(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119613560 A
(43)申请公布日 2025.03.14

(21)申请号 202411831660.4

(22)申请日 2022.11.18

(30)优先权数据
2029844 2021.11.19 NL

(62)分案原申请数据
202280076849.X 2022.11.18

(71)申请人 美勒斯公司
地址 荷兰乌得勒支
申请人 英赛特公司

(72)发明人 C·A·W·热延 P·梅耶斯
S·M·斯图维尔特 王亮权

(74)专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283
专利代理师 水文钰 徐婕超

(51)Int.Cl.
C07K 16/46(2006.01)
C12N 5/20(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

权利要求书5页 说明书59页
序列表（电子公布） 附图46页

(54)发明名称

包含PD-1和TGF-βRII结合域的多特异性结合部分

(57)摘要

本公开涉及包含PD-1和TGF-βRII结合域的多特异性结合部分,其中该PD-1结合域阻断PD-1介导的信号传导,并且该TGF-βRII结合域阻断TGF-βRII介导的信号传导。本公开还涉及一种包含此类多特异性结合部分的药物组合物、一种使用此类多特异性结合部分的治疗方法和一种产生此类多特异性结合部分的细胞。

CN 119613560 A

1.一种包含PD-1结合域和TGF-βRII结合域的多特异性结合部分,其特征在于,所述PD-1结合域阻断PD-1介导的信号传导,并且所述TGF-βRII结合域阻断TGF-βRII介导的信号传导。

2.根据权利要求1所述的多特异性结合部分,其特征在于,在活化的T细胞,特别是活化的肿瘤特异性T细胞中,所述PD-1结合域阻断PD-1介导的信号传导,并且所述TGF-βRII结合域阻断TGF-βRII介导的信号传导。

3.根据权利要求1或2所述的多特异性结合部分,其特征在于,所述多特异性结合部分包含与PD-1结合的单个Fab结构域、与TGF-βRII结合的单个Fab结构域和Fc区。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的多特异性结合部分,其特征在于,所述多特异性结合部分阻断TGF-βRII介导的信号传导的效力在表达PD-1和TGF-βRII两者的细胞中比在表达TGF-βRII且不表达、基本上不表达或表达低水平的PD-1的细胞中更高。

5.根据权利要求4所述的多特异性结合部分,其特征在于,所述表达PD-1和TGF-βRII两者的细胞为Jurkat-PD-1^{+}细胞,并且所述表达TGF-βRII且不表达或基本上不表达PD-1的细胞为Jurkat-PD-1^{null}细胞。

6.根据权利要求4所述的多特异性结合部分,其特征在于,所述表达PD-1和TGF-βRII两者的细胞为活化的$CD4^{+}$和/或$CD8^{+}$细胞,并且所述表达TGF-βRII且不表达PD-1的细胞为未活化的$CD4^{+}$和/或$CD8^{+}$细胞。

7.根据权利要求4所述的多特异性结合部分,其特征在于,所述表达PD-1和TGF-βRII两者的细胞为HEK-Blue TGF-β-PD-1^{+}细胞,并且所述表达TGF-βRII且不表达PD-1的细胞为HEK-Blue TGF-β细胞。

8.根据权利要求4至6中任一项所述的多特异性结合部分,其特征在于,所述阻断TGF-βRII介导的信号传导的效力在磷酸化SMAD2/3测定中测量。

9.根据权利要求4或7所述的多特异性结合部分,其特征在于,所述阻断TGF-βRII介导的信号传导的效力在同基因PD-1-TGF-β报告基因测定中测量。

10.根据权利要求4至9中任一项所述的多特异性结合部分,其特征在于,所述阻断TGF-βRII介导的信号传导的效力在表达PD-1和TGF-βRII两者的细胞中比在表达TGF-βRII且不表达、基本上不表达或表达低水平的PD-1的细胞中高至少约200倍;优选地,介于约200倍至30000倍之间。

11.根据权利要求4至10中任一项所述的多特异性结合部分,其特征在于,所述多特异性结合部分在表达TGF-βRII且不表达PD-1的细胞中阻断TGF-βRII介导的信号传导的所述效力比参考抗TGF-βRII抗体的所述效力更低,并且所述多特异性结合部分在表达TGF-βRII和PD-1两者的细胞中阻断TGF-βRII介导的信号传导的所述效力比所述参考抗TGF-βRII抗体的所述效力更高,其中所述参考抗TGF-βRII抗体为二价单特异性抗体,所述二价单特异性抗体包含具有如SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列的重链和具有如SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列的轻链。

12.根据权利要求11所述的多特异性结合部分,其特征在于,所述多特异性结合部分在表达TGF-βRII和PD-1两者的细胞中阻断TGF-βRII介导的信号传导的所述效力比所述参考抗TGF-βRII抗体的所述效力高至少约100倍;优选地,介于约100倍至20000倍之间。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的多特异性结合部分,其特征在于,所述多特异

性结合部分在减小肿瘤体积方面具有比参考抗体的组合更高的活性,其中所述参考抗体的组合为两种靶向PD-1和TGF-βRII的二价单特异性抗体,其中靶向PD-1的所述二价单特异性抗体包含具有如SEQ ID NO:78所示的氨基酸序列的重链和具有如SEQ ID NO:79所示的氨基酸序列的轻链,并且靶向TGF-βRII的所述二价单特异性抗体包含具有如SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列的重链和具有如SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列的轻链。

14.根据权利要求13所述的多特异性结合部分,其特征在于,减小肿瘤体积的所述活性是通过在小鼠体内研究中,特别是在使用MDA-MB-231异种移植huCD34 NSG小鼠的小鼠体内研究中测量肿瘤体积减小来测定。

15.根据权利要求13或14所述的多特异性抗体,其特征在于,减小肿瘤体积的较高活性是肿瘤体积减小为所述参考抗体的组合的所述肿瘤体积减小的至少约1.5倍;优选地,介于约1.5倍至100倍之间。

16.一种包含PD-1结合域和TGF-βRII结合域的多特异性结合部分,其特征在于,所述PD-1结合域包含重链可变区,所述重链可变区包含:

a)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列;

b)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列;

c)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列;

d)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;或

e)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列;

其中,所述HCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异。

17.根据权利要求16所述的多特异性结合部分,其特征在于,所述PD-1结合域包含重链可变区,所述重链可变区具有如SEQ ID NO:1、5、9、13、14、18和19中任一项所示的氨基酸序列或与其具有至少80%,优选85%,更优选90%,或最优选95%序列同一性的氨基酸序列。

18.根据权利要求16或17所述的多特异性结合部分,其特征在于,所述PD-1结合域包含轻链可变区,所述轻链可变区包含分别具有如SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列或其变体的轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3)。

19.根据权利要求16至18中任一项所述的多特异性结合部分,其特征在于,所述PD-1结合域包含轻链可变区,所述轻链可变区具有如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列或与其具有至少80%,优选85%,更优选90%,或最优选95%序列同一性的氨基酸序列。

20.根据权利要求16或17所述的多特异性结合部分,其特征在于,所述TGF-βRII结合域包含重链可变区,所述重链可变区包含:

a)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列;

b)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列;

c)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列;

d)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列;

e)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列;

f)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列;或

g)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:91和SEQ ID NO:92所示的氨基酸序列,

其中,所述HCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异。

21.根据权利要求16至20中任一项所述的多特异性结合部分,其特征在于,所述TGF-βRII结合域包含重链可变区,所述重链可变区具有如SEQ ID NO:23、27、31、35、39、43、47、88和89中任一项所示的氨基酸序列或与其具有至少80%,优选85%,更优选90%,或最优选95%序列同一性的氨基酸序列。

22.根据权利要求16至21中任一项所述的多特异性结合部分,其特征在于,所述TGF-βRII结合域包含轻链可变区,所述轻链可变区包含分别具有如SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列或其变体的轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3)。

23.根据权利要求16至22中任一项所述的多特异性结合部分,其特征在于,所述TGF-βRII结合域包含轻链可变区,所述轻链可变区具有如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列或与其具有至少80%,优选85%,更优选90%,或最优选95%序列同一性的氨基酸序列。

24.一种包含PD-1结合域和TGF-βRII结合域的多特异性结合部分,其特征在于,所述TGF-βRII结合域包含重链可变区,所述重链可变区包含:

a)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列;

b)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列;

c)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列;

d)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列;

e)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列;

f)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列;或

g)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:91和SEQ ID NO:92所示的氨基酸序列,

其中,所述HCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异。

25.根据权利要求24所述的多特异性结合部分,其特征在于,所述TGF-βRII结合域包含重链可变区,所述重链可变区具有如SEQ ID NO:23、27、31、35、39、43、47、88和89中任一项所示的氨基酸序列或与其具有至少80%,优选85%,更优选90%,或最优选95%序列同一性的氨基酸序列。

26.根据权利要求24或25所述的多特异性结合部分,其特征在于,所述TGF-βRII结合域包含轻链可变区,所述轻链可变区包含分别具有如SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列或其变体的轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3)。

27.根据权利要求24至26中任一项所述的多特异性结合部分,其特征在于,所述TGF-βRII结合域包含轻链可变区,所述轻链可变区具有如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列或与其具有至少80%,优选85%,更优选90%,或最优选95%序列同一性的氨基酸序列。

28.根据权利要求24至27中任一项所述的多特异性结合部分,其特征在于,所述PD-1结合域包含重链可变区,所述重链可变区包含:

a)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列;

b)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列;

c)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列;

d)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;或

e)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列;

其中,所述HCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异。

29.根据权利要求24至28中任一项所述的多特异性结合部分,其特征在于,所述PD-1结合域包含重链可变区,所述重链可变区具有如SEQ ID NO:1、5、9、13、14、18和19中任一项所示的氨基酸序列或与其具有至少80%,优选85%,更优选90%,或最优选95%序列同一性的氨基酸序列。

30.根据权利要求24至29中任一项所述的多特异性结合部分,其特征在于,所述PD-1结合域包含轻链可变区,所述轻链可变区包含分别具有如SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列或其变体的轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3)。

31.根据权利要求24至30中任一项所述的多特异性结合部分,其特征在于,所述PD-1结合域包含轻链可变区,所述轻链可变区具有如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列或与其具有至少80%,优选85%,更优选90%,或最优选95%序列同一性的氨基酸序列。

32.一种包含PD-1结合域和TGF-βRII结合域的多特异性结合部分,所述多特异性结合部分与根据权利要求1至31中任一项所述的多特异性结合部分竞争以与PD-1和/或TGF-βRII结合。

33.一种药物组合物,所述药物组合物包含有效量的根据权利要求1至32中任一项所述

的多特异性结合部分,和药学上可接受的载体。

34.根据权利要求1至32中任一项所述的多特异性结合部分或根据权利要求33所述的药物组合物用于治疗。

35.根据权利要求1至32中任一项所述的多特异性结合部分或根据权利要求33所述的药物组合物用于治疗与受抑制的免疫系统相关联的疾病,特别是癌症。

36.一种用于治疗疾病的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据权利要求1至32中任一项所述的多特异性结合部分或根据权利要求33所述的药物组合物。

37.一种用于治疗与受抑制的免疫系统相关联的疾病,特别是癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据权利要求1至32中任一项所述的多特异性结合部分或根据权利要求33所述的药物组合物。

38.一种细胞,所述细胞包含编码如权利要求16或17中所定义的PD-1结合域的所述重链可变区的核酸序列以及编码如权利要求20或21中所定义的TGF-βRII结合域的所述重链可变区的核酸序列。

39.根据权利要求38所述的细胞,其特征在于,所述细胞还包含编码CH1区以及优选地编码铰链、CH2区和CH3区的核酸序列。

40.根据权利要求38或39所述的细胞,其特征在于,所述细胞还包含至少一种编码轻链可变区,特别是如权利要求18或19中所定义的轻链可变区,以及优选地编码CL区的核酸序列。

41.一种细胞,所述细胞产生根据权利要求1至32中任一项所述的多特异性结合部分。

包含PD-1和TGF-βRII结合域的多特异性结合部分

[0001] 本申请是申请日为2022年11月18日、申请号为202280076849X、发明创造名称为“包含PD-1和TGF-βRII结合域的多特异性结合部分”的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本公开涉及抗体的领域。具体地,本公开涉及治疗性抗体的领域,该治疗性抗体用于治疗涉及异常细胞的疾病。更具体地,本公开涉及多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含与PD-1结合的结合域和与TGF-βRII结合的结合域。

背景技术

[0003] 尽管已知T淋巴细胞在肿瘤免疫监视中的作用,但癌细胞能够通过诱导抑制性免疫通路而逃避免疫控制。因此,免疫检查点阻断(ICB)(其中使用抗体来阻断抑制性免疫通路)已成为一种有前景的治疗选择,并且已经在临床前和临床研究中证明可以增强和维持对某些癌症的内源性免疫。

[0004] 程序性死亡1(PD-1)和程序性死亡配体1(PD-L1)是在正常生理学中抑制T细胞活性的免疫抑制网络的组成部分,但可被肿瘤利用来抑制T细胞介导的抗肿瘤免疫反应。针对PD-1和PD-L1的抗体已经改善了一些患有几种不同癌症的患者的反应和存活率。然而,尽管具有良好的临床活性,但只有少数患者对抗PD-1/PD-L1疗法有响应,且持久性有限。因此,迫切需要开发新的、安全且有效的治疗癌症的疗法。

[0005] 程序性细胞死亡1蛋白(PD-1)为一种细胞表面受体,其属于CD28受体家族,并在T细胞和前B细胞上表达。目前已知PD-1结合两种配体PD-L1和PD-L2。PD-1作为免疫检查点,通过抑制T细胞的活化在下调免疫系统中发挥重要作用,而PD-1在体细胞上存在时,会降低自身免疫并促进自我耐受。PD-1的抑制作用被认为是通过促进淋巴结中抗原特异性T细胞的凋亡(程序性细胞死亡),而同时减少调节性T细胞(抑制性T细胞)的凋亡的双重机制来实现的。还已知PD-1有许多不同的别名,诸如PDCD1、程序性细胞死亡1、系统性红斑狼疮易感性2、蛋白质PD-1、HPD-1、PD1、程序性细胞死亡1蛋白、CD279抗原、CD279、HPD-L、HSLE1、SLEB2和PD-1。PD-1的外部ID为HGNC:8760,Entrez基因:5133,Ensembl:ENSG00000188389,OMIM:600244,以及UniProtKB:Q15116。阻断PD-1活性的新型药物,PD-1抑制剂,激活免疫系统以攻击肿瘤,并因此用于治疗一些类型的癌症。

[0006] 已批准靶向PD-1的单克隆抗体用于治疗各种恶性肿瘤。例如,尽管70%至80%的患者最初有反应,但用抗PD-1抗体(帕博利珠单抗)治疗的黑素瘤患者在3年时的反应率为33%(Ribas A.等人,Association of Pembrolizumab With Tumor Response and Survival Among Patients With Advanced Melanoma,JAMA,2016年4月19日,第315卷第15期:第1600-1609页)。

[0007] TGF-β信号传导调节了过多的生理和病理过程,包括上皮细胞和造血细胞的细胞周期停滞、间充质细胞增殖和分化的控制、伤口愈合、细胞外基质产生、免疫抑制和致癌作用(MassaguéJ.,TGFβsignalling in context,Nat Rev Mol Cell Biol,2012年10月,第13

卷第10期:第616-630页)。此外,TGF-β信号传导调节了许多癌细胞功能,包括细胞周期进程、凋亡、粘附和分化(Liu S等人,Signal Transduction and targeted Therapy,2021年)。TGF-β表现出双相功能,使得在正常细胞和癌变前的细胞中,TGF-β主要被报道用作肿瘤抑制剂;而在肿瘤细胞中,TGF-β允许生长促进功能和上皮细胞向间充质细胞的转化,从而允许肿瘤细胞迁移、侵袭、内渗和外渗。

[0008] TGF-βRII是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族和TGFB受体亚家族的成员。已知其具有各种同义词,包括TGFBR2、AAT3、FAA3、LDS1B、LDS2、LDS2B、MFS2、RIIC、TAAD2、TGFR-2、TGFβ-RII、转化生长因子β受体2、TBR-ii和TBRII。TGF-βRII与另一种受体蛋白形成异二聚体复合物,并结合TGF-β。这种受体/配体复合物使蛋白质磷酸化,然后这些蛋白质进入细胞核并调节与细胞增殖相关的基因子集的转录。

[0009] 几种靶向TGF-β通路的抑制剂正处于临床前和临床开发阶段,并在不同水平上(即在配体水平、配体-受体水平或细胞内水平上)抑制TGF-β。这些抑制剂包括例如,TGF-β中和单克隆抗体、抗TGF-βRII抗体、可溶性受体、抗体配体陷阱(例如,抗PD-L1-TGF-βRIIECD)、阻止TGF-β合成的反义寡核苷酸、TGF-β2反义基因修饰的同种异体癌细胞疫苗和靶向TGF-βRI的激酶结构域的小分子。

[0010] 据报道,用单特异性抗体靶向TGF-β通路在体外和体内显示出抗肿瘤活性;然而,持续存在疗效低且毒性不可接受的不良临床结果,包括主要的细胞因子释放综合征(CRS)。已经尝试用Bintrafuspα(一种抗PD-L1-TGFBRII双功能融合蛋白)联合靶向TGF-β通路和免疫检查点抑制,但临床效果不明显。

[0011] 仍然需要新的治疗干预措施,它们选择性地抑制局部处于肿瘤微环境中的活化的表达肿瘤特异性PD-1的T细胞中的TGF-β信号传导,以便促进T细胞肿瘤浸润,并恢复和维持T细胞抗肿瘤效应活性。这种靶向将缓解免疫抑制通路,以有效促进CTL功能和T细胞记忆,从而有效持久地消除癌症,同时最大限度地减少与全身TGF-β阻断相关联的毒性。

发明内容

[0012] 本公开的目的中的一个目的是提供一种用于治疗人类疾病,特别是用于治疗癌症的新型药物制剂。通过提供结合PD-1和TGF-βRII的多特异性结合部分,例如双特异性抗体,实现了该目的。多特异性结合部分的PD-1结合域旨在驱动多特异性结合部分对肿瘤和肿瘤引流淋巴结中活化/耗竭的效应T细胞的特异性,其中TGF-βRII结合域可局部阻断TGF-β与TGF-βRII的结合,从而降低TGF-β抑制对非T细胞的全身毒性。另外,多特异性结合部分缓解PD1-和TGF-β两者介导的免疫抑制通路,以提升肿瘤微环境中细胞毒性T淋巴细胞的活性。

[0013] 本公开提供了一种包含PD-1结合域和TGF-βRII结合域的多特异性结合部分,其中PD-1结合域阻断PD-1介导的信号传导,并且TGF-βRII结合域阻断TGF-βRII介导的信号传导。

[0014] 本公开还提供了一种包含PD-1结合域和TGF-βRII结合域的多特异性结合部分,其中PD-1结合域包含重链可变区,该重链可变区包含如本文进一步描述的CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0015] 本公开还提供了一种包含PD-1结合域和TGF-βRII结合域的多特异性结合部分,其中TGF-βRII结合域包含重链可变区,该重链可变区包含如本文进一步描述的CDR1、CDR2和

CDR3序列。

[0016] 本公开还提供了一种药物组合物,该药物组合物包含有效量的如本文所述的多特异性结合部分。

[0017] 本公开还提供了一种用于治疗的如本文所述的多特异性结合部分和如本文所述的药物组合物。

[0018] 本公开还提供了一种用于治疗癌症的如本文所述的多特异性结合部分和如本文所述的药物组合物。

[0019] 本公开还提供了一种用于治疗疾病的方法,该方法包括向有需要的个体施用有效量的如本文所述的多特异性结合部分或如本文所述的药物组合物。

[0020] 本公开还提供了一种用于治疗癌症的方法,该方法包括向有需要的个体施用有效量的如本文所述的多特异性结合部分或如本文所述的药物组合物。

[0021] 本公开还提供一种细胞,该细胞包含编码如本文所述的PD-1结合域的重链可变区的核酸序列和编码如本文所述的TGF-βRII结合域的重链可变区的核酸序列。

[0022] 本公开还提供了一种细胞,该细胞产生如本文所述的多特异性结合部分。

附图说明

[0023] 以下命名约定在本文中如下使用。在图中,二价单特异性抗体以SEQ ID NO:A/SEQ ID NO:B的形式表示,其中SEQ ID NO:A是指两个结合域的重链,并且SEQ ID NO:B是指两个结合域的轻链。

[0024] 二价双特异性抗体以SEQ ID NO:A×SEQ ID NO:B的形式表示,其中SEQ ID NO:A和SEQ ID NO:B两者均是指重链可变序列。双特异性抗体的每个结合域包含相同的轻链。

[0025] 二价单特异性参考抗体帕博利珠单抗、纳武利尤单抗和TGF1类似物以SEQ ID NO:A/SEQ ID NO:B的形式表示,其中SEQ ID NO:A是指相应的重链序列,并且SEQ ID NO:B是指相应的轻链序列。帕博利珠单抗和TGF1类似物的组合以SEQ ID NO:A/SEQ ID NO:B+SEQ ID NO:C/SEQ ID NO:D的形式表示,其中SEQ ID NO:A是指帕博利珠单抗或TGF1类似物的重链序列,并且SEQ ID NO:B是指帕博利珠单抗或TGF1类似物的轻链序列,并且SEQ ID NO:C是指帕博利珠单抗或TGF1类似物中另一者的重链序列,并且SEQ ID NO:D是指帕博利珠单抗或TGF1类似物中另一者的轻链序列。

[0026] 参考PD-L1-TGF-βTRAP分子类似物,其是Bintrafuspα的类似物,以SEQ ID NO:A/SEQ ID NO:B的形式表示,其中SEQ ID NO:A是指包含$(G_4S)_4G$接头和TGF-βRII的胞外结构域的重链序列,并且SEQ ID NO:B是指轻链序列。参考PD-L1-TGF-βTRAP分子类似物包含两个PD-L1结合域和两个TGF-βRII胞外结构域。

[0027] 图1A-图1B如在PD-1-SHP募集测定中测量的双特异性抗体和对照抗体对PD-1介导的SHP募集的抑制百分比。图1A的双特异性抗体为:SEQ ID NO:39×SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:35×SEQ ID NO:5。对照抗体为:帕博利珠单抗类似物-SEQ ID NO:78/SEQ ID NO:79、PD-L1-TGF-βTRAP分子类似物-SEQ ID NO:80/SEQ ID NO:81和TGF1类似物-SEQ ID NO:76/SEQ ID NO:77。

[0028] 图1B的双特异性抗体为:SEQ ID NO:23×SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:47×SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:88×SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:89×SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23×SEQ

ID NO:14和SEQ ID NO:43×SEQ ID NO:9。对照抗体为:帕博利珠单抗类似物-SEQ ID NO:78/SEQ ID NO:79和RSV IgG1-SEQ ID NO:86/SEQ ID NO:87。

[0029] 图2A-图2C如在PD-1-NFAT报告基因测定中测量的双特异性抗体和对照抗体对T细胞活化的诱导倍数。图2A的双特异性抗体为:SEQ ID NO:39×SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:35×SEQ ID NO:5。对照抗体为:帕博利珠单抗类似物-SEQ ID NO:78/SEQ ID NO:79、PD-L1-TGF-βTRAP分子类似物-SEQ ID NO:80/SEQ ID NO:81和TGF1类似物-SEQ ID NO:76/SEQ ID NO:77。

[0030] 图2B的双特异性抗体为:SEQ ID NO:47×SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:88×SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:89×SEQ ID NO:13。对照抗体为:帕博利珠单抗类似物-SEQ ID NO:78/SEQ ID NO:79和RSV IgG1-SEQ ID NO:86/SEQ ID NO:87。

[0031] 图2C的双特异性抗体为:SEQ ID NO:23×SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:23×SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:43×SEQ ID NO:9。对照抗体为:帕博利珠单抗类似物-SEQ ID NO:78/SEQ ID NO:79和RSV IgG1-SEQ ID NO:86/SEQ ID NO:87。

[0032] 图3-在Jurkat-PD-1^{null}(A-G)细胞和Jurkat-PD-1^{+}细胞(H-N)中双特异性抗体和对照抗体对磷酸化SMAD2/3的抑制。这些图显示了与双特异性抗体或对照抗体一起孵育的Jurkat-PD-1^{null}细胞和Jurkat-PD-1^{+}细胞的裂解物中的磷酸化SMAD2/3水平。“无TGF-β1”表示如在不存在双特异性抗体的情况下测量的当不添加TGF-β配体时的背景磷酸化SMAD2/3水平;“10ng/mL TGF-β1”表示在不存在双特异性抗体的情况下添加10ng/mL的TGF-β配体时的最大磷酸化SMAD2/3水平。对照抗体为:RSV IgG1-SEQ ID NO:86/SEQ ID NO:87、TGF1类似物-SEQ ID NO:76/SEQ ID NO:77和TGF-βRII×RSV抗体,该抗体包含TGF-βRII结合域、RSV结合域和共同轻链,该TGF-βRII结合域包含如SEQ ID NO:23、31、39、27、35或43所示的重链可变区氨基酸序列;该RSV结合域包含SEQ ID NO:86所示的重链可变区氨基酸序列;该共同轻链包含如SEQ ID NO:48所示的轻链可变区氨基酸序列和如SEQ ID NO:75所示的轻链恒定区氨基酸序列。每个数据点代表相应重复品的平均吸光度。A和H:双特异性抗体,这些双特异性抗体包含PD-1结合域和TGF-βRII结合域,该PD-1结合域含有具有如SEQ ID NO:1、5、9、14或19所示的氨基酸序列的重链可变区,该TGF-βRII结合域含有具有如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的重链可变区;B和I:双特异性抗体,这些双特异性抗体包含PD-1结合域和TGF-βRII结合域,该PD-1结合域含有具有如SEQ ID NO:1、5、9、14或19所示的氨基酸序列的重链可变区,该TGF-βRII结合域含有具有如SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列的重链可变区;C和J:双特异性抗体,其包含PD-1结合域和TGF-βRII结合域,该PD-1结合域含有具有如SEQ ID NO:1、5、9、14或19所示的氨基酸序列的重链可变区,该TGF-βRII结合域含有具有如SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列的重链可变区;D和K:双特异性抗体,这些双特异性抗体包含PD-1结合域和TGF-βRII结合域,该PD-1结合域含有具有如SEQ ID NO:1、5、9、14或19所示的氨基酸序列的重链可变区,该TGF-βRII结合域含有具有如SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列的重链可变区;E和L:双特异性抗体,这些双特异性抗体包含PD-1结合域和TGF-βRII结合域,该PD-1结合域含有具有如SEQ ID NO:1、5、9、14或19所示的氨基酸序列的重链可变区,该TGF-βRII结合域含有具有如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列的重链可变区;F和M:双特异性抗体,这些双特异性抗体包含PD-1结合域和TGF-βRII结合域,该PD-1结合域含有具有如SEQ ID NO:1、5、9、14或19所示的氨基酸序列的重链可变区,该TGF-βRII结合域含有具

有如SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列的重链可变区;G和N:双特异性抗体为:SEQ ID NO:23×SEQ ID NO:9;SEQ ID NO:23×SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:43×SEQ ID NO:9;SEQ ID NO:23×SEQ ID NO:13;SEQ ID NO:23×SEQ ID NO:18;SEQ ID NO:47×SEQ ID NO:13;SEQ ID NO:88×SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:89×SEQ ID NO:13。对照抗体为:RSV IgG1-SEQ ID NO:86/SEQ ID NO:87;TGF1类似物-SEQ ID NO:76/SEQ ID NO:77;和帕博利珠单抗-SEQ ID NO:78/SEQ ID NO:79。

[0033] 图4-通过流式细胞术进行的胞内磷酸化SMAD2测量。这些图显示了与双特异性抗体或对照抗体一起孵育的受刺激和未受刺激的$CD4^+$和$CD8^+$T细胞的胞内磷酸化SMAD2水平。双特异性抗体为:SEQ ID NO:23×SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:47×SEQ ID NO:13。对照抗体为:RSV IgG1-SEQ ID NO:86/SEQ ID NO:87、TGF1类似物-SEQ ID NO:76/SEQ ID NO:77和帕博利珠单抗-SEQ ID NO:78/SEQ ID NO:79。

[0034] A:受供体A刺激的$CD4^+$T细胞、B:受供体A刺激的$CD8^+$T细胞、C:未受供体A刺激的$CD4^+$T细胞、D:未受供体A刺激的$CD8^+$T细胞、E:受供体B刺激的$CD4^+$T细胞、F:受供体B刺激的$CD8^+$T细胞、G:未受供体B刺激的$CD4^+$T细胞、H:未受供体B刺激的$CD8^+$T细胞。

[0035] 图5-在耗竭MLR测定中由双特异性抗体或对照抗体诱导的细胞因子产生的测量。测试的双特异性抗体为:SEQ ID NO:23×SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:23×SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:23×SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:31×SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:39×SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:35×SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:35×SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:35×SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:27×SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:43×SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:43×SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:23×SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23×SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:47×SEQ ID NO:13;SEQ ID NO:88×SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:89×SEQ ID NO:13。对照抗体为:RSV IgG1-SEQ ID NO:86/SEQ ID NO:87、TGF1类似物-SEQ ID NO:76/SEQ ID NO:77、帕博利珠单抗和TGF1类似物的组合-SEQ ID NO:78/SEQ ID NO:79+SEQ ID NO:76/SEQ ID NO:77、PD-L1-TGF-βTRAP分子类似物-SEQ ID NO:80/SEQ ID NO:81和帕博利珠单抗-SEQ ID NO:78/SEQ ID NO:79。A:该图显示了一个代表性供体的耗竭T细胞对IFN-γ细胞因子分泌的诱导。B:该图显示了一个代表性供体的耗竭T细胞对IFN-γ细胞因子分泌的诱导。C:该图显示了一个代表性供体中的耗竭T细胞对IL-2细胞因子分泌的诱导。D:该图显示了一个代表性供体中的耗竭T细胞对TNF-α细胞因子分泌的诱导。E:该图显示了一个代表性供体中的耗竭T细胞对TNF-α细胞因子分泌的诱导。

[0036] 图6-由双特异性抗体或对照抗体诱导的TGF-β诱导的信号传导抑制%的测量。双特异性抗体为:SEQ ID NO:23×SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:23×SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:39×SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:35×SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:35×SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:35×SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:27×SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:43×SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:43×SEQ ID NO:19。对照抗体为:RSV IgG1-SEQ ID NO:86/SEQ ID NO:87、TGF1类似物-SEQ ID NO:76/SEQ ID NO:77和帕博利珠单抗-SEQ ID NO:78/SEQ ID NO:79。A和B:这些图显示了在HEK-Blue™TGF-β细胞中双特异性抗体或对照抗体对TGF-β信号传导的抑制。C和D:这些图显示了在HEK-Blue™TGF-β-PD-1^+细胞中双特异性抗体或对照抗体对TGF-βR信号传导的抑制。

[0037] 图7-在Treg抑制测定中由双特异性抗体或对照抗体诱导的细胞因子产生的测量。

双特异性抗体为:SEQ ID NO:23×SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:23×SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:31×SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:39×SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:35×SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:35×SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:35×SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:27×SEQ ID NO:9;SEQ ID NO:43×SEQ ID NO:9;和SEQ ID NO:43×SEQ ID NO:19。对照抗体为:RSV IgG1-SEQ ID NO:86/SEQ ID NO:87;TGF1类似物-SEQ ID NO:76/SEQ ID NO:77;帕博利珠单抗和TGF1类似物的组合-SEQ ID NO:78/SEQ ID NO:79+SEQ ID NO:76/SEQ ID NO:77;和帕博利珠单抗-SEQ ID NO:78/SEQ ID NO:79。A:该图显示了在一种代表性供体的Treg与PBMC共培养物中IFN-γ细胞因子分泌的诱导。B:该图显示了在一种代表性供体的Treg与PBMC共培养物中TNF-α细胞因子分泌的诱导。

[0038] 图8-在巨噬细胞抑制测定中由双特异性抗体或对照抗体诱导的细胞因子产生的测量。双特异性抗体为:SEQ ID NO:35×SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:23×SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:23×SEQ IDNO:19、SEQ ID NO:43×SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:39×SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:43×SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:35×SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:35×SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:31×SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:27×SEQ ID NO:9。对照抗体为:RSV IgG1-SEQ ID NO:86/SEQ ID NO:87、TGF1类似物-SEQ ID NO:76/SEQ ID NO:77、Opdivo、LILRB2、PD-L1-TGF-βTRAP分子类似物-SEQ ID NO:80/SEQ ID NO:81、帕博利珠单抗-SEQ ID NO:78/SEQ ID NO:79和纳武利尤单抗类似物-SEQ ID NO:96/SEQ ID NO:97。A:这些图显示了CD163、CD209、CD206和CD86在从三个不同供体的PBMC获得的M2巨噬细胞上的表达。B:这些图显示了在从三个不同供体的PBMC获得的M2巨噬细胞的存在下,$CD4^+$T细胞对IFN-γ细胞因子分泌的诱导。

[0039] 图9-双特异性抗体的体内功效。A:该图显示了由对照抗体和参考抗体诱导的肿瘤体积减小(以mm^3为单位)。B-E:这些图显示与对照抗体和参考抗体相比,双特异性抗体诱导的肿瘤体积减小(以mm^3为单位)。双特异性抗体为:SEQ ID NO:43×SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:43×SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:23×SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:23×SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:39×SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:27×SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:23×SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:47×SEQ ID NO:13。对照抗体为:RSV IgG1-SEQ ID NO:86/SEQ ID NO:87、TGF1类似物-SEQ ID NO:76/SEQ ID NO:77、帕博利珠单抗-SEQ ID NO:78/SEQ ID NO:79、PD-L1-TGF-βTRAP分子类似物-SEQ ID NO:80/SEQ ID NO:81和帕博利珠单抗和TGF1类似物的组合-SEQ ID NO:78/SEQ ID NO:79+SEQ ID NO:76/SEQ ID NO:77。双特异性抗体以1mg/kg(1)和/或10mg/kg(10)(A-C)和仅10mg/kg(D-F)给药。F:左图显示了用双特异性抗体或对照抗体处理后TGF-βRII受体占用,并且右图显示了PD-1受体占用。

[0040] 图10-载体图谱。

[0041] 图11-双特异性抗体的体内功效。该图显示了与对照抗体在10mg/kg下相比,示例性双特异性抗体在两种不同剂量水平(1mg/kg和10mg/kg)下诱导的肿瘤体积减小(以mm^3为单位)。双特异性抗体为:SEQ ID NO:23×SEQ ID NO:18,并且对照抗体为:SEQ ID NO:86/SEQ ID NO:87。

具体实施方式

[0042] 在某些实施方案中,本公开提供了一种多特异性结合部分,该多特异性结合部分

包含PD-1结合域和TGF-βRII结合域,其中该PD-1结合域阻断PD-1介导的信号传导,并且该TGF-βRII结合域阻断TGF-βRII介导的信号传导。

[0043] 如本文所用,“阻断”是指干扰或改变配体与受体之间的相互作用,或导致信号转导级联的全部或部分减少。为了本公开的目的,在某些实施方案中,阻断配体诱导的PD-1信号传导的效力通过使用如实施例2中所述的SHP募集测定或如实施例3中所述的NFAT报告基因测定来测定。在某些实施方案中,阻断配体诱导的PD-1信号传导的效力通过使用如实施例2中所述的SHP募集测定来测定。在某些实施方案中,阻断配体诱导的PD-1信号传导的效力通过使用如实施例3中所述的NFAT报告基因测定来测定。为了本公开的目的,在某些实施方案中,阻断配体诱导的TGF-βRII信号传导的效力通过使用如实施例4或5中所述的SMAD测定来测定。在某些实施方案中,阻断配体诱导的TGF-βRII信号传导的效力通过使用如实施例4中所述的SMAD测定来测定。在某些实施方案中,阻断配体诱导的TGF-βRII信号传导的效力通过使用如实施例5中所述的SMAD测定来测定。

[0044] 在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分与人PD-1结合。在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的PD-1结合域阻断PD-L1与PD-1的结合,例如如在实施例2或3中所述的测定中测量的。

[0045] 在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分与人TGF-βRII结合。人TGF-βRII是一种跨膜蛋白,其具有不同的同种型。人TGF-βRII同种型A的氨基酸序列提供为SEQ ID NO:82;人TGF-βRII同种型A的胞外结构域的氨基酸序列提供为SEQ ID NO:83。人TGF-βRII同种型B是一种剪接变体,该剪接变体由于插入胞外结构域而编码较长的同种型。人TGF-βRII同种型B的氨基酸序列提供为SEQ ID NO:84;人TGF-βRII同种型B的胞外结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:85所示。

[0046] “结合部分”是指蛋白质分子,并包括例如本领域中可用的所有抗体形式,诸如例如全长IgG抗体、免疫缀合物、双抗体、BiTE、Fab片段、scFv、串联scFv、单结构域抗体(如VHH和VH)、小抗体、scFab、scFv-拉链、纳米抗体、DART分子、TandAb、Fab-scFv、F(ab)’2、F(ab)’2-scFv2和胞内抗体。

[0047] 在某些实施方案中,多特异性结合部分是多特异性抗体。根据本公开的多特异性抗体是包含至少两个结合域的抗体,该至少两个结合域对至少两个不同的靶标或表位具有特异性。在某些实施方案中,本公开的多特异性抗体是双特异性抗体。在某些实施方案中,本公开的多特异性抗体还可以包含Fc区或其部分。在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分是IgG1抗体。本公开的结合部分的恒定区可以包括一种或多种变异,该一种或多种变异调节结合部分的特性而不是其与靶抗原的结合特性。例如,恒定区可以包括一种或多种变异,该一种或多种变异促进PD-1和TGF-βRII重链的异源二聚而不是两个PD-1重链和/或两个TGF-βRII重链的同源二聚,并且/或者恒定区可以包括一种或多种减少或改善效应功能的变异,特别是一种或多种减少效应功能的变异。

[0048] “Fab”通常是指包含重链可变区、轻链可变区、CH1区和CL区的结合域。

[0049] 在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分包含结合PD-1的单个Fab结构域、结合TGF-βRII的单个Fab结构域、和Fc区。在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分由结合PD-1的单个Fab结构域、结合TGF-βRII的单个Fab结构域、和Fc区组成。在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分基本上由结合PD-1的单个Fab结构域、结合TGF-βRII的单

个Fab结构域、和Fc区组成。

[0050] “Fc区”通常包含铰链、CH2区和CH3区。合适的铰链包括但不限于其氨基酸序列如SEQ ID NO:68所示的铰链。合适的CH2区和CH3区包括但不限于其氨基酸序列如SEQ ID NO:70或71所示的CH2区,以及其氨基酸序列如SEQ ID NO:72或73和74所示的CH3区。

[0051] CL区、CH1区、CH2区和/或CH3区可根据本领域已知的方法进行修饰,以便获得有利的抗体特征,该抗体特征包括例如促进不同重链的异源二聚,改善重-轻链配对,以及增强或降低免疫细胞效应功能。

[0052] 在某些实施方案中,在活化的T细胞,特别是活化的肿瘤特异性T细胞中,多特异性结合部分的PD-1结合域阻断PD-1介导的信号传导,并且多特异性结合部分的TGF-βRII结合域阻断TGF-βRII介导的信号传导。

[0053] 在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分阻断TGF-βRII介导的信号传导的效力在表达PD-1和TGF-βRII两者的细胞中比在表达TGF-βRII且不表达、基本上不表达或表达低水平的PD-1的细胞中更高。

[0054] 因此,本公开还提供了包含PD-1结合域和TGF-βRII结合域的多特异性结合部分,其中该多特异性结合部分阻断TGF-βRII介导的信号传导的效力在表达PD-1和TGF-βRII两者的细胞中比在表达TGF-βRII且不表达、基本上不表达或表达低水平的PD-1的细胞中更高。

[0055] 在某些实施方案中,表达PD-1和TGF-βRII两者的细胞是Jurkat-PD-1^{+}细胞,诸如例如表达人PD-1和由NFAT反应元件(NFAT-RE)驱动的荧光素酶报告基因的Jurkat T细胞,并且表达TGF-βRII且不表达PD-1的细胞是Jurkat-PD-1^{null}细胞,例如Jurkat-PD-1^{null}细胞。表达人PD-1和由NFAT-RE驱动的荧光素酶报告基因的Jurkat T细胞例如可从普洛麦格(Promega)商购获得(目录号CS187105,试剂盒CS187106和CS187107的一部分);Jurkat-PD-1^{null}细胞例如可从ATCC(目录号TIB-152)公开获得。

[0056] 在某些实施方案中,表达PD-1和TGF-βRII两者的细胞是受刺激的$CD4^{+}$或$CD8^{+}$细胞,并且表达TGF-βRII和低水平PD-1的细胞是未受刺激的$CD4^{+}$或$CD8^{+}$细胞。在某些实施方案中,受刺激的$CD4^{+}$或$CD8^{+}$细胞是用重组人TGF-β1刺激的。

[0057] 在某些实施方案中,表达PD-1和TGF-βRII两者的细胞是HEK-Blue™TGF-β-PD-1^{+}细胞,诸如例如实施例7中所述,并且表达TGF-βRII且不表达PD-1的细胞是HEK-Blue™TGF-β细胞,诸如例如HEK-Blue™TGF-β细胞。HEK-Blue™TGF-β细胞,例如可从Invivogen商购获得(目录号hkb-tgfb),是包含人TGFBRI、Smad3和Smad4基因的稳定转染的人胚肾HEK 293细胞。它们还表达Smad3/4-结合元件(SBE)-诱导型SEAP报告基因。

[0058] 在某些实施方案中,不表达、基本上不表达或表达低水平的PD-1是指在如本文所述的合适测定中细胞表面上的无法检测到的PD-1水平。在某些实施方案中,低水平的PD-1是指在细胞表面上存在的少于100个PD-1分子。在某些实施方案中,PD-1的水平使用Quantibrite珠法测量。

[0059] 为了本公开的目的,通过使用本文所述的测定中的一者来确定多特异性结合部分阻断TGF-βRII介导的信号传导的效力在表达PD-1和TGF-βRII两者的细胞中是否比在表达TGF-βRII且不表达、基本上不表达或表达低水平的PD-1的细胞中更高。

[0060] 如本文提供的多特异性结合部分的效力数据是用如实施例4和实施例5中所述的

磷酸化SMAD2/3测定以及如实施例7中所述的同基因HEK-BLUE-PD-1TGF-β报告基因测定获得的。因此,在某些实施方案中,阻断TGF-βRII介导的信号传导的效力在如实施例4或实施例5中所述的磷酸化SMAD2/3测定中测量。

[0061] 简言之,如实施例4中所述的磷酸化SMAD2/3测定是使用培养在RPMI/10％ FBS中的Jurkat-PD-1^{null}和Jurkat-PD-1^{+}细胞进行的。将细胞与6步系列稀释液(100μg/mL至0.001μg/mL)中的测试抗体或对照抗体在37℃/5％ CO_2下孵育一小时。一小时后,以10ng/mL的最终浓度加入人重组TGF-β1,并将细胞在37℃/5％ CO_2下再孵育两小时。孵育后,用PBS轻轻洗涤细胞。使用含有磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液制备细胞裂解物。使用ELISA测定磷酸化SMAD2/3水平。

[0062] 简言之,如实施例5中所述的磷酸化SMAD2/3测定是使用来自健康供体的PBMC进行的,用1μg/mL抗CD3刺激PBMC 48小时,然后在0.1％FBS中进行16小时的血清剥夺。将受刺激和未受刺激的PBMC与测试抗体和对照抗体在室温下孵育30分钟。以1ng/mL的最终浓度加入重组人TGF-β1,并将细胞再孵育30分钟。最后,用PBS洗涤细胞两次,并对细胞表面标志物进行染色,然后进行细胞内磷酸化SMAD2染色。进行流式细胞术以门控$CD4^{+}$和$CD8^{+}$细胞。磷酸化SMAD2信号的平均几何荧光强度(GMFI)在这些细胞上测量。

