

抗 CD28 抗体及其用途

相关申请的交叉引用

本申请基于申请号为 202410047645.4、申请日为 2024 年 1 月 12 日的中国专利申请提出，并要求所述中国专利申请的优先权，所述中国专利申请的全部内容在此引入本申请作为参考。

本发明提供了一种抗体或其抗原结合片段，该抗体或其抗原结合片段可以特异性结合 CD28 蛋白，例如人 CD28 蛋白。本发明还提供了特异性结合 CD28 以及一种或多种肿瘤相关抗原的多特异性结合分子，例如多特异性抗体。本发明进一步提供了编码所述抗体的核酸分子、用于表达所述抗体的表达载体、宿主细胞及其制备方法。本发明还提供了使用本发明的抗体的诊断和治疗方法。

发明背景

T 细胞活化涉及通过抗原呈递细胞(诸如树突细胞)刺激高度特异性 T 细胞受体(TCR)，该抗原呈递细胞在其 II 类主要组织相容性(MHC)复合物上呈递其特异性抗原，并且可以通过共刺激分子如 CD28 来促进。CD28 是在五个不同位点糖基化的 44KDa 二硫键连接的同源二聚体受体。CD28 在 T 细胞(人外周血中 95% 的静息 CD4⁺细胞和 50% 的静息 CD8⁺T 细胞)和浆母细胞上表达，并提供 T 细胞活化和存活所需的共刺激信号。当 T 细胞表面上的 CD28 与抗原呈递细胞上的 CD80(B7-1)和 CD86(B7-2)结合时，发生共刺激。CD80 表达在抗原呈递细胞(APC)被活化时在该细胞中上调，而 CD86 在 APC 上组成型表达。T 辅助细胞的 CD28 共刺激增强 IL2R 和 IL2 的转录(导致 T 细胞增殖)，诱导 Bcl XL 的表达(增强 T 细胞存活)，并增加 IL-4(导致 Th2 分化)、IFN γ 、IL-1、TNF、IL-5、各种趋化因子及其受体的产生。

此外，CD28 诱导其他几种共刺激分子和调节分子的表达或上调，包括 ICOS、4-1BB 和 CTLA-4，以及 T 细胞和 B 细胞相互作用所必需的 CD40L 分子。

本领域已知一些 CD28 的单克隆抗体例如 TGN1412(Tegenero, US20060188493A1)，它是一种 CD28 超激动剂单克隆抗体，它在缺乏 TCR 共刺激的情况下优先活化调节性 T(TReg)细胞。但是，当将其用于涉及 T 细胞活化的治疗目的后，该抗体的 I 期临床试验导致所有六名志愿者快速多器官衰竭，即严重的细胞因子释放综合征(细胞因子风暴)。

因此，本领域仍然有待于开发作为药物适用的安全的抗 CD28 抗体，以及基于其构建的特异性结合 CD28 以及其他靶抗原的多特异性抗原结合分子，应用于治疗。

发明内容

本发明一个方面涉及一种抗 CD28 抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段与 CD28 (例如人 CD28) 特异性结合。在一些实施方案中，本发明的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段与 CD28 (例如人 CD28) 的结合亲和力的 K_D 值小于或等于大约 50nM、45nM、40nM、35nM、30nM、25nM、20nM、18nM、15nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM 或 0.6nM，或在所述数值之间。在一些实施方案中，本发明的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段与 CD28 (例如人 CD28) 的结合亲和力的 K_D 值大于或等于大约 0.5nM。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段能够激活 CD28 信号通路。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段能够激活 T 细胞（如人外周 T 细胞，例如 CD4 或 CD8T 细胞），例如激活 T 细胞释放细胞因子，例如释放 TNF，如 TNF α ，或释放白介素，例如 IL2。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段能够激活人 T 细胞杀伤肿瘤细胞，例如激活人外周 T 细胞杀伤肿瘤细胞。

本发明的另一个方面涉及一种基于本发明的 CD28 抗体构建的多特异性结合分子（例如多特异性抗体，如双特异性抗体），其包含来自本发明抗 CD28 抗体的靶标结合区，以及任选地一个或多个其他靶标结合区（抗原结合区），例如特异性结合一个或多个肿瘤相关抗原（TAA）的靶标结合区（抗原结合区）。

在一个实施方案中，本发明涉及一种特异性结合 CD28 和一种或多种 TAA 的多特异性抗体，例如双特异性抗体。在一些实施方案中，TAA 是 CLDN18.2 或 PSMA，例如人 CLDN18.2 或人 PSMA。

在一个实施方案中，本发明涉及一种特异性结合 CD28（例如人 CD28）和 CLDN18.2（例如人 CLDN18.2）的双特异性抗体。

在一个实施方案中，本发明涉及一种特异性结合 CD28（例如人 CD28）和 PSMA（例如人 PSMA）的双特异性抗体。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体能够有效激活 CD28 信号通路。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体能够激活人外周 T 细胞，例如激活 T 细胞（例如 CD4 或 CD8T 细胞）释放细胞因子，例如释放 TNF，如 TNF α ，或释放白介素，例如 IL2。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体能够激活人 T 细胞杀伤肿瘤细胞，例如激活人外周 T 细胞杀伤肿瘤细胞。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体能够特异性结合 CD28（例如人 CD28）和 TAA（例如人 TAA，例如 CLDN18.2 或 PSMA）。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体，例如特异性结合 CD28 和 CLDN18.2 的双特异性抗体或特异性结合 CD28 和 PSMA 的双特异性抗体，具有抗肿瘤活性，例如具有体内抗肿瘤活性。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体，能够与其他治疗剂（例如其他抗体如抗 PD1 抗体）组合，用于抗肿瘤。

附图说明

图 1: 抗 CD28 嵌合抗体对 Jurkat-NFkB 激活活性检测的结果；

图 2: 抗 CD28 人源化抗体激活人外周 T 细胞激活的结果，A-B: 没有 CD3 抗体，C-D: 有 CD3 抗体；

图 3: CD28 双特异性抗体示意图；

图 4: CLDN18.2xCD28 双特异抗体激活 NFkB Jurkat Reporter 的结果；

图 5: CLDN18.2xCD28 双特异抗体介导人外周 T 细胞杀伤肿瘤细胞的结果;

图 6: CLDN18.2xCD28 双特异抗体激活外周 T 细胞释放细胞因子的结果, A: 没有 CD3 抗体, B:有 CD3 抗体;

图 7: PSMAxCD28 双特异抗体细胞表面亲和力测试的结果, A:PSMA 亲和力, B:CD28 亲和力;

图 8: PSMAxCD28 双特异抗体激活 NFkB Jurkat Reporter 的结果, A: 添加 CD3 抗体, B:添加 PSMAxCD3 双特异性抗体;

图 9: PSMAxCD28 双特异抗体介导人外周 T 细胞杀伤肿瘤细胞的结果;

图 10: PSMA xCD28 双特异抗体激活外周 T 细胞释放细胞因子 IL2 的结果, A: 没有 CD3 抗体 (-signal 1), B:有 CD3 抗体(+signal 1);

图 11: PSMA xCD28 双特异抗体在体内的单药药效检测结果, A: 给药方案; B: 检测结果;

图 12: PSMA xCD28 双特异抗体联合 PD1 抗体在体内的药效检测结果, A: 给药方案; B: 检测结果。

发明详述

应理解本发明不限于本文中描述的特定方法、方案、实施例和试剂, 因为这些可以变化。还应理解本文中使用的术语仅为了描述具体实施方案, 而并不意图限制本发明的范围, 其仅会由所附权利要求书限制。

I. 定义

除非另外定义, 本文中使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域中普通技术人员通常的理解具有相同的含义。

为了解释本说明书, 将使用以下定义, 并且只要适当, 以单数形式使用的术语也可以包括复数, 并且反之亦然。要理解, 本文所用的术语仅是为了描述具体的实施方案, 并且不意欲是限制性的。

术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小 5% (例如 4%、3%、2%或 1%) 的下限和比指定数字数值大 5% (例如 4%、3%、2%或 1%) 的上限的范围内的数字数值。

如本文所用, 术语“和/或”意指可选项中的任一项或可选项的两项或多项或全部。

在本文中当提及“第一”“第二”时, 仅为了区分两个结构域或两条链, 而不以任何方式表明两个结构域的位置。

如本文所用, 术语“包含”或“包括”意指包括所述的要素、整数或步骤, 但是不排除任意其他要素、整数或步骤。在本文中, 当使用术语“包含”或“包括”时, 除非另有指明, 否则也

涵盖由所述及的要素、整数或步骤组成的情形。例如，当提及“包含”某个具体序列的抗体可变区时，也旨在涵盖由该具体序列组成的抗体可变区。

本文所使用的术语“CD28”是指作为共刺激受体在 T 细胞上表达的抗原。人 CD28 包括例如具有如 NCBI 登录号 NP_006130.1 中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中，CD28 是人 CD28。

如本文所使用的，“结合 CD28 的抗体”或“抗 CD28 抗体”或“特异性结合 CD28 的抗体”是指这样的抗体：所述抗体能够以适当的亲和力结合单体 CD28 或其胞外结构域，或者结合二聚体 CD28 或其胞外结构域。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，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。

在一些方面，本文所述的抗 CD28 抗体也涵盖同时特异性结合 CD28 和其它靶标抗原的多特异性抗体，例如双特异性抗体。

关于人免疫球蛋白轻链和重链的氨基酸序列和核苷酸序列的一般信息在 Kabat, E.A. 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) 中给出。

本发明的多特异性抗体可以包含接头。如本文所用的术语“接头”是指使得能够直接连接多特异性抗体的不同部分的任何分子。在多特异性抗体不同部分之间建立共价连接的接头的实例包括肽接头和非蛋白质聚合物，包括但不限于聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚氧化烯或聚乙二醇、聚丙二醇的共聚物。在一些实施方案中，根据本发明的术语“肽接头”是指氨基酸的序列，其中所述序列将多特异性抗体的各个部分的氨基酸序列连接在一起。优选地，所述肽接头具有这样的长度，其足以连接两个实体，其方式使得它们维持它们相对于彼此的构象，使得不妨碍期望的活性。肽接头可以主要包括或不主要包括以下氨基酸残基：Gly、Ser、Ala 或 Thr。

术语“Fc 结构域”或“Fc 区”在本文中用来定义免疫球蛋白重链的含有至少一部分恒定区的 C 端区域。该术语包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。天然的免疫球蛋白“Fc 结构域”包含两个或三个恒定结构域，即 CH2 结构域、CH3 结构域和可选的 CH4 结构域。例如，在天然抗体中，免疫球蛋白 Fc 结构域包含源自 IgG、IgA 和 IgD 类抗体的两条重链的第二和第三恒定结构域(CH2 结构域和 CH3 结构域)；或者包含源自 IgM 和 IgE 类抗体的两条重链的第二、第三和第四恒定结构域(CH2 结构域、CH3 结构域和 CH4 结构域)。除非本文中另外说明，否则 Fc 区或重链恒定区中的氨基酸残基编号根据如 Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 中所述的 EU 编号体系（也称作 EU 索引）进行编号。然而，Fc 区的 C 端赖氨酸(Lys447)可以存在或可以不存在。两个 Fc 区可以实现二聚化以构成二聚 Fc，两个不同的 Fc 异二聚化形成异二聚 Fc。在本文中，术语“Fc 区”、“Fc 部分”和“二聚 Fc（例如异二聚 Fc）”不包括免疫球蛋白的重链可变区 VH 和轻链可变区 VL 以及重链恒定区 CH1 和轻链恒定区 CL，但在一些情况下可以包括在重链恒定区 N 端的铰链区。在一个实施方案中，人 IgG 重链 Fc 区从 Asp221 或从 Cys226 或从 Asp231 延伸至重链的羧基端。

在一个实施方案中，人 IgG1 Fc 区多肽（包含部分铰链区）包含以下氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成：

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:94); 或

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:95)。

在一个实施方案中，Fc 区来源于人的 Fc 区。在一个实施方案中，该 Fc 区包含人类恒定区的全部或部分。抗体 Fc 区直接参与补体激活、C1q 结合、C3 活化和 Fc 受体结合。在一个实施方案中，Fc 区是人 Fc 区。在一个实施方案中，Fc 区属于人 IgG4 亚类。在一个实施方案中，Fc 区属于人 IgG1 亚类。在一个实施方案中，Fc 区是人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 区。

在本文中，“异二聚体 Fc 支架”是指包含两个不同的 Fc 区或由两个不同的 Fc 区二聚化后形成的支架，其可以在其 N 末端或 C 末端连接结合抗原的结构域（例如可以与靶分子结合的抗体的重链和/或轻链可变区或抗体的抗原结合片段，或可以与靶分子结合的配体或受体的可溶性部分），用于构成多特异性抗体例如双特异性抗体。

术语“CH1 区”指抗体重链多肽的从 EU 位置 118 延伸至 EU 位置 220 的部分(EU 编号体系)。在一个实施方案中，CH1 结构域包含 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC(SEQ ID NO: 74)的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，CH1 可以包含部分铰链区。在一些实施方案中，Fc 区可以包含部分铰链区。

在本文中，根据 EU 编号系统，提及抗体 IgG 恒定区的特定氨基酸残基。例如，“S364”是指位于 EU 位置 364 的丝氨酸。在恒定区特定位置的氨基酸突变用（原始氨基酸,氨基酸位置,突变氨基酸）来表示。例如，“S364R”是指，位于 EU 位置 364 的丝氨酸(S)被精氨酸取代(R)。当提及突变组合时，组合的突变之间用加号(+)或“-”或“和”连接。“S364R+D399K”，S364R-D399K 或“S364R 和 D399K”表示 Fc 区同时包含突变 S364R 和 D399K。当在一个特定位置可以具有多种突变可能性时，在本文中，通过符号“/”来表示。例如，突变“K370T/S”表示 370 位的残基 K 可以替代为 T 或 S 残基。

对于多肽序列，“保守性改变”包括对多肽序列的置换、缺失或添加，但不实质性改变多肽序列的期望功能活性。例如，保守性置换常常导致某个氨基酸置换为化学上相似的氨基酸。提供功能上相似氨基酸的保守性置换表是本领域熟知的。以下列出了 8 组含有互为保守替换的氨基酸：1)丙氨酸(A)、甘氨酸(G)；2)天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)；3)天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)；4)精氨酸(R)、赖氨酸(K)；5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V)；6)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)；7)丝氨酸(S)、苏氨酸(T)；和 8)半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)。在一些实施方案中，术语“保守序列改变”用于指不显著影响或改变含有氨基酸序列的本发明抗体分子或结合蛋白分子的目的抗原结合特征的氨基酸修饰。例如保守修改变体相对于亲本抗体或结合蛋白保持对目的抗原至少 80%,85%,90%,95%,98%,99%或更高，例如 100-110%或更高的结合亲和力。

术语“载体”当在本文中使用时是指能够增殖与其相连的另一个核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及结合到已经引入其的宿主细胞的基因组中的载体。一些载体能够指导与其可操作相连的核酸的表达。这样的载体在本文中被称为“表达载体”。

术语“结合分子”是指能够与靶标特异性结合的任何分子，例如抗体或其抗原结合片段或融合蛋白。

术语“靶标”是指结合分子所针对的被结合物。靶标可以是抗原，也可以是配体或受体。术语“抗原”是指引发免疫应答的分子。这种免疫应答可能涉及抗体产生或特异性免疫细胞的活化，或两者兼有。技术人员将理解，任何大分子，包括基本上所有的蛋白质或肽，都可以用作抗原。此外，抗原可以衍生自重组或基因组 DNA。如本文所用，术语“表位”指抗原中与抗体分子特异性相互作用的部分。在本发明的结合分子涉及来源于抗体的靶标结合区时，“靶标”和“抗原”可以互换使用。在一些实施方案中，抗原为肿瘤相关抗原（TAA）。

本文所述的术语“肿瘤相关抗原（TAA）”优选涉及在正常条件下在有限数量的组织和/或器官中或在特定发育阶段中特异性表达并且在一个或多个肿瘤或癌组织中表达或异常表达的蛋白质。在本发明的上下文中，肿瘤相关抗原优选与癌细胞的细胞表面相关，并且优选在正常组织中不表达或仅很少表达。在一些实施方案中，所述肿瘤相关抗原是人的肿瘤相关抗原。在一些实施方案中，所述肿瘤相关抗原是 CLDN18.2，如人 CLDN18.2，或 PSMA，如人 PSMA。

如本文所用的术语“靶标结合区”是指结合分子，例如多特异性结合分子或双特异性结合分子的结合特定靶标或抗原的部分。靶标结合区可以是例如抗体或免疫球蛋白本身或抗体片段。这种靶标结合区可以具有或不具有独立于结合分子的剩余部分的三级结构，并且可以作为单独实体结合或不结合其靶标。靶标结合区还可以是受体或配体，或受体的能够结合配体的结构域。在多特异性抗体或双特异性抗体时，也将“靶标结合区”称为“抗原结合区”。

如本文所用的术语“抗原结合区”是指抗体或其抗原结合片段，例如多特异性抗体或双特异性抗体的结合特定靶标或抗原的任何部分。抗原结合区可以是例如抗体或免疫球蛋白本身或抗体片段。这种抗原结合区可以具有或不具有独立于多特异性抗体或双特异性抗体的剩余部分的三级结构，并且可以作为单独实体结合或不结合其抗原/表位。在本发明的结合分子涉及来源于抗体的靶标结合区时，“靶标结合区”和“抗原结合区”可以互换使用。

术语“多特异性结合分子”是指至少是双特异性的多特异性结合分子，例如双特异性结合分子，即所述分子包含至少第一靶标结合区和第二靶标结合区，其中所述第一靶标结合区结合一种靶标或抗原且所述第二靶标结合区结合另一抗原或靶标。根据本发明的多特异性结合分子也涵盖包含多个靶标结合区/结合位点的多特异性结合分子。在一些实施方案中，本发明的多特异性结合分子是多特异性抗体。在一些实施方案中，本发明的双特异性结合分子是双特异性抗体。

如本文所用，术语“单特异性”指，具有一个或多个靶标结合区的多肽/蛋白分子，所述每一个结合区与相同靶标的相同位点或结构或相同抗原的相同表位结合。

如本文所用，术语“多特异性”结合分子例如抗体指具有至少两个靶标结合区，所述至少两个靶标结合区中的每一个靶标结合区与相同靶标的不同位点/结构或与不同靶标结合。多特异性结合分子是对至少两个不同靶标或位点/结构具有结合特异性的结合分子。在一个实施方案中，本文提供了这样的双特异性结合分子，其具有针对第一靶标和第二靶标的结合特异性。

如本文所用，术语“多特异性”抗体指具有至少两个抗原结合区的抗体，所述至少两个抗原结合区中的每一个抗原结合区与相同抗原的不同表位或与不同抗原的不同表位结合。多特异性抗体是对至少两个不同抗原或表位具有结合特异性的抗体。在一个实施方案中，本文提供了这样的双特异性抗体，其具有针对第一抗原和第二抗原的结合特异性。

当在多特异性抗体或双特异性抗体中提及“第一抗原结合区”时，是指结合第一抗原的结合区，而不意图限制抗体中所含的该抗原结合区的个数，例如多特异性抗体或双特异性抗体中可以包含1个或1个以上的第一抗原结合区。例如，双特异性抗体包含第一抗原结合区和第二抗原结合区，但是可以包含1个或1个以上的第一抗原结合区和1个或1个以上的第二抗原结合区。

当在结合分子中提及“第一靶标结合区”时，是指结合第一靶标的结合区，而不意图限制结合分子中所含的该靶标结合区的个数，例如多特异性结合分子或双特异性结合分子中可以包含1个或1个以上的第一靶标结合区。例如，双特异性结合分子包含第一靶标结合区和第二靶标结合区，可以包含1个或1个以上的第一靶标结合区和1个或1个以上的第二靶标结合区。

当提及“靶标或抗原结合区来源于抗体”时，是指构成该靶标/抗原结合区的结合结构域为或衍生自该抗体的特异性结合抗原的结合结构域，例如，抗原结合区的特异性结合抗原的片段例如 Fab 为或衍生自该抗体的相应片段例如 Fab，或抗原结合区的重链可变区和/或轻链可变区为或衍生自该抗体的重链可变区和/或轻链可变区，或者该抗原结合区的1个、2个、3个、4个、5个或6个 CDR 为该抗体的 CDR。

术语“衍生自”是指在抗原结合区中的片段与其所来源的抗体的片段基本相同，但是在一个或多个位点处具有突变，例如取代、缺失或添加。在一个具体的实施方案中，所述突变不在抗体的 CDR 中。

术语“全长抗体”或“全长抗体”在本文中可互换使用，是指具有天然免疫球蛋白分子结构的抗体分子。在常规四链 IgG 抗体的情况下，全长抗体包含由二硫键相互连接的两条重链(H)和两条轻链(L)。在仅具有重链而缺乏轻链的重链抗体情况下，全长抗体包含由二硫键相互连接的两条重链(H)。对于常规四链 IgG 抗体，全长抗体重链通常由重链可变区(本文中缩写为 VH)和重链恒定区组成，其中重链恒定区至少包含3个结构域 CH1、CH2 和 CH3。全长抗体轻链由轻链可变区(本文中缩写为 VL)和轻链恒定区组成，其中轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。每个重链可变区 VH 和每个轻链可变区都由三个 CDR 和 4 个 FR 组成，从氨基端到羧基端以如下顺序排列：FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。术语“抗体片段”包括完整抗体的一部分。在优选的实施方案中，抗体片段为抗原结合片段。

术语抗体的“抗原结合片段”是与全长抗体不同的分子，其包含全长抗体的一部分，但其能结合全长抗体的抗原或与全长抗体(即与抗原结合片段所来源的全长抗体)竞争结合抗原。可以通过重组 DNA 技术、或通过酶或化学切割完整的抗体制备抗原结合片段。抗原结合片段包括但不限于 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、单链 Fv、双体抗体(diabody)、单域抗体(sdAb)、纳米抗体。例如，通过木瓜蛋白酶消化全长抗体能够获得 Fab 片段。此外，通过胃蛋白酶在铰链区的二硫键下面消化完全抗体产生 F(ab')₂，其为 Fab' 的二聚体，是二价的抗体片段。F(ab')₂ 可以在中性条件下通过破坏铰链区中的二硫键而被还原，由此将 F(ab')₂ 二聚体转化为 Fab' 单体。Fab' 单体基本上是具有铰链区的 Fab 片段。Fv 片段由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成。Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 可以由独立的基因编码，但是也可以使用重组方法，使用合成性连接肽连接这两个结构域以使其作为单条蛋白链产生，并且在所述单条蛋白链中 VL

区和 VH 区配对以形成单链 Fv (scFv)。

“Fab 片段”或“Fab”在本文中可互换使用，用于指，由两条多肽链组成的、包含免疫球蛋白重链可变结构域 VH、重链恒定结构域 CH1、轻链可变结构域 VL 和轻链恒定结构域 CL 的免疫球蛋白片段，其中，一条多肽链从 N 端到 C 端包含 VH 和选自 CH1 和 CL 的一个恒定区，另一条多肽链从 N 端到 C 端包含 VL 和选自 CL 和 CH1 的另一恒定区，其中所述 VH 结构域和 VL 结构域配对形成抗原结合位点。在本文中，包含重链恒定区 CH1 的 Fab 多肽链也称作“Fab 重链”；相应地，包含轻链恒定区 CL 的 Fab 多肽链也称作“Fab 轻链”。

“互补决定区”或“CDR 区”或“CDR”是抗体可变结构域中在序列上高变并且形成在结构上确定的环（“超变环”）和/或含有抗原接触残基（“抗原接触点”）的区域。CDR 主要负责与抗原表位结合。重链和轻链的 CDR 通常被称作 CDR1、CDR2 和 CDR3，从 N-端开始顺序编号。位于抗体重链可变结构域内的 CDR 被称作 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3，而位于抗体轻链可变结构域内的 CDR 被称作 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3。在一个给定的轻链可变区或重链可变区氨基酸序列中，各 CDR 的精确氨基酸序列边界可以使用许多公知的抗体 CDR 指派方案的任一种或其组合确定，所述指派方案包括例如：基于抗体的三维结构和 CDR 环的拓扑学的 Chothia (Chothia 等人, (1989) Nature 342: 877-883, Al-Lazikani 等人, “Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins”, Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997))，基于抗体序列可变性的 Kabat (Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 4 版, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)), AbM (University of Bath), Contact (University College London), 国际 ImMunoGeneTics database (IMGT) (www.imgt.cines.fr/), 以及基于利用大量晶体结构的近邻传播聚类(affinity propagation clustering)的 North CDR 定义。除非另有说明, 否则在本发明中, 术语“CDR”或“CDR 序列”涵盖以上述任一种方式或其组合确定的 CDR 序列。CDR 也可以基于与参考 CDR 序列(例如本发明示例性 CDR 之任一)具有相同的 Kabat 编号位置而确定。

在一些实施方案中，本发明中抗体的重链可变区的 CDR 分别是按照 Kabat 或 Chothia，或 Kabat 和 Chothia 组合(后文称为“Kabat& Chothia”，在 Kabat 编号系统下对应于 H26-H32)确定的。在一些实施方案中，本发明中抗体的轻链可变区的 CDR 分别是按照 Kabat 确定的。

在一个实施方案中，本发明抗 CD28 抗体中的 CDRH1 按照 Kabat& Chothia 规则定义，CDRH2、CDRH3 分别按照 Kabat 规则定义，CDRLs 分别按照 Kabat 规则定义。

CDR	Kabat 方案	Chothia 方案	Kabat& Chothia
CDRL1 (Kabat 编号系统)	L24-L34		
CDRL2 (Kabat 编号系统)	L50-L56		
CDRL3 (Kabat 编号系统)	L89-L97		
CDRH1 (Kabat 和 Chothia 编号系统)	H31-H35	H26-H32	H26-H35
CDRH2 (Kabat 编号系统)	H50-H65		
CDRH3 (Kabat 编号系统)	H95-H102		

如下进行序列之间序列同一性的计算。

为确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分数，将所述序列出于最佳比较目的比对(例如，可以为了最佳比对而在第一和第二氨基酸序列或核酸序列之一或二者中引入空位或可以为比较目的而抛弃非同源序列)。在一个优选实施方案中，为比较目的，所比对的参考

序列的长度是至少 30%、优选地至少 40%、更优选地至少 50%、60%和甚至更优选地至少 70%、80%、90%、100%的参考序列长度。随后比较在对应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置由第二序列中对应位置处的相同氨基酸残基或核苷酸占据时，则所述分子在这个位置处是相同的。

“人源化抗体”是一种保留非人类抗体的抗原特异性反应性，同时作为治疗药对人施用时无免疫原性较低的抗体。这可以例如通过保留非人类抗原结合位点并将抗体的剩余部分替换成它们的人类相应部分(即，将可变区中不参与结合的部分替换为人类抗体的相应部分)来实现。

如本文所用，术语“抗”、“结合”或“特异性结合”意指结合作用对靶标或抗原是选择性的并且可以与不想要的或非特异的相互作用区别。结合位点与特定靶标或抗原结合的能力可以通过流式细胞术或酶联免疫吸附测定法(ELISA)或本领域已知的常规结合测定法如通过放射性免疫测定(RIA)或生物膜薄层干涉测定法或 MSD 测定法或表面等离子体共振法 (SPR) 测定。

