



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110382539 B

(45) 授权公告日 2023. 08. 08

(21) 申请号 201880014655.0
(22) 申请日 2018.02.28
(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110382539 A
(43) 申请公布日 2019.10.25
(30) 优先权数据
17158566.4 2017.02.28 EP
17174407.1 2017.06.02 EP
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.08.28
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2018/054989 2018.02.28
(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/158349 EN 2018.09.07
(73) 专利权人 阿菲姆德股份有限公司
地址 德国海德堡
(72) 发明人 索斯藤·罗斯 伊维卡·法斯克
克里斯蒂娜·埃尔旺格

迈克尔·维柴尔 乌维·罗伊施
斯特凡·奈克马斯
埃里希·拉伊科维奇
马丁·特里德
(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002
专利代理师 蒋洪之 安玉
(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
(56) 对比文件
CN 103687879 A, 2014.03.26
CN 101583625 A, 2009.11.18
CN 101821288 A, 2010.09.01
CN 105367660 A, 2016.03.02
US 2011206672 A1, 2011.08.25
审查员 徐乐
权利要求书2页 说明书24页
序列表8页 附图10页

(54) 发明名称

用于CD16A定向的NK细胞结合的串联双抗体

(57) 摘要

本发明涉及一种特异性双价结合CD16A的、由两条多肽链组成的串联双抗体,其中每条多肽链包含至少四个可变结构域,所述可变结构域从N末端到C末端按以下顺序排列:VH_TA-VL_CD16A-VH_CD16A-VL_TA。



1. 一种二聚体多特异性抗原结合分子,其特异性结合CD16A和不同于CD16A的靶细胞抗原,并由两条多肽链组成,其中每条多肽链包含四个可变结构域:

(i) 对CD16A有特异性的重链可变结构域(VH_CD16A),其包含氨基酸序列为SEQ ID NO:1的重链CDR1、氨基酸序列为SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7的重链CDR2和氨基酸序列为SEQ ID NO:3的重链CDR3,

(ii) 对CD16A有特异性的轻链可变结构域(VL_CD16A),其包含氨基酸序列为SEQ ID NO:4的轻链CDR1、氨基酸序列为SEQ ID NO:5的轻链CDR2和氨基酸序列为SEQ ID NO:6的轻链CDR3,

(iii) 对靶细胞抗原有特异性的重链可变结构域(VH_TA),和

(iv) 对靶细胞抗原有特异性的轻链可变结构域(VL_TA),

其中,

这些可变结构域通过由12个或更少的氨基酸残基组成的肽接头L1、L2和L3一个接一个地连接,并且从N末端到C末端以如下顺序位于两条多肽链的每一条内:

VH_TA-L1-VL_CD16A-L2-VH_CD16A-L3-VL_TA。

2. 根据权利要求1所述的多特异性抗原结合分子,其中所述抗原结合分子是四价串联双抗体。

3. 根据权利要求1或2所述的多特异性抗原结合分子,其中,与接头L1和接头L3中的每一个相比,接头L2由更少的氨基酸残基组成。

4. 根据权利要求1或2所述的多特异性抗原结合分子,其中接头L2由3至9个氨基酸残基组成。

5. 根据权利要求4所述的抗原结合分子,其中(i) 接头L2由3个氨基酸残基组成,接头L1和接头L3各自由6至12个氨基酸残基组成,或者(ii) 接头L2由6个氨基酸残基组成,接头L1和接头L3各自由9至12个氨基酸残基组成。

6. 根据权利要求5所述的多特异性抗原结合分子,其中(i) 接头L1由12个氨基酸残基组成,接头L2由3个氨基酸残基组成,接头L3由12个氨基酸残基组成,或者(ii) 接头L1由9个氨基酸残基组成,接头L2由6个氨基酸残基组成,接头L3由9个氨基酸残基组成。

7. 根据权利要求1或2所述的多特异性抗原结合分子,其中所述靶细胞抗原选自BCMA、CS-1、CD19、CD20、CD38和CD138。

8. 根据权利要求1或2所述的多特异性抗原结合分子,其中,

(i) 所述对CD16A有特异性的重链可变结构域(VH_CD16A)的氨基酸序列为SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:10,

(ii) 所述对CD16A有特异性的轻链可变结构域(VL_CD16A)的氨基酸序列为SEQ ID NO:9。

9. 一种编码权利要求1-8中任一项所述的多特异性抗原结合分子的多核苷酸。

10. 一种载体,其包含权利要求9所述的多核苷酸。

11. 一种用权利要求10所述的载体转染的宿主细胞。

12. 权利要求1至7中任一项所述的多特异性抗原结合分子在制备用于基于NK细胞的免疫治疗的药物中的用途。

13. 权利要求7所述的多特异性抗原结合分子在制备用于治疗多发性骨髓瘤的药物中

的用途。

14. 根据权利要求13所述的用途,其中所述靶细胞抗原是BCMA。

用于CD16A定向的NK细胞结合的串联双抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及多特异性抗原结合分子,其用于结合天然杀伤(NK)细胞,以通过NK细胞上表达的CD16A($\text{Fc } \gamma \text{ RIIIA}$)抗原触发NK细胞的细胞毒性。本发明描述了用于诱导有效的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的新型Fv结构域蛋白构象。在一个实施方案中,本发明进一步涉及一种串联双抗体,其包含呈新型Fv结构域蛋白构象的两个抗CD16A。本发明的一个实施方案是抗BCMA/CD16A多特异性抗原分子及其用于治疗BCMA⁺疾病,例如用于治疗多发性骨髓瘤的用途。

背景技术

[0002] NK细胞是先天免疫系统的有效细胞毒性免疫效应细胞。通过将NK细胞溶解重定向至肿瘤细胞并刺激在NK细胞的细胞表面上表达的活化性受体CD16A(也称为 $\text{Fc } \gamma \text{ RIIIA}$),可将NK细胞的细胞毒性潜力(cytotoxic potential)用于癌症免疫疗法。已经构建了在2期临床开发中的双特异性抗CD30/CD16A串联双抗体用于治疗某些CD30阳性B细胞恶性肿瘤和T细胞恶性肿瘤,包括霍奇金淋巴瘤(Rothe et al.; Blood 2015, 125(26):4024-4031; Reusch et al.; MABS 2014, 6(3):727-738)。该分子包含针对在各种淋巴瘤的肿瘤细胞上发现的表位CD30的两个结合位点,以及针对CD16A的两个结合位点。NK细胞表达调节其活性的各种刺激性受体和抑制性受体,使其能够区分健康细胞和被感染或转化的细胞。

[0003] 当NK细胞经由其CD16A受体通过串联双抗体与CD30阳性肿瘤细胞(通过其CD30抗原)结合时,它形成免疫突触,其会产生强激活信号。串联双抗体与NK细胞(通过其CD16A受体)和肿瘤细胞(通过CD30)的同时结合诱导CD16A介导的NK细胞活化和免疫突触的形成,导致含有穿孔素和颗粒酶的溶解性颗粒的极化胞吐作用以及FasL、TRAIL和TNF- α 的表面表达,其通过启动一系列进一步的酶活性(半胱天冬酶级联)诱导肿瘤细胞死亡,从而导致肿瘤细胞凋亡(程序性细胞死亡)。

[0004] 因此,这种双特异性串联双抗体能够选择性地重定向NK细胞溶解以发动攻击并消除癌细胞。相反,IgG同种型的全长抗体通过其Fc区激活和抑制性 $\text{Fc } \gamma$ 受体结合,所述受体包括CD16A、CD16B($\text{Fc } \gamma \text{ RIIIB}$)、CD32A($\text{Fc } \gamma \text{ RIIA}$)、CD32B($\text{Fc } \gamma \text{ RIIB}$)和CD64($\text{Fc } \gamma \text{ RI}$)。然而,对CD16A具有特异性的串联双抗体选择性地靶向激活性亚型CD16A(其发现于NK细胞和巨噬细胞上,但未在嗜中性粒细胞上发现)。此外,NK细胞结合的串联双抗体与CD16A进行双价相互作用,导致亲和力与常规抗体相比高约1000倍。

[0005] 对于NK细胞的结合,在WO 2006/125668中已经构建并描述了以高亲和力选择性地与CD16A相互作用的抗体。结合所述抗CD16A抗体和靶抗原特异性抗体(例如CD30)的NK细胞结合串联双抗体(NK-cell engaging tandem diabody),其结合位点中的两个与靶细胞抗原分子结合,并且其他两个结合位点同时与CD16A受体相互作用。该细胞-细胞交联事件刺激CD16A信号传导并启动相应NK细胞的细胞毒活性。

[0006] 因此,使用多特异性抗体将NK细胞定向以进行肿瘤细胞溶解被认为是一种有效的免疫治疗方法,具有降低的毒性和可控的安全性(Rothe等,2015)。

[0007] CD16A是一种触发NK细胞的细胞毒活性的激活受体。抗体对CD16A的亲合力与它们引发NK细胞活化的能力直接相关,因此减少了激活所需的抗体剂量。

[0008] 因此,需要增加CD16A结合抗体的亲合力以触发NK细胞的细胞毒性增加。

[0009] NK细胞的细胞毒活性可以通过多价结合CD16A(例如二价结合CD16A)增加亲合力来增加。

[0010] 然而,与CD16A的二价和多价结合可能导致一个NK细胞通过抗体的两个CD16A结合臂与另一个NK细胞交联。这会导致NK细胞活化和诱导自相残杀(NK-NK细胞溶解)最终导致体内有效NK细胞的耗竭,如先前使用CD16-定向的小鼠IgG抗体(3G8)所描述的,该抗体在恒河猴和绢毛猴中对CD16A是二价的(Choi et al., Immunology, 2008, 124: 215-222; Yoshida et al., Frontier in Microbiology, 2010, 1: 128)。因此, NK细胞的交联和NK-NK溶解的诱导减少了可用于介导ADCC的效应细胞的数量并且损害了治疗性抗体的功效。

[0011] 因此,本发明的一个目的是提供一种CD16A结合抗体,该抗体能够与NK细胞上的CD16A二价相互作用并因此具有增加的结合亲合力和细胞毒性效力但不能诱导NK-NK细胞溶解。

发明内容

[0012] 现在已经发现,通过四价串联双抗体可以增加NK细胞的细胞毒活性,当在串联双抗体中时,一对(两个)并列的抗CD16A抗原结合位点位于中心内部,两个抗肿瘤抗原结合位点位于外部(CD16A抗原结合位点的外围),可变结构域位于每条多肽链内,从多肽的N末端至C末端按以下顺序排列:VH_TA-VL_CD16A-VH_CD16A-VL_TA (VH=可变重链,VL=可变轻链;TA=肿瘤抗原;图1)。

[0013] 抗原结合位点的这种排列防止了NK细胞通过CD16A交联,从而不会诱导NK细胞溶解。另一方面,抗原结合分子通过两个抗CD16A抗原结合位点与NK细胞双价结合,从而通过较高的亲合力提高细胞毒性效力。

[0014] 双价双抗体的结构分析表明,这种分子中的抗原结合位点位于相对侧并且在构象中彼此背离,所述构象允许在与两个表面抗原特异性结合后进行有效的细胞-细胞交联(Perisic et al., Structure, 1994, 2(12): 1217-26)。与此一致,由与本发明的四价抗原结合分子中心所用的结构域相同的抗CD16A结构域以相同的结构域取向组成的类似的双价抗CD16A双抗体在体外诱导NK-NK细胞交联和NK-NK细胞耗竭(实施例4,表6)。根据本发明的四价串联双抗体不能体外诱导NK细胞耗竭表明以下特定的蛋白构型,即两个并列的抗CD16A抗原结合位点位于中心,两个抗肿瘤抗原结合位点位于外部(CD16A抗原结合位点的外围),所述蛋白构型采用以下顺序:VH_TA-VL_CD16A-VH_CD16A-VL_TA(图1),根据本发明,所述蛋白构型令人惊讶地产生不同于双抗体的构象,其防止NK-NK细胞溶解但通过双价CD16A结合来增加亲合力。

[0015] 因此,在多肽中心具有一对CD16A抗原结合位点的这种特定的四价串联双抗体提供了一种蛋白构象,其中两个CD16A定向的Fv结构域定位成使得双价结合是最佳的但是阻止了NK细胞-NK细胞交联。因此,这种抗原结合分子表现出增强的亲合力和细胞毒性效力,但不诱导NK细胞耗竭。

[0016] 此外,不诱导NK细胞-NK细胞溶解可以使这种抗原结合分子与细胞的NK细胞疗法

结合使用,例如,通过在输注给患者之前离体混合同种异体或自体NK细胞与抗体(过继转移)。

[0017] 此外,由于IgG的高血浆水平(生理水平通常为约10mg/ml),CD16A结合抗体面临与IgG的Fc-结构域竞争结合CD16A,从而增加了治疗性抗体的所需剂量。与血浆IgG的竞争在以高水平血浆IgG为特征性疾病(例如多发性骨髓瘤)中更为明显。因此,使用双特异性抗原结合分子或结合IgG的Fc区的典型抗体形式时,CD16A介导的对NK细胞的细胞毒活性的刺激在血清IgG存在下降低,血清IgG通过其Fc区竞争与NK细胞上的CD16A结合。

[0018] 本发明进一步提供识别CD16A上不同于Fc结合位点的表位的CD16A Fv结构域,从而减少多克隆IgG对CD16A的竞争。

[0019] 值得注意的是,在抗原结合分子的中心位置定位一对并列的CD16A定向的Fv结构域影响NK细胞结合并使得多克隆IgG对CD16A的竞争减少。实施例2表明IgG的存在降低了CD16A结合串联双抗体的亲和力,这种降低与分子内的结构域取向无关。然而,串联双抗体受到的影响不同,并且由于对CD16A结合的竞争减少,具有将CD16A结构域定位在串联双抗体(变体4)中心的取向的串联双抗体在多克隆IgG存在下表现出更高的NK细胞结合亲和力。类似地,串联双抗体的体外细胞毒活性受生理IgG水平的存在的影响不同,这取决于分子内CD16A结构域的定位,串联双抗体变体4在多克隆IgG存在下表现出更高的效力和更低的效力损失。

[0020] 此外,已发现串联双抗体在NK细胞表面上的停留不受添加多克隆IgG的影响,因为在存在和不存在IgG时解离速率相似(实施例2)。这表明一旦结合,多克隆IgG就不能从NK细胞中置换串联双抗体,因为串联双抗体与CD16A上的不同于IgG结合位点的表位结合。因此,变体4(图2)中串联双抗体内的结构域取向所产生的蛋白构象可以独特地适合于在血清IgG存在下靶向并双价结合NK细胞,例如在生理IgG浓度下,特别是在以高水平产生单克隆免疫球蛋白为特征的浆细胞疾病中也是如此。特别地,观察到串联双抗体在NK细胞上的停留以及IgG不干扰其解离表明变体4中的串联双抗体(图2)可以与为细胞的NK细胞产品组合使用,例如,通过在输注给患者之前将NK细胞和抗体体外混合(过继性NK细胞转移)。因为典型的基于IgG的治疗性抗体形式仅与CD16A弱相互作用并且直接与血清IgG竞争CD16A结合,所以预期当在输注到患者之前与NK细胞混合时,这些抗体将迅速从NK细胞解离。相比之下,由于在NK细胞表面的停留被延长,变体4中的CD16A定向的串联双抗体(图2)有望实现迄今为止无法实现的与为细胞的NK细胞产品的新组合方法。

[0021] 总之,本发明针对结合表位不同于IgG Fc结构域的结合表位的CD16A Fv结构域,提供了四价串联双抗体形式的特定蛋白构象,该构象用于通过双价结合NK细胞来增加NK细胞的细胞毒性,同时阻止由NK-NK细胞交联引起的NK细胞耗竭,并且降低多克隆IgG对CD16A的竞争。

[0022] 因此,本发明的第一个实施方案涉及一种二聚体多特异性抗原结合分子,优选串联双抗体,其特异性结合CD16A和不同于CD16A的靶细胞抗原,并由两条多肽链组成,其中每条多肽链包含选自下组的至少四个可变结构域:(i)对CD16A有特异性的重链可变结构域(VH_CD16A),其包含具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链CDR1,具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的重链CDR2,和具有SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的重链CDR3,(ii)对CD16A有特异性的轻链可变结构域(VL_CD16A),其包含具有SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的轻链

