白酶切割时, P_3 与 D_1 解结合, 从而使 D_1 暴露于 CD3。在一些实施方案中, P_3 与 CD3 具有小于 70% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_3 与 CD3 具有小于 85% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_3 与 CD3 具有小于 90% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_3 与 CD3 具有小于 95% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_3 与 CD3 具有小于 98% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_3 与 CD3 具有小于 99% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_3 包含根据 SEQ ID NO:177-180 的氨基酸序列。在一些实施方案中, P_3 包含与 CD3 共享小于 10% 的序列同一性的从头生成氨基酸序列。在一些实施方案中, P_4 削弱 E_1 与肿瘤抗原的结合。在一些实施方案中, P_4 通过离子相互作用、静电相互作用、疏水相互作用、 π -堆积相互作用和 H 键相互作用或其组合结合至 E_1 。在一些实施方案中, P_4 在抗原结合位点或其附近结合至 E_1 。在一些实施方案中, 当 L_4 被肿瘤特异性蛋白酶切割时, P_4 与 E_1 解结合, 从而使 E_1 暴露于肿瘤抗原。在一些实施方案中, P_4 与肿瘤抗原具有小于 70% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_4 与肿瘤抗原具有小于 80% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_4 与肿瘤抗原具有小于 85% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_4 与肿瘤抗原具有小于 90% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_4 与肿瘤抗原具有小于 95% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_4 包含与肿瘤抗原共享小于 10% 的序列同一性的从头生成氨基酸序列。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含长度为至少 5 个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含长度为至少 6 个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含长度为至少 10 个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含长度为至少 10 个氨基酸并且长度为不多于 20 个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含长度为至少 16 个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含长度为不多于 40 个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含至少两个半胱氨酸氨基酸残基。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含环肽或线性肽。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含环肽。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含线性肽。在一些实施方案中, P_4 包含根据 SEQ ID NO:185 或 186 的氨基酸序列。在一些实施

方案中,肿瘤抗原包括EGFR,并且T细胞衔接器包含SEQ ID NO:183和184的氨基酸序列。在一些实施方案中, P_4 包含根据SEQ ID NO:199-201的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括TROP2,并且T细胞衔接器包含SEQ ID NO:193-198的氨基酸序列的任一者。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括PSMA,并且T细胞衔接器包含SEQ ID NO:175和176的氨基酸序列。

[0009] 本文公开了分离的多肽或多肽复合物,其包含CD28结合结构域,CD28结合结构域联接至削弱CD28结合结构域与CD28的结合的肽,其中肽包含根据SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。在一些实施方案中,肽包含根据SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的氨基酸序列。在一些实施方案中,肽包含根据SEQ ID NO:42-53的任一者的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:42-53的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。在一些实施方案中,肽包含根据SEQ ID NO:42-53的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,肽包含根据表20的氨基酸序列的任一者的氨基酸序列或相对于表20的氨基酸序列的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。在一些实施方案中,肽包含根据表20的氨基酸序列的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,肽包含根据SEQ ID NO:128-147的任一者的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:128-147的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。在一些实施方案中,肽包含根据SEQ ID NO:128-147的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,肽包含根据 $X_1-X_2-X_3-C-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-C-X_{11}-X_{12}$ 的氨基酸序列,其中 X_1 选自M、I、L和V; X_2 选自D、H、N、A、F、S、T、Y和V; X_3 选自W、L和F; X_4 选自P、A和L; X_5 选自R、T、I、M、S、K、L、V、W、F、A、P和D; X_6 选自E、D、Y、H、S、F、A、N、T、I、P和V; X_7 选自L、M、R、S、Q和H; X_8 选自W和Q; X_9 选自H、N、D、A、S、Y、T、F、V、L和I; X_{10} 选自E、V、L、D、Y、R、Q、H、F、K、A、M和N; X_{11} 选自F、Y、L、W和V;并且 X_{12} 选自N、A、F、S、Y、H、D、T和L。在一些实施方案中, X_1 选自M、I和L; X_2 选自D、H、N和A; X_3 是W; X_4 是P; X_5 选自R、T、I、M、S和K; X_6 选自E、D、Y、H、S和F; X_7 选自L、M和R; X_8 是W; X_9 选自H、N、D、A、S和V; X_{10} 选自E、V、L、D和H; X_{11} 选自F、Y和L;并且 X_{12} 选自N、A、F、S和Y。在一些实施方案中, X_1 是M; X_2 选自D和H; X_3 是W; X_4 是P; X_5 选自R、T和I; X_6 选自E、D和Y; X_7 选自L、M和R; X_8 是W; X_9 选自H、N、D和V; X_{10} 选自E、V、L、D和H; X_{11} 是F;并且 X_{12} 选自N、A和F。在一些实施方案中,肽包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:32具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。在一些实施方案中,肽包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列。在一些实施方案中,肽包含根据SEQ ID NO:138的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:138具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。在一些实施方案中,肽包含根据SEQ ID NO:138的氨基酸序列。在一些实施方案中,CD28结合结构域包含单链可变片段、单结构域抗体、Fab或Fab'。在一些实施方案中,CD28结合结构域包含单链可变片段并且单链可变片段包含scFv重链可变结构域和scFv轻链可变结构域。在一些实施方案中,CD28结合结构域包含单结构域抗体。如权利要求313所述的分离的多肽或多肽复合物,其中CD28结合结构域包含Fab或Fab'。在一些实施方案中,scFv重链可变结构域包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中scFv重链可变结构域的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:1;HC-CDR2:SEQ ID NO:2;HC-CDR3:SEQ ID NO:3,并且其中所述CDR包含所述HC-CDR1、HC-CDR2或HC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修

饰。在一些实施方案中,scFv轻链可变结构域包含互补决定区(CDR):LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中scFv轻链可变结构域的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:4;LC-CDR2:SEQ ID NO:5(KA);和LC-CDR3:SEQ ID NO:6,并且其中CDR包含所述LC-CDR1、LC-CDR2或LC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修饰。在一些实施方案中,scFv重链可变结构域包含与根据SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv重链可变结构域包含SEQ ID NO:7的至少75个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv重链可变结构域包含SEQ ID NO:7的至少110个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv重链可变结构域包含SEQ ID NO:7的至少110个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID NO:7的至少110个连续氨基酸残基具有至少80%序列同一性。在一些实施方案中,scFv重链可变结构域包含根据SEQ ID NO:7的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv轻链可变结构域包含与根据SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv轻链可变结构域包含SEQ ID NO:8的至少75个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv轻链可变结构域包含SEQ ID NO:8的至少100个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv轻链可变结构域包含SEQ ID NO:8的至少100个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID NO:8的至少100个连续氨基酸残基具有至少80%序列同一性。在一些实施方案中,scFv轻链可变结构域包含根据SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv包含与根据SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:9的至少175个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:9的至少210个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:9的至少210个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID NO:9的至少210个连续氨基酸残基具有至少80%序列同一性。在一些实施方案中,scFv包含根据SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在一些实施方案中,CD28结合结构域通过联接部分(L₁)联接至肽。在一些实施方案中,L₁是肿瘤特异性蛋白酶的底物。在一些实施方案中,L₁是具有至少5个至不多于50个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中,L₁是具有至少10个至不多于30个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中,L₁是具有至少10个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中,L₁是具有至少18个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中,L₁是具有至少26个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中,L₁包含包括(G₂S)_n的式,其中n是1至3的整数(SEQ ID NO:228)。在一些实施方案中,L₁包含包括(G₂S)_n的式,其中n是至少为1的整数。在一些实施方案中,L₁包含选自以下的式:(G₂S)_n、(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:58)、(GGGS)_n(SEQ ID NO:59)、(GGGGS)_n(SEQ ID NO:60)和(GSSGGS)_n(SEQ ID NO:61),其中n是至少为1的整数。在一些实施方案中,肿瘤特异性蛋白酶选自金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶。在一些实施方案中,L₁包含尿激酶可切割氨基酸序列、膜型丝氨酸蛋白酶可切割氨基酸序列或基质金属蛋白酶可切割氨基酸序列。在一些实施方案中,L₁包含根据SEQ ID NO:18-19、62-88的序列。在一些实施方案中,L₁结合至A₁的N-末端。在一些实施方案中,L₁结合至A₁的C-末端。在一些实施方案中,当L₁被肿瘤特异性蛋白酶切割时,P₁与A₁解结合,从而使A₁暴露于CD28。在一些实施方案中,L₁包含经修饰氨基酸或非天然氨基酸或经修饰非天然氨基酸,或其组合。在一些实施方案中,经修饰氨基酸或经修饰非天然氨基酸包含翻译后修饰。在一些实施方案中,分离的多肽或多肽复合物进一步包含半衰期延长

分子(H₁)。在一些实施方案中,H₁连接至肽。在一些实施方案中,H₁不断CD28结合结构域与CD28。在一些实施方案中,H₁包含连接H₁与肽的联接部分(L₅)。在一些实施方案中,半衰期延长分子(H₁)对CD28不具有结合亲和力。在一些实施方案中,半衰期延长分子(H₁)不保护分离的多肽或多肽复合物免受CD28的影响。在一些实施方案中,H₁包含根据SEQ ID NO:54-57的序列。在一些实施方案中,H₁包含具有重复序列基序的氨基酸序列。在一些实施方案中,H₁包含具有高度有序二级结构的氨基酸序列。在一些实施方案中,H₁包含聚合物。在一些实施方案中,聚合物是聚乙二醇(PEG)。在一些实施方案中,H₁包含白蛋白。在一些实施方案中,H₁包含Fc结构域。在一些实施方案中,白蛋白是血清白蛋白。在一些实施方案中,白蛋白是人血清白蛋白。在一些实施方案中,H₁包含多肽、配体或小分子。在一些实施方案中,多肽、配体或小分子结合血清蛋白或其片段、循环免疫球蛋白或其片段、或CD35/CR1。在一些实施方案中,血清蛋白包括甲状腺素结合蛋白、转甲状腺素蛋白、1-酸性糖蛋白、转铁蛋白、转铁蛋白受体或其转铁蛋白结合部分、纤维蛋白原或白蛋白。在一些实施方案中,循环免疫球蛋白分子包含IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、sIgA、IgM或IgD。在一些实施方案中,血清蛋白是白蛋白。在一些实施方案中,多肽是抗体。在一些实施方案中,抗体包括单结构域抗体、单链可变片段、Fab或Fab'。在一些实施方案中,单结构域抗体包括结合至白蛋白的单结构域抗体。在一些实施方案中,单结构域抗体是人抗体或人源化抗体。在一些实施方案中,单结构域抗体选自645gH1gL1、645dsgH5gL4、23-13-A01-sc02、A10m3或其片段、DOM7r-31、DOM7h-11-15、A1b-1、A1b-8、A1b-23、10G、10E和SA21。在一些实施方案中,单结构域抗体包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中单结构域抗体的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:54、HC-CDR2:SEQ ID NO:55和HC-CDR3:SEQ ID NO:56;并且其中CDR包含HC-CDR1、HC-CDR2或HC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修饰。在一些实施方案中,H₁包含根据SEQ ID NO:57的氨基酸序列。在一些实施方案中,H₁包含与SEQ ID NO:57具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,H₁包含与SEQ ID NO:57具有至少85%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,H₁包含与SEQ ID NO:57具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,H₁包含与SEQ ID NO:57具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,H₁包含与SEQ ID NO:57具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,H₁包含经修饰氨基酸或非天然氨基酸或经修饰非天然氨基酸,或其组合。在一些实施方案中,经修饰氨基酸或经修饰非天然氨基酸包含翻译后修饰。在一些实施方案中,H₁包含连接H₁与P₁或P₂的联接部分(L₅)。在一些实施方案中,L₅是具有至少5个至不多于50个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中,L₅是具有至少10个至不多于30个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中,L₅是具有至少10个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中,L₅是具有至少18个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中,L₅是具有至少26个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中,L₅包含选自以下的式:(G₂S)_n、(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:58)、(GGGS)_n(SEQ ID NO:59)、(GGGGS)_n(SEQ ID NO:60)和(GSSGGS)_n(SEQ ID NO:61),其中n是至少为1的整数。

[0010] 本文公开了在有需要的对象中治疗癌症的方法,其包括向对象施用以上实施方案的任一者的多特异性抗体。在一些实施方案中,多特异性抗体诱导T细胞介导的肿瘤细胞的细胞毒性。在一些实施方案中,癌症是血液恶性肿瘤。在一些实施方案中,癌症是白血病或淋巴瘤。在一些实施方案中,癌症是淋巴瘤,并且其中淋巴瘤是B细胞淋巴瘤。在一些实施方

案中,癌症是实体肿瘤。在一些实施方案中,实体肿瘤表达PD-L1。在一些实施方案中,实体肿瘤是肉瘤、乳腺癌、肺癌或癌瘤。在一些实施方案中,实体肿瘤是肺癌,并且其中肺癌是非小细胞肺癌。在一些实施方案中,多特异性抗体与抗癌疗法组合施用。在一些实施方案中,多特异性抗体和抗癌疗法在相同的药物组合物中施用。在一些实施方案中,多特异性抗体和抗癌疗法作为单独的药物组合物施用。在一些实施方案中,对象对于检查点抑制剂疗法是难治的。在一些实施方案中,对象已从检查点抑制剂疗法复发。在一些实施方案中,抗癌疗法包括小分子、基于细胞的治疗或基于抗体的治疗。在一些实施方案中,基于抗体的治疗是T细胞衔接器。在一些实施方案中,T细胞衔接器包含根据以下的式: $D_1-L_0-E_1$ (式II),其中 D_1 包含结合至效应细胞抗原的效应细胞结合结构域, E_1 包含结合至肿瘤抗原的肿瘤抗原结合结构域,并且 L_0 包含连接 D_1 与 E_1 的接头。在一些实施方案中, D_1 包含单链可变片段、单结构域抗体、Fab片段或Fab'。在一些实施方案中, D_1 包含单链可变片段。在一些实施方案中, E_1 包含单链可变片段、单结构域抗体、Fab片段或Fab'。在一些实施方案中, E_1 包含Fab片段。在一些实施方案中,效应细胞结合结构域包含选自以下的互补决定区(CDR):莫罗单抗-CD3 (OKT3)、奥昔组单抗(TRX4)、替利组单抗(MGA031)、维西珠单抗(Nuvion)、SP34、X35、VIT3、BMA030 (BW264/56)、CLB-T3/3、CRIS7、YTH12.5、F111-409、CLB-T3.4.2、TR-66、WT32、SPv-T3b、11D8、XIII-141、XIII-46、XIII-87、12F6、T3/RW2-8C8、T3/RW2-4B6、OKT3D、M-T301、SMC2、F101.01、UCHT-1、WT-31、15865、15865v12、15865v16和15865v19。在一些实施方案中,效应细胞结合结构域包含根据SEQ ID NO:89-101的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括表皮生长因子受体(EGFR)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)或肿瘤相关钙信号转导器2(在本文中称为TROP2)。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括EGFR。在一些实施方案中,肿瘤抗原结合结构域包含根据SEQ ID NO:102-111的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括EGFR,并且肿瘤结合结构域包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,以及LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含HC-CDR1:SEQ ID NO:105;HC-CDR2:SEQ ID NO:106;HC-CDR3:SEQ ID NO:107;并且其中LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:102;LC-CDR2:SEQ ID NO:103 (YAS);和LC-CDR3:SEQ ID NO:104。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括EGFR,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:181和182具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括EGFR,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:181和182的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括EGFR,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:181和182具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括EGFR,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:214和215的氨基酸序列。在一些实施方案中,癌症是结肠直肠癌(CRC)、头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)、非小细胞肺癌(NSCLC)、前列腺癌、乳腺癌、结肠癌/直肠癌、头颈癌、食管胃癌、肝癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、膀胱癌、肾癌或胰腺癌。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括TROP2。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括TROP2,并且肿瘤结合结构域包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,以及LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含HC-CDR1:SEQ ID NO:112;HC-CDR2:SEQ ID NO:113;HC-CDR3:SEQ ID NO:114;并且其中LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:115;LC-CDR2:SEQ ID NO:116 (SAS);和LC-CDR3:SEQ ID NO:117。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括TROP2,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:187-192具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一

些实施方案中,肿瘤抗原包括TROP2,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:187-192的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原结合结构域包含根据SEQ ID NO:112-119的氨基酸序列。如权利要求416所述的方法,其中癌症是肺癌、乳腺癌(例如HER2+;ER/PR+;TNBC)、宫颈癌、卵巢癌、结肠直肠癌、胰腺癌、胃癌、三阴性乳腺癌(TNBC)、尿路上皮癌(UC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、小细胞肺癌(SCLC)、胃癌、食管癌、头颈癌、前列腺癌或子宫内膜癌。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括PSMA。在一些实施方案中,肿瘤抗原结合结构域包含根据SEQ ID NO:120-127的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括PSMA,并且肿瘤结合结构域包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,以及LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含HC-CDR1:SEQ ID NO:120;HC-CDR2:SEQ ID NO:121;HC-CDR3:SEQ ID NO:122;并且其中LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:123;LC-CDR2:SEQ ID NO:124(EA);和LC-CDR3:SEQ ID NO:125。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括PSMA,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:173和174具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括PSMA,并且T细胞衔接器包含根据SEQ IDNO:173和174的氨基酸序列。在一些实施方案中,癌症是癌症是肺癌、乳腺癌(例如HER2+;ER/PR+;TNBC)、宫颈癌、卵巢癌、结肠直肠癌、胰腺癌或胃癌。在一些实施方案中,T细胞衔接器分子在肿瘤微环境中被选择性激活。

[0011] 在一些实施方案中,T细胞衔接器是根据以下子式: $P_3-L_3-D_1-L_0-E_1$ (式IIa),其中 D_1 包含CD3结合结构域; E_1 包含肿瘤抗原结合结构域; L_0 包含连接 D_1 与 E_1 的接头; P_3 包含结合至 D_1 的肽,并且 L_3 包含连接 D_1 与 P_3 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物。

[0012] 在一些实施方案中,T细胞衔接器是根据以下子式: $D_1-L_0-E_1-L_4-P_4$ (式IIb),其中 D_1 包含CD3结合结构域; E_1 包含肿瘤抗原结合结构域; L_0 包含连接 D_1 与 E_1 的接头; P_4 包含结合至 E_1 的肽,并且 L_4 包含连接 E_1 与 P_4 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物。在一些实施方案中,T细胞衔接器是根据以下子式: $P_3-L_3-D_1-L_0-E_1-L_4-P_4$ (式IIc),其中 D_1 包含CD3结合结构域; E_1 包含肿瘤抗原结合结构域; L_0 包含连接 D_1 与 E_1 的接头; P_3 包含结合至 D_1 的肽,并且 L_3 包含连接 D_1 与 P_3 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物; P_4 包含结合至 E_1 的肽,并且 L_4 包含连接 E_1 与 P_4 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物。在一些实施方案中,T细胞衔接器包含 H_1 。在一些实施方案中, H_1 包含根据SEQ ID NO:54-57的序列。在一些实施方案中, H_1 包含单结构域抗体。在一些实施方案中,单结构域抗体包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中单结构域抗体的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:54、HC-CDR2:SEQ ID NO:55和HC-CDR3:SEQ ID NO:56。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 是具有至少5个至不多于50个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 是具有至少10个至不多于30个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 是具有至少10个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 是具有至少18个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 是具有至少26个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 包含包括 $(G_2S)_n$ 的式,其中n是1至3的整数(SEQ ID NO:228)。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 包含包括 $(G_2S)_n$ 的式,其中n是至少为1的整数。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 包含选自以下的式: $(G_2S)_n$ 、 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO:58)、 $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO:59)、 $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO:60)和 $(GSSGGS)_n$ (SEQ ID NO:61),其中n是至少为1的整数。在一些实施方案中,肿瘤特异性蛋白酶选自金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 包含尿激

酶可切割氨基酸序列、膜型丝氨酸蛋白酶可切割氨基酸序列或基质金属蛋白酶可切割氨基酸序列。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 包含根据SEQ ID NO:18-19、62-88的序列。在一些实施方案中, L_3 结合至 D_1 的N-末端。在一些实施方案中, L_3 结合至 D_1 的C-末端。在一些实施方案中, L_4 结合至 E_1 的N-末端。在一些实施方案中, L_4 结合至 E_1 的C-末端。在一些实施方案中, 当 L_3 被肿瘤特异性蛋白酶切割时, P_3 与 D_1 解结合, 从而使 D_1 暴露于CD3。在一些实施方案中, 当 L_4 被肿瘤特异性蛋白酶切割时, P_4 与 E_1 解结合, 从而使 E_1 暴露于肿瘤抗原。在一些实施方案中, P_3 削弱 D_1 与CD3的结合。在一些实施方案中, P_3 通过离子相互作用、静电相互作用、疏水相互作用、 π -堆积相互作用和H键相互作用或其组合结合至 D_1 。在一些实施方案中, P_3 在抗原结合位点或其附近结合至 D_1 。在一些实施方案中, 当 L_3 被肿瘤特异性蛋白酶切割时, P_3 与 D_1 解结合, 从而使 D_1 暴露于CD3。在一些实施方案中, P_3 与CD3具有小于70%的序列同一性。在一些实施方案中, P_3 与CD3具有小于85%的序列同一性。在一些实施方案中, P_3 与CD3具有小于90%的序列同一性。在一些实施方案中, P_3 与CD3具有小于95%的序列同一性。在一些实施方案中, P_3 与CD3具有小于98%的序列同一性。在一些实施方案中, P_3 与CD3具有小于99%的序列同一性。在一些实施方案中, P_3 包含根据SEQ ID NO:177-180的氨基酸序列。在一些实施方案中, P_3 包含与CD3共享小于10%的序列同一性的从头生成氨基酸序列。在一些实施方案中, P_4 削弱 E_1 与肿瘤抗原的结合。在一些实施方案中, P_4 通过离子相互作用、静电相互作用、疏水相互作用、 π -堆积相互作用和H键相互作用或其组合结合至 E_1 。在一些实施方案中, P_4 在抗原结合位点或其附近结合至 E_1 。在一些实施方案中, 当 L_4 被肿瘤特异性蛋白酶切割时, P_4 与 E_1 解结合, 从而使 E_1 暴露于肿瘤抗原。在一些实施方案中, P_4 与肿瘤抗原具有小于70%的序列同一性。在一些实施方案中, P_4 与肿瘤抗原具有小于80%的序列同一性。在一些实施方案中, P_4 与肿瘤抗原具有小于85%的序列同一性。在一些实施方案中, P_4 与肿瘤抗原具有小于90%的序列同一性。在一些实施方案中, P_4 与肿瘤抗原具有小于95%的序列同一性。在一些实施方案中, P_4 包含与肿瘤抗原共享小于10%的序列同一性的从头生成氨基酸序列。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含长度为至少5个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含长度为至少6个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含长度为至少10个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含长度为至少10个氨基酸并且长度为不多于20个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含长度为至少16个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含长度为不多于40个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含至少两个半胱氨酸氨基酸残基。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含环肽或线性肽。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含环肽。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含线性肽。在一些实施方案中, P_4 包含根据SEQ ID NO:185或186的氨基酸序列。在一些实施方案中, 肿瘤抗原包括EGFR, 并且T细胞衔接器包含SEQ ID NO:183和184的氨基酸序列。在一些实施方案中, P_4 包含根据SEQ ID NO:199-201的氨基酸序列。在一些实施方案中, 肿瘤抗原包括TROP2, 并且T细胞衔接器包含SEQ ID NO:193-198的氨基酸序列的任一者。在一些实施方案中, 肿瘤抗原包括PSMA, 并且T细胞衔接器包含SEQ ID NO:175和176的氨基酸序列。

附图说明

[0013] 本公开的新颖特征在所附权利要求中具体阐述。通过参考以下阐述了利用到本公开原理的说明性实施方案的详细说明和附图, 将获得对本公开特征和优点的更好的理解,

在附图中：

[0014] 图1A-1B说明了抗PDL1 x CD28多特异性抗体的示例性模式。图1A说明了抗体Fab-scFv形式的“Vh”形式。图1B说明了Fab-scFv抗体形式的“Vl”形式。

[0015] 图2说明了用于鉴定可以附接至抗PD-L1和抗CD28多特异性抗体的肽用于在肿瘤微环境中选择性激活的示意图。该示意图说明了定向进化和噬菌体展示技术,以鉴定通过抗原结合结构域阻断抗原识别的肽。

[0016] 图3A说明了通过ELISA测量的抗CD28 scFv与肽的结合。

[0017] 图3B说明了通过ELISA测量的Ab-12与肽的结合。

[0018] 图3C说明了通过ELISA测量的抗CD28 scFv与肽的结合。

[0019] 图3D说明了通过ELISA测量的Ab-12与肽的结合。

[0020] 图3E-3F说明了如通过ELISA所测量的,肽抑制抗CD28 scFv与CD28抗原结合。

[0021] 图3G说明了如通过ELISA所测量的,肽抑制Ab-12与CD28抗原结合。

[0022] 图4A-4D说明了通过Octet的抗CD28 scFv或Ab-12与肽-9和肽-12的动力学结合。

[0023] 图5A-5B说明了抗CD28 scFv与肽-9的Ala扫描肽的结合。

[0024] 图6A-6B说明了通过肽-9的Ala扫描肽的抗CD28 scFv的抑制。

[0025] 图7说明了使用WebLogo 3.7.4生成的优化的抗CD28 scFv肽-9序列的核心序列基序。

[0026] 图8A-8C说明了通过ELISA测量的抑制抗CD28 scFv与CD28抗原结合的肽。

[0027] 图9A-9C说明了通过ELISA的抑制Ab-12与CD28抗原结合的肽。

[0028] 图10A-10U说明了如通过Octet所测量的抗CD28 scFv与肽结合的动力学结合。

[0029] 图11A说明了如通过ELISA所测量的Ab-12和抗PD-L1 Fab 1 (SEQ ID NO:16和17)与PD-L1的结合。

[0030] 图11B说明了如通过ELISA所测量的Ab-12和抗CD28 scFv (SEQ ID NO:9)与CD28的结合。

[0031] 图11C说明了如通过ELISA所测量的Ab-12和Ab-13与PD-L1的结合。

[0032] 图11D说明了如通过ELISA所测量的Ab-12和Ab-13与CD28的结合。

[0033] 图11E说明了如通过ELISA所测量的Ab-1、Ab-2、Ab-3、Ab-4、Ab-5、Ab-6和Ab-12与PD-L1的结合。在一些情况下,抗体用MTSP1温育。

[0034] 图11F说明了如通过ELISA所测量的Ab-12、Ab-1、Ab-2、Ab-3、Ab-4、Ab-5、Ab-6和Ab-7与CD28的结合。在一些情况下,抗体用MTSP1温育。

[0035] 图11G说明了如通过ELISA所测量的Ab-12、Ab-1、Ab-2、Ab-5和Ab-6与PD-L1的结合。在一些情况下,抗体用MMP9温育。

[0036] 图11H说明了如通过ELISA所测量的Ab-12、Ab-1、Ab-2、Ab-5和Ab-6与CD28的结合。在一些情况下,抗体用MMP9温育。

[0037] 图11I说明了如通过ELISA所测量的Ab-12、Ab-8、Ab-9、Ab-10和Ab-11与CD28的结合。在一些情况下,抗体用MTSP1温育。

[0038] 图11J说明了如通过ELISA所测量的Ab-12、Ab-5、Ab-1和Ab-9与CD28的结合。

[0039] 图11K说明了如通过ELISA所测量的Ab-12、Ab-5、Ab-1和Ab-9与PD-L1的结合。

[0040] 图11L说明了如通过ELISA所测量的Ab-12、Ab-9和Ab-9+MTSP1与PD-L1的结合。

- [0041] 图11M说明了如通过ELISA所测量的Ab-12、Ab-9和Ab-9+MTSP1与CD28的结合。
- [0042] 图12A-12D说明了在用TROP2和PD-L1包被的靶包被的珠粒和PBMC共培养并施用靶向CD28和PD-L1的抗体构建体和抗TROP2x CD3 T细胞衔接器 (Ab-14) 之后,如通过细胞因子释放所测量的免疫细胞激活。
- [0043] 图12E说明了靶向CD28和PD-L1的抗体构建体的卡通构型,该构建体与靶向肿瘤相关抗原 (TAA) 诸如T细胞的TROP2和CD3的T细胞衔接器 (TCE) 组合施用。
- [0044] 图13A-13B说明了在靶向包被珠粒和人PBMC (图13A) 或食蟹猴PSMC (图13B) 共培养之后,如经由IL-2释放所测量的免疫细胞激活。珠粒用生物素化PD-L1和可溶性生物素化TROP2处理,并且靶向CD28和PD-L1的抗体构建体作为单剂或以组合施用。
- [0045] 图14A-14C说明了使用LNCaP PD-L1阳性肿瘤细胞系的体外PBMC激活测定的结果,在其中各种抗体构建体靶向CD28和PD-L1并在人PBMC存在下与Ab-15共施用。当靶向CD28和PD-L1的各种抗体构建体与抗PSMA x CD3 T细胞衔接器 (Ab-15) 组合时,通过细胞因子释放测量的体外PBMC激活是协同作用的。
- [0046] 图14D-14F说明了在人PBMC存在下使用LNCaP PDL1阳性肿瘤细胞系的体外肿瘤细胞杀伤测定的结果。当靶向CD28和PD-L1的各种抗体构建体与抗PSMA x CD3 T细胞衔接器 (Ab-15) 或掩蔽的PSMA x CD3 T细胞衔接器 (Ab-16) 组合时,体外肿瘤细胞杀伤增强。肿瘤细胞杀伤是掩蔽依赖性的,其中去除掩蔽的通过MTSP1的切割导致增强的肿瘤细胞杀伤。
- [0047] 图15A说明了靶向CD28和PD-L1的多特异性抗体的卡通构型,该多特异性抗体与靶向肿瘤相关抗原 (TAA) 诸如T细胞的TROP2和CD3的T细胞衔接器组合施用。
- [0048] 图15B说明了在PBMC与MDAMB231肿瘤细胞和指示的抗体共培养之后经由IL-2诱导所测量的免疫细胞激活。
- [0049] 图16A和16C说明了在PBMC与MDAMB231肿瘤细胞和指示的抗体共培养之后经由IL-2诱导所测量的免疫细胞激活。图16B说明了靶向CD28和PD-L1的多特异性抗体的卡通构型,该多特异性抗体与靶向肿瘤相关抗原 (TAA) 诸如T细胞的TROP2和CD3的T细胞衔接器组合施用。
- [0050] 图17说明了在单次IV推注注射之后Ab-12和Ab-9在食蟹猴中的药代动力学。
- [0051] 图18A-18C说明了在单次IV推注注射Ab-12和Ab-9之后在食蟹猴中的细胞因子释放。
- [0052] 图19A-19D说明了在单次IV推注注射Ab-12和Ab-9之后在食蟹猴中的血清肝酶。
- [0053] 图20A-20D说明了通过流式细胞术的Ab-12 (以Vh形式结合至PD-L1和CD28的未掩蔽抗体)、Ab-9 (以可切割的掩蔽Vh形式结合至PD-L1和CD28的抗体) 和Ab-19 (以不可切割的掩蔽Vh形式结合至PD-L1和CD28的抗体) 与人PBMC或食蟹猴PBMC的结合结果。
- [0054] 图21说明了Ab-12、Ab-9、帕博利珠单抗 (Pembrolizumab)、阿替利珠单抗 (Atezolizumab) 和纳武单抗 (Nivolumab) 的PD-1报道分子测定的结果。
- [0055] 图22说明了Ab-12、Ab-9、Ab-19和TGN1412的CD28报道分子测定的结果。
- [0056] 图23A说明了来自人PBMC和肿瘤细胞混合淋巴细胞反应的Ab-12、Ab-9和Ab-19的体外IL-2诱导的结果。还示出了使用MTSP1和MMP9的切割的Ab-9。图23B说明了Ab-12与帕博利珠单抗组合、Ab-9与帕博利珠单抗组合、MMP9切割的Ab-9与帕博利珠单抗组合,以及MTSP1切割的Ab-9与帕博利珠单抗组合的结果。

[0057] 图24说明了在表达PD-L1的MDA MB231肿瘤细胞系上的Ab-12、Ab-9和Ab-19与PD-L1结合的结果。

[0058] 图25A说明了靶向CD28和PD-L1的多特异性抗体的卡通构型,该多特异性抗体与靶向肿瘤相关抗原(TAA)诸如T细胞的EGFR和CD3的T细胞衔接器组合施用。

[0059] 图25B-25C说明了通过Ab-12、Ab-9、Ab-18单独或与1pM的Ab-20(EGFR T细胞衔接器)组合的CAL27肿瘤细胞的肿瘤细胞杀伤。图的结果也总结在表28中。

[0060] 图25D-25F说明了在滴定的Ab-12或滴定的Ab-12与补充人血清的培养基中的1pM的Ab-20组合存在下,来自人PBMC与Ca127肿瘤细胞共培养的细胞因子诱导(IFN γ 、TNF和IL-2)。

[0061] 图25G-25I说明了在滴定的Ab-9或滴定的Ab-9与1pM的Ab-20组合并且还有滴定的Ab-18或滴定的Ab-18与补充人血清的培养基中的1pM的Ab-20组合存在下,来自人PBMC与Ca127肿瘤细胞共培养的细胞因子诱导(IFN γ 、TNF和IL-2)。

[0062] 图26说明了在用Ab-22与Ab-18组合处理,或用Ab-21与Ab-17组合处理,或用Ab-17单独处理或用Ab-21单独处理之后,免疫功能低下小鼠中的MDAMB231的体内肿瘤生长动力学(平均肿瘤体积)。

[0063] 图27说明了以15mg/kg、5mg/kg和1mg/kg的Ab-9给药的非人灵长类的药代动力学。

[0064] 图28A-28E说明了在施用15mg/kg、5mg/kg和1mg/kg的Ab-9之后非人灵长类中的细胞因子释放(IFN γ 、TNF、IL-2、IL-6和IL-10)。

[0065] 图29A-29E说明了以15mg/kg、5mg/kg和1mg/kg的Ab-9给药的非人灵长类的临床化学结果(AST、ALT、TBIL、CRE、尿素)。

具体实施方式

[0066] 用于重定向T细胞以介导癌细胞杀伤的双特异性抗体在临床前和临床研究中都显示出前景。已经用单链可变片段(scFv)获得了有效的T细胞激活,特别是双特异性T细胞衔接器(BiTE)形式,在其中一种scFv靶向肿瘤细胞抗原,并且另一种scFv靶向参与T细胞激活的表位诸如CD3。BiTE的一个此类示例是靶向CD19和CD3的贝林妥欧单抗(blinatumomab),其已在欧洲和美国经批准用于治疗对化疗具有抗性的CD19+B细胞急性成淋巴细胞性白血病。尽管T细胞衔接器诸如贝林妥欧单抗取得了进展,但一些患者对治疗应答不佳,即使该患者表达肿瘤抗原,其原因尚不完全清楚。

[0067] 已经通过与靶向共抑制性免疫检查点程序性死亡配体1(PD-L1)和/或CD28的二抗共施用来探索用于增加T细胞衔接器的T细胞细胞毒性的策略。CD28是在T细胞上表达的蛋白,其提供T细胞激活和存活所需的共刺激信号。已知通过CD28与BiTE组合的刺激信号传导增加T细胞诱导的肿瘤细胞的细胞毒性。然而,在既往研究中获得T细胞介导的肿瘤细胞的细胞毒性主要需要存在具有肿瘤结合结构域的BiTE,诸如抗CD19抗体和CD3结合结构域,而以scFv-scFv形式单剂施用抗CD28和抗PD-L1被发现针对肿瘤细胞不诱导T细胞介导的细胞毒性。

[0068] T细胞的激活是高度调节的过程,其通常需要两个信号传导事件用于实现全功能性:第一信号在MHC-抗原复合物结合后启动,这有助于区分“自我”和“非自我”与T细胞受体(TCR)及通过激活共刺激受体的第二信号。尽管第一识别信号激活T细胞并触发T细胞介导

的经识别细胞的毒性,但如果T细胞没有收到第二共刺激信号,则其可以导致T细胞耐受,从而T细胞继续识别肿瘤抗原,但不针对肿瘤细胞产生免疫应答。第二共刺激信号阻止T细胞耐受,并进一步激活T细胞以增强T细胞对于靶向细胞的细胞毒性。

[0069] 如本文所描述的,包含CD28结合结构域和PD-L1结合结构域的多特异性抗体被设计为既作为PD-L1的拮抗剂又作为C28的条件性激动剂。尽管CD28激动作用已显示出一些临床前景,但由于CD28全身激活所引起的剂量限制性毒性,此方法所见的疗效受到限制。本文所描述的包含CD28结合结构域和PD-L1结合结构域的多特异性抗体被设计为仅在PD-L1存在下有条件地使CD28激动,PD-L1通常被肿瘤过度表达以避免T细胞介导的杀伤。此外,PD-L1的参与被设计为阻断PD-1结合并提供检查点抑制。此组合提供了增强抗肿瘤应答并限制CD28激动作用的全身毒性的作用机制。本文所描述的多特异性抗体的研究表明缺乏全身免疫系统激活,如缺乏细胞因子释放所证明的。尽管临床应答率前所未有,但大多数患者对靶向PD-1和PD-L1的疗法没有应答,这部分是因为T细胞需要共刺激用于实现全功能性。因此,仅检查点抑制可能不足以完全使免疫系统攻击肿瘤。如本文所描述的,通过添加多特异性抗体可以衍生进一步的益处。

[0070] 本文公开了特异性结合至PD-L1和CD28的抗体,其能够作为单剂或与T细胞衔接器组合诱导T细胞介导的肿瘤细胞的细胞毒性。值得注意的是,此类靶向PD-L1和CD28的抗体能够作为单剂诱导T细胞介导的肿瘤细胞的细胞毒性,即使不与特异性靶向肿瘤细胞抗原的第二剂一起施用。此类特异性结合至PD-L1和CD28的抗体不是scFv-scFv形式。

[0071] 本文公开了根据以下式的分离的多特异性抗体: $P_1-L_1-A_1-L-B$ (式I),其中 A_1 包含CD28结合结构域;B包含PD-L1结合结构域;L包含连接 A_1 与B的接头; P_1 包含结合至 A_1 的肽,并且 L_1 包含连接 A_1 与 P_1 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物,其中 P_1 包含根据SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。

[0072] 本文公开了包含以下式的分离的多特异性抗体: $P_1-L_1-A_1-L-B$ (式I),其中 A_1 包含CD28结合结构域;B包含PD-L1结合结构域;L包含连接 A_1 与B的接头; P_1 包含结合至 A_1 的肽,并且 L_1 包含连接 A_1 与 P_1 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物,其中 P_1 包含根据SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。

[0073] 本文公开了包含以下式的分离的多特异性抗体: $P_1-L_1-A_1-L-B$ (式I),其中 A_1 是CD28结合结构域;B是PD-L1结合结构域;L是连接 A_1 与B的接头; P_1 是结合至 A_1 的肽,并且 L_1 是连接 A_1 与 P_1 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物,其中 P_1 包含根据SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。

[0074] 本文公开了根据以下式的分离的多特异性抗体: $P_1-L_1-A_1-L-B$ (式I),其中 A_1 是CD28结合结构域;B是PD-L1结合结构域;L是连接 A_1 与B的接头; P_1 是结合至 A_1 的肽,并且 L_1 是连接 A_1 与 P_1 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物,其中 P_1 包含根据SEQ ID NO:24-

53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。

[0075] 在一些实施方案中,多特异性抗体是根据以下式: $P_1-L_1-A_1-L-B-L_2-P_2$ (式Ia),其中 P_2 包含结合至B的肽,并且 L_2 包含连接B与 P_2 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物。

[0076] 在一些实施方案中,多特异性抗体包含以下式: $P_1-L_1-A_1-L-B-L_2-P_2$ (式Ia),其中 P_2 包含结合至B的肽,并且 L_2 包含连接B与 P_2 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物。

[0077] 在一些实施方案中,多特异性抗体包含以下式: $P_1-L_1-A_1-L-B-L_2-P_2$ (式Ia),其中 P_2 是结合至B的肽,并且 L_2 是连接B与 P_2 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物。

[0078] 在一些实施方案中,多特异性抗体是根据以下式: $P_1-L_1-A_1-L-B-L_2-P_2$ (式Ia),其中 P_2 是结合至B的肽,并且 L_2 是连接B与 P_2 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物。

[0079] 虽然本文已经示出和描述了本公开的优选实施方案,但是对于本领域技术人员来说将显而易见的是,这些实施方案仅作为示例提供。在不脱离本公开的情况下,本领域技术人员现在将想到许多变化、改变和取代。应当理解,在实践本公开时可以采用本文所述的本公开实施方案的各种替代方案。所附权利要求旨在限定本公开的范围,且因此涵盖这些权利要求的范围内的方法和结构及其等同物。

[0080] 定义

[0081] 本文使用的术语仅用于描述特定情形的目的,而不旨在限制。如本文所使用,单数形式“一(a、an)”和“该(the)”也旨在包括复数形式,除非上下文另外清楚地指示。此外,就在具体实施方式和/或权利要求书中使用的术语“包括(including/includes)”、“具有(having/has)”、“有(with)”或其变体而言,这些术语旨在以类似于术语“包含”的方式为包含性的。

[0082] 术语“抗体”以最广泛的含义使用,覆盖完全组装的抗体;可结合抗原的抗体片段,例如Fab、F(ab')₂、Fv、单链抗体(scFv)、双抗体(diabodies)、抗体嵌合体、杂合抗体、双特异性抗体等。

[0083] 术语“互补决定区”或“CDR”是抗体可变区的区段,其在结构上与抗体所结合的表位互补,且比可变区的其余部分更可变。因此,CDR有时被称为高变区。可变区包含三个CDR。CDR肽可以通过构建编码感兴趣抗体的CDR的基因获得。例如,通过使用聚合酶链反应从产生抗体的细胞的RNA合成可变区来制备这些基因。参见,例如,Larrick等人,Methods:A Companion to Methods in Enzymology 2:106(1991);Monoclonal Antibodies: Production,Engineering and Clinical Application,Ritter等人(编著),第166-179页(Cambridge University Press 1995)中的Courtenay-Luck,“Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies”;和Monoclonal Antibodies:Principles and Applications,Birch等人,(编著),第137-185页(Wiley-Liss,Inc.1995)中的Ward等人,“Genetic Manipulation and Expression of Antibodies”。

[0084] 在一些情况下,抗体的CDR根据以下各项确定:(i)Kabat编号系统(Kabat等人(197)Ann.NY Acad.Sci.190:382-391和Kabat等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH出版物编号91-3242);或(ii)Chothia编号方案,其在本文中被称为“Chothia CDR”(参见,

例如, Chothia和Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917; Al-Lazikani等人, 1997, *J. Mol. Biol.*, 273:927-948; Chothia等人, 1992, *J. Mol. Biol.*, 227:799-817; Tramontano A等人, 1990, *J. Mol. Biol.* 215 (1):175-82; 及美国专利号7,709,226); 或 (iii) ImMunoGeneTics (IMGT) 编号系统, 例如, 如Lefranc, M.-P., 1999, *The Immunologist*, 7:132-136和Lefranc, M.-P.等人, 1999, *Nucleic Acids Res.*, 27:209-212 (“IMGT CDR”) 中所描述的; 或 (iv) MacCallum等人, 1996, *J. Mol. Biol.*, 262:732-745。另参见, 例如, Martin, A., “Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains”, *Antibody Engineering*, Kontermann和Diibel编辑, 第31章, 第422-439页, Springer-Verlag, Berlin (2001)。

[0085] 就Kabat编号系统而言, 抗体重链分子内的CDR通常存在于氨基酸位置31至35, 其可任选地在35 (在Kabat编号方案中称为35A和35B) (CDR1)、氨基酸位置50至65 (CDR2) 和氨基酸位置95至102 (CDR3) 之后包括一个或两个额外的氨基酸。使用Kabat编号系统, 抗体轻链分子内的CDR通常存在于氨基酸位置24至34 (CDR1)、氨基酸位置50至56 (CDR2) 和氨基酸位置89至97 (CDR3)。如本领域技术人员熟知的, 使用Kabat编号系统, 抗体可变结构域的实际线性氨基酸序列可以由于FR和/或CDR的缩短或加长而含有更少或更多的氨基酸, 因此氨基酸的Kabat编号不一定与其线性氨基酸编号相同。

[0086] 术语“Fab”是指含有轻链恒定结构域和重链第一恒定结构域 (CH1) 的蛋白。Fab片段与Fab'片段的区别之处在于在重链CH1结构域的羧基末端添加了几个残基, 包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH在本文中称为Fab', 其中恒定结构域的半胱氨酸残基带有游离巯基。通过还原F(ab')₂片段的重链二硫桥产生Fab'片段。抗体片段的其它化学偶联也是已知的。

[0087] “单链可变片段 (scFv)”是抗体的重链 (VH) 和轻链 (VL) 的可变区的融合蛋白, 用十至约25个氨基酸的短接头肽连接。为了灵活性, 接头通常富含甘氨酸, 而为了溶解性, 接头通常富含丝氨酸或苏氨酸, 且可以将VH的N-末端与VL的C-末端连接, 反之亦然。该蛋白保留了原始抗体的特异性, 尽管除去了恒定区并引入了接头。scFv抗体例如描述于Houston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-96) 中。此外, 抗体片段包含单链多肽, 其具有VH结构域的特征, 即能够与VL结构域组装在一起, 或者具有VL结构域的特征, 即能够与VH结构域组装在一起, 形成功能性抗原结合位点, 从而提供全长抗体的抗原结合特性。

[0088] 术语“多特异性”是指抗体能够特异性结合至两个或更多个不同的抗原决定簇, 例如两个或更多个结合位点, 每个结合位点由一对抗体重链可变结构域 (VH) 和抗体轻链可变结构域 (VL) 形成, 或在单结构域抗体的情况下, 单个可变结构域结合至不同的抗原。

[0089] 如本文所用, 关于序列的术语“百分比 (%) 氨基酸序列同一性”定义为, 在比对序列并引入空位 (如果必要) 以实现最大百分比序列同一性且不将任何保守取代视为序列同一性的一部分之后, 候选序列中与特定序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。用于确定百分比氨基酸序列同一性的比对可以本领域技术人员已知的各种方式实现, 例如, 使用可公开获得的计算机软件如EMBOSS MATCHER、EMBOSS WATER、EMBOSS STRETCHER、EMBOSS NEEDLE、EMBOSS LALIGN、BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megaalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数, 包括在被比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0090] 在使用ALIGN-2进行氨基酸序列比较的情况下,给定氨基酸序列A与、和、或针对给定氨基酸序列B的%氨基酸序列同一性(其可替代地表述为给定氨基酸序列A与、和、或针对给定氨基酸序列B具有或包含一定%氨基酸序列同一性)计算如下:100乘以分数X/Y,其中X是在A和B的程序比对中通过序列比对程序ALIGN-2评分为相同匹配的氨基酸残基的数目,且其中Y是B中氨基酸残基的总数。应当理解,当氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度时,A与B的%氨基酸序列同一性将不等于B与A的%氨基酸序列同一性。除非另有特别说明,否则本文所用的所有%氨基酸序列同一性值均如前一段所述使用ALIGN-2计算机程序获得。

[0091] 术语“个体”、“对象”和“患者”在本文中可互换使用,并且是指任何哺乳动物。在一些实施方案中,哺乳动物是人。在一些实施方案中,哺乳动物是非人的。这些术语均不要求或限于以医疗保健工作者(例如医生、注册护士、执业护士、医师助理、护理员或临终关怀工作者)的监督(例如持续或间歇性)为特征的情况。

[0092] 肽(P₁)或(P₂)

[0093] 在一些实施方案中,P₁包含根据SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的氨基酸序列。

[0094] 在一些实施方案中,P₁包含根据SEQ ID NO:42-53的任一者的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:42-53的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。在一些实施方案中,P₁包含根据SEQ ID NO:42-53的任一者的氨基酸序列。

[0095] 在一些实施方案中,P₁包含根据表20的氨基酸序列的任一者的氨基酸序列或相对于表20的氨基酸序列的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。在一些实施方案中,P₁包含根据表20的氨基酸序列的任一者的氨基酸序列。

[0096] 在一些实施方案中,P₁包含根据SEQ ID NO:128-147的任一者的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:128-147的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。在一些实施方案中,P₁包含根据SEQ ID NO:128-147的任一者的氨基酸序列。

[0097] 在一些实施方案中,P₁包含根据X₁-X₂-X₃-C-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-C-X₁₁-X₁₂的氨基酸序列,其中X₁选自M、I、L和V;X₂选自D、H、N、A、F、S、T、Y和V;X₃选自W、L和F;X₄选自P、A和L;X₅选自R、T、I、M、S、K、L、V、W、F、A、P和D;X₆选自E、D、Y、H、S、F、A、N、T、I、P和V;X₇选自L、M、R、S、Q和H;X₈选自W和Q;X₉选自H、N、D、A、S、Y、T、F、V、L和I;X₁₀选自E、V、L、D、Y、R、Q、H、F、K、A、M和N;X₁₁选自F、Y、L、W和V;并且X₁₂选自N、A、F、S、Y、H、D、T和L。在一些实施方案中,X₁选自M、I和L;X₂选自D、H、N和A;X₃是W;X₄是P;X₅选自R、T、I、M、S和K;X₆选自E、D、Y、H、S和F;X₇选自L、M和R;X₈是W;X₉选自H、N、D、A、S和V;X₁₀选自E、V、L、D和H;X₁₁选自F、Y和L;并且X₁₂选自N、A、F、S和Y。在一些实施方案中,X₁是M;X₂选自D和H;X₃是W;X₄是P;X₅选自R、T和I;X₆选自E、D和Y;X₇选自L、M和R;X₈是W;X₉选自H、N、D和V;X₁₀选自E、V、L、D和H;X₁₁是F;并且X₁₂选自N、A和F。

[0098] 在一些实施方案中,P₁包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:32具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。在一些实施方案中,P₁包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

[0099] 在一些实施方案中,P₁包含根据SEQ ID NO:138的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:138具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。在一些实施方案中,P₁包含根据SEQ ID NO:138的氨基酸序列。

[0100] 在一些实施方案中, P_1 削弱 A_1 与 CD28 的结合。在一些实施方案中, P_1 通过离子相互作用、静电相互作用、疏水相互作用、 π -堆积相互作用和 H 键相互作用或其组合结合至 A_1 。在一些实施方案中, P_1 在抗原结合位点或其附近结合至 A_1 。在一些实施方案中, 当 L_1 被肿瘤特异性蛋白酶切割时, P_1 与 A_1 解结合, 从而使 A_1 暴露于 CD28。在一些实施方案中, P_1 与 CD28 具有小于 75% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_1 与 CD28 具有小于 80% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_1 与 CD28 具有小于 85% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_1 与 CD28 具有小于 90% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_1 与 CD28 具有小于 95% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_1 包含与 CD28 共享小于 10% 的序列同一性的从头生成氨基酸序列。

[0101] 在一些实施方案中, P_2 削弱 B 与 PD-L1 的结合。在一些实施方案中, P_2 通过离子相互作用、静电相互作用、疏水相互作用、 π -堆积相互作用和 H 键相互作用或其组合结合至 B。

[0102] 在一些实施方案中, P_2 在抗原结合位点或其附近结合至 B。在一些实施方案中, 当 L_2 被肿瘤特异性蛋白酶切割时, P_2 与 B 解结合, 从而使 B 暴露于 PD-L1。在一些实施方案中, P_2 与 PD-L1 具有小于 70% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_2 与 PD-L1 具有小于 75% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_2 与 PD-L1 具有小于 80% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_2 与 PD-L1 具有小于 85% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_2 与 PD-L1 具有小于 90% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_2 与 PD-L1 具有小于 95% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_2 包含与 PD-L1 共享小于 10% 的序列同一性的从头生成氨基酸序列。在一些实施方案中, P_2 包含长度为至少 5 个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_2 包含长度为至少 6 个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_2 包含长度为至少 10 个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_2 包含长度为至少 10 个氨基酸并且长度为不多于 20 个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_2 包含长度为至少 16 个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_2 包含长度为不多于 40 个氨基酸的肽序列。

[0103] 在一些实施方案中, P_1 或 P_2 包含至少两个半胱氨酸氨基酸残基。在一些实施方案中, P_1 或 P_2 包含环肽或线性肽。在一些实施方案中, P_1 或 P_2 包含环肽。在一些实施方案中, P_1 或 P_2 包含线性肽。在一些实施方案中, P_1 或 P_2 包含经修饰氨基酸或非天然氨基酸或经修饰非天然氨基酸, 或其组合。在一些实施方案中, P_1 或 P_2 不包含白蛋白或白蛋白片段。在一些实施方案中, P_1 或 P_2 不包含白蛋白结合结构域。

[0104] 表 1. P_1 序列

[0105]

构建体描述	氨基酸序列(N至C)	SEQ ID NO:
肽-1	YWYCSPSIVRCVLV	24
肽-2	LICKSGSILILCAQ	25
肽-3	SPCGLFQWMEICEF	26
肽-4	SFCGLFLDLWICEF	27
肽-5	DNCYVIWGFQWQCR	28
肽-6	VNCMRVHRTLWCV	29
肽-7	FCTPREWSFLNFVC	30
肽-8	CFAYLWIDSWIRVC	31
肽-9	MDWCPRERWVDCFF	32
肽-10	GQHCATSMWRYCMF	33
肽-11	WICDKSGSIMLCRA	34
肽-12	GYCHYWGDMVMWCG	35
肽-13	DNCHYIWGFQWQCG	36
肽-14	IDCIMVHMVKPWCFC	37
肽-15	NCQPWYWNMFAFGC	38
肽-16	NCQPWYWNMIAFGC	39
肽-17	GCFTWSQRTFPFTC	40
肽-18	CFYAEYYDQVYSFC	41
肽-19	ADWCPRERWVDCFF	42
肽-20	MAWCPRERWVDCFF	43
肽-21	MDACPRERWVDCFF	44
肽-22	MDWCARERWVDCFF	45
肽-23	MDWCPAERWVDCFF	46
肽-24	MDWCPRARWVDCFF	47
肽-25	MDWCPREAWVDCFF	48
肽-26	MDWCPRERA VDCFF	49
肽-27	MDWCPRERWADCFF	50
肽-28	MDWCPRERWVACFF	51
肽-29	MDWCPRERWVDCAF	52
肽-30	MDWCPRERWVDCFA	53
肽-31	MDWCPIDLWNECFE	128
肽-32	MDWCPIHLWHVCFN	129
肽-33	MDWCPIYLWSECFN	130

[0106]	肽-34	MNWC PKDIWYLCFN	131
	肽-35	MDWC PLHMWHECF S	132
	肽-36	MDWC PLYLWNECF N	133
	肽-37	MDWC PRDLWDLCF A	134
	肽-38	MDWC PRDLWHECF A	135
	肽-39	MDWC PRDLWHLCF S	136
	肽-40	MDWC PRDLWSECF F	137
	肽-41	MDWC PRDLWVHCF A	138
	肽-42	MDWC PRDMWDECF A	139
	肽-43	MDWC PRDMWSECF A	140
	肽-44	MDWC PRDMWSVCF S	141
	肽-45	MDWC PRFMWDECF N	142
	肽-46	MDWC PRHMWNYCF A	143
	肽-47	MDWC PRSLWHECF A	144
	肽-48	MDWC PRYLWHVCF A	145
	肽-49	MHWCPVDLWYLCYN	146
	肽-50	MDWC PVHLWSVCF A	147
	肽-51	MDWC PRERWVDCF F	148

[0107] 联接部分 (L_1 或 L_2)

[0108] 在一些实施方案中, L_1 或 L_2 是具有至少5个至不多于50个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_1 或 L_2 是具有至少10个至不多于30个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_1 或 L_2 是具有至少10个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_1 或 L_2 是具有至少18个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_1 或 L_2 是具有至少26个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_1 或 L_2 包含包括 $(G_2S)_n$ 的式, 其中 n 是1至3的整数 (SEQ ID NO:228)。在一些实施方案中, L_1 或 L_2 包含包括 $(G_2S)_n$ 的式, 其中 n 是至少为1的整数。在一些实施方案中, L_1 或 L_2 包含选自以下的式: $(G_2S)_n$ 、 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO:58)、 $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO:59)、 $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO:60) 和 $(GSSGGS)_n$ (SEQ ID NO:61), 其中 n 是至少为1的整数。在一些实施方案中, 肿瘤特异性蛋白酶选自金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶。在一些实施方案中, L_1 或 L_2 包含尿激酶可切割氨基酸序列、膜型丝氨酸蛋白酶可切割氨基酸序列或基质金属蛋白酶可切割氨基酸序列。在一些实施方案中, L_1 或 L_2 包含根据 SEQ ID NO:18-19、62-88 的序列。在一些实施方案中, L_1 结合至 A_1 的 N-末端。在一些实施方案中, L_1 结合至 A_1 的 C-末端。在一些实施方案中, L_2 结合至 B 的 N-末端。在一些实施方案中, L_2 结合至 B 的 C-末端。

[0109] 表2. L_1 或 L_2

构建体描述	氨基酸序列(N至C)	SEQ ID NO:
接头 1	GGGGSGGGSGGGGS	18

[0111]

接头 2	GGGGS	19
接头 3	GGGSGGGGS	62
可切割接头	GGGSGGGLSGRSDAGSPLGL AGSGGGS	63
接头 4	GGGSLSGRSDNHGSSGT	64
接头 5	GGGSSGGSGGSGLSGRSDNH GSSGT	65
接头 6	ASGRSDNH	66
接头 7	LAGRSDNH	67
接头 8	ISSGLASGRSDNH	68
接头 9	ISSGLLAGRSDNH	69
接头 10	LSGRSDNH	70
接头 11	ISSGLLSGRSDNP	71
接头 12	ISSGLLSGRSDNH	72
接头 13	LSGRSDNHSPLGLAGS	73
接头 14	SPLGLAGLSGRSDNH	74
接头 15	SPLGLSGRSDNH	75
接头 16	LAGRSDNHSPLGLAGS	76
接头 17	LSGRSDNHVPLSLKMG	77
接头 18	LSGRSDNHVPLSLSMG	78
接头 19	GSSGGSGGSGGSGISSGLLSGR SDNHGSSGT	79
接头 20	GSSGGSGGSGGSGISSGLLSGRSD NHGGGS	80
接头 21	ASGRSDNH	81
接头 22	LAGRSDNH	82
接头 23	ISSGLASGRSDNH	83
接头 24	LSGRSDAG	84
接头 25	ISSGLLSGRSDAG	85
接头 26	AAGLLAPPGLSGRSDAG	86
接头 27	SPLGLSGRSDAG	87
接头 28	LSGRSDAGSPLGLAG	88

[0112] CD28结合结构域(A₁)、PD-L1结合结构域(B)和接头(L)

[0113] 在一些实施方案中,CD28结合结构域包含单链可变片段、单结构域抗体、Fab或Fab'。在一些实施方案中,CD28结合结构域包含单链可变片段。在一些实施方案中,CD28结

合结构域包含单结构域抗体。在一些实施方案中,CD28结合结构域包含Fab或Fab'。在一些实施方案中,PD-L1结合结构域包含单链可变片段、单结构域抗体、Fab或Fab'。在一些实施方案中,PD-L1结合结构域包含Fab或Fab'。在一些实施方案中,PD-L1结合结构域包含Fab或Fab'并且CD28结合结构域包含单链可变片段。在一些实施方案中,包含Fab或Fab'的PD-L1结合结构域包含Fab重链多肽和Fab轻链多肽,该Fab重链多肽包含Fab重链可变结构域,该Fab轻链多肽包含Fab轻链可变结构域。在一些实施方案中,包含单链可变片段的CD28结合结构域包含scFv重链可变结构域和scFv轻链可变结构域。在一些实施方案中,接头连接A₁的C-末端与B的N-末端。在一些实施方案中,接头连接A₁的N-末端与B的C-末端。在一些实施方案中,接头连接A₁的C-末端与Fab重链多肽的N-末端。在一些实施方案中,接头连接A₁的N-末端与Fab重链多肽的C-末端。在一些实施方案中,接头连接A₁的C-末端与Fab轻链多肽的N-末端。在一些实施方案中,接头连接A₁的N-末端与Fab轻链多肽的C-末端。在一些实施方案中,接头连接Fab轻链多肽与scFv轻链可变结构域。在一些实施方案中,接头连接Fab轻链多肽与scFv重链可变结构域。在一些实施方案中,接头连接Fab重链多肽与scFv轻链可变结构域。在一些实施方案中,接头连接Fab重链多肽与scFv重链可变结构域。在一些实施方案中,接头连接Fab轻链多肽与scFv轻链可变结构域的N-末端。在一些实施方案中,接头连接Fab轻链多肽与scFv轻链可变结构域的C-末端。在一些实施方案中,接头连接Fab轻链多肽与scFv重链可变结构域的N-末端。在一些实施方案中,接头连接Fab轻链多肽与scFv重链可变结构域的C-末端。在一些实施方案中,接头连接Fab重链多肽与scFv轻链可变结构域的N-末端。在一些实施方案中,接头连接Fab重链多肽与scFv轻链可变结构域的C-末端。在一些实施方案中,接头连接Fab重链多肽与scFv重链可变结构域的N-末端。在一些实施方案中,接头连接Fab重链多肽与scFv重链可变结构域的C-末端。

[0114] 在一些实施方案中,接头的长度为至少5个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为不多于30个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为至少5个氨基酸并且不多于30个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为5个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为15个氨基酸。在一些实施方案中,接头包含(G₂S)_n、(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:58)、(GGGS)_n(SEQ ID NO:59)、(GGGGS)_n(SEQ ID NO:60)和(GSSGGS)_n(SEQ ID NO:61),其中n是至少为1的整数。在一些实施方案中,L包含包括(G₂S)_n的式,其中n是1至3的整数(SEQ ID NO:228)。在一些实施方案中,L包含SEQ ID NO:18(GGGGSGGGGSGGGGS)或SEQ ID NO:19(GGGGS)的氨基酸序列。

[0115] 表3. 接头序列

构建体描述	氨基酸序列(N至C)	SEQ ID NO:
接头 1	GGGGSGGGGSGGGGS	18
接头 2	GGGGS	19

[0117] 在一些实施方案中,scFv重链可变结构域包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中scFv重链可变结构域的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:1;HC-CDR2:SEQ ID NO:2;HC-CDR3:SEQ ID NO:3,并且其中所述CDR包含所述HC-CDR1、HC-CDR2或HC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修饰。在一些实施方案中,scFv轻链可变结构域包含互补决定区(CDR):LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中scFv轻链可变结构

域的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:4;LC-CDR2:SEQ ID NO:5(KA);和LC-CDR3:SEQ ID NO:6,并且其中CDR包含所述LC-CDR1、LC-CDR2或LC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修饰。在一些实施方案中,A₁包含互补决定区(CDR):LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中A₁的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:4;LC-CDR2:SEQ ID NO:5(KA);和LC-CDR3:SEQ ID NO:6;其中A₁包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中A₁的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:1;HC-CDR2:SEQ ID NO:2;HC-CDR3:SEQ ID NO:3。

[0118] 表4. 如IMGT定义所确定的抗CD28重链多肽互补决定区(CDR)

构建体描述	氨基酸序列(N至C)	SEQ ID NO:
[0119] 抗 CD28: HC: CDR1	GYTFTSY	1
抗 CD28: HC: CDR2	IYPGNVNT	2
抗 CD28: HC: CDR3	TRSHYGLDWNFDV	3

[0120] 表5. 如IMGT定义所确定的抗CD28轻链多肽互补决定区(CDR)

构建体描述	氨基酸序列(N至C)	SEQ ID NO:
[0121] 抗 CD28: LC: CDR1	QNIYVW	4
抗 CD28: LC: CDR2	KA	5
抗 CD28: LC: CDR3	QQGQTYPYT	6

[0122] 在一些实施方案中,Fab重链可变结构域包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中Fab重链可变结构域的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:10;HC-CDR2:SEQ ID NO:11;HC-CDR3:SEQ ID NO:12;并且其中所述CDR包含所述HC-CDR1、HC-CDR2或HC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修饰。在一些实施方案中,Fab轻链可变结构域包含互补决定区(CDR):LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中Fab轻链可变结构域的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:13;LC-CDR2:SEQ ID NO:14(DA);和LC-CDR3:SEQ ID NO:15,并且其中CDR包含所述LC-CDR1、LC-CDR2或LC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修饰。在一些实施方案中,B包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中B的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:10;HC-CDR2:SEQ ID NO:11;HC-CDR3:SEQ ID NO:12;并且其中B包含互补决定区(CDR):LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中B的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:13;LC-CDR2:SEQ ID NO:14(DA);和LC-CDR3:SEQ ID NO:15。

[0123] 表6. 如IMGT定义所确定的抗PD-L1重链多肽互补决定区(CDR)

构建体描述	氨基酸序列(N至C)	SEQ ID NO:
[0124] 抗 PD-L1 Fab 1: HC: CDR1	GDTFSTYA	10
抗 PD-L1 Fab 1: HC: CDR2	IIPIFGKA	11
抗 PD-L1 Fab 1: HC: CDR3	ARKFHFVSGSPFGMDV	12

[0125] 表7. 如IMGT定义所确定的抗PD-L1轻链多肽互补决定区 (CDR)

构建体描述	氨基酸序列(N 至 C)	SEQ ID NO:
抗 PD-L1 Fab 1: LC: CDR1	QSVSSY	13
抗 PD-L1 Fab 1: LC: CDR2	DA	14
抗 PD-L1 Fab 1: LC: CDR3	QQRSNWPT	15

[0127] 在一些实施方案中, scFv重链可变结构域包含与根据SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, scFv重链可变结构域包含SEQ ID NO:7的至少75个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中, scFv重链可变结构域包含SEQ ID NO:7的至少110个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中, scFv重链可变结构域包含SEQ ID NO:7的至少110个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID NO:7的至少110个连续氨基酸残基具有至少80%序列同一性。在一些实施方案中, scFv重链可变结构域包含根据SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

[0128] 在一些实施方案中, scFv轻链可变结构域包含与根据SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, scFv轻链可变结构域包含SEQ ID NO:8的至少75个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中, scFv轻链可变结构域包含SEQ ID NO:8的至少100个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中, scFv轻链可变结构域包含SEQ ID NO:8的至少100个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID NO:8的至少100个连续氨基酸残基具有至少80%序列同一性。在一些实施方案中, scFv轻链可变结构域包含根据SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

[0129] 在一些实施方案中, scFv包含与根据SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, scFv包含SEQ ID NO:9的至少175个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中, scFv包含SEQ ID NO:9的至少210个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中, scFv包含SEQ ID NO:9的至少210个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID NO:9的至少210个连续氨基酸残基具有至少80%序列同一性。在一些实施方案中, scFv包含根据SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0130] 表8. 抗CD28轻链可变结构域、重链可变结构域序列和全长序列。CDR序列带有下划线, 并使用IMGT定义确定。

[0131]

构建体描述	氨基酸序列(N至C)	SEQ ID NO:
抗 CD28: HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKAS <u>GYTF</u> TSYYIHWVRQAP GQGLEWIGSI <u>Y</u> PGNVNTNYNE KFKDRATLTVDTISISTAYMEL SRLRSDDTAVYFC <u>TRSHYGLD</u> <u>WNFDV</u> WGQGTITVTVSS	7
抗 CD28: LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT CHAS <u>QNIYV</u> WLNWYQQKPG KAPKLLIY <u>K</u> ASNLHTGVPSRFS GSGSGTDFLTITSSLPEDFAT YYC <u>QOGQTY</u> PYTFGGGKVEIK	8
抗 CD28 scFv (VH-接头 1-VL)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKAS <u>GYTF</u> TSYYIHWVRQAP GQGLEWIGSI <u>Y</u> PGNVNTNYNE KFKDRATLTVDTISISTAYMEL SRLRSDDTAVYFC <u>TRSHYGLD</u> <u>WNFDV</u> WGQGTITVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSDIQMTQSPS SLSASVGDRVITITCHAS <u>QNIYV</u> <u>WLNWYQQKPGKAPKLLIYKA</u> SNLHTGVPSRFSGSGSGTDFLT TITSSLPEDFATYYC <u>QOGQTY</u> <u>PYTFGGGKVEIK</u>	9

[0132] 在一些实施方案中,Fab重链多肽包含与根据SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fab重链多肽包含SEQ ID NO:17的至少175个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fab重链多肽包含SEQ ID NO:17的至少215个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fab重链多肽包含SEQ ID NO:17的至少215个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID NO:17的至少215个连续氨基酸残基具有至少80%序列同一性。在一些实施方案中,Fab重链多肽包含根据SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0133] 在一些实施方案中,Fab轻链多肽包含与根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fab轻链多肽包含SEQ ID NO:16的至少175个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fab轻链多肽包含SEQ ID NO:16的至少200个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fab轻链多肽包含SEQ ID NO:16的至少200个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID NO:16的至少200个连续氨基酸残基具有至少80%序列同一性。在一些实施方案中,Fab轻链多肽包含根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0134] 表9.抗PD-L1 Fab轻链多肽和Fab重链多肽序列。CDR序列带有下划线,并使用IMGT定义确定。

构建体描述	氨基酸序列(N至C)	SEQ ID NO:
抗 PD-L1 Fab 1: LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYDASNRAITGIPARFSGSGGTDFLTITISSLEPEDFAVY YCQQRSNWPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	16
抗 PD-L1 Fab 1: HC	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKTSGDTFSTYAIWVRQAP GQGLEWMGGIPIFGKAHYAQKFGGRVTITADESTSTAYMEL SSLRSEDTAVYFCARKFHFVSGSPFGMDVWGQGTITVTVSSA STKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NPKPSNTKVDKKEPKSC	17

[0136] 在一些实施方案中,接头连接Fab重链多肽与scFv轻链可变结构域的C-末端,并且其中Fab轻链多肽包含与根据SEQ ID NO:20的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列,并且连接至scFv轻链可变结构域的C-末端的Fab重链多肽的氨基酸序列包含与根据SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,接头连接Fab重链多肽与scFv轻链可变结构域的C-末端,并且其中Fab轻链多肽包含根据SEQ ID NO:20的氨基酸序列,并且连接至scFv轻链可变结构域的C-末端的Fab重链多肽的氨基酸序列包含根据SEQ ID NO:21的氨基酸序列。在一些实施方案中,接头连接Fab轻链多肽与scFv轻链可变结构域的C-末端,并且其中Fab重链多肽包含与根据SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列,并且连接至scFv轻链可变结构域的C-末端的Fab轻链多肽的氨基酸序列包含与根据SEQ ID NO:22的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,接头连接Fab轻链多肽与scFv轻链可变结构域的C-末端,并且其中Fab重链多肽包含根据SEQ ID NO:23的氨基酸序列,并且连接至scFv轻链可变结构域的C-末端的Fab轻链多肽的氨基酸序列包含根据SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

[0137] 表10. 结合至CD28和PD-L1的抗体

[0138]

构建体描述	氨基酸序列(N至C)	SEQ ID NO:
Ab-12 LC PDL1xCD28 未掩蔽的(Vh)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA RFGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQ RSNWPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSST LTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	20
Ab-12 HC PDL1xCD28 未掩蔽的(Vh) 抗 CD28 scFv -接头 2-抗 PDL1 Fab HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FTSYIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPGNVN TNYNEKFKDRATLTVDTISSTAYMELSRL RSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQG TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ SPSSLSASVGDRTITCHASQNIYVWLNW YQQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGQTY PYTFGGGTKVEIKGGGGSQVQLVQSGAE VKKPGSSVKVCKTSGDTFSTYAISWVRQ APGQGLEWMGGIPIFGKAHYAQKFQGRV TITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCAR KFHFVSGSPFGMDVWGQGTITVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKEPKSC	21
Ab-13 LC PDL1xCD28 未掩蔽的(VL)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FTSYIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPGNVN TNYNEKFKDRATLTVDTISSTAYMELSRL RSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQG TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ	22

[0139]

	SPSSLSASVGDVRTITCHASQNIYVWLNW YQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGQTY PYTFGGGKVEIKGGGGSEIVLTQSPATLS LSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPG QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDF TLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	
Ab-13 HC PDL1xCD28 未掩蔽的(VL)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSCKTSGDT FSTYAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGK AHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSL RSEDTAVYFCARKFHFVSGSPFGMDVWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	23
JXA2618 LC PDL1xCD28 掩蔽的; 不可 切割的 (Vh)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSS YLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQ RSNWPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	210
JXA2618 HC PDL1xCD28 掩蔽的; 不可 切割的 (Vh)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSAASGFTF SKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRD TLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSL RPEDTAVYYCTIGGSLVSSQGLVTVSSG GGGSGGGSGGMDWCPRDLVWVHCFAAGG GSGGGSGGGSGGASSGAGGSGGGGQVQ LVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTFTS YYIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPGNVNTN YNEKFKDRATLTVDTISISTAYMELSLRSL DDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGT TVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPS SLSASVGDVRTITCHASQNIYVWLNWYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGQTYPY TFGGGKVEIKGGGGSQVQLVQSGAEV KPGSSVKVCSCKTSGDTFSTYAIWVRQAP GQGLEWMGGIPIFGKAHYAQKFQGRVTI TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARK FHFVSGSPFGMDVWGQTTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSC	211
JXA3777 LC PDL1xCD28 掩蔽的; 不可 切割的 (Vh)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSS YLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQ RSNWPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	212

[0140]

	LTLISKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	
JXA3777 HC PDL1xCD28 掩蔽的; 不可 切割的 (Vh)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTF YTAVMGWVRQAPGKGLEWVAAIRWTAL TTSYADSVKGRFTISRDKAKTTLYLQMNS LRPEDTAVYYCAARGTLGLFTTADSYDY WGQGTLLVTVSSGGGSGGGSGGMDWCP RDLWVHCFAGGGGSGGGSGGGSGGASS GAGGSGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWI GSIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDSIST AYMELSRLSDDTAVYFCTRSHYGLDWN FDVWGQGTITVTVSSGGGSGGGSGGG GSDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCHASQN IYVWLNWYQKPKGKAPKLLIYKASNLHT GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKGGGGSQV QLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKTSQDTFST YAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGKAHY AQKFGQGRVITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYFCARKFHFVSGSPFGMDVWGQGT TVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKEPKSC	213

[0141] 半衰期延长分子 (H_1)

[0142] 在一些实施方案中,多特异性抗体进一步包含半衰期延长分子 (H_1)。在一些实施方案中, H_1 连接至 P_1 。在一些实施方案中, H_1 连接至 P_2 。在一些实施方案中, H_1 不阻断 A_1 结合至CD28。在一些实施方案中, H_1 不阻断B结合至PD-L1。 H_1 包含连接 H_1 与 P_1 或 H_1 与 P_2 的联接部分 (L_5)。在一些实施方案中,半衰期延长分子 (H_1) 对PD-L1不具有结合亲和力。在一些实施方案中,半衰期延长分子 (H_1) 对CD28不具有结合亲和力。在一些实施方案中,半衰期延长分子 (H_1) 不保护多特异性抗体免受CD28的影响。在一些实施方案中, H_1 包含根据SEQ ID NO:54-57的序列。在一些实施方案中, H_1 包含具有重复序列基序的氨基酸序列。在一些实施方案中, H_1 包含具有高度有序二级结构的氨基酸序列。在一些实施方案中, H_1 包含聚合物。在一些实施方案中,聚合物是聚乙二醇 (PEG)。在一些实施方案中, H_1 包含白蛋白。在一些实施方案中, H_1 包含Fc结构域。在一些实施方案中,白蛋白是血清白蛋白。在一些实施方案中,白蛋白是人血清白蛋白。在一些实施方案中, H_1 包含多肽、配体或小分子。在一些实施方案中,多肽、配体或小分子结合血清蛋白或其片段、循环免疫球蛋白或其片段、或CD35/CR1。在一些实施方案中,血清蛋白包括甲状腺素结合蛋白、转甲状腺素蛋白、1-酸性糖蛋白、转铁蛋白、转铁蛋白受体或其转铁蛋白结合部分、纤维蛋白原或白蛋白。在一些实施方案中,循环免疫球蛋白分子包含IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、sIgA、IgM或IgD。在一些实施方案中,血清蛋白是白蛋白。在一些实施方案中,多肽是抗体。在一些实施方案中,抗体包括单结构域抗体、单链可变片段、Fab或Fab'。在一些实施方案中,单结构域抗体包括结合至白蛋白的单结构域抗体。在一些实施方案中,单结构域抗体是人抗体或人源化抗体。在一些实施方案中,单结构域抗体选自645gH1gL1、645dsgH5gL4、23-13-A01-sc02、A10m3或其片段、DOM7r-31、DOM7h-11-15、A1b-1、A1b-8、A1b-23、10G、10E和SA21。在一些实施方案中,单结构域抗体包含互补决定区 (CDR) :HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中单结构域抗体的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包

含:HC-CDR1:SEQ ID NO:54、HC-CDR2:SEQ ID NO:55和HC-CDR3:SEQ ID NO:56;并且其中CDR包含HC-CDR1、HC-CDR2或HC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修饰。在一些实施方案中, H_1 包含根据SEQ ID NO:57的氨基酸序列。在一些实施方案中, H_1 包含与SEQ ID NO:57具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, H_1 包含与SEQ ID NO:57具有至少85%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, H_1 包含与SEQ ID NO:57具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, H_1 包含与SEQ ID NO:57具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, H_1 包含与SEQ ID NO:57具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, H_1 包含经修饰氨基酸或非天然氨基酸或经修饰非天然氨基酸,或其组合。在一些实施方案中,经修饰氨基酸或经修饰非天然氨基酸包含翻译后修饰。在一些实施方案中, H_1 包含连接 H_1 与 P_1 或 P_2 的联接部分(L_5)。在一些实施方案中, L_5 是具有至少5个至不多于50个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_5 是具有至少10个至不多于30个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_5 是具有至少10个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_5 是具有至少18个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_5 是具有至少26个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_5 包含选自以下的式: $(G_2S)_n$ 、 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO:58)、 $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO:59)、 $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO:60)和 $(GSSGGS)_n$ (SEQ ID NO:61),其中n是至少为1的整数。

[0143] 在一些实施方案中,单结构域抗体包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中单结构域抗体的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:204、HC-CDR2:SEQ ID NO:205和HC-CDR3:SEQ ID NO:206;并且其中CDR包含HC-CDR1、HC-CDR2或HC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修饰。在一些实施方案中, H_1 包含根据SEQ ID NO:207的氨基酸序列。在一些实施方案中, H_1 包含与SEQ ID NO:207具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, H_1 包含与SEQ ID NO:207具有至少85%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, H_1 包含与SEQ ID NO:207具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, H_1 包含与SEQ ID NO:207具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, H_1 包含与SEQ ID NO:207具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, H_1 包含经修饰氨基酸或非天然氨基酸或经修饰非天然氨基酸,或其组合。在一些实施方案中,经修饰氨基酸或经修饰非天然氨基酸包含翻译后修饰。在一些实施方案中, H_1 包含连接 H_1 与 P_1 或 P_2 的联接部分(L_5)。在一些实施方案中, L_5 是具有至少5个至不多于50个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_5 是具有至少10个至不多于30个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_5 是具有至少10个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_5 是具有至少18个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_5 是具有至少26个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_5 包含选自以下的式: $(G_2S)_n$ 、 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO:58)、 $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO:59)、 $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO:60)和 $(GSSGGS)_n$ (SEQ ID NO:61),其中n是至少为1的整数。

[0144] 表11. H_1 序列

构建体描述	氨基酸序列(N至C)	SEQ ID NO:
抗白蛋白: CDR-H1	GSTFYTAV	54
抗白蛋白: CDR-H2	IRWTALTT	55
抗白蛋白: CDR-H3	AARGTLGLFTTADSYDY	56
抗白蛋白 (HE-1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GSTF YTAV MGWVRQAPGKGLEWVA AIRWTA L TTSYADSVKGRFTISRDKAKTTLYLQM NSLRPEDITAVYY CAARGTLGLFTTADSY DY WGQGLVTVSS	57
抗白蛋白: CDR-H1	GFTFSKFG	204
抗白蛋白: CDR-H2	ISGSGRDT	205
抗白蛋白: CDR-H3	TIGGSLSV	206
抗白蛋白 (HE-3)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS GFT FSKFG MSWVRQAPGKGLEWVSS ISGSGR D ILYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMN SLRPEDITAVYY CTIGGSLSV SSQGLVTV SS	207

[0146] 结合至CD28和PD-L1的肿瘤激活多特异性抗体

[0147] 在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149-170的任一者具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149-170的任一者具有至少85%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149-170的任一者具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149-170的任一者具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149-170的任一者具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含SEQ ID NO:149-170的任一者的氨基酸序列。

[0148] 在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149和150具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149和150具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0149] 在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:151和152具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:151和152具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0150] 在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:153和154具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:153和154具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0151] 在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:155和156具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:155和156具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0152] 在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:157和158具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:157和158具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0153] 在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:159和160具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:159和160具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0154] 在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:161和162具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:161和162具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0155] 在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:163和164具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:163和164具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0156] 在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:165和166具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:165和166具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0157] 在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:167和168具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:167和168具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0158] 在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:169和170具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:169和170具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0159] 在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:208和209具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:208和209具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0160] 表12. 结合至CD28和PD-L1的肿瘤激活多特异性抗体序列

[0161]

构建体描述	氨基酸序列(N至C)	SEQ ID NO:
Ab-1 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSS YLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA RFGSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQQ RSNWPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	149
Ab-1 HC	EVQLVESGGGLVQPGLSLRSLCAASGFTF SKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRD TLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSL RPEDTAVYYCTIGGSLVSSQGLTVTVSSG GGGSGGGSGGMDWCPRRRWDCFFGGG GSGGGLSGRSDAGSPLGLAGSGGGGQVQ LVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTS YYIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPGNVNTN YNEKFKDRATLTVDTISITAYMELSRRLRS DDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGT TVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPS SLSASVGDRTITCHASQNIYVWLNWYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSG SGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQGQTYPY TFGGGTKVEIKGGGGGQVQLVQSGAEVK KPGSSVKVSKTSGDTFSTYAISWVRQAP GQGLEWMGGIPIFGKAHYAQKFGGRVTI TADSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARK FHFVSGSPFGMDVWGQGTITVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKCKVEPKSC	150

[0162]

Ab-2 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFLTISLLEPEDFAVYYCQQ RSNWPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	151
Ab-2 HC	EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTF SKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRD TLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSL RPEDTAVYYCTIGGSLVSSQGLTVTVSSG GGGSGGGSGGMDWCPREWRVDCFFGSS GGSAAGLLAPPGGLSGRSDAGGGGSQVQ LVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YYIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPGNVNTN YNEKFKDRATLTVDTSISTAYMELSLRLS DDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGT VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPS SLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSG SGTDFLTISLQPEDFATYYCQQGQTYPY TFGGGTKVEIKGGGGSQVQLVQSGAEVK KPGSSVKVCKTSGDTFSTYAIWVRQAP GQGLEWMGGIPIFGKAHYAQKFQGRVTI TADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARK FHFVSGSPFGMDVWGQGTITVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTK VDKCKVEPKSC	152
Ab-3 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFLTISLLEPEDFAVYYCQQ RSNWPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	153
Ab-3 HC	EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTF SKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRD TLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSL RPEDTAVYYCTIGGSLVSSQGLTVTVSSG GGGSGGGSGGMDWCPREWRVDCFFGGG GSGGGSGGGSGGASSGAGGSGGGGSQVQ LVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YYIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPGNVNTN YNEKFKDRATLTVDTSISTAYMELSLRLS DDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGT VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPS SLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSG SGTDFLTISLQPEDFATYYCQQGQTYPY TFGGGTKVEIKGGGGSQVQLVQSGAEVK KPGSSVKVCKTSGDTFSTYAIWVRQAP GQGLEWMGGIPIFGKAHYAQKFQGRVTI	154

[0163]

	TADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARK HFVSGSPFGMDVWGQTTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTK VDKKVEPKSC	
Ab-4 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA RFGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQ RSNWPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	155
Ab-4 HC	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTF SKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRD TLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSL RPEDTAVYYCTIGGSLVSSQGLTVTVSSG GGGSGGGSGGGSGSSGGASSGGSGGGG SGGGSGGGSGGASSGAGGSGGGSQVQL VQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSY YIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPGNVNTNY NEKFKDRATLTVDTISISTAYMELSLRSD DTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQTTV TVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSS LSASVGDRTITCHASQNIYVWLNWYQQ KPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGQTYPYT FGGGTKVEIKGGGGSQVQLVQSGAEVKK PGSSVKVSKTSGDTFSTYAIWVRQAPG QGLEWMGGIPIFGKAHYAQKFQGRVTIT ADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARKF HFVSGSPFGMDVWGQTTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKV DKKVEPKSC	156
Ab-5 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA RFGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQ RSNWPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	157
Ab-5 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGSTF YTAVMGWVRQAPGKGLEWVAAIRWTAL TTSYADSVKGRFTISRDKGAKTTLYLQMNS LRPEDTAVYYCAARGTLGLFTTADSYDY WGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGMDWCP RERWVDCFFGGGGSGGGSLGRSDAGSPL GLAGSGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVK VSKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWI GSIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTISIST AYMELSLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWN FDVWGQTTVTVSSGGGGSGGGSGGG	158

	<p>GSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQN IYVWLNWYQQKPGKAPKLLIYKASNLHT GVPSRFSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQGQTYPYTFGGGKVEIKGGGGSQV QLVQSGAEVKKPGSSVKVCKTSGDTFST YAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGKAHY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYFCARKFHFVSGSPFGMDVWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSC</p>	
Ab-6 LC	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQ RSNWPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC</p>	159
Ab-6 HC	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGSTF YTAVMGWVRQAPGKGLEWVAAIRWTAL TTSYADSVKGRFTISRDKGAKTTLYLQMN LRPEDTAVYYCAARGTLGLFTTADSYDY WGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGMDWCP RERWVDCFFGSSGSAAGLLAPPGLSGR SDAGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWIG SIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSSIS YMELSRRLSDDTAVYFCTRSYGLDWNF DVWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNI YVWLNWYQQKPGKAPKLLIYKASNLHTG VPSRFSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQGQTYPYTFGGGKVEIKGGGGSQVQ LVQSGAEVKKPGSSVKVCKTSGDTFSTY AISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGKAHYA QKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDT AVYFCARKFHFVSGSPFGMDVWGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSC</p>	160
Ab-7 LC	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQ RSNWPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC</p>	161
Ab-7 HC	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGSTF YTAVMGWVRQAPGKGLEWVAAIRWTAL TTSYADSVKGRFTISRDKGAKTTLYLQMN LRPEDTAVYYCAARGTLGLFTTADSYDY WGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGMDWCP</p>	162

[0164]

[0165]

	RERWVDCFFGGGSGGGSGGGSGGASS GAGGSGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWI GSIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTISIST AYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWN FDVWGQGTTVTVSSGGGSGGGSGGG GSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCHASQN IYVWLNWYQKPKGAPKLLIYKASNLHT GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATY YCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKGGGGSQV QLVQSGAEVKKPGSSVKVCKTSGDTFST YAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGKAHY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYFCARKFHFVSGSPFGMDVWGQGT TVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	
Ab-8 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSS YLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQ RSNWPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSST LTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	163
Ab-8 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTF YTAVMGWVRQAPGKGLEWVAAIRWTAL TTSYADSVKGRFTISRDKAKTTLYLQMNS LRPEDTAVYYCAARGTLGLFTTADSYDY WGQGTTLTVTVSSGGGSGGGSGGMDWCPI YLWSECFNGSSGGSGGLSGRSDAGSPLGL AGSGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWIGS IYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTISISTA YMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNF DVWGQGTTVTVSSGGGSGGGSGGGSGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCHASQNI YVWLNWYQKPKGAPKLLIYKASNLHTG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYY CQQGQTYPYTFGGGTKVEIKGGGGSQVQ LVQSGAEVKKPGSSVKVCKTSGDTFSTY AISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGKAHYA QKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDT AVYFCARKFHFVSGSPFGMDVWGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSC	164
Ab-9 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSS YLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQ RSNWPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSST	165

	LTLISKADYEHKVKYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	
Ab-9 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTF YTAVMGWVRQAPGKGLEWVAAIRWTAL TTSYADSVKGRFTISRDKGAKTTLYLQMNS LRPEDTAVYYCAARGTLGLFTTADSYDY WGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGMDWCP RDLWVHCFAGSSGGSGGLSGRSDAGSPL GLAGSGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVK VSKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWI GSIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTISST AYMELSRLSDDTAVYFCTRSHYGLDWN FDVWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGG GSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCHASQN IYVWLNWYQKPKGKAPKLLIYKASNLHT GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQGQTYPYTFGGGKVEIKGGGGSQV QLVQSGAEVKKPGSSVKVSKTSGDTFST YAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGKAHY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYFCARKFHFVSGSPFGMDVWGQGT TVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKEPKSC	166
Ab-10 LC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTF YTAVMGWVRQAPGKGLEWVAAIRWTAL TTSYADSVKGRFTISRDKGAKTTLYLQMNS LRPEDTAVYYCAARGTLGLFTTADSYDY WGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGMDWCPI YLWSECFNGSSGGSGGLSGRSDAGSPLGL AGSGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWIGS IYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTISSTA YMELSRLSDDTAVYFCTRSHYGLDWNF DVWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCHASQNI YVWLNWYQKPKGKAPKLLIYKASNLHTG VPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQGQTYPYTFGGGKVEIKGGGGSEIVL TQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLIYDASNRATGIPARFS GSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRN WPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTL KADYEHKVKYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC	167
Ab-10 HC	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKTSGDT FSTYAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGK AHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSL RSEDVAVYFCARKFHFVSGSPFGMDVWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQ VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC	168

[0166]

[0167]

Ab-11 LC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTF YTAVMGWVRQAPGKGLEWVAAIRWTAL TTSYADSVKGRFTISRDKGAKTTLYLQMNS LRPETA VYYCAARGTLGLFTTADSYDY WGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGMDWCP RDLWVHCFAGSSGGSGGLSGRSDAGSPL GLAGSGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWI GSIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTISIST AYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWN FDVWGQGT TVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCHASQN IYVWLNWYQQKPGKAPKLLIYKASNLHT GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQGQTYPYTFGGGKVEIKGGGGSEIV LTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQR SNWPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC	169
Ab-11 HC	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKTSKDT FSTYAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGK AHYAQKFGQGRVTITADESTSTAYMELSSL RSED TAVYFCARKFHFVSGSPFGMDVWG QGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC	170
JXA 2616 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA RFGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQ RSNWP TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTL LTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	208
JXA 2616 HC	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTF SKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRD TLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSL RPETA VYYCTIGGSLSVSSQGLTVTVSSG GGGSGGGSGGMDWCP RDLWVHCFAGSS GGSGGLSGRSDAGSPLGLAGSGGGSQVQ LVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YYIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPGNVNTN YNEKFKDRATLTVDTISISTAYMELSRLRS DDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGT TVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPS SLSASVGDRTITCHASQNIYVWLNWYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGQTYPY TFGGGKVEIKGGGGSGVQLVQSGAEVK KPGSSVKVSCKTSKDTFSTYAIWVRQAP GQGLEWMGGIPIFGKAHYAQKFGQGRVTI	209

[0168]	TADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARK FHFVSGSPFGMDVWGQTTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSC	
--------	---	--

[0169] 编码结合至CD28和PD-L1的肿瘤激活多特异性抗体的多核苷酸

[0170] 在一些实施方案中,本文公开了分离的重组核酸分子,其编码本文所公开的多特异性抗体。

[0171] 在一些实施方案中,本文公开了分离的重组核酸分子,其编码根据以下式的分离的多特异性抗体: $P_1-L_1-A_1-L-B$ (式I),其中 A_1 包含CD28结合结构域;B包含PD-L1结合结构域;L包含连接 A_1 与B的接头; P_1 包含结合至 A_1 的肽,并且 L_1 包含连接 A_1 与 P_1 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物,其中 P_1 包含根据SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。

[0172] 在一些实施方案中,本文公开了分离的重组核酸分子,其编码包含以下式的分离的多特异性抗体: $P_1-L_1-A_1-L-B$ (式I),其中 A_1 包含CD28结合结构域;B包含PD-L1结合结构域;L包含连接 A_1 与B的接头; P_1 包含结合至 A_1 的肽,并且 L_1 包含连接 A_1 与 P_1 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物,其中 P_1 包含根据SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。

[0173] 在一些实施方案中,本文公开了分离的重组核酸分子,其编码包含以下式的分离的多特异性抗体: $P_1-L_1-A_1-L-B$ (式I),其中 A_1 是CD28结合结构域;B是PD-L1结合结构域;L是连接 A_1 与B的接头; P_1 是结合至 A_1 的肽,并且 L_1 是连接 A_1 与 P_1 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物,其中 P_1 包含根据SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。

[0174] 在一些实施方案中,本文公开了分离的重组核酸分子,其编码根据以下式的分离的多特异性抗体: $P_1-L_1-A_1-L-B$ (式I),其中 A_1 是CD28结合结构域;B是PD-L1结合结构域;L是连接 A_1 与B的接头; P_1 是结合至 A_1 的肽,并且 L_1 是连接 A_1 与 P_1 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物,其中 P_1 包含根据SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。

[0175] 在一些实施方案中,是分离的重组核酸分子,其编码根据以下式的分离的多特异性抗体: $P_1-L_1-A_1-L-B-L_2-P_2$ (式Ia),其中 P_2 包含结合至B的肽,并且 L_2 包含连接B与 P_2 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物。

[0176] 在一些实施方案中,是分离的重组核酸分子,其编码包含以下式的分离的多特异性抗体: $P_1-L_1-A_1-L-B-L_2-P_2$ (式Ia),其中 P_2 包含结合至B的肽,并且 L_2 包含连接B与 P_2 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物。

[0177] 在一些实施方案中,是分离的重组核酸分子,其编码包含以下式的分离的多特异

性抗体： $P_1-L_1-A_1-L-B-L_2-P_2$ (式Ia)，其中 P_2 是结合至B的肽，并且 L_2 是连接B与 P_2 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物。

[0178] 在一些实施方案中，是分离的重组核酸分子，其编码根据以下式的分离的多特异性抗体： $P_1-L_1-A_1-L-B-L_2-P_2$ (式Ia)，其中 P_2 是结合至B的肽，并且 L_2 是连接B与 P_2 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物。

[0179] 在一些实施方案中，本文公开了分离的重组核酸分子，其编码分离的多特异性抗体，该分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149-170的任一者具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，是分离的重组核酸分子，其编码分离的多特异性抗体，该分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149-170的任一者具有至少85%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，是分离的重组核酸分子，其编码分离的多特异性抗体，该分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149-170的任一者具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，是分离的重组核酸分子，其编码分离的多特异性抗体，该分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149-170的任一者具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，是分离的重组核酸分子，其编码分离的多特异性抗体，该分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149-170的任一者具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，是分离的重组核酸分子，其编码分离的多特异性抗体，该分离的多特异性抗体包含SEQ ID NO:149-170的任一者的氨基酸序列。

[0180] 在一些实施方案中，分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149和150具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，是分离的重组核酸分子，其编码分离的多特异性抗体，该分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149和150具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0181] 在一些实施方案中，是分离的重组核酸分子，其编码分离的多特异性抗体，该分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:151和152具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，是分离的重组核酸分子，其编码分离的多特异性抗体，该分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:151和152具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0182] 在一些实施方案中，是分离的重组核酸分子，其编码分离的多特异性抗体，该分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:153和154具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，是分离的重组核酸分子，其编码分离的多特异性抗体，该分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:153和154具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0183] 在一些实施方案中，是分离的重组核酸分子，其编码分离的多特异性抗体，该分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:155和156具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，是分离的重组核酸分子，其编码分离的多特异性抗体，该分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:155和156具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0184] 在一些实施方案中，是分离的重组核酸分子，其编码分离的多特异性抗体，该分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:157和158具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，是分离的重组核酸分子，其编码分离的多特异性抗体，该分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:157和158具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0185] 在一些实施方案中，是分离的重组核酸分子，其编码分离的多特异性抗体，该分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:159和160具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一

些实施方案中,是分离的重组核酸分子,其编码分离的多特异性抗体,该分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:159和160具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0186] 在一些实施方案中,是分离的重组核酸分子,其编码分离的多特异性抗体,该分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:161和162具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,是分离的重组核酸分子,其编码分离的多特异性抗体,该分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:161和162具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0187] 在一些实施方案中,是分离的重组核酸分子,其编码分离的多特异性抗体,该分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:163和164具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,是分离的重组核酸分子,其编码分离的多特异性抗体,该分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:163和164具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0188] 在一些实施方案中,是分离的重组核酸分子,其编码分离的多特异性抗体,该分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:165和166具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,是分离的重组核酸分子,其编码分离的多特异性抗体,该分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:165和166具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0189] 在一些实施方案中,是分离的重组核酸分子,其编码分离的多特异性抗体,该分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:167和168具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,是分离的重组核酸分子,其编码分离的多特异性抗体,该分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:167和168具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0190] 在一些实施方案中,是分离的重组核酸分子,其编码分离的多特异性抗体,该分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:169和170具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,是分离的重组核酸分子,其编码分离的多特异性抗体,该分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:169和170具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0191] 在一些实施方案中,是分离的重组核酸分子,其编码分离的多特异性抗体,该分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:208和209具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,是分离的重组核酸分子,其编码分离的多特异性抗体,该分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:208和209具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0192] 药物组合物

[0193] 在一些实施方案中,本文公开了药物组合物,其包含:(a)如本文所公开的多特异性抗体;和(b)药学上可接受的赋形剂。

[0194] 在一些实施方案中,药物组合物包含(a)根据以下式的分离的多特异性抗体: $P_1-L_1-A_1-L-B$ (式I),其中 A_1 包含CD28结合结构域;B包含PD-L1结合结构域;L包含连接 A_1 与B的接头; P_1 包含结合至 A_1 的肽,并且 L_1 包含连接 A_1 与 P_1 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物,其中 P_1 包含根据SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列;和(b)药学上可接受的赋形剂。

[0195] 在一些实施方案中,药物组合物包含(a)包含以下式的分离的多特异性抗体: $P_1-L_1-A_1-L-B$ (式I),其中 A_1 包含CD28结合结构域;B包含PD-L1结合结构域;L包含连接 A_1 与B的接头; P_1 包含结合至 A_1 的肽,并且 L_1 包含连接 A_1 与 P_1 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物,其中 P_1 包含根据SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者

的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列;和(b)药学上可接受的赋形剂。

[0196] 在一些实施方案中,药物组合物包含(a)包含以下式的分离的多特异性抗体: $P_1-L_1-A_1-L-B$ (式I),其中 A_1 是CD28结合结构域;B是PD-L1结合结构域;L是连接 A_1 与B的接头; P_1 是结合至 A_1 的肽,并且 L_1 是连接 A_1 与 P_1 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物,其中 P_1 包含根据SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列;和(b)药学上可接受的赋形剂。

[0197] 在一些实施方案中,药物组合物包含(a)根据以下式的分离的多特异性抗体: $P_1-L_1-A_1-L-B$ (式I),其中 A_1 是CD28结合结构域;B是PD-L1结合结构域;L是连接 A_1 与B的接头; P_1 是结合至 A_1 的肽,并且 L_1 是连接 A_1 与 P_1 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物,其中 P_1 包含根据SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列;和(b)药学上可接受的赋形剂。

[0198] 在一些实施方案中,药物组合物包含(a)根据以下式的分离的多特异性抗体: $P_1-L_1-A_1-L-B-L_2-P_2$ (式Ia),其中 P_2 包含结合至B的肽,并且 L_2 包含连接B与 P_2 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物;和(b)药学上可接受的赋形剂。

[0199] 在一些实施方案中,药物组合物包含(a)包含以下式的分离的多特异性抗体: $P_1-L_1-A_1-L-B-L_2-P_2$ (式Ia),其中 P_2 包含结合至B的肽,并且 L_2 包含连接B与 P_2 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物;和(b)药学上可接受的赋形剂。

[0200] 在一些实施方案中,药物组合物包含(a)包含以下式的分离的多特异性抗体: $P_1-L_1-A_1-L-B-L_2-P_2$ (式Ia),其中 P_2 是结合至B的肽,并且 L_2 是连接B与 P_2 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物;和(b)药学上可接受的赋形剂。

[0201] 在一些实施方案中,药物组合物包含(a)根据以下式的分离的多特异性抗体: $P_1-L_1-A_1-L-B-L_2-P_2$ (式Ia),其中 P_2 是结合至B的肽,并且 L_2 是连接B与 P_2 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物;和(b)药学上可接受的赋形剂。

[0202] 在一些实施方案中,药物组合物包含(a)分离的多特异性抗体,其包含与SEQ ID NO:149-170的任一者具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;和(b)药学上可接受的赋形剂。

[0203] 在一些实施方案中,药物组合物包含(a)分离的多特异性抗体,其包含与SEQ ID NO:149-170的任一者具有至少85%序列同一性的氨基酸序列;和(b)药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,药物组合物包含(a)分离的多特异性抗体,其包含与SEQ ID NO:149-170的任一者具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;和(b)药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,药物组合物包含(a)分离的多特异性抗体,其包含与SEQ ID NO:149-170的任一者具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;和(b)药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,药物组合物包含(a)分离的多特异性抗体,其包含与SEQ ID NO:149-170的任一者具有至少99%序列同一性的氨基酸序列;和(b)药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,药物组合物包含(a)分离的多特异性抗体,其包含SEQ ID NO:149-170的任一者的氨基酸序列;和(b)药学上可接受的赋形剂。

有至少99%序列同一性的氨基酸序列;和(b)药学上可接受的赋形剂。

[0214] 在一些实施方案中,药物组合物包含(a)分离的多特异性抗体,其包含与SEQ ID NO:169和170具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;和(b)药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,药物组合物包含(a)分离的多特异性抗体,其包含与SEQ ID NO:169和170具有至少99%序列同一性的氨基酸序列;和(b)药学上可接受的赋形剂。

[0215] 在一些实施方案中,药物组合物包含(a)分离的多特异性抗体,其包含与SEQ ID NO:208和209具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;和(b)药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,药物组合物包含(a)分离的多特异性抗体,其包含与SEQ ID NO:208和209具有至少99%序列同一性的氨基酸序列;和(b)药学上可接受的赋形剂。

[0216] 本文公开了药物组合物,其包含:(a)本文所描述的分离的多特异性抗体、(b)抗癌疗法和(c)药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,抗癌疗法包括小分子、基于细胞的治疗法或基于抗体的疗法。

[0217] 在一些实施方案中,基于抗体的疗法是T细胞衔接器。在一些实施方案中,T细胞衔接器包含根据以下的式: $D_1-L_0-E_1$ (式II),其中 D_1 包含结合至效应细胞抗原的效应细胞结合结构域, E_1 包含结合至肿瘤抗原的肿瘤抗原结合结构域,并且 L_0 包含连接 D_1 与 E_1 的接头。在一些实施方案中, D_1 包含单链可变片段、单结构域抗体、Fab片段或Fab'。在一些实施方案中, D_1 包含单链可变片段。在一些实施方案中, E_1 包含单链可变片段、单结构域抗体、Fab片段或Fab'。在一些实施方案中, E_1 包含Fab片段。在一些实施方案中,效应细胞抗原包含CD3。在一些实施方案中,效应细胞结合结构域包含选自以下的互补决定区(CDR):莫罗单抗-CD3 (OKT3)、奥昔组单抗 (TRX4)、替利组单抗 (MGA031)、维西珠单抗 (Nuvion)、SP34、X35、VIT3、BMA030 (BW264/56)、CLB-T3/3、CRIS7、YTH12.5、F111-409、CLB-T3.4.2、TR-66、WT32、SPv-T3b、11D8、XIII-141、XIII-46、XIII-87、12F6、T3/RW2-8C8、T3/RW2-4B6、OKT3D、M-T301、SMC2、F101.01、UCHT-1、WT-31、15865、15865v12、15865v16和15865v19。在一些实施方案中,效应细胞结合结构域包含根据SEQ ID NO:89-101的氨基酸序列。

[0218] 表13.效应细胞结合结构域氨基酸序列

	构建体描述	氨基酸序列(N至C)	SEQ ID NO:
[0219]	SP34.185 CD3: HC: CDR1	GFTFNKYA	89
	SP34.185 CD3: HC: CDR2	IRSKYNNYAT	90
	SP34.185 CD3: HC: CDR3	VRHGNFGNSYISYWAY	91

[0220]

SP34.185 CD3: LC: CDR1	TGAVTSGNY	92
SP34.185 CD3: LC: CDR2	GTK	93
SP34.185 CD3: LC: CDR3	VLWYSNRWV	94
SP34.194 CD3: HC: CDR1	GFTFNTYA	95
SP34.194 CD3: HC: CDR2	IRSKYNNYAT	90
SP34.194 CD3: HC: CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	96
SP34.194 CD3: LC: CDR1	TGAVTTSNY	97
SP34.194 CD3: LC: CDR2	GT	98
SP34.194 CD3: LC: CDR3	ALWYSNLWV	99
SP34.185 scFv (VH - 接头 1 - VL)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAAS GFTFNKY AMNWVRQA PGKGLEWVAR IRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYC VRH GNFNSYISYWAY WGQTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSQT VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSG STGAVTSGNY PNWVQQKPGQ APRGLIG GTK FLAPGTPARFSG SLLGGKAALTLSGVQPEDEAE YYC VLWYSNRWV FGGGTKL TVL	100
SP34.194 scFv (VL - 接头 1 - VH)	QTVVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CRS STGAVTTSNY ANWVQQK PGQAPRGLIG GT NKRAPGTPA RFSGSLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYC ALWYSNLWV FGG GTKLTVLGGGGSGGGGSGGG GSEVQLVESGGGLVQPGGSLK LSCAAS GFTFNTY AMNWVRQ APKGLEWVAR IRSKYNNYA TY YADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYC VR HGNFGNSYVSWFAY WGQGT LTVSS	101
SP34.185 肽掩蔽物 (P ₃)	GSQCLGPEWEVCPY	177
SP34.185 肽掩蔽物 (P ₃)	VYCGPEFDESVCMM	178
SP34.185 肽掩蔽物 (P ₃)	VYCGPEFDESVCMA	179
SP34.185 肽掩蔽物 (P ₃)	YLCGPDGDETLACY	180

[0221] 在一些实施方案中,肿瘤抗原包括表皮生长因子受体(EGFR)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)或肿瘤相关钙信号转导器2(在本文中称为TROP2)。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括EGFR。在一些实施方案中,肿瘤抗原结合结构域包含根据SEQ ID NO:102-111的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括EGFR,并且肿瘤结合结构域包含互补决定区(CDR): HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,以及LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:105;HC-CDR2:SEQ IDNO:106;HC-CDR3:SEQ ID NO:107;并且其中LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:102;LC-CDR2:SEQ ID NO:103(YAS);和LC-CDR3:SEQ ID NO:104。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括EGFR,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:181和182具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括EGFR,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:181和182的氨基酸序

列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括EGFR,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:214和215具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括EGFR,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:214和215的氨基酸序列。

[0222] 表14. 肿瘤抗原结合结构域氨基酸序列——抗EGFR

构建体描述	氨基酸序列(N 至 C)	SEQ ID NO:
EGFR: LC: CDR1	QSIGTN	102
EGFR: LC: CDR2	YAS	103
EGFR: LC: CDR3	QQNNNWPTT	104
EGFR: HC: CDR1	GFSLTNYG	105
EGFR: HC: CDR2	IWSGGNT	106
EGFR: HC: CDR3	ARALTYDYEFAY	107
EGFR Fab LC v1	QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQ SIGTNIHWYQ QRTNGSPRLLIK YAS ESISGIPSRFSGSGSGTDFLSINSVES EDIADYYC QQNNNWPTT FGAGTKL ELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVCCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	108
EGFR Fab LC v2	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQ SIGTNIHWYQ QRTNGSPRLLIK YAS ESISGIPSRFSGSGSGTDFLSINSVES EDIADYYC QQNNNWPTT FGAGTKL ELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVCCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	109
EGFR Fab HC	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVS GFSLTNYG VHWVVRQSPGKGLEWL GVI IWSGGNT DYNTPTFSRLSINKDN SKSQVFFKMNSLQSNDAIYYC ARA LTYDYEFAY WGQGLVTVSAAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC	110
EGFR Fab HC (N88Q)	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVS GFSLTNYG VHWVVRQSPGKGLEWL GVI IWSGGNT DYNTPTFSRLSINKDN SKSQVFFKMNSLQSDTAIYYC ARA LTYDYEFAY WGQGLVTVSAAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF	111

[0223]

[0224]

	PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	
EGFR TCE-1 LC,	QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQ SIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASE SISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESE DIADYQCQNNNNWPTTFGAGTKLE LKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	181
EGFR TCE-1 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAAS GFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGL VTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAV TSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGT KFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTL GVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFG GGTKLTVLGGGGSQVQLKQSGPGL VQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHW VRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYN TPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQ SQDTAIYYCARALTYDYEFAYWG QGTLLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSC	182
EGFR TCE-2 LC JXA2212	QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQ SIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASE SISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESE DIADYQCQNNNNWPTTFGAGTKLE LKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	214
EGFR TCE-2 HC JXA2212	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAAS GFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGL VTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAV TSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGT KFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTL GVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFG GGTKLTVLGGGGSQVQLKQSGPGL VQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHW VRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYN TPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQ SQDTAIYYCARALTYDYEFAYWG QGTLLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKS	215

[0225]

	TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSC	
EGFR TRACT _r -1 LC,	GGPCRSHIDVAKPICVGGGGSGGLS GRSDAGSPLGLAGSGSDILLTQSP VILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIH WYQQRNTNGSPRLLIKYASESISGIPS RFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADY YCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSSTLSSTLTLKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC	183
EGFR TRACT _r -1 HC,	EVQLVESGGGLVQPGLSLRSLCAAS GSTFYTAVMGWVRQAPGKGLEWV AAIRWTALTTSYADSVKGRFTISR GAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCA ARGTLGLFTTADSYDYWGQGLVT VSSGGGGSGGGSGGVYCGPEFDES VTCMGGGGSGGGSLGRSDAGSPLG LAGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGL SLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQA PGKLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLL KTEDTAVYYCVRHGFNFGNSYISYW AYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSG GGGSQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLT CGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQA PRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLLGG KAALTLGSGVQPEDEAEYCVLWYS NRWVFGGGTKLTVLGGGGSQVQL KQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLT NYGVHWVRQSPGKLEWLGVIWS GGNTDYNTPTFSTRSINKDNSKSQV FFKMNSLQSNDAIYYCARALTY DYEFAYWGQGLVTVSAASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVL QSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	184
EGFR TRACT _r -1 肽 掩蔽物 (P ₄)	PCRSHIDVAKPICV	185
EGFR TRACT _r -2 肽 掩蔽物 (P ₄),	PCLFHFDPAKPICS	186

[0226] 在一些实施方案中,肿瘤抗原包括TROP2。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括TROP2,并且肿瘤结合结构域包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,以及LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含HC-CDR1:SEQ ID NO:112; HC-CDR2:SEQ ID NO:113;HC-CDR3:SEQ ID NO:114;并且其中LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:115;LC-CDR2:SEQ ID NO:116(SAS);和LC-CDR3:SEQ ID NO:117。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括TROP2,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:187-192具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括TROP2,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:187-192的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿

瘤抗原结合结构域包含根据SEQ ID NO:112-119的氨基酸序列。

[0227] 表15. 肿瘤抗原结合结构域氨基酸序列-抗TROP2

构建体描述	氨基酸序列(N至C)	SEQ ID NO:
TROP2: HC: CDR1	GYTFTNYG	112
TROP2: HC: CDR2	INTYTGEP	113
TROP2: HC: CDR3	ARGGFGSSYWYFDV	114
TROP2: LC: CDR1	QDVSI A	115
TROP2: LC: CDR2	SAS	116
TROP2: LC: CDR3	QQHYITPLT	117
TROP2 Fab LC	DIQLTQSPSSLSASVGD RVSITC KAS QDVSI A VAWYQQKPGKA PKLLIY SAS YRYTGVPDRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFAVYY CQQHYITPLT FGAGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPR EAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	118
TROP2 Fab HC	QVQLQQSGSELKKPGASVKVS CKAS GYTFTNYG MNWKQA PGQGLKWMGW INTYTGEPT TDDFKGRFAFSLDTSVSTAYL QISSLKADDTAVYFC ARGGFG SSYWYFDV WGQGLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDK KVEPKSC	119
TROP2 TCE-1 LC	DIQLTQSPSSLSASVGD RVSITC KASQDVSI AVAWYQQKPGKA PKLLIYSAS YRYTGVPDRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFAVYY CQQHYITPLTFGAGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPR EAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	187
TROP2 TCE-1 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATY YADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYWGQGLVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSQT VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGS	188

[0228]

[0229]

	STGAVTSGNYPNWVQKPGQ APRGLIGGTKFLAPGTPARFSG SLLGGKAALTLSGVQPEDEAE YYCVLWYSNRWVFGGGTKLT VLGGGGSQVQLQQSGSELKKP GASVKVSCKASGYTFTNYGM NWKQAPGQGLKWMGWINT YTGEPTYTDDFKGRFAFSLDT SVSTAYLQISSLKADDTAVYF CARGGFGSSYWYFDVWGQGS LTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHNKPSNTKVDKKVEPK SC	
TROP2 TCE-2 LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITC KASQDVSIAVAWYQKPGKA PKLLIYSASYRYTGVPDRFSGS GSGTDFTLTISLQPEDFAVYY CQQHYITPLTFGAGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNFPYAPREKVVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	189
TROP2 TCE-2 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATY YADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYWGQGLVT VSSGGGSGGGGSGGGGSQT VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGS STGAVTSGNYPNWVQKPGQ APRGLIGGTKFLAPGTPARFSG SLLGGKAALTLSGVQPEDEAE YYCVLWYSNRWVFGGGTKLT VLGGGGSQVQLQQSGSELKKP GASVKVSCKASGYTFTNYGM NWKQAPGQGLKWMGWINT YTGEPTYTDDFKGRFAFSLDT SVSTAYLQISSLKADDTAVYF CARGGFGSSYWYADVWGQGS LTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHNKPSNTKVDKKVEPK SC	190
TROP2 TCE-3 LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITC KASQDVSIAVAWYQKPGKA PKLLIYSASYRYTGVPDRFSGS GSGTDFTLTISLQPEDFAVYY CQQHYITPLTFGAGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS	191

[0230]

	VVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
TROP2 TCE-3 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATY YADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYWGQGLVT VSSGGGSGGGGSGGGGSQT VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGS STGAVTSGNYPNWVQKPGQ APRGLIGGTKFLAPGTPARFSG SLLGGKAALTLGTVQPEDEAE YYCVLWYSNRWVFGGGTKLT VLGGGGSQVQLQQSGSELKKP GASVKVSCKASGYFTNYGM NWVKQAPGQGLKWMGWINT YTGEPTYTDDFKGRFAFSLDT SVSTAYLQISSLKADDTAVYF CARGGFGSSYWFYAVWGQGS LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSKVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEPK SC	192
TROP2 TRACT _r -1 LC	GGIDFCMLYNWPICAGGGGGS GGLSGRSDAGSPLGLAGSGGS DIQLTQSPSSLSASVGDVRSITC KASQDVSIATAVWYQKPGKA PKLLIYSASYRTGVPDRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFAVYY CQQHYITPLTFGAGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	193
TROP2 TRACT _r -1 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGSTFYTAVMGWVRQAP GKGLEWVAAIRWTALTTSYA DSVKGRFTISRDKAKTTLYLQ MNSLRPEDTAVYYCAARGTL GLFTTADSYDYWGQGLVTV SSGGGSGGGSGGVYCGPEFD ESVGMGGGGSGGGLSGRSD AGSPLGLAGSGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLKLSAASGFT FNKYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNNL KTEDTAVYYCVRHGNFGNSYI SYWAYWGQGLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSQTVVTQEPSL	194

[0231]

	<p>TVSPGGTVTLTCGSSTGAVTS GNYPNWVQQKPGQAPRGLIG GTKFLAPGTPARFSGSLLGGK AALTLSGVQPEDEAEYYCVL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGG GSQVQLQQSGSELKKPGASVK VSCKASGYTFTNYGMNWVKQ APGQGLKWMGWINTYTGEPT YTDDFKGRFAFSLDTSVSTAY LQISSLKADDTAVYFCARGGF GSSYWYFDVWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSC</p>	
TROP2 TRACTr-2 LC	<p>GGVDFCGLYHWPICYQGGGG SGLSGRSDAGSPLGLAGSGG SDIQLTQSPSSLSASVGDRVSIT CKASQDVSIAVAWYQQKPGK APKLLIYSASYRYTGVPDRFSG SSGTDFTLTISSLQPEDFAVY YCQQHYITPLTFGAGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C</p>	195
TROP2 TRACTr-2 HC	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGSTFYTAVMGWVVRQAP GKGLEWVAAIRWTALTTSYA DSVKGRFTISRDKAKTTLYLQ MNSLRPEDTAVYYCAARGTL GLFTTADSYDYWGQGLVTV SSGGGSGGGSGGVYCGPEFD ESGVCMGGGGSGGGLSGRSD AGSPLGLAGSGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLKLSAASGFT FNKYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNNL KTEDTAVYYCVRHGNFGNSYI SYWAYWGQGLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSQTVVTQEPSL TVSPGGTVTLTCGSSTGAVTS GNYPNWVQQKPGQAPRGLIG GTKFLAPGTPARFSGSLLGGK AALTLSGVQPEDEAEYYCVL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGG GSQVQLQQSGSELKKPGASVK VSCKASGYTFTNYGMNWVKQ APGQGLKWMGWINTYTGEPT YTDDFKGRFAFSLDTSVSTAY LQISSLKADDTAVYFCARGGF GSSYWYFAVWGQGLVTVSS</p>	196

	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSC	
TROP2 TRACTr-3 LC	GGVDFCALYHWPICYQGGGG SGGLSGRSDAGSPLGLAGSGG SDIQLTQSPSSLSASVGDRVSIT CKASQDVSIATAVWYQQKPGK APKLLIYSASYRYTGVPDRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFAVY YCQQHYITPLTFGAGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SIVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	197
TROP2 TRACTr-3 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGSTFYTAVMGWVRQAP GKGLEWVAAIRWTALTTSYA DSVKGRFTISRDKAKTTLYLQ MNSLRPEDTAVYYCAARGTL GLFTTADSYDYWGQGLVTV SSGGGSGGGSGGVYCGPEFD ESVTCMGGGGSGGGLSGRSD AGSPLGLAGSGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLKLSAASGFT FNKYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNNL KTEDTAVYYCVRHGNFGNSYI SYWAYWGQGLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGQTVVTQEPSL TVSPGGTVTLTCGSSTGAVTS GNYPNWVQQKPGQAPRGLIG GTKFLAPGTPARFSGSLLGGK AALTLSGVQPEDEAEYYCVL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGG GSQVQLQQSGSELKPGASVK VSCKASGYTFTNYGMNWVKQ APGQGLKWMGWINTYTGEPT YTDDFKGRFAFSLDTSVSTAY LQISSLKADDTAVYFCARGGF GSSYWYADVWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSC	198
TROP2 TRACTr-4 LC JXA2388	GGIDFCMLYNWPICAGGGGGG GGLSGRSDAGSPLGLAGSGGS DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITC KASQDVSIATAVWYQQKPGKA PKLLIYSASYRYTGVPDRFSGS SGSGTDFTLTISLQPEDFAVYY	216

[0232]

[0233]

	CQQHYITPLTFGAGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
TROP2 TRACTr-4 HC JXA2388	EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLS CAASGFTFSKFGMSWVRQAP GKGLEWVSSISGSGRDTLYAD SVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVS SQGTLVTVSSGGGGSGGGSGG VYCGPEFDESVMGGGGSG GGLSGRSDAGSPLGLAGSGGG SEVQLVESGGGLVQPGSLKL SCAASGFTFNKYAMNWVRQA PGKGLEWVARIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRH GNFGNSYISYWAYWGQGLV TVSSGGGGSGGGGGSGGGGSQT VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGS STGAVTSGNYPNWVQKPGQ APRGLIGGTKFLAPGTPARFSG SLLGGKAALTLGVPEDAE YYCVLWYSNRWVFGGGTKLT VLGGGGSQVQLQQSGSELKPK GASVKVSKASGYTFTNYGM NWKQAPGQGLKWMGWINT YTGEPTYTDDFKGRFAFLDT SVSTAYLQISSLKADDTAVYF CARGGFGSSYWFYFDVWGQGS LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEPK SC	217
TROP2 TRACTr-5 LC JXA2389	GGIDFCMLYNWPICAGGGGGS GGGGGSGGGGSGGASSGAGG SGGSDIQLTQSPSSLSASVDR VSITCKASQDVSIKAWYQK PGKAPKLLIYSASYRYTGVPD RFSGSGSGTDFLTISLQPEDF AVYYCQQHYITPLTFGAGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEK KVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEK	218
TROP2 TRACTr-5 HC JXA2389	EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLS CAASGFTFSKFGMSWVRQAP GKGLEWVSSISGSGRDTLYAD SVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVS	219

[0234]

	SQGTLVTVSSGGGGSGGGSGG VYCGPEFDES VGCMGGGGSG GGSGGGSGGASSGAGGSGG GSEVQLVESGGGLVQPGGSLK LSCAASGFTFNKYAMNWVRQ APKGLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVR HGNFGNSYISYWAYWGQGL VTVSSGGGGSGGGSGGGGS QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CGSSTGAVTSGNYPNWVQOK PGQAPRGLIGGTKFLAPGTPAR FSGSLLGGKAALTLSGVQPED EAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVLGGGGSQVQLQQSGSEL KKPGASVKVSKASGYTFTNY GMNWVKQAPGQGLKWMGWI NTYTGEPTYTDDFKGRFAFSL DTSVSTAYLQISSLKADDTAV YFCARGGFGSSYWFYFDVWGQ GSLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSC	
TROP2 TRACTr-1 肽掩蔽物(P ₄)	IDFCMLYNWPICA	199
TROP2 TRACTr-2 肽掩蔽物(P ₄)	VDFCGLYHWPICYQ	200
TROP2 TRACTr-2 肽掩蔽物(P ₄)	VDFCALYHWPICYQ	201

[0235] 在一些实施方案中,肿瘤抗原包括PSMA。在一些实施方案中,肿瘤抗原结合结构域包含根据SEQ ID NO:120-127的氨基酸序列。

[0236] 在一些实施方案中,肿瘤抗原包括PSMA,并且肿瘤结合结构域包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,以及LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含HC-CDR1:SEQ ID NO:120;HC-CDR2:SEQ ID NO:121;HC-CDR3:SEQ ID NO:122;并且其中LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:123;LC-CDR2:SEQ ID NO:124(EA);和LC-CDR3:SEQ ID NO:125。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括PSMA,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:173和174具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括PSMA,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:173和174的氨基酸序列。

[0237] 表16.肿瘤抗原结合结构域氨基酸序列-抗PSMA

[0238]

构建体描述	氨基酸序列(N至C)	SEQ ID NO:
PSMA: HC: CDR1	GFAFSRYG	120

PSMA: HC: CDR2	IWYDGSNK	121
PSMA: HC: CDR3	ARGGDFLYYYYYGMDV	122
PSMA: LC: CDR1	QGISNY	123
PSMA: LC: CDR2	EA	124
PSMA: LC: CDR3	QNYNSAPFT	125
006 PSMA Fab LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT CRAS <u>QGISNY</u> LAWYQQKTGK VPKFLIYE <u>ASTLQSGVPSRFSG</u> GGSGTDFTLTISSLQPEDVATY Y <u>CQNYNSAPFT</u> FGPGTKVDIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPRKAVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC	126
006 PSMA Fab HC	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAAS <u>GFAFSRYGMHWRQAP</u> GKGLEWVAVI <u>IWYDGSNK</u> YY ADSVKGRFTISRDNKNTQYL QMNSLRAEDTAVYYC <u>ARGGD</u> <u>FLYYYYGMDV</u> WGQGTITV VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	127
PSMA TCE-1 LC	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATY YADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYWGQGLVT VSSGGGSGGGGSGGGGSQT VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCS STGAVTSGNYPNWVQKPGQ APRGLIGGKFLAPGTPARFSG SLLGGKAALTLQSGVQPEDEAE YYCVLWYSNRWVFGGGTKLT VLGGGSDIQMTQSPSSLSAS VGDRVITITCRASQGISNYLAW YQQKTGKVPKFLIYEASTLQ GVPSRFSGGSGTDFTLTISSL QPEDVATYYCQNYNSAPFTFG PGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKSTYLSSTLTLSKA DYKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	173
PSMA TCE-1 HC	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFAFSRYGMHWRQAP GKGLEWVAVIWYDGSNKYYA	174

[0239]

[0240]

	DSVKGRFTISRDN SKNTQYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGGDF LYYYYYGMDVWGQTTTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDK KVEPKSC	
PSMA TRACT _r -1 LC	EVQLVESGGGLVQP GGSRLRS CAASGSTFYTAVMGWVRQAP GKGLEWVAAIRWTALTTSYA DSVKGRFTISR DGAKTTLYLQ MNSLRPEDTAVYYCAARGTL GLFTTADSYDYWGQGLTVTV SSGGGSGGGSGGVYCGPEFD ESV GCMGGGSGGGLSGRSD AGSPLGLAGSGGGSEVQLVES GGGLVQP GGSRLKLSAASGFT FNKYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNNL KTEDTAVYYCVRHGNFGNSYI SYWAYWGQGLTVTVSSGGGG SGGGGSGGGG SQT VVTQEPSL TVSPGGTVTLTCSSTGAVTS GNYPNWVQKPGQAPRGLIG GTKFLAPGTPARFSGSLLGK AALTLSGVQPEDEAEYCVL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGG GSDIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQGISNYLAWYQQKTG KVPKFLIYEASTLQSGVPSRFS GGSGTDFTLTISSLQPEDVAT YYCQNYNSAPFTFGPGTKVDI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	175
PSMA TRACT _r -1 HC	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFAFSRYGMHWVRQAP GKGLEWVAVIWYDGSNKYYA DSVKGRFTISRDN SKNTQYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGGDF LYYYYYGMDVWGQTTTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDK KVEPKSC	176

[0241] 在一些实施方案中,T细胞衔接器分子在肿瘤微环境中被选择性激活。在一些实施方案中,T细胞衔接器是根据以下子式: $P_3-L_3-D_1-L_0-E_1$ (式IIa),其中 D_1 包含CD3结合结构域; E_1 包含肿瘤抗原结合结构域; L_0 包含连接 D_1 与 E_1 的接头; P_3 包含结合至 D_1 的肽,并且 L_3 包含连接 D_1 与 P_3 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物。

[0242] 在一些实施方案中,T细胞衔接器是根据以下子式: $D_1-L_0-E_1-L_4-P_4$ (式IIb),其中 D_1

包含CD3结合结构域;E₁包含肿瘤抗原结合结构域;L₀包含连接D₁与E₁的接头;P₄包含结合至E₁的肽,并且L₄包含连接E₁与P₄的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物。

[0243] 在一些实施方案中,T细胞衔接器是根据以下子式:P₃-L₃-D₁-L₀-E₁-L₄-P₄(式IIc),其中D₁包含CD3结合结构域;E₁包含肿瘤抗原结合结构域;L₀包含连接D₁与E₁的接头;P₃包含结合至D₁的肽,并且L₃包含连接D₁与P₃的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物;P₄包含结合至E₁的肽,并且L₄包含连接E₁与P₄的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物。

[0244] 在一些实施方案中,T细胞衔接器包含H₁。在一些实施方案中,H₁包含根据SEQ ID NO:54-57的序列。在一些实施方案中,H₁包含单结构域抗体。

[0245] 在一些实施方案中,单结构域抗体包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中单结构域抗体的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:54、HC-CDR2:SEQ ID NO:55和HC-CDR3:SEQ ID NO:56。在一些实施方案中,L₃或L₄是具有至少5个至不多于50个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中,L₃或L₄是具有至少10个至不多于30个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中,L₃或L₄是具有至少10个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中,L₃或L₄是具有至少18个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中,L₃或L₄是具有至少26个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中,L₃或L₄包含包括(G₂S)_n的式,其中n是1至3的整数(SEQ ID NO:228)。在一些实施方案中,L₃或L₄包含包括(G₂S)_n的式,其中n是至少为1的整数。在一些实施方案中,L₃或L₄包含选自以下的式:(G₂S)_n、(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:58)、(GGGS)_n(SEQ IDNO:59)、(GGGS)_n(SEQ ID NO:60)和(GSSGGS)_n(SEQ ID NO:61),其中n是至少为1的整数。在一些实施方案中,肿瘤特异性蛋白酶选自金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶。

[0246] 在一些实施方案中,L₃或L₄包含尿激酶可切割氨基酸序列、膜型丝氨酸蛋白酶可切割氨基酸序列或基质金属蛋白酶可切割氨基酸序列。在一些实施方案中,L₃或L₄包含根据SEQ ID NO:18-19、62-88的序列。在一些实施方案中,L₃结合至D₁的N-末端。在一些实施方案中,L₃结合至D₁的C-末端。在一些实施方案中,L₄结合至E₁的N-末端。在一些实施方案中,L₄结合至E₁的C-末端。

[0247] 在一些实施方案中,当L₃被肿瘤特异性蛋白酶切割时,P₃与D₁解结合,从而使D₁暴露于CD3。在一些实施方案中,当L₄被肿瘤特异性蛋白酶切割时,P₄与E₁解结合,从而使E₁暴露于肿瘤抗原。在一些实施方案中,P₃削弱D₁与CD3的结合。在一些实施方案中,P₃通过离子相互作用、静电相互作用、疏水相互作用、Pi-堆积相互作用和H键相互作用或其组合结合至D₁。在一些实施方案中,P₃在抗原结合位点或其附近结合至D₁。在一些实施方案中,当L₃被肿瘤特异性蛋白酶切割时,P₃与D₁解结合,从而使D₁暴露于CD3。在一些实施方案中,P₃与CD3具有小于70%的序列同一性。在一些实施方案中,P₃与CD3具有小于85%的序列同一性。在一些实施方案中,P₃与CD3具有小于90%的序列同一性。在一些实施方案中,P₃与CD3具有小于95%的序列同一性。在一些实施方案中,P₃与CD3具有小于98%的序列同一性。在一些实施方案中,P₃与CD3具有小于99%的序列同一性。在一些实施方案中,P₃包含根据SEQ ID NO:177-180的氨基酸序列。在一些实施方案中,P₃包含与CD3共享小于10%的序列同一性的从头生成氨基酸序列。在一些实施方案中,P₄削弱E₁与肿瘤抗原的结合。在一些实施方案中,P₄通过离子相互作用、静电相互作用、疏水相互作用、Pi-堆积相互作用和H键相互作用或其组合结合至E₁。在一些实施方案中,P₄在抗原结合位点或其附近结合至E₁。在一些实施方案中,

当L₄被肿瘤特异性蛋白酶切割时,P₄与E₁解结合,从而使E₁暴露于肿瘤抗原。在一些实施方案中,P₄与肿瘤抗原具有小于70%的序列同一性。在一些实施方案中,P₄与肿瘤抗原具有小于80%的序列同一性。在一些实施方案中,P₄与肿瘤抗原具有小于85%的序列同一性。在一些实施方案中,P₄与肿瘤抗原具有小于90%的序列同一性。在一些实施方案中,P₄与肿瘤抗原具有小于95%的序列同一性。在一些实施方案中,P₄包含与肿瘤抗原共享小于10%的序列同一性的从头生成氨基酸序列。在一些实施方案中,P₃或P₄包含长度为至少5个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中,P₃或P₄包含长度为至少6个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中,P₃或P₄包含长度为至少10个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中,P₃或P₄包含长度为至少10个氨基酸并且长度为不多于20个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中,P₃或P₄包含长度为至少16个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中,P₃或P₄包含长度为不多于40个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中,P₃或P₄包含至少两个半胱氨酸氨基酸残基。在一些实施方案中,P₃或P₄包含环肽或线性肽。在一些实施方案中,P₃或P₄包含环肽。在一些实施方案中,P₃或P₄包含线性肽。在一些实施方案中,P₄包含根据SEQ ID NO:185或186的氨基酸序列。

[0248] 在一些实施方案中,肿瘤抗原包括EGFR,并且T细胞衔接器包含SEQ ID NO:183和184的氨基酸序列。在一些实施方案中,P₄包含根据SEQ ID NO:199-201的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括TROP2,并且T细胞衔接器包含SEQ ID NO:193-198的氨基酸序列的任一者。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括PSMA,并且T细胞衔接器包含SEQ ID NO:175和176的氨基酸序列。

[0249] 在一些实施方案中,多特异性抗体进一步包含可检测标签、治疗剂或药代动力学修饰部分。在一些实施方案中,可检测标签包括荧光标签、放射性标签、酶、核酸探针或对比剂。

[0250] 对于向对象施用,如本文所公开的多特异性抗体可以与一种或多种药学上可接受的载剂或赋形剂一起在药物组合物中提供。术语“药学上可接受的载剂”包括但不限于不干扰成分的生物活性的有效性且对所施用的患者无毒的任何载剂。合适的药物载剂的示例是本领域熟知的,且包括磷酸缓冲盐水溶液、水、如油/水乳剂的乳剂、各种类型的润湿剂、无菌溶液等。此类载剂可以通过常规方法配制,且可以以合适的剂量施用于对象。优选地,组合物是无菌的。这些组合物还可以含有助剂,如防腐剂、乳化剂和分散剂。可以通过包含各种抗细菌剂和抗真菌剂来确保防止微生物的作用。

[0251] 药物组合物可以是任何合适的形式(取决于期望的施用方法)。它可以以单位剂型提供,可以在密封容器中提供且可以作为试剂盒的一部分提供。这样的试剂盒可以包括使用说明书。它可以包括多个所述单位剂型。

[0252] 药物组合物可适应于通过任何合适的途径施用,包括肠胃外(例如皮下、肌肉或静脉内)途径。这样的组合物可以通过药学领域已知的任何方法制备,例如通过在无菌条件下将活性成分与载剂或赋形剂混合。

[0253] 本公开的物质的剂量可以在宽范围内变化,这取决于待治疗的疾病或病症、待治疗的个体的年龄和病况等,且医师将最终确定待使用的适当剂量。

[0254] 联接至削弱与CD28结合的肽的CD28结合结构域

[0255] 本文公开了分离的多肽或多肽复合物,其包含CD28结合结构域,CD28结合结构域联接至削弱CD28结合结构域与CD28结合的肽,其中肽包含根据SEQ ID NO:24-53、128-148

的任一者和表20的氨基酸序列的任一者的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。在一些实施方案中,肽包含根据SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的氨基酸序列。在一些实施方案中,肽包含根据SEQ ID NO:42-53的任一者的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:42-53的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。在一些实施方案中,肽包含根据SEQ ID NO:42-53的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,肽包含根据表20的氨基酸序列的任一者的氨基酸序列或相对于表20的氨基酸序列的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。在一些实施方案中,肽包含根据表20的氨基酸序列的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,肽包含根据SEQ ID NO:128-147的任一者的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:128-147的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。在一些实施方案中,肽包含根据SEQ ID NO:128-147的任一者的氨基酸序列。

[0256] 在一些实施方案中,肽包含根据 $X_1-X_2-X_3-C-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-C-X_{11}-X_{12}$ 的氨基酸序列,其中 X_1 选自M、I、L和V; X_2 选自D、H、N、A、F、S、T、Y和V; X_3 选自W、L和F; X_4 选自P、A和L; X_5 选自R、T、I、M、S、K、L、V、W、F、A、P和D; X_6 选自E、D、Y、H、S、F、A、N、T、I、P和V; X_7 选自L、M、R、S、Q和H; X_8 选自W和Q; X_9 选自H、N、D、A、S、Y、T、F、V、L和I; X_{10} 选自E、V、L、D、Y、R、Q、H、F、K、A、M和N; X_{11} 选自F、Y、L、W和V;并且 X_{12} 选自N、A、F、S、Y、H、D、T和L。在一些实施方案中, X_1 选自M、I和L; X_2 选自D、H、N和A; X_3 是W; X_4 是P; X_5 选自R、T、I、M、S和K; X_6 选自E、D、Y、H、S和F; X_7 选自L、M和R; X_8 是W; X_9 选自H、N、D、A、S和V; X_{10} 选自E、V、L、D和H; X_{11} 选自F、Y和L;并且 X_{12} 选自N、A、F、S和Y。在一些实施方案中, X_1 是M; X_2 选自D和H; X_3 是W; X_4 是P; X_5 选自R、T和I; X_6 选自E、D和Y; X_7 选自L、M和R; X_8 是W; X_9 选自H、N、D和V; X_{10} 选自E、V、L、D和H; X_{11} 是F;并且 X_{12} 选自N、A和F。在一些实施方案中,肽包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:32具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。在一些实施方案中,肽包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列。在一些实施方案中,肽包含根据SEQ ID NO:138的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:138具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。在一些实施方案中,肽包含根据SEQ ID NO:138的氨基酸序列。

[0257] 在一些实施方案中,CD28结合结构域包含单链可变片段、单结构域抗体、Fab或Fab'。在一些实施方案中,CD28结合结构域包含单链可变片段。在一些实施方案中,CD28结合结构域包含单结构域抗体。在一些实施方案中,CD28结合结构域包含Fab或Fab'。在一些实施方案中,scFv重链可变结构域包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中scFv重链可变结构域的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:1;HC-CDR2:SEQ ID NO:2;HC-CDR3:SEQ ID NO:3,并且其中所述CDR包含所述HC-CDR1、HC-CDR2或HC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修饰。在一些实施方案中,scFv轻链可变结构域包含互补决定区(CDR):LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中scFv轻链可变结构域的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:4;LC-CDR2:SEQ ID NO:5(KA);和LC-CDR3:SEQ ID NO:6,并且其中CDR包含所述LC-CDR1、LC-CDR2或LC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修饰。在一些实施方案中,scFv重链可变结构域包含与根据SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv重链可变结构域包含SEQ ID NO:7的至少75个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv重链可变结构域

包含SEQ ID NO:7的至少110个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv重链可变结构域包含SEQ ID NO:7的至少110个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID NO:7的至少110个连续氨基酸残基具有至少80%序列同一性。在一些实施方案中,scFv重链可变结构域包含根据SEQ ID NO:7的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv轻链可变结构域包含与根据SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv轻链可变结构域包含SEQ ID NO:8的至少75个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv轻链可变结构域包含SEQ ID NO:8的至少100个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv轻链可变结构域包含SEQ ID NO:8的至少100个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID NO:8的至少100个连续氨基酸残基具有至少80%序列同一性。在一些实施方案中,scFv轻链可变结构域包含根据SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv包含与根据SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:9的至少175个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:9的至少210个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:9的至少210个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID NO:9的至少210个连续氨基酸残基具有至少80%序列同一性。在一些实施方案中,scFv包含根据SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0258] 在一些实施方案中,CD28结合结构域通过联接部分(L_1)联接至肽。在一些实施方案中, L_1 是肿瘤特异性蛋白酶的底物。在一些实施方案中, L_1 是具有至少5个至不多于50个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_1 是具有至少10个至不多于30个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_1 是具有至少10个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_1 是具有至少18个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_1 是具有至少26个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_1 包含包括 $(G_2S)_n$ 的式,其中n是1至3的整数(SEQ ID NO:228)。在一些实施方案中, L_1 包含包括 $(G_2S)_n$ 的式,其中n是至少为1的整数。在一些实施方案中, L_1 包含选自以下的式: $(G_2S)_n$ 、 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO:58)、 $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO:59)、 $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO:60)和 $(GSSGGS)_n$ (SEQ ID NO:61),其中n是至少为1的整数。在一些实施方案中,肿瘤特异性蛋白酶选自金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶。在一些实施方案中, L_1 包含尿激酶可切割氨基酸序列、膜型丝氨酸蛋白酶可切割氨基酸序列或基质金属蛋白酶可切割氨基酸序列。在一些实施方案中, L_1 包含根据SEQ ID NO:18-19、62-88的序列。在一些实施方案中, L_1 结合至 A_1 的N-末端。在一些实施方案中, L_1 结合至 A_1 的C-末端。在一些实施方案中,当 L_1 被肿瘤特异性蛋白酶切割时, P_1 与 A_1 解结合,从而使 A_1 暴露于CD28。在一些实施方案中, L_1 包含经修饰氨基酸或非天然氨基酸或经修饰非天然氨基酸,或其组合。在一些实施方案中,经修饰氨基酸或经修饰非天然氨基酸包含翻译后修饰。

[0259] 在一些实施方案中,分离的多肽或多肽复合物进一步包含半衰期延长分子(H_1)。在一些实施方案中, H_1 连接至肽。在一些实施方案中, H_1 不阻断CD28结合结构域与CD28。在一些实施方案中, H_1 包含连接 H_1 与肽的联接部分(L_5)。在一些实施方案中,半衰期延长分子(H_1)对CD28不具有结合亲和力。在一些实施方案中,半衰期延长分子(H_1)不保护分离的多肽或多肽复合物免受CD28的影响。在一些实施方案中, H_1 包含根据SEQ ID NO:54-57的序列。在一些实施方案中, H_1 包含具有重复序列基序的氨基酸序列。在一些实施方案中, H_1 包含具有高度有序二级结构的氨基酸序列。在一些实施方案中, H_1 包含聚合物。在一些实施方案

中,聚合物是聚乙二醇(PEG)。在一些实施方案中, H_1 包含白蛋白。在一些实施方案中, H_1 包含Fc结构域。在一些实施方案中,白蛋白是血清白蛋白。在一些实施方案中,白蛋白是人血清白蛋白。在一些实施方案中, H_1 包含多肽、配体或小分子。在一些实施方案中,多肽、配体或小分子结合血清蛋白或其片段、循环免疫球蛋白或其片段、或CD35/CR1。在一些实施方案中,血清蛋白包括甲状腺素结合蛋白、转甲状腺素蛋白、1-酸性糖蛋白、转铁蛋白、转铁蛋白受体或其转铁蛋白结合部分、纤维蛋白原或白蛋白。在一些实施方案中,循环免疫球蛋白分子包含IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、sIgA、IgM或IgD。在一些实施方案中,血清蛋白是白蛋白。在一些实施方案中,多肽是抗体。在一些实施方案中,抗体包括单结构域抗体、单链可变片段、Fab或Fab'。在一些实施方案中,单结构域抗体包括结合至白蛋白的单结构域抗体。在一些实施方案中,单结构域抗体是人抗体或人源化抗体。在一些实施方案中,单结构域抗体选自645gH1gL1、645dsgH5gL4、23-13-A01-sc02、A10m3或其片段、DOM7r-31、DOM7h-11-15、A1b-1、A1b-8、A1b-23、10G、10E和SA21。在一些实施方案中,单结构域抗体包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中单结构域抗体的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:54、HC-CDR2:SEQ ID NO:55和HC-CDR3:SEQ ID NO:56;并且其中CDR包含HC-CDR1、HC-CDR2或HC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修饰。在一些实施方案中, H_1 包含根据SEQ ID NO:57的氨基酸序列。在一些实施方案中, H_1 包含与SEQ ID NO:57具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, H_1 包含与SEQ ID NO:57具有至少85%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, H_1 包含与SEQ ID NO:57具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, H_1 包含与SEQ ID NO:57具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, H_1 包含与SEQ ID NO:57具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, H_1 包含经修饰氨基酸或非天然氨基酸或经修饰非天然氨基酸,或其组合。在一些实施方案中,经修饰氨基酸或经修饰非天然氨基酸包含翻译后修饰。在一些实施方案中, H_1 包含连接 H_1 与 P_1 或 P_2 的联接部分(L_5)。在一些实施方案中, L_5 是具有至少5个至不多于50个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_5 是具有至少10个至不多于30个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_5 是具有至少10个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_5 是具有至少18个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_5 是具有至少26个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_5 包含选自以下的式:(G_2S)_n、(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:58)、(GGGS)_n(SEQ ID NO:59)、(GGGGS)_n(SEQ ID NO:60)和(GSSGGS)_n(SEQ ID NO:61),其中n是至少为1的整数。

[0260] 治疗方法

[0261] 本文公开了在有需要的对象中治疗癌症的方法,其包括向对象施用本文所描述的任何实施方案的多特异性抗体。在一些实施方案中,多特异性抗体诱导T细胞介导的肿瘤细胞的细胞毒性。在一些实施方案中,癌症是血液恶性肿瘤。在一些实施方案中,癌症是白血病或淋巴瘤。在一些实施方案中,癌症是淋巴瘤,并且其中淋巴瘤是B细胞淋巴瘤。在一些实施方案中,癌症是实体肿瘤。在一些实施方案中,实体肿瘤表达PD-L1。在一些实施方案中,实体肿瘤是肉瘤、乳腺癌、肺癌或癌。在一些实施方案中,实体肿瘤是肺癌,并且其中肺癌是非小细胞肺癌。在一些实施方案中,多特异性抗体与抗癌疗法组合施用。在一些实施方案中,多特异性抗体和抗癌疗法在相同的药物组合物中施用。在一些实施方案中,多特异性抗体和抗癌疗法作为单独的药物组合物施用。在一些实施方案中,对象对于检查点抑制剂疗

法是难治的。在一些实施方案中,对象已从检查点抑制剂疗法复发。在一些实施方案中,抗癌疗法包括小分子、基于细胞的疗法或基于抗体的疗法。

[0262] 在一些实施方案中,与在施用多特异性抗体之前从对象获取的癌症的基线测量相比,向对象施用多特异性抗体足以减少或消除癌症。在一些实施方案中,减少为至少约1倍、5倍、10倍、20倍、40倍、60倍、80倍或多至约100倍。

[0263] 在一些实施方案中,基于抗体的疗法是T细胞衔接器。在一些实施方案中,T细胞衔接器包含根据以下的式: $D_1-L_0-E_1$ (式II),其中 D_1 包含结合至效应细胞抗原的效应细胞结合结构域, E_1 包含结合至肿瘤抗原的肿瘤抗原结合结构域,并且 L_0 包含连接 D_1 与 E_1 的接头。在一些实施方案中, D_1 包含单链可变片段、单结构域抗体、Fab片段或Fab'。在一些实施方案中, D_1 包含单链可变片段。在一些实施方案中, E_1 包含单链可变片段、单结构域抗体、Fab片段或Fab'。在一些实施方案中, E_1 包含Fab片段。在一些实施方案中,效应细胞结合结构域包含选自以下的互补决定区(CDR):莫罗单抗-CD3(OKT3)、奥昔组单抗(TRX4)、替利组单抗(MGA031)、维西珠单抗(Nuvion)、SP34、X35、VIT3、BMA030(BW264/56)、CLB-T3/3、CRIS7、YTH12.5、F111-409、CLB-T3.4.2、TR-66、WT32、SPv-T3b、11D8、XIII-141、XIII-46、XIII-87、12F6、T3/RW2-8C8、T3/RW2-4B6、OKT3D、M-T301、SMC2、F101.01、UCHT-1、WT-31、15865、15865v12、15865v16和15865v19。在一些实施方案中,效应细胞结合结构域包含根据SEQ ID NO:89-101的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括表皮生长因子受体(EGFR)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)或肿瘤相关钙信号转导器2(在本文中称为TROP2)。

[0264] 在一些实施方案中,肿瘤抗原包括EGFR。在一些实施方案中,肿瘤抗原结合结构域包含根据SEQ ID NO:102-111的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括EGFR,并且肿瘤结合结构域包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,以及LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:105;HC-CDR2:SEQ ID NO:106;HC-CDR3:SEQ ID NO:107;并且其中LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:102;LC-CDR2:SEQ ID NO:103(YAS);和LC-CDR3:SEQ ID NO:104。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括EGFR,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:181和182具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括EGFR,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:181和182的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括EGFR,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:214和215具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括EGFR,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:214和215的氨基酸序列。在一些实施方案中,癌症是结肠直肠癌(CRC)、头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)、非小细胞肺癌(NSCLC)、前列腺癌、乳腺癌、结肠癌/直肠癌、头颈癌、食管胃癌、肝癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、膀胱癌、肾癌或胰腺癌。

[0265] 在一些实施方案中,肿瘤抗原包括TROP2。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括TROP2,并且肿瘤结合结构域包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,以及LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含HC-CDR1:SEQ ID NO:112;HC-CDR2:SEQ ID NO:113;HC-CDR3:SEQ ID NO:114;并且其中LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:115;LC-CDR2:SEQ ID NO:116(SAS);和LC-CDR3:SEQ ID NO:117。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括TROP2,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:187-192具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括TROP2,并且

T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:187-192的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原结合结构域包含根据SEQ ID NO:112-119的氨基酸序列。在一些实施方案中,癌症是肺癌、乳腺癌(例如HER2+;ER/PR+;TNBC)、宫颈癌、卵巢癌、结肠直肠癌、胰腺癌、胃癌、三阴性乳腺癌(TNBC)、尿路上皮癌(UC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、小细胞肺癌(SCLC)、胃癌、食管癌、头颈癌、前列腺癌或子宫内膜癌。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括PSMA。在一些实施方案中,肿瘤抗原结合结构域包含根据SEQ ID NO:120-127的氨基酸序列。

[0266] 在一些实施方案中,肿瘤抗原包括PSMA,并且肿瘤结合结构域包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,以及LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含HC-CDR1:SEQ ID NO:120;HC-CDR2:SEQ ID NO:121;HC-CDR3:SEQ ID NO:122;并且其中LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:123;LC-CDR2:SEQ ID NO:124(EA);和LC-CDR3:SEQ ID NO:125。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括PSMA,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:173和174具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括PSMA,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:173和174的氨基酸序列。在一些实施方案中,癌症是肺癌、乳腺癌(例如HER2+;ER/PR+;TNBC)、宫颈癌、卵巢癌、结肠直肠癌、胰腺癌或胃癌。

[0267] 在一些实施方案中,T细胞衔接器分子在肿瘤微环境中被选择性激活。在一些实施方案中,T细胞衔接器是根据以下子式: $P_3-L_3-D_1-L_0-E_1$ (式IIa),其中 D_1 包含CD3结合结构域; E_1 包含肿瘤抗原结合结构域; L_0 包含连接 D_1 与 E_1 的接头; P_3 包含结合至 D_1 的肽,并且 L_3 包含连接 D_1 与 P_3 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物。在一些实施方案中,T细胞衔接器是根据以下子式: $D_1-L_0-E_1-L_4-P_4$ (式IIb),其中 D_1 包含CD3结合结构域; E_1 包含肿瘤抗原结合结构域; L_0 包含连接 D_1 与 E_1 的接头; P_4 包含结合至 E_1 的肽,并且 L_4 包含连接 E_1 与 P_4 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物。在一些实施方案中,T细胞衔接器是根据以下子式: $P_3-L_3-D_1-L_0-E_1-L_4-P_4$ (式IIc),其中 D_1 包含CD3结合结构域; E_1 包含肿瘤抗原结合结构域; L_0 包含连接 D_1 与 E_1 的接头; P_3 包含结合至 D_1 的肽,并且 L_3 包含连接 D_1 与 P_3 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物; P_4 包含结合至 E_1 的肽,并且 L_4 包含连接 E_1 与 P_4 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物。

[0268] 在一些实施方案中,T细胞衔接器包含 H_1 。在一些实施方案中, H_1 包含根据SEQ ID NO:54-57的序列。在一些实施方案中, H_1 包含单结构域抗体。在一些实施方案中,单结构域抗体包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中单结构域抗体的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:54、HC-CDR2:SEQ ID NO:55和HC-CDR3:SEQ ID NO:56。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 是具有至少5个至不多于50个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 是具有至少10个至不多于30个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 是具有至少10个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 是具有至少18个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 是具有至少26个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 包含包括 $(G_2S)_n$ 的式,其中 n 是1至3的整数(SEQ ID NO:228)。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 包含包括 $(G_2S)_n$ 的式,其中 n 是至少为1的整数。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 包含选自以下的式: $(G_2S)_n$ 、 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO:58)、 $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO:59)、 $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO:60)和 $(GSSGGS)_n$ (SEQ ID NO:61),其中 n 是至少为1的整数。在一些实施方案中,肿瘤特异性蛋白酶选自金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白

酶。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 包含尿激酶可切割氨基酸序列、膜型丝氨酸蛋白酶可切割氨基酸序列或基质金属蛋白酶可切割氨基酸序列。在一些实施方案中, L_3 或 L_4 包含根据 SEQ ID NO: 18-19、62-88 的序列。在一些实施方案中, L_3 结合至 D_1 的 N-末端。在一些实施方案中, L_3 结合至 D_1 的 C-末端。在一些实施方案中, L_4 结合至 E_1 的 N-末端。在一些实施方案中, L_4 结合至 E_1 的 C-末端。在一些实施方案中, 当 L_3 被肿瘤特异性蛋白酶切割时, P_3 与 D_1 解结合, 从而使 D_1 暴露于 CD3。在一些实施方案中, 当 L_4 被肿瘤特异性蛋白酶切割时, P_4 与 E_1 解结合, 从而使 E_1 暴露于肿瘤抗原。在一些实施方案中, P_3 削弱 D_1 与 CD3 的结合。在一些实施方案中, P_3 通过离子相互作用、静电相互作用、疏水相互作用、 π -堆积相互作用和 H 键相互作用或其组合结合至 D_1 。在一些实施方案中, P_3 在抗原结合位点或其附近结合至 D_1 。在一些实施方案中, 当 L_3 被肿瘤特异性蛋白酶切割时, P_3 与 D_1 解结合, 从而使 D_1 暴露于 CD3。

[0269] 在一些实施方案中, P_3 与 CD3 具有小于 70% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_3 与 CD3 具有小于 85% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_3 与 CD3 具有小于 90% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_3 与 CD3 具有小于 95% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_3 与 CD3 具有小于 98% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_3 与 CD3 具有小于 99% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_3 包含根据 SEQ ID NO: 177-180 的氨基酸序列。在一些实施方案中, P_3 包含与 CD3 共享小于 10% 的序列同一性的从头生成氨基酸序列。

[0270] 在一些实施方案中, P_4 削弱 E_1 与肿瘤抗原的结合。在一些实施方案中, P_4 通过离子相互作用、静电相互作用、疏水相互作用、 π -堆积相互作用和 H 键相互作用或其组合结合至 E_1 。在一些实施方案中, P_4 在抗原结合位点或其附近结合至 E_1 。在一些实施方案中, 当 L_4 被肿瘤特异性蛋白酶切割时, P_4 与 E_1 解结合, 从而使 E_1 暴露于肿瘤抗原。在一些实施方案中, P_4 与肿瘤抗原具有小于 70% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_4 与肿瘤抗原具有小于 80% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_4 与肿瘤抗原具有小于 85% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_4 与肿瘤抗原具有小于 90% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_4 与肿瘤抗原具有小于 95% 的序列同一性。在一些实施方案中, P_4 包含与肿瘤抗原共享小于 10% 的序列同一性的从头生成氨基酸序列。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含长度为至少 5 个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含长度为至少 6 个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含长度为至少 10 个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含长度为至少 10 个氨基酸并且长度为不多于 20 个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含长度为至少 16 个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含长度为不多于 40 个氨基酸的肽序列。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含至少两个半胱氨酸氨基酸残基。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含环肽或线性肽。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含环肽。在一些实施方案中, P_3 或 P_4 包含线性肽。在一些实施方案中, P_4 包含根据 SEQ ID NO: 185 或 186 的氨基酸序列。在一些实施方案中, 肿瘤抗原包括 EGFR, 并且 T 细胞衔接器包含 SEQ ID NO: 183 和 184 的氨基酸序列。在一些实施方案中, P_4 包含根据 SEQ ID NO: 199-201 的氨基酸序列。在一些实施方案中, 肿瘤抗原包括 TROP2, 并且 T 细胞衔接器包含 SEQ ID NO: 193-198 的氨基酸序列的任一者。在一些实施方案中, 肿瘤抗原包括 PSMA, 并且 T 细胞衔接器包含 SEQ ID NO: 175 和 176 的氨基酸序列。

[0271] 抗体的产生

[0272] 在一些实施方案中, 本文所述的多肽 (例如, 抗体及其结合片段) 使用本领域已知的用于合成多肽 (例如, 抗体) 的任何方法产生, 特别是通过化学合成或通过重组表达, 且优

选通过重组表达技术产生。

[0273] 在一些情况下,重组表达抗体或其结合片段,且从化学合成的寡核苷酸组装编码抗体或其结合片段的核酸(例如,描述于Kutmeier等人,1994,BioTechniques 17:242),其涉及含有编码抗体的序列的部分的重叠寡核苷酸的合成,那些寡核苷酸的退火和连接,以及随后对连接的寡核苷酸的PCR扩增。

[0274] 可替代地,编码抗体的核酸分子任选地由合适的来源(例如,抗体cDNA文库,或由表达免疫球蛋白的任何组织或细胞产生的cDNA文库)通过使用可与序列的3'和5'端杂交的合成引物进行PCR扩增或通过使用对特定基因序列具有特异性的寡核苷酸探针进行克隆来产生。

[0275] 在一些情况下,抗体或其结合任选地通过免疫动物(例如,小鼠)以产生多克隆抗体,或更优选地通过产生单克隆抗体来产生,例如,描述于Kohler和Milstein(1975,Nature 256:495-497)或描述于Kozbor等人(1983,Immunology Today 4:72)或Cole等人(1985于Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,Inc.,第77-96页中)。或者,任选地通过筛选Fab表达文库(例如,描述于Huse等人,1989,Science 246:1275-1281)中结合特异性抗原的Fab片段的克隆或通过筛选抗体文库(参见,例如,Clackson等人,1991,Nature352:624;Hane等人,1997Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:4937),获得编码抗体的至少Fab部分的克隆。

[0276] 在一些实施方案中,使用了通过将来自具有适当抗原特异性的小鼠抗体分子的基因与来自具有适当生物活性的人抗体分子的基因剪接在一起而开发的用于产生“嵌合抗体”(Morrison等人,1984,Proc.Natl.Acad.Sci.81:851-855;Neuberger等人,1984,Nature 312:604-608;Takeda等人,1985,Nature 314:452-454)的技术。嵌合抗体是其中不同部分衍生自不同动物物种的分子,例如具有衍生自鼠单克隆抗体的可变区和人免疫球蛋白恒定区的那些。

[0277] 在一些实施方案中,描述用于产生单链抗体的技术(美国专利号4,694,778;Bird,1988,Science 242:423-42;Huston等人,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;和Ward等人,1989,Nature 334:544-54)适应于产生单链抗体。通过氨基酸桥连接Fv区的重链和轻链片段形成单链抗体,产生单链多肽。还任选采用在大肠杆菌中组装功能性Fv片段的技术(Skerra等人,1988,Science 242:1038-1041)。

[0278] 在一些实施方案中,通过常规技术(例如,电穿孔、脂质体转染和磷酸钙沉淀)将包含抗体的核苷酸序列的表达载体或抗体的核苷酸序列转移至宿主细胞,然后通过常规技术培养转染的细胞以产生抗体。在具体的实施方案中,抗体的表达由组成型、诱导型或组织特异性启动子调节。

[0279] 在一些实施方案中,利用多种宿主表达载体系统表达本文所述的抗体或其结合片段。这种宿主表达系统代表通过其产生并随后纯化抗体编码序列的媒介物,但也代表当用合适的核苷酸编码序列转化或转染时原位表达抗体或其结合片段的细胞。这些包括但不限于:微生物,例如用含有抗体或其结合片段编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的细菌(例如大肠杆菌和枯草芽孢杆菌);用含有抗体或其结合片段编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如,毕赤酵母(Saccharomyces Pichia));用含有抗体或其结合片段编码序列的重组病毒表达载体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用重组

病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒(CaMV)和烟草花叶病毒(TMV))感染或用含有抗体或其结合片段编码序列的重组质粒表达载体(例如,Ti质粒)转化的植物细胞系统;或携带含有源自哺乳动物细胞基因组的启动子(例如金属硫蛋白启动子)或源自哺乳动物病毒的启动子(例如,腺病毒晚期启动子;痘苗病毒7.5K启动子)的重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如,COS、CHO、BH、293、293T、3T3细胞)。

[0280] 为了长期、高产率地产生重组蛋白,优选稳定表达。在一些情况下,任选地工程化稳定表达抗体的细胞系。不是使用含有病毒复制起点的表达载体,而是用由适当的表达控制元件(例如,启动子、增强子、序列、转录终止子、多聚腺苷酸化位点等)和可选择标志物控制的DNA来转化宿主细胞。引入外源DNA后,使工程化的细胞在富集培养基中生长1-2天,然后转入选择性培养基。重组质粒中的可选择标志物赋予对选择的抗性,并允许细胞稳定地将质粒整合到它们的染色体中并生长形成转化灶(foci),转化灶又被克隆并扩增成细胞系。该方法可以有利地用于工程化表达抗体或其结合片段的细胞系。

[0281] 在一些情况下,使用许多选择系统,包括但不限于单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler等人,1977,Cell 11:223)、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(Szybalska&Szybalski,192,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 48:202)和腺嘌呤磷酸核糖转移酶(Lowy等人,1980,Cell 22:817)基因分别用于tk细胞、hgpRT细胞或apRT细胞。此外,抗代谢物抗性用作选择以下基因的基础:dhfr,其赋予对甲氨蝶呤的抗性(Wigler等人,1980,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:357;O'Hare等人,1981,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:1527);gpt,其赋予对霉酚酸的抗性(Mulligan&Berg,1981,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:2072);neo,其赋予对氨基糖苷G-418的抗性(Clinical Pharmacy 12:488-505;Wu和Wu,1991,Biotherapy 3:87-95;Tolstoshev,1993,Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.32:573-596;Mulligan,1993,Science 260:926-932;以及Morgan和Anderson,1993,Ann.Rev.Biochem.62:191-217;May 1993,TIB TECH 11(5):155-215);和hygro,其赋予对潮霉素的抗性(Santerre等人,1984,Gene 30:147)。可使用的重组DNA技术领域通常已知的方法描述于Ausubel等人(编著,1993,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,NY;Kriegler,1990,Gene Transfer and Expression,A Laboratory Manual,Stockton Press,NY;以及Dracopoli等人(编著),1994,Current Protocols in Human Genetics,John Wiley&Sons,NY.第12和13章中;Colberre-Garapin等人,1981,J.Mol.Biol.150:1)。

[0282] 在一些情况下,通过载体扩增来增加抗体的表达水平(对于综述,参见Bebbington和Hentschel,the use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning,第3卷.(Academic Press,New York,1987))。当表达抗体的载体系统中的标志物可扩增时,存在于宿主细胞培养物中的抑制剂水平的增加将增加标志物基因的拷贝数。由于扩增区与抗体的核苷酸序列相关,抗体的产生也将增加(Crouse等人,1983,Mol.Cell Biol.3:257)。

[0283] 在一些情况下,使用本领域已知的用于纯化抗体的任何方法,例如,通过色谱法(例如,离子交换;亲和力,特别是通过在蛋白A后对特定抗原的亲和力;和分级(sizing)柱色谱法)、离心、差异溶解度或通过用于纯化蛋白的任何其他标准技术。

[0284] 表达载体

[0285] 在一些实施方案中,载体包括来源于真核或原核来源的任何合适的载体。在一些

情况下,载体获自细菌(例如,大肠杆菌)、昆虫、酵母(例如,巴斯德毕赤酵母)、藻类或哺乳动物来源。示例性细菌载体包括pACYC177、pASK75、pBAD载体系列、pBADM载体系列、pET载体系列、pETM载体系列、pGEX载体系列、pHAT、pHAT2、pMal-c2、pMal-p2、pQE载体系列、pRSET A、pRSET B、pRSET C、pTrcHis2系列、pZA31-Luc、pZE21-MCS-1、pFLAG ATS、pFLAG CTS、pFLAG MAC、pFLAG Shift-12c、pTAC-MAT-1、pFLAG CTC或pTAC-MAT-2。

[0286] 示例性昆虫载体包括pFastBac1、pFastBac DUAL、pFastBac ET、pFastBac HTa、pFastBac HTb、pFastBac HTc、pFastBac M30a、pFastBac M30b、pFastBac M30c、pVL1392、pVL1393、pVL1393 M10、pVL1393M11、pVL1393 M12、诸如pPolh-FLAG1或pPolh-MAT 2的FLAG载体或诸如pPolh-MAT1或pPolh-MAT2的MAT载体。

[0287] 在一些情况下,酵母载体包括 Gateway® pDEST™14载体、Gateway® pDEST™15载体、Gateway® pDEST™17载体、Gateway® pDEST™24载体、Gateway® pYES-DEST52载体、pBAD-DEST49 Gateway® 目的载体、pA0815毕赤酵母载体、pFLD1巴斯德毕赤酵母(*Pichi pastoris*)载体、pGAPZA、B、&C巴斯德毕赤酵母载体、pPIC3.5K毕赤酵母载体、pPIC6 A、B、&C毕赤酵母载体、pPIC9K毕赤酵母载体、pTEF1/Zeo、pYES2酵母载体、pYES2/CT酵母载体、pYES2/NT A、B、&C酵母载体或pYES3/CT酵母载体。

[0288] 示例性藻类载体包括pChlamy-4载体或MCS载体。

[0289] 哺乳动物载体的示例包括瞬时表达载体或稳定表达载体。哺乳动物瞬时表达载体可包括pRK5、p3xFLAG-CMV 8、pFLAG-Myc-CMV 19、pFLAG-Myc-CMV 23、pFLAG-CMV 2、pFLAG-CMV 6a、b、c、pFLAG-CMV 5.1、pFLAG-CMV 5a、b、c、p3xFLAG-CMV 7.1、pFLAG-CMV 20、p3xFLAG-Myc-CMV 24、pCMV-FLAG-MAT1、pCMV-FLAG-MAT2、pBICEP-CMV 3或pBICEP-CMV 4。哺乳动物稳定表达载体可包括pFLAG-CMV 3、p3xFLAG-CMV 9、p3xFLAG-CMV 13、pFLAG-Myc-CMV 21、p3xFLAG-Myc-CMV 25、pFLAG-CMV 4、p3xFLAG-CMV 10、p3xFLAG-CMV 14、pFLAG-Myc-CMV 22、p3xFLAG-Myc-CMV 26、pBICEP-CMV 1或pBICEP-CMV 2。

[0290] 在一些情况下,无细胞系统是来自细胞的细胞质和/或细胞核组分的混合物,并用于体外核酸合成。在一些情况下,无细胞系统利用原核细胞组分或真核细胞组分。有时,在基于例如果蝇细胞、非洲爪蟾卵或HeLa细胞的无细胞系统中获得核酸合成。示例性无细胞系统包括但不限于大肠杆菌S30提取物系统、大肠杆菌T7 S30系统或PURExpress®。

[0291] 宿主细胞

[0292] 在一些实施方案中,宿主细胞包括任何合适的细胞,例如天然来源的细胞或遗传修饰的细胞。在一些情况下,宿主细胞是生产宿主细胞。在一些情况下,宿主细胞是真核细胞。在其他情况下,宿主细胞是原核细胞。在一些情况下,真核细胞包括真菌(例如,酵母细胞)、动物细胞或植物细胞。在一些情况下,原核细胞是细菌细胞。细菌细胞的示例包括革兰氏阳性细菌或革兰氏阴性细菌。有时革兰氏阴性细菌是厌氧的、棒状的或两者。

[0293] 在一些情况下,革兰氏阳性细菌包括放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)或软壁菌门(Tenericutes)。在一些情况下,革兰氏阴性细菌包括产水菌门(Aquificae)、异常球菌-栖热菌门(Deinococcus-Thermus)、纤维杆菌-绿菌/拟杆菌门(Fibrobacteres-Chlorobi/Bacteroidetes)(FCB组)、梭杆菌门(Fusobacteria)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、硝基螺旋菌门(Nitrospirae)、浮霉菌-疣微菌门/衣原体门

(Planctomycetes-Verrucomicrobia/Chlamydiae) (PVC组)、变形菌门(Proteobacteria)、螺旋菌门(Spirochaetes)或互养菌门(Synergistetes)。其他细菌可以是酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、产金菌门(Chrysiogenetes)、蓝细菌(Cyanobacteria)、脱铁杆菌门(Deferribacteres)、网团菌纲(Dictyoglomi)、热脱硫杆菌门(Thermodesulfobacteria)或热袍菌门(Thermotogae)。细菌细胞可以是大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肉毒杆菌(*Clostridium botulinum*)或大肠杆菌(*Coli bacilli*)。

[0294] 示例性原核宿主细胞包括但不限于BL21、Mach1TM、DH10BTM、TOP10、DH5 α 、DH10BacTM、OmniMaxTM、MegaXTM、DH12STM、INV110、TOP10F'、INV α F、TOP10/P3、ccdB Survival、PIR1、PIR2、Stb12TM、Stb13TM或Stb14TM。

[0295] 在一些情况下,动物细胞包括来自脊椎动物或来自无脊椎动物的细胞。在一些情况下,动物细胞包括来自海洋无脊椎动物、鱼、昆虫、两栖动物、爬行动物或哺乳动物的细胞。在一些情况下,真菌细胞包括酵母细胞,如啤酒酵母、面包酵母或葡萄酒酵母。

[0296] 真菌包括诸如酵母的子囊菌、霉菌、丝状真菌、担子菌或接合菌。在一些情况下,酵母包括子囊菌门或担子菌门(Basidiomycota)。在一些情况下,子囊菌门包括酵母亚门(Saccharomycotina)(真酵母,例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)(面包酵母))或外囊菌亚门(Taphrinomycotina)(例如,裂殖酵母纲(Schizosaccharomycetes)(分裂酵母))。在一些情况下,担子菌门包括伞菌亚门(Agaricomycotina)(例如,银耳纲(Tremellomycetes))或柄锈菌亚门(Pucciniomycotina)(例如,微球黑粉菌纲(Microbotryomycetes))。

[0297] 示例性酵母或丝状真菌包括例如以下属:酵母属(*Saccharomyces*)、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)、假丝酵母属(*Candida*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、汉逊酵母属(*Hansenula*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、接合酵母属(*Zygosaccharomyces*)、耶氏酵母属(*Yarrowia*)、丝孢酵母属(*Trichosporon*)、红冬孢酵母属(*Rhodosporeidi*)、曲霉属(*Aspergillus*)、镰孢属(*Fusarium*)或木霉属(*Trichoderma*)。示例性酵母或丝状真菌包括例如以下种:酿酒酵母、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、产朊假丝酵母(*Candida utilis*)、博伊丁假丝酵母(*Candida boidini*)、白假丝酵母(*Candida albicans*)、热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)、类星型假丝酵母(*Candida stellatoidea*)、光滑假丝酵母(*Candida glabrata*)、克鲁塞假丝酵母(*Candida krusei*)、近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis*)、季也蒙假丝酵母(*Candida guilliermondii*)、维斯假丝酵母(*Candida viswanathii*)、葡萄牙假丝酵母(*Candida lusitaniae*)、粘红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)、甲醇毕赤酵母(*Pichia metanolica*)、安格斯塔毕赤酵母(*Pichia angusta*)、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、异常毕赤酵母(*Pichia anomala*)、多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、鲁氏接合酵母(*Zygosaccharomyces rouxii*)、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)、茁芽丝孢酵母(*Trichosporon pullulans*)、圆红冬孢酵母-黑曲霉(*Rhodosporeidium toru-Aspergillus niger*)、巢状曲霉(*Aspergillus nidulans*)、阿瓦森曲霉(*Aspergillus awamori*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)、布鲁塞尔酒香酵母(*Brettanomyces bruxellensis*)、星型假丝酵母(*Candida stellata*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces*

pombe)、德尔布有孢圆酵母(*Torulasporea delbrueckii*)、拜氏接合酵母(*Zygosaccharomyces bailii*)、新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)、格特隐球菌(*Cryptococcus gattii*)或布拉酵母(*Saccharomyces boulardii*)。

[0298] 示例性酵母宿主细胞包括但不限于巴斯德毕赤酵母酵母菌株,如GS115、KM71H、SMD1168、SMD1168H和X-33;以及酿酒酵母酵母菌株,如INVSc1。

[0299] 在一些情况下,另外的动物细胞包括从软体动物、节肢动物、环节动物或海绵获得的细胞。在一些情况下,另外的动物细胞是哺乳动物细胞,例如来自灵长类动物、猿、马、牛、猪、犬、猫或啮齿动物。在一些情况下,啮齿动物包括小鼠、大鼠、仓鼠、沙鼠、仓鼠、南美栗鼠(chinchilla)、花枝鼠或豚鼠。

[0300] 示例性哺乳动物宿主细胞包括但不限于293A细胞系、293FT细胞系、293F细胞、293H细胞、CHO DG44细胞、CHO-S细胞、CHO-K1细胞、FUT8 KO CHOK1、Expi293F™细胞、Flp-In™T-REx™293细胞系、Flp-In™-293细胞系、Flp-In™-3T3细胞系、Flp-In™-BHK细胞系、Flp-In™-CHO细胞系、Flp-In™-CV-1细胞系、Flp-In™-Jurkat细胞系、FreeStyle™293-F细胞、FreeStyle™CHO-S细胞、GripTite™293MSR细胞系、GS-CHO细胞系、HepaRG™细胞、T-REx™Jurkat细胞系、Per.C6细胞、T-REx™-293细胞系、T-REx™-CHO细胞系和T-REx™-HeLa细胞系。

[0301] 在一些情况下,哺乳动物宿主细胞是稳定的细胞系,或已将感兴趣的遗传物质整合到其自身基因组中并具有在许多代细胞分裂后表达遗传物质产物的能力的细胞系。在一些情况下,哺乳动物宿主细胞是瞬时细胞系,或没有将感兴趣的遗传物质整合到其自身基因组中且不具有在许多代细胞分裂后表达遗传物质产物的能力的细胞系。

[0302] 示例性昆虫宿主细胞包括但不限于果蝇S2细胞、Sf9细胞、Sf21细胞、High Five™细胞和**expresSF+**®细胞。

[0303] 在一些情况下,植物细胞包括来自藻类的细胞。示例性的昆虫细胞系包括但不限于来自莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*) 137c或细长聚球藻(*Synechococcus elongatus*) PPC 7942的菌株。

[0304] 制品

[0305] 在本公开的另一方面,提供了含有可用于治疗、预防和/或诊断上述病症的材料的制品。制品包含容器和在容器上或与容器相关联的标签或包装说明书。合适的容器包括,例如,瓶子、小瓶、注射器、IV溶液袋等。容器可以由诸如玻璃或塑料的各种材料形成。

[0306] 标签或包装说明书指示组合物用于治疗所选择的病况。本公开的该实施方案中的制品还可以包含包装说明书,其指示组合物可用于治疗特定病况。

[0307] 可替代地或附加地,制品进一步可以包含:第二(或第三)容器,其包含药学上可接受的缓冲剂,如抑菌注射用水(BWFI)、磷酸缓冲盐水、林格氏溶液和右旋糖溶液。它可以进一步包括从商业和用户观点来看所需的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针和注射器。

[0308] 实施方案

[0309] 实施方案1.一种根据以下式的分离的多特异性抗体: $P_1-L_1-A_1-L-B$ (式I),其中 A_1 包含CD28结合结构域;B包含PD-L1结合结构域;L包含连接 A_1 与B的接头; P_1 包含结合至 A_1 的肽,并且 L_1 包含连接 A_1 与 P_1 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物,其中 P_1 包含根据

SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。

[0310] 实施方案2.如实施方案1所述的分离的多特异性抗体,其中多特异性抗体是根据以下式: $P_1-L_1-A_1-L-B-L_2-P_2$ (式Ia),其中 P_2 包含结合至B的肽,并且 L_2 包含连接B与 P_2 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物。

[0311] 实施方案3.如实施方案1或2所述的分离的多特异性抗体,其中 P_1 包含根据SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的氨基酸序列。

[0312] 实施方案4.如实施方案1或2所述的分离的多特异性抗体,其中 P_1 包含根据SEQ ID NO:42-53的任一者的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:42-53的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。

[0313] 实施方案5.如实施方案1或2所述的分离的多特异性抗体,其中 P_1 包含根据SEQ ID NO:42-53的任一者的氨基酸序列。

[0314] 实施方案6.如实施方案1或2所述的分离的多特异性抗体,其中 P_1 包含根据表20的氨基酸序列的任一者的氨基酸序列或相对于表20的氨基酸序列的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。

[0315] 实施方案7.如实施方案1或2所述的分离的多特异性抗体,其中 P_1 包含根据表20的氨基酸序列的任一者的氨基酸序列。

[0316] 实施方案8.如实施方案1或2所述的分离的多特异性抗体,其中 P_1 包含根据SEQ ID NO:128-147的任一者的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:128-147的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。