“亲和力”或“结合亲和力”指反映结合对子的成员之间相互作用的固有结合亲和力。分子 X 对其配偶物 Y 的亲和力可以通常由解离常数(K_D)表示，解离常数是解离速率常数和缔合速率常数(分别是 K_{dis} 和 K_{on})的比例。亲和力可以由本领域已知的常见方法测量。用于测量亲和力的一个具体方法是本文中的 ForteBio 动力学结合测定法。

术语“宿主细胞”指已经向其中引入外源多核苷酸的细胞，包括这类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”，这包括原代转化的细胞和从其衍生的子代。

术语“个体”或“受试者”可互换地使用，是指哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯化动物(例如，奶牛、绵羊、猫、犬和马)、灵长类(例如，人和非人灵长类如猴)、兔和啮齿类(例如，小鼠和大鼠)。特别地，个体是人。

术语“治疗”指减缓、中断、阻滞、缓解、停止、降低、或逆转疾病的症状、并发症、或生化指征的发作、缓解症状或阻止或抑制疾病、病状或病症的进一步发展。

术语“预防”包括对疾病或病症或特定疾病或病症的症状的发生或发展的抑制。

本文所述的术语“治疗剂”涵盖在预防或治疗肿瘤，例如癌症中有效的任何物质，包括化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体(例如免疫检查点分子抗体)、小分子药物或免疫调节剂(例如免疫抑制剂或激动剂)。

术语“组合疗法”是指施用两种或更多种治疗剂或治疗方式以治疗本文所述疾病。这种施用包括以基本上同时的方式共同施用这些治疗剂，例如以具有固定比例的活性成分的单一胶囊。或者，这种施用包括对于各个活性成分在多种或在分开的容器(例如片剂、胶囊、粉末和液体)中的共同施用。粉末和/或液体可以在施用前重构或稀释至所需剂量。此外，这种施用还包括以大致相同的时间或在不同的时间以顺序的方式使用每种类型的治疗剂。在任一情况下，治疗方案将提供药物组合在治疗本文所述的病症或病状中的有益作用。

术语“药物组合或组合产品”是指非固定组合产品或固定组合产品，包括但不限于药盒、药物组合物。术语“非固定组合”意指活性成分(例如，(i)本发明的抗体、以及(ii)其他治疗剂)以分开的实体被同时、无特定时间限制或以相同或不同的时间间隔、依次地施用于患者，其中这类施用在患者体内提供预防或治疗有效水平的两种或更多种活性剂。术语“固定组合”意指两种或更多种活性剂以单个实体的形式被同时施用于患者。优选对两种或更多种活性剂的

剂量和/或时间间隔进行选择,从而使各部分的联合使用能够在治疗疾病或病症时产生大于单独使用任何一种成分所能达到的效果。各成分可以各自呈单独的制剂形式,其制剂形式可以相同也可以不同。

术语“药物组合物”指这样的组合物,其以允许包含在其中的活性成分的生物学活性有效的形式存在,并且不包含对施用所述组合物的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。

术语“药用辅料”指与活性物质一起施用的稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂(完全和不完全的)),赋形剂、载体或稳定剂等。

“受试者/患者/个体样品”指从患者或受试者得到的细胞或流体的集合。组织或细胞样品的来源可以是实体组织,像来自新鲜的、冷冻的和/或保存的器官或组织样品或活检样品或穿刺样品;体液,诸如泪液、玻璃体液、脑脊液、羊膜液(羊水)、腹膜液(腹水)、或间隙液。

II. 抗 CD28 抗体

在一些实施方案中,本发明的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段包含 3 个来自重链可变区的互补决定区(CDRH),CDRH1、CDRH2 和 CDRH3。在一些实施方案中,本发明的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区(CDRL),CDRL1、CDRL2 和 CDRL3。在一些实施方案中,本发明的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段包含 3 个来自重链可变区的互补决定区(CDRH)和 3 个来自轻链可变区的互补决定区(CDRL)。

在一些方面中,本发明的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)。在一些方面中,本发明的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区(VL)。在一些方面中,本发明的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,所述重链可变区包含 3 个来自重链可变区的互补决定区(CDRH),CDRH1、CDRH2 和 CDRH3。在一些实施方案中,所述轻链可变区包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区(CDRL),CDRL1、CDRL2 和 CDRL3。

在一些实施方案中,本发明的抗 CD28 抗体的重链可变区 VH

(i)包含与 SEQ ID NO:4、5、13、23、24、69、72 或 75 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii)包含 SEQ ID NO:4、5、13、23、24、69、72 或 75 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(iii)包含与 SEQ ID NO:4、5、13、23、24、69、72 或 75 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个(优选不超过 10 个,更优选不超过 5、4、3、2、1 个)的氨基酸改变(优选氨基酸置换,更优选氨基酸保守置换)的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成,优选地,所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方案中,本发明的抗 CD28 抗体的轻链可变区 VL

(i)包含与 SEQ ID NO:9、17、19、28、70、73 或 78 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii)包含 SEQ ID NO: 9、17、19、28、70、73 或 78 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii)包含与 SEQ ID NO: 9、17、19、28、70、73 或 78 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方案中，本发明抗 CD28 抗体的 3 个来自重链可变区的互补决定区(CDRH)，CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 为

(i)如 SEQ ID NO: 4、5、13、23、69、72 或 75 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3，或

(ii)相对于(i)的序列，在所述三个 CDRH 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的序列，

其中所述 CDRH 可以分别根据任何确定 CDR 的方案来确定，例如分别根据 Kabat、AbM、Chothia、Contact 或 IMGT 方案或其组合确定；

优选地，所述 CDRH1 是根据 Kabat& Chothia 规则确定，CDRH2、CDRH3 分别是根据 Kabat 确定的。

在一些实施方案中，本发明抗 CD28 抗体的 3 个来自轻链可变区的互补决定区(CDRL)，CDRL1、CDRL2 和 CDRL3 为

(i)如 SEQ ID NO: 9、17、19、28、70、73 或 78 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3，或

(ii)相对于(i)的序列，在所述三个 CDRL 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的序列；

其中所述 CDRL 可以分别根据任何确定 CDR 的方案来确定，例如分别根据 Kabat、AbM、Chothia、Contact 或 IMGT 方案或其组合确定；

优选地，所述 CDRL1-3 分别是根据 Kabat 确定的。

在一些实施方案中，所述 CDRH1 包含 SEQ ID NO:1、10 或 20 所示的氨基酸序列，或与其相比具有 1、2 或 3 个氨基酸改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，所述 CDRH2 包含 SEQ ID NO:2、11、21 或 76 所示的氨基酸序列，或与其相比具有 1、2 或 3 个氨基酸改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，所述 CDRH3 包含 SEQ ID NO:3、12、22 或 77 所示的氨基酸序列，或与其相比具有 1、2 或 3 个氨基酸改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中,所述 CDRL1 包含 SEQ ID NO:6、14、18、25 或 71 所示的氨基酸序列,或与其相比具有 1、2 或 3 个氨基酸改变(优选氨基酸置换,优选保守置换)的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中,所述 CDRL2 包含 SEQ ID NO:7、15 或 26 所示的氨基酸序列,或与其相比具有 1、2 或 3 个氨基酸改变(优选氨基酸置换,优选保守置换)的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中,所述 CDRL3 包含 SEQ ID NO:8、16 或 27 所示的氨基酸序列,或与其相比具有 1、2 或 3 个氨基酸改变(优选氨基酸置换,优选保守置换)的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中,本发明的抗 CD28 抗体中,

CDRH1 包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;CDRH2 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;CDRH3 包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;CDRL1 包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;CDRL2 包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;和/或 CDRL3 包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;

CDRH1 包含 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;CDRH2 包含 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;CDRH3 包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;CDRL1 包含 SEQ ID NO:14 或 18 或 71 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;CDRL2 包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;和/或 CDRL3 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;

CDRH1 包含 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;CDRH2 包含 SEQ ID NO:21 或 76 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;CDRH3 包含 SEQ ID NO:22 或 77 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;CDRL1 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;CDRL2 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;和/或 CDRL3 包含 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;

CDRH1 包含 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;CDRH2 包含 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;CDRH3 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;CDRL1 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;CDRL2 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;和/或 CDRL3 包含 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;或

CDRH1 包含 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;CDRH2 包含 SEQ ID NO: 76 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;CDRH3 包含 SEQ ID NO: 77 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;CDRL1 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;CDRL2 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;和/或 CDRL3 包含 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成。

在本发明的一些具体实施方案中,本发明的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段包含 VH 和 VL,其中

所述 VH 含有 SEQ ID NO:4 或 5 或 72 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:9 或 73 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

所述 VH 含有 SEQ ID NO:4 或 5 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

所述 VH 含有 SEQ ID NO: 72 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO: 73 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

所述 VH 含有 SEQ ID NO:13 或 69 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:17 或 19 或 70 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

所述 VH 含有 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:17 或 19 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

所述 VH 含有 SEQ ID NO: 69 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO: 70 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

所述 VH 含有 SEQ ID NO:23 或 24 或 75 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:28 或 78 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

所述 VH 含有 SEQ ID NO:23 或 24 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或

所述 VH 含有 SEQ ID NO: 75 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO: 78 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段包含

- (i). 如 SEQ ID NO:4 或 5 或 72 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3,和如 SEQ ID NO:9 或 73 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3;
- (ii). 如 SEQ ID NO:13 或 69 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3,和如 SEQ ID NO:17、19 或 70 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3; 或
- (iii). 如 SEQ ID NO:23、24 或 75 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3,和如 SEQ ID NO:28 或 78 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3;

优选地，其中所述 CDRH 和 CDRL 可以分别根据任何确定 CDR 的方案来确定，例如分别根据 Kabat、AbM、Chothia、Contact 或 IMGT 方案或其组合确定；例如所述 CDRH1 是根据 Kabat& Chothia 规则确定，CDRH2、CDRH3 分别是根据 Kabat 确定的；且所述 CDRL1-3 分别通过 Kabat 方案确定。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段包含 CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2 和 CDRL3，其中

CDRH1 由 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列组成；CDRH2 由 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列组成；CDRH3 由 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列组成；CDRL1 由 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列组成；CDRL2 由 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列组成；和 CDRL3 由 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列组成；

CDRH1 由 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列组成；CDRH2 由 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列组成；CDRH3 由 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列组成；CDRL1 由 SEQ ID NO:14 或 18 或 71 的氨基酸序列组成；CDRL2 由 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列组成；和 CDRL3 由 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列组成；

CDRH1 由 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列组成；CDRH2 由 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列组成；CDRH3 由 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列组成；CDRL1 由 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列组成；CDRL2 由 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列组成；和 CDRL3 由 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列组成；或

CDRH1 由 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列组成；CDRH2 由 SEQ ID NO: 76 的氨基酸序列组成；CDRH3 由 SEQ ID NO: 77 的氨基酸序列组成；CDRL1 由 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列组成；CDRL2 由 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列组成；和 CDRL3 由 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列组成。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段包含 VH 和 VL，其中

所述 VH 含有 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

所述 VH 含有 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

所述 VH 含有 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

所述 VH 含有 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

所述 VH 含有 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

所述 VH 含有 SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

所述 VH 含有 SEQ ID NO:72 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:73 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

所述 VH 含有 SEQ ID NO:69 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:70 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或

所述 VH 含有 SEQ ID NO:75 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:78 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在本发明的一个实施方案中,本文所述的氨基酸改变包括氨基酸的置换、插入或缺失。在优选的实施方案中,本发明所述的氨基酸改变发生在 CDR 外的区域(例如在 FR 中)。更优选地,本发明所述的氨基酸改变发生在重链可变区外和/或轻链可变区外的区域。优选的,本文所述的氨基酸改变为氨基酸置换,优选地保守置换。

在一些实施方案中,本发明的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段是 IgG1 形式的抗体或 IgG2 形式的抗体或 IgG3 形式的抗体或 IgG4 形式的抗体或其抗原结合片段,例如,为 IgG1 形式的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中,本发明的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段还包含抗体重链恒定区 HC。在一些实施方案中,本发明抗 CD28 抗体或其抗原结合片段还包含抗体轻链恒定区 LC。在一些实施方案中,本发明抗 CD28 抗体或其抗原结合片段还包含重链恒定区 HC 和轻链恒定区 LC。在一些实施方案中,本发明的重链恒定区包含 Fc 区。

在一些实施方案中,本发明的抗 CD28 抗体的重链恒定区为(人)IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的恒定区,例如 IgG1 的恒定区。

在一些实施方案中,适用于本发明抗体分子的 IgG1 重链恒定区

(i) 包含与 SEQ ID NO: 29 或 79 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii) 包含 SEQ ID NO: 29 或 79 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 29 或 79 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个(优选不超过 10 个或 10 个,更优选不超过 5、4、3、2、1 个)的氨基酸改变(优选氨基酸置换,更优选氨基酸保守置换)的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中,本发明的抗 CD28 抗体的轻链恒定区为(人)Kappa 或 Lambda 轻链恒定区,例如 Kappa 轻链恒定区。

在一些实施方案中，所述轻链恒定区

(i) 包含与 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段包含抗体重链。在一些实施方案中，本发明抗 CD28 抗体或其抗原结合片段包含抗体轻链。在一些实施方案中，本发明抗 CD28 抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链。在一些实施方案中，本发明抗 CD28 抗体或其抗原结合片段包含两条重链和两条轻链。在一些实施方案中，所述重链包含重链可变区和重链恒定区，或由重链可变区和重链恒定区组成。在一些实施方案中，所述轻链包含轻链可变区和轻链恒定区，或由轻链可变区和轻链恒定区组成。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段具有以下一个或多个特性：

(i)显示与本发明抗体对 CD28 相同或相似的结合亲和力和/或特异性；

(ii)抑制(例如，竞争性抑制)本发明抗体与 CD28 的结合；

(iii)与本发明抗体结合相同或重叠的表位；

(iv)与本发明抗体竞争结合 CD28；

(v)具有本发明抗体的一个或多个生物学特性。

在一些实施方案中，抗 CD28 抗体是单克隆抗体。

在一些实施方案中，抗 CD28 抗体是人源化的。人源化可以通过如下方式实现：将非人源的天然抗体重链可变区和轻链可变区中的一个或多个氨基酸残基，尤其是构架区序列，置换成来自人的常规抗体的可变区相应位置的残基。人源化抗体的方法在本领域中是熟知的。典型地，人源化置换以保持抗体的有利结合性质的方式进行。本领域熟知用于确定人源化抗体的生物学性质，例如结合亲和力等的试验，以确定和选择适宜的人源化残基突变或突变组合。

在一个实施方案中，本发明的抗 CD28 抗体是全长抗体。在一个实施方案中，本发明的抗 CD28 抗体还涵盖其抗体片段（例如抗原结合片段），优选地选自以下的抗体片段：Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、单链抗体（例如 scFv）、(Fab')₂、单结构域抗体（例如 VHH）、dAb(domain antibody)、重链抗体或线性抗体。在一个实施方案中，本发明的抗 CD28 抗体片段是 Fab，包含本文所述的 VH 和 VL，以及 CH1 和 CL。

在一个实施方案中，本发明的抗 CD28 抗体还可以是双特异性抗体或多特异性抗体，其特异性结合 CD28，以及一种或多种其他抗原（例如 TAA）。

III. 多特异性结合分子

在本发明的一个方面，本发明涉及多特异性结合分子，其能够特异性结合 CD28，以及特异性结合一个或多个其他靶标或抗原。在一些实施方案中，所述其他抗原为肿瘤相关抗原（TAA），例如 CLDN18.2 或 PSMA。在一些实施方案中，所述多特异性结合分子是多特异性抗体，例如双特异性抗体。

在一些实施方案中，本发明的抗体是双特异性抗体。术语“双特异性抗体”是指包含第一抗原结合区和第二抗原结合区的抗体，其中所述第一抗原结合区结合一种抗原或表位且所述第二抗原结合区结合另一抗原或另一表位。因此，根据本发明的双特异性抗体包含对于两种不同的抗原，或对一种抗原的两个不同的表位的特异性。双特异性抗体形式包含 IgG 样抗体(Fan 等人 (2015) Journal of Hematology & Oncology . 8: 130)。最常见的 IgG 样抗体类型包含两个 Fab 区域和两个 Fc 区域，每个 Fab 的重链和轻链可以来自单独的单克隆抗体。可以使用本领域已知的双特异性抗体形式或技术来制备本发明的双特异性抗体。可以在本发明的背景下使用的具体示例性双特异性形式参见例如，Labrijn, et al. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. Nature Reviews Drug Discovery, 2019, 18(8):1-24。

因此，本发明的一个方面涉及一种双特异性抗体，其包含

第一抗原结合区和第二抗原结合区，其中第一抗原结合区特异性结合 CD28，且第二抗原结合区特异性结合肿瘤相关抗原。在一些实施方案中，肿瘤相关抗原选自 PSMA 或 CLDN18.2。

在一些实施方案中，第一抗原结合区来自本文所述的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段，例如是本文所述的抗 CD28 抗体的 Fab。在一些实施方案中，特异性结合 CD28 的第一抗原结合区包含本文所述的抗 CD28 抗体的 1、2、3、4、5、或 6 个 CDR。在一些实施方案中，所述第一抗原结合区包含本文所述的抗 CD28 抗体的 1、2 或 3 个重链可变区 CDR，即 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3。在一些实施方案中，所述第一抗原结合区包含本文所述的抗 CD28 抗体的 1、2 或 3 个轻链可变区 CDR，即 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3。在一些实施方案中，所述第一抗原结合区包含本文所述的抗 CD28 抗体的 3 个重链可变区 CDR 和 3 个轻链可变区 CDR。在一些实施方案中，所述第一抗原结合区包含本文所述的抗 CD28 抗体的重链可变区。在一些实施方案中，所述第一抗原结合区包含本文所述的抗 CD28 抗体的轻链可变区。在一些实施方案中，所述第一抗原结合区包含本文所述的抗 CD28 抗体的重链可变区和轻链可变区。在一些实施方案中，所述第一抗原结合区包含本文所述的抗 CD28 抗体的 Fab。

在一些实施方案中，第二抗原结合区来自抗 TAA（例如 CLDN18.2 或 PSMA，例如人 CLDN18.2 或人 PSMA）的抗体或其抗原结合片段，例如抗 CLDN18.2 的抗体或其抗原结合片段，或抗 PSMA 的抗体或其抗原结合片段。

适用于本发明的双特异性抗体的第一抗原结合区可以包含本发明的抗 CD28 全长抗体或其抗原结合片段，或由其组成，只要其能够特异性结合 CD28 即可，包括但不限于，例如特异性结合 CD28 的全长抗体、半抗体、Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、单链抗体(例如 scFv)、(Fab')₂、单结构域抗体(例如 VHH)、dAb(domain antibody)、重链抗体或线性抗体等。

适用于本发明的双特异性抗体的第二抗原结合区可以包含抗 TAA 的抗体或其抗原结合片段，或由其组成，只要其能够特异性结合 TAA 即可，包括但不限于，例如特异性结合 TAA

的全长抗体、半抗体、Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、单链抗体(例如 scFv)、(Fab')₂、单结构域抗体(例如 VHH)、dAb(domain antibody)、重链抗体或线性抗体等。

在一些实施方案中,适用于本发明的双特异性抗体的第二抗原结合区可以包含抗 CLDN18.2 的抗体或其抗原结合片段(例如 CN202010570517.X (WO2021254481A1) 公开的抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合片段,例如 HB37A6 抗体或其抗原结合片段),或由其组成,只要其能够特异性结合 CLDN18.2 即可,包括但不限于,例如特异性结合 CLDN18.2 的全长抗体、半抗体、Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、单链抗体(例如 scFv)、(Fab')₂、单结构域抗体(例如 VHH)、dAb(domain antibody)、重链抗体或线性抗体等。

在一些实施方案中,适用于本发明的双特异性抗体的第二抗原结合区可以包含抗 PSMA 的抗体或其抗原结合片段(例如 EP1851250B1 公开的抗 PSMA 抗体或其抗原结合片段,例如 1C3 抗体或其抗原结合片段),或由其组成,只要其能够特异性结合 PSMA 即可,包括但不限于,例如特异性结合 PSMA 的全长抗体、半抗体、Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、单链抗体(例如 scFv)、(Fab')₂、单结构域抗体(例如 VHH)、dAb(domain antibody)、重链抗体或线性抗体等。

在一些实施方案中,本发明的双特异性抗体是 IgG 样双特异性抗体。在一些实施方案中,本发明的 IgG 样双特异性抗体是指包含 Fc 二聚体(例如异二聚体 Fc 支架)的双特异性抗体。因此,在一些实施方案中,本发明的双特异性抗体包含 Fc 二聚体,例如异二聚体 Fc 支架。

在一个实施方案中,所述双特异性抗体可以包含一个或多个第一抗原结合区。在一个实施方案中,所述双特异性抗体可以包含一个或多个第二抗原结合区。

III-1 第二抗原结合区

在一些实施方案中,第二抗原结合区特异性结合肿瘤相关抗原(TAA)或免疫检查点分子。

在一些实施方案中,所述肿瘤相关抗原是 CLDN18.2。

在一些实施方案中,第二抗原结合区是特异性结合 CLDN18.2 的抗原结合区。在一些实施方案中,特异性结合 CLDN18.2 的第二抗原结合区来源于特异性结合 CLDN18.2 的抗体,例如 CN202010570517.X(WO2021254481A1)(以其全文并入本文)中公开的特异性结合 CLDN18.2 的抗体,例如其中公开的 HB37A6。

在一些实施方案中,特异性结合 CLDN18.2 的第二抗原结合区包含已知的特异性结合 CLDN18.2 的抗体(例如 CN202010570517.X(WO2021254481A1)中公开的 CLDN18.2 抗体,例如其中公开的 HB37A6)的 1、2、3、4、5、或 6 个 CDR。在一些实施方案中,所述第二抗原结合区包含已知的特异性结合 CLDN18.2 的抗体(例如 CN202010570517.X(WO2021254481A1)中公开的 CLDN18.2 抗体,例如其中公开的 HB37A6)的 1、2 或 3 个重链可变区 CDR,即 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3。在一些实施方案中,所述第二抗原结合区包含已知的特异性结合 CLDN18.2 的抗体(例如 CN202010570517.X(WO2021254481A1)中公开的 CLDN18.2 抗体,例如其中公开的 HB37A6)的 1、2 或 3 个轻链可变区 CDR,即 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3。在一些实施方案中,所述第二抗原结合区包含已知的特异性结合 CLDN18.2 的抗体(例如

CN202010570517.X(WO2021254481A1)中公开的 CLDN18.2 抗体,例如其中公开的 HB37A6)的 3 个重链可变区 CDR 和 3 个轻链可变区 CDR。在一些实施方案中,所述第二抗原结合区包含已知的特异性结合 CLDN18.2 的抗体(例如 CN202010570517.X(WO2021254481A1)中公开的 CLDN18.2 抗体,例如其中公开的 HB37A6)的重链可变区。在一些实施方案中,所述第二抗原结合区包含已知的特异性结合 CLDN18.2 的抗体(例如 CN202010570517.X(WO2021254481A1)中公开的 CLDN18.2 抗体,例如其中公开的 HB37A6)的轻链可变区。在一些实施方案中,所述第二抗原结合区包含已知的特异性结合 CLDN18.2 的抗体(例如 CN202010570517.X(WO2021254481A1)中公开的 CLDN18.2 抗体,例如其中公开的 HB37A6)的重链可变区和轻链可变区。在一些实施方案中,所述第二抗原结合区包含已知的特异性结合 CLDN18.2 的抗体(例如 CN202010570517.X(WO2021254481A1)中公开的特异性结合 CLDN18.2 的抗体,例如其中公开的 HB37A6)的 Fab。

在一些实施方案中,特异性结合 CLDN18.2 的第二抗原结合区包含 3 个来自重链可变区的互补决定区(CDRH),CDRH1、CDRH2 和 CDRH3,其中所述 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 为如 SEQ ID NO:86 所示重链可变区的 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3,优选地,其中所述 CDRH 可以分别根据任何确定 CDR 的方案来确定,例如分别根据 Kabat、AbM、Chothia、Contact 或 IMGT 方案或其组合确定。在一些实施方案中,所述特异性结合 CLDN18.2 的第二抗原结合区包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区(CDRL),CDRL1、CDRL2 和 CDRL3,其中所述的 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3 为如 SEQ ID NO:90 所示轻链可变区的 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3,优选地,其中所述 CDRL 可以分别根据任何确定 CDR 的方案来确定,例如分别根据 Kabat、AbM、Chothia、Contact 或 IMGT 方案或其组合确定。

在一些实施方案中,所述特异性结合 CLDN18.2 的第二抗原结合区的 CDRH1 包含 SEQ ID NO:87 的氨基酸序列或由其组成;CDRH2 包含 SEQ ID NO:88 的氨基酸序列或由其组成,CDRH3 包含 SEQ ID NO:89 的氨基酸序列或由其组成,CDRL1 包含 SEQ ID NO:91 的氨基酸序列或由其组成,CDRL2 包含 SEQ ID NO:92 的氨基酸序列或由其组成,和/或 CDRL3 包含 SEQ ID NO:93 的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中,所述特异性结合 CLDN18.2 的第二抗原结合区包含 VH,其中所述 VH 包含

3 个来自重链可变区的互补决定区(CDRH),CDRH1、CDRH2 和 CDRH3,其中 CDRH1 包含 SEQ ID NO:87 的氨基酸序列或由其组成;CDRH2 包含 SEQ ID NO:88 的氨基酸序列或由其组成,且 CDRH3 包含 SEQ ID NO:89 的氨基酸序列或由其组成;或

SEQ ID NO:86 所示的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中,所述特异性结合 CLDN18.2 的第二抗原结合区包含 VL,其中所述 VL 包含

3 个来自轻链可变区的互补决定区(CDRL),CDRL1、CDRL2 和 CDRL3,其中 CDRL1 包含 SEQ ID NO:91 的氨基酸序列或由其组成,CDRL2 包含 SEQ ID NO:92 的氨基酸序列或由其组成,和 CDRL3 包含 SEQ ID NO:93 的氨基酸序列或由其组成;或

SEQ ID NO:90 所示的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中,所述特异性结合 CLDN18.2 的第二抗原结合区包含 3 个来自重链可变区的互补决定区(CDRH),CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 和 3 个来自轻链可变区的互补决

定区 (CDRL), CDRL1、CDRL2 和 CDRL3, 其中 CDRH1 包含 SEQ ID NO:87 的氨基酸序列或由其组成; CDRH2 包含 SEQ ID NO:88 的氨基酸序列或由其组成, CDRH3 包含 SEQ ID NO:89 的氨基酸序列或由其组成, CDRL1 包含 SEQ ID NO:91 的氨基酸序列或由其组成, CDRL2 包含 SEQ ID NO:92 的氨基酸序列或由其组成, 和 CDRL3 包含 SEQ ID NO:93 的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中, 所述特异性结合 CLDN18.2 的第二抗原结合区包含 VH 和 VL, 其中 VH 包含 SEQ ID NO:86 所示的序列或由所述序列组成; 和/或 VL 包含 SEQ ID NO:90 所示的序列或由所述序列组成。

