



(21) 申请号 202310261481.0

(22) 申请日 2023.03.15

(71) 申请人 三生国健药业(上海)股份有限公司

地址 201203 上海市浦东新区中国(上海)
自由贸易试验区李冰路399号

(72) 发明人 赵杰 蒋良丰 郑众 朱祯平
张昊 娄竞

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限
公司 31266

专利代理师 徐迅 马莉华

(51) Int. Cl.

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书33页
序列表(电子公布) 附图12页

(54) 发明名称

抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体

(57) 摘要

本发明提供了一种抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体。具体地,本发明的三特异性抗体靶向肿瘤特异性抗原MUC17,同时靶向T细胞表达的CD3和共刺激分子CD28,能够为T细胞提供共刺激信号,从而激发更强更有效的杀伤活性,有望有效克服实体肿瘤对T细胞衔接子的耐药性。

1. 一种多特异性T细胞衔接子(T-cell Engagers), 其特征在于, 所述多特异性T细胞衔接子包含:

第一靶向结构域D1, 所述D1与选自下组的靶蛋白结合: CD3、CD28、CD40、CD137;

任选的第二靶向结构域D2, 所述D2与选自下组的靶蛋白结合: CD3、CD28、CD40、CD137;

和

第三靶向结构域D3, 所述D3包含一个或多个MUC17抗原结合结构域。

2. 如权利要求1所述的多特异性T细胞衔接子, 其特征在于, 所述MUC17抗原结合结构域包含第三重链可变区和第三轻链可变区, 其中, 所述第三重链可变区包含如下三个重链可变区CDR:

H-CDR1, 其具有如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;

H-CDR2, 其具有如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列; 和

H-CDR3, 其具有如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列; 以及

所述第三轻链可变区包含如下三个轻链可变区CDR:

L-CDR1, 其具有如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列;

L-CDR2, 其具有如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列; 和

L-CDR3, 其具有如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。

3. 如权利要求1所述的多特异性T细胞衔接子, 其特征在于, 所述多特异性T细胞衔接子为三特异性抗体, 其从N端到C端包含如下所示的结构:

(a) 第一链: VL₁-L1-VH₂-L2-VL₂-L3-VH₁-L4-Fc1;

(b) 第二链: VH₃-CH1-Fc2; 和

(c) 第三链: VL₃-CL;

或所述三特异性抗体从N端到C端包含如下所示的结构:

(a) 第一链: VL₁-L1-VH₁-L2-VL₂-L3-VH₂-L4-Fc1;

(b) 第二链: VH₃-CH1-Fc2; 和

(c) 第三链: VL₃-CL;

其中,

VH₁为第一重链可变区, VL₁为第一轻链可变区;

VH₂为第二重链可变区, VL₂为第二轻链可变区;

VH₃为第三重链可变区, VL₃为第三轻链可变区;

CL为轻链恒定区, CH1为CH1结构域;

L1、L2、L3、L4各自独立地为无、键或接头;

Fc1或Fc2各自独立地为Fc元件;

“-”代表肽键。

4. 一种多核苷酸, 其特征在于, 所述多核苷酸编码权利要求1-3任一所述的多特异性T细胞衔接子。

5. 一种载体, 其特征在于, 所述载体含有权利要求4所述的多核苷酸。

6. 一种宿主细胞, 其特征在于, 所述宿主细胞含有权利要求5所述的载体或基因组中整合有权利要求4所述的多核苷酸。

7. 一种制备如权利要求1-3任一所述的多特异性T细胞衔接子的方法, 其特征在于, 包

括步骤：

(i) 在合适的条件下，培养权利要求6所述的宿主细胞，获得含有如权利要求1-3任一所述的多特异性T细胞衔接子的混合物；

(ii) 对步骤(i)中得到的混合物进行纯化和/或分离，从而获得如权利要求1-3任一所述的多特异性T细胞衔接子。

8. 一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物含有：

(I) 如权利要求1-3任一所述的多特异性T细胞衔接子；和

(II) 药学上可接受的载体。

9. 一种免疫偶联物，其特征在于，所述免疫偶联物包括：

(a) 如权利要求1-3任一所述的多特异性T细胞衔接子；和

(b) 选自下组的偶联部分：可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、酶、或其组合。

10. 如权利要求1-3任一所述多特异性T细胞衔接子、如权利要求8所述的药物组合物或如权利要求9所述的免疫偶联物的用途，其特征在于，用于制备 (a) 检测试剂或试剂盒；和/或(b) 制备预防和/或治疗癌症/肿瘤的药物。

抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及抗体领域,具体地涉及一种抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体。

背景技术

[0002] 据世界卫生组织IARC发布的《2020世界癌症报告》中数据显示,2020年全球新发癌症病例1929万例,仅中国新发癌症就有457万人,占全球23.7%,中国癌症新发人数远超世界其他国家。2020年,我国癌症病种中,癌症病种最高的前10位分别是:肺癌、乳腺癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、食管癌、宫颈癌、甲状腺癌、子宫癌、前列腺癌。肺癌为患病率最高的癌症,结直肠癌和胃癌紧随其后,分别占比12.3%和10.5%。因此,寻找和探索胃肠道肿瘤相关治疗靶点用于开发更加有效的临床治疗药物,具有重大临床意义。

[0003] MUC17是一种分子量较大的O-糖基化黏蛋白(Mucins),与其它几种黏蛋白(MUC1、3、12、13和16)同属于SEA家族的跨膜黏蛋白。临床癌症研究数据表明,MUC17在多种消化道肿瘤(包括胃癌和结直肠癌)中高表达,这使MUC17成为潜在的消化道肿瘤相关靶点。

[0004] 双特异性T细胞衔接子(Bispecific T-cell Engagers,BiTEs)是一种双特异型抗体,它由两类抗体的片段融合而成,分别可以结合T细胞表面的CD3分子以及肿瘤细胞表面抗原分子,从而诱导T细胞对肿瘤细胞的杀伤,此过程不受MHC限制。目前这一疗法在血液系统恶性肿瘤中效果较好,其中一种CD3×CD19的BiTE,Blinatumomab,已经被FDA批准用于B细胞恶性肿瘤的治疗。由于实体瘤存在的物理屏障以及免疫抑制微环境,BiTEs在多种实体瘤的临床治疗中没有达到预期效果。

[0005] 因此,本领域亟待提供一种能克服BiTEs缺陷的新型T细胞衔接子,例如能够靶向肿瘤特异性抗原MUC17的三特异性T细胞衔接子(Trispecific T-cell engagers,TriTEs)。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体。

[0007] 本发明的目的在于提供一种三特异性T细胞衔接子(TriTEs),靶向的肿瘤特异性抗原为MUC17,同时靶向T细胞表达的CD3和共刺激分子CD28。

[0008] 在本发明的第一方面,提供了一种多特异性T细胞衔接子(T-cell Engagers),所述多特异性T细胞衔接子包含:

[0009] 第一靶向结构域D1,所述D1与选自下组的靶蛋白结合:CD3、CD28、CD40、CD137;

[0010] 任选的第二靶向结构域D2,所述D2与选自下组的靶蛋白结合:CD3、CD28、CD40、CD137;和

[0011] 第三靶向结构域D3,所述D3包含一个或多个MUC17抗原结合结构域。

[0012] 在另一优选例中,所述D1、D2或D3各自独立地选自:单域抗体(sdAb)、Fab、Fab'、F(ab')₂、TriFab、Fv片段、片段可变(Fv)异二聚体、单链Fv(scFv)片段、双抗体(diabody)、双特异性T细胞接合器(BiTE)或单结构域片段,优选为单链Fv(scFv)、Fv片段或Fab片段。

[0013] 在另一优选例中,所述MUC17抗原结合结构域包含第三重链可变区和第三轻链可

变区,其中,所述第三重链可变区包含如下三个重链可变区CDR:

[0014] H-CDR1,其具有如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;

[0015] H-CDR2,其具有如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列;和

[0016] H-CDR3,其具有如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列;以及

[0017] 所述第三轻链可变区包含如下三个轻链可变区CDR:

[0018] L-CDR1,其具有如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列;

[0019] L-CDR2,其具有如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列;和

[0020] L-CDR3,其具有如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。

[0021] 在另一优选例中,所述MUC17抗原结合结构域包含如SEQ ID NO:1或9所示的第三重链可变区,和如SEQ ID NO:2或10所示的第三轻链可变区。

[0022] 在另一优选例中,所述MUC17抗原结合结构域包含与如SEQ ID NO:1或9所示的氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的第三重链可变区(其中CDR序列不变或基本不变);和与如SEQ ID NO:2或10所示的氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的第三轻链可变区(其中CDR序列不变或基本不变)。

[0023] 在另一优选例中,所述第二靶向结构域选自下组:CD3抗原结合结构域、CD28抗原结合结构域、CD40抗原结合结构域、CD137抗原结合结构域、CD40L序列、或CD137L序列。

[0024] 在另一优选例中,所述第三靶向结构域选自下组:CD3抗原结合结构域、CD28抗原结合结构域、CD40抗原结合结构域、CD137抗原结合结构域、CD40L序列、或CD137L序列。

[0025] 在另一优选例中,所述多特异性T细胞衔接子还包含Fc片段。

[0026] 在另一优选例中,所述Fc片段来源于IgG1或IgG4。

[0027] 在另一优选例中,所述Fc片段为来源于IgG1的Fc片段。

[0028] 在另一优选例中,所述来源于IgG1的Fc片段具有选自下组的突变:

[0029] N297A;

[0030] L234F/L235E/P331S;

[0031] Y349C/K370E/K409D/K439E;

[0032] S354C/D356K/E357K/D399K;

[0033] S354C/T366W;

[0034] S354C/T366W/H435R/Y436F;

[0035] Y349C/T366S/L368A/Y407V;

[0036] L234F/L235E/P331S/Y349C/K370E/K409D/K439E;

[0037] L234F/L235E/P331S/S354C/D356K/E357K/D399K;

[0038] L234F/L235E/P331S/S354C/T366W;

[0039] L234F/L235E/P331S/Y349C/T366S/L368A/Y407V;

[0040] N297A/Y349C/K370E/K409D/K439E;

[0041] N297A/S354C/D356K/E357K/D399K;

[0042] N297A/S354C/T366W;

[0043] N297A/Y349C/T366S/L368A/Y407V;和/或

[0044] S267E;S267E/G236D;S267E/S239D;S267E/L328F。

- [0045] 在另一优选例中,所述来源于IgG1的Fc片段具有选自下组的突变:
- [0046] L234A/L235A/G237A;
- [0047] S354C/T366W;
- [0048] S354C/T366W/H435R/Y436F;
- [0049] Y349C/T366S/L368A/Y407V。
- [0050] 在另一优选例中,所述多特异性T细胞衔接子为双/三特异性T细胞衔接子
- [0051] 在另一优选例中,所述多特异性T细胞衔接子为双特异性T细胞衔接子。
- [0052] 在另一优选例中,所述三特异性T细胞衔接子包含:
- [0053] 第一靶向结构域,所述第一靶向结构域为CD28抗原结合结构域;
- [0054] 第二靶向结构域,所述第二靶向结构域为CD3抗原结合结构域;和
- [0055] 第三靶向结构域,所述第三靶向结构域包含一个或多个MUC17抗原结合结构域。
- [0056] 在另一优选例中,所述第一靶向结构域、第二靶向结构域和第三靶向结构域各包含一个或多个抗体可变区。
- [0057] 在另一优选例中,所述多特异性T细胞衔接子为三特异性T细胞衔接子。
- [0058] 在另一优选例中,所述多特异性T细胞衔接子为同源或异源二聚体。
- [0059] 在另一优选例中,所述三特异性T细胞衔接子为三特异性抗体。
- [0060] 在另一优选例中,所述三特异性抗体的结构对称或不对称。
- [0061] 在另一优选例中,所述三特异性抗体为二价、三价、四价或多价分子。
- [0062] 在另一优选例中,所述三特异性抗体为结构不对称的三价三特异性抗体。
- [0063] 在另一优选例中,所述CD3抗原结合结构域包含第二重链可变区和第二轻链可变区,其中,所述第二重链可变区包含如下三个重链可变区CDR:
- [0064] H-CDR1,其具有如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;
- [0065] H-CDR2,其具有如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列;和
- [0066] H-CDR3,其具有如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列;以及
- [0067] 所述第二轻链可变区包含如下三个轻链可变区CDR:
- [0068] L-CDR1,其具有如SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列;
- [0069] L-CDR2,其具有如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列;和
- [0070] L-CDR3,其具有如SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列;或
- [0071] 所述第二重链可变区包含如下三个重链可变区CDR:
- [0072] H-CDR1,其具有如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;
- [0073] H-CDR2,其具有如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列;和
- [0074] H-CDR3,其具有如SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列;以及
- [0075] 所述第二轻链可变区包含如下三个轻链可变区CDR:
- [0076] L-CDR1,其具有如SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列;
- [0077] L-CDR2,其具有如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列;和
- [0078] L-CDR3,其具有如SEQ ID NO:52所示的氨基酸序列。
- [0079] 在另一优选例中,所述CD3抗原结合结构域包含与如SEQ ID NO:15或23所示的氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的第二重链可变区,和与如SEQ ID NO:16或24所示的氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、96%、97%、

98%或99%的序列同一性的第二轻链可变区。

[0080] 在另一优选例中,所述CD3抗原结合结构域包含与如SEQ ID NO:15所示的第二重链可变区,和与如SEQ ID NO:16所示的第二轻链可变区;或如SEQ ID NO:23所示的第二重链可变区,和与如SEQ ID NO:24所示的第二轻链可变区。

[0081] 在另一优选例中,所述CD28抗原结合结构域包含第一重链可变区和第一轻链可变区,其中所述第一重链可变区述包含如下三个重链可变区CDR:

[0082] H-CDR1,其具有如SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列;

[0083] H-CDR2,其具有如SEQ ID NO:31或53所示的氨基酸序列;和

[0084] H-CDR3,其具有如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列;以及

[0085] 所述第一轻链可变区包含如下三个轻链可变区CDR:

[0086] L-CDR1,其具有如SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列;

[0087] L-CDR2,其具有如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列;和

[0088] L-CDR3,其具有如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列。

[0089] 在另一优选例中,所述CD28抗原结合结构域包含与如SEQ ID NO:28或50所示的氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的第一重链可变区,和与如SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的第一轻链可变区。

[0090] 在另一优选例中,所述CD28抗原结合结构域包含与如SEQ ID NO:28或50所示的第一重链可变区,和与如SEQ ID NO:29所示的第一轻链可变区。

[0091] 在另一优选例中,所述三特异性抗体为同源二聚体或异源二聚体。

[0092] 在另一优选例中,所述第一靶向结构域和第二靶向结构域成异二聚体结构。

[0093] 在另一优选例中,所述第一靶向结构域包含抗CD28 Fv结构域、Fab结构域或抗CD28 scFv结构域。

[0094] 在另一优选例中,所述第二靶向结构域包含抗CD3 Fv结构域、Fab结构域或抗CD3 scFv结构域。

[0095] 在另一优选例中,所述第三靶向结构域包含抗MUC17 Fab结构域。

[0096] 在另一优选例中,所述三特异性抗体从N端到C端包含如下所示的结构:

[0097] (a) 第一链:VL₁-L1-VH₂-L2-VL₂-L3-VH₁-L4-Fc1;

[0098] (b) 第二链:VH₃-CH1-Fc2;和

[0099] (c) 第三链:VL₃-CL;

[0100] 或所述三特异性抗体从N端到C端包含如下所示的结构:

[0101] (a) 第一链:VL₁-L1-VH₁-L2-VL₂-L3-VH₂-L4-Fc1;

[0102] (b) 第二链:VH₃-CH1-Fc2;和

[0103] (c) 第三链:VL₃-CL;

[0104] 其中,

[0105] VH₁为第一重链可变区,VL₁为第一轻链可变区;

[0106] VH₂为第二重链可变区,VL₂为第二轻链可变区;

[0107] VH₃为第三重链可变区,VL₃为第三轻链可变区;

[0108] CL为轻链恒定区,CH1为CH1结构域;

- [0109] L1、L2、L3、L4各自独立地为无、键或接头；
- [0110] Fc1或Fc2各自独立地为Fc元件；
- [0111] “-”代表肽键。
- [0112] 在另一优选例中，所述接头为刚性接头或柔性接头。
- [0113] 在另一优选例中，所述L1、L2、L3、L4各自独立地为无或(GS)_n、(G3S)_n、(G4S)_n(n选自1-6)。
- [0114] 在另一优选例中，所述三特异性抗体与检查点抑制剂共同施用。
- [0115] 在另一优选例中，所述三特异性抗体与抗PD1和/或抗PDL1拮抗剂共同施用。
- [0116] 在另一优选例中，所述轻链恒定区为人Kappa轻链恒定区。
- [0117] 在另一优选例中，所述VH₁、VL₁分别为CD28抗原结合结构域包含的第一重链可变区、第一轻链可变区。
- [0118] 在另一优选例中，所述VH₂、VL₂分别为CD3抗原结合结构域包含的第二重链可变区、第二轻链可变区。
- [0119] 在另一优选例中，所述VH₃、VL₃分别为MUC17抗原结合结构域包含的第三重链可变区、第三轻链可变区。
- [0120] 在另一优选例中，所述VH1包含：氨基酸序列分别如SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3；和所述VL1包含：氨基酸序列分别如SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3；或
- [0121] 所述VH1包含：氨基酸序列分别如SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:53和SEQ ID NO:32所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3；和所述VL1包含：氨基酸序列分别如SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。
- [0122] 在另一优选例中，所述VH2包含：氨基酸序列分别如SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3；和所述VL2包含：氨基酸序列分别如SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3；或
- [0123] 所述VH2包含：氨基酸序列分别如SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:51所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3；和所述VL2包含：氨基酸序列分别如SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:52所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。
- [0124] 在另一优选例中，所述VH3包含：氨基酸序列分别如SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3；和所述VL3包含：氨基酸序列分别如SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。
- [0125] 在另一优选例中，所述三特异性抗体中，
- [0126] 所述第一链的氨基酸序列如SEQ ID NO.38或42所示。
- [0127] 在另一优选例中，所述三特异性抗体中，
- [0128] 所述第二链的氨基酸序列如SEQ ID NO.40所示；和/或
- [0129] 所述第三链的氨基酸序列如SEQ ID NO.14所示。
- [0130] 在另一优选例中，所述三特异性抗体还包括所述三特异性抗体的活性片段和/或衍生物，所述抗体的衍生物具有与本发明的三特异性抗体至少86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的序列同一性。
- [0131] 在本发明的第二方面，提供了一种多核苷酸，所述多核苷酸编码本发明的第一方

面所述的多特异性T细胞衔接子。

[0132] 在本发明的第三方面,提供了一种载体,所述载体含有本发明的第二方面所述的多核苷酸。

[0133] 在另一优选例中,所述载体包括质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒如腺病毒、逆转录病毒、或其他载体。

[0134] 在本发明的第四方面,提供一种宿主细胞,所述宿主细胞含有本发明的第三方面所述的载体或基因组中整合有本发明的第二方面所述的多核苷酸。

[0135] 在另一优选例中,所述宿主细胞为真核细胞,优选地为哺乳动物细胞。

[0136] 在本发明的第五方面,提供了一种制备如本发明的第一方面所述的多特异性T细胞衔接子的方法,包括步骤:

[0137] (i) 在合适的条件下,培养本发明的第四方面所述的宿主细胞,获得含有如本发明的第一方面所述的多特异性T细胞衔接子的混合物;

[0138] (ii) 对步骤(i)中得到的混合物进行纯化和/或分离,从而获得如本发明的第一方面所述的多特异性T细胞衔接子。

[0139] 在本发明的第六方面,提供了一种药物组合物,所述药物组合物含有:

[0140] (I) 如本发明的第一方面所述的多特异性T细胞衔接子;和

[0141] (II) 药学上可接受的载体。

[0142] 在另一优选例中,所述药物组合物还包括其他的药学活性试剂。

[0143] 在另一优选例中,所述其他的药学活性试剂包括一种或多种检查点调节剂或化疗剂。

[0144] 在另一优选例中,所述检查点调节剂包括但不限于抗PD1和/或抗PDL1拮抗剂。

[0145] 在另一优选例中,所述药物组合物为注射剂型。

[0146] 在本发明的第七方面,提供了一种免疫偶联物,所述免疫偶联物包括:

[0147] (a) 如本发明的第一方面所述的多特异性T细胞衔接子;和

[0148] (b) 选自下组的偶联部分:可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、酶、或其组合。

[0149] 在另一优选例中,所述偶联物部分选自:荧光或发光标记物、放射性标记物、MRI(磁共振成像)或CT(电子计算机X射线断层扫描技术)造影剂、或能够产生可检测产物的酶、放射性核素、生物毒素、细胞因子(如IL-2等)、抗体、抗体Fc片段、抗体scFv片段、金纳米颗粒/纳米棒、病毒颗粒、脂质体、纳米磁粒。

[0150] 在本发明的第八方面,提供了如本发明的第一方面所述多特异性T细胞衔接子、如本发明的第六方面所述的药物组合物或如本发明的第七方面所述的免疫偶联物的用途,用于制备(a)检测试剂或试剂盒;和/或(b)制备预防和/或治疗癌症/肿瘤的药物。

[0151] 在另一优选例中,所述癌症/肿瘤为MUC17相关的癌症/肿瘤。

[0152] 在另一优选例中,所述癌症/肿瘤包括实体瘤和血液肿瘤。

[0153] 在另一优选例中,所述癌症/肿瘤为实体瘤。

[0154] 在另一优选例中,所述癌症/肿瘤选自下组:胃癌、胃肠癌、结直肠癌、食管癌、胃食管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、肝癌、宫颈癌、甲状腺癌、子宫癌、前列腺癌或其组合。

[0155] 在本发明的第九方面,提供了一种试剂盒,所述试剂盒包括如本发明的第一方面

所述的多特异性T细胞衔接子、如本发明的第二方面所述的多核苷酸、如本发明的第三方面所述的载体、如本发明的第四方面所述的宿主细胞、如本发明的第六方面所述的药物组合物或如本发明的第七方面所述的免疫偶联物。

[0156] 在本发明的第十方面,提供了如本发明的第一方面所述的多特异性T细胞衔接子、如本发明的第二方面所述的多核苷酸、如本发明的第三方面所述的载体、如本发明的第四方面所述的宿主细胞、如本发明的第六方面所述的药物组合物或如本发明的第七方面所述的免疫偶联物在制备预防、治疗和/或检测癌症/肿瘤的药物中的用途。

[0157] 在本发明的第十一方面,提供了一种预防、治疗和/或检测癌症/肿瘤的方法,向有需要的受试者施用安全有效量的如本发明的第一方面所述的多特异性T细胞衔接子、其药物组合物或其免疫偶联物。

[0158] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0159] 图1显示了本发明的三特异性抗体的结构示意图。其中图1A为CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH抗体的结构示意图,图1B为CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH抗体的结构示意图。

[0160] 图2显示了ELISA测定抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体对MUC17(图2A)、CD3(图2B)和CD28(图2C)的抗原结合力。

[0161] 图3显示了流式细胞仪测定抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体结合人结肠腺癌细胞LS174T表面MUC17(图3A),以及结合人T细胞表面CD3/CD28的能力(图3B)。

[0162] 图4显示了抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体对靶细胞LS174T-Luciferase的杀伤活性,图4A和4B分别是两次独立重复实验的结果,两次实验中使用的效应细胞来自不同的人类个体。

[0163] 图5显示了抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体相对于双特异性抗体的优效性评价。其中,图5A中的突变体SP34-Hu-IgG1(A101D)不再结合CD3-Epsilon。图5B中的突变体Anti-CD28-Hu-IgG1(H35A+H96A)不再结合CD28。

[0164] 图6显示了本发明的三特异性抗体及其突变体对靶细胞的杀伤活性(图6A)和刺激T细胞分泌IFN-gamma的活性(图6B)。

[0165] 图7显示了抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体相对于CODV-IgG的优效性,其中图7A显示了对靶细胞的杀伤活性比较,图7B显示了刺激CD3阳性T细胞分泌IFN-gamma的能力比较。

[0166] 图8显示了抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体的体外安全性评估,其中显示了SP34-Hu-IgG1单抗能够强烈刺激PBMC分泌IL-2(图8A)、IFN-gamma(图8B),并能够刺激PBMC增殖(图8C)。

[0167] 图9显示了抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体的SEC纯度分析。其中,图9A和图9B分别显示了CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH、CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH的HPLC-SEC图谱。

[0168] 图10显示了抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体的CE-SDS分析。其中,图10A和图10B分别为CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH的NR-CE-SDS和R-CE-SDS图谱,图10C和图10D分别为

CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH的NR-CE-SDS和R-CE-SDS图谱。

具体实施方式

[0169] 本发明人经过广泛而深入地研究,首次意外地开发了一种抗MUC17的多特异性T细胞衔接子。本发明的多特异性T细胞衔接子优选地包含经人源化改造的MUC17、CD3和CD28靶向结构域。本发明的多特异性T细胞衔接子除了能结合CD3外还能靶向CD28,能够为T细胞提供共刺激信号,从而激发更强更有效的杀伤活性,能够有效克服实体肿瘤对T细胞衔接子的耐药性。在此基础上完成了本发明。

[0170] 术语

[0171] 除非另有定义,否则本文中使用的全部技术术语和科学术语均具有如本发明所属领域普通技术人员通常理解的含义。

[0172] 术语“约”可以是指在本领域普通技术人员确定的特定值或组成的可接受误差范围内的值或组成,其将部分地取决于如何测量或测定值或组成。

[0173] 如本文所用,术语“含有”或“包括(包含)”可以是开放式、半封闭式和封闭式的。换言之,所述术语也包括“基本上由…构成”、或“由…构成”。

[0174] MUC17

[0175] MUC17是一种分子量较大的O-糖基化黏蛋白(Mucins),与其它几种黏蛋白(MUC1、3、12、13和16)同属于SEA(Sea urchin sperm protein,Enterokinase,and Agrin)家族的跨膜黏蛋白。跨膜黏蛋白在维持粘膜屏障功能方面起着重要作用,它们可以防止病原体侵入粘膜表面,还与炎症性肠病的发展有关。通过对HPA(Human Protein Atlas,基因组学数据库)数据的分析,申请人发现MUC17的RNA主要表达于结直肠和胃相关器官(小肠、十二指肠、直肠、结肠和胃)。临床癌症研究数据表明,MUC17在多种消化道肿瘤(包括胃癌和结直肠癌)中高表达,这使MUC17成为潜在的消化道肿瘤相关靶点。

[0176] T细胞衔接子(T-cell Engagers)

[0177] 双特异性T细胞衔接子(Bispecific T-cell Engagers,BiTEs)是一种双特异型抗体,它由两类抗体的片段融合而成,分别可以结合T细胞表面的CD3分子以及肿瘤细胞表面抗原分子,从而诱导T细胞对肿瘤细胞的杀伤,此过程不受MHC限制。

[0178] 2022年2月,赛诺菲的研发团队在《Nature》发表了一篇关于靶向HER2×CD3×CD28的三特异性T细胞衔接子(Trispecific T-cell engagers,TriTEs)(采用CODV-IgG结构)的研究进展(参考文献:Seung E,Xing Z,Wu L,et al.A trispecific antibody targeting HER2 and T cells inhibits breast cancer growth via CD4 cells[J].Nature,2022,603(7900):328-334.)。该研究表明,该TriTEs能比BiTEs更加有效地刺激IL-2分泌并激活NF-κB信号通路,并具有更强烈的杀伤活性。在用原代人CD3阳性T细胞重建的免疫缺陷NSG小鼠体内,该TriTEs使CD8阳性T细胞中颗粒酶的表达增加了6.8倍,剂量低至10μg/kg时,HER2×CD3×CD28依然能够诱导肿瘤消退。该论文中靶向HER2×CD3×CD28的TriTEs已经处于临床1期开发阶段,具有治疗HER2阳性实体瘤的潜力。

[0179] 抗体

[0180] 通常,“抗体”也称为“免疫球蛋白”其可以是天然或常规的抗体,其中两条重链通过二硫键彼此连接且每条重链与轻链通过二硫键连接。存在两种类型的轻链,λ(1)和κ(k)。

存在五种主要的重链种类(或同型),其决定抗体分子的功能活性:IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。每种链包含不同的序列结构域。轻链包括两个结构域或区,可变结构域(VL)和恒定结构域(CL)。重链包括四个结构域,重链可变区(VH)和三个恒定区(CH1、CH2和CH3,统称为CH)。轻链(VL)和重链(VH)的可变区都决定对抗原的结合识别和特异性。轻链的恒定结构域(CL)和重链的恒定区(CH)赋予重要的生物性质如抗体链结合、分泌、经胎盘的移动性、补体结合和与Fc受体(FcR)的结合。Fv片段是免疫球蛋白Fab片段的N-末端部分且由一条轻链和一条重链的可变部分组成。抗体的特异性取决于抗体结合位点和抗原决定区间的结构互补。抗体结合位点由主要来自高度可变区或互补决定区(CDR)的残基组成。偶尔,来自非高度可变或框架区(FR)的残基影响整体结构域结构且进而影响结合位点。互补决定区或CDR指共同限定结合亲和力和天然免疫球蛋白结合位点天然Fv区的特异性的氨基酸序列。免疫球蛋白的轻链和重链各具有三个CDR,分另称为CDR1-L、CDR2-L、CDR3-L和CDR1-H、CDR2-H、CDR3-H。常规抗体抗原结合位点因此包括六个CDR,包含来自每个重链和轻链v区的CDR集合。

[0181] 在一个给定的抗体的轻链可变区或重链可变区氨基酸序列中,各CDR的精确氨基酸序列边界可以使用许多公知的抗体CDR指派系统的任一种或其组合确定,所述指派系统包括例如:Chothia,Kabat,AbM,Contact,国际Immuno GeneTics database (IMGT),EU编号系统等。

[0182] 应理解,本发明中的CDR的精确氨基酸序列边界可以任选地利用上述提及的不同指派系统定义。优选地,除非另有说明,否则在本发明中,当提及抗体可变区中的残基位置(包括重链可变区残基和轻链可变区残基)时,是指根据Kabat编号系统的编号位置。

[0183] 如本文所用,术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同,它形成了各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而,可变性并不均匀地分布在整个抗体可变区中。它集中于轻链和重链可变区中称为互补决定区(CDR)或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为构架区(FR)。天然重链和轻链的可变区中各自包含四个FR区,它们大致上呈 β -折叠构型,由形成连接环的三个CDR相连,在某些情况下可形成部分 β -折叠结构。每条链中的CDR通过FR区紧密地靠在一起并与另一链的CDR一起形成了抗体的抗原结合部位(参见Kabat等,NIH Publ.No.91-3242,卷I,647-669页(1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但是它们表现出不同的效应功能,例如参与抗体的依赖于抗体的细胞毒性。

[0184] 如本文所用,术语“构架区”(FR)指插入CDR间的氨基酸序列,即指在单一物种中不同的免疫球蛋白间相对保守的免疫球蛋白的轻链和重链可变区的那些部分。免疫球蛋白的轻链和重链各具有四个FR,分别称为FR1-L、FR2-L、FR3-L、FR4-L和FR1-H、FR2-H、FR3-H、FR4-H。相应地,轻链可变结构域可因此称作(FR1-L)-(CDR1-L)-(FR2-L)-(CDR2-L)-(FR3-L)-(CDR3-L)-(FR4-L)且重链可变结构域可因此表示为(FR1-H)-(CDR1-H)-(FR2-H)-(CDR2-H)-(FR3-H)-(CDR3-H)-(FR4-H)。优选地,本发明的FR是人抗体FR或其衍生物,所述人抗体FR的衍生物与天然存在的人抗体FR基本相同,即序列同一性达到85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0185] 获知CDR的氨基酸序列,本领域的技术人员可轻易确定构架区FR1-L、FR2-L、FR3-L、FR4-L和/或FR1-H、FR2-H、FR3-H、FR4-H。

[0186] 如本文所用,术语“人构架区”是与天然存在的人抗体的构架区基本相同的(约

85%或更多,具体地90%、95%、97%、99%或100%)框架区。

[0187] 如本文所用,术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明抗体相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽,而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的,或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽,或(iii)成熟多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物,例如聚乙二醇)融合所形成的多肽,或(iv)附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列,或与6His标签形成的融合蛋白)。根据本文的教导,这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

[0188] 如本文所用,术语“抗体片段”、“抗原结合片段”、“靶向结构域”或“抗原结合结构域”用于指抗体的一部分,例如F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, 单链Fvs(scFv), 单链抗体, 二硫键连接的Fvs(sdFv), 包含VL或VH结构域的片段, Fab表达文库产生的片段以及抗个体遗传型(anti-Id)抗体。不论结构如何,抗体片段都与完整抗体所识别的相同抗原结合。本发明的靶向结构域的实例包括例如但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、单链Fv(scFv)片段和单结构域片段。

[0189] “Fv”片段是含有完整靶识别和结合位点的抗体的最小片段。该区域由以紧密的非共价结合的一个重链和一个轻链可变结构域的二聚体(VH-VL二聚体)组成。在该构型中,每个可变结构域的三个CDR相互作用,以限定在VH-VL二聚体的表面上的靶结合位点。通常,六个CDR对抗体赋予靶结合特异性。然而,在一些情况下,甚至单个可变结构域(或仅包含对于靶特异性的三个CDR的Fv的一半)可以具有识别且结合靶的能力,尽管其亲和力低于整个结合位点。

[0190] “单链Fv”或“scFv”抗体结合片段包含抗体的VH和VL结构域,其中这些结构域存在于单条多肽链中。一般地,Fv多肽进一步包含在VH和VL结构域之间的多肽接头,其致使scFv能够形成有利于靶结合的结构。

[0191] “单结构域片段”由对冠状病毒RBD显示出足够亲和力的单个VH或VL结构域组成。在一个具体实施方案中,单结构域片段是骆驼化的。

[0192] 如本文所用,术语“轻链恒定区(CL)”包括衍生自抗体轻链的氨基酸序列CL。优选地,轻链恒定区包括恒定κ结构域或恒定λ结构域中的至少一个。

[0193] 如本文所用,术语“重链恒定区(CH)”包括源自免疫球蛋白重链的氨基酸序列。包含重链恒定区的多肽包含以下至少之一:CH1结构域,铰链区(例如,上部,中间和/或下部铰链区)结构域,CH2结构域,CH3结构域或其变体或片段。应当理解,可以修饰重链恒定区,使得它们的氨基酸序列与天然存在的免疫球蛋白分子不同。

[0194] 如本文所用,术语“抗原”或“靶抗原”指能够由抗体或抗体样结合蛋白所结合分子或分子的部分。该术语进一步指能够用于动物以产生能够与该抗原的表位结合的抗体的分子或分子的部分。靶抗原可具有一个或多个表位。对于每种由抗体或由抗体样结合蛋白识别的靶抗原,抗体样结合蛋白能够与识别靶抗原的完整抗体竞争。

[0195] 如本文所用,术语“接头”是指插入免疫球蛋白结构域中为轻链和重链的结构域提供足够的可动性以折叠成交换双重可变区免疫球蛋白的一个或多个氨基酸残基。合适的接头实例包括单甘氨酸(Gly)、或丝氨酸(Ser)残基,接头中氨基酸残基的标识和序列可随着

接头中需要实现的次级结构要素的类型而变化。优选的接头可以为(GS)_n、(G3S)_n、(G4S)_n (n选自1-6)。

[0196] 如本文所用,抗体、抗体片段或抗体结构域的“变体”是指如下,抗体、抗体片段或抗体结构域:(1)与原始抗体、抗体片段或抗体结构域具有至少80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%的序列同一性,和(2)特异性结合至与原始抗体,抗体片段或抗体结构域特异性结合的共同靶标。应当理解,在以“至少x%相同”或“至少x%同一性”的形式表示序列同一性的情况下,这样的实施方案包括等于或高于下限的任何和所有数值百分比。此外,应当理解,在本申请中存在氨基酸序列的情况下,应将其解释为另外公开或包含与该氨基酸序列具有至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%或至少99%的同一性。

[0197] 本发明的T细胞衔接子

[0198] 如本文所用,术语“多特异性T细胞衔接子”是指包含至少两个具有不同结合特异性的靶向结构域分子,其中至少一个靶向结构域特异性结合T细胞表面抗原。在一些实施方式中,多特异性抑制剂是包含支架和靶向不同抗原或表位的两个或更多个免疫球蛋白抗原结合结构域的多肽。在某些实施方式中,多特异性T细胞衔接子是双特异性抗体或三特异性抗体。

[0199] 如本文所用,术语“双特异性抗体”和“双特异性T细胞衔接子”在本文中可互换使用,涉及可以特异性结合两种不同抗原(或表位)的抗体。

[0200] 如本文所用,术语“本发明的三特异性抗体”、“本发明的三特异性T细胞衔接子”、“3Sbody”在本文中可互换使用,涉及包含具有三个不同结合特异性的三个靶向结构域分子。每个靶向结构域都能够与靶分子特异性结合,并在与靶分子结合时抑制靶分子的生物学功能。在一些实施方式中,三特异性拮抗剂是具有两个或更多个肽的聚合物分子。在一些实施方案中,靶向结构域包含抗体的抗原结合结构域或CDR。在一些实施方式中,靶向结构域包含与靶蛋白特异性结合的配体或其片段。

[0201] 应理解,本发明的三特异性T细胞衔接子本质上是三特异性抗体,是能同时特异性结合三种抗原的抗体分子。根据对称性,三特异性抗体可以分为结构对称的和不对称的分子。根据结合位点的多少,双特异性抗体可以分为二价、三价、四价和多价分子。本发明的两种三特异性抗体为结构不对称的三价三特异性抗体,针对每个特定靶点,该三特异性抗体都是单价的。

[0202] 如本文所用,术语“Fc片段”或“Fc”是指抗体的不具有抗原结合活性但是最初被观察到容易结晶的部分,并因此将其命名为Fc片段(针对片段可结晶性)。这种片段对应于成对的CH2和CH3结构域,并且是抗体分子的与效应分子和细胞相互作用的部分。本文所述的Fc片段可以衍生自IgG1、IgG2和IgG4抗体。对于特定用途,可以优选特定的IgG亚类。此外,可以通过将一个或多个突变引入Fc来增加或减少抗体的效应子功能。较佳地,Fc段可以含有L234A/L235A/G237A突变以削弱Fc与Fc γ 受体之间的相互作用。

[0203] 进一步地,可以引入突变以形成杵臼结构(Knob-Into-Hole,KIH)。其主要功能是促使双特异性抗体的两条不同重链异二聚化。其结构特点为:组成双特异性抗体的两条不同重链,其中一条重链的CH3区发生突变形成一个突起的“杵”的结构,另一条重链的CH3区发生突变形成一个凹陷的“臼”的结构,杵臼结构设计有利于两种异源抗体重链的正确装

配。具体地,将第一条重链CH3结构域的366位的T突变成侧链体积更大的W,形成一个突起的“杵”的结构;同时将第二条重链CH3结构域的366位的T突变成S、368位的L突变成A、407位的Y突变成V,这三种突变均使得侧链体积更小,从而形成一个凹陷的“臼”的结构。进一步地,将第一条重链354位的S突变成C,将第二条重链349位的Y突变成C,如此可使第一重链和第二条重链在形成杵臼结构后再增加一个共价的二硫键,这能够进一步地稳定形成的杵臼结构。