CDR1,具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的轻链CDR2,和具有SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的轻链CDR3,(iii)对靶细胞抗原有特异性的重链可变结构域(VH_TA),和(iv)对靶细胞抗原有特异性的轻链可变结构域(VL_TA),其中这些可变结构域通过肽接头L1、L2和L3一个接一个地连接,并且在两条多肽链的每一条内从N末端到C末端以如下顺序定位:VH_TA-L1-VL_CD16A-L2-VH_CD16A-L3-VL_TA。优选地,肽接头L1、L2和L3由12个或更少的氨基酸残基组成。

[0023] 此外,尽管最近在治疗多发性骨髓瘤(MM)方面取得了进展,但仍需要新的治疗方法以在更多患者中实现持久的缓解。NK细胞在对多发性骨髓瘤的免疫应答中起关键作用,并且涉及包括免疫调节剂(IMiD)、蛋白酶体抑制剂、最近批准的免疫疗法和自体干细胞移植(ASCT)的当前标准护理干预的临床功效。正在开发许多策略来增强针对骨髓瘤细胞的天然NK细胞的细胞毒性,其经常在多发性骨髓瘤中失调。方法包括通过细胞因子刺激或免疫检查点靶向调节活性,以及在符合自体干细胞移植的多发性骨髓瘤中过继转移培养扩增的NK细胞。虽然极具吸引力,但这些方法是非靶向的,因为它们依赖于NK细胞的天然细胞毒性,并且可能受益于抗原特异性重定向和效应子激活。

[0024] 多发性骨髓瘤是浆细胞恶性肿瘤,其特征在于高水平产生单克隆免疫球蛋白(M-蛋白):IgG型骨髓瘤中M-蛋白的血清水平可高达100mg/mL或更高,其中对于健康个体典型的血清水平为约10mg/mL。大约50%的肿瘤产生IgG M-蛋白,其中大约50%是IgG1或IgG3。

[0025] 由于生理浓度下血清IgG对CD16A的竞争,(i)可以降低抗体诱导NK细胞介导的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的效力,这导致需要增加治疗剂量,以及(ii)由于IgG竞争有效地减少了可用于细胞-细胞交联的CD16A受体的数量,因此在遇到靶抗原阳性细胞时引发NK细胞活化所需的靶抗原水平的阈值增加。因此,IgG竞争降低了抗体诱导的NK细胞对表达低水平靶抗原的靶细胞的活性。这可以从报告如下内容的研究中推断出来:用携带CD16A结合亲和力增加的Fc突变的抗体刺激的NK细胞对低抗原表达细胞的ADCC活性增加。

[0026] BCMA(B细胞成熟抗原,CD269)被认为是对多发性骨髓瘤的免疫治疗极具吸引力的靶抗原。BCMA被描述为在骨髓瘤细胞上普遍表达。

[0027] 因此,本发明的另一个目的是提供一种在骨髓瘤中诱导有力和有效ADCC的抗体,特别是在IgG M-蛋白存在的情况下。

[0028] 在另一方面,本发明提供了结合BCMA和CD16A的新型四价双特异性串联双抗体(TandAb)。该串联双抗体包含亲和力改善的抗CD16A Fv结构域并与NK细胞进行双价相互作用,获得了高亲合力和不受多克隆IgG的存在影响的延长的细胞表面停留。由于特定CD16A结合结构域的新型Fv结构域蛋白构象,即使存在多克隆IgG,串联双抗体也能有效诱导NK细胞介导的体外细胞溶解。这表明串联双抗体与典型mAb相比,在血清IgG存在下以及在低抗体浓度下保留ADCC活性,即使在大约一半的多发性骨髓瘤患者中存在的高水平的IgG M-蛋白的情况下也是如此。

[0029] 根据本发明,这已经通过以下所述而实现:将一对并列的抗CD16A抗原结合位点置于串联双抗体的中心内部,并且将BCMA抗原结合位点以N末端和C末端的方式置于它们的外围,使得可变结构域以VH_(BCMA)-VL_(CD16A)-VH_(CD16A)-VL_(BCMA)的顺序排列在串联双抗体的多肽链内。

[0030] 因此,本发明公开的这种BCMA/CD16A串联双抗体是治疗多发性骨髓瘤的高效候选

药物。

[0031] 以引用方式并入

[0032] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文，其程度如同具体地且单独地指明每个单独的出版物、专利或专利申请均通过引用而并入。

附图说明

[0033] 图1为特异性结合第一抗原A(例如BCMA)和第二抗原B(CD16A)的多特异性串联双抗体的基因和结构域组织的示意图。串联双抗体表达为包括通过短接头L1、L2和L3连接的四个可变结构域的单个多肽。表达后，两个单体多肽头尾相互非共价结合形成功能性同源二聚体串联双抗体，提供四个抗原结合位点(Fv-1, Fv-2)。L1、L2、L3: 肽接头; VH: 重链可变结构域; VL: 轻链可变结构域。A、B: 抗原特异性。

[0034] 图2为特异性结合BCMA和CD16A的多特异性串联双抗体多肽的基因组织和结构域顺序的示意图。串联双抗体表达为包括通过短接头L1、L2和L3连接的四个可变结构域的单个多肽。第一行: var.1=变体1, 第二行: var.2=变体2, 第三行: var.3=变体3, 第四行: var.4=变体4。

[0035] L1、L2、L3: 接头; VH CD16A: 与CD16A结合的重链可变结构域; VL CD16A: 与CD16A结合的轻链可变结构域; VH BCMA: 与BCMA结合的重链可变结构域; VL BCMA: 与BCMA结合的轻链可变结构域; sp: 信号肽; Ta: 亲和标签。

[0036] 图3示出了与抗CD16A scFv相比，在存在和不存在多克隆人IgG的情况下串联双抗体与原代人NK细胞结合的结合亲和力增加。

[0037] 图4示出了与原代人NK细胞结合的串联双抗体和抗CD16A scFv。

[0038] 图5示出了在存在和不存在多克隆人IgG的情况下串联双抗体在原代人NK细胞上的表面停留。

[0039] 图6示出了在存在和不存在多克隆人IgG的情况下，串联双抗体诱导的NK细胞介导的对BCMA⁺骨髓瘤细胞系的体外细胞毒性。

[0040] 图7示出了变体2而非变体4串联双抗体，诱导NK细胞-NK细胞溶解

[0041] 图8示出了NK细胞-NK细胞溶解由双价单特异性抗CD16A双抗体诱导，而不是由单价抗CD16A scFv诱导。

[0042] 图9示出了在存在和不存在BCMA⁺靶细胞的情况下人PBMC培养物中抗体诱导的细胞因子释放。

[0043] 图10示出了在存在浓度递增的BCMA/CD16A定向的串联双抗体和比较抗体的情况下，原代人NK细胞对BCMA⁺靶细胞系的体外细胞毒性。

[0044] 图11示出了在存在浓度递增的BCMA/CD16A定向的串联双抗体和比较抗体的情况下，原代人NK细胞对原发性骨髓瘤细胞的体外细胞毒性。

[0045] 图12示出了抗体与骨髓瘤细胞系的结合。

[0046] 图13: 用HLA-A2^{MMP1-003}/CD16A串联双抗体变体2和变体4进行的4小时钙黄绿素释放细胞毒性测定，以评估抗体诱导的NK-NK细胞溶解。

具体实施方式

[0047] 因此,本发明提供了一种多特异性抗原结合分子,其包含在链中连接在一起的至少四个抗原结合位点,其中至少两个并列的抗原结合位点对CD16A具有特异性,并且至少一个对靶细胞抗原具有特异性的其他抗原结合位点位于对CD16A具有特异性的所述一对(两个)并列的抗原位点外侧。

[0048] 因此,本发明提供了包含至少四个抗原结合位点的多特异性抗原结合分子。抗原结合位点可以彼此非共价结合或彼此共价结合。如果抗原结合位点彼此共价结合,它们可以通过肽键或肽接头彼此融合。或者,抗原结合位点可以通过化学结合连接,诸如二硫键(例如在至少一个抗原结合位点的半胱氨酸残基与另一个抗原结合位点的半胱氨酸残基之间)、酯键或通过化学交联连接。

[0049] 在抗原结合位点通过肽键或肽接头彼此结合的实施方案中,抗原结合分子可以是由单条多肽链组成的单体,或者抗原结合分子可以是多聚体,该多聚体包含至少两条多肽链,即两条、三条或更多条多肽链,它们彼此共价或非共价结合。

[0050] 在某些实施方案中,包含至少四个抗原结合位点的抗原结合分子是由彼此非共价结合的两条多肽链组成的二聚体分子,其中每条多肽链包含至少四个可变结构域。这种二聚体抗原结合分子的实例是下面进一步描述的串联双抗体。

[0051] 在某些实施方案中,抗原结合分子不包含抗体恒定结构域。

[0052] 本发明提供了一种多特异性抗原结合分子,其包含特异性结合CD16A以用于与NK细胞结合的抗原结合位点,以及特异性结合不同于CD16A的靶抗原(TA)的抗原结合位点,其中抗原结合分子由两条多肽链组成。这种抗原结合分子的实例是串联双抗体。

[0053] 术语“结合蛋白”是指具有抗原结合特性的免疫球蛋白衍生物,即结合蛋白是抗原结合蛋白。结合蛋白包含能够结合靶抗原的免疫功能性免疫球蛋白部分。免疫功能性免疫球蛋白部分可包含免疫球蛋白或其部分、衍生自免疫球蛋白部分的融合肽或结合形成抗原结合位点的免疫球蛋白部分的缀合物。结合蛋白包含至少一个抗原结合位点,该抗原结合位点是与靶抗原结合的结合蛋白的区域、部分或结构域。每个抗原结合位点至少包含衍生抗原结合位点的免疫球蛋白重链或轻链的CDR。

[0054] 术语“结合蛋白”还指抗体片段、抗体衍生物或抗体样结合蛋白,其保留对其抗原的特异性和亲和力,包括例如基于Fv结构域的不含或含有其他恒定结构域的IgG样或非IgG样融合肽,例如Fc-scFv、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、单链Fv、串联单链Fv((scFv)₂)、双特异性T细胞衔接器(BiTE®)或双特异性NK细胞衔接器(BiKE)、双亲和重靶向抗体(DART™)、双抗体、单链双抗体和串联双抗体(TandAb®);三链抗体(triabody)、三抗体(tribody)或三特异性NK细胞衔接器(TriKE)。取决于所需的特征,例如化合价、多特异性、药代动力学和药效学特性,Fv和/或恒定结构域和/或其他功能结构域可以以不同的形式或支架模块化组装,例如,如Brinkmann and Kontermann, mAbs, 2017, 9(2):182-192或Spiess et al., 2015, Molecular Immunology, 67:95-106中所述。

[0055] 术语“抗原结合位点”是指抗体-抗原结合位点或抗原结合分子的互补位(paratope),特别是其特异性地结合抗原的抗原决定簇(表位)。抗原结合位点是抗原结合分子的结合部分,其能够识别抗原并特异性结合抗原。抗原结合位点包含轻链(VL)和重链(VH)的可变结构域,其与抗原结合,即与抗原的表位结合。在某些实施方案中,抗原结合位

点可以是单结构域(sdAb),例如,来自骆驼科动物(camelid)的V_H片段或来自软骨鱼类的V_{NAR}片段。

[0056] 每个抗原结合位点由抗体(即免疫球蛋白)、可变重链结构域(VH)和结合相同表位的抗体可变轻链结构域(VL)形成,然而可变重链结构域(VH)包含三个重链互补决定区(CDR):HCDR1、HCDR2和HCDR3;可变轻链结构域(VL)包含三个轻链互补决定区(CDR):LCDR1、LCDR2和LCDR3。在本发明的某些实施方案中,结合蛋白缺乏免疫球蛋白恒定结构域。抗原结合位点的可变重链和轻链结构域可以彼此共价连接,例如,通过肽接头,或彼此非共价结合以形成抗原结合位点。

[0057] 术语“多肽链”是指通过酰胺键连接的氨基酸残基的聚合物。多肽链优选是不支化的单链融合蛋白。在多肽链中,可变结构域通过肽接头或肽键从多肽的N-末端到C-末端一个接一个地连接。除了可变结构域以及连接N-末端和/或C-末端的可变结构域的肽接头之外,多肽链可以具有连续的氨基酸残基。例如,多肽链可含有标签(Tag)序列,优选在C末端,其可用于纯化多肽。标签序列的一个例子是His-标签,例如由六个组氨酸残基组成的His-标签。

[0058] 在一些实施方案中,抗原结合分子由单个多肽链组成。这种抗原结合分子是单体。在其他实施方案中,抗原结合分子包含至少两条多肽链。这种抗原结合分子是多聚体,例如,二聚体、三聚体或四聚体。

[0059] 在某些实施方案中,抗原结合分子是同源二聚体并且由两条相同的多肽链组成。

[0060] 这种同型二聚体是二聚的双特异性串联双抗体。

[0061] 术语“串联双抗体”是指通过在能够实现同源二聚化的单个基因构建体中连接至少四个可变结构域(两个重链可变结构域(VH)和两个轻链可变结构域(VL))而构建的抗原结合分子。在这种串联双抗体中,接头长度使得其阻止可变结构域的分子内配对,从而使得分子自身不能折叠起来形成单体单链分子,而是被迫与另一条链的互补结构域配对。可变结构域也被排列成使得相应的可变结构域在该二聚化期间配对(Weichel et al.,2015, European Pharmaceutical Review,20(1):27-32)。

[0062] 在由单个基因构建体表达后,两条相同的多肽链头尾相互折叠,形成约105kDa的功能性非共价同源二聚体。尽管不存在分子间共价键,但同源二聚体一旦形成就高度稳定,保持完整并且不会恢复为单体形式。串联双抗体具有许多优于传统单克隆抗体和其他较小双特异性分子的性质。串联双抗体仅含有抗体可变结构域,因此被认为缺乏可能与Fc部分相关的副作用或非特异性相互作用。例如,可以在许多细胞类型(例如白细胞(例如嗜碱性粒细胞、B细胞、嗜酸性粒细胞、NK细胞、嗜中性粒细胞等)或库普弗细胞)上发现可以结合Fc区的Fc受体。因为串联双抗体允许与CD16A和靶细胞抗原的双价结合,所以亲合力(avidity)与IgG的亲合力相同。串联双抗体的大小约为105kDa,小于IgG的尺寸,但远高于首肾清除率的阈值,与基于抗体结合域或非抗体支架的较小双特异性形式相比,提供了药代动力学优势。此外,基于这些药代动力学和亲合力性质,串联双抗体优于其他双特异性结合蛋白例如BiTE®或DART™分子,导致更长的内在半衰期和增强的细胞毒性。串联双抗体在宿主细胞(例如哺乳动物CHO细胞)中很好地表达。预期强大的上游和下游制造工艺可用于串联双抗体。

[0063] 术语“多特异性”是指抗原结合分子,其包含与至少两个不同表位(特别是不同抗

原的表位)结合的抗原结合位点。“多特异性”包括但不限于双特异性、三特异性和四特异性。

[0064] 术语“靶抗原”是指由一类细胞(即靶细胞,或NK细胞应该靶向以诱导或触发NK细胞的细胞毒性的病毒)表达的或与该类细胞相关的抗原。靶抗原的实例可以是肿瘤抗原或肿瘤相关抗原(TAA)。肿瘤抗原或TAA可以在靶细胞的表面上表达或由MHC复合物展示为MHC限制性肽。肿瘤抗原的实例包括但不限于CD5、CD19、CD20、CD30、CD33、CD38、CD138、CS-1、基质金属蛋白酶1(MMP1)、层粘连蛋白受体前体蛋白、BCMA、Ep-CAM、PLAP、Thomsen-Friedenreich(TF)抗原、MUC-1(粘蛋白)、IGFR、IL4-R α 、IL13-R、HER2/neu、HER3、PSMA、CEA、TAG-72、HPV E6、HPV E7、BING-4、细胞周期蛋白-B₁、9D7、EphA2、EphA3、端粒酶、间皮素、SAP-1、存活蛋白、癌症睾丸抗原(BAGE家族、CAGE家族、GAGE家族、MAGE家族、SAGE家族、XAGE家族)、NY-ESO-1/LAGE-1、PRAME、SSX-2、Melan-A/MART-1、Gp100/pmel17、酪氨酸酶、TRP-1/-2、MC1R、 β -连环蛋白、BRCA1/2、CDK4、CML66、MART-2、p53、Ras、TGF- β RII和TCR(出自Categories of Tumor Antigens,Holland-Frei Cancer Medicine,6th edition.Kufe DW, Pollock RE,Weichselbaum RR.et al.,editors Hamilton(ON):Becker;2003)。在本发明的某些实施方案中,靶抗原不是EGFR或EGFRvIII。