[0317] 实施方案9.如实施方案1或2所述的分离的多特异性抗体,其中 P_1 包含根据SEQ ID NO:128-147的任一者的氨基酸序列。

[0318] 实施方案10.如实施方案1或2所述的分离的多特异性抗体,其中 P_1 包含根据 $X_1-X_2-X_3-C-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-C-X_{11}-X_{12}$ 的氨基酸序列,其中 X_1 选自M、I、L和V; X_2 选自D、H、N、A、F、S、T、Y和V; X_3 选自W、L和F; X_4 选自P、A和L; X_5 选自R、T、I、M、S、K、L、V、W、F、A、P和D; X_6 选自E、D、Y、H、S、F、A、N、T、I、P和V; X_7 选自L、M、R、S、Q和H; X_8 选自W和Q; X_9 选自H、N、D、A、S、Y、T、F、V、L和I; X_{10} 选自E、V、L、D、Y、R、Q、H、F、K、A、M和N; X_{11} 选自F、Y、L、W和V;并且 X_{12} 选自N、A、F、S、Y、H、D、T和L。

[0319] 实施方案11.如实施方案10所述的分离的多特异性抗体,其中 X_1 选自M、I和L; X_2 选自D、H、N和A; X_3 是W; X_4 是P; X_5 选自R、T、I、M、S和K; X_6 选自E、D、Y、H、S和F; X_7 选自L、M和R; X_8 是W; X_9 选自H、N、D、A、S和V; X_{10} 选自E、V、L、D和H; X_{11} 选自F、Y和L;并且 X_{12} 选自N、A、F、S和Y。

[0320] 实施方案12.如实施方案11所述的分离的多特异性抗体,其中 X_1 是M; X_2 选自D和H; X_3 是W; X_4 是P; X_5 选自R、T和I; X_6 选自E、D和Y; X_7 选自L、M和R; X_8 是W; X_9 选自H、N、D和V; X_{10} 选自E、V、L、D和H; X_{11} 是F;并且 X_{12} 选自N、A和F。

[0321] 实施方案13.如实施方案1-3、10-12中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中 P_1 包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:32具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。

[0322] 实施方案14.如实施方案1-3、10-12中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中 P_1

包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

[0323] 实施方案15.如实施方案1-3、10-12中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₁包含根据SEQ ID NO:138的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:138具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。

[0324] 实施方案16.如实施方案1-3、10-12中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₁包含根据SEQ ID NO:138的氨基酸序列。

[0325] 实施方案17.如实施方案1-16中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₁削弱A₁与CD28的结合。

[0326] 实施方案18.如实施方案1-17中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₁通过离子相互作用、静电相互作用、疏水相互作用、Pi-堆积相互作用和H键相互作用或其组合结合至A₁。

[0327] 实施方案19.如实施方案1-18中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₁在抗原结合位点或其附近结合至A₁。

[0328] 实施方案20.如实施方案1-18中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中当L₁被肿瘤特异性蛋白酶切割时,P₁与A₁解结合,从而使A₁暴露于CD28。

[0329] 实施方案21.如实施方案1-20中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₁与CD28具有小于75%的序列同一性。

[0330] 实施方案22.如实施方案1-21中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₁与CD28具有小于80%的序列同一性。

[0331] 实施方案23.如实施方案1-22中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₁与CD28具有小于85%的序列同一性。

[0332] 实施方案24.如实施方案1-23中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₁与CD28具有小于90%的序列同一性。

[0333] 实施方案25.如实施方案1-24中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₁与CD28具有小于95%的序列同一性。

[0334] 实施方案26.如实施方案1-25中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₁包含与CD28共享小于10%的序列同一性的从头生成氨基酸序列。

[0335] 实施方案27.如实施方案2-26中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₂削弱B与PD-L1的结合。

[0336] 实施方案28.如实施方案2-27中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₂通过离子相互作用、静电相互作用、疏水相互作用、Pi-堆积相互作用和H键相互作用或其组合结合至B。

[0337] 实施方案29.如实施方案2-28中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₂在抗原结合位点或其附近结合至B。

[0338] 实施方案30.如实施方案2-29中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中当L₂被肿瘤特异性蛋白酶切割时,P₂与B解结合,从而使B暴露于PD-L1。

[0339] 实施方案31.如实施方案2-30中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₂与PD-L1具有小于70%的序列同一性。

[0340] 实施方案32.如实施方案2-31中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₂与PD-

L1具有小于75%的序列同一性。

[0341] 实施方案33.如实施方案2-32中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₂与PD-L1具有小于80%的序列同一性。

[0342] 实施方案34.如实施方案2-33中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₂与PD-L1具有小于85%的序列同一性。

[0343] 实施方案35.如实施方案2-34中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₂与PD-L1具有小于90%的序列同一性。

[0344] 实施方案36.如实施方案2-35中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₂与PD-L1具有小于95%的序列同一性。

[0345] 实施方案37.如实施方案2-36中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₂包含与PD-L1共享小于10%的序列同一性的从头生成氨基酸序列。

[0346] 实施方案38.如实施方案2-37中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₂包含长度为至少5个氨基酸的肽序列。

[0347] 实施方案39.如实施方案2-38中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₂包含长度为至少6个氨基酸的肽序列。

[0348] 实施方案40.如实施方案2-39中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₂包含长度为至少10个氨基酸的肽序列。

[0349] 实施方案41.如实施方案2-40中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₂包含长度为至少10个氨基酸并且长度为不多于20个氨基酸的肽序列。

[0350] 实施方案42.如实施方案2-41中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₂包含长度为至少16个氨基酸的肽序列。

[0351] 实施方案43.如实施方案2-42中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₂包含长度为不多于40个氨基酸的肽序列。

[0352] 实施方案44.如实施方案1-43中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₁或P₂包含至少两个半胱氨酸氨基酸残基。

[0353] 实施方案45.如实施方案1-44中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₁或P₂包含环肽或线性肽。

[0354] 实施方案46.如实施方案1-45中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₁或P₂包含环肽。

[0355] 实施方案47.如实施方案1-46中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₁或P₂包含线性肽。

[0356] 实施方案48.如实施方案1-47中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₁或P₂包含经修饰氨基酸或非天然氨基酸或经修饰非天然氨基酸,或其组合。

[0357] 实施方案49.如实施方案1-48中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₁或P₂不包含白蛋白或白蛋白片段。

[0358] 实施方案50.如实施方案1-49中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中P₁或P₂不包含白蛋白结合结构域。

[0359] 实施方案51.如实施方案1-50中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中L₁或L₂是具有至少5个至不多于50个氨基酸的肽序列。

[0360] 实施方案52.如实施方案1-51中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中L₁或L₂是具有至少10个至不多于30个氨基酸的肽序列。

[0361] 实施方案53.如实施方案1-52中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中L₁或L₂是具有至少10个氨基酸的肽序列。

[0362] 实施方案54.如实施方案1-53中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中L₁或L₂是具有至少18个氨基酸的肽序列。

[0363] 实施方案55.如实施方案1-54中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中L₁或L₂是具有至少26个氨基酸的肽序列。

[0364] 实施方案56.如实施方案1-55中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中L₁或L₂包含包括(G₂S)_n的式,其中n是1至3的整数(SEQ ID NO:228)。

[0365] 实施方案57.如实施方案1-56中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中L₁或L₂包含包括(G₂S)_n的式,其中n是至少为1的整数。

[0366] 实施方案58.如实施方案1-57中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中L₁或L₂包含选自以下的式:(G₂S)_n、(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:58)、(GGGS)_n(SEQ ID NO:59)、(GGGS)_n(SEQ ID NO:60)和(GSSGGS)_n(SEQ ID NO:61),其中n是至少为1的整数。

[0367] 实施方案59.如实施方案1-58中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中肿瘤特异性蛋白酶选自金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶。

[0368] 实施方案60.如实施方案1-58中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中L₁或L₂包含尿激酶可切割氨基酸序列、膜型丝氨酸蛋白酶可切割氨基酸序列或基质金属蛋白酶可切割氨基酸序列。

[0369] 实施方案61.如实施方案1-60中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中L₁或L₂包含根据SEQ ID NO:18-19、62-88的序列。

[0370] 实施方案62.如实施方案1-61中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中L₁结合至A₁的N-末端。

[0371] 实施方案63.如实施方案1-61中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中L₁结合至A₁的C-末端。

[0372] 实施方案64.如实施方案1-61中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中L₂结合至B的N-末端。

[0373] 实施方案65.如实施方案1-61中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中L₂结合至B的C-末端。

[0374] 实施方案66.如实施方案1-65中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中CD28结合结构域包含单链可变片段、单结构域抗体、Fab或Fab'。

[0375] 实施方案67.如实施方案66所述的分离的多特异性抗体,其中CD28结合结构域包含单链可变片段。

[0376] 实施方案68.如实施方案66所述的分离的多特异性抗体,其中CD28结合结构域包含单结构域抗体。

[0377] 实施方案69.如实施方案66所述的分离的多特异性抗体,其中CD28结合结构域包含Fab或Fab'。

[0378] 实施方案70.如实施方案1-69中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中PD-L1结合结构域包含单链可变片段、单结构域抗体、Fab或Fab'。

[0379] 实施方案71.如实施方案70所述的分离的多特异性抗体,其中PD-L1结合结构域包含Fab或Fab'。

[0380] 实施方案72.如实施方案70所述的分离的多特异性抗体,其中PD-L1结合结构域包含Fab或Fab'并且CD28结合结构域包含单链可变片段。

[0381] 实施方案73.如实施方案70所述的分离的多特异性抗体,其中包含Fab或Fab'的PD-L1结合结构域包含Fab重链多肽和Fab轻链多肽,Fab重链多肽包含Fab重链可变结构域,Fab轻链多肽包含Fab轻链可变结构域。

[0382] 实施方案74.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中包含单链可变片段的CD28结合结构域包含scFv重链可变结构域和scFv轻链可变结构域。

[0383] 实施方案75.如实施方案1-74中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中接头连接A₁的C-末端与B的N-末端。

[0384] 实施方案76.如实施方案1-74中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中接头连接A₁的N-末端与B的C-末端。

[0385] 实施方案77.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中接头连接A₁的C-末端与Fab重链多肽的N-末端。

[0386] 实施方案78.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中接头连接A₁的N-末端与Fab重链多肽的C-末端。

[0387] 实施方案79.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中接头连接A₁的C-末端与Fab轻链多肽的N-末端。

[0388] 实施方案80.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中接头连接A₁的N-末端与Fab轻链多肽的C-末端。

[0389] 实施方案81.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中接头连接Fab轻链多肽与scFv轻链可变结构域。

[0390] 实施方案82.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中接头连接Fab轻链多肽与scFv重链可变结构域。

[0391] 实施方案83.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中接头连接Fab重链多肽与scFv轻链可变结构域。

[0392] 实施方案84.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中接头连接Fab重链多肽与scFv重链可变结构域。

[0393] 实施方案85.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中接头连接Fab轻链多肽与scFv轻链可变结构域的N-末端。

[0394] 实施方案86.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中接头连接Fab轻链多肽与scFv轻链可变结构域的C-末端。

[0395] 实施方案87.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中接头连接Fab轻链多肽与scFv重链可变结构域的N-末端。

[0396] 实施方案88.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中接头连接Fab轻链多肽与scFv重链可变结构域的C-末端。

[0397] 实施方案89.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中接头连接Fab重链多肽与scFv轻链可变结构域的N-末端。

[0398] 实施方案90.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中接头连接Fab重链多肽与scFv轻链可变结构域的C-末端。

[0399] 实施方案91.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中接头连接Fab重链多肽与scFv重链可变结构域的N-末端。

[0400] 实施方案92.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中接头连接Fab重链多肽与scFv重链可变结构域的C-末端。

[0401] 实施方案93.如实施方案1-92中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中接头的长度为至少5个氨基酸。

[0402] 实施方案94.如实施方案1-93中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中接头的长度为不多于30个氨基酸。

[0403] 实施方案95.如实施方案1-94中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中接头的长度为至少5个氨基酸并且不多于30个氨基酸。

[0404] 实施方案96.如实施方案1-95中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中接头的长度为5个氨基酸。

[0405] 实施方案97.如实施方案1-96中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中接头的长度为15个氨基酸。

[0406] 实施方案98.如实施方案1-97中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中接头包含(G₂S)_n、(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:58)、(GGGS)_n(SEQ ID NO:59)、(GGGGS)_n(SEQ ID NO:60)和(GSSGGS)_n(SEQ ID NO:61),其中n是至少为1的整数。

[0407] 实施方案99.如实施方案1-98中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中L包含包括(G₂S)_n的式,其中n是1至3的整数(SEQ ID NO:228)。

[0408] 实施方案100.如实施方案1-97中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中L包含SEQ ID NO:18(GGGGSGGGGSGGGGS)或SEQ ID NO:19(GGGGS)的氨基酸序列。

[0409] 实施方案101.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中scFv重链可变结构域包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中scFv重链可变结构域的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:1;HC-CDR2:SEQ ID NO:2;HC-CDR3:SEQ ID NO:3,并且其中所述CDR包含所述HC-CDR1、HC-CDR2或HC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修饰。

[0410] 实施方案102.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中scFv轻链可变结构域包含互补决定区(CDR):LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中scFv轻链可变结构域的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:4;LC-CDR2:SEQ ID NO:5(KA);和LC-CDR3:SEQ ID NO:6,并且其中CDR包含所述LC-CDR1、LC-CDR2或LC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修饰。

[0411] 实施方案103.如实施方案1-100中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中A₁包含互补决定区(CDR):LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中A₁的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:4;LC-CDR2:SEQ ID NO:5(KA);和LC-CDR3:SEQ ID NO:6;其中A₁包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中A₁的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包

含:HC-CDR1:SEQ ID NO:1;HC-CDR2:SEQ ID NO:2;HC-CDR3:SEQ ID NO:3。

[0412] 实施方案104.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中Fab重链可变结构域包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中Fab重链可变结构域的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:10;HC-CDR2:SEQ ID NO:11;HC-CDR3:SEQ ID NO:12;并且其中所述CDR包含所述HC-CDR1、HC-CDR2或HC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修饰。

[0413] 实施方案105.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中Fab轻链可变结构域包含互补决定区(CDR):LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中Fab轻链可变结构域的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:13;LC-CDR2:SEQ ID NO:14(DA);和LC-CDR3:SEQ ID NO:15;并且其中CDR包含所述LC-CDR1、LC-CDR2或LC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修饰。

[0414] 实施方案106.如实施方案1-100中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中B包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中B的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:10;HC-CDR2:SEQ ID NO:11;HC-CDR3:SEQ ID NO:12;并且其中B包含互补决定区(CDR):LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中B的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:13;LC-CDR2:SEQ ID NO:14(DA);和LC-CDR3:SEQ ID NO:15。

[0415] 实施方案107.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中scFv重链可变结构域包含与根据SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0416] 实施方案108.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中scFv重链可变结构域包含SEQ ID NO:7的至少75个连续氨基酸残基的氨基酸序列。

[0417] 实施方案109.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中scFv重链可变结构域包含SEQ ID NO:7的至少110个连续氨基酸残基的氨基酸序列。

[0418] 实施方案110.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中scFv重链可变结构域包含SEQ ID NO:7的至少110个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID NO:7的至少110个连续氨基酸残基具有至少80%序列同一性。

[0419] 实施方案111.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中scFv重链可变结构域包含根据SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

[0420] 实施方案112.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中scFv轻链可变结构域包含与根据SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0421] 实施方案113.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中scFv轻链可变结构域包含SEQ ID NO:8的至少75个连续氨基酸残基的氨基酸序列。

[0422] 实施方案114.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中scFv轻链可变结构域包含SEQ ID NO:8的至少100个连续氨基酸残基的氨基酸序列。

[0423] 实施方案115.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中scFv轻链可变结构域包含SEQ ID NO:8的至少100个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID NO:8的至少100个连续氨基酸残基具有至少80%序列同一性。

[0424] 实施方案116.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中scFv轻链可变结构域包含根据SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

[0425] 实施方案117.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中scFv包含与根据

SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0426] 实施方案118.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中scFv包含SEQ ID NO:9的至少175个连续氨基酸残基的氨基酸序列。

[0427] 实施方案119.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中scFv包含SEQ ID NO:9的至少210个连续氨基酸残基的氨基酸序列。

[0428] 实施方案120.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中scFv包含SEQ ID NO:9的至少210个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID NO:9的至少210个连续氨基酸残基具有至少80%序列同一性。

[0429] 实施方案121.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中scFv包含根据SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0430] 实施方案122.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中Fab重链多肽包含与根据SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0431] 实施方案123.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中Fab重链多肽包含SEQ ID NO:17的至少175个连续氨基酸残基的氨基酸序列。

[0432] 实施方案124.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中Fab重链多肽包含SEQ ID NO:17的至少215个连续氨基酸残基的氨基酸序列。

[0433] 实施方案125.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中Fab重链多肽包含SEQ ID NO:17的至少215个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID NO:17的至少215个连续氨基酸残基具有至少80%序列同一性。

[0434] 实施方案126.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中Fab重链多肽包含根据SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0435] 实施方案127.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中Fab轻链多肽包含与根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0436] 实施方案128.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中Fab轻链多肽包含SEQ ID NO:16的至少175个连续氨基酸残基的氨基酸序列。

[0437] 实施方案129.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中Fab轻链多肽包含SEQ ID NO:16的至少200个连续氨基酸残基的氨基酸序列。

[0438] 实施方案130.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中Fab轻链多肽包含SEQ ID NO:16的至少200个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID NO:16的至少200个连续氨基酸残基具有至少80%序列同一性。

[0439] 实施方案131.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中Fab轻链多肽包含根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0440] 实施方案132.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中接头连接Fab重链多肽与scFv轻链可变结构域的C-末端,并且其中Fab轻链多肽包含与根据SEQ ID NO:20的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列,并且连接至scFv轻链可变结构域的C-末端的Fab重链多肽的氨基酸序列包含与根据SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0441] 实施方案133.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中接头连接Fab重链多肽与scFv轻链可变结构域的C-末端,并且其中Fab轻链多肽包含根据SEQ ID NO:20的氨

基酸序列,并且连接至scFv轻链可变结构域的C-末端的Fab重链多肽的氨基酸序列包含根据SEQ ID NO:21的氨基酸序列。

[0442] 实施方案134.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中接头连接Fab轻链多肽与scFv轻链可变结构域的C-末端,并且其中Fab重链多肽包含与根据SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列,并且连接至scFv轻链可变结构域的C-末端的Fab轻链多肽的氨基酸序列包含与根据SEQ ID NO:22的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0443] 实施方案135.如实施方案73所述的分离的多特异性抗体,其中接头连接Fab轻链多肽与scFv轻链可变结构域的C-末端,并且其中Fab重链多肽包含根据SEQ ID NO:23的氨基酸序列,并且连接至scFv轻链可变结构域的C-末端的Fab轻链多肽的氨基酸序列包含根据SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

[0444] 实施方案136.如实施方案1-135中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中多特异性抗体进一步包含半衰期延长分子(H_1)。

[0445] 实施方案137.如实施方案136所述的分离的多特异性抗体,其中 H_1 连接至 P_1 。

[0446] 实施方案138.如实施方案136所述的分离的多特异性抗体,其中 H_1 连接至 P_2 。

[0447] 实施方案139.如实施方案136-138中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中 H_1 不阻断 A_1 结合至CD28。

[0448] 实施方案140.如实施方案136-139中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中 H_1 不阻断B结合至PD-L1。

[0449] 实施方案141.如实施方案136-140中任一项所述的分离的多特异性抗体, H_1 包含连接 H_1 与 P_1 或 H_1 与 P_2 的联接部分(L_3)。

[0450] 实施方案142.如实施方案136-141中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中半衰期延长分子(H_1)对PD-L1不具有结合亲和力。

[0451] 实施方案143.如实施方案136-142中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中半衰期延长分子(H_1)对CD28不具有结合亲和力。

[0452] 实施方案144.如实施方案136-143中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中半衰期延长分子(H_1)不保护多特异性抗体免受CD28的影响。

[0453] 实施方案145.如实施方案136-144中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中 H_1 包含根据SEQ ID NO:54-57的序列。

[0454] 实施方案146.如实施方案136-144中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中 H_1 包含具有重复序列基序的氨基酸序列。

[0455] 实施方案147.如实施方案136-144中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中 H_1 包含具有高度有序二级结构的氨基酸序列。

[0456] 实施方案148.如实施方案136-144中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中 H_1 包含聚合物。

[0457] 实施方案149.如实施方案148所述的分离的多特异性抗体,其中聚合物是聚乙二醇(PEG)。

[0458] 实施方案150.如实施方案136-149中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中 H_1 包含白蛋白。

- [0459] 实施方案151.如实施方案136-150中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中H₁包含Fc结构域。
- [0460] 实施方案152.如实施方案150所述的分离的多特异性抗体,其中白蛋白是血清白蛋白。
- [0461] 实施方案153.如实施方案152所述的分离的多特异性抗体,其中白蛋白是人血清白蛋白。
- [0462] 实施方案154.如实施方案136-153中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中H₁包含多肽、配体或小分子。
- [0463] 实施方案155.如实施方案153所述的分离的多特异性抗体,其中多肽、配体或小分子结合血清蛋白或其片段、循环免疫球蛋白或其片段、或CD35/CR1。
- [0464] 实施方案156.如实施方案155所述的分离的多特异性抗体,其中血清蛋白包括甲状腺素结合蛋白、转甲状腺素蛋白、1-酸性糖蛋白、转铁蛋白、转铁蛋白受体或其转铁蛋白结合部分、纤维蛋白原或白蛋白。
- [0465] 实施方案157.如实施方案155所述的分离的多特异性抗体,其中循环免疫球蛋白分子包含IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、sIgA、IgM或IgD。
- [0466] 实施方案158.如实施方案155所述的分离的多特异性抗体,其中血清蛋白是白蛋白。
- [0467] 实施方案159.如实施方案154所述的分离的多特异性抗体,其中多肽是抗体。
- [0468] 实施方案160.如实施方案159所述的分离的多特异性抗体,其中抗体包括单结构域抗体、单链可变片段、Fab或Fab'。
- [0469] 实施方案161.如实施方案160所述的分离的多特异性抗体,其中单结构域抗体包括结合至白蛋白的单结构域抗体。
- [0470] 实施方案162.如实施方案160所述的分离的多特异性抗体,其中单结构域抗体是人抗体或人源化抗体。
- [0471] 实施方案163.如实施方案160所述的分离的多特异性抗体,其中单结构域抗体选自645gH1gL1、645dsgH5gL4、23-13-A01-sc02、A10m3或其片段、DOM7r-31、DOM7h-11-15、Alb-1、Alb-8、Alb-23、10G、10E和SA21。
- [0472] 实施方案164.如实施方案160所述的分离的多特异性抗体,其中单结构域抗体包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中单结构域抗体的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:54、HC-CDR2:SEQ ID NO:55和HC-CDR3:SEQ ID NO:56;并且其中CDR包含HC-CDR1、HC-CDR2或HC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修饰或其中单结构域抗体包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中单结构域抗体的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:204、HC-CDR2:SEQ ID NO:205和HC-CDR3:SEQ ID NO:206;并且其中CDR包含HC-CDR1、HC-CDR2或HC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修饰。
- [0473] 实施方案165.如实施方案164所述的分离的多特异性抗体,其中H₁包含根据SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:207的氨基酸序列。
- [0474] 实施方案166.如实施方案165所述的分离的多特异性抗体,其中H₁包含与SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:207具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

- [0475] 实施方案167.如实施方案165所述的分离的多特异性抗体,其中H₁包含与SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:207具有至少85%序列同一性的氨基酸序列。
- [0476] 实施方案168.如实施方案165所述的分离的多特异性抗体,其中H₁包含与SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:207具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。
- [0477] 实施方案169.如实施方案165所述的分离的多特异性抗体,其中H₁包含与SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:207具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。
- [0478] 实施方案170.如实施方案165所述的分离的多特异性抗体,其中H₁包含与SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:207具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。
- [0479] 实施方案171.如实施方案136-170中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中H₁包含经修饰氨基酸或非天然氨基酸或经修饰非天然氨基酸,或其组合。
- [0480] 实施方案172.如实施方案171所述的分离的多特异性抗体,其中经修饰氨基酸或经修饰非天然氨基酸包含翻译后修饰。
- [0481] 实施方案173.如实施方案136-172中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中H₁包含连接H₁与P₁或P₂的联接部分(L₅)。
- [0482] 实施方案174.如实施方案173所述的分离的多特异性抗体,其中L₅是具有至少5个至不多于50个氨基酸的肽序列。
- [0483] 实施方案175.如实施方案173所述的分离的多特异性抗体,其中L₅是具有至少10个至不多于30个氨基酸的肽序列。
- [0484] 实施方案176.如实施方案173所述的分离的多特异性抗体,其中L₅是具有至少10个氨基酸的肽序列。
- [0485] 实施方案177.如实施方案173所述的分离的多特异性抗体,其中L₅是具有至少18个氨基酸的肽序列。
- [0486] 实施方案178.如实施方案173所述的分离的多特异性抗体,其中L₅是具有至少26个氨基酸的肽序列。
- [0487] 实施方案179.如实施方案173所述的分离的多特异性抗体,其中L₅包含选自以下的式:(G₂S)_n、(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:58)、(GGGS)_n(SEQ ID NO:59)、(GGGGS)_n(SEQ ID NO:60)和(GSSGGS)_n(SEQ ID NO:61),其中n是至少为1的整数。
- [0488] 实施方案180.如实施方案1-179中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149-170的任一者具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。
- [0489] 实施方案181.如实施方案1-180中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149-170的任一者具有至少85%序列同一性的氨基酸序列。
- [0490] 实施方案182.如实施方案1-181中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149-170的任一者具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。
- [0491] 实施方案183.如实施方案1-182中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149-170的任一者具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0492] 实施方案184.如实施方案1-183中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149-170的任一者具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0493] 实施方案185.如实施方案1-183中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149和150具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0494] 实施方案186.如实施方案1-183中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:149和150具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0495] 实施方案187.如实施方案1-183中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:151和152具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0496] 实施方案188.如实施方案1-183中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:151和152具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0497] 实施方案189.如实施方案1-183中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:153和154具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0498] 实施方案190.如实施方案1-183中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:153和154具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0499] 实施方案191.如实施方案1-183中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:155和156具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0500] 实施方案192.如实施方案1-183中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:155和156具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0501] 实施方案193.如实施方案1-183中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:157和158具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0502] 实施方案194.如实施方案1-183中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:157和158具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0503] 实施方案195.如实施方案1-183中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:159和160具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0504] 实施方案196.如实施方案1-183中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:159和160具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0505] 实施方案197.如实施方案1-183中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:161和162具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0506] 实施方案198.如实施方案1-183中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:161和162具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0507] 实施方案199.如实施方案1-183中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:163和164具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0508] 实施方案200.如实施方案1-183中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:163和164具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0509] 实施方案201.如实施方案1-183中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:165和166具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0510] 实施方案202.如实施方案1-183中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:165和166具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0511] 实施方案203.如实施方案1-183中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:167和168具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0512] 实施方案204.如实施方案1-183中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:167和168具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0513] 实施方案205.如实施方案1-183中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:169和170具有至少95%序列同一性或 SEQ ID NO:208和209具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0514] 实施方案206.如实施方案1-183中任一项所述的分离的多特异性抗体,其中分离的多特异性抗体包含与SEQ ID NO:169和170具有至少99%序列同一性或 SEQ ID NO:208和209具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0515] 实施方案207.一种分离的重组核酸分子,其编码如实施方案1-206中任一项所述的分离的多特异性抗体的多肽。

[0516] 实施方案208.一种药物组合物,其包含:

[0517] (a) 如实施方案1-206中任一项所述的分离的多特异性抗体;和

[0518] (b) 药学上可接受的赋形剂。

[0519] 实施方案209.一种药物组合物,其包含:(a) 如实施方案1-206中任一项所述的分离的多特异性抗体、(b) 抗癌疗法和(c) 药学上可接受的赋形剂。

[0520] 实施方案210.实施方案2.如实施方案209所述的药物组合物,其中抗癌疗法包括小分子、基于细胞的治疗或基于抗体的治疗。

[0521] 实施方案211.如实施方案210所述的药物组合物,其中基于抗体的治疗是T细胞衔接器。

[0522] 实施方案212.如实施方案211所述的药物组合物,其中T细胞衔接器包含根据以下的式: $D_1-L_0-E_1$ (式II),其中 D_1 包含结合至效应细胞抗原的效应细胞结合结构域, E_1 包含结合至肿瘤抗原的肿瘤抗原结合结构域,并且 L_0 包含连接 D_1 与 E_1 的接头。

[0523] 实施方案213.如实施方案212所述的药物组合物,其中 D_1 包含单链可变片段、单结构域抗体、Fab片段或Fab'。

[0524] 实施方案214.如实施方案213所述的药物组合物,其中 D_1 包含单链可变片段。

[0525] 实施方案215.如实施方案212所述的药物组合物,其中 E_1 包含单链可变片段、单结构域抗体、Fab片段或Fab'。

[0526] 实施方案216.如实施方案215所述的药物组合物,其中 E_1 包含Fab片段。

[0527] 实施方案217.如实施方案215所述的药物组合物,其中效应细胞抗原包含CD3。

[0528] 实施方案218.如实施方案217所述的药物组合物,其中效应细胞结合结构域包含选自以下的互补决定区(CDR):莫罗单抗-CD3(OKT3)、奥昔组单抗(TRX4)、替利组单抗(MGA031)、维西珠单抗(Nuvion)、SP34、X35、VIT3、BMA030(BW264/56)、CLB-T3/3、CRIS7、YTH12.5、F111-409、CLB-T3.4.2、TR-66、WT32、SPv-T3b、11D8、XIII-141、XIII-46、XIII-87、12F6、T3/RW2-8C8、T3/RW2-4B6、OKT3D、M-T301、SMC2、F101.01、UCHT-1、WT-31、15865、15865v12、15865v16和15865v19。

[0529] 实施方案219.如实施方案217所述的药物组合物,其中效应细胞结合结构域包含根据SEQ ID NO:89-101的氨基酸序列。

[0530] 实施方案220.如实施方案212-219中任一项所述的药物组合物,其中肿瘤抗原包括表皮生长因子受体(EGFR)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)或肿瘤相关钙信号转导器2(在本文中称为TROP2)。

[0531] 实施方案221.如实施方案220所述的药物组合物,其中肿瘤抗原包括EGFR。

[0532] 实施方案222.如实施方案220所述的药物组合物,其中肿瘤抗原结合结构域包含根据SEQ ID NO:102-111的氨基酸序列。

[0533] 实施方案223.如实施方案220所述的药物组合物,其中肿瘤抗原包括EGFR,并且肿瘤结合结构域包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,以及LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:105;HC-CDR2:SEQ ID NO:106;HC-CDR3:SEQ ID NO:107;并且其中LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:102;LC-CDR2:SEQ ID NO:103(YAS);和LC-CDR3:SEQ ID NO:104。

[0534] 实施方案224.如实施方案220所述的药物组合物,其中肿瘤抗原包括EGFR,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:181和182具有至少95%序列同一性或根据SEQ ID NO:214和215具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0535] 实施方案225.如实施方案220所述的药物组合物,其中肿瘤抗原包括EGFR,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:181和182或根据SEQ ID NO:214和215的氨基酸序列。

[0536] 实施方案226.如实施方案220所述的药物组合物,其中肿瘤抗原包括TROP2。

[0537] 实施方案227.如实施方案220所述的药物组合物,其中肿瘤抗原包括TROP2,并且肿瘤结合结构域包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,以及LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含HC-CDR1:SEQ ID NO:112;HC-CDR2:SEQ ID NO:113;HC-CDR3:SEQ ID NO:114;并且其中LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:115;LC-CDR2:SEQ ID NO:116(SAS);和LC-CDR3:SEQ ID NO:117。

[0538] 实施方案228.如实施方案220所述的药物组合物,其中肿瘤抗原包括TROP2,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:187-192具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0539] 实施方案229.如实施方案220所述的药物组合物,其中肿瘤抗原包括TROP2,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:187-192的任一者的氨基酸序列。

[0540] 实施方案230.如实施方案220所述的药物组合物,其中肿瘤抗原结合结构域包含根据SEQ ID NO:112-119的氨基酸序列。

[0541] 实施方案231.如实施方案220所述的药物组合物,其中肿瘤抗原包括PSMA。

[0542] 实施方案232.如实施方案220所述的药物组合物,其中肿瘤抗原结合结构域包含根据SEQ ID NO:120-127的氨基酸序列。

[0543] 实施方案233.如实施方案220所述的药物组合物,其中肿瘤抗原包括PSMA,并且肿瘤结合结构域包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,以及LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含HC-CDR1:SEQ ID NO:120;HC-CDR2:SEQ ID NO:121;HC-CDR3:SEQ ID NO:122;并且其中LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:123;LC-CDR2:SEQ ID NO:124(EA);和LC-CDR3:SEQ ID NO:125。

[0544] 实施方案234.如实施方案220所述的药物组合物,其中肿瘤抗原包括PSMA,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:173和174具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0545] 实施方案235.如实施方案220所述的药物组合物,其中肿瘤抗原包括PSMA,并且T

细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:173和174的氨基酸序列。

[0546] 实施方案236.如实施方案211-235中任一项所述的药物组合物,其中T细胞衔接器分子在肿瘤微环境中被选择性激活。

[0547] 实施方案237.如实施方案236所述的药物组合物,其中T细胞衔接器是根据以下子式: $P_3-L_3-D_1-L_0-E_1$ (式IIa),其中 D_1 包含CD3结合结构域; E_1 包含肿瘤抗原结合结构域; L_0 包含连接 D_1 与 E_1 的接头; P_3 包含结合至 D_1 的肽,并且 L_3 包含连接 D_1 与 P_3 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物。

[0548] 实施方案238.如实施方案236所述的药物组合物,其中T细胞衔接器是根据以下子式: $D_1-L_0-E_1-L_4-P_4$ (式IIb),其中 D_1 包含CD3结合结构域; E_1 包含肿瘤抗原结合结构域; L_0 包含连接 D_1 与 E_1 的接头; P_4 包含结合至 E_1 的肽,并且 L_4 包含连接 E_1 与 P_4 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物。

[0549] 实施方案239.如实施方案236所述的药物组合物,其中T细胞衔接器是根据以下子式: $P_3-L_3-D_1-L_0-E_1-L_4-P_4$ (式IIc),其中 D_1 包含CD3结合结构域; E_1 包含肿瘤抗原结合结构域; L_0 包含连接 D_1 与 E_1 的接头; P_3 包含结合至 D_1 的肽,并且 L_3 包含连接 D_1 与 P_3 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物; P_4 包含结合至 E_1 的肽,并且 L_4 包含连接 E_1 与 P_4 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物。

[0550] 实施方案240.如实施方案211-239中任一项所述的药物组合物,其中T细胞衔接器包含 H_1 。

[0551] 实施方案241.如实施方案240所述的药物组合物,其中 H_1 包含根据SEQ ID NO:54-57的序列。

[0552] 实施方案242.如实施方案240所述的药物组合物,其中 H_1 包含单结构域抗体。

[0553] 实施方案243.如实施方案240所述的药物组合物,其中单结构域抗体包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中单结构域抗体的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:54、HC-CDR2:SEQ ID NO:55和HC-CDR3:SEQ ID NO:56。

[0554] 实施方案244.如实施方案237-243中任一项所述的药物组合物,其中 L_3 或 L_4 是具有至少5个至不多于50个氨基酸的肽序列。

[0555] 实施方案245.如实施方案237-244中任一项所述的药物组合物,其中 L_3 或 L_4 是具有至少10个至不多于30个氨基酸的肽序列。

[0556] 实施方案246.如实施方案237-245中任一项所述的药物组合物,其中 L_3 或 L_4 是具有至少10个氨基酸的肽序列。

[0557] 实施方案247.如实施方案237-246中任一项所述的药物组合物,其中 L_3 或 L_4 是具有至少18个氨基酸的肽序列。

[0558] 实施方案248.如实施方案237-247中任一项所述的药物组合物,其中 L_3 或 L_4 是具有至少26个氨基酸的肽序列。

[0559] 实施方案249.如实施方案237-243中任一项所述的药物组合物,其中 L_3 或 L_4 包含包括 $(G_2S)_n$ 的式,其中n是1至3的整数(SEQ ID NO:228)。

[0560] 实施方案250.如实施方案237-243中任一项所述的药物组合物,其中 L_3 或 L_4 包含包括 $(G_2S)_n$ 的式,其中n是至少为1的整数。

[0561] 实施方案251.如实施方案237-243中任一项所述的药物组合物,其中 L_3 或 L_4 包含选

自以下的式： $(G_2S)_n$ 、 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO:58)、 $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO:59)、 $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO:60)和 $(GSSGGS)_n$ (SEQ ID NO:61)，其中n是至少为1的整数。

[0562] 实施方案252.如实施方案237-243中任一项所述的药物组合物,其中肿瘤特异性蛋白酶选自金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶。

[0563] 实施方案253.如实施方案237-243中任一项所述的药物组合物,其中 L_3 或 L_4 包含尿激酶可切割氨基酸序列、膜型丝氨酸蛋白酶可切割氨基酸序列或基质金属蛋白酶可切割氨基酸序列。

[0564] 实施方案254.如实施方案237-243中任一项所述的药物组合物,其中 L_3 或 L_4 包含根据SEQ ID NO:18-19、62-88的序列。

[0565] 实施方案255.如实施方案237-254中任一项所述的药物组合物,其中 L_3 结合至 D_1 的N-末端。

[0566] 实施方案256.如实施方案237-254中任一项所述的药物组合物,其中 L_3 结合至 D_1 的C-末端。

[0567] 实施方案257.如实施方案238-254中任一项所述的药物组合物,其中 L_4 结合至 E_1 的N-末端。

[0568] 实施方案258.如实施方案238-254中任一项所述的药物组合物,其中 L_4 结合至 E_1 的C-末端。

[0569] 实施方案259.如实施方案237-254中任一项所述的药物组合物,其中当 L_3 被肿瘤特异性蛋白酶切割时, P_3 与 D_1 解结合,从而使 D_1 暴露于CD3。

[0570] 实施方案260.如实施方案238-254中任一项所述的药物组合物,其中当 L_4 被肿瘤特异性蛋白酶切割时, P_4 与 E_1 解结合,从而使 E_1 暴露于肿瘤抗原。

[0571] 实施方案261.如实施方案237-260中任一项所述的药物组合物,其中 P_3 削弱 D_1 与CD3的结合。

[0572] 实施方案262.如实施方案237-261中任一项所述的药物组合物,其中 P_3 通过离子相互作用、静电相互作用、疏水相互作用、 π -堆积相互作用和H键相互作用或其组合结合至 D_1 。

[0573] 实施方案263.如实施方案237-262中任一项所述的药物组合物,其中 P_3 在抗原结合位点或其附近结合至 D_1 。

[0574] 实施方案264.如实施方案237-263中任一项所述的药物组合物,其中当 L_3 被肿瘤特异性蛋白酶切割时, P_3 与 D_1 解结合,从而使 D_1 暴露于CD3。

[0575] 实施方案265.如实施方案237-264中任一项所述的药物组合物,其中 P_3 与CD3具有小于70%的序列同一性。

[0576] 实施方案266.如实施方案237-265中任一项所述的药物组合物,其中 P_3 与CD3具有小于85%的序列同一性。

[0577] 实施方案267.如实施方案237-266中任一项所述的药物组合物,其中 P_3 与CD3具有小于90%的序列同一性。

[0578] 实施方案268.如实施方案237-267中任一项所述的药物组合物,其中 P_3 与CD3具有小于95%的序列同一性。

- [0579] 实施方案269.如实施方案237-268中任一项所述的药物组合物,其中P₃与CD3具有小于98%的序列同一性。
- [0580] 实施方案270.如实施方案237-269中任一项所述的药物组合物,其中P₃与CD3具有小于99%的序列同一性。
- [0581] 实施方案271.如实施方案237-270中任一项所述的药物组合物,其中P₃包含根据SEQ ID NO:177-180的氨基酸序列。
- [0582] 实施方案272.如实施方案237-271中任一项所述的药物组合物,其中P₃包含与CD3共享小于10%的序列同一性的从头生成氨基酸序列。
- [0583] 实施方案273.如实施方案238-272中任一项所述的药物组合物,其中P₄削弱E₁与肿瘤抗原的结合。
- [0584] 实施方案274.如实施方案238-273中任一项所述的药物组合物,其中P₄通过离子相互作用、静电相互作用、疏水相互作用、Pi-堆积相互作用和H键相互作用或其组合结合至E₁。
- [0585] 实施方案275.如实施方案238-274中任一项所述的药物组合物,其中P₄在抗原结合位点或其附近结合至E₁。
- [0586] 实施方案276.如实施方案238-275中任一项所述的药物组合物,其中当L4被肿瘤特异性蛋白酶切割时,P₄与E₁解结合,从而使E₁暴露于肿瘤抗原。
- [0587] 实施方案277.如实施方案238-276中任一项所述的药物组合物,其中P₄与肿瘤抗原具有小于70%的序列同一性。
- [0588] 实施方案278.如实施方案238-277中任一项所述的药物组合物,其中P₄与肿瘤抗原具有小于80%的序列同一性。
- [0589] 实施方案279.如实施方案238-278中任一项所述的药物组合物,其中P₄与肿瘤抗原具有小于85%的序列同一性。
- [0590] 实施方案280.如实施方案238-279中任一项所述的药物组合物,其中P₄与肿瘤抗原具有小于90%的序列同一性。
- [0591] 实施方案281.如实施方案238-280中任一项所述的药物组合物,其中P₄与肿瘤抗原具有小于95%的序列同一性。
- [0592] 实施方案282.如实施方案238-281中任一项所述的药物组合物,其中P₄包含与肿瘤抗原共享小于10%的序列同一性的从头生成氨基酸序列。
- [0593] 实施方案283.如实施方案237-282中任一项所述的药物组合物,其中P₃或P₄包含长度为至少5个氨基酸的肽序列。
- [0594] 实施方案284.如实施方案237-283中任一项所述的药物组合物,其中P₃或P₄包含长度为至少6个氨基酸的肽序列。
- [0595] 实施方案285.如实施方案237-284中任一项所述的药物组合物,其中P₃或P₄包含长度为至少10个氨基酸的肽序列。
- [0596] 实施方案286.如实施方案237-285中任一项所述的药物组合物,其中P₃或P₄包含长度为至少10个氨基酸并且长度为不多于20个氨基酸的肽序列。
- [0597] 实施方案287.如实施方案237-286中任一项所述的药物组合物,其中P₃或P₄包含长度为至少16个氨基酸的肽序列。

- [0598] 实施方案288.如实施方案237-287中任一项所述的药物组合物,其中P₃或P₄包含长度为不多于40个氨基酸的肽序列。
- [0599] 实施方案289.如实施方案237-288中任一项所述的药物组合物,其中P₃或P₄包含至少两个半胱氨酸氨基酸残基。
- [0600] 实施方案290.如实施方案237-289中任一项所述的药物组合物,其中P₃或P₄包含环肽或线性肽。
- [0601] 实施方案291.如实施方案237-290中任一项所述的药物组合物,其中P₃或P₄包含环肽。
- [0602] 实施方案292.如实施方案237-291中任一项所述的药物组合物,其中P₃或P₄包含线性肽。
- [0603] 实施方案293.如实施方案238-292中任一项所述的药物组合物,其中P₄包含根据SEQ ID NO:185或186的氨基酸序列。
- [0604] 实施方案294.如实施方案237-293中任一项所述的药物组合物,其中肿瘤抗原包括EGFR,并且T细胞衔接器包含SEQ ID NO:183和184的氨基酸序列。
- [0605] 实施方案295.如实施方案238-292中任一项所述的药物组合物,其中P₄包含根据SEQ ID NO:199-201的氨基酸序列。
- [0606] 实施方案296.如实施方案237-292中任一项所述的药物组合物,其中肿瘤抗原包括TROP2,并且T细胞衔接器包含SEQ ID NO:193-198的氨基酸序列的任一者。
- [0607] 实施方案297.如实施方案237-292中任一项所述的药物组合物,其中肿瘤抗原包括PSMA,并且T细胞衔接器包含SEQ ID NO:175和176的氨基酸序列。
- [0608] 实施方案298.一种分离的多肽或多肽复合物,其包含CD28结合结构域,CD28结合结构域联接至削弱CD28结合结构域与CD28的结合的肽,其中肽包含根据SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。
- [0609] 实施方案299.如实施方案298所述的分离的多肽或多肽复合物,其中肽包含根据SEQ ID NO:24-53、128-148的任一者和表20的氨基酸序列的氨基酸序列。
- [0610] 实施方案300.如实施方案298所述的分离的多肽或多肽复合物,其中肽包含根据SEQ ID NO:42-53的任一者的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:42-53的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。
- [0611] 实施方案301.如实施方案298所述的分离的多肽或多肽复合物,其中肽包含根据SEQ ID NO:42-53的任一者的氨基酸序列。
- [0612] 实施方案302.如实施方案298所述的分离的多肽或多肽复合物,其中肽包含根据表20的氨基酸序列的任一者的氨基酸序列或相对于表20的氨基酸序列的任一者具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。
- [0613] 实施方案303.如实施方案298所述的分离的多肽或多肽复合物,其中肽包含根据表20的氨基酸序列的任一者的氨基酸序列。
- [0614] 实施方案304.如实施方案298所述的分离的多肽或多肽复合物,其中肽包含根据SEQ ID NO:128-147的任一者的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:128-147的任一者具有1、2

或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。

[0615] 实施方案305.如实施方案298所述的分离的多肽或多肽复合物,其中肽包含根据SEQ ID NO:128-147的任一者的氨基酸序列。

[0616] 实施方案306.如实施方案298所述的分离的多肽或多肽复合物,其中肽包含根据 $X_1-X_2-X_3-C-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-C-X_{11}-X_{12}$ 的氨基酸序列,其中 X_1 选自M、I、L和V; X_2 选自D、H、N、A、F、S、T、Y和V; X_3 选自W、L和F; X_4 选自P、A和L; X_5 选自R、T、I、M、S、K、L、V、W、F、A、P和D; X_6 选自E、D、Y、H、S、F、A、N、T、I、P和V; X_7 选自L、M、R、S、Q和H; X_8 选自W和Q; X_9 选自H、N、D、A、S、Y、T、F、V、L和I; X_{10} 选自E、V、L、D、Y、R、Q、H、F、K、A、M和N; X_{11} 选自F、Y、L、W和V;并且 X_{12} 选自N、A、F、S、Y、H、D、T和L。

[0617] 实施方案307.如实施方案306所述的分离的多肽或多肽复合物,其中 X_1 选自M、I和L; X_2 选自D、H、N和A; X_3 是W; X_4 是P; X_5 选自R、T、I、M、S和K; X_6 选自E、D、Y、H、S和F; X_7 选自L、M和R; X_8 是W; X_9 选自H、N、D、A、S和V; X_{10} 选自E、V、L、D和H; X_{11} 选自F、Y和L;并且 X_{12} 选自N、A、F、S和Y。

[0618] 实施方案308.如实施方案307所述的分离的多肽或多肽复合物,其中 X_1 是M; X_2 选自D和H; X_3 是W; X_4 是P; X_5 选自R、T和I; X_6 选自E、D和Y; X_7 选自L、M和R; X_8 是W; X_9 选自H、N、D和V; X_{10} 选自E、V、L、D和H; X_{11} 是F;并且 X_{12} 选自N、A和F。

[0619] 实施方案309.如实施方案298-302或306-308中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中肽包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:32具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。

[0620] 实施方案310.如实施方案298-302或306-308中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物。

[0621] 实施方案311.如实施方案298所述的分离的多肽或多肽复合物,其中肽包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

[0622] 实施方案312.如实施方案298-302或306-308中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中肽包含根据SEQ ID NO:138的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:138具有1、2或3个氨基酸突变、取代或缺失的氨基酸序列。

[0623] 实施方案313.如实施方案298-302或306-308中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中肽包含根据SEQ ID NO:138的氨基酸序列。

[0624] 实施方案314.如实施方案298-312中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中CD28结合结构域包含单链可变片段、单结构域抗体、Fab或Fab'。

[0625] 实施方案315.如实施方案314所述的分离的多肽或多肽复合物,其中CD28结合结构域包含单链可变片段并且单链可变片段包含scFv重链可变结构域和scFv轻链可变结构域。

[0626] 实施方案316.如实施方案314所述的分离的多肽或多肽复合物,其中CD28结合结构域包含单结构域抗体。

[0627] 实施方案317.如实施方案314所述的分离的多肽或多肽复合物,其中CD28结合结构域包含Fab或Fab'。

[0628] 实施方案318.如实施方案315所述的分离的多肽或多肽复合物,其中scFv重链可变结构域包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中scFv重链可变结构域的

HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:1;HC-CDR2:SEQ ID NO:2;HC-CDR3:SEQ ID NO:3,并且其中所述CDR包含所述HC-CDR1、HC-CDR2或HC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修饰。

[0629] 实施方案319.如实施方案315所述的分离的多肽或多肽复合物,其中scFv轻链可变结构域包含互补决定区(CDR):LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中scFv轻链可变结构域的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:4;LC-CDR2:SEQ ID NO:5(KA);和LC-CDR3:SEQ ID NO:6,并且其中CDR包含所述LC-CDR1、LC-CDR2或LC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修饰。

[0630] 实施方案320.如实施方案315所述的分离的多肽或多肽复合物,其中scFv重链可变结构域包含与根据SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0631] 实施方案321.如实施方案315所述的分离的多肽或多肽复合物,其中scFv重链可变结构域包含SEQ ID NO:7的至少75个连续氨基酸残基的氨基酸序列。

[0632] 实施方案322.如实施方案315所述的分离的多肽或多肽复合物,其中scFv重链可变结构域包含SEQ ID NO:7的至少110个连续氨基酸残基的氨基酸序列。

[0633] 实施方案323.如实施方案315所述的分离的多肽或多肽复合物,其中scFv重链可变结构域包含SEQ ID NO:7的至少110个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID NO:7的至少110个连续氨基酸残基具有至少80%序列同一性。

[0634] 实施方案324.如实施方案315所述的分离的多肽或多肽复合物,其中scFv重链可变结构域包含根据SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

[0635] 实施方案325.如实施方案315所述的分离的多肽或多肽复合物,其中scFv轻链可变结构域包含与根据SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0636] 实施方案326.如实施方案315所述的分离的多肽或多肽复合物,其中scFv轻链可变结构域包含SEQ ID NO:8的至少75个连续氨基酸残基的氨基酸序列。

[0637] 实施方案327.如实施方案315所述的分离的多肽或多肽复合物,其中scFv轻链可变结构域包含SEQ ID NO:8的至少100个连续氨基酸残基的氨基酸序列。

[0638] 实施方案328.如实施方案315所述的分离的多肽或多肽复合物,其中scFv轻链可变结构域包含SEQ ID NO:8的至少100个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID NO:8的至少100个连续氨基酸残基具有至少80%序列同一性。

[0639] 实施方案329.如实施方案315所述的分离的多肽或多肽复合物,其中scFv轻链可变结构域包含根据SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

[0640] 实施方案330.如实施方案314所述的分离的多肽或多肽复合物,其中scFv包含与根据SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0641] 实施方案331.如实施方案315所述的分离的多肽或多肽复合物,其中scFv包含SEQ ID NO:9的至少175个连续氨基酸残基的氨基酸序列。

[0642] 实施方案332.如实施方案315所述的分离的多肽或多肽复合物,其中scFv包含SEQ ID NO:9的至少210个连续氨基酸残基的氨基酸序列。

[0643] 实施方案333.如实施方案315所述的分离的多肽或多肽复合物,其中scFv包含SEQ ID NO:9的至少210个连续氨基酸残基的氨基酸序列并且与SEQ ID NO:9的至少210个连续氨基酸残基具有至少80%序列同一性。

- [0644] 实施方案334.如实施方案315所述的分离的多肽或多肽复合物,其中scFv包含根据SEQ ID NO:9的氨基酸序列。
- [0645] 实施方案335.如实施方案298-334中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中CD28结合结构域通过联接部分(L₁)联接至肽。
- [0646] 实施方案336.如实施方案335所述的分离的多肽或多肽复合物,其中L₁是肿瘤特异性蛋白酶的底物。
- [0647] 实施方案337.如实施方案335-336中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中L₁是具有至少5个至不多于50个氨基酸的肽序列。
- [0648] 实施方案338.如实施方案335-337中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中L₁是具有至少10个至不多于30个氨基酸的肽序列。
- [0649] 实施方案339.如实施方案335-338中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中L₁是具有至少10个氨基酸的肽序列。
- [0650] 实施方案340.如实施方案335-339中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中L₁是具有至少18个氨基酸的肽序列。
- [0651] 实施方案341.如实施方案335-341中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中L₁是具有至少26个氨基酸的肽序列。
- [0652] 实施方案342.如实施方案335-341中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中L₁包含包括(G₂S)_n的式,其中n是1至3的整数(SEQ ID NO:228)。
- [0653] 实施方案343.如实施方案335-341中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中L₁包含包括(G₂S)_n的式,其中n是至少为1的整数。
- [0654] 实施方案344.如实施方案335-341中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中L₁包含选自以下的式:(G₂S)_n、(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:58)、(GGGS)_n(SEQ ID NO:59)、(GGGGS)_n(SEQ ID NO:60)和(GSSGGS)_n(SEQ ID NO:61),其中n是至少为1的整数。
- [0655] 实施方案345.如实施方案335-344中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中肿瘤特异性蛋白酶选自金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶。
- [0656] 实施方案346.如实施方案335-344中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中L₁包含尿激酶可切割氨基酸序列、膜型丝氨酸蛋白酶可切割氨基酸序列或基质金属蛋白酶可切割氨基酸序列。
- [0657] 实施方案347.如实施方案335-346中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中L₁包含根据SEQ ID NO:18-19、62-88的序列。
- [0658] 实施方案348.如实施方案335-347中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中L₁结合至A₁的N-末端。
- [0659] 实施方案349.如实施方案335-347中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中L₁结合至A₁的C-末端。
- [0660] 实施方案350.如实施方案335-349中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中当L₁被肿瘤特异性蛋白酶切割时,P₁与A₁解结合,从而使A₁暴露于CD28。
- [0661] 实施方案351.如实施方案335-350中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中L₁包含经修饰氨基酸或非天然氨基酸或经修饰非天然氨基酸,或其组合。

- [0662] 实施方案352.如实施方案351所述的分离的多肽或多肽复合物,其中经修饰氨基酸或经修饰非天然氨基酸包含翻译后修饰。
- [0663] 实施方案353.如实施方案298-352中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中分离的多肽或多肽复合物进一步包含半衰期延长分子(H₁)。
- [0664] 实施方案354.如实施方案353所述的分离的多肽或多肽复合物,其中H₁连接至肽。
- [0665] 实施方案355.如实施方案353或354所述的分离的多肽或多肽复合物,其中H₁不断CD28结合结构域与CD28。
- [0666] 实施方案356.如实施方案354-355中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,H₁包含联接部分(L₅),联接部分连接H₁与肽。
- [0667] 实施方案357.如实施方案353-356中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中半衰期延长分子(H₁)对CD28不具有结合亲和力。
- [0668] 实施方案358.如实施方案353-357中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中半衰期延长分子(H₁)不保护分离的多肽或多肽复合物免受CD28的影响。
- [0669] 实施方案359.如实施方案353-358中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中H₁包含根据SEQ ID NO:54-57的序列。
- [0670] 实施方案360.如实施方案353-359中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中H₁包含具有重复序列基序的氨基酸序列。
- [0671] 实施方案361.如实施方案353-360中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中H₁包含具有高度有序二级结构的氨基酸序列。
- [0672] 实施方案362.如实施方案353-361中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中H₁包含聚合物。
- [0673] 实施方案363.如实施方案362所述的分离的多肽或多肽复合物,其中聚合物是聚乙二醇(PEG)。
- [0674] 实施方案364.如实施方案353-361中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中H₁包含白蛋白。
- [0675] 实施方案365.如实施方案353-361中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中H₁包含Fc结构域。
- [0676] 实施方案366.如实施方案364所述的分离的多肽或多肽复合物,其中白蛋白是血清白蛋白。
- [0677] 实施方案367.如实施方案364所述的分离的多肽或多肽复合物,其中白蛋白是人血清白蛋白。
- [0678] 实施方案368.如实施方案353-361中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中H₁包含多肽、配体或小分子。
- [0679] 实施方案369.如实施方案368所述的分离的多肽或多肽复合物,其中多肽、配体或小分子结合血清蛋白或其片段、循环免疫球蛋白或其片段、或CD35/CR1。
- [0680] 实施方案370.如实施方案369所述的分离的多肽或多肽复合物,其中血清蛋白包括甲状腺素结合蛋白、转甲状腺素蛋白、1-酸性糖蛋白、转铁蛋白、转铁蛋白受体或其转铁蛋白结合部分、纤维蛋白原或白蛋白。
- [0681] 实施方案371.如实施方案369所述的分离的多肽或多肽复合物,其中循环免疫球

蛋白分子包含IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、sIgA、IgM或IgD。

[0682] 实施方案372.如实施方案369所述的分离的多肽或多肽复合物,其中血清蛋白是白蛋白。

[0683] 实施方案373.如实施方案368所述的分离的多肽或多肽复合物,其中多肽是抗体。

[0684] 实施方案374.如实施方案373所述的分离的多肽或多肽复合物,其中抗体包括单结构域抗体、单链可变片段、Fab或Fab'。

[0685] 实施方案375.如实施方案374所述的分离的多肽或多肽复合物,其中单结构域抗体包括结合至白蛋白的单结构域抗体。

[0686] 实施方案376.如实施方案374所述的分离的多肽或多肽复合物,其中单结构域抗体是人抗体或人源化抗体。

[0687] 实施方案377.如实施方案374所述的分离的多肽或多肽复合物,其中单结构域抗体选自645gH1gL1、645dsgH5gL4、23-13-A01-sc02、A10m3或其片段、DOM7r-31、DOM7h-11-15、A1b-1、A1b-8、A1b-23、10G、10E和SA21。

[0688] 实施方案378.如实施方案374所述的分离的多肽或多肽复合物,其中单结构域抗体包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中单结构域抗体的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:54、HC-CDR2:SEQ ID NO:55和HC-CDR3:SEQ ID NO:56;并且其中CDR包含HC-CDR1、HC-CDR2或HC-CDR3的至少一个中的0-2个氨基酸修饰。

[0689] 实施方案379.如实施方案353-361中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中H₁包含根据SEQ ID NO:57的氨基酸序列。

[0690] 实施方案380.如实施方案353-361中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中H₁包含与SEQ ID NO:57具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0691] 实施方案381.如实施方案353-361中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中H₁包含与SEQ ID NO:57具有至少85%序列同一性的氨基酸序列。

[0692] 实施方案382.如实施方案353-361中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中H₁包含与SEQ ID NO:57具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

[0693] 实施方案383.如实施方案353-361中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中H₁包含与SEQ ID NO:57具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0694] 实施方案384.如实施方案353-361中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中H₁包含与SEQ ID NO:57具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0695] 实施方案385.如实施方案353-361中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中H₁包含经修饰氨基酸或非天然氨基酸或经修饰非天然氨基酸,或其组合。

[0696] 实施方案386.如实施方案385所述的分离的多肽或多肽复合物,其中经修饰氨基酸或经修饰非天然氨基酸包含翻译后修饰。

[0697] 实施方案387.如实施方案353-387中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中H₁包含连接H₁与P₁或P₂的联接部分(L₅)。

[0698] 实施方案388.如实施方案387所述的分离的多肽或多肽复合物,其中L₅是具有至少5个至不多于50个氨基酸的肽序列。

[0699] 实施方案389.如实施方案387-388中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中L₅是具有至少10个至不多于30个氨基酸的肽序列。

- [0700] 实施方案390.如实施方案387-389中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中 L_5 是具有至少10个氨基酸的肽序列。
- [0701] 实施方案391.如实施方案387-390中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中 L_5 是具有至少18个氨基酸的肽序列。
- [0702] 实施方案392.如实施方案387-391中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中 L_5 是具有至少26个氨基酸的肽序列。
- [0703] 实施方案393.如实施方案387-392中任一项所述的分离的多肽或多肽复合物,其中 L_5 包含选自以下的式: $(G_2S)_n$ 、 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO:58)、 $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO:59)、 $(GGGG)_n$ (SEQ ID NO:60)和 $(GSSGGS)_n$ (SEQ ID NO:61),其中n是至少为1的整数。
- [0704] 实施方案394.一种在有需要的对象中治疗癌症的方法,其包括向对象施用如实施方案1-180中任一项所述的多特异性抗体。
- [0705] 实施方案395.如实施方案394所述的方法,其中多特异性抗体诱导T细胞介导的肿瘤细胞的细胞毒性。
- [0706] 实施方案396.如实施方案394或395所述的方法,其中癌症是血液恶性肿瘤。
- [0707] 实施方案397.如实施方案394或395所述的方法,其中癌症是白血病或淋巴瘤。
- [0708] 实施方案398.如实施方案394或395所述的方法,其中癌症是淋巴瘤,并且其中淋巴瘤是B细胞淋巴瘤。
- [0709] 实施方案399.如实施方案394或395所述的方法,其中癌症是实体肿瘤。
- [0710] 实施方案400.如实施方案399所述的方法,其中实体肿瘤表达PD-L1。
- [0711] 实施方案401.如实施方案399所述的方法,其中实体肿瘤是肉瘤、乳腺癌、肺癌或癌。
- [0712] 实施方案402.如实施方案399所述的方法,其中实体肿瘤是肺癌,并且其中肺癌是非小细胞肺癌。
- [0713] 实施方案403.如实施方案394-402中任一项所述的方法,其中多特异性抗体与抗癌疗法组合施用。
- [0714] 实施方案404.如实施方案403所述的方法,其中多特异性抗体和抗癌疗法在相同的药物组合物中施用。
- [0715] 实施方案405.如实施方案403所述的方法,其中多特异性抗体和抗癌疗法作为单独的药物组合物施用。
- [0716] 实施方案406.如实施方案403-405中任一项所述的方法,其中对象对于检查点抑制剂疗法是难治的。
- [0717] 实施方案407.如实施方案403-405中任一项所述的方法,其中对象已从检查点抑制剂疗法复发。
- [0718] 实施方案408.如实施方案403-407中任一项所述的方法,其中抗癌疗法包括小分子、基于细胞的疗法或基于抗体的疗法。
- [0719] 实施方案409.如实施方案408所述的方法,其中基于抗体的疗法是T细胞衔接器。
- [0720] 实施方案410.如实施方案409所述的方法,其中T细胞衔接器包含根据以下的式: $D_1-L_0-E_1$ (式II),其中 D_1 包含结合至效应细胞抗原的效应细胞结合结构域, E_1 包含结合至肿瘤抗原的肿瘤抗原结合结构域,并且 L_0 包含连接 D_1 与 E_1 的接头。

- [0721] 实施方案411.如实施方案410所述的方法,其中D₁包含单链可变片段、单结构域抗体或Fab片段。
- [0722] 实施方案412.如实施方案411所述的方法,其中D₁包含单链可变片段。
- [0723] 实施方案413.如实施方案409-411中任一项所述的方法,其中E₁包含单链可变片段、单结构域抗体、Fab片段或Fab'。
- [0724] 实施方案414.如实施方案413所述的方法,其中E₁包含Fab片段。
- [0725] 实施方案415.如实施方案410-414中任一项所述的方法,其中效应细胞结合结构域包含选自以下的互补决定区(CDR):莫罗单抗-CD3(OKT3)、奥昔组单抗(TRX4)、替利组单抗(MGA031)、维西珠单抗(Nuvion)、SP34、X35、VIT3、BMA030(BW264/56)、CLB-T3/3、CRIS7、YTH12.5、F111-409、CLB-T3.4.2、TR-66、WT32、SPv-T3b、11D8、XIII-141、XIII-46、XIII-87、12F6、T3/RW2-8C8、T3/RW2-4B6、OKT3D、M-T301、SMC2、F101.01、UCHT-1、WT-31、15865、15865v12、15865v16和15865v19。
- [0726] 实施方案416.如实施方案410-415中任一项所述的方法,其中效应细胞结合结构域包含根据SEQ ID NO:89-101的氨基酸序列。
- [0727] 实施方案417.如实施方案410-416中任一项所述的方法,其中肿瘤抗原包括表皮生长因子受体(EGFR)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)或肿瘤相关钙信号转导器2(在本文中称为TROP2)。
- [0728] 实施方案418.如实施方案417所述的方法,其中肿瘤抗原包括EGFR。
- [0729] 实施方案419.如实施方案418所述的方法,其中肿瘤抗原结合结构域包含根据SEQ ID NO:102-111的氨基酸序列。
- [0730] 实施方案420.如实施方案417所述的方法,其中肿瘤抗原包括EGFR,并且肿瘤结合结构域包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,以及LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含HC-CDR1:SEQ ID NO:105;HC-CDR2:SEQ ID NO:106;HC-CDR3:SEQ ID NO:107;并且其中LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:102;LC-CDR2:SEQ ID NO:103(YAS);和LC-CDR3:SEQ ID NO:104。
- [0731] 实施方案421.如实施方案417所述的方法,其中肿瘤抗原包括EGFR,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:181和182具有至少95%序列同一性或根据SEQ ID NO:214和215具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。
- [0732] 实施方案422.如实施方案417所述的方法,其中肿瘤抗原包括EGFR,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:181和182或根据SEQ ID NO:214和215的氨基酸序列。
- [0733] 实施方案423.如实施方案417所述的方法,其中癌症是结肠直肠癌(CRC)、头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)、非小细胞肺癌(NSCLC)、前列腺癌、乳腺癌、结肠癌/直肠癌、头颈癌、食管胃癌、肝癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、膀胱癌、肾癌或胰腺癌。
- [0734] 实施方案424.如实施方案417所述的方法,其中肿瘤抗原包括TROP2。
- [0735] 实施方案425.如实施方案416所述的方法,其中肿瘤抗原包括TROP2,并且肿瘤结合结构域包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,以及LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含HC-CDR1:SEQ ID NO:112;HC-CDR2:SEQ ID NO:113;HC-CDR3:SEQ ID NO:114;并且其中LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:115;LC-CDR2:SEQ ID NO:116(SAS);和LC-CDR3:SEQ ID NO:117。

[0736] 实施方案426.如实施方案417所述的方法,其中肿瘤抗原包括TROP2,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:187-192具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0737] 实施方案427.如实施方案417所述的方法,其中肿瘤抗原包括TROP2,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:187-192的任一者的氨基酸序列。

[0738] 实施方案428.如实施方案417所述的方法,其中肿瘤抗原结合结构域包含根据SEQ ID NO:112-119的氨基酸序列。

[0739] 实施方案429.如实施方案417所述的方法,其中癌症是肺癌、乳腺癌(例如HER2+; ER/PR+; TNBC)、宫颈癌、卵巢癌、结肠直肠癌、胰腺癌、胃癌、三阴性乳腺癌(TNBC)、尿路上皮癌(UC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、小细胞肺癌(SCLC)、胃癌、食管癌、头颈癌、前列腺癌或子宫内膜癌。

[0740] 实施方案430.如实施方案417所述的方法,其中肿瘤抗原包括PSMA。

[0741] 实施方案431.如实施方案417所述的方法,其中肿瘤抗原结合结构域包含根据SEQ ID NO:120-127的氨基酸序列。

[0742] 实施方案432.如实施方案417所述的方法,其中肿瘤抗原包括PSMA,并且肿瘤结合结构域包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,以及LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,其中HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含HC-CDR1:SEQ ID NO:120;HC-CDR2:SEQ ID NO:121;HC-CDR3:SEQ ID NO:122;并且其中LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含:LC-CDR1:SEQ ID NO:123;LC-CDR2:SEQ ID NO:124(EA);和LC-CDR3:SEQ ID NO:125。

[0743] 实施方案433.如实施方案417所述的方法,其中肿瘤抗原包括PSMA,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:173和174具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0744] 实施方案434.如实施方案417所述的方法,其中肿瘤抗原包括PSMA,并且T细胞衔接器包含根据SEQ ID NO:173和174的氨基酸序列。

[0745] 实施方案435.如实施方案417所述的方法,其中癌症是肺癌、乳腺癌(例如HER2+; ER/PR+; TNBC)、宫颈癌、卵巢癌、结肠直肠癌、胰腺癌或胃癌。

[0746] 实施方案436.如实施方案408-435中任一项所述的方法,其中T细胞衔接器分子在肿瘤微环境中被选择性激活。

[0747] 实施方案437.如实施方案436所述的方法,其中T细胞衔接器是根据以下子式: $P_3-L_3-D_1-L_0-E_1$ (式IIa),其中 D_1 包含CD3结合结构域; E_1 包含肿瘤抗原结合结构域; L_0 包含连接 D_1 与 E_1 的接头; P_3 包含结合至 D_1 的肽,并且 L_3 包含连接 D_1 与 P_3 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物。

[0748] 实施方案438.如实施方案436所述的方法,其中T细胞衔接器是根据以下子式: $D_1-L_0-E_1-L_4-P_4$ (式IIb),其中 D_1 包含CD3结合结构域; E_1 包含肿瘤抗原结合结构域; L_0 包含连接 D_1 与 E_1 的接头; P_4 包含结合至 E_1 的肽,并且 L_4 包含连接 E_1 与 P_4 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物。

[0749] 实施方案439.如实施方案436所述的方法,其中T细胞衔接器是根据以下子式: $P_3-L_3-D_1-L_0-E_1-L_4-P_4$ (式IIc),其中 D_1 包含CD3结合结构域; E_1 包含肿瘤抗原结合结构域; L_0 包含连接 D_1 与 E_1 的接头; P_3 包含结合至 D_1 的肽,并且 L_3 包含连接 D_1 与 P_3 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物; P_4 包含结合至 E_1 的肽,并且 L_4 包含连接 E_1 与 P_4 的联接部分并且是肿瘤特异性蛋白酶的底物。

- [0750] 实施方案440.如实施方案437-439中任一项所述的方法,其中T细胞衔接器包含H₁。
- [0751] 实施方案441.如实施方案440所述的方法,其中H₁包含根据SEQ ID NO:54-57的序列。
- [0752] 实施方案442.如实施方案440所述的方法,其中H₁包含单结构域抗体。
- [0753] 实施方案443.如实施方案440所述的方法,其中单结构域抗体包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其中单结构域抗体的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含:HC-CDR1:SEQ ID NO:54、HC-CDR2:SEQ ID NO:55和HC-CDR3:SEQ ID NO:56。
- [0754] 实施方案444.如实施方案437-443中任一项所述的方法,其中L₃或L₄是具有至少5个至不多于50个氨基酸的肽序列。
- [0755] 实施方案445.如实施方案437-444中任一项所述的方法,其中L₃或L₄是具有至少10个至不多于30个氨基酸的肽序列。
- [0756] 实施方案446.如实施方案437-445中任一项所述的方法,其中L₃或L₄是具有至少10个氨基酸的肽序列。
- [0757] 实施方案447.如实施方案437-446中任一项所述的方法,其中L₃或L₄是具有至少18个氨基酸的肽序列。
- [0758] 实施方案448.如实施方案437-447中任一项所述的方法,其中L₃或L₄是具有至少26个氨基酸的肽序列。
- [0759] 实施方案449.如实施方案437-448中任一项所述的方法,其中L₃或L₄包含包括(G₂S)_n的式,其中n是1至3的整数(SEQ ID NO:228)。
- [0760] 实施方案450.如实施方案437-449中任一项所述的方法,其中L₃或L₄包含包括(G₂S)_n的式,其中n是至少为1的整数。
- [0761] 实施方案451.如实施方案437-443中任一项所述的方法,其中L₃或L₄包含选自以下的式:(G₂S)_n、(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:58)、(GGGS)_n(SEQ ID NO:59)、(GGGGS)_n(SEQ ID NO:60)和(GSSGGS)_n(SEQ ID NO:61),其中n是至少为1的整数。
- [0762] 实施方案452.如实施方案437-451中任一项所述的方法,其中肿瘤特异性蛋白酶选自金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶。
- [0763] 实施方案453.如实施方案437-452中任一项所述的方法,其中L₃或L₄包含尿激酶可切割氨基酸序列、膜型丝氨酸蛋白酶可切割氨基酸序列或基质金属蛋白酶可切割氨基酸序列。
- [0764] 实施方案454.如实施方案437-453中任一项所述的方法,其中L₃或L₄包含根据SEQ ID NO:18-19、62-88的序列。
- [0765] 实施方案455.如实施方案437-454中任一项所述的方法,其中L₃结合至D₁的N-末端。
- [0766] 实施方案456.如实施方案437-454中任一项所述的方法,其中L₃结合至D₁的C-末端。
- [0767] 实施方案457.如实施方案438-454中任一项所述的方法,其中L₄结合至E₁的N-末端。
- [0768] 实施方案458.如实施方案438-454中任一项所述的方法,其中L₄结合至E₁的C-末端。

端。

[0769] 实施方案459.如实施方案437-458中任一项所述的方法,其中当 L_3 被肿瘤特异性蛋白酶切割时, P_3 与 D_1 解结合,从而使 D_1 暴露于CD3。

[0770] 实施方案460.如实施方案438-459中任一项所述的方法,其中当 L_4 被肿瘤特异性蛋白酶切割时, P_4 与 E_1 解结合,从而使 E_1 暴露于肿瘤抗原。

[0771] 实施方案461.如实施方案437-460中任一项所述的方法,其中 P_3 削弱 D_1 与CD3的结合。

[0772] 实施方案462.如实施方案437-461中任一项所述的方法,其中 P_3 通过离子相互作用、静电相互作用、疏水相互作用、 π -堆积相互作用和H键相互作用或其组合结合至 D_1 。

[0773] 实施方案463.如实施方案437-462中任一项所述的方法,其中 P_3 在抗原结合位点或其附近结合至 D_1 。

[0774] 实施方案464.如实施方案437-463中任一项所述的方法,其中当 L_3 被肿瘤特异性蛋白酶切割时, P_3 与 D_1 解结合,从而使 D_1 暴露于CD3。

[0775] 实施方案465.如实施方案437-464中任一项所述的方法,其中 P_3 与CD3具有小于70%的序列同一性。

[0776] 实施方案466.如实施方案437-465中任一项所述的方法,其中 P_3 与CD3具有小于85%的序列同一性。

[0777] 实施方案467.如实施方案437-465中任一项所述的方法,其中 P_3 与CD3具有小于90%的序列同一性。

[0778] 实施方案468.如实施方案437-467中任一项所述的方法,其中 P_3 与CD3具有小于95%的序列同一性。

[0779] 实施方案469.如实施方案437-468中任一项所述的方法,其中 P_3 与CD3具有小于98%的序列同一性。

[0780] 实施方案470.如实施方案437-469中任一项所述的方法,其中 P_3 与CD3具有小于99%的序列同一性。

[0781] 实施方案471.如实施方案437-470中任一项所述的方法,其中 P_3 包含根据SEQ ID NO:177-180的氨基酸序列。

[0782] 实施方案472.如实施方案437-470中任一项所述的方法,其中 P_3 包含与CD3共享小于10%的序列同一性的从头生成氨基酸序列。

[0783] 实施方案473.如实施方案437-471中任一项所述的方法,其中 P_4 削弱 E_1 与肿瘤抗原的结合。

[0784] 实施方案474.如实施方案437-473中任一项所述的方法,其中 P_4 通过离子相互作用、静电相互作用、疏水相互作用、 π -堆积相互作用和H键相互作用或其组合结合至 E_1 。

[0785] 实施方案475.如实施方案437-474中任一项所述的方法,其中 P_4 在抗原结合位点或其附近结合至 E_1 。

[0786] 实施方案476.如实施方案437-475中任一项所述的方法,其中当 L_4 被肿瘤特异性蛋白酶切割时, P_4 与 E_1 解结合,从而使 E_1 暴露于肿瘤抗原。

[0787] 实施方案477.如实施方案437-476中任一项所述的方法,其中 P_4 与肿瘤抗原具有小于70%的序列同一性。

- [0788] 实施方案478.如实施方案437-477中任一项所述的方法,其中P₄与肿瘤抗原具有小于80%的序列同一性。
- [0789] 实施方案479.如实施方案437-478中任一项所述的方法,其中P₄与肿瘤抗原具有小于85%的序列同一性。
- [0790] 实施方案480.如实施方案437-479中任一项所述的方法,其中P₄与肿瘤抗原具有小于90%的序列同一性。
- [0791] 实施方案481.如实施方案437-480中任一项所述的方法,其中P₄与肿瘤抗原具有小于95%的序列同一性。
- [0792] 实施方案482.如实施方案437-481中任一项所述的方法,其中P₄包含与肿瘤抗原共享小于10%的序列同一性的从头生成氨基酸序列。
- [0793] 实施方案483.如实施方案436-482中任一项所述的方法,其中P₃或P₄包含长度为至少5个氨基酸的肽序列。
- [0794] 实施方案484.如实施方案436-483中任一项所述的方法,其中P₃或P₄包含长度为至少6个氨基酸的肽序列。
- [0795] 实施方案485.如实施方案436-484中任一项所述的方法,其中P₃或P₄包含长度为至少10个氨基酸的肽序列。
- [0796] 实施方案486.如实施方案436-485中任一项所述的方法,其中P₃或P₄包含长度为至少10个氨基酸并且长度为不多于20个氨基酸的肽序列。
- [0797] 实施方案487.如实施方案436-486中任一项所述的方法,其中P₃或P₄包含长度为至少16个氨基酸的肽序列。
- [0798] 实施方案488.如实施方案436-487中任一项所述的方法,其中P₃或P₄包含长度为不多于40个氨基酸的肽序列。
- [0799] 实施方案489.如实施方案436-488中任一项所述的方法,其中P₃或P₄包含至少两个半胱氨酸氨基酸残基。
- [0800] 实施方案490.如实施方案436-489中任一项所述的方法,其中P₃或P₄包含环肽或线性肽。
- [0801] 实施方案491.如实施方案436-490中任一项所述的方法,其中P₃或P₄包含环肽。
- [0802] 实施方案492.如实施方案436-490中任一项所述的方法,其中P₃或P₄包含线性肽。
- [0803] 实施方案493.如实施方案437-492中任一项所述的方法,其中P₄包含根据SEQ ID NO:185或186的氨基酸序列。
- [0804] 实施方案494.如实施方案437-492中任一项所述的方法,其中肿瘤抗原包括EGFR,并且T细胞衔接器包含SEQ ID NO:183和184的氨基酸序列。
- [0805] 实施方案495.如实施方案437-492中任一项所述的方法,其中P₄包含根据SEQ ID NO:199-201的氨基酸序列。
- [0806] 实施方案496.如实施方案437-492中任一项所述的方法,其中肿瘤抗原包括TROP2,并且T细胞衔接器包含SEQ ID NO:193-198的氨基酸序列的任一者。
- [0807] 实施方案497.如实施方案437-492中任一项所述的方法,其中肿瘤抗原包括PSMA,并且T细胞衔接器包含SEQ ID NO:175和176的氨基酸序列。
- [0808] 实施方案498.如实施方案210所述的药物组合物,其中基于抗体的疗法包括抗PD-

1抗体疗法。

[0809] 实施方案499.如实施方案498所述的药物组合物,其中抗PD-1抗体疗法包含帕博利珠单抗或纳武单抗的互补决定区(CDR)。

[0810] 实施方案500.如实施方案498所述的药物组合物,其中抗PD-1抗体疗法包含SEQ ID NO:222和223的氨基酸序列。

[0811] 实施方案501.如实施方案498所述的药物组合物,其中抗PD-1抗体疗法包含SEQ ID NO:226和227的氨基酸序列。

[0812] 实施方案502.如实施方案403所述的方法,其中基于抗体的疗法包括抗PD-1抗体疗法。

[0813] 实施方案503.如实施方案502所述的方法,其中抗PD-1抗体疗法包含帕博利珠单抗或纳武单抗的互补决定区(CDR)。

[0814] 实施方案504.如实施方案502所述的方法,其中抗PD-1抗体疗法包含SEQ ID NO:222和223的氨基酸序列。

[0815] 实施方案505.如实施方案502所述的方法,其中抗PD-1抗体疗法包含SEQ ID NO:226和227的氨基酸序列。

[0816] 实施例

[0817] 实施例1.发现结合至抗CD28 scFv的肽

[0818] 根据图2的方法,通过噬菌体展示鉴定掩蔽根据SEQ ID NO:9的抗CD28 scFv的先导肽。然后将先导命中物合成为肽,并如以下所描述地评估。以标准酶联免疫吸附测定(ELISA)形式评估合成肽结合人抗CD28 scFv的能力。简言之,将生物素化肽捕获在中性亲和素包被的板上。然后将在缓冲剂中稀释的抗CD28 scFv或Ab-12添加至肽捕获的板。使用标准辣根过氧化物酶缀合物二抗检测结合的抗CD28scFv。使用Graphpad Prism软件计算达到50%最大信号所需的抗CD28scFv或Ab-12浓度(EC50)。还评估了肽对于抑制抗CD28 scFv或Ab-12与其同源抗原CD28结合的能力。简言之,将生物素化CD28抗原捕获在中性亲和素包被的板上。将2nM的抗CD28 scFv或5nM的Ab-12用0-100uM滴定的肽预温育。在短预温育期之后,将滴定的肽与固定的抗CD28 scFv(2nM)或Ab-12(5nM)的混合物添加至CD28抗原捕获的板。在板上短温育之后,用标准辣根过氧化物酶缀合的二抗检测结合的抗CD28 scFv或Ab-12。在Graphpad Prism软件中计算使最大信号降低50%所需的肽浓度(IC50)。

[0819] 图3A说明了通过ELISA测量的抗CD28 scFv(SEQ ID NO:9)与肽的结合。图3B说明了通过ELISA测量的Ab-12与肽的结合。Ab-12是Vh形式的抗PD-L1 x CD28(未掩蔽)抗体。图3C说明了通过ELISA测量的抗CD28 scFv与肽的结合。图3D说明了通过ELISA测量的Ab-12与肽的结合。图3E-3F说明了如通过ELISA所测量的,肽抑制抗CD28 scFv与CD28抗原结合。图3G说明了如通过ELISA所测量的,肽抑制Ab-12与CD28结合。

[0820] 实施例2.抗CD28scFv(SEQ ID NO:9)或Ab-12(Vh形式的抗PD-L1 x CD28未掩蔽抗体)与肽-9和肽-12的动力学结合测定。

[0821] 此实施例在体外动力学结合测定中评估抗CD28 scFv或Ab-12与肽-9和肽-12的结合。使用Octet RED96仪器通过生物层干涉测量法评估抗CD28 scFv或Ab-12与肽-9和肽-12的动力学结合。简言之,链霉亲和素生物传感器装载有生物素化的肽并在缓冲剂中设定基线。将抗CD28 scFv或Ab-12在100nM、50nM、25nM和12.5nM的溶液中滴定,然后缔合到装载肽

的传感器上。在短缔合期之后,将传感器转移到缓冲剂中,并测量结合的抗CD28 scFv或Ab-12的解离。实验的时间和步骤在附表中示出。实时记录缔合和解离信号,并使用仪器软件中的1:1结合模型来分析。使用1:1结合模型的分析能够计算结合和解离速率常数以及亲和力KD。肽-9和肽-12动力学结合传感图在图4A-4D中示出,并总结在表17-19中。

[0822] 表17. 测定时间和步骤

步骤	时间
基线: 缓冲剂	60 秒
上样: • 200nM 肽-9 • 200nM 肽-12	300 秒
基线: 缓冲剂	300 秒
在 octet 缓冲剂中缔合 • 100nM Ab-12 或 CD28 scFv • 50nM Ab-12 或 CD28 scFv • 25nM Ab-12 或 CD28 scFv • 12.5nM Ab-12 或 CD28 scFv	300 秒
解离: 缓冲剂	900 秒

[0823]

[0824] 表18. 抗CD28scFv与肽-9和肽-12的结合动力学总结

[0825]

结合结构域	肽	KD (M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)
CD28scFv	肽-9	3.77E-07	3.25E+04	1.23E-02
CD28 scFv	肽-12	1.70E-08	9.87E+04	1.67E-03

[0826] 表19. Ab-12与肽-9和肽-12的结合动力学总结

[0827]

结合结构域	肽	KD (M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)
Ab-12	肽-9	1.88E-08	1.68E+05	3.17E-03
Ab-12	肽-12_200nM	1.31E-08	9.66E-04	1.27E-03

[0828] 实施例3: 优化的噬菌体文库构建-抗CD28 scFv (SEQ ID NO:9) 肽-9

[0829] 通过将肽内的每个单独残基突变为丙氨酸并测量针对抗CD28scFv的结合和抑制,建立了肽-9的序列活性关系。丙氨酸突变显著削弱结合和抑制的肽残基被认为是不耐受突变的关键残基。丙氨酸突变表现与非突变序列相似的肽残基被认为是确实耐受突变的非关键位点。使用肽序列活性关系 (SAR), 构建了DNA寡聚物文库, 其中每个肽序列中的编码关键残基的密码子突变最小, 并且编码非关键残基的密码子突变严重。将得到的寡聚物克隆到噬菌体载体中, 用于经由与噬菌体的pIII丝融合来展示SAR引导的肽。然后使用相关载体经由使用本领域中的标准技术在细菌中的扩增产生噬菌体优化文库。图5A和图5B演示了根据实施例1的ELISA规程的肽-9的丙氨酸扫描肽的抗CD28 scFv结合。图6A和图6B演示了根据实施例1的ELISA规程的肽-9的丙氨酸扫描肽的抗CD28 scFv抑制。

[0830] 实施例4: 淘选ELISA-抗CD28 scFv肽

[0831] 克隆噬菌体以粗上清液收获, 并经由标准酶联免疫吸附测定 (ELISA) 来筛选。简言之, 在中性亲和素包被的板上捕获生物素化抗CD28 scFv。在添加克隆噬菌体之前, 将孔用

阻断缓冲剂和CD28可溶性蛋白或单独的阻断缓冲剂温育。在不进行洗涤或抽吸的情况下，然后将克隆噬菌体上清液添加至孔并短时间温育。然后洗涤孔，随后使用辣根过氧化物酶缀合的抗M13抗体检测结合的噬菌体。然后将感兴趣的克隆噬菌体送去进行序列分析。

[0832] 抗CD28 scFv肽-9文库序列的噬菌体淘选结果在表20中示出。鉴定出453个克隆噬菌体序列。从表20的所有序列计算出的共有序列在图7中示出，并使用WebLogo 3.7.4生成。

[0833] 表20.抗CD28 scFv肽-9文库序列的噬菌体淘选结果。(-) 指示与抗CD28 scFv肽-9相应位置(例如噬菌体-1位置)相同的氨基酸。

[0834]

ID	克隆噬菌体肽序列	SEQ ID NO:	氨基酸位置序列													噬菌体结合 ELISA			SEQ ID NO:	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	#	#	#	#	#	背景信号	CD28 scFv 信号		CD28 存 在 的 下 的 CD28 scFv 信号
噬菌体-9	MDWCPRERWVDCFF	32	M	D	W	C	P	R	E	R	W	V	D	C	F	F	0.084	2.042	0.489	32
噬菌体-19	MDWCPIDLWNECF	128	-	-	-	-	I	D	L	-	N	E	-	-	-	0.066	2.515	0.187	128	
噬菌体-20	MDWCPIHLWHVCFN	129	-	-	-	-	I	H	L	-	H	V	-	-	N	0.082	2.526	0.167	129	
噬菌体-21	MDWCPIYLWSECFN	130	-	-	-	-	I	Y	L	-	S	E	-	-	N	0.075	2.635	0.513	130	
噬菌体-22	MNWCPKDIWYLCFN	131	-	N	-	-	K	D	I	-	Y	L	-	-	N	0.073	2.625	0.168	131	
噬菌体-23	MDWCPLHMWHECF	132	-	-	-	-	L	H	M	-	H	E	-	-	S	0.086	2.511	0.151	132	
噬菌体-24	MDWCPLYLWNECFN	133	-	-	-	-	L	Y	L	-	N	E	-	-	N	0.065	2.612	0.247	133	
噬菌体-25	MDWCPRDLWDLCA	134	-	-	-	-	-	D	L	-	D	L	-	-	A	0.078	2.696	0.219	134	
噬菌体-26	MDWCPRDLWHECA	135	-	-	-	-	-	D	L	-	H	E	-	-	A	0.063	2.710	0.277	135	
噬菌体-27	MDWCPRDLWHLCFS	136	-	-	-	-	-	D	L	-	H	L	-	-	S	0.059	2.592	0.290	136	
噬菌体-28	MDWCPRDLWSECF	137	-	-	-	-	-	D	L	-	S	E	-	-	-	0.068	2.574	0.218	137	
噬菌体-29	MDWCPRDLWVHCA	138	-	-	-	-	-	D	L	-	-	H	-	-	A	0.062	2.554	0.179	138	
噬菌体-30	MDWCPRDMWDECA	139	-	-	-	-	-	D	M	-	D	E	-	-	A	0.116	2.593	0.250	139	
噬菌体-31	MDWCPRDMWSECA	140	-	-	-	-	-	D	M	-	S	E	-	-	A	0.069	2.701	0.293	140	
噬菌体-32	MDWCPRDMWSVCS	141	-	-	-	-	-	D	M	-	S	V	-	-	S	0.062	2.619	0.207	141	
噬菌体-33	MDWCPRFDMWDECFN	142	-	-	-	-	-	F	M	-	D	E	-	-	N	0.079	2.680	0.256	142	
噬菌体-34	MDWCPRHDMWNYCA	143	-	-	-	-	-	H	M	-	N	Y	-	-	A	0.089	2.712	0.242	143	
噬菌体-35	MDWCPRSLWHECA	144	-	-	-	-	-	S	L	-	H	E	-	-	A	0.064	2.544	0.255	144	
噬菌体-36	MDWCPRYLWHVCA	145	-	-	-	-	-	Y	L	-	H	V	-	-	A	0.072	2.475	0.226	145	

