



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112351820 B

(45) 授权公告日 2024.10.11

(21) 申请号 201980041082.5

(22) 申请日 2019.06.21

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 112351820 A

(43) 申请公布日 2021.02.09

(30) 优先权数据

62/688,227 2018.06.21 US

62/781,930 2018.12.19 US

62/781,980 2018.12.19 US

62/815,878 2019.03.08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2020.12.18

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2019/038460 2019.06.21

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02019/246514 EN 2019.12.26

(73) 专利权人 瑞泽恩制药公司  
地址 美国纽约州

(72) 发明人 A·J·墨菲 D·斯科克斯  
J·韦特 E·乌尔曼 A·赫尔曼  
E·史密斯 L·哈伯  
G·D·扬科普洛斯

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

(51) Int.Cl.  
C07K 16/28 (2006.01)  
C07K 16/30 (2006.01)  
A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件  
W0 2017121905 A1, 2017.07.20  
审查员 郝永利

权利要求书2页 说明书76页  
序列表28页 附图49页

(54) 发明名称

双特异性抗PSMA X抗CD28抗体及其用途

(57) 摘要

本发明提供了双特异性抗原结合分子,其包括特异性结合人CD28的第一抗原结合结构域和特异性结合人PSMA的第二抗原结合分子。在某些实施例中,本发明的双特异性抗原结合分子能够抑制表达PSMA的肿瘤(如前列腺肿瘤)的生长。本发明的所述抗体和双特异性抗原结合分子可用于治疗以下疾病和病症,在所述疾病和病症中,上调的或诱导的靶向性免疫应答是期望的和/或在治疗上是有益的。

1. 一种双特异性抗原结合分子,其包含:

特异性结合人CD28的第一抗原结合结构域;和特异性结合人PSMA的第二抗原结合结构域,

其中所述第一抗原结合结构域包含重链可变区(HCVR)和轻链可变区(LCVR),所述重链可变区包含分别由SEQ ID NO:12、14和16的氨基酸序列组成的三个重链互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区包含分别由SEQ ID NO:20、22和24的氨基酸序列组成的三个轻链互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3;以及

所述第二抗原结合结构域包含重链可变区(HCVR)和轻链可变区(LCVR),所述重链可变区包含分别由SEQ ID NO:4、6和8的氨基酸序列组成的三个重链互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区包含分别由SEQ ID NO:20、22和24的氨基酸序列组成的三个轻链互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3。

2. 根据权利要求1所述的双特异性抗原结合分子,其中所述第一抗原结合结构域的HCVR由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成。

3. 根据权利要求1所述的双特异性抗原结合分子,其中所述第二抗原结合结构域的HCVR由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成。

4. 根据权利要求1所述的双特异性抗原结合分子,其中所述第一抗原结合结构域的LCVR和所述第二抗原结合结构域的LCVR由SEQ ID NO:18的氨基酸序列组成。

5. 根据权利要求1所述的双特异性抗原结合分子,其中所述第一抗原结合结构域的HCVR由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成,所述第二抗原结合结构域的HCVR由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成,且所述第一抗原结合结构域的LCVR和所述第二抗原结合结构域的LCVR由SEQ ID NO:18的氨基酸序列组成。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其为双特异性抗体,其包含:

通过二硫键相互连接的第一重链和配对轻链,其中所述第一重链包含HCVR和含有CH1、CH2和CH3结构域的重链恒定区,并且所述配对轻链包含LCVR和轻链恒定区,其中所述第一重链和配对轻链包含所述第一抗原结合结构域;和

通过二硫键相互连接的第二重链和配对轻链,其中所述第二重链包含HCVR和含有CH1、CH2和CH3结构域的重链恒定区,并且所述配对轻链包含LCVR和轻链恒定区,其中所述第二重链和配对轻链包含所述第二抗原结合结构域。

7. 根据权利要求6所述的双特异性抗原结合分子,其中所述第一重链或所述第二重链包含CH3结构域,但不是两者都包含CH3结构域,所述CH3结构域包含H435R(EU编号)修饰和Y436F(EU编号)修饰。

8. 根据权利要求6所述的双特异性抗原结合分子,其中所述第一重链的重链恒定区和所述第二重链的重链恒定区是同种型IgG1。

9. 根据权利要求6所述的双特异性抗原结合分子,其中所述第一重链的重链恒定区和所述第二重链的重链恒定区是同种型IgG4。

10. 根据权利要求6所述的双特异性抗原结合分子,其中所述第一重链由SEQ ID NO:81的氨基酸序列组成且所述配对轻链由SEQ ID NO:83的氨基酸序列组成,以及所述第二重链由SEQ ID NO:82的氨基酸序列组成且所述配对轻链由SEQ ID NO:83的氨基酸序列组成。

11. 一种药物组合物,其包含权利要求1-10中任一项所述的双特异性抗原结合分子和药学上可接受的载剂或稀释剂。

12. 一种核酸分子,其包含编码权利要求1-10中任一项所述的双特异性抗原结合分子的核苷酸序列,或者

一组核酸分子,其包含分别编码权利要求1-10中任一项所述的双特性抗原结合分子中的第一抗原结合结构域的HCVR、第二抗原结合结构域的HCVR、以及第一和第二抗原结合结构域的LCVR的核苷酸序列。

13. 一种表达载体,其包含根据权利要求12所述的核酸分子,或者

一组表达载体,其分别包含权利要求12所述的一组核酸分子。

14. 宿主细胞,其包含根据权利要求1-10中任一项所述的双特异性抗原结合分子、根据权利要求12所述的核酸分子或核酸分子组、或根据权利要求13所述的表达载体或表达载体组。

15. 一种产生抗CD28x抗PSMA双特异性抗原结合分子的方法,包括在允许产生所述双特异性抗原结合分子的条件培养权利要求14所述的宿主细胞,并回收产生的所述双特异性抗原结合分子。

16. 根据权利要求15所述的方法,进一步包括将所述双特异性抗原结合分子配制为具有合适载剂的药物组合物。

17. 抗CD28x抗PSMA双特异性抗原结合分子,其是通过权利要求15所述的方法可获得的。

18. 根据权利要求1-10中任一项所述的双特异性抗原结合分子或根据权利要求11所述的药物组合物的用途,用于制备治疗受试者中表达PSMA的癌症的药物,其中所述表达PSMA的癌症是前列腺癌。

19. 根据权利要求18所述的用途,其中所述药物用于与第二治疗剂联合治疗表达PSMA的癌症,其中所述表达PSMA的癌症是前列腺癌。

20. 根据权利要求19所述的用途,其中所述第二治疗剂包括抗肿瘤药剂、放射疗法、抗体药物缀合物、检查点抑制剂或其组合。

21. 根据权利要求20所述的用途,其中所述第二治疗剂是检查点抑制剂。

22. 根据权利要求21所述的用途,其中所述检查点抑制剂靶向PD-1。

23. 根据权利要求22所述的用途,其中所述检查点抑制剂靶向PD-1,并且选自由以下组成的组:派姆单抗、纳武单抗、阿特朱单抗和西米普利单抗。

24. 根据权利要求19所述的用途,其中所述第二治疗剂是包含结合人CD3的第一抗原结合结构域和结合人PSMA的第二抗原结合结构域的双特异性抗体。

## 双特异性抗PSMA X抗CD28抗体及其用途

### [0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请涉及并要求于2018年6月21日提交的美国临时申请第62/688,227号、于2018年12月19日提交的美国临时申请第62/781,930号、于2018年12月19日提交的美国临时申请第62/781,980号以及于2019年3月8日提交的美国临时申请第62/815,878号的优先权。前述申请的全部内容通过引用明确地并入本文。

### [0003] 序列表

[0004] 本申请含有已经以ASCII格式电子提交的序列表,并且特此将其通过引用整体并入本文。所述ASCII副本创建于2019年6月20日,被命名为10367W001\_118003-45220\_SL.TXT并且大小为48,690字节。

## 技术领域

[0005] 本发明涉及结合CD28和如PSMA等靶分子的双特异性抗原结合分子及其使用方法。

## 背景技术

[0006] CD28是在T细胞表面表达的I型跨膜蛋白,其具有组装成同源二聚体的单个细胞外Ig-V样结构域。CD28是CD80(B7.1)和CD86(B7.2)蛋白的受体,并且由在APC上表达的CD80或CD86活化。CD28与CD80或CD86的结合提供了对T细胞活化和存活重要的共刺激信号。除了T细胞受体(TCR)之外,通过CD28的T细胞刺激为各种白细胞介素的产生提供了强效信号。CD28在TCR活化之后加强细胞信号,如由NF $\kappa$ B转录因子控制的通路。CD28共信号对于有效的T细胞活化(如T细胞分化、增殖、细胞因子释放和细胞死亡)很重要。

[0007] 已提出抗CD28抗体用于涉及T细胞活化的治疗目的。一种特殊的抗CD28抗体,TGN1412(抗CD28超激动剂)用于临床试验。TGN1412诱导细胞因子风暴,这是毒理学或离体人PBMC研究中未预测到的。2006年,以0.1mg/kg的剂量向六名健康志愿者静脉注射TGN1412(抗CD28超激动剂)。在2小时内,所有六名患者都有明显的炎症反应(细胞因子风暴)。在16小时内,所有患者均出现多器官衰竭。用皮质类固醇治疗受试者,并且细胞因子水平在2-3天内恢复到正常水平。在1期研究(与CRS相关联)中,0.1mg/kg的起始剂量基于食蟹猴的50mg/kg的未观察到的副作用水平“NOAEL”的500倍的倍数(Suntharalingam等人,“1期试验中抗CD28单克隆抗体TGN1412的细胞因子风暴(Cytokine Storm in a Phase 1 Trial of the Anti-CD28 Monoclonal Antibody TGN1412)”,《新英格兰医学期刊(NEJM)》355:1018-1028(2006))。

[0008] 对食蟹猴的毒理学研究无法预测在人类中观察到的细胞因子应答。

[0009] PSMA(前列腺特异性膜抗原)/FOLH1是“充分表征”的肿瘤靶标。PSMA是在前列腺癌中过度表达的II型跨膜糖蛋白。其也称为谷氨酸羧肽酶II(GPC)。在正常人类前列腺中,PSMA与前列腺导管周围的上皮细胞的细胞质和顶面相关联。前列腺组织的发育不良性转化和/或致瘤性转化导致PSMA从顶膜转移到导管的管腔表面。PSMA被组成性地内吞,并且其未脱落。PSMA是各种临床ADC(抗体-药物缀合物)试验和成像方法的目标。PSMA在人类前列腺

腺癌中高度表达,并且与转移(淋巴结)相匹配。在前列腺肿瘤中,PSMA表达水平根据阶段和级别而增加。向雄激素非依赖性前列腺癌的转变最终导致表达增加。有趣的是,在一些实体肿瘤(包含结肠癌、肺癌、乳腺癌、肾癌和膀胱癌亚型)的肿瘤新血管系统中也报道了PSMA表达。

[0010] PSMA也在正常组织中表达。在前列腺上皮细胞、十二指肠、肾小管细胞、唾液腺和星形胶质细胞中发现表达最强。PSMA在输卵管和乳腺中被弱表达,并且在宫颈内皮中极少表达。

[0011] 结合CD28和靶抗原(如PSMA)的双特异性抗原结合分子在治疗环境中是有用的,在所述治疗环境中,需要表达靶抗原的细胞的特异性靶向和T细胞介导的杀伤。还需要在药物组合物中安全使用的抗CD28抗体。

### 发明内容

[0012] 在第一方面,本发明提供了结合CD28和靶抗原的双特异性抗原结合分子。根据某些示例性实施例,所述双特异性抗原结合分子结合CD28和PSMA;这种双特异性抗原结合分子在本文中也称为“抗CD28/抗PSMA双特异性分子”。所述抗CD28/抗PSMA双特异性分子的抗PSMA部分可用于靶向表达PSMA的肿瘤细胞(例如,前列腺肿瘤细胞),并且所述双特异性分子的抗CD28部分可用于活化T细胞。肿瘤细胞上的PSMA和T细胞上的CD28的同时结合促进了活化的T细胞对所靶向的肿瘤细胞的定向杀伤(细胞裂解)。因此,本发明的抗CD28/抗PSMA双特异性分子尤其可用于治疗与表达PSMA的肿瘤相关或由其引起的疾病和病症(例如,前列腺癌)。

[0013] 根据本发明的此方面的双特异性抗原结合分子包括特异性结合人CD28的第一抗原结合结构域和特异性结合PSMA的第二抗原结合结构域。本发明包含抗CD28/抗PSMA双特异性分子(例如,双特异性抗体),其中每个抗原结合结构域包括与轻链可变区(LCVR)配对的重链可变区(HCVR)。在本发明的某些示例性实施例中,抗CD28抗原结合结构域和抗PSMA抗原结合结构域各自包括与共同LCVR配对的不同的独特的HCVR。

[0014] 本发明提供了抗CD28/抗PSMA双特异性分子,其中特异性结合CD28的所述第一抗原结合结构域包括如表1中所示的HCVR氨基酸序列中的任何一个。特异性结合CD28的所述第一抗原结合结构域还可以包括如表1中所示的LCVR氨基酸序列中的任何一个。根据某些实施例,特异性结合CD28的所述第一抗原结合结构域包括如表1中所示的HCVR/LCVR氨基酸序列对中的任何一个。本发明还提供了抗CD28/抗PSMA双特异性分子,其中特异性结合CD28的所述第一抗原结合结构域包括如表1中所示的重链CDR1-CDR2-CDR3氨基酸序列中的任何一个和/或如表1中所示的轻链CDR1-CDR2-CDR3氨基酸序列中的任何一个。

[0015] 根据某些实施例,本发明提供了抗CD28/抗PSMA双特异性分子,其中特异性结合CD28的所述第一抗原结合结构域包括重链可变区(HCVR),所述重链可变区具有选自SEQ ID NO:10、26和58组成的组的氨基酸序列或其基本上类似的序列,所述基本上类似的序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性。

[0016] 本发明还提供了抗CD28/抗PSMA双特异性分子,其中特异性结合CD28的所述第一抗原结合结构域包括轻链可变区(LCVR),所述轻链可变区具有选自SEQ ID NO:18、42和66组成的组的氨基酸序列或其基本上类似的序列,所述基本上类似的序列具有至少90%、

至少95%、至少98%或至少99%序列同一性。

[0017] 本发明还提供了抗CD28/抗PSMA双特异性分子,其中特异性结合CD28的所述第一抗原结合结构域包括选自由SEQ ID NO:10/18、26/42和58/66组成的组的HCVR和LCVR(HCVR/LCVR)氨基酸序列对。

[0018] 本发明还提供了抗CD28/抗PSMA双特异性分子,其中特异性结合CD28的所述第一抗原结合结构域包括:重链CDR3(HCDR3)结构域,所述重链CDR3结构域具有选自由SEQ ID NO:16、32和64组成的组的氨基酸序列或与其基本上类似的序列,所述基本上类似的序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性;以及轻链CDR3(LCDR3)结构域,所述轻链CDR3结构域具有选自由SEQ ID NO:24、48和72组成的组的氨基酸序列或其基本上类似的序列,所述基本上类似的序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性。

[0019] 在某些实施例中,特异性结合CD28的所述第一抗原结合结构域包括选自由SEQ ID NO:16/24、32/48和64/72组成的组的HCDR3/LCDR3氨基酸序列对。

[0020] 本发明还提供了抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子,其中特异性结合CD28的所述第一抗原结合结构域包括:重链CDR1(HCDR1)结构域,所述重链CDR1结构域具有选自由SEQ ID NO:12、28和60组成的组的氨基酸序列或其基本上类似的序列,所述基本上类似的序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性;重链CDR2(HCDR2)结构域,所述重链CDR2结构域具有选自由SEQ ID NO:14、30和62组成的组的氨基酸序列或其基本上类似的序列,所述基本上类似的序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性;轻链CDR1(LCDR1)结构域,所述轻链CDR1结构域具有选自由SEQ ID NO:20、44和68组成的组的氨基酸序列或其基本上类似的序列,所述基本上类似的序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性;以及轻链CDR2(LCDR2)结构域,所述轻链CDR2结构域具有选自由SEQ ID NO:22、46和70组成的组的氨基酸序列或其基本上类似的序列,所述基本上类似的序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性。

[0021] 本发明的某些非限制性、示例性抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子包含特异性结合分别包括HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3结构域的CD28的第一抗原结合结构域,所述第一抗原结合结构域具有选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:12-14-16-20-22-24;28-30-32-44-46-48;和60-62-64-68-70-72。

[0022] 本发明还提供了抗CD28/抗PSMA双特异性分子,其中特异性结合PSMA的所述第二抗原结合结构域包括重链可变区(HCVR),所述重链可变区具有选自由SEQ ID NO:2、34和50组成的组的氨基酸序列或其基本上类似的序列,所述基本上类似的序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性。

[0023] 本发明还提供了抗CD28/抗PSMA双特异性分子,其中特异性结合PSMA的所述第二抗原结合结构域包括轻链可变区(LCVR),所述轻链可变区具有选自由SEQ ID NO:18、42和66组成的组的氨基酸序列或其基本上类似的序列,所述基本上类似的序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性。

[0024] 本发明还提供了抗CD28/抗PSMA双特异性分子,其中特异性结合PSMA的所述第二抗原结合结构域包括选自由SEQ ID NO:2/18、34/42和50/66组成的组的HCVR和LCVR(HCVR/LCVR)氨基酸序列对。

[0025] 本发明还提供了抗CD28/抗PSMA双特异性分子,其中特异性结合PSMA的所述第二抗原结合结构域包括:重链CDR3(HCDR3)结构域,所述重链CDR3结构域具有选自自由SEQ ID NO:8、40和56组成的组的氨基酸序列或与其基本上类似的序列,所述基本上类似的序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性;以及轻链CDR3(LCDR3)结构域,所述轻链CDR3结构域具有选自自由SEQ ID NO:24、48和72组成的组的氨基酸序列或其基本上类似的序列,所述基本上类似的序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性。

[0026] 在某些实施例中,特异性结合PSMA的所述第二抗原结合结构域包括选自自由SEQ ID NO:8/24、40/48和56/72组成的组的HCDR3/LCDR3氨基酸序列对。

[0027] 本发明还提供了抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子,其中特异性结合PSMA的所述第二抗原结合结构域包括:重链CDR1(HCDR1)结构域,所述重链CDR1结构域具有选自自由SEQ ID NO:4、36和52组成的组的氨基酸序列或其基本上类似的序列,所述基本上类似的序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性;重链CDR2(HCDR2)结构域,所述重链CDR2结构域具有选自自由SEQ ID NO:6、38和54组成的组的氨基酸序列或其基本上类似的序列,所述基本上类似的序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性;轻链CDR1(LCDR1)结构域,所述轻链CDR1结构域具有选自自由SEQ ID NO:20、44和68组成的组的氨基酸序列或其基本上类似的序列,所述基本上类似的序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性;以及轻链CDR2(LCDR2)结构域,所述轻链CDR2结构域具有选自自由SEQ ID NO:22、46和70组成的组的氨基酸序列或其基本上类似的序列,所述基本上类似的序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性。

[0028] 本发明的某些非限制性、示例性抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子包含特异性结合分别包括HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3结构域的PSMA的第二抗原结合结构域,所述第二抗原结合结构域具有选自自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:4-6-8-20-22-24;36-38-40-44-46-48;和52-54-56-68-70-72。

[0029] 在相关实施例中,本发明包含抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子,其中特异性结合PSMA的所述第二抗原结合结构域包括选自自由SEQ ID NO:2/18、34/42和50/66组成的组的重链和轻链可变区(HCVR/LCVR)序列内含有的重链和轻链CDR结构域。

[0030] 在另一个方面,本发明提供了编码本文公开的抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子的HCVR、LCVR或CDR序列中的任何一个的核酸分子,所述核酸分子包含:包括如本文表1中所示的多核苷酸序列的核酸分子以及包括如表1中所示的多核苷酸序列中的两个或更多的核酸分子(以其任何功能组合或排列)。携带本发明核酸的重组表达载体和引入了此类载体的宿主细胞也涵盖在本发明中,通过在允许产生抗体的条件下培养宿主细胞并回收产生的抗体来产生抗体的方法也是如此。

[0031] 本发明包含抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子,其中上述特异性结合CD28的抗原结合结构域中的任何一个与上述特异性结合PSMA的抗原结合结构域中的任何一个组合、连接或以其它方式缔合,从而形成结合CD28和PSMA的双特异性抗原结合分子。

[0032] 本发明包含具有经修饰的糖基化模式的抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子。在一些应用中,例如,可以使用修饰以去除不期望的糖基化位点,或者在寡糖链上存在缺乏岩藻糖部分的抗体,以增加抗体依赖性细胞毒性(ADCC)功能(参见Shield等人,(2002)《生

物化学杂志(JBC)》277:26733)。在其它应用中,可以进行半乳糖基化的修饰,以修饰补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0033] 在另一个方面,本发明提供了药物组合物,其包括如本文所公开的抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子以及药学上可接受的载剂。在相关方面,本发明的特征在于一种组合物,其是抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子和第二治疗剂的组合。在一个实施例中,所述第二治疗剂是利地与抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子组合的任何药剂。可以利地与抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子组合的示例性药剂在本文的其它地方详细讨论。

[0034] 在另一个方面,本发明提供了用于使用本发明的抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子靶向/杀伤表达PSMA的肿瘤细胞的治疗方法,其中所述治疗方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的包括本发明的抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子的药物组合物。

[0035] 本发明还包含本发明的抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子在制造用于治疗与PSMA表达相关或由其引起的疾病或病症的药物中的用途。

[0036] 在又另一方面,本发明提供了用于使用本发明的抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子来靶向/杀伤表达PSMA的肿瘤细胞的治疗方法,其中所述抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子与结合到CD3的其它抗肿瘤双特异性抗原结合分子组合(例如,抗CD28/抗PSMA与抗CD3/抗PSMA抗体组合)。

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

[0038] 在仍另一方面,本发明提供了用于使用本发明的抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子来靶向/杀伤表达PSMA的肿瘤细胞的治疗方法,其中所述抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子与结合到CD3的其它抗肿瘤双特异性抗原结合分子组合(例如,抗CD28/抗PSMA与抗CD3/抗PSMA双特异性抗体组合)并且与靶向PD-1或CTLA-4的检查点抑制剂组合(例如,抗CD28/抗PSMA与抗PD-1抗体组合)。

[0039] 通过阅读随后的具体实施方式,其它实施例将变得显而易见。

## 附图说明

[0040] 图1是示出示例性抗CD28/PSMA双特异性抗体的结构的示意图。

[0041] 图2是示出在具有引入的共刺激配体表达的工程化细胞系中肿瘤生长抑制的图。三个肿瘤细胞系B16F10.9、EL4和MC 38被工程化为表达共刺激配体或GFP作为对照。图2是示出存活率百分比(%)的图。当肿瘤生长到大于2000mm<sup>3</sup>时,对小鼠实施安乐死。

[0042] 图3是示出用于测试抗PSMA<sub>x</sub>CD28双特异性抗体的初级和工程化生物测定的示意图。

[0043] 图4A和4B示出,在存在初次刺激(REGN2281)和在HEK293/hCD20细胞上表达的PSMA的情况下,抗hPSMA<sub>x</sub>hCD28增强了CD4<sup>+</sup>T细胞和工程化的JRT3.T3/1G4/hCD28细胞的活化。

[0044] 图5A-5H示出,在具有引入的PSMA的工程化细胞系中,在存在抗CD20xCD3双特异性抗体引起的TCR刺激的情况下,PSMAxCD28双特异性抗体会加强T细胞活化。

[0045] 图5A是示出双特异性抗体作用模式的示意图。

[0046] 图5B是示出免疫突触内/外CD28荧光比率的定量的图。将PSMA工程化的靶细胞(HEK293)和人Jurkat T细胞与荧光标记的双特异性抗体(抗PSMAxCD28、抗CD20xCD3)在37℃下共培养1小时,轻轻固定并用抗CD28染色。条形图上指示了每组所分析的细胞数量。

[0047] 图5C和5D示出了用PSMA工程化的靶细胞培养的人T细胞的增殖。所示的数据为平均值±SEM。数据表示至少两(2)个实验。

[0048] 图5C提供了示出在存在0.5nM hIgG4s同种型对照或PSMAxCD28的情况下CD20xCD3的剂量滴定的图。

[0049] 图5D提供了示出在存在5pM hIgG4s同种型对照或CD20xCD3的情况下PSMAxCD28或指定对照的剂量滴定的图。

[0050] 图5E-5G是示出在存在5pM hIgG4s同种型对照(每个图的底部小图)或CD20xCD3(每个图的顶部小图)的情况下用TAA(PSMA或CD20)工程化的靶细胞培养的人T细胞的增殖和细胞因子释放的图,如小图的顶部所示。数据为平均值±SEM。数据表示至少三(3)个实验。

[0051] 图5E是示出增殖的图。

[0052] 图5F是示出IL-2释放的图。

[0053] 图5G是示出IFN  $\gamma$  释放的图。

[0054] 图5H是示出抗PSMAxCD28和抗PSMAxCD3双特异性抗体可以同时与表达PSMA的细胞结合的图。将22RV1细胞在流式细胞仪缓冲液(PBS+1%FBS)中在4℃下与20mg/ml的PSMAxCD3或20mg/ml的抗PSMA抗体一起预孵育30分钟,所述抗体具有与PSMAxCD28双特异性抗体类似的抗PSMA臂。孵育之后,用流式细胞仪缓冲液洗涤细胞,并在4℃下与5mg/ml用Alexa647直接标记的PSMAxCD28一起孵育20分钟。孵育之后,洗涤细胞,将其重悬于流式细胞仪缓冲液中,并通过流式细胞仪分析。

[0055] 图6A和6B示出,在存在前列腺癌和人或食蟹猴T细胞的情况下,抗PSMAxCD28增强了抗PSMAxCD3的细胞毒性效力。

[0056] 图7A-7H提供的图示出,在具有内源性PSMA的癌症细胞系中,在存在PSMAxCD3双特异性抗体引起的TCR刺激的情况下,PSMAxCD28双特异性抗体会加强T细胞活化。对于图7A-7D,将人T细胞与具有内源性PSMA表达的癌症靶细胞(前列腺癌细胞系C4-2)和指定的双特异性抗体一起培养96小时。

[0057] 图7A是示出肿瘤细胞杀伤的图。所示的数据是活细胞的百分比。

[0058] 图7B是示出IFN  $\gamma$  释放的图。

[0059] 图7C提供了示出CD4<sup>+</sup>T细胞计数和CD25<sup>+</sup>细胞频率(作为CD4<sup>+</sup>T细胞的百分比)的图。

[0060] 图7D提供了示出CD8<sup>+</sup>T细胞计数和CD25<sup>+</sup>细胞频率(作为CD8<sup>+</sup>T细胞的百分比)的图。

[0061] 对于图7E-7G,将内源性T细胞与具有内源性PSMA表达的癌症细胞(前列腺癌细胞系C4-2)和指定的双特异性抗体一起培养96小时。

- [0062] 图7E是示出肿瘤细胞杀伤的图。所示的数据是活细胞的百分比。
- [0063] 图7F提供了示出CD4<sup>+</sup> T细胞计数和CD25<sup>+</sup>细胞频率(作为CD4<sup>+</sup> T细胞的百分比)的图。
- [0064] 图7G提供了示出CD8<sup>+</sup> T细胞计数和CD25<sup>+</sup>细胞频率(作为CD8<sup>+</sup> T细胞的百分比)的图。
- [0065] 图7H提供了示出通过流式细胞术测量的与细胞靶标结合的抗体的图。
- [0066] 图8示出了TGN超激动剂特性与本发明的抗CD28抗体的特性之间的比较。
- [0067] 图9A和9B提供了示出PSMAxCD28双特异性抗体通过PSMAxCD3和诱导的T细胞活化来增强抗肿瘤免疫的图和绘图。将MC38/hPSMA肿瘤细胞皮下植入hCD3/hCD28/hPSMA人源化小鼠中。在第0天、第3天和第7天,用指定的5mg/kg双特异性抗体治疗小鼠。
- [0068] 图9A示出了肿瘤体积随时间的变化。值表示平均值±SEM,并且表示三(3)个实验,其中每组3-7只小鼠。用双向ANOVA计算p值。(\*, p<0.05;\*\* , p<0.01;\*\*\*, p<0.001和\*\*\*\*, p<0.0001)。
- [0069] 图9B提供的图示出了来自每个治疗组的每个簇中细胞的百分比(顶部小图);在viSNE绘图上指定的簇的叠加(底部小图)。
- [0070] 图9C和9D提供了示出PSMAxCD28双特异性抗体增强由PSMAxCD3诱导的细胞因子释放的条形图。在第0天给药后4小时,对小鼠进行血清细胞因子放血。与同种型\*\*p<0.01和\*\*\*p<0.0001相比,用单向ANOVA计算统计学显著性,n=每组7只小鼠。数据表示3个实验。
- [0071] 图9E提供了示出PSMAxCD28双特异性抗体增强由PSMAxCD3诱导的T细胞活化的图和绘图。
- [0072] 图10示出,PSMA x CD28双特异性抗体或亲本CD28二价抗体在CD3/CD28/PSMA人源化小鼠中不诱导血清细胞因子产生。
- [0073] 图11示出,CD28超激动剂治疗在移植了PBMC的NSG小鼠中会在4小时内驱动细胞因子应答,而抗CD28抗体mAb14226P2不驱动细胞因子应答。
- [0074] 图12示出了本发明的共刺激双特异性抗原结合分子的潜在更安全的毒理学特征。抗CD28 x抗PSMA并未引起细胞因子应答,而抗CD3 x抗PSMA引起了细胞因子应答。
- [0075] 图13A和13B示出,与PSMA x CD3和CD28超激动剂相比,PSMA x CD28并未示出细胞因子产生或T细胞边缘化。LLOQ:“定量下限”。
- [0076] 图14和17示出TSAxCD28和PD-1阻断活化了肿瘤部位处T细胞上的TCR/CD3和CD28。图15、16和18示出TSAxCD28双特异性和PD-1阻断协同促进体外T细胞活化。在图14-18中,T细胞(Jurkat/PD-1)和靶细胞(Raji WT)在存在非阻断剂PD-1 mAb(NB PD-1 mAb)或阻断剂(PD-1 mAb)和CD20xCD3双特异性的情况下缀合。
- [0077] 图14提供了示出免疫突触处PD-1和CD28定位的定量的条形图。用未配对t检验来计算统计学显著性(不显著,ns)。为了定量免疫突触处的PD-1和CD28定位,拍摄了T细胞(Jurkat/PD-1)和靶细胞(Raji WT)缀合物在存在非阻断剂PD-1 mAb(NB PD-1 mAb)或阻断剂(PD-1 mAb)和抗CD20xCD3双特异性抗体的情况下的图像。用Alexa647直接标记PD-1 mAbs,用Alexa488直接标记抗CD20xCD3双特异性抗体,用PE直接标记CD28 mAb,并且用Hoechst 33342染色细胞核(图像未示出)。

[0078] 图15提供了示出免疫突触处PD-1和CD28定位的定量的条形图。用未配对t检验来计算统计学显著性 ( $p < 0.0001$ , \*\*\*\*)。为了定量免疫突触处的PD-1和CD28定位,拍摄了T细胞 (Jurkat/PD-1) 和靶细胞 (Raji/PD-L1) 缀合物在存在非阻断剂PD-1 mAb (NB PD-1 mAb) 或阻断剂 (PD-1 mAb) 和抗CD20xCD3双特异性抗体的情况下的图像。用Alexa647直接标记PD-1 mAbs (用红色示出),用Alexa488直接标记CD20xCD3 (用绿色示出),用PE直接标记CD28 mAb (用蓝色示出),并且用Hoechst 33342染色细胞核 (用灰色示出)。虚线是基于明场图像绘制的细胞轮廓。

[0079] 图16示出了22RV1-PDL1细胞在96小时处的生存力百分比 (%)。

[0080] 图17是示出在96小时处上清液中IFN  $\gamma$  水平的图。

[0081] 图18是示出在96小时处IL-2释放的图。

[0082] 图19A-19D示出,肿瘤细胞上CD28配体 (CD86) 的表达与抗PD1治疗协同作用,以诱导CD8依赖性抗肿瘤免疫。用CD28、CD86 (MC38/CD86) 或空载体对照 (MC38/EV) 的配体来转导MC38肿瘤细胞。最初,向WT C57BL6小鼠植入每只小鼠 $1 \times 10^6$ 个肿瘤细胞,并且在肿瘤植入后第0天、第3天、第7天、第10天和第14天以5mg/kg用PD-1 mAb或大鼠同种型对照进行治疗。

[0083] 图19A示出了平均肿瘤体积随时间的变化。误差条表示 $\pm$  SEM。用双向ANOVA和Tukey的多重比较检验来确定统计学显著性。

[0084] 图19B示出了存活率随时间的变化 (肿瘤 $< 2000 \text{mm}^3$ 的小鼠的百分比)。用对数秩 (Mantel-Cox) 检验来确定植入后第60天的统计学显著性。

[0085] 在图19C中,用CD8耗竭性抗体 (CD8耗竭) 或同种型对照 (无耗竭) 来治疗小鼠。在CD8耗竭的情况下随时间变化的平均肿瘤体积 (虚线),以及无耗竭情况下随时间变化的平均肿瘤体积 (实线) 被示为 $\pm$  SEM。用双向ANOVA和Tukey的多重比较检验来确定统计学显著性。

[0086] 图19D示出了植入了MC38/CD86并用PD1 mAb治疗的无肿瘤小鼠的第二次肿瘤植入 (再次攻击)。

[0087] 在图19A-19D中,所示的数据来自每组10只小鼠的1个实验。数据表示至少4个独立实验。指定了统计学显著性 (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ 和\*\*\*\* $p < 0.0001$ )。

[0088] 图20、21A、22、24和25示出,PSMAxCD28与PD1 mAb治疗协同作用以诱导抗肿瘤免疫。将MC38/hPSMA肿瘤细胞皮下植入hCD3/hCD28/hPSMA小鼠中。PSMAxCD28双特异性抗体、PD-1 mAb或大鼠IgG2a同种型对照以每个5mg/kg的剂量通过腹膜内注射作为单一疗法施用或联合施用。图21B和21C示出,PSMAxCD28和PD-1 mAb的组合增加了肿瘤特异性T细胞的频率。图23A和23B示出PSMA x CD28与抗PD1治疗协同作用以诱导肿瘤内细胞因子,但不诱导脾细胞因子或全身细胞因子。

[0089] 图20A-20E示出,立即用抗PSMA x抗CD28抗体进行治疗会增强肿瘤部位的免疫力,并且与抗PD-1抗体协同作用以促进肿瘤排斥。图20A示出了平均肿瘤体积随时间的变化。误差条表示 $\pm$  SEM。用双向ANOVA和Tukey的多重比较检验来确定统计学显著性 (\*\*\*,  $p < 0.001$ 和\*\*\*\*,  $p < 0.0001$ )。图20B示出了存活率随时间的变化 (对肿瘤 $> 2000 \text{mm}^3$ 的小鼠实施安乐死)。用对数秩 (Mantel-Cox) 检验来确定统计学显著性 (\*\*,  $p < 0.01$ )。图20C示出了植入后第21天的平均肿瘤体积。误差条表示 $\pm$  SEM。用单向ANOVA和Holm-Sidak多重比较检验来确定统计学显著性 (\*\*\*\*,  $p < 0.0001$ )。图20D示出了植入后第21天的肿瘤体积 ( $\text{mm}^3$ ) 的

表。图20E示出了来自6个独立实验的每组的无肿瘤小鼠数量的表格。

[0090] 图21A示出了先前用PSMAxCD28和PD1 mAb组合治疗的无肿瘤小鼠的第二次肿瘤攻击。误差条表示 $\pm$ -SEM,数据表示4个实验。

[0091] 图21B示出了植入CD3/CD28/PSMA人源化小鼠中并在植入后第10天和第14天用5mg/kg的同种型对照、PSMAxCD28、PD1 mAb或组合进行治疗的MC38/PSMA肿瘤细胞。在第17天收获脾脏。将脾细胞在含有10mg/ml肽(p15E或OVA)和2mg/ml抗CD28的T细胞培养基中培养过夜。过夜孵育之后,按照标准程序执行细胞内细胞因子染色。

[0092] 图21C示出,来自抗CD28 x PSMA和抗PD1治疗但未进行抗CD28 x PSMA和抗CD3 x PSMA治疗的无肿瘤小鼠排斥第二次肿瘤再次攻击。

[0093] 图22A-22D、24和25示出了延迟/治疗性治疗方案(剂量由箭头指示);图22A和22B为第9天、第16天和第22天;图24和25为第7天、第11天和第14天。

[0094] 图22A示出了平均肿瘤体积随时间的变化。误差条表示 $\pm$ -SEM。用双向ANOVA和Tukey的多重比较检验来确定统计学显著性。数据表示3个实验。

[0095] 图22B示出了离体脾细胞因子和肿瘤内细胞因子。点表示来自单只小鼠的数据。条为平均值 $\pm$ -SEM。

[0096] 图22C示出了第20天的平均肿瘤大小。

[0097] 图22D示出了接受不同治疗的小鼠的存活率。

[0098] 图23A和23B示出,PSMA x CD28与抗PD1治疗协同作用以诱导肿瘤内细胞因子,但不诱导脾细胞因子或全身细胞因子。

[0099] 在图23A中,数据对应于图22B。离体脾细胞因子和肿瘤内细胞因子。点表示来自单只小鼠的数据。条为平均值 $\pm$ -SEM。

[0100] 在图23B中,向CD3/CD28/PSMA三重人源化小鼠植入MC38/hPSMA,并且在第0天用5mg/kg的指定抗体进行治疗。在给药后4小时对小鼠进行放血,并收集血清。在图23A和23B中,均用单向ANOVA和Tukey的多重比较检验来计算统计学显著性。 $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $****p < 0.0001$

[0101] 图24示出了来自引流淋巴结(dLN)、脾脏(Sp)和肿瘤(Tu)的T细胞亚群上的PD1表达。点表示来自单只小鼠的数据。条为平均值 $\pm$ -SEM。

[0102] 图25示出了来自指定治疗组的C1和C2中的CD8 T细胞的频率。

[0103] 图22B、24和25中的数据各自来自1个实验。图22B和24,  $n =$  每组4-6只小鼠。图25,  $n =$  每组10只小鼠。

[0104] 图26A-26C和27示出与食蟹猴中的CD28超激动剂相比,单独的或与PD1疗法组合的TAAxCD28不会诱导全身性T细胞活化。用指定剂量(如所指示的1或10mg/kg)的单剂量双特异性抗体来治疗食蟹猴。给药后指定时间(小时)。

[0105] 图26A示出了血清细胞因子。

[0106] 图26B示出了相对外周血T细胞计数。

[0107] 图26C示出了Ki67<sup>+</sup>和ICOS<sup>+</sup> T细胞的频率(CD3的百分比)。

[0108] 在图26A-26C中,值表示平均值 $\pm$ -SEM。 $N =$  每组3只动物。

[0109] 图27示出,用单剂量抗体(如所指示的0.25或2.5mg/kg)来治疗CD3/CD28/PSMA三重人源化小鼠。在给药后4小时(第0天)对小鼠进行放血,并收集血清。用单向ANOVA和Holm-

Sidak的多重比较检验来计算统计学显著性。 $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.0001$

[0110] 图28示出,PSMA x CD28+/-PD1并未升高荷瘤小鼠的血清细胞因子。

[0111] 29A和29B示出单独的或与PD1 mAb组合的PSMAxCD28在非荷瘤小鼠体内示出安全的细胞因子分布。数据与图27中的数据对应。用单剂量抗体(如所指示的0.25或2.5mg/kg)来治疗CD3/CD28/PSMA三重人源化小鼠。在给药后4小时(第0天)和72小时(第3天)对小鼠进行放血,并收集血清。用单向ANOVA和Holm-Sidak的多重比较检验来计算统计学显著性。 $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.0001$

### 具体实施方式

[0112] 在描述本发明之前,应当理解本发明不限于所描述的具体方法和实验条件,因为此类方法和条件可以变化。还应当理解的是,本文使用的术语仅出于描述具体实施例的目的,而并不旨在进行限制,因为本发明的范围仅由所附权利要求限定。

[0113] 除非另外定义,否则本文所使用的所有技术术语和科学术语均具有与本发明所属领域普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。如本文所使用的,当用于提及具体所列举的数值时,术语“约”意指数值可以与所列举的值相差不超过1%。例如,如本文所使用的,表述“约100”包含99和101以及介于两者之间的所有值(例如,99.1、99.2、99.3、99.4等)。

[0114] 尽管在本发明的实践或测试中可以使用类似于或等同于本文所述的方法和材料的任何方法和材料,但现在描述了优选的方法和材料。本说明书中提及的所有专利、申请和非专利出版物均通过引用整体并入本文。

[0115] 定义

[0116] 如本文所使用的,表述“CD28”是指作为共刺激受体在T细胞上表达的抗原。人CD28包括如SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列,和/或具有如NCBI登录号NP\_006130.1中所示的氨基酸序列。本文对蛋白质、多肽和蛋白质片段的所有提及旨在指代相应蛋白质、多肽或蛋白质片段的人类形式,除非明确指出其来自非人物种。因此,表述“CD28”意指人CD28,除非指定为来自非人物种,例如,“小鼠CD28”、“猴子CD28”等。

[0117] 如本文所使用的,“结合CD28的抗体”或“抗CD28抗体”包含特异性识别单体CD28的抗体及其抗原结合片段,以及特异性识别二聚体CD28的抗体及其抗原结合片段。本发明的抗体及抗原结合片段可以结合可溶性CD28和/或在细胞表面表达的CD28。可溶性CD28包含天然CD28蛋白以及重组CD28蛋白变体,如例如单体和二聚体CD28构建体,其缺乏跨膜结构域或以其它方式与细胞膜无关。

[0118] 如本文所使用的,表述“在细胞表面表达的CD28”意指在体外或体内在细胞表面上表达的一种或多种CD28蛋白,使得CD28蛋白的至少一部分暴露于细胞膜的细胞外侧的并且可被抗体的抗原结合部分接近。“在细胞表面表达的CD28”包含在细胞的膜中的功能性T细胞共刺激受体的背景下所含有的CD28蛋白。表述“在细胞表面表达的CD28”包含在细胞表面上作为同源二聚体的一部分表达的CD28蛋白。“在细胞表面表达的CD28”可以包括在通常表达CD28蛋白的细胞表面上表达的CD28蛋白或由其组成。可替代地,“在细胞表面表达的CD28”可以包括在这样一种细胞表面上表达的CD28蛋白或由其组成,所述细胞通常在其表面上不表达人CD28,但已被人工工程化为在其表面上表达CD28。

[0119] 如本文所使用的,表述“抗CD28抗体”包含具有单一特异性的单价抗体,以及包括

结合CD28的第一臂和结合第二(靶)抗原的第二臂的双特异性抗体,其中抗CD28臂包括如本文表1中所示的HCVR/LCVR或CDR序列中的任何一个。抗CD28双特异性抗体的实例在本文的其它地方描述。术语“抗原结合分子”包含抗体以及抗体的抗原结合片段,包含例如,双特异性抗体。

[0120] 如本文所使用的,术语“抗体”意指包括与特定抗原(例如,CD28)特异性结合或相互作用的至少一个互补决定区(CDR)的任何抗原结合分子或分子复合物。术语“抗体”包含免疫球蛋白分子,所述免疫球蛋白分子包括四条多肽链、通过二硫键相互连接的两条重(H)链和两条轻(L)链以及其多聚体(例如,IgM)。每条重链包括重链可变区(在本文中缩写为HCVR或V<sub>H</sub>)和重链恒定区。重链恒定区包括三个结构域C<sub>H</sub>1、C<sub>H</sub>2和C<sub>H</sub>3。每条轻链包括轻链可变区(在本文中缩写为LCVR或V<sub>L</sub>)和轻链恒定区。轻链恒定区包括一个结构域(C<sub>L</sub>1)。可以将V<sub>H</sub>区和V<sub>L</sub>区进一步细分为被称作互补决定区(CDR)的高变区,其间散布着更保守的被称作骨架区(FR)的区域。每个V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>包括三个CDR和四个FR,按以下顺序从氨基端到羧基端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本发明的不同实施例中,抗CD28抗体(或其抗原结合部分)的FR可以与人种系序列相同,或者可以是天然的或经人工修饰的。可以基于两个或更多个CDR的并列分析来定义氨基酸共有序列。

[0121] 如本文所使用的,术语“抗体”还包含完整抗体分子的抗原结合片段。如本文所使用的,术语抗体的“抗原结合部分”、抗体的“抗原结合片段”等包含任何天然存在的、可酶促获得的、合成的或基因工程化的多肽或糖蛋白,其特异性结合抗原以形成复合物。抗体的抗原结合片段可以例如使用任何合适的标准技术(如蛋白水解消化或重组基因工程技术,所述技术涉及操纵和表达编码抗体可变结构域以及任选的恒定结构域的DNA)衍生自完整抗体分子。这种DNA是已知的和/或易于从例如商业来源、DNA文库(包含例如,噬菌体-抗体文库)获得,或可以合成。可以通过化学方法或通过分子生物学技术对DNA进行测序和操作,例如,将一个或多个可变结构域和/或恒定结构域排列成合适的构型、或引入密码子、产生半胱氨酸残基、修饰、添加或缺失氨基酸等。

[0122] 抗原结合片段的非限制性实例包含:(i) Fab片段;(ii) F(ab')<sub>2</sub>片段;(iii) Fd片段;(iv) Fv片段;(v) 单链Fv(scFv)分子;(vi) dAb片段;以及(vii) 由模拟抗体的高变区的氨基酸残基组成的最小识别单位(例如,分离的互补决定区(CDR),如CDR3肽)或受约束的FR3-CDR3-FR4肽。如本文所使用的,表述“抗原结合片段”还涵盖其它工程化的分子,如结构域特异性抗体、单结构域抗体、结构域缺失抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、双抗体、三抗体、四抗体、微抗体、纳米抗体(例如,单价纳米抗体、二价纳米抗体等)、小模块免疫药物(SMIP)和鲨鱼可变IgNAR结构域。

[0123] 抗体的抗原结合片段通常包括至少一个可变结构域。可变结构域可以具有任何大小或氨基酸组成,并且将通常包括与一个或多个框架序列相邻或在所述框架内的至少一个CDR。在具有与V<sub>L</sub>结构域相关联的V<sub>H</sub>结构域的抗原结合片段中,V<sub>H</sub>结构域和V<sub>L</sub>结构域可以以任何合适的布置相对于彼此定位。例如,可变区可以是二聚体,并且含有V<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>、V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>或V<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>二聚体。可替代地,抗体的抗原结合片段可以含有单体V<sub>H</sub>或V<sub>L</sub>结构域。

[0124] 在某些实施例中,抗体的抗原结合片段可以含有至少一个与至少一个恒定结构域共价连接的可变结构域。可以在本发明的抗体的抗原结合片段内发现的可变结构域和恒定结构域的非限制性示例性构型包含:(i) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1;(ii) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>2;(iii) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>3;(iv) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2;

(v)  $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$ ; (vi)  $V_H-C_H2-C_H3$ ; (vii)  $V_H-C_L$ ; (viii)  $V_L-C_H1$ ; (ix)  $V_L-C_H2$ ; (x)  $V_L-C_H3$ ; (xi)  $V_L-C_H1-C_H2$ ; (xii)  $V_L-C_H1-C_H2-C_H3$ ; (xiii)  $V_L-C_H2-C_H3$ ; 和 (xiv)  $V_L-C_L$ 。在可变结构域和恒定结构域的任何构型中(包含上文所列出的示例性构型中任何一种),可变结构域和恒定结构域可以彼此直接连接或可以通过完整或部分的铰链或连接子区域连接。铰链区可以由至少2个(例如,5个、10个、15个、20个、40个、60个或更多个)氨基酸组成,所述氨基酸导致单个多肽分子中相邻可变结构域和/或恒定结构域之间的柔性或半柔性连接。此外,抗原结合片段可以包括上文所列出的可变结构域和恒定结构域构型中的任何一个的同源二聚体或异源二聚体(或其它多聚体),其彼此和/或与一个或多个单体 $V_H$ 或 $V_L$ 结构域非共价缔合(例如,通过一个或多个二硫键)。

[0125] 与完整抗体分子一样,抗原结合片段可以是单特异性的或多特异性的(例如,双特异性的)。抗体的多特异性抗原结合片段通常包括至少两个不同的可变结构域,其中每个可变结构域能够与单独的抗原或同一抗原上的不同表位特异性结合。可以使用本领域可用的常规技术将任何多特异性抗体形式(包含本文公开的示例性双特异性抗体形式)适用于本发明抗体的抗原结合片段背景下。

[0126] 本发明的抗体可以通过补体依赖性细胞毒性反应(CDC)或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性反应(ADCC)起作用。“补体依赖性细胞毒性反应”(CDC)是指在存在补体的情况下本发明的抗体对表达抗原的细胞的裂解。“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性反应”(ADCC)是指细胞介导的反应,其中表达Fc受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞(例如,自然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)识别靶细胞上的结合抗体,并且从而导致靶细胞的裂解。可以使用本领域熟知和可用的测定法来测量CDC和ADCC。(参见例如,美国专利第5,500,362号和第5,821,337号以及Clynes等人,(1998),《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.)》(USA)95:652-656)。抗体的恒定区对于抗体固定补体和介导细胞依赖性细胞毒性的能力是重要的。因此,可以基于抗体是否需要介导细胞毒性来选择抗体的同种型。

[0127] 在本发明的某些实施例中,本发明的抗CD28抗体(单特异性或双特异性)是人抗体。如本文所使用的,术语“人抗体”旨在包含具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人抗体可以包含并非由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变而引入的突变),例如在CDR中,特别是在CDR3中。然而,如本文所使用的,术语“人抗体”不旨在包含其中衍生自如小鼠等另一种哺乳动物物种的种系的CDR序列已经移植到人框架序列上的抗体。

[0128] 在一些实施例中,本发明的抗体可以是重组人抗体。如本文所使用的,术语“重组人抗体”旨在包含通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有人抗体,如使用转染到宿主细胞内的重组表达载体表达的抗体(在下文中进一步描述)、从重组的组合人抗体库中分离的抗体(在下文中进一步描述)、从人免疫球蛋白基因转基因动物(例如,小鼠)中分离的抗体(参见例如,Taylor等人,(1992),《核酸研究(Nucl.Acids Res.)》,20:6287-6295)或通过任何其它方式制备、表达、产生或分离的抗体,所述其它方式涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接到其它DNA序列上。此类重组人抗体具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而,在某些实施例中,此类重组人抗体经历体外诱变(或,当使用人Ig序列转基因动物时,经历体内体细胞诱变),并且因此重组抗体的 $V_H$ 区和 $V_L$ 区的氨基酸序列是如下序列:虽

然衍生自人种系 $V_H$ 序列和 $V_L$ 序列并与之相关,但在体内可能并非天然存在于人抗体种系库中。

[0129] 人抗体可以以与铰链异质性相关的两种形式存在。在一种形式中,免疫球蛋白分子包括约150-160kDa的稳定四链构建体,其中二聚体通过链间重链二硫键保持在一起。在第二种形式中,二聚体不通过链间二硫键连接,并且形成约75-80kDa的分子(半抗体),其包括共价偶联的轻链和重链。即使在亲和纯化之后,这些形式也极难分离。

[0130] 以各种完整IgG同种型形式出现第二种形式的频率基于但不限于与抗体的铰链区同种型相关的结构差异。人IgG4铰链的铰链区中的单个氨基酸取代可以将第二种形式的出现(Angal等人,(1993),《分子免疫学(Molecular Immunology)》30:105)显著降低到通常使用人IgG1铰链所观察到的水平。本发明涵盖在铰链区、CH2区或CH3区具有一个或多个突变的抗体,所述突变可能是例如在生产中所期望的,以便提升期望的抗体形式的产率。

[0131] 本发明的抗体可以是分离的抗体。如本文所使用的,“分离的抗体”意指已经从其天然环境的至少一种组分中鉴定和分离和/或回收的抗体。例如,已经从生物体的至少一种组分,或从天然存在或天然产生抗体的组织或细胞中分离或除去的抗体是用于本发明的目的的“分离的抗体”。分离的抗体还包含重组细胞内的原位抗体。分离的抗体是已经经历至少一个纯化或分离步骤的抗体。根据某些实施例,分离的抗体可以基本上不含其它细胞材料和/或化学物质。

[0132] 本发明还包含结合CD28单臂抗体。如本文所使用的,“单臂抗体”意指包括单抗体重链和单抗体轻链的抗原结合分子。本发明的单臂抗体可以包括表2中所示的HCVR/LCVR或CDR氨基酸序列中的任何一个。

[0133] 与衍生抗原结合蛋白或抗原结合结构域的对种系序列相比,本文的抗CD28抗体或其抗原结合结构域可以在重链和轻链可变结构域的框架和/或CDR区中包括一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失。通过将本文公开的氨基酸序列与可从例如公共抗体序列数据库获得的种系序列进行比较,可以容易地确定此类突变。本发明包含衍生自本文公开的氨基酸序列中的任何一个的抗体及其抗原结合结构域,其中一个或多个框架和/或CDR区内的一个或多个氨基酸突变为衍生抗体的种系序列的一个或多个对应的残基、或突变为另一个人种系序列的一个或多个对应的残基、或突变为一个或多个对应的种系残基的保守氨基酸取代(此类序列变化在本文中统称为“种系突变”)。从本文公开的重链和轻链可变区序列开始,本领域普通技术人员可以容易地产生包括一个或多个个体种系突变或其组合的许多抗体和抗原结合片段。在某些实施例中, $V_H$ 结构域和/或 $V_L$ 结构域内的框架和/或CDR残基全部突变回在衍生抗体的原始种系序列中所发现的残基。在其它实施例中,仅将某些残基突变回原始种系序列,例如,仅在FR1的前8个氨基酸内或在FR4的最后8个氨基酸内发现的突变后的残基,或仅在CDR1、CDR2或CDR3内发现的突变后的残基。在其它实施例中,一个或多个框架和/或CDR残基中的一个或多个突变为不同种系序列(即,与最初衍生抗体的种系序列不同的种系序列)的一个或多个对应的残基。此外,本发明的抗体或其抗原结合结构域可以含有框架和/或CDR区内的两个或更多个种系突变的任何组合,例如,其中某些个体残基突变为特定种系序列的对应残基,而与原始种系序列不同的某些其它残基可以维持不变或突变为不同种系序列的对应残基。一旦获得,可以容易地测试含有一个或多个种系突变的抗体或其抗原结合片段的一种或多种期望的特性,如改善的结合特异性、增加的结合亲和力、

改善或增强的拮抗或激动性生物学特性(视情况而定)、降低的免疫原性等。以这种通用方式获得的抗体或其抗原结合片段涵盖在本发明内。

[0134] 本发明还包含抗CD28抗体和抗原结合分子,其包括本文公开的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中的任何一个的变体。包含在本发明的此方面内的示例性变体包含具有一个或多个保守取代的本文公开的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中的任何一个的变体。例如,本发明包含具有HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列的抗CD28抗体和抗原结合分子,相对于如本文表1中所示的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中的任何一个,所述HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列具有例如,10个或更少、8个或更少、6个或更少、4个或更少等的保守氨基酸取代。

[0135] 术语“表位”是指与被称为互补位的抗体分子的可变区中的特定抗原结合位点相互作用的抗原决定簇。单个抗原可以具有多于一个表位。因此,不同的抗体可以结合抗原上的不同区域,并且可以具有不同的生物学效应。表位可以是构象的或线性的。构象表位通过来自线性多肽链的不同区段的空间并列的氨基酸产生。线性表位是由多肽链中的相邻氨基酸残基产生的表位。在某些情况下,表位可以包含抗原上的糖、磷酸基或磺酰基的部分。

[0136] 当提及核酸或其片段时,术语“基本同一性”或“基本上相同”表示当通过适当的核苷酸插入或缺失与另一个核酸(或其互补链)进行最佳比对时,核苷酸序列同一性为核苷酸碱基的至少约95%,并且更优选地,至少约96%、97%、98%或99%,如通过如FASTA、BLAST或Gap等任何众所周知的序列同一性算法所测量的,如以下所讨论的。在某些情况下,具有与参考核酸分子基本同一性的核酸分子可以编码具有与由参考核酸分子编码的多肽相同或基本上类似的氨基酸序列的多肽。

[0137] 当应用于多肽时,术语“基本相似性”或“基本上类似”意指当如通过使用默认间隙权重的程序GAP或BESTFIT进行最佳比对时,两个肽序列共享至少95%的序列同一性,甚至更优选地,至少98%或99%的序列同一性。优选地,不相同的残基位置因保守氨基酸取代而不同。“保守氨基酸取代”是一个氨基酸残基被具有化学特性(例如,电荷或疏水性)类似的侧链(R基团)的另一个氨基酸残基取代的氨基酸取代。通常,保守氨基酸取代不会实质上改变蛋白质的功能特性。在两个或更多个氨基酸序列因保守取代而彼此不同的情况下,可以向上调整序列同一性百分比或相似性程度,以校正取代的保守性质。用于作出此调整的方法是本领域技术人员所熟知的。参见例如,Pearson(1994)《分子生物学方法(Methods Mol.Biol.)》24:307-331。具有化学特性类似的侧链的氨基酸基团的实例包含(1)脂肪族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;(2)脂肪族羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;(3)含酰胺的侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;(4)芳香族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;(5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;(6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸,以及(7)含硫侧链是半胱氨酸和蛋氨酸。优选的保守氨基酸取代基是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。可替代地,保守替代是在以下文献中公开的PAM250对数似然矩阵中具有正值的任何变化:Gonnet等人(1992)《科学(Science)》256:1443-1445。“适度保守”替代是PAM250对数似然矩阵中具有非负值的任何变化。

[0138] 通常使用序列分析软件来测量多肽的序列相似性,也被称为序列同一性。蛋白质分析软件使用分配给各种取代、缺失和其它修饰(包含保守氨基酸取代)的相似性度量来匹

配类似的序列。例如,GCG软件含有如Gap和Bestfit等程序,所述程序可以与默认参数一起使用,以确定紧密相关的多肽(如来自不同生物体物种的同源多肽)之间或野生型蛋白质与其突变蛋白之间的序列同源性或序列同一性。参见例如,6.1版GCG。还可以使用使用默认或推荐的参数的FASTA(6.1版GCG中的程序)来比较多肽序列。FASTA(例如,FASTA2和FASTA3)提供了查询序列与搜索序列之间的最佳重叠区域的比对和序列同一性百分比(Pearson(2000),同上文)。当将本发明的序列与含有大量来自不同生物体的序列的数据库进行比较时,另一个优选的算法是使用默认参数的计算机程序BLAST,尤其是BLASTP或TBLASTN。参见例如,Altschul等人(1990)《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》215:403-410以及Altschul等人(1997)《核酸研究》25:3389-402。

