



(21) 申请号 202311835214.6

(22) 申请日 2023.12.28

(66) 本国优先权数据

202211705788.7 2022.12.29 CN

(71) 申请人 南京圣和药业股份有限公司

地址 210038 江苏省南京市南京经济技术  
开发区惠中路9号

(72) 发明人 潘新荣 周冠月 张小猛 蒋美玲

严帅 陈虹宇 谢美娟

(51) Int. Cl.

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

权利要求书3页 说明书25页

序列表(电子公布) 附图1页

(54) 发明名称

抗CRTAM/抗PD-L1抗体及其应用

(57) 摘要

本发明涉及抗体药物领域,尤其涉及抗CRTAM/抗PD-L1抗体,包含抗CRTAM/抗PD-L1抗体的药物组合及其应用。本发明的抗CRTAM/抗PD-L1抗体具有显著的抗肿瘤活性,可在制备抗肿瘤药物中应用。

1. 一种抗CRTAM/抗PD-L1抗体,其包括抗CRTAM抗体或其抗原结合片段和抗PD-L1抗体或其抗原结合片段,其中:

所述抗CRTAM抗体或其抗原结合片段包含第一重链可变区和第一轻链可变区,其中:

(1) 所述第一重链可变区包含选自如下组的H1CDR1、H1CDR2和H1CDR3:

(A1) 如SEQ ID NO:1、2和3所示的氨基酸序列;和

(A2) 如SEQ ID NO:7、8和9所示的氨基酸序列;

(A3) 与(A1)、(A2)所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列;和

(2) 所述第一轻链可变区包含选自如下组的L1CDR1、L1CDR2和L1CDR3:

(A4) 如SEQ ID NO:4、5和6所示的氨基酸序列;

(A5) 如SEQ ID NO:10、11和12所示的氨基酸序列;

(A6) 与(A4)、(A5)所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列。

2. 如权利要求1所述的抗CRTAM/抗PD-L1抗体,其中

所述抗PD-L1抗体或其抗原结合片段包含第二重链可变区和第二轻链可变区,其中:

(1) 所述第二重链可变区包含H2CDR1、H2CDR2和H2CDR3,其氨基酸序列分别为SEQ ID NO:13、14和15或与SEQ ID NO:13、14和15所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列;和

(2) 所述第二轻链可变区包含L2CDR1、L2CDR2和L2CDR3,其氨基酸序列分别为SEQ ID NO:16、17和18或与SEQ ID NO:16、17和18所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列。

3. 如权利要求1或2所述的抗CRTAM/抗PD-L1抗体,其中所述抗CRTAM抗体或其抗原结合片段包含:

所述H1CDR1、H1CDR2和H1CDR3分别为SEQ ID NO:1、2和3或与SEQ ID NO:1、2和3所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列的第一重链可变区,和所述L1CDR1、L1CDR2和L1CDR3分别为SEQ ID NO:4、5和6或与SEQ ID NO:4、5和6所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列的第一轻链可变区;或者

所述H1CDR1、H1CDR2和H1CDR3分别为SEQ ID NO:7、8和9或与SEQ ID NO:7、8和9所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列的第一重链可变区,和所述L1CDR1、L1CDR2和L1CDR3分别为SEQ ID NO:10、11和12或与SEQ ID NO:10、11和12所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列的第一轻链可变区。

4. 如权利要求1-3之任一项所述的抗CRTAM/抗PD-L1抗体,其中:

所述抗CRTAM抗体或其抗原结合片段包含第一重链可变区和第一轻链可变区,其中:

(1) 所述第一重链可变区的氨基酸序列选自:

(B1) 如SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列;

(B2) (B1)所示的氨基酸序列经取代、缺失或添加一个或多个氨基酸获得的、且与(B1)所示的氨基酸序列功能相同或相似的氨基酸序列;和

(B3) 与(B1)所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;和

(2) 所述第一轻链可变区的氨基酸序列选自:

(B4) 如SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列;

(B5) (B4)所示的氨基酸序列经取代、缺失或添加一个或多个氨基酸获得的、且与(B4)

所示的氨基酸序列功能相同或相似的氨基酸序列;和

(B6) 与 (B4) 所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

5. 如权利要求1-4之任一项所述的抗CRTAM/抗PD-L1抗体,其中:

所述第一重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列,SEQ ID NO:23经取代、缺失或添加一个或多个氨基酸获得的且与SEQ ID NO:23功能相同的氨基酸序列或与SEQ ID NO:23具有至少85%,或至少90%,或至少95%,或至少98%序列同一性且所述H1CDR1、H1CDR2和H1CDR3如SEQ ID NO:7、8和9所示的氨基酸序列,且所述第一轻链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:25经取代、缺失或添加一个或多个氨基酸获得的且与SEQ ID NO:25功能相同的氨基酸序列或与SEQ ID NO:25具有至少85%,或至少90%,或至少95%,或至少98%序列同一性且所述L1CDR1、L1CDR2和L1CDR3如SEQ ID NO:10、11和12所示的氨基酸序列;或者

所述第一重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列,SEQ ID NO:27经取代、缺失或添加一个或多个氨基酸获得的且与SEQ ID NO:27功能相同的氨基酸序列或与SEQ ID NO:27具有至少85%,或至少90%,或至少95%,或至少98%序列同一性且所述H1CDR1、H1CDR2和H1CDR3如SEQ ID NO:1、2和3所示的氨基酸序列,且所述第一轻链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:28经取代、缺失或添加一个或多个氨基酸获得的且与SEQ ID NO:28功能相同的氨基酸序列或与SEQ ID NO:28具有至少85%,或至少90%,或至少95%,或至少98%序列同一性且所述L1CDR1、L1CDR2和L1CDR3如SEQ ID NO:4、5和6所示的氨基酸序列。

6. 如权利要求1-5之任一项所述的抗CRTAM/抗PD-L1抗体,其中所述抗PD-L1抗体或其抗原结合片段包含第二重链可变区和第二轻链可变区,其中:

(1) 所述第二重链可变区的氨基酸序列选自:

(b1) 如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列;

(b2) (b1) 所示的氨基酸序列经取代、缺失或添加一个或多个氨基酸获得的且与(b1)所示的氨基酸序列功能相同或相似的氨基酸序列;和

(b3) 与(b1)所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;和

(2) 所述第二轻链可变区的氨基酸序列选自:

(b4) 如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列;

(b5) (b4) 所示的氨基酸序列经取代、缺失或添加一个或多个氨基酸获得的且与(b4)所示的氨基酸序列功能相同或相似的氨基酸序列;和

(b6) 与(b4)所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

7. 如权利要求1-6之任一项所述的抗CRTAM/抗PD-L1抗体,其中所述抗体是人源化抗体或完全人抗体。

8. 如权利要求1-7之任一项所述的抗CRTAM/抗PD-L1抗体,其中所述抗体是双特异性抗体。

9. 一种分离的核酸,其编码权利要求1-8之任一项所述的抗CRTAM/抗PD-L1抗体。

10. 如权利要求9所述的核酸,其中:

(1) 编码所述第一重链可变区氨基酸序列的核苷酸序列如SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:34所示;

(2) 编码所述第一轻链可变区氨基酸序列的核苷酸序列如SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:35所示;

(3) 编码所述第二重链可变区氨基酸序列的核苷酸序列如SEQ ID NO:30所示;和

(4) 编码所述第二轻链可变区氨基酸序列的核苷酸序列如SEQ ID NO:31所示。

11. 一种表达载体,其包含如权利要求9或10所述的核酸。

12. 一种宿主细胞,其转化如权利要求11所述的表达载体,所述宿主细胞选自原核细胞和真核细胞,优先为哺乳动物细胞。

13. 制备权利要求1-8任一项所述的抗CRTAM/抗PD-L1抗体的方法,包括在如权利要求12所述的宿主细胞中表达抗体,以及从宿主细胞中分离所述抗体的步骤。

14. 一种药物组合物,其包含权利要求1-8之任一项所述的抗CRTAM/抗PD-L1抗体和药学可接受的载体。

15. 如权利要求1-8之任一项所述的抗CRTAM/抗PD-L1抗体或如权利要求14的药物组合物在制备用于抑制PD-L1活性和/或激发CRTAM活性的药物中的应用,优选所述药物用于治疗血液肿瘤、淋巴瘤、乳腺癌、肺癌、胃癌、肠癌、食管癌、卵巢癌、宫颈癌、肾癌、膀胱癌、胰腺癌、神经胶质瘤和/或黑素瘤。

## 抗CRTAM/抗PD-L1抗体及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及抗体药物领域,尤其涉及抗CRTAM/抗PD-L1抗体,包含抗CRTAM/抗PD-L1抗体的药物组合物及其应用。

### 背景技术

[0002] 程序性死亡配体1(PD-L1,Programed death-ligand 1),也称为B7-H1或CD274,属于免疫球蛋白超家族的I型跨膜蛋白,分子量为40kDa,包含一个Ig-V和Ig-C样细胞外结构域、一个跨膜结构域和一个不包含典型信号基序的短胞浆尾。PD-L1在不同类型的细胞上广泛表达,包括肝细胞、血管内皮细胞以及B细胞、巨噬细胞等免疫细胞,是参与免疫抑制的PD-1配体之一。IFN- $\gamma$ 可诱导PD-L1的表达上调,通常情况下,上调的PD-L1与T细胞表面的PD-1结合,抑制T细胞激活以防止自身免疫攻击,维持细胞的免疫耐受。PD-L1在多种实体瘤中高表达,包括非小细胞肺癌、结直肠癌、卵巢癌和肾细胞癌等。肿瘤利用PD-L1和PD-1的信号轴,抑制CD8<sup>+</sup>T细胞的活性和增殖,诱导T细胞无能与衰竭,筑建局部免疫耐受的肿瘤微环境,促进肿瘤免疫逃逸。

[0003] PD-L1在人非小细胞肺癌中表达,促进了癌细胞增殖;PD-L1的敲除则抑制了HCC827和PC9细胞系中肿瘤细胞的增殖并诱导其凋亡。目前抗PD-L1的Atezolizumab和Durvalumab两款药物已用于晚期非小细胞肺癌的治疗,显著改善了患者总体生存率,其中高表达PD-L1的患者获益更加明显。

[0004] CRTAM(Class-I-restricted T cell associated molecule),或称为CD355,是免疫球蛋白超家族的一员。CRTAM是由393氨基酸组成的I型跨膜蛋白,分子量为42.7kDa。CRTAM的表达受到NK细胞激活受体和T细胞受体(TCR)激活的严格调控,限制性的表达于激活的免疫细胞上,如活化的CD8<sup>+</sup>T细胞和NK细胞,而在正常人的PBMC中低表达,在哮喘病人的PBMC中高表达。CRTAM基因启动子受到了AP-1转录因子的正调控,TCR激活信号通过AP-1调控元件控制CRTAM在CD8<sup>+</sup>T细胞上的表达。CRTAM的配体Nec1-2属于Nectin家族的黏附分子,又被称为TSLC1(The tumor suppressor in lung cancer-1)或CADM1。Nec1-2与CRTAM结合作用能在体外促进NK细胞的细胞毒作用和CD8<sup>+</sup>T细胞释放IFN- $\gamma$ ,并在体内促进NK细胞对肿瘤的排斥反应。现有文献表明,Nec1-2在肿瘤细胞表达会抑制肿瘤细胞的生长和增殖,但肿瘤细胞的Nec1-2的表达会逐渐减少至沉默,为癌细胞逃脱免疫系统的监测提供了一种可能机制。

[0005] Nec1-2和CRTAM通路与PD-1-PD-L1通路具有不同的信号机制且具备互补的作用,通过开发一种靶向CRTAM与PD-L1的双功能抗体,该双特异性抗体包含PD-L1结合部分和CRTAM结合部分,既能阻断PD-L1与PD-1的结合,又能激发CRTAM,解除靶细胞对T细胞的抑制作用,并激活T细胞,促进IFN- $\gamma$ 的释放,增强免疫细胞对肿瘤细胞的杀伤作用。能双重阻断肿瘤的免疫逃逸机制,重新肿瘤微环境中发生免疫耐受免疫细胞,从而具备弥补PD-L1低表达肿瘤患者治疗不佳的优势,具有更好的抗肿瘤活性、靶向特异性和更高的安全性。

## 发明内容

[0006] 本发明提供一种抗CRTAM/抗PD-L1抗体,其包括抗CRTAM抗体或其抗原结合片段和抗PD-L1抗体或其抗原结合片段,其中所述抗CRTAM抗体或其抗原结合片段包含第一重链可变区和第一轻链可变区,其中所述第一重链可变区包含第一重链可变区的互补决定区1(H1CDR1)、第一重链可变区的互补决定区2(H1CDR2)和/或第一重链可变区的互补决定区3(H1CDR3),所述第一轻链可变区包含第一轻链可变区的互补决定区1(L1CDR1)、第一轻链可变区的互补决定区2(L1CDR2)和/或第一轻链可变区的互补决定区3(L1CDR3);和所述抗PD-L1抗体或其抗原结合片段为特异性结合PD-L1的抗体或其抗原结合片段。