[0835]

噬菌体 -37	MHWCPVD LWYLCYN	146	-	H	-	-	-	V	D	L	-	Y	L	-	Y	N	0.079	2.659	0.417	146	
噬菌体 -38	MDWCPVH LWSVCFA	147	-	-	-	-	-	V	H	L	-	S	V	-	-	A	0.072	2.650	0.302	147	
噬菌体 -39	MDWCPMH LWHQCFN	229	-	-	-	-	-	M	H	L	-	H	Q	-	-	N	0.073	2.555	0.299	229	
噬菌体 -40	MDWCPID MWDQCFN	230	-	-	-	-	-	I	D	M	-	D	Q	-	-	N	0.061	2.661	0.297	230	
噬菌体 -41	MAWCPRD KWSECFN	231	-	A	-	-	-	-	D	K	-	S	E	-	-	S	0.062	0.853	0.147	231	
噬菌体 -42	MDWCPRH LWVHCFN	232	-	-	-	-	-	-	H	L	-	-	H	-	-	N	0.071	2.505	0.254	232	
噬菌体 -43	MDWCPRA LWHECFY	233	-	-	-	-	-	-	A	L	-	H	E	-	-	Y	0.115	2.499	0.252	233	
噬菌体 -44	MDWCPIA LWAEFCN	234	-	-	-	-	-	-	I	A	L	-	A	E	-	N	0.111	2.458	0.224	234	
噬菌体 -45	MDWCPRP LWIECFN	235	-	-	-	-	-	-	P	L	-	H	E	-	-	S	0.078	2.346	0.121	235	
噬菌体 -46	MHWCPID LWAECYA	236	-	H	-	-	-	-	I	D	L	-	A	E	-	Y	A	0.082	2.278	0.225	236
噬菌体 -47	MAWCVPY LWHECFN	237	-	A	-	-	-	-	V	Y	L	-	H	E	-	N	0.094	2.273	0.351	237	
噬菌体 -48	IDWCPRYL WDECYN	238	I	-	-	-	-	-	Y	L	-	D	E	-	Y	N	0.061	2.243	0.153	238	
噬菌体 -49	MSWCPIHL WNECFN	239	-	S	-	-	-	-	I	H	L	-	N	E	-	N	0.083	2.057	0.284	239	
噬菌体 -50	MDWCPPY LWNVCFN	240	-	-	-	-	-	-	P	Y	L	-	N	V	-	S	0.063	1.639	0.100	240	
噬菌体 -51	MDWCPMD LWDYCFN	241	-	-	-	-	-	-	M	D	L	-	D	Y	-	N	0.071	1.635	0.107	241	
噬菌体 -52	MDWCPIN LWDECFN	242	-	-	-	-	-	-	I	N	L	-	D	E	-	S	0.062	1.498	0.096	242	
噬菌体 -53	MDWCPMH LWNKCFN	243	-	-	-	-	-	-	M	H	L	-	N	K	-	N	0.071	1.043	0.122	243	
噬菌体 -54	MNWCPRD MWYQCFN	244	-	N	-	-	-	-	D	M	-	Y	Q	-	-	N	0.068	1.948	0.177	244	
噬菌体 -55	QDWCPRH MWSFCFH	245	Q	-	-	-	-	-	H	M	-	S	F	-	-	H	0.138	0.074	0.081	245	
噬菌体 -56	MHWCPMD QWSNCFN	246	-	H	-	-	-	-	M	D	Q	-	S	N	-	N	0.062	0.515	0.084	246	
噬菌体 -57	MDWCPRH RWVDCFY	247	-	-	-	-	-	-	H	-	-	-	-	-	-	Y	0.073	0.478	0.110	247	
噬菌体 -58	MHWCPID RWADCFN	248	-	H	-	-	-	-	I	D	-	-	A	-	-	N	0.074	0.287	0.077	248	
噬菌体 -59	MDWCPRD SWHLCFA	249	-	-	-	-	-	-	D	S	-	H	L	-	-	A	0.073	2.446	0.147	249	

[0836]

噬菌体 -60	MDWCPRT LWYLCFN	250	-	-	-	-	-	-	T	L	-	Y	L	-	-	N	0.508	2.593	1.198	250
噬菌体 -61	MVSCPTT MWNRCFN	251	-	V	S	-	-	T	T	M	-	N	R	-	-	N	0.079	1.329	0.072	251
噬菌体 -62	MDWCPSY LWNECFE	252	-	-	-	-	-	S	Y	L	-	N	E	-	-	-	0.065	1.995	0.133	252
噬菌体 -64	MDWCPRA LWAEFCN	253	-	-	-	-	-	-	A	L	-	A	E	-	-	N	0.068	2.676	0.339	253
噬菌体 -65	MDWCPMY LWNECFN	254	-	-	-	-	-	M	Y	L	-	N	E	-	-	N	0.064	2.609	0.471	254
噬菌体 -66	MDWCPRY LWNECFY	255	-	-	-	-	-	-	Y	L	-	N	E	-	-	Y	0.079	2.537	0.358	255
噬菌体 -67	MNWCPTA LWHVCFN	256	-	N	-	-	-	T	A	L	-	H	V	-	-	N	0.067	1.644	0.169	256
噬菌体 -68	MDWCPMY MWYECFA	257	-	-	-	-	-	M	Y	M	-	Y	E	-	-	A	0.080	2.479	0.358	257
噬菌体 -69	MDWCPH MWADCFE	258	-	-	-	-	-	I	H	M	-	A	-	-	-	A	0.065	2.457	0.143	258
噬菌体 -70	ITWCPSSM WNRCHI	259	I	T	-	-	-	S	S	M	-	N	R	-	-	I	0.065	0.379	0.110	259
噬菌体 -71	MDWCPRY LWHECFA	260	-	-	-	-	-	-	Y	L	-	H	E	-	-	A	0.071	2.628	0.429	260
噬菌体 -72	MFWCPTT MWNRCFT	261	-	F	-	-	-	T	T	M	-	N	R	-	-	T	0.111	0.662	0.338	261
噬菌体 -73	MDWCPRA LWHECFN	262	-	-	-	-	-	-	A	L	-	H	E	-	-	N	0.071	2.686	0.401	262
噬菌体 -74	MDWCPRD MWLFCYN	263	-	-	-	-	-	-	D	M	-	L	F	-	-	N	0.097	2.707	1.023	263
噬菌体 -75	MDWCPRS HWHVCYN	264	-	-	-	-	-	-	S	H	-	H	V	-	-	N	0.072	1.951	0.281	264
噬菌体 -76	MDWCPRY LWSDCFA	265	-	-	-	-	-	-	Y	L	-	S	-	-	-	A	0.084	2.727	1.530	265
噬菌体 -77	MDWCPFY LWDECFN	266	-	-	-	-	-	F	Y	L	-	D	E	-	-	N	0.092	2.672	0.291	266
噬菌体 -78	MDWCPRH LWHECFN	267	-	-	-	-	-	-	H	L	-	H	E	-	-	N	0.070	2.654	0.704	267
噬菌体 -79	MDWCPRD LWHECFE	268	-	-	-	-	-	-	D	L	-	H	E	-	-	S	0.066	2.649	0.382	268
噬菌体 -80	MDWCPMY LWNECFE	269	-	-	-	-	-	M	Y	L	-	N	E	-	-	S	0.071	2.641	0.411	269
噬菌体 -81	MDWCPRE LWSVCFN	270	-	-	-	-	-	-	F	L	-	S	V	-	-	N	0.515	2.637	1.151	270
噬菌体 -82	MDWCPRD LWTECFA	271	-	-	-	-	-	-	D	L	-	T	E	-	-	A	0.060	2.634	0.151	271
噬菌体 -83	MDWCPRE LWDECFN	272	-	-	-	-	-	-	F	L	-	D	E	-	-	N	0.065	2.629	0.483	272

[0837]

噬菌体 -84	MDWCPKY LWSVCFE	273	-	-	-	-	-	K	Y	L	-	S	V	-	-	-	0.184	2.622	0.826	273
噬菌体 -85	MDWCPMD LWYQCFN	274	-	-	-	-	-	M	D	L	-	Y	Q	-	-	N	0.063	2.617	0.187	274
噬菌体 -86	MDWCPRH LWAECEFF	275	-	-	-	-	-	H	L	-	A	E	-	-	-		0.066	2.611	0.292	275
噬菌体 -87	MDWCPKD LWYLCFA	276	-	-	-	-	-	K	D	L	-	Y	L	-	-	A	0.200	2.608	0.213	276
噬菌体 -88	MDWCPH LWHYCFN	277	-	-	-	-	-	I	H	L	-	H	Y	-	-	N	0.078	2.602	0.453	277
噬菌体 -89	MDWCPRA LWNVCFN	278	-	-	-	-	-	A	L	-	N	V	-	-	N		0.065	2.598	0.472	278
噬菌体 -90	MDWCPID LWHLCFY	279	-	-	-	-	-	I	D	L	-	H	L	-	-	Y	0.062	2.590	0.488	279
噬菌体 -91	MDWCPRD LWFLCYN	280	-	-	-	-	-	D	L	-	F	L	-	Y	N		0.060	2.587	0.424	280
噬菌体 -92	MDWCPRH LWHECFE	281	-	-	-	-	-	H	L	-	H	E	-	-	-		0.364	2.583	0.373	281
噬菌体 -93	MDWCPRY LWTVCFE	282	-	-	-	-	-	Y	L	-	T	V	-	-	S		0.115	2.582	0.372	282
噬菌体 -94	MDWCPRD LWSLCFY	283	-	-	-	-	-	D	L	-	S	L	-	-	Y		0.065	2.573	0.246	283
噬菌体 -95	MDWCPRE LWSECFN	284	-	-	-	-	-	F	L	-	S	E	-	-	N		0.062	2.571	0.227	284
噬菌体 -96	MDWCPRT LWAYCFN	285	-	-	-	-	-	T	L	-	A	Y	-	-	N		0.070	2.571	0.584	285
噬菌体 -97	MDWCPKD LWDYCEFA	286	-	-	-	-	-	K	D	L	-	D	Y	-	-	A	0.078	2.568	0.165	286
噬菌体 -98	MDWCPKY LWDVCFN	287	-	-	-	-	-	K	Y	L	-	D	V	-	-	N	0.096	2.566	0.422	287
噬菌体 -99	MDWCPRY LWNMCFH	288	-	-	-	-	-	Y	L	-	N	M	-	-	H		0.114	2.564	0.404	288
噬菌体 -100	MDWCPRY LWTECFN	289	-	-	-	-	-	Y	L	-	T	E	-	-	N		0.062	2.560	0.549	289
噬菌体 -101	MDWCPRS LWHYCEFA	290	-	-	-	-	-	S	L	-	H	Y	-	-	A		0.140	2.552	0.338	290
噬菌体 -102	MDWCPRY LWAECEFY	291	-	-	-	-	-	Y	L	-	A	E	-	-	Y		0.063	2.552	0.354	291
噬菌体 -103	MDWCPRD LWHECFN	292	-	-	-	-	-	D	L	-	H	E	-	-	N		0.074	2.552	0.218	292
噬菌体 -104	MDWCPRD LWDLCEFF	293	-	-	-	-	-	D	L	-	D	L	-	-	-		0.076	2.549	0.156	293
噬菌体 -105	MDWCPRY LWNVCFN	294	-	-	-	-	-	Y	L	-	N	V	-	-	N		0.087	2.546	0.570	294
噬菌体 -106	MDWCPY LWDECFN	295	-	-	-	-	-	I	Y	L	-	D	E	-	-	N	0.061	2.546	0.215	295

[0838]

噬菌体 -107	MDWCPRD LWAECTN	296	-	-	-	-	-	-	-	D	L	-	A	E	-	-	N	0.061	2.537	0.207	296	
噬菌体 -108	MDWCPRA LWHECFT	297	-	-	-	-	-	-	-	A	L	-	H	E	-	-	T	0.075	2.536	0.191	297	
噬菌体 -109	MDWCPKN LWHVCFN	298	-	-	-	-	-	-	-	K	N	L	-	H	V	-	-	N	0.081	2.530	0.248	298
噬菌体 -110	MDWCPRY LWDECFN	299	-	-	-	-	-	-	-	Y	L	-	D	E	-	-	N	0.069	2.529	0.283	299	
噬菌体 -111	MDWCPFY LWNECFY	300	-	-	-	-	-	-	-	F	Y	L	-	N	E	-	-	Y	0.099	2.528	0.594	300
噬菌体 -112	MHWCPR LWDVCYN	301	-	H	-	-	-	-	-	A	L	-	D	V	-	Y	N	0.077	2.528	0.240	301	
噬菌体 -113	MDWCPRD LWNVCF	302	-	-	-	-	-	-	-	D	L	-	N	V	-	-	-	0.164	2.520	0.137	302	
噬菌体 -114	MDWCPRY LWFECA	303	-	-	-	-	-	-	-	Y	L	-	F	E	-	-	A	0.066	2.504	0.210	303	
噬菌体 -115	MDWCPRY LWHECFN	304	-	-	-	-	-	-	-	Y	L	-	H	E	-	-	N	0.105	2.490	0.421	304	
噬菌体 -116	MDWCPRD LWYACFA	305	-	-	-	-	-	-	-	D	L	-	Y	A	-	-	A	0.072	2.474	0.242	305	
噬菌体 -117	MDWCPRY LWFECS	306	-	-	-	-	-	-	-	Y	L	-	F	E	-	-	S	0.079	2.462	0.235	306	
噬菌体 -118	MDWCPRH LWDECF	307	-	-	-	-	-	-	-	H	L	-	D	E	-	-	-	0.074	2.459	0.663	307	
噬菌体 -119	MDWCPRY LWHMCYS	308	-	-	-	-	-	-	-	Y	L	-	H	M	-	Y	S	0.129	2.419	1.166	308	
噬菌体 -120	MDWCPRD LWHACFS	309	-	-	-	-	-	-	-	D	L	-	H	A	-	-	S	0.074	2.414	0.173	309	
噬菌体 -121	MDWCPRD LWHVCF	310	-	-	-	-	-	-	-	D	L	-	H	V	-	-	-	0.068	2.412	0.268	310	
噬菌体 -122	MDWCPRD LWDQCYA	311	-	-	-	-	-	-	-	D	L	-	D	Q	-	Y	A	0.059	2.406	0.201	311	
噬菌体 -123	MDWCPH LWNECA	312	-	-	-	-	-	-	-	I	H	L	-	N	E	-	-	A	0.104	2.405	0.203	312
噬菌体 -124	MDWCPRP LWDMCF	313	-	-	-	-	-	-	-	P	L	-	D	M	-	-	-	0.063	2.403	0.138	313	
噬菌体 -125	MDWCPVS LWHVCFY	314	-	-	-	-	-	-	-	V	S	L	-	H	V	-	Y	0.107	2.401	0.409	314	
噬菌体 -126	MDWCPRF LWNECFN	315	-	-	-	-	-	-	-	F	L	-	N	E	-	-	N	0.072	2.400	0.503	315	
噬菌体 -127	MDWCPRA LWNECA	316	-	-	-	-	-	-	-	A	L	-	N	E	-	-	A	0.080	2.385	0.375	316	
噬菌体 -128	MDWCPRD LWIECF	317	-	-	-	-	-	-	-	D	L	-	I	E	-	-	-	0.084	2.372	0.137	317	
噬菌体 -129	MDWCPSY LWTVCA	318	-	-	-	-	-	-	-	S	Y	L	-	T	V	-	-	A	0.062	2.340	0.096	318

[0839]

噬菌体 -130	MDWCPRY LWDACFF	319	-	-	-	-	-	-	-	Y	L	-	D	A	-	-	-	0.066	2.337	0.168	319
噬菌体 -131	MDWCPRS LWYCFN	320	-	-	-	-	-	-	S	L	-	I	Y	-	-	N		0.113	2.336	0.401	320
噬菌体 -132	MDWCPTY LWFECFN	321	-	-	-	-	-	T	Y	L	-	F	E	-	-	N		0.205	2.329	0.224	321
噬菌体 -133	MDWCPRF LWDECFE	322	-	-	-	-	-	-	F	L	-	D	E	-	-	-		0.064	2.284	0.246	322
噬菌体 -134	MDWCPSY LWHECFA	323	-	-	-	-	-	S	Y	L	-	H	E	-	-	A		0.096	2.284	0.198	323
噬菌体 -135	MDWCPKF LWHECFS	324	-	-	-	-	-	K	F	L	-	H	E	-	-	S		0.065	2.279	0.142	324
噬菌体 -136	MHWCPY LWDECFN	325	-	H	-	-	-	I	Y	L	-	D	E	-	-	N		0.071	2.234	0.193	325
噬菌体 -137	MDWCPRY LWHECFH	326	-	-	-	-	-	-	Y	L	-	H	E	-	-	H		0.101	2.193	0.308	326
噬菌体 -138	MDWCPTN LWHECFA	327	-	-	-	-	-	T	N	L	-	H	E	-	-	A		0.061	2.163	0.096	327
噬菌体 -139	MDWCPRD LWDVCFE	328	-	-	-	-	-	-	D	L	-	D	V	-	-	A		0.096	2.158	0.280	328
噬菌体 -140	MDWCPRD LWDVCFN	329	-	-	-	-	-	M	D	L	-	D	V	-	-	N		0.090	2.149	0.263	329
噬菌体 -141	MDWCPRS LWNVCFE	330	-	-	-	-	-	-	S	L	-	N	V	-	-	-		0.106	2.131	0.356	330
噬菌体 -142	MDWCPVI LWDFCFN	331	-	-	-	-	-	V	I	L	-	D	F	-	-	N		0.066	2.030	0.173	331
噬菌体 -143	LDWCPLN LWDLCYF	332	L	-	-	-	-	L	N	L	-	D	L	-	Y	-		0.062	2.028	0.095	332
噬菌体 -144	MDWCPRH LWYACFN	333	-	-	-	-	-	-	H	L	-	Y	A	-	-	N		0.061	2.012	0.159	333
噬菌体 -145	MDWCPKH LWIECFA	334	-	-	-	-	-	K	H	L	-	I	E	-	-	A		0.065	1.977	0.132	334
噬菌体 -146	MDWCPRH LWSECFY	335	-	-	-	-	-	-	H	L	-	S	E	-	-	Y		0.136	1.918	0.199	335
噬菌体 -147	MHWCPRD LWVCFN	336	-	H	-	-	-	-	D	L	-	-	V	-	-	N		0.070	1.834	0.112	336
噬菌体 -148	MHWCPY LWNECFA	337	-	H	-	-	-	E	Y	L	-	N	E	-	-	A		0.074	1.687	0.092	337
噬菌体 -149	MDWCPRD LWAVCFE	338	-	-	-	-	-	-	D	L	-	A	V	-	-	A		0.070	1.669	0.089	338
噬菌体 -150	MDWCPRH LWNVCFE	339	-	-	-	-	-	-	H	L	-	N	V	-	-	S		0.058	1.613	0.176	339
噬菌体 -151	MDFCPISL WHECFE	340	-	-	F	-	-	I	S	L	-	H	E	-	-	-		0.081	1.585	0.129	340
噬菌体 -152	MDWCPKY LWDKCFH	341	-	-	-	-	-	K	Y	L	-	D	K	-	-	H		0.073	1.540	0.109	341

[0840]

噬菌体 -153	MDWCPRH LWDLCHF	342	-	-	-	-	-	-	H	L	-	D	L	-	-	-	0.093	1.395	0.182	342
噬菌体 -154	MDWCPRD LWNVCFA	343	-	-	-	-	-	-	D	L	-	N	V	-	-	A	0.114	1.382	0.145	343
噬菌体 -155	MHWCPH LWNECYH	344	-	H	-	-	-	L	H	L	-	N	E	-	Y	H	0.063	1.370	0.113	344
噬菌体 -156	MDWCPKH LWHQCFH	345	-	-	-	-	-	K	H	L	-	H	Q	-	-	H	0.058	1.351	0.108	345
噬菌体 -157	MDWCPRS LWSYCFH	346	-	-	-	-	-	S	L	-	S	Y	-	-	H		0.066	1.335	0.152	346
噬菌体 -158	MDWCPRY LWTECF	347	-	-	-	-	-	Y	L	-	T	E	-	-	-		0.110	1.265	0.244	347
噬菌体 -159	MAWCPMN LWDQCF	348	-	A	-	-	-	M	N	L	-	D	Q	-	-	-	0.070	1.202	0.145	348
噬菌体 -160	MHWCPRA LWHECFN	349	-	H	-	-	-	A	L	-	H	E	-	-	N		0.070	1.178	0.144	349
噬菌体 -161	MDWCPRH LWDQCF	350	-	-	-	-	-	H	L	-	D	Q	-	-	A		0.150	1.122	0.144	350
噬菌体 -162	MNWCPTD LWHECFN	351	-	N	-	-	-	T	D	L	-	H	E	-	N		0.087	1.093	0.095	351
噬菌体 -163	MFWCPRY LWHECFN	352	-	F	-	-	-	Y	L	-	H	E	-	-	N		0.086	1.078	0.175	352
噬菌体 -164	MDWCPKF LWDLCHA	353	-	-	-	-	-	K	F	L	-	D	L	-	-	A	0.100	1.075	0.139	353
噬菌体 -165	MDWCPFY LWDECF	354	-	-	-	-	-	F	Y	L	-	D	E	-	-	L	0.070	1.024	0.141	354
噬菌体 -166	MDWCPRH LWDLCHA	355	-	-	-	-	-	H	L	-	D	L	-	-	A		0.061	0.925	0.096	355
噬菌体 -167	MSWCPQD LWHVCFN	356	-	S	-	-	-	Q	D	L	-	H	V	-	-	N	0.095	0.860	0.112	356
噬菌体 -168	MDWCPKD LWHECFN	357	-	-	-	-	-	K	D	L	-	H	E	-	-	N	0.073	0.762	0.100	357
噬菌体 -169	MDWCPRD LWNVCFN	358	-	-	-	-	-	D	L	-	N	V	-	-	N		0.100	0.740	0.108	358
噬菌体 -170	MNWCPSD LWHLCFN	359	-	N	-	-	-	S	D	L	-	H	L	-	-	N	0.071	0.739	0.131	359
噬菌体 -171	MNWCPSH LWHMCFY	360	-	N	-	-	-	S	H	L	-	H	M	-	Y	-	0.195	0.702	0.192	360
噬菌体 -172	MDWCPY LWYECFA	361	-	-	-	-	-	P	Y	L	-	Y	E	-	-	A	0.068	0.692	0.094	361
噬菌体 -173	MDWCPMN LWSECFN	362	-	-	-	-	-	M	N	L	-	S	E	-	-	N	0.168	0.670	0.124	362
噬菌体 -174	MDWCPKH LWNECFN	363	-	-	-	-	-	K	H	L	-	N	E	-	-	N	0.063	0.663	0.105	363
噬菌体 -175	MDWCPAY LWAEFCF	364	-	-	-	-	-	A	Y	L	-	A	E	-	-	S	0.082	0.640	0.120	364

[0841]

噬菌体 -176	MDWCPSD LWHECFH	365	-	-	-	-	-	S	D	L	-	H	E	-	-	H	0.075	0.629	0.164	365
噬菌体 -177	MDWCPCS LWDHCFN	366	-	-	-	-	-	V	S	L	-	D	H	-	-	N	0.075	0.616	0.100	366
噬菌体 -178	LDWCPRD LWHVCFE	367	L	-	-	-	-	-	D	L	-	H	V	-	-	-	0.176	0.610	0.105	367
噬菌体 -179	MDWCPWI LWNECFN	368	-	-	-	-	-	W	I	L	-	N	E	-	-	N	0.141	0.581	0.137	368
噬菌体 -180	MHWCPRY LWDECFN	369	-	H	-	-	-	-	Y	L	-	D	E	-	-	N	0.132	0.550	0.127	369
噬菌体 -181	MYWCPRD LWDVCFN	370	-	Y	-	-	-	-	D	L	-	D	V	-	-	N	0.145	0.512	0.102	370
噬菌体 -182	MHWCPRS LWNECYF	371	-	H	-	-	-	-	S	L	-	N	E	-	Y	-	0.168	0.456	0.115	371
噬菌体 -183	IDWCPRDL WALCFN	372	I	-	-	-	-	-	D	L	-	A	L	-	-	N	0.127	0.370	0.129	372
噬菌体 -184	MHWCPIN LWNECFN	373	-	H	-	-	-	I	N	L	-	N	E	-	-	S	0.081	0.316	0.098	373
噬菌体 -185	MERCPRFL WNECFN	374	-	E	R	-	-	-	F	L	-	N	E	-	-	N	0.132	0.216	0.093	374
噬菌体 -186	QDWCPY LWHHCFN	375	Q	-	-	-	-	-	T	Y	L	-	H	H	-	-	0.101	0.123	0.122	375
噬菌体 -187	IGKLTCL NADLVI	376	I	G	K	L	T	L	C	L	N	A	-	L	V	I	0.274	0.116	0.100	376
噬菌体 -188	MDWCPSY LWDQCFE	377	-	-	-	-	-	S	Y	L	-	D	Q	-	-	-	0.100	0.083	0.079	377
噬菌体 -189	VDWCPRY LWHVCYN	378	V	-	-	-	-	-	Y	L	-	H	V	-	Y	N	0.064	0.065	0.061	378
噬菌体 -190	MDWCPRD MWAECFF	379	-	-	-	-	-	-	D	M	-	A	E	-	-	-	0.099	2.687	2.259	379
噬菌体 -191	MDWCPRD MWYECFN	380	-	-	-	-	-	-	D	M	-	Y	E	-	-	N	0.099	2.564	0.235	380
噬菌体 -192	DVWCPKY MWSLCFN	381	D	V	-	-	-	K	Y	M	-	S	L	-	-	N	0.101	2.529	0.418	381
噬菌体 -193	MDWCPMD MWVNCFN	382	-	-	-	-	-	M	D	M	-	-	N	-	-	N	0.059	2.516	0.277	382
噬菌体 -194	MDWCPSD MWHCEYA	383	-	-	-	-	-	S	D	M	-	H	E	-	Y	A	0.062	2.474	0.200	383
噬菌体 -195	MDWCPKH MWFMCFN	384	-	-	-	-	-	K	H	M	-	F	M	-	-	N	0.101	2.395	0.372	384
噬菌体 -196	MDWCPRY MWYQCFN	385	-	-	-	-	-	-	Y	M	-	Y	Q	-	-	S	0.079	2.364	0.357	385
噬菌体 -197	MDWCPRH MWYECFF	386	-	-	-	-	-	-	H	M	-	Y	E	-	-	-	0.129	2.342	0.298	386
噬菌体 -198	MDWCPRA MWNHCFN	387	-	-	-	-	-	-	A	M	-	N	H	-	-	N	0.321	2.326	0.426	387

[0842]

噬菌体 -199	MDWCPRN MWAQCFA	388	-	-	-	-	-	-	-	N	M	-	A	Q	-	-	A	0.102	2.315	0.209	388
噬菌体 -200	MFWCPEF MWHFCFN	389	-	F	-	-	-	F	D	M	-	H	F	-	-	N		0.150	2.292	0.469	389
噬菌体 -201	MDWCPRD MWDQCFD	390	-	-	-	-	-	-	D	M	-	D	Q	-	-	D		0.072	2.292	0.119	390
噬菌体 -202	MFWCPEF MWDQCFN	391	-	F	-	-	-	M	D	M	-	D	Q	-	-	N		0.091	2.260	0.207	391
噬菌体 -203	MSWCPRD MWFYCYA	392	-	S	-	-	-	-	D	M	-	F	Y	-	Y	A		0.065	2.248	0.174	392
噬菌体 -204	MDWCPRH MWNVCFS	393	-	-	-	-	-	-	H	M	-	N	V	-	-	S		0.067	2.245	0.130	393
噬菌体 -205	MDWCPTD MWHICFL	394	-	-	-	-	-	T	D	M	-	H	H	-	-	L		0.061	2.201	0.126	394
噬菌体 -206	IHWCPINM WDKCYN	395	I	H	-	-	-	I	N	M	-	D	K	-	Y	N		0.060	2.080	0.203	395
噬菌体 -207	MDWCPRA MWHFCFY	396	-	-	-	-	-	-	A	M	-	H	E	-	-	Y		0.069	1.915	0.129	396
噬菌体 -208	MDWCPTD MWTVCFA	397	-	-	-	-	-	T	D	M	-	I	V	-	-	A		0.363	1.495	0.172	397
噬菌体 -209	IDWCPQD MWFYCFN	398	I	-	-	-	-	Q	D	M	-	F	Y	-	-	N		0.069	1.416	0.160	398
噬菌体 -210	MDWCPRD MWFECFA	399	-	-	-	-	-	-	D	M	-	F	E	-	-	A		0.076	1.310	0.143	399
噬菌体 -211	MDWCPRN MWTVCFL	400	-	-	-	-	-	-	N	M	-	T	V	-	-	L		0.060	1.116	0.093	400
噬菌体 -212	MDWCPRA MWDKCFE	401	-	-	-	-	-	-	A	M	-	D	K	-	-			0.073	0.985	0.094	401
噬菌体 -213	MNWCPSY MWDQCFE	402	-	N	-	-	-	S	Y	M	-	D	Q	-	-	A		0.125	0.854	0.105	402
噬菌体 -214	MDWCPTY MWSECFN	403	-	-	-	-	-	T	Y	M	-	S	E	-	-	N		0.086	0.754	0.107	403
噬菌体 -215	MDWCPRY MWNECFN	404	-	-	-	-	-	-	Y	M	-	N	E	-	-	N		0.064	0.687	0.128	404
噬菌体 -216	MDWCPMN MWYQCFN	405	-	-	-	-	-	M	N	M	-	Y	Q	-	-	N		0.110	0.639	0.137	405
噬菌体 -217	MDWCPWF DMWDKCF	406	-	-	-	-	-	W	D	M	-	D	K	-	-	N		0.101	0.586	0.108	406
噬菌体 -218	TFGPTTM WNRCEFA	407	T	F	G	-	-	T	T	M	-	N	R	-	-	A		0.117	0.181	0.068	407
噬菌体 -219	NYWCPSS MWNRLCH	408	N	Y	-	-	-	S	S	M	-	N	R	-	L	H		0.295	0.158	0.088	408
噬菌体 -220	FDFPITM WTYCQH	409	F	-	F	-	-	T	T	M	-	T	Y	-	Q	H		0.084	0.086	0.081	409
噬菌体 -221	TTWCPTS MWLHCFD	410	T	T	-	-	-	T	S	M	-	L	H	-	-	D		0.096	0.074	0.072	410

[0843]

噬菌体 -222	MDWCPRD QWHNCFN	411	-	-	-	-	-	-	D	Q	-	H	N	-	-	N	0.075	0.200	0.078	411
噬菌体 -223	MDWCPRD RWVDCFF	412	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	0.066	1.577	0.140	412
噬菌体 -224	MDWCPRD RWNDCYF	413	-	-	-	-	-	K	D	-	-	N	-	-	Y	-	0.078	1.091	0.093	413
噬菌体 -225	MDWCPRD RWADCFE	414	-	-	-	-	-	-	D	-	-	A	-	-	-	-	0.069	0.392	0.089	414
噬菌体 -226	MDWCPRD RWIDCFN	415	-	-	-	-	-	-	D	-	-	I	-	-	-	N	0.218	0.339	0.131	415
噬菌体 -227	MDWCPRD RWSDCFN	416	-	-	-	-	-	-	D	-	-	S	-	-	-	N	0.074	0.102	0.074	416
噬菌体 -228	ITWCHVIS GLECWN	417	I	T	-	-	H	V	I	S	G	L	E	-	W	N	0.076	0.193	0.100	417
噬菌体 -229	VPWCQIIS GLECLT	418	V	P	-	-	Q	I	I	S	G	L	E	-	L	T	0.076	0.174	0.077	418
噬菌体 -230	APWCQIIS GLECLT	419	A	P	-	-	Q	I	I	S	G	L	E	-	L	T	0.080	0.169	0.078	419
噬菌体 -231	VPWCLIIS GLDCLN	420	V	P	-	-	L	I	I	S	G	L	-	-	L	N	0.455	0.107	0.090	420
噬菌体 -232	MDWCARF VGYGCLD	421	-	-	-	-	A	-	F	V	G	Y	G	-	L	D	0.948	0.065	0.074	421
噬菌体 -233	MTWCPTSF WNRCLD	422	-	T	-	-	-	T	S	F	-	N	R	-	L	D	0.142	0.392	0.405	422
噬菌体 -234	MDWCPRD LWFECHF	423	-	-	-	-	-	-	A	L	-	F	E	-	-	-	0.111	2.668	0.331	423
噬菌体 -235	MDWCPRY LWHECFE	424	-	-	-	-	-	-	Y	L	-	H	E	-	-	S	0.063	2.654	0.303	424
噬菌体 -236	MDWCPRD LWNLCHF	425	-	-	-	-	-	-	D	L	-	N	L	-	-	-	0.084	2.639	0.436	425
噬菌体 -237	MDWCPSY LWHECHF	426	-	-	-	-	-	S	Y	L	-	H	E	-	-	-	0.067	2.606	0.447	426
噬菌体 -238	MDWCPPY LWSECFE	427	-	-	-	-	-	P	Y	L	-	S	E	-	-	A	0.539	2.604	0.234	427
噬菌体 -239	MDWCPRY LWHVCFN	428	-	-	-	-	-	-	Y	L	-	H	V	-	-	N	0.187	2.603	0.409	428
噬菌体 -240	MDWCPRD LWHVCFN	429	-	-	-	-	-	-	T	L	-	H	V	-	-	N	0.317	2.601	0.551	429
噬菌体 -241	MDWCPRH LWHECFE	430	-	-	-	-	-	-	H	L	-	H	E	-	Y	S	0.066	2.584	0.374	430
噬菌体 -242	MDWCPKH LWTECFE	431	-	-	-	-	-	K	H	L	-	T	E	-	-	A	0.098	2.491	0.145	431
噬菌体 -243	MDWCPRH LWYECFN	432	-	-	-	-	-	-	H	L	-	Y	E	-	-	N	0.063	2.414	0.167	432
噬菌体 -244	MDWCPRY LWHECFD	433	-	-	-	-	-	-	Y	L	-	H	E	-	-	D	0.071	2.066	0.177	433

[0844]

噬菌体 -245	MDWCPRN LWHLCFA	434	-	-	-	-	-	-	-	N	L	-	H	L	-	-	A	0.082	1.397	0.164	434
噬菌体 -246	MDWCPKH LWNKCFN	435	-	-	-	-	-	-	K	H	L	-	N	K	-	-	N	0.075	1.161	0.092	435
噬菌体 -247	MDWCPRF MWAECFN	436	-	-	-	-	-	-	F	M	-	A	E	-	-	N	0.073	2.603	0.341	436	
噬菌体 -248	MDWCPRN MWHHCFD	437	-	-	-	-	-	-	N	M	-	H	H	-	-	D	0.205	1.597	0.524	437	
噬菌体 -249	MDWCPSD MWAHCYN	438	-	-	-	-	-	S	D	M	-	A	H	-	Y	N	0.191	1.209	0.109	438	
噬菌体 -250	MDWCPKV MWHYCFA	439	-	-	-	-	-	-	K	V	M	-	H	Y	-	-	A	0.136	1.138	0.252	439
噬菌体 -251	MDWCPRF MWSECFN	440	-	-	-	-	-	-	F	M	-	S	E	-	-	S	0.092	1.008	0.137	440	
噬菌体 -252	MDWCPRH MWINCFA	441	-	-	-	-	-	-	H	M	-	I	N	-	-	A	0.091	0.920	0.165	441	
噬菌体 -253	MVGCATS MWNRLT	442	-	V	G	-	A	T	S	M	-	N	R	-	L	T	0.256	0.770	0.746	442	
噬菌体 -254	MDWCPRY LWSECFN	443	-	-	-	-	-	-	Y	L	-	S	E	-	-	A	0.078	2.705	0.513	443	
噬菌体 -255	MDWCPRH LWSVCFN	444	-	-	-	-	-	-	H	L	-	S	V	-	-	N	0.064	2.649	0.825	444	
噬菌体 -256	MDWCPFD LWHVCYN	445	-	-	-	-	-	F	D	L	-	H	V	-	Y	N	0.089	2.602	0.651	445	
噬菌体 -257	MDWCPRF LWHECFN	446	-	-	-	-	-	-	F	L	-	H	E	-	-	N	0.079	2.586	0.351	446	
噬菌体 -258	MDWCPRS LWHVCFN	447	-	-	-	-	-	-	S	L	-	H	V	-	-	N	0.098	2.412	0.238	447	
噬菌体 -259	MDWCPRN LWHACFN	448	-	-	-	-	-	-	N	L	-	H	A	-	-	N	0.071	1.571	0.112	448	
噬菌体 -260	MDWCPVF MWNCFN	449	-	-	-	-	-	V	F	M	-	N	E	-	-	N	0.079	2.661	0.356	449	
噬菌体 -261	MDWCMPF MWHCFN	450	-	-	-	-	-	M	F	M	-	H	E	-	-	N	0.102	2.235	1.045	450	
噬菌体 -262	MYWCATS MWNRCFV	451	-	Y	-	-	A	T	S	M	-	N	R	-	-	V	0.248	0.398	0.415	451	
噬菌体 -263	MDWCPRH MWHCFN	452	-	-	-	-	-	-	H	M	-	H	E	-	-	A	0.074	2.518	0.298	452	
噬菌体 -264	MDWCPRH LWHVCFN	453	-	-	-	-	-	-	H	L	-	H	V	-	-	N	0.070	2.667	0.636	453	
噬菌体 -265	MDWCPRF MWDLCFA	454	-	-	-	-	-	-	F	M	-	D	L	-	-	A	0.270	2.638	0.725	454	
噬菌体 -266	VTSCPITM WNRCS	455	V	T	S	-	-	T	T	M	-	N	R	-	-	S	0.396	1.220	0.546	455	
噬菌体 -267	MTLCLSVD LVHCWY	456	-	T	L	-	L	S	V	D	L	-	H	-	W	Y	0.114	0.632	0.093	456	

[0845]

噬菌体 -269	DSFCTWSA WQECGR	457	D	S	F	-	T	W	S	A	-	Q	E	-	G	R	0.072	0.130	0.101	457
噬菌体 -270	MDWCPRD FWAFCHF	458	-	-	-	-	-	D	F	-	A	F	-	-	-	-	0.118	2.365	0.655	458
噬菌体 -271	MDWCPTS FWNRCFH	459	-	-	-	-	T	S	F	-	N	R	-	-	H	-	0.102	0.087	0.092	459
噬菌体 -272	MVWCMSV GWAVCLN	460	-	V	-	-	M	S	V	G	-	A	V	-	L	N	0.289	0.271	0.284	460
噬菌体 -273	IDWCPTAG WTYCWFF	461	I	-	-	-	T	A	G	-	T	Y	-	W	-	-	0.071	0.136	0.075	461
噬菌体 -274	WVSLRH HWLECFH	462	W	V	S	-	L	-	H	H	-	L	E	-	-	H	0.781	0.723	0.858	462
噬菌体 -275	MDWCPRD HWVDCYS	463	-	-	-	-	-	D	H	-	-	-	-	Y	S	-	0.172	0.671	0.092	463
噬菌体 -276	IDWCPKIH WDLICYF	464	I	-	-	-	K	I	H	-	D	L	-	Y	-	-	0.072	0.295	0.082	464
噬菌体 -277	MDWCPRS HWSECFSS	465	-	-	-	-	-	S	H	-	S	E	-	-	S	-	0.080	0.253	0.087	465
噬菌体 -278	MDWCPRSI WYLCFN	466	-	-	-	-	-	S	I	-	Y	L	-	-	N	-	0.383	2.548	1.337	466
噬菌体 -279	MDWCPRY LWAEFCFN	467	-	-	-	-	-	Y	L	-	A	E	-	-	N	-	0.068	2.742	1.141	467
噬菌体 -280	MDWCPRY LWDYCFCA	468	-	-	-	-	-	Y	L	-	D	Y	-	-	A	-	0.073	2.709	0.382	468
噬菌体 -281	MDWCPRS LWFLCFN	469	-	-	-	-	-	S	L	-	F	L	-	-	N	-	1.110	2.709	1.774	469
噬菌体 -282	MDWCPRD LWFACFA	470	-	-	-	-	-	D	L	-	F	A	-	-	A	-	0.060	2.658	0.794	470
噬菌体 -283	MDWCPRH LWNECFN	471	-	-	-	-	-	H	L	-	N	E	-	-	N	-	0.079	2.650	0.393	471
噬菌体 -284	MDWCPRF LWHVCFSS	472	-	-	-	-	-	F	L	-	H	V	-	-	S	-	2.091	2.643	2.480	472
噬菌体 -285	MDWCPRD LWAMCFCA	473	-	-	-	-	-	D	L	-	A	M	-	-	A	-	0.071	2.627	0.889	473
噬菌体 -286	MERCPRYL WHMCYS	474	-	E	R	-	-	Y	L	-	H	M	-	Y	S	-	0.164	2.589	0.840	474
噬菌体 -288	MDWCPIA LWDFCFCA	475	-	-	-	-	-	I	A	L	-	D	F	-	A	-	0.073	2.522	0.492	475
噬菌体 -289	MDWCPRY LWNVCFCA	476	-	-	-	-	-	Y	L	-	N	V	-	-	A	-	0.070	2.513	0.280	476
噬菌体 -290	MDWCPRD LWSVCFSS	477	-	-	-	-	-	D	L	-	S	V	-	-	S	-	0.090	2.505	0.116	477
噬菌体 -291	MDWCPRY LWHVCFY	478	-	-	-	-	-	Y	L	-	H	V	-	-	Y	-	0.227	2.498	1.137	478
噬菌体 -292	MDWCPR LWDHCF	479	-	-	-	-	-	A	L	-	D	H	-	-	-	-	0.081	2.492	0.394	479

[0846]

噬菌体 -293	MDWCPRH LWFECFN	480	-	-	-	-	-	-	H	L	-	F	E	-	-	N	0.064	2.489	0.171	480
噬菌体 -294	MDWCPRS LWDYCFA	481	-	-	-	-	-	-	S	L	-	D	Y	-	-	A	0.115	2.488	0.235	481
噬菌体 -297	MDWCPRH LWTECFE	482	-	-	-	-	-	-	H	L	-	T	E	-	-	S	0.074	2.482	0.243	482
噬菌体 -298	MDWCPLY LWAEFCN	483	-	-	-	-	-	-	L	Y	L	-	A	E	-	N	0.094	2.476	0.193	483
噬菌体 -299	MDWCPIY LWAEFCN	484	-	-	-	-	-	-	I	Y	L	-	A	E	-	N	0.078	2.453	0.307	484
噬菌体 -300	MDWCPRH LWFECFF	485	-	-	-	-	-	-	H	L	-	F	E	-	-	-	0.178	2.451	0.479	485
噬菌体 -301	MDWCPRY LWHECFE	486	-	-	-	-	-	-	Y	L	-	H	E	-	-	-	0.082	2.450	0.682	486
噬菌体 -302	MDWCPRY LWHVCFD	487	-	-	-	-	-	-	Y	L	-	H	V	-	-	D	0.068	2.445	0.310	487
噬菌体 -303	MDWCPRY LWTECFE	488	-	-	-	-	-	-	Y	L	-	T	E	-	-	S	0.074	2.421	0.329	488
噬菌体 -304	MDWCPRY LWDECFE	489	-	-	-	-	-	-	K	F	L	-	D	E	-	A	0.311	2.406	0.376	489
噬菌体 -305	MDWCPRD LWTECFE	490	-	-	-	-	-	-	D	L	-	T	E	-	-	S	0.080	2.401	0.174	490
噬菌体 -306	MDWCPRH LWNECFE	491	-	-	-	-	-	-	H	L	-	N	E	-	-	A	0.068	2.394	0.170	491
噬菌体 -307	MDWCPRY LWVCFHI	492	-	-	-	-	-	-	Y	L	-	P	V	-	-	H	0.179	2.392	0.602	492
噬菌体 -308	MDWCPRY LWAEFCN	493	-	-	-	-	-	-	K	S	L	-	A	E	-	N	0.395	2.377	0.162	493
噬菌体 -309	MDWCPRY LWHECFE	494	-	-	-	-	-	-	M	F	L	-	H	E	-	N	0.170	2.375	0.591	494
噬菌体 -310	MDWCPRD LWDEFCN	495	-	-	-	-	-	-	D	L	-	D	E	-	-	N	0.066	2.374	0.248	495
噬菌体 -311	MDWCPRD LWYQCFN	496	-	-	-	-	-	-	D	L	-	Y	Q	-	-	N	0.069	2.353	0.609	496
噬菌体 -313	MDWCPRS LWNYCFN	497	-	-	-	-	-	-	S	L	-	N	Y	-	-	N	0.076	2.350	0.209	497
噬菌体 -314	MDWCPIH LWNECFN	498	-	-	-	-	-	-	I	H	L	-	N	E	-	N	0.074	2.347	0.157	498
噬菌体 -315	MDWCPTY LWHVCFE	499	-	-	-	-	-	-	T	Y	L	-	H	V	-	S	0.089	2.324	0.160	499
噬菌体 -316	MDWCPRS LWNYCFA	500	-	-	-	-	-	-	S	L	-	N	Y	-	-	A	0.067	2.316	0.198	500
噬菌体 -317	MDWCPRH LWHECFE	501	-	-	-	-	-	-	H	L	-	H	E	-	-	T	0.103	2.297	0.320	501
噬菌体 -318	MDWCPRY LWDEFCN	502	-	-	-	-	-	-	M	F	L	-	D	E	-	N	0.132	2.287	0.203	502

[0847]

噬菌体 -319	MSWCPRD LWHLCFF	503	-	S	-	-	-	-	D	L	-	H	L	-	-	0.077	2.265	0.319	503
噬菌体 -320	MDWCPTY LWNECFN	504	-	-	-	-	-	T	Y	L	-	N	E	-	-	0.120	2.244	0.606	504
噬菌体 -321	MDWCPRD LWYVCFA	505	-	-	-	-	-	D	L	-	Y	V	-	-	A	0.095	2.221	0.138	505
噬菌体 -322	MDWCPRH LWIECFN	506	-	-	-	-	-	H	L	-	I	E	-	-	N	0.339	2.214	0.376	506
噬菌体 -323	MDWCPTY LWNVCFN	507	-	-	-	-	-	T	Y	L	-	N	V	-	-	0.085	2.211	0.132	507
噬菌体 -324	MDWCPRH LWYECFS	508	-	-	-	-	-	H	L	-	Y	E	-	-	S	0.216	2.167	0.163	508
噬菌体 -325	MDWCPRH LWDECFN	509	-	-	-	-	-	A	Y	L	-	D	E	-	-	0.096	2.166	0.163	509
噬菌体 -326	MFWCPTL WNECFN	510	-	F	-	-	-	I	T	L	-	N	E	-	-	0.075	2.153	0.143	510
噬菌体 -327	MHWCPRD LWHVCFN	511	-	H	-	-	-	D	L	-	H	V	-	-	N	0.071	2.149	0.150	511
噬菌体 -328	MDWCPRH LWDHCFN	512	-	-	-	-	-	A	L	-	D	H	-	-	N	0.323	2.145	0.293	512
噬菌体 -329	MDWCPRH LWNVCFN	513	-	-	-	-	-	A	L	-	N	V	-	-	A	0.071	2.140	0.249	513
噬菌体 -330	MDWCPRF LWDVCFN	514	-	-	-	-	-	F	L	-	D	V	-	-	N	0.100	2.139	0.309	514
噬菌体 -331	MDWCPRH LWDECFY	515	-	-	-	-	-	H	L	-	D	E	-	-	Y	0.098	2.127	0.146	515
噬菌体 -332	IDWCPRAL WDACLA	516	I	-	-	-	-	A	L	-	D	A	-	L	A	0.269	2.103	0.164	516
噬菌体 -333	MDWCPTD LWHECFN	517	-	-	-	-	-	T	D	L	-	H	E	-	-	0.078	2.071	0.154	517
噬菌体 -334	MDWCPRY LWDECFN	518	-	-	-	-	-	Y	L	-	D	E	-	-	S	0.069	2.064	0.164	518
噬菌体 -335	MDWCPRF LWDYCFN	519	-	-	-	-	-	F	L	-	D	Y	-	-	A	0.146	2.034	0.207	519
噬菌体 -336	MDWCPRD LWNWCFN	520	-	-	-	-	-	D	L	-	N	W	-	-	N	0.139	2.026	0.390	520
噬菌体 -337	MDWCPKP LWHVCFN	521	-	-	-	-	-	K	P	L	-	H	V	-	-	0.069	2.022	0.152	521
噬菌体 -338	MDWCPRF LWNECFY	522	-	-	-	-	-	F	L	-	N	E	-	-	Y	0.143	1.996	0.287	522
噬菌体 -339	MDWCPRH LWDQCFN	523	-	-	-	-	-	T	L	-	D	Q	-	-	-	0.088	1.992	0.314	523
噬菌体 -340	MSWCPRD WSECFN	524	-	S	-	-	-	I	D	L	-	S	E	-	-	0.072	1.986	0.148	524
噬菌体 -341	MDWCPRH LWDECFN	525	-	-	-	-	-	H	L	-	D	E	-	-	N	0.084	1.978	0.268	525

[0848]

噬菌体 -342	MDWCPRN LWHECF A	526	-	-	-	-	-	-	N	L	-	H	E	-	-	A	0.067	1.965	0.175	526
噬菌体 -343	MDWCPRD LWTQCF F	527	-	-	-	-	-	-	D	L	-	T	Q	-	-	-	0.065	1.932	0.119	527
噬菌体 -344	MDWCPRH LWVHCFS	528	-	-	-	-	-	-	H	L	-	-	H	-	-	S	0.096	1.914	0.173	528
噬菌体 -345	MDFCPRFL WHECFN	529	-	-	F	-	-	-	F	L	-	H	E	-	-	N	0.063	1.908	0.225	529
噬菌体 -346	MDWCPRH LWHACFS	530	-	-	-	-	-	-	H	L	-	H	A	-	-	S	0.073	1.826	0.167	530
噬菌体 -347	MDWCPLF LWDQCFN	531	-	-	-	-	-	L	F	L	-	D	Q	-	-	N	0.116	1.819	0.264	531
噬菌体 -348	MAWCPW YLWDECF	532	-	A	-	-	-	W	Y	L	-	D	E	-	-	N	0.200	1.810	0.267	532
噬菌体 -349	LDWCPRH LWALCFN	533	L	-	-	-	-	-	H	L	-	A	L	-	-	N	0.073	1.780	0.240	533
噬菌体 -350	MDWCPRH LWNECFN	534	-	-	-	-	-	W	F	L	-	N	E	-	-	N	0.158	1.774	0.279	534
噬菌体 -351	MDWCMPN LWHECF A	535	-	-	-	-	-	M	N	L	-	H	E	-	-	A	0.080	1.742	0.160	535
噬菌体 -352	MDWCPIH LWYECFN	536	-	-	-	-	-	I	H	L	-	Y	E	-	-	N	0.080	1.734	0.203	536
噬菌体 -353	IDWCPLHL WHECYH	537	I	-	-	-	-	L	H	L	-	H	E	-	Y	H	0.067	1.693	0.182	537
噬菌体 -354	MDWCPRY LWLECFN	538	-	-	-	-	-	-	Y	L	-	L	E	-	-	N	0.083	1.685	0.368	538
噬菌体 -356	MDWCMPY LWDECF F	539	-	-	-	-	-	M	Y	L	-	D	E	-	-	-	0.082	1.652	0.178	539
噬菌体 -357	MDWCPRH LWHECFN	540	-	-	-	-	-	-	L	L	-	H	E	-	-	N	0.071	1.601	0.109	540
噬菌体 -358	MDWCPIH LWHECF F	541	-	-	-	-	-	P	H	L	-	H	E	-	-	-	0.069	1.449	0.136	541
噬菌体 -359	MDWCPRP LWHECF A	542	-	-	-	-	-	-	P	L	-	H	E	-	-	A	0.063	1.439	0.138	542
噬菌体 -360	MDWCMPF LWHECF S	543	-	-	-	-	-	M	F	L	-	H	E	-	-	S	0.092	1.435	0.193	543
噬菌体 -361	MHWCPRH LWSECFN	544	-	H	-	-	-	-	H	L	-	S	E	-	-	N	0.165	1.430	0.478	544
噬菌体 -362	MDWCPRH WHECF S	545	-	-	-	-	-	-	I	L	-	H	E	-	-	S	0.064	1.391	0.174	545
噬菌体 -363	MNWCMPH LWAECFN	546	-	N	-	-	-	M	H	L	-	A	E	-	-	N	0.087	1.390	0.140	546
噬菌体 -364	MDWCPRS LWAQCFY	547	-	-	-	-	-	-	S	L	-	A	Q	-	-	Y	0.067	1.387	0.140	547
噬菌体 -365	MDWCPSY LWPVCFN	548	-	-	-	-	-	S	Y	L	-	P	V	-	-	N	0.079	1.178	0.131	548

[0849]

噬菌体 -366	MHWCPLY LWDECFY	549	-	H	-	-	-	L	Y	L	-	D	E	-	-	Y	0.153	1.159	0.376	549
噬菌体 -367	MDWCPSF LWYECFN	550	-	-	-	-	S	F	L	-	Y	E	-	-	N		0.063	1.130	0.104	550
噬菌体 -368	MSWCPPY LWTVCYN	551	-	S	-	-	P	Y	L	-	T	V	-	Y	N		0.176	1.104	0.326	551
噬菌体 -369	MHWCPRD LWYECFA	552	-	H	-	-	-	D	L	-	Y	E	-	-	A		0.072	0.995	0.108	552
噬菌体 -370	MTWCPAY LWHECFN	553	-	T	-	-	A	Y	L	-	H	E	-	-	N		0.086	0.985	0.139	553
噬菌体 -371	MAWCPRY LWAECEFF	554	-	A	-	-	-	Y	L	-	A	E	-	-	-		0.510	0.918	0.216	554
噬菌体 -372	MDWCPRY LWVDCEFA	555	-	-	-	-	-	Y	L	-	-	-	-	-	A		0.095	0.917	0.218	555
噬菌体 -373	MDWCPRIL WSDCFN	556	-	-	-	-	-	I	L	-	S	-	-	-	N		0.082	0.847	0.113	556
噬菌体 -374	MAWCPLD LWDKCFY	557	-	A	-	-	-	L	D	L	-	D	K	-	-	Y	0.079	0.770	0.141	557
噬菌体 -375	MNWCPRRA LWHECFL	558	-	N	-	-	-	A	L	-	H	E	-	-	L		0.085	0.759	0.107	558
噬菌体 -376	MDWCPRH LWTYCFH	559	-	-	-	-	-	H	L	-	T	Y	-	-	H		0.109	0.757	0.207	559
噬菌体 -377	MDWCPRIL LWLECFN	560	-	-	-	-	-	F	D	L	-	L	E	-	-	N	0.087	0.650	0.120	560
噬菌体 -378	MHWCPLH LWNECFRA	561	-	H	-	-	-	L	H	L	-	N	E	-	-	A	0.065	0.575	0.083	561
噬菌体 -379	MDWCPRN LWAECEFS	562	-	-	-	-	-	N	L	-	A	E	-	-	S		0.061	0.538	0.080	562
噬菌体 -380	MDYCPSY LWHECFRA	563	-	-	Y	-	-	S	Y	L	-	H	E	-	-	A	0.065	0.470	0.090	563
噬菌体 -381	MAWCPRIL WHQCFN	564	-	A	-	-	-	I	L	-	H	Q	-	-	N		0.113	0.322	0.129	564
噬菌体 -382	HWCPSTL WNRCLV	565	I	T	-	-	-	T	S	L	-	N	R	-	L	V	0.077	0.242	0.089	565
噬菌体 -383	LAGQRD LATVCVI	566	L	A	G	-	Q	-	D	L	A	T	V	-	V	I	0.068	0.229	0.116	566
噬菌体 -384	IMWCPTSL WNRCVT	567	I	M	-	-	-	T	S	L	-	N	R	-	V	T	0.104	0.161	0.129	567
噬菌体 -385	ILRCQMNL QDECLN	568	I	L	R	-	Q	M	N	L	Q	D	E	-	L	N	0.083	0.083	0.077	568
噬菌体 -386	NHWCPTT LWNRCAVA	569	N	H	-	-	-	T	T	L	-	N	R	-	V	A	0.293	0.078	0.093	569
噬菌体 -387	MDWCPRH LWLECFN	570	-	-	-	-	-	H	L	-	L	E	-	-	N		0.064	0.066	0.074	570
噬菌体 -388	MDWCPRF MWNCFE	571	-	-	-	-	-	F	M	-	N	F	-	-	-		2.200	2.621	2.539	571

[0850]

噬菌体 -389	MDWCPSD MWANCFE	572	-	-	-	-	-	S	D	M	-	A	N	-	-	-	0.110	2.621	0.316	572
噬菌体 -390	IDWCPMH MWDFCYN	573	I	-	-	-	-	M	H	M	-	D	F	-	Y	N	0.078	2.544	0.232	573
噬菌体 -391	MDWCPFD MWADCFE	574	-	-	-	-	-	F	D	M	-	A	-	-	-	-	0.063	2.532	0.215	574
噬菌体 -392	LHWCPIS MWTYCYY	575	L	H	-	-	-	T	S	M	-	T	Y	-	Y	Y	0.688	2.475	2.456	575
噬菌体 -393	MDWCPRD MWFEFCN	576	-	-	-	-	-	D	M	-	F	E	-	-	N	-	0.069	2.422	0.778	576
噬菌体 -394	MDWCPRY MWSDCFE	577	-	-	-	-	-	Y	M	-	S	-	-	-	-	-	0.082	2.280	0.377	577
噬菌体 -395	MDWCPKD MWAECFN	578	-	-	-	-	-	K	D	M	-	A	E	-	N	-	0.083	2.106	0.457	578
噬菌体 -396	TDWCPRD MWYLCFN	579	T	-	-	-	-	D	M	-	Y	L	-	-	N	-	0.082	2.106	0.301	579
噬菌体 -397	MDWCPRA MWDYCFY	580	-	-	-	-	-	A	M	-	D	Y	-	-	Y	-	0.123	2.106	0.339	580
噬菌体 -398	MDWCPRN MWNECFE	581	-	-	-	-	-	N	M	-	N	E	-	-	-	-	0.095	2.099	0.430	581
噬菌体 -399	MDWCPRS MWDFCFN	582	-	-	-	-	-	S	M	-	D	S	-	-	N	-	0.332	2.019	0.142	582
噬菌体 -400	MHWCPIS MWSECFE	583	-	H	-	-	-	T	Y	M	-	S	E	-	A	-	0.070	1.839	0.161	583
噬菌体 -401	MDWCPID MWVLCFE	584	-	-	-	-	-	L	D	M	-	-	L	-	A	-	0.085	1.837	0.169	584
噬菌体 -402	MDWCPRH MWHCFH	585	-	-	-	-	-	H	M	-	H	E	-	-	H	-	0.067	1.815	0.171	585
噬菌体 -403	MSWCPWD MWNECFE	586	-	S	-	-	-	W	D	M	-	N	E	-	A	-	0.069	1.521	0.108	586
噬菌体 -404	MDWCPRD MWTSCFN	587	-	-	-	-	-	D	M	-	T	S	-	-	N	-	0.100	1.414	0.179	587
噬菌体 -405	MDWCPMS MWAFCFD	588	-	-	-	-	-	M	S	M	-	A	F	-	D	-	0.102	1.412	0.160	588
噬菌体 -406	MNWCPID MWTECFN	589	-	N	-	-	-	I	D	M	-	T	E	-	N	-	0.245	1.403	0.175	589
噬菌体 -407	MNWCPIH MWNQCFA	590	-	N	-	-	-	I	H	M	-	N	Q	-	A	-	0.085	1.373	0.133	590
噬菌体 -408	MFWCPKD MWAECFA	591	-	F	-	-	-	K	D	M	-	A	E	-	A	-	0.099	1.258	0.113	591
噬菌体 -409	LHWCPIM WTYCYY	592	L	H	-	-	-	I	T	M	-	T	Y	-	Y	Y	0.229	1.212	0.516	592
噬菌体 -410	IDWCPRI MWHCFE	593	I	-	-	-	-	Y	M	-	H	E	-	-	-	-	0.098	1.178	0.164	593
噬菌体 -411	MSWCPRI MWHCFN	594	-	S	-	-	-	F	M	-	H	E	-	-	N	-	0.081	1.111	0.246	594

[0851]

噬菌体 -412	QHWCPRD MWNDCYA	595	Q	H	-	-	-	-	D	M	-	N	-	-	Y	A	0.066	1.076	0.149	595
噬菌体 -413	MDWCPSD MWSNCFN	596	-	-	-	-	-	S	D	M	-	S	N	-	-	N	0.070	1.075	0.121	596
噬菌体 -414	LYWCPRD MWAYCYS	597	L	Y	-	-	-	-	D	M	-	A	Y	-	Y	S	0.068	1.019	0.157	597
噬菌体 -415	MDWCPMY MWHKCFH	598	-	-	-	-	-	M	Y	M	-	H	K	-	-	H	0.099	0.987	0.168	598
噬菌体 -416	MDWCPSN MWNCEFF	599	-	-	-	-	-	S	N	M	-	N	E	-	-	-	0.072	0.983	0.136	599
噬菌体 -417	IYWCPTA MWNRCSA	600	I	Y	-	-	-	T	A	M	-	N	R	-	S	A	0.086	0.817	0.073	600
噬菌体 -418	MYWCPKY MWSECEFA	601	-	Y	-	-	-	K	Y	M	-	S	E	-	-	A	0.072	0.741	0.099	601
噬菌体 -419	VDWCPAH MWNCEYN	602	V	-	-	-	-	A	H	M	-	N	E	-	Y	N	0.208	0.664	0.085	602
噬菌体 -420	MFWCPSD MWNRCFD	603	-	F	-	-	-	S	T	M	-	N	R	-	-	D	0.063	0.464	0.138	603
噬菌体 -421	TIFCPSTM WNRCSWT	604	T	I	F	-	-	S	T	M	-	N	R	-	W	T	0.138	0.262	0.085	604
噬菌体 -422	MYWCPIA MWDYCYA	605	-	Y	-	-	-	I	N	M	-	D	Y	-	Y	A	0.122	0.109	0.088	605
噬菌体 -423	INLCPIPM WNRCSWL	606	I	N	L	-	-	T	P	M	-	N	R	-	W	L	0.119	0.103	0.101	606
噬菌体 -424	ITQCPSTM WNRCSV	607	I	T	Q	-	-	S	T	M	-	N	R	-	S	V	0.067	0.098	0.108	607
噬菌体 -425	MDLCPTA MWNRCFY	608	-	-	L	-	-	T	A	M	-	N	R	-	-	Y	0.063	0.097	0.084	608
噬菌体 -426	MFLCPSA MWNRCFY	609	-	F	L	-	-	S	A	M	-	N	R	-	-	Y	0.069	0.094	0.114	609
噬菌体 -427	VILCPTM WNRCSFH	610	V	I	L	-	-	T	T	M	-	N	R	-	-	H	0.100	0.072	0.084	610
噬菌体 -428	MNWCPSD MWNRCFL	611	-	N	-	-	-	S	T	M	-	N	R	-	L	T	0.067	0.065	0.070	611
噬菌体 -430	IHLCHWVP WIKCSH	612	I	H	L	-	H	W	V	P	-	I	K	-	S	H	2.516	2.550	2.508	612
噬菌体 -431	MAWCPSD QWHECFN	613	-	A	-	-	-	A	D	Q	-	H	E	-	-	N	0.076	1.845	0.456	613
噬菌体 -432	IDWCPIQG LPCFA	614	I	-	-	-	-	I	I	Q	G	L	P	-	-	A	0.058	0.368	0.065	614
噬菌体 -433	MAWCPW AQFDECLA	615	-	A	-	-	-	W	A	Q	F	D	E	-	L	A	0.073	0.071	0.078	615
噬菌体 -434	IVWCPTQ WNRCSAT	616	I	V	-	-	-	T	T	Q	-	N	R	-	A	T	0.113	0.067	0.083	616
噬菌体 -435	MDWCPRD RWVDCYA	617	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	Y	A	0.157	1.484	0.403	617

[0852]	噬菌体 -436	MDWCPRD RWADCFN	618	-	-	-	-	-	-	D	-	-	A	-	-	-	N	0.063	1.351	0.080	618
	噬菌体 -437	MDWCPVD RWADCFN	619	-	-	-	-	-	V	D	-	-	A	-	-	-	N	0.071	1.156	0.315	619
	噬菌体 -438	MDWCPRD RWAFCFD	620	-	-	-	-	-	M	S	-	-	A	F	-	-	D	0.071	1.000	0.115	620
	噬菌体 -439	MDWCPRD RWDVCFN	621	-	-	-	-	-	-	D	-	-	D	V	-	-	A	0.073	0.924	0.096	621
	噬菌体 -440	MDWCPRD RWVDCFN	622	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	N	0.106	0.911	0.132	622
	噬菌体 -441	MDWCPRD RWDDCFN	623	-	-	-	-	-	-	D	-	-	D	-	-	-	-	0.114	0.899	0.183	623
	噬菌体 -442	IYWCPIDR WNDCYN	624	I	Y	-	-	-	I	D	-	-	N	-	-	Y	N	0.177	0.867	0.164	624
	噬菌体 -443	MDWCPRD RWNDCYF	625	-	-	-	-	-	M	T	-	-	N	-	-	Y	-	0.081	0.671	0.078	625
	噬菌体 -444	VNQCTRY RWAECLE	626	V	N	Q	-	T	-	Y	-	-	A	E	-	L	N	0.465	0.566	0.135	626
	噬菌体 -445	MDWCPRD RWHDCFF	627	-	-	-	-	-	-	A	-	-	H	-	-	-	-	0.097	0.497	0.138	627
	噬菌体 -446	MDWCPRD RWDDCFN	628	-	-	-	-	-	-	D	-	-	D	-	-	-	N	0.069	0.450	0.077	628
	噬菌体 -447	MDWCPRD RWDVCFN	629	-	-	-	-	-	-	D	-	-	D	V	-	Y	Y	0.073	0.074	0.073	629
	噬菌体 -448	MAWCPW ASFDECLA	630	-	A	-	-	-	W	A	S	F	D	E	-	L	A	0.104	0.089	0.109	630
	噬菌体 -449	MVDCPLIS FDECLA	631	-	V	D	-	-	L	I	S	F	D	E	-	L	A	0.246	0.070	0.076	631
	噬菌体 -450	EDWCPTD VWPYCFN	632	E	-	-	-	-	T	D	V	-	P	Y	-	-	S	0.100	0.711	0.157	632
	噬菌体 -451	MDWCPRD WWIECYA	633	-	-	-	-	-	-	F	W	-	H	E	-	Y	A	0.246	2.397	0.503	633
	噬菌体 -452	MDWCPRD WWHMCF	634	-	-	-	-	-	-	D	W	-	H	M	-	-	N	0.100	2.115	0.243	634
	噬菌体 -453	MDWCPSD YWYVCFN	635	-	-	-	-	-	S	D	Y	-	Y	V	-	-	A	0.065	0.707	0.080	635

[0853] 实施例5.通过ELISA的肽抑制抗CD28scFv和Ab-12结合CD28抗原

[0854] 以标准酶联免疫吸附测定 (ELISA) 形式来评估肽对于抑制抗CD28 scFv或Ab-12与CD28抗原结合的能力。简言之,将生物素化CD28抗原捕获在中性亲和素包被的板上。将2nM的抗CD28 scFv或5nM的Ab-12用0-100uM滴定的肽预温育。在短预温育期之后,将滴定的肽与固定的抗CD28 scFv (2nM) 或Ab-12 (5nM) 的混合物添加至CD28抗原捕获的板。在板上短温育之后,用标准辣根过氧化物酶缀合的二抗检测结合的抗CD28 scFv或Ab-12。在Graphpad Prism软件中计算使最大信号降低50%所需的肽浓度(IC50)。图8A-8C说明了通过ELISA测量的抑制抗CD28 scFv与CD28抗原结合的肽。图9A-9C说明了通过ELISA的抑制Ab-12与CD28抗原结合的肽。

[0855] 实施例6.通过Octet的抗CD28 scFv与肽的动力学结合

[0856] 使用Octet RED96仪器通过生物层干涉测量法评估抗CD28 scFv与肽的动力学结合。简言之,链霉亲和素生物传感器装载有生物素化肽并在缓冲剂中设定基线。将抗CD28 scFv或Ab-12在100nM、50nM、25nM和12.5nM的溶液中滴定,然后缔合到装载肽的传感器上。

在短缔合期之后,将传感器转移到缓冲剂中,并测量结合的抗CD28 scFv的解离。实验的时间和步骤在附表中示出。实时记录缔合和解离信号,并使用仪器软件中的1:1结合模型来分析。使用1:1结合模型的分析能够计算结合和解离速率常数以及亲和力KD。图10A-10F说明了如通过Octet所测量的抗CD28 scFv与肽结合的动力学结合。图10G-10U说明了如通过Octet所测量的肽与抗CD28 scFv的动力学结合。

[0857] 表21. 测定时间和步骤

步骤	时间
基线: 缓冲剂	60 秒
上样: • 200nM 肽	300 秒
基线: 缓冲剂	300 秒
[0858] 在 octet 缓冲剂中缔合 • 100nM CD28 scFv • 50nM CD28 scFv • 25nM CD28 scFv • 12.5nM CD28 scFv	300 秒
解离: 缓冲剂	900 秒

[0859] 表22. 动力学数据总结

样品 ID	上样样 ID	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
[0860] 抗 CD28 scFv	肽-31	7.18E-08	5.14E+04	3.69E-03
抗 CD28 scFv	肽-32	4.99E-08	5.91E+04	2.95E-03
抗 CD28 scFv	肽-33	5.28E-08	2.90E+04	1.53E-03

抗 CD28 scFv	肽-34	8.88E-08	7.70E+04	6.84E-03
	肽-35	1.27E-07	3.90E+04	4.97E-03
抗 CD28 scFv	肽-36	6.87E-08	3.67E+04	2.52E-03
抗 CD28 scFv	肽-37	9.78E-08	3.59E+04	3.51E-03
抗 CD28 scFv	肽-38	9.23E-08	3.00E+04	2.77E-03
抗 CD28 scFv	肽-39	5.19E-08	5.11E+04	2.65E-03
抗 CD28 scFv	肽-40	7.99E-08	3.88E+04	3.10E-03
抗 CD28 scFv	肽-41	4.23E-08	3.64E+04	1.54E-03
抗 CD28 scFv	肽-42	1.52E-07	2.84E+04	4.33E-03
抗 CD28 scFv	肽-43	1.92E-07	1.67E+04	3.20E-03
抗 CD28 scFv	肽-44	3.74E-07	2.17E+04	8.12E-03
抗 CD28 scFv	肽-45	1.34E-07	2.71E+04	3.64E-03
抗 CD28 scFv	肽-46	3.52E-08	6.19E+04	2.18E-03
抗 CD28 scFv	肽-47	5.18E-08	3.89E+04	2.01E-03
抗 CD28 scFv	肽-48	2.11E-08	8.89E+04	1.87E-03
抗 CD28 scFv	肽-49	2.11E-08	8.82E+04	1.86E-03
抗 CD28 scFv	肽-50	4.80E-08	9.23E+04	4.43E-03
抗 CD28 scFv	肽-9	2.78E-07	4.15E+04	1.15E-02

[0861]

[0862] 实施例7. 标准ELISA测定中的PD-L1和/或CD28的结合

[0863] 以标准酶联免疫吸附测定 (ELISA) 形式来评估抗体对于结合人PD-L1或CD28的能

力。简言之,将生物素化抗原捕获在中性亲和素包被的板上。然后将在缓冲剂中稀释的抗体添加至抗原包被的板。使用标准辣根过氧化物酶缀合物二抗检测结合的抗体。使用 Graphpad Prism 软件计算达到50%最大信号(EC50)所需的抗体浓度。

[0864] 图11A说明了Ab-12和抗PD-L1 Fab 1 (SEQ ID NO:16和17) 与PD-L1的结合。图11B说明了Ab-12和抗CD28 scFv (SEQ ID NO:9) 与CD28的结合。图11C说明了Ab-12和Ab-13与PD-L1的结合。图11D说明了Ab-12和Ab-13与CD28的结合。图11E说明了Ab-1、Ab-2、Ab-3、Ab-4、Ab-5、Ab-6和Ab-12与PD-L1的结合。在一些情况下,抗体用蛋白酶MTSP1温育。图11F说明了Ab-12、Ab-1、抗PD-L1 Fab 1、抗CD28 scFv、Ab-5、Ab-6和Ab-7与CD28的结合。在一些情况下,抗体用MTSP1温育。图11G说明了Ab-12、Ab-2、Ab-1、Ab-5和Ab-6与PD-L1的结合。在一些情况下,抗体用MMP9温育。图11H说明了Ab-12、Ab-1、Ab-2、Ab-5和Ab-6与CD28的结合。在一些情况下,抗体用MMP9温育。图11I说明了Ab-12、Ab-8、Ab-9、Ab-10和Ab-11与CD28的结合。在一些情况下,抗体用MTSP1温育。图11J说明了Ab-12、Ab-5、Ab-1和Ab-9与CD28的结合。图11K说明了Ab-12、Ab-5、Ab-1和Ab-9与PD-L1的结合。图11L说明了Ab-12、Ab-9和Ab-9+MTSP1与PD-L1的结合。图11M说明了Ab-12、Ab-9和Ab-9+MTSP1与CD28的结合。

[0865] 实施例8. 免疫细胞激活测定

[0866] 此实施例演示了使用靶包被的珠粒和滴定的测试化合物激活人PBMC。测定的示例性方案如图12E所示。

[0867] 简言之,在靶包被的珠粒和PBMC共培养之后,经由IL-2释放测量免疫细胞激活。用可溶性生物素化的PD-L1和可溶性生物素化的TROP2处理M280磁性链霉亲和素珠粒。将M280珠粒洗涤并以每孔200,000个珠粒接种在96孔板中。然后将化合物作为单剂和组合滴定,并且然后添加至孔,随后添加100,000个PBMC。在不存在化合物的情况下,将人T细胞激活剂CD3/CD28珠粒 (Invitrogen) 用作阳性对照。在共培养48小时之后,使用来自BD Biosciences的流式珠粒阵列 (Cytometric Bead Array, CBA) 试剂盒在上清液中测量细胞因子。根据制造商的说明书使用标准曲线计算细胞因子的浓度。

[0868] 图12A-12C显示化合物的数据,Ab-12是Vh形式的抗PD-L1 x CD28未掩蔽抗体 (序列提供如下); Ab-5是用肽-9掩蔽的抗PD-L1x CD28抗体; Ab-5用蛋白酶MTSP1温育、Ab-12与Ab-14 (抗TROP2T细胞衔接器) (序列提供如下) 组合; Ab-5与Ab-14组合、Ab-5与Ab-14组合并用蛋白酶MTSP1温育以及Ab-14单独。图12A显示IL-2的数据。图12B显示IFN γ 的数据。图12C显示TNF α 的数据。图12D显示化合物Ab-12、Ab-13、V1形式的抗PD-L1 x CD28未掩蔽抗体 (序列提供如下) 以及掩蔽的抗PD-L1 x CD28抗体Ab-8、Ab-10、Ab-9和Ab-11与Ab-14组合,用或不用蛋白酶MTSP1温育的数据。

[0869] 表23. Ab-12、Ab-13和Ab-14的氨基酸序列

构建体描述	氨基酸序列(N至C)	SEQ ID NO:
Ab-12 LC PDL1xCD28 未掩蔽的 (Vh)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSSYLAWYQQKPGQA PRLLIYDASNRATGIPARFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYY CQQRSNWPTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKST YLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	20
Ab-12 HC PDL1xCD28 未掩蔽的 (Vh)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYIHWVRQAP GQGLEWIGSIYPGNVNTNYNE KFKDRATLTVDTISISTAYMEL SRLRSDDTAVYFCTRSHYGLD WNFDVWGQTTVTVSSGGGG SGGGSGGGGSDIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCHASQNIYV WLNWYQQKPGKAPKLLIYKA SNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQGQTYP YTFGGGTKVEIKGGGGSQVQL VQSGAEVKKPGSSVKVSKTS GDTFSTYAISWVRQAPGQGLE WMGGIPIFGKAHYAQKFQGR VTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYFCARKFHFVSGSPFGM DVWGQTTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSC	21
Ab-13 LC PDL1xCD28 未掩蔽的 (VL)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYIHWVRQAP GQGLEWIGSIYPGNVNTNYNE KFKDRATLTVDTISISTAYMEL SRLRSDDTAVYFCTRSHYGLD WNFDVWGQTTVTVSSGGGG SGGGSGGGGSDIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCHASQNIYV WLNWYQQKPGKAPKLLIYKA SNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQGQTYP YTFGGGTKVEIKGGGGSEIVLT QSPATLSLSPGERATLSCRASQ SVSSYLAWYQQKPGQAPRLLI YDASNRATGIPARFSGSGSGT	22

[0870]

	DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQR SNWPTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	
Ab-13 HC PDL1xCD28 未掩蔽的 (VL)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVS CKTSGDTFSTYAISWVRQAPG QGLEWMGGIPIFGKAHYAQK FQGRVTITADESTSTAYMELSS LRSEDVAVYFCARKFHFVSGS PFGMDVWGQGTTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKEPKSC	23
Ab-14 LC TROP2 T 细胞衔接器	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CRSSTGAVTTSNYANWVQKQ PGQAPRGLIGGTNKRAPGTPA RFSGSLGGAALTLSGVQPE DEAEYYCALWYSNLWVFGGG TKLTVLGGGGSGGGSGGGG SEVQLVESGGGLVQPGGSLKL SCAASGFTFNTYAMNWVRQA PGKGLEWVARIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRH GNFGNSYVSWFAYWGQGLV TVSSGGGSDIQLTQSPSSLSA SVGDRVSITCKASQDVSIAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASYRY TGVPDRFSGSGSGTDFLTISS LQPEDFAVYYCQQHYITPLTF GAGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFY REAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYLSSTLTLK ADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	202
Ab-14 HC TROP2 T 细胞衔接器	QVQLQQSGSELKKPGASVKVS CKASGYTFTNYGMNWVKQAP GQGLKWMGWINTYTGEPTYT DDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQI SSLKADDTAVYFCARGGFGSS YWYFDVWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKEPKSC	203

[0871]

[0872] 实施例9. 通过IL-2释放测量的免疫细胞激活

[0873] 在靶包被的珠粒和PBMC共培养之后, 经由IL-2释放测量免疫细胞激活。简言之, 用

可溶性生物素化PD-L1和可溶性生物素化TROP2处理M280磁性链霉亲和素珠粒。将M280珠粒洗涤并以每孔200,000个珠粒接种在96孔板中。然后将化合物作为单剂和组合滴定,然后添加至孔,随后添加100,000个人或食蟹猴PBMC。在共培养48小时之后,使用来自BD Biosciences的流式珠粒阵列(CBA)试剂盒在上清液中测量细胞因子。根据制造商的说明书使用标准曲线计算细胞因子的浓度。图13A显示测试化合物Ab-14与Ab-9组合和Ab-14与Ab-12组合的数据。图13B显示Ab-14与Ab-12组合和Ab-14与Ab-9组合以及Ab-14单独的数据。

[0874] 实施例10. 在与LNCaP细胞的共培养测定中激活hPBMC

[0875] 使用PD-L1阳性肿瘤细胞系LNCaP在功能性体外肿瘤细胞杀伤和细胞因子释放测定中评估化合物。使用来自Agilent的xCelligence实时细胞分析仪来测量肿瘤细胞杀伤,该细胞分析仪依赖于随着肿瘤细胞在传感器表面上粘附、扩散并扩增而增加的传感器阻抗测量(细胞指数)。同样地,随着肿瘤细胞被杀伤,阻抗降低。添加肿瘤细胞并允许其在96孔板上粘附过夜。第二天,将化合物作为单剂或与T细胞衔接器、用肽掩蔽的T细胞衔接器或用肽掩蔽的预切割的T细胞衔接器组合,与PBMC一起在补充人血清的培养基中滴定并添加至孔。每10分钟进行细胞指数测量,持续另外120小时。然后将细胞指数乘以小时数(肿瘤细胞生长动力学)相对于多肽复合物浓度绘图,其中使用Graphpad Prism软件计算减少肿瘤生长50%所需的浓度(IC50)。使用来自BD Biosciences的Th1/Th2/Th17流式珠粒阵列在研究终点测量细胞因子。

[0876] 图14A显示针对Ab-15(抗PSMA T细胞衔接器)绘制的各种浓度的Ab-12的数据,Ab-15的序列提供如下。图14B显示针对Ab-15绘制的各种浓度的Ab-5的数据。图14C显示针对Ab-15绘制的具有MTSP1的各种浓度的Ab-5的数据。图14D显示针对Ab-16(用肽掩蔽的抗PSMA T细胞衔接器)绘制的各种浓度的Ab-5的数据,Ab-16的序列提供如下。图14E显示针对MTSP1处理的Ab-16绘制的各种浓度的MTSP1处理的Ab-5的数据。图14F显示针对Ab-15绘制的各种浓度的Ab-12的数据。数据表明,测试化合物与T细胞衔接器协同作用,以增强人PBMC存在下的肿瘤细胞杀伤。

[0877] 表24. Ab-15和Ab-16的氨基酸序列

构建体描述	氨基酸序列(N至C)	SEQ ID NO:
Ab-15 LC	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATY YADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYWGQGLVT	173

[0878]

[0879]

	VSSGGGSGGGGSGGGGSQT VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGS STGAVTSGNYPNWVQKPGQ APRGLIGGTKFLAPGTPARFSG SLLGGKAALTLSGVQPEDEAE YYCVLWYSNRWVFGGGTKLT VLGGGSDIQMTQSPSSLSAS VGDRVITICRASQGISNYLAW YQKTKGKVPKFLIYEASTLQS GVPSRFSGGGSGTDFTLTISSL QPEDVATYYCQNYNSAPFTFG PGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYLSSTLTLKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	
Ab-15 HC 抗 PSMA T 细胞衔接器	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFAFSRYGMHWVRQAP GKGLEWVAVIWYDGSNKYYA DSVKGRFTISRDNKNTQYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGGDF LYYYYYGMDVWGQTTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSC	174
Ab-16 LC 抗 PSMA 掩蔽的 T 细胞衔接器	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGSTFYTAVMGWVRQAP GKGLEWVAAIRWTALTTSYA DSVKGRFTISRDKAKTTLYLQ MNSLRPEDTAVYYCAARGTL GLFTTADSYDYWGQTLVTV SSGGGSGGGSGGVYCGPEFD ESVGCMMGGGSGGGLSGRSD AGSPLGLAGSGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLKLSAASGFT FNKYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNNL KTEDTAVYYCVRHGNFGNSYI SYWAYWGQTLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSQTVVTQEPSL TVSPGGTVTLTCGSSTGAVTS GNYPNWVQKPGQAPRGLIG GTKFLAPGTPARFSGSLLGGK AALTLSGVQPEDEAEYYCVL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGG GSDIQMTQSPSSLSASVGDRV ITCRASQGISNYLAWYQKTKG KVPKFLIYEASTLQSGVPSRFS GGGSGTDFTLTISSLQPEDVAT YYCQNYNSAPFTFGPGTKVDI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW	175

	KVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	
[0880] Ab-16 HC 抗 PSMA 掩蔽的 T 细 胞衔接器	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFAFSRYGMHWVRQAP GKGLEWVAVIWYDGSNKYYA DSVKGRFTISRDNKNTQYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGGDF LYYYYYGMDVWGQGTITVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKEPKSC	176

[0881] 实施例11. 抗PD-L1 x CD28抗体与T细胞衔接器组合增强T细胞激活的概念验证研究

[0882] 在PBMC与MDAMB231肿瘤细胞共培养之后,经由IL-2诱导测量免疫细胞激活。简言之,将30,000个MDAMB231细胞和90,000个PBMC在96孔板中共培养。然后将化合物作为单剂和组合滴定,然后添加至孔。在共培养72小时之后,使用来自BD Biosciences的流式珠粒阵列(CBA)细胞因子试剂盒在上清液中测量细胞因子。图15A说明了靶向CD28和PD-L1的多特异性抗体的卡通构型,该多特异性抗体与靶向肿瘤相关抗原(TAA)诸如T细胞的TROP2和CD3的T细胞衔接器(TCE)组合施用。图15B说明了在PBMC与MDAMB231肿瘤细胞共培养之后,经由IL-2诱导所测量的免疫细胞激活。示出了Ab-14、抗PD-L1 Fab 1、Ab-9和Ab-12的各种组合的图。

[0883] 实施例12. 在与MDAMB231肿瘤细胞的共培养测定中激活hPBMC

[0884] 在PBMC与MDAMB231肿瘤细胞共培养之后,经由IL-2诱导测量免疫细胞激活。简言之,将30,000个MDAMB231细胞和90,000个PBMC在96孔板中共培养。然后将化合物作为单剂和组合滴定,然后添加至孔。在共培养72小时之后,使用来自BD Biosciences的流式珠粒阵列(CBA)细胞因子试剂盒在上清液中测量细胞因子。图16A显示Ab-9与Ab-14组合和Ab-12与Ab-14组合以及Ab-14单独。图16B显示测定的示意图。图16C显示Ab-11与Ab-14组合和Ab-13与Ab-14组合以及Ab-14单独。

[0885] 实施例13. Ab-12和Ab-9在食蟹猴中的药代动力学

[0886] 在食蟹猴中评估了Ab-12和Ab-9的药代动力学和探察安全性。简言之,将体重大约3kg的食蟹猴以IV推注施用测试剂,并每天观察不良事件的迹象。没有观察到生活中的不良事件。在给药之后,在特定时间点将血液收集在K2 EDTA管中并处理成血浆。将血浆冷冻保存直至分析。相对于在对照食蟹猴血浆中稀释的参考标准,经由标准ELISA技术测量血浆中测试剂的浓度。将血浆浓度曲线拟合成代表分布相和消除相的标准两相指数方程。药代动力学的拟合使得能够计算C_{max}、半衰期、分布体积、清除率和表20中示出的7天曲线下面积(AUC)。图17说明了在单次IV推注注射之后食蟹猴中Ab-12和Ab-9的药代动力学。

[0887] 表25. Ab-12和Ab-9的图17药代动力学总结

[0888]

	Ab-12	Ab-9
剂量(ug/kg)	30	100
C _{MAX} (nM)	10.7	60
t _{1/2} (hr)	2.15	40
Vd (L)	0.11	0.05
CL (ml/hr/kg)	12.1	0.3

[0889] 实施例14. 单次IV推注注射Ab-12和Ab-9后食蟹猴中的细胞因子释放

[0890] 在食蟹猴中评估了通过IV推注施用Ab-12或Ab-9后的细胞因子释放。简言之,将体重大约3kg的食蟹猴以IV推注施用测试剂,并每天观察不良事件的迹象。没有观察到生活中的不良事件。在给药之后,在特定时间点将血液收集在K2 EDTA管中并处理成血浆。将血浆冷冻保存直至分析。按照制造商的说明书,对血浆样品使用来自BD biosciences的非人灵长类流式Th1/Th2珠粒阵列试剂盒分析细胞因子。相对于珠粒阵列试剂盒提供的参考标准,计算血浆中的干扰素 γ 、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素6和白细胞介素2水平。图18A-18C说明了在单次IV推注注射Ab-12和Ab-9之后食蟹猴中的细胞因子释放。