[0139] 双特异性抗原结合分子

[0140] 本发明的抗体可以是单特异性的、双特异性的或多特异性的。多特异性抗体可以对一种靶多肽的不同表位具有特异性,或者可以含有对多于一种靶多肽具有特异性的抗原结合结构域。参见例如,Tutt等人,1991,《免疫学期刊(J.Immunol.)》147:60-69;Kufer等人,2004,《生物科技趋势(Trends Biotechnol.)》22:238-244。本发明的抗CD28抗体可以与另一种功能分子(例如,另一种肽或蛋白质)连接或共表达。例如,抗体或其片段可以与一个或多个其它分子实体(如另一个抗体或抗体片段)功能性连接(例如,通过化学偶联、遗传融合、非共价缔合或以其它方式),以产生具有第二结合特异性的双特异性或多特异性抗体。

[0141] 本文使用的表述“抗CD28抗体”旨在包含单特异性抗CD28抗体以及包括CD28结合臂和结合靶抗原的第二臂的双特异性抗体。因此,本发明包含双特异性抗体,其中免疫球蛋白的一个臂结合人CD28,并且免疫球蛋白的另一个臂对靶抗原具有特异性。CD28双特异性抗体的另一个臂所结合的靶抗原可以是在细胞、组织、器官、微生物或病毒上表达或在其附近表达的任何抗原,需要针对所述抗原的靶向性免疫应答。CD28结合臂可以包括如本文表1中所示的HCVR/LCVR或CDR氨基酸序列中的任何一个。在某些实施例中,CD28结合臂结合人CD28并诱导人T细胞增殖。

[0142] 在本发明的双特异性抗体的背景下,其中抗体的一个臂结合CD28,并且另一个臂结合靶抗原,所述靶抗原可以是肿瘤相关型抗原,如PSMA。

[0143] 根据某些示例性实施例,本发明包含特异性结合CD28和PSMA的双特异性抗原结合分子。此类分子在本文中可以被称为例如,“抗CD28/抗PSMA”或“抗CD28xPSMA”或“CD28xPSMA”或“抗PSMA/抗CD28”或“抗PSMAxCD28”或“PSMAxCD28”双特异性分子,或其它类似的术语。

[0144] 如本文所使用的,术语“PSMA”是指人PSMA蛋白,除非指定为来自非人物种(例如,“小鼠PSMA”、“猴子PSMA”等)。人PSMA蛋白具有SEQ ID NO:73所示的氨基酸序列,和/或具有NCBI登录号NP\_004467.1所示的氨基酸序列。

[0145] 根据图1所示的某些示例性实施例,双特异性抗原结合分子(例如,双特异性抗体)可以具有效应臂和靶向臂。效应臂可以是与效应细胞(例如,T细胞)上的抗原结合的第一抗原结合结构域(例如,抗CD28抗体)。靶向臂可以是与靶细胞(例如,肿瘤细胞)上的抗原结合的第二抗原结合结构域(例如,抗PSMA抗体)。根据某些示例性实施例,效应臂与CD28结合,并且靶向臂与PSMA结合。双特异性抗CD28/PSMA可以向效应细胞(例如,T细胞)提供共刺激信号。效应臂在没有聚集的情况下没有刺激T细胞的作用。在聚集时,单独的效应臂几乎没

有刺激T细胞的作用。效应臂通过与靶向臂组合来刺激T细胞。肿瘤靶向臂可以具有不完善的肿瘤特异性。作为靶向臂的靶标的抗原(例如,PSMA)可以在肿瘤细胞的一部分上表达。可以通过与抗CD3双特异性抗原结合分子(例如,抗CD3/PSMA双特异性抗体)的组合重叠来增加肿瘤靶向臂的特异性。

[0146] 如本文所使用的,表述“抗原结合分子”意指包括至少一个互补决定区(CDR)或由所述至少一个互补决定区组成的蛋白质、多肽或分子复合物,所述互补决定区单独地或与一个或多个另外的CDR和/或框架区(FR)组合地与特定抗原特异性结合。在某些实施例中,抗原结合分子是抗体或抗体的片段,如在本文其它地方定义的那些术语。

[0147] 如本文所使用的,表述“双特异性抗原结合分子”意指包括至少第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的蛋白质、多肽或分子复合物。双特异性抗原结合分子内的每个抗原结合结构域包括至少一个CDR,所述CDR单独地或与一个或多个另外的CDR和/或FR组合地与特定抗原特异性结合。在本发明的背景下,第一抗原结合结构域特异性结合第一个抗原(例如,CD28),并且第二抗原结合结构域特异性结合第二个不同抗原(例如,PSMA)。

[0148] 在本发明的某些示例性实施例中,双特异性抗原结合分子是双特异性抗体。双特异性抗体的每个抗原结合结构域包括重链可变结构域(HCVR)和轻链可变结构域(LCVR)。在包括第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的双特异性抗原结合分子(例如,双特异性抗体)的背景下,第一抗原结合结构域的CDR可以用前缀“D1”表示,并且第二抗原结合结构域的CDR可以用前缀“D2”表示。因此,第一抗原结合结构域的CDR在本文中可以被称为D1-HCDR1、D1-HCDR2和D1-HCDR3;并且第二抗原结合结构域的CDR在本文中可以被称为D2-HCDR1、D2-HCDR2和D2-HCDR3。

[0149] 第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域可以彼此直接或间接连接以形成本发明的双特异性抗原结合分子。可替代地,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域可以各自连接到单独的多聚化结构域。一个多聚化结构域与另一个多聚化结构域的缔合促进了两个抗原结合结构域之间的缔合,从而形成双特异性抗原结合分子。如本文所使用的,“多聚化结构域”是具有与具有相同或相似结构或构成的第二多聚化结构域缔合的能力的任何大分子、蛋白质、多肽、肽或氨基酸。例如,多聚化结构域可以是包括免疫球蛋白C<sub>H</sub>3结构域的多肽。多聚化组分的非限制性实例是免疫球蛋白的Fc部分(包括C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3结构域),例如,选自同种型IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的IgG以及每个同种型组内的任何同种型的Fc结构域。

[0150] 本发明的双特异性抗原结合分子通常包括两个多聚化结构域,例如,两个Fc结构域,其各自独立地是单独的抗体重链的一部分。第一多聚化结构域和第二多聚化结构域可以是同一IgG同种型,如例如IgG1/IgG1、IgG2/IgG2、IgG4/IgG4。可替代地,第一多聚化结构域和第二多聚化结构域可以是不同的IgG同种型,如例如IgG1/IgG2、IgG1/IgG4、IgG2/IgG4等。

[0151] 在某些实施例中,多聚化结构域是Fc片段或含有至少一个半胱氨酸残基的长度为1到约200个氨基酸的氨基酸序列。在其它实施例中,多聚化结构域是半胱氨酸残基或含半胱氨酸的短肽。其它多聚化结构域包含包括亮氨酸拉链、螺旋环基序或卷曲螺旋基序或由所述亮氨酸拉链、螺旋环基序或卷曲螺旋基序组成的肽或多肽。

[0152] 可以使用任何双特异性抗体形式或技术来制备本发明的双特异性抗原结合分子。

例如,具有第一抗原结合特异性的抗体或其片段可以与一个或多个其它分子实体(如具有第二抗原结合特异性的另一个抗体或抗体片段)功能性连接(例如,通过化学偶联、遗传融合、非共价缔合或以其它方式),以产生双特异性抗原结合分子。可以在本发明的背景下使用的具体示例性双特异性形式包含但不限于:例如,基于scFv的或双抗体双特异性形式、IgG-scFv融合、双可变结构域(OV0)-Ig、四体杂交瘤(Quadroma)、旋钮成孔(knobs-into-holes)、共同轻链(例如,具有旋钮成孔的共同轻链等)、CrossMab、CrossFab, (SEE0) body、亮氨酸拉链、Ouoobody、IgG1/IgG2、双作用Fab (OAF) -IgG以及Mab<sup>2</sup>双特异性形式(参加例如, Klein等人2012, mAbs 4:6, 1-11, 以及其中引用的参考文献, 用于回顾前述形式)。

[0153] 在本发明的双特异性抗原结合分子的背景下,与野生型、天然存在形式的Fc结构域相比,多聚化结构域(例如,Fc结构域)可以包括一个或多个氨基酸变化(例如,插入、缺失或取代)。例如,本发明包含双特异性抗原结合分子,其在Fc结构域中包括一个或多个修饰,从而产生在Fc与FcRn之间具有经修饰的结合相互作用(例如,增强或减弱)的经修饰的Fc结构域。在一个实施例中,双特异性抗原结合分子包括C<sub>H</sub>2区或C<sub>H</sub>3区中的修饰,其中所述修饰增加了Fc结构域在酸性环境中(例如,在pH范围为约5.5到约6.0的内体中)对FcRn的亲合力。此类Fc修饰的非限制性实例包含例如:第250位(例如,E或Q)处的修饰;第250位和第428位(例如,L或F)处的修饰;第252位(例如,LN/FIW或T)、第254位(例如,S或T)和第256位(例如,S/R/Q/E/EID或T)位处的修饰;或第428位和/或第433位(例如,UR/S/P/Q或K)和/或第434位(例如,H/F或V)处的修饰;或第250位和/或第428位处的修饰;或第307位或第308位(例如,308F、V308F)和第434位处的修饰。在一个实施例中,修饰包括428L(例如,M428L)和434S(例如,N434S)修饰;428L、259I(例如,V259I)和308F(例如,V308F)修饰;433K(例如,H433K)和434(例如,434Y)修饰;252、254和256(例如,252Y、254T和256E)修饰;250Q和428L修饰(例如,T250Q和M428L);以及307和/或308修饰(例如,308F或308P)。

[0154] 本发明还包含双特异性抗原结合分子,其包括第一C<sub>H</sub>3结构域和第二Ig C<sub>H</sub>3结构域,其中第一和第二C<sub>H</sub>3结构域彼此相差至少一个氨基酸,并且其中与缺乏氨基酸差异的双特异性抗体相比,所述至少一个氨基酸差异降低了双特异性抗体与蛋白A的结合。在一个实施例中,第一Ig C<sub>H</sub>3结构域结合蛋白A,并且第二Ig C<sub>H</sub>3结构域含有降低或消除蛋白A结合的突变,如H95R修饰(通过IMGT外显子编号;H435R,通过EU编号)。第二C<sub>H</sub>3可以进一步包括Y96F修饰(通过IMGT;Y436F,通过EU)。可以在第二CH3内找到的另外的修饰包含:在IgG1抗体的情况下,D16E、L18M、N44S、K52N、V57M和V82I(通过IMGT;D356E、L358M、N384S、K392N、V397M和V422I,通过EU);在IgG2抗体的情况下,N44S、K52N和V82I(IMGT;N384S、K392N和V422I,通过EU);以及在IgG4抗体的情况下,Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q和V82I(通过IMGT;Q355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q和V422I,通过EU)。

[0155] 在某些实施例中,Fc结构域可以是嵌合的,其组合衍生自多于一种免疫球蛋白同种型的Fc序列。例如,嵌合Fc结构域可以包括衍生自人IgG1区、人IgG2区或人IgG4 C<sub>H</sub>2区的C<sub>H</sub>2序列的部分或全部,以及衍生自人IgG1、人IgG2或人IgG4的C<sub>H</sub>3序列的部分或全部。嵌合Fc结构域还可以含有嵌合铰链区。例如,嵌合铰链可以包括衍生自人IgG1铰链区、人IgG2铰链区或人IgG4铰链区的“上铰链”序列,其与衍生自人IgG1铰链区、人IgG2铰链区或人IgG4铰链区的“下铰链”序列组合。可以包含在本文所示的任何抗原结合分子中的嵌合Fc结构域的具体实例包括,从N端到C端:[IgG4 C<sub>H</sub>1]-[IgG4上铰链]-[IgG2下铰链]-[IgG4 CH2]-

[1gG4 C<sub>H</sub>3]。可以包含在本文所示的任何抗原结合分子中的嵌合Fc结构域的另一个实例包括,从N端到C端:[1gG1 C<sub>H</sub>1]-[1gG1上铰链]-[1gG2下铰链]-[1gG4 C<sub>H</sub>2]-[1gG1 C<sub>H</sub>3]。WO2014/022540 A1中描述了可以包含在本发明的任何抗原结合分子中的嵌合Fc结构域的这些和其它实例,具有这些一般结构布置的嵌合Fc结构域及其变体可以具有改变的Fc受体结合,这反过来影响Fc效应功能。

#### [0156] 序列变体

[0157] 与衍生单个抗原结合结构域的对号种系序列相比,本发明的抗体和双特异性抗原结合分子可以在重链和轻链可变结构域的框架和/或CDR区中包括一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失。通过将本文公开的氨基酸序列与可从例如公共抗体序列数据库获得的种系序列进行比较,可以容易地确定此类突变。本发明的抗原结合分子可以包括衍生自本文公开的示例性氨基酸序列中的任何一个的抗原结合片段,其中一个或多个框架和/或CDR区内的一个或多个氨基酸突变为衍生抗体的种系序列的一个或多个对应的残基、或突变为另一个人种系序列的一个或多个对应的残基、或突变为一个或多个对应的种系残基的保守氨基酸取代(此类序列变化在本文中统称为“种系突变”)。从本文公开的重链和轻链可变区序列开始,本领域普通技术人员可以容易地产生包括一个或多个个体种系突变或其组合的许多抗体和抗原结合片段。在某些实施例中,V<sub>H</sub>结构域和/或V<sub>L</sub>结构域内的框架和/或CDR残基全部突变回在最初衍生抗原结合结构域的原始种系序列中所发现的残基。在其它实施例中,仅将某些残基突变回原始种系序列,例如,仅在FR1的前8个氨基酸内或在FR4的最后8个氨基酸内发现的突变后的残基,或仅在CDR1、CDR2或CDR3内发现的突变后的残基。在其它实施例中,一个或多个框架和/或CDR残基中的一个或多个突变为不同种系序列(即,与最初衍生抗原结合结构域的种系序列不同的种系序列)的一个或多个对应的残基。此外,本发明的抗原结合结构域可以含有框架和/或CDR区内的两个或更多个种系突变的任何组合,例如,其中某些个体残基突变为特定种系序列的对应残基,而与原始种系序列不同的某些其它残基可以维持不变或突变为不同种系序列的对应残基。一旦获得,可以容易地测试含有一个或多个种系突变的抗原结合结构域的一种或多种期望的特性,如改善的结合特异性、增加的结合亲和力、改善或增强的拮抗或激动性生物学特性(视情况而定)、降低的免疫原性等。包括以这种通用方式获得的抗原结合结构域的双特异性抗原结合分子涵盖在本发明内。

[0158] 本发明还包含抗原结合分子,其中抗原结合结构域中的一个或两个包括具有一个或多个保守取代的本文公开的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中的任何一个的变体。例如,本发明包含抗原结合分子,其包括具有HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列的抗原结合结构域,相对于本文公开的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中的任何一个,所述HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列具有例如,10个或更少、8个或更少、6个或更少、4个或更少等的保守氨基酸取代。“保守氨基酸取代”是一个氨基酸残基被具有化学特性(例如,电荷或疏水性)类似的侧链(R基团)的另一个氨基酸残基取代的氨基酸取代。通常,保守氨基酸取代不会实质上改变蛋白质的功能特性。具有化学特性类似的侧链的氨基酸基团的实例包含(1)脂肪族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;(2)脂肪族羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;(3)含酰胺的侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;(4)芳香族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;(5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;(6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸,以及(7)含硫侧链是半胱氨酸和蛋氨酸。优选的保守氨基酸取代基是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖

氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。可替代地,保守替代是在以下文献中公开的PAM250对数似然矩阵中具有正值的任何变化:Gonnet等人(1992)《科学》,256:1443-1445。“适度保守”替代是PAM250对数似然矩阵中具有非负值的任何变化。

[0159] 本发明还包含抗原结合分子,其包括具有与本文公开的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中的任何一个基本相同的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列的抗原结合结构域。当提及氨基酸序列时,术语“基本同一性”或“基本上相同”意指当如通过使用默认间隙权重的程序GAP或BESTFIT进行最佳比对时,两个氨基酸序列共享至少95%的序列同一性,甚至更优选地,至少98%或99%的序列同一性。优选地,不相同的残基位置因保守氨基酸取代而不同。在两个或更多个氨基酸序列因保守取代而彼此不同的情况下,可以向上调整序列同一性百分比或相似性程度,以校正取代的保守性质。用于作出此调整的方法是本领域技术人员所熟知的。参见例如,Pearson(1994)《分子生物学方法》24:307-331。

[0160] 通常使用序列分析软件来测量多肽的序列相似性,也被称为序列同一性。蛋白质分析软件使用分配给各种取代、缺失和其它修饰(包含保守氨基酸取代)的相似性度量来匹配类似的序列。例如,GCG软件含有如Gap和Bestfit等程序,所述程序可以与默认参数一起使用,以确定紧密相关的多肽(如来自不同生物体物种的同源多肽)之间或野生型蛋白质与其突变蛋白之间的序列同源性或序列同一性。参见例如,6.1版GCG。还可以使用默认或推荐的参数的FASTA(6.1版GCG中的程序)来比较多肽序列。FASTA(例如,FASTA2和FASTA3)提供了查询序列与搜索序列之间的最佳重叠区域的比对和序列同一性百分比(Pearson(2000),同上文)。当将本发明的序列与含有大量来自不同生物体的序列的数据库进行比较时,另一个优选的算法是使用默认参数的计算机程序BLAST,尤其是BLASTP或TBLASTN。参见例如,Altschul等人(1990)《分子生物学杂志》215:403-410以及Altschul等人(1997)《核酸研究》25:3389-402。

[0161] pH依赖性结合

[0162] 本发明包含具有pH依赖性的结合特性的抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子。例如,与中性pH相比,本发明的抗CD28抗体在酸性pH下可以展现出与CD28的结合降低。可替代地,与中性pH相比,本发明的抗PSMA抗体在酸性pH下可以展现出与PSMA的结合增强。表述“酸性pH”包含小于约6.2(例如,约6.0、5.95、5.9、5.85、5.8、5.75、5.7、5.65、5.6、5.55、5.5、5.45、5.4、5.35、5.3、5.25、5.2、5.15、5.1、5.05、5.0或更小)的pH值。如本文所使用的,表述“中性pH”意指pH为约7.0到约7.4。表述“中性pH”包含约7.0、7.05、7.1、7.15、7.2、7.25、7.3、7.35和7.4的pH值。

[0163] 在某些情况下,“与中性pH相比,在酸性pH下的结合降低”是就在酸性pH下与其抗原结合的抗体的 $K_D$ 值与在中性pH下与其抗原结合的抗体的 $K_D$ 值的比率而言表述的(反之亦然)。例如,如果抗体或其抗原结合片段展现出约3.0或更大的酸性/中性 $K_D$ 比率,则出于本发明的目的可以认为抗体或其抗原结合片段展现出“与中性pH相比,在酸性pH下与CD28的结合降低”。在某些示例性实施例中,本发明的抗体或抗原结合片段的酸性/中性 $K_D$ 比率可以为约3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、13.5、14.0、14.5、15.0、20.0、25.0、30.0、40.0、50.0、60.0、70.0、100.0或更大。

[0164] 具有pH依赖性结合特性的抗体可以通过以下获得：例如，通过筛选与中性pH相比在酸性pH下与特定抗原的结合降低(或增强)的抗体群。另外，氨基酸水平上的抗原结合结构域的修饰可以产生具有pH依赖性特性的抗体。例如，通过用组氨酸残基取代抗原结合结构域(例如，在CDR内)的一个或多个氨基酸，可以获得在相对于中性pH的酸性pH下与抗原的结合降低的抗体。

[0165] 包括Fc变体的抗体

[0166] 根据本发明的某些实施例，提供了包括Fc结构域的抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子，所述Fc结构域包括一个或多个增强或减弱(例如，与中性pH相比，在酸性pH下)抗体与FcRn受体的结合的突变。例如，本发明包含在Fc结构域的C<sub>H</sub>2区或C<sub>H</sub>3区中包括突变的抗体和抗原结合分子，其中一个或多个突变增加Fc结构域在酸性环境中(例如，在pH范围为约5.5到约6.0的内体中)对FcRn的亲合力。当此类突变施用于动物时，其可以导致抗体的血清半衰期增加。此类Fc修饰的非限制性实例包含例如：第250位(例如，E或Q)处的修饰；第250位和第428位(例如，L或F)处的修饰；第252位(例如，L/Y/F/W或T)、第254位(例如，S或T)和第256位(例如，S/R/Q/E/D或T)处的修饰；或第428位和/或第433位(例如，H/L/R/S/P/Q或K)和/或第434位(例如，H/F或Y)处的修饰；或第250位和/或第428位处的修饰；或第307位或第308位(例如，308F、V308F)和第434位处的修饰。在一个实施例中，修饰包括428L(例如，M428L)和434S(例如，N434S)修饰；428L、259I(例如，V259I)和308F(例如，V308F)修饰；433K(例如，H433K)和434(例如，434Y)修饰；252、254和256(例如，252Y、254T和256E)修饰；250Q和428L修饰(例如，T250Q和M428L)；以及307和/或308修饰(例如，308F或308P)。

[0167] 例如，本发明包含包括Fc结构域的抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子，所述Fc结构域包括选自以下组成的组的一个或多个突变对或突变组：250Q和248L(例如，T250Q和M248L)；252Y、254T和256E(例如，M252Y、S254T和T256E)；428L和434S(例如，M428L和N434S)；以及433K和434F(例如，H433K和N434F)。前述Fc结构域突变的所有可能的组合和本文公开的抗体可变结构域内的其它突变都在本发明的范围内。

[0168] 抗体和抗原结合分子的生物学特性

[0169] 本发明包含以高亲和力结合人CD28/抗PSMA的抗体及其抗原结合片段。本发明还包含以中等或低亲和力结合人CD28/抗PSMA的抗体及其抗原结合片段，这取决于所期望的治疗背景和具体靶向特性。例如，在双特异性抗原结合分子的背景下，其中一个臂结合CD28而另一个臂结合靶抗原(例如，PSMA)，可能令人期望的是，靶抗原结合臂以高亲和力结合靶抗原，而抗CD28臂仅以中等或低亲和力结合CD28。以这种方式，可以实现抗原结合分子对表达靶抗原的细胞的优先靶向，同时避免一般/非靶向性CD28结合以及随之产生的与之相关的不良副作用。

[0170] 根据某些实施例，本发明包含抗体和抗体的抗原结合片段，其以小于约210nM的K<sub>D</sub>结合人CD28(例如，在25℃下)，如例如使用本文实例3中限定的测定形式通过表面等离子体共振所测量的。在某些实施例中，本发明的抗体或抗原结合片段以小于约150nM、小于约130nM、小于约120nM、小于约100nM、小于约50nM、小于约80nM、小于约60nM、小于约40nM或小于约30nM的K<sub>D</sub>结合CD28，如例如使用本文实例3中限定的测定形式或基本上类似的测定法通过表面等离子体共振所测量的。在某些实施例中，本发明的抗体或抗原结合片段以约30nM到约207nM之间的K<sub>D</sub>结合CD28。

[0171] 本发明还包含结合CD28的抗体及其抗原结合片段,其中解离半衰期( $t_{1/2}$ )大于约3.5分钟,如例如使用本文实例3中限定的测定形式或基本上类似的测定法在25°C或37°C下通过表面等离子体共振所测量的。在某些实施例中,本发明的抗体或抗原结合片段结合CD28,其中 $t_{1/2}$ 大于约5分钟、大于约10分钟、大于约20分钟、大于约30分钟、大于约40分钟、大于约50分钟、大于约60分钟、大于约70分钟、大于约80分钟、大于约90分钟、大于约100分钟、大于约200分钟、大于约300分钟、大于约400分钟、大于约500分钟、大于约600分钟、大于约700分钟、大于约800分钟、大于约900分钟、大于约1000分钟或大于约1200分钟,如例如使用本文实例3中限定的测定形式或基本上类似的测定法在25°C或37°C下通过表面等离子体共振所测量的。

[0172] 本发明包含能够同时与人CD28和人PSMA结合的双特异性抗原结合分子(例如,双特异性抗体)。根据某些实施例,本发明的双特异性抗原结合分子与表达CD28和/或PSMA的细胞特异性地相互作用。可以通过荧光活化细胞分选(FACS)评估双特异性抗原结合分子结合表达CD28和/或PSMA的细胞的程度,如本文实例4中所示。例如,本发明包含双特异性抗原结合分子,其特异性结合表达CD28但不表达PSMA的人细胞系(例如,被工程化为表达CD28的HEK293)以及表达PSMA但不表达CD28的人前列腺癌细胞系(例如,C4-2)。本发明包含结合上述细胞和细胞系中的任一种的双特异性抗原结合分子,其中 $EC_{50}$ 值为约 $9.6 \times 10^{-9}$ 到约 $3.5 \times 10^{-10}$ 或更小,如使用如实例4中所示的FACS测定法或基本上类似的测定法所确定的。

[0173] 本发明还提供了诱导或增加T细胞介导的肿瘤细胞杀伤的抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子。例如,本发明包含诱导或增加T细胞介导的肿瘤细胞杀伤的抗CD28xPSMA抗体,其中 $EC_{50}$ 小于约78pM,如例如使用本文实例6中限定的测定形式(例如,在存在抗CD28xPSMA抗体的情况下评估人PBMC对C4-2肿瘤细胞的杀伤程度)或基本上类似的测定法在体外T细胞介导的肿瘤细胞杀伤测定中所测量的。在某些实施例中,本发明的抗体或抗原结合片段诱导T细胞介导的肿瘤细胞杀伤(例如,PBMC介导的C4-2细胞杀伤),其中 $EC_{50}$ 值小于约40pM、小于约20pM、小于约16pM、小于约10pM、小于约5.0pM、小于约4.0pM、小于约3.0pM、小于约2.5pM、小于约2.0pM、小于约1.5pM或小于约1.45pM,如例如使用本文实例6中限定的测定形式或基本上类似的测定法通过体外T细胞介导的肿瘤细胞杀伤测定所测量的。

[0174] 本发明还包含与表达CD28的人T细胞结合的抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子,其中 $EC_{50}$ 值介于1.0pM与1000nM之间。在某些实施例中,抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子与表达CD28的人T细胞结合,其中 $EC_{50}$ 值介于48nM与180nM之间。例如,本发明包含与表达CD28的人T细胞结合的抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子,其中 $EC_{50}$ 值为约1pM、约10pM、约100pM、约500pM、约1nM、约2nM、约5nM、约10nM、约20nM、约30nM、约40nM、约50nM、约60nM、约70nM、约80nM、约90nM、约100nM、约200nM、约300nM、约500nM、约800nM、约1000nM或更多。

[0175] 本发明还包含抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子,其展现出一个或多个选自以下组成的组的特性:(a) 体外诱导T细胞增殖(参见例如,本文实例8);(b) 活化T细胞,诱导人PBMC中的CD25和PD-1上调(参见例如,本文实例8);(c) 增加人T细胞介导的对表达PSMA的细胞系的细胞毒性(参见例如,本文实例8);(d) 在表达PSMA的细胞系上诱导原始灵长类T细胞介导的细胞毒性(参见例如,本文实例8);(e) 耗竭小鼠中的肿瘤细胞(例如,本文实例

10) ; (f) 增强小鼠的肿瘤清除率(例如,本文实例10) ; (g) 不诱导细胞因子风暴(例如,本文实例10) ; (h) 在食蟹猴中不诱导全身性T细胞作用(例如,本文实例11) ; (i) 增强PD-1阻断对T细胞活化诱导的肿瘤细胞杀伤的影响(例如,本文实例13) ; (j) 增强记忆T细胞的扩增(例如,本文实例13)。

[0176] 本发明包含能够耗竭受试者中的肿瘤细胞的抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子(参见例如,实例8)。例如,根据某些实施例,提供了抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子,其中向受试者单次施用双特异性抗原结合分子(例如,以约0.1mg/kg、约0.08mg/kg、约0.06mg/kg、约0.04mg/kg、约0.04mg/kg、约0.02mg/kg、约0.01mg/kg或更少的剂量)导致受试者中肿瘤细胞数量的减少。

[0177] 表位作图和相关技术

[0178] 本发明的抗原结合分子所结合的CD28或PSMA上的表位可以由CD28蛋白或PSMA蛋白的3个或更多个(例如,3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或更多个)氨基酸的单个连续序列组成。可替代地,表位可以由CD28或PSMA的多个非连续氨基酸(或氨基酸序列)组成。本发明的抗体可以与CD28单体中含有的氨基酸相互作用,或者可以与CD28二聚体的两个不同CD28链上的氨基酸相互作用。如本文所使用的,术语“表位”是指与被称为互补位的抗体分子的可变区中的特定抗原结合位点相互作用的抗原决定簇。单个抗原可以具有多于一个表位。因此,不同的抗体可以结合抗原上的不同区域,并且可以具有不同的生物学效应。表位可以是构象的或线性的。构象表位通过来自线性多肽链的不同区段的空间并列的氨基酸产生。线性表位是由多肽链中的相邻氨基酸残基产生的表位。在某些情况下,表位可以包含抗原上的糖、磷酸基或磺酰基的部分。

[0179] 可以使用本领域普通技术人员已知的各种技术来确定抗体的抗原结合结构域是否在多肽或蛋白质内“与一个或多个氨基酸相互作用”。可以用于确定特定抗体或抗原结合结构域的表位或结合结构域的示例性技术包含例如:常规交叉阻断测定法,如在以下文献中描述的常规交叉阻断测定法:《抗体(Antibodies)》,Harlow和Lane(冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Press),冷泉港(Cold Spring Harb.),纽约(N.Y.));点诱变(例如,丙氨酸扫描诱变、精氨酸扫描诱变等);肽印迹分析(Reineke,2004,《分子生物学方法》248:443-463);蛋白酶保护;以及肽切割分析。另外,可以采用如表位切除、表位提取及抗原的化学修饰等方法(Tomer,2000,《蛋白质科学(Protein Science)》,9:487-496)。可以用于鉴定与抗体相互作用的多肽内的氨基酸的另一种方法是通过质谱法检测的氢/氘交换。一般而言,氢/氘交换方法涉及对所关注的蛋白质进行氘标记,然后将抗体与经氘标记的蛋白质结合。接下来,将蛋白质/抗体复合物转移到水中,以允许在除抗体保护的残基(其保持为经氘标记的)之外的所有残基处发生氢-氘交换。在解离抗体后,对靶蛋白进行蛋白酶切割和质谱分析,从而揭示对应于与抗体相互作用的特定氨基酸的经氘标记的残基。参见例如,Ehring(1999)《分析生物化学(Analytical Biochemistry)》,267(2):252-259;Engen和Smith(2001)《分析化学(Anal.Chem.)》,73:256A-265A。也可以使用X射线晶体结构分析来鉴定与抗体相互作用的多肽内的氨基酸。

[0180] 本发明进一步包含抗CD28和抗PSMA抗体,其与本文所述的任何特定示例性抗体(例如,包括本文表1中所示的氨基酸序列中的任何一个的抗体)结合同一表位。同样,本发

明还包含抗CD28和/或抗PSMA抗体,其与本文所述的任何特定示例性抗体(例如,包括本文表1中所示的任何氨基酸序列中的任何一个的抗体)竞争结合CD28和/或PSMA。

[0181] 本发明还包含双特异性抗原结合分子,其包括特异性结合人CD28的第一抗原结合结构域和特异性结合人PSMA的第二抗原结合片段,其中所述第一抗原结合结构域与本文所述的任何特定示例性CD28特异性抗原结合结构域结合CD28上的同一表位,和/或其中所述第二抗原结合结构域与本文所述的任何特定示例性PSMA特异性抗原结合结构域结合PSMA上的同一表位。

[0182] 同样,本发明还包含双特异性抗原结合分子,其包括特异性结合人CD28的第一抗原结合结构域和特异性结合人PSMA的第二抗原结合片段,其中所述第一抗原结合结构域与本文所述的任何特定示例性CD28特异性抗原结合结构域竞争结合CD28,和/或其中所述第二抗原结合结构域与本文所述的任何特定示例性PSMA特异性抗原结合结构域竞争结合PSMA。

[0183] 通过使用本领域中已知的常规方法,可以容易地确定特定的抗原结合分子(例如,抗体)或其抗原结合结构域是否与本发明的参考抗原结合分子结合同一表位,或是否与所述参考抗原结合分子竞争结合。例如,为了确定测试抗体是否与本发明的参考双特异性抗原结合分子结合CD28(或PSMA)上的同一表位,首先允许所述参考双特异性分子与CD28蛋白(或PSMA蛋白)结合。接下来,评估测试抗体与CD28(或PSMA)分子结合的能力。如果测试抗体在与参考双特异性抗原结合分子饱和结合后能够与CD28(或PSMA)结合,则可以得出结论,测试抗体与参考双特异性抗原结合分子结合CD28(或PSMA)的不同表位。另一方面,如果测试抗体在与参考双特异性抗原结合分子饱和结合后无法与CD28(或PSMA)分子结合,则测试抗体可以结合CD28(或PSMA)的与本发明的参考双特异性抗原结合分子所结合的表位相同的表位。然后可以进行另外的常规实验(例如,肽突变和结合分析)以确认所观察到的测试抗体的结合缺乏是否实际上是由于与参考双特异性抗原结合分子结合同一表位,或者空间阻断(或其它现象)是否导致所观察到的结合缺乏。可以使用ELISA、RIA、Biacore、流式细胞术或本领域可用的任何其它定量或定性抗体结合测定法进行这种实验。根据本发明的某些实施例,如果一种抗原结合蛋白的例如1倍、5倍、10倍、20倍或100倍过量抑制另一种抗原结合蛋白的至少50%,但优选地,75%、90%或甚至99%的结合(如在竞争性结合测定中所测量的),则两种抗原结合蛋白结合同一(或重叠)表位(参见例如,Junghans等人,《癌症研究(Cancer Res.)》1990:50:1495-1502)。可替代地,如果抗原中减少或消除一种抗原结合蛋白的结合的基本上所有氨基酸突变均减少或消除另一种抗原结合蛋白的结合,则认为两种抗原结合蛋白结合同一表位。如果仅减少或消除一种抗原结合蛋白的结合的氨基酸突变的一个子集减少或消除另一种抗原结合蛋白的结合,则认为两种抗原结合蛋白具有“重叠表位”。

[0184] 为确定抗体或其抗原结合结构域是否与参考抗原结合分子竞争结合,以两种定向进行上述结合方法:在第一种定向中,使参考抗原结合分子在饱和条件下与CD28蛋白(或PSMA蛋白)结合,然后评估测试抗体与CD28(或PSMA)分子的结合。在第二种定向中,使测试抗体在饱和条件下与CD28(或PSMA)分子结合,然后评估参考抗原结合分子与CD28(或PSMA)分子的结合。在两种定向中,如果只有第一个(饱和的)抗原结合分子能够与CD28(或PSMA)分子结合,则可以得出结论,测试抗体与参考抗原结合分子竞争结合CD28(或PSMA)。如本领域

域普通技术人员所理解的,与参考抗原结合分子竞争结合的抗体可能不一定与参考抗体结合到同一表位,但是可以通过结合重叠或相邻的表位来空间阻断参考抗体的结合。

[0185] 抗原结合结构域的制备和双特异性分子的构建

[0186] 可以通过本领域已知的任何抗体产生技术制备对特定抗原具有特异性的抗原结合结构域。一旦获得,对两种不同抗原(例如,CD28和PSMA)具有特异性的两种不同的抗原结合结构域可以相对于彼此适当地排列,以使用常规方法产生本发明的双特异性抗原结合分子。(本文其它地方提供了对可用于构建本发明的双特异性抗原结合分子的示例性双特异性抗体形式的讨论)。在某些实施例中,本发明的多特异性抗原结合分子的一种或多种个体组分(例如,重链和轻链)衍生自嵌合抗体、人源化抗体或完全人抗体。制备此类抗体的方法是本领域熟知的。例如,可以使用VELOCIMMUNE™技术制备本发明的双特异性抗原结合分子的一条或多条重链和/或轻链。使用VELOCIMMUNE™技术(或任何其他人抗体产生技术),首先分离具有人可变区和小鼠恒定区的对特定抗原(例如,CD28或PSMA)具有高亲和力的嵌合抗体。对抗体进行表征并选择期望的特性,包含亲和力、选择性、表位等。用期望的人恒定区替代小鼠恒定区以产生可以掺入本发明的双特异性抗原结合分子中的完全人重链和/或轻链。

[0187] 可以使用经基因工程化的动物来制造人双特异性抗原结合分子。例如,可以使用无法重排和表达内源性小鼠免疫球蛋白轻链可变序列的经基因修饰的小鼠,其中小鼠仅表达由人免疫球蛋白序列编码的一个或两个人轻链可变结构域,所述人免疫球蛋白序列与内源性小鼠 $\kappa$ 基因座处的小鼠 $\kappa$ 恒定基因可操作地连接。可以使用这种经基因修饰的小鼠产生包括两条不同的重链的完全人双特异性抗原结合分子,所述重链与相同的轻链缔合,所述轻链包括衍生自两个不同的人轻链可变区基因区段之一的可变结构域。(有关这种工程化的小鼠及其产生双特异性抗原结合分子的用途的详细讨论,参见例如US 2011/0195454)。

[0188] 生物等效性

[0189] 本发明涵盖具有不同于所述抗体的氨基酸序列的氨基酸序列但保留结合CD28和/或PSMA的能力的抗原结合分子。当与亲本序列比较时,此类变体分子包括氨基酸的一个或多个添加、缺失或取代,但展现出与所述抗原结合分子的生物活性基本相同的生物活性。同样,本发明的对抗原结合分子进行编码的DNA序列涵盖这样的序列:与所公开的序列相比,其包括核苷酸的一个或多个添加、缺失或取代,但编码基本上与本发明所述的抗原结合分子生物等效的抗原结合分子。上文讨论了此类变体氨基酸和DNA序列的实例。

[0190] 本发明包含与本文所示的任何示例性抗原结合分子生物等效的抗原结合分子。如果例如,两种抗原结合蛋白或抗体是在相似的实验条件下以相同的摩尔剂量施用(单次剂量或多次剂量)时吸收速率和吸收程度不显示显著差异的药物等效物或药物替代物,则认为所述两种抗原结合蛋白或抗体是生物等效的。如果一些抗体在吸收程度上等效但其吸收速率不等效,则认为所述抗体是等效物或药物替代物,并且可以认为所述抗体是生物等效的,因为这种有意的并且反映在标签上的吸收速率的差异在例如长期使用对于达到有效的身体药物浓度并非必需的,并且对于所研究的特定药物产品而言被认为是医学上无关紧要的。

[0191] 在一个实施例中,如果两种抗原结合蛋白的安全性、纯度和效力不存在临床上有意義的差异,则所述两种抗原结合蛋白是生物等效的。

[0192] 在一个实施例中,与不存在参考产品和生物产品之间的转换的持续治疗相比,如果患者可以在参考产品和生物产品之间转换一次或多次而没有预期的副作用风险增加(包含免疫原性的临床显著变化或有效性降低),则两种抗原结合蛋白是生物等效的。

[0193] 在一个实施例中,如果两种抗原结合蛋白均通过针对一个或多个使用条件的一种或多种共同作用机制起作用(只要这些机制是已知的),则所述两种抗原结合蛋白是生物等效的。

[0194] 生物等效性可以通过体内和体外方法来证明。生物等效性测量包含例如:(a)在人或其它哺乳动物中进行的体内测试,其中在血液、血浆、血清或其它生物流体中测量抗体或其代谢物的浓度随时间的变化;(b)与人类体内生物利用度数据相关并且可合理预测所述数据的体外测试;(c)在人或其它哺乳动物中进行的体内测试,其中测量抗体(或其靶标)的适当急性药理作用随时间的变化;以及(d)在建立抗体的安全性、疗效或生物利用度或生物等效性的控制良好的临床试验中。

[0195] 可以通过例如对残基或序列进行各种取代或缺失非生物活性所必需的末端或内部残基或序列来构建本文所示的示例性双特异性抗原结合分子的生物等效变体。例如,可以缺失非生物活性所必需的半胱氨酸残基或用其它氨基酸替代,以防止在复性时形成不必要的或不正确的分子内二硫键。在其它情况下,生物等效抗体可以包含本文所示的示例性双特异性抗原结合分子,所述示例性双特异性抗原结合分子包括改变抗体的糖基化特性的氨基酸变化,例如,消除或去除糖基化的突变。

[0196] 物种选择性和物种交叉反应性

[0197] 根据某些实施例,本发明提供了与人CD28结合但不与来自其它物种的CD28结合的抗原结合分子。本发明还提供了与人PSMA结合但不与来自其它物种的PSMA结合的抗原结合分子。本发明还包含与人CD28结合并与来自一个或多个非人物种的CD28结合的抗原结合分子;和/或与人PSMA结合并与来自一个或多个非人物种的PSMA结合的抗原结合分子。

[0198] 根据本发明的某些示例性实施例,提供了抗原结合分子,所述抗原结合分子与人CD28和/或人PSMA结合,并且视情况可以与小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、沙鼠、猪、猫、狗、兔子、山羊、绵羊、牛、马、骆驼、食蟹猴、狨猴、恒河猴或黑猩猩CD28和/或PSMA中的一种或多种结合或不与其结合。例如,在本发明的一个具体的示例性实施例中,提供了双特异性抗原结合分子,其包括结合人CD28和食蟹猴CD28的第一抗原结合结构域以及特异性结合人PSMA的第二抗原结合结构域。

[0199] 免疫缀合物

[0200] 本发明涵盖与治疗部分缀合的抗原结合分子(“免疫缀合物”),如细胞毒素、化学治疗药物、免疫抑制剂或放射性同位素。细胞毒性剂包含对细胞有害的任何药剂。用于形成免疫缀合物的合适细胞毒性剂和化学治疗剂的实例是本领域已知的(参见例如,WO 05/103081)。

[0201] 治疗调配物和施用

[0202] 本发明提供了包括本发明的抗原结合分子的药物组合物。本发明的药物组合物与合适的载剂、赋形剂和提供经改善的转移、递送、耐受性等的其它药剂一起配制。在所有药物化学家已知的处方集中可以找到许多合适的调配物:《雷明顿氏药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,(马克出版公司(Mack Publishing Company),伊斯顿,宾夕

法尼亚州。这些调配物包含例如,粉末、糊剂、软膏、凝胶、蜡、油、脂质、含有囊泡的脂质(阳离子或阴离子)(如LIPOFECTIN™,生命科技公司(Life Technologies),卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、DNA缀合物、无水吸收膏、水包油和油包水乳液、乳液聚乙二醇(各种分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶和含有聚乙二醇的半固体混合物。参见例如Powell等人“用于肠胃外调配物的赋形剂的汇编(Compendium of excipients for parenteral formulations)”PDA(1998),《药物科学与技术杂志(J Pharm Sci Technol)》,52:238-311。

[0203] 施用于患者的抗原结合分子的剂量可以根据患者的年龄和体型、目标疾病、病症、施用途等而变化。通常根据体重或体表面积计算优选的剂量。当本发明的双特异性抗原结合分子用于成年患者的治疗目的时,可能是有利的是,通常以约0.01mg/kg到约20mg/kg体重、更优选地,约0.02mg/kg到约7mg/kg体重、约0.03mg/kg到约5mg/kg体重或约0.05mg/kg到约3mg/kg体重的单剂量静脉内施用本发明的双特异性抗原结合分子。根据病症的严重程度,可以调整治疗的频率和持续时间。可以凭经验确定施用双特异性抗原结合分子的有效剂量和时间表;例如,可以通过定期评估来监测患者进展,并相应地调整剂量。此外,可以使用本领域熟知的方法进行剂量的种间类推(例如,Mordenti等人,1991,《药学研究(Pharmaceut.Res.)》,8:1351)。

[0204] 各种递送系统是已知的,并且可以用于施用本发明的药物组合物,例如,包封在脂质体、微颗粒、微胶囊、能够表达突变体病毒的重组细胞、受体介导的胞吞作用中(参见例如,Wu等人,1987,《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》262:4429-4432)。引入的方法包含但不限于皮内、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。可以通过任何方便的途径施用组合物,例如通过输注或团注、通过经由上皮或皮肤粘膜内层(例如,口腔粘膜、直肠和肠道粘膜等)吸收,并且可以将其与其它生物活性剂一起施用。施用可以是全身性的或局部的。

[0205] 可以用标准针头和注射器皮下或静脉内递送本发明的药物组合物。另外,就皮下递送而言,笔递送装置易于应用于递送本发明的药物组合物。这种笔递送装置可以是可重复使用的或一次性的。可重复使用的笔递送装置通常利用含有药物组合物的可更换药筒。一旦已经施用了药筒内的全部药物组合物,并且药筒是空的,就可以轻易地丢弃空药筒,并且用含有药物组合物的新药筒替代。然后可以重新使用笔递送装置。在一次性笔递送装置中,没有可替代的药筒。相反,一次性笔递送装置预装有固持在装置内的贮存器中的药物组合物。一旦贮存器中的药物组合物清空,就丢弃整个装置。

[0206] 许多可重复使用的笔递送装置和自动注射器递送装置应用于皮下递送本发明的药物组合物。实例包含但不限于AUTOPEN™(Owen Mumford公司(Owen Mumford,Inc.)),伍德斯托克,UK)、DISETRONIC™笔(Disetronic Medical Systems,Bergdorf,瑞士)、HUMALOG MIX 75/25™笔、HUMALOG™笔、HUMALIN 70/30™笔(礼来公司(Eli Lilly and Co.)),印第安纳波利斯,印第安纳州)、NOVOPEN™ I、II和III(诺和诺德(Novo Nordisk),哥本哈根,丹麦)、NOVOPEN JUNIOR™(诺和诺德,哥本哈根,丹麦)、BD™笔(贝迪医疗(Becton Dickinson),富兰克林湖,新泽西州)、OPTIPEN™、OPTIPEN PRO™、OPTIPEN STARLET™以及OPTICLIK™(赛诺菲(Sanofi-Aventis),法兰克福市,德国),仅举几例。应用于皮下递送本发明的药物组合物的一次性笔递送装置的实例包含但不限于SOLOSTAR™笔(赛诺菲)、FLEXPEN™(诺和诺德)以及KWIKPEN™(礼来)、SURECLICK™自我注射器(安进(Amgen)),千橡

市,加利福尼亚州)、PENLET™ (Haselmeier,斯图加特,德国)、EIPEN (Dey公司(Dey, L.P.))以及HUMIRA™笔(雅培实验室(Abbott Labs),雅培科技园,伊利诺伊州),仅举几例。

[0207] 在某些情况下,可以在控释系统中递送药物组合物。在一个实施例中,可以使用泵(参见Langer,同上文;Sefton,1987,《CRC:生物医学工程评论(CRC Crit.Ref.Biomed.) Eng.》,14:201)。在另一个实施例中,可以使用聚合物材料;参见,《控释医学应用(Medical Applications of Controlled Release)》,Langer和Wise(编辑),1974,CRC出版社,波卡拉顿,佛罗里达州。在又一个实施例中,控释系统可以放置在组合物的靶标附近,因此仅需要全身剂量的一小部分(参见例如,Goodson,1984,《控释医学应用》,同上文,第2卷,第115-138页)。其它受控释放系统在Langer,1990,《科学》249:1527-1533的评论中讨论。

[0208] 可注射制剂可以包含用于静脉内、皮下、皮内和肌肉注射、滴注等的剂型。可以通过已知的方法制备这些可注射制剂。例如,可以通过例如将上述抗体或其盐溶解、悬浮或乳化在无菌水性介质或常规用于注射的油性介质中来制备可注射制剂。作为用于注射的水性介质,存在例如生理盐水、含有葡萄糖的等渗溶液以及其它助剂等,其可以与适当的增溶剂(如醇(例如,乙醇)、多元醇(例如,丙二醇、聚乙二醇))、非离子表面活性剂[例如,聚山梨醇酯80、HCO-50(氢化蓖麻油的聚氧乙烯(50mol)加合物)]等组合使用。作为油性介质,可以采用例如芝麻油、大豆油等,其可以与如苯甲酸苄酯、苯甲醇等增溶剂组合使用。如此制备的注射剂优选地填充在适当的安瓿中。

[0209] 有利地是,将上述用于口服或肠胃外使用的药物组合物制备成适于配合一定剂量的活性成分的单位剂量的剂型。这种单位剂量的剂型包含例如片剂、丸剂、胶囊剂、注射剂(安瓿)、栓剂等。所含的上述抗体的量通常为每单位剂量剂型约5mg到约500mg;特别是在注射形式下,优选地上述抗体的含量为约5mg到约100mg,对于其它剂型,约10mg到约250mg。

[0210] 抗原结合分子的治疗用途

[0211] 本发明包含包括向有需要的受试者施用治疗组合物的方法,所述治疗组合物包括抗CD28抗体或特异性结合CD28和靶抗原(例如,PSMA)的双特异性抗原结合分子。治疗组合物可以包括本文公开的任何抗体或双特异性抗原结合分子以及药学上可接受的载剂或稀释剂。如本文所使用的,表述“有需要的受试者”意指表展现出一种或多种癌症症状或征兆的人或非人动物(例如,表达肿瘤或患有下文提及的任何癌症的受试者)或以其它方式受益于PSMA活性的抑制或降低或PSMA+细胞的耗竭的人或非人动物。

[0212] 本发明的抗体和双特异性抗原结合分子(以及包括其的治疗组合物)尤其可用于治疗其中免疫应答的刺激、活化和/或靶向将会有益的任何疾病或病症。具体地说,本发明的抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子可用于治疗、预防和/或改善与PSMA的表达或活性或PSMA+细胞的增殖相关或由其介导的任何疾病或病症。实现本发明的治疗方法的作用机制包含在存在效应细胞(例如,T细胞)的情况下杀伤表达PSMA的细胞。可以使用本发明的双特异性抗原结合分子抑制或杀死的表达PSMA的细胞包含例如,致瘤性前列腺细胞。

[0213] 本发明的抗原结合分子可以用于治疗例如结肠癌、肺癌、乳腺癌、肾癌和膀胱癌亚型中出现的原发性和/或转移性肿瘤。根据某些示例性实施例,本发明的双特异性抗原结合分子用于治疗前列腺癌。

[0214] 本发明还包含用于治疗受试者中的残留癌症的方法。如本文所使用的,术语“残留癌症”意指在用抗癌疗法治疗后受试者中的一个或多个癌细胞的存在或持续存在。

[0215] 根据某些方面,本发明提供了用于治疗与PSMA表达(例如,前列腺癌)相关的疾病或病症的方法,所述方法包括在示出受试者对其它类型的抗癌疗法无反应后,向所述受试者施用一种或多种本文其它地方描述的双特异性抗原结合分子。例如,本发明包含用于治疗前列腺癌的方法,所述方法包括在受试者接受针对癌症(例如,前列腺癌)患者的标准护理后1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周、4周、2个月、4个月、6个月、8个月、1年或更长时间,向患者施用抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子。在其它方面,最初在一个或多个时间点处向受试者施用包括IgG4 Fc结构域的本发明的双特异性抗原结合分子(抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子)(例如,以提供前列腺癌细胞的稳健的初始耗竭),之后在随后的时间点处施用包括不同IgG结构域(如IgG1 Fc结构域)的等效双特异性抗原结合分子。可以预见的是,本发明的抗CD28/抗PSMA抗体可以与其它双特异性抗原结合分子结合使用,如与抗PSMA/抗CD3双特异性抗体结合使用。还可以预见的是,本发明的双特异性抗体将与检查点抑制剂结合使用,例如,靶向PD-1和CTLA-4以及其它靶标的检查点抑制剂。将靶向同一肿瘤抗原(例如,PSMA)的两种双特异性抗体组合可以是有利的,但是其中一种双特异性抗体靶向T细胞上的CD3而另一种双特异性抗体靶向如CD28等共刺激分子。此组合可以单独用于增强肿瘤细胞杀伤,或者可以与检查点抑制剂组合使用。

[0216] 组合疗法和调配物

[0217] 本发明包含包括本文所述的任何示例性抗体和双特异性抗原结合分子与一种或多种另外的治疗活性组分的组合的组合物和治疗调配物,以及包括向有需要的受试者施用此类组合的治疗方法。

[0218] 可以与本发明的抗原结合分子组合或组合施用的示例性另外的治疗剂包含例如,化学疗法、放射疗法、靶向PD-1(例如,抗PD-1抗体,如派姆单抗(pembrolizumab)或纳武单抗(nivolumab);另参见US9,987,500)、CTLA-4、LAG3、TIM3等的检查点抑制剂、靶向如GITR、OX40、4-1BB等分子的共刺激激动剂二价抗体、CD3x双特异性抗体(参见例如W02017/053856A1、W02014/047231A1、W02018/067331A1和W02018/058001A1)、靶向PSMA XCD3的其它抗体(参见例如W02017/023761A1)以及其它共刺激性CD28x双特异性抗体。

[0219] 可以与本发明的抗体有益地组合施用的其它药剂包含例如他莫昔芬、芳香酶抑制剂和细胞因子抑制剂,包含小分子细胞因子抑制剂和抗体,所述抗体与如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18等细胞因子或其各自的受体结合。本发明的药物组合物(例如,包括如本文所公开的抗CD28/抗PSMA双特异性抗原结合分子的药物组合物)还可以作为治疗方案的一部分施用,所述治疗方案包括一种或多种选自以下的治疗组合:“ICE”:异环磷酰胺(例如,Ifex®)、卡铂(例如,Paraplatin®)、依托泊苷(例如,Etopophos®、Toposar®、VePesid®、VP-16);“DHAP”:地塞米松(例如,Decadron®)、阿糖胞苷(例如,Cytosar-U®、胞嘧啶阿拉伯糖苷、ara-C)、顺铂(例如,Platinol®-AQ);以及“ESHAP”:依托泊苷(例如,Etopophos®、Toposar®、VePesid®、VP-16)、甲基强的松龙(例如,Medrol®)、高剂量阿糖胞苷、顺铂(例如,Platinol®-AQ)。

[0220] 本发明还包含治疗组合,所述治疗组合包括本文提及的任何抗原结合分子和VEGF、Ang2、DLL4、EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EGFRv111、cMet、IGF1R、B-raf、PDGFR- $\alpha$ 、PDGFR- $\beta$ 、FOLH1、PRLR、STEAP1、STEAP2、TMPRSS2、MSLN、CA9、uroplakin或任何上述细胞因

子中的一个或多个的抑制剂,其中所述抑制剂是适体、反义分子、核酶、siRNA、肽体、纳米抗体或抗体片段(例如,Fab片段;F(ab')<sub>2</sub>片段;Fd片段;Fv片段;scFv;dAb片段;或其它工程化分子,如双抗体、三抗体、四抗体、微抗体和最小识别单元)。本发明的抗原结合分子还可以与抗病毒剂、抗生素、镇痛药、皮质类固醇和/或NSAID一起组合施用和/或共同配制。本发明的抗原结合分子还可以作为治疗方案的一部分施用,所述治疗方案还包含放射治疗和/或常规化学疗法,或用生物制品(包含检查点抑制剂或其它双特异性抗体)治疗。

[0221] 本发明包含包括本文所述的任何抗原结合分子与一种或多种化学治疗剂的组合的组合物和治疗调配物。化学治疗剂的实例包含:烷化剂,例如噻替派和环磷酰胺(Cytoxan<sup>TM</sup>);烷基磺酸盐,例如白消安、英丙舒凡和泊舒凡;氮丙啶类,如苯佐替派、卡波醌、美妥替派和乌瑞替派;乙撑亚胺类和甲基蜜胺类,包含六甲蜜胺、三亚乙基密胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲密胺(trimethylolomelamine);氮芥类,如苯丁酸氮芥、萘氮芥、胆磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀、异环磷酰胺、二氯甲基二乙胺、盐酸氧二氯甲基二乙胺、美法仑、新恩比兴、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲磷胺、尿嘧啶氮芥;亚硝脲类,如卡莫司汀、氯脲菌素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀;抗生素类,如阿克拉霉素、放线菌素、安曲霉素、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素(cactinomycin)、卡奇霉素、卡拉比星、洋红霉素、嗜癌菌素、色霉素、放线菌素D、柔红霉素、地托比星、6-二氮-5-氧代-L-正亮氨酸、阿霉素、表柔比星、依索比星、去甲氧基柔红霉素、麻西罗霉素、丝裂霉素类、茵酚酸、诺加霉素、橄榄霉素类、培洛霉素、泊非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑菌素、链脲菌素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗代谢物类,如氨甲蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,如二甲叶酸、氨甲蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙;嘌呤类似物,如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮杂尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷;雄激素类,如卡普睾酮、丙酸屈他雄酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺类,如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充剂,如亚叶酸(frolic acid);醋葡萄糖内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;安吡啶;百垂布西;比生群;依达曲沙;地磷酰胺;地美可辛;地吡醌;依氟鸟氨酸;依利醋铵;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明;米托胍脞;米托蒽醌;莫派达醇;二胺硝吡啶;喷司他丁;蛋氨酸氮芥;吡柔比星;鬼臼酸;2-乙基酰肼;丙卡巴肼;PSK<sup>TM</sup>;丙亚胺;西佐喃;螺锗;细交链孢菌酮酸;三环乙亚胺醌;2,2',2''-三氯三乙胺;乌拉坦;长春地辛;达卡巴嗪;甘露莫司汀;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;盖克托辛(gacytosine);阿拉伯糖苷("Ara-C");环磷酰胺;噻替派;紫杉烷类,例如紫杉醇(Taxol<sup>TM</sup>,百时美施贵宝公司肿瘤学部门(Bristol-Myers Squibb Oncology),普林斯顿,新泽西州)和多烯紫杉醇(Taxotere<sup>TM</sup>,安内特安东尼(Aventis Antony),法国)苯丁酸氮芥;吉西他滨;6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物例如顺铂和卡铂;长春碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;丝裂霉素C;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;诺维本;诺安托;替尼泊苷;道诺霉素;氨蝶呤;希罗达;伊班膦酸盐;CPT-11;拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);视黄酸;埃斯波霉素(esperamicins);卡培他滨;以及以上任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。此定义还包含用于调节或抑制对肿瘤的激素作用的抗激素剂,如:抗雌激素类,包含例如他莫西芬、雷洛昔芬、芳香酶抑制4(5)-咪唑、4-羟基他莫西芬、曲沃昔芬、雷洛昔芬(keoxifene)、LY 117018、奥那司酮和托瑞米芬(法乐通);和抗雄激素类,如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮

丙瑞林和戈舍瑞林;以及以上任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0222] 可以在施用本发明的抗原结合分子之前、同时或之后施用一种或多种另外的治疗活性组分; (出于本公开的目的, 此类施用方案被认为是抗原结合分子与另外的治疗活性组分“组合”施用)。

