(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119947749 A
(43)申请公布日 2025.05.06

(21)申请号 202380060610.8
(22)申请日 2023.08.25
(30)优先权数据
63/401,086 2022.08.25 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.02.18
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/072884 2023.08.25
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/044732 EN 2024.02.29
(71)申请人 百立特生物制药有限公司
地址 美国特拉华州
(72)发明人 杨明 钟鸿雁 李协兴 郭文中
(74)专利代理机构 北京植众德本知识产权代理有限公司 16083
专利代理师 关巍 刘振佳
(51)Int.Cl.
*A61K 39/39*(2006.01)
*A61P 37/02*(2006.01)
*C07K 16/22*(2006.01)
*C07K 16/28*(2006.01)
*C07K 16/32*(2006.01)

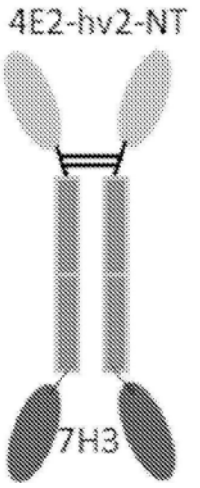
权利要求书9页 说明书67页
序列表（电子公布） 附图37页

(54)发明名称

# 多特异性抗体及其用途

(57)摘要

本公开涉及多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其抗原结合片段。一方面,所述多特异性抗体或其抗原结合片段与PD-L1和/或VEGF或其组合结合。更具体地讲,所述抗体或抗原结合片段包含序列指定的重链可变区和轻链可变区,所述序列指定的重链可变区和轻链可变区分别进一步包含序列指定的CDR 1、2和3。




4E2_Fc_7H3

CN 119947749 A

1.一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段与程序性死亡配体1(PD-L1)结合,所述抗体或其抗原结合片段包含:

重链抗体可变结构域(VHH),所述VHH包含互补决定区(CDR)1、2和3,其中所述VHH CDR1区包含与所选VHH CDR1氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,所述VHH CDR2区包含与所选VHH CDR2氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,并且所述VHH CDR3区包含与所选VHH CDR3氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列;

其中所述所选VHH CDR 1、2和3氨基酸序列如以下中的一者中所述:

(1)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:96、97和98中示出;

(2)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:99、100和101中示出;

(3)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:102、103和104中示出;

(4)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:105、106和107中示出;

(5)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:108、109和110中示出;

(6)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:111、112和113中示出;

(7)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:114、115和116中示出;

(8)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:117、118和119中示出;

(9)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:120、121和122中示出;

(10)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:123、124和125中示出;

(11)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:126、127和128中示出;

(12)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:129、130和131中示出;

(13)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:132、133和134中示出;

(14)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:135、136和137中示出;

(15)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:138、139和140中示出;

(16)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:141、142和143中示出;

(17)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:144、145和146中示出;

(18)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:147、148和149中示出;

(19)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:150、151和152中示出;

(20)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:153、154和155中示出;

(21)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:156、157和158中示出;

(22)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:159、160和161中示出;

(23)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:162、163和164中示出;

(24)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:165、166和167中示出;

(25)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:168、169和170中示出;

(26)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:171、172和173中示出;

(27)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:174、175和176中示出;

(28)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:177、178和179中示出;

(29)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:180、181和182中示出;以及

(30)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:183、184和185中示出。

2.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VHH包含具有分别在SEQ ID

NO:183、184和185中示出的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

3.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VHH包含具有分别在SEQ ID NO:171、172和173中示出的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

4.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VHH包含具有分别在SEQ ID NO:177、178和179中示出的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

5.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VHH包含具有分别在SEQ ID NO:180、181和182中示出的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

6.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VHH包含具有分别在SEQ ID NO:132、133和134中示出的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

7.一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段与PD-L1结合,所述抗体或其抗原结合片段包含重链抗体可变结构域(VHH),所述VHH包含与所选VHH序列至少80%相同的氨基酸序列,其中所述所选VHH序列选自由SEQ ID NO:1-80组成的组。

8.根据权利要求8所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VHH包含SEQ ID NO:79的序列。

9.根据权利要求8所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VHH包含SEQ ID NO:60的序列。

10.根据权利要求8所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VHH包含SEQ ID NO:68的序列。

11.根据权利要求8所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VHH包含SEQ ID NO:74的序列。

12.根据权利要求8所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VHH包含SEQ ID NO:78的序列。

13.根据权利要求8所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VHH包含SEQ ID NO:33的序列。

14.根据权利要求1至13中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段与PD-L1特异性结合。

15.根据权利要求1至14中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是人源化抗体或其抗原结合片段。

16.一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含根据权利要求1至15中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的所述VHH CDR 1、2、3。

17.根据权利要求1至16中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含人IgG Fc。

18.根据权利要求1至17中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含两个或更多个重链抗体可变结构域。

19.一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段与根据权利要求1至18中任一项所述的抗体或其抗原结合片段交叉竞争。

20.一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段与VEGF(血管内皮生长因子)结合,所述抗体或其抗原结合片段包含:

重链抗体可变结构域(VHH),所述VHH包含互补决定区(CDR)1、2和3,其中所述VHH CDR1

区包含与所选VHH CDR1氨基酸序列至少80％相同的氨基酸序列,所述VHH CDR2区包含与所选VHH CDR2氨基酸序列至少80％相同的氨基酸序列,并且所述VHH CDR3区包含与所选VHH CDR3氨基酸序列至少80％相同的氨基酸序列;

其中所述所选VHH CDR 1、2和3氨基酸序列如以下中的一者中所述:

(1)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:186、187和188中示出;

(2)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:189、190和191中示出;

(3)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:192、193和194中示出;以及

(4)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:195、196和197中示出。

21.根据权利要求20所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VHH包含具有分别在SEQ ID NO:186、187和188中示出的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

22.根据权利要求20所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VHH包含具有分别在SEQ ID NO:189、190和191中示出的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

23.根据权利要求20所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VHH包含具有分别在SEQ ID NO:192、193和194中示出的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

24.根据权利要求20所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VHH包含具有分别在SEQ ID NO:195、196和197中示出的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

25.一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段与VEGF结合,所述抗体或其抗原结合片段包含重链抗体可变结构域(VHH),所述VHH包含与所选VHH序列至少80％相同的氨基酸序列,其中所述所选VHH序列选自由SEQ ID NO:81-84组成的组。

26.根据权利要求25所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VHH包含SEQ ID NO:81的序列。

27.根据权利要求25所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VHH包含SEQ ID NO:82的序列。

28.根据权利要求25所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VHH包含SEQ ID NO:83的序列。

29.根据权利要求25所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VHH包含SEQ ID NO:84的序列。

30.根据权利要求20至29中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段与VEGF特异性结合。

31.根据权利要求20至30中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是人源化抗体或其抗原结合片段。

32.一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包括根据权利要求20至31中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的所述VHH CDR 1、2、3。

33.根据权利要求20至32中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含人IgG Fc。

34.根据权利要求20至33中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含两个或更多个重链抗体可变结构域。

35.一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段与根据权利要求20至34中任一项所述的抗体或其抗原结合片段交叉竞争。

36.一种多特异性抗体或其抗原结合片段,所述多特异性抗体或其抗原结合片段包含与VEGF特异性结合的第一VHH(VHH1)、与PD-L1特异性结合的第二VHH(VHH2)。

37.根据权利要求36所述的多特异性抗体或其抗原结合片段,所述多特异性抗体或其抗原结合片段进一步包含与VEGF特异性结合的第三VHH(VHH3)和与PD-L1特异性结合的第四VHH(VHH4)。

38.根据权利要求36或37所述的多特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述VHH1和/或所述VHH3包含互补决定区(CDR)1、2和3,其中所述CDR1区包含与所选CDR1氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,所述CDR2区包含与所选CDR2氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,并且所述CDR3区包含与所选CDR3氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列;其中所述所选CDR 1、2和3氨基酸序列在图28中列出。

39.根据权利要求36至38中任一项所述的多特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述VHH1和/或所述VHH3包含与所选VHH序列至少80%相同的氨基酸序列,其中所述所选VHH序列选自由SEQ ID NO:1-80组成的组。

40.根据权利要求36至39中任一项所述的多特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述VHH2和/或所述VHH4包含互补决定区(CDR)1、2和3,其中所述CDR1区包含与所选CDR1氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,所述CDR2区包含与所选CDR2氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,并且所述CDR3区包含与所选CDR3氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列;其中所述所选CDR 1、2和3氨基酸序列在图29中列出。

41.根据权利要求36至40中任一项所述的多特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述VHH3和所述VHH4包含与所选VHH序列至少80%相同的氨基酸序列,其中所述所选VHH序列选自由SEQ ID NO:81-84组成的组。

42.根据权利要求36至41中任一项所述的多特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述多特异性抗体或其抗原结合片段包含人IgG Fc。

43.根据权利要求36至42中任一项所述的多特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述VHH1和所述VHH3与所述人IgG Fc的N末端或C末端连接。

44.根据权利要求36至43中任一项所述的多特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述VHH2和所述VHH4与所述人IgG Fc的N末端或C末端连接。

45.一种多肽复合物,其包含

(a)第一多肽,所述第一多肽从N末端到C末端包含:第一重链抗体可变结构域(VHH1)、第一铰链区、第一Fc区和第二VHH(VHH2);以及

(b)第二多肽,所述第二多肽从N末端到C末端包含:第三VHH(VHH3)、第二铰链区、第二Fc区和第四VHH(VHH4),

其中所述VHH1和所述VHH3与PD-L1特异性结合,并且所述VHH2和所述VHH4与VEGF特异性结合。

46.根据权利要求45所述的多肽复合物,其中所述第一多肽包含与SEQ ID NO:85、89、90、91、92、93或95至少80%相同的序列;和/或其中所述第二多肽包含与SEQ ID NO:85、89、90、91、92、93或95至少80%相同的序列。

47.根据权利要求45或46所述的多肽复合物,其中所述VHH2通过第一接头肽序列与所述第一Fc区的C末端连接。

48.根据权利要求45至47中任一项所述的多肽复合物,其中所述VHH4通过第二接头肽序列与所述第二Fc区的C末端连接。

49.根据权利要求47或48所述的多肽复合物,其中所述第一接头肽序列和/或所述第二接头肽序列与SEQ ID NO:202或203至少80%相同。

50.一种多肽复合物,其包含

(a)第一多肽,所述第一多肽从N末端到C末端包含:VHH1、VHH2、第一铰链区、第一Fc区;以及

(b)第二多肽,所述第二多肽从N末端到C末端包含:VHH3、VHH4、第二铰链区和第二Fc区,

其中所述VHH1和所述VHH3与PD-L1特异性结合,并且所述VHH2和所述VHH4与VEGF特异性结合。

51.根据权利要求50所述的多肽复合物,其中所述VHH1通过第一接头肽序列与所述VHH2的N末端连接。

52.根据权利要求50或51所述的多肽复合物,其中所述VHH3通过第二接头肽序列与所述VHH4的N末端连接。

53.根据权利要求50至52中任一项所述的多肽复合物,其中所述第一多肽包含与SEQ ID NO:86或94至少80%相同的序列;和/或其中所述第二多肽包含与SEQ ID NO:86或94至少80%相同的序列。

54.根据权利要求51至53中任一项所述的多肽复合物,其中权利要求47或48的,其中所述第一接头肽序列和/或所述第二接头肽序列与SEQ ID NO:202或203至少80%相同。

55.一种多肽复合物,其包含

(a)第一多肽,所述第一多肽从N末端到C末端包含:VHH2、VHH1、第一铰链区、第一Fc区;以及

(b)第二多肽,所述第二多肽从N末端到C末端包含:VHH4、VHH3、第二铰链区和第二Fc区,

其中所述VHH1和所述VHH3与PD-L1特异性结合,并且所述VHH2和所述VHH4与VEGF特异性结合。

56.根据权利要求55所述的多肽复合物,其中所述VHH2通过第一接头肽序列与所述VHH1的N末端连接。

57.根据权利要求55或56所述的多肽复合物,其中所述VHH4通过第二接头肽序列与所述VHH3的N末端连接。

58.根据权利要求55至57中任一项所述的多肽复合物,其中所述第一多肽包含与SEQ ID NO:87至少80%相同的序列;和/或其中所述第二多肽包含与SEQ ID NO:87至少80%相同的序列。

59.根据权利要求56至58中任一项所述的多肽复合物,其中所述第一接头肽序列和/或所述第二接头肽序列与SEQ ID NO:202或203至少80%相同。

60.一种多肽复合物,其包含

(a)第一多肽,所述第一多肽从N末端到C末端包含:VHH2、第一铰链区、第一Fc区和VHH1;以及

(b)第二多肽,所述第二多肽从N末端到C末端包含:VHH4、第二铰链区、第二Fc区和VHH3,

其中所述VHH1和所述VHH3与PD-L1特异性结合,并且所述VHH2和所述VHH4与VEGF特异性结合。

61.根据权利要求60所述的多肽复合物,其中所述第一多肽包含与SEQ ID NO:88至少80%相同的序列;和/或其中所述第二多肽包含与SEQ ID NO:88至少80%相同的序列。

62.根据权利要求60或61所述的多肽复合物,其中所述VHH1通过第一接头肽序列与所述第一Fc区的C末端连接。

63.根据权利要求60至62中任一项所述的多肽复合物,其中所述VHH3通过第二接头肽序列与所述第二Fc区的C末端连接。

64.根据权利要求62或63所述的多肽复合物,其中所述第一接头肽序列和/或所述第二接头肽序列与SEQ ID NO:202或203至少80%相同。

65.根据权利要求45至64中任一项所述的多肽复合物,其中所述VHH1和/或所述VHH3包含互补决定区(CDR)1、2和3,其中所述CDR1区包含与所选CDR1氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,所述CDR2区包含与所选CDR2氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,并且所述CDR3区包含与所选CDR3氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列;其中所述所选CDR 1、2和3氨基酸序列在图28中列出。

66.根据权利要求45至65中任一项所述的多肽复合物,其中所述VHH1和/或所述VHH3包含与所选VHH序列至少80%相同的氨基酸序列,其中所述所选VHH序列选自由SEQ ID NO:1-80组成的组。

67.根据权利要求45至66中任一项所述的多肽复合物,其中所述VHH2和/或所述VHH4包含互补决定区(CDR)1、2和3,其中所述CDR1区包含与所选CDR1氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,所述CDR2区包含与所选CDR2氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,并且所述CDR3区包含与所选CDR3氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列;其中所述所选CDR 1、2和3氨基酸序列在图29中列出。

68.根据权利要求45至67中任一项所述的多肽复合物,其中所述VHH2和/或所述VHH4包含与所选VHH序列至少80%相同的氨基酸序列,其中所述所选VHH序列选自由SEQ ID NO:81-84组成的组。

69.一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段与程序性死亡配体1(PD-L1)结合,所述抗体或其抗原结合片段包含:

重链抗体可变结构域(VHH),所述VHH包含互补决定区(CDR)1、2和3,其中所述VHH CDR1区包含与所选VHH CDR1氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,所述VHH CDR2区包含与所选VHH CDR2氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,并且所述VHH CDR3区包含与所选VHH CDR3氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,其中所述所选VHH CDR 1、2和3氨基酸序列如以下中的一者中所述:

(1)所述所选VHH CDR3是$NARX_1TTIY$(SEQ ID NO:198),其中

$X_1$=K、T或R;所述所选VHH CDR1选自由以下组成的组:SEQ ID NO:

96、99、102、105、108、111、126和129;并且所述所选VHH CDR2选自由以下组成的组:SEQ ID NO:97、100、103、106、109、112、127和130;

(2)所述所选VHH CDR3是NALVW$X_2$GSSYNN(SEQ ID NO:199),其中$X_2$=Q、T、S或N;所述所选VHH CDR1选自由以下组成的组:SEQ ID NO:114、117、120、123、168、171、174、177、180和183;并且所述所选VHH CDR2选自由以下组成的组:SEQ ID NO:115、118、121、124、169、172、175、178、181和184;并且

(3)所述所选VHH CDR3选自由以下组成的组:SEQ ID NO:134、137、140、143、146、149、152、155、158、161、164和167;所述所选VHH CDR1选自由以下组成的组:SEQ ID NO:132、135、138、141、144、147、150、153、156、159、162和165;并且所述所选VHH CDR2选自由以下组成的组:SEQ ID NO:133、136、139、142、145、148、151、154、157、160、163和166。

70.根据权利要求69所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述所选VHH CDR 1、2和3氨基酸序列如以下中的一者中所述:

(1)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:96、97和98中示出;

(2)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:99、100和101中示出;

(3)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:102、103和104中示出;

(4)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:105、106和107中示出;

(5)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:108、109和110中示出;

(6)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:111、112和113中示出;

(7)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:114、115和116中示出;

(8)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:117、118和119中示出;

(9)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:120、121和122中示出;

(10)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:123、124和125中示出;

(11)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:126、127和128中示出;

(12)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:129、130和131中示出;

(13)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:132、133和134中示出;

(14)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:135、136和137中示出;

(15)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:138、139和140中示出;

(16)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:141、142和143中示出;

(17)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:144、145和146中示出;

(18)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:147、148和149中示出;

(19)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:150、151和152中示出;

(20)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:153、154和155中示出;

(21)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:156、157和158中示出;

(22)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:159、160和161中示出;

(23)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:162、163和164中示出;

(24)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:165、166和167中示出;

(25)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:168、169和170中示出;

(26)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:171、172和173中示出;

(27)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:174、175和176中示出;

(28)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:177、178和179中示出;

(29)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:180、181和182中示出;以

及

(30)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:183、184和185中示出。

71.一种核酸,其包含多核苷酸,所述多核苷酸编码根据权利要求1至35、69和70中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求36至44中任一项所述的多特异性抗体或其抗原结合片段或根据权利要求45至68中任一项所述的多肽复合物。

72.根据权利要求71所述的核酸,其中所述核酸是DNA(例如,cDNA)或RNA(例如,mRNA)。

73.一种载体,其包含根据权利要求71或72所述的核酸中的一种或多种核酸。

74.一种细胞,其包含根据权利要求73所述的载体。

75.根据权利要求74所述的细胞,其中所述细胞是CHO细胞。

76.一种细胞,其包含根据权利要求71或72所述的核酸中的一种或多种核酸。

77.一种产生抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包含

(c)在足以使根据权利要求74至76中任一项所述的细胞产生所述抗体或所述抗原结合片段的条件下培养所述细胞;以及

(d)收集由所述细胞产生的所述抗体或所述抗原结合片段。

78.一种抗体药物缀合物,其包含根据权利要求1至35、69和70中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求36至44中任一项所述的多特异性抗体或其抗原结合片段或根据权利要求45至68中任一项所述的多肽复合物,所述抗体药物缀合物与治疗剂共价结合。

79.根据权利要求78所述的抗体药物缀合物,其中所述治疗剂是细胞毒性剂或细胞生长抑制剂。

80.一种治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包含向所述受试者施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含根据权利要求1至35、69和70中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求36至44中任一项所述的多特异性抗体或其抗原结合片段或根据权利要求45至68中任一项所述的多肽复合物或根据权利要求78或79所述的抗体药物缀合物。

81.根据权利要求80所述的方法,其中所述受试者患有表达PD-L1的癌症。

82.根据权利要求80或81所述的方法,其中所述受试者患有表达VEGF的癌症。

83.根据权利要求80至82中任一项所述的方法,其中所述癌症是结肠癌、直肠癌、肺癌、乳腺癌、肾癌(kidney cancer)、肝细胞癌、肾癌(renal cancer)、子宫内膜癌、胰腺癌、头颈癌或晚期实体瘤。

84.根据权利要求83所述的方法,其中所述癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)。

85.一种降低肿瘤生长速率的方法,所述方法包含

使肿瘤细胞与有效量的组合物接触,所述组合物包含根据权利要求1至35、69和70中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求36至44中任一项所述的多特异性抗体或其抗原结合片段或根据权利要求45至68中任一项所述的多肽复合物或根据权利要求78或79所述的抗体药物缀合物。

86.一种杀死肿瘤细胞的方法,所述方法包含

使肿瘤细胞与有效量的组合物接触,所述组合物包含根据权利要求1至35、69和70中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求36至44中任一项所述的多特异性抗体或其抗原结合片段或根据权利要求45至68中任一项所述的多肽复合物或根据权利要求78或

79所述的抗体药物缀合物。

87.一种药物组合物,其包含根据权利要求1至35、69和70中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求36至44中任一项所述的多特异性抗体或其抗原结合片段或根据权利要求45至68中任一项所述的多肽复合物或根据权利要求78或79所述的抗体药物缀合物,以及药学上可接受的载剂。

# 多特异性抗体及其用途

[0001] 相关申请交叉引用

[0002] 本公开要求于2022年8月25日提交的美国临时专利申请序列号63/401,086的优先权和权益,所述美国临时专利申请以引用方式整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有已经以电子方式提交作为命名为52501-0007WO1.xml的XML文件的序列表。创建于2023年8月22日的XML文件的大小为194,051字节。XML文件中的材料特此以引用方式整体并入。

## 技术领域

[0005] 本公开涉及多特异性抗体或其抗原结合片段。

## 背景技术

[0006] 多特异性抗体是可以与两个或更多个不同表位同时结合的人工蛋白质。这开辟了广泛的应用,包括将T细胞重定向到肿瘤细胞,同时阻断两个不同的信号传导途径,双重靶向不同疾病介体以及将有效载荷递送到靶向位点。卡妥索单抗(catumaxomab)(抗EpCAM和抗CD3)和博纳吐单抗(blinatumomab)(抗CD19和抗CD3)的批准已经成为多特异性抗体开发的重大里程碑。

[0007] 由于多特异性抗体具有各种应用,因此需要继续开发基于多特异性抗体的各种治疗剂。

## 发明内容

[0008] 本公开涉及抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段与PD-L1和/或VEGF或其组合特异性结合。在一些实施例中,本公开涉及靶向双特异性抗体的PD-L1/VEGF的开发。

[0009] 一方面,本公开涉及一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段与程序性死亡配体1(PD-L1)结合,所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0010] 重链抗体可变结构域(VHH),所述VHH包含互补决定区(CDR)1、2和3,其中所述VHH CDR1区包含与所选VHH CDR1氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,所述VHH CDR2区包含与所选VHH CDR2氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,并且所述VHH CDR3区包含与所选VHH CDR3氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列;

[0011] 其中所述所选VHH CDR 1、2和3氨基酸序列如以下中的一者中所述:

[0012] (1)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:96、97和98中示出;

[0013] (2)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:99、100和101中示出;

[0014] (3)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:102、103和104中示出;

[0015] (4)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:105、106和107中示出;

[0016] (5)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:108、109和110中示出;

[0017] (6)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:111、112和113中示出；

[0018] (7)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:114、115和116中示出；

[0019] (8)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:117、118和119中示出；

[0020] (9)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:120、121和122中示出；

[0021] (10)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:123、124和125中示出；

[0022] (11)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:126、127和128中示出；

[0023] (12)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:129、130和131中示出；

[0024] (13)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:132、133和134中示出；

[0025] (14)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:135、136和137中示出；

[0026] (15)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:138、139和140中示出；

[0027] (16)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:141、142和143中示出；

[0028] (17)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:144、145和146中示出；

[0029] (18)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:147、148和149中示出；

[0030] (19)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:150、151和152中示出；

[0031] (20)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:153、154和155中示出；

[0032] (21)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:156、157和158中示出；

[0033] (22)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:159、160和161中示出；

[0034] (23)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:162、163和164中示出；

[0035] (24)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:165、166和167中示出；

[0036] (25)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:168、169和170中示出；

[0037] (26)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:171、172和173中示出；

[0038] (27)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:174、175和176中示

出;

[0039] (28)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:177、178和179中示出;

[0040] (29)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:180、181和182中示出;以及

[0041] (30)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:183、184和185中示出。

[0042] 在一些实施例中,所述VHH包含具有分别在SEQ ID NO:183、184和185中示出的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

[0043] 在一些实施例中,所述VHH包含具有分别在SEQ ID NO:171、172和173中示出的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

[0044] 在一些实施例中,所述VHH包含具有分别在SEQ ID NO:177、178和179中示出的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

[0045] 在一些实施例中,所述VHH包含具有分别在SEQ ID NO:180、181和182中示出的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

[0046] 在一些实施例中,所述VHH包含具有分别在SEQ ID NO:132、133和134中示出的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

[0047] 一方面,本公开涉及一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段与PD-L1结合,所述抗体或其抗原结合片段包含重链抗体可变结构域(VHH),所述VHH包含与所选VHH序列至少80%相同的氨基酸序列,其中所述所选VHH序列选自由SEQ ID NO:1-80组成的组。

[0048] 在一些实施例中,所述VHH包含SEQ ID NO:79的序列。

[0049] 在一些实施例中,所述VHH包含SEQ ID NO:60的序列。

[0050] 在一些实施例中,所述VHH包含SEQ ID NO:68的序列。

[0051] 在一些实施例中,所述VHH包含SEQ ID NO:74的序列。

[0052] 在一些实施例中,所述VHH包含SEQ ID NO:78的序列。

[0053] 在一些实施例中,其中所述VHH包含SEQ ID NO:33的序列。

[0054] 在一些实施例中,所述抗体或抗原结合片段与PD-L1特异性结合。

[0055] 在一些实施例中,所述抗体或抗原结合片段是人源化抗体或其抗原结合片段。

[0056] 一方面,本公开涉及一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含本文所述的抗体或其抗原结合片段的所述VHH CDR 1、2、3。

[0057] 在一些实施例中,所述抗体或抗原结合片段包含人IgG Fc。

[0058] 在一些实施例中,所述抗体或抗原结合片段包含两个或更多个重链抗体可变结构域。

[0059] 一方面,本公开涉及一种抗体或其抗原结合片段,其与本文所述的抗体或其抗原结合片段交叉竞争。

[0060] 一方面,本公开涉及一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段与VEGF(血管内皮生长因子)结合,所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0061] 重链抗体可变结构域(VHH),所述VHH包含互补决定区(CDR)1、2和3,其中所述VHH

CDR1区包含与所选VHH CDR1氨基酸序列至少80％相同的氨基酸序列,所述VHH CDR2区包含与所选VHH CDR2氨基酸序列至少80％相同的氨基酸序列,并且所述VHH CDR3区包含与所选VHH CDR3氨基酸序列至少80％相同的氨基酸序列;

[0062] 其中所述所选VHH CDR 1、2和3氨基酸序列如以下中的一者中所述:

[0063] (1)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:186、187和188中示出;

[0064] (2)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:189、190和191中示出;

[0065] (3)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:192、193和194中示出;以及

[0066] (4)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:195、196和197中示出。

[0067] 在一些实施例中,所述VHH包含具有分别在SEQ ID NO:186、187和188中示出的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

[0068] 在一些实施例中,所述VHH包含具有分别在SEQ ID NO:189、190和191中示出的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

[0069] 在一些实施例中,所述VHH包含具有分别在SEQ ID NO:192、193和194中示出的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

[0070] 在一些实施例中,所述VHH包含具有分别在SEQ ID NO:195、196和197中示出的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

[0071] 一方面,本公开涉及一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段与VEGF结合,所述抗体或其抗原结合片段包含重链抗体可变结构域(VHH),所述VHH包含与所选VHH序列至少80％相同的氨基酸序列,其中所述所选VHH序列选自由SEQ ID NO:81-84组成的组。

[0072] 在一些实施例中,所述VHH包含SEQ ID NO:81的序列。

[0073] 在一些实施例中,所述VHH包含SEQ ID NO:82的序列。

[0074] 在一些实施例中,所述VHH包含SEQ ID NO:83的序列。

[0075] 在一些实施例中,所述VHH包含SEQ ID NO:84的序列。

[0076] 在一些实施例中,所述抗体或抗原结合片段与VEGF特异性结合。

[0077] 在一些实施例中,所述抗体或抗原结合片段是人源化抗体或其抗原结合片段。

[0078] 一方面,本公开涉及一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含本文所述的抗体或其抗原结合片段的所述VHH CDR 1、2、3。

[0079] 在一些实施例中,所述抗体或抗原结合片段包含人IgG Fc。

[0080] 在一些实施例中,所述抗体或抗原结合片段包含两个或更多个重链抗体可变结构域。

[0081] 一方面,本公开涉及一种抗体或其抗原结合片段,其与本文所述的抗体或其抗原结合片段交叉竞争。

[0082] 一方面,本公开涉及一种多特异性抗体或其抗原结合片段,所述多特异性抗体或其抗原结合片段包含与VEGF特异性结合的第一VHH(VHH1)、与PD-L1特异性结合的第二VHH(VHH2)。

[0083] 在一些实施例中,所述多特异性抗体或其抗原结合片段进一步包含与VEGF特异性结合的第三VHH(VHH3)和与PD-L1特异性结合的第四VHH(VHH4)。

[0084] 在一些实施例中,所述VHH1和/或所述VHH3包含互补决定区(CDR)1、2和3,其中所述CDR1区包含与所选CDR1氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,所述CDR2区包含与所选CDR2氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,并且所述CDR3区包含与所选CDR3氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列;其中所述所选CDR 1、2和3氨基酸序列在图28中列出。

[0085] 在一些实施例中,所述VHH1和/或所述VHH3包含与所选VHH序列至少80%相同的氨基酸序列,其中所述所选VHH序列选自由SEQ ID NO:1-80组成的组。

[0086] 在一些实施例中,所述VHH2和/或所述VHH4包含互补决定区(CDR)1、2和3,其中所述CDR1区包含与所选CDR1氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,所述CDR2区包含与所选CDR2氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,并且所述CDR3区包含与所选CDR3氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列;其中所述所选CDR 1、2和3氨基酸序列在图29中列出。

[0087] 在一些实施例中,所述VHH3和所述VHH4包含与所选VHH序列至少80%相同的氨基酸序列,其中所述所选VHH序列选自由SEQ ID NO:81-84组成的组。

[0088] 在一些实施例中,所述多特异性抗体或其抗原结合片段包含人IgG Fc。

[0089] 在一些实施例中,所述VHH1和所述VHH3与所述人IgG Fc的N末端或C末端连接。

[0090] 在一些实施例中,所述VHH2和所述VHH4与所述人IgG Fc的N末端或C末端连接。

[0091] 一方面,本公开涉及一种多肽复合物,其包含

[0092] (a)第一多肽,所述第一多肽从N末端到C末端包含:第一重链抗体可变结构域(VHH1)、第一铰链区、第一Fc区和第二VHH(VHH2);以及

[0093] (b)第二多肽,所述第二多肽从N末端到C末端包含:第三VHH(VHH3)、第二铰链区、第二Fc区和第四VHH(VHH4),

[0094] 其中所述VHH1和所述VHH3与PD-L1特异性结合,并且所述VHH2和所述VHH4与VEGF特异性结合。

[0095] 在一些实施例中,所述第一多肽包含与SEQ ID NO:85、89、90、91、92、93或95至少80%相同的序列;和/或其中所述第二多肽包含与SEQ ID NO:85、89、90、91、92、93或95至少80%相同的序列。

[0096] 在一些实施例中,所述VHH2通过第一接头肽序列与所述第一Fc区的所述C末端连接。

[0097] 在一些实施例中,所述VHH4通过第二接头肽序列与所述第二Fc区的所述C末端连接。

[0098] 在一些实施例中,所述第一接头肽序列和/或所述第二接头肽序列与SEQ ID NO:202或203至少80%相同。

[0099] 一方面,本公开涉及一种多肽复合物,其包含

[0100] (a)第一多肽,所述第一多肽从N末端到C末端包含:VHH1、VHH2、第一铰链区、第一Fc区;以及

[0101] (b)第二多肽,所述第二多肽从N末端到C末端包含:VHH3、VHH4、第二铰链区和第二Fc区,

[0102] 其中所述VHH1和所述VHH3与PD-L1特异性结合,并且所述VHH2和所述VHH4与VEGF特异性结合。

[0103] 在一些实施例中,所述VHH1通过第一接头肽序列与所述VHH2的所述N末端连接。

[0104] 在一些实施例中,所述VHH3通过第二接头肽序列与所述VHH4的所述N末端连接。

[0105] 在一些实施例中,所述第一多肽包含与SEQ ID NO:86或94至少80%相同的序列;和/或其中所述第二多肽包含与SEQ ID NO:86或94至少80%相同的序列。

[0106] 在一些实施例中,所述第一接头肽序列和/或所述第二接头肽序列与SEQ ID NO:202或203至少80%相同。

[0107] 一方面,本公开涉及一种多肽复合物,其包含

[0108] (a)第一多肽,所述第一多肽从N末端到C末端包含:VHH2、VHH1、第一铰链区、第一Fc区;以及

[0109] (b)第二多肽,所述第二多肽从N末端到C末端包含:VHH4、VHH3、第二铰链区和第二Fc区,

[0110] 其中所述VHH1和所述VHH3与PD-L1特异性结合,并且所述VHH2和所述VHH4与VEGF特异性结合。

[0111] 在一些实施例中,所述VHH2通过第一接头肽序列与所述VHH1的所述N末端连接。

[0112] 在一些实施例中,所述VHH4通过第二接头肽序列与所述VHH3的所述N末端连接。

[0113] 在一些实施例中,所述第一多肽包含与SEQ ID NO:87至少80%相同的序列;和/或其中所述第二多肽包含与SEQ ID NO:87至少80%相同的序列。

[0114] 在一些实施例中,所述第一接头肽序列和/或所述第二接头肽序列与SEQ ID NO:202或203至少80%相同。

[0115] 一方面,本公开涉及一种多肽复合物,其包含

[0116] (a)第一多肽,所述第一多肽从N末端到C末端包含:VHH2、第一铰链区、第一Fc区和VHH1;以及

[0117] (b)第二多肽,所述第二多肽从N末端到C末端包含:VHH4、第二铰链区、第二Fc区和VHH3,

[0118] 其中所述VHH1和所述VHH3与PD-L1特异性结合,并且所述VHH2和所述VHH4与VEGF特异性结合。

[0119] 在一些实施例中,所述第一多肽包含与SEQ ID NO:88至少80%相同的序列;和/或其中所述第二多肽包含与SEQ ID NO:88至少80%相同的序列。

[0120] 在一些实施例中,所述VHH1通过第一接头肽序列与所述第一Fc区的所述C末端连接。

[0121] 在一些实施例中,所述VHH3通过第二接头肽序列与所述第二Fc区的所述C末端连接。

[0122] 在一些实施例中,所述第一接头肽序列和/或所述第二接头肽序列与SEQ ID NO:202或203至少80%相同。

[0123] 在一些实施例中,所述VHH1和/或所述VHH3包含互补决定区(CDR)1、2和3,其中所述CDR1区包含与所选CDR1氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,所述CDR2区包含与所选CDR2氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,并且所述CDR3区包含与所选CDR3氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列;其中所述所选CDR 1、2和3氨基酸序列在图28中列出。

[0124] 在一些实施例中,所述VHH1和/或所述VHH3包含与所选VHH序列至少80%相同的氨基酸序列,其中所述所选VHH序列选自由SEQ ID NO:1-80组成的组。

[0125] 在一些实施例中,所述VHH2和/或所述VHH4包含互补决定区(CDR)1、2和3,其中所述CDR1区包含与所选CDR1氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,所述CDR2区包含与所选CDR2氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,并且所述CDR3区包含与所选CDR3氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列;其中所述所选CDR 1、2和3氨基酸序列在图29中列出。

[0126] 在一些实施例中,所述VHH2和/或所述VHH4包含与所选VHH序列至少80%相同的氨基酸序列,其中所述所选VHH序列选自由SEQ ID NO:81-84组成的组。

[0127] 一方面,本公开涉及一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段与程序性死亡配体1(PD-L1)结合,所述抗体或其抗原结合片段包含:重链抗体可变结构域(VHH),所述VHH包含互补决定区(CDR)1、2和3,其中所述VHH CDR1区包含与所选VHH CDR1氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,所述VHH CDR2区包含与所选VHH CDR2氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,并且所述VHH CDR3区包含与所选VHH CDR3氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,其中所述所选VHH CDR 1、2和3氨基酸序列如以下中的一者中所述:

[0128] (1)所述所选VHH CDR3是NARX$_1$TTIY(SEQ ID NO:198),其中X$_1$=K、T或R;所述所选VHH CDR1选自由以下组成的组:SEQ ID NO:96、99、102、105、108、111、126和129;并且所述所选VHH CDR2选自由以下组成的组:SEQ ID NO:97、100、103、106、109、112、127和130;

[0129] (2)所述所选VHH CDR3是NALVWX$_2$GSSYNN(SEQ ID NO:199),其中X$_2$=Q、T、S或N;所述所选VHH CDR1选自由以下组成的组:SEQ ID NO:114、117、120、123、168、171、174、177、180和183;并且所述所选VHH CDR2选自由以下组成的组:SEQ ID NO:115、118、121、124、169、172、175、178、181和184;并且

[0130] (3)所述所选VHH CDR3选自由以下组成的组:SEQ ID NO:134、137、140、143、146、149、152、155、158、161、164和167;所述所选VHH CDR1选自由以下组成的组:SEQ ID NO:132、135、138、141、144、147、150、153、156、159、162和165;并且所述所选VHH CDR2选自由以下组成的组:SEQ ID NO:133、136、139、142、145、148、151、154、157、160、163和166。

[0131] 在一些实施例中,所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列如以下中的一者中所述:

[0132] (1)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:96、97和98中示出;

[0133] (2)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:99、100和101中示出;

[0134] (3)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:102、103和104中示出;

[0135] (4)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:105、106和107中示出;

[0136] (5)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:108、109和110中示出;

[0137] (6)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:111、112和113中示出;

[0138] (7)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:114、115和116中示出;

[0139] (8)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:117、118和119中示出;

[0140] (9)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:120、121和122中示出;

[0141] (10)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:123、124和125中示出;

[0142] (11)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:126、127和128中示出;

[0143] (12)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:129、130和131中示出;

[0144] (13)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:132、133和134中示出;

[0145] (14)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:135、136和137中示出;

[0146] (15)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:138、139和140中示出;

[0147] (16)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:141、142和143中示出;

[0148] (17)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:144、145和146中示出;

[0149] (18)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:147、148和149中示出;

[0150] (19)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:150、151和152中示出;

[0151] (20)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:153、154和155中示出;

[0152] (21)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:156、157和158中示出;

[0153] (22)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:159、160和161中示出;

[0154] (23)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:162、163和164中示出;

[0155] (24)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:165、166和167中示出;

[0156] (25)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:168、169和170中示出;

[0157] (26)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:171、172和173中示出;

[0158] (27)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:174、175和176中示出;

[0159] (28)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:177、178和179中示出;

[0160] (29)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:180、181和182中示出;以及

[0161] (30)所述所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:183、184和185中示出。

[0162] 一方面,本公开涉及一种核酸,其包含多核苷酸,所述多核苷酸编码本文所述的抗体或其抗原结合片段、本文所述的多特异性抗体或其抗原结合片段或本文所述的多肽复合物。

[0163] 在一些实施例中,所述核酸是DNA(例如,cDNA)或RNA(例如,mRNA)。

[0164] 一方面,本公开涉及一种载体,其包含本文所述的核酸中的一种或多种核酸。

[0165] 一方面,本公开涉及一种细胞,其包含本文所述的载体。

[0166] 在一些实施例中,所述细胞是CHO细胞。

[0167] 一方面,本公开涉及一种细胞,其包含本文所述的核酸中的一种或多种核酸。

[0168] 一方面,本公开涉及一种产生抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包含:

[0169] (a)在足以使本文所述的细胞产生所述抗体或所述抗原结合片段的条件下培养所述细胞;以及

[0170] (b)收集由所述细胞产生的所述抗体或所述抗原结合片段。

[0171] 一方面,本公开涉及一种抗体药物缀合物,其包含本文所述的抗体或其抗原结合片段、本文所述的多特异性抗体或其抗原结合片段或本文所述的多肽复合物,所述抗体药物缀合物与治疗剂共价结合。

[0172] 在一些实施例中,所述治疗剂是细胞毒性剂或细胞生长抑制剂。

[0173] 一方面,本公开涉及一种治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包含向所述受试者施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含本文所述的抗体或其抗原结合片段、本文所述的多特异性抗体或其抗原结合片段或本文所述的多肽复合物或本文所述的抗体药物缀合物。

[0174] 在一些实施例中,所述受试者患有表达PD-L1的癌症。

[0175] 在一些实施例中,所述受试者患有表达VEGF的癌症。

[0176] 在一些实施例中,癌症是结肠癌、直肠癌、肺癌、乳腺癌、肾癌(kidney cancer)、肝细胞癌、肾癌(renal cancer)、子宫内膜癌、胰腺癌、头颈癌或晚期实体瘤。

[0177] 在一些实施例中,所述癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)。

[0178] 一方面,本公开涉及一种降低肿瘤生长速率的方法,所述方法包含使肿瘤细胞与有效量的组合物接触,所述组合物包含本文所述的抗体或其抗原结合片段、本文所述的多特异性抗体或其抗原结合片段或本文所述的多肽复合物或本文所述的抗体药物缀合物。

[0179] 一方面,本公开涉及一种杀死肿瘤细胞的方法,所述方法包含使肿瘤细胞与有效量的组合物接触,所述组合物包含本文所述的抗体或其抗原结合片段、本文所述的多特异性抗体或其抗原结合片段或本文所述的多肽复合物或本文所述的抗体药物缀合物。

[0180] 一方面,本公开涉及一种药物组合物,其包含本文所述的抗体或其抗原结合片段、本文所述的多特异性抗体或其抗原结合片段或本文所述的多肽复合物或本文所述的抗体药物缀合物,以及药学上可接受的载剂。

[0181] 一方面,本公开提供了一种与PD-L1特异性结合的抗体或其抗原结合片段。一方面,本公开提供了一种与VEGF特异性结合的抗体或其抗原结合片段。

[0182] 如本文所用,术语“抗体”是指含有至少一个(例如,一个、两个、三个、四个、五个或六个)互补决定区(CDR)(例如,来自免疫球蛋白轻链的三个CDR中的任何CDR或来自免疫球蛋白重链的三个CDR中的任何CDR)并且能够与抗原中的表位特异性结合的任何抗原结合分子。抗体的非限制性实例包括:单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、单链抗体、单可变结构域(VHH)抗体、嵌合抗体、人抗体和人源化抗体。在一些实施例中,抗体可以含有人抗体的Fc区。术语抗体还包括由这些抗体或抗体片段形成的衍生物,例

如,多特异性抗体、双特异性抗体、单链抗体、双功能抗体和线性抗体。

[0183] 如本文所用,术语“抗原结合片段”是指全长抗体的一部分,其中所述抗体的所述部分能够与抗原特异性地结合。在一些实施例中,抗原结合片段含有至少一个可变结构域(例如,重链的可变结构域或轻链的可变结构域或VHH)。抗体片段的非限制性实例包括例如Fab、Fab’、F(ab’)2和Fv片段、ScFv以及VHH。