[0065] 在其他实施方案中,靶抗原可以是传染原(infectious agent),例如病毒或细菌病原体,例如源自登革热病毒、单纯疱疹、流感病毒或HIV。在某些实施方案中,靶抗原不是EGFR或EGFRvIII。

[0066] 在一些实施方案中,本发明提供了一种多特异性抗原结合分子,例如,串联双抗体,其包含特异性结合CD16A和不同于CD16A的靶抗原(TA)的抗原结合位点,其中抗原结合分子由两条多肽链组成。每条多肽链包含至少四个选自下组的可变结构域

[0067] (i)对CD16A有特异性的重链可变结构域(VH_CD16A),

[0068] (ii)对CD16A有特异性的轻链可变结构域(VL_CD16A),

[0069] (iii)对靶抗原有特异性的重链可变结构域(VH_TA),和

[0070] (iv)对靶抗原有特异性的轻链可变结构域(VL_TA)。

[0071] 这些可变结构域从多肽的N-末端到C-末端以如下顺序位于两条多肽链的每一条内:

[0072] VH_TA-VL_CD16A-VH_CD16A-VL_TA(图1)

[0073] 在替代实施方案中,可变结构域可以从多肽的N-末端到C-末端以如下顺序位于两条多肽链的每一条内:VL_TA-VH_CD16A-VL_CD16A-VH_TA。

[0074] 因此,抗CD16A的重链和轻链可变结构域以如下方式定位:一对并列的结构域位于多肽链内部的中心,而特异性结合靶抗原的重链和轻链可变结构域在多肽内部位于一对并列的抗CD16A结构域的N末端侧和C-末端侧。

[0075] 有利地,多肽链中的这种可变结构域排列阻止NK细胞通过抗原结合分子交联NK细胞上的CD16A受体而诱导NK细胞溶解,因为抗原结合分子内部的该对(两个)并列的CD16A抗原结合位点不能交联不在相同细胞上表达的CD16A受体。然而,另一方面,抗原结合分子的两个CD16A抗原结合位点能够与在相同NK细胞上表达的CD16A双价结合,从而通过增加的亲和力提高NK细胞活化的细胞毒性效力。

[0076] 这种多特异性抗原结合分子,例如,串联双抗体是双特异性的并且至少是四价的,

即包含至少四个抗原结合位点。

[0077] 在另一个实施方案中,所述至少四个可变结构域通过肽接头L1、L2和L3连接,并且定位为从多肽链的N末端到C末端按如下顺序排列:

[0078] VH_TA-L1-VL_CD16A-L2-VH_CD16A-L3-VL_TA(图1)。

[0079] 在其他实施方案中,可变结构域和肽接头定位为从多肽链的N末端至C末端按如下顺序排列:VL_TA-L1-VH_CD16A-L2-VL_CD16A-L3-VH_TA。

[0080] 根据报道的研究,接头的长度影响这种多特异性抗原结合分子的柔韧性。因此,在一些实施方案中,肽接头L1、L2和L3的长度使得一条多肽的结构域可以与另一条多肽的结构域进行分子间结合以形成串联双抗体。在某些实施方案中,此类接头是“短的”,即由0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个氨基酸残基组成。因此,在某些情况下,接头由约12个或更少的氨基酸残基组成,例如3-12、3-10或3-9个氨基酸残基。在0个氨基酸残基的情况下,接头是肽键。这种短接头有利于两个多肽通过在不同多肽的抗体可变轻链结构域和抗体可变重链结构域之间结合并形成正确的抗原结合位点来进行分子间二聚化。将接头缩短至约12个或更少的氨基酸残基通常可防止相同多肽链的相邻结构域彼此发生分子内相互作用。在一些实施方案中,这些接头由约3至约12个,例如3、4、5或6个连续氨基酸残基组成。

[0081] 接头L1、L2和L3可以由相同数量的氨基酸残基组成,或者多肽链可以包含不同长度的接头。在一些实施方案中,长度为3至9个、优选3至6个、最优选3个氨基酸残基的较短的中心接头L2有利于增加双价CD16A结合NK细胞的亲和力,而在一些实施方案中,长度为9至12个、优选12个氨基酸残基的更柔韧的接头L1和L3可有利于NK细胞与靶细胞的有效交联。在一个实施方案中,与连接对CD16A有特异性的VH和VL结构域与可变靶结合结构域的外接头L1和外接头L3相比,连接对CD16A有特异性的VH和VL结构域的中心接头L2由更少的氨基酸残基组成。在此类实施方案中,中心接头L2可以由3至9个(例如3至6个)氨基酸残基组成。在一些实施方案中,中心接头L2由3个氨基酸残基组成,接头L1和接头L3由4、5、6、7、8、9、10、11或12个氨基酸残基组成,例如由6至9或6至12个氨基酸残基组成。在特定实施方案中,中心接头L2由3个氨基酸残基组成,接头L1和接头L3由6、9或12个氨基酸残基组成。在其他实施方案中,中心接头L2由6个氨基酸残基组成,接头L1和接头L3由7、8、9、10、11或12个氨基酸残基组成,例如由9-12个氨基酸残基组成。在特定实施方案中,中心接头L2由3个氨基酸残基组成,接头L1和接头L3由9或12个氨基酸残基组成。在其他的实施方案中,中心接头L2由9个氨基酸残基组成,接头L1和接头L3由10、11或12个氨基酸残基组成。

[0082] 关于接头的氨基酸组成,选择不干扰两种多肽二聚化的肽。例如,包含甘氨酸和丝氨酸残基的接头通常提供蛋白酶抗性。可以例如通过噬菌体展示方法优化接头的氨基酸序列,以改善抗原结合多肽二聚体的抗原结合和产量。在一些实施方案中,使用 $(G_2S)_x$ 肽接头,例如, $(G_2S)_1$ 、 $(G_2S)_2$ 、 $(G_2S)_3$ 、 $(G_2S)_4$ 、 $(G_2S)_5$ 、 $(G_2S)_6$ 、 $(G_2S)_7$ 或 $(G_2S)_8$ 。在一些实施方案中,适用于串联双抗体的肽接头的实例是GGSGGSGGS(SEQ ID NO:13)、GGSGG(SEQ ID NO:14)、GGSGGS(SEQ ID NO:15)或GGSGGSGGS(SEQ ID NO:16)。在一个具体实施方案中,接头L1和接头L3是 $(G_2S)_4$,接头L2是 $(G_2S)_1$ 。

[0083] 在某些实施方案中,靶抗原是展示在骨髓瘤细胞或浆细胞上的抗原。Sherbenou等人(Blood Rev 2015,28(2),81-91)综述了在骨髓瘤细胞上表达的抗原。在骨髓瘤细胞或浆细胞上表达的抗原的实例是BCMA、CD138、CD38、CS-1、CD19和CD20。优选地,抗原结合分子结

合抗原的细胞外结构域。

[0084] “骨髓瘤细胞”是由骨髓中的浆细胞产生的恶性(癌性)浆细胞。在骨髓瘤中,恶性浆细胞产生大量缺乏抗感染能力的异常抗体。这些异常抗体是单克隆蛋白或M-蛋白,其作为骨髓瘤的肿瘤标志物起作用。骨髓瘤细胞具有表型CD19⁻/CD38⁺/CD138⁺/BCMA⁺。因此,CD38、CD138和BCMA代表在骨髓瘤细胞上表达的抗原。

[0085] B细胞成熟抗原(BCMA、CD269或TNFRSF17)是TNF受体超家族的蛋白,通过其与B细胞激活(BAFF)和增殖诱导配体(APRIL)的结合,对于浆细胞的长期存活至关重要(O'Connor, B.P. et al. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. J. Exp. Med. 2004, 199, 91-96)。人BCMA是一种184个氨基酸(aa)的蛋白,由54个氨基酸细胞外结构域、23个氨基酸跨膜结构域和107个氨基酸细胞内结构域组成(Entrez Gene IDs: 608(Human) 102145399(Cynomolgous Monkey); UniProt Q02223(Human))。

[0086] 在某些实施方案中,抗原结合分子使用特异性结合BCMA细胞外结构域的抗体。

[0087] 优选地,本发明的抗原结合分子中使用的这种抗BCMA Fv抗体与BCMA相互作用,其平衡解离常数(K_D) (通过Biacore测量)小于 10^{-7} M,优选小于 10^{-8} M,最优选小于 10^{-10} M。包含在本发明的抗原结合分子中的这种抗BCMA可变(Fv)结构域能够使CD16A结合的NK细胞重定向并在BCMA⁺MM细胞存在的情况下诱导ADCC。已经报道了在体外和体内使经由CD3结合T细胞的双特异性抗体针对BCMA⁺骨髓瘤细胞的概念验证(例如, Hipp S. et al., Leukemia. 2017Aug; 31(8): 1743-1751. Epub 2016Dec27)。

[0088] 此类抗体可通过例如噬菌体或核糖体文库筛选方法或用BCMA的细胞外结构域免疫非人动物来获得,例如, Ryan M.C. et al., Antibody targeting of B-cell maturation antigen on malignant plasma cells. Mol Cancer Ther. 2007, 6, 3009-3018中所述。

[0089] Ryan等人描述了作为IgG或抗体药物缀合物的具有细胞毒活性的抗BCMA抗体的产生。Ryan M.C等人(通过引用并入本文)描述了产生人BCMA选择性抗体以用于肿瘤细胞靶向。产生了针对人BCMA细胞外结构域(ECD, 氨基酸5-51; NP_001183)的抗体。该抗体在体外诱导针对MM细胞的有效ADCC,其随着增强CD16A结合的Fc突变而增加。通过饱和结合, SG1对H929细胞的结合亲和力 K_D 为51nmol/L。这些抗体展示了针对MM细胞系的体外抗肿瘤活性并因此,它们的Fv结构域可用作本发明抗原结合分子中的BCMA抗原结合位点。

[0090] 此外, WO 02/066516描述了与TACI交叉反应的BCMA抗体。描述了抗BCMA/TACI双特异性抗体结合BCMA的残基1-48以及TACI的残基30-67和68-154。其可变重链和轻链结构域可用于本发明的抗原结合分子中,并通过引用并入本文。

[0091] Ramadoss et al., J. Am. Chem. Soc. 2015, 137, 5288-5291(通过引用并入本文)描述了双特异性(BiFab-BCMA)抗体,其重定向T细胞以溶解恶性MM细胞。据描述,双特异性抗体可用于治疗MM,因为它们靶向静息癌症干细胞以及少量的肿瘤相关抗原。

[0092] WO2014/122144描述了以双特异性形式特异性结合人BCMA和CD3的双特异性抗体。所公开的抗BCMA可变结构域适用于本发明的抗原结合分子。

[0093] WO2013/072406公开了在双特异性单链抗体中称为BCMA-1至BCMA-108的抗BCMA Fv结构域,该单链抗体对CD3具有第二特异性以结合T细胞。描述了这些BCMA/CD3双特异性单链抗体在人肿瘤异种移植模型中的抗肿瘤功效,因此,这些抗BCMA Fv结构域可用于本发明的抗原结合分子中。

[0094] 在W02010/104949、W02012/163805、W02013/072415、W02014/140248和W02014/068079中公开了可用于结合免疫效应细胞(例如T-细胞或NK-细胞)的双特异性抗体的其它抗BCMA抗体。这些参考文献还描述了以高亲和力特异性靶向BCMA的抗BCMA Fv结构域和使用这种抗BCMA Fv结构域的双特异性抗体,其诱导有力和有效的骨髓瘤细胞溶解。因此,已经表明了用于重定向T细胞以溶解MM细胞的双特异性抗体中的抗BCMA Fv结构域的概念验证。串联双抗体还可有效地结合免疫效应细胞(例如T细胞或NK细胞)以杀死肿瘤细胞(Weichel et al.,2015)。因此,本领域的这些抗BCMA Fv结构域可以用于本发明的串联双抗体中,并且包含根据本发明的两个CD16A结构域的新型Fv结构域蛋白构象将诱导针对MM细胞的增强的NK细胞细胞毒性。

[0095] 另一个靶标是CD138,其在骨髓瘤和正常浆细胞上普遍表达(Pellat-Deceunynck C.,et al.Expression of CD28 and CD40 in human myeloma cells:a comparative study with normal plasma cells.Blood.1994,84(8):2597-603)。抗CD138抗体的一个实例是茈达昔单抗(Indatuximab)(Biotest)(Jagannath S,et al.BT062 an antibody-drug conjugate directed against CD138,shows clinical activity in patients with relapsed or relapsed/refractory multiple myeloma(Blood 2011,118(21)(Abstract 305))。

[0096] 此外,CD38(环状ADP核糖水解酶)几乎在所有浆细胞和骨髓瘤细胞上表达。抗CD38抗体的实例是达雷木单抗(daratumumab)(Genmab,Janssen)(De Weers M et al.Daratumumab,a novel therapeutic human CD38monoclonal antibody,induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors.J.Immunol.2011,186(3):1840-8)和伊沙妥昔单抗(isatuximab)(Sanofi)(Deckert J.,et al.SAR650984,a novel humanized CD38-targeting antibody,demonstrates potent antitumor activity in models of multiple myeloma and other CD38+hematological malignancies.Clin.Cancer Res.2014,20(17):4574-83)。

[0097] 其他的抗原结合位点以及骨髓瘤细胞上表达的抗原(尤其是BCMA)结合的抗原结合位点的可变结构域可以衍生自其他已知的或市售的抗体,或者通过本领域熟知的方法从头合成。例如,可以通过选择对BCMA有特异性的可变片段(Fv)来获得与BCMA结合的可变结构域抗原结合位点。这可以通过例如筛选单链Fv(scFv)噬菌体展示文库或通过杂交瘤技术来实现。例如,可以对人scFv序列的基于IgM的噬菌体展示文库进行几轮体外筛选以富集对BCMA有特异性的结合物(实施例1)。通过亲和力成熟可以进一步增加所选scFv的亲和力。

[0098] 因此,本发明进一步提供了一种多特异性抗原结合分子,例如,串联双抗体,其包含特异性结合CD16A和在骨髓瘤细胞或浆细胞上表达的靶抗原(TA)的抗原结合位点,其中抗原结合分子由两条多肽链组成。每条多肽链包含至少四个选自下组的可变结构域:

[0099] (i)对CD16A有特异性的重链可变结构域(VH_CD16A),

[0100] (ii)对CD16A有特异性的轻链可变结构域(VL_CD16A),

[0101] (iii)对骨髓瘤细胞或浆细胞上表达的靶抗原有特异性的重链可变结构域(VH_TA),和

[0102] (iv)对骨髓瘤细胞或浆细胞上表达的靶抗原有特异性的轻链可变结构域(VL_TA);其中在骨髓瘤细胞或浆细胞上表达的靶抗原选自BCMA、CD138、CD38、CS-1、CD19和

CD20;优选选自BCMA、CD138或CD38。

[0103] 可变结构域从多肽的N末端到C末端以如下顺序位于两条多肽链的每一条内:

[0104] VH_TA-VL_CD16A-VH_CD16A-VL_TA(图1)

[0105] 另一个实施方案是一种多特异性抗原结合分子,其包含特异性结合CD16A和BCMA的抗原结合位点,其中所述抗原结合分子由两条多肽链组成。每条多肽链包含至少四个选自下组的可变结构域:

[0106] (i)对CD16A有特异性的重链可变结构域(VH_CD16A),

[0107] (ii)对CD16A有特异性的轻链可变结构域(VL_CD16A),

[0108] (iii)对BCMA有特异性的重链可变结构域,和

[0109] (iv)对BCMA有特异性的轻链可变结构域。

[0110] 这些可变结构域从多肽的N末端到C末端以如下顺序位于两条多肽链的每一条内:

[0111] VH_BCMA-VL_CD16A-VH_CD16A-VL_BCMA(图1)。

[0112] 或者,结构域可以定位为按以下顺序排列:

[0113] VL_BCMA-VH_CD16A-VL_CD16A-VH_BCMA。

[0114] 多特异性抗原结合分子,例如,串联双抗体,其包含与CD16A结合的抗原结合位点。

[0115] 优选地,多特异性抗原结合分子结合CD16A,但不结合CD16B。包含与CD16A结合但不与CD16B结合的重链和轻链可变结构域的抗原结合位点可由这样的抗原结合位点提供,该抗原结合位点特异性结合CD16A的表位,其包含(在CD16B中不存在的)C末端序列SFFPPGYQ(SEQ ID NO:11)的氨基酸残基和/或CD16A(SEQ ID NO:20)的残基G130和/或Y141。

[0116] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子包含对CD16A有特异性的重链和轻链可变结构域,其中(i)对CD16A有特异性的重链可变结构域(VH_CD16A),其包含具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链CDR1,具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的重链CDR2,和具有SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的重链CDR3;对CD16A有特异性的轻链可变结构域,其包含具有SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的轻链CDR1,具有SEQ ID NO:5所示氨基酸序列的轻链CDR2,和具有SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的轻链CDR3;或

[0117] (ii)对CD16A有特异性的重链可变结构域(VH_CD16A)具有SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列;和/或

[0118] (iii)对CD16A有特异性的轻链可变结构域(VL_CD16A)具有SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列。

[0119] 该亲和力成熟的抗CD16A结构域不与CD16B结合并且以相似的亲和力识别已知的CD16A同种异型F158和V158。已经在人CD16A中鉴定了两个等位基因单核苷酸多态性,它们改变了158位的氨基酸,这对于与IgG的铰链区的相互作用很重要。纯合子158F/F和杂合子158V/F等位基因的等位基因频率在高加索人群中是相似的,范围在35%到52%之间或38%到50%之间,而纯合子158V/V等位基因仅为10-15%(Lopez-Escamez JA et al.;BMC Med Genet 2011;12:2.)。由于相似的亲和力,在所有患者中通过这种抗CD16A结构域激活NK细胞是有利的。

[0120] 在另一个实施方案中,(i)重链CDR2可以被具有SEQ ID NO:7所示氨基酸序列的重链CDR2取代,或者(ii)重链可变结构域可以被具有SEQ ID NO:10所示氨基酸序列的重链可

变结构域取代。

[0121] 在WO 2006/125668中描述了包含与CD16A结合但不与CD16B结合的重链和轻链可变结构域的其他CD16A抗原结合位点。

[0122] 在一个特定实施方案中,本发明是一种多特异性抗原结合分子,其包含特异性结合CD16A和BCMA的抗原结合位点,其中抗原结合分子由两条多肽链组成。每条多肽链包含至少四个选自下组的可变结构域:

[0123] (i) 对CD16A有特异性的重链可变结构域(VH_CD16A),其包含具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链CDR1,具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的重链CDR2,和具有SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的重链CDR3,

[0124] (ii) 对CD16A有特异性的轻链可变结构域(VL_CD16A),其包含具有SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的轻链CDR1,具有SEQ ID NO:5所示氨基酸序列的轻链CDR2,和具有SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的轻链CDR3,

[0125] (iii) 对BCMA有特异性的重链可变结构域,和

[0126] (iv) 对靶细胞抗原BCMA有特异性的轻链可变结构域,

[0127] 其中这些可变结构域从多肽的N末端到C末端以如下顺序位于两条多肽链的每一条内:VH_BCMA-VL_CD16A-VH_CD16A-VL_BCMA(图1)。

[0128] 可变结构域通过由12个或更少的氨基酸残基组成的接头L1、L2和L3连接,并且从多肽的N末端到C末端以如下顺序位于两条多肽链的每一条内:VH_BCMA-L1-VL_CD16A-L2-VH_CD16A-L3-VL_BCMA。

[0129] 优选地,中心接头L2由3至9个,例如3、6或9个氨基酸残基组成,这有利于以高亲和力与NK细胞双价结合,同时防止NK-NK细胞交联。此外,接头L2可以比接头L1和接头L3短,即与接头L1和接头L3相比,接头L2由更少的氨基酸残基组成。更长更柔韧的接头有利于NK细胞通过CD16A与骨髓瘤细胞上的BCMA结合(交联)。

[0130] 在一些实施方案中,中心接头L2由3个氨基酸残基组成,接头L1和接头L3由4、5、6、7、8、9、10、11或12个氨基酸残基组成,例如由6至9个或6至12个氨基酸残基组成。在特定实施方案中,中心接头L2由3个氨基酸残基组成,接头L1和接头L3由6、9或12个氨基酸残基组成。在其他实施方案中,中心接头L2由6个氨基酸残基组成,接头L1和接头L3由7、8、9、10、11或12个氨基酸残基组成,例如由9-12个氨基酸残基组成。

[0131] 在特定实施方案中,中心接头L2由3个氨基酸残基组成,接头L1和接头L3由9或12个氨基酸残基组成,或者中心接头L2由6个氨基酸残基组成,接头L1和接头L3由9个氨基酸残基组成。这种接头组合,例如,12/3/12、9/3/9和9/6/9,通过实现与CD16A的有效双价结合以及通过BCMA与MM细胞的交联,有利于本发明的BCMA/CD16A串联双抗体。由3或6个氨基酸残基组成的短接头L2有利于根据本发明的串联双抗体的双价CD16A抗原结合部分的亲和力。

[0132] 在包含特异性结合CD16A和BCMA的抗原结合位点的多特异性抗原结合分子的特定实施方案中,该分子包含:

[0133] (i) 对CD16A有特异性的重链可变结构域(VH_CD16A),如SEQ ID NO:8所示,

[0134] (ii) 对CD16A有特异性的轻链可变结构域(VL_CD16A),如SEQ ID NO:9所示,

[0135] 在其他实施方案中,重链和轻链结构域包含本文所述的CDR或框架序列的免疫活

性同源物或变体。因此,在一些实施方案中,结合CD16A的重链或轻链结构域中的CDR序列与SEQ ID NO:1-7中所示的氨基酸序列相似但不相同。在某些情况下,与SEQ ID NO:1-7的序列相比,CDR变体序列具有99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%或80%的序列同一性,并且具有免疫活性。

[0136] 在其他情况下,CDR变体序列包含1、2、3、4或5个保守氨基酸取代。保守取代包括用具有相似特征的另一种氨基酸取代给定的氨基酸的氨基酸取代,并且还包括丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的脂肪族氨基酸之间的交换;羟基残基丝氨酸和苏氨酸的交换,酸性残基天冬氨酸和谷氨酸的交换,酰胺残基天冬酰胺和谷氨酰胺之间的取代,碱性残基赖氨酸和精氨酸的交换,以及芳香族残基苯丙氨酸和酪氨酸之间的取代。

[0137] 在其他情况下,修饰CDR变体序列以改变非关键区域中的非关键残基或残基。可以通过已知方法例如亲和力成熟、CDR步行诱变、定点诱变、结晶、核磁共振、光亲和标记或丙氨酸扫描诱变,来鉴定非关键的氨基酸。

[0138] 在其他的可选实施方案中,多特异性结合蛋白包含重链和轻链结构域,其是本文提供的重链和轻链结构域序列的免疫活性同源物或变体。因此,在一些实施方案中,多特异性结合蛋白包含重链或轻链结构域序列,其与SEQ ID NO:8-10中所示的氨基酸序列相似但不相同。在某些情况下,与SEQ ID NO:8-10的序列相比,变体重链或轻链结构域序列具有99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%或80%的序列同一性,并且具有免疫活性。

[0139] 在其他情况下,变体重链或轻链结构域序列包含1、2、3、4或5个保守氨基酸取代。保守取代包括用具有相似特征的另一种氨基酸取代给定的氨基酸的氨基酸取代,并且还包括丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的脂肪族氨基酸之间的交换;羟基残基丝氨酸和苏氨酸的交换,酸性残基天冬氨酸和谷氨酸的交换,酰胺残基天冬酰胺和谷氨酰胺之间的取代,碱性残基赖氨酸和精氨酸的交换,以及芳香族残基苯丙氨酸和酪氨酸之间的取代。

[0140] 在其他情况下,变体重链或轻链结构域序列包含增强CDR的性质(例如提高稳定性、对蛋白酶的抗性和/或对BCMA或CD16A的结合亲和力)的取代。

[0141] 在其他情况下,修饰变体重链或轻链结构域序列以改变非关键区域中的非关键残基或残基。可以通过已知方法例如亲和力成熟、CDR步行诱变、定点诱变、结晶、核磁共振、光亲和标记或丙氨酸扫描诱变,来鉴定非关键的氨基酸。

[0142] 根据本文描述的任何个实施方案的抗原结合分子可以通过表达编码形成抗原结合分子的各个多肽链的多核苷酸来产生。因此,本发明的其他实施方案是多核苷酸,例如,DNA或RNA,其编码如上文所述的抗体分子的多肽。

[0143] 多核苷酸可以通过本领域技术人员已知的方法构建,例如,通过将编码可变结构域(通过肽接头隔开或通过多肽链的肽键直接连接)的基因组合成可操作地连接到合适的启动子和任选合适的转录终止子的遗传构建体,并在细菌或其他适当的表达系统(例如CHO细胞)中表达。取决于所用的载体系统和宿主,可以使用任何数量的合适的转录和翻译元件,包括组成型启动子和诱导型启动子。选择启动子使得其驱动多核苷酸在相应宿主细胞中的表达。

[0144] 可将多核苷酸插入载体,优选表达载体,其代表本发明的另一实施方案。可以根据本领域技术人员熟知的方法构建这些重组载体。

[0145] 可利用多种表达载体/宿主系统来包含和表达编码本发明的多肽链的多核苷酸。用于在大肠杆菌(*E. coli*)中表达的表达载体的实例是用于在哺乳动物细胞中表达的pSKK (LeGall et al., *J Immunol Methods*. (2004) 285(1):111-27)或pcDNA5 (Invitrogen)。

[0146] 本发明还提供多特异性抗原结合分子,特别是包含如上文所述的多特异性抗原结合分子和至少一种其他组分的组合物。

[0147] 本发明进一步提供了多特异性抗原结合分子或包含如上所述的多特异性抗原结合分子的组合物在基于NK细胞的免疫疗法中的用途。基于NK细胞的免疫疗法包括基于活性NK细胞的疗法,其中NK细胞通过本发明的抗原结合分子的结合而被激活。特别是NK细胞攻击和杀死异常细胞(例如癌细胞)的能力得到增强。

[0148] 在某些实施方案中,本发明提供了如上所述的一种多特异性抗原结合分子用于治疗多发性骨髓瘤的用途,该多特异性抗原结合分子特异性结合CD16A和选自BCMA、CS-1、CD19、CD20、CD38和CD138的在骨髓瘤细胞或浆细胞上表达的抗原,所述用途包括施用多特异性抗原结合分子的步骤。

[0149] 在某个实施方案中,本发明提供了特异性结合靶细胞抗原(例如,肿瘤抗原)和CD16A的一种多特异性抗原结合分子在NK细胞免疫疗法中的用途,其中多特异性抗原结合分子与NK细胞在体外混合,并将NK细胞和多特异性抗原结合分子的组合物施用给患者。

[0150] 在一个具体实施方案中,肿瘤抗原是BCMA,并且该组合物用于治疗浆细胞疾病或自身免疫疾病,特别是多发性骨髓瘤。

[0151] 浆细胞疾病包括多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、浆细胞白血病、巨球红细胞增多症、淀粉样变性、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、孤立性骨浆细胞瘤、髓外浆细胞瘤、骨硬化性骨髓瘤、重链疾病、意义不明的单克隆丙种球蛋白病(MGUS)和冒烟型骨髓瘤(smoldering myeloma)。

[0152] 自身免疫疾病是例如系统性红斑狼疮(SLE)或类风湿性关节炎(RA)。

[0153] 因此,在某些实施方案中,本文提供的是的医学用途和方法,其中将对BCMA和CD16A具有特异性的抗原结合蛋白(例如,如上文所述的串联双抗体)以有效剂量施用于个体,用于治疗BCMA⁺癌症或自身免疫疾病,例如多发性骨髓瘤。

[0154] 通过不同的方式进行施用,例如,通过静脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、外部或皮内施用。剂量将由主治医师和其他临床因素确定。任何一个个体的剂量取决于多种因素,包括患者的体型、体表面积、年龄、性别、要施用的具体化合物、施用的时间和途径、治疗的种类、总体健康状况以及同时施用的其他药物。“有效剂量”是指活性成分的量足以影响疾病的进程和严重程度,使得病情减轻或缓解。可用已知方法确定可用于治疗和/或预防BCMA⁺疾病的“有效剂量”。

[0155] 以下的实施例用于进一步说明所述实施方案,而不是限制本发明的范围。证明了根据本发明的串联双抗体的特定双价CD16A结合部分能够诱导增强的NK细胞毒性:

[0156] 实施例1

[0157] 构建BCMA/CD16A串联双抗体分子

[0158] 如Reusch等,2014,mAbs 6:3,728-739中所述构建串联双抗体。

[0159] 为了构建串联双抗体,将抗BCMA抗体克隆的Fv结构域与抗CD16A抗体克隆的Fv结构域组合。通过在丝状融合噬菌体上表达和展示单链Fv结构域(scFv),并通过对重组靶抗

原或靶抗原阳性细胞进行淘选以富集编码显示靶结合的scFv的噬菌体颗粒,可以从人抗体文库中分离出与选择的靶抗原具有选择性结合的抗体片段,如例如Smith GP (Science, 1985, 228:1315-7) 和Clackson等人 (Nature, 1991, 352:624-8) 所述。为分离BCMA结合抗体片段,重组人BCMA (1-54) -Fc、食蟹猴 (cynomolgus) BCMA (1-53) -Fc以及稳定表达与人CD3zeta的跨膜区和细胞质结构域融合的人BCMA (1-54) 或食蟹猴BCMA (1-53) 的CHO细胞可用于随后的淘选轮中以富集结合的噬菌体颗粒。为此,将噬菌体颗粒与重组Fc-融合抗原在溶液中温育,例如,在室温下保持2小时,然后用蛋白G包被的磁珠捕获并在PBS-吐温和PBS中洗涤以除去未结合的噬菌体。用甘氨酸洗脱结合的噬菌体。为了富集表达靶抗原的细胞上的结合的噬菌体,将噬菌体与稳定转染的CHO细胞一起温育,例如,在室温下保持1小时,然后用细胞培养基洗涤并用甘氨酸洗脱结合的噬菌体。为了减少对编码选择性结合Fc的抗体片段的噬菌体颗粒或未转染的CHO细胞的富集,将噬菌体池与无关的Fc-融合抗原或靶抗原阴性CHO细胞一起温育。在每轮淘选和洗脱结合的噬菌体后,洗脱的噬菌体颗粒用于感染大肠杆菌 (XL1Blue) 并繁殖扩增噬菌体和编码scFv的DNA。在重复噬菌体淘选和富集的噬菌体克隆的繁殖扩增后,从大肠杆菌中分离遗传DNA并重新克隆到细菌表达载体 (例如pSKK2) 中,使用标准分子生物学技术用于随后在大肠杆菌中产生His-标记的 (SEQ ID NO:12) scFv抗体片段并制备细菌周质提取物。将含有scFv抗体片段的周质提取物进行筛选 (诸如ELISA或流式细胞术的筛选方法),以评估靶抗原结合。例如,重组人BCMA (1-54) -Fc或食蟹猴BCMA (1-53) -Fc被包被在标准ELISA微孔板中的抗人Fc抗体结合,然后与细菌周质提取物一起温育并进行彻底洗涤。使用抗His-HRP缀合物检测scFv结合。为了评估scFv与细胞表达的BCMA的结合,将细菌周质提取物与表达人或食蟹猴BCMA的CHO细胞一起温育,然后进行洗涤并通过流式细胞术使用抗His-R-PE检测结合的scFv。从相应的细菌克隆中分离编码与人和/或食蟹猴BCMA抗原选择性结合的scFv抗体片段的质粒,并通过DNA测序分析以获得编码DNA序列的scFv。例如,获得了具有如SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列的抗BCMA,其中VH如SEQ ID NO:17中所述,VL如SEQ ID NO:18中所述。

[0160] 克隆用于串联双抗体的表达盒,使得抗BCMA结构域和抗CD16A结构域定位为按VH-BCMA-L1-VL-CD16A-L2-VH-CD16A-L3-VL-BCMA的顺序排列,并且在根据本发明的串联双抗体中 $(G_2S)_4$ 用作接头L1和接头L3, (G_2S) 用作接头L2。