[0891] 实施例15. 单次IV推注注射Ab-12和Ab-9后食蟹猴中的肝酶分析

[0892] 在食蟹猴中评估了通过IV推注施用测试剂之后的系统性肝酶。简言之,将体重大约3kg的食蟹猴以IV推注施用测试剂,并每天观察不良事件的迹象。没有观察到生活中的不良事件。在给药之后,在特定时间点将血液收集在K2 EDTA管中并处理成血浆。将血浆冷冻保存直至分析。分析血浆样品是否存在肝酶天冬氨酸转氨酶(AST)和丙氨酸氨基转移酶(ALT)作为潜在肝毒性的迹象。按照来自Millipore的市售试剂盒中所提供的说明书对AST和ALT定量。根据制造商说明书相对于阳性对照参考标准计算AST和ALT水平。图19A-19D说明了在单次IV推注注射Ab-12或Ab-9后食蟹猴中的血清肝酶。

[0893] 实施例16. Ab-12、Ab-9和Ab-19与人和猴T细胞的结合

[0894] 将源于食蟹猴或健康人供体血液的PBMC以每ml 1×10^6 个的浓度接种在平底96孔板中,总共100uL。将细胞沉淀并在室温在黑暗中用活/死排除染料染色15分钟。用PBS洗涤两轮之后,用针对以下表面标志物的抗体对细胞染色:CD3、CD4、CD8和PD-1。表面标志物染色在+4°C进行20min,在此之后用PBS洗涤细胞。将PBS中制备的测试化合物稀释物添加至细胞,最终体积为100uL,并在CO₂、37°C培养箱中温育1h。为了检测细胞表面结合的测试化合物,将细胞用PBS洗涤3次,并用Alexa fluor 647缀合的山羊抗人IgG(H+L)二抗在+4°C温育30min。在用PBS洗涤之后,将细胞固定并使用BD FACSymphony流式细胞仪进行分析。使用FlowJo软件处理和分析数据。Alexa fluor-647的几何平均荧光强度(GMFI)用于计算CD28结合的百分比以及绘制结合曲线。

[0895] 图20A-20D说明了Ab-12(以Vh形式结合至PD-L1和CD28的未掩蔽抗体)、Ab-9和Ab-19(以不可切割的掩蔽Vh形式结合至PD-L1和CD28的抗体)的结合结果。

[0896] 结果表明,CD28结合结构域的掩蔽降低了与T细胞的浓度依赖性结合。

[0897] 实施例17.用Ab-12、Ab-9、帕博利珠单抗、阿替利珠单抗和纳武单抗的PD-1报道分子测定

[0898] 为了评估化合物拮抗PD-1/PD-L1通路的效力,使用了市售的基于生物发光细胞报道分子的系统(Promega J1250)。

[0899] PD-1报道分子系统依赖于表达T细胞受体(TCR)、人PD-1和由NFAT应答元件(NFAT-RE)驱动的荧光素酶报道分子的重组Jurkat T细胞系。此细胞系与表达人PD-L1和被设计用于激活Jurkat报道分子细胞上表达的同源TCR的工程化细胞表面蛋白的人工抗原呈递细胞(aAPC)(PD-L1 aAPC/CHO Ki细胞)组合。当两种类型的细胞共培养时,PD-1/PD-L1相互作用抑制TCR信号传导和NFAT-RE介导的发光。与抗PD-(L)1阻断抗体温育释放抑制信号并导致TCR激活和NFAT-RE介导的发光。

[0900] 所有测定都根据制造商的说明书进行。简言之,将40,000个PD-L1 aAPC细胞接种在96孔板的每个孔,并在37°C、5% CO₂湿润的培养箱中温育过夜。第二天,在细胞培养物培养基中制备测试物的适当系列稀释物,并添加至含有PD-L1 aAPC的孔。将90,000个Jurkat报道分子细胞重悬浮于细胞培养物培养基中并加入适当的孔中。每个测试条件以一式四份设置。将Jurkat PD-1报道分子细胞与PD-L1aAPC和测试物在37°C、5% CO₂湿润的培养箱中温育72h。在温育5小时之后,将Bio-Glo试剂添加至孔,并在室温温育10min。使用Tecan Spark酶标仪测量发光。将测试化合物的对数浓度相对于归一化的发光信号作图。

[0901] 图21说明了Ab-12、Ab-9、帕博利珠单抗、阿替利珠单抗和纳武单抗的PD-1报道分子测定的结果。表26中提供了帕博利珠单抗、阿替利珠单抗和纳武单抗的序列。结果表明,在PD-1报道分子测定中观察到的活性在CD28掩蔽或未掩蔽分子中相似。

[0902] 表26. 另外的序列

[0903]

构建体描述	氨基酸序列(N至C)	SEQ ID NO:
TGN1412 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTIT CHASQNIYVWLNWYQQKPGK APKLLIYKASNLHTGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQGQTYPTYTFGGGKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPRKAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSK STYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC	220
TGN1412 HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYIHWRQAP GQGLEWIGSIYPGNVNTNYNE KFKDRATLTVDTISISTAYMEL SRLRSDDTAVYFCTRSHYGLD WFDVWGQGTITVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	221
帕博利珠单抗 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASKGVSTSGYSYLHWYQQK PGQAPRLLIYLASYLESGVPAR FSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQHSRDLPLTFGGGKVE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPRKAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHK	222

[0904]

	VYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	
帕博利珠单抗 HC	QVQLVQSGVEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYYMYWVRQA PGQGLEWMGGINPSNGGTFN NEKFKNRVTLTTDSSTTTAYM ELKSLQFDDTAVYYCARRDY RFDMGFDYWGQGTITVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSDQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGK	223
阿替利珠单抗 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT CRASQDVSTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSG SGSGTDFLTITSSLPEDFATY YCQQYLYHPATFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVCLLNRFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC	224
阿替利珠单抗 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSDSWIHWVRQAPG KGLEWVAWISPYGGSTYYAD SVKGRFTISADTSKNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCARRHWPG GFDYWGQGTITVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYASTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVL DSDGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ	225

[0905]

	GNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	
纳武单抗 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSSYLAWYQQKPGQA PRLLIYDASNRATGIPARFSGS GSGTDFLTISSLEPEDFAVYY CQSSNWPRTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	226
纳武单抗 HC	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLD CKASGITFSNSGMHWVRQAPG KGLEWVAVIWYDGSKRYYAD SVKGRFTISRDNKNTLFLQM NSLRAEDTAVYYCATNDDYW GQGLTLTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLG K	227

[0906] 实施例18. 用Ab-12、Ab-9、Ab-19和TGN1412的CD28报道分子测定

[0907] 为了评估化合物激动CD28共刺激通路的效力,使用了市售的基于生物发光细胞报道分子的系统(Promega JA6701)。

[0908] CD28报道分子系统依赖于表达T细胞受体(TCR)、CD3和CD28受体以及由CD28通路依赖性启动子驱动的荧光素酶报道分子的重组Jurkat T细胞系。将CD28报道分子Jurkat细胞与来自PD-1报道分子试剂盒(Promega J1250)的人工APC(PD-L1 aAPC/CHO Ki细胞)共培养,人工APC表达人PD-L1和被设计用于激活Jurkat报道分子细胞上表达的同源TCR的工程化细胞表面蛋白。在不存在CD28激动剂抗体的情况下,CD28未被激活并且发光低。用CD28激动剂抗体温育诱导CD28通路并且增加发光。

[0909] 所有测定都根据制造商的说明书进行。简言之,将40,000个PD-L1 aAPC细胞接种在96孔板的每个孔,并在37°C、5% CO₂湿润的培养箱中温育过夜。第二天,在细胞培养物培养基中制备测试物的适当系列稀释物,并添加至含有PD-L1 aAPC的孔。将90,000个Jurkat CD28报道分子细胞重悬浮于细胞培养物培养基中并加入适当的孔中。每个测试条件以一式四份设置。将Jurkat CD28报道分子细胞与PD-L1 aAPC和测试物在37°C、5% CO₂湿润的培养箱中温育72h。在温育5小时之后,将Bio-Glo试剂添加至孔,并在室温温育10min。使用

Tecan Spark酶标仪测量发光。将测试化合物的对数浓度相对于归一化的发光信号作图。

[0910] 图22说明了Ab-12、Ab-9、Ab-19和TGN1412的CD28报道分子测定的结果。TGN1412的序列在表26中提供。结果表明,与未掩蔽版本相比,掩蔽分子在CD28报道分子测定中表现出降低的活性。实施例19. 在混合淋巴细胞反应 (MLR) 系统中如通过肿瘤细胞中的IL-2诱导所测量的作为单剂或与帕博利珠单抗组合的功能活性测定

[0911] 为了评估测试化合物作为单剂或与帕博利珠单抗组合的功能活性,基于健康人供体PBMC和三阴性乳腺肿瘤细胞系MDA-MB231的共培养建立了混合淋巴细胞反应 (MLR) 系统。其中指示的测试化合物用蛋白酶MMP9或MTSP1预处理。为了确保存在活性抗原呈递,MDA-MB231细胞装载有HLA-A*0201限制性CMV肽(NLVPMVATV)。为了确保T细胞识别该肽,将源自HLA-A*0201+CMV+供体的PBMC用于MLR反应。简言之,在1 μ g/mL的CMV肽存在下,将50,000个MDA-MB231细胞接种在96孔板的每个孔,并在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂湿润的培养箱中温育过夜。第二天,在完全细胞培养物培养基中制备测试物的适当系列稀释物并添加至含有肽包被的MDA-MB231肿瘤细胞的孔。将健康供体PBMC(150,000个细胞)重悬浮于细胞培养物培养基中并加入适当的孔中。每个测试条件以一式四份设置。将PBMC与测试物和MDA-MB231细胞在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂湿润的培养箱中温育72小时。收获细胞培养物上清液并保存在-20 $^{\circ}$ C直至细胞因子分析。使用MSD平台在细胞培养物上清液中测量可溶性IL-2。将IL-2诱导针对测试化合物的对数浓度作图。

[0912] 图23A说明了Ab-12、Ab-9和Ab-19的IL-2诱导的结果。Ab-9还与MMP9或MTSP1组合示出。图23B说明了Ab-12与帕博利珠单抗组合、Ab-9与帕博利珠单抗组合、Ab-9与MMP9和帕博利珠单抗组合以及Ab-9与MTSP1和帕博利珠单抗组合的结果。

[0913] 实施例20. Ab-12、Ab-9和Ab-19与肿瘤细胞上的PD-L1的结合

[0914] 使用表达PD-L1的MDA-MB231肿瘤细胞系来评估测试化合物与肿瘤细胞上表达的PD-L1的结合。简言之,将100,000个MDA-MB231细胞接种在96孔板的每个孔,并在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂湿润的培养箱中温育1h,适当系列稀释测试化合物。为了检测细胞表面结合的测试化合物,用PBS洗涤细胞3次,并在+4 $^{\circ}$ C用Alexa fluor 647缀合的抗人IgG二抗温育30min。在用PBS洗涤之后,将细胞固定并使用BD FACSymphony来分析。使用FlowJo软件处理和分析数据。几何平均荧光强度(GMFI)或Alexa fluor-647用于计算PD-L1结合的百分比以及绘制结合曲线。

[0915] 图24说明了Ab-12、Ab-9和Ab-19在表达PD-L1的MDA MB231肿瘤细胞系上与PD-L1结合的结果。结果表明,在MDA-MB231肿瘤细胞上与PD-L1的结合在CD28掩蔽和未掩蔽的分子中相似。

[0916] 实施例21. 结合至CD28和PD-L1的肿瘤激活多特异性抗体与T细胞衔接器组合增强T细胞功能激活

[0917] 使用PDL1阳性肿瘤细胞系CAL27在功能性体外肿瘤细胞杀伤和细胞因子释放测定中评估多肽复合物。使用来自Agilent的xCelligence实时细胞分析仪来测量肿瘤细胞杀伤,该细胞分析仪依赖于随着肿瘤细胞在传感器表面上粘附、扩散并扩增而增加的传感器阻抗测量值(细胞指数)。同样地,随着肿瘤细胞被杀伤,阻抗降低。添加肿瘤细胞并允许其在96孔E板上粘附过夜。第二天,将可切割或不可切割多肽复合物作为单剂或与TCE组合,与人PBMC一起在补充人血清的培养基中滴定并添加至孔。每10分钟进行细胞指数测量,持续

另外120小时。然后将细胞指数乘以小时数(肿瘤细胞生长动力学)相对于多肽复合物浓度绘图,其中使用Graphpad Prism软件计算减少肿瘤生长50%所需的浓度(IC50)。使用来自BD Biosciences的Th1/Th2/Th17流式珠粒阵列在研究终点测量细胞因子。

[0918] 图25A说明了靶向CD28和PD-L1的多特异性抗体的卡通构型,该多特异性抗体与靶向肿瘤相关抗原(TAA)诸如T细胞的EGFR和CD3的T细胞衔接器组合施用。

[0919] 图25B-25C说明了通过Ab-12、Ab-9、Ab-18单独或与1pM的Ab-20(EGFR T细胞衔接器)组合的CAL27肿瘤细胞的肿瘤细胞杀伤。图的结果也总结在表28中。表27总结了CAL27细胞上的PD-L1和EGFR密度。

[0920] 图25D-25F说明了当在补充人血清的培养基中与人PBMC一起滴定时,通过Ab-12或Ab-12与1pM的Ab-20组合的细胞因子诱导(IFN γ 、TNF和IL-2)。

[0921] 图25G-25I说明了当在补充人血清的培养基中与人PBMC一起滴定时,通过Ab-9或Ab-9与1pM的Ab-20组合并且还有Ab-18或Ab-18与1pM的Ab-20组合的细胞因子诱导(IFN γ 、TNF和IL-2)。

[0922] 结果表明,靶向PD-L1和CD28的分子与靶向EGFR和CD3的T细胞衔接器组合的体外功能活性是掩蔽和切割依赖性的。未掩蔽的PD-L1 x CD28双特异性表现出比掩蔽版本更强的效力,并且掩蔽的不可切割版本表现出比掩蔽的可切割版本更弱的活性。掩蔽的可切割分子和掩蔽的不可切割分子之间的活性差异意味着测定中的蛋白水解切割来自肿瘤细胞或PBMC或两者。

[0923] 表27.CAL27密度

细胞系	PD-L1 密度(每细胞拷贝)	EGFR 密度(每细胞拷贝)
CAL27	22,000	170,000

[0925] 表28.

化合物	有Ab-20(EGFR TCE)	无Ab-20(EGFR TCE)
Ab-12(未掩蔽的)	70pM	> 100,000pM
Ab-9(可切割的)	2,226pM	> 100,000pM
Ab-18(不可切割的)	64,463pM	> 100,000pM

[0927] 实施例22.结合至CD28和PD-L1的肿瘤激活多特异性抗体与结合TROP2和CD3的抗体组合的抗肿瘤疗效

[0928] 测试化合物的抗肿瘤活性在三阴性乳腺癌小鼠模型中测试。将雌性NCG小鼠在后侧肋腹皮下接种 5×10^6 个MDAMB231肿瘤细胞。当肿瘤变得易于察觉时($50-80\text{mm}^3$),将小鼠随机分组(每组N=10),并通过腹膜内注射施用 15×10^6 个人PBMC。当肿瘤达到 $200-300\text{mm}^3$ 时,每天通过尾静脉经由静脉内注射向动物施用测试物持续10天。随着时间推移,使用卡尺测量肿瘤体积。当肿瘤体积达到 2000mm^3 或移植物抗宿主病迹象明显时,将动物安乐死。肿瘤生长动力学通过绘制平均肿瘤体积与时间的图来评估。

[0929] 图26说明了在用Ab-22与Ab-18组合处理,或用Ab-21与Ab-17组合处理,或用Ab-17单独处理或用Ab-21单独处理之后的平均肿瘤体积。

[0930] 结果表明,靶向PD-L1和CD28的分子与靶向TROP2和CD3的分子组合的体内抗肿瘤

活性是切割依赖性的。尽管掩蔽的可切割靶向PD-L1和CD28的分子与靶向TROP2和CD3的分子组合抑制肿瘤生长,但掩蔽的不可切割版本在相同的组合中不抑制肿瘤生长。由于移植的PBMC对肿瘤缺乏免疫识别,单剂靶向PD-L1和CD28的分子未抑制肿瘤生长。所利用的PBMC是专门选择的,因为它们缺乏体内对抗MDAMB231肿瘤的内源性活性。

[0931] 实施例23. 在以1mg/kg、5mg/kg和15mg/kg IV给药Ab-9后的非人灵长类研究

[0932] 除了用1mg/kg、5mg/kg和15mg/kg的治疗剂量以外,根据实施例13的程序评估Ab-9的药代动力学和安全性。使用标准Luminex细胞因子组 (cytokine panel) 测量施用之后的细胞因子释放,其包括IL-2、IL-10、TNF α 、IL-6和IFN γ 。使用标准组和方法在NHP血清中测量临床化学参数。临床化学组包括肝酶、AST和ALT、以及总胆红素 (TBIL)、肌酸酐 (CRE) 和血尿素 (尿素),作为肝和肾功能的间接测量。

[0933] 图27说明了以15mg/kg、5mg/kg和1mg/kg的Ab-9给药的非人灵长类的药代动力学。

[0934] 图28A-28E说明了在施用15mg/kg、5mg/kg和1mg/kg的Ab-9之后非人灵长类中的细胞因子释放 (IFN γ 、TNF、IL-2、IL-6和IL-10)。

[0935] 图29A-29E说明了以15mg/kg、5mg/kg和1mg/kg的Ab-9给药的非人灵长类的临床化学结果 (AST、ALT、TBIL、CRE、尿素)。

[0936] 结果表明,在给药多至15mg/kg之后,没有诱导所测量的细胞因子或临床化学物质发生有意义的变化。此研究未达到最大耐受剂量 (MTD)。



图1A

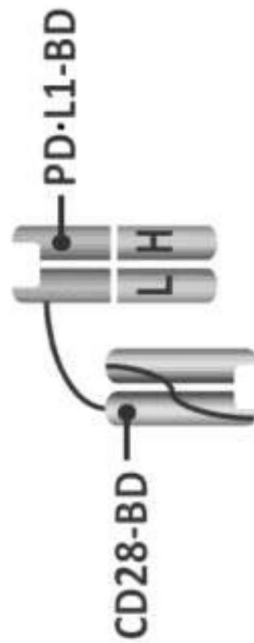


图1B

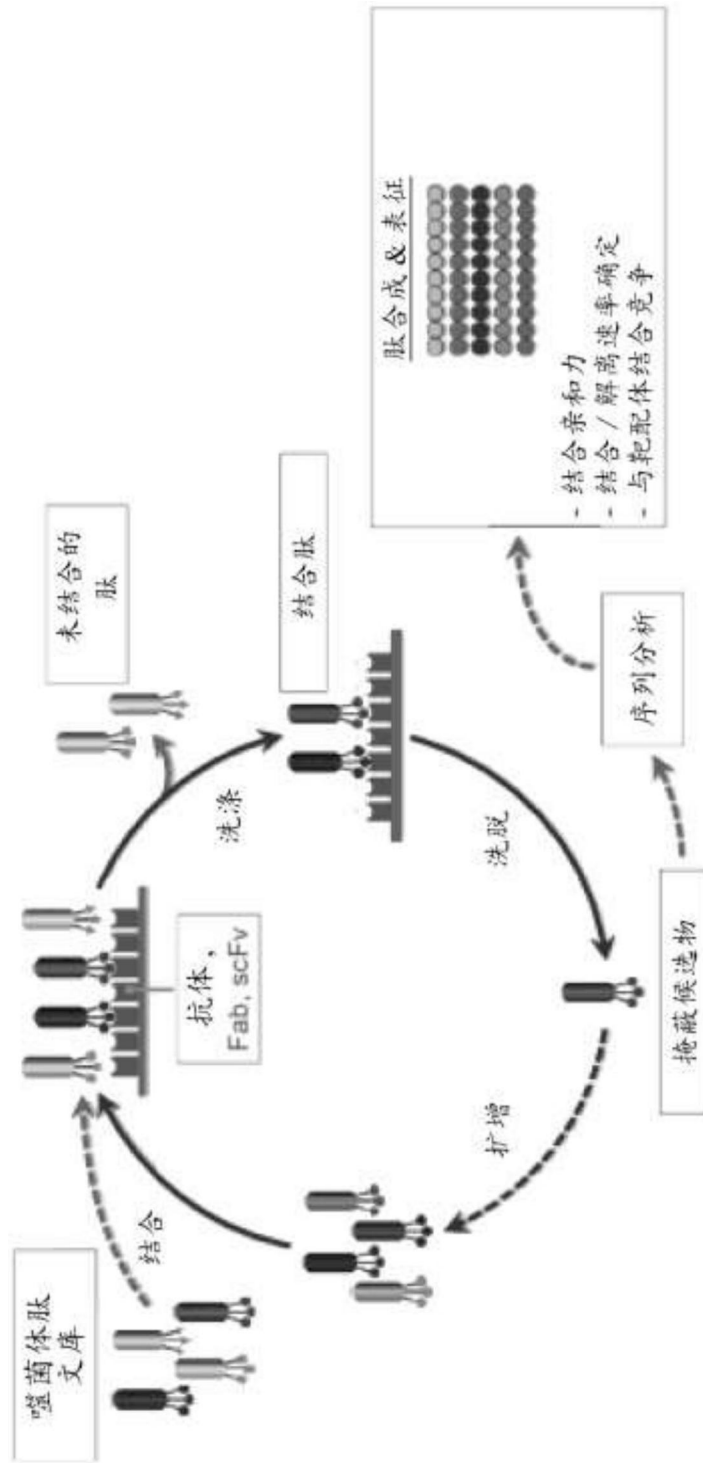
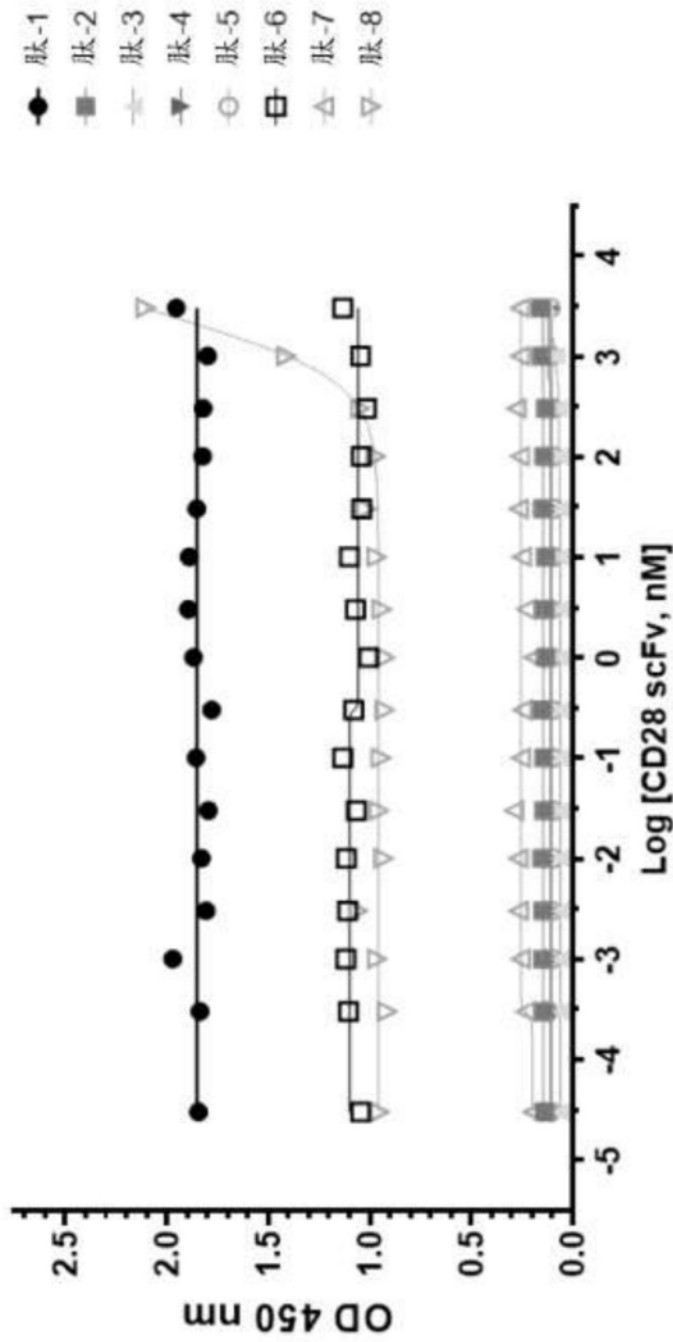


图2

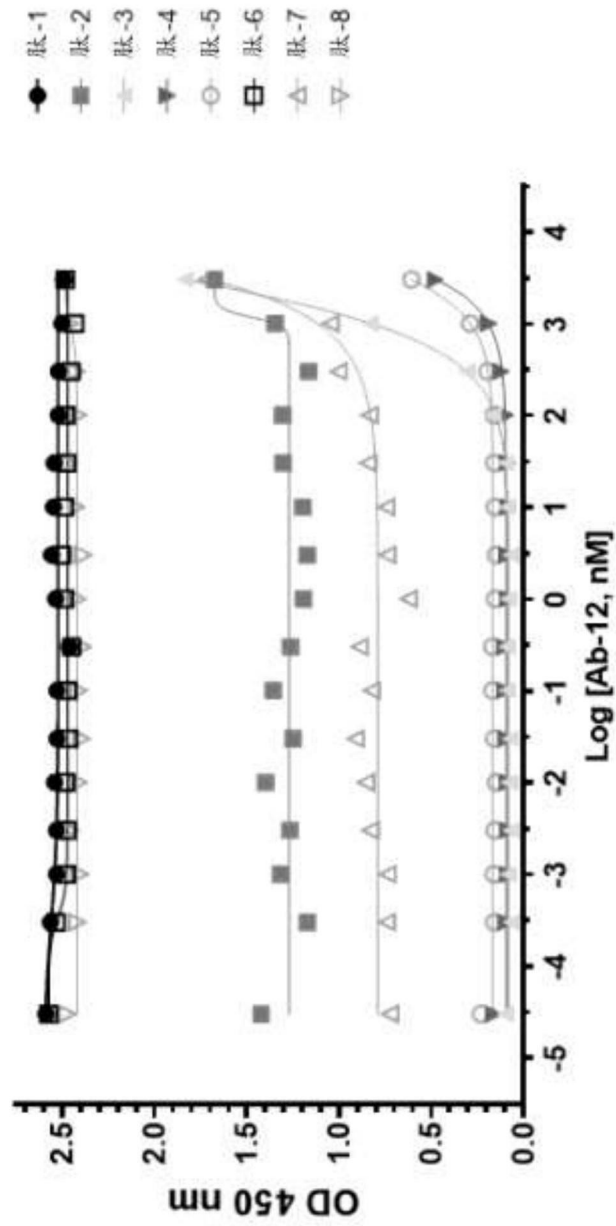
CD28 scFv 与肽的结合



EGFR ELISA	肽-1	肽-2	肽-3	肽-4	肽-5	肽-6	肽-7	肽-8
EC50 nM	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000	2076

图3A

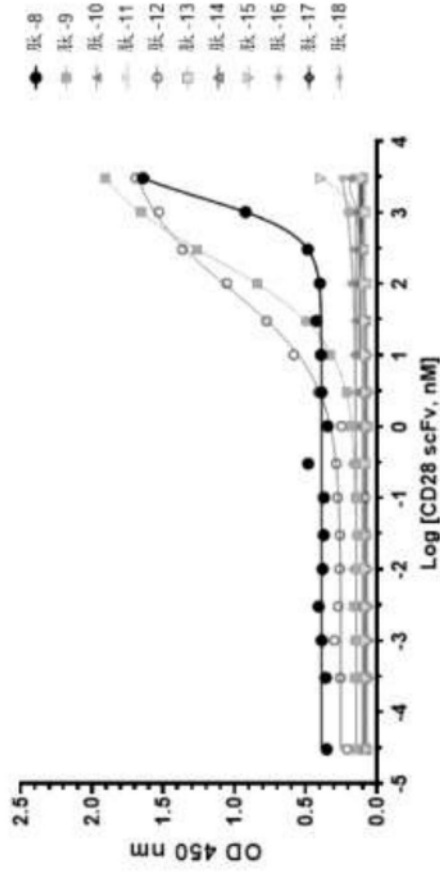
通过ELISA 的 Ab-12 与肽的结合



EGFR ELISA	肽-1	肽-2	肽-3	肽-4	肽-5	肽-6	肽-7	肽-8
EC50 nM	>3000	>3000	2000	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000

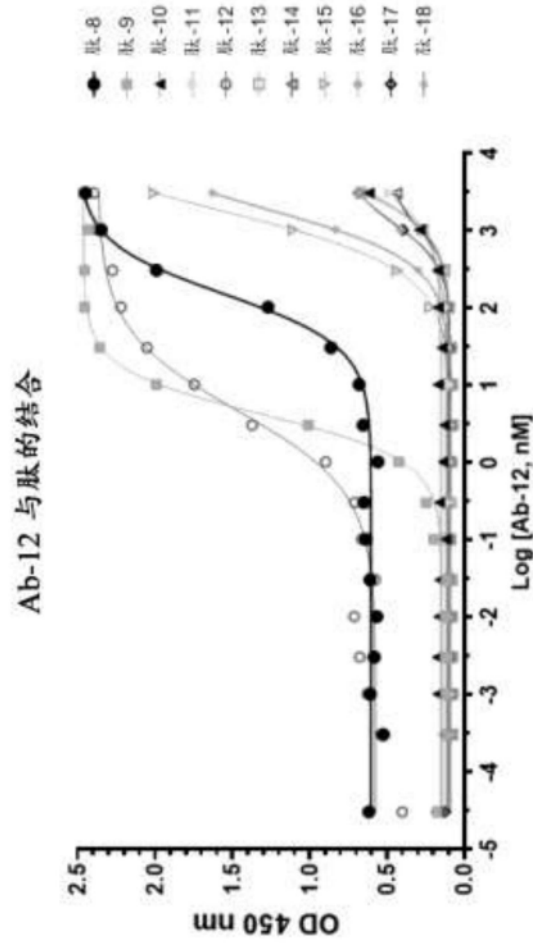
图3B

CD28 scFv 与肽的结合



EGFR ELISA	肽-8	肽-9	肽-10	肽-11	肽-12	肽-13	肽-14	肽-15	肽-16	肽-17	肽-18
EC50 nM	1569	224.6	>3000	>3000	83.40	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000

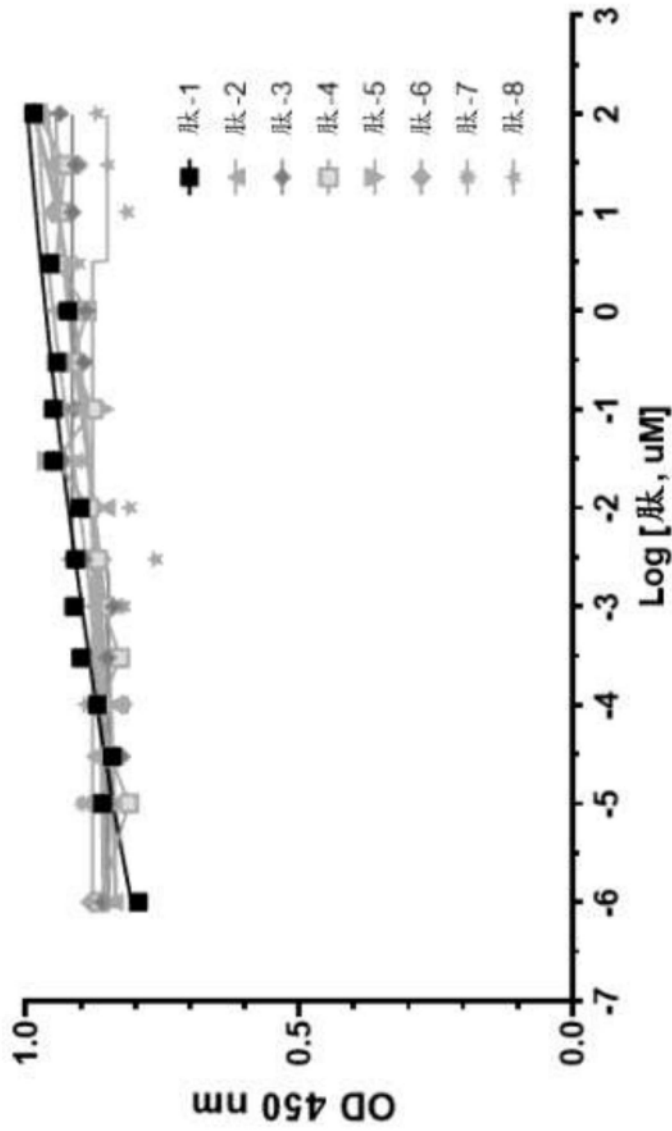
图3C



EGFR ELISA	肽-8	肽-9	肽-10	肽-11	肽-12	肽-13	肽-14	肽-15	肽-16	肽-17	肽-18
EC50 nM	147.4	4.108	>3000	>3000	4.673	>3000	>3000	1201	>3000	>3000	1921

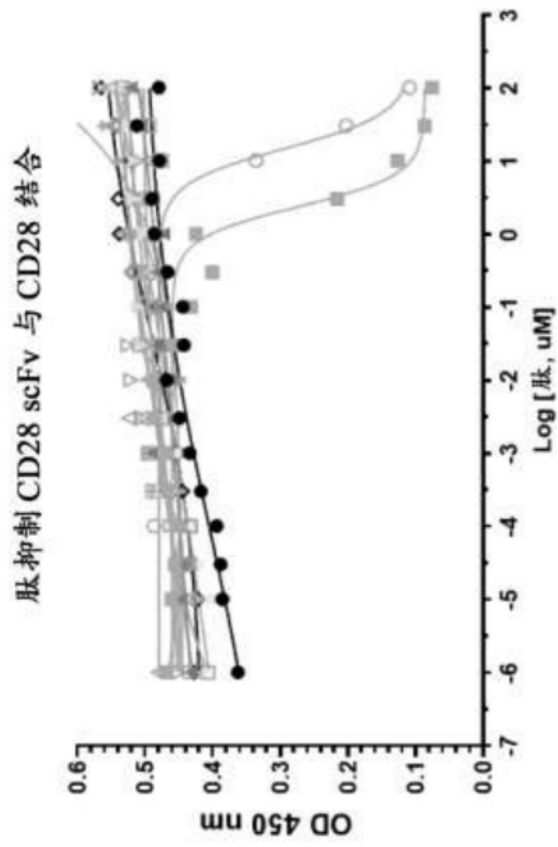
图3D

肽抑制 CD28 scFv 与 CD28 结合



ELISA	肽-1	肽-2	肽-3	肽-4	肽-5	肽-6	肽-7	肽-8
IC50 nM	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100

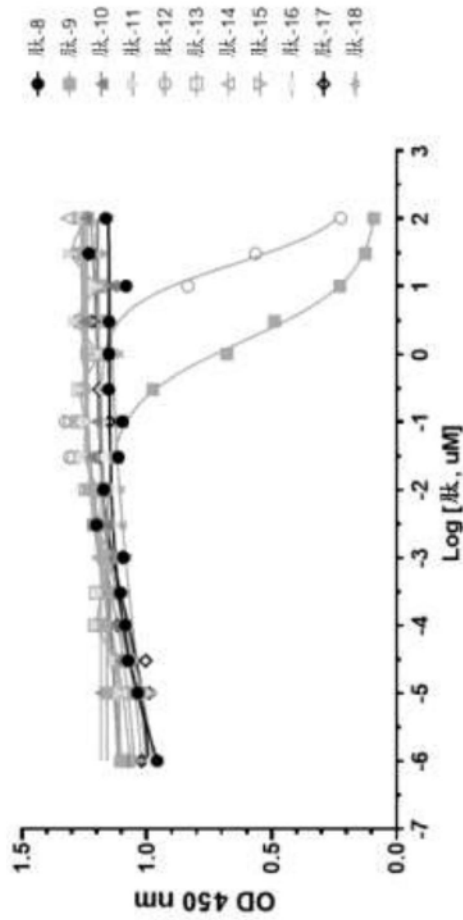
图3E



ELISA	肽-8	肽-9	肽-10	肽-11	肽-12	肽-13	肽-14	肽-15	肽-16	肽-17	肽-18
IC50 nM	>100	2.348	>100	>100	14.75	>100	>100	>100	>100	>100	>100

图3F

肽抑制 Ab-12 与 CD28 结合



ELISA	肽-8	肽-9	肽-10	肽-11	肽-12	肽-13	肽-14	肽-15	肽-16	肽-17	肽-18
IC50 nM	>100	1.545	>100	>100	20.96	>100	>100	>100	>100	>100	>100

图3G

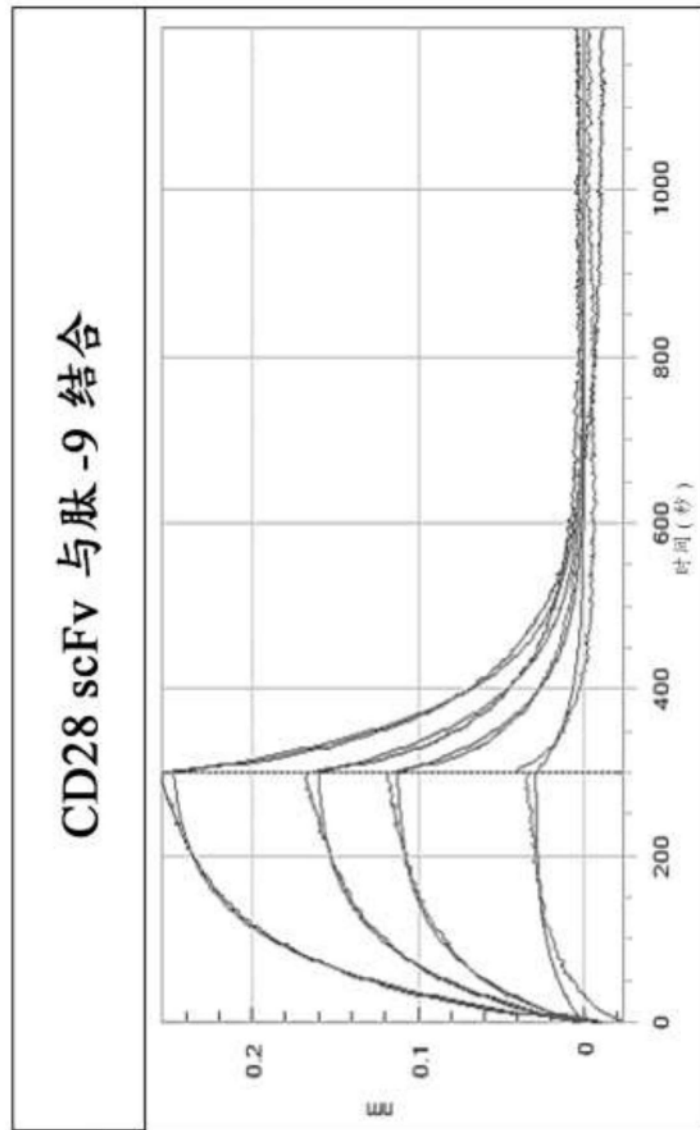


图4A

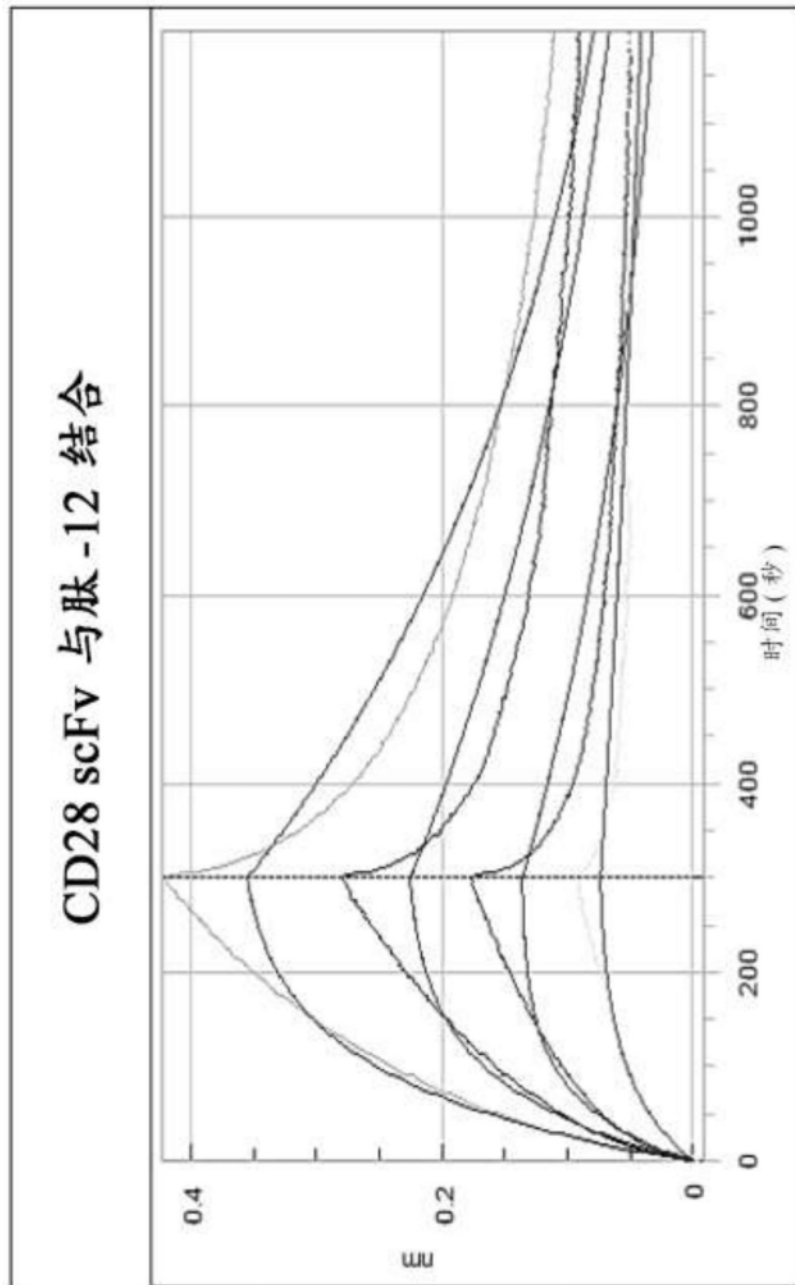


图4B

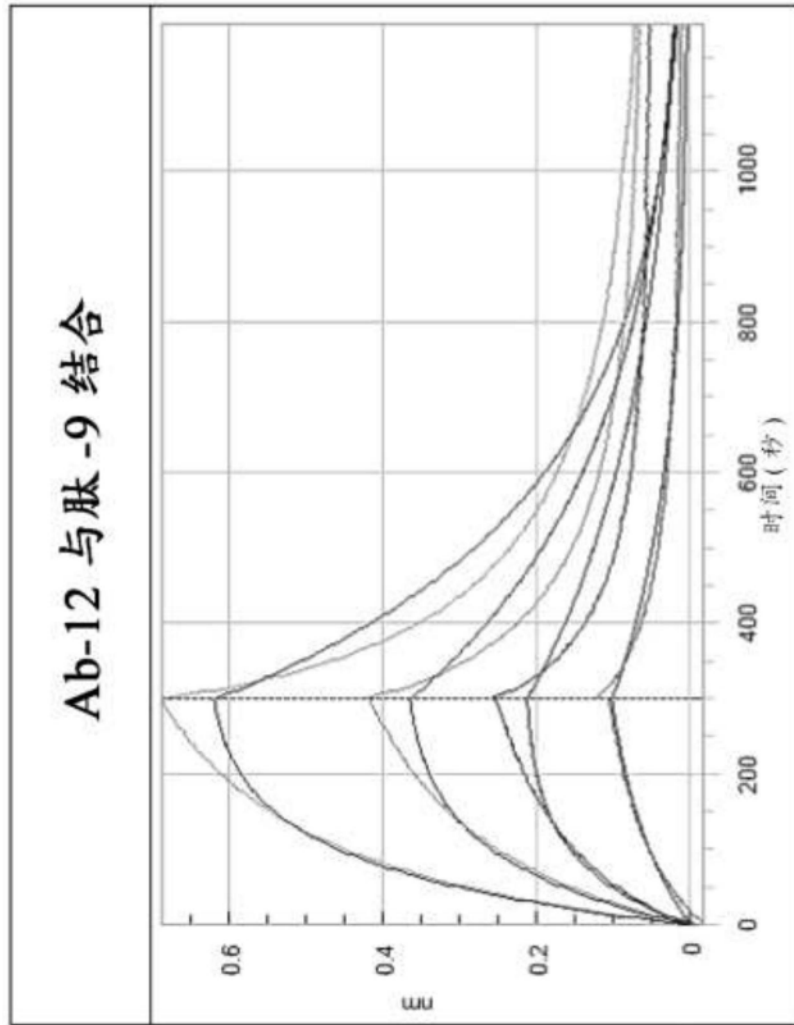


图4C

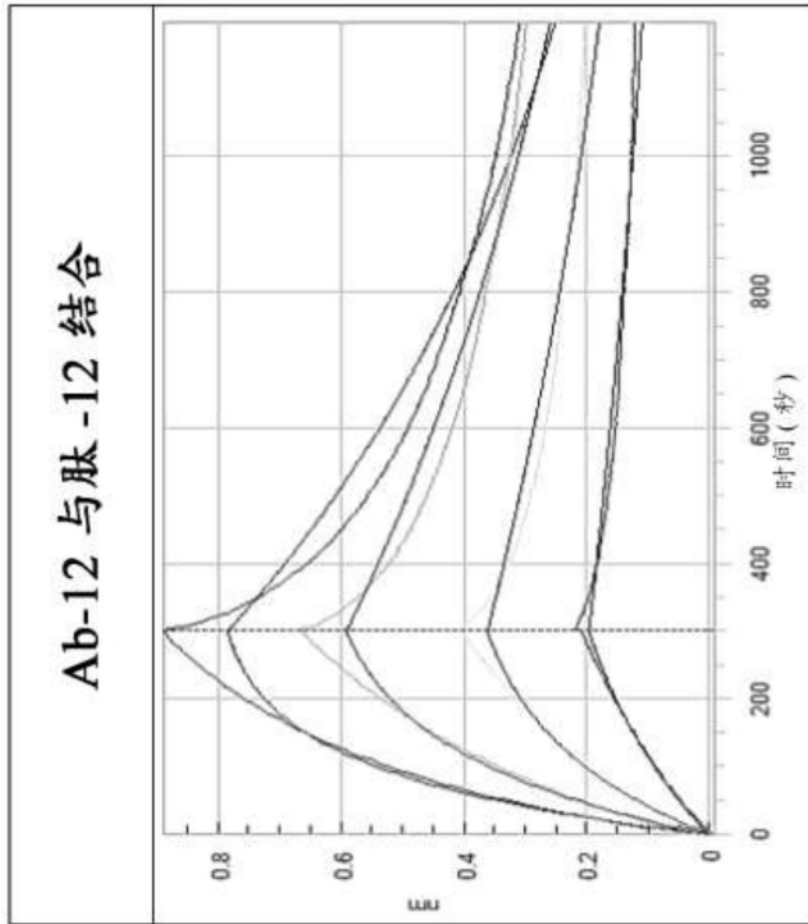


图4D

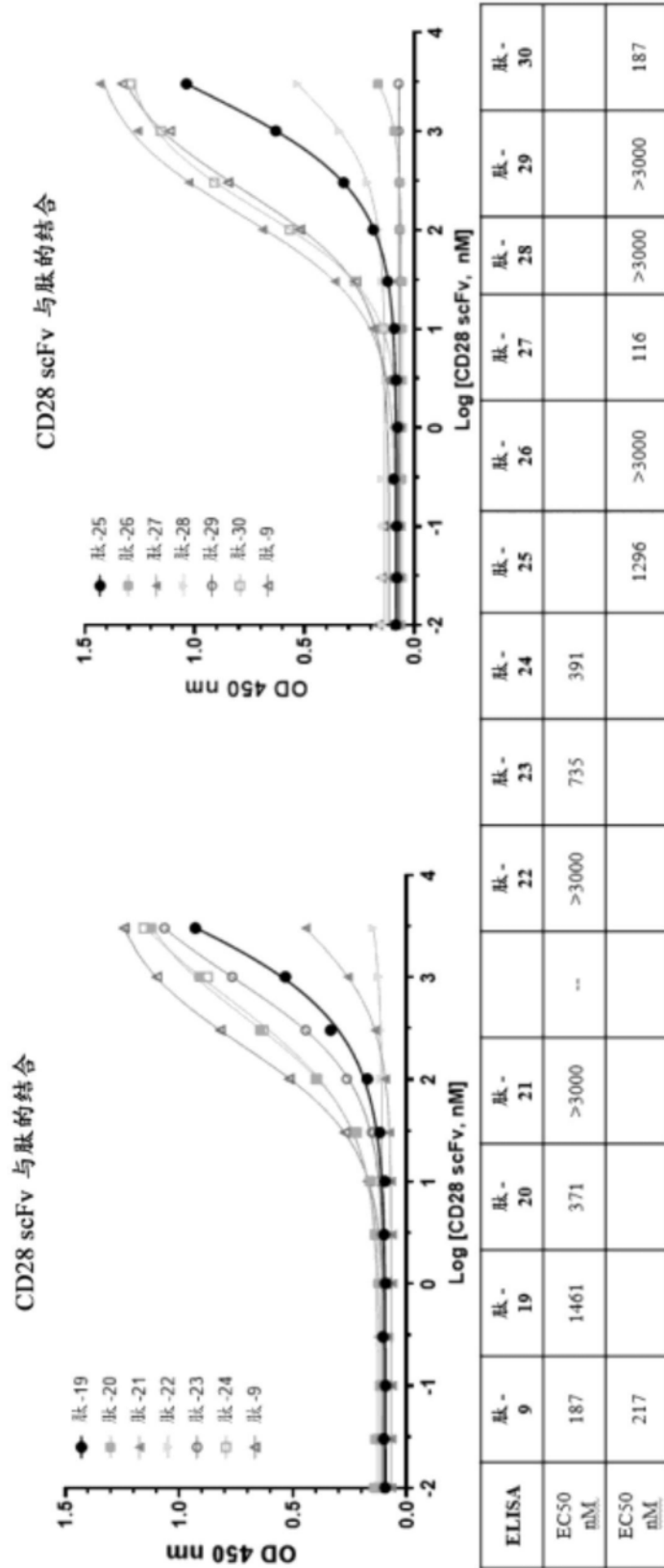


图 5A

图 5B

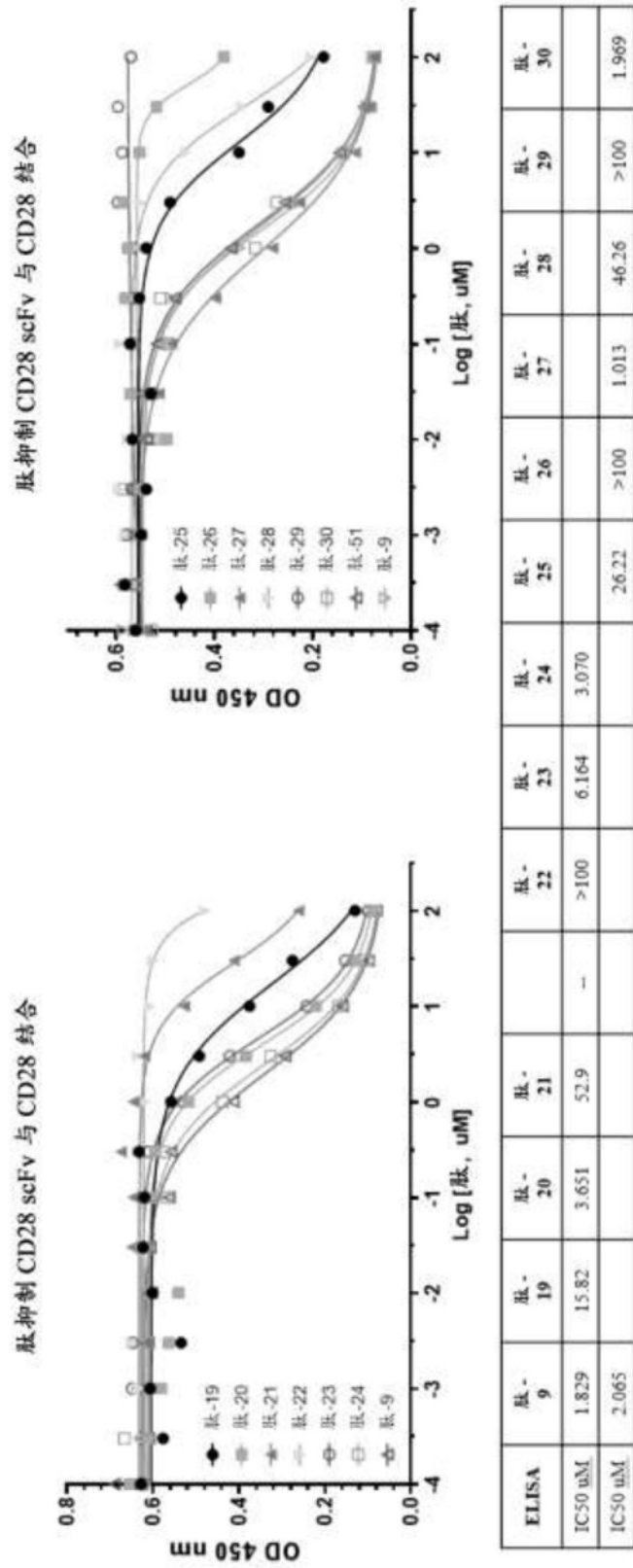


图 6A

图 6B



图7

肽抑制 CD28 scFv 与 CD28 结合

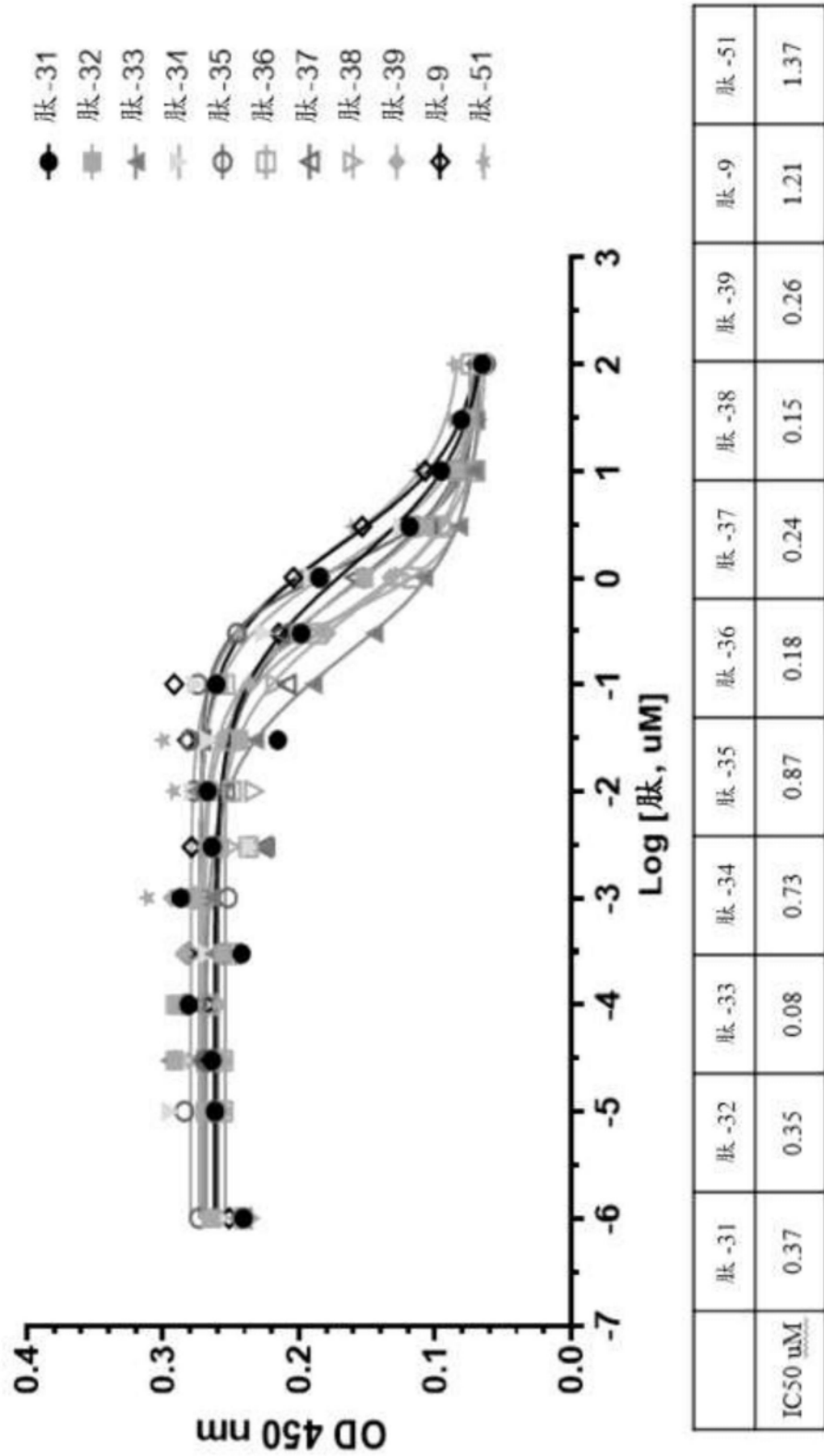
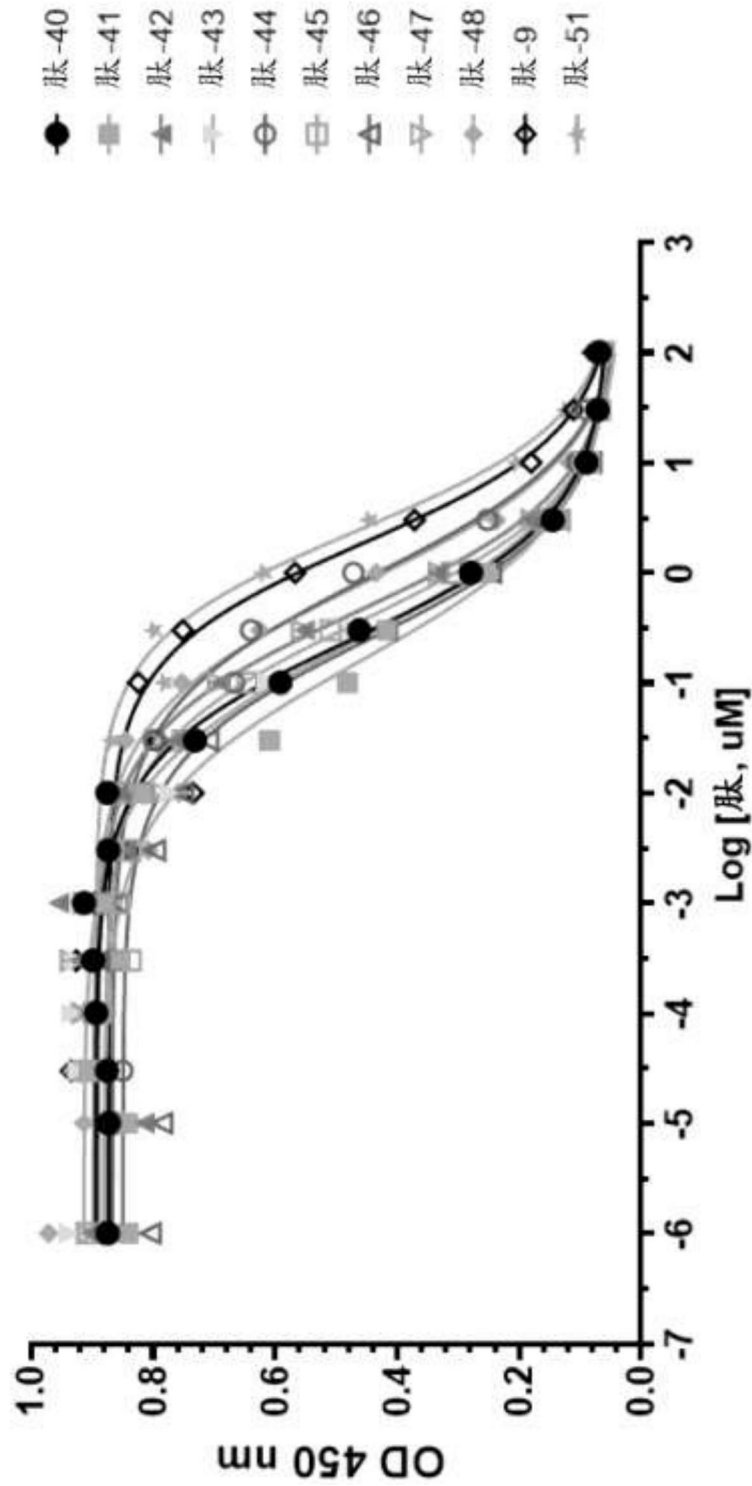


图8A

肽抑制 CD28 scFv 与 CD28 结合



	肽-40	肽-41	肽-42	肽-43	肽-44	肽-45	肽-46	肽-47	肽-48	肽-9	肽-51
IC50 μ M	0.18	0.09	0.29	0.16	0.45	0.22	0.12	0.29	0.49	1.10	1.65

图8B

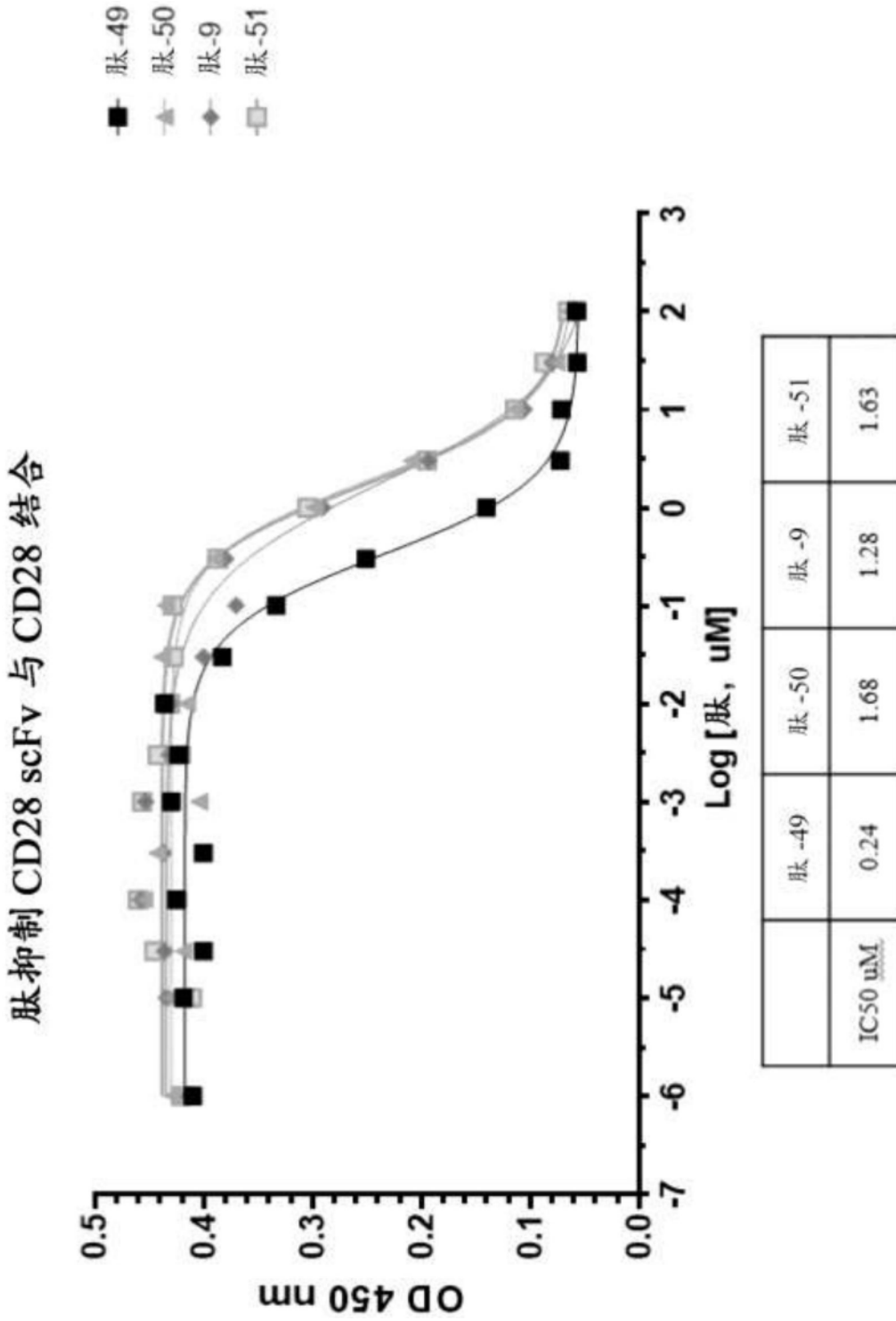


图8C

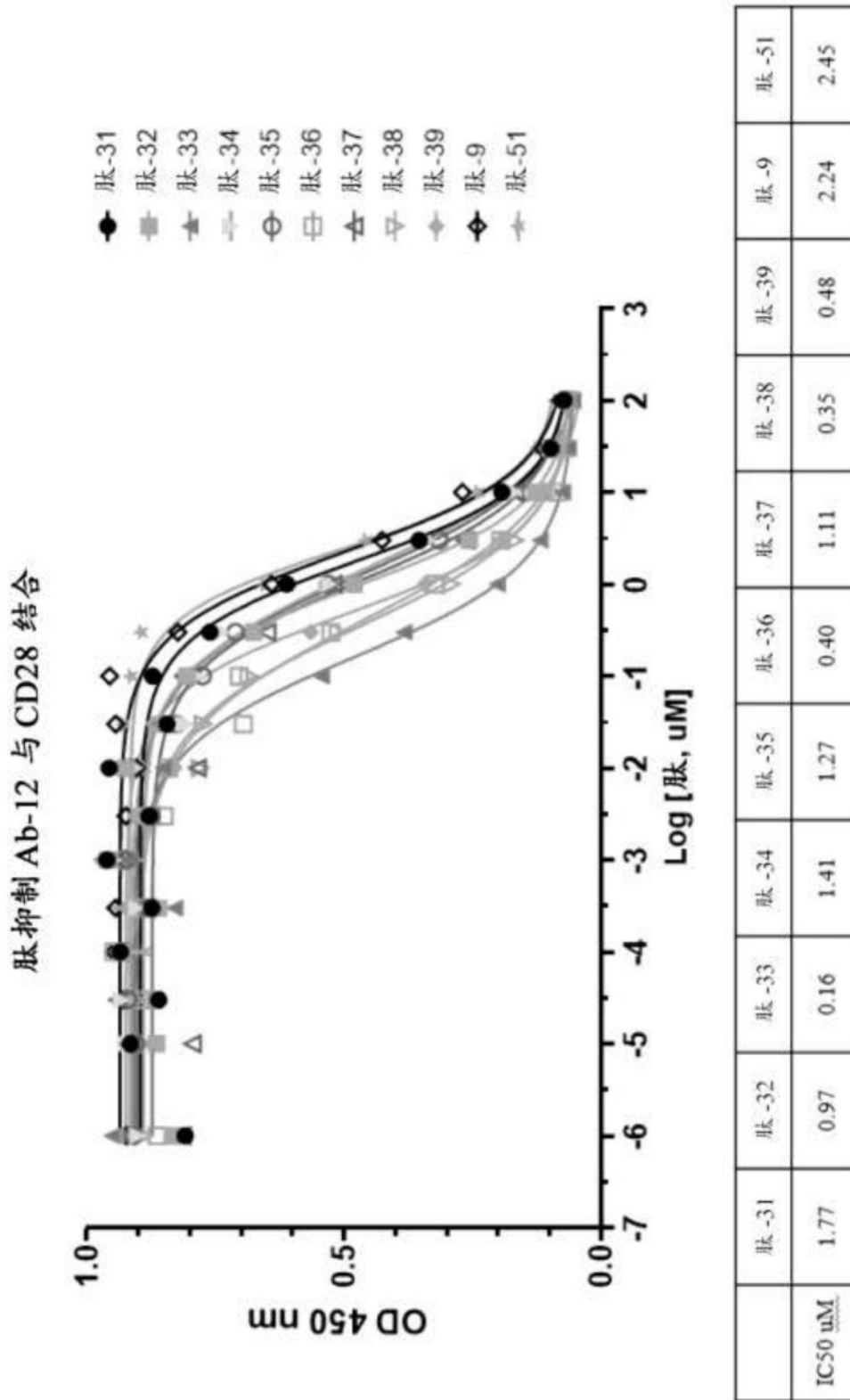
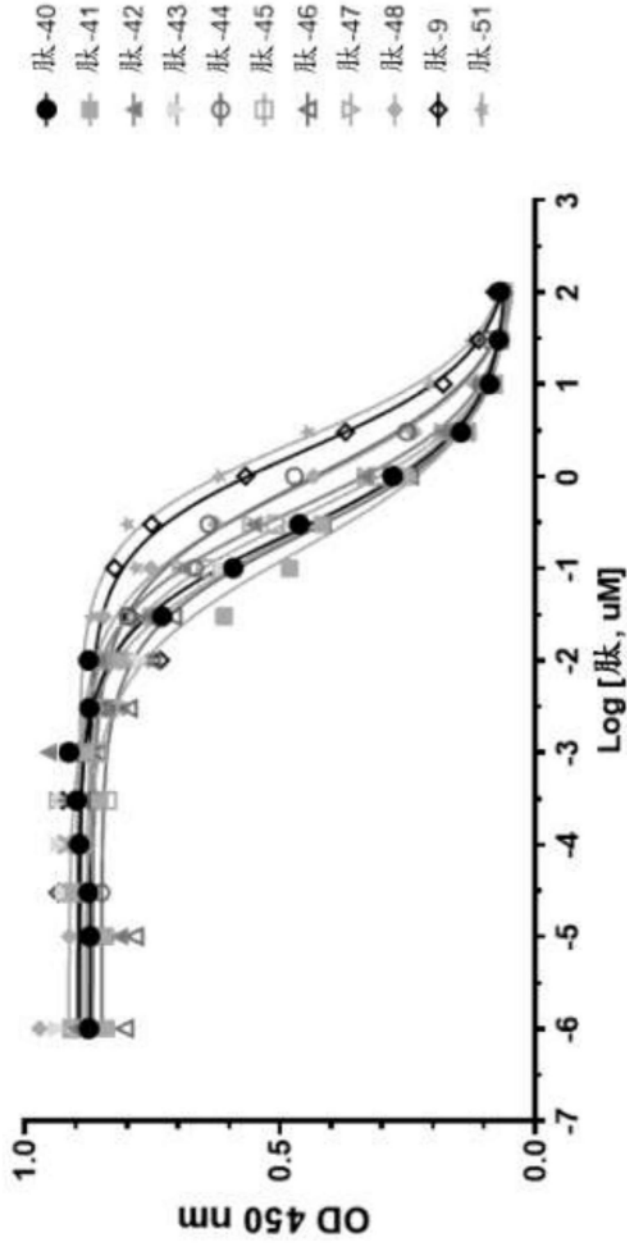


图9A

肽抑制 Ab-12 与 CD28 结合



肽-40	肽-41	肽-42	肽-43	肽-44	肽-45	肽-46	肽-47	肽-48	肽-9	肽-51
0.25	0.15	0.44	0.24	0.94	0.37	0.24	0.45	0.79	1.86	2.43
IC50 uM										