[0184] 如本文所用,术语“受试者”和“患者”在整个说明书中可互换使用,并且描述提供根据本发明的方法进行治疗的动物、人或非人。在本公开中设想了兽医应用和非兽医应用。人类患者可以是成年人或青少年(例如,年龄为18岁以下的人)。除了人之外,患者包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、兔子、雪貂、猫、狗和灵长类动物。包括例如非人灵长类动物(例如,猴子、黑猩猩、大猩猩等)、啮齿动物(例如,大鼠、小鼠、沙鼠、仓鼠、雪貂、兔子)、兔类动物、猪类动物(例如,猪、小型猪)、马、犬、猫、牛和其它家畜动物、农场动物和动物园动物。

[0185] 如本文所用,当提及抗体或抗原结合片段时,短语“特异性结合(specifically binding)”和“特异性结合(specifically binds)”是指抗体或抗原结合片段与其靶分子相互作用,优选地与其它分子相互作用,因为相互作用依赖于靶分子上特定结构(即抗原决定簇或表位)的存在;换句话说,试剂通常识别包括特定结构的分子而非所有分子,并且与所述分子结合。与靶分子特异性结合的抗体可以被称为靶标特异性抗体。例如,与VEGF特异性结合的抗体可以被称为VEGF特异性抗体或抗VEGF抗体。

[0186] 如本文所用,术语“双特异性抗体”是指与两个不同表位结合的抗体。所述表位可以在相同抗原上或在不同抗原上。

[0187] 如本文所用,术语“三特异性抗体”是指与三个不同表位结合的抗体。所述表位可以在相同抗原上或在不同抗原上。

[0188] 如本文所用,术语“多特异性抗体”是指与两个或更多个不同表位结合的抗体。所述表位可以在相同抗原上或在不同抗原上。多特异性抗体可以是例如双特异性抗体或三特异性抗体。在一些实施例中,多特异性抗体与两个、三个、四个、五个或六个不同表位。

[0189] 如本文所用,“VHH”是指仅重链抗体的重链的可变结构域及其变体。重链抗体是仅由两条重链组成但仍然可以与抗原特异性结合的抗体。在一些实施例中,VHH是人源化VHH。

[0190] 如本文所用,术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”可互换使用,是指具有至少两个氨基酸的任何长度的氨基酸聚合物。

[0191] 如本文所用,术语“多核苷酸”、“核酸分子”和“核酸序列”在本文中可互换使用,是指具有至少两个核苷酸的任何长度的核苷酸聚合物,并且包括但不限于DNA、RNA、DNA/RNA杂合体及其修饰。

[0192] 除非另有定义,否则本文所使用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属领域普通技术人员所通常理解的相同含义。本文描述了用于在本发明中使用的方法和材料;也可以使用本领域已知的其它合适的方法和材料。材料、方法和实例仅仅是说明性的,而不意图进行限制。本文提及的全部出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目和其它参考文献均全文以引用方式并入。在发生冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。

[0193] 根据以下具体实施方式和附图以及根据权利要求书,本发明的其它特征和优点将显而易见。

## 附图说明

[0194] 图1A示出了如通过流式细胞术测定确定的VHH二价抗体与人PD-L1(h-PD-L1)的全细胞结合(WCB)。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是AlexaFlour 488的中值荧光强度的值。阿特珠单抗(Atezo)是来自罗氏公司(Roche)的参考抗h-PD-L1抗体。1F4、5C12、6D2、4H8、6A10、1G4和6D1是抗人PD-L1 VHH-Fc克隆。

[0195] 图1B示出了如使用荧光素酶报告基因测定确定的先导二价抗体阻断人PD-L1活性的效力。在存在抗h-PD-L1 VHH-Fc抗体的情况下,将人PD-L1稳定转染的CHO细胞与PD1和NFAT报告基因稳定转染的Jurkat细胞一起培养。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是以相对发光单位表示的NFAT荧光素酶活性的值。KN035是来自康宁杰瑞公司(AlphaMab)的参考抗h-PD-L1抗体。1F4、5C12、6A10、6D2、4H8和6D1是抗h-PD-L1VHH-Fc克隆。

[0196] 图2示出了如通过流式细胞术测定确定的小鼠PD-L1 ELISA阳性VHH-Fc抗体与小鼠PD-L1(m-PD-L1)稳定转染的293T细胞的全细胞结合。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是AlexaFlour 488的中值荧光强度的值。阿特珠单抗(Atezo)是来自罗氏公司的参考抗m-PD-L1抗体。5F8、3H1、2A11、1C3、6D2和4H8是抗PD-L1 VHH-Fc克隆。

[0197] 图3A示出了5F8的人源化变体hv7和hv8以及3H1的hv7阻断人PD-L1的效力。KN035是阳性对照。效力(以nM为单位的EC50)也在附图下面的表中示出。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是以相对发光单位表示的NFAT荧光素酶活性的值。

[0198] 图3B示出了人源化变体及其亲本克隆与小鼠PD-L1的全细胞结合活性,如通过流式细胞术使用小鼠PD-L1稳定转染的293T细胞和抗人IgG Fc-AlexaFlour 488作为二级抗体确定的。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是中值荧光强度的值。阿特珠单抗(Atezo)是来自罗氏公司的参考对照抗体。

[0199] 图3C示出了如在表达内源性m-PD-L1的Hepa1-6细胞中确定的3H1-hv7和5F8-hv8与小鼠PD-L1的全细胞结合活性,其中抗人IgG Fc-AlexaFlour 488作为二级抗体。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是中值荧光强度的值。

[0200] 图4示出了所选高亲和力PD-L1克隆与T24细胞中的内源性表达的人PD-L1的全细胞结合,如用抗人IgG Fc-AlexaFlour 488作为二级抗体通过流式细胞术测定确定的。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是AlexaFlour 488的中值荧光强度的值。阿特珠单抗(Atezo)是来自罗氏公司的参考抗h-PD-L1抗体。KN035也是来自康宁杰瑞公司的参考抗h-PD-L1抗体。5C12、1F4、4D2、4E2和5F8是先导抗PD-L1 VHH-Fc克隆。

[0201] 图5A-5D示出了使用Agilent AdvanceBio SEC 300A 2.7um柱和Agilent1200HPLC得到的SEC-HPLC数据。以25毫升/分钟注射10ul浓度为约1-2mg/ml的蛋白质,在150mM磷酸钠缓冲液中进行SEC。图5A示出了5C12-亲本的数据。图5B示出了5C12-NS的数据。图5C示出了5C12-NT的数据。图5D示出了5C12-NQ的数据。

[0202] 图6A示出了5C12热点校正变体与h-PD-L1稳定转染的细胞中的人PD-L1的全细胞结合,如使用抗人IgG Fc-AlexaFlour 488作为二级抗体通过流式细胞术测定确定的。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是AlexaFlour 488的中值荧光强度的值。

[0203] 图6B示出了如使用荧光素酶报告基因测定确定的5C12热点校正变体阻断人PD-L1活性的效力。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是以相对发光单位表示的NFAT荧

光素酶活性的值。阿特珠单抗(Atezo)是来自罗氏公司的参考抗h-PD-L1抗体。

[0204] 图7A示出了5C12人源化变体与h-PD-L1稳定转染的细胞中的人PD-L1的全细胞结合,如使用抗人IgG Fc-AlexaFlour 488作为二级抗体通过流式细胞术测定确定的(示出了所选人源化变体的数据)。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是AlexaFlour 488的中值荧光强度的值。

[0205] 图7B示出了5C12 CDR3热点校正变体(N至T)和人源化变体与h-PD-L1稳定转染的细胞中的人PD-L1的全细胞结合,如使用抗人IgG Fc-AlexaFlour 488作为二级抗体通过流式细胞术测定确定的,示出了所选变体的数据。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是AlexaFlour 488的中值荧光强度的值。阿维鲁单抗(Avelumab)是来自辉瑞公司(Pfizer)的参考抗PD-L1抗体。

[0206] 图7C示出了5C12 CDR3热点校正变体(N至T)和人源化变体与NCI-H441肺肿瘤细胞的全细胞结合,如使用抗人IgG Fc-AlexaFlour 488作为二级抗体通过流式细胞术测定确定的,示出了所选变体的数据。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是AlexaFlour 488的中值荧光强度的值。阿维鲁单抗是来自辉瑞公司的参考抗PD-L1抗体。

[0207] 图7D示出了使用荧光素酶报告基因测定确定所选5C12 CDR3热点校正变体和人源化变体阻断人PD-L1活性的效力。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是以相对发光单位表示的NFAT荧光素酶活性的值。阿特珠单抗(Atezo)是来自罗氏公司的参考抗h-PD-L1抗体。

[0208] 图8A示出了1F4 CDR3热点校正变体和人源化变体与h-PD-L1稳定转染的细胞中的人PD-L1的全细胞结合,如使用抗人IgG Fc-AlexaFlour 488作为二级抗体通过流式细胞术测定确定的(示出了所选人源化变体的数据)。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是AlexaFlour 488的中值荧光强度的值。阿维鲁单抗是来自辉瑞公司的参考抗PD-L1抗体。

[0209] 图8B示出了如使用荧光素酶报告基因测定确定的所选1F4 CDR3热点校正变体和人源化变体阻断人PD-L1活性的效力。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是以相对发光单位表示的NFAT荧光素酶活性的值。

[0210] 图9A示出了4D2和4E2 CDR3热点校正变体和人源化变体与h-PD-L1稳定转染的细胞中的人PD-L1的全细胞结合,如使用抗人IgG Fc-AlexaFlour488作为二级抗体通过流式细胞术测定确定的(示出了所选变体的数据)。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是AlexaFlour 488的中值荧光强度的值。阿维鲁单抗是来自辉瑞公司的参考抗PD-L1抗体。

[0211] 图9B示出了4D2和4E2 CDR3热点校正变体和人源化变体与NCI-H441肺癌细胞的全细胞结合,如使用抗人IgG Fc-AlexaFlour 488作为二级抗体通过流式细胞术测定确定的(示出了所选变体的数据)。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是AlexaFlour 488的中值荧光强度的值。阿维鲁单抗是来自辉瑞公司的参考抗PD-L1抗体。

[0212] 图10示出了如使用荧光素酶报告基因测定确定的4D2和4E2 CDR3热点校正变体和人源化变体阻断人PD-L1活性的效力。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是以相对发光单位表示的NFAT荧光素酶活性的值。

[0213] 图11示出了先导抗VEGF克隆阻断人VEGFA介导的NFAT荧光素酶活性的效力,如使用KDR(VEGFR2)和NFAT荧光素酶报告基因稳定转染的细胞通过荧光素酶报告基因测定确定的。在存在50ng/ml的人VEGFA的情况下,将悬浮液中的稳定细胞与抗VEGF抗体的连续稀释

液一起温育4-5小时,通过添加具有底物的Bright-Glo荧光素酶测定缓冲液来确定荧光素酶活性,并通过读板器读取。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是以相对发光单位表示的NFAT荧光素酶活性的值。

[0214] 图12示出了先导抗VEGF克隆阻断小鼠VEGFA介导的NFAT荧光素酶活性的效力,如使用KDR(VEGFR2)和NFAT荧光素酶报告基因稳定转染的细胞通过荧光素酶报告基因测定确定的。在存在50ng/ml的小鼠VEGFA的情况下,将悬浮液中的稳定细胞与抗VEGF抗体的连续稀释液一起温育4-5小时,通过添加具有底物的Bright-Glo荧光素酶测定缓冲液来确定荧光素酶活性,并通过读板器读取。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是以相对发光单位表示的NFAT荧光素酶活性的值。

[0215] 图13A-13D示出了不同形式的BsAb构建体的示意图。

[0216] 图14A示出了如使用荧光素酶报告基因测定确定的不同形式的BsAb阻断人PD-L1活性的效力。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是以相对发光单位表示的NFAT荧光素酶活性的值。

[0217] 图14B示出了不同形式的BsAb阻断人VEGFA(VEGF165)的效力。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是以相对发光单位表示的NFAT荧光素酶活性的值。

[0218] 图15A-15F示出了如通过BLI结合测定确定的BsAb或单特异性Ab与h-PD-L1 ECD或h-VEGFA的双重结合能力。简单来说,传感器负载有300nM的抗体,然后浸入含有200nM h-PD-L1 ECD的重组蛋白(his-标记的)的溶液中,在130秒缔合后,移动传感器并将其浸入含有200nM h-VEGFA(VEGF165,his-标记的)的另一种溶液中。Y轴是以nm为单位的位移,X轴是以秒为单位的时间。

[0219] 图16A-16E示出了具有不同先导抗PD-L1克隆的BsAb构建体的示意图。

[0220] 图17A示出了先导BsAb及其亲本二价抗体在全细胞结合中与在T24肿瘤细胞中内源性表达的h-PD-L1的结合能力。

[0221] 图17B示出了如使用荧光素酶报告基因测定确定的先导BsAb及其亲本二价抗体阻断人PD-L1活性的效力。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是以相对发光单位表示的NFAT荧光素酶活性的值。

[0222] 图17C示出了如使用荧光素酶报告基因测定确定的先导BsAb阻断人VEGFA(VEGF165)的效力。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是以相对发光单位表示的NFAT荧光素酶活性的值。

[0223] 图18A-18B示出了两个先导替代BsAb构建体的示意图。

[0224] 图19A示出了如使用荧光素酶报告基因测定确定的两种不同形式的替代BsAb阻断小鼠VEGFA(VEGF164)的效力。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是以相对发光单位表示的荧光素酶活性的值。EC50值在每个附图下面示出。

[0225] 图19B示出了如使用荧光素酶报告基因测定确定的两种不同形式的替代BsAb阻断小鼠PD-L1的效力。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是以相对发光单位表示的荧光素酶活性的值。EC50值在每个附图下面示出。

[0226] 图20A示出了如针对经小鼠血清处理的样品使用荧光素酶报告基因测定确定的先导替代BsAb 3B9_Fc_7H3阻断小鼠PD-L1的效力。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是以相对发光单位表示的荧光素酶活性的值。EC50值在每个附图下面示出。

[0227] 图20B示出了如针对经小鼠血清处理的样品使用荧光素酶报告基因测定确定的先导替代BsAb 3B9_Fc_7H3阻断小鼠VEGFA的效力。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是以相对发光单位表示的荧光素酶活性的值。EC50值在每个附图下面示出。

[0228] 图21A示出了来自MC38同基因模型中的体内功效研究的肿瘤体积数据。X轴是处理天数。Y轴是肿瘤体积。

[0229] 图21B示出了来自MC38同基因模型中的体内功效研究的体重数据。X轴是处理天数。Y轴是体重变化%。

[0230] 图22示出了每只小鼠的单独肿瘤体积。X轴是处理后天数。Y轴是肿瘤体积。

[0231] 图23示出了先导BsAb与IMM2510在全细胞结合中与人PD-L1稳定转染的CHO细胞的比较。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是AlexaFlour 488的中值荧光强度的值。

[0232] 图24示出了先导BsAb与参考BsAb在阻断人PD-L1活性中的比较。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是以相对发光单位表示的NFAT荧光素酶活性的值。

[0233] 图25示出了先导BsAb与参考BsAb在阻断人VEGFA中的比较。X轴是以纳摩尔为单位的抗体浓度的值。Y轴是以相对发光单位表示的NFAT荧光素酶活性的值。

[0234] 图26A示出了来自MC38-PD-L1同基因小鼠模型中的体内功效研究的肿瘤体积数据。X轴是处理天数。Y轴是肿瘤体积。

[0235] 图26B示出了来自MC38-PD-L1同基因小鼠模型中的体内功效研究的体重数据。X轴是处理天数。Y轴是体重变化%。

[0236] 图27示出了每只小鼠的单独肿瘤体积。X轴是处理天数。Y轴是肿瘤体积。

[0237] 图28列出了在本公开中描述的PD-L1抗体的CDR序列。

[0238] 图29列出了在本公开中描述的VEGF抗体的CDR序列。

[0239] 图30列出了如在本公开中描述的VHH的氨基酸序列。

## 具体实施方式

[0240] 癌细胞已经发展出若干种机制来逃避宿主的免疫监视。例如,许多肿瘤或癌细胞在其表面上表达高水平的PD-L1和PD-L2,这两者与T细胞表面上的PD-1结合,从而诱导T细胞凋亡。

[0241] 另外,癌细胞的生长依赖于足够的营养供应。癌细胞本身可以分泌促进血管生长的因子,如血管上皮生长因子(VEGF)。抑制VEGF或其受体的活性将停止向实体瘤的血液供应,由此抑制其生长。

[0242] 本公开涉及抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段与PD-L1和/或VEGF或其组合特异性结合。在一些实施例中,本公开涉及靶向双特异性抗体的PD-L1/VEGF的开发。

[0243] PD-L1

[0244] 程序性死亡配体1(PD-L1或PDL1)是程序性死亡1(PD-1)的主要配体,一种可以在骨髓、淋巴、正常上皮细胞和癌症中组成性地表达或诱导的共抑制受体。在生理条件下,PD-1/PD-L1相互作用在防止可能导致组织破坏和自身免疫的过度免疫细胞活性的免疫耐受的发展中是至关重要的。PD-L1表达是各种恶性肿瘤所利用的免疫逃避机制,并且通常与较差的预后相关。PD-L1表达也被认为是对抗PD-1/PD-L1疗法的应答的预测性生物标志物;然

而,关于其在组织分型中的作用存在矛盾证据。多年来,通过在包括转移性肺癌、黑色素瘤等在内的许多恶性肿瘤中诱导持久的肿瘤消退,抗PD-1/PD-L1药剂作为新型抗癌治疗剂已经获得了发展势头。

[0245] PD-L1表达可以是组成型或诱导型的。可以在静息淋巴细胞、抗原呈递细胞(APC)以及角膜细胞、合体滋养层细胞和朗格汉斯氏岛细胞(Langerhans'islet cell)中发现组成型低水平PD-L1表达,其中所述PD-L1表达有助于促炎应答中的组织稳态。PD-L1赋予某些组织(如胎盘、睾丸和眼睛前房)'免疫特权'状态,其中接种外源性抗原是耐受的,而不会诱导炎性/免疫应答。

[0246] 在致癌作用中,PD-L1可能由于驱动致癌事件而过表达。表皮生长因子受体(EGFR)突变例如与肺癌中的PD-L1表达呈正相关,其中EGFR抑制剂用作PD-L1转录的阻遏物。在磷酸酶和张力蛋白同源物(PTEN)突变肿瘤中,PD-L1过表达通过PI3K/AKT途径的无限制激活来维持。在T细胞淋巴瘤中,核磷蛋白(NPM)/间变性淋巴瘤激酶(ALK)融合基因通过组成型STAT3激活上调PD-L1。

[0247] PD-L1的生物学功能取决于与PD-1(CD279)的结合,所述PD-1是由PDCD1基因编码并在淋巴细胞和骨髓细胞上生理学表达的288个氨基酸长的1型跨膜受体。PD-1由细胞外IgV样结构域和跨膜区组成。其细胞内尾部由基于酪氨酸的开关基序(ITSM)和基于免疫受体酪氨酸的抑制基序序列组成。在与PD-L1连接时,将含有磷酸酶1和2(SHP-1/SHP-2)的Src同源2结构域募集到ITSM导致信号传导激酶如CD3ζ、PKCθ和ZAP70的去磷酸化,从而导致T细胞扩增的整体抑制作用。此类抑制应答继发于PI3K-Akt和Ras-MEK-ERK级联的失活。酪蛋白激酶2是SHP-2的靶标。酪蛋白激酶2(CK-2)去磷酸化导致PTEN(一种生理PI3K-Akt信号传导拮抗剂)的无限制激活。PD-1对Ras-MEK-ERK级联的抑制效果主要取决于Ras的直接抑制和磷脂酶Cγ的去磷酸化。

[0248] 可以在以下文献中找到PD-L1及其功能的详细综述:(1)Kythreotou,Anthousa等人"PD-L1."《临床病理学杂志(Journal of clinical pathology)》71.3(2018):189-194;以及(2)Gong,Jun等人"PD-1和PD-L1抑制剂作为癌症免疫疗法的一种形式的发展:注册试验的全面综述和未来考虑因素(Development of PD-1and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy:a comprehensive review of registration trials and future considerations)".《癌症免疫疗法杂志(Journal for immunotherapy of cancer)》6.1(2018):1-18,所述文献中的每个文献以引用方式整体并入。

[0249] VEGF

[0250] VEGF是控制组织/伤口修复程序的关键的多效性生长因子,并且被分类为VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D和PIGF。在组织愈合过程期间,VEGF同时驱动新血管的形成(血管生成),同时下调免疫(Canic M等人血管内皮生长因子在伤口愈合中的作用(The role of vascular endothelial growth factor in wound healing).《外科研究杂志(J Surg Res)》.2009,153:347-358;Leung D W等人血管内皮生长因子是一种分泌型血管生成有丝分裂原(Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen).《科学(Science)》.1989,246:1306-1309;Voron T等人Control of the immune response by pro-angiogenic factors(促血管生成因子对免疫应答的控制).《肿瘤学前沿(Front Oncol)》.2014,4:70)。VEGF的这两个特性对于致瘤过程至关重要,因为所述特性能够促进

肿瘤血管的发育并遏制抗癌免疫(Manahan D,Weinberg RA.癌症的标志:下一代(Hallmarks of cancer:the next generation).《细胞(Cell)》.2011,144:646-674)。具体地,VEGF被认为通过三种关键机制发挥其免疫抑制作用:抑制DC成熟、减少T细胞肿瘤浸润和增加肿瘤微环境中的抑制细胞。异常VEGF表达还会导致其它疾病,包括类风湿性关节炎、糖尿病性视网膜病变、湿性年龄相关性黄斑变性和肾小球肥大。FDA批准的抗VEGF单克隆抗体药物阿瓦斯汀(Avastin)通过抑制VEGF的生物活性来治疗癌症(结肠癌、肺癌)。另一种靶向VEGF的蛋白质药物阿柏西普(Aflibercept)在美国和欧洲以商品名艾力雅(Eylea)获批用于治疗湿性黄斑变性,并以柔癌捕(Zaltrap)获批用于转移性结直肠癌。

[0251] 抗VEGF抗体减少植入免疫缺陷小鼠中的肿瘤细胞的生长的发现为靶向VEGF-VEGFR信号传导开辟了翻译可能性。另外,还证实了小鼠中vegfa基因的单个等位基因的失活导致血管发育缺陷和早期胚胎致死,从而强调了胚胎发育期间VEGF的重要性。vegfr2的两个拷贝的失活在很大程度上表型模拟了vegfa单等位基因缺失。随着cre-lox系统的出现,使靶组织中缺失VEGF的能力为评估VEGF在单个组织/细胞中的作用创造了可能性。采用此方法的许多研究已经证明了在各种病理生理情况下,VEGF在血管生成和稳态中的重要作用。

[0252] 由肿瘤细胞和周围基质分泌的VEGF刺激内皮细胞的增殖和存活,从而导致新血管的形成,所述新血管在结构上可能是异常的和渗漏的。VEGF mRNA在大多数人类肿瘤中过表达并且与侵袭性、血管密度、转移、复发和预后相关。已经设计了若干种抑制VEGF-VEGFR信号传导路径以治疗癌症的策略。

[0253] 可以在以下文献中找到VEGF及其功能的详细综述:(1)Apte等人“信号传导和疾病中的VEGF:超越发现和发展(VEGF in signaling and disease:beyond discovery and development)”.《细胞》176.6(2019):1248-1264;以及(2)Yang等人“靶向VEGF/VEGFR以调节抗肿瘤免疫(Targeting VEGF/VEGFR to modulate antitumor immunity)”.《免疫学前沿(Frontiers in Immunology)》9(2018):978,所述文献中的每个文献以引用方式整体并入。

[0254] 重链抗体可变结构域(VHH)

[0255] 单克隆抗体和重组抗体是医学和生物技术中的重要工具。与所有哺乳动物一样,骆驼科(例如,大羊驼和羊驼)可以产生由用二硫键以Y形状(例如,IgG1)结合在一起的两条重链和两条轻链构成的常规抗体。然而,骆驼科还产生两种独特的IgG亚类:IgG2和IgG3,也称为重链抗体。这些抗体由缺乏CH1区但仍在其N末端携带被称为VHH(或纳米抗体)的抗原结合结构域的仅两条重链构成。常规Ig需要来自重链和轻链两者的可变区的缔合,以允许抗原-抗体相互作用的高多样性。尽管分离的重链和轻链仍示出此能力,但是当与成对的重链和轻链相比时,其表现出非常低的亲和力。重链抗体的独特特征是其单体抗原结合区以特异性、亲和力和特别地多样性结合抗原的能力,其与不需要与另一和个区配对的常规抗体相当。此特征主要是由于两条重链的可变区的氨基酸序列内的一些主要变异,与常规Ig相比,这些变异诱导深层构象变化。可变区中的主要取代防止轻链与重链结合,但也防止未结合的重链被免疫球蛋白结合蛋白回收。

[0256] 这些抗体的单可变结构域(命名为VHH、sdAb、纳米抗体或重链抗体可变结构域)是由适应性免疫系统产生的最小抗原结合结构域。经常发现这些抗体的可变区的第三互补决

定区(CDR3)是常规抗体的两倍长。这使与抗原的相互作用表面增加并且抗原-抗体相互作用的多样性增加,这补偿了轻链的缺失。在长互补决定区3(CDR3)的情况下,VHH可以延伸到常规抗体无法到达的蛋白质裂隙中,包括功能上所关注的位点,如酶的活性位点或病毒表面上的受体结合峡谷。此外,另外的半胱氨酸残基使结构更加稳定,由此增加相互作用的强度。

[0257] 与携带VH和VL结构域的常规抗体相比,VHH提供了许多其它优势,包括更高的稳定性、溶解性、表达产率和重折叠能力以及更好的体内组织穿透性。此外,与常规抗体的VH结构域相比,VHH不显示与轻链结合的固有倾向。这有利于在存在功能性轻链基因座的情况下诱导重链抗体。进一步地,由于VHH不与VL结构域结合,因此将VHH重新格式化为多特异性抗体构建体比重新格式化为含有常规VH-VL对或基于VH结构域的单结构域的构建体容易得多。

[0258] 抗PD-L1抗体和抗原结合片段

[0259] 本公开提供了例如抗PD-L1抗体、其经修饰抗体、其嵌合抗体和其人源化抗体。本公开还提供了这些抗体的可变结构域(例如,VHH)。这些VHH可以用于如本文所述的各种多特异性抗体构建体中。

[0260] 在一些实施例中,R1-1C3和R1-1C3衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:96、97、98中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:1中示出。

[0261] 在一些实施例中,R2-1G4和R2-1G4衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:99、100、101中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:2中示出。

[0262] 在一些实施例中,R2-1A3和R2-1A3衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:102、103、104中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:3中示出。

[0263] 在一些实施例中,R2-3A5和R2-3A5衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:99、100、101中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:4中示出。

[0264] 在一些实施例中,R2-1G10和R2-1G10衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:96、97、98中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:5中示出。

[0265] 在一些实施例中,R2-6D2和R2-6D2衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:105、106、107中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:6中示出。

[0266] 在一些实施例中,R2-4H8和R2-4H8衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:108、109、110中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:7中示出。

[0267] 在一些实施例中,R2-6A10和R2-6A10衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:111、112、113中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:8中示出。

[0268] 在一些实施例中,R2-5C12和R2-5C12衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:114、115、116中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:9中示出。

[0269] 在一些实施例中,R2-1F4和R2-1F4衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:117、118、119中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:10中示出。

[0270] 在一些实施例中,R2-4D2和R2-4D2衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:120、121、122中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:11中示出。

[0271] 在一些实施例中,R2-4E2和R2-4E2衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:123、124、125中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:12中示出。

[0272] 在一些实施例中,R3-3H1和R3-3H1衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:126、127、128中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:13中示出。

[0273] 在一些实施例中,R3-5F8和R3-5F8衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:129、130、131中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:14中示出。

[0274] 在一些实施例中,R3-2A11和R3-2A11衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:99、100、101中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:15中示出。

[0275] 在一些实施例中,5F8-羊驼和5F8-羊驼衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:129、130、131中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:16中示出。

[0276] 在一些实施例中,5F8-hv1和5F8-hv1衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:129、130、131中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:17中示出。

[0277] 在一些实施例中,5F8-hv2和5F8-hv2衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:129、130、131中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:18中示出。

[0278] 在一些实施例中,5F8-hv3和5F8-hv3衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:129、130、131中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:19中示出。

[0279] 在一些实施例中,5F8-hv4和5F8-hv4衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:129、130、131中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:20中示出。

[0280] 在一些实施例中,5F8-hv5和5F8-hv5衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:129、130、131中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:21中示出。

[0281] 在一些实施例中,5F8-hv6和5F8-hv6衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:129、130、131中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:22中示出。

[0282] 在一些实施例中,5F8-hv7和5F8-hv7衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:129、130、131中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:23中示出。

[0283] 在一些实施例中,5F8-hv8和5F8-hv8衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:129、130、131中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:24中示出。

[0284] 在一些实施例中,3H1-羊驼和3H1-羊驼衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:126、127、128中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:25中示出。

[0285] 在一些实施例中,3H1-hv1和3H1-hv1衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:126、127、128中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:26中示出。

[0286] 在一些实施例中,3H1-hv2和3H1-hv2衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:126、127、128中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:27中示出。

[0287] 在一些实施例中,3H1-hv3和3H1-hv3衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:126、127、128中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:28中示出。

[0288] 在一些实施例中,3H1-hv4和3H1-hv4衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:126、127、128中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:29中示出。

[0289] 在一些实施例中,3H1-hv5和3H1-hv5衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:126、127、128中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:30中示出。

[0290] 在一些实施例中,3H1-hv6和3H1-hv6衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:126、127、128中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:31中示出。

[0291] 在一些实施例中,3H1-hv7和3H1-hv7衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:126、127、128中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:32中示出。

[0292] 在一些实施例中,3H1-3B9和3H1-3B9衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:132、133、134中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:33中示出。

[0293] 在一些实施例中,3H1-2A2和3H1-2A2衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:111、112、113中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:34中示出。

[0294] 在一些实施例中,3H1-2G3和3H1-2G3衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:135、136、137中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:35中示出。

[0295] 在一些实施例中,3H1-1G9和3H1-1G9衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:138、139、140中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:36中示出。

[0296] 在一些实施例中,3H1-6D2和3H1-6D2衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:141、142、143中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:37中示出。

[0297] 在一些实施例中,3H1-2F4和3H1-2F4衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:144、145、146中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:38中示出。

[0298] 在一些实施例中,5F8-3A3和5F8-3A3衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:147、148、149中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:39中示出。

[0299] 在一些实施例中,5F8-8E3和5F8-8E3衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:150、151、152中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:40中示出。

[0300] 在一些实施例中,5F8-8D4和5F8-8D4衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:153、154、155中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:41中示出。

[0301] 在一些实施例中,5F8-4B12和5F8-4B12衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:156、157、158中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:42中示出。

[0302] 在一些实施例中,5F8-6D6和5F8-6D6衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:159、160、161中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:43中示出。

[0303] 在一些实施例中,5F8-8H3和5F8-8H3衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:162、163、164中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:44中示出。

[0304] 在一些实施例中,5F8-7D5和5F8-7D5衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:165、166、167中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:45中示出。

[0305] 在一些实施例中,5C12-NQ和5C12-NQ衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:168、169、170中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:46中示出。

[0306] 在一些实施例中,5C12-NT和5C12-NT衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:171、172、173中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:47中示出。

[0307] 在一些实施例中,5C12-NS和5C12-NS衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:174、175、176中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:48中示出。

[0308] 在一些实施例中,5C12-hv1和5C12-hv1衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:114、115、116中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:49中示出。

[0309] 在一些实施例中,5C12-hv1-NQ和5C12-hv1-NQ衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:168、169、170中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:50中示出。

[0310] 在一些实施例中,5C12-hv1-NT和5C12-hv1-NT衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:171、172、173中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:51中示出。

[0311] 在一些实施例中,5C12-hv1-NS和5C12-hv1-NS衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:174、175、176中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:52中示出。

[0312] 在一些实施例中,5C12-hv2和5C12-hv2衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:114、115、116中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:53中示出。

[0313] 在一些实施例中,5C12-hv3和5C12-hv3衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:114、115、116中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:54中示出。

[0314] 在一些实施例中,5C12-hv4和5C12-hv4衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:114、115、116中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:55中示出。

[0315] 在一些实施例中,5C12-hv5和5C12-hv5衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:114、115、116中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:56中示出。

[0316] 在一些实施例中,5C12-hv6和5C12-hv6衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:114、115、116中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:57中示出。

[0317] 在一些实施例中,5C12-hv7和5C12-hv7衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:114、115、116中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:58中示出。

[0318] 在一些实施例中,5C12-hv8和5C12-hv8衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:114、115、116中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:59中示出。

[0319] 在一些实施例中,5C12-hv7-NT和5C12-hv7-NT衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:171、172、173中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:60中示出。

[0320] 在一些实施例中,5C12-hv9-NT和5C12-hv9-NT衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:171、172、173中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:61中示出。

[0321] 在一些实施例中,1F4-hv1-NT和1F4-hv1-NT衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:177、178、179中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:62中示出。

[0322] 在一些实施例中,1F4-hv2-NT和1F4-hv2-NT衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:177、178、179中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:63中示出。

[0323] 在一些实施例中,1F4-hv3-NT和1F4-hv3-NT衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:177、178、179中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:64中示出。

[0324] 在一些实施例中,1F4-hv4-NT和1F4-hv4-NT衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:177、178、179中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:65中示出。

[0325] 在一些实施例中,1F4-hv5-NT和1F4-hv5-NT衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:177、178、179中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:66中示出。

[0326] 在一些实施例中,1F4-hv6-NT和1F4-hv6-NT衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:177、178、179中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:67中示出。

[0327] 在一些实施例中,1F4-hv7-NT和1F4-hv7-NT衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:177、178、179中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:68中示出。

[0328] 在一些实施例中,1F4-hv8-NT和1F4-hv8-NT衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:177、178、179中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:69中示出。

[0329] 在一些实施例中,1F4-hv9-NT和1F4-hv9-NT衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:177、178、179中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:70中示出。

[0330] 在一些实施例中,1F4-hv10-NT和1F4-hv10-NT衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:177、178、179中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:71中示出。

[0331] 在一些实施例中,1F4-hv11-NT和1F4-hv11-NT衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:177、178、179中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:72中示出。

[0332] 在一些实施例中,1F4-hv12-NT和1F4-hv12-NT衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:177、178、179中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:73中示出。

[0333] 在一些实施例中,4D2-hv1和4D2-hv1衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:180、181、182中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:74中示出。

[0334] 在一些实施例中,4D2-hv2和4D2-hv2衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:180、181、182中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:75中示出。

[0335] 在一些实施例中,4D2-hv3和4D2-hv3衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:180、181、182中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:76中示出。

[0336] 在一些实施例中,4D2-hv4和4D2-hv4衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:180、181、182中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:77中示出。

[0337] 在一些实施例中,4E2_Alpaca和4E2_Alpaca衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:183、184、185中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:201中示出。

[0338] 在一些实施例中,4E2-hv1和4E2-hv1衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:183、184、185中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:78中示出。

[0339] 在一些实施例中,4E2-hv2和4E2-hv2衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:183、184、185中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:79中示出。

[0340] 在一些实施例中,4E2-hv3和4E2-hv3衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:183、184、185中示出的VHH结构域的CDR。在一些实施例中,VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:80中示出。

[0341] 还提供了各种经修饰或人源化VHH的氨基酸序列。由于存在修饰大羊驼抗体或使大羊驼抗体人源化的不同方式(例如,可以用不同氨基酸取代修饰序列),因此抗体的重链和轻链可以具有多于一个版本的人源化序列。在一些实施例中,人源化VHH结构域与SEQ ID NO:1-80的任何序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同。

[0342] 此外,在一些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段还可以含有一个、两个或三个VHH结构域CDR,所述VHH结构域CDR选自由SEQ ID NO:96-185组成的组。

[0343] 在一些实施例中,所述抗体可以具有重链抗体可变结构域(VHH),所述VHH包含互补决定区(CDR)1、2和3,其中所述CDR1区包含与所选VHH CDR1氨基酸序列至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,所述CDR2区包含与所选VHH CDR2氨基酸序列至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,并且所述CDR3区包含与所选VHH CDR3氨基酸序列至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。图28中示出了所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列。

[0344] 在一些实施例中,本文所述的抗体或抗原结合片段可以含有重链抗体可变结构域(VHH),所述VHH含有以下中的一个、两个或三个:具有零种、一种或两种氨基酸插入、缺失或

取代的VHH CDR1;具有零种、一种或两种氨基酸插入、缺失或取代的VHH CDR2;具有零种、一种或两种氨基酸插入、缺失或取代的VHH CDR3,其中VHH CDR1、VHH CDR2和VHH CDR3选自图28中的CDR。

[0345] 在一些实施例中,本文所述的抗体或抗原结合片段可以含有重链抗体可变结构域(VHH),所述VHH含有SEQ ID NO:96-185的具有零种、一种或两种氨基酸插入、缺失或取代的CDR中的一个、两个或三个。

[0346] 所述插入、缺失和取代可以在CDR序列内,或者在CDR序列的一个或两个末端。在一些实施例中,基于Kabat编号方案来确定CDR。在一些实施例中,基于Chothia编号方案来确定CDR。在一些实施例中,基于IMGT编号方案来确定CDR。

[0347] 本公开还提供了与PD-L1结合的抗体或其抗原结合片段。所述抗体或其抗原结合片段含有重链抗体可变结构域(VHH),所述VHH包含与所选VHH序列至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。在一些实施例中,所选VHH序列选自SEQ ID NO:1-80。

[0348] 为确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分比,出于最佳比较目的,对序列进行比对(例如,可以在第一和第二氨基酸或核酸序列中的一者或两者中引入缺口以进行最佳比对,并且出于比较目的可以忽略非同源序列)。然后比较在相应的氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中的相应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,则分子在所述位置是相同的。考虑了缺口数量和每个缺口的长度(需要将其引入以实现两个序列的最佳比对),两个序列之间的同一性百分比是由序列所共享的相同位置的数量的函数。例如,序列的比较以及两个序列之间的同一性百分比的确定可以例如使用其中空位罚分为12、空位延伸罚分为4并且移码空位罚分为5的Blossum 62评分矩阵来完成。

[0349] 本公开还提供了核酸,所述核酸包含多核苷酸,所述多核苷酸编码包含免疫球蛋白重链抗体可变结构域(VHH)的多肽。VHH包含如图28所示的CDR,或者具有如图30所示的序列。

[0350] 所述抗体和抗原结合片段还可以是抗体或抗体片段以及多特异性(例如,双特异性)抗体或抗体片段的抗体变体(包括衍生物和缀合物)。本文提供的另外的抗体是多克隆的、单克隆的、多特异性的(多聚体的,例如双特异性)、人抗体、嵌合抗体(例如人-小鼠嵌合体)、单链抗体、细胞内制造的抗体(即,体内抗体)及其抗原结合片段。

[0351] 在一些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包含Fc结构域,所述Fc结构域可以源自各种类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。在一些实施例中,Fc结构域源自IgG抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,Fc结构域包含一个、两个、三个、四个或更多个重链恒定区。

[0352] 抗VEGF抗体和抗原结合片段

[0353] 本公开提供了例如抗VEGF抗体、其经修饰抗体、其嵌合抗体和其人源化抗体。本公开还提供了这些抗体的VHH。这些VHH可以用于如本文所述的各种多特异性抗体构建体中。

[0354] 7H3和7H3衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:186、187和188中示出的VHH结构域的CDR。7H3抗体的VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:81中示出。

[0355] 1C8和1C8衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:189、190和191中示出的VHH结构域的CDR。1C8抗体的VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:82中示出。

[0356] 4B11和4B11衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:192、193和194中示出的VHH结构域的CDR。4B11抗体的VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:83中示出。

[0357] 1G1和1G1衍生抗体(例如,人源化抗体)的CDR序列包括如分别在SEQ ID NO:195、196和197中示出的VHH结构域的CDR。1G1抗体的VHH结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:84中示出。

[0358] 还提供了各种经修饰或人源化VHH的氨基酸序列。由于存在修饰大羊驼抗体或使大羊驼抗体人源化的不同方式(例如,可以用不同氨基酸取代修饰序列),因此抗体的重链和轻链可以具有多于一个版本的人源化序列。在一些实施例中,人源化VHH结构域与SEQ ID NO:81-84的任何序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同。

[0359] 此外,在一些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段还可以含有一个、两个或三个VHH结构域CDR,所述VHH结构域CDR选自由SEQ ID NO:186-197组成的组。

[0360] 在一些实施例中,所述抗体可以具有重链抗体可变结构域(VHH),所述VHH包含互补决定区(CDR)1、2和3,其中所述CDR1区包含与所选VHH CDR1氨基酸序列至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,所述CDR2区包含与所选VHH CDR2氨基酸序列至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,并且所述CDR3区包含与所选VHH CDR3氨基酸序列至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。图29中示出了所选VHH CDR 1、2、3氨基酸序列。

[0361] 在一些实施例中,本文所述的抗体或抗原结合片段可以含有重链抗体可变结构域(VHH),所述VHH含有以下中的一个、两个或三个:具有零种、一种或两种氨基酸插入、缺失或取代的VHH CDR1;具有零种、一种或两种氨基酸插入、缺失或取代的VHH CDR2;具有零种、一种或两种氨基酸插入、缺失或取代的VHH CDR3,其中VHH CDR1、VHH CDR2和VHH CDR3选自图29中的CDR。

[0362] 在一些实施例中,本文所述的抗体或抗原结合片段可以含有重链抗体可变结构域(VHH),所述VHH含有SEQ ID NO:186-197的具有零种、一种或两种氨基酸插入、缺失或取代的CDR中的一个、两个或三个。

[0363] 所述插入、缺失和取代可以在CDR序列内,或者在CDR序列的一个或两个末端。在一些实施例中,基于Kabat编号方案来确定CDR。在一些实施例中,基于Chothia编号方案来确定CDR。在一些实施例中,基于IMGT编号方案来确定CDR。

[0364] 本公开还提供了与VEGF结合的抗体或其抗原结合片段。所述抗体或其抗原结合片段含有重链抗体可变结构域(VHH),所述VHH包含与所选VHH序列至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。在一些实施例中,所选VHH序列选自SEQ ID NO:81-84。

[0365] 本公开还提供了核酸,所述核酸包含多核苷酸,所述多核苷酸编码包含免疫球蛋白重链抗体可变结构域(VHH)的多肽。VHH包含如图29所示的CDR,或者具有如图30所示的序

