



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114302893 B

(45) 授权公告日 2025.01.28

(21) 申请号 202080061412.X

(22) 申请日 2020.08.14

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 114302893 A

(43) 申请公布日 2022.04.08

(30) 优先权数据  
62/887,411 2019.08.15 US  
62/924,435 2019.10.22 US  
62/978,584 2020.02.19 US  
63/057,824 2020.07.28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2022.03.01

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2020/046352 2020.08.14

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02021/030680 EN 2021.02.18

(73) 专利权人 瑞泽恩制药公司  
地址 美国纽约州

(72) 发明人 L·哈伯 J·A·芬尼 R·麦凯  
E·史密斯 C·Y·林

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所  
11247

专利代理师 史文静 黄革生

(51) Int.Cl.  
C07K 14/725 (2006.01)  
C07K 14/74 (2006.01)  
C07K 16/28 (2006.01)  
C07K 16/30 (2006.01)  
C07K 16/46 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61P 31/04 (2006.01)  
A61P 31/12 (2006.01)  
A61P 31/10 (2006.01)  
A61P 33/00 (2006.01)

(56) 对比文件  
US 2006228300 A1, 2006.10.12  
WO 2014022540 A1, 2014.02.06  
WO 2018178074 A1, 2018.10.04  
WO 9103493 A1, 1991.03.21

审查员 殷岑楠

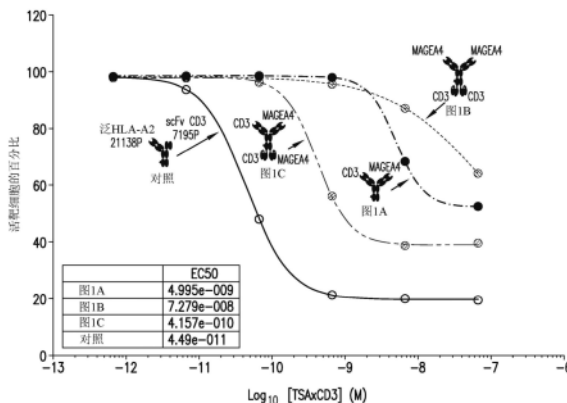
权利要求书2页 说明书38页  
序列表44页 附图47页

(54) 发明名称

用于细胞靶向的多特异性抗原结合分子及其用途

(57) 摘要

本发明提供了结合T细胞抗原(例如,CD3)和靶抗原(例如,肿瘤相关抗原、病毒或细菌抗原)两者的多特异性抗原结合分子,并且其包含就T细胞抗原结合而言是多价(例如,二价)的单条多肽链,以及其用途。



1. 一种多特异性抗原结合分子,其包括:

(a) 第一多肽,所述第一多肽从N端到C端包括(i)特异性结合人CD3的第一抗原结合结构域,其中第一抗原结合结构域包括免疫球蛋白Fab结构域,该免疫球蛋白Fab结构域包括与轻链可变区(LCVR)和轻链CL结构域配对的重链可变区(HCVR)和重链CH1结构域;(ii)包含免疫球蛋白Fc结构域的第一多聚化结构域;和(iii)特异性结合人CD3的第二抗原结合结构域,其中第二抗原结合结构域是包含通过肽接头连接的HCVR和LCVR的scFv结构域;和

(b) 第二多肽,所述第二多肽从N端到C端包括(i)特异性结合靶抗原的第三抗原结合结构域,其中第三抗原结合结构域包含免疫球蛋白Fab结构域,该免疫球蛋白Fab结构域包括与LCVR和轻链CL结构域配对的HCVR和重链CH1结构域;(ii)第二多聚化结构域,其包含免疫球蛋白Fc结构域;和(iii)第四抗原结合结构域,其特异性结合靶抗原,其中第四抗原结合结构域是包含通过肽接头连接的HCVR和LCVR的scFv结构域,

其中所述第一多聚化结构域和所述第二多聚化结构域通过二硫键彼此缔合以形成分子。

2. 根据权利要求1所述的分子,其中所述肽接头为10至30个氨基酸。

3. 根据权利要求1所述的分子,其中所述肽接头为(G4S)<sub>n</sub>接头,其中n为1至10。

4. 根据权利要求1所述的分子,其中所述scFv结构域包括在残基44处包括半胱氨酸突变的HCVR,和在残基100处包括半胱氨酸突变的LCVR。

5. 根据权利要求1到4中任一项所述的分子,其中所述scFv结构域分别通过5至25个氨基酸的接头连接到第一多聚化结构域和第二多聚化结构域的C末端。

6. 根据权利要求1到4中任一项所述的分子,其中所述scFv结构域分别通过(G4S)<sub>n</sub>接头连接到第一多聚化结构域和第二多聚化结构域的C末端,其中n为1-10。

7. 根据权利要求1到4中任一项所述的分子,其中所述第一多聚化结构域和所述第二多聚化结构域是人IgG1或人IgG4 Fc结构域。

8. 根据权利要求1到4中任一项所述的分子,其中所述第一多聚化结构域或所述第二多聚化结构域,包括与相同同种型的野生型Fc结构域相比降低对蛋白A结合的亲和力的氨基酸取代。

9. 根据权利要求8所述的分子,其中所述氨基酸取代包括EU编号的H435R和Y436F修饰。

10. 根据权利要求1到4中任一项所述的分子,其中所述第一多肽、所述第二多肽或所述第一多肽和所述第二多肽两者包括经修饰的铰链结构域,与相同同种型的野生型铰链结构域相比,所述经修饰的铰链结构域降低对Fc $\gamma$ 受体的结合亲和力。

11. 根据权利要求1到4中任一项所述的分子,其中靶抗原是肽/MHC复合物。

12. 根据权利要求1到4中任一项所述的分子,其中所述第三抗原结合结构域和所述第四抗原结合结构域结合不同的靶抗原。

13. 根据权利要求12所述的分子,其中所述不同的靶抗原在细胞表面上共表达。

14. 根据权利要求1到4中任一项所述的分子,其中所述第三抗原结合结构域结合的靶抗原与所述第四抗原结合结构域结合的靶抗原相同。

15. 一种药物组合物,其包括根据权利要求1到14中任一项所述的分子,以及药学上可接受的载体或稀释剂。

16. 根据权利要求1到14中任一项所述的多特异性抗原结合分子或权利要求15所述的

药物组合物在制造用于治疗有需要的受试者的癌症的药物中的用途,其中靶抗原是肿瘤细胞抗原。

17. 根据权利要求1到14中任一项所述的多特异性抗原结合分子或权利要求15所述的药物组合物在制造用于治疗有需要的受试者的感染的药物中的用途,其中靶抗原是感染相关抗原。

18. 根据权利要求17所述的用途,其中:

- (a) 所述感染是病毒感染并且所述感染相关抗原是病毒抗原;
- (b) 所述感染是细菌感染并且所述感染相关抗原是细菌抗原;
- (c) 所述感染是真菌感染并且所述感染相关抗原是真菌抗原;或
- (d) 所述感染是寄生虫感染并且所述感染相关抗原是寄生虫表达的抗原。

19. 根据权利要求16到18中任一项所述的用途,其中所述药物与第二治疗剂组合使用,所述第二治疗剂包括双特异性抗原结合分子,所述双特异性抗原结合分子包括结合靶抗原(TA)的第一抗原结合结构域和结合T细胞抗原的第二抗原结合结构域。

20. 根据权利要求19所述的用途,其中所述第二治疗剂包括双特异性抗TA x抗CD28抗体。

21. 根据权利要求20所述的用途,其中所述第二治疗剂包括双特异性抗EGFR x抗CD28抗体。

22. 根据权利要求19所述的用途,其中所述第二治疗剂包括结合T细胞上的检查点抑制剂的抗体。

23. 根据权利要求22所述的用途,其中所述第二治疗剂包括抗PD-1抗体。

24. 根据权利要求16到18中任一项所述的用途,其中所述靶抗原以每个靶细胞100个到5000个拷贝的密度存在。

25. 根据权利要求16到18中任一项所述的用途,其中所述靶抗原以每个靶细胞1000个到20,000个拷贝的密度存在。

## 用于细胞靶向的多特异性抗原结合分子及其用途

[0001] 对序列表的参考

[0002] 本申请通过引用并入以计算机可读形式作为文件10606W001-Sequence.txt提交的序列表,其创建于2020年8月7日并含有64,570个字节。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及多价抗原结合蛋白的替代形式及其使用方法。多价抗原结合蛋白,包含双特异性和多特异性分子,包括具有特异性结合T细胞抗原(例如,CD3)的N端和C端抗原结合结构域两者的第一多肽链和包括至少一个结合靶抗原(例如,肿瘤细胞抗原)的抗原结合结构域的第二多肽链。

### 背景技术

[0004] 双特异性和多特异性抗体和抗原结合分子是本领域已知的(参见,例如,Brinkmann和Kontermann,《MABS》,9(2):182-212,2017)。在此类已知的形式中,存在FcFc\*(图1A结构),一种传统的双特异性抗体,其在抗体的任一臂上具有Fab抗原结合结构域,以及Fc区域,其具有改变蛋白A结合亲和力以允许从同二聚体杂质中分离异二聚体的经修饰的CH3结构域(同上,第184页,图2,图片7,最后一个结构)。这种传统的双特异性抗体形式已被用于制造双特异性抗体,其中抗体的一个臂靶向肿瘤细胞抗原并且第二个臂靶向T细胞抗原,如CD3。另一种常规形式是IgG-HC-scFv(图1B结构),一种双特异性抗体,其中两个N端Fab结构域结合第一抗原并且连接到Fc区域的C端的两个scFv结构域结合第二抗原(同上,第184页,图2,图片10,第一个结构)。本领域需要改进所需功能的双特异性或多特异性抗原结合分子的新的和有用的形式。虽然Brinkmann等人一般提及用于生成任何同二聚体或异二聚体抗原结合分子的“构件”(第183页,图1),但可能性实际上是无限的,并且据报道,仅制备了图2(第184页)中所示的那些分子。此外,Brinkmann没有考虑特定的抗原结合结构域,具体地说,在形成多特异性分子的一部分的单条多肽链的N端和C端均包括T细胞抗原结合结构域分子。

### 发明内容

[0005] 一般而言,本发明提供了结合T细胞抗原(TCA)(例如,CD3)和靶抗原(TA)(例如,肿瘤相关抗原、病毒或细菌抗原)两者的多特异性抗原结合分子,并且其包含就T细胞抗原结合而言是多价(例如,二价)的单条多肽链。

[0006] 在一方面,本发明提供了一种多特异性抗原结合分子,其包括:(a)第一多肽,所述第一多肽从N端到C端包括(i)特异性结合T细胞抗原的第一抗原结合结构域、(ii)第一多聚化结构域和(iii)特异性结合T细胞抗原的第二抗原结合结构域;以及(b)第二多肽,所述第二多肽从N端到C端包括(i)特异性结合靶抗原的第三抗原结合结构域和(ii)第二多聚化结构域,其中所述第一多聚化结构域和所述第二多聚化结构域彼此缔合以形成分子。

[0007] 在一些实施例中,所述第二多肽进一步包括位于所述第二多聚化结构域的所述C

端处的第四抗原结合结构域。在一些情况下,所述第四抗原结合结构域特异性结合靶抗原。在一些情况下,所述第三抗原结合结构域和所述第四抗原结合结构域特异性结合不同的靶抗原。在一些情况下,所述不同的靶抗原在相同细胞的表面上表达(或存在)。在一些情况下,所述不同的靶抗原在不同细胞的表面上表达(或存在)。在本文中,对在细胞表面上表达(或存在)的靶抗原的提及包含由细胞表达的嵌入或跨越细胞膜的蛋白质,以及由细胞在主要组织相容性复合物(MHC)蛋白的凹槽背景下呈递的肽。在一些情况下,所述第三抗原结合结构域和所述第四抗原结合结构域特异性结合相同的靶抗原。在一些实施例中,所述第四抗原结合结构域特异性结合T细胞抗原。在一些情况下,所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域特异性结合相同的T细胞抗原。在一些情况下,所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域特异性结合不同的T细胞抗原。在一些实施例中,所述第一抗原结合结构域特异性结合作为共刺激分子的第一T细胞抗原,并且所述第二抗原结合结构域特异性结合作为检查点抑制剂的第二T细胞抗原。在一些情况下,所述共刺激分子是CD28,并且所述检查点抑制剂是PD-1。在一些情况下,所述第一、第二和第四抗原结合结构域特异性结合相同的T细胞抗原。在一些情况下,所述第一、第二和第四抗原结合结构域结合不同的T细胞抗原。在一些情况下,所述第一和第四抗原结合结构域特异性结合相同的T细胞抗原。在一些情况下,所述第二和第四抗原结合结构域特异性结合相同的T细胞抗原。

[0008] 在各个实施例中,所述抗原结合结构域中的一个或多个是Fab。在各个实施例中,所述抗原结合结构域中的一个或多个是scFv。在一些实施例中,所述多特异性分子含有Fab和scFv抗原结合结构域两者。在一些情况下,所述第一抗原结合结构域和所述第三抗原结合结构域是Fab。在一些情况下,所述第二抗原结合结构域是scFv。在一些情况下,所述第四抗原结合结构域是scFv。在一些实施例中,所述第一、第二和第三抗原结合结构域是Fab。在一些情况下,所述第一和第三抗原结合结构域是Fab结构域,并且所述第二抗原结合结构域是scFv结构域。在一些实施例中,所述第一、第二、第三和第四抗原结合结构域是Fab。在一些情况下,所述第一、第二、第三和第四抗原结合结构域是Fab结构域。在一些情况下,所述第一和第三抗原结合结构域是Fab结构域,并且所述第二和第四抗原结合结构域是scFv结构域。在一些情况下,所述第一、第二、第三和第四抗原结合结构域是Fab结构域。在一些情况下,所述第一和第三抗原结合结构域是Fab结构域,并且所述第二和第四抗原结合结构域是scFv结构域。在一些情况下,所述第一、第二、第三和第四抗原结合结构域是Fab结构域。

[0009] 在其中所述抗原结合结构域是scFv结构域的任何实施例中,所述scFv结构域可以包括在残基44处包括半胱氨酸突变的重链可变区(HCVR)和在残基100处包括半胱氨酸突变的轻链可变区(Kabat编号)。在一些情况下,所述scFv包括通过10个到30个氨基酸的多肽接头,任选地(G4S)<sub>4</sub>接头,连接在一起的HCVR和LCVR。在一些实施例中,所述scFv通过5个到25个氨基酸的接头,任选地(G4S)<sub>3</sub>接头,连接到所述第一和/或第二多聚化结构域的所述C端。

[0010] 在一些实施例中,所述T细胞抗原是T细胞受体复合物抗原(即,构成所述T细胞受体复合物的任何蛋白质亚基)。在一些情况下,所述T细胞抗原是CD3。在一些情况下,所述T细胞抗原是T细胞上的共刺激分子或检查点抑制剂。在一些实施例中,所述T细胞抗原选自自由CD27、CD28、4-1BB和PD-1组成的组。在一些实施例中,所述T细胞抗原选自自由CD3、CD27、CD28、4-1BB和PD-1组成的组。

[0011] 在一些实施例中,所述靶抗原是肿瘤相关抗原。在一些实施例中,所述靶抗原是病

毒或细菌抗原。在一些实施例中,所述靶抗原是真菌抗原或寄生虫抗原。

[0012] 在一些实施例中,所述第一和第二多聚化结构域是免疫球蛋白Fc结构域。在一些情况下,所述第一多聚化结构域和所述第二多聚化结构域是人IgG1或人IgG4 Fc结构域。在一些情况下,所述第一和第二多聚化结构域包括人IgG多肽(例如,IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)的免疫球蛋白铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域。在一些情况下,所述第一和第二多聚化结构域包括人IgG1多肽的铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域。在一些情况下,所述第一和第二多聚化结构域包括人IgG4多肽的铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域。在一些实施例中,所述第一和第二多聚化结构域通过二硫键彼此缔合。

[0013] 在一些实施例中,所述第一多聚化结构域或所述第二多聚化结构域包括与相同同种型的野生型Fc结构域相比降低对蛋白A结合的亲和力的氨基酸取代。在一些情况下,所述氨基酸取代包括H435R修饰,或H435R和Y436F修饰(EU编号)。在一些情况下,所述第一多聚化结构域包括所述H435R和Y436F修饰。在一些情况下,所述第二多聚化结构域包括所述H435R和Y436F修饰。在一些实施例中,所述第一多肽、所述第二多肽或所述第一多肽和所述第二多肽两者包括经修饰的铰链结构域,与相同同种型的野生型铰链结构域相比,所述经修饰的铰链结构域降低对Fc $\gamma$ 受体的结合亲和力。

[0014] 在另一方面,本发明提供了一种多特异性抗原结合分子,其包括:(a)第一多肽,所述第一多肽从N端到C端包括(i)特异性结合T细胞抗原的第一Fab、(ii)第一免疫球蛋白Fc结构域和(iii)特异性结合T细胞抗原的第一scFv;以及(b)第二多肽,所述第二多肽从N端到C端包括(i)特异性结合靶抗原的第二Fab、(ii)第二免疫球蛋白Fc结构域和(iii)特异性结合靶抗原的第二scFv,其中所述第一免疫球蛋白结构域和所述第二免疫球蛋白结构域通过二硫键彼此缔合以形成分子。

[0015] 在一些实施例中,所述第二Fab和所述第二scFv特异性结合不同的靶抗原。在一些情况下,所述不同的靶抗原在相同细胞的表面上表达。在一些实施例中,所述第二Fab和所述第二scFv特异性结合相同的靶抗原。

[0016] 在另一方面,本发明提供了一种多特异性抗原结合分子,其包括:(a)第一多肽,所述第一多肽从N端到C端包括(i)特异性结合T细胞抗原的第一Fab、(ii)第一免疫球蛋白Fc结构域和(iii)特异性结合T细胞抗原的第二Fab;以及(b)第二多肽,所述第二多肽从N端到C端包括(i)特异性结合靶抗原的第三Fab、(ii)第二免疫球蛋白Fc结构域和(iii)特异性结合靶抗原的第四Fab,其中所述第一免疫球蛋白结构域和所述第二免疫球蛋白结构域通过二硫键彼此缔合以形成分子。

[0017] 在一些实施例中,所述第三Fab和所述第四Fab特异性结合不同的靶抗原。在一些情况下,所述不同的靶抗原在相同细胞的表面上表达。在一些实施例中,所述第三Fab和所述第四Fab特异性结合相同的靶抗原。

[0018] 在另一方面,本发明提供了一种多特异性抗原结合分子,其包括:(a)第一多肽,所述第一多肽从N端到C端包括(i)特异性结合T细胞抗原的第一Fab、(ii)第一免疫球蛋白Fc结构域和(iii)特异性结合T细胞抗原的第一scFv;以及(b)第二多肽,所述第二多肽从N端到C端包括(i)特异性结合靶抗原的第二Fab、(ii)第二免疫球蛋白Fc结构域和(iii)特异性结合T细胞抗原的第二scFv,其中所述第一免疫球蛋白结构域和所述第二免疫球蛋白结构域通过二硫键彼此缔合以形成分子。

[0019] 在另一方面,本发明提供了一种多特异性抗原结合分子,其包括:(a)第一多肽,所述第一多肽从N端到C端包括(i)特异性结合T细胞抗原的第一Fab、(ii)第一免疫球蛋白Fc结构域和(iii)特异性结合T细胞抗原的第二Fab;以及(b)第二多肽,所述第二多肽从N端到C端包括(i)特异性结合靶抗原的第二Fab和(ii)第二免疫球蛋白Fc结构域,其中所述第一免疫球蛋白结构域和所述第二免疫球蛋白结构域通过二硫键彼此缔合以形成分子。

[0020] 在各个实施例中,如上文或本文提及的那些实施例中的任何一个实施例,所述T细胞抗原是T细胞受体复合物抗原(即,构成所述T细胞受体复合物的任何蛋白质亚基)。在一些情况下,所述T细胞抗原是CD3。在一些情况下,所述T细胞抗原是T细胞上的共刺激分子或检查点抑制剂。在一些实施例中,所述T细胞抗原选自CD27、CD28、4-1BB和PD-1组成的组。在一些实施例中,所述T细胞抗原选自CD3、CD27、CD28、4-1BB和PD-1组成的组。

[0021] 在各个实施例中,如上文或本文提及的那些实施例中的任何一个实施例,所述靶抗原是肿瘤相关抗原。在一些实施例中,所述靶抗原是病毒或细菌抗原。在一些实施例中,所述靶抗原是真菌抗原或寄生虫抗原。

