



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119998329 A

(43) 申请公布日 2025. 05. 13

(21) 申请号 202380070894.9	(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所 11517 专利代理师 黄遵玲 顾云峰
(22) 申请日 2023.02.07	
(66) 本国优先权数据 PCT/CN2022/110697 2022.08.05 CN	(51) Int.Cl. C07K 16/46 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2025.04.02	
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/CN2023/074836 2023.02.07	
(87) PCT国际申请的公布数据 W02024/027120 EN 2024.02.08	
(71) 申请人 上海凯今生物科技有限公司 地址 201203 上海市浦东新区张衡路1077 号2幢3层A3019室 申请人 成都恩沐生物科技有限公司	
(72) 发明人 周桢昊 张洁 王琪	权利要求书7页 说明书68页 序列表(电子公布) 附图29页

(54) 发明名称
多特异性多肽复合物

(57) 摘要
本公开提供了新型共价多特异性抗体和其用途。

1. 一种融合多肽, 其从C末端至N末端包含:

- a) 第一靶结合片段A1;
- b) 多肽连接子;
- c) 第二靶结合片段B2;

其中:

所述多肽连接子的长度足够短以最小化A1与B2之间潜在的分子内相互作用,

所述A1能够与第一配对片段B1配对, 以形成第一靶结合结构域;

所述B2能够与第二配对片段A2配对, 以形成第二靶结合结构域; 并且

相对于与所述B1的结合, 所述A1被配置成表现出与所述B2更少的结合, 并且相对于与
所述A2的结合, 所述B2被配置成表现出与所述A1更少的结合。

2. 一种多肽复合物, 其包含:

- a) 根据权利要求1所述的融合多肽,
- b) 包含所述第一配对片段B1的第二多肽;
- c) 包含所述第二靶结合片段B2的第三多肽; 以及
- d) 各自包含所述第二配对片段A2的第四多肽和第五多肽;

其中:

所述融合多肽中的所述A1与所述第二多肽中的所述B1配对以形成第一靶结合结构域,

所述融合多肽中的所述B2与所述第四多肽中的所述A2配对以形成第二靶结合结构域,

并且

所述第五多肽中的所述A2与所述第三多肽中的所述B2配对以形成另一个第二靶结合
结构域。

3. 根据权利要求1所述的融合多肽或者根据权利要求2所述的多肽复合物, 其中所述B1
和A1对以及所述B2和A2对中的至少一者含有至少一种能够阻碍B1与A2之间和/或B2与A1之
间的错配的构型。

4. 根据权利要求1或3所述的融合多肽或者根据权利要求2或3所述的多肽复合物, 其
中:

所述A1包含选自VH1或VL1的第一抗体可变区VA1,

所述B1包含能够与VA1配对以形成所述第一靶结合结构域的第一配对抗体可变区VB1,
其中所述VB1选自VH1或VL1, 并且

所述B2包含选自VH2或VL2的第二抗体可变区VB2, 并且

所述A2包含能够与VB2配对以形成所述第二靶结合结构域的第二配对抗体可变区VA2,
其中所述VA2选自VH2或VL2。

5. 根据权利要求4所述的融合多肽或者根据权利要求4所述的多肽复合物, 其中所述
VB1包含VH1, 所述VA1包含VL1, 所述VB2包含VH2, 并且所述VA2包含VL2。

6. 根据权利要求4所述的融合多肽或者根据权利要求4所述的多肽复合物, 其中:

- a) 所述VB1包含VH1, 所述VA1包含VL1, 所述VB2包含VL2, 并且所述VA2包含VH2; 或者
- b) 所述VB1包含VL1, 所述VA1包含VH1, 所述VB2包含VH2, 并且所述VA2包含VL2。

7. 根据权利要求1和3至6中任一项所述的融合多肽或者根据权利要求2至6中任一项所
述的多肽复合物, 其中所述A1进一步包含与所述VA1可操作地连接的第一支架区SR_a, 并且

所述B2进一步包含与所述VB2可操作地连接的第二支架区 SR_b ,其中所述 SR_a 和所述 SR_b 被配置成阻碍所述 SR_a 与所述 SR_b 之间的配对。

8. 根据权利要求7所述的融合多肽或者根据权利要求7所述的多肽复合物,其中所述B1进一步包含第一配对支架区 PSR_a ,所述第一配对支架区 PSR_a 与所述VB1可操作地连接并且能够与所述 SR_a 结合,并且其中所述A2进一步包含第二配对支架区 PSR_b ,所述第二配对支架区 PSR_b 与所述VA2可操作地连接并且能够与所述 SR_b 结合,任选地,所述 SR_a 和所述 PSR_a 通过第一二硫键配对,和/或所述 SR_b 和所述 PSR_b 通过第二二硫键配对。

9. 根据权利要求7或8所述的融合多肽或者根据权利要求7或8所述的多肽复合物,其中 SR_a/PSR_a 对或 SR_b/PSR_b 对选自由以下组成的组:

- a) 重链恒定区1 (CH1) 和轻链恒定区 (CL) 对;
- b) T细胞受体 (TCR) 恒定区 α ($C\alpha$) 和TCR恒定区 β ($C\beta$) 对;
- c) TCR恒定区 γ ($C\gamma$) 和TCR恒定区 δ ($C\delta$) 对;
- d) 受体的配体结合结构域和配体对;
- e) PRD (富含脯氨酸的结构域) 和SH3结构域对;以及
- f) 遮蔽蛋白和肌联蛋白对。

10. 根据权利要求7至9中任一项所述的融合多肽或者根据权利要求7至9中任一项所述的多肽复合物,其中所述 SR_a 和 PSR_a 对不同于所述 SR_b 和 PSR_b 对。

11. 根据权利要求7至10中任一项所述的融合多肽或者根据权利要求7至10中任一项所述的多肽复合物,其中:

- a) 所述 SR_a 和 PSR_a 对是CH1和CL对,并且所述 SR_b 和 PSR_b 对是以下各项:
 - i) $C\alpha$ 和 $C\beta$ 对,
 - ii) $C\gamma$ 和 $C\delta$ 对,
 - iii) 受体的配体结合结构域和配体对;
 - iv) PRD (富含脯氨酸的结构域) 和SH3结构域对,或者
 - v) 遮蔽蛋白和肌联蛋白对,或者
- b) 所述 SR_b 和 PSR_b 对是CH1和CL对,并且所述 SR_a 和 PSR_a 对是以下各项:
 - i) $C\alpha$ 和 $C\beta$ 对,
 - ii) $C\gamma$ 和 $C\delta$ 对,
 - iii) 受体的配体结合结构域和配体对;
 - iv) PRD (富含脯氨酸的结构域) 和SH3结构域对,或者
 - v) 遮蔽蛋白和肌联蛋白对。

12. 根据权利要求7至9中任一项所述的融合多肽或者根据权利要求7至9中任一项所述的多肽复合物,其中所述 SR_a/PSR_a 对和所述 SR_b/PSR_b 对两者是相同的,并且所述 SR_a/PSR_a 对和/或所述 SR_b/PSR_b 对被配置成阻碍 SR_a/PSR_b 之间或 SR_b/PSR_a 之间的错配。

13. 根据权利要求12所述的融合多肽或者根据权利要求12所述的多肽复合物,其中所述 SR_a/PSR_a 对包含CH1结构域CH1a和CL结构域CLa,并且所述 SR_b/PSR_b 对包含CH1结构域CH1b和CL结构域CLb。

14. 根据权利要求13所述的融合多肽或者根据权利要求13所述的多肽复合物,其中所

述VB1包含VH1,所述VA1包含VL1,所述VB2包含VH2,并且所述VA2包含VL2,并且其中:

a) 所述PSR_a是CL结构域CLa,所述SR_a是CH1结构域CH1a,所述SR_b是CH1结构域CH1b,所述PSR_b是CL结构域CLb;或者

b) 所述PSR_a是CH1结构域CH1a,所述SR_a是CL结构域CLa,所述SR_b是CL结构域CLb,所述PSR_b是CH1结构域CH1b。

15. 根据权利要求13所述的融合多肽或者根据权利要求13所述的多肽复合物,其中所述PSR_a是CH1结构域CH1a,所述SR_a是CL结构域CLa,所述SR_b是CH1结构域CH1b,所述PSR_b是CL结构域CLb,并且其中:

a) 所述VB1包含VH1,所述VA1包含VL1,所述VB2包含VL2,并且所述VA2包含VH2;或者

b) 所述VB1包含VL1,所述VA1包含VH1,所述VB2包含VH2,并且所述VA2包含VL2。

16. 根据权利要求13所述的融合多肽或者根据权利要求13所述的多肽复合物,其中:所述VB1包含VH1,所述VA1包含VL1,所述VB2包含VH2,并且所述VA2包含VL2,所述PSR_a是CH1结构域CH1a,所述SR_a是CL结构域CLa,所述SR_b是CH1结构域CH1b,所述PSR_b是CL结构域CLb,并且其中:

a) 所述融合多肽包含式(I)的氨基酸序列:VH2-CH1b-连接子-VL1-CLa,

b) 所述第二多肽包含式(II)的氨基酸序列:VH1-CH1a,

c) 所述第三多肽包含式(III)的氨基酸序列:VH2-CH1b,

d) 所述第四多肽和所述第五多肽各自包含式(IV)的氨基酸序列:VL2-CLb;

其中所述CH1b/CLb对和/或所述CH1a/CLa对被配置成阻碍CH1b与CLa之间和/或CH1a与CLb之间的错配。

17. 根据权利要求16所述的融合多肽或者根据权利要求16所述的多肽复合物,其中所述CH1b/CLb对和所述CH1a/CLa对中的至少一者具有一个或多个如下所示的特性:

1) 具有至少一个非天然二硫键,所述非天然二硫键阻碍CH1b与CLa之间和/或CH1a与CLb之间的错配;

2) 具有一个或多个引入的氨基酸突变,所述一个或多个引入的氨基酸突变成阻碍CH1b与CLa之间和/或CH1a与CLb之间的错配的至少一个或多个引入的带电荷氨基酸残基;或者

3) 具有一个或多个引入的氨基酸突变,所述一个或多个引入的氨基酸突变成阻碍CH1b与CLa之间或CH1a与CLb之间的错配的正交CH1-CL界面。

18. 根据权利要求17所述的融合多肽或者根据权利要求17所述的多肽复合物,其中第一CH1/CL对和第二CH1/CL对选自CH1b/CLb和CH1a/CLa,并且其中所述第一CH1/CL对通过非天然的第一二硫键缔合,并且任选地缺乏天然二硫键或具有被破坏的天然二硫键。

19. 根据权利要求18所述的融合多肽或者根据权利要求18所述的多肽复合物,其中所述第二CH1/CL对通过第二二硫键缔合,所述第二二硫键形成于不同于所述第一二硫键的位置处,并且任选地所述第二二硫键是天然二硫键。

20. 根据权利要求18或19所述的融合多肽或者根据权利要求18或19所述的多肽复合物,其中所述第一二硫键由在一组重链-轻链EU位置处引入的两个半胱氨酸残基形成,所述一组重链-轻链EU位置选自由以下组成的组:

a) 重链EU位置126-轻链EU位置121,

- b) 重链EU位置173-轻链EU位置160,以及
- c) 重链EU位置128-轻链EU位置118。

21. 根据权利要求18至20中任一项所述的融合多肽或者根据权利要求18至20中任一项所述的多肽复合物,其中所述天然二硫键位于重链EU位置220与轻链EU位置214之间。

22. 根据权利要求18至21中任一项所述的融合多肽或者根据权利要求18至21中任一项所述的多肽复合物,其中所述第一CH1/CL对包含CH1和CL,所述CH1包含在EU位置126处取代为半胱氨酸残基,以及在EU位置220处取代为非半胱氨酸残基;所述CL包含在EU位置121处取代为半胱氨酸残基,以及在EU位置214处取代为非半胱氨酸残基。

23. 根据权利要求17至22中任一项所述的融合多肽或者根据权利要求17至22中任一项所述的多肽复合物,其中第一CH1/CL对和第二CH1/CL对选自CH1b/CLb和CH1a/CLa,并且其中所述第一CH1/CL对含有至少一个带电荷残基对非带电荷残基的取代,和/或至少一个带相反电荷的残基对带电荷残基的取代,使得所述第一CH1/CL对含有有利于所述第一CH1/CL对配对的第一对带相反电荷的残基。

24. 根据权利要求23所述的融合多肽或者根据权利要求23所述的多肽复合物,其中所述第二CH1/CL对含有至少一个带电荷残基对非带电荷残基的取代,和/或至少一个带相反电荷的残基对带电荷残基的取代,使得所述第二CH1/CL对含有有利于所述第二CH1/CL对配对的第二对带相反电荷的残基,并且任选地,所述第一对带相反电荷的残基和所述第二对带相反电荷的残基阻碍CH1a与CLb之间的配对或阻碍CH1b与CLa之间的配对。

25. 根据权利要求24所述的融合多肽或者根据权利要求24所述的多肽复合物,其中所述第一对带相反电荷的残基和/或所述第二对带相反电荷的残基被配置成使得CH1a和CLb都具有带正电荷的残基或都具有带负电荷的残基,和/或CH1b和CLa都具有带正电荷的残基或都具有带负电荷的残基。

26. 根据权利要求23至25中任一项所述的融合多肽或者根据权利要求23至25中任一项所述的多肽复合物,其中所述第一对带相反电荷的残基和/或所述第二对带相反电荷的残基被引入在一组重链-轻链EU位置处,所述重链-轻链EU位置选自由以下组成的组:

- a) 重链EU位置183:轻链EU位置176,
- b) 重链EU位置183:轻链EU位置133,
- c) 重链EU位置147:轻链EU位置176,
- d) 重链EU位置141:轻链EU位置116,
- e) 重链EU位置126:轻链EU位置121,以及
- f) 重链EU位置218:轻链EU位置122。

27. 根据权利要求22至26中任一项所述的融合多肽或者根据权利要求22至26中任一项所述的多肽复合物,其中所述带相反电荷的残基对包含带正电荷的氨基酸残基和带负电荷的氨基酸残基,其中所述带正电荷的氨基酸残基选自由以下组成的组:赖氨酸(K)、组氨酸(H)和精氨酸(R),和/或所述带负电荷的氨基酸残基选自由以下组成的组:天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)。

28. 根据权利要求17至27中任一项所述的融合多肽或者根据权利要求17至27中任一项所述的多肽复合物,其中第一CH1/CL对和第二CH1/CL对选自CH1b/CLb和CH1a/CLa,并且其中所述第一CH1/CL对包含形成正交CH1-CL界面的一个或多个引入的氨基酸突变。

29. 根据权利要求28所述的融合多肽或者根据权利要求28所述的多肽复合物,其中所述正交CH1-CL界面在一组重链-轻链EU位置处引入,所述一组重链-轻链EU位置包括重链EU位置H168A、F170G、轻链EU位置L135Y、S176W。

30. 根据权利要求17至29中任一项所述的融合多肽或者根据权利要求17至29中任一项所述的多肽复合物,其中所述第一CH1/CL对包含在一组重链-轻链EU位置处形成正交Fab设计的一个或多个引入的氨基酸突变,所述一个或多个引入的氨基酸突变选自以下组成的组:

a) 重链EU位置A141I、F170S、S181M、S183A和V185A处的取代,以及轻链EU位置F116A、A235V、S174A、S176F和T178V处的取代。

31. 根据权利要求16至30中任一项所述的融合多肽或者根据权利要求16至30中任一项所述的多肽复合物,其中第一VH/VL对和第二VH/VL对选自VH1/VL1和VH2/VL2,并且其中所述第一VH/VL对具有至少一个带电荷残基对非带电荷残基的取代,和/或至少一个带相反电荷的残基对带电荷残基的取代,使得所述第一VH/VL含有有利于所述第一VH/VL对配对的第三对带相反电荷的残基。

32. 根据权利要求31所述的融合多肽或者根据权利要求31所述的多肽复合物,其中所述第二VH/VL对具有至少一个带电荷残基对非带电荷残基的取代,和/或至少一个带相反电荷的残基对带电荷残基的取代,使得所述第二VH/VL含有有利于所述第二VH/VL对配对的第四对带相反电荷的残基,并且任选地,所述第三对带相反电荷的残基和所述第四对带相反电荷的残基阻碍VH1与VL2之间的配对或阻碍VH2与VL1之间的配对。

33. 根据权利要求32所述的融合多肽或者根据权利要求32所述的多肽复合物,其中所述第三对带相反电荷的残基和所述第四对带相反电荷的残基被配置成使得VH1和VL2都具有带正电荷的残基或都具有带负电荷的残基,和/或VH2和VL1都具有带正电荷的残基或都具有带负电荷的残基。

34. 根据权利要求31至33中任一项所述的融合多肽或者根据权利要求31至33中任一项所述的多肽复合物,其中所述第三对带相反电荷的残基和/或所述第四对带相反电荷的残基被引入在一组重链-轻链EU位置处,所述重链-轻链EU位置选自以下组成的组:

a) 重链EU位置39;轻链EU位置38;

b) 重链EU位置105;轻链EU位置43,以及

c) 重链EU位置62;轻链EU位置1,或者

其任何组合。

35. 根据权利要求31至34中任一项所述的融合多肽或者根据权利要求31至34中任一项所述的多肽复合物,其中所述带相反电荷的残基对包含带正电荷的氨基酸残基和带负电荷的氨基酸残基,其中所述带正电荷的氨基酸残基选自以下组成的组:赖氨酸(K)、组氨酸(H)和精氨酸(R),和/或所述带负电荷的氨基酸残基选自以下组成的组:天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)。

36. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽复合物,其中所述第二多肽和所述第三多肽进一步分别包含可操作地连接的第一二聚化结构域和可操作地连接的第二二聚化结构域,所述第一二聚化结构域和所述第二二聚化结构域缔合以形成二聚体;任选地,所述第一二聚化结构域包含第一Fc区,和/或所述第二二聚化结构域包含第二Fc区。

37. 根据权利要求36所述的多肽复合物, 其中所述第一Fc区和/或所述第二Fc区源自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

38. 根据权利要求36所述的多肽复合物, 其中所述第一Fc区和所述第二Fc区具有不同的氨基酸序列, 并且具有至少一种促进所述第一Fc区和所述第二Fc区异二聚化的构型。

39. 根据权利要求38所述的多肽复合物, 其中所述第一Fc区包含第一Fc突变, 和/或所述第二Fc区包含第二Fc突变, 其中:

a) 所述第一Fc突变包括T366W或S354C, 并且所述第二Fc突变包括Y349C、T366S、L368A或Y407V;

b) 所述第一Fc突变包括D399K或E356K, 并且所述第二Fc突变包括K392D或K409D;

c) 所述第一Fc突变包括E356K、E357K或D399K, 并且所述第二Fc突变包括K370E、K409D或K439E;

d) 所述第一Fc突变包括S364H或F405A, 并且所述第二Fc突变包括Y349T或T394F;

e) 所述第一Fc突变包括S364H或T394F, 并且所述第二Fc突变包括Y394T或F405A;

f) 所述第一Fc突变包括K370D或K409D, 并且所述第二Fc突变包括E357K或D399K; 或者

g) 所述第一Fc突变包括L351D或L368E, 并且所述第二Fc突变包括L351K或T366K,

其中编号是根据EU索引的。

40. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽或者根据前述权利要求中任一项所述的多肽复合物, 其中所述第一靶结合结构域和所述第二靶结合结构域与不同靶标结合。

41. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽或者根据前述权利要求中任一项所述的多肽复合物, 其中所述第一靶结合结构域和所述第二靶结合结构域中的至少一者是嵌合的、人源化的或完全人的。

42. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽或者根据前述权利要求中任一项所述的多肽复合物, 其中所述第一靶结合结构域和所述第二靶结合结构域中的至少一者与疾病相关抗原或免疫相关靶标结合, 任选地, 所述疾病相关抗原是肿瘤相关抗原、与自身免疫性疾病或炎性疾病相关的抗原、或与眼部病症相关的抗原、与中枢神经系统疾病相关的抗原、与感染性疾病相关的抗原或与凝血性疾病相关的抗原。

43. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽或者根据前述权利要求中任一项所述的多肽复合物, 其中所述第一靶结合结构域和所述第二靶结合结构域中的一者与肿瘤相关抗原结合, 并且另一者与免疫相关靶标结合。

44. 一种核酸, 其包含编码根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽或者根据前述权利要求中任一项所述的多肽复合物的核苷酸序列。

45. 一种载体, 其包含根据权利要求44所述的核酸。

46. 一种宿主细胞, 其包含根据权利要求44所述的核酸或根据权利要求45所述的载体。

47. 一种药物组合物, 其包含根据权利要求1至43中任一项所述的多肽复合物以及药学上可接受的载剂。

48. 一种缀合物, 其包含根据权利要求1至43中任一项所述的多肽复合物以及与所述多肽复合物缀合的有效载荷, 其中所述有效载荷选自以下组成的组: 放射性标记、荧光标记、酶-底物标记、亲和纯化标签、示踪分子、抗癌药物和细胞毒性分子。

49. 一种组合物, 其包含根据权利要求1至43中任一项所述的多肽复合物、或根据权利

要求48所述的缀合物,以及药学上可接受的载剂。

50.一种治疗或预防疾病、病状或症状的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据权利要求1至43中任一项所述的多肽复合物、根据权利要求47所述的药物组合物、根据权利要求48所述的缀合物或根据权利要求49所述的组合物。

51.根据权利要求50所述的方法,其中所述疾病选自由以下组成的组:癌症、炎性疾病、感染性或寄生虫性疾病、心血管疾病、眼病、中枢神经系统(CNS)疾病、损伤、代谢性疾病、自身免疫性疾病或凝血障碍。

52.一种检测抗原的存在或水平的方法,所述方法包括:使怀疑含有所述抗原的样品与根据权利要求1至43中任一项所述的多肽复合物接触;以及确定在所述抗原与所述多肽复合物之间形成复合物。

多特异性多肽复合物

技术领域

[0001] 本发明涉及新型共价多特异性抗体和其用途。

背景技术

[0002] 双特异性抗体是能够与至少两种抗原结合的人工抗体。通过同时接合至少两个所关注靶标,双特异性抗体可以通过新颖和独特的机制提供优于常规单特异性抗体的益处。例如,靶向CD3和CD19的博纳吐单抗(Blinatumomab)(CD3×CD19,安进公司(Amgen))可以通过其识别CD3的Fv有效地使T细胞参与杀伤表达CD19的肿瘤细胞,并且在治疗ALL(急性淋巴细胞性白血病)等方面显示出优于常规抗体的功效。博纳吐单抗于2014年被FDA批准用于ALL治疗。

[0003] 已经开发了许多双特异性抗体技术平台,仅举几例:BiTE双特异性T细胞衔接器(Micromet公司,2012年由安进公司收购)、CrossMab(罗氏公司(Roche))、DVD-Ig(艾伯维公司(Roche))、TandAb(Affimed公司)和DART(双抗原重靶向,MacroGenics公司)。

[0004] 然而,尽管双特异性或多特异性抗体具有优势,但它们也带来了挑战,例如在制备中。错配可能发生在重链之间和/或重链与轻链之间。对于双特异性或多特异性抗体来说,如何高效且有效地去除错配的副产物是一个不可克服的挑战。因此,非常需要开发新型构建体,其既可以提供对所关注靶标的良好结合亲和力,又便于制备和下游纯化。

发明内容

[0005] 在整个本公开中,本文使用的冠词“一个(a)”、“一种(an)”和“所述(the)”是指冠词的语法宾语中的一个或多于一个(即,至少一个)。举例来说,“抗体”意指一种抗体或多于一种抗体。

[0006] 本公开尤其提供了新型融合多肽、编码此类多肽的核苷酸序列以及其用途。

[0007] 一方面,本公开提供了一种融合多肽,其从C末端至末N端包含:a)第一靶结合片段A1;b)多肽连接子;c)第二靶结合片段B2,其中所述多肽连接子的长度足够短以最小化A1与B2之间潜在的分子内相互作用。在一些实施方式中,所述A1能够与第一配对片段B1配对,以形成第一靶结合结构域;所述B2能够与第二配对片段A2配对,以形成第二靶结合结构域。在此类实施方式中,相对于与所述B1的结合,所述A1被配置成表现出与所述B2更少的结合,并且相对于与所述A2的结合,所述B2被配置成表现出与所述A1更少的结合。

[0008] 在另一方面,本公开提供了一种多肽复合物,其包含:a)本文所提供的融合多肽;b)包含所述第一配对片段B1的第二多肽;c)包含所述第二靶结合片段B2的第三多肽;以及d)各自包含所述第二配对片段A2的第四多肽和第五多肽,其中所述融合多肽中的所述A1与所述第二多肽中的所述B1配对以形成第一靶结合结构域;所述融合多肽中的所述B2与所述第四多肽中的所述A2配对以形成所述第二靶结合结构域;并且所述第五多肽中的所述A2与所述第三多肽中的所述B2配对以形成另一个第二靶结合结构域。

[0009] 在一些实施方式中,所述B1和A1对以及所述B2和A2对中的至少一者含有至少一种

能够阻碍B1与A2之间和/或B2与A1之间的错配的构型。

[0010] 在一些实施方式中,所述A1包含选自VH1或VL1的第一抗体可变区VA1。在此类实施方式中,所述B1包含能够与VA1配对以形成所述第一靶结合结构域的第一对抗体可变区VB1,其中所述VB1选自VH1或VL1。

[0011] 在一些实施方式中,所述B2包含选自VH2或VL2的第二抗体可变区VB2。在此类实施方式中,所述A2包含能够与VB2配对以形成所述第二靶结合结构域的第二对抗体可变区VA2,其中所述VA2选自VH2或VL2。

[0012] 在一些实施方式中,所述VB1包含VH1,所述VA1包含VL1,所述VB2包含VH2,并且所述VA2包含VL2。

[0013] 在一些实施方式中,所述VB1包含VH1,所述VA1包含VL1,所述VB2包含VL2,并且所述VA2包含VH2。在一些其它实施方式中,所述VB1包含VL1,所述VA1包含VH1,所述VB2包含VH2,并且所述VA2包含VL2。

[0014] 在一些实施方式中,所述A1进一步包含与所述VA1可操作地连接的第一支架区SR_a,并且所述B2进一步包含与所述VB2可操作地连接的第二支架区SR_b,其中所述SR_a和所述SR_b被配置成使得阻碍所述SR_a与所述SR_b之间的配对。

[0015] 在一些实施方式中,所述B1进一步包含第一配对支架区PSR_a,所述第一配对支架区PSR_a与所述VB1可操作地连接并且能够与所述SR_a结合,并且其中所述A2进一步包含第二配对支架区PSR_b,所述第二配对支架区PSR_b与所述VA2可操作地连接并且能够与所述SR_b结合。

[0016] 在一些实施方式中,SR_a/PSR_a对或SR_b/PSR_b对选自由以下组成的组:a)重链恒定区1(CH1)和轻链恒定区(CL)对;b)T细胞受体(TCR)恒定区α(C_α)和TCR恒定区β(C_β)对;c)TCR恒定区γ(C_γ)和TCR恒定区δ(C_δ)对;d)受体的配体结合结构域和配体对;以及e)PRD(富含脯氨酸的结构域)和SH3结构域对;f)遮蔽蛋白和肌联蛋白对。

[0017] 在一些实施方式中,所述SR_a和PSR_a对不同于所述SR_b和PSR_b对。在这些实施方式中的一些实施方式中,所述SR_a和PSR_a对是CH1和CL对,并且所述SR_b和PSR_b对是以下各项:i)C_α和C_β对,ii)C_γ和C_δ对,iii)受体的配体结合结构域和配体对;iv)PRD(富含脯氨酸的结构域)和SH3结构域对,或者v)遮蔽蛋白和肌联蛋白对。在这些实施方式中的一些其它实施方式中,所述SR_b和PSR_b对是CH1和CL对,并且所述SR_a和PSR_a对是以下各项:i)C_α和C_β对,ii)C_γ和C_δ对,iii)受体的配体结合结构域和配体对;iv)PRD(富含脯氨酸的结构域)和SH3结构域对,或者v)遮蔽蛋白和肌联蛋白对。

[0018] 在一些实施方式中,所述SR_a/PSR_a对和所述SR_b/PSR_b对两者是相同的,并且所述SR_a/PSR_a对和/或所述SR_b/PSR_b对被配置成阻碍SR_a/PSR_b之间或SR_b/PSR_a之间的错配。在这些实施方式中的一些实施方式中,所述SR_a/PSR_a对包含CH1结构域CH1a和CL结构域CLa,并且所述SR_b/PSR_b对包含CH1结构域CH1b和CL结构域CLb。

[0019] 在一些实施方式中,所述VB1包含VH1,所述VA1包含VL1,所述VB2包含VH2,并且所述VA2包含VL2。在这些实施方式中的一些实施方式中,一对CH1结构域和CL结构域交叉。例如,所述PSR_a是CL结构域CLa,所述SR_a是CH1结构域CH1a,所述SR_b是CH1结构域CH1b,所述PSR_b是CL结构域CLb。可替代地,所述PSR_a是CH1结构域CH1a,所述SR_a是CL结构域CLa,所述SR_b是CL结构域CLb,所述PSR_b是CH1结构域CH1b。

[0020] 在一些实施方式中,所述PSR_a是CH1结构域CH1a,所述SR_a是CL结构域CLa,所述SR_b是CH1结构域CH1b,所述PSR_b是CL结构域CLb。在这些实施方式中的一些实施方式中,一对VH结构域和VL结构域交叉。例如,所述VB1包含VH1,所述VA1包含VL1,所述VB2包含VL2,并且所述VA2包含VH2。可替代地,所述VB1包含VL1,所述VA1包含VH1,所述VB2包含VH2,并且所述VA2包含VL2。

[0021] 在某些实施方式中,所述VB1包含VH1,所述VA1包含VL1,所述VB2包含VH2,并且所述VA2包含VL2,所述PSR_a是CH1结构域CH1a,所述SR_a是CL结构域CLa,所述SR_b是CH1结构域CH1b,所述PSR_b是CL结构域CLb,并且其中:a)所述融合多肽包含式(I)的氨基酸序列:VH2-CH1b-连接子-VL1-CLa;b)所述第二多肽包含式(II)的氨基酸序列:VH1-CH1a;c)所述第三多肽包含式(III)的氨基酸序列:VH2-CH1b;d)所述第四多肽和所述第五多肽各自包含式(IV)的氨基酸序列:VL2-CLb;并且其中所述CH1b/CLb对和/或所述CH1a/CLa对被配置成阻碍CH1b与CLa之间和/或CH1a与CLb之间的错配。

[0022] 在一些实施方式中,所述CH1b/CLb对和所述CH1a/CLa对中的至少一者具有一个或多个如下所示的特性:1)具有至少一个非天然二硫键,所述非天然二硫键阻碍CH1b与CLa之间和/或CH1a与CLb之间的错配;2)具有一个或多个引入的带电荷氨基酸残基,所述一个或多个引入的带电荷氨基酸残基阻碍CH1b与CLa之间和/或CH1a与CLb之间的错配;或者3)具有一个或多个引入的氨基酸突变,所述一个或多个引入的氨基酸突变成阻碍CH1b与CLa之间或CH1a与CLb之间的错配的正交CH1-CL界面。这些特性对于阻碍CH1b与CLa之间和/或CH1a与CLb之间的错配是有用的。

[0023] 在一些实施方式中,所述CH1b/CLb对和所述CH1a/CLa对中的至少一者具有至少一个非天然二硫键,所述非天然二硫键阻碍CH1b与CLa之间和/或CH1a与CLb之间的错配。在这些实施方式中的一些实施方式中,第一CH1/CL对和第二CH1/CL对选自CH1b/CLb和CH1a/CLa,并且其中所述第一CH1/CL对通过非天然的第一二硫键缔合,并且任选地缺乏天然二硫键或具有被破坏的天然二硫键。在一些实施方式中,所述第二CH1/CL对通过第二二硫键缔合,所述第二二硫键形成于不同于所述第一二硫键的位置处,并且任选地所述第二二硫键是天然二硫键。在一些实施方式中,所述第一二硫键由在一组重链-轻链EU位置处引入的两个半胱氨酸残基形成,所述一组重链-轻链EU位置选自由以下组成的组:a)重链EU位置126-轻链EU位置121,b)重链EU位置173-轻链EU位置160,以及c)重链EU位置128-轻链EU位置118。在一些实施方式中,所述天然二硫键位于重链EU位置220与轻链EU位置214之间。在某些实施方式中,所述第一CH1/CL对包含CH1和CL,所述CH1包含在EU位置126处取代为半胱氨酸残基,以及在EU位置220处取代为非半胱氨酸残基;所述CL包含在EU位置121处取代为半胱氨酸残基,以及在EU位置214处取代为非半胱氨酸残基。

[0024] 在一些实施方式中,所述CH1b/CLb对和所述CH1a/CLa对中的至少一者具有至少一个或多个阻碍CH1b与CLa之间和/或CH1a与CLb之间的错配的引入的带电荷氨基酸残基。在一些实施方式中,第一CH1/CL对和第二CH1/CL对选自CH1b/CLb和CH1a/CLa,并且其中所述第一CH1/CL对含有至少一个带电荷残基对非带电荷残基的取代,和/或至少一个带相反电荷的残基对带电荷残基的取代,使得所述第一CH1/CL对含有有利于所述第一CH1/CL对配对的第一对带相反电荷的残基。在一些实施方式中,所述第二CH1/CL对含有至少一个带电荷残基对非带电荷残基的取代,和/或至少一个带相反电荷的残基对带电荷残基的取代,使得

所述第二CH1/CL对含有有利于所述第二CH1/CL对配对的第二对带相反电荷的残基,并且任选地,所述第一对带相反电荷的残基和所述第二对带相反电荷的残基阻碍CH1a与CLb之间的配对或阻碍CH1b与CLa之间的配对。在一些实施方式中,所述第一对带相反电荷的残基和/或所述第二对带相反电荷的残基被配置成使得CH1a和CLb都具有带正电荷的残基或都具有带负电荷的残基,和/或CH1b和CLa都具有带正电荷的残基或都具有带负电荷的残基。在某些实施方式中,其中所述第一对带相反电荷的残基和/或所述第二对带相反电荷的残基被引入在一组重链-轻链EU位置处,所述重链-轻链EU位置选自由以下组成的组:a)重链EU位置183:轻链EU位置176,b)重链EU位置183:轻链EU位置133,c)重链EU位置147:轻链EU位置176,d)重链EU位置141:轻链EU位置116,e)重链EU位置126:轻链EU位置121,以及f)重链EU位置218:轻链EU位置122。在某些实施方式中,带相反电荷的残基对包含带正电荷的氨基酸残基和带负电荷的氨基酸残基,其中所述带正电荷的氨基酸残基选自由以下组成的组:赖氨酸(K)、组氨酸(H)和精氨酸(R),和/或所述带负电荷的氨基酸残基选自由以下组成的组:天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)。

[0025] 在一些实施方式中,所述CH1b/CLb对和所述CH1a/CLa对中的至少一者具有一个或多个引入的氨基酸突变,所述一个或多个引入的氨基酸突变成阻碍CH1b与CLa之间或CH1a与CLb之间的错配的正交CH1-CL界面。在一些实施方式中,第一CH1/CL对和第二CH1/CL对分别选自CH1b/CLb和CH1a/CLa,并且其中所述第一CH1/CL对包含形成正交CH1-CL界面的一个或多个引入的氨基酸突变。在一些实施方式中,所述正交CH1-CL界面在一组重链-轻链EU位置处引入,所述一组重链-轻链EU位置包括重链EU位置H168A、F170G和轻链EU位置L135Y、S176W。在一些实施方式中,所述第一CH1/CL对包含在一组重链-轻链EU位置处形成正交Fab设计的一个或多个引入的氨基酸突变,所述一个或多个引入的氨基酸突变选自由以下组成的组:a)重链EU位置A141I、F170S、S181M、S183A和V185A处的取代,以及轻链EU位置F116A、A235V、S174A、S176F和T178V处的取代。

[0026] 在一些实施方式中,所述VH1/VL1对和/或所述VH2/VL2对被配置成阻碍VH1与VL2之间和/或VH2与VL1之间的错配。在这些实施方式中的一些实施方式中,第一VH/VL对和第二VH/VL对选自VH1/VL1和VH2/VL2,并且其中所述第一VH/VL对具有至少一个带电荷残基对非带电荷残基的取代,和/或至少一个带相反电荷的残基对带电荷残基的取代,使得所述第一VH/VL含有有利于所述第一VH/VL对配对的第三对带相反电荷的残基。在一些实施方式中,所述第二VH/VL对具有至少一个带电荷残基对非带电荷残基的取代,和/或至少一个带相反电荷的残基对带电荷残基的取代,使得所述第二VH/VL含有有利于所述第二VH/VL对配对的第四对带相反电荷的残基,并且任选地,所述第三对带相反电荷的残基和所述第四对带相反电荷的残基阻碍VH1与VL2之间的配对或阻碍VH2与VL1之间的配对。在这些实施方式中的一些实施方式中,所述第三对带相反电荷的残基和所述第四对带相反电荷的残基被配置成使得VH1和VL2都具有带正电荷的残基或都具有带负电荷的残基,和/或VH2和VL1都具有带正电荷的残基或都具有带负电荷的残基。在一些实施方式中,所述第三对带相反电荷的残基和/或所述第四对带相反电荷的残基被引入在一组重链-轻链EU位置处,所述重链-轻链EU位置选自由以下组成的组:a)重链EU位置39:轻链EU位置38;b)重链EU位置105:轻链EU位置43,以及c)重链EU位置62:轻链EU位置1,或者其任何组合。在一些实施方式中,带相反电荷的残基对包含带正电荷的氨基酸残基和带负电荷的氨基酸残基,其中所述带正电荷

的氨基酸残基选自以下组成的组：赖氨酸(K)、组氨酸(H)和精氨酸(R)，和/或所述带负电荷的氨基酸残基选自以下组成的组：天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)。

[0027] 在一些实施方式中，所述第二多肽和所述第三多肽进一步分别包含可操作地连接的第一二聚化结构域和可操作地连接的第二二聚化结构域，所述第一二聚化结构域和所述第二二聚化结构域缔合以形成二聚体；任选地，所述第一二聚化结构域包含第一Fc区，和/或所述第二二聚化结构域包含第二Fc区。在一些实施方式中，所述多肽复合物的所述第一Fc区和/或所述第二Fc区源自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一些实施方式中，所述多肽复合物的所述第一Fc区和所述第二Fc区具有不同的氨基酸序列，并且具有至少一种促进所述第一Fc区和所述第二Fc区异二聚化的构型。

[0028] 在一些实施方式中，所述多肽复合物的所述第一Fc区包含第一Fc突变，和/或所述多肽复合物的所述第二Fc区包含第二Fc突变，其中：a) 所述第一Fc突变包括T366W或S354C，并且所述第二Fc突变包括Y349C、T366S、L368A或Y407V；b) 所述第一Fc突变包括D399K或E356K，并且所述第二Fc突变包括K392D或K409D；c) 所述第一Fc突变包括E356K、E357K或D399K，并且所述第二Fc突变包括K370E、K409D或K439E；d) 所述第一Fc突变包括S364H或F405A，并且所述第二Fc突变包括Y349T或T394F；e) 所述第一Fc突变包括S364H或T394F，并且所述第二Fc突变包括Y394T或F405A；f) 所述第一Fc突变包括K370D或K409D，并且所述第二Fc突变包括E357K或D399K；或者g) 所述第一Fc突变包括L351D或L368E，并且所述第二Fc突变包括L351K或T366K，其中编号是根据EU索引的。

[0029] 另一方面，所述第一靶结合结构域和所述第二靶结合结构域中的至少一者是嵌合的、人源化的或完全人的。

[0030] 在一些实施方式中，所述第一靶结合结构域和所述第二靶结合结构域与不同靶标结合。在一些实施方式中，所述第一靶结合结构域和所述第二靶结合结构域中的至少一者与肿瘤相关抗原或免疫相关靶标结合。在一些实施方式中，所述第一靶结合结构域和所述第二靶结合结构域中的一者与肿瘤相关抗原结合，并且另一者与免疫相关靶标结合。在一些实施方式中，所述第一靶结合结构域和所述第二靶结合结构域中的至少一者与疾病相关抗原或免疫相关靶标结合，任选地，所述疾病相关抗原是肿瘤相关抗原、与自身免疫性疾病或炎性疾病相关的抗原、或与眼部病症相关的抗原、与中枢神经系统疾病相关的抗原、与感染性疾病相关的抗原或与凝血性疾病相关的抗原。