图9B

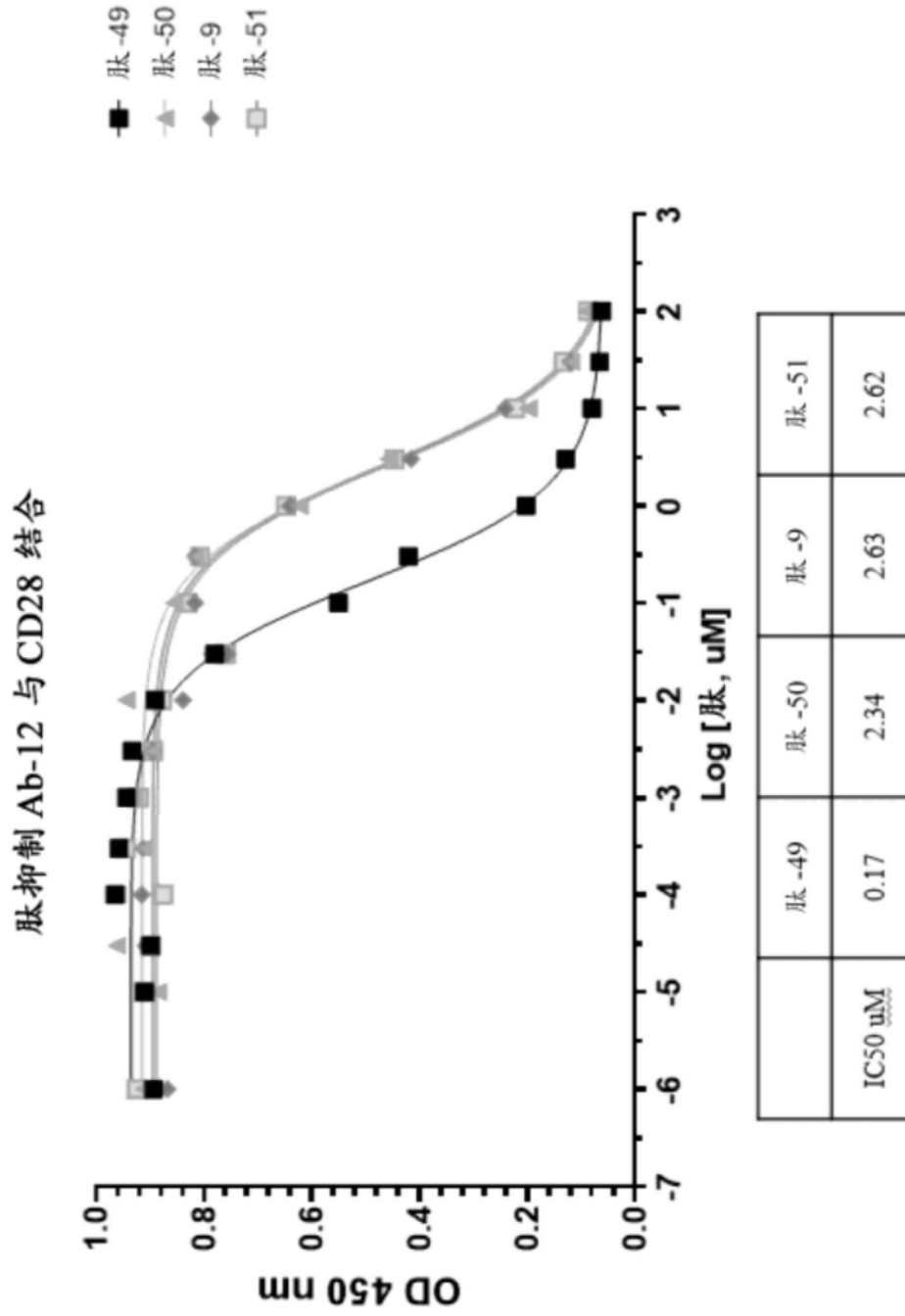


图9C

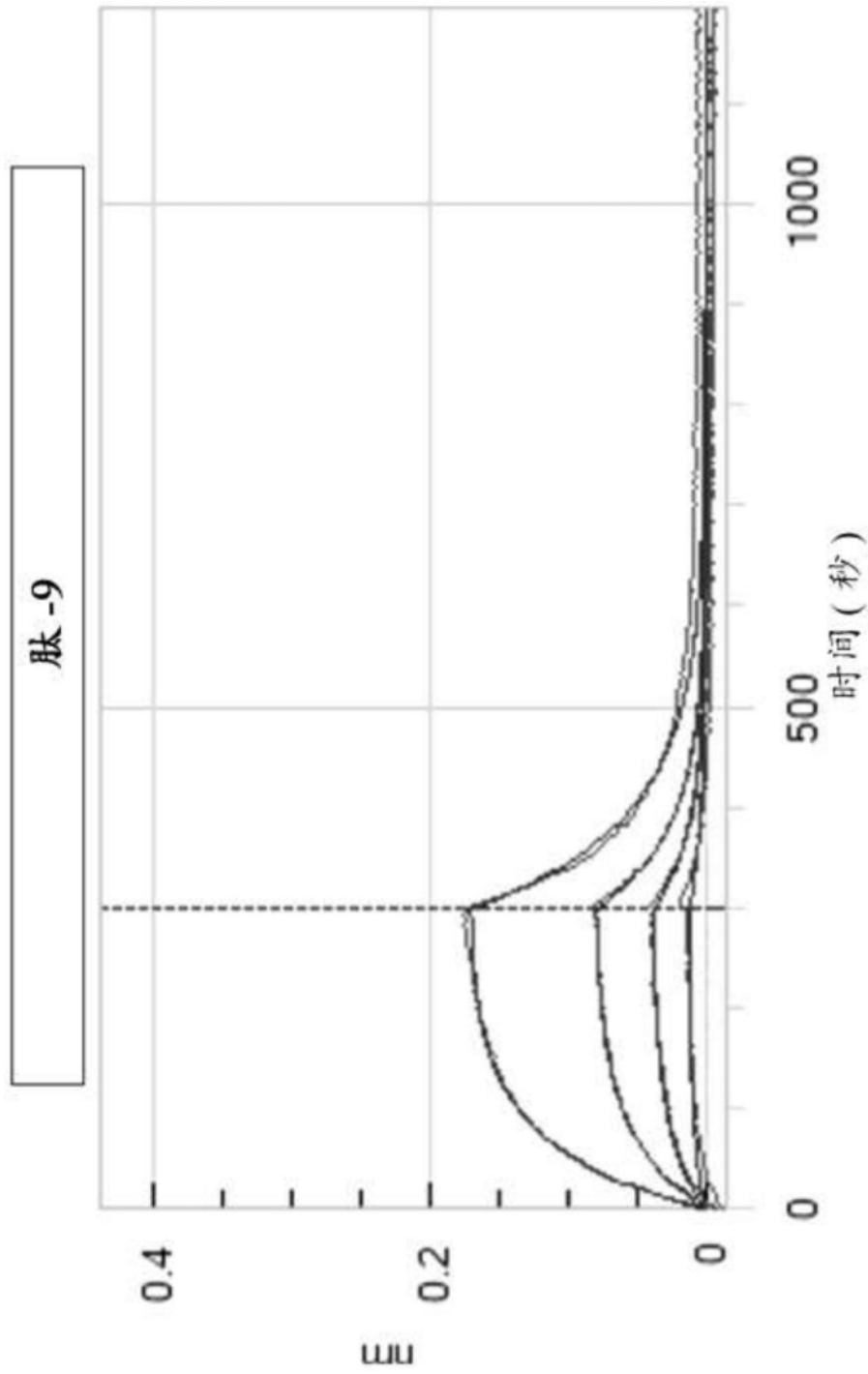


图10A

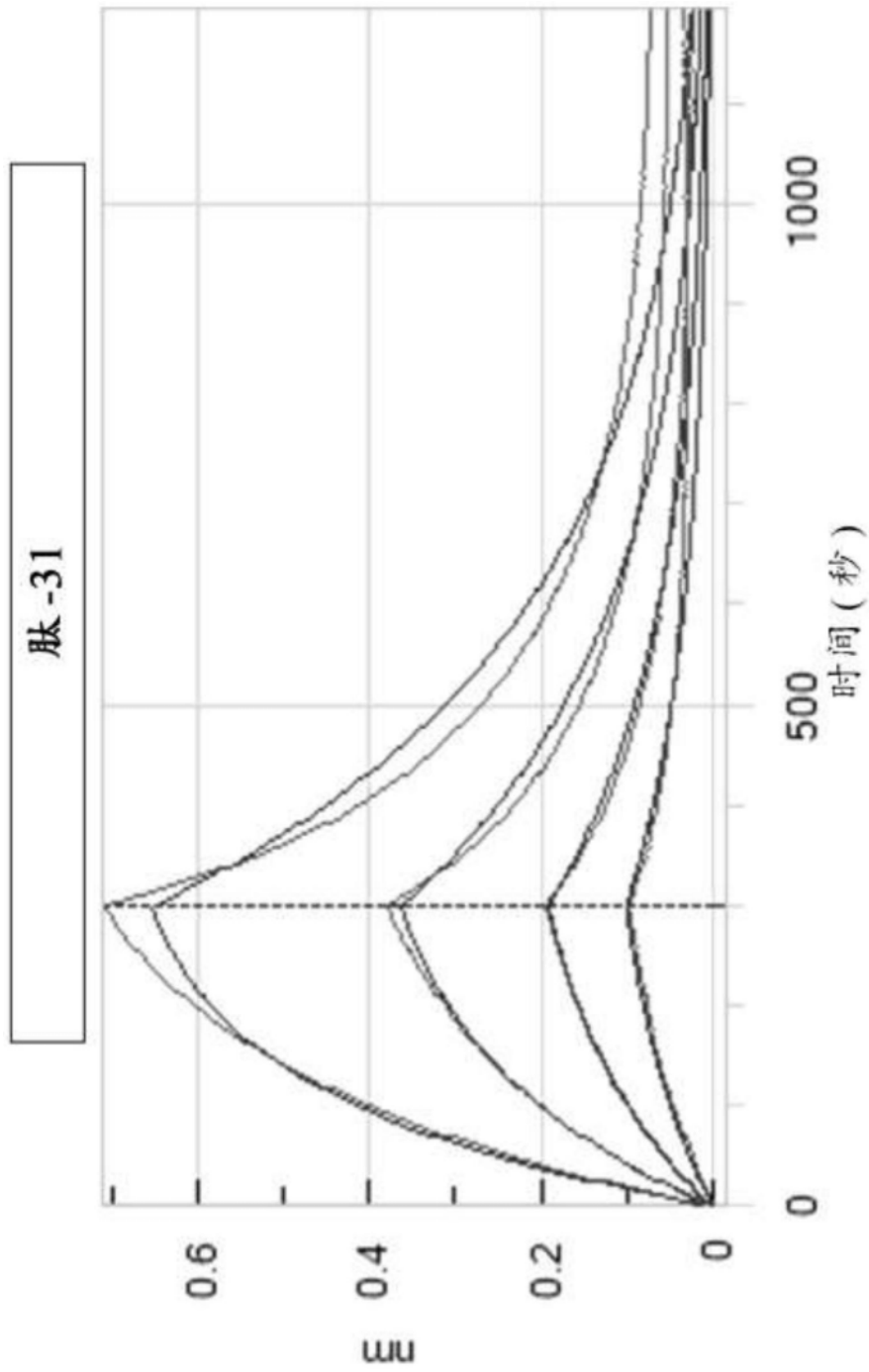


图10B

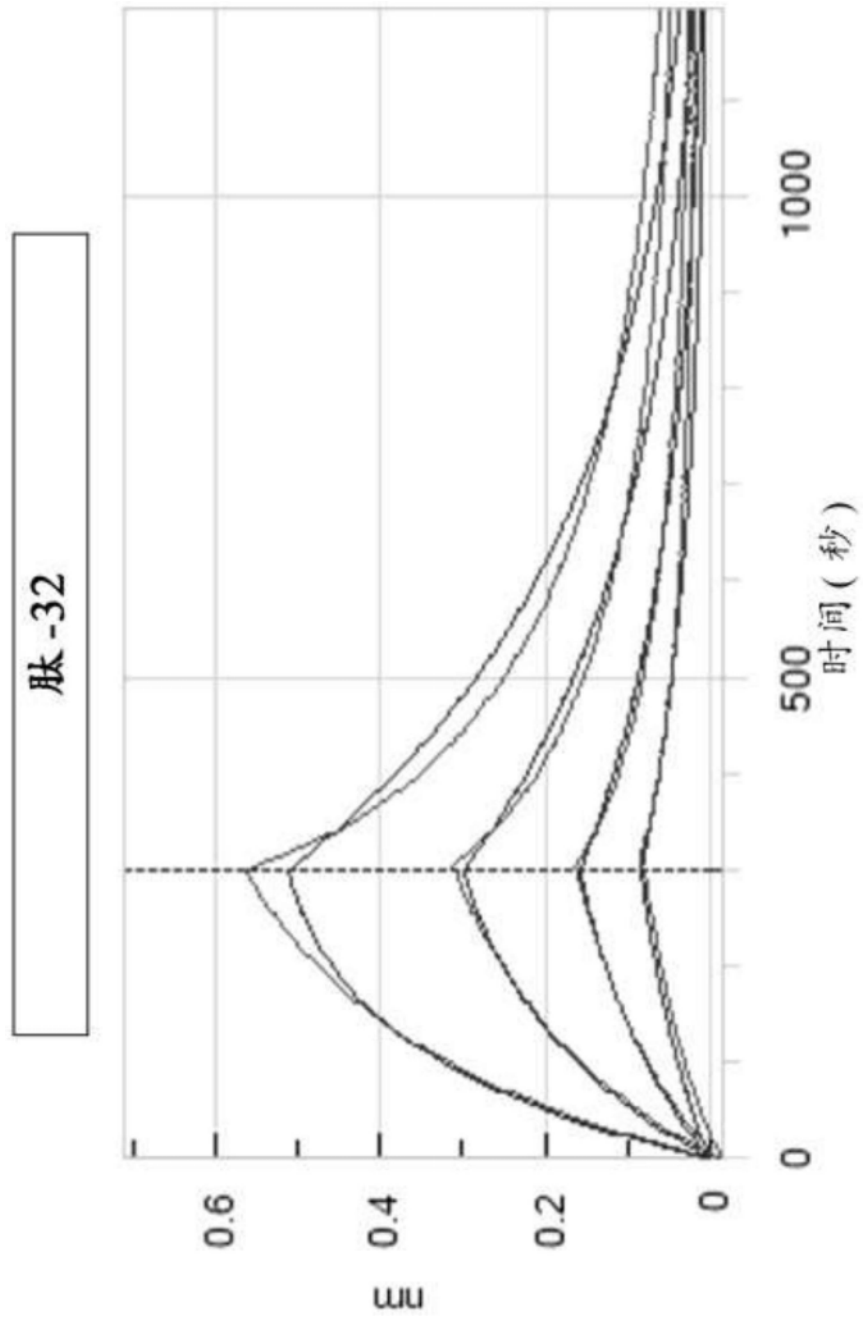


图10C

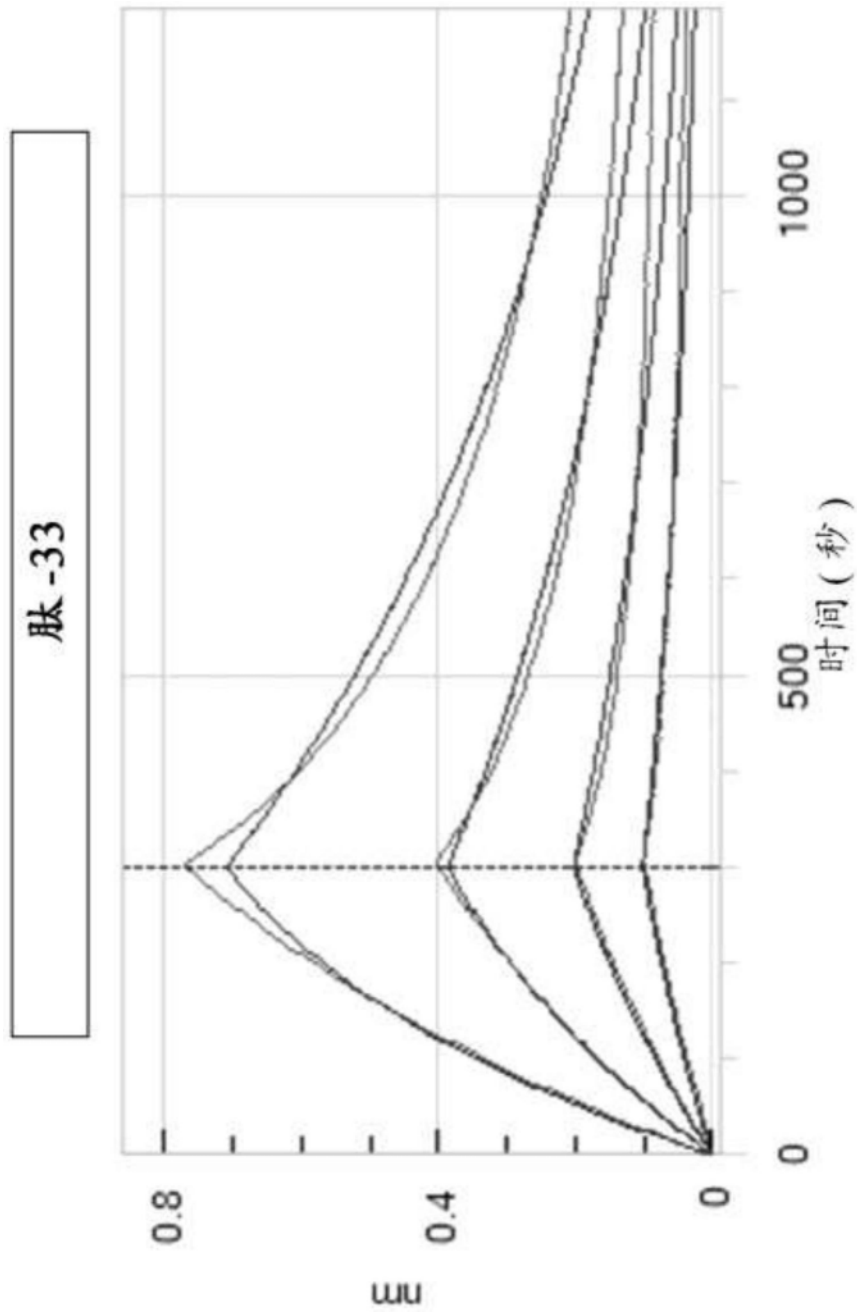


图10D

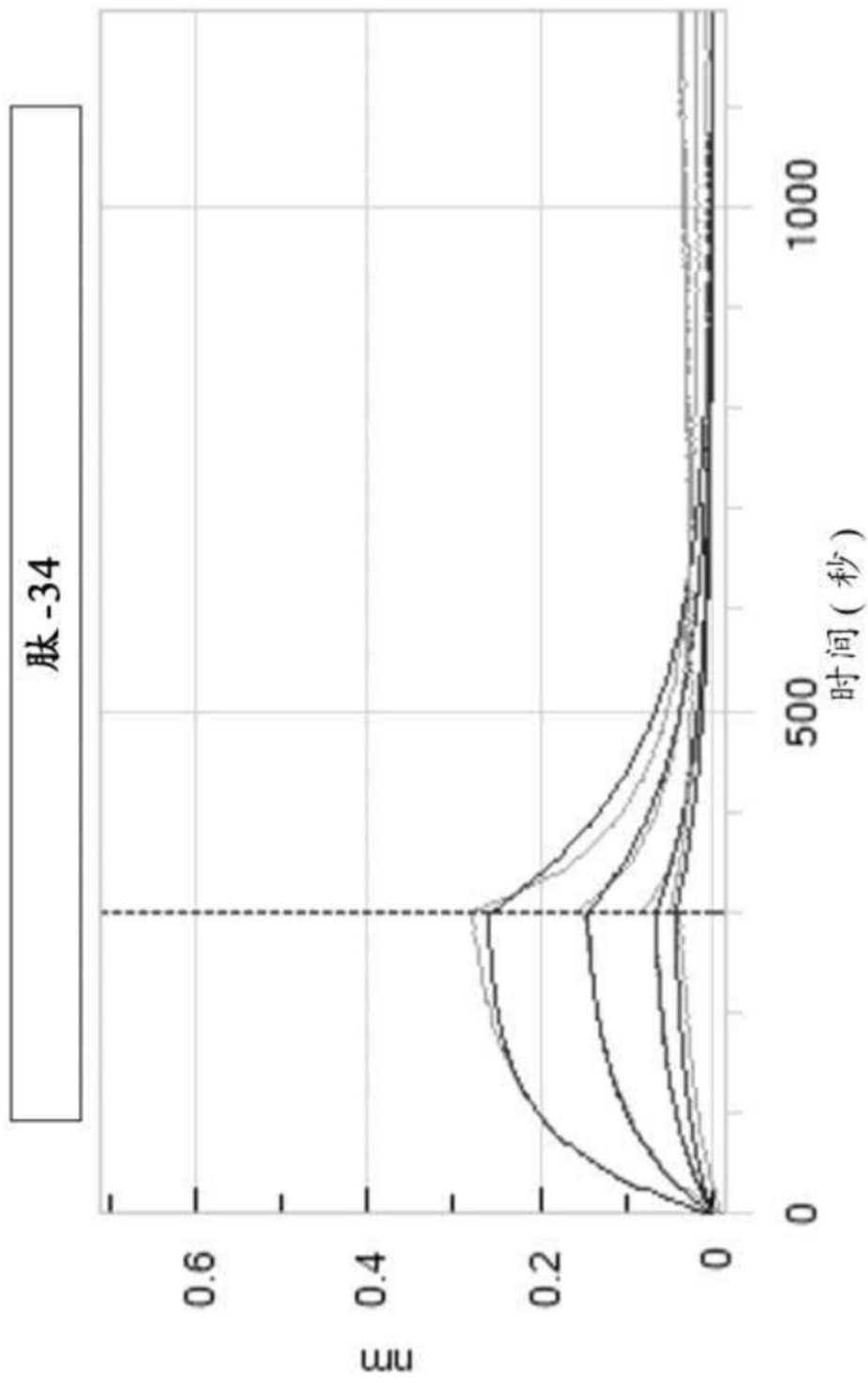


图10E

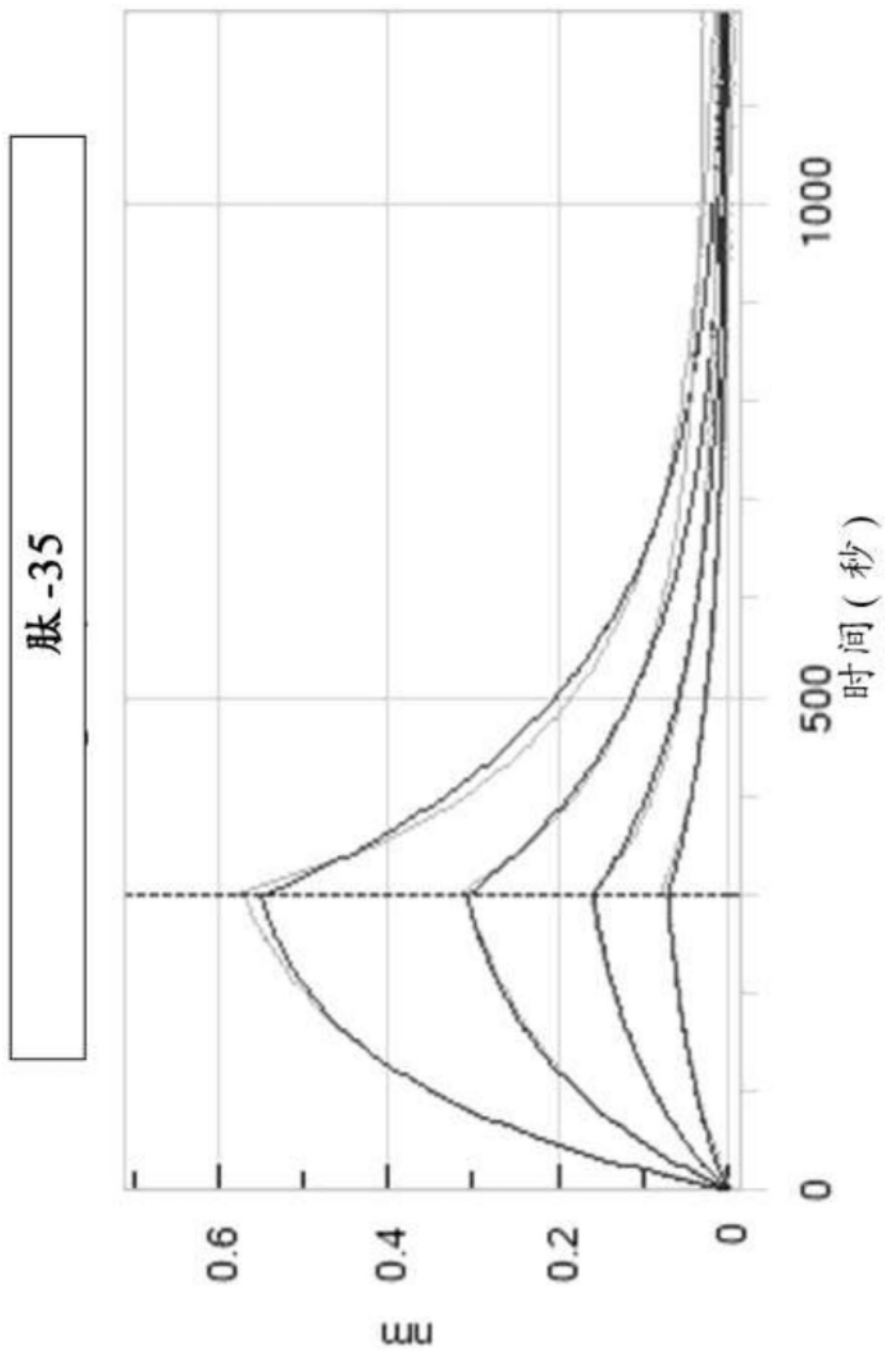


图10F

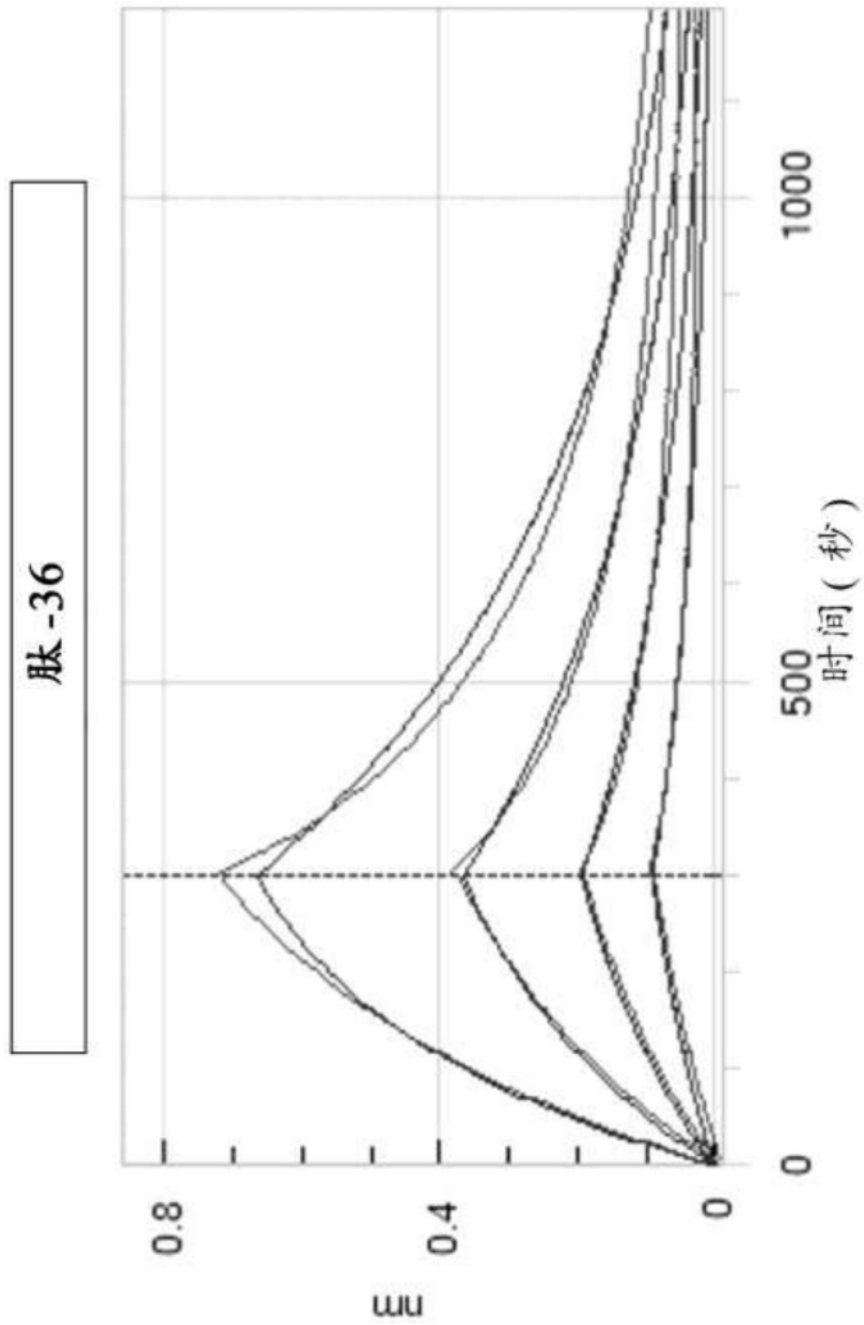


图10G

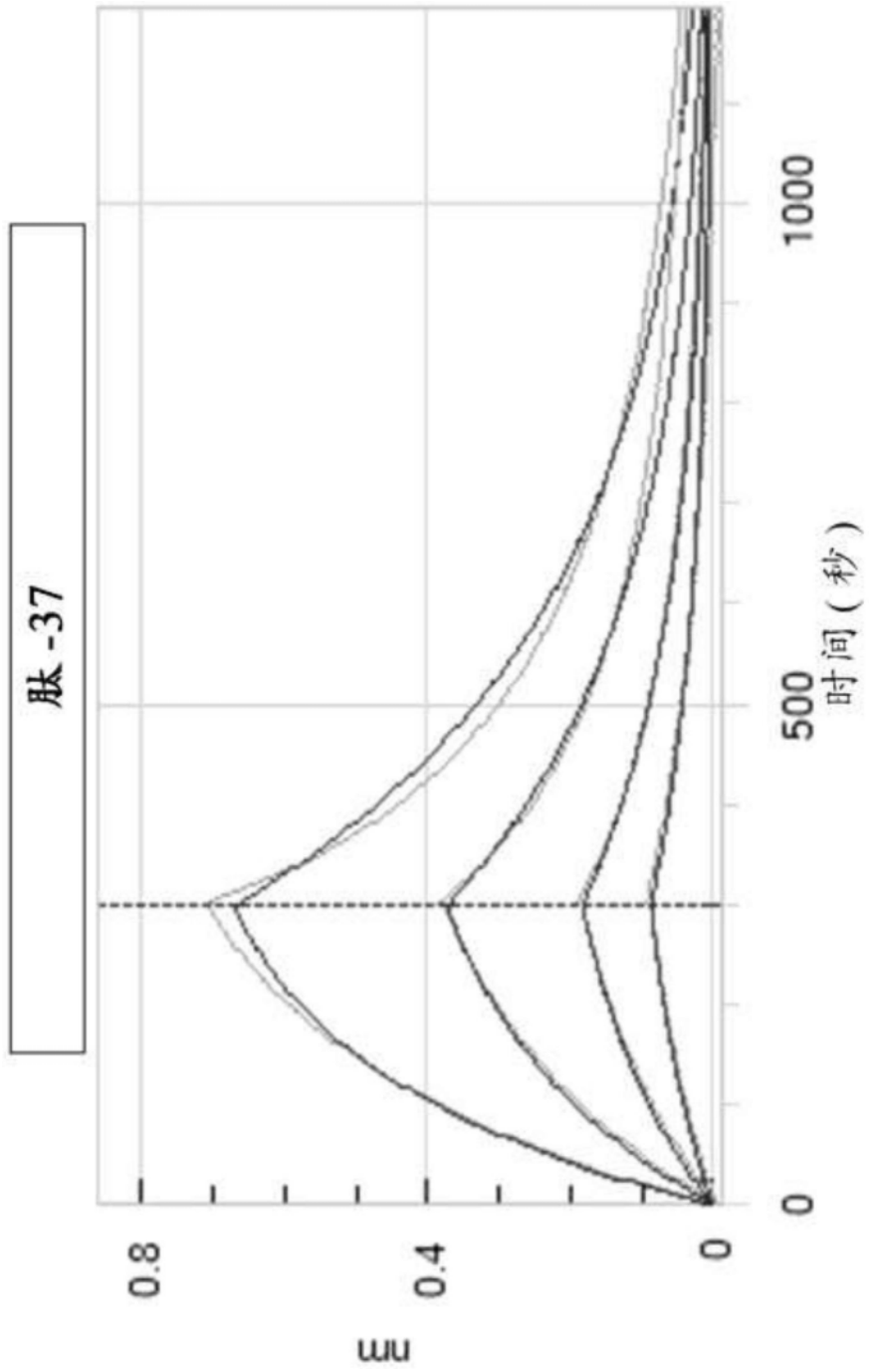


图10H

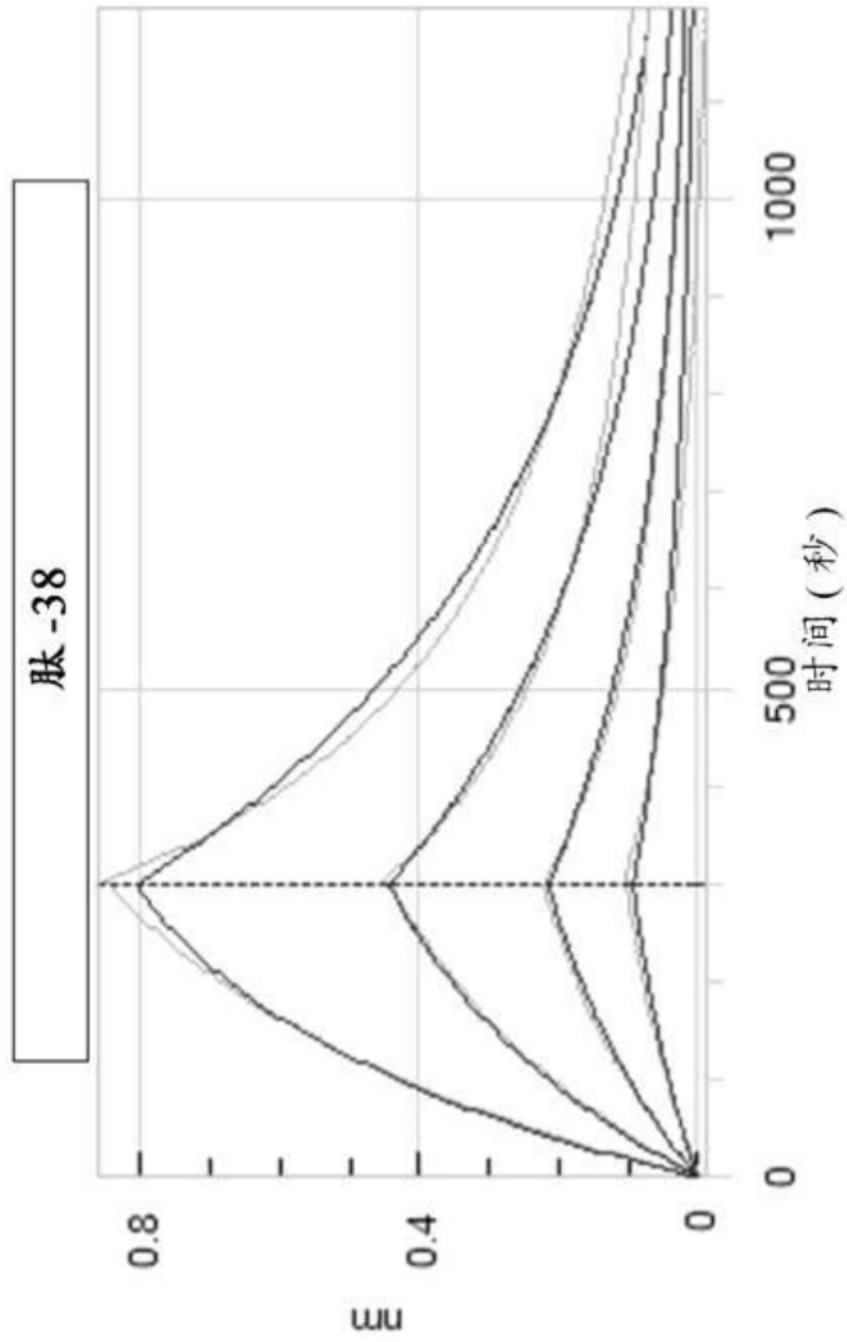


图10I

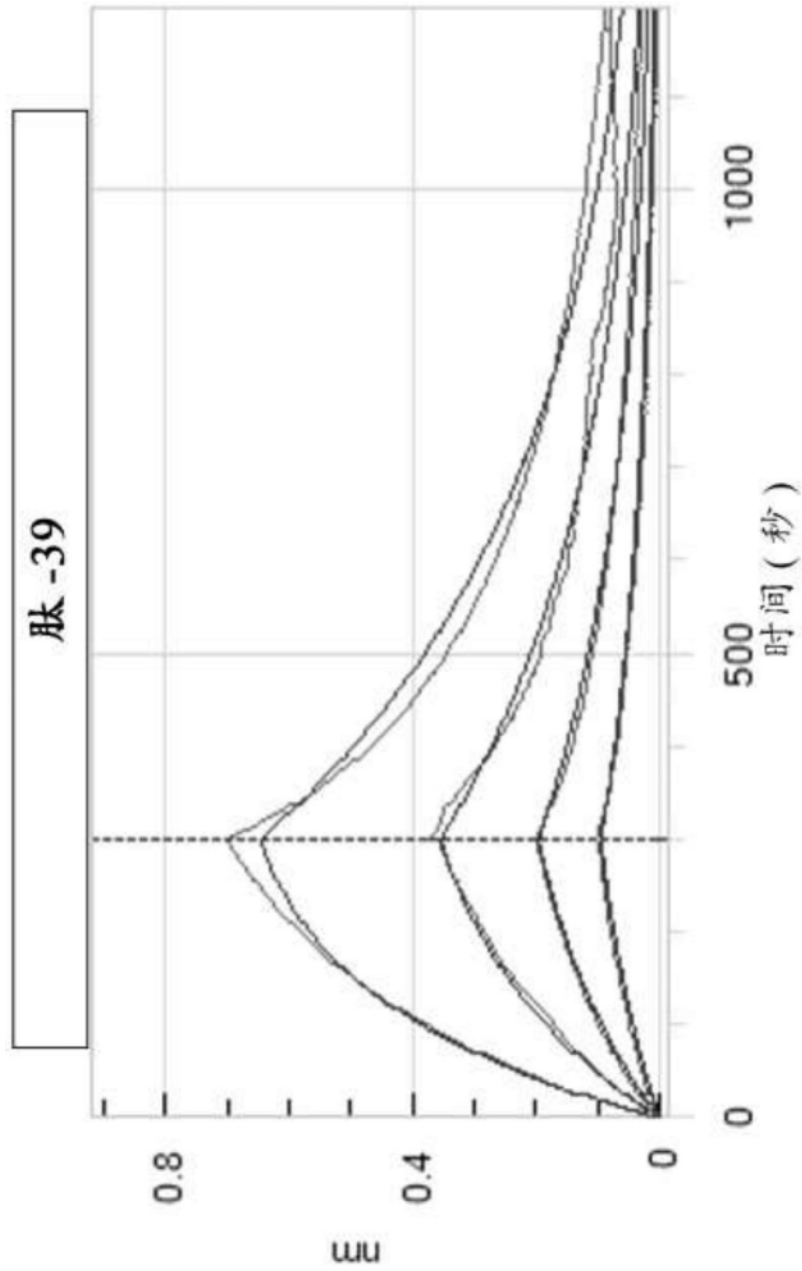


图10J

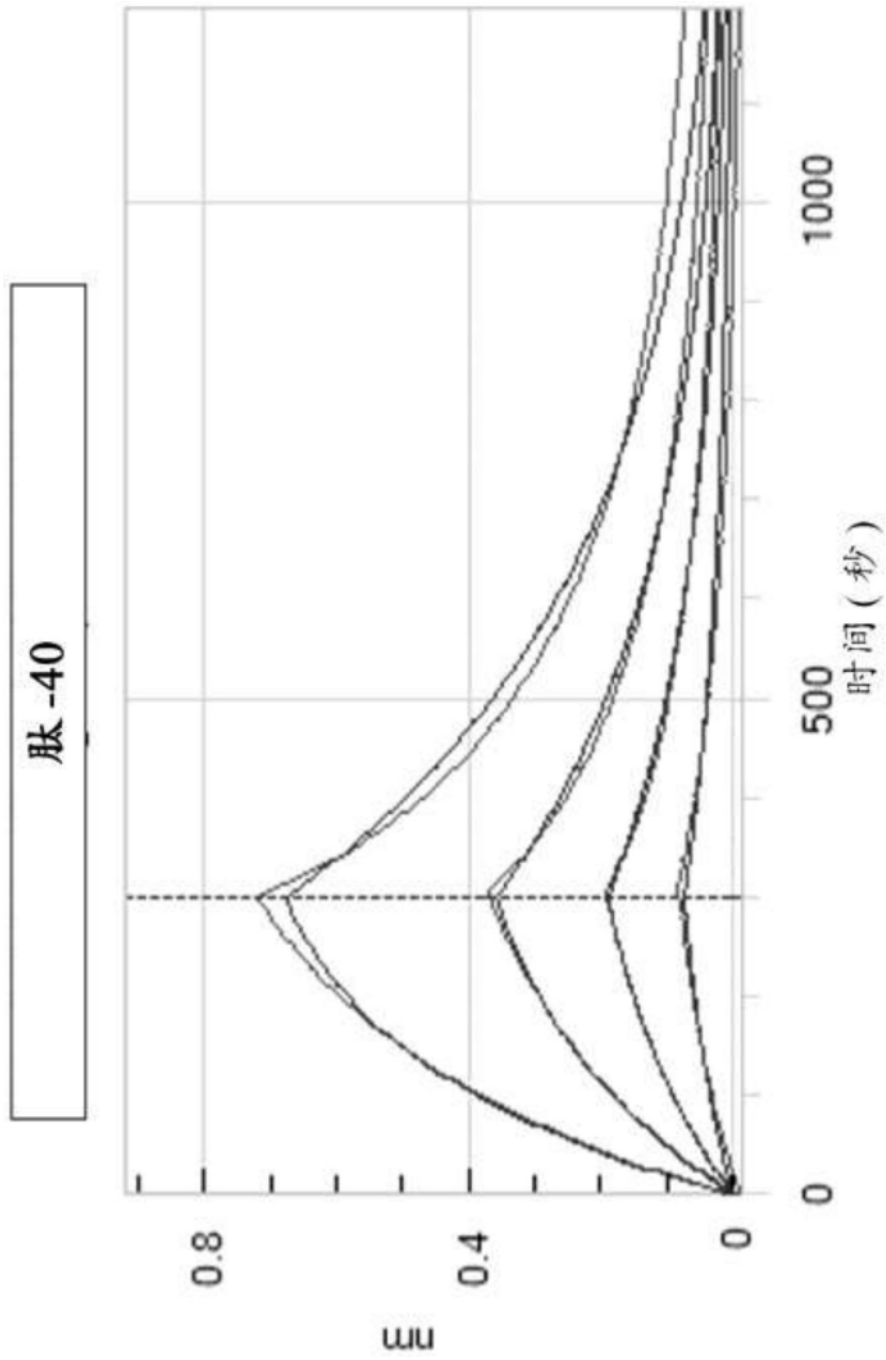


图10K

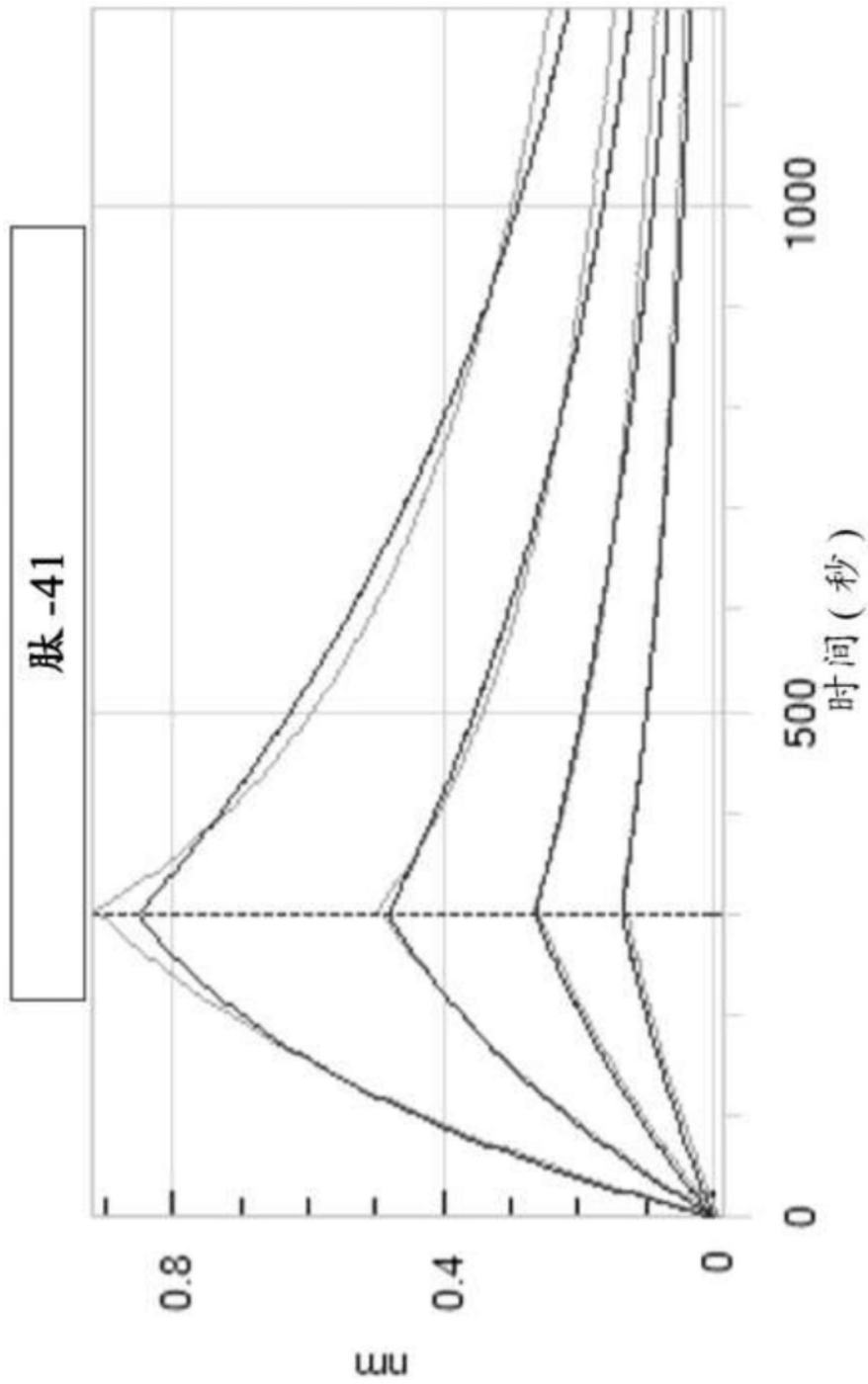


图10L

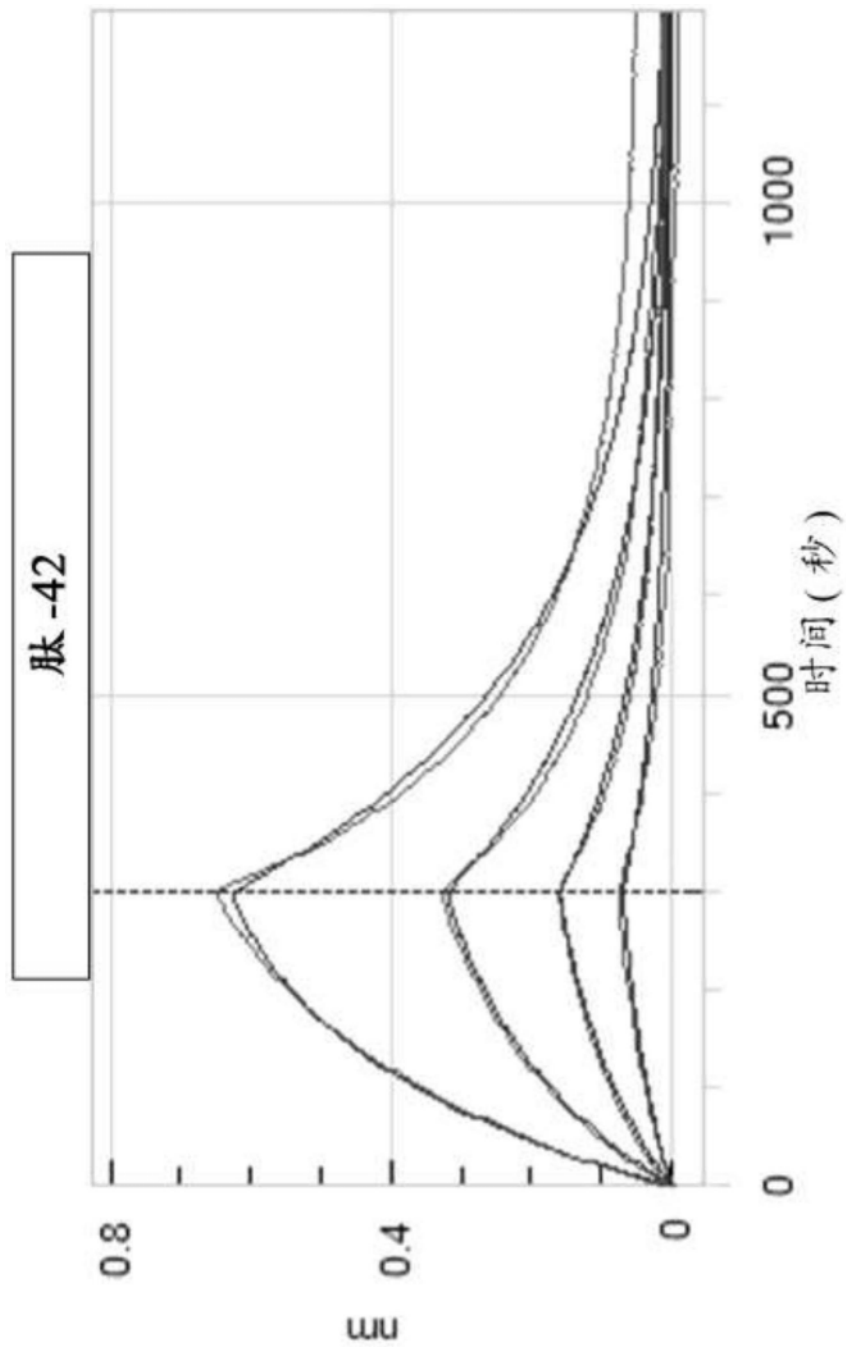


图10M

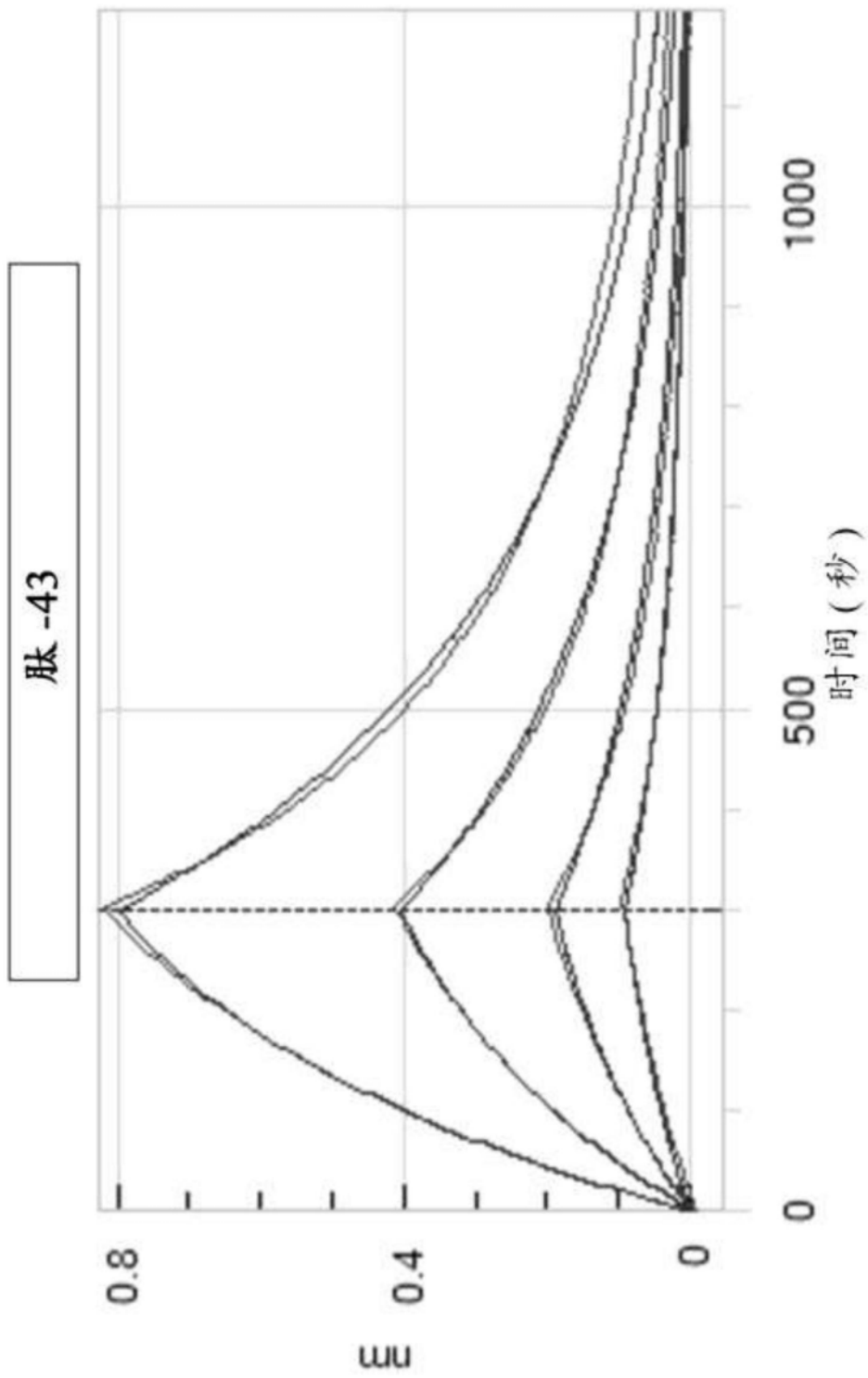


图10N

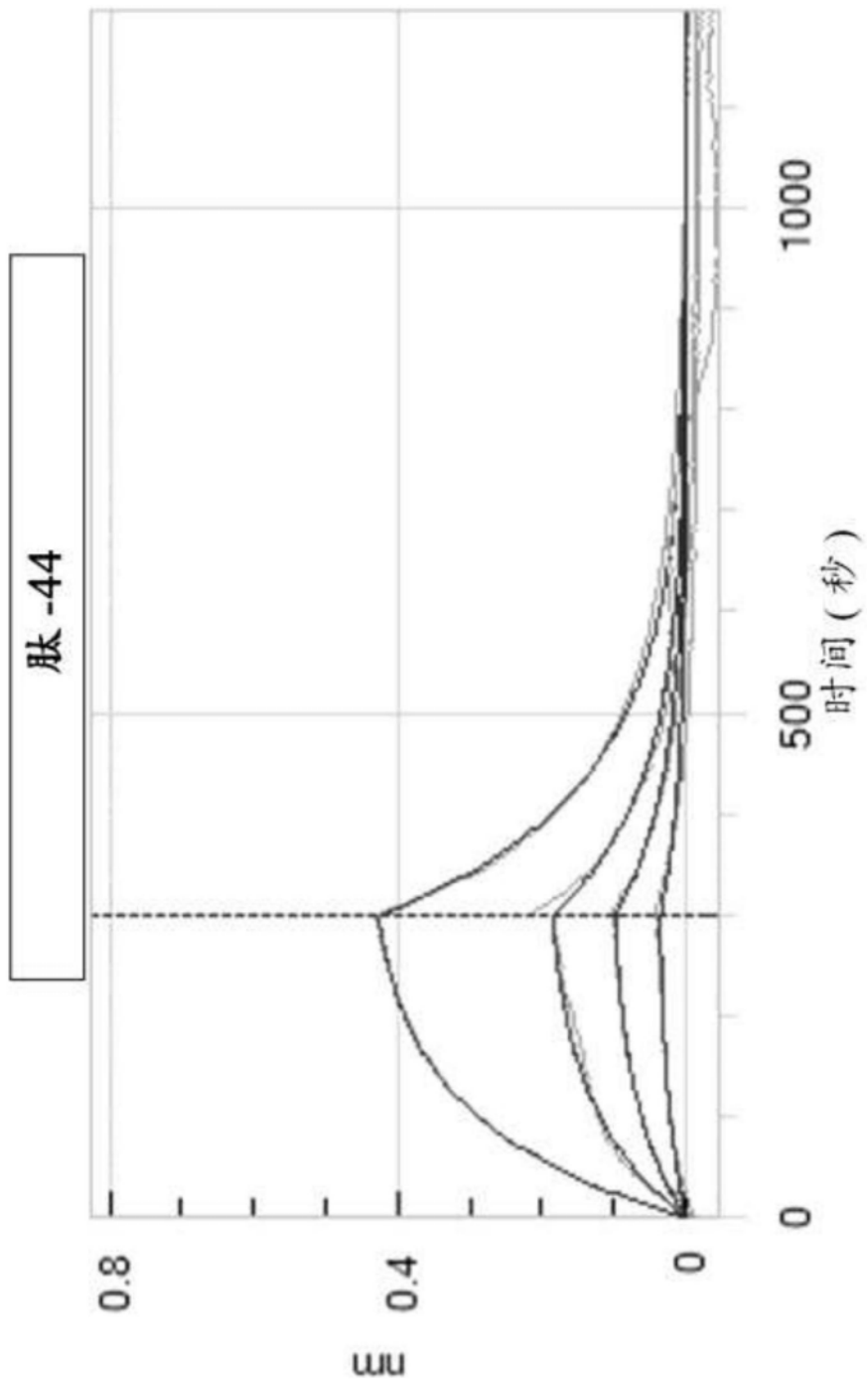


图100

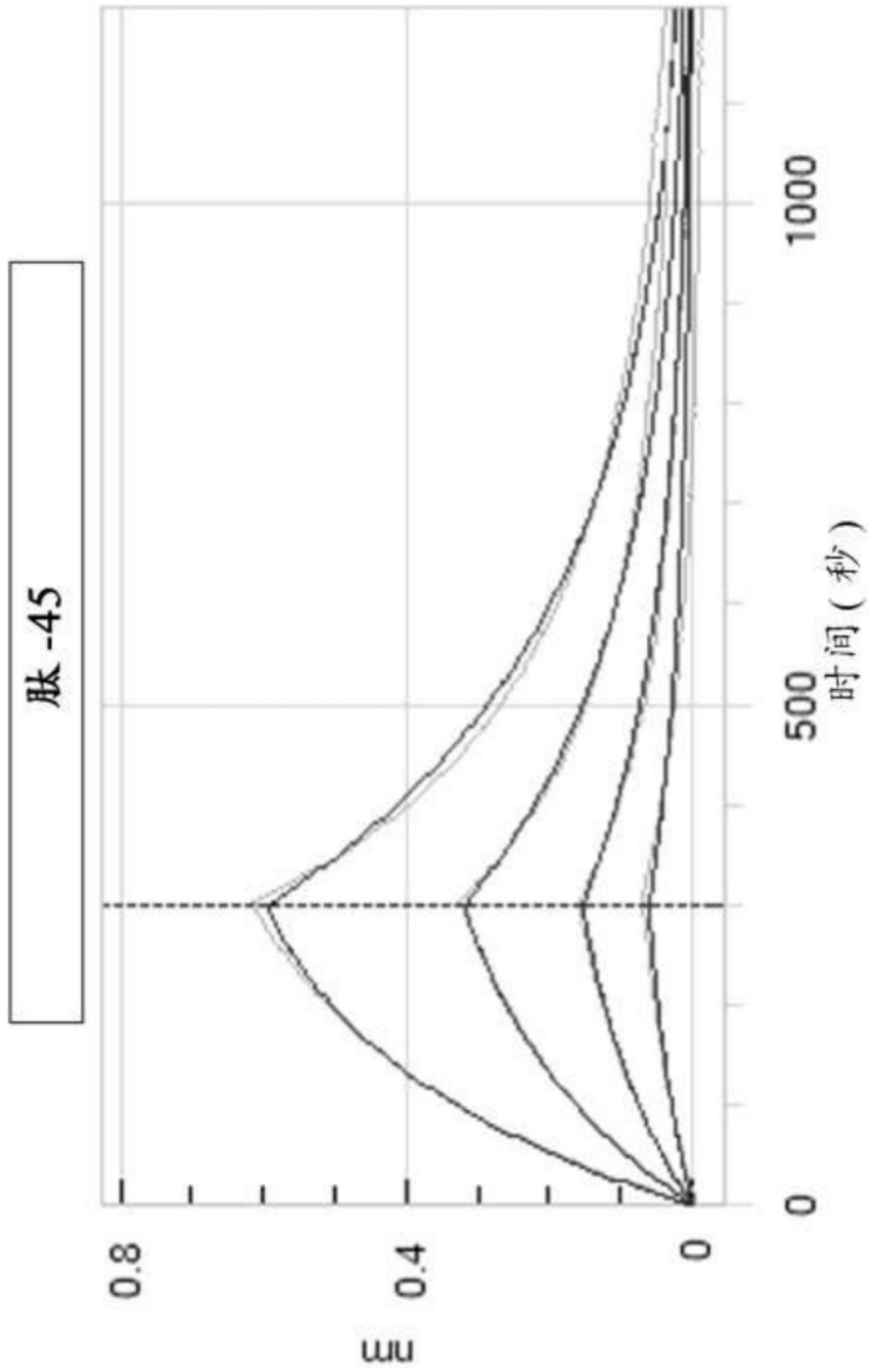


图10P

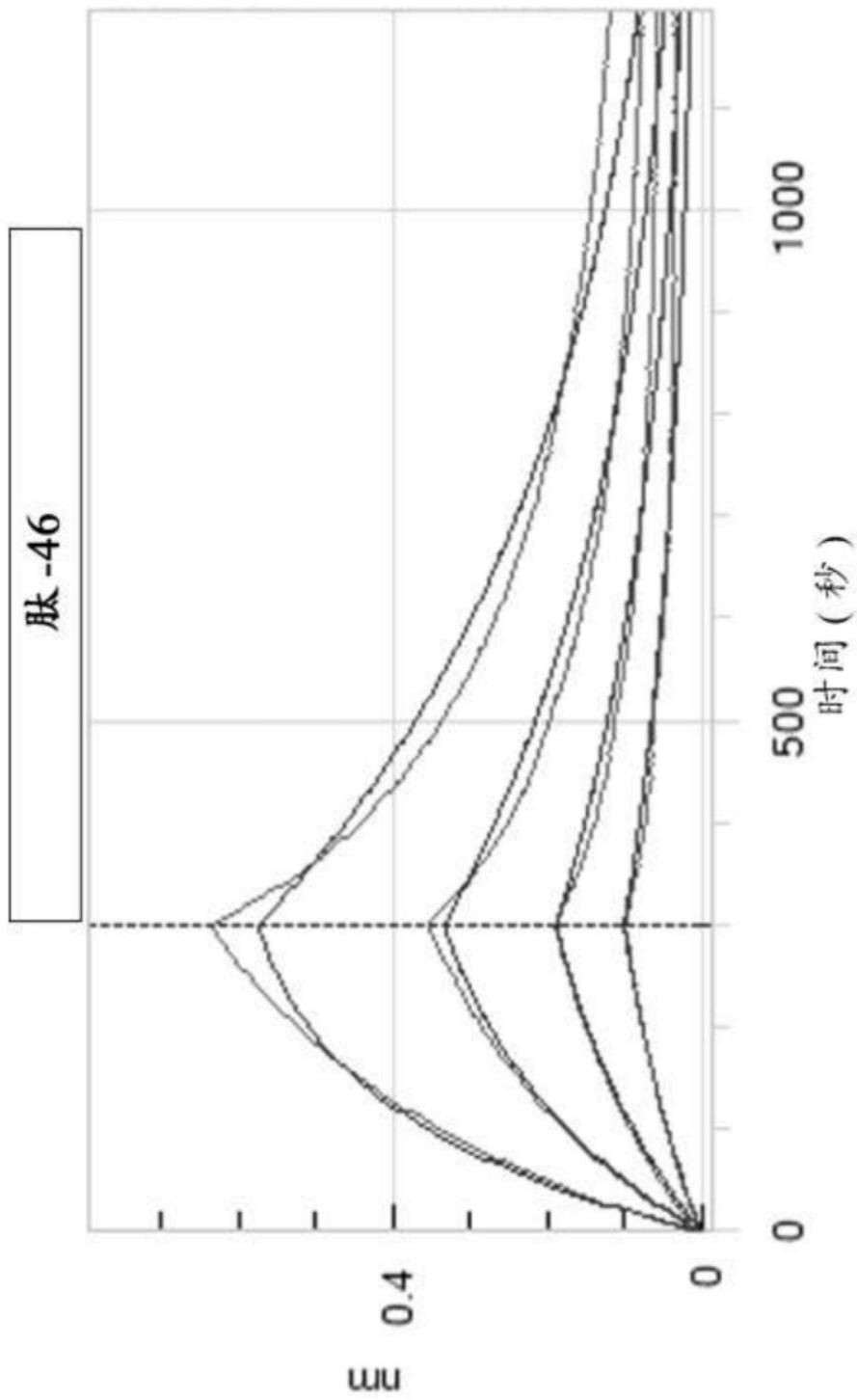


图10Q

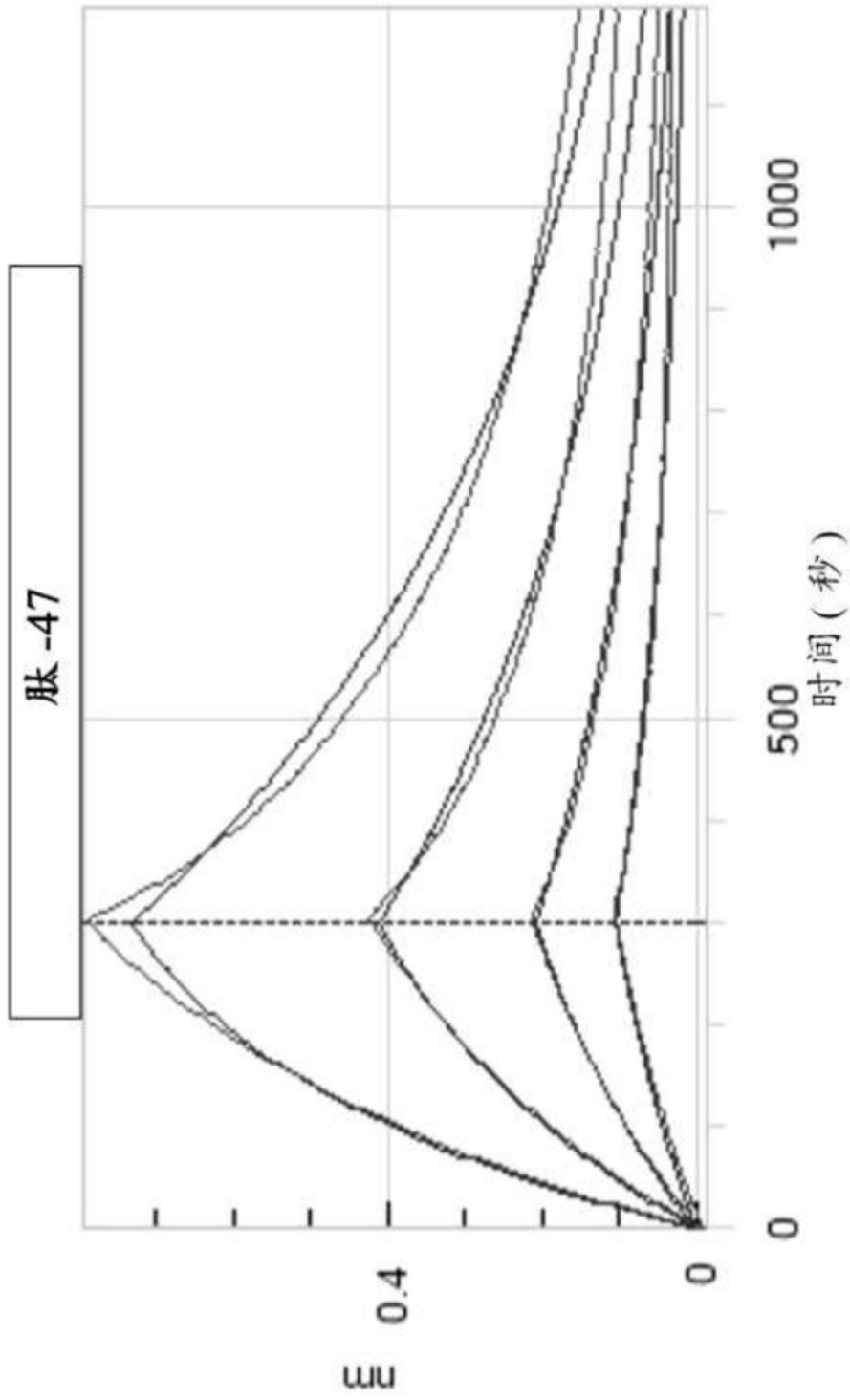


图10R

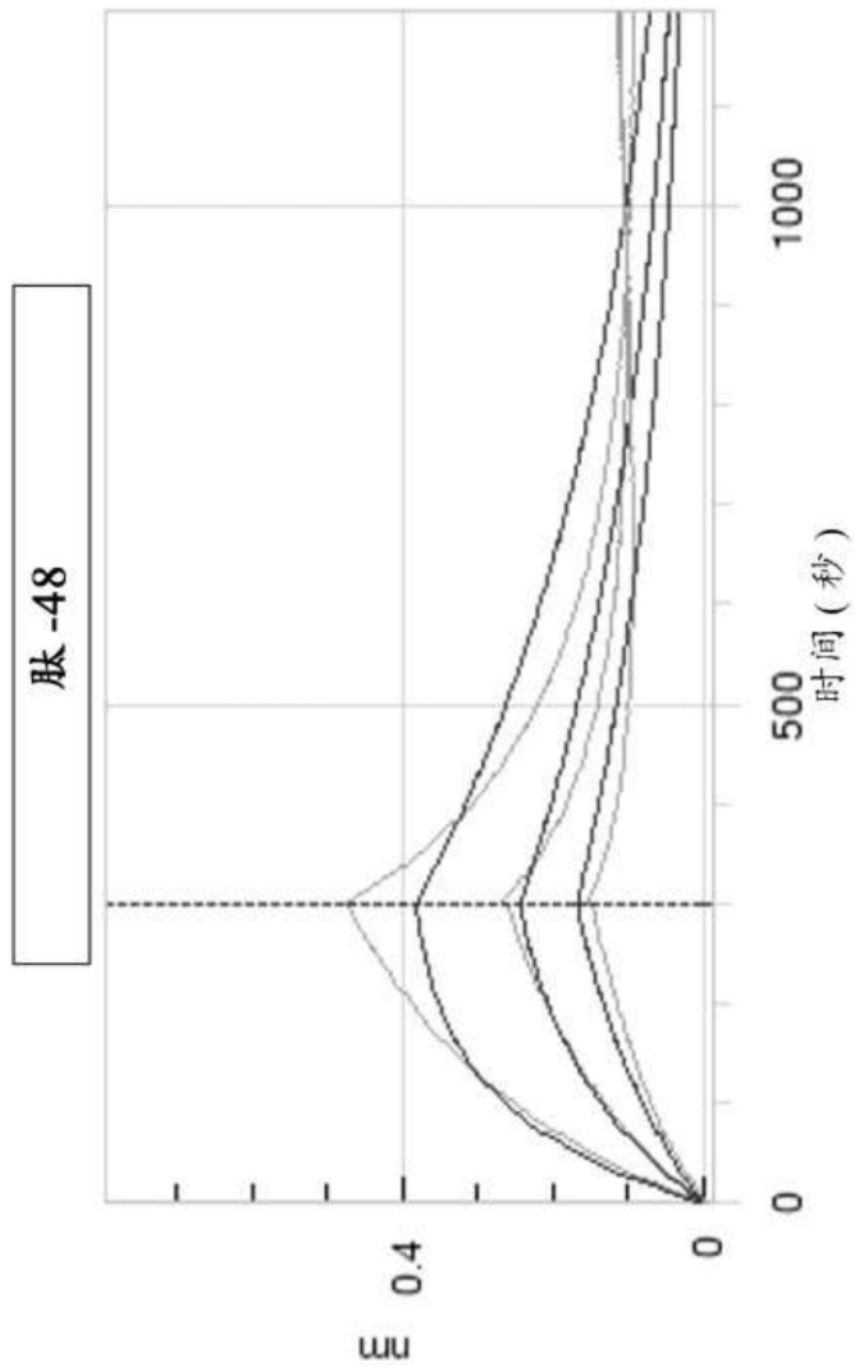


图10S

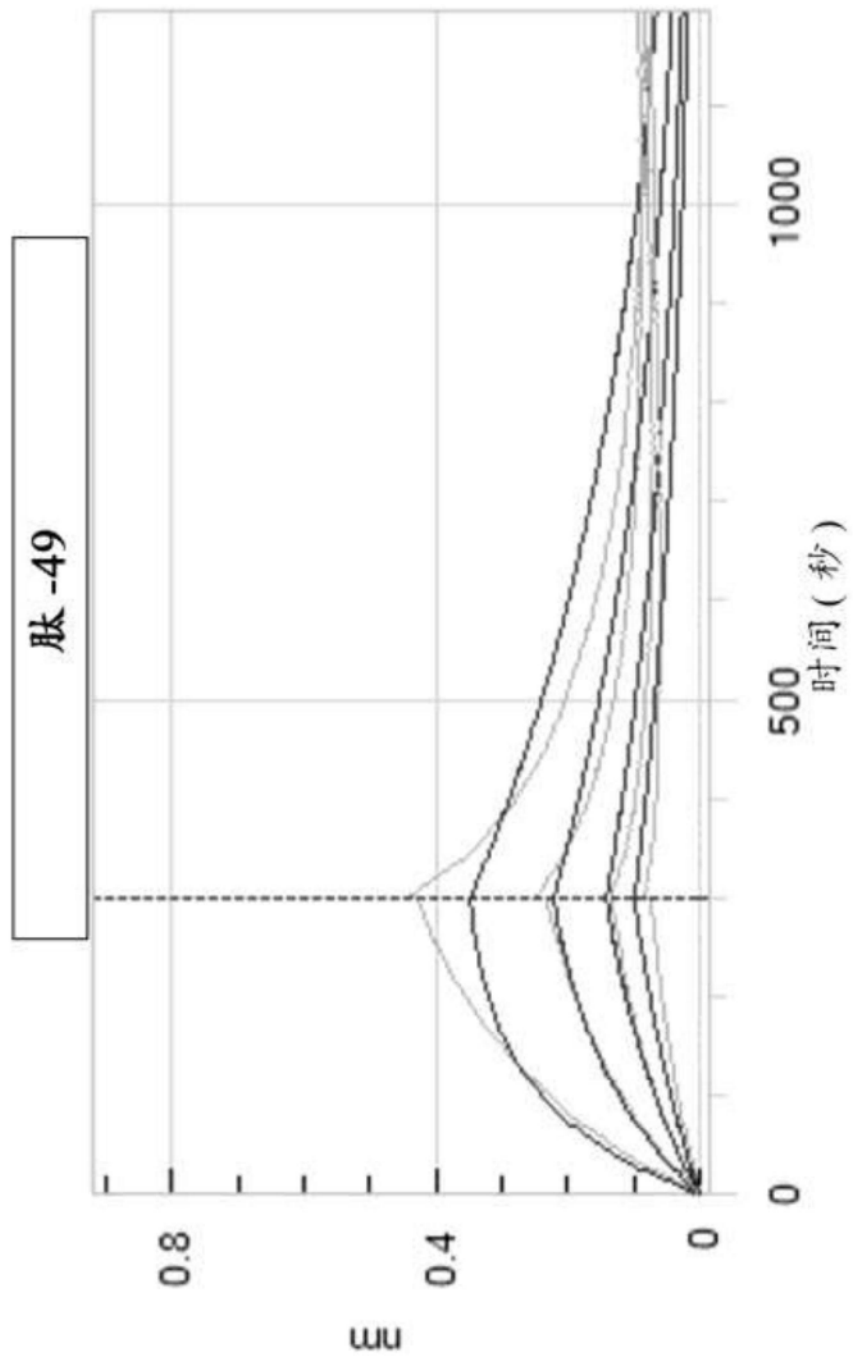


图10T

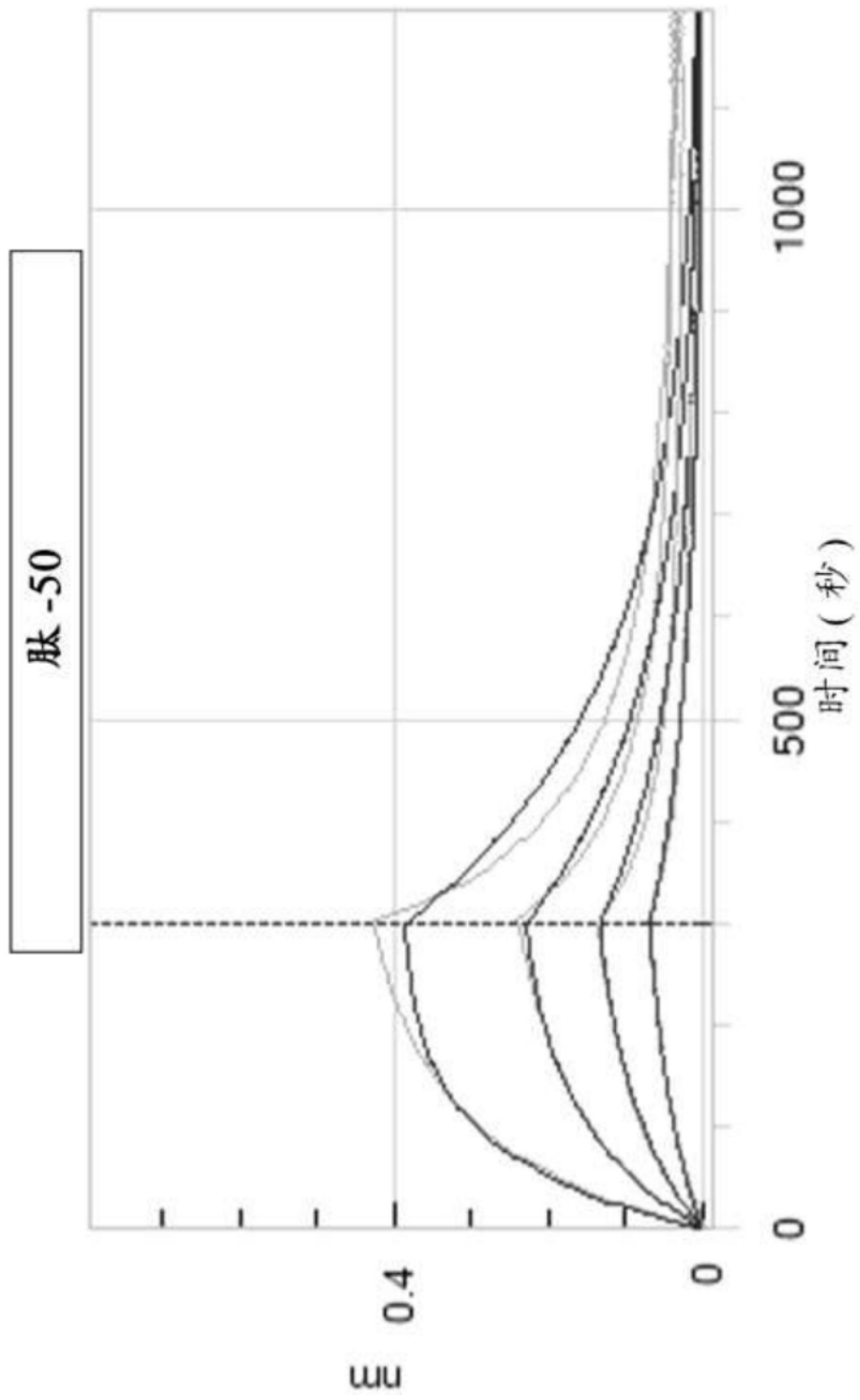


图10U

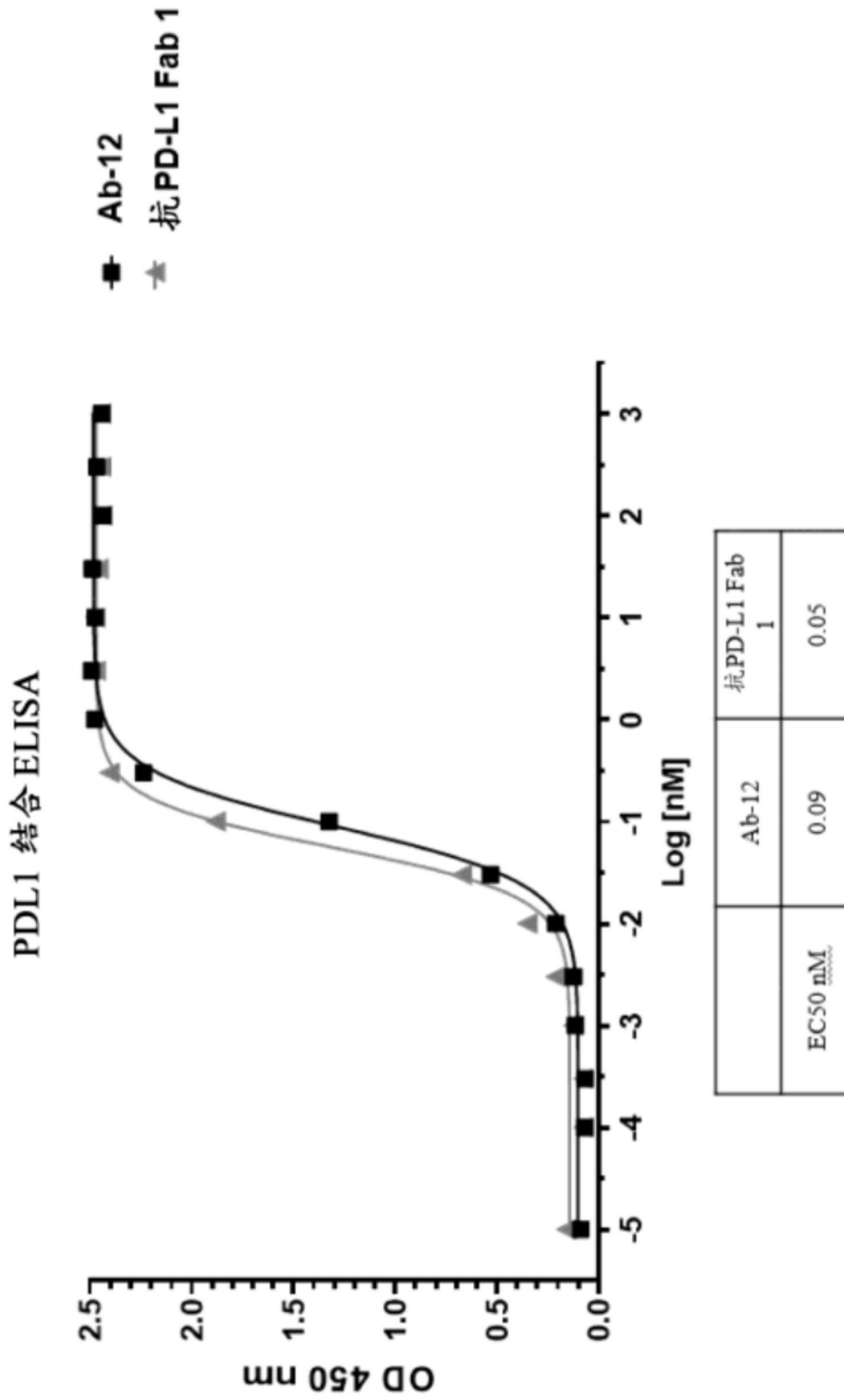


图11A

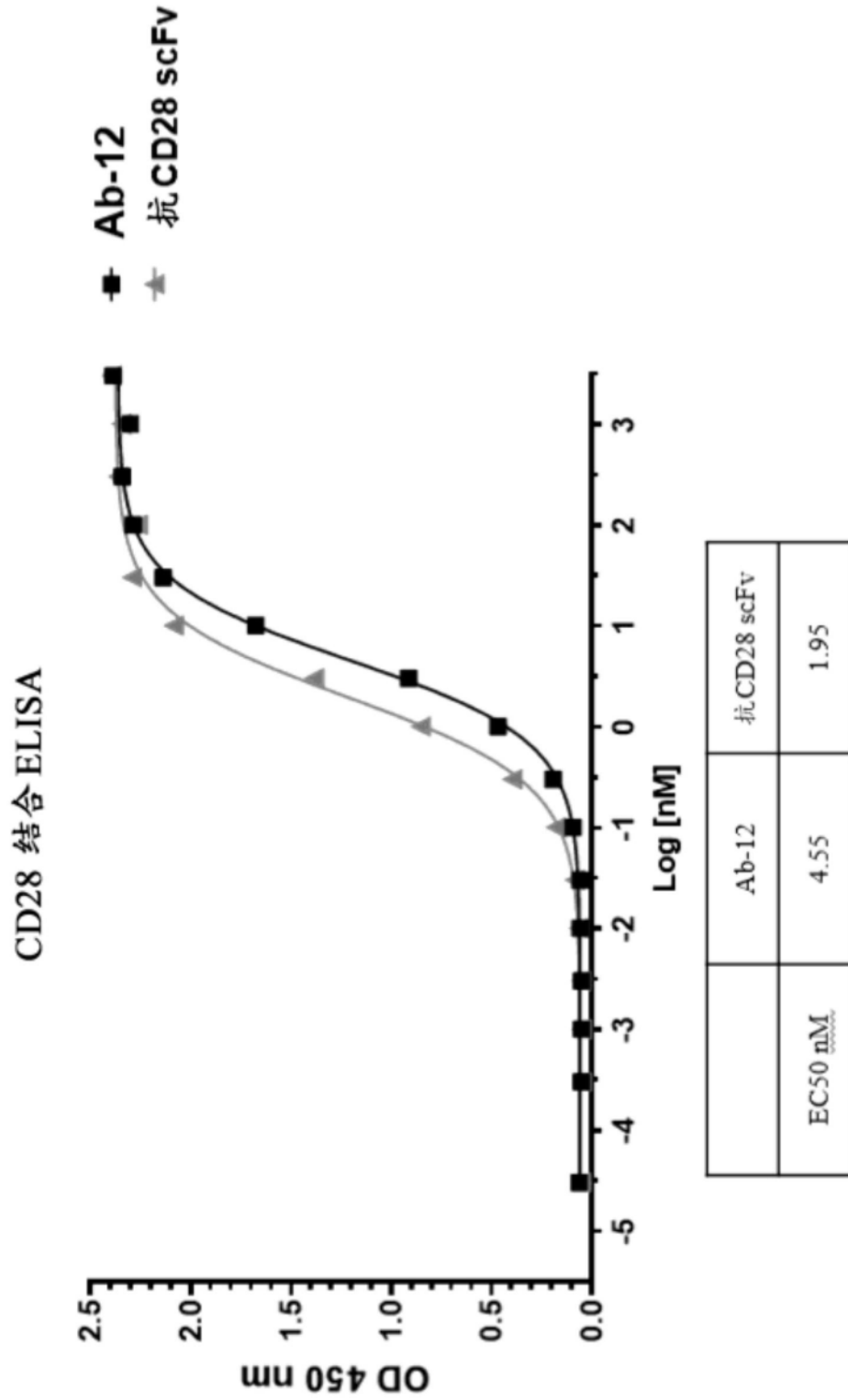


图11B

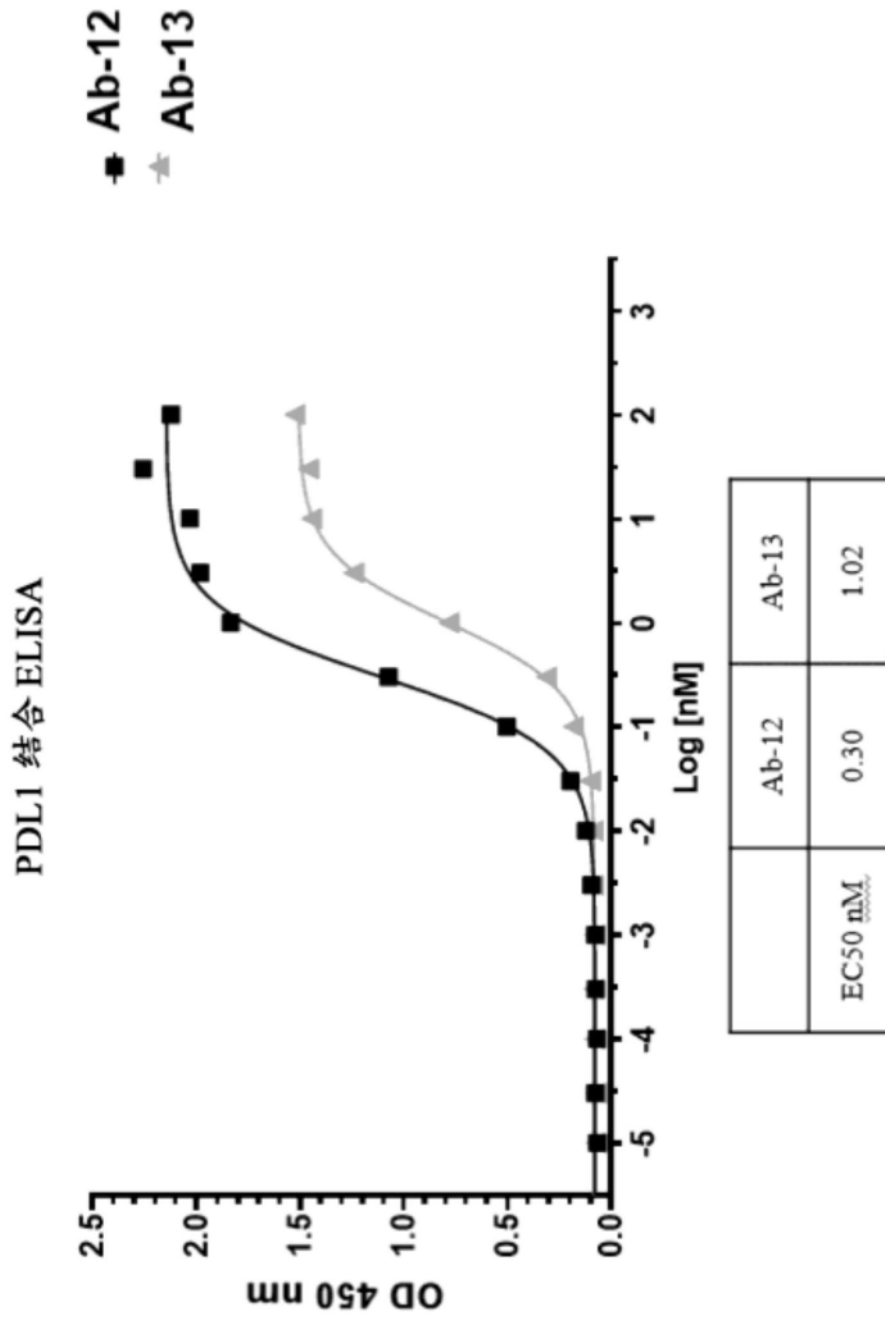


图11C

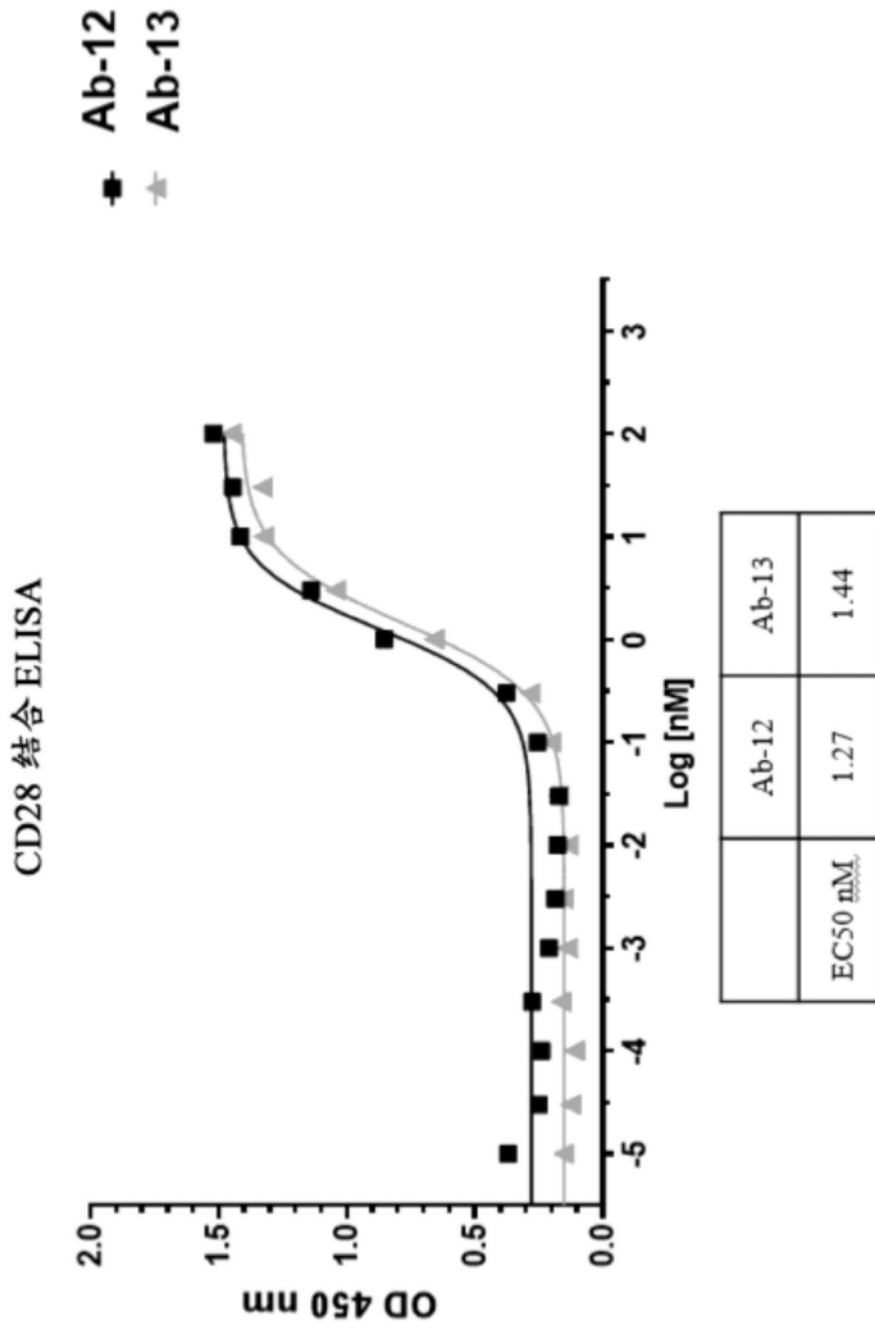
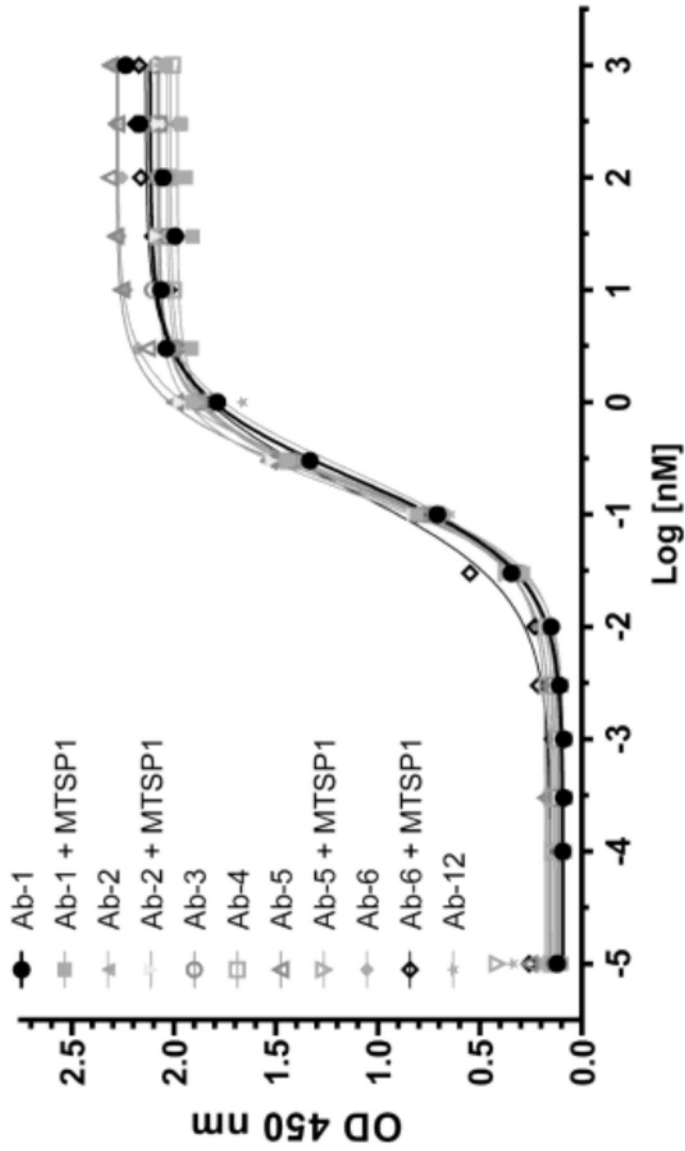


图11D

PDL1 结合 ELISA



Ab-1	Ab-1 + MTSP1	Ab-2	Ab-2 + MTSP1	Ab-3	Ab-4	Ab-5	Ab-5 + MTSP1	Ab-6	Ab-6 + MTSP1	Ab-12
0.25	0.16	0.18	0.15	0.16	0.17	0.19	0.16	0.23	0.17	0.26

图11E

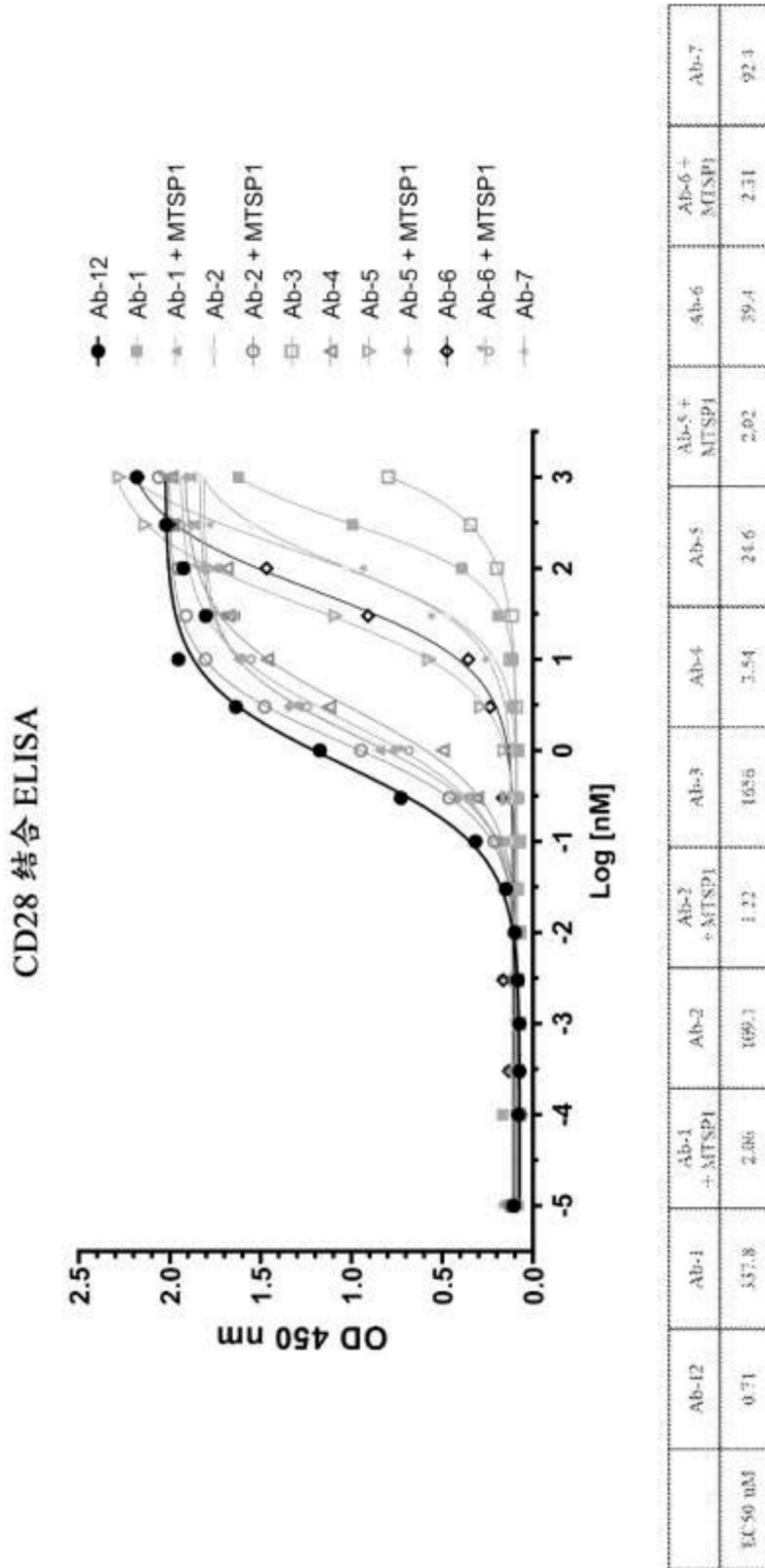
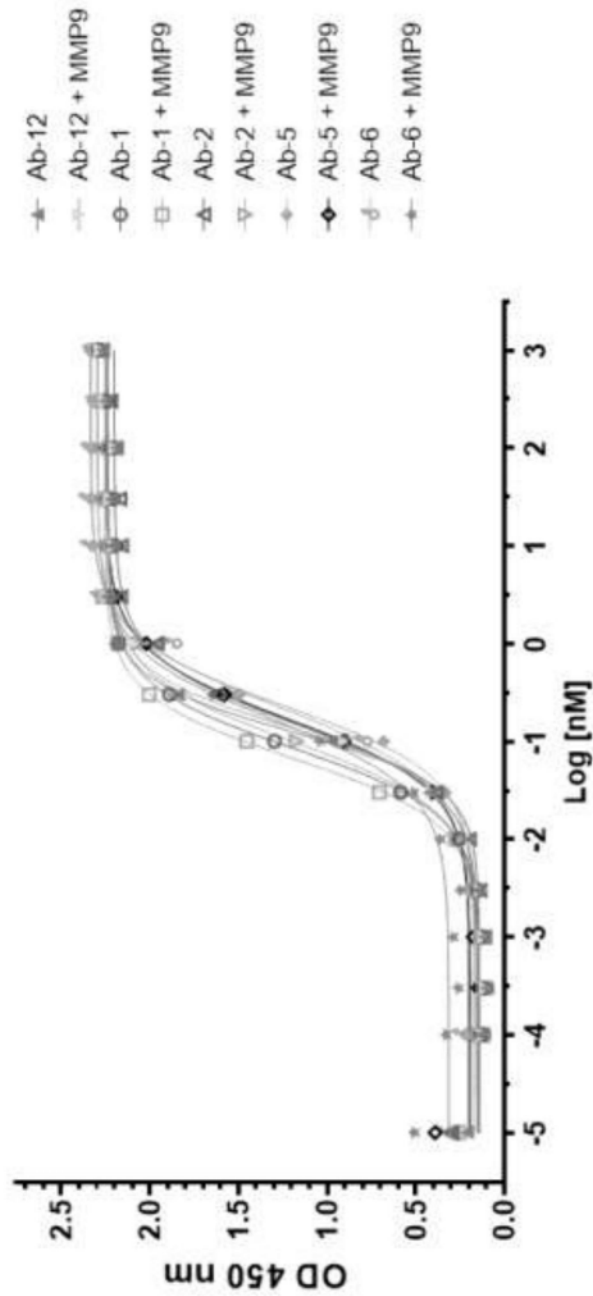