[0022] 在一些实施例中,如上文或本文提及的那些实施例中的任何一个实施例,所述第一和第二多聚化结构域是免疫球蛋白Fc结构域。在一些情况下,所述第一多聚化结构域和所述第二多聚化结构域是人IgG1或人IgG4 Fc结构域。在一些情况下,所述第一和第二多聚化结构域包括人IgG多肽(例如,IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)的免疫球蛋白铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域。在一些情况下,所述第一和第二多聚化结构域包括人IgG1多肽的铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域。在一些情况下,所述第一和第二多聚化结构域包括人IgG4多肽的铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域。在一些实施例中,所述第一和第二多聚化结构域通过二硫键彼此缔合。

[0023] 在一些实施例中,如上文或本文提及的那些实施例中的任何一个实施例,所述第一多聚化结构域或所述第二多聚化结构域包括与相同同种型的野生型Fc结构域相比降低对蛋白A结合的亲和力的氨基酸取代。在一些情况下,所述氨基酸取代包括H435R修饰,或H435R和Y436F修饰(EU编号)。在一些情况下,所述第一多聚化结构域包括所述H435R和Y436F修饰。在一些情况下,所述第二多聚化结构域包括所述H435R和Y436F修饰。在一些实施例中,所述第一多肽、所述第二多肽或所述第一多肽和所述第二多肽两者包括经修饰的铰链结构域,与相同同种型的野生型铰链结构域相比,所述经修饰的铰链结构域降低对Fc $\gamma$ 受体的结合亲和力。

[0024] 在另一方面,本发明提供了一种药物组合物,其包括上文或本文所讨论的任何一种多特异性分子,以及药学上可接受的载体或稀释剂。

[0025] 在另一方面,本发明提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括将上文或本文所讨论的任何一种多特异性分子施用于有需要的受试者。

[0026] 在另一方面,本发明提供了一种治疗感染的方法,所述方法包括将上文或本文所讨论的任何一种多特异性分子施用于有需要的受试者。在一些情况下,所述感染是细菌感染。在一些情况下,所述感染是病毒感染。在一些情况下,所述感染是真菌感染。在一些情况下,所述感染是寄生虫感染。

[0027] 在各个实施例中,所述靶抗原以每个靶细胞10到10,000,000个拷贝的密度存在。在各个实施例中,所述靶抗原以每个靶细胞100到10,000,000个拷贝的密度存在。在各个实

施例中,所述靶抗原以每个靶细胞100到1,000,000个拷贝的密度存在。在一些实施例中,所述靶抗原以50到10,000的密度存在。在一些实施例中,所述靶抗原以100到5000的密度存在。在一些实施例中,所述靶抗原以100到20,000的密度存在。在一些实施例中,所述靶抗原以每个靶细胞500到1,000,000个拷贝的密度存在。在一些实施例中,所述靶抗原以每个靶细胞1000到20,000个拷贝的密度存在。在一些实施例中,所述靶抗原以每个靶细胞大于20,000个拷贝的密度存在。在一些实施例中,所述靶抗原以每个靶细胞约10个、约50个、约100个、约200个、约300个、约400个、约500个、约1000个、约2000个、约3000个、约4000个、约5000个、约6000个、约7000个、约8000个、约9000个、约10,000个、约15,000个、约20,000个、约25,000个、约50,000个、约75,000个、约100,000个、约200,000个、约300,000个、约400,000个、约500,000个、约600,000个、约700,000个、约800,000个、约900,000个、约1,000,000个、约2,000,000个、约3,000,000个、约4,000,000个或约5,000,000个拷贝的密度存在。如本文所使用的,“低密度抗原”是在靶细胞上发现不超过5000个拷贝的抗原。提及低密度抗原包含其中细胞具有不超过4000个、不超过3000个、不超过2000个、不超过1000个、不超过900个、不超过800个、不超过700个、不超过600个、不超过500个、不超过400个、不超过300个、不超过200个、不超过100个或不超过50个靶抗原拷贝的情况。

[0028] 在各个实施例中,所述多特异性分子与第二治疗剂组合施用以治疗疾病或病症。在一些情况下,所述第二治疗剂包括双特异性抗原结合分子,所述双特异性抗原结合分子包括结合靶抗原(TA)的第一抗原结合结构域和结合T细胞抗原的第二抗原结合结构域。在一些情况下,所述靶抗原是肿瘤细胞抗原。在一些实施例中,所述第二治疗剂包括双特异性抗TA x抗CD28抗体。在一些实施例中,所述第二治疗剂包括双特异性抗EGFR x抗CD28抗体。在一些实施例中,所述第二治疗剂包括结合T细胞上的检查点抑制剂的抗体。在一些实施例中,所述第二治疗剂包括抗PD-1抗体。在一些情况下,所述多特异性分子与两种或更多种第二治疗剂组合施用。

[0029] 在另一方面,本发明提供了一种上文或本文所讨论的任何一种多特异性分子在制备用于治疗有需要的受试者的疾病或病症(例如,癌症或感染)的药物中的用途。

[0030] 在另一方面,本发明提供了一种上文或本文所讨论的任何一种多特异性分子在医学或治疗疾病或病症(例如,癌症或感染)中的用途。

[0031] 在另一方面,本发明提供了一种如上文或本文所讨论的多特异性分子,其用于医学或治疗疾病或病症(例如,癌症或感染)。

[0032] 在上文或本文所讨论的任何实施例中,所述靶抗原可以是主要组织相容性复合物(MHC)蛋白的凹槽背景下的肽。

[0033] 在各个实施例中,上文或本文所讨论的实施例的特征或组分中的任何特征或组分可以组合,并且此类组合涵盖在本公开的范围。上文或本文所讨论的任何特定值可以与上文或本文所讨论的另一个相关值组合以列举具有表示范围的上端和下端的值的范围,并且此类范围涵盖在本公开的范围。

[0034] 通过阅读随后的详细描述,其它实施例将变得显而易见。

## 附图说明

[0035] 图1A和1B展示了已知的双特异性抗体和抗原结合分子形式。



图1E结构的分子。

[0045] 图10A和10B示出了具有图1C和1D结构的分子与过表达MAGEA4肽的A375细胞(图10A)或CD3+Jurkat细胞(图10B)的结合。分子的CD3结合结构域包括7221G抗CD3抗体的可变区。这两种分子相对于彼此显示出与两种细胞类型的相似结合。

[0046] 图11A和11B示出了图10A和10B中所示的相同分子对来自两个不同供体来源的A375细胞的细胞毒活性。分子的CD3结合结构域包括7221G抗CD3抗体的可变区。具有图1C结构的分子比具有图1D结构的分子更有效。

[0047] 图12A和12B分别示出了与具有图1A结构的分子相比,具有图1C和图1F结构的分子的相对细胞毒活性和效力。如实例7中所讨论的,这些分子被单独测试,并且与共刺激双特异性EGFR x CD28抗体和抗PD-1抗体组合测试。分子的CD3结合结构域包括7195P抗CD3抗体的可变区。具有图1F结构的分子靶向具有两个TA抗原结合结构域的不同靶抗原的两个不同表位,而具有图1C结构的分子靶向具有两个TA抗原结合结构域的靶抗原的相同表位。具有图1F结构的分子比具有图1C结构的分子更有效,并且两种分子都比具有图1A结构的分子更有效。在每种情况下,这些分子与共刺激双特异性抗体和抗PD-1抗体的组合产生了甚至更大的细胞毒性效力,类似于图4A-4C中所示的结果。

[0048] 图13示出了对具有图1F结构的分子的相对结合亲和力,其中CD3结合结构域衍生自对CD3具有强、中等或弱结合亲和力的抗CD3抗体。“强”结合结构域衍生自7195P抗CD3抗体。“中等”结合结构域衍生自7221G抗CD3抗体。“弱”结合结构域衍生自7221G20抗CD3抗体。提及例如“强/强”分别是指Fab抗CD3结合结构域和scFc抗CD3结合结构域。如预期的那样,与CD3阳性Jurkat细胞的结合与分子中抗CD3结合结构域的亲和力强度相关。

[0049] 图14A和14B示出了图13所示分子在MAGEA4阳性A375细胞中的相对细胞毒活性和效力。如实例8中所讨论的,这些分子被单独测试(图14A),并且与共刺激双特异性EGFR x CD28和抗PD-1抗体组合测试(图14B)。抗CD3结合结构域与分子的效力之间存在明显的相关性。“对照”是一种阳性对照,其靶向所有HLA分子的支架,以提供与其它分子进行比较的最大细胞毒性。

[0050] 图15A和15B示出了图13所示分子在MAGEA4阳性ScaBER细胞中的相对细胞毒活性和效力。如实例8中所讨论的,这些分子被单独测试(图15A),并且与共刺激双特异性EGFR x CD28和抗PD-1抗体组合测试(图15B)。抗CD3结合结构域与分子的效力之间存在明显的相关性。“对照”是一种阳性对照,其靶向所有HLA分子的支架,以提供与其它分子进行比较的最大细胞毒性。

[0051] 图16A、16B和16C示出了具有图1A(分子C)、1C(分子B)和1F(分子A和D)结构的分子对NYESO-1阳性细胞(图16A)、MAGEA4(肽1)阳性细胞(图16B)和MAGEA4(肽2)阳性细胞(图16C)的相对结合亲和力。如预期的那样,没有NYESO-1结合结构域分子D不与NYESO-1表达细胞结合(图16A),而缺乏相关MAGEA4结合结构域分子不与MAGEA4表达细胞结合,如图16B和16C所示。分子的CD3结合结构域包括7195P抗CD3抗体的可变区。“HLA靶向双特异性”阳性对照结合HLA分子和CD3。“同种型对照多特异性”是具有图1C结构的分子,其具有与无关靶抗原的结合结构域。

[0052] 图17A和17B分别示出了与结合HLA分子和CD3的具有图1A结构的阳性对照相比,具有图1C和图1F结构的分子的相对细胞毒活性和效力。同种型对照包含具有图1C结构的分

子,其具有与无关靶抗原的结合结构域,以及具有图1A结构的分子,其具有与CD3和无关靶抗原的结合结构域。如实例9中所讨论的,这些分子被单独测试,并且与共刺激双特异性EGFR x CD28抗体和抗PD-1抗体组合测试。分子的CD3结合结构域包括7195P抗CD3抗体的可变区。具有图1F结构的分子靶向具有两个TA抗原结合结构域的不同抗原(NYESO-1和MAGEA4),而具有图1C结构的分子靶向具有两个TA抗原结合结构域的统一抗原。具有图1F结构并靶向两种不同抗原的分子比具有图1C结构的分子更有效。在每种情况下,与单独分子相比,这些分子与共刺激双特异性抗体和抗PD-1抗体的组合产生了甚至更大的细胞毒性效力,类似于图4A-4C中所示的结果。

[0053] 图17C和17D示出了结合图17A和17B讨论的分子的相对T细胞活化。

[0054] 图18A和18B分别示出了与具有图1A结构的分子相比,具有图1C和图1F结构的分子的相对细胞毒活性和效力。阳性对照是具有图1A结构的分子,其结合人白细胞抗原(HLA)分子和CD3。同种型对照包含具有图1C结构的分子,其具有与无关靶抗原的结合结构域,以及具有图1A结构的分子,其具有与CD3和无关靶抗原的结合结构域。如实例9中所讨论的,这些分子被单独测试,并且与共刺激双特异性EGFR x CD28抗体和抗PD-1抗体组合测试。分子的CD3结合结构域包括7195P抗CD3抗体的可变区。如图18A所示,具有图1F结构的分子(靶向MAGEA4的两个不同表位)比具有图1C结构的分子(靶向具有两个TA结合结构域的单一个表位)更有效,并且两种分子都比具有图1A结构的分子更有效。类似地,如图18B所示,具有图1F结构的分子(靶向两种不同的抗原)比具有图1C结构的分子(靶向具有两个TA结合结构域的统一抗原)更有效,并且两种分子都比具有图1A结构的分子更有效。在每种情况下,与单独分子相比,这些分子与共刺激双特异性抗体和抗PD-1抗体的组合产生了甚至更大的细胞毒性效力,类似于图4A-4C中所示的结果。

[0055] 图18C、18D、18E和18F示出了结合图18A和18B讨论的分子的相对T细胞活化。

[0056] 图19A和19B分别示出了具有图1F结构的分子相对于具有图1A结构的两种分子的组合的细胞毒活性和效力以及T细胞活化,其中这两种分子的组合与具有图1F结构的分子结合相同的靶抗原对。如图19A和19B所示,具有图1F结构的分子比具有图1A结构的两种分子的组合更有效地杀死肿瘤细胞并增加T细胞活化。

## 具体实施方式

[0057] 在更详细地描述本发明之前,应当理解的是本发明不限于所描述的具体方法和实验条件,因为此类方法和条件可以变化。还应理解,本文所使用的术语仅出于描述具体实施例的目的,而不旨在是限制性的,因为本发明的范围仅受所附权利要求书限制。

[0058] 除非另外定义,否则本文所使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。如本文所使用的,当用于提及具体所列举的数值时,术语“约”意指数值可以与所列举的值相差不超过1%。例如,如本文所使用的,表述“约100”包含99和101以及其之间的所有值(例如,99.1、99.2、99.3、99.4等)。

[0059] 尽管在本发明的实践或测试中可以使用类似于或等同于本文所描述的方法和材料的任何方法和材料,但现在描述了优选的方法和材料。本说明书中提及的所有专利、申请和非专利出版物均通过引用整体并入本文。

[0060] 定义

[0061] 术语“T细胞”是指表达CD3的免疫细胞,包含CD4+细胞(辅助T细胞)、CD8+细胞(细胞毒性T细胞)、调节性T细胞(Treg)和肿瘤浸润淋巴细胞。

[0062] 表述“T细胞抗原”是指存在于T细胞上的细胞表面表达的蛋白质,并且包含“共刺激分子”。“共刺激分子”是指由T细胞表达的蛋白质,所述T细胞结合同源配体或受体(例如,在抗原呈递细胞上)以提供刺激信号,所述刺激信号,与由T细胞的TCR与肽/MHC的接合所提供的主要信号组合,可刺激T细胞的活性。T细胞的刺激可以包含T细胞的活化、增殖和/或存活。

[0063] 如本文所使用的,表述“细胞表面表达的”或“细胞表面分子”意指这样一种或多种蛋白质,其在体外或体内在细胞表面上表达,使得蛋白质的至少一部分暴露于细胞膜的细胞外侧并且可被抗体的抗原结合部分或本文讨论的多特异性抗原结合分子的抗原结合结构域接近。

[0064] 本文所使用的表述“CD3”是指作为多分子T细胞受体(TCR)的一部分在T细胞上表达的抗原,并且其由以下四个受体链中的两个缔合形成的同二聚体或异二聚体组成:CD3- $\epsilon$ 、CD3- $\delta$ 、CD3- $\zeta$ 和CD3- $\gamma$ 。本文对蛋白质、多肽和蛋白质片段的所有提及旨在指代相应蛋白质、多肽或蛋白质片段的人版本,除非明确指出其来自非人物种。因此,表述“CD3”意指人CD3,除非指定为来自非人物种,例如“小鼠CD3”、“猴CD3”等。

[0065] 如本文所使用的,“结合CD3的抗体”或“抗CD3抗体”包含特异性识别单个CD3亚基(例如, $\epsilon$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 或 $\zeta$ )的抗体及其抗原结合片段,以及特异性识别两个CD3亚基的二聚体复合物(例如, $\gamma/\epsilon$ 、 $\delta/\epsilon$ 和 $\zeta/\zeta$ CD3二聚体)的抗体及其抗原结合片段。本发明的抗原结合结构域可以结合可溶性CD3和/或细胞表面表达的CD3。可溶性CD3包含天然CD3蛋白以及如单体和二聚体CD3构建体等重组CD3蛋白变体,其缺乏跨膜结构域或以其它方式与细胞膜无关。

[0066] 如本文所使用的,表述“在细胞表面表达的CD3”是指这样一种或多种CD3蛋白,其在体外或体内在细胞表面上表达,使得CD3蛋白的至少一部分暴露于细胞膜的细胞外侧并且可被抗体的抗原结合部分接近。“在细胞表面表达的CD3”包含在细胞的膜中的功能性T细胞受体的背景下所含有的CD3蛋白。表述“在细胞表面表达的CD3”包含表达为细胞表面上的同二聚体或异二聚体的一部分的CD3蛋白(例如, $\gamma/\epsilon$ 、 $\delta/\epsilon$ 和 $\zeta/\zeta$ CD3二聚体)。表述“在细胞表面表达的CD3”还包含CD3链(例如,CD3- $\epsilon$ 、CD3- $\delta$ 或CD3- $\gamma$ ),其在细胞表面上自身表达而没有其它CD3链类型。“细胞表面表达的CD3”可以包括通常表达CD3蛋白的细胞表面上表达的CD3蛋白或由其组成。可替代地,“细胞表面表达的CD3”可以包括在细胞表面上表达的CD3蛋白或由其组成,所述细胞通常在其表面上不表达人CD3,但已被人工工程化为在其表面上表达CD3。

[0067] 术语“抗原结合结构域”是指多特异性分子或对应抗体的与预定抗原(例如,CD3或肿瘤相关抗原)特异性结合的那部分。提及“对应抗体”是指衍生用于多特异性分子中的CDR或可变区(HCVR和LCVR)的抗体。例如,实例中讨论的图1C结构的分子包含具有衍生自特定抗CD3抗体和抗MAGEA4抗体的可变区的Fab和scFv。这些抗体是相应多特异性分子的“对应抗体”。

[0068] 术语“多特异性抗原结合分子”包含结合两种或更多种(例如,三种或四种)不同表位或抗原的分子。在一些情况下,多特异性抗原结合分子是双特异性的。在一些情况下,多特异性抗原结合分子是三特异性的。在一些情况下,多特异性抗原结合分子是四特异性的。

[0069] 术语“抗体”意指包括至少一个与特定抗原(例如,CD3或靶抗原(TA))特异性结合或相互作用的互补决定区(CDR)的任何抗原结合分子或分子复合物。术语“抗体”包含包括四条多肽链、通过二硫键相互连接的两条重(H)链和两条轻(L)链以及其多聚体(例如,IgM)的免疫球蛋白分子。术语“抗体”还包含由四条多肽链、通过二硫键相互连接的两条重(H)链和两条轻(L)链组成的免疫球蛋白分子。每条重链包括重链可变区(本文缩写为HCVR或 $V_H$ )和重链恒定区。重链恒定区包括三个结构域 $C_H1$ 、 $C_H2$ 和 $C_H3$ 。每条轻链包括轻链可变区(本文缩写为LCVR或 $V_L$ )和轻链恒定区。轻链恒定区包括一个结构域( $C_L1$ )。可以将 $V_H$ 区和 $V_L$ 区进一步细分为被称作互补决定区(CDR)的高变区,其间散布着更保守的被称作构架区(FR)的区域。每个 $V_H$ 和 $V_L$ 由三个CDR和四个FR构成,按以下顺序从氨基端到羧基端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本发明的不同实施例中,抗TA抗体或抗CD3抗体(或其抗原结合部分)的FR可以与人种系序列相同,或者可以是天然的或人工修饰的。可以基于两个或更多个CDR的并列分析来定义氨基酸共有序列。

[0070] 如本文所使用的,术语“抗体”还包含完整抗体分子的抗原结合片段。如本文所使用的,术语抗体的“抗原结合部分”、抗体的“抗原结合片段”等包含任何天然存在的、可酶促获得的、合成的或经基因工程化的多肽或糖蛋白,其特异性结合抗原以形成复合物。抗体的抗原结合片段可以例如使用任何合适的标准技术从完整抗体分子衍生,如蛋白水解消化或涉及操纵和表达编码抗体可变以及任选地恒定结构域的DNA的重组基因工程技术。此类DNA是已知的和/或易于从例如商业来源、DNA文库(包含例如噬菌体-抗体文库)获得,或可以合成。可以通过化学方法或通过分子生物学技术对DNA进行测序和操作,例如,将一个或多个可变结构域和/或恒定结构域排列成合适的构型、或引入密码子、产生半胱氨酸残基、修饰、添加或缺失氨基酸等。

[0071] 抗原结合片段的非限制性实例包含:(i) Fab片段;(ii) F(ab')<sub>2</sub>片段;(iii) Fd片段;(iv) Fv片段;(v) 单链Fv(scFv)分子;(vi) dAb片段;以及(vii) 由模拟抗体的高变区的氨基酸残基组成的最小识别单位(例如,分离的互补决定区(CDR),如CDR3肽)或受约束的FR3-CDR3-FR4肽。其它工程分子,如结构域特异性抗体、单结构域抗体、结构域缺失抗体、嵌合抗体、CDR嫁接抗体、双抗体、三抗体、四抗体、微抗体、纳米抗体(例如单价纳米抗体、二价纳米抗体等),小型模块化免疫药物(SMIP)和鲨鱼变异IgNAR结构域也涵盖在本文所使用的表述“抗原结合片段”内。