[0007] 在一些实施方案中,本发明提供一种抗CRTAM/抗PD-L1抗体,其包括抗CRTAM抗体或其抗原结合片段和抗PD-L1抗体或其抗原结合片段,其中所述抗CRTAM抗体或其抗原结合片段包含第一重链可变区和第一轻链可变区,其中:

[0008] (1) 所述第一重链可变区包含选自如下组的H1CDR1、H1CDR2和H1CDR3:

[0009] (A1) 如SEQ ID NO:1、2和3所示的氨基酸序列;和

[0010] (A2) 如SEQ ID NO:7、8和9所示的氨基酸序列;

[0011] (A3) 与(A1)、(A2)所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列;和

[0012] (2) 所述第一轻链可变区包含选自如下组的L1CDR1、L1CDR2和L1CDR3:

[0013] (A4) 如SEQ ID NO:4、5和6所示的氨基酸序列;

[0014] (A5) 如SEQ ID NO:10、11和12所示的氨基酸序列;

[0015] (A6) 与(A4)、(A5)所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列。

[0016] 在一些实施方案中,根据本发明的抗CRTAM/抗PD-L1抗体,所述抗CRTAM抗体或其抗原结合片段包含:

[0017] 所述H1CDR1、H1CDR2和H1CDR3分别为SEQ ID NO:1、2和3或与SEQ ID NO:1、2和3所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列的第一重链可变区,和所述L1CDR1、L1CDR2和L1CDR3分别为SEQ ID NO:4、5和6或与SEQ ID NO:4、5和6所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列的第一轻链可变区;或者

[0018] 所述H1CDR1、H1CDR2和H1CDR3分别为SEQ ID NO:7、8和9或与SEQ ID NO:7、8和9所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列的第一重链可变区,和所述L1CDR1、L1CDR2和L1CDR3分别为SEQ ID NO:10、11和12或与SEQ ID NO:10、11和12所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列的第一轻链可变区。

[0019] 在一些实施方案中,根据本发明的抗CRTAM/抗PD-L1抗体,所述抗CRTAM抗体或其抗原结合片段包含第一重链可变区和第一轻链可变区,其中:

[0020] (1) 所述第一重链可变区的氨基酸序列选自:

[0021] (B1) 如SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列;

[0022] (B2) (B1)所示的氨基酸序列经取代、缺失或添加一个或多个氨基酸获得的、且与(B1)所示的氨基酸序列功能相同或相似的氨基酸序列;和

[0023] (B3) 与(B1)所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;和

[0024] (2) 所述第一轻链可变区的氨基酸序列选自:

[0025] (B4) 如SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列;

[0026] (B5) (B4)所示的氨基酸序列经取代、缺失或添加一个或多个氨基酸获得的、且与

(B4)所示的氨基酸序列功能相同或相似的氨基酸序列;和

[0027] (B6)与(B4)所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0028] 在一些实施方案中,根据本发明的抗CRTAM/抗PD-L1抗体,所述抗CRTAM抗体或其抗原结合片段包含第一重链可变区和第一轻链可变区,其中:

[0029] 所述第一重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列,SEQ ID NO:23经取代、缺失或添加一个或多个氨基酸获得的且与SEQ ID NO:23功能相同的氨基酸序列或与SEQ ID NO:23具有至少85%,或至少90%,或至少95%,或至少98%序列同一性且所述H1CDR1、H1CDR2和H1CDR3如SEQ ID NO:7、8和9所示的氨基酸序列,且所述第一轻链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:25经取代、缺失或添加一个或多个氨基酸获得的且与SEQ ID NO:25功能相同的氨基酸序列或与SEQ ID NO:25具有至少85%,或至少90%,或至少95%,或至少98%序列同一性且所述L1CDR1、L1CDR2和L1CDR3如SEQ ID NO:10、11和12所示的氨基酸序列;或者

[0030] 所述第一重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列,SEQ ID NO:27经取代、缺失或添加一个或多个氨基酸获得的且与SEQ ID NO:27功能相同的氨基酸序列或与SEQ ID NO:27具有至少85%,或至少90%,或至少95%,或至少98%序列同一性且所述H1CDR1、H1CDR2和H1CDR3如SEQ ID NO:1、2和3所示的氨基酸序列,且所述第一轻链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:28经取代、缺失或添加一个或多个氨基酸获得的且与SEQ ID NO:28功能相同的氨基酸序列或与SEQ ID NO:28具有至少85%,或至少90%,或至少95%,或至少98%序列同一性且所述L1CDR1、L1CDR2和L1CDR3如SEQ ID NO:4、5和6所示的氨基酸序列。

[0031] 在一些实施方案中,本发明提供一种抗CRTAM/抗PD-L1抗体,其包括抗CRTAM抗体或其抗原结合片段和抗PD-L1抗体或其抗原结合片段,其中所述抗CRTAM抗体或其抗原结合片段如以上实施方案中所限定;和所述抗PD-L1抗体或其抗原结合片段包含第二重链可变区和/或第二轻链可变区,其中所述第二重链可变区包含第二重链可变区的互补决定区1(H2CDR1)、第二重链可变区的互补决定区2(H2CDR2)和/或第二重链可变区的互补决定区3(H2CDR3),所述第二轻链可变区包含第二轻链可变区的互补决定区1(L2CDR1)、第二轻链可变区的互补决定区2(L2CDR2)和/或第二轻链可变区的互补决定区3(L2CDR3)。

[0032] 在一些具体的实施方案中,本发明提供一种抗CRTAM/抗PD-L1抗体,其包括抗CRTAM抗体或其抗原结合片段和抗PD-L1抗体或其抗原结合片段,其中所述抗CRTAM抗体或其抗原结合片段如以上实施方案中所限定,和所述抗PD-L1抗体或其抗原结合片段包含第二重链可变区和第二轻链可变区,其中:

[0033] (1)所述第二重链可变区包含选自如下组的H2CDR1、H2CDR2和H2CDR3:

[0034] (a1)如SEQ ID NO:13、14和15所示的氨基酸序列;

[0035] (a2)与(a1)所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列;和

[0036] (2)所述第二轻链可变区包含如下组的L2CDR1、L2CDR2和L2CDR3:

[0037] (a3)如SEQ ID NO:16、17和18所示的氨基酸序列;

[0038] (a4)与(a3)所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列。

[0039] 在一些具体的实施方案中,本发明提供一种抗CRTAM/抗PD-L1抗体,其包括抗CRTAM抗体或其抗原结合片段和抗PD-L1抗体或其抗原结合片段,其中:

[0040] 所述抗CRTAM抗体或其抗原结合片段包含第一重链可变区和第一轻链可变区,其中:

[0041] (1) 所述第一重链可变区包含选自如下组的H1CDR1、H1CDR2和H1CDR3:

[0042] (A1) 如SEQ ID NO:1、2和3所示的氨基酸序列;

[0043] (A2) 如SEQ ID NO:7、8和9所示的氨基酸序列;

[0044] (A3) 与(A1)、(A2)所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列;和

[0045] (2) 所述第一轻链可变区包含选自如下组的L1CDR1、L1CDR2和L1CDR3:

[0046] (A4) 如SEQ ID NO:4、5和6所示的氨基酸序列;

[0047] (A5) 如SEQ ID NO:10、11和12所示的氨基酸序列;

[0048] (A6) 与(A4)、(A5)所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列;和

[0049] 所述抗PD-L1抗体或其抗原结合片段包含第二重链可变区和第二轻链可变区,其中:

[0050] (1) 所述第二重链可变区包含H2CDR1、H2DR2和H2CDR3,其氨基酸序列分别为SEQ ID NO:13、14和15或与SEQ ID NO:13、14和15所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列;

[0051] (2) 所述第二轻链可变区包含L2CDR1、L2CDR2和L2CDR3,其氨基酸序列分别为SEQ ID NO:16、17和18或与SEQ ID NO:16、17和18所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列。

[0052] 在一个具体的实施方案中,本发明提供一种抗CRTAM/抗PD-L1抗体,其包括抗CRTAM抗体或其抗原结合片段和抗PD-L1抗体或其抗原结合片段,其中所述抗CRTAM抗体或其抗原结合片段包含所述H1CDR1、H1CDR2和H1CDR3分别为SEQ ID NO:1、2和3或与SEQ ID NO:1、2和3所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列的第一重链可变区,和所述L1CDR1、L1CDR2和L1CDR3分别为SEQ ID NO:4、5和6或与SEQ ID NO:4、5和6所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列的第一轻链可变区;和所述抗PD-L1抗体或其抗原结合片段包含所述H2CDR1、H2DR2和H2CDR3分别为SEQ ID NO:13、14和15或与SEQ ID NO:13、14和15所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列的第二重链可变区,和所述L2CDR1、L2CDR2和L2CDR3分别为SEQ ID NO:16、17和18或与SEQ ID NO:16、17和18所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列的第二轻链可变区。

[0053] 在一个具体的实施方案中,本发明提供一种抗CRTAM/抗PD-L1抗体,其包括抗CRTAM抗体或其抗原结合片段和抗PD-L1抗体或其抗原结合片段,其中所述抗CRTAM抗体或其抗原结合片段包含所述H1CDR1、H1CDR2和H1CDR3分别为SEQ ID NO:7、8和9或与SEQ ID NO:7、8和9所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列的第一重链可变区,和所述L1CDR1、L1CDR2和L1CDR3分别为SEQ ID NO:10、11和12或与SEQ ID NO:10、11和12所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列的第一轻链可变区;和所述抗PD-L1抗体或其抗原结合片段包含所述H2CDR1、H2DR2和H2CDR3分别为SEQ ID NO:13、14和15或与SEQ ID NO:13、14和15所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列的第二重链可变区,和所述L2CDR1、L2CDR2和L2CDR3分别为SEQ ID NO:16、17和18或与SEQ ID NO:16、17和18所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列的第二轻链可变区。

[0054] 在一些具体的实施方案中,本发明提供一种抗CRTAM/抗PD-L1抗体,其中所述抗

CRTAM抗体或其抗原结合片段包含第一重链可变区和第一轻链可变区,其中:

[0055] (1)所述第一重链可变区的氨基酸序列选自:

[0056] (B1)如SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列;

[0057] (B2) (B1)所示的氨基酸序列经取代、缺失或添加一个或多个氨基酸获得的、且与(B1)所示的氨基酸序列功能相同或相似的氨基酸序列;和

[0058] (B3)与(B1)所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;和

[0059] (2)所述第一轻链可变区的氨基酸序列选自:

[0060] (B4)如SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列;

[0061] (B5) (B4)所示的氨基酸序列经取代、缺失或添加一个或多个氨基酸获得的、且与(B4)所示的氨基酸序列功能相同或相似的氨基酸序列;和

[0062] (B6)与(B4)所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;和

[0063] 所述抗PD-L1抗体或其抗原结合片段包含第二重链可变区和第二轻链可变区,其中:

[0064] (1)所述第二重链可变区的氨基酸序列选自:

[0065] (b1)如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列;

[0066] (b2) (b1)所示的氨基酸序列经取代、缺失或添加一个或多个氨基酸获得的且与(b1)所示的氨基酸序列功能相同或相似的氨基酸序列;和

[0067] (b3)与(b1)所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;和

[0068] (2)所述第二轻链可变区的氨基酸序列选自:

[0069] (b4)如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列;

[0070] (b5) (b4)所示的氨基酸序列经取代、缺失或添加一个或多个氨基酸获得的且与(b4)所示的氨基酸序列功能相同或相似的氨基酸序列;和

[0071] (b6)与(b4)所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0072] 在一些具体的实施方案中,本发明提供一种抗CRTAM/抗PD-L1抗体,其中所述第一重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:23,且所述第一轻链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:25;和所述第二重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:19,且所述第二轻链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:21。

[0073] 在另一些具体的实施方案中,本发明提供一种抗CRTAM/抗PD-L1抗体,其中所述第一重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:27,且所述第一轻链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:28;和所述第二重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:19,且所述第二轻链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:21。

[0074] 在一些实施方案中,本发明提供一种抗CRTAM/抗PD-L1人源化抗体,其中所述重链包含人源的IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其变体的重链恒定区,所述轻链包含人源的 $\kappa$ 、 $\lambda$ 链或其变体的轻链恒定区。

[0075] 在一些具体的实施方案中,根据本发明的抗CRTAM/抗PD-L1抗体,所述抗CRTAM人源化抗体或其抗原结合片段还包含人源IgG1、IgG2、IgG3或IgG4或其变体的重链恒定区,和人源 $\kappa$ 、 $\lambda$ 链或其变体的轻链恒定区。在一些优选的实施方案中,本发明的抗CRTAM人源化抗体或其抗原结合片段还包含人源IgG4或其变体的重链恒定区,和人源 $\kappa$ 链或其变体的轻链恒定区。