列。

[0366] 所述抗体和抗原结合片段还可以是抗体或抗体片段以及多特异性(例如,双特异性)抗体或抗体片段的抗体变体(包括衍生物和缀合物)。本文提供的另外的抗体是多克隆的、单克隆的、多特异性的(多聚体的,例如双特异性)、人抗体、嵌合抗体(例如人-小鼠嵌合体)、单链抗体、细胞内制造的抗体(即,体内抗体)及其抗原结合片段。

[0367] 在一些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包含Fc结构域,所述Fc结构域可以源自各种类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。在一些实施例中,Fc结构域源自IgG抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,Fc结构域包含一个、两个、三个、四个或更多个重链恒定区。

[0368] PD-L1/VEGF双特异性抗体的结构

[0369] 在一些实施例中,双特异性抗体被设计成包括靶向PD-L1的VHH和靶向VEGF的VHH。在一些实施例中,本公开提供了与PD-L1和VEGF两者结合的双特异性抗体。双特异性抗体可以用于治疗受试者的PD-L1或VEGF阳性癌症(例如,非小细胞肺癌)。

[0370] 具有特定结构的PD-L1/VEGF双特异性抗体在下文进行了描述。

[0371] 双特异性-V1结构

[0372] 如图13A所示,可以制备具有双特异性-V1结构的PD-L1/VEGF双特异性抗体。具体地讲,PD-L1/VEGF双特异性抗体包含(a)第一多肽,所述第一多肽从N末端到C末端包含:第一重链抗体可变结构域(VHH1)、第一铰链区、第一Fc区和第三重链抗体可变结构域(VHH3);和(b)第二多肽,所述第二多肽从N末端到C末端包含:第二重链抗体可变区(VHH2)、第二铰链区、第二Fc区和第四重链抗体可变区(VHH4)。

[0373] 在一些实施例中,VHH1和VHH2与PD-L1特异性结合。在一些实施例中,VHH3和VHH4与VEGF特异性结合。在一些实施例中,VHH1和VHH2的序列是相同的。在一些实施例中,VHH3和VHH4的序列是相同的。

[0374] 在一些实施例中,PD-L1/VEGF双特异性抗体包含杵臼突变。在一些实施例中,Fc区是IgG1 Fc区。在一些实施例中,第一多肽包含与SEQ ID NO:85、89、90、91、92、93或95至少80%、85%、90%、95%或100%相同的序列。在一些实施例中,第二多肽包含与SEQ ID NO:85、89、90、91、92、93或95至少80%、85%、90%、95%或100%相同的序列。

[0375] 在一些实施例中,第一Fc区和/或第二Fc区包含根据EU编号的在位置239处的天冬氨酸(Asp)。在一些实施例中,第一Fc区和/或第二Fc区包含根据EU编号的在位置332处的谷氨酸(Glu)。

[0376] 在一些实施例中,所述VHH3通过第一接头肽序列与所述第一Fc区的所述C末端连接。在一些实施例中,所述VHH4通过第二接头肽序列与所述第二Fc区的所述C末端连接。

[0377] 在一些实施例中,第一接头肽序列和/或第二接头肽序列包含与GGGGS的一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7或8个)重复序列至少80%、85%、90%、95%或100%相同的序列。在一些实施例中,第一接头肽序列和/或第二接头肽序列包含选自GSGGSGGSGGSG(SEQ ID NO:202)和GSGGSGGSGGSGGSG(SEQ ID NO:203)的序列。

[0378] 双特异性-V2结构

[0379] 如图13B所示,可以制备具有双特异性-V2结构的PD-L1/VEGF双特异性抗体。具体地讲,PD-L1/VEGF双特异性抗体包含(a)第一多肽,所述第一多肽从N末端到C末端包含:

VHH1、VHH3、第一铰链区、第一Fc区;和(b)第二多肽,所述第二多肽从N末端到C末端包含:VHH2、VHH4、第二铰链区和第二Fc区。

[0380] 在一些实施例中,VHH1和VHH2与PD-L1特异性结合。在一些实施例中,VHH3和VHH4与VEGF特异性结合。在一些实施例中,VHH1和VHH2的序列是相同的。在一些实施例中,VHH3和VHH4的序列是相同的。

[0381] 在一些实施例中,PD-L1/VEGF双特异性抗体包含杵臼突变。在一些实施例中,Fc区是IgG1 Fc区。在一些实施例中,第一多肽包含与SEQ ID NO:86或94至少80%、85%、90%、95%或100%相同的序列。在一些实施例中,第二多肽包含与SEQ ID NO:86或94至少80%、85%、90%、95%或100%相同的序列。

[0382] 在一些实施例中,第一Fc区和/或第二Fc区包含根据EU编号的在位置239处的天冬氨酸(Asp)。在一些实施例中,第一Fc区和/或第二Fc区包含根据EU编号的在位置332处的谷氨酸(Glu)。

[0383] 在一些实施例中,所述VHH1通过第一接头肽序列与所述VHH3的所述N末端连接。在一些实施例中,所述VHH2通过第二接头肽序列与所述VHH4的所述N末端连接。

[0384] 在一些实施例中,第一接头肽序列和/或第二接头肽序列包含与GGGGS的一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7或8个)重复序列至少80%、85%、90%、95%或100%相同的序列。在一些实施例中,第一接头肽序列和/或第二接头肽序列包含选自GSGGSGGSGGSG(SEQ ID NO:202)和GSGGSGGSGGSGGSG(SEQ ID NO:203)的序列。

[0385] 双特异性-V3结构

[0386] 如图13C所示,可以制备具有双特异性-V3结构的PD-L1/VEGF双特异性抗体。具体地讲,PD-L1/VEGF双特异性抗体包含(a)第一多肽,所述第一多肽从N末端到C末端包含:VHH3、VHH1、第一铰链区和第一Fc区;(b)第二多肽,所述第二多肽从N末端到C末端包含:VHH4、VHH2、第二铰链区和第二Fc区。

[0387] 在一些实施例中,VHH1和VHH2与PD-L1特异性结合。在一些实施例中,VHH3和VHH4与VEGF特异性结合。在一些实施例中,VHH1和VHH2的序列是相同的。在一些实施例中,VHH3和VHH4的序列是相同的。

[0388] 在一些实施例中,第一多肽包含与SEQ ID NO:87至少80%、85%、90%、95%或100%相同的序列。在一些实施例中,第二多肽包含与SEQ ID NO:87至少80%、85%、90%、95%或100%相同的序列。

[0389] 在一些实施例中,第一Fc区和/或第二Fc区包含根据EU编号的在位置239处的天冬氨酸(Asp)。在一些实施例中,第一Fc区和/或第二Fc区包含根据EU编号的在位置332处的谷氨酸(Glu)。

[0390] 在一些实施例中,所述VHH3通过第一接头肽序列与所述VHH1的所述N末端连接。在一些实施例中,所述VHH4通过第二接头肽序列与所述VHH2的所述N末端连接。

[0391] 在一些实施例中,第一接头肽序列和/或第二接头肽序列包含与GGGGS的一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7或8个)重复序列至少80%、85%、90%、95%或100%相同的序列。在一些实施例中,第一接头肽序列和/或第二接头肽序列包含选自GSGGSGGSGGSG(SEQ ID NO:202)和GSGGSGGSGGSGGSG(SEQ ID NO:203)的序列。

[0392] 双特异性-V4结构

[0393] 如图13D所示,可以制备具有双特异性-V4结构的PD-L1/VEGF双特异性抗体。具体地讲,PD-L1/VEGF双特异性抗体包含(a)第一多肽,所述第一多肽从N末端到C末端包含:VHH3、第一铰链区、第一Fc区和VHH1;和(b)第二多肽,所述第二多肽从N末端到C末端包含:VHH4、第二铰链区、第二Fc区和VHH2。

[0394] 在一些实施例中,VHH1和VHH2与PD-L1特异性结合。在一些实施例中,VHH3和VHH4与VEGF特异性结合。在一些实施例中,VHH1和VHH2的序列是相同的。在一些实施例中,VHH3和VHH4的序列是相同的。

[0395] 在一些实施例中,PD-L1/VEGF双特异性抗体包含杵臼突变。在一些实施例中,Fc区是IgG1 Fc区。在一些实施例中,第一多肽包含与SEQ ID NO:88至少80%、85%、90%、95%或100%相同的序列。在一些实施例中,第二多肽包含与SEQ ID NO:88至少80%、85%、90%、95%或100%相同的序列。

[0396] 在一些实施例中,第一Fc区和/或第二Fc区包含根据EU编号的在位置239处的天冬氨酸(Asp)。在一些实施例中,第一Fc区和/或第二Fc区包含根据EU编号的在位置332处的谷氨酸(Glu)。

[0397] 在一些实施例中,所述VHH1通过第一接头肽序列与所述第一Fc区的所述C末端连接。在一些实施例中,所述VHH2通过第二接头肽序列与所述第二Fc区的所述C末端连接。

[0398] 在一些实施例中,第一接头肽序列和/或第二接头肽序列包含与GGGGS的一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7或8个)重复序列至少80%、85%、90%、95%或100%相同的序列。在一些实施例中,第一接头肽序列和/或第二接头肽序列包含选自GSGGSGGSGGSG(SEQ ID NO:202)和GSGGSGGSGGSGGSG(SEQ ID NO:203)的序列。

[0399] 抗体特点

[0400] 抗PD-L1、抗VEGF或抗PD-L1/VEGF抗原结合蛋白构建体(例如,抗体、双特异性抗体、三特异性抗体、多特异性抗体或其抗体片段)可以包括源自如本文所述的任何抗PD-L1抗体、抗VEGF抗体或其任何抗原结合片段的抗原结合位点。

[0401] 在一些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段是VEGF拮抗剂。在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段是VEGF激动剂。

[0402] 在一些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段可以与PD-L1和/或VEGF结合,从而阻断这些受体及其相应配体的相互作用;降低下游信号传导路径(例如,ERK和/或Akt路径)的磷酸化;和/或通过ADCC和/或CDC直接杀死癌细胞。

[0403] 在一些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段与PD-L1结合的EC50为小于或约3nM、小于或约2.5nM、小于或约2.0nM、小于或约1.5nM、小于或约1.1nM、小于或约1nM、小于或约0.8nM、小于或约0.7nM、小于或约0.6nM、小于或约0.5nM、小于或约0.4nM、小于或约0.3nM、小于或约0.2nM、小于或约0.1nM、小于或约0.09nM、小于或约0.08nM、小于或约0.05nM或小于或约0.04nM。在一些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段与PD-L1结合的EC50为约0.04nM至0.1nM、约0.05nM至0.2nM、约0.08nM至0.3nM、约0.09nM至0.4nM、约0.1nM至0.5nM、约0.2nM至0.6nM、约0.3nM至0.7nM、约0.4nM至0.8nM、约0.5nM至1nM、约0.6nM至1.1nM或约0.7nM至1.5nM。

[0404] 在一些实施例中,抗体(或其抗原结合片段)以小于$0.1s^{-1}$、小于$0.01s^{-1}$、小于$0.001s^{-1}$、小于$0.0001s^{-1}$或小于$0.00001s^{-1}$的解离速率(koff)与抗原(例如,PD-L1或VEGF)

特异性结合。在一些实施例中,解离速率(koff)为大于0.01$s^{-1}$、大于0.001$s^{-1}$、大于0.0001$s^{-1}$、大于0.00001$s^{-1}$或大于0.000001$s^{-1}$。在一些实施例中,动力学缔合速率(kon)为大于1x $10^2$/Ms、大于1x$10^3$/Ms、大于1x $10^4$/Ms、大于1x $10^5$/Ms、大于2x $10^5$/Ms、大于3x $10^5$/Ms、大于4x $10^5$/Ms、大于5x $10^5$/Ms或大于6x $10^5$/Ms。在一些实施例中,动力学缔合速率(kon)为小于1x $10^5$/Ms、小于1x $10^6$/Ms或小于1x $10^7$/Ms。

[0405] 亲和力可以由动力学速率常数的商(Kd=koff/kon)推导。在一些实施例中,Kd为小于1x $10^{-4}$M、小于1x $10^{-5}$M、小于1x $10^{-6}$M、小于1x $10^{-7}$M、小于1x $10^{-8}$M、小于1x $10^{-9}$M或小于1x $10^{-10}$M。在一些实施例中,Kd为小于50nM、30nM、20nM、15nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM或0.1nM。在一些实施例中,Kd大于1x $10^{-4}$M、大于1x $10^{-5}$M、大于1x $10^{-6}$M、大于1x $10^{-7}$M、大于1x $10^{-8}$M、大于1x$10^{-9}$M、大于1x $10^{-10}$M、大于1x $10^{-11}$M或大于1x $10^{-12}$M。

[0406] 在一些实施例中,仔细地调整对PD-L1或VEGF的结合亲和力,例如,Kd可以介于100nM~0.1nM之间、介于100nM~1nM之间、介于100nM~10nM之间、介于10nM~0.1nM之间、介于10nM~1nM之间或介于1nM~0.1nM之间。

[0407] 测量抗体对抗原的亲和力的通用技术包括例如ELISA、RIA和表面等离子体共振(SPR)。

[0408] 在一些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段的稳定性可以通过SEC-HPLC进行分析,以评估聚集和降解的量。在一些实施例中,如SEC-HPLC所示出的,高分子量(HMW)物种占比小于20%、15%、10%、7.5%、5%、2.5%、1%或0.5%。在一些实施例中,如SEC-HPLC所示出的,单体占比超过60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、97.5%、95%、97.5%或98%。在一些实施例中,如SEC-HPLC所示出的,低分子量(LMW)物种占比小于20%、15%、10%、7.5%、5%、2.5%、1%或0.5%。在一些实施例中,如SEC-HPLC所示出的,高分子量(HMW)物种占比超过20%、15%、10%、7.5%、5%、2.5%、1%或0.5%。在一些实施例中,如SEC-HPLC所示出的,单体占比小于60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、97.5%、95%、97.5%或98%。在一些实施例中,如SEC-HPLC所示出的,低分子量(LMW)物种占比超过20%、15%、10%、7.5%、5%、2.5%、1%或0.5%。

[0409] 在一些实施例中,抗体的肿瘤生长抑制率百分比(TGI%)大于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%或200%。在一些实施例中,抗体的肿瘤生长抑制率百分比小于60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%或200%。TGI%可以在治疗开始后例如3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天或30天确定,或在治疗开始后1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月或12个月确定。如本文所用,肿瘤生长抑制率百分比(TGI%)使用以下公式计算:

[0410] TGI(%)=[1-(Ti-T0)/(Vi-V0)]×100

[0411] Ti是第i天时治疗组中的平均肿瘤体积。T0是第零天时治疗组中的平均肿瘤体积。Vi是第i天时对照组中的平均肿瘤体积。V0是第零天时对照组中的平均肿瘤体积。

[0412] 在一些实施例中,与参考抗体(例如,IMM2510)的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性

(ADCC)相比,本文所述的抗体或其抗原结合片段的ADCC为至少或约50%、至少或约60%、至少或约70%、至少或约80%、至少或约90%、至少或约100%、至少或约110%、至少或约120%、至少或约130%、至少或约140%、至少或约150%、至少或约200%。在一些实施例中,与非特异性抗体对照或同种型抗体对照的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)相比,本文所述的抗体或其抗原结合片段可以将ADCC增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、20倍或100倍。

[0413] 在一些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段的细胞杀死IC50为小于或约1000ng/ml、小于或约500ng/ml、小于或约400ng/ml、小于或约300ng/ml、小于或约250ng/ml、小于或约200ng/ml、小于或约100ng/ml。在一些实施例中,与参考抗体(例如,IMM2510)的细胞杀死IC50值相比,本文所述的抗体或其抗原结合片段的细胞杀死IC50值为小于或约50%、小于或约60%、小于或约70%、小于或约80%、小于或约90%、小于或约100%、小于或约110%、小于或约120%、小于或约130%、小于或约140%、小于或约150%、小于或约200%。在一些实施例中,与同种型对照抗体的细胞杀死IC50值相比,本文所述的抗体或其抗原结合片段的细胞杀死IC50值为小于或约20%、小于或约10%、小于或约8%、小于或约5%、小于或约3%、小于或约1%。

[0414] 在一些实施例中,抗体或抗原结合片段具有功能性Fc区。在一些实施例中,功能性Fc区的效应子功能是抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。在一些实施例中,功能性Fc区的效应子功能是吞噬作用。在一些实施例中,功能性Fc区的效应子功能是ADCC和吞噬作用。在一些实施例中,Fc区是人IgG1、人IgG2、人IgG3或人IgG4。

[0415] 在一些实施例中,抗体或抗原结合片段可以诱导细胞凋亡。

[0416] 在一些实施例中,抗体或抗原结合片段不具有功能性Fc区。例如,所述抗体或抗原结合片段是Fab、Fab'、F(ab')2和Fv片段。

[0417] 在一些实施例中,抗体或抗原结合片段是人源化抗体。人源化百分比意指如与国际免疫遗传学信息系统(International Immunogenetics Information System,IMGT)数据库中的人抗体序列相比,重链或轻链可变区序列的同一性百分比。顶部命中意指相比于其它物种,重链或轻链可变区序列更接近特定物种。例如,对人类的顶部命中意指相比于其它物种,序列更接近人类。对人类和食蟹猴(Macaca fascicularis)的顶部命中意指序列对人序列和食蟹猴序列具有相同的同一性百分比,并且相比于其它物种的序列,这些同一性百分比最高。在一些实施例中,人源化百分比为大于80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%或95%。关于如何确定人源化百分比和如何确定顶部命中的详细描述是本领域已知的,并且在以下文献中进行了描述:例如Jones等人"抗体非专有名称的来龙去脉(The INNs and outs of antibody nonproprietary names)".《单克隆抗体(Mabs.)》第8卷.第1期.泰勒弗朗西斯出版社(Taylor&Francis),2016,所述文献以引用方式整体并入本文。高的人源化百分比通常具有各种优势,例如,在人类中更安全且更有效、更有可能被人受试者耐受、和/或更不太可能具有副作用。

[0418] 本公开还提供了与如本文所述的任何抗体或抗原结合片段交叉竞争的抗体或其抗原结合片段。交叉竞争测定是本领域已知的,并且例如在以下文献中进行了描述:Moore等人,"人免疫缺陷病毒1型gp120外包膜糖蛋白的抗体交叉竞争分析(Antibody cross-competition analysis of the human immunodeficiency virus type 1gp120 exterior

envelope glycoprotein)”.《病毒学杂志(Journal of virology)》70.3(1996):1863-1872,所述文献以引用方式整体并入本文。一方面,本公开还提供了与如本文所述的任何抗体或抗原结合片段结合相同的表位或区域的抗体或其抗原结合片段。表位分箱测定是本领域已知的,并且在以下中进行了描述:例如Estep等人“基于高通量解决方案对抗体-抗原亲和力和表位分箱的测量(High throughput solution-based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning)”《单克隆抗体》第5卷.第2期.泰勒弗朗西斯出版社,2013,所述文献以引用方式整体并入本文。

[0419] 抗体和抗原结合片段

[0420] 本公开提供了包含本文所述的互补决定区(CDR)、VHH、重链可变区、轻链可变区、重链或轻链的抗体及其抗原结合片段。

[0421] 通常,抗体(也称为免疫球蛋白)由两类多肽链组成:轻链和重链。本公开的非限制性抗体可以是包含两条重链和两条轻链的完整的四条免疫球蛋白链抗体。抗体的重链可以是任何同种型(包括IgM、IgG、IgE、IgA或IgD)或亚同种型(包括IgG1、IgG2、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4、IgE1、IgE2等)。轻链可以是κ轻链或λ轻链。抗体可以包含轻链的两个相同拷贝和/或重链的两个相同拷贝。重链(每一条重链含有一个可变结构域(或可变区,VH)和多个恒定结构域(或恒定区))在其恒定结构域内通过二硫键彼此结合以形成抗体的“茎”。轻链(每一条轻链含有一个可变结构域(或可变区,VL)和一个恒定结构域(或恒定区))各自通过二硫键结合至一条重链。每条轻链的可变区与其所结合的重链的可变区对齐。轻链和重链二者的可变区均含有夹在更保守的框架区(FR)之间的三个高变区。

[0422] 这些高变区(被称为互补决定区(CDR))形成包含抗体的主要抗原结合表面的环。四个框架区大量采用β-折叠构象,并且CDR形成连接并且在一些情况下形成β-折叠结构的一部分的环。每条链中的CDR通过框架区紧密结合,并且与另一条链中的CDR一起有助于形成抗原结合区。

[0423] 通过分析抗体的氨基酸序列来鉴定抗体的CDR区的方法是熟知的,并且CDR的许多定义是常用的。Kabat定义是基于序列变异性,并且Chothia定义是基于结构环区域的位置。V-DOMAIN(IG和TR)的IMGT编号源自V-REGION的IMGT唯一编号。在以下文献中描述了这些方法和定义:例如,Martin,“抗体可变结构域的蛋白质序列和结构分析(Protein sequence and structure analysis of antibody variabledomains)”《抗体工程(Antibody engineering)》,柏林海德堡的施普林格出版社(Springer Berlin Heidelberg),2001.422-439;Abhinandan等人“Kabat的分析和改进以及抗体可变结构域的结构正确的编号(Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variabledomains)”,《分子免疫学(Molecular immunology)》45.14(2008):3832-3839;Wu,T.T.和Kabat,E.A.(1970)《实验医学杂志(J.Exp.Med.)》132:211-250;Martin等人,《酶学方法(Methods Enzymol.)》203:121-53(1991);Morea等人,《生物物理化学(Biophys Chem.)》68(1-3):9-16(1997年10月);Morea等人,《分子生物学杂志(J Mol Biol.)》275(2):269-94(1998年1月);Chothia等人,《自然(Nature)》342(6252):877-83(1989年12月);Ponomarenko和Bourne,《BMC结构生物学(BMC Structural Biology)》7:64(2007);Kontermann,R.和Dübel,S.(编辑).(2010).《抗体工程》:第2卷.施普林格出版社(Springer);Lefranc M.-P.,“用于免疫球蛋白、T细胞受体和Ig样结构域的IMGT独特编号

(The IMGT unique numbering for Immunoglobulins,T cell receptors and Ig-like domains)"《免疫学家(The Immunologist)》,7,132-136(1999);所述文献中的每个文献以引用方式整体并入本文。在一些实施例中,CDR基于Kabat定义。在一些实施例中,CDR基于Chothia定义。在一些实施例中,CDR是如通过Kabat、Chothia、AbM、IMGT或接触定义所确定的最长CDR序列。

[0424] CDR对于识别抗原表位很重要。如本文所用,"表位"是能够被抗体的抗原结合结构域特异性地结合的靶分子的最小部分。表位的最小大小可能为约三个、四个、五个、六个或七个氨基酸,但这些氨基酸不一定位于抗原一级结构的连续线性序列中,因为表位可能取决于以抗原的二级和三级结构为基础的抗原的三维构型。

[0425] 在一些实施例中,抗体是完整的免疫球蛋白分子(例如,IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgD、IgE、IgA)。IgG亚类(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)是高度保守的,区别在于其的恒定区,尤其是其的铰链和上部CH2结构域。IgG亚类的序列和差异是本领域已知的,并且例如在以下文献中进行了描述:Vidarsson等人,"IgG亚类和同种异型:从结构到效应子功能(IgG subclasses and allotypes:from structure to effector functions)".《免疫学前沿(Frontiers in immunology)》5(2014);Irani等人"人IgG亚类的分子特性和其对设计针对感染性疾病的治疗性单克隆抗体的意义(Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases).".《分子免疫学(Molecular immunology)》67.2(2015):171-182;Shakib,Farouk编辑人IgG亚类:结构、功能和调节的分子分析(The human IgG subclasses:molecular analysis of structure,function and regulation).爱思唯尔出版社(Elsevier),2016;所述文献中的每个文献以引用方式整体并入本文。

[0426] 抗体还可以是源自任何物种(例如,人类、啮齿动物、小鼠、大鼠、骆驼科)的免疫球蛋白分子。本文公开的抗体还包括但不限于多克隆、单克隆、单特异性、多特异性抗体、和包括与另一个多肽融合的免疫球蛋白结合结构域的嵌合抗体。术语"抗原结合结构域"或"抗原结合片段"是保留了完整抗体的特异性结合活性的抗体的一部分,即能够与完整抗体的靶分子上的表位特异性地结合的任何抗体部分。其包括例如Fab、Fab'、F(ab')2、VHH和这些片段的变体。因此,在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段可以是例如scFv、Fv、Fd、dAb、双特异性抗体、双特异性scFv、双抗体、线性抗体、单链抗体分子、由抗体片段形成的多特异性抗体、以及包含是抗体结合结构域或与抗体结合结构域同源的结合结构域的任何多肽。抗原结合结构域的非限制性实例包括例如完整抗体的重链和/或轻链CDR、完整抗体的重链和/或轻链可变区、完整抗体的全长重链或轻链、或来自完整抗体重链或轻链的单个CDR。

[0427] 在一些实施例中,scFV具有两个重链可变结构域和两个轻链可变结构域。在一些实施例中,scFV具有两个抗原结合区(抗原结合区:A和B),并且两个抗原结合区可以以不同亲和力与相应的靶抗原结合。

[0428] 在一些实施例中,抗原结合片段可以形成嵌合抗原受体(CAR)的一部分。在一些实施例中,嵌合抗原受体是如本文所述的单链可变片段(scFv)或VHH的与CD3ζ跨膜结构域和内结构域融合的融合物。在一些实施例中,嵌合抗原受体还包含来自多种共刺激蛋白受体(例如,CD28、41BB、ICOS)的细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,嵌合抗原受体包含多

个信号传导结构域(例如CD3z-CD28-41BB或CD3z-CD28-OX40)以增加效力。因此,一方面,本公开还提供了表达如本文所述的嵌合抗原受体的细胞(例如T细胞)。

[0429] 在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段可以与两个不同抗原或两个不同表位结合。在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段可以与三个不同抗原或三个不同表位结合。

[0430] Fv片段是含有完整抗原识别和结合位点的抗体片段。此区域由紧密缔合的一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的二聚体组成,所述紧密缔合在本质上可以是共价的,例如在scFv中。在这种配置中,每个可变结构域的三个CDR发生相互作用以在VH-VL二聚体的表面上限定抗原结合位点。总之,六个CDR或其子集共同赋予针对抗体的抗原结合特异性。然而,即使单个可变结构域(或仅包含对抗原特异的三个CDR的一半Fv)也可以具有识别和结合抗原的能力,但是通常亲和力低于整个结合位点。

[0431] 单链Fv或(scFv)抗体片段包含抗体的VH和VL结构域(或区域),其中这些结构域存在于单个多肽链中。通常,scFv多肽进一步包含位于VH结构域与VL结构域之间的使scFv能够形成对于抗原结合而言所期望的结构的多肽接头。

[0432] 在一些实施例中,本文所述的scFv从N末端到C末端包含:VH;多肽接头;和VL。在一些实施例中,本文所述的scFv从N末端到C末端包含:VL;多肽接头;和VH。

[0433] Fab片段含有轻链的可变和恒定结构域以及重链的可变结构域和第一恒定结构域(CH1)。F(ab')2抗体片段包含一对Fab片段,所述一对Fab片段通常在它们的羧基末端附近通过它们之间的铰链半胱氨酸共价地连接。抗体片段的其它化学偶联也是本领域已知的。

[0434] 可以在Fc区中修饰本公开的抗体和抗体片段,以提供所需的效应子功能或血清半衰期。在一些实施例中,本文所述的抗体或抗原结合片段中的任一种抗体或抗原结合片段中的Fc区包含根据EU编号的在位置239处的天冬氨酸(Asp)。在一些实施例中,本文所述的抗体或抗原结合片段中的任何一种抗体或抗原结合片段中的Fc区包含根据EU编号的在位置332处的谷氨酸(Glu)。在一些实施例中,本文所述Fc区是本文所述的Fc区中的任何一个Fc区,其包含根据EU编号的在位置239处的天冬氨酸(Asp)和/或根据EU编号的在位置332处的谷氨酸(Glu)。在一些实施例中,与野生型抗体或其抗原结合片段的效应子功能相比,本文所述的Asp239和/或Glu332可以使抗体或其抗原结合片段的效应子功能(例如,ADCC或CDC)增加至少或约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍或100倍。详细信息可以在以下中找到:例如Lazar,G.A.等人,"具有增强的效应子功能的经工程化的抗体Fc变体(Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function)"《美国国家科学院院刊(Proceedings of the National Academy of Sciences)》103.11(2006):4005-4010,所述文献以引用方式整体并入本文。

[0435] 在一些实施例中,本文所述的抗体或抗原结合片段中的任何一种抗体或抗原结合片段中的Fc区包含野生型人IgG1 CH2结构域。在一些实施例中,本文所述的抗体或抗原结合片段中的任何一种抗体或抗原结合片段中的Fc区包含突变的人IgG1 CH2结构域。

[0436] 本文所述的抗体或抗原结合片段中的任何抗体或抗原结合片段可以与稳定分子(例如,增加受试者或溶液中的抗体或其抗原结合片段的半衰期的分子)缀合。稳定分子的非限制性实例包括:聚合物(例如,聚乙二醇)或蛋白质(例如,血清白蛋白如人血清白蛋白)。稳定分子的缀合可以增加抗体或抗原结合片段的在体外(例如,在组织培养中或当以药物组合物形式储存时)或在体内(例如,在人体中)的半衰期或延长其生物活性。

[0437] 在一些实施例中,本文所述的抗体或抗原结合片段(例如,双特异性抗体)可以与治疗剂缀合。包含抗体或其抗原结合片段的抗体药物缀合物可以与治疗剂共价结合或非共价结合。在一些实施例中,治疗剂是细胞毒性剂或细胞生长抑制剂(例如,细胞松弛素B(cytochalasin B)、短杆菌肽D(gramicidin D)、溴化乙锭(ethidium bromide)、吐根碱(emetine)、丝裂霉素(mitomycin)、依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenoposide)、长春新碱(vincristine)、长春花碱(vinblastine)、秋水仙碱(colchicin)、阿霉素(doxorubicin)、道诺霉素(daunorubicin)、二羟基炭疽菌素(dihydroxy anthracin)、登木素生物碱(maytansinoids)(如DM-1和DM-4)、二酮(dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光神霉素(mithramycin)、放线菌素D(actinomycin D)、1-去氢睾酮(dehydrotestosterone)、糖皮质激素(glucocorticoids)、普鲁卡因(procaine)、丁卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛尔(propranolol)、嘌呤霉素(puromycin)、表柔比星(epirubicin)和环磷酰胺(cyclophosphamide)以及类似物)。

[0438] 在一些实施例中,本文所述的多特异性抗体或其抗原结合片段(例如,PD-L1/VEGF双特异性抗体)以与包含所述多特异性抗体的相同VHH的重链抗体(例如,抗PD-L1重链抗体)的结合能力约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%、约110%、约120%、约130%、约140%、约150%或约200%的结合能力与抗原(例如,PD-L1)结合。

[0439] 在一些实施例中,本文所述的多特异性抗体或其抗原结合片段(例如,PD-L1/VEGF双特异性抗体)以与包含所述多特异性抗体的靶向VEGF的相同VHH的抗体或抗原结合片段(例如,抗VEGF重链抗体)的结合能力约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%、约110%、约120%、约130%、约140%、约150%或约200%的结合能力与抗原(例如,VEGF)结合。

[0440] 在一些实施例中,与由同种型对照抗体介导的补体依赖性细胞毒性(CDC)或ADC相比,本文所述的双特异性抗体或其抗原结合片段(例如,PD-L1/VEGF双特异性抗体)将CDC或ADC介导至至少或约1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍、30倍、40倍或50倍。

[0441] 重组载体

[0442] 本公开还提供了包括本文所公开的所分离多核苷酸(例如,编码本文所公开的多肽的多核苷酸)的重组载体(例如,表达载体)、重组载体被引入到其中(即,使得所述宿主细胞含有多核苷酸和/或包含所述多核苷酸的载体)的宿主细胞以及通过重组技术产生重组抗体多肽或其片段。

[0443] 如本文所用,“载体”是当将载体引入宿主细胞时能够将一种或多种目的多核苷酸递送至宿主细胞的任何构建体。“表达载体”能够在已经引入表达载体的宿主细胞中递送一种或多种目的多核苷酸和将其表达为编码的多肽。因此,通过在目的多核苷酸的整合位点处或附近或侧翼与载体内或宿主细胞基因组中的调控元件诸如启动子、增强子和/或聚A尾巴可操作地连接使得目的多核苷酸将在与表达载体一起引入的宿主细胞中翻译,将目的多核苷酸定位在载体中用于表达。

[0444] 可以通过本领域已知的方法将载体引入宿主细胞中,例如电穿孔、化学转染(例如DEAE-葡聚糖)、转化、转染、以及感染和/或转导(例如用重组病毒)。因此,载体的非限制性实例包括病毒载体(其可以用于产生重组病毒)、裸DNA或RNA、质粒、粘粒、噬菌体载体、以及

与阳离子缩合剂相关的DNA或RNA表达载体。

[0445] 在一些实施方案中,本文所公开的多核苷酸(例如,编码本文所公开的多肽的多核苷酸)是使用病毒表达系统(例如,牛痘或其它痘病毒、逆转录病毒或腺病毒)引入的,这可能涉及使用非致病性(缺陷型)有复制能力的病毒,或者可以使用复制缺陷型病毒。在后一种情况下,病毒传播通常将只发生在互补的病毒包装细胞中。例如,在以下文献中公开了合适的系统:Fisher-Hoch等人,1989,《美国国家科学院院刊》86:317-321;Flexner等人,1989,《纽约科学院年报(Ann.N.Y.Acad Sci.)》569:86-103;Flexner等人,1990,《疫苗(Vaccine)》,8:17-21;美国专利第4,603,112号、第4,769,330号和第5,017,487号;WO 89/01973;美国专利第4,777,127号;GB 2,200,651;EP 0,345,242;WO 91/02805;Berkner,《生物技术(Biotechniques)》,6:616-627,1988;Rosenfeld等人,1991,《科学》,252:431-434;Kolls等人,1994,《美国国家科学院院刊》,91:215-219;Kass-Eisler等人,1993,《美国国家科学院院刊》,90:11498-11502;Guzman等人,1993,《循环(Circulation)》,88:2838-2848;以及Guzman等人,1993,《循环研究(Cir.Res.)》,73:1202-1207。用于将DNA并入到此类表达系统中的技术是本领域普通技术人员所熟知的。DNA还可以是“裸的”,如以下中所描述的:例如Ulmer等人,1993,《科学》,259:1745-1749和Cohen,1993,《科学》,259:1691-1692。裸DNA的摄取可以通过将DNA涂覆到可生物降解的珠粒上来增加,所述珠粒被高效地运送到细胞中。

[0446] 为了进行表达,可以将包含本文所公开的编码抗体的多核苷酸或编码多肽的多核苷酸的DNA插入物与适当的启动子(例如,异源启动子)可操作地连接,所述启动子如噬菌体λPL启动子、大肠杆菌(E.coli)lac、trp和tac启动子、SV40早期和晚期启动子以及逆转录病毒LTR的启动子,仅举几例。其它适合的启动子是技术人员已知的。表达构建体可以进一步含有转录起始、终止的位点,并且在经转录的区中含有用于翻译的核糖体结合位点。由构建体表达的成熟转录物的编码部分可以包括起始于开始处的翻译以及适当定位于要翻译的多肽的末端处的终止密码子(UAA、UGA或UAG)。

[0447] 如所指示的,表达载体可以包括至少一种可选择标志物。此类标志物包括用于真核细胞培养的二氢叶酸还原酶或新霉素抗性,以及用于在大肠杆菌和其它细菌中培养的四环素或氨苄青霉素抗性基因。适合的宿主的代表性实例包括但不限于细菌细胞,如大肠杆菌、链霉菌(Streptomyces)和鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)细胞;真菌细胞如酵母细胞;昆虫细胞如果蝇S2和夜蛾Sf9细胞;动物细胞如CHO、COS、Bowes黑色素瘤和HK293细胞;以及植物细胞。本文所述的宿主细胞的适合的培养基和条件是本领域已知的。

[0448] 用于细菌的非限制性载体包括pQE70、pQE60和pQE-9,这些可从凯杰公司(Qiagen)获得;pBS载体、Phagescript载体、Bluescript载体、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A,这些可从斯特拉特基因公司(Stratagene)获得;以及ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5,这些可从法玛西亚公司(Pharmacia)获得。非限制性真核载体包括pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1和pSG,这些可从斯特拉特基因公司获得;以及pSVK3、pBPV、pMSG和pSVL,这些可从法玛西亚公司获得。其它适合的载体对于技术人员来说将是显而易见的。

[0449] 适于使用的非限制性细菌启动子包括大肠杆菌lacI和lacZ启动子、T3和T7启动子、gpt启动子、λPR和PL启动子以及trp启动子。合适的真核启动子包括CMV即时早期启动子、HSV胸苷激酶启动子、早期和晚期SV40启动子、逆转录病毒LTR的启动子如劳氏肉瘤病毒

(RSV)的启动子,以及金属硫蛋白启动子如小鼠金属硫蛋白-I启动子。

[0450] 在酵母酿酒酵母(yeast Saccharomyces cerevisiae)中,可以使用许多含有如α因子、醇氧化酶和PGH等组成型启动子或诱导型启动子的载体。有关综述,参见Ausubel等人(1989)《分子生物学实验指南(Current Protocols in Molecular Biology)》纽约州纽约市的约翰威利父子公司(John Wiley&Sons,New York,N.Y)以及Grant等人,《酶学方法(Methods Enzymol)》.,153:516-544(1997)。

[0451] 构建体引入到宿主细胞中可能受到磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、感染或其它方法影响。此类方法描述于许多标准实验室手册中,如Davis等人,《分子生物学基础方法(Basic Methods In Molecular Biology)》(1986),所述文献以引用方式整体并入本文。

[0452] 可以通过将增强子序列插入到载体中来提高由较高等真核生物进行的对编码本公开的抗体的DNA的转录。增强子是起到增加给定宿主细胞类型中的启动子的转录活性的作用的通常为约10至300bp的DNA的顺式作用元件。增强子的实例包括位于碱基对100至270处的复制起点的后侧的SV40增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、复制起点的后侧上的多瘤增强子和腺病毒增强子。

[0453] 为了使经翻译的蛋白质分泌到内质网的腔、周质空间或细胞外环境中,可以将适当的分泌信号并入到所表达的多肽中。所述信号对于多肽可以是内源性的,或者所述信号可以是异源性信号。

[0454] 多肽(例如,抗体)可以以经修饰形式如融合蛋白(例如,GST-融合物)或用组氨酸标签表达,并且不仅可以包括分泌信号,而且还可以包括另外的异源性功能区。例如,可以将另外的氨基酸,特别是带电荷的氨基酸的区添加到多肽的N末端,以改进在纯化期间或在随后的搬运和储存期间在宿主细胞中的稳定性和持久性。同样,可以将肽部分添加到多肽中以促进纯化。可以在最终制备多肽之前将此类区去除。将肽部分添加到多肽中以引起分泌或排泄、改进稳定性并促进纯化等是本领域的熟知和常规技术。

[0455] 本公开还提供了与本文所述的任何核苷酸序列为至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%相同的核酸序列、以及与本文所述的任何氨基酸序列为至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%相同的氨基酸序列。

[0456] 本公开还提供了与如本文所述的任何核苷酸序列具有至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同源性的核酸序列以及与如本文所述的任何氨基酸序列具有至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同源性的氨基酸序列。

[0457] 在一些实施例中,本公开涉及编码本文所述的任何肽的核苷酸序列、或由本文所述的任何核苷酸序列编码的任何氨基酸序列。在一些实施例中,核酸序列为小于10、20、30、

40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、150、200、250、300、350、400、500、或600个核苷酸。在一些实施例中,氨基酸序列为小于5个、6个、7个、8个、9个、10个、20个、30个、40个、50个、60个、70个、80个、90个、100个、110个、120个、130个、140个、150个、160个、170个、180个、190个、200个、250个、300个、350个或400个氨基酸残基。

[0458] 在一些实施例中,氨基酸序列(i)包含氨基酸序列;或(ii)由氨基酸序列组成,其中所述氨基酸序列是如本文所述的序列中的任何序列。

[0459] 在一些实施例中,核酸序列(i)包含核酸序列;或(ii)由核酸序列组成,其中所述核酸序列是如本文所述的序列中的任何序列。

[0460] 制备抗体的方法

[0461] 可以将人蛋白质(例如,PD-L1、VEGF或癌症抗原)的所分离片段用作免疫原以使用用于多克隆和单克隆抗体制备的标准技术产生抗体。可以通过多次注射(例如,皮下注射或腹膜内注射)抗原肽或蛋白质在动物中产生多克隆抗体。在一些实施例中,抗原肽或蛋白质与至少一种佐剂一起注射。在一些实施例中,抗原肽或蛋白质可以与在待免疫的物种中具有免疫原性的试剂缀合。可以向动物注射多于一次(例如,两次、三次或四次)抗原肽或蛋白质。

[0462] 可以将全长多肽或蛋白质用作免疫原,或者可替代地,可以将其抗原肽片段用作免疫原。蛋白质的抗原肽包含蛋白质的氨基酸序列的至少8个(例如,至少10个、15个、20个或30个)氨基酸残基,并且涵盖蛋白质的表位,使得针对肽产生的抗体与蛋白质形成特异性免疫复合物。

[0463] 免疫原通常用于通过使合适的受试者(例如,表达至少一个人免疫球蛋白基因座的人或转基因动物)免疫来制备抗体。适当的免疫原性制剂可以含有例如经过重组表达的多肽或经过化学合成的多肽。制剂可以进一步包括佐剂,如弗氏完全或不完全佐剂(Freund's complete or incomplete adjuvant)或类似免疫刺激剂。

[0464] 如上所述,可以通过用多肽或其抗原肽(例如,蛋白质的一部分)作为免疫原使适合的受试者免疫来制备多克隆抗体。可以通过标准技术,如利用使用固定化多肽或肽的酶联免疫吸附测定(ELISA))随时间推移监测经过免疫的受试者中的抗体滴度。如果需要,可以从哺乳动物中(例如,从血液中)分离抗体分子,并且通过众所周知的技术(如蛋白G层析法的蛋白A)对其进行进一步纯化以获得IgG馏分。在免疫后的适当时间,例如当特异性抗体滴度最高时,可以从受试者获得抗体产生细胞,并且通过以下标准技术将其用于制备单克隆抗体:如最初由Kohle等人(《自然》256:495-497,1975)描述的杂交瘤技术、人B细胞杂交瘤技术(Kozbor等人,《今日免疫学(Immunol.Today)》4:72,1983)、EBV杂交瘤技术(Cole等人,《单克隆抗体与癌症疗法(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy)》,Alan R.Liss公司(Alan R.Liss,Inc.),第77-96页,1985)或三源杂交瘤技术。用于产生杂交瘤的技术是众所周知的(通常参见,《当代免疫学指南(Current Protocols in Immunology)》,1994,Coligan等人(编辑),纽约州纽约市的约翰威利父子公司)。通过筛选杂交瘤培养物上清液中结合所关注的多肽或表位的抗体例如使用标准ELISA测定)对产生单克隆抗体的杂交瘤细胞进行检测。