在一些实施方案中, 所述特异性结合 CLDN18.2 的第二抗原结合区是 Fab 片段。

在一些实施方案中, 第二抗原结合区是特异性结合 PSMA 的抗原结合区。在一些实施方案中, 特异性结合 PSMA 的第二抗原结合区来源于特异性结合 PSMA 的抗体, 例如 EP1851250B1 中公开的特异性结合 PSMA 的抗体, 例如其中公开的 1C3。

在一些实施方案中, 特异性结合 PSMA 的第二抗原结合区包含已知的特异性结合 PSMA 的抗体(例如 EP1851250B1(以其全文并入本文)中公开的 PSMA 抗体, 例如其中公开的 1C3)的 1、2、3、4、5、或 6 个 CDR。在一些实施方案中, 所述第二抗原结合区包含已知的特异性结合 PSMA 的抗体(例如 EP1851250B1 中公开的 PSMA 抗体, 例如其中公开的 1C3)的 1、2 或 3 个重链可变区 CDR, 即 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3。在一些实施方案中, 所述第二抗原结合区包含已知的特异性结合 PSMA 的抗体(例如 EP1851250B1 中公开的 PSMA 抗体, 例如其中公开的 1C3)的 1、2 或 3 个轻链可变区 CDR, 即 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3。在一些实施方案中, 所述第二抗原结合区包含已知的特异性结合 PSMA 的抗体(例如 EP1851250B1 中公开的 PSMA 抗体, 例如其中公开的 1C3)的 3 个重链可变区 CDR 和 3 个轻链可变区 CDR。在一些实施方案中, 所述第二抗原结合区包含已知的特异性结合 PSMA 的抗体(例如 EP1851250B1 中公开的 PSMA 抗体, 例如其中公开的 1C3)的重链可变区。在一些实施方案中, 所述第二抗原结合区包含已知的特异性结合 PSMA 的抗体(例如 EP1851250B1 中公开的 PSMA 抗体, 例如其中公开的 1C3)的轻链可变区。在一些实施方案中, 所述第二抗原结合区包含已知的特异性结合 PSMA 的抗体(例如 EP1851250B1 中公开的 PSMA 抗体, 例如其中公开的 1C3)的重链可变区和轻链可变区。在一些实施方案中, 所述第二抗原结合区包含已知的特异性结合 PSMA 的抗体(例如 EP1851250B1 中公开的特异性结合 PSMA 的抗体, 例如其中公开的 1C3)的 Fab。

在一些实施方案中, 特异性结合 PSMA 的第二抗原结合区包含 3 个来自重链可变区的互补决定区 (CDRH), CDRH1、CDRH2 和 CDRH3, 其中所述 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 为如 SEQ ID NO:47 所示重链可变区的 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3, 优选地, 其中所述 CDRH 可以分别根据任何确定 CDR 的方案来确定, 例如分别根据 Kabat、AbM、Chothia、Contact 或 IMGT 方案或其组合确定。在一些实施方案中, 所述特异性结合 PSMA 的第二抗原结合区包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区 (CDRL), CDRL1、CDRL2 和 CDRL3, 其中所述的 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3 为如 SEQ ID NO:49 所示轻链可变区的 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3, 优选地, 其中所述 CDRL 可以分别根据任何确定 CDR 的方案来确定, 例如分别根据 Kabat、AbM、Chothia、Contact 或 IMGT 方案或其组合确定。在一些实施方案中, 所述特异性结合 PSMA 的第二抗原结合区的 CDRH1 包含 SEQ ID NO:96 的氨基酸序列或由其组成; CDRH2

包含 SEQ ID NO:97 的氨基酸序列或由其组成, CDRH3 包含 SEQ ID NO:98 的氨基酸序列或由其组成, CDRL1 包含 SEQ ID NO:99 的氨基酸序列或由其组成, CDRL2 包含 SEQ ID NO:100 的氨基酸序列或由其组成, 和/或 CDRL3 包含 SEQ ID NO:101 的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中, 所述特异性结合 PSMA 的第二抗原结合区包含 VH, 其中所述 VH 包含

3 个来自重链可变区的互补决定区 (CDRH), CDRH1、CDRH2 和 CDRH3, 其中 CDRH1 包含 SEQ ID NO:96 的氨基酸序列或由其组成; CDRH2 包含 SEQ ID NO:97 的氨基酸序列或由其组成, 且 CDRH3 包含 SEQ ID NO:98 的氨基酸序列或由其组成; 或

SEQ ID NO:47 所示的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中, 所述特异性结合 PSMA 的第二抗原结合区包含 VL, 其中所述 VL 包含

3 个来自轻链可变区的互补决定区 (CDRH), CDRH1、CDRH2 和 CDRH3, 其中 CDRL1 包含 SEQ ID NO:99 的氨基酸序列或由其组成, CDRL2 包含 SEQ ID NO:100 的氨基酸序列或由其组成, 和 CDRL3 包含 SEQ ID NO:101 的氨基酸序列或由其组成; 或

SEQ ID NO:49 所示的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中, 所述特异性结合 PSMA 的第二抗原结合区包含 3 个来自重链可变区的互补决定区 (CDRH), CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 和 3 个来自轻链可变区的互补决定区 (CDRL), CDRL1、CDRL2 和 CDRL3, 其中 CDRH1 包含 SEQ ID NO:96 的氨基酸序列或由其组成; CDRH2 包含 SEQ ID NO:97 的氨基酸序列或由其组成, CDRH3 包含 SEQ ID NO:98 的氨基酸序列或由其组成, CDRL1 包含 SEQ ID NO:99 的氨基酸序列或由其组成, CDRL2 包含 SEQ ID NO:100 的氨基酸序列或由其组成, 和 CDRL3 包含 SEQ ID NO:101 的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中, 所述特异性结合 PSMA 的第二抗原结合区包含 VH 和 VL, 其中 VH 包含 SEQ ID NO:47 所示的序列或由所述序列组成; 和 VL 包含 SEQ ID NO:49 所示的序列或由所述序列组成。

在一些实施方案中, 所述特异性结合 PSMA 的第二抗原结合区是 Fab 片段。

III-2 Fab 片段

在一些实施方案中, 本发明的第一抗原结合区和/或第二抗原结合区是 Fab 片段。适用于作为本发明的多特异性结合分子例如双特异性抗体抗原结合区的 Fab 片段由包含抗体 VH、CH1、VL 和 CL 结构域的两条多肽链组成, 其中所述 VH 与 VL 配对且所述 CH1 与 CL 配对以形成抗原结合区。在一些实施方案中, 在 Fab 中, 一条链从 N 端到 C 端包含 VH 和 CH1 (即, VH-CH1) 或由 VH 和 CH1 组成, 另一条链从 N 端到 C 端包含 VL 和 CL (即, VL-CL) 或由 VL 和 CL 组成。在一些实施方案中, 在本发明的多特异性抗体中, Fab 可以通过包含 VH 的链的 C 端连接在抗体的 Fc 结构域的 N 端。优选地, 所述 Fab 包含 VH-CH1 链和 VL-CL 链, 并可以通过 VH-CH1 链的 CH1 的 C 末端与抗体 Fc 结构域连接。在一些实施方案中, 所

述连接是直接连接，或通过接头连接。在本文中，包含 VH-CH1 或 VH-CH1 其组成的 Fab 链也称作 Fab 重链，而包含 VL-CL 或由 VL-CL 组成的 Fab 链也称作 Fab 轻链。

在一些实施方案中，所述 CH1 是来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 CH1，优选地来自 IgG1 的 CH1。在一些实施方案中，所述 CH1

(i) 包含与 SEQ ID NO:74 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含 SEQ ID NO:74 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO:74 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，所述 CL 是 Kappa 轻链恒定区或 Lambda 轻链恒定区。在一些实施方案中，CL 是 Kappa 轻链恒定区。在一些实施方案中，所述 CL

(i) 包含与 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，第一抗原结合区是特异性结合 CD28 的 Fab，其中所述 Fab 片段来自本发明的抗 CD28 抗体，其包含本发明的抗 CD28 抗体的重链可变区 VH 和轻链可变区 VL。在一些实施方案中，作为第一抗原结合区的特异性结合 CD28 抗体的 Fab 的 Fab 重链包含 VH 和 CH1，或由 VH 和 CH1 组成，其中 VH 为本发明的抗 CD28 抗体的 VH。在一些实施方案中，作为第一抗原结合区的特异性结合 CD28 的 Fab 的 Fab 轻链包含 VL 和 CL，或由 VL 和 CL 组成，其中 VL 为本发明的抗 CD28 抗体的 VL。

在一些实施方案中，特异性结合 CD28 的 Fab 重链包含

(i) 包含与 SEQ ID NO:103、104 或 105 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含 SEQ ID NO: 103、104 或 105 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 103、104 或 105 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，特异性结合 CD28 的 Fab 轻链包含

(i) 包含与 SEQ ID NO:36、38 或 40 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含 SEQ ID NO: 36、38 或 40 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 36、38 或 40 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，特异性结合 CD28 的 Fab 重链包含 SEQ ID NO:103 所示的氨基酸序列或由其组成，且 Fab 轻链包含 SEQ ID NO:36 所示的氨基酸序列或由其组成；

在一些实施方案中，特异性结合 CD28 的 Fab 重链包含 SEQ ID NO:104 所示的氨基酸序列或由其组成，且 Fab 轻链包含 SEQ ID NO:38 所示的氨基酸序列或由其组成；或

在一些实施方案中，特异性结合 CD28 的 Fab 重链包含 SEQ ID NO:105 所示的氨基酸序列或由其组成，且 Fab 轻链包含 SEQ ID NO:40 所示的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，第二抗原结合区是特异性结合 TAA 的 Fab，其中所述 Fab 片段来自抗 TAA 抗体，其包含抗 TAA 抗体（例如抗 CLDN18.2 抗体或抗 PSMA 抗体）的重链可变区 VH 和轻链可变区 VL。在一些实施方案中，第二抗原结合区是特异性结合 CLDN18.2 的 Fab，其中所述 Fab 片段来自抗 CLDN18.2 抗体，其包含抗 CLDN18.2 抗体的重链可变区 VH 和轻链可变区 VL。在一些实施方案中，第二抗原结合区是特异性结合 PSMA 的 Fab，其中所述 Fab 片段来自抗 PSMA 抗体，其包含抗 PSMA 抗体的重链可变区 VH 和轻链可变区 VL。

在一些实施方案中，作为第二抗原结合区的 Fab 包含本文所述的第二抗原结合区的 VH 或 VL，或者包含本文所述的第二抗原结合区的 VH 和 VL。

在一些实施方案中，特异性结合 CLDN18.2 的 Fab 重链包含

(i) 包含与 SEQ ID NO:102 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含 SEQ ID NO: 102 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 102 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，特异性结合 CLDN18.2 的 Fab 轻链包含

(i) 包含与 SEQ ID NO:34 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含 SEQ ID NO: 34 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 34 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，特异性结合 CLDN18.2 的 Fab 重链包含 SEQ ID NO:102 所示的氨基酸序列或由其组成，且 Fab 轻链包含 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，特异性结合 PSMA 的 Fab 重链包含

(i) 包含与 SEQ ID NO:106 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、

95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii) 包含 SEQ ID NO: 106 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 106 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个或 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中, 特异性结合 PSMA 的 Fab 轻链包含

(i) 包含与 SEQ ID NO:50 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii) 包含 SEQ ID NO:50 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO:50 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个或 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中, 特异性结合 PSMA 的 Fab 重链包含 SEQ ID NO:106 所示的氨基酸序列或由其组成, 且 Fab 轻链包含 SEQ ID NO:50 所示的氨基酸序列或由其组成。

III-3 Fc 区

在一些实施方案中, 本发明的多特异性结合分子例如多特异性抗体 (例如双特异性抗体) 的一个或多个靶标结合区 (抗原结合区) 还包含 Fc 区, 其中所包含的 Fc 区可以相同或不同。

在一些实施方案中, 第一 Fc 区和第二 Fc 区不同, 其能够二聚化形成异二聚体 Fc 支架。

在本文中, Fc 区是指含有至少一部分的恒定区的免疫球蛋白重链的 C-端区域, 并且可以包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。天然序列 F 区涵盖天然存在的各种免疫球蛋白 Fc 序列, 例如各种 Ig 亚型以及其同种异型的 Fc 区 (Gestur Vidarsson 等, IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions, 20 October 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00520)。在一些实施方案中, 本发明的 Fc 区包含抗体 CH2 和 CH3。在一些实施方案中, 抗体 Fc 区还可以在 N 端带有 IgG 铰链区或部分 IgG 铰链区, 例如, IgG1 铰链区或部分 IgG1 铰链区, 例如根据 EU 编号, D221 到 P230 的序列。在所述铰链区中可以含有突变。

除非本文中另外指出, Fc 区中的氨基酸残基的编号根据 EU 编号系统, 也称为 EU 索引, 如 Kabat, E.A. 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242 中所述。

在一些实施方案中, Fc 区为人的 IgG Fc, 例如, 人 IgG1 Fc, 人 IgG2 Fc, 人 IgG3 Fc 或人 IgG4 Fc。在一个实施方案中, Fc 区包含氨基酸序列 SEQ ID NO:94 或 95 或与其具有至少 90% 同一性, 例如 95%, 96%, 97%, 98%、99% 或更高的同一性的氨基酸序列或由其组成。

如本领域技术人员理解的, 为了促进本发明的多特异性抗体作为异二聚体的形成, 本发明多特异性抗体所包含的 Fc 区可以包含利于第一 Fc 区与第二 Fc 区异二聚化的突变。在一个实施方案中, 在两个 Fc 区的 CH3 区中引入突变。

本领域已知促进 Fc 区异二聚化的方法。例如，第一 Fc 区的 CH3 区和第二 Fc 区的 CH3 区以互补方式进行工程化改造使得每个 CH3 区(或包含它的重链)不再能与其自身同二聚化但被迫与互补工程化改造的其它 CH3 区异二聚化(使得第一和第二 Fc 区的 CH3 区异二聚化且两个第一 CH3 区或两个第二 CH3 区之间不形成同二聚体)。例如，基于 Knob-into-Hole 技术，在第一 Fc 区和第二 Fc 区中引入相应的 Knob 突变和 Hole 突变。此技术参见例如 US 5,731,168; US 7,695,936; Ridgway 等, Prot Eng 9,617-621(1996)和 Carter ,J Immunol Meth 248,7-15(2001)。

还可以基于 Innobody 技术，在第一 Fc 区和第二 Fc 区中引入相应的突变。此技术参见例如 PCT/CN2021/143141 (所述专利以其全文并入本文)。

在一个特定的实施方案中，

所述第一 CH3 区包含 S364R/K 突变(优选地 S364R)，以及任选的一个或多个其他突变。在一些实施方案中，所述第二 CH3 区包含 K370S/T/A/V 突变 (优选地 K370S)，以及任选的一个或多个其他突变。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 S364R/K 突变，且所述第二 CH3 区包含 K370S/T/A/V 突变。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 S364R 突变，且所述第二 CH3 区包含 K370S 突变。

在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 S364R/K(优选地 S364R)和 D399K/R (优选地 D399K) 突变。在一些实施方案中，所述第二 CH3 区包含 K370S/T/A/V (优选地 K370S) 突变和 K409D/E (优选地 K409D) 突变。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 S364R/K+D399K/R，且所述第二 CH3 区包含 K370S/T/A/V+Y349T/S/A/V。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 S364R +D399K，且所述第二 CH3 区包含 K370S +Y349T。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区还包含 E375N/Q(优选地 E375N)和/或 T350V/A (优选地 T350V)。在一些实施方案中，所述第二 CH3 区还包含 K409D/E (优选地 K409D)、Q347D/E (优选地 Q347D) 和/或 T350V/A (优选地 T350V)。

在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 S364R+D399K，且所述第二 CH3 区包含 K370S+Y349T+K409D。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区还包含 E357N。在一些实施方案中，所述第二 CH3 区还包含 Q347D。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区还包含 E357N，且所述第二 CH3 区还包含 Q347D。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区和所述第二 CH3 区还分别包含 T350V，或都包含 T350V。

因此，在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 S364R+D399K，且所述第二 CH3 区包含 K370S+Y349T+K409D+Q347D。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 S364R+D399K+E357N，且所述第二 CH3 区包含 K370S+Y349T+K409D+Q347D。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 S364R+D399K+E357N+T350V，且所述第二 CH3 区包含 K370S+Y349T+K409D+Q347D+T350V。

在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 K409E/D(优选地 K409E)。在一些实施方案中，所述第二 CH3 区包含 D399K/R (优选地 D399K) 或 K370T/S/A/V (优选地 K370T)。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 K409E/D(优选地 K409E)，且所述第二 CH3 区包含 D399K/R (优选地 D399K)。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区还包含 T411R/K(优选地 T411R)。在一些实施方案中，所述第二 CH3 区还包含 K370T/S/A/V (优选地 K370T)。在一些实施方案中，所述 CH3 区包含 K409E/D+T411R/K，且所述第二 CH3 区包含 D399K/R+K370T/S/A/V。在一些实施方案中，所述 CH3 区包含 K409E+T411R，且所述第二 CH3 区包含 D399K+K370T。

在一些具体的实施方案中，所述第一和第二 CH3 区具有以下 5 种突变组合：

第一 CH3 区	第二 CH3 区
S364R, D399K, E357N, T350V	K370S, Y349T, Q347D, K409D, T350V
K409E, T411R	D399K, K370T
S364R, D399K, E357N	K370S, Y349T, Q347D, K409D
S364R, D399K	K370S, Y349T, Q347D, K409D
S364R, D399K	K370S, Y349T, K409D

在一个实施方案中，一个 Fc 区的 CH3 包含 S364R 和 D399K 突变，且另一个 Fc 区的 CH3 突变包含 Y349T、K370S 和 K409D 突变。

在一些实施方案中，Fc 区还包含其他利于异二聚体纯化的突变。

还可以将本发明的结合分子例如抗体中的 Fc 区进行突变以获得所需的特性。本领域已知对 Fc 区的突变。

在一个实施方案中，在 Fc 区的效应子功能（例如 Fc 区的补体激活功能）的特性上修饰 Fc 区。在一个实施方案中，所述效应子功能相对于野生同种型 Fc 区已经被降低或消除。在一个实施方案中，通过选自以下的方法来降低或消除效应子功能：使用天然具有降低或消除的效应子功能的 Fc 同种型、和 Fc 区修饰。

在一个优选的实施方案中，Fc 区具有减少的由 Fc 区介导的效应子功能，例如减少的或消除的 ADCC 或 ADCP 或 CDC 效应子功能，例如包含实现上述功能的突变。

如本领域技术人员理解的，根据本发明结合分子例如抗体分子的预期用途，本发明结合分子例如抗体分子也可以在 Fc 结构域中包含改变对一种或多种 Fc 受体的结合亲和力的修饰。在一个实施方案中，所述 Fc 受体是 Fcγ 受体，特别地是人 Fcγ 受体。在一些实施方案中，所述 Fc 区包含降低与 Fcγ 受体结合的突变。例如，在一些实施方案中，用于本发明的 Fc 区具有降低与 Fcγ 受体结合的突变，例如 L234A/L235A 突变或 P329 位缺失脯氨酸(P329delP)。在再一优选的实施方案中，Fc 片段可以具有导致增加的血清半衰期的突变，例如改善 Fc 片段与 FcRn 结合的突变。

因此，在一个具体的实施方案中，本发明的抗体如多特异性抗体包含的两个 Fc 区异二聚化，其中

一个 Fc-区多肽包含突变 S364R 和 D399K，而另一个 Fc-区多肽包含突变 Y349T、K370S 和 K409D。

在一些实施方案中，所述 Fc 区还分别包含 L234A/L235A 突变，以及任选地在 P329 位缺失脯氨酸（P329delP）。

因此，在一个具体的实施方案中，本发明的抗体如多特异性抗体包含的两个 Fc 区异二聚化，其中

a) 一个 Fc 区包含 SEQ ID NO:80 所示的氨基酸序列或由其组成, 而另一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:81 所示的氨基酸序列或由其组成; 或

b) 一个 Fc 区包含 SEQ ID NO:82 所示的氨基酸序列或由其组成, 而另一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:83 所示的氨基酸序列或由其组成。

在一个具体的实施方案中, 本发明的抗体如多特异性抗体包含的两个 Fc 区异二聚化, 其中

a) 一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:80 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列, 而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:81 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列; 或

b) 一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:82 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列, 而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:83 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列。

因此, 在一个具体的实施方案中, 本发明的结合分子例如抗体如多特异性抗体包含的两个 Fc 区异二聚化, 其中

a) 一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:80 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列且包含突变 S364R 和 D399K, 而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:81 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列且包含突变 Y349T、K370S 和 K409D;

b) 一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:80 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列且包含突变 S364R 和 D399K 和 L234A/L235A 突变以及 P329delP, 而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:81 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列且包含突变 Y349T、K370S 和 K409D 和 L234A/L235A 突变以及 P329delP;

c) 一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:82 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列且包含突变 S364R 和 D399K, 而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:83 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列且包含突变 Y349T、K370S 和 K409D; 或

d) 一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:82 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列且包含突变 S364R 和 D399K 和 L234A/L235A 突变, 而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:83 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列且包含突变 Y349T、K370S 和 K409D 和 L234A/L235A 突变。

III-4 示例性双特异性抗体

在一些实施方案中, 本发明的双特异性抗体包含本文所述的特异性结合第一抗原的第一

抗原结合区和本文所述的特异性结合第二抗原的第二抗原结合区，其中第一抗原结合区包含第一 Fab，第二抗原结合区包含第二 Fab，其中第一 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第一 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区），第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第二 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区）。在一个具体的实施方案中，第一 Fab 与第一 Fc 区构成结合第一抗原的第一半抗体，第二 Fab 与第二 Fc 区构成结合第二抗原的第二半抗体，且第一半抗体和第二半抗体构成本发明的双特异性抗体。

在一个具体的实施方案，所述双特异性抗体是 IgG 样抗体，其具有如图 3 所示的构型。在一个具体的实施方案中，第一 Fc 区和第二 Fc 区包含 Innobody 突变，以及任选地减少的由 Fc 区介导的效应子功能的突变或降低与 Fc γ 受体结合的突变。在一个实施方案中，所述双特异性抗体包含或由下述组成：

重链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第一 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第一 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第一 Fc 区 N 末端经由或不经由接头（例如铰链区）连接；

轻链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第一 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区；

重链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第二 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第二 Fc 区 N 末端经由或不经由接头（例如铰链区）连接；

轻链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区；

优选地，各个结构域之间直接连接。

在一些实施方案中，Fab 重链可变区和重链恒定区 CH1 构成 Fab 重链，即 Fab 的重链可变区的 C 末端与重链恒定区的 CH1 的 N 末端连接（直接连接）。在一些实施方案中，Fab 轻链可变区和轻链恒定区构成 Fab 轻链，即 Fab 轻链可变区的 C 末端与轻链恒定区的 N 末端连接（直接连接）。

在一个具体的实施方案中，第一 Fab 是本发明的抗 CD28 抗体的 Fab，且第二 Fab 是抗 TAA 抗体的 Fab，或反之亦然。

在一个具体的实施方案中，第一 Fab 是本发明的抗 CD28 抗体的 Fab，且第二 Fab 是抗 CLDN18.2 抗体的 Fab，或反之亦然。

在一个具体的实施方案，本发明的双特异性抗体特异性结合 CD28 和 CLDN18.2，且包含或由下述组成：

重链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：特异性结合 CD28 的 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第一 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第一 Fc 区 N 末端经由或不经由接头（例如铰链区）连接；

轻链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：特异性结合 CD28 的 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区；

重链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：特异性结合 CLDN18.2 的 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第二 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第二 Fc 区 N 末端经由或不经由接头（例如铰链区）连接；和/或

轻链 2: 从 N 端至 C 端包含后或下述组成: 特异性结合 CLDN18.2 的 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区,

任选地, 所述第一 Fc 区包含突变 Y349T、K370S 和 K409D 突变, 且第二 Fc 区包含 S364R 和 D399K 或反之亦然; 任选地, 所述第一 Fc 区和第二 Fc 区还分别包含 L234A/L235A 突变, 以及任选地 P329delP 突变;

优选地, 各个结构域之间直接连接。

在一些具体的实施方案中, 特异性结合 CD28 和 CLDN18.2 的双特异性抗体包含重链 1、重链 2、轻链 1 和轻链 2 或由所述链组成, 其中

重链 1 包含 SEQ ID NO:35、37 或 39 所示的氨基酸序列, 或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

轻链 1 包含 SEQ ID NO:36、38 或 40 所示的氨基酸序列, 或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

重链 2 包含 SEQ ID NO:33 所示的氨基酸序列, 或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 和/或

轻链 2 包含 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列, 或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些具体的实施方案中, 特异性结合 CD28 和 CLDN18.2 的双特异性抗体包含重链 1、重链 2、轻链 1 和轻链 2 或由所述链组成, 其中

重链 1 包含 SEQ ID NO:35 所示的氨基酸序列, 或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 轻链 1 包含 SEQ ID NO:36 所示的氨基酸序列, 或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 重链 2 包含 SEQ ID NO:33 所示的氨基酸序列, 或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 和轻链 2 包含 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列, 或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

重链 1 包含 SEQ ID NO:37 所示的氨基酸序列, 或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 轻链 1 包含 SEQ ID NO:38 所示的氨基酸序列, 或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 重链 2 包含 SEQ ID NO:33 所示的氨基酸序列, 或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 和轻链 2 包含 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列, 或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或

重链 1 包含 SEQ ID NO:39 所示的氨基酸序列, 或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 轻链 1 包含 SEQ ID NO:40 所示的氨基酸序列, 或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 重链 2 包含 SEQ ID NO:33 所示的氨基酸序列, 或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 和轻链 2 包含 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列, 或与其具有至少 85%、90%、

95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些具体的实施方案中，特异性结合 CD28 和 CLDN18.2 的双特异性抗体包含重链 1、重链 2、轻链 1 和轻链 2 或由所述链组成，其中

重链 1 包含 SEQ ID NO:35 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；轻链 1 包含 SEQ ID NO:36 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；重链 2 包含 SEQ ID NO:33 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和轻链 2 包含 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

重链 1 包含 SEQ ID NO:37 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；轻链 1 包含 SEQ ID NO:38 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；重链 2 包含 SEQ ID NO:33 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和轻链 2 包含 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

重链 1 包含 SEQ ID NO:39 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；轻链 1 包含 SEQ ID NO:40 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；重链 2 包含 SEQ ID NO:33 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和轻链 2 包含 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一个具体的实施方案中，第一 Fab 是本发明的抗 CD28 的 Fab，且第二 Fab 是抗 PSMA 的 Fab，或反之亦然。

在一个具体的实施方案，本发明的双特异性抗体特异性结合 CD28 和 PSMA，且包含或由下述组成：

重链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：特异性结合 CD28 的 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第一 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第一 Fc 区 N 末端经由或不经由接头（例如铰链区）连接；