[0223] 本发明包含药物组合物, 其中本发明的抗原结合分子与一种或多种如本文其它地方所描述的另外的治疗活性组分一起共同配制。

[0224] 施用方案

[0225] 根据本发明的某些实施例, 可以在限定的时间过程内向受试者施用多剂量的抗原结合分子 (例如, 抗CD28抗体或特异性结合PSMA和CD28的双特异性抗原结合分子)。根据本发明的此方面的方法包括向受试者依次施用多剂量的本发明的抗原结合分子。如本文所使用的, “依次施用”意指在不同时间点, 例如在隔开预定间隔 (例如, 数小时、数天、数周或数月) 的不同日期, 向受试者施用于、每个剂量的抗原结合分子。本发明包含以下方法: 其包括向患者依次施用单一初始剂量的抗原结合分子, 然后施用一种或多种第二剂量的抗原结合分子, 并且任选地随后施用一种或多种第三剂量的抗原结合分子。

[0226] 术语“初始剂量”、“第二剂量”和“第三剂量”是指施用本发明的抗原结合分子的时间序列。因此, “初始剂量”是在治疗方案开始时施用的剂量 (也被称为“基线剂量”); “第二剂量”是在初始剂量之后施用的剂量; 并且“第三剂量”是在第二剂量之后施用的剂量。初始剂量、第二剂量和第三剂量可以均含有相同量的抗原结合分子, 但是在施用频率方面通常可能彼此不同。然而, 在某些实施例中, 在治疗过程期间, 初始剂量、第二剂量和/或第三剂量中含有的抗原结合分子的量彼此不同 (例如, 适当地调高或降低)。在某些实施例中, 在治疗方案开始时施用两个或更多个 (例如, 2个、3个、4个或5个) 剂量作为“负荷剂量”, 然后以较低频率施用后续剂量 (例如, “维持剂量”)。

[0227] 在本发明的一个示例性实施例中, 在上一剂量后1到26 (例如, 1、1<sup>1/2</sup>、2、2<sup>1/2</sup>、3、3<sup>1/2</sup>、4、4<sup>1/2</sup>、5、5<sup>1/2</sup>、6、6<sup>1/2</sup>、7、7<sup>1/2</sup>、8、8<sup>1/2</sup>、9、9<sup>1/2</sup>、10、10<sup>1/2</sup>、11、11<sup>1/2</sup>、12、12<sup>1/2</sup>、13、13<sup>1/2</sup>、14、14<sup>1/2</sup>、15、15<sup>1/2</sup>、16、16<sup>1/2</sup>、17、17<sup>1/2</sup>、18、18<sup>1/2</sup>、19、19<sup>1/2</sup>、20、20<sup>1/2</sup>、21、21<sup>1/2</sup>、22、22<sup>1/2</sup>、23、23<sup>1/2</sup>、24、24<sup>1/2</sup>、25、25<sup>1/2</sup>、26、26<sup>1/2</sup>或更多) 周施用每个第二剂量和/或第三剂量。如本文所使用的, 短语“前一剂量”意指在多次施用的序列中, 在没有中间剂量的情况下在所述序列中的下一个剂量之前施用给患者的抗原结合分子的剂量。

[0228] 根据本发明的此方面的方法可以包括向患者施用任何数量的第二剂量和/或第三剂量的抗原结合分子 (例如, 抗CD28抗体或特异性结合PSMA和CD28的双特异性抗原结合分子)。例如, 在某些实施例中, 仅向患者施用单个第二剂量。在其它实施例中, 向患者施用两个或更多个 (例如, 2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或更多个) 第二剂量。同样, 在某些实施例中, 仅向患者施用单个第三剂量。在其它实施例中, 向患者施用两个或更多个 (例如, 2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或更多个) 第三剂量。

[0229] 在涉及多个第二剂量的实施例中, 每个第二剂量可以按与其它第二剂量相同的频率施用。例如, 可以在前一剂量后1到2周向患者施用每个第二剂量。类似地, 在涉及多个第三剂量的实施例中, 每个第三剂量可以按与其它第三剂量相同的频率施用。例如, 可以在前一剂量后2到4周向患者施用每个第三剂量。可替代地, 向患者施用第二剂量和/或第三剂量的频率可以在治疗方案的过程中变化。施用频率也可以在医师的治疗过程中根据临床检查

后个体患者的需要进行调整。

#### [0230] 抗体的诊断用途

[0231] 也可以例如出于诊断目的使用本发明的双特异性抗体检测和/或测量样品中的CD28或PSMA,或表达CD28或表达PSMA的细胞。例如,可以使用抗CD28x PSMA抗体或其片段诊断以CD28或PSMA的异常表达(例如,过度表达、表达不足、缺乏表达等)为特征的病症或疾病。CD28或PSMA的示例性诊断测定可以包括例如使从患者获得的样品与本发明的抗体接触,其中用可检测的标记或报道分子标记所述抗体。可替代地,未标记的抗体可以与本身被可检测地标记的二级抗体组合用于诊断应用。可检测标记或报告分子可以是放射性同位素,如<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S或<sup>125</sup>I;荧光或化学发光部分,如异硫氰酸荧光素或罗丹明;或酶,如碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶或荧光素酶。可以用于检测或测量样品中的CD28或PSMA的具体示例性测定包含酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)和荧光活化细胞分选(FACS)。可以用于根据本发明的CD28或PSMA诊断测定中的样品包含可从在正常或病理条件下含有可检测量的CD28或PSMA蛋白或其片段的患者获得的任何组织或流体样品。通常,将测量从健康患者(例如,未患有与异常CD28或PSMA水平或活性相关的疾病或病症的患者)获得的特定样品中CD28或PSMA的水平,以初步建立CD28或PSMA的基线或标准水平。然后将CD28或PSMA的此基线水平与从疑似患有CD28或PSMA相关性疾病或病症的个体获得的样品中测量到的CD28或PSMA的水平进行比较。

#### [0232] 实例

[0233] 提出以下实例,以向本领域普通技术人员提供关于如何制备和使用本发明的方法和组合物的完整公开和描述,并且不旨在限制发明人认为是其发明的范围。已经努力确保关于所使用的数字(例如,量、温度等)的准确性,但是应该考虑一些实验误差和偏差。除非另外指明,否则份数是重量份,分子量是平均分子量,温度是摄氏度,并且压力是大气压或接近大气压。

#### [0234] 摘要

[0235] 肿瘤特异性抗原(TSA)或肿瘤相关型抗原(TAA)-CD3双特异性抗体(如抗PSMAxCD3双特异性抗体)最近的临床成功正在转化癌症免疫疗法。TAA-CD3抗体供应了相对安全且立即可用的治疗解决方案,所述治疗解决方案可能被证明是重要的新型免疫疗法。然而,其可能达不到CAR-T细胞方法中观察到的疗效,所述CAR-T细胞方法采用通常由CD28细胞内结构域介导的第二共刺激信号。事实上,CD28活化抗体在人类研究中极为强大,但是也是有毒的。术语TSA和TAA可以在本文中可互换地使用。

[0236] 本文描述了被称为TAA-CD28的新型双特异性抗体,其本身似乎是安全的,耐受性良好,并且当与TAA-CD3组合时会产生极大扩增且高度靶向的抗肿瘤应答。使用如PSMA等在前列腺肿瘤上表达的TAA,已经发现,TAAxCD28在存在肿瘤靶标和TCR/CD3刺激的情况下会增强T细胞活化并显著加强肿瘤细胞裂解。

[0237] 已经证明,本发明的TAAxCD28双特异性抗体在同基因肿瘤模型中显著增强了由TAAxCD3诱导的T细胞活化介导的抗肿瘤免疫。在非人灵长类动物和人源化小鼠模型中,单独或与TAAxCD28组合时,将CD3与具有有限正常组织表达的肿瘤抗原配对,几乎不会诱导或完全不会诱导外周细胞因子的产生。此外,与CD28超激动抗体相比,食蟹猴中单独的TAAxCD28具有最少的血清细胞因子分泌和T细胞活化□儻有血清细胞因子分泌和T细胞活化

① □插入内容。这些结果表明,将这种新颖的共刺激双特异性抗体与新兴的TAA-CD3类抗体组合可以提供更安全的现成的生物制品解决方案,所述解决方案会显著增强传统TAA-CD3双特异性抗体的疗效。

[0238] 介绍

[0239] 虽然单克隆抗体在过去的二十年中已经被确立为抗肿瘤治疗剂,但是其在肿瘤部位处动员T细胞和有效行使其细胞毒性活性的能力有限。先前已经证明了双特异性抗体用于T细胞靶向性免疫疗法和随后的肿瘤细胞杀伤的能力。事实上,双特异性抗体平台旨在通过将抗CD3与抗肿瘤靶标结合结构域组合来募集免疫效应细胞。最近,卡妥索单抗(EpCAMxCD3)和博纳吐单抗(CD19xCD3)获得了用于急性淋巴细胞白血病的监管批准,同时许多其它双特异性抗体正在研究中。事实上,已经构建了识别B细胞标志物CD20和T细胞库的CD3组分的双特异性抗体,并且目前正在针对血液恶性肿瘤进行临床研究。事实上,TAA-CD3提供了相对安全且现成的治疗解决方案,所述解决方案不必针对个别患者进行高度且费力的定制。然而,尽管TAA-CD3双特异性抗体可能被证明是重要的新型免疫疗法,但是交叉研究比较表明其可能无法达到与在CAR-T方法中观察到的疗效。

[0240] 两种嵌合抗原受体(CAR)-T细胞药物Kymriah和Yescarta最近获得了用于血液B细胞恶性肿瘤的FDA批准,这证明了此方法在个性化癌症免疫疗法领域的巨大潜力。这两种产品都利用CD19抗原作为肿瘤相关型抗原(TAA),由于其对B细胞的限制性表达,因此CD19抗原是用于T细胞介导的杀伤的理想靶标,其将脱靶毒性降到最低,并且增强抗肿瘤疗效。然而,CAR-T细胞的高效力已经与如细胞因子释放综合征(CRS)和神经毒性等副作用相关联。另外,所有患者尚未从治疗中受益,并且在自体 and 同种异体方法中,可能影响每个患者临床结果的变量数量相对较高。进一步地,迄今为止,在实体肿瘤中靶向肿瘤相关型抗原的尝试取得了有限的成功,显示出最小的抗肿瘤活性或严重的副作用。抑制肿瘤微环境、CAR-T细胞难以进入整个肿瘤组织以及费力的制造是有前景的CAR-T细胞疗法的一些当前的挑战。

[0241] 当前免疫疗法治疗的局限性之一是通过特异性肿瘤细胞识别和细胞毒性诱导来最佳地诱导患者自身对肿瘤细胞的免疫应答。除了通过TCR/CD3复合物的抗原特异性刺激(信号1)之外,有效活化原始T细胞和诱导有经验的记忆T细胞群体还需要共刺激信号(信号2)。共刺激通路CD28和4-1BB的激动作用可以提供靶细胞裂解的显著加强,从而有利于患者对不同免疫疗法的抵抗力。然而,共刺激在临床肿瘤学中更广泛的作用仍有待评估。许多肿瘤缺乏共刺激受体,这阻止了其进一步增强CD3xTAA诱导的T活化。

[0242] 本文通过在一组同基因肿瘤上强制表达共刺激配体来进行共刺激通路的盲法筛选,所述盲法筛选将CD28与4-1BB一起确立为最强效的共刺激受体之一。进一步地,本文构建了在T细胞表面桥接CD28的基于共刺激的双特异性抗体,其中用来自前列腺组织的TAA来加强抗肿瘤应答。本文公开的数据表明,在存在TAA和TCR刺激两者的情况下,TAA-CD3和TAA-CD28双特异性抗体的组合疗法有效地增强了T细胞活化和细胞毒性,从而导致抗肿瘤免疫增强。事实上,本文公开的数据表明,将这种新颖的双特异性抗体(TAA-CD28)与新兴的TAA-CD3类抗体组合可以提供更安全的现成的生物制品解决方案,所述解决方案可以接近定制的CAR-T细胞疗法的疗效。

[0243] 更具体地说,产生了示例性PSMAxCD28双特异性抗体,并且证明了示例性抗

PSMAxCD28在体外加强了PSMAxCD3或CD20xCD3诱导的T细胞活化,并且在体内安全地增强了抗肿瘤疗效。通过显示定位于T细胞和靶细胞缀合物的免疫突触处的双特异性抗体、PSMAxCD3诱导的增殖增强、细胞因子释放和细胞毒性的图像来证明体外活性。在小鼠肿瘤模型(同基因)中评估了体内抗肿瘤疗效。随时间推移监测肿瘤体积和血清细胞因子,以显示对双特异性抗体治疗的应答。在食蟹猴中进行了一项研究,以确定本发明的示例性PSMAxCD28在非人灵长类动物中的安全性和耐受性。通过临床观察和血液样品采集来检查针对动物的毒性,以分析血清细胞因子和T细胞表型。

[0244] 如下文详细描述,已经产生了示例性抗PSMAxCD28双特异性抗体以加强TCR/CD3依赖性T细胞活化,从而模拟由专业APC提供的共刺激(信号2)。

[0245] 所有程序均按照NIH《实验动物的护理和使用指南(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)》进行。该方案已由再生元制药公司(Regeneron Pharmaceuticals)机构动物护理和使用委员会批准。

[0246] 实例1. 抗PSMAxCD28抗体的构建

[0247] 抗CD28抗体的产生

[0248] 通过用与小鼠IgG2a的Fc部分融合的人CD28蛋白,或用表达CD28的细胞或用编码CD28的DNA对VELOCIMMUNE®小鼠(即,包括编码人免疫球蛋白重链和κ轻链可变区的DNA的工程化小鼠)进行免疫来获得抗CD28抗体。通过CD28特异性免疫测定法监测抗体免疫应答。当达到期望的免疫应答时,收获脾细胞并使其与小鼠骨髓瘤细胞融合,以保持其活力并形成杂交瘤细胞系。筛选并选择杂交瘤细胞系以鉴定产生CD28特异性抗体的细胞系。使用此技术获得了几种抗CD28嵌合抗体(即,具有人可变结构域和小鼠恒定结构域的抗体)。另外,如US2007/0280945A1中所描述的,直接从抗原阳性B细胞中分离出几种完全人抗CD28抗体,而不与骨髓瘤细胞融合。

[0249] 根据此实例的方法产生的示例性抗CD28抗体的某些生物学特性在下文阐述的实例中详细描述。

[0250] 抗PSMA抗体的产生

[0251] 通过用人PSMA抗原对经基因修饰的小鼠进行免疫或用人PSMA抗原对包括编码人免疫球蛋白重链和κ轻链可变区的DNA的工程化小鼠进行免疫,获得了抗PSMA抗体。可替代地,用表达人PSMA蛋白(UniProtKB/瑞士专利号Q04609)的人前列腺癌细胞(LNCaP, ATTC, 美国弗吉尼亚州马纳萨斯)对小鼠进行免疫。通过PSMA特异性免疫测定法监测抗体免疫应答。当达到期望的免疫应答时,从每只小鼠收获脾细胞,并且(1)使其与小鼠骨髓瘤细胞融合以保持其活力并形成杂交瘤细胞并筛选PSMA特异性,或(2)使用具有N端6-His标签的人PSMA(R&D, 目录号4234-ZN)作为结合并鉴定反应性抗体(抗原阳性B细胞)的分选试剂分选B细胞(如US2007/0280945A1中所描述)。最初分离出具有人可变区和小鼠恒定区的针对PSMA的嵌合抗体。对抗体进行表征并选择期望的特性,包含亲和力、选择性等。如果需要的话,用期望的人恒定区(例如野生型或经修饰的IgG1或IgG4)替代小鼠恒定区,以产生完全人抗PSMA抗体。

[0252] 结合CD28和PSMA的双特异性抗体的产生

[0253] 使用标准方法构建包括抗PSMA特异性结合结构域和抗CD28特异性结合结构域的双特异性抗体,其中抗PSMA抗原结合结构域和抗CD28抗原结合结构域各自包括与共同LCVR

配对的不同的独特的HCVR。在一些情况下,利用来自抗CD28抗体的重链、来自抗PSMA抗体的重链和共同轻链构建双特异性抗体(见表1)。在某些实施例中,来自示例性双特异性抗体(bs16429D)的抗CD28抗体的重链氨基酸序列在SEQ ID NO.:81中示出。来自示例性双特异性抗体(bs16429D)的抗PSMA抗体的重链氨基酸序列在SEQ ID NO.:82中示出。bs16429D的共同轻链氨基酸序列在SEQ ID NO.:83中示出。

[0254] 根据本实例产生的双特异性抗体包括两个单独的抗原结合结构域(即,结合臂)。第一抗原结合结构域包括衍生自抗CD28抗体的重链可变区(“CD28-VH”),并且第二抗原结合结构域包括衍生自抗PSMA抗体的重链可变区(“PSMA-VH”)。抗PSMA和抗CD28两者共享共同的轻链。CD28-VH/PSMA-VH配对产生了抗原结合结构域,所述抗原结合结构域特异性识别T细胞上的CD28和肿瘤细胞上的PSMA。

[0255] 实例2.重链和轻链可变区氨基酸和核酸序列

[0256] 表1示出了根据实例1制备的各种双特异性抗体的重链和轻链可变区和CDR的氨基酸序列标识符。相应的核酸序列标识符列于表2中。

[0257] 表1:氨基酸序列ID

抗 PSMA x 抗 CD28 双 特异性抗 体 PID	第二抗原结合结构域 (D2, 抗 PSMA)				第一抗原结合结构域 (D1, 抗 CD28)				轻链可变区			
	D2- HCVR	D2- HCDR1	D2- HCDR2	D2- HCDR3	D1- HCVR	D1- HCDR1	D1- HCDR2	D2- HCDR3	D3- LCVR	D3- LCDR1	D3- LCDR2	D3- LCDR3
[0258] bs16429D	mAb11838P2				mAb14226P2				8567			
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
bs16430D	mAb11810P2				mAb14193P2				10082			
	34	36	38	40	26	28	30	32	42	44	46	48
bs16431D	mAb11810P2				mAb14216P2				10082			
	50	52	54	56	58	60	62	64	66	68	70	72

[0259] 表2:核酸序列ID

抗 PSMA x 抗 CD28 双 特异性抗 体 PID	第二抗原结合结构域 (D2, 抗 PSMA)				第一抗原结合结构域 (D1, 抗 CD28)				轻链可变区			
	D2- HCV R	D2- HCDR 1	D2- HCDR 2	D2- HCDR 3	D1- HCV R	D1- HCDR 1	D1- HCDR 2	D2- HCDR 3	D3- LCV R	D3- LCDR 1	D3- LCDR 2	D3- LCDR 3
[0260] bs16429 D	mAb11838P2				mAb14226P2				8567			
	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23
bs16430 D	mAb11810P2				mAb14193P2				10082			
	33	35	37	39	25	27	29	31	41	43	45	47
bs16431 D	mAb11810P2				mAb14216P2				10082			
	49	51	53	55	57	59	61	63	65	67	69	71

[0261] 实例3.CD28和4-1BB是强效的共刺激受体

[0262] 为了确定哪些共刺激受体在提供对T细胞活化重要的共刺激信号方面是有效的,通过在一组同基因肿瘤上强制表达共刺激配体进行的共刺激通路的盲法筛选(表3和图2)再次将CD28与4-1BB一起确立为最强效的共刺激受体之一。表3总结了盲法筛选中无肿瘤小鼠的数量。每组测试五(5)只小鼠。在三(3)种不同的肿瘤细胞系上进行测定,所述细胞系被工程化为表达七(7)种不同的共刺激配体。简而言之,通过慢病毒转导,将EL4、MC38和B16F10.9肿瘤细胞工程化为表达单独的共刺激配体。将细胞皮下植入WT C57BL6小鼠中。分

别在植入EL4、MC38和B16F10.9肿瘤类型后第18天、第24天和第25天测量肿瘤生长。这是来自对照组的肿瘤体积达到最大允许大小(>2000mm<sup>3</sup>)的时间点。测量肿瘤大小。与表3中的数据一致,CD28和4-1BB在减小肿瘤大小方面也是最有效的(数据未示出)。

[0263] 表3:具有引入的共刺激配体表达的工程化细胞系中的肿瘤生长抑制

共刺激配体	共刺激受体	淋巴瘤 (EL4)	癌 (MC38)	黑色素瘤 (B16F10.9)
4-1BBL	4-BB	3	4	1
CD80 (B7.1)	CD28	2	2	2
CD86 (B7.2)	CD28	1	0	2
CD70	CD27	5	0	
OX40L	OX40	0	0	2
CD40	CD40L	0	1	0
ICOSL	ICOS	0	0	0
空载体		0	0	0
亲本		0	0	

[0265] 实例4.抗PSMAxCD28双特异性抗体的表面等离子体共振衍生的结合亲和力和动力学常数

[0266] 为了确定抗PSMAxCD28双特异性单克隆抗体的结合动力学,确定了抗PSMAxCD28双特异性和相关联的亲本单克隆抗体对PSMA和/或CD28的表面等离子体共振衍生的结合亲和力和动力学常数。

[0267] 抗PSMAxCD28双特异性单克隆抗体对PSMA的结合动力学

[0268] 使用Biacore T-200仪器,使用实时表面等离子体共振生物传感器确定了6h.hPSMA(重组人PSMA/FOLH1蛋白,R&D,目录号4234-ZN)与纯化的抗PSMAxCD28双特异性单克隆抗体或抗PSMA双价亲本单克隆抗体结合的平衡解离常数( $K_D$ 值)。通过与单克隆小鼠抗人Fc抗体的胺偶联衍生CM5 Biacore传感器表面,以捕获纯化的抗PSMAxCD28双特异性抗体或抗PSMA和抗CD28亲本单克隆抗体。

[0269] 在由0.01M HEPES pH 7.4、0.15M NaCl、0.5mM MgCl<sub>2</sub>、1.0mM CaCl<sub>2</sub>、0.05%v/v表面活性剂P20(HBS-P++运行缓冲液)构成的缓冲液中进行这种Biacore结合研究。在HBS-P++运行缓冲液中制备不同浓度的具有N端多组氨酸标签的hPSMA(6h.hPSMA,R&D),范围为10nM到0.4nM,并连续3倍稀释用于抗PSMAxCD28双特异性抗体和抗PSMA或抗CD28亲本单克隆抗体。

[0270] 在单克隆抗体捕获表面上以50微升/分钟的流速注射不同浓度的6h.hPSMA。监测6h.hPSMA与捕获的单克隆抗体的缔合,持续3分钟,并且监测6h.hPSMA在HBS-P++运行缓冲液中的解离,持续10分钟。通过使用Scrubber 2.0c曲线拟合软件(生物软件公司(BioLogic Software))将实时传感图拟合为1:1结合模型来确定动力学缔合( $k_a$ )和解离( $k_d$ )速率常数。根据如下动力学速率常数来计算结合解离平衡常数( $K_D$ )和解离半衰期( $t_{1/2}$ ):

[0271]  $K_D$  (M) =  $k_d/k_a$ , 和  $t_{1/2}$  (分钟) =  $0.693/k_d/60$

[0272] 在25°C下6h.hPSMA与纯化的单克隆抗体结合的结合动力学参数如下表4所示。

[0273] 表4:在25°C下单克隆抗体对PSMA的Biacore结合亲和力

抗体ID	通用名	ka (1/Ms)	kd (1/s)	$K_D$ (M)	T1/2 (分钟)
bs16429D	PSMAxCD28单克隆抗体	1.96E+05	4.92E-05	2.51E-10	234.6

bs16430D	PSMAxCD28单克隆抗体	TBD	TBD	TBD	TBD
bs16431D	PSMAxCD28单克隆抗体	2.80E+05	3.85E-05	1.37E-10	300.4
mAb11810P2	抗PSMA单克隆抗体	4.45E+05	2.99E-05	6.72E-11	386.3
mAb11838P2	抗PSMA单克隆抗体	TBD	TBD	TBD	TBD
mAb14226P2	抗CD28单克隆抗体	NB	NB	NB	NB
mAb14193P2	抗CD28单克隆抗体	NB	NB	NB	NB
mAb14216P2	抗CD28单克隆抗体	NB	NB	NB	NB

[0275] TBD:未测试

[0276] NB:未观察到结合

[0277] 在37°C下6h.hPSMA与一个纯化的示例性单克隆双特异性抗体结合的结合动力学参数如下表5所示。—(1)RU(应答单位)表示每 $\text{mm}^2$ 1pg的蛋白质,如由制造商限定的。

[0278] 表5.在37°C下单克隆抗体对PSMA的Biacore结合亲和力

抗体 ID	mAb 捕获 (RU)	10nM hPSMA.6H 结合 (RU)	K <sub>a</sub> (1/Ms)	K <sub>d</sub> (1/s)	K <sub>D</sub> (M)	t <sub>1/2</sub>
bs16429D	256.8±0.9	43.5	2.00E+05	7.93E-05	3.96E-10	145.7
抗体 ID	mAb 捕获 (RU)	20nM hPSMA.6H 结合 (RU)	K <sub>a</sub> (1/Ms)	K <sub>d</sub> (1/s)	K <sub>D</sub> (M)	t <sub>1/2</sub>
bs16429D	189.7±1.6	73.7	2.93E+05	6.36E+05	2.17E-10	181.6

[0280] 抗PSMAxCD28双特异性单克隆抗体对CD28的结合动力学

[0281] 使用Biacore T-200仪器,使用实时表面等离子体共振生物传感器来确定了hCD28.mmh与纯化的单克隆抗体结合的平衡解离常数(K<sub>D</sub>值)。通过与单克隆小鼠抗人Fc抗体的胺偶联衍生CM5 Biacore传感器表面,以捕获纯化的抗PSMAxCD28双特异性单克隆抗体和抗PSMA或抗CD28亲本单克隆抗体。

[0282] 在单克隆抗体捕获表面上以50微升/分钟的流速注射不同浓度的hCD28.mmh。监测hCD28.mmh与捕获的单克隆抗体的缔合,持续5分钟,并且监测hCD28.mmh在HBS-P++运行缓冲液中的解离,持续10分钟。通过使用Scrubber 2.0c曲线拟合软件将实时传感图拟合为1:1结合模型来确定动力学缔合(k<sub>a</sub>)和解离(k<sub>d</sub>)速率常数。根据如下动力学速率常数来计算结合解离平衡常数(K<sub>D</sub>)和解离半衰期(t<sub>1/2</sub>):

[0283]  $K_D (M) = k_d / k_a$ , 和  $t_{1/2} (\text{分钟}) = 0.693 / k_d / 60$

[0284] 在25°C下hCD28.mmh与纯化的抗PSMAxCD28双特异性单克隆抗体或抗CD28双价亲本单克隆抗体结合的结合动力学参数如下表6所示。

[0285] 表6:在25°C下单克隆抗体对CD28的Biacore结合亲和力

抗体 ID	通用名	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K <sub>D</sub> (M)	T <sub>1/2</sub> (分钟)
bs16429D	PSMAxCD28 单克隆抗体	2.26E+04	3.26E-03	1.44E-07	3.5
bs16430D	PSMAxCD28 单克隆抗体	TBD	TBD	TBD	TBD
[0286] bs16431D	PSMAxCD28 单克隆抗体	6.79E+03	1.41E-03	2.07E-07	8.2
mAB11810P2	抗 PSMA 单克隆抗体	NB	NB	NB	NB
mAB11838P2	抗 PSMA 单克隆抗体	TBD	TBD	TBD	TBD
mAB14226P2	抗 CD28 单克隆抗体	2.34E+04	3.28E-03	1.40E-07	3.5
mAB14193P2	抗 CD28 单克隆抗体	8.73E+03	2.64E-04	3.03E-08	43.7
mAB14216P2	抗 CD28 单克隆抗体	1.12E+04	1.41E-03	1.27E-07	8.2

[0287] TBD: 未测试

[0288] NB: 未观察到结合

[0289] 在37°C下hCD28.mmh与纯化的抗PSMAxCD28双特异性单克隆抗体结合的结合动力学参数如下表7所示。

[0290] 表7. 在37°C下单克隆抗体对CD28的Biacore结合亲和力

抗体 ID	mAb 捕获 (RU)	400nM hCD28.6H 结合 (RU)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	K <sub>D</sub> (M)	t <sub>1/2</sub>
[0291] bs16429D	1576.3±5.0	98.9	2.46E+04	6.70E-03	2.72E-07	1.7

[0292] 如表4到7所示,本发明的几种抗CD28抗体以高亲和力结合CD28。本发明的几种抗PSMA抗体以高亲和力结合PSMA。几种抗PSMAxCD28双特异性抗体以高亲和力结合CD28和PSMA。

[0293] 实例5. 抗PSMAxCD28双特异性单克隆抗体对PSMA和CD28的细胞结合的效力和特异性

[0294] 为了评估这些抗体(抗PSMA、抗CD28和抗PSMAxCD28单克隆抗体)特异性结合细胞表面蛋白的能力,在基于电化学发光的检测平台(MSD)中使用表达人PSMA或CD28的细胞开发了体外结合测定。进行了两项研究。在一项研究中,评估了单克隆抗体与细胞表面抗原结合的效力和特异性。这些抗体(抗PSMA、抗CD28和抗PSMAxCD28抗体)显示出与表达人PSMA或人CD28的细胞系的特异性结合。在补充实验中,进行了IgG4s同种型的桥接研究。

[0295] 用于确定抗PSMAxCD28双特异性抗体对PSMA和CD28的细胞结合的效力和特异性的方法

[0296] 人上皮前列腺癌细胞系(C4-2(UroCor))内源性表达人PSMA。通过用编码人CD28(hCD28登录号NP\_006130.1)的新霉素抗性慢病毒构建体转导来自ATCC的人胚胎肾细胞(CRL-1573),对表达HEK293/hCD28的细胞系进行工程化。为了评估结合的特异性,通过荧光活化细胞分选(FACS)将这两种细胞系与亲本HEK293HZ细胞系(其针对PSMA和CD28为阴性)平行评估。抗Fe1d1人IgG1抗体作为IgG检测的阴性对照被包含在内。

[0297] 将上述细胞系用不含Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>(欧文科学公司(Irvine Science),目录号9240)的1xPBS缓冲液冲洗一次,并且在37°C下用无酶细胞分离溶液(密理博(Millipore),登录号S-004-C)孵育10分钟,以便从烧瓶中分离细胞。用含有Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>的1xPBS(欧文科学公司,目录号9236)进行另外的清洗。然后用Cellometer™自动T4细胞计数器(耐细隆生物科学(Nexcelom Bioscience),型号#自动T4)对细胞进行计数。将细胞洗涤缓冲液中每孔大约

10,000个细胞分别接种到96孔碳电极板(多阵列高结合板,MSD,Meso Scale Discovery,目录号L15XB-3/LX11XB-3)中,并且在37°C下孵育1小时,以使细胞粘附。非特异性结合位点在室温下被PBS中的2%BSA(w/v)(西格玛(Sigma),目录号A8577-IL)阻断1小时。

[0298] 将含有连续稀释液中的抗PSMA、抗CD28、抗PSMAxCD28抗体或对照抗体(范围为1.7pM到100nM)的溶液或不含抗体的溶液添加到板结合的细胞中,并且在室温下孵育1小时。除非另有指示,否则以一式两份进行分析。然后使用带有细胞洗涤头的AquaMax2000板洗涤器(MDS分析技术公司(MDS Analytical Technologies),型号#2000)来洗涤板,以除去未结合的抗体。在室温下,用针对重链和轻链具有特异性的SULFO-TAG™缀合的山羊多克隆抗人IgG抗体(杰克逊免疫研究公司(Jackson ImmunoResearch),目录号109-005-088)来检测板结合的抗体,持续1小时。洗涤之后,根据制造商推荐的程序用读取缓冲液(MSD,Meso Scale Discovery,目录号R92TD-2)对板进行显影,并且用SECTOR成像仪600(Meso Scale Discovery,型号#600)仪器来记录发光信号。

[0299] 分析直接结合信号(以相对光单位(RLU)计)随抗体浓度的变化。使用GraphPad Prism™软件(GraphPad软件版本#6)来将数据拟合到S形(四参数逻辑)剂量-应答模型中。确定与HEK293/hCD28和C4-2细胞结合的EC<sub>50</sub>值,其被定义为检测到50%的最大结合信号时的抗体浓度,以指示每种抗体分别与CD28或PSMA结合的效力。另外,计算了11.1nM的抗体对HEK293/hCD28或C4-2细胞的结合信号与所述抗体对HEK293HZ细胞的结合信号的比率。选择此代表性浓度用于高度靶细胞结合,但在CD28、PSMA阴性HEK293HZ细胞上具有低本底信号。结合率小于3的抗体在下表8中标记为NB。NB被定义为“在测定条件下未观察到特异性结合”

[0300] 在补充研究中,使用与上述方案相同的方案进行了单独的实验,但是包含了IgG4同种型对照(参见USSN 15/147,791)和亲本CD28单克隆抗体。测试溶液含有3.4pM到200nM的连续稀释液中的抗PSMA、抗CD28、抗PSMAxCD28双特异性单克隆抗体或对照抗体。在7.4nm下计算结合比。

[0301] 结果、总结和结论

[0302] 使用免疫结合测定,评估了与针对PSMA或CD28表达为阴性的细胞系相比,抗PSMAxCD28双特异性抗体特异性结合表达PSMA或CD28的细胞的能力。包含了对PSMA或CD28具有特异性的双价亲本抗体以进行比较。使用SULFO-TAG™缀合的抗人IgG抗体来检测抗体浓度高达100nM的96孔高结合板(MSD,Meso Scale Discovery,目录号L15XB-3/LX11XB-3)上抗体与细胞的剂量依赖性结合,并且电化学发光中的结合信号记录在扇形成像仪600(MSD)上。确定与细胞结合的抗体的RLU值。针对表达CD28或PSMA的细胞,将EC<sub>50</sub>值作为效力的量度来计算。针对产生高本底信号的样品,较高的浓度被排除在EC<sub>50</sub>值的计算之外,并且数值在表8中用星号指示。比较在11.1nM下抗体与HEK293/hCD28或C4-2细胞的结合信号以及抗体与阴性HEK293HZ细胞的结合信号,从而评估抗体的结合特异性。特异性结合被定义为在此浓度下,与HEK293HZ细胞相比,抗体与表达CD28或PSMA的细胞结合的比率为3倍或更高。

[0303] 结合结果汇总于表8中。在11.1nM的浓度下,本发明的三种示例性抗PSMAxCD28双特异性抗体(bs16429D、bs16430D和bs16431D)特异性结合HEK293-hCD28和C4-2细胞两者,其比率分别比HEK293HZ细胞高13-31倍和4-10倍。双特异性抗体对HEK293-hCD28细胞的效力在5.31-9.58nM的EC<sub>50</sub>值范围内,而对C4-2细胞的效力在0.35-5.24nM的范围内。

[0304] 表8:单克隆抗体与细胞表面抗原的结合

抗体 ID	HEK293-hCD28 EC <sub>50</sub> (M)	C4-2 EC <sub>50</sub> (M)	HEK293-hCD28/HEK293HZ**	C4-2/ HEK293HZ***
bs16429D	9.58E-09	8.53E-10	31	10
mAb14226P2 (CD28)	1.04E-09	NB	68	1
mAb11838P2 (PSMA)	NB	7.38E-10*	<1	4
bs16430D	8.47E-09	5.24-09	41	10
[0305] mAb14193P2 (CD28)	1.02E-08	NB	110	1
mAb11810P2 (PSMA) #	NB	9.46E-10	1	25
bs16431D	5.31E-09	3.50E-10*	13	4
mAb14216P2 (CD28)	2.47E-09	NB	114	1
对照				
抗 Feld#	NB	NB	1	1

[0306] NB:非特异性结合,如11.1nM下细胞信号与HEK293HZ的比率小于3倍所指示的

[0307] \*:由于高本底,11.1nM以上的浓度被从EC<sub>50</sub>计算中排除

[0308] #:样品作为单个稀释系列运行

[0309] \*\*:11.1nM抗体与HEK293-hCD28的细胞结合信号(RLU)相对于HEK293HZ亲本的比率

[0310] \*\*\*:11.1nM抗体与C4-2的细胞结合信号(RLU)相对于HEK293HZ的比率

[0311] 亲本抗体与对应于用于产生所述抗体的抗原的细胞特异性地结合,如抗体ID列中的括号中所指示的。亲本抗体与HEK293-hCD28和C4-2细胞结合的EC<sub>50</sub>值对于HEK293-hCD28细胞上在1.04-10.2nM的范围内,而对于C4-2细胞在0.738-0.946nM的范围内。针对抗体,C4-2细胞上较高浓度的mAb11838P2和mAb11810P2结合值被排除在EC<sub>50</sub>值的计算之外,以补偿阴性细胞上的高本底。如所预期的,IgG对照抗体未特异性结合表达CD28或PSMA的细胞系。

[0312] 如上所述进行补充实验,但是包含IgG4同种型对照和亲本CD28单克隆抗体。生成此数据作为衔接性研究,以证明使用hIgG4s同种型对照存在显著的本底信号。数据汇总于表9中。如表9所示,抗CD28抗体mAb14226P2特异性结合表达人CD28的细胞HEK293-hCD28 P-3。抗CD28抗体mAb14226P2不与不表达人CD28的细胞结合,无论所述细胞是否表达PSMA(C4-2)(HEK293HZ)。

[0313] 表9:单克隆抗体同种型与细胞表面抗原的结合

抗体 ID	HEK293-hCD28 P-3 EC <sub>50</sub> (M)	C4-2 P-7 EC <sub>50</sub> (M)	HEK293-hCD28/ HEK293HZ*	C4-2 / HEK293HZ**
[0314] mAb14226P2	8.41E-10	NB	99	1
对照				
抗 Feld1-hIgG1	NB	NB	1	1
抗 Feld1-hIgG4	NB	NB	1	1

[0315] NB:非特异性结合,如11.1nM下细胞信号与HEK293HZ的比率小于3倍所指示的

[0316] \*:7.4nM抗体与HEK293-hCD28的细胞结合信号(RLU)相对于HEK293HZ亲本的比率

[0317] \*\*:7.4nM抗体与C4-2的细胞结合信号(RLU)相对于HEK293HZ的比率

[0318] PSMAxCD28双特异性抗体与T细胞和靶细胞的结合

[0319] 实验程序

[0320] 利用流式细胞术分析确定抗PSMAxCD28双特异性抗体与C4-2、22RV1,RAJI、人和食蟹猴T细胞的结合,然后用藻红蛋白(PE)标记的抗人IgG抗体进行检测。简而言之,1x10<sup>5</sup>细胞/孔在4℃下与PSMAxCD28双特异性抗体或人IgG4抗体(参见USSN 15/147,791)的连续稀释液一起孵育30分钟,所述抗体与人抗原结合而与人或食蟹猴CD28无交叉反应,针对人和食蟹猴T细胞,范围为133nM到8.14pM,而针对表达PSMA的细胞,范围为133nM到61pM。孵育后,将细胞用含有1%过滤的FBS的冷PBS洗涤两次,并将PE缀合的抗人二级抗体(杰克逊免疫研究公司,目录号709-116-149)添加到细胞中并再孵育30分钟。将活/死染料添加到人和食蟹猴T细胞孵育中。不含抗体或仅含二级抗体的孔作为对照。

[0321] 在与表达PSMA的细胞一起孵育之后,洗涤细胞,将其重新悬浮在200μL含有1%过滤的FBS的冷PBS中,并在BD FACS Canto II上通过流式细胞术进行分析。

[0322] 在与人或食蟹猴T细胞一起孵育后,洗涤细胞,并将其用抗CD2(BD,目录号562638),抗CD16(BD,目录号562874)、抗CD4(BD,目录号564305)和抗CD8(BD,目录号563795)抗体的混合物在明亮染色缓冲液(BD,目录号566349)中染色,用于在4℃下再孵育20分钟。洗涤后,将细胞重新悬浮在200μL含有1%过滤后的FBS(TCB,目录号101)的冷PBS(Gibco,目录号14190-144)中,在活/CD2+/CD4+/CD16-或活/CD2+/CD8+/CD16-门中进行门控,并在BD FACS LSR-Fortessa-X20上通过流式细胞术进行分析。

[0323] 结果、总结和结论:

[0324] 通过流式细胞术测试PSMAxCD28双特异性抗体与人T细胞表面的结合。

[0325] bs16429D与所有T细胞结合,其中EC50值为4.80x10<sup>-8</sup>M。其与CD4+和CD8+ T细胞两者结合,其中EC50值分别为5.09x10<sup>-8</sup>M和5.89x10<sup>-8</sup>M。

[0326] bs16431D与所有T细胞弱结合,其中EC50值为1.80x10<sup>-7</sup>。其与CD4+和CD8+ T细胞弱结合,其中EC50值分别为1.67E-07M和1.80E-07M。

[0327] 通过流式细胞术测试PSMAxCD28双特异性抗体与表达PSMA的细胞系表面的结合。

[0328] C4-2是衍生自LNCaP(衍生自淋巴结迁移的雄激素敏感性人前列腺腺癌细胞;参见Wu等人,《国际癌症杂志(Int.J.Cancer)》,57:406-412(1994))细胞的CaP(前列腺癌)细胞系。bs16429D和bs16431D均与C4-2细胞结合(参见Liu等人,2004,《前列腺(Prostate)》,60:98-108),其中EC50值分别为3.87x10<sup>-9</sup>M和1.50x10<sup>-9</sup>M。

[0329] 22RV1是上皮前列腺腺癌细胞系(参见《体外细胞和发育生物学:动物(In Vitro Cell Dev.Biol.Anim.)》,1999,35(7):403-409)。bs16429D和bs16431D均与22RV1细胞结合,其中EC50值分别为3.05x10<sup>-9</sup>M和6.33x10<sup>-9</sup>M。

[0330] 这些结果总结在表10-12中。

[0331] 表10:抗PSMAxCD28双特异性抗体与人T细胞的结合

抗体 ID	人 CD2+ T 细胞 FACS[M]	人 CD4+ T 细胞 FACS[M]	人 CD8+ T 细胞 FACS[M]
[0332] bs16429D	4.80E-08	5.09E-08	5.89E-08
bs16431D	(弱) 1.80E-07	(弱) 1.67E-07	(弱) 1.80E-07
同种型对照	无结合	无结合	无结合

[0333] 表11:抗PSMAxCD28双特异性抗体与食蟹猴T细胞的结合

抗体 ID	食蟹猴 CD2+ T 细胞 FACS[M]	食蟹猴 CD4+ T 细胞 FACS[M]	食蟹猴 CD8+ T 细胞 FACS[M]
[0334] bs16429D	1.10E-08	1.93E-08	(弱) 6.84E-08
bs16431D	(弱) 1.34E-07	(弱) 2.81E-07	非常弱的结合
同种型对照	无结合	无结合	无结合

[0335] 表12:抗PSMAxCD28双特异性抗体与表达PSMA的细胞的结合

抗体ID	C4-2细胞FACS [M]	22RV1细胞FACS [M]	Raji细胞FACS [M]
[0336] bs16429D	3.87E-09	3.05E-09	无结合
bs16431D	1.50E-09	6.33E-09	无结合
同种型对照	无结合	无结合	无结合

[0337] 实例6:PSMAxCD28双特异性抗体的初级和工程化生物测定

[0338] T细胞活化是通过刺激T细胞受体 (TCR) 实现的,所述受体识别抗原呈递细胞 (APC) 上由I类或II类主要组织相容性复合物 (MHC I或MHC II) 蛋白质呈递的特定肽 (Goldrath等人,“选择和维持多样T细胞库 (Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire)”,《自然 (Nature)》402,255-262 (1999))。活化的TCR反过来启动一系列信号传导事件,所述信号传导事件可以由报告基因监测,由各种转录因子 (如活化蛋白1 (AP-1)、活化的T细胞的核因子 (NFAT) 或活化的B细胞的核因子K-轻链增强子 (NFκB)) 驱动。然后,通过在T细胞上组成型地或可诱导地表达的共受体 (如CD28、CTLA-4 (细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4)、PD-1 (程序性细胞死亡蛋白1)、LAG-3 (淋巴细胞活化基因3) 或其它分子) 的接合来进一步细化T细胞应答 (Sharpe等人,“B7-CD28超家族 (B7-CD28 Superfamily)”,《免疫学自然评论 (Nat. Rev. Immunol.)》,2 (2):116-26 (2002))。共刺激分子CD28由APC上表达的内源性配体CD80或CD86活化。CD28在TCR活化之后加强细胞信号,如由NFκB转录因子控制的通路。CD28共信号对于有效的T细胞活化 (如T细胞分化、增殖、细胞因子释放和细胞死亡) 很重要 (Smeets等人,“由T细胞受体/CD28共刺激诱导的NFκB活化由蛋白激酶C-θ介导 (NFκB activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C-θ)”,《美国国家科学院院报 (PNAS)》,97 (7):3394-3399 (2012))。

[0339] 为了鉴定在存在初次刺激和PSMA靶标表达的情况下增强T细胞活性的抗体,在使用人原代T细胞的工程化报告基因生物测定和基于细胞的测定中表征了抗CD28抗体和抗PSMAxCD28双特异性抗体。所述测定评估了抗PSMA/CD28双特异性抗体在存在和不存在初次刺激以及在存在和不存在靶标表达的情况下的行为。所述测定的示意图在图3中示出。进行所述测定以选择在存在初次刺激和靶标表达的情况下增强T细胞活性的抗PSMAxCD28双特异性抗体。因此,所述测定评估了双特异性抗体在存在和不存在初次刺激和靶标表达的情况下的行为。

[0340] 1) 基于荧光素酶的报告基因测定:

[0341] a) 报告基因T细胞的工程化:

[0342] 用NFκB荧光素酶报告基因构建体 (NFκB-Luc, SA生物科学公司 (Biosciences) /凯杰 (Qiagen), 目录号CLS-013L) 转导Jurkat衍生的T细胞克隆JRT3.T3.5 (ATCC, #TIB-153)。在分离嘌呤霉素抗性克隆 (JRT3.T3.5/NFκB-Luc克隆1C2) 之后,对细胞进行进一步工程化为表达全长人TCRα (1G4A-氨基酸M1到S274) 和TCRβ亚基 (1G4B-氨基酸M1到G311) (Robbins

等人,“TCR CDR中的单个和双个氨基酸取代可以增强抗原特异性T细胞功能(Single and Dual Amino Acid Substitutions in TCR CDRs Can Enhance Antigen-Specific T Cell Functions)”,《免疫学杂志(J.Immunol.)》180(9):6116-31(2008)。在分离单个克隆(J.RT3-T3.5/NF $\kappa$ B-Luc/1G4AB克隆1D2)之后,对细胞进行进一步工程化为表达全长人CD8 $\alpha$ (登录号NP\_001139345的hCD8a-氨基酸M1到V235)和人CD8  $\beta$ 亚基(登录号P10966的hCD8b-氨基酸M1到K210)。再次产生单个克隆(J.RT3-T3.5/NF $\kappa$ B-Luc/1G4AB/hCD8ab克隆1D5),并且用全长人CD28(hCD28-氨基酸M1到S220登录号P10747)进一步转导。针对高CD28表达对细胞进行分选,并维持在RPMI+20%FBS+青霉素/链霉素/谷氨酰胺(P/S/G)+NEAA+NaPyr+1 $\mu$ g/mL嘌呤霉素+500 $\mu$ g/mL G418+250 $\mu$ g/mL潮霉素+10 $\mu$ g/mL杀稻瘟菌素中。为了更快地生长,将工程化的报告基因T细胞保存在不含抗生素的细胞培养培养基中,并作为工程化的报告基因T细胞用于基于细胞的荧光素酶实验。试剂信息如下:RPMI 1640,欧文科学公司,目录号9160;FBS,Seradigm,目录号1500-50;青霉素/链霉素/谷氨酰胺100x(P/S/G),赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific),目录号10378-016;非必需氨基酸(NEAA),欧文科学公司,目录号9304;丙酮酸钠(NaPyr),密理博,目录号TMS-005-C;嘌呤霉素,西格玛,目录号P8833;遗传霉素(G418),赛默飞世尔科技公司,目录号11811-098;潮霉素;杀稻瘟菌素。

[0343] b) APC的工程化:

[0344] 用人PSMA(登录号Q04609的氨基酸M1到A750)转导表达人CD20(登录号NP\_068769.2的氨基酸M1到P297)的稳定的HEK293细胞系(ATCC,#CRL-1573)。通过荧光活化细胞分选术(FACS)分离人PSMA阳性细胞,并且将高分选的细胞系HEK293/CD20/hPSMA保存在补充有500 $\mu$ g/mL G418的DMEM+10%+P/S/G+NEAA中。

[0345] c) T细胞/APC刺激:

[0346] 在此实验中,通过两种双特异性抗体来刺激工程化的报告基因T细胞。第一刺激由T细胞活化双特异性抗体抗CD3xCD20 hIgG4(参见W014/047231、US9657102和USSN 14/661,334)递送,所述双特异性抗体靶向工程化报告基因T细胞上的CD3分子和HEK293细胞上的CD20。在此,第一刺激绕过了通过其天然配体来活化TCR的需要,所述天然配体是MHC分子上显示的特定肽。第二刺激由CD28双特异性抗体驱动。这种抗体通过其在APC上表达的配体CD80/CD86模仿T细胞上的CD28活化。在此,抗体与T细胞上的CD28和工程化HEK293细胞上的PSMA相互作用,并且驱动工程化报告基因T细胞上的CD28的活化。TCR和CD28的同时活化导致NF $\kappa$ B的转录活性增强,这进而诱导报告基因荧光素酶的产生。

[0347] d) 荧光素酶测定的建立:

[0348] 将补充有10%FBS和P/S/G的RPMI1640用作用于制备细胞悬浮液和抗体稀释液的测定介质,以筛选抗PSMA x CD28双特异性抗体。

[0349] 筛选前一天,在细胞培养培养基中将工程化报告基因T细胞培养至 $1 \times 10^6$ 细胞/mL。在存在恒定的50pM抗CD20 x CD3或hIgG4同种型对照的情况下,对三倍(1:3)连续稀释的抗PSMA x Cd28双特异性抗体和对照进行测试。10点稀释液介于15pM到100nM之间,其中最终稀释液不含抗PSMA x CD28抗体。按以下顺序添加试剂:1) 将连续稀释的抗体添加到96孔白色平底板的对应孔中;2) 向每个孔添加固定浓度的50pM抗CD20 x CD3或hIgG4同种型对照;3) 将重新悬浮至 $4 \times 10^5$ 细胞/mL的APC添加到板中,最终浓度为 $1 \times 10^4$ 细胞/孔;4) 将过夜培养的报告基因T细胞以 $2 \times 10^6$ /mL的浓度重新悬浮,并且添加到的板中,最终浓度为 $5 \times 10^4$ 细胞/

孔。在添加100 $\mu$ L ONE-Glo™ (普洛麦格公司 (Promega), 目录号E6051) 试剂以裂解细胞并检测荧光素酶活性之前, 将板在37 $^{\circ}$ C/5%CO<sub>2</sub>下孵育4-6小时。在多标签板读取器Envision (珀金埃尔默, 型号2104) 上以相对光单位 (RLU) 捕获发射的光。一式两份地对所有连续稀释液进行测试。

[0350] 通过使用GraphPad Prism™软件将数据拟合到10点剂量-应答曲线上的四参数逻辑方程来确定抗体的EC<sub>50</sub>值。使用以下方程式计算倍数诱导:

$$[0351] \quad \text{倍数诱导} = \frac{\text{抗体}[100 \text{ nM}] \text{的平均 RLU 值}}{\text{抗体}[0 \text{ nM}] \text{的平均 RLU 值}}$$

[0352] 2) 使用原代人CD4<sup>+</sup>T细胞的IL-2功能测定法:

[0353] 开发了原代CD4<sup>+</sup>T细胞/APC功能测定法, 以评估与抗PSMA x CD28双特异性抗体接合时, CD28活化对IL-2产生的影响。

[0354] a) 人原代CD4<sup>+</sup>T细胞分离:

[0355] 从健康的供体白细胞包中分离人外周血单核细胞 (PBMC)。按照制造商推荐的方案, 使用50mL SepMate™管 (干细胞技术公司 (StemCell Technologies), 目录号85450) 通过密度梯度离心完成PBMC分离。简而言之, 将15mL FicollPaque PLUS分层到50mL SepMate管中, 然后添加30mL用PBS以1:2稀释的白细胞 (达尔伯克氏磷酸盐缓冲盐水溶液, 欧文科学公司, 目录号9240)。根据SepMate制造商的方案进行后续步骤。按照制造商的说明, 随后使用美天旎公司 (Miltenyi Biotec) 的人CD4微珠试剂盒 (目录号130-045-101) 从PBMC中分离出CD4<sup>+</sup>T细胞。将分离的CD4<sup>+</sup>T细胞冷冻在浓度为每小瓶5 $\times$ 10<sup>6</sup>个细胞的含有10%DMSO的FBS (马克龙精细化学品公司 (Macron Fine Chemicals), 目录号4948-02) 中。

[0356] b) 从用CD28抗体处理的原代CD4<sup>+</sup>T细胞中释放的IL-2:

[0357] 在此测定中, 使用与被工程化为表达人CD20的HEK293细胞组合的抗CD20 x CD3双特异性抗体, 通过CD3在其表面上的交联来活化原代CD4<sup>+</sup>T细胞。抗CD20 x CD3双特异性抗体的CD20臂与表达CD20的HEK293细胞的结合驱动CD3受体的聚集, 从而提供了对T细胞刺激重要的第一信号。然而, 为了检测可定量的IL-2释放, 可通过使CD28分子交联而提供的共刺激是重要的。在此, 双特异性抗PSMA x CD28抗体与CD4<sup>+</sup>T细胞上的CD28和工程化HEK293/hCD20细胞上的PSMA相互作用, 并且驱动聚集-CD28的活化。组合的TCR和CD28的接合导致释放到细胞培养培养基中的IL-2产量增加。使用均质的免冲洗AlphaLisa试剂盒 (珀金埃尔默 (PerkinElmer), 目录号AL221) 从细胞上清液中检测IL-2并对其进行定量。

[0358] 于测定当天, 在含有50U/ml 苯并酶核酸酶 (EMD密理博, 目录号71205-3) 的补充有10%FBS、HEPES、NaPyr、NEAA和0.01mM BME ( $\beta$ -巯基乙醇, 西格玛奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich), 目录号M-7522) 的刺激培养基 (X-VIVO 15细胞培养培养基 (龙沙集团 (Lonza), 目录号04-418Q)) 中解冻先前从供体分离和冷冻的人CD4<sup>+</sup>T细胞。将细胞以1200rpm离心10分钟, 重新悬浮在刺激培养基中, 并且以1 $\times$ 10<sup>5</sup>细胞/孔的浓度平板接种在96孔圆形底板中。在初次刺激培养基中, 用15 $\mu$ g/mL 丝裂霉素C (西格玛-奥德里奇公司, 目录号M4287) 处理被工程化为单独表达或与人PSMA组合地表达人CD20的HEK293细胞, 浓度为10 $\times$ 10<sup>6</sup>个细胞/mL。在37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>下孵育1小时之后, 将HEK293细胞用含有2%FBS的D-PBS洗涤3次, 并且以每孔1 $\times$ 10<sup>4</sup>个细胞的最终浓度添加到含有CD4<sup>+</sup>T细胞的孔中。

[0359] 随后, 在存在50pM抗CD20 x CD3或hIgG4同种型对照的情况下, 向孔中添加在15pM

到100nM范围内的1:3连续稀释的抗PSMA x CD28双特异性或对照抗体。10点稀释液的最終点不含抗PSMA x CD28或抗CD28抗体。将板在37℃, 5%CO<sub>2</sub>下孵育72小时之后, 将其离心以沉淀细胞, 并且收集40μL培养基上清液。由此, 根据制造商的方案, 在人IL-2 AlphaLISA测定中测试了5μL。在多标签板读取器Envision (珀金埃尔默, 型号2104) 上获得测量值。使用已知IL-2浓度的标准曲线确定在测定孔中产生的IL-2浓度。一式两份地对所有连续稀释液进行测试。

[0360] 通过使用GraphPad Prism™软件将数据拟合到10点剂量-应答曲线上的四参数逻辑方程来确定抗体的EC<sub>50</sub>值。使用以下方程式计算倍数诱导:

$$[0361] \quad \text{倍数诱导} = \frac{\text{抗体}[100 \text{ nM}] \text{的平均 IL-2 值}}{\text{抗体}[0 \text{ nM}] \text{的平均 IL-2 值}}$$

[0362] 结果、总结和结论

[0363] 如图4A和4B所示, 在存在初次刺激 (REGN2281抗CD20xCD3) 和在HEK293/hCD20细胞上表达的PSMA的情况下, hPSMA x hCD28增强了CD4+ T细胞的活化 (如通过IL-2释放所测量的) 和工程化JRT3.T3/1G4/hCD28细胞的活化 (如通过荧光素酶活性所测量的)。CD28二价抗体 (mAb14193P2) 在存在初次刺激的情况下略微增强T细胞活性, 而在不存在初次刺激的情况下在工程化生物测定中略微增强活性。在存在CD20 x CD3刺激的情况下, CD28超激动剂TGN1412在初级和工程化测定中均增强T细胞活化, 尽管其程度比在存在靶PSMA和初次刺激的情况下的PSMA x CD28双特异性抗体要低。

[0364] 1) 基于荧光素酶的报告基因测定:

[0365] 除了50pM恒定hIgG4同种型对照或抗CD3 x CD20双特异性抗体 (T细胞刺激双特异性抗体) 之外, 表13和14总结了与HEK293/hCD20或HEK293/hCD20/hPSMA细胞一起共孵育的工程化报告基因T细胞的EC<sub>50</sub>和倍数诱导值。

[0366] 表13: 在不存在TCR刺激的情况下, 工程化报告基因T细胞中的荧光素酶活性

抗体	HEK293/hCD20		HEK293/hCD20/hPSMA	
	EC <sub>50</sub> [M]	倍数诱导	EC <sub>50</sub> [M]	倍数诱导
bs16429D	-	0.81	-	1.04
bs16430D	-	0.87	-	0.89
bs16431D	-	0.94	-	0.98
[0367] mAb14226P2 (CD28)	5.11 E-09	4.76	4.90 E-09	3.59
mAb14193P2 (CD28)	-	0.86	-	0.89
mAb14216P2 (CD28)	n/c	2.80	n/c	3.95
单臂 mAb14226P2	-	0.83	-	0.88
单臂 mAb14193P2	-	0.88	-	0.86
单臂 mAb14216P2	-	0.89	-	0.91

[0368] 表14总结了与HEK293/hCD20或HEK293/hCD20/hPSMA细胞一起共孵育的工程化T细胞以及50pM恒定hIgG4同种型对照中荧光素酶活性的EC<sub>50</sub>值和倍数诱导结果。