[0465] VHH也可以从纯种或设计的合成大羊驼VHH文库获得。可以从大羊驼中获得PBMC,并且可以分离RNA以通过逆转录产生cDNA。然后,可以通过PCR扩增VHH基因,并且将所述基

因克隆到噬菌体展示载体上,以构建天然VHH文库。可以通过将由重叠PCR产生的改组的VHH CDR1、2和3掺入到经修饰人VH支架中来制备合成的(例如,人源化)VHH文库,以产生增强的多样性并且保持低免疫原性。然后可以将VHH文库针对抗原进行淘选以获得具有所期望的结合能力的VHH。

[0466] 可以通过将适当的核苷酸改变引入到编码本文所述的人抗体、人源化抗体或嵌合抗体或其抗原结合片段的DNA中或通过肽合成来制备本文所述的抗体或抗原结合片段的变体。此类变体包括例如制成抗体的抗原结合位点或抗原结合结构域的氨基酸序列内的残基的缺失、插入或取代。在此类变体的群体中,一些抗体或抗原结合片段对靶蛋白将具有增加的亲和力。可以进行缺失、插入和/或组合的任何组合以获得对靶标具有增加的结合能力的抗体或其抗原结合片段。引入到抗体或抗原结合片段中的氨基酸改变也可以改变抗体或抗原结合片段或将新的翻译后修饰引入到抗体或抗原结合片段中,如改变(例如,增加或减少)糖基化位点的数量、改变糖基化位点的类型(例如,改变氨基酸序列,使得由细胞中存在的酶连接不同的糖)或引入新的糖基化位点。

[0467] 本文所公开的抗体可以源自任何动物物种,包括哺乳动物。天然抗体的非限制性实例包括源自人、灵长类动物(例如,猴和猿)、奶牛、猪、马、绵羊、骆驼科动物(例如,骆驼科动物、羊驼和大羊驼)、鸡、山羊和啮齿动物(例如,大鼠、小鼠、仓鼠和兔)的抗体,所述啮齿动物包括经过基因工程化以产生人抗体的转基因啮齿动物。

[0468] 噬菌体展示(淘选)可以用于优化具有所期望的结合能力的抗体序列。在此技术中,可以将编码单链Fv(包含VH或VL)或VHH的基因插入噬菌体包衣蛋白基因中,使得噬菌体在其外部“展示”scFv或VHH同时在其内部含有蛋白质的基因,从而导致基因型与表型之间的连接。然后可以针对靶抗原筛选这些展示噬菌体,以便检测所展示的抗原结合位点与靶抗原之间的相互作用。因此,可以在称为体外选择的过程中筛选和扩增大型蛋白质文库并且可以获得具有所期望的结合能力的抗体序列。

[0469] 人抗体和人源化抗体包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区(或具有与源自人种系免疫球蛋白序列的氨基酸序列相同的氨基酸序列)的抗体。人抗体可以包括例如CDR中的未由人种系免疫球蛋白序列(例如,通过体外随机诱变或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)编码的氨基酸残基。

[0470] 人源化抗体通常具有移植有非人CDR的人框架(FR)。因此,人源化抗体具有从非人的来源引入到其的一个或多个氨基酸序列。这些非人氨基酸残基通常被称为“输入(import)”残基,所述输入残基通常取自“输入”可变结构域。人源化基本上可以通过例如用啮齿动物CDR或CDR序列取代人抗体的相应序列来执行。这些方法描述于以下中,例如Jones等人,《自然》,321:522-525(1986);Riechmann等人,《自然》,332:323-327(1988);Verhoeyen等人,《科学》,239:1534-1536(1988);所述文献中的每个文献以引用方式整体并入本文。因此,“人源化”抗体是嵌合抗体,其中基本上少于完整的人V结构域已由来自非人物种的相应序列取代。

[0471] 更重要的是,对抗体进行人源化,保留对抗原的高特异性和亲和力和其它有利的生物学特性。为了实现此目标,人源化抗体可以通过使用亲本序列和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物的过程来制备。三维免疫球蛋白模型通常是可获得的,并且是本领域技术人员熟悉的。说明并展示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构

象结构的计算机程序是可获得的。对这些展示的检查允许对残基在候选免疫球蛋白序列的功能方面的可能作用进行分析,即对影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基进行分析。以此方式,可以从接受者序列和输入序列中选择并组合FR残基,从而实现所期望的抗体特点,如对靶抗原的亲和力增加。

[0472] 关于原始序列的同一性或同源性通常是存在于候选序列内的与存在于人抗体、人源化抗体或嵌合抗体或片段内的序列相同的氨基酸残基的在比对序列并在必要时引入空位以实现最大序列同一性百分比之后并且不考虑作为序列同一性的一部分的保守取代的百分比。

[0473] 在一些实施例中,可以对抗体或其抗原结合片段进行共价修饰。这些共价修饰可以通过化学合成或酶促合成或通过酶促切割或化学切割来进行。通过使抗体或片段的靶向氨基酸残基与能够与所选侧链或N末端残基或C末端残基反应的有机衍生剂反应,将抗体或抗体片段的其它类型的共价修饰引入到分子中。

[0474] 在一些实施例中,通过了具有缺少与Fc区(直接或间接)连接的岩藻糖的碳水化合物结构的抗体变体。例如,此类抗体中的岩藻糖的量可以是1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。例如,岩藻糖的量是通过计算糖链内在Asn297处的岩藻糖的相对于如通过如WO 2008/077546中所述的MALDI-TOF质谱法测得的与Asn 297附接的所有糖结构(例如,复合、杂合和高甘露糖结构)的总和的平均量确定的。Asn297是指位于Fc区中约位置297(Fc区残基的EU编号;或Kabat编号中的位置314)处的天冬酰胺残基;然而,由于抗体中的微小序列变化,Asn297还可以位于位置297上游或下游约±3个氨基酸处,即,位置294与300之间。此类岩藻糖基化变体可以具有改善的ADCC功能。在一些实施例中,为了减少聚糖异质性,抗体的Fc区可以被进一步工程化以用丙氨酸(N297A)替换在位置297处的天冬酰胺。

[0475] 在一些实施例中,为了通过避免Fab臂交换促进生产效率,对抗体的Fc区进行了进一步工程化,以用脯氨酸(S228P)替代IgG4的在位置228(EU编号)处的丝氨酸。关于S228突变的详细描述在以下中进行了描述,例如Silva等人"S228P突变防止如使用新型定量免疫测定和生理基质制备的组合所展示的体内和体外IgG4 Fab臂交换(The S228P mutation prevents in vivo and in vitro IgG4 Fab-arm exchange as demonstrated using a combination of novel quantitative immunoassays and physiological matrix preparation)."《生物化学杂志(Journal of Biological Chemistry)》290.9(2015):5462-5469,其以引用方式整体并入。

[0476] 在一些实施例中,本文所述的方法被设计成制备双特异性抗体。可以通过对抗体分子对之间的界面进行工程化以最大化从重组细胞培养物中回收的异源二聚体的百分比来制备双特异性抗体。例如,界面可以含有抗体恒定结构域的CH3结构域的至少一部分。在此方法中,将来自第一抗体分子界面的一个或多个小的氨基酸侧链替代为较大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸)。通过用较小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替代大的氨基酸侧链,在第二抗体分子的界面上产生了与一个或多个大的侧链相同或相似大小的补偿"腔"。这提供了增加异二聚体的产量而不是其它不需要的终产物诸如同二聚体的一种机制。例如在WO 96/27011中描述了此方法,将其全文以引用方式并入。

[0477] 在一些实施例中,IgG的CH3部分中的一个或多个氨基酸残基被取代。在一些实施例中,一条重链具有以下取代Y349C和T366W中的一个或多个取代。另一条重链可以具有一

个或多个以下取代E356C、T366S、L368A和Y407V。此外,也可以在两个经取代的IgG的铰链区处引入取代(-ppcpScp-->-ppcpPcp-)。在一些实施例中,一条重链具有T366Y(杵)取代,并且另一条重链具有Y407T(臼)取代(EU编号)。

[0478] 本申请的一方面提供了一种异源多聚体(例如,异源二聚体)蛋白,其包含第一多肽和第二多肽,所述第一多肽包含第一重链恒定结构域3(CH3)结构域,所述第二多肽包含第二CH3结构域,其中所述第一CH3结构域包含相对于野生型CH3结构域在氨基酸位置354处用大体积疏水氨基酸的取代,和/或所述第二CH3结构域包含相对于野生型CH3结构域在氨基酸位置347处用带负电荷的氨基酸的取代,并且其中氨基酸残基编号基于EU编号。在一些实施例中,在氨基酸位置354处的庞大疏水性氨基酸与第二CH3结构域中的氨基酸残基形成疏水相互作用。在一些实施例中,第二CH3结构域包含在氨基酸位置349(例如,Y349)处的庞大疏水残基。在一些实施例中,在氨基酸位置347处的带负电荷的氨基酸与第一CH3结构域中的氨基酸残基形成离子键。在一些实施例中,第一CH3结构域包含在氨基酸位置360(例如,K360)处的带正电荷的残基。在一些实施例中,第一CH3结构域和第二CH3结构域是人CH3结构域。在一些实施例中,第一CH3结构域包含选自由以下组成的组的取代:S354Y、S354F和S354W。在一些实施例中,第一CH3结构域包含S354Y。在一些实施例中,第二CH3结构域不包含用于取代第一CH3结构域中的S354的补偿性取代(例如,在Y349处的取代)。在一些实施例中,第二CH3结构域包含选自由Q347E和Q347D组成的组的取代。在一些实施例中,第二CH3结构域包含Q347E。在根据上述异源多聚体蛋白中的任何一种异源多聚体蛋白的一些实施例中,第一CH3结构域和第二CH3结构域进一步包含杵臼(KIH)残基。在一些实施例中,杵臼残基是T366Y和Y407T。在一些实施例中,第一CH3结构域包含T366Y和S354Y,并且第二CH3结构域包含Y407T和Q347E。在一些实施例中,第一CH3结构域包含Y407T和S354Y,并且第二CH3结构域包含T366Y和Q347E。细节可以在以下中找到,例如PCT/US2020/025469,所述文献以引用方式并入本文。

[0479] 治疗方法

[0480] 本文所述的方法包括用于治疗与癌症相关的病症的方法。通常,所述方法包括向需要或已确定需要此类治疗的受试者施用治疗有效量的如本文所述的其抗原结合片段的经工程化的双特异性抗体。

[0481] 如在此上下文中所用,“治疗”意指改善与癌症相关的病症的至少一种症状。通常,癌症会导致死亡;因此,治疗可以使得预期寿命增加(例如,延长至少1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月,或延长至少1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年)。施用治疗有效量的本文所述的药剂(例如,双特异性抗体)用于治疗与癌症相关的病状将使得癌细胞数量减少和/或症状缓解。

[0482] 如本文所用,术语“癌症”是指具有自主生长能力的细胞,即以快速增殖的细胞生长为特征的异常状态或病状。所述术语意在包括所有类型的癌性生长或致癌过程、转移性组织或恶性转化的细胞、组织或器官,而不论组织病理学类型或侵袭性阶段。如本文所用,术语“肿瘤”是指癌细胞例如大量癌细胞。可以使用本文所述的方法治疗或诊断的癌症包括各种器官系统的恶性肿瘤,如影响肺、乳腺、甲状腺、淋巴、胃肠道和泌尿生殖道的恶性肿瘤,以及包括恶性肿瘤的腺癌,如大多数结肠癌、肾细胞癌、前列腺癌和/或睾丸肿瘤、非小细胞肺癌、小肠癌和食道癌。在一些实施例中,本文所述的药剂被设计成用于治疗或诊断受

试者的癌症。术语“癌”是本领域公认的,并且是指上皮或内分泌组织的恶性肿瘤,包括呼吸系统癌、胃肠道系统癌、泌尿生殖系统癌、睾丸癌、乳腺癌、前列腺癌、内分泌系统癌、和黑色素瘤。在一些实施例中,癌症是肾癌或黑素瘤。示例性癌包括形成于子宫颈、肺、前列腺、乳腺、头颈部、结肠和卵巢组织的癌。所述术语还包括癌肉瘤,例如所述癌肉瘤包括由癌性组织和肉瘤组织构成的恶性病。“腺癌”是指源自腺体组织或其中肿瘤细胞形成可识别的腺体结构的癌。术语“肉瘤”是本领域公认的,并且是指间充质衍生的恶性病。

[0483] 一方面,本公开还提供了用于治疗受试者的癌症的方法、降低受试者的肿瘤体积随着时间的推移增加的速率的方法、降低发生转移的风险的方法或降低受试者发生另外的转移的风险的方法。在一些实施例中,治疗可以停止、减慢、延缓或抑制癌症的进展。在一些实施例中,治疗可以导致受试者中癌症的一种或多种症状的数量、严重性和/或持续时间的减少。

[0484] 在一方面,本公开的特征在于方法,所述方法包括向有需要的受试者例如,患有癌症或者被标识为或被诊断为患有癌症的受试者施用本文所公开的治疗有效量的抗体或其抗原结合片段或抗体药物缀合物,所述癌症例如乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)、良性肿瘤癌、宫颈癌、子宫内膜癌、胶质瘤、头颈癌、肝癌、肺癌、小细胞肺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、结肠直肠癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、膀胱癌、尿道癌或血液系统恶性肿瘤。

[0485] 如本文所用,术语“受试者”和“患者”在整个说明书中可互换使用,并且描述提供根据本发明的方法进行治疗的动物、人或非人。在本发明中设想了兽医应用和非兽医应用。人类患者可以是成年人或青少年(例如,年龄为18岁以下的人)。除了人之外,患者包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、兔子、雪貂、猫、狗和灵长类动物。包括例如非人灵长类动物(例如,猴子、黑猩猩、大猩猩等)、啮齿动物(例如,大鼠、小鼠、沙鼠、仓鼠、雪貂、兔子)、兔类动物、猪类动物(例如,猪、小型猪)、马、犬、猫、牛和其它家畜动物、农场动物和动物园动物。

[0486] 在一些实施例中,癌症是表达PD-L1的癌症。在一些实施例中,癌症是表达VEGF的癌症。在一些实施例中,癌症是表达PD-L1和VEGF两者的癌症。

[0487] 在一些实施例中,所述癌症是不可切除的黑色素瘤或转移性黑色素瘤、非小细胞肺癌(NSCLC)、小细胞肺癌(SCLC)、膀胱癌或转移性激素难治性前列腺癌。在一些实施例中,所述受试者患有实体瘤。在一些实施例中,所述癌症为头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)、肾细胞癌(RCC)、三阴性乳腺癌(TNBC)或结直肠癌、宫颈癌、子宫内膜癌或肝细胞癌。在一些实施例中,受试者患有霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin’s lymphoma)。在一些实施例中,受试者患有三阴性乳腺癌(TNBC)、胃癌、尿路上皮癌、梅克尔细胞癌(Merkel-cell carcinoma)或头颈鳞状细胞癌。在一些实施例中,所述癌症为黑色素瘤、胰腺癌、间皮瘤、血液系统恶性病,尤其是非霍奇金氏淋巴瘤、淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病或晚期实体瘤。

[0488] 在一些实施例中,癌症是结肠癌、直肠癌、肺癌、乳腺癌、肾癌、肝细胞癌、肾癌、子宫内膜癌、胰腺癌、头颈癌或晚期实体瘤。

[0489] 在一些实施例中,本文所述的癌细胞是细胞系。在一些实施例中,癌细胞具有升高的VEGF或PD-L1水平,例如,比非癌细胞高至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%。

[0490] 在一些实施例中,本文公开的组合物和方法可以用于治疗处于患癌症风险的患

者。癌症患者可以通过本领域已知的各种方法来鉴定。

[0491] 如本文所用,“有效量”意指足以实现有益或期望结果(包括停止、减慢、延缓或抑制疾病(例如癌症)的进展)的量或剂量。有效量将根据例如要施用抗体、抗原结合片段、抗体药物缀合物、编码抗体的多核苷酸、包含多核苷酸的载体和/或其组合物的受试者的年龄和体重、症状的严重程度和施用的途径而变化,并且因此施用可以根据个人情况而确定。

[0492] 有效量可以在一次或多次给药中进行施用。举例来说,抗体、抗原结合片段或抗体药物缀合物的有效量是足以改善、停止、稳定、逆转、抑制、减缓和/或延缓患者的疾病(例如,自身免疫性疾病或癌症)的进展的量,或者是足以改善、停止、稳定、逆转、减缓和/或延缓细胞(例如,活检细胞、本文所述的癌细胞中的任何癌细胞或细胞系(例如,癌细胞系))在体外的增殖的量。如本领域所了解的,抗体、抗原结合片段或抗体药物缀合物的有效量可以变化,尤其取决于患者病史以及其它因素,如所使用抗体的类型(和/或剂量)。

[0493] 施用本文所公开的抗体、编码抗体的多核苷酸、抗体药物缀合物和/或组合物的有效量和方案可以凭经验确定,并且做出此类确定在本领域的技术范围内。本领域技术人员将理解,必须施用的剂量将根据例如将接受本文所公开的抗体、编码抗体的多核苷酸、抗体药物缀合物和/或组合物的哺乳动物、施用途径、所使用的本文所公开的抗体、编码抗体的多核苷酸、抗原结合片段、抗体药物缀合物和/或组合物的具体类型以及施用于哺乳动物的其它药物而变化。可以在有关抗体和抗原结合片段治疗用途的文献中找到选择适当的抗体或抗原结合片段剂量的指南,例如《单克隆抗体手册(Handbook of Monoclonal Antibodies》,Ferrone等人编辑,新泽西州帕克里奇的诺伊斯出版社(Noges Publications,Park Ridge,N.J.),(1985)第22章和第303-357页;Smith等人,《人诊断和疗法中的抗体(Antibodies in Human Diagnosis and Therapy)》,Haber等人,编辑,纽约的瑞文出版社(Raven Press,New York),1977,第365-389页。

[0494] 有效量的抗体的典型的每日剂量为0.01mg/kg至100mg/kg。在一些实施例中,剂量可以小于100mg/kg、10mg/kg、9mg/kg、8mg/kg、7mg/kg、6mg/kg、5mg/kg、4mg/kg、3mg/kg、2mg/kg、1mg/kg、0.5mg/kg或0.1mg/kg。在一些实施例中,剂量可以大于10mg/kg、9mg/kg、8mg/kg、7mg/kg、6mg/kg、5mg/kg、4mg/kg、3mg/kg、2mg/kg、1mg/kg、0.5mg/kg、0.1mg/kg、0.05mg/kg或0.01mg/kg。在一些实施例中,剂量为约10mg/kg、9mg/kg、8mg/kg、7mg/kg、6mg/kg、5mg/kg、4mg/kg、3mg/kg、2mg/kg、1mg/kg、0.9mg/kg、0.8mg/kg、0.7mg/kg、0.6mg/kg、0.5mg/kg、0.4mg/kg、0.3mg/kg、0.2mg/kg或0.1mg/kg。

[0495] 在本文所述的方法中的任何方法中,所述至少一种抗体、其抗原结合片段、抗体药物缀合物或药物组合物(例如,本文所述的抗体、抗原结合片段、抗体药物缀合物或药物组合物中的任何抗体、抗原结合片段、抗体药物缀合物或药物组合物)以及任选地至少一种另外的治疗剂可以以每周至少一次(例如,每周一次、每周两次、每周三次、每周四次、每天一次、每天两次或每天三次)施用于受试者。在一些实施例中,至少两种不同抗体和/或抗原结合片段以相同的组合物(例如,液体组合物)施用。在一些实施例中,至少一种抗体、抗原结合片段、抗体药物缀合物和至少一种另外的治疗剂以相同的组合物(例如,液体组合物)施用。在一些实施例中,所述至少一种抗体或抗原结合片段和至少一种另外的治疗剂以两种不同组合物(例如,含有至少一种抗体或抗原结合片段的液体组合物和含有至少一种另外的治疗剂的固体口服组合物)施用。在一些实施例中,将所述至少一种另外的治疗剂以丸

剂、片剂或胶囊剂施用。在一些实施例中,将所述至少一种另外的治疗剂以持续释放的口服配制品施用。

[0496] 在一些实施例中,可以在施用至少一种抗体、抗原结合抗体片段、抗体药物缀合物或药物组合物(例如,本文所述的抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物中的任何抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物)之前或之后将一种或多种另外的治疗剂施用于受试者。在一些实施例中,将一种或多种另外的治疗剂和至少一种抗体、抗原结合抗体片段、抗体药物缀合物或药物组合物(例如,本文所述的抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物中的任何一种)施用于受试者,使得受试者中的一种或多种另外的治疗剂和至少一种抗体或抗原结合片段(例如,本文所述的抗体或抗原结合片段中的任何抗体或抗原结合片段)的生物活性期重叠。

[0497] 在一些实施例中,可以在延长的时间段内(例如,在至少1周、2周、3周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、1年、2年、3年、4年或5年的时间段内)将至少一种抗体、抗原结合抗体片段、抗体药物缀合物或药物组合物(例如,本文所述的抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物中的任何一种)施用于受试者。熟练的医疗专业人员可以使用本文所述的用于诊断或跟踪治疗有效性(例如观察至少一种癌症症状)的任何方法来确定治疗期的长度。如本文所述,熟练的医学专业人员还可以改变(例如,增加或减少)施用于受试者的抗体或抗原结合抗体片段、抗体药物缀合物(和/或一种或多种另外的治疗剂)的身份和数量,并且还可以基于对治疗有效性的评估(例如,使用本文所述和本领域已知的方法中的任何一种方法)来调整(例如,增加或减少)施用于受试者的至少一种抗体或抗原结合抗体片段(和/或一种或多种另外的治疗剂)的剂量或频率。

[0498] 在一些实施例中,可以将一种或多种另外的治疗剂施用至受试者。另外的治疗剂可以包含一种或多种选自由以下组成的组的抑制剂:B-Raf抑制剂、VEGF抑制剂、PD-1抑制剂、MEK抑制剂、ERK抑制剂、K-Ras抑制剂、c-Met抑制剂、间变性淋巴瘤激酶(ALK)抑制剂、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)抑制剂、Akt抑制剂、mTOR抑制剂、双重PI3K/mTOR抑制剂、布鲁顿氏酪氨酸激酶(Bruton's tyrosine kinase,BTK)抑制剂以及异柠檬酸脱氢酶1(IDH1)和/或异柠檬酸脱氢酶2(IDH2)抑制剂。在一些实施例中,所述另外的治疗剂是吲哚胺2,3-二加氧酶-1)(IDO1)的抑制剂(例如艾卡哚司他(epacadostat))。

[0499] 在一些实施例中,所述另外的治疗剂可以包含一种或多种抑制剂,所述一种或多种抑制剂选自由以下组成的组:HER3抑制剂、LSD1抑制剂、MDM2抑制剂、BCL2抑制剂、CHK1抑制剂、激活的hedgehog信号传导途径的抑制剂,以及选择性地降解雌激素受体的药剂。

[0500] 在一些实施例中,所述另外的治疗剂可以包含一种或多种治疗剂,所述一种或多种治疗剂选自由以下组成的组:曲贝替定、白蛋白结合型紫杉醇(nab-paclitaxel)、Trebananib、帕唑帕尼、西地尼布、帕博昔布、依维莫司、氟嘧啶、IFL、瑞戈非尼、Reolysin、力比泰(Alimta)、Zykadia、索坦(Sutent)、坦西莫司、阿昔替尼、依维莫司、索拉非尼、Votrient、帕唑帕尼、IMA-901、AGS-003、卡博替尼、长春氟宁、Hsp90抑制剂、Ad-GM-CSF、替莫唑胺(Temazolomide)、IL-2、IFNa、长春碱、沙立度胺(Thalomid)、达卡巴嗪、环磷酰胺、来那度胺、氮杂胞苷、来那度胺、硼替佐米、氨柔比星(amrubicine)、卡非佐米、普拉曲沙和恩扎妥林。

[0501] 在一些实施例中,所述另外的治疗剂可以包含一种或多种治疗剂,所述一种或多种治疗剂选自由以下组成的组:佐剂、TLR激动剂、肿瘤坏死因子(TNF)α、IL-1、HMGB1、IL-10拮抗剂、IL-4拮抗剂、IL-13拮抗剂、IL-17拮抗剂、HVEM拮抗剂、ICOS激动剂、靶向CX3CL1的治疗、靶向CXCL9的治疗、靶向CXCL10的治疗、靶向CCL5的治疗、LFA-1激动剂、ICAM1激动剂和选择素(Selectin)激动剂。

[0502] 在一些实施例中,将卡铂、白蛋白结合型紫杉醇、紫杉醇、顺铂、培美曲塞、吉西他滨、FOLFOX或FOLFIRI施用至受试者。

[0503] 在一些实施例中,另外的治疗剂是抗VEGFR抗体、抗OX40抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗LAG-3抗体、抗TIGIT抗体、抗BTLA抗体、抗CTLA-4抗体或抗GITR抗体。

[0504] 药物组合物和施用途径

[0505] 本文还提供了含有本文所述的抗体、抗原结合片段或抗体药物缀合物中的至少一种(例如,一种、两种、三种或四种)的药物组合物。本文所述的抗体、抗原结合片段或抗体药物缀合物中的任何抗体、抗原结合片段或抗体药物缀合物中的两种或更多种(例如,两种、三种或四种)可以以任何组合的形式存在于药物组合物中。药物组合物可以以本领域已知的任何方式调配。

[0506] 药物组合物被调配成与其预期施用途径(例如,静脉内、动脉内、肌肉内、皮内、皮下或腹膜内)相容。组合物可以包括无菌稀释剂(例如,无菌水或盐水)、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂、抗菌剂或抗真菌剂如苄醇或对羟基苯甲酸甲酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等;抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂如乙二胺四乙酸;缓冲液如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及等渗剂如糖(例如,右旋糖)、多元醇(例如,甘露醇或山梨醇)或盐(例如,氯化钠)或其任何组合。脂质体悬浮液也可以用作药学上可接受的载剂(参见例如美国专利第4,522,811号)。组合物的制剂可以调配并封装在安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。在需要的情况下(例如,在可注射调配物中),可以例如通过使用包衣(如卵磷脂)或表面活性剂来维持适当的流动性。抗体或其抗原结合片段的吸收可以通过包括延缓吸收的药剂(例如,单硬脂酸铝和明胶)来延长。可替代地,可以通过植入物和微囊化递送系统实现控释,所述系统可以包括可生物降解的生物相容性聚合物(例如,乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸;阿尔扎公司(Alza Corporation)和诺娃制药公司(Nova Pharmaceutical,Inc.))。

[0507] 含有本文所述的抗体、抗原结合片段、抗体药物缀合物中的任何一种中的一种或多种的组合物可以以剂量单位形式(即含有预定量的活性化合物的物理离散单元,以便于施用和剂量均匀)调配用于肠胃外(例如,静脉内、动脉内、肌肉内、皮内、皮下或腹膜内)施用。

[0508] 组合物的毒性和治疗功效可以通过细胞培养物或实验动物(例如,猴)的标准药物程序来确定。例如,可以确定LD50(对50%的群体致死的剂量)和ED50(在50%的群体中治疗有效的剂量):治疗指数为LD50:ED50的比率。表现出高治疗指数的药剂是优选的。在药剂表现出不期望的副作用的情况下,应注意使潜在的损害最小化(即减少不希望的副作用)。毒性和治疗功效可以通过其它标准药物程序来确定。

[0509] 可以使用从细胞培养测定和动物研究获得的数据来调配用于受试者(例如,人类)

的任何给定药剂的适当剂量。一种或多种(例如,一种、两种、三种或四种)抗体或其抗原结合片段(例如,本文所述的任何抗体或抗体片段)的治疗有效量将是在受试者(例如,被鉴定为患有癌症的人类受试者)或被鉴定为有风险患上疾病的受试者(例如,先前曾患有癌症但现在已被治愈的受试者)中治疗受试者的疾病(例如,杀死癌细胞)、降低受试者(例如,人类)的疾病的一种或多种症状的严重程度、频率和/或持续时间的量。本文所述的抗体或抗原结合片段中的任何抗体或抗原结合片段的有效性和剂量可以由卫生保健专业人员或兽医专业人员使用本领域已知的方法并且通过观察受试者(例如,人类)的疾病的一种或多种症状来确定。某些因素可能影响有效治疗受试者所需的剂量和时程(例如,疾病或病症的严重程度、之前的治疗、受试者的总体健康状况和/或年龄以及其它疾病的存在)。

[0510] 示例性剂量包括每千克受试者体重毫克或微克量的本文所述的抗体或抗原结合片段或抗体药物缀合物中的任何一种(例如,约1μg/kg至约500mg/kg;约100μg/kg至约500mg/kg;约100μg/kg至约50mg/kg;约10μg/kg至约5mg/kg;约10μg/kg至约0.5mg/kg;或约1μg/kg至约50μg/kg)。虽然这些剂量涵盖宽泛的范围,但是本领域普通技术人员将理解,治疗剂(包括抗体和其抗原结合片段)的效力是不同的,并且有效量可以通过本领域已知的方法来确定。典型地,首先施用相对低的剂量,并且主治卫生保健专业人员或兽医专业人员(在治疗应用的情况下)或研究人员(当仍在研发阶段工作时)可以随后且逐渐增加剂量,直到获得适当的应答为止。另外,应理解的是,对任何特定受试者的具体剂量水平将取决于各种各样的因素,包括受试者所采用的具体化合物的活性、年龄、体重、总体健康状况、性别和饮食、施用时间、施用途径、排泄率和抗体或抗体片段在体内的半衰期。

[0511] 药物组合物可以与施用说明书一起包括在容器、包装或分配器中。本公开还提供了制造用于如本文所述的各种用途的抗体或其抗原结合片段或抗体药物缀合物的方法。

[0512] 实例

[0513] 在以下实例中进一步描述本发明,所述实例并不限制权利要求书中所描述的本发明的范围。

[0514] 实例1:免疫、抗人PD-L1 VHH抗体的产生和命中鉴定

[0515] 人、食蟹猴和小鼠PD-L1细胞外结构域(ECD)的重组蛋白的抗原购自美国义翘神州公司(Sinobiological USA)。PD-L1抗原的免疫是使用2岁原初雌性羊驼进行的。通过ELISA测定测量血清抗体的滴度。4轮免疫后,观察到高滴度(1:100,000)的抗h-PD-L1。从羊驼收集80ml全血,并且分离PBMC。从PBMC中分离RNA。

[0516] 使用覆盖所有羊驼种系的10对专门设计的引物,用PCR扩增VHH(重链抗体的重链的可变结构域)基因。PCR产物通过DNA琼脂糖凝胶和凝胶提取试剂盒进行纯化,构建到噬菌粒载体pADL-23c中并且通过电穿孔转化成TG1电感受态细胞。在2YT培养基中培养经转化的TG1细胞,并且通过添加辅助噬菌体并培养过夜来产生显示靶VHH的噬菌体。通过用4%PGE/0.5M NaCl沉淀和高速离心来收获培养物上清液中的噬菌体。使用包被有生物素化h-PD-L1 ECD蛋白或m-PD-L1 ECD蛋白的链霉亲和素偶联的Dynabeads来对人PD-L1(h-PD-L1)或小鼠PD-L1(m-PD-L1)抗原的结合剂进行淘选。2-3轮淘选后,将h-PD-L1或m-PD-L1的结合剂洗脱并用于感染SS320细胞。挑取SS320细胞的集落并在2YT培养基中培养,并且添加0.5mM IPTG用于分泌VHH抗体。使用h-PD-L1 ECD抗原包被的板通过ELISA测定,随后使用稳定表达h-PD-L1的293T细胞进行流式细胞术全细胞结合测定来筛选具有VHH抗体的上清液。挑取全细

胞结合剂进行测序。获得了54个具有不同序列的克隆,其中许多克隆在CDR或框架中仅具有微小的序列差异。对24个具有更独特序列的克隆进行了鉴定。通过分析序列使用IMGT(国际免疫遗传学信息系统)来获得CDR和框架序列。

[0517] 实例2:功能性PD-L1 VHH抗体的表征

[0518] 通过添加人IgG1恒定重链2(CH2)和恒定重链3(CH3)的铰链区和结构域,使用24个独特克隆来制备具有人IgG1 Fc区(VHH-Fc)的二价抗体。在CHO细胞中瞬时表达所构建的二价VHH-Fc抗体,并且收获上清液中的蛋白质并通过蛋白A树脂进行纯化。

[0519] 通过流式细胞术全细胞结合(WCB)测定来确定稳定转染的细胞中二价PD-L1 VHH-Fc克隆与人PD-L1的结合。简单来说,将抗体(不同浓度)与稳定表达h-PD-L1的细胞($0.2x10^6$/ml)以100ul/孔在FACS缓冲液(具有1.0%FBS的PBS)中在96孔板中一起温育30分钟。洗涤后,添加Alexaflour488缀合的抗人IgG Fc二级抗体(AlexaFluor®488AffiniPure山羊抗人IgG,Fcγ片段特异性,杰克逊实验室(Jackson labs),1:750稀释度),并温育30分钟。洗涤后,通过对活细胞群体进行门控使用CytoFlex(贝克曼库尔特公司(Beckman Coulter))并使用FITC通道来测量中值荧光强度。使用GraphPad Prism7.0计算结合的EC50。图1A中示出了代表性结果。下表1中示出了功能性结合剂(所述功能性结合剂与人IgG1 Fc融合)的概述。

[0520] 通过PD-L1阻断测定来确定PD-L1 VHH-Fc克隆的功能。简单来说,将稳定表达h-PD-L1的CHO细胞在96孔半区域细胞培养板中以20k/孔培养过夜。取出培养基,并且以20ul/孔添加PD-L1抗体的连续稀释液。以20ul/孔以200万/ml的密度添加人PD1和NFAT报告基因稳定转染的Jurkat细胞。温育5小时后,添加40ul的具有底物(普洛麦格公司(Promega))的Bright-Glo荧光素酶测定缓冲液,并且使用读板器EnSight(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))通过化学发光活性来测量荧光素酶活性。通过GraphPad Prims7.0使用非线性回归计算抗体阻断PD-L1活性的效力。图1B中示出了代表性结果。下表中示出了功能性克隆的效力(以nM为单位的EC50值)的概述。R1-R3(克隆名称)表示1至3轮淘选。

[0521] 表1:全细胞结合测定和PD-L1阻断测定中的EC50的概述。

[0522]

| | 克隆名称 | 与 h-PD-L1 的 WCB 中的 EC50，nM | PD-L1 阻断报告基因测定中的 EC50，nM |
|---|---|---|---|
| 1 | R1-1C3 | 1.69 | 1.14 |
| 2 | R2-1G4 | 0.42 | 0.58 |
| 3 | R2-1A3 | 0.88 | 0.76 |
| 4 | R2-3A5 | 0.6 | 0.72 |
| 5 | R2-1G10 | 0.63 | 0.85 |
| 6 | R2-6D2 | 0.93 | 1.14 |
| 7 | R2-4H8 | 0.87 | 1.59 |
| 8 | R2-6A10 | 0.54 | 1.20 |
| 9 | R2-5C12 | 0.24 | 0.77 |
| 10 | R2-1F4 | 0.22 | 0.76 |
| 11 | R2-4D2 | 0.202 | 1.12 |
| 12 | R2-4E2 | 0.148 | 1.18 |
| 13 | R3-3H1 | 0.815 | 1.88 |
| 14 | R3-5F8 | 0.53 | 1.00 |
| 15 | R3-2A11 | 1.16 | 3.00 |

[0523] 图28和30以及下表中示出了功能性结合剂的序列。

[0524] 表2:功能性结合剂的CDR和框架的序列

[0525]

| 克隆 | FR1 CDR1 FR2 CDR2 FR3 CDR3 FR4 | SEQ ID |
|---|---|---|
| R1-1C3 | EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGIFFSDTHMGWYRQAPGKER ELVAIITSGGSTDYVDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNTLKFEDTAV YYCNARRTTIYWGQGTQVTVSS | 1 |
| R2-1G4 | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSDTHMGWYRQAPGKER ELVALITSGGFTDYADSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNTLKFEDTA VYYCNARRTTIYWGQGTQVTVSS | 2 |
| R2-1A3 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFDFSDTHMGWYRQAPGKQR ELVALITSGAFTDYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNTLKFEDTAV YYCNARRTTIYWGQGTQVTVSS | 3 |
| R2-3A5 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSDTHMGWYRQAPGKQR ELVALITSGGFTDYADSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNTLKLEDTA VYYCNARRTTIYWGQGTQVTVSS | 4 |
| R2-1G10 | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIFFSDTHMGWYRQAPGKER ELVAIITSGGSTDYVDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKFEDTAV YYCNARRTTIYWGQGTQVTVSS | 5 |
| R2-6D2 | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSDTHMGWYRQAPGKER ELVALITSGGFTDYADSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNTLKFEDTA VYYCNARKTTIYWGQGTQVTVSS | 6 |
| R2-4H8 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCGASGIFFSGVHMGWYRQAPGKER ELVALITDSGSADYVDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKFEDTA VYYCNARTTTIYWGQGTQVTVSS | 7 |
| R2-6A10 | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSDTHMGWYRQAPGKER ELVALITSGGFTDYADSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNTLKFEDTA VYYCNARRSTIYWGQGTQVTVSS | 8 |
| R2-5C12 | QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFSASDVVMAWYRQAPGKQ REFVANIAARGSTDYANSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKSDDT AVYYCNALVWNGSSYNNWGQGTQVTVSS | 9 |
| R2-1F4 | QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFSASDVVMAWYRQAPGKQ REFVANIAASSTTRYADSVKGRFTISRDDAKNTVSLQMNSLKSEDTA VYYCNALVWNGSSYNNWGQGTQVTVSS | 10 |
| R2-4D2 | QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFSASDVVMAWYRQAPGKQ REFVANLGASSTTRYADSVKGRFTISRDDAKNTVSLQMNSLKSEDTA VYYCNALVWNGSSYNNWGQGTQVTVSS | 11 |
| R2-4E2 | EVQLVESGGGSVQDGGSLTLSCAASGFSAGDVVMAWYRQAPGKQ REFVANIAASSTTRYTDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKSEDTA VYYCNALVWNGSSYNNWGQGTQVTVSS | 12 |
| R3-3H1 | QLQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGIDFSDTHMGWYRQAPGKQR ELVAIITSGGSTDYVDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKFEDTAV YYCNARRSTIYWGQGTQVTVSS | 13 |
| R3-5F8 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFDFSDTHMGWYRQAPGKER ELVAIITSGGSTDYVDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKFEDTAV YYCNARRTTIYWGQGTQVTVSS | 14 |
| R3-2A11 | QVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGIDFSDTHMGWYRQAPGKQR ELVALITSGGFTDYPDSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNTLKLEDTA VYYCNARRTTIYWGQGTQVTVSS | 15 |

[0526]

[0527] 实例3:先导小鼠PD-L1结合剂的表征和选择

[0528] 使用Gator仪器和人PD-L1-ECD的重组蛋白通过BLI(生物层干涉测量)动力学测定来确定抗体(所有抗体与人IgG1 Fc融合)与人PD-L1的亲和力。下表中示出了高亲和力结合剂。5F8具有最高亲和力,如通过平衡解离常数(KD)确定的。使用小鼠PD-L1-ECD抗原包被的板通过ELISA测定来确定PD-L1克隆与小鼠PD-L1的交叉结合,随后确定与小鼠PD-L1稳定转染的293T细胞的全细胞结合。图2中示出了阳性小鼠PD-L1结合剂。

[0529] 表3:在动力学结合测定中靠前的PD-L1克隆的亲和力

[0530]

| 克隆 | koff (1/秒) | kon (1/毫秒) | KD (M) |
|---|---|---|---|
| 5F8 | 8.65E-06 | 1.60E+05 | 5.40E-11 |
| 3H1 | 1.39E-04 | 1.15E+05 | 1.20E-09 |

[0531]

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1F4 | 7.79E-04 | 3.83E+05 | 2.04E-09 |
| 5C12 | 1.54E-03 | 3.08E+05 | 5.01E-09 |
| 阿特朱单抗 | 8.01E-04 | 4.12E+05 | 1.94E-09 |
| KN035 | 8.82E-04 | 4.12E+05 | 2.14E-09 |

[0532] 基于克隆5F8和3H1(1)对人PD-L1的结合亲和力和(2)与小鼠PD-L1的全细胞结合的EC50,选择所述克隆5F8和3H1进行人源化(图2)。使用Igblast通过分析种系序列来进行人源化。使用最接近的种系序列来改变5F8和3H1的框架。对于克隆5F8,制备了八种人源化变体,并且对于克隆3H1,制备了7种人源化变体,所有人源化变体与人IgG1 Fc融合。5F8的变体7和8(5F8-hv7和8)和3H1的变体7(3H1-hv7)保留了h-PD-L1阻断功能(图3A),所述阻断功能具有与参考抗体恩沃利单抗(Envafolimab)(KN035)(一种单结构域PD-L1抗体)类似的效力。为了从这些人源化变体中选择有效的小鼠PD-L1结合剂,使用293T小鼠PD-L1稳定转染的细胞进行全细胞结合测定。图3B中示出了结合活性。在人源化变体中,3H1-hv7示出了与阿特珠单抗与小鼠PD-L1的结合能力类似的结合能力。所有其它变体示出了弱得多的结合能力(数据未示出)。在小鼠PD-L1过表达的293T细胞中,有效的人PD-L1阻断剂5F8-hv7和hv8示出了低得多的与小鼠PD-L1的结合能力(图3B)。使用Hepa1-6细胞进一步检查3H1-hv7和5F8-hv8与小鼠癌细胞中的内源性表达的小鼠PD-L1的结合。如图3C所示,令人惊讶的是,克隆3H1-hv7示出了与内源性表达的小鼠PD-L1的弱得多的结合能力,并且克隆5F8-hv8未示出结合能力。图28和30以及下表中示出了人源化变体和亲本克隆5F8和3H1的序列。

[0533] 表4:R3-5F8人源化变体的序列

[0534]

| 克隆名称 | FR1CDR1FR2CDR2FR3CDR3FR4 | SEQ ID |
|---|---|---|
| 5F8-Alpaca | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFDFSDTHMGWYRQAPGKERELVAIITSGGSTDYVDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKFEDTAVYYCNARRTTIYWGQGTQVTVSS | 16 |
| 5F8-hv1 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSDTHMSWVRQAPGKERELVSVITSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNARRTTIYWGQGTQVTVSS | 17 |
| 5F8-hv2 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSDTHMSWVRQAPGKERELVSAITSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNARRTTIYWGQGTQVTVSS | 18 |