[0063] 在某些实施方案中,阻断TGF-βRII介导的信号传导的效力在如实施例7中所述的同基因HEK-BLUE-PD-1TGF-β报告基因测定中测量。

[0064] 简言之,HEK-BLUE-PD-1TGF-β报告基因测定是使用HEK-Blue™TGF-β细胞和HEK-Blue™TGF-β-PD-1^{+}细胞以25000个细胞/孔的速度进行的。加入测试抗体和对照抗体的系列稀释液,并将细胞在室温下孵育一小时,然后加入最终浓度为1ng/mL的人重组TGF-β1。将细胞在37℃/5％ CO_2下孵育过夜。孵育后,将40μl的上清液和160μl的再悬浮的QUANTI-Blue™溶液在37℃/5％ CO_2下孵育40分钟。使用QUANTI-Blue™溶液评估上清液中分泌的SEAP的量。SEAP水平是使用分光光度计在650nm处测定的。

[0065] 在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分阻断TGF-βRII介导的信号传导的效力在表达PD-1和TGF-βRII两者的细胞中比在表达TGF-βRII且不表达PD-1的细胞中高至少约10倍,优选介于约10倍至100000倍之间。在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分阻断TGF-βRII介导的信号传导的效力在表达PD-1和TGF-βRII两者的细胞中比在表达TGF-βRII且不表达PD-1的细胞中高至少10倍,优选介于10倍至100000倍之间。在某些实施方案中,阻断TGF-βRII介导的信号传导的效力是在磷酸化SMAD2/3测定或HEK-BLUE-PD-1TGF-β报告基因测定中以IC50(μg/mL)测定的。在某些实施方案中,阻断TGF-βRII介导的信号传导的效力是在磷酸化SMAD2/3测定中以IC50(μg/mL)测定的。在某些实施方案中,阻断TGF-βRII介导的信号传导的效力是在HEK-BLUE-PD-1TGF-β报告基因测定中以IC50(μg/mL)测定的。

[0066] 在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分在表达TGF-βRII且不表达、基本上不表达或表达低水平的PD-1的细胞中阻断TGF-βRII介导的信号传导的效力比靶向相同细胞的参考抗TGF-βRII抗体的效力更低,并且该多特异性结合部分在表达TGF-βRII和PD-1两者的细胞中阻断TGF-βRII介导的信号传导的效力比靶向相同细胞的参考抗TGF-βRII抗体的效力更高,其中该参考抗TGF-βRII抗体是二价单特异性抗体,该二价单特异性抗体包含具有如SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列的重链和具有如SEQ ID NO:77所示的氨基酸序

列的轻链。

[0067] 在某些实施方案中,表达PD-1和TGF-βRII两者的细胞是Jurkat-PD-1^{+}细胞、受刺激的CD4^{+}或CD8^{+}细胞、或HEK-Blue^{TM}TGF-β-PD-1^{+}细胞;表达TGF-βRII且不表达、或基本上不表达PD-1的细胞是Jurkat-PD-1^{null}细胞或是HEK-Blue^{TM}TGF-β细胞;并且表达TGF-βRII和低水平的PD-1的细胞是未受刺激的CD4^{+}或CD8^{+}细胞,如本文进一步所述。

[0068] 在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分在表达TGF-βRII和PD-1两者的细胞中阻断TGF-βRII介导的信号传导的效力比参考抗TGF-βRII抗体的效力高至少10倍,优选地介于10倍至100000倍之间。在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分在表达TGF-βRII和PD-1两者的细胞中阻断TGF-βRII介导的信号传导的效力比参考抗TGF-βRII抗体的效力高至少约10倍,优选地介于约10倍至100000倍之间。在某些实施方案中,参考TGF-βRII抗体是二价单特异性抗体,该二价单特异性抗体包含具有如SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列的重链和具有如SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列的轻链。在某些实施方案中,阻断TGF-βRII介导的信号传导的效力是在磷酸化SMAD2/3测定中以IC50(μg/mL)测定的。

[0069] 在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分在减小肿瘤体积方面具有比参考抗体的组合更高的活性。在某些实施方案中,参考抗体的组合是两种靶向PD-1和TGF-βRII的二价单特异性抗体,其中靶向PD-1的二价单特异性抗体包含具有如SEQ ID NO:78所示的氨基酸序列的重链和具有如SEQ ID NO:79所示的氨基酸序列的轻链,并且靶向抗TGF-βRII的二价单特异性抗体包含具有如SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列的重链和具有如SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列的轻链。

[0070] 因此,本公开还提供了包含PD-1结合域和TGF-βRII结合域的多特异性结合部分,其中该多特异性结合部分在减小肿瘤体积方面具有比参考抗体的组合更高的活性。在某些实施方案中,多特异性结合部分以比参考抗体的组合的二价单特异性抗体中的每一者低两倍至低至多二十倍的PD-1和TGF-βRII结合域的数目给药。例如,当以1mg/kg给药时,多特异性结合部分(其对于与PD-1结合为单价并且对于与TGF-βRII结合为单价)在减小肿瘤体积方面具有比参考抗体的组合更高的活性(该参考抗体中的每一者对于与PD-1或TGF-βRII结合为二价,并且该参考抗体中的每一者以10mg/kg给药)。此外,当以10mg/kg给药时,多特异性结合部分(其对于与PD-1结合为单价并且对于与TGF-βRII结合为单价)在减小肿瘤体积方面具有比参考抗体的组合更高的活性(该参考抗体中的每一者对于与PD-1或TGF-βRII结合为二价,并且该参考抗体中的每一者以10mg/kg给药)。

[0071] 在某些实施方案中,参考抗体的组合是两种靶向PD-1和TGF-βRII的二价单特异性抗体,其中靶向PD-1的二价单特异性抗体包含具有如SEQ ID NO:78所示的氨基酸序列的重链和具有如SEQ ID NO:79所示的氨基酸序列的轻链,并且其中靶向TGF-βRII的二价单特异性抗体包含具有如SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列的重链和具有如SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列的轻链。

[0072] 在某些实施方案中,减小肿瘤体积的活性通过在小鼠体内研究中,特别是在使用MDA-MB-231异种移植huCD34 NSG小鼠的小鼠体内研究中测量肿瘤体积减小来测定的。

[0073] 在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的肿瘤体积减小是参考抗体的组合的肿瘤体积减小的至少1.5倍,优选地介于1.5倍至100倍、或2倍至80倍、或5倍至80倍、或10倍至80倍、或15倍至80倍、或20倍至80倍、或30倍至80倍、或40倍至80倍、或50倍至80倍、

或2倍至60倍、或5倍至60倍、或10倍至60倍、或15倍至60倍、或20倍至60倍、或30倍至60倍、或40倍至60倍之间。在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的肿瘤体积减小是参考抗体的组合的肿瘤体积减小的至少约1.5倍,优选地约介于1.5倍至100倍、或2倍至80倍、或5倍至80倍、或10倍至80倍、或15倍至80倍、或20倍至80倍、或30倍至80倍、或40倍至80倍、或50倍至80倍、或2倍至60倍、或5倍至60倍、或10倍至60倍、或15倍至60倍、或20倍至60倍、或30倍至60倍、或40倍至60倍之间。换句话说,本公开的多特异性结合部分提供比参考抗体的组合更多的肿瘤体积减小。在某些实施方案中,参考抗体的组合是两种靶向PD-1和TGF-βRII的二价单特异性抗体,其中靶向PD-1的二价单特异性抗体包含具有如SEQ ID NO:78所示的氨基酸序列的重链和具有如SEQ ID NO:79所示的氨基酸序列的轻链,并且靶向TGF-βRII的二价单特异性抗体包含具有如SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列的重链和具有如SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列的轻链。

[0074] 在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分在作为单一药剂施用时减小肿瘤体积。

[0075] 因此,本公开还提供了包含PD-1结合域和TGF-βRII结合域的多特异性结合部分,其中该多特异性结合部分作为单一药剂诱导肿瘤体积减小。

[0076] 在某些实施方案中,本公开提供了若干PD-1×TGF-βRII双特异性抗体作为示例性多特异性结合部分,其PD-1结合域包含具有选自SEQ ID NO:1、5、9、13、14、18和19的氨基酸序列的重链可变区,其TGF-βRII结合域包含具有选自SEQ ID NO:23、27、31、35、39、43、47、88和89的氨基酸序列的重链可变区,并且该PD-1和TGF-βRII结合域两者均包含相同的轻链。

[0077] 在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的PD-1结合域包含重链可变区,该重链可变区包含:

[0078] a)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列;

[0079] b)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列;

[0080] c)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列;

[0081] d)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;或

[0082] e)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列。

[0083] 本公开的多特异性结合部分的PD-1结合域的重链可变区可以包含有限数目,诸如例如一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个非保守氨基酸取代,或无限数目的保守氨基酸取代。

[0084] 在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的PD-1结合域还包括其PD-1结合域变体,其中HCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异。在某些实施方案中,仅一个或两个HCDR可以包含至多三个、两个或一个非保守氨基酸变异。在某些实施方案中,此类变体不包含HCDR3中的氨基酸变异。在某些实施方案中,氨基酸变异是保守氨基酸

取代。

[0085] 通常,保守氨基酸取代涉及具有同源氨基酸残基的氨基酸的变异,该同源氨基酸残基是具有相似特征或特性的残基。同源氨基酸是本领域已知的,如用于在抗体结合域中进行氨基酸取代而不显著影响抗体的结合或功能的常规方法,参见例如手册,如Lehninger(Nelson、David L.和Michael M.Cox.,2017年,Lehninger Principles of Biochemistry,第7版,纽约,NY:W.H.Freeman)或Stryer(Berg J.、Tymoczko J.、Stryer L.和Stryer L.,2007年,Biochemistry,纽约:W.H.Freeman),其全部内容并入本文。在确定氨基酸是否可以被保守氨基酸置换时,通常可以对诸如但不限于(a)取代区域中的多肽骨架的结构,例如片状或螺旋构象,(b)分子在靶位点处的电荷或疏水性,和/或(c)侧链的本体等因素进行评估。如果残基可以用具有共同特征(诸如相似的侧链或相似的电荷或疏水性)的残基取代,则这样的残基优选作为取代基。例如,可以确定以下组:(1)非极性:Ala(A)、Gly(G)、Val(V)、Leu(L)、Ile(I)、Pro(P)、Phe(F)、Trp(W)、Met(M);(2)不带电荷的极性:Ser(S)、Thr(T)、Cys(C)、Tyr(Y)、Asn(N)、Gln(Q);(3)酸性:Asp(D)、Glu(E);和(4)碱性:Lys(K)、Arg(R)、His(H)。另选地,氨基酸可以如下分组:(1)芳香族:Phe(F)、Trp(W)、Tyr(Y);(2)非极性:Leu(L)、Val(V)、Ile(I)、Ala(A)、Met(M);(3)脂肪族:Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、Ile(I);(4)酸性:Asp(D)、Glu(E);(5)碱性:His(H)、Lys(K)、Arg(R);和(6)极性:Gln(Q)、Asn(N)、Ser(S)、Thr(T)、Tyr(Y)。另选地,氨基酸残基可以基于常见的侧链特性分成如下组:(1)疏水性:Met(M)、Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、Ile(I);(2)中性亲水性:Cys(C)、Ser(S)、Thr(T)、Asn(N)、Gln(Q);(3)酸性:Asp(D)、Glu(E);(4)碱性:His(H)、Lys(K)、Arg(R);(5)影响链取向的残基:Gly(G),Pro(P);和(6)芳香族:Trp(W)、Tyr(Y)、Phe(F)。

[0086] 优选的是,用在同一组中存在的另一个氨基酸残基取代氨基酸残基。因此,保守氨基酸取代可涉及将这些类别中的一个类别的成员与同一类别的另一成员进行交换。通常,该变异不会导致或基本上不会导致结合域与其预期靶标的结合特异性的损失。

[0087] 其他类型的氨基酸变异包括由体细胞超突变或亲和力成熟引起的变异。本公开所包含的PD-1结合变体包括体细胞超突变或亲和力成熟的重链可变区,它们是衍生自与本文序列所述的重链可变区相同的VH基因片段的重链可变区,这些变体具有氨基酸变异,包括在一个、两个或全部三个HCDR中的非保守和/或保守氨基酸取代。用于亲和力成熟抗体结合域的常规方法在本领域中是广泛已知的,参见例如Tabasinezhad M等人(Trends in therapeutic antibody affinity maturation:Fromin-vitro towards next-generation sequencing approaches,Immunol Lett.,2019年8月;第212卷:第106-113页)。

[0088] 用于引入氨基酸变异的合适位置的示例包括但不限于HCDR1的第一、第二和/或第四个氨基酸;HCDR2的第三、第七、第八、第九、第十、第十一、第十三、第十四和/或第十六个氨基酸;和/或HCDR3的第六和/或第十三个氨基酸。

[0089] 在某些实施方案中,因此本公开还提供了多特异性结合部分,其PD-1结合域包含:

[0090] -HCDR1,其具有氨基酸序列$X_1X_2FX_3S$,其中

[0091] X_1可以是F、Y、T或H;

[0092] X_2可以是Y、Q、E、H或D;

[0093] X_3可以是W或Y;和/或

[0094] -HCDR2,其具有氨基酸序列$YIX_1YSGX_2X_3X_4X_5X_6PX_7X_8KX_9$,其中

[0095] X_1可以是Y、V或I;

[0096] X_2可以是S或G;

[0097] X_3可以是T、Y、S、H、N、W、L或Q;

[0098] X_4可以是S或N;

[0099] X_5可以是F、V或L;

[0100] X_6可以是N或S;

[0101] X_7可以是S或A;

[0102] X_8可以是F或L;

[0103] X_9可以是S、T、G、D、R或N;和/或

[0104] -HCDR3,其具有氨基酸序列GGYTGX$_1$GGDWFDX$_2$,其中

[0105] X_1可以是Y、H、V或A;

[0106] X_2可以是P、V、Y、W、F、T、Q、H或S。

[0107] 用于引入氨基酸变异的其他合适位置包括但不限于HCDR1的第二、第三、第四和/或第五个氨基酸;HCDR2的第三、第四、第五、第六、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五、第十六和/或第十七个氨基酸;和/或HCDR3的第一、第二、第六、第七、第九、第十、第十四、第十五、第十六和/或第十八个氨基酸。

[0108] 在某些实施方案中,因此本公开还提供了多特异性结合部分,其PD-1结合域包含:

[0109] -HCDR1,其具有氨基酸序列RX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$,其中

[0110] X_1可以是F或Y;

[0111] X_2可以是T、A或V;

[0112] X_3可以是M、L或V;

[0113] X_4可以是S、H、N、V或T;和/或

[0114] -HCDR2,其具有氨基酸序列WIX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$GX$_5$X$_6$X$_7$X$_8$X$_9$X$_{10}$X$_{11}$X$_{12}$X$_{13}$X$_{14}$,其中

[0115] X_1可以是N或D;

[0116] X_2可以是P、S或T;

[0117] X_3可为N或Q;

[0118] X_4可以是T或D;

[0119] X_5可以是N、S、T、K、L或E;

[0120] X_6可以是P、Y、A、H或F;

[0121] X_7可以是T或S;

[0122] X_8可以是Y、F或H;

[0123] X_9可以是A、G、V或F;

[0124] X_{10}可以是Q、R、N、L、T或S;

[0125] X_{11}可以是D、A、G或S;

[0126] X_{12}可以是F、V或A;

[0127] X_{13}可以是T、K、H、G;

[0128] X_{14}可以是G、N、E或D;和/或

[0129] -HCDR3,其具有氨基酸序列X$_1$X$_2$GYCX$_3$X$_4$DX$_5$CYPNX$_6$X$_7$X$_8$DX$_9$,其中

[0130] X_1可以是I、S或V;

[0131] X_2可以是L、Q或N;

[0132] X_3可以是N、G、S或D;

[0133] X_4可以是T、S、P、N或E;

[0134] X_5可以是N或I;

[0135] X_6可以是W、G、Q、H、W、A或L;

[0136] X_7可以是I、V或L;

[0137] X_8可以是F、L或I;

[0138] X_9可以是Y、S、N、I、R、H、V、T、K、A或L。

[0139] 在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的PD-1结合域包含重链可变区,该重链可变区具有如SEQ ID NO:1、5、9、13、14、18和19中任一项所示的氨基酸序列或其变体。在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的PD-1结合域包含重链可变区,该重链可变区具有如SEQ ID NO:1、5、9、13、14、18和19中任一项所示的氨基酸序列,或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的变体。

[0140] “同一性百分比(%)”在本文中是指核酸或氨基酸序列,其定义为在为了最佳比较目的对序列进行比对后,与所选序列中残基相同的候选序列中残基的百分比。为了优化两个序列之间的比对,可以在被比较的两个序列中的任一者中引入缺口。这种比对可以在被比较的序列的全长上进行。另选地,比对可以在较短长度上进行,例如在约20、约50、约100或更多个核酸/碱基或氨基酸上进行。序列同一性是在报告的比对区上两个序列之间的同一性匹配的百分比。

[0141] 序列的比较和两个序列之间的序列同一性百分比的测定可以使用数学算法来完成。技术人员将意识到以下事实:几种不同的计算机程序可用于比对两个序列并确定两个序列之间的同一性(Kruskal,J.B.(1983年)An overview of sequence comparison,在D.Sankoff和J.B.Kruskal,(编辑),Time warps,string edits and macromolecules:the theory and practice of sequence comparison,页码1-44,Addison Wesley)。两个氨基酸序列或核酸序列之间的序列同一性百分比可以使用用于两个序列比对的Needleman和Wunsch算法来确定。(Needleman,S.B.和Wunsch,C.D.(1970年)J.Mol.Biol,第48卷,第443-453页)。Needleman-Wunsch算法已经在计算机程序NEEDLE中实现。为了本发明的目的,将来自EMBOSS包的NEEDLE程序用于测定氨基酸和核酸序列的同一性百分比(版本2.8.0,EMBOSS:The European Molecular Biology Open Software Suite(2000年),Rice,P.LongdenJ.和Bleasby A.,Trends in Genetics,第16卷,第6期,页码276-277,http://emboss.bioinformatics.nl/)。对于蛋白质序列,EBLOSUM62用于取代基质。对于DNA序列,使用DNAFULL。所用参数是缺口开放罚分10和缺口延伸罚分0.5。

[0142] 在如上所述通过程序NEEDLE比对后,查询序列与本发明序列之间的序列同一性百分比计算如下:将在两个序列中显示相同氨基酸或相同核苷酸的比对中的对应位置的数目除以在减去比对中的缺口总数之后的比对的总长度。

[0143] 在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的PD-1结合域还包含PD-1结合域变体,其除了上文提及的HCDR中的变异之外还包含框架区中的一个或多个变异。变异可以是本文所述的任何类型的氨基酸变异,诸如例如由体细胞超突变或亲和力成熟引起的保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代。在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的PD-1

结合域变体不包含CDR区中的变异,但包含框架区中的一个或多个变异。这样的变体与本文所公开的序列具有至少80％、至少85％、至少90％或至少95％序列同一性,并且预期保留PD-1结合特异性。因此,在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的PD-1结合域包含:

[0144] -与如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、或至少95％序列同一性的重链可变区,该重链可变区包含如SEQ ID NO:2所示的HCDR1氨基酸序列、如SEQ ID NO:3所示的HCDR2氨基酸序列和如SEQ ID NO:4所示的HCDR3氨基酸序列;

[0145] -与如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、或至少95％序列同一性的重链可变区,该重链可变区包含如SEQ ID NO:6所示的HCDR1氨基酸序列、如SEQ ID NO:7所示的HCDR2氨基酸序列和如SEQ ID NO:8所示的HCDR3氨基酸序列;

[0146] -与如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、或至少95％序列同一性的重链可变区,该重链可变区包含如SEQ ID NO:10所示的HCDR1氨基酸序列、如SEQ ID NO:11所示的HCDR2氨基酸序列和如SEQ ID NO:12所示的HCDR3氨基酸序列;

[0147] -与如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、或至少95％序列同一性的重链可变区,该重链可变区包含如SEQ ID NO:10所示的HCDR1氨基酸序列、如SEQ ID NO:11所示的HCDR2氨基酸序列和如SEQ ID NO:12所示的HCDR3氨基酸序列;

[0148] -与如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、或至少95％序列同一性的重链可变区,该重链可变区包含如SEQ ID NO:15所示的HCDR1氨基酸序列、如SEQ ID NO:16所示的HCDR2氨基酸序列和如SEQ ID NO:17所示的HCDR3氨基酸序列;

[0149] -与如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、或至少95％序列同一性的重链可变区,该重链可变区包含如SEQ ID NO:15所示的HCDR1氨基酸序列、如SEQ ID NO:16所示的HCDR2氨基酸序列和如SEQ ID NO:17所示的HCDR3氨基酸序列;或

[0150] -与如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、或至少95％序列同一性的重链可变区,该重链可变区包含如SEQ ID NO:20所示的HCDR1氨基酸序列、如SEQ ID NO:21所示的HCDR2氨基酸序列和如SEQ ID NO:22所示的HCDR3氨基酸序列。

[0151] 本公开的多特异性结合部分的结合域已经用共同轻链生成,特别是用称为VK1-39/JK1的共同轻链生成。本公开的多特异性结合部分的结合域可以包含任何合适的轻链,包括但不限于本领域已知的共同轻链。在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的结合域包含共同轻链VK1-39/JK1,或其含有有限数目,诸如例如一个、两个或三个非保守氨基酸取代,或无限数目的保守氨基酸取代的变体。

[0152] 在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的PD-1结合域包含具有如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列的轻链可变区或其变体。在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的PD-1结合域包含轻链可变区,该轻链可变区具有如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列或与其具有至少80％、至少85％、至少90％或至少95％序列同一性的变体。

[0153] 在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的PD-1结合域包含轻链可变区,

该轻链可变区包含具有如SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列的轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3)。在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的PD-1结合域的轻链可变区还包括其变体,其中LCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异。在某些实施方案中,氨基酸变异是保守氨基酸取代。

[0154] 在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的PD-1结合域还包括PD-1结合域变体,其除了上文提及的LCDR中的变异之外还包含框架区中的一个或多个变异。变异优选是保守氨基酸取代。在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的PD-1结合域变体不包含LCDR区中的变异,但包含框架区中的一个或多个变异。这样的变体与本文所公开的序列具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性。因此,在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的PD-1结合域包含:

[0155] -与SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的轻链可变区,该轻链可变区包含如SEQ ID NO:49所示的LCDR1氨基酸序列;如SEQ ID NO:50所示的LCDR2氨基酸序列;和如SEQ ID NO:51所示的LCDR3氨基酸序列。

[0156] 包含这些LCDR和/或轻链可变区的轻链或轻链可变区可以是例如在本领域中称为VK1-39/JK1的轻链。这是共同轻链。根据本公开的术语“共同轻链”是指能够与多个不同的重链,诸如例如具有不同抗原或表位结合特异性的重链配对的轻链。共同轻链特别地可用于生成例如双特异性抗体或多特异性抗体,其中当所有结合域包含相同轻链时,抗体产生更有效。术语“共同轻链”涵盖了相同或具有一些氨基酸序列差异,然而全长抗体的结合特异性不受影响的轻链。例如,在如本文所用的共同轻链的定义范围内,可以制备或发现不相同但功能上仍然等效的轻链,例如,通过使用引入保守氨基酸变化的已建立的变异、已知或显示在与重链配对时不贡献或仅部分贡献结合特异性的区域中的氨基酸的变化,等等。

[0157] 除了包含上文提及的LCDR和/或轻链可变区的共同轻链之外,可以使用本领域已知的其他共同轻链。这些共同轻链的示例包括但不限于:VK1-39/JK5,其包含轻链可变区,该轻链可变区包含具有如SEQ ID NO:52所示的氨基酸序列的轻链可变区的轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3)。在某些实施方案中,轻链包含轻链可变区,该轻链可变区包含具有如SEQ ID NO:52所示的氨基酸序列的轻链可变区的轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3),其中LCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异,例如取代。在某些实施方案中,轻链包含轻链可变区,该轻链可变区具有如SEQ ID NO:52所示的氨基酸序列或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,轻链包含具有如SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54和SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列的轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3);VK3-15/JK1,其包含轻链可变区,该轻链可变区包含具有如SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列的轻链可变区的轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3)。在某些实施方案中,轻链包含轻链可变区,该轻链可变区包含具有如SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列的轻链可变区的轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3),其中LCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异,例如取代。在某些实施方案中,轻链包含轻链可变区,该轻链可变区具有如SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,轻链包含具有如SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59所示的氨基酸序列的轻

链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3);VK3-20/JK1,其包含轻链可变区,该轻链可变区包含具有如SEQ ID NO:60所示的氨基酸序列的轻链可变区的轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3)。在某些实施方案中,轻链包含轻链可变区,该轻链可变区包含具有如SEQ ID NO:60所示的氨基酸序列的轻链可变区的轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3),其中LCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异,例如取代。在某些实施方案中,轻链包含轻链可变区,该轻链可变区具有如SEQ ID NO:60所示的氨基酸序列或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,轻链包含具有如SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62和SEQ ID NO:63所示的氨基酸序列的轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3);VL3-21/JL3,其包含轻链可变区,该轻链可变区包含具有如SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列的轻链可变区的轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3)。在某些实施方案中,轻链包含轻链可变区,该轻链可变区包含具有如SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列的轻链可变区的轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3),其中LCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异,例如取代。在某些实施方案中,轻链包含轻链可变区,该轻链可变区具有如SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,轻链包含具有如SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3)。

[0158] VK1-39是免疫球蛋白可变κ1-39基因的简称。该基因也被称为免疫球蛋白κ可变1-39;IGKV139;IGKV1-39;IgVκ1-39。该基因的外部ID为HGNC:5740;Entrez基因:28930;Ensembl:ENSG00000242371。VK1-39的氨基酸序列作为SEQ ID NO:93给出。这是V区的序列。V区可以与五个J区中的一者组合。合适的VJ区序列表示为VK1-39/JK1(SEQ ID NO:94)和VK1-39/JK5(SEQ ID NO:95);别名为IgVκ1-39*01/IGJκ1*01或IgVκ1-39*01/IGJκ5*01(根据IMGT数据库的全球网络imgt.org进行命名)。这些名称是示例性的,并且包括基因片段的等位基因变体。

[0159] VK3-15是免疫球蛋白可变κ3-15基因的简称。该基因也被称为免疫球蛋白κ可变3-15、IGKV315、IGKV3-15、IgVκ3-15。该基因的外部ID为HGNC:5816;Entrez基因:28913;Ensembl:ENSG00000244437。VK3-15的氨基酸序列作为SEQ ID NO:98给出。这是V区的序列。V区可以与五个J区中的一者组合。合适的VJ区序列表示为VK3-15/JK1(SEQ ID NO:99);别名为Vκ3-15*01/IGJκ1*01(根据IMGT数据库的全球网络imgt.org进行命名)。该名称是示例性的,并且包括基因片段的等位基因变体。

[0160] VK3-20是免疫球蛋白可变κ3-20基因的简称。该基因也被称为免疫球蛋白κ可变3-20;IGKV320;IGKV3-20;IgVκ3-20。该基因的外部ID为HGNC:5817;Entrez基因:28912;Ensembl:ENSG00000239951。VK3-20的氨基酸序列表示为SEQ ID NO:100。这是V区的序列。V区可以与五个J区中的一者组合。合适的VJ区序列表示为VK3-20/JK1(SEQ ID NO:101);别名为IgVκ3-20*01/IGJκ1*01(根据IMGT数据库的全球网络imgt.org进行命名)。该名称是示例性的,并且包括基因片段的等位基因变体。

[0161] VL3-21是免疫球蛋白可变λ3-21基因的简称。该基因也称为免疫球蛋白λ可变3-21、IGLV321、IGLV3-21、IgVλ3-21。该基因的外部ID是HGNC:5905;Entrez基因:28796;

Ensembl:ENSG00000211662.2。VL3-21的氨基酸序列作为SEQ ID NO:102给出。这是V区的序列。V区可以与五个J区中的一者组合。合适的VJ区序列表示为VL3-21/JL3(SEQ ID NO:103);别名为IgVλ3-21/IGJλ3(根据IMGT数据库的全球网络imgt.org进行命名)。该名称是示例性的,并且包括基因片段的等位基因变体。

[0162] 此外,可以使用本领域中可获得的PD-1抗体的任何轻链可变区,也可以使用可以容易地获得的任何其他轻链可变区,诸如例如通过当与本公开的多特异性结合部分的PD-1结合域配对时显示抗原结合活性而从抗体展示文库获得的轻链可变区。

[0163] 在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的PD-1结合域还可以包含CH1区和CL区。可以使用任何CH1结构域,特别是人CH1结构域。合适的CH1结构域的示例由提供为SEQ ID NO:69的氨基酸序列提供。可以使用任何CL结构域,特别是人CL。合适的CL结构域的示例由提供为SEQ ID NO:75的氨基酸序列提供。

[0164] 在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的TGF-βRII结合域包含重链可变区,该重链可变区包含:

[0165] a)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列;

[0166] b)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列;

[0167] c)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列;

[0168] d)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列;

[0169] e)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列;

[0170] f)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列;或

[0171] g)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:91和SEQ ID NO:92所示的氨基酸序列。

[0172] 本公开的多特异性结合部分的TGF-βRII结合域的重链可变区可以包含有限数目,诸如例如一个、两个或三个非保守氨基酸取代,或无限数目的保守氨基酸取代。

[0173] 在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的TGF-βRII结合域还包括其TGF-βRII结合域变体,其中HCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异。在某些实施方案中,仅一个或两个HCDR可以包含至多三个、两个或一个氨基酸变异。在某些实施方案中,此类变体不包含HCDR3中的氨基酸变异。在某些实施方案中,氨基酸变异是保守氨基酸取代。保守氨基酸取代如本文进一步描述。

[0174] 本公开所包含的TGF-βRII结合变体包括体细胞超突变或亲和力成熟的重链可变区,它们是衍生自与本文序列所述的重链可变区相同的VH基因片段的重链可变区,这些变体具有氨基酸变异,包括在一个、两个或全部三个HCDR中的非保守和/或保守氨基酸取代。

[0175] 在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的TGF-βRII结合域包含重链可变区,该重链可变区具有如SEQ ID NO:23、27、31、35、39、43、47、88和89中任一项所示的氨基

酸序列或其变体。在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的TGF-βRII结合域包含重链可变区,该重链可变区具有如SEQ ID NO:23、27、31、35、39、43、47、88和89中任一项所示的氨基酸序列,或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0176] 在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的TGF-βRII结合域还包括TGF-βRII结合域变体,其除了上文提及的HCDR中的变异之外还包含框架区中的一个或多个变异。变异可以是本文所述的任何类型的氨基酸变异,诸如例如由体细胞超突变或亲和力成熟引起的保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代。在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的TGF-βRII结合域变体不包含CDR区中的变异,但包含框架区中的一个或多个变异。此类变体与本文所公开的序列具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性,并且预期保留TGF-βRII结合特异性。因此,在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的TGF-βRII结合域包含:

[0177] -与如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、或至少95%序列同一性的重链可变区,该重链可变区包含如SEQ ID NO:24所示的HCDR1氨基酸序列;如SEQ ID NO:25所示的HCDR2氨基酸序列;和如SEQ ID NO:26所示的HCDR3氨基酸序列;

[0178] -与如SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、或至少95%序列同一性的重链可变区,该重链可变区包含如SEQ ID NO:28所示的HCDR1氨基酸序列;如SEQ ID NO:29所示的HCDR2氨基酸序列;和如SEQ ID NO:30所示的HCDR3氨基酸序列;

[0179] -与如SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、或至少95%序列同一性的重链可变区,该重链可变区包含如SEQ ID NO:32所示的HCDR1氨基酸序列;如SEQ ID NO:33所示的HCDR2氨基酸序列;和如SEQ ID NO:34所示的HCDR3氨基酸序列;

[0180] -与如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、或至少95%序列同一性的重链可变区,该重链可变区包含如SEQ ID NO:36所示的HCDR1氨基酸序列;如SEQ ID NO:37所示的HCDR2氨基酸序列;和如SEQ ID NO:38所示的HCDR3氨基酸序列;

[0181] -与如SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、或至少95%序列同一性的重链可变区,该重链可变区包含如SEQ ID NO:40所示的HCDR1氨基酸序列;如SEQ ID NO:41所示的HCDR2氨基酸序列;和如SEQ ID NO:42所示的HCDR3氨基酸序列;

[0182] -与如SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、或至少95%序列同一性的重链可变区,该重链可变区包含如SEQ ID NO:44所示的HCDR1氨基酸序列;如SEQ ID NO:45所示的HCDR2氨基酸序列;和如SEQ ID NO:46所示的HCDR3氨基酸序列;

[0183] -与如SEQ ID NO:47所示的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、或至少95%序列同一性的重链可变区,该重链可变区包含如SEQ ID NO:90所示的HCDR1氨基酸序列;如SEQ ID NO:91所示的HCDR2氨基酸序列;和如SEQ ID NO:92所示的HCDR3氨基酸序

列;

[0184] -与如SEQ ID NO:88所示的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、或至少95%序列同一性的重链可变区,该重链可变区包含如SEQ ID NO:44所示的HCDR1氨基酸序列;如SEQ ID NO:45所示的HCDR2氨基酸序列;和如SEQ ID NO:46所示的HCDR3氨基酸序列;或

[0185] -与如SEQ ID NO:89所示的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、或至少95%序列同一性的重链可变区,该重链可变区包含如SEQ ID NO:90所示的HCDR1氨基酸序列;如SEQ ID NO:91所示的HCDR2氨基酸序列;和如SEQ ID NO:92所示的HCDR3氨基酸序列。

[0186] 可以使用本领域中可获得的TGF-βRII抗体的任何轻链可变区,例如如本文所述,也可以使用可以容易地获得的任何其他轻链可变区,诸如例如通过当与本公开的多特异性结合部分的TGF-βRII结合域配对时显示抗原结合活性而从抗体展示文库获得的轻链可变区。在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的TGF-βRII结合域包含与PD-1结合域相同或基本上相同的轻链。

[0187] 在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的TGF-βRII结合域包含轻链可变区,该轻链可变区具有如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列或其变体。在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的TGF-βRII结合域包含轻链可变区,该轻链可变区具有如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列,或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的变体。

[0188] 在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的TGF-βRII结合域包含轻链可变区,该轻链可变区包含分别具有如SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列的轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3)。在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的TGF-βRII结合域的轻链可变区还包括其变体,其中LCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个保守或非保守氨基酸变异。在某些实施方案中,氨基酸变异是保守氨基酸取代。

[0189] 在某些实施方案中,本公开的多特异性结合部分的TGF-βRII结合域还可以包含CH1区和CL区。可以使用任何CH1结构域,特别是人CH1结构域。合适的CH1结构域的示例由提供为SEQ ID NO:69的氨基酸序列提供。可以使用任何CL结构域,特别是人CL。合适的CL结构域的示例由提供为SEQ ID NO:75的氨基酸序列提供。

[0190] 因此,本发明还提供了包含PD-1结合域和TGF-βRII结合域的多特异性结合部分,其中PD-1结合域包含重链可变区,和任选的轻链可变区以及CH1区和CL区,如本文所述。在某些实施方案中,多特异性结合部分还包含TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含重链可变区,和任选的轻链可变区以及CH1区和CL区,如本文所述。

[0191] 因此,本发明还提供了包含PD-1结合域和TGF-βRII结合域的多特异性结合部分,其中TGF-βRII结合域包含重链可变区,和任选的轻链可变区以及CH1区和CL区,如本文所述。在某些实施方案中,多特异性结合部分还包含PD-1结合域,该PD-1结合域包含重链可变区,和任选的轻链可变区以及CH1区和CL区,如本文所述。

[0192] 在某些实施方案中,本文所公开的任何PD-1结合域可以与本文所公开的任何TGF-βRII结合域组合,以产生本公开的多特异性结合部分。因此,本公开提供了如表1中呈现的

示例性多特异性结合部分PB1-PB18。

[0193] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0194] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含分别具有如SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12所述的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3);以及

[0195] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含分别具有如SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),

[0196] 其中HCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异,例如取代。在某些实施方案中,HCDR不包含氨基酸变异。

[0197] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0198] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含分别具有如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17所述的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3);以及

[0199] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含分别具有如SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),

[0200] 其中HCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异,例如取代。在某些实施方案中,HCDR不包含氨基酸变异。

[0201] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0202] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含分别具有如SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22所述的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3);以及

[0203] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含分别具有如SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),

[0204] 其中HCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异,例如取代。在某些实施方案中,HCDR不包含氨基酸变异。

[0205] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0206] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含分别具有如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17所述的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3);以及

[0207] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含分别具有如SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),

[0208] 其中HCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异,例如取代。在某些实施方案中,HCDR不包含氨基酸变异。

[0209] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0210] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含分别具有如SEQ ID NO:10、SEQ ID

NO:11和SEQ ID NO:12所述的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3);以及

[0211] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含分别具有如SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),

[0212] 其中HCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异,例如取代。在某些实施方案中,HCDR不包含氨基酸变异。

[0213] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0214] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含分别具有如SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12所述的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3);以及

[0215] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含分别具有如SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),

[0216] 其中HCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异,例如取代。在某些实施方案中,HCDR不包含氨基酸变异。

[0217] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0218] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含分别具有如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17所述的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3);以及

[0219] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含分别具有如SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),

[0220] 其中HCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异,例如取代。在某些实施方案中,HCDR不包含氨基酸变异。

[0221] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0222] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含分别具有如SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22所述的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3);以及

[0223] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含分别具有如SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),

[0224] 其中HCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异,例如取代。在某些实施方案中,HCDR不包含氨基酸变异。

[0225] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0226] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含分别具有如SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12所述的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3);以及

[0227] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含分别具有如SEQ ID NO:

28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),

[0228] 其中HCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异,例如取代。在某些实施方案中,HCDR不包含氨基酸变异。

[0229] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0230] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含分别具有如SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12所述的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3);以及

[0231] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含分别具有如SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:91和SEQ ID NO:92所示的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),

[0232] 其中HCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异,例如取代。在某些实施方案中,HCDR不包含氨基酸变异。

[0233] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0234] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含分别具有如SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22所述的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3);以及

[0235] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含分别具有如SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),

[0236] 其中HCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异,例如取代。在某些实施方案中,HCDR不包含氨基酸变异。

[0237] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0238] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含分别具有如SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12所述的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3);以及

[0239] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含分别具有如SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),

[0240] 其中PD-1结合域和TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列的轻链CDR1(LCDR1)、具有如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列的轻链CDR2(LCDR2)和具有如SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列的轻链CDR3(LCDR3),并且

[0241] 其中HCDR和/或LCDR中的每一者可以包含至多三个、两个或一个氨基酸变异,例如取代。在某些实施方案中,HCDR和/或LCDR不包含氨基酸变异。

[0242] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0243] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含分别具有如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17所述的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3);以及

[0244] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含分别具有如SEQ ID NO:

24、SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),

[0245] 其中PD-1结合域和TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列的轻链CDR1(LCDR1)、具有如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列的轻链CDR2(LCDR2)和具有如SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列的轻链CDR3(LCDR3),并且

[0246] 其中HCDR和/或LCDR中的每一者可以包含至多三个、两个或一个氨基酸变异,例如取代。在某些实施方案中,HCDR和/或LCDR不包含氨基酸变异。

[0247] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0248] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含分别具有如SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22所述的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3);以及

[0249] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含分别具有如SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),

[0250] 其中PD-1结合域和TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列的轻链CDR1(LCDR1)、具有如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列的轻链CDR2(LCDR2)和具有如SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列的轻链CDR3(LCDR3),并且

[0251] 其中HCDR和/或LCDR中的每一者可以包含至多三个、两个或一个氨基酸变异,例如取代。在某些实施方案中,HCDR和/或LCDR不包含氨基酸变异。

[0252] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0253] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含分别具有如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17所述的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3);以及

[0254] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含分别具有如SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),

[0255] 其中PD-1结合域和TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列的轻链CDR1(LCDR1)、具有如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列的轻链CDR2(LCDR2)和具有如SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列的轻链CDR3(LCDR3),并且

[0256] 其中HCDR和/或LCDR中的每一者可以包含至多三个、两个或一个氨基酸变异,例如取代。在某些实施方案中,HCDR和/或LCDR不包含氨基酸变异。

[0257] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0258] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含分别具有如SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12所述的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3);以及

[0259] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含分别具有如SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),

[0260] 其中PD-1结合域和TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列

的轻链CDR1(LCDR1)、具有如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列的轻链CDR2(LCDR2)和具有如SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列的轻链CDR3(LCDR3),并且

[0261] 其中HCDR和/或LCDR中的每一者可以包含至多三个、两个或一个氨基酸变异,例如取代。在某些实施方案中,HCDR和/或LCDR不包含氨基酸变异。

[0262] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0263] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含分别具有如SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12所述的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3);以及

[0264] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含分别具有如SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),

[0265] 其中PD-1结合域和TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列的轻链CDR1(LCDR1)、具有如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列的轻链CDR2(LCDR2)和具有如SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列的轻链CDR3(LCDR3),并且

[0266] 其中HCDR和/或LCDR中的每一者可以包含至多三个、两个或一个氨基酸变异,例如取代。在某些实施方案中,HCDR和/或LCDR不包含氨基酸变异。

[0267] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0268] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含分别具有如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17所述的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3);以及

[0269] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含分别具有如SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),

[0270] 其中PD-1结合域和TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列的轻链CDR1(LCDR1)、具有如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列的轻链CDR2(LCDR2)和具有如SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列的轻链CDR3(LCDR3),并且

[0271] 其中HCDR和/或LCDR中的每一者可以包含至多三个、两个或一个氨基酸变异,例如取代。在某些实施方案中,HCDR和/或LCDR不包含氨基酸变异。

[0272] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0273] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含分别具有如SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22所述的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3);以及

[0274] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含分别具有如SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),

[0275] 其中PD-1结合域和TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列的轻链CDR1(LCDR1)、具有如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列的轻链CDR2(LCDR2)和具有如SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列的轻链CDR3(LCDR3),并且

[0276] 其中HCDR和/或LCDR中的每一者可以包含至多三个、两个或一个氨基酸变异,例如

取代。在某些实施方案中,HCDR和/或LCDR不包含氨基酸变异。

[0277] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0278] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含分别具有如SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12所述的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3);以及

[0279] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含分别具有如SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),

[0280] 其中PD-1结合域和TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列的轻链CDR1(LCDR1)、具有如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列的轻链CDR2(LCDR2)和具有如SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列的轻链CDR3(LCDR3),并且

[0281] 其中HCDR和/或LCDR中的每一者可以包含至多三个、两个或一个氨基酸变异,例如取代。在某些实施方案中,HCDR和/或LCDR不包含氨基酸变异。

[0282] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0283] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含分别具有如SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12所述的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3);以及

[0284] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含分别具有如SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:91和SEQ ID NO:92所示的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),

[0285] 其中PD-1结合域和TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列的轻链CDR1(LCDR1)、具有如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列的轻链CDR2(LCDR2)和具有如SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列的轻链CDR3(LCDR3),并且

[0286] 其中HCDR和/或LCDR中的每一者可以包含至多三个、两个或一个氨基酸变异,例如取代。在某些实施方案中,HCDR和/或LCDR不包含氨基酸变异。

[0287] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0288] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含分别具有如SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22所述的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3);以及

[0289] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含分别具有如SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),

[0290] 其中PD-1结合域和TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列的轻链CDR1(LCDR1)、具有如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列的轻链CDR2(LCDR2)和具有如SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列的轻链CDR3(LCDR3),并且

[0291] 其中HCDR和/或LCDR中的每一者可以包含至多三个、两个或一个氨基酸变异,例如取代。在某些实施方案中,HCDR和/或LCDR不包含氨基酸变异。

[0292] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0293] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含具有如SEQ ID NO:9所示的氨基酸

序列的重链可变区或与其具有至少80％、至少85％、至少90％或至少95％序列同一性的重链可变区;和

[0294] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80％、至少85％、至少90％或至少95％序列同一性的重链可变区。在某些实施方案中,重链可变区中的每一者包含不包含氨基酸变异的HCDR。在某些实施方案中,重链可变区中的每一者不包含氨基酸变异。

[0295] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0296] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含具有如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80％、至少85％、至少90％或至少95％序列同一性的重链可变区;和