[0031] 本公开的另一方面提供了一种核酸，其包含编码如本文所描述的融合多肽或多肽复合物的核苷酸序列。

[0032] 又另一方面，本公开提供了一种载体，其包含本文所描述的核酸。

[0033] 又另一方面，本公开提供了一种宿主细胞，其包含本文所描述的核酸和载体。

[0034] 又另一方面，本公开提供了一种药物组合物，其包含本文所描述的多肽复合物以及药学上可接受的载剂。

[0035] 又另一方面，本公开提供了一种缀合物，其包含本文所描述的多肽复合物以及与所述多肽复合物缀合的有效载荷，其中所述有效载荷选自以下组成的组：放射性标记、荧光标记、酶-底物标记、亲和纯化标签、示踪分子、抗癌药物、免疫相关分子和细胞毒性分子。

[0036] 又另一方面，本公开提供了一种组合物，其包含本文所描述的多肽复合物或缀合物，以及药学上可接受的载剂。

[0037] 又另一方面,本公开提供了一种治疗或预防疾病、病状或症状的方法。在一些实施方式中,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本文所描述的多肽复合物、本文所描述的药物组合物、本文所描述的缀合物或本文所描述的组合物。

[0038] 在一些实施方式中,所述疾病选自以下组成的组:癌症、炎性疾病、感染性或寄生虫性疾病、心血管疾病、眼病、中枢神经系统(CNS)疾病、损伤、代谢性疾病、自身免疫性疾病或凝血障碍。在一些实施方式中,所述CNS疾病是神经病变、神经精神病状、神经母细胞瘤、胶质母细胞瘤或阿尔茨海默病。

[0039] 又另一方面,本公开提供了一种检测抗原的存在或水平的方法。在一些实施方式中,所述方法包括:使怀疑含有所述抗原的样品与本文所描述的多肽复合物接触;以及确定在所述抗原与所述多肽复合物之间形成复合物。

附图说明

[0040] 图1描绘了由两对单克隆抗体和一对Fc区构建的示例性多肽复合物的每个多肽片段。

[0041] 图2图解地描绘了通过本发明的方法(方法B)构建的示例性多肽复合物的结构。

[0042] 图3进一步描绘了通过本发明的方法(方法B)构建的示例性多肽复合物的结构,其中来自两种单克隆抗体的Fab片段被细分为VH/VL对和CH1/CL对。

[0043] 图4A和4B进一步描绘了通过本发明的方法(方法B)构建的示例性多肽复合物的结构,所述多肽复合物具有来自两个单克隆抗体的Fab片段的所定义的VH/VL对和CH1/CL对。图4C-4E分别描绘了B1-A2错配(图4C)、B2-A1错配(图4D)以及B1-A2和B2-A1错配(图4E)的抗体结构。

[0044] 图5A和5B描绘了通过常规方法(方法A)构建的示例性双特异性抗体的结构图。图5C-5E分别描绘了B1-A2错配(图5C)、B2-A1错配(图5D)以及B1-A2和B2-A1错配(图5E)的抗体结构。

[0045] 图6A和6B指示了通过SDS-Page分析的示例性多肽复合物(FORMAT EX1-8和FORMAT NEW1-8)的表达结果。

[0046] 图7A-7P指示了通过SEC-HPLC分析的示例性多肽复合物(FORMAT EX1-8和FORMAT NEW1-8)的表达结果。

[0047] 图8描绘了通过SDS-Page分析的经表达的多肽复合物抗CD20 x CD3(FORMAT NEW7)的纯度。

[0048] 图9描绘了通过CE-SDS分析的经表达的多肽复合物抗CD20 x CD3(FORMAT NEW7)的纯度。

[0049] 图10描绘了通过SEC-HPLC分析的经表达的多肽复合物抗CD20 x CD3(FORMAT NEW7)的纯度。

[0050] 图11描绘了通过亲和色谱法进行的经表达的多肽复合物抗CD20 x CD3(FORMAT NEW7)的纯化曲线。

[0051] 图12示出了通过亲和色谱法纯化的经表达的多肽复合物抗CD20 x CD3(FORMAT NEW7)的SEC-HPLC纯度分析。

[0052] 图13示出了通过亲和色谱法纯化的经表达的多肽复合物抗CD20 x CD3(FORMAT

NEW7)的SDS-Page纯度分析。

[0053] 图14描绘了在通过CEX进行的线性梯度洗脱下经表达的多肽复合物抗CD20 x CD3 (FORMAT NEW7)的纯化曲线。

[0054] 图15示出了通过CEX纯化的经表达的多肽复合物抗CD20 x CD3 (级分C01-C04)的SDS-Page纯度分析。

[0055] 图16示出了通过CEX纯化的经表达的多肽复合物抗CD20 x CD3 (级分C01-C04)的SEC-HPLC纯度分析。

[0056] 图17示出了双特异性抗体中使用的示例性支架区对的序列。

具体实施方式

[0057] 下文参考用于说明的示例应用说明了本发明的若干方面。应当理解,阐述了许多具体细节、关系和方法以提供对本发明的充分理解。然而,相关领域普通技术人员将很容易认识到,可以在没有所述具体细节中的一个或多个具体细节的情况下或者用其它方法来实践本发明。本发明不受所展示的活动或事件的顺序的限制,因为一些活动可以按不同的顺序和/或与其它活动或事件同时地发生。

[0058] 此外,实施根据本发明的方法并不需要所有展示的活动或事件。

[0059] I. 定义和缩写词

[0060] 在提供本发明的详细描述之前,注意并定义以下。

[0061] 本文所提供的所有描述仅旨在说明本公开中提供的发明的各种实施方式。如此,所讨论的具体修改不应被解释为对本公开的范围的限制。对于本领域技术人员将显而易见的是,在不脱离本公开的范围的情况下,可以做出各种等效物、改变和修改,并且应当理解,此类等效实施方式将被包括在本文中。

[0062] 本公开中引用的所有参考文献,包括专利申请、授权专利、发表的文章或其它出版物,都通过引用整体并入,其目的是提供可以与本文所提供的描述结合使用的方法。对于在一个或多个出版物中呈现的与本公开中明确定义的术语类似或相同的任何术语,在所有方面都以本公开中明确提供的术语定义为准。

[0063] 除非另有明确定义,否则在本公开中使用的所有技术和科学术语通常被认为具有与本公开所属领域的普通技术人员普遍理解的相同含义。

[0064] 如本文所使用的,即贯穿整个公开,除非另有说明,否则冠词“一个/一种(a/an)”和“所述(the)”将被解释为意指“一个或多个/一种或多种”或“至少一个/种”。举例来说,“多肽复合物”意指一种多肽复合物肽或多于一种多肽复合物。

[0065] 如本文所使用的,术语“约”、“大约”“左右”等是指某一数量、水平、值、数量、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度相对于参考数量、水平、值、数量、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度变化多达30%、25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%。在特定实施方式中,术语“约”或“大约”在数字值之前时指示所述值加上或减去15%、10%、5%或1%的范围。

[0066] 如本文所使用的,术语“包括/包含(comprise)”、“包括/包含(comprises)”、“包括/包含(comprising)”、“包括(include)”、“包括(includes)”、“包括(including)”、“含有(contain)”、“含有(contains)”、“含有(containing)”、“具有(have)”、“具有(has)”、“具有

(having)”等是同义词,并且以开放式方式使用,并且不排除其它元素、特征、步骤、动作、操作等。

[0067] 如本文所使用的,术语“或”以其包容性含义使用(而不是以其排他性含义使用),因此例如当用于连接元素列表时,术语“或”意指列表中的元素中的一个、一些或所有元素。

[0068] 如本文所使用的,短语“至少一个/种”意指一个或多个/一种或多种,即1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多。指代一系列项目中的“至少一个/种”的短语被解释为是指这些项目的任何组合,包括单个成员。作为实例,“A、B或C中的至少一个”旨在涵盖:A、B、C;A和B;A和C;B和C;以及A、B和C。除非另外特别说明,否则如短语“X、Y和Z中的至少一个”等连接性语言根据如通常用于表达项目、项等可能是X、Y或Z中的至少一个的上下文来理解。因此,此类连接性语言通常并不旨在暗示某些实施方式需要X中的至少一个、Y中的至少一个和Z中至少一个中的每一个均存在。

[0069] 如本文所使用的,提及“一个实施方式”、“一实施方式”、“特定实施方式”、“相关实施方式”、“某个实施方式”、“另外的实施方式”、“一些实施方式”、“某些实施方式”或“另外实施方式”或其组合理解为意指结合此特定实施方式描述的特定特征、结构或特性包括在本公开的至少一个实施方式中。因此,贯穿本公开的各处存在或出现的前述短语不一定全部指代同一实施方式。此外,特定特征、结构或特性可以在一个或多个实施方式中以任何合适的方式组合。

[0070] 本文使用的条件语言,如“可以/能够/可能(can、could、might、may)”、“例如(e.g.)”等,除非另外明确说明或者在所使用的上下文中以其它方式理解,否则通常旨在传达某些实施方式包含某些特征、元素和/或步骤,而其它实施方式不包括某些特征、元素和/或步骤。因此,此类条件性语言通常不旨在暗示特征、元素和/或步骤以任何方式对于一个或多个实施方式是必需的。

[0071] 在本章节中,提供了一些通用术语的定义。其它术语的定义可见于随后的本公开的其它章节中。

[0072] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,以表示通过肽键相互连接的一系列线性氨基酸残基,所述肽键包括蛋白质、多肽、寡肽、肽以及其片段。蛋白质可以由天然存在的氨基酸和/或合成(例如,经修饰的或非天然存在的)氨基酸构成。因此,如本文所使用的,“氨基酸”或“肽残基”意指天然存在的氨基酸和合成氨基酸两者。术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”包括融合蛋白,包括但不限于具有异源氨基酸序列的融合蛋白;带有具有或不具有N末端甲硫氨酸残基的异源和同源前导序列的融合蛋白;免疫标记的蛋白质;具有可检测融合配偶体的融合蛋白,例如,包括荧光蛋白、 β -半乳糖苷酶、荧光素酶等作为融合配偶体的融合蛋白;等等。

[0073] 如本文所使用的,术语“氨基酸”是指蛋白质、肽、多肽或氨基酸聚合物的构建块,并且术语“氨基酸”进一步指天然存在的或合成的氨基酸,以及任何以与天然存在的氨基酸类似的方式发挥作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸以及后来被修饰的那些氨基酸,例如羟基脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸以及O-磷酸丝氨酸。如本申请中所使用的,天然存在的氨基酸包括包含以下的天然存在的羧基 α -氨基酸组:丙氨酸(三个字母代码:Ala,一个字母代码:A)、精氨酸(Arg,R)、天冬酰胺(Asn,N)、天冬氨酸(Asp,D)、半胱氨酸(Cys,C)、谷氨酰胺(Gln,Q)、谷氨酸(Glu,E)、甘氨酸(Gly,G)、组氨

酸(His,H)、异亮氨酸(Ile,I)、亮氨酸(Leu,L)、赖氨酸(Lys,K)、蛋氨酸(Met,M)、苯丙氨酸(Phe,F)、脯氨酸(Pro,P)、丝氨酸(Ser,S)、苏氨酸(Thr,T)、色氨酸(Trp,W)、酪氨酸(Tyr,Y)和缬氨酸(Val,V)。

[0074] 如本文所使用的,术语“结构域”是指由一条或多条包括肽环(例如,包括3个至4个肽环)的多肽链的一个或多个区形成的球状结构,所述肽环例如通过 β -折叠片和/或链内二硫键来稳定。实例可以包括Fab结构域(有关更多详细信息,参见下文)。注意,在本公开中,两个术语“结构域”和“区”可以互换使用。

[0075] 如本文所使用的,术语“核酸”、“核酸分子”、“核苷酸”、“多核苷酸”等被解释为是指任何长度的核苷酸聚合物,可以包括DNA和RNA两者,可以是单链或双链的,并且包括天然存在的多核苷酸的类似物,在所述类似物中一个或多个核苷酸相对于天然存在的核苷酸被修饰。

[0076] 如本文所使用的,术语“抗体”涵盖与特定抗原结合的任何免疫球蛋白、单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、多特异性抗体、双特异性抗体、二价抗体或多价抗体。在下文中,更详细地提供了抗体以及与其相关的术语的描述。

[0077] 在如人等哺乳动物中,根据免疫球蛋白中存在的不同类型的重链,有五种不同的类别/同种型(即,IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,分别对应于五种Ig重链类型 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ)的抗体,所述抗体通常具有不同的分子和生物学特性、功能位置、生理功能和疾病的病理学意义。某些抗体类别可以进一步包括亚类。例如,在人中,IgA可以包括IgA1和IgA2亚类,并且IgG可以包括分别表示为IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的四个亚类。以免疫球蛋白单体作为其基本功能单位,哺乳动物抗体可以以单体(例如IgD、IgE和IgG)、二聚体(IgA)、四聚体(IgM)或五聚体(IgM)存在。在哺乳动物中,存在两种类型的轻链,包括kappa(κ)链和lambda(λ)链。

[0078] 在基本免疫球蛋白单位内,如IgG等天然或天然存在的抗体通常包括两条相同的重(H)链和两条相同的轻(L)链。每条轻链通过一个共价二硫键或分别存在于每条轻链和重链中的一对半胱氨酸残基之间形成的连接与重链连接,并且两条重链通过每条重链中的半胱氨酸残基之间形成的若干个二硫键进一步相互连接。由此形成的四聚体基本上呈Y样抗体形状,其中每个叉臂的末端含有与抗原的对应表位特异性相互作用的相同抗原结合位点(即,互补位)。

[0079] 更具体地,在天然抗体中,在N末端至C末端的方向上,每条重链包括可变区(VH或HCVR),随后是三个或四个恒定区(“CH”,IgA、IgD、IgG含有三个CH区CH1、CH2和CH3;并且IgE和IgM含有四个CH区CH1、CH2、CH3和CH4),并且每条轻链包括可变区(VL或LCVR)和恒定区(CL)。在Y型抗体中,每条轻链的可变区(即,VL区)与其配对重链的可变区(即,VH区)对齐或缔合,以共同形成抗体的抗原结合位点。

[0080] 如本文所使用的术语“可变区”或“VR”意指抗体重链或轻链中负责抗原结合的区域。在天然抗体中,重链可变区(VH或HCVR)含有三个高度可变的环,称为“互补决定区”(CDR),即,包括HCDR1、HCDR2、HCDR3的重(H)链CDR,并且轻链可变区(VL或LCVR)含有三个轻(L)链CDR,包括LCDR1、LCDR2和LCDR3。抗体的CDR边界可以通过Kabat、Chothia或Al-Lazikani编号规则来定义或确定(Al-Lazikani,B.,Chothia,C.,Lesk,A.M.,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》,273(4),927(1997);Chothia,C.等人,《分子生物学杂志》12月5日;186(3):651-63(1985);Chothia,C.和Lesk,A.M.,《分子生物学杂志》,196,901(1987);

Chothia, C. 等人,《自然 (Nature)》.12月21-28日;342(6252):877-83(1989);Kabat E.A. 等人,马里兰州贝塞斯达国立卫生研究院 (National Institutes of Health, Bethesda, Md.) (1991)。三个CDR插置于称为“框架区”(FR)的侧接延伸段之间,所述FR比CDR更高度保守并且形成支架以支持高变环。在天然抗体中,每个VH和VL包括四个FR,并且CDR和FR从氨基末端到羧基末端按顺序布置:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。然而,应当理解,如本文所使用的,术语“可变区”不一定需要包括所有三个CDR或所有四个FR,并且应当解释为涵盖来自天然抗体的天然可变区的任何变体或衍生物,只要此类变体或衍生物保留了抗原结合活性。

[0081] 如本文所使用的术语“恒定区”或“恒定部分”意指抗体重链或轻链中不直接参与抗原结合的区。应当理解,如本文所使用的术语“恒定区”或“恒定部分”不一定需要包括全长的天然抗体的天然恒定区,并且应当解释为涵盖此类天然恒定区或恒定部分的任何变体或衍生物,只要此类变体或衍生物保留了例如支持抗原结合结构域的稳定性能力,或保留了预期的生物学功能,如效应子功能,如分泌、经胎盘迁移性、Fc受体结合、补体结合等。

[0082] 术语“CL区”是指与VL区相邻的免疫球蛋白轻链的恒定区。CL区可以在免疫球蛋白轻链中约EU位置108延伸至约EU位置216。在天然抗体中,每条轻链的恒定区(即,CL区)与配对重链的第一恒定区(即,CH1区)缔合。

[0083] 如本文所使用的术语“CH1区”涵盖免疫球蛋白重链的第一(最靠近氨基末端)恒定区,其从约EU位置118延伸至至少约EU位置220(例如,可以延伸至EU位置221等)。CH1区与VH区相邻,并且位于免疫球蛋白重链分子铰链区的氨基末端。

[0084] 就抗体而言,术语“铰链区”包括重链分子的将CH1区与CH2区连接的部分。铰链区的长度可以根据CH1区和CH2区的限定边界而变化。铰链区通常是柔性的,因此允许两个N末端抗原结合区独立移动。

[0085] 如本文所使用的术语“CH2区”是指重链免疫球蛋白分子的例如从约EU位置231延伸至EU位置340的部分。

[0086] 如本文所使用的术语“CH3区”是指重链免疫球蛋白分子的从CH2结构域的N末端延伸大约110个残基的部分,例如从约EU位置341到EU位置445、446或447。CH3结构域通常形成抗体如IgG、IgA和IgD的C末端部分。然而,在一些免疫球蛋白如IgE和IgM中,另外的结构域可能从CH3结构域延伸以形成分子的C末端部分(例如,IgM的 μ 链和IgE的 ϵ 链中的CH4结构域)。

[0087] 如本文所使用的“Fc”是指源自抗体(例如,IgG)的部分,所述抗体主要由通过一个或多个作为非肽键的共价键(例如,通过二硫键合)与第二重链的第二恒定区(CH2)和第三恒定区(CH3)结合的第一重链的CH2和CH3组成。抗体的Fc部分负责各种效应子功能,如抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)等,但不在抗原结合中起作用。

[0088] 如本文所使用的,“抗原”或“Ag”是指可以被免疫系统的组分(例如,抗体)特异性识别和结合的化合物、组合物、肽、多肽、蛋白质或物质(例如,多肽、碳水化合物、核酸、脂质或其它天然存在或合成化合物)。如本文所使用的,术语“抗原”涵盖抗原表位,例如作为抗原表位的抗原片段。术语“抗原”和“靶标”在本公开中可互换使用。

[0089] 关于抗体的“Fv”是指携带完整抗原结合位点的抗体的最小片段。Fv片段由与单条重链的可变结构域结合的单条轻链的可变结构域组成。已经提供了许多Fv设计,包括dsFv,

其中两个结构域之间的缔合通过引入的二硫键得以增强;并且可以使用肽连接子将两个结构域结合在一起作为单个多肽来形成scFv。含有与对应免疫球蛋白重链或轻链的可变结构域和恒定结构域缔合的重或轻免疫球蛋白链的可变结构域的Fv构建体已经被生产出来。Fv也已经被多聚化以形成双功能抗体和三功能抗体 (Maynard等人,《生物医学工程年评 (Annu Rev Biomed Eng)》2 339-376(2000))。

[0090] 如本文所使用的“Fab”是指源自抗体的单一抗原结合结构域,其中所述结构域具有通过一个或多个作为非肽键的共价键与单一轻链片段缔合的单一重链片段。在一些实施方式中,Fab结构域中的单一重链片段包括HCVR和CH1区。在一些实施方式中,Fab结构域中的单一轻链片段包括LCVR和CL结构域。在一些实施方式中,CH1区通过如二硫键等共价键例与HCVR缔合。在天然抗体中,Fab结构域基本上对应于抗体的一个臂,通常保留识别其对应抗原并与其结合的能力。

[0091] 如本文所使用的,术语“多特异性抗体”是指可以同时与至少两个不同表位结合的人工或工程化抗体。双特异性抗体实质上是多特异性抗体的一种类型。另外,其它多特异性抗体可以包括具有三种不同抗原结合特异性的三特异性抗体、具有四种不同抗原结合特异性的四特异性抗体等。

[0092] 如本文所使用的,术语“双特异性抗体”是指包括两个在其抗原特异性方面彼此不同的物理上可分离的抗原结合结构域的抗体。通常,双特异性抗体是具有源自两个不同的单克隆抗体的片段并且能够与两个不同的表位结合的人工抗体。两个表位可以存在于同一抗原上,或其可以存在于两种不同抗原上。它与天然存在的抗体形成对比,天然存在的抗体具有两个物理上可分离的抗原结合部分,所述抗原结合部分结构上相同,因此具有相同的抗原特异性。

[0093] 在整个公开中,指示抗体恒定区中的氨基酸残基位置的数字,如恒定部分中的重链恒定区1(CH1)和轻链恒定区(CL)中的那些数字基于EU编号,如Edelman,G.M.等人,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.USA)》,63,78-85(1969)中所描述。如上所述,一些位置使用IMGT编号或Kabat索引,如以下中所描述:Kabat等人,《具有免疫学意义的蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》,第5版马里兰州贝塞斯达国立卫生研究院公共卫生服务中心(Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.)(1991);Marie-Paule Lefranc等人,《发育与比较免疫学(Developmental and Comparative Immunology)》,27:55-77(2003);Marie-Paule Lefranc等人,《免疫组研究(Immunome Research)》,1(3), (2005);Marie-Paule Lefranc,《B细胞分子生物学(Molecular Biology of B cells)》(第二版),第26章,481-514, (2015)。这些编号也可从IMGT科学图表中获得,可从国际ImMunoGeneTics信息系统的网站访问。

[0094] 如本文所使用的,术语“嵌合”意指具有源自一种物种的重链和/或轻链的一部分和源自不同物种的重链和/或轻链的其余部分的抗体或抗原结合片段。在说明性实例中,嵌合抗体可以包含源自人的恒定区和源自非人动物,如源自小鼠的可变区。在一些实施方式中,所述非人动物是哺乳动物,例如小鼠、大鼠、兔、山羊、绵羊、豚鼠或仓鼠。

[0095] 如本文所使用的,术语“价”是指给定分子中存在指定数量的抗原结合位点。术语“单价”是指仅具有一个单抗原结合位点的抗体或抗原结合片段;并且术语“多价”是指具有

多个抗原结合位点的抗体或抗原结合片段。如此,术语“二价”、“四价”和“六价”分别表示在抗原结合分子中存在两个结合位点、四个结合位点和六个结合位点。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段是二价的。

[0096] 根据本公开的抗体和其片段涵盖双特异性和多特异性抗体及其片段。双特异性或多特异性抗体可能类似于单一抗体(或抗体片段),但具有两个或更多个不同的抗原结合位点。双特异性抗体可以对至少两种不同的表位具有结合特异性。双特异性抗体和片段也可以呈异源抗体的形式。异源抗体是连接在一起的两种或更多种抗体或抗体结合片段(例如,Fab),每种抗体或片段具有不同的特异性。

[0097] 在抗体的特性的上下文中,术语“抗体的特异性结合”或“抗原特异性抗体”是指抗体优先与存在于不同抗原混合物中的特定抗原结合的能力。在某些实施方式中,特异性结合相互作用将在样品中区分期望的抗原和不期望的抗原(或“靶”和“非靶”抗原),在一些实施方式中,超过约10-100倍或更多倍(例如,超过约1000倍或10,000倍)。在某些实施方式中,当抗体和抗原在抗体抗原复合物中特异性结合时,它们之间的亲和力的特征在于 K_D (解离常数)小于 $10^{-6}M$ 、小于 $10^{-7}M$ 、小于 $10^{-8}M$ 、小于 $10^{-9}M$ 、小于 $10^{-9}M$ 、小于 $10^{-11}M$ 或小于约 $10^{-12}M$ 或更小。

[0098] 如本文所使用的,术语“载体”是指可以将遗传元件可操作地插入其中以使所述遗传元件产生表达,以便产生由遗传元件编码的蛋白质、RNA或DNA或复制遗传元件的媒剂。载体可以用于转化、转导或转染宿主细胞,以使其携带的遗传元件在宿主细胞内产生表达。载体的实例包括质粒;噬菌粒;粘粒;人工染色体,如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1衍生的人工染色体(PAC);噬菌体,如 λ 噬菌体或M13噬菌体;和动物病毒。载体可以含有多种用于控制表达的元件,包括启动子序列、转录起始序列、增强子序列、可选择元件和报告基因。另外,载体还可以含有复制起点。载体还可以包括协助其进入细胞的材料,包括但不限于病毒颗粒、脂质体或蛋白质包衣。载体可以是表达载体或克隆载体。本公开提供了载体(例如,表达载体),所述载体包含本文所提供的编码抗体或其抗原结合片段的核酸序列、至少一个与所述核酸序列可操作地连接的启动子(例如,SV40、CMV、EF-1 α)以及至少一个选择标志物。

[0099] 如本文所使用的,短语“宿主细胞”是指其中可以或已经引入有外源多核苷酸和/或载体的细胞。

[0100] 还提供了抗体缀合物。术语“缀合”和“连接”通常是指将一个分子与第二个分子紧密缔合的共价或非共价化学键。缀合物包括本公开的任何抗体以及药剂。所述药剂可以选择治疗剂、成像剂、标记剂或用于治疗 and/或标记目的的药剂。

[0101] 如本文所使用的,术语“生物样品”或“样品”是指从所关注的受试者获得或源自所关注的受试者的生物组合物,所述生物组合物含有例如基于物理、生化、化学和/或生理特性待表征和/或鉴定的细胞和/或其它分子实体。生物样品包括但不限于通过本领域技术人员已知的任何方法获得的受试者的细胞、组织、器官和/或生物体液。在一些实施方式中,生物样品是体液样品。在一些实施方式中,体液样品是全血、血浆、血清、粘液(包括鼻腔引流物和痰)、腹膜液、胸膜液、胸水、唾液、尿液、滑液、脑脊液(CSF)、胸腔穿刺液、腹腔液、腹水或心包液。在一些实施方式中,生物样品是从受试者的心脏、肝、脾、肺、肾、皮肤或血管获得的组织或细胞。

[0102] II. 新型多特异性 (或双特异性) 多肽复合物

[0103] 一方面, 本公开提供了一种新型多特异性 (或双特异性) 多肽复合物, 其便于制备和纯化, 因此可以以高纯度和高产率提供。

[0104] 多特异性 (或双特异性) 抗体是抗体工程领域的重要研究方向, 并且在如抗肿瘤免疫治疗等方面具有广阔的应用前景。已经开发了不同形式的双特异性抗体, 包括IgG样双特异性抗体。IgG样双特异性抗体是二价的, 包含两对源自两种不同抗体的重链 (HC) 和轻链 (LC)。

[0105] IgG样双特异性抗体提供两个单价Fab, 各自与不同抗原结合。然而, 当与对单一抗原提供二价结合的常规IgG抗体相比时, 这会降低对每种抗原的亲和力, 并且甚至丧失某些功能。

[0106] 另一个挑战涉及区分IgG样双特异性抗体对两种靶抗原的结合亲和力。根据两种靶抗原的预期作用机制 (即, MOA), 对两种靶抗原的结合亲和力可能有不同的要求。例如, 对于CD3/CD20双特异性抗体, 期望对CD20达到纳摩尔水平的亲和力, 但对CD3达到亚微摩尔水平 (例如, 30-100nm)。为了增加对所关注靶标的亲和力, 可以将靶向此类靶标的另外Fab结构域与IgG样双特异性抗体的重链中的一条重链融合 (参见图5A)。此类双特异性但三价的抗体的结构在本文中被称为2:1结构, 即与一种所关注抗原的结合是二价的, 而与另一种抗原的结合保持单价。此类二价结合恢复了对所述抗原靶标的结合亲和力, 并且同时可以赋予两种抗原靶标之间的亲和力差异。

[0107] 尽管2:1结构双特异性抗体提供了益处, 但在其表达和产生中存在一些不可克服的挑战。例如, LC-HC结合不稳定性和LC错配可能发生在此类2:1结构双特异性抗体的组装期间。可能存在不同的LC错配产物 (即, 杂质), 所述错配产物在分子量以及物理和化学特性方面与目标产物 (即, 正确配对的) 相似或无法区分, 使得难以从这些杂质中分离或纯化目标产物。这可能导致所表达的目标产物的纯度低和产量降低。

[0108] 本公开提供了新型2:1结构双特异性抗体平台, 其不仅可以满足两个抗原靶标之间亲和力差异的要求, 而且比常规2:1结构双特异性抗体更易于纯化。这种新型2:1结构是有利的, 因为潜在的错配产物 (如果有的话) 与正确配对的产物在例如分子量以及物理和化学特性方面有足够的不同, 这使得去除错配产物更容易。因此, 根据这种新型2:1结构平台构建的双特异性抗体可以用相对简单的纯化过程获得更高的纯度和产率。

[0109] III. 多特异性抗体的新型2:1结构

[0110] 本文提供的新型2:1结构是基于IgG样双特异性抗体与额外的Fab结构域相融合, 所述额外的Fab结构域和两个靶标中的一个结合。具体地, 与常规2:1结构双特异性抗体 (即所述额外的Fab结构域融合到Ig样双特异性抗体的重链上, 参见图5A中的第二多肽链) 不同, 本文所提供的新型2:1结构将所述额外的Fab区域融合到了IgG样双特异性抗体的轻链上 (参见图2中的第一多肽链)。

[0111] 具体地, 如图2所示, 新型2:1结构双特异性抗体包含由五条多肽链构成的多肽复合物, 所述多肽复合物包含: 1) 包含融合多肽的第一多肽链, 所述融合多肽包含第一靶向结合片段A1和第二靶结合片段B2; 2) 包含第一配对片段B1的第二多肽; 3) 包含第二靶结合片段B2的第三多肽; 4) 包含第二配对片段A2的第四多肽; 以及5) 与第四多肽相同的第五多肽, 即也包含第二靶结合片段A2。融合多肽中的A1与第二多肽中的B1配对以形成第一靶结合结

构域,融合多肽中的B2与第四多肽中的A2配对以形成第二靶结合结构域,并且第五多肽中的A2与第三多肽中的B2配对以形成另一个第二靶结合结构域。

[0112] 本文所提供的多肽复合物的独特性至少部分在于其中包含的融合多肽(即,第一多肽链)是新型的,并且不包含在任何常规的2:1结构双特异性抗体中。这种融合多肽使得任何错配产物可能具有与靶双特异性产物显著不同的分子量以及物理和化学特性。

[0113] 在一些实施方式中,所述融合多肽从C末端至N末端包含:第一靶结合片段A1;多肽连接子;第二靶结合片段B2;其中,所述多肽连接子的长度足够短以最小化A1与B2之间潜在的分子内相互作用,所述A1能够与第一配对片段B1配对以形成第一靶结合结构域;所述B2能够与第二配对片段A2配对以形成第二靶结合结构域;并且相对于与所述B1的结合,所述A1被配置成表现出与所述B2更少的结合,并且相对于与所述A2的结合,所述B2被配置成表现出与所述A1更少的结合。

[0114] 在如图2所示的新型2:1结构中,两条轻链是相同的,并且因此有助于减少不必要的错配。在本文所提供的说明性新型2:1结构中(参见图4A),预期总共有3种不同的错配产物(参见图4C-4E),估计所述错配产物的分子量分别为约150KDa、250KDa和200KDa(参见图4B),并且因此大多数潜在的错配产物的分子量与正确配对的产物不同。此外,这些潜在的错配产物也显示出与正确配对的双特异性产物相比具有不同的物理和化学特性,并且因此可以通过常规纯化方法容易地去除。

[0115] 相比之下,如图5A所示,常规的2:1结构双特异性抗体具有可能与不同重链错配的两种不同轻链,可能产生总共5种不同的错配产物(参见图5C-5E),估计所述错配产物都具有与正确配对的产物相同的分子量(即,200KDa)(参见图5B)。这些相似的错配产物很难从目标产物中分离出来,因此不仅影响了目标产物的纯度,也影响了其产率。

[0116] 本文所提供的新型2:1多肽复合物与第一靶标和第二靶标结合。所述多肽复合物具有两个均与第二靶标结合的抗原结合结构域和与第一靶标结合的第三抗原结合结构域。换言之,所述多肽复合物对于第二靶标是二价的,并且对于第一靶标是一价的,并且因此被称为“2:1”。针对第二靶标的两个抗原结合结构域位于本文所提供的多肽复合物的不同臂上。

[0117] 在一些实施方式中,本文所提供的多肽复合物中的靶结合结构域通过两个多肽片段的配对形成。在某些实施方式中,第一靶结合结构域通过第一靶结合片段A1和第一配对片段B1的配对(即,A1/B1对)形成。在某些实施方式中,第二靶结合结构域通过第二靶结合片段A2和第二配对片段B2的配对(即,A2/B2对)形成。

[0118] 在一些实施方式中,第一靶结合片段A1和第一配对片段B1(即,A1/B1)可以通过例如二硫键、氢键、静电相互作用、盐桥或疏水-亲水相互作用、连接物或其组合配对,其中所述配对是在A1与B1之间形成的,或者更具体地是在来自于A1和B1的至少两个氨基酸残基之间形成的。

[0119] 类似地,在一些实施方式中,第二靶结合片段B2和第二配对片段A2(即,A2/B2)可以通过例如二硫键、氢键、静电相互作用、盐桥或疏水-亲水相互作用、连接物或其组合配对,其中所述配对是在A2与B2之间形成的,或者更具体地是在来自于A2和B2的至少两个氨基酸残基之间形成的。

[0120] “二硫键”是指具有结构R-S-S-R'的共价键。氨基酸半胱氨酸包括可以与例如来自

另一个半胱氨酸残基的第二硫醇基团形成二硫键的硫醇基团。二硫键可以在分别位于两条多肽链上的两个半胱氨酸残基的巯基之间形成,从而形成链间二硫键。二硫键可以在已知支架多肽片段,如抗体CH1结构域和CL结构域,或TCR恒定区(例如,TCR α /TCR β 、TCR γ /TCR δ),仅举几例)之间形成。

[0121] 静电相互作用是非共价相互作用,并且在蛋白质折叠、稳定性、柔性和功能方面很重要,包括离子相互作用、氢键合和卤素键合。静电相互作用可以在多肽中形成,例如,在Lys与Asp之间、在Lys与Glu之间、在Glu与Arg之间,或者在第一多肽链上的Glu、Trp与第二多肽链上的Arg、Val或Thr之间。

[0122] “盐桥”是一种近距离静电相互作用,主要由Asp或Glu的阴离子羧酸盐与Lys或Arg的胍基的阳离子铵产生,它们是天然蛋白质结构中空间上邻近的带相反电荷的残基对。大部分疏水性界面中的带电和极性残基可能充当结合的热点。其中,具有可电离侧链的残基如His、Tyr和Ser也可以参与形成盐桥。

[0123] 一条多肽链上的一个或多个Val、Tyr和Ala与第二条链上的一个或多个Val、Leu和Trp,或者第一条链上的His和Ala与另一条多肽链上的Thr和Phe之间可以形成疏水相互作用。

[0124] 当氢原子与高电负性原子如氮、氧或氟共价结合时,两个极性基团之间通过静电引力形成氢键。可以形成氢键,例如,Asn中的氨基团和His中的氧基团,或者Asn中的氧基团和Lys中的氨基团。

[0125] 在一些实施方式中,如图4A的新型2:1结构图中所示,天然或引入的非天然二硫键有利于A1和B1的同源配对,而错配的产物(如错配的A1和B2,或错配的A2和B1)将缺少此类二硫键。不希望受任何理论的束缚,预期此类二硫键将特别有利于允许容易地鉴定和/或表征错配产物的存在,例如,通过使用常规方法如十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。这至少部分地是因为二硫键结合的同源配对产物可以经受SDS-PAGE处理,而缺乏此类二硫键合的错配产物将遭受错配多肽链的解离,导致用SDS-PAGE观察到的同源配对产物和错配产物的有分子量差异,如图4B-4E所展示。此外,图4A的新型2:1结构允许使用相对常规的纯化方法,如亲和纯化和/或离子交换纯化,容易地将错配产物与同源配对产物分离,由此获得高纯度的同源配对产物,否则这是不可能的或者需要冗长的纯化过程。

[0126] 在某些实施方式中,A1/B1对和/或A2/B2对包含抗体Fv结构域。

[0127] 在一些实施方式中,在本文所提供的融合多肽或多肽复合物中,所述A1包含选自VH1或VL1的第一抗体可变区VA1,所述B1包含能够与VA1配对以形成第一靶结合结构域的第一对抗体可变区VB1,其中所述VB1选自VH1或VL1。换言之,第一靶结合结构域包含第一Fv结构域,其包含缔合在一起的VH1和VL1,能够与第一靶标结合。

[0128] 在一些实施方式中,在本文所提供的融合多肽或多肽复合物中,所述B2包含选自VH2或VL2的第二抗体可变区VB2,并且所述A2包含能够与VB2配对以形成第二靶结合结构域的第二对抗体可变区VA2,其中所述VA2选自VH2或VL2。换言之,第二靶结合结构域包含第二Fv结构域,其包含缔合在一起的VH2和VL2,能够与第二靶标结合。

[0129] 在一些实施方式中,所述VB1包含VH1,所述VA1包含VL1,所述VB2包含VH2,并且所述VA2包含VL2。在一些实施方式中,所述VB1包含VL1,所述VA1包含VH1,所述VB2包含VL2,并且所述VA2包含VH2。

[0130] 在一些实施方式中,所述第一Fv结构域或所述第二Fv结构域是交叉的。在一些实施方式中,所述VB1包含VH1,所述VA1包含VL1,所述VB2包含VL2,并且所述VA2包含VH2。在一些实施方式中,所述VB1包含VL1,所述VA1包含VH1,所述VB2包含VH2,并且所述VA2包含VL2。

[0131] Fv结构域可以通过本领域已知的任何合适的方式(例如但不限于,通过Fv结构域中引入的非天然二硫键或者通过Fv结构域中引入的非天然静电相互作用)缔合。在一些其它实施方式中,Fv结构域可以通过与Fv结构域融合的支架结构域而缔合。例如,支架区可以与Fv结构域的一条链融合,并且配对支架区可以与Fv结构域的另一条链融合。支架区与配对支架区的结合可以允许VH区和VL区的缔合,由此形成能够与靶抗原结合的Fv结构域。

[0132] 在一些实施方式中,在本文所公开的多肽复合物中,所述A1进一步包含与所述VA1可操作地连接的第一支架区SR_a,并且所述B2进一步包含与所述VB2可操作地连接的第二支架区SR_b,其中所述SR_a和所述SR_b被配置成使得阻碍所述SR_a与所述SR_b之间的配对。在一些实施方式中,在本文所公开的多肽复合物中,所述B1进一步包含第一配对支架区PSR_a,所述第一配对支架区PSR_a与所述VB1可操作地连接并且能够与所述SR_a结合,并且其中所述A2进一步包含第二配对支架区PSR_b,所述第二配对支架区PSR_b与所述VA2可操作地连接并且能够与所述SR_b结合。SR_a和PSR_a的结合形成了第一支架结构域,并且SR_b和PSR_b的结合形成了第二支架结构域。图3中示出了说明性图。

[0133] 任何合适的结合配偶体都可以用作支架区。在某些实施方式中,支架区可以选自抗体CH1结构域和CL结构域、配对TCR恒定区(如TCR α /TCR β 、TCR γ /TCR δ)、或PRD(富含脯氨酸结构域)和SH3结构域或遮蔽蛋白和肌联蛋白。

[0134] TCR属于免疫球蛋白超家族,并且类似于具有单重链和单轻链的半抗体。天然TCR由两条多肽链组成,并且通常有两种类型:一种由 α 链和 β 链组成(即, α/β TCR),并且另一种由 γ 链和 δ 链组成(即, γ/δ TCR)。两条TCR链通过在TCR链的胞外部分中的恒定区之间形成的二硫键连接。换言之,在TCR恒定区 α 与TCR恒定区 β 之间或者在TCR恒定区 γ 与TCR恒定区 δ 之间形成二硫键。