[0161] 将串联双抗体的表达盒克隆到哺乳动物表达载体中,并如所述制备和纯化串联双抗体。

[0162] 实施例2

[0163] 与原代NK细胞结合的抗体

[0164] 方法:在存在或不存在10mg/mL多克隆人IgG (Gammanorm, Octapharma) 的情况下,将变体2和变体4中对BCMA和CD16A具有特异性的串联双抗体的系列稀释液在37°C下加入原代人NK细胞中,保持45分钟,随后通过以下步骤在冰上检测抗体的结合:用缓冲液反复洗涤,与重组人BCMA (1-54) -GCN4-His融合蛋白一起温育30分钟,反复洗涤并加入小鼠抗His mAb 13/45/31-2 (Dianova) 和FITC缀合的山羊抗小鼠IgG,然后进行流式细胞术分析。

[0165] 结果示于表1和图3中:测试的变体2和变体4中的串联双抗体以相当的表观亲和力 (分别为 K_D :2.1nM和 K_D :1.2nM) 与具有原代人NK细胞相互作用。值得注意的是,虽然加入10mg/mL多克隆IgG后两种分子的结合亲和力均降低,但变体2抗体和变体4抗体受到的影响

不同。IgG的添加使变体2串联双抗体的表观亲和力和变体4串联双抗体的表观亲和力分别降低6.9倍(K_D :14.5nM)和3倍(K_D :3.6nM),表明变体4中使用的结构域顺序,即CD16A定向的Fv结构域在串联双抗体的两个中心位置处的定位,影响了NK细胞结合并导致多克隆IgG对CD16A的竞争减少。

[0166]	抗体	K_D (缓冲液)	K_D (10mg/mL IgG)	变化-倍数
	变体2	2.1nM	14.5nM	6.9
	变体4	1.2nM	3.6nM	3.0

[0167] 表1:串联双抗体与原代NK细胞的结合

[0168] 方法:将抗CD16A scFv的系列稀释液在37℃下加入原代人NK细胞中,保持45分钟,然后在冰上检测抗体的结合。通过以下步骤进行串联双抗体检测:用缓冲液反复洗涤,与重组BCMA(1-54)-GCN4-His一起温育并添加小鼠抗His mAb 13/45/31-2(Dianova)和FITC缀合的山羊抗小鼠IgG,随后进行流式细胞术分析。同串联双抗体一样通过以下步骤测定抗CD16A scFv:用缓冲液反复洗涤,与抗His mAb 13/45/31-2(Dianova)和FITC缀合的山羊抗小鼠IgG一起温育,然后进行流式细胞术分析。

[0169] 结果示于表2和图4中:变体4中的串联双抗体以1.2nM的表观亲和力(K_D)与原代人NK细胞相互作用,而相应的抗CD16A scFv表现出12.2nM(K_D)的亲和力。观察到的亲合力增加表明串联双抗体在NK细胞上的双价CD16A结合。

[0170]	抗体	K_D (缓冲液)
	变体4	1.2nM
	抗CD16A scFv	12.2nM

[0171] 表2:串联双抗体和抗CD16A scFv与原代人NK细胞的结合

[0172] 在存在和不存在多克隆人IgG的情况下,串联双抗体的NK细胞表面停留(retention)

[0173] 方法:将原代人NK细胞与50μg/mL的变体4中的BCMA/CD16A定向的串联双抗体在冰上温育45分钟,然后离心并重悬于含有10mg/mL多克隆人IgG(Gammanorm,Octapharma)或不含IgG的缓冲液中,并在37℃温育。在5、10、15、20、25、30、45和60分钟后,通过用BCMA(1-54)-GCN4-His、mAb anti-His和FITC-缀合的山羊抗小鼠IgG进行顺序染色和随后的流式细胞术分析定量与NK细胞结合的串联双抗体的相对量从而监测抗体的解离。

[0174] 结果示于图5中:NK细胞表面上的串联双抗体停留不受添加多克隆IgG的影响,因为在存在和不存在IgG的情况下,解离率相似(解离时间1小时后,结合的抗体约为70%)。这些数据表明多克隆IgG不能与串联双抗体竞争与NK细胞的结合,并且表明串联双抗体与不同于CD16A上IgG的结合位点的表位结合。因此,变体4中的BCMA/CD16A定向的串联双抗体可以独特地适合于在血清IgG存在的情况下(例如在IgG的生理浓度下,特别是在以高水平产生单克隆免疫球蛋白为特征的浆细胞疾病的情况下)结合NK细胞。特别地,观察到串联双抗体在NK细胞上的停留以及不存在IgG对其解离的干扰,表明变体4中的串联双抗体可以与为细胞的NK细胞产品组合使用,例如,通过在输注给患者之前将NK细胞和抗体体外混合(过继性NK细胞转移)。由于典型的基于IgG的治疗性抗体形式仅与CD16A发生微弱的相互作用并且直接与血清IgG竞争与CD16A的结合,因此预期变体4中的CD16A定向的串联双抗体能够实现迄今为止不可能实现的与为细胞的NK细胞产品的新的组合方法。

[0175] 实施例3

[0176] 抗体诱导的NK细胞介导的细胞毒性

[0177] 方法:通过在浓度递增的变体2和变体4中BCMA/CD16A定向的串联双抗体的存在下,温育比例为5:1的人原代NK细胞和钙黄绿素标记的NCI-H929靶细胞,体外测试抗体诱导的NK细胞介导的对BCMA+骨髓瘤细胞系NCI-H929的细胞毒性。在存在和不存在10mg/mL多克隆人IgG (Gammanorm, Octapharma) 的情况下进行测定。在37℃温育4小时后通过对释放到细胞培养上清液中的钙黄绿素进行量化来评估特异性靶细胞溶解。

[0178] 结果示于表3和图6中:所有被测试的抗体均观察到抗体诱导的靶细胞溶解。变体2中的串联双抗体分别在不存在和存在10mg/mL多克隆人IgG的情况下,在78.3pM和3782.0pM下诱导半数最大靶细胞溶解 (EC₅₀), 对应于48.3倍的效力丧失。值得注意的是, IgG的添加使抗体效力(靶细胞溶解%)从大约90%降低至70%。相反,变体4中的串联双抗体的EC₅₀受IgG添加的影响明显较小。变体4中的串联双抗体在不存在IgG的情况下,在16.2pM下诱导半数最大靶细胞溶解,因此比变体2中的串联双抗体明显更有效,而IgG的添加仅使EC₅₀增加至76.1pM (=4.7倍的效力损失)。此外,靶细胞溶解的功效从约100%减少至90%。因此,将BCMA/CD16A定向的串联双抗体从变体2重组 (reformatting) 为变体4可显著提高NK细胞介导的靶细胞溶解的体外效力和功效。这些数据表明变体4中的BCMA/CD16A定向的串联双抗体特别适合于在血清IgG存在的条件下(例如在生理IgG浓度下,以及在诸如多发性骨髓瘤的以高水平产生IgG为特征的浆细胞疾病的情况下)结合NK细胞以用于治疗用途。

[0179]

抗体	EC ₅₀ (缓冲液)	EC ₅₀ (10mg/mL)	效力损失倍数
变体2	78.3pM	3782.0pM	48.3
变体4	16.2pM	76.1pM	4.7

[0180] 表3:抗体诱导的NK细胞介导的对BCMA+骨髓瘤细胞系的体外细胞毒性

[0181] 实施例4

[0182] 抗体诱导的NK细胞介导的NK细胞体外裂解

[0183] 方法:将钙黄绿素标记的原代人NK细胞与浓度递增的变体2和变体4中的BCMA/CD16A定向的串联双抗体一起温育。在37℃温育4小时后通过对释放到细胞培养上清液中的钙黄绿素进行量化来评估抗体诱导的NK细胞溶解。

[0184] 结果示于表4和图7中:变体2中的串联双抗体诱导约60%的NK细胞溶解,在492.7pM下观察到半数最大细胞溶解 (EC₅₀), 因此导致效应细胞的明显耗竭。相比之下,变体4中的串联双抗体不会诱导NK细胞溶解,尽管其与变体2中的串联双抗体相比具有更高的表观亲和力,并且其能够与NK细胞上的CD16A双价结合。这些数据表明变体4中改变的结构域顺序导致一种蛋白构象,其中两个CD16A定向的Fv结构域都被定位成使得双价结合是最优的,但是防止NK细胞-NK细胞交联。因此,变体4串联双抗体可以以较高的治疗浓度使用而不会诱导NK细胞耗竭。此外,不会诱导NK细胞-NK细胞溶解可使得变体4串联双抗体能够与细胞的NK细胞疗法组合使用,例如,通过在输注给患者之前将同种异体NK细胞或自体NK细胞与抗体体外混合(过继转移)。

[0185]

抗体	EC ₅₀
变体2	492.7pM
变体4	-

[0186] 表4:变体2的串联双抗体诱导NK细胞-NK细胞溶解,而变体4的串联双抗体不诱导NK细胞-NK细胞溶解

[0187] 双价单特异性抗CD16A双抗体诱导NK细胞-NK细胞溶解

[0188] 方法:将钙黄绿素标记的原代人NK细胞与浓度递增的单特异性CD16A定向的单价scFv和双价双抗体一起温育。在37℃温育4小时后通过对释放到细胞培养上清液中的钙黄绿素进行量化来评估抗体诱导的NK细胞溶解。

[0189] 结果示于表5和图8中:抗CD16A双抗体诱导NK细胞溶解(EC_{50} :659.2pM),而单价结合抗CD16A scFv不会诱导可检测的NK细胞耗竭。值得注意的是,抗CD16A双抗体是两个多肽的同源二聚体,每个多肽包含按VL_CD16A-VH-CD16A结构域顺序排列的轻链可变结构域和重链可变结构域,该顺序如在变体4中的BCMA/CD16A定向的串联双抗体的中心处所使用的那样。然而,虽然抗-CD16A双抗体在体外可有效诱导NK细胞耗竭,但对于变体4串联双抗体,未观察到NK细胞耗竭。这些数据表明变体4串联双抗体的VL_CD16A-VH-CD16A部分采用与典型双抗体不同的结构构象,并且阻止NK细胞-NK细胞交联。

[0190]

抗体	EC_{50}
抗CD16A scFv	-
抗CD16A双抗体	659.2pM

[0191] 表5:双价单特异性抗CD16A双抗体诱导NK细胞-NK细胞溶解

[0192]

抗体	结构域顺序
串联双抗体变体2	VH_CD16A-VL_BCMA-VH_BCMA-VL_CD16A
串联双抗体变体4	VH_BCMA-VL_CD16A-VH_CD16A-VL_BCMA
抗CD16A双抗体	VL_CD16A-VH_CD16A
抗CD16A scFv	VL_CD16A-VH_CD16A

[0193] 表6:抗体构建体的结构域顺序

[0194] 实施例5

[0195] 在存在和不存在BCMA+靶细胞的情况下,人PBMC培养物中的抗体诱导的细胞因子释放

[0196] 方法:在存在或不存在浓度递增的抗BCMA IgG1的情况下,在以50:1的比例与BCMA+靶细胞(NCI-H929)混合的人PBMC培养物中产生炎性细胞因子(IL-4、IL-2、IL-10、IL-6、TNF α 和IFN- γ),在37℃温育24小时后,对具有CD16A亲和力增强突变S239D/I332E的抗BCMA IgG1、变体4中的BCMA/CD16A定向的串联双抗体和BCMA/CD3定向的(scFv)₂的进行定量。作为对照(ctrl.),通过添加CD3/CD28靶向磁珠刺激细胞因子释放。

[0197] 结果示于图9中:当以3.2ng/ml或更高的浓度添加T-细胞结合BCMA/CD3定向的(scfv)₂时,在PBMC/NCI-H929共培养物中检测到炎性细胞因子IL-2、IL-10、IL-6、TNF α 和IFN- γ 的明显释放。在使用抗体进行非生理性T细胞活化后释放细胞因子可在患者中导致明显的毒性,包括细胞因子释放综合征。用BCMA/CD16A定向的串联双抗体诱导靶细胞溶解以刺激NK细胞介导的细胞毒性确实导致释放到细胞培养物上清液中的炎性细胞因子的量明显降低,该量与由典型BCMA靶向IgG1(WT)和亲和力增强的IgG1(Fc增强的;S239D/I332E)诱导的细胞因子释放相当。因此,由于细胞因子释放综合征和相关毒性的风险降低,CD16A定向的NK细胞结合用以诱导靶细胞溶解可能是T细胞结合的更安全的替代物。

[0198] 实施例6

[0199] 抗体诱导的NK细胞介导的对BCMA+细胞系的细胞毒性

[0200] 方法:通过在浓度递增的BCMA/CD16A定向的串联双抗体或对CS1有特异性的比较IgG1抗体(埃罗妥珠单抗)、对CD38有特异性的比较IgG1抗体(达雷木单抗)和对EGFR有特异性的比较IgG1抗体(西妥昔单抗)存在的情况下,温育比例为5:1的人原代NK细胞和钙黄绿素标记的BCMA+靶细胞,体外测试抗体诱导的NK细胞介导的对BCMA+骨髓瘤细胞系NCI-H929、RPMI-8226和MM.1S的细胞毒性。在37℃温育4小时后通过对释放到细胞培养上清液中的钙黄绿素进行量化来评估特异性靶细胞溶解。

[0201] 结果示于图10和表7中:BCMA/CD16A定向的串联双抗体(串联双抗体变体4)有效诱导MM.1S、NCI-H929和RPMI-8226细胞系的NK细胞介导的裂解,EC50值分别为3.7pM、9.1pM和62.3pM。靶细胞溶解的效力和百分比均与典型IgG1抗体埃罗妥珠单抗和达雷木单抗诱导的裂解相当或更优。当在浓度递增的抗EGFR IgG1存在的情况下进行测定时未观察到细胞溶解。值得注意的是,BCMA/CD16A定向的串联双抗体诱导了相当的或更优的靶细胞溶解,尽管在被测试的细胞系上的BCMA的表达明显降低。

[0202]

	EC ₅₀		
抗体	MM1.S	NCI-H929	RPMI-8226
串联双抗体(变体 4)	3.7pM	9.1pM	62.3pM
抗 CD38 IgG1	51.0pM	12.6pM	41.8pm
抗 CS1 IgG1	152.8pM	393.7pM	4.5nM
西妥昔单抗	-	-	-

[0203] 表7:在浓度递增的BCMA/CD16A定向的串联双抗体和比较抗体存在的情况下,原代人NK细胞对BCMA+靶细胞系的体外细胞毒性。

[0204] 实施例7

[0205] 抗体诱导的NK细胞介导的对原发性骨髓瘤细胞的细胞毒性

[0206] 方法:通过在浓度递增的BCMA/CD16A定向的串联双抗体或对CS1有特异性的比较IgG1抗体(埃罗妥珠单抗)、对CD38有特异性的比较IgG1抗体(达雷木单抗)和对Her2有特异性的比较IgG1抗体(曲妥珠单抗)存在的情况下,温育比例为10:1的人原代NK细胞和⁵¹Cr标记的肿瘤细胞,体外测试抗体诱导的NK细胞介导的对来自既往多次化疗患者的原发性骨髓瘤细胞的细胞毒性。在37℃温育4小时后通过对释放到细胞培养上清液中的⁵¹Cr进行定量来评估特异性靶细胞溶解。

[0207] 结果示于图11和表8中:BCMA/CD16A定向的串联双抗体(串联双抗体变体4)有效诱导从胸腔积液(左图)或外周血(浆细胞白血病,右图)取得的原发性骨髓瘤细胞的NK细胞介导的细胞溶解。相比之下,当分别使用抗CD38抗体达雷木单抗和抗CS1抗体埃罗妥珠单抗时,观察到较低效的靶细胞溶解诱导。当在浓度递增的抗Her2 IgG1抗体曲妥珠单抗存在的情况下进行测定时,未检测到靶细胞溶解。EC50值示于表8中。

	EC ₅₀	
	多发性骨髓瘤	浆细胞白血病
[0208]	串联双抗体(v4)	4.0pM
	达雷木单抗	17.7pM
	埃罗妥珠单抗	145.5pM
	曲妥珠单抗	-