[0204] 具体地,对于杵-臼形式,除了可以在第一个Fc中引入T366W突变产生“杵”,在第二个Fc引入T366S、L368A和Y407V突变产生“臼”外。对于电荷对形式,通过在相反的Fc结构域中引入连接电荷残基来稳定离子相互作用,从而有利于异二聚化。例如,第一Fc结构域中的D356K、E357K和D399K,以及第二Fc结构域中的K370E、K409D和K439E突变,或其组合(根据Kabat EU编号系统对残基进行编号)。此外,半胱氨酸可被引入以稳定异二聚体的配对,例如第一Fc中的S234C和第二Fc中的Y349C,或者第一Fc中的Y349C和第二Fc中的S344C。将“臼”链435位的H突变成R、436位的Y突变成F,这样可以消除“臼”链对Protein A的结合作用,以便在纯化步骤将“臼”链的同源二聚体去除。

[0205] 本发明的多特异性分子可以包括选自下组的各种结构:不对称IgG样抗体(例如,三功能单克隆抗体/四价体瘤(triomab/quadroma));钮孔式抗体(knobs-into-holes antibodies);交叉单克隆抗体(Cross MAbs);静电匹配抗体;LUZ-Y;链交换工程化结构域(SEED)体;Fab交换抗体;对称IgG类抗体;二合一抗体;交联的单克隆抗体,mAb2;Cov X-body;双可变区结构域(DVD)-Ig融合蛋白;IgG样双特异性抗体;Ts2Ab;BsAb;scFv/Fc融合;双(scFv)2-Fabs;F(ab)2融合蛋白;双作用或Bis-Fab;Dock-and-Lock(DNL);Fab-Fv;scFv抗体和双抗体(例如双特异性T细胞衔接子(BiTEs));串联双抗体(Tandab);DARTs;单链双抗体;TCR样抗体;人类血清白蛋白scFv融合蛋白,COMBODIES和IgG/non-IgG融合蛋白。

[0206] 编码核酸和表达载体

[0207] 本发明还提供了编码上述抗体或其片段的多核苷酸分子。本发明的多核苷酸可以是DNA形式或RNA形式。DNA形式包括cDNA、基因组DNA或人工合成的DNA。DNA可以是单链的或是双链的。DNA可以是编码链或非编码链。编码成熟多肽的编码区序列可以与本发明抗体的编码区序列相同或者是简并的变体。如本文所用,“简并的变体”在本发明中是指编码具有与本发明的多肽相同的氨基酸序列,但其编码区序列有差别的核酸序列。

[0208] 编码本发明的成熟多肽的多核苷酸包括:只编码成熟多肽的编码序列;成熟多肽的编码序列和各种附加编码序列;成熟多肽的编码序列(和任选的附加编码序列)以及非编码序列。

[0209] 术语“编码多肽的多核苷酸”可以是包括编码此多肽的多核苷酸,也可以是还包括附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。

[0210] 本发明还涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少50%,更佳地至少70%,更佳地至少80%相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件下与本发明所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。在本发明中,“严格条件”是指:(1)在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱,如 $0.2 \times \text{SSC}$,0.1% SDS,60°C;或(2)杂交时加有变性剂,如50%(v/v)甲酰胺,0.1%小牛血清/0.1% Ficoll,42°C等;或(3)仅在两条序列之间的相同性至少在90%以上,更好是95%以上时才发生杂交。并且,可杂交的多核苷酸编码的多肽与SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.9所示的成熟多肽有相同的生物学功能和活性。

[0211] 本发明的抗体的核苷酸全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。一种可行的方法是用人工合成的方法来合成有关序列,尤其是片段长度较短时。通常,通过先合成多个小片段,然后再进行连接可获得序列很长的片段。此外,还可将重链的编码序列和表达标签(如6His)融合在一起,形成融合蛋白。

[0212] 一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。本发明所涉及的生物分子(核酸、蛋白等)包括以分离的形式存在的生物分子。

[0213] 目前,已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(或其片段,或其衍生物)的DNA序列。然后可将该DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(或如载体)和细胞中。此外,还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

[0214] 本发明还涉及包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞,以使其能够表达蛋白质。

[0215] 宿主细胞可以是原核细胞,如细菌细胞;或是低等真核细胞,如酵母细胞;或是高等真核细胞,如哺乳动物细胞。代表性例子有:大肠杆菌,链霉菌属;鼠伤寒沙门氏菌的细菌细胞;真菌细胞如酵母;果蝇S2或Sf9的昆虫细胞;CHO、COS7、293细胞的动物细胞等。

[0216] 用重组DNA转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时,能吸收DNA的感受态细胞可在指数生长期后收获,用CaCl₂法处理,所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用MgCl₂。如果需要,转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物,可选用如下的DNA转染方法:磷酸钙共沉淀法,常规机械方法如显微注射、电穿孔,脂质体包装等。

[0217] 获得的转化子可以用常规方法培养,表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞,培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后,用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子,将细胞再培养一段时间。

[0218] 在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要,可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于:常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

[0219] 本发明的抗体可以单独使用,也可与可检测标记物(为诊断目的)、治疗剂、PK(蛋白激酶)修饰部分或任何以上这些物质的组合结合或偶联。

[0220] 用于诊断目的的可检测标记物包括但不限于:荧光或发光标记物、放射性标记物、MRI(磁共振成像)或CT(电子计算机X射线断层扫描技术)造影剂、或能够产生可检测产物的酶。

[0221] 可偶联的治疗剂包括但不限于:胰岛素、IL-2、干扰素、降钙素、GHRH肽、肠肽类似物、白蛋白、抗体片段、细胞因子、和激素。

[0222] 组合物

[0223] 本发明还提供了一种组合物。在优选例中,所述的组合物是药物组合物,它含有上述的抗体或其活性片段或其融合蛋白,以及药学上可接受的载体。通常,可将这些物质配制

于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中,其中pH通常约为5-8,较佳地pH约为6-8,尽管pH值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药,其中包括(但并不限于):口服、呼吸道、瘤内、腹膜内、静脉内、或局部给药。

[0224] 本发明的药物组合物可用于治疗癌症/肿瘤,尤其是实体瘤,特别是MUC17高表达的实体瘤。

[0225] 本发明的药物组合物含有安全有效量(如0.001-99wt%,较佳地0.01-90wt%,更佳地0.1-80wt%)的本发明上述的单克隆抗体(或其偶联物)以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于):盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式,例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量,例如每天约1微克/千克体重-约10毫克/千克体重。此外,本发明的药物组合物还可与其他治疗剂一起使用。

[0226] 使用药物组合物时,是将安全有效量的免疫偶联物施用于哺乳动物,其中该安全有效量通常至少约10微克/千克体重,而且在大多数情况下不超过约8毫克/千克体重,较佳地该剂量是约10微克/千克体重-约1毫克/千克体重。当然,具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素,这些都是熟练医师技能范围内的。

[0227] 应用

[0228] 本发明涉及预防、治疗和/或检测癌症/肿瘤或自身免疫性疾病的方法。该方法包括向有需要的受试者施用有效量的本发明的多特异性T细胞衔接子或三特异性抗体。另一方面,预防、治疗和/或检测癌症/肿瘤的方法包括向有需要的受试者施用有效量的一种或多种表达本发明的三特异性抗体的表达载体。在另一优选例中,所述癌症/肿瘤为MUC17相关的癌症/肿瘤,特征在于表达MUC17的细胞的数量/比例/活性增加的疾病/病症,与在没有疾病/病症的情况下表达MUC17的细胞的数量/比例/活性相比。所述癌症/肿瘤包括实体瘤和血液肿瘤。优选地选自下组:胃癌、胃肠癌、结直肠癌、食管癌、胃食管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、肝癌、宫颈癌、甲状腺癌、子宫癌、前列腺癌或其组合。

[0229] 本发明的主要优点包括

[0230] (1) 本发明的三特异性抗体能够同时靶向肿瘤特异性抗原MUC17、T细胞表达的CD3和共刺激分子CD28,对靶细胞能激发更强更有效的杀伤活性;并具有良好的体外安全性。

[0231] (2) 本发明的三特异性抗体具有高纯度和良好的理化性质,避免抗体分子在生产 and 存储抗体的过程中容易出现的聚集体、降解片段和不完整组装等问题,有利于工业化生产。

[0232] 下面结合具体实施例,进一步陈述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明详细条件的实验方法,通常按照常规条件如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。

[0233] 实施例1.抗MUC17单克隆抗体的来源和序列

[0234] 根据CN202111500224.5中所述,抗MUC17鼠源单克隆抗体44H4的重链可变区氨基

酸序列如下所示(SEQ ID NO:1):

[0235] EVQLQQSGAELVKPGASVKLSFTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGYTKYGPRFQ GKAT
ITADTASNAAYLQLSSLTSEDTAVYYCARNYGTSPNAMDYWGQGTSTVTVSS

[0236] 抗MUC17鼠源单克隆抗体44H4的轻链可变区氨基酸序列如下(SEQ ID NO:2):

[0237] DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVETYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASSLESIGIPARFSGS
GSRTDFTLTITPVEADVATYFCQQSNEDPYTFGGGTKLEIK

[0238] 对鼠源单抗44H4的重链可变区和轻链可变区氨基酸序列进行分析,依据Kabat编码规则分别确定其重链和轻链可变区的互补决定区(complementarity determining region,CDR)和框架区。44H4重链可变区CDR氨基酸序列分别为

[0239] H-CDR1:DTYIH(SEQ ID NO:3)、H-CDR2:RIDPANGYTKYGPRFQG(SEQ ID NO:4)和H-CDR3:NYGTSPNAMDY(SEQ ID NO:5),

[0240] 轻链可变区CDR的氨基酸序列分别为L-CDR1:RASESVETYGNSFMH(SEQ ID NO:6)、L-CDR2:RASSLES(SEQ ID NO:7)和L-CDR3:QQSNEDPYT(SEQ ID NO:8)。

[0241] 鼠源44H4的人源化过程描述如下。将鼠源单抗44H4的重链可变区与人抗体重链可变区胚系序列进行同源性比较,选择IGHV1-46*01为人源化的模板,将鼠源44H4的3个重链CDR移植入IGHV1-46*01,分别替换IGHV1-46*01对应位置的CDR,并在H-CDR3之后加入WGQGLTVTVSS作为第四个框架区,获得CDR移植重链可变区氨基酸序列。同样地,将鼠源44H4的轻链可变区与人抗体轻链可变区胚系序列进行同源性比较,选择IGKV7-3*01为人源化的模板,将鼠源44H4的3个轻链CDR移植入IGKV7-3*01的骨架区,分别替换IGKV7-3*01对应位置的CDR,并在L-CDR3之后加入FGQGTKVEIK作为第四个框架区,获得CDR移植轻链可变区氨基酸序列。在CDR移植可变区的基础上,对框架区的一些位点进行回复突变(回复突变就是将人源框架区的某些氨基酸残基突变成鼠源框架区同一位置的氨基酸残基,回复突变的位点一般对维持抗体的结构和/或亲和力是至关重要的)。在进行回复突变时,将氨基酸序列进行Kabat编码,位点的位置由Kabat码指示。

[0242] 优选的,对于CDR移植后的重链可变区,将第27位的Y回复突变为鼠源的F,将第28位的T突变为N,将第29位的F突变为I,将第30位的T突变为K,将第69位的M突变为I,第71位的R突变为A。对于CDR移植后的轻链可变区,将第81位的N突变为D,以消除轻链的N糖基化位点。上述带有突变的重链和轻链可变区分别定义为44H4人源化重链可变区(SEQ ID NO:9)和轻链可变区(SEQ ID NO:10)。

[0243] 由上海生工生物工程有限公司合成编码上述人源化重链和轻链可变区的DNA。用基因工程的方法将合成的人源化重链可变区与人IgG1重链恒定区(SEQ ID NO:11)相连,获得全长的人源化重链,命名为44H4-Hu-HC(SEQ ID NO:12);将人源化轻链可变区与人Kappa轻链恒定区(SEQ ID NO:13)相连,获得全长的人源化轻链,命名为44H4-Hu-LC(SEQ ID NO:14)。

[0244] 将44H4-Hu-HC和44H4-Hu-LC的编码基因分别克隆到pcDNA3.4表达载体中,利用PEI将重链和轻链的表达载体共同转染到HEK293F细胞中以表达抗体。5天后收取FreeStyle™293-F细胞培养上清液,利用Protein A亲和层析法纯化抗体,所得抗体命名为44H4-Hu-IgG1。

[0245] 实施例2.抗CD3单克隆抗体的来源和序列

[0246] 鼠源抗人CD3单克隆抗体(简称SP34)的重链和轻链可变区氨基酸序列分别来自于US8236308B2中的SEQ ID NO:2和4,分别对应本发明中的序列SEQ ID NO:15和16。

[0247] SP34重链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO:15):

[0248] EVKLLSEGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDSQSILYLQMNLIKTEDTAMYCVRHGNGNSYVSWFAYWGQGLVTVSA

[0249] SP34轻链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO:16):

[0250] QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLI
GDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

[0251] 对SP34的重链和轻链可变区氨基酸序列进行分析,依据Kabat规则分别确定SP34重链和轻链的互补决定区(CDR)和框架区。

[0252] SP34重链3个CDR的氨基酸序列分别为H-CDR1:TYAMN(SEQ ID NO:17)、H-CDR2:
RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:18)和H-CDR3:HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:19),

[0253] 轻链3个CDR的氨基酸序列分别为L-CDR1:RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:20)、L-
CDR2:GTNKRAP(SEQ ID NO:21)和L-CDR3:ALWYSNLWV(SEQ ID NO:22)。

[0254] 鼠源SP34的人源化过程描述如下。将鼠源单抗SP34的重链可变区与人抗体重链可变区胚系序列进行同源性比较,选择IGHV3-23*04为人源化的模板,将鼠源SP34的3个重链CDR移植入IGHV3-23*04,分别替换IGHV3-23*04对应位置的CDR,并在H-CDR3之后加入第四个框架区,获得CDR移植重链可变区氨基酸序列。同样地,将SP34的轻链可变区与人抗体重链可变区胚系序列进行同源性比较,选择IGLV7-46*01为轻链CDR移植模板,将鼠源SP34的3个轻链CDR移植入IGLV7-46*01,分别替换IGLV7-46*01对应位置的CDR,并在L-CDR3之后加入第四个框架区,获得CDR移植轻链可变区氨基酸序列。在CDR移植可变区的基础上,对框架区的一些位点进行回复突变。在进行回复突变时,将氨基酸序列进行Kabat编码,位点的位置由Kabat码指示。

[0255] 优选的,对于CDR移植重链可变区,将第73位的N回复突变为D,将第94位的K突变为R。对于CDR移植轻链可变区,将第36位的F突变为V,第46位的T突变为G,第49位的Y突变为G,第57位的W突变为G,第58位的T突变为V。此外,将CDR移植重链可变区第2位的A突变为T,第96位的G(位于H-CDR3)突变为D。此外,对于CDR移植轻链可变区,将第24位的R突变为G,第33位的A突变为P,第94位的N(位于L-CDR3)突变为D。上述改造可以进一步提高SP34人源化抗体的亲和力和稳定性等性能。上述带有突变的重链和轻链可变区分别定义为SP34人源化重链可变区(SEQ ID NO:23)和轻链可变区(SEQ ID NO:24)。

[0256] 由上海生工生物工程有限公司合成编码上述人源化重链和轻链可变区的DNA。用基因工程的方法将合成的人源化重链可变区与人IgG1重链恒定区(SEQ ID NO:11)相连,获得全长的人源化重链,命名为SP34-Hu-HC(SEQ ID NO:25);将人源化轻链可变区与人Lambda轻链恒定区(SEQ ID NO:26)相连,获得全长的人源化轻链,命名为SP34-Hu-LC(SEQ ID NO:27)。

[0257] 将SP34-Hu-HC和SP34-Hu-LC的编码基因分别克隆到pcDNA3.4表达载体中,利用PEI将所得重链和轻链的表达载体共同转染到FreeStyle™293-F细胞中以表达抗体,5天后收取FreeStyle™293-F细胞培养上清液,利用Protein A亲和层析法从上清液中纯化抗体,所得抗体命名为SP34-Hu-IgG1。

[0258] 实施例3. 抗CD28单克隆抗体的来源和序列

[0259] 抗人CD28单克隆抗体(简称Anti-CD28)的重链和轻链可变区氨基酸序列分别来自于US20060286104A1中的SEQ ID NO:46和48,分别对应本发明中的序列SEQ ID NO:28和29。

[0260] Anti-CD28重链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO:28):

[0261] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTISISTAYMELSRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTITVTVSS

[0262] Anti-CD28轻链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO:29):

[0263] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKPKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGQTYPTFGGGTKVEIK

[0264] 对Anti-CD28的重链和轻链可变区氨基酸序列进行分析,依据Kabat规则分别确定Anti-CD28重链和轻链的互补决定区(CDR)和框架区。Anti-CD28重链3个CDR的氨基酸序列分别为H-CDR1:SYIHW (SEQ ID NO:30)、H-CDR2:CIYPGNVNTNYNEKFKD (SEQ ID NO:31)和H-CDR3:SHYGLDWNFDV (SEQ ID NO:32),

[0265] 轻链3个CDR的氨基酸序列分别为L-CDR1:HASQNIYVWLN (SEQ ID NO:33)、L-CDR2:KASNLHT (SEQ ID NO:34)和L-CDR3:QQGQTYPT (SEQ ID NO:35)。

[0266] 为进一步提高Anti-CD28单克隆抗体的人源化程度,改造其重链可变区氨基酸序列,过程描述如下。将Anti-CD28重链可变区氨基酸序列与人抗体重链可变区胚系序列进行同源性比较,选择IGHV1-46*01为参照模板。在此将Anti-CD28重链可变区框架区的某些氨基酸残基突变成IGHV1-46*01框架区同一位置的氨基酸残基。在进行突变时,将氨基酸序列进行Kabat编码,位点的位置由Kabat码指示。

[0267] 优选的,对于Anti-CD28重链可变区氨基酸序列,将其第48位的I突变为M,将第67位的A突变为V,将第91位的F突变为Y。此外,将Anti-CD28重链可变区H-CDR2的第一个氨基酸残基C突变成S,以避免生产过程中抗体分子之间形成共价的二硫键。

[0268] 改造后的Anti-CD28重链可变区氨基酸序列如下:

[0269] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPGNVNTNYNEKFKDRVTLTVDTISISTAYMELSRSDDTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO.50)

[0270] 由上海生工生物工程有限公司合成编码上述改造后的Anti-CD28重链可变区和未改造的Anti-CD28轻链可变区的DNA。用基因工程的方法将合成的人源化重链可变区与人IgG1重链恒定区 (SEQ ID NO:11) 相连,获得全长的人源化重链,命名为Anti-CD28-Hu-HC (SEQ ID NO:36);将Anti-CD28轻链可变区与人Kappa轻链恒定区 (SEQ ID NO:13) 相连,获得全长的人源化轻链,命名为Anti-CD28-Hu-LC (SEQ ID NO:37)。

[0271] 将Anti-CD28-Hu-HC和Anti-CD28-Hu-LC的编码基因分别克隆到pcDNA3.4表达载体中,利用PEI将所得重链和轻链表达载体共同转染到FreeStyle™293-F细胞中以表达抗体,5天后收取FreeStyle™293-F细胞培养上清液,利用Protein A亲和层析法从上清液中纯化抗体,所得抗体命名为Anti-CD28-Hu-IgG1。