[0369] 表14: 在存在TCR刺激的情况下, 工程化报告基因T细胞中的荧光素酶活性

抗体	HEK293/hCD20		HEK293/hCD20/hPSMA	
	EC <sub>50</sub> [M]	倍数诱导	EC <sub>50</sub> [M]	倍数诱导
bs16429D	-	1.00	1.72 E-10	16.15
bs16430D	-	0.92	4.57 E-10	13.61
bs16431D	-	0.95	2.78 E-10	24.47
[0370] mAb14226P2 (CD28)	3.59 E-09	3.16	3.27 E-09	3.03
mAb14193P2 (CD28)	2.23 E-08	1.27	-	1.37
mAb14216P2 (CD28)	n/c	3.26	n/c	3.15
单臂 mAb14226P2	-	0.99	-	0.95
单臂 mAb14193P2	2.24 E-08	1.10	-	1.15
单臂 mAb14216P2	-	0.96	-	0.94

[0371] 表14总结了与HEK293/hCD20或HEK293/hCD20/hPSMA细胞一起共孵育的工程化T细胞以及50pM恒定的抗CD3xCD20中荧光素酶活性的EC<sub>50</sub>值和倍数诱导结果。

[0372] 当用50pM hIgG4同种型对照处理T细胞和APC时,在不存在TCR刺激的情况下,没有任何CD28双特异性抗体先示出荧光素酶活性增加,而不管测定中使用的APC系如何。在表14所示的HEK293/hCD20细胞(4.76x)和HEK293/hCD20/hSPMA细胞(3.59x)上的亲本CD28抗体(mAb14226P2)中的一种抗体中观察到轻微的萤光素酶活化。

[0373] 相反,如果用50pM抗CD3 x CD20双特异性抗体处理细胞,当与在表面上表达hPSMA的APC一起共孵育时,所有三种抗PSMA x CD28双特异性抗体bs16429D、bs16430D和bs16431D都强烈诱导荧光素酶活性。不论APC系如何,在单臂对照(mAb14226P2、mAb14193P2和mAb14216P2的一个臂)中观察到非常低的活化或没有活化。如表14所示,在所有三种亲本CD28抗体(mAb14226P2,mAb14193P2和mAb14216P2)中均观察到轻微的萤光素酶活化。

[0374] 2) 使用原代人CD4<sup>+</sup> T细胞的IL-2功能测定法:

[0375] 在测量IL-2细胞因子产量的功能性原代CD4<sup>+</sup> T细胞测定中评估了抗PSMA x CD28双特异性抗体在不存在或存在PSMA靶标表达的情况下通过T细胞上的CD28提供共刺激的能力。

[0376] 除了50pM恒定hIgG4同种型对照或抗CD3 x CD20双特异性抗体(T细胞刺激双特异性抗体)之外,表15总结了与HEK293/hCD20或HEK293/hCD20/hPSMA细胞一起共孵育的CD4<sup>+</sup>T细胞的EC<sub>50</sub>和倍数诱导值。

[0377] 如所预期的,在含有恒定量的hIgG4同种型对照的孔中未观察到可测量的IL-2释放,因为不存在原代T细胞刺激。

[0378] 相反,在用抗CD3 x CD20双特异性抗体处理的样品中检测到可测量的IL-2水平。在这些条件下,如果将人CD4<sup>+</sup> T细胞与HEK293/hCD20细胞一起共孵育,则所有测试的CD28单克隆抗体(包含抗CD28抗体和抗PSMA x CD28双特异性抗体(除了bs16430D和bs16431D外))均显示出IL-2水平升高(表15)。亲本抗体mAb14226P2显示出最高的诱导倍数和6nM左右的EC<sub>50</sub>。当将CD4<sup>+</sup> T细胞与表达hPSMA的APC和抗CD3 x CD20双特异性抗体一起共培养时,在所有三种抗PSMAxCD28双特异性抗体(bs16429D、bs16430D和bs16431D)中均检测到IL-2的释放。在如表15所示的相同环境中,用其单臂对照抗体和亲本抗体来测量较低的IL-2水平。

[0379] 表15:在存在TCR刺激的情况下从原代CD4<sup>+</sup> T细胞产生IL-2

抗体	HEK293/hCD20		HEK293/hCD20/hPSMA	
	EC <sub>50</sub> [M]	倍数诱导	EC <sub>50</sub> [M]	倍数诱导
bs16429D	n/c	22	0.27 E-09	606
bs16430D	-	1	0.15 E-09	165
bs16431D	-	1	0.22 E-09	463
[0380] mAb14226P2 (CD28)	6.05 E-09	110	8.69 E-09	46
mAb14193P2 (CD28)	n/c	27	n/c	13
mAb14216P2 (CD28)	n/c	13	n/c	11
单臂 mAb14226P2	n/c	21	n/c	14
单臂 mAb14193P2	13.78 E-09	21	14.52 E-09	13
单臂 mAb14216P2	n/c	9	n/c	6

[0381] 表15总结了与HEK293/hCD20或HEK293/hCD20/hPSMA细胞一起共孵育的原代CD4<sup>+</sup>T细胞以及50pm恒定抗CD3xCD20抗体的IL-2产生的EC<sub>50</sub>值和倍数诱导结果。

[0382] 实例7:在存在抗CD20xCD3的PSMA和TCR刺激的情况下,抗PSMAxCD28双特异性抗体加强T细胞活化

[0383] 已经产生了示例性抗PSMAxCD28双特异性抗体,并且对其进行了biacore验证(参见例如,实例1和4)。一对双特异性抗体(CD20xCD3和本发明的示例性抗PSMAxCD28双特异性抗体)用于通过结合PSMA(CD20和前列腺特异性膜肿瘤抗原-PSMA)来诱导肿瘤细胞上的T细胞和共刺激受体的聚集(图5A)。为了展示PSMAxCD28在存在靶细胞上表达的PSMA和TCR活化的情况下结合并活化CD28,执行了一系列基于细胞的体外测定。

[0384] CD28的定位

[0385] 细胞系

[0386] 使用稳定的HEK293细胞系(ATCC#CRL-1573)来产生细胞系HEK293/hCD20、HEK293/hPSMA和HEK293/hCD20/hPSMA。为了产生HEK293/hPSMA细胞系,使用对泛素C启动子驱动的PSMA(登录号Q04609的氨基酸M1到A750)和新霉素抗性基因进行编码的哺乳动物载体进行稳定转染。类似地,使用对泛素启动子驱动的hCD20(登录号NP\_068769.2的氨基酸M1到P297)进行编码的哺乳动物载体产生HEK293/hCD20细胞系。在500μg/ml的遗传霉素A中培养转染的细胞,以选择稳定表达的细胞系。

[0387] 为了产生HEK293/hCD20/hPSMA细胞,使用对人PSMA(登录号Q04609的氨基酸M1到A750)和新霉素抗性基因进行编码的慢病毒质粒来转染HEK293T细胞,从而促进病毒颗粒的产生,所述病毒颗粒随后用于感染HEK293/hCD20细胞。通过荧光活化细胞分选术(FACS)分离人PSMA阳性细胞。将所有产生的细胞系均维持在补充有500μg/mL G418的DMEM+10%FBS+P/S/G+NEAA中。根据ATCC推荐的方案培养Jurkat克隆E6-1(ATCC,#TIB-152)。

[0388] 为了产生MC38/hPSMA细胞,使用对人PSMA(登录号Q04609的氨基酸M1到A750)和新霉素抗性基因进行编码的慢病毒质粒来转染HEK293T细胞,从而促进病毒颗粒的产生,所述病毒颗粒随后用于感染MC38亲本细胞。通过FACS分离人PSMA阳性细胞。将MC38/hPSMA维持在补充有500μg/mL G418的DMEM+10%FBS+P/S/G+NEAA中。

[0389] Amnis图像流

[0390] 将Jurkat T细胞和靶细胞(HEK293/hPSMA或HEK293/hPSMA/hCD20)与单独的CD20xCD3-Alexa488(REGN2280,0.5μg/ml)或与PSMAxCD28-Alexa647(bs16429D,1μg/ml)一起在37°C下孵育1小时。将细胞用FACS缓冲液(3%FBS,PBS中的2mM EDTA)轻轻洗涤两次,并

在4℃下用抗CD28-生物素 (REGN1412, 2μg/ml) 染色15分钟,并且随后在4℃下用链霉亲和素-PE-CF594 (BD 562284, 1μg/ml) 和Hoechst 33342 (赛默飞世尔H3570, 1μM) 染色15分钟。用PBS洗涤细胞,并将细胞储存在BD稳定固定剂 (BD 338036) 中。在Amnis®成像流式细胞仪上收集细胞图像,并用IDEAS®软件进行分析。将细胞在双峰明视场、双峰核、核焦点、单点计数、单峰CD28上进行门控。突触区域由基于核染色的峰谷掩模限定。通过在峰谷掩模与CD28之间的重叠区域上进行门控来消除具有错误峰谷掩模的细胞。通过以下公式计算CD28进/出突触的比率:

[0391]  $CD28进/出突触 = \frac{\text{突触中CD28的强度}}{\text{CD28总强度} - \text{突触中CD28的强度}} * 100\%$ 。

[0392] 结果、总结和结论

[0393] 将T细胞与过度表达CD20和PSMA的工程化靶细胞 (HEK293/hPSMA或HEK293/hCD20/hPSMA) 以及荧光标记的双特异性抗体 (CD20xCD3用绿色,PSMAxCD28用红色) 一起共培养。为了确定CD28的定位,在37℃下孵育1小时后,将细胞固定并用抗CD28染色。使用Amnis图像流式细胞术获得T细胞和靶细胞缀合物的图像。在靶细胞上不存在PSMA表达的情况下,单独的CD20xCD3双特异性抗体在T细胞上几乎不诱导或完全不诱导CD28聚集。当在靶细胞上表达PSMA时,CD20xCD3定位于T细胞和靶细胞缀合物的界面,并且形成CD28定位处的免疫突触 (IS)。PSMAxCD28与CD20xCD3一起进一步增强了CD28在IS处的积累。通过计算IS内部的CD28染色与IS外部的CD28染色的比率来定量CD28的分布 (图5B)。

[0394] 已经得出结论,在存在PSMAxCD3和表达PSMA的靶细胞的情况下,PSMAxCD28在IS (T细胞活化信号传导发生的位置) 处驱动稳健的CD28积累。

[0395] 细胞因子释放

[0396] 为了进一步研究TAAxCD28对T细胞活化的影响,在与原代人T细胞和过度表达不同TAA的工程化靶细胞 (HEK293/hPSMA、HEK293/hCD20或HEK293/hCD20/hPSMA) 一起共培养的剂量滴定的CD20xCD3或PSMAxCD28双特异性抗体一起孵育之后,测量T细胞增殖以及IL-2和IFN γ 细胞因子的释放 (图5C-5G)。已经证实,本发明的示例性抗PSMAxCD28抗体和抗PSMAxCD3双特异性抗体不竞争结合表达PSMA的细胞,并且因此结合不同的表位 (图5H)。进一步证实了,在靶细胞 (HEK293/hCD20/hPSMA加5pM CD20xCD3) 上存在CD3刺激和PSMA表达两者的情况下,PSMAxCD28诱导T细胞活化。在靶细胞上不存在PSMA表达 (与HEK293/hCD20一起共培养) 或不存在CD3刺激 (与HEK293/PSMA加5pM CD20xCD3或HEK293/hCD20/hPSMA加5pM同种型对照一起共培养) 的情况下,未观察到示例性抗PSMAxCD28双特异性抗体活化T细胞。 (图5E-5G)。总的来说,证明了本发明的示例性抗PSMAxCD28抗体在存在PSMAxCD3和表达PSMA的靶细胞的情况下驱动T细胞活化,从而导致增殖和细胞因子分泌增加。

[0397] 实例8:表达PSMA的细胞的杀伤

[0398] 进行了两项基于FACS的细胞毒性研究。在第一项研究中,在存在或不存在抗PSMAxCD28刺激的情况下,在存在人外周血单核细胞 (PBMC) 的情况下,对C4-2细胞进行了基于FACS的细胞毒性。在存在固定浓度的抗PSMAxCD28双特异性抗体和连续稀释的抗PSMAxCD3双特异性抗体的情况下进行刺激。除使用食蟹猴PBMC代替人PBMC以外,第二项研究在其它方面与第一项研究相同。得出的结论是,在存在PSMAxCD3的TCR刺激的情况下,PSMAxCD28双特异性抗体会加强T细胞活化和对前列腺肿瘤细胞的细胞毒性。

[0399] 实验方法

**[0400] 人原代CD4<sup>+</sup> T细胞分离**

[0401] 从健康的供体白细胞包中分离人外周血单核细胞(PBMC)。按照制造商的方案,使用50mL SepMate™管通过密度梯度离心完成PBMC分离。随后使用来自干细胞技术公司(StemCell Technologies)的EasySep™人CD4<sup>+</sup> T细胞分离试剂盒并按照制造商的推荐说明从PBMC中分离CD4<sup>+</sup> T细胞。将分离的CD4<sup>+</sup> T细胞冷冻在含有10% DMSO的FBS中,浓度为每小瓶 $50 \times 10^6$ 个细胞。

**[0402] 原代人T细胞活化测定**

[0403] 在测定当天,在含有50U/ml苯并酶核酸酶的刺激培养基(补充有10% FBS、HEPES、NaPyr、NEAA和0.01μM BME的X-VIVO 15细胞培养基)中解冻先前分离和冷冻的人CD4<sup>+</sup> T细胞。将细胞以1200rpm离心10分钟,重新悬浮在刺激培养基中,并且以每孔 $1 \times 10^5$ 个细胞的浓度平板接种在96孔圆形底板中。在初次刺激培养基中,用15μg/mL丝裂霉素C处理HEK293细胞(HEK293/hPSMA, HEK293/hCD20或HEK293/hPSMA/hCD20),浓度为 $10 \times 10^6$ 个细胞/mL。在37°C, 5% CO<sub>2</sub>下孵育1小时之后,将HEK293细胞用含有2% FBS的D-PBS洗涤3次,并且以每孔 $2 \times 10^4$ 个细胞的最终浓度添加到含有CD4<sup>+</sup> T细胞的孔中。

[0404] 为了确定用于活化T细胞的CD20xCD3双特异性抗体的次优浓度,在存在500pM PSMAxCD28双特异性或hIgG4s同种型对照的情况下,以1:3连续稀释CD20xCD3,范围为1.5pM到10nM。选择恒定5pM的CD20xCD3双特异性或hIgG4对照,以及下列抗体:将1) PSMA x CD28、2) 非靶标x CD28对照、3) CD28亲本、4) CD28SA(超激动剂)、5) hIgG4同种型对照和6) hIgG4s同种型对照以1:3稀释度从15pM滴定到100nM。10点稀释的最终点不含滴定的抗体,仅含5pM的CD20xCD3双特异性或hIgG4对照。

[0405] 将板在37°C, 5% CO<sub>2</sub>下孵育48小时之后,将其离心以沉淀细胞,并且收集50μL培养基上清液。由此,根据制造商的方案,在人IL-2和人IFN γ AlphaLISA测定中测试了5μL。在珀金埃尔默的多标签板读取器Envision上获得这些测量值。生成已知IL-2或IFN γ浓度的标准曲线,以推断测定孔中产生的IL-2或IFN γ的pg/mL。一式两份地对所有连续稀释液进行测试。将沉淀的细胞与[甲基-3H]-胸苷以0.25uCi/孔在37°C, 5% CO<sub>2</sub>下孵育16小时。使用珀金埃尔默的Unifilter96细胞收获器将细胞收集到珀金埃尔默Unifilter板上。添加30μl闪烁液后,将板密封,并且使用珀金埃尔默的TopCount NXT对获得的每个孔进行每分钟计数。

[0406] 通过使用GraphPad Prism™软件根据10点剂量-应答曲线上的四参数逻辑方程来确定抗体的EC<sub>50</sub>值。

**[0407] 基于FACS的细胞毒性测定**

[0408] 为了在存在抗PSMAxCD3与抗PSMAxCD28抗体的组合的情况下监测PSMA+细胞的杀伤,用1μM荧光跟踪染料Violet Cell Tracker(英杰公司(Invitrogen),目录号34557)对C4-2细胞进行标记。标记后,将细胞在37°C下平板接种过夜。单独地,将人PBMC(纽约血液中心(New York Blood Center)或食蟹猴PBMC(新泽西州克兰福德(Cranford)科文斯(Covance))以 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL平板接种在补充的RPMI培养基中,并在37°C下孵育过夜,以通过耗竭粘附的巨噬细胞、树突状细胞和一些单核细胞来富集淋巴细胞。第二天,将靶细胞与粘附细胞耗竭的原始PBMC(效应细胞/靶细胞比率为4:1)以及单独的抗PSMAxCD3双特异性抗体或IgG4对照的连续稀释液(浓度范围:0.42nM到0.1pM)或与固定浓度的PSMAxCD28共刺激分子bs16429D或bs16431D一起以2.5μg/ml(16.7nM)在37°C下孵育96小时。

[0409] 孵育后,从细胞培养板胰蛋白酶-EDTA(密理博,登录号SM-2004-C)解离缓冲液中去除细胞,并且在FACS BD LSRFortessa-X20(BD)上通过FACS进行分析。

[0410] 对于FACS分析,将细胞用生存力远红细胞跟踪仪(英杰公司(Invitrogen))和直接缀合到CD2、CD4、CD8和CD25(BD)的抗体进行染色。用校准珠运行样品以进行细胞计数。为了评估杀伤的特异性,将靶细胞门控为Violet细胞跟踪器阳性群体。如下计算活的靶细胞的百分比:活细胞的百分比(%) = (R1/R2) \* 100,其中R1 = 存在抗体时活的靶细胞的百分比(%),并且R2 = 不存在测试抗体时活的靶细胞的百分比(%)。通过CD2<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>或CD2<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T细胞中活化的(CD25<sup>+</sup>) T细胞的百分比来测量T细胞活化。通过计算每个校准珠的活CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>细胞的数量来测量T细胞计数。

[0411] 按照制造商的方案,使用BD流式细胞术珠阵列(CBA)人Th1/Th2/Th17细胞因子试剂盒来分析培养基中积累的细胞因子的水平。

[0412] 对于FACS分析,将细胞用死/活近IR反应剂(英杰公司,目录号L34976)染料染色。在即将进行FACS分析之前,向每个孔中加入五十万(5x10<sup>5</sup>)个计数珠。每个样品收集十万(1x10<sup>5</sup>)个珠子。为了评估杀伤的特异性,在活的Violet标记的群体上对细胞进行门控。记录活人口百分比并用其计算存活率。

[0413] 通过将细胞与直接缀合到CD2、CD4、CD8、CD25和PD-1的抗体一起孵育并报告晚期活化的(CD25<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) T细胞和PD-1<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T细胞占总T细胞(CD2<sup>+</sup>)的百分比来评估T细胞活化和PD-1标志物的上调。直接缀合的抗体的信息如下:CD2, PE:CD2(C1:RPA-2.1), BD, 目录号555327; CD4, PerCP-Cy5.5:CD4(C1:OKT-4), Biolegend公司, 目录号317428; CD8, APC:CD8(C1:RPA-T8), Biolegend公司, 目录号301049; CD25, BV510:CD25(C1:M-A251), BD, 目录号563352; 以及PD-1, PE-Cy7:PD1(C1:EH12.2H7), Biolegend公司, 目录号329918。

[0414] 使用BD流式细胞珠阵列人试剂盒(BD, 目录号560484)并按照制造商方案评估来自人PBMC测定的测定孔的上清液的Th1/Th2细胞因子释放。

[0415] 结果、总结和结论:

[0416] 图6A和6B示出了在存在人或食蟹猴T细胞的情况下,抗PSMAxCD28增强了bs13644D(抗PSMAxCD3)的细胞毒性效力。测试了抗PSMAxCD3双特异性抗体作为单一药剂诱导原始人T细胞杀伤表达人PSMA的靶细胞的能力,或在共刺激性抗PSMAxCD28双特异性抗体存在下的能力。在如图6A和6B所示的研究中,将抗PSMAxCD28抗体固定为2.5μg/ml。抗PSMAxCD3以1:4倍连续稀释。将抗体与细胞一起孵育96小时。表16总结了本研究中使用的抗体的组分。

[0417] 表16:细胞毒性效力研究中双特异性抗体的组分

AbPiD	抗体形式	PSMA 臂[VH]	CD28 臂[VH]	轻链
bs16429D	PSMAxCD28	mAb11838P2	mAb14226P2	3-20 ULC
bs16431D	PSMAxCD28	mAb11810P2	mAb14216P2	1-39 ULC
bs13644D	PSMA (mAb11835P2)xCD3 (7221G)			1-39 ULC
bs17664D	EGFRvIIIxCD3(7221G)对照			1-39 ULC

[0418] 测试了示例性抗PSMAxCD28双特异性抗体是否可以通过靶向PSMA来增强T细胞活化和对前列腺癌细胞的细胞毒性。使用基于FACS的细胞毒性和T细胞活化测定法,将示例性抗PSMAxCD28双特异性抗体与PSMAxCD3组合进行了测试(图6、7A-7D)。将含有人PBMC的T细胞与内源地表达高水平PSMA的C4-2前列腺癌细胞一起共培养(数据未示出)。PSMAxCD28显著增加了单独由PSMAxCD3诱导的细胞毒性的效力,所述效力使EC50从4.3x10<sup>-11</sup>移位到

$1.5 \times 10^{-12}$  (超过效力的对数移位) (图6和7A)。与诱导T细胞毒性一致,PSMAxCD28将由PSMAxCD3诱导的IFN  $\gamma$  释放水平提高了4倍(图7B)。类似地,PSMAxCD28与PSMAxCD3的组合增加了CD4和CD8 T细胞的数量和活化标志物CD25的表达(图7C和7D)。当将示例性抗PSMAxCD28双特异性抗体与非靶向性CD3双特异性抗体组合时,未观察到对T细胞细胞毒性或活化的影响。此外,为了表明示例性抗PSMAxCD28双特异性抗体可以加强来自非人灵长类动物的PSMAxCD3细胞毒性和T细胞的活化,使用来自食蟹猴的PBMC执行了相同的测定,获得了类似的结果(图6、7E-7G)。这些结果表明,示例性抗PSMAxCD28双特异性抗体不仅可以通过增殖和细胞因子释放的方式,而且可以通过细胞毒性的方式有效地增强PSMAxCD3介导的T细胞活化。图7H显示,示例性抗PSMAxCD28双特异性抗体与细胞靶标结合,如通过流式细胞术所测量的。

[0420] 抗PSMA x CD3双特异性抗体活化并指导人T细胞耗竭C4-2细胞(人前列腺癌细胞系)。在存在抗PSMAxCD3双特异性抗体的情况下观察到靶细胞杀伤,并且用皮摩尔 $EC_{50}$ 以剂量依赖性方式杀伤C4-2细胞(表17)。观察到的靶细胞裂解与CD2+ T细胞上CD25+和PD-1+细胞的上调相关联,同样与皮摩尔 $EC_{50}$ 相关联(表17)。抗PSMAxCD3双特异性抗体诱导人细胞因子的释放。在存在固定浓度的抗PSMAxCD28共刺激分子(双特异性抗体)的情况下,用抗PSMAxCD3双特异性抗体作为单一药剂观察到的细胞毒性活性增强(表17)。

[0421] 总之,与用抗PSMAxCD3双特异性抗体作为单一药剂观察到的情况相比,抗PSMAxCD28双特异性抗体的共刺激增加了T细胞活化、PD-1上调和细胞因子释放。表16总结了使用人PBMC的实验结果。

[0422] 表17:在存在人PBMC的情况下,抗PSMAxCD28对抗PSMAxCD3对C4-2细胞的细胞毒性的影响

抗体	C4-2 杀伤 $EC_{50}$ [M]	T 细胞活化 $EC_{50}$ [M] (CD8+/CD25+)	PD-1 上调 $EC_{50}$ [M] (CD4+/PD1+)
[0423] 抗 PSMAxCD3	4.35E-11	7.53E-11	3.03E-11
抗 PSMAxCD3 +bs16429D	1.45E-12	4.95E-12	3.71E-12
抗 PSMAxCD3 +bs16431D	4.88E-12	6.44E-12	4.38E-12

[0424] 还测试了抗PSMAxCD3双特异性抗体作为单一药剂诱导原始食蟹猴T细胞杀伤表达人PSMA的靶细胞的能力,或在共刺激性抗PSMAxCD28双特异性抗体存在下的能力。在所选的抗体滴定中,抗PSMAxCD3双特异性抗体活化人T细胞,但不引导T细胞耗竭C4-2细胞(表18)。与抗PSMAxCD28抗体的共刺激导致了T细胞活化增加、细胞毒性活性增强并且T细胞上的PD-1标志物上调(表18)。

[0425] 表18:在存在食蟹猴PBMC的情况下,抗PSMAxCD28对抗PSMAxCD3对C4-2细胞的细胞毒性的影响

抗体	C4-2 杀伤 $EC_{50}$ [M]	T 细胞活化 $EC_{50}$ [M] (CD8+/CD25+)	PD-1 上调 $EC_{50}$ [M] (CD4+/PD1+)
[0426] 抗 PSMAxCD3	N/A	1.71E-10	2.29E-10
抗 PSMAxCD3 +bs16429D	1.55E-11	1.64E-11	5.64E-12
抗 PSMAxCD3 +bs16431D	7.72E-11	2.76E-11	2.66E-11

[0427] 实例9:来自细胞的细胞因子释放

[0428] 如本文其它地方所述,使用“可溶”形式的人PBMC的体外细胞因子释放测定无法预

测细胞因子释放。因此,开发了“涂覆的”测定形式。

[0429] 使用涂覆的测定形式评估了本发明的抗PSMA/CD28双特异性抗体和抗CD28抗体诱导人PBMC增殖和细胞因子释放的能力。对于PBMC增殖测定,以 $1 \times 10^5$ /孔使用新分离的PBMC。对于共培养,以 $1 \times 10^4$ /孔添加经丝裂霉素C处理的C4-2细胞。将抗体稀释液湿涂或干涂在板上过夜。在添加PBMC之前清洗板。在约54小时处收集上清液,用于通过Meso Scale Diagnostics进行细胞因子分析(马里兰州罗克维尔市的MSD)。添加 $^3\text{H}$ 胸苷,持续18小时,并且测量增殖。

[0430] 结果显示,可溶性抗PSMA x CD28双特异性抗体在存在CD3刺激的情况下诱导人PBMC的增殖。相比之下,在不存在CD3刺激的情况下,抗CD28超激动剂诱导人PBMC的增殖(数据未示出)。

[0431] 此外,湿涂的bs16429D(PSMA x CD28“A”)和mAb14226P2(CD28亲本“A”)诱导的细胞因子释放比湿涂的抗CD28超激动剂少,而bs16431D(PSMA x CD28“B”)和mAb14216P2(CD28亲本“B”)与对照相比并未诱导显著更多的细胞因子释放(数据未示出)。

[0432] 本发明的抗CD28抗体与超激动剂TGN1412相比显示出几种不同的特性。常规的CD28激动mAbs(非超激动剂)被认为与膜远端表位结合,从而仅允许单价Ab结合(Dennehy等人,“前沿:CD28的单价性维持了T细胞共刺激应答的抗原依赖性(Cutting Edge: monovalency of CD28 maintains the antigen dependence of T cell costimulatory responses)”,《免疫学杂志》176(10):5725-29(2006))。CD28抗体通过TCR在存在肽MHC抗原特异性识别的情况下驱动最佳的T细胞活化。CD28信号传导调节TCR活化的阈值,并且显著减少有效活化T细胞所需的TCR接合的数量。相比之下,TGN抗CD28抗体具有一些超激动特性(Luhder等人,“T细胞活化的抗CD28抗体超激动剂的拓扑要求和信号传导特性(Topological requirements and signaling properties of T cell-activating, anti-CD28 antibody superagonists)”,《实验医学杂志(J.of Exp.Med.)》197(8):955-966(2003));Riley等人,“CD28家族:用于治疗性控制T细胞活化的T细胞变阻器(the CD28 family:a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation)”,《血液学(Blood)》,105(1):13-21(2005))。例如,TGN抗CD28在体外和体内诱导强效的T细胞增殖和IL2产生,即使在不存在TCR信号传导的情况下,也比常规的抗CD28/CD3信号传导更有效地增强了NF- $\kappa$ B活性并诱导AP-1/SRE活化,并且结合到细胞表面附近的CD28表位,从而允许二价结合。

[0433] 因此,如图8所示,CD28超激动剂TGN 1412在不存在CD3初次刺激的情况下活化AP-1报告基因。相比之下,本发明的抗CD28抗体(PSMA x CD28的亲本)在AP-1荧光素酶生物测定中最低限度地活化了AP-1。

[0434] 实例10:抗PSMAxCD28抗体的体内研究

[0435] 同基因肿瘤模型

[0436] 与实例8中的体外研究一致,在小鼠模型中,将靶向肿瘤抗原的抗CD3xPSMA与抗CD28xPSMA双特异性抗体组合增强了肿瘤清除。为了测试抗PSMAxCD28双特异性抗体作为单一疗法或与抗PSMAxCD3双特异性抗体组合的有效性,在表达人CD28、人CD3和人PSMA的小鼠中进行同基因肿瘤实验,以代替使用Velocigene专有技术产生的对应小鼠基因(hCD3/hCD28/hPSMA小鼠)。结论是,抗PSMAxCD28双特异性抗体通过抗PSMAxCD3诱导的T细胞活化

增强了体内抗肿瘤免疫。

[0437] 在T细胞受体 (TCR) /CD3复合物与肽-MHC复合物接合时启动T细胞活化(“信号1”);然后,通过第二“共刺激”受体(如T细胞上的CD28受体)与靶细胞上其一个或多个同源配体接合而增强活化(信号2)。最近描述的基于CD3的“双特异性抗体”通过以下发挥作用:替代常规的信号1,通过用双特异性抗体的一个臂结合肿瘤特异性抗原(TSA)将T细胞连接到肿瘤细胞,并且用另一个臂桥接TCR/CD3。虽然这些TSAxCD3双特异性抗体中的一些已经在癌症患者中展示出有前景的抗肿瘤疗效,但是其活性仍有待优化。如本文其它地方所述,本发明引入了一类新颖的双特异性抗体,所述双特异性抗体通过将第二个TSA桥接到T细胞上的共刺激CD28受体来模拟信号2。这些双特异性抗体被称为TSAxCD28双特异性抗体或抗TSA/CD28双特异性受体。如本文所述,本发明的一种示例性抗体对前列腺癌抗原(例如,PSMA)具有特异性。与广泛活化T细胞并在某些情况下在早期临床试验中导致严重毒性的CD28超激动剂不同,这些TSAxCD28双特异性抗体在单独用于基因人源化免疫活性小鼠模型或灵长类动物时,显示出有限的活性且无毒性。然而,当与TSAxCD3双特异性抗体组合时,本发明的示例性抗体增强了T细胞与其靶细胞之间的人工突触,加强了T细胞活化,并且显著改善了同基因肿瘤模型中CD3双特异性抗体的抗肿瘤活性。将此类新颖的CD28共刺激双特异性抗体与一类新兴的TSAxCD3双特异性抗体组合,可以提供具有潜在增强抗肿瘤疗效的耐受性良好的“现成”抗体疗法。

[0438] T细胞识别和杀伤其细胞靶标(如病毒感染的细胞或肿瘤细胞)的能力取决于一系列协调的相互作用。其中最重要的是TCR复合物(所述复合物包含相关联的CD3  $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ 链)对靶细胞的识别和结合;这种相互作用被称为用于T细胞活化的“信号1”。TCR可以识别存在于在靶细胞表面表达的MHC蛋白凹槽中的病毒或肿瘤肽。这种结合通常是低亲和力的;因此,为了成功触发信号1,重要的是许多TCR复合物沿着T细胞与其靶细胞之间的界面聚集,并且此界面被称为免疫突触(J.B.Huppa, M.M.Davis, “T细胞-抗原识别和免疫突触(T-cell-antigen recognition and the immunological synapse)”《免疫学自然评论(Nat Rev Immunol)》3,973-983(2003))。然后通过如CD28等共刺激受体的另外的相互作用来进一步促进T细胞活化和增殖(“信号2”)(J.H.Esensten, Y.A.Helou, G.Chopra, A.Weiss, J.A.Bluestone, “CD28共刺激:从机制到治疗(CD28 Costimulation:From Mechanism to Therapy)”《免疫力(Immunity)》44,973-988(2016))。当T细胞通过TCR复合物识别靶细胞并通过CD28与其在专业抗原呈递细胞或靶细胞上的一个或多个同源配体(CD80/B7.1和/或CD86/B7.2)结合来接合信号2时,T细胞的活化被增强。如同信号1,CD28介导的信号2被认为是通过在免疫突触处共聚集而发生的。

[0439] 在过去的二十年中,靶向肿瘤特异性抗原(TSA)的常规单克隆抗体已经被用作抗肿瘤治疗剂(G.Salles等人,“B细胞血液恶性肿瘤中的利妥昔单抗:20年临床经验综述(Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies:A Review of 20Years of Clinical Experience.)”《治疗进展(Adv Ther)》34,2232-2273(2017);M.V.Mateos等人,“用于未治疗的骨髓瘤的达雷木单抗加硼替佐米、美法仑和泼尼松(Daratumumab plus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone for Untreated Myeloma)”《新英格兰医学期刊(N Engl J Med)》378,518-528(2018);W.Eiermann, G. “国际赫赛汀研究,曲妥珠单抗与化学疗法组合用于治疗HER2阳性转移性乳腺癌:关键的试验数据(International Herceptin Study,

Trastuzumab combined with chemotherapy for the treatment of HER2-positive metastatic breast cancer:pivotal trial data)》《肿瘤学年鉴(Ann Oncol)》12增刊1, S57-62(2001);J.M.Connors等人,“本妥昔单抗与化学疗法用于第III阶段或第IV阶段霍奇金淋巴瘤(Brentuximab Vedotin with Chemotherapy for Stage III or IV Hodgkin's Lymphoma.)”《新英格兰医学期刊》378,331-344(2018);V.Dieras等人,“曲妥珠单抗美坦新与卡培他滨加拉帕替尼在先前治疗过HER2阳性晚期乳腺癌(EMILIA)的患者中:对来自随机的开放标签的3期试验的最终总存活率结果的描述性分析(Trastuzumab emtansine versus capecitabine plus lapatinib in patients with previously treated HER2-positive advanced breast cancer:a descriptive analysis of final overall survival results from a randomised,open-label,phase 3trial.)”《柳叶刀肿瘤学(Lancet Oncol)》18,732-742(2017))。然而,此类抗体诱导T细胞介导的细胞毒性的能力有限,而是通过促进抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)或通过向肿瘤细胞递送毒素来发挥作用。最近,一类新型双特异性抗体(TSAxCD3)兴起,其可以通过替代机制将T细胞连接到肿瘤细胞并活化CD3/TCR复合物(通常通过CD3的 $\epsilon$ 链)来有效地触发T细胞介导的肿瘤细胞杀伤,从而模拟信号1。最近,这种双特异性抗体的早期版本(一个臂与白血病细胞上的CD19结合,而另一个臂与CD3结合)获得了B细胞急性淋巴细胞白血病的监管批准(R.Bargou等人,“通过非常低剂量的T细胞接合抗体使癌症患者中的肿瘤消退(Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell engaging antibody.)”《科学》321,974-977(2008);H.Kantarjian等人,“博纳吐单抗与化学疗法用于晚期急性淋巴细胞白血病(Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia.)”《新英格兰医学期刊》376,836-847(2017))。最近,已经显示双特异性抗体的更先进的版本针对非霍奇金氏淋巴瘤具有良好的活性,所述双特异性抗体靶向这些淋巴瘤上的CD20(E.J.Smith等人,“触发T细胞对B细胞的杀伤的一种新颖的天然形式的双特异性抗体在小鼠肿瘤模型和食蟹猴中具有稳健的活性(A novel,native-format bispecific antibody triggering T-cell killing of Bcells is robustly active in mouse tumor models and cynomolgus monkeys)”《科技报告(Sci Rep)》5,17943(2015);L.L.Sun等人,“用于治疗B细胞恶性肿瘤的抗CD20/CD3 T细胞依赖性双特异性抗体(Anti-CD20/CD3 T cell-dependent bispecific antibody for the treatment of B cell malignancies)”《科学转化医学(Sci Transl Med)》7,287ra270(2015);M.Bacac等人,“用奥比努单抗预处理的CD20-TCB作为下一代血液恶性肿瘤治疗(CD20-TCB with Obinutuzumab Pretreatment as Next-Generation Treatment of Hematologic Malignancies)”《临床癌症研究(Clin Cancer Res)》24,4785-4797(2018);R.Bannerji等人,“抗CD20 x抗CD3双特异性抗体REGN1979在复发性/难治性滤泡性淋巴瘤(FL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)和其它B细胞非霍奇金氏淋巴瘤(B-NHL)亚型患者中的新兴临床活性(Emerging Clinical Activity of REGN1979,an Anti-CD20 x Anti-CD3 Bispecific Antibody,in Patients with Relapsed/Refractory Follicular Lymphoma(FL),Diffuse Large B-Cell Lymphoma(DLBCL),and Other B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma(B-NHL) Subtypes)”《美国血液学学会(American Society of Hematology)》,(2018);L.Budde等人,“全长双特异性CD20/CD3抗体Mosunetuzumab在复发性/难治性B细胞非霍奇金氏淋巴瘤

(NHL) 中展示出临床活性:1期研究的中期安全性和疗效结果 (Mosunetuzumab, a Full-Length Bispecific CD20/CD3 Antibody, Displays Clinical Activity in Relapsed/Refractory B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma (NHL): Interim Safety and Efficacy Results from a Phase 1 Study)”《美国血液学学会》, (2018))。然而, 尽管TSAxCD3双特异性抗体正在成为血液恶性肿瘤免疫疗法的一个重要的新类别, 但交叉研究比较 (A. Zhukovsky, R. J. Morse, M. V. Maus, “双特异性抗体和CAR: 利用T细胞重新定向的广义免疫疗法 (Bispecific antibodies and CARs: generalized immunotherapeutics harnessing T cell redirection)”《当前免疫学观点 (Curr Opin Immunol)》40, 24-35 (2016)) 表明, 在一些情况下, 所述双特异性抗体可能无法实现在个性化嵌合抗原受体T细胞 (CAR-T) 疗法中观察到的疗效水平。

[0440] CAR-T疗法具有强大疗效的原因之一是, 嵌合抗原受体 (CAR) 被工程化为在与位于肿瘤细胞上的靶标结合时提供信号1 (通过CD3 $\zeta$ 细胞结构域的一部分) 和信号2 (例如, 通过CD28细胞结构域的一部分)。最近, FDA批准了两种用于B细胞恶性肿瘤的CAR-T细胞疗法, 所述两种疗法都是通过结合和靶向抗原CD19而发挥作用的 (S. S. Neelapu等人, “难治性大B细胞淋巴瘤中的阿基仑赛CAR-T细胞疗法 (Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B Cell Lymphoma)”《新英格兰医学期刊》377, 2531-2544 (2017); S. J. Schuster等人, “难治性B细胞淋巴瘤中的嵌合抗原受体T细胞 (Chimeric antigen receptor T cells in refractory B-cell lymphomas)”《新英格兰医学期刊》377, 2545-2554 (2017))。CAR-T细胞方法可能与严重的副作用 (如细胞因子释放综合征 (CRS) 和神经毒性) 相关联 (S. S. Neelapu等人, “嵌合抗原受体T细胞疗法-毒性的评估和管理 (Chimeric antigen receptor T-cell therapy-assessment and management of toxicities)”《临床肿瘤学自然评论 (Nat Rev Clin Oncol)》15, 47-62 (2018); J. Gust等人, “在CD19 CAR-T细胞的过继性免疫疗法之后, 神经毒性中的内皮活化和血脑屏障破坏 (Endothelial Activation and Blood-Brain Barrier Disruption in Neurotoxicity after Adoptive Immunotherapy with CD19 CAR-T Cells)”《癌症发现 (Cancer Discov)》7, 1404-1419 (2017); A. Shimabukuro-Vornhagen等人, “细胞因子释放综合征 (Cytokine release syndrome)”《癌症免疫疗法杂志 (J Immunother Cancer)》6, 56 (2018)); 并且由于高度个性化的制造工艺和对预处理化学疗法方案的要求 (S. S. Neelapu等人, “难治性大B细胞淋巴瘤中的阿基仑赛CAR-T细胞疗法 (Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B Cell Lymphoma)”《新英格兰医学期刊》377, 2531-2544 (2017); S. J. Schuster等人, “难治性B细胞淋巴瘤中的嵌合抗原受体T细胞 (Chimeric antigen receptor T cells in refractory B-cell lymphomas)”《新英格兰医学期刊》377, 2545-2554 (2017); P. Salmikangas, N. Kinsella, P. Chamberlain, “用于癌症免疫疗法的嵌合抗原受体T细胞 (CART-细胞) - 行业的移动靶标? (Chimeric Antigen Receptor T-Cells (CART-Cells) for Cancer Immunotherapy-Moving Target for Industry?)”《药学研究 (Pharm Res)》35, 152 (2018)), 许多患者被认为不是合适的候选人。

[0441] 如果可以进一步优化其抗肿瘤活性, 特别是如果可以在不牺牲耐受性的情况下完成, 或甚至增加肿瘤细胞相对于正常细胞的特异性, 则TSAxCD3双特异性抗体作为针对更广泛患者群体的相对良好耐受性和“现成”治疗方案的优点将得到增强。为此目的, 假设将

TSAxCD3双特异性抗体与一类新颖的独立活化信号2的双特异性抗体配对可以提供潜在的增强的疗效以及增强特异性的机会。因此,设计了第二类双特异性抗体。这些双特异性抗体可以与同一肿瘤特异性抗原上的第二表位或第二个单独的肿瘤抗原接合,其中共刺激受体CD28(TSAxCD28双特异性抗体)在T细胞上表达。推断将TSA1xCD3与TSA2xCD28组合应当允许通过触发信号1和信号2来引导和增强T细胞的替代活化,其特异性仅靶向表达两个表位或两种抗原的肿瘤细胞,从而允许更大的抗肿瘤活性以及增加特异性的机会。

[0442] 本文描述了靶向前列腺癌的TSAxCD28共刺激双特异性抗体(PSMAxCD28,其结合前列腺特异性膜肿瘤抗原)的产生和测试。经基因人源化的免疫活性小鼠以及食蟹猴中的毒理学研究表明,这些双特异性抗体作为单一药剂展示出有限的活性且无毒性。然而,这些新颖的共刺激双特异性抗体可以有效地与一类新兴的TSAxCD3双特异性抗体组合,以加强同基因肿瘤模型中的抗肿瘤应答。总的来说,这些数据表明,将此类新颖的基于CD28的双特异性抗体(TSAxCD28)与基于CD3的双特异性抗体(TSAxCD3)组合可以提供具有显著增强的且协同的抗肿瘤活性的耐受性良好的“现成”生物制品解决方案。

[0443] 材料与amp;方法

[0444] 在实例10和13中使用了以下材料和方法。

[0445] 同基因肿瘤研究

[0446] 如前所述,使用Velocigene®技术来产生表达人CD28、人CD3和人PSMA的小鼠(被称为hCD3/hCD28/hPSMA人源化小鼠),以代替对应的小鼠基因(Valenzuela(2003),《自然生物技术(Nat Biotechnol)》,6月;21(6):652-9;Crawford等人,2018,手稿准备中)。对于每只人源化小鼠,通过如前所述的等位基因缺失测定法鉴定了F1H4(C57BL/6×129个杂交体)胚胎干(ES)细胞克隆中的正确基因靶向(Poueymirou等人(2007),《自然生物技术》,1月;25(1):91-9)。将被靶向的ES细胞注射到8细胞阶段的Swiss Webster胚胎中,以产生完全F0代杂合小鼠,用于与C57BL/6N小鼠(纽约美国伦斯勒理工学院,泰康利公司(Taconic))进行纯合性育种。向hCD3/hCD28/hPSMA小鼠(4-8只/组,8-16周龄)皮下注射 $1 \times 10^6$ 个MC38/hPSMA肿瘤细胞。在第0天、第3天和第7天,将抗PSMAxCD28双特异性抗体、抗PSMAxCD3双特异性抗体或人IgG4同种型对照作为单一疗法或组合疗法以5mg/kg通过腹腔注射进行施用。

[0447] 使用X和Y直径的卡尺测量随时间推移监测肿瘤生长。计算肿瘤体积( $X \times Y \times (X/2)$ )。当肿瘤大小大于 $2000 \text{mm}^3$ 时,对小鼠实施安乐死。

[0448] 小鼠血清细胞因子水平的测量

[0449] 在指定的时间点处,通过颌下穿刺将血液收集到微量血清收集管(BD 365967)中。按照制造商的说明(马里兰州罗克维尔市的Meso Scale Diagnostics),使用V-plex人促炎-10 Plex试剂盒来分析细胞因子水平。

[0450] 结果、总结和结论

[0451] 通过FACS验证了人CD28在T细胞和NK细胞上的表达(数据未示出)。使用体外T细胞增殖测定法对三重人源化小鼠进行了功能验证(数据未示出)。通过QPCR证实了PSMA表达(数据未示出)。在三重人源化hCD3/hCD28/hPSMA小鼠(如上所述)中监测随时间推移的MC38/hPSMA肿瘤的生长(图9A)。与同型对照相比,PSMAxCD3和PSMAxCD28单一疗法治疗均显著抑制肿瘤生长(分别为 $p < 0.001$ 和 $p < 0.0001$ )。通过组合疗法进一步显著了抑制肿瘤生长( $p < 0.00001$ )。与同型对照相比,PSMAxCD3和PSMAxCD28双特异性抗体的组合提供了最大

的细胞因子产量(图9C和9D)。为了进一步理解组合疗法对肿瘤内CD8<sup>+</sup> T细胞活化状态的作用,进行了viSNE分析(图9B)。viSNE是用于在保存高维结构的同时将高维细胞术数据映射到2D的工具。每次治疗都在脾脏和肿瘤中驱动独特的CD8<sup>+</sup> T细胞簇。组合疗法驱动了活化/记忆T细胞表型(表达TCF1、CD1-2、CD127、PD-1、ICOS、KLRG1和CD38)的扩展,如肿瘤中的簇4所示。

[0452] 进行研究以确定hCD3<sup>+/+</sup>/hPSMA<sup>+/+</sup>/hCD28<sup>+/+</sup>小鼠和hCD3<sup>+/-</sup>/hPSMA<sup>+/-</sup>/hCD28<sup>+/-</sup>小鼠中血清细胞因子(IFN  $\gamma$ 、IL-2、IL-6、IL-10、TNF $\alpha$ 、IL-4和IL-5)的水平。在治疗之后的第0天(4小时)、第3天、第7天和第11天采集血液。除了hCD3<sup>+/+</sup>/hPSMA<sup>+/+</sup>/hCD28<sup>+/+</sup>小鼠中的IL-10,在第0天,细胞因子水平在包含抗PSMAxCD3抗体的治疗中显著增加,其中使用抗PSMAxCD3和抗PSMAxCD28的组合疗法提供了最大的细胞因子释放。相比之下,IgG对照和抗PSMAxCD28单一疗法并未导致细胞因子产量增加。除了IL-5和IL-10外,三(3)天之后所有治疗组中的细胞因子产量均下降到类似水平。在hCD3<sup>+/+</sup>/hPSMA<sup>+/+</sup>/hCD28<sup>+/+</sup>小鼠中,IL-5的产生在第3天具有显著更高的产量(尽管低于第0天),但在接受了组合疗法的hCD3<sup>+/-</sup>/hPSMA<sup>+/-</sup>/hCD28<sup>+/-</sup>小鼠中,产量并未增加。在hCD3<sup>+/+</sup>/hPSMA<sup>+/+</sup>/hCD28<sup>+/+</sup>小鼠中,所有治疗组在第0天和第3天的IL-10产量类似,但是组合疗法在第7天和第11天产生的组合疗法水平显著更高。在hCD3<sup>+/-</sup>/hPSMA<sup>+/-</sup>/hCD28<sup>+/-</sup>小鼠中,组合疗法在第0天、第3天和第11天产生显著更多的IL-10,但在第7天并未产生显著更多的IL-10。抗PSMAxCD3单一疗法在第0天和第3天产生显著更多的IL-10,但在第7天和第11天并未产生显著更多的IL-10。抗PSMAxCD28单一疗法仅在第11天产生显著更多的IL-10(数据未示出)。

[0453] 如图9A所示,不同于先前的体外测定,其中CD28双特异性抗体具有非常有限的单一药剂活性(参见上文实例8),此同基因MC38/hPSMA模型中的CD28双特异性抗体作为单一药剂具有更显著的活性。这表明在此MC38模型中,“信号1”已经在某种程度上被活化。与此相一致的是,先前已经表明MC38肿瘤细胞表达高水平的重新活化的内源性逆转录病毒蛋白,如p15E,并且C57BL6小鼠可以产生识别和响应这种新表位的内源性T细胞(J.C.Yang、D.Perry-Lalley,“内源性鼠逆转录病毒的包膜蛋白是多种鼠肿瘤的肿瘤相关T细胞抗原(The envelope protein of an endogenous murine retrovirus is a tumor-associated T-cell antigen for multiple murine tumors)”《免疫疗法杂志(J Immunother)》23,177-183(2000);H.J.Zeh,第3版,D.Perry-Lalley、M.E.Dudley、S.A.Rosenberg、J.C.Yang,“两种自身抗原的高亲和力CTL表现出优异的体外和体内抗肿瘤疗效(High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy)”《免疫学杂志》162,989-994(1999))。事实上,已经证实MC38模型中,可以容易地检测到响应于此p15E新抗原的瘤内T细胞。因此,在此同基因肿瘤模型中,CD28双特异性抗体可以增强内源性TCR/CD3依赖性T细胞应答,然后通过CD3双特异性抗体提供另外的“信号1”活化来进一步增强所述应答。

[0454] 为了确定组合疗法的细胞机制,通过高维流式细胞术从这些实验中分析肿瘤浸润性细胞和脾CD8<sup>+</sup> T细胞,并且使用无监督聚类方法。据发现,每种治疗都会在脾脏和肿瘤中驱动独特的CD8<sup>+</sup> T细胞簇。如簇C35所示,单一治疗方案减少了肿瘤内活化表型较少的CD8<sup>+</sup> T细胞(ICOS、KLRG1、Ki67、PD1、CD38和LAG3较低,图9E)。然而,组合疗法显著驱动了更活化/记忆T细胞表型(表达Tcf1、CD122、CD127、PD1、ICOS、KLRG1和CD38,图9B)的扩展,如簇C4所

示。

[0455] 在不存在和存在肿瘤的情况下,抗CD28 x anti-PSMA在CD28/CD3/PSMA人源化小鼠中不诱导血清细胞因子升高

[0456] 如本文其它地方所述,超激动剂抗CD28抗体TGN1412诱导了对患者有害的“细胞因子风暴”。本发明的抗CD28抗体和抗CD28xPSMA双特异性抗体并未引起细胞因子风暴。在此研究中,以2.5mg/kg或0.25mg/kg的剂量将几种抗体(总结在表19中)施用于hCD3/hCD28/hPSMA人源化小鼠。在抗体施用后4小时和3天从小鼠抽取血液。如图10所示,在不存在肿瘤的情况下,抗PSMAxCD28双特异性抗体或亲本CD28二价抗体在CD3/CD28/PSMA人源化小鼠中不诱导血清细胞因子的产生。

[0457] 表19:在hCD3/hCD28/hPSMA人源化小鼠中的抗体的细胞因子风暴研究

抗体ID	批次号	名称
REGN1945	REGN1945-L49	hIgG4
mAb14226P2	REGN5705-L1	CD28 mAb
REGN2329 (TeGenero)	REGN2329-L3	CD28 SA
bs16429D	bs16429D-L2	PSMAxCD28
BE0146	614216J2B	PD1, RMP1-14
bs15780D	bs15780D-L2	PSMAxCD3

[0459] 在2.5mg/kg下,TGN1412可以导致血液中IL-2、IL-4、IL-5和TNF $\alpha$ 水平显著升高(数据未示出)。

[0460] 此外,如图28所示,单独的抗PSMAxCD28治疗或与抗PD1的组合治疗并未提高荷瘤小鼠的血清细胞因子。相比之下,单独或与抗PD1组合的抗PSMAxCD3治疗可以增加荷瘤小鼠的血清细胞因子水平,如TNF $\alpha$ 、IL-5、IL-10、IL-2和IL-4。在给药后4小时,抗PSMAxCD3治疗诱导细胞因子表达。在第7天之后,细胞因子升高并未持续。本研究是在MC38/hPSMA荷瘤hCD3/hCD28/hPSMA人源化小鼠中完成的。在第0天和第7天,在给药后4小时,从MC38/hPSMA荷瘤hCD3/hCD28/hPSMA人源化小鼠中收集血清,4天后使用5mg/kg指定抗体或双特异性抗体。按照制造商的方案,使用10-plex小鼠细胞因子MSD试剂盒来测量血清细胞因子。

[0461] 另外,如图11所示,CD28超激动剂治疗在移植了PBMC的NSG小鼠中在4小时内驱动细胞因子应答,而本发明的抗CD28抗体不驱动细胞因子应答。在如图11所示的研究中,在第10天向免疫缺陷NSG小鼠移植了来自正常健康供体的 $5 \times 10^6$ 个PBMC。在第1天,通过对外周血进行人T细胞标志物染色来确认T细胞的全身性移植。在第0天,向小鼠腹膜内注射50 $\mu$ g IgG4同种型对照抗体、5 $\mu$ g或50 $\mu$ g抗CD28超激动剂、或5 $\mu$ g或50 $\mu$ g抗CD28 mAb14226P2抗体。抗体注射后四小时,从动物收获血液并制备血清。通过多重测定(Meso Scale Discovery V-PLEX试剂盒)分析血清中的细胞因子浓度。虽然与经同种型对照抗体治疗的动物相比,抗CD28超激动剂驱动干扰素 $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、IL-2、IL-6和TNF $\alpha$ 的血清水平增加,但在用抗CD28 mAb14226P2治疗的动物血清中未观察到细胞因子应答的增加。因此,在共刺激双特异性抗原结合分子中,双特异性抗CD28xPSMA具有潜在更安全的毒理学特征。双特异性抗CD28xPSMA并未引起细胞因子应答,而抗CD3xPSMA引起了细胞因子应答。如图12所示,抗CD3 x PSMA在人源化小鼠中引起IFN $\gamma$ 升高,而抗CD28xPSMA却没有。在此研究中,在给药5mg/kg指定的双特异性抗体后4小时,从MC38/hPSMA荷瘤CD3/CD28/PSMA或CD3/CD28人源化小鼠中

收集血清。按照制造商的方案,使用10-plex小鼠细胞因子MSD试剂盒来测量血清细胞因子。数据点表示每只小鼠的单个细胞因子水平。图上的条表示每个治疗组的平均值。误差条表示 $\pm$ SEM。使用同种型处理的小鼠作为对照,用单向ANOVA和Holm-Sidak多重比较测试来确定统计学显著性(\*\*,  $p < 0.01$ )

[0462] 与人源化小鼠数据一致,抗CD3xPSMA双特异性抗体导致非人灵长类动物(食蟹猴)中的CRP升高和全身性细胞因子释放。在猴子研究中,将抗CD3xPSMA双特异性抗体以0.01、0.1和0.5mg/kg的剂量施用给食蟹猴。猴子显示出以下症状:第一天的临床症状,如呕吐、驼背、皮肤发红/变色;CRP升高(与对照小鼠约为10vs 1mg/dL);血浆细胞因子(IL-6、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2和MCP)升高;并且血液中绝对T细胞数量下降(数据未示出)。

[0463] 此外,与抗PSMAxCD3或抗CD28超激动剂治疗相比,接受抗CD28xPSMA治疗的小鼠未显示出细胞因子产生或T细胞边缘化(图13A和13B)。

[0464] 总结

[0465] 长期以来已经认识到,通过TCR复合物(“信号1”)的T细胞活化可以通过共刺激信号显著增强,如当T细胞上的CD28受体与其在靶细胞上的配体(CD80/B7.1和CD86/B7.2)接合时介导的共刺激信号(“信号2”) (J.H.Esensten、Y.A.Helou、G.Chopra、A.Weiss、J.A.Bluestone,“CD28共刺激:从机制到治疗”《免疫力》44,973-988(2016))。与本文公开的数据一致,首先通过B7配体在肿瘤细胞上过度表达的研究证明了CD28-共刺激增强T细胞抗肿瘤活性的潜力(R.H.Schwartz,“T淋巴细胞的共刺激:CD28、CTLA-4和B7/BB1在白细胞介素-2产生和免疫疗法中的作用(Costimulation of T lymphocytes:the role of CD28, CTLA-4,and B7/BB1in interleukin-2production and immunotherapy)”《细胞(Cell)》71,1065-1068(1992);L.Chen等人,“T淋巴细胞分子CD28和CTLA-4的B7反受体对抗肿瘤免疫的共刺激(Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4)”《细胞》71,1093-1102(1992)),其显示出对这种表达B7的肿瘤的T细胞排斥的改善。这种潜力激发了在人体试验中评估CD28活化性抗体的努力。可悲的是,由于大量细胞因子释放综合征(CRS)导致的多器官衰竭,2006年对这种抗体(TGN1412)的试验导致所有六名人类志愿者出现危及生命的并发症(G.Suntharalingam等人,“抗CD28单克隆抗体TGN1412的1期试验中的细胞因子风暴(Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412)”《新英格兰医学期刊》355,1018-1028(2006))。这场灾难导致停止了对人类中CD28活化性抗体的任何进一步测试。

[0466] 本文描述了一类新颖的CD28共刺激双特异性抗体,其可以通过提供共刺激“信号2”来显著且安全地促进抗肿瘤活性。这些CD28双特异性抗体自身活性有限(在不存在“信号1”的情况下),但在“信号1”的情况下可以显著增强抗肿瘤活性,如可以通过将这些CD28双特异性抗体与一类新兴的CD3双特异性抗体配对来提供(或者如果这些CD28双特异性抗体用于已经存在肿瘤特异性T细胞内源性群体的环境中)。本文描述了靶向前列腺癌的TSAxCD28共刺激双特异性抗体(PSMAxCD28)的产生和测试。结果表明,在不存在“信号1”的情况下,这些CD28双特异性抗体在体外或体内具有最小的活性。然而,这些CD28双特异性抗体可以与CD3双特异性抗体配对,以形成含有肿瘤抗原以及TCR和CD28复合物的人工“免疫突触”。此外,当在体外与合适的CD3双特异性抗体配对时,这些CD28双特异性抗体可以以抗