[0209] 表8:在浓度递增的BCMA/CD16A定向的串联双抗体和比较抗体存在的情况下,原代人NK细胞对原发性骨髓瘤细胞的体外细胞毒性。

[0210] 实施例8

[0211] 抗体与骨髓瘤细胞系的结合

[0212] 方法:在细胞系NCI-H929、RPMI-8226和MM.1S上滴定BCMA/CD16A定向的串联双抗体以及对CD38有特异性的比较抗体(达雷木单抗)和对CS1有特异性的比较抗体(埃罗妥珠单抗)。通过用CD16A-mFc.67/抗人FITC和流式细胞术检测来对抗体结合进行定量。以饱和浓度加入对照抗体抗BCMA(ANC3B1)、抗CD38(HB7)和抗CS1(235614),并通过抗小鼠-Fc-FITC(对照)进行检测。

[0213] 结果示于图12和表9中:BCMA/CD16A定向的串联双抗体(串联双抗体变体4)结合MM.1S、NCI-H929和RPMI-8226骨髓瘤细胞系,KD值分别为11.5nM、27.7nM和26.7nM。相比之下,抗CD38 IgG1抗体达雷木单抗以明显更高的亲和力(分别为0.74nM、2.2nM和6.2nM)与所有三种细胞系相互作用。当与BCMA/CD16A定向的串联双抗体和抗CD38IgG1达雷木单抗相比时,抗CS1 IgG1抗体埃罗妥珠单抗与MM.1S细胞和NCI-H929细胞以较低的亲和力(分别为35.7nM和36nM)相互作用,由于缺乏CS1表达而不与RPMI-8226相互作用。值得注意的是,平均荧光强度(MFI)的比较表明,所有三种细胞系上的BCMA表达与CD38表达相比,均明显降低。然而,尽管与抗CD37 IgG1达雷木单抗相比,BCMA表达低且结合靶细胞的结合亲和力较低,但与抗CD38 IgG1达雷木单抗相比,BCMA/CD16A定向的串联双抗体诱导的NK细胞介导的靶细胞溶解具有相似的或更好的效力。

	K _D		
	MM1.S	NCI-H929	RPMI-8226
[0214]	串联双抗体(v4)	11.5nM	27.7nM
	抗 CD38 IgG1	0.74nM	2.2nM
	抗 CS1 IgG1	35.7nM	36.0nM
	西妥昔单抗	-	-

[0215] 表9:与骨髓瘤细胞系结合的抗体。

[0216] 实施例9

[0217] 不依赖于靶结构域的抗体诱导的NK细胞介导的NK细胞体外溶解

[0218] 方法:将钙黄绿素标记的原代人NK细胞与浓度递增的变体2和变体4中的所示串联双抗体一起温育。在37℃温育4小时后,通过对释放到细胞培养上清液中的钙黄绿素进行定

量来评估抗体诱导的NK细胞溶解。

[0219] 结果:变体2中的串联双抗体诱导了大量的NK-NK细胞溶解,而变体4串联双抗体则不会诱导。对于含有抗BCMA靶结构域的串联双抗体,以及含有针对具有HLA-A2限制性肽金属蛋白酶1 (MMP1) 的肽/MHC复合物的靶结构域的串联双抗体,观察到变体2和变体4之间的这种差异。数据表明,针对靶细胞的增强的NK细胞细胞毒性由掺入串联双抗体中的特定CD16A Fv结构域的特定蛋白构象驱动,并且不依赖于特定的靶结构域。显然,NK细胞的增强活化既不依赖于肿瘤靶结构域,也不依赖于肿瘤靶标的种类。

[0220] 表10:用于评估抗体诱导的NK-NK细胞溶解的4小时钙黄绿素释放细胞毒性测定的列表总结

[0221]	靶结构域	效应结构域	变体	EC ₅₀ [pM]
	BCMA	CD16A	2	493
	BCMA	CD16A	4	无
	HLA-A2	CD16A	2	1296
	HLA-A2	CD16A	4	无

[0222] 变体=串联双抗体变体;无=无NK细胞溶解

[0223] HLA-A2结合肽源自基质金属肽酶1 (MMP1) 并且被鉴定为由几种肿瘤类型(包括结肠直肠癌和肺癌)呈现的有希望的治疗靶标,但其在正常组织中不存在(WO 2016/156202中公开的MMP1-003)。通过用MMP-003筛选完全人抗体噬菌体展示文库来鉴定HLA-A2特异性单链Fv抗体。创建了本发明的变体2中的HLA-A2/CD16A串联双抗体和变体4中的HLA-A2/CD16A串联双抗体。

[0224] 序列总结:

[0225]

序 列 号	序列
1	HCDR1 CD16A GYTFTSYY
2	HCDR2 CD16A IEPMYGST
3	HCDR3 CD16A ARGSAYYYDFADY
4	LCDR1 CD16A NIGSKN
5	LCDR2 CD16A QDN
6	LCDR3 CD16A QVWDNYSVL
7	HCDR2 CD16A INPSGGST
8	VH CD16A QVQLVQSGAEVKKPGESLKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGAIEPMYGSTSY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDYAVYYCARGSAYYYDFADYWGQGLTVTVSS
9	VL CD16A SYVLTQPSSVSVAPGQTATISCGGHNIGSKNVHWYQQRPGQSPVLVIYQDNKRPSGIPERFSG SNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQVWDNYSVLFGGGTKLTVL
10	VH CD16A QVQLVQSGAEVKKPGESLKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDYAVYYCARGSAYYYDFADYWGQGLTVTVSS
11	CD16A 的 C 末端序列 SFFPPGYQ
12	亲和标签 AAAGSHHHHHH
13	接头 GGSG
14	接头 GGSGG
15	接头 GGSGGS
16	接头 GGSGGSGGS
17	BCMA VH QVQLVQSGAEVKTPEPLKISCKGSGYSFTDSWIGWVRQMPGKGLEWMGIYAGDSDARYS PSFQGQVTISADTSTSTVYLQWSSLKASDTAMYYCARNFGDHWGQGLTVTVSS
18	BCMA VL

[0226]

	SYELTQSPSVSVAPGQTARIFCGGDNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLVIYRDSNRPSGIPERFSG ANSENTATLTISRAQAGDEADYYCQVWDSRTYVFGTGTKLTVL
19	BCMA scFv QVQLVQSGAEVKTPGEPLKISCKGSGYSFTDSWIGWVRQMPGKGLEWMGIYAGDSDARYS PSFQGQVTISADTSTSTVYLQWSSLKASDTAMYYCARNFGDHWGQGTLVTVSSGGSGGSGG SGGSGGSGGSSYELTQSPSVSVAPGQTARIFCGGDNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLVIYRDSN RPSGIPERFSGANSENTATLTISRAQAGDEADYYCQVWDSRTYVFGTGTKLTVLAAAGSHHH HHH
20	CD16A GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDA ATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLFGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFF PPGYQ
21	接头(G ₂ S) ₄ GGSGGSGGSGGS

[0001] SEQUENCE LISTING

[0002] <110> 阿菲姆德股份有限公司 (AFFIMED GMBH)

[0003] <120> 用于CD16A定向的NK细胞结合的串联双抗体

[0004] <130> A 3314PCT

[0005] <160> 21

[0006] <170> PatentIn 3.5版本

[0007] <210> 1

[0008] <211> 8

[0009] <212> PRT

[0010] <213> 人工序列 (artificial sequence)

[0011] <220>

[0012] <223> CDR

[0013] <400> 1

[0014] Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr

[0015] 1 5

[0016] <210> 2

[0017] <211> 8

[0018] <212> PRT

[0019] <213> 人工序列 (artificial sequence)

[0020] <220>

[0021] <223> CDR

[0022] <400> 2

[0023] Ile Glu Pro Met Tyr Gly Ser Thr

[0024] 1 5

[0025] <210> 3

[0026] <211> 13

[0027] <212> PRT

[0028] <213> 人工序列 (artificial sequence)

[0029] <220>

[0030] <223> CDR

[0031] <400> 3

[0032] Ala Arg Gly Ser Ala Tyr Tyr Tyr Asp Phe Ala Asp Tyr

[0033] 1 5 10

[0034] <210> 4

[0035] <211> 6

[0036] <212> PRT

[0037] <213> 人工序列 (artificial sequence)

[0038] <220>

[0039]	<223> CDR
[0040]	<400> 4
[0041]	Asn Ile Gly Ser Lys Asn
[0042]	1 5
[0043]	<210> 5
[0044]	<211> 4
[0045]	<212> PRT
[0046]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0047]	<220>
[0048]	<223> cdr
[0049]	<400> 5
[0050]	Gln Asp Asn Lys
[0051]	1
[0052]	<210> 6
[0053]	<211> 9
[0054]	<212> PRT
[0055]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0056]	<220>
[0057]	<223> CDR
[0058]	<400> 6
[0059]	Gln Val Trp Asp Asn Tyr Ser Val Leu
[0060]	1 5
[0061]	<210> 7
[0062]	<211> 8
[0063]	<212> PRT
[0064]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0065]	<220>
[0066]	<223> CDR
[0067]	<400> 7
[0068]	Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr
[0069]	1 5
[0070]	<210> 8
[0071]	<211> 120
[0072]	<212> PRT
[0073]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0074]	<220>
[0075]	<223> vh
[0076]	<400> 8
[0077]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

[0078]	1	5	10	15
[0079]	Ser Leu Lys Val	Ser Cys Lys Ala	Ser Gly Tyr Thr	Phe Thr Ser Tyr
[0080]	20	25	30	
[0081]	Tyr Met His Trp	Val Arg Gln Ala	Pro Gly Gln Gly	Leu Glu Trp Met
[0082]	35	40	45	
[0083]	Gly Ala Ile Glu	Pro Met Tyr Gly	Ser Thr Ser Tyr	Ala Gln Lys Phe
[0084]	50	55	60	
[0085]	Gln Gly Arg Val	Thr Met Thr Arg	Asp Thr Ser Thr	Ser Thr Val Tyr
[0086]	65	70	75	80
[0087]	Met Glu Leu Ser	Ser Leu Arg Ser	Glu Asp Thr Ala	Val Tyr Tyr Cys
[0088]	85	90	95	
[0089]	Ala Arg Gly Ser	Ala Tyr Tyr Tyr	Asp Phe Ala Asp	Tyr Trp Gly Gln
[0090]	100	105	110	
[0091]	Gly Thr Leu Val	Thr Val Ser Ser		
[0092]	115	120		
[0093]	<210> 9			
[0094]	<211> 106			
[0095]	<212> PRT			
[0096]	<213> 人工序列(artificial sequence)			
[0097]	<220>			
[0098]	<223> v1			
[0099]	<400> 9			
[0100]	Ser Tyr Val Leu	Thr Gln Pro Ser	Ser Val Ser Val	Ala Pro Gly Gln
[0101]	1	5	10	15
[0102]	Thr Ala Thr Ile	Ser Cys Gly Gly	His Asn Ile Gly	Ser Lys Asn Val
[0103]	20	25	30	
[0104]	His Trp Tyr Gln	Gln Arg Pro Gly	Gln Ser Pro Val	Leu Val Ile Tyr
[0105]	35	40	45	
[0106]	Gln Asp Asn Lys	Arg Pro Ser Gly	Ile Pro Glu Arg	Phe Ser Gly Ser
[0107]	50	55	60	
[0108]	Asn Ser Gly Asn	Thr Ala Thr Leu	Thr Ile Ser Gly	Thr Gln Ala Met
[0109]	65	70	75	80
[0110]	Asp Glu Ala Asp	Tyr Tyr Cys Gln	Val Trp Asp Asn	Tyr Ser Val Leu
[0111]	85	90	95	
[0112]	Phe Gly Gly Gly	Thr Lys Leu Thr	Val Leu	
[0113]	100	105		
[0114]	<210> 10			
[0115]	<211> 120			
[0116]	<212> PRT			

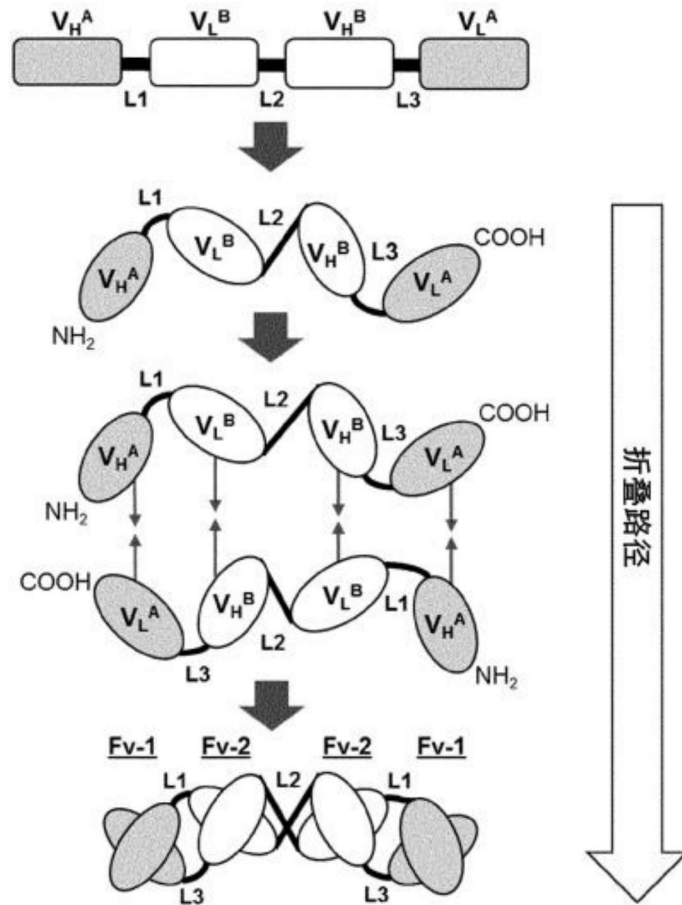
[0117]	<213>	人工序列(artificial sequence)
[0118]	<220>	
[0119]	<223>	vh
[0120]	<400>	10
[0121]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu	
[0122]	1 5 10 15	
[0123]	Ser Leu Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
[0124]	20 25 30	
[0125]	Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
[0126]	35 40 45	
[0127]	Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe	
[0128]	50 55 60	
[0129]	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr	
[0130]	65 70 75 80	
[0131]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0132]	85 90 95	
[0133]	Ala Arg Gly Ser Ala Tyr Tyr Tyr Asp Phe Ala Asp Tyr Trp Gly Gln	
[0134]	100 105 110	
[0135]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
[0136]	115 120	
[0137]	<210>	11
[0138]	<211>	8
[0139]	<212>	PRT
[0140]	<213>	智人(homo sapiens)
[0141]	<400>	11
[0142]	Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln	
[0143]	1 5	
[0144]	<210>	12
[0145]	<211>	11
[0146]	<212>	PRT
[0147]	<213>	人工序列(artificial sequence)
[0148]	<220>	
[0149]	<223>	亲和标签
[0150]	<400>	12
[0151]	Ala Ala Ala Gly Ser His His His His His His	
[0152]	1 5 10	
[0153]	<210>	13
[0154]	<211>	4
[0155]	<212>	PRT

[0156] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0157] <220>
[0158] <223> 接头
[0159] <400> 13
[0160] Gly Gly Ser Gly
[0161] 1
[0162] <210> 14
[0163] <211> 5
[0164] <212> PRT
[0165] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0166] <220>
[0167] <223> 接头
[0168] <400> 14
[0169] Gly Gly Ser Gly Gly
[0170] 1 5
[0171] <210> 15
[0172] <211> 6
[0173] <212> PRT
[0174] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0175] <220>
[0176] <223> 接头
[0177] <400> 15
[0178] Gly Gly Ser Gly Gly Ser
[0179] 1 5
[0180] <210> 16
[0181] <211> 9
[0182] <212> PRT
[0183] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0184] <220>
[0185] <223> 接头
[0186] <400> 16
[0187] Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
[0188] 1 5
[0189] <210> 17
[0190] <211> 114
[0191] <212> PRT
[0192] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0193] <220>
[0194] <223> vh

[0195]	<400> 17
[0196]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Thr Pro Gly Glu
[0197]	1 5 10 15
[0198]	Pro Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Ser
[0199]	20 25 30
[0200]	Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
[0201]	35 40 45
[0202]	Gly Ile Ile Tyr Ala Gly Asp Ser Asp Ala Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
[0203]	50 55 60
[0204]	Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
[0205]	65 70 75 80
[0206]	Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
[0207]	85 90 95
[0208]	Ala Arg Asn Phe Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
[0209]	100 105 110
[0210]	Ser Ser
[0211]	<210> 18
[0212]	<211> 106
[0213]	<212> PRT
[0214]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0215]	<220>
[0216]	<223> v1
[0217]	<400> 18
[0218]	Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
[0219]	1 5 10 15
[0220]	Thr Ala Arg Ile Phe Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val
[0221]	20 25 30
[0222]	His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
[0223]	35 40 45
[0224]	Arg Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ala
[0225]	50 55 60
[0226]	Asn Ser Glu Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Gly
[0227]	65 70 75 80
[0228]	Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Arg Thr Tyr Val
[0229]	85 90 95
[0230]	Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[0231]	100 105
[0232]	<210> 19
[0233]	<211> 249