[0135] SH3结构域, SRC同源3结构域的缩写,是一个约60个氨基酸残基的小蛋白结构域,其最初被描述为病毒衔接蛋白v-Crk中的保守序列。经典的SH3结构域通常发现于与其它蛋白质相互作用并介导特定蛋白质复合物组装(通常通过与它们相应的结合配偶体中的富含脯氨酸的结构域(即,PRD)结合)的蛋白质中(Liubov V Gushchina等人,《生物分子结构与动力学杂志(J Biomol Struct Dyn.)》2011年12月;29(3):485-95.)。

[0136] 肌联蛋白(也被称为连接蛋白)是一种由TTN基因编码的蛋白质。肌联蛋白是一种长度超过1 μ m的充当负责肌肉的被动弹性的分子弹簧的巨大蛋白质。遮蔽蛋白(约800kDa),肌联蛋白家族的最新成员,最初被鉴定为肌联蛋白Zdisk部分的配体,尽管它主要定位于成熟肌肉的肌节M带。在肌肉发育期间,巨大的肌肉蛋白肌联蛋白和遮蔽蛋白在Zdisk处彼此结合。这种相互作用有助于稳定和组织肌节;这种结合的消除导致肌营养不良(Allyn G Letourneau等人,《蛋白质与肽快报(Protein Pept Lett.)》2018;25(11):973-979.)。具体地,肌联蛋白的肌联蛋白Ig样152结构域与遮蔽蛋白的遮蔽蛋白Ig样1结构域相互作用,并且它们可以形成复合物。在一些先前报告的研究中,肌联蛋白T链和遮蔽蛋白O链可以用于取代抗体的CH1区和CL区,其中肌联蛋白T链是含有长度为78-118个氨基酸的肌联蛋白Ig样152结构域或其功能变体的肽,而遮蔽蛋白O链是含有长度为87-117个氨基酸的遮蔽蛋白Ig

样1结构域或其功能变体的肽(参见例如,W02021/139757A,其整体并入本文)。

[0137] 适用于本发明的支架区对(即, SR_a/PSR_a 对或 SR_b/PSR_b 对)包括:a)重链恒定区1(CH1)和轻链恒定区(CL)对;b)T细胞受体(TCR)恒定区 α (C α)和TCR恒定区 β (C β)对;c)TCR恒定区 γ (C γ)和TCR恒定区 δ (C δ)对;d)受体的配体结合结构域和配体对;以及e)PRD(富含脯氨酸的结构域)和SH3结构域对;f)遮蔽蛋白和肌联蛋白对,等等。应当理解,如本文整个公开中所使用的,表达“一对X和Y”或“X/Y对”并不旨在限制顺序次序。例如,通过陈述“ SR_a/PSR_a 对可以是CH1和CL对”,其旨在意指 SR_a 可以是CH1或CL,并且因此,当 SR_a 是CH1时,则 PSR_a 可以是CL,或者当 SR_a 是CL时,则 PSR_a 可以是CH1。

[0138] 在一些实施方式中, SR_a 和 PSR_a 通过第一二硫键配对。在此类实施方式中, SR_a 和 PSR_b 或 SR_b 和 PSR_a 的错配将缺少第一二硫键。在一些实施方式中, SR_b 和 PSR_b 通过第二二硫键配对。在此类实施方式中, SR_a 和 PSR_b 或 SR_b 和 PSR_a 的错配将缺少第二二硫键。能够通过二硫键配对的任何合适的支架区对都可以用作 SR_a 和 PSR_a 对或 SR_b/PSR_b 对。例如,抗体CH1结构域和CL结构域可以通过二硫键配对;TCR恒定区(如C α 和C β ,或C γ 和C δ)可以通过二硫键配对;并且遮蔽蛋白和肌联蛋白可以通过二硫键配对。

[0139] 在一些实施方式中, SR_a/PSR_a 对包含CH1结构域CH1a和CL结构域CLa对,并且 SR_b/PSR_b 对包含CH1结构域CH1b和CL结构域CLb对。图4A中示出了说明性图。在某些实施方式中,第一靶结合结构域(由A1/B1对形成)和第二靶结合结构域(由A2/B2对形成)包含抗体Fab结构域。

[0140] 在某些实施方式中,A1与B1之间的配对可以在VA1和VB1、VH1和VL1、 SR_a 和 PSR_a 或CH1a和CLa中的两个氨基酸残基之间形成。A2与B2之间的配对可以在VA2和VB2、VH2和VL2、 SR_b 和 PSR_b 或CH1b和CLb中的两个氨基酸残基之间形成。

[0141] IV. 用于避免错误配对的构型

[0142] 虽然旨在靶结合多肽片段与其配对多肽片段结合以形成靶结合结构域(即,同源配对),但在不旨在配对的多肽片段之间仍可能发生错配。例如,第一靶结合片段A1可能与第二靶结合片段B2错配,或者第一靶结合片段A2可能与第二靶结合片段B1错配,由此不能形成预期的靶结合结构域。

[0143] 例如,旨在VH1与VL1配对以形成第一靶结合结构域,并且VH2与VL2配对以形成第二靶结合结构域,并且旨在促进此类同源配对。然而,VH1可能与VL2错配,并且VH2可能与VL1错配,并且优选地阻碍或减少此类错配。

[0144] 为了促进同源配对并有希望减少错配,多肽片段可以被设计或工程化为含有有助于实现所述目的的某些构型。在一些实施方式中,在本文所公开的融合多肽或多肽复合物中,A1和B1对(被称为A1/B1)和A2和B2对(被称为A2/B2)中的至少一个含有至少一种构型,所述构型能够:a)促进A1与A2和/或B1与B2之间的同源配对,和/或b)阻碍B1与A2之间和/或B2与A1之间的错配。

[0145] 本领域已知的任何合适的方法都可以用于本文所公开的多肽复合物,以促进同源配对和/或减少错配。若干策略已经应用于设计正交界面,以促进同源配对。例如,罗氏公司交换了CH1和CL结构域并创建了CrossMab平台(Schaefer等人《美国国家科学院院刊(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)》,108(27),第11187-11192页(2011))、医学免疫公司(MedImmune)引入了非天然

二硫键(Mazor等人《mAbs》,7(2),第377-389页(2015)),安进公司进一步在CH1-CL区引入了静电相互作用(Liu等人《生物化学杂志(Journal of Biological Chemistry)》,290(12),第7535-7562页(2015)),礼来公司(Eli Lilly)(Lewis等人《自然生物技术(Nature Biotechnology)》,32(2),第191-198页(2014))、基因泰克公司(Dillon等人《mAbs》,9(2),第213-230页(2017))在可变结构域和恒定结构域两者中均引入了突变,并且药明生物(Wuxi Biologics)用T细胞受体(TCR)恒定区替代了一对CH1-CL区(Guo等人,《蛋白质表达和纯化(Protein Expr Purif.)》,173:105647(2020))。这些策略已被证明可用于促进同源配对,并且可以用于本公开。

[0146] 在某些实施方式中,在本文所公开的融合多肽或多肽复合物中,所述SR_a/PSR_a对和所述SR_b/PSR_b对两者是相同的或者是同一类型的,并且所述SR_a/PSR_a对和/或所述SR_b/PSR_b对被配置成阻碍SR_a/PSR_b之间或SR_b/PSR_a之间的错配。

[0147] 可以使用任何合适的方式来阻碍或减少错配。例如,A1/B1对和A2/B2对可以被设计为并入交叉的VA1/VB1构型(例如,CrossMap),或者并入不同的配对支架区,或者并入交叉的配对支架区,或者在其它方面相同的配对支架区中引入至少一个突变。更多细节将在下文讨论。

[0148] A).交叉VA1/VB1构型

[0149] 在某些实施方式中,B1/A1对和B2/A2对包含抗体Fv结构域,并且Fv结构域被交叉以阻碍或减少B2与A1之间或B1与A2之间的错配。Fv结构域包含重链可变结构域VH和轻链可变结构域VL。两个Fv结构域可以呈交叉构型,使得当B2与A1之间发生错配和/或B1与A2之间发生错配时,将导致两个VH结构域的配对或两个VL结构域的配对,这被认为不如VH与VL之间的配对稳定,并且因此不太可能形成。

[0150] 在一些实施方式中,所述VB1包含VH1,所述VA1包含VL1,所述VB2包含VL2,并且所述VA2包含VH2。在一些实施方式中,所述VB1包含VL1,所述VA1包含VH1,所述VB2包含VH2,并且所述VA2包含VL2。在这些交叉VA/VB1构型中,当B2与A1错配时或者当B1与A2错配时,将导致VH1与VH2配对或者VL1与VL2配对,这被认为不太可能形成稳定的产物。

[0151] 在这些实施方式的某些实施方式中,VB1与第一配对支架区PSR_a可操作地连接,并且VA1与SR_a可操作地连接,其中SR_a与PSR_a结合以形成第一配对支架结构域。在这些实施方式的某些实施方式中,VB2与第二配对支架区SR_b可操作地连接,并且VA2与PSR_b可操作地连接,其中SR_b与PSR_b结合以形成第二配对支架结构域。

[0152] 在一些实施方式中,PSR_a是CH1结构域CH1a,SR_a是CL结构域CLa,SR_b是CH1结构域CH1b,PSR_b是CL结构域CLb,并且其中:a)VB1包含VH1,VA1包含VL1,VB2包含VL2,并且VA2包含VH2;或者b)VB1包含VL1,VA1包含VH1,VB2包含VH2,并且VA2包含VL2。

[0153] B).不同的配对支架区

[0154] 在某些实施方式中,B1/A1对包含第一抗体Fv结构域和第一对支架区(即,SR_a/PSR_a),并且B2/A2对包含第二抗体Fv结构域和第二对支架区(即,SR_b/PSR_b),其中第一对支架区和第二支架区是不同的,或者是不同类型的支架区。因此,A2与B1之间的错配或A1与B2之间的错配将产生不相容的支架区,所述支架区不能自然地彼此结合。

[0155] 在一些实施方式中,所述SR_a和PSR_a对不同于所述SR_b和PSR_b对。在某些实施方式中,SR_a/PSR_a对或SR_b/PSR_b对选自由以下组成的组:a)重链恒定区1(CH1)和轻链恒定区(CL)

对;b) T细胞受体 (TCR) 恒定区 α ($C\alpha$) 和TCR恒定区 β ($C\beta$) 对;c) TCR恒定区 γ ($C\gamma$) 和TCR恒定区 δ ($C\delta$) 对;d) 受体的配体结合结构域和配体对;以及e) PRD(富含脯氨酸的结构域) 和SH3结构域对;以及f) 遮蔽蛋白和肌联蛋白对。在一些实施方式中, TCR恒定区 α (即, $C\alpha$) 包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列;并且TCR恒定区 β (即, $C\beta$) 包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列。

[0156] 在一些实施方式中, 所述 SR_a 和 PSR_a 对是CH1和CL对, 并且所述 SR_b 和 PSR_b 对是以下各项:i) $C\alpha$ 和 $C\beta$ 对, ii) $C\gamma$ 和 $C\delta$ 对, iii) 受体的配体结合结构域和配体对;iv) PRD(富含脯氨酸的结构域) 和SH3结构域对, 或者v) 遮蔽蛋白和肌联蛋白对。在一些实施方式中, 所述 SR_b 和 PSR_b 对是CH1和CL对, 并且所述 SR_a 和 PSR_a 对是以下各项:i) $C\alpha$ 和 $C\beta$ 对, ii) $C\gamma$ 和 $C\delta$ 对, iii) 受体的配体结合结构域和配体对, iv) PRD(富含脯氨酸的结构域) 和SH3结构域对, 或者v) 遮蔽蛋白和肌联蛋白对。

[0157] 在一些实施方式中, 所述 SR_a 和 PSR_a 对是 $C\alpha$ 和 $C\beta$ 对, 并且所述 SR_b 和 PSR_b 对是以下各项:i) CH1和CL对, ii) $C\gamma$ 和 $C\delta$ 对, iii) 受体的配体结合结构域和配体对;iv) PRD(富含脯氨酸的结构域) 和SH3结构域对, 或者v) 遮蔽蛋白和肌联蛋白对。在一些实施方式中, 所述 SR_b 和 PSR_b 对是 $C\alpha$ 和 $C\beta$ 对, 并且所述 SR_a 和 PSR_a 对是以下各项:i) CH1和CL对, ii) $C\gamma$ 和 $C\delta$ 对, iii) 受体的配体结合结构域和配体对, iv) PRD(富含脯氨酸的结构域) 和SH3结构域对, 或者v) 遮蔽蛋白和肌联蛋白对。

[0158] 在一些实施方式中, 所述 SR_a 和 PSR_a 对是 $C\gamma$ 和 $C\delta$ 对, 并且所述 SR_b 和 PSR_b 对是以下各项:i) CH1和CL对, ii) $C\alpha$ 和 $C\beta$ 对, iii) 受体的配体结合结构域和配体对;iv) PRD(富含脯氨酸的结构域) 和SH3结构域对, 或者v) 遮蔽蛋白和肌联蛋白对。在一些实施方式中, 所述 SR_b 和 PSR_b 对是 $C\gamma$ 和 $C\delta$ 对, 并且所述 SR_a 和 PSR_a 对是以下各项:i) CH1和CL对, ii) $C\alpha$ 和 $C\beta$ 对, iii) 受体的配体结合结构域和配体对, iv) PRD(富含脯氨酸的结构域) 和SH3结构域对, 或者v) 遮蔽蛋白和肌联蛋白对。

[0159] 在一些实施方式中, 所述 SR_a 和 PSR_a 对是受体的配体结合结构域和配体对, 并且所述 SR_b 和 PSR_b 对是以下各项:i) CH1和CL对, ii) $C\alpha$ 和 $C\beta$ 对, iii) $C\gamma$ 和 $C\delta$ 对;iv) PRD(富含脯氨酸的结构域) 和SH3结构域对, 或者v) 遮蔽蛋白和肌联蛋白对。在一些实施方式中, 所述 SR_b 和 PSR_b 对是受体的配体结合结构域和配体对, 并且所述 SR_a 和 PSR_a 对是以下各项:i) CH1和CL对, ii) $C\alpha$ 和 $C\beta$ 对, iii) $C\gamma$ 和 $C\delta$ 对, iv) PRD(富含脯氨酸的结构域) 和SH3结构域对, 或者v) 遮蔽蛋白和肌联蛋白对。

[0160] 在一些实施方式中, 所述 SR_a 和 PSR_a 对是PRD(富含脯氨酸的结构域) 和SH3结构域对, 并且所述 SR_b 和 PSR_b 对是以下各项:i) CH1和CL对, ii) $C\alpha$ 和 $C\beta$ 对, iii) $C\gamma$ 和 $C\delta$ 对;iv) 受体的配体结合结构域和配体对, 或者v) 遮蔽蛋白和肌联蛋白对。在一些实施方式中, 所述 SR_b 和 PSR_b 对是PRD(富含脯氨酸的结构域) 和SH3结构域对, 并且所述 SR_a 和 PSR_a 对是以下各项:i) CH1和CL对, ii) $C\alpha$ 和 $C\beta$ 对, iii) $C\gamma$ 和 $C\delta$ 对;iv) 受体的配体结合结构域和配体对, 或者v) 遮蔽蛋白和肌联蛋白对。

[0161] 在一些实施方式中, 所述 SR_a 和 PSR_a 对是遮蔽蛋白和肌联蛋白对, 并且所述 SR_b 和 PSR_b 对是以下各项:i) CH1和CL对, ii) $C\alpha$ 和 $C\beta$ 对, iii) $C\gamma$ 和 $C\delta$ 对;iv) 受体的配体结合结构域和配体对, 或者v) PRD(富含脯氨酸的结构域) 和SH3结构域对。在一些实施方式中, 所述 SR_b 和 PSR_b 对是遮蔽蛋白和肌联蛋白对, 并且所述 SR_a 和 PSR_a 对是以下各项:i) CH1和CL对, ii) $C\alpha$ 和 $C\beta$ 对, iii) $C\gamma$ 和 $C\delta$ 对, iv) 受体的配体结合结构域和配体对, 或者v) PRD(富含脯氨酸的结构域) 和SH3结构域对。

酸的结构域)和SH3结构域对。

[0162] 在一些实施方式中,通过引入非天然二硫键来促进支架区的同源配对。在此类实施方式中,支架区是CH1和CL、C α 和C β 或C γ 和C δ 。

[0163] C).交叉支架区

[0164] 在某些实施方式中,第一对支架区和第二对支架区属于相同类型的支架结构域,但是被配置成阻碍第一对支架区与第二对支架区之间的错配。

[0165] 在一些实施方式中,在本文所提供的融合多肽或多肽复合物中,所述SR_a/PSR_a对和所述SR_b/PSR_b对两者是同一类型的,例如均是CH1/CL结构域、或C α /C β 结构域或C γ /C δ 结构域等,但所述SR_a/PSR_a对和/或所述SR_b/PSR_b对被配置成阻碍SR_a/PSR_b之间或SR_b/PSR_a之间的错配。可以使用任何合适的方式来阻碍两个支架区对之间的错配,例如,SR_a/PSR_a对和SR_b/PSR_b对可以被配置成被交叉。

[0166] 在某些实施方式中,例如,SR_a/PSR_a对和SR_b/PSR_b对两者均是由CH1/CL配对形成的抗体恒定结构域。在某些实施方式中,A1/B1对和A2/B2对包含抗体Fab结构域,并且Fab结构域中的其中一个VH/VL对被交叉以阻碍或减少B2与A1之间或B1与A2之间的错配。

[0167] 在一些实施方式中,SR_a/PSR_a对包含CH1结构域CH1a和CL结构域CLa,并且SR_b/PSR_b对包含CH1结构域CH1b和CL结构域CLb。在一些实施方式中,CH1a/CLa对和CH1b/CLb对被配置成被交叉,使得当B2与A1之间发生错配和/或B1与A2之间发生错配时,将导致两个非配对支架区的配对,如CH1a和CH1b,或CLa和CLb,它们比CH1与CL之间的错配更不稳定,并且因此更不太可能形成。

[0168] 在一些实施方式中,VB1包含VH1,VA1包含VL1,VB2包含VH2,并且VA2包含VL2,并且其中:a) PSR_a是CL结构域CLa,SR_a是CH1结构域CH1a,SR_b是CH1结构域CH1b,PSR_b是CL结构域CLb;或者b) PSR_a是CH1结构域CH1a,SR_a是CL结构域CLa,SR_b是CL结构域CLb,PSR_b是CH1结构域CH1b。

[0169] D).在其它方面相同的配对支架区中引入的突变

[0170] 在一些实施方式中,第一对支架区和第二对支架区两者均是相同类型的支架结构域,具有一个或多个引入的突变以减少或阻碍错配。

[0171] 在一些实施方式中,所述VB1包含VH1,所述VA1包含VL1,所述VB2包含VH2,并且所述VA2包含VL2,所述PSR_a是CH1结构域CH1a,所述SR_a是CL结构域CLa,所述SR_b是CH1结构域CH1b,所述PSR_b是CL结构域CLb,并且其中:a) 所述融合多肽包含式(I)的氨基酸序列:VH2-CH1b-连接子-VL1-CLa,b) 所述第二多肽包含式(II)的氨基酸序列:VH1-CH1a,c) 所述第三多肽包含式(III)的氨基酸序列:VH2-CH1b,d) 所述第四多肽和所述第五多肽各自包含式(IV)的氨基酸序列:VL2-CLb;其中所述CH1b/CLb对和/或所述CH1a/CLa对被配置成阻碍CH1b与CLa之间和/或CH1a与CLb之间的错配。

[0172] 在一些实施方式中,将一个或多个突变引入到CH1b/CLb对和/或CH1a/CLa对,从而阻碍CH1b与CLa之间和/或CH1a与CLb之间的错配。在某些实施方式中,所述一个或多个突变引入了非天然结合相互作用,如例如非天然共价键、非天然静电相互作用、非天然盐桥、非天然疏水-亲水相互作用、非天然连接子或其任何组合。优选地,将非天然结合相互作用引入到CH1b/CLb对或CH1a/CLa对,使得阻碍CH1b/CLb对与CH1a/CLa对之间的错配。

[0173] 在某些实施方式中,所述CH1b/CLb对和所述CH1a/CLa对中的至少一者具有一个或

多个如下所示的特性:1) 具有至少一个非天然二硫键,所述非天然二硫键阻碍CH1b与CLa之间和/或CH1a与CLb之间的错配;2) 具有一个或多个引入的氨基酸突变,所述一个或多个引入的氨基酸突变形成一个或多个阻碍CH1b与CLa之间和/或CH1a与CLb之间的错配的引入的带电荷氨基酸残基;或者3) 具有一个或多个引入的氨基酸突变,所述一个或多个引入的氨基酸突变形成阻碍CH1b与CLa之间或CH1a与CLb之间的错配的正交CH1-CL界面。

[0174] i) CH1/CL区中引入的二硫键

[0175] 在某些实施方式中,所述CH1b/CLb对和所述CH1a/CLa对中的至少一者具有至少一个非天然二硫键,所述非天然二硫键阻碍CH1b与CLa之间和/或CH1a与CLb之间的错配。

[0176] 在一些实施方式中,第一CH1/CL对和第二CH1/CL对选自CH1b/CLb和CH1a/CLa。例如,第一CH1/CL对可以是CH1_b/CL_b,并且第二CH1/CL对可以是CH1_a/CL_a;或者可替代地,第一CH1/CL对可以是CH1_a/CL_a,并且第二CH1/CL对可以是CH1_b/CL_b。在一些实施方式中,第一CH1/CL对通过非天然的第一二硫键缔合。在一些实施方式中,并且第一CH1/CL对缺乏天然二硫键或具有被破坏的天然二硫键,例如,通过形成天然二硫键的半胱氨酸残基的突变。

[0177] 在一些实施方式中,所述第二CH1/CL对通过第二二硫键缔合,所述第二二硫键形成于不同于所述第一二硫键的位置处。在一些实施方式中,在第二CH1/CL对中形成的第二二硫键是天然二硫键或非天然二硫键。

[0178] 在一些实施方式中,第一二硫键由在一组重链-轻链EU位置处引入的两个半胱氨酸残基形成,所述位置选自由以下组成的组:a) 重链位置134和轻链位置116,b) 重链位置141和轻链位置116,c) 重链位置128和轻链位置118,d) 重链位置126和轻链位置121,e) 重链位置127和轻链位置121,f) 重链位置126和轻链位置124,g) 重链位置170和轻链位置162,h) 重链位置171和轻链位置162,以及i) 重链位置173和轻链位置162。

[0179] 在一些实施方式中,第一二硫键由在一组重链-轻链EU位置处引入的两个半胱氨酸残基形成,所述位置选自由以下组成的组:j) 重链位置133和轻链位置209,k) 重链位置131和轻链位置119,l) 重链位置133和轻链位置207,m) 重链位置170和轻链位置176,n) 重链位置173和轻链位置160,o) 重链位置133和轻链位置117,以及p) 重链位置129和轻链位置121。

[0180] 在一些实施方式中,所述第一二硫键由在一组重链-轻链EU位置处引入的两个半胱氨酸残基形成,所述一组重链-轻链EU位置选自由以下组成的组:a) 重链EU位置126和轻链EU位置121,b) 重链EU位置173和轻链EU位置160,以及c) 重链EU位置128和轻链EU位置118。

[0181] 在一些实施方式中,所述天然二硫键位于选自131、219和220的重链EU位置与轻链EU位置214之间。在一些实施方式中,所述天然二硫键位于重链EU位置220与轻链EU位置214之间。

[0182] 在一些实施方式中,所述第一CH1/CL对包含CH1和CL,所述CH1包含在EU位置126处取代为半胱氨酸残基,以及在EU位置220处取代为非半胱氨酸残基;所述CL包含在EU位置121处取代为半胱氨酸残基,以及在EU位置214处取代为非半胱氨酸残基。

[0183] 在一些实施方式中,所述CH1b包含在EU位置126处取代为半胱氨酸残基,以及在EU位置220处取代为非半胱氨酸残基;并且所述CLb包含在EU位置121处取代为半胱氨酸残基,以及在EU位置214处取代为非半胱氨酸残基。在一些实施方式中,CH1b包含SEQ ID NO:77的

氨基酸序列,和/或CLb包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述CH1a包含在EU位置126处取代为半胱氨酸残基,以及在EU位置220处取代为非半胱氨酸残基;所述CLa包含在EU位置121处取代为半胱氨酸残基,以及在EU位置214处取代为非半胱氨酸残基。在一些实施方式中,CH1a包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列,和/或CLa包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列。

[0184] ii) 用带电荷的氨基酸取代

[0185] 在某些实施方式中,所述CH1b/CLb对和所述CH1a/CLa对中的至少一者具有至少一个或多个阻碍CH1b与CLa之间和/或CH1a与CLb之间的错配的引入的带电荷氨基酸残基。

[0186] 在一些实施方式中,第一CH1/CL对和第二CH1/CL对选自CH1b/CLb和CH1a/CLa。例如,第一CH1/CL对可以是CH1_b/CL_b,并且第二CH1/CL对可以是CH1_a/CL_a;或者可替代地,第一CH1/CL对可以是CH1_a/CL_a,并且第二CH1/CL对可以是CH1_b/CL_b。在一些实施方式中,所述第一CH1/CL对含有至少一个带电荷残基对非带电荷残基的取代,和/或至少一个带相反电荷的残基对带电荷残基的取代,使得所述第一CH1/CL对含有有利于第一CH1/CL对配对的第一对带相反电荷的残基。在一些实施方式中,第一CH1/CL对可以含有取代的组合,所述取代一起提供了有利于第一CH1/CL对配对的第一对带相反电荷的残基。

[0187] 换言之,可以将一对带相反电荷的残基引入到第一CH1/CL对中,以促进第一CH1/CL对中的CH1结构域与CL结构域之间的同源配对。例如,可以引入带电荷的残基来替代CH1(或CL)中的某个位置处的不带电荷的残基,使得引入的带电荷的残基将与CL(或CH1)中已经存在或将要引入的另一个带相反电荷的残基形成静电相互作用,从而有利于第一CH1/CL对的配对。又例如,CH1(或CL)中的某个位置处的现有带电荷的残基可以被带相反电荷的残基替代,使得取代后的带电荷的残基将与CL(或CH1)中已经存在或将要引入的另一个带相反电荷的残基形成静电相互作用,从而有利于第一CH1/CL对的配对。在某些实施方式中,CH1或CL中现有带电荷的残基可以被不带电荷的残基替代,以减少对第一CH1/CL对之间的静电相互作用的潜在干扰。

[0188] 在一些实施方式中,所述第二CH1/CL对含有至少一个带电荷残基对非带电荷残基的取代,和/或至少一个带相反电荷的残基对带电荷残基的取代,使得所述第二CH1/CL对含有有利于第二CH1/CL对配对的第二对带相反电荷的残基,并且任选地,所述第一对带相反电荷的残基和所述第二对带相反电荷的残基阻碍CH1a与CLb之间的配对或阻碍CH1b与CLa之间的配对。

[0189] 在一些实施方式中,第一对带相反电荷的残基和第二对带相反电荷的残基被配置成使得CH1a和CLb在第一对带相反电荷的残基和第二对带相反电荷的残基的对应位置处都具有带正电荷的残基或都具有带负电荷的残基,和/或CH1b和CLa在第一对带相反电荷的残基和第二对带相反电荷的残基的对应位置处都具有带正电荷的残基或都具有带负电荷的残基。

[0190] 在一些实施方式中,所述第一对带相反电荷的残基和/或所述第二对带相反电荷的残基被引入在一组重链-轻链EU位置处,所述重链-轻链EU位置选自自由以下组成的组:a)重链EU位置183和轻链EU位置176,b)重链EU位置183和轻链EU位置133,c)重链EU位置147和轻链EU位置176,d)重链EU位置141和轻链EU位置116,e)重链EU位置126和轻链EU位置121,以及f)重链EU位置218和轻链EU位置122。

[0191] 在一些实施方式中,所述第一对带相反电荷的残基和/或所述第二对带相反电荷的残基被引入在一组重链-轻链EU位置处,所述重链-轻链EU位置选自自由以下组成的组:g)重链EU位置147和轻链EU位置131,h)重链EU位置168和轻链EU位置174,i)重链EU位置147和168以及轻链EU位置131和174。

[0192] 在一些实施方式中,带相反电荷的残基对包含带正电荷的氨基酸残基和带负电荷的氨基酸残基,其中所述带正电荷的氨基酸残基选自自由以下组成的组:赖氨酸(K)、组氨酸(H)和精氨酸(R),和/或所述带负电荷的氨基酸残基选自自由以下组成的组:天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)。

[0193] 在一些实施方式中,CH1b包含EU位置147处的赖氨酸取代带负电荷的残基;CLb包含EU位置176处的丝氨酸取代带正电荷的残基;CH1a包含EU位置183处的丝氨酸取代带正电荷的残基;并且CLa包含EU位置176处的丝氨酸取代带负电荷的残基。在一些实施方式中,CH1b包含取代K147D;CLb包含取代S176K;CH1a包含取代S183K;并且CLa包含取代S176D。在一些实施方式中,CH1b包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列;CLb包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;CH1a包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列;并且CLa包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列。

[0194] 在一些实施方式中,CH1a包含EU位置147处的赖氨酸取代带负电荷的残基;CLa包含EU位置176处的丝氨酸取代带正电荷的残基;CH1b包含EU位置183处的丝氨酸取代带正电荷的残基;并且CLb包含EU位置176处的丝氨酸取代带负电荷的残基。在一些实施方式中,CH1a包含取代K147D;CLa包含取代S176K;CH1b包含取代S183K;并且CLb包含取代S176D。

[0195] 在一些实施方式中,CH1a包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列;CLa包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;CH1b包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列;并且CLb包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列。

[0196] 在一些实施方式中,第一CH1/CL对包含CH1b和CLb。

[0197] 在一些实施方式中,对于CH1b,EU位置173处的氨基酸残基被半胱氨酸残基替代,EU位置183处的氨基酸残基被带正电荷的残基替代,并且EU位置220处的氨基酸残基被非半胱氨酸残基替代,并且对于CLb,EU位置160处的氨基酸残基被半胱氨酸残基替代,EU位置176处的氨基酸残基被带负电荷的残基替代,并且EU位置214处的氨基酸残基被非半胱氨酸残基替代。

[0198] 在一些实施方式中,对于CH1b,EU位置173处的氨基酸残基被半胱氨酸残基替代,EU位置183处的氨基酸残基被带负电荷的残基替代,并且EU位置220处的氨基酸残基被非半胱氨酸残基替代,并且对于CLb,EU位置160处的氨基酸残基被半胱氨酸残基替代,EU位置176处的氨基酸残基被带正电荷的残基替代,并且EU位置214处的氨基酸残基被非半胱氨酸残基替代。

[0199] 在一些实施方式中,CH1b包含V173C、S183K和C220S取代,并且CLb包含Q160C、S176D和C214S取代。在一些实施方式中,CH1b包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列;并且CLb包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列。

[0200] 在一些实施方式中,第一CH1/CL对包含至少一个非天然二硫键和非天然静电相互作用的组合。

[0201] 在一些实施方式中,第一CH1/CL对包含CH1a和CLa。

[0202] 在一些实施方式中,对于CH1a,EU位置173处的氨基酸残基被半胱氨酸残基替代,

EU位置183处的氨基酸残基被带正电荷的残基替代,并且EU位置220处的氨基酸残基被非半胱氨酸残基替代,并且对于CLa,EU位置160处的氨基酸残基被半胱氨酸残基替代,EU位置176处的氨基酸残基被带负电荷的残基替代,并且EU位置214处的氨基酸残基被非半胱氨酸残基替代。在一些实施方式中,CH1a包含V173C、S183K和C220S取代,并且CLa包含Q160C、S176D和C214S取代。在一些实施方式中,CH1a包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列;并且CLa包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列。

[0203] 在一些实施方式中,对于CH1a,EU位置173处的氨基酸残基被半胱氨酸残基替代,EU位置183处的氨基酸残基被带负电荷的残基替代,并且EU位置220处的氨基酸残基被非半胱氨酸残基替代,并且对于CLa,EU位置160处的氨基酸残基被半胱氨酸残基替代,EU位置176处的氨基酸残基被带正电荷的残基替代,并且EU位置214处的氨基酸残基被非半胱氨酸残基替代。

[0204] iii) 正交CH1/CL界面的形成

[0205] 在某些实施方式中,所述CH1b/CLb对和所述CH1a/CLa对中的至少一者具有一个或多个引入的氨基酸突变,所述一个或多个引入的氨基酸突变形成阻碍CH1b与CLa之间或CH1a与CLb之间的错配的正交CH1-CL界面。

[0206] 在某些实施方式中,第一CH1/CL对和第二CH1/CL对选自CH1b/CLb和CH1a/CLa,并且其中所述第一CH1/CL对包含形成正交CH1-CL界面的一个或多个引入的氨基酸突变。

[0207] 在一些实施方式中,所述至少一个修饰包含一个或多个引入的氨基酸突变,其形成正交CH1-CL界面,所述界面有利于CH1b和CLb配对,并且任选地阻碍CH1b与CLa之间的配对或阻碍CH1a与CLb之间的配对。在一些实施方式中,所述至少一个修饰包含一个或多个引入的氨基酸突变,其形成正交CH1-CL界面,所述界面有利于CH1a和CLa配对,并且任选地阻碍CH1a与CLb之间的配对或阻碍CH1b与CLa之间的配对。

[0208] 在一些实施方式中,正交CH1-CL界面包含重链EU位置H168A、F170G和轻链EU位置L135Y、S176W处的突变。在一些实施方式中,正交CH1-CL界面包含重链EU位置H168A和F170G以及轻链EU位置L135Y和S176W处的突变,其中重链CH1结构域包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列,并且轻链CL结构域包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列。

[0209] 在一些实施方式中,CH1a包含S183E取代,并且CLa包含V133K取代,CH1b包含A141I、F170S、S181M、S183A和V185A取代,并且CLb包含F116A、L235V、S174A、S176F和T178V取代。在一些实施方式中,CH1b包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列,和/或CLb包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列。

[0210] 在一些实施方式中,CH1b包含S183E取代,并且CLb包含V133K取代,CH1a包含A141I、F170S、S181M、S183A和V185A取代,并且CLa包含F116A、L235V、S174A、S176F和T178V取代。在一些实施方式中,CH1a包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列,和/或CLa包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列。

[0211] 在一些实施方式中,所述第一CH1/CL对包含在一组重链-轻链EU位置处形成正交Fab设计的一个或多个引入的氨基酸突变,所述一个或多个引入的氨基酸突变选自自由以下组成的组:重链EU位置A141I、F170S、S181M、S183A和V185A处的取代,以及轻链EU位置F116A、A235V、S174A、S176F和T178V处的取代。

[0212] 在一些实施方式中,所述第一CH1/CL对包含在一组重链-轻链EU位置处形成正交

Fab设计的引入的氨基酸突变,所述引入的氨基酸突变选自以下组成的组:重链EU位置A141I、F170S、S181M、S183A和V185A处的取代,以及轻链EU位置F116A、A235V、S174A、S176F和T178V处的取代;所述第二CH1/CL对包含引入的氨基酸突变,所述引入的氨基酸突变成一对带相反电荷的残基,包括CH1中的S183E和CL中的V133K。在一些实施方式中,CH1a包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列;CLa包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列;CH1b包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列;和/或CLb包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列。

[0213] E).Fab可变区中引入的突变促进特异性配对

[0214] 除了支架区,还可以在任一个VA1/VB1和VA2/VB2的可变区中引入突变,以阻碍B1/A2或B2/A1的错配。

[0215] 在一些实施方式中,在本文所公开的融合多肽或多肽复合物中,第一VH/VL对和第二VH/VL对选自VH1/VL1和VH2/VL2,并且其中所述第一VH/VL对具有至少一个带电荷残基对非带电荷残基的取代,和/或至少一个带相反电荷的残基对带电荷残基的取代,使得所述第一VH/VL含有有利于所述第一VH/VL对配对的第三对带相反电荷的残基。

[0216] 在一些实施方式中,所述第二VH/VL对具有至少一个带电荷残基对非带电荷残基的取代,和/或至少一个带相反电荷的残基对带电荷残基的取代,使得所述第二VH/VL含有有利于所述第二VH/VL对配对的第四对带相反电荷的残基,并且任选地,所述第三对带相反电荷的残基和所述第四对带相反电荷的残基阻碍VH1与VL2或VH2和VL1的配对。

[0217] 在一些实施方式中,所述第三对带相反电荷的残基和所述第四对带相反电荷的残基被配置成使得VH1和VL2都具有带正电荷的残基或都具有带负电荷的残基,和/或VH2和VL1都具有带正电荷的残基或都具有带负电荷的残基。

[0218] 在一些实施方式中,所述第三对带相反电荷的残基和/或所述第四对带相反电荷的残基被引入在一组重链-轻链EU位置处,所述重链-轻链EU位置选自以下组成的组:a)重链EU位置39:轻链EU位置38;b)重链EU位置105:轻链EU位置43,c)重链EU位置62:轻链EU位置1,或者d)其任何组合。

[0219] 在一些实施方式中,带相反电荷的残基对包含带正电荷的氨基酸残基和带负电荷的氨基酸残基,其中所述带正电荷的氨基酸残基选自以下组成的组:赖氨酸(K)、组氨酸(H)和精氨酸(R),和/或所述带负电荷的氨基酸残基选自以下组成的组:天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)。

[0220] F).Fc区中的修饰

[0221] 在一些实施方式中,在本文所公开的多肽复合物中,所述第二多肽和所述第三多肽进一步分别包含可操作地连接的第一二聚化结构域和可操作地连接的第二二聚化结构域,所述第一二聚化结构域和所述第二二聚化结构域缔合以形成二聚体。

[0222] 在一些实施方式中,所述第一二聚化结构域和所述第二二聚化结构域包含IgG的CH3结构域。在一些实施方式中,所述第一二聚化结构域和所述第二二聚化结构域进一步包含铰链区。

[0223] 在一些实施方式中,在本文所公开的多肽复合物中,所述第二多肽包含可操作地连接的第一二聚化结构域,和/或所述第三多肽进一步包含可操作地连接的第二二聚化结构域。在一些实施方式中,在本文所公开的多肽复合物中,所述第二多肽包含可操作地连接的第二二聚化结构域,和/或所述第三多肽进一步包含可操作地连接的第一二聚化结构域。

[0224] 在一些实施方式中,在本文所公开的多肽复合物中,所述第一二聚化结构域包含可操作地连接的第一Fc区,和/或所述第二二聚化结构域包含可操作地连接的第二Fc区。在一些实施方式中,所述第一Fc区和/或所述第二Fc区源自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0225] 在一些实施方式中,所述第一Fc区和所述第二Fc区具有不同的氨基酸序列,并且具有至少一种促进所述第一Fc区和所述第二Fc区异二聚化的构型。

[0226] 在某些实施方式中,本文所公开的多肽复合物包含Fc区的界面中的一个或多个氨基酸取代以便于推动和/或促进异二聚体化。这些修饰包含将突起引入到第一Fc区中并且将空腔引入到第二Fc区中,其中突起可以定位于空腔中,以便促进第一Fc多肽与第二Fc多肽的相互作用以形成异二聚体或复合物(也被称为杵臼构型)。产生具有这些修饰的抗体的方法是本领域已知的,例如,如美国专利第5,731,168号中所描述的。

[0227] 在一些实施方式中,通过用较大的侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)替换第一抗体分子的界面的一个或多个小氨基酸侧链来产生“杵”。通过用较小的氨基酸侧链(例如,丙氨酸或苏氨酸)替换大的氨基酸侧链,在第二抗体分子的界面上产生了与一条或多条大的侧链相同或类似大小的补偿性“臼”。