[0072] 抗体的抗原结合片段通常包括至少一个可变结构域。可变结构域可以具有任何大小或氨基酸组成,并且将通常包括与一个或多个框架序列相邻或在所述框架内的至少一个CDR。在具有与 $V_L$ 结构域相关联的 $V_H$ 结构域的抗原结合片段中, $V_H$ 结构域和 $V_L$ 结构域可以以任何合适的布置相对于彼此定位。例如,可变区可以是二聚体,并且含有 $V_H$ - $V_H$ 、 $V_H$ - $V_L$ 或 $V_L$ - $V_L$ 二聚体。可替代地,抗体的抗原结合片段可以含有单体 $V_H$ 或 $V_L$ 结构域。

[0073] 在某些实施例中,抗体的抗原结合片段可以含有至少一个与至少一个恒定结构域共价连接的可变结构域。可以在本发明的抗体的抗原结合片段内发现的可变结构域和恒定结构域的非限制性示例性构型包含:(i)  $V_H$ - $C_H1$ ;(ii)  $V_H$ - $C_H2$ ;(iii)  $V_H$ - $C_H3$ ;(iv)  $V_H$ - $C_H1$ - $C_H2$ ;(v)  $V_H$ - $C_H1$ - $C_H2$ - $C_H3$ ;(vi)  $V_H$ - $C_H2$ - $C_H3$ ;(vii)  $V_H$ - $C_L$ ;(viii)  $V_L$ - $C_H1$ ;(ix)  $V_L$ - $C_H2$ ;(x)  $V_L$ - $C_H3$ ;(xi)  $V_L$ - $C_H1$ - $C_H2$ ;(xii)  $V_L$ - $C_H1$ - $C_H2$ - $C_H3$ ;(xiii)  $V_L$ - $C_H2$ - $C_H3$ ;以及(xiv)  $V_L$ - $C_L$ 。在可变结构域和恒定结构域的任何构型(包含上文所列的任何示例性构型)中,可变结构域和恒定结构域可以彼

此直接连接或可以通过完整或部分铰链或接头区连接。铰链区可以由至少2个(例如,5个、10个、15个、20个、40个、60个或更多个)氨基酸组成,所述氨基酸导致单个多肽分子中相邻可变结构域和/或恒定结构域之间的柔性或半柔性连接。此外,本发明的抗体的抗原结合片段可以包括上文所列出的任何可变结构域和恒定结构域构型的同二聚体或异二聚体(或其它多聚体),其彼此非共价缔合和/或与一个或多个单体 $V_H$ 或 $V_L$ 结构域共价缔合(例如,通过一个或多个二硫键)。

[0074] 在本发明的某些实施例中,所述抗体是人抗体。术语“人抗体”旨在包含具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。所述人抗体可以包含并非由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变),例如在CDR区中,并且具体说,在CDR3区中。然而,如本文所使用的,术语“人抗体”并非旨在包含以下抗体,在这些抗体中衍生自另一个哺乳动物物种(如小鼠)的种系的CDR序列已经被移植于人类构架区序列上。

[0075] 在一些实施例中,本文所讨论的抗体可以是重组人抗体。术语“重组人抗体”旨在包含通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有人抗体,如使用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体、从重组的组合人抗体库中分离的抗体、从人免疫球蛋白基因转基因动物(例如,小鼠)中分离的抗体(参见例如,Taylor等人,(1992),《核酸研究(Nucl. Acids Res.)》,20:6287-6295)或通过任何其它方式制备、表达、产生或分离的抗体,所述其它方式涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接到其它DNA序列上。此类重组人抗体具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而,在某些实施例中,此类重组人抗体经历体外诱变(或,当使用转基因人Ig序列的动物时,经历体内体细胞诱变),并且因此重组抗体的 $V_H$ 区和 $V_L$ 区的氨基酸序列是如下序列:虽然衍生自人种系 $V_H$ 序列和 $V_L$ 序列并与之相关,但可能并非天然体内存在于人抗体种系库中。

[0076] 本文提及的抗体可以是分离的抗体。如本文所使用的,“分离的抗体”意指已经从其天然环境的至少一种组分中鉴定和分离和/或回收的抗体。例如,已经从生物体的至少一种组分,或从天然存在或天然产生抗体的组织或细胞中分离或除去的抗体是“分离的抗体”。分离的抗体还包含重组细胞内的原位抗体。分离的抗体是已经经历至少一个纯化或分离步骤的抗体。分离的抗体可以基本上不含其它细胞材料和/或化学品。

[0077] 与衍生抗体的对应种系序列相比,本文所提及的抗体在重链和轻链可变结构域的框架和/或CDR区中包括一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失。通过将本文所公开的氨基酸序列与可从例如公共抗体序列数据库获得的种系序列进行比较,可以容易地确定此类突变。

[0078] 术语“表位”是指与称为互补位的抗体分子的可变区中的特定抗原结合位点相互作用的抗原决定簇。单一抗原可以具有多于一个表位。因此,不同的抗体可以与抗原上的不同区域结合,并且可以具有不同的生物学效应。表位可以是构象的或线性的。构象表位通过来自线性多肽链的不同区段的空间并列的氨基酸产生。线性表位是由多肽链中的相邻氨基酸残基产生的表位。在某些情况下,表位可以包含抗原上的糖、磷酸基或磺酰基的部分。

[0079] “多聚化结构域(multimerization domain或multimerizing domain)”是具有与具有相同或相似结构或组成的第二个大分子(共价或非共价)缔合的能力的任何大分子。例如,多聚化结构域可以是包括免疫球蛋白 $C_H3$ 结构域的多肽。多聚化结构域的非限制性实例

是免疫球蛋白的Fc部分,例如,选自同种型IgG1、IgG2、IgG3和IgG4以及每个同种型组内的任何同种异型的IgG的Fc结构域。在某些实施例中,多聚化结构域是Fc片段或含有至少一个半胱氨酸残基的长度为1个到约200个氨基酸的氨基酸序列。在其它实施例中,多聚化结构域是半胱氨酸残基或含半胱氨酸的短肽。其它多聚化结构域包含包括亮氨酸拉链、螺旋环基序或卷曲螺旋基序或由所述亮氨酸拉链、螺旋环基序或卷曲螺旋基序组成的肽或多肽。在一些实施例中,多聚化结构域是免疫球蛋白Fc结构域,并且两个这样的Fc结构域通过链间二硫键缔合形成本发明的多特异性抗原结合分子,如在常规抗体中。

[0080] 术语“核酸”或“多核苷酸”是指核苷酸和/或多核苷酸,如脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)、寡核苷酸、通过聚合酶链反应(PCR)生成的片段,以及通过连接、断裂、核酸内切酶作用和核酸外切酶作用中的任何一种生成的片段。核酸分子可以由是天然存在的核苷酸(如DNA和RNA)的单体或天然存在的核苷酸的类似物(例如,天然存在的核苷酸的对映异构形式)或两者的组合构成。经修饰的核苷酸可以在糖部分中和/或在嘧啶或嘌呤碱基部分中具有改变。糖修饰包含例如用卤素、烷基、胺和叠氮基置换一个或多个羟基,或者糖可以被官能化为醚或酯。此外,整个糖部分可以被空间和电子类似的结构(如氮杂糖和碳环糖类类似物)置换。碱基部分中的修饰的实例包含烷基化的嘌呤和嘧啶、酰化的嘌呤或嘧啶或其它众所周知的杂环取代基。核酸单体可以通过磷酸二酯键或此类连接的类似物连接。核酸可以是单链或双链的。

[0081] 如本文所使用的,术语“重组”旨在包含通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有分子,如使用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的多特异性分子(例如双特异性分子)、从人免疫球蛋白基因转基因的动物(例如,小鼠)中分离的多特异性分子(例如双特异性分子)(参见例如,Taylor等人,(1992),《核酸研究》20:6287-6295),或通过任何其它方式制备、表达、产生或分离的多特异性分子,所述方式涉及将人免疫球蛋白和/或MHC基因序列剪接到其它DNA序列上。这种重组多特异性分子可以包含具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗原结合结构域。

[0082] 如本文所使用的,术语“受试者”或“患者”包含动物界的所有成员,包含非人灵长类动物和人类。在一个实施例中,所述患者是患有疾病或病症,例如感染或癌症的人。

[0083] 当提及核酸或其片段时,术语“基本同一性”或“基本相同”表示当通过适当的核苷酸插入或缺失与另一种核酸(或其互补链)最佳对齐时,如通过如FASTA、BLAST或Gap等任何众所周知的序列同一性算法所测量的为至少约95%,更优选地至少约96%、97%、98%或99%的核苷酸碱基的核苷酸序列同一性,如下所讨论的。在某些情况下,具有与参考核酸分子基本同一性的核酸分子可以编码具有与由参考核酸分子编码的多肽相同或基本上类似的氨基酸序列的多肽。

[0084] 当应用于这些多肽时,术语“基本类似性”或“基本上类似”意指如通过程序GAP或BESTFIT使用默认间隙权重最佳对齐时的两个肽序列在共享至少95%的序列同一性,甚至更优选地至少98%或99%的序列同一性。优选地,不相同的残基位置因保守氨基酸取代而不同。“保守氨基酸取代”是一个氨基酸残基被具有化学特性(例如,电荷或疏水性)类似的侧链(R基团)的另一个氨基酸残基取代的氨基酸取代。总体而言,保守氨基酸取代不会实质上改变蛋白质的功能特性。在两个或更多个氨基酸序列因保守取代而彼此不同的情况下,可以向上调整序列同一性百分比或相似性程度,以校正取代的保守性质。用于做出此调整

的方法是本领域技术人员所熟知的。参见例如, Pearson (1994) 《分子生物学方法 (Methods Mol. Biol.)》24:307-331, 所述文献通过引用并入本文。具有化学特性类似的侧链的氨基酸基团的实例包含 (1) 脂肪族侧链: 甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸; (2) 脂肪族羟基侧链: 丝氨酸和苏氨酸; (3) 含酰胺的侧链: 天冬酰胺和谷氨酰胺; (4) 芳香族侧链: 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸; (5) 碱性侧链: 赖氨酸、精氨酸和组氨酸; (6) 酸性侧链: 天冬氨酸和谷氨酸; 以及 (7) 含硫侧链是半胱氨酸和蛋氨酸。优选的保守氨基酸取代基是: 缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。可替代地, 保守替代是在通过引用并入本文的Gonnet等人, (1992), 《科学 (Science)》, 256:1443-1445中公开的PAM250对数似然矩阵中具有正值的任何变化。“适度保守”替代是PAM250对数似然矩阵中具有非负值的任何变化。

[0085] 通常使用序列分析软件测量也称为序列同一性的多肽的序列相似性。蛋白质分析软件使用分配给各种取代、缺失和其它修饰 (包含保守氨基酸取代) 的类似性的度量来匹配类似的序列。例如, GCG软件含有如Gap和Bestfit等程序, 所述程序可以与默认参数一起使用, 以确定紧密相关的多肽, 如来自不同生物体物种的同源多肽之间或野生型蛋白质与其突变蛋白之间的序列同源性或序列同一性。参见例如, 6.1版GCG。还可以使用使用默认的或推荐的参数的FASTA来比较多肽序列, 所述FASTA为6.1版GCG中的程序。FASTA (例如, FASTA2和FASTA3) 提供了询问序列与搜索序列之间的最佳重叠区域的对齐和序列同一性百分比 (Pearson (2000), 同上文)。当将本发明的序列与含有大量来自不同生物体的序列的数据库进行比较时, 另一个优选的算法是使用默认参数的计算机程序BLAST, 尤其是BLASTP或TBLASTN。参见例如, 各自通过引用并入本文的Altschul等人 (1990) 《分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.)》215:403-410以及Altschul等人 (1997) 《核酸研究》25:3389-402。

[0086] 术语“载体”和“表达载体”包含但不限于病毒载体、质粒、RNA载体或线性或环状DNA或RNA分子, 其可以由染色体、非染色体、半合成或合成核酸组成。在一些情况下, 载体是能够自主复制 (游离型载体) 和/或表达与其连接的核酸 (表达载体) 的那些。大量合适的载体是本领域的技术人员已知的, 并且可商购获得。病毒载体包含逆转录病毒, 腺病毒, 细小病毒 (例如, 腺伴随病毒)、冠状病毒、如正粘病毒 (例如, 流感病毒) 等负链RNA病毒、弹状病毒 (例如, 狂犬病和水泡性口炎病毒)、副粘病毒 (例如, 麻疹和仙台)、如小核糖核酸病毒和甲病毒等正链RNA病毒以及双链DNA病毒, 包含腺病毒、疱疹病毒 (例如, 单纯性疱疹病毒1型和2型、爱泼斯坦-巴尔病毒 (Epstein-Barr virus)、巨细胞病毒) 和痘病毒 (例如, 牛痘、鸡痘和金丝雀痘)。其它病毒包含例如诺沃克病毒 (Norwalk virus)、披膜病毒、黄病毒、呼肠孤病毒、乳多空病毒、嗜肝dna病毒和肝炎病毒。逆转录病毒的实例包含: 禽白血病肉瘤、哺乳动物C型、B型病毒、D型病毒、HTLV-BLV组和慢病毒。

[0087] 多特异性抗原结合分子

[0088] 本发明的多特异性抗原结合分子 (例如, 双特异性或三特异性或四特异性抗原结合分子) 包括 (a) 第一多肽, 所述第一多肽从N端到C端包括 (i) 特异性结合T细胞抗原的第一抗原结合结构域、(ii) 第一多聚化结构域和 (iii) 特异性结合T细胞抗原的第二抗原结合结构域; 以及 (b) 第二多肽, 所述第二多肽从N端到C端包括 (i) 特异性结合靶抗原的第三抗原结合结构域和 (ii) 第二多聚化结构域, 其中所述第一多聚化结构域和所述第二多聚化结构域彼此缔合 (例如, 通过链间二硫键) 以形成分子。

[0089] 在一些实施例中,本发明的多特异性抗原结合分子(例如,双特异性或三特异性或四特异性抗原结合分子)包括(a)第一多肽,所述第一多肽从N端到C端包括(i)特异性结合T细胞抗原的第一抗原结合结构域、(ii)第一多聚化结构域和(iii)特异性结合T细胞抗原的第二抗原结合结构域;以及(b)第二多肽,所述第二多肽从N端到C端包括(i)特异性结合靶抗原的第三抗原结合结构域、(ii)第二多聚化结构域和(iii)特异性结合靶抗原的第四抗原结合结构域,其中所述第一多聚化结构域和所述第二多聚化结构域彼此缔合(例如,通过链间二硫键)以形成分子。

[0090] 上文和本文提及的抗原结合结构域可以是Fab结构域,其包括与轻链可变区(LCVR)和CL结构域配对的重链可变区(HCVR)和重链CH1结构域。上文和本文提及的抗原结合结构域也可以是单链可变片段(scFv)结构域,其包括通过例如约10个到约25个氨基酸的短肽接头连接在一起的HCVR和LCVR。具体的接头包含 $(G4S)_n$ 接头,其中 $n=1-10$ ,或 $n$ 是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些情况下,每个scFv的HCVR和LCVR之间的接头为 $(G4S)_4$ 。除非另有定义,否则本发明的多特异性分子的抗原结合结构域可以是所有的Fab结构域、所有的scFv结构域或Fab结构域和scFv结构域的组合。在一些情况下,所述抗原结合结构域中的一个或多个是Fab结构域。在一些情况下,所述抗原结合结构域中的一个或多个是scFv结构域。在一些情况下,所述第一抗原结合结构域和所述第三抗原结合结构域是Fab结构域。在一些情况下,所述第二抗原结合结构域是scFv结构域。在一些情况下,所述第四抗原结合结构域是scFv结构域。在一些情况下,所述第一和第三抗原结合结构域是Fab结构域,并且所述第二和第四抗原结合结构域是scFv结构域。在一些情况下,所述第一、第二和第三抗原结合结构域是Fab结构域。在一些情况下,所述第一、第二、第三和第四抗原结合结构域是Fab结构域。

[0091] 在各个实施例中,scFv结构域通过接头肽连接至相应多聚化结构域的C端。在一些情况下,接头的长度在1-10个氨基酸之间。在一些实施例中,接头的长度在1-20个氨基酸之间。在这点上,接头的长度可以为1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个氨基酸。在一些实施例中,接头的长度可以为21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个或30个氨基酸。包含本文所讨论的数字的范围也涵盖在本公开中,例如,长度为10个到30个氨基酸的接头。在一些实施例中,接头是柔性接头。合适的接头可以容易地选择,并且可以具有任何合适的不同长度,如1个氨基酸(例如,Gly)到20个氨基酸、2个氨基酸到15个氨基酸、3个氨基酸到12个氨基酸,包含4个氨基酸到10个氨基酸、5个氨基酸到9个氨基酸、6个氨基酸到8个氨基酸或7个氨基酸到8个氨基酸,并且可以是1个、2个、3个、4个、5个、6个或7个氨基酸。示例性柔性接头包含甘氨酸聚合物 $(G)_n$ 、甘氨酸-丝氨酸聚合物 $(GS)_n$ (其中 $n$ 是至少1(例如,1-20)的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和本领域已知的其它柔性接头。具体的接头包含 $(G4S)_n$ 接头,其中 $n=1-10$ ,或 $n$ 是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些情况下,每个scFv结构域之间的接头和相应多聚化结构域的C端是 $(G4S)_3$ 。

[0092] 在其中一个或多个抗原结合结构域是scFv的那些实施例中,scFv可以是稳定的scFv,其中对HCVR和/或LCVR序列进行一个或多个修饰以产生和维持scFv的正确构象。在一些实施例中,scFv包含在HCVR的残基44和LCVR的残基100处的半胱氨酸突变(Kabat编号),以在可变区之间产生二硫键间(参见Zhao等人,《国际分子医学杂志(Int.J.Mol.Sci)》,12:

1-11, 2011; 和Weatherill等人,《蛋白质工程化、设计和选择 (Protein Engineering, Design and Selection)》, 25(7):321-329, 2012)。在一些实施例中, scFv包含在HCVR的残基39和LCVR的残基38处的突变 (Kabat编号), 以将谷氨酰胺残基修饰为谷氨酸或赖氨酸残基从而抑制构象异构化 (参见Igawa等人,《蛋白质工程化、设计和选择》, 23(8):667-677, 2010)。

[0093] 在各个实施例中, 任何抗原结合结构域的LCVR (以及任选地, CL) 可以是对应于HCVR的同源LCVR, 或者LCVR (以及任选地, CL) 可以是多抗原结合结构域共有的通用LCVR。在一些实施例中, Fab结构域的轻链是共同轻链。在一些实施例中, Fab结构域的轻链是对应于靶抗原结合结构域的同源轻链, 并且轻链对于两个Fab结构域是共同的。在一些实施例中, scFv结构域的LCVR是同源LCVR。在一些实施例中, Fab结构域的轻链是共同轻链并且scFv结构域的LCVR是同源LCVR。

[0094] 在一些实施例中, 本发明的多特异性抗原结合分子包括: (a) 第一多肽, 所述第一多肽从N端到C端包括 (i) 特异性结合T细胞抗原的第一Fab、(ii) 第一免疫球蛋白Fc结构域和 (iii) 特异性结合T细胞抗原的第一scFv; 以及 (b) 第二多肽, 所述第二多肽从N端到C端包括 (i) 特异性结合靶抗原的第二Fab、(ii) 第二免疫球蛋白Fc结构域和 (iii) 特异性结合靶抗原的第二scFv, 其中所述第一免疫球蛋白结构域和所述第二免疫球蛋白结构域通过二硫键彼此缔合以形成分子。此类分子的示例性结构如图1C所示。

[0095] 在一些实施例中, 本发明的多特异性抗原结合分子包括: (a) 第一多肽, 所述第一多肽从N端到C端包括 (i) 特异性结合T细胞抗原的第一Fab、(ii) 第一免疫球蛋白Fc结构域和 (iii) 特异性结合T细胞抗原的第二Fab; 以及 (b) 第二多肽, 所述第二多肽从N端到C端包括 (i) 特异性结合靶抗原的第三Fab、(ii) 第二免疫球蛋白Fc结构域和 (iii) 特异性结合靶抗原的第四Fab, 其中所述第一免疫球蛋白结构域和所述第二免疫球蛋白结构域通过二硫键彼此缔合以形成分子。此类分子的示例性结构如图1E所示。