[0535]

| | | |
|---|---|---|
| 5F8-hv3 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSDTHMNWVRQAPGKE RELVSYITSGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCNARRTTIYWGQGTQVTVSS | 19 |
| 5F8-hv4 | QVQLVESGGGLKQPGGSLRLSCAASGFDFSDTHMSWIRQAPGKE RELVSYITSGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCNARRTTIYWGQGTQVTVSS | 20 |
| 5F8-hv5 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSDTHMSWVRQAPGKE RELVSVITSGGSTDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCNARRTTIYWGQGTQVTVSS | 21 |
| 5F8-hv6 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSDTHMSWVRQAPGKE RELVSVITSGGSTDYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCNARRTTIYWGQGTQVTVSS | 22 |
| 5F8-hv7 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSDTHMSWVRQAPGKE RELVSIITSGGSTDYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCNARRTTIYWGQGTQVTVSS | 23 |
| 5F8-hv8 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSDTHMSWVRQAPGKE RELVAIITSGGSTDYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCNARRTTIYWGQGTQVTVSS | 24 |

[0536] 表5:R3-3H1人源化变体的序列

| 克隆名称 | FR1CDR1FR2CDR2FR3CDR3FR4 | SEQ ID |
|---|---|---|
| 3H1-羊驼 | QLQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGIDFSDTHMGWYRQAPGK QRELVAIITSGGSTDYVDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKFE DTAVYYCNARRSTIYWGQGTQVTVSS | 25 |
| 3H1-hv1 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSDTHMSWVRQAPGKQ RELVSVITSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCNARRSTIYWGQGTQVTVSS | 26 |
| 3H1-hv2 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGIDFSDTHMHWVRQAPGK QRELVSVITSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCNARRSTIYWGQGTQVTVSS | 27 |
| 3H1-hv3 | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGIDFSDTHMSWIRQAPGKQ RELVSYITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCNARRSTIYWGQGTQVTVSS | 28 |
| 3H1-hv4 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGIDFSDTHMHWVRQAPGK QRELVSVITSGGSTDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCNARRSTIYWGQGTQVTVSS | 29 |
| 3H1-hv5 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGIDFSDTHMHWVRQAPGK QRELVSVITSGGSTDYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCNARRSTIYWGQGTQVTVSS | 30 |
| 3H1-hv6 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGIDFSDTHMHWVRQAPGK QRELVSIITSGGSTDYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCNARRSTIYWGQGTQVTVSS | 31 |
| 3H1-hv7 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGIDFSDTHMHWVRQAPGK QRELVAIITSGGSTDYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCNARRSTIYWGQGTQVTVSS | 32 |

[0537]

[0538] 为了增加3H1-hv7与小鼠PD-L1的结合,进行亲和力成熟。设计了用于产生每个CDR区的氨基酸的单突变的引物。使用组装PCR制备文库并且克隆到噬菌粒载体pADL-23c中。使用辅助噬菌体产生噬菌体,并且使用包被有生物素化小鼠PD-L1-ECD的链霉亲和素偶联的Dynabeads进行噬菌体淘选。两轮淘选后,使用淘选产物的洗脱来感染SS320细胞。挑取集落

并在具有0.5mM IPTG的2YT培养基中培养。使用小鼠PD-L1稳定转染的293T细胞通过全细胞结合测定来确定上清液中VHH抗体的结合活性。选择具有高结合能力的结合剂进行测序。合成具有独特序列的克隆基因并且克隆到与人IgG1 Fc融合的pcDNA3.4表达载体中。使用稳定表达小鼠PD-L1的293T细胞或Hepa1-6细胞(具有内源性PD-L1表达的小鼠细胞系)在全细胞结合测定中测试VHH-Fc克隆与小鼠PD-L1的结合(表6)。还在小鼠PD-L1阻断报告基因测定中测试了VHH-Fc克隆在阻断小鼠PD-L1活性中的效力。选择具有高结合能力和效力的结合剂。下表中示出了全细胞结合中的EC50和阻断m-PD-L1中的效力。

[0539] 表6:所选3H1-hv7亲和力成熟的克隆的全细胞结合能力和效力

[0540]

| 克隆名称 | 与 293T m-PD-L1 的 WCB 中的 EC50,nM | 与 Hepa1-6 细胞的 WCB 中的 EC50，nM | m-PD-L1 阻断测定中的 EC50，nM |
|---|---|---|---|
| 3H1-3B9 | 0.97 | 0.30 | 0.457 |
| 3H1-2A2 | 1.42 | 0.31 | 0.382 |
| 3H1-2G3 | 1.57 | 0.31 | 0.333 |
| 3H1-1G9 | 1.01 | 0.55 | 0.436 |
| 3H1-6D2 | 1.29 | 0.51 | 0.314 |
| 3H1-2F4 | 1 | 0.65 | 0.825 |
| 3H1-hv7 | 0.56 | 6.78 | 2.141 |
| 阿特朱单抗 | 0.78 | 0.31 | 0.178 |

[0541] 图28和30以及下表中列出了序列。选择靠前的克隆3B9作为替代分子,以基于结合能力和效力构建用于体内研究的双特异性抗体。

[0542] 表7:所选3H1-hv7亲和力成熟的克隆的序列

[0543]

| 克隆名称 | FR1CDR1FR2CDR2FR3CDR3FR4 | SEQ ID |
|---|---|---|
| 3H1-hv7 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGIDFSDTHMHWVRQAPGK QRELVAIITSGGSTDYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCNARRSTIYWGQGTQVTVSS | 32 |

[0544]

| | | |
|---|---|---|
| 3H1-3B9 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGIDFSDTHMHWVRQAPGK QRELVAIITSGGFTDYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCNARTSTIYWGQGTQVTVSS | 33 |
| 3H1-2A2 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGIDFSDTHMHWVRQAPGK QRELVAIITSGGFTDYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCNARRSTIYWGQGTQVTVSS | 34 |
| 3H1-2G3 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGIDFSDTHMHWVRQAPGK QRELVAIITSSGSTDYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCNARRSTILWGQGTQVTVSS | 35 |
| 3H1-1G9 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGIDFDDTHMHWVRQAPGK QRELVAIITSGGLTDYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCNARTSTIYWGQGTQVTVSS | 36 |
| 3H1-6D2 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGIDFNDTHMHWVRQAPGK QRELVAIITSRGSTDYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCNARRSTLYWGQGTQVTVSS | 37 |
| 3H1-2F4 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGIDFSDLHMHWVRQAPGK QRELVAIITSGGSTDYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCNARSSTIYWGQGTQVTVSS | 38 |

[0545] 还进行了5F8-hv8克隆的亲和力成熟,并且在下表中示出了在阻断人PD-L1中具有

增加的效力的克隆(所有克隆与人IgG1 Fc融合)。

[0546] 表8:所选5F8-hv8亲和力成熟的克隆的全细胞结合能力和效力

[0547]

| 克隆名称 | h-PD-L1 WCB 中的 EC50（nM） | h-PD-L1 阻断测定中的 EC50（nM） |
|---|---|---|
| 5F8-6D6 | 0.52 | 1.38 |
| 5F8-8D4 | 0.49 | 1.84 |
| 5F8-4B12 | 0.63 | 1.59 |
| 5F8-3A3 | 0.73 | 1.38 |
| 5F8-8E3 | 0.57 | 1.44 |
| 5F8-8H3 | 0.51 | 1.60 |
| 5F8-7D5 | 0.51 | 1.58 |
| 5F8-hv8 亲本 | 0.69 | 1.85 |
| 阿特朱单抗 | 0.20 | 1.61 |

[0548] 图28和30以及下表中示出了序列。

[0549] 表9:所选5F8-hv8亲和力成熟的克隆的序列

[0550]

| 克隆 | FR1CDR1FR2CDR2FR3CDR3FR4 | SEQ ID |
|---|---|---|
| 5F8-hv8 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASITSGGSTMSWVRQAPGKERELVAIITSGGSTDYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNARRTTIYWGQGTQVTVSS | 24 |
| 5F8-3A3 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSDTHMSWVRQAPGKERELVAIITGGGSTDYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCLARRTTIYWGQGTQVTVSS | 39 |
| 5F8-8E3 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSDTHMSWVRQAPGKERELVAIITSGGSTDYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNARLTTIYWGQGTQVTVSS | 40 |
| 5F8-8D4 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSDTFMSWVRQAPGKERELVAIITSGGSTDYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNARRTTIYWGQGTQVTVSS | 41 |
| 5F8-4B12 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFPDTHMSWVRQAPGKERELVAIITSGGFTDYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRARRTTIYWGQGTQVTVSS | 42 |
| 5F8-6D6 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSDTAMSWVRQAPGKERELVAIITSGGSVDYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRARRTTIYWGQGTQVTVSS | 43 |
| 5F8-8H3 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSMTHMSWVRQAPGKERELVAIITSGGKTDYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNARRATIYWGQGTQVTVSS | 44 |
| 5F8-7D5 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFEDTHMSWVRQAPGKERELVAIITSGCSTDYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNARRATIYWGQGTQVTVSS | 45 |

[0551]

[0552] 实例4:先导人PD-L1功能性结合剂的表征和选择,以及靠前的克隆的热点校正和人源化。

[0553] 使用T24细胞(一种以中等水平表达内源性人PD-L1的人膀胱癌细胞)确定先导人PD-L1结合剂与在人肿瘤细胞上表达的人PD-L1的结合能力。令人惊讶的是,相较于克隆5C12、1F4、4D2和4E2(一组具有同一CDR3的克隆(图4和下表)),在动力学测定中高亲和力克隆5F8与T24细胞中的内源性表达的人PD-L1的结合能力低得多。因此,人们专注于对此组进

行进一步研究。

[0554] 表10:与在T24细胞中内源性表达的h-PD-L1的WCB中的靠前的h-PD-L1VHH-Fc克隆的EC50

[0555]

| PD-L1先导克隆 | 与T24的WCB中的EC50,nM |
|---|---|
| 5F8 | 0.503 |
| 5C12 | 0.078 |
| 1F4 | 0.059 |
| 4D2 | 0.041 |
| 4E2 | 0.050 |
| KN35-hv | 0.054 |
| 阿维鲁单抗 | 0.336 |
| 阿特朱单抗 | 0.091 |

[0556] 这4个PD-L1结合剂的CDR3序列含有热点(NGS),所述NGS诱导N-糖基化并且改变蛋白质的单体比率,如SEC-HPLC分析测定(图5)中所示。为了校正CDR3中的热点,进行了三种不同的设计。将N变为T、S或Q。图28和30以及下表中示出了序列。

[0557] 表11:热点校正的5C12变体的CDR3(变体46-48的其它CDR和FR无变化)

[0558]

| 克隆名称 | CDR3 | SEQ ID |
|---|---|---|
| 5C12亲本 | NALVWNGSSYNN | 9 |
| 5C12-NQ | NALVWQGSSYNN | 46 |
| 5C12-NT | NALVWTGSSYNN | 47 |
| 5C12-NS | NALVWSGSSYNN | 48 |

[0559] 用SEC-HPLC分析具有热点校正的新变体,并且在全细胞结合测定和PD-L1阻断报告基因测定中进行检查。将N变为T、S或Q校正了N-糖基化,并且SEC-HPLC证明了高得多的单体比率(图5)。与其亲本克隆相比,阻断报告基因测定中的全细胞结合能力和效力得以保留,如图所示(图6A和6B)。

[0560] 使用Igblast通过分析种系序列来对5C12克隆进行人源化。5C12的最接近的人种系之一是IGHV-3-11.01。除了框架2中的大多数氨基酸序列(具体地44、45、47处的QREF的羊驼/大羊驼序列的三个标志)之外,将5C12的羊驼序列的框架变为IGHV-3-11.01的框架,由于这些氨基酸在稳定性和亲和力方面的影响,这些氨基酸序列得以保留。在框架2和3的人源化中用略微不同的设计制备9种不同的人源化变体。将人源化VHH与人IgG1 Fc融合,并且通过瞬时转染到ExpiCHO细胞来产生蛋白质并且通过蛋白A树脂进行纯化。使用稳定表达h-PD-L1的细胞进行全细胞结合测定。图7A中示出了与h-PD-L1具有高结合能力的代表性变体。hv1、hv2和hv7示出了与亲本克隆5C12类似的结合能力(在0.22nM处的EC50)。还制备了热点校正的人源化变体,并且确定了与稳定表达h-PD-L1的CHO细胞和内源性表达h-PD-L1的人肿瘤细胞NCI-H441的全细胞结合(图7B和7C)。通过报告基因测定来确定PD-L1阻断功能(图7D)。结果表明,5C12-hv9-NT变体具有最高的结合能力和效力。图28和30以及下表中示出了5C12人源化变体和CDR3热点校正变体的序列。

[0561] 表12:5C12 CDR3热点校正变体和人源化变体的序列

[0562]

| 克隆名称 | FR1CDR1FR2CDR2FR3CDR3FR4 | SEQ ID |
|---|---|---|
| 5C12-羊驼 | QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFSASDVVMAWYRQA PGKQREFVANIAARGSTDYANSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKSDDTAVYYCNALVWNGSSYNNWGQGTQVTVSS | 9 |
| 5C12-hv1 | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSASDVVMAWYRQA PGKQREFVANIAARGSTDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCNALVWNGSSYNNWGQGTQVTVSS | 49 |
| 5C12-hv1-NQ | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSASDVVMAWYRQA PGKQREFVANIAARGSTDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCNALVWQGSSYNNWGQGTQVTVSS | 50 |
| 5C12-hv1-NT | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSASDVVMAWYRQA PGKQREFVANIAARGSTDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCNALVWTGSSYNNWGQGTQVTVSS | 51 |
| 5C12-hv1-NS | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSASDVVMAWYRQA PGKQREFVANIAARGSTDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCNALVWSGSSYNNWGQGTQVTVSS | 52 |
| 5C12-hv2 | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSASDVVMSWYRQA PGKQREFVANIAARGSTDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCNALVWNGSSYNNWGQGTQVTVSS | 53 |
| 5C12-hv3 | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSASDVVMSWYRQA PGKQREFVAYIAARGSTDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCNALVWNGSSYNNWGQGTQVTVSS | 54 |
| 5C12-hv4 | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSASDVVMSWYRQA PGKQREFVSYIAARGSTDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCNALVWNGSSYNNWGQGTQVTVSS | 55 |
| 5C12-hv5 | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSASDVVMSWYRQA PGKQREFVSYIAARGSTDYANSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCNALVWNGSSYNNWGQGTQVTVSS | 56 |
| 5C12-hv6 | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSASDVVMSWYRQA PGKQREFVSYIAARGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCNALVWNGSSYNNWGQGTQVTVSS | 57 |
| 5C12-hv7 | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSASDVVMAWYRQA PGKQREFVSNIAARGSTDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCNALVWNGSSYNNWGQGTQVTVSS | 58 |
| 5C12-hv8 | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSASDVVMAWYRQA PGKQREFVSYIAARGSTDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCNALVWNGSSYNNWGQGTQVTVSS | 59 |
| 5C12-hv7-NT | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSASDVVMAWYRQA PGKQREFVSNIAARGSTDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCNALVWTGSSYNNWGQGTQVTVSS | 60 |
| 5C12-hv9-NT | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSASDVVMAWYRQA PGKQREFVSNIAARGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCNALVWTGSSYNNWGQGTQVTVSS | 61 |

[0563] 使用人种系IGHV-3-11.01或IGHV-3-23.04通过与用于克隆5C12的策略相同的策略来对1F4进行人源化。制备十二种人源化变体(所有人源化变体与人IgG1 Fc融合)并且校正其CDR3热点(N至T)。通过全细胞结合测定检查其与h-PD-L1的结合能力。图8A中示出了具有高结合能力的克隆的结果并且在PD-L1阻断报告基因测定中测试其在阻断PD-L1中的效力,并且图8B中示出了结果。图28和30以及下表中示出了人源化1F4克隆的序列。与亲本克隆1F4相比,1F4-hv7和hv9保留了高结合能力和效力。

[0564] 表13:1F4 CDR3热点校正变体和人源化变体的序列

| 克隆名称 | FR1CDR1FR2CDR2FR3CDR3FR4 | SEQ ID |
|---|---|---|
| 1F4-羊驼 | QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFSASDVVMAWYRQ APGKQREFVANIAASSTTRYADSVKGRFTISRDDAKNTVSLQ MNSLKSEDTAVYYCNALVWNGSSYNNWGQGTQVTVSS | 10 |
| 1F4-hv1-NT | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSASDVVMSWVRQA PGKQREFVSAIAASSTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCNALVWTGSSYNNWGQGTQVTVSS | 62 |
| 1F4-hv2-NT | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSASDVVMSWVRQA PGKQREFVAAIAASSTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCNALVWTGSSYNNWGQGTQVTVSS | 63 |
| 1F4-hv3-NT | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSASDVVMSWIRQAP GKQREFVSYIAASSTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCNALVWTGSSYNNWGQGTQVTVSS | 64 |
| 1F4-hv4-NT | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSASDVVMSWIRQAP GKQREFVSAIAASSTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCNALVWTGSSYNNWGQGTQVTVSS | 65 |
| 1F4-hv5-NT | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSASDVVMSWYRQA PGKQREFVAYIAASSTTRYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCNALVWTGSSYNNWGQGTQVTVSS | 66 |
| 1F4-hv6-NT | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSASDVVMSWYRQA PGKQREFVSYIAASSTTRYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCNALVWTGSSYNNWGQGTQVTVSS | 67 |
| 1F4-hv7-NT | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSASDVVMAWYRQA PGKQREFVANIAASSTTRYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCNALVWTGSSYNNWGQGTQVTVSS | 68 |
| 1F4-hv8-NT | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSASDVVMAWYRQA PGKQREFVANIAASSTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCNALVWTGSSYNNWGQGTQVTVSS | 69 |
| 1F4-hv9-NT | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSASDVVMAWYRQA PGKQREFVSNIAASSTTRYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCNALVWTGSSYNNWGQGTQVTVSS | 70 |
| 1F4-hv10-NT | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSASDVVMAWYRQA PGKQREFVSNIAASSTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCNALVWTGSSYNNWGQGTQVTVSS | 71 |

[0565]

| | | |
|---|---|---|
| 1F4-hv11-NT | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSASDVVMAWYRQA PGKQREFVSYIAASSTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCNALVWTGSSYNNWGQGTQVTVSS | 72 |
| 1F4-hv12-NT | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSASDVVMAWYRQA PGKQREFVSYIAASSTTRYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCNALVWTGSSYNNWGQGTQVTVSS | 73 |

[0566]

[0567] 按照用于5C12的相同策略进行克隆4D2和4E2的人源化和CDR3热点校正。图9A和9B中示出了人源化变体(所有变体与人IgG1 Fc融合)与稳定表达h-PD-L1的CHO细胞和内源性表达h-PD-L1的人肿瘤细胞NCI-H441的全细胞结合。确定阻断人PD-L1的效力,并且图10中示出了结果。具有CDR3热点校正的人源化变体可以保留与人PD-L1的结合活性和阻断人PD-L1的效力,其中在4D2-hv1-NT、4E2-hv1-NT和4E2-hv2-NT中观察到高结合能力和效力(图9-10和下表)。

[0568] 表14:PD-L1的WCB以及阻断4D2和4E2人源化变体的PD-L1的效力

[0569]

| 克隆名称 | 与 CHO-h-PD-L1 细胞的 WCB 中的 EC50，nM | 与 NCI-H441 细胞的 WCB 中的 EC50，nM | hPD-L1 阻断测定中的 EC50，nM |
|---|---|---|---|
| 4D2-羊驼-NT | 0.103 | 0.044 | 0.729 |
| 4D2-hv1-NT | 0.143 | 0.065 | 0.915 |
| 4D2-hv2-NT | 0.203 | 0.099 | 1.323 |
| 4D2-hv3-NT | 0.598 | 0.271 | 4.177 |
| 4D2-hv4-NT | 0.171 | 0.112 | 3.779 |
| 4E2-羊驼-NT | 0.109 | 0.041 | 0.812 |
| 4E2-hv1-NT | 0.110 | 0.039 | 1.128 |
| 4E2-hv2-NT | 0.110 | 0.054 | 1.083 |
| 4E2-hv3-NT | 0.167 | 0.055 | 1.556 |
| 1F4-hv7-NT | 0.130 | 0.056 | 0.960 |
| 阿维鲁单抗 | 0.526 | 0.501 | 1.55 |

[0570] 图28和30以及下表中示出了亲本羊驼克隆和人源化变体的序列。

[0571] 表15:4D2和4E2人源化变体的序列

[0572]

| 克隆名称 | FR1CDR1FR2CDR2FR3CDR3FR4 | SEQ ID |
|---|---|---|
| **4D2_羊驼-NT** | QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFSASDVVMAWYRQA PGKQREFVANLGASSTTRYADSVKGRFTISRDDAKNTVSLQM NSLKSEDTAVYYCNALVWTGSSYNNWGQGTQVTVSS | 200 |
| **4D2-hv1-NT** | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSASDVVMAWYRQA PGKQREFVANLGASSTTRYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCNALVWTGSSYNNWGQGTQVTVSS | 74 |
| **4D2-hv2-NT** | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSASDVVMAWYRQA PGKQREFVSNLGASSTTRYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCNALVWTGSSYNNWGQGTQVTVSS | 75 |
| **4D2-hv3-NT** | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSASDVVMAWYRQA PGKQREFVSNLGASSTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCNALVWTGSSYNNWGQGTQVTVSS | 76 |
| **4D2-hv4-NT** | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSASDVVMAWYRQA PGKQREFVSNLGASSTTNYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCNALVWTGSSYNNWGQGTQVTVSS | 77 |
| **4E2_Alpaca-NT** | EVQLVESGGGSVQDGGSLTLSCAASGFSAGDVVMAWYRQA PGKQREFVANIAASSTTRYTDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQM NSLKSEDTAVYYCNALVWTGSSYNNWGQGTQVTVSS | 201 |
| **4E2-hv1-NT** | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSAGDVVMAWYRQA PGKQREFVANIAASSTTRYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCNALVWTGSSYNNWGQGTQVTVSS | 78 |
| **4E2-hv2-NT** | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSAGDVVMAWYRQA PGKQREFVSNIAASSTTRYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCNALVWTGSSYNNWGQGTQVTVSS | 79 |
| **4E2-hv3-NT** | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSAGDVVMAWYRQA PGKQREFVSNIAASSTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCNALVWTGSSYNNWGQGTQVTVSS | 80 |

[0574] 使用BLI来确定所选先导人源化克隆(所有克隆与人IgG1 Fc融合)的动力学结合亲和力。所有先导克隆示出了与人PD-L1的良好缔合曲线。下表中示出了通过Koff和Kon计

算的人PD-L1的亲和力。

[0575] 表16:先导PD-L1克隆对h-PD-L1的结合亲和力

[0576]

| 负载 | koff(1/秒) | kon(1/毫秒) | KD(M) |
|---|---|---|---|
| 4D2-hv1-NT | 1.74E-03 | 3.84E+05 | 4.54E-09 |
| 4E2-hv1-NT | 2.25E-03 | 4.85E+05 | 4.64E-09 |
| 4E2-hv2-NT | 2.48E-03 | 5.23E+05 | 4.75E-09 |
| 1F4-hv7-NT | 3.41E-03 | 5.33E+05 | 6.39E-09 |
| 5C12-hv7-NT | 4.37E-03 | 5.39E+05 | 8.12E-09 |

[0577] 下表中示出了通过Koff和Kon计算的食蟹猴PD-L1(cyno-PD-L1)的亲和力。

[0578] 表17:先导PD-L1克隆对cyno-PD-L1的结合亲和力

[0579]

| 负载 | koff(1/秒) | kon(1/毫秒) | KD(M) |
|---|---|---|---|
| 4D2-hv1-NT | 2.06E-03 | 5.47E+05 | 3.76E-09 |
| 4E2-hv1-NT | 2.10E-03 | 6.18E+05 | 3.40E-09 |
| 4E2-hv2-NT | 2.10E-03 | 6.47E+05 | 3.24E-09 |
| 1F4-hv7-NT | 2.34E-03 | 6.05E+05 | 3.87E-09 |
| 5C12-hv7-NT | 2.57E-03 | 5.92E+05 | 4.34E-09 |

[0580] 实例5:合成VHH抗体文库构建

[0581] 骆驼/羊驼VHH抗体是一种仅重链抗体,其保留了与类似于含有重链和轻链两者的常规抗体的抗原的结合(和功能)。VHH的独特特征在于与常规抗体重链的CDR3相比,其具有较长的CDR3。最近,使用“硅中”设计来制备合成VHH文库已经变得更加常见。基于所公布的信息,设计了自己的VEGF结合剂的VHH合成文库。针对CDR1和2使用固定长度,每个含有8个氨基酸。对于CDR3,设计了13种不同长度(10至22个氨基酸)并且采用不同比率。对所设计的VHH文库的基因进行合成并将其克隆到pADL-23c噬菌粒中。使用噬菌粒VHH文库来转化TG1细胞。1.5ug噬菌粒DNA产生>2.5x $10^9$个TG1集落。进行12次转化,并且合并的TG1 VHH文库为约3x $10^{10}$。通过培养2L TG1细胞和20倍辅助噬菌体来制备噬菌体文库,并且按照标准方案进行纯化。噬菌体文库的最终滴度(在OD260下测量)为2.37x $10^{13}$/mL。

[0582] 实例6:抗VEGFA VHH抗体的淘选

[0583] 重组人/食蟹猴VEGF165(h-VEGFA的同种型)的抗原购自美国义翘神州公司并且用NHS-酯生物素化试剂(EZ-Link Sulfo-NHS-SS-生物素,赛默飞世尔公司(ThermoFisher))进行生物素化。使用包被有生物素化VEGF165的链霉亲和素偶联的Dynabeads来对与人/食蟹猴VEGF165抗原的结合剂进行淘选。3轮淘选后,将VEGF165的结合剂洗脱并感染SS320细胞。挑取SS320细胞的集落并在2YT培养基中培养,并且添加IPTG用于分泌VHH抗体。使用VEGF165包被的高结合板通过ELISA测定筛选具有VHH抗体的上清液。筛选9个板(约864个样品),并且获得176个ELISA阳性结合剂。测量VHH上清液对VEGF165介导的报告基因活性的抑制,并且确定与小鼠VEGF164(小鼠VEGFA的同种型)的交叉结合。选择人VEGFA阻断剂和小鼠VEGFA阻断剂两者(总共72种克隆)进行测序,并且获得42种序列独特克隆。检查序列独特克隆与VEGF B、C、D和PIGF的亚型的交叉结合,并且消除交叉结合剂。选择19个独特克隆来制备二价IgG1或IgG4Fc克隆。

[0584] 实例7:二价抗VEGF VHH-Fc克隆的亲和力和效力

[0585] 将抗VEGFA VHH克隆与人IgG4 Fc(铰链+CH2+CH3)融合,克隆到pcDNA3.4载体中,并且转染到CHO细胞用于蛋白质产生。将VHH-Fc蛋白通过蛋白A树脂进行纯化。使用荧光素酶报告基因测定来确定VHH-Fc克隆对人VEGFA的阻断功能,其中稳定的细胞系过表达VEGFA受体KDR和NFAT-荧光素酶报告基因。图11中示出了阻断人VEGFA的前4种克隆的结果。克隆7H3和1C8具有与参考抗体雷莫芦单抗(Ramucirumab)类似的效力。这4种克隆阻断小鼠VEGFA的结果(图12)显示7H3比雷莫芦单抗更有效。还使用BLI动力学测定来确定前4种VHH-Fc克隆对人VEGFA的结合亲和力(参见下表)。7H3对人VEGFA表现出最高亲和力。

[0586] 表18:与人VEGFA的结合亲和力

[0587]

| 克隆 | koff(1/秒) | kon(1/毫秒) | KD(M) |
|---|---|---|---|
| 7H3 | 2.71E-04 | 1.30E+05 | 2.08E-09 |
| 1C8 | 1.77E-04 | 6.80E+04 | 2.61E-09 |
| 4B11 | 6.52E-04 | 2.31E+05 | 2.82E-09 |
| 1G1 | 2.62E-03 | 1.82E+05 | 1.44E-08 |

[0588] 图29和30以及下表中示出了这4种克隆的序列。

[0589] 表19:前4个抗VEGF克隆的序列

[0590]

| 克隆 | FR1CDR1FR2CDR2FR3CDR3FR4 | SEQ ID |
|---|---|---|
| **7H3** | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFGPYAMHWVRQAPGKERELVAAIWPSGSITYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAFGSPTGSITYWGQGTLVTVSS | 81 |
| **1C8** | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRSFSRYAMAWVRQAPGKERESVAVIGSGGGRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARIYRVVGSGTYPAGYDYWGQGTLVTVSS | 82 |
| **4B11** | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGLSFSQYEMHWVRQAPGKEREFVAAISSSGISTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAELVDYHRWGYDYWGQGTLVTVSS | 83 |
| **1G1** | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGLSFSYGTMAWVRQAPGKELELVAALSAGGTITYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAALGGYSGGSKYPYYDYWGQGTLVTVSS | 84 |

[0591] 实例8:双特异性抗PD-L1 x抗VEGF抗体的构建以及双特异性抗体阻断PD-L1和VEGFA的效力

[0592] 使用先导人源化抗人PD-L1克隆来制备具有先导抗VEGF克隆7H3的双特异性抗体。首先,针对抗PD-L1臂使用4E2-hv2-NT克隆并且针对抗VEGFA臂使用7H3来制备4种不同形式的BsAb。IgG1铰链和CH2+CH3用于所有这些构建。图13A-13D中示出了图解,并且以下四个表中示出了序列。

[0593] 表20:4E2_Fc_7H3(SEQ ID NO:85)的序列

[0594]

| 4E2-hv2-NT（SEQ ID NO: 79） | 铰链+CH2+CH3（IgG1）（SEQ ID NO: 204） | 接头 2（SEQ ID NO: 203） | 7H3（SEQ ID NO: 81） |
|---|---|---|---|
| EVQLVESGGGLV<br>KPGGSLRLSCAA<br>SGFSAGDVVMA<br>WYRQAPGKQRE<br>FVSNIAASSTTRY<br>ADSVKGRFTISR<br>DNAKNSLYLQM<br>NSLRAEDTAVYY<br>CNALVWTGSSY<br>NNWGQGTQVTV<br>SS | EPKSSDKTHTCPPCPAP<br>ELLGGPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVVD<br>VSHEDPEVKFNWYVD<br>GVEVHNAKTKPREEQY<br>NSTYRVVSVLTVLHQD<br>WLNGKEYKCKVSNKA<br>LPAPIEKTISKAKGQPRE<br>PQVYTLPPSREEMTKN<br>QVSLTCLVKGFYPSDIA<br>VEWESNGQPENNYKTT<br>PPVLDSDGSFFLYSKLT<br>VDKSRWQQGNVFSCSV<br>MHEALHNHYTQKSLSL<br>SPGK | GSGGSGGSGGSG<br>GSG | QVQLVESGGGV<br>VQPGRSLRLSCA<br>ASGFTFGPYAMH<br>WVRQAPGKERE<br>LVAAIWPSGSITY<br>YADSVKGRFTIS<br>RDNSKNTLYLQ<br>MNSLRAEDTAVY<br>YCAFGSPTGSITY<br>WGQGTLVTVSS |

[0595] 表21:4E2+7H3_Fc(SEQ ID NO:86)的序列

[0596]

| 4E2-hv2-NT（SEQ ID NO: 79） | 接头 1（SEQ ID NO: 202） | 7H3（SEQ ID NO: 81） | 铰链+CH2+CH3(IgG1)（SEQ ID NO: 204） |
|---|---|---|---|
| EVQLVESGGGLV<br>KPGGSLRLSCAA<br>SGFSAGDVVMA<br>WYRQAPGKQRE<br>FVSNIAASSTTRY<br>ADSVKGRFTISR<br>DNAKNSLYLQM<br>NSLRAEDTAVYY<br>CNALVWTGSSY<br>NNWGQGTQVTV<br>SS | GSGGSGGSGGSG | QVQLVESGGGV<br>VQPGRSLRLSCA<br>ASGFTFGPYAMH<br>WVRQAPGKERE<br>LVAAIWPSGSITY<br>YADSVKGRFTIS<br>RDNSKNTLYLQ<br>MNSLRAEDTAV<br>YYCAFGSPTGSI<br>TYWGQGTLVTV<br>SS | EPKSSDKTHTCPPCPA<br>PELLGGPSVFLFPPKP<br>KDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNW<br>YVDGVEVHNAKTKP<br>REEQYNSTYRVVSVL<br>TVLHQDWLNGKEYK<br>CKVSNKALPAPIEKTI<br>SKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTC<br>LVKGFYPSDIAVEWES<br>NGQPENNYKTTPPVL<br>DSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVM<br>HEALHNHYTQKSLSL<br>SPGK |

[0597] 表22:7H3+4E2_Fc(SEQ ID NO:87)的序列

[0598]

| 7H3 (SEQ ID NO: 81) | 接头 1 (SEQ ID NO: 202) | 4E2-hv2-NT (SEQ ID NO: 79) | 铰链+CH2+CH3(IgG1) (SEQ ID NO: 204) |
|---|---|---|---|
| QVQLVESGGGV<br>VQPGRSLRLSCA<br>ASGFTFGPYAMH<br>WVRQAPGKERE<br>LVAAIWPSGSITY<br>YADSVKGRFTIS<br>RDNSKNTLYLQ<br>MNSLRAEDTAVY<br>YCAFGSPTGSITY<br>WGQGTLVTVSS | GSGGSGGSGGSG | EVQLVESGGGLV<br>KPGGSLRLSCAA<br>SGFSAGDVVMA<br>WYRQAPGKQRE<br>FVSNIAASSTTRY<br>ADSVKGRFTISR<br>DNAKNSLYLQM<br>NSLRAEDTAVYY<br>CNALVWTGSSY<br>NNWGQGTQVTV<br>SS | EPKSSDKTHTCPPCPA<br>PELLGGPSVFLFPPKP<br>KDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNW<br>YVDGVEVHNAKTKP<br>REEQYNSTYRVVSVL<br>TVLHQDWLNGKEYK<br>CKVSNKALPAPIEKTI<br>SKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTC<br>LVKGFYPSDIAVEWES<br>NGQPENNYKTTPPVL<br>DSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVM<br>HEALHNHYTQKSLSL<br>SPGK |

[0599] 表23:7H3_Fc_4E2(SEQ ID NO:88)的序列

[0600]

| 7H3 (SEQ ID NO: 81) | 铰链+CH2+CH3 (IgG1) (SEQ ID NO: 204) | 接头 2 (SEQ ID NO: 203) | 4E-hv2-NT (SEQ ID NO: 79) |
|---|---|---|---|
| QVQLVESGGGV<br>VQPGRSLRLSCA<br>ASGFTFGPYAM<br>HWVRQAPGKER<br>ELVAAIWPSGSIT<br>YYADSVKGRFTI<br>SRDNSKNTLYL<br>QMNSLRAEDTA<br>VYYCAFGSPTG<br>SITYWGQGTLVT<br>VSS | EPKSSDKTHTCPPCPAP<br>ELLGGPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVVD<br>VSHEDPEVKFNWYVD<br>GVEVHNAKTKPREEQ<br>YNSTYRVVSVLTVLHQ<br>DWLNGKEYKCKVSNK<br>ALPAPIEKTISKAKGQP<br>REPQVYTLPPSREEMT<br>KNQVSLTCLVKGFYPS<br>DIAVEWESNGQPENNY<br>KTTPPVLDSDGSFFLYS<br>KLTVDKSRWQQGNVF<br>SCSVMHEALHNHYTQ<br>KSLSLSPGK | GSGGSGGSGGSG<br>GSG | EVQLVESGGGLV<br>KPGGSLRLSCAA<br>SGFSAGDVVMA<br>WYRQAPGKQRE<br>FVSNIAASSTTRY<br>ADSVKGRFTISR<br>DNAKNSLYLQM<br>NSLRAEDTAVYY<br>CNALVWTGSSY<br>NNWGQGTQVTV<br>SS |

[0601] 测试了其抗PD-L1臂阻断人PD-L1的效力,图14A和下表中示出了结果。在这些不同形式的BsAb中,4E2_Fc_7H3的形式在阻断h-PD-L1中表现出最高效力。

[0602] 还测试了其抗VEGFA臂的效力,并且结果类似于抗PD-L1臂的结果。4E2_Fc_7H3的形式在阻断h-VEGFA中表现出最高效力,如图14B和下表中所示。

[0603] 表24:不同BsAb形式阻断h-PD-L1和h-VEGFA的效力以及其SEC-HPLC曲线

[0604]

| 克隆 | 阻断 h-PD-L1 的 EC50（nM） | 阻断 h-VEGFA 的 EC50（nM） | SEC 中的单体% |
|---|---|---|---|
| 4E2_Fc_7H3（SEQ ID NO: 85） | 1.11 | 1.01 | 98.0 |
| 4E2+7H3_Fc（SEQ ID NO: 86） | 3.14 | 13.75 | 79.0 |
| 7H3+4E2_Fc（SEQ ID NO: 87） | 2.41 | 1.95 | 87.3 |
| 7H3_Fc_4E2（SEQ ID NO: 88） | 2.18 | 8.02 | 82.2 |
| 阿维鲁单抗 | 1.61 | No | 97.2 |
| 阿瓦斯汀 | No | 1.79 | 97.1 |
| 雷莫芦单抗 | No | 4.05 | ND |

[0605] No＝无活性。ND＝未确定

[0606] 使用双重结合测定测试这些BsAb与h-PD-L1和h-VEGFA抗原两者的同时结合(图15)。所有BsAb能够与h-PD-L1和h-VEGFA两者结合。相比之下,亲本单特异性抗体(4E2-hv2-NT_Fc或7H3_Fc)仅与h-PD-L1或h-VEGFA结合。参考抗PD-L1抗体阿维鲁单抗仅与h-PD-L1结合。

[0607] 抗PD-L1_Fc_抗VEGF的形式可以保留两个臂抗PD-L1或VEGF的效力,并且在SEC中具有最高单体比率(图14和表24)。因此,使用此形式来构建BsAb的所有先导PD-L1克隆(图16)。以下四个表中示出了序列。

[0608] 表25:5C12-hv7-NT_Fc_7H3(SEQ ID NO:89)的序列

[0609]

| 5C12-hv7-NT（SEQ ID NO: 60） | 铰链+CH2+CH3(IgG1)（SEQ ID NO: 204） | 接头 2（SEQ ID NO: 203） | 7H3（SEQ ID NO: 81） |
|---|---|---|---|
| QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSASDVVMAWYRQAPGKQREFVSNIAARGSTDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCNALVWTGSSYNNWGQGTQVTVSS | EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | GSGGSGGSGGSGGSG | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFGPYAMHWVRQAPGKERELVAAIWPSGSITYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAFGSPTGSITYWGQGTLVTVSS |

[0610] 表26:1F4-hv7-NT_Fc_7H3(SEQ ID NO:90)的序列

[0611]

| 1F4-hv7-NT (SEQ ID NO: 68) | 铰链+CH2+CH3(IgG1) (SEQ ID NO: 204) | 接头 2 (SEQ ID NO: 203) | 7H3 (SEQ ID NO: 81) |
|---|---|---|---|
| QVQLVESGGGLV KPGGSLRLSCAA SGFSASDVVMA WYRQAPGKQRE FVANIAASSTTRY ADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYY CNALVWTGSSY NNWGQGTQVTV SS | EPKSSDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSP GK | GSGGSGGSGGSG GSG | QVQLVESGGGV VQPGRSLRLSCA ASGFTFGPYAMH WVRQAPGKERE LVAAIWPSGSITY YADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAV YYCAFGSPTGSI TYWGQGTLVTV SS |

[0612] 表27:4D2-hv1-NT_Fc_7H3(SEQ ID NO:91)的序列

[0613]

| 4D2-hv1-NT (SEQ ID NO: 74) | 铰链+CH2+CH3(IgG1) (SEQ ID NO: 204) | 接头 2 (SEQ ID NO: 203) | 7H3 (SEQ ID NO: 81) |
|---|---|---|---|
| QVQLVESGGGLV KPGGSLRLSCAA SGFSASDVVMA WYRQAPGKQRE FVANLGASSTTR YADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVY YCNALVWTGSS YNNWGQGTQVT VSS | EPKSSDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSP GK | GSGGSGGSGGSG GSG | QVQLVESGGGV VQPGRSLRLSCA ASGFTFGPYAMH WVRQAPGKERE LVAAIWPSGSITY YADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAV YYCAFGSPTGSI TYWGQGTLVTV SS |

[0614] 表28:4E2-hv1-NT_Fc_7H3(SEQ ID NO:92)的序列

[0615]

| 4E2-hv1-NT (SEQ ID NO: 78) | 铰链+CH2+CH3 (SEQ ID NO: 204) | 接头 2 (SEQ ID NO: 203) | 7H3 (SEQ ID NO: 81) |
|---|---|---|---|
| EVQLVESGGGL<br>VKPGGSLRLSC<br>AASGFSAGDVV<br>MAWYRQAPGK<br>QREFVANIAASS<br>TTRYADSVKGR<br>FTISRDNAKNSL<br>YLQMNSLRAED<br>TAVYYCNALVW<br>TGSSYNNWGQG<br>TQVTVSS | EPKSSDKTHTCPPCPAP<br>ELLGGPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVVD<br>VSHEDPEVKFNWYVD<br>GVEVHNAKTKPREEQ<br>YNSTYRVVSVLTVLHQ<br>DWLNGKEYKCKVSNK<br>ALPAPIEKTISKAKGQP<br>REPQVYTLPPSREEMT<br>KNQVSLTCLVKGFYPS<br>DIAVEWESNGQPENNY<br>KTTPPVLDSDGSFFLYS<br>KLTVDKSRWQQGNVF<br>SCSVMHEALHNHYTQ<br>KSLSLSPGK | GSGGSGGSGGSG<br>GSG | QVQLVESGGGV<br>VQPGRSLRLSCA<br>ASGFTFGPYAMH<br>WVRQAPGKERE<br>LVAAIWPSGSITY<br>YADSVKGRFTIS<br>RDNSKNTLYLQ<br>MNSLRAEDTAV<br>YYCAFGSPTGSI<br>TYWGQGTLVTV<br>SS |