[0228] 在一些实施方式中,所述第一Fc区包含第一Fc突变,和/或所述第二Fc区包含第二Fc突变,其中:a)所述第一Fc突变包括T366W或S354C,并且所述第二Fc突变包括Y349C、T366S、L368A或Y407V;b)所述第一Fc突变包括D399K或E356K,并且所述第二Fc突变包括K392D或K409D;c)所述第一Fc突变包括E356K、E357K或D399K,并且所述第二Fc突变包括K370E、K409D或K439E;d)所述第一Fc突变包括S364H或F405A,并且所述第二Fc突变包括Y349T或T394F;e)所述第一Fc突变包括S364H或T394F,并且所述第二Fc突变包括Y394T或F405A;f)所述第一Fc突变包括K370D或K409D,并且所述第二Fc突变包括E357K或D399K;或者g)所述第一Fc突变包括L351D或L368E,并且所述第二Fc突变包括L351K或T366K,其中编号是根据EU索引的。

[0229] 在一些实施方式中,所述第一Fc区包含第一Fc突变,和/或所述第二Fc区包含第二Fc突变,其中:a)所述第一Fc突变包括T366S/L368A/Y407V,并且所述第二Fc突变包括T366W;b)所述第一Fc突变包括S354C/T366W,并且所述第二Fc突变包括Y349C/T366S/L368A/Y407V;c)所述第一Fc突变包括T366Y,并且所述第二Fc突变包括Y407T;d)所述第一Fc突变包括T366W,并且所述第二Fc突变包括Y407A;e)所述第一Fc突变包括T394W,并且所述第二Fc突变包括F405A;f)所述第一Fc突变包括T366Y/F405A,并且所述第二Fc突变包括T394W/Y407T;g)所述第一Fc突变包括T366W/F405W,并且所述第二Fc突变包括T394S/Y407A;g)所述第一Fc突变包括F405W,并且所述第二Fc突变包括T394S;h)所述第一Fc突变包括D399C,并且所述第二Fc突变包括K392C;i)所述第一Fc突变包括T366W/D399C,并且所述第二Fc突变包括T366S/L368A/K392C/Y407V;j)所述第一Fc突变包括T366W/K392C,并且所述第二Fc突变包括T366S/L368A/D399C/Y407V;k)所述第一Fc突变包括S354C/T366W,并且所述第二Fc突变包括Y349C/T366S/L368A/Y407V;l)所述第一Fc突变包括Y349C/T366W,并且所述第二Fc突变包括S354C/T366S/L368A/Y407V;m)所述第一Fc突变包括E356C/T366W,并且所述第二Fc突变包括Y349C/T366S/L368A/Y407V;n)所述第一Fc突变包括Y349C/T366W,并且所述第二Fc突变包括E356C/T366S/L368A/Y407V;o)所述第一Fc突变包括E357C/T366W,并且所述第二Fc突变包括Y349C/T366S/L368A/Y407V;p)所述第一Fc突变

包括Y349C/T366W,并且所述第二Fc突变包括E357C/T366S/L368A/Y407V。

[0230] 在一些实施方式中,本文所公开的多肽复合物包含第一CH3区和第二CH3区,其中第一CH3区或第二CH3区包括与野生型IgG氨基酸序列不同的氨基酸序列,使得野生型人IgG氨基酸序列中的一个或多个带正电荷的氨基酸(例如,赖氨酸、组氨酸和精氨酸)被CH3区中的对应位置处的一个或多个带负电荷的氨基酸(例如,天冬氨酸和谷氨酸)替代。可替代地,第一CH3区或第二CH3区包括与野生型IgG氨基酸序列不同的van氨基酸序列,使得野生型人IgG氨基酸序列中的一个或多个带负电荷的氨基酸被CH3区中的对应位置处的一个或多个带正电荷的氨基酸替代。

[0231] 在一些实施方式中,所述第一Fc区包含第一Fc突变,和/或所述第二Fc区包含第二Fc突变,其中:a)所述第一Fc突变包括K370E/D399K/K439D,并且所述第二Fc突变包括D356K/E357K/K409D;b)所述第一Fc突变包括K409D,并且所述第二Fc突变包括D399K;c)所述第一Fc突变包括K409E,并且所述第二Fc突变包括D399K;d)所述第一Fc突变包括K409E,并且所述第二Fc突变包括D399K;e)所述第一Fc突变包括K409D,并且所述第二Fc突变包括D399K;f)所述第一Fc突变包括D399K,并且所述第二Fc突变包括E356K;g)所述第一Fc突变包括E356K/D399K,并且所述第二Fc突变包括K392D/K409D;h)所述第一Fc突变包括E356K/D399K,并且所述第二Fc突变包括K409D/K439D;i)所述第一Fc突变包括E357K/D399K,并且所述第二Fc突变包括K370D/K409D;j)所述第一Fc突变包括E356K/E357K/D399K,并且所述第二Fc突变包括K370D/K392D/K409D;k)所述第一Fc突变包括E357K/D399K,并且所述第二Fc突变包括K392D/K409D;l)所述第一Fc突变包括K392D/K409D,并且所述第二Fc突变包括D399K;m)所述第一Fc突变包括K360D/K409D,并且所述第二Fc突变包括D399K。

[0232] V.多肽复合物的靶标

[0233] 在一些实施方式中,在本文所公开的多肽复合物中,所述第一靶结合结构域和所述第二靶结合结构域中的至少一者是嵌合的、人源化的或完全人的。

[0234] 在一些实施方式中,本文中的“嵌合靶结合结构域”是指具有可变结构域的重组蛋白,所述可变结构域包括源自一个物种的抗体(如啮齿动物抗体或鼠抗体)的互补决定区(CDR),而抗体分子的恒定结构域源自不同物种的抗体(如人抗体)的恒定结构域。对于兽医应用,嵌合抗体的恒定结构域可以源自其它物种,如非人灵长类动物、猫或狗的恒定结构域。

[0235] 在一些实施方式中,本文中的“人源化靶结合结构域”意指在其中来自一个物种的抗体(例如,啮齿动物抗体)的CDR被转移到人重链和轻链可变结构域的框架区中的重组蛋白。抗体分子的恒定结构域来源自人抗体的恒定结构域。在一些实施方式中,人源化抗体的框架区的特定残基,特别是那些接触或接近CDR序列的残基,可以被修饰,例如用来自原始啮齿动物、非人灵长类动物或其它抗体的对应残基替代。

[0236] 在一些实施方式中,第一靶结合结构域和第二靶结合结构域中的至少一者是完全人的,其可以使用本领域已知的任何合适的方法产生,例如,来自转基因小鼠,所述转基因小鼠已经被基因工程化以产生响应于抗原攻击的特异性人抗体。用于从转基因小鼠中获得人抗体的方法由Green等人,《自然遗传学(Nature Genet.)》7:13(1994),Lonberg等人,《自然》368:856(1994)和Taylor等人,《国际免疫药理学(Int.Immun.)》6:579(1994)描述。完全人靶结合结构域也可以通过遗传或染色体转染方法以及噬菌体展示技术构建,所有这些都

是本领域已知的。关于从未经免疫的供体的免疫球蛋白可变结构域基因文库中体外生产人抗体及其片段,参见例如McCafferty等人,《自然》348:552-553(1990)。噬菌体展示可以以多种形式进行,关于它们的综述,参见例如Johnson和Chiswell,《结构生物学最新观点(Current Opinion in Structural Biology)》3:5564-571(1993)。人靶结合结构域也可以由体外活化的B细胞产生。参见美国专利第5,567,610和5,229,275号,所述美国专利通过引用整体并入本文。

[0237] 本文所提供的多肽复合物基于新的2:1结构,并且对于第二靶标是二价的,并且对于第一靶标是一价的。具体地,在IgG样双特异性抗体的基础上引入另外的Fab区,使得两个靶结合位点中的一个将是二价的,并且重新获得其靶结合亲和力,这有效地调节了两个靶结合位点之间的亲和力差异,而没有对抗体特异性的任何不利影响或任何安全风险。此类亲和力差异可能是有用的,因为与第二靶标的二价结合赋予了亲和力,并且允许增强第二靶标的高表达与低表达细胞之间的分化。此外,与第一靶标的相对较低的亲和力结合可以用于减少或避免与第一靶标的强结合的不期望效应(例如,第一靶标的非特异性活化,其可导致不期望的生物效应)。

[0238] 在一些实施方式中,所述第一靶结合结构域和所述第二靶结合结构域与不同靶标结合。在一些实施方式中,第一靶标和第二靶标中的至少一个是疾病相关抗原。例如,疾病相关抗原可以是肿瘤相关抗原、或与自身免疫性疾病或炎症疾病相关的抗原、或与眼部病症相关的抗原、与中枢神经系统疾病相关的抗原、与感染性疾病相关的抗原或与凝血障碍相关的抗原。

[0239] 在某些实施方式中,第一靶标和第二靶标中的一个为肿瘤相关抗原。在一些实施方式中,第二靶标是肿瘤相关抗原。在一些实施方式中,肿瘤相关抗原是存在于肿瘤中但不存在于正常器官、组织和/或细胞中的抗原。在一些实施方式中,肿瘤相关抗原是在肿瘤中比在正常器官、组织和/或细胞中更普遍的抗原。在一些实施方式中,肿瘤相关抗原是在恶性癌细胞中比在正常细胞中更普遍的抗原。

[0240] 在一些实施方式中,所述第二靶结合结构域与肿瘤相关抗原结合。肿瘤相关抗原包括这样的抗原:呈递于肿瘤细胞表面上、位于肿瘤细胞上或肿瘤细胞内、仅由肿瘤细胞呈递并且不由正常细胞(即,非肿瘤细胞)呈递、表示与非肿瘤细胞相比具有一种或多种肿瘤特异性突变的蛋白质、当与非肿瘤细胞相比时,在肿瘤细胞中过度表达;由于与非肿瘤组织相比,肿瘤组织的结构不太紧凑,因此易于与肿瘤细胞中的抗体结合,并且呈递于肿瘤的脉管系统等上,意指在肿瘤细胞中产生的抗原物质,即它在宿主中触发免疫应答。

[0241] 肿瘤相关抗原的实例包括但不限于:CD19、CD20、CD38、CD30、Her2/neu/ERBB2、CA125、MUC-1、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、CD44表面粘附分子、间皮素、癌胚抗原(CEA)、表皮生长因子受体(EGFR)、EGFRvIII、血管内皮生长因子受体-2(VEGFR2)、高分子量黑色素瘤相关抗原(HMW-MAA)、MAGE-A1、IL-13R-a2、GD2等。癌症相关抗原还包括,例如4-1BB、5T4、腺癌抗原、甲胎蛋白、BAFF、B淋巴瘤细胞、C242抗原、CA-125、碳酸酐酶9(CA-IX)、C-MET、CCR4、CD152、CD19、CD20、CD200、CD22、CD221、CD23(IgE受体)、CD28、CD30(TNFRSF8)、CD33、CD4、CD40、CD44 v6、CD51、CD52、CD56、CD74、CD80、CEA、CNT0888、CTLA-4、DRS、EGFR、EpCAM、CD3、FAP、纤连蛋白额外结构域-B、叶酸受体1、GD2、GD3神经节苷脂、糖蛋白75、GPNMB、HER2/neu、HGF、人散射因子受体激酶、IGF-1受体、IGF-I、IgG1、L1-CAM、IL-13、IL-6、胰岛素样生长因

子I受体、整合素 $\alpha 5\beta 1$ 、整合素 $\alpha v\beta 3$ 、MORAb-009、MS4A1、MUC1、粘蛋白CanAg、羟乙酰神经氨酸、NPC-1C、PDGF- α 、PDL192、磷脂酰丝氨酸、前列腺癌细胞、RANKL、RON、ROR1、SCH 900105、SDC1、SLAMF7、TAG-72、腱生蛋白C、TGF $\beta 2$ 、TGF- β 、TRAIL-R1、TRAIL-R2、肿瘤抗原CTAA16.88、VEGF-A、VEGFR-1、VEGFR2和波形蛋白等。

[0242] 在某些实施方式中,第一靶标和第二靶标中的一个为肿瘤相关抗原,并且另一个为免疫相关靶标。在一些实施方式中,第一靶结合结构域与免疫相关靶标结合。在一些实施方式中,第二靶标是肿瘤相关抗原,并且第一靶结合结构域与免疫相关靶标结合。

[0243] 本文所提供的免疫相关靶标可以选自以下组成的组:CD2、CD3、CD7、CD16、CD27、CD30、CD70、CD83、CD28、CD80 (B7-1)、CD86 (B7-2)、CD40、CD40L (CD154)、CD47、CD122、CD137、CD137L、OX40 (CD134)、OX40L (CD252)、NKG2C、4-1BB、LIGHT、PVRIG、SLAMF7、HVEM、BAFFR、ICAM-1、2B4、LFA-1、GITR、ICOS (CD278)、ICOSLG (CD275)、LAG3 (CD223)、A2AR、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、BTLA (CD272)、BTLA、CD160、CTLA-4 (CD152)、IDO1、IDO2、TDO、KIR、LAIR-1、NOX2、PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM-3、VISTA、SIGLEC-7 (CD328)、TIGIT、PVR (CD155)、TGF β 、SIGLEC9 (CD329) 和其任何组合。

[0244] 在本文所提供的双特异性多肽复合物的一些优选实施方式中,第二靶标涉及细胞毒性T淋巴细胞上的受体(例如,CD3),并且第一靶标涉及细胞表面肿瘤抗原,如CD19、CD20、CD33、CD123、HER1、HER2、CEA、二唾液酸神经节苷脂GD2、PSMA、gpA33、EpCAM、P-钙粘蛋白或B7H3 (Sedykh SE等人,《药物设计开发与治疗 (Drug Des Devel Ther.)》2018;12:195-208.)。因此,本文所提供的双特异性多肽复合物可以用于在T细胞与肿瘤细胞之间形成连接,这可能导致T细胞对肿瘤细胞发挥细胞毒活性。

[0245] 在某些实施方式中,第一靶标和第二靶标中的至少一个是与自身免疫性疾病或炎性疾病(例如类风湿性关节炎(RA)、银屑病、骨质疏松症、特发性肺纤维化、哮喘、干燥综合征、II型糖尿病)相关的抗原。在一些实施方式中,与自身免疫性疾病或炎性疾病相关的抗原是,例如但不限于HSA、TNF、IL6R、IL17A/F、RANKL、IL-13、IL4-IL17、BAFF、ICOSL、IL-17A、NGF、CD32b、CD79b、FGFR1、KLB、AOC3 (VAP-1)、CAM-3001、CCL11 (嗜酸细胞活化趋化因子-1)、CD125、CD147 (碱性糖蛋白 (basigin))、CD154 (CD40L)、CD2、CD20、CD23 (IgE受体)、CD25 (IL-2受体链)、CD3、CD4、CD5、IFN- α 、IFN- γ 、IgE、IgE Fc区、IL-1、IL-12、IL-23、IL-13、IL-17、IL-17A、IL-22、IL-4、IL-5、IL-5、IL-6、IL-6受体、整合素 $\alpha 4$ 、整合素 $\alpha 4\beta 7$ 、LFA-1 (CD11a)、肌骨素、OX-40、硬化蛋白 (scleroscin)、SOST、TGF $\beta 1$ 、TNF- α 或VEGF-A。

[0246] 在某些实施方式中,第一靶标和第二靶标中的至少一个是与眼病(例如年龄相关性黄斑变性 (AMD) 和糖尿病性黄斑水肿)相关的抗原。在一些实施方式中,与眼病相关的抗原是例如但不限于VEGF或ANG-2。

[0247] 在某些实施方式中,第一靶标和第二靶标中的至少一个是与中枢神经系统疾病(例如神经母细胞瘤、胶质母细胞瘤、阿尔茨海默病)相关的抗原。在一些实施方式中,与眼病相关的抗原是例如但不限于GD2、EGFRvIII、A β 40或A β 42。

[0248] 在某些实施方式中,第一靶标和第二靶标中的至少一个是与感染性疾病(例如肺炎、病毒感染(如COVID-19感染))相关的抗原。在一些实施方式中,与自身免疫性疾病或炎性疾病相关的抗原是例如但不限于Psl、Pcrrv或COVID-19病毒的刺突蛋白。

[0249] 在某些实施方式中,第一靶标和第二靶标中的至少一个是与凝血障碍(例如血

友病A) 相关的抗原。在一些实施方式中,与血友病A相关的抗原是例如但不限于FIXa或FX。

[0250] 可以被本文所提供的双特异性多肽复合物靶向从而具有潜在治疗作用的抗原对的其它实例可以包括但不限于PD-L1:TGF β 、CD38:EGFR、HER2:VEGF、HER2:EGFR、PD-1:CTLA-4、PD-1:TIM3、OX40:PD-L1、FIXa:FX、CD32B:CD79B、血管生成素2:VEGF、IL13:IL4、TNF:IL17A、DLL4:VEGF、IL1 α :IL1 β 、FAP:DR5、CD30:gpA33、TNF:HSA、IL6R:HSA、IL17A/F:HSA、RANKL:HSA、A β 40:A β 42、IL13:IL17、FGFR1:KLB、PsI:PcrV、BAFF:B7RP1、NGF:TNF和TNF:IL17A(Sedykh SE等人,《药物设计开发与治疗》2018;12:195-208)。

[0251] 在某些实施方式中,第一靶标是CD3,并且第二靶标是CD20。

[0252] 在某些实施方式中,第一靶结合结构域能够与CD3结合,并且包含包括SEQ ID NO:113的氨基酸序列的重链CDR1、包括SEQ ID NO:114的氨基酸序列的重链CDR2、包括SEQ ID NO:115的氨基酸序列的重链CDR3、包括SEQ ID NO:116的氨基酸序列的轻链CDR1、包括SEQ ID NO:117的氨基酸序列的轻链CDR2和包括SEQ ID NO:118的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0253] 在某些实施方式中,第二靶结合结构域能够与CD20结合,并且包含包括SEQ ID NO:107的氨基酸序列的重链CDR1、包括SEQ ID NO:108的氨基酸序列的重链CDR2、包括SEQ ID NO:109的氨基酸序列的重链CDR3、包括SEQ ID NO:110的氨基酸序列的轻链CDR1、包括SEQ ID NO:111的氨基酸序列的轻链CDR2和包括SEQ ID NO:112的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0254] 示例性多肽复合物

[0255] 在某些实施方式中,本文所提供的多肽复合物包含:a)所述融合多肽包含式(I)的氨基酸序列:VH2-CH1b-连接子-VL1-CLa,b)所述第二多肽包含式(II)的氨基酸序列:VH1-CH1a,c)所述第三多肽包含式(III)的氨基酸序列:VH2-CH1b,d)所述第四多肽和所述第五多肽各自包含式(IV)的氨基酸序列:VL2-CLb;其中所述CH1b/CLb对和/或所述CH1a/CLa对被配置成阻碍CH1b与CLa之间和/或CH1a与CLb之间的错配。

[0256] FORMAT NEW 1

[0257] 在本文所提供的多肽复合物的某些实施方式中,CH1a具有在重链EU位置A141I、F170S、S181M、S183A和V185A处的取代,并且CLa具有在轻链EU位置F116A、A235V、S174A、S176F和T178V处的取代;并且CH1b具有在重链EU位置S183E处的取代,并且CLb具有在轻链EU位置V133K处的取代。在某些实施方式中,CH1_a包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列,CL_a包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列,CH1_b包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列,并且CL_b包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列。

[0258] 在某些实施方式中,VH1具有在重链EU位置Q39E处的取代,并且VL1具有在轻链EU位置Q38K处的取代。在某些实施方式中,VH2具有在重链EU位置Q39K处的取代,并且VL1具有在轻链EU位置Q38E处的取代。在某些实施方式中,VH1包含分别包括SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:114和SEQ ID NO:115的氨基酸序列的重链CDR1/CDR2/CDR3,和/或VL1包含分别包括SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117和SEQ ID NO:118的氨基酸序列的轻链CDR1/CDR2/CDR3。在某些实施方式中,VH2包含分别包括SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:108和SEQ ID NO:109的氨基酸序列的重链CDR1/CDR2/CDR3,和/或VL2包含分别包括SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:111和SEQ ID NO:112的氨基酸序列的轻链CDR1/CDR2/CDR3。

[0259] 在本文所提供的多肽复合物的某些实施方式中,VH1包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列,VL1包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列,VH2包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列,VL2包含

SEQ ID NO:72的氨基酸序列。

[0260] 在这些实施方式中的某些实施方式中,第一Fc和第二Fc包含SEQ ID NO:69和84的氨基酸序列。在这些实施方式中的某些实施方式中,融合多肽、第二多肽、第三多肽、第四多肽分别包含SEQ ID NO:6、5、7和8的氨基酸序列。这种多肽复合物也被称为抗CD20x CD3 FORMAT NEW1。

[0261] FORMAT NEW 2

[0262] 在本文所提供的多肽复合物的某些实施方式中,所述CH1a具有在EU位置126处取代为半胱氨酸残基,以及在EU位置220处取代为非半胱氨酸残基;所述CLa具有在EU位置121处取代为半胱氨酸残基,以及在EU位置214处取代为非半胱氨酸残基。在这些实施方式中的某些实施方式中,CH1a包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列;CLa包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列;CH1b包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;CLb包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列。

[0263] 在某些实施方式中,VH1包含分别包括SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:114和SEQ ID NO:115的氨基酸序列的重链CDR1/CDR2/CDR3,和/或VL1包含分别包括SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117和SEQ ID NO:118的氨基酸序列的轻链CDR1/CDR2/CDR3。在某些实施方式中,VH2包含分别包括SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:108和SEQ ID NO:109的氨基酸序列的重链CDR1/CDR2/CDR3,和/或VL2包含分别包括SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:111和SEQ ID NO:112的氨基酸序列的轻链CDR1/CDR2/CDR3。

[0264] 在本文所提供的多肽复合物的某些实施方式中,VH1包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列,VL1包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列,VH2包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列,VL2包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列。在某些实施方式中,第一Fc和第二Fc包含SEQ ID NO:69和84的氨基酸序列。在这些实施方式中的某些实施方式中,融合多肽、第二多肽、第三多肽、第四多肽分别包含SEQ ID NO:14、13、15和16的氨基酸序列。这种多肽复合物也被称为抗CD20 x CD3 FORMAT NEW2。

[0265] FORMAT NEW 3

[0266] 在本文所提供的多肽复合物的某些实施方式中,CH1a具有在重链EU位置K147D处的取代,并且CLa具有在轻链EU位置S176K处的取代;并且CH1b具有在重链EU位置S183K处的取代,并且CLb具有在轻链EU位置S176D处的取代。在这些实施方式中的某些实施方式中,CH1_a包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列,CL_a包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列,CH1_b包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列,CL_b包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列。

[0267] 在某些实施方式中,VH1具有在重链EU位置Q39K和Q105K处的取代,并且VL1具有在轻链EU位置Q38D和A43D处的取代。在某些实施方式中,VH2具有在重链EU位置Q39D和Q105D处的取代,并且VL2具有在轻链EU位置Q38K和A43K处的取代。在某些实施方式中,VH1包含分别包括SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:114和SEQ ID NO:115的氨基酸序列的重链CDR1/CDR2/CDR3,和/或VL1包含分别包括SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117和SEQ ID NO:118的氨基酸序列的轻链CDR1/CDR2/CDR3。在某些实施方式中,VH2包含分别包括SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:108和SEQ ID NO:109的氨基酸序列的重链CDR1/CDR2/CDR3,和/或VL2包含分别包括SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:111和SEQ ID NO:112的氨基酸序列的轻链CDR1/CDR2/CDR3。

[0268] 在本文所提供的多肽复合物的某些实施方式中,VH1包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列,VL1包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列,VH2包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列,VL2包含

SEQ ID NO:91的氨基酸序列。在某些实施方式中,第一Fc和第二Fc包含SEQ ID NO:69和84的氨基酸序列。在这些实施方式中的某些实施方式中,融合多肽、第二多肽、第三多肽、第四多肽分别包含SEQ ID NO:22、21、23和24的氨基酸序列。这种多肽复合物也被称为抗CD20 x CD3 FORMAT NEW3。

[0269] FORMAT NEW 4

[0270] 在本文所提供的多肽复合物的某些实施方式中,CH1a具有在重链EU位置H168A和F170G处的取代,并且CLa具有在轻链EU位置L135Y和S176W处的取代。在这些实施方式中的某些实施方式中,CH1_a包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列,CL_a包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列,CH1_b包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列,并且CL_b包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列。

[0271] 在某些实施方式中,VH1具有在重链EU位置62E和Q39K处的取代,并且VL1具有在轻链EU位置D1R和Q38D处的取代。在某些实施方式中,VH2具有在重链EU位置Q39Y处的取代,并且VL2具有在轻链EU位置Q38R处的取代。在某些实施方式中,VH1包含分别包括SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:114和SEQ ID NO:115的氨基酸序列的重链CDR1/CDR2/CDR3,和/或VL1包含分别包括SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117和SEQ ID NO:118的氨基酸序列的轻链CDR1/CDR2/CDR3。在某些实施方式中,VH2包含分别包括SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:108和SEQ ID NO:109的氨基酸序列的重链CDR1/CDR2/CDR3,和/或VL2包含分别包括SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:111和SEQ ID NO:112的氨基酸序列的轻链CDR1/CDR2/CDR3。

[0272] 在本文所提供的多肽复合物的某些实施方式中,VH1包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列,VL1包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列,VH2包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列,VL2包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列。在某些实施方式中,第一Fc和第二Fc包含SEQ ID NO:69和84的氨基酸序列。在这些实施方式中的某些实施方式中,融合多肽、第二多肽、第三多肽、第四多肽分别包含SEQ ID NO:30、29、31和32的氨基酸序列。这种多肽复合物也被称为抗CD20 x CD3 FORMAT NEW4。

[0273] FORMAT NEW 7

[0274] 在本文所提供的多肽复合物的某些实施方式中,所述CH1a具有在EU位置173处取代为半胱氨酸残基,在EU位置220处取代为非半胱氨酸残基,以及在EU位置S183K处的取代;所述CLa具有在EU位置160处取代为半胱氨酸残基,在EU位置214处取代为非半胱氨酸残基,以及在EU位置S176D处的取代。在这些实施方式中的某些实施方式中,CH1a包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列;CLa包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列;CH1b包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;CLb包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列。

[0275] 在某些实施方式中,VH1包含分别包括SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:114和SEQ ID NO:115的氨基酸序列的重链CDR1/CDR2/CDR3,和/或VL1包含分别包括SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117和SEQ ID NO:118的氨基酸序列的轻链CDR1/CDR2/CDR3。在某些实施方式中,VH2包含分别包括SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:108和SEQ ID NO:109的氨基酸序列的重链CDR1/CDR2/CDR3,和/或VL2包含分别包括SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:111和SEQ ID NO:112的氨基酸序列的轻链CDR1/CDR2/CDR3。

[0276] 在本文所提供的多肽复合物的某些实施方式中,VH1包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列,VL1包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列,VH2包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列,VL2包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列。在某些实施方式中,第一Fc和第二Fc包含SEQ ID NO:69和84

的氨基酸序列。在这些实施方式中的某些实施方式中,融合多肽、第二多肽、第三多肽、第四多肽分别包含SEQ ID NO:54、53、55和56的氨基酸序列。这种多肽复合物也被称为抗CD20 x CD3 FORMAT NEW7。

[0277] FORMAT NEW 5

[0278] 在某些实施方式中,本文所提供的多肽复合物包含:a)融合多肽,所述融合多肽包含式(I)的氨基酸序列:VH2-CH1_b-连接子-VL1-TCR β ;b)第二多肽,所述第二多肽包含式(II)的氨基酸序列:VH1-TCR α ;c)第三多肽,所述第三多肽包含式(III)的氨基酸序列:VH2-CH1_b;d)第四多肽和第五多肽,所述第四多肽和所述第五多肽各自包含式(IV)的氨基酸序列:VL2-CL_b。

[0279] 在这些实施方式中的某些实施方式中,TCR α 包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列;TCR β 包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列;CH1b包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;CLb包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列。

[0280] 在某些实施方式中,VH1包含分别包括SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:114和SEQ ID NO:115的氨基酸序列的重链CDR1/CDR2/CDR3,和/或VL1包含分别包括SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117和SEQ ID NO:118的氨基酸序列的轻链CDR1/CDR2/CDR3。在某些实施方式中,VH2包含分别包括SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:108和SEQ ID NO:109的氨基酸序列的重链CDR1/CDR2/CDR3,和/或VL2包含分别包括SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:111和SEQ ID NO:112的氨基酸序列的轻链CDR1/CDR2/CDR3。

[0281] 在本文所提供的多肽复合物的某些实施方式中,VH1包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列,VL1包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列,VH2包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列,VL2包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列。在某些实施方式中,第一Fc和第二Fc包含SEQ ID NO:69和84的氨基酸序列。在这些实施方式中的某些实施方式中,融合多肽、第二多肽、第三多肽、第四多肽分别包含SEQ ID NO:38、37、39和40的氨基酸序列。这种多肽复合物也被称为抗CD20 x CD3 FORMAT NEW5。

[0282] FORMAT NEW 6

[0283] 在某些实施方式中,本文所提供的多肽复合物包含:a)融合多肽,所述融合多肽包含式(I)的氨基酸序列:VH2-CH1_b-连接子-VH1-CL_a;b)第二多肽,所述第二多肽包含式(II)的氨基酸序列:VL1-CH1_a;c)第三多肽,所述第三多肽包含式(III)的氨基酸序列:VH2-CH1_b;d)第四多肽和第五多肽,所述第四多肽和所述第五多肽各自包含式(IV)的氨基酸序列:VL2-CL_b。

[0284] 在本文所提供的多肽复合物的某些实施方式中,CH1_a包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列,CL_a包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列,CH1_b包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列,CL_b包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列。

[0285] 在某些实施方式中,VH1包含分别包括SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:114和SEQ ID NO:115的氨基酸序列的重链CDR1/CDR2/CDR3,和/或VL1包含分别包括SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117和SEQ ID NO:118的氨基酸序列的轻链CDR1/CDR2/CDR3。在某些实施方式中,VH2包含分别包括SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:108和SEQ ID NO:109的氨基酸序列的重链CDR1/CDR2/CDR3,和/或VL2包含分别包括SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:111和SEQ ID NO:112的氨基酸序列的轻链CDR1/CDR2/CDR3。

[0286] 在本文所提供的多肽复合物的某些实施方式中,VH1包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列,VL1包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列,VH2包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列,VL2包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列。在某些实施方式中,第一Fc和第二Fc包含SEQ ID NO:69和84的氨基酸序列。在这些实施方式中的某些实施方式中,融合多肽、第二多肽、第三多肽、第四多肽分别包含SEQ ID NO:46、45、47和48的氨基酸序列。这种多肽复合物也被称为抗CD20 x CD3 FORMAT NEW6。

[0287] FORMAT NEW 8

[0288] 在某些实施方式中,本文所提供的多肽复合物包含:a)融合多肽,所述融合多肽包含式(I)的氨基酸序列:VH2-CH1b-连接子-VL1-CH1a;b)第二多肽,所述第二多肽包含式(II)的氨基酸序列:VH1-CLa;c)第三多肽,所述第三多肽包含式(III)的氨基酸序列:VH2-CH1b;d)第四多肽和第五多肽,所述第四多肽和所述第五多肽各自包含式(IV)的氨基酸序列:VL2-CLb。

[0289] 在本文所提供的多肽复合物的某些实施方式中,CH1_a包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列,CLa包含SEQ ID NO:106的氨基酸序列,CH1_b包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列,CLb包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列。

[0290] 在某些实施方式中,VH1包含分别包括SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:114和SEQ ID NO:115的氨基酸序列的重链CDR1/CDR2/CDR3,和/或VL1包含分别包括SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117和SEQ ID NO:118的氨基酸序列的轻链CDR1/CDR2/CDR3。在某些实施方式中,VH2包含分别包括SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:108和SEQ ID NO:109的氨基酸序列的重链CDR1/CDR2/CDR3,和/或VL2包含分别包括SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:111和SEQ ID NO:112的氨基酸序列的轻链CDR1/CDR2/CDR3。

[0291] 在本文所提供的多肽复合物的某些实施方式中,VH1包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列,VL1包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列,VH2包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列,VL2包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列。在某些实施方式中,第一Fc和第二Fc包含SEQ ID NO:69和84的氨基酸序列。在这些实施方式中的某些实施方式中,融合多肽、第二多肽、第三多肽、第四多肽分别包含SEQ ID NO:62、61、63和64的氨基酸序列。这种多肽复合物也被称为抗CD20 x CD3 FORMAT NEW8。

[0292] VI. 多核苷酸和重组方法

[0293] 本公开提供了一种核酸,其包含编码本文所提供的融合多肽或多肽复合物的核苷酸序列。如本文所使用的,术语“核酸”或“核苷酸序列”是指单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)和其聚合物。除非另外指出,否则特定多核苷酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如,简并密码子取代)、等位基因、直系同源物、SNP和互补序列以及明确指出的序列。具体地,简并密码子取代可以通过产生其中一个或多个选定(或全部)密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现(参见Batzer等人,《核酸研究(Nucleic Acid Res.)》19:5081(1991);Ohtsuka等人,《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》260:2605-2608(1985);以及Rossolini等人,《分子细胞探针(Mol.Cell.Probes)》8:91-98(1994))。

[0294] 编码本文所公开的多肽复合物的多核苷酸可以使用本领域已知的方法产生。在某些实施方式中,多核苷酸的序列可以基于多肽复合物的氨基酸序列获得,并且核酸可以使

用合成方法产生。可替代地,本文所提供的多核苷酸也可以从另一种可获得的核酸获得,所述核酸编码具有与本文所公开的多肽复合物中的多肽同源的序列的多肽。然后可以应用DNA操作过程来操作亲本抗体编码核酸的序列,如引入突变、插入、缺失等,以获得编码本文所公开的多肽复合物的核酸。

[0295] 可以使用本领域已知的重组技术将编码融合多肽或多肽复合物的核苷酸序列插入到一个或多个载体中,以供进一步克隆(扩增DNA)或表达。许多载体是可用的。载体组成通常包括但不限于以下中的一种或多种:信号序列、复制起点、一种或多种标志物基因、增强子元件、启动子(例如,SV40、CMV、EF-1 α)、转录终止序列和一个或多个其它调节元件。

[0296] 本公开提供了包含本文所提供的核酸的载体。在某些实施方式中,本文所提供的核酸编码抗体,其中至少一种启动子(例如,SV40、CMV、EF-1 α)与核酸序列可操作地连接,以及至少一种选择标志物。载体的实例包括但不限于逆转录病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(例如,单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳多空病毒(例如,SV40)、 λ 噬菌体和M13噬菌体、质粒pcDNA3.3、pMD18-T、pOptivec、pCMV、pEGFP、pIRES、pQD-Hyg-GSeu、pALTER、pBAD、pcDNA、pCal、pL、pET、pGEMEX、pGEX、pCI、pEGFT、pSV2、pFUSE、pVITRO、pVIVO、pMAL、pMONO、pSELECT、pUNO、pDUO、Psg5L、pBABE、pWPXL、pBI、p15TV-L、pPro18、pTD、pRS10、pLexA、pACT2.2、pCMV-SCRIPT.RTM.、pCDM8、pCDNA1.1/amp、pcDNA3.1、pRc/RSV、PCR 2.1、pEF-1、pFB、pSG5、pXT1、pCDEF3、pSVSPORT、pEF-Bos等。

[0297] 可以将包含编码融合多肽或多肽复合物的核苷酸序列的载体引入到宿主细胞以进行克隆或基因表达。用于克隆或表达本文载体中的DNA的合适宿主细胞是上述原核细胞、酵母细胞或高等真核细胞。用于此目的的合适的原核细胞包括真细菌,如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体,例如肠杆菌科(Enterobacteriaceae),如埃希氏杆菌属(*Escherichia*) (例如,大肠杆菌)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、变形杆菌属(*Proteus*)、沙门氏菌属(*Salmonella*) (例如,鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*))、沙雷氏菌属(*Serratia*) (例如,粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)) 和志贺氏菌属(*Shigella*) 以及芽孢杆菌属(*Bacilli*),如枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) 和地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*),如铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*) 以及链霉菌属(*Streptomyces*)。

[0298] 除了原核细胞之外,如丝状真菌或酵母等真核微生物也是编码多肽复合物的载体的合适的克隆或表达宿主。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或普通面包酵母是低等真核宿主微生物中最常用的。然而,许多其它属、物种和菌株都比较常用且在本文中适用,如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*);克鲁维酵母菌属宿主(*Kluyveromyces* host),例如,乳酸克鲁维酵母(*K. lactis*)、脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis*) (ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母(*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)、魏氏克鲁维酵母(*K. wickerhamii*) (ATCC 24,178)、克鲁维酵母(*K. waltii*) (ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母(*K. drosophilum*) (ATCC 36,906)、耐热克鲁维酵母(*K. thermotolerans*) 和马克斯克鲁维酵母(*K. marxianus*);耶氏酵母属(*Yarrowia*) (EP 402,226);巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*) (EP 183,070);念珠菌属;里氏木霉(*Trichoderma reesia*) (EP 244,234);粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*);许旺酵母属(*Schwanniomyces*),如西方许旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*);以及丝状真菌,例如,脉孢菌(*Neurospora*)、青霉菌属

(*Penicillium*)、弯颈霉属(*Tolypocladium*)和曲霉菌属宿主,如构巢曲霉(*A.nidulans*)和黑曲霉菌。

[0299] 用于表达本文所提供的糖基化多肽复合物的合适宿主细胞源自多细胞生物。无脊椎细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已鉴定多种杆状病毒株和变体以及对应的许可性昆虫宿主细胞,所述许可性昆虫宿主细胞来自于如以下等宿主:草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) (毛虫)、埃及斑蚊(*Aedes aegypti*) (蚊子)、白纹伊蚊(*Aedes albopictus*) (蚊子)、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*) (果蝇)和家蚕(*Bombyx mori*)。多种用于转染的病毒株为公众可得,例如苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*) NPV的L-1变体以及家蚕NPV的Bm-5菌株,并且此类病毒都可以根据本发明用作本文的病毒,特别是用于转染草地夜蛾细胞。棉花、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、番茄和烟草的植物细胞培养物也可以用作宿主。

[0300] 然而,最关注的是脊椎动物细胞,并且脊椎动物细胞在培养物(组织培养物)中的繁殖已成为常规程序。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例是由SV40(COS-7, ATCC CRL 1651)转化的猴肾CV1系;人胚胎肾系(针对悬浮培养物中的生长亚克隆的293或293细胞, Graham等人,《普通病毒学杂志(J.Gen.Virol.)》36:59(1977));小仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO, Urlaub等人,《美国国家科学院院刊》77:4216(1980));小鼠支持细胞(TM4, Mather,《生殖生物学(Biol.Reprod.)》,23:243-251(1980));猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587);人宫颈肿瘤细胞(HELA, ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL 34);布法罗大鼠肝细胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138, ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2, HB 8065);鼠类乳腺肿瘤(MMT 060562, ATCC CCL51);TRI细胞(Mather等人,《纽约科学院年鉴(Annals N.Y.Acad.Sci.)》383:44-68(1982));MRC 5细胞;FS4细胞;以及人肝癌系(Hep G2)。在一些实施方式中,宿主细胞是哺乳动物培养的细胞系,如CHO、BHK、NS0、293和其衍生物。

[0301] 用上述用于抗体产生的表达或克隆载体转化宿主细胞,并将所述宿主细胞在常规营养培养基中培养,所述常规营养培养基被改性成适于诱导启动子、选择转化子或扩增编码期望序列的基因。在另一个实施方式中,抗体可以通过本领域中已知的同源重组产生。在某些实施方式中,宿主细胞能够产生本文所提供的融合多肽或多肽复合物。