[0297] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80％、至少85％、至少90％或至少95％序列同一性的重链可变区。在某些实施方案中,重链可变区中的每一者包含不包含氨基酸变异的HCDR。在某些实施方案中,重链可变区中的每一者不包含氨基酸变异。

[0298] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0299] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含具有如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80％、至少85％、至少90％或至少95％序列同一性的重链可变区;和

[0300] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80％、至少85％、至少90％或至少95％序列同一性的重链可变区。在某些实施方案中,重链可变区中的每一者包含不包含氨基酸变异的HCDR。在某些实施方案中,重链可变区中的每一者不包含氨基酸变异。

[0301] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0302] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含具有如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80％、至少85％、至少90％或至少95％序列同一性的重链可变区;和

[0303] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80％、至少85％、至少90％或至少95％序列同一性的重链可变区。在某些实施方案中,重链可变区中的每一者包含不包含氨基酸变异的HCDR。在某些实施方案中,重链可变区中的每一者不包含氨基酸变异。

[0304] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0305] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含具有如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80％、至少85％、至少90％或至少95％序列同一性的重链可变区;和

[0306] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80％、至少85％、至少90％或至少95％序列同一性的重链可变区。在某些实施方案中,重链可变区中的每一者包含不包含氨基酸变异的HCDR。在某些实施方案中,重链可变区中的每一者不包含氨基酸变异。

[0307] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0308] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含具有如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的重链可变区;和

[0309] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的重链可变区。在某些实施方案中,重链可变区中的每一者包含不包含氨基酸变异的HCDR。在某些实施方案中,重链可变区中的每一者不包含氨基酸变异。

[0310] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0311] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含具有如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的重链可变区;和

[0312] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的重链可变区。在某些实施方案中,重链可变区中的每一者包含不包含氨基酸变异的HCDR。在某些实施方案中,重链可变区中的每一者不包含氨基酸变异。

[0313] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0314] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含具有如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的重链可变区;和

[0315] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的重链可变区。在某些实施方案中,重链可变区中的每一者包含不包含氨基酸变异的HCDR。在某些实施方案中,重链可变区中的每一者不包含氨基酸变异。

[0316] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0317] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含具有如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的重链可变区;和

[0318] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的重链可变区。在某些实施方案中,重链可变区中的每一者包含不包含氨基酸变异的HCDR。在某些实施方案中,重链可变区中的每一者不包含氨基酸变异。

[0319] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0320] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含具有如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的重链可变区;和

[0321] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:47所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的重链可变区。在某些实施方案中,重链可变区中的每一者包含不包含氨基酸变异的HCDR。在某些实施方案中,重链可变区中的每一者不包含氨基酸变异。

[0322] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0323] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含具有如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的重链可变区;和

[0324] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的重链可变区。在某些实施方案中,重链可变区中的每一者包含不包含氨基酸变异的HCDR。在某些实施方案中,重链可变区中的每一者不包含氨基酸变异。

[0325] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0326] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含具有如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的重链可变区;和

[0327] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的重链可变区,

[0328] 其中该PD-1结合域和TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列的轻链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的轻链可变区。在某些实施方案中,重链可变区和轻链可变区中的每一者分别包含HCDR和LCDR,并且不包含氨基酸变异。在某些实施方案中,重链可变区和轻链可变区中的每一者不包含氨基酸变异。

[0329] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0330] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含具有如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的重链可变区;和

[0331] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的重链可变区,

[0332] 其中该PD-1结合域和TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列的轻链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的轻链可变区。在某些实施方案中,重链可变区和轻链可变区中的每一者分别包含HCDR和LCDR,并且不包含氨基酸变异。在某些实施方案中,重链可变区和轻链可变区中的每一者不包含氨基酸变异。

[0333] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0334] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含具有如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的重链可变区;和

[0335] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的重链可变区,

[0336] 其中该PD-1结合域和TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列的轻链可变区或与其具有至少80％、至少85％、至少90％或至少95％序列同一性的轻链可变区。在某些实施方案中,重链可变区和轻链可变区中的每一者分别包含HCDR和LCDR,并且不包含氨基酸变异。在某些实施方案中,重链可变区和轻链可变区中的每一者不包含氨基酸变异。

[0337] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0338] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含具有如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80％、至少85％、至少90％或至少95％序列同一性的重链可变区;和

[0339] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％序列同一性的重链可变区,

[0340] 其中该PD-1结合域和TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列的轻链可变区或与其具有至少80％、至少85％、至少90％或至少95％序列同一性的轻链可变区。在某些实施方案中,重链可变区和轻链可变区中的每一者分别包含HCDR和LCDR,并且不包含氨基酸变异。在某些实施方案中,重链可变区和轻链可变区中的每一者不包含氨基酸变异。

[0341] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0342] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含具有如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80％、至少85％、至少90％或至少95％序列同一性的重链可变区;和

[0343] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80％、至少85％、至少90％或至少95％序列同一性的重链可变区,

[0344] 其中该PD-1结合域和TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列的轻链可变区或与其具有至少80％、至少85％、至少90％或至少95％序列同一性的轻链可变区。在某些实施方案中,重链可变区和轻链可变区中的每一者分别包含HCDR和LCDR,并且不包含氨基酸变异。在某些实施方案中,重链可变区和轻链可变区中的每一者不包含氨基酸变异。

[0345] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0346] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含具有如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80％、至少85％、至少90％或至少95％序列同一性的重链可变区;和

[0347] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80％、至少85％、至少90％或至少95％序列同一性的重链可变区,

[0348] 其中该PD-1结合域和TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列的轻链可变区或与其具有至少80％、至少85％、至少90％或至少95％序列同一性的轻链可变区。在某些实施方案中,重链可变区和轻链可变区中的每一者分别包含HCDR和LCDR,并

且不包含氨基酸变异。在某些实施方案中,重链可变区和轻链可变区中的每一者不包含氨基酸变异。

[0349] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0350] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含具有如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的重链可变区;和

[0351] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的重链可变区,

[0352] 其中该PD-1结合域和TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列的轻链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的轻链可变区。在某些实施方案中,重链可变区和轻链可变区中的每一者分别包含HCDR和LCDR,并且不包含氨基酸变异。在某些实施方案中,重链可变区和轻链可变区中的每一者不包含氨基酸变异。

[0353] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0354] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含具有如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的重链可变区;和

[0355] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的重链可变区,

[0356] 其中该PD-1结合域和TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列的轻链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的轻链可变区。在某些实施方案中,重链可变区和轻链可变区中的每一者分别包含HCDR和LCDR,并且不包含氨基酸变异。在某些实施方案中,重链可变区和轻链可变区中的每一者不包含氨基酸变异。

[0357] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0358] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含具有如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的重可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的重链可变区;和

[0359] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的重链可变区,

[0360] 其中该PD-1结合域和TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列的轻链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的轻链可变区。在某些实施方案中,重链可变区和轻链可变区中的每一者分别包含HCDR和LCDR,并且不包含氨基酸变异。在某些实施方案中,重链可变区和轻链可变区中的每一者不包含氨基酸变异。

[0361] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0362] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含具有如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的重可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的重链可变区;和

[0363] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:47所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的重链可变区,

[0364] 其中该PD-1结合域和TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列的轻链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的轻链可变区。在某些实施方案中,重链可变区和轻链可变区中的每一者分别包含HCDR和LCDR,并且不包含氨基酸变异。在某些实施方案中,重链可变区和轻链可变区中的每一者不包含氨基酸变异。

[0365] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含:

[0366] -如本文所述的PD-1结合域,该PD-1结合域包含具有如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的重链可变区;和

[0367] -如本文所述的TGF-βRII结合域,该TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列的重链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的重链可变区,

[0368] 其中该PD-1结合域和TGF-βRII结合域包含具有如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列的轻链可变区或与其具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的轻链可变区。在某些实施方案中,重链可变区和轻链可变区中的每一者分别包含HCDR和LCDR,并且不包含氨基酸变异。在某些实施方案中,重链可变区和轻链可变区中的每一者不包含氨基酸变异。

[0369] 本文还提供了可用于产生本公开的多特异性结合部分的核酸。在某些实施方案中,此类核酸包含编码如本文所述的PD-1结合域的重链可变区的核酸序列和编码如本文所述的TGF-βRII结合域的重链可变区的核酸序列。在某些实施方案中,本公开的核酸还可以包含编码CH1区以及优选地编码铰链、CH2区和CH3区的核酸序列。在某些实施方案中,本公开的核酸还可以包含至少一种编码轻链可变区以及优选地编码CL区的核酸序列。在某些实施方案中,该轻链可变区可以是如本文所述的共同轻链可变区。

[0370] 本文还提供了载体,这些载体包含可用于产生本公开的多特异性结合部分的本公开的核酸。在某些实施方案中,此类载体包含编码如本文所述的PD-1结合域的重链可变区的核酸序列和编码如本文所述的TGF-βRII结合域的重链可变区的核酸序列。在某些实施方案中,本公开的载体还可以包含编码CH1区以及优选地编码铰链、CH2区和CH3区的核酸序列。在某些实施方案中,本公开的载体还可以包含至少一种编码轻链可变区以及优选地编码CL区的核酸序列。在某些实施方案中,该轻链可变区可以是如本文所述的共同轻链可变区。

[0371] 本公开还提供了一种细胞,该细胞包含编码如本文所述的PD-1结合域的重链可变区的核酸序列(例如载体)和编码如本文所述的TGF-βRII结合域的重链可变区的核酸序列。在某些实施方案中,本公开的细胞还可以包含编码CH1区以及优选地编码铰链、CH2区和CH3

区的核酸序列,例如载体。在某些实施方案中,本公开的细胞还可以包含至少一种编码轻链可变区以及优选地编码CL区的核酸序列,例如载体。在某些实施方案中,该轻链可变区可以是如本文所述的共同轻链可变区。

[0372] 本公开还提供了一种细胞,该细胞产生如本文所述的多特异性结合部分。在某些实施方案中,这样的细胞可以是重组细胞,其已经用本公开的核酸例如载体转化。在某些实施方案中,本公开的细胞包含编码如本文所述的PD-1结合域的重链可变区的核酸序列(例如载体)和编码如本文所述的TGF-βRII结合域的重链可变区的核酸序列。在某些实施方案中,本公开的细胞还包含编码CH1区以及优选地编码铰链、CH2区和CH3区的核酸序列,例如载体。在某些实施方案中,本公开的细胞还包含编码轻链可变区,特别是如本文所述的轻链可变区,以及优选地编码CL区的至少一种核酸序列,例如载体。

[0373] 本公开还提供了一种细胞,该细胞产生如本文所述的多特异性结合部分。

[0374] 在某些实施方案中,本公开提供了一种药物组合物,该药物组合物包含有效量的如本文所述的多特异性结合部分和任选的药学上可接受的载体。

[0375] 在某些实施方案中,本公开提供了一种用于治疗的如本文所述的多特异性结合部分和如本文所述的药物组合物。

[0376] 在某些实施方案中,本公开提供了一种用于治疗癌症的如本文所述的多特异性结合部分或如本文所述的药物组合物。

[0377] 在某些实施方案中,本公开提供了一种用于治疗疾病的方法,该方法包括向有需要的个体施用有效量的如本文所述的多特异性结合部分或如本文所述的药物组合物。

[0378] 在某些实施方案中,本公开提供了一种用于治疗癌症的方法,该方法包括向有需要的个体施用有效量的如本文所述的多特异性结合部分或如本文所述的药物组合物。

[0379] 如本文所用,术语“个体”、“受试者”和“患者”可互换使用,并且是指哺乳动物,诸如人、小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、兔、猫、狗、猴、牛、马、猪等,并且特别是指患有癌症的人受试者。

[0380] 如本文所用,术语“治疗”是指对受试者进行的或向受试者施用活性剂或活性剂的组合的任何类型的干预或过程,目的是治愈或改善其疾病或症状或者产生积极的治疗反应。如本文所用,“积极的治疗反应”是指产生有益效果的治疗,例如逆转、缓解、改善、抑制或减缓与疾病相关联的症状、并发症、状况或生物化学指标,以及预防与疾病相关联的症状、并发症、状况或生物化学指标的发作、进展、发展、严重程度或复发,诸如例如疾病或病症(例如癌症)的至少一种症状的改善。有益效果可以采取比基线改善的形式,包括比根据该方法开始治疗之前进行的测量或观察的改善。例如,有益效果可以采取减缓、稳定、停止或逆转处于任何临床阶段的受试者中的癌症进展的形式,如通过疾病的临床或诊断症状或者癌症标志物的减少或消除所证明的。有效的治疗可以例如减小肿瘤大小、减少循环肿瘤细胞的存在、减少或预防肿瘤的转移、减缓或阻止肿瘤生长和/或预防或延迟肿瘤复发或重新恶化。

[0381] 术语“治疗量”或“有效量”是指治疗疾病(诸如癌症)的药剂或药剂的组合的量。在一些实施方案中,治疗量是足以延迟肿瘤发展的量。在一些实施方案中,治疗量是足以预防或延迟肿瘤复发的量。

[0382] 如本文所用,有效量的药剂或组合物是例如可以:(i)减少癌细胞的数目;(ii)减

小肿瘤大小;(iii)在一定程度上抑制、延缓、减缓并可阻止癌细胞向外周器官的浸润;(iv)抑制肿瘤转移;(v)抑制肿瘤生长;(vi)预防或延迟肿瘤的发生和/或复发;以及/或者(vii)在某种程度上减轻与癌症相关联的一种或多种症状的有效量的药剂或组合物。

[0383] 有效量可根据诸如待治疗个体的疾病状态、年龄、性别和体重,以及药剂或药剂的组合在个体中引起所需反应的能力等因素而变化,该有效量可由普通熟练医师或其他健康护理工作者容易地评估。

[0384] 可以在一次或多次施用中向受试者施用有效量。

[0385] 有效量还可以包括平衡药剂或药剂的组合的任何毒性或有害效果与有益效果的量。

[0386] 术语“药剂”是指治疗活性物质,在本发明情况下是指本公开的多特异性结合部分,或本公开的药物组合物。

[0387] 如本文所用,“包含”及其词形变化以其非限制性意义使用,意味着包括该词之后的项目,但不排除未具体提及的项目。

[0388] 冠词“一个”和“一种”在本文中用于指一个或多个冠词的语法对象。作为示例,“一个元件”表示一个或多个元件。

[0389] 本文对专利文件或其他事项的引用不应被视为承认该文件或事项在任何权利要求的优先权日是已知的,或其所包含的信息是公知常识的一部分。

[0390] 本说明书中引用的所有专利和参考文献都通过引用方式全文并入本文。

[0391] 注意,在本说明书中,除非另有说明,否则分配给抗体或抗体片段的可变区中的CDR和框架的氨基酸位置是根据Kabat的编号指定的(参见Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institute of Health,Bethesda,Md.,1987年和1991年))。恒定区中的氨基酸根据EU编号系统表示。

[0392] 给出登录号主要是为了提供识别靶标的进一步方法,结合的蛋白质的实际序列可能会变化,例如因为编码基因中的突变,诸如发生在某些癌症等中的突变。本公开的多特异性结合部分的抗原结合位点可以结合抗原和其多种变体,诸如由一些抗原阳性免疫或肿瘤细胞表达的那些抗原和其多种变体。HGNC代表HUGO基因命名委员会。缩写后面的数字是登录号,用该登录号可以从HGNC数据库中检索关于基因和由该基因编码的蛋白质的信息。Entrez基因提供了登录号或基因ID,用该登录号或基因ID可以从NCBI(国家生物技术信息中心)数据库检索关于基因或由该基因编码的蛋白质的信息。Ensembl提供了登录号,用该登录号可从Ensembl数据库获得关于基因或由该基因编码的蛋白质的信息。Ensembl是EMBL-EBI与威康信托桑格研究所之间的联合项目,用于开发产生并保持对选定真核基因组的自动注释的软件系统。

[0393] 当本文提及基因或蛋白质时,优选提及基因或蛋白质的人形式。当本文提及基因或蛋白质时,既指天然基因或蛋白质,也指如可以在肿瘤、癌症等中检测到的,优选地如可以在人肿瘤、癌症等中检测到的基因或蛋白质的变体形式。

[0394] 条款

[0395] 1.一种多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含PD-1结合域和TGF-βRII结合域,其中该PD-1结合域阻断PD-1介导的信号传导,并且该TGF-βRII结合域阻断TGF-βRII介导的信号传导。

[0396] 2.根据条款1所述的多特异性结合部分,其中在活化的T细胞中,该PD-1结合域阻断PD-1介导的信号传导,并且该TGF-βRII结合域阻断TGF-βRII介导的信号传导。

[0397] 3.根据条款1或2所述的多特异性结合部分,其中在活化的肿瘤特异性T细胞中,该PD-1结合域阻断PD-1介导的信号传导,并且该TGF-βRII结合域阻断TGF-βRII介导的信号传导。

[0398] 4.一种多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含与PD-1特异性结合的Fab结构域和与TGF-βRII特异性结合的Fab结构域。

[0399] 5.根据前述条款中任一项所述的多特异性结合部分,其中该多特异性结合部分由与PD-1特异性结合的单个Fab结构域、与TGF-βRII特异性结合的单个Fab结构域、以及Fc区组成。

[0400] 6.根据前述条款中任一项所述的多特异性结合部分,其中该多特异性结合部分阻断TGF-βRII介导的信号传导的效力在表达PD-1和TGF-βRII两者的细胞中比在表达TGF-βRII且不表达、基本上不表达或表达低水平的PD-1的细胞中更高。

[0401] 7.一种多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含PD-1结合域和TGF-βRII结合域,其中该多特异性结合部分阻断TGF-βRII介导的信号传导的效力在表达PD-1和TGF-βRII两者的细胞中比在表达TGF-βRII且不表达、基本上不表达或表达低水平的PD-1的细胞中更高。

[0402] 8.一种多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含PD-1结合域和TGF-βRII结合域,其中该多特异性结合部分在减小肿瘤体积方面具有比参考抗体的组合更高的活性,其中该参考抗体的组合是两种靶向PD-1和TGF-βRII的二价单特异性抗体,其中靶向PD-1的该二价单特异性抗体包含具有如SEQ ID NO:78所示的氨基酸序列的重链和具有如SEQ ID NO:79所示的氨基酸序列的轻链,并且靶向TGF-βRII的该二价单特异性抗体包含具有如SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列的重链和具有如SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列的轻链。

[0403] 9.根据条款8所述的多特异性结合部分,其中减小肿瘤体积的该活性是通过在小鼠体内研究中,特别是在使用MDA-MB-231异种移植huCD34 NSG小鼠的小鼠体内研究中测量肿瘤体积减小来测定的。

[0404] 10.根据条款8或9所述的多特异性抗体或其变体,其中减小肿瘤体积的较高活性是肿瘤体积减小为该参考抗体的组合的该肿瘤体积减小的至少约1.5倍,优选介于约1.5倍至100倍之间。

[0405] 11.根据前述条款中任一项所述的多特异性结合部分,其中这些表达PD-1和TGF-βRII两者的细胞是活化的T细胞。

[0406] 12.根据前述条款中任一项所述的多特异性结合部分,其中这些表达PD-1和TGF-βRII两者的细胞是活化的肿瘤特异性T细胞。

[0407] 13.根据前述条款中任一项所述的多特异性结合部分,其中这些表达PD-1和TGF-βRII两者的细胞是Jurkat-PD-1^{+}细胞,并且这些表达TGF-βRII且不表达或基本上不表达PD-1的细胞是Jurkat-PD-1^{null}细胞。

[0408] 14.根据前述条款中任一项所述的多特异性结合部分,其中这些表达PD-1和TGF-βRII两者的细胞是活化的$CD4^{+}$和/或$CD8^{+}$细胞,并且这些表达TGF-βRII且不表达、基本上不表达或表达低水平的PD-1的细胞是未活化的$CD4^{+}$和/或$CD8^{+}$细胞。

[0409] 15.根据前述条款中任一项所述的多特异性结合部分,其中这些表达PD-1和TGF-βRII两者的细胞是HEK-Blue TGF-β-PD-1^{+}细胞,并且这些表达TGF-βRII且不表达、基本上不表达或表达低水平的PD-1的细胞是HEK-Blue TGF-β细胞。

[0410] 16.根据前述条款中任一项所述的多特异性结合部分,其中该阻断TGF-βRII介导的信号传导的效力在磷酸化SMAD2/3测定中测量。

[0411] 17.根据前述条款中任一项所述的多特异性结合部分,其中该阻断TGF-βRII介导的信号传导的效力在同基因PD-1-TGF-β报告基因测定中测量。

[0412] 18.根据前述条款中任一项所述的多特异性结合部分,其中该阻断TGF-βRII介导的信号传导的效力在表达PD-1和TGF-βRII两者的细胞中比在表达TGF-βRII且不表达或基本上不表达或表达低水平的PD-1的细胞中高至少约200倍或500倍或1000倍或5000倍或10000倍或15000倍或20000倍或30000倍,或介于约200倍至30000倍之间、或介于500倍至30000倍之间、或介于1000倍至30000倍之间、或介于5000倍至30000倍之间、或介于10000倍至30000倍之间、或介于200倍至20000倍之间、或介于200倍至15000倍之间。

[0413] 19.根据前述条款中任一项所述的多特异性结合部分,其中该多特异性结合部分在表达TGF-βRII且不表达PD-1的细胞中阻断TGF-βRII介导的信号传导的该效力比参考抗TGF-βRII抗体的该效力更低,并且该多特异性结合部分在表达TGF-βRII和PD-1两者的细胞中阻断TGF-βRII介导的信号传导的该效力比该参考抗TGF-βRII抗体的该效力更高,其中该参考抗TGF-βRII抗体是二价单特异性抗体,该二价单特异性抗体包含具有如SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列的重链和具有如SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列的轻链。

[0414] 20.根据前述条款中任一项所述的多特异性结合部分,其中该多特异性结合部分在表达TGF-βRII和PD-1两者的细胞中阻断TGF-βRII介导的信号传导的该效力比该参考抗TGF-βRII抗体的该效力高至少约100倍或200倍,优选地介于约100倍至20000倍之间、或介于100倍至15000倍之间、或介于100倍至12000倍之间、或介于200倍至20000倍之间、或介于200倍至15000倍之间、或介于200倍至12000倍之间。

[0415] 21.根据前述条款中任一项所述的多特异性结合部分,其中该PD-1结合域和TGF-βRII结合域是Fab结构域。

[0416] 22.根据前述条款中任一项所述的多特异性结合部分,其中该多特异性结合部分是双特异性抗体。

[0417] 23.根据前述条款中任一项所述的多特异性结合部分,其中该多特异性结合部分是IgG1双特异性抗体。

[0418] 24.根据前述条款中任一项所述的多特异性结合部分,其中该PD-1结合域和TGF-βRII结合域各自包含轻链,该轻链包含能够与具有不同表位特异性的多条重链配对的轻链的轻链可变区。

[0419] 25.根据前述条款中任一项所述的多特异性结合部分,其中该PD-1结合域和TGF-βRII结合域包含相同的轻链。

[0420] 26.根据前述条款中任一项所述的多特异性结合部分,其中该PD-1结合域包含重链可变区,该重链可变区包含:

[0421] a)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列;

[0422] b)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列;

[0423] c)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列;

[0424] d)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;或

[0425] e)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列;

[0426] 其中这些HCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异。

[0427] 27.根据前述条款中任一项所述的多特异性结合部分,其中该TGF-βRII结合域包含重链可变区,该重链可变区包含:

[0428] a)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列;

[0429] b)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列;

[0430] c)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列;

[0431] d)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列;

[0432] e)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列;

[0433] f)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列;或

[0434] g)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:91和SEQ ID NO:92所示的氨基酸序列,

[0435] 其中这些HCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异。

[0436] 28.一种多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含PD-1结合域和TGF-βRII结合域,其中该PD-1结合域包含重链可变区,该重链可变区包含:

[0437] a)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列;

[0438] b)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列;

[0439] c)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列;

[0440] d)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;或

[0441] e)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列;

[0442] 其中这些HCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异。

[0443] 29.一种多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含PD-1结合域和TGF-βRII结合域,其中该TGF-βRII结合域包含重链可变区,该重链可变区包含:

[0444] a)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列;

[0445] b)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列;

[0446] c)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列;

[0447] d)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列;

[0448] e)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列;

[0449] f)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列;或

[0450] g)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:91和SEQ ID NO:92所示的氨基酸序列,

[0451] 其中这些HCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异。

[0452] 30.根据前述条款中任一项所述的多特异性结合部分,其中该PD-1结合域包含重链可变区,该重链可变区具有如SEQ ID NO:1、5、9、13、14、18和19中任一项所示的氨基酸序列或与其具有至少80%,优选85%,更优选90%,或最优选95%序列同一性的氨基酸序列。

[0453] 31.根据前述条款中任一项所述的多特异性结合部分,其中该PD-1结合域包含轻链可变区,该轻链可变区包含分别具有如SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列的轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3),其中这些LCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异。

[0454] 32.根据前述条款中任一项所述的多特异性结合部分,其中该PD-1结合域包含轻链可变区,该轻链可变区具有如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列或与其具有至少80%,优选85%,更优选90%,或最优选95%序列同一性的氨基酸序列。

[0455] 33.根据前述条款中任一项所述的多特异性结合部分,其中该TGF-βRII结合域包含重链可变区,该重链可变区包含:

[0456] a)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列;

[0457] b)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列;

[0458] c)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列;

[0459] d)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列;

[0460] e)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列;

[0461] f)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列;或

[0462] g)重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3),它们分别具有如SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:91和SEQ ID NO:92所示的氨基酸序列,

[0463] 其中这些HCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异。

[0464] 34.根据前述条款中任一项所述的多特异性结合部分,其中该TGF-βRII结合域包含重链可变区,该重链可变区具有如SEQ ID NO:23、27、31、35、39、43、47、88和89中任一项所示的氨基酸序列或与其具有至少80%,优选85%,更优选90%,或最优选95%序列同一性的氨基酸序列。

[0465] 35.根据前述条款中任一项所述的多特异性结合部分,其中该TGF-βRII结合域包含轻链可变区,该轻链可变区包含分别具有如SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列的轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3),其中这些LCDR中的每一者能够包含至多三个、两个或一个氨基酸变异。

[0466] 36.根据前述条款中任一项所述的多特异性结合部分,其中该TGF-βRII结合域包含轻链可变区,该轻链可变区具有如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列或与其具有至少80%,优选85%,更优选90%,或最优选95%序列同一性的氨基酸序列。

[0467] 37.一种多特异性结合部分,该多特异性结合部分包含PD-1结合域和TGF-βRII结合域,该多特异性结合部分与根据前述条款中任一项所述的多特异性结合部分竞争以与PD-1和/或TGF-βRII结合。

[0468] 38.一种药物组合物,该药物组合物包含有效量的根据前述条款中任一项所述的多特异性结合部分,和药学上可接受的载体。

[0469] 39.根据条款1至37中任一项所述的多特异性结合部分或根据条款38所述的药物组合物用于治疗。

[0470] 40.根据条款1至37中任一项所述的多特异性结合部分或根据条款38所述的药物组合物用于治疗与受抑制的免疫系统相关联的疾病。

[0471] 41.根据条款1至37中任一项所述的多特异性结合部分或根据条款38所述的药物组合物用于治疗癌症。

[0472] 42.根据条款1至37中任一项所述的多特异性结合部分或根据条款38所述的药物组合物用于制造药物的用途,该药物用于治疗与受抑制的免疫系统相关联的疾病。

[0473] 43.根据条款1至37中任一项所述的多特异性结合部分或根据条款38所述的药物组合物用于制造药物的用途,该药物用于治疗癌症。

[0474] 44.一种用于治疗疾病的方法,该方法包括向有需要的人受试者施用有效量的根据条款1至37中任一项所述的多特异性结合部分或根据条款38所述的药物组合物。

[0475] 45.一种用于治疗与受抑制的免疫系统相关联的疾病的方法,该方法包括向有需要的人受试者施用有效量的根据条款1至37中任一项所述的多特异性结合部分或根据条款38所述的药物组合物。

[0476] 46.一种用于治疗癌症的方法,该方法包括向有需要的人受试者施用有效量的根据条款1至37中任一项所述的多特异性结合部分或根据条款38所述的药物组合物。

[0477] 47.一种细胞,该细胞包含编码如条款28或30中所定义的PD-1结合域的重链可变

区的核酸序列以及编码如条款29或34中所定义的TGF-βRII结合域的重链可变区的核酸序列。

[0478] 48.根据条款47所述的细胞,其中该细胞还包含编码CH1区以及优选地编码铰链、CH2区和CH3区的核酸序列。

[0479] 49.根据条款47或48所述的细胞,其中该细胞还包含至少一种编码轻链可变区,特别是如条款34或35中所定义的轻链可变区,以及优选地编码CL区的核酸序列。

[0480] 50.一种细胞,该细胞产生根据条款1至37中任一项所述的多特异性结合部分。

[0481] 实施例

[0482] 在用于说明本公开但不旨在以任何方式限制本公开的实施例中,双特异性抗体的每个结合域包含具有如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列的轻链可变区和具有如SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列的轻链恒定区。双特异性抗体优选地是包含CH1、铰链、CH2和CH3的IgG1抗体。在用于说明本公开但不旨在以任何方式限制本公开的实施例中,以IgG1形式筛选双特异性抗体,其中PD-1结合重链包含具有如SEQ ID NO:69所示的氨基酸序列的CH1、具有如SEQ ID NO:71所示的氨基酸序列的CH2和具有如SEQ ID NO:73所示的氨基酸序列的CH3;并且TGF-βRII结合重链包含具有如SEQ ID NO:69所示的氨基酸序列的CH1、具有如SEQ ID NO:71所示的氨基酸序列的CH2和具有如SEQ ID NO:74所示的氨基酸序列的CH3。

[0483] 实施例中使用的参考抗体和分子以及对照抗体包括:

[0484] -参考PD-1抗体帕博利珠单抗类似物,其是二价单特异性抗体,该二价单特异性抗体包含具有如SEQ ID NO:78所示的氨基酸序列的两条重链和具有如SEQ ID NO:79所示的氨基酸序列的两条轻链。

[0485] -参考PD-1抗体帕博利珠单抗(由Merck制造,由Myonex分销)。

[0486] -参考TGF-βRII抗体TGF1,其是TGF1的二价单特异性类似物,并且包含具有如SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列的两条重链和具有如SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列的两条轻链。

[0487] -参考PD-L1-TGF-βTRAP分子,其是用于与PD-L1结合的Bintrafusaα二价单特异性的类似物,并且包含具有如SEQ ID NO:80所示的氨基酸序列的两条重链和具有如SEQ ID NO:81所示的氨基酸序列的两条轻链,其中TGF-βRII的胞外结构域具有如SEQ ID NO:104所示的氨基酸序列,该氨基酸序列通过$(G_4S)_4G$接头连接到每个重链的C末端。

[0488] -阴性对照IgG1抗体(RSV-G),其是二价单特异性抗体,该二价单特异性抗体包含具有如SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列的两条重链和具有如SEQ ID NO:87所示的氨基酸序列的两条轻链。

[0489] -对照TGF-βRII×RSV抗体,其是二价双特异性抗体,该二价双特异性抗体包含TGF-βRII结合域、RSV结合域和共同轻链,该TGF-βRII结合域包含如SEQ ID NO:23、31、39、27、35或43所示的重链可变区氨基酸序列;该RSV结合域包含如SEQ ID NO:86所示的重链可变区氨基酸序列;该共同轻链包含如SEQ ID NO:48所示的轻链可变区氨基酸序列和如SEQ ID NO:75所示的轻链恒定区氨基酸序列。

[0490] -阳性对照LILRB2(BioLegend;目录号338714)。

[0491] -商业参考PD-1抗体Opdivo(由Bristol Myers Squibb(BMS)制备)。

[0492] 实施例1-PD-1×TGF-βRII双特异性抗体的生成

[0493] 通过用人PD-1或TGF-βRII抗原部分免疫包含共同IGKV1-39轻链的转基因小鼠(MeMo®小鼠)(包括使用不同形式的DNA、蛋白质和基于细胞的抗原递送),来获得结合域、抗体和对人PD-1具有结合特异性的重链可变区,以及对人TGF-βRII具有结合特异性的重链可变区。

[0494] 具有如SEQ ID NO:1、5、9、13、14、18和19所示的氨基酸序列的对人PD-1具有结合特异性的重链可变区,以及具有如SEQ ID NO:23、27、31、35、39、43、47、88和89所示的氨基酸序列的对人TGF-βRII具有结合特异性的重链可变区被选择用于产生双特异性抗体。本文的结合域序列,一旦通过本文提供的技术表征和测序,随后就可以通过本领域已知的任何方法获得。

[0495] 表1.可用于生成双特异性抗体的PD-1重链可变区和TGF-βRII重链可变区的组合。

[0496]

		TGF-βRII								
PD-1		SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 88	SEQ ID NO: 89
	SEQ ID NO: 1	PB1	PB2	PB3	PB4	PB5	PB6	PB7	PB50	PB57
	SEQ ID NO: 5	PB8	PB9	PB10	PB11	PB12	PB13	PB14	PB51	PB58
	SEQ ID NO: 9	PB15	PB16	PB17	PB18	PB19	PB20	PB21	PB52	PB59
	SEQ ID NO: 13	PB22	PB23	PB24	PB25	PB26	PB27	PB28	PB53	PB60
	SEQ ID NO: 14	PB29	PB30	PB31	PB32	PB33	PB34	PB35	PB54	PB61
	SEQ ID NO: 18	PB36	PB37	PB38	PB39	PB40	PB41	PB42	PB55	PB62
	SEQ ID NO: 19	PB43	PB44	PB45	PB46	PB47	PB48	PB49	PB56	PB63

[0497] 通过瞬时共转染两种质粒载体来生成双特异性IgG抗体:一个编码具有PD-1结合VH区的IgG重链,并且另一个编码具有TGF-βRII结合VH区的IgG重链。使用WO2013/157954和WO2013/157953中所述的CH3工程技术来确保有效的异源二聚化和双特异性抗体的形成。两个载体进一步编码包含IGKV1-39/Jk1轻链可变区的共同轻链。通过本领域已知的方法进行细胞转染、细胞培养以及抗体的收获和纯化。

[0498] 实施例2-PD-1-SHP募集测定

[0499] 在PD-1-SHP募集测定中表征双特异性抗体,以测定它们阻断配体与PD-1结合并从而抑制T细胞中PD-1/PD-L1信号传导的能力。PD-1SHP募集测定涉及两种细胞体系,该两种细胞体系包括被工程化以表达酶供体(ED)标记PD-1受体(例如PD-L1或PD-L2)的U2OS细胞和表达PD-1并被工程化为表达酶受体(EA)融合的SHP1的Jurkat T细胞。配体或激动性抗体诱导的Jurkat T细胞的PD-1活化导致SHP1募集,迫使ED和EA相互作用以及活性β-gal酶的重构。在底物的存在下,重构的β-gal产生化学发光信号。

[0500] 抗体样品包括几种双特异性抗体,阴性对照IgG1抗体(RSV),参考PD-1抗体帕博利珠单抗类似物,参考TGF-βRII抗体TGF1的类似物,和参考PD-L1-TGF-βTRAP分子的类似物。

[0501] 将U2OS/PD-L1细胞(DiscoveRx公司)保持在添加了10% FBS+0.25μg/mL嘌呤霉素

(赛默飞世尔科学公司)的McCoy's 5A培养基(赛默飞世尔科学公司)中。Jurkat-PD-1-SHP细胞(含有Src同源区2结构域的磷酸酶;DiscoveRx公司)在补充有10% FBS、250μg/mL潮霉素B(赛默飞世尔科学公司)和500μg/mL G418(赛默飞世尔科学公司)的RPMI1640培养基(赛默飞世尔科学公司)中培养。U2OS/PD-L1细胞和Jurkat-PD-1-SHP细胞均首先在锥形管中离心以除去培养基,然后洗涤,并在细胞铺板前用测定培养基(含有1% FBS的RPMI1640培养基)重悬。将U2OS/PD-L1细胞以20μL测定培养基中每孔5000个细胞加入384孔黑色透明底部测定板(CELLCOAT®组织培养板,Greiner Bio-One)中。通过在具有1%FBS的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中系列稀释液,并将5μL/孔转移到细胞板中,并在37℃、5%CO_2下孵育一小时来制备抗体样品。随后将Jurkat-PD-1-SHP细胞在20μL测定培养基中以每孔5000个细胞的速度加入细胞板中,并在37℃、5% CO_2下孵育两小时,然后在每孔中加入2.5μL PathHunter试剂1(DiscoveRx公司)。然后将该测定板以350rpm摇动1分钟,并在室温下在黑暗中保持15分钟,随后加入10μL PathHunter试剂2(DiscoveRx公司)。在室温下孵育一小时后,用TopCount读数器(珀金埃尔默公司)记录化学发光信号。仅用PBS的孔用作阳性对照,并且不含细胞的孔用作阴性对照。IC_{50}测定是通过使用GraphPad Prism 7.0软件拟合对照活性百分比与化合物浓度对数的曲线来进行的。

[0502] 结果在表2和图1A及图1B中示出。所有双特异性抗体抑制PD-1介导的SHP募集。在PD-1-SHP募集测定中,许多对PD-1结合为单价的双特异性抗体与二价单特异性参考PD-1抗体帕博利珠单抗类似物和对PD-L1结合为二价的参考PD-L1-TGF-βTRAP分子等价。

[0503] 表2.PD-1-SHP募集测定的结果。

[0504]

IC_{50} (ng/mL)	SEQ ID NO: 86	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 43
SEQ ID NO: 86	-	-	-	-	-	-	-
SEQ ID NO: 1	271	277	390	428	410	415	278
SEQ ID NO: 5	126	141	160	158	118	78	312
SEQ ID NO: 9	101	120	137	94	122	130	226
SEQ ID NO: 14	202	257	337	251	167	255	238
SEQ ID NO: 19	207	234	400	237	232	220	267

[0505] 实施例3-PD-1-NFAT报告基因测定

[0506] 在PD-1-NFAT报告基因测定中表征双特异性抗体,以测定它们阻断活化T细胞中的PD-1/PD-L1信号传导的能力。PD-1-NFAT报告基因测定涉及两种转基因细胞系体系,其中PD-$L1^+$aAPC/CHO-K1细胞共表达TCR同源蛋白,并且PD-1^+效应Jurkat T细胞在NFAT-RE顺式元件的控制下驱动荧光素酶报告基因。效应Jurkat T细胞以抗原非依赖性方式活化TCR信号传导。PD-1/PD-L1相互作用抑制TCR介导的发光。阻断PD-1/PD-L1相互作用允许TCR信号传导,从而诱导可通过添加底物检测到的发光。

[0507] 抗体样品包括几种双特异性抗体,阴性对照IgG1抗体(RSV),参考PD-1抗体帕博利珠单抗类似物,参考TGF-βRII抗体TGF1的类似物,和参考PD-L1-TGF-βTRAP分子的类似物。

[0508] 将PD-L1 aAPC/CHO-K1细胞((人工抗原呈递细胞)/CHO(中国仓鼠卵巢)-K1细胞;Promega)保持在F-12培养基(赛默飞世尔科学公司)中,该培养基中添加了10% FBS、200μg/mL潮霉素B(赛默飞世尔科学公司)和250μg/mL遗传霉素(G418;赛默飞世尔科学公司)。将Jurkat-PD-1-NFAT效应细胞(活化T细胞的核因子;Promega)培养在RPMI 1640培养基(赛默

飞世尔科学公司)中,该培养基中补充了10% FBS、100μg/mL潮霉素B(赛默飞世尔科学公司)和500μg/mL G418(赛默飞世尔科学公司)。PD-L1 aAPC/CHO-K1细胞和Jurkat-PD-1-NFAT效应细胞两者均首先离心除去培养基,然后洗涤并在细胞接种前用测定培养基(含有1% FBS的RPMI1640培养基)悬浮。将PD-L1 aAPC/CHO-K1细胞在10μL测定培养基中以每孔8000个细胞的速度加入384孔白色透明底部测定板(CELLCOAT®Tissue Culture Plates,Greiner Bio One)中。通过在具有1% FBS的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中系列稀释液制备抗体样品,并将5μL/孔转移到细胞板。然后将Jurkat-PD-1-NFAT效应细胞在5μL测定培养基中以每孔10,000个细胞的速度分配到每个孔中。在37℃、5% CO_2下将测定板孵育24小时。在将测定板平衡至室温15分钟后,加入20μL/孔的Bio-Glo™试剂(Promega)。在室温下孵育8分钟后,用Phrastar微板读数器(BMG Labtech)读出发光。含有PBS的孔用作阴性对照(0%诱导),并且含有12.5μg/mL帕博利珠单抗类似物的孔用作阳性对照(100%诱导)。EC_{50}测定是通过使用GraphPad Prism 7.0软件拟合对照活性百分比与化合物浓度对数的曲线来进行的。

[0509] 结果在表3和图2A-图2C中示出。所有双特异性抗体抑制PD-1介导的T细胞抑制。在PD-1-NFAT报告基因测定中,许多对于PD-1结合为单价的双特异性抗体与二价单特异性参考PD-1抗体帕博利珠单抗类似物等效。

[0510] 表3.PD-1-NFAT报告基因测定的结果。

[0511]

EC_{50} (ng/mL)	SEQ ID NO: 86	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 43
SEQ ID NO: 86	-	-	-	-	-	-	-
SEQ ID NO: 1	1352	1828	3569	1775	756	2030	1236
SEQ ID NO: 5	545	444	535	299	369	533	555
SEQ ID NO: 9	346	448	325	287	317	664	257
SEQ ID NO: 14	1513	869	868	904	772	686	790
SEQ ID NO: 19	791	771	2900	1019	741	936	681

[0512] 实施例4-Jurkat磷酸化SMAD2/3测定

[0513] 在Jurkat磷酸化SMAD2/3测定中表征双特异性抗体,以测定它们阻断T细胞中TGF-βRII信号传导的能力。该Jurkat磷酸化SMAD2/3测定涉及双特异性抗体对Jurkat-PD-1^{null}细胞和Jurkat-PD-1^{+}细胞活性的比较,以测定双特异性抗体是否以PD-1相关的方式抑制TGF-β诱导的SMAD2/3磷酸化。参考TGF-βRII抗体TGF1的类似物、TGF-βRII×RSV双特异性抗体、和包含具有如SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列的重链和具有如SEQ ID NO:87所示的氨基酸序列的轻链的阴性对照二价单特异性IgG1抗体作为对照抗体被包括在内。

[0514] 将在RPMI/10% FBS中的Jurkat-PD-1^{null}细胞(ATCC目录号TIB-152)和Jurkat-PD-1^{+}细胞(Promega目录号CS187105)接种在96孔平底板中。Jurkat-PD-1^{null}细胞检测不到PD-1的表达;Jurkat-PD-1^{+}细胞上的PD-1分子的数目使用Quantibrite珠法测定为约4000。以6步系列稀释液(100μg/mL至0.001μg/mL)加入双特异性抗体和对照抗体,并将细胞在37℃/5% CO_2下孵育一小时。一小时后,加入最终浓度为10ng/mL的人重组TGF-β1(R&D系统目录号7754-BH),并将细胞在37℃/5% CO_2下再孵育两小时。孵育后,用PBS轻轻洗涤细胞。使用含有磷酸酶抑制剂(Sigma#P0044和P-5726)和蛋白酶抑制剂(Pierce Biotechnology#87785)的裂解缓冲液(MSD#R60TX-2)制备细胞裂解物。使用BCA蛋白测定试剂盒(Pierce#

23227)将样品标准化为总蛋白。根据制造商的说明书,使用ELISA(Cell Signaling#12001)测定磷酸化SMAD2/3水平。使用GraphPad Prism(8.2.0)作图。

[0515] 结果在表4、5和6以及图3中示出。表6显示了10种双特异性抗体在Jurkat-PD-1^{null}与Jurkat-PD-1^{+}细胞中抑制TGF-βRII信号传导的效力的倍数差异。在该测定中,双特异性抗体的倍数差异比参考抗体TGF1的类似物的倍数差异高介于200倍至11000倍之间。