[0234]	<212>	PRT
[0235]	<213>	人工序列(artificial sequence)
[0236]	<220>	
[0237]	<223>	scFv
[0238]	<400>	19
[0239]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Thr Pro Gly Glu	
[0240]	1	5 10 15
[0241]	Pro Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Ser	
[0242]	20 25 30	
[0243]	Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met	
[0244]	35 40 45	
[0245]	Gly Ile Ile Tyr Ala Gly Asp Ser Asp Ala Arg Tyr Ser Pro Ser Phe	
[0246]	50 55 60	
[0247]	Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr	
[0248]	65 70 75 80	
[0249]	Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys	
[0250]	85 90 95	
[0251]	Ala Arg Asn Phe Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val	
[0252]	100 105 110	
[0253]	Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly	
[0254]	115 120 125	
[0255]	Ser Gly Gly Ser Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Val Ser Val	
[0256]	130 135 140	
[0257]	Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Phe Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly	
[0258]	145 150 155 160	
[0259]	Ser Lys Asn Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val	
[0260]	165 170 175	
[0261]	Leu Val Ile Tyr Arg Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg	
[0262]	180 185 190	
[0263]	Phe Ser Gly Ala Asn Ser Glu Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg	
[0264]	195 200 205	
[0265]	Ala Gln Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser	
[0266]	210 215 220	
[0267]	Arg Thr Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ala Ala	
[0268]	225 230 235 240	
[0269]	Ala Gly Ser His His His His His His	
[0270]	245	
[0271]	<210>	20
[0272]	<211>	192

[0273]	<212>	PRT
[0274]	<213>	智人(homo sapiens)
[0275]	<400>	20
[0276]	Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro	
[0277]	1 5 10 15	
[0278]	Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln	
[0279]	20 25 30	
[0280]	Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu	
[0281]	35 40 45	
[0282]	Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr	
[0283]	50 55 60	
[0284]	Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu	
[0285]	65 70 75 80	
[0286]	Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln	
[0287]	85 90 95	
[0288]	Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys	
[0289]	100 105 110	
[0290]	His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn	
[0291]	115 120 125	
[0292]	Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro	
[0293]	130 135 140	
[0294]	Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Phe	
[0295]	145 150 155 160	
[0296]	Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln	
[0297]	165 170 175	
[0298]	Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln	
[0299]	180 185 190	
[0300]	<210>	21
[0301]	<211>	12
[0302]	<212>	PRT
[0303]	<213>	人工序列(artificial sequence)
[0304]	<220>	
[0305]	<223>	接头
[0306]	<400>	21
[0307]	Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser	
[0308]	1 5 10	