[0096] 在一些实施例中, 本发明的多特异性抗原结合分子包括: (a) 第一多肽, 所述第一多肽从N端到C端包括 (i) 特异性结合T细胞抗原的第一Fab、(ii) 第一免疫球蛋白Fc结构域和 (iii) 特异性结合T细胞抗原的第一scFv; 以及 (b) 第二多肽, 所述第二多肽从N端到C端包括 (i) 特异性结合第一靶抗原的第二Fab、(ii) 第二免疫球蛋白Fc结构域和 (iii) 特异性结合不同于第一靶抗原的第二靶抗原的第二scFv, 其中所述第一免疫球蛋白结构域和所述第二免疫球蛋白结构域通过二硫键彼此缔合以形成分子。此类分子的示例性结构如图1F所示。

[0097] 在一些实施例中, 本发明的多特异性抗原结合分子包括: (a) 第一多肽, 所述第一多肽从N端到C端包括 (i) 特异性结合T细胞抗原的第一Fab、(ii) 第一免疫球蛋白Fc结构域和 (iii) 特异性结合T细胞抗原的第二Fab; 以及 (b) 第二多肽, 所述第二多肽从N端到C端包括 (i) 特异性结合第一靶抗原的第三Fab、(ii) 第二免疫球蛋白Fc结构域和 (iii) 特异性结合不同于第一靶抗原的第二靶抗原的第四Fab, 其中所述第一免疫球蛋白结构域和所述第二免疫球蛋白结构域通过二硫键彼此缔合以形成分子。此类分子的示例性结构如图1G所示。

[0098] 在一些实施例中, 本发明的多特异性抗原结合分子包括: (a) 第一多肽, 所述第一多肽从N端到C端包括 (i) 特异性结合T细胞抗原的第一Fab、(ii) 第一免疫球蛋白Fc结构域

和(iii)特异性结合T细胞抗原的第一scFv;以及(b)第二多肽,所述第二多肽从N端到C端包括(i)特异性结合靶抗原的第二Fab、(ii)第二免疫球蛋白Fc结构域和(iii)特异性结合T细胞抗原的第二scFv,其中所述第一免疫球蛋白结构域和所述第二免疫球蛋白结构域通过二硫键彼此缔合以形成分子。此类分子的示例性结构如图1H所示。

[0099] 在一些实施例中,本发明的多特异性抗原结合分子包括:(a)第一多肽,所述第一多肽从N端到C端包括(i)特异性结合T细胞抗原的第一Fab、(ii)第一免疫球蛋白Fc结构域和(iii)特异性结合T细胞抗原的第二Fab;以及(b)第二多肽,所述第二多肽从N端到C端包括(i)特异性结合靶抗原的第三Fab、(ii)第二免疫球蛋白Fc结构域和(iii)特异性结合T细胞抗原的第四Fab,其中所述第一免疫球蛋白结构域和所述第二免疫球蛋白结构域通过二硫键彼此缔合以形成分子。此类分子的示例性结构如图1I所示。

[0100] 在一些实施例中,本发明的多特异性抗原结合分子包括:(a)第一多肽,所述第一多肽从N端到C端包括(i)特异性结合T细胞抗原的第一Fab、(ii)第一免疫球蛋白Fc结构域和(iii)特异性结合T细胞抗原的第二Fab;以及(b)第二多肽,所述第二多肽从N端到C端包括(i)特异性结合靶抗原的第二Fab和(ii)第二免疫球蛋白Fc结构域,其中所述第一免疫球蛋白结构域和所述第二免疫球蛋白结构域通过二硫键彼此缔合以形成分子。此类分子的示例性结构如图1J所示。

[0101] 在一些实施例中,本发明的多特异性抗原结合分子包括:(a)第一多肽,所述第一多肽从N端到C端包括(i)特异性结合T细胞抗原的第一Fab、(ii)第一免疫球蛋白Fc结构域和(iii)特异性结合T细胞抗原的第二Fab;以及(b)第二多肽,所述第二多肽从N端到C端包括(i)特异性结合靶抗原的第三Fab和(ii)第二免疫球蛋白Fc结构域,其中所述第一免疫球蛋白结构域和所述第二免疫球蛋白结构域通过二硫键彼此缔合以形成分子。此类分子的示例性结构如图1K所示。

[0102] 在一些实施例中,本发明的多特异性抗原结合分子包括:(a)第一多肽,所述第一多肽从N端到C端包括(i)特异性结合第一T细胞抗原的第一Fab、(ii)第一免疫球蛋白Fc结构域和(iii)特异性结合第二T细胞抗原的第一scFv;以及(b)第二多肽,所述第二多肽从N端到C端包括(i)特异性结合靶抗原的第二Fab、(ii)第二免疫球蛋白Fc结构域和(iii)特异性结合靶抗原的第二scFv,其中所述第一免疫球蛋白结构域和所述第二免疫球蛋白结构域通过二硫键彼此缔合以形成分子。此类分子的示例性结构如图1L所示。

[0103] 在一些实施例中,本发明的多特异性抗原结合分子包括:(a)第一多肽,所述第一多肽从N端到C端包括(i)特异性结合第一T细胞抗原的第一Fab、(ii)第一免疫球蛋白Fc结构域和(iii)特异性结合第二T细胞抗原的第二Fab;以及(b)第二多肽,所述第二多肽从N端到C端包括(i)特异性结合靶抗原的第三Fab、(ii)第二免疫球蛋白Fc结构域和(iii)特异性结合靶抗原的第四Fab,其中所述第一免疫球蛋白结构域和所述第二免疫球蛋白结构域通过二硫键彼此缔合以形成分子。此类分子的示例性结构如图1M所示。

[0104] 在一些实施例中,本发明的多特异性抗原结合分子包括:(a)第一多肽,所述第一多肽从N端到C端包括(i)特异性结合第一T细胞抗原的第一Fab、(ii)第一免疫球蛋白Fc结构域和(iii)特异性结合第二T细胞抗原的第一scFv;以及(b)第二多肽,所述第二多肽从N端到C端包括(i)特异性结合第一靶抗原的第二Fab、(ii)第二免疫球蛋白Fc结构域和(iii)特异性结合不同于第一靶抗原的第二靶抗原的第二scFv,其中所述第一免疫球蛋白结构域

和所述第二免疫球蛋白结构域通过二硫键彼此缔合以形成分子。此类分子的示例性结构如图1N所示。

[0105] 在一些实施例中,本发明的多特异性抗原结合分子包括:(a)第一多肽,所述第一多肽从N端到C端包括(i)特异性结合第一T细胞抗原的第一Fab、(ii)第一免疫球蛋白Fc结构域和(iii)特异性结合第二T细胞抗原的第二Fab;以及(b)第二多肽,所述第二多肽从N端到C端包括(i)特异性结合第一靶抗原的第三Fab、(ii)第二免疫球蛋白Fc结构域和(iii)特异性结合不同于第一靶抗原的第二靶抗原的第四Fab,其中所述第一免疫球蛋白结构域和所述第二免疫球蛋白结构域通过二硫键彼此缔合以形成分子。此类分子的示例性结构如图10所示。

[0106] 在一些实施例中,本发明的多特异性抗原结合分子包括:(a)第一多肽,所述第一多肽从N端到C端包括(i)特异性结合第一T细胞抗原的第一Fab、(ii)第一免疫球蛋白Fc结构域和(iii)特异性结合第二T细胞抗原的第一scFv;以及(b)第二多肽,所述第二多肽从N端到C端包括(i)特异性结合靶抗原的第二Fab、(ii)第二免疫球蛋白Fc结构域和(iii)特异性结合T细胞抗原的第二scFv(任选地可以结合第一T细胞抗原、第二T细胞抗原或第三T细胞抗原),其中所述第一免疫球蛋白结构域和所述第二免疫球蛋白结构域通过二硫键彼此缔合以形成分子。此类分子的示例性结构如图1P所示。

[0107] 在一些实施例中,本发明的多特异性抗原结合分子包括:(a)第一多肽,所述第一多肽从N端到C端包括(i)特异性结合第一T细胞抗原的第一Fab、(ii)第一免疫球蛋白Fc结构域和(iii)特异性结合第二T细胞抗原的第二Fab;以及(b)第二多肽,所述第二多肽从N端到C端包括(i)特异性结合靶抗原的第三Fab、(ii)第二免疫球蛋白Fc结构域和(iii)特异性结合T细胞抗原的第四Fab(任选地可以结合第一T细胞抗原、第二T细胞抗原或第三T细胞抗原),其中所述第一免疫球蛋白结构域和所述第二免疫球蛋白结构域通过二硫键彼此缔合以形成分子。此类分子的示例性结构如图1Q所示。

[0108] 在一些实施例中,本发明的多特异性抗原结合分子包括:(a)第一多肽,所述第一多肽从N端到C端包括(i)特异性结合第一T细胞抗原的第一Fab、(ii)第一免疫球蛋白Fc结构域和(iii)特异性结合第二T细胞抗原的第二Fab;以及(b)第二多肽,所述第二多肽从N端到C端包括(i)特异性结合靶抗原的第二Fab和(ii)第二免疫球蛋白Fc结构域,其中所述第一免疫球蛋白结构域和所述第二免疫球蛋白结构域通过二硫键彼此缔合以形成分子。此类分子的示例性结构如图1R所示。

[0109] 在一些实施例中,本发明的多特异性抗原结合分子包括:(a)第一多肽,所述第一多肽从N端到C端包括(i)特异性结合第一T细胞抗原的第一Fab、(ii)第一免疫球蛋白Fc结构域和(iii)特异性结合第二T细胞抗原的第二Fab;以及(b)第二多肽,所述第二多肽从N端到C端包括(i)特异性结合靶抗原的第三Fab和(ii)第二免疫球蛋白Fc结构域,其中所述第一免疫球蛋白结构域和所述第二免疫球蛋白结构域通过二硫键彼此缔合以形成分子。此类分子的示例性结构如图1S所示。

[0110] 除非另有定义,并且当存在时,所述第四抗原结合结构域可以特异性结合靶抗原或T细胞抗原。在一些情况下,所述第三抗原结合结构域和所述第四抗原结合结构域特异性结合不同的靶抗原(相同蛋白质上的不同表位,或不同蛋白质)。在一些情况下,所述不同的靶抗原在相同靶细胞(例如,肿瘤细胞)的表面上表达。在一些情况下,所述第三抗原结合结

构域和所述第四抗原结合结构域特异性结合相同的靶抗原(相同蛋白质上的相同表位)。在各个实施例中,第一和第二抗原结合结构域以及第四抗原结合结构域(当存在时,并且针对T细胞抗原)可以结合相同或不同的T细胞抗原,如图所示。在一些情况下,第一、第二和第四抗原结合结构域特异性结合不同的T细胞抗原(相同蛋白质上的不同表位,或不同蛋白质)。在一些情况下,所述第一、第二和第四抗原结合结构域特异性结合相同的T细胞抗原(相同蛋白质上的相同表位)。在一些情况下,不同的T细胞抗原是T细胞表面上的共刺激分子(例如,CD28)和检查点抑制剂(例如,PD-1)。在此类实施例中,本发明的多特异性分子可以向T细胞提供共刺激信号以及防止检查点抑制。如本文所使用的,提及“相同的”靶抗原或T细胞抗原并不一定意味着抗原结合结构域与相同的表面分子结合,而是抗原结合结构域具有相同的特异性(例如,其各自结合CD3或TA)。类似地,提及“不同的”靶抗原或T细胞抗原意味着其不同于另一种靶抗原(例如,MAGEA4对比EGFR)或另一种T细胞抗原(例如,CD28对比PD-1),或是相同蛋白质上的另一个表位。

[0111] 在上文或本文所讨论的任何实施例中,靶抗原可以是肿瘤相关抗原或感染相关抗原(例如,病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原或由寄生虫表达的抗原)。在一些情况下,所述靶抗原是肿瘤相关抗原。在一些情况下,所述靶抗原是感染相关抗原。在一些情况下,所述靶抗原是病毒抗原。在一些情况下,所述靶抗原是细菌抗原。在一些情况下,所述靶抗原是真菌抗原。在一些实施例中,所述靶抗原是由寄生虫表达的抗原。

[0112] 在一些情况下,所述靶抗原是主要组织相容性复合物(MHC)蛋白的凹槽背景下的肽(PiG)。在一些实施例中,PiG是由约5个到约40个氨基酸残基、约6个到约30个氨基酸残基、约8个到约20个氨基酸残基或约9个、10个或11个氨基酸残基组成的肽。在一些情况下,PiG是肿瘤相关抗原、病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原或寄生虫抗原的片段。在各个实施例中,靶抗原是在人白细胞抗原的任何类别、亚型或等位基因的凹槽背景下的肽,包含HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DR、HLA-DQ或HLA-DP中的任一种。在一些实施例中,靶抗原是肽/MHC复合物。在一些情况下,肽/MHC复合物中的肽是肿瘤相关抗原的片段、细菌抗原的片段、病毒抗原的片段、真菌抗原的片段或寄生虫抗原的片段。

[0113] 在一些情况下,所述抗原是肿瘤相关抗原或由肿瘤细胞表达的抗原。在一些实施例中,所述肿瘤相关抗原选自由以下组成的组:AFP、ALK、BAGE蛋白、BIRC5(存活蛋白)、BIRC7、 $\beta$ -连环蛋白、bcr-abl、BRCA1、BORIS、CA9、碳酸酐酶IX、胱天蛋白酶-8、CALR、CCR5、CD19、CD20(MS4A1)、CD22、CD40、CD70、CDK4、CEA、细胞周期蛋白-B1、CYP1B1、EGFR、EGFRvIII、ErbB2/Her2、ErbB3、ErbB4、ETV6-AML、EpCAM、EphA2、Fra-1、FOLR1、GAGE蛋白(例如,GAGE-1、2)、GD2、GD3、GloboH、磷脂酰肌醇聚糖-3、GM3、gp100、Her2、HLA/B-raf、HLA/k-ras、HLA/MAGE-A3、hTERT、IL-10、LMP2、MAGE蛋白(例如,MAGE-1、2、3、4、6和12)、MART-1、间皮素、ML-IAP、Muc1、Muc2、Muc3、Muc4、Muc5、Muc16(CA-125)、MUM1、NA17、NY-BR1、NY-BR62、NY-BR85、NY-ES01、p15、p53、PAP、PAX3、PAX5、PCTA-1、PLAC1、PRLR、PRAME、PSMA(FOLH1)、RAGE蛋白、Ras、RGS5、Rho、SART-1、SART-3、STEAP1、STEAP2、TAG-72、TGF- $\beta$ 、TMPRSS2、汤-诺氏抗原(Thompson-nouvelle antigen,Tn)、TRP-1、TRP-2、酪氨酸酶和尿斑素-3(uroplakin-3)。

[0114] 在一些情况下,所述抗原是病毒抗原或细菌抗原。在一些实施例中,所述病毒抗原与选自由以下组成的组的病毒相关或由所述病毒表达:腺病毒、星状病毒、基孔肯雅病毒、

巨细胞病毒、登革热、埃博拉病毒、EBV、汉坦病毒、HBsAg、甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎、戊型肝炎、疱疹、HIV、HPV、HTLV、流感、日本脑炎病毒、拉沙(lassa)、麻疹、偏肺病毒、腮腺炎、诺如病毒、oropauche、HPV、细小病毒、轮状病毒、RSV、风疹、SARS、TBEV、乌苏土(usutu)、牛痘、水痘、西尼罗河、黄热病和寨卡,或者所述细菌抗原衍生自选自以下组成的组的细菌:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、艰难梭菌、耐碳青霉烯肠杆菌、耐药淋球菌、耐多药不动杆菌、耐药弯曲杆菌、耐氟康唑念珠菌、产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶的细菌、耐万古霉素肠球菌、耐多药铜绿假单胞菌、耐药非伤寒沙门氏菌、耐药伤寒沙门氏菌血清型、耐药志贺氏菌、耐药肺炎链球菌、耐药结核菌、耐万古霉素金黄色葡萄球菌、耐红霉素A组链球菌、耐克林霉素B组链球菌。

[0115] 在上文或本文所讨论的任何实施例中,T细胞抗原可以是在T细胞表面处表达的抗原、T细胞受体复合物抗原、T细胞上的共刺激分子或检查点抑制剂、CD3、CD27、CD28、4-1BB或PD-1。在一些情况下,T细胞抗原是T细胞受体复合物抗原。在一些情况下,所述T细胞抗原是CD3。在一些情况下,所述T细胞抗原是T细胞上的共刺激分子或检查点抑制剂。在一些情况下,所述T细胞抗原选自CD27、CD28、4-1BB和PD-1组成的组。在一些情况下,所述T细胞抗原选自CD3、CD27、CD28、4-1BB和PD-1组成的组。在一些情况下,T细胞抗原选自以下组成的组:CD28、ICOS、HVEM、CD27、4-1BB、OX40、DR3、GITR、CD30、SLAM、CD2、2B4、CD226、TIM1和TIM2。

[0116] 在其中T细胞抗原是CD3的某些实施例中,CD3结合结构域结合到人CD3并诱导人T细胞活化。在某些实施例中,CD3结合结构域弱结合到人CD3并诱导人T细胞活化。在一些实施例中,CD3结合结构域弱结合到人CD3并诱导肿瘤相关抗原表达细胞的杀伤。在一些实施例中,CD3结合结构域与人和食蟹猴(猴)CD3弱结合或缔合,但是结合相互作用无法通过本领域已知的体外测定检测到。在一些实施例中,CD3结合结构域以弱亲和力结合到人CD3。在一些实施例中,CD3结合结构域以中等亲和力结合到人CD3。在一些实施例中,CD3结合结构域以高亲和力结合到人CD3。在一些实施例中,CD3结合结构域以小于15nM的 $K_D$ 结合到人CD3(例如,在25°C下),如通过表面等离子共振(例如,mAb-捕获或抗原-捕获形式)或基本上相似的测定法所测量的。在一些实施例中,CD3结合结构域以大于约15nM、大于约20nM、大于约30nM、大于约40nM、大于约50nM、大于约60nM、大于约100nM、大于约200nM或大于约300nM的 $K_D$ 结合人CD3,如在表面等离子共振结合测定法(例如,mAb-捕获或抗原-捕获形式)或基本上类似的测定法中所测量的。在一些实施例中,本发明的抗体或抗原结合片段以小于约5nM、小于约2nM、小于约1nM、小于约800pM、小于约600pM、小于约500pM、小于约400pM、小于约300pM、小于约200pM、小于约180pM、小于约160pM、小于约140pM、小于约120pM、小于约100pM、小于约80pM、小于约60pM、小于约40pM、小于约20pM或小于约10pM的 $K_D$ 结合人CD3,如通过表面等离子共振,例如,使用如本文实例3中定义的测定形式(例如,mAb-捕获或抗原-捕获形式),或基本上类似的测定法所测量的。

[0117] 在一些实施例中,CD3结合结构域表现出小于约50nM、小于约40nM、小于约30nM、小于约20nM、小于约10nM、小于约5nM、小于约4nM、小于约3nM、小于约2nM、小于约1nM、小于900pM、小于800pM、小于700pM、小于600pM或小于500pM的 $EC_{50}$ 值,如在体外流式细胞术结合测定法中所测量的。在一些实施例中,CD3结合结构域表现出约或大于约1nM、2nM、3nM、4nM、5nM、10nM、25nM、50nM、100nM、500nM或1 $\mu$ M的 $EC_{50}$ 值,如在体外流式细胞术结合测定法中所测

量的。

[0118] 在任何实施例中,CD3结合结构域可以包括在WO 2014/047231 (9250-WO) 或WO 2017/053856 (10151W001) 中公开的抗CD3抗体的HCVR/LCVR或CDR (例如,包含在一对HCVR/LCVR序列中的六个CDR) 氨基酸序列中的任一种,所述抗CD3抗体包含被鉴定为7195P、7221G、7221G5和7221G20的抗体。在各个实施例中,被鉴定为“强结合剂”的抗CD3抗体对人CD3的亲合力在个位数纳摩尔范围内 (例如,1-9nM),如在表面等离子共振测定法中所测量的 (例如,在25°C下以抗原-捕获形式在T200 BIACORE仪器上进行测量)。在各个实施例中,被鉴定为“中度结合剂”的抗CD3抗体对人CD3的亲合力在两位数纳摩尔范围内 (例如,10-99nM,任选地,10-50nM或10-25nM),如在表面等离子共振测定法中所测量的。在各个实施例中,被鉴定为“弱结合剂”的抗CD3抗体对人CD3的亲合力在三位数纳摩尔范围内 (例如,100-999nM,任选地,100-500nM或500nM到1 $\mu$ M),如在表面等离子共振测定法中所测量的。在各个实施例中,被鉴定为“非常弱结合剂”的抗CD3抗体对人CD3的亲合力大于10 $\mu$ M或检测不到,如在表面等离子共振测定法中所测量的。