[0516] 所有双特异性抗体在Jurkat-PD-1^{null}细胞和Jurkat-PD-1^{+}细胞两者中均抑制TGF-βRII信号传导。双特异性抗体在Jurkat-PD-1^{+}细胞中比在Jurkat-PD-1^{null}细胞中更有效地抑制TGF-βRII信号传导,表明它们以与PD-1表达相关的方式抑制TGF-β诱导的SMAD2/3磷酸化。与参考TGF-βRII抗体TGF1的类似物相比,所有双特异性抗体都需要更高的浓度来抑制Jurkat-PD-1^{null}细胞中的TGF-βRII信号传导。许多对于与TGF-βRII结合为单价的双特异性抗体在抑制Jurkat-PD-1^{+}细胞中的TGF-βRII信号传导方面优于参考TGF-βRII抗体TGF1的二价单特异性类似物。

[0517] 表4.Jurkat-PD-1^{null}细胞中Jurkat磷酸化SMAD2/3测定的IC_{50}值。

[0518]

	SEQ ID NO: 86	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 43
SEQ ID NO: 86	-	54560	19170	14190	31510	15700	21600
SEQ ID NO: 1	-	60540	38700	17200	42960	23030	15240
SEQ ID NO: 5	-	41320	43600	30640	64230	24590	18080
SEQ ID NO: 9	-	70920	32920	29670	55380	16400	13100
SEQ ID NO: 14	-	55380	13620	21750	46580	19850	15380
SEQ ID NO: 19	-	41450	15250	8383	40960	26050	22760

[0519] 表5.Jurkat-PD-1^{+}细胞中Jurkat磷酸化SMAD2/3测定的IC_{50}值。

[0520]

IC_{50} (ng/mL)	SEQ ID NO: 86	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 43
SEQ ID NO: 86	-	37100	18160	10010	6118	31580	10130
SEQ ID NO: 1	-	182	27	9	7	577	16
SEQ ID NO: 5	-	3	15	24	35	10	7
SEQ ID NO: 9	-	128	10	101	7	13	17
SEQ ID NO: 14	-	4	1	10	10	11	53
SEQ ID NO: 19	-	3	11	56	6	21	11

[0521] 表6.在Jurkat-PD-1^{null}与Jurkat-PD-1^{+}细胞中抑制TGF-βRII信号传导的效力的倍数差异。

[0522]

TGF-βRII	PD-1	pSMAD PD-1^{null}与PD-1^{+}的倍数差异
SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 14	13845
SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 19	13817
SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 14	13620
SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 9	294
SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 9	1262
SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 14	1805
SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 19	1240
SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 9	7911
SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 9	771
SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 19	2069
	SEQ ID NO: 78/ SEQ ID NO: 79	NA
SEQ ID NO: 76/ SEQ ID NO: 77		1.3

[0523] 实施例5-用受刺激的和未受刺激的CD4^{+}和CD8^{+}T细胞进行磷酸化SMAD2测定

[0524] 在磷酸化SMAD2测定中表征双特异性抗体以测定它们在PD-1阳性T细胞中阻断TGF-βRII信号传导的特异性。磷酸化SMAD2测定涉及双特异性抗体对表达低水平PD-1的未受刺激的T细胞和表达高水平PD-1的受刺激的T细胞的活性的比较,以测定双特异性抗体是否以与PD-1表达相关的方式抑制TGF-β诱导的SMAD2磷酸化。将参考TGF-βRII抗体TGF1的类似物、参考PD-1抗体帕博利珠单抗和阴性对照的二价单特异性IgG1抗体分别作为阳性对照和阴性对照包括在内,该阴性对照的二价单特异性IgG1抗体包含具有如SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列的重链和具有如SEQ ID NO:87所示的氨基酸序列的轻链。

[0525] 用1μg/mL抗CD3抗体(BD Biosciences#555336)刺激来自健康供体的PBMC达48小时,然后进行16小时血清剥夺(0.1% FBS)。活化的CD4^{+}和CD8^{+}T细胞上的PD-1分子的数目使用Quantibrite珠法测定为约1000至2000。然后将受刺激和未受刺激的PBMC与双特异性抗体和对照抗体在室温下孵育30分钟。以1ng/mL的最终浓度加入重组人TGF-β1(Cell Signaling#7754-BH),并将细胞再孵育30分钟。最后,用PBS洗涤细胞两次,并对细胞表面标志物进行染色,然后进行胞内磷酸化SMAD2染色。

[0526] 将以下抗体用于流式细胞术的染色:抗人CD45(克隆:HI30;目录号557748,BD Biosciences)的抗体、抗人CD11b(克隆:M1/70;目录号563015,BD Biociences)的抗体、抗人CD3(克隆:UCHT1;目录号565491,BD Biosciences)的抗体,抗人CD4(克隆;SK3;目录号563550,BD Biosciences)的抗体、抗人CD8(克隆#SK1,目录号344714,BioLegend)的抗体和人磷酸化SMAD2(目录号56532,Cell Signaling)抗体。将活性染料(BioLegend#423114)用于在分析过程中排除死细胞。使用DIVA软件在FACSymphony A3下进行细胞采集。

[0527] 使用FSC-A和SSC-A根据尺寸和粒度对PBMC进行门控,以排除碎片。然后使用可固定的活性染料排除死细胞。选择CD45阳性细胞,随后选择CD11b阴性T细胞和CD3阳性T细胞。最后,CD4和CD8阳性亚群被门控,并在这些亚群上以几何平均荧光强度(GMFI)测量磷酸化SMAD2信号。使用FlowJo软件进行数据分析,并使用GrapPad Prism(8.2.0)作图。

[0528] 结果在图4中示出。所有双特异性抗体在受刺激的CD4^{+}和CD8^{+}T细胞中抑制TGF-β

RII信号传导。在一个供体(供体B)中,双特异性抗体在未受刺激的$CD4^+$和$CD8^+$T细胞中不抑制TGF-βRII信号传导。在另一个供体中,包含具有如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的PD-1重链可变区和具有如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的TGF-βRII重链可变区的双特异性抗体不抑制未受刺激的$CD4^+$和$CD8^+$T细胞中的TGF-βRII信号传导,并且包含具有如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的PD-1重链可变区和具有如SEQ ID NO:47所示的氨基酸序列的TGF-βRII重链可变区的双特异性抗体在未受刺激的$CD4^+$和$CD8^+$T细胞中抑制TGF-βRII信号传导的效力显著低于在受刺激的$CD4^+$T细胞和$CD8^+$T细胞中的效力。这些数据证实了实施例4中的发现,即双特异性抗体以与PD-1表达相关的方式抑制TGF-β诱导的SMAD磷酸化。

[0529] 实施例6-耗竭混合淋巴细胞反应(MLR)测定

[0530] 在耗竭混合淋巴细胞反应(MLR)测定中表征双特异性抗体,以测定它们在通过衰竭T细胞诱导细胞因子产生中的效力。

[0531] 抗体样品包括几种双特异性抗体,阴性对照IgG1抗体(RSV),参考PD-1抗体帕博利珠单抗,参考TGF-βRII抗体TGF1的类似物,以及参考PD-1抗体帕博利珠单抗和参考TGF-βRII抗体TGF1的类似物的组合。

[0532] 从健康供体分离人PBMC。通过用葡萄球菌肠毒素B(SEB)重复活化PBMC达6天来进行体外T细胞耗竭。根据制造商的说明书,使用T细胞分离试剂盒(StemCell Technologies,目录号17951)分离总T细胞。将T细胞与来自不同供体的树突状细胞(DC)在96孔U底板中以10:1的T细胞与DC比率混合。加入抗体样品的系列稀释液,并将板在37℃/5% CO_2下再孵育六天。六天后,使用定制的MSD试剂盒测量上清液中的IFN-γ、IL-2或TNF-α细胞因子水平。使用GraphPad Prism(8.2.0)作图。

[0533] 分别用五个供体进行的两个实验的代表性结果在图5的A、图5的C和图5的D中示出。用三个供体进行的进一步实验的结果在图5的B和图5的E中示出。大多数双特异性抗体诱导的IFN-γ、IL-2或TNF-α水平与参考PD-1抗体帕博利珠单抗、参考PD-L1-TGF-βTRAP分子的类似物或参考PD-1抗体帕博利珠单抗和参考TGF-βRII抗体TGF1的组合相似。来自最初研究的许多双特异性抗体的IC_{50}值在表7中示出。

[0534] 表7.耗竭MLR测定的IC_{50}值

[0535]

TGF-βRII	PD-1	AUC IFNg (% of Combination)	AUC IL2 (% of Combination)	AUC TNFa (% of Combination)
SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 14	95.3	97.1	92
SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 19	121.3	98.5	93.2
SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 14	137.2	105.4	100.4
SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 9	139.3	105.9	101
SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 9	132.5	101.9	96
SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 14	121.2	104.3	94.5
SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 19	94.1	91.8	78
SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 9	90.1	86.7	76.4
SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 9	98.5	104.3	83.1
SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 19	95.7	89	77.5

[0536] 实施例7-HEK-BLUE-PD-1TGF-β报告基因测定

[0537] 在HEK-BLUE-PD-1TGF-β报告基因测定中表征双特异性抗体,以测定它们在抑制T

细胞中TGF-β诱导的信号传导方面的效力。用TGF-β刺激HEK-Blue™TGF-β细胞或HEK-Blue™TGF-β-PD-1⁺细胞可诱导TGF-β/Smad信号传导通路的激活,导致诱导SEAP产生的Smad3/Smad4复合物的形成。

[0538] 所用试剂:重组人TGF-β1(人细胞表达的)蛋白,R&D,目录号7754-BH。生长培养基:DMEM、4.5g/L葡萄糖、2mM L-谷氨酰胺、10%热灭活胎牛血清(FBS;在56℃下30分钟)、100μg/mL Normocin™,Pen-Strep(100U/mL至100μg/mL)。对于HEK-Blue™TGF-β-PD-1⁺细胞,使用含有0.4μg/mL嘌呤霉素的生长培养基。测试培养基:DMEM 4.5g/L葡萄糖,2mM L-谷氨酰胺,0.1%加热灭活的FBS,不含Normocin™,Blasticidin、Hygromycin B和Zeocin™的Pen-Strep(100U/mL至100μg/mL)。

[0539] 如下生成稳定的表达PD-1的HEK-Blue™TGF-β细胞系:将PD-1的全长cd插入含有嘌呤霉素抗性基因的哺乳动物表达载体pD2529-EFM(ATUM)中。启动子为经修饰的EF1a。通过ATUM进行载体构建,并确认序列。参见图10的载体图谱。根据制造商的方案,使用TransIT-293转染试剂(Mirus Bio)转染无法检测到PD-1表达的HEK-Blue™TGF-β细胞(Invivogen)。在含有0.4μg/mL嘌呤霉素的HEK-Blue™TGF-β培养基中选择稳定转染的细胞。克隆通过限制性稀释来分离,并通过蛋白质印迹表征PD-1的表达。基于以下项选择一个克隆:1)其稳定且均匀的表面PD-1表达(直方图中的一个峰);2)与亲代HEK-Blue™细胞系相比,具有相似的表面TGF-βRII表达;和3)在报告基因测定中具有与参考抗体TGF1相似的EC50。所选克隆中PD-1的GMFI为3272(相比于亲本细胞系为5,并且同种型对照为8)。这些细胞上PD-1分子的数目使用Quantibrite珠法测定为约20000。

[0540] 抗体样品包括几种双特异性抗体、阴性对照IgG1抗体(RSV)、参考PD-1抗体帕博利珠单抗和参考TGF-βRII抗体TGF1的类似物。

[0541] 将表达TGF-βRII的HEK-Blue™TGF-β细胞(Invivogen,目录代码:hkb-tgfb)或HEK-Blue™TGF-β-PD-1⁺细胞接种在96孔平底板中,在测试培养基中每孔25000个细胞。加入抗体样品的系列稀释液,并将细胞在室温下孵育一小时;然后加入终浓度为1ng/mL的人重组TGF-β1。将细胞在37℃/5% CO_2下孵育过夜。在孵育后,将40ul上清液从每个孔转移到新鲜的平底96孔板中;并向上清液中加入160ul重新悬浮的QUANTI-Blue™溶液。将平板在37℃/5% CO_2下孵育40分钟。使用QUANTI-Blue™溶液(SEAP检测试剂)评估上清液中分泌的SEAP的量。SEAP水平使用分光光度计在650nm处测定。使用GraphPad Prism(8.2.0)作图。

[0542] 结果在图6和表8中示出。许多双特异性抗体以与PD-1表达相关的方式显示出对TGF-β诱导的信号传导的有效抑制。

[0543] 表8.HEK-BLUE-P-D-1TGF-β报告基因测定的结果。

[0544]

抗体	HEK-Blue™ TGF-β	HEK-Blue™ TGF-β -PD-1+	倍数差异
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87	>100	>100	-
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79	>100	>100	-
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77	0.8056	0.6551	-
SEQ ID NO: 23 × SEQ ID NO: 14	>100 (142)	0.005606	25330
SEQ ID NO: 23 × SEQ ID NO: 19	>100 (177)	0.001747	101317
SEQ ID NO: 31 × SEQ ID NO: 14	9.7	7.404	1.3101
SEQ ID NO: 39 × SEQ ID NO: 9	38	0.000193	197198
SEQ ID NO: 35 × SEQ ID NO: 9	18.5	0.001533	12068
SEQ ID NO: 35 × SEQ ID NO: 14	20.45	0.000687	20450
SEQ ID NO: 35 × SEQ ID NO: 19	23.79	0.001215	19580
SEQ ID NO: 27 × SEQ ID NO: 9	65	0.00141	46099
SEQ ID NO: 43 × SEQ ID NO: 9	8.2	<0.0001	NA
SEQ ID NO: 43 × SEQ ID NO: 19	4.1	<0.0001	NA

[0545] 实施例8-Treg抑制测定

[0546] 在Treg抑制测定中表征双特异性抗体,以测定它们消除或减少调节性T细胞的抑制作用从而诱导T细胞产生细胞因子的能力。

[0547] 抗体样品包括几种双特异性抗体,阴性对照IgG1抗体(RSV),参考PD-1抗体帕博利珠单抗,参考TGF-βRII抗体TGF1的类似物,以及参考PD-1抗体帕博利珠单抗和参考TGF-βRII抗体TGF1的类似物的组合。

[0548] 通过Ficoll-Paque梯度离心从健康供体分离人PBMC。根据制造商的说明书,使用EasySep Treg分离试剂盒(StemCell Technologies,#18063)分离Treg。将Treg与来自相同供体的PBMC混合。将抗-CD3 ab(BD Biosciences#555336)和抗-CD28 ab(BD Biosciences#555725)加入共培养物中。最后,加入双特异性抗体的系列稀释液,并将板在37℃/5% CO_2下孵育三天。孵育三天后,使用MSD试剂盒(Mesoscale)测量上清液中IFN-γ和TNF-α细胞因子水平。使用GraphPad Prism(8.2.0)作图。

[0549] 结果在图7和表9中示出。大多数双特异性抗体诱导的IFN-γ或TNF-α水平与参考PD-1抗体帕博利珠单抗或参考PD-1抗体帕博利珠单抗和参考TGF-βRII抗体TGF1的类似物的组合相似。

[0550] 表9.Treg抑制测定的结果。

[0551]

TGF-βRII	PD-1	AUC IFN-γ	AUC TNF-α
		参考抗体的组合的%	参考抗体的组合的%
SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 14	95.1	134.5
SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 19	122.5	179.4
SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 14	81.8	101
SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 9	107.2	138.9
SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 9	99.9	121.5
SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 14	123.9	121.7
SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 19	88.3	115.8
SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 9	103.8	127.2
SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 9	109	114
SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 19	128.6	107.2

[0552] 实施例9-巨噬细胞抑制测定

[0553] M2表型的肿瘤相关联的巨噬细胞抑制T细胞增殖和细胞因子产生。在M2巨噬细胞抑制测定中表征了双特异性抗体,以测试它们是否可以逆转M2巨噬细胞对T细胞增殖和IFN-γ产生的抑制作用。

[0554] 将双特异性抗体与阴性对照IgG1抗体(RSV)、参考TGF-βRII抗体TGF1的类似物、参考PD-L1-TGF-βTRAP分子的类似物、参考PD-1抗体纳武利尤单抗的类似物、商业参考PD-1抗体Opdivo(BMS)、阳性对照抗体抗-LILRB2(BioLegend)、大鼠IgG2a同种型对照(BioLegend)和huIgG4同种型对照(BioLegend)一起测试。此外,在不添加测试抗体或对照抗体的情况下受刺激的$CD4^+$T细胞和M2巨噬细胞的共培养物或单独的$CD4^+$T细胞(未受刺激的与受刺激的)作为对照条件被包括在测定中。

[0555] 在六天内用M-CSF将来自三个不同健康供体的PBMC分离的单核细胞分化为巨噬细胞,并使用细胞因子IL-4(20ng/mL)、IL-10(20ng/mL)和TGF-β(20ng/mL)(+M-CSF)的特异性混合物极化以获得M2巨噬细胞。为了证实这种表型,通过流式细胞术测量CD163(Miltenye Biotec)、CD209(Miltenye Biotec)、CD206(BD Bioscience)和CD86(Miltenye Biotec)的表达(图8)。CD163在所有供体中由Ms样巨噬细胞表达。CD209和CD206在所有供体中由M2-巨噬细胞高度表达。CD86由M2样巨噬细胞以低水平表达。M2样巨噬细胞在所有三个供体中显示预期的表型。

[0556] 然后,用LPS(100ng/mL)活化这些M2巨噬细胞4小时。收获、洗涤这些巨噬细胞,并在浓度为10μg/mL的测试抗体或对照抗体的存在下以1:5的比例将其接种在具有自体$CD4^+$活化的T细胞(由得自StemCell technologies的CD3/CD28 ImmunoCult™活化)的96孔板中,设置5个复孔。在共培养的第5天,通过ELISA(LEGEND MAXTM人IFN-γELISA试剂盒,BioLegend)测量分泌的IFN-γ的浓度。在GraphPad Prism 7.0中使用多因素ANOVA分析数据。

[0557] 结果在图8中示出。与参考PD-1抗体纳武利尤单抗的类似物、参考TGF-βRII抗体TGF1的类似物、或参考PD-L1-TGF-βTRAP分子的类似物相比,许多双特异性抗体诱导相似或更高水平的IFN-γ。

[0558] 实施例10-体内人源化NSG MDA-MB-231小鼠模型

[0559] 在人源化NSG MDA-MB-231小鼠模型中体内表征双特异性抗体,以测定它们在减小肿瘤体积方面的效力。使用10mg/kg的阴性对照二价单特异性IgG1抗体(该抗体包含具有如

SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列的重链和具有如SEQ ID NO:87所示的氨基酸序列的轻链);参考TGF-βRII抗体TGF1的类似物(10mg/kg);参考PD-1抗体帕博利珠单抗(10mg/kg);参考TGF-βRII抗体TGF1的类似物(10mg/kg)和参考PD-1抗体帕博利珠单抗(10mg/kg)的组合;和参考PD-L1-TGF-βTRAP分子的类似物(10mg/kg)来验证该小鼠模型。结果在图9的A中示出。

[0560] 用悬浮在100μl的无血清培养基和等体积matrigel基质(康宁(Corning))中的总共3×10^6MDA-MB-231肿瘤细胞皮下接种人源化CD34 NSG小鼠。在建立肿瘤($80mm^3$至$100mm^3$)后,将小鼠随机分入以下治疗组中:

[0561] 1)阴性对照二价单特异性IgG1抗体(10mg/kg),其包含具有如SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列的重链和具有如SEQ ID NO:87所示的氨基酸序列的轻链;

[0562] 2)参考TGF-βRII抗体TGF1的类似物(10mg/kg);

[0563] 3)参考PD-1抗体帕博利珠单抗(10mg/kg);

[0564] 4)参考TGF-βRII抗体TGF1的类似物(10mg/kg)+参考PD-1抗体帕博利珠单抗(10mg/kg);

[0565] 5)双特异性抗体(1mg/kg),其包含TGF-βRII结合域和PD-1结合域,该TGF-βRII结合域含有具有如SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列的重链可变区,该PD-1结合域含有具有如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的重链可变区;

[0566] 6)双特异性抗体(10mg/kg),其包含TGF-βRII结合域和PD-1结合域,该TGF-βRII结合域含有具有如SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列的重链可变区,该PD-1结合域含有具有如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的重链可变区;

[0567] 7)双特异性抗体(1mg/kg),其包含TGF-βRII结合域和PD-1结合域,该TGF-βRII结合域含有具有如SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列的重链可变区,该PD-1结合域含有具有如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的重链可变区;

[0568] 8)双特异性抗体(10mg/kg),其包含TGF-βRII结合域和PD-1结合域,该TGF-βRII结合域含有具有如SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列的重链可变区,该PD-1结合域含有具有如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的重链可变区;

[0569] 9)双特异性抗体(1mg/kg),其包含TGF-βRII结合域和PD-1结合域,该TGF-βRII结合域含有具有如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的重链可变区,该PD-1结合域含有具有如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的重链可变区;

[0570] 10)双特异性抗体(10mg/kg),其包含TGF-βRII结合域和PD-1结合域,该TGF-βRII结合域含有具有如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的重链可变区,该PD-1结合域含有具有如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的重链可变区。

[0571] 11)双特异性抗体(1mg/kg),其包含TGF-βRII结合域和PD-1结合域,该TGF-βRII结合域含有具有如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的重链可变区,该PD-1结合域含有具有如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的重链可变区;

[0572] 12)双特异性抗体(10mg/kg),其包含TGF-βRII结合域和PD-1结合域,该TGF-βRII结合域含有具有如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的重链可变区,该PD-1结合域含有具有如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的重链可变区;

[0573] 13)双特异性抗体(10mg/kg),其包含TGF-βRII结合域和PD-1结合域,该TGF-βRII

结合域含有具有如SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列的重链可变区,该PD-1结合域含有具有如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的重链可变区;

[0574] 14)双特异性抗体(10mg/kg),其包含TGF-βRII结合域和PD-1结合域,该TGF-βRII结合域含有具有如SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列的重链可变区,该PD-1结合域含有具有如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的重链可变区;

[0575] 15)双特异性抗体(10mg/kg),其包含TGF-βRII结合域和PD-1结合域,该TGF-βRII结合域含有具有如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的重链可变区,该PD-1结合域含有具有如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的重链可变区。

[0576] 16)双特异性抗体(10mg/kg),其包含TGF-βRII结合域和PD-1结合域,该TGF-βRII结合域含有具有如SEQ ID NO:47所示的氨基酸序列的重链可变区,该PD-1结合域含有具有如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的重链可变区。

[0577] 每组有8-9只小鼠。每五天对动物进行腹膜内给药,持续27天或30天的时间段。使用卡尺测量肿瘤,并通过使用以下公式将其同化为椭球体来计算肿瘤体积:l(长度)×w^2(宽度)×1/2。在整个研究中还监测体重。收获肿瘤(最后一次给药后24小时),用于研究终止后的肿瘤免疫分析和受体占用。

[0578] 结果显示于图9的B至图9的E中。所有双特异性抗体均诱导比参考PD-1抗体帕博利珠单抗和参考TGF-βRII抗体TGF1的类似物的组合更好的抗肿瘤反应。双特异性抗体甚至在1mg/kg和10mg/kg两个剂量水平下均诱导了良好的抗肿瘤反应,而参考抗体的组合包括每种参考抗体10mg/kg的剂量。

[0579] 除了疗效之外,在双特异性抗体治疗时,观察到PD-1和TGF-βRII受体两者的相似受体覆盖率,就像参考TGF-βRII抗体TGF1的类似物和参考PD-1抗体帕博利珠单抗在最后一次给药后24小时分析的T细胞上的联合治疗一样(图9的F)。

[0580] 实施例11-在体内人源化NSG MDA-MB-231小鼠模型中测试不同剂量

[0581] 如实施例10所述,在人源化NSG MDA-MB-231小鼠模型中,在体内以1mg/kg和10mg/kg两种不同剂量水平表征了双特异性抗体,该双特异性抗体包含TGF-βRII结合域和PD-1结合域,该TGF-βRII结合域含有具有如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的重链可变区,该PD-1结合域含有具有如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的重链可变区。以10mg/kg包含阴性对照二价单特异性IgG1抗体,该抗体包含具有如SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列的重链和具有如SEQ ID NO:87所示的氨基酸序列的轻链。

[0582] 结果在图11中示出。双特异性抗体在两个剂量水平下均诱导显著的抗肿瘤反应。

[0583] 序列表:

[0584] SEQ ID NO:1-重链可变区

[0585] EVQLVQSGAEVKKPGSSMKVSCKASGGTFSSYVISWVRQAPGQGLEWMGMIIPVFDTSSYEKK FQGRITIIADKSTSTVYLELSSLRSEDAAVYYCARGTVEATLLFDFWGQGTLVTVSS

[0586] SEQ ID NO:2-重链CDR1

[0587] SYVIS

[0588] SEQ ID NO:3-重链CDR2

[0589] MIIPVFDTSSYEKKFQG

[0590] SEQ ID NO:4-重链CDR3

[0591] GTVEATLLFDF

[0592] SEQ ID NO:5-重链可变区

[0593] QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSNGSLGFDFWSWIRQPPGRGLEWIGYIYYSGSWSLNPSFK GRVTMSVDTSKNQFSLNLRSVTAADTAVYYCARGGYTGYGGDWFDPWGQGTLVTVSS

[0594] SEQ ID NO:6-重链CDR1

[0595] FDFWS

[0596] SEQ ID NO:7-重链CDR2

[0597] YIYYSGSWSLNPSFKG

[0598] SEQ ID NO:8-重链CDR3

[0599] GGYTGYGGDWFDP

[0600] SEQ ID NO:9-重链可变区

[0601] QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSDGSIGYHFWSWIRQPPGRGLEWIGYIVYSGSYNVNPSLKTRVTMSVDTSKNQFSLNLRSVTAADTAVYYCARGGYTGYGGDWFDPWGQGTLVTVSS

[0602] SEQ ID NO:10-重链CDR1

[0603] YHFWS

[0604] SEQ ID NO:11-重链CDR2

[0605] YIVYSGSYNVNPSLKT

[0606] SEQ ID NO:12-重链CDR3

[0607] GGYTGYGGDWFDP

[0608] SEQ ID NO:13-重链可变区

[0609] QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSEGSIGYHFWSWIRQPPGRGLEWIGYIVYSGSYNVNPSLKTRVTMSVDTSKNQFSLNLRSVTAADTAVYYCARGGYTGYGGDWFDPWGQGTLVTVSS

[0610] SEQ ID NO:14-重链可变区

[0611] QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTRFALHWVRQAPGQGLEWMGWIDPNTGTPTFAQGVTGRFVFSLDTSVTTAYLQISSLKAEDTAVYYCARSLGYCDSDICYPNWIFDNWGQGTLVTVSS

[0612] SEQ ID NO:15-重链CDR1

[0613] RFALH

[0614] SEQ ID NO:16-重链CDR2

[0615] WIDPNTGTPTFAQGVTG

[0616] SEQ ID NO:17-重链CDR3

[0617] SLGYCDSDICYPNWIFDN

[0618] SEQ ID NO:18-重链可变区

[0619] QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTRFALHWVRQAPGQGLEWMGWIDPNTGTPTFAQGVTGRFVFSLDTSVTTAYLQISSLKAEDTAVYYCARSLGYCDSDICYPNWIFDNWGQGTLVTVSS

[0620] SEQ ID NO:19-重链可变区

[0621] QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTRFALSWVRQAPGQGLEWMGWIDPNTGTPTYAQDFTGRFVFSLDTSVTTAYLQISSLKAEDTAVYYCARSLGYCGSDICYPNGILDNWGQGTLVTVSS

[0622] SEQ ID NO:20-重链CDR1

[0623] RFALS

[0624] SEQ ID NO:21-重链CDR2

[0625] WIDPNTGTPTYAQDFTG

[0626] SEQ ID NO:22-重链CDR3

[0627] SLGYCGSDICYPNGILDN

[0628] SEQ ID NO:23-重链可变区

[0629] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDIYAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGQYRDIVGATDYWGQGTLVTVSS

[0630] SEQ ID NO:24-重链CDR1

[0631] IYAMT

[0632] SEQ ID NO:25-重链CDR2

[0633] VISGSGGTTYYADSVKG

[0634] SEQ ID NO:26-重链CDR3

[0635] RGQYRDIVGATDY

[0636] SEQ ID NO:27-重链可变区

[0637] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDINAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGQYRDIVGATDYWGQGTLVTVSS

[0638] SEQ ID NO:28-重链CDR1

[0639] INAMT

[0640] SEQ ID NO:29-重链CDR2

[0641] VISGSGGTTYYADSVKG

[0642] SEQ ID NO:30-重链CDR3

[0643] RGQYRDIVGATDY

[0644] SEQ ID NO:31-重链可变区

[0645] QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKTTISGGATDFAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTLDLRDYWGQGTLVTVSS

[0646] SEQ ID NO:32-重链CDR1

[0647] NAWMS

[0648] SEQ ID NO:33-重链CDR2

[0649] RIKTTISGGATDFAAPVKG

[0650] SEQ ID NO:34-重链CDR3

[0651] DLRDY

[0652] SEQ ID NO:35-重链可变区

[0653] QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFKFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKTTISGGATQFAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTLDLRDYWGQGTLVTVSS

[0654] SEQ ID NO:36-重链CDR1

[0655] NAWMS

[0656] SEQ ID NO:37-重链CDR2

[0657] RIKTTISGGATQFAAPVKG

[0658] SEQ ID NO:38-重链CDR3

[0659] DLRDY

[0660] SEQ ID NO:39-重链可变区

[0661] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDRTHNTDS VKGR FSISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGIAASGKNYFDPWGQGTLVTVSS

[0662] SEQ ID NO:40-重链CDR1

[0663] RYAMS

[0664] SEQ ID NO:41-重链CDR2

[0665] AISASGDRTHNTDSVKG

[0666] SEQ ID NO:42-重链CDR3

[0667] GIAASGKNYFDP

[0668] SEQ ID NO:43-重链可变区

[0669] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDRTKNTDS VKGR FSISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGTAAAGKNYFDPWGQGTLVTVSS

[0670] SEQ ID NO:44-重链CDR1

[0671] RYAMS

[0672] SEQ ID NO:45-重链CDR2

[0673] AISASGDRTKNTDSVKG

[0674] SEQ ID NO:46-重链CDR3

[0675] GTAAAGKNYFDP

[0676] SEQ ID NO:47-重链可变区

[0677] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDRTKYTDS VKGR FSISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGTAAAGKNYFDPWGQGTLVTVSS

[0678] SEQ ID NO:48-轻链可变区

[0679] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK

[0680] SEQ ID NO:49-依IMGT的轻链CDR1

[0681] QSISSY

[0682] SEQ ID NO:50-依IMGT的轻链CDR2

[0683] AAS

[0684] SEQ ID NO:51-依IMGT的轻链CDR3

[0685] QQSYSTPPT

[0686] SEQ ID NO:52-轻链可变区

[0687] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK

[0688] SEQ ID NO:53-依IMGT的轻链CDR1

[0689] QSISSY

[0690] SEQ ID NO:54-依IMGT的轻链CDR2

[0691] AAS

[0692] SEQ ID NO:55-依IMGT的轻链CDR3

[0693] QQSYSTPPIT

[0694] SEQ ID NO:56-轻链可变区

[0695] EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGS GSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPWTFGQGTKVEIK

[0696] SEQ ID NO:57-依IMGT的轻链CDR1

[0697] QSVSSN

[0698] SEQ ID NO:58-依IMGT的轻链CDR2

[0699] GAS

[0700] SEQ ID NO:59-依IMGT的轻链CDR3

[0701] QQYNNWPWT

[0702] SEQ ID NO:60-轻链可变区

[0703] EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

[0704] SEQ ID NO:61-依IMGT的轻链CDR1

[0705] QSVSSSY

[0706] SEQ ID NO:62-依IMGT的轻链CDR2

[0707] GAS

[0708] SEQ ID NO:63-依IMGT的轻链CDR3

[0709] QQYGSSPWT

[0710] SEQ ID NO:64-轻链可变区

[0711] SYVLTQPPSVSVAPGETARITCGGDNIGRKSVYWYQQKSGQAPVLVIYYDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDGSSDHWVFGGGTKLTVL

[0712] SEQ ID NO:65-依IMGT的轻链CDR1

[0713] NIGRKS

[0714] SEQ ID NO:66-依IMGT的轻链CDR2

[0715] YDS

[0716] SEQ ID NO:67-依IMGT的轻链CDR3

[0717] QVWDGSSDHWV

[0718] SEQ ID NO:68-铰链区

[0719] EPKSCDKTHTCPPCP

[0720] SEQ ID NO:69-CH1区

[0721] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV

[0722] SEQ ID NO:70-CH2区

[0723] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

[0724] SEQ ID NO:71-CH2-DM区

[0725] APELGRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

[0726] SEQ ID NO:72-CH3区

[0727] GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0728] SEQ ID NO:73-CH3-DE区

[0729] GQPREPQVYTDPPSREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0730] SEQ ID NO:74-CH3-KK区

[0731] GQPREPQVYTKPPSREEMTKNQVSLKCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0732] SEQ ID NO:75-CL区

[0733] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0734] SEQ ID NO:76-重链参比抗TGF-βRII抗体TGF1类似物

[0735] QLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKSRA TISIDTSKSQFSLKLSSVTAADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0736] SEQ ID NO:77-轻链参比抗TGF-βRII抗体TGF1类似物

[0737] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGT DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0738] SEQ ID NO:78-重链参比PD-1抗体帕博利珠单抗

[0739] QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVT LTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0740] SEQ ID NO:79-轻链参比PD-1抗体帕博利珠单抗

[0741] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESGVPARFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0742] SEQ ID NO:80-重链参比PD-L1-TGF-βTRAP分子类似物

[0743] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN

STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGAGGGG
SGGGGSGGGGSGGGGSGIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV
CVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

[0744] SEQ ID NO:81-轻链参比PD-L1-TGF-βTRAP分子类似物

[0745] QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKS
GNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG
AVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0746] SEQ ID NO:82-人源TGF-βRII同种型A

[0747] MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMS
NCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDN
IIFSEEYNTSNPDLLLVIFQVTGISLLPPLGVAISVIIIFYCYRVNRQQKLSSTWETGKTRKLMEFSEHCAIILEDD
RSDISSTCANNINHNTELLPIELDTLVGKGRFAEVYKAKLKQNTSEQFETVAVKIFPYEEYASWKTEKDIFSDINLK
HENILQFLTAEERKTELGKQYWLITAFHAKGNLQEYLTRHVISWEDLRKLGSSLARGIAHLHSDHTPCGRPKMPIVH
RDLKSSNILVKNDLTCCLCDFGLSLRLDPTLSVDDLANSGQVGTARYMAPEVLESRMNLENVESFKQTDVYSMALVL
WEMTSRCNAVGEVKDYEPPFGSKVREHPCVESMKDNVLRDRGRPEIPSFWLNHQGIQMVCETLTECWDHDPEARLTA
QCVAERFSELEHLDRLSGRSCSEEKIPEDGSLNTTK

[0748] SEQ ID NO:83-人源TGF-βRII同种型A的胞外结构域

[0749] TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKN
DENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIFQ

[0750] SEQ ID NO:84-人源TGF-βRII同种型B

[0751] MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRTAHPLRHINNDMIVTDNNGA
VKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKC
IMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIFQVTGISLLPPLGVAISVIIIFYCYRVNRQQKLS
STWETGKTRKLMEFSEHCAIILEDDRSDISSTCANNINHNTELLPIELDTLVGKGRFAEVYKAKLKQNTSEQFETVA
VKIFPYEEYASWKTEKDIFSDINLKHENILQFLTAEERKTELGKQYWLITAFHAKGNLQEYLTRHVISWEDLRKLGS
SLARGIAHLHSDHTPCGRPKMPIVHRDLKSSNILVKNDLTCCLCDFGLSLRLDPTLSVDDLANSGQVGTARYMAPEV
LESRMNLENVESFKQTDVYSMALVLWEMTSRCNAVGEVKDYEPPFGSKVREHPCVESMKDNVLRDRGRPEIPSFWLN
HQGIQMVCETLTECWDHDPEARLTAQCVAERFSELEHLDRLSGRSCSEEKIPEDGSLNTTK

[0752] SEQ ID NO:85-人源TGF-βRII同种型B的胞外结构域

[0753] TIPPHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRTAHPLRHINNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKS
CMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDEC
NDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIFQ

[0754] SEQ ID NO:86-重链阴性对照RSV IgG1抗体

[0755] EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSTKYSADSLKGRFT
ISRDNSKNTLYLQMNSLRADDTAVYYCAKEGWSFDSSGYRSWFDSWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV

KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0756] SEQ ID NO:87-轻链

[0757] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0758] SEQ ID NO:88-重链可变区

[0759] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDRTKNTDS VKGR FSISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGTAAAGKNYFDPWGQGTLVTVSS

[0760] SEQ ID NO:89-重链可变区

[0761] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDRTKYTDS VKGR FSISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGTAAAGKNYFDPWGQGTLVTVSS

[0762] SEQ ID NO:90-重链CDR1

[0763] RYAMS

[0764] SEQ ID NO:91-重链CDR2

[0765] AISASGDRTKYTDSVKG

[0766] SEQ ID NO:92-重链CDR3

[0767] GTAAAGKNYFDP

[0768] SEQ ID NO:93-V区VK1-39

[0769] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP

[0770] SEQ ID NO:94-VK1-39/JK1

[0771] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK

[0772] SEQ ID NO:95-VK1-39/JK5

[0773] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK

[0774] SEQ ID NO:96:-重链参比纳武单抗类似物抗体

[0775] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFT ISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0776] SEQ ID NO:97-轻链参比纳武单抗类似物抗体

[0777] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGT DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0778] SEQ ID NO:98-V区VK3-15

[0779] EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGS

GSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWP

[0780] SEQ ID NO:99-VK3-15/JK1

[0781] EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGS GSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPWTFGQGTKVEIK

[0782] SEQ ID NO:100-V区VK3-20

[0783] EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP

[0784] SEQ ID NO:101-VK3-20/JK1

[0785] EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

[0786] SEQ ID NO:102-V区VL3-21

[0787] SYVLTQPPSVSVAPGETARITCGGDNIGRKSVYWYQQKSGQAPVLVIYYDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDGSSDH

[0788] SEQ ID NO:103-VL3-21/JL3

[0789] SYVLTQPPSVSVAPGETARITCGGDNIGRKSVYWYQQKSGQAPVLVIYYDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDGSSDHWVFGGGTKLTVL

[0790] SEQ ID NO:104-TGF-βRII胞外结构域

[0791] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAV WRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNT SNPD。

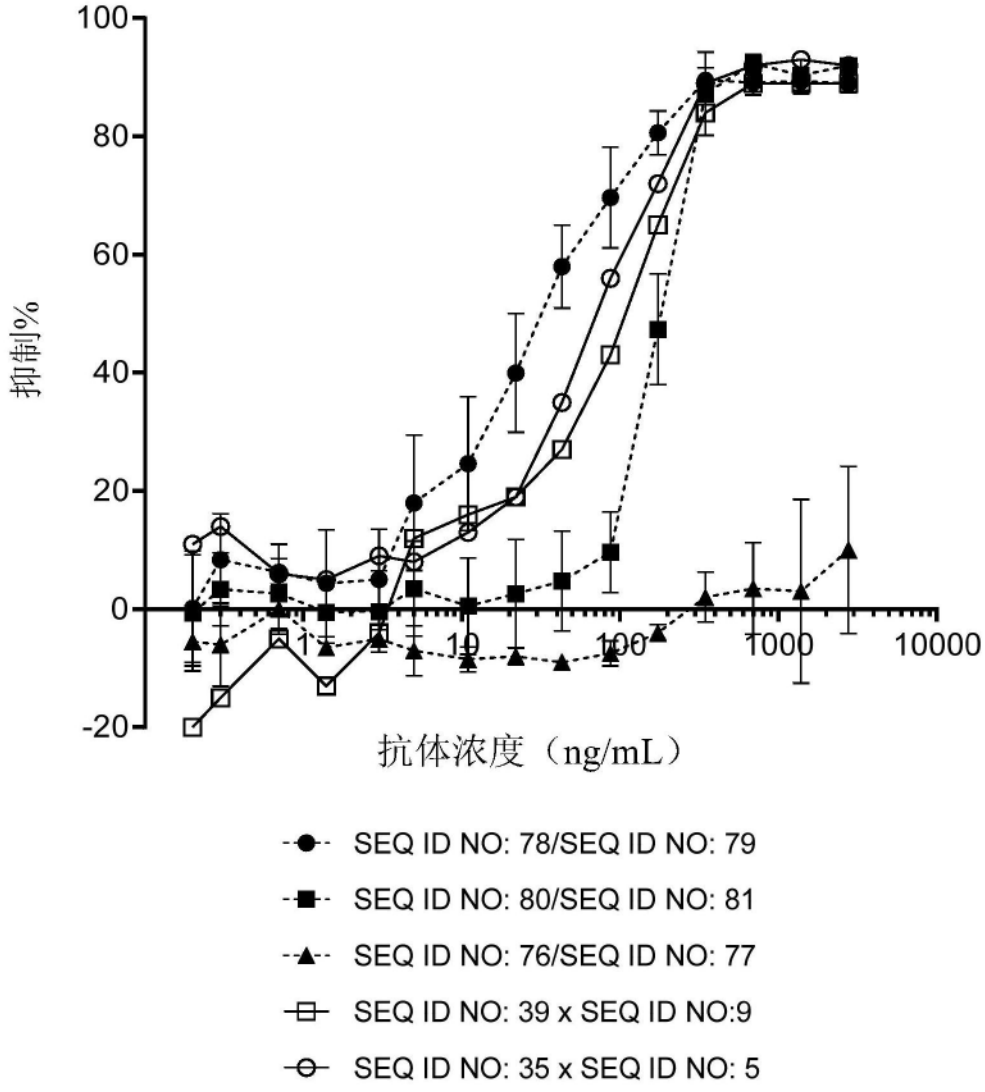

100
80
60
40
20
0
-20
抑制%
1
10
100
1000
10000
抗体浓度（ng/mL）
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 81
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 39 x SEQ ID NO:9
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 5