图11F

PDL1 结合 ELISA



	Ab-12	Ab-12 + MMP9	Ab-1	Ab-1 + MMP9	Ab-2	Ab-2 + MMP9	Ab-5	Ab-5 + MMP9	Ab-6	Ab-6 + MMP9
EC50 nM	0.13	0.14	0.09	0.07	0.17	0.11	0.22	0.17	0.20	0.14

图11G

CD28 结合 ELISA

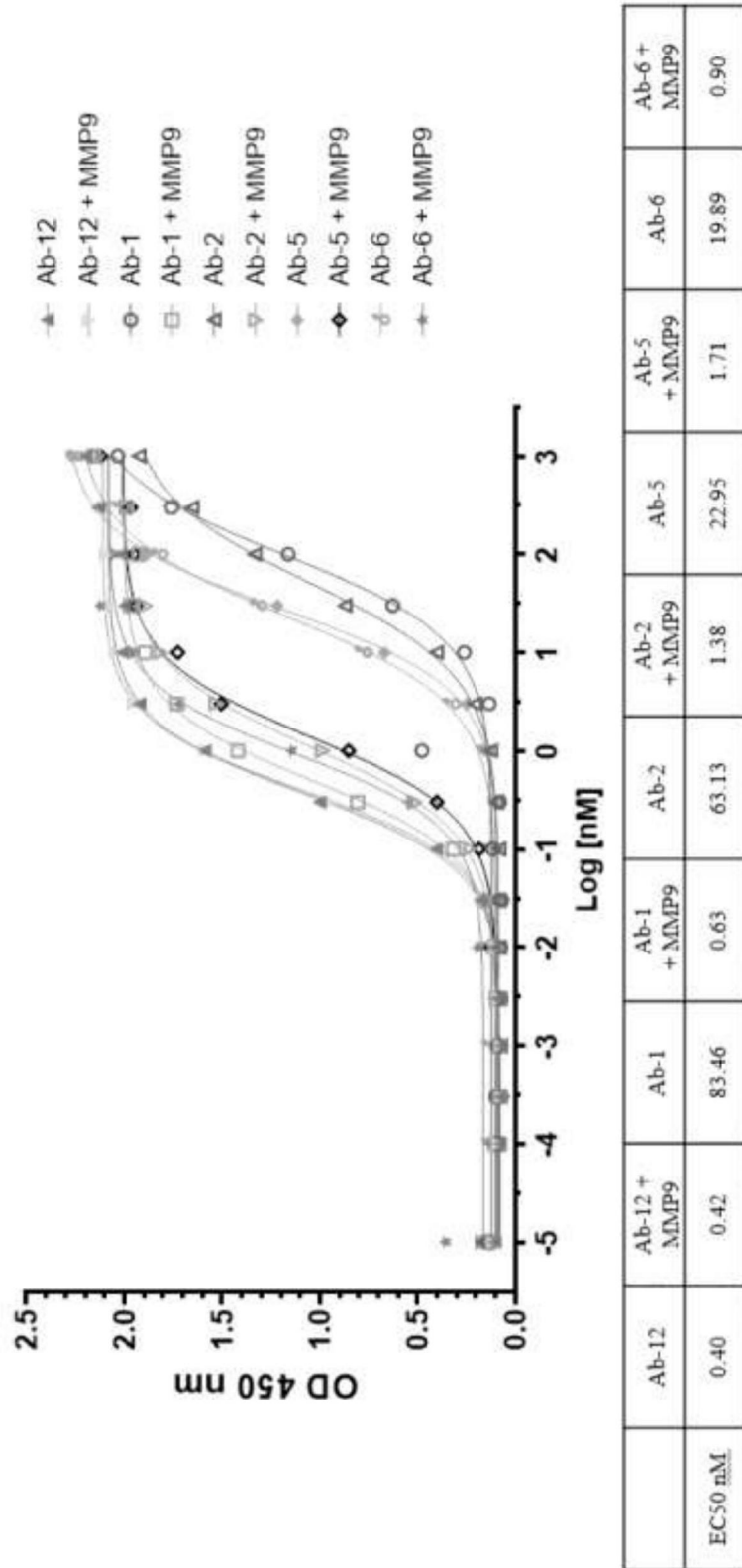


图11H

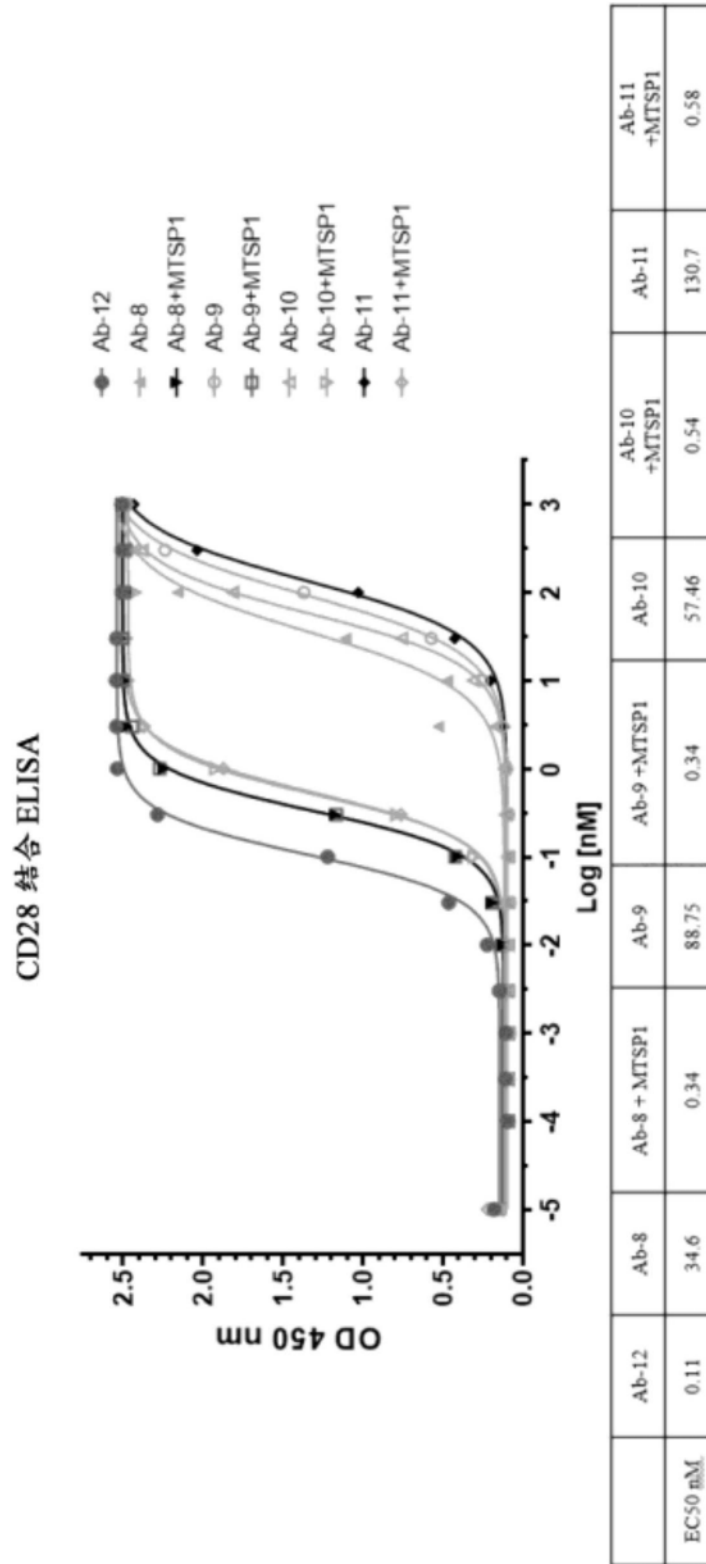


图11I

CD28 结合 ELISA

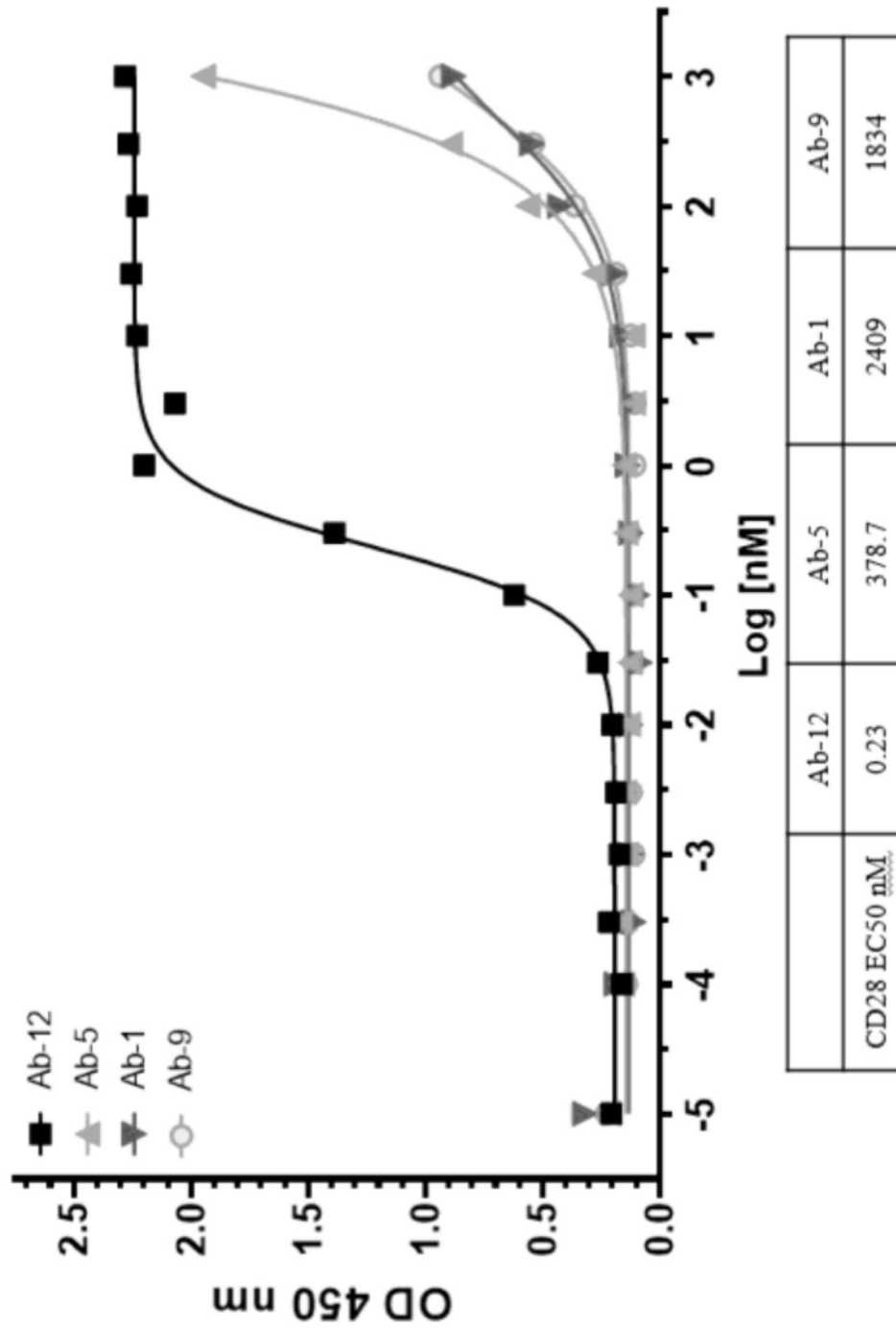


图11J

PDL1 结合 ELISA

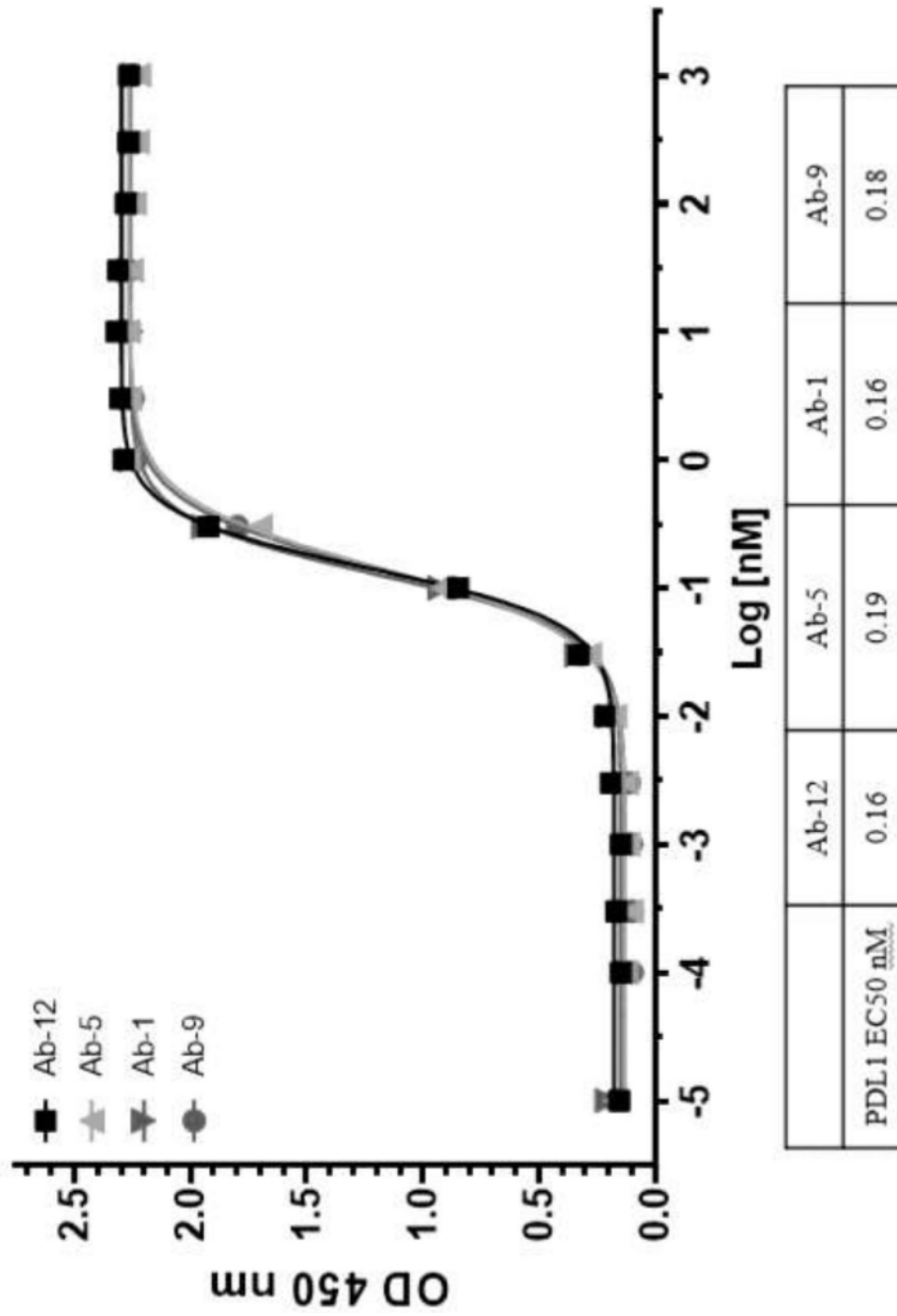


图11K

PDL1 结合 ELISA

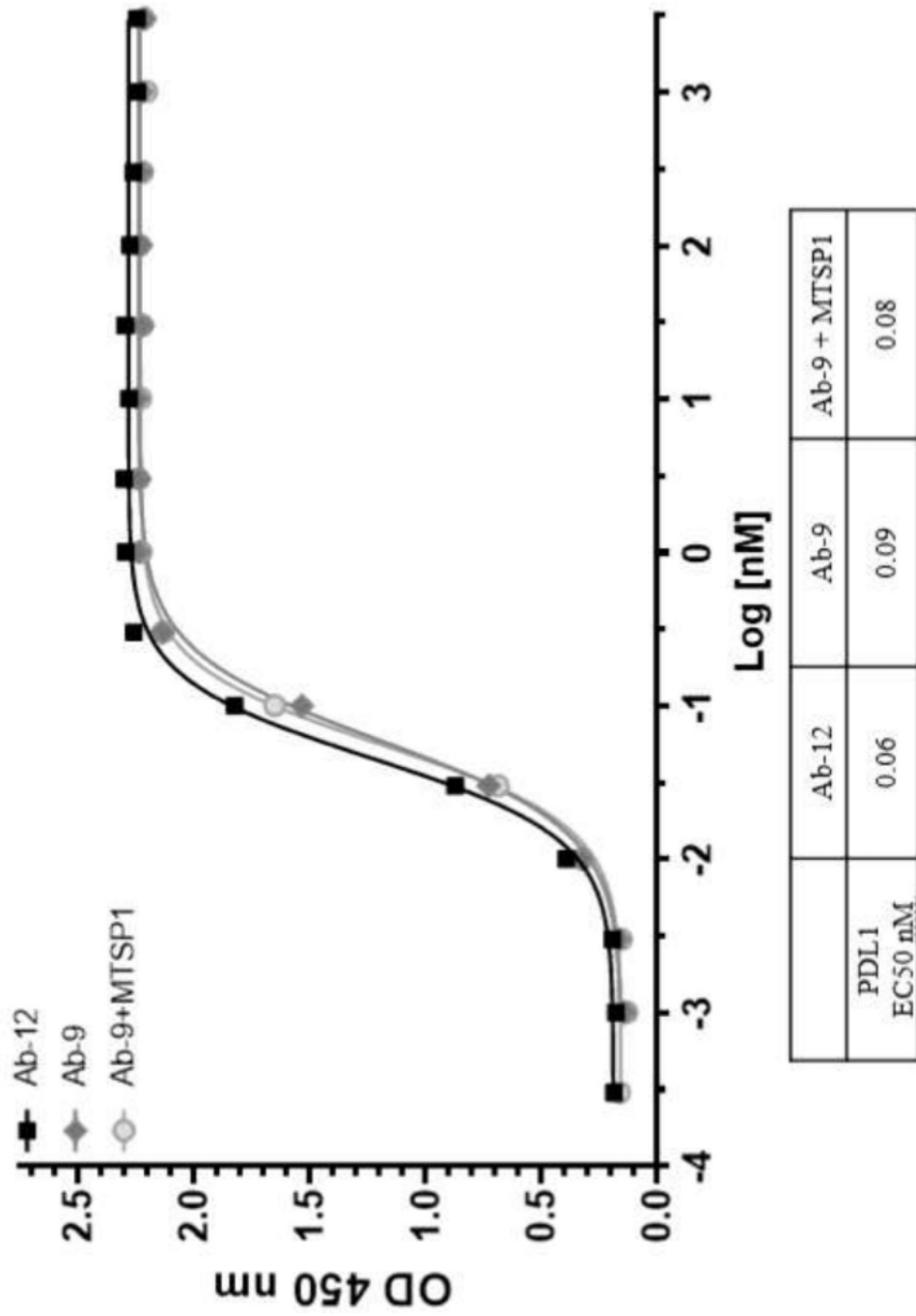
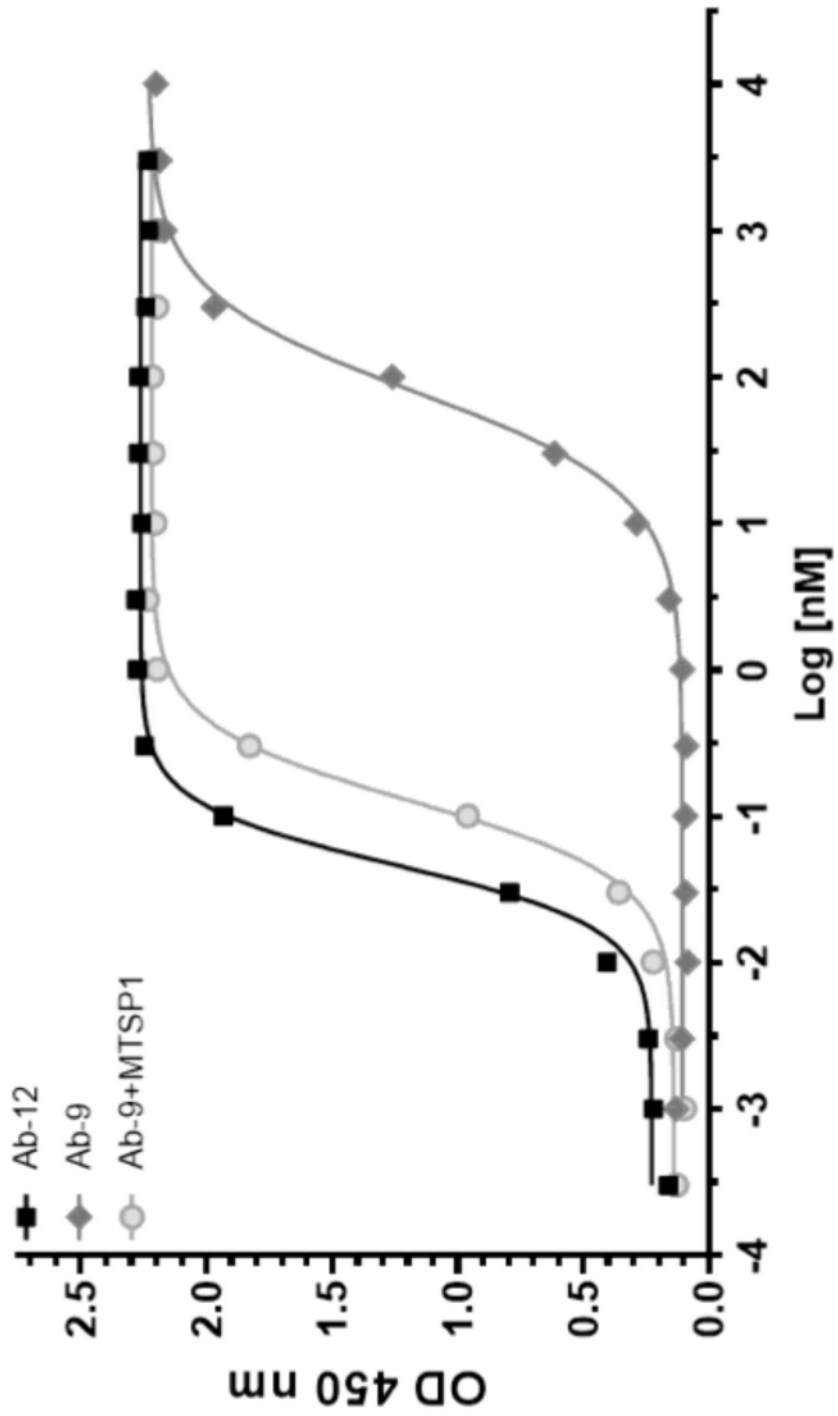