[0272] 实施例4. 抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体的构建和制备

[0273] 第一种结构含有三条序列不同的多肽链,分别由三条基因编码,它们的设计和构建方式描述如下。

[0274] 第一条多肽链或基因的构建方法描述如下:

[0275] 用基因工程的方法, Anti-CD28-Hu-IgG1的轻链可变区(含Q100C突变)通过短人工连接子(在此使用的连接子是GGGS)连接SP34-Hu-IgG1的重链可变区, 末端再通过长人工连接子(在此使用的连接子是四个串联的GGGS)连接SP34-Hu-IgG1的轻链可变区, 末端再通过短人工连接子(在此使用的连接子是GGGS)连接Anti-CD28-Hu-IgG1的重链可变区(含G44C突变), 末端再通过长人工连接子(在此使用的连接子是三个串联的GGGS)连接人IgG1的铰链区和Fc段(Fc段表示人IgG1重链恒定区的CH2和CH3结构域)。

[0276] 此处, Fc段含有L234A/L235A/G237A突变以削弱Fc与Fc γ 受体之间的相互作用(参考文献:Liu R, Oldham R J, Teal E, et al. Fc-engineering for modulated effector functions—improving antibodies for cancer treatment[J]. *Antibodies*, 2020, 9(4): 64.), 还含有S354C/T366W突变以与后述的另一条重链多肽形成Knob-Into-Hole(KIH)结构的异源二聚体(参考文献:Ha J H, Kim J E, Kim Y S. Immunoglobulin Fc heterodimer platform technology: from design to applications in therapeutic antibodies and proteins[J]. *Frontiers in Immunology*, 2016, 7:394.)。

[0277] 第一条多肽链或基因命名为CD28-44-SP34-Dia-IgG1-Knob-HC(氨基酸序列SEQ ID NO:38, 核苷酸序列SEQ ID NO:39)。

[0278] 第二条多肽链或基因的构建方法描述如下:

[0279] 44H4-Hu-IgG1的重链可变区与含有多个突变的人IgG1重链恒定区(包括CH1、CH2和CH3结构域)相连。此处, Fc段含有L234A/L235A/G237A突变以削弱Fc与Fc γ 受体之间的相互作用, 还含有Y349C/T366S/L368A/Y407V突变以与前述的另一条重链多肽形成Knob-Into-Hole(KIH)结构的异源二聚体。第二条多肽链或基因命名为44H4-IgG1-Hole-HC(氨基酸序列SEQ ID NO:40, 核苷酸序列SEQ ID NO:41)。

[0280] 第三条多肽链或基因即44H4-Hu-IgG1的轻链, 不做任何改动和修饰。

[0281] 将CD28-44-SP34-Dia-IgG1-Knob-HC、44H4-IgG1-Hole-HC和44H4-Hu-LC的编码基因分别克隆到pcDNA3.4表达载体中, 利用PEI将所得表达载体共同转染到FreeStyle™293-F细胞中以表达抗体, 5天后收取FreeStyle™293-F细胞培养上清液, 利用Protein A亲和和层析法从上清液中纯化抗体, 所得抗体命名为CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH。

[0282] 该三特异性抗体的结构示意图如图1A所示, 图中VL1和VH1分别为抗CD28抗体的轻链和重链可变区, VH2和VL2分别为抗CD3抗体的重链和轻链可变区, VH3和VL3分别为抗MUC17抗体的重链和轻链可变区。直线箭头和曲线箭头表示人工设计的衔接子和其方向, 双向直线箭头表示人工设计的二硫键的位置。图1A中的VL1、VH2、VL2和VH1通过长度不同的衔接子依次相连, 最终折叠并组合成Diabody的结构(Diabody的结构可参考文献Wu C. Diabodies: molecular engineering and therapeutic applications[J]. *Drug News Perspect*, 2009, 22(8):453.)。

[0283] 第二种结构含有三条序列不同的多肽链, 分别由三条基因编码, 它们的设计和构建方式描述如下。

[0284] 第一条多肽链或基因的构建方法描述如下:

[0285] 用基因工程的方法, Anti-CD28-Hu-IgG1的轻链可变区(含Q100C突变)通过长人工连接子(在此使用的连接子是四个串联的GGGS)连接Anti-CD28-Hu-IgG1的重链可变区(含G44C突变), 末端再通过短人工连接子(在此使用的连接子是两个串联的GGGS)连接SP34-

Hu-IgG1的轻链可变区,末端再通过长人工连接子(在此使用的连接子是四个串联的GGGGS)连接SP34-Hu-IgG1的重链可变区,末端再通过短人工连接子(在此使用的连接子是两个串联的GGGS)连接人IgG1的铰链区和Fc段(Fc段表示人IgG1重链恒定区的CH2和CH3结构域)。此处,Fc段含有L234A/L235A/G237A突变以削弱Fc与Fc γ 受体之间的相互作用,还含有S354C/T366W突变以与后述的另一条重链多肽形成Knob-Into-Hole(KIH)结构的异源二聚体。第一条多肽链或基因命名为CD28-44-SP34-2ScFv-IgG1-Knob-HC(氨基酸序列SEQ ID NO:42,核苷酸序列SEQ IDNO:43)。

[0286] 第二条多肽链或基因为44H4-IgG1-Hole-HC。

[0287] 第三条多肽链或基因为44H4-Hu-LC。

[0288] 将CD28-44-SP34-2ScFv-IgG1-Knob-HC、44H4-IgG1-Hole-HC和44H4-Hu-LC的编码基因分别克隆到pcDNA3.4表达载体中,利用PEI将所得表达载体共同转染到FreeStyle™293-F细胞中以表达抗体,5天后收取FreeStyle™293-F细胞培养上清液,利用Protein A亲和层析法从上清液中纯化抗体,所得抗体命名为CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH。

[0289] 该三特异性抗体的结构示意图如图1B所示,图中VL1和VH1分别为抗CD28抗体的轻链和重链可变区,VL2和VH2分别为抗CD3抗体的轻链和重链可变区,VH3和VL3分别为抗MUC17抗体的重链和轻链可变区。曲线箭头表示人工设计的衔接子和其方向,双向直线箭头表示人工设计的二硫键的位置。

[0290] 图1B中的VL1、VH1、VL2和VH2通过长度不同的衔接子依次相连,最终折叠并组合成2个串联的ScFv的结构(ScFv的结构可参考文献Ahmad Z A,Yeap S K,Ali A M,et al.scFv antibody:principles and clinical application[J].Clinical and developmental immunology,2012,2012:980250.)。

[0291] 本实施例中,在人IgG1重链恒定区Fc段进行突变,分别构建成带有“杵”结构的重链恒定区和带有“臼”结构的重链恒定区。将“臼”链435位的H突变成R、436位的Y突变成F,这样可以消除“臼”链对Protein A的结合作用,可以在纯化步骤将“臼”链的同源二聚体去除(参见文献:Smith E,Olson K,Haber L,et al.A novel,native-format bispecific antibody triggering T-cell killing of B-cells is robustly active in mouse tumor models and cynomolgus monkeys[J].Scientific Reports,2016,5(1):17943-17943.)。将上述“杵”重链恒定区和改进后的“臼”重链恒定区Fc段分别命名为IgG1-Knob-HC(SEQ ID NO:44)和IgG1-Hole-HC(SEQ ID NO:45)。

[0292] 实施例5.抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体结合抗原的能力

[0293] 表达并纯化相关重组蛋白的方法说明如下:人类MUC17氨基酸序列来自Uniprot(Entry:Q685J3),选取其中的第4131到4390位氨基酸序列,并在其N端引入信号肽,在其C端引入一个衔接子(GGGGS)和6个组氨酸残基,通过基因合成获得前述重组氨基酸序列的编码基因,将该重组蛋白的编码基因克隆到pcDNA3.4(购自Thermo Fisher Scientific)表达载体中,利用PEI将表达载体转入FreeStyle™293-F细胞(购自Thermo Fisher Scientific)中以表达重组蛋白,适当时间后收集细胞培养上清液并过滤,然后用镍亲和层析法从上清液中纯化相应重组蛋白,所得重组蛋白命名为MUC17-His(SEQ ID:46)。人类CD28氨基酸序列来自Uniprot(Entry:P10747),选取其中的第19到152位氨基酸序列,并在其N端引入信号

肽,在其C端引入一个衔接子(GGGGS)和6个组氨酸残基,通过基因合成获得前述重组氨基酸序列的编码基因,通过上述相似的方法表达并纯化该重组蛋白,所得重组蛋白命名为CD28-His(SEQ ID:47)。

[0294] 此实施例中使用ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 测定抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体对MUC17、CD3和CD28的结合力,该方法说明如下:

[0295] 用重组蛋白MUC17-His、CD3-Epsilon (购自ACROBiosystems,货号:CDE-H5223) 和CD28-His分别包被微孔板(96孔),各种重组蛋白的包被量为10ng/孔,用含有1%牛血清白蛋白的PBST (PBST表示含0.05% Tween-20的磷酸盐缓冲液) 封闭微孔板。将待测抗体进行梯度稀释,然后转移到上述包被重组蛋白的微孔板中,室温孵育半小时后洗板;加入适当稀释的HRP (Horseradish Peroxidase) 标记的羊抗人抗体 (Fc specific,购自Sigma,货号:SAB3701283),室温孵育半小时后洗板;每孔加入100 μ L以TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) 为底物的显色液,室温孵育1~5min;加50 μ L终止液(2M H₂SO₄) 终止反应;Microplate Reader (型号SpectraMax 190) 读取OD450,用GraphPad Prism7进行作图 and 数据分析,并计算EC₅₀ (concentration for 50% of maximal effect)。

[0296] 表1. 抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体结合抗原的能力

	Antibody	EC ₅₀ (nM)		
		MUC17-His	CD3-Epsilon	CD28-His
[0297]	44H4-Hu-IgG1	0.06507	NA	NA
	SP34-Hu-IgG1	NA	0.05533	NA
	Anti-CD28-Hu-IgG1	NA	NA	0.1166
[0298]	CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH	0.06246	0.9199	0.8207
	CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH	0.1732	3.363	1.711

[0299] 表1为图2A/B/C中各曲线计算结果的汇总。如图2A/B/C和表1所示,44H4-Hu-IgG1、SP34-Hu-IgG1和Anti-CD28-Hu-IgG1均能够有效地分别结合MUC17-His、CD3-Epsilon和CD28-His,EC₅₀分别是0.06507nM、0.05533nM和0.1166nM。CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH能有效地结合MUC17-His、CD3-Epsilon和CD28-His,EC₅₀分别为0.06246nM、0.9199nM和0.8207nM。CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH也能有效地结合MUC17-His、CD3-Epsilon和CD28-His,EC₅₀分别为0.1732nM、3.363nM和1.711nM。

[0300] CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH和CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH均能有效地结合MUC17-His、CD3-Epsilon和CD28-His,这说明它们是三特异性抗体。

[0301] 实施例6. 抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体结合细胞表面抗原的能力

[0302] 用流式细胞仪分别测定抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体结合人结肠腺癌细胞LS174T (购自ATCC,货号:CL-188) 表面MUC17,以及结合人T细胞表面CD3/CD28的能力。

[0303] 具体方法描述如下:将LS 174T细胞或者新鲜人外周血单个核细胞(简称PBMC,购自上海澳能生物技术有限公司,货号:FPB002-C-200) 接种到96孔圆底微孔板中(每孔30万

个细胞), 300g离心5min, 用多道移液器吸掉上清液, 每孔加入200 μ L含有1%牛血清白蛋白(BSA)的磷酸盐缓冲液(PBS)(记作PBS+1% BSA)重悬细胞团块, 300g离心5min, 吸掉上清。加入梯度稀释的抗体, 重悬细胞团块, 室温孵育半小时左右。300g离心5min, 吸掉上清, 每孔细胞用200 μ L PBS洗涤2遍。每孔加入适量用PBS+1%BSA以1:1000稀释的R-Phycoerythrin标记的Goat Anti-Human IgG(购自Jackson ImmunoResearch, 货号:109-115-098), 重悬细胞团块, 室温孵育半小时左右。对于PBMC, 此处还要加入APC Mouse Anti-Human CD4(购自BD Biosciences, 货号:555349)以标记CD4阳性T细胞。300g离心5min, 吸掉上清, 每孔细胞用200 μ L PBS洗涤2遍。每孔加入Fix Buffer I(购自BD Biosciences, 货号:557870)以固定细胞, 室温孵育5min。300g离心5min, 吸掉上清, 每孔细胞用200 μ L PBS洗涤2遍, 最终用200 μ L PBS重悬细胞。在流式细胞仪CytoFLEX Cytometer System(购自Beckman Coulter)检测PE通道的荧光强度。对于PBMC, 此处检测的是CD4阳性T细胞的PE荧光强度。用流式细胞仪的软件处理数据并导出各个样本PE通道的平均荧光强度(MFI)。用GraphPad Prism 7进行数据分析和作图, 计算 EC_{50} 。

[0304] 此处, 引入Amgen开发的抗MUC17*CD3双特异性抗体AMG199作为对照抗体。AMG199的氨基酸序列来自W02022060901A1中的SEQ ID NO:171。按照上述实施例中的表达和纯化方法制备AMG199。

[0305] 表2. 抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体结合细胞表面抗原的能力

Antibody	LS 174T		CD4 T	
	EC_{50} (nM)	Top	EC_{50} (nM)	Top
44H4-Hu-IgG1	0.652	3745	NA	NA
SP34-Hu-IgG1	NA	NA	0.6691	39823
[0306] Anti-CD28-Hu-IgG1	NA	NA	2.38	21894
CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH	2.265	8072	4.175	31073
CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH	1.844	7494	2.802	26579
AMG199	0.4247	4068	2.714	12929

[0307] 表2为图3A/B中各曲线计算结果的汇总。Top表示拟合曲线的高平台, 代表抗体结合的理论最大信号强度。

[0308] 如图3A和表2所示, 44H4-Hu-IgG1、CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH、CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH和AMG199均能够有效地结合LS 174T细胞, EC_{50} 分别是0.652nM、2.265nM、1.844nM和0.4247nM, 它们的Top分别为3745、8072、7494和4068。

[0309] 上述结果表明, 44H4-Hu-IgG1和AMG199对LS 174T细胞的结合力是相当的, CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH和CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH对LS 174T细胞的结合力是相当的。在高浓度时, CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH和CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH的Top明显高于44H4-Hu-IgG1和AMG199, 这表明本发明三特异性抗体对细胞表面抗原的结合能力优于后两者。

[0310] 如图3B和表2所示, SP34-Hu-IgG1、Anti-CD28-Hu-IgG1、CD28-44/SP34-Dia+44H4-

KIH、CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH和AMG199均能够有效地结合CD4阳性T细胞,EC₅₀分别是0.6691nM、2.38nM、4.175nM、2.802nM和2.714nM,它们的Top分别为39823、21894、31073、26579和12929。

[0311] 上述结果表明,单抗SP34-Hu-IgG1对CD4 T细胞的结合力最强,Anti-CD28-Hu-IgG1、CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH和CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH对CD4 T细胞的结合能力相当,AMG199的结合能力最弱。

[0312] 实施例7.抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体对靶细胞的杀伤活性

[0313] 靶细胞的制备方法描述如下:Luciferase基因序列来源于GenBank(MK484108.1),经生工生物工程(上海)股份有限公司合成其编码基因,将Luciferase基因克隆至pLVX-puro慢病毒载体中(购自Clontech,货号:632164),获得的表达载体命名为pLVX-Luciferase-puro。将慢病毒包装质粒和pLVX-Luciferase-puro共同转染至HEK293细胞中,以制备携带Luciferase基因的重组慢病毒。收集含有重组慢病毒的细胞培养上清用以感染LS 174T细胞,三天后用Puromycin加压筛选以获得转入目的基因的细胞克隆。最终获得的稳定表达Luciferase的细胞株命名为LS174T-Luciferase。

[0314] CD3阳性T细胞(购自上海澳能生物技术有限公司,货号:FPB009-1-C-100)在此作为效应细胞。在抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体的介导下,效应细胞可以有效活化并杀伤上述建立的肿瘤靶细胞LS174T-Luciferase。效应细胞的杀伤效果或者靶细胞被杀伤的程度,可以通过测定Luciferase的强度反映出来,从而计算出三特异性抗体的功能活性。

[0315] 按照1:10的比例将LS174T-Luciferase和CD3阳性T混合,离心并弃掉上清后用Advanced RPMI 1640完全培养基(含有10% FBS,1% Penicillin Streptomycin,1% GlutaMAX和1% 2-Mercaptoethanol)重悬细胞团块,然后按照每孔1万个LS174T-Luciferase细胞的密度将细胞混合物接种到平底96孔细胞培养板中。然后加入梯度稀释的各种抗体。此外,在若干个孔中加入0.01%的Triton X-100以完全杀伤靶细胞,在另外若干个孔中补充不含抗体的完全培养基。72小时之后,用Bio-Glo™ Luciferase Assay System(购自Promega,货号:G7940)测定Luciferase强度。加入Triton X-100的若干孔的Luciferase强度的平均值作为最低背景值,不含抗体的若干孔的Luciferase强度的平均值作为细胞增殖程度的最大参考值。抗体杀伤活性(Cytotoxicity)的计算公式为:
Cytotoxicity=(最大参考值-Luciferase)/(最大参考值-最低背景值)*100%

[0316] 表3A. 抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体对靶细胞的杀伤活性

Antibody	EC ₅₀ (pM)	Top (%)
44H4-Hu-IgG1	NA	NA
SP34-Hu-IgG1	432.4	37.76
Anti-CD28-Hu-IgG1	NA	NA
CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH	8.418	97.11
CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH	25.71	85.14
AMG199	13.63	83.04

[0318] 表3B. 抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体对靶细胞的杀伤活性

	Antibody	EC ₅₀ (pM)	Top (%)
	44H4-Hu-IgG1	NA	NA
	SP34-Hu-IgG1	253.3	49.58
[0319]	Anti-CD28-Hu-IgG1	NA	NA
	CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH	9.284	93.55
	CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH	20.59	85.72
	AMG199	10.48	83.91

[0320] 图4A和4B分别是两次独立重复实验的结果,两次实验中使用的效应细胞来自不同的人类个体,表3A/B分别为图4A/B中各曲线计算结果的汇总。Top表示拟合曲线的高平台,代表细胞毒性的理论最大强度。

[0321] 图4A和表3A结果显示,单抗44H4-Hu-IgG1和Anti-CD28-Hu-IgG1没有杀伤靶细胞LS174T-Luciferase的活性,SP34-Hu-IgG1显示出较弱的杀伤活性(EC₅₀为432.4pM,Top为37.76%)。CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH、CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH和AMG199均能够有效地杀伤LS174T-Luciferase细胞,EC₅₀分别是8.418pM、25.71pM和13.63pM,它们的Top分别为97.11%、85.14%和83.04%,CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH对靶细胞的杀伤程度最高(97.11%)。

[0322] 综合评估后确定,三种抗体对靶细胞的杀伤活性从强到弱的排序为:CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH>AMG199>CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH。

[0323] 图4B和表3B结果显示,单抗44H4-Hu-IgG1和Anti-CD28-Hu-IgG1没有杀伤靶细胞LS174T-Luciferase的活性,SP34-Hu-IgG1显示出较弱的杀伤活性(EC₅₀为253.3pM,Top为49.58%)。CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH、CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH和AMG199均能够有效地杀伤LS174T-Luciferase细胞,EC₅₀分别是9.284pM、20.59pM和10.48pM,它们的Top分别为93.55%、85.72%和83.91%,CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH对靶细胞的杀伤程度最高(93.55%)。

[0324] 综合评估后确定,三种抗体对靶细胞的杀伤活性从强到弱的排序为:CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH>AMG199>CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH。

[0325] 实施例8. 评估抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体相对于双特异性抗体的优效性