图1A

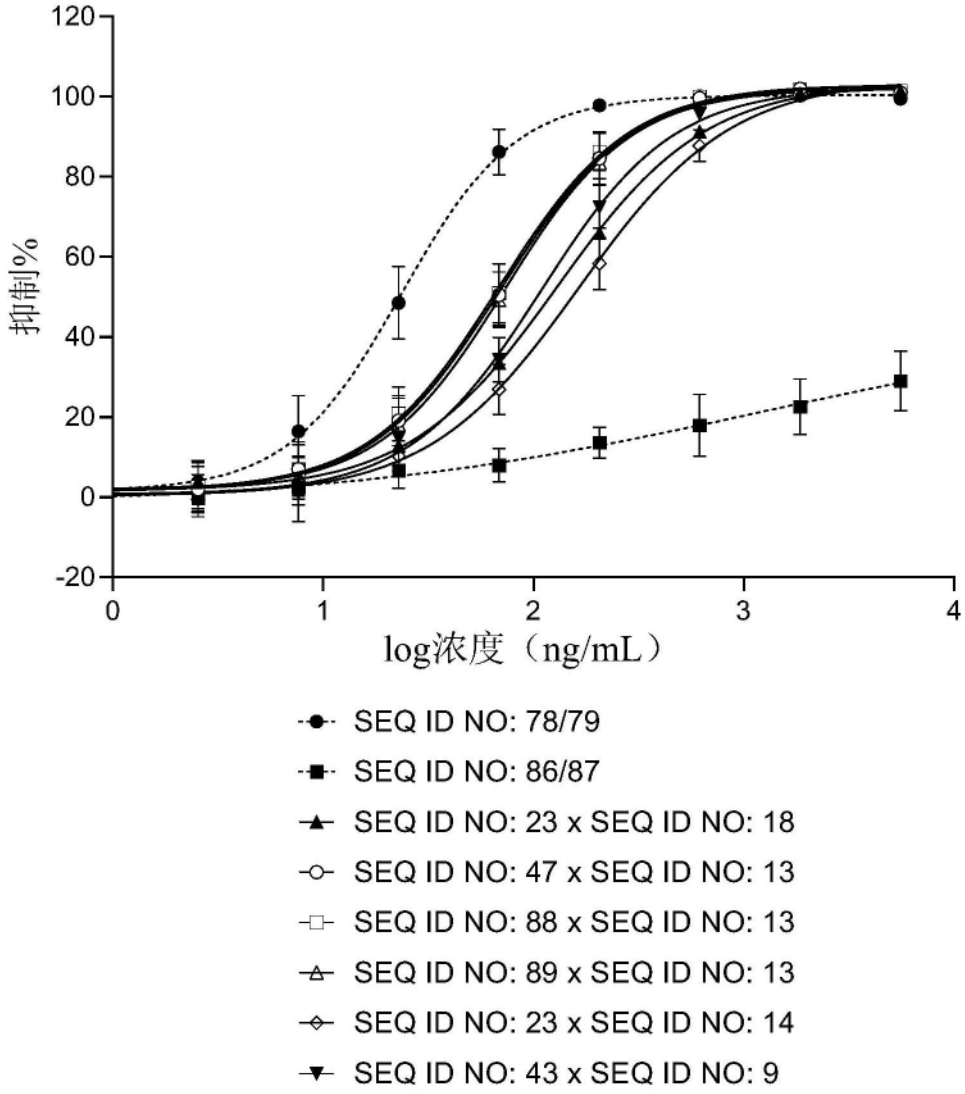

120
100
80
60
40
20
0
-20
抑制%
0
1
2
3
4
log浓度（ng/mL）
SEQ ID NO: 78/79
SEQ ID NO: 86/87
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 18
SEQ ID NO: 47 x SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 88 x SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 89 x SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 9

图1B

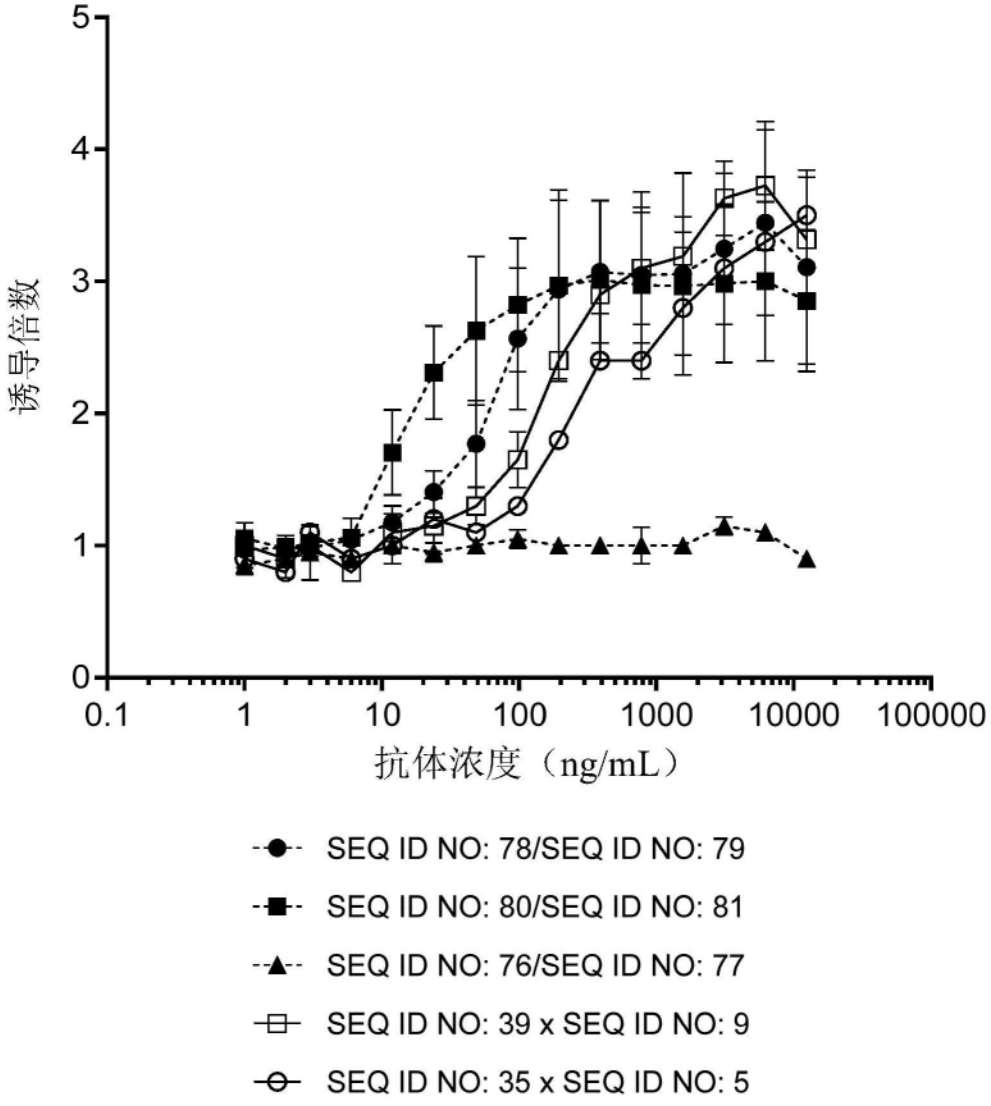

5
4
3
2
1
0
诱导倍数
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
抗体浓度（ng/mL）
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 81
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 39 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 5

图2A

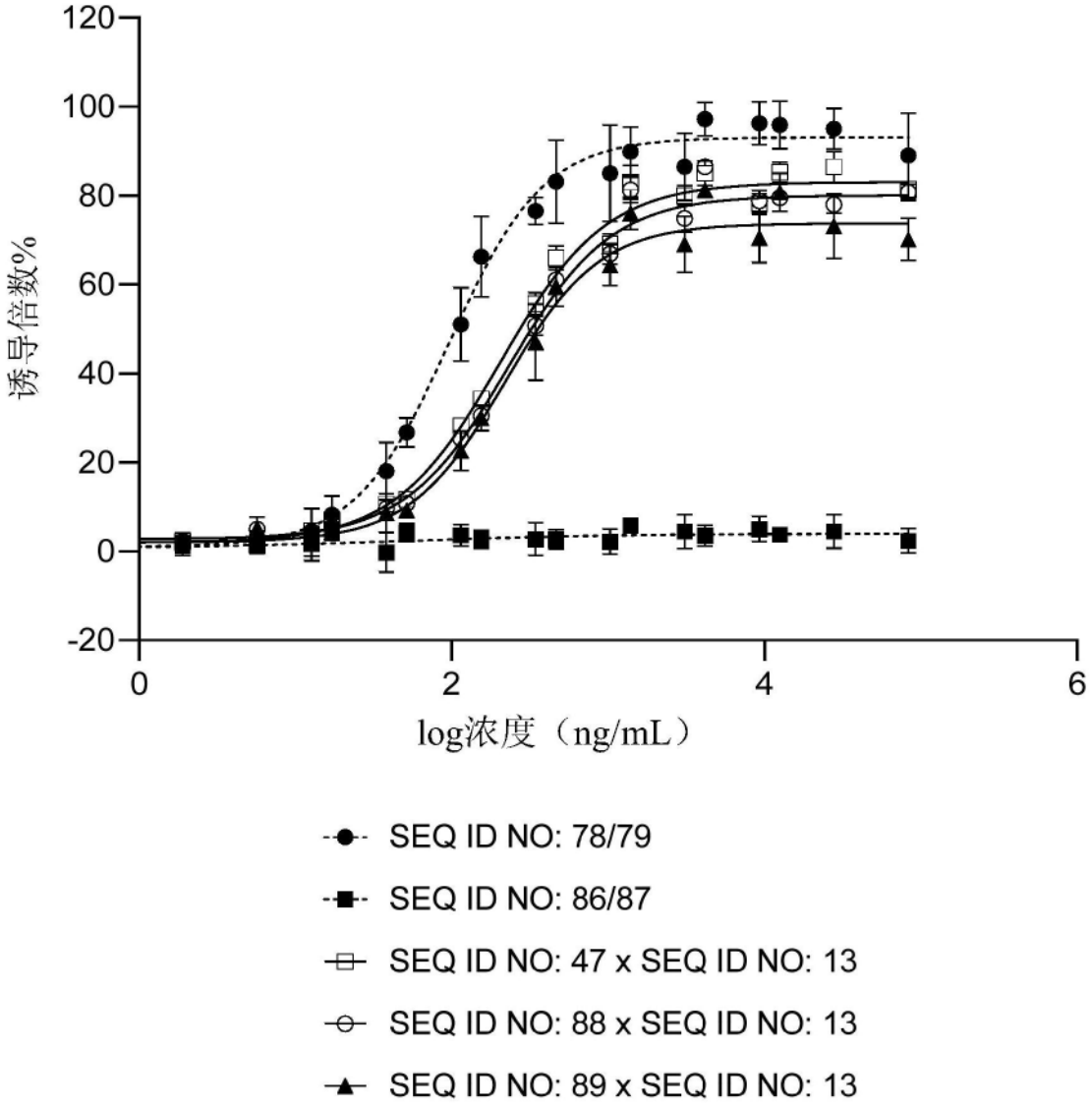

120
100
80
60
40
20
0
-20
0
2
4
6
诱导倍数%
log浓度（ng/mL）
SEQ ID NO: 78/79
SEQ ID NO: 86/87
SEQ ID NO: 47 x SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 88 x SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 89 x SEQ ID NO: 13

图2B

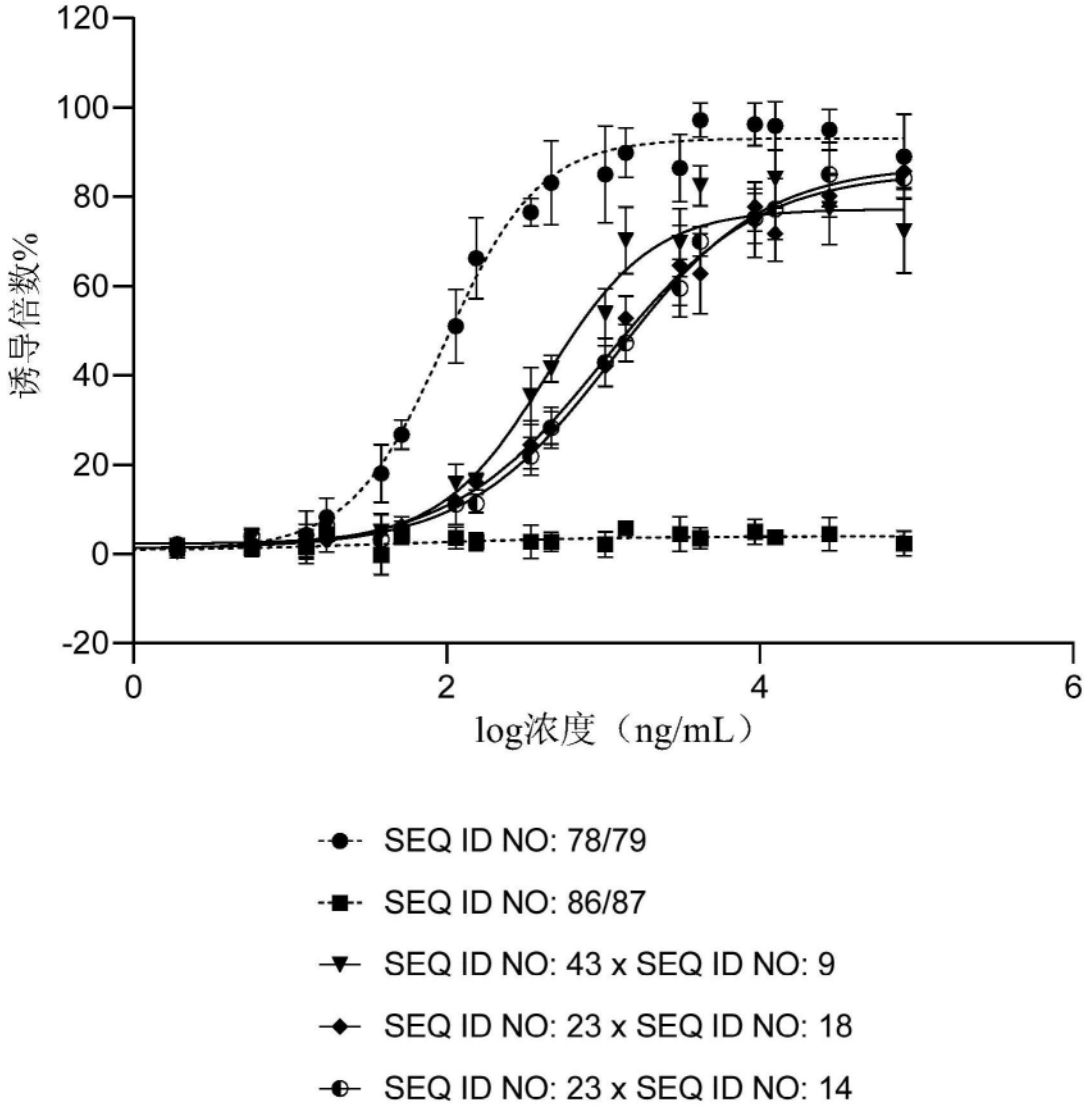

120
100
80
60
40
20
0
-20
诱导倍数%
0
2
4
6
log浓度（ng/mL）
SEQ ID NO: 78/79
SEQ ID NO: 86/87
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 18
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 14

图2C

A

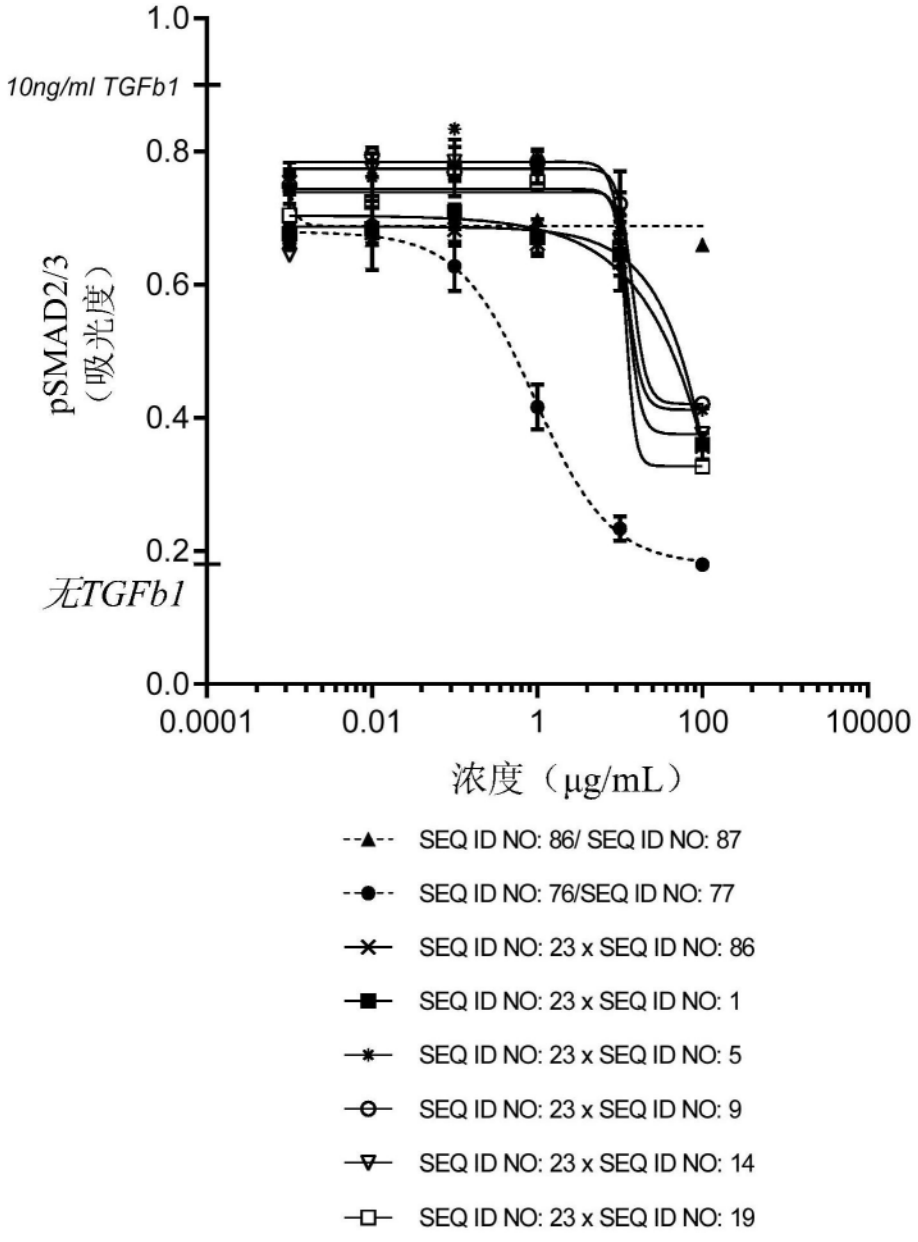

1.0
10ng/ml TGFb1
0.8
0.6
0.4
0.2
无TGFb1
0.0
pSMAD2/3
（吸光度）
0.0001
0.01
1
100
10000
浓度（μg/mL）
SEQ ID NO: 86/ SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 86
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 1
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 5
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 19

图3

B

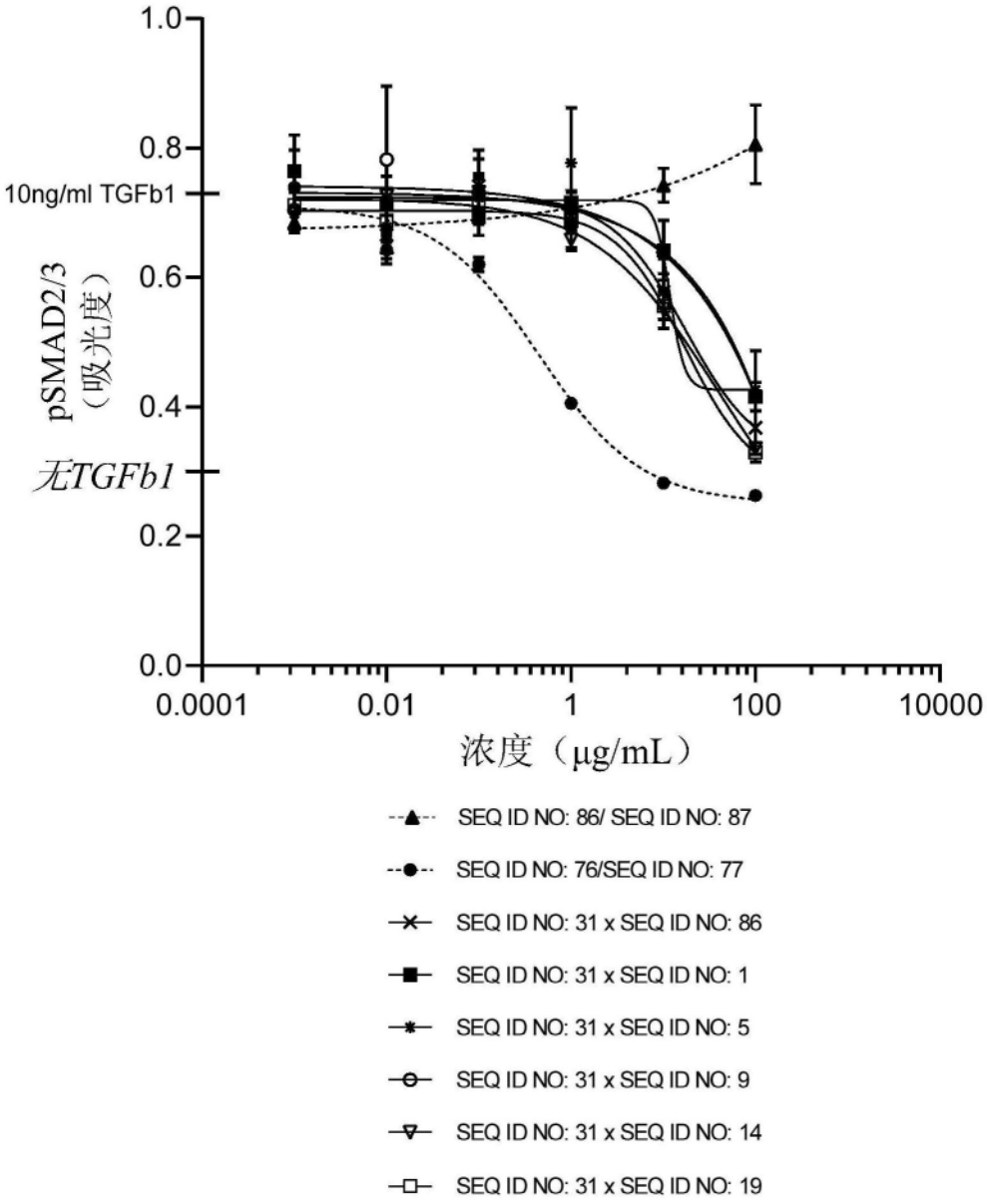

1.0
0.8
10ng/ml TGFb1
0.6
0.4
无TGFb1
0.2
0.0
pSMAD2/3
（吸光度）
0.0001
0.01
1
100
10000
浓度（μg/mL）
SEQ ID NO: 86/ SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 31 x SEQ ID NO: 86
SEQ ID NO: 31 x SEQ ID NO: 1
SEQ ID NO: 31 x SEQ ID NO: 5
SEQ ID NO: 31 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 31 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 31 x SEQ ID NO: 19

图3 (续)

C

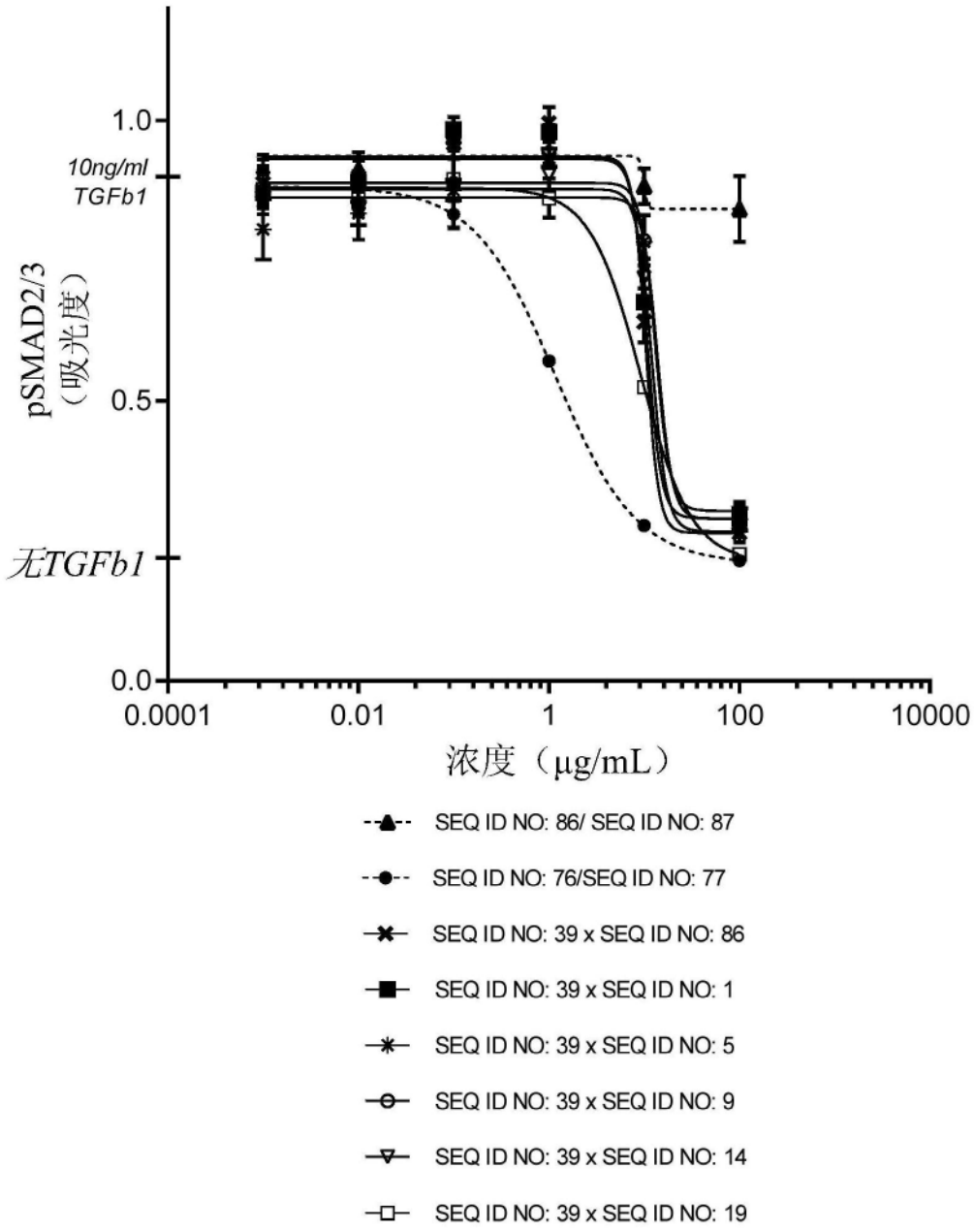

1.0
10ng/ml
TGFb1
pSMAD2/3
（吸光度）
0.5
无TGFb1
0.0
0.0001
0.01
1
100
10000
浓度（μg/mL）
SEQ ID NO: 86/ SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 39 x SEQ ID NO: 86
SEQ ID NO: 39 x SEQ ID NO: 1
SEQ ID NO: 39 x SEQ ID NO: 5
SEQ ID NO: 39 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 39 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 39 x SEQ ID NO: 19

图3 (续)

D

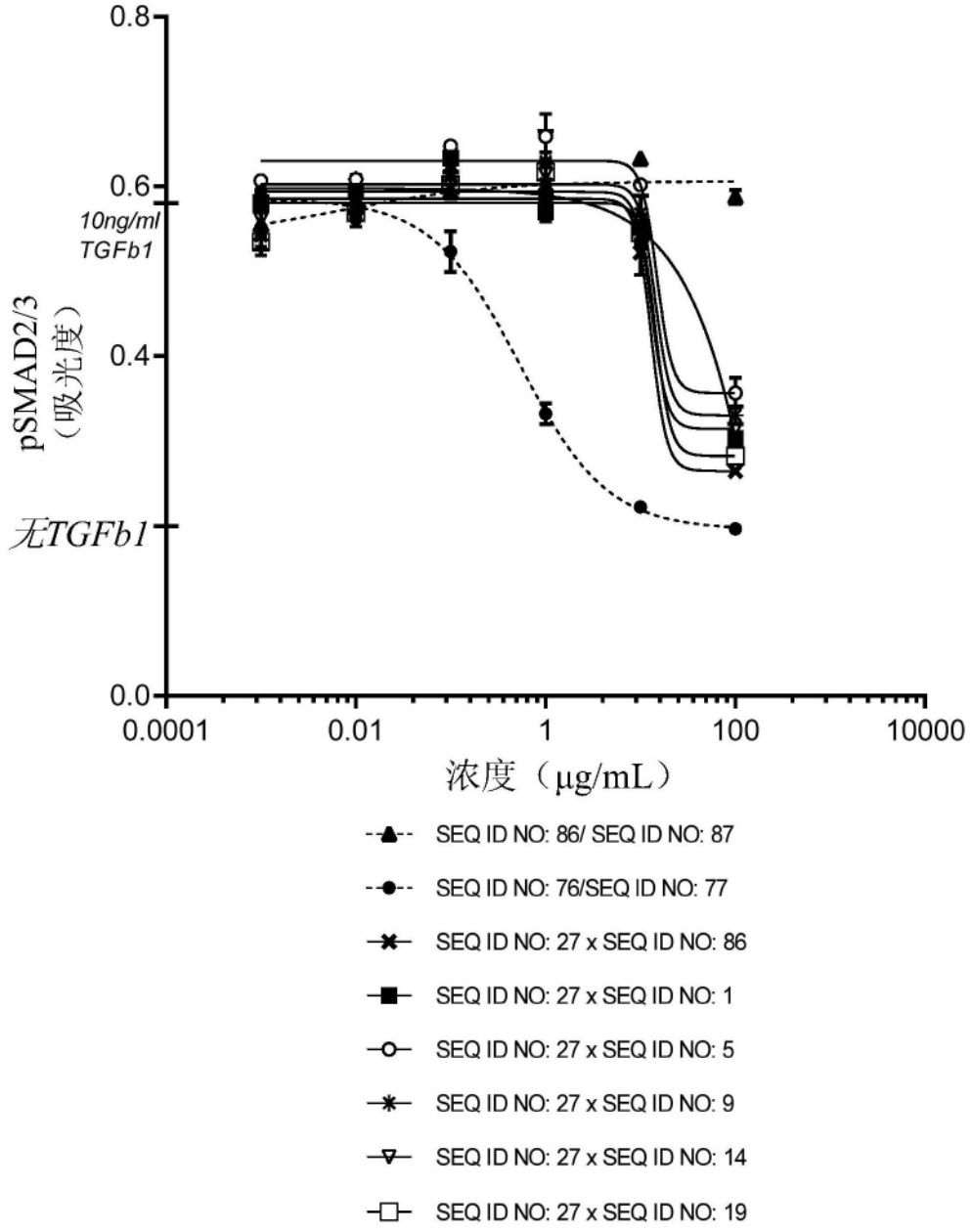

0.8
0.6
10ng/ml
TGFb1
0.4
无TGFb1
0.0
pSMAD2/3
（吸光度）
0.0001
0.01
1
100
10000
浓度（μg/mL）
SEQ ID NO: 86/ SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 27 x SEQ ID NO: 86
SEQ ID NO: 27 x SEQ ID NO: 1
SEQ ID NO: 27 x SEQ ID NO: 5
SEQ ID NO: 27 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 27 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 27 x SEQ ID NO: 19

图3(续)

E

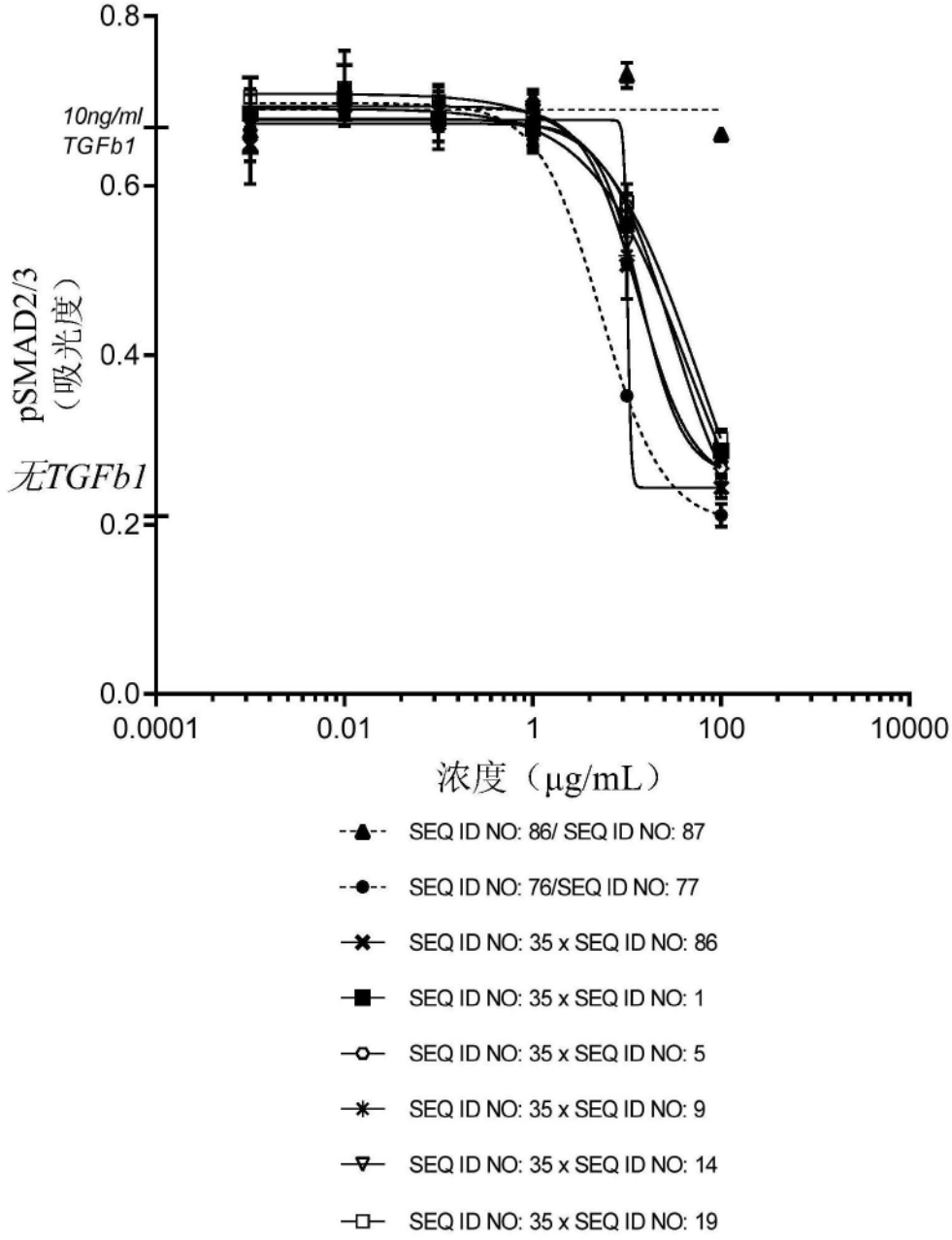

0.8
10ng/ml
TGFb1
0.6
pSMAD2/3
（吸光度）
0.4
无TGFb1
0.2
0.0
0.0001
0.01
1
100
10000
浓度（μg/mL）
SEQ ID NO: 86/ SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 86
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 1
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 5
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 19

图3(续)

F

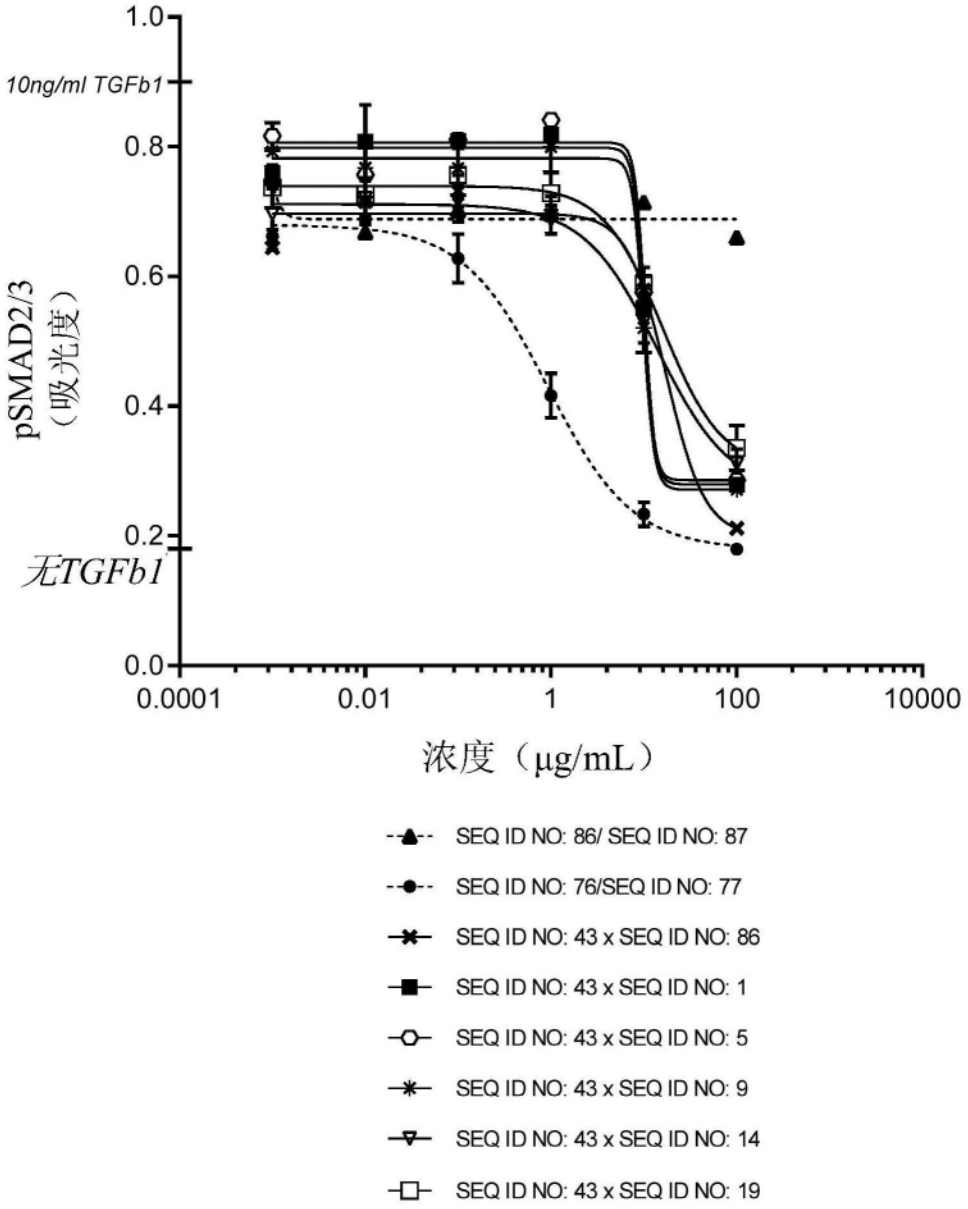

1.0
10ng/ml TGFb1
0.8
0.6
0.4
0.2
无TGFb1
0.0
pSMAD2/3
（吸光度）
0.0001
0.01
1
100
10000
浓度（μg/mL）
SEQ ID NO: 86/ SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 86
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 1
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 5
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 19

图3 (续)

G

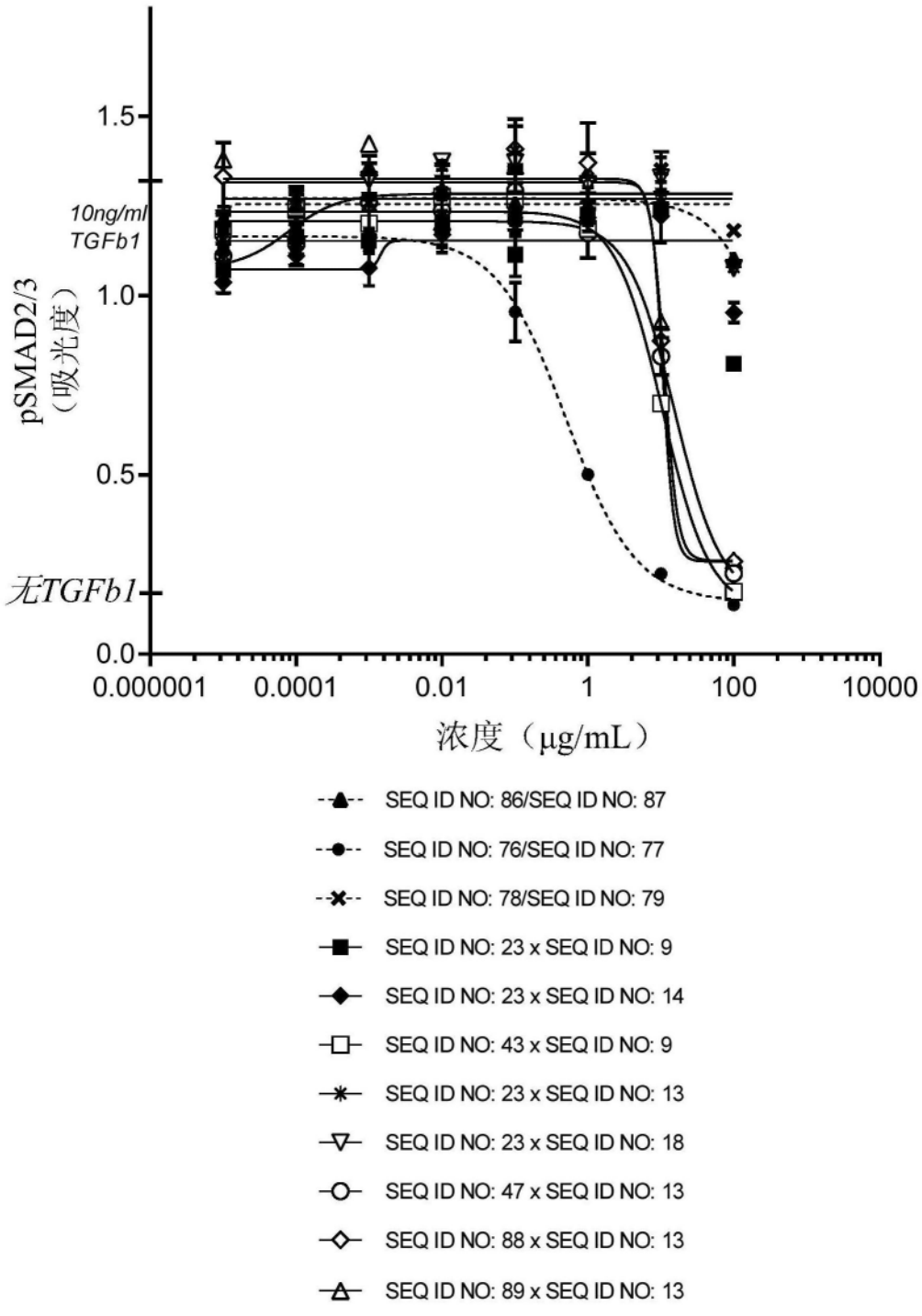

1.5
10ng/ml
TGFb1
1.0
pSMAD2/3
（吸光度）
0.5
无TGFb1
0.0
0.000001
0.0001
0.01
1
100
10000
浓度（μg/mL）
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 18
SEQ ID NO: 47 x SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 88 x SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 89 x SEQ ID NO: 13

图3(续)