[0616] 表29:4E2-hv2-NT_Fc_7H3(SEQ ID NO:93)的序列

[0617]

| 4E2-hv2-NT (SEQ ID NO: 79) | 铰链+CH2+CH3 (IgG1) (SEQ ID NO: 204) | 接头 2 (SEQ ID NO: 203) | 7H3 (SEQ ID NO: 81) |
|---|---|---|---|
| EVQLVESGGGLV<br>KPGGSLRLSCAA<br>SGFSAGDVVMA<br>WYRQAPGKQRE<br>FVSNIAASSTTRY<br>ADSVKGRFTISR<br>DNAKNSLYLQM<br>NSLRAEDTAVYY<br>CNALVWTGSSY<br>NNWGQGTQVT<br>VSS | EPKSSDKTHTCPPCPAP<br>ELLGGPSVFLFPPKPK<br>DTLMISRTPEVTCVVV<br>DVSHEDPEVKFNWYV<br>DGVEVHNAKTKPREE<br>QYNSTYRVVSVLTVLH<br>QDWLNGKEYKCKVSN<br>KALPAPIEKTISKAKGQ<br>PREPQVYTLPPSREEM<br>TKNQVSLTCLVKGFYP<br>SDIAVEWESNGQPENN<br>YKTTPPVLDSDGSFFL<br>YSKLTVDKSRWQQGN<br>VFSCSVMHEALHNHY<br>TQKSLSLSPGK | GSGGSGGSGGSG<br>GSG | QVQLVESGGGV<br>VQPGRSLRLSCA<br>ASGFTFGPYAM<br>HWVRQAPGKER<br>ELVAAIWPSGSIT<br>YYADSVKGRFTI<br>SRDNSKNTLYLQ<br>MNSLRAEDTAV<br>YYCAFGSPTGSI<br>TYWGQGTLVTV<br>SS |

[0618] 通过全细胞结合测定来确定这些BsAb及其亲本单特异性抗PD-L1二价抗体(所有抗体与人IgG1 Fc融合)与在T24肿瘤细胞中表达的人PD-L1的结合能力,并且图17A中示出了结果。还确定了这些BsAb及其亲本单特异性抗PD-L1二价抗体阻断h-PD-L1的效力,并且图17B中示出了结果。与其亲本单特异性二价形式相比,BsAb的结合能力及其阻断h-PD-L1的效力在最大程度上得以保留。图17C和下表中示出了阻断h-VEGFA的效力。

[0619] 表30:与h-PD-L1的全细胞结合能力和阻断h-PD-L1和h-VEGFA的效力

[0620]

| 克隆名称 | 与T24细胞的WCB中的EC50（nM） | 阻断h-PD-L1的EC50（nM） | 阻断h-VEGFA的EC50（nM） |
|---|---|---|---|
| 5C12-hv7-NT_Fc | 0.083 | 0.94 | 否 |
| 4D2-hv1-NT_Fc | 0.043 | 1.02 | 否 |
| 1F4-hv7-NT_Fc | 0.047 | 1.04 | 否 |
| 4E2-hv1-NT_Fc | 0.048 | 0.76 | 否 |
| 4E2-hv2-NT_Fc | 0.047 | 0.90 | 否 |
| 5C12-hv7-NT-Fc-7H3（SEQ ID NO: 89） | 0.075 | 1.07 | 0.97 |
| 1F4-hv7-NT_Fc_7H3（SEQ ID NO: 90） | 0.044 | 0.92 | 1.01 |
| 4D2-hv1-NT_Fc_7H3（SEQ ID NO: 91） | 0.054 | 0.88 | 0.87 |
| 4E2-hv1-NT_Fc_7H3（SEQ ID NO: 92） | 0.055 | 0.85 | 1.12 |
| 4E2-hv2-NT_Fc_7H3（SEQ ID NO: 93） | 0.074 | 0.97 | 1.01 |
| 阿维鲁单抗 | 0.501 | 1.73 | 否 |
| 阿瓦斯汀 | 否 | 否 | 1.79 |
| 雷莫芦单抗 | 否 | 否 | 4.05 |

[0621] No＝无活性

[0622] 实例9:替代抗PD-L1 x抗VEGF BsAb的构建和BsAb阻断小鼠PD-L1和小鼠VEGFA的效力

[0623] 因为先导抗PD-L1克隆不结合/阻断小鼠PD-L1,所以克隆3B9由于其阻断小鼠PD-L1的效力而被选择作为替代PD-L1阻断剂,如实例3中所示。首先,通过将7H3-IgG4-Fc转化为7H3-IgG1-Fc来制备新的二价7H3-Fc克隆,然后构建了串联形式BsAb 3B9+7H3_Fc和N末端或C末端形式BsAb3B9_Fc_7H3(图18)。以下两个表中示出了其序列。

[0624] 表31:3B9+7H3_Fc(SEQ ID NO:94)的序列

[0625]

| 3B9 (SEQ ID NO: 33) | 接头 1 (SEQ ID NO: 202) | 7H3 (SEQ ID NO: 81) | 铰链+CH2+CH3(IgG1) (SEQ ID NO: 204) |
|---|---|---|---|
| QVQLVESGGGV VQPGGSLRLSCA ASGIDFSDTHMH WVRQAPGKQRE LVAIITSGGFTDY VDSVKGRFTISR DNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY CNARTSTIYWGQ GTQVTVSS | GSGGSGGSGGSG | QVQLVESGGGV VQPGRSLRLSCA ASGFTFGPYAMH WVRQAPGKERE LVAAIWPSGSITY YADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAV YYCAFGSPTGSI TYWGQGTLVTV SS | EPKSSDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSL SPGK |

[0626] 表32:3B9_Fc_7H3(SEQ ID NO:95)的序列

[0627]

| 3B9 (SEQ ID NO: 33) | 铰链+CH2+CH3 (IgG1) (SEQ ID NO: 204) | 接头 2 (SEQ ID NO: 203) | 7H3 (SEQ ID NO: 81) |
|---|---|---|---|
| QVQLVESGGGV VQPGGSLRLSCA ASGIDFSDTHMH WVRQAPGKQRE LVAIITSGGFTDY VDSVKGRFTISR DNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY CNARTSTIYWGQ GTQVTVSS | EPKSSDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK | GSGGSGGSGGSG GSG | QVQLVESGGGV VQPGRSLRLSCA ASGFTFGPYAMH WVRQAPGKERE LVAAIWPSGSITY YADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAV YYCAFGSPTGSI TYWGQGTLVTV SS |

[0628] 测量BsAb在小鼠VEGFA介导的NFAT荧光素酶报告基因活性中的阻断功能,并且图19A中示出了结果。串联形式BsAb以类似于二价亲本克隆7H3或参考抗体雷莫芦单抗的效力保留对VEGFA的阻断功能。有趣的是,当抗VEGFA 7H3与BsAb的C末端融合时,与二价7H3-Fc亲本克隆相比,3B9_Fc_7H3在阻断m-VEGFA中表现出显著更高的效力,效力增加超过7倍。还检查了BsAb(两种形式)阻断小鼠PD-L1的效力。如图19B所示,两种BsAb阻断小鼠PD-L1活性,其中3B9_Fc_7H3比3B9+7H3_Fc略微更有效,并且示出了与亲本克隆二价3B9类似的效力。基于抗PD-L1和抗VEGFA的两个臂的功能,选择3B9_Fc_7H3作为用于体内研究的替代BsAb候选物。通过将3B9_Fc_7H3与66.6%小鼠血清在37℃下温育不同时间段来测试3B9_Fc_7H3在小鼠血清中的稳定性。检查阻断小鼠PD-L1和小鼠VEGFA的功能。图20A和20B示出了3B9_Fc_7H3在37℃下在小鼠血清处理下稳定至多6天。

[0629] 实例10:替代抗PD-L1 x抗VEGF BsAb以及单特异性抗PD-L1和抗VEGF抗体在MC38同基因小鼠模型中的体内功效研究

[0630] 使用患有MC38鼠类结肠癌的C57BL/6N小鼠模型,研究BsAb3B9_Fc_7H3的功效以比较单特异性抗体3B9_Fc(抗PD-L1)或7H3_Fc(抗VEGF)的功效。在处理前一周植入MC38肿瘤细胞。当肿瘤达到约46mm$^3$体积时开始处理,以6mg/kg或相等摩尔量每周三次腹膜内给予药物,持续3周,如图21所示,总共给予8次给药。与阴性对照(无活性抗PD-L1变体5F8-hv2)相比,3B9_Fc和7H3_Fc两者均显著减少了肿瘤生长,其中在处理开始后第19天肿瘤生长抑制率(TGI)分别为62.7%和60.9%(图21A和下表)。与单特异性抗体相比,BsAb 3B9_Fc_7H3具有更好的功效,其中TGI在处理后第19天达到76.9%。使用双向ANOVA图基多重比较检验(Tukey's multiple comparisons test)的统计分析表明,与阴性对照相比,所有三个处理组的肿瘤抑制是显著的,P<0.0001。与3B9_Fc或7H3_Fc的TGI相比,3B9_Fc_7H3的肿瘤抑制也是显著的,分别地P=0.0259或0.0089。图22中示出了每个处理组的单独肿瘤体积。在来自不同研究组的小鼠中未观察到体重的显著差异,这表明药物是良好耐受的(图21B)。

[0631] 表33:MC38同基因模型中的功效概述

[0632]

| 组 | 处理 | 数量 | TV (mm$^3$) [a] | P [b] | P [c] | P [d] | TGI% (第19天) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 阴性对照 | 8 | 2666.2±242.7 | - | - | - | - |
| 2 | 3B9_Fc | 8 | 994.5±312.7 | <0.0001 | - | - | 62.70% |
| 3 | 7H3_Fc | 8 | 1042.0±171.5 | <0.0001 | - | - | 60.92% |
| 4 | 3B9_Fc_7H3 | 8 | 616.9±107.9 | <0.0001 | 0.0259 | 0.0089 | 76.86% |

[0633] a平均值±SEM

[0634] b通过双向ANOVA图基多重比较检验与阴性对照进行比较

[0635] c通过双向ANOVA图基多重比较检验与3B9_Fc进行比较

[0636] d通过双向ANOVA图基多重比较检验与7H3_Fc进行比较

[0637] 实例11:在基于细胞的功能性测定中,先导BsAb与其它抗PD-L1/PD1x抗VEGF双功能性药物候选物IMM2510或AK112的比较研究

[0638] 目前,在临床试验中存在两种主要的双功能性药物候选物IMM2510和AK112。IMM2510是在重链的N末端中与$VEGF_{Trap}$融合的传统抗PD-L1抗体。$VEGF_{Trap}$是将取自人VEGF受体I(VEGFRI的结构域2)和人VEGF受体II(VEGFRII的结构域3)的细胞外组分的配体结合元件组合的融合蛋白。$VEGF_{Trap}$以高亲和力与其配体VEGFA结合,由此阻断VEGFA的功能。目前IMM2510处于I期临床试验中。AK112是使用阿瓦斯汀(罗氏公司(Roche)的抗VEGF抗体)构建的在阿瓦斯汀的重链的C末端中与抗PD1抗体的scFv(单链可变片段)融合的BsAb。目前AK112处于III期临床试验中。

[0639] 使用人PD-L1稳定转染的CHO细胞进行通过全细胞结合测定进行的比较研究(参见图23和表34)。与IMM2510相比,本发明的先导BsAb全都显示出高得多的结合能力,其EC50是IMM2510的EC50的约1/10。还进行了AK112与PD1稳定转染的Jurkat细胞的全细胞结合测定,并且表34中示出了EC50数据。在人PD1/PD-L1阻断测定中,与IMM2510和AK112相比,本发明的先导BsAb在阻断PD1/PD-L1中表现出更有效的功能(参见图24和表34),其中BsAb的EC50在0.36-0.56nM的范围内。显示IMM2510和AK112的EC50分别为2.04nM和8.08nM。在人VEGFA阻断测定中,BsAb和IMM2510的效力是类似的,但是IMM2510略微更有效。AK112在阻断VEGFA中较弱,并且甚至在浓度增加至10nM以上时逐渐丧失抑制功能(图25)。

[0640] 还进行了SEC-HPLC,以比较IMM2510和AK112与本发明的先导BsAb,如表34所示。在

SEC-HPLC测定中,BsAb具有超过98%的单体,然而IMM2510仅具有92.9%的单体,其中6.8%降解的片段显示为低分子量(LMW)物种。AK112是稳定性最差的分子,仅具有65.8%的单体并且具有21.2%的显示为高分子量(HMW)物种的聚集体和12.9%的显示为LMW物种的降解的片段。使用蛋白A树脂通过同一纯化方法来对所有蛋白质样品进行纯化。

[0641] 总的来说,在基于细胞的功能性测定中,本发明的先导抗PD-L1 x抗VEGF BsAb的双臂抗人PD1/PD-L1或VEGFA比AK112更有效。此外,本发明的先导BsAb在阻断人PD-L1中比IMM2510更有效,并且在阻断人VEGFA中与IMM2510同样有效。另外,相较于IMM2510和AK112两者,本发明的先导BsAb具有更好的SEC曲线,是更稳定的分子,在开发为癌症患者药物方面具有好得多的可开发性。

[0642] 表34:在全细胞结合、人PD1/PD-L1阻断、人VEGFA阻断和SEC-HPLC测定中先导BsAb与参考BsAb的比较

[0643]

| 克隆 | 与PD1稳定细胞的WCB中的EC50(nM) | 与PD-L1稳定细胞的WCB中的EC50(nM) | 阻断h-PD1/PDL1的EC50(nM) | 阻断h-VEGFA的EC50(nM) | SEC-HPLC | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | HMW物种% | 单体% | LMW物种% |
| 1F4-hv7-NT_Fc_7H3 | 否 | 0.10 | 0.36 | 0.43 | 0.40 | 98.40 | 1.20 |
| 4D2-hv1-NT_Fc_7H3 | 否 | 0.16 | 0.50 | 0.51 | 0.60 | 98.90 | 0.50 |
| 4E2-hv1-NT_Fc_7H3 | 否 | 0.19 | 0.55 | 0.40 | 0.00 | 99.20 | 0.80 |
| 4E2-hv2-NT_Fc_7H3 | 否 | 0.16 | 0.56 | 0.41 | 0.60 | 98.00 | 1.40 |
| IMM2510 | 否 | 1.63 | 2.04 | 0.32 | 0.40 | 92.80 | 6.80 |
| AK112 | 9.47 | No | 8.08 | 1.18* | 21.20 | 65.90 | 12.9 |

[0644] No=无活性。

[0645] *并非如图25所示的良好非线性回归拟合。

[0646] 实例12:在C57BL/6N同基因小鼠中使用MC38-hPD-L1鼠类结肠癌细胞模型进行的先导抗PD-L1 x抗VEGF BsAb的体内功效研究

[0647] MC38-hPD-L1(MC38$^{CD274}$)是被工程化以通过敲除小鼠PD-L1基因并将人PD-L1(hPD-L1)转基因敲入到小鼠PD-L1基因座中来表达人PD-L1基因(CD274)的鼠类结肠癌细胞系(MC38)。使用具有MC38-hPD-L1鼠类结肠癌模型的C57BL/6N小鼠,评估抗PD-L1 x抗VEGF BsAb1F4-hv7-NT_Fc_7H3的功效,并且将所述功效与单特异性抗体1F4-hv7-NT_Fc(抗PD-L1)、7H3_Fc(抗VEGF)和参考BsAb IMM2510的功效进行比较。在处理前一周植入MC38-hPD-L1肿瘤细胞(1x $10^6$个)。在肿瘤体积平均达到约105$mm^3$时开始处理。以6mg/kg或相等摩尔量每周三次腹膜内给予药物,持续3周。肿瘤体积的统计分析(通过双向ANOVA和图基多重比较检验)显示与阴性对照(无活性抗PD-L1变体5F8-hv2)相比,所有处理组都显著抑制了肿瘤生长(表35)。与阴性对照相比,单特异性抗体1F4-hv7-NT_Fc和7H3_Fc两者均显著减少了肿瘤生长,在处理开始后第28天,肿瘤生长抑制率(TGI)分别为24.25%和30.33%(图26A和表35)。与单特异性抗体相比,BsAb 1F4-hv7-NT_Fc_7H3示出了更强的功效,其中在处理后第28天TGI为81.32%。还观察到,与参考BsAb IMM2510相比,BsAb 1F4-hv7-NT_Fc_7H3的肿瘤抑制显著增加,$P<0.013$(TGI:81.32%对55.62%)。

[0648] 在来自不同研究组的小鼠中未观察到体重的显著变化,这表明药物是良好耐受的

(图26B)。图27中示出了每个处理组的单独肿瘤体积数据。

[0649] 表35:C57BL/6N同基因小鼠中M38-PD-L1肿瘤模型的功效概述

[0650]

| 处理 | 数量 | 肿瘤体积（$mm^3$）[a] | $P^b$ | $P^c$ | $P^d$ | TGI%（第28天） |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 阴性对照 | 8 | 1335.76 ± 206.93 | - | | | - |
| 1F4-hv7-NT_Fc | 8 | 1037.48 ± 245.63 | 0.0070 | | | 24.25 |
| 7H3_Fc | 8 | 962.71 ± 72.63 | 0.0114 | | | 30.33 |
| 1F4-hv7-NT_Fc_7H3 | 8 | 335.53 ± 45.95 | <0.0001 | <0.0001 | 0.0136 | 81.32 |
| IMM2510 | 8 | 651.58 ± 114.78 | <0.0001 | | | 55.62 |

[0651] [a]平均值±SEM

[0652] [b]与阴性对照进行比较

[0653] [c]与1F4-hv7-NT_Fc或7H3_Fc进行比较。

[0654] [d]与IMM2510进行比较。

[0655] 通过双向ANOVA和图基多重比较检验进行统计分析。

[0656] 其它实施例

[0657] 应当理解,尽管已经结合本发明的具体实施方式描述了本发明,但是前述描述旨在说明而不限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求书的范围限定。其它方面、优点和修改在以下权利要求书的范围内。

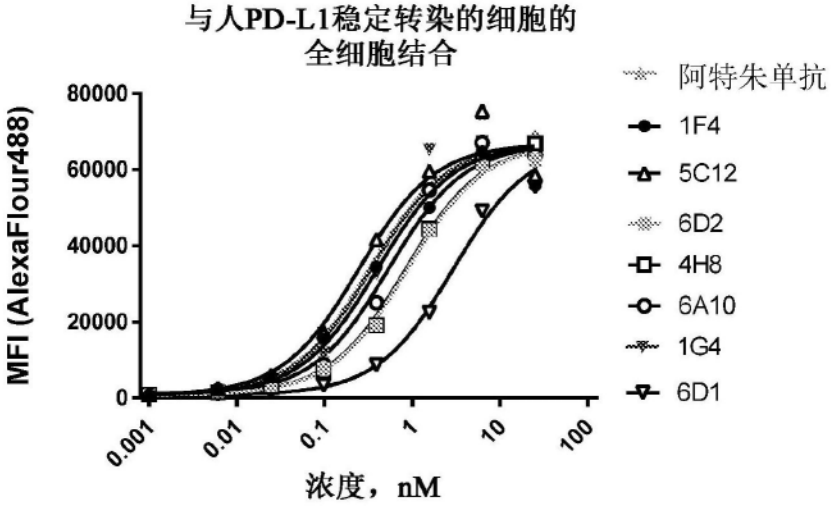

与人PD-L1稳定转染的细胞的
全细胞结合
MFI (AlexaFlour488)
80000
60000
40000
20000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度，nM
阿特朱单抗
1F4
5C12
6D2
4H8
6A10
1G4
6D1

图1A

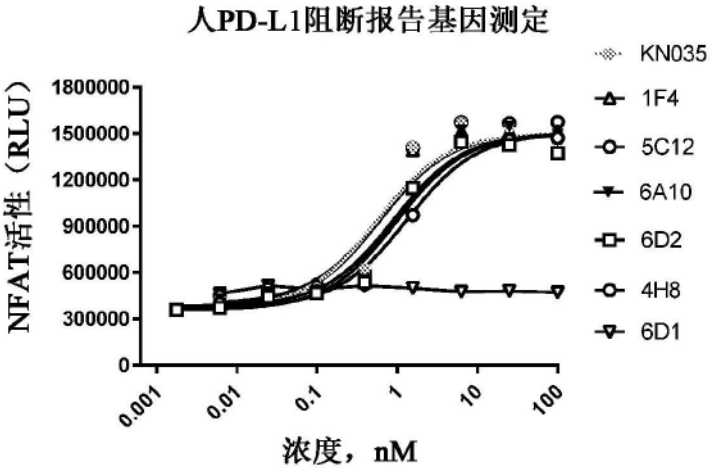
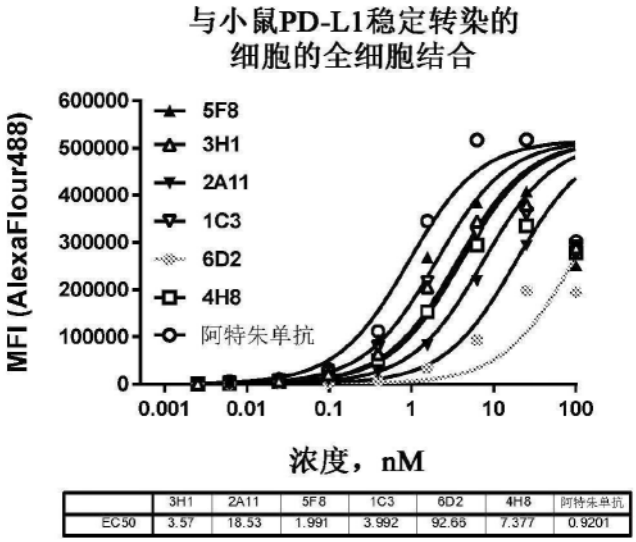
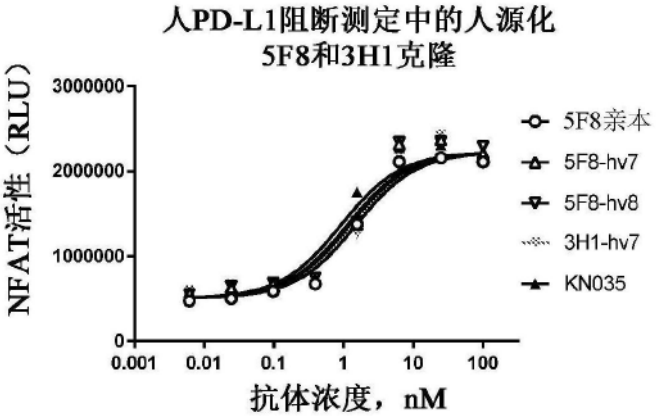

人PD-L1阻断报告基因测定
NFAT活性（RLU）
1800000
1500000
1200000
900000
600000
300000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度，nM
KN035
1F4
5C12
6A10
6D2
4H8
6D1

图1B



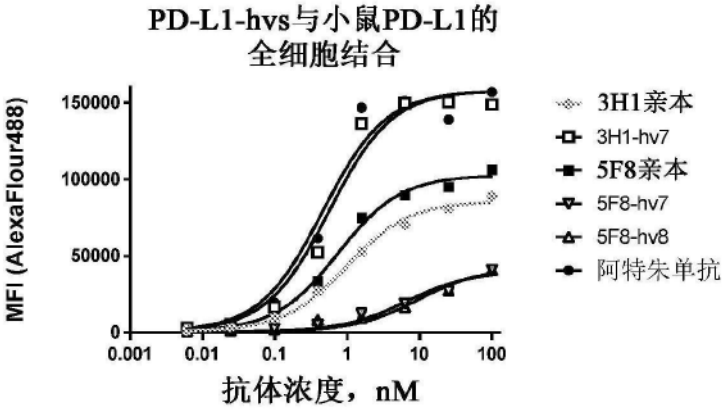

| | 3H1 | 2A11 | 5F8 | 1C3 | 6D2 | 4H8 | 阿特朱单抗 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| EC50 | 3.57 | 18.53 | 1.991 | 3.992 | 92.65 | 7.377 | 0.9201 |

图2



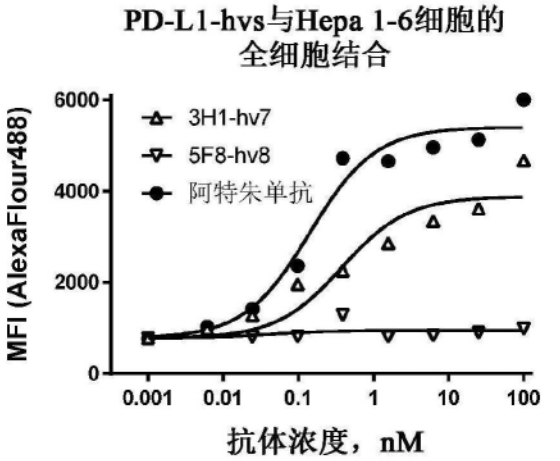

| | 5F8亲本 | 5F8-hv7 | 5F8-hv8 | 3H1-hv7 | KN035 |
|---|---|---|---|---|---|
| EC50 | 1.507 | 1.211 | 1.132 | 1.384 | 0.9157 |

图3A



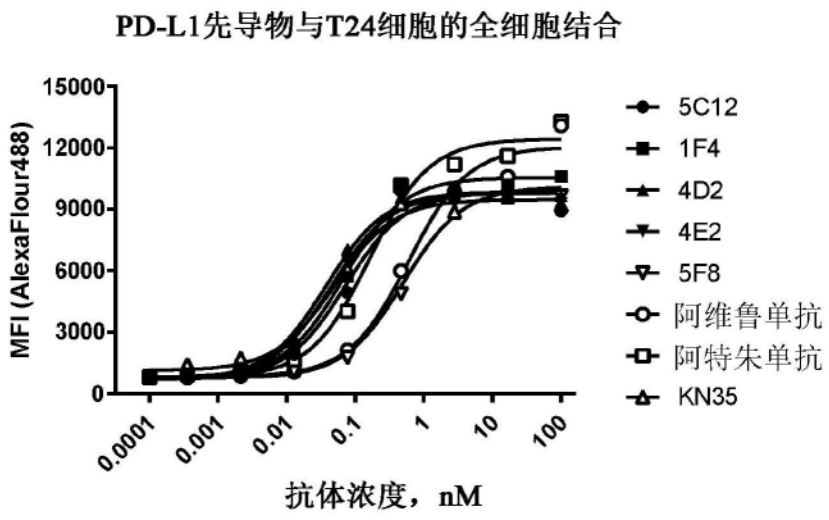

| | 3H1亲本 | 3H1-hv7 | 5F8亲本 | 5F8-hv7 | 5F8-hv8 | 阿特朱单抗 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| EC50 | 0.9792 | 0.5624 | 0.7426 | 6.531 | 9.601 | 0.4579 |

图3B




| | 3H1-hv7 | 5F8-hv8 | 阿特朱单抗 |
|---|---|---|---|
| EC50 | 0.3793 | 0.04185 | 0.142 |

图3C




| | 5C12 | 1F4 | 4D2 | 4E2 | 5F8 | 阿维鲁单抗 | 阿特朱单抗 | KN35 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| EC50 | 0.07155 | 0.06828 | 0.03771 | 0.04491 | 0.5031 | 0.5942 | 0.1628 | 0.05008 |

图4

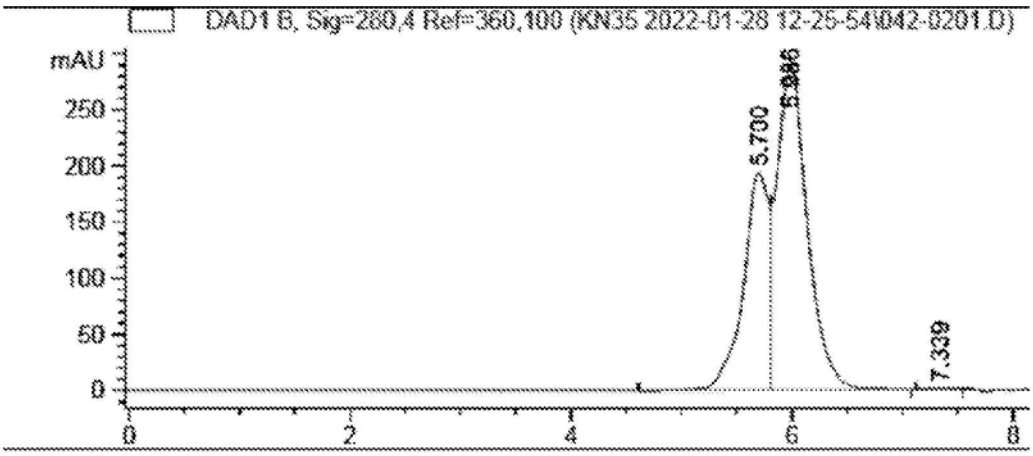



图5A

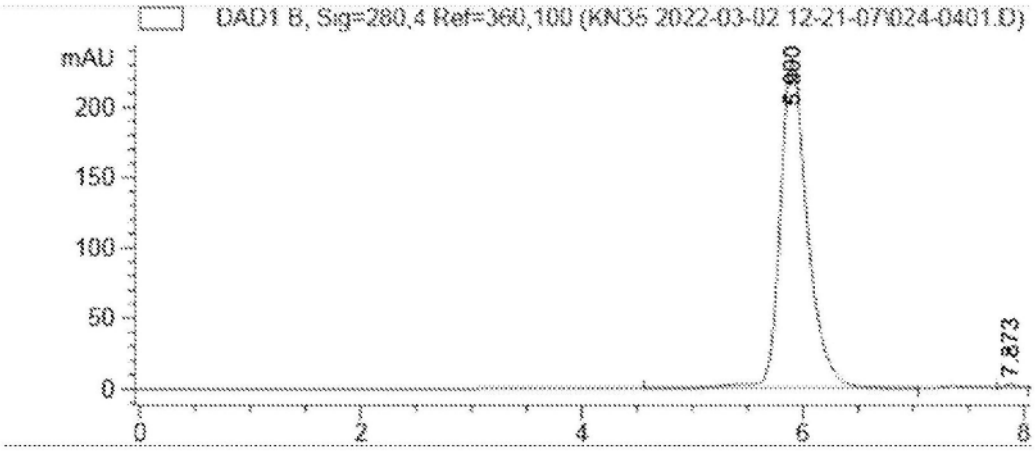

DAD1 B, Sig=280,4 Ref=360,100 (KN35 2022-03-02 12-21-07\024-0401.D)
mAU
200
150
100
50
0
5.880
7.873
0
2
4
6
8

图5B

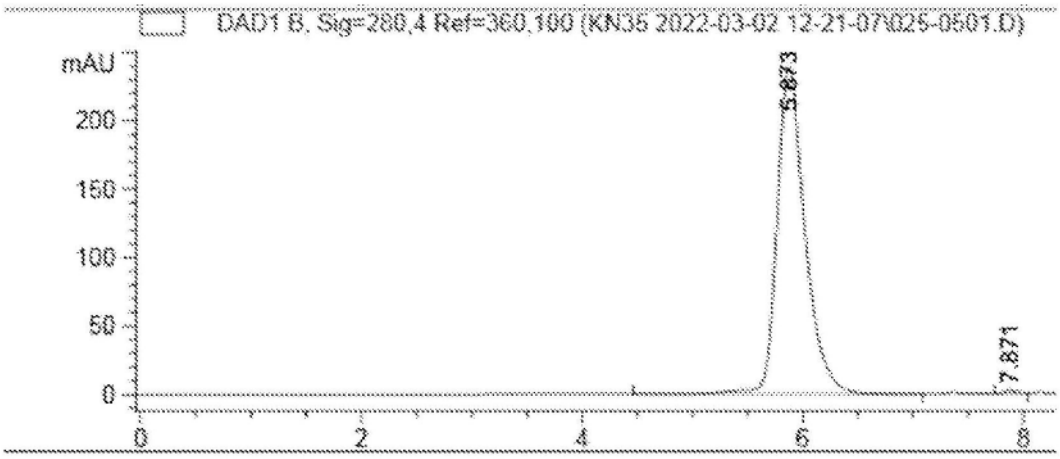

DAD1 B, Sig=280,4 Ref=360,100 (KN35 2022-03-02 12-21-07\025-0501.D)
mAU
200
150
100
50
0
5.873
7.871
0
2
4
6
8

图5C

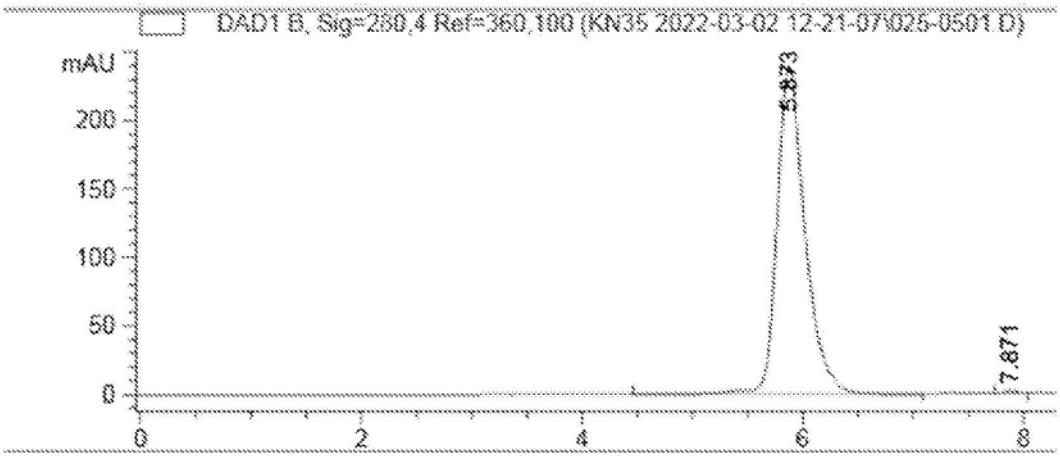
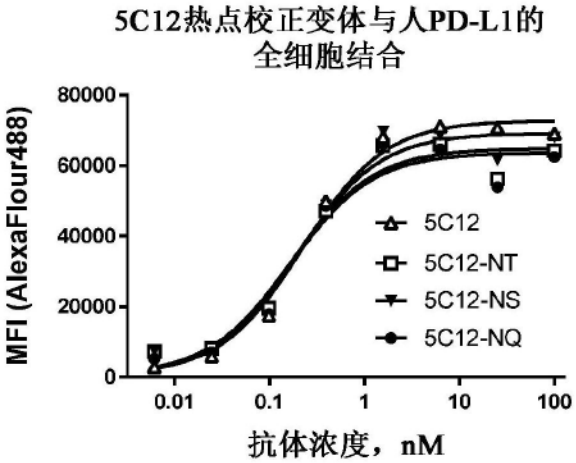
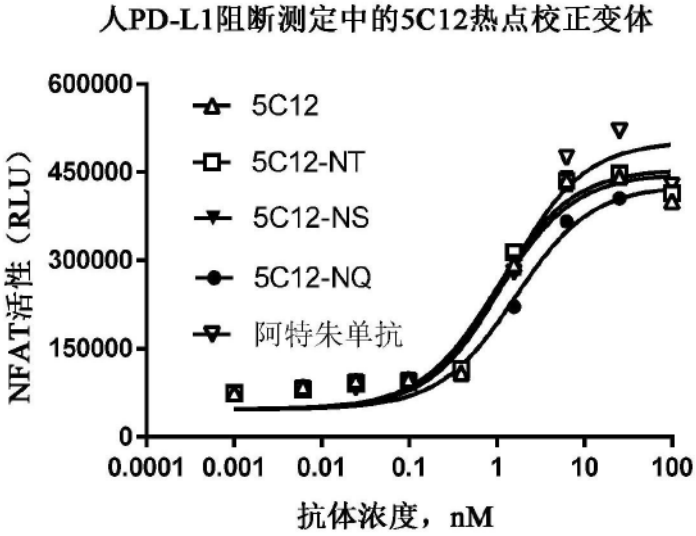

DAD1 B, Sig=280,4 Ref=360,100 (KN35 2022-03-02 12-21-07\025-0501.D)
mAU
200
150
100
50
0
5.873
7.871
0
2
4
6
8

图5D



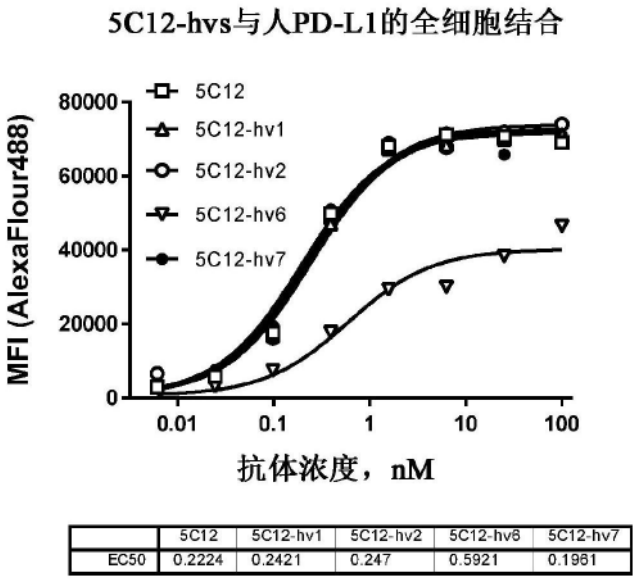

| | 5C12 | 5C12-NS | 5C12-NQ | 5C12-NT |
|---|---|---|---|---|
| EC50 | 0.2224 | 0.195 | 0.1653 | 0.1688 |

图6A



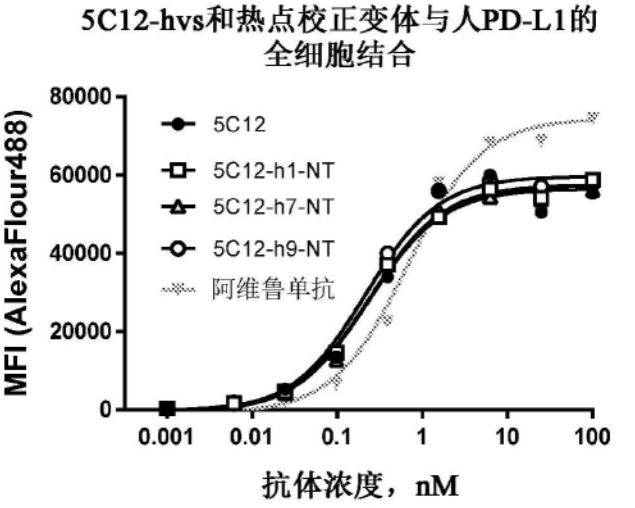

| | 5C12 | 5C12-NT | 5C12-NQ | 5C12-NS | 阿特朱单抗 |
|---|---|---|---|---|---|
| EC50 | 1.048 | 0.9846 | 1.621 | 1.048 | 1.333 |

图6B



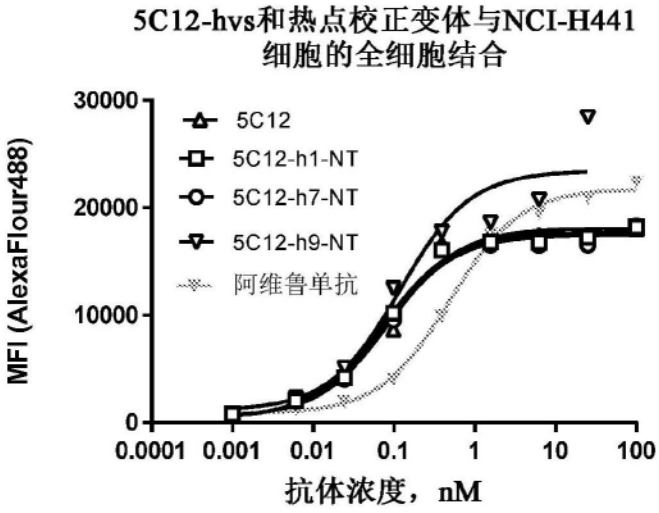

| | 5C12 | 5C12-hv1 | 5C12-hv2 | 5C12-hv6 | 5C12-hv7 |
|---|---|---|---|---|---|
| EC50 | 0.2224 | 0.2421 | 0.247 | 0.5921 | 0.1961 |

图7A



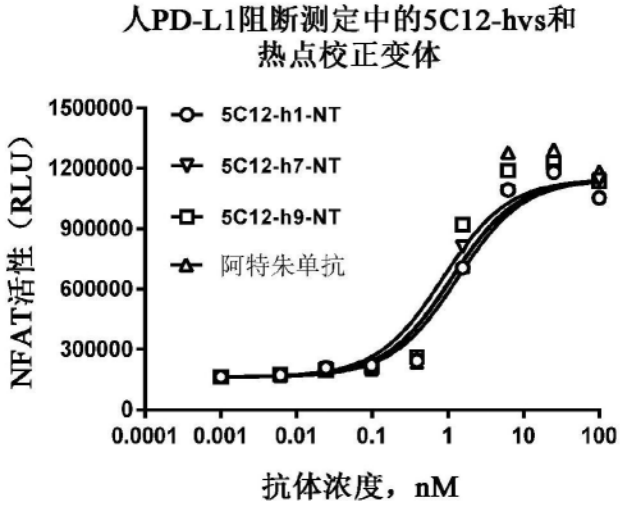

| | 5C12 | 5C12-h1-NT | 5C12-h7-NT | 5C12-h9-NT | 阿维鲁单抗 |
|---|---|---|---|---|---|
| EC50 | 0.2387 | 0.2413 | 0.2348 | 0.2141 | 0.8671 |

图7B



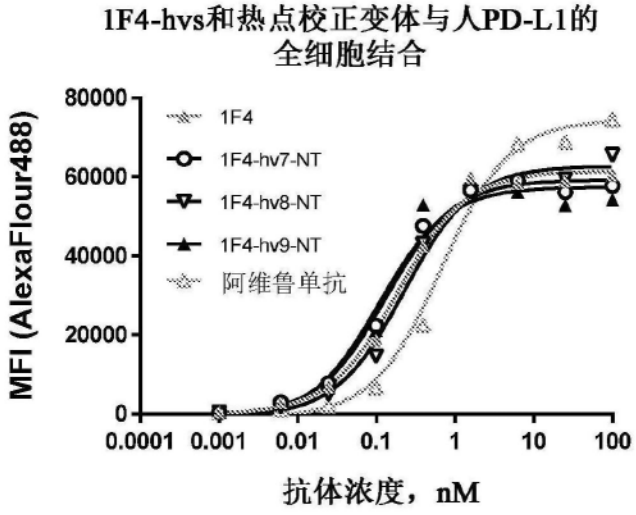

| | 5C12 | 5C12-h1-NT | 5C12-h7-NT | 5C12-h9-NT | 阿维鲁单抗 |
|---|---|---|---|---|---|
| EC50 | 0.08662 | 0.07299 | 0.07689 | 0.1169 | 0.4851 |