说明

— $L1$
 — $L2$
 — $L3$ } 接头

$Fv-1$
 $Fv-2$ } 可变抗体片段

图1

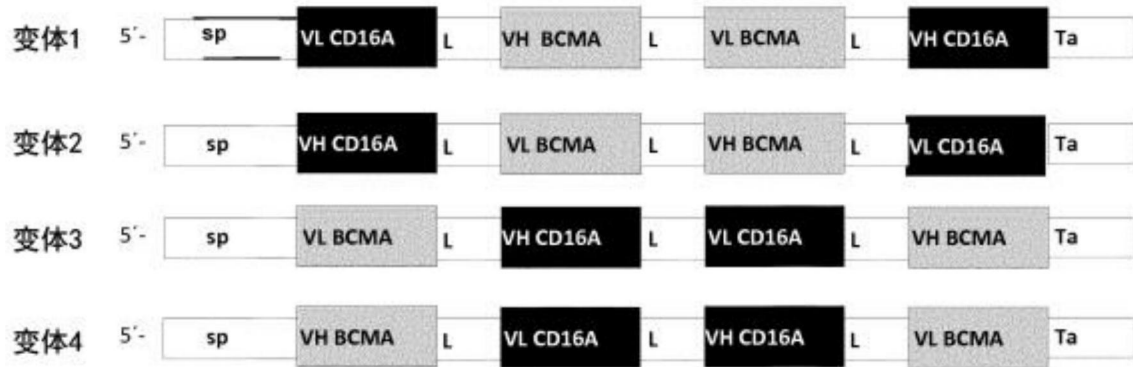


图2

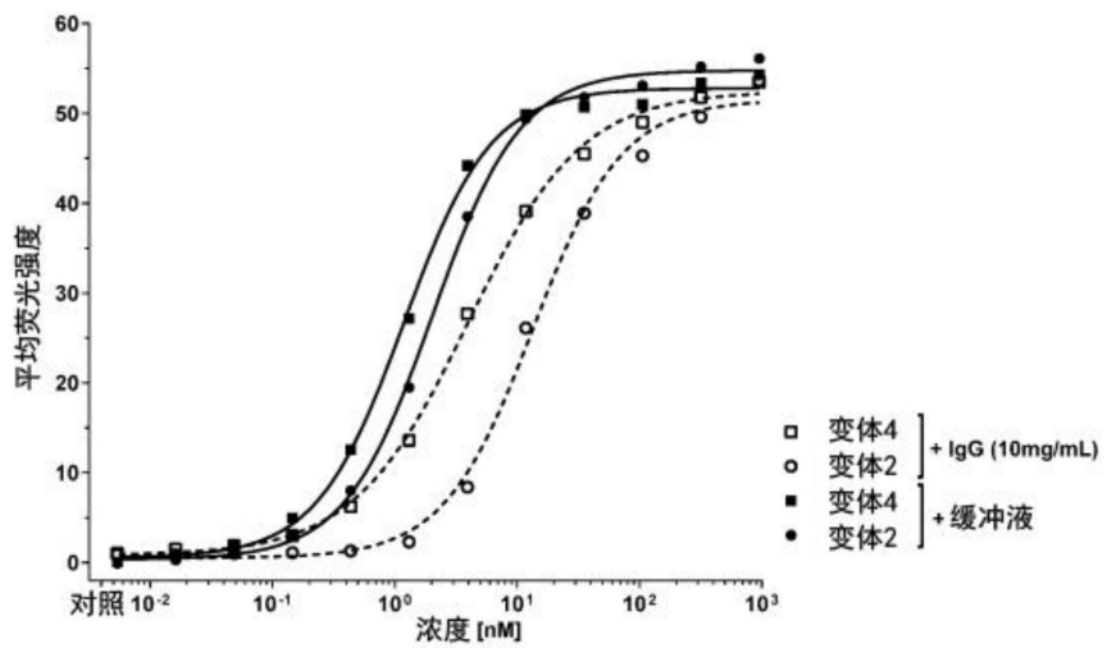


图3

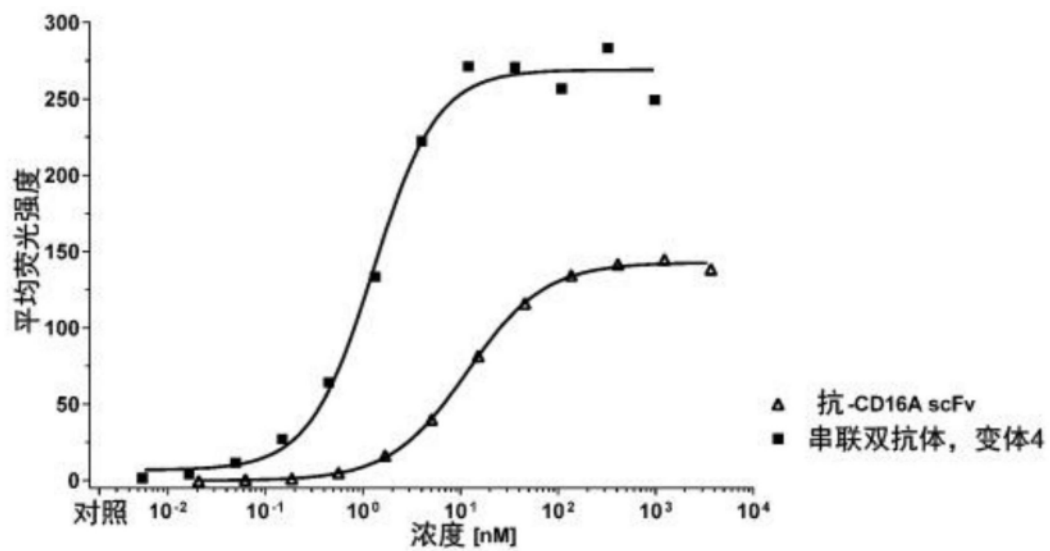


图4

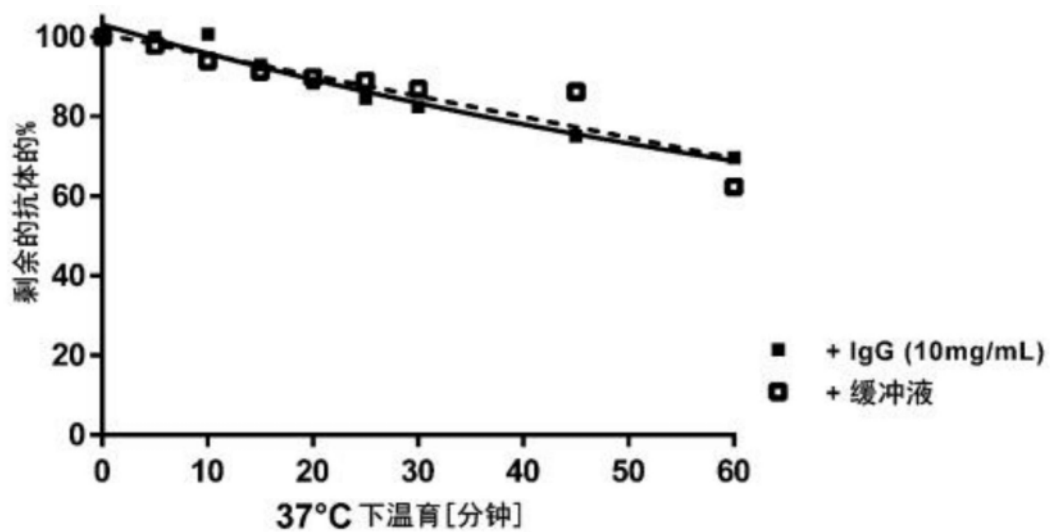


图5

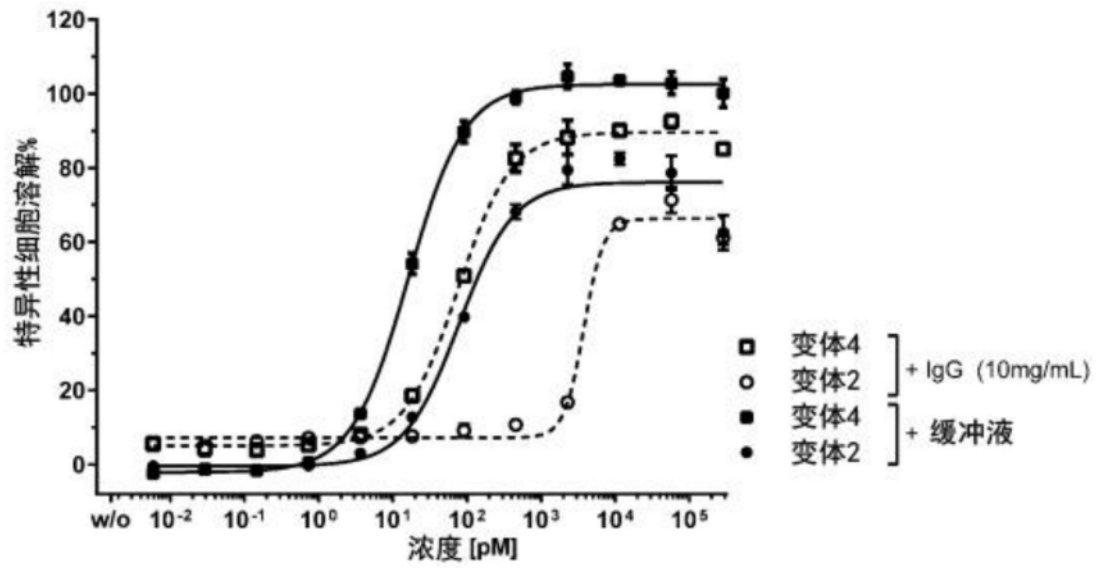


图6

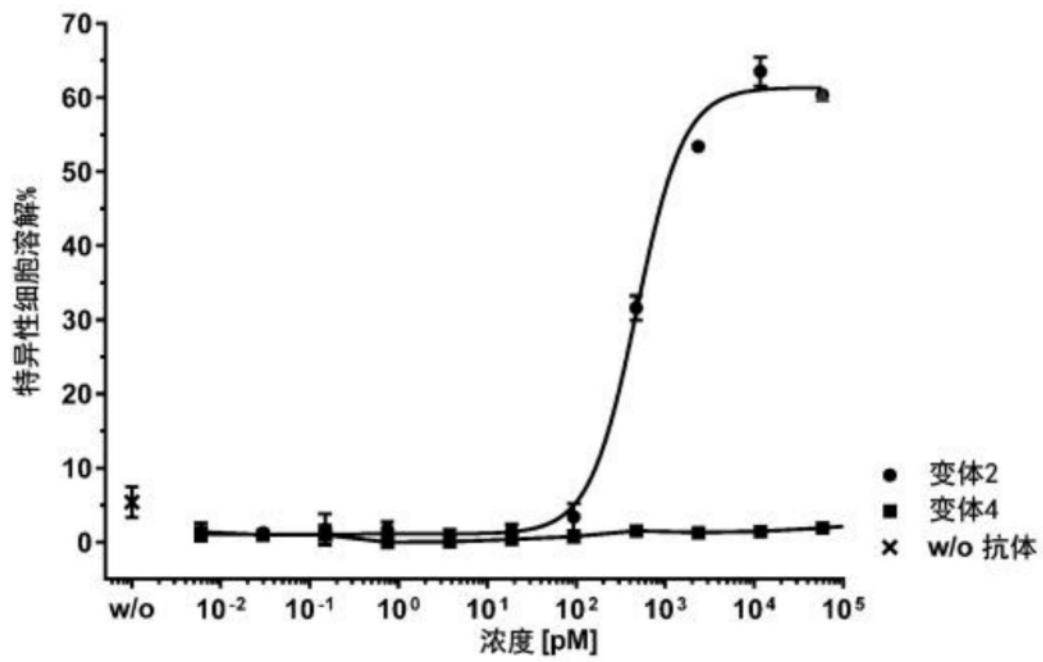


图7

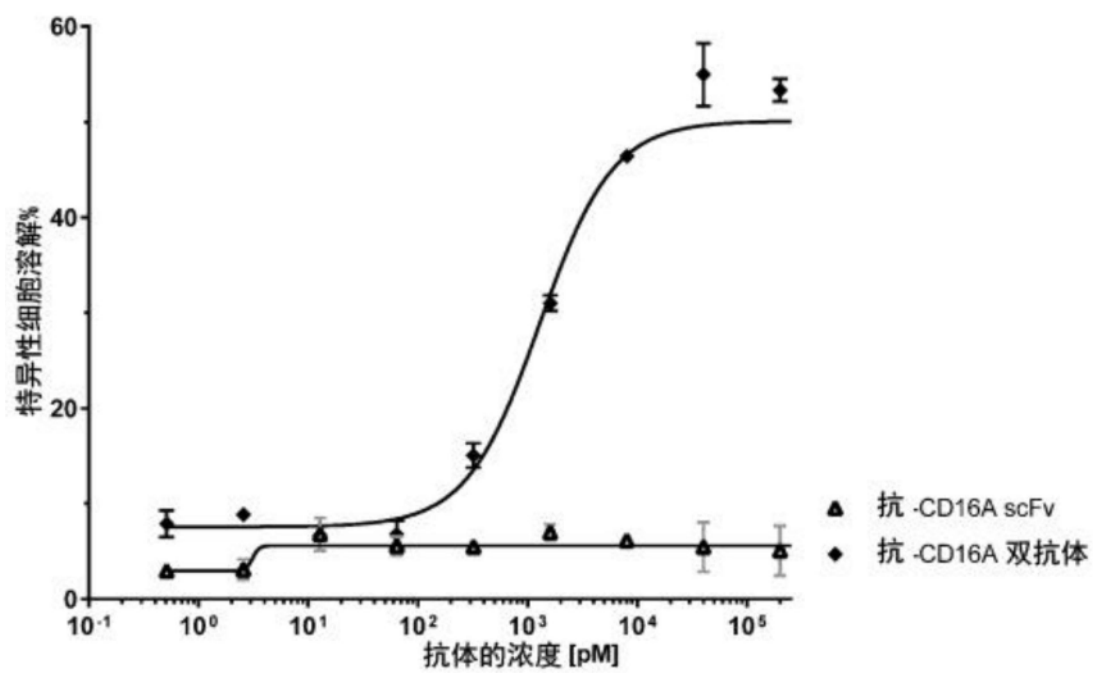


图8

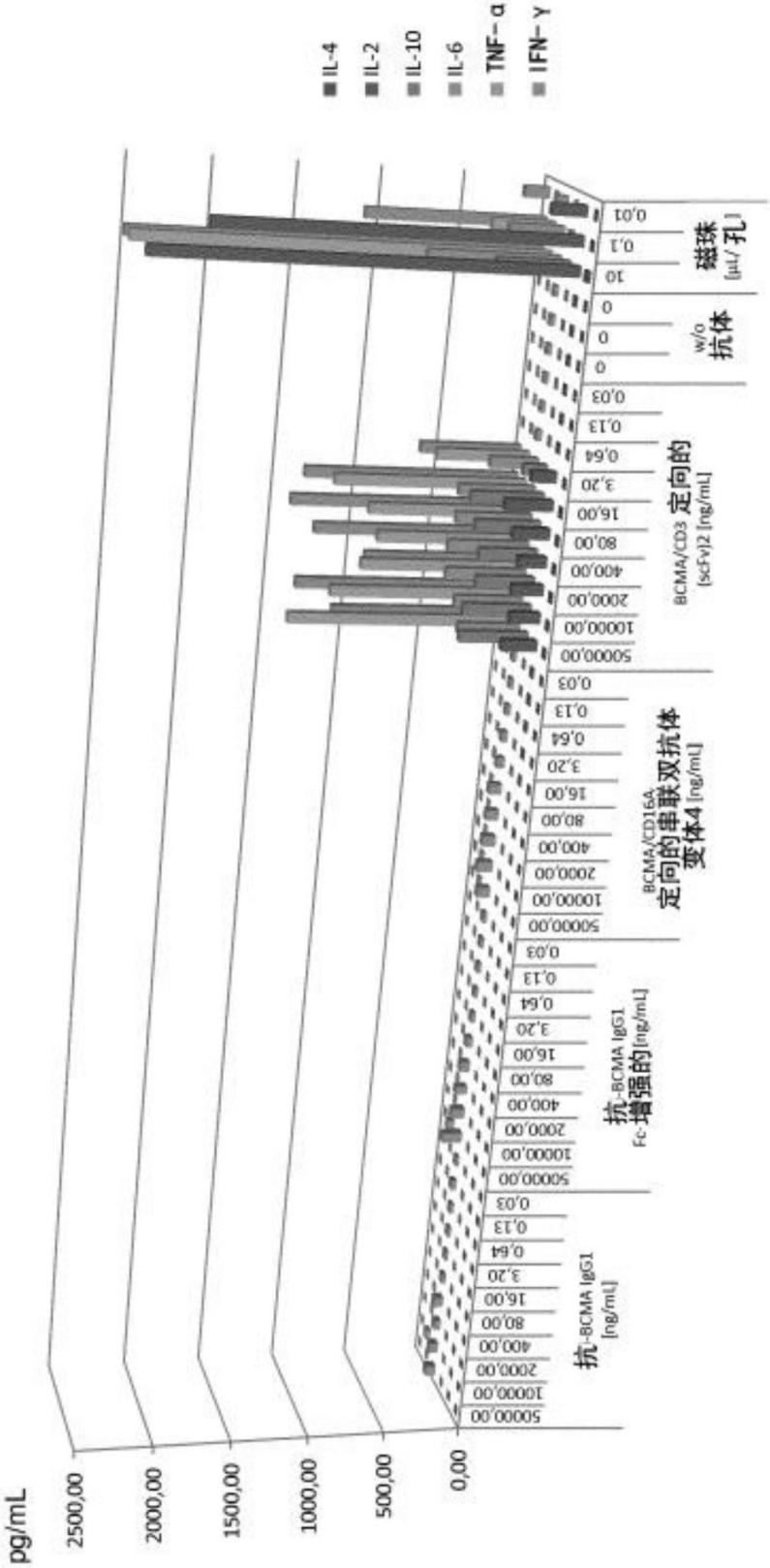


图9

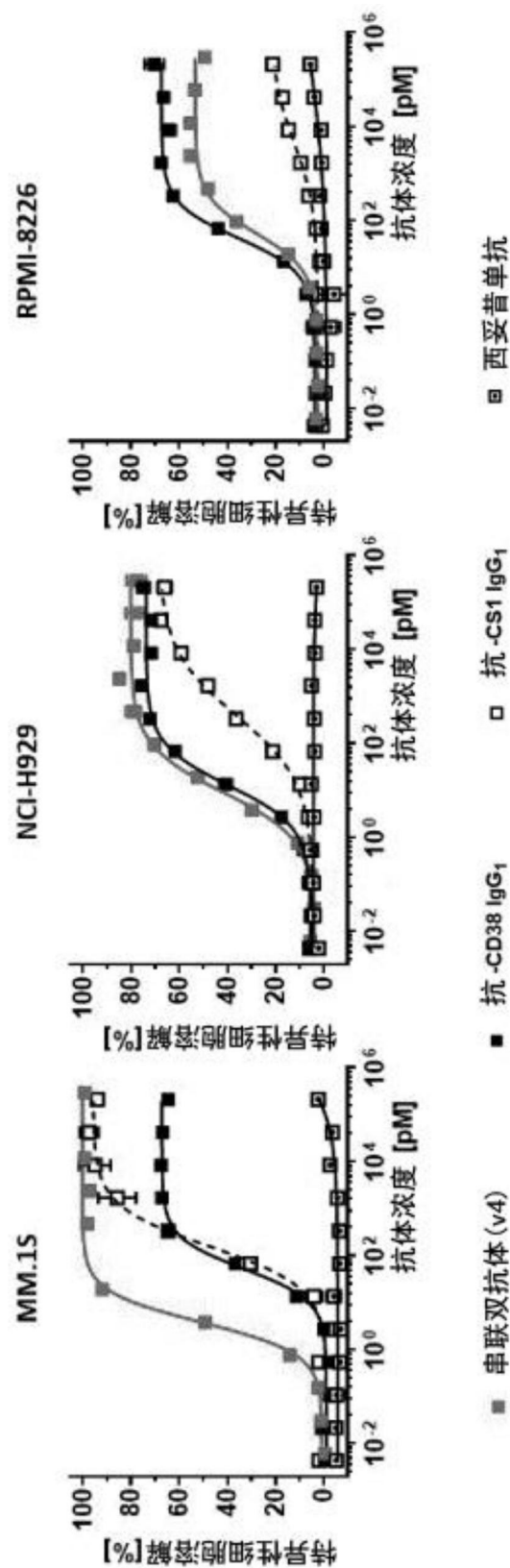


图10

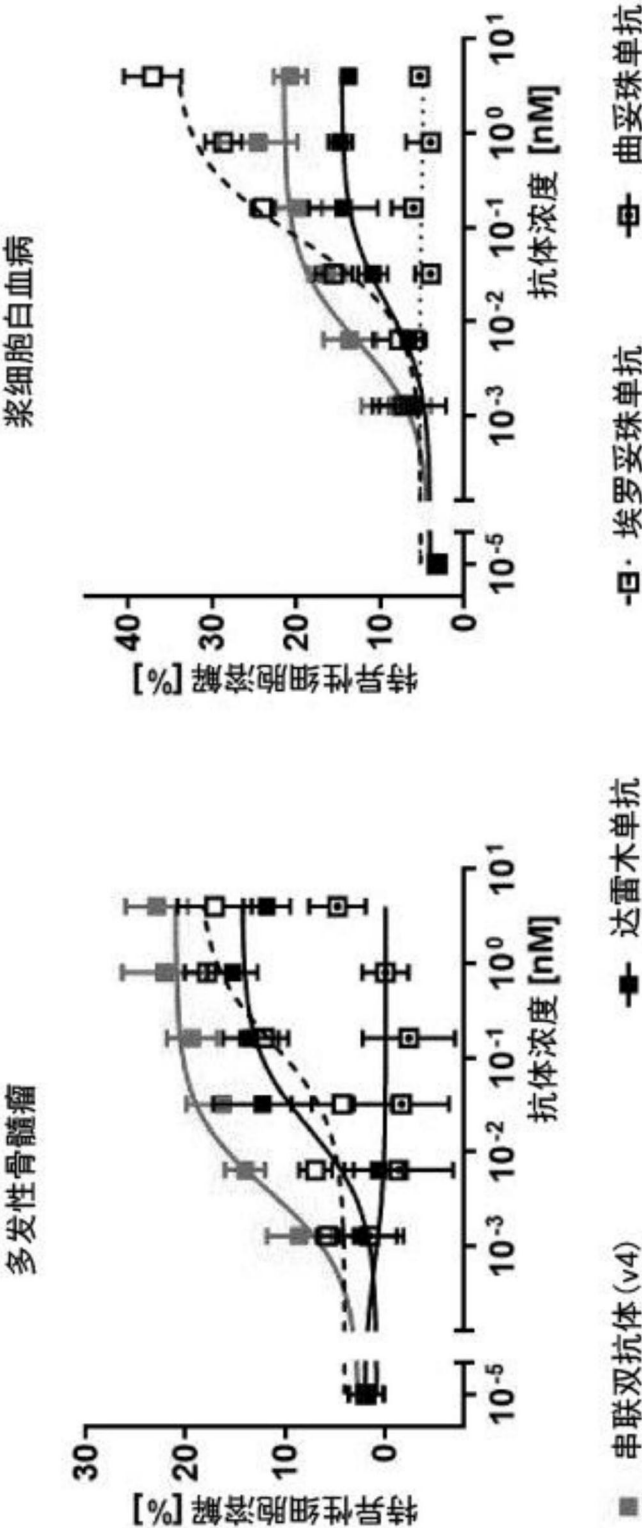


图11

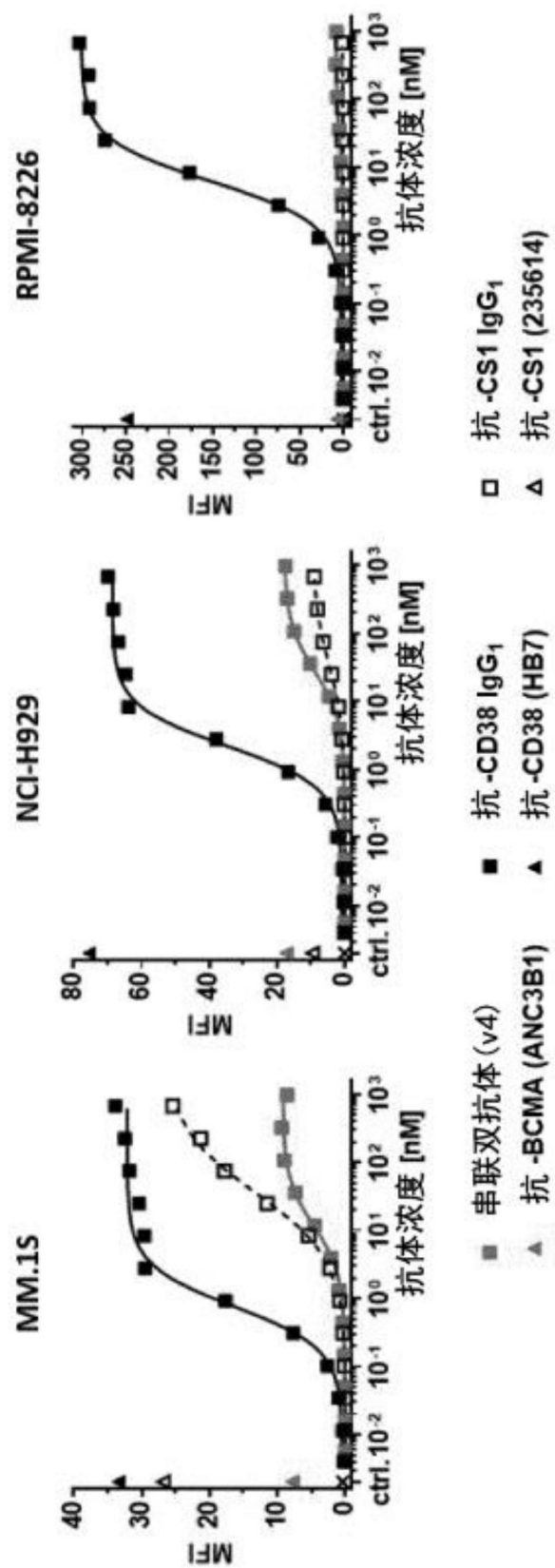


图12

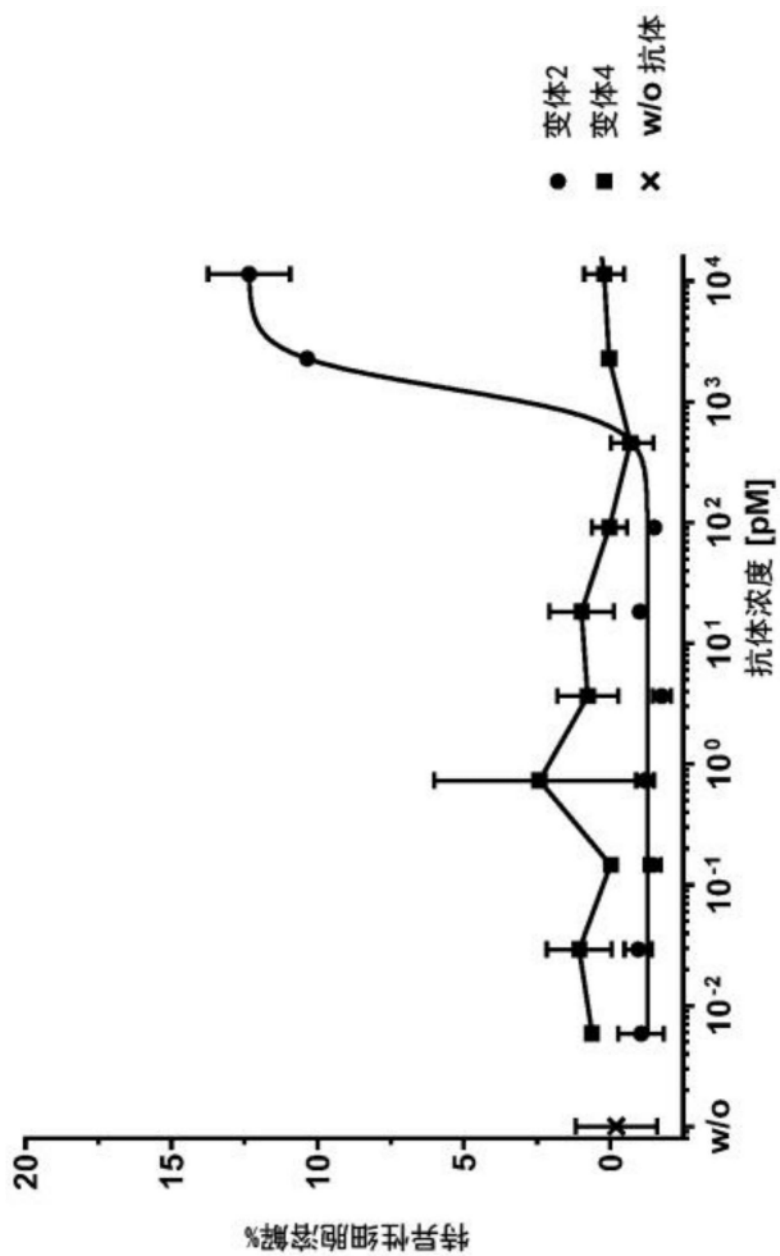


图13