[0119] 在任何实施例中,CD3结合结构域可以包括下表中列出的HCVR/LCVR或CDR (例如,包含在一对HCVR/LCVR序列中的六个CDR) 氨基酸序列中的任一种 (“G”版本取自WO 2017/053856)。在一些实施例中,CD3结合结构域 (例如,在具有图1C或1F结构的分子的Fab臂中) 包括对应于靶抗原结合结构域的同源轻链。换言之,靶抗原结合结构域的同源轻链对于靶抗原结合结构域和CD3结合结构域都是共同的 (例如,在图1C或1F的结构N端Fab结构域中)。

[0120] 表1:重链氨基酸序列标识符

抗体 CD3-VH 名称	SEQ ID NO:			
	HCVR	CDR1	CDR2	CDR3
CD3-VH-G	2	4	6	8
CD3-VH-G2	10	12	14	16
CD3-VH-G3	18	20	22	24
CD3-VH-G4	26	28	30	32
CD3-VH-G5	34	36	38	40
CD3-VH-G8	42	44	46	48
CD3-VH-G9	50	52	54	56
CD3-VH-G10	58	60	62	64
CD3-VH-G11	66	68	70	72
CD3-VH-G12	74	76	78	80
CD3-VH-G13	82	84	86	88
CD3-VH-G14	90	92	94	96
CD3-VH-G15	98	100	102	104
CD3-VH-G16	106	108	110	112
CD3-VH-G17	114	116	118	120
CD3-VH-G18	122	124	126	128
CD3-VH-G19	130	132	134	136
CD3-VH-G20	138	140	142	144
CD3-VH-G21	146	148	150	152
7195P	154	156	158	160

[0121]

[0122] 表2:重链核酸序列标识符

抗体 CD3-VH 名称	SEQ ID NO:			
	HCVR	CDR1	CDR2	CDR3
CD3-VH-G	1	3	5	7
CD3-VH-G2	9	11	13	15
CD3-VH-G3	17	19	21	23
CD3-VH-G4	25	27	29	31
CD3-VH-G5	33	35	37	39
CD3-VH-G8	41	43	45	47
CD3-VH-G9	49	51	53	55
CD3-VH-G10	57	59	61	63
CD3-VH-G11	65	67	69	71
CD3-VH-G12	73	75	77	79
CD3-VH-G13	81	83	85	87
CD3-VH-G14	89	91	93	95
CD3-VH-G15	97	99	101	103
CD3-VH-G16	105	107	109	111
CD3-VH-G17	113	115	117	119
CD3-VH-G18	121	123	125	127
CD3-VH-G19	129	131	133	135
CD3-VH-G20	137	139	141	143
CD3-VH-G21	145	147	149	151
7195P	153	155	157	159

[0123]

[0124] 表3:轻链氨基酸序列标识符

抗体 ULC 名称	SEQ ID NO:			
	LCVR	CDR1	CDR2	CDR3
Vκ1-39JK5	162	164	166	168

[0125]

[0126] 表4:轻链核酸序列标识符

抗体 ULC 名称	SEQ ID NO:			
	LCVR	CDR1	CDR2	CDR3
Vκ1-39JK5	161	163	165	167

[0127]

[0128] 表1中列出的每种抗体包括共同的轻链可变区,所述轻链可变区包括表3中列出的氨基酸序列。每个“G”指定的抗体在本文中也可以用“7221”前缀表示,例如,7221G、7221G5、7221G20等。在抗原结合结构域的scFv版本中,重链可变区第44位氨基酸残基可以被半胱氨酸残基取代,例如,如SEQ ID NO:169(经修饰的重链对应于7195P)或SEQ ID NO:170(经修饰的重链对应于7221G)中所示。

[0129] 本发明的多特异性抗原结合分子(例如,双特异性或三特异性或四特异性抗原结合分子)包括两条多肽链,其中每条多肽链均包含多聚化结构域,所述多聚化结构域促进两条多肽链的缔合(例如,通过链间二硫键)以形成单个多特异性抗原结合分子。在上文或本文所讨论的任何实施例中,第一和第二多聚化结构域可以是(例如人IgG同种型的)免疫球蛋白Fc结构域。在一些情况下,所述第一和第二多聚化结构域通过二硫键彼此缔合。在一些

实施例中,所述第一多聚化结构域和所述第二多聚化结构域是人IgG1或人IgG4 Fc结构域。在一些情况下,所述第一和第二多聚化结构域包括人IgG1或人IgG4的铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域。

[0130] 在一些实施例中,所述第一多聚化结构域或所述第二多聚化结构域包括与相同同种型(例如,人IgG1或人IgG4)的野生型Fc结构域相比降低对蛋白A结合的亲和力的氨基酸取代。在一些情况下,所述氨基酸取代包括H435R修饰,或H435R和Y436F修饰(EU编号)。在一些情况下,所述第一多聚化结构域包括所述H435R和Y436F修饰。在一些情况下,所述第二多聚化结构域包括所述H435R和Y436F修饰。

[0131] 在一些实施例中,所述第一多肽、所述第二多肽或所述第一多肽和所述第二多肽两者包括经修饰的铰链结构域,与相同同种型(例如,人IgG1或人IgG4)的野生型铰链结构域相比,所述经修饰的铰链结构域降低对Fc  $\gamma$  受体的结合亲和力。

[0132] 在其中多聚化结构域包括包含铰链结构域的重链恒定区的各个实施例中,恒定区可以是嵌合的,结合衍生自一种以上免疫球蛋白同种型的序列。例如,嵌合Fc结构域可以包括衍生自人IgG1、人IgG2或人IgG4 C<sub>H</sub>2区的C<sub>H</sub>2序列的部分或全部以及衍生自人IgG1、人IgG2或人IgG4的C<sub>H</sub>3序列的部分或全部。嵌合Fc结构域还可以含有嵌合铰链区。例如,嵌合铰链可以包括衍生自人IgG1、人IgG2或人IgG4铰链区的“上铰链”序列,其与衍生自人IgG1、人IgG2或人IgG4铰链区的“下铰链”序列组合。可以包含在本文中所示的任何抗原结合分子中的嵌合Fc结构域的具体实例包括,从N端到C端:[IgG4 CH1]-[IgG4上铰链]-[IgG2下铰链]-[IgG4 CH2]-[IgG4 CH3]。可以包含在本文所列出的任何抗原结合分子中的嵌合Fc结构域的另一种实例包括,从N端到C端:[IgG1 CH1]-[IgG1上铰链]-[IgG2下铰链]-[IgG4CH2]-[IgG1 CH3]。可以包含在本发明的任何抗原结合分子中的嵌合Fc结构域的这些和其它实例描述于WO 2014/121087 (8550-WO)中。具有这些通用结构排列的嵌合Fc结构域及其变体可以具有改变的Fc受体结合,其反过来影响Fc效应子功能。

[0133] 在其中多聚化结构域包括包含铰链结构域的重链恒定区的各个实施例中,铰链结构域内的第233-236位可以是G、G、G和空置;G、G、空置和空置;G、空置、空置和空置;或全部空置,其中位置按EU编号进行编号。任选地,重链恒定区从N端到C端包括铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域。任选地,重链恒定区从N端到C端包括CH1结构域、铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域。任选地,CH1区(如果存在的话)、铰链区的其余部分(如果有的话)、CH2区和CH3区是相同的人同种型。任选地,CH1区(如果存在的话)、铰链区的其余部分(如果有的话)、CH2区和CH3区是人IgG1。任选地,CH1区(如果存在的话)、铰链区的其余部分(如果有的话)、CH2区和CH3区是人IgG2。任选地,CH1区(如果存在的话)、铰链区的其余部分(如果有的话)、CH2区和CH3区是人IgG4。任选地,恒定区具有被修饰成减少与蛋白A的结合的CH3结构域。可以包含在本发明的任何抗原结合分子中的多聚化重链恒定区的这些和其它实例描述于WO 2016/161010 (10140W001)中。

[0134] 在本发明的实施例中,一个多聚化结构域与另一个多聚化结构域的缔合促进两个抗原结合结构域之间的缔合,由此形成多特异性抗原结合分子。多聚化结构域可以是具有与具有相同或相似结构或构成的第二多聚化结构域缔合的能力的任何大分子、蛋白质、多肽、肽或氨基酸。例如,多聚化结构域可以是包括免疫球蛋白C<sub>H</sub>3结构域的多肽。多聚化组分的非限制性实例是免疫球蛋白的Fc部分(包括C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3结构域),例如,选自同种型IgG1、

IgG2、IgG3和IgG4的IgG以及每个同种型组内的任何同种型的Fc结构域。

[0135] 在一些实施例中,第一多聚化结构域和第二多聚化结构域可以是如IgG1/IgG1、IgG2/IgG2、IgG4/IgG4等相同的IgG同种型。可替代地,第一多聚化结构域和第二多聚化结构域可以是如IgG1/IgG2、IgG1/IgG4、IgG2/IgG4等不同的IgG同种型。

[0136] 在某些实施例中,多聚化结构域是Fc片段或含有至少一个半胱氨酸残基的长度为1到约200个氨基酸的氨基酸序列。在其它实施例中,多聚化结构域是半胱氨酸残基或含短半胱氨酸的肽。其它多聚化结构域包含包括亮氨酸拉链、螺旋环基序或卷曲螺旋基序或由所述亮氨酸拉链、螺旋环基序或卷曲螺旋基序组成的肽或多肽。

[0137] 多聚化结构域,例如Fc结构域(带有或不带有铰链),与野生型、天然存在版本的Fc结构域相比,可以包括一个或多个氨基酸变化(例如,插入、缺失或取代)。例如,本发明包含双特异性抗原结合分子,其在Fc结构域中包括一个或多个修饰,所述修饰带来在Fc与FcRn之间具有修饰的结合相互作用(例如,增强或减弱)的修饰后的Fc结构域。在一个实施例中,双特异性抗原结合分子包括在C<sub>H</sub>2区或C<sub>H</sub>3区中的修饰,其中所述修饰增加Fc结构域在酸性环境中(例如,在pH范围为约5.5到约6.0的内体中)对FcRn的亲和力。此类Fc修饰的非限制性实例包含例如第250位(例如,E或Q)处的修饰;第250和428位(例如,L或F)处的修饰;第252(例如,L/Y/F/W或T)、254(例如,S或T)和256(例如,S/R/Q/E/D或T)位处的修饰;或在第428和/或433(例如,L/R/S/P/Q或K)和/或434(例如,H/F或Y)位处的修饰;或第250位和/或第428位处的修饰;或第307位或第308位(例如,308F、V308F)和第434位处的修饰。在一个实施例中,修饰包括428L(例如,M428L)和434S(例如,N434S)修饰;428L、259I(例如,V259I)和308F(例如,V308F)修饰;433K(例如,H433K)和434(例如,434Y)修饰;252、254和256(例如,252Y、254T和256E)修饰;250Q和428L修饰(例如,T250Q和M428L);以及307和/或308修饰(例如,308F或308P)。

[0138] 本发明还包含多特异性抗原结合分子,其包括第一Ig C<sub>H</sub>3结构域和第二Ig C<sub>H</sub>3结构域,其中所述第一Ig C<sub>H</sub>3结构域和所述第二Ig C<sub>H</sub>3结构域彼此相差至少一个氨基酸,并且其中与缺乏氨基酸差异的双特异性抗体相比,至少一个氨基酸差异减少双特异性抗体与蛋白A的结合。在一个实施例中,第一Ig C<sub>H</sub>3结构域结合蛋白A,并且第二Ig C<sub>H</sub>3结构域含有降低或消除蛋白质A结合的突变,如H95R修饰(通过IMGT外显子编号;H435R,通过EU编号)。第二C<sub>H</sub>3可以进一步包括Y96F修饰(通过IMGT;Y436F,通过EU)。参见例如,美国专利第8,586,713号。可以在第二C<sub>H</sub>3内找到的进一步修改包含:在IgG1抗体的情况下,D16E、L18M、N44S、K52N、V57M和V82I(通过IMGT;D356E、L358M、N384S、K392N、V397M和V422I,通过EU);在IgG2抗体的情况下,N44S、K52N和V82I(IMGT;N384S、K392N和V422I,通过EU);以及在IgG4抗体的情况下,Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q和V82I(通过IMGT;Q355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q和V422I,通过EU)。

[0139] 抗原结合结构域的制备和双特异性分子的构建

[0140] 对特异性抗原特异的抗原结合结构域可以通过本领域已知的任何抗体生成技术制备。一旦获得,对两种或更多种不同抗原(例如,CD3和靶抗原)特异的不同的抗原结合结构域可以相对于彼此适当地排列,以使用常规方法产生本发明的多特异性抗原结合分子的结构。在某些实施例中,本发明的多特异性抗原结合分子的一种或多种个体组分(例如,重链和轻链或其部分)衍生自嵌合抗体、人源化抗体或完全人抗体。制备此类抗体的方法是本

领域熟知的。例如,可以使用VELOCIMMUNE™技术制备本发明的多特异性抗原结合分子的一条或多条重链和/或轻链。使用VELOCIMMUNE™技术(或任何它他人抗体生成技术),将高亲和力嵌合抗体最初分离为具有人可变区和小鼠恒定区的特定抗原(例如,CD3或靶抗原)。对抗体进行表征和选择以获得包含亲和力、选择性、表位等的期望的特性。用期望的人恒定区替代小鼠恒定区以生成可以掺入到本发明的多特异性抗原结合分子中的完全人重链和/或轻链。

[0141] 基因工程动物可以用于制备人多特异性抗原结合分子。例如,可以使用无法重排和表达内源性小鼠免疫球蛋白轻链可变序列的经基因修饰的小鼠,其中小鼠仅表达由人免疫球蛋白序列编码的一个或两个人轻链可变结构域,所述人免疫球蛋白序列与内源性小鼠 $\kappa$ 基因座处的小鼠 $\kappa$ 恒定基因可操作地连接。可以使用此类经基因修饰的小鼠产生包括两个不同重链的完全人多特异性抗原结合分子,所述重链与包括衍生自两个不同的人轻链可变区基因区段之一的可变结构域的相同的轻链缔合。(参见例如,US2011/0195454)。完全人是指包括由DNA编码的氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段或免疫球蛋白结构域,所述DNA衍生自在抗体或其抗原结合片段或免疫球蛋白结构域的每个多肽的整个长度内的人序列。在一些情况下,完全人序列衍生自人内源性蛋白质。在其它情况下,完全人蛋白质或蛋白质序列包括嵌合序列,其中每个组分序列衍生自人序列。虽然不受任何一种理论的束缚,但嵌合蛋白或嵌合序列通常被设计成例如与任何野生型人免疫球蛋白区域或结构域相比,使组分序列的连接处的免疫原性表位的产生最小化。

[0142] 在各个实施例中,上文所讨论的方法和技术用于生成针对T细胞抗原和靶抗原的抗体,并且这些抗体的抗原结合结构域(例如,HCVR、LCVR或CDR)用于产生本文讨论的多特异性抗原结合分子或具有例如图1C和1E-1S所示结构的多特异性抗原结合分子。

[0143] 抗原结合结构域的结合性质

[0144] 如本文所使用的,在抗体(例如对应抗体)、免疫球蛋白、抗原结合结构域或多特异性抗原结合分子与例如预定抗原(如细胞表面蛋白质或其片段)结合的背景下,术语“结合”通常是指最少两个实体或分子结构之间的相互作用或缔合,如抗原结合结构域/抗原相互作用。

[0145] 例如,当通过例如,表面等离子体共振(SPR)技术在BIAcore 3000仪器中使用抗原作为配体和抗体,Ig、抗体结合结构域或多特异性抗原结合分子作为分析物(或抗配体)进行测定时,结合亲和力通常与约 $10^{-7}$ M或更低(如约 $10^{-8}$ M或更低,如约 $10^{-9}$ 或更低)的 $K_D$ 值相对应。流式细胞术也经常使用。

[0146] 因此,本发明的抗体(例如,对应抗体)、抗原结合结构域或多特异性抗原结合分子结合到预定的抗原或细胞表面分子,所述抗原或细胞表面分子具有与 $K_D$ 值相对应的亲和力,所述亲和力比所述抗原或细胞表面分子结合到非特异性抗原(例如,BSA、酪蛋白)的亲和力低至少十倍。根据本发明,等于或小于非特异性抗原的十倍的与 $K_D$ 值相对应的抗体(例如,对应抗体)、抗原结合结构域或多特异性抗原结合分子的亲和力可以被认为是不可检测的结合,但是这种抗体可以与第二抗原结合臂配对,用于产生本发明的双特异性抗体。

[0147] 术语“ $K_D$ ”(M)是指特定抗体(或抗原结合结构域)-抗原相互作用的解离平衡常数,或抗体(或抗原结合结构域)或抗体结合片段与抗原结合的解离平衡常数。 $K_D$ 与结合亲和力之间存在反比关系,因此 $K_D$ 值越小,亲和力越高,即越强。因此,术语“较高亲和力”或“较强

亲和力”涉及较高的形成相互作用的能力并因此涉及较小的 $K_D$ 值,并且相反,术语“较低亲和力”或“较弱亲和力”涉及较低的形成相互作用的能力,并且因此 $K_D$ 值更大。在一些情况下,与分子(例如,抗体或抗原结合结构域)对另一个相互作用的配偶体分子(例如,抗原Y)的结合亲和力相比,特定分子(例如,抗体或抗原结合结构域)对其相互作用的配偶体分子(例如,抗原X)的更高结合亲和力(或 $K_D$ )可以表述为通过将较大的 $K_D$ 值(较低或较弱的亲和力)除以较小的 $K_D$ (较高或较强的亲和力)而确定的结合比,例如视情况可以表述为5倍或10倍大的结合亲和力。

[0148] 术语“ $k_d$ ”(秒<sup>-1</sup>或1/s)是指特定抗体(或抗原结合结构域)-抗原相互作用的解离速率常数,或抗体或抗体结合结构域的解离速率常数。所述值也称为 $k_{off}$ 值。

[0149] 术语“ $k_a$ ”(M<sup>-1</sup>×秒<sup>-1</sup>或1/M)是指特定抗体(或抗原结合结构域)-抗原相互作用的缔合速率常数,或抗体或抗体结合结构域的缔合速率常数。

[0150] 术语“ $K_A$ ”(M<sup>-1</sup>或1/M)是指特定抗体(或抗原结合结构域)-抗原相互作用的缔合平衡常数,或抗体或抗体结合结构域的缔合平衡常数。通过将 $k_a$ 除以 $k_d$ 获得缔合平衡常数。

[0151] 术语“EC<sub>50</sub>”或“EC<sub>50</sub>”是指半数最大有效浓度,其包含在指定的暴露时间后介于基线与最大值中间诱导响应的抗体(或抗原结合结构域或多特异性分子)的浓度。EC<sub>50</sub>基本上代表抗体(或抗原结合结构域或多特异性分子)的浓度,其中观察到其最大效应的50%。在某些实施例中,EC<sub>50</sub>值等于本发明的多特异性分子的浓度,所述多特异性分子与表达CD3或靶抗原(例如,肿瘤相关抗原)的细胞进行最大值半数的结合,如通过例如流式细胞术结合测定法所确定的。因此,观察到降低的或较弱的结合,所述结合具有增加的EC<sub>50</sub>或最大有效浓度值的半数。

[0152] 在一个实施例中,降低的结合可以定义为增加的EC<sub>50</sub>的分子浓度,其能够与最大值半数的靶细胞的结合。

[0153] 在另一个实施例中,EC<sub>50</sub>值代表本发明分子的浓度,其通过T细胞细胞毒活性引发最大值半数的靶细胞的耗竭。因此,观察到增加的细胞毒活性(例如,T细胞介导的肿瘤细胞杀伤),其具有降低的EC<sub>50</sub>或最大值半数的有效浓度值。

[0154] pH依赖性结合

[0155] 本发明包含具有pH依赖性结合特征的抗原结合结构域和多特异性抗原结合分子。例如,与中性pH相比,本发明的分子在酸性pH下可以表现出与T细胞抗原或靶抗原的结合减少。可替代地,与中性pH相比,本发明的分子在酸性pH下可以表现出与T细胞抗原或靶抗原的结合增强。表述“酸性pH”包含小于约6.2的pH值,例如,约6.0、5.95、5.9、5.85、5.8、5.75、5.7、5.65、5.6、5.55、5.5、5.45、5.4、5.35、5.3、5.25、5.2、5.15、5.1、5.05、5.0或更小。如本文所使用的,表述“中性pH”意指pH为约7.0到约7.4。表述“中性pH”包含约7.0、7.05、7.1、7.15、7.2、7.25、7.3、7.35和7.4的pH值。