图7C



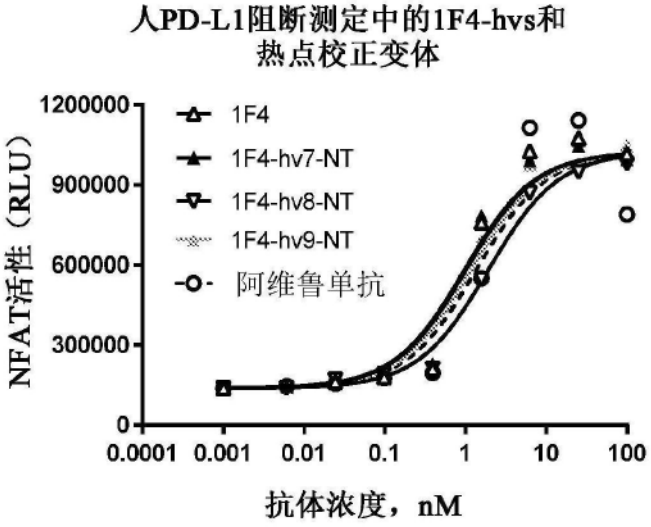

| | 5C12-h1-NT | 5C12-h7-NT | 5C12-h9-NT | 阿特朱单抗 |
|---|---|---|---|---|
| EC50 | 1.347 | 1.135 | 0.859 | 1.111 |

图7D




| | 1F4 | 1F4-hv7-NT | 1F4-hv8-NT | 1F4-hv9-NT | 阿维鲁单抗 |
|---|---|---|---|---|---|
| EC50 | 0.1843 | 0.1301 | 0.2233 | 0.107 | 0.6671 |

图8A




| | 1F4 | 1F4-hv7-NT | 1F4-hv8-NT | 1F4-hv9-NT | 阿维鲁单抗 |
|---|---|---|---|---|---|
| EC50 | 1.011 | 0.9678 | 1.909 | 1.17 | 1.355 |

图8B

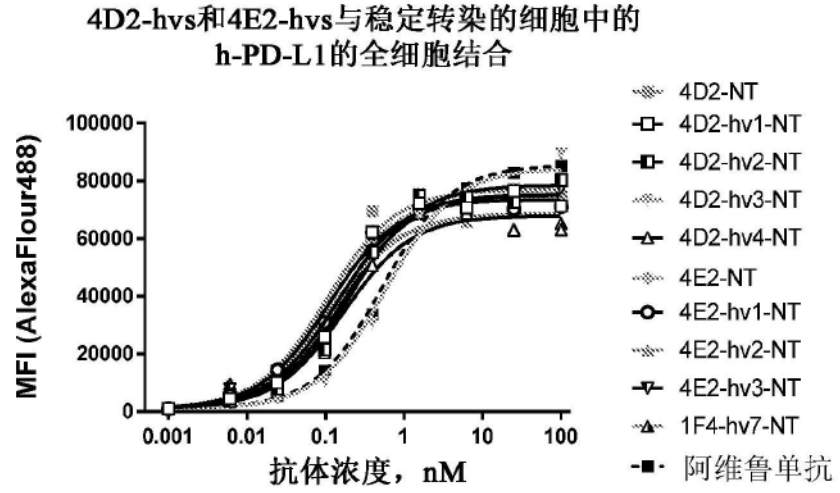

4D2-hvs和4E2-hvs与稳定转染的细胞中的
h-PD-L1的全细胞结合
MFI (AlexaFlour488)
100000
80000
60000
40000
20000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗体浓度，nM
4D2-NT
4D2-hv1-NT
4D2-hv2-NT
4D2-hv3-NT
4D2-hv4-NT
4E2-NT
4E2-hv1-NT
4E2-hv2-NT
4E2-hv3-NT
1F4-hv7-NT
阿维鲁单抗

图9A

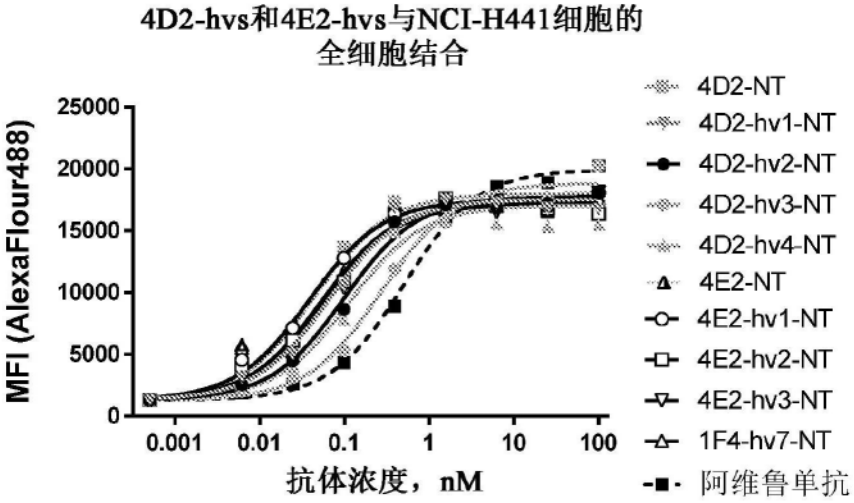

4D2-hvs和4E2-hvs与NCI-H441细胞的
全细胞结合
MFI (AlexaFlour488)
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗体浓度，nM
4D2-NT
4D2-hv1-NT
4D2-hv2-NT
4D2-hv3-NT
4D2-hv4-NT
4E2-NT
4E2-hv1-NT
4E2-hv2-NT
4E2-hv3-NT
1F4-hv7-NT
阿维鲁单抗

图9B

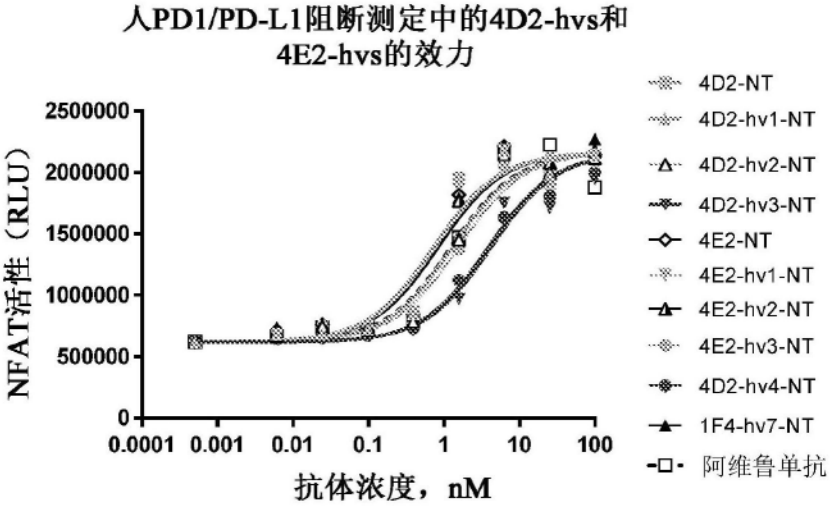
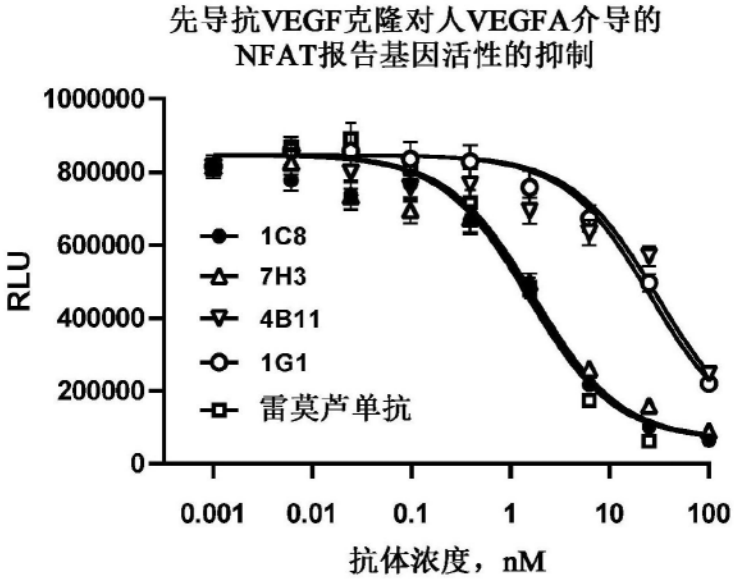
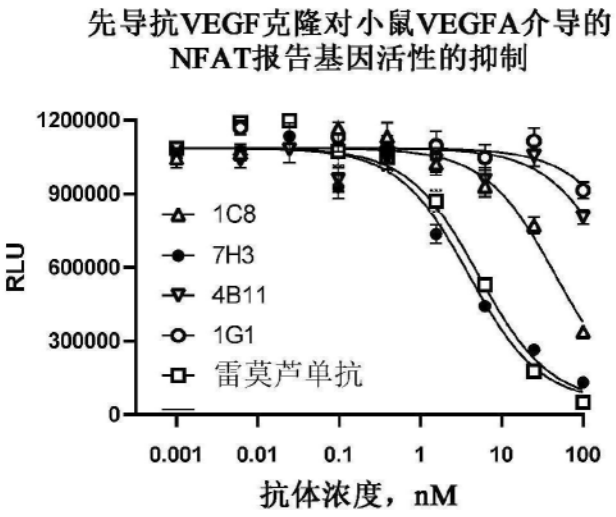



图10



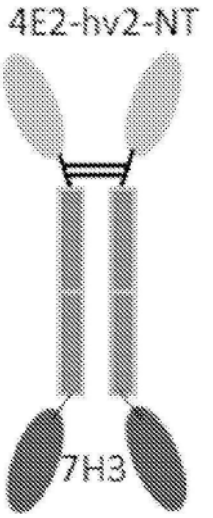

| | 1C8 | 7H3 | 4B11 | 1G1 | 雷莫芦单抗 |
|---|---|---|---|---|---|
| IC50 | 1.502 | 1.734 | 30.48 | 26.21 | 1.588 |

图11



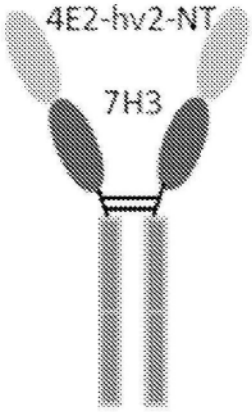

| | 1C8 | 7H3 | 4B11 | 1G1 | 雷莫芦单抗 |
|---|---|---|---|---|---|
| IC50 | 45.87 | 3.963 | 280.1 | 586.6 | 5.196 |

图12



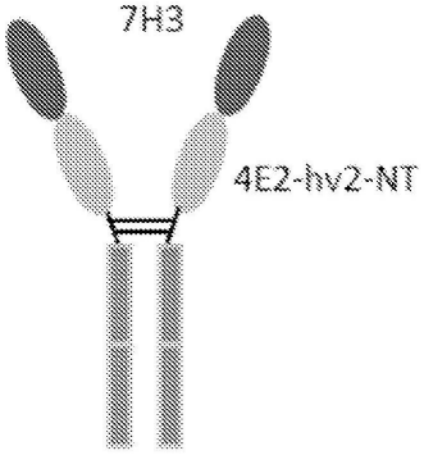

4E2_Fc_7H3

图13A




4E2+7H3_Fc

图13B




7H3+4E2_Fc

图13C

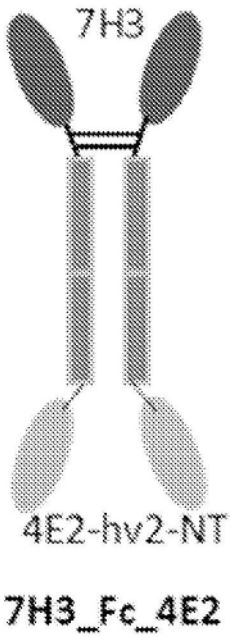

7H3
4E2-hv2-NT
7H3_Fc_4E2

图13D

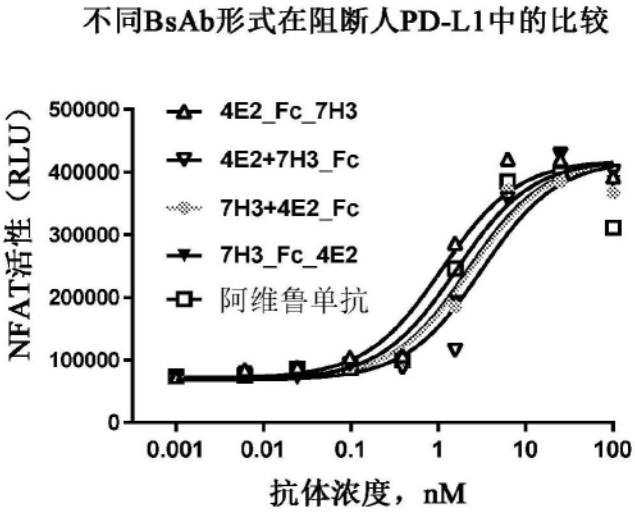

不同BsAb形式在阻断人PD-L1中的比较
NFAT活性（RLU）
500000
400000
300000
200000
100000
0
4E2_Fc_7H3
4E2+7H3_Fc
7H3+4E2_Fc
7H3_Fc_4E2
阿维鲁单抗
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗体浓度，nM

图14A

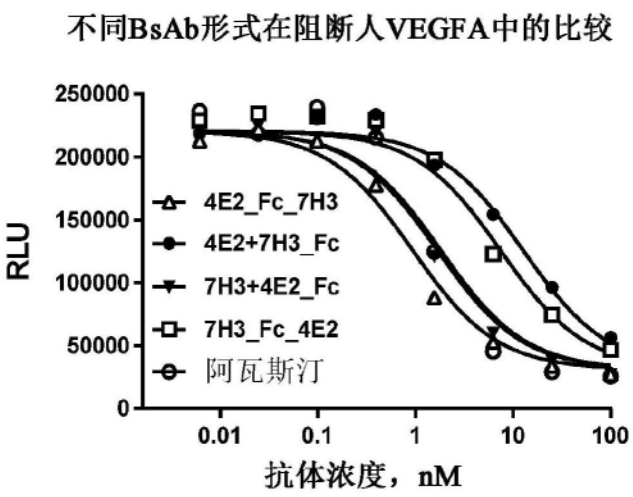

不同BsAb形式在阻断人VEGFA中的比较
RLU
250000
200000
150000
100000
50000
0
4E2_Fc_7H3
4E2+7H3_Fc
7H3+4E2_Fc
7H3_Fc_4E2
阿瓦斯汀
0.01
0.1
1
10
100
抗体浓度，nM

图14B

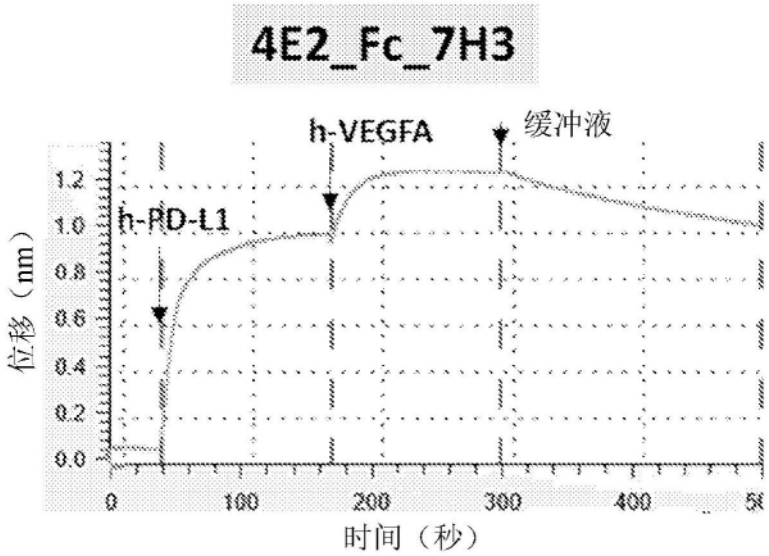

4E2_Fc_7H3
h-VEGFA
缓冲液
h-PD-L1
位移（nm）
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
100
200
300
400
时间（秒）

图15A

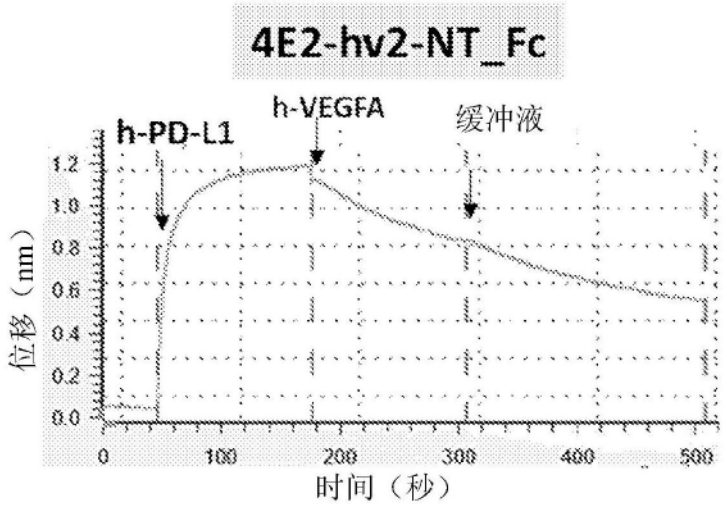

4E2-hv2-NT_Fc
h-PD-L1
h-VEGFA
缓冲液
位移（nm）
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
100
200
300
400
500
时间（秒）

图15B

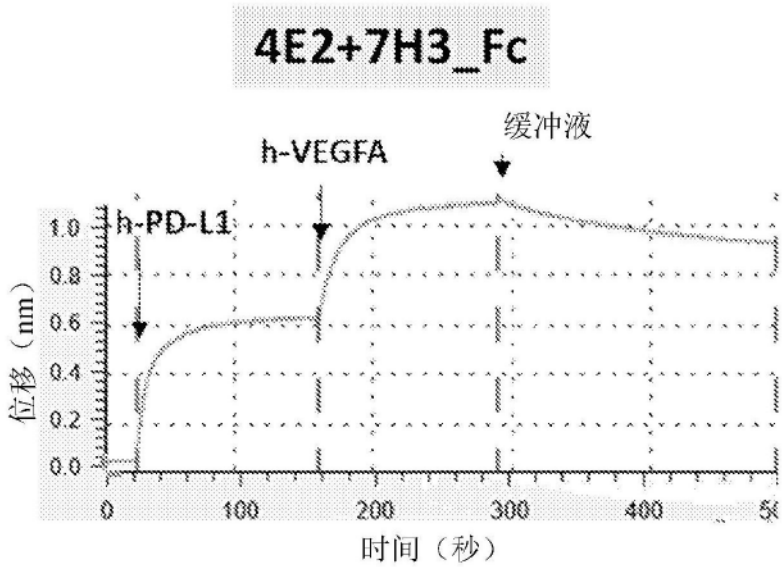

4E2+7H3_Fc
缓冲液
h-VEGFA
h-PD-L1
位移（nm）
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
100
200
300
400
时间（秒）

图15C

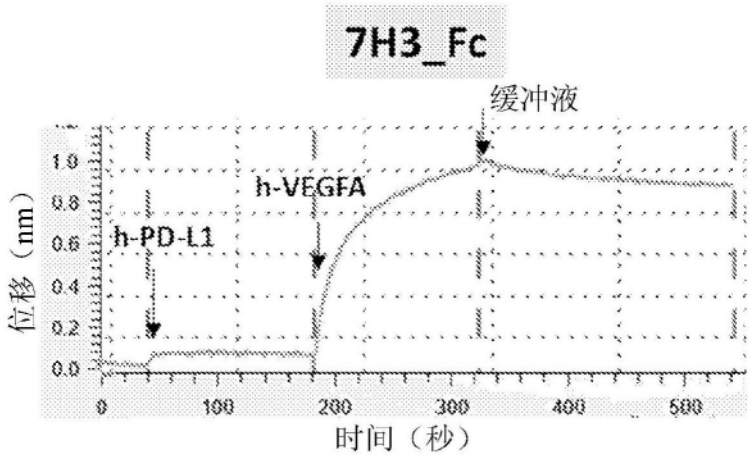

7H3_Fc
缓冲液
h-VEGFA
h-PD-L1
位移（nm）
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
100
200
300
400
500
时间（秒）

图15D

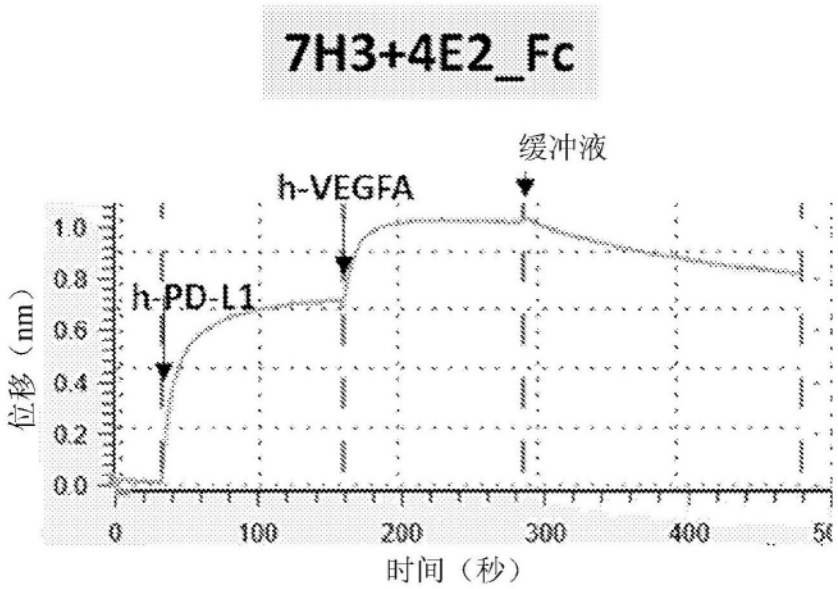

7H3+4E2_Fc
缓冲液
h-VEGFA
h-PD-L1
位移（nm）
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
100
200
300
400
时间（秒）

图15E

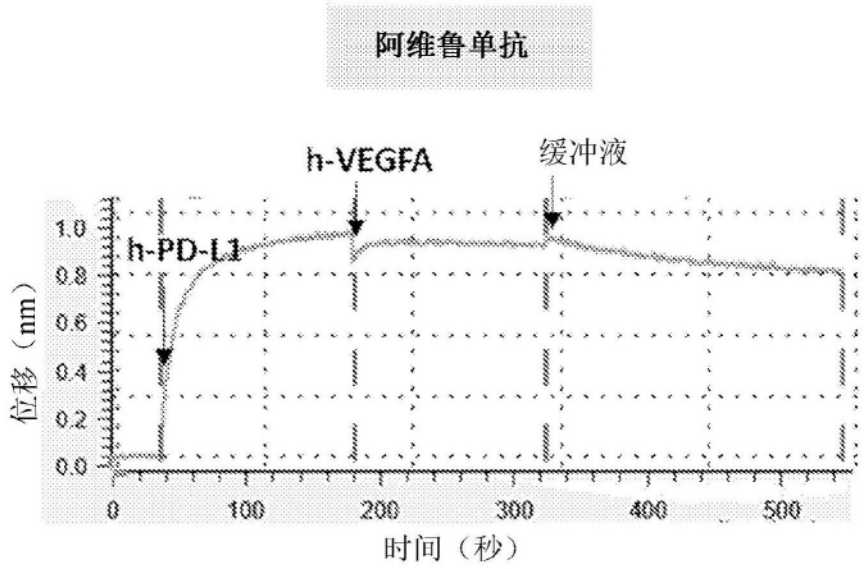

阿维鲁单抗
h-VEGFA
缓冲液
h-PD-L1
位移（nm）
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
100
200
300
400
500
时间（秒）

图15F

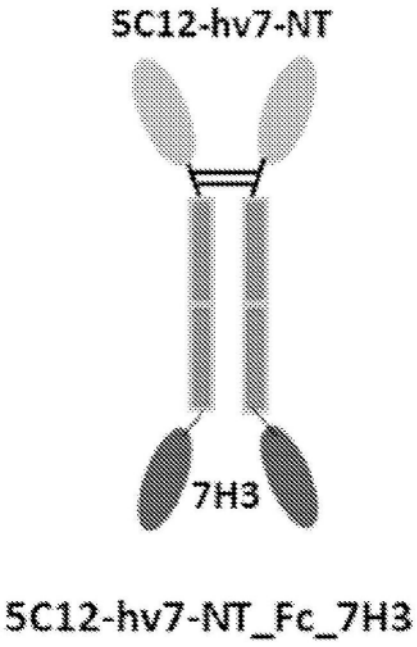

5C12-hv7-NT
7H3
5C12-hv7-NT_Fc_7H3

图16A

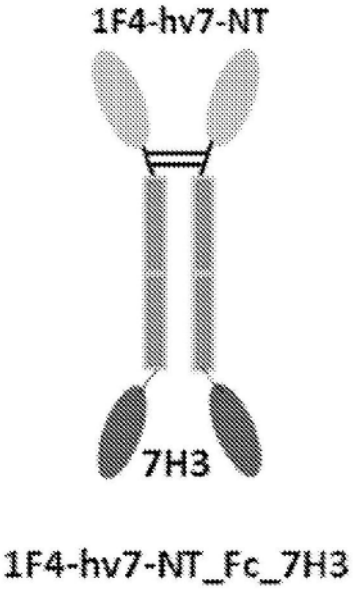



图16B

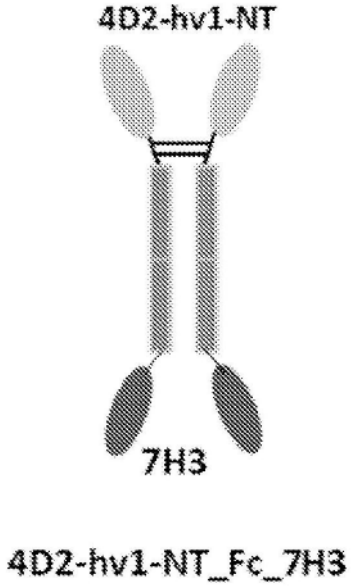



图16C

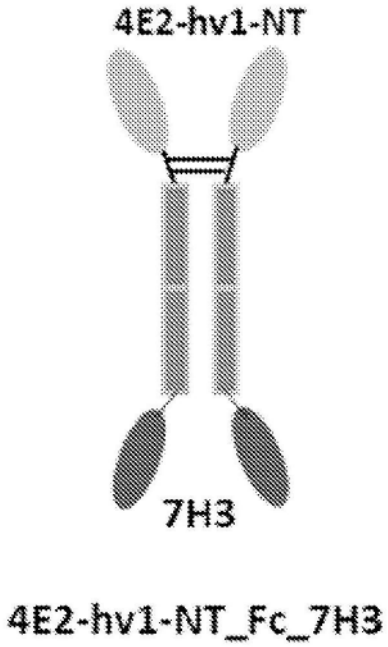



图16D

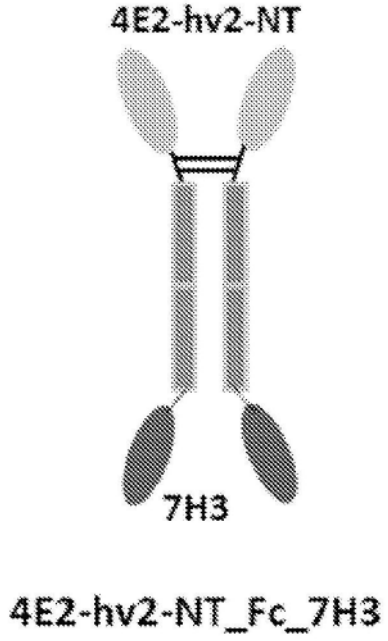



图16E

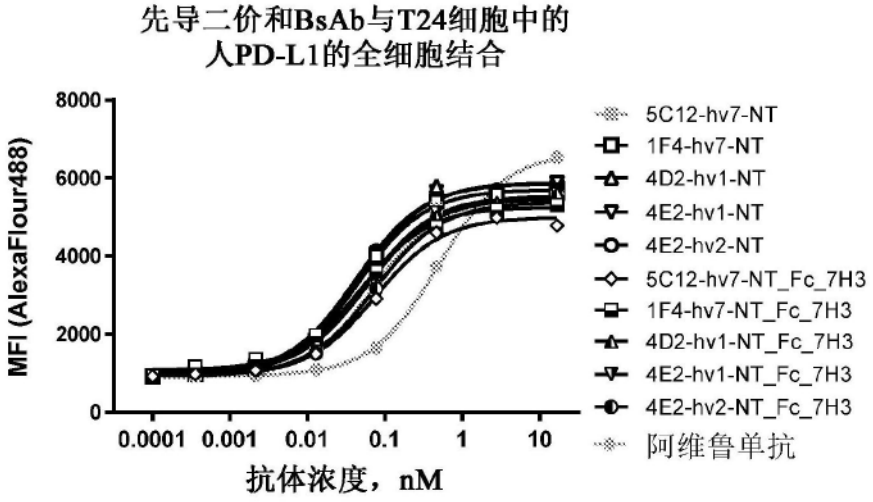

先导二价和BsAb与T24细胞中的
人PD-L1的全细胞结合
MFI (AlexaFlour488)
8000
6000
4000
2000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
抗体浓度，nM
5C12-hv7-NT
1F4-hv7-NT
4D2-hv1-NT
4E2-hv1-NT
4E2-hv2-NT
5C12-hv7-NT_Fc_7H3
1F4-hv7-NT_Fc_7H3
4D2-hv1-NT_Fc_7H3
4E2-hv1-NT_Fc_7H3
4E2-hv2-NT_Fc_7H3
阿维鲁单抗

图17A

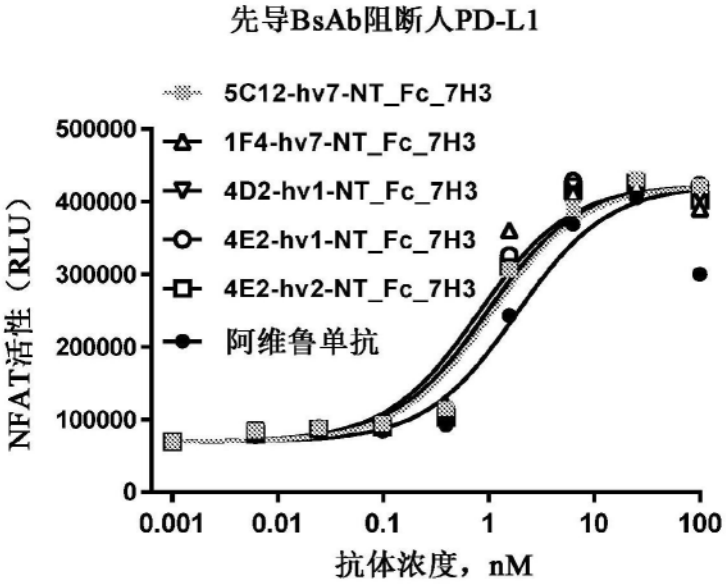

先导BsAb阻断人PD-L1
NFAT活性（RLU）
500000
400000
300000
200000
100000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗体浓度，nM
5C12-hv7-NT_Fc_7H3
1F4-hv7-NT_Fc_7H3
4D2-hv1-NT_Fc_7H3
4E2-hv1-NT_Fc_7H3
4E2-hv2-NT_Fc_7H3
阿维鲁单抗

图17B

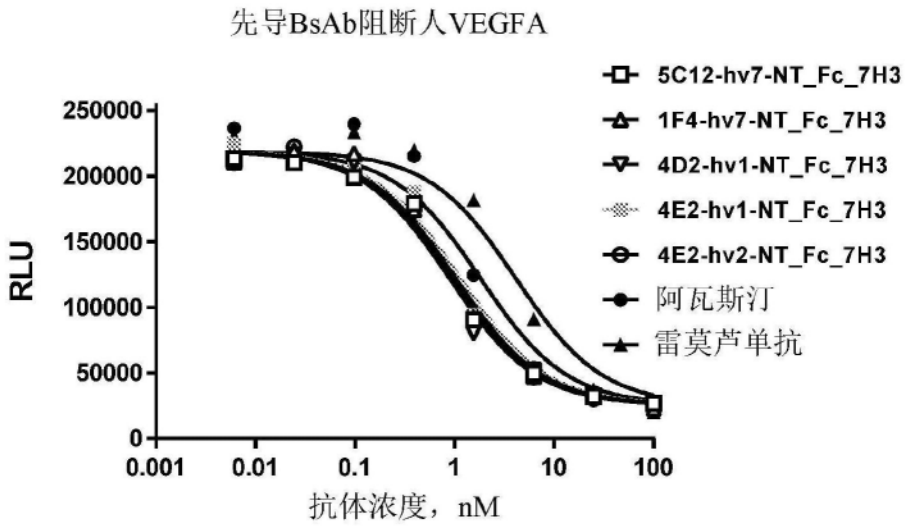

先导BsAb阻断人VEGFA
RLU
250000
200000
150000
100000
50000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗体浓度，nM
5C12-hv7-NT_Fc_7H3
1F4-hv7-NT_Fc_7H3
4D2-hv1-NT_Fc_7H3
4E2-hv1-NT_Fc_7H3
4E2-hv2-NT_Fc_7H3
阿瓦斯汀
雷莫芦单抗

图17C

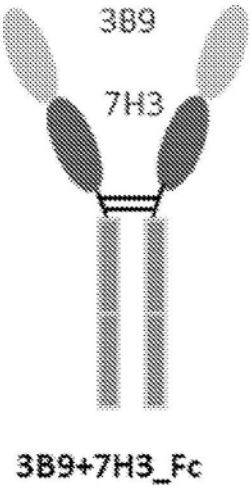
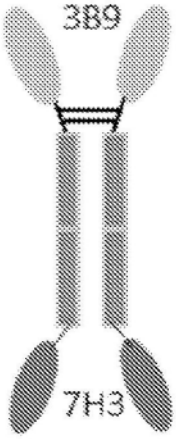
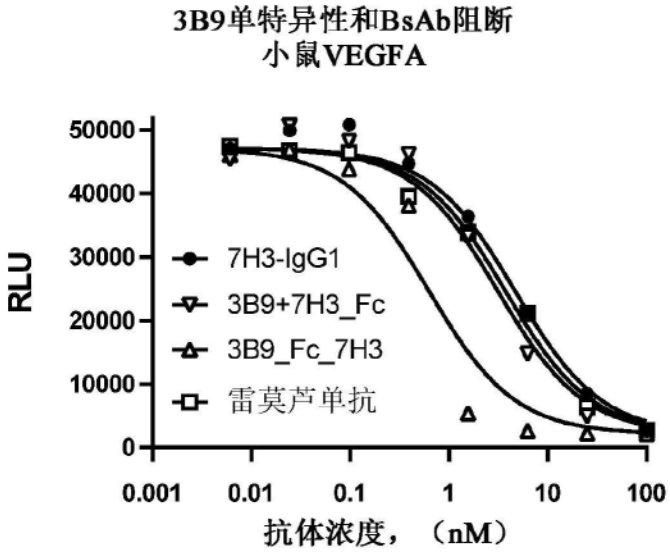

3B9
7H3
3B9+7H3_Fc

图18A



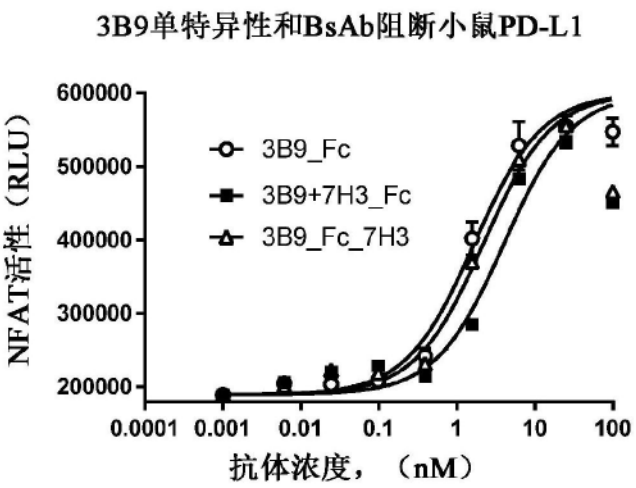

3B9_Fc_7H3

图18B



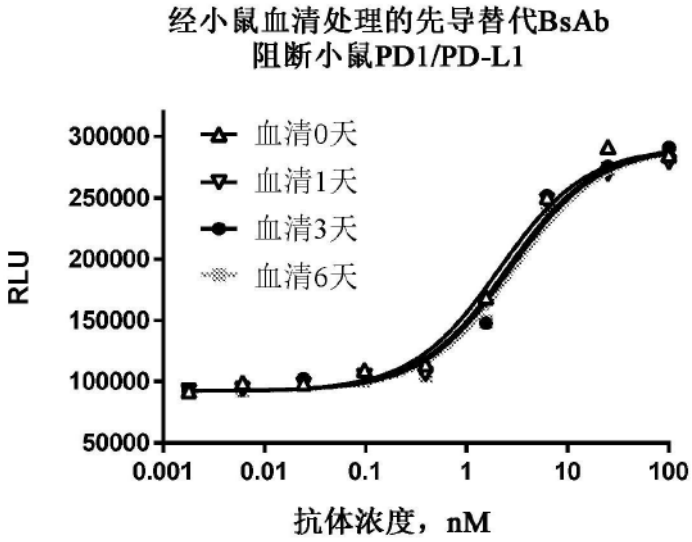

| | 7H3-IgG1 | 3B9+7H3_Fc | 3B9_Fc_7H3 | 雷莫芦单抗 |
|---|---|---|---|---|
| IC50 | 4.698 | 3.134 | 0.6297 | 3.747 |

图19A



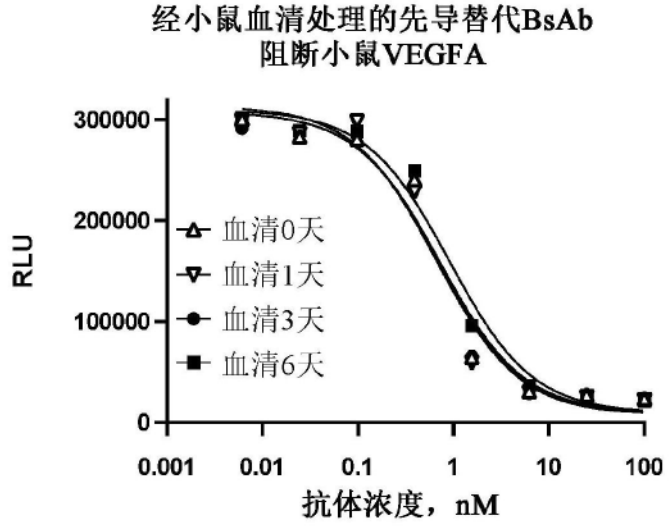

| | 3B9_Fc | 3B9+7H3_Fc | 3B9_Fc_7H3 |
|---|---|---|---|
| EC50 | 1.662 | 4.002 | 2.18 |

图19B



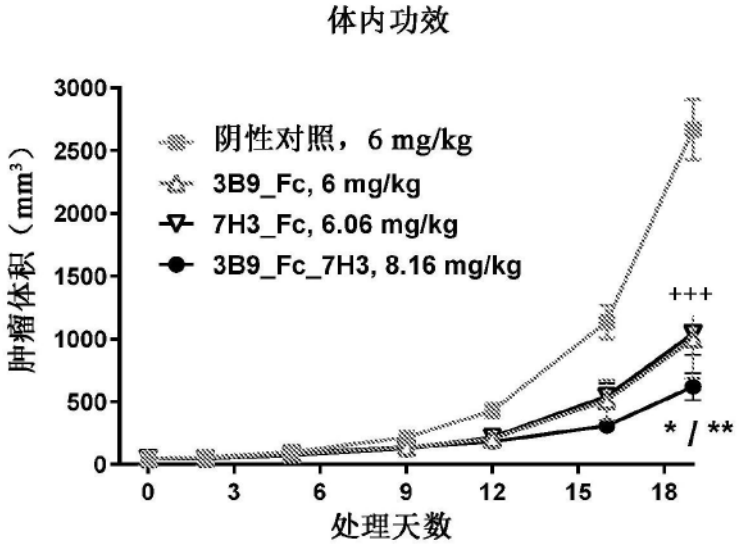

| | 血清0天 | 血清1天 | 血清3天 | 血清6天 |
|---|---|---|---|---|
| EC50 | 2.102 | 2.501 | 2.678 | 2.983 |

图20A




| | 血清0天 | 血清1天 | 血清3天 | 血清6天 |
|---|---|---|---|---|
| IC50 | 0.7238 | 0.6665 | 0.7206 | 0.9136 |

图20B




双向AVONA 图基多重比较检验
* 3B9_Fc_7H3对3B9_Fc：P = 0.0259
** 3B9_Fc_7H3对7H3_Fc：P = 0.0089
+++ 3B9_Fc或7H3_Fc对阴性对照：P < 0.0001

图21A

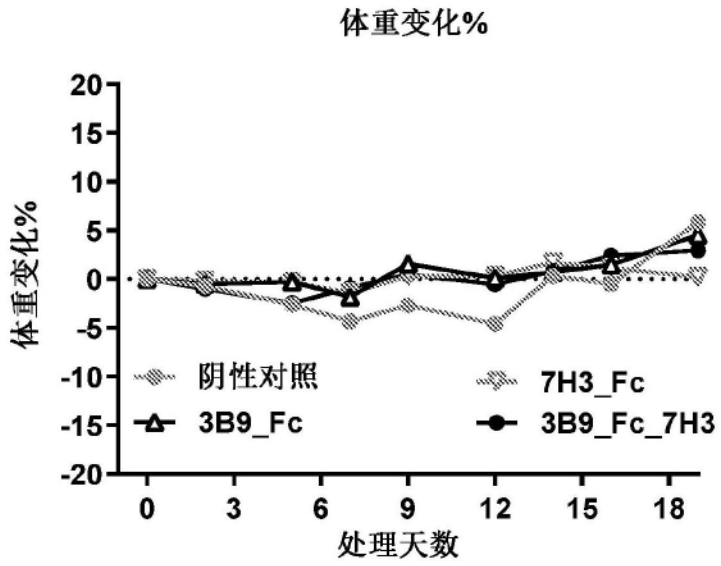

体重变化%
体重变化%
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
阴性对照
7H3_Fc
3B9_Fc
3B9_Fc_7H3
0
3
6
9
12
15
18
处理天数