轻链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：特异性结合 CD28 的 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区；

重链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：特异性结合 PSMA 的 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第二 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第二 Fc 区 N 末端经由或不经由接头（例如铰链区）连接；和/或

轻链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：特异性结合 PSMA 的 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区，

任选地，所述第一 Fc 区包含突变 Y349T、K370S 和 K409D 突变，且第二 Fc 区包含 S364R 和 D399K 或反之亦然；任选地，所述第一 Fc 区和第二 Fc 区还分别包含 L234A/L235A 突变，以及任选地 P329delP 突变；

优选地，各个结构域之间直接连接。

在一些具体的实施方案中，特异性结合 CD28 和 PSMA 的双特异性抗体包含重链 1、重链 2、轻链 1 和轻链 2 或由所述链组成，其中

重链 1 包含 SEQ ID NO:51、52 或 53 所示的氨基酸序列,或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

轻链 1 包含 SEQ ID NO:36、38 或 40 所示的氨基酸序列,或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

重链 2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列,或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;和/或

轻链 2 包含 SEQ ID NO:50 所示的氨基酸序列,或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些具体的实施方案中,特异性结合 CD28 和 PSMA 的双特异性抗体包含重链 1、重链 2、轻链 1 和轻链 2 或由所述链组成,其中

重链 1 包含 SEQ ID NO:51 所示的氨基酸序列,或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;轻链 1 包含 SEQ ID NO:36 所示的氨基酸序列,或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;重链 2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列,或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;和轻链 2 包含 SEQ ID NO:50 所示的氨基酸序列,或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

重链 1 包含 SEQ ID NO:52 所示的氨基酸序列,或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;轻链 1 包含 SEQ ID NO:38 所示的氨基酸序列,或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;重链 2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列,或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;和轻链 2 包含 SEQ ID NO:50 所示的氨基酸序列,或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或

重链 1 包含 SEQ ID NO:53 所示的氨基酸序列,或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;轻链 1 包含 SEQ ID NO:40 所示的氨基酸序列,或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;重链 2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列,或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;和轻链 2 包含 SEQ ID NO:50 所示的氨基酸序列,或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些具体的实施方案中,特异性结合 CD28 和 PSMA 的双特异性抗体包含重链 1、重链 2、轻链 1 和轻链 2 或由所述链组成,其中

重链 1 包含 SEQ ID NO:51 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;轻链 1 包含 SEQ ID NO:36 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;重链 2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;和轻链 2 包含 SEQ ID NO:50 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

重链 1 包含 SEQ ID NO:52 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;轻链 1 包含 SEQ

ID NO:38 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；重链 2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和轻链 2 包含 SEQ ID NO:50 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

重链 1 包含 SEQ ID NO:53 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；轻链 1 包含 SEQ ID NO:40 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；重链 2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和轻链 2 包含 SEQ ID NO:50 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

本文描述的针对多特异性结合分子例如双特异抗体的各个组件/结构域如本文所述。本领域技术人员可以理解，除非上下文有明确相反指示，本文描述的针对多特异性结合分子例如双特异抗体的各个组件的任何技术特征的任何组合均在本发明范畴之中。并且，本领域技术人员可以理解，除非上下文有明确相反指示，本发明的抗体(包括任何形式的抗体)可以包含任何这样的组合。

IV. 多核苷酸、载体和宿主细胞

本发明提供编码以上任何本发明抗体分子（例如本发明的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段或多特异性抗体如双特异性抗体）的核酸。

在一方面，本发明提供编码以上任何抗 CD28 抗体或其抗原结合片段或多特异性抗体如双特异性抗体的核酸。

为了便于生产和纯化，抗 CD28 抗体或其抗原结合片段或多特异性抗体如双特异性抗体可以在 N 端或 C 端（例如 C 端）融合分泌性信号肽，和/或利于纯化的标签肽，如六组氨酸标签或生物素标记。

如本领域技术人员明了的，因为密码子简并性，每一个抗体或多肽氨基酸序列可以由多种核酸序列编码。

在一些实施方案中，本发明的核酸包含编码选自 SEQ ID NO:4、5、9、13、17、19、23、24、28、33、35、36-40、48、51-53、69、70、72、73、75、78 或 102-106 中任一项所示氨基酸序列的核酸，或编码与选自 SEQ ID NO: 4、5、9、13、17、19、23、24、28、33、35、36-40、48、51-53、69、70、72、73、75、78 或 102-106 中任一项所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列的核酸。

编码本发明分子的核酸序列可以采用本领域熟知的方法，例如通过从头固相 DNA 合成，或通过 PCR 扩增而产生。

在一个方面，本发明还提供包含本发明核酸的载体。在一个实施方案中，载体是表达载体，例如原核表达载体或真核表达载体。载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、λ 噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。在优选的实施方案，表达载体是 pCDNA，例如 pCDNA3.1。

在一个方面，本发明还提供了包含所述核酸或所述载体的宿主细胞。在一个实施方案中，宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞(例如 CHO

细胞或 293 细胞, 例如(HEK 293 或 293F 细胞或 293FT 细胞或 Expi293 细胞)。在另一个实施方案中, 宿主细胞是原核的。

合适的宿主细胞包括原核微生物, 如大肠杆菌, 真核微生物如丝状真菌或酵母, 或各种真核细胞, 如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、昆虫细胞等。可以使用适于悬浮培养的哺乳动物细胞系。有用的哺乳动物宿主细胞系的例子包括 SV40 转化的猴肾 CV1 系(COS-7); 人胚肾系(HEK 293 或 293F 细胞或 293FT 细胞或 Expi293 细胞)、幼仓鼠肾细胞(BHK)、猴肾细胞(CV1)、非洲绿猴肾细胞(VERO-76)、人宫颈癌细胞(HELA)、犬肾细胞(MDCK)、布法罗大鼠肝脏细胞(BRL 3A)、人肺细胞(W138)、人肝脏细胞(Hep G2)、CHO 细胞、NSO 细胞、骨髓瘤细胞系如 YO、NS0、P3X63 和 Sp2/0 等。本领域已知适合产生抗体的哺乳动物宿主细胞系。在一个优选的实施方案中, 所述宿主细胞是 CHO 或 HEK293 细胞或 293FT 细胞或 Expi293 细胞。

V. 本发明分子的生产 and 纯化

再一方面, 本发明提供用于生产本发明的抗体分子(例如抗 CD28 抗体或其抗原结合片段或多特异性抗体如双特异性抗体)的方法, 所述方法包括: 在适于表达所述分子的多肽链的条件下培养包含编码所述多肽链的宿主细胞; 任选地还包括在适于所述多肽链装配为所述分子的条件下使多肽链装配产生所述分子。

为了重组生产, 可以将编码本发明分子的多肽链的多核苷酸插入一个或多个载体中以便进一步在宿主细胞中克隆和/或表达。可以使用本领域技术人员熟知的方法来构建表达载体。表达载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、 λ 噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。一旦已经制备了用于表达的包含本发明的一种或多种多核苷酸的表达载体, 则可以将表达载体转染或引入适宜的宿主细胞中。多种技术可以用来实现这个目的, 例如, 原生质体融合、磷酸钙沉淀、电穿孔、逆转录病毒的转导、病毒转染、基因枪、基于脂质体的转染或其他常规技术。

如本文所述制备的分子可以通过已知的现有技术如高效液相色谱、离子交换层析、凝胶电泳、亲和层析(例如 Protein A 亲和层析)、大小排阻层析等纯化。用来纯化特定蛋白质的实际条件还取决于如净电荷、疏水性、亲水性等因素, 并且这些对本领域技术人员是显而易见的。

可以通过多种熟知分析方法中的任一种方法确定本发明的分子的纯度, 所述熟知分析方法包括大小排阻层析、凝胶电泳、高效液相色谱等。可以通过本领域已知的多种测定法, 鉴定、筛选或表征本文提供的抗体分子的物理/化学特性和/或生物学活性。

VI. 测定法

可以通过本领域中已知的多种测定法对本文中提供的分子(例如抗 CD28 抗体或其抗原结合片段或多特异性抗体如双特异性抗体)进行鉴定, 筛选, 或表征其物理/化学特性和/或生物学活性。实施例示例了对于本发明抗 CD28 抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体的性质的测定方法, 例如生物膜薄层干涉测定技术(BLI)、T 细胞报告基因检测方法、T 细胞激活检测方法、介导 T 细胞杀伤实验或抗肿瘤活性检测等。

VII. 免疫缀合物

在一个方面，本发明提供了免疫缀合物，其包含本发明分子（例如抗 CD28 抗体或其抗原结合片段或多特异性抗体如双特异性抗体）和一种或多种其他活性成分（例如来自治疗本发明疾病的药物或治疗剂的活性成分，例如增强本发明分子治疗效果的小分子）。

在一些实施方案中，所述免疫缀合物是抗体-药物-偶联物（ADC）。

VIII. 药物和用途

在一些实施方案中，本发明还涉及包含本发明分子（例如抗 CD28 抗体或其抗原结合片段或多特异性抗体如双特异性抗体，或免疫缀合物）的组合物（例如药物组合物或药物制剂）。

在一个实施方案中，所述组合物还包含药用辅料，如本领域中已知的药用载体、药用赋形剂，包括缓冲剂。在一个实施方案中，组合物，例如药物组合物，包含本发明的分子，以及一种或多种其它治疗剂的组合。

本发明的组合物还可以包含合适的药用辅料，如本领域中已知的药用载体、药用赋形剂，包括缓冲剂。如本文所用，“药用载体”包括生理上相容的任何和全部溶剂、分散介质、等渗剂或吸收延迟剂等。对于药用辅料的使用及其用途，亦参见“Handbook of Pharmaceutical Excipients”，第八版，R.C.Rowe,P.J.Seskey 和 S.C. Owen, Pharmaceutical Press, London, Chicago。本发明的组合物可以处于多种形式。这些形式例如包括液体、半固体和固体剂型，如液态溶液剂（例如，可注射用溶液剂和可输注溶液剂）、散剂或混悬剂、脂质体剂和栓剂。优选的形式取决于预期的施用模式和治疗用途。

可以通过将具有所需纯度的本发明的抗体分子（例如抗 CD28 抗体或其抗原结合片段或多特异性抗体如双特异性抗体）或免疫缀合物与一种或多种任选的药用辅料混合来制备包含本文所述的抗体分子或免疫缀合物的药物，例如以冻干制剂或水溶液的形式。

本发明一方面提供了在受试者中预防或治疗疾病的方法，包括向受试者施用有效量的本发明的分子（例如本发明的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段或多特异性抗体如双特异性抗体或其免疫缀合物）、药物组合物、药物组合或药盒。在一些实施方案中，所述疾病例如肿瘤如癌症。

在一些实施方案中，本发明涉及本发明的分子（例如本发明的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段或多特异性抗体如双特异性抗体或其免疫缀合物），其用于疗法，例如用于治疗肿瘤例如癌症。

在一些实施方案中，本发明涉及利用本发明的分子（例如本发明的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段或多特异性抗体如双特异性抗体或其免疫缀合物）治疗疾病，例如肿瘤例如癌症的方法，或用于所述治疗的用途，或用于制备用于所述治疗的药物的用途。

在一些实施方案中，所述肿瘤是实体瘤或血液肿瘤以及转移性病灶。在一个实施方案中，实体瘤的例子包括恶性肿瘤。癌症可以处于早期、中期或晚期或是转移性癌。在一些实施方案中，肿瘤是肿瘤免疫逃逸。

在一些实施方案中，所述肿瘤是 TAA 阳性肿瘤或癌症。在一些实施方案中，所述肿瘤是

CLDN18.2 阳性肿瘤或癌症。在一些实施方案中，所述肿瘤是 PSMA 阳性肿瘤或癌症。在一些实施方案中，所述肿瘤与 TAA 的异常表达或异常活性相关。在一些实施方案中，所述肿瘤与 CLDN18.2 的异常表达或异常活性相关。在一些实施方案中，所述肿瘤与 PSMA 的异常表达或异常活性相关。

在一些实施方案中，TAA 阳性肿瘤或癌症是指患有所有肿瘤癌症的受试者中具有表达 TAA 的肿瘤细胞。在一些实施方案中，所述受试者的肿瘤细胞表达 TAA，例如中等或高等表达 TAA。在一些实施方案中，所述受试者中具有（例如升高水平的，例如核酸或蛋白质水平或活性）TAA（例如相比健康受试者）。在一些实施方案中，所述受试者的生物样品（例如肿瘤细胞或肿瘤组织）中具有（例如升高水平的，例如核酸或蛋白质水平或活性的）TAA（例如相比健康受试者的生物样品（例如健康受试者中的相应组织或细胞），或者相比所述受试者的临近健康组织或细胞中的 TAA）。在一些实施方案中，所述 TAA 是 CLDN18.2 或 PSMA。

在一些实施方案中，所述肿瘤为胃肠道肿瘤，例如胃肠道癌症，例如结肠癌、直肠癌或结直肠癌，例如 CLDN18.2 阳性的胃肠道肿瘤，例如胃肠道癌症，例如胃癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌或结直肠癌。在一些实施方案中，所述肿瘤为 PSMA 阳性的肿瘤，例如肾细胞癌症，例如乳腺癌、肺癌、直肠癌或结直肠癌。

取决于其治疗用途，本发明所述抗体或其抗原结合片段或免疫缀合物或药物组合物还可以与一种或多种其他疗法例如治疗方式和/或其他治疗剂组合施用，用于本文所述的用途，例如用于预防和/或治疗本文提及的相关疾病或病症。

在一些实施方案中，当本发明的分子（例如本发明的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体或其免疫缀合物）用于治疗肿瘤时，所述治疗剂例如用于治疗肿瘤的各种治疗剂，例如化疗剂、血管生成抑制剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂（例如免疫检查点抑制剂或激动剂）。在一些实施方案中，所述治疗剂是 PD-1 抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中，当本发明的分子（例如本发明的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体或其免疫缀合物）用于治疗肿瘤时，治疗方式包括外科手术；放射疗法、局部照射或聚焦照射等。

在一些实施方案中，本发明还提供了药物组合或药物组合产品，其包含本发明的抗体或其抗原结合片段或免疫缀合物，以及一种或多种其它治疗剂等。

本发明的另一个目的是提供一种成套药盒，其包含本发明的药物组合，优选地所述药盒为药物剂量单元形式。由此可以依据给药方案或药物施用间隔提供剂量单元。

在一个实施方案中，本发明的成套药盒在同一包装内包含：

- 含有包含本发明的抗体或其抗原结合片段或免疫缀合物的药物组合物的第一容器；
- 含有包含其它治疗剂的药物组合物的第二容器。

在一些实施方案中，当本发明的分子（例如本发明的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体或其免疫缀合物）用于治疗肿瘤时，所述治疗剂例如用于治疗肿瘤的各种治疗剂，例如化疗剂、血管生成抑制剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂（例如免疫检查点抑制剂或激动剂）。在一些实施方案中，所述治疗剂是 PD-1 抗体或其抗原结合片段。

在其他方面，本发明提供本发明的分子（例如抗 CD28 抗体或其抗原结合片段或双特异

性抗体或其免疫缀合物等)或包含其的组合物或组合产品在生产或制备药物中的用途,所述药物用于本文所述的用途,例如用于预防或治疗本文提及的相关疾病或病症。

在其他方面,本发明还提供了本发明的分子(例如抗 CD28 抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体或其免疫缀合物等),或包含其的组合物或药物或制剂或组合产品,其用于疗法,例如用于治疗本文提及的相关疾病或病症。

IX. 诊断和检测

在某些实施方案中,本文中提供的分子(例如抗 CD28 抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体或其免疫缀合物等)可以用于检测 CD28 或 TAA 在生物样品中的存在。

术语“检测”用于本文中时,包括定量或定性检测,示例性的检测方法可以涉及免疫组织化学、免疫细胞化学、流式细胞术(例如, FACS)、抗体分子复合的磁珠、ELISA 测定法、PCR-技术(例如, RT-PCR)。在某些实施方案中,生物样品是体液。

在某些实施方案中,所述方法包括将生物样品与如本文所述的分子(例如双特异性抗体或其免疫缀合物)在允许其与 CD28 和/或 TAA 结合的条件下接触,并检测在该分子与 CD28 或 TAA 之间是否形成复合物,其中复合物的形成表示存在 CD28 和/或 TAA。该方法可以是体外或体内方法。在一个实施方案中,本发明的分子用于选择适合利用针对本发明的抗 CD28 抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体或其免疫缀合物等)治疗的受试者,例如其中 CD28 和/或 HTRA1 是用于选择所述受试者的生物标记物。

在某些实施方案中,提供标记的本发明的分子(例如本发明的例如抗 CD28 抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体或其免疫缀合物等)。标记包括但不限于,被直接检测的标记或部分(如荧光标记、发色团标记、电子致密标记、化学发光标记和放射性标记),以及被间接检测的部分,如酶或配体,例如,通过酶促反应或分子相互作用。

在本文中提供的一些实施方案中,样品是在用本发明的分子或包含其的组合物、药物、制剂或组合产品治疗之前获得的。在一些实施方案中,样品是在用其他疗法之前获得的。在一些实施方案中,样品是在用其他疗法治疗过程中,或者用其他疗法治疗后获得的。

在一些实施方案中,在治疗之前,例如,在起始治疗之前或在治疗间隔后的某次治疗之前检测 TAA。

在一些实施方案中,提供了一种治疗本发明疾病的方法,所述方法包括:对受试者(例如,样品)(例如,受试者样品)检验 TAA 的存在,因而确定 TAA 值,将 TAA 的值与对照值(例如正常个体中的值)比较,并且如果 TAA 值大于对照值,则向受试者施用治疗有效量的任选与一种或多种其他疗法组合的本发明的双特异性抗体或包含其的组合物、药物或制剂,因而治疗所述疾病。

X. 具体实施方案

1. 抗 CD28 抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区 VH 的 3 个 CDR,CDRH1、CDRH2 和 CDRH3,以及轻链可变区 VL 的 3 个 CDR,CDRL1、CDRL2 和 CDRL3,其中

- (i). 所述 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 选自如 SEQ ID NO: 24、23 或 75 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3; 且所述 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3 为如 SEQ ID NO: 28 或 78 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3;
- (ii). 所述 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 选自如 SEQ ID NO: 4 或 5 或 72 中任一项所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3; 且所述 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3 为如 SEQ ID NO: 9 或 73 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3; 或
- (iii). 所述 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 选自如 SEQ ID NO: 13 或 69 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3; 且所述 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3 为如 SEQ ID NO: 17、19 或 70 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3。

2、抗 CD28 抗体或其抗原结合片段, 其包含 CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2 和 CDRL3, 其中

- (i). CDRH1 包含或由 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列组成; CDRH2 包含或由 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列组成; CDRH3 包含或由 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列组成; CDRL1 包含或由 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列组成; CDRL2 包含或由 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列组成; 和 CDRL3 包含或由 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列组成;
- (ii). CDRH1 包含或由 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列组成; CDRH2 包含或由 SEQ ID NO: 76 的氨基酸序列组成; CDRH3 包含或由 SEQ ID NO: 77 的氨基酸序列组成; CDRL1 包含或由 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列组成; CDRL2 包含或由 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列组成; 和 CDRL3 包含或由 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列组成;
- (iii). CDRH1 包含或由 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列组成; CDRH2 包含或由 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列组成; CDRH3 包含或由 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列组成; CDRL1 包含或由 SEQ ID NO:6 或 74 的氨基酸序列组成; CDRL2 包含或由 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列组成; 和 CDRL3 包含或由 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列组成; 或
- (iv). CDRH1 包含或由 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列组成; CDRH2 包含或由 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列组成; CDRH3 包含或由 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列组成; CDRL1 包含或由 SEQ ID NO:14 或 18 或 71 的氨基酸序列组成; CDRL2 包含或由 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列组成; 和 CDRL3 由 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列组成。

3、实施方案 1 或 2 的抗体或其抗原结合片段, 其包含重链可变区 VH, 其中所述重链可变区

(i)包含与 SEQ ID NO: 24、4、5、13、23、69、72 或 75 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 24、4、5、13、23、69、72 或 75 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

4、实施方案 1-3 中任一项的抗体或其抗原结合片段, 其包含轻链可变区 VL, 其中所述轻链可变区

(i)包含与 SEQ ID NO: 28、9、17、19、70、73 或 78 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 28、9、17、19、70、73 或 78 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

5、实施方案 1 或 2 的抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL,其中

- (i). 所述 VH 含有 SEQ ID NO: 24 或 23 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (ii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO: 75 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:78 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (iii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:23 或 24 或 75 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:28 或 78 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (iv). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:4 或 5 或 72 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:9 或 73 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (v). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:4 或 5 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (vi). 所述 VH 含有 SEQ ID NO: 72 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO: 73 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (vii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:13 或 69 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:17 或 19 或 70 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (viii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:17 或 19 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或

- (ix). 所述 VH 含有 SEQ ID NO: 69 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO: 70 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

6、实施方案 1 或 2 的抗体或其抗原结合片段, 其包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL,

- (i). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (ii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (iii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:72 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:73 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (iv). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (v). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (vi). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (vii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (viii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:69 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:70 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或
- (ix). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:75 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:78 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

7、抗 CD28 抗体或其抗原结合片段, 其包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL,

- (i). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (ii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (iii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:72 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:73 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (iv). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (v). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (vi). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (vii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (viii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:69 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:70 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或

(ix). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:75 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:78 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

8、实施方案 1-7 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其还包含重链恒定区 HC, 例如, 所述抗体重链恒定区 HC 为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的重链恒定区, 优选的人 IgG1 的重链恒定区, 优选地, 所述重链恒定区

(i) 包含与选自 SEQ ID NO: 29 或 79 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 29 或 79 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

9、实施方案 7 或 8 的抗体或其抗原结合片段, 其中所述重链恒定区包含降低与 Fc γ 受体结合的突变, 例如 LALA 突变和/或 P329del。

10、实施方案 1-9 中任一项的抗体或其抗原结合片段, 其包含轻链恒定区, 例如所述轻链恒定区为 lambda 或 kappa 轻链恒定区。

11、实施方案 10 的抗体或其抗原结合片段, 其中所述轻链恒定区

(i) 包含与 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或

(ii) 包含 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

12、实施方案 1-11 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体为人源化抗体或嵌合抗体。

13、实施方案 1-12 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体为单克隆抗体。

14、实施方案 1-13 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗原结合片段为选自以下的抗体片段: Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、单链抗体(例如 scFv)、(Fab')₂、单结构域抗体(例如 VHH)、dAb(domain antibody)或线性抗体。

15、实施方案 1-11 中任一项的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体是双特异性抗体或多特异性抗体, 其包含针对 CD28 的第一结合特异性和针对一种或多种的肿瘤相关抗原的其它结合特异性。

16、实施方案 15 的抗体或其抗原结合片段, 其中所述肿瘤相关抗原选自 CLDN18.2 或 PSMA。

17、双特异性抗体, 其包含第一抗原结合区和第二抗原结合区,

其中第一抗原结合区特异性结合 CD28, 且包含 VH 和 VL, 其中

所述 VH 包含如实施方案 1 或 2 所定义的 CDRH1、CDRH2、CDRH3 且所述 VL 包含实施方案 1 或 2 所定义的 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3; 或

所述 VH 和 VL 为如实施方案 3-6 中任一项所定义的 VH 和 VL;

第二抗原结合区特异性结合肿瘤相关抗原或免疫检查点分子。

18、实施方案 17 的双特异性抗体, 其中所述第一抗原结合区为实施方案 1-14 中任一项所定义的抗 CD28 抗体的 Fab。

19、实施方案 17 或 18 的双特异性抗体，其中所述第二抗原结合区为特异性结合肿瘤相关抗原或免疫检查点分子的 Fab。

20、实施方案 18 或 19 所述的双特异性抗体，其中所述作为第一抗原结合区或第二抗原结合区的 Fab 包含 CH1，其中所述 CH1 是来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 CH1，优选地来自 IgG1 的 CH1。

21、实施方案 20 所述的双特异性抗体，其中所述 CH1

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:74 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

(ii) 包含 SEQ ID NO:74 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

22、实施方案 18-21 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述作为第一抗原结合区或第二抗原结合区的 Fab 包含轻链恒定区，其中所述轻链恒定区为 Kappa 轻链恒定区或 Lambda 轻链恒定区。

23、实施方案 22 的双特异性抗体，其中所述 Kappa 轻链恒定区

(i) 包含与 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

(ii) 包含 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

24、实施方案 17-23 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述双特异性抗体是包含 Fc 二聚体的 IgG 样双特异性抗体，其中构成所述 Fc 二聚体的两个 Fc 区相同或不同，任选地，所述 Fc 区为人的 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 Fc，任选地，所述 Fc 区

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:94 或 95 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

(ii) 包含 SEQ ID NO: 94 或 95 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

25、实施方案 24 所述的双特异性抗体，其中所述两个 Fc 区不同，其中基于 Innobody 技术，在第一 Fc 区和第二 Fc 区中引入突变，促进第一 Fc 区和第二 Fc 区的异二聚化。

26、实施方案 25 的抗体或其抗原结合片段，其中一个 Fc 区的 CH3 包含 S364R 和 D399K 突变，且另一个 Fc 区的 CH3 突变包含 Y349T、K370S 和 K409D 突变。

27、实施方案 24-26 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述第一和/或第二 Fc 区包含降低与 Fcγ 受体结合的突变，例如 L234A/L235A 突变，以及任选地 P329delP。

28、实施方案 26 或 27 的双特异性抗体，其中

a) 一个 Fc 区包含 SEQ ID NO:80 所示的氨基酸序列或由其组成，且另一个 Fc 区包含 SEQ ID NO:81 所示的氨基酸序列或由其组成；

b) 一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:80 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列且包含突变 S364R 和 D399K，而另一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:81 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列且包含突变 Y349T、K370S 和 K409D；

c) 一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:80 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、

90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 S364R 和 D399K 和 L234A/L235A 突变以及 delP, 而另一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:81 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 Y349T、K370S 和 K409D 和 L234A/L235A 突变以及 delP;

d) 一个 Fc 区包含 SEQ ID NO:82 所示的氨基酸序列或由其组成, 且另一个 Fc 区包含 SEQ ID NO:83 所示的氨基酸序列或由其组成;

e) 一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:82 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 S364R 和 D399K, 而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:83 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 Y349T、K370S 和 K409D; 或

f) 一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:82 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 S364R 和 D399K 和 L234A/L235A 突变, 而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:83 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 Y349T、K370S 和 K409D 和 L234A/L235A 突变。

29、实施方案 17-28 中任一项的双特异性抗体, 其中所述 TAA 为 CLDN18.2, 优选地, 所述第二抗原结合区包含 3 个来自重链可变区的互补决定区 (CDRH), CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 和 3 个来自轻链可变区的互补决定区 (CDRL), CDRL1、CDRL2 和 CDRL3, 其中

CDRH1 包含 SEQ ID NO:87 的氨基酸序列或由其组成; CDRH2 包含 SEQ ID NO:88 的氨基酸序列或由其组成, CDRH3 包含 SEQ ID NO:89 的氨基酸序列或由其组成, CDRL1 包含 SEQ ID NO:91 的氨基酸序列或由其组成, CDRL2 包含 SEQ ID NO:92 的氨基酸序列或由其组成, 和 CDRL3 包含 SEQ ID NO:93 的氨基酸序列或由其组成。