[0156] 在某些情况下,“与中性pH相比在酸性pH下的结合减少”是就分子(或抗原结合结构域)在酸性pH下结合到其抗原的 $K_D$ 值与分子(或抗原结合结构域)在中性pH下结合到其抗原的 $K_D$ 值的比率而言表述的(反之亦然)。例如,如果分子或抗原结合结构域表现出约3.0或更大的酸性/中性 $K_D$ 比率,则出于本发明的目的,可以认为分子或抗原结合结构域表现出“与中性pH相比,在酸性pH下与T细胞抗原或靶抗原的结合减少”。在某些示例性实施例中,本发明的分子或抗原结合结构域的酸性/中性 $K_D$ 比率可以为约3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、

6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、13.5、14.0、14.5、15.0、20.0、25.0、30.0、40.0、50.0、60.0、70.0、100.0或更大。

[0157] 具有pH依赖性结合特性的多特异性分子可以通过以下方式获得：例如，筛选与中性pH相比在酸性pH下与特定抗原的结合减少（或增强）的一组对应抗体。另外，氨基酸水平上的抗原结合结构域的修饰可以产生具有pH依赖性特性的分子。例如，通过用组氨酸残基取代抗原结合结构域（例如，在CDR内）的一个或多个氨基酸，可以获得在相对于中性pH在酸性pH下与抗原的结合减少的分子。

[0158] 多特异性抗原结合分子的生物学特性

[0159] 本发明可以包含能够同时结合人T细胞抗原（例如，CD3）和人靶抗原（例如，肿瘤相关抗原）的多特异性抗原结合分子及其抗原结合结构域。

[0160] 本发明可以包含多特异性抗原结合分子，其结合人T细胞抗原（例如，CD3）并在存在靶细胞的情况下诱导T细胞活化。例如，在一些实施例中，本发明包含多特异性抗原结合分子，其结合人T细胞抗原（例如，CD3）并在存在表达一种或多种靶抗原（例如，肿瘤相关抗原）的细胞的情况下诱导T细胞毒性。

[0161] 本发明可以包含多特异性抗原结合分子，其结合人T细胞抗原（例如，CD3）并诱导T细胞活化而不会相对于常规结构的双特异性抗CD3 x抗TA抗体（例如，图1A）增加细胞因子产生。

[0162] 本发明可以包含多特异性抗原结合分子，其能够消耗或减少细胞群，其中细胞表达靶抗原或靶抗原。本发明的多特异性抗原结合分子能够比具有常规双特异性抗体形式的分子（例如，图1A和1B）更有效地诱导T细胞介导的细胞毒性。

[0163] 本发明可以包含多特异性抗原结合分子，其结合人T细胞抗原（例如，CD3）和两种不同的靶抗原（例如，具有图1F结构的分子），并在存在表达两种靶抗原的细胞的情况下诱导细胞毒活性和/或T细胞活化。

[0164] 许多癌症表达多种细胞内抗原，这些抗原在细胞内由蛋白体加工，并且相关肽在HLA分子的背景下呈递在细胞表面。来自不同蛋白质的靶向肽可用于增加本发明的多特异性分子的特异性。在一些情况下，以PiG抗原或低密度癌症抗原为特征的癌症逃脱了常规的癌症治疗，因为它们通常以低靶拷贝数存在于肿瘤内。另外，以PiG或低密度癌症抗原为特征的实体瘤可能对治疗更具抗性并且更难以治疗，因为它们不是细胞表面抗原，而是存在于癌症相关肽内的凹槽中。因此，使用靶向两种不同抗原（例如，低密度抗原）的本发明的多特异性分子可以有效地靶向PiG和/或低密度癌症抗原，以增加/增强癌症治疗的功效，尤其是那些以实体瘤为特征的癌症。

[0165] 在各个实施例中，当靶抗原的密度范围为每细胞约100个拷贝到每细胞约100万个拷贝或更多时，本发明的多特异性抗原结合分子能够在细胞群中诱导T细胞介导的细胞毒性。在一些情况下，靶抗原以每细胞约100个、约200个、约300个、约400个、约500个、约1000个、约2000个、约3000个、约4000个、约5000个、约6000个、约7000个、约8000个、约9000个、约10000个、约15000个、约20000个、约25000个、约30000个、约35000个、约40000个、约45000个、约50000个、约75000个、约100000个（即，100K）、约200K、约300K、约400K、约500K、约600K、约700K、约800K、约900K、约100万、约200万、约300万、约400万、约500万或约1000万个拷贝的密度存在。

[0166] 不受理论的束缚,发明人假设本发明的分子形式的改进的细胞毒性效力是分子单链上两个T细胞抗原(例如,CD3)结合结构域存在的函数。具体地说,假设本发明的分子结构的几何形状在低浓度下选择性地诱导溶解性突触形成而不诱导刺激性突触形成,后者负责由细胞毒性T淋巴细胞产生细胞因子。

[0167] 表位作图和相关技术

[0168] 本发明的抗原结合分子所结合的T细胞抗原(例如,CD3)和/或靶抗原(例如,肿瘤相关抗原)上的表位可以由蛋白质的3个或更多个(例如,3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或更多个)氨基酸的单一连续序列组成。可替代地,表位可以由蛋白质的多个非连续氨基酸(或氨基酸序列)组成。本发明的分子可以与例如单个CD3链(例如,CD3- $\epsilon$ 、CD3- $\delta$ 或CD3- $\gamma$ )中含有的氨基酸相互作用,或者可以与两个或更多个不同CD3链上的氨基酸相互作用。如本文所使用的,术语“表位”是指与被称为互补位的抗原结合结构域的可变区中的特定抗原结合位点相互作用的抗原决定簇。单一抗原可以具有多于一个表位。因此,不同抗原结合结构域可以与抗原上的不同区域结合并且可以具有不同的生物学效应。表位可以是构象的或线性的。构象表位通过来自线性多肽链的不同区段的空间并列的氨基酸产生。线性表位是由多肽链中的相邻氨基酸残基产生的表位。在某些情况下,表位可以包含抗原上的糖、磷酰基或磺酰基的部分。

[0169] 可以使用本领域普通技术人员已知的各种技术来确定分子的抗原结合结构域是否是多肽或蛋白质内“与一个或多个氨基酸相互作用”。示例性技术包含例如,常规交叉阻断测定(如在《抗体(Antibodies)》,Harlow和Lane(冷泉港出版社,冷泉港实验室,纽约)中描述的交叉阻断测定)、丙氨酸扫描突变分析、肽印迹分析(Reineke,2004,《分子生物学方法》,248:443-463)和肽切割分析。另外,可以采用如表位切除、表位提取及抗原的化学修饰等方法(Tomer,2000,《蛋白质科学(Protein Science)》,9:487-496)。可以用于鉴定与分子的抗原结合结构域相互作用的多肽内的氨基酸的另一种方法是通过质谱法检测的氢/氘交换。一般而言,氢/氘交换方法涉及对所关注的蛋白质进行氘标记,然后将分子与经氘标记的蛋白质结合。接下来,将蛋白质/分子复合物转移到水中,以允许在除分子保护的残基(其保持为经氘标记的)之外的所有残基处发生氢-氘交换。在解离分子后,对靶蛋白进行蛋白酶切割和质谱分析,由此揭示对应于与分子相互作用的特定氨基酸的经氘标记的残基。参见例如,Ehring,(1999)《分析生物化学(Analytical Biochemistry)》,267(2):252-259;Engen和Smith(2001)《分析化学(Anal.Chem.)》,73:256A-265A。抗原/分子复合物的X射线晶体学也可以用于表位作图。

[0170] 生物等效物

[0171] 本发明包含与本文所列出的任何示例性多特异性抗原结合分子生物等效的多特异性抗原结合分子。如果例如两种抗原结合蛋白是在相似的实验条件下以相同的摩尔剂量(单剂量或多剂量)施用吸收速率和吸收程度不显示显著差异的药物等效物或药物替代物,则认为所述两种抗原结合蛋白或抗体是生物等效的。如果一些抗原结合蛋白在吸收程度上等效但其吸收速率不等效,则其被认为是等效物或药物替代物,并且可以被认为是生物等效的,因为这种有意的并且反映在标签上的吸收速率的差异在例如长期使用对于获得有效的身体药物浓度并非必需的,并且对于所研究的特定药物产品而言被认为是医学上无关紧要的。

[0172] 在一个实施例中,如果两种抗原结合蛋白的安全性、纯度和效力没有临床上有意差异,则其是生物等效的。

[0173] 在一个实施例中,与没有转换的持续治疗相比,如果患者可以在参考产品和生物产品之间转换一次或多次而没有预期的副作用风险增加,包含免疫原性的临床显著变化或有效性降低,则两种抗原结合蛋白是生物等效的。

[0174] 在一个实施例中,如果两种抗原结合蛋白均通过针对一种或多种使用条件的一种或多种共同作用机制起作用(只要这些机制是已知的),则其是生物等效的。

[0175] 生物等效性可以通过体内和体外方法证明。生物等效性测量包含例如:(a)在人或其它哺乳动物中进行的体内测试,其中在血液、血浆、血清或其它生物流体中测量抗原结合蛋白或其代谢物的浓度随时间的变化;(b)与人体内生物利用度数据相关并且可合理预测的体外测试;(c)在人或其它哺乳动物中的体内测试,其中测量抗原结合蛋白(或其靶标)的适当急性药理作用随时间的变化;以及(d)在建立抗原结合蛋白的安全性、功效或生物利用度或生物等效性的对照的临床试验中。

[0176] 本文所列出的示例性多特异性抗原结合分子的生物等效变体可以通过例如进行残基或序列的各种取代或缺失非生物活性所必需的末端或内部残基或序列来构建。例如,可以缺失非生物活性所必需的半胱氨酸残基或用其它氨基酸替代,以防止在复性时形成不必要的或不正确的分子内二硫键。在其它背景下,生物等效抗原结合蛋白可以包含本文所列出的示例性多特异性抗原结合分子的变体,所述变体包括改变分子的糖基化特性的氨基酸变化,例如,消除或去除糖基化的突变。

[0177] 物种选择性和物种交叉反应性

[0178] 根据本发明的某些实施例,提供了与人T细胞抗原(例如,CD3)结合但不与来自其它物种的相同抗原结合的抗原结合分子。还提供了与人靶抗原(例如,肿瘤抗原)结合但不与来自其它物种的相同靶抗原结合的抗原结合分子。本发明还包含与人抗原和来自一个或多个非人物种的对应抗原结合的抗原结合分子。

[0179] 根据本发明的某些示例性实施例,提供了抗原结合分子,其结合到人CD3和/或人肿瘤抗原,并且视情况可以与小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、沙鼠、猪、猫、狗、兔子、山羊、绵羊、牛、马、骆驼、食蟹猴、狨猴、恒河猴或黑猩猩CD3和/或肿瘤抗原中的一种或多种结合或不与其结合。例如,在本发明的具体示例性实施例中,提供了多特异性抗原结合分子,其包括结合人CD3和食蟹猴CD3的第一抗原结合结构域以及特异性地结合人肿瘤抗原的第二抗原结合结构域。

[0180] 免疫缀合物

[0181] 本发明涵盖与治疗部分缀合的抗原结合分子(“免疫缀合物”),如细胞毒素、化学治疗药物、免疫抑制剂或放射性同位素。细胞毒性剂包含对细胞有害的任何药剂。用于形成免疫缀合物的合适的细胞毒性剂和化学治疗剂的实例是本领域已知的(参见例如,WO 05/103081)。

[0182] 治疗调配物和施用

[0183] 本发明提供了包括本发明的多特异性抗原结合分子的药物组合物。本发明的药物组合物与合适的载体、赋形剂和提供经改善的转移、递送、耐受性等的其它药剂一起调配。在所有药物化学家已知的处方集中可以找到许多适当的调配物:《雷明顿氏药物科学

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

[0184] 施用于患者的抗原结合分子的剂量可以根据患者的年龄和体型、目标疾病、病症、施用途等而变化。通常根据体重或体表面积计算优选的剂量。当本发明的多特异性抗原结合分子出于治疗目的用于成年患者中时,可能有利的是,通常以约0.01到约20mg/kg体重、更优选地约0.02到约7mg/kg体重、约0.03到约5mg/kg体重或约0.05到约3mg/kg体重的单剂量静脉内施用本发明的多特异性抗原结合分子。根据病状的严重程度,可以调整治疗的频率和持续时间。可以凭经验确定用于施用多特异性抗原结合分子的有效剂量和时间表;例如,可以通过定期评估来监测患者进展,并且相应地调整剂量。此外,剂量的种间缩放可以使用本领域熟知的方法进行(例如, Mordenti 等人, 1991, 《药学研究(Pharmaceut. Res.)》8:1351)。

[0185] 各种递送系统是已知的并且可以用于施用本发明的药物组合物,例如,在脂质体、微粒、微胶囊内包封、能够表达突变病毒的重组细胞、受体介导的胞吞作用(参见例如, Wu 等人1987《生物化学杂志(J. Biol. Chem.)》262:4429-4432)。引入的方法包含但不限于皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。可以通过任何方便的途径施用组合物,例如通过输注或团注注射、通过上皮或皮肤粘膜内层(例如,口腔粘膜、直肠和肠道粘膜等)吸收,并且可以与其它生物活性剂一起施用。施用可以是全身的或局部的。

[0186] 可以用标准针头和注射器皮下或静脉内递送本发明的药物组合物。另外,就皮下递送而言,笔递送装置易于应用于递送本发明的药物组合物。这种笔递送装置可以是可重复使用的或一次性的。可重复使用的笔递送装置通常利用含有药物组合物的可更换药筒。一旦已经施用了药筒内的全部药物组合物,并且药筒是空的,就可以轻易地丢弃空药筒,并且用含有药物组合物的新药筒更换。然后可以重复使用笔递送装置。在一次性笔递送装置中,没有可更换的药筒。相反,一次性笔递送装置预装有固持在装置内的贮存器中的药物组合物。一旦贮存器中的药物组合物清空,就丢弃整个装置。

[0187] 许多可重复使用的笔和自动注射器递送装置应用于皮下递送本发明的药物组合物。实例包含但不限于AUTOPEN™(Owen Mumford公司(Owen Mumford, Inc.), 伍德斯托克, UK)、DISETRONIC™笔(Disetronic Medical Systems, 波道夫, 瑞士)、HUMALOG MIX 75/25™笔、HUMALOG™笔、HUMALIN 70/30™笔(礼来公司(Eli Lilly and Co.), 印第安纳波利斯, 印第安纳州)、NOVOPEN™I、II和III(诺和诺德(Novo Nordisk), 哥本哈根, 丹麦)、NOVOPEN JUNIOR™(诺和诺德, 哥本哈根, 丹麦)、BD™笔(贝迪医疗(Becton Dickinson), 富兰克林湖, 新泽西州)、OPTIPEN™、OPTIPEN PRO™、OPTIPEN STARLET™以及OPTICLIK™(赛诺菲(sanofi-aventis), 法兰克福市, 德国), 仅举几例。应用于皮下递送的本发明的药物组合物的一次性笔递送装置的实例包含但不限于SOLOSTAR™笔(赛诺菲)、FLEXPEN™(诺和诺德)以及KWIKPEN™(礼来)、SURECLICK™自我注射器(安进(Amgen), 千橡市, 加利福尼亚州)、PENLET™

(Haselmeier,斯图加特,德国)、EIPEN(Dey公司(Dey,L.P.))以及HUMIRA™笔(雅培实验室(Abbott Labs),雅培科技园IL),仅举几例。

[0188] 在某些情况下,药物组合物可以在控释系统中递送。在一个实施例中,可以使用泵(参见Langer,同上;Sef-ton,1987,《CRC:生物医学工程评论(CRC Crit.Ref.Biomed.Eng.)》,14:201)。在另一个实施例中,可以使用聚合物材料;参见,《控释医学应用(Medical Applications of Controlled Release)》,Langer和Wise(编辑),1974,佛罗里达州波卡拉顿CRC出版社(CRC Pres.,Boca Raton,Florida)。在又一个实施例中,控释系统可以放置在组合物靶标附近,因此仅需要全身剂量的一小部分(参见例如,Goodson,1984,《控释医学应用》,同上,第2卷,第115-138页)。其它控释系统在Langer,1990,《科学》,249:1527-1533的评论中讨论。

[0189] 可注射制剂可以包含用于静脉内、皮下、皮内和肌内注射、滴注等的剂型。这些可注射制剂可以通过公知的方法制备。例如,可以通过例如将上述抗原结合分子或其盐溶解、悬浮或乳化在无菌水性介质或常规用于注射的油性介质中来制备可注射制剂。作为用于注射的水性介质,存在例如生理盐水、含有葡萄糖的等渗溶液以及其它助剂等,其可以与适当的增溶剂(如醇(例如,乙醇)、多元醇(例如,丙二醇、聚乙二醇))、非离子表面活性剂[例如,聚山梨醇酯80、HCO-50(氢化蓖麻油的聚氧乙烯(50mol)加合物)]等组合使用。作为油性介质,可以采用例如芝麻油、大豆油等,其可以与如苯甲酸苄酯、苯甲醇等增溶剂组合使用。如此制备的注射剂优选地填充在适当的安瓿中。

[0190] 有利的是,将上述用于口服或肠胃外使用的药物组合物制备成适于配合一定剂量活性成分的单位剂量的剂型。单位剂量的此类剂型包含例如片剂、丸剂、胶囊剂、注射剂(安瓿剂)、栓剂等。上述抗原结合分子的含量通常为每单位剂量剂型约5mg到约500mg;特别是在注射形式下,优选的是,上述抗原结合分子的含量为约5mg到约100mg并且对于其它剂型为约10mg到约250mg。

[0191] 抗原结合分子的治疗用途

[0192] 本发明包含包括向有需要的受试者施用治疗组合物的方法,所述治疗组合物包括特异性结合T细胞抗原(例如,CD3)和靶抗原(例如,肿瘤相关抗原)的多特异性抗原结合分子。治疗性组合物可以包括如本文所公开的多特异性抗原结合分子中的任何一种,以及药学上可接受的载体或稀释剂。如本文所使用的,表述“有此需要的受试者”意指表现出一种或多种癌症症状或征兆的人或非人动物,或者将以其它方式受益于靶抗原活性的抑制或降低或靶抗原阳性细胞(例如,肿瘤细胞)的耗竭的人或非人动物。

[0193] 本发明的多特异性抗原结合分子(以及包括所述多特异性抗原结合分子的治疗性组合物)尤其可用于治疗其中免疫应答的刺激、活化和/或靶向将会有益的任何疾病或病症。具体地说,本发明的多特异性抗原结合分子可用于治疗、预防和/或改善与靶向抗原表达或活性或靶抗原阳性细胞增殖相关或由其介导的任何疾病或病症。实现本发明的治疗性方法的作用机制包含在存在T细胞的情况下杀死表达靶抗原的细胞。

[0194] 本发明的多特异性抗原结合分子可用于治疗与靶抗原表达相关的疾病或病症,包含例如癌症。本领域已知的如肿瘤扫描等分析/诊断方法可用于确定患者是否携带对靶抗原呈阳性的肿瘤细胞。在一些情况下,所述癌症选自实体瘤、宫颈癌、头颈部鳞状细胞癌、黑色素瘤、前列腺癌、急性髓性白血病、胰腺癌、结肠癌、急性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴

瘤、胃癌、移植后淋巴组织增生性疾病、卵巢癌、肺癌、鳞状细胞癌、非小细胞肺癌、食管癌、膀胱癌、鼻咽癌、子宫癌、肝癌、睾丸癌或乳腺癌。

[0195] 本发明还包含用于治疗受试者中残留癌症的方法。如本文所使用的,术语“残留癌症”意指在用抗癌疗法治疗后受试者中的一个或多个癌细胞的存在或持续存在。

[0196] 根据某些方面,本发明提供了用于治疗与靶抗原表达相关的疾病或病症(例如,癌症)的方法,所述方法包括在已确定受试者患有靶抗原阳性癌症后,将一种或多种本文别处描述的多特异性抗原结合分子施用于所述受试者。例如,本发明包含治疗癌症的方法,所述方法包括在受试者接受其它免疫疗法或化学疗法后1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周或4周、2个月、4个月、6个月、8个月、1年或更长时间向患者施用多特异性抗原结合分子。