[0076] 在一些具体的实施方案中,根据本发明的抗CRTAM/抗PD-L1抗体,所述抗PD-L1人源化抗体或其抗原结合片段还包含人源IgG1、IgG2、IgG3或IgG4或其变体的重链恒定区,和人源 $\kappa$ 、 $\lambda$ 链或其变体的轻链恒定区。在一些优选的实施方案中,本发明的抗PD-L1人源化抗体或其抗原结合片段还包含人源IgG1、IgG2、IgG4或其变体的重链恒定区,和人源 $\kappa$ 链或其变体的轻链恒定区。

[0077] 在一些实施方案中,本发明提供抗CRTAM/抗PD-L1抗体,其中所述的抗CRTAM抗体或其抗原结合片段以及抗PD-L1抗体或其抗原结合片段分别为Fab、Fv、sFv或F(ab)<sub>2</sub>。在一个具体的实施方案中,本发明提供的抗CRTAM/抗PD-L1抗体为scF(ab)<sub>2</sub>。

[0078] 优选地,本发明以上实施方案中的抗CRTAM/抗PD-L1抗体是抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体。在一些实施方案中,所述双特异性抗体是人抗体或人源化抗体。在一些实施方案中,所述结合特异性之一是针对CRTAM,而另一个结合特异性是针对任何其它抗原。在一些实施方案中,所述结合特异性之一是针对PD-L1,而另一个结合特异性是针对CRTAM。可将本发明的双特异性抗体制备成全长抗体或抗体片段(例如F(ab')<sub>2</sub>双特异性抗体)。

[0079] 制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。传统上,双特异性抗体的重组制备基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两个重链具有不同的特异性(Millstein and Cuello, Nature 305:537 (1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(quadroma)可能产生10种不同抗体分子的混合物,其中只有一种分子具有正确的双特异性结构。该正确分子的纯化通常通过亲和层析步骤进行,相当麻烦且产物产量低。类似的方法在W093/08829及Trauncker et al., EMBOL. 10:3655 (1991) 中有公开。

[0080] 根据一种不同的方法,具有期望结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变区与免疫球蛋白恒定区序列融合。在一些实施方案中,与包含至少部分铰链、CH2和CH3区的免疫球蛋白重链恒定区进行融合。在一些实施方案中,包含与轻链结合所必需位点的第二重链恒定区(CH1)存在于该融合的至少一部分中。将编码免疫球蛋白重链融合片段以及免疫球蛋白轻链(如果需要)的DNA插入不同的表达载体中并共转染入合适的宿主生物体。在用于构建的三种多肽链比例不等时提供最佳产量的实施方案中,这为调整三种多肽链的相互比例提供极大的灵活性。不过,在至少两种多肽链以相同比例表达产生高产量时或比例没有特别意义时,有可能将两种或所有三种多肽链的编码序列插入一个表达载体中。

[0081] 在该方法的一个实施方案中,所述双特异性抗体由一个臂中具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链和另一个臂中的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)组成。由于免疫球蛋白轻链仅在该双特异性分子的一半中存在提供了便利的分离途径,因此发现该不对称性结构便于将期望的双特异性物质与不想要的免疫球蛋白链组合物分开。该方法在W094/04690中公开。关于产生双特异性抗体的进一步信息参见例如 Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210 (1986)。

[0082] 根据另一种方法,可改造一对抗体分子间的界面以使从重组细胞培养物回收的异二聚体的百分比最大化。该界面包含抗体恒定区CH3结构域的至少一部分。在该方法中,将第一抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链用较大侧链(例如酪氨酸或色氨酸)替换。通过将大氨基酸侧链用较小氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替换,在第二抗体分子的界面上产生与大侧链相同或相似大小的补偿性“空腔”。这提供了提高异二聚体相比于其它不想要的终产物诸如同二聚体的产量的机制。

[0083] 双特异性抗体包括交联或“异源缀合”抗体。例如,一种异源缀合抗体可以与亲合素偶联,另一种异源缀合抗体可以与生物素偶联。可使用任何便利的交联方法来制备异源缀合抗体。合适的交联剂是本领域众所周知的,连同许多交联技术一起在美国专利No. 4, 676, 980中公开。

[0084] 本发明的双特异性抗体可以由抗体片段生成。例如,可使用化学连接技术来制备双特异性抗体。Brennan et al., Science 229:81 (1985) 描述了通过蛋白水解切割完整抗体以生成F(ab')<sub>2</sub>片段的方法。将这些片段在存在二硫醇络合剂亚砷酸钠的情况下(用以稳定邻近的二硫醇和防止分子间二硫键的形成)分解。然后将产生的Fab'片段转变为硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。然后将Fab'-TNB衍生物之一通过巯基乙胺的还原重新恢复成Fab'-硫醇,并与等摩尔量的另一种Fab'-TNB衍生物混合,以形成双特异性抗体。

[0085] 可以从大肠杆菌直接回收Fab'-SH片段,这些片段可化学偶联以形成双特异性抗体。Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992) 描述了完全人源化的双特异性抗体F(ab')<sub>2</sub>分子的生成。每个Fab'片段由大肠杆菌单独分泌,并在体外进行定向化学偶联以形成双特异性抗体。

[0086] 在一些实施方案中,本发明的双特异性抗体片段可以直接从重组细胞培养物生成和分离。例如,可以使用亮氨酸拉链生成双特异性抗体(Kostelny et al., J. Immunol. 148 (5):1547-1553 (1992))。将来自Fos和Jun蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合与两种不同抗体的Fab'部分连接。抗体同二聚体在铰链区分解以形成单体,然后重新氧化以形成抗体异二聚体。该方法也可用于生成抗体同二聚体。双抗体技术提供了制备双特异性抗体片段的其他机制。所述双特异性抗体片段包含通过接头相连的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述接头太短以使得同一条链上的两个结构域之间不能配对。因此,迫使一个片段上的VH和VL结构域与另一个片段上的互补VL和VH结构域配对,由此形成两个抗原结合位点。在另一实施方案中,可以通过使用单链Fv(sFv)二聚体构建双特异性抗体片段。

[0087] 本发明涵盖具有超过两价的多价抗体,例如,可制备三特异性抗体。多价抗体可以比二价抗体更快的受到表达该抗体结合的抗原的细胞的内在化(和/或异化)。本发明的抗体可以是可容易地通过编码抗体多肽链的核酸的重组表达而生成的、具有三个或更多抗原结合位点(例如四价抗体)的多价抗体。多价抗体可包含二聚化结构域和三个或更多抗原结合位点。在一些实施方案中,二聚化结构域包含(或由其组成)Fc区或铰链区。在这种情况下,抗体会包含Fc区及Fc区氨基末端的三个或更多抗原结合位点。在一些实施方案中,多价抗体包含(或由其组成)三个至大约八个抗原结合位点。在一些实施方案中,多价抗体包含四个抗原结合位点。多价抗体包含至少一条多肽链(例如两条多肽链),其中所述多肽链包含两个或更多可变区。本发明的多价抗体可进一步包含至少两条(例如四条)轻链可变区多肽。本发明的多价抗体可包含例如约两条至约八条轻链可变区多肽。本发明的轻链可变区多肽包含轻链可变区,且任选进一步包含CL结构域。

[0088] 在包含CRTAM靶向部分和PD-L1靶向部分的双特异性抗体中,CRTAM靶向部分和PD-L1靶向部分之一可以是全长抗体,并且另一个可以是包含重链CDR、轻链CDR或其组合的抗原结合片段(例如scFv)。靶向CRTAM和PD-L1蛋白之一的全长抗体和靶向另一蛋白的抗原结合片段可以直接或通过肽接头以化学方式连接(例如共价连接)。抗原结合片段(例如scFv)可以直接或通过肽接头与全长抗体的N-末端(例如全长抗体的轻链或重链的N-末端)、全长

抗体的C-末端(例如全长抗体的重链(或Fc或CH3结构域)的C-末端)或两者连接。

[0089] 在一个实施方案中,双特异性抗体可以包含全长抗CRTAM抗体、抗PD-L1抗体的抗原结合片段(例如scFab、scFv)以及它们之间的肽接头。在其他实施方案中,双特异性抗体可以包含全长抗CRTAM抗体、抗PD-L1抗体的抗原结合片段(例如scFab、scFv)以及它们之间的肽接头。

[0090] 在一个实施方案中,双特异性抗体中包含的scFv可以按任何顺序包含重链可变区和轻链可变区。例如,双特异性抗体中包含的scFv可以在从N-末端到C-末端的方向上包含重链可变区和轻链可变区以及任选地在它们之间的肽接头,或者可替代地,双特异性抗体中包含的scFv可以在从N-末端到C-末端的方向上包含轻链可变区和重链可变区以及任选地在它们之间的肽接头。

[0091] 在一些实施方案中,所述肽接头可包括例如Gly、Asn和/或Ser残基,并且还可以包括中性氨基酸,例如Thr和/或Ala。适用于肽接头的氨基酸序列可以是相关领域中已知的那些。同时,可以在使得融合蛋白功能不受影响的这样的限度内不同地确定肽接头的长度。例如,肽接头可以通过包括总共约1至约100、约2至约50、或约5至约25个选自Gly、Asn、Ser、Thr、和Ala组成的组的一种或多种来形成。在一个实施方案中,肽接头可以表示为(GmSl)<sub>n</sub>(m、l和n独立地是约1至约10的整数,特别是约2至约5的整数)。

[0092] 在另一个实施方案中,CRTAM靶向部分和PD-L1靶向部分可以均是全长抗体或包含重链CDR、轻链CDR或其组合的抗原结合片段。

[0093] 在另一个实施方案中,双特异性抗体可以是异二聚体形式,其包含第一臂和第二臂,该第一臂包括靶向CRTAM和PD-L1之一的一对第二重链和第二轻链,该第二臂包括靶向另一者的一对第一重链和第一轻链。

[0094] 在一个实施方案中,全长抗体可以是全长免疫球蛋白形式(例如IgG、IgM、IgA、IgE或IgD,例如人IgG、人IgM、人IgA、人IgE或人IgD),并且抗原结合片段可以选自Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv、scFv、scFab、单链抗体、sdFv等组成的组。例如,全长抗体可以是全长人IgG(人IgG1、人IgG2、人IgG3或人IgG4)形式,并且抗原结合片段可以是scFv。

[0095] 例如,本文描述的抗体可以包含柔性接头序列,或者可以被修饰以添加功能部分(例如PEG、药物、毒素或标记)。

[0096] 在一些具体的实施方案中,根据本发明的抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体,所述抗PD-L1抗体或其抗原结合片段的结构为(VL-CL)-肽接头-(VH)-IgG4CH,所述抗CRTAM抗体或其抗原结合片段的结构为(VL-CL)和(VH)-IgG4CH自组装。在一些具体的实施方案中,所述肽接头为(GGGGS)<sub>n</sub>形式,其中n为1-12,优选为3-10,更优选为6-8,例如6、7、8个GGGS重复序列。在另一些具体的实施方案中,靶向PD-L1部分的(VL-CL)-肽接头-(VH)-IgG4CH中的IgG4CH为含有S228P、L235E、T366W、S354C突变成“Knob”结构的IgG4 CH段,靶向CRTAM部分的(VH)-IgG4CH中的IgG4CH为含有S228P、L235E、Y349C、T366S、L368A、Y407V突变成“Hole”结构的IgG4 CH段。在一些具体的实施方案中,靶向PD-L1部分的(VL-CL)-肽接头-(VH)-IgG4CH中的VL的氨基酸序列为SEQ ID NO:21,CL的氨基酸序列为SEQ ID NO:22,VH的氨基酸序列为SEQ ID NO:19,IgG4 CH的氨基酸序列为SEQ ID NO:20;和/或靶向CRTAM部分的(VL-CL)和(VH)-IgG4CH中的VL的氨基酸序列为SEQ ID NO:25,CL的氨基酸序列为SEQ ID NO:26,VH的氨基酸序列为SEQ ID NO:23,IgG4 CH的氨基酸序列为SEQ ID NO:24。

[0097] 在一些具体的实施方案中,根据本发明的抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体的结构为靶向PD-L1部分的(VH-IgG4CH)-肽接头-靶向CRTAM部分的(VH-VL)和靶向PD-L1部分的(VL-CL)自组装。在一些具体的实施方案中,所述的肽接头为(GGGGS)<sub>n</sub>形式,其中n为1-12,优选为3-10,更优选为6-8,例如6、7、8个GGGGS重复序列。在一些具体的实施方案中,靶向PD-L1部分的VL的氨基酸序列为SEQ ID NO:21,CL的氨基酸序列为SEQ ID NO:22,VH的氨基酸序列为SEQ ID NO:19,IgG4 CH的氨基酸序列为SEQ ID NO:29;和/或靶向CRTAM部分的VH的氨基酸序列为SEQ ID NO:27,VL的氨基酸序列为SEQ ID NO:28。

[0098] 在一些实施方案中,根据本发明的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是人源化抗体或完全人抗体。

[0099] 本发明的另一方面提供分离的核酸。在一些实施方案中,根据本发明的分离的核酸编码本发明的抗PD-L1/抗CRTAM抗体。在一些实施方案中,根据本发明的分离的核酸编码本发明的抗CRTAM抗体或其抗原结合片段。在另一些实施方案中,根据本发明的分离的核酸编码本发明的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段。