图21B

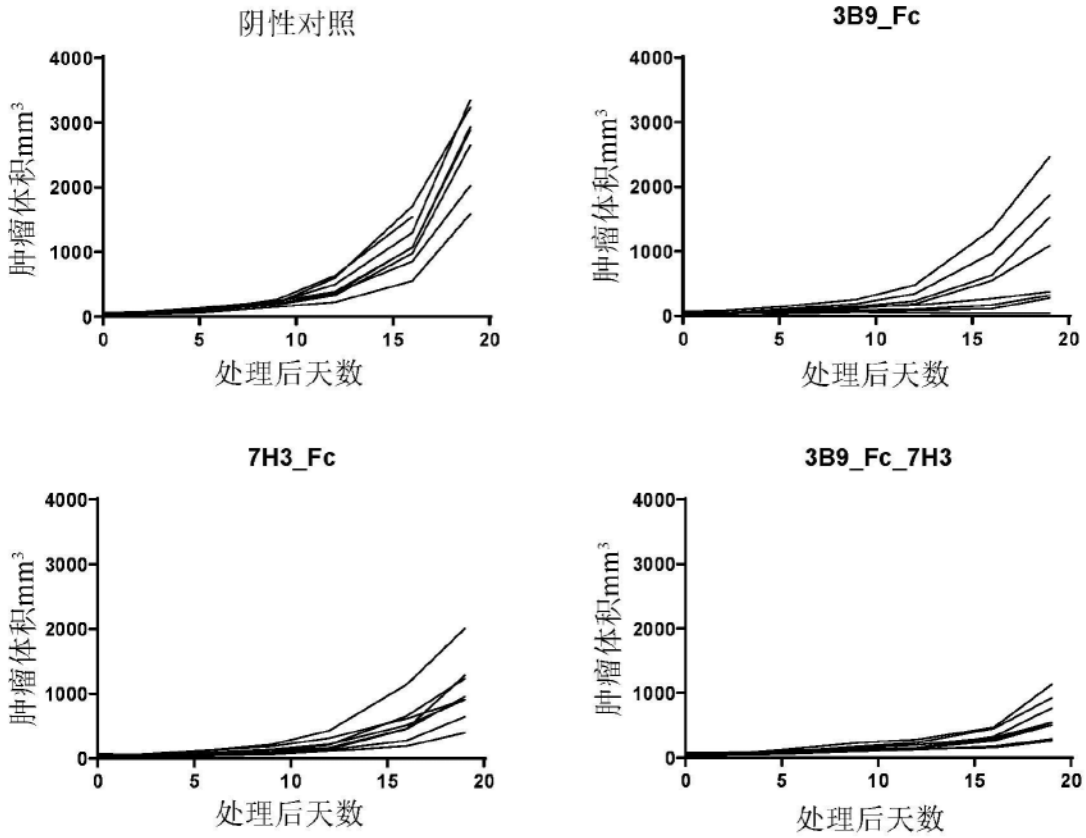

阴性对照
3B9_Fc
7H3_Fc
3B9_Fc_7H3
肿瘤体积mm3
4000
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
20
处理后天数

图22

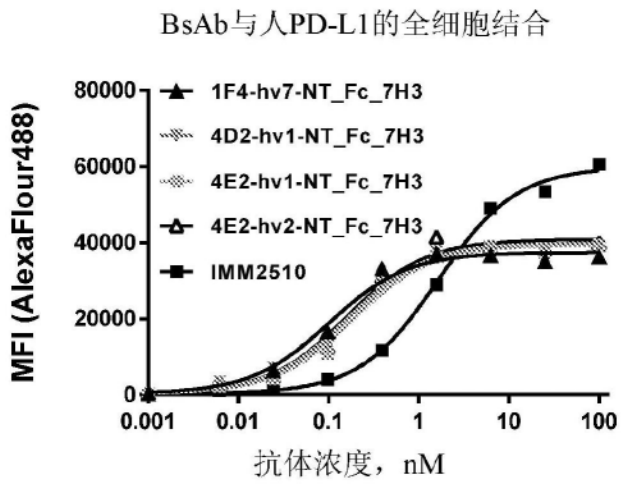

BsAb与人PD-L1的全细胞结合
MFI (AlexaFlour488)
80000
60000
40000
20000
0
1F4-hv7-NT_Fc_7H3
4D2-hv1-NT_Fc_7H3
4E2-hv1-NT_Fc_7H3
4E2-hv2-NT_Fc_7H3
IMM2510
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗体浓度，nM

图23

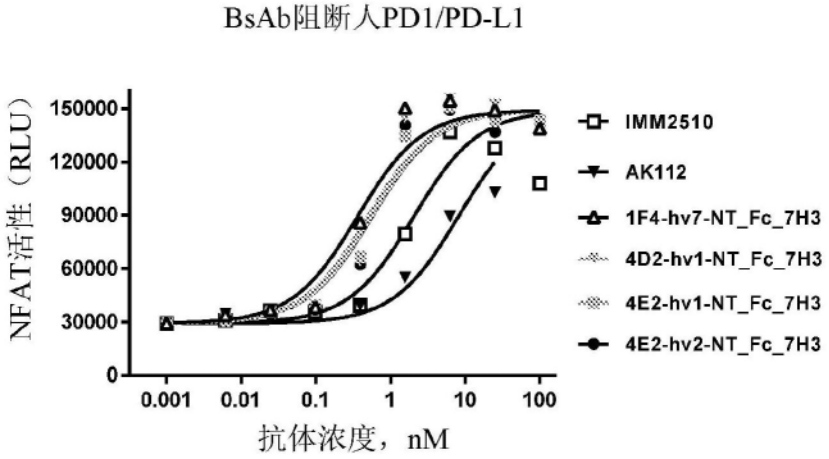

BsAb阻断人PD1/PD-L1
NFAT活性（RLU）
150000
120000
90000
60000
30000
0
IMM2510
AK112
1F4-hv7-NT_Fc_7H3
4D2-hv1-NT_Fc_7H3
4E2-hv1-NT_Fc_7H3
4E2-hv2-NT_Fc_7H3
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗体浓度，nM

图24

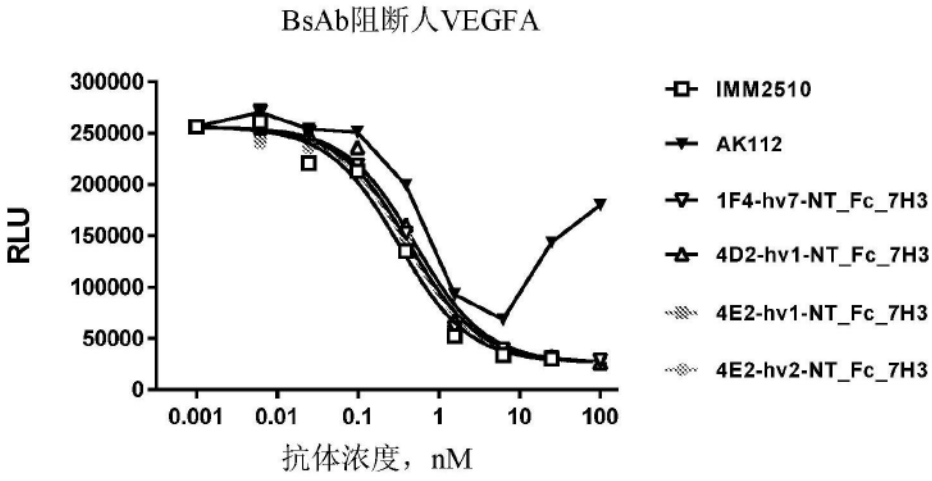

BsAb阻断人VEGFA
RLU
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
IMM2510
AK112
1F4-hv7-NT_Fc_7H3
4D2-hv1-NT_Fc_7H3
4E2-hv1-NT_Fc_7H3
4E2-hv2-NT_Fc_7H3
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗体浓度，nM

图25

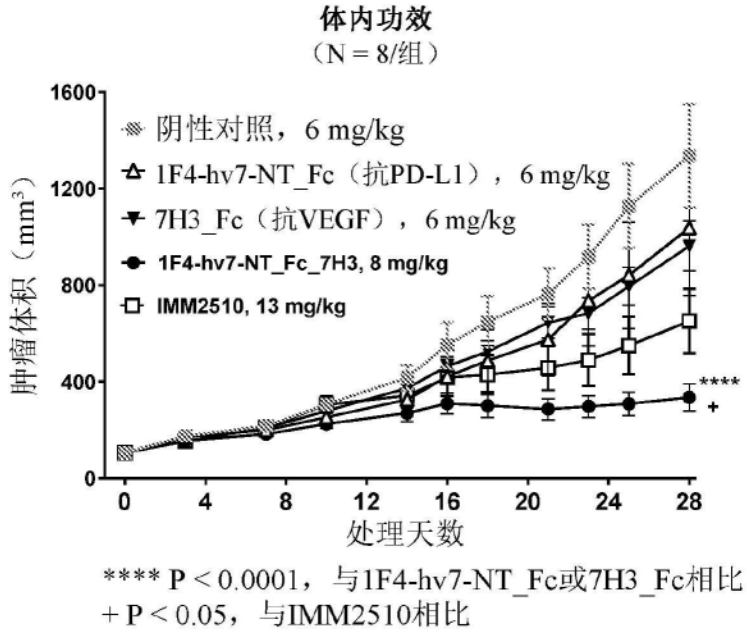

体内功效
（N = 8/组）
肿瘤体积（mm³）
1600
1200
800
400
0
阴性对照，6 mg/kg
1F4-hv7-NT_Fc（抗PD-L1），6 mg/kg
7H3_Fc（抗VEGF），6 mg/kg
1F4-hv7-NT_Fc_7H3, 8 mg/kg
IMM2510, 13 mg/kg
****
+
0 4 8 12 16 20 24 28
处理天数
**** P < 0.0001，与1F4-hv7-NT_Fc或7H3_Fc相比
+ P < 0.05，与IMM2510相比

图26A

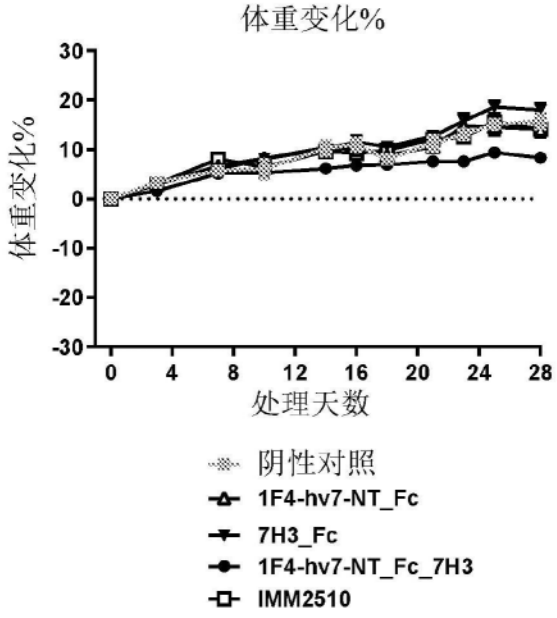

体重变化%
体重变化%
30
20
10
0
-10
-20
-30
0 4 8 12 16 20 24 28
处理天数
阴性对照
1F4-hv7-NT_Fc
7H3_Fc
1F4-hv7-NT_Fc_7H3
IMM2510

图26B

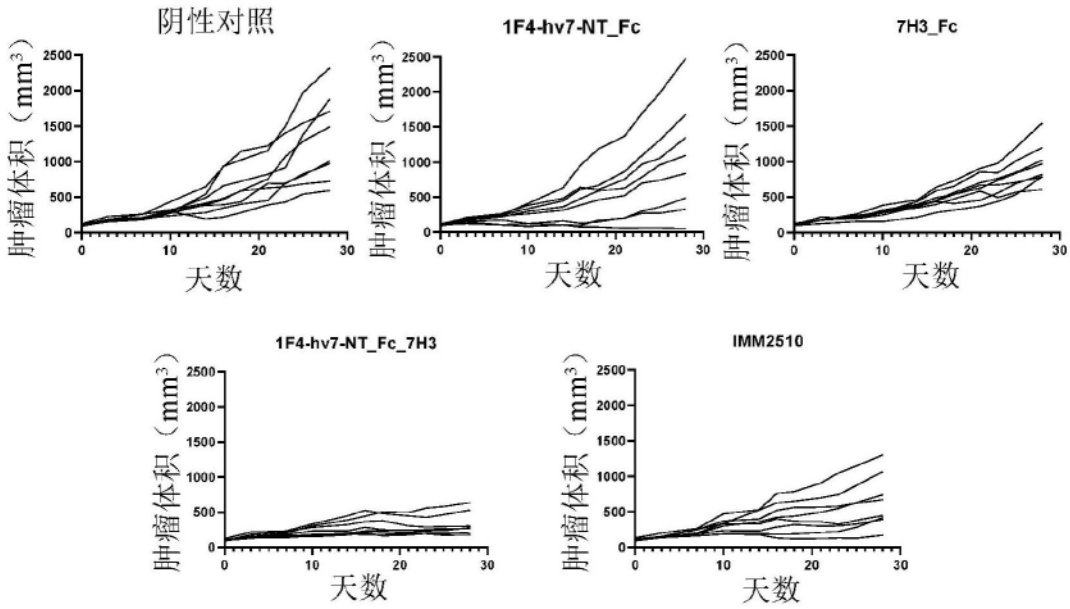

阴性对照
1F4-hv7-NT_Fc
7H3_Fc
1F4-hv7-NT_Fc_7H3
IMM2510
肿瘤体积（mm³）
天数
0
500
1000
1500
2000
2500
10
20
30

图27

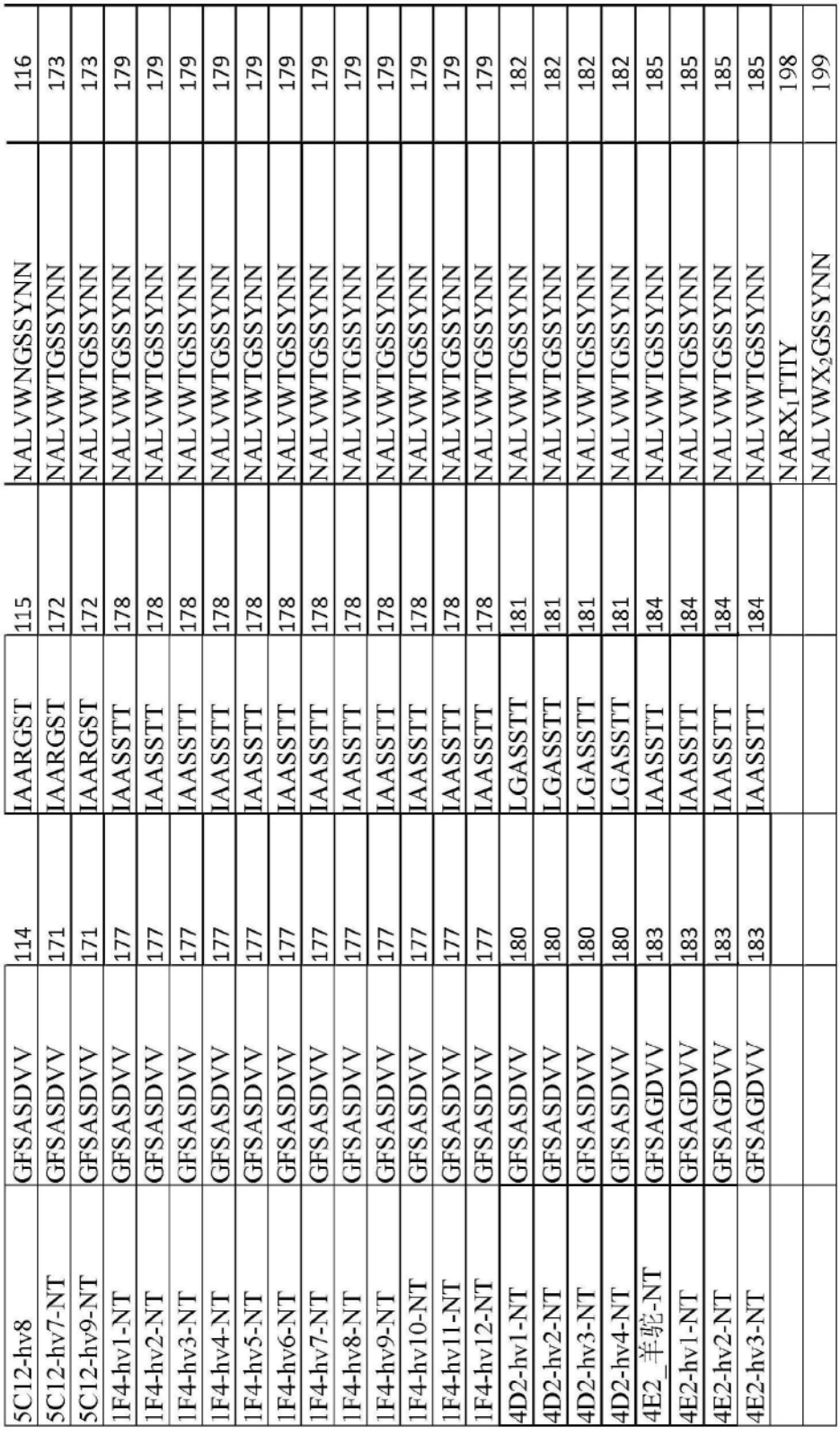
抗PD-L1 CDR序列

| 克隆 | CDR1 | SEQ ID: | CDR2 | SEQ ID: | CDR3 | SEQ ID |
|---|---|---|---|---|---|---|
| R1-1C3 | GIFFSDTH | 96 | ITSGGST | 97 | NARRTTIY | 98 |
| R2-1G4 | GIDFSDTH | 99 | ITSGGFT | 100 | NARRTTIY | 101 |
| R2-1A3 | GFDFSDTH | 102 | ITSGAFT | 103 | NARRTTIY | 104 |
| R2-3A5 | GIDFSDTH | 99 | ITSGGFT | 100 | NARRTTIY | 101 |
| R2-1G10 | GIFFSDTH | 96 | ITSGGST | 97 | NARRTTIY | 98 |
| R2-6D2 | GIDFSDTH | 105 | ITSGGFT | 106 | NARKTTIY | 107 |
| R2-4H8 | GIFFSGVH | 108 | ITDSGSA | 109 | NARTTTIY | 110 |
| R2-6A10 | GIDFSDTH | 111 | ITSGGFT | 112 | NARRSTIY | 113 |
| R2-5C12 | GFSASDVV | 114 | IAARGST | 115 | NALVWNGSSYNN | 116 |
| R2-1F4 | GFSASDVV | 117 | IAASSTT | 118 | NALVWNGSSYNN | 119 |
| R2-4D2 | GFSASDVV | 120 | LGASSTT | 121 | NALVWNGSSYNN | 122 |
| R2-4E2 | GFSAGDVV | 123 | IAASSTT | 124 | NALVWNGSSYNN | 125 |
| R3-3H1 | GIDFSDTH | 126 | ITSGGST | 127 | NARRSTIY | 128 |
| R3-5F8 | GFDFSDTH | 129 | ITSGGST | 130 | NARRTTIY | 131 |
| R3-2A11 | GIDFSDTH | 99 | ITSGGFT | 100 | NARRTTIY | 101 |
| 5F8-羊驼 | GFDFSDTH | 129 | ITSGGST | 130 | NARRTTIY | 131 |
| 5F8-hv1 | GFDFSDTH | 129 | ITSGGST | 130 | NARRTTIY | 131 |
| 5F8-hv2 | GFDFSDTH | 129 | ITSGGST | 130 | NARRTTIY | 131 |
| 5F8-hv3 | GFDFSDTH | 129 | ITSGGST | 130 | NARRTTIY | 131 |
| 5F8-hv4 | GFDFSDTH | 129 | ITSGGST | 130 | NARRTTIY | 131 |
| 5F8-hv5 | GFDFSDTH | 129 | ITSGGST | 130 | NARRTTIY | 131 |
| 5F8-hv6 | GFDFSDTH | 129 | ITSGGST | 130 | NARRTTIY | 131 |
| 5F8-hv7 | GFDFSDTH | 129 | ITSGGST | 130 | NARRTTIY | 131 |
| 5F8-hv8 | GFDFSDTH | 129 | ITSGGST | 130 | NARRTTIY | 131 |
| 3H1-羊驼 | GIDFSDTH | 126 | ITSGGST | 127 | NARRSTIY | 128 |
| 3H1-hv1 | GIDFSDTH | 126 | ITSGGST | 127 | NARRSTIY | 128 |
| 3H1-hv2 | GIDFSDTH | 126 | ITSGGST | 127 | NARRSTIY | 128 |

图28

| | | 126 | | 127 | | 128 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 3H1-hv3 | GIDFSDTH | 126 | ITSGGST | 127 | NARRSTIY | 128 |
| 3H1-hv4 | GIDFSDTH | 126 | ITSGGST | 127 | NARRSTIY | 128 |
| 3H1-hv5 | GIDFSDTH | 126 | ITSGGST | 127 | NARRSTIY | 128 |
| 3H1-hv6 | GIDFSDTH | 126 | ITSGGST | 127 | NARRSTIY | 128 |
| 3H1-hv7 | GIDFSDTH | 126 | ITSGGST | 127 | NARRSTIY | 128 |
| 3H1-3B9 | GIDFSDTH | 132 | ITSGGFT | 133 | NARTSTIY | 134 |
| 3H1-2A2 | GIDFSDTH | 111 | ITSGGFT | 112 | NARRSTIY | 113 |
| 3H1-2G3 | GIDFSDTH | 135 | ITSSGST | 136 | NARRSTIL | 137 |
| 3H1-1G9 | GIDFDDTH | 138 | ITSGGLT | 139 | NARTSTIY | 140 |
| 3H1-6D2 | GIDFNDTH | 141 | ITSRGST | 142 | NARRSTLY | 143 |
| 3H1-2F4 | GIDFSDLH | 144 | ITSGGST | 145 | NARSSTIY | 146 |
| 5F8-3A3 | GFDFSDTH | 147 | ITGGGST | 148 | LARRTTIY | 149 |
| 5F8-8E3 | GFDFSDTH | 150 | ITSGGST | 151 | NARLTTIY | 152 |
| 5F8-8D4 | GFDFSDTF | 153 | ITSGGST | 154 | NARRTTIY | 155 |
| 5F8-4B12 | GFDFPDTH | 156 | ITSGGFT | 157 | RARRTTIY | 158 |
| 5F8-6D6 | GFDFSDTA | 159 | ITSGGSV | 160 | RARRTTIY | 161 |
| 5F8-8H3 | GFDFSMTH | 162 | ITSGGKT | 163 | NARRATIY | 164 |
| 5F8-7D5 | GFDFEDTH | 165 | ITSGCST | 166 | NARRATIY | 167 |
| 5C12-NQ | GFSASDVV | 168 | IAARGST | 169 | NALVWQGSSYNN | 170 |
| 5C12-NT | GFSASDVV | 171 | IAARGST | 172 | NALVWTGSSYNN | 173 |
| 5C12-NS | GFSASDVV | 174 | IAARGST | 175 | NALVWSGSSYNN | 176 |
| 5C12-hv1 | GFSASDVV | 114 | IAARGST | 115 | NALVWNGSSYNN | 116 |
| 5C12-hv1-NQ | GFSASDVV | 168 | IAARGST | 169 | NALVWQGSSYNN | 170 |
| 5C12-hv1-NT | GFSASDVV | 171 | IAARGST | 172 | NALVWTGSSYNN | 173 |
| 5C12-hv1-NS | GFSASDVV | 174 | IAARGST | 175 | NALVWSGSSYNN | 176 |
| 5C12-hv2 | GFSASDVV | 114 | IAARGST | 115 | NALVWNGSSYNN | 116 |
| 5C12-hv3 | GFSASDVV | 114 | IAARGST | 115 | NALVWNGSSYNN | 116 |
| 5C12-hv4 | GFSASDVV | 114 | IAARGST | 115 | NALVWNGSSYNN | 116 |
| 5C12-hv5 | GFSASDVV | 114 | IAARGST | 115 | NALVWNGSSYNN | 116 |
| 5C12-hv6 | GFSASDVV | 114 | IAARGST | 115 | NALVWNGSSYNN | 116 |
| 5C12-hv7 | GFSASDVV | 114 | IAARGST | 115 | NALVWNGSSYNN | 116 |

图28续



| 5C12-hv8 | GFSASDVV | 114 | IAARGST | 115 | NALVWNGSSYNN | 116 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 5C12-hv7-NT | GFSASDVV | 171 | IAARGST | 172 | NALVWTGSSYNN | 173 |
| 5C12-hv9-NT | GFSASDVV | 171 | IAARGST | 172 | NALVWTGSSYNN | 173 |
| 1F4-hv1-NT | GFSASDVV | 177 | IAASSTT | 178 | NALVWTGSSYNN | 179 |
| 1F4-hv2-NT | GFSASDVV | 177 | IAASSTT | 178 | NALVWTGSSYNN | 179 |
| 1F4-hv3-NT | GFSASDVV | 177 | IAASSTT | 178 | NALVWTGSSYNN | 179 |
| 1F4-hv4-NT | GFSASDVV | 177 | IAASSTT | 178 | NALVWTGSSYNN | 179 |
| 1F4-hv5-NT | GFSASDVV | 177 | IAASSTT | 178 | NALVWTGSSYNN | 179 |
| 1F4-hv6-NT | GFSASDVV | 177 | IAASSTT | 178 | NALVWTGSSYNN | 179 |
| 1F4-hv7-NT | GFSASDVV | 177 | IAASSTT | 178 | NALVWTGSSYNN | 179 |
| 1F4-hv8-NT | GFSASDVV | 177 | IAASSTT | 178 | NALVWTGSSYNN | 179 |
| 1F4-hv9-NT | GFSASDVV | 177 | IAASSTT | 178 | NALVWTGSSYNN | 179 |
| 1F4-hv10-NT | GFSASDVV | 177 | IAASSTT | 178 | NALVWTGSSYNN | 179 |
| 1F4-hv11-NT | GFSASDVV | 177 | IAASSTT | 178 | NALVWTGSSYNN | 179 |
| 1F4-hv12-NT | GFSASDVV | 177 | IAASSTT | 178 | NALVWTGSSYNN | 179 |
| 4D2-hv1-NT | GFSASDVV | 180 | LGASSTT | 181 | NALVWTGSSYNN | 182 |
| 4D2-hv2-NT | GFSASDVV | 180 | LGASSTT | 181 | NALVWTGSSYNN | 182 |
| 4D2-hv3-NT | GFSASDVV | 180 | LGASSTT | 181 | NALVWTGSSYNN | 182 |
| 4D2-hv4-NT | GFSASDVV | 180 | LGASSTT | 181 | NALVWTGSSYNN | 182 |
| 4E2_羊驼-NT | GFSAGDVV | 183 | IAASSTT | 184 | NALVWTGSSYNN | 185 |
| 4E2-hv1-NT | GFSAGDVV | 183 | IAASSTT | 184 | NALVWTGSSYNN | 185 |
| 4E2-hv2-NT | GFSAGDVV | 183 | IAASSTT | 184 | NALVWTGSSYNN | 185 |
| 4E2-hv3-NT | GFSAGDVV | 183 | IAASSTT | 184 | NALVWTGSSYNN | 185 |
| | | | | | $NARX_1TTIY$ | 198 |
| | | | | | $NALVWX_2GSSYNN$ | 199 |

图28续

抗VEGF CDR序列

| 克隆 | CDR1 | SEQ ID: | CDR2 | SEQ ID: | CDR3 | SEQ ID |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 7H3 | GFTFGPYA | 186 | IWPSGSIT | 187 | AFGSPTGSITY | 188 |
| 1C8 | GRSFSRYA | 189 | IGSGGGRT | 190 | AARIYRVVGSGTYPAGYDY | 191 |
| 4B11 | GLSFSQYE | 192 | ISSSGIST | 193 | AAELVDYHRWGYDY | 194 |
| 1G1 | GLSFSYGT | 195 | LSAGGTIT | 196 | AALGGYSGGSKYPYYDY | 197 |

图29

VHH序列

| 克隆 | 氨基酸序列 | | | | | | | | SEQ ID |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | FR1 | CDR1 | FR2 | CDR2 | FR3 | CDR3 | FR4 | | |
| R1-1C3 | EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAAS | GIFFSDTH | MGWYRQAPGKERELVAI | ITSGGST | DYVDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNTLKFEDTAVYYC | NARRTTIY | WGQGTQVTVSS | | 1 |
| R2-1G4 | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS | GIDFSDTH | MGWYRQAPGKERELVAL | ITSGGFT | DYADSVKGRFTISRDNAKNTWYLQMNTLKFEDTAVYYC | NARRTTIY | WGQGTQVTVSS | | 2 |
| R2-1A3 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVAS | GFDFSDTH | MGWYRQAPGKQRELVAL | ITSGAFT | DYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNTLKFEDTAVYYC | NARRTTIY | WGQGTQVTVSS | | 3 |
| R2-3A5 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS | GIDFSDTH | MGWYRQAPGKQRELVAL | ITSGGFT | DYADSVKGRFTISRDNAKNTWYLQMNTLKLEDTAVYYC | NARRTTIY | WGQGTQVTVSS | | 4 |
| R2-1G10 | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS | GIFFSDTH | MGWYRQAPGKERELVAI | ITSGGST | DYVDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKFEDTAVYYC | NARRTTIY | WGQGTQVTVSS | | 5 |
| R2-6D2 | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS | GIDFSDTH | MGWYRQAPGKERELVAL | ITSGGFT | DYADSVKGRFTISRDNAKNTWYLQMNTLKFEDTAVYYC | NARKTTIY | WGQGTQVTVSS | | 6 |
| R2-4H8 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCGAS | GIFFSGVH | MGWYRQAPGKERELVAL | IDSGSA | DYVDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKFEDTAVYYC | NARTTTIY | WGQGTQVTVSS | | 7 |
| R2-6A10 | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS | GIDFSDTH | MGWYRQAPGKERELVAL | ITSGGFT | DYADSVKGRFTISRDNAKNTWYLQMNTLKFEDTAVYYC | NARRSTIY | WGQGTQVTVSS | | 8 |
| R2-5C12 | QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS | GFSASDVV | MAWYRQAPGKQREFVAN | AARGST | DYANSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKSDDTAVYYC | NALVWNGSSYNN | WGQGTQVTVSS | | 9 |
| R2-1F4 | QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS | GFSASDVV | MAWYRQAPGKQREFVAN | AASSTT | RYADSVKGRFTISRDDAKNTVSLQMNSLKSEDTAVYYC | NALVWNGSSYNN | WGQGTQVTVSS | | 10 |
| R2-4D2 | QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS | GFSASDVV | MAWYRQAPGKQREFVAN | LGASSTT | RYADSVKGRFTISRDDAKNTVSLQMNSLKSEDTAVYYC | NALVWNGSSYNN | WGQGTQVTVSS | | 11 |
| R2-4E2 | EVQLVESGGGSVQDGGSLTLSCAAS | GFSAGDVV | MAWYRQAPGKQREFVAN | AASSTT | RYTDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKSEDTAVYYC | NALVWNGSSYNN | WGQGTQVTVSS | | 12 |
| R3-3H1 | QLQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS | GIDFSDTH | MGWYRQAPGKQRELVAI | ITSGGST | DYVDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKFEDTAVYYC | NARRSTIY | WGQGTQVTVSS | | 13 |
| R3-5F8 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVAS | GFDFSDTH | MGWYRQAPGKERELVAI | ITSGGST | DYVDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKFEDTAVYYC | NARRTTIY | WGQGTQVTVSS | | 14 |
| R3-2A11 | QVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAAS | GIDFSDTH | MGWYRQAPGKQRELVAL | ITSGGFT | DYPDSVKGRFTISRDNAKNTWYLQMNTLKLEDTAVYYC | NARRTTIY | WGQGTQVTVSS | | 15 |
| 5F8-羊驼 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVAS | GFDFSDTH | MGWYRQAPGKERELVAI | ITSGGST | DYVDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKFEDTAVYYC | NARRTTIY | WGQGTQVTVSS | | 16 |
| 5F8-hv1 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS | GFDFSDTH | MSWVRQAPGKERELVSV | ITSGGST | YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC | NARRTTIY | WGQGTQVTVSS | | 17 |
| 5F8-hv2 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS | GFDFSDTH | MSWVRQAPGKERELVSA | ITSGGST | YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC | NARRTTIY | WGQGTQVTVSS | | 18 |
| 5F8-hv3 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS | GFDFSDTH | MNWVRQAPGKERELVSY | ITSGGST | YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC | NARRTTIY | WGQGTQVTVSS | | 19 |
| 5F8-hv4 | QVQLVESGGGLKQPGGSLRLSCAAS | GFDFSDTH | MSWVRQAPGKERELVSY | ITSGGST | YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC | NARRTTIY | WGQGTQVTVSS | | 20 |
| 5F8-hv5 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS | GFDFSDTH | MSWVRQAPGKERELVSV | ITSGGST | DYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC | NARRTTIY | WGQGTQVTVSS | | 21 |
| 5F8-hv6 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS | GFDFSDTH | MSWVRQAPGKERELVSV | ITSGGST | DYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC | NARRTTIY | WGQGTQVTVSS | | 22 |
| 5F8-hv7 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS | GFDFSDTH | MSWVRQAPGKERELVSI | ITSGGST | DYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC | NARRTTIY | WGQGTQVTVSS | | 23 |
| 5F8-hv8 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS | GFDFSDTH | MSWVRQAPGKERELVAI | ITSGGST | DYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC | NARRTTIY | WGQGTQVTVSS | | 24 |
| 3H1-羊驼 | QLQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS | GIDFSDTH | MGWYRQAPGKQRELVAI | ITSGGST | DYVDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKFEDTAVYYC | NARRSTIY | WGQGTQVTVSS | | 25 |

图30

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 3H1-hv1 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GIDFSDTH MSWVRQAPGKQRELVSV ITSGGST YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC NARRSTIY | WGQGTQVTVSS | 26 |
| 3H1-hv2 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS GIDFSDTH MHWVRQAPGKQRELVSV ITSGGST YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC NARRSTIY | WGQGTQVTVSS | 27 |
| 3H1-hv3 | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GIDFSDTH MSWVRQAPGKQRELVSY ITSGGST NYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NARRSTIY | WGQGTQVTVSS | 28 |
| 3H1-hv4 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS GIDFSDTH MHWVRQAPGKQRELVSV ITSGGST DYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC NARRSTIY | WGQGTQVTVSS | 29 |
| 3H1-hv5 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS GIDFSDTH MHWVRQAPGKQRELVSV ITSGGST DYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC NARRSTIY | WGQGTQVTVSS | 30 |
| 3H1-hv6 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS GIDFSDTH MHWVRQAPGKQRELVSI ITSGGST DYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC NARRSTIY | WGQGTQVTVSS | 31 |
| 3H1-hv7 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS GIDFSDTH MHWVRQAPGKQRELVAI ITSGGST DYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC NARRSTIY | WGQGTQVTVSS | 32 |
| 3H1-3B9 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS GIDFSDTH MHWVRQAPGKQRELVAI ITSGGFT DYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC NARTSTIY | WGQGTQVTVSS | 33 |
| 3H1-2A2 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS GIDFSDTH MHWVRQAPGKQRELVAI ITSGGFT DYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC NARRSTIY | WGQGTQVTVSS | 34 |
| 3H1-2G3 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS GIDFSDTH MHWVRQAPGKQRELVAI ITSGGST DYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC NARRSTIL | WGQGTQVTVSS | 35 |
| 3H1-1G9 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS GIDFDDTH MHWVRQAPGKQRELVAI ITSGGLT DYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC NARTSTIY | WGQGTQVTVSS | 36 |
| 3H1-6D2 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS GIDFNDTH MHWVRQAPGKQRELVAI ITSRGST DYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC NARRSTLY | WGQGTQVTVSS | 37 |
| 3H1-2F4 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS GIDFSDLH MHWVRQAPGKQRELVAI ITSGGST DYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC NARSSTIY | WGQGTQVTVSS | 38 |
| 5F8-3A3 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFDFSDTH MSWVRQAPGKERELVAI ITGGGST DYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC LARRTTIY | WGQGTQVTVSS | 39 |
| 5F8-8E3 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFDFSDTH MSWVRQAPGKERELVAI ITSGGST DYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC NARLTTIY | WGQGTQVTVSS | 40 |
| 5F8-8D4 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFDFSDTE MSWVRQAPGKERELVAI ITSGGST DYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC NARRTTIY | WGQGTQVTVSS | 41 |
| 5F8-4B12 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFDFPDTH MSWVRQAPGKERELVAI ITSGGFT DYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC RARRTTIY | WGQGTQVTVSS | 42 |
| 5F8-6D6 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFDFSDTA MSWVRQAPGKERELVAI ITSGGSV DYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC RARRTTIY | WGQGTQVTVSS | 43 |
| 5F8-8H3 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFDFSMTH MSWVRQAPGKERELVAI ITSGGKT DYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC NARRATIY | WGQGTQVTVSS | 44 |
| 5F8-7D5 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFDFEDTH MSWVRQAPGKERELVAI ITSGCST DYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC NARRATIY | WGQGTQVTVSS | 45 |
| 5C12-NQ | QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS GFSASDVV MAWYRQAPGKQREFVAN IAARGST DYANSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKSDDTAVYYC NALVWQGSSYNN | WGQGTQVTVSS | 46 |
| 5C12-NT | QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS GFSASDVV MAWYRQAPGKQREFVAN IAARGST DYANSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKSDDTAVYYC NALVWTGSSYNN | WGQGTQVTVSS | 47 |
| 5C12-NS | QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS GFSASDVV MAWYRQAPGKQREFVAN IAARGST DYANSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKSDDTAVYYC NALVWSGSSYNN | WGQGTQVTVSS | 48 |
| 5C12-hv1 | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MAWYRQAPGKQREFVAN IAARGST DYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWNGSSYNN | WGQGTQVTVSS | 49 |
| 5C12-hv1-NQ | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MAWYRQAPGKQREFVAN IAARGST DYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWQGSSYNN | WGQGTQVTVSS | 50 |
| 5C12-hv1-NT | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MAWYRQAPGKQREFVAN IAARGST DYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWTGSSYNN | WGQGTQVTVSS | 51 |
| 5C12-hv1-NS | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MAWYRQAPGKQREFVAN IAARGST DYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWSGSSYNN | WGQGTQVTVSS | 52 |
| 5C12-hv2 | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MSWYRQAPGKQREFVAN IAARGST DYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWNGSSYNN | WGQGTQVTVSS | 53 |
| 5C12-hv3 | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MSWYRQAPGKQREFVAY IAARGST DYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWNGSSYNN | WGQGTQVTVSS | 54 |

图30续

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 5C12-hv4 | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MSWYRQAPGKQREFVSY IAARGST DYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWNGSSYNN WGQGTQVTVSS | 55 |
| 5C12-hv5 | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MSWYRQAPGKQREFVSY IAARGST DYANSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWNGSSYNN WGQGTQVTVSS | 56 |
| 5C12-hv6 | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MSWYRQAPGKQREFVSY IAARGST YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWNGSSYNN WGQGTQVTVSS | 57 |
| 5C12-hv7 | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MAWYRQAPGKQREFVSN IAARGST DYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWNGSSYNN WGQGTQVTVSS | 58 |
| 5C12-hv8 | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MAWYRQAPGKQREFVSY IAARGST DYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWNGSSYNN WGQGTQVTVSS | 59 |
| 5C12-hv7-NT | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MAWYRQAPGKQREFVSN IAARGST DYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWTGSSYNN WGQGTQVTVSS | 60 |
| 5C12-hv9-NT | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MAWYRQAPGKQREFVSN IAARGST YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWTGSSYNN WGQGTQVTVSS | 61 |
| 1F4-hv1-NT | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MSWYRQAPGKQREFVSA IAASSTT YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWTGSSYNN WGQGTQVTVSS | 62 |
| 1F4-hv2-NT | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MSWYRQAPGKQREFVAA IAASSTT YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWTGSSYNN WGQGTQVTVSS | 63 |
| 1F4-hv3-NT | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MSWRQAPGKQREFVSY IAASSTT YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWTGSSYNN WGQGTQVTVSS | 64 |
| 1F4-hv4-NT | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MSWRQAPGKQREFVSA IAASSTT YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWTGSSYNN WGQGTQVTVSS | 65 |
| 1F4-hv5-NT | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MSWYRQAPGKQREFVAY IAASSTT RYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWTGSSYNN WGQGTQVTVSS | 66 |
| 1F4-hv6-NT | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MSWYRQAPGKQREFVSY IAASSTT RYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWTGSSYNN WGQGTQVTVSS | 67 |
| 1F4-hv7-NT | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MAWYRQAPGKQREFVAN IAASSTT RYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWTGSSYNN WGQGTQVTVSS | 68 |
| 1F4-hv8-NT | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MAWYRQAPGKQREFVAN IAASSTT YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWTGSSYNN WGQGTQVTVSS | 69 |
| 1F4-hv9-NT | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MAWYRQAPGKQREFVSN IAASSTT RYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWTGSSYNN WGQGTQVTVSS | 70 |
| 1F4-hv10-NT | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MAWYRQAPGKQREFVSN IAASSTT YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWTGSSYNN WGQGTQVTVSS | 71 |
| 1F4-hv11-NT | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MAWYRQAPGKQREFVSY IAASSTT YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWTGSSYNN WGQGTQVTVSS | 72 |
| 1F4-hv12-NT | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MAWYRQAPGKQREFVSY IAASSTT RYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWTGSSYNN WGQGTQVTVSS | 73 |
| 4D2-hv1-NT | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MAWYRQAPGKQREFVAN LGASSTT RYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWTGSSYNN WGQGTQVTVSS | 74 |
| 4D2-hv2-NT | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MAWYRQAPGKQREFVSN LGASSTT RYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWTGSSYNN WGQGTQVTVSS | 75 |
| 4D2-hv3-NT | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MAWYRQAPGKQREFVSN LGASSTT YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWTGSSYNN WGQGTQVTVSS | 76 |
| 4D2-hv4-NT | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSASDVV MAWYRQAPGKQREFVSN LGASSTT NYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWTGSSYNN WGQGTQVTVSS | 77 |
| 4E2_羊驼 | EVQLVESGGGSVQDGGSLTLSCAAS GFSAGDVV MAWYRQAPGKQREFVAN IAASSTT RYTDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKSEDTAVYYC NALVWTGSSYNN WGQGTQVTVSS | 201 |
| 4E2-hv1 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSAGDVV MAWYRQAPGKQREFVAN IAASSTT RYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWTGSSYNN WGQGTQVTVSS | 78 |
| 4E2-hv2 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSAGDVV MAWYRQAPGKQREFVSN IAASSTT RYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWTGSSYNN WGQGTQVTVSS | 79 |
| 4E2-hv3 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFSAGDVV MAWYRQAPGKQREFVSN IAASSTT YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC NALVWTGSSYNN WGQGTQVTVSS | 80 |
| 7H3 | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFGPYA MHWVRQAPGKERELVAA IWPSGSLI YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AFGSPTGSIY WGQGTLVTVSS | 81 |
| 1C8 | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GRSFSRYA MAWWRQAPGKERESVAV IGSGGGRT YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AARIYRVWGSGTYPAGYDY WGQGTLVTVSS | 82 |

图30续


4B11 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GLSFSQYE MHWVRQAPGKEREFVAA ISSSGISI YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AAELVDYHRWGYDY WGQGTLVTVSS 83
1G1 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GLSFSYGT MAWVRQAPGKELELVAA LSAGGTIT YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AALGGYSGGSKYPYYDY WGQGTLVTVSS 84

图30续