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

[0467] 通常,在免疫肿瘤学领域中,人特异性临床候选物的表征仅限于在具有移植的人免疫细胞的异种肿瘤模型中进行测试。虽然这些异种模型可以是非常有用的,但其具有局限性。在这种异种模型中使用的小鼠在其正常组织中不表达人肿瘤靶标,由此排除了在靶标的正常组织表达环境中对测试药剂的评估。事实上,如果靶标在正常组织中通常也以高水平表达,这可能会通过从肿瘤转移测试药剂来限制抗肿瘤疗效,并可能对这些正常组织产生毒性-在正常情况下无法在异种模型中评估这些毒性。另外的限制可能涉及转移到免疫缺陷小鼠的移植人外周血单核细胞(PBMC)的活性,这可能与免疫活性系统中发现的正常宿主T细胞的活性不同。为了克服这些限制并提供更好的用于测试人特异性临床候选物的模型,本文产生了双重和三重基因人源化小鼠。在这些模型中,对肿瘤抗原进行基因人源化以允许其在合适的宿主组织中正常表达,并且对CD3和/或CD28组分进行基因人源化以使免疫活性宿主细胞响应于人特异性临床候选物。在这些经基因人源化的免疫活性同基因动物模型中,发现PSMA肿瘤靶标的CD28双特异性抗体增强了其适当的CD3双特异性抗体的抗肿瘤活性。在多个临床前模型中,不同的TSAxCD28双特异性抗体对抗肿瘤疗效的类似增强表明,此治疗模式是稳健的,并不限于特定的肿瘤模型,并且作为免疫疗法的新组合靶类可以具有更广泛的用途。总的来说,这些发现强调了TSAxCD28双特异性抗体可以与TSAxCD3双特异性抗体协同作用,并且可以提供一种生物解决方案,所述生物解决方案以相当安全且耐受性良好的方式显著增强经过充分研究的TSAxCD3双特异性抗体的疗效,从而证明在人体试验中的测试是合理的。

[0468] TSAxCD3双特异性抗体代表了一类有前景的新兴免疫疗法,但在许多情况下,进一步优化抗肿瘤活性肯定是重要的。正如CAR-T方法采用人工活化“信号1”和“信号2”的嵌合受体从而提高其抗肿瘤活性一样(E.A. Zhukovsky, R.J. Morse, M.V. Maus, “双特异性抗体和CAR:利用T细胞重新定向的广义免疫疗法”《当前免疫学观点》40, 24-35 (2016); S.L. Maude等人, “患有B细胞淋巴细胞白血病的儿童和年轻成人中的司利弗明(Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia)”《新英格兰医学期刊》378, 439-448 (2018)), 现在显示了将CD3特异性抗体(提供“信号1”)与CD28双特异性抗体(其提供“信号2”)组合以增强抗肿瘤活性的潜在益处。除了这种方法可能比CAR-T疗法具有的实际益处之外-因为其不需要为每个患者单独定制的费力的细胞疗法准备,也不需要通过与副作用相关联的毒性化学疗法对患者预先进行“淋巴耗竭”,以使患者可以接受这种细胞疗法(A. Shimabukuro-Vornhagen等人, “细胞因子释放综合征”《癌症免疫疗法杂志》6, 56 (2018); C.H. June, R.S. O'Connor, O.U. Kawalekar, S. Ghassemi, M.C. Milone, “用于人类癌症的CAR T细胞免疫疗法(CAR T cell immunotherapy for human cancer)”《科学》

359,1361-1365(2018)) -根据本发明的双特异性方法提供了增加疗效以及增加安全性和作用特异性的潜力。也就是说,通过将针对一种抗原的CD3双特异性抗体与针对第二抗原的CD28双特异性抗体配对,可以利用“组合靶向”的优势-仅在表达两种抗原的肿瘤细胞上才会出现增加的疗效,从而将T细胞杀伤仅集中于表达两种抗原的肿瘤细胞,同时限制仅表达所述抗原中的一种抗原的正常组织中的“脱靶毒性”。总之,本文公开的数据表明,将基于CD28的双特异性抗体与基于CD3的双特异性抗体组合可以提供具有显著增强的且协同的抗肿瘤活性的耐受性良好的“现成”生物制品解决方案。今年将在人体试验中对这种可能性进行初步测试。

[0469] 实例11:食蟹猴毒理学研究

[0470] 这些研究表明,与食蟹猴中的CD28超激动剂相比,PSMAxCD28单独或组合疗法不会诱导全身性T细胞作用。本发明的示例性抗PSMAxCD28双特异性抗体加强了食蟹猴T细胞的TAAxCD3活化(实例8,图7E-7G)。为了确定单独或与抗PSMAxCD3组合的本发明的示例性抗PSMAxCD28双特异性抗体的安全性和耐受性,在食蟹猴中进行了单剂量毒性研究。如表20所指示的,将雌性或雄性食蟹猴分配到治疗组。

[0471] 表20:使用抗PSMAxCD28的探索性单剂量猴子毒理学研究

组	治疗(单剂量)	动物总数	剂量水平/剂量递增 (30分钟静脉输注)
		雄性	
1	PSMAxCD3	3	0.1 mg/kg
2	bs16429D	3	1 mg/kg
[0472] 3	bs16429D	3	10 mg/kg
4	抗CD28超激动剂“SA”	3	10 mg/kg
5	bs16429D+抗PD-1	3	10 mg/kg + 10 mg/kg
6	bs16431D+抗PD-1	3	10 mg/kg + 10 mg/kg
7	同种型对照Ab	3	10 mg/kg

[0473] 食蟹猴研究是根据IACUC指南进行的。雄性食蟹猴(3只动物/组)通过静脉输注接受单剂量的每种试验品,持续大约30分钟(组合疗法作为单独输注施用,总计1小时)。毒性评估基于临床观察结果、定性食物消耗量、体重、神经系统检查、生命体征(体温、心率、脉搏血氧饱和度和呼吸率)以及临床和解剖病理学。采集血液和组织样品用于细胞因子分析、FACS免疫表型分析、组织病理学和毒物动力学评估。在罗氏分子公司(Roche Modular)P800系统上分析CRP水平。通过Meso Scale Diagnostics(马里兰州罗克维尔市的MSD)测量细胞因子。对于外周血流式细胞术,将血液采集到EDTA钾管中,裂解,用指定抗体(如抗CD3、抗Ki67和抗ICOS(BD生物科学公司(BD Biosciences)))染色,并且使用FACS Canto II进行分析。在以单剂量施用1或10mg/kg PSMAxCD28之后,未观察到显著的细胞因子释放、T细胞边缘化或T细胞活化标志物上调,未诱导显著的细胞因子释放、T细胞边缘化或T细胞活化标志物上调(表21)。

[0474] 表21:食蟹猴毒性研究综述

分子	描述	剂量 (mg/kg)	第1天-任何观察第2-4天临床观察	绝对T细胞 (E3/ $\mu$ L)		增殖性T细胞 Ki67+(E3/ $\mu$ L)		CRP (mg/dL)	给药后5小时的血浆细胞因子 (pg/ml)								
				预测测试	5小时	预测测试	168小时		24小时	IL-6	IL-8	IL-10	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-2	IL-4	IL-5
[0475] bs16429D	抗PSMAxCD28	1	-	6.58	7.22	0.62	0.59	0.5	BLQ*	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
			-	4.91	5.09	0.42	0.32	0.5	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
			-	4.50	4.04	0.63	0.48	1.1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
bs16429D	抗PSMAxCD28	10	-	6.03	5.73	0.33	0.35	0.2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
			-	4.64	4.53	0.38	0.64	0.2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
			-	10.06	7.16	0.88	0.39	1.3	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
REGN2329 (TeGenero)	抗CD28超激动剂	10	-	7.02	0.26	0.60	5.66	15.4	764	BLQ	3364	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	1169
			-	7.06	0.19	0.79	7.29	15	2907	1095	17155	333	BLQ	238	BLQ	615	
			-	11.87	0.66	1.13	10.96	15.3	5226	5324	7918	1509	163	522	342	198	
mAb10154P3	EGFRVIIIAb		-	6.39	5.62	0.62	0.39	0.8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	151	BLQ	335	BLQ	
			-	7.43	7.72	0.86	0.52	11	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	267	BLQ	378	BLQ	
			-	3.66	4.61	0.52	0.69	0.2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	

[0476] BLQ: 低于定量下限

[0477] 相反,在施用CD28超激动剂的猴子中观察到显著的细胞因子释放、淋巴细胞边缘化和T细胞活化。进一步地,使用干涂和湿涂的人T细胞增殖测定验证了这些发现(实例9)。实际上,与CD28超激动剂抗体相比,未观察到示例性抗PSMAxCD28双特异性抗体以及亲本二价CD28抗体诱导的人T细胞增殖。总的来说,在猴子中的探索性单剂量毒理学研究和基于体外人T细胞的测定表明,本发明的示例性抗PSMAxCD28双特异性抗体是安全的且耐受性良好。

[0478] 如表21所示,CD28超激动剂TGN1412引起细胞因子适度释放和T细胞的瞬时增加(在D15上测量)。此研究在雄性食蟹猴上完成,每周给药5到50mg/kg,持续4周。在静脉注射每周(d1、8、15、22)递增剂量(5、10、25、50mg/kg)的TGN1412之后,在雄性食蟹猴上进行白细胞亚群的FACS分析。在最初的2到24小时内观察到IL-2、IL-5、IL-6、IFN- $\gamma$ 适度增加(2到20倍)。IL-4、TNF- $\alpha$ 均无实质性变化。进行了使用抗CD28xPSMA的探索性单剂量猴子毒理学研究,以确定抗CD28xPSMA双特异性抗体的安全性和药代动力学特征。

[0479] 总之,已经显示出抗CD28xPSMA抗体增强了肿瘤部位处的免疫力。抗CD28xPSMA使肿瘤细胞转变为抗原呈递细胞(APC)。与抗CD28超激动剂相比,抗CD28xPSMA抗体不诱导T细胞增殖或刺激细胞因子释放。

[0480] 实例12:通过氘氘交换进行mAb14226P2与CD28结合的表位作图

[0481] 进行了H/D交换表位作图与质谱法(HDX-MS),以确定与抗hCD28单克隆抗体相互作用的CD28(重组人CD28,示出为hCD28胞外(N19-P152).mmh;SEQ ID NO:75)的氨基酸残基。H/D交换的一般描述在例如以下文献中示出:Ehring(1999)《分析生物化学》267(2):252-259;以及Engen和Smith(2001)《分析化学》73:256A-265A。

[0482] 在集成的HDX/MS平台上进行HDX-MS实验,所述平台由用于氘标记和淬灭的Leaptec HDX PAL系统、用于样品消解和上样的沃特斯(Waters)Acquity M级( $\mu$ Binary溶剂管理器)、用于分析梯度的沃特斯Acquity M级( $\mu$ 二元溶剂管理器)以及用于肽质量测量的Thermo Q Exactive HF质谱仪组成。

[0483] 在pD 7.0下,将标记溶液制备为D<sub>2</sub>O中的PBS缓冲液(10mM磷酸盐缓冲液、140mM

NaCl和3mM KCl,在25°C下相当于pH 7.4)。对于氘标记,在各个时间点,将与REGN5705以1:0.6摩尔比(Ag-Ab复合物)预混合的11 $\mu$ L CD28.mmH(再生元公司(Regeneron)的内部蛋白(in house protein)REGN2011,127 $\mu$ M)或CD28.mmH在20°C下与44 $\mu$ L D<sub>2</sub>O标记溶液一起孵育,一式两份(例如,未氘化对照=0秒;经氘标记的,5分钟和10分钟)。通过向每份样品中添加55 $\mu$ L预冷却的淬灭缓冲液(0.5M TCEP-HCl,8M尿素和1%甲酸)以在20°C下孵育5分钟来淬灭氘化反应。然后将淬灭的样品注射到沃特斯HDX管理器中,以进行在线胃蛋白酶/蛋白酶XIII消化。通过C8柱(1.0mm x 50mm,NovaBioassays)从10%-32%B(流动相A:0.5%甲酸,于水中,流动相B:0.1%甲酸,乙腈中)中以13分钟的梯度分离消化的肽。通过Q Exactive HF质谱法以LC-MS/MS或LC-MS模式下分析洗脱的肽。

[0484] 使用Byonic搜索引擎(Protein Metrics),针对包含CD28及其随机序列的数据库搜索未氘化的CD28样品的LC-MS/MS数据。使用非特异性酶消化和人糖基化作为常见的变量修饰,将搜索参数(在ELN中)设置为默认值。然后将鉴定出的肽列表导入HDX工作台软件(3.3版),以计算通过LC-MS从所有氘化样品中检测到的每种肽的氘吸收量。对于给定的肽,使用每个时间点的质心质量(强度加权平均质量)来计算氘吸收量(D)和氘吸收量百分比(%D)。

[0485] 氘吸收量(D-吸收量) = .平均质量(氘化) - 平均质量(未氘化)

[0486] 氘吸收量百分比(%D) = 
$$\frac{\text{每个时间点处的肽的 D-吸收量} \times 100\%}{\text{肽的最大 D-吸收量 (在 ELN 中定义)}}$$

[0487] 从单独的hCD28.mmH和与抗CD28抗体样品混合的hCD28.mmH中,鉴定出总共73种来自hCD28.mmH的肽(SEQ ID NO:75),这表示hCD28的序列覆盖率为85.8%。展示出高于5%的D-吸收量值差异百分比的任何肽均被定义为受到显著保护。对于hCD28.mmH(SEQ ID NO:75),对应于氨基酸5-20(VKQSPMLVAYDNAVNL;SEQ ID NO:77)、29-38(FSREFRASHLH;SEQ ID NO:78)、80-84(YLQNL;SEQ ID NO:79)和91-108(IYFCKIEVMYPPPYLDNE;SEQ ID NO:80)的区域被抗CD28抗体显著保护,其中氨基酸91-108(IYFCKIEVMYPPPYLDNE;SEQ ID NO:80)被定义为CD28上的主要表位。使用hCD28.mFc(SEQ ID NO:76)证实了抗CD28抗体对这些残基的保护。本研究的结果摘要另见下表22。

[0488] 表22:与抗CD28抗体结合时具有显著保护作用的所选的CD28.mmH肽

CD28 残基	电荷 (+)	5 分钟			10 分钟			$\Delta\%D$
		REGN2011 + mAb14226P2			REGN2011 REGN2011+ mAb14226P2			
		质心 MH <sup>+</sup>	质心 MH <sup>+</sup>	$\Delta D$	质心 MH <sup>+</sup>	质心 MH <sup>+</sup>	$\Delta D$	
5-11	1	805.74	805.53	-0.21	805.83	805.58	-0.25	-7.1
5-11	2	806.69	806.48	-0.21	806.76	806.51	-0.24	-7.1
8-11	1	449.28	449.11	-0.16	449.33	449.16	-0.17	-10.5
12-19	1	869.61	869.30	-0.31	869.72	869.33	-0.39	-7.2
12-19	2	869.95	869.72	-0.23	870.08	869.69	-0.39	-6.4
12-20	1	982.96	982.54	-0.42	983.05	982.63	-0.41	-7.4
15-20	1	648.02	647.61	-0.40	648.06	647.68	-0.38	-12.3
29-32	1	540.44	540.06	-0.38	540.51	540.08	-0.44	-25.4
29-37	2	1116.66	1116.15	-0.51	1116.79	1116.20	-0.60	-9.9
29-37	3	1117.61	1117.74	-0.50	1117.11	1117.17	-0.57	-9.6
30-37	2	969.13	968.85	-0.28	969.23	968.90	-0.33	-6.4
30-38	3	1107.35	1106.93	-0.42	1107.48	1107.02	-0.46	-7.8
33-37	1	595.17	595.23	-0.12	595.05	595.08	-0.15	-5.8
33-38	1	732.40	732.24	-0.16	732.45	732.25	-0.19	-5.5
33-38	2	733.43	733.25	-0.18	733.48	733.29	-0.19	-5.7
80-84	1	652.81	652.51	-0.30	652.91	652.60	-0.31	-12.6
81-84	1	489.26	488.99	-0.28	489.34	489.04	-0.30	-17.9
91-93	1	443.49	443.50	-0.07	443.42	443.41	-0.09	-10.1
93-97	1	641.40	641.48	-0.58	640.83	640.89	-0.59	-24.4
94-105	2	1458.33	1456.70	-1.63	1458.63	1456.83	-1.80	-30.7
94-107	2	1688.09	1686.36	-1.73	1688.33	1686.43	-1.90	-25.2
94-108	2	1817.69	1816.15	-1.54	1817.88	1816.19	-1.69	-20.2
96-107	2	1455.75	1455.07	-0.68	1455.91	1455.09	-0.82	-13.4
98-107	2	1212.67	1212.07	-0.60	1212.78	1212.07	-0.70	-16.3
98-108	2	1342.17	1341.57	-0.60	1342.10	1341.61	-0.48	-5.0

[0490] 实例13:PSMA x CD28双特异性抗体有效增强PD-1免疫疗法的抗肿瘤疗效

[0491] 摘要

[0492] 除了抗原特异性TCR/CD3活化(“信号1”)之外,还通过接合第二共刺激受体(“信号2”)来增强T细胞活化。癌症免疫疗法的目标是最佳地活化和动员T细胞以检测和杀伤肿瘤细胞。然而,目前的治疗往往无法在肿瘤部位有效且选择性地活化T细胞,从而通常无法实现持久的应答和/或导致不期望的毒性。本文介绍了一种将PD-1抑制与双特异性抗体相组合的新颖的肿瘤靶向性免疫疗法模式。双特异性抗体用一条臂结合肿瘤特异性抗原(TSA)(例如,PSMA),并且用另一条臂结合T细胞上的共刺激受体CD28。事实上,PD-1-PD-L1信号传导抑制会显著增加免疫突触中累积的CD28的比率,从而使TSAxCD28双特异性抗体发挥作用。使用对前列腺抗原具有特异性的双特异性抗体(例如,PSMA)验证了这种组合免疫疗法。与广泛活化T细胞的非特异性CD28超激动剂不同,在经基因人源化的免疫活性小鼠模型中或在灵长类动物中单独使用或与PD-1阻断剂组合使用时,TSAxCD28双特异性抗体耐受性良好。重要的是,在存在内源性TCR/CD3触发的情况下,TSAxCD28显著改善了PD-1抗体的抗肿瘤活性,这与持久的抗肿瘤应答相关联。在各种同基因和人肿瘤异种移植物模型中,组合疗法特别加强了肿瘤内T细胞活化,从而促进效应记忆样T细胞表型而无全身性细胞因子分泌。将此类CD28共刺激双特异性抗体与经临床验证的抗PD-1治疗组合可以提供具有显著增强的抗肿瘤疗效的耐受性良好的“现成”抗体疗法。

[0493] 介绍

[0494] 许多作为抗肿瘤治疗剂的旨在增强T细胞活化的单克隆抗体(mAb)正处于临床开

发阶段 (M.K.Callahan、M.A.Postow、J.D.Wolchok,“靶向性T细胞共受体用于癌症疗法 (Targeting T Cell Co-receptors for Cancer Therapy)”《免疫力》44,1069-1078 (2016))。然而,目前的大多数治疗都面临着克服肿瘤微环境的抑制性质的挑战,因此无法产生有效的肿瘤特异性T细胞活化和随后的肿瘤细胞杀伤 (K.G.Anderson、I.M.Stromnes、P.D.Greenberg,“肿瘤微环境对T细胞活性构成的障碍:协同疗法的案例 (Obstacles Posed by the Tumor Microenvironment to T cell Activity:A Case for Synergistic Therapies)”《癌细胞 (Cancer Cell)》31,311-325 (2017))。针对检查点抑制剂 (如细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白 (CTLA-4) 和程序性细胞死亡1 (PD-1) /程序性细胞死亡配体1 (PD-L1)) 的几种阻断性mAb已经在临床上被批准用于治疗黑色素瘤、肾细胞癌、非小肺癌和晚期转移性皮肤鳞状细胞癌 (J.S.Weber等人,“纳武单抗对比化学疗法用于在抗CTLA-4治疗后患晚期黑色素瘤的患者 (CheckMate 037):随机的、受控的、开放标签的3期试验 (Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037):a randomised,controlled,open-label,phase 3trial)”《柳叶刀肿瘤学》16,375-384 (2015);S.L.Topalian等人,“接受了纳武单抗的晚期黑色素瘤患者的存活率、持久肿瘤缓解和长期安全性 (Survival,durable tumor remission,and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab)”《临床肿瘤学期刊 (J Clin Oncol)》32,1020-1030 (2014);M.A.Postow、M.K.Callahan、J.D.Wolchok,“癌症疗法中的免疫检查点阻断 (Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy)”《临床肿瘤学期刊》33,1974-1982 (2015);M.R.Migden等人,“在晚期皮肤鳞状细胞癌中使用西米普利单抗进行PD-1阻断 (PD-1 Blockade with Cemiplimab in Advanced Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma)”《新英格兰医学期刊》379,341-351 (2018))。阻断PD-1会释放T细胞活化的中断,但其作为单一药剂的疗效通常不足以获得肿瘤清除和持久的抗肿瘤应答。当组合时,抗PD-1/PD-L1和抗CTLA-4确实在某些肿瘤类型中产生了高应答率,但通常也观察到高级别毒性 (J.Larkin等人,“在未治疗的黑色素瘤中的纳武单抗和伊匹单抗组合疗法或单一疗法 (Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma)”《新英格兰医学期刊》373,23-34 (2015);D.B.Johnson等人,“具有组合免疫检查点阻断的暴发性心肌炎 (Fulminant Myocarditis with Combination Immune Checkpoint Blockade)”《新英格兰医学期刊》375,1749-1755 (2016);M.H.Pollack等人,“从在转移性黑色素瘤中组合使用抗CTLA-4和抗PD1期间具有免疫相关不良事件 (irAE) 的患者中恢复抗PD-1的安全性 (Safety of resuming anti-PD-1 in patients with immune-related adverse events (irAEs) during combined anti-CTLA-4 and anti-PD-1 in metastatic melanoma)”《肿瘤学年鉴》29,250-255 (2018);J.D.Wolchok等人,“在晚期黑色素瘤中的纳武单抗加伊匹单抗 (Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma)”《新英格兰医学期刊》369,122-133 (2013))。因此,正在进行相当大的努力来通过鉴定可预测反应性的生物标志物来标识更可能响应于检查点抑制的患者 (R.Cristescu等人,“基于PD-1检查点阻断的免疫疗法的泛肿瘤基因组生物标志物 (Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade-based immunotherapy)”《科学》362, (2018))。此外,旨在通过组合触发共刺激受体的激动性抗体或与如化学疗法或放射疗法等其它方式相结合来改善PD-1阻断的疗效和抗肿瘤应答的持

久性的组合疗法正在接受临床前评估和临床评估 (S.Hu-Lieskovan、A.Ribas, “使用程序性细胞死亡1/程序性细胞死亡配体1检查点抑制剂作为骨架的新组合策略 (New Combination Strategies Using Programmed Cell Death 1/Programmed Cell Death Ligand 1 Checkpoint Inhibitors as a Backbone)”《癌症期刊 (Cancer J)》23,10-22 (2017); Y.K.Chae等人, “抗CTLA4和PD-1/PD-L1双重阻断免疫疗法在癌症中的现状和未来;来自黑色素瘤和非小细胞肺癌 (NSCLC) 临床试验的经验教训 (Current landscape and future of dual anti-CTLA4 and PD-1/PD-L1 blockade immunotherapy in cancer; lessons learned from clinical trials with melanoma and non-small cell lung cancer (NSCLC))”《癌症免疫疗法杂志》6,39 (2018); P.S.Chowdhury、K.Chamoto、T.Honjo, “用于改善PD-1阻断疗效的组合疗法策略:癌症免疫疗法的新时代 (Combination therapy strategies for improving PD-1 blockade efficacy:a new era in cancer immunotherapy)”《内科医学杂志 (J Intern Med)》283,110-120 (2018); B.Wang等人, “靶向PD-1和GITR的组合癌症免疫疗法可以挽救CD8 (+) T细胞功能障碍并维持记忆表型 (Combination cancer immunotherapy targeting PD-1 and GITR can rescue CD8 (+) T cell dysfunction and maintain memory phenotype)”《科学免疫学 (Sci Immunol)》3, (2018); S.Chen等人, “4-1BB激动剂和PD-1拮抗剂的组合可以在免疫原性差的肿瘤模型中促进抗肿瘤效应/记忆CD8 T细胞 (Combination of 4-1BB agonist and PD-1 antagonist promotes antitumor effector/memory CD8 T cells in a poorly immunogenic tumor model)”《癌症免疫学研究 (Cancer Immunol Res)》3,149-160 (2015))。微卫星标记 (Microsatellite) 的不稳定性和高突变负担产生潜在的内源性抗原,所述内源性抗原在某些癌症中表达 (K.W.Mouw、M.S.Goldberg、P.A.Konstantinopoulos、A.D.D'Andrea, “免疫疗法应答的DNA损伤和修复生物标志物 (DNA Damage and Repair Biomarkers of Immunotherapy Response)”《癌症发现》7,675-693 (2017))。T细胞将这些突变肽识别为新抗原 (M.Efremova、F.Finotello、D.Rieder、Z.Trajanoski, “由个体突变产生的新抗原及其在癌症免疫和免疫疗法中的作用 (Neoantigens Generated by Individual Mutations and Their Role in Cancer Immunity and Immunotherapy)”《免疫学前沿 (Front Immunol)》8,1679 (2017))。然而,在单独的情况下,这些抗原的呈递不足以促进稳健的T细胞活化以产生抗肿瘤活性 (S.Spranger、R.Bao、T.F.Gajewski, “黑色素瘤固有的 $\beta$ -连环蛋白信号传导可阻止抗肿瘤免疫 (Melanoma-intrinsic beta-catenin signaling prevents anti-tumour immunity)”《自然》523,231-235 (2015))。这可能是由于肿瘤的免疫抑制性微环境。

[0495] 本文描述了一种使用靶向前列腺癌TSA PSMA $\times$ CD28的TSA $\times$ CD28双特异性抗体的新颖的免疫疗法模式,当与PD-1阻断抗体组合时,所述双特异性抗体在动物肿瘤模型中诱导长期抗肿瘤免疫并促进稳健的肿瘤内T细胞活化和T细胞记忆,而没有全身性细胞因子释放的迹象。在经基因人源化的免疫活性小鼠和食蟹猴中进行的毒理学研究表明,这些双特异性抗体本身或与抗PD-1抗体组合时均无毒性。总的来说,这些数据表明,将此类基于CD28的双特异性抗体 (TSA $\times$ CD28) 与PD-1抑制组合起来可以提供具有显著增强的、特异性的且协同的抗肿瘤活性的耐受性良好的“现成”生物制品解决方案。

[0496] 材料与amp;方法

[0497] 在实例13中使用了以下材料和方法。

[0498] 研究设计

[0499] 本发明的一个示例性目的是开发TSAxCD28双特异性抗体,并且证明TSAxCD28在体外加强PD-1诱导的T细胞活化,并且在体内安全地增强抗肿瘤疗效。通过显示定位于T细胞和靶细胞缀合物的免疫突触处的双特异性抗体PD-1和CD28、PD-1 T细胞细胞因子释放增强的图像来证明体外活性。在同基因小鼠肿瘤模型中评估了体内抗肿瘤疗效。随时间推移监测肿瘤体积和血清细胞因子,以显示对双特异性抗体治疗的应答。食蟹猴研究的一个目的是确定TSAxCD28作为单一疗法或与PD-1组合时在非人灵长类动物中的安全性和耐受性(药理学和毒理学特征)。通过临床观察和血液样品采集来检查针对动物的毒性,以分析血清细胞因子和T细胞表型。

[0500] 动物研究

[0501] 所有程序均按照NIH《实验动物的护理和使用指南(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)》进行。该方案已由再生元制药公司(Regeneron Pharmaceuticals)机构动物护理和使用委员会批准。

[0502] 细胞系

[0503] 根据ATCC建议的方案培养Jurkat克隆E6-1(ATCC,#TIB-152)、Raji(ATCC,#CCL-86)、HEK293细胞系(ATCC,#CRL-1573)和A-431(ATCC,CRL-1555)。使用对泛素启动子驱动的hCD20(登录号NP\_068769.2的氨基酸M1到P297)进行编码的哺乳动物载体产生HEK293/hCD20细胞系。在500 $\mu$ g/ml的遗传霉素A(G418)中培养转染的细胞,以选择稳定表达的细胞系。为了产生表达hCD80或hPDL1的细胞,使用对人CD80(288aa长;登录号NM\_005191.4)和新霉素抗性基因或人PDL1(290aa长;登录号NM\_14143.4)和嘌呤霉素抗性基因进行编码的慢病毒质粒来转染HEK293T细胞,从而促进病毒颗粒的产生,所述病毒颗粒随后用于感染HEK293/hCD20或Raji细胞。通过FACS分离人CD80或PDL1阳性细胞。使用来自凯杰(Qiagen)的慢病毒(目录号CLS-013L)和对人PD-1和嘌呤霉素抗性基因进行编码的慢病毒质粒,用NF $\kappa$ B-Luc转导Jurkat细胞。将所有产生的细胞系均维持在补充有500 $\mu$ g/mL G418和/或0.5 $\mu$ g/ml嘌呤霉素的DMEM+10%FBS+P/S/G+NEAA中。

[0504] 通过用病毒颗粒转导DU145细胞(ATCC,HTB-81)产生DU145/hPSMA细胞系,所述病毒颗粒由用对人PSMA(登录号Q04609的氨基酸M1到A750)和新霉素抗性基因进行编码的慢病毒质粒转染的HEK293T细胞产生。感染之后,在500 $\mu$ g/ml的遗传霉素A(G418)中培养细胞,以选择稳定表达PSMA的细胞。将产生的细胞系DU145/PSMA维持在具有500 $\mu$ g/mL G418的MEM+10%FBS+P/S/G中。

[0505] 为了产生被工程化为表达共刺激配体的肿瘤细胞系,使用具有对小鼠CD86和嘌呤霉素抗性基因或空载体和嘌呤霉素抗性基因进行编码的EF1a启动子(分别为pLVX.EF1a.CD86-puro和pLVX.EF1a.EV-puro)的pLVX慢病毒质粒转染HEK293T细胞,从而促进病毒颗粒的产生,所述病毒颗粒随后用于感染MC38(美国国家癌症研究所,肿瘤免疫学和生物实验室(National Cancer Institute,Laboratory of Tumor Immunology&Biology))。通过荧光活化细胞分选术(FACS)分离表达CD86的工程化细胞系。在存在0.5 $\mu$ g/ml嘌呤霉素的情况下,将细胞维持在ATCC推荐的条件下。所得的细胞系被指定为MC38/CD86和MC38/EV。

[0506] 为了产生MC38/hPSMA细胞,使用对人PSMA(登录号Q04609的氨基酸M1到A750)和新霉素抗性基因进行编码的慢病毒质粒来转染HEK293T细胞,从而促进病毒颗粒的产生,所述病毒颗粒随后用于感染MC38亲本细胞。通过FACS分离人PSMA阳性细胞。将MC38/hPSMA维持在补充有500 $\mu$ g/mL G418的DMEM+10%FBS+P/S/G+NEAA中。

[0507] Amnis图像流

[0508] 如实例7中所述进行Amnis图像流。

[0509] 人原代CD3<sup>+</sup> T细胞分离

[0510] 如实例8中所述进行T细胞分离。

[0511] 在与DU145/PSMA细胞发生MLR反应时,IL-2从原代CD3<sup>+</sup> T细胞中释放

[0512] 在测定当天,在含有50U/ml苯并酶核酸酶的刺激培养基(补充有10%FBS、HEPES、NaPyr、NEAA和0.01mM BME的X-VIVO 15-细胞培养基)中解冻先前分离和冷冻的人CD3<sup>+</sup> T细胞。将细胞以1200rpm离心10分钟,重新悬浮在刺激培养基中,并且以 $1 \times 10^5$ 个细胞/孔的浓度平板接种在96孔圆形底板中。在初次刺激培养基中,用25 $\mu$ g/mL丝裂霉素C处理被工程化为表达人PSMA的DU145亲本细胞或DU145细胞,浓度为 $10 \times 10^6$ 个细胞/mL。在37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>下孵育1小时之后,将经丝裂霉素C处理的细胞用含有2%FBS的D-PBS洗涤3次,并且以每孔 $5 \times 10^4$ 个细胞的最终浓度添加到含有CD3<sup>+</sup> T细胞的孔中。为了防止通过将CD28抗体与Fc-受体进行Fc锚定而产生的可能的CD28激动活性,将饱和量的非特异性人IgG抗体(每种为100nM:hIgG1、hIgG4和hIgG4s)包含在每个测定孔内。随后,将PSMA x CD28、非靶标x CD28对照或hIgG4s同种型对照、抗体以1:3稀释度从30pM滴定到200nM,然后添加到孔中。10点稀释液的最终点不含滴定的抗体。由于DU145细胞内源性表达PD-L1,因此通过向孔中添加恒定的20nM的PD-1拮抗剂REGN2810来评估PD-1抑制对T细胞活性的影响。还包含了不存在PD-1抑制的条件,在所述条件下使用20nM的匹配的hIgG4同种型对照。将板在37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>下孵育72小时,并且随后将其离心以沉淀细胞。收集50 $\mu$ L培养基上清液,并且由此,根据制造商的方案,在人IL-2AlphaLISA测定中测试了5 $\mu$ L。在珀金埃尔默的多标签板读取器Envision上获得这些测量值。生成已知IL-2浓度的标准曲线,以推断测定孔中产生的IL-2的pg/mL。一式两份地对所有连续稀释液进行测试。通过使用GraphPad Prism<sup>TM</sup>软件根据10点剂量-应答曲线上的四参数逻辑方程来确定抗体的EC<sub>50</sub>值。

[0513] 基于FACS的细胞毒性测定

[0514] 如前所述进行了基于FACS的细胞毒性测定(实例8)。

[0515] 同基因肿瘤研究

[0516] 根据ATCC指南培养MC38/EV和MC38/CD86。将 $1 \times 10^6$ 个MC38/EV或MC38/CD86皮下植入C57BL/6小鼠中。肿瘤植入后第0天、第3天、第7天、第10天和第14天,通过腹膜内注射5mg/kg的PD-1抗体(RPM1-14, BioXcell)或大鼠IgG2a同种型对照(BioXcell)对小鼠进行治疗。使用卡尺(Roboz RS-6466)每周两次测量肿瘤大小。使用公式 $X \times Y \times (X/2)$ 计算肿瘤体积,其中Y为最长尺寸,并且X为垂直尺寸。通过CO<sub>2</sub>窒息法对肿瘤大于2000mm<sup>3</sup>或患有溃疡肿瘤的小鼠实施安乐死。

[0517] 如实例10所述产生hCD3/hCD28/hPSMA人源化小鼠。抗体治疗也是类似的,不同之处在于,在第0天、第7天和第14天(预防性治疗)或在第9天、第13天和第22天(延迟治疗)通过腹膜内注射施用5mg/kg的指定抗体或双特异性抗体作为单一疗法或组合疗法。

[0518] 离体组织细胞因子分析

[0519] 植入后第29天,通过二氧化碳窒息法对MC38/hPSMA荷瘤CD3/CD28/PSMA小鼠实施安乐死。收集脾脏和肿瘤,并且储存在冰上培养基中。除非另有说明,否则以下所有步骤均在冰上或4℃下进行。按照制造方案(美天旋(Miltenyi) 130-096-730),使用美天旋小鼠肿瘤解离试剂盒将肿瘤切成小块,并且将碎片加工成单细胞悬浮液。使用温和的MACS机械解离(脾4程序)将脾加工成单细胞悬浮液,并且使用3ml注射器的橡胶端将其通过70微米过滤器捣碎。通过以1200rpm离心5分钟,使细胞沉淀。通过将细胞沉淀物重新悬浮在1ml ACK裂解缓冲液中并在冰上孵育5分钟来裂解红细胞。用FACS缓冲液淬灭ACK裂解缓冲液。通过以1200rpm离心5分钟,使细胞沉淀。将细胞悬浮液重新悬浮在1ml培养基中,并且将0.2ml平板接种在96孔板中(20-400K肿瘤细胞或50-70K脾细胞)。将细胞在37℃下孵育过夜,并收集培养上清液。按照制造商方案(Meso Scale Diagnostics K1 5048D-4)使用V-Plex促炎性MSD试剂盒测量组织培养上清液中的细胞因子水平。通过FACS分析确定每孔平板接种的细胞数。将细胞因子水平归一化为平板接种的细胞数。将校准珠与细胞一起运行,以使用以下计算精确测量细胞数:

[0520]  $\text{细胞\#} = (\text{\#输入珠} \times \text{\#通过FACS计数的细胞}) / \text{\#通过FACS计数的珠}$

[0521] 小鼠血清细胞因子水平的测量

[0522] 如前所述进行小鼠血清细胞因子水平的测量(实例10)。

[0523] 流式细胞术分析

[0524] 对于体内实验的流式细胞术分析,收获肿瘤,制备单细胞悬浮液,并且使用ACK裂解缓冲液(赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher Scientific))裂解红细胞。使用活/死可固定的蓝色死细胞染色试剂盒(赛默飞世尔科技公司)来进行活/死细胞鉴别。在Symphony(BD生物科学公司)上获得样品,并且使用Cytobank软件(加利福尼亚州圣克拉拉的Cytobank)进行分析。对每个样品使用相同数量的事件进行分析。事件范围由获得的事件最少的样品确定。为了基于特异性标志物自动对T细胞进行聚类,使用Cytobank的CITRUS分析。

[0525] 食蟹猴毒理学研究

[0526] 如前所述进行了食蟹猴研究(实例11)。

[0527] 结果

[0528] PD-1检查点抑制增加了免疫突触内CD28的相对比率,从而允许TSAxCD28双特异性抗体显著增强抗PD-1体外促进T细胞活化的能力

[0529] 为了测试共刺激双特异性激动剂是否可以补充检查点抑制,测试了本发明的示例性PSMAxCD28双特异性抗体(bs16429D)以TCR/CD3依赖性T细胞活化方式增强PD-1阻断的有效性的能力。事实上,有效的T细胞活化取决于TCR/CD3和CD28复合物在“免疫突触”(IS)处的共聚集。然而,来自TCR/CD3和CD28的活化信号被PD-1-Shp-2磷酸化直接抑制,随后PD-1/PD-L1在突触处聚集(E.Hui等人,“T细胞共刺激受体CD28是PD-1介导的抑制的主要靶标(T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition)”《科学》355,1428-1433(2017);J.M.Chemnitz、R.V.Parry、K.E.Nichols、C.H.June、J.L.Riley,“SHP-1和SHP-2在原代人T细胞刺激时与程序性死亡1的基于免疫受体酪氨酸的开关基序相关联,但只有受体连接可阻止T细胞活化(SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death

l upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation)”《免疫学杂志》173,945-954(2004))。为了确定CD28和PD-1在IS处的相对定位,使用过度表达PD-1的Jurkat T细胞和被工程化为过度表达PD-L1的Raji肿瘤靶细胞开发了体外测定法(如实例7中所述的Amnis图像流)。使用一种荧光标记的双特异性CD20xCD3抗体(E.J.Smith等人,“触发T细胞对B细胞的杀伤的一种新颖的天然形式的双特异性抗体在小鼠肿瘤模型和食蟹猴中具有稳健的活性”《科技报告》5,17943(2015))复制肽MHC/TCR结合,并使T细胞与形成IS的靶细胞的相互作用可视化。使用两种不同的荧光标记的单克隆PD-1抗体(PD-1 mAb)、阻断剂(PD-1 mAb, REGN2810, (E.Burova等人,“抗PD-1抗体REGN2810的表征及其在人PD-1敲入小鼠中的抗肿瘤活性(Characterization of the Anti-PD-1 Antibody REGN2810 and Its Antitumor Activity in Human PD-1 Knock-In Mice)”《分子癌症疗法(Mol Cancer Ther)》16,861-870(2017))和非阻断剂(NB PD-1 mAb)同时阻断与PD-L1的相互作用并使PD-1的定位可视化。发现在靶细胞上不存在PD-L1表达的情况下,并且在存在PD-1 mAb的情况下,IS处PD-1或CD28的相对量没有变化(图14)。然而,在存在非阻断性PD-1 mAb的情况下,靶细胞上的PD-L1表达降低了突触处的CD28,并促进了IS处的高PD-1累积。相反,在存在阻断性PD-1 mAb的情况下,PD-1定位显著降低,并且相对CD28水平维持在IS处。通过计算IS内部的抗体染色与IS外部的抗体染色的比率来定量PD-1和CD28的分布(图15)。此数据表明,靶细胞上的PD-L1表达增强了IS处的PD-1定位,同时降低了CD28。此外,PD-1阻断性mAb降低了IS处PD-1的相对量,并且挽救了CD28的水平,从而增加了CD28与PD-1的相对比率。

[0530] 接下来测试了PSMAxCD28是否可以增强PD-1阻断对T细胞活化诱导的肿瘤细胞杀伤的影响。为此,利用了前列腺癌系22RV1。22RV1细胞内源性表达PSMA,并且被工程化为表达PD-L1(22RV1/PD-L1)。由于不存在通过同种异体T细胞应答引起的TCR/CD3刺激,因此使用PSMAxCD3(美国专利第10,179,819号)来提供初次刺激。在人外周血单核细胞(PBMC,含有人T细胞)和22RV1/PD-L1细胞的共培养中,PSMAxCD3单独诱导了约40%的肿瘤细胞杀伤(图16,菱形,8E-10的EC<sub>50</sub>)。将PD-1 mAb添加到PSMAxCD3会将肿瘤细胞杀伤增强到约55%(图16,实心三角,4E-10的EC<sub>50</sub>)。有趣的是,PSMAxCD28与PSMAxCD3的组合类似地将肿瘤细胞杀伤的深度增强到约55%,其中效力增加(图16,实心圆圈,6E-11的EC<sub>50</sub>)。这表明PSMAxCD28可以覆盖PD-1/PD-L1介导的抑制。有趣的是,PSMAxCD28、PD-1 mAb和PSMAxCD3的三重组合具有最强的肿瘤细胞杀伤作用(约70%),从而证明了这种组合的协同效应(图16,实心方块,7E-11的EC<sub>50</sub>)。如所预期的,单独的PSMAxCD28、PD-1 mAb或PSMAxCD28加PD-1 mAb的组合都不会诱导任何肿瘤细胞杀伤(图16,空心符号)。一致地,观察到使用三重组合治疗使IFN  $\gamma$  释放最大增加(图17)。

[0531] 接下来确定了PSMAxCD28和PD-1 mAb组合对体外原代人T细胞活化的影响。为了复制生理性PD-L1表达和TCR/CD3刺激,采用了混合淋巴细胞反应(MLR)。在单向MLR中,同种异体决定簇的不相容性导致T细胞活化,这可以通过细胞因子产量来定量。在此,将来自健康供体的T细胞与DU145/PSMA细胞(内源性表达PD-L1并过度表达PSMA的工程化前列腺癌细胞系)和指定抗体一起孵育(图18)。在存在DU145/PSMA细胞和T细胞的情况下,PSMAxCD28双特异性导致IL-2释放的剂量依赖性比IgG4同种型对照增加约3-4倍(图18,圆圈)。类似地,在MLR测定中添加20nM PD-1 mAb也使IL-2释放比IgG4同种型对照增加约3-4倍(图18,三角)。

以组合形式,PSMAxCD28和20nM PD-1 mAb显著加强了由PSMAxCD28双特异性抗体诱导的活化,其中最大IL-2水平比同种型对照增加了约20倍(图18,方块),从而表明在存在具有内源性水平TCR/CD3活化和PD-L1抑制的肿瘤细胞的情况下,PSMAxCD28双特异性抗体与PD-1阻断mAb的组合有效且协同地活化T细胞。

[0532] 总之,这些结果表明,在存在TCR/CD3信号传导(由CD3双特异性或同种异体反应驱动)的情况下,PSMAxCD28双特异性抗体可以有效增强PD-1 mAb促进T细胞活化的能力,从而在体外增加细胞因子释放和表达PSMA和PD-L1的肿瘤细胞杀伤。

[0533] 天然CD28配体在肿瘤细胞上的过度表达与PD-1 mAb治疗协同作用以在体内诱导CD8 T细胞依赖性持久抗肿瘤免疫

[0534] 为了确定CD28与其一个或多个天然配体的接合是否可以加强PD-1 mAb在体内的抗肿瘤疗效,将MC38肿瘤细胞工程化为过度表达CD86,即CD28的共刺激配体之一(数据未示出)。与用空载体对照(MC38/EV)转染的阴性对照MC38细胞相比,MC38/CD86细胞和PD-1 mAb治疗的组合显著抑制了肿瘤生长(图19A),从而导致肿瘤完全消退,并伴有稳健的生存益处(图19B)。在治疗过程期间,CD8<sup>+</sup> T细胞的耗竭完全消除了通过将PD-1 mAb疗法与MC38/CD86细胞组合所引起的抗肿瘤疗效,这表明对CD8<sup>+</sup> T细胞具有依赖性(图19C)。值得注意的是,最初植入有MC38/CD86细胞并用PD-1 mAb治疗的无瘤小鼠排斥在原发性肿瘤植入60多天之后植入的第二MC38亲本肿瘤,这表明存在T细胞记忆应答(图19D)。因此,这些数据表明,组成型表达CD28配体与抗PD-1疗法的协同效应可以在体内产生持久的CD8依赖性抗肿瘤免疫。

[0535] 在同基因肿瘤模型中,PSMAxCD28与PD-1 mAb治疗协同作用以诱导抗肿瘤免疫

[0536] 接下来扩展了上述发现,以证明在同基因肿瘤模型中单独使用TSAxCD28双特异性抗体或与PD-1 mAb组合使用的治疗的抗肿瘤疗效。使用如本文所述的已建立的C57BL6同基因MC38肿瘤模型,将hPSMA基因(pLVX.EF1a.hPSMA)基因性地引入MC38细胞,从而产生如本文所述的肿瘤特异性抗原MC38/hPSMA。为了避免小鼠自发排斥这些以其它方式表达引入的人肿瘤抗原的同基因肿瘤的可能性,在这些小鼠中对PSMA进行了基因人源化。另外,如先前所述,还使用VelociGene技术将CD3  $\gamma$ - $\delta$ - $\epsilon$ 和CD28基因人源化(D.M.Valenzuela等人,“小鼠基因组高通量工程与高分辨率表达分析相结合(High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis)”《自然生物技术(Nat Biotechnol)》21,652-659(2003);W.T.Poueymirou等人,“允许立即进行表型分析的完全衍生自基因靶向性胚胎干细胞的F0代小鼠(F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses)”《自然生物技术》25,91-99(2007)),使得双特异性抗体将识别宿主T细胞(通过hCD3或hCD28)以及正常组织和肿瘤中的人肿瘤抗原(即hPSMA),这代表实际临床情况(Y.Kinoshita等人,“正常和恶性人组织中前列腺特异性膜抗原的表达(Expression of prostate-specific membrane antigen in normal and malignant human tissues)”《世界外科学杂志(World J Surg)》30,628-636(2006))。在此模型中,PSMAxCD28双特异性和PD-1 mAb的组合提供了最大的肿瘤生长控制,所述控制转化为稳健的生存益处。

[0537] 用抗CD28 X抗PSMA和抗PD1的组合进行立即治疗可协同地抑制肿瘤生长

[0538] 在立即治疗研究中,在第0天、第7天和第14天通过腹膜内注射施用5mg/kg抗CD28

x抗PSMA、抗PD1或大鼠IgG2a同种型对照作为单一疗法或组合疗法。使用X和Y直径的卡尺测量随时间推移监测肿瘤生长。计算肿瘤体积( $X*Y*(X/2)$ )。当肿瘤大小大于 $2000\text{mm}^3$ 时,对小鼠实施安乐死。

[0539] 如图20A到20E所示,当单独使用时,抗CD28 x抗PSMA抗体可抑制肿瘤生长并增加小鼠的存活率,但也与抗PD-1抗体协同作用,以促进肿瘤排斥并增加存活率,甚至比在没有PD-1抗体的情况下使用时更好。

[0540] 用CD28xPSMA和PD1的组合进行治疗可诱导针对第二次肿瘤攻击的长期抗肿瘤免疫

[0541] 此外,植入PSMAxCD28双特异性抗体和PD-1 mAb的组合并用其进行治疗的无肿瘤小鼠排斥在原发性肿瘤植入60多天之后植入的第二MC38亲本肿瘤系,这表明免疫记忆的产生(图21A)与本文所述的观察一致。这些结果表明,内源性抗原特异性TCR信号(信号1)是由MC38/PSMA植入肿瘤细胞上的肽MHC复合物产生的。已经显示,MC38肿瘤细胞表达高水平的重新活化的内源性逆转录病毒蛋白,如p15E,并且C57BL6小鼠中的瘤内T细胞响应于此p15E抗原(J.C.Yang、D.Perry-Lalley,“内源性鼠逆转录病毒的包膜蛋白是多种鼠肿瘤的肿瘤相关T细胞抗原(The envelope protein of an endogenous murine retrovirus is a tumor-associated T-cell antigen for multiple murine tumors)”《免疫疗法杂志》23, 177-183(2000);H.J.Zeh,第3版,D.Perry-Lalley、M.E.Dudley、S.A.Rosenberg、J.C.Yang,“两种自身抗原的高亲和力CTL表现出优异的体外和体内抗肿瘤疗效”《免疫学杂志》162, 989-994(1999))。与此发现一致,发现PSMAxCD28和PD-1 mAb组合疗法诱导了对至少一种内源性抗原P15E具有反应性的外周T细胞,从而支持抗肿瘤免疫记忆的产生(图21B)。值得注意的是,在类似的实验中(其中使用PSMAxCD28与PSMAxCD3的组合治疗诱导了MC38/hPSMA肿瘤排斥),这些无肿瘤小鼠无法排斥继发性肿瘤再次攻击(图21C)。总之,此数据表明,在此PSMA同基因肿瘤模型中,CD28双特异性抗体与PD-1 mAb协同作用,并且可以增强内源性TCR/CD3依赖性T细胞应答。

[0542] 使用抗CD28x抗PSMA与抗PD1的组合的治疗性治疗可协同地抑制肿瘤生长

[0543] 类似地,在延迟治疗方案中,植入后10天,PSMAxCD28与PD-1 mAb的组合抑制了已建立的MC38/hPSMA肿瘤的生长(图22A),并且还导致存活率显著增加(图22C)和肿瘤体积减少(图22D)。有趣的是,肿瘤靶向性组合疗法选择性地增加了肿瘤内细胞因子,如IFN  $\gamma$  所示(图22B)。在同一小鼠中未观察到脾或全身性细胞因子诱导(图23A和23B)。此外,T细胞活化标志物的表达谱显示,在支持此组合疗法的情况下,在进行PSMAxCD28治疗时,肿瘤内PD-1表达增加(图24)。为了进一步表征组合疗法后的应答性T细胞亚群,在肿瘤攻击后第17天通过高维流式细胞术分析了肿瘤浸润性CD8<sup>+</sup> T细胞。使用CITRUS(聚类标识、表征和回归)独立地对具有统计学意义的不同T细胞簇进行分层。重要的是,发现PD-1阻断扩大了表达高水平的活化/耗竭标志物(PD-1,TIM3,LAG3,Ki67)的效应细胞(CD44<sup>高</sup>CD62L<sup>低</sup>)CD8<sup>+</sup> T细胞(簇C1)(图25)。然而,只有组合疗法能够驱动肿瘤内CD8<sup>+</sup> T细胞(簇C2)的扩张,所述细胞具有记忆样表型(高Tcf1、EOMES、CD62L、中间CD122和CD127)和较低耗竭的表型(低PD-1、LAG3、TIM3、CD38、KLRG1、较高CD5)(图25)(M.Philip等人,“染色质状态限定了肿瘤特异性T细胞功能障碍和重新编程(Chromatin states define tumour-specific T cell dysfunction and reprogramming)”《自然》545,452-456(2017))。这些数据表明,PSMAxCD28双特异性抗

体和抗PD-1组合疗法可驱动与具有记忆样表型的肿瘤内T细胞活化相关联的稳健的抗肿瘤免疫,并驱动生存益处。

[0544] 与食蟹猴中的CD28超激动剂相比,单独或与PD-1 mAb疗法组合的TSAxCD28不会诱导全身性T细胞活化

[0545] 早期临床试验数据显示,被称为“CD28超激动剂”(CD28-SA)的二价CD28活化抗体广泛活化T细胞,并在一组健康志愿者中导致与细胞因子释放综合征(CRS)相关联的严重毒性(G.Suntharalingam等人,“抗CD28单克隆抗体TGN1412的1期试验中的细胞因子风暴”《新英格兰医学期刊》355,1018-1028(2006))。为了评估单独的TSAxCD28双特异性抗体的耐受性,或与PD-1 mAb组合使用时的协同药理学的潜力,在经基因工程化的三重人源化小鼠和食蟹猴中进行了探索性研究。每个治疗组有三只猴子通过静脉输注接受单剂量(10mg/kg)的单独的或与PD-1 mAb(REGN2810)(10mg/kg)组合的PSMAxCD28(组合组接受连续输注)(表20,图26A-26C和27)。

[0546] 另外,如本文所述,每组有三只猴子接受单剂量(01.mg/kg)抗PSMAxCD3双特异性抗体和单剂量(10mg/kg)CD28超激动剂抗体(表20,图26A-26C和27)。毒性评估基于临床观察结果、定性食物消耗量、体重、生命体征(体温、心率、脉搏血氧饱和度和呼吸率)、临床和解剖病理学(实验完成后)。采集血液样品用于细胞因子和FACS免疫表型分析。单独的或与PD-1组合的PSMAxCD28耐受性良好,并且所有动物在研究期间均存活。未观察到与试验品相关的临床观察(数据未示出)。未发现器官重量的变化,也未在最终尸检中发现任何肉眼可见的变化(数据未示出)。此外,未观察到显著的细胞因子释放、T细胞边缘化或活化(表23、图26A-26C)。相反,在单独施用CD28“超激动剂”的猴子中观察到显著的细胞因子释放、淋巴细胞边缘化和T细胞活化(图29A和29B)。在用CD28超激动剂治疗的动物的肾脏、脑和精囊中观察到免疫细胞的大量浸润。相反,在单独施用或与PD-1组合施用PSMAxCD28的动物中,未观察到与治疗相关的显著组织学变化(数据未示出)。

[0547] 表23:在探索性单剂量猴子毒理学研究中,用单独的或与抗PD-1组合的抗PSMAxCD28未观察到显著临床观察或细胞因子释放

[0548]

分子	描述	剂量 (mg/kg)	第1天-临床观察	任何观察	绝对 T 细胞 (E3/μL)		增殖性 T 细胞 Ki67+ (E3/μL)		活化 T 细胞 (E3/μL) -ICOS		CRP (mg/dL)	给药后 5 小时的血浆细胞因子 (pg/ml)									
					第2-4天	预测	5小时	预测	96小时	预测		96小时	24小时	IL-6	IL-8	IL-10	IFN-γ	TNF-α	IL-2	IL-4	IL-5
bs15780D	抗 PSMAxCD3	0.1	HUN		4.15	0.11	0.24	1.21	0.42	0.82	13.6	4449	531	2878	159	BLQ*	BLQ	BLQ	BLQ		
					7.41	0.15	0.88	1.69	0.40	0.64	14.9	11239	3910	22140	1800	BLQ	357	BLQ	152		
					5.68	0.01	0.42	3.87	0.68	3.75	15.4	10529	776	24784	1176	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ		
bs16429D	抗 PSMAxCD28	1	-	-	6.58	7.22	0.62	0.41	0.33	0.32	0.5	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ		
					4.91	5.09	0.42	0.23	0.26	0.17	0.5	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ		
					4.50	4.04	0.63	0.39	0.51	0.48	1.1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ		
bs16429D	抗 PSMAxCD28	10	-	-	6.03	5.73	0.33	0.44	0.33	0.22	0.2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ		
					4.64	4.53	0.38	0.60	0.58	0.50	0.2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ		
					10.06	7.16	0.88	0.49	0.84	0.48	1.3	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ		
REGN2329 (TeGenero)	抗 CD28 超激动剂	10	-	-	7.02	0.26	0.60	2.57	0.51	1.94	15.4	764	BLQ	3364	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	1169		
					7.06	0.19	0.79	1.55	0.43	1.11	15	2907	1095	17155	333	BLQ	238	BLQ	615		
					11.87	0.66	1.13	3.61	0.48	2.09	15.3	5226	5324	7918	1509	163	522	342	198		
bs16429D + REGN2810	抗 PSMAxCD28 +PD-1	10+10	-	-	3.76	1.90	0.38	0.37	0.34	0.28	10.8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ		
					3.66	2.07	0.54	0.52	0.22	0.20	1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	195	BLQ	323	BLQ		
					3.54	1.34	0.39	0.40	0.12	0.10	11.9	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ		
bs16431D + REGN2810	抗 PSMAxCD28 +PD-1	10+10	-	-	3.63	4.23	0.36	0.42	0.24	0.38	5.1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	333	BLQ		
					3.53	1.90	0.35	0.19	0.13	0.15	2.9	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	323	BLQ		
					4.16	3.16	0.42	0.32	0.26	0.33	0.2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	187	BLQ	323	BLQ		
mAb10154P3	EGFRVIIIAb		-	-	6.21	5.62	0.60	0.58	0.32	0.39	0.8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	151	BLQ	335	BLQ		
					7.22	7.72	0.84	0.77	0.39	0.41	11	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	267	BLQ	378	BLQ		
					3.55	4.61	0.51	0.75	0.26	0.44	0.2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ		

[0549] \*BLQ: 低于定量下限

[0550] 与上述食蟹猴的研究一致,在用单独的或与PD-1组合的PSMAxCD28给药的荷瘤或非荷瘤原始三重人源化小鼠 (hCD3/hCD28/hPSMA) 中未观察到细胞因子升高(图27和图29A和29B)。相反,在给药后4小时,用CD28超激动剂给药诱导了IFN γ、TNFα、IL-2、IL-4和IL-5的显著增加(图27和图29A和29B)。与上述结果一致的是,先前已经显示TSAxCD28双特异性抗体(以及用于制备这些双特异性抗体的亲本二价非超激动特性CD28抗体)在FDA推荐的体外干涂和湿涂测定中无法诱导人T细胞增殖(R.Stebbing、D.Eastwood、S.Poole、R.Thorpe,“TGN1412后:细胞因子释放测定的最新进展(After TGN1412:recent developments in cytokine release assays)”《免疫毒理学杂志(J Immunotoxicol)》10, 75-82 (2013)),与CD28-SA诱导的强增殖相比(数据未示出)。总的来说,这些数据表明TSAxCD28双特异性抗体耐受性良好。

[0551] 此外,如前所述(实例10,图28),单独的或与抗PD1组合的抗PSMAxCD28治疗并未升高荷瘤小鼠的血清细胞因子,而单独的或与抗PD1组合的抗PSMAxCD3治疗增加了荷瘤小鼠的血清细胞因子水平。

[0552] 讨论

[0553] 本文介绍并验证了新颖的肿瘤靶向性免疫疗法,所述疗法使用与PD-1阻断mAb组合的TSAxCD28双特异性抗体,其在动物肿瘤模型中诱导长期抗肿瘤免疫并促进稳健的肿瘤内T细胞活化。对经基因人源化的免疫活性小鼠和食蟹猴的毒理学研究表明,这些双特异性抗体本身或与PD-1 mAb组合时均未展示出毒性,这表明此治疗方法可以提供具有显著增强的、特异性的且协同的抗肿瘤活性的耐受性良好的“现成”生物制品解决方案。