H

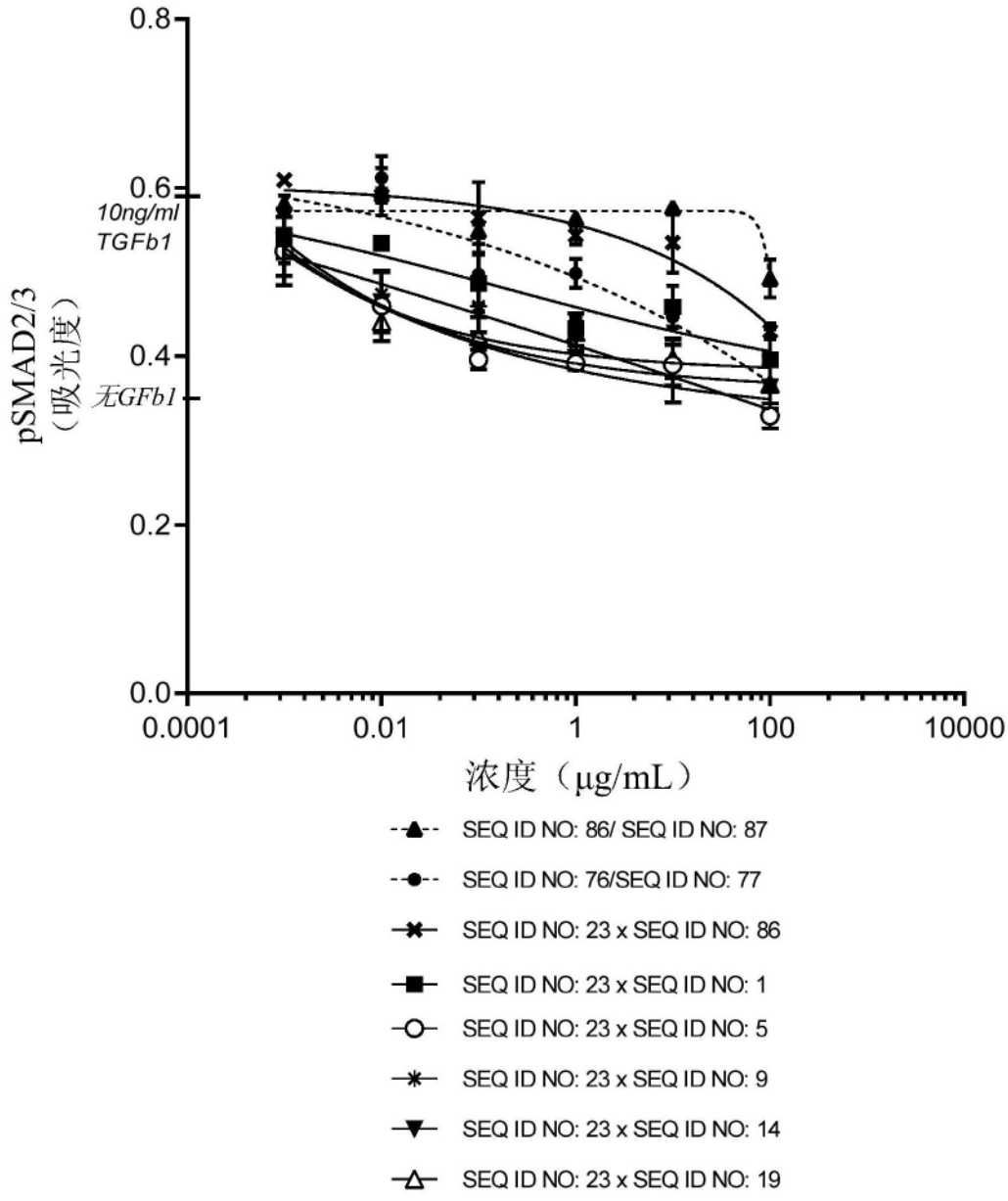

0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
10ng/ml TGFb1
无GFb1
pSMAD2/3（吸光度）
0.0001
0.01
1
100
10000
浓度（μg/mL）
SEQ ID NO: 86/ SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 86
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 1
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 5
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 19

图3(续)

I

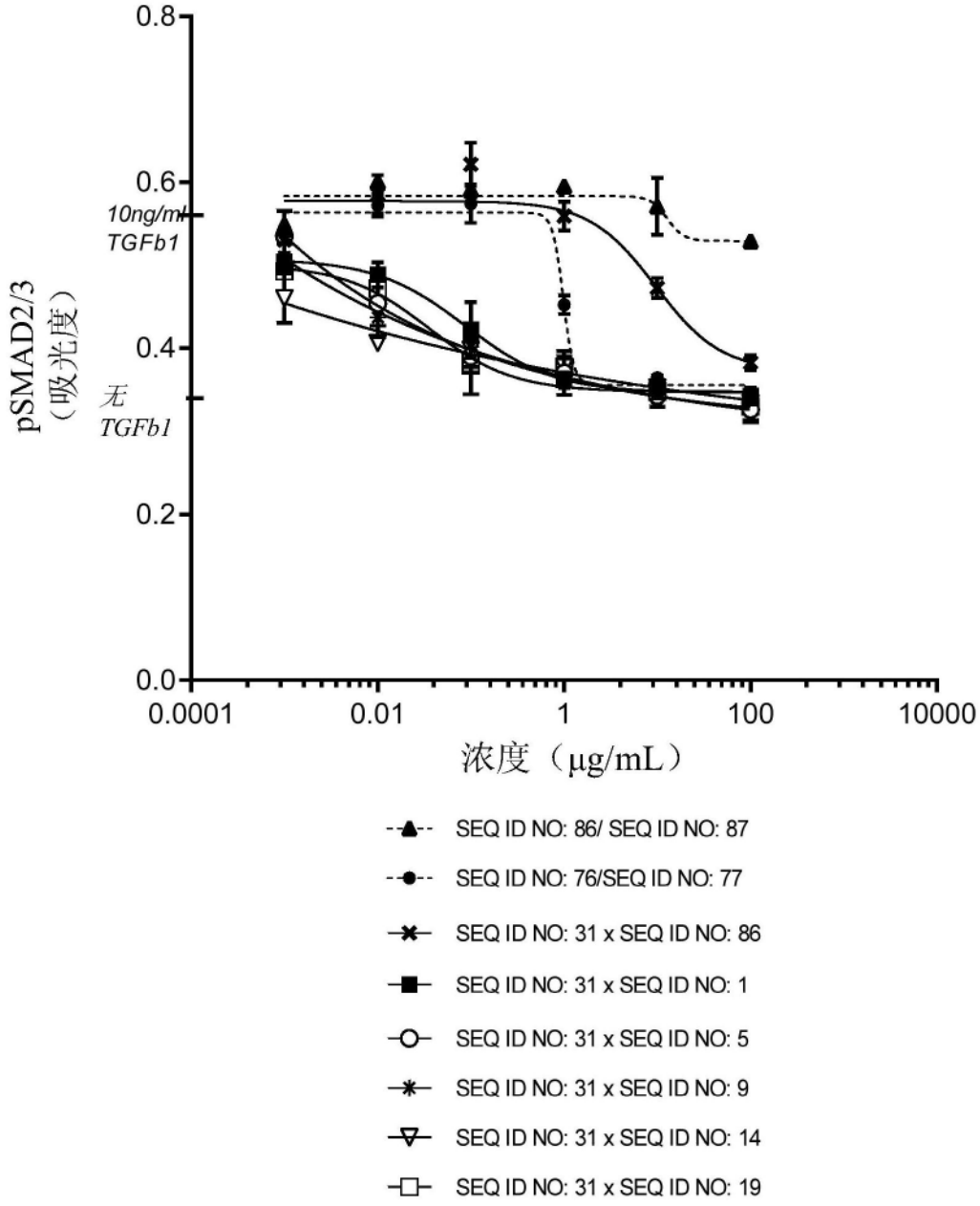

0.8
0.6
10ng/ml
TGFb1
0.4
无
TGFb1
0.2
0.0
pSMAD2/3
（吸光度）
0.0001
0.01
1
100
10000
浓度（μg/mL）
SEQ ID NO: 86/ SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 31 x SEQ ID NO: 86
SEQ ID NO: 31 x SEQ ID NO: 1
SEQ ID NO: 31 x SEQ ID NO: 5
SEQ ID NO: 31 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 31 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 31 x SEQ ID NO: 19

图3 (续)

J

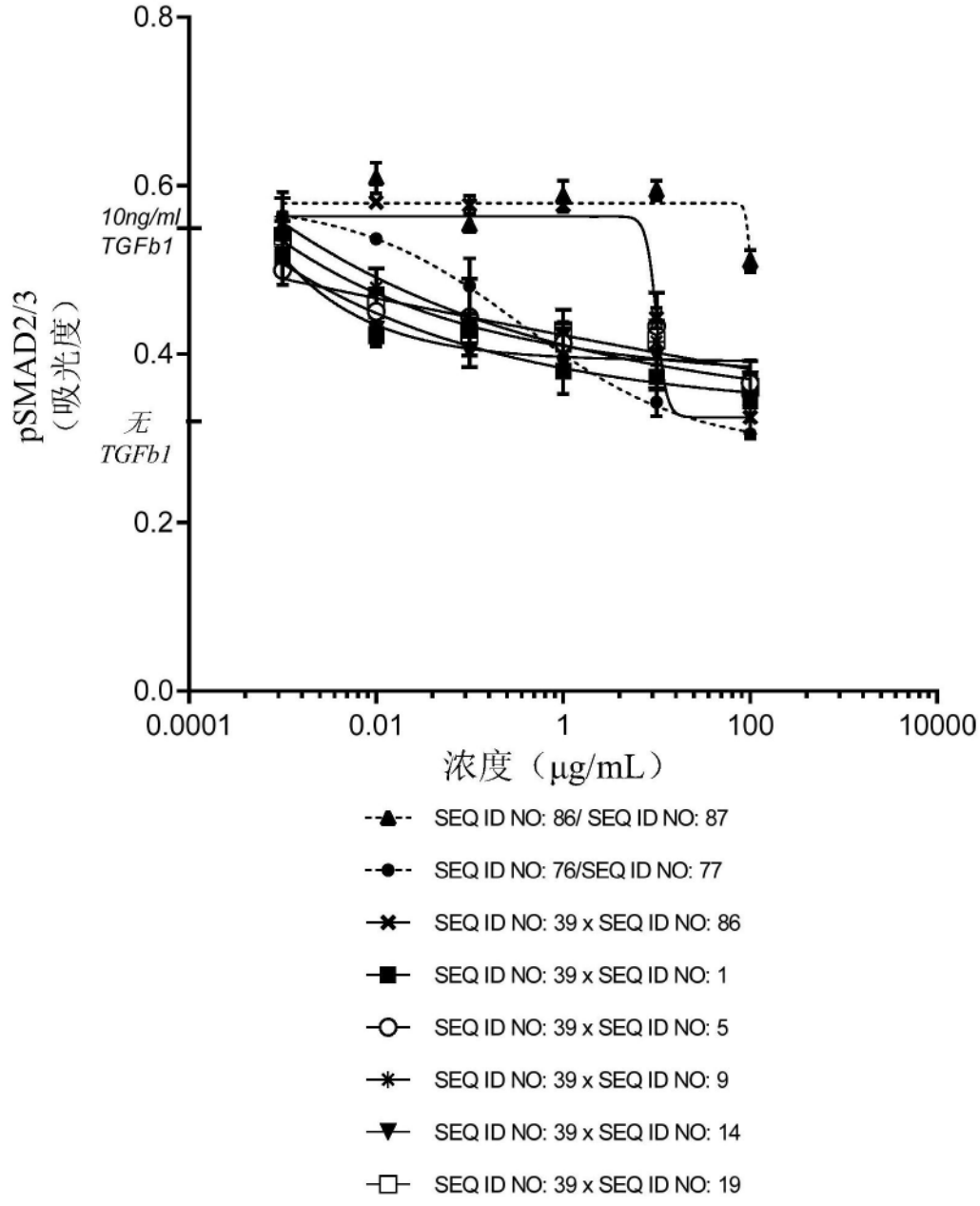

0.8
0.6
10ng/ml
TGFb1
0.4
无
TGFb1
0.2
0.0
pSMAD2/3
（吸光度）
0.0001
0.01
1
100
10000
浓度（μg/mL）
SEQ ID NO: 86/ SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 39 x SEQ ID NO: 86
SEQ ID NO: 39 x SEQ ID NO: 1
SEQ ID NO: 39 x SEQ ID NO: 5
SEQ ID NO: 39 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 39 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 39 x SEQ ID NO: 19

图3 (续)

K

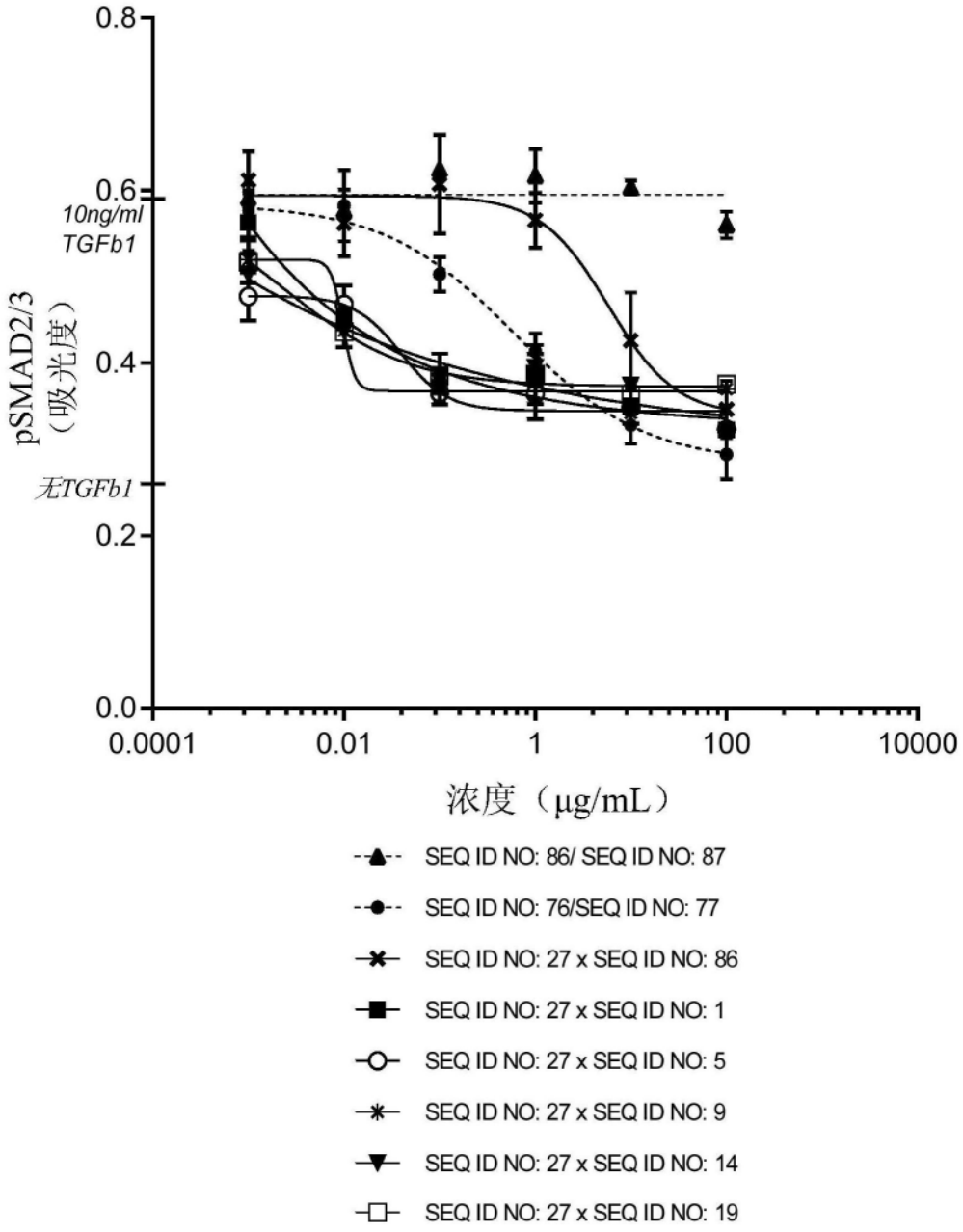

0.8
0.6
10ng/ml
TGFb1
0.4
无TGFb1
0.2
0.0
pSMAD2/3
（吸光度）
0.0001
0.01
1
100
10000
浓度（μg/mL）
SEQ ID NO: 86/ SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 27 x SEQ ID NO: 86
SEQ ID NO: 27 x SEQ ID NO: 1
SEQ ID NO: 27 x SEQ ID NO: 5
SEQ ID NO: 27 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 27 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 27 x SEQ ID NO: 19

图3 (续)

L

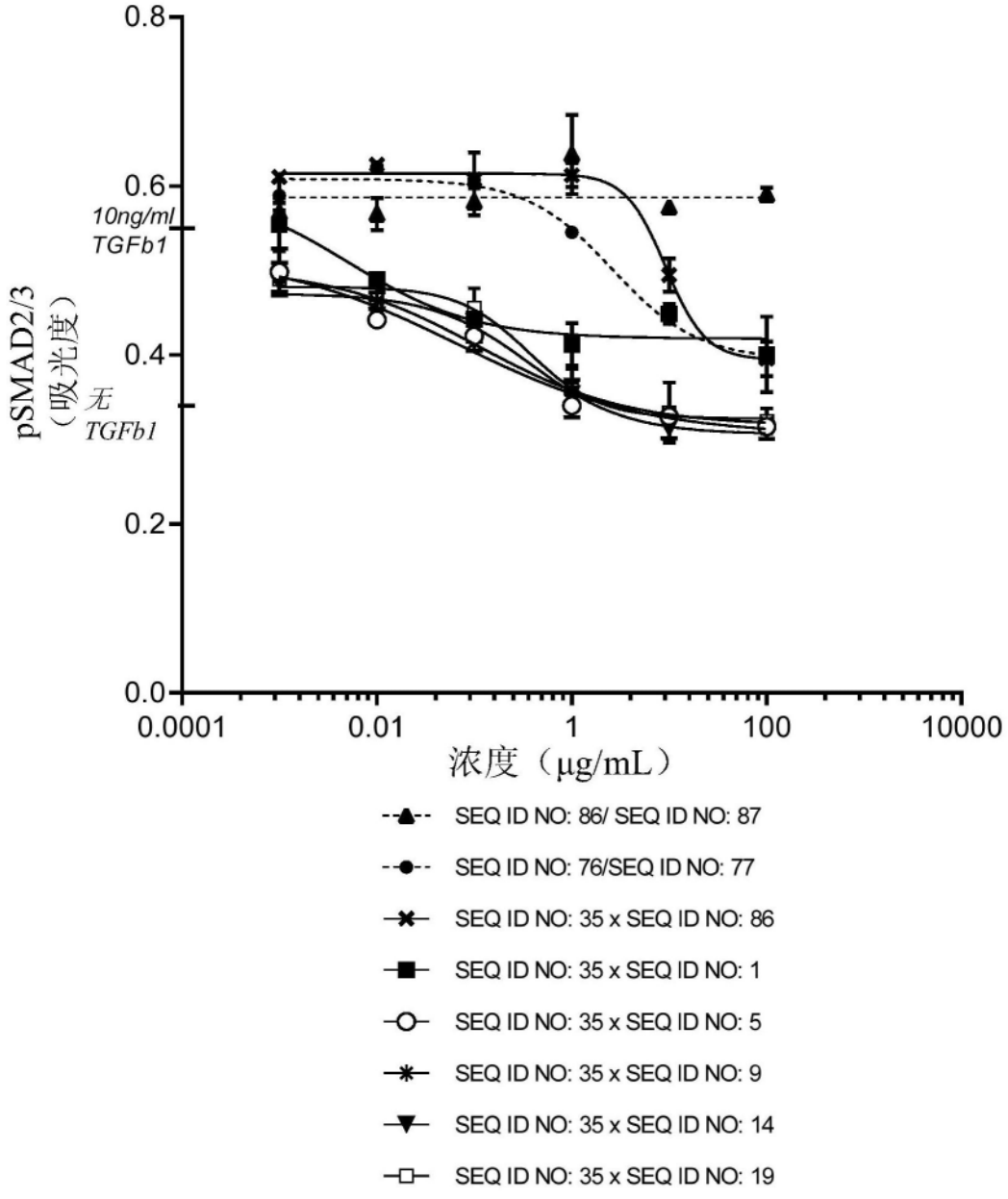

0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
10ng/ml TGFb1
无 TGFb1
pSMAD2/3（吸光度）
0.0001
0.01
1
100
10000
浓度（μg/mL）
SEQ ID NO: 86/ SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 86
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 1
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 5
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 19

图3(续)

M

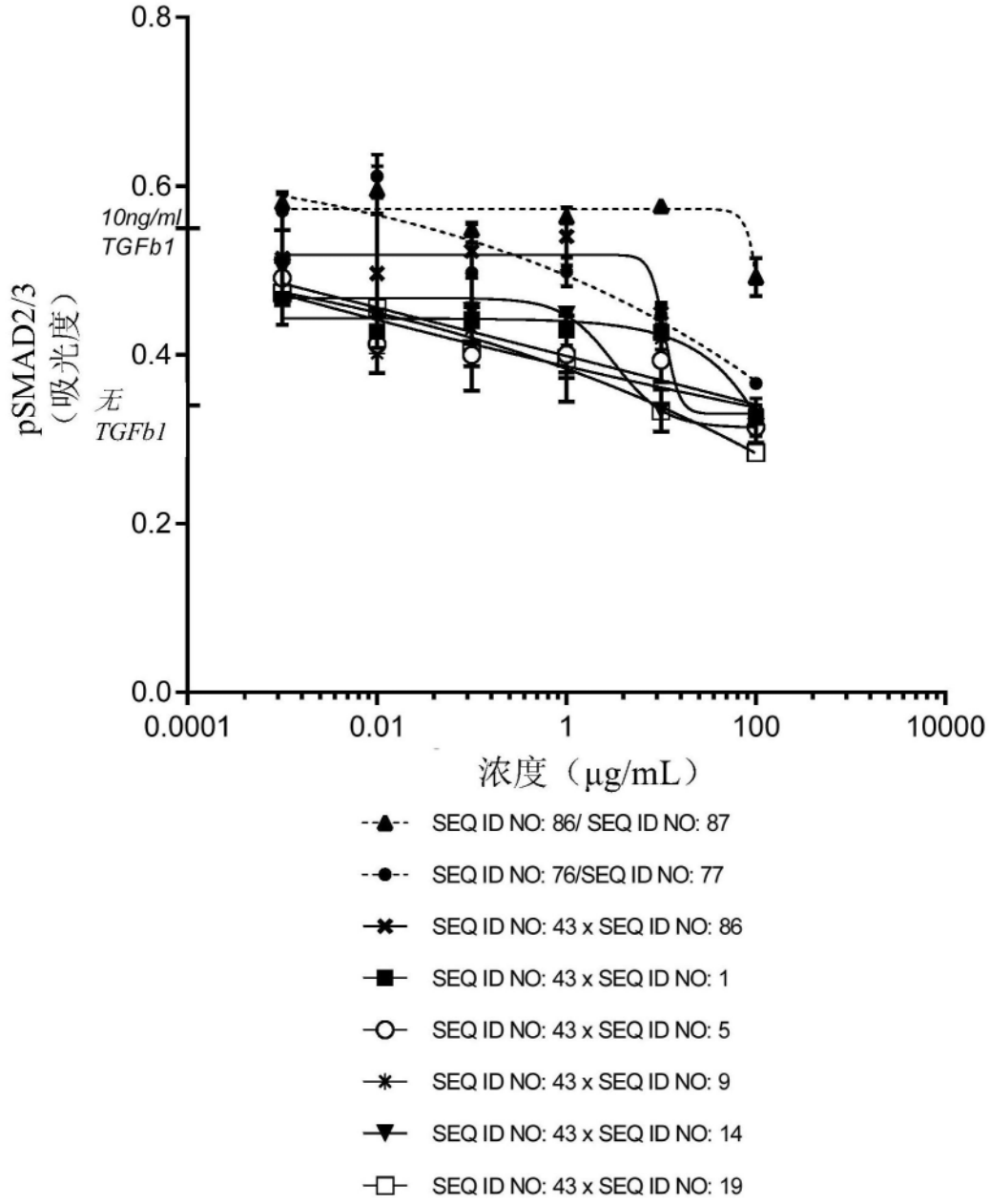

0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
10ng/ml TGFb1
无 TGFb1
pSMAD2/3 （吸光度）
0.0001
0.01
1
100
10000
浓度（μg/mL）
SEQ ID NO: 86/ SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 86
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 1
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 5
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 19

图3 (续)

N

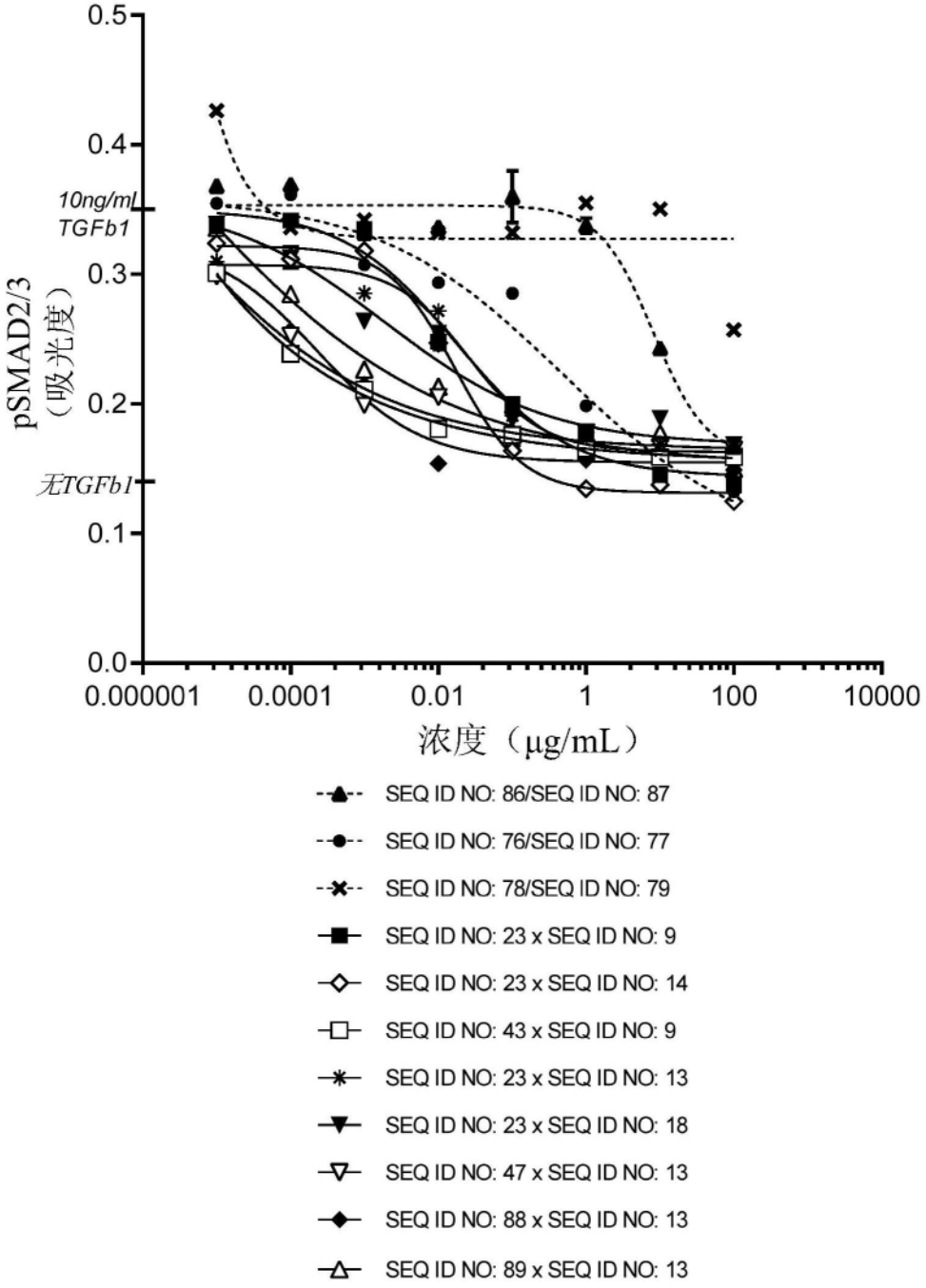

0.5
0.4
10ng/mL TGFb1
0.3
0.2
无TGFb1
0.1
0.0
pSMAD2/3 (吸光度)
0.000001
0.0001
0.01
1
100
10000
浓度（μg/mL）
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 18
SEQ ID NO: 47 x SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 88 x SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 89 x SEQ ID NO: 13

图3(续)

A

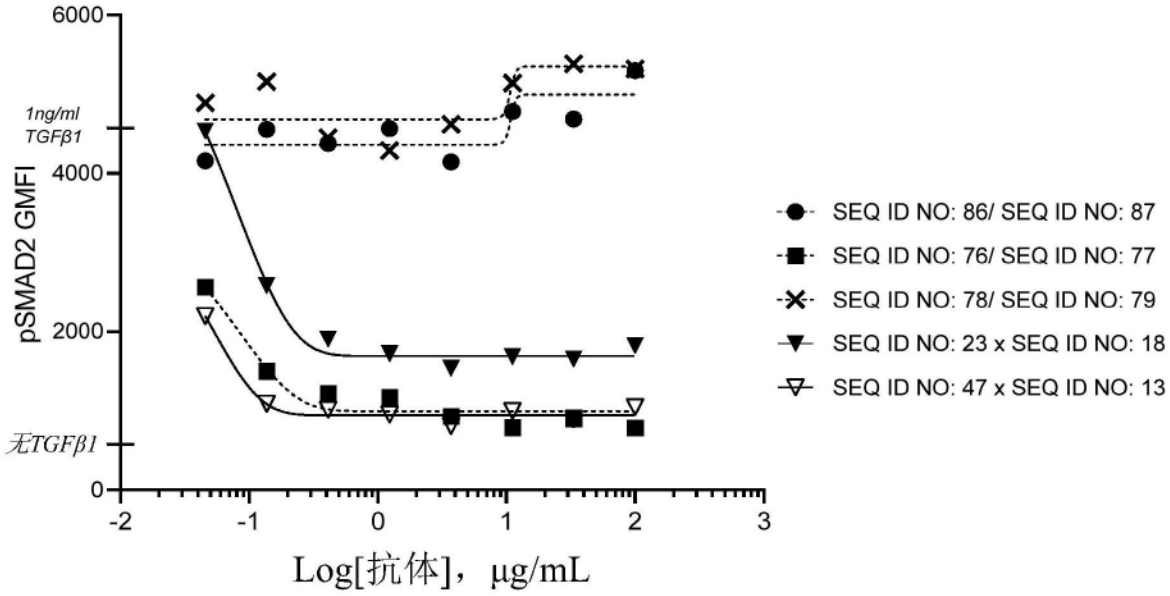
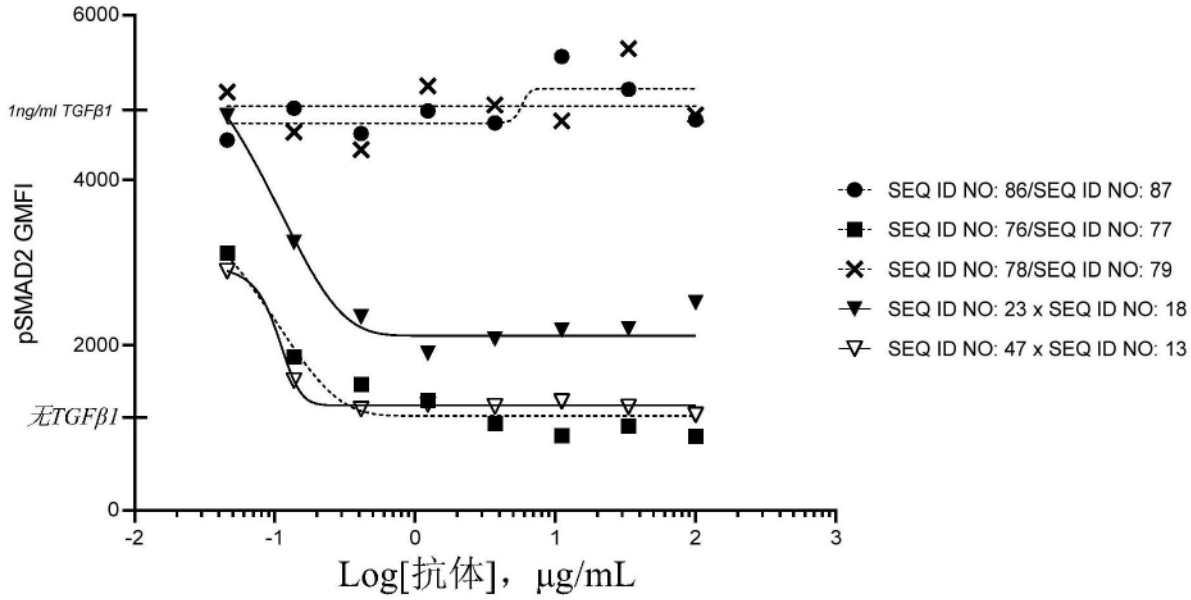

6000
4000
2000
0
1ng/ml TGFβ1
无TGFβ1
pSMAD2 GMFI
-2
-1
0
1
2
3
Log[抗体]，μg/mL
SEQ ID NO: 86/ SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/ SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 78/ SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 18
SEQ ID NO: 47 x SEQ ID NO: 13

图4

B


6000
4000
2000
0
1ng/ml TGFβ1
无TGFβ1
pSMAD2 GMFI
-2
-1
0
1
2
3
Log[抗体]，μg/mL
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 18
SEQ ID NO: 47 x SEQ ID NO: 13

C

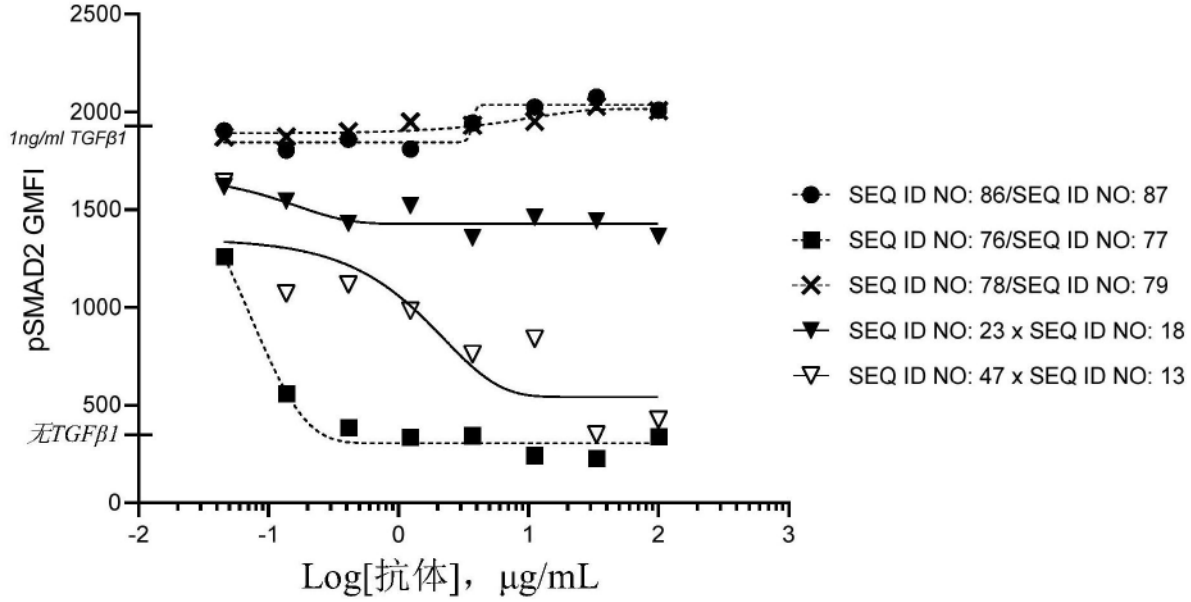
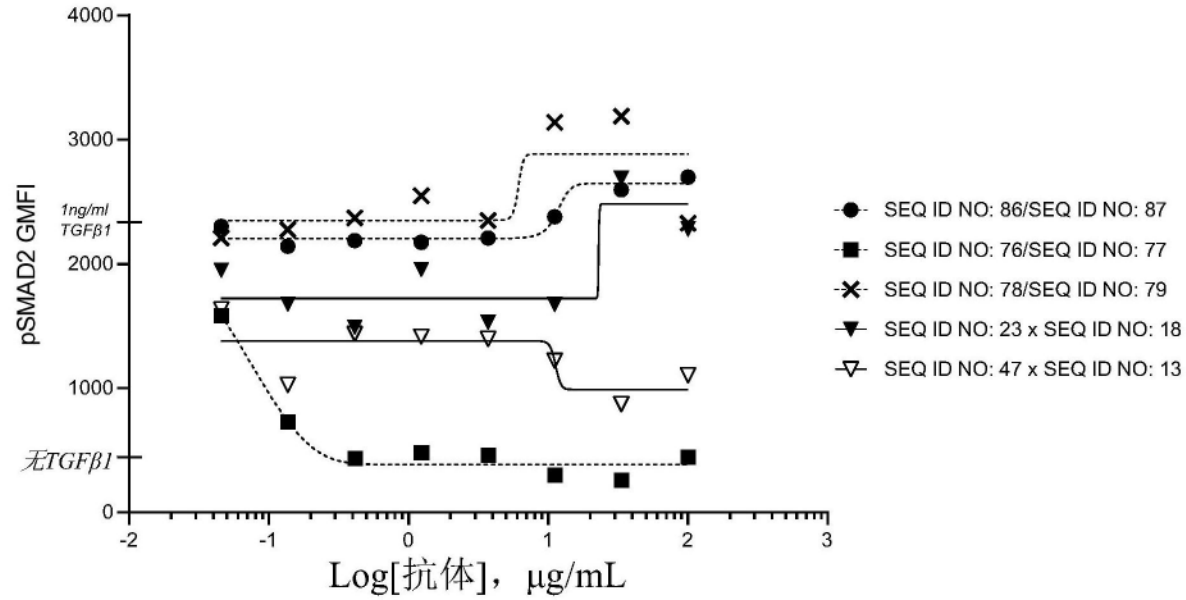

2500
2000
1500
1000
500
0
1ng/ml TGFβ1
无TGFβ1
pSMAD2 GMFI
-2
-1
0
1
2
3
Log[抗体]，μg/mL
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 18
SEQ ID NO: 47 x SEQ ID NO: 13

图4 (续)

D


4000
3000
2000
1000
0
1ng/ml TGFβ1
无TGFβ1
pSMAD2 GMFI
-2
-1
0
1
2
3
Log[抗体]，μg/mL
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 18
SEQ ID NO: 47 x SEQ ID NO: 13

E

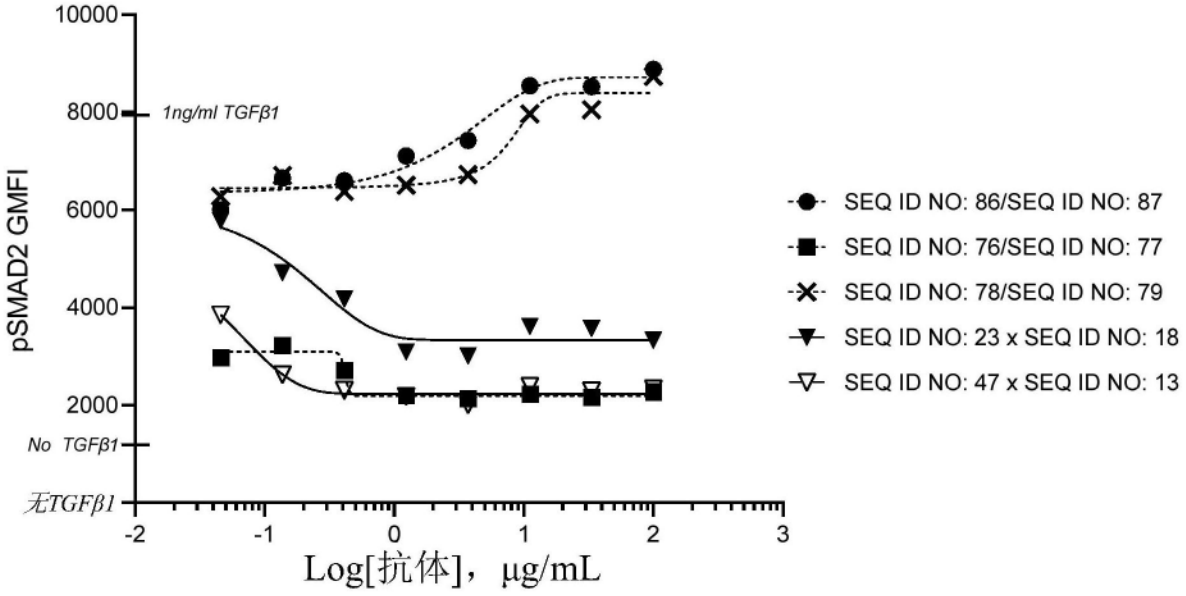
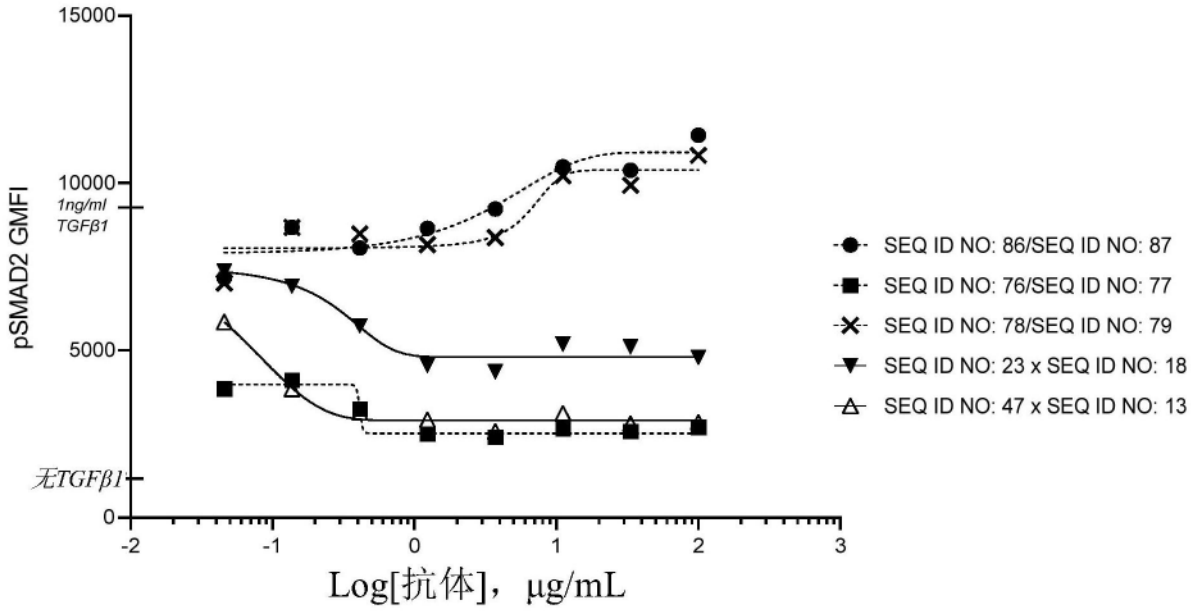

10000
8000
6000
4000
2000
1ng/ml TGFβ1
No TGFβ1
无TGFβ1
pSMAD2 GMFI
-2
-1
0
1
2
3
Log[抗体]，μg/mL
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 18
SEQ ID NO: 47 x SEQ ID NO: 13

图4(续)

F


15000
10000
1ng/ml TGFβ1
5000
无TGFβ1
0
pSMAD2 GMFI
-2
-1
0
1
2
3
Log[抗体]，μg/mL
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 18
SEQ ID NO: 47 x SEQ ID NO: 13

G

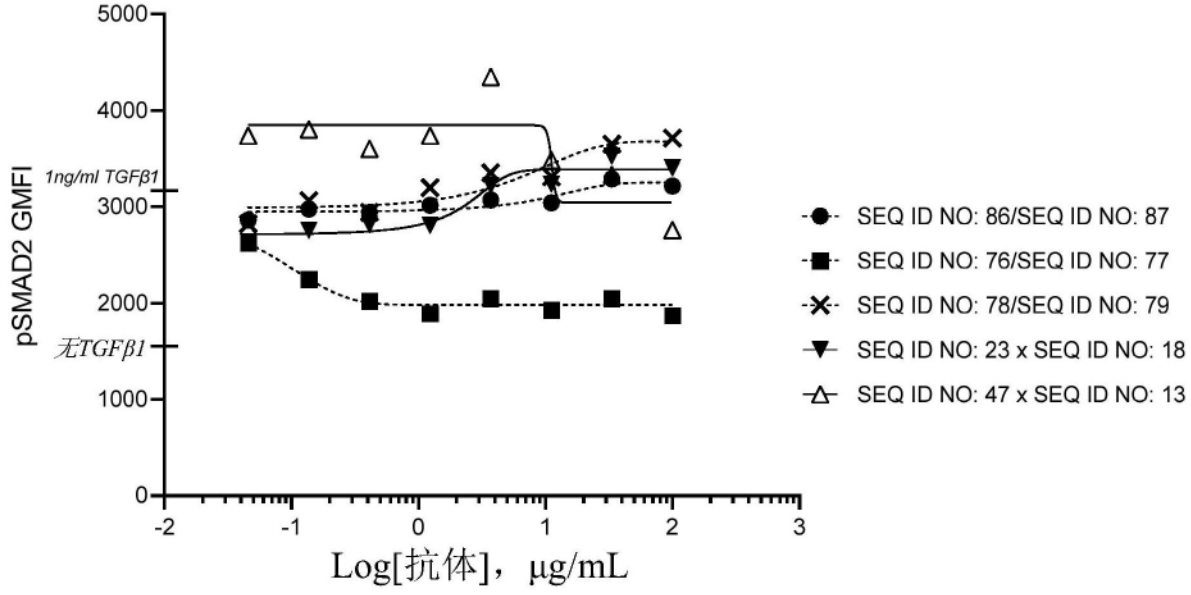

5000
4000
1ng/ml TGFβ1
3000
2000
无TGFβ1
1000
0
pSMAD2 GMFI
-2
-1
0
1
2
3
Log[抗体]，μg/mL
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 18
SEQ ID NO: 47 x SEQ ID NO: 13