30、实施方案 29 的双特异性抗体, 其中所述第二抗原结合区包含 VH 和 VL, 其中 VH 包含 SEQ ID NO:86 所示的序列或由所述序列组成; 和 VL 包含 SEQ ID NO:90 所示的序列或由所述序列组成。

31、实施方案 17-28 中任一项的双特异性抗体, 其中所述 TAA 为 PSMA, 优选地, 所述第二抗原结合区包含 3 个来自重链可变区的互补决定区 (CDRH), CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 和 3 个来自轻链可变区的互补决定区 (CDRL), CDRL1、CDRL2 和 CDRL3, 其中

CDRH1 包含 SEQ ID NO:96 的氨基酸序列或由其组成; CDRH2 包含 SEQ ID NO:97 的氨基酸序列或由其组成, CDRH3 包含 SEQ ID NO:98 的氨基酸序列或由其组成, CDRL1 包含 SEQ ID NO:99 的氨基酸序列或由其组成, CDRL2 包含 SEQ ID NO:100 的氨基酸序列或由其组成, 和 CDRL3 包含 SEQ ID NO:101 的氨基酸序列或由其组成。

32、实施方案 31 的双特异性抗体, 其中所述第二抗原结合区包含 VH 和 VL, 其中 VH 包含 SEQ ID NO:47 所示的序列或由所述序列组成; 和 VL 包含 SEQ ID NO:49 所示的序列或由所述序列组成。

33、实施方案 17-32 中任一项的双特异性抗体, 其中所述双特异性抗体包含特异性结合 CD28 的第一抗原结合区和特异性结合 TAA 的第二抗原结合区, 其中第一抗原结合区包含或为第一 Fab, 第二抗原结合区包含或为第二 Fab, 其中第一 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第一 Fc 区 N 末端连接 (经由或不经过接头, 例如铰链区), 第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第二 Fc 区 N 末端连接 (经由或不经过接头, 例如铰链区)。

34、实施方案 33 的双特异性抗体，其中所述双特异性抗体是 IgG 样抗体，其具有如图 3 所示的构型。

35、实施方案 33 或 34 所述的双特异性抗体，其包含作为特异性结合 CD28 的第一抗原结合区的第一 Fab 和作为特异性结合 TAA 的第二抗原结合区的第二 Fab，其中所述双特异性抗体包含

重链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第一 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第一 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第一 Fc 区 N 末端经由或不经由接头（例如铰链区）连接；

轻链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第一 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区；

重链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第二 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第二 Fc 区 N 末端经由或不经由接头（例如铰链区）连接；

轻链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区；

优选地，每个结构域直接连接。

36、实施方案 35 所述的双特异性抗体，其中 TAA 为 CLDN18.2，且其中

重链 1 包含 SEQ ID NO:35 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；轻链 1 包含 SEQ ID NO:36 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；重链 2 包含 SEQ ID NO:33 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和轻链 2 包含 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

重链 1 包含 SEQ ID NO:37 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；轻链 1 包含 SEQ ID NO:38 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；重链 2 包含 SEQ ID NO:33 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和轻链 2 包含 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

重链 1 包含 SEQ ID NO:39 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；轻链 1 包含 SEQ ID NO:40 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；重链 2 包含 SEQ ID NO:33 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和轻链 2 包含 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

37、实施方案 35 所述的双特异性抗体，其中 TAA 为 PSMA，且其中

重链 1 包含 SEQ ID NO:51 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；轻链 1 包含 SEQ ID NO:36 所示

的氨基酸序列,或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;重链 2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列,或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;和轻链 2 包含 SEQ ID NO:50 所示的氨基酸序列,或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

重链 1 包含 SEQ ID NO:52 所示的氨基酸序列,或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;轻链 1 包含 SEQ ID NO:38 所示的氨基酸序列,或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;重链 2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列,或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;和轻链 2 包含 SEQ ID NO:50 所示的氨基酸序列,或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或

重链 1 包含 SEQ ID NO:53 所示的氨基酸序列,或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;轻链 1 包含 SEQ ID NO:40 所示的氨基酸序列,或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;重链 2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列,或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;和轻链 2 包含 SEQ ID NO:50 所示的氨基酸序列,或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

38、核酸分子,其编码实施方案 1-16 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段的任一条链,或实施方案 17-37 中任一项的双特异性抗体中的任一条链,或由所述核酸序列组成。

39、表达载体,其包含实施方案 38 的核酸分子,优选地,所述表达载体为 pCDNA,例如 pCDNA3.1。

40、宿主细胞,其包含实施方案 38 所述的核酸分子或实施方案 39 所述的表达载体,优选地,所述宿主细胞是原核的或真核的,例如 293 细胞或 CHO 细胞,例如 Expi293 细胞。

41、制备实施方案 1-16 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或实施方案 17-37 中任一项所述的双特异性抗体的方法,所述方法包括,在适合所述抗体的链表达的条件下,培养实施方案 38 所述的核酸分子或实施方案 39 所述的表达载体的宿主细胞,和任选地从所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述抗体。

42、免疫缀合物,其包含实施方案 1-16 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或实施方案 17-37 中任一项所述的双特异性抗体。

43、药物组合物或药物或制剂,其包含实施方案 1-16 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或实施方案 17-37 中任一项所述的双特异性抗体,或实施方案 42 的免疫缀合物以及任选地药用辅料。

44、药物组合产品,其包含实施方案 1-16 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或实施方案 17-37 中任一项所述的双特异性抗体,或实施方案 42 的免疫缀合物,以及一种或多种其它治疗剂,优选地,所述治疗剂为用于治疗肿瘤的各种治疗剂,例如化疗剂、血管生成抑制剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂(例如免疫检查点抑制剂或激动剂),优选地,其它抗体为 PD-1 抗体。

45、在受试者中预防或治疗肿瘤的方法,包括向受试者施用有效量的实施方案 1-16 中任

一项的所述的抗体或其抗原结合片段或实施方案 17-37 中任一项所述的双特异性抗体，或实施方案 42 的免疫缀合物，或实施方案 43 的药物组合物或制剂；或实施方案 44 的药物组合产品。

46、实施方案 45 的方法，其中所述肿瘤是实体肿瘤或血液肿瘤，例如 TAA 阳性的肿瘤或癌症，任选地所述肿瘤为 CLDN18.2 阳性的胃肠道肿瘤，例如胃肠道癌症，例如胃癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌或结直肠癌；或所述肿瘤为 PSMA 阳性的肿瘤，例如肾细胞癌症，例如乳腺癌、肺癌、直肠癌或结直肠癌。

47、实施方案 45-46 中任一项的方法，其中所述方法还包括与其它疗法例如治疗方式（例如手术或放疗）和/或其它治疗剂组合施用，优选地，所述治疗剂为用于治疗肿瘤的各种治疗剂，例如化疗剂、血管生成抑制剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂（例如免疫检查点抑制剂或激动剂），优选地，其它抗体为 PD-1 抗体。

实施例 1：鼠源抗 CD28 抗体发现与亲和力检测

CD28 抗原免疫

将人的 CD28 胞外段蛋白 (Acro, Cat CD8-H52Hc)，与弗氏完全佐剂 (sigma, Cat#F5881) 乳化后免疫 Balb/c 小鼠 (购自北京维通利华实验动物技术有限公司)，两周后再与弗氏不完全佐剂 (sigma, F5506) 乳化后免疫三次，每两周皮下注射一次 (每只小鼠 50 微克蛋白)。

细胞融合和高通量筛选

当血清效价满足要求后，摘取小鼠的脾制备 B 淋巴细胞悬液，与 SP2/0 骨髓瘤细胞 (ATCC) 进行电融合。将融合后的细胞用选择性培养基 (含 20% FBS, 1 x HAT 的 1640 培养基) 稀释细胞至 $1\sim 2 \times 10^4$ 个细胞/毫升，铺到 96 孔板，每孔加入 100 微升细胞悬液。融合后第 7 天更换筛选培养基 (含 10% FBS, 1 x HT 的 1640 培养基)，培养第 10 天 (或更久，根据细胞生长状态) 后取上清进行检测。

通过流式细胞仪 (FACS) 筛选出特异性表达抗 CD28 抗体的杂交瘤细胞。将待检测细胞 (huCD28/GS-CHO, 内部构建) 计数，并稀释至 1×10^6 个细胞/毫升，向 U 型底 96 孔板中加入 100 微升/孔。500 g 离心 5 min，去除细胞培养基。将杂交瘤 96 孔板培养上清中加入 U 型板并重悬细胞，每孔加 100 微升，冰上静置 30min。500g 离心 5min 去除上清，PBS 洗细胞 1 遍。500 g 5min 离心去除 PBS，每孔加入 100 微升抗鼠 Fab 的 APC 标记的二抗 (Jackson Immunoresearch, Cat#115-606-071) (1:500 稀释于 PBS 中)，阳性对照抗体 (TGN1412 (Creative BioLabs TAB-064LC)) 加入 100 微升抗人 Fc 的 PE 标记的二抗 (Biolegend, Cat#409304)。冰上避光孵育 30 min。500g 5min 离心去除上清，PBS 洗涤细胞 1 遍。用 50 微升 $1 \times$ PBS 重悬细胞，FACS 上机检测。将阳性克隆上清，进行 CD28 的激活实验，将强激活功能的克隆用有限稀释法进行亚克隆，挑取单克隆细胞。

阳性杂交瘤细胞亚克隆

有限稀释法亚克隆步骤：准备一块 96 孔板，每孔加入 200 微升培养基，该培养基是在筛选培养基的基础上将 HAT 更换成 HT (Gibco, Cat#11067-030)，其余配方相同。将上述融合筛选出的阳性孔的细胞制成细胞悬液，分别取 100 微升加入到第一排的每个孔中混匀，然后

将第 1 排细胞悬液取 100 微升加入第 2 排，充分混匀后取 100 微升加入下一排；重复上述步骤，静置 96 孔板 30 min，显微镜下观察计数。取 100 个细胞对应的体积加入 20 毫升培养基，并混匀铺板，每孔 200 微升。一周后显微镜下观察，判断并标记出单克隆孔。

待每孔内细胞汇合度达到 50%以上时，用上述高通量的筛选方法检测，挑出目标阳性孔，扩大培养后进行细胞冻存。

嵌合抗体的制备

对上述实验中获得杂交瘤候选克隆进行抗体轻重链基因序列的调取，并将其构建成人鼠嵌合抗体 61F3G、5B11D8 以及 4F12B5，其抗体轻重链对应的序列如下，抗体重链恒定区为人 IgG1 重链恒定区(SEQ ID NO:79)。可变区以及 CDR 序列如下表 1。

取新鲜培养的细胞株，每株约 5E6 个，抽提 RNA(Macherey-Nagel, Cat#740984.250)。利用 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara) 反转录获得 cDNA。以位于 5'端 FR1 区的碱基序列设计上游引物，以位于抗体恒定区或 FR4 区的碱基设计下游引物，扩增出抗体轻链和重链可变区基因片段。将其连接到 T 载体中 (Mighty TA-cloning Kit 试剂盒, Takara)，挑取单克隆进行测序，将测序结果利用 MEGA7 软件进行分析比对。

经比对，抗体轻重链可变区序列正确且配对的克隆，分别将其轻重链可变区基因片段通过南京诺维赞公司的同源重组酶 (Exnase®II, 目录号: C112-01) 连接到 pcDNA3.1 载体 (包含 IgG1 重链恒定区 (SEQ ID NO:79) 或 Kappa 轻链恒定区(SEQ ID NO:30)) 中，其中恒定区选择 IgG1 亚型，获得轻链和重链抗体的表达质粒。

表 1: CD28 嵌合抗体 CDR 轻重链组合对照表

	61F3G3 序列	5B11D8 序列	4F12B5 序列
VH	69	72	75
CDRH1	10	1	20
CDRH2	11	2	76
CDRH3	12	3	77
VL:	70	73	78
CDRL1	71	6	25
CDRL2	15	7	26
CDRL3	16	8	27

用 Expi293F 培养基(Gibco, REF# A14351-01)培养 Expi293F 细胞(购自 Gibco)，转染前一天检测细胞密度 (活力需大于 95%)，并用新鲜的 Expi293F 培养基调整到 3E6 个细胞/毫升继续培养，转染当天将细胞密度调整为 3E6 个细胞/毫升。

取 1/10 转染终体积的 Opti-MEM 培养基 (Gibco, REF# 31985-070) 作为转染缓冲液，按照 1mg/L 的比例加入待转染的嵌合抗体的质粒，其中轻重链质粒配比为 1:1，混匀，按照 DNA:

PEI 质量比 1:3 加入 PEI_{Max} (Polysciences Inc. Cat# 24765-1), 混匀, 室温孵育 20 min, 然后将混合物轻柔地倒入 Expi293F 细胞悬液中, 边倒边摇, 细胞置于摇床培养, 培养条件为 8 % CO₂、36.5 °C、120 rpm。

培养 16~18h 后, 向细胞悬液中补加 2%(体积比) 的浓度为 200 g/L 的 Feed(100 g/L Phytone Peptone + 100g/L Difco Select Phytone)、终浓度为 5 g/L 的葡萄糖溶液和终浓度为 2.2 mM 的 Valproic acid sodium salt (Merk, Cat# P4543-100G), 轻轻混匀, 8 % CO₂、36.5 °C、120 rpm 继续培养 7 天后收样。将细胞料液与硅藻土 (Sartorius, Cat 1000037025) 混匀(1L 细胞料液加 40g 硅藻土), 用 0.22μm 的一次性真空过滤装置进行过滤。

亲和层析纯化目的蛋白: 选用 HiTrap MabSelect Prisma (GE Healthcare, Cat# 17549853) 亲和层析柱进行亲和捕获, 纯化前用 10-20 倍柱体积的 0.1 M NaOH 流经管路及亲和层析柱, 然后用 10-20 倍柱体积的蒸馏水清洗管路以及柱子, 用 5 倍柱体积的 1×PBS (Gibco) 平衡填料柱; 将过滤后的细胞料液通过柱子, 再用 10 倍柱体积的 1×PBS 清洗填料柱, 去除非特异性结合蛋白; 用 5 倍柱体积的洗脱缓冲液 (100 mM sodium citrate, pH 3.5) 冲洗填料, 收集洗脱液, 用 2 M Tris 调节 pH 至 6.0, 过滤除菌, 待纯度检测合格后用于后面功能分析。

嵌合抗 CD28 抗体的亲和力检测

在本研究中生物膜薄层干涉技术(BLI)测定本发明的抗体抗原的结合动力学参数(KD)。BLI 法亲和力测定按照现有的方法 (Estep, P 等人, High throughput solution Based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. MAbs, 2013.5(2): 第 270-8 页) 进行。

实验开始前半个小时, 根据样品数量, 取合适数量的 AHC 传感器 (18-5060, Sartorius) 浸泡于 SD 缓冲液 (1x PBS, 0.1% BSA, 0.05% Tween-20) 中。将上面提到的抗 CD28 抗体和人 CD28 重组蛋白 (CD8-H52Hc-1mg, ACRO) 分别稀释至 100 nM。

分别将 SD 缓冲液、抗体溶液、CD28 重组蛋白分别加入到 96 孔黑色聚苯乙烯微孔板 (Greiner, 655209) 中。使用 ForteBio Octet Red96e 进行检测, 根据样品位置布板, 选择传感器位置。仪器设置参数如下: 运行步骤: 平衡基线 120 s、加样固化抗体 100 s、平衡基线 120 s、结合抗原 100 s 和解离 120 s, 转速为 1000 rpm, 温度为 30°C。实验完成后, 使用 ForteBio Octet 分析软件分析 KD 值, 结果见下表 2。

从亲和力实验动力学参数可以看出这些嵌合 CD28 与人 CD28 重组蛋白都具有很强的亲和力。

表 2: 抗 CD28 抗体与 CD28 的亲和力

样品 ID	K _D (M)	k _{on} (1/Ms)	k _{dis} (1/s)
61F3G3	6.39E-10	3.13E+05	2.00E-04
5B11D8	5.42E-10	4.70E+05	2.54E-04
4F12B5	1.47E-09	2.75E+05	4.04E-04

实施例 2: 鼠源抗 CD28 抗体对 T 细胞 Reporter 激活检测

为了验证抗 CD28 抗体是否能够有效地识别人 CD28 并且激活 CD28 信号, 我们选取了 T 细胞系 Jurkat NFκB (吉满生物, GM-C07855) 报告细胞作为我们的研究对象, 判断 CD28 抗

体的活性。具体过程如下:

1. 用 PBS 稀释 anti-human IgG (Jackson ImmuneResearch, 109-005-098) 抗体(1 微克/毫升)加入到 96 孔平底板 (上海卧宏 WHB-96-03)中,每孔加入 100 微升。冰箱 4℃孵育过夜,使抗体与孔板底部充分结合。
2. 孵育结束后倾倒掉板中未结合的抗体溶液,每孔加入 100 微升的 PBS,清洗一次并弃掉 PBS。
3. 将培养的 Jurkat NFkB 细胞离心并用 Assay buffer(1% FBS(Gibco, SV30208.02), RPMI 1640 (Gibco, 22400-071)) 重悬, 每孔加入 50 微升 确保每孔细胞为 50000 个。
4. 用 Assay buffer 稀释待测试嵌合 CD28 抗体 (2 微克/毫升) 加或减 CD3 抗体 (Acro, CDE-M120A-1MG,0.5 微克/毫升终浓度)加入到孔板中,每孔加入 50 微升,放入 5% CO₂, 37℃ 培养箱中孵育 6h。
5. 实验结束后取出孔板放于试验台中平衡至室温,加入 100 微升 Bio-Glo 检测试剂 (Promega, G7940), 于酶标仪 (Molecular Devices, spectra MAX i3x) 上检测。

结果显示 (图 1), 在没有 CD3 (OKT3, Acro, CDE-M120A-1MG) 抗体提供的第一信号的情况下,对照抗体 TGN1412 (Tegenaro, US20060188493A1, 本发明中简称为 TGN)、5B11D8 以及 61F3G3 能够激活 CD28 下游的 NFkB 信号,而 4F12B5 不能。在有 CD3 抗体的情况下,本研究中的 CD28 抗体都能够激活 CD28 信号。

实施例 3: 鼠源抗 CD28 抗体的人源化

根据常规方法,将实施例 1-2 得到的嵌合抗体进行人源化。由此获得人源化抗体: hz5B11D8-a、hz5B11D8-b、hz61F3G3-a、hz61F3G3-b 和 hz4F12B5-a 以及 hz4F12B5-b,其 CDR 序列、轻链可变区和重链可变区序列,轻链和重链的氨基酸序列参见序列表以及表 3。重链恒定区选取人源 IgG1 序列 (SEQ ID NO:29),轻链恒定区分别根据可变区是 Kappa 选取对应的恒定区 CL-Kappa(SEQ ID NO:30) 。然后将抗体的重链序列和轻链序列分别构建到表达载体 pcDNA3.1 (Invitrogen, V790-20) 中,利用 Expi293 细胞 (Invitrogen, A14527) 进行转染,获得相应的人源化抗体。具体转染过程同实施例 1。

表 3: CD28 抗体人源化 CDR 突变抗体组合轻重链组合对照表

protein ID	VH	SEQ ID NO	CDRH 1 SEQ ID NO	CDRH 2 SEQ ID NO	CDRH 3 SEQ ID NO	VL	SEQ ID NO	CDRL 1 SEQ ID NO	CDRL 2 SEQ ID NO	CDRL 3 SEQ ID NO
hz5B11D8-a	hz5B11D8H.g.a	4	1	2	3	hz5B11D8K.g0	9	6	7	8
hz5B11D8-b	hz5B11D8H.g.b	5	1	2	3	hz5B11D8K.g0	9	6	7	8
hz61F3G3-a	hz61F3G3H.g0	13	10	11	12	hz61F3G3Kg0.h.p.a	17	14	15	16
hz61F3G3-b	hz61F3G3H.g0	13	10	11	12	hz61F3G3Kg0.h	19	18	15	16

b						p.b				
hz4F12B5-a	hz4F12B5H.g1.hp	23	20	21	22	hz4F12B5K.g0	28	25	26	27
hz4F12B5-b	hz4F12B5H.g2.hp	24	20	21	22	hz4F12B5K.g0	28	25	26	27

实施例 4：人源化的抗 CD28 抗体的制备以及亲和力检测

抗体制备: 用 Expi293F 培养基(Gibco, REF# A14351-01)培养 Expi293F 细胞(购自 Gibco), 转染前一天检测细胞密度 (活力需大于 95%), 并用新鲜的 Expi293F 培养基调整到 3E6 个细胞/毫升继续培养, 转染当天将细胞密度调整为 3E6 个细胞/毫升。

取 1/10 转染终体积的 Opti-MEM 培养基 (Gibco, REF# 31985-070) 作为转染缓冲液, 按照 1mg/L 的比例加入待转染的人源化单克隆抗体的质粒(实施例 3 中获得的质粒), 其中轻重链质粒配比为 1:1, 混匀, 按照 DNA: PEI 质量比 1:3 加入 PEIMax (Polysciences Inc. Cat# 24765-1), 混匀, 室温孵育 20 min, 然后将混合物轻柔地倒入 Expi293F 细胞悬液中, 边倒边摇, 细胞置于摇床培养, 培养条件为 8 % CO₂、36.5 °C、120 rpm。

培养 16~18h 后, 向细胞悬液中补加 2%(体积比)的浓度为 200 g/L 的 Feed(100 g/L Phytone Peptone + 100g/L Difco Select Phytone)、终浓度为 5 g/L 的葡萄糖溶液和终浓度为 2.2 mM 的 Valproic acid sodium salt (Merk, Cat# P4543-100G), 轻轻混匀, 8 % CO₂、36.5 °C、120 rpm 继续培养 7 天后收样。将细胞料液与硅藻土 (Sartorius, Cat 1000037025) 混匀(1L 细胞料液加 40g 硅藻土), 用 0.22μm 的一次性真空过滤装置进行过滤。

亲和层析纯化目的蛋白: 选用 HiTrap MabSelect Prisma (GE Healthcare, Cat# 17549853) 亲和层析柱进行亲和捕获, 纯化前用 10-20 倍柱体积的 0.1 M NaOH 流经管路及亲和层析柱, 然后用 10-20 倍柱体积的蒸馏水清洗管路以及柱子, 用 5 倍柱体积的 1×PBS (Gibco) 平衡填料柱; 将过滤后的细胞料液通过柱子, 再用 10 倍柱体积的 1×PBS 清洗填料柱, 去除非特异性结合蛋白; 用 5 倍柱体积的洗脱缓冲液 (100 mM sodium citrate, pH 3.5) 冲洗填料, 收集洗脱液, 用 2 M Tris 调节 pH 至 6.0, 过滤除菌, 待纯度检测合格后用于后面功能分析。

应用实施例 1 中提到的生物膜薄层干涉技术 (BLI) 测定本发明的人源化 CD28 抗体的亲和力。人源化分子亲和力如下表 (表 4)。

表 4: 人源化抗体与 CD28 的亲和力

样品 ID	K _D (M)	k _{on} (1/Ms)	k _{dis} (1/s)
hz5B11D8-a	7.46E-10	2.68E+05	2.00E-04
hz5B11D8-b	5.33E-10	3.75E+05	2.00E-04
hz61F3G3-a	8.12E-09	5.51E+05	4.48E-03
hz61F3G3-b	9.39E-09	6.49E+05	6.09E-03

hz4F12B5-a	3.06E-08	3.58E+05	1.09E-02
hz4F12B5-b	1.70E-08	3.22E+05	5.47E-03

实施例 5: 人源化的抗 CD28 抗体对 T 细胞激活检测

为了验证人源化 CD28 抗体是否仍然维持活性, 我们检测这些抗体在体外能否有效激活人外周 T 细胞。具体过程如下:

1. 提前一天取出 PBMC 细胞 (妙顺生物), 在 25°C, 400G, 4min 的条件下离心, 用生长培养基 (Gibco, 1640) 重悬, 放入培养瓶, 加入终浓度为 2 微克/毫升 的 DNase I (SIGMA, D5025-375KU), 在 5%CO₂, 37°C 培养箱中过夜培养。

2. 用 PBS 稀释待测 CD28 人源化抗体(1 微克/孔) (或同时加入 CD3 抗体 (Acro, CDE-M120A-IMG, 0.1 微克/孔) 加入到 96 孔平底板中), 每孔加入 100 微升的待检测 CD28 人源化抗体。冰箱 4°C 孵育过夜, 使抗体与孔板底部充分结合。

3. 实验当天, 抗体孵育结束后倾倒掉板中未结合的抗体溶液, 每孔加入 100 微升的 PBS, 清洗一次并弃掉 PBS。

4. 取出前一天复苏的 PBMC 细胞, 倒出悬浮细胞至离心管中, 在 25°C, 400G, 4min 的条件下离心后用 Assay buffer (RPMI 1640, 1% FBS) 调整细胞密度, 按每孔 100 微升 (100000 cells/well) 调整细胞浓度, 将细胞铺入包被抗体后的 96 孔平底板中。放入 5%CO₂, 37°C 培养箱中培养。

5. 细胞培养结束前 4 小时, 从培养箱中取出 96 孔板, 每孔吸取 50 微升上清液至一个新的 96 孔圆底板中, 用于细胞因子检测实验, 冰箱-40°C 冻存。在 96 孔平底板中加入蛋白酶转运抑制剂 (Invitrogen, 00-4980-93), 每孔加入 50 微升, 放入 5%CO₂, 37°C 培养箱中孵育 4h。

6. 孵育结束后, 准备流式抗体染色。首先, 将 96 孔平底板在 25°C, 400G, 4min 的条件下离心, 弃掉培养液上清。用 PBS 重悬细胞, 并转移至一个新的 96 孔圆底板中, 在 25°C, 400G, 4min 的条件离心, 弃掉 PBS 洗液。

7. 加入事先配置好的表面封闭染料混合液: Fc 封闭 (BD, 564219, 1:200 PBS) 死活染料 (Invitrogen L34968A 1:100 PBS), 每孔加入 50 微升。室温避光孵育 10min。孵育结束后, 直接于每孔加入 50 微升的 1:100 细胞表面染料混合液: PD1 抗体 (Biolegend, 329918)、CD4 抗体 (Biolegend, 329918) 或 CD8 抗体 (Biolegend, 344724) 在 FACS buffer 中, 4°C 避光孵育 30min。

8. 表面染料孵育结束后, 在 25°C, 400G, 4min 的条件下离心, 弃掉未结合细胞的染料。用 FACS 洗液(2 mM EDTA, 0.5% BSA, PBS)重悬细胞, 离心洗涤两遍。

9. 加入 Fix/Perm buffer (ebioscience 00-5523-00 Invitrogen, 00-8333-56) 100 微升/孔, 室温避光孵育 30min, 穿透细胞膜。

10. 孵育结束后, 在 25°C, 400G, 4min 的条件下离心, 弃掉 Fix/Perm buffer。用 PBE (Invitrogen, 00-8333-56) 洗液重悬细胞, 离心弃掉洗液。