[0554] 已知使用PD-1阻断性mAb的检查点抑制会释放T细胞活化的中断,但其作为单一药剂的疗效通常不足以在许多癌症中获得肿瘤清除和持久的抗肿瘤应答。目前正在评估改善对PD-1抑制的应答率的几种方法。事实上,标识生物标志物以预测对PD-1 mAb的反应性

(R.Cristescu等人,“基于PD-1检查点阻断的免疫疗法的泛肿瘤基因组生物标志物(Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade-based immunotherapy)”《科学》362,(2018))、将PD-1抑制与触发共刺激受体的激动性抗体一起使用以改善T细胞活化的非肿瘤靶向性组合疗法、或与化学疗法或放射疗法一起使用的疗法目前都在进行临床前和临床测试(S.Hu-Lieskovan、A.Ribas,“使用程序性细胞死亡1/程序性细胞死亡配体1检查点抑制剂作为骨架的新组合策略”《癌症期刊》23,10-22(2017);Y.K.Chae等人,“抗CTLA4和PD-1/PD-L1双重阻断免疫疗法在癌症中的现状和未来;来自黑色素瘤和非小细胞肺癌(NSCLC)临床试验的经验教训”《癌症免疫疗法杂志》6,39(2018);P.S.Chowdhury、K.Chamoto、T.Honjo,“用于改善PD-1阻断疗效的组合疗法策略:癌症免疫疗法的新时代”《内科医学杂志》283,110-120(2018))。然而,挑战在于,这些组合中的许多组合通常基于现有药物的可用性和组合疗法的事后合理性,而不是真正的假设驱动的方法,这在某些情况下导致患者的预后较差(M.J.Ahn、J.M.Sun、S.H.Lee、J.S.Ahn、K.Park,“非小细胞肺癌中的EGFR.TKI与免疫疗法的组合(EGFR TKI combination with immunotherapy in non-small cell lung cancer)”《药物安全专家意见(Expert Opin Drug Saf)》16,465-469(2017))。显然,检查点抑制和免疫系统的再活化为许多患者提供了长期缓解的可能性(J.S.Weber等人,“纳武单抗对比化学疗法用于在抗CTLA-4治疗后患晚期黑色素瘤的患者(CheckMate 037):随机的、受控的、开放标签的3期试验”《柳叶刀肿瘤学》16,375-384(2015);S.L.Topalian等人,“接受了纳武单抗的晚期黑色素瘤患者的存活率、持久肿瘤缓解和长期安全性”《临床肿瘤学期刊》32,1020-1030(2014);M.A.Postow、M.K.Callahan、J.D.Wolchok,“癌症疗法中的免疫检查点阻断”《临床肿瘤学期刊》33,1974-1982(2015);M.R.Migden等人,“在晚期皮肤鳞状细胞癌中使用西米普利单抗进行PD-1阻断”《新英格兰医学期刊》379,341-351(2018)),因此,需要进一步改善或增强T细胞活性以促进更持久应答的方法。在此,为了改善PD-1 mAb的抗肿瘤疗效,引入了使用TSAxCD28双特异性抗体来增强T细胞信号传导和活化的概念。事实上,这种新颖的组合免疫疗法使用肿瘤靶(例如,PSMA)进行了验证,并且证明CD28共刺激双特异性抗体与PD-1 mAb协同作用不仅会产生稳健的T细胞活化,而且会提供持久的抗肿瘤应答,而没有全身性毒性。因此,相对于先前所述的非靶向性方法,这种肿瘤靶向性组合疗法可以提供相当大的优势。使用CD28双特异性抗体(除非聚集在肿瘤细胞表面,否则其不会直接活化CD28)提供了仅在肿瘤部位处促进共刺激的可能性,从而避免了常规CD28活化抗体的全身性毒性(G.Suntharalingam等人,“抗CD28单克隆抗体TGN1412的1期试验中的细胞因子风暴”《新英格兰医学期刊》355,1018-1028(2006)),即,组合使用CTLA-4和PD-1阻断(J.Larkin等人,“在未治疗的黑色素瘤中的纳武单抗和伊匹单抗组合疗法或单一疗法”《新英格兰医学期刊》373,23-34(2015);D.B.Johnson等人,“具有组合免疫检查点阻断的暴发性心肌炎”《新英格兰医学期刊》375,1749-1755(2016);M.H.Pollack等人,“从在转移性黑色素瘤中组合使用抗CTLA-4和抗PD1期间具有免疫相关不良事件(irAE)的患者中恢复抗PD-1的安全性”《肿瘤学年鉴》29,250-255(2018))或其它共刺激激动剂二价抗体(N.H.Segal等人,“乌瑞鲁单抗(urelumab)(一种激动剂抗CD137单克隆抗体)的综合安全性分析结果(Results from an Integrated Safety Analysis of Urelumab,an Agonist Anti-CD137 Monoclonal Antibody)”《临床癌症研究》23,1929-1936(2017))时经常观察到的毒性。在经基因人源化的免疫活性小鼠和

食蟹猴中进行的毒理学研究表明,这些双特异性抗体作为单一药剂或与PD-1 mAb组合时均无毒性。在同基因模型中,安全性特征以及本发明的抗PSMAxCD28双特异性抗体与PD-1 mAb引起的抗肿瘤疗效的增强表明,此治疗模式是稳健的,并且作为一类新颖的免疫疗法组合具有更广泛的用途。

[0555] 为了增强T细胞介导的肿瘤细胞杀伤,正在开发肿瘤靶向性方法(E.Dahlen、N.Veitonmaki、P.Norlen,“癌症免疫疗法中的双特异性抗体(Bispecific antibodies in cancer immunotherapy)”《疫苗免疫疗法的治疗性进展(Ther Adv Vaccines Immunother)》6,3-17(2018))。事实上,基于CD3的双特异性抗体代表了一类新兴的抗体,所述抗体通过将T细胞与肿瘤细胞连接并活化TCR/CD3可以有效地触发T细胞活化(E.J.Smith等人,“触发T细胞对B细胞的杀伤的一种新颖的天然形式的双特异性抗体在小鼠肿瘤模型和食蟹猴中具有稳健的活性”《科技报告》5,17943(2015)),从而模仿正常的“信号1”。然而,尽管CD3双特异性抗体具有有前景的临床疗效,但由于直接的T细胞活化和缺乏仅针对肿瘤的特异性,其可能与细胞因子释放综合征(CRS)相关联(S.L.Maude、D.Barrett、D.T.Teachey、S.A.Grupp,“管理与新颖的T细胞接合疗法相关联的细胞因子释放综合征(Managing cytokine release syndrome associated with novel T cell-engaging therapies)”《癌症期刊》20,119-122(2014))。在此首次证明了,TSAXCD28双特异性抗体和PD-1 mAb组合疗法在免疫活性小鼠肿瘤模型中诱导与长期记忆应答相关联的肿瘤特异性T细胞活化。TSAXCD28双特异性抗体在不存在“信号1”的情况下活性有限或没有活性,并且PD-1阻断依赖于内源性抗原特异性T细胞对肿瘤肽的应答(W.Hugo等人,“转移性黑色素瘤中对抗PD-1疗法的应答的基因组和转录特征(Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma)”《细胞》165,35-44(2016); N.A.Rizvi等人,《癌症免疫学(Cancer immunology)》“在非小细胞肺癌中,突变景观决定了对PD-1阻断的敏感性(Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer)”《科学》348,124-128(2015); J.M.Mehnert等人,“POLE-突变型子宫内膜癌中的免疫活化和对派姆单抗的应答(Immune activation and response to pembrolizumab in POLE-mutant endometrial cancer)”《临床研究杂志(J Clin Invest)》126,2334-2340(2016); D.T.Le等人,“错配修复缺陷可预测实体瘤对PD-1阻断的应答(Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade)”《科学》357,409-413(2017))。因此,内源性肿瘤抗原提供的“信号1”对PSMAxCD28和PD-1mAb组合治疗很重要。这与独立于TCR特异性而活化T细胞的CD3双特异性抗体相反,因此可能不会产生长期的肿瘤特异性免疫。事实上,已经发现,尽管PSMAxCD3和PSMAxCD28组合治疗诱导了强大的抗肿瘤疗效,但是其并未产生强烈的记忆应答。进一步地,已经表明,MC38肿瘤细胞表达高水平的重新活化的内源性逆转录病毒肽,如p15E,并且C57BL6小鼠可以产生识别和响应这种新表位的内源性T细胞(J.C.Yang、D.Perry-Lalley,“内源性鼠逆转录病毒的包膜蛋白是多种鼠肿瘤的肿瘤相关T细胞抗原”《免疫疗法杂志》23,177-183(2000); H.J.Zeh,第3版,D.Perry-Lalley、M.E.Dudley、S.A.Rosenberg、J.C.Yang,“两种自身抗原的高亲合力CTL表现出优异的体外和体内抗肿瘤疗效”《免疫学杂志》162,989-994(1999))。在本文所述的MC38模型中,证明了PSMAxCD28和PD-1 mAb组合疗法增加了响应于此p15E新抗原的T细胞的数量。另外,本文通过对肿瘤浸润性T细胞的广泛

分析发现,PSMAxCD28和PD-1mAb的组合会产生功能障碍较少的CD8 T细胞,并促进强大的肿瘤内记忆T细胞表型。因此,CD28双特异性抗体与及PD-1阻断一起可以增强内源性TCR/CD3依赖性T细胞应答,从而驱动持久的抗肿瘤应答。

[0556] 本文的数据表明,当PD-L1由靶细胞表达时,PD-1在免疫突触处累积,并且其累积与突触处CD28的减少相关联,这表明PD-1可以通过防止CD28定位于突触来行使T细胞抑制。另外,本文发现PD-1阻断阻止了PD-1突触定位,同时突触处的CD28积累增加,从而允许TSAxCD28双特异性抗体显著增强PD-1mAb促进T细胞活化的能力。这可以是PD-1阻断抗体促进T细胞活化的机制之一。总的来说,在PD-1-PD-L1相互作用和/或PD-1抑制之后,免疫突触中PD-1和CD28定位的可视化使得能够更好地理解PD-1阻断对T细胞活化的影响,以及TSAxCD28与PD-1 mAb在免疫突触水平上的协同作用。

[0557] 尽管PD-1 mAb是一类重要的新型免疫疗法,但在许多情况下,进一步优化抗肿瘤活性肯定是重要的。正如CAR-T方法采用人工活化“信号1”和“信号2”的嵌合受体从而提高其抗肿瘤活性一样(E.A.Zhukovsky、R.J.Morse、M.V.Maus,“双特异性抗体和CAR:利用T细胞重新定向的广义免疫疗法”《当前免疫学观点》40,24-35(2016);A.I.Salter等人,“嵌合抗原受体信号传导的磷酸化蛋白质组学分析揭示了影响细胞功能的动力学和数量差异(Phosphoproteomic analysis of chimeric antigen receptor signaling reveals kinetic and quantitative differences that affect cell function)”《科学信号传导(Sci Signal)》11,(2018)),现在显示了将PD-1抑制与CD28双特异性抗体(其提供“信号2”)组合以增强抗肿瘤活性的潜在益处。与CAR-T疗法相比,这种方法具有几个实际的益处,因为其不需要为每个患者单独定制的费力的细胞疗法准备,也不需要通常与副作用相关联的毒性化学疗法对患者预先进行“淋巴耗竭”,以使患者可以接受这种细胞疗法(C.H.June、R.S.O'Connor、O.U.Kawalekar、S.Ghassemi、M.C.Milone,“用于人类癌症的CAR T细胞免疫疗法”《科学》359,1361-1365(2018))。这种双特异性方法通过其作用的特异性提供了增加疗效和增加安全性的潜力。总之,这些数据表明,将基于CD28的双特异性抗体与临床验证的PD-1mAb(如西米普利单抗)组合可以提供具有显著增强的且协同的抗肿瘤活性的耐受性良好的“现成”生物制品解决方案。

[0558] 本发明不限于本文所描述的具体实施例的范围。事实上,除了本文所述的那些之外,本发明的各种修改对于本领域技术人员来说将从前面的描述和附图中变得显而易见。此类修改旨在落入所附权利要求书的范围内。

## 序列表

<110> 再生元制药公司 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.)

<120> 双特异性抗 PSMA X 抗 CD28 抗体及其用途

<130> 10367W001/118003-45220

<140>

<141>

<150> 62/815, 878

<151> 2019-03-08

<150> 62/781, 980

<151> 2018-12-19

<150> 62/781, 930

<151> 2018-12-19

<150> 62/688, 227

<151> 2018-06-21

<160> 83

<170> Windows 的 FastSEQ 4.0 版

<210> 1

<211> 372

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

[0001]

<400> 1

```
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttatggca tgcactgggt ccgccagget 120
ccaggaagg ggctggagtg ggtggcattt atgtcatatg atggaagtaa taaattctat 180
tcagactccg tgaagggccg attcaccatc tcagagaca attccaggaa aatgctgttt 240
ctgcaaatga acaacctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc aagagatcag 300
tattacgatt ttttgactga tcacggggtc tttgactact ggggccaggg aacctggtc 360
accgtctcct ca 372
```

<210> 2

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 2

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
           20           25           30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
           35           40           45
Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Phe Tyr Ser Asp Ser Val
```

50	55	60																	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Arg	Lys	Met	Leu	Phe				
65					70					75				80					
Leu	Gln	Met	Asn	Asn	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys				
				85					90					95					
Ala	Arg	Asp	Gln	Tyr	Tyr	Asp	Phe	Leu	Thr	Asp	His	Gly	Val	Phe	Asp				
				100					105					110					
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115						120											

<210> 3  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 3

ggattcacct tcagtagtta tggc 24

<210> 4  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 4

[0002]

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly

1 5  
 <210> 5  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 5

atgtcatatg atggaagtaa taaa 24

<210> 6  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 6

Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys

1 5  
 <210> 7

[0003]

<211> 51  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 7  
 gcaagagatc agtattacga ttttttgact gatcacgggg tctttgacta c 51  
 <210> 8  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 8  
 Ala Arg Asp Gln Tyr Tyr Asp Phe Leu Thr Asp His Gly Val Phe Asp  
 1 5 10 15  
 Tyr  
  
 <210> 9  
 <211> 366  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 9  
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60  
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagecc 120  
 ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggatcac cactacaac 180  
 ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagatcca gttctccctg 240  
 aagctgagtt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag atgggggggtt 300  
 cggagggact actactacta cggtatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360  
 tectca 366  
 <210> 10  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 10  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile



[0005]

1 5  
 <210> 15  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 15  
 gcgagatggg gggttcggag ggactactac tactacgta tggacgtc 48  
 <210> 16  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 16  
 Ala Arg Trp Gly Val Arg Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10 15  
 <210> 17  
 <211> 324  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 17  
 gaaatagttt tgacacagag tcccggcaca ctgtcactct ctcccgggga aagagccacc 60  
 ttgtcatgta gagcaagtca gtcagtctct agctcttata tcgcctggta ccagcagaag 120  
 ccgggacagg cccctagact gctgatctac ggggcaagtt ccagggccac cggaatcccc 180  
 gaccggttca gtggaagcgg aagcgggaacc gattttactt tgacgatttc tagactggag 240  
 ccagaggatt tcgccgttta ctattgtcaa cagtacggaa gcagcccgtg gacgtttggc 300  
 cagggcacga aggtagaaat caag 324  
 <210> 18  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 18  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
 20 25 30  
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65 70 75 80  
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
 85 90 95  
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 19

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 19

agagcaagtc agtcagtctc tagctcttat ctcgcc

36

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 20

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1

5

10

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 21

ggggcaagtt ccagggccac c

21

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 22

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1

5

<210> 23

<211> 27

[0006]

<212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 23  
 caacagtacg gaagcagccc gtggacg 27  
 <210> 24  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 24  
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr  
 1 5  
 <210> 25  
 <211> 387  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 25  
 [0007] gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc cggggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttage acctatgcca tgacctgggt ccgccagct 120  
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcattt attagtggta gtggtgataa cacgtattac 180  
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgacgat tccggccatat atcactgtgc gaaagattcc 300  
 ggatattgta gtagtgggtgg gtgctccctc tacttctact acggtatgga cgtctggggc 360  
 caagggacca cggtcaccgt ctccctca 387  
 <210> 26  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 26  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Phe Ile Ser Gly Ser Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60



[0009]

<210> 31  
 <211> 66  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 31  
 gcgaaagatt ccgatattg tagtagtggt ggggtctccc tctacttcta ctacggtatg 60  
 gacgtc 66  
 <210> 32  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 32  
 Ala Lys Asp Ser Gly Tyr Cys Ser Ser Gly Gly Cys Ser Leu Tyr Phe  
 1 5 10 15  
 Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 20  
 <210> 33  
 <211> 372  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 33  
 cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
 tctctgtcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcaactgggt ccgccagget 120  
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtc atttcatatg ctggaacaa taaatactat 180  
 gcagactccg tgaaaggccg attcaccgtt tccagagaca attcgaagaa aacattgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag atctgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaagattcg 300  
 tattatgatt ttttgactga tcccgatgtt ttggatatct ggggccaagg gacaatggtc 360  
 accgtctett ca 372  
 <210> 34  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 34  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

	20		25		30										
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
	35		40		45										
Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Ala	Gly	Asn	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50		55		60										
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Val	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Lys	Thr	Leu	Tyr
65			70		75									80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85		90									95	
Ala	Lys	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Asp	Phe	Leu	Thr	Asp	Pro	Asp	Val	Leu	Asp
	100		105		110										
Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
	115		120												

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 35

ggattcacct tcagtagcta tggc

24

[0010]

<210> 36

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 36

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly

1

5

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 37

atttcatatg ctggaacaa taaa

24

<210> 38

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 38  
 Ile Ser Tyr Ala Gly Asn Asn Lys  
 1 5  
 <210> 39  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 39  
 gcgaaagatt cgtattatga ttttttgact gatcccgatg ttttgatat c 51  
 <210> 40  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 40  
 Ala Lys Asp Ser Tyr Tyr Asp Phe Leu Thr Asp Pro Asp Val Leu Asp  
 1 5 10 15  
 Ile  
 [0011]  
 <210> 41  
 <211> 324  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 41  
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcaactgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgtca 180  
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tetgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300  
 caagggacac gactggagat taaa 324  
 <210> 42  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 42  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro  
 85 90 95  
 Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 43

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 43

cagagcatta gcagctat

18

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 44

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 45

gctgcatcc

9

<210> 46

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 46

[0012]

[0013]

Ala Ala Ser  
 1  
 <210> 47  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 47  
 caacagagtt acagtacccc tccgatcacc 30  
 <210> 48  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 48  
 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr  
 1 5 10  
 <210> 49  
 <211> 372  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 49  
 cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggagge gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120  
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtc atttcatatg ctggaaacaa taaatactat 180  
 gcagactccg tgaaaggccg attcaccgtt tccagagaca attcgaagaa aacattgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag atctgaggac acggetgtgt attactgtgc gaaagattcg 300  
 tattatgatt ttttgactga tcccgatggt ttggatatct ggggcccaagg gacaatggtc 360  
 accgtctctt ca 372  
 <210> 50  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 50  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ala Val Ile Ser Tyr Ala Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Leu Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Lys Asp Ser Tyr Tyr Asp Phe Leu Thr Asp Pro Asp Val Leu Asp  
100 105 110  
Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 51

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 51

ggattcacct tcagtagcta tggc

24

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 52

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly

1 5

<210> 53

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 53

atttcatatg etggaacaa taaa

24

<210> 54

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 54

[0014]

Ile Ser Tyr Ala Gly Asn Asn Lys

1 5

<210> 55

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 55

gcgaaagatt cgtattatga ttttttgact gatcccgatg ttttgatat c 51

<210> 56

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 56

Ala Lys Asp Ser Tyr Tyr Asp Phe Leu Thr Asp Pro Asp Val Leu Asp

1 5 10 15

Ile

[0015]

<210> 57

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 57

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt caccttcagt aggaataata tgcaactgggt cgcaggct 120

ccagggaagg gactggaata tgtttcaggt attagtagta atgggggtcg cacatattat 180

gcagactctg tgaagggcag attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

cttcaaatgg gggcctgag agctgcggac atggctgtgt atttctgtac gagagatgac 300

gagctgcttt cctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcactgtctc ctca 354

<210> 58

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 58

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn



[0017]

<400> 62  
 Ile Ser Ser Asn Gly Gly Arg Thr  
 1 5  
 <210> 63  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 63  
 acgagagatg acgagctgct ttcctttgac tac 33  
 <210> 64  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 64  
 Thr Arg Asp Asp Glu Leu Leu Ser Phe Asp Tyr  
 1 5 10  
 <210> 65  
 <211> 324  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 65  
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattage agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagetctt gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgtca 180  
 aggttcagtg gcagtggate tgggacagat ttaactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300  
 caagggacac gactggagat taaa 324  
 <210> 66  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 66  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
                   35                                  40                                  45  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                   50                                  55                                  60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65                                  70                                  75                                  80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro  
                                   85                                  90                                  95  
 Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
                                   100                                  105

<210> 67

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 67

cagagcatta gcagctat

18

<210> 68

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 68

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

1

5

<210> 69

<211> 9

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 69

gctgcatcc

9

<210> 70

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 70

Ala Ala Ser

1

[0018]

<210> 71  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 71  
 caacagagtt acagtacccc tccgatcacc 30  
 <210> 72  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 72  
 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr  
 1 5 10  
 <210> 73  
 <211> 750  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 [0019] <223> 人 PSMA (FOLH1) >NP\_004467.1 谷氨酸羧肽酶 2 同种型 1  
 <400> 73  
 Met Trp Asn Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val Ala Thr Ala Arg  
 1 5 10 15  
 Arg Pro Arg Trp Leu Cys Ala Gly Ala Leu Val Leu Ala Gly Gly Phe  
 20 25 30  
 Phe Leu Leu Gly Phe Leu Phe Gly Trp Phe Ile Lys Ser Ser Asn Glu  
 35 40 45  
 Ala Thr Asn Ile Thr Pro Lys His Asn Met Lys Ala Phe Leu Asp Glu  
 50 55 60  
 Leu Lys Ala Glu Asn Ile Lys Lys Phe Leu Tyr Asn Phe Thr Gln Ile  
 65 70 75 80  
 Pro His Leu Ala Gly Thr Glu Gln Asn Phe Gln Leu Ala Lys Gln Ile  
 85 90 95  
 Gln Ser Gln Trp Lys Glu Phe Gly Leu Asp Ser Val Glu Leu Ala His  
 100 105 110  
 Tyr Asp Val Leu Leu Ser Tyr Pro Asn Lys Thr His Pro Asn Tyr Ile  
 115 120 125  
 Ser Ile Ile Asn Glu Asp Gly Asn Glu Ile Phe Asn Thr Ser Leu Phe  
 130 135 140  
 Glu Pro Pro Pro Pro Gly Tyr Glu Asn Val Ser Asp Ile Val Pro Pro  
 145 150 155 160

Phe Ser Ala Phe Ser Pro Gln Gly Met Pro Glu Gly Asp Leu Val Tyr  
 165 170 175  
 Val Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe Lys Leu Glu Arg Asp Met  
 180 185 190  
 Lys Ile Asn Cys Ser Gly Lys Ile Val Ile Ala Arg Tyr Gly Lys Val  
 195 200 205  
 Phe Arg Gly Asn Lys Val Lys Asn Ala Gln Leu Ala Gly Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 Val Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe Ala Pro Gly Val Lys  
 225 230 235 240  
 Ser Tyr Pro Asp Gly Trp Asn Leu Pro Gly Gly Gly Val Gln Arg Gly  
 245 250 255  
 Asn Ile Leu Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro Leu Thr Pro Gly Tyr  
 260 265 270  
 Pro Ala Asn Glu Tyr Ala Tyr Arg Arg Gly Ile Ala Glu Ala Val Gly  
 275 280 285  
 Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Gly Tyr Tyr Asp Ala Gln Lys  
 290 295 300  
 Leu Leu Glu Lys Met Gly Gly Ser Ala Pro Pro Asp Ser Ser Trp Arg  
 305 310 315 320  
 Gly Ser Leu Lys Val Pro Tyr Asn Val Gly Pro Gly Phe Thr Gly Asn  
 325 330 335  
 [0020] Phe Ser Thr Gln Lys Val Lys Met His Ile His Ser Thr Asn Glu Val  
 340 345 350  
 Thr Arg Ile Tyr Asn Val Ile Gly Thr Leu Arg Gly Ala Val Glu Pro  
 355 360 365  
 Asp Arg Tyr Val Ile Leu Gly Gly His Arg Asp Ser Trp Val Phe Gly  
 370 375 380  
 Gly Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala Ala Val Val His Glu Ile Val Arg  
 385 390 395 400  
 Ser Phe Gly Thr Leu Lys Lys Glu Gly Trp Arg Pro Arg Arg Thr Ile  
 405 410 415  
 Leu Phe Ala Ser Trp Asp Ala Glu Glu Phe Gly Leu Leu Gly Ser Thr  
 420 425 430  
 Glu Trp Ala Glu Glu Asn Ser Arg Leu Leu Gln Glu Arg Gly Val Ala  
 435 440 445  
 Tyr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile Glu Gly Asn Tyr Thr Leu Arg Val  
 450 455 460  
 Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser Leu Val His Asn Leu Thr Lys Glu  
 465 470 475 480  
 Leu Lys Ser Pro Asp Glu Gly Phe Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Glu Ser  
 485 490 495  
 Trp Thr Lys Lys Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ser Gly Met Pro Arg Ile  
 500 505 510

Ser Lys Leu Gly Ser Gly Asn Asp Phe Glu Val Phe Phe Gln Arg Leu  
 515 520 525  
 Gly Ile Ala Ser Gly Arg Ala Arg Tyr Thr Lys Asn Trp Glu Thr Asn  
 530 535 540  
 Lys Phe Ser Gly Tyr Pro Leu Tyr His Ser Val Tyr Glu Thr Tyr Glu  
 545 550 555 560  
 Leu Val Glu Lys Phe Tyr Asp Pro Met Phe Lys Tyr His Leu Thr Val  
 565 570 575  
 Ala Gln Val Arg Gly Gly Met Val Phe Glu Leu Ala Asn Ser Ile Val  
 580 585 590  
 Leu Pro Phe Asp Cys Arg Asp Tyr Ala Val Val Leu Arg Lys Tyr Ala  
 595 600 605  
 Asp Lys Ile Tyr Ser Ile Ser Met Lys His Pro Gln Glu Met Lys Thr  
 610 615 620  
 Tyr Ser Val Ser Phe Asp Ser Leu Phe Ser Ala Val Lys Asn Phe Thr  
 625 630 635 640  
 Glu Ile Ala Ser Lys Phe Ser Glu Arg Leu Gln Asp Phe Asp Lys Ser  
 645 650 655  
 Asn Pro Ile Val Leu Arg Met Met Asn Asp Gln Leu Met Phe Leu Glu  
 660 665 670  
 Arg Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly Leu Pro Asp Arg Pro Phe Tyr Arg  
 675 680 685  
 His Val Ile Tyr Ala Pro Ser Ser His Asn Lys Tyr Ala Gly Glu Ser  
 690 695 700  
 Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val Asp  
 705 710 715 720  
 Pro Ser Lys Ala Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln Ile Tyr Val Ala Ala  
 725 730 735  
 Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ser Glu Val Ala  
 740 745 750  
 <210> 74  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 人 CD28 >NP\_006130.1 T 细胞特异性表面糖蛋白 CD28 同种型 1 前体  
 <400> 74  
 Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val  
 1 5 10 15  
 Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr  
 20 25 30  
 Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser  
 35 40 45  
 Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu

```

      50              55              60
Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser
65              70              75              80
Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr
      85              90              95
Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys
      100             105             110
Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser
      115             120             125
Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro
      130             135             140
Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
145             150             155             160
Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
      165             170             175
Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
      180             185             190
Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
      195             200             205
Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
      210             215             220

```

[0022]

&lt;210&gt; 75

&lt;211&gt; 162

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hCD28 胞外 (N19-P152) .mmH (REGN2011):

单体人 CD28 (氨基酸 N19-P152, 登录号 NM\_006139),

带有 C 端 myc-myc-六组氨酸 (mmH) 标签

&lt;400&gt; 75