[0197] 组合疗法和调配物

[0198] 本发明提供了包括施用药物组合物的方法,所述药物组合物包括本文所描述的任何示例性多特异性抗原结合分子与一种或多种另外的治疗剂的组合。可以与本发明的抗原结合分子组合或联合施用的示例性附加治疗剂包含例如抗肿瘤剂(例如化疗剂)。在某些实施例中,第二治疗剂可以是单克隆抗体、抗体药物缀合物、与抗肿瘤剂缀合的双特异性抗体、检查点抑制剂或其组合。可以与本发明的抗原结合分子有益地组合施用的其它药剂包含细胞因子抑制剂,所述细胞因子抑制剂包含小分子细胞因子抑制剂和与如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18等细胞因子或其相应受体结合的抗体。本发明的药物组合物(例如,包括如本文所公开的多特异性抗原结合分子的药物组合物)还可以作为包括选自以下的一种或多种治疗组合的治疗方案的一部分来施用:可以与细胞表面上的不同抗原相互作用的单克隆抗体;双特异性抗体,其一个臂与肿瘤细胞表面上的抗原结合并且另一个臂与T细胞上的抗原结合;抗体药物缀合物;与抗肿瘤剂缀合的双特异性抗体;检查点抑制剂,例如靶向PD-1或CTLA-4的检查点抑制剂;或其组合。在某些实施例中,所述检查点抑制剂可以选自PD-1抑制剂,如派姆单抗(pembrolizumab,健痊得(Keytruda))、纳武利尤单抗(nivolumab,欧狄沃(Opdivo))或西米普利单抗(cemiplimab)(REGN2810)。在某些实施例中,所述检查点抑制剂可以选自PD-L1抑制剂,如阿特珠单抗(atezolizumab/Tecentriq)、阿维鲁单抗(avelumab/Bavencio)或度伐鲁单抗(Durvalumab/Imfinzi)。在某些实施例中,所述检查点抑制剂可以选自CTLA-4抑制剂,如易普利姆玛(ipilimumab,伊匹单抗(Yervoy))。上文描述了可以与本发明的抗体结合使用的其它组合。

[0199] 本发明还包含治疗组合,其包括本文提及的任何抗原结合分子和VEGF、Ang2、DLL4、EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EGFRvIII、cMet、IGF1R、IL-10、B-raf、PDGFR- $\alpha$ 、PDGFR- $\beta$ 、FOLH1(PSMA)、PRLR、STEAP1、STEAP2、TMPRSS2、MSLN、CA9、尿空斑蛋白(uroplakin)或任何上述细胞因子中的一个或多个的抑制剂,其中所述抑制剂是适体、反义分子、核酶、siRNA、肽体、纳米体、抗体、双特异性抗体或抗体片段(例如,Fab片段;F(ab')<sub>2</sub>片段;Fd片段;Fv片段;scFv;dAb片段;或其它工程化分子,如双抗体、三抗体、四抗体、微抗体和最小识别单元)。本发明的抗原结合分子还可以与抗病毒剂、抗生素、镇痛药、皮质类固醇和/或NSAID组合施用和/或共同调配。本发明的抗原结合分子还可以作为治疗方案的一部分施用,所述治疗方案还包含放射治疗和/或常规化疗。

[0200] 另外的治疗活性组分可以在施用本发明的抗原结合分子之前、同时或不久之后施

用；(出于本公开的目的,此类施用方案被认为是抗原结合分子与另外的治疗活性组分“组合”施用)。

[0201] 本发明包含药物组合物,其中本发明的抗原结合分子与一种或多种如本文其它地方所描述的另外的治疗活性组分共同配制。

[0202] 施用方案

[0203] 根据本发明的某些实施例,可以在限定的时间过程内向受试者施用多特异性抗原结合分子。根据本发明的此方面的方法包括向受试者依次施用多剂量的本发明的抗原结合分子。如本文所使用的,“依次施用”意指每个剂量的抗原结合分子在不同时间点施用于受试者,例如,在隔开预定间隔(例如,数小时、数天、数周或数月)的不同日期。本发明包含方法,所述方法包括向患者依次施用单一初始剂量的抗原结合分子,然后施用一种或多种第二剂量的抗原结合分子,并且任选地随后施用一种或多种第三剂量的抗原结合分子。

[0204] 术语“初始剂量”、“第二剂量”和“第三剂量”是指施用本发明的抗原结合分子的时间序列。因此,“初始剂量”是在治疗方案开始时施用的剂量(也被称为“基线剂量”);“第二剂量”是初始剂量后施用的剂量;“第三剂量”是在第二剂量后施用的剂量。初始剂量、第二剂量和第三剂量可以均含有相同量的抗原结合分子,但是在施用频率方面通常可能彼此不同。然而,在某些实施例中,在治疗过程中初始剂量、第二剂量和/或第三剂量中含有的抗原结合分子的量彼此不同(例如,适当地调高或降低)。在某些实施例中,在治疗方案开始时施用两个或更多个(例如,2个、3个、4个或5个)剂量作为“负荷剂量”,然后是在较不频繁的基础上施用后续剂量(例如,“维持剂量”)。

[0205] 在本发明的一个示例性实施例中,每个第二剂量和/或第三剂量在前一剂量后1到26(例如,1、1<sup>1/2</sup>、2、2<sup>1/2</sup>、3、3<sup>1/2</sup>、4、4<sup>1/2</sup>、5、5<sup>1/2</sup>、6、6<sup>1/2</sup>、7、7<sup>1/2</sup>、8、8<sup>1/2</sup>、9、9<sup>1/2</sup>、10、10<sup>1/2</sup>、11、11<sup>1/2</sup>、12、12<sup>1/2</sup>、13、13<sup>1/2</sup>、14、14<sup>1/2</sup>、15、15<sup>1/2</sup>、16、16<sup>1/2</sup>、17、17<sup>1/2</sup>、18、18<sup>1/2</sup>、19、19<sup>1/2</sup>、20、20<sup>1/2</sup>、21、21<sup>1/2</sup>、22、22<sup>1/2</sup>、23、23<sup>1/2</sup>、24、24<sup>1/2</sup>、25、25<sup>1/2</sup>、26、26<sup>1/2</sup>或更多)周施用。如本文所使用的,短语“前一剂量”意指在多次施用的序列中,在没有中间剂量的情况下在所述序列中的下一个剂量之前施用给患者的抗原结合分子的剂量。

[0206] 根据本发明的此方面的方法可以包括向患者施用任意数量的第二和/或第三剂量的抗原结合分子。例如,在某些实施例中,仅向患者施用单个第二剂量。在其它实施例中,向患者施用两个或更多个(例如,2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或更多个)第二剂量。同样地,在某些实施例中,仅向患者施用单个第三剂量。在其它实施例中,向患者施用两个或更多个(例如,2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或更多个)第三剂量。

[0207] 在涉及多个第二剂量的实施例中,每个第二剂量可以以与其它第二剂量相同的频率施用。例如,可以在前一剂量后1到2周向患者施用每个第二剂量。类似地,在涉及多个第三剂量的实施例中,每个第三剂量可以按与其它第三剂量相同的频率施用。例如,可以在前一剂量后2到4周向患者施用每个第三剂量。可替代地,向患者施用第二剂量和/或第三剂量的频率可以在治疗方案的过程中变化。施用频率也可以在医师的治疗过程中根据临床检查后个体患者的需要进行调整。

[0208] 实例

[0209] 提出以下实例以向本领域普通技术人员提供如何制备和使用本发明的方法和组合物的完整公开和描述,并且不旨在限制发明人认为是其发明的范围。已经做出努力以确

保关于所使用的数字(例如,量、温度等)的准确性,但是应当考虑一些实验误差和偏差。除非另外指明,否则份数是重量份,分子量是平均分子量,温度是摄氏度,并且压力是或接近大气压。

[0210] 用于通过流式细胞术进行结合的方法:在以下实例中,使用以下流式细胞术方法测定各种分子的结合。使用流式细胞仪分析确定MAGEA4xCD3多特异性分子与RAJI/HLA-A2/B2M/MAGEA4(肽a)、A375/hHLA-A2/B2M/MAGEA4(肽b)、RAJI/HLA-A2/B2M/NY-ESO-1和JURKAT的结合,然后用APC标记的抗人IgG抗体进行检测。简而言之,将 $1 \times 10^5$ 个细胞/孔在4℃下与MAGEA4xCD3多特异性分子或同种型对照(一种结合人抗原且与人MAGEA4或CD3无交叉反应的人IgG4隐形抗体)的连续稀释液一起孵育30分钟。孵育后,将细胞用含有1%过滤的FBS的冷PBS洗涤两次,并将PE缀合的抗人二抗添加到细胞中并再孵育30分钟。使用不含抗体或仅含二抗的孔作为对照。孵育后,洗涤细胞,重悬于200 $\mu$ L含有1%过滤的FBS的冷PBS中,并在BD FACS Canto II上通过流式细胞术分析。

[0211] 用于细胞毒性测定的方法:在以下实施例中,使用以下细胞毒性测定法来确定各种分子的细胞毒性。为了监测在存在MAGEA4xCD3作为单一药剂或与EGFRxCD28双特异性抗体和/或PD-1抗体、A375细胞、ScaBER细胞、NCI-H1755转移性(来自肝脏)细胞的组合的情况下对MAGEA4+细胞的杀伤,并将NCI-H1755细胞用1 $\mu$ M荧光示踪染料Violet Cell Tracker进行标记。标记后,使细胞在37℃下平板接种过夜。单独地,将人PBMC以 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL平板接种在补充的RPMI培养基中,并在37℃下孵育过夜,以通过耗竭粘附的巨噬细胞、树突细胞和一些单核细胞来富集淋巴细胞。第二天,将靶细胞与粘附细胞耗竭的原初PBMC(效应子/靶细胞10:1比率)、MAGEA4xCD3多特异性分子的连续稀释液以及固定浓度的EGFRxCD28和/或抗PD1抗体在37℃下共同孵育96小时。使用胰蛋白酶-EDTA解离缓冲液从细胞培养板中取出细胞,并在FACS BD LSRFortessa-X20上通过FACS进行分析。对于FACS分析,将细胞用死/活近IR反应(Invitrogen)染料进行染色。在FACS分析之前立即向每个孔中添加5E05计数珠。针对每个样品收集1E05个珠。为了评估杀伤的特异性,在活的Violet标记的群体上对细胞进行门控。记录活群体的百分比并将其用于计算存活率。

[0212] 实例1:T细胞活化取决于靶细胞的存在

[0213] 对图1A、1B和1C所示的每种分子形式的T细胞活化进行了评估。通过将细胞与直接缀合到CD2、CD4、CD8、CD25和PD-1的抗体一起孵育并报告晚期活化的(CD25+/CD8+)T细胞和PD-1+/CD4+T细胞占总T细胞(CD2+)的百分比来评估T细胞活化和PD-1标志物的上调。

[0214] 如图2所示,本发明的示例性多特异性分子(图1C结构)在不存在靶细胞的情况下不会使T细胞活化。“零”代表仅T细胞对照。

[0215] 实例2:多特异性分子相对于常规形式的细胞毒性

[0216] 如上所述测量本发明的示例性多特异性分子(图1C结构)的细胞毒性,并将其与具有相同抗原结合结构域的常规形式的分子(图1A和1B)的细胞毒性进行比较。本实例中使用的CD3结合结构域对人CD3具有中等的结合亲和力。本实例中使用的靶抗原结合结构域与MAGEA4(黑色素瘤相关抗原A4)肽结合。“对照”是一种阳性对照,其靶向所有HLA分子的支架,以提供与其它形式相比的最大细胞毒性。

[0217] 如图3所示,本发明的示例性多特异性分子(图1C结构)比具有常规双特异性形式的分子(图1A结构和图1B结构)更有效地杀死靶细胞。

[0218] 实例3:多特异性分子相对于与抗PD-1抗体、共刺激双特异性抗体或两者组合的常规形式的细胞毒性

[0219] 如上所述测量本发明的示例性多特异性分子(图1C结构)的细胞毒性,并将其与具有相同抗原结合结构域的常规形式的分子(图1A和1B)与抗PD-1抗体、共刺激双特异性EGFR x CD28抗体或抗PD-1抗体和共刺激双特异性EGFR x CD28抗体两者组合时的细胞毒性进行比较。阳性对照、CD3和靶抗原结合结构域如上文实例2中所述。

[0220] 如图4A、4B和4C所示,抗PD-1抗体、共刺激双特异性EGFR x CD28抗体或两者的添加进一步增强了本发明的示例性多特异性分子(图1C结构)的效力。实线代表单一药剂的细胞毒性(如图3所示),并且虚线代表相应组合的细胞毒性。

[0221] 除了细胞毒性之外,使用BD细胞计数珠阵列人类试剂盒并遵循制造商的方案,评估来自人PBMC测定的测定孔的上清液的Th1/Th2细胞因子释放。如图5所示,与常规双特异性抗体形式(图1A结构)相比,本发明的示例性多特异性分子(图1C结构)的更大细胞毒性不会导致任何更大的细胞因子释放。

[0222] 这组实验证实:(a)在细胞毒性测定中,在最大浓度下,具有图1C结构的分子表现出比具有相当水平的细胞因子释放的图1A结构的分子更强的效力;(b)具有图1C结构的分子(单一药剂)的细胞毒性EC50低于针对具有图1A结构的分子(单一药剂)观察到的EC50;(c)在细胞毒性测定中,在最大浓度下,具有图1A结构的分子与抗PD-1抗体组合时表现出比具有相当水平的细胞因子释放的图1A结构的分子(抗PD-1组合)更强的效力;(d)具有图1C结构的分子与抗PD-1抗体组合时的细胞毒性EC50低于针对具有图1A结构的分子(抗PD-1组合)观察到的EC50;(e)在细胞毒性测定中,在最大浓度下,具有图1A结构的分子与抗EGFR x CD28双特异性抗体组合时表现出比具有相当水平的细胞因子释放的图1A结构的分子(抗EGFR x CD28组合)更强的效力;(f)具有图1C结构的分子与抗EGFR x CD28双特异性抗体组合时的细胞毒性EC50低于针对具有图1A结构的分子(抗EGFR x CD28组合)观察到的EC50;(g)在细胞毒性测定中,在最大浓度下,具有图1A结构的分子与抗PD-1抗体和抗EGFR x CD28双特异性抗体组合时表现出比具有相当水平的细胞因子释放的图1A结构的分子(三重组合)更强的效力;(h)具有图1C结构的分子与抗PD-1抗体和抗EGFR x CD28双特异性抗体组合时的细胞毒性EC50低于针对具有图1A结构的分子(三重组合)观察到的EC50。

[0223] 实例4:多特异性分子的效力通过两个效应子结合结构域增强

[0224] 如上所述测量示例性多特异性分子(图1C结构)与过表达MAGEA4肽的靶细胞和CD3+Jurkat细胞的结合。还评估了与这些细胞的结合对图1C结构的修饰,在所述修饰中使一个或多个抗原结合结构域失活。失活的结构域在图例中用“X”表示。

[0225] 如图6A-6D所示,结合数据显示,与具有单个Fab结构域的分子或具有单个scFv结构域的分子的结合相比,两个抗原结合结构域(例如,单个Fab和单个scFv)的组合以更大的亲和力(更低的EC50)与靶细胞结合。如预期的那样,同种型对照分子没有显示出结合。无论抗CD3结合结构域的来源如何,都没有观察到结合模式的区别。

[0226] 除了结合之外,这些分子的细胞毒性也使用上述方法确定。如图7A和7B所示,本发明的示例性多特异性分子(图1C结构)显示出最大的细胞毒性效力,其次是包括两个T细胞抗原(CD3)结合结构域但只有单一靶抗原(MAGEA4)结合结构域(scFv或Fab)的两个经修饰的分子。同样,无论抗CD3结合结构域的来源如何,都观察到相同的细胞毒性模式。阴性对照

(图1A形式)包括不相关的靶抗原结合结构域。

[0227] 实例5:C端scFv结构域相对于C端Fab结构域增强多特异性分子的效力

[0228] 如上所述测量示例性多特异性分子(图1C结构)与过表达MAGEA4肽的靶细胞和CD3+Jurkat细胞的结合。还评估了与这些细胞的结合对图1C结构的修饰,以用Fab结构域(图1E结构)替代C端scFv结构域,或在所述修饰中使N端Fab结构域失活。失活的结构域在图例中用“X”表示。

[0229] 类似于在实例4中讨论的结合,并且如图8A和8B所示,结合数据显示,与具有单个Fab结构域分子或具有单个scFv结构域分子的结合相比,两个抗原结合结构域(例如,单个Fab和单个scFv,或两个Fab)的组合以更大的亲和力(更低的EC50)与靶细胞结合。如图8A和8B中的表格所示,具有图1C和图1E结构的分子以相当的结合滴度结合。

[0230] 除了结合之外,这些分子的细胞毒性也使用上述方法确定。如图9所示,本发明的示例性多特异性分子(图1C结构)显示出最大的细胞毒性效力,其次是包括C端Fab结构域代替两个scFv结构域的经修饰的分子。

[0231] 实例6:T细胞抗原的单链二价相对于多链二价增强多特异性分子的效力

[0232] 如上所述测量示例性多特异性分子(图1C结构)与过表达MAGEA4肽的靶细胞和CD3+Jurkat细胞的结合。还评估了具有图1D所示结构的分子与这些细胞的结合,其中MAGEA4结合结构域和CD3结合结构域被交换,使得两组抗原结合结构域定位在两条单独的多肽链上。

[0233] 如图10A和10B所示,结合数据显示出两种分子结构与两种细胞类型中的每一种细胞类型的类似结合。

[0234] 除了结合之外,这些分子的细胞毒性也使用上述方法确定。如图11A和11B所示,本发明的示例性多特异性分子(图1C结构)相对于具有图1D结构的分子显示出更大的细胞毒性效力,从而证实了在单条多肽链上存在两个T细胞抗原结合结构域会提供增强的细胞毒性效力。

[0235] 实例7:靶向一种或两种抗原的多特异性分子相对于单独或与抗PD-1抗体和共刺激双特异性抗体组合的常规形式的相对细胞毒性

[0236] 如上所述测量本发明的两个示例性多特异性分子(图1C和图1F结构)的细胞毒性,并将其与单独或与抗PD-1抗体和共刺激双特异性EGFR x CD28抗体组合的常规形式的分子(图1A)的细胞毒性进行比较。本实例使用与先前实例中使用的对照相比具有更高特异性的阳性对照,以示出具有图1C和1F结构的分子,以及这些分子与共刺激双特异性抗体和抗PD-1抗体的组合之间的更大区别。本实例中使用的CD3抗原结合结构域对人CD3具有强结合亲和力,并且靶抗原结合结构域(MAGEA4a)如上文实例2中所述。阴性对照(图1A形式)包括不相关的靶抗原结合结构域。本实施例中用于具有图1F结构的分子的第二靶抗原结合结构域(MAGEA4b)结合到与由第一靶抗原结合结构域结合的表位完全不同的MAGEA4表位。

[0237] 如图12A和12B所示,与仅靶向单一肿瘤抗原的多特异性分子相比,靶向肿瘤细胞上两种不同低密度抗原的多特异性分子显示出增加的效力,并且这两种分子都显示出比具有图1A结构的常规形式的分子更大的效力。抗PD-1抗体和共刺激双特异性EGFR x CD28抗体的添加进一步增强了本发明的示例性多特异性分子(图1C和1F结构)的效力。

[0238] 实例8:多特异性分子的相对细胞毒性与T细胞抗原结合结构域的亲和力相关

[0239] 用具有不同亲和力的抗CD3结合结构域制备具有图1F结构的示例性多特异性分子

(如图13所示)。根据以下参数制备五个分子：

[0240] 具有CD3臂7195P(强)fab和7195P(强)scfv的分子A；

[0241] 具有CD3臂7221G(中等)fab和7221G(中等)scfv的分子B；

[0242] 具有CD3臂7221G20(弱)fab和7221G20(弱)scfv的分子C；

[0243] 具有CD3臂7221G20(弱)fab和7221G(中等)scfv的分子D；以及

[0244] 具有CD3臂7221G(中等)fab和7195P(强)scfv的分子E。

[0245] 这五个分子与T细胞的结合滴定范围通过流式细胞术测试，并且与CD3结合结构域的强度相关，如图13中相对于同种型对照所示。

[0246] 在靶向两种不同MAGEA4+细胞系(A375和ScaBER)的细胞毒性测定中，当效应臂(例如，抗CD3结合结构域)的强度降低时，分子的效力显示降低，作为单一药剂，或与EGFR x CD28双特异性抗体和抗PD1抗体组合，如图14A、14B、15A和15B所示。每个分子含有(与不重叠的MAGEA4肽1和MAGEA4肽2)相同的靶抗原结合结构域。