[0100] 在一个具体的实施方案中,根据本发明的分离的核酸,编码第一重链可变区SEQ ID NO:23的核苷酸序列如SEQ ID NO:32所示,且编码第一轻链可变区SEQ ID NO:25的核苷酸序列如SEQ ID NO:33所示。在另一个具体的实施方案中,根据本发明的分离的核酸,编码第二重链可变区SEQ ID NO:19的核苷酸序列如SEQ ID NO:30所示,且编码第二轻链可变区SEQ ID NO:21的核苷酸序列如SEQ ID NO:31所示。在再一个具体的实施方案中,根据本发明的分离的核酸,编码第一重链可变区SEQ ID NO:27的核苷酸序列如SEQ ID NO:34所示,且编码第一轻链可变区SEQ ID NO:28的核苷酸序列如SEQ ID NO:35所示。

[0101] 本发明的另一方面提供表达载体。在一些实施方案中,本发明的表达载体表达本发明的抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体。在一些实施方案中,本发明的表达载体表达本发明的抗CRTAM抗体或其抗原结合片段。在另一些实施方案中,本发明的表达载体表达本发明的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,根据本发明的表达载体,表达本发明的抗CRTAM抗体或其抗原结合片段的载体和表达抗PD-L1抗体或其抗原结合片段的载体是同种表达载体。根据本发明的表达载体其包含本发明的分离的核酸分子。

[0102] 本发明的另一方面提供一种如上所述的表达载体转化的宿主细胞。

[0103] 在一些实施方案中,根据本发明的宿主细胞选自原核细胞和真核细胞。在一些实施方案中,所述的宿主细胞为细菌,优选为大肠杆菌。在另一个优选的实施方案中,所述的宿主细胞为哺乳动物细胞。

[0104] 本发明的另一方面提供制备本发明的抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体的方法,包括在所述宿主细胞中表达抗体以及从宿主细胞中分离所述抗体的步骤。

[0105] 本发明的另一方面提供一种药物组合物,其包含本发明的抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体和药学可接受的载体。在一些实施方案中,本发明提供药物组合物,其包含本发明的抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体,还包含其他活性组分,如其他抗体、靶向药物等。在一些实施方案中,所述药学可接受的载体选自抗氧化剂、多肽、蛋白质、亲水性聚合物、氨基酸、糖、螯合剂、糖醇、离子和表面活性剂。在一个具体的实施方案中,所述药学可接受的载体为缓冲水溶液。在另一个具体的实施方案中,所述药学可接受的载体为脂质体的形式。

[0106] 本发明的另一方面提供一种嵌合抗原受体(CAR)融合蛋白,其包含本发明的抗

CRTAM抗体或其抗原结合片段和/或抗PD-L1抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述嵌合抗原受体融合蛋白包含本发明的抗CRTAM抗体或其抗原结合片段,其为针对CRTAM抗原的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>的单链可变片段(scFv)。在另一些实施方案中,所述嵌合抗原受体融合蛋白包含本发明的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段,其为针对PD-L1抗原的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>的单链可变片段(scFv)。在另一些实施方案中,所述嵌合抗原受体融合蛋白包含针对CRTAM抗原的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>的第一单链可变片段(scFv)和针对PD-L1抗原的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>的第二单链可变片段(scFv)。所述针对CRTAM抗原的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>的第二scFv具有以上实施方案中描述的第一重链可变区的H1CDR1、H1CDR2和H1CDR3和第一轻链可变区的L1CDR1、L1CDR2和L1CDR3。所述针对PD-L1抗原的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>的第一scFv具有以上实施方案中描述的第二重链可变区的H2CDR1、H2CDR2和H2CDR3和第二轻链可变区的L2CDR1、L2CDR2和L2CDR3。

[0107] 可以将本发明的抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体与药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂混合制备成药物制剂,以适合于经口或胃肠外给药。给药方法包括,但不限于经口、皮内、肌内、腹膜内、静脉内、脑内、眼内、气管内、皮下、鼻内途径。所述制剂可以通过任何途径施用,例如通过输注或推注,通过经上皮或皮肤粘膜(例如口腔粘膜或直肠等)吸收的途径施用。给药可以是全身的或局部的。所述制剂可通过本领域已知的方法制备,且包含药物制剂领域常规使用的载体、稀释剂或赋形剂。

[0108] 本发明的另一方面提供治疗和/或预防与CRTAM、PD-L1或两者相关的疾病的方法,所述方法包括向有此需要的个体施用本发明的抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体或本发明的药物组合物。

[0109] 本发明的另一方面提供本发明的抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体或抗CRTAM抗体或本发明的药物组合物在制备治疗和/或预防与CRTAM、PD-L1或两者相关的疾病的药物中的应用。在一些实施方案中,所述与CRTAM、PD-L1或两者相关的疾病包括血液肿瘤、淋巴瘤、乳腺癌、肺癌、胃癌、肠癌、食管癌、卵巢癌、宫颈癌、肾癌、膀胱癌、胰腺癌、神经胶质瘤和/或黑素瘤。所述肿瘤可以是任何表达CRTAM蛋白的肿瘤,例如膀胱癌、肝癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、白血病、淋巴瘤、胰腺癌、肺癌(例如小细胞肺癌、非小细胞肺癌等)、乳腺癌、尿道癌、头颈癌、胃肠癌、胃癌、食道癌、卵巢癌、肾癌、黑素瘤、前列腺癌、甲状腺癌等。所述肿瘤可以是原发性或转移性肿瘤。在一些实施方案中,本发明提供上述抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体或本发明的药物组合物在制备抗肿瘤的药物的应用,例如所述肿瘤选自血液肿瘤、淋巴瘤、乳腺癌、肺癌、胃癌、肠癌、食管癌、卵巢癌、宫颈癌、肾癌、膀胱癌、胰腺癌、神经胶质瘤和黑素瘤。

[0110] 本发明提供的抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体具有显著的抗肿瘤作用,可明显抑制肿瘤生长,人源化后的抗体免疫原性大大降低,有效消除人体免疫系统对外源性单抗的排异反应,可在制备用于治疗各类肿瘤疾病的药物中应用,具有广阔的市场前景。

[0111] 定义

[0112] 除非另有定义,本文中使用的科学和技术术语的含义是本领域技术人员所通常理解的含义。本文中所述的细胞和组织培养、分子生物学以及蛋白质和寡核苷酸化学及杂交中使用的命名和技术是本领域公知且普遍使用的。对于重组DNA、寡核苷酸合成和组织培养与转化(如电穿孔、脂质转染),使用了标准技术。酶促反应和纯化技术根据生产商的说明书或本领域普遍使用或本文所述的方法进行。前述技术和方法通常根据本领域公知且本

说明书中引用和讨论的多部综合和较具体的文献中描述的那样使用。参见例如Sambrook等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 纽约冷泉港(1989))。本文所述的分析化学、合成有机化学以及医学和药学化学中使用的命名以及实验室方法和技术是本领域公知且普遍使用的。

[0113] 在本发明中, 术语“至少80%序列同一性”是指至少80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%的序列同一性。在本发明中, 术语“至少85%序列同一性”是指至少85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%的序列同一性。在一些优选的实施方案中, 本发明所述的序列同一性可以至少为90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%。两个序列之间的序列比较和同一性百分比测定可以通过National Center For Biotechnology Institute网站上的BLASTN/BLASTP算法来进行。

[0114] 在抗体分子中, 轻链的三个高变区和重链的三个高变区在三维空间中以相对彼此的位置排列以形成抗原结合表面。抗原结合表面与所结合抗原的三维表面互补, 且每条重链和轻链的三个高变区均被称作“互补决定区”或“CDR”。氨基酸向每个结构域的分配是根据Kabat《免疫学感兴趣的蛋白质的序列》(美国国立卫生研究院, 马里兰州贝塞斯达(1987和1991))或Chothia和Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), Chothia等, *Nature* 342: 878-883 (1989) 定义。

[0115] 本发明的“抗体”是指特异性地识别并结合抗原的多肽或多肽复合物。抗体可以是完整抗体和其任何抗原结合片段或单链。本发明的“抗体”包括含有Ig分子的具有结合抗原的生物活性的至少一部分的任何蛋白质或肽。本发明“抗体”的实例包括但不限于重链或轻链的CDR或其配体结合部分、重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、框架区或其任何部分。

[0116] 本发明所述的“抗原结合片段”包括具有抗原结合活性的Fab片段、Fab' 片段、F(ab')<sub>2</sub>片段及与人CRTAM或PD-L1结合的Fv片段、scFv片段。Fv片段含有抗体第二重链可变区和第二轻链可变区, 但没有恒定区, 并具有全部抗原结合位点的最小抗体片段。一般地, Fv抗体还包含在VH和VL结构域之间的多肽接头, 且能够形成抗原结合所需的结构。也可以用不同的连接物将两个抗体可变区连接成一条多肽链, 称为单链抗体或单链Fv (scFv)。本发明的抗CRTAM或抗PD-L1抗体可以是单链可变区片段 (scFv), 其源自抗体的单链多肽, 保留了结合抗原的能力。scFv的实例包括通过重组DNA技术形成的抗体多肽, 其中免疫球蛋白重链 (H链) 和轻链 (L链) 片段的Fv区经由间隔序列连接。制备scFv的各种方法是本领域技术人员所熟知的。

[0117] 本发明所述的抗体指免疫球蛋白分子或其免疫活性部分, 即包含特异性结合抗原 (与其免疫反应) 的抗原结合位点的分子。“特异性结合”指抗体与抗原的一种或多种抗原决定簇反应而不与其他多肽反应或以很低的亲和性 ( $K_d > 10^{-6}$ ) 结合其他多肽。抗体包括但不限于多克隆、单克隆、嵌合、dAb (结构域抗体)、单链、Fab、Fab' 和F(ab')<sub>2</sub>片段、Fv、scFv及Fab表达文库。单克隆抗体 (mAb) 是由单一的克隆细胞株得到的抗体, 所述的细胞株不限于真核的、原核的或噬菌体的克隆细胞株。单克隆抗体或抗原结合片段可以用如杂交瘤技术、重组技术、噬菌体展示技术及合成技术如CDR grafting或其它现有技术进行重组得到。

[0118] 本发明所述的“双特异性抗体”指对至少两种不同抗原具有结合特异性的单克隆

抗体。

[0119] 本发明所述的“肽接头”可以是包括1至10,特别是2至50个任何氨基酸的那些,并且可以包括任何种类的氨基酸而没有任何限制。

### 附图说明

[0120] 图1为双抗Ate-C110-HK结构示意图。

[0121] 图2为双抗Ate-C94-scFv结构示意图。

### 具体实施方式

[0122] 下面代表性的实施例是为了更好地说明本发明,而非用于限制本发明的保护范围。以下实施例中未注明条件的实验方法通常按照常规条件,如冷泉港的抗体技术实验手册、分子克隆手册等,或按照原料或商品制造厂商所建议的条件进行。实施例中使用的材料、试剂如无特殊说明均为商购获得。

[0123] 实施例1: CRTAM抗体相关抗原蛋白及阳性对照抗体的制备

[0124] 1、抗原蛋白及阳性对照抗体的表达载体构建

[0125] (1) 抗原蛋白的表达载体构建

[0126] 合成编码人源CRTAM蛋白全长的基因片段,氨基酸序列设计如SEQ ID NO:38所示。将其核苷酸序列克隆至真核表达质粒pTargetT上,获得其表达质粒pT-hCRTAM。

[0127] 合成编码猴源CRTAM蛋白全长的基因片段,氨基酸序列设计如SEQ ID NO:39所示。将其核苷酸序列克隆至真核表达质粒pTargetT上,获得其表达质粒pT-cCRTAM。

[0128] 融合的人源CRTAM蛋白胞外区和mIgG1-Fc标签的氨基酸序列如SEQ ID NO:40所示。对人源CRTAM蛋白胞外区序列进行密码子优化后,合成带有标签的hCRTAM-mFc的核苷酸序列,并将克隆至真核表达质粒pHR上,获得其表达质粒pHR-hCRTAM-mFc。

[0129] 融合的人源CRTAM蛋白胞外区和hIgG1-Fc或His标签的氨基酸序列如SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42所示,对上述氨基酸序列进行密码子优化后合成带有标签的hCRTAM-hFc和hCRTAM-His的核苷酸序列,并将其分别克隆至真核表达质粒pHR上,获得其表达质粒pHR-hCRTAM-hFc、pHR-hCRTAM-His。

[0130] 融合的猴源CRTAM蛋白胞外区和mIgG1-Fc标签的氨基酸序列如SEQ ID NO:43所示。对猴源CRTAM蛋白胞外区序列进行密码子优化后,合成带有标签的cCRTAM-mFc的核苷酸序列,并将克隆至真核表达质粒pHR上,获得其表达质粒pHR-cCRTAM-mFc。