```

Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr Asp Asn
 1              5              10              15
Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser Arg Glu
      20              25              30
Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu Val Cys
      35              40              45
Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser Lys Thr
      50              55              60
Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr Phe Tyr
65              70              75              80
Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys Lys Ile
      85              90              95
Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly
      100             105             110

```

Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe  
 115 120 125  
 Pro Gly Pro Ser Lys Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu  
 130 135 140  
 Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His  
 145 150 155 160  
 His His

<210> 76

<211> 367

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hCD28 胞外 (N19-P152) .mFc (REGN2011): 二聚体人 CD28 (氨基酸 N19-P152, 登录号 NM\_006139), 带有 C 端小鼠 IgG2a Fc (氨基酸 E98-K330, 登录号 P01863) 标签

<400> 76

Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr Asp Asn  
 1 5 10 15  
 Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser Arg Glu  
 20 25 30  
 Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu Val Cys  
 35 40 45  
 Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser Lys Thr  
 50 55 60  
 Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr Phe Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys Lys Ile  
 85 90 95  
 Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly  
 100 105 110  
 Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe  
 115 120 125  
 Pro Gly Pro Ser Lys Pro Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys  
 130 135 140  
 Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 145 150 155 160  
 Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser  
 165 170 175  
 Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp  
 180 185 190  
 Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln  
 195 200 205  
 Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser  
 210 215 220

[0023]



1 5  
 <210> 80  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> SEQ ID NO: 76 的氨基酸 91-108  
 <400> 80  
 Ile Tyr Phe Cys Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp  
 1 5 10 15  
 Asn Glu  
  
 <210> 81  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述: 合成多肽  
 <400> 81  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr His Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60  
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Ile Gln Phe Ser Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Arg Trp Gly Val Arg Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
 115 120 125  
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr  
 130 135 140  
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 145 150 155 160  
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
 165 170 175  
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
 180 185 190  
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp

[0025]

	195	200	205
	His Lys Pro Ser Asn Thr	Lys Val Asp Lys Arg Val	Glu Ser Lys Tyr
	210	215	220
	Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys	Pro Ala Pro Pro Val Ala	Gly Pro Ser
	225	230	235
	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys	Pro Lys Asp Thr Leu Met	Ile Ser Arg
	245	250	255
	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val	Val Val Asp Val Ser Gln	Glu Asp Pro
	260	265	270
	Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr	Val Asp Gly Val Glu Val	His Asn Ala
	275	280	285
	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu	Gln Phe Asn Ser Thr Tyr	Arg Val Val
	290	295	300
	Ser Val Leu Thr Val Leu His	Gln Asp Trp Leu Asn Gly	Lys Glu Tyr
	305	310	315
	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys	Gly Leu Pro Ser Ser Ile	Glu Lys Thr
	325	330	335
	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln	Pro Arg Glu Pro Gln Val	Tyr Thr Leu
	340	345	350
	Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met	Thr Lys Asn Gln Val Ser	Leu Thr Cys
	355	360	365
[0026]	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro	Ser Asp Ile Ala Val Glu	Trp Glu Ser
	370	375	380
	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn	Tyr Lys Thr Thr Pro Pro	Val Leu Asp
	385	390	395
	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu	Tyr Ser Arg Leu Thr Val	Asp Lys Ser
	405	410	415
	Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val	Phe Ser Cys Ser Val Met	His Glu Ala
	420	425	430
	Leu His Asn Arg Phe Thr Gln	Lys Ser Leu Ser Leu Ser	Pro Gly Lys
	435	440	445
	<210> 82		
	<211> 450		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 人工序列的描述: 合成多肽		
	<400> 82		
	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser	Gly Gly Gly Val Val Gln	Pro Gly Arg
	1	5	10
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala	Ala Ser Gly Phe Thr Phe	Ser Ser Tyr
	20	25	30
	Gly Met His Trp Val Arg Gln	Ala Pro Gly Lys Gly Leu	Glu Trp Val
	35	40	45

Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Phe Tyr Ser Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Lys Met Leu Phe  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asp Gln Tyr Tyr Asp Phe Leu Thr Asp His Gly Val Phe Asp  
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu  
130 135 140

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn  
195 200 205