11. 加入细胞内染料 TNF- α 抗体(Biolegend , 502946), 50 微升/孔, 室温避光孵育 30min。
12. 孵育结束后, 在 25°C, 400G, 4min 的条件下离心, 弃掉未结合细胞的染料。用 PBE 洗液重悬细胞, 洗涤两次, 弃掉洗液。
13. 用 FACS 洗液重悬细胞, 150 微升/孔, 上机检测 (BD FACS SYMPHONY A3)。

结果显示(图 2A-B), 在没有 CD3 抗体提供的第一信号的情况下, 对照抗体 TGN1412 (本研究中简称为 TGN) 能够不依赖第一信号激活 CD4T 和 CD8T 细胞, 释放 TNF α 。本发明中的嵌合抗体 5B11D8 以及 61F3G3 表现出 CD28 超级激动活性, 而 4F12B5 为常规 CD28 激动抗体。人源化后, hz5B11D8-a 和 hz61F3G3-a 相比亲本活性有所下降, 而 hz5B11D8-b、hz61F3G3-b、hz4F12B5-a 以及 hz4F12B5-b 具有与亲本相似的活性。

在有 CD3 抗体提供的第一信号的情况下(图 2C-D), 本发明中的抗体均能不同程度激活 CD4 及 CD8 T 细胞释放 TNF。

实施例 6: CLDN18.2xCD28 双特异性抗体的构建与制备

为了检测 CD28 人源化抗体的单价亲和力, 以及肿瘤相关抗原依赖的 T 细胞的激活能力, 本研究中构建表达了靶向 Claudin18.2 的 CLDN18.2xCD28 双特异性抗体 BsAb-1、BsAb-2、BsAb-3 以及 BsAb-BM-1 (表 5)。双抗分子为“1+1”形式(图 3A), 其中靶向 CLDN18.2 的可变区来自于 HB37A6 (CN202010570517.X(WO2021254481A1), 序列信息见序列表), 抗 CD28 的可变区序列来自与本发明中的人源化抗体 hz5B11D8-a、hz61FG3-a、hz4F12B5-b 以及 TGN1412 (Tegenero, US20060188493A1, 序列见序列表 SEQ ID NO:41-44) 的可变区序列(表 6), 抗体的 Fc 片段采用的是 Innobody (双抗技术来自于 CN116888149A) IgG1 LALA delP 形式, 抗体的示意图如图 3A 所示。

因此, 双特异性抗体 CLDN18.2 端部分的重链为 SEQ ID NO:33, 轻链为 SEQ ID NO:34。本发明中双特异性抗体 CD28 端部分的重链分别为 SEQ ID NO:35、37 和 39, 轻链分别为 SEQ ID NO:36、38 和 40。本发明中双特异性抗体用到的对照 CD28(TGN1412)端的重链为 SEQ ID NO:42, 轻链为 SEQ ID NO:44。

表 5: CLDN18.2xCD28 双抗组合

CLDN18.2xCD28 双抗	CLDN18.2	CD28
BsAb-1	HB37A6	hz5B11D8-a
BsAb-2	HB37A6	hz61FG3-a
BsAb-3	HB37A6	hz4F12B5-b
BsAb-BM-1	HB37A6	TGN1412

HB37A6 重链和轻链对应的序列: SEQ ID NO:33 和 SEQ ID NO:34。

TGN1412 重链和轻链对应的序列: SEQ ID NO:42 和 SEQ ID NO:44。

表 6: CLDN18.2xCD28 双特异性抗体序列信息表

CLDN18.2xCD28 双抗	CLDN18.2 端	CD28 端
BsAb-1	重链可变区: SEQ ID NO:86 重链: SEQ ID NO:33 重链恒定区(Inno-A): SEQ ID NO:31 Fc 区: SEQ ID NO:80 轻链可变区: 90 轻链: SEQ ID NO:34 轻链恒定区: SEQ ID NO:30	重链可变区: SEQ ID NO:4 重链: SEQ ID NO:35 重链恒定区(Inno-B): SEQ ID NO:32 Fc 区: SEQ ID NO:81 轻链可变区: SEQ ID NO:9 轻链: SEQ ID NO:36 轻链恒定区: SEQ ID NO:30
BsAb-2		重链可变区: SEQ ID NO:13 重链: SEQ ID NO:37 重链恒定区(Inno-B): SEQ ID NO:32 Fc 区: SEQ ID NO:81 轻链可变区: SEQ ID NO:17 轻链: SEQ ID NO:38 轻链恒定区: SEQ ID NO:30
BsAb-3		重链可变区: SEQ ID NO:24 重链: SEQ ID NO:39 重链恒定区(Inno-B): SEQ ID NO:32 Fc 区: SEQ ID NO:81 轻链可变区: SEQ ID NO:28 轻链: SEQ ID NO:40 轻链恒定区: SEQ ID NO:30
BsAb-BM-1		重链可变区: SEQ ID NO:41 重链: SEQ ID NO:42 重链恒定区(Inno-B): SEQ ID NO:32 Fc 区: SEQ ID NO:81 轻链可变区: SEQ ID NO:43 轻链: SEQ ID NO:44 轻链恒定区: SEQ ID NO:30

双特异性抗体的制备

本发明中的双抗均采用两个亲本蛋白先分别表达纯化后再通过体外还原氧化重组的方式制备而成。双抗制备路线如下:

质粒构建: 本发明中双抗的的序列由金唯智基因合成, 将双抗中对应轻链可变区以及重链可变区(表 6)装载到包含对应的重链恒定区或轻链恒定区的 pcDNA3.1 的载体上(Invitrogen, V790-20), 分别得到 CLDN18.2 端的重链质粒、轻链质粒, CD28 端的重链质粒、轻链质粒。

用 Expi293F 培养基(Gibco, REF# A14351-01)培养 Expi293F 细胞(购自 Gibco), 转染前一

天检测细胞密度(活力需大于95%),并用新鲜的 Expi293F 培养基调整到 3E6 个细胞/毫升继续培养,转染当天将细胞密度调整为 3E6 个细胞/毫升。

取 1/10 转染终体积的 Opti-MEM 培养基(Gibco, REF# 31985-070)作为转染缓冲液,按照 1mg/L 的比例加入待转染的 DNA,其中轻重链质粒配比为 1:1,混匀,按照 DNA: PEI 质量比 1:3 加入 PEI Max (Polysciences Inc. Cat# 24765-1),混匀,室温孵育 20 min,然后将混合物轻柔地倒入 Expi293F 细胞悬液中,边倒边摇,细胞置于摇床培养,培养条件为 8 % CO₂、36.5 °C、120 rpm。

培养 16~18h 后,向细胞悬液中补加 2%(体积比)的浓度为 200 g/L 的 Feed(100 g/L Phytone Peptone + 100g/L Difco Select Phytone)、终浓度为 5 g/L 的葡萄糖溶液和终浓度为 2.2 mM 的 Valproic acid sodium salt (Merk, Cat# P4543-100G),轻轻混匀,8 % CO₂、36.5 °C、120 rpm 继续培养 7 天后收样。将细胞料液与硅藻土(Sartorius, Cat 1000037025)混匀(1L 细胞料液加 40g 硅藻土),用 0.22μm 的一次性真空过滤装置进行过滤。

亲和层析纯化目的蛋白:选用 HiTrap MabSelect Prisma (GE Healthcare, Cat# 17549853)亲和层析柱进行亲和捕获,纯化前用 10-20 倍柱体积的 0.1 M NaOH 流经管路及亲和层析柱,然后用 10-20 倍柱体积的蒸馏水清洗管路以及柱子,用 5 倍柱体积的 1×PBS (Gibco)平衡填料柱;将过滤后的细胞料液通过柱子,再用 10 倍柱体积的 1×PBS 清洗填料柱,去除非特异性结合蛋白;用 5 倍柱体积的洗脱缓冲液(100 mM sodium citrate, pH 3.5)冲洗填料,收集洗脱液,用 2 M Tris 调节 pH 至 6.0,过滤除菌,备用于进一步的离子交换层析。

体外还原氧化:将亲和层析下来的蛋白收集液按照摩尔比 1:1 混合,加入适量 GSH,用 2M Tris 调节反应 pH 至 8.0。室温过夜。反应物换液至 PBS 中于 4°C 放置备用。

离子交换层析纯化双抗:选用 Mono S 5/50 GL (获自 GE Healthcare)离子交换层析柱,并置于 AKTApure 系统(GE healthcare)内。用 0.5 M NaOH 对装备有 Mono S 5/50 GL 离子交换层析柱的 AKTApure 系统除内毒素 2 小时,然后,用蒸馏水清洗系统以及柱子。使用 5-10 倍柱体积的上样缓冲液(20 mM NaPO₄, pH 6.6)平衡柱子,直至电导以及 pH 稳定;将亲和层析所获得的蛋白用上样缓冲液稀释 10 倍,然后上样;使用 5 倍柱体积的上样缓冲液再平衡;以洗脱缓冲液(20 mM NaPO₄, 1 M NaCl, pH 6.6)的含量为 0-40 % 的梯度进行线性洗脱,共洗脱 30 个柱体积,根据紫外吸收值来收集样品。

利用大小排阻层析(size exclusion chromatography; SEC)检测收集的各级分管中样品的纯度。根据 SEC 结果将纯度大于 95% 的级分管中的样品合并。

将纯化后的双特异性抗体溶液使用 15 毫升超滤离心管,4500 转/分钟离心 30 分钟,使用 PBS 将蛋白稀释后继续离心,4500 转/分钟离心 30 分钟,重复该操作几次,以更换缓冲液。将更换缓冲液后的抗体合并,测抗体浓度。进一步利用毛细管电泳(CE-SDS)和液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)相结合对双特异性抗体的成分和含量进行定性和定量。获得表 5 中的双特异性抗体用于以下实施例研究。

CLDN18.2xCD28 双特异性抗体亲和力检测

为了表征双抗 CD28 双抗两端的亲和力,本研究中采用生物膜薄层干涉测定技术(BLI)测定本发明双特异性抗体结合人 CD28 以及 Claudin18.2 蛋白的平衡解离常数(KD)。具体方法可以参考实施例 1。

经过检测发现(表 7), 双抗中的 CLDN18.2 端对 Claudin18.2 蛋白具很高的亲和力。双抗中的 CD28 端的亲和力表现出了一定的差异。

表 7: CLDN18.2xCD28 双抗两端的亲和力检测

Sample ID	CLDN18.2 端亲和力			CD28 端亲和力		
	K _D (M)	k _{on} (1/Ms)	k _{dis} (1/s)	K _D (M)	k _{on} (1/Ms)	k _{dis} (1/s)
BsAb-1	2.25E-10	8.90E+05	2.00E-04	1.71E-08	2.17E+05	3.70E-03
BsAb-2	2.71E-10	7.37E+05	2.00E-04	1.19E-07	8.27E+05	9.85E-02
BsAb-3	2.24E-10	8.94E+05	2.00E-04	2.67E-07	1.44E+05	3.83E-02

实施例 7: CLDN18.2xCD28 双特异性抗体的体外活性检测

7.1 CLDN18.2xCD28 双抗体外 NFkB Reporter 激活检测

在前面的研究当中,我们已经验证了 CD28 单克隆抗体能够有效地激活 CD28 信号通路,进而激活 T 细胞。这里我们想验证下 CD28 组装成双特异性抗体后是否依然能够对 T 细胞有很好的激动活性。首先我们在体外验证 CLDN18.2xCD28 双抗对 NFkB Jurkat Reporter 细胞上的激活性质。在这个研究体系当中,我们需要应用到表达 Claudin18.2 的肿瘤细胞来提供一个“抓手”,使 CLDN18.2xCD28 双抗的一端 CLDN18.2 能够有效结合到肿瘤细胞上面。此外,在研究中也需验证 CD28 一端,为此本研究中引入了表达 CD28 的 T 细胞系 Jurkat 与表达 Claudin18.2 肿瘤细胞的共培养体系。整个研究过程如下:

DANG-18.2 细胞的构建:

将人源 CLDN18.2 (UniProt ID: P56856-2) 的全长基因构建到载体 pWPT-GFP (Addgene, 12255) 中,替换其中的 GFP 序列,与慢病毒的包装载体 psPAX2 (Addgene, 12260) 和 pMD2.G (Addgene, 12259) 共同转染到 HEK293T (ATCC, CRL-3216) 细胞中,进行病毒的包装。分别收集培养了 48 小时和 72 小时后的培养上清,使用 PEG8000 进行慢病毒的浓缩。用浓缩后的病毒转染胰腺癌 DAN-G 细胞 (DSMZ, 货号 ACC 249), 然后利用流式细胞分选仪 (MoFlo XDP, Beckman Coulter) 将表达 CLDN18.2 的细胞分选出来,获得稳定转染 CLDN18.2 的肿瘤细胞系 DANG-18.2。

CLDN18.2xCD28 双抗激活 NFkB Reporter

靶细胞和效应细胞处理: 从 T75 简易培养瓶取出培养的 DANG-18.2 细胞系,在 25°C, 400G, 4min 的条件下离心,生长培养基调整细胞密度,按每孔 100 微升 (40000 cells/well) 调整细胞浓度,混匀,将细胞铺入 96 孔培养白板中。取出包被有靶细胞的 96 孔培养白板,弃掉培养液。

根据实验设计梯度稀释 CLDN18.2xCD28 双抗(表 5),抗体以 100nM 浓度作为起始浓度,按 4 倍梯度依次稀释,共稀释 10 个浓度梯度,用 Assay buffer (1%FBS, 1640) 稀释抗体。在铺有靶细胞的孔板中,每孔加入 50 微升的待检测抗体(IgG, Jackson ImmuneResearch, 109-005-098)。

从 T75 简易培养瓶取出培养的 NFkB Jurkat 细胞系 (吉满生物, GM-C07855), 在 25°C,

400G, 4min 的条件下离心, 用 Assay buffer 调整细胞密度, 按每孔 50 微升 (50000 cells/well) 调整细胞浓度, 混匀, 同时加入 OKT3 (终浓度 0.5 微克/毫升), 混匀后共同加入 96 孔培养白板中。在 5%CO₂, 37°C 培养箱中孵育 6h。

从培养箱中取出 96 孔培养白板, 加 Bio-Glo Luciferase Reagent (Promega, G7940) 溶液 100 微升/孔, 室温 2min 后使用酶标仪 (Molecular Devices, spectra MAX i3x) 检测。

结果如图 4 所示, CD28 单克隆抗体 TGN 不能够有效地激活 CD28 信号。在有 CLDN18.2 提供“抓手”的情况下, CD28 双抗 BsAb-1、BsAb-2 以及 BsAb-3 都能够有效地激活 CD28 信号通路下游的 NFkB 信号, 且随着浓度的增加信号越强。

7.2 CLDN18.2xCD28 双抗体介导 T 细胞杀伤实验

为了进一步验证 CD28 双抗的体外活性, 我们检测 CLDN18.2xCD28 双抗是否能够激活人外周 T 细胞进而杀伤肿瘤细胞。在此研究中, 肿瘤细胞表面通过表达了一个 aAPC 提供第一信号, 此外在肿瘤细胞表面我们也转染了 CLDN18.2, 作为抗体一端特异性的识别靶点。整个实验过程具体如下:

CLDN18.2-aAPC-CHO K1 构建如下:

将人源 CLDN18.2 (UniProt ID: P56856-2) 的全长基因构建到载体 pWPT-GFP (Addgene, 12255) 中, 替换其中的 GFP 序列, 与慢病毒的包装载体 psPAX2 (Addgene, 12260) 和 pMD2.G (Addgene, 12259) 共同转染到 aAPC-CHO K1 (Promega, J1250) 细胞中, 进行病毒的包装。分别收集培养了 48 小时和 72 小时后的培养上清, 使用 Lenti-X Concentrator (Takara, Cat#631232, Lot#2109261A) 进行慢病毒的浓缩。用浓缩后的病毒转染仓鼠卵巢 aAPC-CHO K1 细胞 (Promega, J1250), 然后利用流式细胞分选仪 (BD FACSAria™ Fusion Cell Sorter) 将表达 CLDN18.2 的细胞分选出来, 获得稳定转染 CLDN18.2 的细胞系 CLDN18.2-aAPC-CHO K1。

CLDN18.2xCD28 介导 T 细胞杀伤过程如下:

1. 靶细胞铺板

取出培养的 CLDN18.2-aAPC-CHO K1 用胰酶消化, 用生长培养基重悬细胞终止消化过程, 离心, 用 Assay buffer 调整细胞密度, 按每孔 100 微升 (10000 cells/well) 将细胞铺入 96 孔圆底板中培养 16-20 小时, 边缘孔加入 Assay buffer, 200 微升/孔。

2. 效应细胞处理

取出冻存的 PBMC 一只, 在 37°C 水浴锅中融化, 在 25°C, 400G, 4min 的条件下离心。根据 EasySep Human CD8+ T Cell (STEMCELL, 19053) 的说明书操作, 分离出 CD8+T 细胞。用 RPMI 1640 培养基重悬, 放入在 5%CO₂, 37°C 培养箱中培养过夜。次日取出后在 25°C, 400G, 4min 的条件下离心, 用 Assay buffer 调整细胞浓度, 按每孔 50 微升 (50000 cells/well) 将 CD8+T 细胞加入到 96 孔圆底板中, 效应细胞:靶细胞=5:1。

3. 稀释抗体

根据实验设计梯度稀释待测抗体, 抗体以 50nM 浓度作为起始浓度, 按 4 倍梯度依次稀释, 共稀释 10 个浓度梯度, 稀释液为 Assay buffer。吸取 50 微升梯度稀释的抗体加入到铺有

CD8+T 细胞和 CLDN18.2-aAPC-CHO K1 细胞的 96 孔圆底板中。5%CO₂, 37°C培养箱中培养 48h, 每孔总体积为 200 微升。

4. 细胞对照组孔加入 20 微升 10x Lysis Buffer 溶解靶细胞, 在 5%CO₂, 37°C培养箱中孵育 45min。根据 Radio Cytotoxicity Assay Kit (Promega, G1781) 说明书操作, 配置检测试剂。将 96 孔圆底板离心, 沉降细胞, 取 50 微升的 Mix buffer 于一个 96 孔平底培养板中, 并在每孔加入 50 微升的实验孔板的培养液上清, 室温避光孵育 30min。加入 Stop buffer 50 微升/孔, 1h 内在酶标仪 (Molecular Devices, spectra MAX i3x) 490nm 或 492nm 波长下读值。

结果(图 5)显示, 待测的几个 CD28 双特异性抗体在第一信号以及细胞表面 Claudin18.2 存在的情况下能够有效激活 T 细胞, 杀伤肿瘤细胞。

7.3 CLDN18.2xCD28 双抗体外激活 T 细胞实验

为了进一步验证本发明中 CLDN18.2xCD28 抗体的活性, 我们检测这些抗体在体外能否有效激活人外周 T 细胞。具体过程如下:

1. 提前一天取出 PBMC 细胞, 在 25°C, 400G, 4min 的条件下离心, 用生长培养基重悬, 放入培养瓶, 加入终浓度为 2 微克/毫升的 DNase I (SIGMA, D5025-375KU), 在 5%CO₂, 37°C培养箱中过夜培养。

2. 用 PBS 稀释 CLDN18.2xCD28 双抗(1 微克/孔)或者因需要将 CD3 抗体 (Acro, CDE-M120A-1MG, 0.1 微克/孔) 加入到 96 孔平底板中, 每孔加入 100 微升的待检测抗体。冰箱 4°C孵育过夜, 使抗体与孔板底部充分结合。

3. 实验当天, 抗体孵育结束后倾倒掉板中未结合的抗体溶液, 每孔加入 100 微升的 PBS, 清洗一次并弃掉 PBS。

4. 取出前一天复苏的 PBMC 细胞, 倒出悬浮细胞至离心管中, 在 25°C, 400G, 4min 的条件下离心后用 Assay buffer (RPMI 1640, 1% FBS)调整细胞密度, 按每孔 100 微升 (100000 cells/well) 调整细胞浓度, 将细胞铺入包被抗体后的 96 孔平底板中。放入 5%CO₂, 37°C培养箱中培养。

5. 细胞培养结束前 4 小时, 从培养箱中取出 96 孔板, 每孔吸取 50 微升上清液至一个新的 96 孔圆底板中, 用于细胞因子检测。实验, 冰箱-40°C冻存。在 96 孔平底板中加入蛋白酶转运抑制剂 (Invitrogen, 00-4980-93), 每孔加入 50 微升, 放入 5%CO₂, 37°C培养箱中孵育 4h。

6. 孵育结束后, 准备流式抗体染色。首先, 将 96 孔平底板在 25°C, 400G, 4min 的条件下离心, 弃掉培养液上清。用 PBS 重悬细胞, 并转移至一个新的 96 孔圆底板中, 在 25°C, 400G, 4min 的条件离心, 弃掉 PBS 洗液。

7. 加入事先配置好的表面封闭染料混合液: Fc 封闭 (BD, 564219, 1:200 PBS) 死活染料 (Invitrogen L34968A 1:100 PBS), 每孔加入 50 微升。室温避光孵育 10min。孵育结束后, 直接于每孔加入 50 微升的 1:100 细胞表面染料混合液: PD1 抗体 (Biolegend, 329918)、CD4 抗体 (Biolegend, 329918) 以及 CD8 抗体 (Biolegend, 344724) 在 FACS buffer 中, 4°C避光孵育 30min。

8. 表面染料孵育结束后, 在 25°C, 400G, 4min 的条件下离心, 弃掉未结合细胞的染料。用 FACS 洗液(2 mM EDTA, 0.5% BSA, PBS)重悬细胞, 离心洗涤两遍。

9. 加入 Fix/Perm buffer (ebioscience 00-5523-00 Invitrogen, 00-8333-56) 100 微升/孔, 室温避光孵育 30min, 穿透细胞膜。
10. 孵育结束后, 在 25°C, 400G, 4min 的条件下离心, 弃掉 Fix/Perm buffer。用 PBE (Invitrogen, 00-8333-56) 洗液重悬细胞, 离心弃掉洗液。
11. 加入细胞内染料混合液: IFN- γ 抗体 (Biolegend, 506504) 和 TNF- α 抗体 (Biolegend, 502946) 的混合液, 50 微升/孔, 室温避光孵育 30min。
12. 孵育结束后, 在 25°C, 400G, 4min 的条件下离心, 弃掉未结合细胞的染料。用 PBE 洗液重悬细胞, 洗涤两次, 弃掉洗液。
13. 用 FACS 洗液重悬细胞, 150 微升/孔, 上机检测 (BD FACS SYMPHONY A3)。

结果显示 (图 6), 在没有 CD3 抗体提供的第一信号的情况下, 对照抗体 BsAb-BM-1 (单价的 TGN) 能够不依赖第一信号激活 CD4T 细胞释放 TNF α , 也进一步证实 TGN 作为单臂的 CD28 抗体也同样表现出了超级激动属性 (图 6A)。在同样的条件下, 本发明中有三个 CD28 双特异性抗体没有表现出 CD28 超级激动活性。在有 CD3 抗体提供的第一信号的情况下, 所有的 CD28 双特异性抗体都能有效地激活 T (CD4 和 CD8) 细胞 (图 6B), 释放不同水平的细胞因子 TNF α 。

实施例 8: PSMAxCD28 双特异性抗体的构建与制备

为了进一步检测 CD28 人源化抗体的功能, 本研究中构建表达了靶向人 PSMA 的 PSMAxCD28 双特异性抗体 (表 8)。双抗分子为“1+1”形式(图 3B), 其中靶向 PSMA 的可变区来自于 1C3 (EP1851250B1, 序列信息见表 9), 抗 CD28 的可变区序列来自本发明中的人源化抗体 hz5B11D8-a、hz61FG3-a、hz4F12B5-b 的可变区序列 (表 9), 抗体的 Fc 片段采用的是 Innobody (双抗技术来自于 CN116888149A) IgG1 LALA 形式, 抗体的示意图如图 3B 所示。因此, 双特异性抗体 PSMA 端 1C3 部分的重链为 SEQ ID NO:48, 轻链为 SEQ ID NO:50。本发明中双特异性抗体 CD28 端部分的重链分别为 SEQ ID NO:51、52 和 53, 轻链分别为 SEQ ID NO:36、38 和 40。

本发明中双特异性抗体用到的对照 PSMAxCD28: REGN5678 (US20190389951A1)) PSMA 端的重链为 SEQ ID NO:55, 轻链为 SEQ ID NO: 57, CD28 端的重链为 SEQ ID NO:59, 轻链为 SEQ ID NO: 57。

表 8: PSMAxCD28 双抗组合

PSMAxCD28 双抗	PSMA	CD28
BsAb-4	1C3	hz5B11D8-a
BsAb-5	1C3	hz61FG3-b
BsAb-6	1C3	hz4F12B5-b
REGN5678	11838P2	14226P2(Regeneron, US20190389951A1)

表 9: PSMAxCD28 双特异性抗体信息表

PSMAxCD28 双抗	PSMA 端	CD28 端
BsAb-4	重链可变区: SEQ ID NO:47 重链: SEQ ID NO:48 重链恒定区(Inno-A): SEQ ID NO:45 Fc 区: SEQ ID NO:82 轻链可变区: SEQ ID NO:49 轻链: SEQ ID NO:50 轻链恒定区: SEQ ID NO:30	重链可变区: SEQ ID NO:4 重链: SEQ ID NO:51 重链恒定区(Inno-B): SEQ ID NO:46 Fc 区: SEQ ID NO:83 轻链可变区: SEQ ID NO:9 轻链: SEQ ID NO:36 轻链恒定区: SEQ ID NO:30
BsAb-5		重链可变区: SEQ ID NO:13 重链: SEQ ID NO:52 重链恒定区: SEQ ID NO:46 Fc 区: SEQ ID NO:83 轻链可变区: SEQ ID NO:17 轻链: SEQ ID NO:38 轻链恒定区: SEQ ID NO:30
BsAb-6		重链可变区: SEQ ID NO:24 重链: SEQ ID NO:53 重链恒定区: SEQ ID NO:46 Fc 区: SEQ ID NO:83 轻链可变区: SEQ ID NO:28 轻链: SEQ ID NO:40 轻链恒定区: SEQ ID NO:30
REGN5678	重链可变区: SEQ ID NO:54 重链: SEQ ID NO:55 轻链可变区: SEQ ID NO:56 轻链: SEQ ID NO:57	重链可变区: SEQ ID NO:58 重链: SEQ ID NO:59 轻链可变区: SEQ ID NO:56 轻链: SEQ ID NO:57

本研究中所有到的 PSMAxCD3 双特异性抗体, 其中 PSMA 所用的序列来自于专利 (WO2017023761A1), CD3 端抗体的可变区序列来自于(CN202180066476A), 该分子的轻链、重链以及对应的可变区序列见表 10。PSMA 端对应的重链和轻链序列分别为 SEQ ID NO:61 和 SEQ ID NO:63, CD3 端对应的重链和轻链序列分别为 SEQ ID NO:65 和 SEQ ID NO:68。