图11L

CD28 结合 ELISA



	Ab-12	Ab-9	Ab-9 + MTSP1
CD28 EC50 nM	0.06	119.1	0.18

图11M

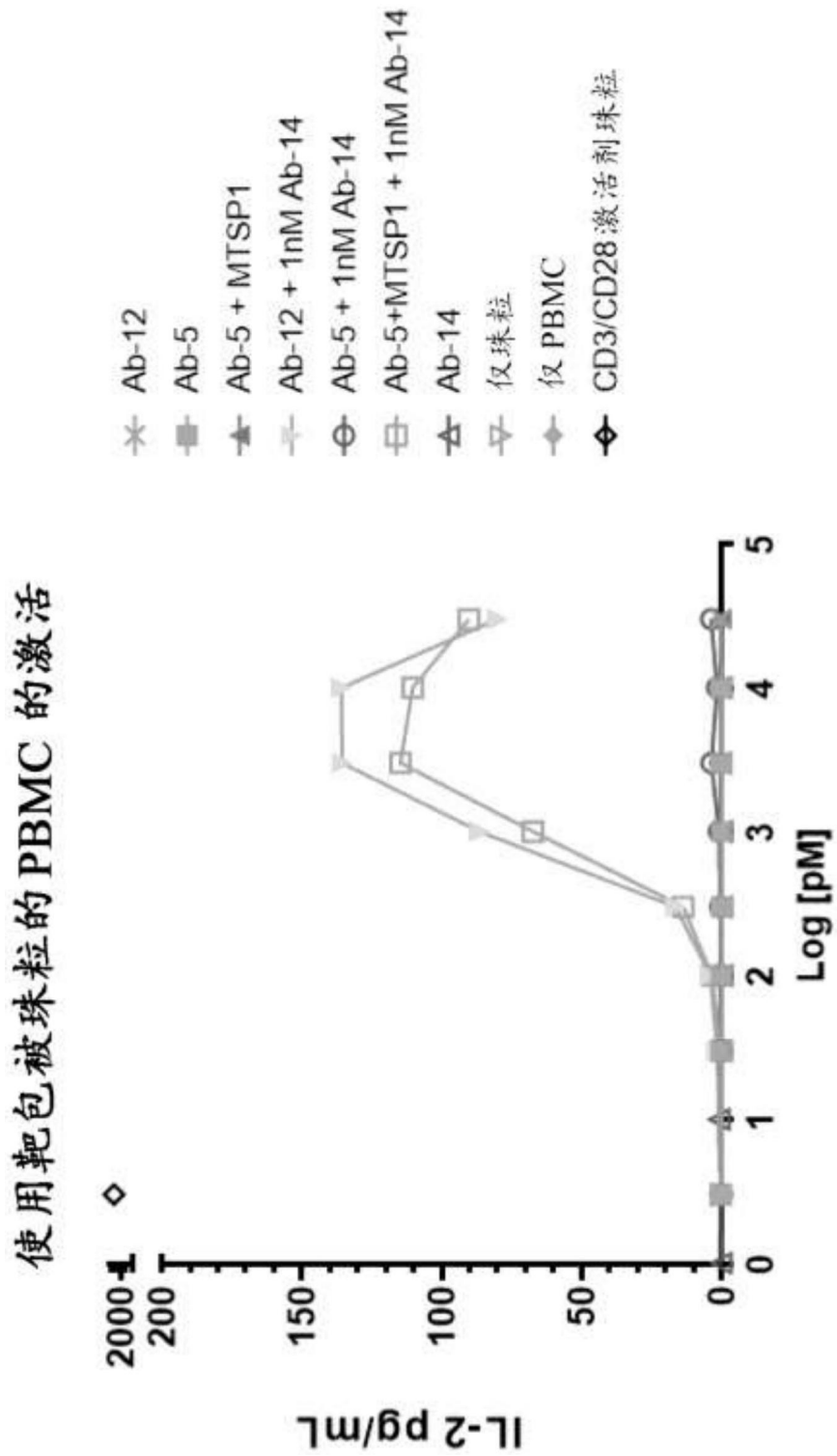


图12A

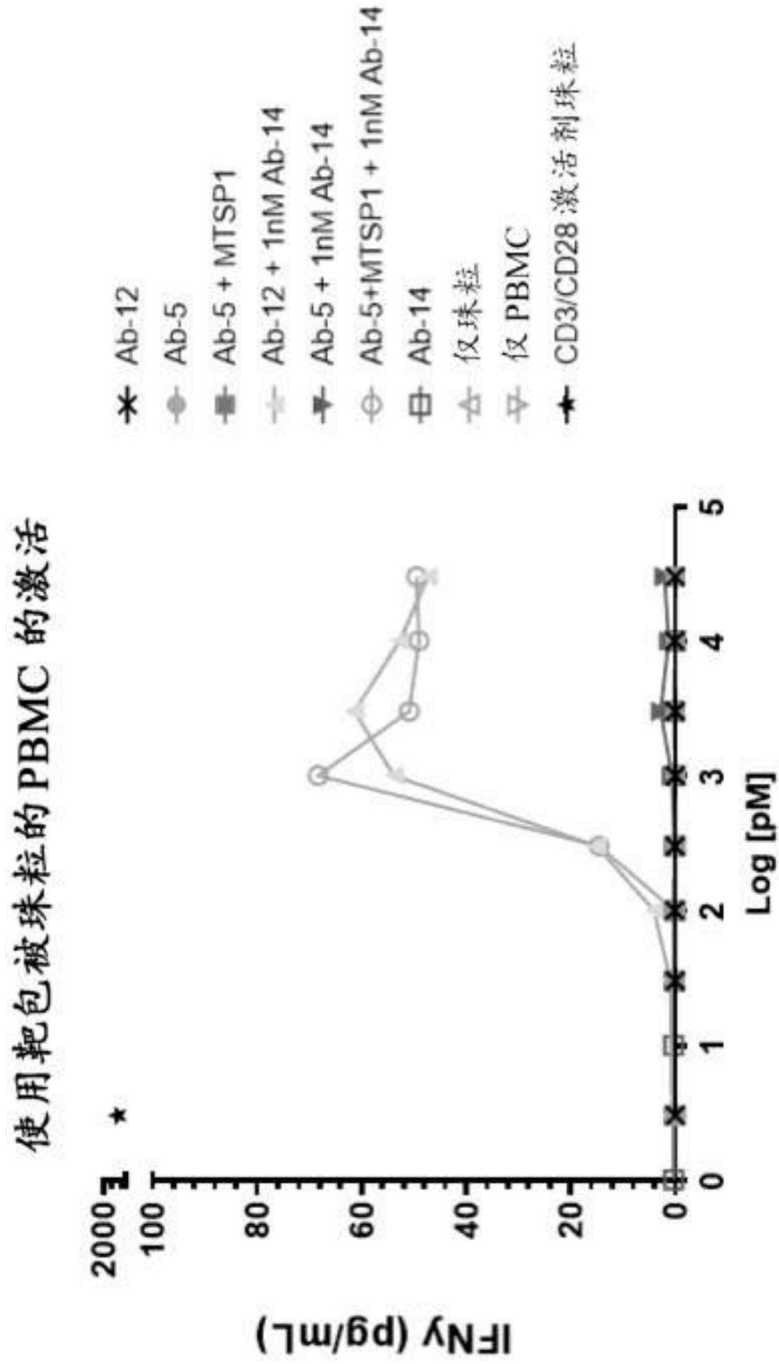


图12B

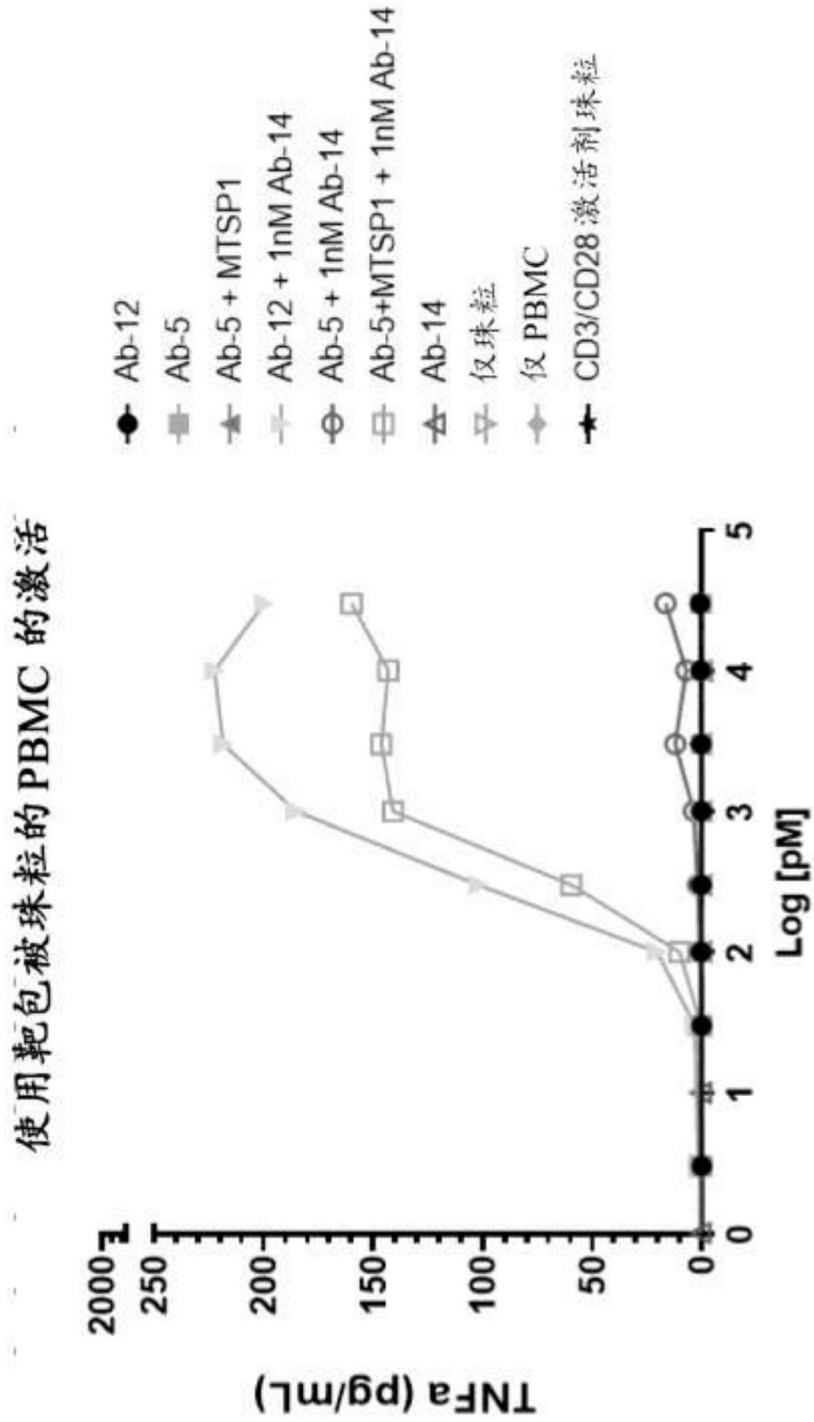


图12C

使用靶包被珠粒的PBMC的激活

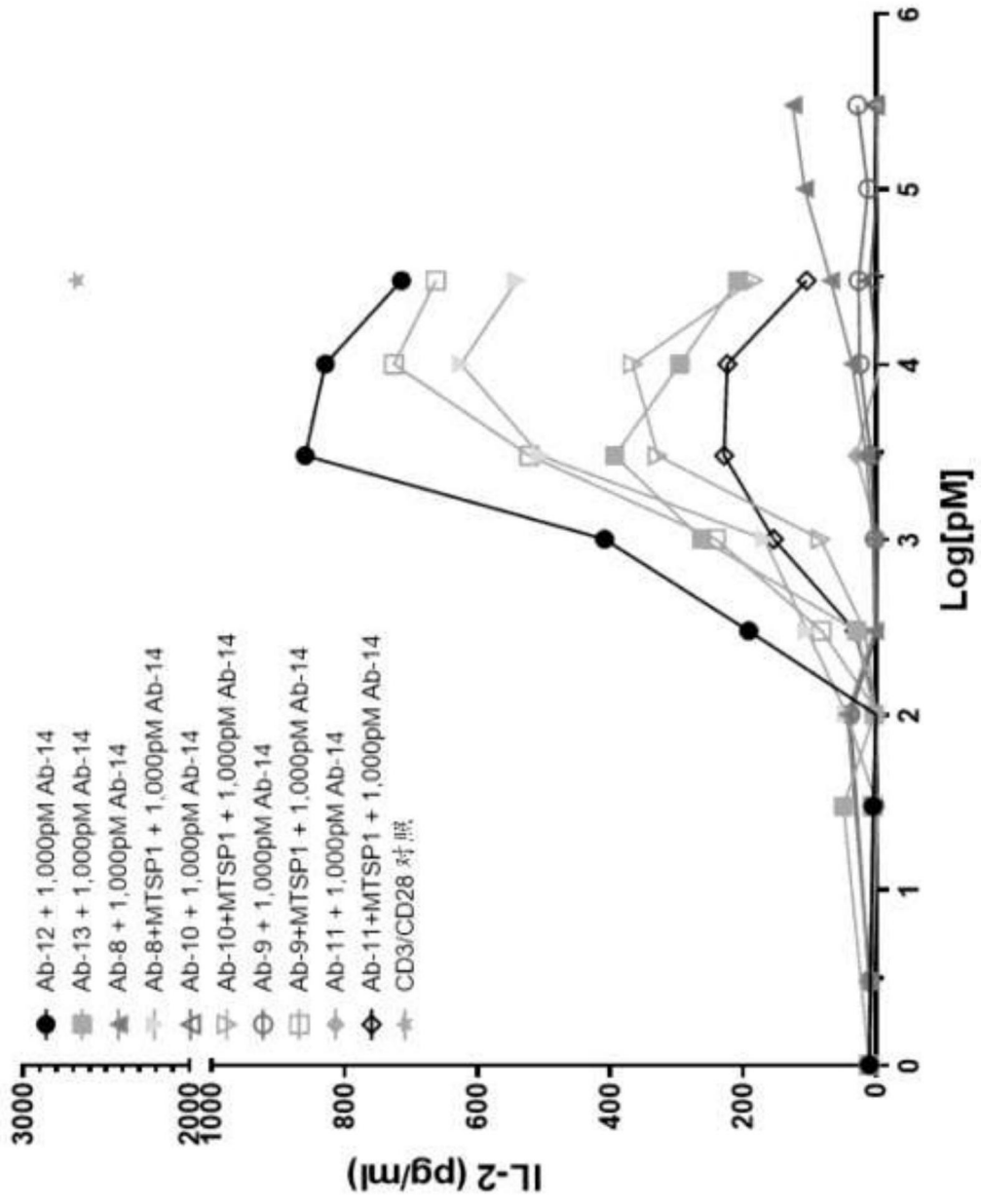


图12D

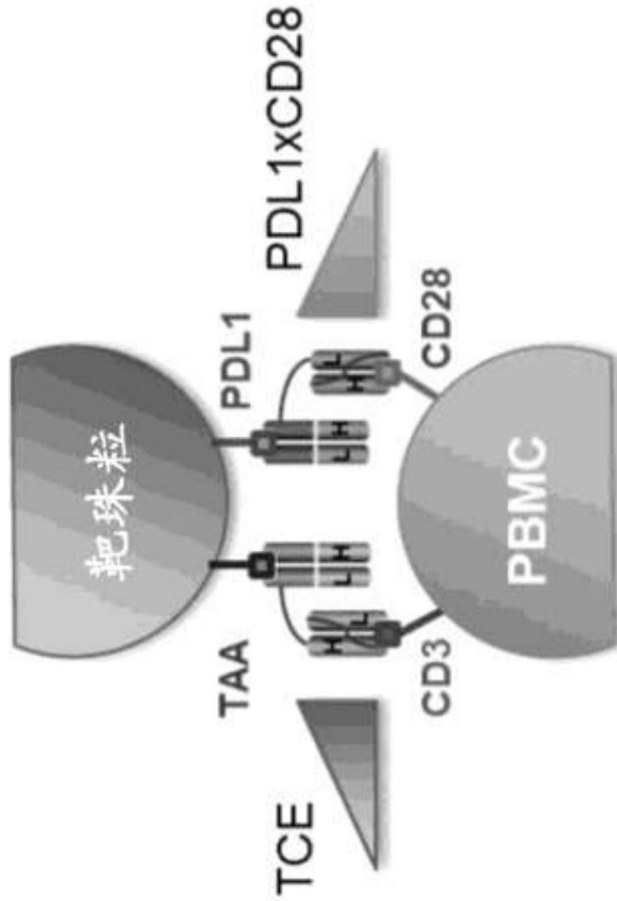


图12E

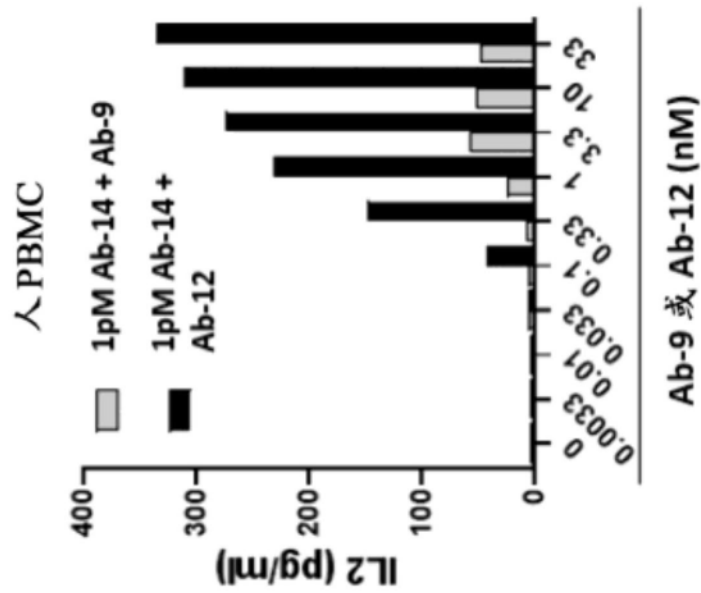


图13A

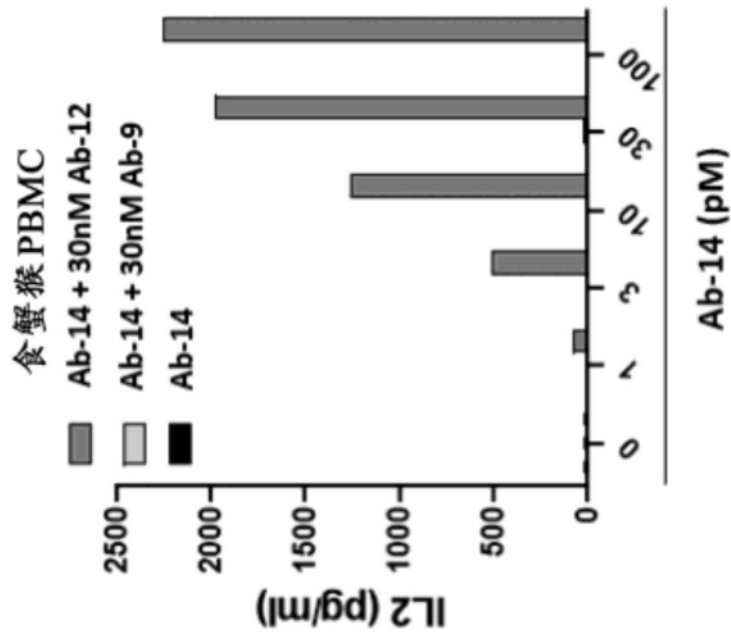


图13B

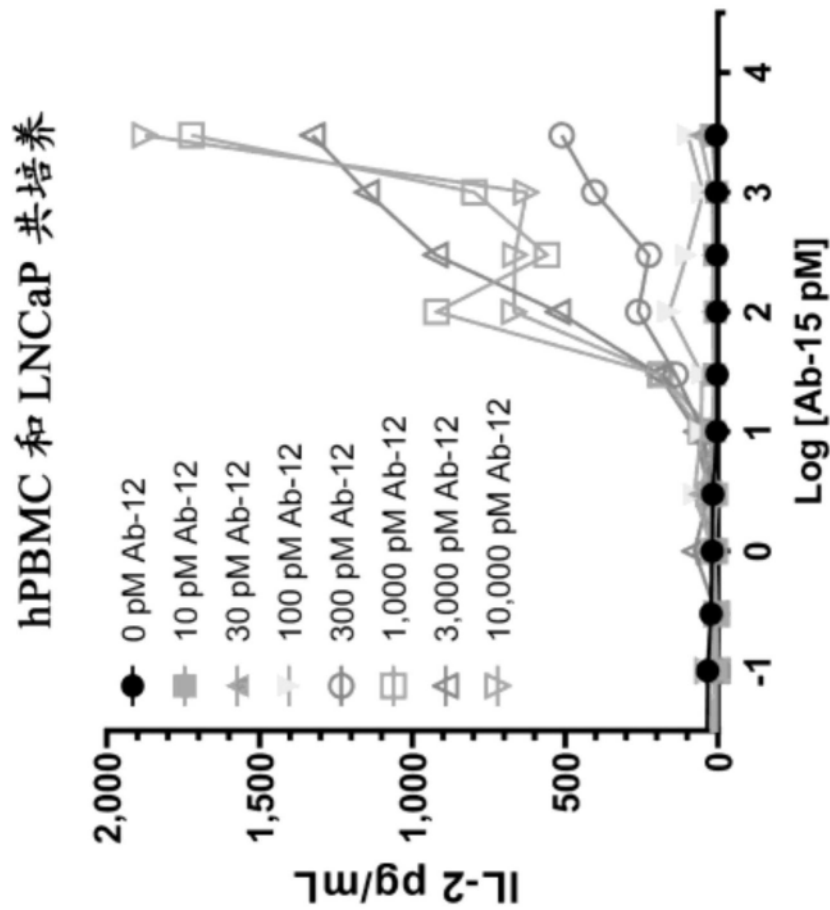


图14A

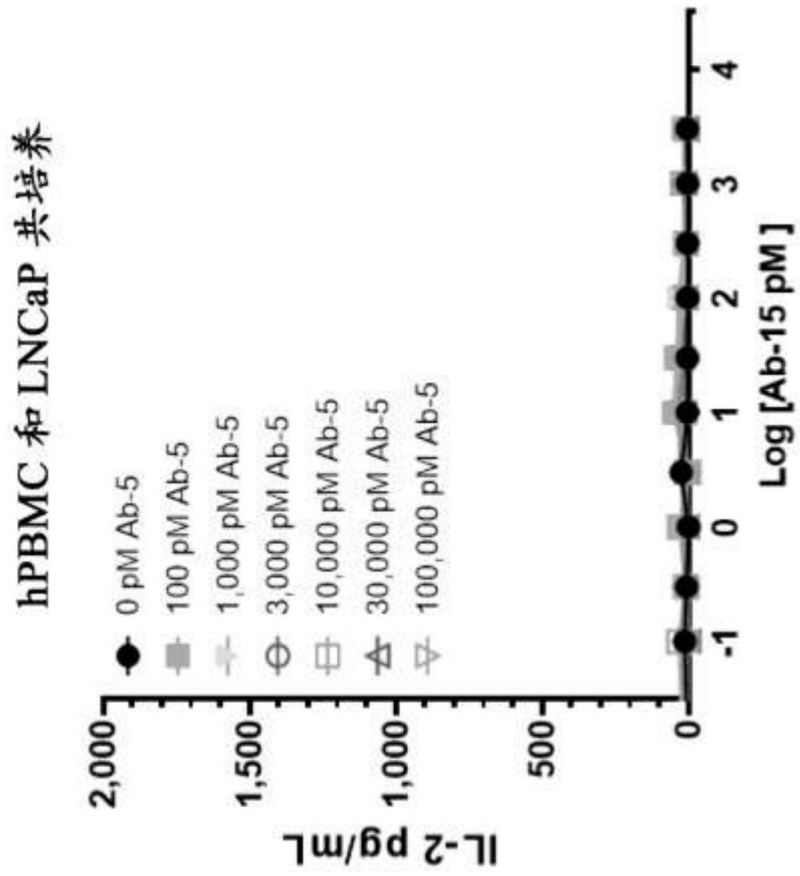


图14B

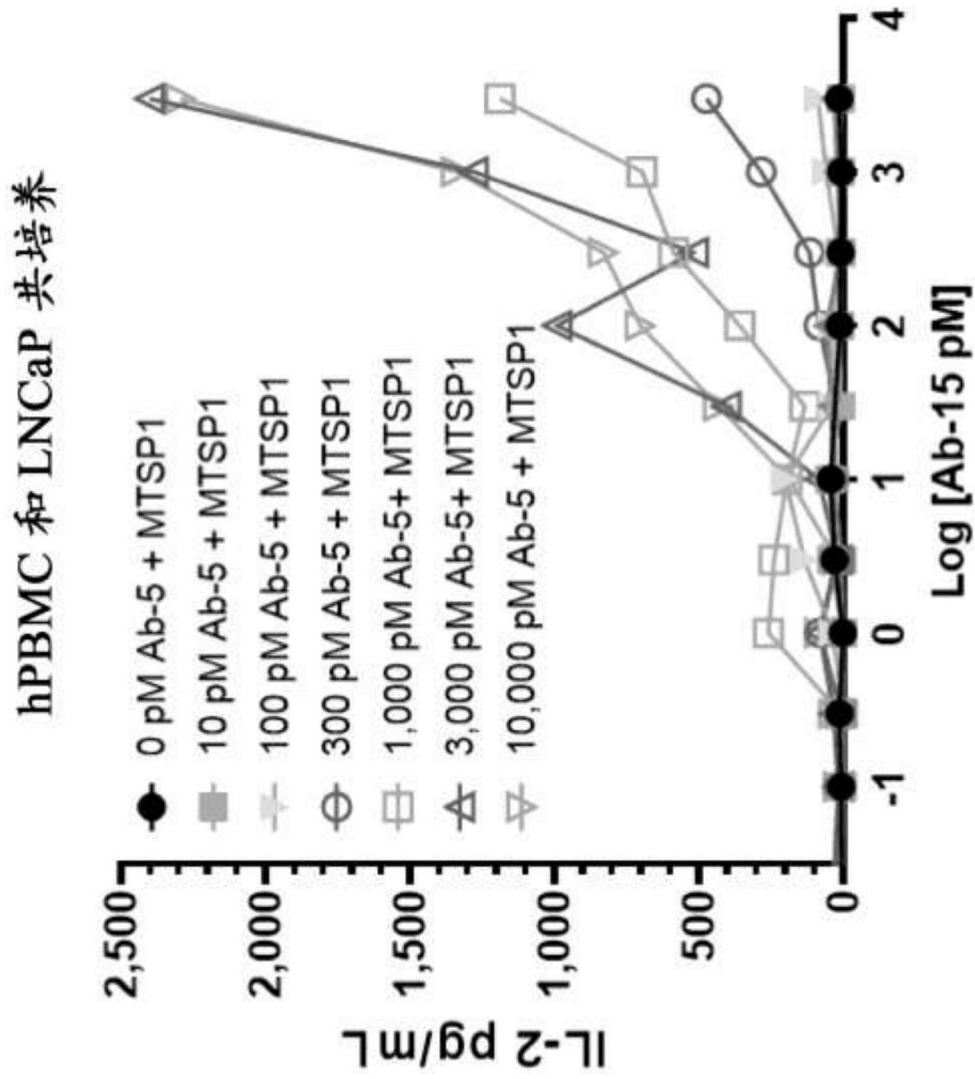


图14C

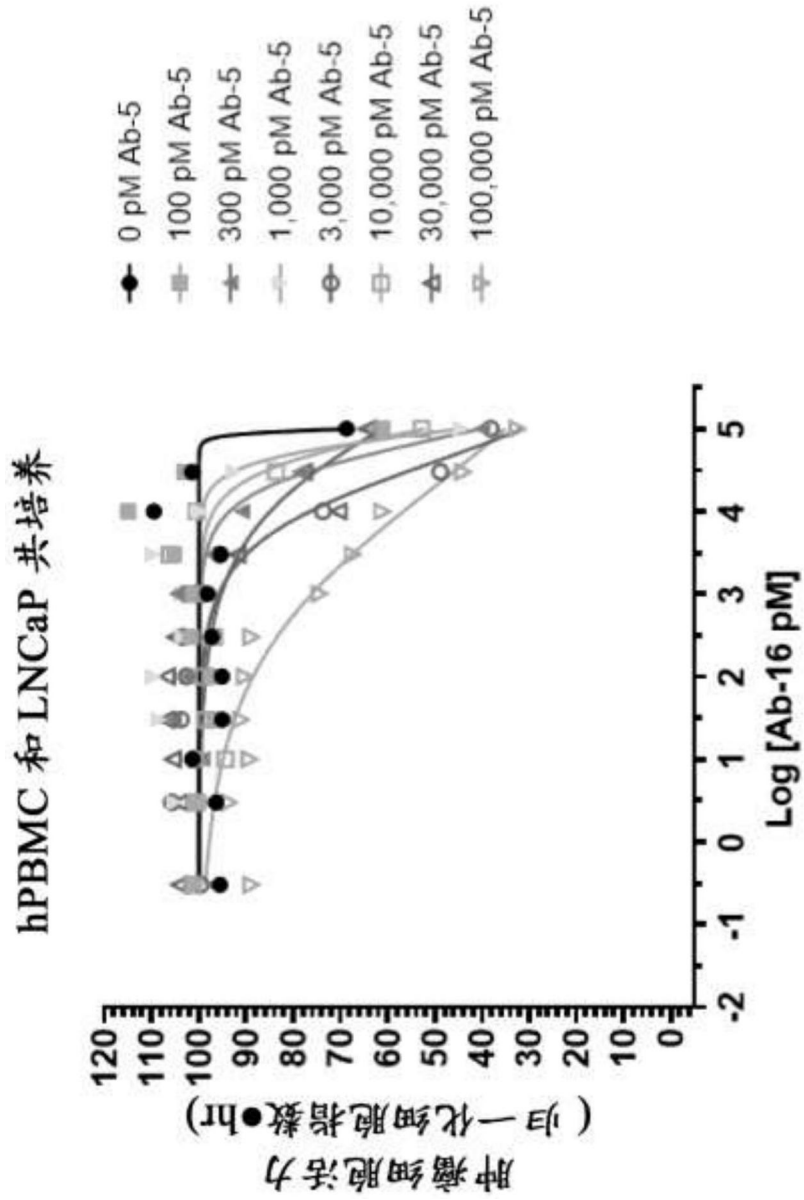


图14D

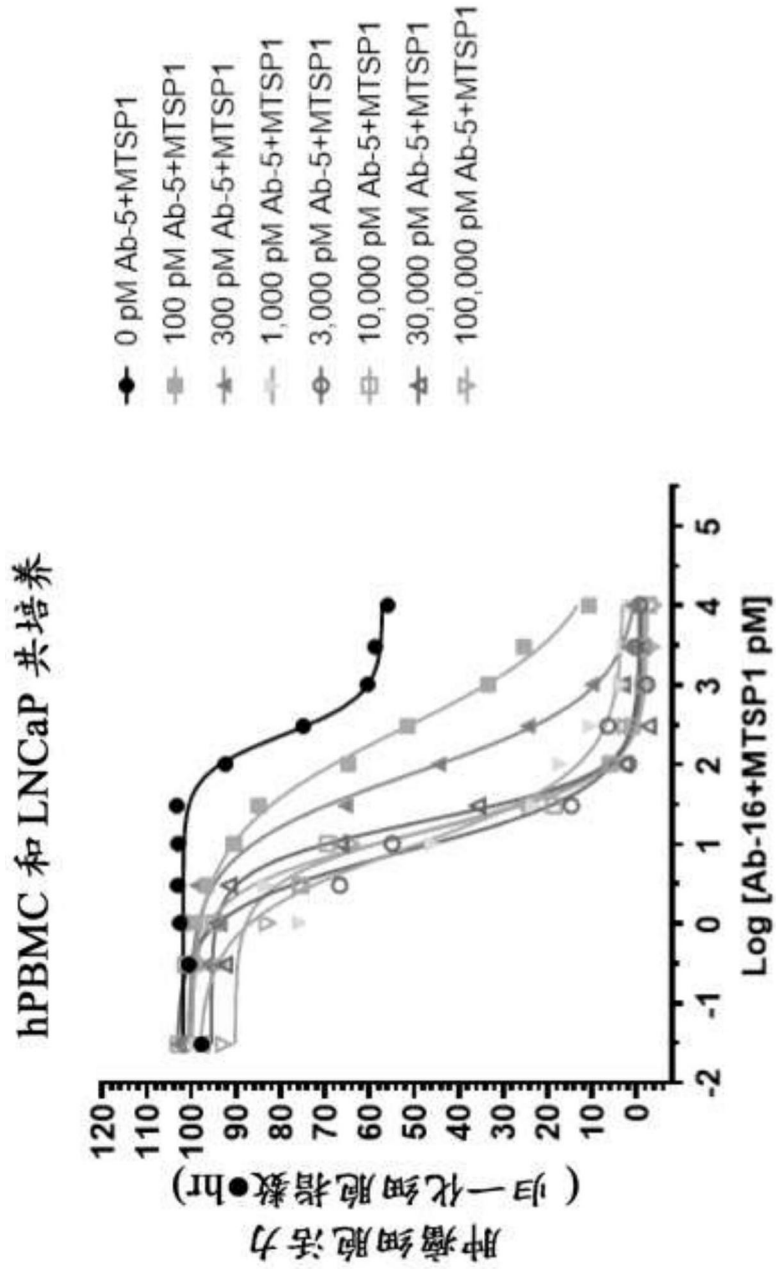


图14E

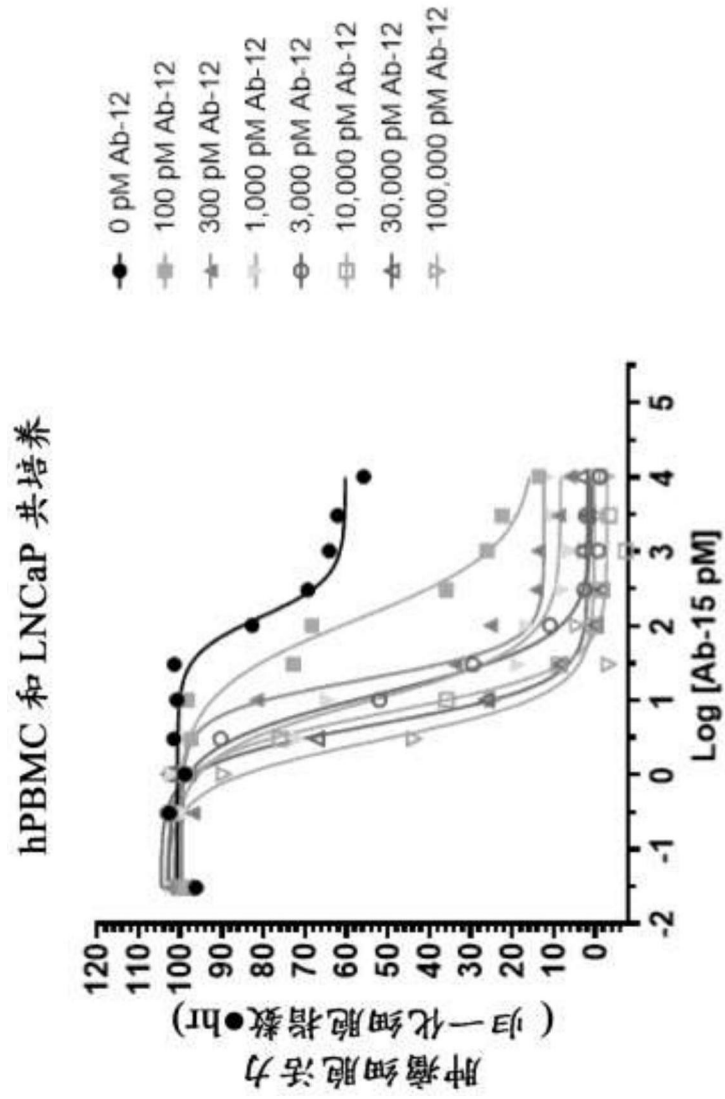


图14F

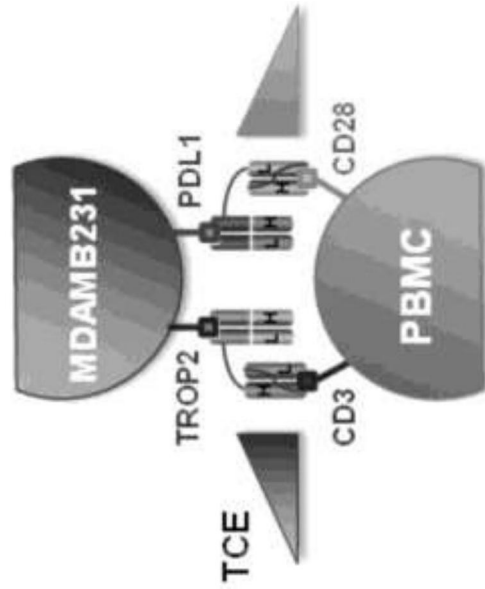


图15A

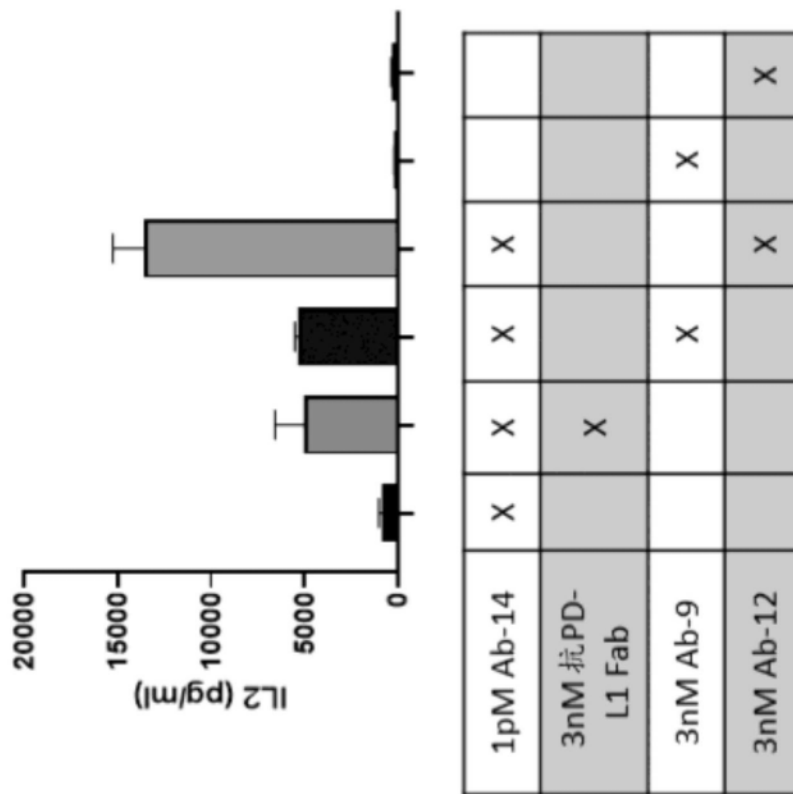


图15B

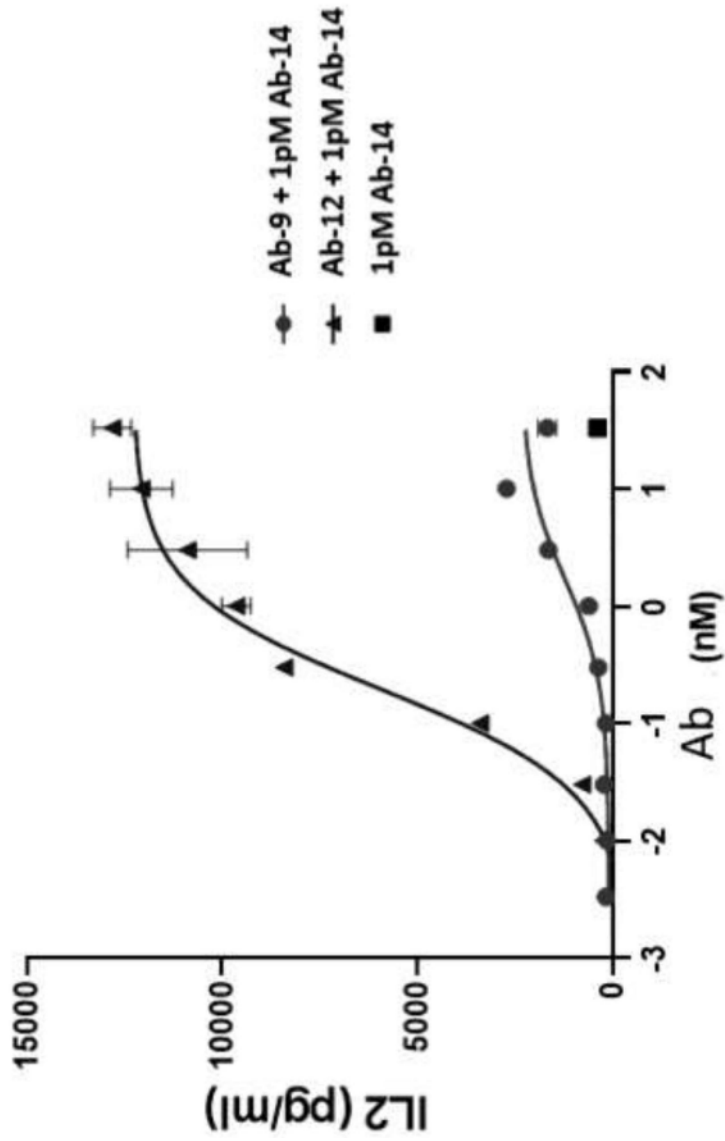


图16A

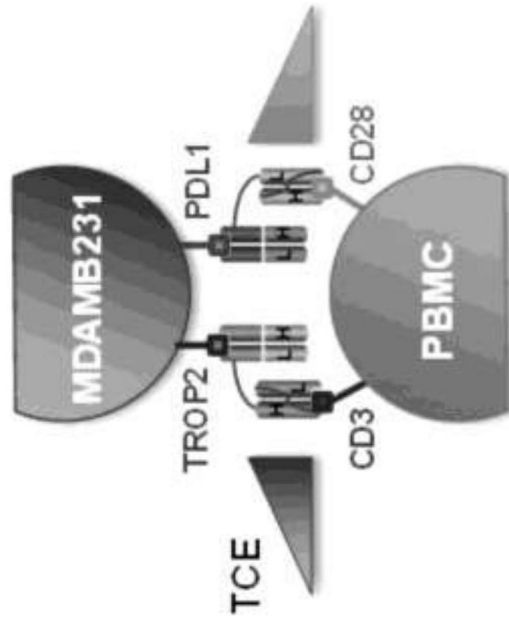


图16B

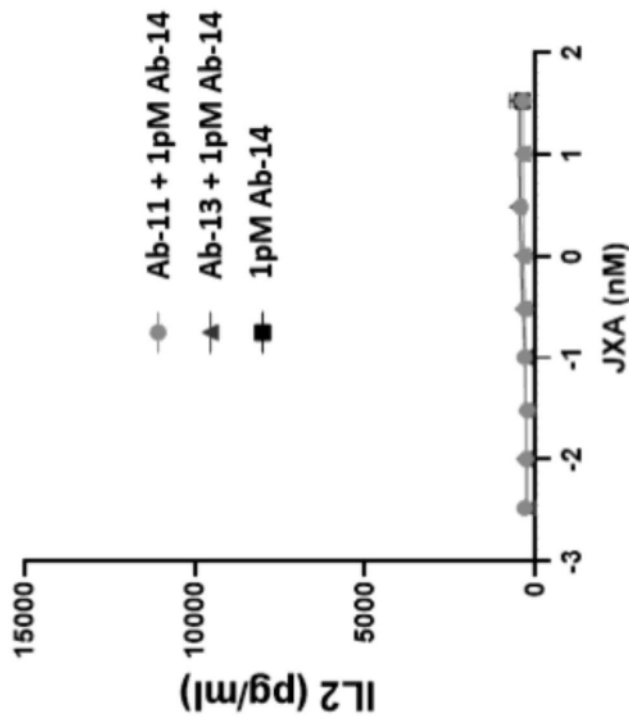


图16C

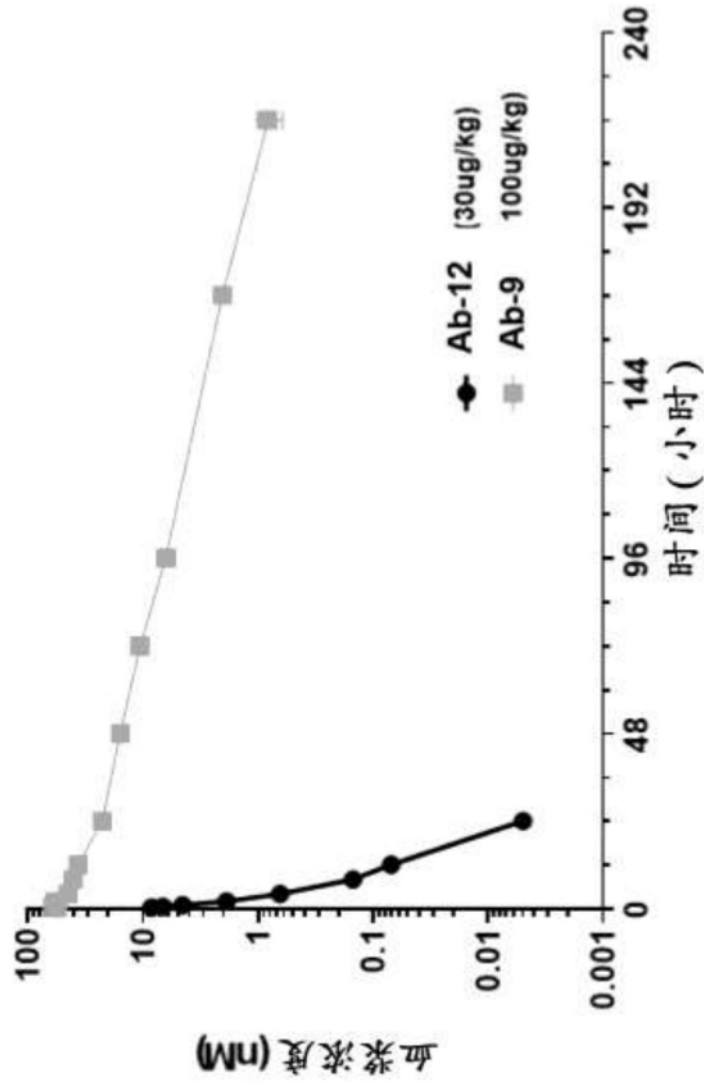


图17

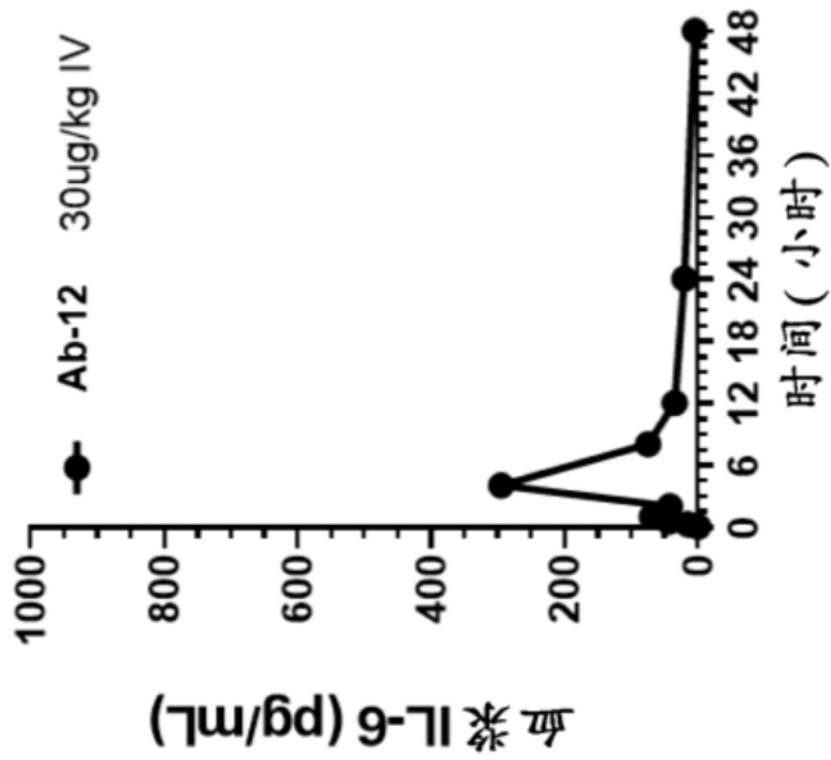


图18A

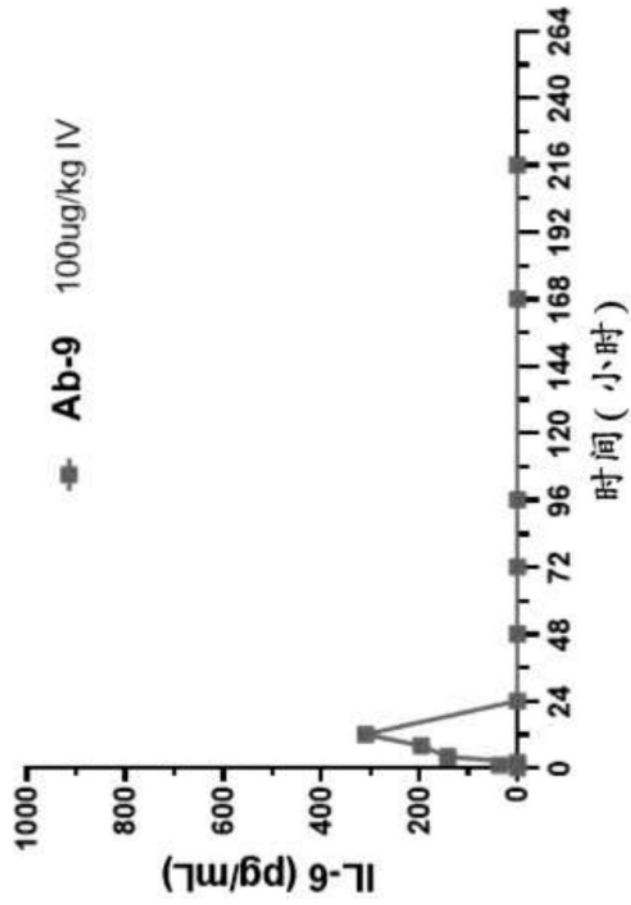


图18B

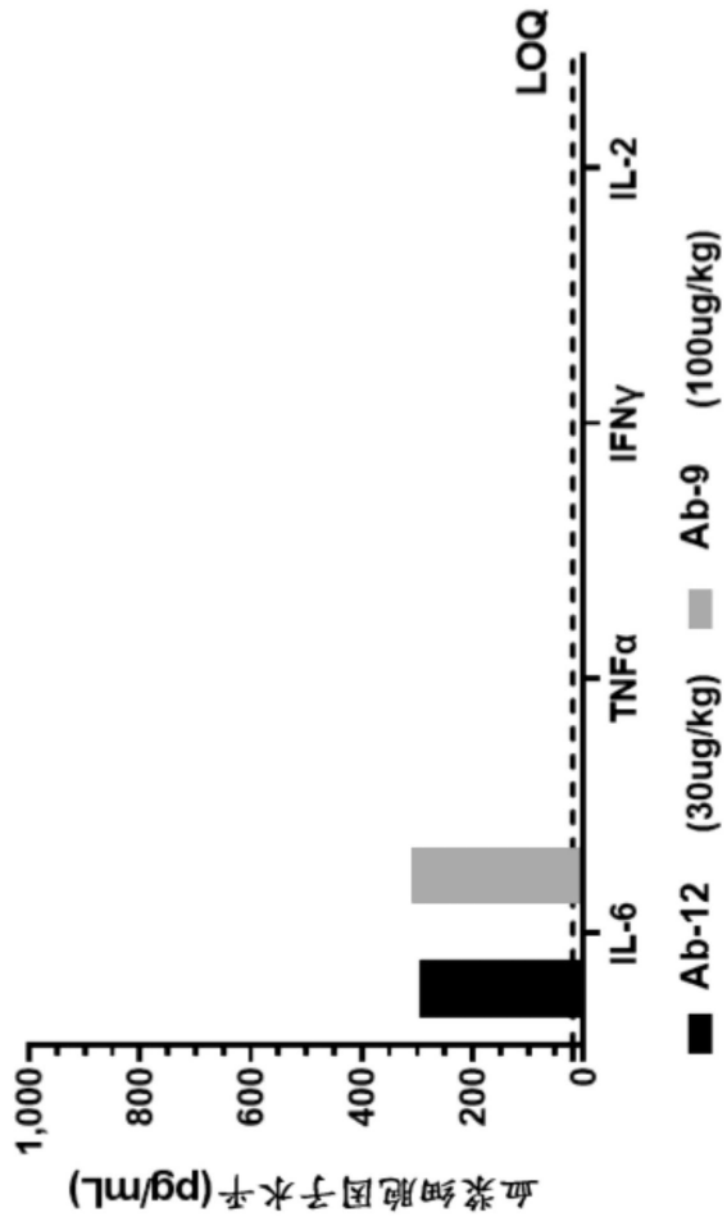


图18C

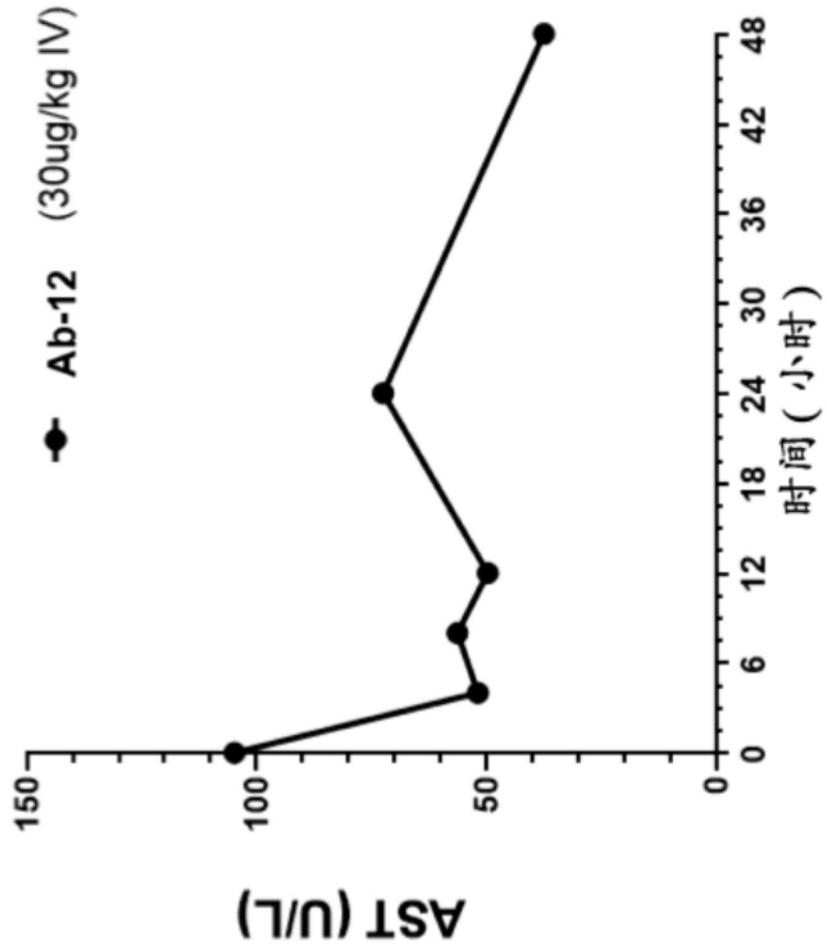


图19A

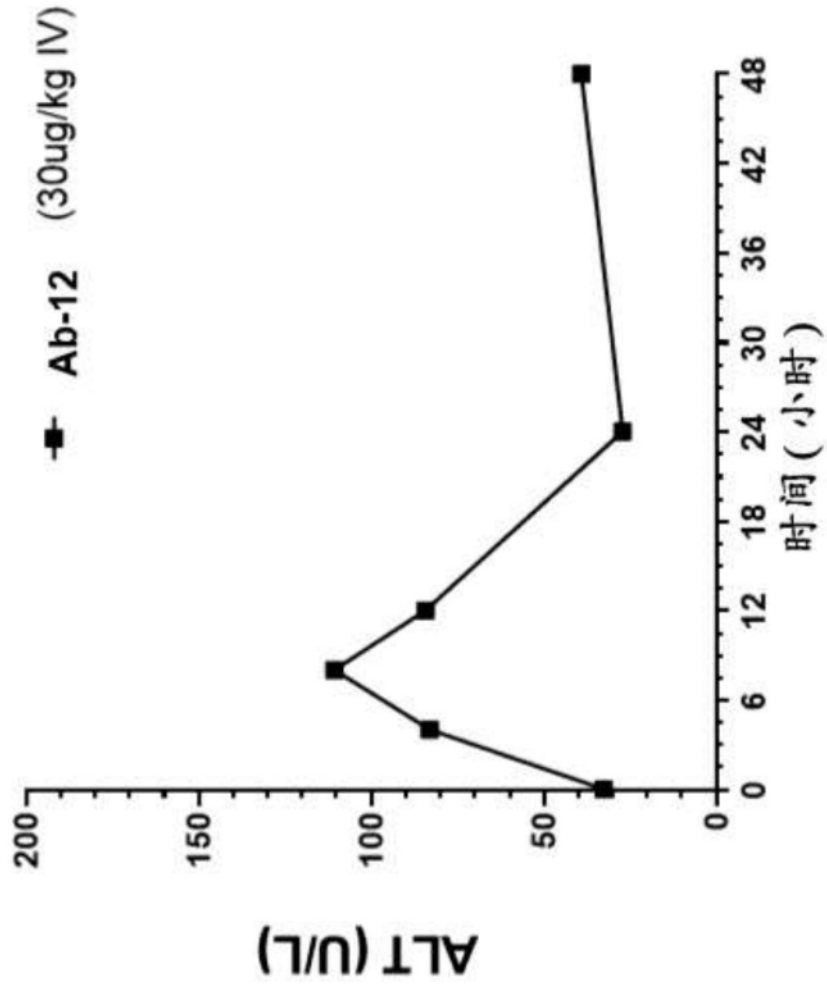


图19B

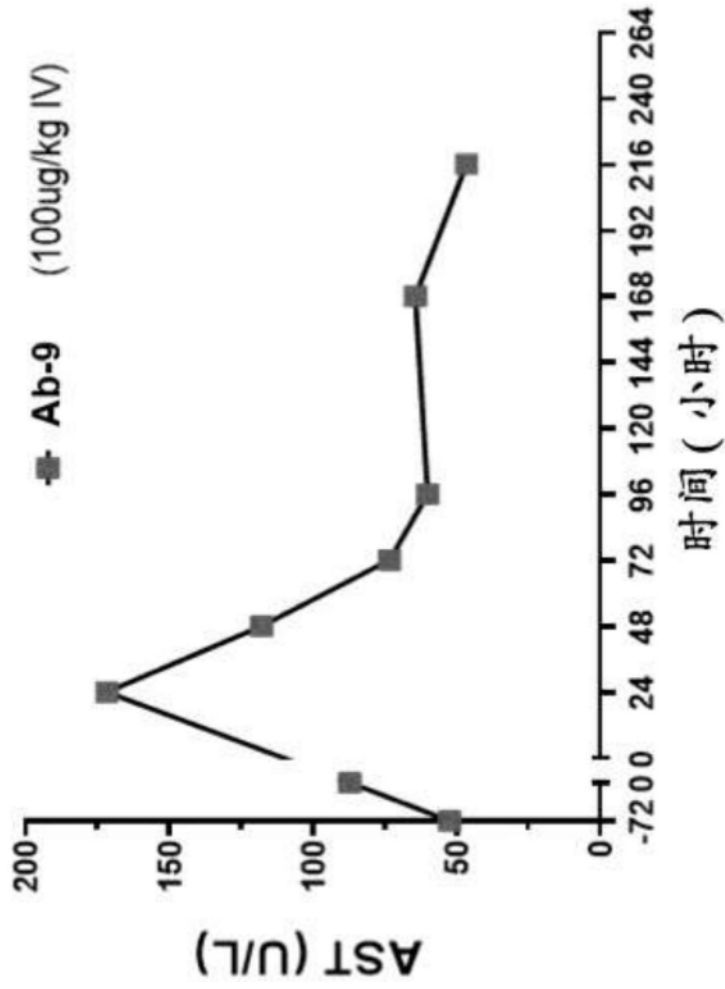


图19C

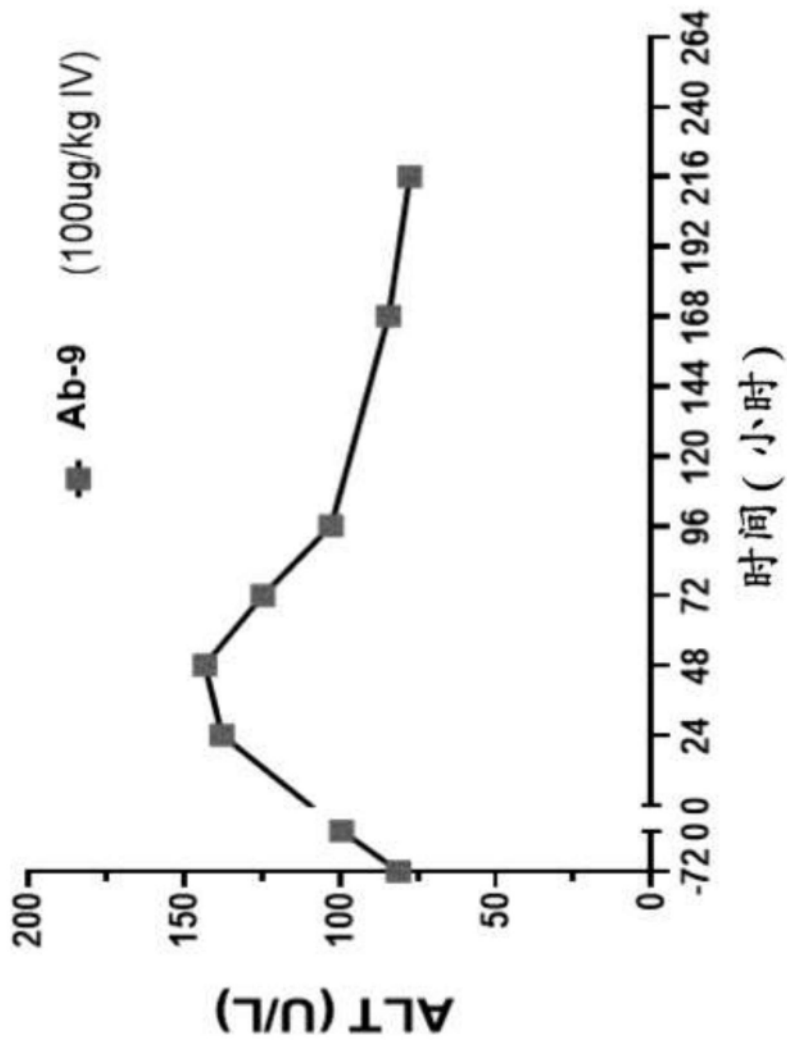


图19D

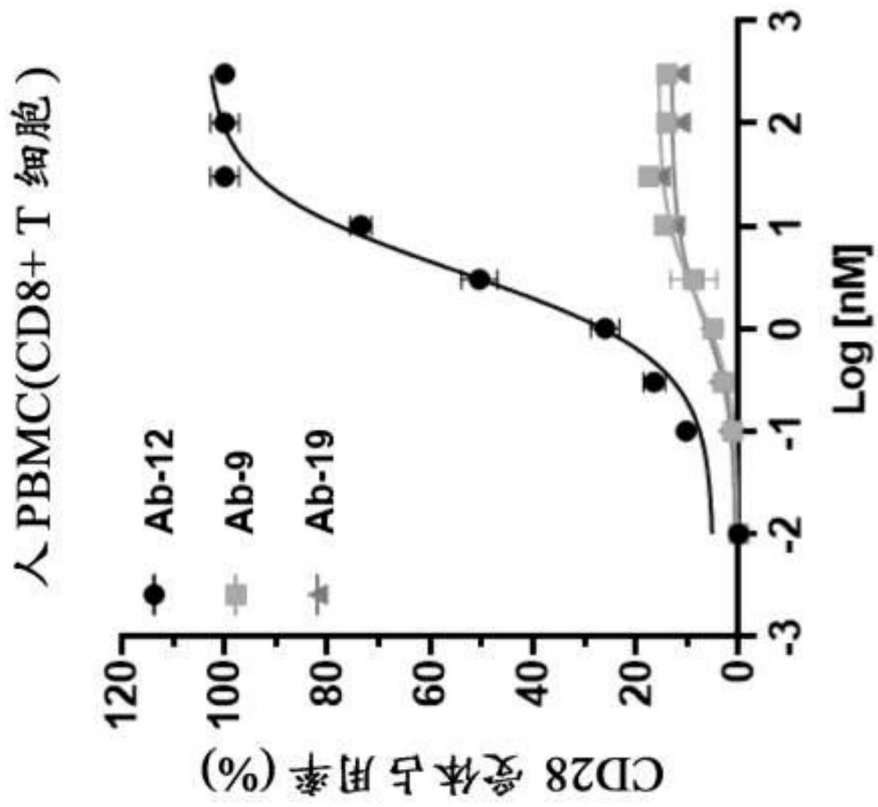


图20A

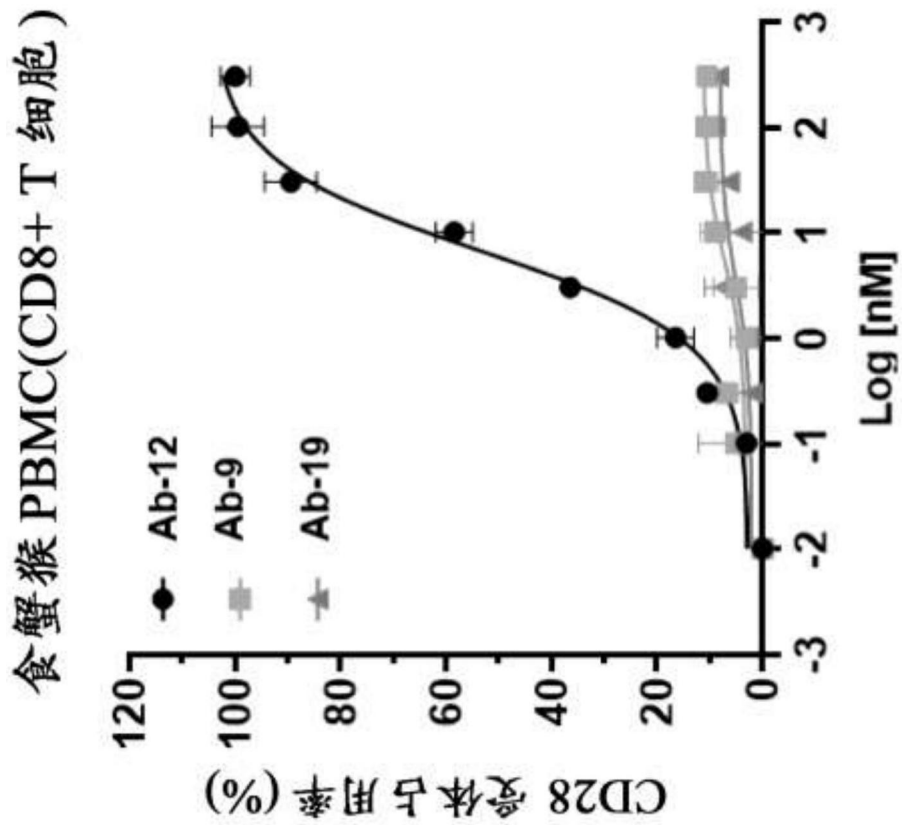


图20B

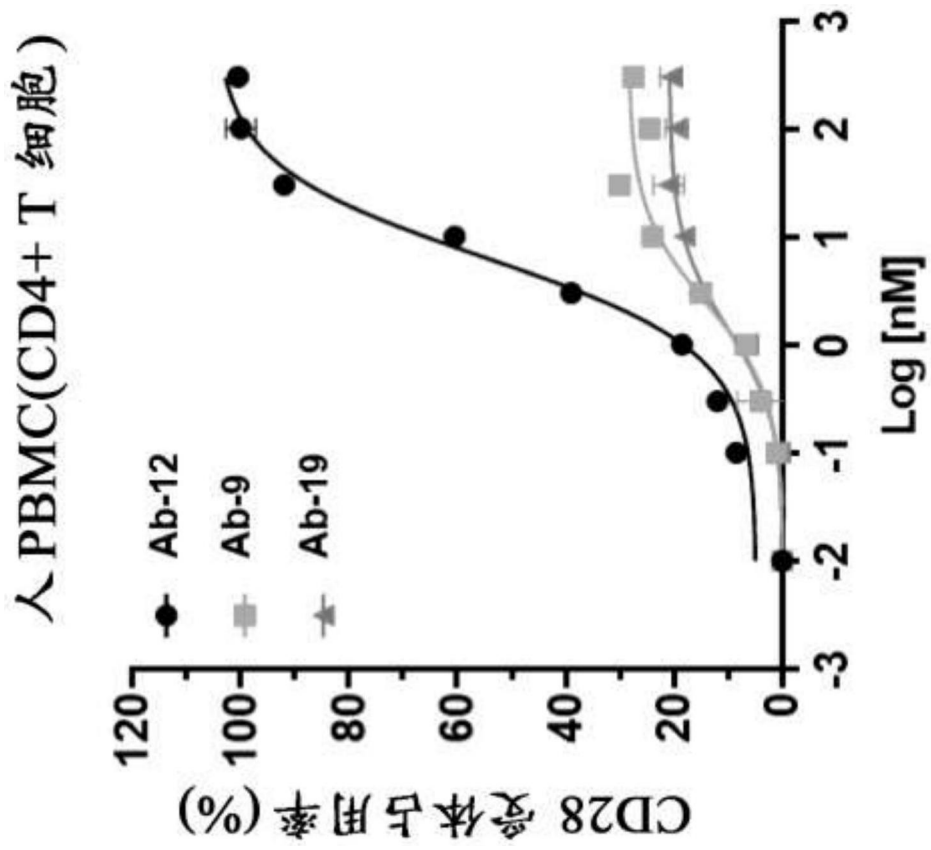


图20C

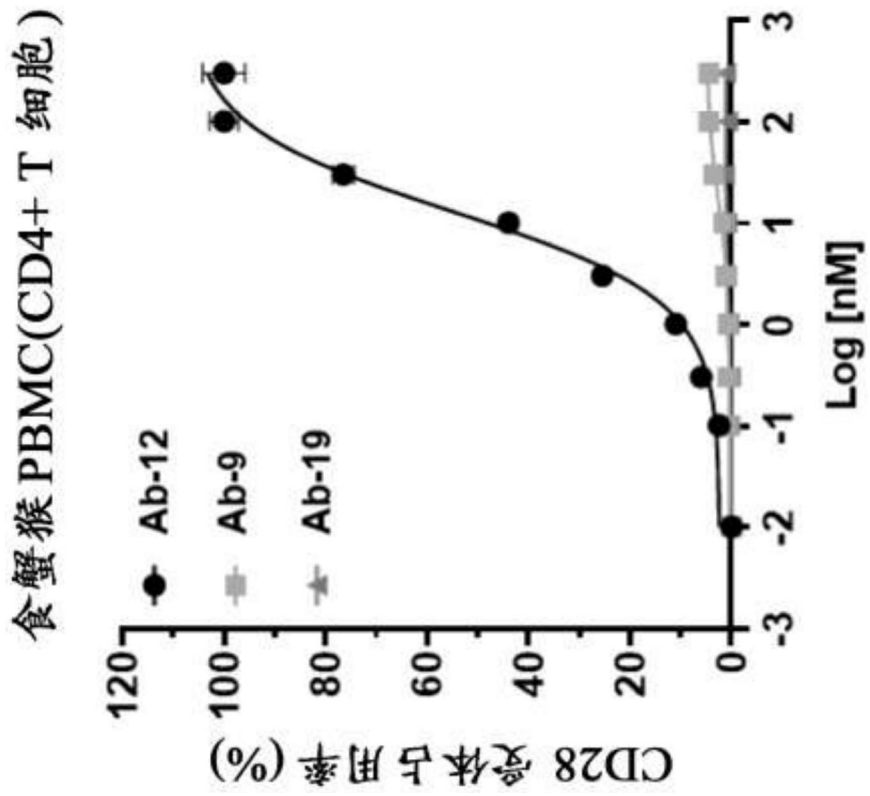


图20D

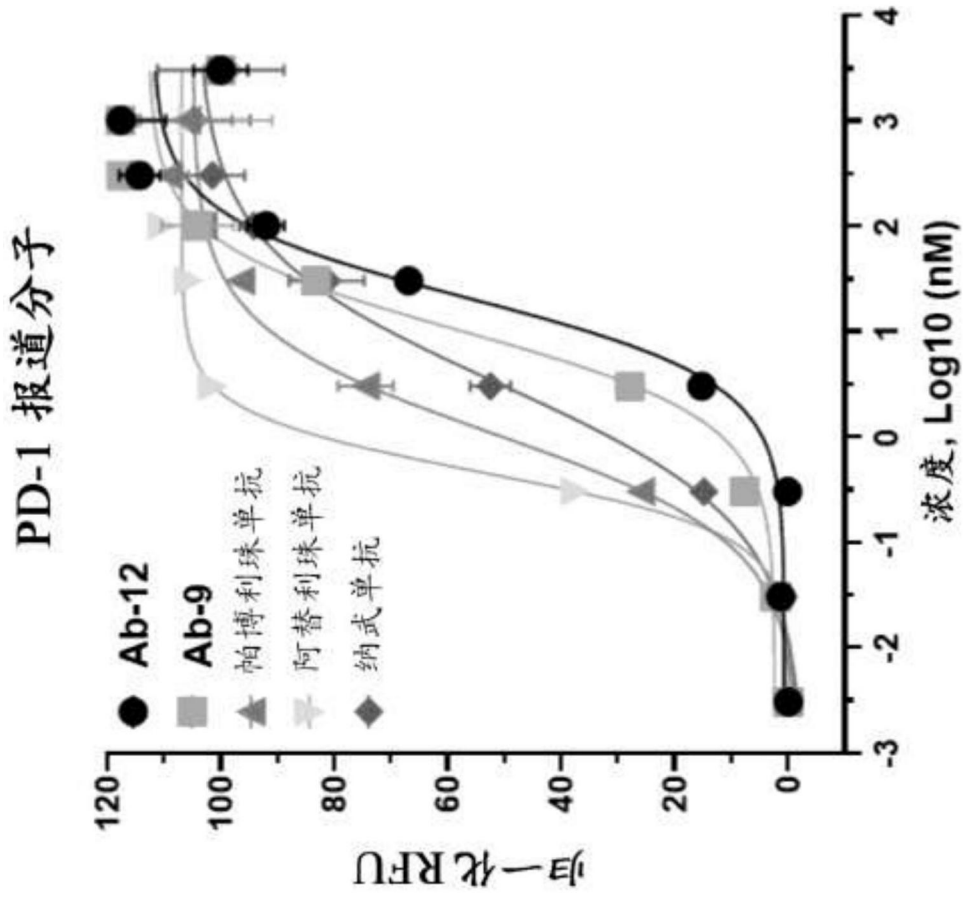


图21

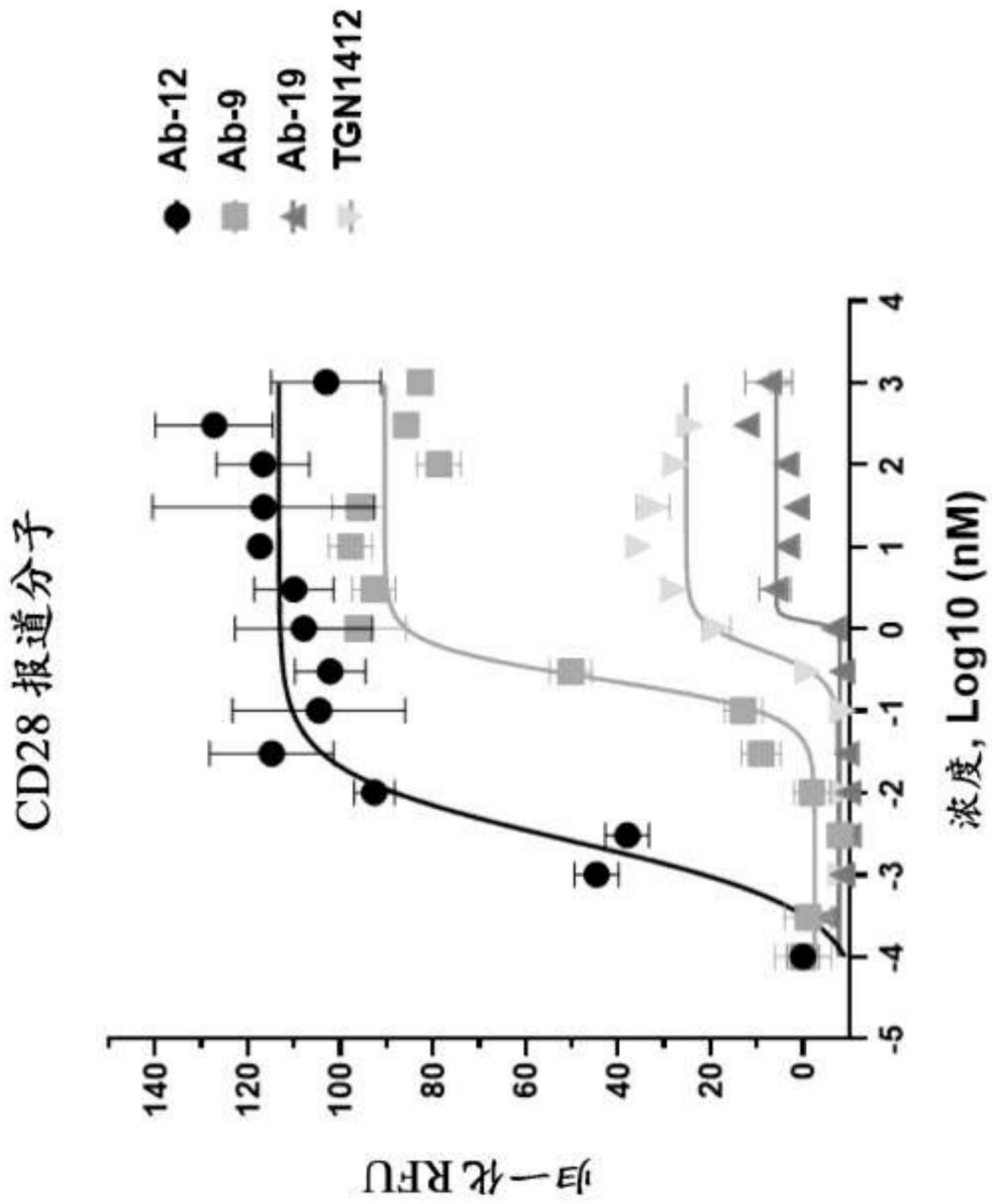


图22

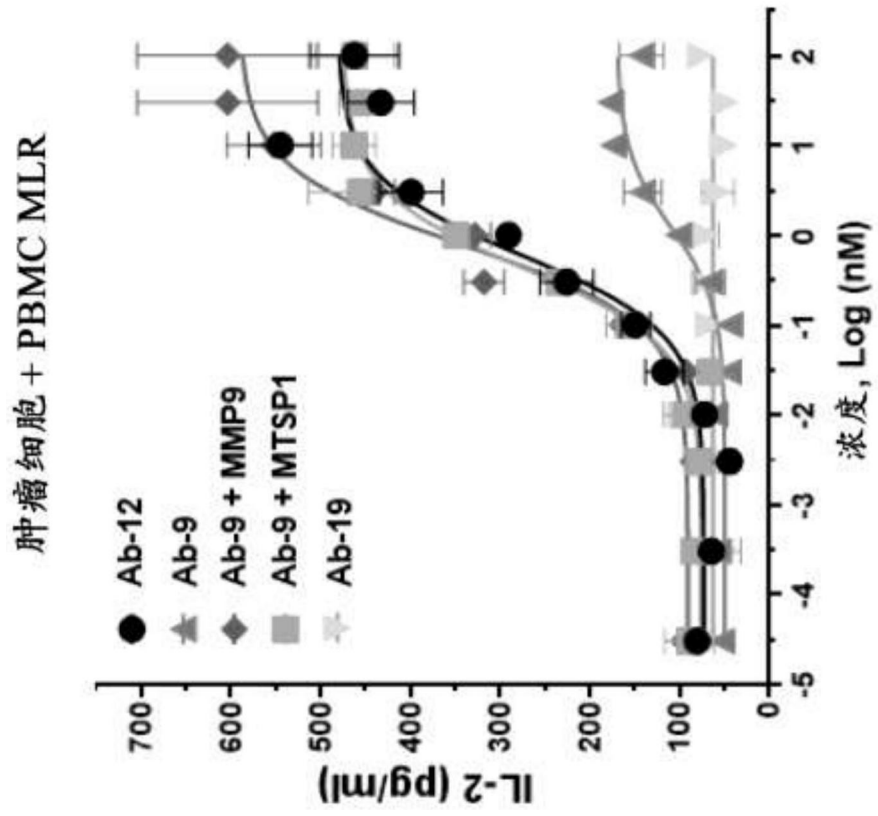


图23A

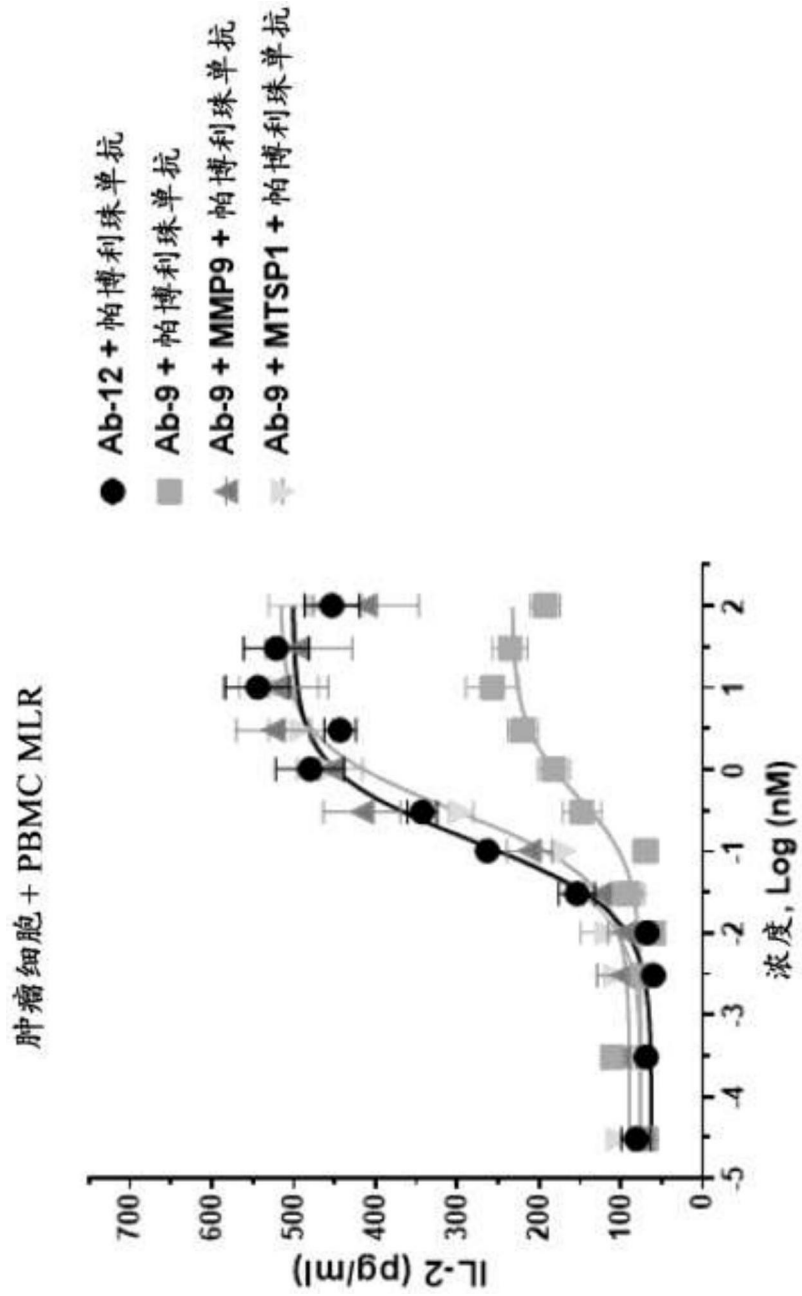


图23B

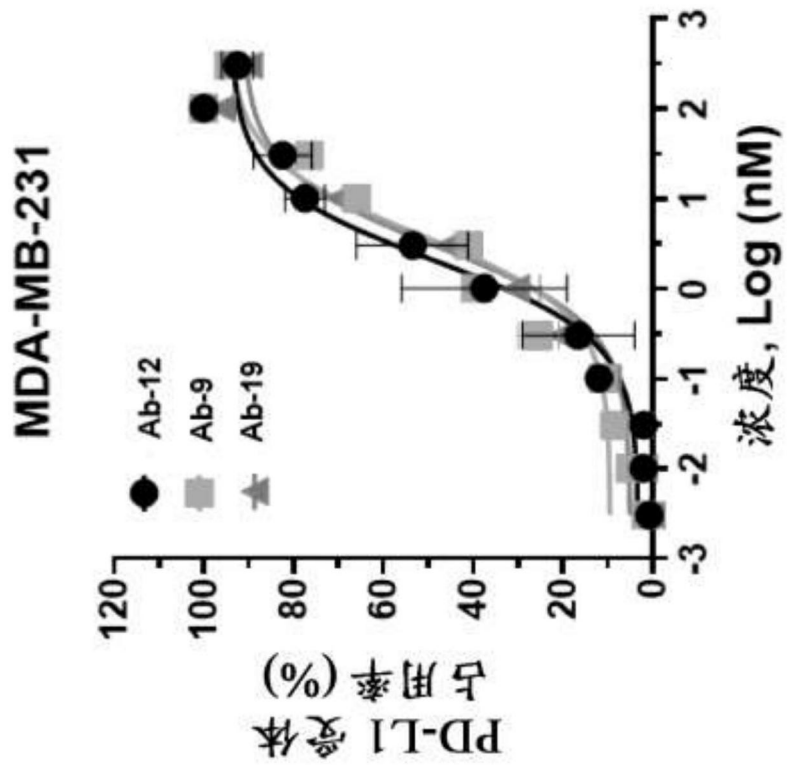


图24

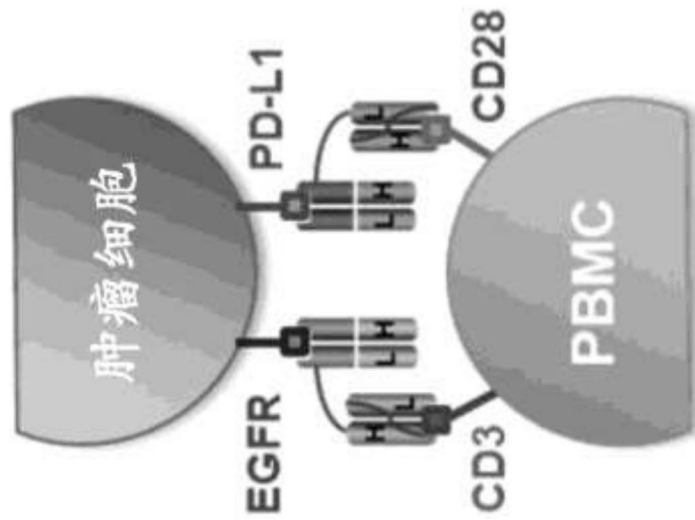


图25A

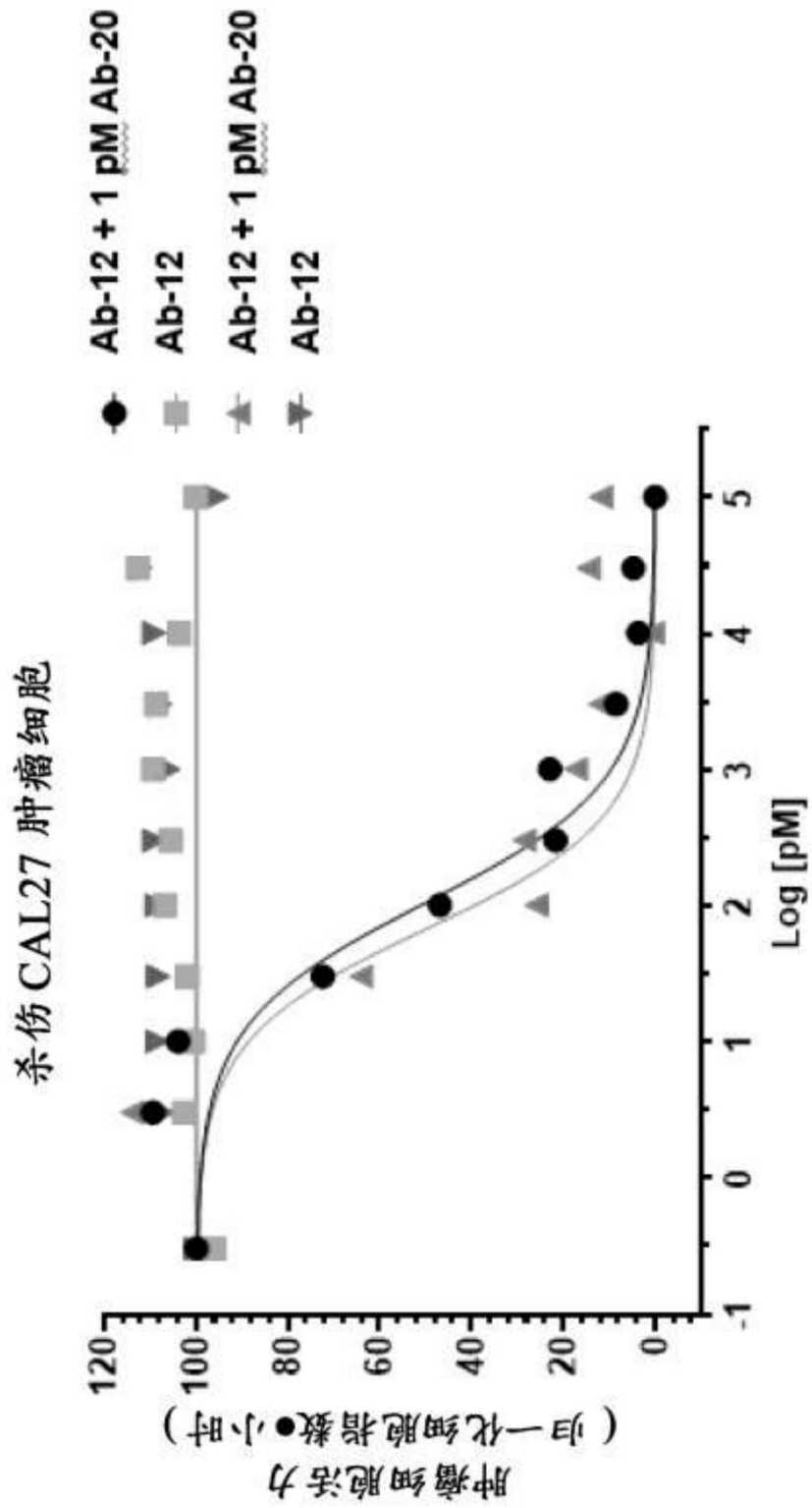


图25B

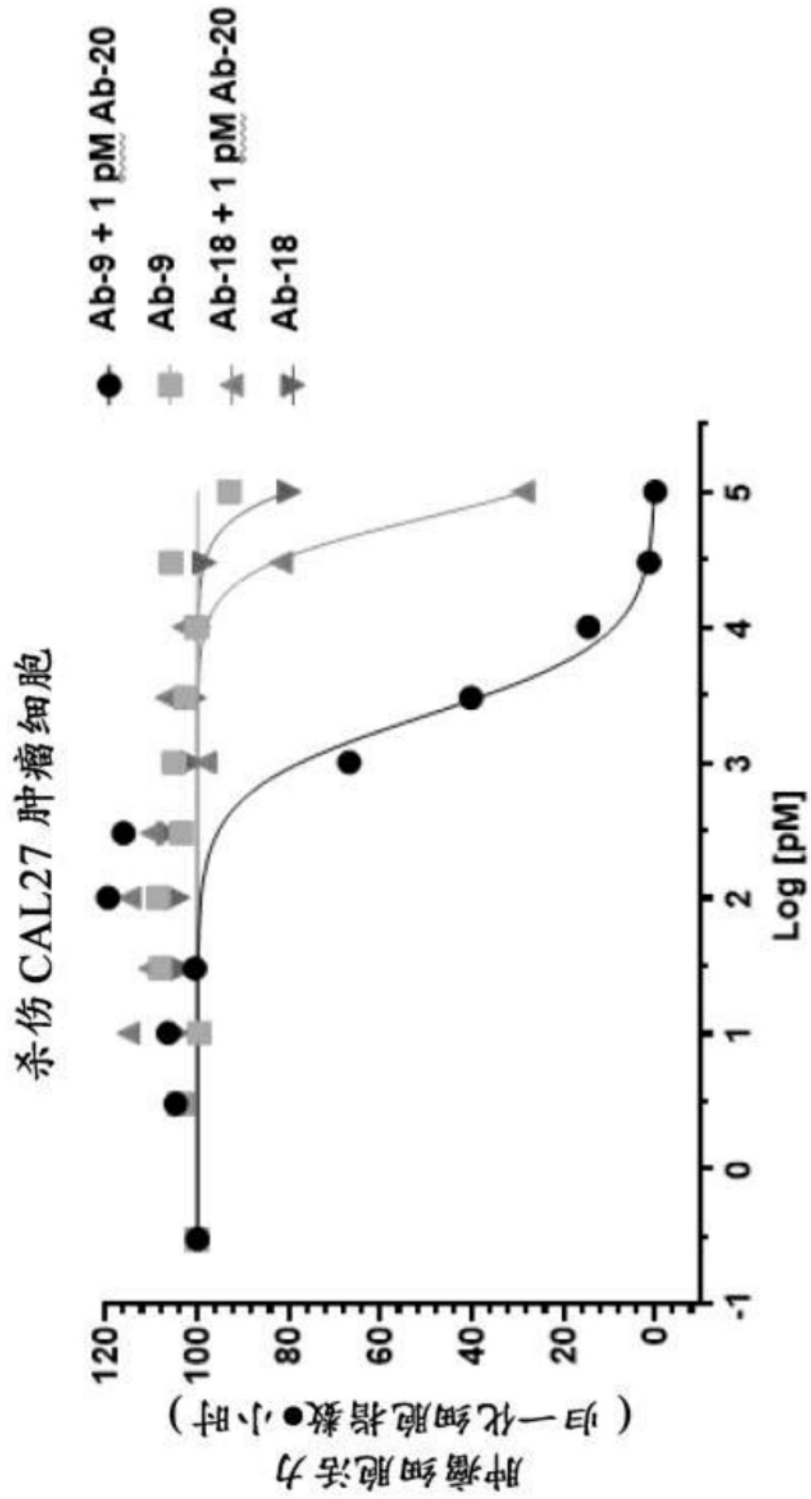


图25C

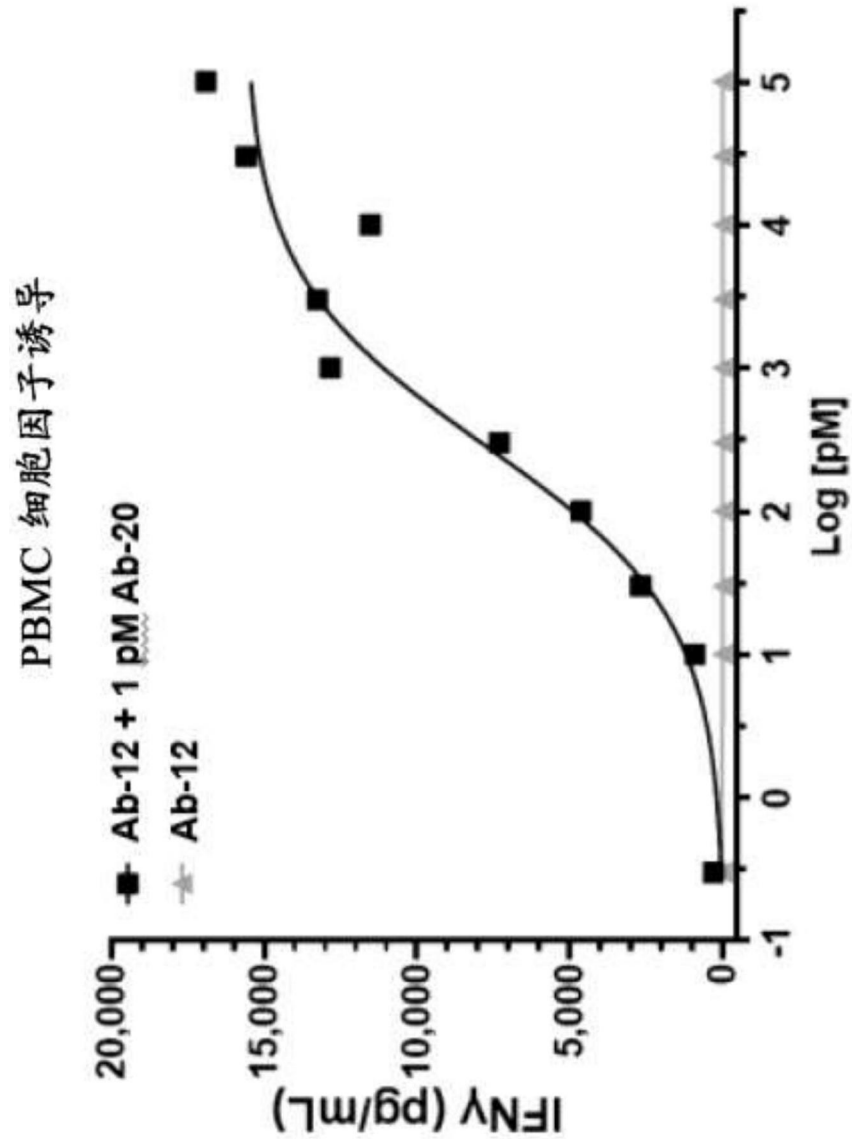


图25D

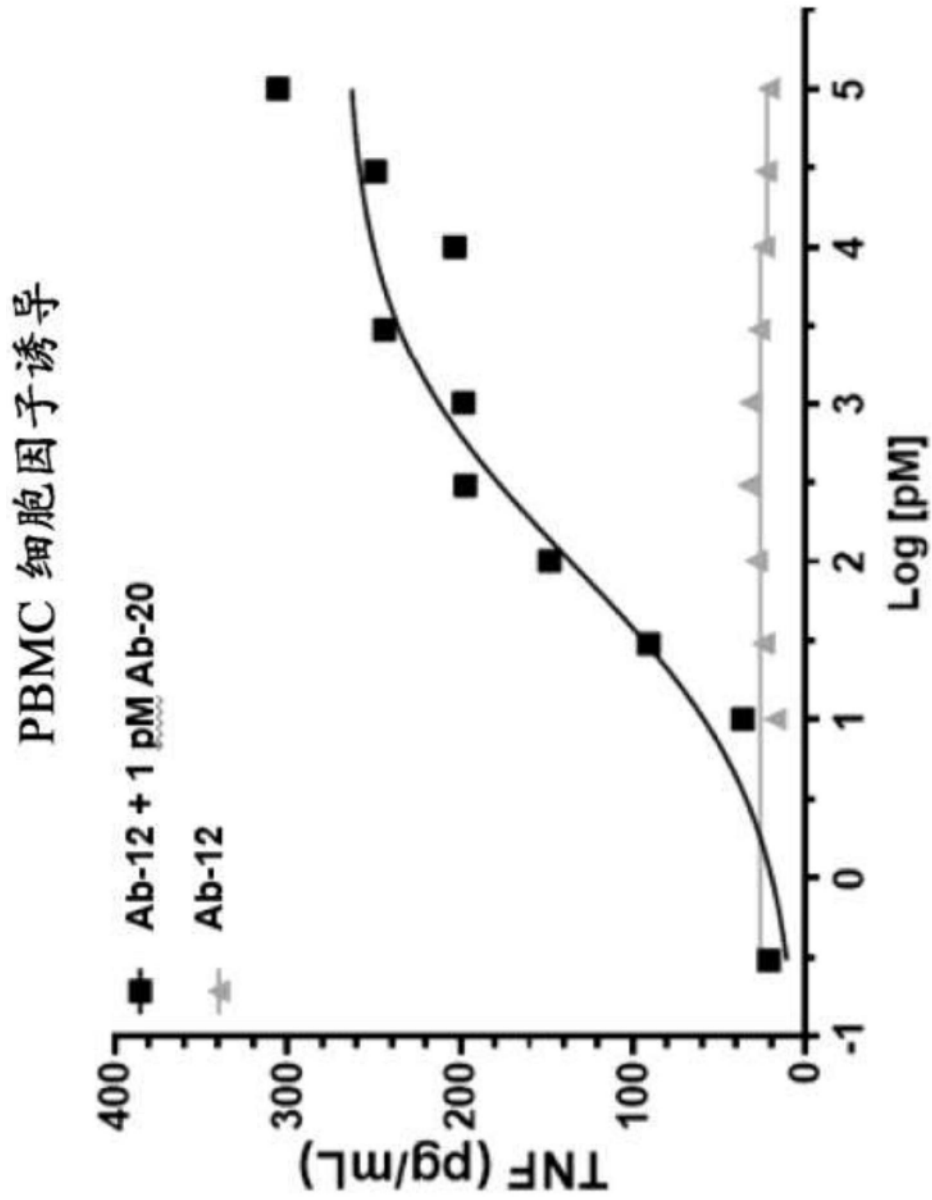


图25E

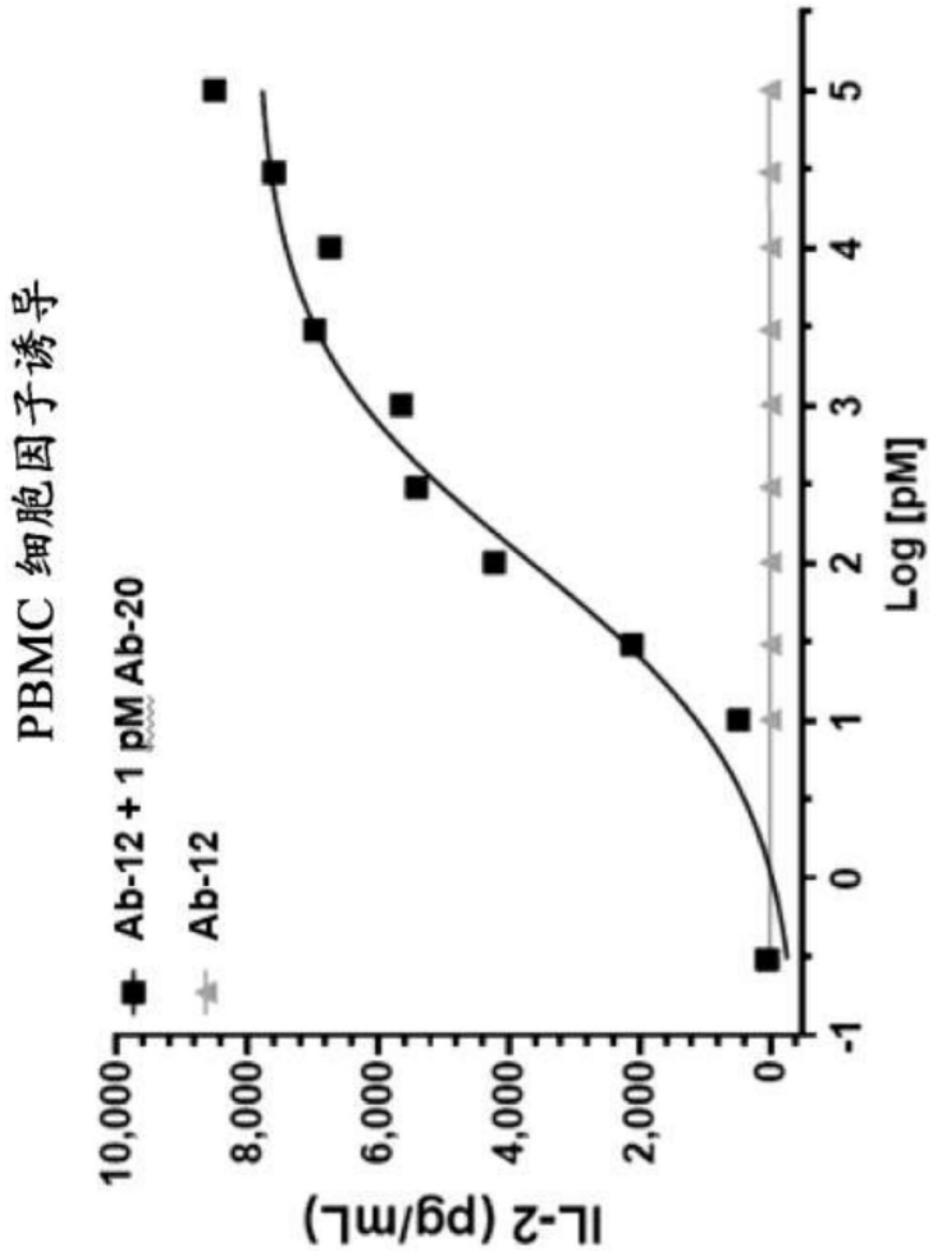


图25F

PBMC 细胞因子诱导

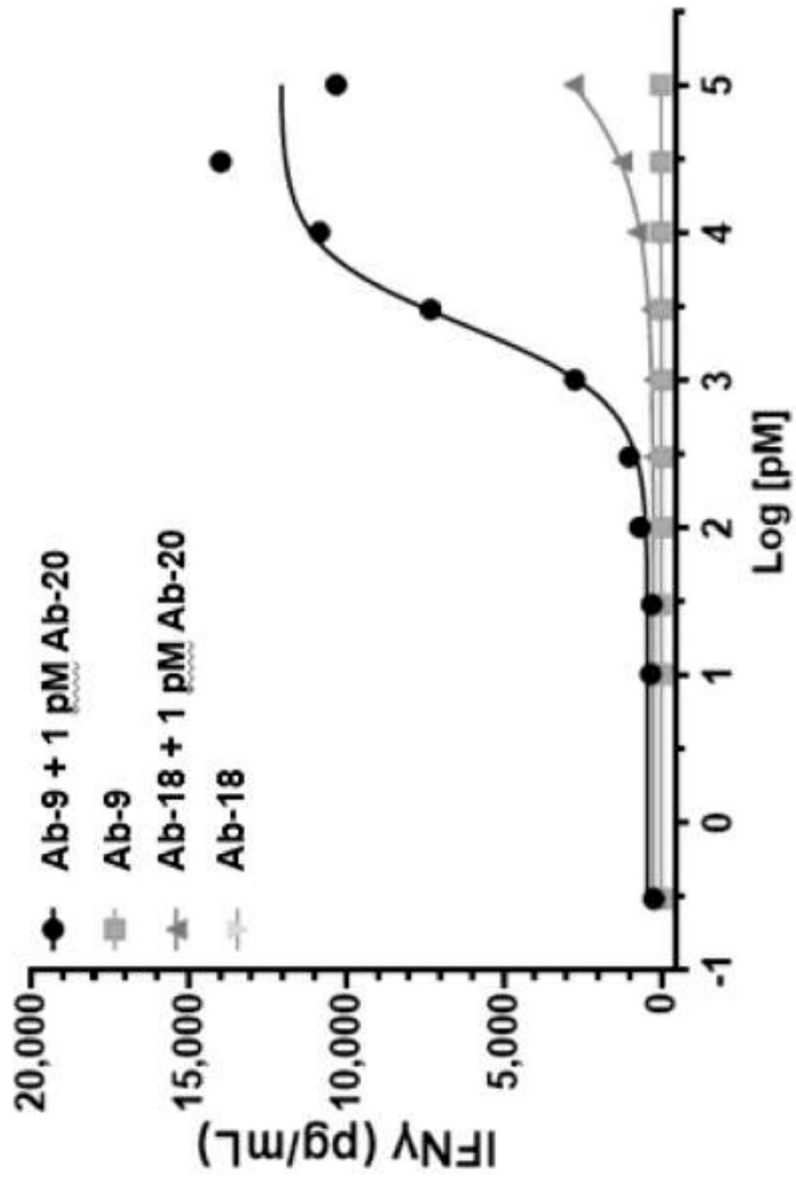


图25G

PBMC 细胞因子诱导

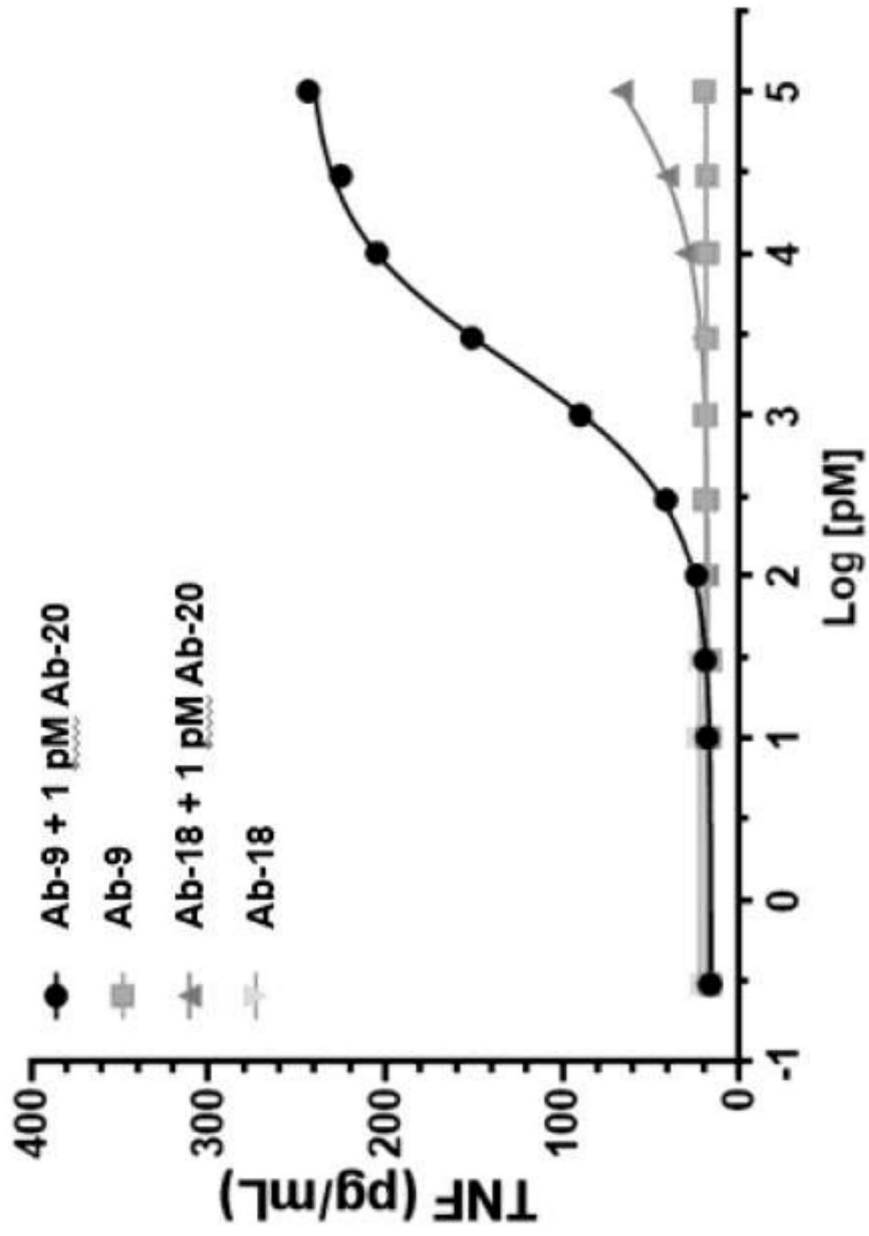


图25H

PBMC 细胞因子诱导

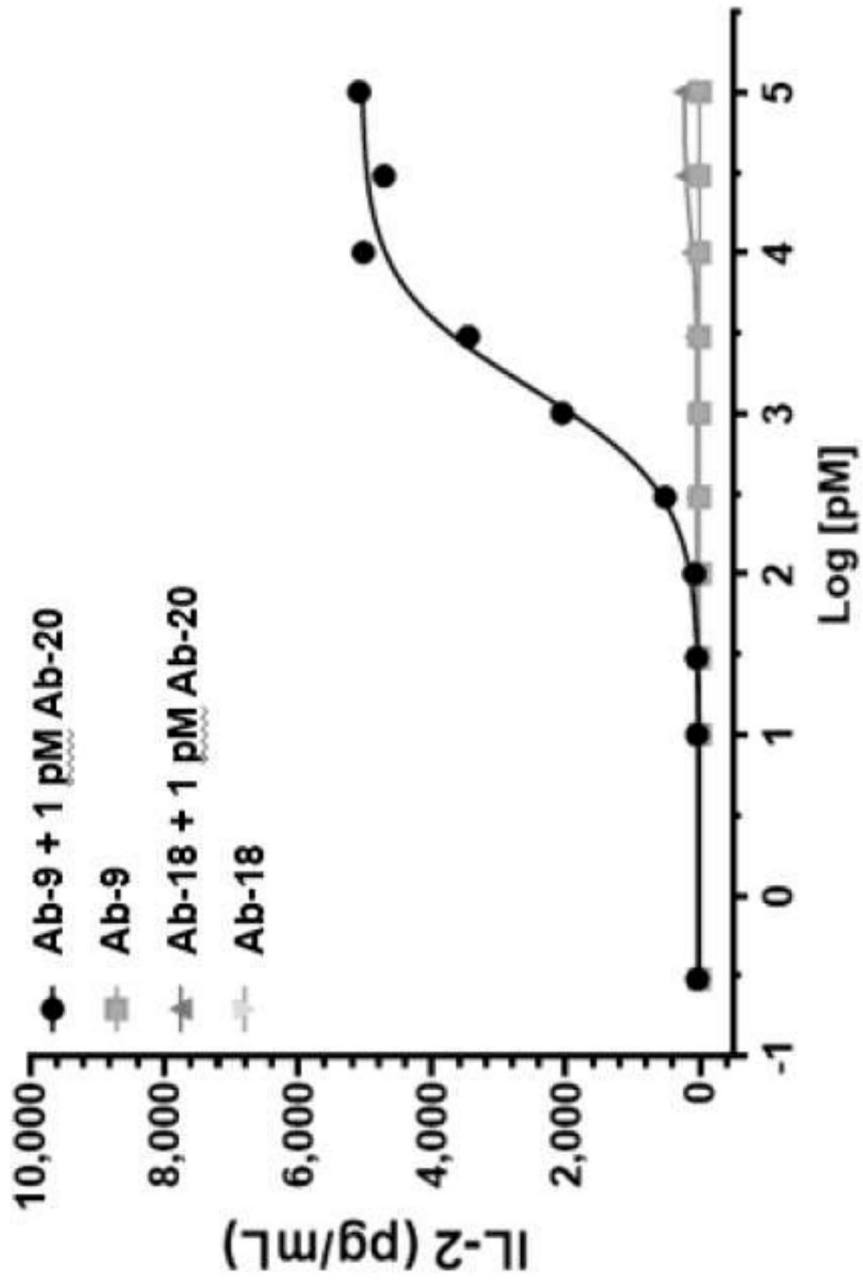


图25I

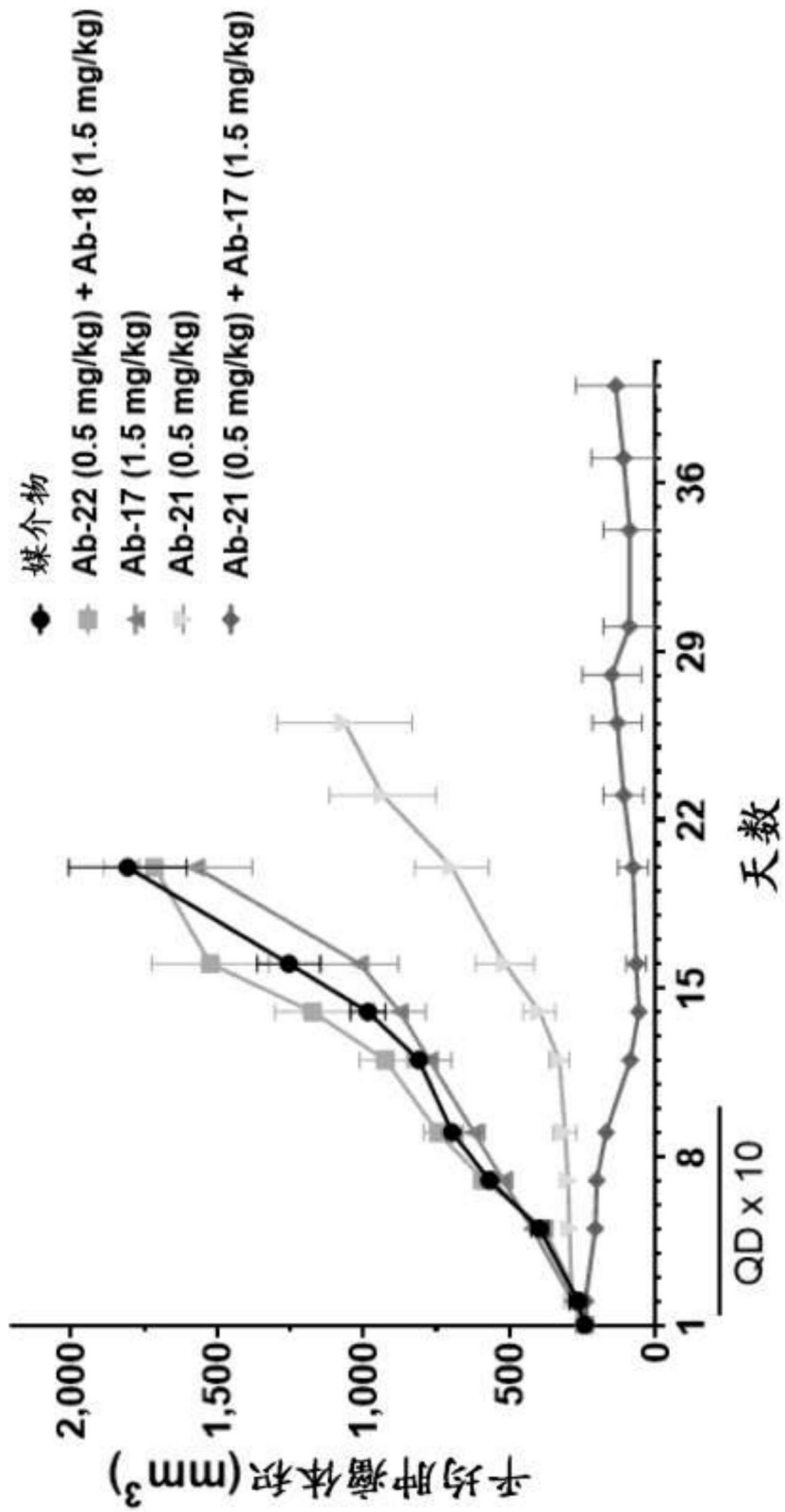


图26

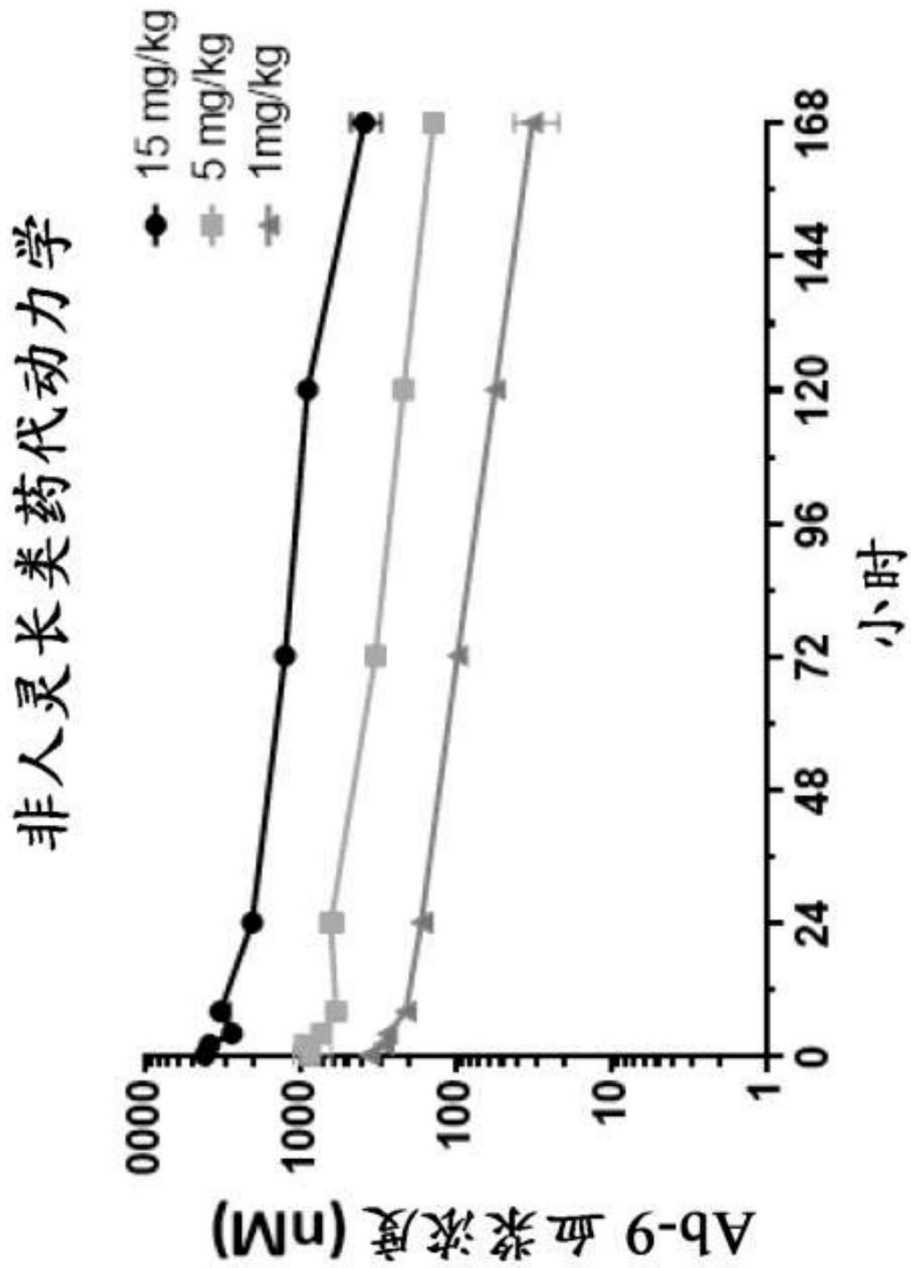


图27

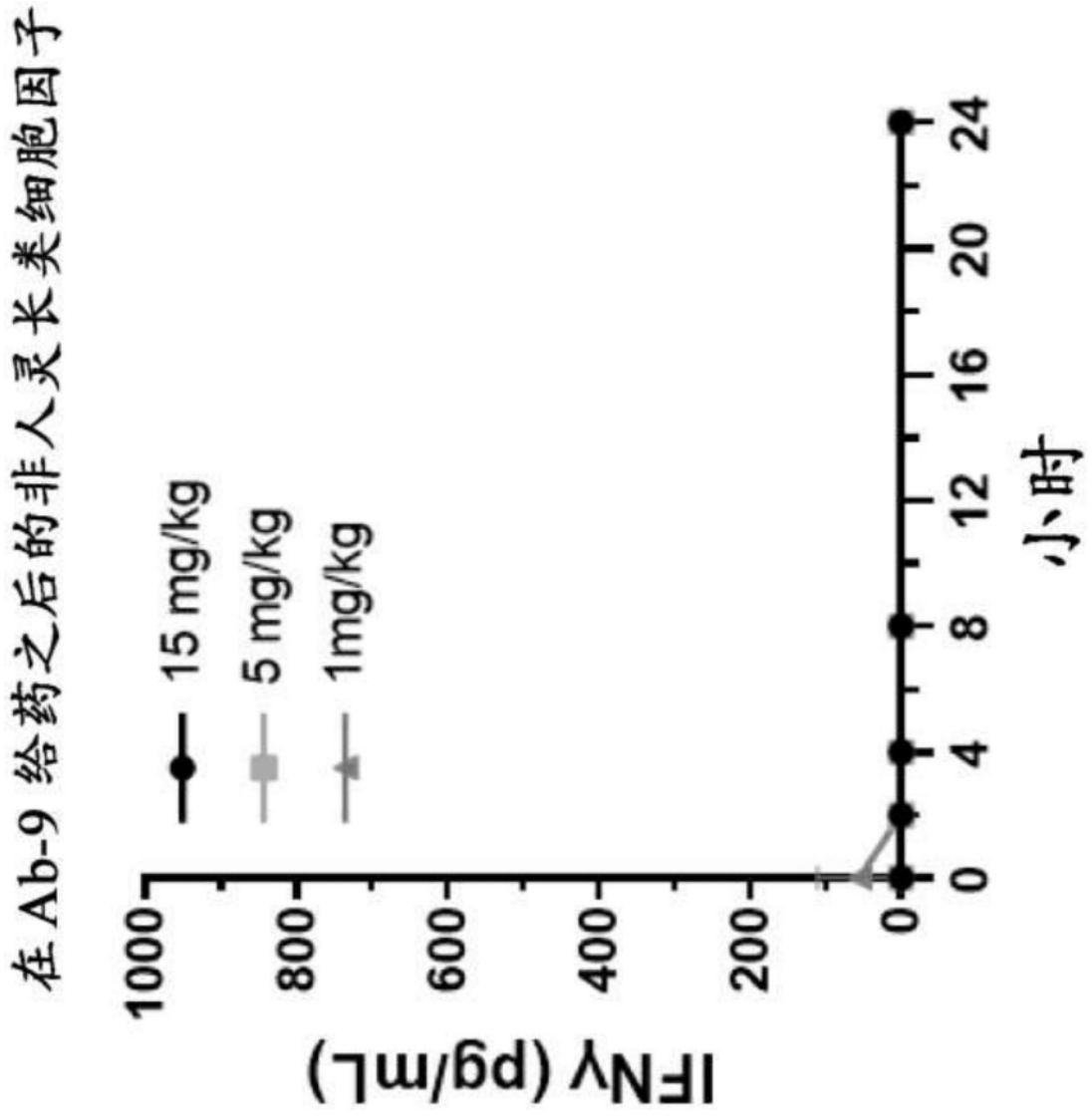


图28A

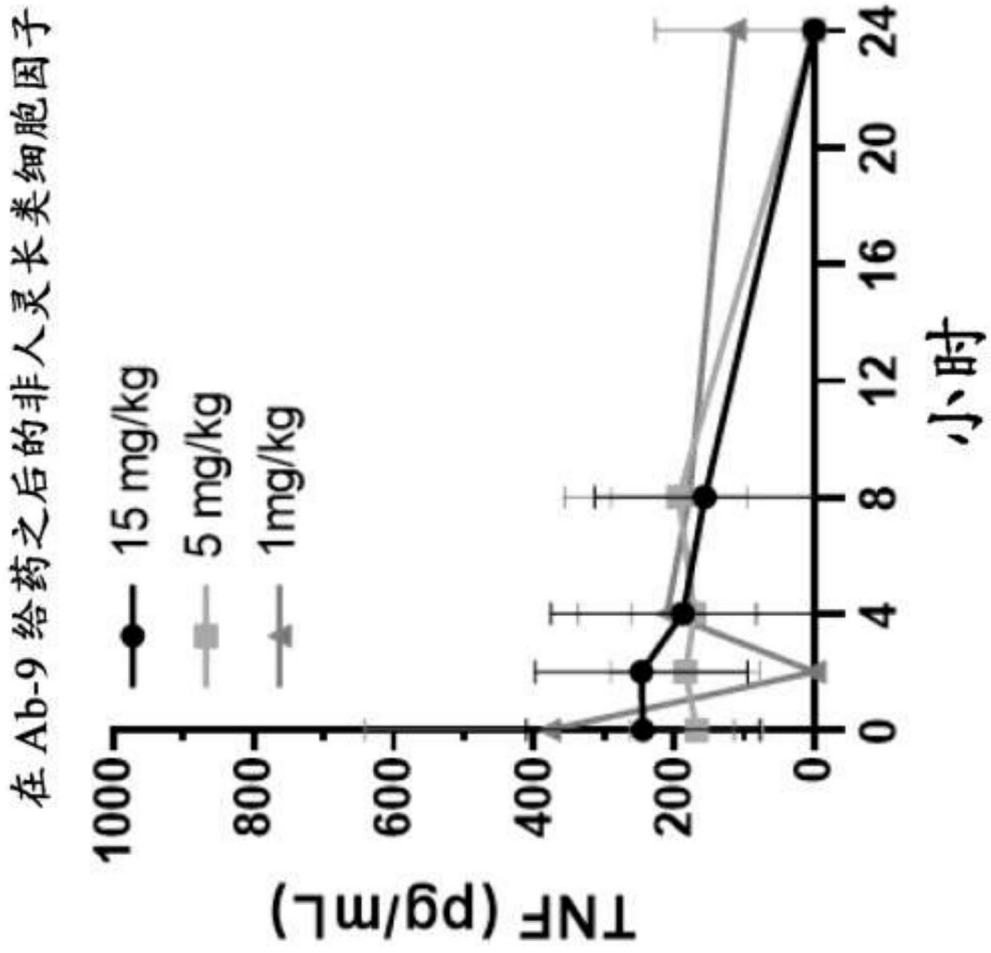


图28B

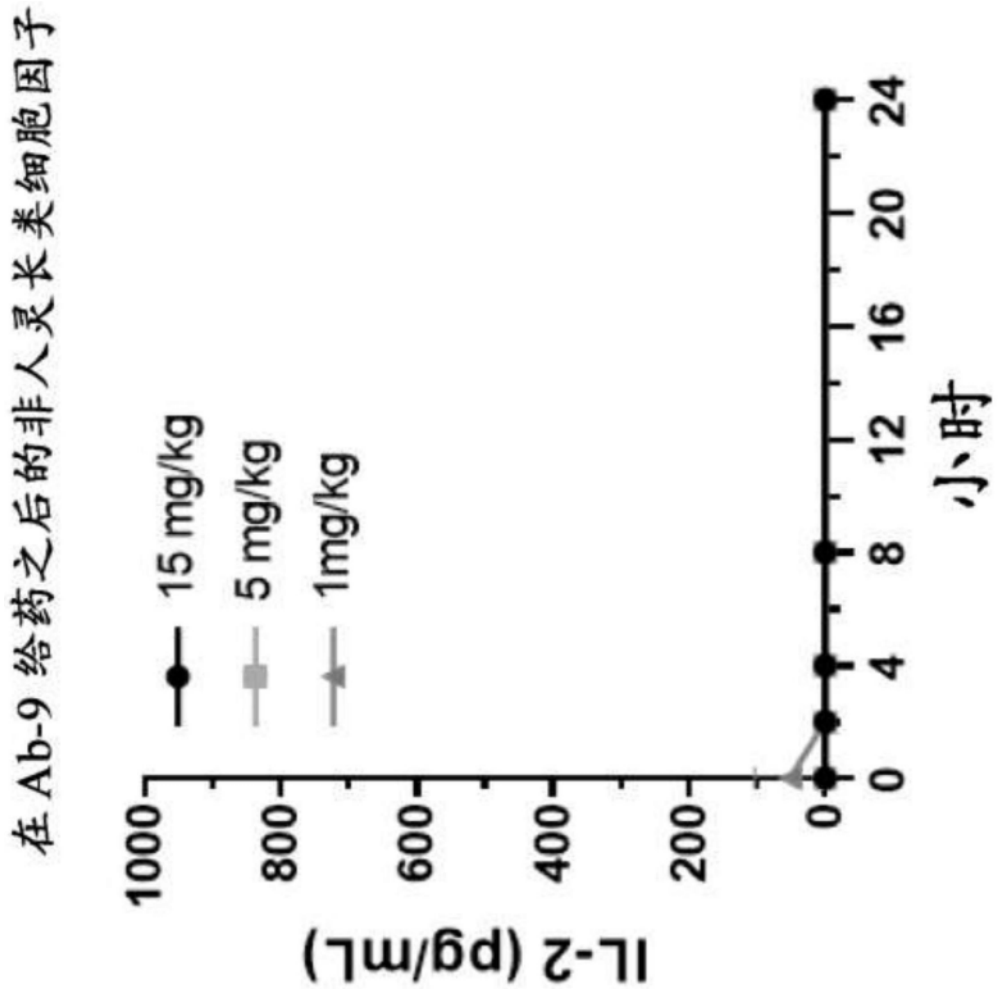


图28C

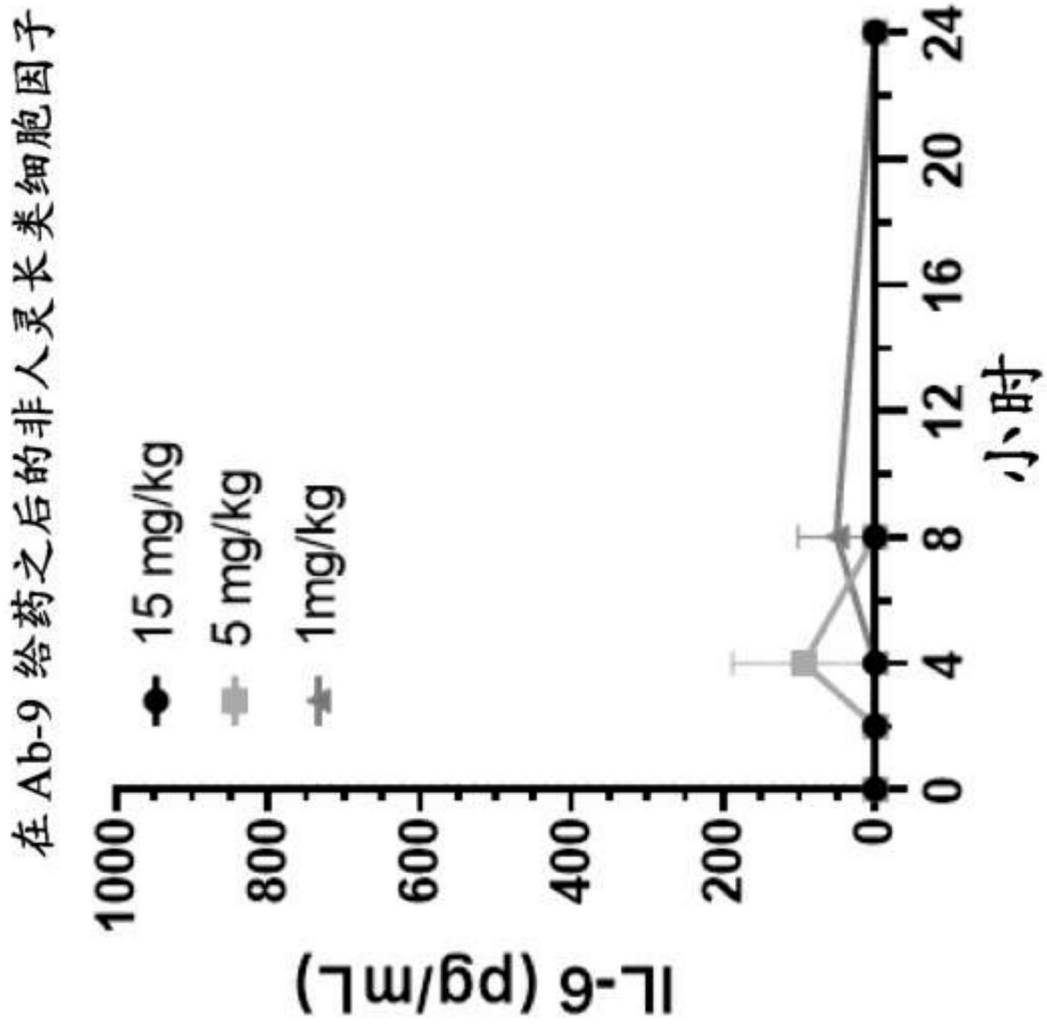


图28D

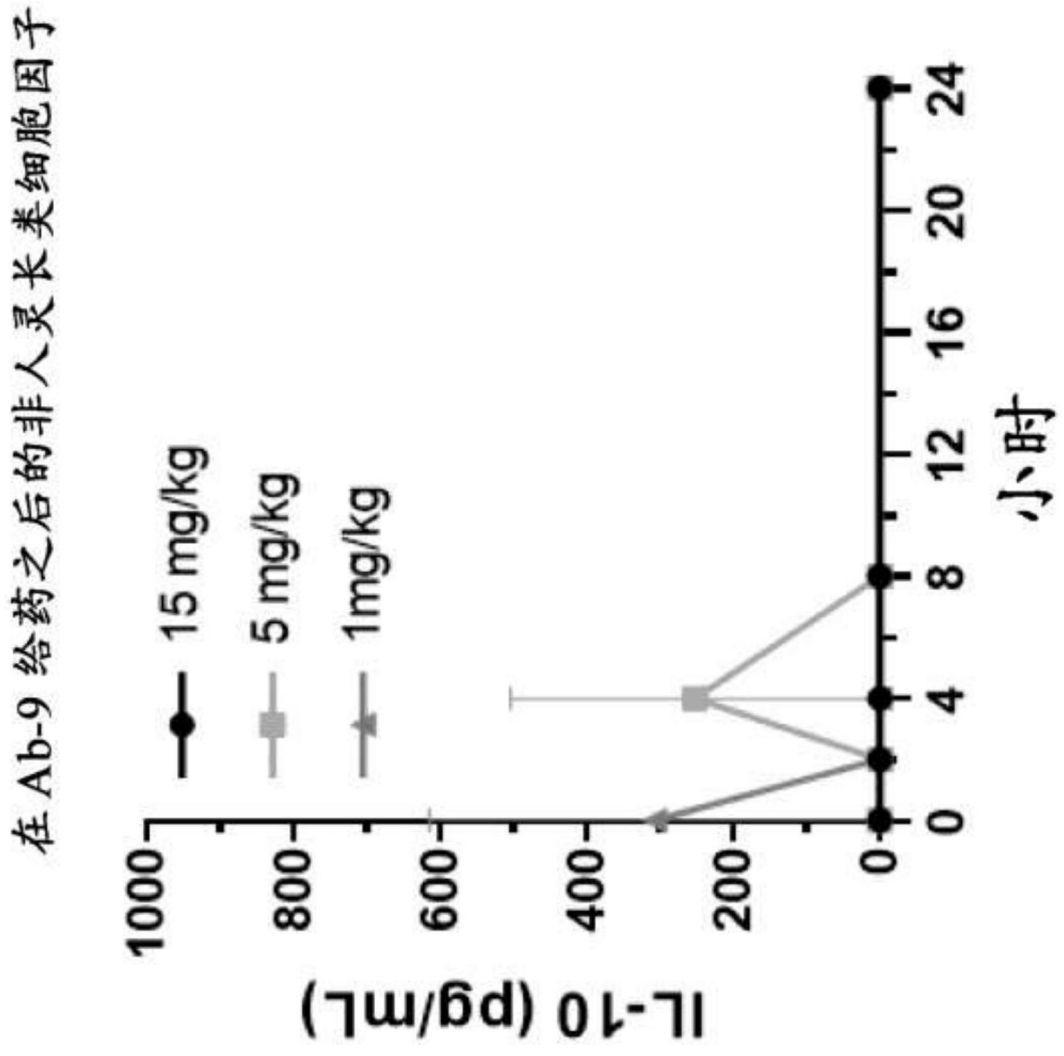


图28E

在 Ab-9 给药之后的非人灵长类临床化学

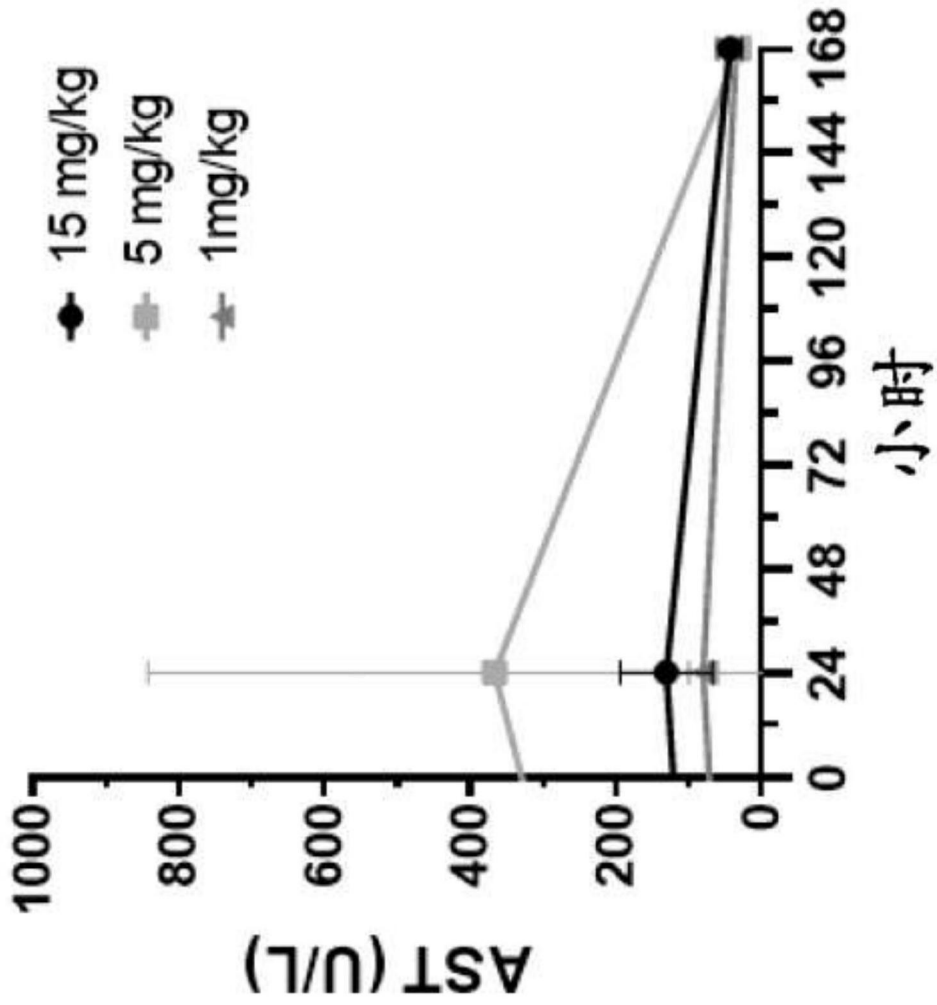


图29A

在 Ab-9 给药之后的非人灵长类临床化学

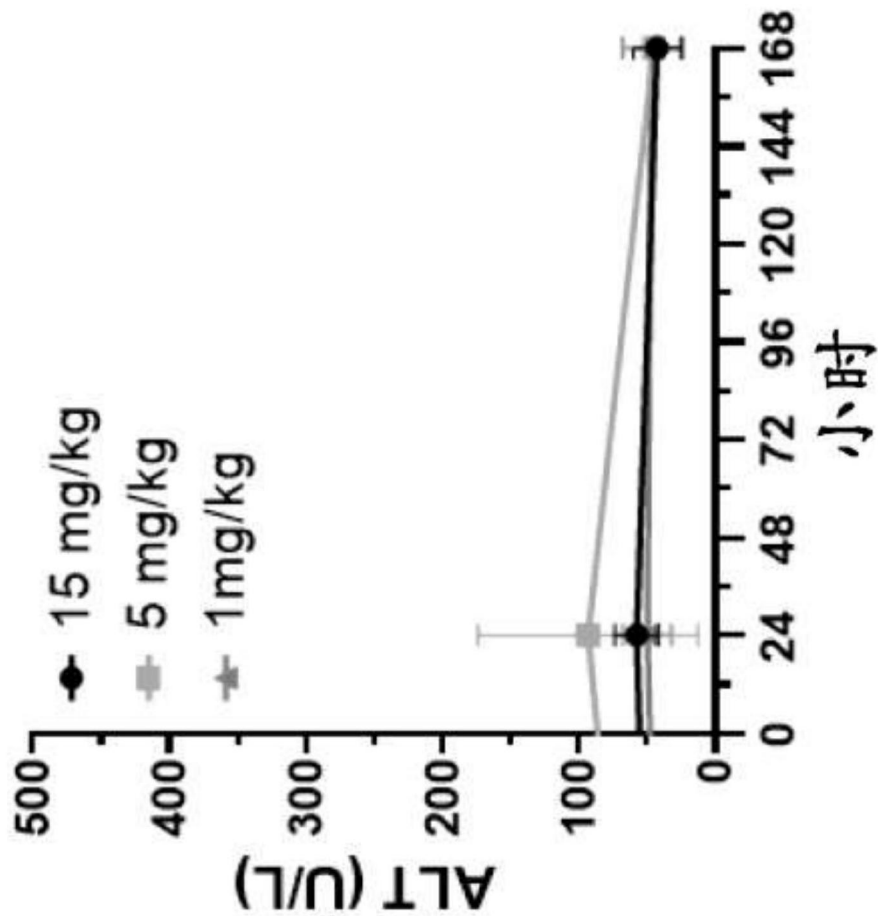


图29B

在 Ab-9 给药之后的非人灵长类临床化学

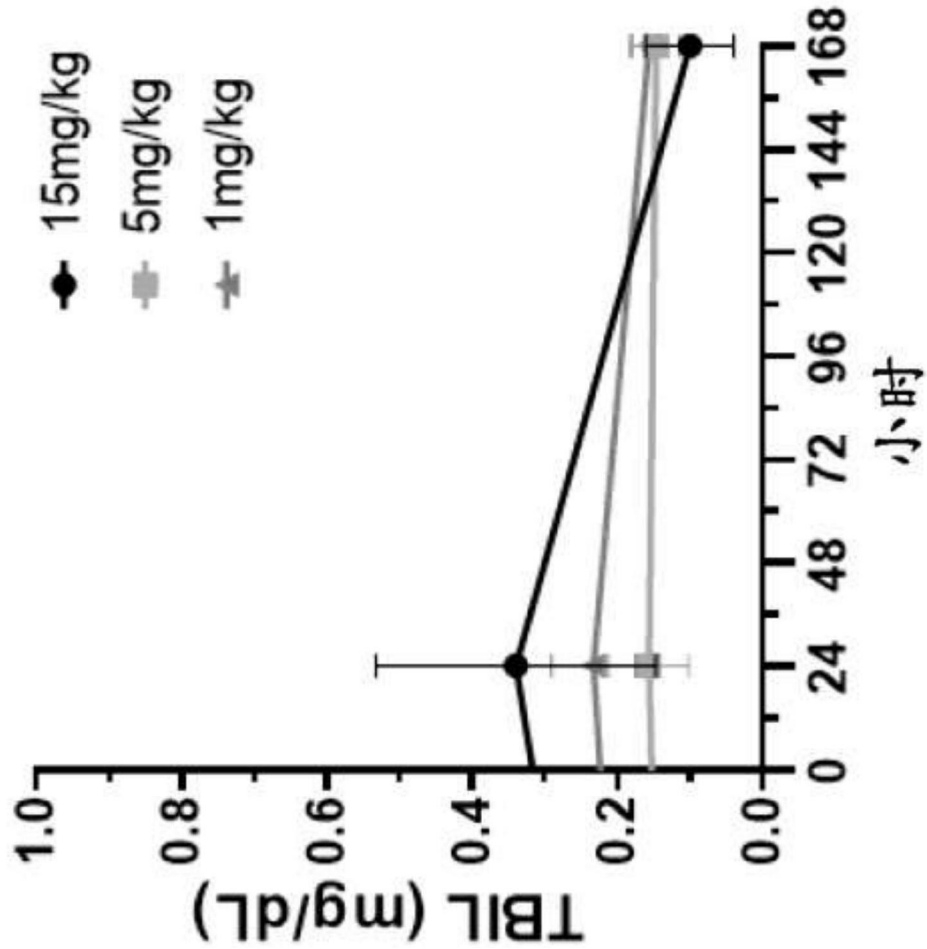


图29C

在 Ab-9 给药之后的非人灵长类临床化学

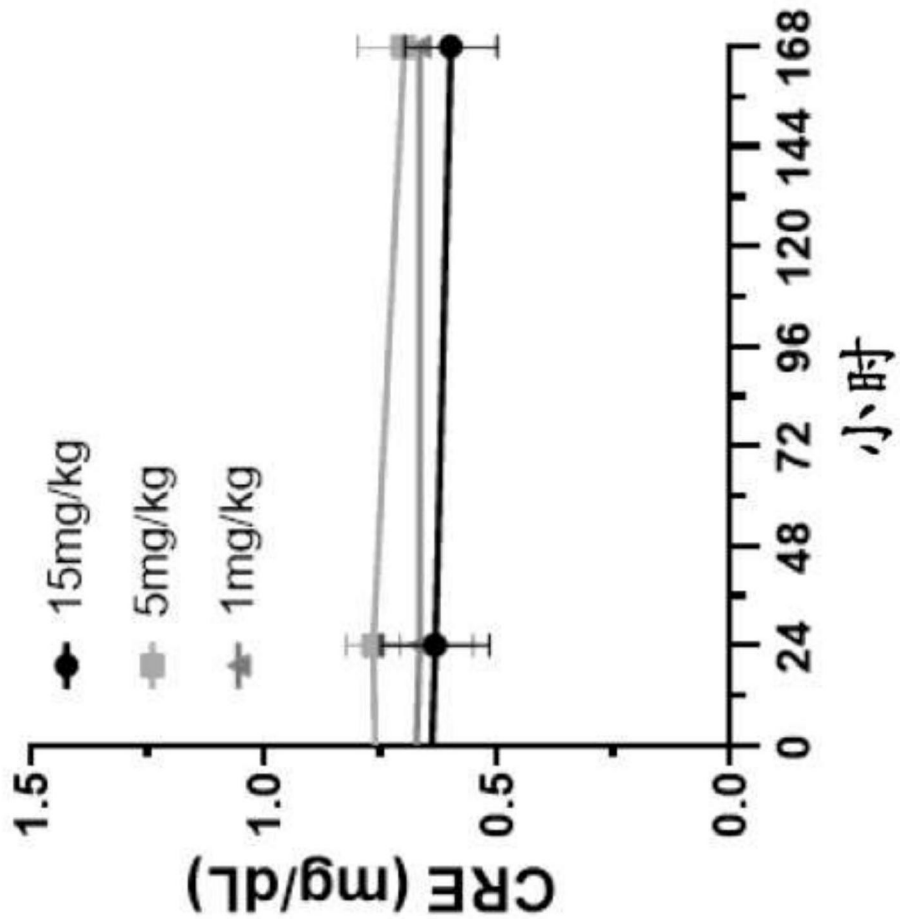


图29D

在 Ab-9 给药之后的非人灵长类临床化学

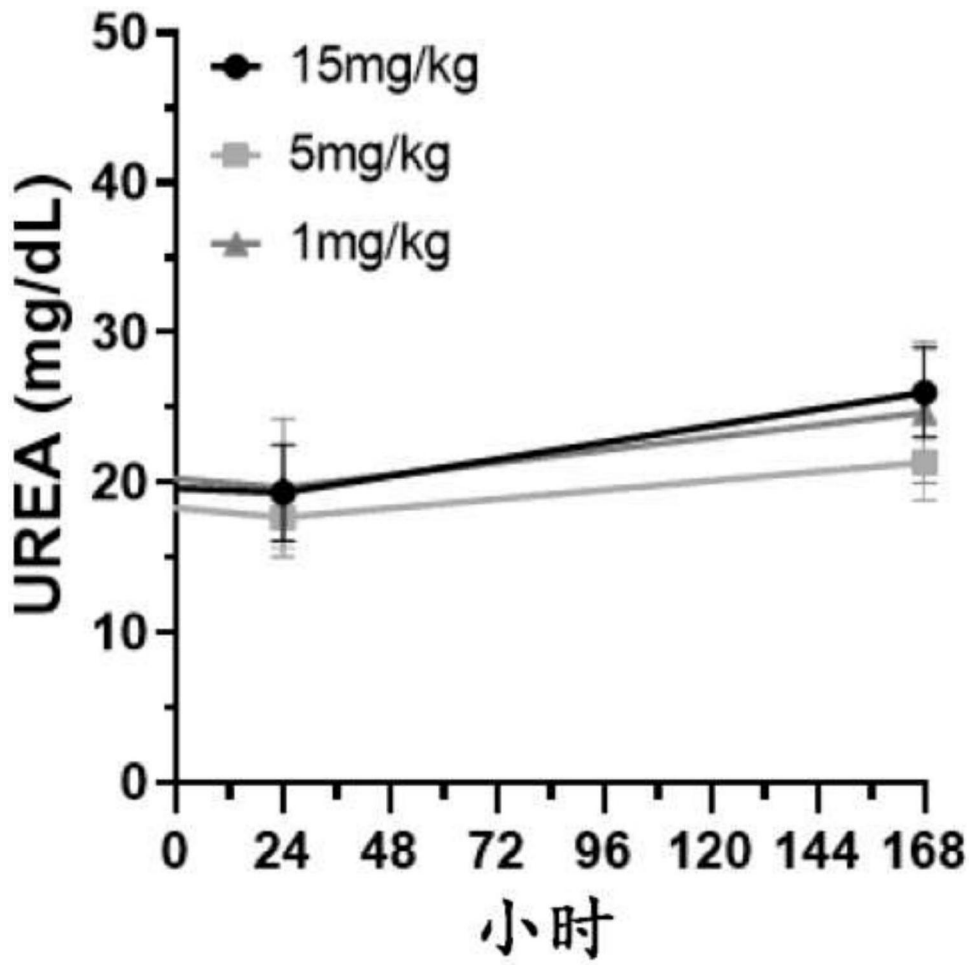


图29E