图4(续)

H

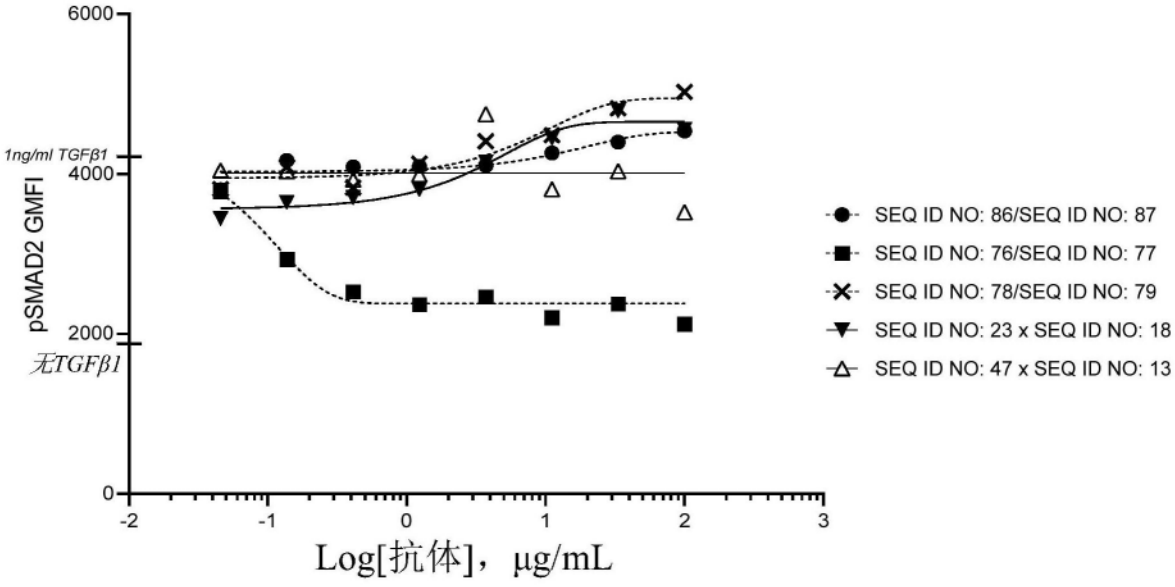

6000
1ng/ml TGFβ1
4000
2000
无TGFβ1
0
pSMAD2 GMFI
-2
-1
0
1
2
3
Log[抗体]，μg/mL
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 18
SEQ ID NO: 47 x SEQ ID NO: 13

图4(续)

A

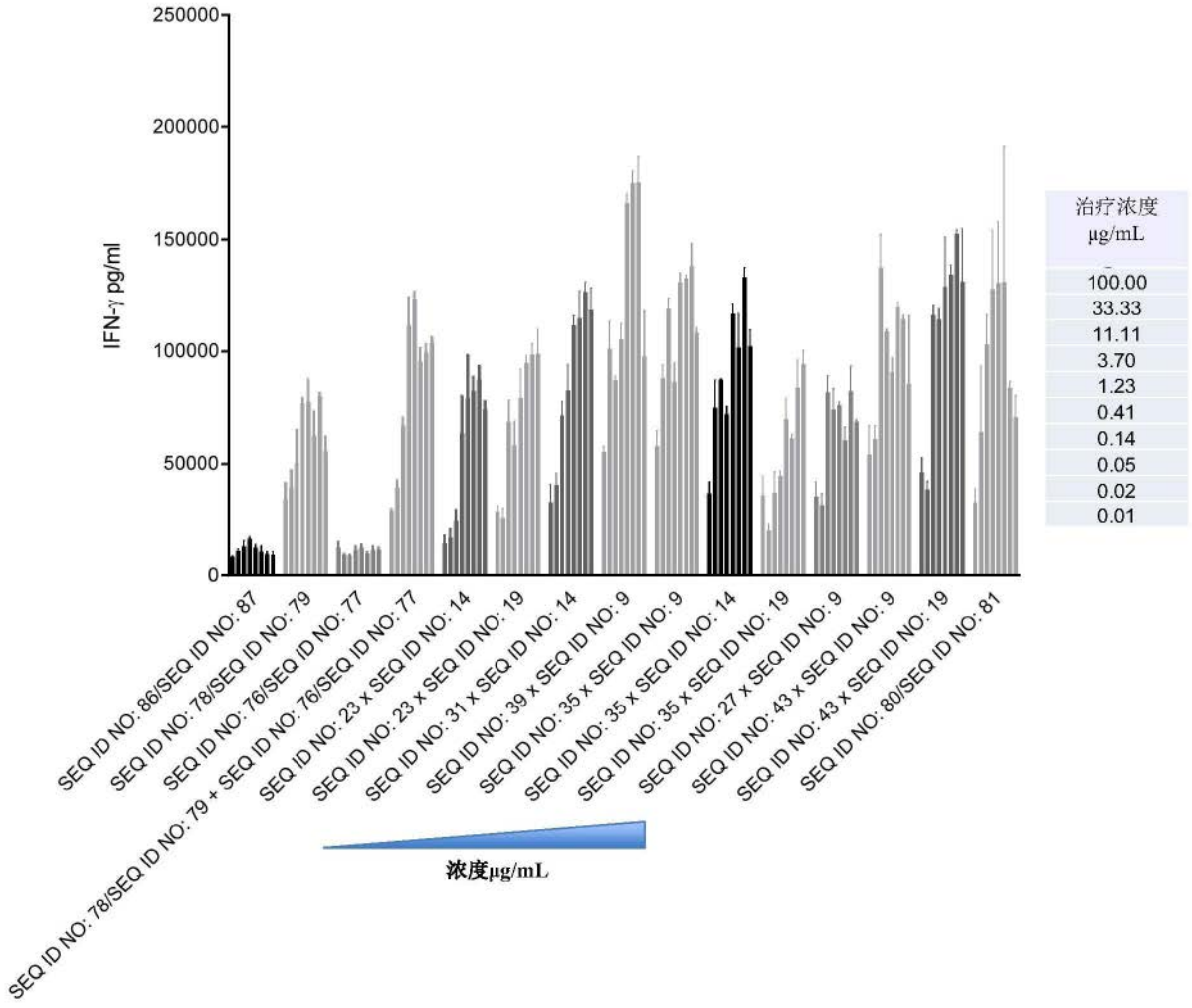

250000
200000
150000
100000
50000
0
IFN-γ pg/ml
治疗浓度 μg/mL
100.00
33.33
11.11
3.70
1.23
0.41
0.14
0.05
0.02
0.01
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79 + SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 31 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 39 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 27 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 81
浓度μg/mL

图5

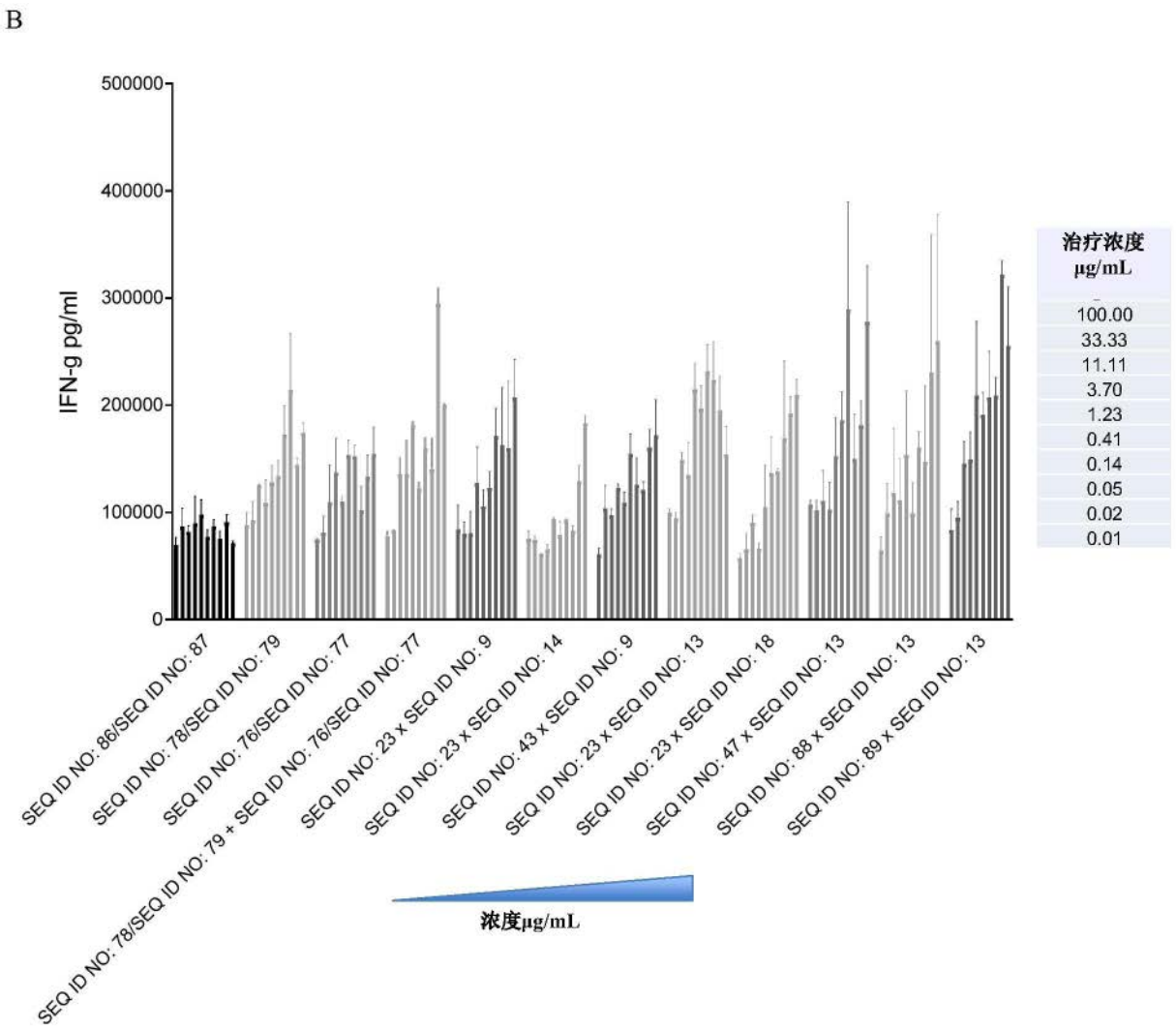

B
IFN-g pg/ml
500000
400000
300000
200000
100000
0
治疗浓度 μg/mL
100.00
33.33
11.11
3.70
1.23
0.41
0.14
0.05
0.02
0.01
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 18
SEQ ID NO: 47 x SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 88 x SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 89 x SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79 + SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
浓度μg/mL

图5(续)

C

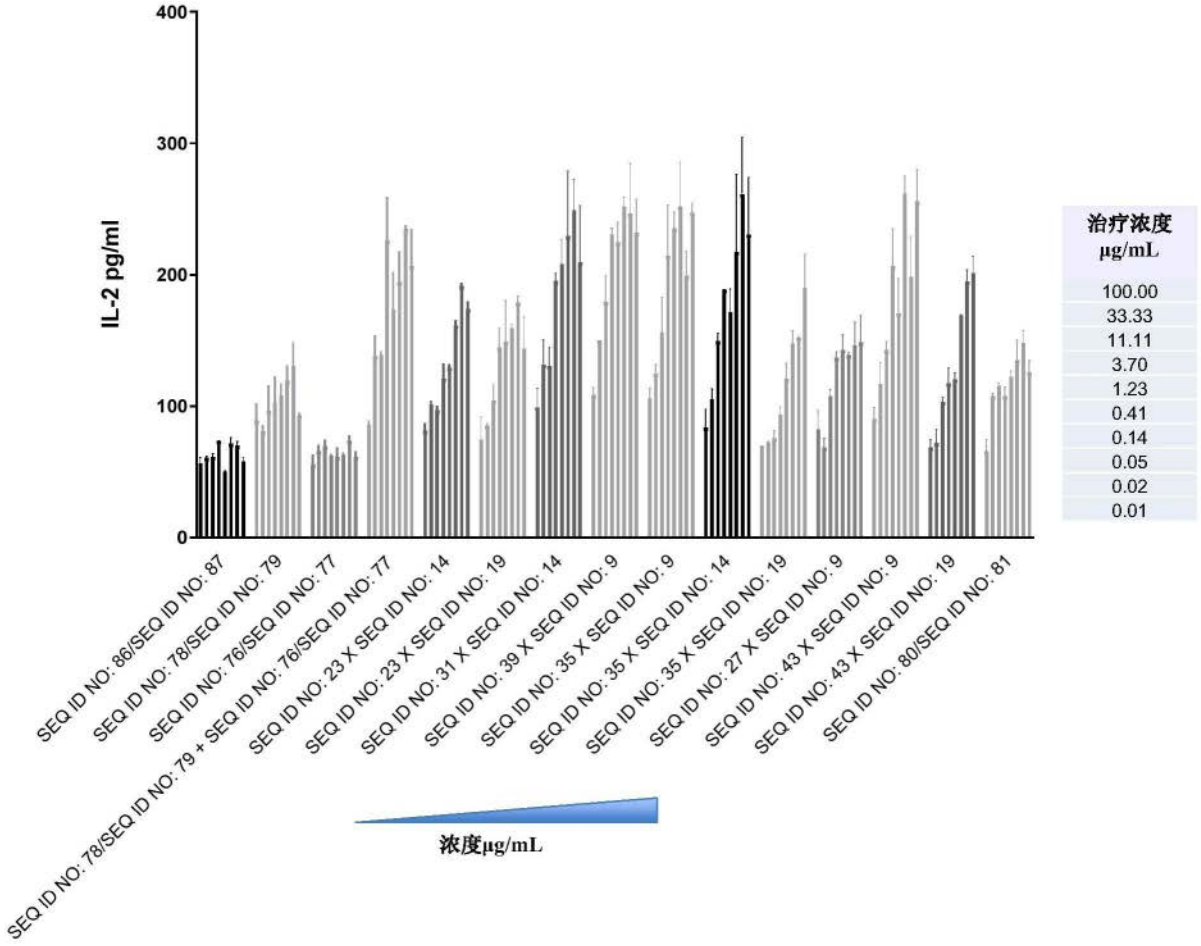

400
300
200
100
0
IL-2 pg/ml
治疗浓度 μg/mL
100.00
33.33
11.11
3.70
1.23
0.41
0.14
0.05
0.02
0.01
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79 + SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 23 X SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 23 X SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 31 X SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 39 X SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 35 X SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 35 X SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 35 X SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 35 X SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 27 X SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 43 X SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 43 X SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 81
浓度μg/mL

图5(续)

D

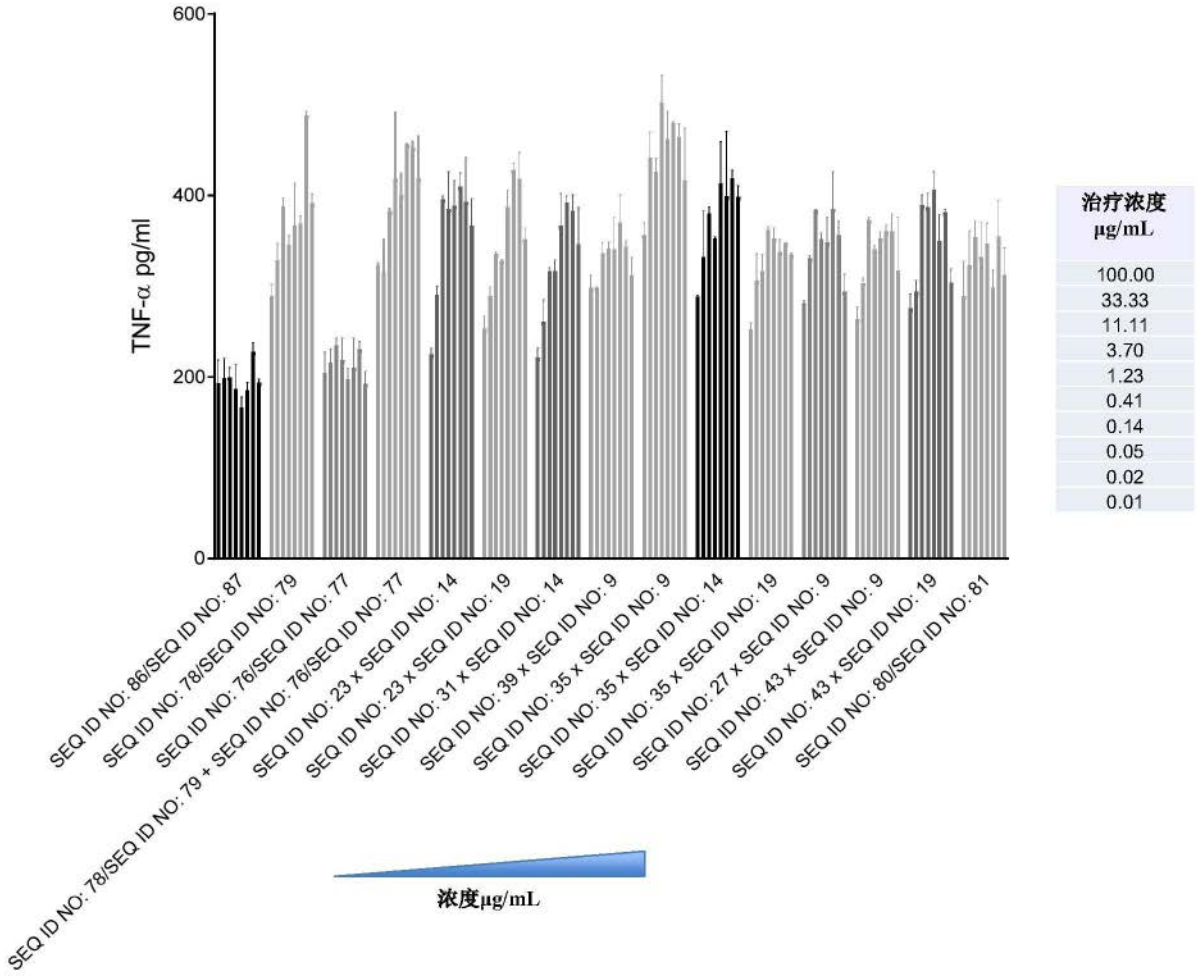

600
400
200
0
TNF-α pg/ml
治疗浓度 μg/mL
100.00
33.33
11.11
3.70
1.23
0.41
0.14
0.05
0.02
0.01
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79 + SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 31 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 39 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 27 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 81
浓度μg/mL

图5(续)

E

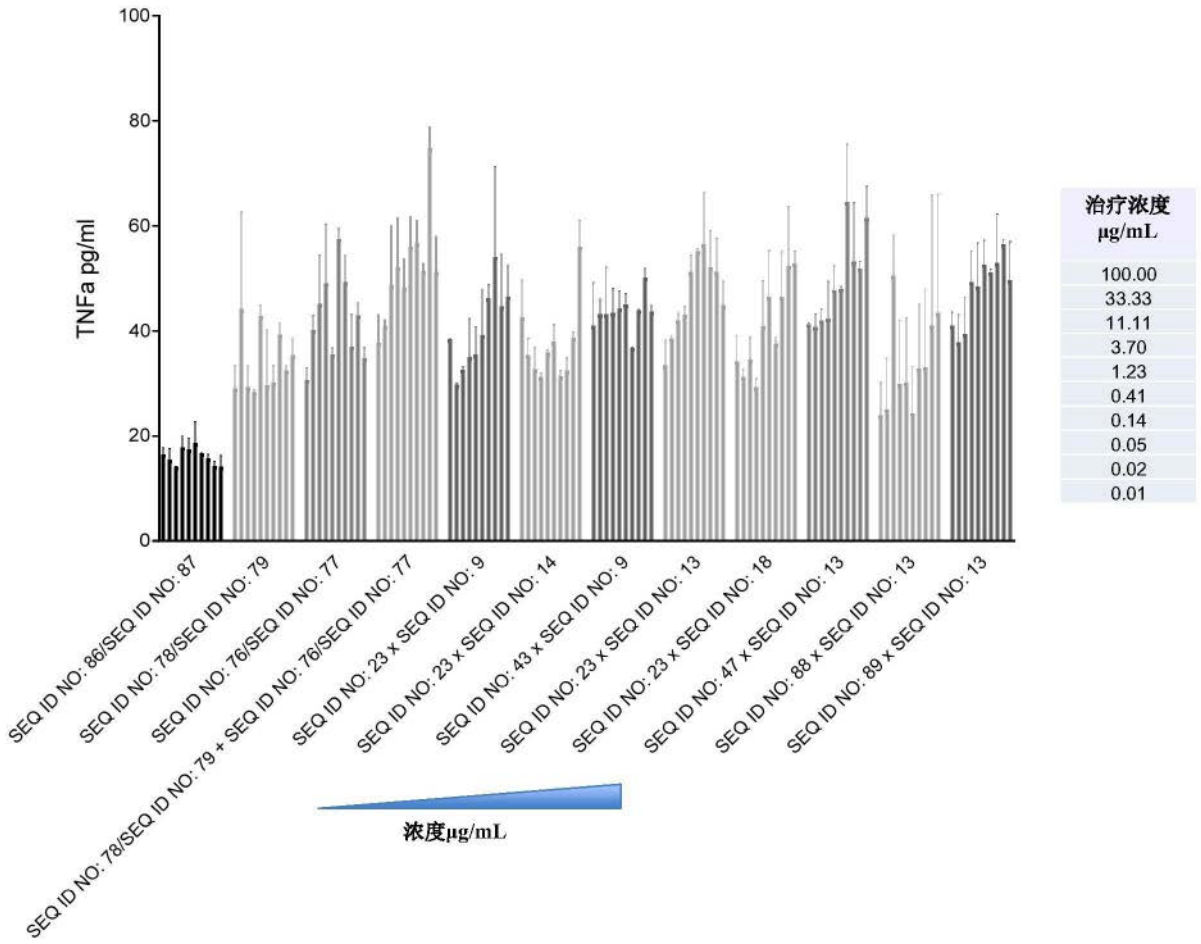
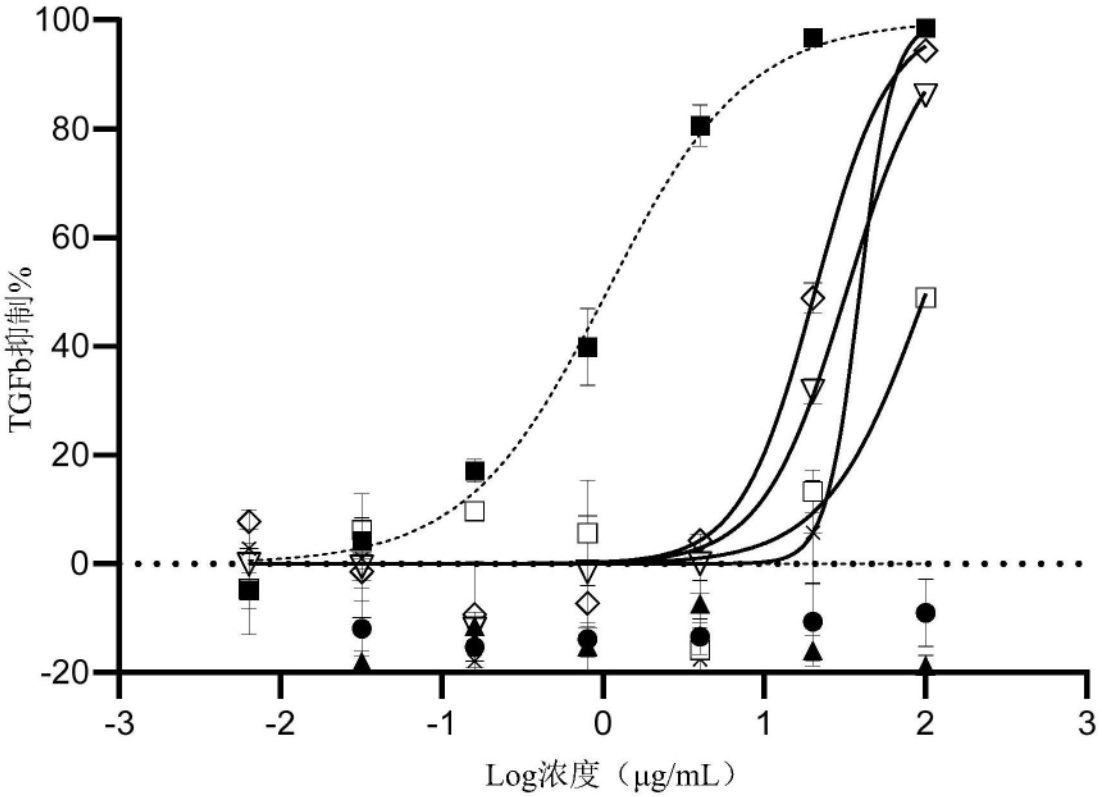

100
80
60
40
20
0
TNFa pg/ml
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79 + SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 18
SEQ ID NO: 47 x SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 88 x SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 89 x SEQ ID NO: 13
浓度μg/mL
治疗浓度 μg/mL
100.00
33.33
11.11
3.70
1.23
0.41
0.14
0.05
0.02
0.01

图5(续)

A



SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 14

SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 19

SEQ ID NO: 39 x SEQ ID NO: 9

SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 9

SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79

SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77

SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87

图6

B

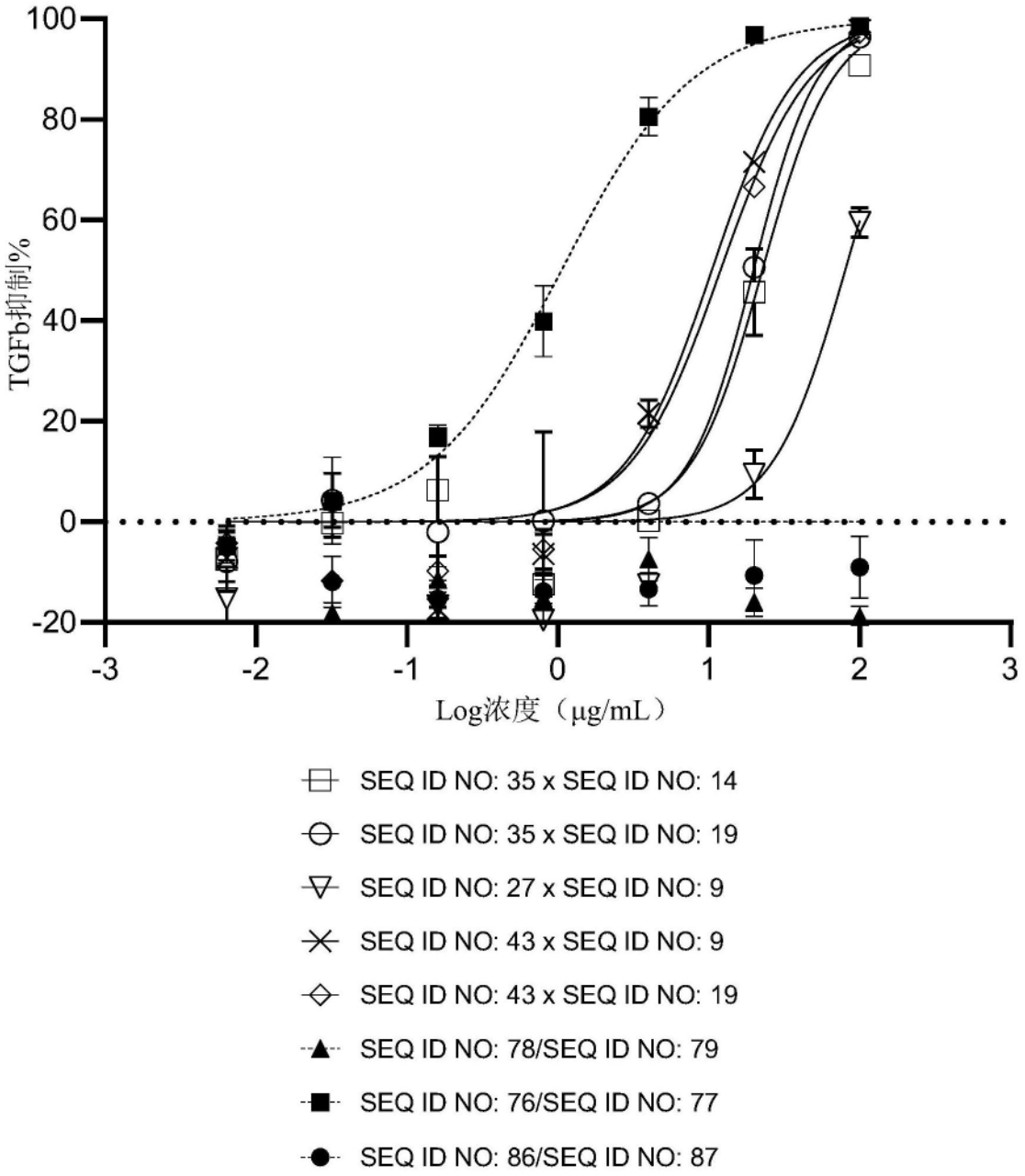

100
80
60
40
20
0
-20
TGFb抑制%
-3
-2
-1
0
1
2
3
Log浓度（μg/mL）
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 27 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87

图6(续)

C

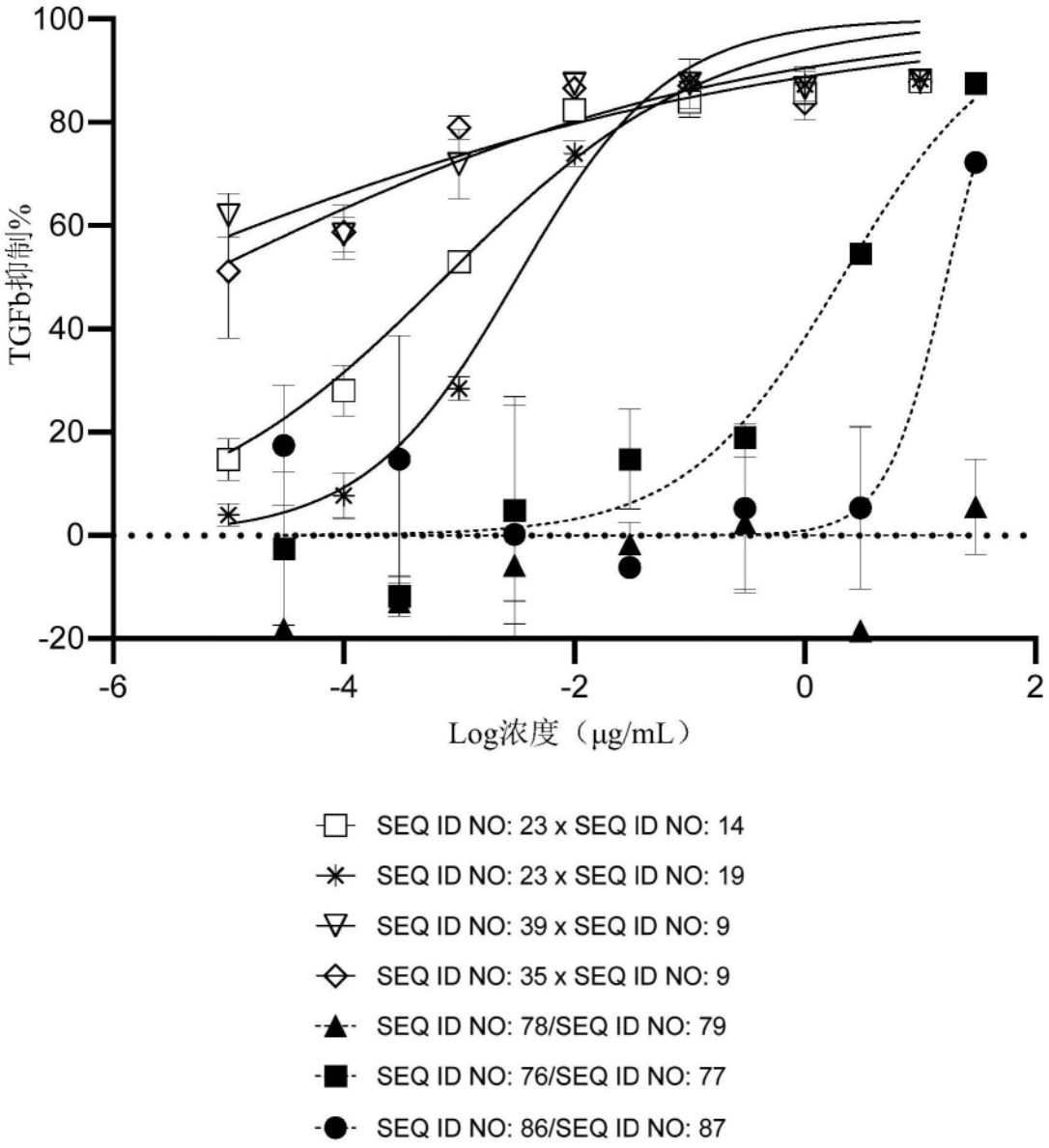

100
80
60
40
20
0
-20
TGFb抑制%
-6
-4
-2
0
2
Log浓度（μg/mL）
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 39 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87

图6(续)

D

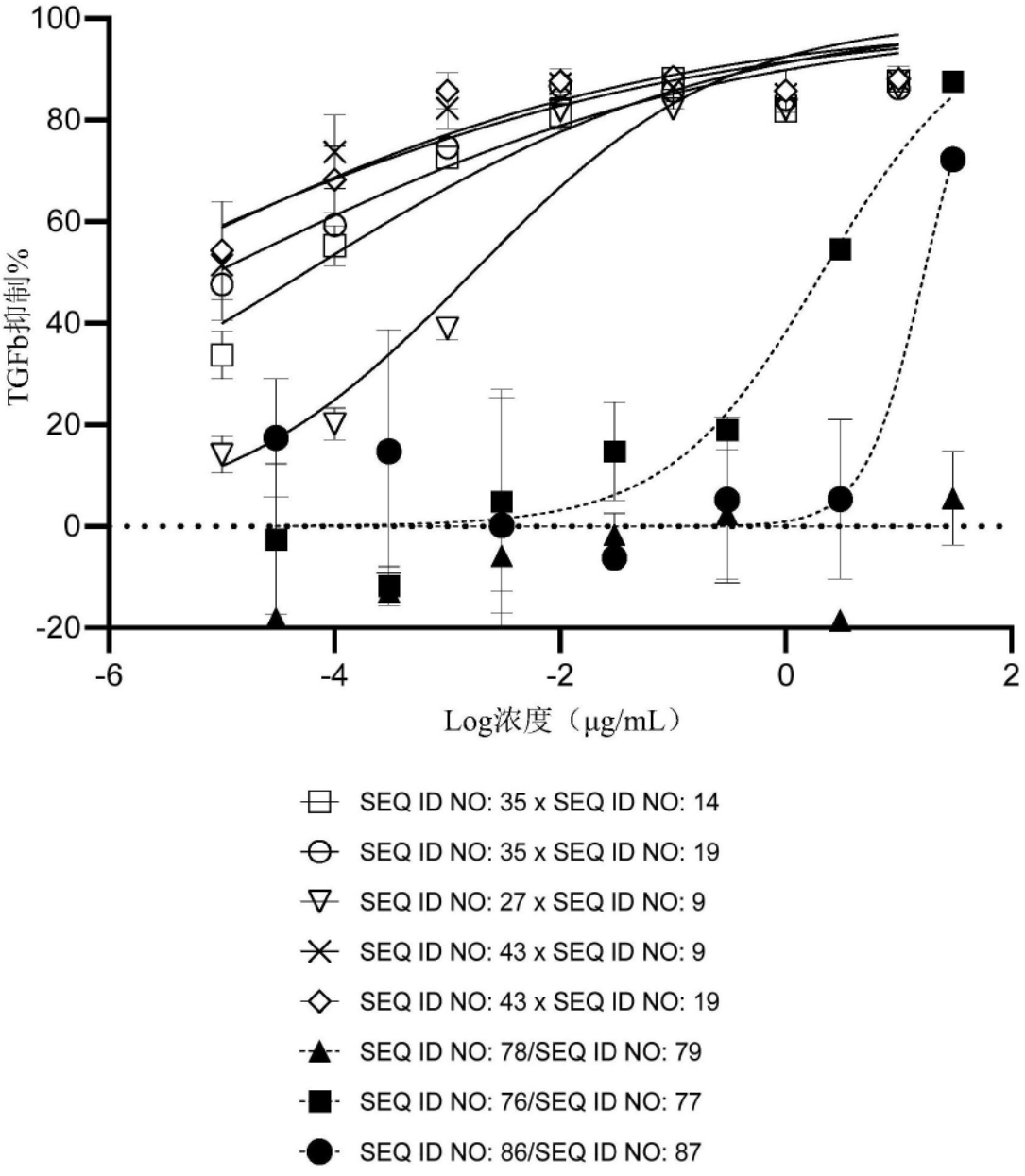

100
80
60
40
20
0
-20
TGFb抑制%
-6
-4
-2
0
2
Log浓度（μg/mL）
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 27 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87

图6(续)

A

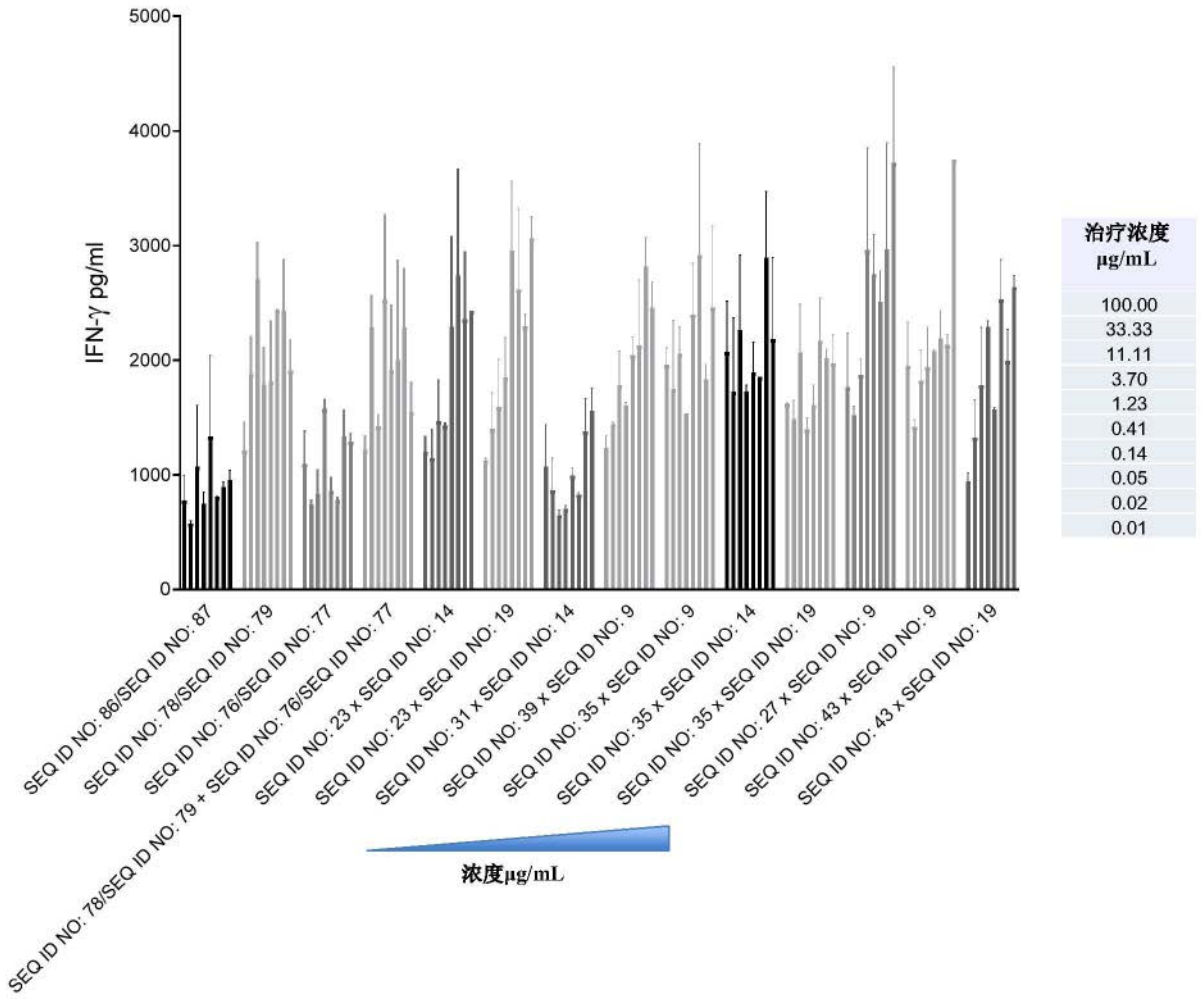

5000
4000
3000
2000
1000
0
IFN-γ pg/ml
治疗浓度 μg/mL
100.00
33.33
11.11
3.70
1.23
0.41
0.14
0.05
0.02
0.01
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79 + SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 31 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 39 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 27 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 19
浓度μg/mL

图7

B

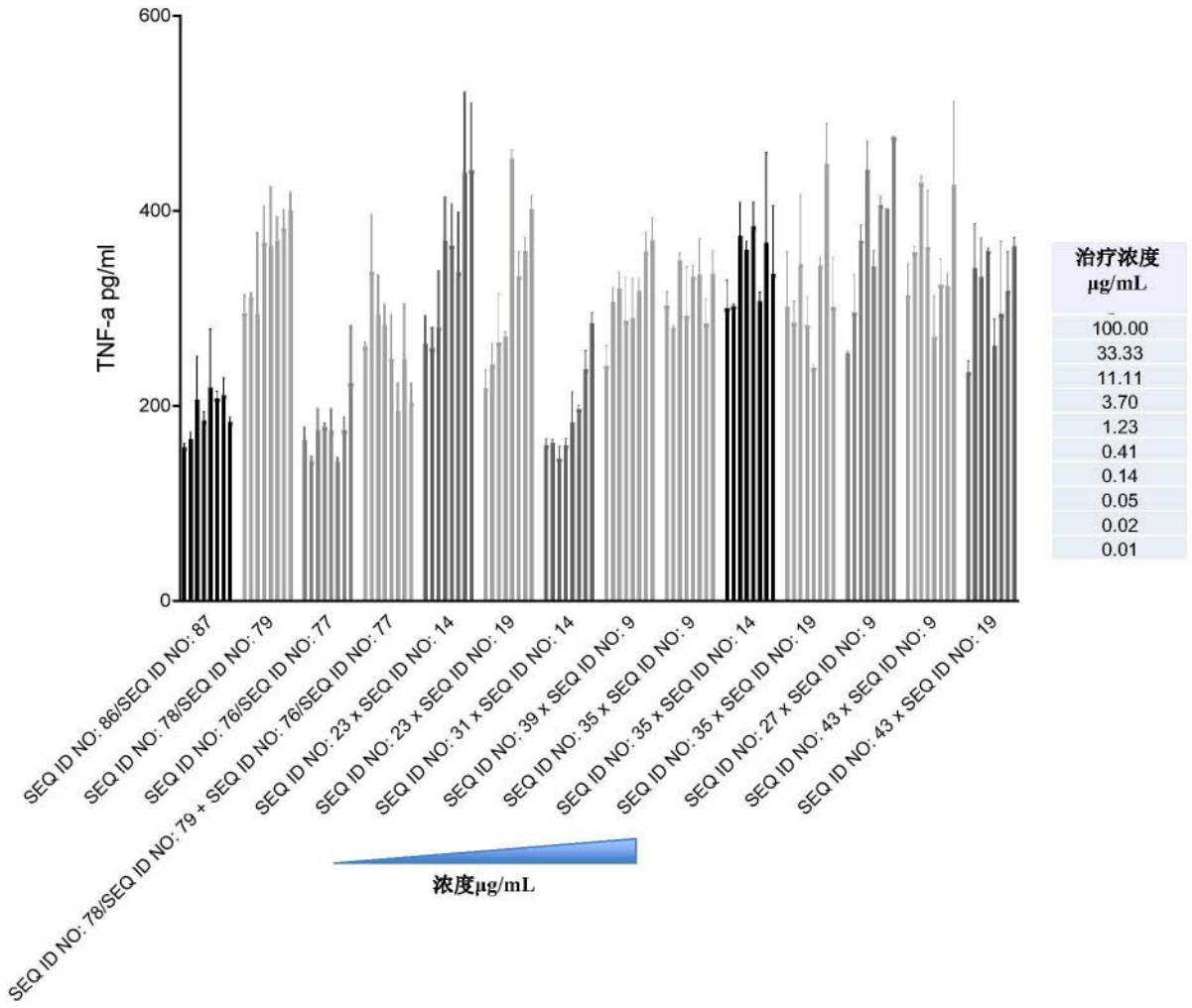
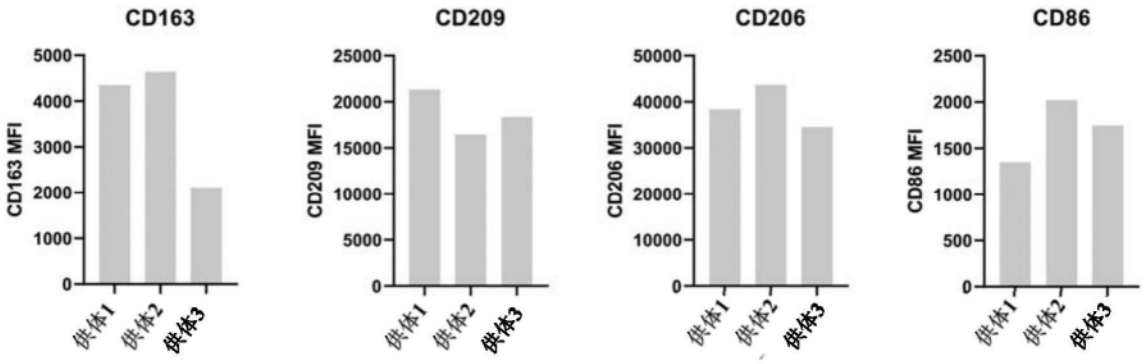