表 10: PSMAxCD3 双特异性抗体信息表

	PSMA	CD3: Hzsp34.24
PSMAxCD3 双特异性抗体	重链可变区: SEQ ID NO:60 重链: SEQ ID NO:61 重链恒定区: SEQ ID NO:45 Fc 区: SEQ ID NO:82 轻链可变区: SEQ ID NO:62 轻链: SEQ ID NO:63	重链可变区: SEQ ID NO:64 重链: SEQ ID NO:65 重链恒定区: SEQ ID NO:46 Fc 区: SEQ ID NO:83 轻链可变区: SEQ ID NO:66 轻链: SEQ ID NO:68

	轻链恒定区: SEQ ID NO:30	轻链恒定区: SEQ ID NO:67
--	---------------------	---------------------

PSMAxCD28 双抗的制备

本发明中的双抗 BsAb-4、BsAb-5、BsAb-6 以及 PSMAxCD3 四个分子采用两个亲本蛋白先分别表达纯化后再通过体外还原氧化重组的方式制备而成。对照双特异性抗体 REGN5678 采用细胞内组装的方式制备而成。

质粒构建: 本发明中双抗的的序列由金唯智基因合成, 将双抗中对应轻链可变区以及重链可变区 (表 9-10) 装载到包含相应的重链恒定区和轻链恒定区的 pcDNA3.1 的载体上 (Invitrogen, V790-20), 分别得到 PSMA 端的重链质粒、轻链质粒, CD28 端的重链质粒、轻链质粒以及 CD3 端的重链质粒、轻链质粒。

BsAb-4、BsAb-5、BsAb-6 以及 PSMAxCD3 四个双抗分子的制备路线可以参照实施例 7。对照双特异性抗体 REGN5678 表达与纯化方法参照 (Andrew D. Tustian 等人(2016) Development of purification processes for fully human bispecific antibodies based upon modification of protein A binding avidity, mAbs, 8:4, 828-838)。

制备并获得表 8-10 的 PSMAxCD28 以及 PSMAxCD3 双抗分子, 用于下面的实施例中的研究。

实施例 9: PSMAxCD28 双特异性抗体的体外活性检测

9.1 PSMAxCD28 双抗细胞表面亲和力检测

为了检测我们 CD28 双抗的活性, 我们首先检验下几个抗体在体外细胞表面的亲和力测试。

首先我们构建了表达人 PSMA 的肿瘤细胞 MC38_hPSMA, 具体构建如下:

将人源 PSMA(UniProt ID: Q04609-1)的全长基因构建到载体 pWPT-GFP(Addgene, 12255)中, 替换其中的 GFP 序列, 与慢病毒的包装载体 psPAX2(Addgene, 12260)和 pMD2.G(Addgene, 12259)共同转染到 HEK293T (ATCC, CRL-3216)细胞中, 进行病毒的包装。分别收集培养了 48 小时和 72 小时后的培养上清, 使用 Lenti-X Concentrator (Takara, Cat#631232, Lot#2109261A)进行慢病毒的浓缩。用浓缩后的病毒转染结肠癌 MC38 细胞(南京科佰生物), 然后利用流式细胞分选仪(BD FACSAria™ Fusion Cell Sorter)将表达 PSMA 的细胞分选出来, 获得稳定转染 PSMA 的肿瘤细胞系 MC38_hPSMA

其次我们构建了表达人 CD28 的肿瘤细胞 024-hCD28 CHO GS, 具体构建如下:

将人源 CD28 (UniProt ID: P10747)的全长基因构建到载体 pXC17.4 (Lonza) 中, 并将质粒用 PvuI (NEB, R3150L) 酶切成线性片段。将线性质粒经过电转仪器 (Bio Rad, GENEPULSER XCELL, 300V, 900uF, Resistance infinity(∞), 2mm) 通过电转的方式转至 CHO-GS(Lonza)细胞中。转染后将细胞转移至 37 度的 CD CHO 培养基中(Gibco, 10743-029)添加 1% SP4 (Lonza, BESP1076E), 于摇床培养内 37°C, 6% CO₂, 120rpm。在电转染 16-30h 后, 1000 rpm 离心 5min, 弃上清, 用添加 SP4 新鲜培养基重悬细胞, 加入终浓度为 50 uM MSX (SIGMA M5379-250MG), 调整细胞密度为 5E5/毫升, 继续培养。从 Day 7 开始, 每隔 1-2 天检测细胞密度与活率。待细胞活率至 90%以上, 利用流式细胞分选仪 (BD FACSAria™

Fusion Cell Sorter) 将表达人 CD28 的细胞分选出来, 获得稳定转染 CD28 的肿瘤细胞系 024-hCD28 CHO GS。

亲和力检测

从 T75 简易培养瓶取出培养的 024-hCD28 CHO GS 以及 MC38_hPSMA 细胞系, 在 25°C, 400G, 4min 的条件下离心, 用 FACS (2 mM EDTA, 0.5% BSA, PBS) 洗液调整细胞密度, 按每孔 50 微升 (100000 cells/well) 调整细胞浓度, 混匀, 将细胞铺入 96 孔圆底培养板中。根据实验设计梯度稀释待测试抗体, 抗体以 100nM 浓度作为起始浓度, 按 4 倍梯度依次稀释, 共稀释 10 个浓度梯度, 稀释液为 FACS 洗液。在铺有细胞的孔板中, 每孔加入 50 微升的待检测抗体。4°C 冰箱中孵育 30-60min, 使抗体与细胞表面充分结合。孵育结束后, 在 25°C, 400G, 4min 的条件下孔板离心, 倾倒掉板中未结合的抗体, 每孔加入 100 微升的 FACS 洗液, 重悬细胞。在 25°C, 400G, 4min 的条件下离心, 倾倒洗液。在孔板中加入 PE-hIgG-heavy chain 稀释液 (Biolegend, 410708), 每孔加入 100 微升, 与待测抗体的重链结合。室温避光孵育 20-30min。孵育结束后, 在 25°C, 400G, 4min 的条件下离心, 弃掉板中未结合的抗体, 每孔加入 100 微升的 FACS 洗液, 重悬细胞。在 25°C, 400G, 4min 的条件下离心, 倾倒掉洗液。最后每孔加入 100 微升的 FACS 洗液重悬细胞, 准备上机检测 (BD FACS SYMPHONY A3)。

结果显示 (图 7), 双抗在 PSMA 端都展现出了很强的亲和力, BsAb-4、BsAb-5 和 BsAb-6 中整体的 PSMA 细胞表面的亲和力与 REGN5678 中的 PSMA 活性相当 (图 7A)。从 CD28 端的亲和力来看, BsAb-4、BsAb-5 和 BsAb-6 均有结合 (图 7B)。

9.2 PSMAxCD28 双抗体外对 NFkB Reporter 激活检测

接下来, 我们进一步验证下 CD28 组装成双特异性抗体后是否依然能够对 T 细胞有很好的激动活性。首先我们在体外验证 PSMAxCD28 双抗对 NFkB Jurkat Reporter 细胞上的激活性质。在这个研究体系当中, 我们需要应用到表达人 PSMA 的肿瘤细胞来提供一个“抓手”, 使 PSMAxCD28 双抗的一端 PSMA 能够有效结合到肿瘤细胞上面。此外, 在研究中也需验证 CD28 一端, 为此本研究中引入了表达 CD28 的 T 细胞系 Jurkat。整个研究过程如下:

靶细胞和效应细胞处理

从 T75 简易培养瓶取出培养的 MC38_hPSMA 细胞系, 在 25°C, 400G, 4min 的条件下离心, 用生长培养基调整细胞密度, 按每孔 100 微升 (40000 cells/well) 调整细胞浓度, 混匀, 将细胞铺入 96 孔培养白板 (WHB) 中。取出包被有靶细胞的 96 孔培养白板 (WHB), 弃掉培养液。

根据实验设计梯度稀释 PSMAxCD28 双抗, 抗体以 100nM 浓度作为起始浓度, 按 4 倍梯度依次稀释, 共稀释 10 个浓度梯度, 用 Assay buffer (1%FBS, 1640) 稀释抗体。在铺有靶细胞的孔板中, 每孔加入 50 微升的待检测抗体。

从 T75 简易培养瓶取出培养的 NFkB Jurkat 细胞系, 在 25°C, 400G, 4min 的条件下离心, 用 Assay buffer 调整细胞密度, 按每孔 50 微升 (50000 cells/well) 调整细胞浓度, 混匀, 同时加入 CD3 抗体 (Acro, CDE-M120A-IMG, 终浓度 0.5 微克/毫升,) 或者 PSMAxCD3 双抗 (终浓度 10pM), 混匀后共同加入 96 孔培养白板 (WHB) 中。在 5%CO₂, 37°C 培养箱中孵育 6h。

从培养箱中取出 96 孔培养白板 (WHB), 加 Bio-Glo Luciferase Reagent (Promega, G7940)

溶液 100 微升/孔, 室温 2min 后使用酶标仪(Molecular Divices, spectra MAX i3x) 检测。

在此研究中, 我们应用了两种第一信号来验证 CD28 双抗对 CD28 信号激活的影响。

首先, 我们应用抗 CD3 抗体作为第一信号, 如图 8A 所示几个 CD28 双抗都能够激活 Jurkat 细胞 CD28 下游的 NFkB 信号,

其次, 我们选用低浓度 PSMAxCD3 双抗作为第一信号来检验 CD28 双抗对 T 细胞激活情况。如图 8B 所示, 测试的几个 PSMAxCD28 双抗对 NFkB reporter 都能激活且趋势与 8A 类似。

9.3 PSMAxCD28 双抗体介导 T 细胞杀伤实验

接下来我们进一步检测 PSMAxCD28 双抗是否能够激活人外周 T 细胞进而杀伤肿瘤细胞。在此研究中, 我们的肿瘤细胞表面整合了一个 aAPC 用来提供第一信号, 此外在肿瘤细胞表面我们也转染了人 PSMA, 作为抗体一端特异性的识别靶点。整个实验过程具体如下:

PSMA-aAPC-CHO K1 构建如下:

将人源 PSMA(UniProt ID: Q04609-1)的全长基因构建到载体 pWPT-GFP(Addgene, 12255) 中, 替换其中的 GFP 序列, 与慢病毒的包装载体 psPAX2(Addgene, 12260)和 pMD2.G(Addgene, 12259) 共同转染到 aAPC-CHO K1 (Promega, J1250) 细胞中, 进行病毒的包装。分别收集培养了 48 小时和 72 小时后的培养上清, 使用 Lenti-X Concentrator (Takara, Cat#631232, Lot#2109261A)进行慢病毒的浓缩。用浓缩后的病毒转染仓鼠卵巢 aAPC-CHO K1 细胞, 然后利用流式细胞分选仪 (MoFlo XDP, Beckman Coulter) 将表达 PSMA 的细胞分选出来, 获得稳定转染 PSMA 的细胞系 PSMA-aAPC-CHO K1。

PSMAxCD28 介导 T 细胞杀伤肿瘤细胞, 具体过程如下:

1. 靶细胞铺板

取出培养的 PSMA-aAPC-CHO K1 用胰酶消化, 用生长培养基重悬细胞终止消化过程, 离心, 用 Assay buffer 调整细胞密度, 按每孔 100 微升 (10000 cells/well) 将细胞铺入 96 孔圆底板中培养 16-20 小时, 边缘孔加入 Assay buffer, 200 微升/孔。

2. 效应细胞处理

取出冻存的 PBMC 一只, 在 37°C 水浴锅中融化, 在 25°C, 400G, 4min 的条件下离心。根据 EasySep Human CD8+ T Cell (STEMCELL, 19053) 的说明书操作, 分离出 CD8+T 细胞。用 RPMI 1640 培养基重悬, 放入在 5%CO₂, 37°C 培养箱中培养过夜。次日取出后在 25°C, 400G, 4min 的条件下离心, 用 Assay buffer 调整细胞浓度, 按每孔 50 微升 (50000 cells/well) 将 CD8+T 细胞加入到 96 孔圆底板中, 效应细胞:靶细胞=5:1。

3. 稀释抗体

根据实验设计梯度稀释抗体, 抗体以 50nM 浓度作为起始浓度, 按 4 倍梯度依次稀释, 共稀释 10 个浓度梯度, 稀释液为 Assay buffer。吸取 50 微升梯度稀释的抗体加入到铺有 CD8+T 细胞和 PSMA-aAPC-CHO K1 细胞的 96 孔圆底板中。5%CO₂, 37°C 培养箱中培养 48h, 每孔总体积为 200 微升。

4. 细胞对照组孔加入 20 微升 10x Lysis Buffer 溶解靶细胞, 在 5%CO₂, 37°C 培养箱中孵育 45min。根据 Radio Cytotoxicity Assay Kit (Promega, G1781) 说明书操作, 配置检测试剂。将 96 孔圆底板离心, 沉降细胞, 取 50 微升的 Mix buffer 于一个 96 孔平底培养板中, 并在每孔加入 50 微升的实验孔板的培养液上清, 室温避光孵育 30min。加入 Stop buffer 50ul/孔, 1h 内在酶标仪 (Molecular Divices, spectra MAX i3x) 490nm 或 492nm 波长下读值。

结果 (图 9) 显示, 三个 PSMAxCD28 双抗都能够激活 T 细胞并对表达 PSMA 的肿瘤细胞产生杀伤作用。从靶细胞的死亡程度来看, CD28 亲和力强的 BsAb-4 具有最强的 CD28 激活活性, 在低浓度下就能够介导 T 细胞杀伤肿瘤细胞。BsAb-5 由于 CD28 端的亲和力最低, 其杀伤活性也相对最弱。BsAb-6 双抗因为 CD28 亲和力的降低, 整体介导的杀伤水平也有所减弱。

实施例 10: PSMAxCD28 双特异性抗体的激活 T 细胞检测

为了进一步验证 PSMAxCD28 抗体的活性, 我们检测这些抗体在体外能否有效激活人外周 T 细胞, 释放细胞因子 IL2。具体过程如下:

1. 提前一天取出 PBMC 细胞, 在 25°C, 400G, 4min 的条件下离心, 用生长培养基重悬, 放入培养瓶, 加入终浓度为 2 微克/毫升的 DNase I (SIGMA, D5025-375KU), 在 5%CO₂, 37°C 培养箱中过夜培养。

2. 用 PBS 稀释 PSMAxCD28 抗体(1 微克/孔)或者因需要将 CD3 抗体(Acro, CDE-M120A-IMG, 0.1 微克/孔) 加入到 96 孔平底板中, 每孔加入 100 微升的待检测抗体。冰箱 4°C 孵育过夜, 使抗体与孔板底部充分结合。

3. 实验当天, 抗体孵育结束后倾倒掉板中未结合的抗体溶液, 每孔加入 100 微升的 PBS, 清洗一次并弃掉 PBS。

4. 取出前一天复苏的 PBMC 细胞, 倒出悬浮细胞至离心管中, 在 25°C, 400G, 4min 的条件下离心后用 Assay buffer (RPMI 1640, 1% FBS) 调整细胞密度, 按每孔 100 微升 (100000 细胞/孔) 调整细胞浓度, 将细胞铺入包被抗体后的 96 孔平底板中。放入 5%CO₂, 37°C 培养箱中培养。

5. 细胞培养结束前 4 小时, 从培养箱中取出 96 孔板, 每孔吸取 50 微升上清液至一个新的 96 孔圆底板中, 用于细胞因子检测。

6. 根据 IL2 Human ELISA KIT (Mabtech, 3445-1H-20) 说明书, 用 PBS 稀释 Human IL-2 抗体, 按每孔 50 微升将加入 96 平底孔板中, 冰箱 4°C 孵育过夜, 封口膜覆盖。

7. 将 96 平底孔板中的未结合的纯化抗体液体倒出, 每孔加入 100 微升的 PBST buffer (0.05% 吐温 20), 漂洗 6 次。然后每孔加入 Assay buffer (1000 毫升 PBS, 500ul 吐温 20, 5g BSA) 100 微升, 室温孵育 1h。

8. 孵育结束后, 将 96 平底孔板取出, 倾倒板中液体, 加入制备好的样品上清液及标准品 50 微升, 室温孵育 2h。

9. 将 96 平底孔板取出, 倾倒板中液体, 漂洗 6 次, 每孔加入生物素抗体稀释液 (Mabtech, 3445-1H-20) 50 微升, 在平板摇床上室温孵育 1h。

10. 将 96 平底孔板取出, 倾倒入板中液体, 漂洗 6 次, 每孔加入 HRP 稀释液 50 微升, 室温孵育 1h。

11. 将 96 平底孔板取出, 倾倒入板中液体, 漂洗 6 次, 每孔加入 TMB 50 微升, 待显色反应进行完全后, 每孔加入终止液 50 微升, 1h 内在酶标仪(Molecular Devices, spectra MAX i3x) 450nm 波长下读值。

结果显示, 在没有第一信号 CD3 抗体 (-signal 1) 的情况下 (图 10A), 对照抗体 TGN1412 (本研究中简称为 TGN) 能够不依赖第一信号激活 T 细胞, 释放 IL2, 证实 TGN 为 CD28 超级激动抗体。在同样的条件下, 本发明中有三个 CD28 双抗 BsAb-4、BsAb-5 和 BsAb-6 不能够激活 T 细胞, 表现为常规 CD28 激动抗体。在有 CD3 抗体提供的第一信号(+signal 1) 的情况下, 所有的 CD28 抗体都能有效地激活 T 细胞并释放 IL2 (图 10B)。

实施例 11: PSMAxCD28 双特异性抗体的体内抗肿瘤活性检测

为了进一步在验证 PSMAxCD28 双抗的活性, 我们在体内检测 PSMAxCD28 双抗在体内小鼠的肿瘤模型中的抗肿瘤活性。

小鼠: 将大小为 6-8 周龄的 hCD28 人源化鼠 (南模生物) 在实验前放置于 SPF 实验环境中静止 3-5 天, 使其更好地适应当前生存环境。

在所有的实验当中, 使用游标卡尺测量肿瘤的长径和短径, 每周测量两次, 并通过测量数据计算出肿瘤的体积 (mm³)。计算公式如下:

$$\text{肿瘤体积 (mm}^3\text{)} = 0.5 * \text{长径 (mm)} * \text{短径 (mm)} * \text{短径 (mm)}$$

将表达人 PSMA 的 hPSMA-MC38 细胞以适当的浓度重悬于 1x PBS (Gibco, 10010049) 中, 以 1E6/鼠的接种量在小鼠的右侧腹部皮下种植肿瘤细胞(图 11A)。接种后 7 天左右, 待肿瘤体积长到 80-100 mm³ 时对小鼠进行分组, 使每组平均的起始给药体积基本相同。分组后 10 mg/kg 的 PSMAxCD28 双特异性抗体通过腹腔给药方式注射到小鼠体内, 观察药物对肿瘤生长的影响。

结果显示, 在人 PSMA 过表达的 MC38 肿瘤模型中, 单次给药剂量为 10 mg/kg 的 PSMAxCD28 能够一定程度地抑制肿瘤细胞生长 (图 11B)。REGN5678 肿瘤抑制效果相对较弱, TGI 只有 42.5%。BsAb-4 和 BsAb-6 (图 11C, 每条线代表一只小鼠) 在同样的条件下能够产生比 REGN5678 更强的肿瘤抑制效果。

实施例 12: PSMAxCD28 双抗联合 PD1 抗体的体内抗肿瘤活性检测

为了进一步在验证 PSMAxCD28 双抗的活性, 我们在体内检测 CD28 双抗联合 PD1 抗体在体内小鼠的肿瘤模型中的抗肿瘤活性。

其中抗鼠 PD1 抗体来自于专利 (WO2018184964A1), 其序列如下。制备过程如同实施例 1。

整个操作过程同实施例 12, 将表达人 PSMA 的 hPSMA-MC38 细胞以适当的浓度重悬于 1x PBS (Gibco, 10010049) 中, 以 1E6/鼠的接种量在小鼠的右侧腹部皮下种植肿瘤细胞(图 12A)。接种后 7 天左右, 待肿瘤体积长到 80-100 mm³ 时对小鼠进行分组, 使每组平均的起始给药体积基本相同。分组后将 BsAb-6 双特异性抗体或者抗 PD1 抗体或者他们联合给药,

通过腹腔给药方式注射到小鼠体内，观察药物对肿瘤生长的影响。

结果显示，在人 PSMA 过表达的 MC38 肿瘤模型中，10 mg/kg 的 BsAb-6 以及 2 mg/kg 的鼠 PD1 抗体联合用药产生了很强协同作用，显著地抑制肿瘤细胞的生长（图 12B）。单次给药后，在持续超过 40 天的观察过程中肿瘤完全消退比例达到 100%，高于单药组的肿瘤完全消退比例(60%)（图 12C，**每条线代表一只小鼠**）。

实施例 13：PSMAxCD28 双特异性抗体的小鼠 PK 实验

本研究利用尾静脉给药的方法，向雌性 C57BL/6 hCD28KI 小鼠(南模生物)注射 10 mg/kg 的 REGN5678 和 BsAb-6，每组 6 只，共 12 只，从而研究其在小鼠体内的药代动力学性质。

小鼠给药后分别在 0.086hr、0.5hr、2hr、6hr、24hr、48hr、4day、7day、14day 和 21day 时间点时经眼球取血，血液于 4°C 3000rpm 离心 10 min，收集血清。利用 ELISA 测定血清中抗体含量，计算获得 REGN5678 和 BsAb-6 在小鼠体内的半衰期。

实验结果如表 11 所示，BsAb-6 在 hCD28 转基因小鼠体内具有很好的稳定性、较长的半衰期（t1/2）以及相对较好的血液暴露量，从半衰期可以看出 BsAb-6 在两种检测方式上都达到了与正常单抗类似的稳定性数据。

表 11：PSMAxCD28 双抗小鼠体内 PK 检测

样品	t1/2 (h)	Cmax (ug/mL)	AUC 0-t (ug*h/mL)	AUC 0-inf_obs (ug*h/mL)	Cl_obs (ml/kg/h)	Vss_obs (ml/kg)
REGN5678 (抗-Fc 端)	87	189	11675	11813	0.85	80
REGN5678 (抗-CD28 端)	57	262	10431	10569	0.95	67
BsAb-6 (抗-Fc 端)	151	210	13818	15100	0.66	136
BsAb-6 (抗-CD28 端)	160	238	11693	12931	0.77	164

序列表

SEQ ID NO	可变区序列名称	具体序列
	hz5B11D8H.g.a	
1	CDRH1	GYTFTFYWMH
2	CDRH2	EIDPSDSYTNYNQEFKD
3	CDRH3	DPWYFDV
4	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTFYWMHWVRQAPGQGLEWMGE IDPSDSYTNYNQEFKDRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARDPWYF DVWGQGT LTVTVSS
29	HC(重链恒定区)(IgG1, WT-DEL IgG1)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
	hz5B11D8H.g.b	
1	CDRH1	SEQ ID NO:1
2	CDRH2	SEQ ID NO:2
3	CDRH3	SEQ ID NO:3
5	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTFYWMHWVRQAPGQGLEWMGE IDPSDSYTNYNQEFKDRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDPWYF DVWGQGT LTVTVSS
29	HC(重链恒定区)	SEQ ID NO:29
	hz5B11D8K.g0	
6	CDRL1	SASSSITYMY
7	CDRL2	DTSKLAS
8	CDRL3	HQRSSYPWT
9	VL	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITCSASSSITYMYWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLAS GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCHQRSSYPWTFGQGTRLEIK
30	LC(轻链恒定区)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
	hz61F3G3H.g0	
10	CDRH1	GYTFTSYWMH
11	CDRH2	NIYPGSGSTNYDEKFKS
12	CDRH3	EHYGSIEAMDY
13	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMG NIYPGSGSTNYDEKFKSRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAREHYG

		SIYEAMDYWGQGLTVTVSS
29	HC(重链恒定区)	SEQ ID NO:29
	hz61F3G3Kg0.h p.a	
14	CDRL1	RASQEIQGYLS
15	CDRL2	AASTLDS
16	CDRL3	LQYVSYPYT
17	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQEIQGYLSWFQQKPGKAPKSLIYAASLT DSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQYVSYPYTFGQGTKLEIK
30	LC(轻链恒定区)	SEQ ID NO:30
	hz61F3G3Kg0.h p.b	
18	CDRL1	RASQEINVYLS
15	CDRL2	SEQ ID NO:15
16	CDRL3	SEQ ID NO:16
19	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQEINVYLSWFQQKPGKAPKSLIYAASLT DSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQYVSYPYTFGQGTKLEIK
30	LC(轻链恒定区)	SEQ ID NO:30
	hz4F12B5H.g1. hp	
20	CDRH1	GFSLTGYGVT
21	CDRH2	MIWGDASTDYNSVLKS
22	CDRH3	DAYRYDVPLAY
23	VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTGYGVTWIRQPPGKGLEWIGMIWG DASTDYNSVLKSRVTISVDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDAYRYDVPL AYWGQGLTVTVSS
	HC(重链恒定区)	SEQ ID NO:29
	hz4F12B5H.g2. hp	
20	CDRH1	SEQ ID NO:20
21	CDRH2	SEQ ID NO:21
22	CDRH3	SEQ ID NO:22
24	VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTGYGVTWIRQPPGKGLEWIGMIWG DASTDYNSVLKSRVTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDAYRYDVPL AYWGQGLTVTVSS
29	HC(重链恒定区)	SEQ ID NO:29
	hz4F12B5K.g0	

25	CDRL1	RASKSVSTSGYSNMH
26	CDRL2	LASNLES
27	CDRL3	LHTRELPR
28	VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSNMHWYQQKPGQPPKLLIY LASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCLHTRELPRTFGGGTK VEIK
30	LC(轻链恒定区)	SEQ ID NO:30
31	Inno-A (CH1+CH2+CH3, 具有突变 L234A、L235A、P329delP、S364R 和 D399K)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVRLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
32	Inno-B(CH1+CH2+CH3, 具有突变 L234A、L235A、P329delP、K370S、Y349T 和 K409D)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVSGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	双特异性抗体中的 CLDN18.2 端 HB37A6	
33	重链	EVQLLDSSGGLVQPGGSLRLSAAASGFTFSSYVMWVRQAPGKGLNWVSTISHSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIDAPYYDI LTGYRYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVRLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
102	Fab 重链	EVQLLDSSGGLVQPGGSLRLSAAASGFTFSSYVMWVRQAPGKGLNWVSTISHSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIDAPYYDI LTGYRYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
34	轻链/Fab 轻链	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFTATYYCQQYNSYSYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

	双特异性抗体 中的 CD28 端 hz5B11D8-a	
35	重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTFYWMHWVRQAPQGLEWMGE IDPSDSYTNYNQEFKDRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDPWYF DVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALAPIEKTISKAKGQPREPQVTTLPSSRDELTKNQVSLTCLVSG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
103	Fab 重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTFYWMHWVRQAPQGLEWMGE IDPSDSYTNYNQEFKDRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDPWYF DVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSC
36	轻链/Fab 轻链	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITCSASSSITYMYWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLAS GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCHQRSSYPWTFGQGTRLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	双特异性抗体 中的 CD28 端 hz61FG3-a	
37	重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPQGLEWMG NIYPGSGSTNYDEKFKSRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREHYG SIYEAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALAPIEKTISKAKGQPREPQVTTLPSSRDELTKNQVS LTCLVSGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
104	Fab 重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPQGLEWMG NIYPGSGSTNYDEKFKSRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREHYG SIYEAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSC
38	轻链/Fab 轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQEIQGYLSWFQQKPGKAPKSLIYAASLT DSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYVSYPYTFGQGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ	双特异性抗体	