[0302] 本公开还提供了一种表达本文所提供的融合多肽或多肽复合物的方法,所述方法包括在表达本公开的载体的条件下培养本文所提供的宿主细胞。用于产生本文所提供的抗体的宿主细胞可以在多种培养基中培养。可商购获得的培养基如Ham's F10(西格玛公司(Sigma))、最低必需培养基(Minimal Essential Medium, MEM)(西格玛公司)、RPMI-1640(西格玛公司)和杜氏改良伊氏培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)(西格玛公司)适用于培养宿主细胞。另外,在以下文献中描述的任何培养基都可以用作宿主细胞的培养基:Ham等人,《酶学方法》58:44(1979);Barnes等人,《分析生物化学(Anal.Biochem.)》102:255(1980);美国专利第4,767,704号;第4,657,866号;第4,927,762号;第4,560,655号;或第5,122,469号;WO 90/03430;WO 87/00195;或美国专利复审程序30,985。任何这些培养基都可以根据需要补充激素和/或其它生长因子(如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐(如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲液(如HEPES)、核苷酸(如腺苷和胸苷)、抗生素(如GENTAMYCINTM药物)、微量元素(定义为最终浓度通常在微摩尔范围内的无机化合物)和葡萄糖或等效能量源。也可以以本领域技术人员已知的适当浓度包括任何

其它必要的补充物。如温度、pH等培养条件是先前与被选定用于表达的宿主细胞一起使用的那些条件,并且对于本领域技术人员而言将是显而易见的。

[0303] 当使用重组技术时,融合多肽或多肽复合物可以在胞内、周质间隙中产生,或者直接分泌到培养基中。如果在胞内产生融合多肽或多肽复合物,那么作为第一步骤,可以例如通过离心或超滤来去除宿主细胞或溶解的片段的微粒状碎片。Carter等人,《生物/技术(Bio/Technology)》10:163-167(1992)描述了用于分离分泌到大肠杆菌的周质间隙的抗体的程序。简言之,将细胞糊状物在乙酸钠(pH 3.5)、EDTA和苯甲基磺酰氟(PMSF)的存在下解冻约30分钟。细胞碎片可通过离心去除。在融合多肽或多肽复合物被分泌到培养基中的情况下,通常首先使用可商购获得的蛋白质浓缩过滤器(例如,Amicon或Millipore Pellicon超滤单元)对来自此类表达系统的上清液进行浓缩。如PMSF等蛋白酶抑制剂可以被包括在任何前述步骤中以抑制蛋白水解,并且可以包括抗生素以防止外来污染物的生长。

[0304] 由细胞制备的融合多肽或多肽复合物可以使用例如羟基磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析、DEAE-纤维素离子交换色谱法、硫酸铵沉淀、盐析和亲和色谱法来纯化,其中亲和色谱法是优选的纯化技术。

[0305] 在某些实施方式中,固定在固相上的蛋白质A用于融合多肽或多肽复合物的免疫亲和纯化。蛋白质A作为亲和配体的适合性取决于多肽复合物中存在的任何免疫球蛋白Fc结构域的种类和同型。蛋白质A可以用于纯化基于人 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链的抗体(Lindmark等人,《免疫学方法杂志(J. Immunol. Meth.)》62:1-13(1983))。蛋白质G被推荐用于所有小鼠同种型和人 $\gamma 3$ (Guss等人,《欧洲分子生物学学会杂志(EMBO J.)》5:1567-1575(1986))。亲和配体附着的基质最常为琼脂糖,但其它基质也是可用的。与可以用琼脂糖实现的流速和处理时间相比,机械稳定的基质如可控孔度玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯可实现更快的流速和更短的处理时间。在多肽复合物包含CH3结构域的情况下,Bakerbond ABXTM树脂(新泽西州菲利普斯堡马林克罗特贝克有限公司(J.T.Baker,Phillipsburg,N.J.)可用于纯化。根据要回收的抗体,用于蛋白质纯化的其它技术也是可用的,如在离子交换柱上进行分级分离、乙醇沉淀、反相HPLC、在二氧化硅上进行色谱法、在肝素SEPHAROSETM上进行色谱法、在阴离子或阳离子交换树脂(如聚天冬氨酸柱)上进行色谱法、色谱聚焦、SDS-PAGE以及硫酸铵沉淀。

[0306] 在任何初步纯化步骤之后,包含融合多肽或感兴趣的多肽复合物以及污染物的混合物可以使用pH介于约2.5-4.5之间的洗脱缓冲液进行低pH疏水相互作用层析,优选地在低盐浓度(例如,约0-0.25M盐)下进行。

[0307] VII. 药物组合物

[0308] 本发明进一步提供了一种药物组合物,其包含本文所描述的多肽复合物以及药学上可接受的载剂。

[0309] 如本文所使用的,术语“药学上可接受的”表示指定的载剂、媒剂、稀释剂、赋形剂、盐和/或介质通常与其它成分在化学和/或生理学上相容,如包含调配物的活性成分(即,多肽复合物或异二聚体抗体或其抗原结合片段),并且与接受药物组合物的受试者生理相容。

[0310] “药学上可接受的载剂”是指药物调配物中除了活性成分以外的生物活性可接受且对受试者无毒的成分。在本公开的上下文中,用于本文所公开的药物组合物的药学上可接受的载剂可以包括例如药学上可接受的液体、凝胶或固体载体、水性媒剂、非水性媒剂、

抗微生物剂、等渗剂、缓冲液、抗氧化剂、麻醉剂、悬浮剂/分配剂、多价螯合剂或螯合剂、稀释剂、佐剂、赋形剂或无毒辅助物质、本领域已知的其它组分或其各种组合。

[0311] 在本文中,合适的“组分”可以包括例如抗氧化剂、填料、粘结剂、崩解剂、缓冲液、防腐剂、润滑剂、调味剂、增稠剂、着色剂、乳化剂或稳定剂,如糖和环糊精。合适的“抗氧化剂”可以包括例如甲硫氨酸、抗坏血酸、EDTA、硫代硫酸钠、铂、过氧化氢酶、柠檬酸、半胱氨酸、硫代甘油、巯基乙酸、硫代山梨糖醇、丁基化羟基苯甲醚(butylated hydroxyanisole)、丁基化羟基甲苯(butylated hydroxytoluene)和/或没食子酸丙酯。如本文所公开的,在本文所提供的药物组合物中包含一种或多种抗氧化剂(如蛋氨酸)减少多肽复合物或异二聚体抗体或其抗原结合片段的氧化。这种氧化的减少防止或减少了结合亲和力的损失,从而提高了蛋白质的稳定性并最大限度地延长了保存期。因此,在某些实施方式中,提供了一种药物组合物,所述药物组合物除了活性成分(即,本文所公开的多肽复合物或异二聚体抗体或其抗原结合片段)之外还包含一种或多种如甲硫氨酸等抗氧化剂。

[0312] 药学上可接受的载剂可以包括例如水性媒剂,如氯化钠注射液、林格氏注射液(Ringer's injection)、等渗右旋糖注射液、无菌水注射液或右旋糖和乳酸林格氏注射液;非水性媒剂,如植物来源的固定油、棉籽油、玉米油、芝麻油或花生油、细菌抑制或真菌抑制浓度下的抗微生物剂、等渗剂如氯化钠或右旋糖、缓冲剂如磷酸盐或柠檬酸盐缓冲剂、抗氧化剂如硫酸氢钠、局部麻醉剂如盐酸普鲁卡因、悬浮和分散剂如羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素或聚乙烯吡咯烷酮、乳化剂如聚山梨醇酯80(TWEEN-80)、多价螯合剂或螯合剂如EDTA(乙二胺四乙酸)或EGTA(乙二醇四乙酸)、乙醇、聚乙二醇、丙二醇、氢氧化钠、盐酸、柠檬酸或乳酸。可以将用作载剂的抗微生物剂添加到多剂量容器中的药物组合物中,所述抗微生物剂包括苯酚或甲酚、汞剂、苯甲醇、氯丁醇、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯、硫柳汞、苯扎氯铵和苄索氯铵。合适的赋形剂可以包括例如水、盐水、右旋糖、甘油或乙醇。合适的无毒辅助物质可以包括例如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂、稳定剂、溶解度增强剂或如乙酸钠、脱水山梨糖醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸盐或环糊精等药剂。

[0313] 药学上可接受的“稀释剂”可以包括盐水和水性缓冲溶液。

[0314] 药学上可接受的“佐剂”可以包括防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。通过上述灭菌程序以及通过包含各种抗菌剂和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸等),可以确保预防微生物的存在。可能还期望将等渗剂,如糖、氯化钠等,包含在这些组合物中。另外,通过包含延迟吸收的药剂(如单硬脂酸铝以及明胶)可以实现可注射药物形式的延长的吸收。

[0315] 药物组合物可以是液体溶液、悬浮液、乳液、丸剂、胶囊、片剂、缓释调配物或粉末。口服调配物可以包括标准载剂,如医药级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。

[0316] 在实施方式中,将药物组合物调配成可注射组合物。可注射的药物组合物可以以任何常规形式制备,例如液体溶液、悬浮液、乳液或适合于产生液体溶液、悬浮液或乳液的固体形式。注射用制剂可以包括准备注射的无菌和/或无热原溶液、准备在使用前与溶剂组合的无菌干燥可溶性产品,如冻干粉末,包括皮下注射片剂、准备注射的无菌悬浮液、准备在使用前与媒剂组合的无菌干燥不溶性产品以及无菌和/或无热原乳液。溶液可以是水性的或非水性的。

[0317] 在某些实施方式中,单位剂量肠胃外制剂被包装在安瓿、小瓶或带有针头的注射器中。正如本领域已知和实践的那样,所有用于肠胃外施用的制剂都应该是无菌且无热原的。

[0318] 在某些实施方式中,无菌冻干粉末是通过将如本文所公开的多肽复合物溶解于合适的溶剂中来制备。所述溶剂可以含有赋形剂,所述赋形剂可改善粉末或由粉末制备的重构溶液的稳定性或其它药理学组分。可以使用的赋形剂包括但不限于水、右旋糖、山梨糖醇、果糖、玉米糖浆、木糖醇、甘油、葡萄糖、蔗糖或其它合适的药剂。在一个实施方式中,溶剂可以包括为约中性pH的缓冲液,如柠檬酸盐、磷酸钠或磷酸钾或本领域技术人员已知的其它此类缓冲液。随后对溶液进行无菌过滤、随后在本领域技术人员已知的标准条件下冻干提供了令人期望的调配物。在一个实施方式中,将所得溶液分配到小瓶中以供冻干。每个小瓶可以含有单剂量或多剂量的多肽复合物、多肽复合物。小瓶过填充超出一次剂量或一组剂量所需的较少量(例如约10%)是可接受的,以便于精确地抽取样品并精确地给药。冻干粉末可以在适当的条件下储存,如在约4°C到室温下储存。

[0319] 用注射用水重构冻干粉末提供了用于肠胃外施用的调配物。在一个实施方式中,为了重构,将无菌和/或无热原水或其它合适的液体载剂添加到冻干粉末中。精确的量取决于给予的所选疗法并且可以根据经验确定。

[0320] 在某些实施方式中,进一步提供了一种组合物,所述组合物包含药学上可接受的载剂、稀释剂或佐剂以及活性成分。活性成分可以是本文所公开的多肽复合物或本文所公开的多肽复合物的缀合物。

[0321] VIII. 缀合物

[0322] 如本文所提供的多肽复合物可以以非缀合形式或缀合形式使用。

[0323] 在缀合形式中,多肽复合物与一种或多种期望的缀合物部分(即,异源部分)缀合,以实现某些功能,例如促进靶标检测或用于成像或疗法。

[0324] 在本文,本公开提供了一种缀合物,其包含本文所提供的多肽复合物以及与其缀合的缀合物部分(例如,有效载荷)。所述有效载荷可以由以下组成的组中的任何一种:放射性标记、荧光标记、酶-底物标记、亲和纯化标签、示踪分子、抗癌药物和细胞毒性分子。

[0325] 各种缀合物可以通过共价结合、亲和结合、嵌入、配位结合、络合、缔合、共混或添加等与本文所提供的多肽复合物连接(参见例如,“缀合物疫苗(Conjugate Vaccines)”,《对微生物学和免疫学的贡献(Contributions to Microbiology and Immunology)》,J.M.Cruse和R.E.Lewis,Jr.(编辑),纽约卡格出版社(Carger Press,New York),(1989))。

[0326] 在某些实施方式中,本文所提供的多肽复合物可以被工程化成在表位结合部分之外包含特定的位点,所述位点可以具体地用于与一个或多个缀合物结合。例如,此类位点可以包括一个或多个反应性氨基酸残基,例如半胱氨酸或组氨酸残基,以促进与缀合物共价连接。

[0327] 在某些实施方式中,本文所提供的多肽复合物的N末端和/或C末端还可以用于提供用于缀合的反应性基团。例如,N末端可以与一部分(例如,聚乙二醇(PEG)等)缀合,并且C末端可以与另一部分(例如,生物素等)缀合。

[0328] 在某些实施方式中,本文所提供的多肽复合物可以与缀合物直接连接,或例如通过另一种缀合物或通过连接子与缀合物间接连接。

[0329] 例如,本文所提供的具有反应性残基(如半胱氨酸)的多肽复合物可以与硫醇反应性试剂连接,其中反应性基团是例如马来酰亚胺、碘乙酰胺、吡啶基二硫化物或其它硫醇反应性缀合配体(Haugland,2003,《分子探针公司荧光探针与研究化合物手册(Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals)》,分子探针公司(Molecular Probes,Inc.);Brinkley,1992,《生物缀合化学(Bioconjugate Chem.)》3:2;Garman,1997,《非放射性标记:实践方法(Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach)》,伦敦学术出版社(Academic Press,London);Means(1990)《生物缀合化学》1:2;Hermanson,G.《生物缀合技术(Bioconjugate Techniques)》(1996)圣地亚哥学术出版社,第40-55,643-671页)。

[0330] 又例如,本文所提供的多肽复合物可以与生物素缀合,然后与第二缀合物间接缀合,所述第二缀合物与抗生物素蛋白缀合。再例如,多肽复合物可以与连接子连接,所述连接子进一步与缀合物连接。连接子的实例包括双官能偶联剂,如N-丁二酰亚胺基-3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯(SPDP)、丁二酰亚胺基-4-(N-顺丁烯二酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(SMCC)、亚氨基硫杂环戊烷(IT)、亚氨基酯的双官能衍生物(如二亚胺代己二酸二甲酯HCl)、活性酯(如辛二酸二丁二酰亚胺酯)、醛(如戊二醛)、双叠氮基化合物(如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(如双-(对重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(如2,6-二异氰酸甲苯酯)以及双活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。特别优选的偶联剂包括N-丁二酰亚胺基-3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯(SPDP)(Carlsson等人,《生物化学杂志(Biochem.J.)》173:723-737(1978))和N-丁二酰亚胺基-4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(SPP)以提供二硫键。

[0331] 在某些实施方式中,所述缀合物部分包含用于检测或分离的药剂,如清除调节剂、化学治疗剂、毒素、放射性同位素、镧系元素、发光标记、荧光标记、酶-底物标记、DNA烷化剂、拓扑异构酶抑制剂、微管蛋白结合剂或其它抗癌药物。

[0332] 缀合物部分可以是可检测标记、药代动力学修饰部分、纯化部分、细胞毒性部分或治疗剂。可检测标记的实例可以包括荧光标记(例如,荧光素、罗丹明、丹酰、藻赤素或德克萨斯红)、酶-底物标记(例如,辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、荧光素酶、葡萄糖淀粉酶、溶菌酶、糖类氧化酶或 β -D-半乳糖苷酶)、放射性同位素(例如, ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 、 ^{111}In 、 ^{112}In 、 ^{14}C 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{86}Y 、 ^{88}Y 、 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、 ^{211}At 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi 和 ^{32}P 、其它镧系元素、发光标记)、发色团部分、地高辛、生物素/亲和素、DNA分子或金以供检测。

[0333] 在某些实施方式中,缀合物部分可以是药代动力学修饰部分,如帮助增加抗体半衰期的PEG。其它合适的聚合物包括如羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、乙二醇/丙二醇的共聚物等。聚合物可以具有任何分子量,并且可以是支链的或非支链的。与抗体连接的聚合物的数量可以变化,并且如果连接多于一种聚合物,则聚合物可以是相同或不同的分子。在某些实施方式中,缀合物可以是纯化部分,如磁珠。

[0334] 在某些实施方式中,缀合物部分可以是细胞毒性部分。“细胞毒性部分”可以是对细胞有害或可以损伤或杀死细胞的任何药剂。细胞毒性部分的实例包括但不限于紫杉醇、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenoposide)、长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、秋水仙碱(colchicin)、阿霉素(doxorubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、二羧基蒽醌二酮(dihydroxy anthracin

dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光辉霉素(mithramycin)、放线菌素D(actinomycin D)、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因(procaine)、丁卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛尔(propranolol)、嘌呤霉素(puromycin)及其类似物、抗代谢物(例如,甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪)、烷化剂(例如,氮芥、塞替派苯丁酸氮芥(thioepa chlorambucil)、美法仑(melphalan)、卡莫司汀(carmustine)(BSNU)和洛莫司汀(lomustine)(CCNU)、环磷酰胺、白消安(busulfan)、二溴甘露醇、链脲霉素(streptozotocin)、丝裂霉素C(mitomycin C)和二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环霉素(anthracycline)(例如,柔红霉素(以前的道诺霉素(daunomycin)和阿霉素)、抗生素(例如,更生霉素(dactinomycin)(以前的放线菌素)、博来霉素(bleomycin)、光神霉素和氨茴霉素(anthramycin)(AMC))和抗有丝分裂剂(例如,长春新碱和长春碱)。在一些实施方式中,缀合物部分包含酶活性毒素或其片段,包括但不限于白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素A链、相思子毒素A链、莫迪素A链(modeccin Achain)、 α -八叠球菌(α -sarcin)、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、康乃馨蛋白、洋商陆(*Phytolaca americana*)蛋白、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂、麻疯树毒蛋白(curcin)、巴豆毒素(croton)、肥皂草(*Saponaire officinalis*)抑制剂、白树素(gelonin)、有丝分裂素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、伊诺霉素(enomycin)和新月毒素。

[0335] 用于将缀合物部分与蛋白质如抗体、免疫球蛋白或其片段缀合的方法发现于例如美国专利第5,208,020号;美国专利第6,441,163号;WO 2005037992;WO 2005081711;以及WO2006/034488中,所述文献通过引用整体并入本文。

[0336] 在某些实施方式中,本文所提供的多肽复合物用作缀合物的基础。

[0337] IX.组合物

[0338] 另一方面,本发明提供了一种组合物,其包含本文所描述的多肽复合物或缀合物,以及药学上可接受的载剂。

[0339] X.医疗用途

[0340] 另一方面,本发明提供了一种用于治疗需要此类治疗的受试者中的疾病病状的方法,所述方法包括:向所述受试者施用治疗有效量的本发明的多肽复合物、本文所描述的药物组合物、本文所描述的缀合物或本文所描述的组合物。

[0341] 如本文所使用的,术语“受试者”或“个体”或“动物”或“患者”是指需要诊断、预后、改善、预防和/或治疗疾病或病症的人或非人动物,包括哺乳动物或灵长类动物。哺乳动物受试者包括人、家畜、农畜,以及动物园、体育或玩赏动物,如狗、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、猪、牛、熊等。在某些实施方式中,所述受试者是人。

[0342] 如本文所使用的,病状的“治疗”可以包括:缓解病状、减缓病状的发作或发展速率、延缓与病状相关的症状的发展、减轻或结束与病状相关的症状、产生病状的完全或部分消退或其一些组合。

[0343] 如本文所使用的,术语“病症”、“疾病”、“病状”等是指影响仍会受益于多肽复合物的治疗的受试者的病状。

[0344] 如本文所使用的,术语治疗剂的“治疗有效量”是指当受试者以适当的方式服用时可以对受试者产生足够的治疗作用的治疗剂的量。应当理解,正如其它治疗药物一样,如上

文所提供的多肽复合物的治疗有效量将受到本领域已知的各种因素的影响,例如受试者的体重、年龄、既往病史、目前的药物治疗、健康状况和交叉反应的可能性、过敏、敏感性和不良副作用,以及施用途和疾病发展的程度。本领域普通技术人员(例如医生或兽医)可如这些和其它情况或要求所指示按比例减少或增加剂量。

[0345] 在某些实施方式中,如本文所提供的多肽复合物可以以约0.01mg/kg至约100mg/kg的治疗有效量施用。可以调整剂量方案以提供最佳的期望应答(例如,治疗应答)。例如,可以施用单次剂量,或可以随时间推移施用若干分次剂量。

[0346] 上文所描述的多肽复合物和本文所公开的方法可以用于治疗多种疾病。在人以及其它灵长类动物中,考虑可通过上文所描述的多肽复合物和本文所公开的方法治疗的疾病可以包括以下:

[0347] (1) 癌症和其它过度增殖性病症,包括良性或恶性肿瘤、白血病和淋巴恶性肿瘤。根据患有癌症或过度增殖性病症的细胞类型,实例包括神经元、神经胶质、星形细胞、下丘脑、腺体、巨噬细胞、上皮、内皮和间质恶性肿瘤。根据患有癌症或过度增殖性病症的器官/位置,实例包括:头癌、颈癌、眼癌、口腔癌、喉癌、食道癌、胸部癌、皮肤癌、骨癌、肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、胃癌、脾癌、肾癌、骨骼肌癌、皮下组织癌、转移性黑色素瘤、子宫内膜癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、睾丸癌、甲状腺癌、血液癌、淋巴结癌、肾癌、肝癌、胰腺癌、脑癌或中枢神经系统癌;

[0348] (2) 自身免疫性和/或炎性病症,包括斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性艾迪生氏病(autoimmune Addison's disease)、肾上腺自身免疫性疾病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性卵巢炎和睾丸炎、干燥综合征(Sjogren's syndrome)、牛皮癣、动脉粥样硬化、糖尿病和其它视网膜病变、晶状体后纤维增生、年龄相关性黄斑变性、新生血管性青光眼、血管瘤、甲状腺增生(包括格雷夫氏病(Grave's disease))、角膜和其它组织移植以及慢性炎症、败血症、类风湿性关节炎、腹膜炎、克罗恩氏病(Crohn's disease)、再灌注损伤、败血病、内毒素性休克、囊性纤维化、心内膜炎、牛皮癣、关节炎(例如银屑病关节炎)、过敏性休克、器官缺血、再灌注损伤、脊髓损伤和同种异体移植排斥、自身免疫性血小板减少症、白塞氏病(Behcet's disease)、大疱性类天疱疮、心肌病、口炎性腹泻-皮炎、慢性疲劳免疫功能障碍综合征(CFIDS)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、查格-施特劳斯综合征(Churg-Strauss syndrome)、瘢痕类天疱疮、CREST综合征、冷凝集素病、盘状狼疮、原发性混合冷球蛋白血症、纤维肌痛-纤维肌炎、肾小球肾炎、格林-巴利(Guillain-Barre)、桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、IgA神经病、幼年关节炎、扁平苔藓、红斑狼疮、梅尼埃病(Meniere's disease)、混合结缔组织病、多发性硬化症、1型或免疫介导的糖尿病、重症肌无力、寻常型天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛、多发性肌炎和皮肌炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、银屑病、银屑病关节炎、雷诺氏现象(Raynaud's phenomenon)、莱特尔氏综合征(Reiter's syndrome)、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病、干燥综合征、僵人综合征、系统性红斑狼疮、红斑狼疮、高血压性动脉炎、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎如疱疹样皮炎血管炎、白癜风和韦格纳氏肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)。炎性病症可以进一步包括但不限于哮喘、脑炎、炎性肠病、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、过敏性病症、败血性休克、肺纤

维化、未分化脊柱关节病、未分化关节病、关节炎、炎性骨质溶解以及慢性病毒或细菌感染引起的慢性炎症；

[0349] (3) 传染病和寄生虫病,如由病毒引起的那些(例如HBV、HCV、HIV、RSV、hMPV、PIV、冠状病毒或流感病毒等)、真菌(例如,纳氏虫属(Naegleria)、曲霉属(Aspergillus)、芽生菌属(Blastomyces)、组织胞浆菌属(Histoplasma)、假丝酵母属(Candida)或癣属(Tinea)等)、真核微生物(贾第虫属(Giardia)、弓形虫属(Toxoplasma)、疟原虫属(Plasmodium)、锥体虫属(Trypanosoma)和内阿米巴属(Entamoeba)等)以及细菌(葡萄球菌属(Staphylococcus)、链球菌属(Streptococcus)、假单胞菌属(Pseudomonas)、梭菌属(Clostridium)、包柔氏螺旋体属(Borrelia)、弧菌属(Vibro)和奈瑟氏菌属(Neisseria)等)；

[0350] (4) 其它疾病或病症,包括上述(1) - (3)中的任一项未涵盖的那些疾病或病症,如心血管疾病、神经病、神经精神病状、损伤或凝血障碍等。

[0351] 在一些实施方式中,所述疾病选自由以下组成的组:癌症、炎性疾病、感染性或寄生虫性疾病、心血管疾病、眼病、中枢神经系统(CNS)疾病、损伤、代谢性疾病、自身免疫性疾病或凝血障碍。在一些实施方式中,所述CNS疾病是神经病变、神经精神病状、神经母细胞瘤、胶质母细胞瘤或阿尔茨海默病。

[0352] 本文所公开的多肽复合物可以通过本领域已知的任何途径施用,例如,肠胃外(例如,皮下、腹膜内、静脉内,包括静脉内输注、肌肉或皮内注射)或非肠胃外(例如,口服、鼻内、眼内、舌下、直肠或局部)途径。

[0353] 在一些实施方式中,本文所公开的多肽复合物可以单独施用或与一种或多种另外治疗手段或药剂组合施用。例如,本文所公开的多肽复合物可以与另一种治疗剂,例如化学治疗剂或抗癌药物组合施用。

[0354] 在这些实施方式中的某些实施方式中,与一种或多种另外的治疗剂组合施用的如本文所公开的多肽复合物可以与所述一种或多种另外的治疗剂同时施用,并且在这些实施方式中的某些实施方式中,多肽复合物和另外的治疗剂可以作为同一药物组合物的一部分施用。然而,与另一种治疗剂“组合”施用的多肽复合物不必与所述药剂同时施用或不与与所述药剂在同一组合物中施用。在本文使用短语“组合”时,在另一药剂之前或之后施用的多肽复合物视为与所述药剂“组合”施用,即使多肽复合物和第二药剂通过不同途径使用。在可能的情况下,与本文所公开的多肽复合物组合施用的另外的治疗剂根据另外的治疗剂的产品信息表中列出的时间表或根据医生桌上参考手册2003(《医生桌上参考手册(Physicians' Desk Reference)》,第57版;医疗经济学公司(Medical Economics Company);ISBN:1563634457第57版(2002年11月))或本领域众所周知的方案施用。

[0355] XI. 抗原检测方法

[0356] 另一方面,本公开提供了一种检测样品中的抗原的存在或量的方法。在一些实施方式中,所述方法包括:使怀疑含有所述抗原的样品与本文所描述的多肽复合物接触;以及确定在所述抗原与所述多肽复合物之间形成复合物。在一些实施方式中,抗原是疾病相关抗原,例如肿瘤相关抗原。在某些实施方式中,本文所公开的多肽复合物用于诊断患有疾病(例如,癌症)的受试者的方法中,所述方法包括:通过将样品与本公开的多肽复合物接触并检测抗原结合的多肽复合物的存在来确定从受试者获得的样品中的疾病相关(例如,肿瘤

相关) 抗原的存在或量。

[0357] 可以使用任何怀疑含有肿瘤相关抗原的样品,如生物流体,如血液样品、血浆样品、尿液样品等,以及疾病组织(例如,肿瘤组织)的活检。

[0358] 样品中疾病相关(例如,肿瘤相关)抗原的存在或水平可以基于检测由本文所公开的多肽复合物或其抗原结合片段结合的疾病相关(例如,肿瘤相关)抗原的复合物的存在或水平来确定。任何合适的方法可以用于此类检测,例如,通过免疫测定,如免疫组织化学(IHC)、免疫荧光(IF)、免疫印迹(例如,蛋白质印迹)、流式细胞术(例如,15FACSTM)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、酶免疫测定(EIA)和放射免疫测定(RIA)。

[0359] 有关免疫学和免疫测定程序的综述,参见《基础免疫学和临床免疫学(Basic and Clinical Immunology)》(Stites和Terr编辑,第7版1991)。此外,免疫测定可以以若干种构型中的任一种进行,这些构型在《酶免疫测定(Enzyme Immunoassay)》(Maggio编辑1980);以及Harlow和Lane,同上中进行了广泛综述。关于一般免疫测定的综述,参见《细胞生物学方法:细胞生物学中的抗体(Methods in Cell Biology:Antibodies in Cell Biology)》,第37卷(Asai编辑1993);《基础免疫学和临床免疫学》(Stites和Terr编辑,第7版1991)。

[0360] 在某些实施方式中,本文所公开的多肽复合物被缀合的有效载荷可检测地标记,或者未被标记但可以与被可检测地标记的第二分子(例如,可检测地标记的次级抗体)反应。

[0361] 在某些实施方式中,本文所公开的多肽复合物可以固定在固体基质上。固定可以通过共价连接或非共价连接(例如,涂覆)进行。固体基质的实例包括多孔和无孔材料、乳胶颗粒、磁性颗粒、微粒、条带、珠粒、膜、微量滴定孔和塑料管。对可检测地标记的固相材料和方法的选择可以基于期望的测定形式性能特性来确定。

[0362] 抗原的水平可以例如通过相对于控制值或标准曲线归一化来确定。对照值可以预先确定或同时确定。

[0363] 本文所提供的用于测量抗原的水平的测定和方法可以被适配或优化用于自动化和半自动化系统或护理点测定系统。

[0364] 提供以下实施例以更好地说明所要求保护的发明,而不应理解为限制本发明的范围。下文描述的所有具体组合物、材料和方法全部或部分地落入本发明的范围内。这些具体组合物、材料和方法不旨在限制本发明,而仅用于说明落入本发明的范围内的具体实施方式。本领域技术人员可以在不运用发明能力和不脱离本发明的范围的情况下开发等效的组合物、材料和方法。应理解,可以在本文描述的程序中做出许多变化,同时仍然保持在本发明的界限内。本发明的发明人的意图是此类变化都包括在本发明的范围内。

[0365] 实施例:

[0366] 实施例1

[0367] 1.1抗体构建

[0368] 使用本发明中公开的新的2:1形式(即,在下文中指定为FORMAT NEW,并在图5A中示出)和本领域已知的现有2:1形式(即,在下文中指定为FORMAT EX,并在图4A中示出)构建双特异性抗体。为了证明FORMAT NEW相对于FORMAT EX的优势,构建并表达了8对双特异性抗体,除了使用FORMAT EX或使用FORMAT NEW之外,所述抗体在其它方面是相同的,从而允许两种形式的头对头比较。

[0369] FORMAT NEW和FORMAT EX两者均是IgG样双特异性抗体,其主要由源自两种单克隆抗体的三个Fab结构域构成,其中一个Fab结构域源自第一抗体,并且另外两个Fab结构域源自第二抗体(图4A和图5A)。第一抗体重链被命名为B1(包括VH1和CH1a),并且第一抗体轻链被命名为A1(包括VL1和CLa),其在双特异性抗体中是单价的。第二抗体重链被命名为B2(包括VH2和CH1b),并且第二抗体轻链被命名为A2(包括VL2+CLb),它们在双特异性抗体中是二价的。在双特异性抗体中使用连接子(GGGGS)₂来连接不同的功能结构域。

[0370] 选择分别靶向CD20和CD3的两种单克隆抗体来构建实施例中使用的双特异性抗体。在构建的说明性双特异性抗体中,抗CD20抗体被制成二价的(即,对应于图4A和图5A中的A2和B2),并且抗CD3是单价的(即,对应于图4A和图5A中的A1和B1)。在此实施例中使用的抗CD20抗体是2F2,并且先前已经在US20040167319中报告了。在此实施例中使用的抗CD3抗体是SP34,并且先前已在《欧洲分子生物学学会杂志》第4卷第2期第337-344页,1985中报告了。

[0371] 为了减少错配,分别在第一抗体和第二抗体的Fab区引入突变或交叉构型,并且细节如下表1所示。

[0372] 表1. 双特异性抗体中引入的突变或构型

[0373]

新形式	第一 Fab			第二 Fab		
	片段	VH1 或 VL1	CH1a 或 CLa	片段	VH2 或 VL2	CH1b 或 CLb
1	B1 (VH1-CH1 _a)	Q39E	yt65H(A141I:F170S:S181M:S183A:V185A)	B2 (VH2-CH1 _b)	Q39K	S183E
	A1 (VL1-CL _a)	Q38K	yt65L(F116A:L135V:S174A:S176F:T178V)	A2 (VL2-CL _b)	Q38E	V133K
2	B1 (VH1-CH1 _a)		F126C、C220V	B2 (VH2-CH1 _b)		
	A1 (VL1-CL _a)		S121C、C214V	A2 (VL2-CL _b)		
3	B1 (VH1-CH1 _a)	Q39K、Q105K	K147D	B2 (VH2-CH1 _b)	Q39D、Q105D	S183K
	A1 (VL1-CL _a)	Q38D、A43D	S176K	A2 (VL2-CL _b)	Q38K、A43K	S176D
4	B1 (VH1-CH1 _a)	62E、Q39K	H168A、F170G	B2 (VH2-CH1 _b)	Q39Y	
	A1 (VL1-CL _a)	D1R、Q38D	L135Y、S176W	A2 (VL2-CL _b)	Q38R	
5	B1 (VH1-TCR α)		TCR α	B2 (VH2-CH1 _b)		
	A1 (VH1-TCR β)		TCR β	A2 (VL2-CL _b)		
6	B1 (VL1-CH1 _a)	VL1		B2 (VH2-CH1 _b)	VH2	

	A1 (VH1-CL_{1a})	VH1		A2 (VL2-CL_b)	VL2	
[0374]	B1 (VH1-CH_{1a})		V173C、S183K、 C220S	B2 (VH2-CH_{1b})		
	A1 (VL1-CL_a)		Q160C、S176D、 C214S	A2 (VL2-CL_b)		
8	B1 (VH1-CL_a)		CL	B2 (VH2-CH_{1b})		CH1
	A1 (VL1-CH_{1a})		CH1	A2 (VL2-CL_b)		CL

[0375] 还在CH3区引入突变以促进第一Fc区和第二Fc区的异二聚化。具体地,CH3区中的一个引入了T366S、L368A和Y407V,而另一个引入了T366W突变。以下实施例CH3区的突变提供了双特异性抗体中的杵臼设计。

[0376] 基于上文指出的双特异性抗体结构(表1),通过使用本发明的新型2:1形式:FORMAT NEW(如图4A所示)和通过使用常规的2:1形式:FORMAT EX(如图5A所示),构建并表达了8对双特异性抗体。这8对双特异性抗体(即,总共16种双特异性抗体)被重组表达,并且分别被命名为FORMAT NEW1至FORMAT NEW8和FORMAT EX1至FORMAT EX8。对于每种抗体,每条多肽链的全长氨基酸序列如下所示,其中功能结构域使用如序列之下的注释所示的不同下划线标记。

[0377] FORMAT EX1

[0378] a) FORMAT EX1链2(AH):CD20HC+CD3HC(杵)SEQ ID No.:1

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRKAPGKGLEWVSTISWNSGSI
GYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNLSRAEDTALYYCAKDIOYGNYYYYGMDVWGQGT
TVTSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLESVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVREAPGKGLEWVGRIRSKYNN

[0379] IATYYADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYW
GQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAILGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTSPAVLQSSGLYMLASAVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0381] 注释:“_”:VH2(SEQ ID NO:65);“___”:CH1b(SEQ ID NO:66);“==”:VH1(SEQ ID NO:67);“____”:CH1a(SEQ ID NO:68);“__”:Fc(SEQ ID NO:69)

[0382] b) FORMAT EX1链1(AL):CD3 LC SEQ ID No.:2

- [0383] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSS**TGAVTTS**NYANWVQKKPGQAPRGLIG**GTN**KRAPW
TPARFSGSLLGGKAALTLGAQA**EDEADYYCALWYSNLW**VFGGGTKLTVLRTVAAPSVA
IFPPSDEQLKSGTASVVCVLNNFY**PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYAL**
FSVLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0384] 注释：“_”：VL1 (SEQ ID NO:70)；“___”：CLa (SEQ ID NO:71)
- [0385] c) FORMAT EX1链3 (BH)：CD20 HC (H) SEQ ID No.:3
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAAS**GFTFNDY**AMHWVRKAPGKGLEWVST**ISWNSGSI**
GYADSVKGRFTISRDN**AKKSLYLQMN**SLRAEDTALYYC**AKDIQYGNYYYYGMDV**WGQGT
TVT**VSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF**
AVLQSSGLYSLESVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN**RFTQKSLSLSPGK**
- [0386]
- [0387] 注释：“_”：VH2 (SEQ ID NO:65)；“___”：CH1b (SEQ ID NO:66)；“__”：Fc (SEQ ID NO:84)
- [0388] d) FORMAT EX1链4 (BL)：CD20 LC SEQ ID No.:4
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS**QSVSSYLAWYQEKPGQAPRLLIYDAS**NRATGIPARF
SGSGSGTDFTLT**ISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPIT**FGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVKCLLNNFY**PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA**
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0389]
- [0390] 注释：“_”：VL2 (SEQ ID NO:72)；“___”：CLb (SEQ ID NO:73)
- [0391] FORMAT NEW1
- [0392] a) FORMAT NEW1链2 (B1)：抗CD3重链 (杆) SEQ ID No.:5
- [0393] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSTY**AMNWVREAPGKGLEWVGR**IRSKYNNY**
ATYYADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMN**SLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWG**
QGT**LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAILGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH**
TSPAVLOSSGLYMLASAVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0394]
- [0395] 注释：“_”：VH1 (SEQ ID NO:67)；“___”：CH1_a (SEQ ID NO:68)；“__”：Fc (SEQ ID NO:69)
- [0396] b) FORMAT NEW1链1 (B2-A1)：抗CD20重链+抗CD3轻链 SEQ ID No.:6

[0397] EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRKAPGKGLEWVSTISWNSGSI
GYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIOYGNYYYGMDVWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLESVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGSGGGG
SQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKKPGQAPRGLIGTNKRAP
WTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLRTVAAPS
VAIFPPSDEQLKSGTASVVCVLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
ALFSVLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0398] 注释：“_”:VH2 (SEQ ID NO:65);“_____”:CH_{1b} (SEQ ID NO:66);“___”:VL1 (SEQ ID NO:70);“_____”:CL_a (SEQ ID NO:71)

[0399] c) FORMAT NEW1链3 (B2):抗CD20重链 (白) SEQ ID No.:7

[0400] EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRKAPGKGLEWVSTISWNSGSI
GYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIOYGNYYYGMDVWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLESVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL
TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

[0401] 注释：“_”:VH2 (SEQ ID NO:65);“_____”:CH_{1b} (SEQ ID NO:66);“___”:Fc (SEQ ID NO:84)

[0402] d) FORMAT NEW1链4 (A2):抗CD20轻链 SEQ ID No.:8

[0403] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQEKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQORSNWPITFGQGTREIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVKCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0404] 注释：“_”:“___”:VL2 (SEQ ID NO:72);“_____”:CL_b (SEQ ID NO:73)

[0405] FORMAT EX2

[0406] a) FORMAT EX2链2 (AH):CD20HC+CD3HC (杆) SEQ ID No.:9

[0407] EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSI
GYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIOYGNYYYYGMDVWGQGT
TVTSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNN
YATYYADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYW
GQGTLVTVSSASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSVDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0408] 注释：“_”：VH2 (SEQ ID NO:74)；“___”：CH_{1b} (SEQ ID NO:75)；“==”：VH1 (SEQ ID NO:76)；“_”：CH_{1a} (SEQ ID NO:77)；“__”：Fc (SEQ ID NO:69)

[0409] b) FORMAT EX2链1 (AL) :CD3 LC SEQ ID No.:10

[0410] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPW
TPARFSGSLLGGKAALTLSGAQAEDADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLRTVAAPSVE
IFPPCDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEV

[0411] 注释：“_”：VL1 (SEQ ID NO:78)；“___”：CL_a (SEQ ID NO:79)

[0412] c) FORMAT EX2链3 (BH) :CD20 HC (H) SEQ ID No.:11

[0413] EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSI
GYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIOYGNYYYYGMDVWGQGT
TVTSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKL
TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