600
400
200
0
TNF-a pg/ml
治疗浓度 μg/mL
100.00
33.33
11.11
3.70
1.23
0.41
0.14
0.05
0.02
0.01
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79 + SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 31 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 39 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 27 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 19
浓度μg/mL

图7(续)

A


CD163
CD163 MFI
5000
4000
3000
2000
1000
0
供体1
供体2
供体3
CD209
CD209 MFI
25000
20000
15000
10000
5000
0
供体1
供体2
供体3
CD206
CD206 MFI
50000
40000
30000
20000
10000
0
供体1
供体2
供体3
CD86
CD86 MFI
2500
2000
1500
1000
500
0
供体1
供体2
供体3

B

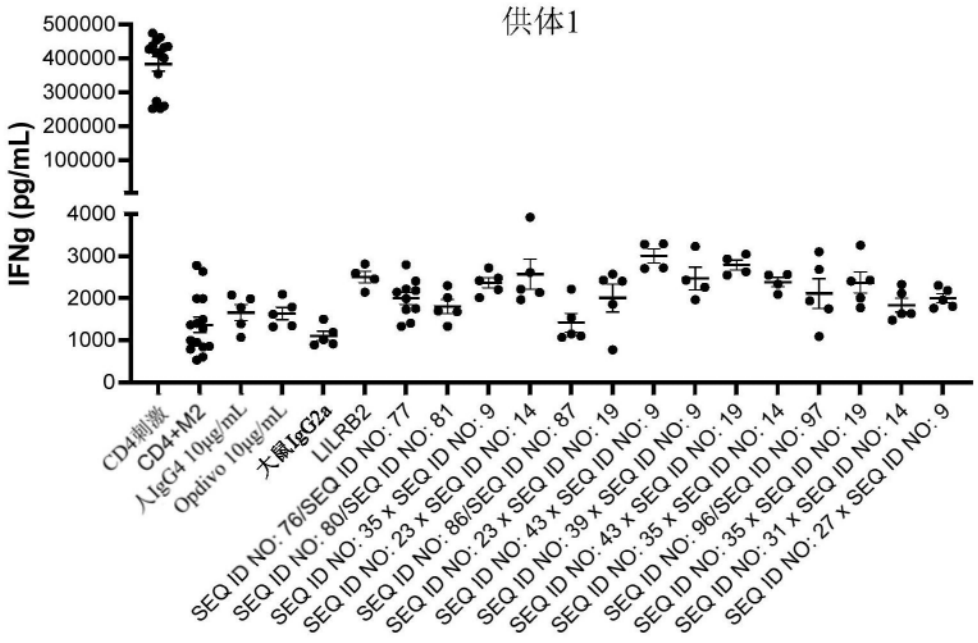

供体1
IFNg (pg/mL)
500000
400000
300000
200000
100000
4000
3000
2000
1000
0
CD4刺激
CD4+M2
人IgG4 10μg/mL
Opdivo 10μg/mL
大鼠IgG2a
LILRB2
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 81
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 39 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 96/SEQ ID NO: 97
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 31 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 27 x SEQ ID NO: 9

图8

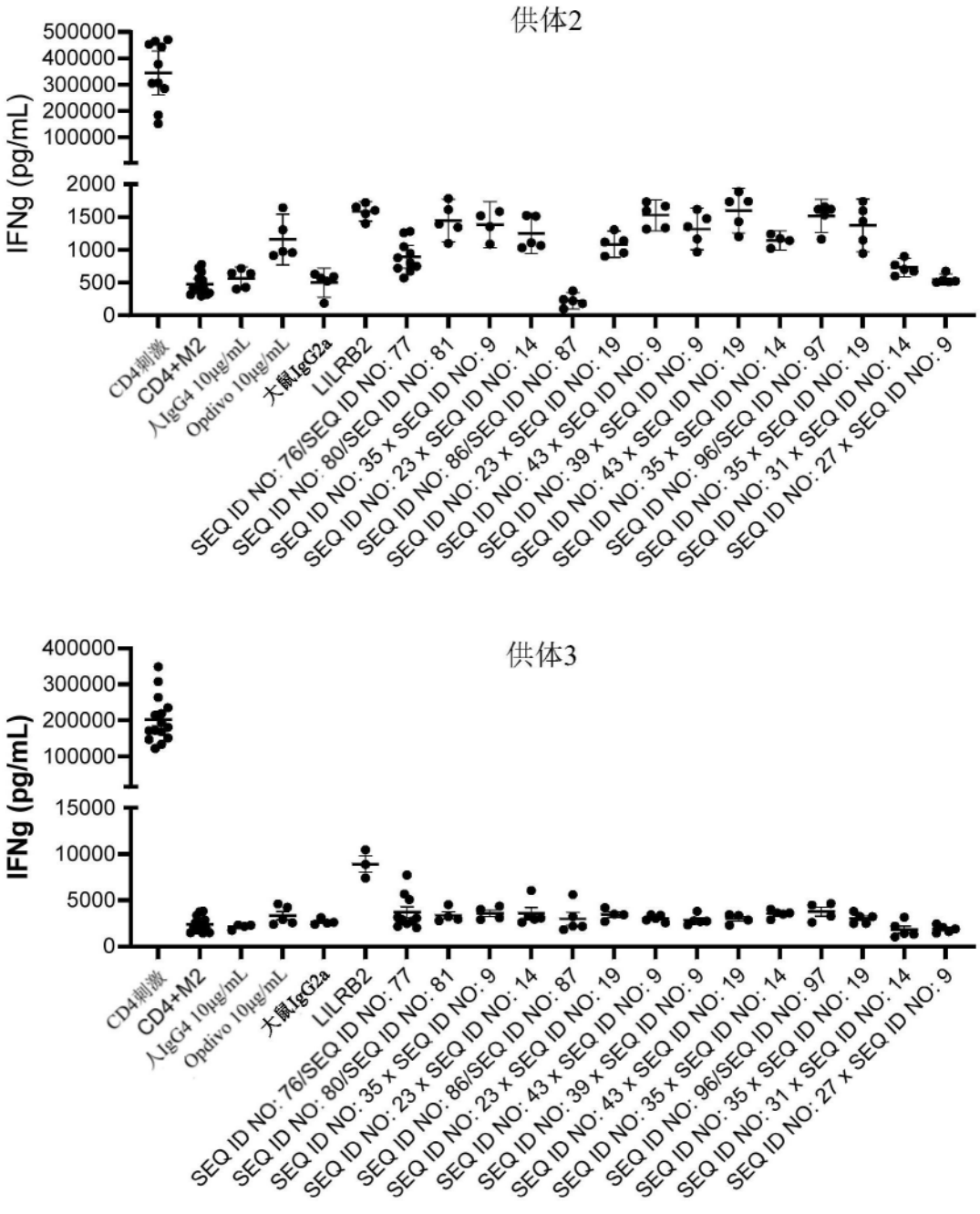

供体2
IFNg (pg/mL)
500000
400000
300000
200000
100000
2000
1500
1000
500
0
CD4刺激
CD4+M2
人IgG4 10μg/mL
Opdivo 10μg/mL
大鼠IgG2a
LILRB2
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 81
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 39 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 96/SEQ ID NO: 97
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 31 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 27 x SEQ ID NO: 9
供体3
IFNg (pg/mL)
400000
300000
200000
100000
15000
10000
5000
0
CD4刺激
CD4+M2
人IgG4 10μg/mL
Opdivo 10μg/mL
大鼠IgG2a
LILRB2
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 81
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 39 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 96/SEQ ID NO: 97
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 31 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 27 x SEQ ID NO: 9

图8(续)

A

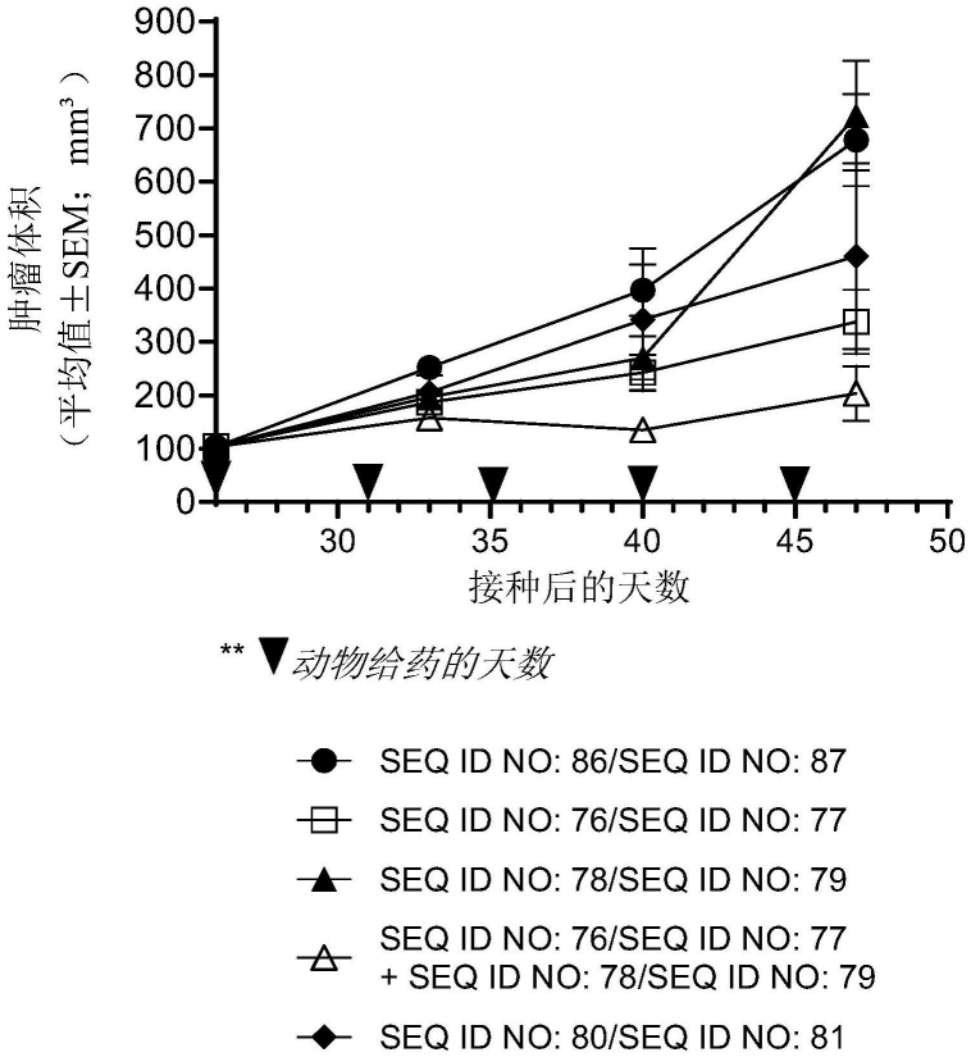

肿瘤体积
（平均值±SEM；mm³）
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
30
35
40
45
50
接种后的天数
** ▼动物给药的天数
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
+ SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 81

图9

B

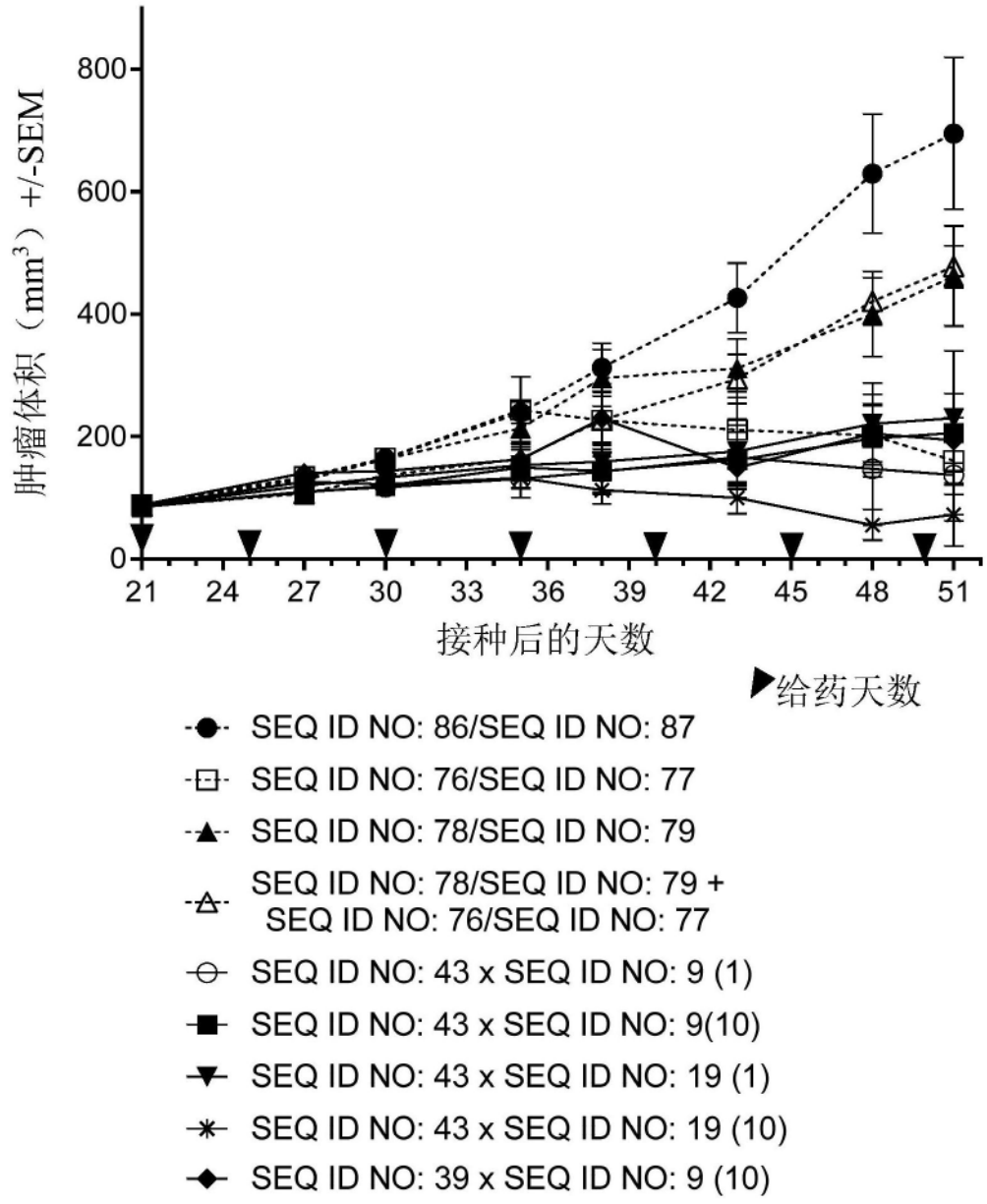

肿瘤体积（mm3）+/-SEM
800
600
400
200
0
21
24
27
30
33
36
39
42
45
48
51
接种后的天数
给药天数
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79 +
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 9 (1)
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 9(10)
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 19 (1)
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 19 (10)
SEQ ID NO: 39 x SEQ ID NO: 9 (10)

图9 (续)

B（续）

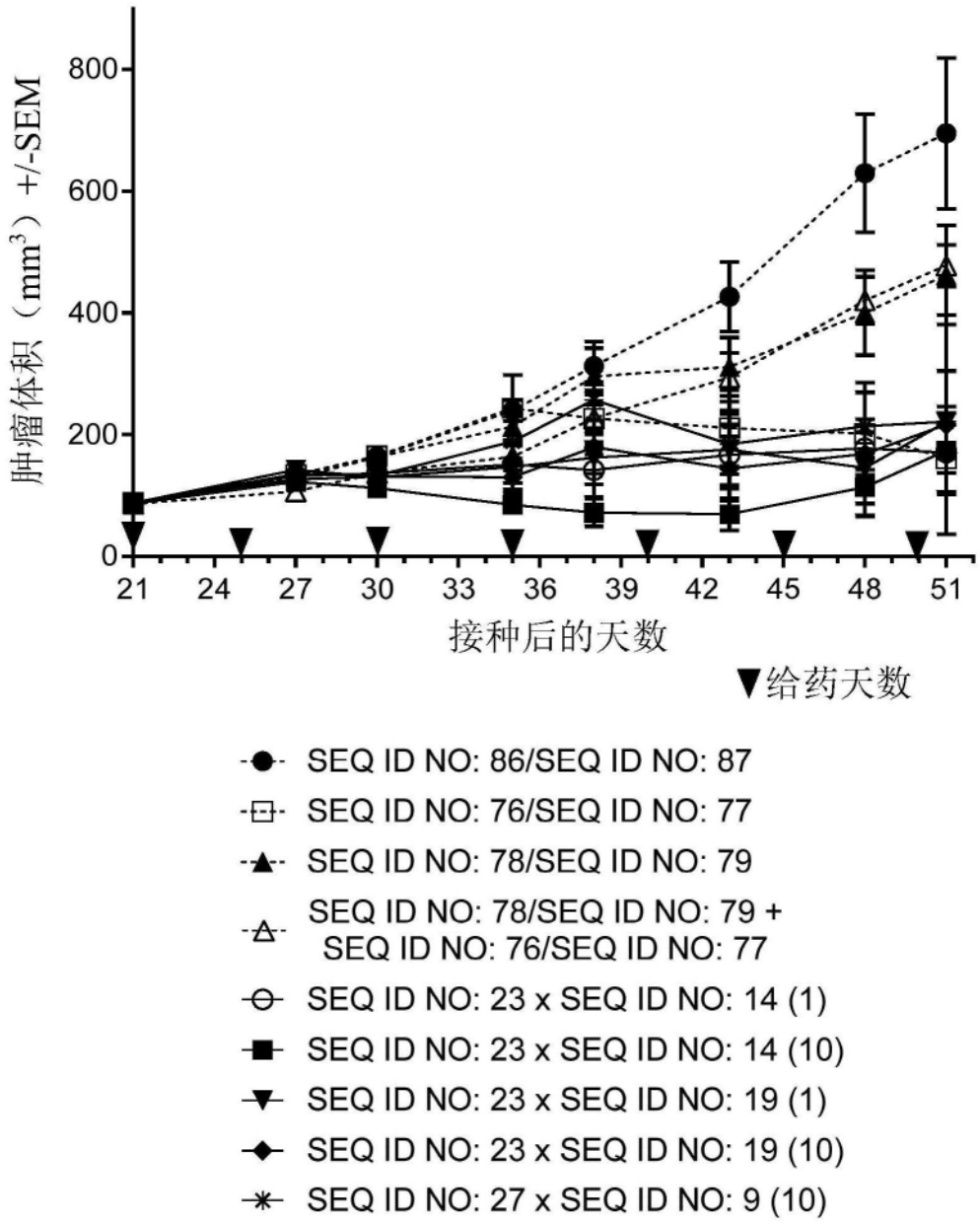

肿瘤体积（mm³）+/-SEM
800
600
400
200
0
21
24
27
30
33
36
39
42
45
48
51
接种后的天数
▼给药天数
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79 +
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 14 (1)
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 14 (10)
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 19 (1)
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 19 (10)
SEQ ID NO: 27 x SEQ ID NO: 9 (10)

图9(续)

C

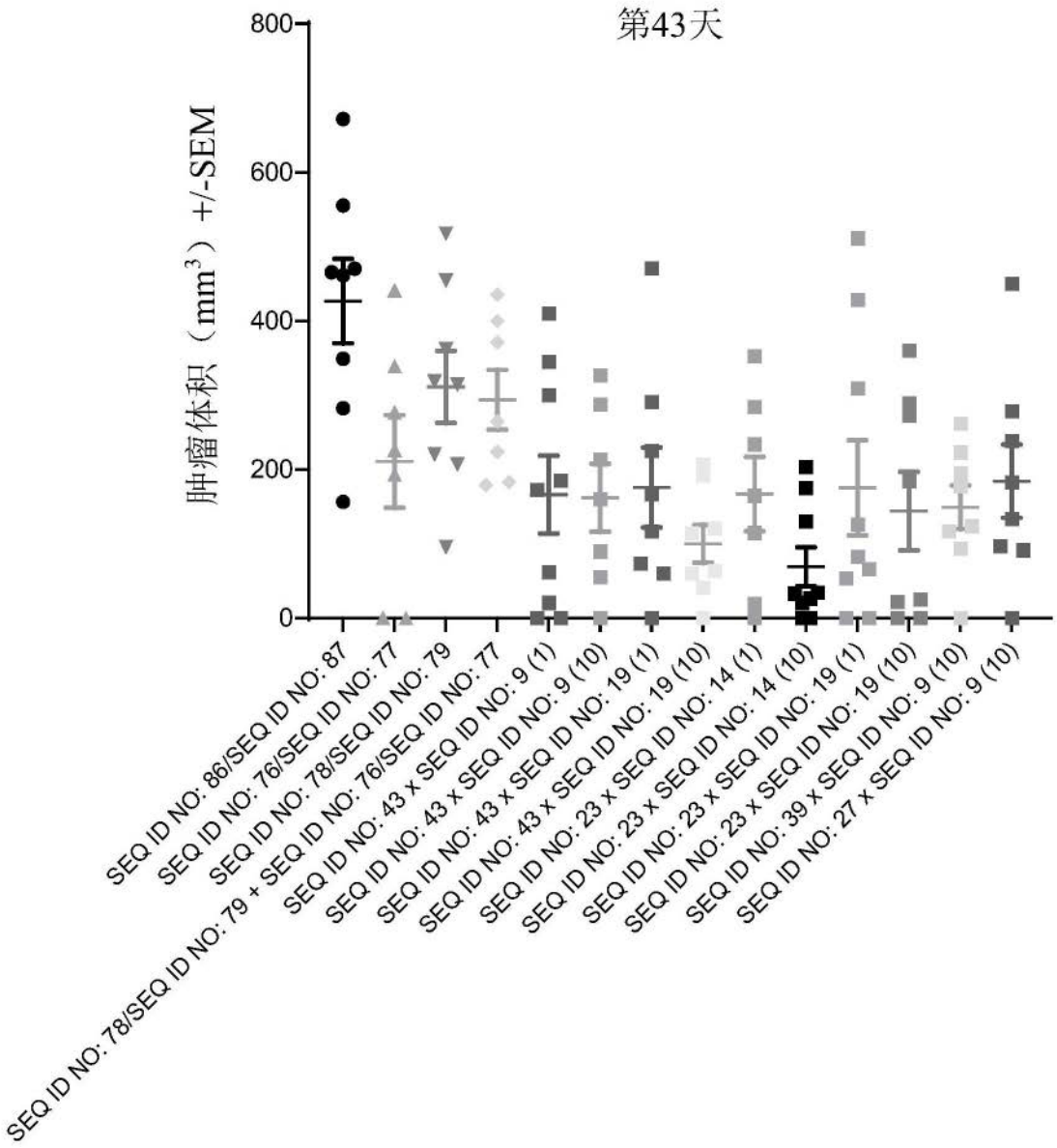

第43天
肿瘤体积（mm3）+/-SEM
800
600
400
200
0
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79 + SEQ ID NO: 9 (1)
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 9 (10)
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 19 (1)
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 19 (10)
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 14 (1)
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 14 (10)
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 19 (1)
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 19 (10)
SEQ ID NO: 39 x SEQ ID NO: 9 (10)
SEQ ID NO: 27 x SEQ ID NO: 9 (10)

图9(续)

D

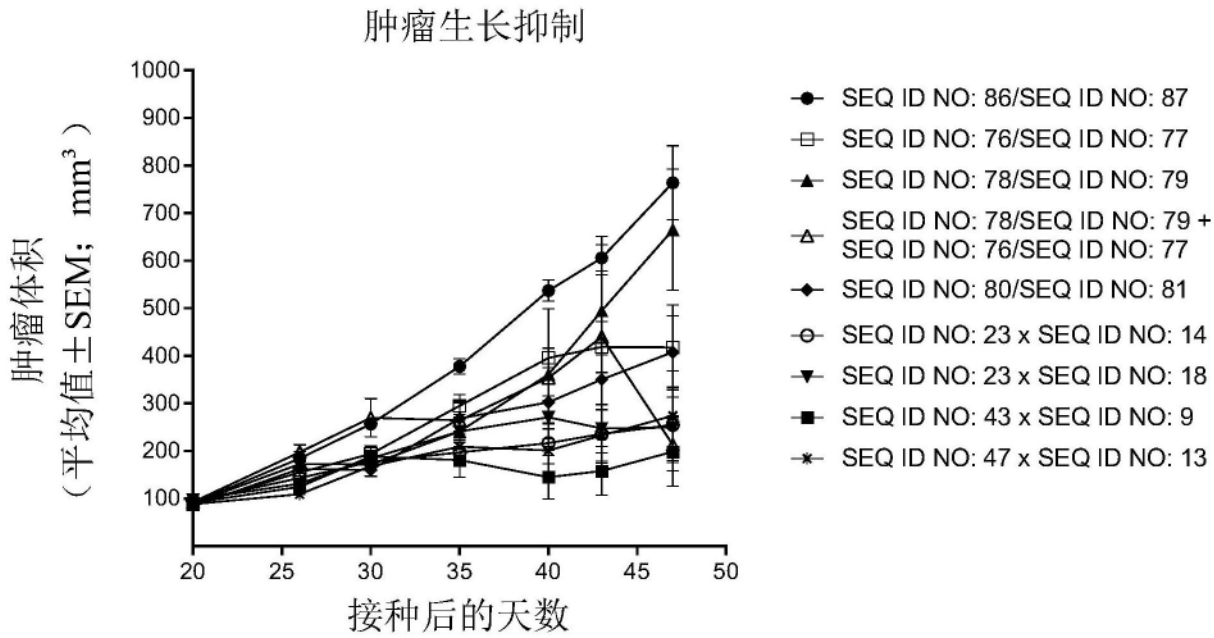

肿瘤生长抑制
肿瘤体积
（平均值±SEM；mm^3）
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
20
25
30
35
40
45
50
接种后的天数
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79 +
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 81
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 18
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 47 x SEQ ID NO: 13

图9(续)

E

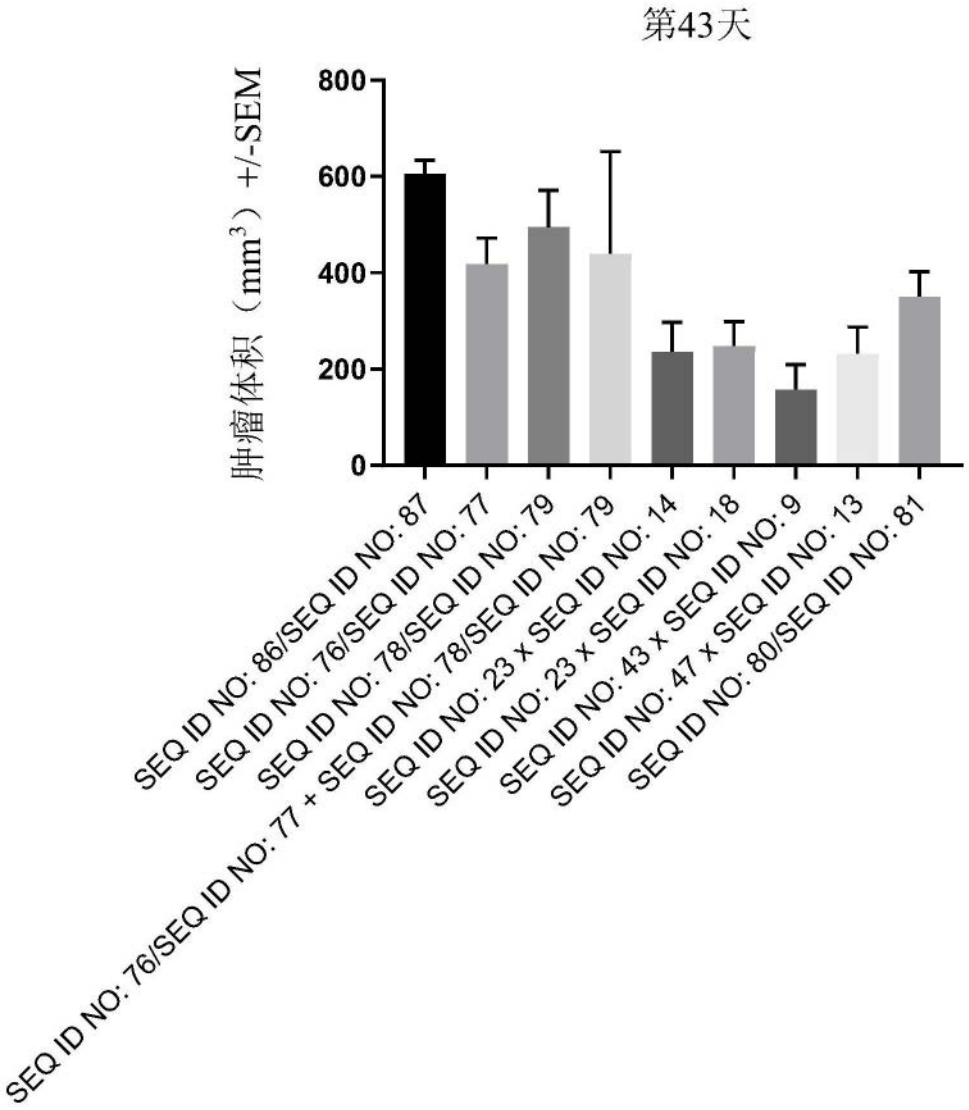
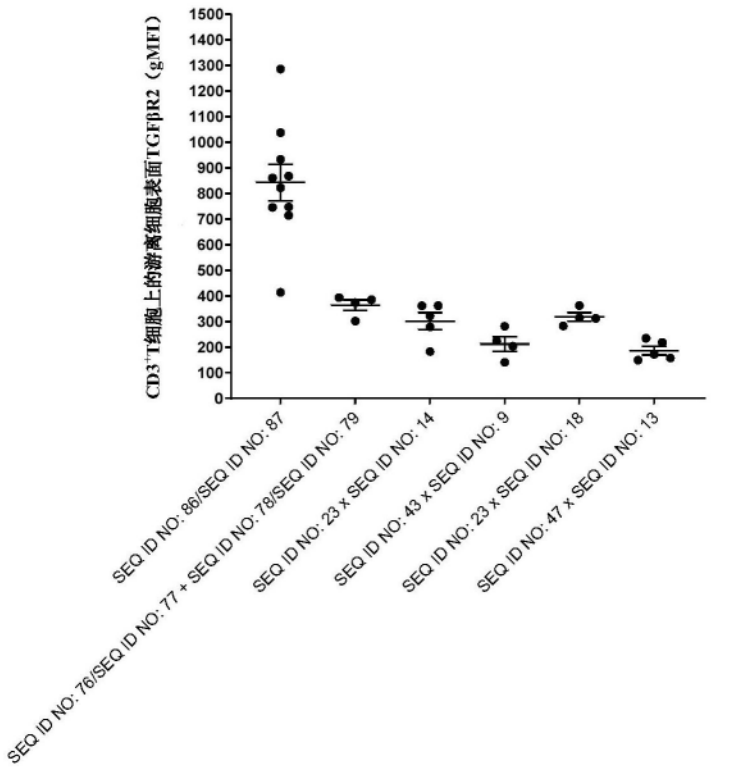

第43天
肿瘤体积（mm³）+/-SEM
800
600
400
200
0
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 18
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 47 x SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 81
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77 + SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79

图9(续)

F


CD3+T细胞上的游离细胞表面TGFβR2（gMFI）
1500
1400
1300
1200
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77 + SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 18
SEQ ID NO: 47 x SEQ ID NO: 13

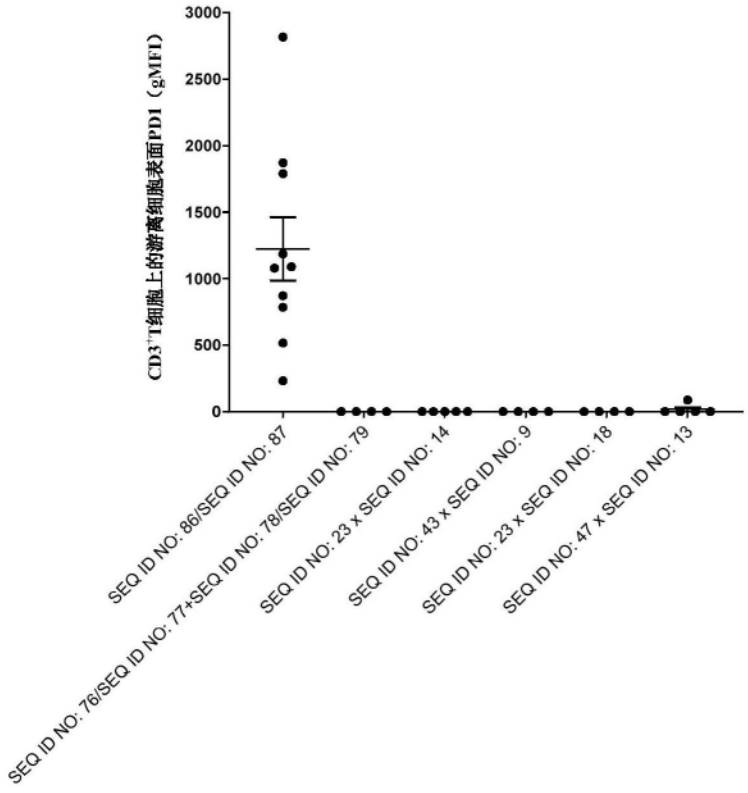

CD3+T细胞上的游离细胞表面PD1（gMFI）
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77+SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 18
SEQ ID NO: 47 x SEQ ID NO: 13

图9(续)

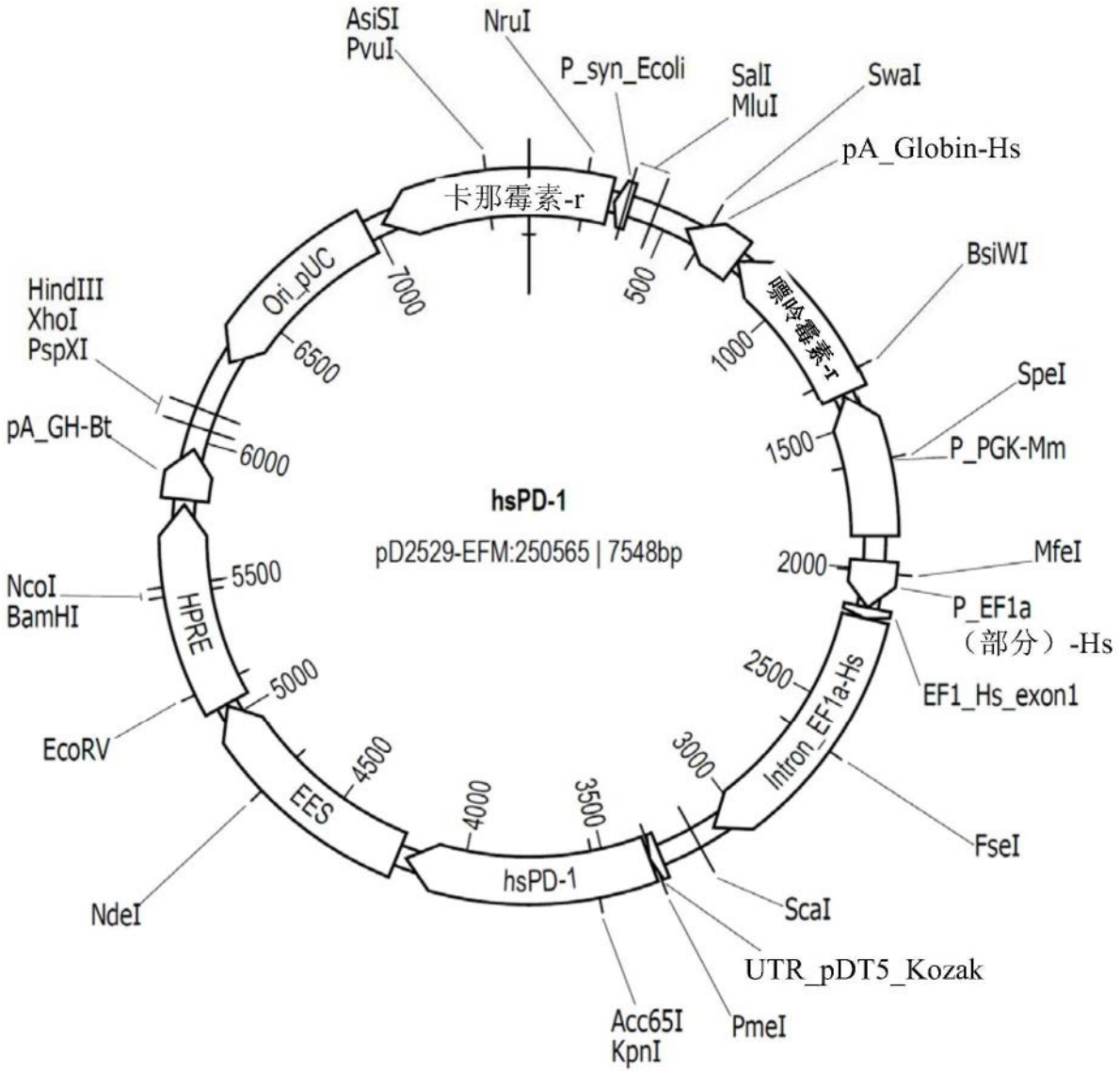

AsiSI
PvuI
NruI
P_syn_Ecoli
SalI
MluI
SwaI
pA_Globin-Hs
BsiWI
SpeI
P_PGK-Mm
MfeI
P_EF1a
（部分）-Hs
EF1_Hs_exon1
FseI
ScaI
UTR_pDT5_Kozak
PmeI
Acc65I
KpnI
NdeI
EcoRV
NcoI
BamHI
HindIII
XhoI
PspXI
pA_GH-Bt
卡那霉素-r
嘌呤霉素-r
Intron_EF1a-Hs
hsPD-1
EES
HPRE
Ori_pUC
hsPD-1
pD2529-EFM:250565 | 7548bp
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
4500
5000
5500
6000
6500
7000

图10

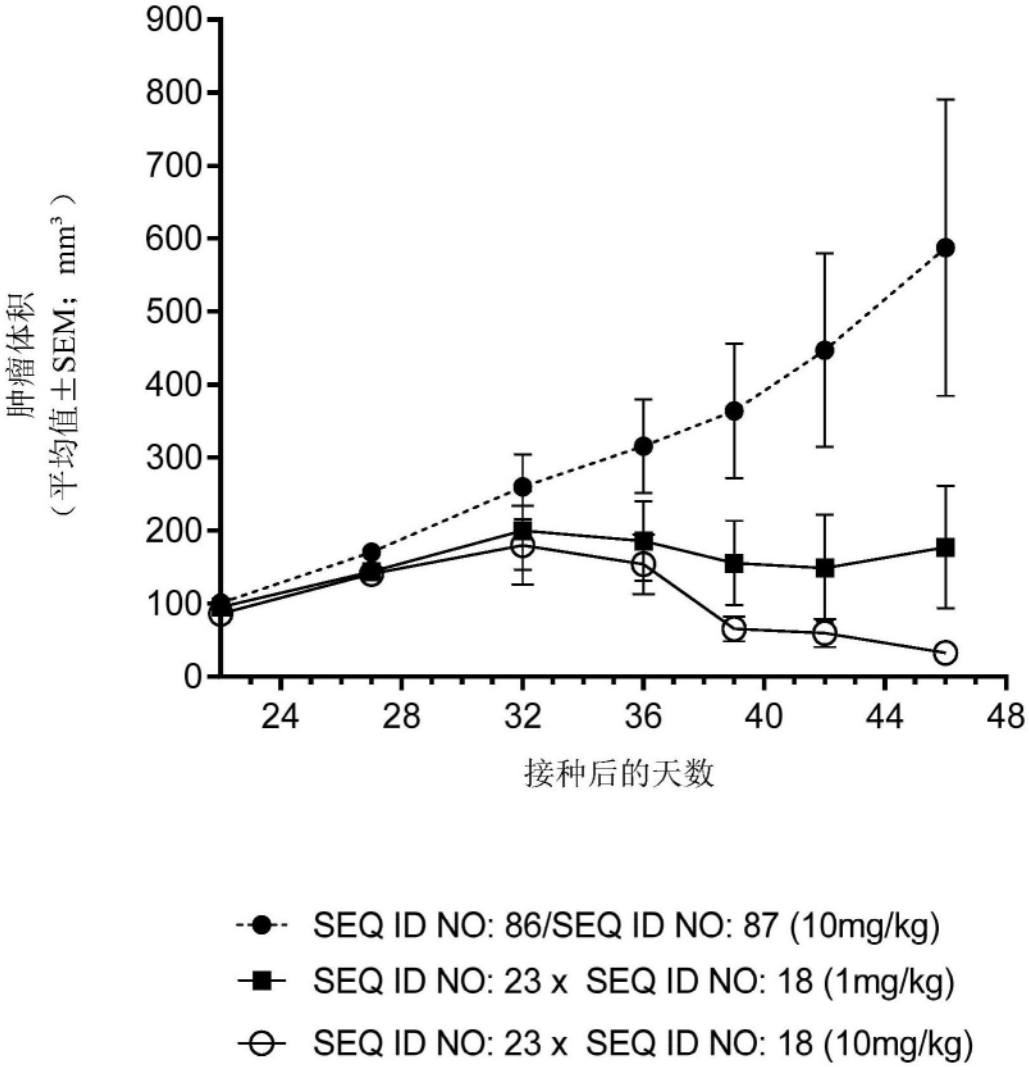

肿瘤体积
（平均值±SEM；mm³）
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
24
28
32
36
40
44
48
接种后的天数
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87 (10mg/kg)
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 18 (1mg/kg)
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 18 (10mg/kg)

图11