[0326] 分别在单抗SP34-Hu-IgG1和Anti-CD28-Hu-IgG1的CDR中关键位置处,引入定点突变,制备各个单抗的系列突变体,用上述实施例5中的ELISA评估突变体的结合活性,获得不能再结合各自对应的靶点的单抗突变体。图5A结果显示,在SP34-Hu-IgG1重链CDR3中引入A101D突变,制备成的突变体SP34-Hu-IgG1(A101D)不再结合CD3-Epsilon。图5B结果显示,在Anti-CD28-Hu-IgG1重链CDR1中引入H35A突变,在CDR3中引入H96A突变,制备成的突变体Anti-CD28-Hu-IgG1(H35A+H96A)不再结合CD28。

[0327] CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH和CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH包含有SP34-Hu-IgG1的VH和VL,在VH中引入A101D突变,重新制备突变后的抗体,并将其分别命名为CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH(-CD3)和CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH(-CD3),突变后的这两个抗体不再具有结合CD3-Epsilon的能力,理论上为可以结合MUC17和CD28的双特异性抗体。

[0328] CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH和CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH包含有Anti-CD28-Hu-IgG1的VH和VL,在VH中引入H35A和H96A突变,重新制备突变后的抗体,并将分别命名为CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH(-CD28)和CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH(-CD28),突变后的这两个抗体不再具有结合CD28的能力,理论上为可以结合MUC17和CD3的双特异性抗体。

[0329] 用实施例7中的方法,测定上述三特异性抗体及其突变体对靶细胞的杀伤活性。表4为图6A中各曲线计算结果的汇总。

[0330] 图6A和表4中结果显示,CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH和CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH依然能够有效地杀伤靶细胞,EC₅₀分别为6.6pM和12.99pM,Top分别为97.51%和96.41%。CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH(-CD3)和CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH(-CD3)对靶细胞没有展现出杀伤活性。CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH(-CD28)和CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH(-CD28)对靶细胞杀伤活性的EC₅₀分别为117.8pM和87.59pM,Top分别为98.15%和92.51%,与母本三特异性抗体相比,突变体的活性明显变弱。

[0331] 表4. 三特异性抗体及其突变体对LS174T-Luciferase细胞的杀伤活性

	Antibody	EC ₅₀ (pM)	Top (%)
	44H4-Hu-IgG1	NA	NA
	CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH	6.6	97.51
	CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH	12.99	96.41
[0332]	CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH(-CD3)	NA	NA
	CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH(-CD3)	NA	NA
	CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH(-CD28)	117.8	98.15
	CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH(-CD28)	87.59	92.51

[0333] 上述细胞杀伤实验中,效应细胞为CD3阳性T细胞,靶细胞为LS174T-Luciferase。在三特异性抗体或其突变体的介导下,T细胞能够识别靶细胞表面表达的特异性抗原并被活化,活化的T细胞会分泌一些细胞因子,这些细胞因子能够进一步激活T细胞并增强其杀伤活性。为进一步验证三特异性抗体相较于双特异性抗体的优效性,本实施例还测定了上述细胞杀伤反应体系上清中INF-gamma的浓度。上清中INF-gamma浓度的测定方法描述如下:

[0334] 采用抗人IFN-gamma抗体(BD Biosciences,货号:551221)包被ELISA微孔板,包被量为0.3μg/孔,用含有1%牛血清白蛋白的PBST(PBST表示含0.05% Tween-20的磷酸盐缓冲液)封闭微孔板。用含1%BSA的PBST配制IFN-gamma标准品(BD Biosciences,货号:554617)。用含1%BSA的PBST将上述细胞杀伤反应体系的上清液稀释4倍。将梯度稀释的IFN-gamma标准品和4倍稀释的上清液转移入上述包被抗人IFN-gamma抗体的微孔板中,每孔100μL,室温孵育1小时;用PBST洗板3次后,每孔加生物素化的抗人IFN-gamma抗体(BD Biosciences,货号:554550。临用前用含有1% BSA的PBST稀释1000倍)100μL,室温孵育0.5小时;PBST洗板3次后,每孔加Streptavidin HRP(BD Biosciences,货号:554066。临用前用含有1% BSA的PBST稀释1000倍)100μL,室温孵育0.5小时;PBST洗板3次后,每孔加入100μL以TMB(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)为底物的显色液,室温孵育1~5min;加50μL终

止液(2M H₂SO₄)终止反应;Microplate Reader(型号SpectraMax 190)读取OD450,并依据标准曲线计算各孔的IFN-gamma浓度;用GraphPad Prism7进行作图 and 数据分析,并计算EC₅₀。

[0335] 图6B结果显示,CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH和CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH能有效地刺激CD3阳性T细胞分泌IFN-gamma,EC₅₀分别为16.65pM和165.8pM,抗体在高浓度时可以使IFN-gamma分泌量达到10ng/mL。CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH(-CD3)和CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH(-CD3)没有展现出促进IFN-gamma分泌的活性。与母本三特异性抗体相比,CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH(-CD28)和CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH(-CD28)刺激T细胞分泌IFN-gamma的活性非常微弱。

[0336] 本实施例的结果表明,CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH和CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH对靶细胞的杀伤活性和刺激T细胞分泌IFN-gamma的活性是相关和一致的。

[0337] CD28是T细胞表面表达的经典共刺激分子,本发明的三特异性抗体在结合CD3的同时还可以进一步结合CD28,从而为T细胞的激活提供双重信号,因此展现出比常规的双特异性抗体更加有效地激活T细胞的杀伤活性。

[0338] 实施例9. 评估抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体相对于CODV-IgG的优效性

[0339] CODV-Ig为赛诺菲的多特异性抗体平台(参考文献:Steinmetz A,Vallée F,Beil C,et al.CODV-Ig,a universal bispecific tetravalent and multifunctional immunoglobulin format for medical applications[C]//MAbs.Taylor&Francis,2016,8(5):867-878.)。借助此平台,赛诺菲设计了一款靶向HER2*CD3*CD28的三特异性抗体(参考文献:Seung E,Xing Z,Wu L,et al.A trispecific antibody targeting HER2 and T cells inhibits breast cancer growth via CD4cells[J].Nature,2022,603(7900):328-334.)。

[0340] 为证明本发明的抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体相对于CODV-IgG的优效性,本实施例制备了具有CODV-IgG结构和相关抗CD3/CD28抗体可变区序列的抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体,制备过程描述如下:

[0341] CODV-IgG相关抗CD3/CD28抗体重链可变区的氨基酸序列来自US20200140552A1中的SEQ ID:64,将该序列与前述多肽CD28-44-SP34-Dia-IgG1-Knob-HC的重链恒定区序列拼接,通过基因工程的方法获得编码该重组序列的编码基因,将这条多肽及其编码基因命名为CD28-CD3-CODV-IgG1-Knob-HC(SEQ ID:48)。CODV-IgG相关抗CD3/CD28抗体轻链的氨基酸序列来自US20200140552A1中的SEQ ID:61,此处将这条多肽及其编码基因命名为CD3-CD28-CODV-LC(SEQ ID:49)。

[0342] 将CD28-CD3-CODV-IgG1-Knob-HC和CD3-CD28-CODV-LC的编码基因分别克隆到pcDNA3.4表达载体中,并与前述实施例中的44H4-IgG1-Hole-HC和44H4-Hu-LC表达载体按比例组合后,利用PEI将四个表达载体共同转染到FreeStyle™293-F细胞中以表达抗体,5天后收取FreeStyle™293-F细胞培养上清液,利用Protein A亲和层析法从上清液中纯化抗体,所得抗体命名为44H4-CD3-CD28-CODV。

[0343] 本实施例对本发明和CODV-IgG结构的三特异性抗体进行了活性上的研究和比较,用前述实施例中的方法测定了这些三特异性抗体的杀伤活性,并测定了细胞反应体系中IFN-gamma的分泌。

[0344] 图7A中结果显示,CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH和CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH

依然能够有效地杀伤靶细胞, EC_{50} 分别为6.6pM和12.99pM。44H4-CD3-CD28-CODV对靶细胞杀伤活性的 EC_{50} 为173.2pM。与本发明的两种三特异性抗体相比, 44H4-CD3-CD28-CODV的活性明显变弱。

[0345] 图7B结果显示, CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH和CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH能有效地刺激CD3阳性T细胞分泌IFN- γ , EC_{50} 分别为16.65pM和165.8pM, 抗体在高浓度时可以使IFN- γ 分泌量达到10ng/mL。与本发明的两种三特异性抗体相比, 44H4-CD3-CD28-CODV刺激T细胞分泌IFN- γ 的活性非常微弱。

[0346] 实施例10. 评估抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体的体外安全性

[0347] 将PBMC(购自上海澳能生物技术有限公司, 货号:FPB002-C-200)用PBS洗涤两次, 然后用Advanced RPMI 1640完全培养基(含有10% FBS, 1% Penicillin Streptomycin, 1% GlutaMAX, 1% 2-Mercaptoethanol)重悬细胞团块, 计数并调整细胞密度后, 接种至96孔圆底细胞培养板中, 每孔30万个细胞, 每孔150 μ L。在另一96孔微孔板中用培养基梯度稀释抗体, 取50 μ L梯度稀释好的抗体加入上述细胞培养板中。将加有抗体的96孔细胞培养板置于CO₂细胞培养箱中37 $^{\circ}$ C孵育2天。取适量细胞培养上清, 测定其中IL-2和IFN- γ 的分泌量。

[0348] IL-2分泌量的测定方法与上述实施例中IFN- γ 的测量方法非常相似, 也采用双抗夹心法, 相关试剂购自BD Biosciences, 分别为抗人IL-2抗体(货号:9133977)、IL-2标准品(货号:9220085)和生物素化的抗人IL-2抗体(货号:9120557)。弃掉细胞培养板中多余上清之后, 用Cell-Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay试剂盒(购自Promega, 货号:G7572)测定细胞的增殖情况。

[0349] 实验结果显示, SP34-Hu-IgG1单抗能够强烈刺激PBMC分泌IL-2(图8A, EC_{50} 为7.596pM)、IFN- γ (图8B, EC_{50} 为24.49pM), 并能够刺激PBMC增殖(图8C, EC_{50} 为0.4244pM)。上述体外实验结果表明, 本发明的两种三特异性抗体在合理浓度范围内, 没有非特异性地激活PBMC细胞。

[0350] 实施例11. 评估抗MUC17*CD3*CD28三特异性抗体的理化性质

[0351] 抗体是高分子量蛋白质, 具有高度复杂的二级和三级结构。由于翻译后修饰、聚集和降解等变化, 抗体在生物化学和生物物理特性方面是异质的。当通过分离技术分析双特异性抗体时, 通常会观察到变体、聚集体和降解片段, 它们的存在可能会损害安全性和有效性。在生产和存储抗体的过程中容易出现聚集体、降解片段和不完整组装的分子。

[0352] 本发明使用高效液相色谱-尺寸排阻色谱(High-performance liquid chromatography-size exclusion chromatography, HPLC-SEC)检测样品中上述杂质的含量。聚集体的分子量要大于单体, 因此相应峰的保留时间较短; 降解片段或不完整组装分子的分子量要小于单体, 因此相应峰的保留时间较长。HPLC-SEC所用色谱仪为Dionex Ultimate 3000; 流动相配制方法如下: 取适量20mM磷酸二氢钠母液, 用20mM磷酸氢二钠调节PH至6.8 \pm 0.1; 进样量: 20 μ g; 色谱柱为TSK G3000SWXL, 规格为7.8 \times 300mm5 μ m; 流速0.5mL/min, 洗脱时间30min; 柱温25 $^{\circ}$ C, 样品室温度10 $^{\circ}$ C; 检测波长214nm。

[0353] 图9A是CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH的HPLC-SEC图谱, 其中保留时间为16.263分钟的主峰占比为98.8%。图9B是CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH的HPLC-SEC图谱, 其中保留时间为15.997分钟的主峰占比为98.2%。这两个三特异性抗体的主峰占比相近, 说明它们

的SEC纯度相当。

[0354] 本发明使用CE-SDS(Capillary Electrophoresis-Sodium Dodecyl Sulfate)分析样品中降解片段或不完整组装的分子的含量。CE分为非还原和还原两种类型,用于前者的样品在变性时不需要用还原剂DTT将分子内的二硫键破坏,而用于后者的样品在变性时需要用还原剂DTT将分子内的二硫键破坏。非还原和还原CE-SDS分别记作NR-CE-SDS和R-CE-SDS。所用毛细管电泳仪为ProteomeLab™ PA800 plus(Beckman Coulter),配备UV 214nm检测器,毛细管型号为Bare Fused-Silica Capillary,规格30.7cm×50μm,有效长度20.5cm;其它相关试剂购自Beckman Coulter。仪器关键参数设置如下:毛细管和样品室温度为20±2℃,分离电压为15kV。

[0355] 图10A和图10B分别是CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH的NR-CE-SDS和R-CE-SDS图谱,图10C和图10D分别表示CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH的NR-CE-SDS和R-CE-SDS图谱。CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH的NR-CE-SDS主峰占比97.5%,CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH的NR-CE-SDS主峰占比98.1%。CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH的R-CE-SDS主峰3、8和11(分别对应应该三特异性抗体的分子量由小到大的三条多肽链)占比分别为15.5%、32.5%和50.7%,三者峰面积占比之和为98.7%。CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH的R-CE-SDS主峰2、6和10(分别对应应该三特异性抗体的分子量由小到大的三条多肽链)占比分别为15.6%、32.2%和50.8%,三者峰面积占比之和为98.6%。

[0356] 上述结果表明,本发明的两种三特异性抗体的SEC纯度均高于98%,CE测得的纯度接近或者高于98%,这表明它们的纯度较高,理化性质良好。

[0357] 序列表

[0358] 抗MUC17鼠源单克隆抗体44H4的重链可变区氨基酸序列如下(SEQ ID NO:1):

[0359] EVQLQQSGAELVKPGASVKLSFTASGFNIKDTYIHWVKRPEQGLEWIGRIDPANGYTKYGPRFQGGKAT
ITADTASNAAYLQLSSLTSEDYAVYYCARNYGTSPNAMYWGQGTSTVTVSS

[0360] 抗MUC17鼠源单克隆抗体44H4的轻链可变区氨基酸序列如下(SEQ ID NO:2):

[0361] DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVETYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASSLESIGIPARFSGS
GSRDFTLTITPVEADDVATYFCQQSNEDPYTFGGGTKLEIK

[0362] 鼠源单抗44H4的H-CDR1(SEQ ID NO.3) DTYIH

[0363] 鼠源单抗44H4的H-CDR2(SEQ ID NO.4) RIDPANGYTKYGPRFQG

[0364] 鼠源单抗44H4的H-CDR3(SEQ ID NO.5) NYGTSPNAMY

[0365] 鼠源单抗44H4的L-CDR1(SEQ ID NO.6) RASESVETYGNSFMH

[0366] 鼠源单抗44H4的L-CDR2(SEQ ID NO.7) RASSLES

[0367] 鼠源单抗44H4的L-CDR3(SEQ ID NO.8) QQSNEDPYT

[0368] 44H4人源化重链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO:9):

[0369] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFNIKDTYIHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGYTKYGPRFQGRVT
ITADTSTSTVYMESSLRSEDYAVYYCARNYGTSPNAMYWGQGTSLVTVSS

[0370] 44H4人源化轻链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO:10):

[0371] DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVETYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASSLESIGVPARFSGS
GSGDFTLTINPVEADDTANYCQQSNEDPYTFGGGTKVEIK

[0372] 人IgG1重链恒定区氨基酸序列(SEQ ID NO:11):

[0373] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0374] 44H4-Hu-HC氨基酸序列 (SEQ ID NO:12) :

[0375] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGYTKYGRFQGRVTITADTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARNYGTSPNAMDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0376] 人Kappa轻链恒定区氨基酸序列 (SEQ ID NO:13) :

[0377] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0378] 44H4-Hu-LC氨基酸序列 (SEQ ID NO:14) :

[0379] DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVETYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASSLESQVQPARFSGSGSGTDFTLTINPVEADDTANYCQQSNEDPYTFGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0380] SP34重链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO:15) :

[0381] EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARHDFGNSYVSWFAYWGQGTLLVTVSS

[0382] SP34轻链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO:16) :

[0383] QAVVTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEKPDHFLTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

[0384] SP34抗体H-CDR1 (SEQ ID NO.17) TYAMN

[0385] SP34抗体H-CDR2 (SEQ ID NO.18) RIRSKYNNYATYYADSVKD

[0386] SP34抗体H-CDR3 (SEQ ID NO.19) HGDFGNSYVSWFAY

[0387] SP34抗体L-CDR1 (SEQ ID NO.20) RSSTGAVTTSNYAN

[0388] SP34抗体L-CDR2 (SEQ ID NO.21) GTNKRAP

[0389] SP34抗体L-CDR3 (SEQ ID NO.22) ALWYSNLWV

[0390] SP34人源化重链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO:23) :

[0391] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARHDFGNSYVSWFAYWGQGTLLVTVSS

[0392] SP34人源化轻链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO:24) :

[0393] QTVVTTQEPSTLVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSDLWVFGGGTKLTVL

[0394] SP34-Hu-HC氨基酸序列 (SEQ ID NO:25) :

[0395] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDR

FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHDNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVK
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

[0396] Lambda轻链恒定区氨基酸序列(SEQ ID NO:26):

[0397] GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAAS
SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0398] SP34-Hu-LC氨基酸序列(SEQ ID NO:27):

[0399] QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSL
GGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSDLWVFGGGLTVLGGPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA
VTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0400] Anti-CD28重链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO:28):

[0401] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTSYIHWVRQAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRAT
LTVDTISISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQTTVTVSS

[0402] Anti-CD28轻链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO:29):

[0403] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKPKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK

[0404] Anti-CD28抗体H-CDR1(SEQ ID NO.30)SYIHH

[0405] Anti-CD28抗体H-CDR2(SEQ ID NO.31)CIYPGNVNTNYNEKFKD

[0406] Anti-CD28抗体H-CDR3(SEQ ID NO.32)SHYGLDWNFDV

[0407] Anti-CD28抗体L-CDR1(SEQ ID NO.33)HASQNIYVWLN

[0408] Anti-CD28抗体L-CDR2(SEQ ID NO.34)KASNLHT

[0409] Anti-CD28抗体L-CDR3(SEQ ID NO.35)QQGQTYPYT

[0410] Anti-CD28-Hu-HC氨基酸序列(SEQ ID NO:36):

[0411] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTSYIHWVRQAPGQGLEWVMSIYPGNVNTNYNEKFKDRVT
LTVDTISISTAYMELSRLRSDDTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0412] Anti-CD28-Hu-LC氨基酸序列(SEQ ID NO:37):

[0413] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKPKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0414] CD28-44-SP34-Dia-IgG1-Knob-HC的氨基酸序列(SEQ ID NO:38):

[0415] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKPKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAM

NWVRQAPGKLEWVSRIIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHDFNGNSYVSW
 FAYWQGGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGTQVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYPNWVQQKPG
 QAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSDLWVFGGGTKLTVLGGGGSQVQLVQ
 SGAEVKPKPGASVKVSKASGYTFTSYIHWVRQAPGQCLEWMGSIYPGNVNTNYNEKFKDRVTLTVDTISISTAYMEL
 SRLRSDDTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWGQTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPP
 KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
 VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0416] CD28-44-SP34-Dia-IgG1-Knob-HC的核苷酸序列(SEQ ID NO:39) :