[0415] 注释：“_”：VH2 (SEQ ID NO:74)；“___”：CH_{1b} (SEQ ID NO:75)；“__”：Fc (SEQ ID NO:84)

[0416] d) FORMAT EX2链4 (BL) :CD20 LC SEQ ID No.:12

[0417] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF
SGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0418] 注释：“_”：VL2 (SEQ ID NO:80)；“___”：CL_b (SEQ ID NO:81)

- [0419] FORMAT NEW2
- [0420] a) FORMAT NEW2链2(B1):抗CD3重链(杵)SEQ ID No.:13
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNY
ATYYADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWG
QGTLLTVSSASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSVDKTHTCPP
- [0421] CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0422] 注释:“_”:VH1(SEQ ID NO:76);“_____”:CH_{1a}(SEQ ID NO:77);“___”:Fc(SEQ ID NO:69)
- [0423] b) FORMAT NEW2链1(B2-A1):抗CD20重链+抗CD3轻链SEQ ID No.:14
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSI
- [0424] GYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGT
TVTSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGG
SQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAP
- [0425] WTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQAEDADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLRTVAAPS
VFIFPPCDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEV
- [0426] 注释:“_”:VH2(SEQ ID NO:74);“_____”:CH_{1b}(SEQ ID NO:75);“___”:VL1(SEQ ID NO:78);“_____”:CL_a(SEQ ID NO:79)
- [0427] c) FORMAT NEW2链3(B2):抗CD20重链(臼)SEQ ID No.:15
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSI
GYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGT
TVTSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
- [0428] PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK
- [0429] 注释:“_”:VH2(SEQ ID NO:74);“_____”:CH_{1b}(SEQ ID NO:75);“___”:Fc(SEQ ID NO:84)
- [0430] d) FORMAT NEW2链4(A2):抗CD20轻链SEQ ID No.:16

- [0431] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF
SGSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKA
DYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0432] 注释：“_”：VL2 (SEQ ID NO:80)；“_____”：CL_b (SEQ ID NO:81)
- [0433] FORMAT EX3
- [0434] a) FORMAT EX3链2 (AH)：CD20HC+CD3HC (杵) SEQ ID No.:17
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRDAPGKGLEWVSTISWNSGSI
GYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGDGT
TVTSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLKSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRKAPGKGLEWVGRIRSKYNN
YATYYADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYW
GKGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVDDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLOSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0436] 注释：“_”：VH2 (SEQ ID NO:86)；“_____”：CH1_b (SEQ ID NO:87)；“___”：VH1 (SEQ ID NO:85)；“___”：CH1_a (SEQ ID NO:88)；“___”：Fc (SEQ ID NO:69)
- [0438] b) FORMAT EX3链1 (AL)：CD3LC SEQ ID No.:18
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSSTGAVTTSNYANWVQDKPGQDPRGLIGGTNKR
APWTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQAEDADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLKSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0439] 注释：“_”：VL1 (SEQ ID NO:89)；“_____”：CL_a (SEQ ID NO:90)
- [0440] c) FORMAT EX3链3 (BH)：CD20HC (臼) SEQ ID No.:19
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRDAPGKGLEWVSTISWNSGSI
GYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGDGT
TVTSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLKSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFYTKSLSLSPGK
- [0442] 注释：“_”：VH2 (SEQ ID NO:86)；“_____”：CH1_b (SEQ ID NO:87)；“___”：Fc (SEQ ID NO:85)
- [0443] 注释：“_”：VH2 (SEQ ID NO:86)；“_____”：CH1_b (SEQ ID NO:87)；“___”：Fc (SEQ ID NO:85)

84)

[0444] d) FORMAT EX3链4(BL):CD20LC SEQ ID No.:20

[0445] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKKPGQKPRLLIYDASNRATGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQORSNWPITFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL[0446] KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLDSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC[0447] 注释:“_”:VL2(SEQ ID NO:91);“___”:CL_b(SEQ ID NO:92)

[0448] FORMAT NEW3

[0449] a) FORMAT NEW3链2(B1):抗CD3重链(杵)SEQ ID No.:21

[0450] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRKAPGKGLEWVGRIRSKYNNY
ATYYADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWG
KGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVDDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK[0451] 注释:“_”:VH1(SEQ ID NO:85);“___”:CH_{1a}(SEQ ID NO:88);“__”:Fc(SEQ ID NO:69)

[0452] b) FORMAT NEW3链1(B2-A1):抗CD20重链+抗CD3轻链SEQ ID No.:22

[0453] EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRDAPGKGLEWVSTISWNSGSI
GYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIOYGNYYYGMDVWGDGT
TVTSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLKSVVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGG
SQAVVTQEPSTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQDKPGQDPRGLIGGTNKRAP
WTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQAEDADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLKSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC[0454] 注释:“_”:VH2(SEQ ID NO:86);“___”:CH_{1b}(SEQ ID NO:87);“__”:VL1(SEQ ID NO:89);“___”:CL_a(SEQ ID NO:90)

[0455] c) FORMAT NEW3链3(B2):抗CD20重链(臼)SEQ ID No.:23

[0456] EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRDAPGKGLEWVSTISWNSGSI
GYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIOYGNYYYGMDVWGDGT

- [0457] TVTVSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPTVTSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLKSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK
- [0458] 注释：“_”：VH2 (SEQ ID NO:86)；“_”：CH_{1b} (SEQ ID NO:87)；“_”：Fc (SEQ ID NO:84)
- [0459] d) FORMAT NEW3链4 (A2)：抗CD20轻链SEQ ID No.:24
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKKPGQKPRLLIYDASNRATGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLDSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0460]
- [0461] 注释：“_”：VL2 (SEQ ID NO:91)；“_”：CL_b (SEQ ID NO:92)
- [0462] FORMAT EX4
- [0463] a) FORMAT EX4链2 (AH)：CD20HC+CD3HC (杆) SEQ ID No.:25
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRYAPGKGLEWVSTISWNSGSI
GYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIOYGNYYYGMDVWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPTVTSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFESTYAMNWVRKAPGKGLEWVGRIRSKYNN
YATYYADEVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVTSWNSGALTSGV
ATGPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0464]
- [0465] 注释：“_”：VH2 (SEQ ID NO:82)；“_”：CH_{1b} (SEQ ID NO:75)；“_”：VH1 (SEQ ID NO:93)；“_”：CH_{1a} (SEQ ID NO:83)；“_”：Fc (SEQ ID NO:69)
- [0466] b) FORMAT EX4链1 (AL)：CD3 LC SEQ ID No.:26
RAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQDKPGQAPRGLIGTNKRAPW
TPARFSGSLLGGKAALTLSGAQAEDADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCYLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
WSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0467]
- [0468] 注释：“_”：VL1 (SEQ ID NO:94)；“_”：CL_a (SEQ ID NO:95)
- [0469] c) FORMAT EX4链3 (BH)：CD20HC (臼) SEQ ID No.:27

- [0470] EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRYAPGKGLEWVSTISWNSGSI
GYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFQKSLSLSPGK
- [0471] 注释：“_”：VH2 (SEQ ID NO:82)；“___”：CH_{1b} (SEQ ID NO:75)；“__”：Fc (SEQ ID NO:84)
- [0472] d) FORMAT EX4链4 (BL)：CD20LC SEQ ID No.:28
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQRKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
- [0473] KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0474] 注释：“_”：VL2 (SEQ ID NO:96)；“___”：CL_b (SEQ ID NO:81)
- [0475] FORMAT NEW4
- [0476] a) FORMAT NEW4链2 (B1)：抗CD3重链 (杵) SEQ ID No.:29
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRKAPGKGLEWVGRIRSKYNNY
ATYYADEVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWG
- [0477] QGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVA
TGPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
- [0478] QVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0479] 注释：“_”：VH1 (SEQ ID NO:93)；“___”：CH_{1a} (SEQ ID NO:83)；“__”：Fc (SEQ ID NO:69)
- [0480] b) FORMAT NEW4链1 (B2-A1)：抗CD20重链+抗CD3轻链 SEQ ID No.:30
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRYAPGKGLEWVSTISWNSGSI
GYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGG
- [0481] SRAVVTQEPSTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQDKPGQAPRGLIGGTNKRAP
WTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQAEDADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLRVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCYLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY
SLWSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0482] 注释：“ ”：VH2 (SEQ ID NO:82)；“ ”：CH1_b (SEQ ID NO:75)；“ ”：VL1 (SEQ ID NO:94)；“ ”：CL_a (SEQ ID NO:95)

[0483] c) FORMAT NEW4链3 (B2)：抗CD20重链 (F) SEQ ID No.:31

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRYAPGKGLEWVSTISWNSGSI
GYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYYGMDVWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRTQKSLSLSPGK

[0485] 注释：“ ”：VH2 (SEQ ID NO:82)；“ ”：CH1_b (SEQ ID NO:75)；“ ”：Fc (SEQ ID NO:84)

[0486] d) FORMAT NEW4链4 (A2)：抗CD20轻链 SEQ ID No.:32

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQRKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

[0489] 注释：“ ”：VL2 (SEQ ID NO:96)；“ ”：CL_b (SEQ ID NO:81)

[0490] FORMAT EX5

[0491] a) FORMAT EX5链2 (AH)：CD20HC+CD3HC (杆) SEQ ID No.:33

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSI
GYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYYGMDVWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFESTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNN
YATYYADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWEAYW
GQGTTLTVSSEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGK
EVHSGVCTDPOPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWONPRNHFRCCVQVQFYGLSENDEW
TQDRAKPVTQIVSAEAWGRYGPPCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE
WESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0493] 注释：“ ”：VH2 (SEQ ID NO:74)；“ ”：CH1_b (SEQ ID NO:75)；“ ”：VH1 (SEQ ID NO:76)；“ ”：TCRα (SEQ ID NO:97)；“ ”：Fc (SEQ ID NO:69)

[0494] b) FORMAT EX5链1 (AL)：CD3LC SEQ ID No.:34

- [0495] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSS*TGAVTTS*NYANWVQKPGQAPRGLIG*GTN*KRAPW
TPARFSGSLLGGKAALTLGAQAEDADYYC*ALWYSNLW*FGGGTKLTVLDPDIQNPDP
VYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSA
VAWS
OKSDFACANAFQNSIIPEDTFFPSP
ESS
- [0496] 注释：“_”：VL1 (SEQ ID NO:78)；“___”：TCR β (SEQ ID NO: 98)
- [0497] c) FORMAT EX5链3 (BH) :CD20HC (B) SEQ ID No.:35
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAAS*GFTFNDY*AMHWVRQAPGKGLEWVST*ISWNSGSI*
- [0498] GYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTALYYC*AKDIQYGN*YYYYGMDVWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK
- [0499] PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK
- [0500] 注释：“_”：VH2 (SEQ ID NO:74)；“___”：CH1_b (SEQ ID NO:75)；“__”：Fc (SEQ ID NO: 84)
- [0501] d) FORMAT EX5链4 (BL) :CD20LC SEQ ID No.:36
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS*QSVSSY*LAWYQKPGQAPRLLIY*DAS*NRATGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC*QQRSNWPIT*FGQTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0502] KSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0503] 注释：“_”：VL2 (SEQ ID NO:80)；“___”：CL_b (SEQ ID NO:81)
- [0504] FORMAT NEW5
- [0505] a) FORMAT NEW5链2 (B1) :抗CD3重链 (杆) SEQ ID No.:37
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS*GFTFSTY*AMNWVRQAPGKGLEWVGR*IRSKYNNY*
*ATYY*ADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC*VRHGNFGNSYVSWFAYWG*
QGTLVTVSSEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKE
VHSGVCTDPOPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWT
QDRAKPVTQIVSAEAWGRYGPPCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK
- [0506] QDRAKPVTQIVSAEAWGRYGPPCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK
- [0507] 注释：“_”：VH1 (SEQ ID NO:76)；“___”：TCR α (SEQ ID NO:97)；“__”：Fc (SEQ ID NO: 69)
- [0508] b) FORMAT NEW5链1 (B2-A1) :抗CD20重链+抗CD3轻链 SEQ ID No.:38

- [0509] EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSI
GYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIOYGNYYYYGMDVWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGG
SQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTISNYANWVQOKPGQAPRGLIGTNKRAP
- [0510] WTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQAEDADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLPDIONPDP
AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSOTQVSQSKSDSVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWS
OKSDFACANAFONSIIPEDTFFPSPSS
- [0511] 注释：“_”：VH2 (SEQ ID NO:74)；“___”：CH_{1b} (SEQ ID NO:75)；“__”：VL1 (SEQ ID NO:78)；“____”：TCRβ (SEQ ID NO:98)
- [0512] c) FORMAT NEW5链3 (B2)：抗CD20重链 (B) SEQ ID No.:39
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSI
GYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIOYGNYYYYGMDVWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
- [0513] PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFQKSLSLSPGK
- [0514] 注释：“_”：VH2 (SEQ ID NO:74)；“___”：CH_{1b} (SEQ ID NO:75)；“__”：Fc (SEQ ID NO:84)
- [0515] d) FORMAT NEW5链4 (A2)：抗CD20轻链 SEQ ID No.:40
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTREIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
- [0516] KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
- [0517] 注释：“_”：VL2 (SEQ ID NO:80)；“___”：CL_b (SEQ ID NO:81)
- [0518] FORMAT EX6
- [0519] a) FORMAT EX6链2 (AH)：CD20HC+CD3HC (杆) SEQ ID No.:41
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSI
GYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIOYGNYYYYGMDVWGQGT
- [0520] TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGG

[0521] SQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSS***TGAVTT***SNYANWVQQKPGQAPRGLIG***GTN***KRAP
WTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQA***E***ADYYC***ALWYSNLW***IFGGG***T***KLTVLSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP***T***TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0522] 注释：“_”：VH2 (SEQ ID NO:74)；“_____”：CH1_b (SEQ ID NO:99)；“___”：VL1 (SEQ ID NO:78)；“___”：CH1_a (SEQ ID NO:100)；“__”：Fc (SEQ ID NO:69)

[0523] b) FORMAT EX6链1 (AL) :CD3LC SEQ ID No.:42
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS***GFTEFSTY***AMNWVRQAPGKGLEWVGR***IRSKYNNY***
ATYYADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC***VRHGNFGNSYVSWFAYWG***
QGT***L***TVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY***P***PREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0525] 注释：“_”：VH1 (SEQ ID NO:76)；“_____”：CL_a (SEQ ID NO:101)

[0526] c) FORMAT EX6链3 (BH) :CD20HC (B) SEQ ID No.:43
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAAS***GFTFNDY***AMHWVRQAPGKGLEWVST***ISWNSGSI***
GYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYYC***AKDIQYGNYYYGMDVWGQGT***
TVT***V***VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEP***T***TVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLS***SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAP***
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRF***T***QKSLSLSPGK

[0528] 注释：“_”：VH2 (SEQ ID NO:74)；“_____”：CH1_b (SEQ ID NO:99)；“__”：Fc (SEQ ID NO:84)

[0529] d) FORMAT EX6链4 (BL) :CD20LC SEQ ID No.:44
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS***OSVSSY***LAWYQQKPGQAPRLLIY***DASN***RATGIPARE
SGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYC***QQRSNWPIT***FGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDRK
LKSGTASVVCLLNNFY***P***PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0532] 注释：“_”：VL2 (SEQ ID NO:80)；“_____”：CL_b (SEQ ID NO:102)

[0533] FORMAT NEW6

[0534] a) FORMAT NEW6链2 (B1) :抗CD3重链 (杆) SEQ ID No.:45

[0535] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSS**TGAVTTS**NYANWVQQKPGQAPRGLIG**GTN**KRAPW
TPARFSGSLLGGKAALTLGAQAEDEADYYC**ALWYSNLW**IFGGGTKLTVLSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0536] 注释：“_”：VL1 (SEQ ID NO:78)；“___”：CH_{1a} (SEQ ID NO:100)；“__”：Fc (SEQ ID NO:69)

[0537] b) FORMAT NEW6链1 (B2-A1)：抗CD20重链+抗CD3轻链SEQ ID No.:46
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAAS**GFTFNDY**AMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSI
GYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTALYYC**AKDIQYGNYYYGMDV**WGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGG
[0538] SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFESTY**AMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNN
YATYYADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC**VRHGNFGNSYVSWFAYW**
GQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0539] 注释：“_”：VH2 (SEQ ID NO:74)；“___”：CH_{1b} (SEQ ID NO:99)；“__”：VH1 (SEQ ID NO:76)；“__”：CL_a (SEQ ID NO:101)

[0540] c) FORMAT NEW6链3 (B2)：抗CD20重链 (B) SEQ ID No.:47
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAAS**GFTFNDY**AMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSI
[0541] GYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTALYYC**AKDIQYGNYYYGMDV**WGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
[0542] REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

[0543] 注释：“_”：VH2 (SEQ ID NO:74)；“___”：CH_{1b} (SEQ ID NO:99)；“__”：Fc (SEQ ID NO:84)

[0544] d) FORMAT NEW6链4 (A2)：抗CD20轻链SEQ ID No.:48
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS**QS****VSS**YLAWYQQKPGQAPRLLIY**DAS**NRATGIPARE
SGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYC**QQRSNWPIT**FGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDRK
[0545] LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

- [0546] 注释：“_”:VL2 (SEQ ID NO:80);“___”:CL_b (SEQ ID NO:102)
- [0547] FORMAT EX7
- [0548] a) FORMAT EX7链2 (AH):CD20HC+CD3HC (杵) SEQ ID No.:49
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSI
GYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIOYGNYYYGMDVWGQGT
TVTSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNN
YATYYADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYW
[0549] GQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPACLOSSGLYSLKSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0550] 注释：“_”:VH2 (SEQ ID NO:74);“___”:CH1_b (SEQ ID NO:75);“__”:VH1 (SEQ ID NO:76);“___”:CH1_a (SEQ ID NO:103);“__”:Fc (SEQ ID NO:69)
- [0551] b) FORMAT EX7链1 (AL):CD3LC SEQ ID No.:50
QAVVTQEPSTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPW
TPARFSGSLLGGKAALTLSGAQAEDADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLRTVAAPSVE
[0552] IFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSCESVTEQDSKDSTYSL
DSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGES
- [0553] 注释：“_”:VL1 (SEQ ID NO:78);“___”:CL_a (SEQ ID NO:104)
- [0554] c) FORMAT EX7链3 (BH):CD20 HC (臼) SEQ ID No.:51
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSI
GYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIOYGNYYYGMDVWGQGT
TVTSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
[0555] PELLGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTHQKSLSLSPGK
- [0556] 注释：“_”:VH2 (SEQ ID NO:74);“___”:CH1_b (SEQ ID NO:75);“__”:Fc (SEQ ID NO:84)
- [0557] d) FORMAT EX7链4 (BL):CD20 LC SEQ ID No.:52

- [0558] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQORSNWPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0559] 注释：“_”:VL2 (SEQ ID NO:80);“_____”:CL_b (SEQ ID NO:81)
- [0560] FORMAT NEW7
- [0561] a) FORMAT NEW7链2 (B1):抗CD3重链 (杵) SEQ ID No.:53
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNY
ATYYADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWG
QGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
[0562] TFPACLOSSGLYSLKSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
[0563] SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0564] 注释：“_”:VH1 (SEQ ID NO:76);“_____”:CH1_a (SEQ ID NO:103);“___”:Fc (SEQ ID NO:69)
- [0565] b) FORMAT NEW7链1 (B2-A1):抗CD20重链+抗CD3轻链SEQ ID No.:54
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSI
GYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGT
TVTSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
[0566] AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGG
SQAVVTQEPSTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQOKPGQAPRGLIGGTNKRAP
WTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQAEDADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSCESVTEQDSKDSTY
SLDSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGES
- [0567] 注释：“_”:VH2 (SEQ ID NO:74);“_____”:CH1_b (SEQ ID NO:75);“___”:VL1 (SEQ ID NO:78);“_____”:CL_a (SEQ ID NO:104)
- [0568] c) FORMAT NEW7链3 (B2):抗CD20重链 (臼) SEQ ID No.:55
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSI
GYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGT
TVTSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
[0569] AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFQKSLSLSPGK

[0570] 注释：“ ”：VH2 (SEQ ID NO:74)；“ ”：CH1_b (SEQ ID NO:75)；“ ”：Fc (SEQ ID NO:84)

[0571] d) FORMAT NEW7链4 (A2)：抗CD20轻链SEQ ID No.:56

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF
[0572] SGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQORSNWPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKA
[0573] DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0574] 注释：“ ”：VL2 (SEQ ID NO:80)；“ ”：CL_b (SEQ ID NO:81)

[0575] FORMAT EX8

[0576] a) FORMAT EX8链2 (AH)：CD20HC+CD3VHLC (杵) SEQ ID No.:57

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSI
GYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNLSRAEDTALYYCAKDIOYGNYYYGMDVWGQGT
TVTSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFESTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNN
[0577] IATYYADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYW
GQGTTLTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
DTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0578] 注释：“ ”：VH2 (SEQ ID NO:74)；“ ”：CH1_b (SEQ ID NO:75)；“ ”：VH1 (SEQ ID NO:76)；“ ”：CL_a (SEQ ID NO:106)；“ ”：Fc (SEQ ID NO:69)

[0579] b) FORMAT EX8链1 (AL)：CD3LC SEQ ID No.:58

QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPW
TPARFSGSLLGGKAALTLSGAQAEDADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPS
[0580] VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

[0581] 注释：“ ”：VL1 (SEQ ID NO:78)；“ ”：CH1_a (SEQ ID NO:105)

[0582] c) FORMAT EX8链3 (BH)：CD20HC (臼) SEQ ID No.:59

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSI
GYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNLSRAEDTALYYCAKDIOYGNYYYGMDVWGQGT
[0583] TVTSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK

- PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
 [0584] TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHFTQKSLSLSPGK
- [0585] 注释：“_”:VH2 (SEQ ID NO:74); “___”:CH1_b (SEQ ID NO:75); “__”:Fc (SEQ ID NO:84)
- [0586] d) FORMAT EX8链4 (BL): CD20LC SEQ ID No.:60
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF
SGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
 [0587] KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
- [0588] 注释：“_”:VL2 (SEQ ID NO:80); “___”:CL_b (SEQ ID NO:81)
- [0589] FORMAT NEW8
- [0590] a) FORMAT NEW8链2 (B1): 抗CD3重链 (杵) SEQ ID No.:61
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNY
ATYYADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWG
QGTTLTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
 [0591] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VYEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0592] 注释：“_”:VH1 (SEQ ID NO:76); “___”:CL_a (SEQ ID NO:106); “__”:Fc (SEQ ID NO:69)
- [0593] b) FORMAT NEW8链1 (B2-A1): 抗CD20重链+抗CD3轻链 SEQ ID No.:62
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSI
GYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIOYGNYYYGMDVWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 [0594] AVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGG
SQAVVTOEPSLTVSPGGTVTLTCRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAP
WTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 [0595] SVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
- [0596] 注释：“_”:VH2 (SEQ ID NO:74); “___”:CH1_b (SEQ ID NO:75); “___”:VL1 (SEQ ID NO:78); “___”:CH1_a (SEQ ID NO:105)
- [0597] c) FORMAT NEW8链3 (B2): 抗CD20重链 (臼) SEQ ID No.:63

[0598] EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSI
GYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNLSRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFITQKSLSLSPGK

[0599] 注释：“_”:VH2 (SEQ ID NO:74);“___”:CH₁ (SEQ ID NO:75);“__”:Fc (SEQ ID NO:84)

[0600] d) FORMAT NEW8链4(A2):抗CD20轻链SEQ ID No.:64
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
 [0601] KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

[0602] 注释：“_”:VL2 (SEQ ID NO:80);“___”:CL₁ (SEQ ID NO:81)

[0603] 1.2双特异性抗体的基因合成、表达和纯化

[0604] 构建质粒以编码上述每种双特异性抗体的每种多肽链。将编码每种双特异性抗体的质粒转染到ExpiCHO-S细胞中,以允许多肽链的表达,然后组装到相应的双特异性抗体中。采集表达的双特异性抗体并将其用蛋白质A纯化。具体的实验程序在下文描述。

[0605] 在进行合成之前,使用OptimumGene对编码多肽链的基因序列进行密码子优化。将基因序列构建在pcDNA3.4载体中,并且通过PureLink™ HiPure制备用于转染的所确认的重组载体DNA。

[0606] 使用ExpiCHO表达培养基在CO₂振荡器中培养细胞,并且当ExpiCHO-S细胞密度达到7×10⁶-10×10⁶个活细胞/ml且存活率>95%时,将25ml细胞悬液用含有大约25ul DNA重链和轻链的ExpiFectamine™ CHO/DNA复合物转染。

[0607] 在转染后的第8-9天,采集培养物,并且收集细胞悬浮液,离心,并使用色谱法进一步纯化。色谱柱:1ml Mab Select Sure LX(GE)预组装柱;平衡缓冲液A:50mM乙酸-乙酸钠,pH 6.0;洗脱缓冲液B:50mM乙酸-乙酸钠,pH 3.6;中和缓冲液C:1M Tris-HCl,pH 8.5;流速:1毫升/分钟;梯度:0-100% B线性梯度洗脱。分离后,以1ml/管的体积收集洗脱液,并向每1ml级分中添加0.1ml中和缓冲液C,pH约6-7。

[0608] 1.3每种双特异性抗体的表达结果

[0609] 分别通过SEC-HPLC(参见图7A至7P)和SDS-PAGE(参见图6A和6B)分析和鉴定经纯化的抗体。

[0610] 1). SDS-PAGE:将样品与4X样品缓冲液(15μl+5μl)在Eppendorf管中混合,并且在100℃下加热5-10分钟,离心,同时收集上清液。然后,将5μg经处理的样品用移液管吸取,并且小心地依次添加到凝胶的每个孔中,并且将标志物添加到所述孔中的一个孔中。将电极室置于电泳槽上,打开电源,正极和负极对准,并且将电压设置为150V。运行5分钟后,将电

压调整为200V。再次运行电泳,持续约35分钟,并且然后关闭电源以停止。使用伯乐公司(Bio-rad)凝胶成像仪来扫描未经染色的SDS-PAGE凝胶并拍摄照片,并且使用Image Lab 5.2.1分析照片以计算蛋白质纯度。

[0611] 2).毛细管电泳十二烷基硫酸钠(CE-SDS):将样品用超纯水稀释至2.5mg/ml,并且添加55 μ L样品缓冲液,随后添加2 μ L 10kDa IS和5 μ L 250mM IAM,并充分混合。接下来,将样品在70 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C下在金属浴中加热10 $\pm$ 2分钟,然后在水浴中冷却至室温,并转移至附带的样品管中,标记,并准备采样。

[0612] 3).尺寸排阻-高效液相色谱法(SEC-HPLC):

[0613] 将样品在15 $^{\circ}$ C下以10000rpm离心,持续5分钟。获取上清液并进行分析。相关的SEC色谱参数在下文列出:

[0614] 流动相A:200mM PBS pH 6.9;

[0615] 流动相B:超纯水;

[0616] 流速:0.7毫升/分钟;

[0617] 波长:280nm;

[0618] 柱温:25 $^{\circ}$ C;

[0619] 样品分析时间:25分钟;

[0620] 注入大小:20 μ g。

[0621] 1.4分析结果

[0622] 常规2:1形式(FORMAT EX)

[0623] 根据SEC-HPLC结果(图7A、7C、7E、7G、7I、7K、7M和7O),除了FORMAT EX5构建体(图7I),所有样品似乎都显示出清晰的单一200kDa大小的主峰,这表明几乎所有样品都具有高纯度。然而,此结果与SDS-PAGE结果不一致(参见图6A和6B),后者显示样品中有多条蛋白带,表明样品含有低分子杂质,并且因此仍需纯化。

[0624] SEC-HPLC结果与SDS-PAGE结果不一致的原因是,FORMAT EX抗体(FORMAT EX1至FORMAT EX8)的样品中的大多数A1-B2和A2-B1错配产物的分子量为约200kDa,所述分子量与预期产物的分子量相同或非常接近,并且因此SEC-HPLC方法不能鉴定样品中存在的这些错配产物。相比之下,此类错配产物可以通过SDS-PAGE方法显示,因为图5B中的A1-B2和A2-B1错配产物没有通过二硫键共价结合,并且会在SDS-PAGE过程期间解离。在本发明研究中,SDS-PAGE结果显示,在200kDa带附近存在175kDa或甚至150kDa的产物,可以在FORMAT EX1、FORMAT EX2、FORMAT EX3、FORMAT EX4、FORMAT EX5、FORMAT EX7和FORMAT EX8中看到,但在FORMAT EX6中没有。这些错配产物在SEC-HPLC结果中看不到,并且由于其物理化学特性与对应的同源配对目标产物相似,因此通过常规纯化过程很难去除。

[0625] 新型2:1形式(FORMAT NEW)

[0626] 如SDS-PAGE结果上所示(参见图6A和6B),SDS-PAGE上显示与目标条带距离较远的杂质主要为150kDa。这些结果与SEC-HPLC结果更加一致(参见图7B、7D、7F、7H、7J、7L、7N和7P),即SEC-HPLC图谱上200kDa的主峰是单一目标产物,而A1-B2以及A2-B1错配产物(参见图4B)更容易通过SEC-HPLC分离,因为它们与目标产物在分子量上有很大的差异,并且由于物理化学特性上的显著差异,最终产物也更便于纯化。

[0627] 实施例2

[0628] 使用常规方法构建并纯化了抗CD20 x CD3双特异性分子FORMAT New7,证明了本发明用于纯化的便利性。

[0629] 2.1抗体构建:

[0630] 链1(AL):B2-连接子-A1(MW:约50kDa)

[0631] 链2(AH):B1-第1Fc(MW:约50kDa)

[0632] 链3(BH):B2-第2Fc(MW:约50kDa)

[0633] 链4(BL):A2(MW:约25kDa)

[0634] 将以下突变引入到B1的CH1中:V173C、S183K、C220S。

[0635] 将以下突变引入到A1的CL中:Q160C、S176D、C214S。

[0636] 2.2抗CD20 x CD3 FORMAT New7双特异性抗体的表达:

[0637] 抗CD20 x CD3 FORMAT New7是一种双特异性抗体,由2对不同的轻链和重链组成。使用两种稳定的转移载体将宿主细胞与CHO-K1细胞共转染。转染后,将细胞以 2×10^4 个细胞/孔的密度铺板,并在CO₂培养箱中在存在选择压力的情况下培养。培养约3周后,将上清液从细胞培养物中取出,以分别测试与CD20和CD3的结合。鉴定出对CD20和CD3显示高结合活性的上清液,并将对应的细胞克隆扩增到24孔细胞培养板中。4至6天后,测试上清液对CD20和CD3的结合活性。扩增对CD20和CD3具有较高结合活性的细胞克隆,并且最后选择并扩增稳定转染的细胞系。将稳定的细胞系传代并在摇瓶中培养3天,测试对CD20和CD3的结合活性,并且基于细胞生长和表达进行补料分批评估和冷冻保存。测试补料分批样品的表达和质量(SEC、非还原CE-SDS、CEX、SDS-PAGE)以评估稳定细胞池的生长、代谢、生产率和产物质量,并且最终选择稳定细胞池以进行随后的单克隆细胞系筛选。

[0638] 通过单细胞分选仪将上述细胞系铺板到96孔板中,每孔1个细胞,在CO₂培养箱中培养,并且通过将板用Solentim Cell Metric扫描来拍照。选择单克隆细胞以进行补料分批评估和细胞冷冻保存。进行表达和质量分析(SEC、nrCE-SDS、iCIEF、N-聚糖、分子量)以评估稳定细胞池的生长、代谢、生产率和产物质量,并且选择6个单克隆细胞系以进行RCB建库。

[0639] 将选择的单克隆细胞系复活、扩增、接种并在摇瓶中培养14天。采集上清液以进行纯化和分析。

[0640] 2.2.1分析方法:

[0641] 1) .SDS-PAGE:将上清液样品与4X样品缓冲液(15 μ l+5 μ l)在Eppendorf管中混合,并且在100°C下加热5-10分钟,离心,同时收集上清液。然后,将5 μ g经处理的样品用移液管吸取,并且小心地依次添加到凝胶的每个孔中,并且将标志物添加到所述孔中的一个孔中。将电极室置于电泳槽上,打开电源,正极和负极对准,并且将电压设置为150V。运行5分钟后,将电压调整为200V。再次运行电泳,持续约35分钟,并且然后关闭电源以停止。使用伯乐公司(Bio-rad)凝胶成像仪来扫描未经染色的SDS-PAGE凝胶并拍摄照片,并且使用Image Lab 5.2.1分析照片以计算蛋白质纯度。

[0642] 2) .CE-SDS:将样品用超纯水稀释至2.5mg/ml,并且添加55 μ L样品缓冲液,随后添加2 μ L 10kDa IS和5 μ L 250mM IAM,并充分混合。接下来,将样品在70 $\pm$ 2°C下加热10 $\pm$ 2分钟,然后冷却至室温,并转移至附带的样品管中,标记,并准备采样。

[0643] 3) .SEC-HPLC:将样品在15°C下以10000rpm离心,持续5分钟。收集上清液并进行分

析。相关的SEC色谱参数在下文列出：

[0644] 流动相A:200mM PBS pH 6.9;

[0645] 流动相B:超纯水;

[0646] 流速:0.7毫升/分钟;

[0647] 波长:280nm;

[0648] 柱温:室温;

[0649] 样品分析时间:20分钟;

[0650] 注入大小:20 μ g。

[0651] 2.2.2分析结果

[0652] 使用SDS-PAGE分析,抗CD20 x CD3 FORMAT New7双特异性抗体的表达产物纯度为约84.1% (图8)。

[0653] 使用CE-SDS分析,抗CD20 x CD3 FORMAT New7双特异性抗体的表达产物纯度为约82.91% (参见图9中的10号峰)。

[0654] 使用SEC-HPLC分析,表达的抗CD20 x CD3 FORMAT New7双特异性抗体的纯度为约90.23% (参见图10中的4号峰)。

[0655] 除了靶蛋白,在表达产物中还有一些低分子量 (LMW) 片段 (参见图8、9和10) 和分子量的聚集体 (HMW, 参见图10)。通过SDS-PAGE、CE-SDS和SEC-HPLC可以更清楚地区分相关产物。结果在图8-10中示出。

[0656] 2.3抗体纯化

[0657] 2.3.1实验方法

[0658] 1). 亲和色谱法 (AC):从细胞培养物中获得的含有抗CD20 x CD3 FORMAT New7双特异性抗体的上清液样品在pH 4.0下通过亲和色谱法洗脱,并且随后分析洗脱峰。

[0659] 色谱柱:1ml Mab Select Sure LX (GE) 预组装柱;平衡缓冲液A:50mM乙酸-乙酸钠,pH 6.0;洗脱缓冲液B:50mM乙酸-乙酸钠,pH 3.6;中和缓冲液C:1M Tris-HCl,pH 8.5;流速:1毫升/分钟;梯度:0-100% B线性梯度洗脱。分离后,以1ml/管的体积收集洗脱液,并向每1ml级分中添加0.1ml中和缓冲液C,pH约6-7。

[0660] 2). 阳离子交换色谱法 (CEX):将前一步骤得到的洗脱液合并,并且将pH调整至6.1。然后将合并的洗脱液过滤,并且用作样品CEX装载。色谱柱:将Capto S Impact与以下缓冲液一起施加:

[0661] EQ/洗涤/洗脱缓冲液A:50mM NaAc-HAc,pH 6.0

[0662] 洗脱缓冲液B:50mM NaAc-HAc+1M NaCl,pH 6.0

[0663] 进行线性梯度洗脱:梯度:0 $\rightarrow$ 50% B,60CV。

[0664] 2.3.2纯化结果:

[0665] 1). 亲和色谱法 (AC):

[0666] 纯化曲线在图11中示出。如图11所示,目标产物被洗脱液缓冲液成功地从亲和色谱柱上洗脱下来,并且使用UV信号检测到单一高峰 (参见图11中的箭头),表明经纯化的产物具有高纯度。

[0667] 通过SEC-HPLC分析洗脱液的纯度,并且结果显示纯度为92.55% (参见图12的3号峰),这表明AC降低了LMW含量。

[0668] 还通过SDS-PAGE分析洗脱液的纯度,并且结果显示纯度为85.7% (参见图13),这表明在此步骤中纯化后仍有LMW(图13)。

[0669] 与实施例1中用未经纯化的样品观察到的结果相比,SEC-HPLC和SDS-PAGE结果清楚地反映了通过AC方法纯化的改善,这也揭示了杂质是LMW,并且因此为随后的纯化过程提供了方向。

[0670] 2). 阳离子交换色谱法 (CEX):

[0671] 为了进一步去除AC纯化的样品中的LMW,收集AC过程的洗脱液,并且使用CEX进一步纯化。CEX纯化后的洗脱曲线在图14中示出。通过UV信号检测到主要的单峰 (参见从100ml洗脱液到120ml洗脱液的峰),这表明目标产物通过线性梯度洗脱被洗脱液缓冲液成功地洗脱。

[0672] 收集三个洗脱液样品 (即,C01-C03,参见图14中的三个箭头),并且分别通过SDS-PAGE和SEC分析纯度。

[0673] SDS-PAGE显示出C01、C02和C03的纯度结果分别为94.6%、95.0%和91.0% (图15)。SEC-HPLC显示出C01、C02和C03的纯度结果分别为93.89%、99.74%和97.73% (参见下表2)。C02的SEC-HPLC图在图16中示出。

[0674] 表2. 通过SEC-HPLC对根据CEX洗脱的级分的纯度分析

[0675]

样品	单体%	聚合物%	区段%
CEX装载	96.06	3.94	/
C01	93.89	0.11	/
C02	99.74	0.26	/
C03	97.73	2.27	/

[0676] 值得注意的是,在通过CEX纯化后,C02级分的纯度通过SEC-HPLC检测超过99% (图16),并且通过SDS-PAGE检测超过95% (图15),其表明与CEX纯化前相比,CEX装载样品的纯度显著提高,去除了AC纯化产物中大部分的LMW和HMW。

[0677] SEC-HPLC和SDS-PAGE清楚地反映出通过CEX提高了纯度,这也表明纯化的最终产物具有高度的均匀性。

[0678] 上述结果表明,本发明的新型2:1双特异性抗体结构 (FORMAT NEW) 可以使用常规纯化方法如AC和CEX容易地纯化。简单到两个步骤的纯化过程可以提供纯度超过95%的高纯度样品,这表明在抗体纯化中FORMAT NEW抗体显著优于FORMAT EX抗体,并且还表明本发明的FORMAT NEW抗体结构易于使用。

[0679] 尽管实施例使用了抗CD20 x CD3双特异性抗体来证明纯化的便利性和高纯度,但是本发明人还测试了用本公开中提供的新的双特异性抗体形式构建的其它双特异性抗体,并且在纯化的便利性和高纯度方面获得了类似的结果。因此,应当理解,本公开中提供的新形式适用于各种类型的靶标,并且可以为任何双特异性抗体提供纯化的便利性和高纯度。