[0131] 融合的猴源CRTAM蛋白胞外区和hIgG1-Fc或His标签的氨基酸序列如SEQ ID NO:44和SEQ ID NO:45所示,对上述氨基酸序列进行密码子优化后合成带有标签的cCRTAM-hFc和cCRTAM-His的核苷酸序列,并将其分别克隆至真核表达质粒pHR上,获得其表达质粒pHR-cCRTAM-hFc、pHR-cCRTAM-His。

[0132] 融合的鼠源CRTAM蛋白胞外区和mIgG1-Fc标签的氨基酸序列如SEQ ID NO:46所示。对鼠源CRTAM蛋白胞外区序列进行密码子优化后,合成带有标签的mCRTAM-mFc的核苷酸序列,并将克隆至真核表达质粒pHR上,获得其表达质粒pHR-mCRTAM-mFc。

[0133] 融合的鼠源CRTAM蛋白胞外区和hIgG1-Fc或His标签的氨基酸序列如SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48所示,对上述氨基酸序列进行密码子优化后合成带有标签的mCRTAM-hFc

和mCRTAM-His的核苷酸序列,并将其分别克隆至真核表达质粒pHR上,获得其表达质粒pHR-mCRTAM-hFc、pHR-mCRTAM-His。

[0134] (2) 配体蛋白的表达载体构建

[0135] 融合的人源CADM1蛋白胞外区和mIgG1-Fc标签的氨基酸序列如SEQ ID NO:49所示,对上述氨基酸序列进行密码子优化后合成带有标签的CADM1-mFc的核苷酸序列。将其克隆至真核表达质粒pHR上,获得其表达质粒pHR-CADM1-mFc。

[0136] 融合的人源CADM1蛋白胞外区和hIgG1-Fc或His标签的氨基酸序列如SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51所示,对上述氨基酸序列进行密码子优化后合成带有标签的CADM1-hFc和CADM1-His的核苷酸序列,并将其分别克隆至真核表达质粒pHR上,获得其表达质粒pHR-CADM1-hFc、pHR-CADM1-His。

[0137] (3) 阳性对照抗体的表达载体构建

[0138] 使用PCT申请W02019/086878中公开的人源化抗体5A11(本文简称5A11)作为阳性对照抗体。参照W02019/086878中公开的方法制备5A11。5A11的氨基酸序列如下所示:

[0139] 5A11重链氨基酸序列:SEQ ID NO:52;

[0140] 5A11轻链氨基酸序列:SEQ ID NO:53;

[0141] 对5A11抗体所对应的氨基酸序列进行密码子人工优化,将其轻、重链基因片段分别克隆到真核表达质粒pHR上,获得5A11的重链真核表达质粒pHR-5A11-hG1m,轻链表达质粒pHR-5A11-hλ。

[0142] 2、抗原蛋白的表达与纯化

[0143] (1) 表达抗原蛋白的稳定转染细胞株构建

[0144] 将真核表达质粒pT-hCRTAM在160V电压,15msec的方形脉冲下以电转的方式转染到CHO-K1细胞(中国科学院上海细胞生物学研究所),置于37℃,5%CO<sub>2</sub>浓度的培养箱中培养。24h后采用含1000μg/mL G418(Gibco,#10131-027)的培养基进行加压培养。转染16天后采用流式细胞术检测转染pool的阳性率,将阳性率较高的pool的细胞进行铺板(按照1×10<sup>6</sup>个/mL的细胞密度,100μL/孔,铺96孔板),采用5A11抗体和Goat pAb to Hu IgG(PE)(Abcam,ab98596)抗体与细胞孵育,以流式细胞仪(ACEABIO,Novocyte 2060R)检测392nm波长下mean值,使用GraphPad生成进行数据分析。将阳性细胞株进行亚克隆,挑选出高表达hCRTAM蛋白的克隆化的CHO-K1细胞株,命名为CHO-K1-hCRTAM。

[0145] 将真核表达质粒pT-cCRTAM在160V电压,15msec的方形脉冲下以电转的方式转染到CHO-K1细胞(中国科学院上海细胞生物学研究所),置于37℃,5%CO<sub>2</sub>浓度的培养箱中培养。24h后采用含1000μg/mL G418(Gibco,#10131-027)的培养基进行加压培养。转染16天后采用流式细胞术检测转染pool的阳性率,将阳性率较高的pool的细胞进行铺板(按照1×10<sup>6</sup>个/mL的细胞密度,100μL/孔,铺96孔板),采用5A11抗体和Goat pAb to Hu IgG(PE)(Abcam,ab98596)抗体与细胞孵育,以流式细胞仪(ACEABIO,Novocyte 2060R)检测392nm波长下mean值,使用GraphPad生成进行数据分析。将阳性细胞株进行亚克隆,挑选出高表达cCRTAM蛋白的克隆化的CHO-K1细胞株,命名为CHO-K1-cCRTAM。

[0146] (2) 标签抗原蛋白的表达

[0147] 在1L细胞培养瓶中接种密度为1×10<sup>6</sup>个/ml的293E细胞(来源于ATCC),加入新鲜的预热的FreeStyle293培养基,使接种后总体积达到250mL,置37℃,8%CO<sub>2</sub>,加湿的细胞摇

床中100rpm培养过夜。取7.5mL FreeStyle293培养基,加入1mg/mL的PEI溶液500 $\mu$ L,混合均匀,静置5min,同时取250 $\mu$ g待转染质粒加入8mL FreeStyle293培养基中,混合均匀,静置5min,其中标签抗原蛋白质粒pHR-hCRTAM-mFc、pHR-hCRTAM-hFc、pHR-hCRTAM-His、pHR-cCRTAM-mFc、pHR-cCRTAM-hFc、pHR-cCRTAM-His、pHR-mCRTAM-mFc、pHR-mCRTAM-hFc、pHR-mCRTAM-His、pHR-CADM1-mFc、pHR-CADM1-hFc、pHR-CADM1-His分别转染,阳性对照抗体5A11重链质粒pHR-5A11-hG1m和轻链质粒pHR-5A11-h $\lambda$ 按照质量比1.1:1共同转染。将PEI与FreeStyle293培养基的混合溶液加入到质粒中,混合均匀,室温静置20min,然后加入细胞培养物中,置37 $^{\circ}$ C,8% CO<sub>2</sub>,加湿的细胞摇床中100rpm培养。在细胞转染后第1天和第3天对细胞进行补料,每瓶加入12.5mL的OPM-CHO PFF05(上海奥浦迈生物科技有限公司,F81279)、5mL的葡萄糖(母液浓度为180g/L)和2.5mL的谷氨酰胺(母液浓度为200mM)。当细胞活力降至75%时,收集细胞上清。将细胞培养物2000rpm离心5min,收集上清,再6000rpm离心20min,收集上清,分别使用0.45 $\mu$ m和0.22 $\mu$ m的滤杯过滤,收集滤液保存于4 $^{\circ}$ C冰箱待纯化。

[0148] (3) 亲和层析柱纯化

[0149] 利用AKTA(GE,AKTApure-150)根据蛋白性质采用亲和层析柱进行纯化。

[0150] 实施例2:抗CRTAM单克隆抗体的制备

[0151] 1、杂交瘤单克隆的制备

[0152] (1) 动物免疫

[0153] 采用不同标签的hCRTAM抗原蛋白与佐剂共同免疫实验动物,或采用CHO-K1-hCRTAM细胞株进行细胞免疫。实验动物包括Balb/c品系小鼠、SJL品系小鼠和SD大鼠。蛋白免疫:小鼠免疫按照首次免疫50 $\mu$ g抗原免疫一只小鼠,后期均使用抗原蛋白25 $\mu$ g/只;SD大鼠免疫按照首次免疫100 $\mu$ g抗原免疫一只大鼠,后期均使用抗原蛋白50 $\mu$ g/只。免疫佐剂可以是弗氏佐剂(Sigma)或Quick Antibody-Mouse5W(Q5W,北京博奥龙免疫技术有限公司)。采用弗氏佐剂乳化抗原,将不同标签的hCRTAM抗原蛋白样品逐滴加入到佐剂溶液中,边滴加边涡旋以充分混合,佐剂使用剂量参考说明书进行。混合均匀形成油包水的乳状后免疫。采用Quick Antibody-Mouse5W作为佐剂,将不同标签的hCRTAM抗原蛋白样品与Quick Antibody-Mouse5W按照1:1的体积比进行混合,混匀后即采用肌肉注射的方式,免疫SD大鼠。细胞免疫:CHO-K1-hCRTAM细胞使用PBS重悬,小鼠免疫按照 $1 \times 10^7$ 个细胞/只;SD大鼠免疫按照 $2 \times 10^7$ 个细胞/只。

[0154] (2) 杂交瘤融合

[0155] 脾细胞的获取和制备:将加强免疫后的小鼠/大鼠处死后浸泡75%的酒精中,解剖取出脾脏,用研磨棒研磨后,经细胞筛网过滤后制备成单细胞悬液。将脾细胞悬液2000rpm离心5min,弃上清。加入2mL红细胞裂解液,室温裂解红细胞2min,加入PBS至20mL,1500rpm离心7min,弃上清,重悬后进行活细胞计数。收集培养瓶中的Sp2/0细胞,1000rpm离心5min后弃上清,重悬后进行活细胞计数。按脾细胞:Sp2/0细胞=1.6:1的比例混合细胞,1500rpm离心7min后弃上清。用20mL电转缓冲液重悬细胞,1500rpm离心7min。弃上清,重复一次。分别用适量电转缓冲液重悬细胞,保证细胞浓度 $2 \times 10^7$ 个细胞/mL左右。把细胞悬液加入9mL电转融合槽中融合。融合后将细胞悬液转入到含有20%FBS的15mL RPMI 1640完全培养基中,室温放置20min。用含 $1 \times$ HAT、 $1 \times$ BIOMYC3、20%FBS的RPMI 1640培养基重悬融合细胞。

按100 $\mu$ L/孔将细胞悬液加到若干块96孔细胞培养板中,保证每孔细胞量约为 $4 \times 10^4$ 个细胞/孔,置于37 $^{\circ}$ C细胞培养箱中培养。5天后补加100 $\mu$ L/孔RPMI 1640完全培养基(含20% FBS,1 $\times$ HAT,1 $\times$ BIOMYC-3)。

[0156] (3) 杂交瘤及亚克隆筛选

[0157] 融合一周后,取杂交瘤母克隆的细胞培养上清,通过ELISA筛选结合hCRTAM蛋白和cCRTAM蛋白的杂交瘤母克隆,进一步通过流式细胞术筛选出能结合CHO-K1-hCRTAM细胞株的母克隆。

[0158] 通过ELISA和FACS筛选出结合能力较强的母克隆,利用有限稀释法将阳性母克隆进行亚克隆,培养一周后利用ELISA检测亚克隆上清与hCRTAM蛋白的结合活性,进而获得分泌抗hCRTAM抗体的单克隆细胞株。选取两个较好的单克隆细胞株,分别标记为C94、C110。

[0159] 2、单克隆抗体的制备

[0160] 根据亚克隆上清活性分析结果确定单克隆抗体细胞株,将其扩大培养。培养条件是含有10%FBS、1 $\times$ NAEE、1 $\times$ 丙酮酸钠、1%青链霉素双抗的1640培养基。待细胞汇合度大于>80%时,进将细胞传代扩培,待培养至约50mL时收集上清,纯化抗体。获得抗体经SDS-PAGE凝胶电泳确定纯度良好。

[0161] 3、单克隆抗体测序

[0162] 将经亚克隆操作的阳性杂交瘤细胞进行扩大培养,取适量细胞按RNeasy Plus Mini Kit(Qiagen,74134)试剂盒说明书提取总RNA,利用Prime Script 1st strand cDNA Synthesis Kit(Takara,6110A)反转录试剂盒合成cDNA第一条链。

[0163] 根据抗体可变区两端保守序列设计通用引物(5'端含有用于与真核表达载体发生同源重组的同源臂序列),以cDNA为模板进行抗体可变区基因的PCR扩增,从而分别获得鼠抗轻链与重链可变区的基因片段;设计引物(参考文献:1.Anke Krebber,Susanne Bornhauser,Jorg Burmester et al.Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system.Journal of Immunological Methods,1997,201:35-55;2.Simon Koren Miha Kosmač Anja Colja Venturini et al. Antibody variable-region sequencing as a method for hybridoma cell-line authentication,2008,78:1071-1078),进行DNA测序获得序列。鼠抗C94的重链氨基酸序列为SEQ ID NO:54,轻链氨基酸序列SEQ ID NO:55。鼠抗C110的重链氨基酸序列为SEQ ID NO:56,轻链氨基酸序列SEQ ID NO:57。

[0164] 实施例3:抗CRTAM嵌合抗体的构建

[0165] 将纯化后(纯化步骤见实施例1)的小鼠抗体重链与轻链可变区基因片段分别与线性化的含有人抗体重链或轻链恒定区的真核表达质粒pHR-hG1m/pHR-h $\lambda$ 共转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞。将混合液均匀涂布于含有氨苄抗生素的琼脂平板表面,于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱倒置过夜培养后分别挑取若干单菌落进行DNA测序。将测序正确的嵌合抗体分别标记为C94CHI、C110CHI。抗体C94CHI、C110CHI的重链可变区氨基酸序列和轻链可变区氨基酸序列与相应的鼠源抗体C94、C110相同。