ID NO	中的 CD28 端 hz4F12B5-b	
39	重链	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTGYGVTVIRQPPGKGLEWIGMIWG DASTDYNVLSKSRVTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDAYRYDVPL AYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALAPIEKTISKAKGQPREPQVTTLPSSRDELTKNQVSLTCLVSG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
105	Fab 重链	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTGYGVTVIRQPPGKGLEWIGMIWG DASTDYNVLSKSRVTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDAYRYDVPL AYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSC
40	轻链/Fab 轻链	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSNMHWYQQKPGQPPELLIY LASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCLHRELPRTFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSF NRGEC
SEQ ID NO	双特异性抗体 中的 CD28 端 TGN1412	
41	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWIGCIY PGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDW NFDVWGQGTITVTVSS
42	重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWIGCIY PGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDW NFDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALAPIEKTISKAKGQPREPQVTTLPSSRDELTKNQVSLTCLV SGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
43	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKPGKAPKLLIYKASN LHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK
44	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKPGKAPKLLIYKASN LHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
45	Inno-A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA

	(CH1+CH2+CH3)(IgG1 具有 L234A L235A S364R D399K)	AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVRLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
46	Inno-B (CH1+CH2+CH3)(IgG1 具有 L234A L235A, K370S, Y349T, K409D)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVTLPPSRDELTKNQVSLTCLVSGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
SEQ ID NO	双特异性抗体中的 PSMA 端 1C3	
47	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVIS YDGNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAVPWGS RYYYYGMDVWVGQGT TVTVSS
48	重链	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVIS YDGNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAVPWGS RYYYYGMDVWVGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVRLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
106	Fab 重链	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVIS YDGNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAVPWGS RYYYYGMDVWVGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSC
49	VL	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKSGKAPKLLIFDASSLE SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFN SYPLTFGGGT KVEIK
50	轻链/Fab 轻链	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKSGKAPKLLIFDASSLE SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFN SYPLTFGGGT KVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSSTYSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO	双特异性抗体中的 CD28 端 hz5B11D8-a	
51	重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTFYWMHWVRQAPQGQGLEWMGE

		IDPSDSYTNYNQEFKDRVMTVDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARDPWYF DVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVTTLPSSRDELTKNQVSLTCLVS GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
103	Fab 重链	SEQ ID NO:103
/	轻链/Fab 轻链	SEQ ID NO:36
SEQ ID NO	双特异性抗体 中的 CD28 端 hz61FG3-a	
52	重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMG NIYPGSGSTNYDEKFKSRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREHYG SIYEAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVTTLPSSRDELTKNQV SLTCLVSGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
104	Fab 重链	SEQ ID NO:104
/	轻链/Fab 轻链	SEQ ID NO:38
SEQ ID NO	双特异性抗体 中的 CD28 端 hz4F12B5-b	
53	重链	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTG YGVTWIRQPPGKGLEWIGMIWG DASTDYNVLSRVITISKDTSKNQVSLKLSSVTAADVAVYYCARDAYRYDVPL AYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVTTLPSSRDELTKNQVSLTCLVS GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
105	Fab 重链	SEQ ID NO:105
/	轻链/Fab 轻链	SEQ ID NO:40
SEQ ID NO	双特异性抗体 REGN5678 中 11838P2	
54	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFM SYDGSNKFYSDSVKGRFTISRDNRSRKMLFLQMNNLRAEDVAVYYCARDQYYD

		FLTDHGVFDYWGQGLTVTVSS
55	重链	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFM SYDGSNKFYSDSVKGRFTISRDNRSRKMFLQMNNLRAEDTAVYYCARDQYYD FLTDHGVFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
56	VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFTGQGTKVEIK
57	轻链	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFTGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO	双特异性抗体 中的 CD28 端 14226P2	
58	VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYY GITHYNPSLKSRTISVDTSKIQFSLKLSSVTAADTAVYYCARWGVRRDYYYY GMDVWGQGTITVTVSS
59	重链	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYY GITHYNPSLKSRTISVDTSKIQFSLKLSSVTAADTAVYYCARWGVRRDYYYY GMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNRFTQKSLSLGLK
/	VL	SEQ ID NO:56
/	轻链	SEQ ID NO:57
SEQ ID NO		双特异性抗体 PSMC $\times$ CD3 中 PSMA:3465P
60	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFITYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIY YDESNKYADSVKGRFTISRDISKNTLYLQMNGLRAEDTAVYYCARAPRVAVE EDYSYYYGMDVWGQGTITVTVSS
61	重链	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFITYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIY YDESNKYADSVKGRFTISRDISKNTLYLQMNGLRAEDTAVYYCARAPRVAVE EDYSYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN

		VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVRLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLKSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
107	Fab 重链	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFITYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIY YDESNKYYADSVKGRFTISRDISKNTLYLQMNGLRAEDTAVYYCARAPRVAVE EDYSYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSC
62	VL/Fab 轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGRAPKRLIYGASN LQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSHPYTFGQGTKLEIK
/	CL	SEQ ID NO:30
63	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGRAPKRLIYGASN LQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSHPYTFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO		双特异性抗体 PSMC α CD3 中 anti-CD3:Hzsp34.24
64	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIR SKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFG QSYVSWFAYWGQGTITVTVSS
65	重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIR SKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFG QSYVSWFAYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVTTLPSSRDEL TKNQVSLTCLVSGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
66	VL	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT NKRAPGVPARFSGSLLGDKAALTLLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGQGTK LTVL
67	CL	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVE TTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
68	轻链	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT NKRAPGVPARFSGSLLGDKAALTLLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGQGTK LTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPT ECS
	6IF3G3 序列	

69	VH	QVQLQQSGSELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRHGQGLEWIGNI YPGSGSTNYDEKFKSKGTLTVDTSSTAYIHLSSLTSEDSAVYYCTREHYGSIYE AMDYWGQGTSTVTVSS
10	CDRH1	SEQ ID NO:10
11	CDRH2	SEQ ID NO:11
12	CDRH3	SEQ ID NO:12
70	VL:	DIVMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQEINGYLSWLQKPDGTIKRLIYAASTLD SGVPKRFGSGRSRGS DYSLTSSLESEDFADYYCLQYVSYPTFGGGTKLEIK
71	CDRL1	RASQEINGYLS
15	CDRL2	SEQ ID NO:15
16	CDRL3	SEQ ID NO:16
	5B11D8 序列	
72	VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTFYWMHWVKQRPGQGLEWIGEI DPSDSYTNYNQEFKDKATLTVDKSSSTAYMHLISLTSEDSAVYYCAKDPWYFD VWGAGTSVTVSS
1	CDRH1	SEQ ID NO:1
2	CDRH2	SEQ ID NO:2
3	CDRH3	SEQ ID NO:3
73	VL	DIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSITYMYWYQQKPGTSPKRWIYDTSKLA SGVPARFSGSGSGPSYSLTSSMEAEADAATYYCHQRSSYPWTFGGGTRLEIK
6	CDRL1	SEQ ID NO:6
7	CDRL2	SEQ ID NO:7
8	CDRL3	SEQ ID NO:8
	4F12B5 序列	
75	VH	EVQLQQSGPGLVAPSSLSITCTVSGFSLTGYGVTWVRQPPGKGLEWLGMIWG DGSTDYNSVLKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTARYYCARDGYRYDVP LAYWGQGTSLVTVSS
20	CDRH1	SEQ ID NO:20
76	CDRH2	MIWGDGSTDYNSVLKS
77	CDRH3	DGYRYDVPLAY
78	VL:	DIKMTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSNMHWYQQKLGQPPKLLIY LASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCLHTRELPRTFGGGTK LEIK
25	CDRL1	SEQ ID NO:25
26	CDRL2	SEQ ID NO:26
27	CDRL3	SEQ ID NO:27
79	IgG1 重链恒定 区 (CH1+CH2+CH 3, EEM)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH

		YTQKSLSLSPGK
80	Inno-A-Fc(IgG1 具有突变 L234A、L235A、P329delP、S364R 和 D399K)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVRLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
81	Inno-B-Fc(IgG1, 具有突变 L234A、L235A、P329delP、K370S、Y349T 和 K409D)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALAPIEKTISKAKGQPREPQVTTLPSPRDELTKNQVSLTCLVSGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
82	Inno-A-Fc(IgG1 具有 L234A、L235A、S364R 和 D399K)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVRLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
83	Inno-B-Fc(IgG1, 具有 L234A、L235A、K370S、Y349T 和 K409D)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALAPIEKTISKAKGQPREPQVTTLPSPRDELTKNQVSLTCLVSGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
84	鼠 PD1 抗体重链	EVQLQESGPGLVKPSQSLTCSVTGYSITSSYRWNWIRKFPGNRLEWMGYINS AGISNYPNPSLKRRISITRDTSKNQFFLQVNSVTTEAATYYCARSDNMGTTPFT YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
85	鼠 PD1 抗体轻链	DIVMTQGTLPNPVPSGESVSITCRSSKSLLYSDGKTYLNWYLQRPQGSPQLLIY WMSTRASGVSDRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVGIYYCQQGLEFPTFGGGTK LELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYAPREKQVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSF NRGEC
86	HB37A6 重链可变区	EVQLLDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYVMSWVRQAPGKGLNWVSTIS HSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIDAPYYDI LTGYRYWGQGTLLTVSS
87	HB37A6 重链可变区	GFTFSSYVMS

	变区 CDRH1	
88	HB37A6 重链可 变区 CDRH2	TISHSGGSTYYADSVKG
89	HB37A6 重链可 变区 CDRH3	DAPYYDILTYRY
90	HB37A6 轻链可 变区	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSL ESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQQYNSYSYTFGQGTELEIK
91	HB37A6 轻链可 变区 CDRL1	RASQSISSWLA
92	HB37A6 轻链可 变区 CDRL2	KASSLES
93	HB37A6 轻链可 变区 CDRL3	QQYNSYSYT
74	CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
94	IgG1 Fc (WT-DEL)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
95	IgG1 Fc (WT-EEM)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
96	PSMA 1C3 重链 可变区 CDRH1	GFTFSSYAMH
97	PSMA 1C3 重链 可变区 CDRH2	VISYDGNNKYYADSVKG
98	PSMA 1C3 重链 可变区 CDRH3	AVPWGSRYYYYGMDV
99	PSMA 1C3 重链 可变区 CDRL1	RASQGISSALA
100	PSMA 1C3 重链 可变区 CDRL2	DASSLES
101	PSMA 1C3 重链 可变区 CDRL3	QQFNSYPLT

权利要求

1、抗 CD28 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区 VH 的 3 个 CDR，CDRH1、CDRH2 和 CDRH3，以及轻链可变区 VL 的 3 个 CDR，CDRL1、CDRL2 和 CDRL3，其中

- (i). 所述 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 选自如 SEQ ID NO: 24、23 或 75 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3；且所述 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3 为如 SEQ ID NO: 28 或 78 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3；
- (ii). 所述 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 选自如 SEQ ID NO: 4 或 5 或 72 中任一项所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3；且所述 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3 为如 SEQ ID NO: 9 或 73 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3；或
- (iii). 所述 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 选自如 SEQ ID NO: 13 或 69 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3；且所述 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3 为如 SEQ ID NO: 17、19 或 70 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3。

2、抗 CD28 抗体或其抗原结合片段，其包含 CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2 和 CDRL3，其中

- (i). CDRH1 包含或由 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列组成；CDRH2 包含或由 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列组成；CDRH3 包含或由 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列组成；CDRL1 包含或由 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列组成；CDRL2 包含或由 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列组成；和 CDRL3 包含或由 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列组成；
- (ii). CDRH1 包含或由 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列组成；CDRH2 包含或由 SEQ ID NO: 76 的氨基酸序列组成；CDRH3 包含或由 SEQ ID NO: 77 的氨基酸序列组成；CDRL1 包含或由 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列组成；CDRL2 包含或由 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列组成；和 CDRL3 包含或由 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列组成；
- (iii). CDRH1 包含或由 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列组成；CDRH2 包含或由 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列组成；CDRH3 包含或由 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列组成；CDRL1 包含或由 SEQ ID NO:6 或 74 的氨基酸序列组成；CDRL2 包含或由 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列组成；和 CDRL3 包含或由 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列组成；或
- (iv). CDRH1 包含或由 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列组成；CDRH2 包含或由 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列组成；CDRH3 包含或由 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列组成；CDRL1 包含或由 SEQ ID NO:14 或 18 或 71 的氨基酸序列组成；CDRL2 包含或由 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列组成；和 CDRL3 包含或由 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列组成。

3、权利要求 1 或 2 的抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区 VH，其中所述重链可变区

(i) 包含与 SEQ ID NO: 24、4、5、13、23、69、72 或 75 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 24、4、5、13、23、69、72 或 75 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

4、权利要求 1-3 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其包含轻链可变区 VL，其中所述轻链可变区

(i) 包含与 SEQ ID NO: 28、9、17、19、70、73 或 78 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 28、9、17、19、70、73 或 78 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

5、权利要求 1 或 2 的抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL，其中

- (i). 所述 VH 含有 SEQ ID NO: 24 或 23 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
- (ii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO: 75 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:78 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
- (iii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:23 或 24 或 75 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:28 或 78 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
- (iv). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:4 或 5 或 72 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:9 或 73 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
- (v). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:4 或 5 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
- (vi). 所述 VH 含有 SEQ ID NO: 72 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO: 73 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
- (vii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:13 或 69 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:17 或 19 或 70 所示的氨基酸序列或与其

具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

- (viii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:17 或 19 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或
- (ix). 所述 VH 含有 SEQ ID NO: 69 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO: 70 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

6、权利要求 1 或 2 的抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL,其中

- (i). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
- (ii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
- (iii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:72 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:73 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
- (iv). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
- (v). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
- (vi). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
- (vii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
- (viii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:69 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:70 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或
- (ix). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:75 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:78 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

7、抗 CD28 抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL,其中

- (i). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
- (ii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
- (iii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:72 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:73 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
- (iv). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

- (v). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (vi). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (vii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (viii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:69 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:70 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或
- (ix). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:75 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:78 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

8、权利要求 1-7 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其还包含重链恒定区 HC, 例如, 所述抗体重链恒定区 HC 为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的重链恒定区, 优选的人 IgG1 的重链恒定区, 优选地, 所述重链恒定区

- (i) 包含与选自 SEQ ID NO: 29 或 79 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或
- (ii) 包含选自 SEQ ID NO: 29 或 79 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

9、权利要求 7 或 8 的抗体或其抗原结合片段, 其中所述重链恒定区包含降低与 Fc γ 受体结合的突变, 例如 LALA 突变和/或 P329delP。

10、权利要求 1-9 中任一项的抗体或其抗原结合片段, 其包含轻链恒定区, 例如所述轻链恒定区为 Lambda 或 Kappa 轻链恒定区。

11、权利要求 10 的抗体或其抗原结合片段, 其中所述轻链恒定区

- (i) 包含与 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或
- (ii) 包含 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

12、权利要求 1-11 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体为人源化抗体或嵌合抗体。

13、权利要求 1-12 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体为单克隆抗体。

14、权利要求 1-13 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗原结合片段为选自以下的抗体片段: Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、单链抗体(例如 scFv)、(Fab')₂、单结构域抗体(例如 VHH)、dAb(domain antibody)或线性抗体。

15、权利要求 1-11 中任一项的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体是双特异性抗体或多特异性抗体, 其包含针对 CD28 的第一结合特异性和针对一种或多种的肿瘤相关抗原的其它结合特异性。

16、权利要求 15 的抗体或其抗原结合片段, 其中所述肿瘤相关抗原选自 CLDN18.2 或 PSMA。

17、双特异性抗体, 其包含第一抗原结合区和第二抗原结合区,

其中第一抗原结合区特异性结合 CD28, 且包含 VH 和 VL, 其中

所述 VH 包含如权利要求 1 或 2 所定义的 CDRH1、CDRH2、CDRH3 且所述 VL 包含权利要求 1 或 2 所定义的 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3; 或

所述 VH 和 VL 为如权利要求 3-7 中任一项所定义的 VH 和 VL;

第二抗原结合区特异性结合肿瘤相关抗原 TAA 或免疫检查点分子。

18、权利要求 17 的双特异性抗体, 其中所述第一抗原结合区为权利要求 1-14 中任一项所定义的抗 CD28 抗体的 Fab。

19、权利要求 17 或 18 的双特异性抗体, 其中所述第二抗原结合区为特异性结合肿瘤相关抗原或免疫检查点分子的 Fab。

20、权利要求 18 或 19 所述的双特异性抗体, 其中所述作为第一抗原结合区或第二抗原结合区的 Fab 包含 CH1, 其中所述 CH1 是来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 CH1, 优选地来自 IgG1 的 CH1。

21、权利要求 20 所述的双特异性抗体, 其中所述 CH1

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:74 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或

(ii) 包含 SEQ ID NO:74 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

22、权利要求 18-21 中任一项所述的双特异性抗体, 其中所述作为第一抗原结合区或第二抗原结合区的 Fab 包含轻链恒定区, 其中所述轻链恒定区为 Kappa 轻链恒定区或 Lambda 轻链恒定区。

23、权利要求 22 的双特异性抗体, 其中所述 Kappa 轻链恒定区

(i) 包含与 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或

(ii) 包含 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

24、权利要求 17-23 中任一项所述的双特异性抗体, 其中所述双特异性抗体是包含 Fc 二聚体的 IgG 样双特异性抗体, 其中构成所述 Fc 二聚体的两个 Fc 区相同或不同, 任选地, 所述 Fc 区为人的 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 Fc, 任选地, 所述 Fc 区

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:94 或 95 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或

(ii) 包含 SEQ ID NO: 94 或 95 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

25、权利要求 24 所述的双特异性抗体, 其中所述两个 Fc 区不同, 其中基于 Innobody 技术, 在第一 Fc 区和第二 Fc 区中引入突变, 促进第一 Fc 区和第二 Fc 区的异二聚化。

26、权利要求 25 的抗体或其抗原结合片段, 其中一个 Fc 区的 CH3 包含 S364R 和 D399K 突变, 且另一个 Fc 区的 CH3 突变包含 Y349T、K370S 和 K409D 突变。

27、权利要求 24-26 中任一项所述的双特异性抗体, 其中所述第一和/或第二 Fc 区包含降低与 Fcγ 受体结合的突变, 例如 L234A/L235A 突变, 以及任选地 P329delP。

28、权利要求 26 或 27 的双特异性抗体, 其中

a) 一个 Fc 区包含 SEQ ID NO:80 所示的氨基酸序列或由其组成, 且另一个 Fc 区包含 SEQ ID NO:81 所示的氨基酸序列或由其组成;

b) 一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:80 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列且包含突变 S364R 和 D399K, 而另一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:81 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列且包含突变 Y349T、K370S 和 K409D;

c) 一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:80 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列且包含突变 S364R 和 D399K 和 L234A/L235A 突变以及 P329delP, 而另一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:81 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列且包含突变 Y349T、K370S 和 K409D 和 L234A/L235A 突变以及 P329delP;

d) 一个 Fc 区包含 SEQ ID NO:82 所示的氨基酸序列或由其组成, 且另一个 Fc 区包含 SEQ ID NO:83 所示的氨基酸序列或由其组成;

e) 一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:82 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列且包含突变 S364R 和 D399K, 而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:83 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列且包含突变 Y349T、K370S 和 K409D; 或

f) 一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:82 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列且包含突变 S364R 和 D399K 和 L234A/L235A 突变, 而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:83 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列且包含突变 Y349T、K370S 和 K409D 和 L234A/L235A 突变。

29、权利要求 17-28 中任一项的双特异性抗体, 其中所述 TAA 为 CLDN18.2, 优选地, 所述第二抗原结合区包含 3 个来自重链可变区的互补决定区 (CDRH), CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 和 3 个来自轻链可变区的互补决定区 (CDRL), CDRL1、CDRL2 和 CDRL3, 其中

CDRH1 包含 SEQ ID NO:87 的氨基酸序列或由其组成; CDRH2 包含 SEQ ID NO:88 的氨基酸序列或由其组成, CDRH3 包含 SEQ ID NO:89 的氨基酸序列或由其组成, CDRL1 包含 SEQ ID NO:91 的氨基酸序列或由其组成, CDRL2 包含 SEQ ID NO:92 的氨基酸序列或由其组成, 和 CDRL3 包含 SEQ ID NO:93 的氨基酸序列或由其组成。

30、权利要求 29 的双特异性抗体, 其中所述第二抗原结合区包含 VH 和 VL, 其中 VH 包含 SEQ ID NO:86 所示的序列或由所述序列组成; 和 VL 包含 SEQ ID NO:90 所示的序列或由所述序列组成。

31、权利要求 17-28 中任一项的双特异性抗体, 其中所述 TAA 为 PSMA, 优选地, 所述第二抗原结合区包含 3 个来自重链可变区的互补决定区 (CDRH), CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 和 3 个来自轻链可变区的互补决定区 (CDRL), CDRL1、CDRL2 和 CDRL3, 其中

CDRH1 包含 SEQ ID NO:96 的氨基酸序列或由其组成; CDRH2 包含 SEQ ID NO:97 的氨基酸序列或由其组成, CDRH3 包含 SEQ ID NO:98 的氨基酸序列或由其组成, CDRL1 包含 SEQ ID NO:99 的氨基酸序列或由其组成, CDRL2 包含 SEQ ID NO:100 的氨基酸序列或由其组成, 和 CDRL3 包含 SEQ ID NO:101 的氨基酸序列或由其组成。

32、权利要求 31 的双特异性抗体，其中所述第二抗原结合区包含 VH 和 VL，其中 VH 包含 SEQ ID NO:47 所示的序列或由所述序列组成；和 VL 包含 SEQ ID NO:49 所示的序列或由所述序列组成。

33、权利要求 17-32 中任一项的双特异性抗体，其中所述双特异性抗体包含特异性结合 CD28 的第一抗原结合区和特异性结合 TAA 的第二抗原结合区，其中第一抗原结合区包含或为第一 Fab，第二抗原结合区包含或为第二 Fab，其中第一 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第一 Fc 区 N 末端连接（经由或不经过接头，例如铰链区），第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第二 Fc 区 N 末端连接（经由或不经过接头，例如铰链区）。

34、权利要求 33 的双特异性抗体，其中所述双特异性抗体是 IgG 样抗体，其具有如图 3 所示的构型。

35、权利要求 33 或 34 所述的双特异性抗体，其包含作为特异性结合 CD28 的第一抗原结合区的第一 Fab 和作为特异性结合 TAA 的第二抗原结合区的第二 Fab，其中所述双特异性抗体包含

重链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第一 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第一 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第一 Fc 区 N 末端经由或不经过接头（例如铰链区）连接；

轻链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第一 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区；

重链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第二 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第二 Fc 区 N 末端经由或不经过接头（例如铰链区）连接；和/或

轻链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区；

优选地，每个结构域直接连接。

36、权利要求 35 所述的双特异性抗体，其中 TAA 为 CLDN18.2，且其中

重链 1 包含 SEQ ID NO:35 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；轻链 1 包含 SEQ ID NO:36 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；重链 2 包含 SEQ ID NO:33 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和轻链 2 包含 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

重链 1 包含 SEQ ID NO:37 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；轻链 1 包含 SEQ ID NO:38 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；重链 2 包含 SEQ ID NO:33 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和轻链 2 包含 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

重链 1 包含 SEQ ID NO:39 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；轻链 1 包含 SEQ ID NO:40

所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；重链 2 包含 SEQ ID NO:33 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和轻链 2 包含 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

37、权利要求 35 所述的双特异性抗体，其中 TAA 为 PSMA，且其中

重链 1 包含 SEQ ID NO:51 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；轻链 1 包含 SEQ ID NO:36 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；重链 2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和轻链 2 包含 SEQ ID NO:50 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

重链 1 包含 SEQ ID NO:52 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；轻链 1 包含 SEQ ID NO:38 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；重链 2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和轻链 2 包含 SEQ ID NO:50 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

重链 1 包含 SEQ ID NO:53 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；轻链 1 包含 SEQ ID NO:40 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；重链 2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和轻链 2 包含 SEQ ID NO:50 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

38、核酸分子，其编码权利要求 1-16 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段的任一条链，或权利要求 17-37 中任一项的双特异性抗体中的任一条链，或由所述核酸序列组成。

39、表达载体，其包含权利要求 38 的核酸分子，优选地，所述表达载体为 pCDNA，例如 pCDNA3.1。

40、宿主细胞，其包含权利要求 38 所述的核酸分子或权利要求 39 所述的表达载体，优选地，所述宿主细胞是原核的或真核的，例如 293 细胞或 CHO 细胞，例如 Expi293 细胞。

41、制备权利要求 1-16 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求 17-37 中任一项所述的双特异性抗体的方法，所述方法包括，在适合所述抗体的链表达的条件下，培养权利要求 38 所述的核酸分子或权利要求 39 所述的表达载体的宿主细胞，和任选地从所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述抗体。

42、免疫缀合物，其包含权利要求 1-16 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求 17-37 中任一项所述的双特异性抗体。

43、药物组合物或药物或制剂，其包含权利要求 1-16 中任一项的所述的抗体或其抗原结

合片段或权利要求 17-37 中任一项所述的双特异性抗体，或权利要求 42 的免疫缀合物以及任选地药用辅料。

44、药物组合产品，其包含权利要求 1-16 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求 17-37 中任一项所述的双特异性抗体，或权利要求 42 的免疫缀合物，以及一种或多种其它治疗剂，优选地，所述治疗剂为用于治疗肿瘤的各种治疗剂，例如化疗剂、血管生成抑制剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂（例如免疫检查点抑制剂或激动剂），优选地，其它抗体为 PD-1 抗体。

45、在受试者中预防或治疗肿瘤的方法，包括向受试者施用有效量的权利要求 1-16 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求 17-37 中任一项所述的双特异性抗体，或权利要求 42 的免疫缀合物，或权利要求 43 的药物组合物或制剂；或权利要求 44 的药物组合产品。

46、权利要求 45 的方法，其中所述肿瘤是实体肿瘤或血液肿瘤，例如 TAA 阳性的肿瘤或癌症，任选地所述肿瘤为 CLDN18.2 阳性的胃肠道肿瘤，例如胃肠道癌症，例如胃癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌或结直肠癌；或所述肿瘤为 PSMA 阳性的肿瘤，例如肾细胞癌症，例如乳腺癌、肺癌、直肠癌或结直肠癌。

47、权利要求 45-46 中任一项的方法，其中所述方法还包括与其它疗法例如治疗方式（例如手术或放疗）和/或其它治疗剂组合施用，优选地，所述治疗剂为用于治疗肿瘤的各种治疗剂，例如化疗剂、血管生成抑制剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂（例如免疫检查点抑制剂或激动剂），优选地，其它抗体为 PD-1 抗体。