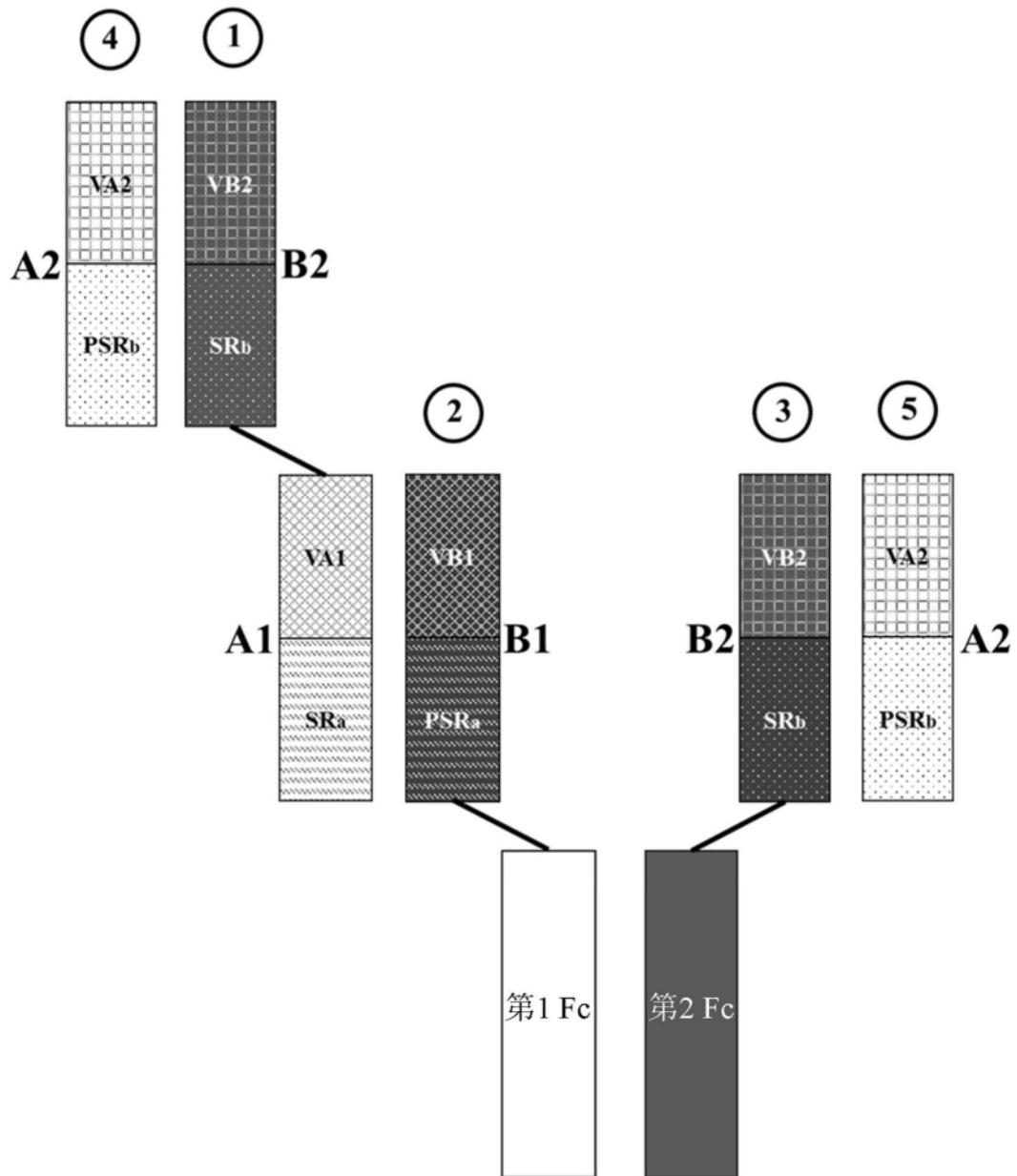


图3

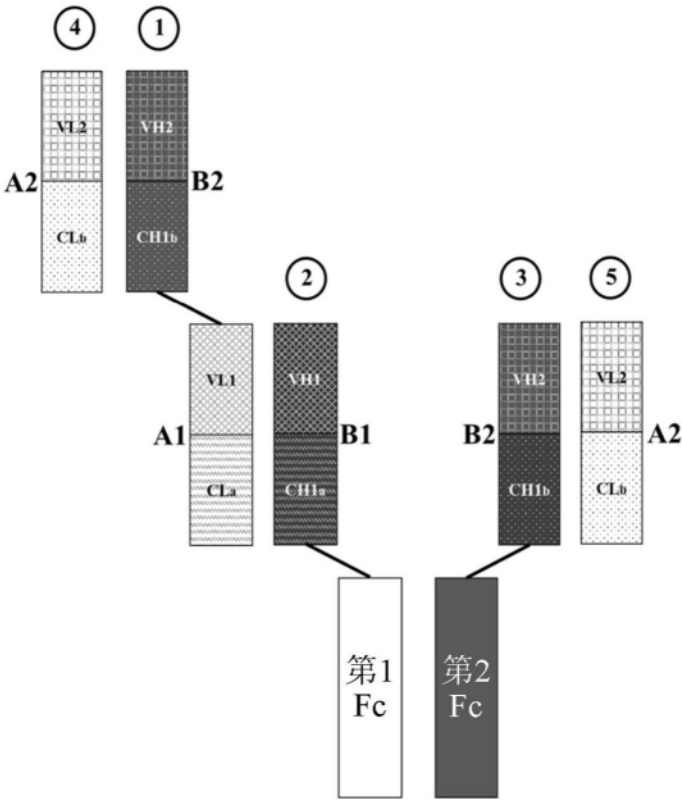


图4A

链1 (AL) : B2-连接子-A1 (MW: 约50 kDa)
 链2 (AH) : B1-第1 Fc (MW: 约50 kDa)
 链3 (BH) : B2-第2 Fc (MW: 约50 kDa)
 链4 (BL) : A2 (MW: 约25 kDa)
 链5 (BL, 与链4相同) : A2 (MW: 约25 kDa)

本文所公开的新型2:1形式的目标产物和错配产物的结构和分子量(方法B)

产物	结构	MW (kDa)	SDS-PAGE (kDa)
目标产物	链4-链1-链2-链3-链5(4)	200	200
B1-A2错配	链4-链2-链3-链5(4)	150	125
B2-A1错配	链4-链1-链2-链3-链1-链4	250	175
B1-A2和B2-A1错配	链5(4)-链2-链3-链1-链4	200	100

图4B

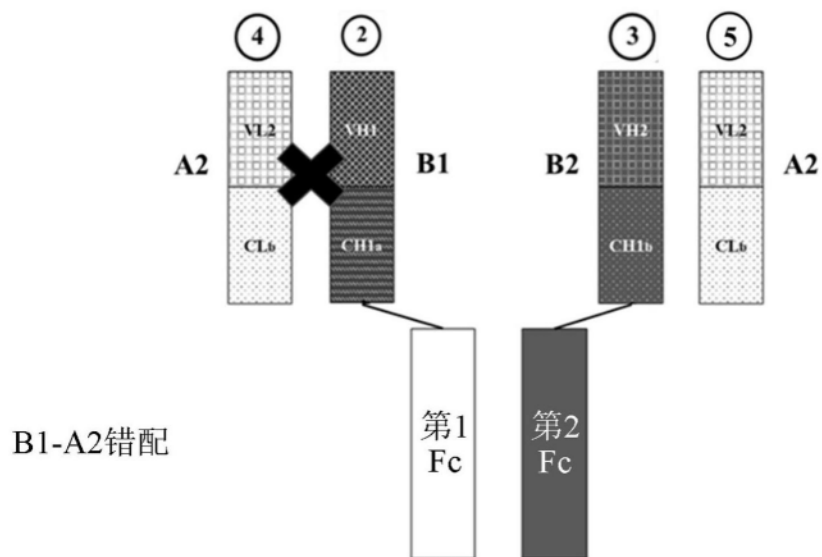


图4C

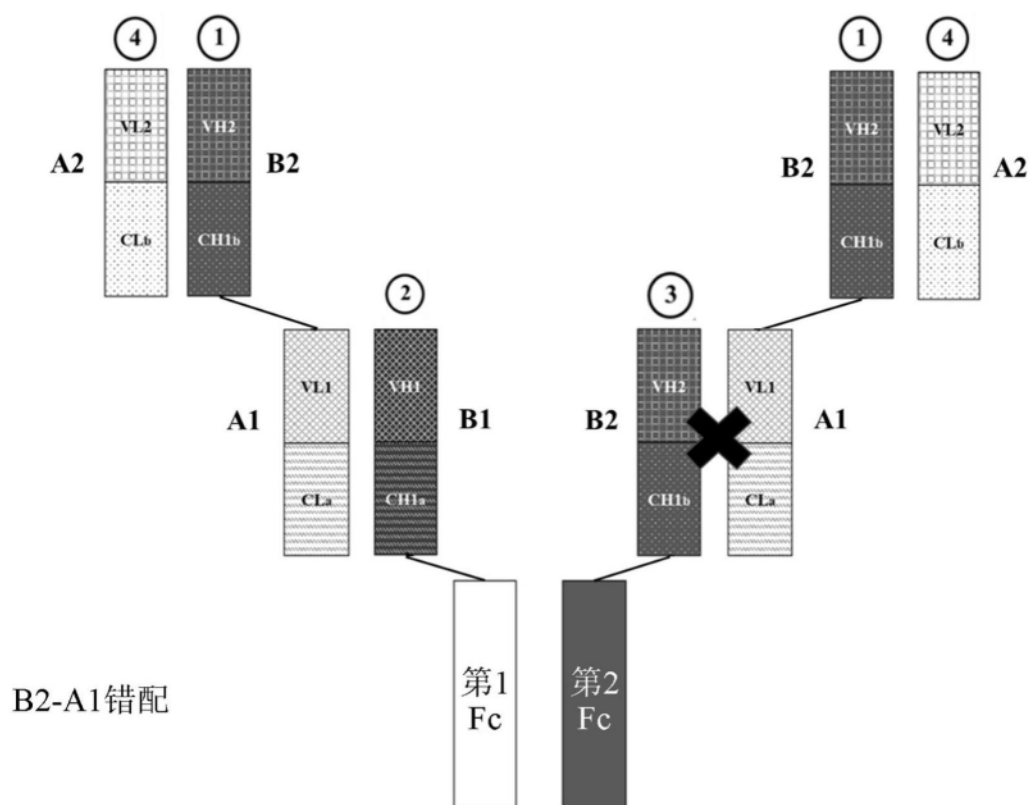


图4D

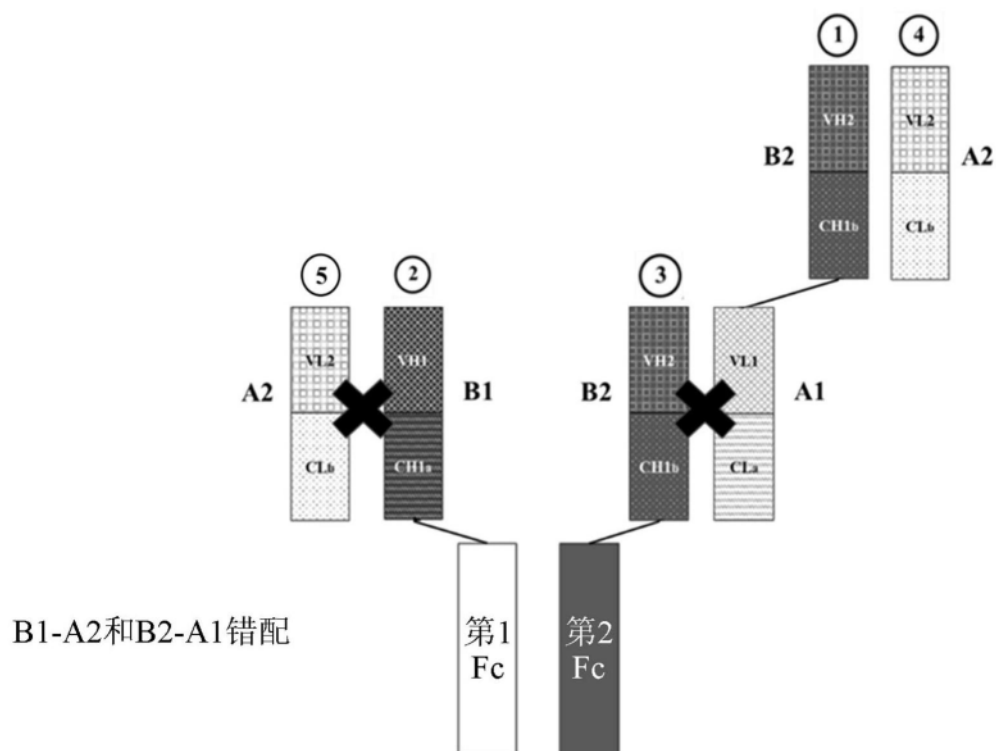


图4E

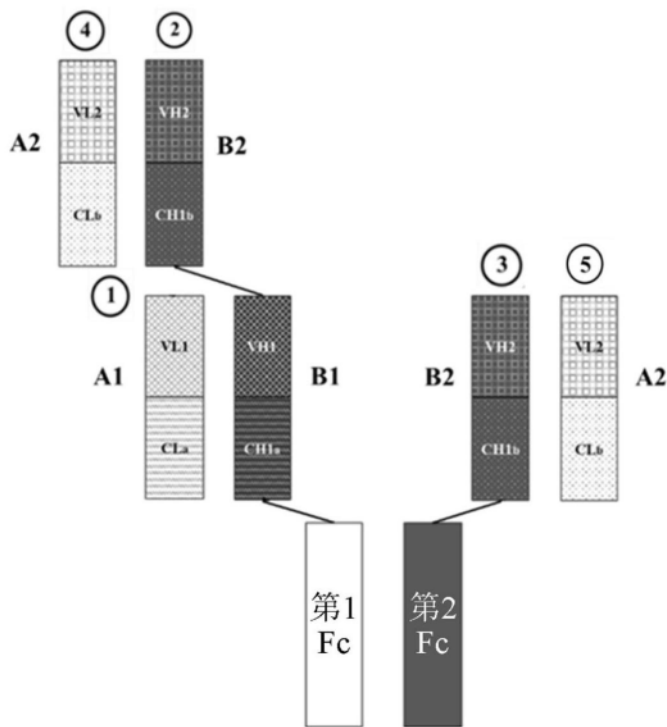


图5A

- 链1 (AL) : A1 (MW: 约25 kDa)
链2 (AH) : B2-连接子-B1-第1 Fc (MW: 约75 kDa)
链3 (BH) : B2-第2 Fc (MW: 约50 kDa)
链4 (BL) : A2 (MW: 约25 kDa)
链5 (BL, 与链4相同) : A2 (MW: 约25 kDa)

常规2:1形式的目标产物和错配产物的结构和分子量 (方法A)

产物	结构	MW (kDa)	SDS-PAGE (kDa)
目标产物	链1-链2-链3-链4-链5(4)	200	200
B1-A2错配	链4-链2-链3-链4-链5(4)	200	175
B2-A1错配	链1-链2-链3-链1-链4	200	175
	链1-链2-链3-链1-链1	200	150
B1-A2和B2-A1错配	链4-链2-链3-链1-链4	200	100
	链4-链2-链3-链1-链1	200	125

图5B

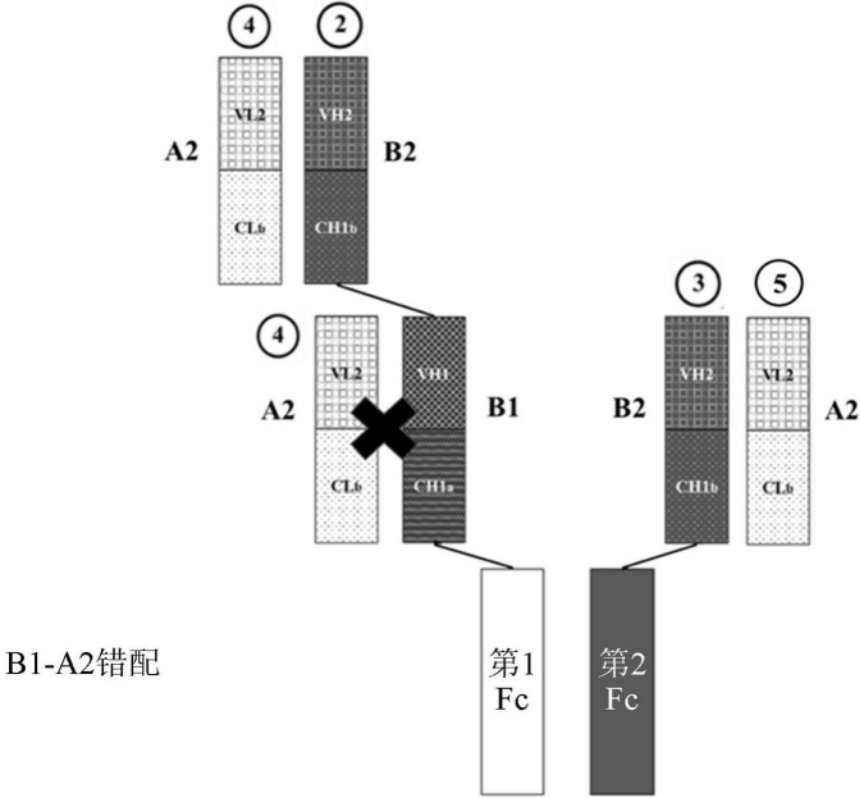


图5C

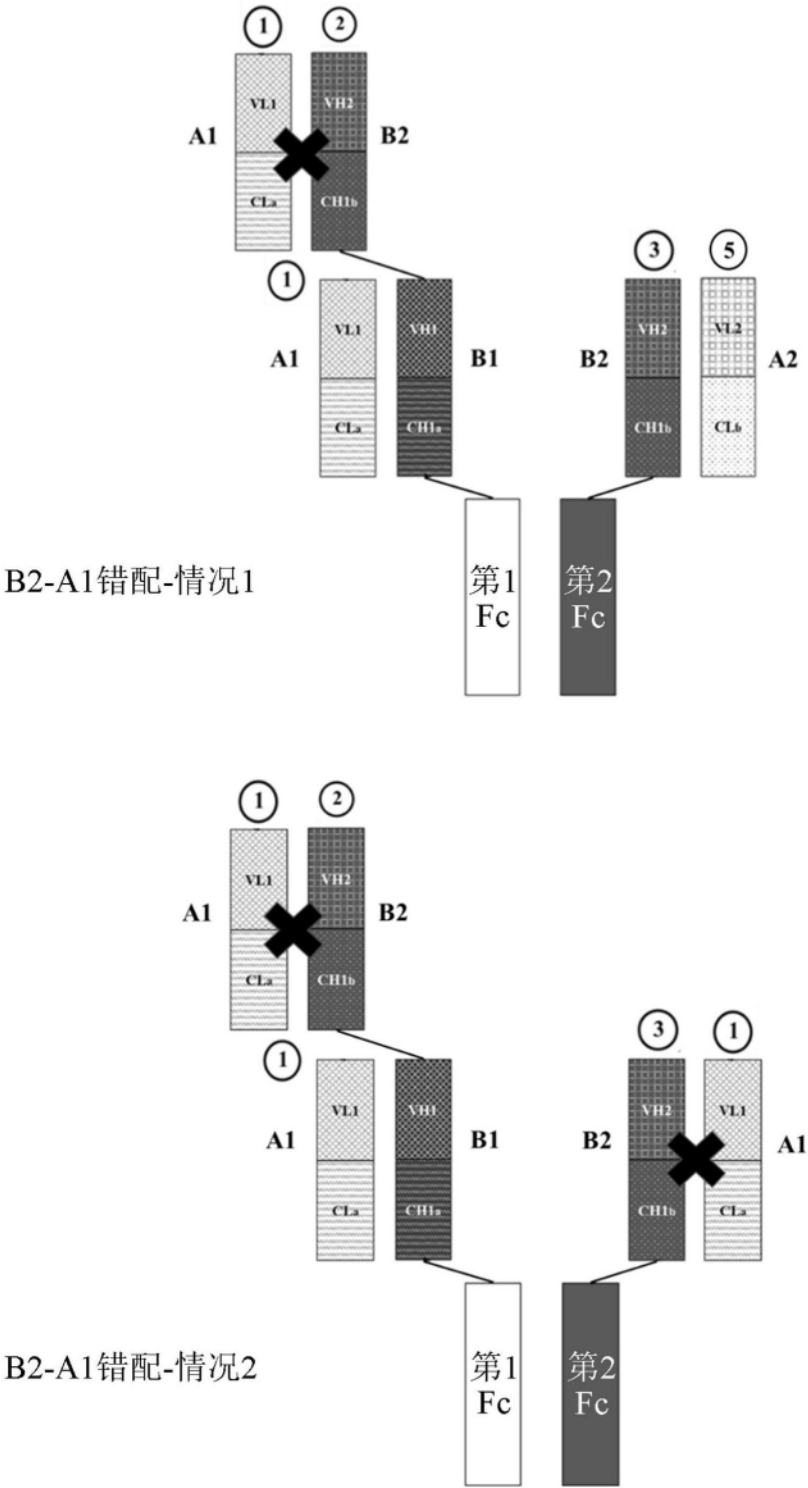


图5D

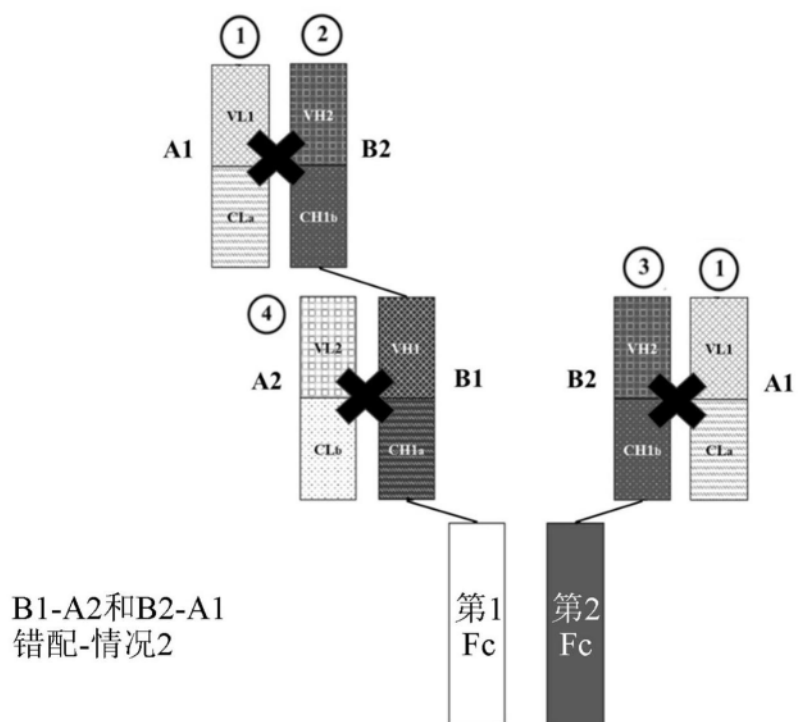
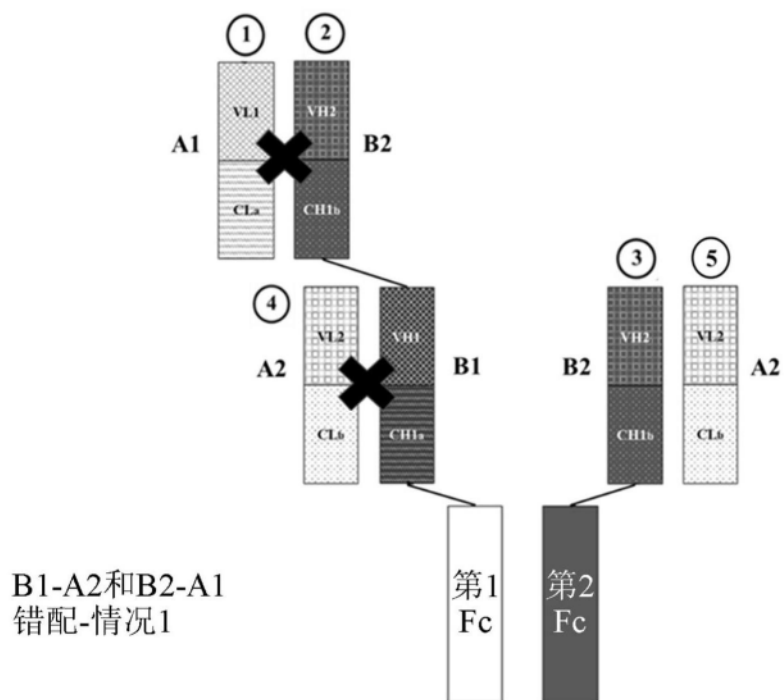


图5E

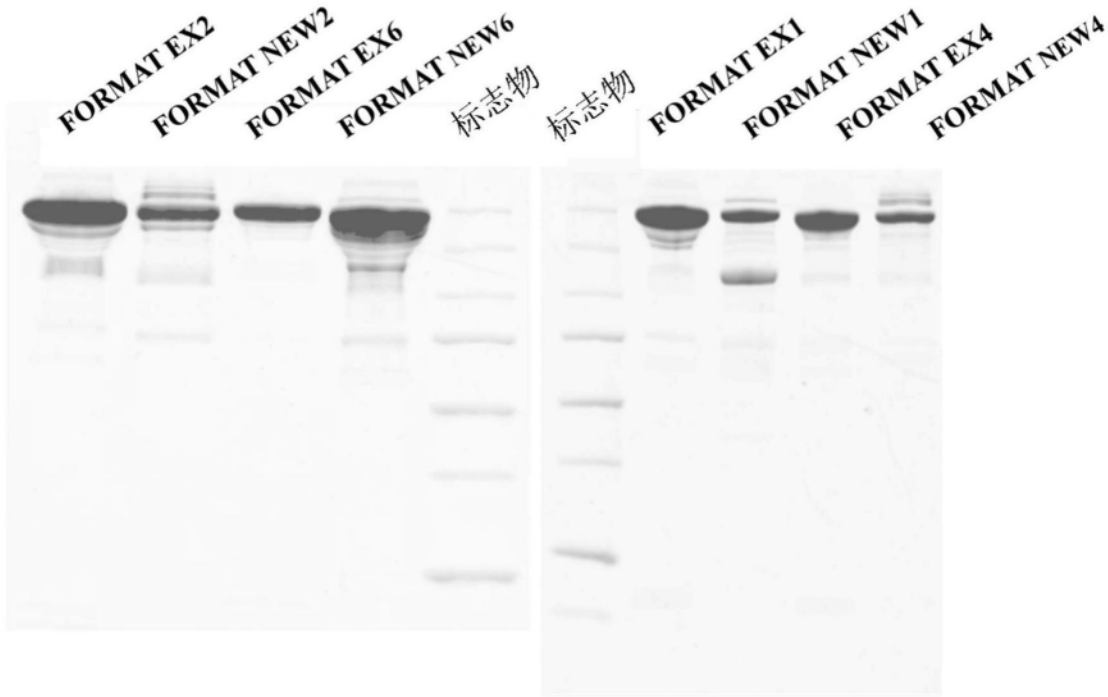


图6A

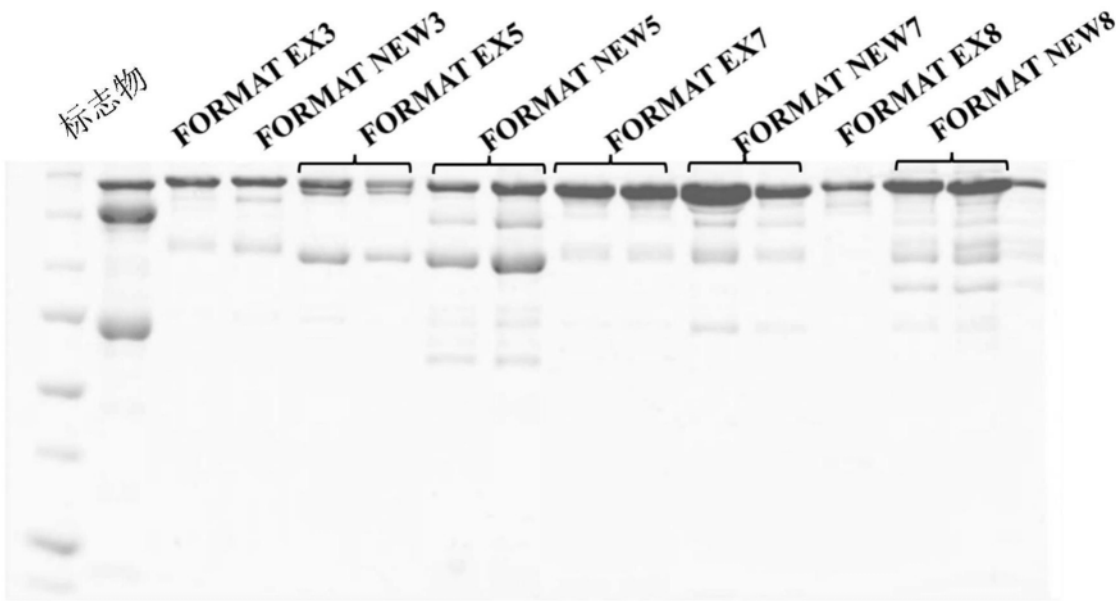
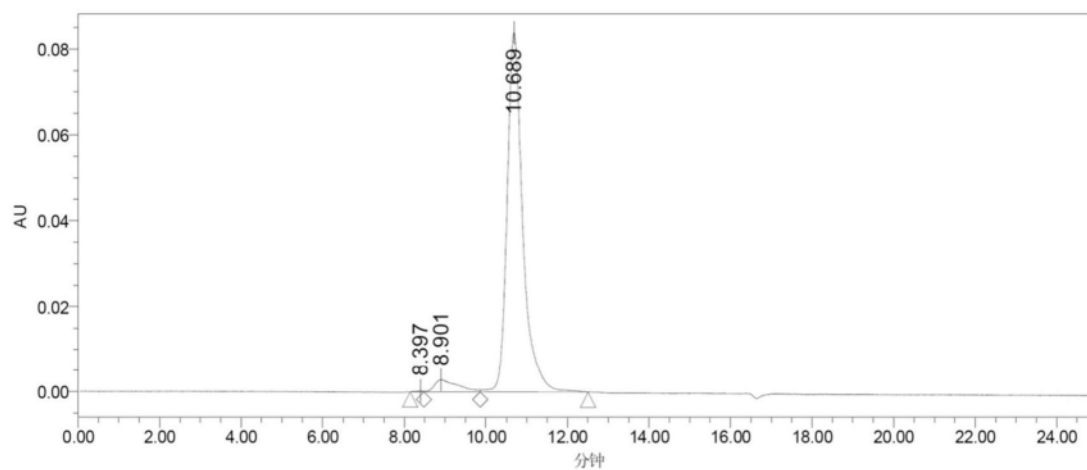
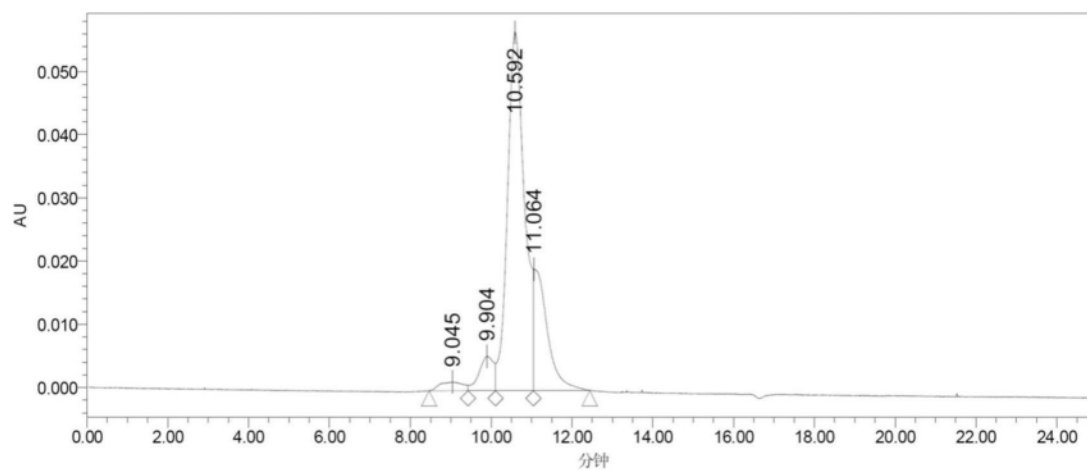


图6B



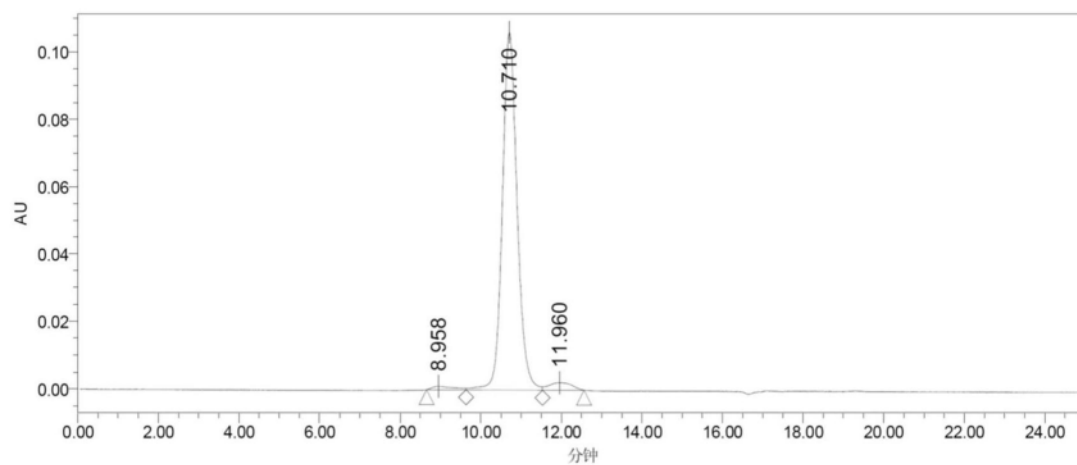
(FORMAT EX1)

图7A



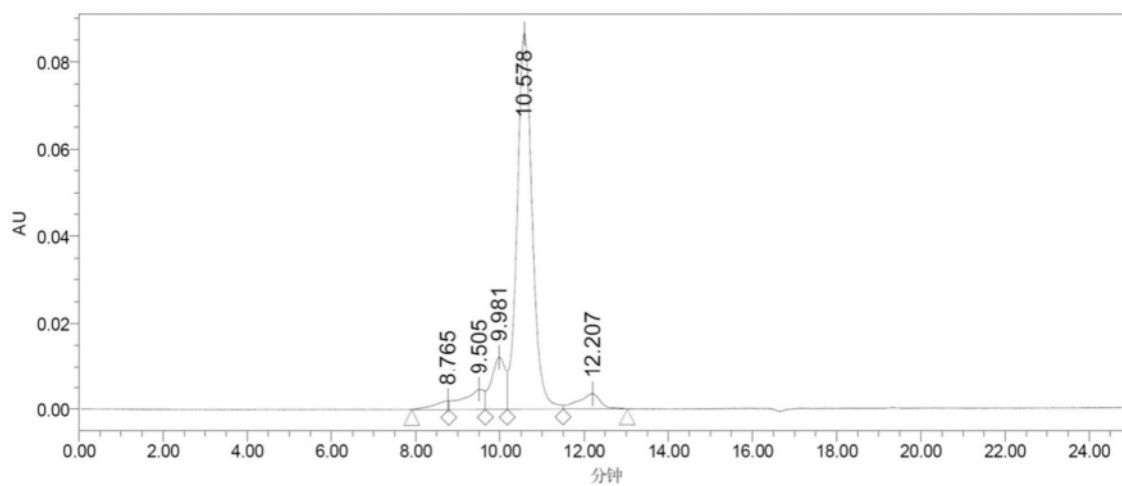
(FORMAT NEW1)

图7B



(FORMAT EX2)

图7C



(FORMAT NEW2)

图7D

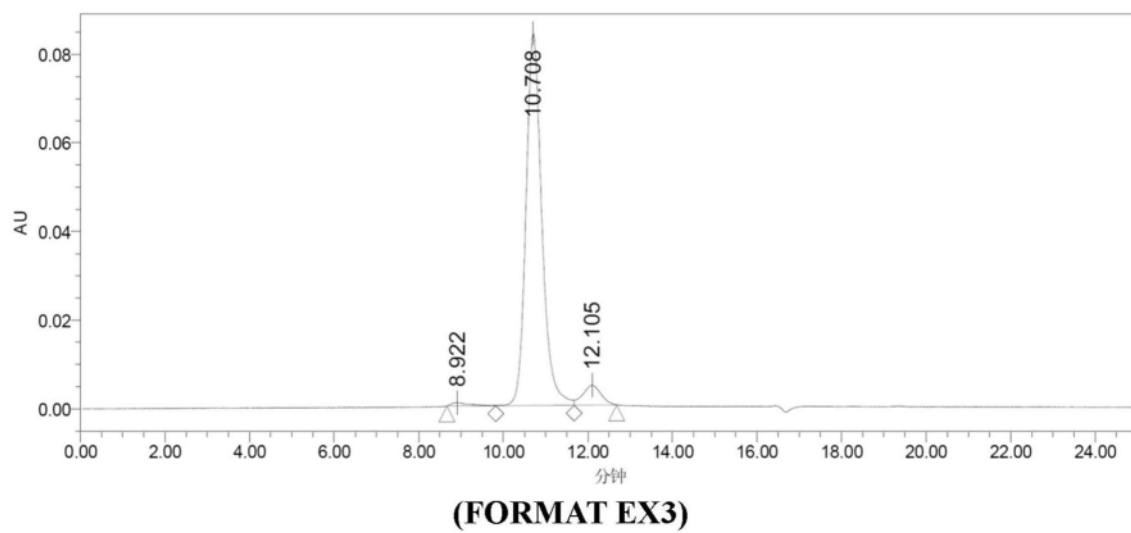


图7E

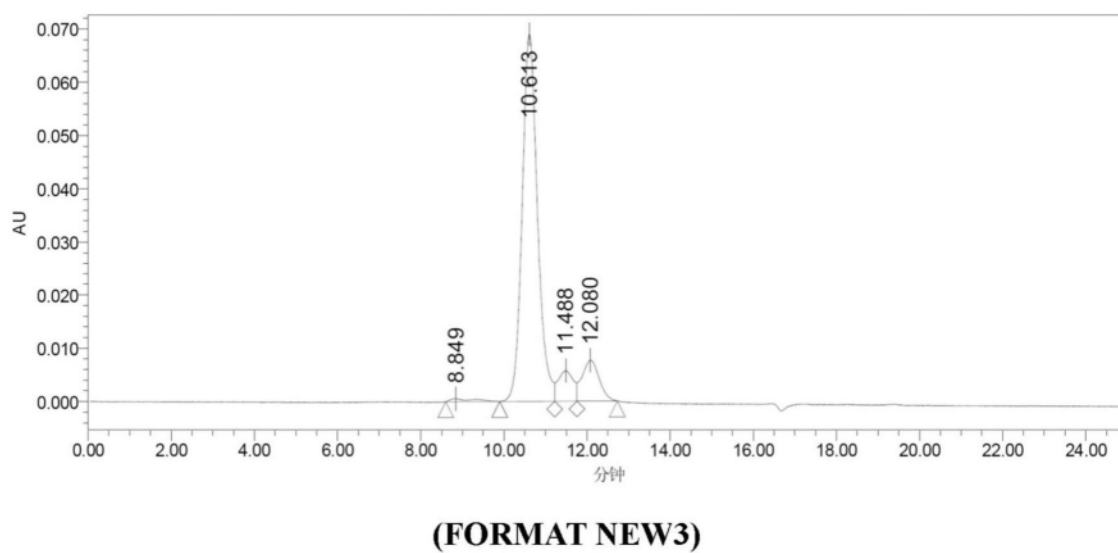
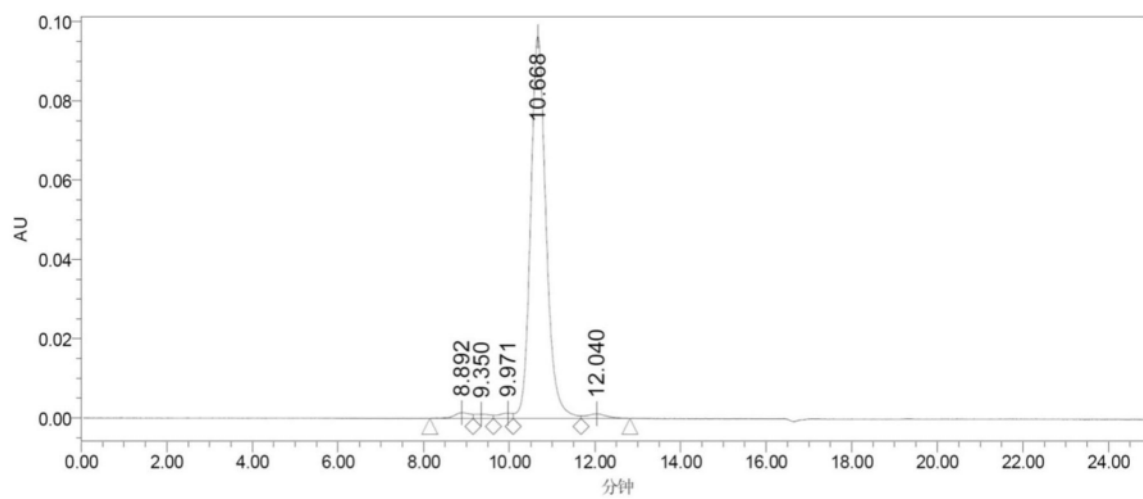
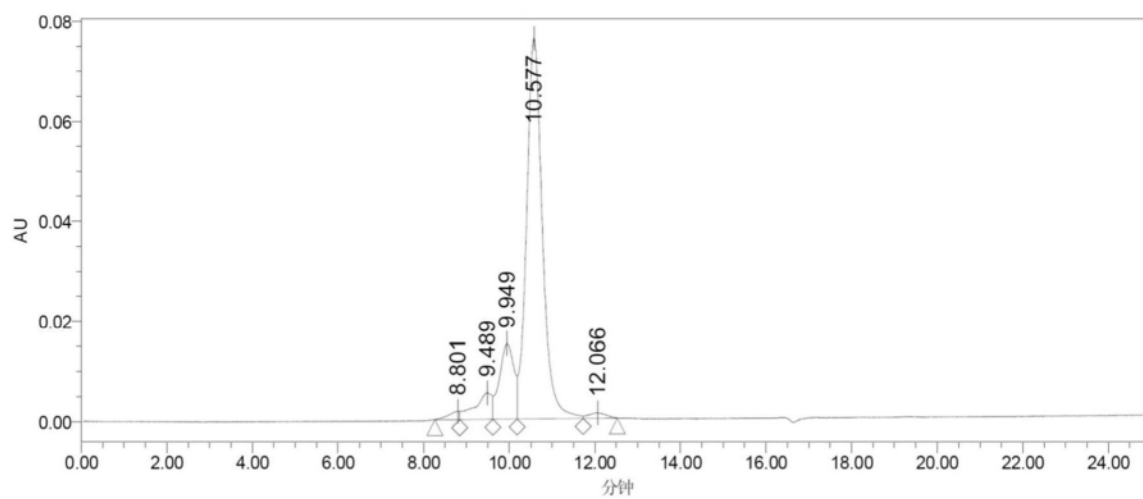