[0166] 将嵌合抗体重轻链质粒共转染HEK293E细胞,表达纯化获得嵌合抗体,然后进行纯度检测、活性分析及亲和力测定。

[0167] 实施例4:抗CRTAM人源化抗体的构建及生产

[0168] 根据嵌合抗体的免疫活性分析,对嵌合抗体C94CHI、C110CHI进行人源化抗体改造。

[0169] 抗体的人源化改造,首先是通过与免疫基因数据库(IMG)中的小鼠抗体序列进行比对,确认C94CHI、C110CHI抗体可变区的鼠源种系,经过同源比对,C94CHI、C110CHI抗体的重链可变区序列的FR区分别与小鼠抗体种系基因(IGHV5-9-1\*01、IGHV1-85\*01)最为相似;抗体轻链可变区的FR序列则分别与小鼠抗体(IGKV10-96\*01、IGKV1-110\*01)最为相似。以C94CHI、C110CHI抗体框架区序列FR1-FR3作为模板,在人框架区库中寻找3D结构相似但是免疫原性较低的全人框架替代C94CHI、C110CHI的FR1-FR3序列,重链/轻链全长序列进行3D建模并和原抗体重链/轻链序列进行结构比对分析,综合考虑抗原性和3D结构相似度,选择C94CHI的4条人源化重链可变区和4条人源化轻链可变区、C110CHI的4条人源化重链可变区和5条人源化轻链可变区进行下一步优化。C94CHI、C110CHI的人源化抗体非CDR区序列均达到95%以上人源化。

[0170] 挑选纯度、活性和亲和力均较好的人源化抗体,分别标记为HuC94、HuC110A。利用定点突变的方法,将人源化抗体HuC110A轻链可变区第34位G基因突变为K(参见SEQ ID NO: 25),提高抗体稳定性,标记为HuC110。序列见表1。

[0171] 表1抗CRTAM人源化抗体序列

人源化抗体	重链可变区 氨基酸序列	轻链可变区 氨基酸序列	HCDR1、HCDR2、 HCDR3	LCDR1、LCDR2、 LCDR3
[0172] HuC94	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO: 1、2、 3	SEQ ID NO:4、5、6
HuC110A	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:58	SEQ ID NO: 7、8、 9	SEQ ID NO: 10、11、 12
HuC110	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO: 7、8、 9	SEQ ID NO: 10、11、 12

[0173] 考虑到抗体的功能与稳定性,选择合适的抗体亚型骨架与优化后的人源化抗体可变区进行匹配,构建完整的人源化抗体。将人源化抗体轻链与重链可变区氨基酸序列反转录成相对应的核苷酸序列,根据表达宿主进行密码子优化,并生成相邻片段之间含有互补序列的寡核苷酸片段,通过Overlap PCR将寡核苷酸片段退火后连接起来,再利用特异性引物(5'端含有用于与真核表达载体发生同源重组的同源臂序列)扩增出完整的轻链与重链可变区核苷酸片段;将纯化后的轻链可变区核苷酸片段与线性化的含有人 $\kappa$ 轻链恒定区的真核表达质粒共转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞,将纯化后的重链可变区核苷酸片段与人IgG重链恒定区的真核表达质粒共转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞,分别将转化质粒的感受态细胞均匀涂布于含有氨苄抗生素的琼脂平板表面,于37℃恒温培养箱过夜培养后分别挑

取若干单菌落进行DNA测序。

[0174] 将测序正确的阳性克隆接种于含有氨苄抗生素的2×YT液体培养基中,于37℃振荡培养12小时以上,然后收集菌体进行质粒提取,从而获得人源化抗体轻链与重链表达质粒,使用核酸定量分析仪检测质粒的浓度与纯度。

[0175] 将质粒转染HEK293E细胞,表达纯化获得大量抗体,进行纯度检测、活性分析及亲和力的检测。完整的人源化抗体序列见表2。

[0176] 表2抗CRTAM人源化抗体完整序列

	人源化抗体	重链氨基酸序列	轻链氨基酸序列
[0177]	HuC94	SEQ ID NO:59	SEQ ID NO:60
	HuC110	SEQ ID NO:61	SEQ ID NO:62

[0178] 实施例5:抗CRTAM抗体与人CRTAM结合活性测定(ELISA)

[0179] 采用ELISA分析抗体的结合活性。将hCRTAM-His蛋白(1.5μg/mL,50μL/孔,实施例1中制得)包被到96孔酶标板,于37℃孵育2h。用1×PBST清洗3次后用含5%脱脂牛奶的PBST 37℃封闭2h。用1×PBST清洗3次后,本发明的抗CRTAM抗体作为一抗从10μg/mL开始,5倍梯度稀释加入酶标板(50μL/孔),共8个浓度,浓度分别为10000ng/mL、2000ng/mL、400ng/mL、80ng/mL、16ng/mL、3.2ng/mL、0.64ng/mL、0.128ng/mL,37℃孵育1.5h,对照抗体为5A11(实施例1中制得);用1×PBST清洗3次后拍干,二抗使用Anti-Human IgG HRP(Jackson,109-035-003,1:5000,50μL/孔),37℃孵育1h。用1xPBST清洗5次后拍干,加入单组分TMB显色液(索莱宝,PR1200,50μL/孔),避光显色约5min,加入2M硫酸(50μL/孔)终止,使用酶标仪(thermo,Multiskan FC)读取OD450值。使用GraphPad生成EC50,结果如表3所示。

[0180] 表3抗CRTAM人源化抗体与人CRTAM结合活性

抗体名称	HuC94	HuC110	5A11
EC50 (ng/mL)	11.41	11.17	38.18

[0182] 实验结果显示,本发明的抗CRTAM抗体具有较好的与人CRTAM结合的能力。

[0183] 实施例6:抗CRTAM抗体与细胞表面食蟹猴CRTAM结合活性测定(FACS)

[0184] 采用FACS分析抗体与CHO-K1-cCRTAM细胞表面的cCRTAM的结合活性。CHO-K1-cCRTAM细胞消化后,用2%FBS-PBS的溶液重悬,计数。将上述细胞按照每孔 $1.5 \times 10^5$ 个细胞的方式铺细胞板,本发明的抗CRTAM抗体作为一抗从20μg/ml开始,5倍梯度稀释加入细胞板,共8个浓度,浓度分别为20000ng/mL、4000ng/mL、800ng/mL、160ng/mL、32ng/mL、6.4ng/mL、1.28ng/mL、0.26ng/mL,4℃条件下孵育1.5h;使用PBS清洗三次细胞后,二抗使用PE-Anti-Human IgG(Biolegend,Cat.No.409303,1.25μl/孔)4℃条件下孵育1h;PBS三次洗涤后使用流式细胞仪检测抗体与细胞表面结合产生的荧光强度,结果如表4所示。

[0185] 表4抗CRTAM抗体与细胞表面食蟹猴CRTAM结合活性

抗体名称	HuC94	HuC110
EC50 (ng/mL)	35.02	50.69

[0187] 实验结果显示,本发明的人源化抗CRTAM抗体具有较好的与细胞表面CRTAM结合能力。

[0188] 实施例7:抗CRTAM抗体与5A11对人CRTAM的表位竞争活性测定(ELISA)

[0189] 采用ELISA法分析本发明的抗CRTAM抗体与5A11对人CRTAM的表位竞争活性。将hCRTAM-His蛋白(2 $\mu$ g/mL, 50 $\mu$ L/孔, 实施例1中制得)包被到96孔酶标板, 于37 $^{\circ}$ C孵育2h。用1x PBST清洗3次后用含5%脱脂牛奶的PBST 37 $^{\circ}$ C封闭2h。同时用Biotin-NHS ester<sup>TM</sup> (Biovsion公司, 2347-50) 标记本发明的抗CRTAM抗体, 标记好的抗体分别命名为HuC94-biotin、HuC110-biotin。封闭好的酶标板用1 x PBST清洗3次后, 分别配置浓度为1 $\mu$ g/mL的HuC94-biotin、HuC110-biotin溶液, 以上述溶液为稀释液分别稀释一抗, 本发明的抗CRTAM抗体(竞争阳性对照)与5A11作为一抗从100 $\mu$ g/mL开始, 5倍梯度稀释加入酶标板(50 $\mu$ L/孔), 共8个浓度, 浓度分别为100000ng/mL、20000ng/mL、4000ng/mL、800ng/mL、160ng/mL、32ng/mL、6.4ng/mL、1.28ng/mL, 37 $^{\circ}$ C孵育1.5h; 用1x PBST清洗3次后拍干, 二抗使用Streptavidin-HRP (BD, 554066, 1:10000, 50 $\mu$ L/孔), 37 $^{\circ}$ C孵育1h。用1xPBST清洗5次后拍干, 加入单组分TMB显色液(索莱宝, PR1200, 50 $\mu$ L/孔), 避光显色约5min, 加入2M硫酸(50 $\mu$ L/孔)终止, 使用酶标仪(thermo, Multiskan FC)读取OD450值。使用GraphPad生成IC50。

[0190] 实验结果显示, 本发明的人源化抗CRTAM抗体HuC94、HuC110与5A11几乎不存在表位竞争, 不阻断5A11与人CRTAM的结合, 表明本发明的人源化抗CRTAM抗体与5A11对CRTAM的结合表位完全不同。

[0191] 实施例8:抗CRTAM抗体与人CRTAM蛋白的亲和力测定

[0192] 利用ForteBio Octet对本发明的人源化抗CRTAM抗体结合抗原hCRTAM-His(实施例1中制得)的亲和力进行测定。将抗CRTAM抗体用SD缓冲液(PBS+0.02% Tween20+0.1% BSA)稀释到浓度10 $\mu$ g/mL, 抗原hCRTAM-His用SD缓冲液4倍浓度梯度稀释, 使其浓度为12 $\mu$ g/mL、3 $\mu$ g/mL、0.75 $\mu$ g/mL、0 $\mu$ g/mL, 选用AHC传感器固化抗体, 按ForteBio Octet RED96的操作规程进行亲和力测定, 具体参数及实验结果如表5所示。

[0193] 表5抗CRTAM抗体与人CRTAM蛋白的亲和力测定

	抗体	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
[0194]	HuC94	3.72E-09	9.35E+04	3.48E-04
	HuC110	4.28E-09	4.63E+04	1.98E-04
	5A11	4.56E-08	6.08E+04	2.77E-03

[0195] 实验结果显示, 本发明的人源化抗CRTAM抗体的亲和力显著优于5A11, 显示出更持久的与人CRTAM蛋白结合能力。

[0196] 实施例9:抗CRTAM抗体的体外药效检测

[0197] 采用SEB(葡萄球菌肠毒素B)刺激健康人PBMC的方法来检测抗CRTAM抗体的体外药效。

[0198] 按所需细胞量复苏PBMC, 加到8-9ml的IMDM完全培养基中, 900g离心10min, 弃上清; 用适量培养基重悬, 用血球计数板计数, 并重悬为1M/mL, 100 $\mu$ L/孔加入96孔板中; 按4倍浓度(即40 $\mu$ g/mL), 50 $\mu$ L/孔, 用IMDM完全培养基配制待检测抗体和Isotype, 做好标记, 涡旋; 将抗体溶液加入96孔板中, 对照组加入50 $\mu$ L/孔的培养基, 96孔板置于37 $^{\circ}$ C孵箱中, 细胞和抗体孵育1h; 按4倍浓度(即200ng/mL)用IMDM完全培养基配制SEB溶液, 50 $\mu$ L/孔加入对应

孔中;96孔板置于37℃,5% CO<sub>2</sub>孵箱中孵育72h后,收集无细胞上清150μL,按一定比例稀释后,按照hIFN-γ ELISA检测试剂盒(R&D Systems® ELISA试剂盒,R&D system Cat: DY285B)说明书检测上清中IFN-γ 的浓度,结果如表6所示。

[0199] 表6抗CRTAM抗体促进PBMC释放IFN-γ

	抗体	IFN-γ 浓度( pg/mL)
[0200]	无 SEB	-236.67
	SEB (50 ng/ml)	3526.67
	IgG4 (10 μg/mL)+SEB(50 ng/mL)	3123.33
	5A11 (10 μg/mL)+SEB(50 ng/mL)	4433.33
[0201]	HuC94 (10 μg/mL)+SEB(50 ng/mL)	7576.67
	HuC110 (10 μg/mL)+SEB(50 ng/mL)	5990

[0202] 实验结果显示,与5A11相比,本发明的抗CRTAM抗体具有更好地促IFN-γ 释放能力。

[0203] 实施例10:HCC827 (de119) 人非小细胞肺癌细胞PBMC重建模型抗肿瘤实验

[0204] 1、实验材料

[0205] (1) 实验细胞及动物

[0206] HCC827 (de119) 细胞购自美国典型培养物保藏中心(ATCC);