[0417] GACATCCAGATGACCCAGAGTCCCAGCAGCCTGTCTGCTTCTGTGGGAGATAGAGTGACAATTACATGT
 CATGCTTCTCAGAATATCTACGTGTGGCTGAACTGGTACCAGCAGAAACCTGGAAAGGCTCCTAAGCTGCTGATCTA
 CAAGGCTTCTAACCTGCACACAGGCGTGCCTTCTAGATTTTCTGGATCTGGCTCCGGAACAGATTTTACTCTGACCA
 TCTCTAGCCTGCAGCCAGAAGATTTTGCCACCTATTATTGTCAGCAGGGACAGACCTACCCTTACACATTTGGCTGC
 GGCACAAAGGTGGAGATCAAGGGTGGAGGCGGTAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGCGGCCTGGTGCAGCC
 TGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTGCTGCTTCTGGCTTACCTTTTCTACCTATGCTATGAATTGGGTGAGACAGG
 CTCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCTAGAATCAGATCTAAGTATAATAATTACGCTACCTATTATGCTGATTCT
 GTGAAGGACAGATTCACAATCTCTAGAGATGATTCTAAGAATACCCTGTATCTGCAGATGAACTCTCTGAGAGCTGA
 GGATACCGCTGTGTATTACTGTGCTAGACATGACAATTTGGCAACTCTTATGTGTCTTGGTTTGTCTATTGGGGAC
 AGGGAACACTGGTGCAGTGCAGCTCTGGTGGAGGCGGTTACAGCGCGGAGGCAGCGGAGGTGGCGGGAGTGGAGGG
 GGTGGCTCTCAGACCGTGGTGACACAGGAGCCAGCCTGACCGTGAGCCCCGGCGCACCGTGACCCTGACCTGCGG
 CTCCTCCACAGGCGCCGTGACCACCTCCAACCTACCCCACTGGGTGCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCAAGGGGCC
 TGATCGGCGGCACCAATAAGAGGGCCCCCGCGTGCCCGCTAGATTCTCTGGCTCTCTCTGGGAGGAAAGGCTGCT
 CTGACACTGTCTGGAGCTCAGCCGAGGATGAGGCTGAATACTATTGTGCTCTGTGGTATTCTGATCTGTGGGTGTT
 TGGCGGTGGAATAAATACTTACAGTTCTGGGCGGGGGCGGTAGCCAGGTGCAGCTGGTCCAGAGCGGAGCCGAGGTGA
 AGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACTTTTACCTCTTACTACATTCAGTGGGTG
 AGACAGGCTCCCGCCAGTGCTGGAGTGGATGGGATCCATCTATCCTGGAAATGTGAACACCAACTATAATGAGAA
 GTTTAAAGATAGAGTGACCCTGACCGTGGATACATCTATCTCTACCGCTTATATGGAGCTGTCTAGACTGAGATCCG
 ATGACACAGCTGTGTATTATTGTACCAGATCTCATTACGGACTGGATTGGAATTTTGTGTGTGGGGCCAGGGCACC
 ACAGTGACCGTGTCTTCTGGTGGGGTGGTTCAGGGGGTGGTGAAGTGGCGGTGGAGGGAGTGACAAGACCCACAC
 ATGTCCCCCTGTCCCGCTCTGAAGCTGCAGGAGCCCCCTCCGTGTTCCCTGTTCCCCCTAAGCCCAAGGACACCC
 TGATGATTTCCAGGACACCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTCAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAAC
 TGGTACGTCGATGGCGTGGAGGTGCACAACGCTAAGACCAAGCCAGGGAGGAGCAGTACAATTCCACCTACAGGGT
 GGTGTCCGTGCTGACCGTCCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGAAGGTGAGCAACAAGGCC
 TCCCTGCTCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAAGCCAAGGGCCAGCCAGGGAACCTCAAGTCTATAACCCTGCCTCCC
 TGCAGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGTGAGCCTCTGGTGCCTCGTCAAGGGCTTCTATCCTTCCGATATTGCCGT
 CGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACAACACCCCCGTGCTCGATTCCGATGGCAGCTTCT
 TCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAACAAGGCAACGTCTTCAGTTGCAGCGTCATGCATGAG
 GCCCTCCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGAGCCCTGGAAAG

[0418] 44H4-IgG1-Hole-HC的氨基酸序列(SEQ ID NO:40) :

[0419] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFNIKDTYIHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGYTKYGRFQGRVT
ITADTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARNYGTSPYNAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKS
CDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNRFQKSLSLSPGK

[0420] 44H4-IgG1-Ho1e-HC的核苷酸序列(SEQ ID NO:41) :

[0421] CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGCGCTTCTGTGAAGGTGTCTTGTAAAG
GCTTCTGGCTTTAATATCAAGGATACATATATCCATTGGGTGAGACAGGCCCTGGCCAGGCCTGGAGTGGATGGG
CAGAATCGATCCAGCTAATGGCTACACCAAGTATGGCCCTAGATTCAGGGAAGAGTGACCATCACAGCTGATACAT
CTACCTCCACCGTGTATATGGAGCTGTCTCTCTGAGATCTGAGGATACAGCTGTGTATTATTGTGCTAGAAATTAT
GGCACATCTTACCCTAATGCTATGGATTACTGGGACAGGGAACACTGGTGACAGTGAGCTCTGCTTCCACCAAAGG
ACCCAGCGTGTTCCTCTGGCCCCTTCCAGCAAGAGCACCAGCGGAGGCACAGCTGCCCTGGGATGCCTGGTGAAGG
ACTATTTCCCTGAGCCCGTGACAGTCAGCTGAACTCCGGCGCTCTGACCTCCGGCGTCCACACCTTTCCTGCCGTG
CTGCAGAGCAGCGCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACCGTGCCTAGCTCCAGCCTGGGCACCCAGACCTACAT
CTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCTAAGAGCTGTGACAAGACCCACA
CATGCCCTCCTTGTCTCTGCTCCTGAAGCCCGCGGCACCTTCCGTGTTCCCTGTTCCCCCCTAAGCCCAAGGATAACC
CTCATGATTTCCAGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTTCGATGTGAGCCACGAAGACCCTGAAGTGAAGTTCAA
CTGGTACGTGGACGGCGTCGAGGTCCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAATAGCACCTACCGGG
TGGTGAGCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGAGCAACAAGGCC
CTCCCTGCCCCATCGAGAAGACCATTTCCAAGGCTAAGGGACAGCCTCGGGAACCCCAAGTGTGCACCCTGCCTCC
TAGCAGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGAGCTGTGCTGTGAAGGGCTTCTACCCTCCGACATCGCTG
TCGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAATAACTACAAGACAACCCCCCGTGCTCGACAGCGATGGCAGCTTC
TTTCTGGTGTCCAAGCTCACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCTGCTCCGTCATGCACGA
GGCCCTGCACAACCGCTTACACAGAAGTCCCTGTCCCTGTCCCTTGAAAAG

[0422] CD28-44-SP34-2ScFv-IgG1-Knob-HC的氨基酸序列(SEQ ID NO:42) :

[0423] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKPKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGCGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVK
VSKASGYTFTSYIHWVRQAPGQCLEWMGSIYPGNVNTNYNEKFKDRVTLTVDTISSTAYMELSRRLRSDDTAVYYC
TRSHYGLDWNFDVWQGTTVTVSSGGGSGGGSTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYPNWVQQKPGQA
PRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYCALWYSDLWVFGGKLTVLGGGSGGGGSGGG
GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPGKLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDRF
TISRDDSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARHDFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSGGGSGGGSDKTHTCPPCPAPEA
AGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0424] CD28-44-SP34-2ScFv-IgG1-Knob-HC的核苷酸序列(SEQ ID NO:43) :

[0425] GACATCCAGATGACCCAGAGTCCCAGCAGCCTGTCTGCTTCTGTGGGAGATAGAGTGACAATTACATGT
CATGCTTCTCAGAATATCTACGTGTGGCTGAACTGGTACCAGCAGAAACCTGGAAAGGCTCCTAAGCTGCTGATCTA

CAAGGCTTCTAACCTGCACACAGGCGTGCCTTCTAGATTTTCTGGATCTGGCTCCGGAACAGATTTTACTCTGACCA
TCTCTAGCCTGCAGCCAGAAGATTTTGCCACCTATTATTGTCAGCAGGGACAGACCTACCCTTACACATTTGGCTGC
GGCACAAGGTGGAGATCAAGGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGCGGAGGCAGCGGAGGTGGCGGGAGTGGAGGGGGTGG
CTCTCAGGTGCAGCTGGTCCAGAGCGGAGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCA
GCGGCTACACTTTTACCTCTTACTACATTCACTGGGTGAGACAGGCTCCCGGCCAGTGCCTGGAGTGGATGGGATCT
ATCTATCCTGGAAATGTGAACACCAACTATAATGAGAAGTTTAAAGATAGAGTGACCCTGACCCTGGATAACATCTAT
CTCTACCGCTTATATGGAGCTGTCTAGACTGAGATCCGATGACACAGCTGTGTATTATTGTACCAGATCTCATTACG
GACTGGATTGGAATTTTGATGTGTGGGGCCAGGGCACCACAGTGACCGTGTCTTCTGGGGGCGGTAGCGGGGGCGGG
TCTCAGACCGTGGTGACACAGGAGCCAGCCTGACCGTGAGCCCCGGCGGCACCGTGACCCTGACCTGCGGCTCCTC
CACCGGCGCCGTGACCACCTCCAACCTACCCCAACTGGGTGCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCAAGGGGCCTGATCG
GCGGCACCAATAAGAGGGCCCCCGCGTGCCCGTAGATTCTCTGGCTCTCTTCTGGGAGGAAAGGCTGCTCTGACA
CTGTCTGGAGCTCAGCCCGAGGATGAGGCTGAATACTATTGTGCTCTGTGGTATTCTGATCTGTGGGTGTTTGGCGG
TGGAATAAACTTACAGTTCTGGGTGGGGTGGTTCAGGGGTGGTGAAGTGGCGGTGGAGGGAGTGGTGGAGGCG
GTAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGCGCCTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTGCTGCT
TCTGGCTTTACCTTTTCTACCTATGCTATGAATTGGGTGAGACAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCTAG
AATCAGATCTAAGTATAATAATTACGCTACCTATTATGCTGATTCTGTGAAGGACAGATTCACAATCTCTAGAGATG
ATTCTAAGAATACCCTGTATCTGCAGATGAACTCTCTGAGAGCTGAGGATACCGCTGTGTATTACTGTGCTAGACAT
GACAATTTTGGCAACTCTTATGTGTCTTGGTTTGCTATTGGGGACAGGGAACACTGGTGACAGTGAAGTCTGGCGG
GGGATCAGGAGGTGGCAGTGACAAGACCCACACATGTCCCCCTGTCCCGCTCCTGAAGCTGCAGGAGCCCCTTCCG
TGTTCTGTTCCCCCTAAGCCCAAGGACACCCTGATGATTCCAGGACACCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGAC
GTCAGCCACGAGGACCCGAGGTGAAATTCAACTGGTACGTCGATGGCGTGGAGGTGCACAACGCTAAGACCAAGCC
CAGGGAGGAGCAGTACAATTCCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTCCATCAGGACTGGCTGAACGGCA
AAGAGTATAAGTGAAGGTGAGCAACAAGGCCCTCCCTGCTCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAAGCCAAGGGCCAG
CCCAGGGAACCTCAAGTCTATAACCCTGCCTCCCTGCAGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGTGAAGCCTCTGGTGCCT
CGTCAAGGGCTTCTATCCTTCCGATATTGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCAGAACTACAAGACAA
CACCCCCGTGCTCGATTCCGATGGCAGCTTCTTCCGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAACAA
GGCAACGTCTTCAGTTGCAGCGTCATGCATGAGGCCCTCCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGAGCCC
TGAAAG

[0426] IgG1-Knob-HC氨基酸序列 (SEQ ID NO:44) :

[0427] DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLW
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKLSL
SPGK

[0428] IgG1-Hole-HC氨基酸序列 (SEQ ID NO:45) :

[0429] DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSL
CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHFTQKLSL
SPGK

[0430] MUC17-His的氨基酸序列 (SEQ ID:46) :

[0431] RTTTCFGDGCQNTASRCKNGGTWDGLKCQCPNLYYGELCEEVSSIDIGPPETISAQMELTVTVTSVKF
TEELKNHSSQEFQEFKQTFTEQMNIIVYSGIPEYVGVNITKLRLGSSVVEHDVLLRKYTPYKTVLDNATEVVKEKI
TKVTTQQIMINDICSDMMCFTTGTQVQNIITVTQYDPEEDCRKMAKEYGDYFVVEYRDQKPYCISPCEPGFSVSKNC
NLGKCQMSLSGPQCLCVTTETHWYSGETCNQGTQKSLGGGGSHHHHHH

[0432] CD28-His的氨基酸序列(SEQ ID:47) :

[0433] NKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVYGNYSQQQLQVYSKTGFNCD
GKLGNESVTFYLNLYVNVQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSPLPFGPSKPGGGGSHHHHHH

[0434] CD28-CD3-CODV-IgG1-Knob-HC的氨基酸序列(SEQ ID:48) :

[0435] QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPGNVNTNYAQKFQGRAT
LTVDTISITAYMELSRLRSDDTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWGKGTITVTVSSSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLS
CAASGFTFTKAWMHVVRQAPGKQLEWVAQIKDKSNSYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVY
YALSPFDYWGQGLTVTVSSRTASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0436] CD3-CD28-CODV-LC的氨基酸序列(SEQ ID:49) :

[0437] DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNANTYLSWYLQKPGQSPQSLIYKVSNRFSGVPDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGGTQYPFTFGSGTKVEIKGQPKAAPDIQMTQSPSSLSASVGRVITITCASQ
NIYVWLNWYQQKPKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYCQQGQTYPYTFGQGTKL
EIKTKGPSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0438] 改造后的Anti-CD28重链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO:50) :

[0439] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWMGSIYPGNVNTNYNEKFKDRVT
LTVDTISITAYMELSRLRSDDTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWGQGTITVTVSS

[0440] 人源化SP34抗体的H-CDR3(SEQ ID NO.51) HDNFGNSYVSWFAY

[0441] 人源化SP34抗体L-CDR3(SEQ ID NO.52) ALWYSDLWV

[0442] 人源化Anti-CD28抗体H-CDR2(SEQ ID NO.53) SIYPGNVNTNYNEKFKD

[0443] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

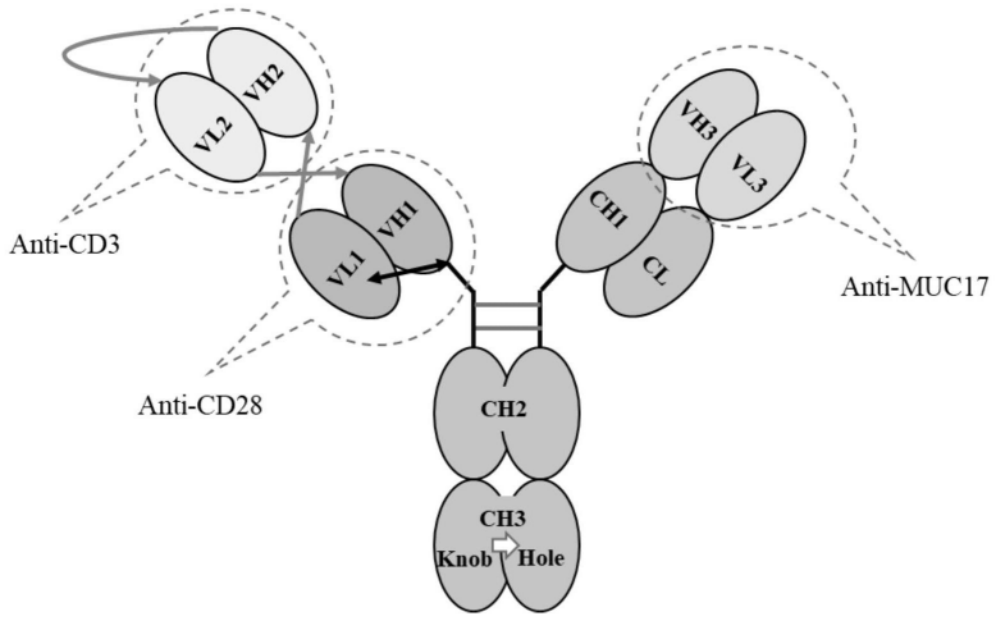


图1A

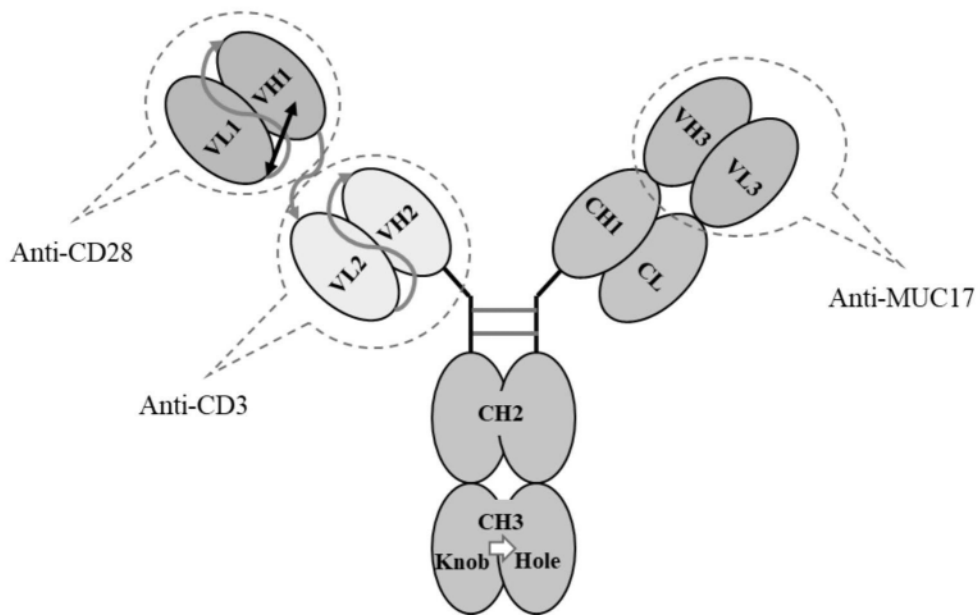


图1B

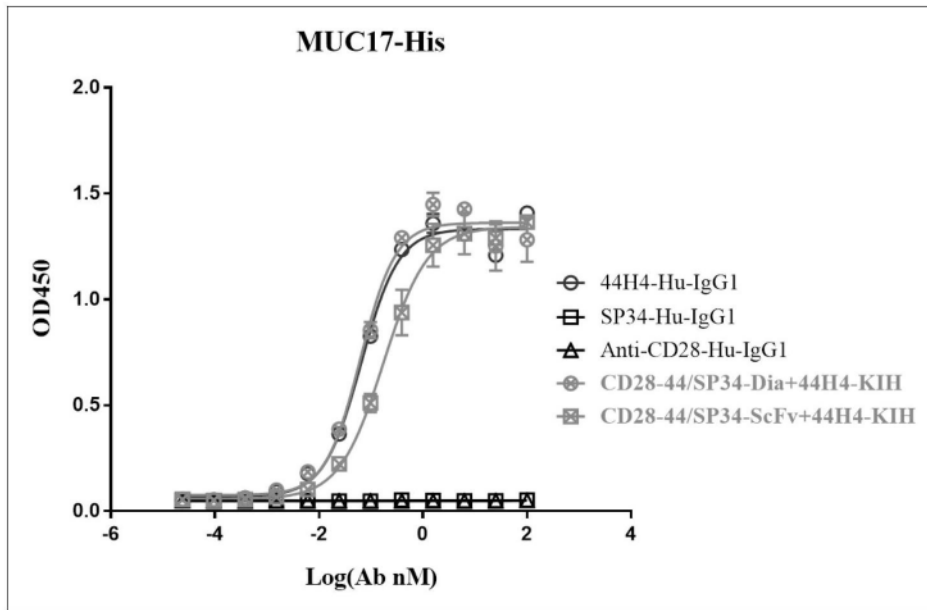


图2A

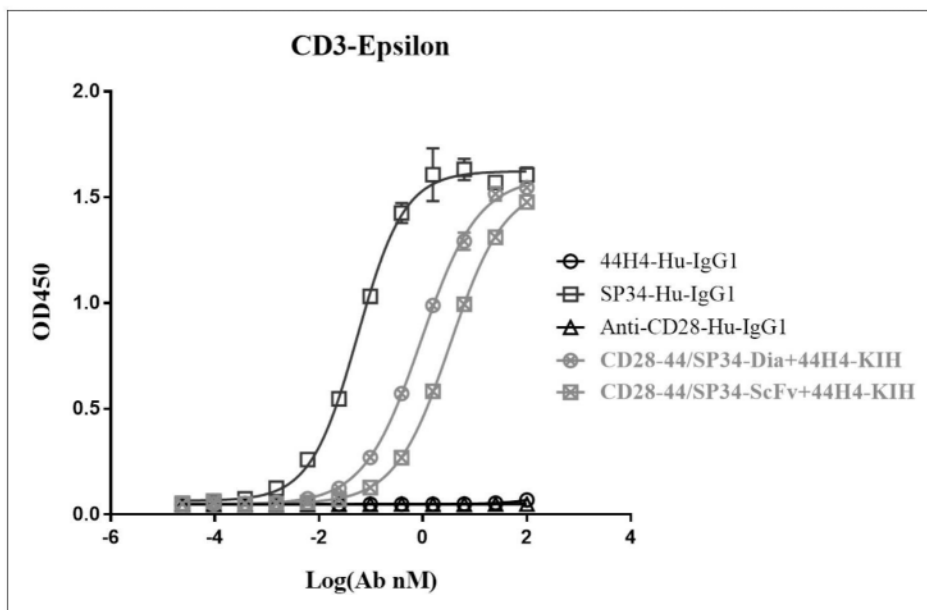


图2B

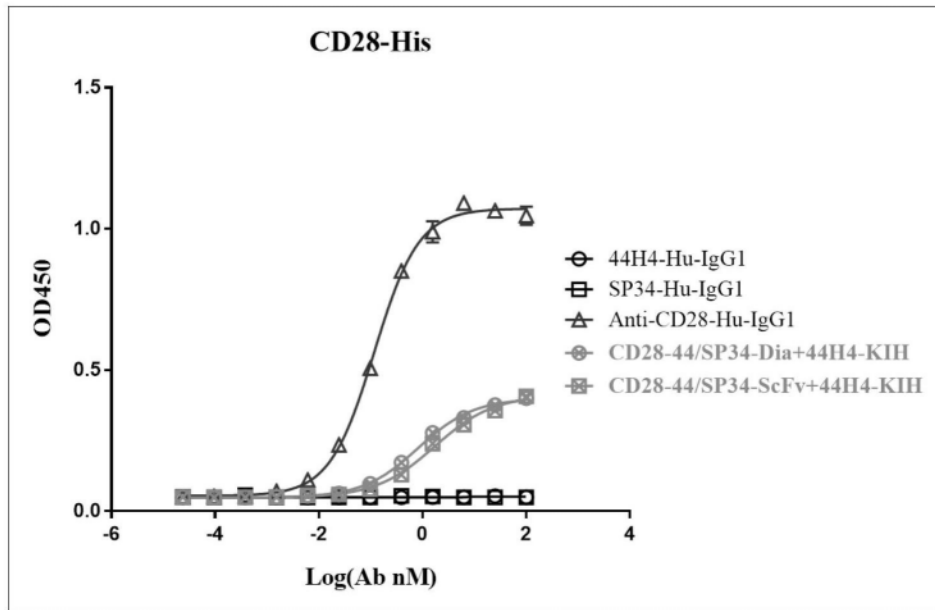


图2C

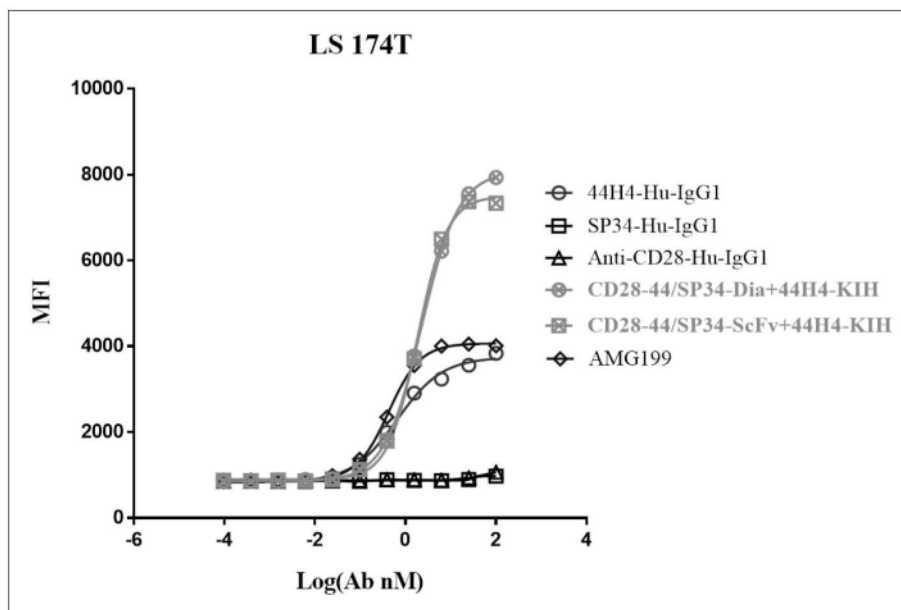


图3A

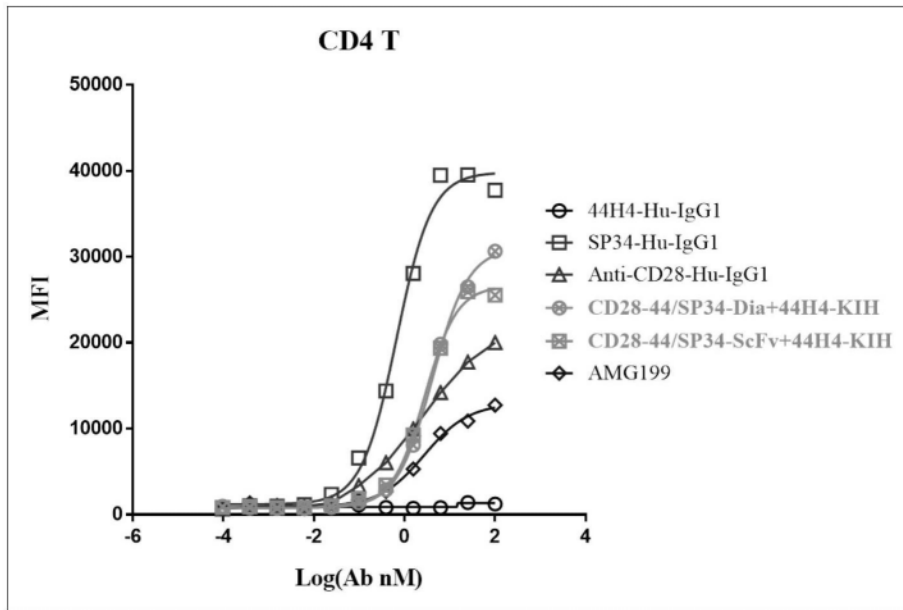


图3B

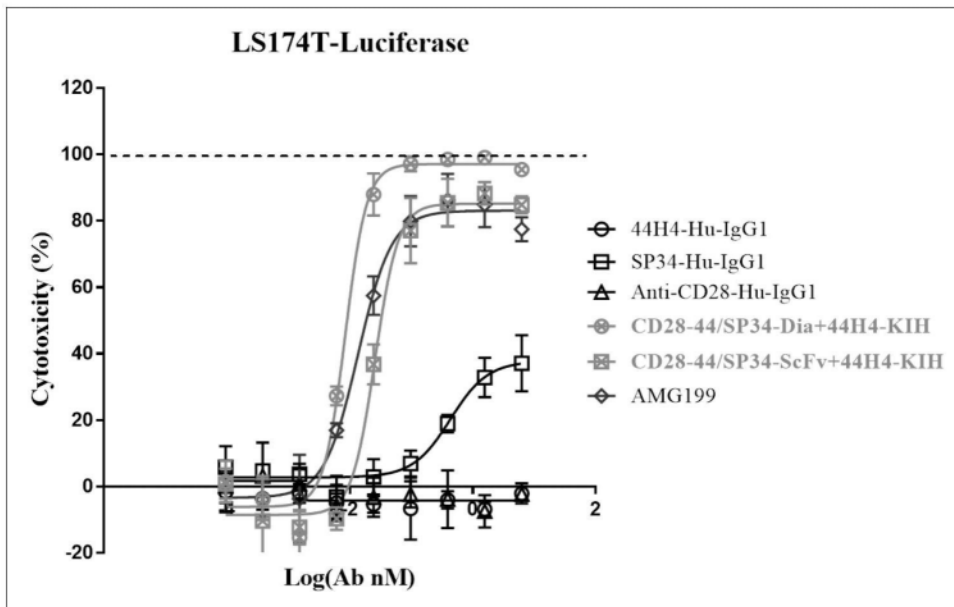


图4A

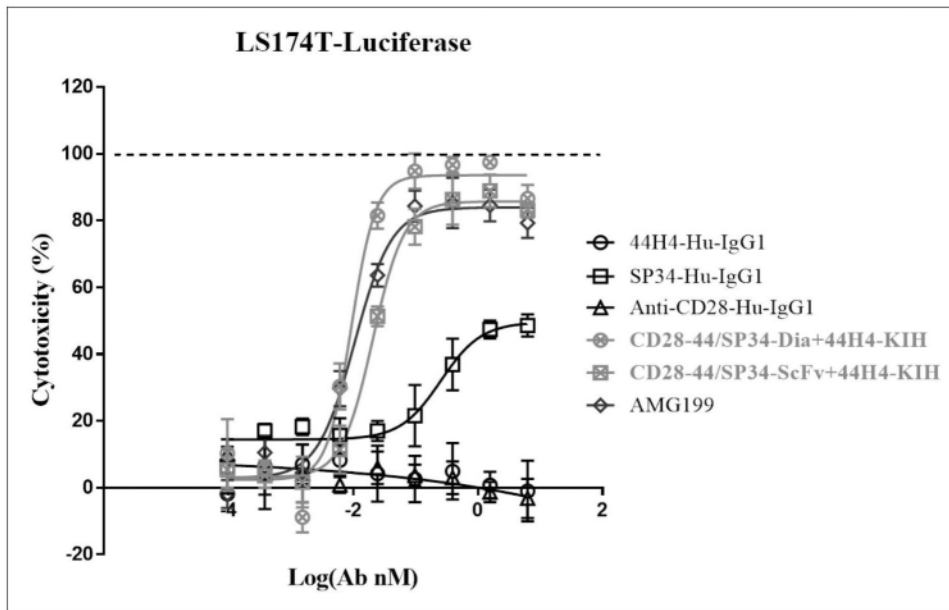


图4B

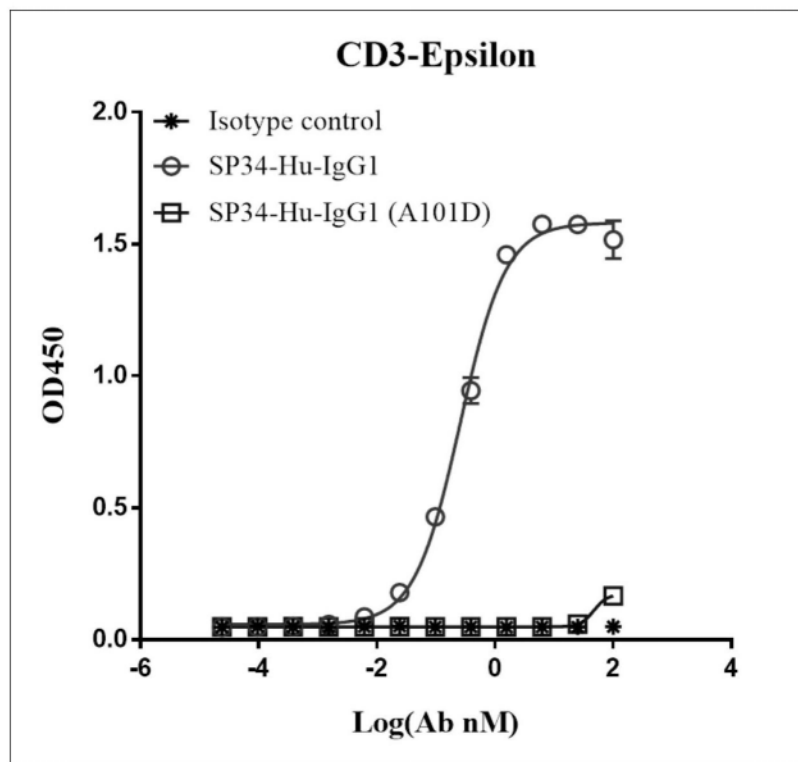