图7F



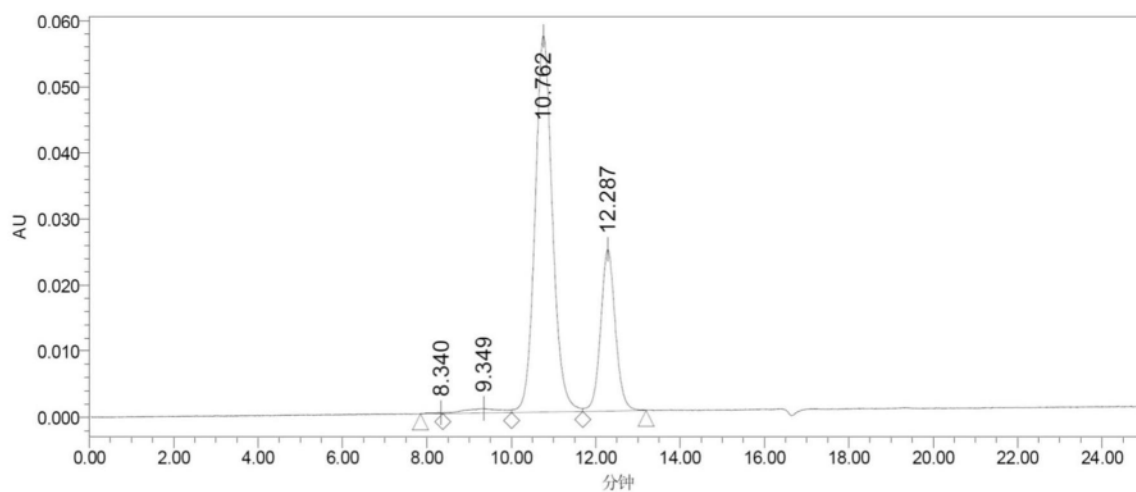
(FORMAT EX4)

图7G



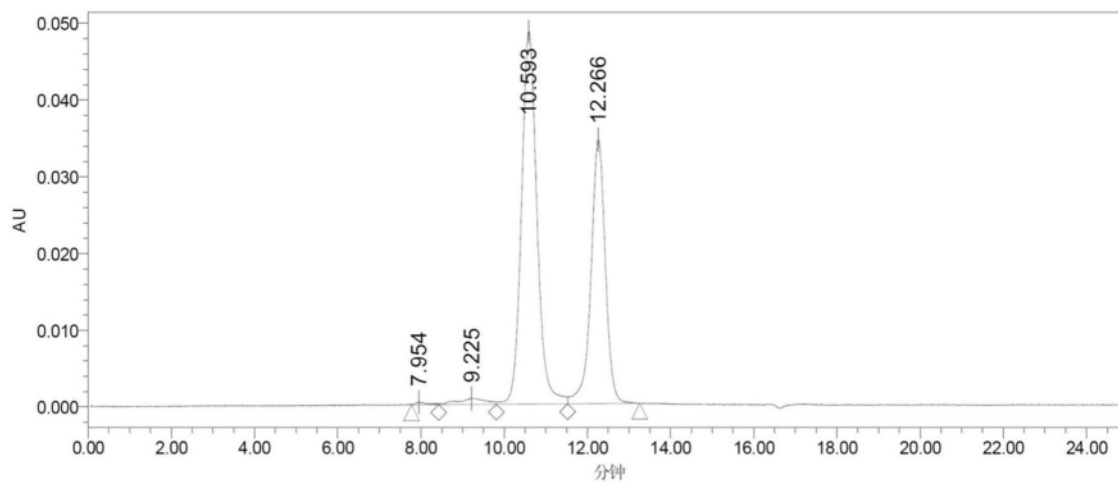
(FORMAT NEW4)

图7H



(FORMAT EX5)

图7I



(FORMAT NEW5)

图7J

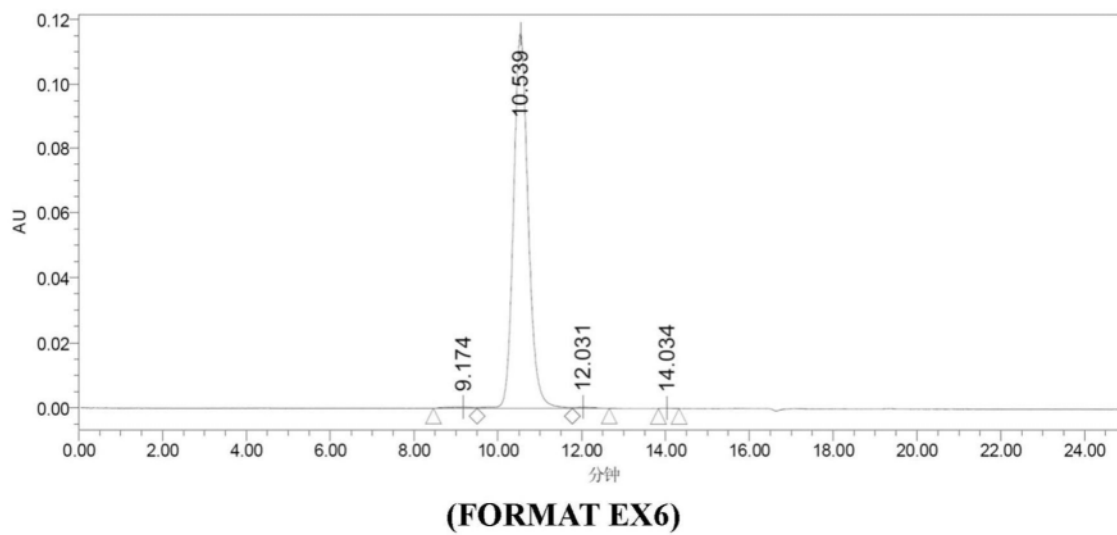


图7K

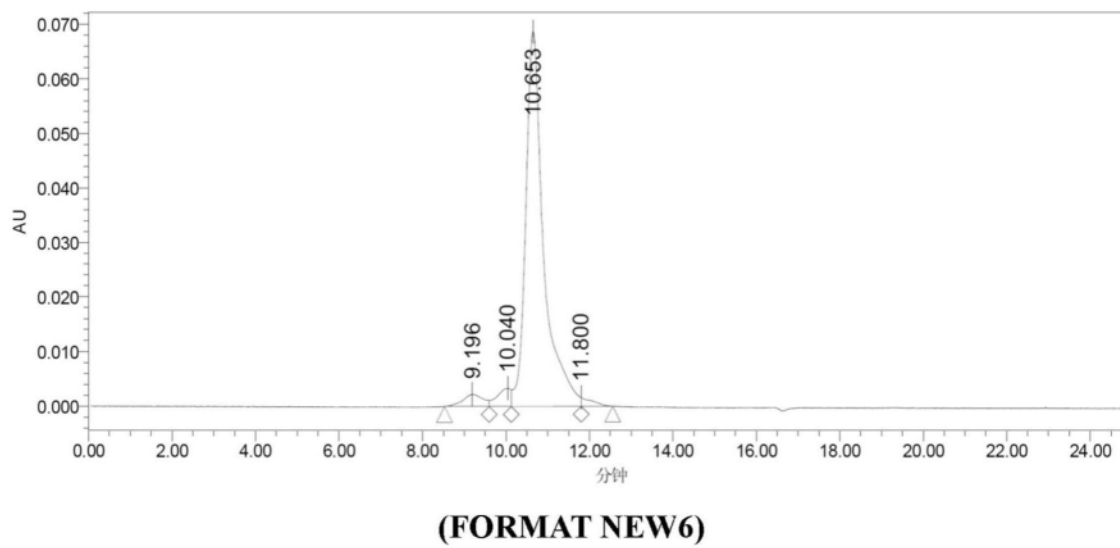


图7L

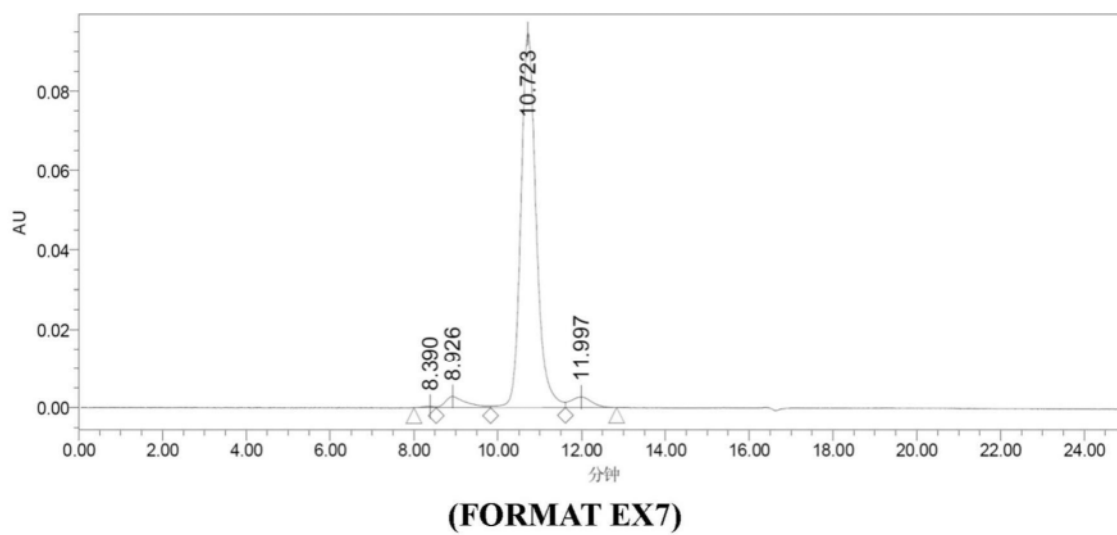


图7M

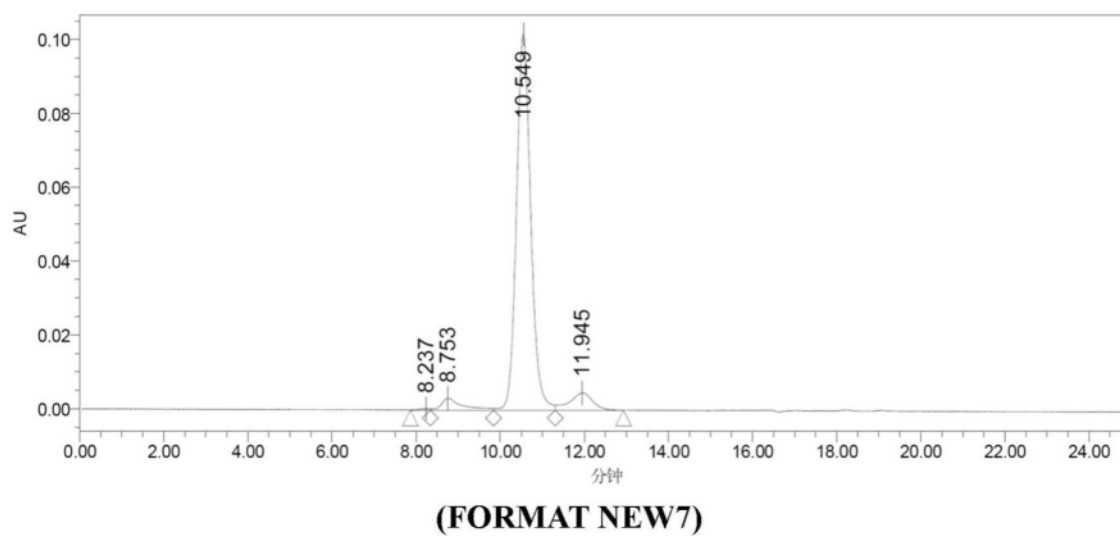
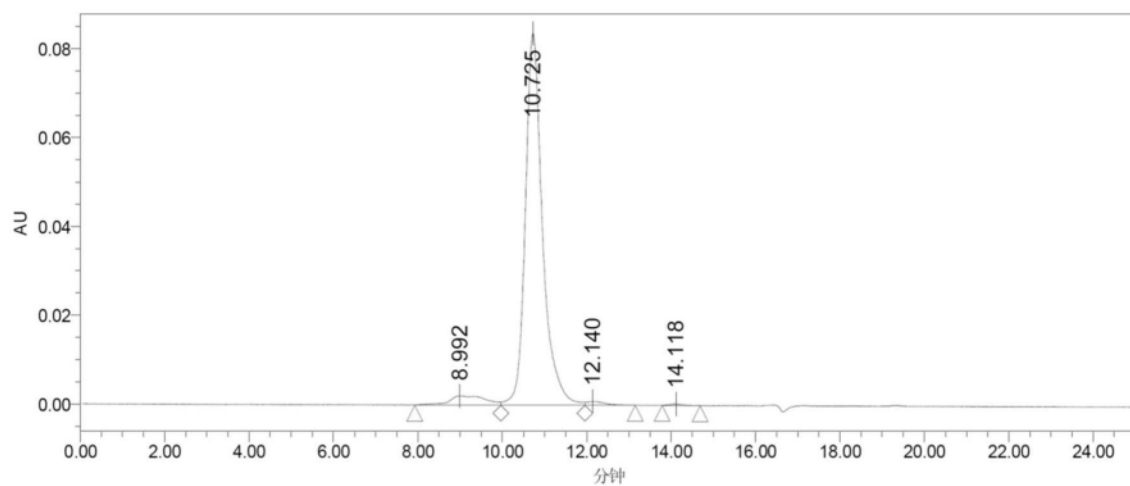
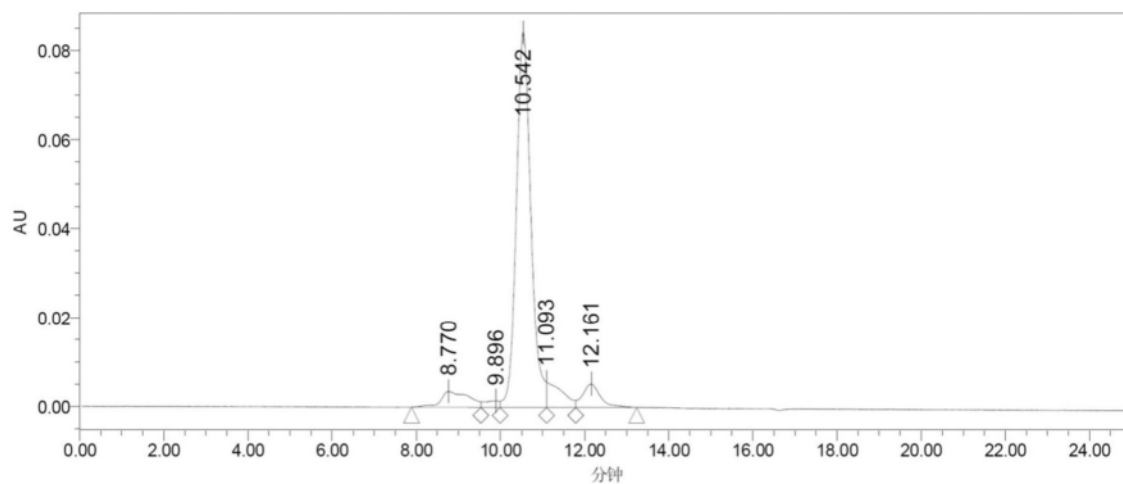


图7N



(FORMAT EX8)

图70

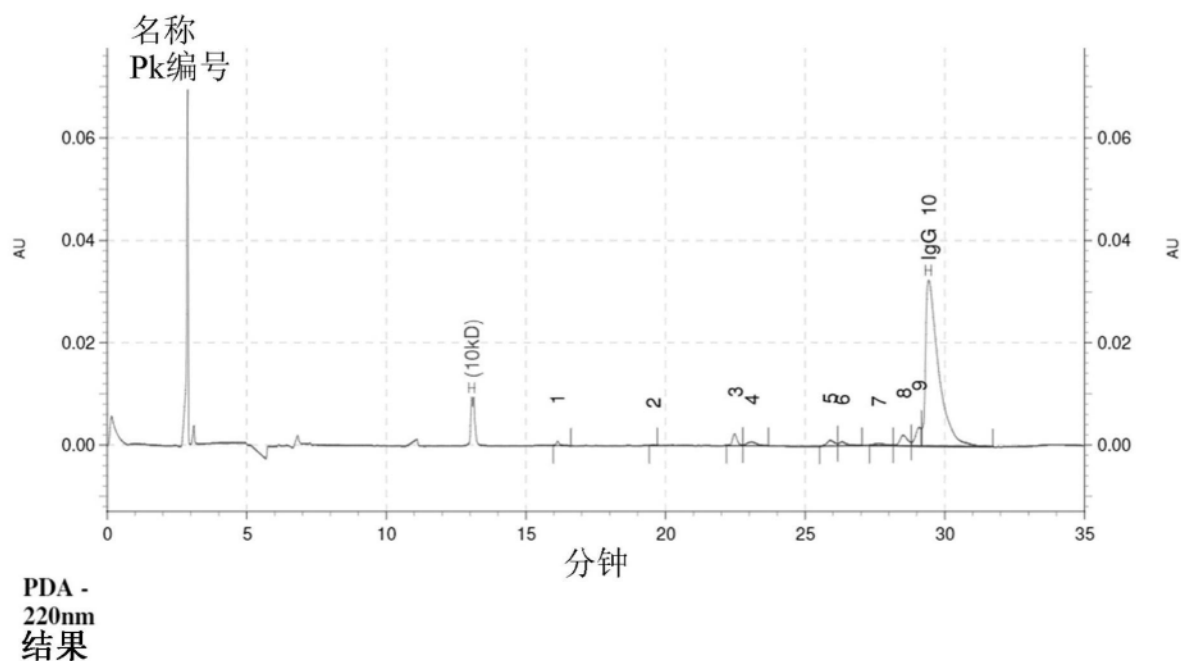


(FORMAT NEW8)

图7P



图8



Pk编号	名称	迁移时间	校正面积	校正面积 百分比	高度	分辨率 (USP)
1		16.133	128.22	0.89	810	0.00
2		19.567	16.01	0.11	114	17.15
3		22.475	395.74	2.75	2278	11.09
4		23.075	241.68	1.68	696	1.32
5		25.900	285.47	1.98	1120	4.76
6		26.325	198.86	1.38	795	0.76
7		27.650	130.67	0.91	385	2.09
8		28.508	470.84	3.27	2073	1.37
9		29.092	590.56	4.11	3606	0.57
10	IgG	29.425	11925.61	82.91	32518	0.29
总计			14383.67	100.00	44395	

图9

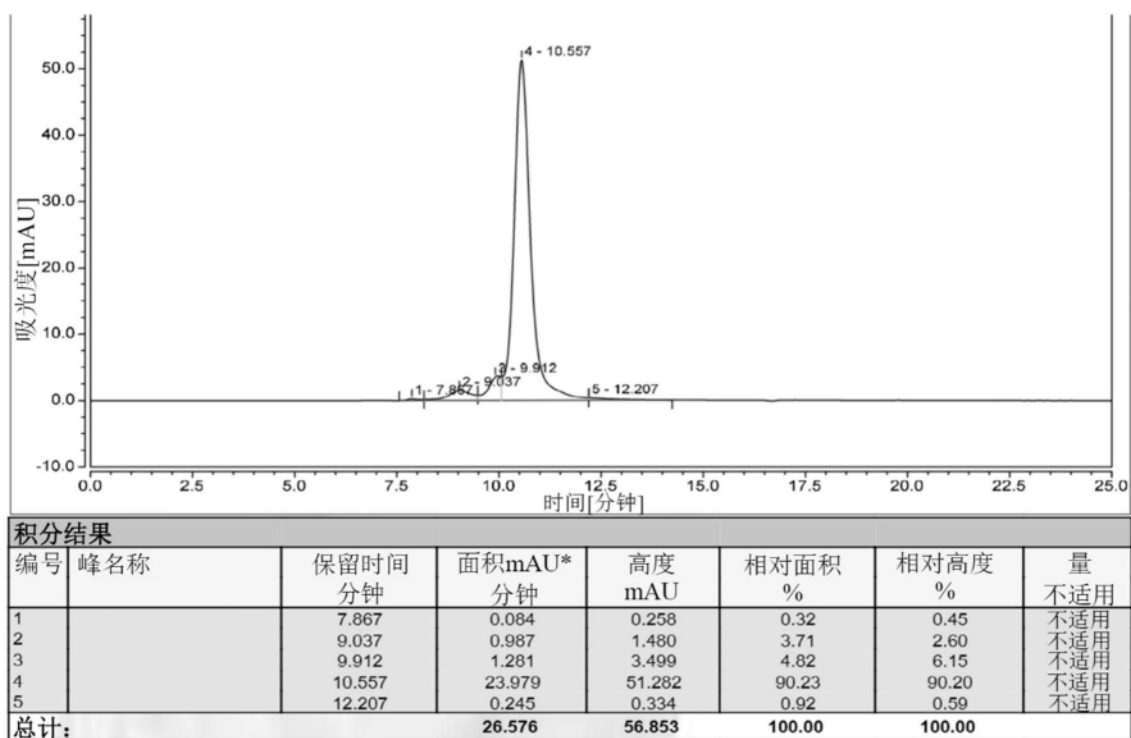


图10

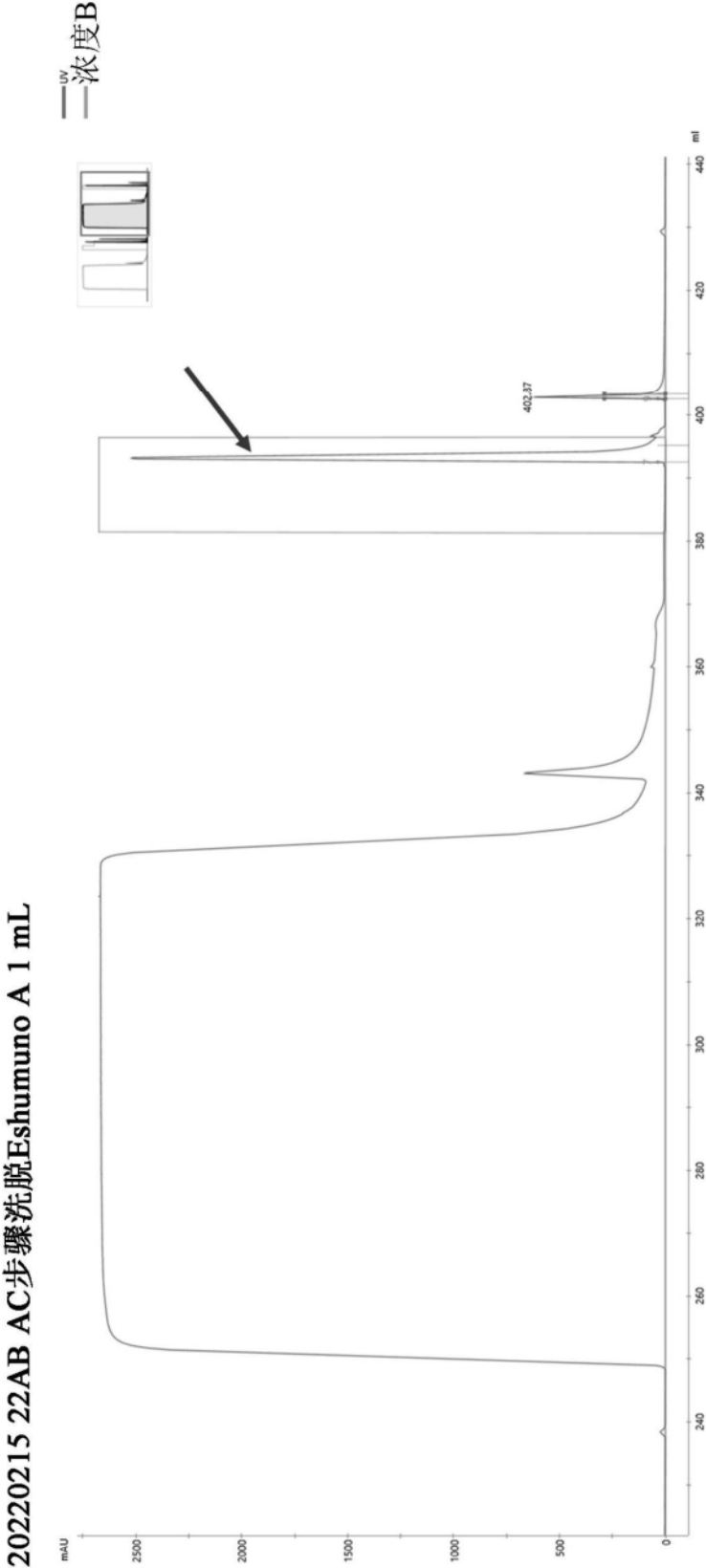


图11

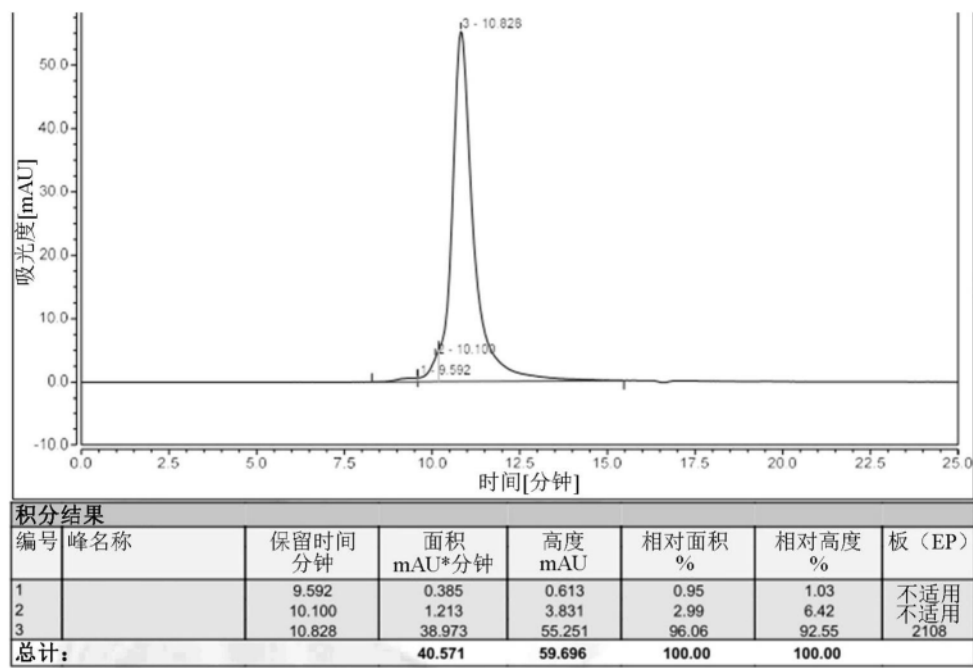


图12

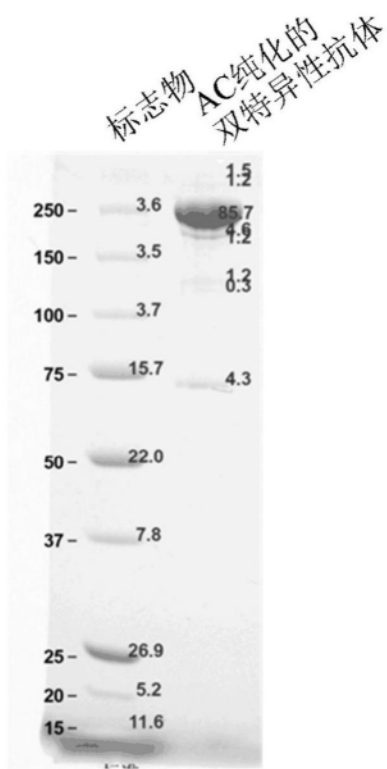


图13

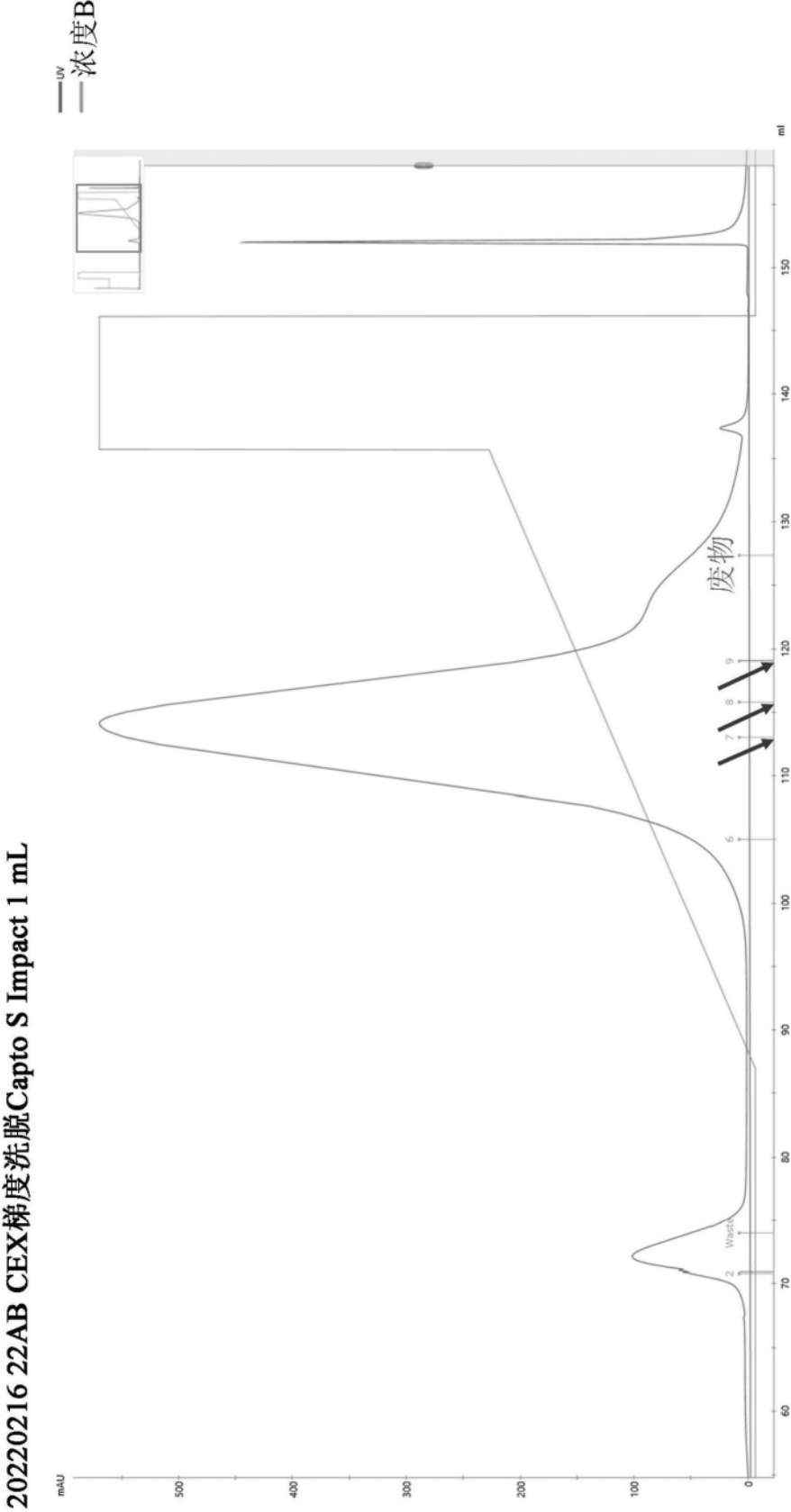


图14

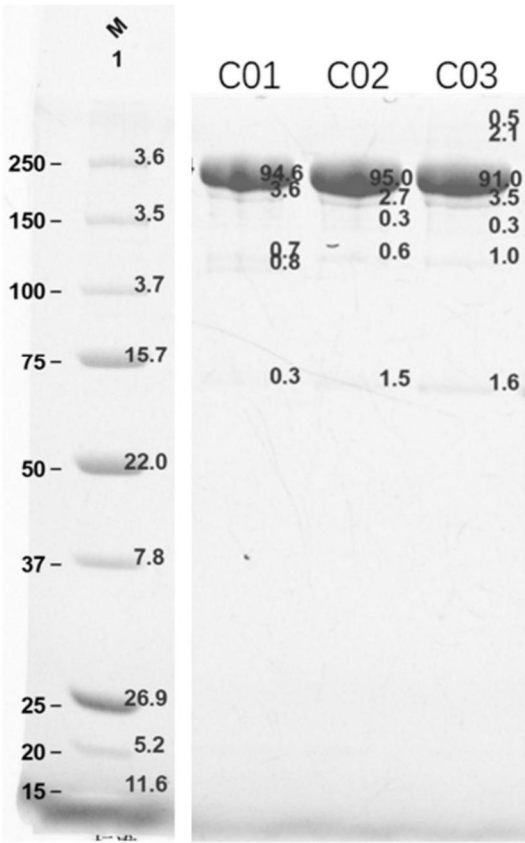


图15

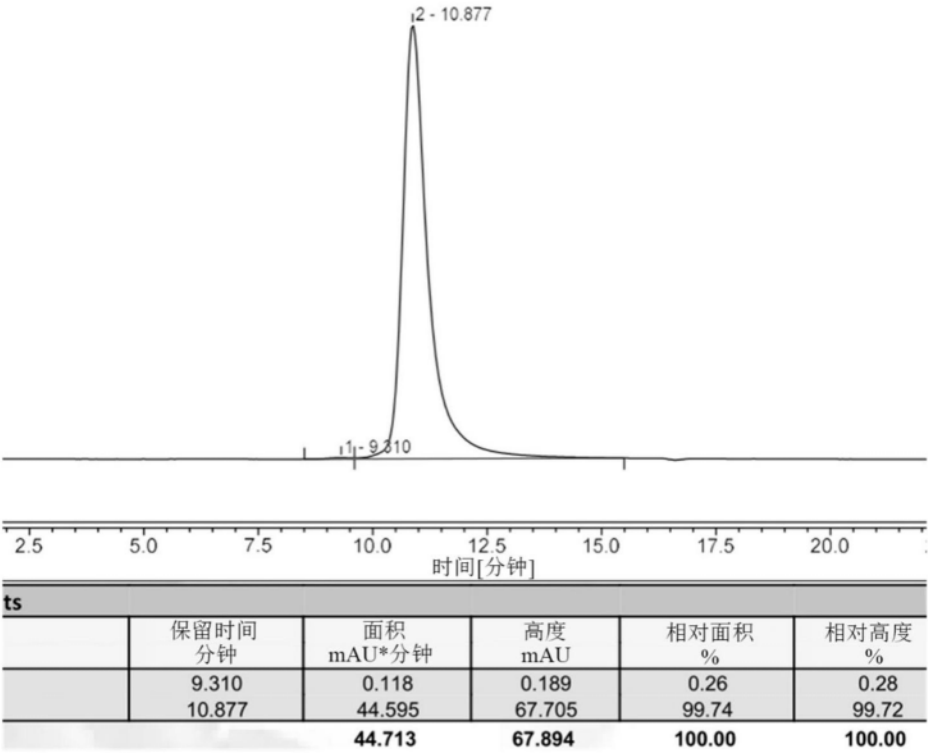


图16

示例性支架区对的序列

名称	序列
具有A141I、 F170S、S181M、 S183A和V185A 突变的CH1区	SEQ ID NO: 68 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAILGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTSPAVLQSSGLYMLASAVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
具有F116A、 L135V、S174A、 S176F和T178V的 CL区	SEQ ID NO: 71 RTVAAPSVAIFPPSDEQLKSGTASVVCVLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYALFSLVTLTKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
具有突变S183E的 CH1区	SEQ ID NO: 66 ASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLESVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
具有突变V133K的 CL区	SEQ ID NO: 73 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVKCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
具有突变F126C、 C220V的CH1区	SEQ ID NO: 77 ASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSVD
具有突变S121C、 C214V的CL区	SEQ ID NO: 79 RTVAAPSVFIFPPCDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEV
具有突变K147D的 CH1区	SEQ ID NO: 88 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVDDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
具有突变S176K的 CL区	SEQ ID NO: 90 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLKSTLTKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图17

名称	序列
具有突变S183K的CH1区	SEQ ID NO: 87 ASTKGPSVFPLAPGSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLKSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
具有突变S176D的CL区	SEQ ID NO: 92 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLDSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
具有突变H168A、F170G的CH1区	SEQ ID NO: 83 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVATGPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
具有突变L135Y、S176W的CL区	SEQ ID NO: 95 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCYLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLWSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
TCR α	SEQ ID NO: 97 EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHV ELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRL RVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQ IVSAEAWGRYGP
TCR β	SEQ ID NO: 98 PDIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKDS DVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSQKSDFACANAFQN SIIPEDTFFPSPESS
具有突变V173C、S183K、C220S的CH1区	SEQ ID NO: 103 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLKSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS
具有突变Q160C、S176D、C214S的CL区	SEQ ID NO: 104 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSCESVTEQDSKDYSLDSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGES
抗CD20 HCDR1	SEQ ID NO: 107 GFTFNDYA
抗CD20 HCDR2	SEQ ID NO: 108 ISWNSGSI
抗CD20 HCDR3	SEQ ID NO: 109 AKDIQYGNYYYGMDV

图17(续)

名称	序列
抗CD20 LCDR1	SEQ ID NO: 110 QSVSSY
抗CD20 LCDR2	SEQ ID NO: 111 DAS
抗CD20 LCDR3	SEQ ID NO: 112 QQRSNWPIT
抗CD3 HCDR1	SEQ ID NO: 113 GFTFSTYA
抗CD3 HCDR2	SEQ ID NO: 114 IRSKYNNYAT
抗CD3 HCDR3	SEQ ID NO: 115 VRHGNFGNSYVSWFAY
抗CD3 LCDR1	SEQ ID NO: 116 TGAVTTSNY
抗CD3 LCDR2	SEQ ID NO: 117 GTN
抗CD3 LCDR3	SEQ ID NO: 118 ALWYSNLWV

图17(续)