[0207] NSG小鼠,雌性,6-8周龄,体重18-20克,购自百奥赛图(江苏)基因生物技术有限公司;

[0208] (2) 供试品及对照品

[0209] 对照品5A11由实施例1制得,用作阳性对照;对照品PBS用作阴性对照;试验前,将本发明的抗CRTAM抗体用PBS配制为1mg/mL。

[0210] 2、实验方法

[0211] HCC827 (de119) 人非小细胞肺癌细胞PBMC重建模型

[0212] 将含有 $1 \times 10^7$ 个HCC827 (de119) 细胞的50μL PBS与50μL基质胶混合后接种于小鼠的右后肢皮下,待肿瘤生长至平均体积达100mm<sup>3</sup>时开始分组。PBMC来自健康献血者的新鲜血液,于DAY1分组后给抗体前1小时进行尾静脉注射(每只小鼠注射10M的PBMC细胞)。尾静脉给药每周2次,每周两次用游标卡尺测量肿瘤直径,计算肿瘤体积,肿瘤体积的计算公式为: $V = 0.5a \times b^2$ ,a和b分别表示肿瘤的长径和短径,计算相对肿瘤增殖率(T/C)。肿瘤生长抑制率用下列公式计算: $TGI(\%) = [1 - (Ti - T0) / (Vi - V0)] \times 100$ ,其中Ti为某一天某给药组的平均肿瘤体积,T0为此给药组在开始给药时的平均肿瘤体积;Vi为某一天(与Ti同一天)溶媒对照组的平均肿瘤体积,V0为溶媒对照组在开始给药时的平均肿瘤体积。记录连续给药22天测量的肿瘤体积,用GraphPad Prism绘制瘤体积生长曲线。在实验结束后检测肿瘤重量,并计算各组的肿瘤抑制率(TGI)%,结果如表7所示。

[0213] 表7 HCC827 (de119) 人非小细胞肺癌细胞PBMC重建模型抗肿瘤结果

	抗体	剂量( mg/kg)	TGI (%)
[0214]	PBS (溶媒对照组)	0	0
	5A11	20	28.97
	HuC110	10	42.80

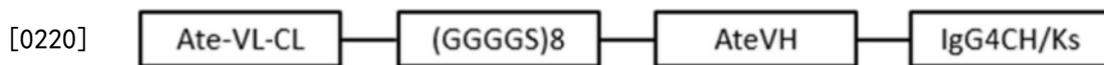
[0215] 实验结果显示,相比于5A11,本发明的抗CRTAM抗体能够更好地抑制HCC827 (de119)人非小细胞肺癌肿瘤生长。

[0216] 实施例11:抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体的构建、表达及纯化

[0217] 1.抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体表达载体的构建

[0218] (1) 运用基因工程手段构建抗CRTAM/抗PD-L1的双特异性抗体,其结构形式如图1所示。该双特异性抗体是由两条分别抗CRTAM/抗PD-L1的抗体单链通过异源二聚体而形成,其中抗PD-L1抗体的轻链通过额外添加的柔性连接肽连接至抗体重链N端,该连接肽是含甘氨酸(G)和丝氨酸(S)残基的GGGGS重复序列,包含8个GGGGS的重复序列,抗CRTAM抗体分别由一条重链和一条轻链通过链间二硫键配对而成。此外,为促进异源二聚体的形成,在抗PD-L1抗体单链的CH3 domain增加S228P/L235E/S354C/T366W突变,在抗CRTAM抗体单链的CH3 domain增加Y349C/T366S/L368A/Y407V突变。根据该结构形式,利用抗PD-L1抗体Ate (Atezolizumab,轻链可变区SEQ ID NO:21和恒定区SEQ ID NO:22)序列,通过基因合成获得抗PD-L1的抗体单链的核苷酸片段,即ScFabAteKs;利用抗CRTAM抗体HuC110(轻链可变区SEQ ID NO:25和恒定区SEQ ID NO:26)序列,通过基因合成获得抗CRTAM的抗体单链的轻链核苷酸片段,即HuC110L;利用抗CRTAM抗体HuC110(重链可变区SEQ ID NO:23)序列,通过基因合成获得抗CRTAM的抗体单链的重链核苷酸片段,即HuC110Hs。将该ScFabAteKs、HuC110Hs和HuC110L核苷酸片段(上下游均含有适当长度的同源臂)分别与线性化的真核表达质粒pHR共转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞,分别将转化质粒的感受态细胞均匀涂布于含有相应抗生素的琼脂平板表面,于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱过夜培养后分别挑取若干单菌落进行DNA测序。将测序正确的阳性克隆进行质粒提取,从而获得ScFabAteKs、HuC110Hs和HuC110L表达载体。

[0219] ScFabAteKs序列示意结构如下:



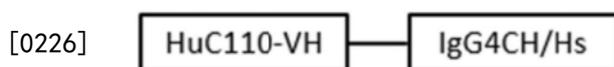
[0221] 其中Ate-VL-CL:人源化PD-L1单抗Ate轻链;

[0222] (GGGGS)8:8个GGGGS重复序列的柔性连接肽;

[0223] AteVH:人源化PD-L1单抗Ate重链可变区;

[0224] IgG4CH/Ks:含有S228P/L235E/S354C/T366W突变形成的“Knobs”结构的IgG4重链恒定区(具体序列如SEQ ID NO:20);

[0225] HuC110Hs序列示意结构如下:

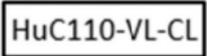


[0227] 其中HuC110VH:人源化CRTAM单抗HuC110重链可变区;

[0228] IgG4CH/Hs:含有S228P/L235E/Y349C/T366S/L368A/Y407V突变形成的“Hole”结构的

IgG4重链恒定区(具体序列如SEQ ID NO:24);

[0229] HuC110L序列示意结构如下:

[0230]  HuC110-VL-CL

[0231] 人源化CRTAM抗体HuC110轻链。

[0232] (2) 运用基因工程手段构建抗CRTAM/抗PD-L1的双特异性抗体,其结构形式如图2所示,该双特异性抗体是ScFv为元件构成的对称结构,,将抗CRTAM抗体的Fv的VH区N端通过额外添加的柔性连接肽连接至抗PD-L1抗体重链C端,该连接肽是含甘氨酸(G)和丝氨酸(S)残基的GGGGS重复序列,包含3个GGGGS的重复序列。抗CRTAM抗体的Fv区VH区C端通过额外添加的柔性连接肽连接至抗CRTAM抗体的Fv区VL的N端,该连接肽是含甘氨酸(G)和丝氨酸(S)残基的GGGGS重复序列,优选包含4个GGGGS的重复序列。根据该结构形式,利用抗PD-L1抗体Ate(重链可变区SEQ ID NO:19和恒定区SEQ ID NO:29)和抗CRTAM抗体HuC94(重链可变区SEQ ID NO:27和轻链可变区SEQ ID NO:28)序列通过基因合成获得上述结构的核苷酸片段,即Ate-IgG-HuC94-ScFv;利用抗PD-L1抗体Ate(轻链可变区SEQ ID NO:21和恒定区SEQ ID NO:22)序列,通过基因合成获得抗PD-L1的抗体单链的核苷酸片段,即Ate-L。将该Ate-IgG-HuC94-ScFv和Ate-VL核苷酸片段上下游均含有适当长度的同源臂)分别与线性化的真核表达质粒pHR共转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞,分别将转化质粒的感受态细胞均匀涂布于含有相应抗生素的琼脂平板表面,于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱过夜培养后分别挑取若干单菌落进行DNA测序。将测序正确的阳性克隆进行质粒提取,从而获得Ate-IgG-HuC94-ScFv、Ate-L表达载体。

[0233] Ate-IgG-HuC94-ScFv序列示意结构如下:

[0234] 

[0235] 其中Ate-VH:人源化PD-L1抗体重链可变区;

[0236] IgG4CH:IgG4重链恒定区(具体序列如SEQ ID NO:29);

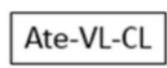
[0237] (GGGGS)3:3个GGGGS重复序列的柔性连接肽;

[0238] HuC94-VH:人源化CRTAM抗体重链可变区(具体序列如SEQ ID NO:27);

[0239] (GGGGS)4:4个GGGGS重复序列的柔性连接肽;

[0240] HuC94-VL:人源化CRTAM抗体轻链可变区(具体序列如SEQ ID NO:28)

[0241] Ate-L序列示意结构如下:

[0242]  Ate-VL-CL

[0243] 人源化PD-L1抗体轻链。

[0244] 2. 抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体在Expi-CHO细胞中的瞬时表达

[0245] 利用Expi-Fectamine CHO Transfection Kit质粒转染试剂盒将上述的ScFabAteKs、HuC110HHs和HuC110L三个表达载体共重组质粒转染Expi-CHO细胞,Ate-IgG-HuC94-ScFv和Ate-VL两个表达载体共重组质粒转染Expi-CHO细胞,在无血清培养基中培养12天后收集Expi-CHO细胞上清液,免疫印迹检测双特异性抗体的表达情况。其中,将由ScFabAteKs、HuC110HHs和HuC110L三个单链二聚化形成的双特异性抗体命名为Ate-C110-HK,将由Ate-IgG-HuC94-ScFv和Ate-VL两个单链二聚化形成的双特异性抗体命名为Ate-

C94-ScFv。

[0246] 3. 抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体的纯化

[0247] 本发明的双特异性抗体在Expi-CHO细胞表达并分泌后,采用Protein A亲和层析的方法对其进行纯化,具体方法如下:Protein A亲和层析柱用缓冲液平衡后,将超滤器浓缩过的Expi-CHO细胞培养液上清液进行进样,并以A280 (nm) 进行监测,用清洗液洗至未结合的蛋白全部被洗脱,然后用洗脱液进行洗脱,以获得相应的双特异性抗体。纯化后的双特异性抗体SEC-HPLC检测纯度进行质量鉴定后用于后续的药学研究。SEC-HPLC鉴定结果表明,双抗Ate-C110-HK和Ate-C94-ScFv的纯度均达到95%以上。

[0248] 实施例12:高表达hPD-L1、hCRTAM稳转细胞株的构建

[0249] 将hPD-L1 (人PD-L1) 序列290个氨基酸 (Primary accession:Q9NZQ7, SEQ ID NO: 36) 的真核表达质粒pTargeT-hPD-L1以电转的方式转染到CHO-K1细胞 (来自中国科学院上海细胞生物学研究所) 中,置37℃, 5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。48h后采用含500ug/ml G418的培养基加压培养。12天后采用FACS检测pool阳性率,将电转质粒后的细胞铺板 (1x10<sup>6</sup>个/ml的细胞密度, 100uL/孔), 将FITC anti-human PD-L1抗体 (SINO BIOLOGICAL, 10084-MMB6-F) 与细胞在4℃孵育60min, 以流式细胞仪读取FITC通道下mean值, 对结果进行数据分析后, 挑出阳性细胞株进行亚克隆, 挑选出克隆化的CHO-K1细胞株, 该细胞株高水平表达PD-L1分子, 命名为CHO-K1-hPD-L1。

[0250] 将含hCRTAM (人CRTAM) 序列393个氨基酸 (Primary accession:095727, SEQ ID NO:37) 的真核表达质粒pTargeT-hCRTAM以电转的方式转染到CHO-K1细胞 (来自中国科学院上海细胞生物学研究所) 中,置37℃, 5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。48h后采用含500ug/ml G418的培养基加压培养。12天后采用FACS检测pool阳性率,将电转质粒后的细胞铺板 (1x10<sup>6</sup>个/ml的细胞密度, 100uL/孔), 将PE anti-human CRTAM抗体 (SINO BIOLOGICAL, 11975-MM12-P) 与细胞在4℃孵育60min, 以流式细胞仪读取PE通道下mean值, 对结果进行数据分析后, 挑出阳性细胞株进行亚克隆, 挑选出克隆化的CHO-K1细胞株, 该细胞株高水平表达CRTAM分子, 命名为CHO-K1-hCRTAM。

[0251] 实施例13:抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体ELISA体外结合与阻断实验

[0252] 1. 抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体PD-L1结合ELISA实验

[0253] 将人PD-L1-His蛋白 (1μg/ml, 50μl/孔) 包被到96孔酶标板, 37℃孵育2h。用1xPBST清洗3次后用5%的脱脂牛奶4℃封闭过夜, 用1xPBST清洗3次。双抗浓度从133nmol/L开始, 5倍梯度稀释加入酶标板, 37℃孵1.5h, 对照抗体为Atezolizumab (Sino Biological, Cat: 68049-H001, 简写Ate); 用1xPBST清洗5次后, 加入HRP-Anti-Human IgG二抗 (Jackson, 109-035-003, 1:10000), 37℃孵育40min。用1xPBST清洗5次, 加入显色液TMB, 终止后利用酶标仪 (thermo, Multiskan FC) 读取OD450值, EC<sub>50</sub>结果见表8。