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser  
210 215 220

[0027] Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly  
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu  
260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg  
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu  
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
385 390 395 400



用于前列腺癌的示例共刺激性双特异性抗体：抗CD28 X抗PSMA

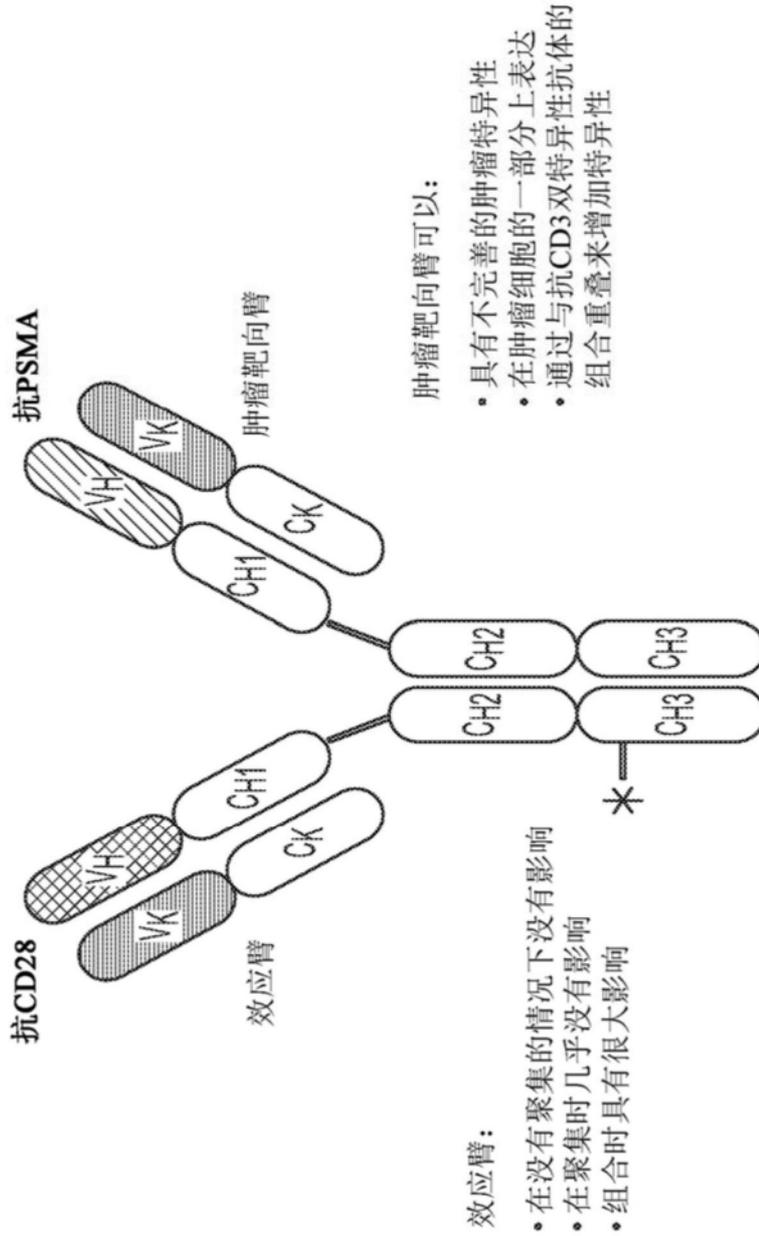


图1

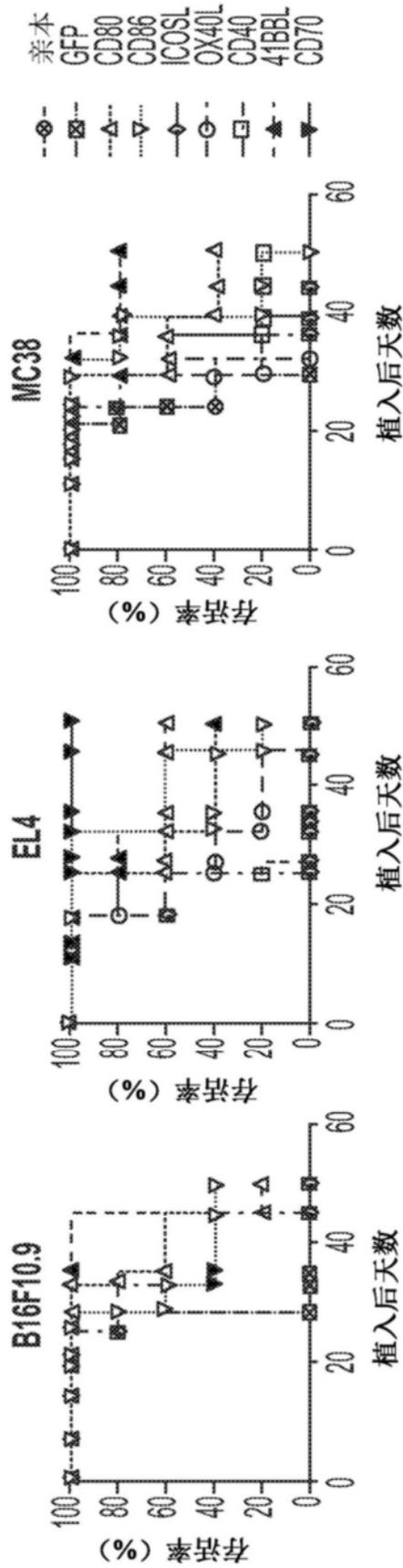


图2

用于测试PSMA X CD28双特异性抗体的  
初级和工程化生物测定的示意图

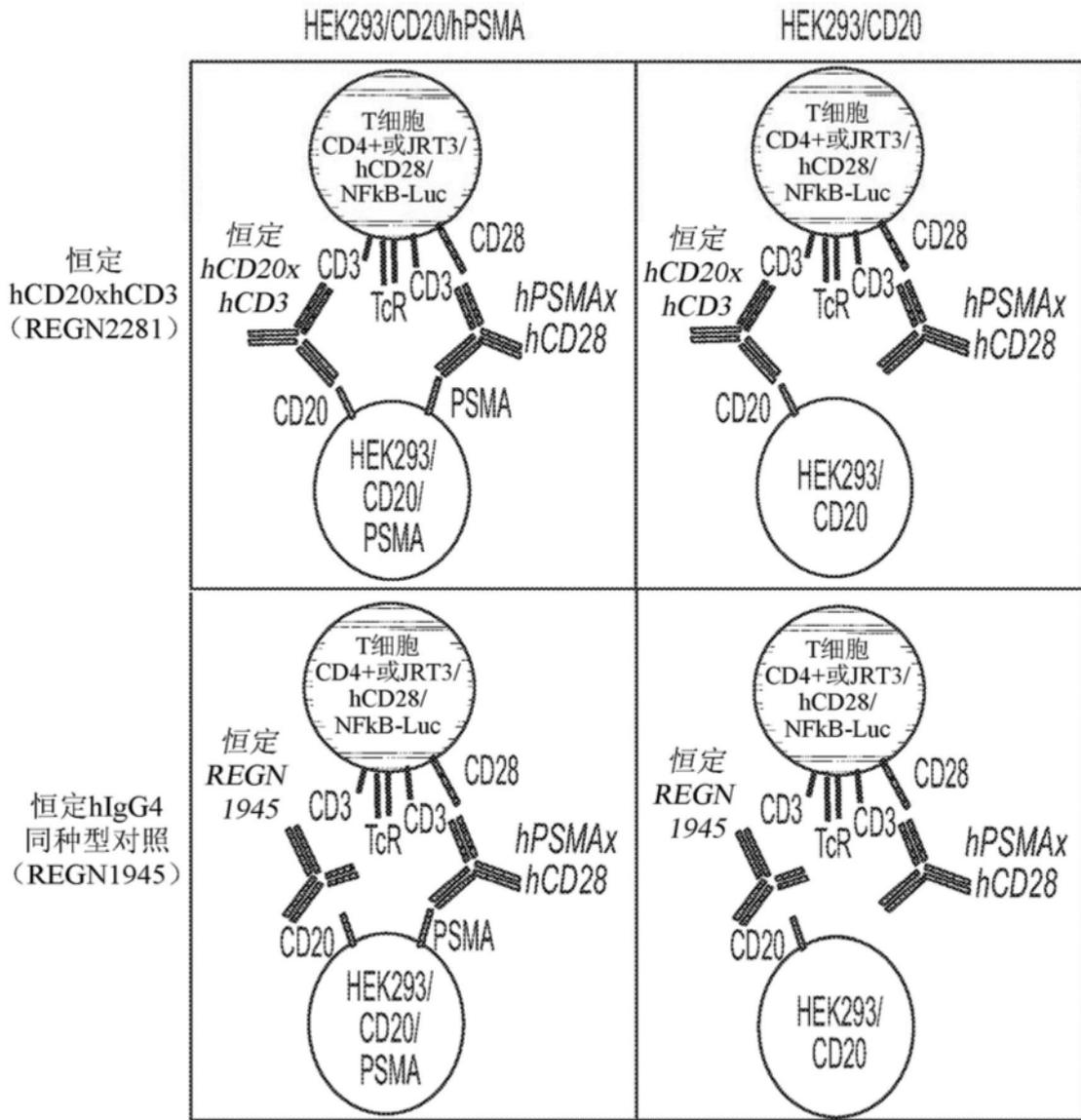


图3

在存在初次刺激 (REGN2281) 和在HEK293/hCD20细胞上表达的PSMA的情况下，  
通过hPSMA X hCD28增强了CD4+ T细胞和工程化JRT3.T3/ IG4/hCD28细胞的活化

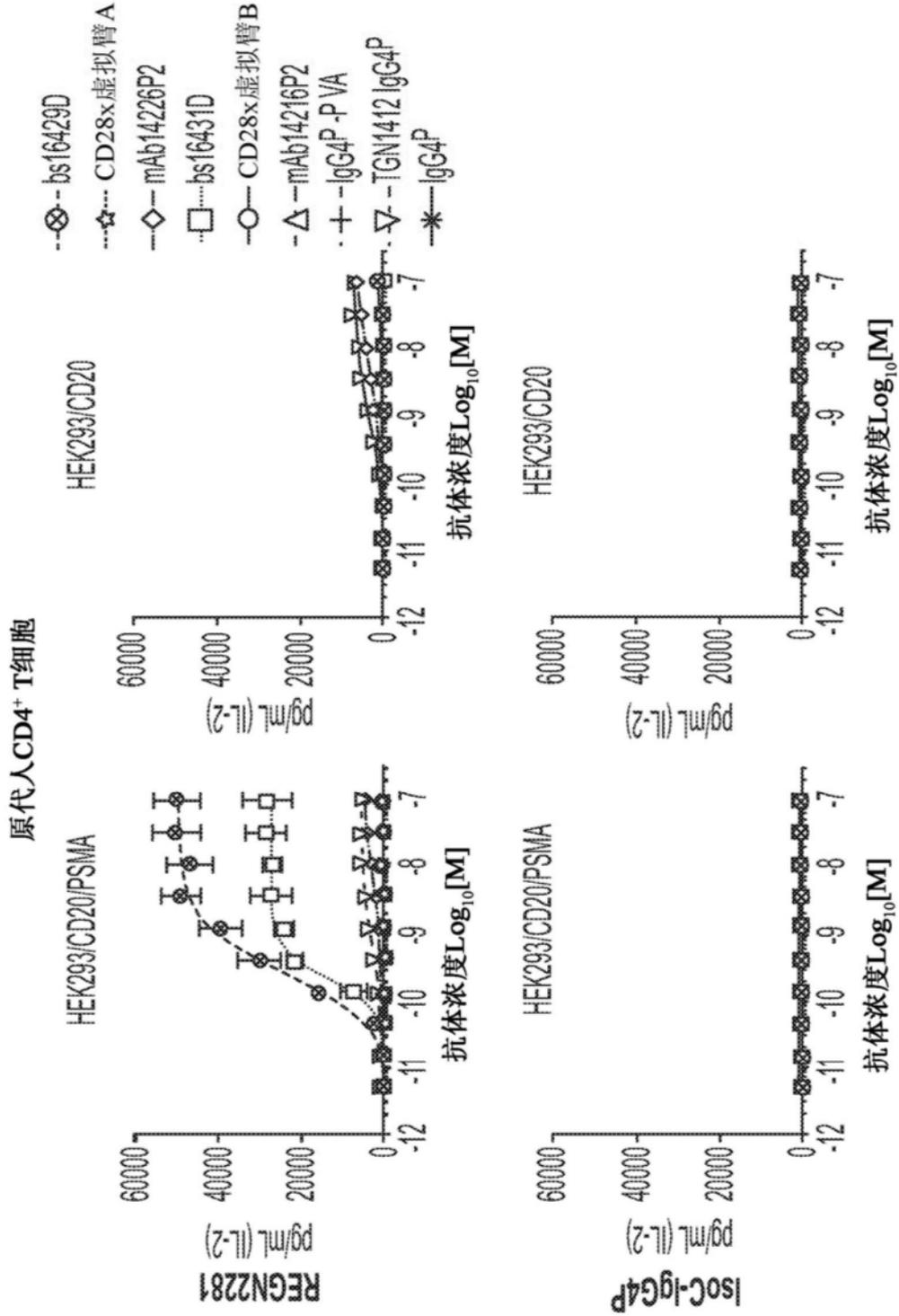


图4A

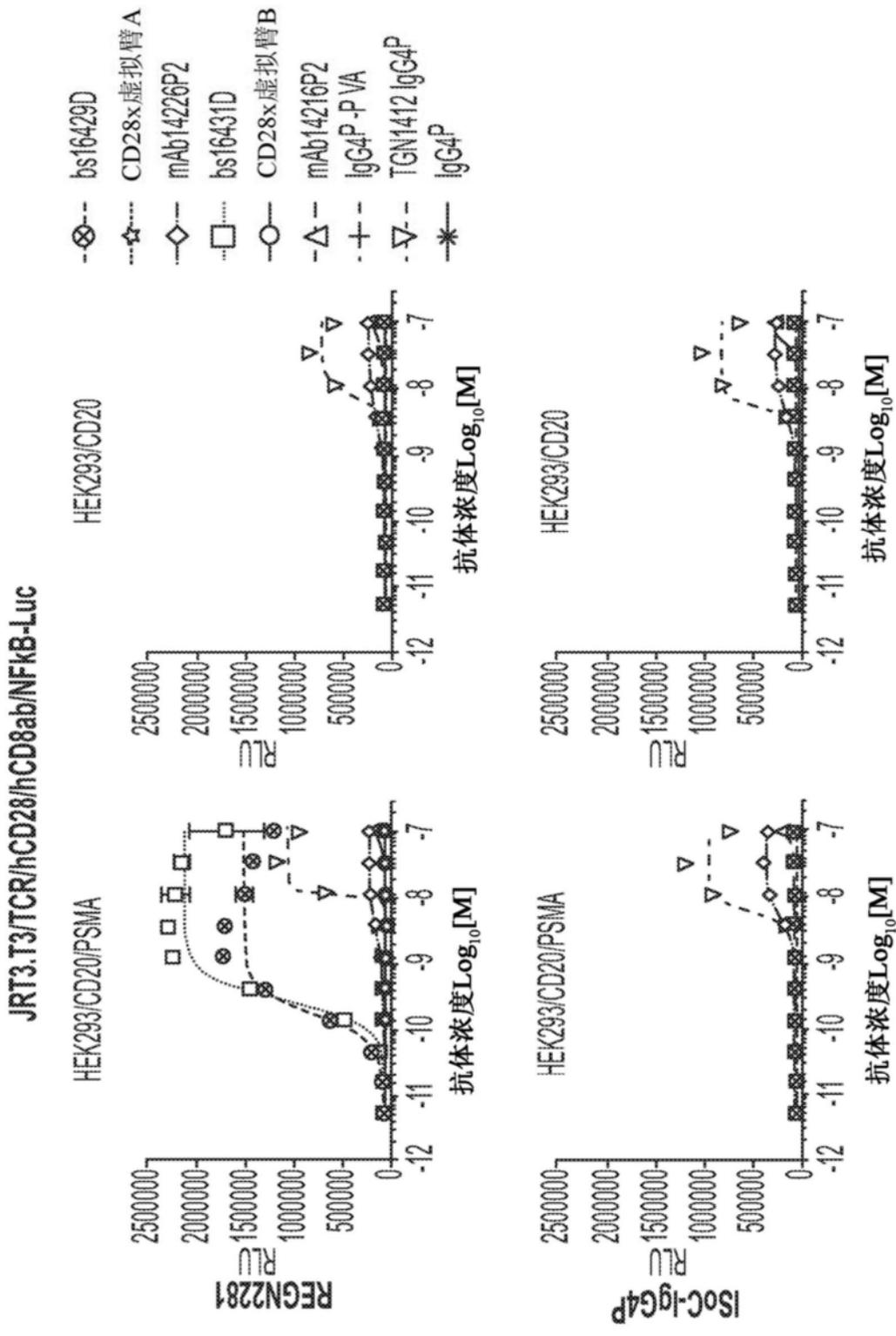


图4B

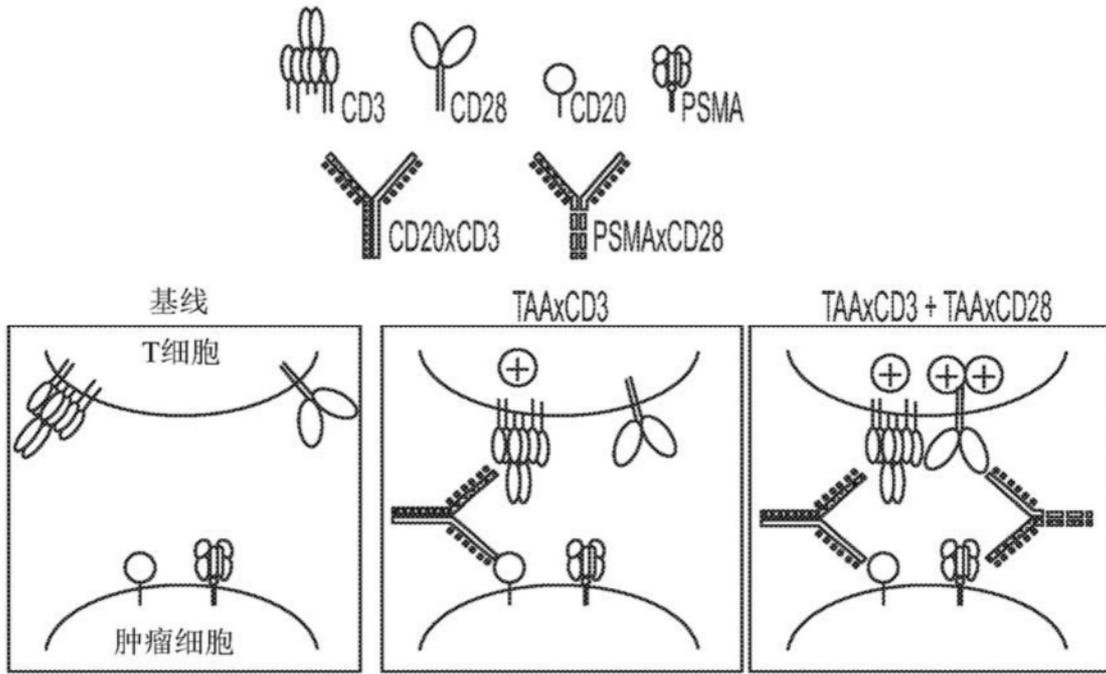


图5A

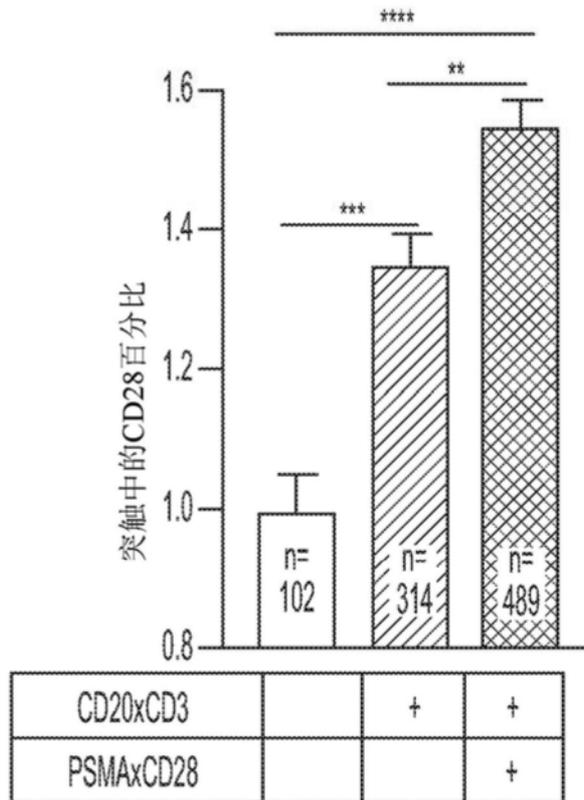


图5B

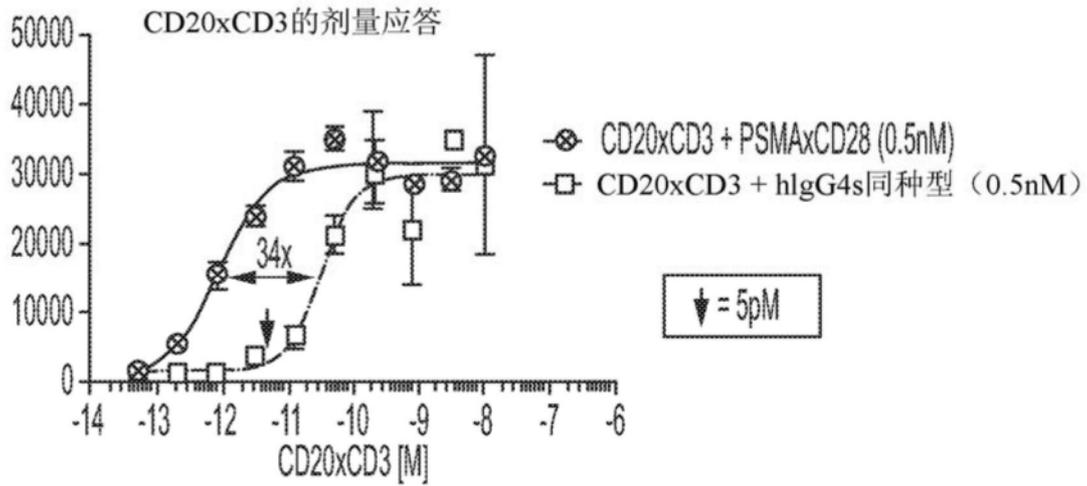


图5C

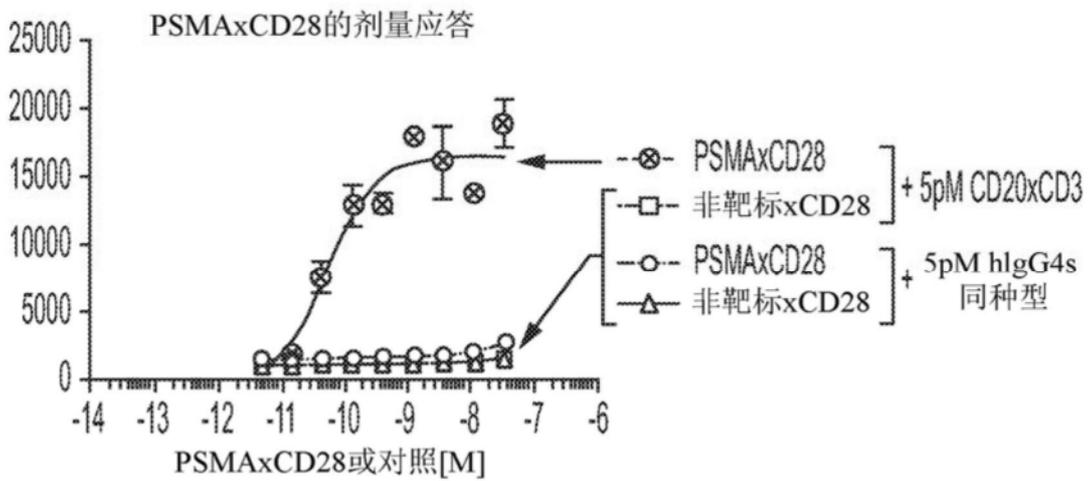


图5D

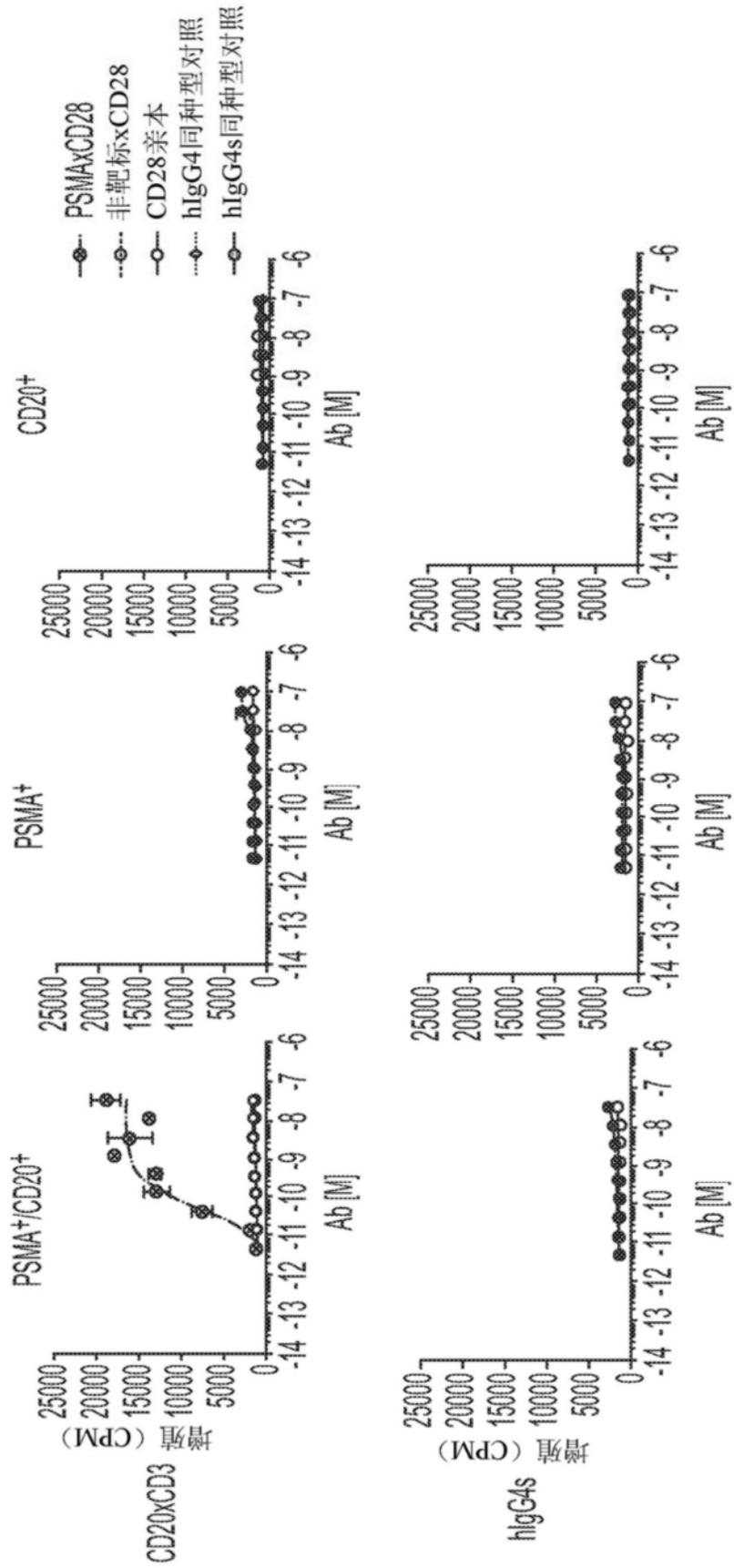


图5E

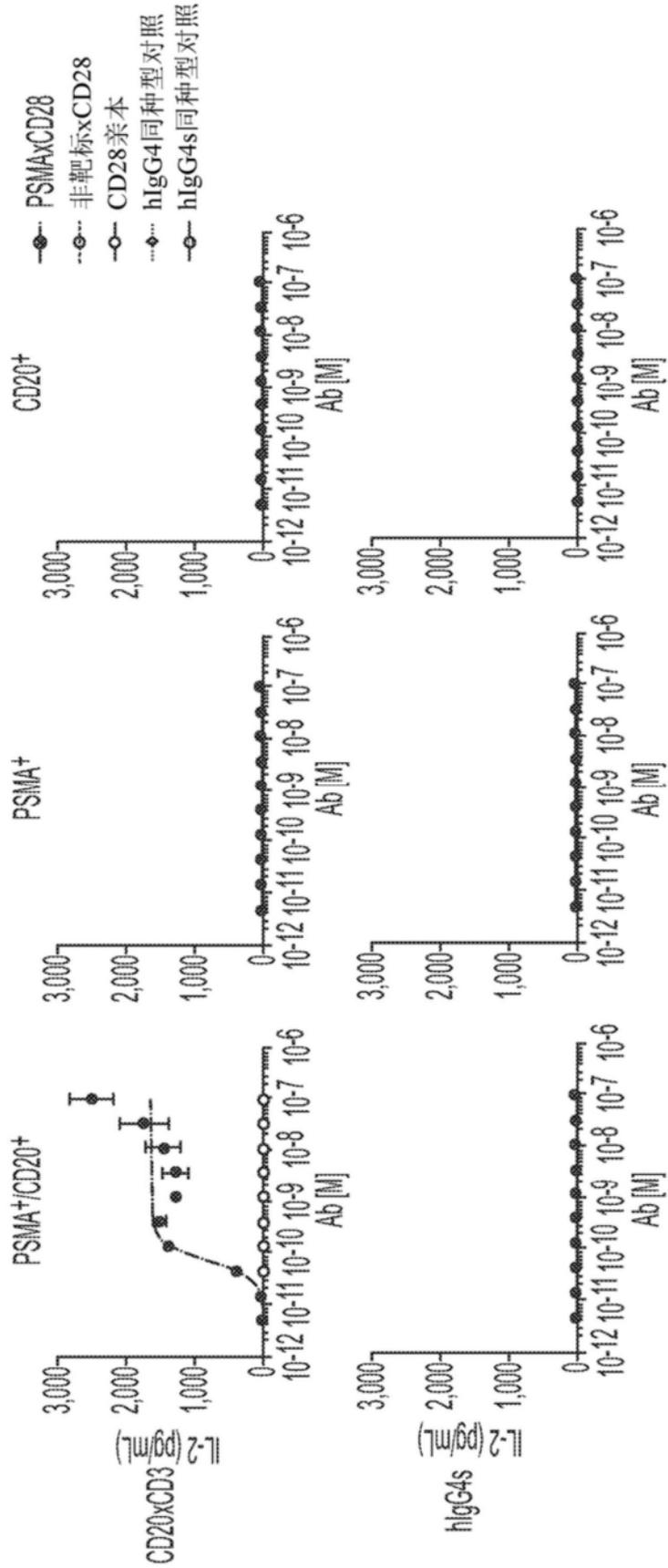


图5F



图5G

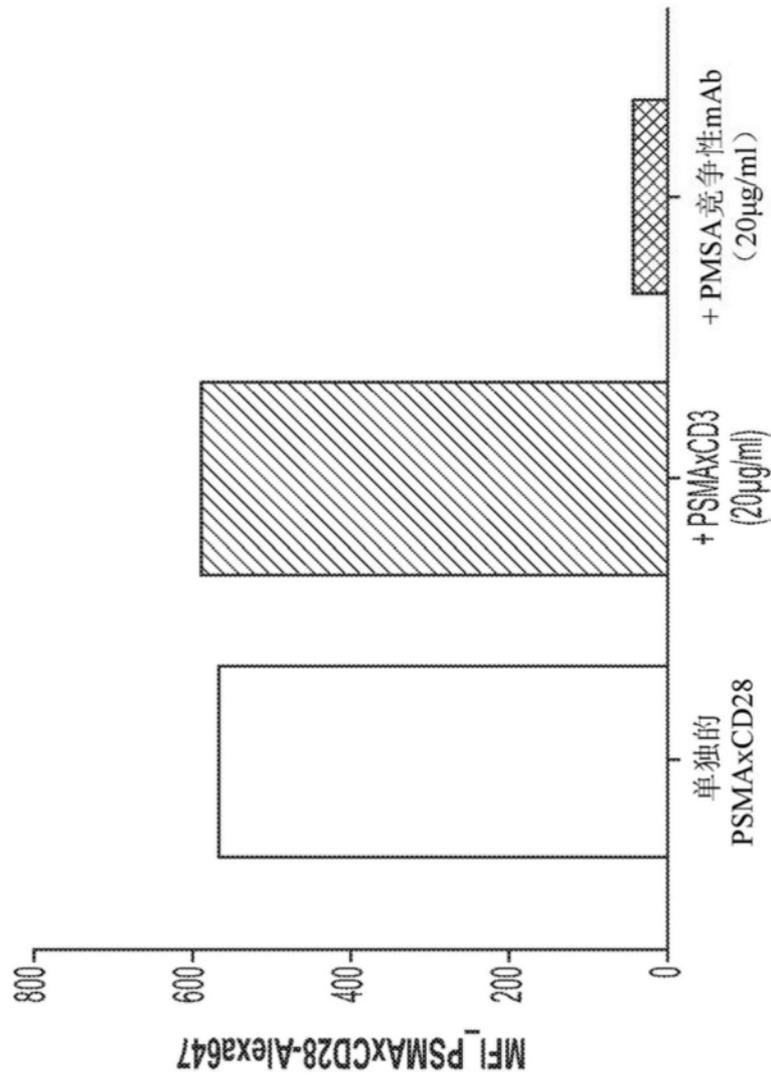
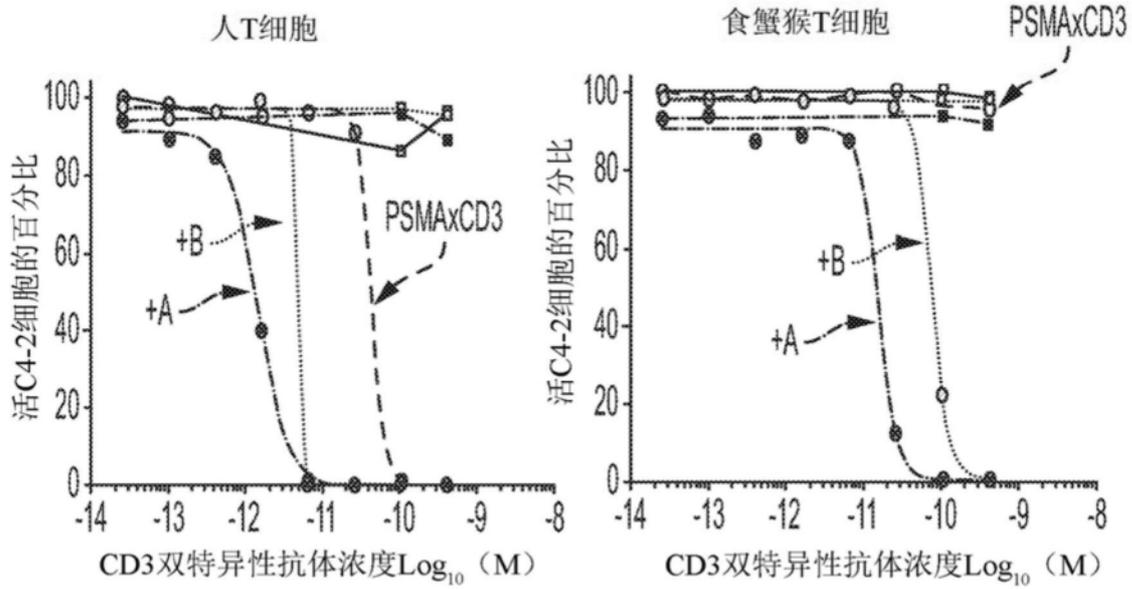


图5H

在存在前列腺癌以及人或食蟹猴T细胞的情况下，PSMAxCD28  
双特异性抗体增强bs13644D (PSMAxCD3) 的细胞毒性效力

———— C4-2前列腺癌 ————



	EC50
bs13644D+ bs16429D (A) (2.5ug/ml)	1.45e-012
bs13644D+ bs16431D (B) (2.5ug/ml)	~4.88e-012
bs13644D	4.347e-011

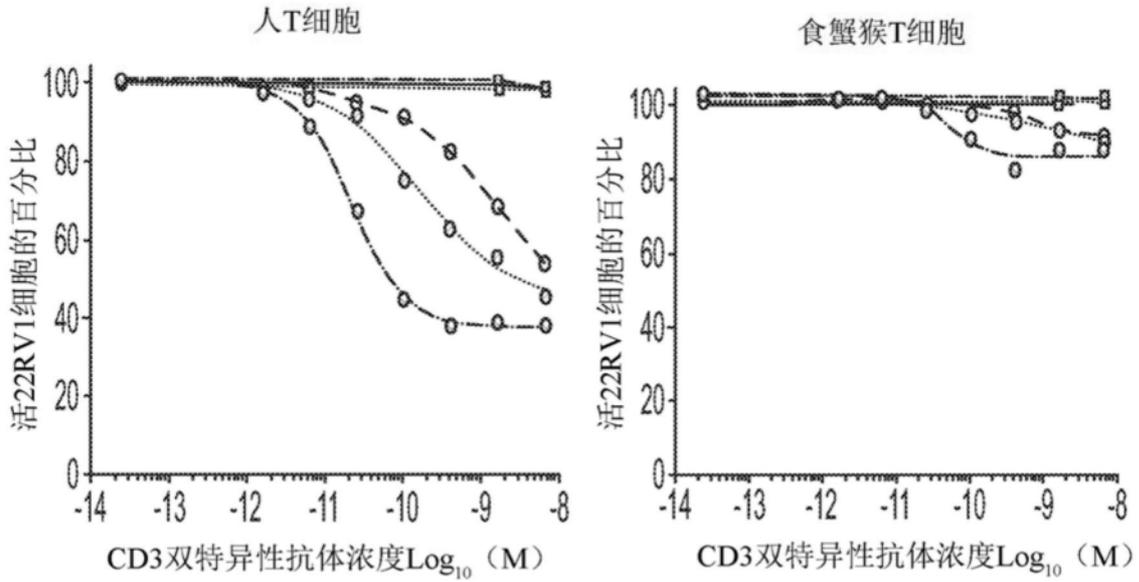
	EC50
bs13644D+ bs16429D (A) (2.5ug/ml)	1.554e-011
bs13644D+ bs16431D (B) (2.5ug/ml)	7.723e-011

- bs13644D+ bs16429D (A) (2.5ug/ml)
- bs17664D+ bs16429D (A) (2.5ug/ml)
- bs17664D+ bs16431D (B) (2.5ug/ml)
- bs17664D + bs16431D (B) (2.5ug/ml)
- bs13644D
- bs17664D

图6A

在存在前列腺癌以及人或食蟹猴T细胞的情况下，PSMAxCD28  
双特异性抗体增强bs13644D（PSMAxCD3）的细胞毒性效力

————— 22RV1前列腺癌 —————



	EC50
bs13644D+ bs16429D (A) (2.5ug/ml)	2.287e-011
bs13644D+ bs16431D (B) (2.5ug/ml)	1.669e-010
bs13644D	2.516e-009

	EC50
bs13644D+ bs16429D (A) (2.5ug/ml)	5.516e-011
bs13644D+ bs16431D (B) (2.5ug/ml)	1.221e-009

- ⊗ bs13644D+ bs16429D (A) (2.5ug/ml)
- ⊠ bs17664D+ bs16429D (A) (2.5ug/ml)
- ⊙ bs17664D+ bs16431D (B) (2.5ug/ml)
- ⊡ bs17664D + bs16431D (B) (2.5ug/ml)
- ⊖ bs13644D
- ⊕ bs17664D

图6B

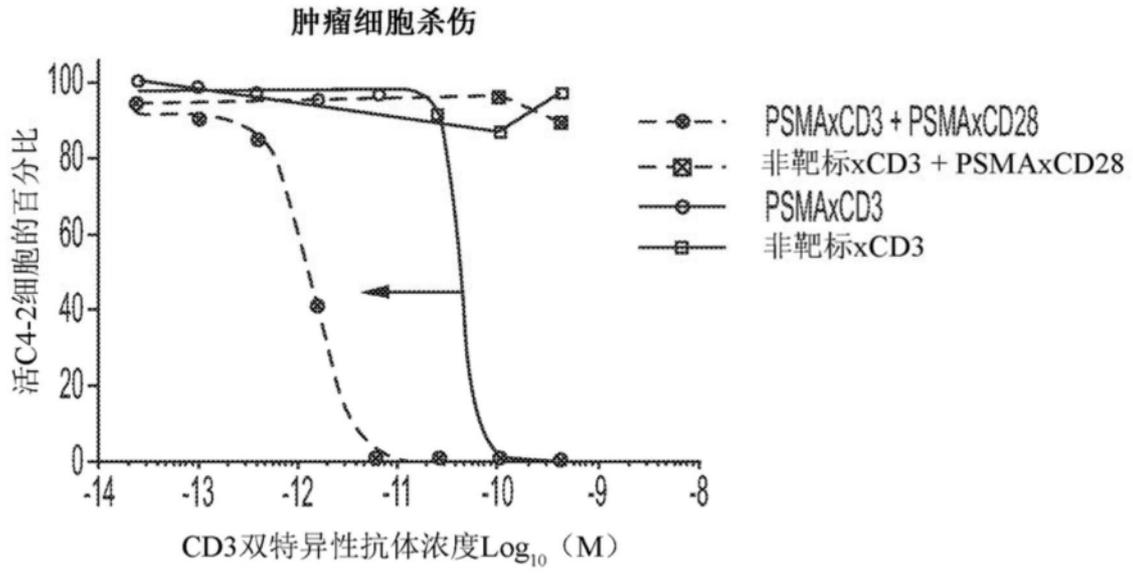


图7A

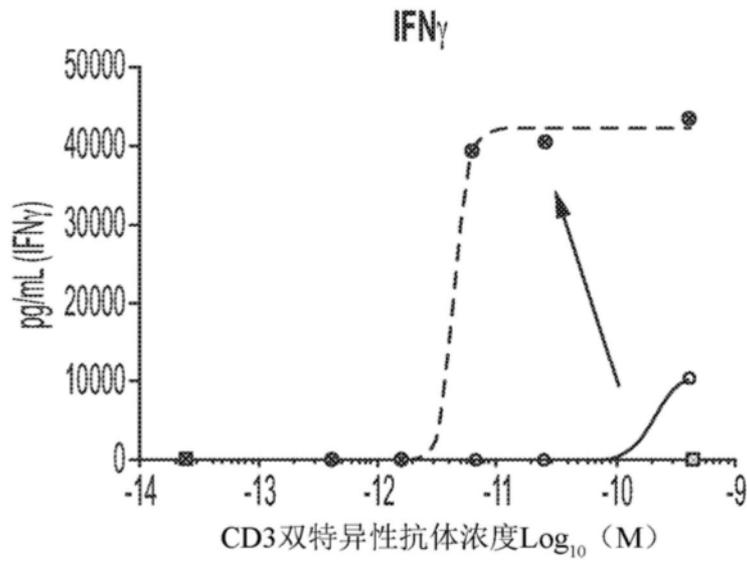


图7B

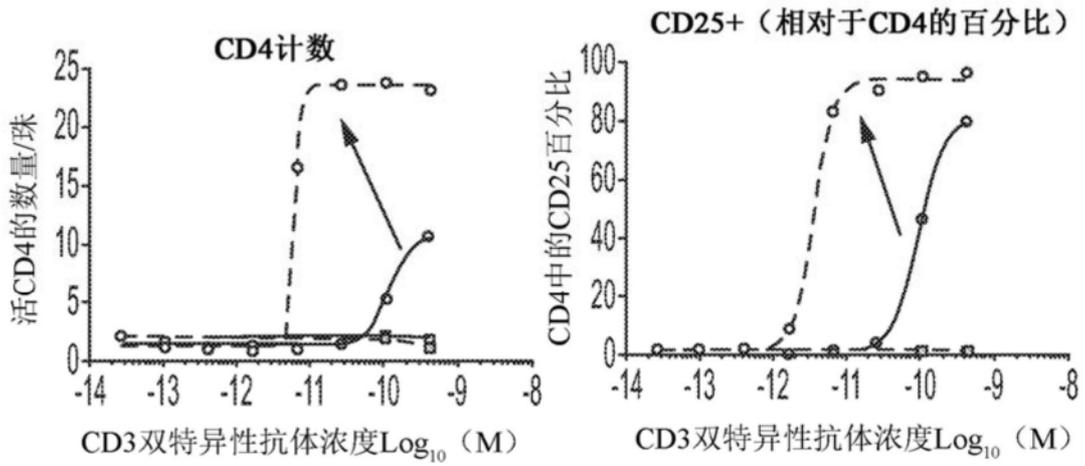


图7C

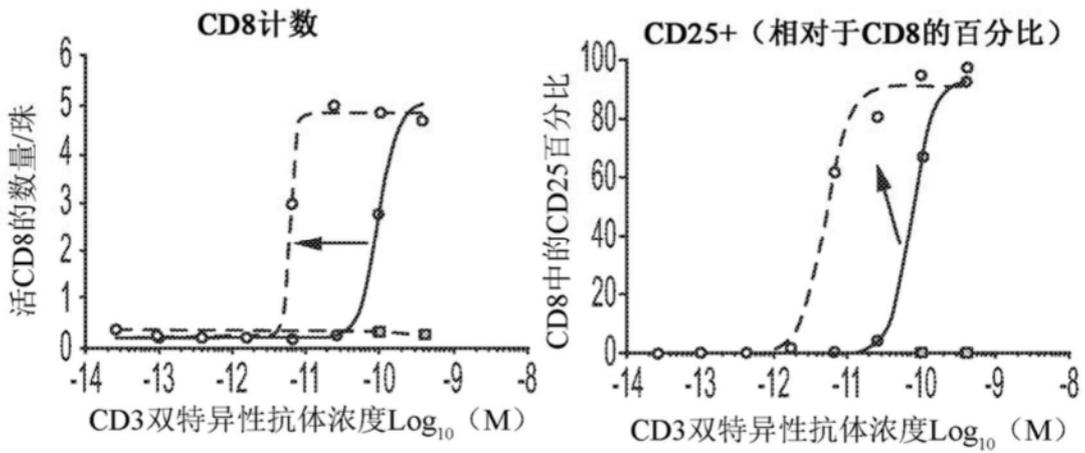


图7D

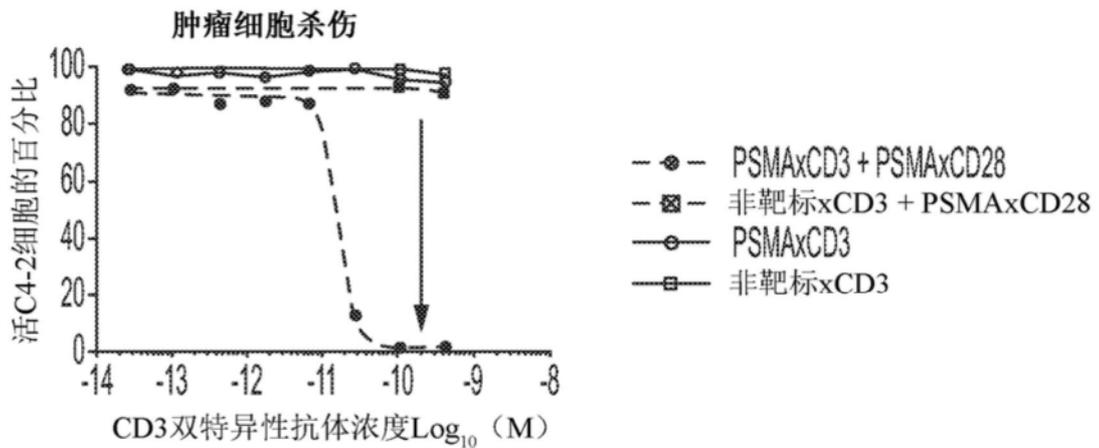


图7E

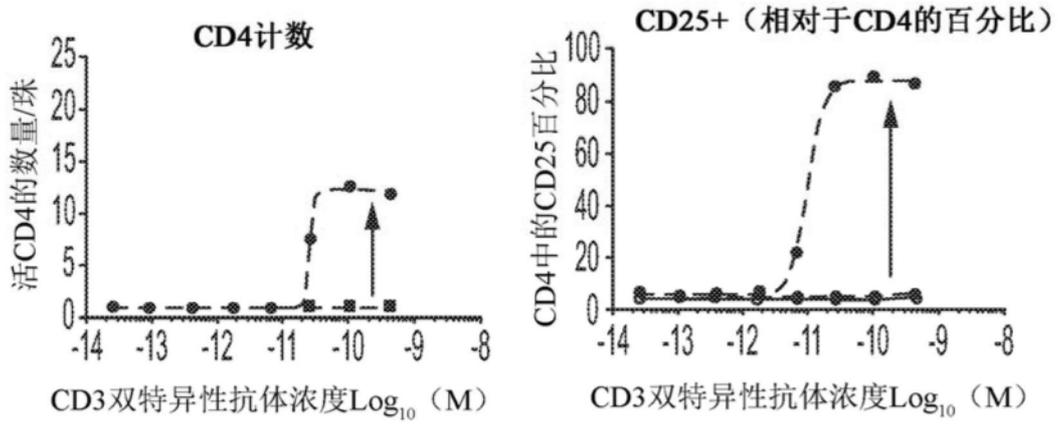


图7F

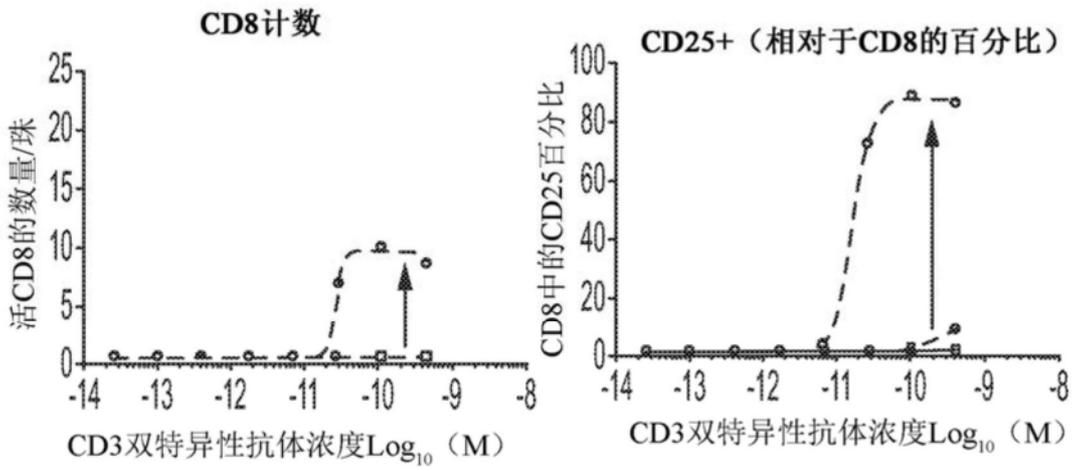


图7G

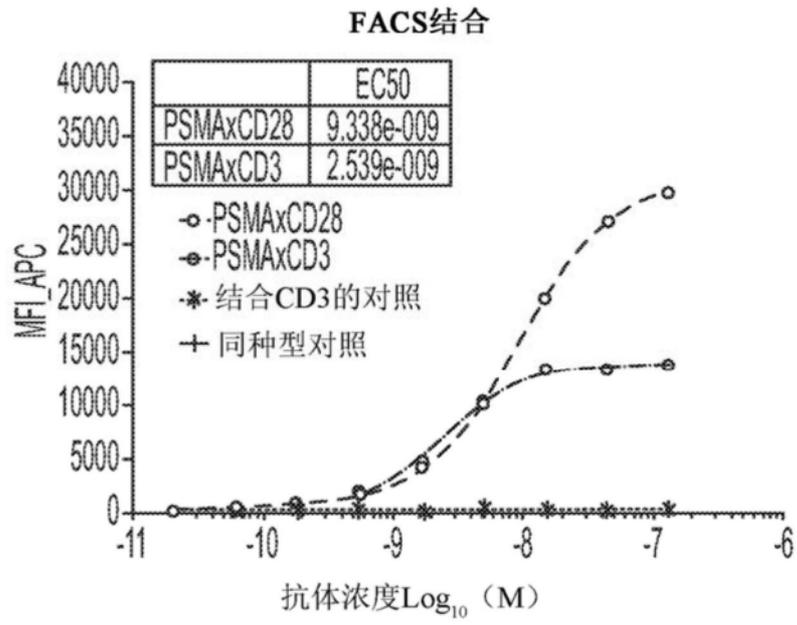
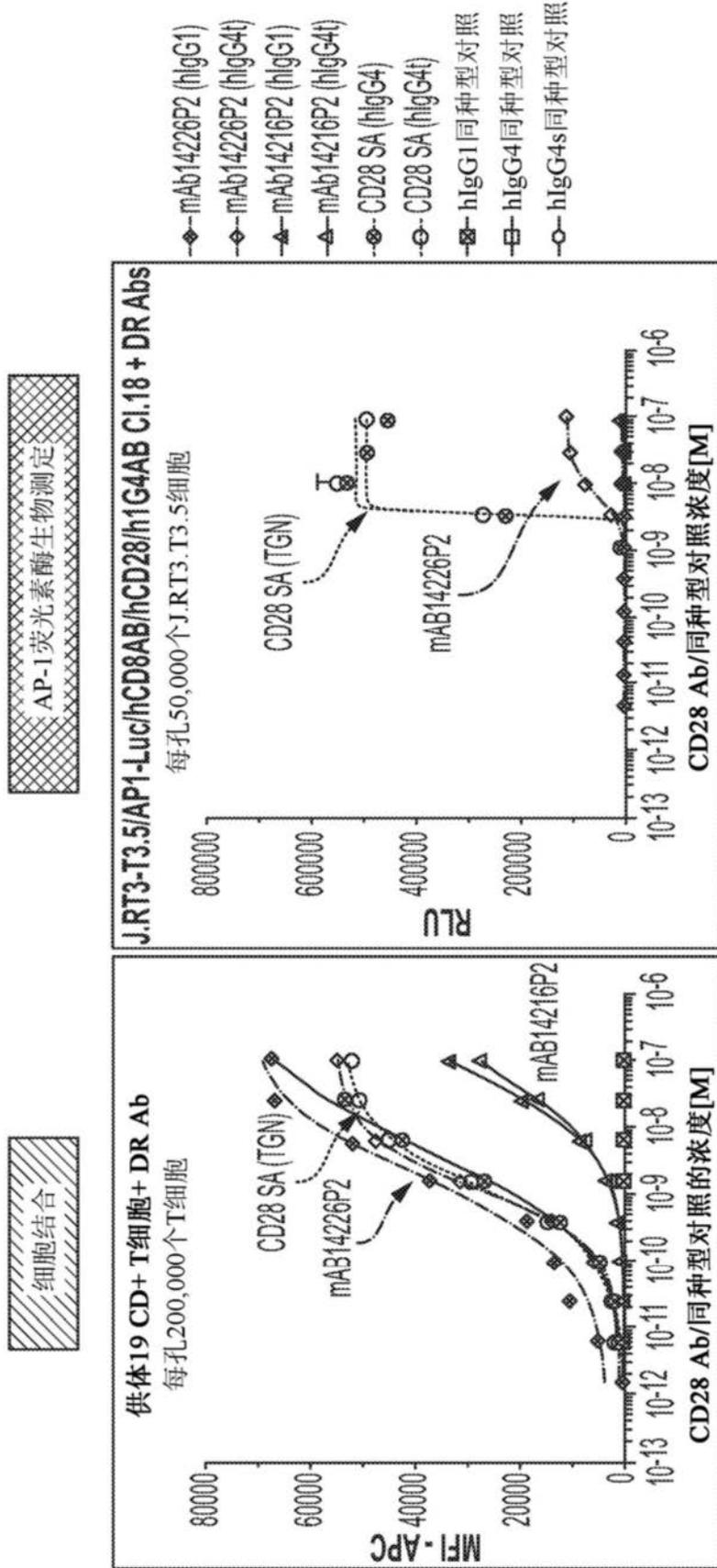


图7H

TGN超激动剂特性对比本发明的二价抗CD28



原代CD4+ T细胞上类似的细胞结合

图8

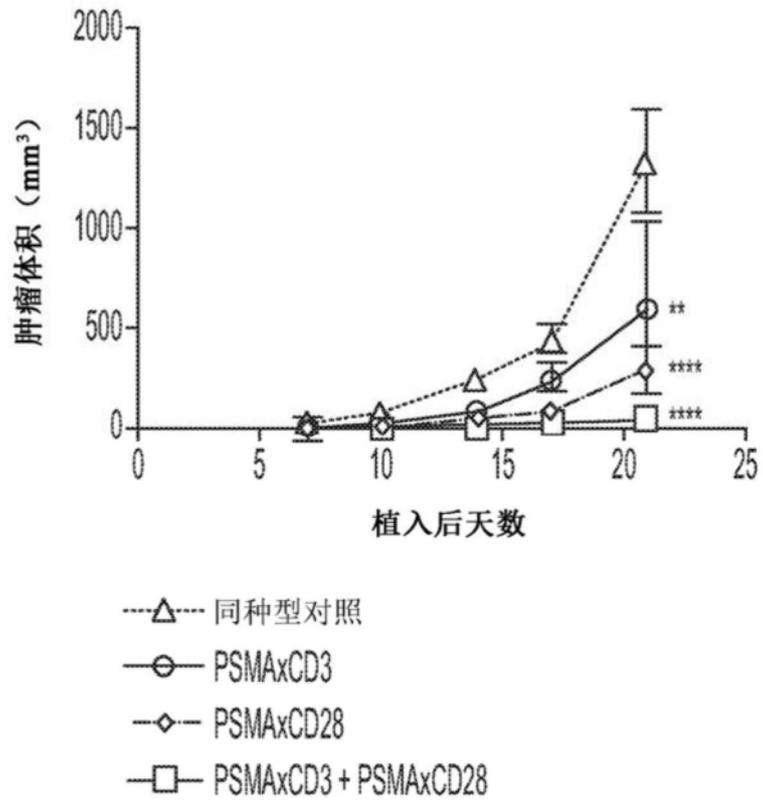


图9A

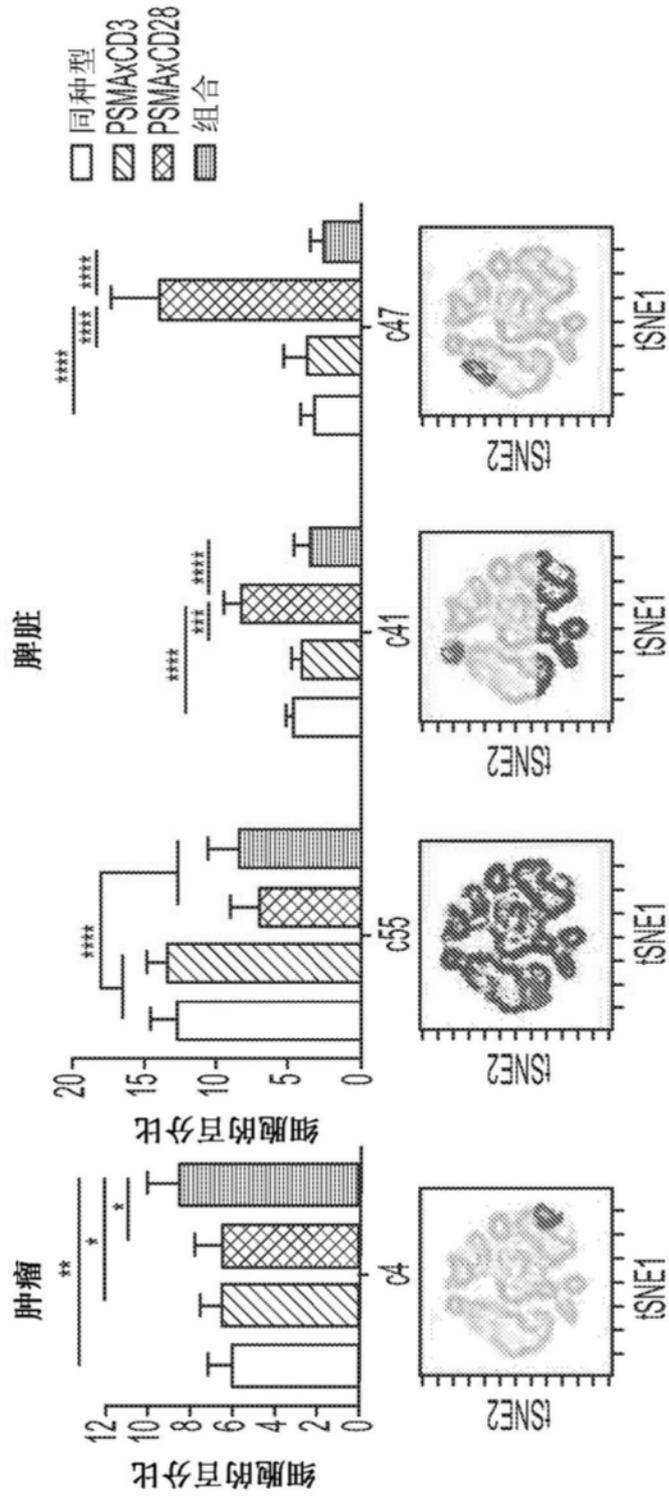


图9B

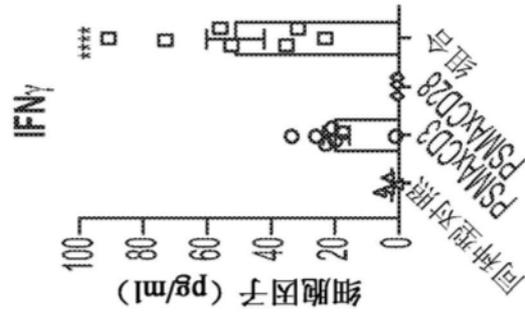


图9C

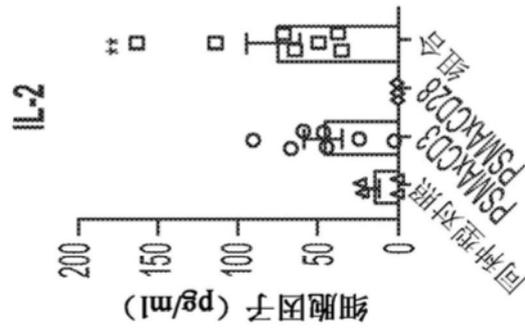


图9D

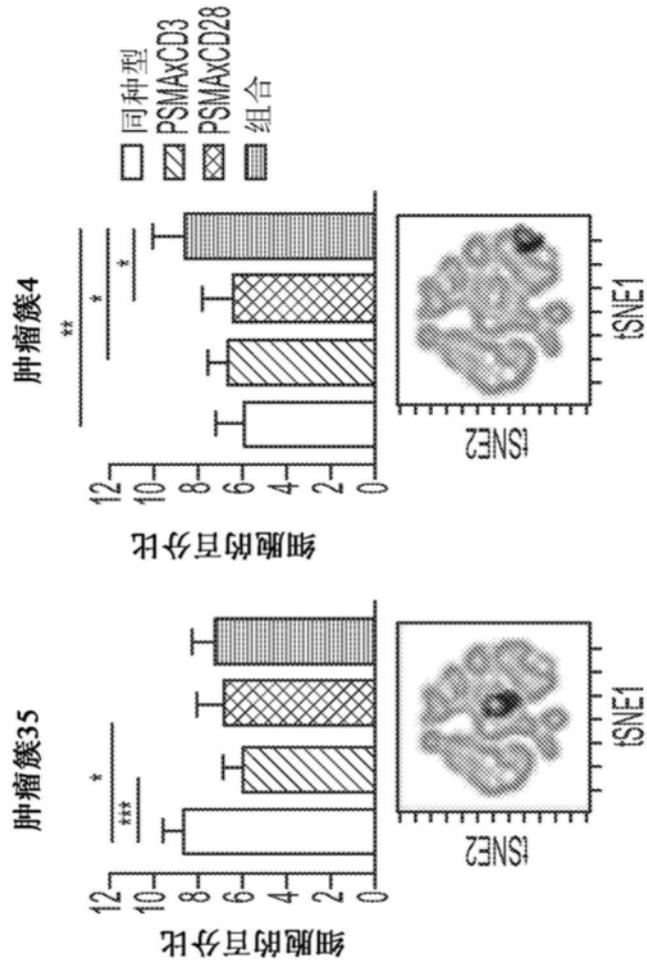


图9E

在CD3/CD28/PSMA人源化小鼠中，PSMA X CD28双特异性抗体或亲本CD28二价抗体不诱导血清细胞因子的产生

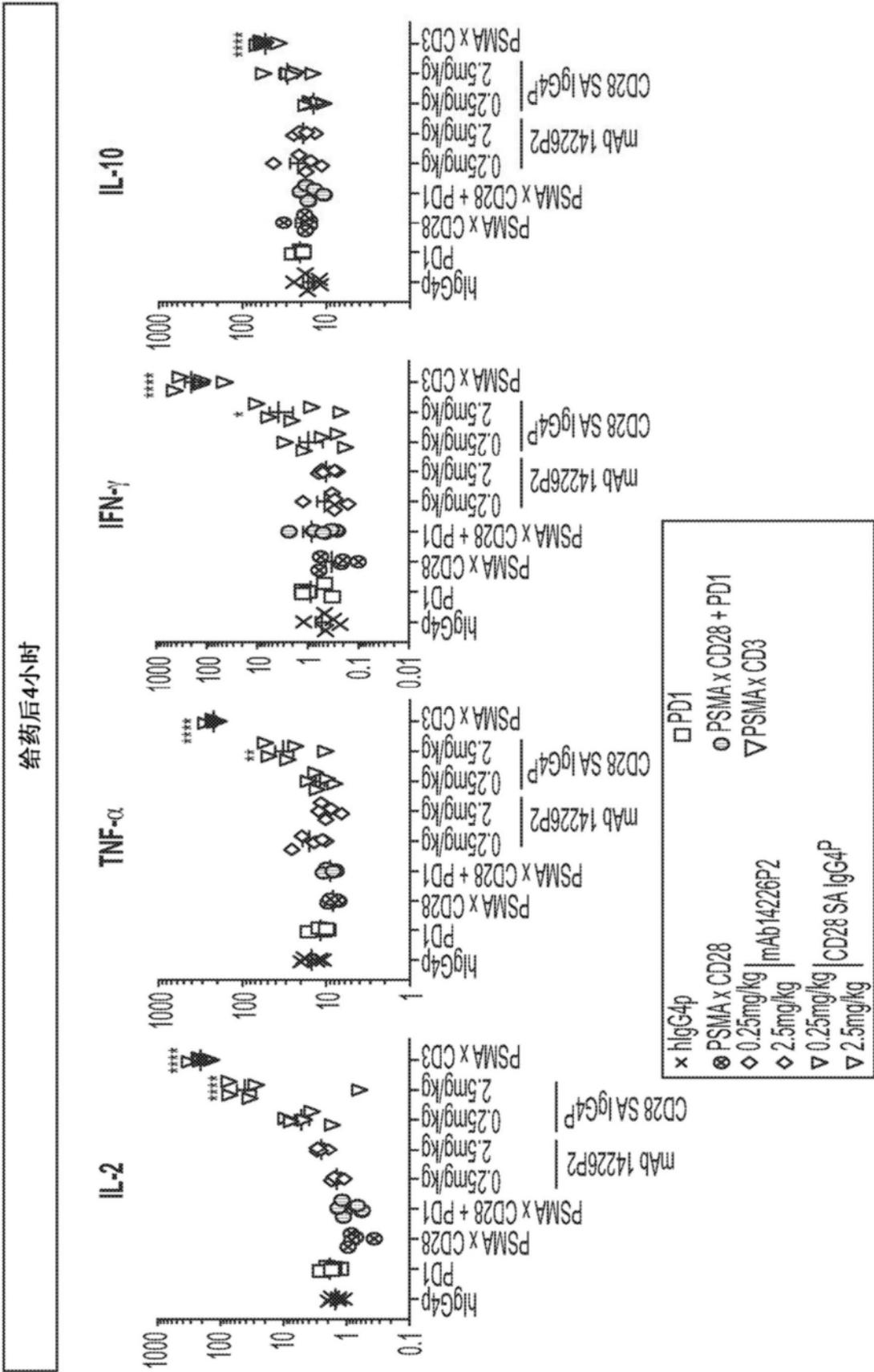


图10

在移植了PBMC的NSG小鼠中，CD28超激动剂治疗在4小时处驱动细胞因子应答，而mAb 14226P2 (CD28亲本‘A’) 不驱动细胞因子应答

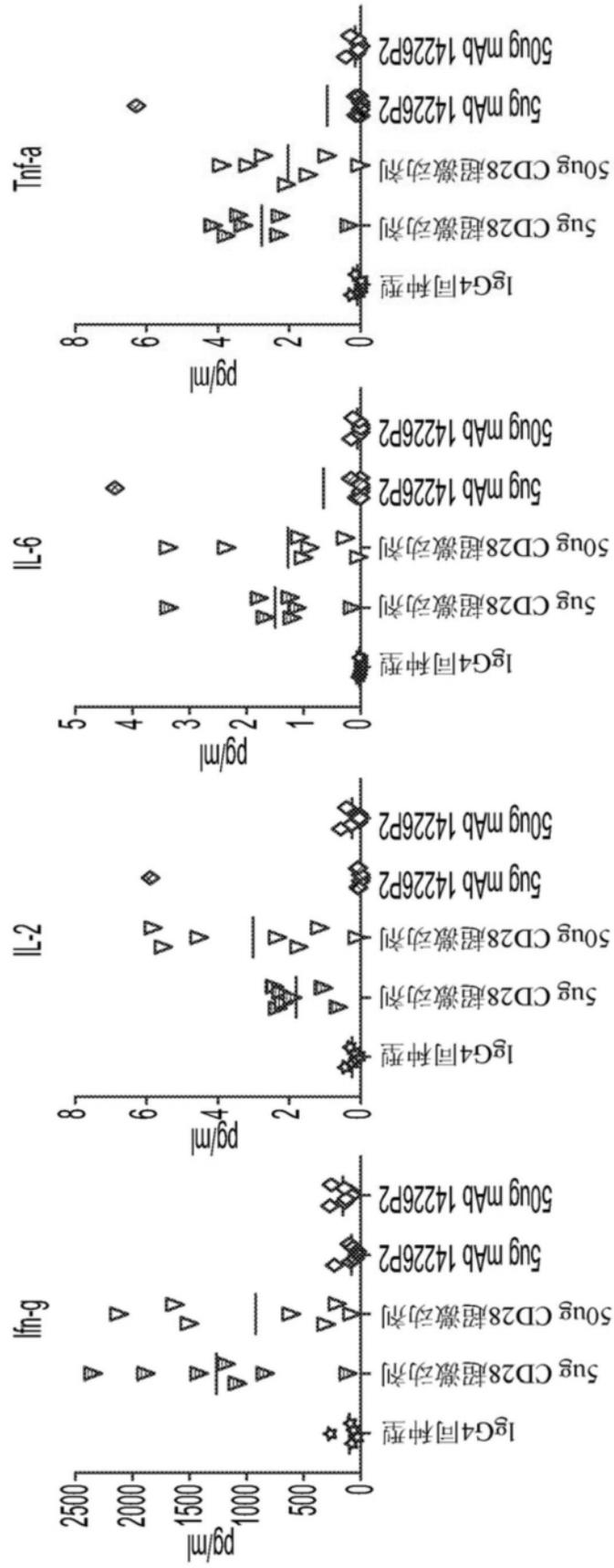


图11

共刺激性双特异性抗体的潜在更安全的毒性特征

在人源化小鼠中，CD3 x PSMA引起  
IFN $\gamma$ 升高，而CD28xPSMA不引起IFN $\gamma$ 升高

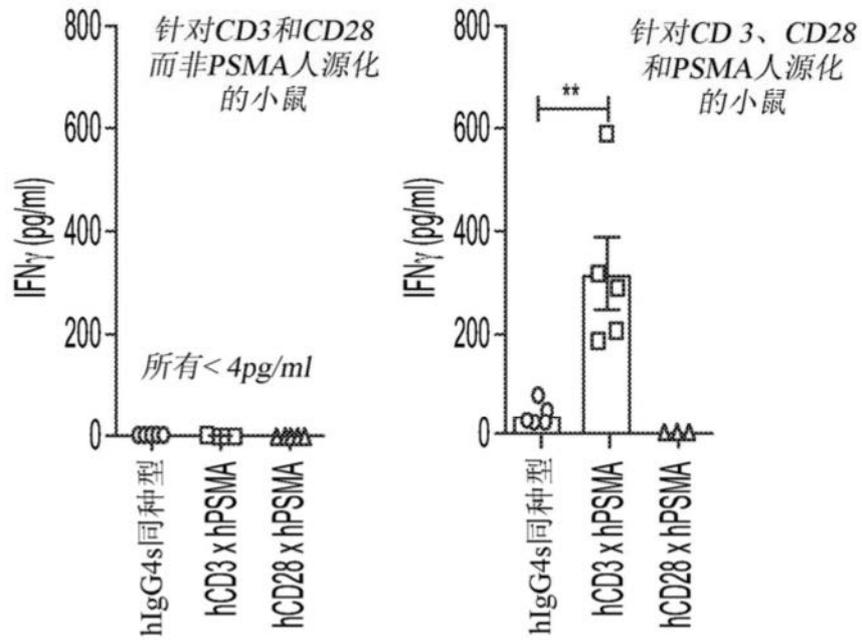


图12

NHP研究：与PSMA X CD3和CD28超激动剂相比，PSMA X CD28未显示细胞因子产生或T细胞边缘化

在施用PSMAxCD3和CD28超激动剂时观察到T细胞边缘化，但在施用bs16429D时未观察到

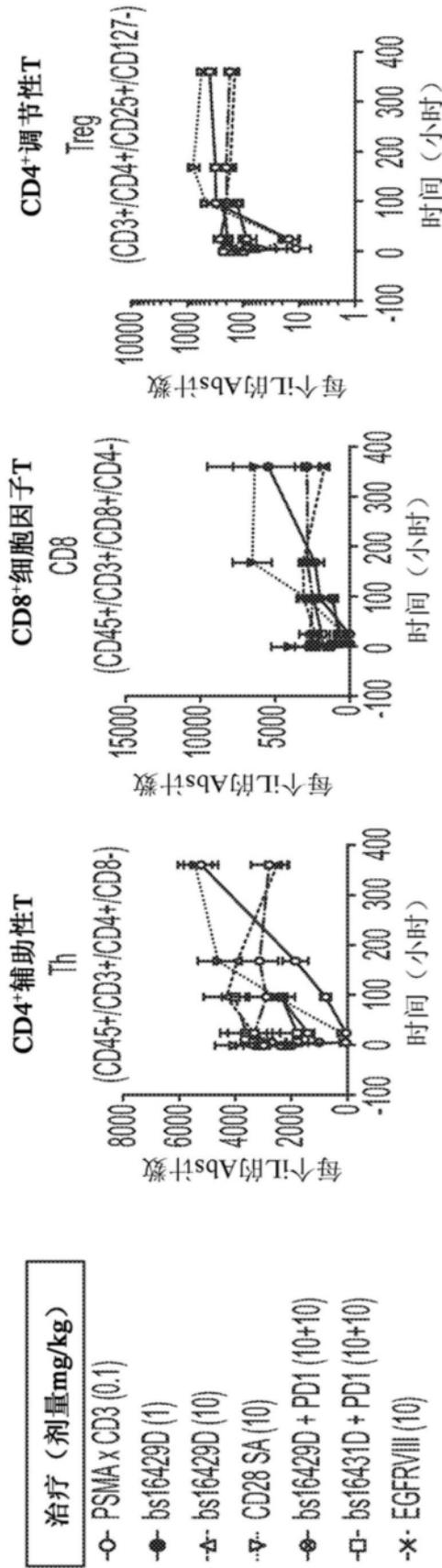


图13A

施用PSMAxCD3和CD28超激动剂后5小时的细胞因子诱导，但PSMAxCD28不诱导细胞因子

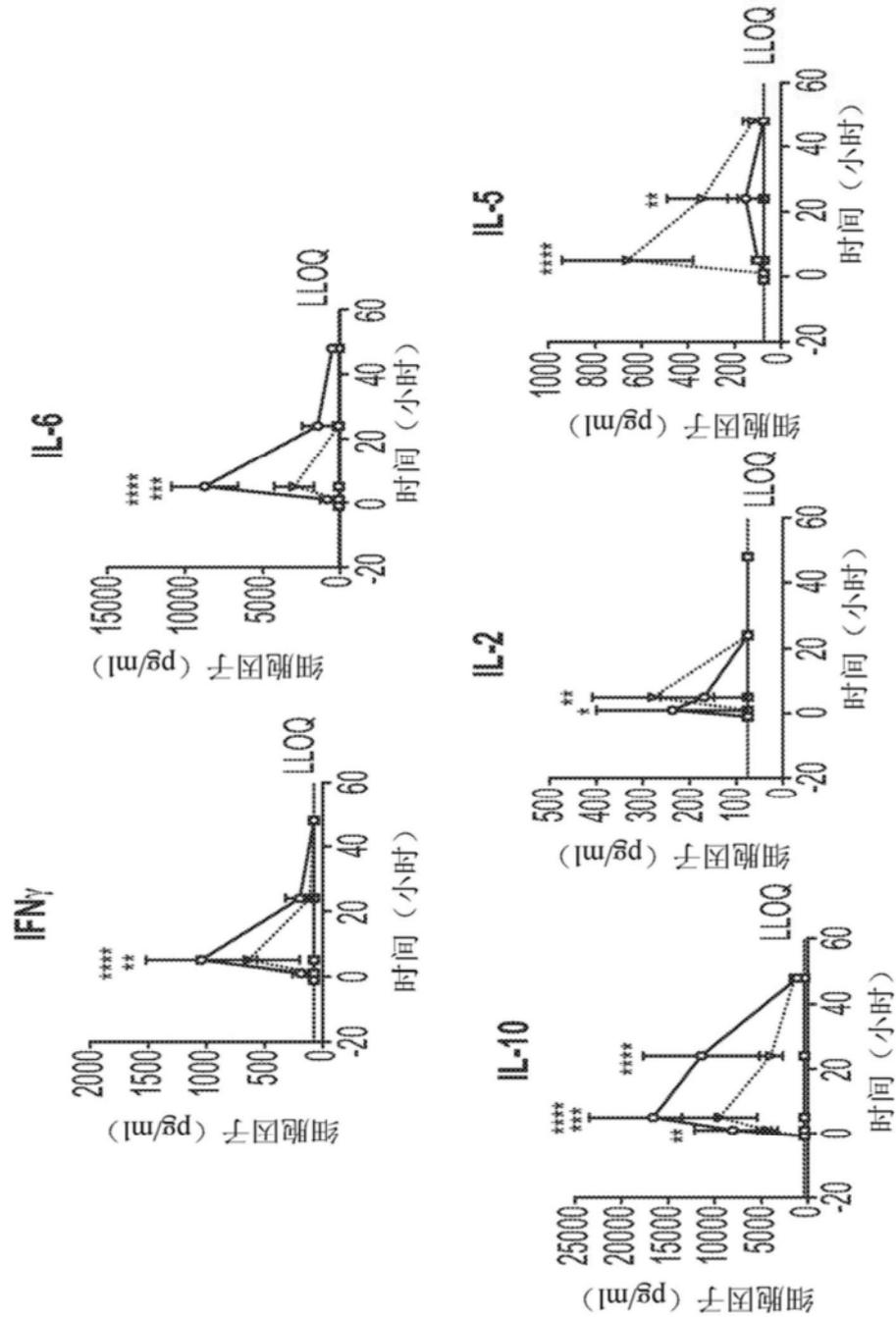


图13B

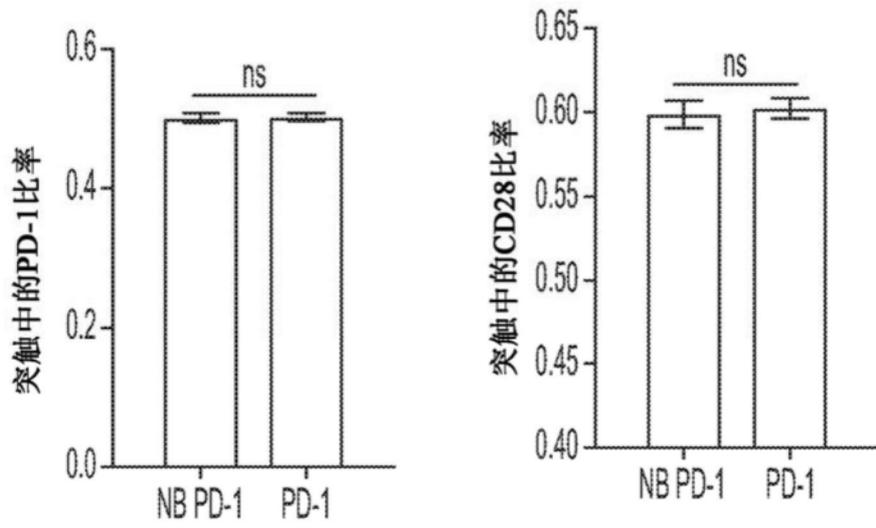


图14

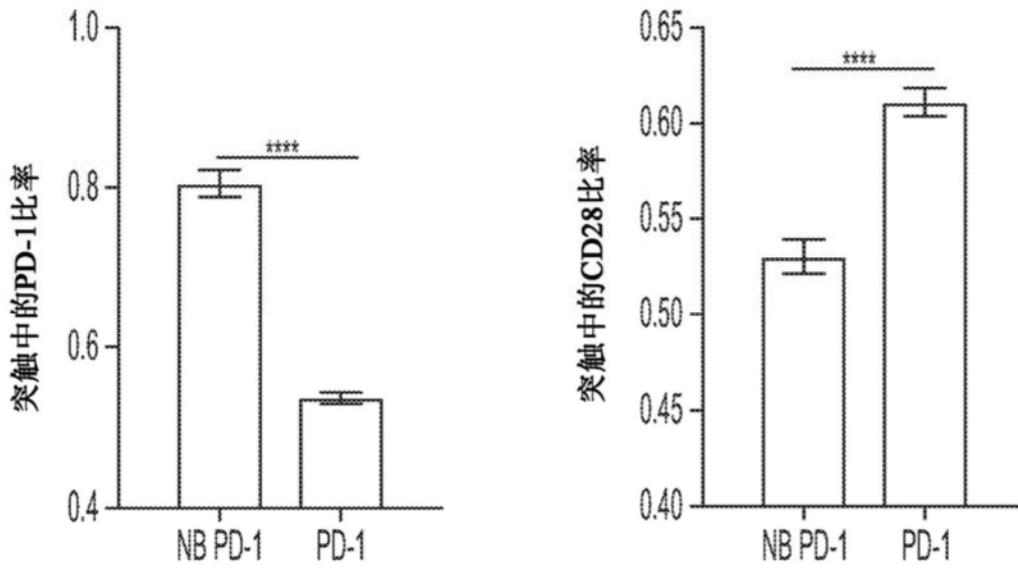


图15

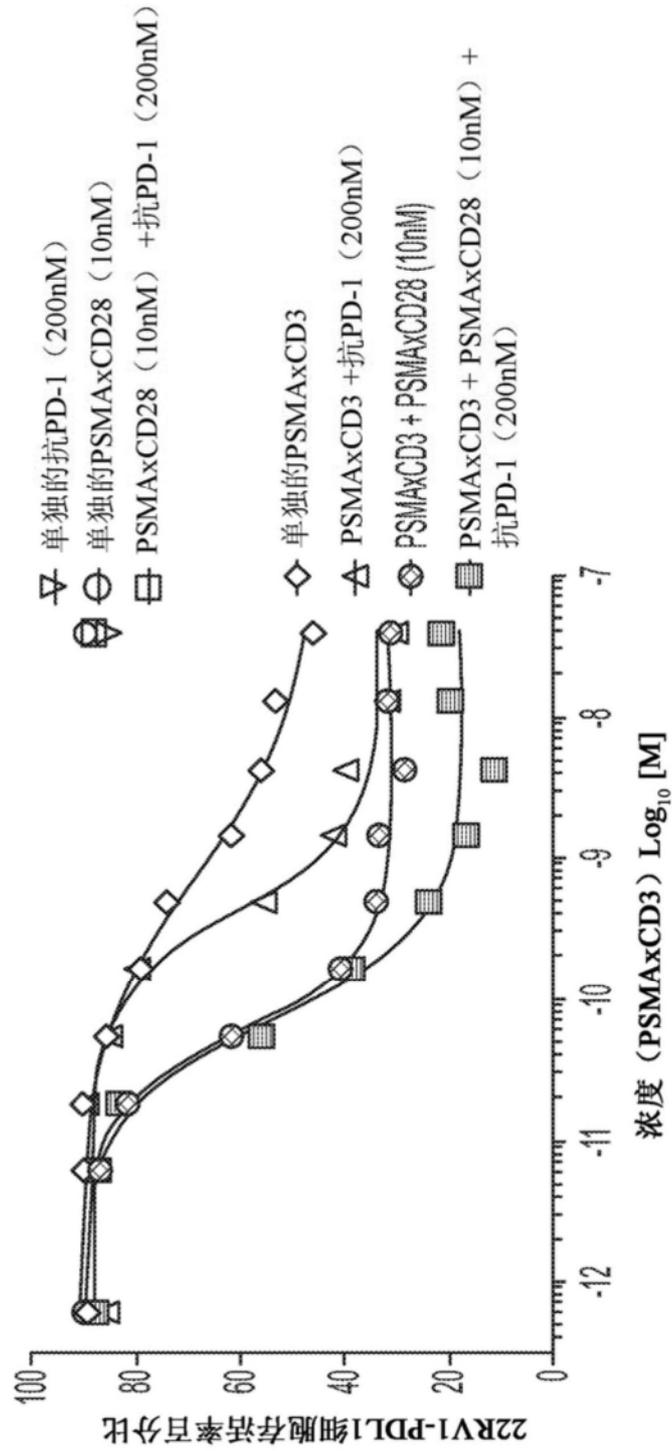


图16

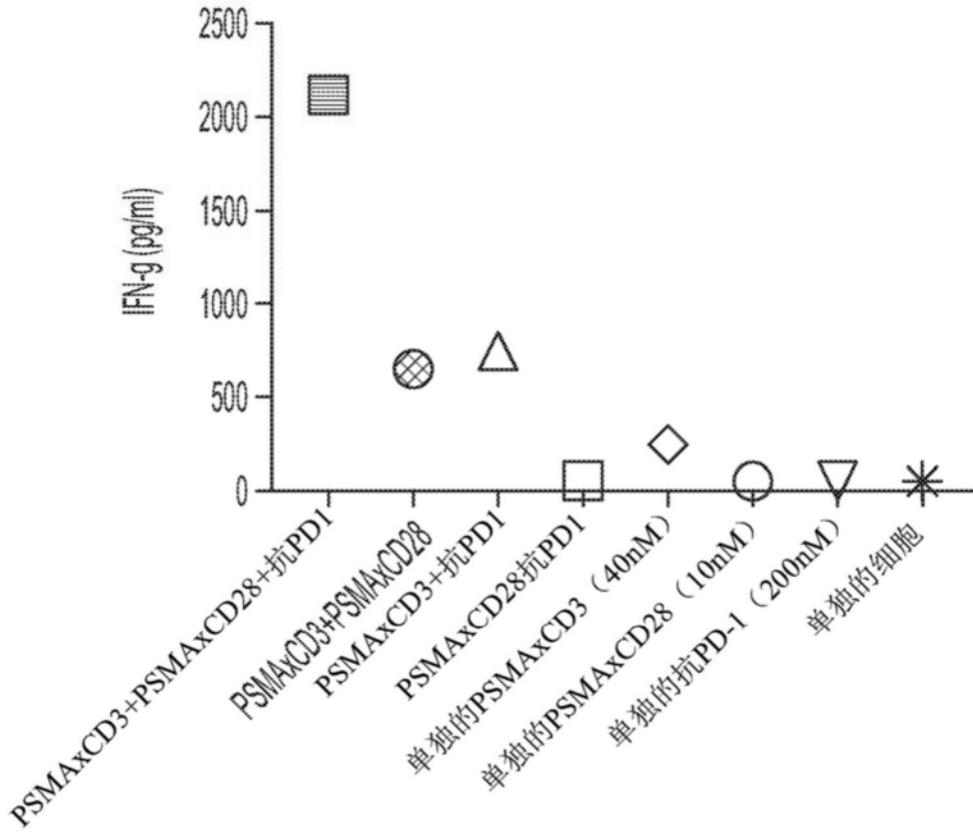


图17

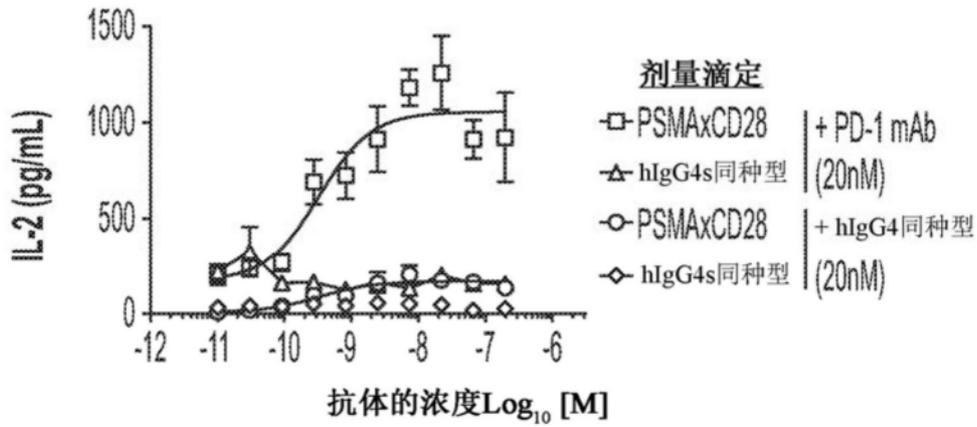


图18

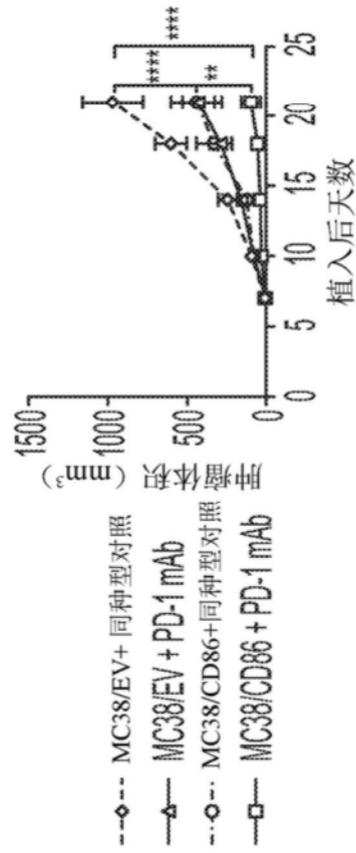


图19A

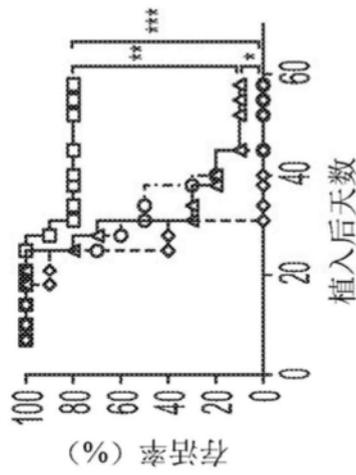


图19B

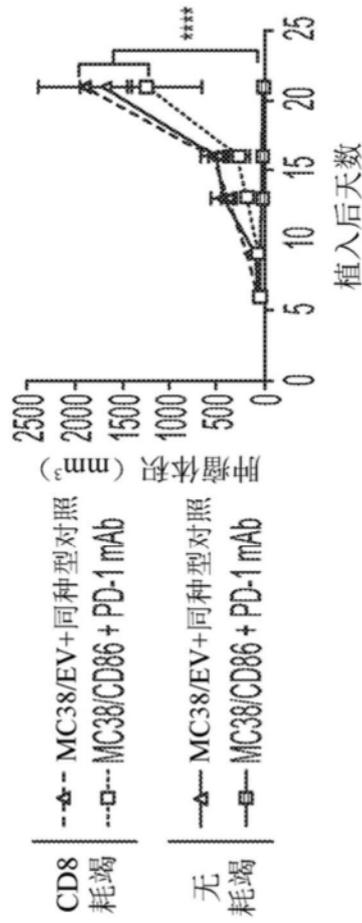


图19C

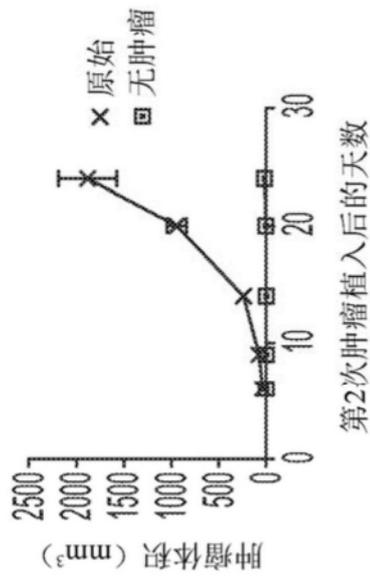


图19D

- 同种型
- △ PD1
- CD28 x PSMA
- ◇ CD28 x PSMA + PD1

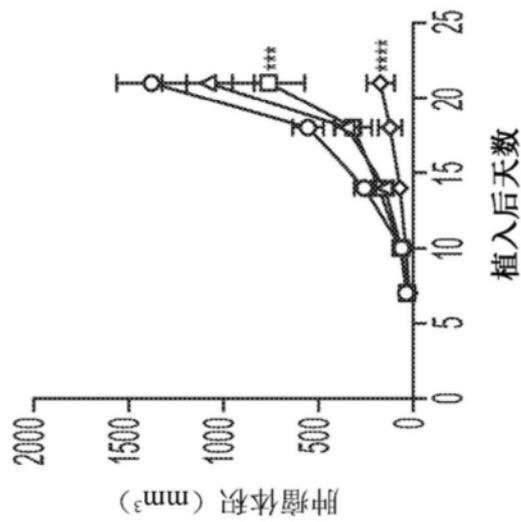


图20A

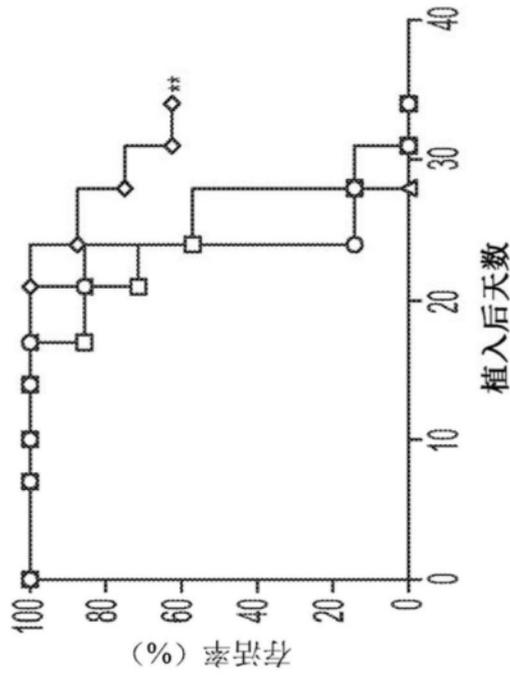


图20B

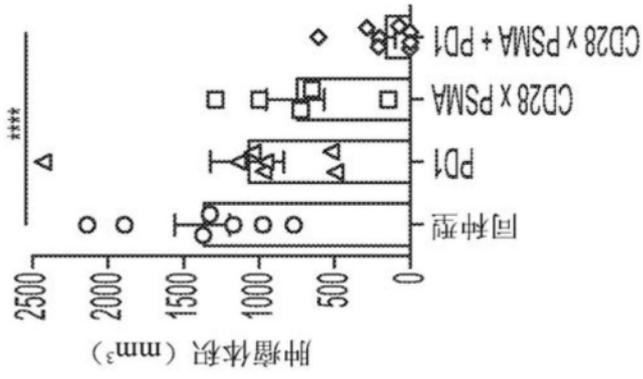


图20C

第21天的肿瘤体积 (mm<sup>3</sup>)

Ms #	同种型	PD1	CD28 x PSMA	CD28 x PSMA + PD1
Ms 1	1372.0	1044.0	147.9	4.0
Ms 2	1328.1	972.0	998.3	208.3
Ms 3	771.8	500.0	1289.1	0.0
Ms 4	976.6	2432.0	650.0	288.0
Ms 5	2137.5	1140.8		609.2
Ms 6	1892.3	958.8		0.0
Ms 7	1171.9	526.5	726.0	211.3
Ms 8				75.0

图20D

无肿瘤的百分比

实验#	同种型	PD1	CD28 x PSMA	CD28 x PSMA + PD1
1	0	0	0	38
2A	0	17	0	57
2B	0	33	0	50
3	0	0	33	82
4	0			29
5	0	0	0	13
6	0	0	0	13

图20E

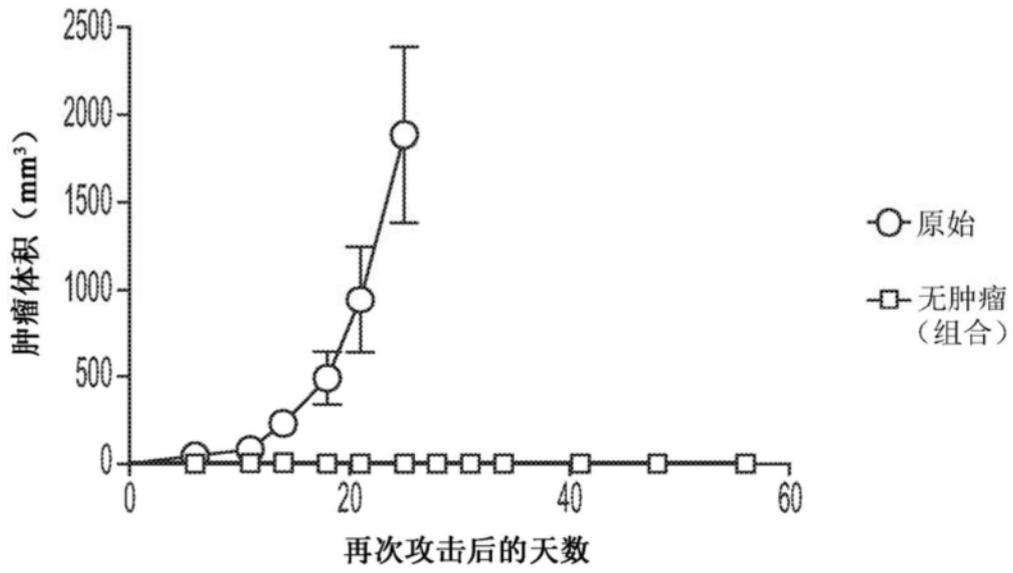


图21A

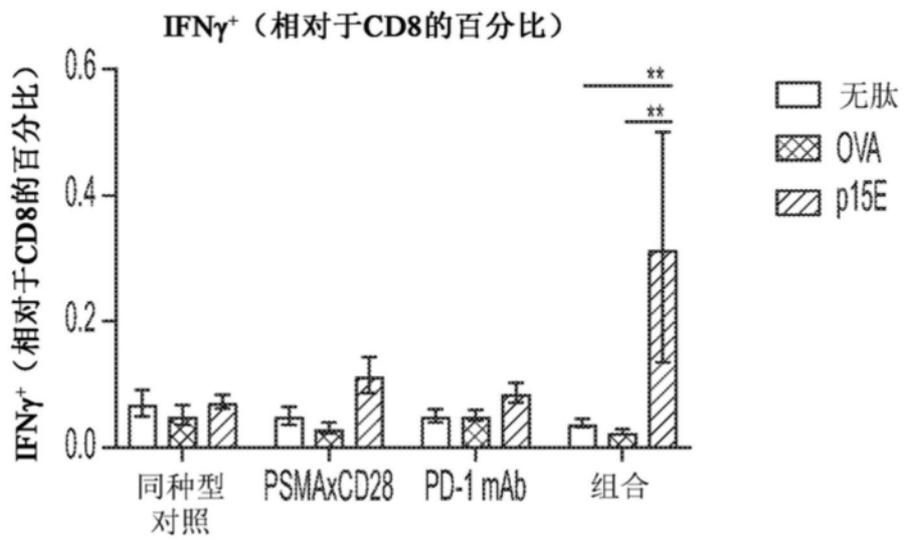


图21B

来自CD28 X PSMA + PD1治疗而非CD28 X PSMA + CD3 X PSMA治疗的无肿瘤小鼠排斥第2次肿瘤再次攻击

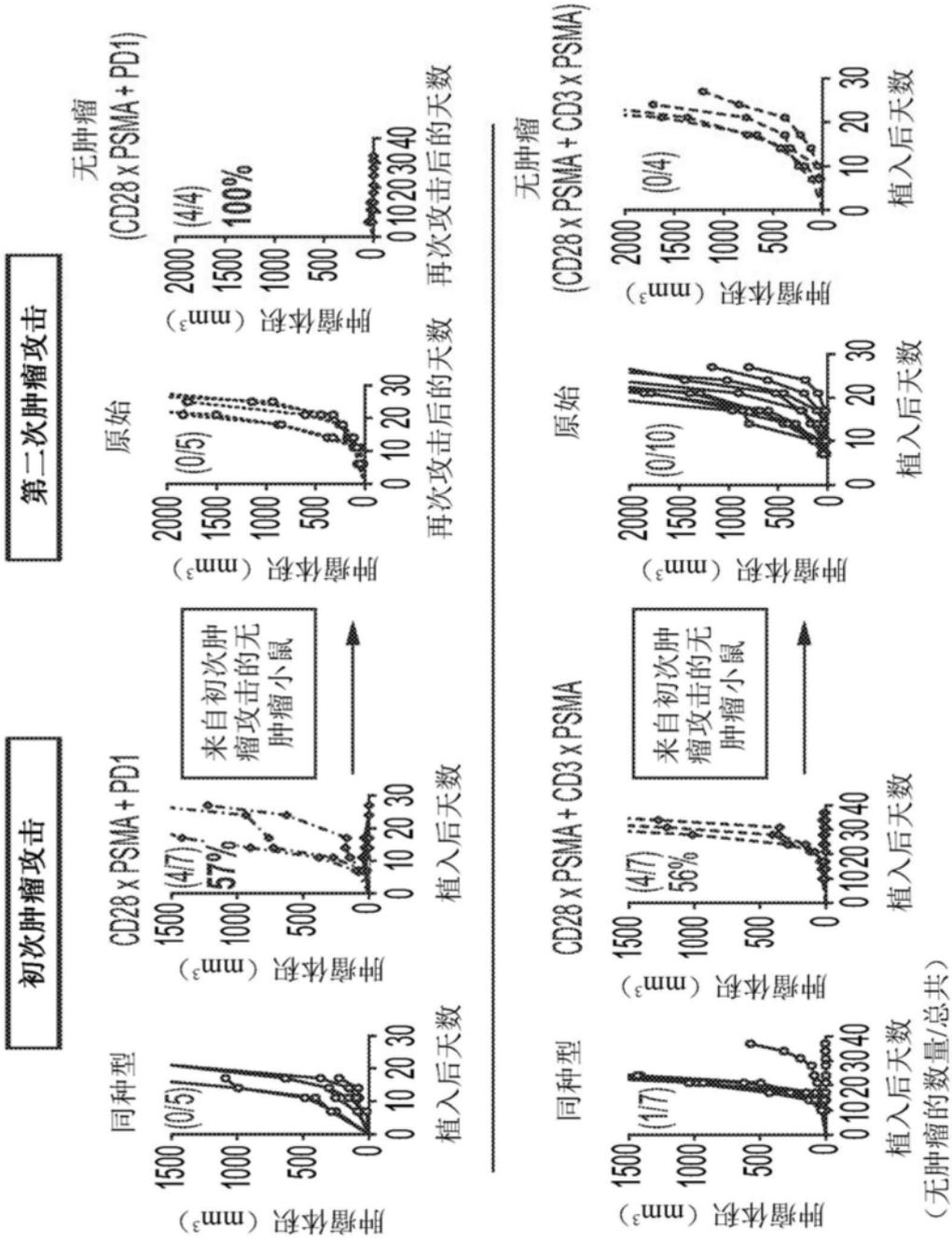


图21C

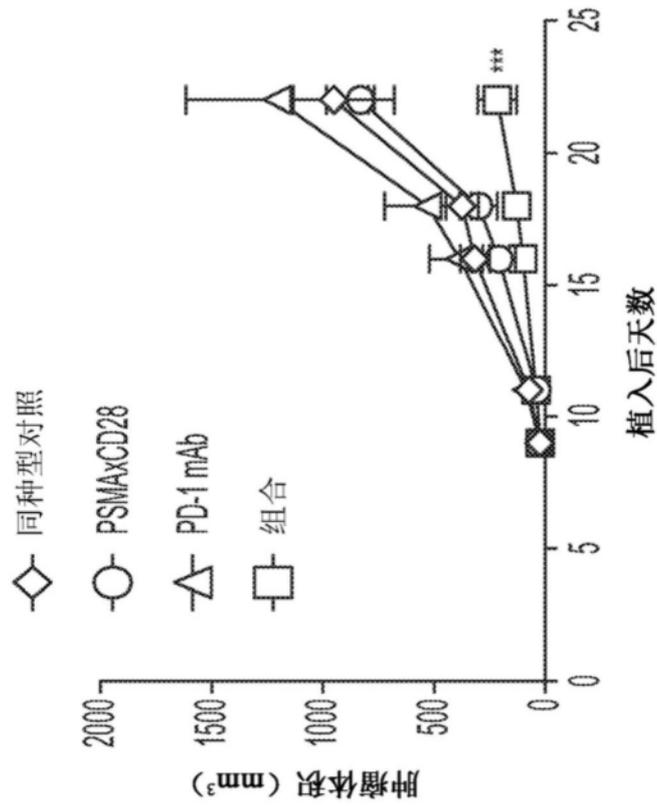


图22A

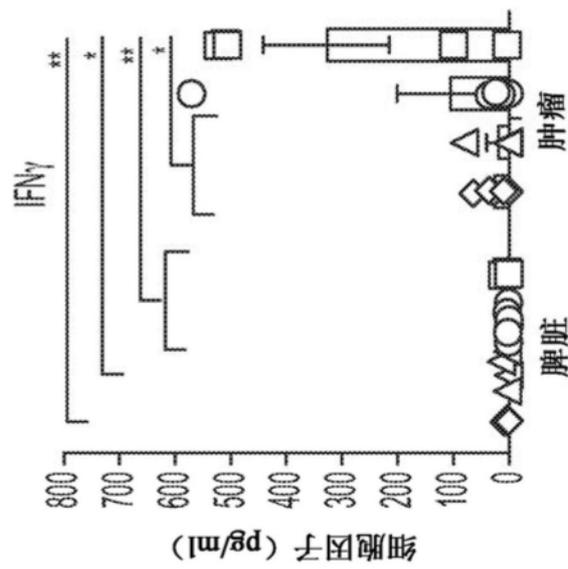


图22B

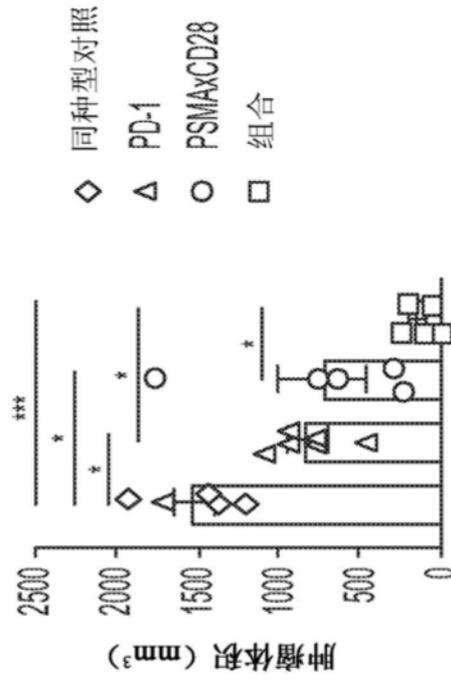


图22C

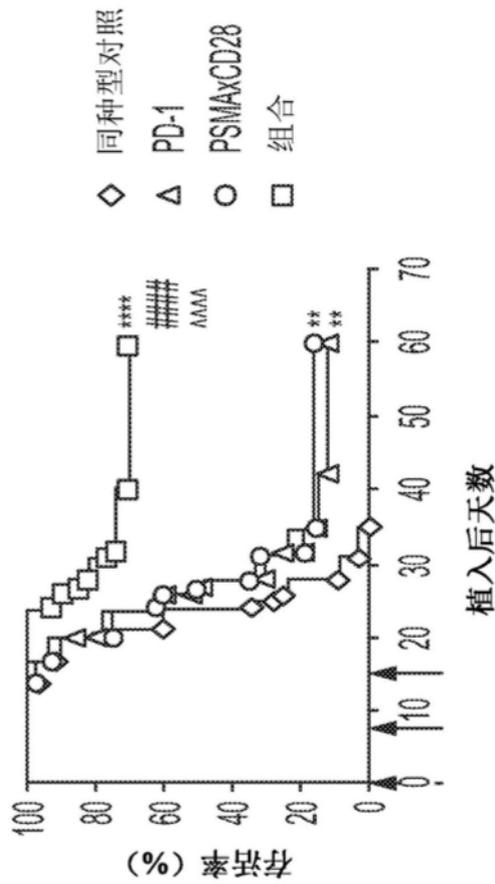


图22D

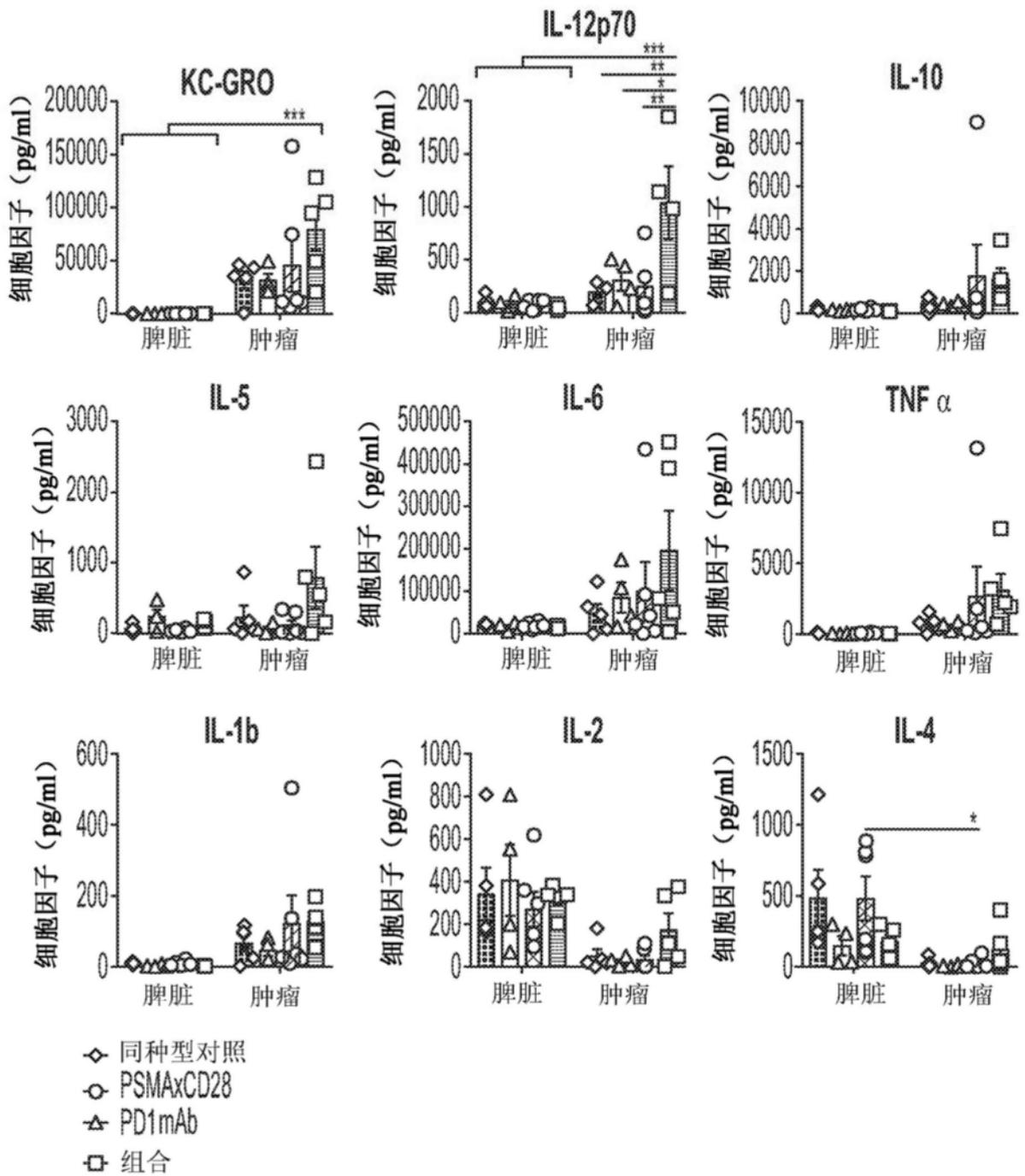


图23A

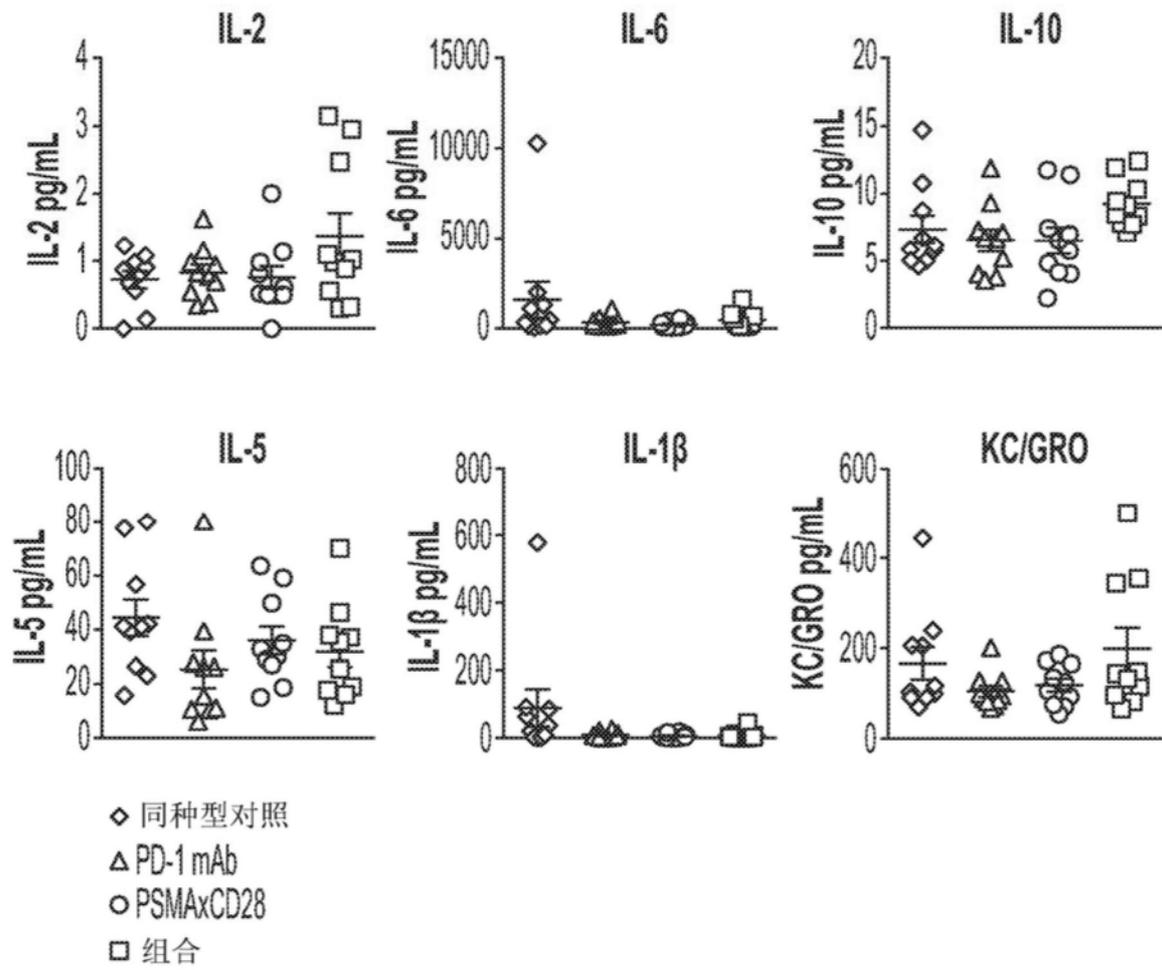


图23B

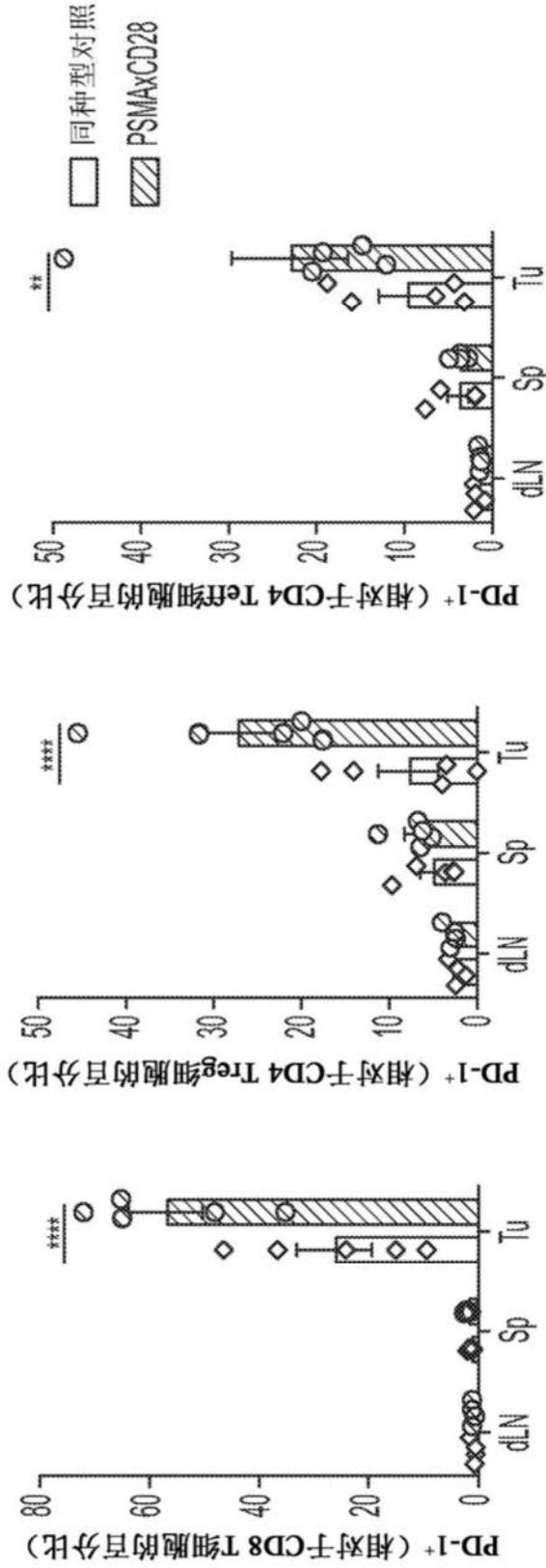


图24

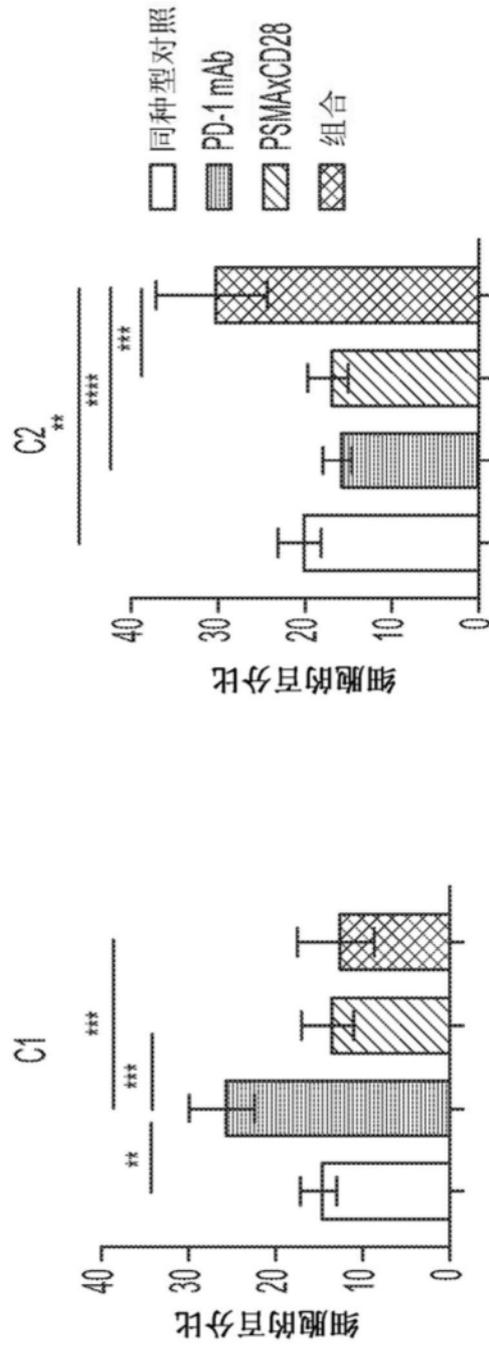


图25

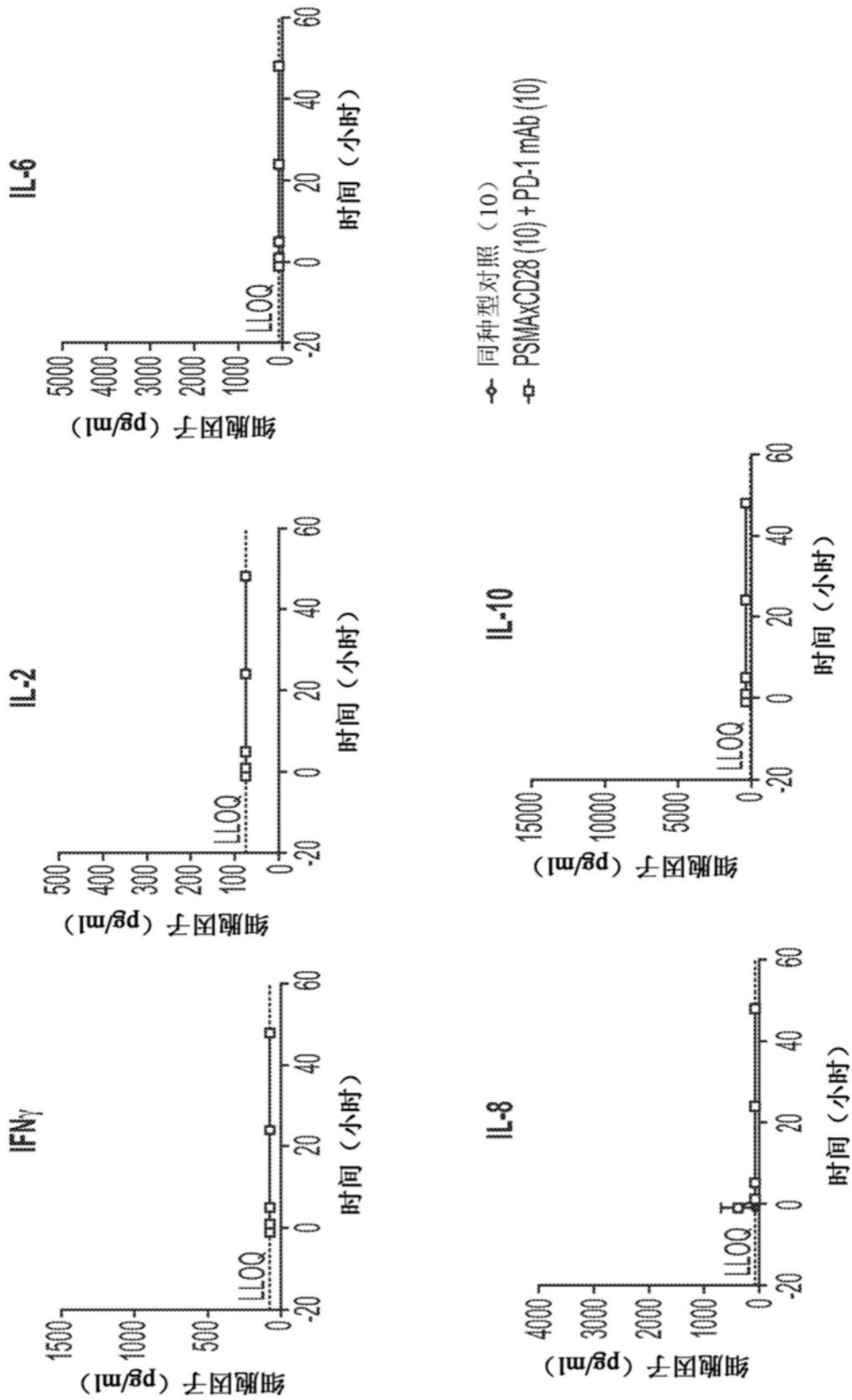


图26A

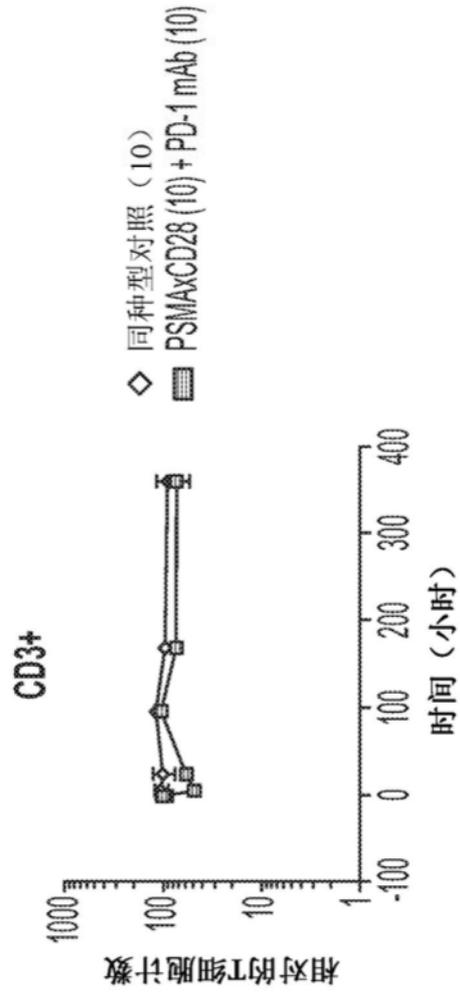


图26B

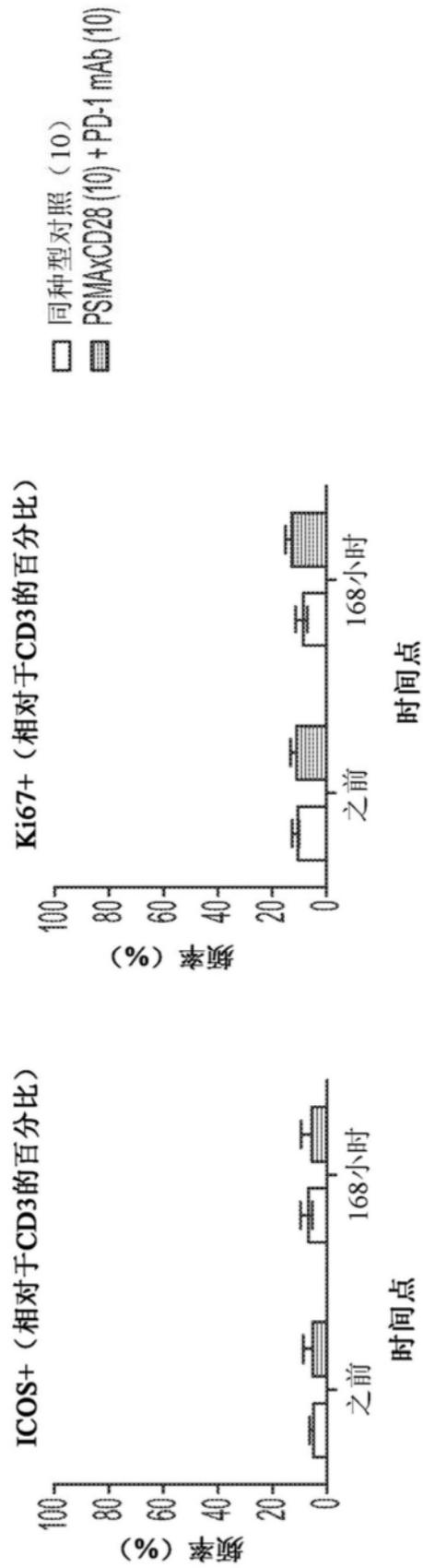


图26C

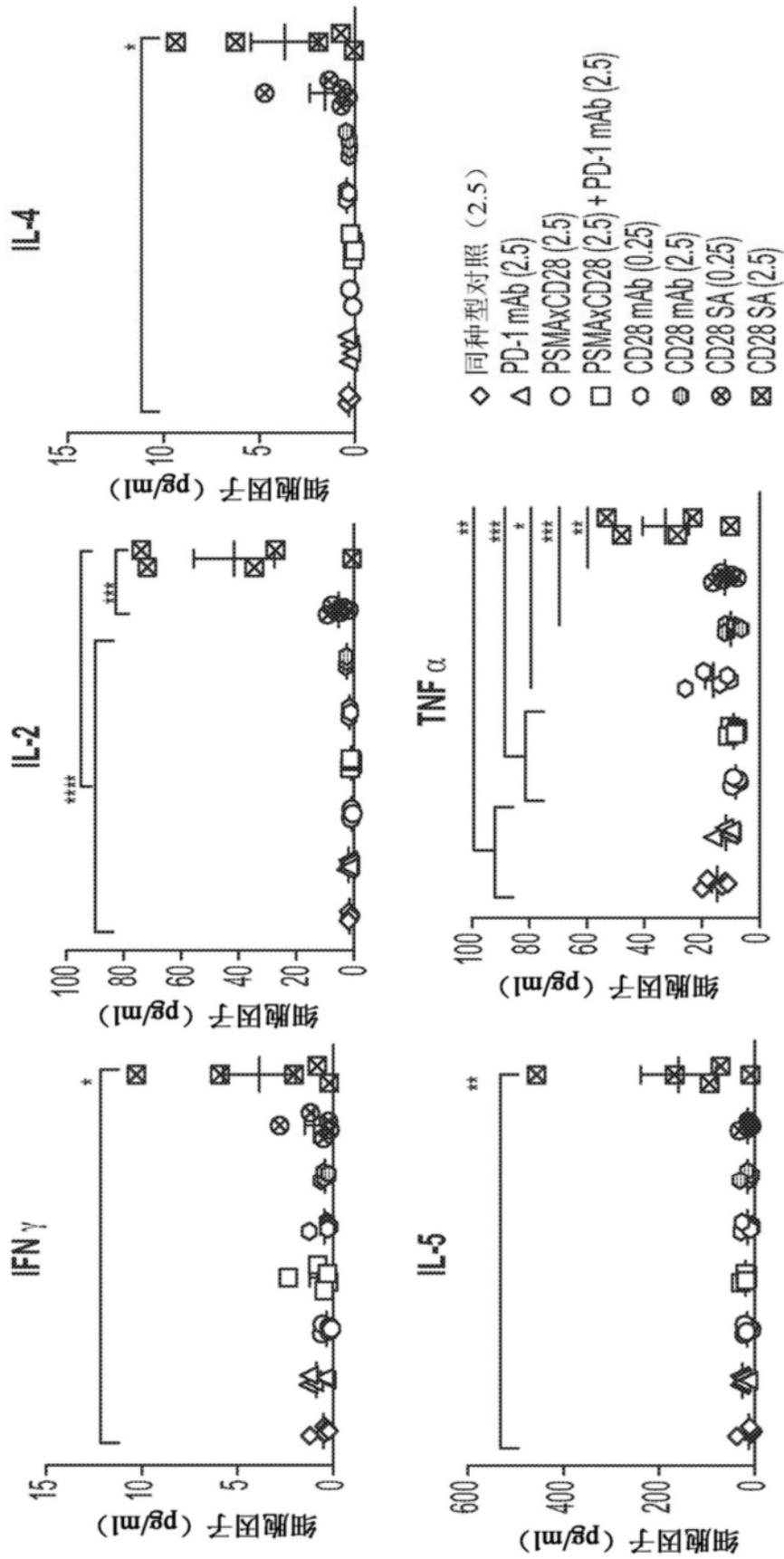


图27

bs16429D +/- PD1不升高荷瘤小鼠的血清细胞因子

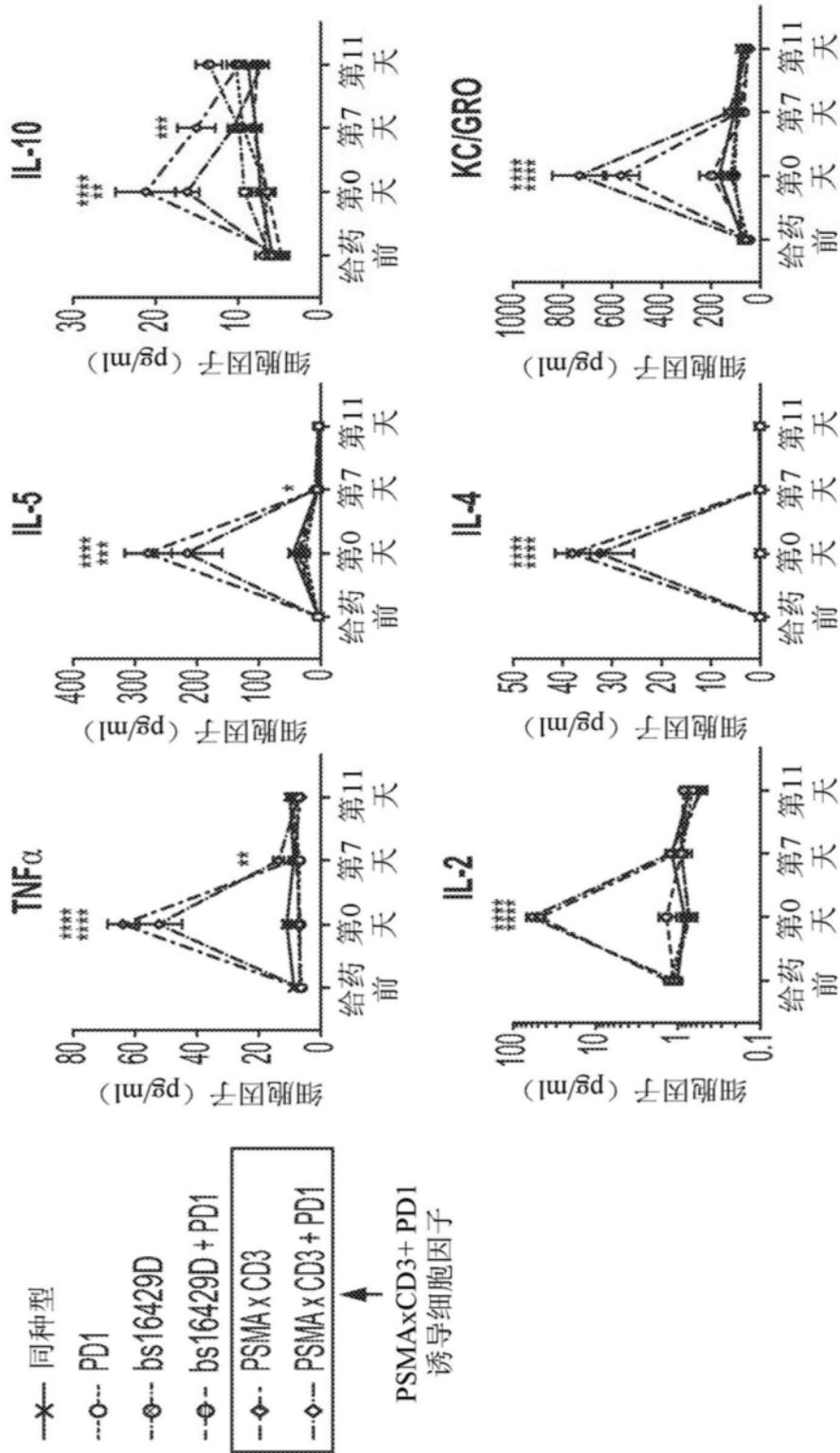


图28

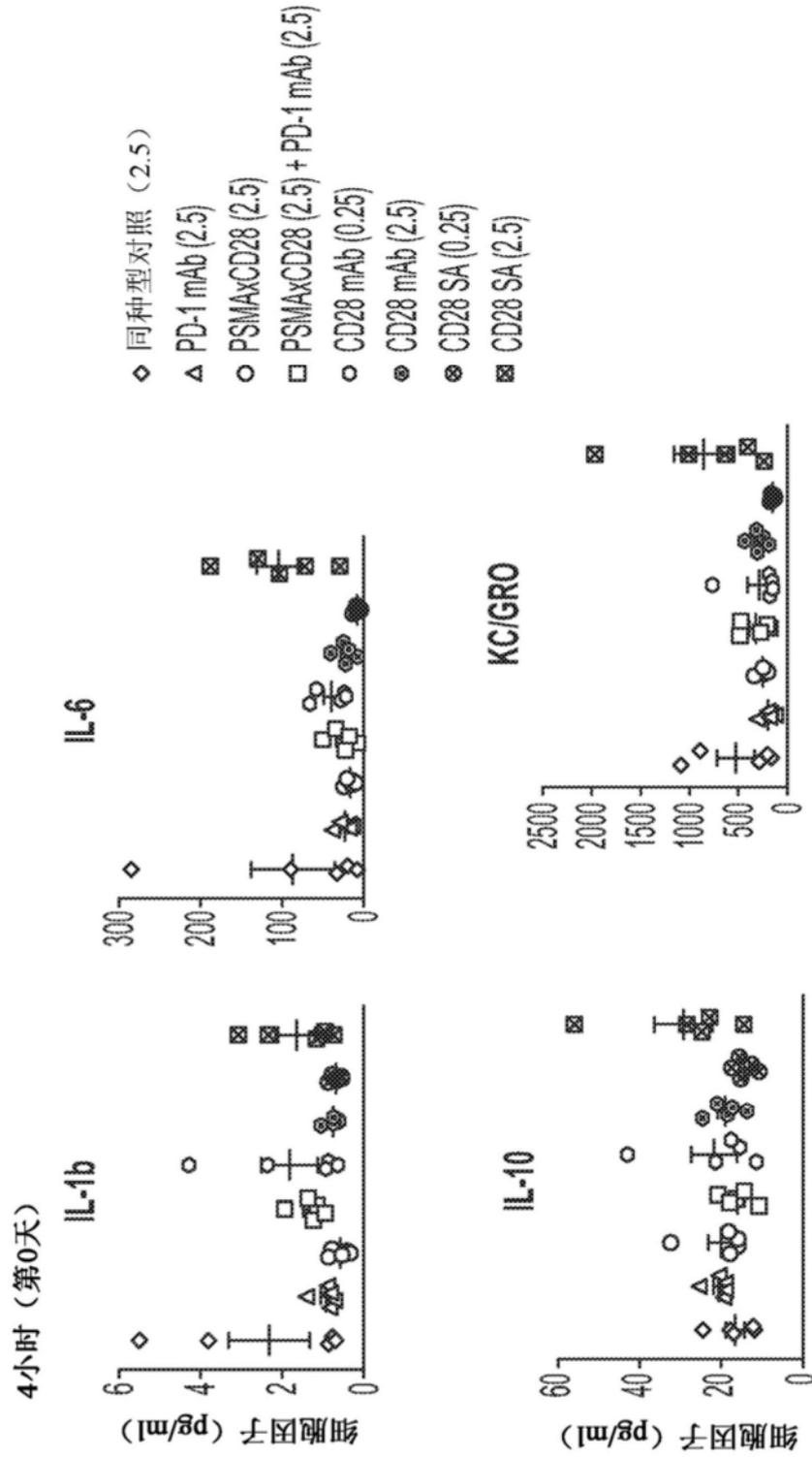


图29A

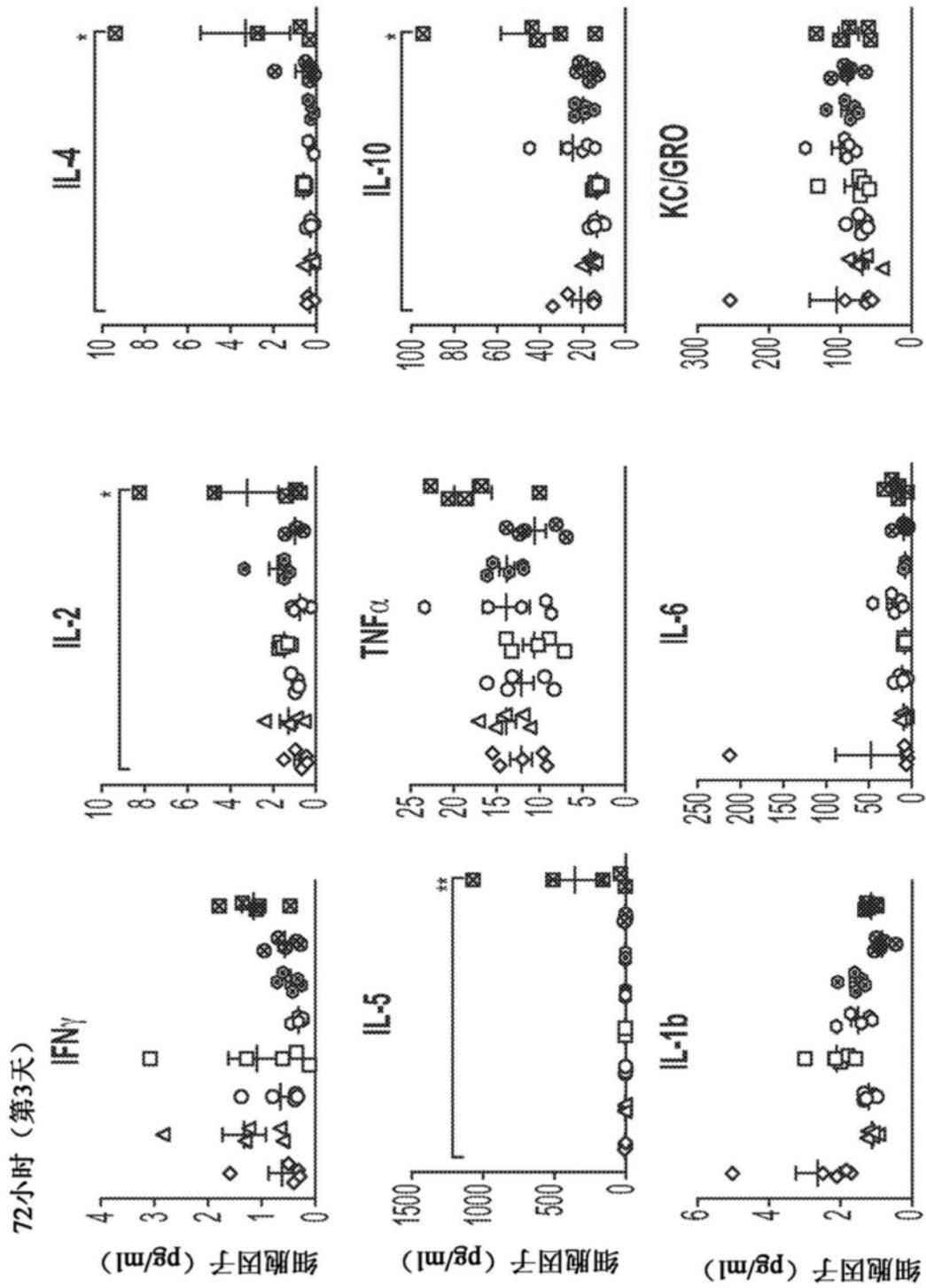


图29B