图5A

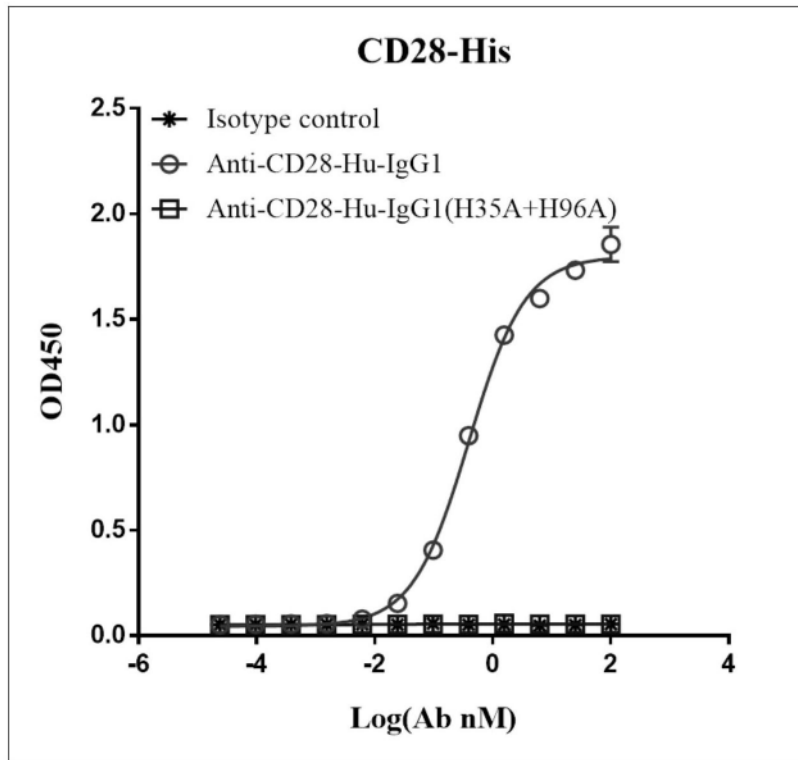


图5B

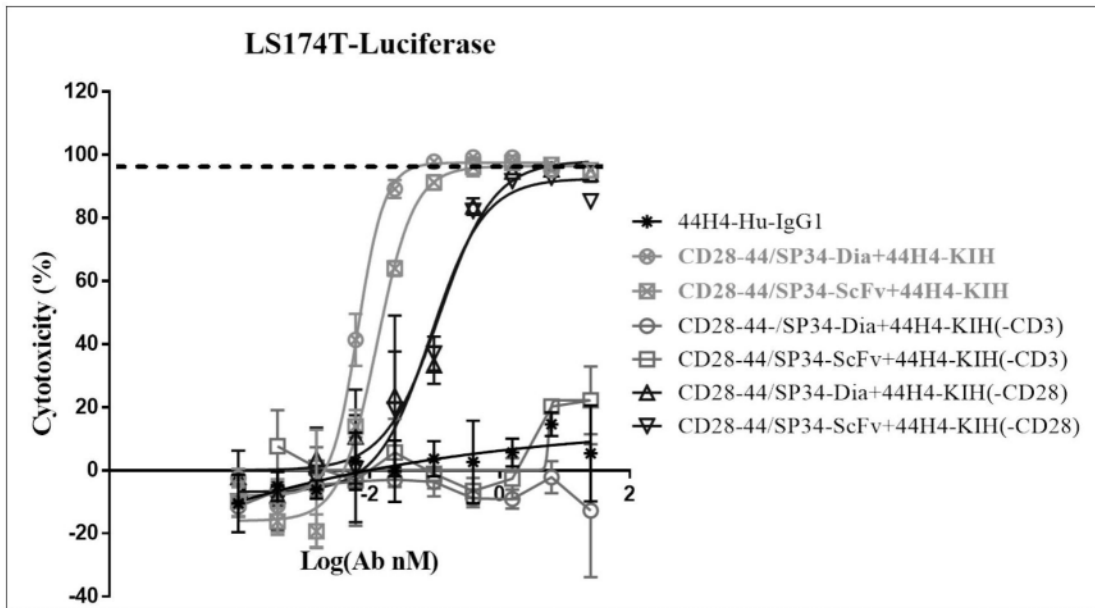


图6A

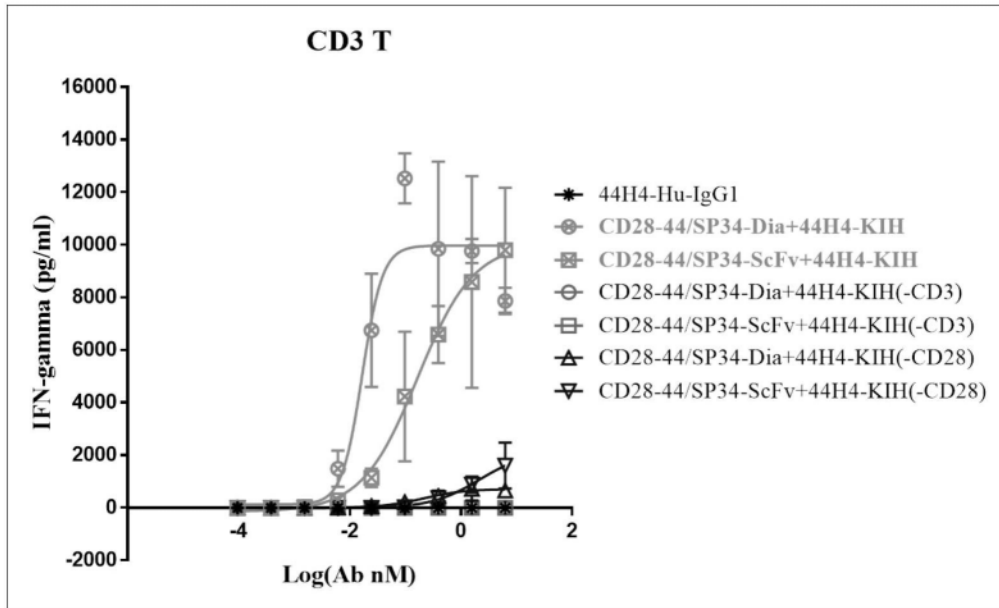


图6B

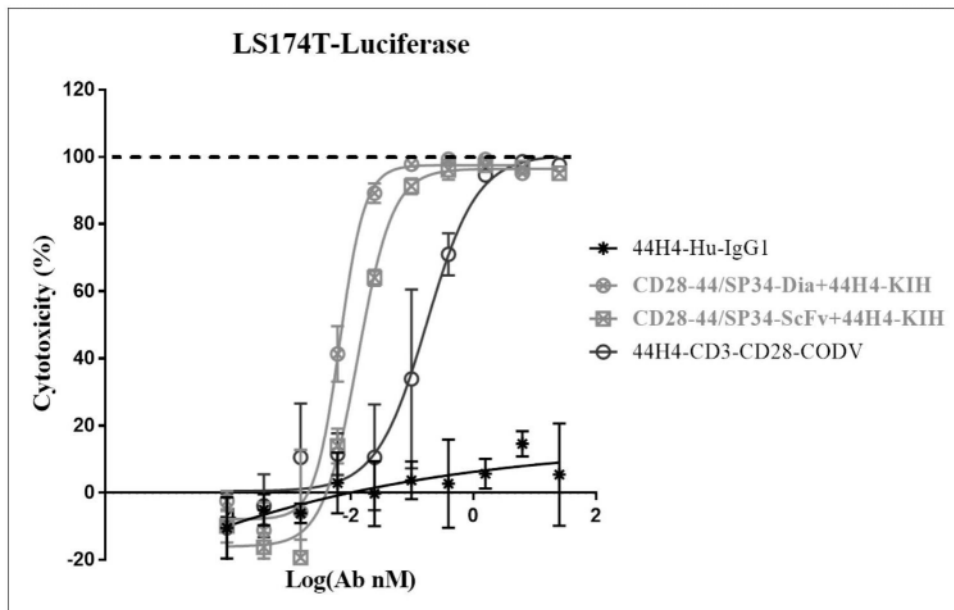


图7A

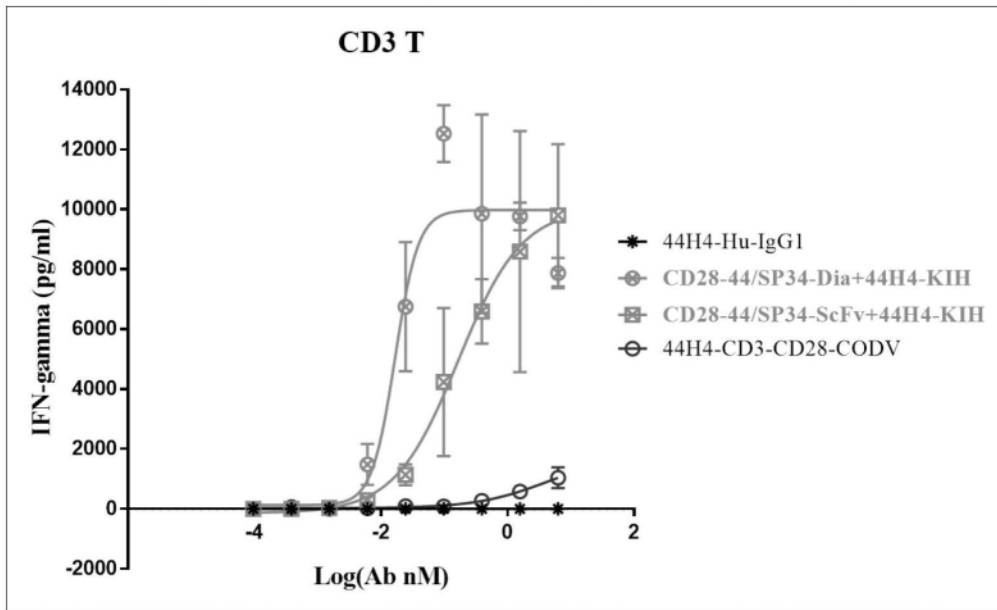


图7B

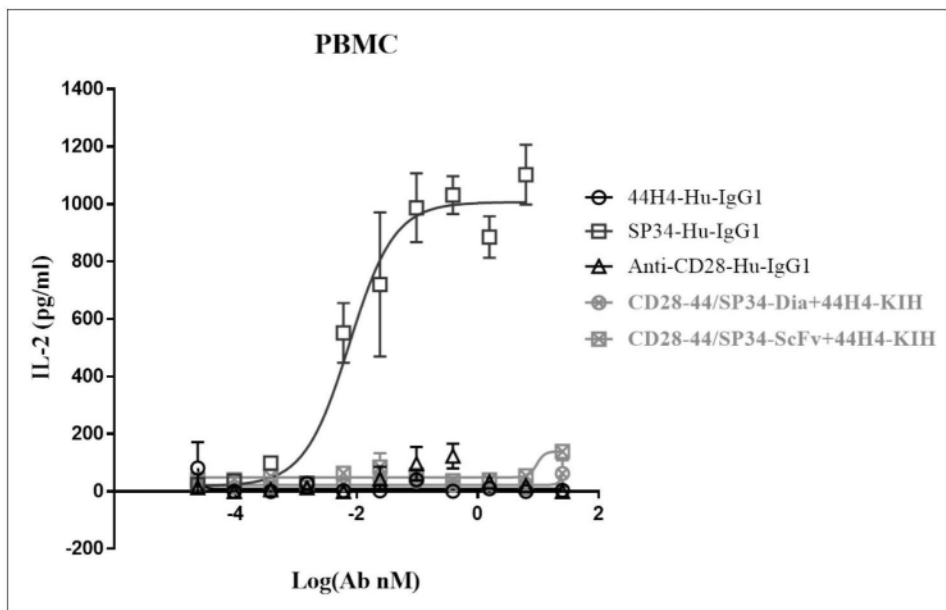


图8A

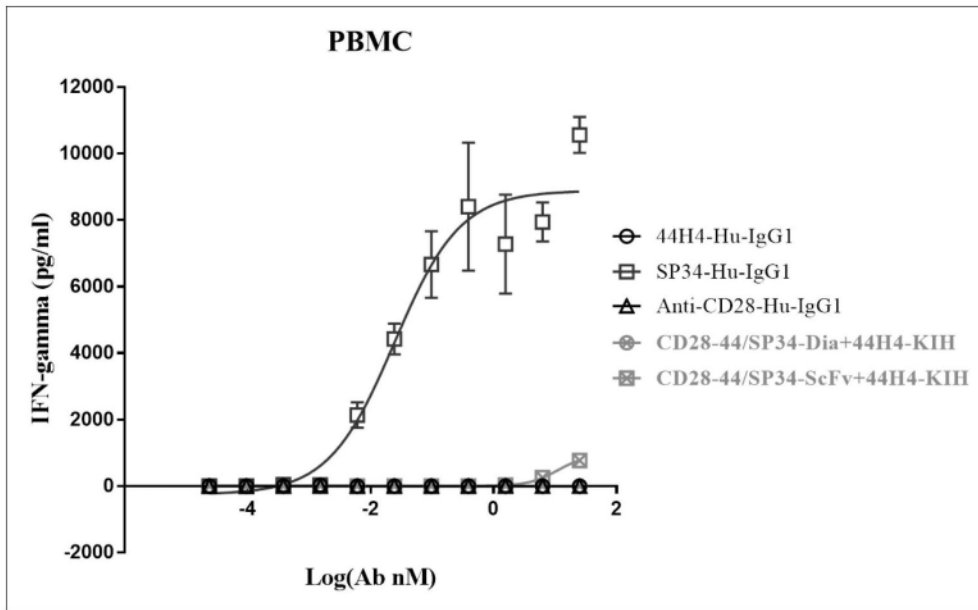


图8B

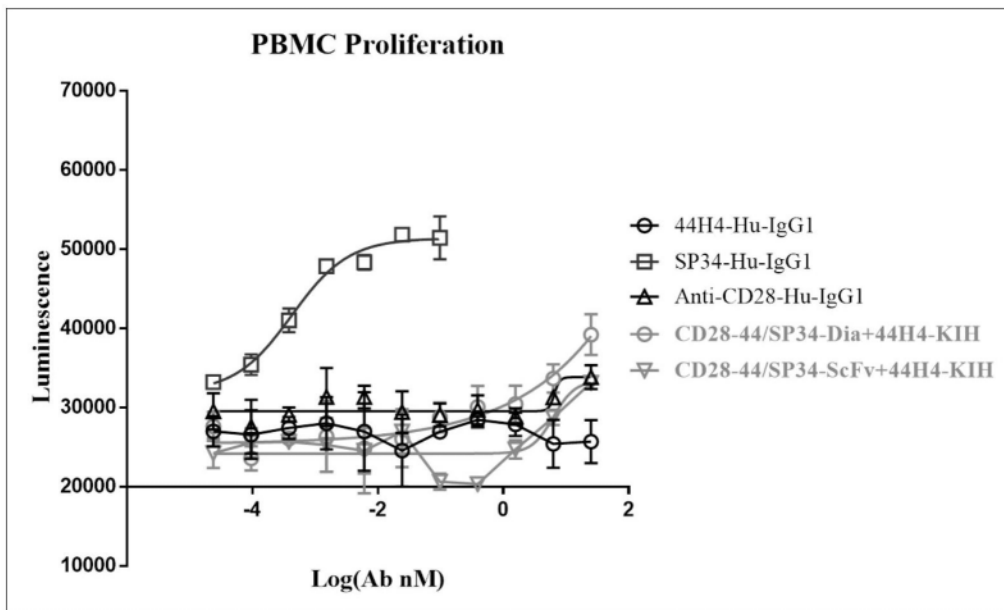


图8C

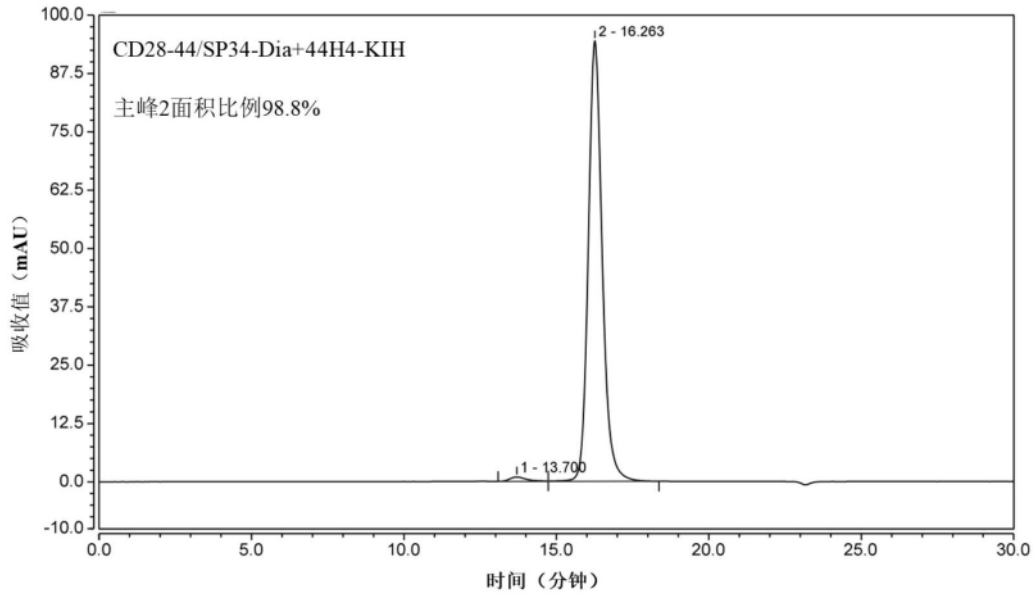


图9A

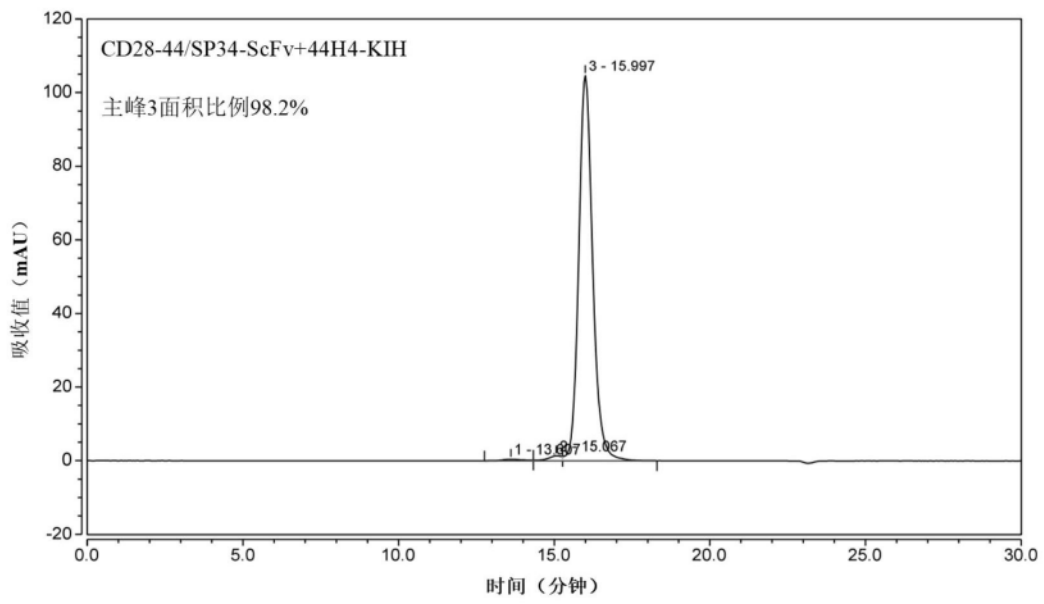


图9B

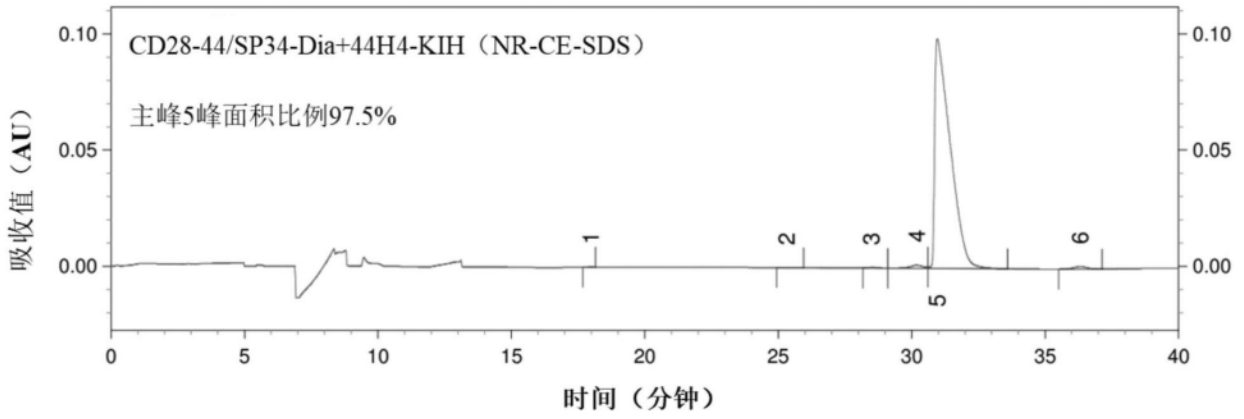


图10A

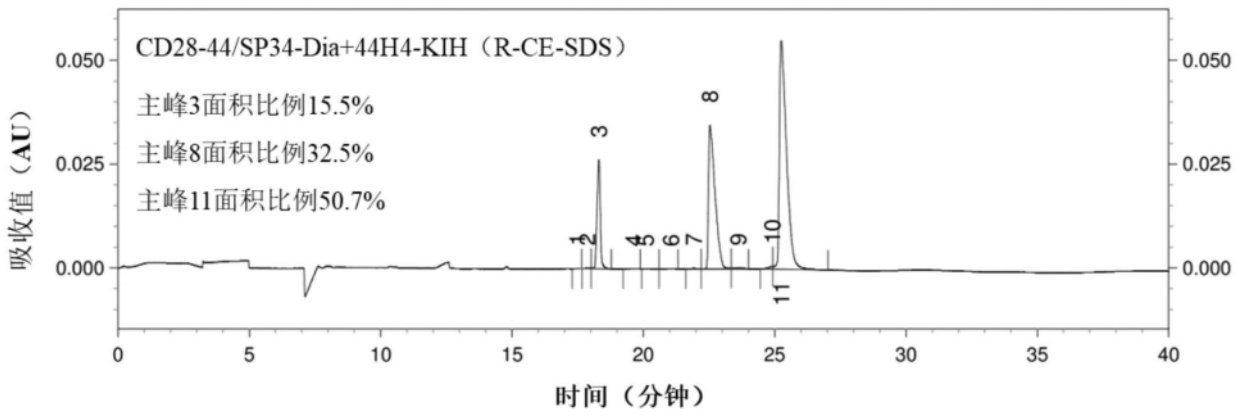


图10B

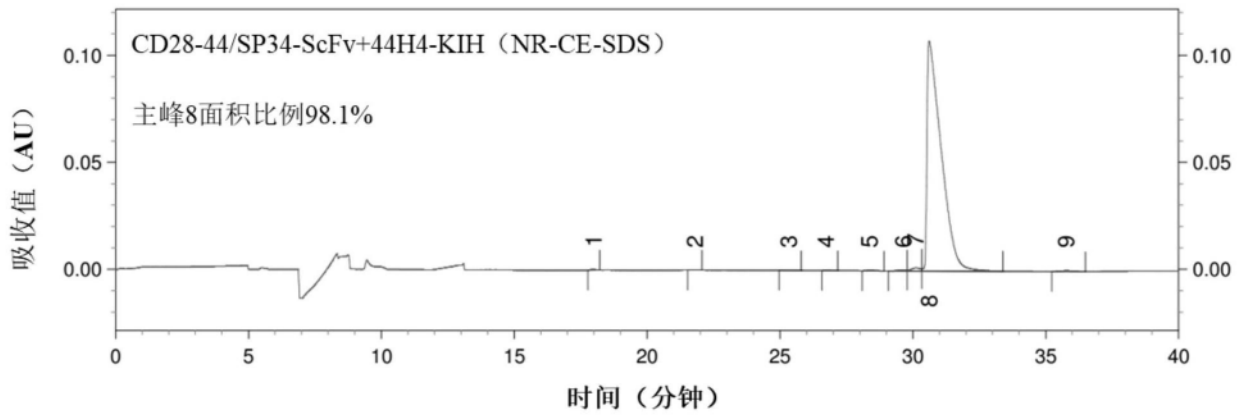


图10C

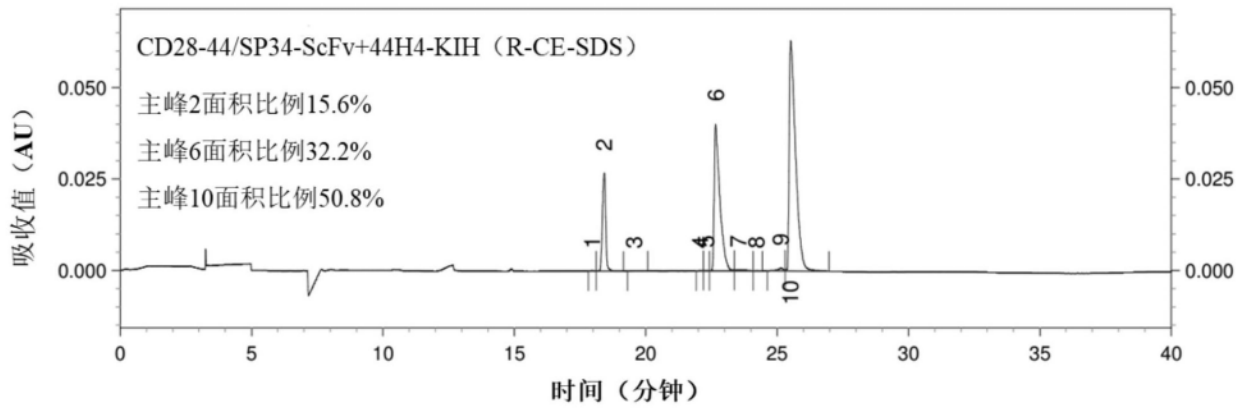


图10D