[0254] 表8双抗与人PD-L1结合活性

抗体名称	Ate	Ate-C110-HK	Ate-C94-ScFv
EC50 (nM)	0.055	0.062	0.054

[0256] 实验结果显示, 双特异性抗体Ate-C110-HK和Ate-C94-ScFv均具有较好的与人PD-L1结合的能力。与人PD-L1结合能力与Atezolizumab相当。

[0257] 2. 抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体阻断PD-1结合到细胞表面的能力

[0258] CHO-K1-hPD-L1作为PD-L1的提供者,在梯度稀释的抗CRTAM/抗PD-L1双抗存在的情况下,观察PD-L1与PD-1结合的能力情况。双特异性抗体Ate-C110-HK或Ate-C94-ScFv作为一抗,初始浓度为400nmol/L,3倍梯度稀释后,与4 $\mu$ g/mL的PD-1-mFc共同加入细胞板中,4 $^{\circ}$ C孵育1.5h。二抗使用PE-Anti-Mouse IgG,4 $^{\circ}$ C孵育1h。Atezolizumab作为阻断PD-1-mFc结合到细胞表面PD-L1的阳性对照,结果如表9所示。

[0259] 表9双抗阻断PD1与PD-L1结合测定

[0260]	抗体名称	Ate	Ate-C110-HK	Ate-C94-ScFv
	IC50 (nM)	5.65	3.35	5.41

[0261] 实验结果显示,双特异抗体Ate-C110-HK、Ate-C94-ScFv均具有阻断人PD-1与PD-L1结合的能力。

[0262] 3. 抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体CRTAM结合ELISA实验

[0263] 将人CRTAM蛋白(2 $\mu$ g/ml,100 $\mu$ l/孔)包被到96孔酶标板,37 $^{\circ}$ C孵育2h。用1xPBST清洗3次后用5%的脱脂牛奶4 $^{\circ}$ C封闭过夜,用1xPBST清洗3次。双抗浓度从200nmol/L开始,5倍梯度稀释加入酶标板,37 $^{\circ}$ C孵1.5h,对照抗体为5A11;用1xPBST清洗5次后,加入HRP-Anti-Human IgG二抗(Jackson,109-035-003,1:10000),37 $^{\circ}$ C孵育40min。用1xPBST清洗5次,加入显色液TMB,终止后利用酶标仪(thermo,Multiskan FC)读取OD450值。

[0264] 实验表明,双特异抗体Ate-C110-HK、Ate-C94-ScFv与CRTAM结合活性与单抗HuC110相当。

[0265] 实施例14:抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体与人PD-L1和CRTAM亲和力的测定(Fortebio)

[0266] 1. 抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体与人PD-L1亲和力测定实验

[0267] 将人PD-L1-His用SD缓冲液(0.02%Tween20+0.1%BSA溶液)3倍浓度梯度稀释,使其浓度为3 $\mu$ g/ml、1 $\mu$ g/ml、0.33 $\mu$ g/ml、0 $\mu$ g/ml,将所述双特异性抗体Ate-C110-HK、Ate-C94-ScFv用SD缓冲液稀释到浓度10 $\mu$ g/ml,选用AHC传感器固化抗体蛋白,按fortebio Octet RED96的操作规程进行亲和力测定,具体参数及实验结果如表10所示。

[0268] 表10双抗与人PD-L1蛋白结合的亲和力测定

	抗体	KD (M)	Kon (1/Ms)	Kdis (1/s)
[0269]	<b>Ate-C110-HK</b>	6.19E-10	4.20E+05	2.60E-04
	<b>Ate-C94-ScFv</b>	7.51E-10	4.20E+05	3.15E-04

[0270] 实验结果表明,双特异抗体Ate-C110-HK、Ate-C94-ScFv与PD-L1具有较好的亲和力。

[0271] 2. 抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体与人CRTAM亲和力测定实验

[0272] 参照实施例8的方法,利用Fortebio Octet对本发明的双特异抗体Ate-C110-HK、Ate-C94-ScFv结合抗原hCRTAM-His(实施例1中制得)的亲和力进行测定。按Fortebio Octet RED96的操作规程进行亲和力测定,具体参数及实验结果如表11所示。

[0273] 表11双抗与人CRTAM蛋白结合的亲和力测定

	抗体	KD (M)	Kon (1/Ms)	Kdis (1/s)
[0274]	<b>Ate-C110-HK</b>	4.77E-10	1.37E+05	6.53E-05
	<b>Ate-C94-ScFv</b>	6.70E-10	7.60E+04	5.09E-05

[0275] 实验结果表明,双特异抗体Ate-C110-HK、Ate-C94-ScFv与CRTAM具有较好的亲和力。

[0276] 实施例15:抗CRTAM/抗PD-L1双特异抗体SEB激活PBMC实验

[0277] 复苏PBMC,用适量IMDM培养基重悬计数后,按1M/mL,100 $\mu$ L/孔加入96孔板中;本发明提供的抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体,初始浓度为40 $\mu$ g/mL(终浓度降低4倍),10倍梯度稀释,共3个浓度,同型对照为IgG4,按50 $\mu$ L/孔加入铺有PBMC的96孔板,37 $^{\circ}$ C培养箱中孵育1h;用培养基配置400ng/mL SEB,50 $\mu$ L/孔加入96孔板中,37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育72h后,取无细胞上清120 $\mu$ L进行ELISA检测细胞因子IFN- $\gamma$ 的分泌。按ELISA检测试剂盒操作说明进行操作,随即利用酶标仪(thermo,Multiskan FC)读取OD450值。结果如表12所示。

[0278] 表12抗CRTAM/抗PD-L1双特异抗体促进PBMC释放IFN- $\gamma$

	抗体	IFN- $\gamma$ 浓度( pg/mL)
	无 SEB	-15.00
	SEB (50ng/mL)	1463.65
	Ate (10 $\mu$ g/mL)	2160.00
[0279]	HuC110 (10 $\mu$ g/mL)	2267.31
	Ate (10 $\mu$ g/mL) + HuC110 (10 $\mu$ g/mL)	3572.88
	Ate-C110-HK (10 $\mu$ g/mL)	4585.96
	Ate-C94-ScFv (10 $\mu$ g/mL)	5187.12

[0280] 实验结果显示,抗PD-L1/抗CRTAM双特异性抗体Ate-C110-HK、Ate-C94-ScFv具有很好的促进SEB激活PBMC释放细胞因子IFN- $\gamma$ 。

[0281] 实施例16:抗CRTAM/抗PD-L1双特异抗体MLR实验

[0282] 取DC细胞用1640培养基重悬计数后,按 $1 \times 10^4$ 个/孔铺于96孔细胞培养板,50 $\mu$ L/孔;取PBMC细胞用1640培养基重悬计数后,按 $2 \times 10^5$ 个/孔铺于96孔细胞培养板,100 $\mu$ L/孔。本发明提供的抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体,初始浓度为40 $\mu$ g/mL(终浓度降低4倍),10倍梯度稀释,共2个浓度,按50 $\mu$ L/孔加入铺有DC和PBMC的细胞板,37 $^{\circ}$ C孵育3d和5d。取细胞上清120 $\mu$ L进行ELISA检测细胞因子IFN- $\gamma$ 和IL-2的分泌。按ELISA检测试剂盒操作说明进行操作,其中上清4倍稀释后进行IFN- $\gamma$ 检测,3倍稀释后进行IL-2检测,随即利用酶标仪(thermo,Multiskan FC)读取OD450值。结果如表13所示。

[0283] 表13双抗对IFN- $\gamma$ 、IL-2释放的影响

	抗体	IFN- $\gamma$ 浓度( pg/mL)	IL-2 浓度( pg/mL)
[0284]	Ate (1 $\mu$ g/mL)	2213	727

	HuC110 (1 $\mu$ g/mL)	661	182
	Ate(1 $\mu$ g/mL) +HuC110(1 $\mu$ g/mL)	1867	578
[0285]	Ate-C110-HK (1 $\mu$ g/mL)	3088	653
	Ate-C94-ScFv (1 $\mu$ g/mL)	2168	647

[0286] 实验结果显示,抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体Ate-C110-HK、Ate-C94-ScFv能够使得PBMC细胞因子IFN- $\gamma$ 的释放功能增强并保持细胞因子IL-2的功能。

[0287] 实施例17:抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体诱导PBMC杀伤HCC827细胞实验

[0288] 第一天:取HCC827细胞用1640培养基重悬计数后,按 $1 \times 10^4$ 个/孔铺于96孔细胞培养板,过夜培养。复苏PBMC,计数后分瓶过夜培养,每瓶 $<10M$ ,培养基:1640+10%FBS+IL-2(10ng/mL)+1%P/S。第二天:弃去孔中旧培养基,每孔加入50 $\mu$ l新鲜培养基,对照孔平行操作。培养基:1640+2%FBS(灭活)+1%P/S。本发明提供的抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体,初始浓度为800nmol/L(终浓度降低4倍),10倍梯度稀释,共7个浓度,同型对照为IgG4,按50 $\mu$ l/孔加入预先铺有HCC827的细胞板。取第一天复苏的PBMC细胞,用1640+2%FBS(灭活)+1%P/S调整细胞为 $4 \times 10^6$ 个/mL,按照效靶比为40:1,每孔加入100 $\mu$ l,充分混匀后,于37 $^{\circ}$ C培养箱中孵育48h。按LDH试剂盒操作说明进行操作,取细胞上清120 $\mu$ l与60 $\mu$ l LDH工作液混匀,于室温避光孵育30min,随即利用酶标仪(thermo,Multiskan FC)读取OD490值。计算各组的杀伤活性(细胞毒)%,结果如表14所示。

[0289] 表14双抗诱导PBMC杀伤HCC827细胞

	抗体	杀伤活性(%)
	Ate (200nmol/L)	8.01
[0290]	IgG4 (200nmol/L)	-1.48
	Ate-C110-HK (200nmol/L)	45.34
	Ate-C94-ScFv (200nmol/L)	29.99

[0291] 实验结果显示,抗CRTAM/抗PD-L1双特异性抗体Ate-C110-HK、Ate-C94-ScFv具有较好的诱导PBMC杀伤小细胞肺癌细胞的能力。

[0292] 尽管以上已经对本发明作了详细描述,但是本领域技术人员理解,在不偏离本发明的精神和范围的前提下可以对本发明进行各种修改和改变。本发明的权利范围并不限于上文所作的详细描述,而应归属于权利要求书。

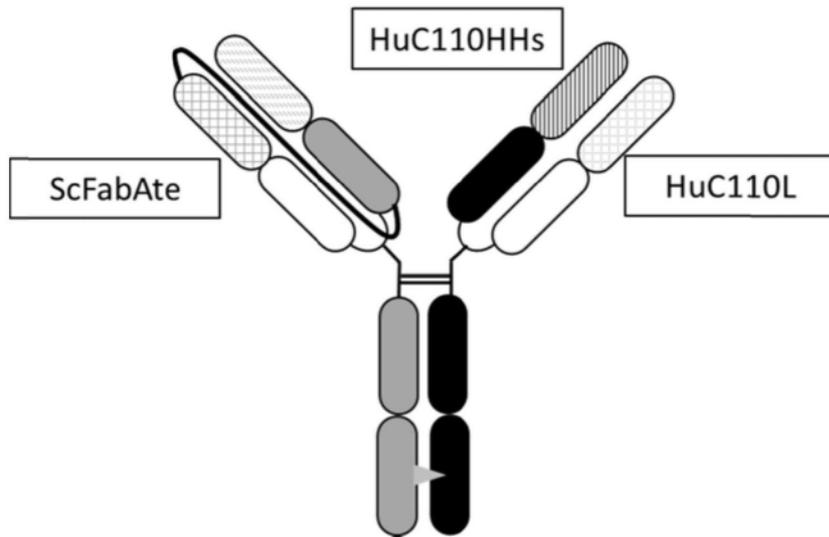


图1

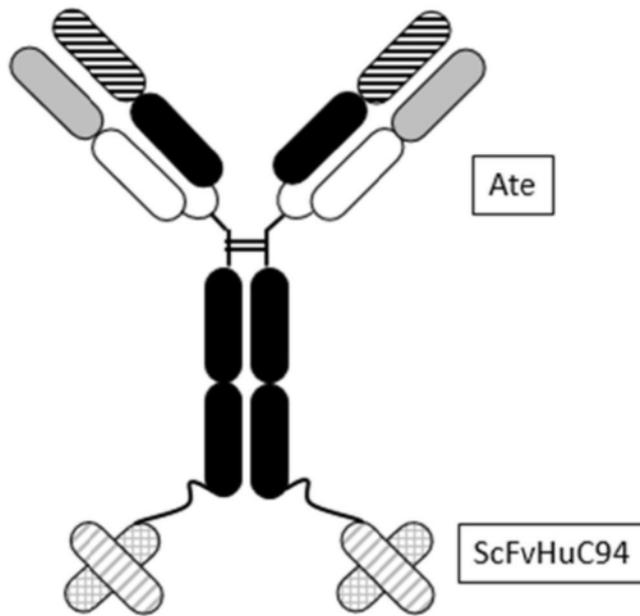


图2