[0247] 实例9：靶向两种抗原的多特异性分子相对于单独或与抗PD-1抗体和共刺激双特异性抗体组合的常规形式的相对细胞毒性

[0248] 如上所述测量本发明的三个示例性多特异性分子(图1C和图1F结构)的细胞毒性，并将其与单独或与抗PD-1抗体和共刺激双特异性EGFR x CD28抗体组合的常规形式的分子(图1A)的细胞毒性进行比较。本实例使用具有图1A结构的阳性对照，其结合CD3和HLA。本实例中使用的CD3抗原结合结构域对人CD3(衍生自7195P)具有强结合亲和力，并且靶抗原结合结构域针对一个或两个非重叠的MAGEA4(黑色素瘤相关抗原A4)肽(MAGEA4Aa和MAGEA4b)或针对NY-ESO-1(纽约食管鳞状细胞癌1)的肽。还包含了两个同种型阴性对照(图1A形式和图1C形式)，其包括不相关的靶抗原结合结构域。

[0249] 如图16A、16B和16C所示，如预期的那样，通过流式细胞术，分子结合到表达NY-ESO-1、MAGEA4a或MAGEA4b的细胞。

[0250] 如图17A和17B所示，靶向两种不同抗原(分子A)或单一抗原的两个不同表位(分子B)的多特异性分子有效诱导转移性非小细胞肺癌(NSCLC)细胞(图17A)和NSCLC细胞(图17B)的细胞毒性，其中相对于靶向相同抗原的两个不同表位的多特异性分子(分子B)，靶向两种不同抗原的多特异性分子(分子A)显示出增加的效力。抗PD-1抗体和共刺激双特异性EGFR x CD28抗体的添加进一步增强了本发明的示例性多特异性分子(图1F结构)的效力。还评估了这些分子对T细胞活化的相对诱导，如图17C(在转移性NSCLC细胞中)和17D(在NSCLC细胞中)中所示。

[0251] 将靶向一种或两种抗原(不同表位或不同抗原)并且具有图1C和1F结构的多特异性分子的相对细胞毒活性和效力与单独或与抗PD-1抗体和共刺激双特异性EGFR x CD28抗体组合的常规形式的分子(图1A)的细胞毒性进行比较。阳性对照和同种型对照如本实例中所述。如图18A和18B所示，多特异性分子比常规形式的分子更有效，并且靶向两个不同表位(图18A)或两种不同抗原(图18B)的多特异性分子比在两个靶抗原结合结构域处靶向相同抗原的多特异性分子更有效。这些分子对T细胞活化的相对诱导示于图18C、18D、18E和18F中。

[0252] 实例10：靶向两种抗原的多特异性分子相对于靶向相同抗原的常规形式的分子的组合的相对细胞毒性

[0253] 如上所述测量靶向两种不同抗原的本发明的示例性多特异性分子(图1F结构)的细胞毒性,并将其与靶向相同的两种抗原的常规形式的分子(图1A结构)的组合的细胞毒性进行比较,所述常规形式的分子是单独的或与抗PD-1抗体和共刺激双特异性EGFR x CD28抗体组合。

[0254] 细胞毒性测定靶向MAGEA4表达-SCaBER细胞(膀胱),并证明靶向MAGEA4a和MAGEA4b(它们是MAGEA4的非重叠肽)的多特异性分子比靶向相同的两个MAGEA4肽的常规形式的双特异性抗体的组合更有效,如图19A所示。抗PD-1抗体和共刺激双特异性EGFR x CD28抗体的添加进一步增强了本发明的示例性多特异性分子(图1F结构)的效力。这些相同分子对T细胞活化的相对诱导示于图19B中。

[0255] 本发明不被在本文所描述的具体实施例限于一定的范围。事实上,除了本文所描述的那些之外,本发明的各种修改对于本领域技术人员来说将从前面的描述中变得显而易见。此类修改旨在落入所附权利要求书的范围内。

序列表

<110> 瑞泽恩制药公司 (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.)

<120> 用于细胞靶向的多特异性抗原结合分子及其用途

<130> 10606WO01

<150> 62/887,411

<151> 2019-08-15

<150> 62/924,435

<151> 2019-10-22

<150> 62/978,584

<151> 2020-02-19

<150> 63/057,824

<151> 2020-07-28

<160> 170

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 372

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 1

gaagtacagc ttgtagaatc cgccggagga ctggtacaac ctggaagaag tcttagactg 60

[0001]

agtgcgcag ctagtgggtt tacattcgc gattacagca tgcattgggt gaggcaagct 120

cttgtaaag gattggaatg ggtagcggg atatcatgga actcaggaag caagggatac 180

gccgacagcg tgaaggccg attacaata tctagggaca acgcaaaaaa ctctctctac 240

cttcaaatga actctcttag gccagaagac acagcattgt attattcgc aaaatacggc 300

agtggttatg gcaagtttta tcattatgga ctggacgtgt ggggacaagg gacaacagtg 360

acagtgagta gc 372

<210> 2

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Lys Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr His Tyr Gly Leu Asp  
 100                    105                    110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115                    120

<210> 3  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 3  
 gggttacat tcgacgatta cagc                    24

<210> 4  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 4

[0002]

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ser  
 1                    5

<210> 5  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 5  
 atatcatgga actcaggaag caag                    24

<210> 6  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 6

Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Lys  
 1                    5

<210> 7  
 <211> 51  
 <212> DNA

<213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成  
 <400> 7  
 gcaaaatacg gcagtggtta tggcaagttt tatcattatg gactggacgt g 51

<210> 8  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成  
 <400> 8  
 Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr His Tyr Gly Leu Asp  
 1 5 10 15

Val

<210> 9  
 <211> 372  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

[0003]

<400> 9  
 gaagtacagt tggtagaatc tggaggagga ctcgtgcaac caggacgac attcggttg 60  
 agttgtgctg ctagtgatt cacattcgac gactatgcta tgcattgggt aagacaggct 120  
 ccaggaaaag gactcgaatg ggtgtcagga ataagttgga actccggaag cattgggtac 180  
 gcagattcag tcaaagggeg attcaccata tcccagata acgctaagaa ctactttac 240  
 ctcaaatga actctctcg agcagaggac actgcacttt attattgcgc taaggacggc 300  
 tccggtatg gatatttta ttattatgga atggacgtat ggggacaagg cactactgtt 360  
 accgttagtt cc 372

<210> 10  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 10  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45



<211> 51  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成  
 <400> 15  
 gctaaggacg gctccgggta tggatatttt tattattatg gaatggacgt a 51

<210> 16  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成  
 <400> 16  
 Ala Lys Asp Gly Ser Gly Tyr Gly Tyr Phe Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp  
 1 5 10 15

Val

<210> 17  
 <211> 372  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成  
 <400> 17  
 gaagtacaac tggtcgaac tggaggaggt cttgttcaac ctggtcgatc acttcgcctt 60  
 tcttgtgccg cttctggttt cacttctgac gattatagca tgcattgggt acgacaggct 120  
 cccggaaaag ggctggaatg ggtgtcagga attagtggga actcaggaag tattggatac 180  
 gctgattcag tcaaaaggac cttcacaate tcaagggaca acgctaaaaa ctcactttat 240  
 ttgcaaatga actctctccg cgctgaagat accgctctct attattgcgc caaagatggg 300  
 tctggftacg gttattttta ctactatgga atggacgttt ggggccaagg aacaactgtc 360  
 acagtatcat cc 372

[0005]

<210> 18  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成  
 <400> 18  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
 20 25 30  
 Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45



<210> 23  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 23  
 gccaaagatg ggtctgggta cgggtatttt tactactatg gaatggacgt t 51

<210> 24  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 24

Ala Lys Asp Gly Ser Gly Tyr Gly Tyr Phe Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp  
 1 5 10 15

Val

[0007]

<210> 25  
 <211> 372  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 25  
 gaagttcaac ttgtggaaag tggcggagga ttggttcaac caggacgttc attgaggctt 60  
 tcatgcgcag ctccggatt tacattgac gattacgcaa tgcactgggt tagacaggca 120  
 ccagaaaag gactggagtg ggtgagcggg atttcatgga acagcggcag taccggttat 180  
 gcagactcag ttaaaggaag atccaccatc agtagagaca acgcaaaaaa ttccctttat 240  
 ctccaaatga actctcttag ggccgaagat acagcattgt actactgcgc aaaagacgga 300  
 tcaggttacg gaaaatttta ctactatggt atggatgtat ggggtcaggg aaccacagta 360  
 actgtatcaa gc 372

<210> 26  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 26

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp  
 100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 27  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 27  
 ggatttacat ttgacgatta cgca 24

[0008]

<210> 28  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 28  
 Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala  
 1 5

<210> 29  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 29  
 atttcatgga acagcggcag tate 24

<210> 30  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 30  
 Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile

1 5  
 <210> 31  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成  
 <400> 31  
 gcaaaagacg gatcaggta cggaaaattt tactactatg gtatggatgt a 51

<210> 32  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成  
 <400> 32  
 Ala Lys Asp Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp  
 1 5 10 15

Val

[0009]

<210> 33  
 <211> 372  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成  
 <400> 33  
 gaagtgcac tcgtgaaag cggaggagga ctggtccagc ccggcagatc ttcagattg 60  
 tcttgcgtg catccgatt tacattgac gactattcaa tgcactgggt acggcaagcc 120  
 ccaggtaaag gactcgaatg ggtaagcggc atacttggga actcaggcag tattggctac 180  
 gcagattcag taaaaggaag atcactatt tcaaggata atgctaagaa cagtctctac 240  
 ttgcaaatga atagcttgcg cgcagaagat acagcacttt attattgtgc aaaagatgga 300  
 agcggttatg ggaaatttta ttattatggt atggatgat ggggtcaagg tacaacagtt 360  
 actgtgtcaa gt 372

<210> 34  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成  
 <400> 34  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
 20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp  
 100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 35  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 35  
 ggatttacat ttgacgacta tca 24

[0010]

<210> 36  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 36  
 Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ser  
 1 5

<210> 37  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 37  
 atatcttggga actcaggcag tatt 24

<210> 38  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 38

Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile  
1 5

<210> 39  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成

<400> 39  
gcaaaagatg gaagcgggta tgggaaattt tattattatg gtatggatg a 51

<210> 40  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成

<400> 40

Ala Lys Asp Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp  
1 5 10 15

Val

[0011]

<210> 41  
<211> 372  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成

<400> 41  
gaagtacagc ttgtagaatc cggcggagga ctggtacaac ctggaagaag tcttagactg 60  
agttgcgcag ctagtgggtt tacattcgac gattacagca tgcattgggt gaggcaagct 120  
cctggtaaaag gattggaatg ggtagcggg atatcatgga actcaggaag catcggatac 180  
gccgacagcg tgaaggccg attacaata tctagggaca acgcaaaaaa ctctctctac 240  
ctcaaatga actctcttag ggcagaagac acagcattgt attattgcgc aaaatacggc 300  
agtggttatg gcaagttta tcattatgga ctggacgtgt ggggacaagg gacaacagtg 360  
acagtgagta gc 372

<210> 42  
<211> 124  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成

<400> 42

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
 20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr His Tyr Gly Leu Asp  
 100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 43  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

[0012]

<400> 43  
 gggtttaccat tcgacgatta cagc 24

<210> 44  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 44

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ser  
 1 5

<210> 45  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 45  
 atatcatgga actcaggaag catc 24

<210> 46  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 46

Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile  
1 5

<210> 47

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 47

gcaaaatacg gcagtggtta tggcaagttt tatcattatg gactggacgt g 51

<210> 48

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 48

Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr His Tyr Gly Leu Asp  
1 5 10 15

Val

[0013]

<210> 49

<211> 372

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 49

gaagtacagc ttgtagaatc cggcggagga ctggtacaac ctggaagaag tcttagactg 60

agttgcgcag ctagtggtt tacattcgac gattacagca tgcatgggt gagcaagct 120

cttgtaaag gattggaatg ggttagcggg atatcatgga actcaggaag caaggatac 180

gccgacagcg tgaaggcgc atttacaata tctagggaca acgcaaaaaa ctctctctac 240

ctcaaatga actctcttag ggcagaagac acagcattgt attattgccc aaaagacggc 300

agtggttatg gcaagtttta tcattatgga ctggacgtgt ggggacaagg gacaacagtg 360

acagtgagta gc 372

<210> 50

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 50

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Lys Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr His Tyr Gly Leu Asp  
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 51  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列

[0014]

<220>  
<223> 合成

<400> 51  
gggtttacat tcgacgatta cagc 24

<210> 52  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成

<400> 52

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ser  
1 5

<210> 53  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成

<400> 53  
atatcatgga actcaggaag caag 24

<210> 54  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成  
 <400> 54  
 Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Lys  
 1 5

<210> 55  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成  
 <400> 55  
 gcaaaagacg gcagtggtta tggcaagttt taccattatg gactggacgt g 51

<210> 56  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成  
 <400> 56  
 Ala Lys Asp Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr His Tyr Gly Leu Asp  
 1 5 10 15

[0015] Val

<210> 57  
 <211> 372  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成  
 <400> 57  
 gaagtacagc ttgtagaatc cggcggagga ctggtacaac ctggaagaag tcttagactg 60  
 agttgcgcag ctagtggtt tacattcgac gattacagca tgcattgggt gaggcaagct 120  
 cctggtaaag gattggaatg ggttagcggg atatcatgga actcaggaag caagggatac 180  
 gccgacagcg tgaagggcgg atttacaata tctagggaca acgcaaaaaa ctctctctac 240  
 ctcaaatga actctcttag ggcagaagac acagcattgt attattgcgc aaaatacggc 300  
 agtggttatg gcaagtttta ttattatgga ctggacgtgt ggggacaagg gacaacagtg 360  
 acagtgagta gc 372

<210> 58  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成  
 <400> 58

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
 20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Lys Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp  
 100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 59  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

[0016]

<220>  
 <223> 合成

<400> 59  
 gggtttacat tcgacgatta cagc 24

<210> 60  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 60

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ser  
 1 5

<210> 61  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 61  
 atatcatgga actcaggaag caag 24

<210> 62  
 <211> 8  
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 62

Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Lys  
1 5

<210> 63

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 63

gcaaaatacg gcagtggtta tggcaagttt tattattatg gactggacgt g 51

<210> 64

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 64

Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp  
1 5 10 15

[0017]

Val

<210> 65

<211> 372

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 65

gaagtacagc ttgtagaatc cggcggagga ctggtacaac ctggaagaag tcttagactg 60

agttgcgcag ctagtggtt tacattcgac gattacagca tgcattgggt gaggcaagct 120

cctgtaaag gattggaatg ggttagcggg atatcatgga actcaggaag caagggatac 180

gccgacagcg tgaaggccg attacaata tctagggaca acgcaaaaaa ctctctctac 240

ctcaaatga actctcttag ggcagaagac acagcattgt attattgcgc aaaatacggc 300

agtgttatg gcaagttta tcattatgga atggacgtgt ggggacaagg gacaacagtg 360

acagtgagta gc 372

<210> 66

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 66  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
 20 25 30  
 Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Lys Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr His Tyr Gly Met Asp  
 100 105 110  
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

[0018]

<210> 67  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成  
 <400> 67  
 gggtttacat tcgacgatta cagc 24

<210> 68  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成  
 <400> 68

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ser  
 1 5

<210> 69  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成  
 <400> 69  
 atatcatgga actcaggaag caag 24

<210> 70

<211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 70

Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Lys  
 1 5

<210> 71  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 71  
 gcaaaatagc gcagtggtta tggcaagttt tatcattatg gaatggacgt g 51

<210> 72  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 72

[0019]

Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr His Tyr Gly Met Asp  
 1 5 10 15

Val

<210> 73  
 <211> 372  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 73  
 gaagtacagc ttgtagaatc cggcggagga ctggtacaac ctggaagaag tcttagactg 60  
 agttgcgcag ctagtggtt tacatcgac gattacagca tgcattgggt gaggcaagct 120  
 cctgtaaag gattggaatg ggttagcggg atatcatgga actcaggaag catcggatac 180  
 gccgacagcg tgaaggccg attfacaata tctagggaca acgcaaaaaa ctctctctac 240  
 ctcaaatga actctcttag ggcagaagac acagcattgt attattgcgc aaaagacggc 300  
 agtggttatg gcaagtttta tcattatgga ctggacgtgt ggggacaagg gacaacagtg 360  
 acagtgagta gc 372

<210> 74  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>



<210> 78  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 78

Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile  
 1 5

<210> 79  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 79  
 gcaaaagacg gcagtggta tggcaagttt tatcattatg gactggacgt g 51

<210> 80  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 80

[0021]

Ala Lys Asp Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr His Tyr Gly Leu Asp  
 1 5 10 15

Val

<210> 81  
 <211> 372  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 81  
 gaagtacagc ttgtagaatc cggcggagga ctggtacaac ctggaagaag tcttagactg 60  
 agttgcgcag ctagtgggtt tacattcgac gattacagca tgcattgggt gaggcaagct 120  
 cctggtaaag gattggaatg ggttagcggg atatcatgga actcaggaag catcggatac 180  
 gccgacagcg tgaaggccg attacaata tctagggaca acgcaaaaaa ctctctctac 240  
 ctcaaatga actctcttag ggcagaagac acagcattgt attattgcgc aaaatacggc 300  
 agtgggtatg gcaagtttta ttattatgga ctggacgtgt ggggacaagg gacaacagtg 360  
 acagtgagta gc 372

<210> 82  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列



atatcatgga actcaggaag catc 24  
  
 <210> 86  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成  
  
 <400> 86  
  
 Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile  
 1 5  
  
 <210> 87  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成  
  
 <400> 87  
 gcaaaatagc gcagtggtta tggcaagttt tattattatg gactggacgt g 51  
  
 <210> 88  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成  
 [0023]  
 <400> 88  
  
 Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp  
 1 5 10 15  
  
 Val  
  
 <210> 89  
 <211> 372  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成  
  
 <400> 89  
 gaagtacagc ttgtagaatc cggcggagga ctggtacaac ctggaagaag tcttagactg 60  
 agttgctcag ctagtggtt tacatcgcac gattacagca tgcattggtt gaggcaagct 120  
 cctgtaaag gattggaatg ggttagcggg atatcatgga actcaggaag catcggatac 180  
 gccgacagcg tgaaggccg atttacaata tctagggaca acgcaaaaaa ctctctctac 240  
 ctcaaatga actctcttag gccagaagac acagcattgt attattcgcg aaaatacggc 300  
 agtggttatg gcaagtttta tcattatgga atggacgtgt ggggacaagg gacaacagtg 360  
 acagtgagta gc 372  
  
 <210> 90  
 <211> 124



<400> 93  
 atatcatgga actcaggaag catc 24

<210> 94  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 94

Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile  
 1 5

<210> 95  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 95  
 gcaaaatcgc gcagtggtta tggcaagttt tatcattatg gaatggacgt g 51

<210> 96  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

[0025]

<220>  
 <223> 合成

<400> 96

Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr His Tyr Gly Met Asp  
 1 5 10 15

Val

<210> 97  
 <211> 372  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 97  
 gaagtacagc ttgtagaatc cggcggagga ctggtacaac ctggaagaag tcttagactg 60  
 agttcgcag ctagtgggtt tacattcgac gattacagca tgcattgggt gaggcaagct 120  
 cctggtaaag gattggaatg ggttagcggg atatcatgga actcaggaag caagggatac 180  
 gccgacagcg tgaaggccg attfacaata tctagggaca acgcaaaaaa ctctctctac 240  
 ctcaaatga actctcttag ggcagaagac acagcattgt attattgcgc aaaagacggc 300  
 agtggftatg gcaagtttta ttattatgga ctggacgtgt ggggacaagg gacaacagtg 360  
 acagtgagta gc 372



<220>  
 <223> 合成  
  
 <400> 101  
 atatcatgga actcaggaag caag 24  
  
 <210> 102  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成  
  
 <400> 102  
  
 Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Lys  
 1 5  
  
 <210> 103  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成  
  
 <400> 103  
 gcaaaagacg gcagtggtta tggcaagttt tattattatg gactggacgt g 51  
  
 <210> 104  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成  
  
 <400> 104  
  
 Ala Lys Asp Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp  
 1 5 10 15  
  
 Val  
  
 <210> 105  
 <211> 372  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成  
  
 <400> 105  
 gaagtacagc ttgtagaatc cggcggagga ctggtacaac ctggaagaag tcttagactg 60  
 agttgctcag ctagtgggtt tacattcgac gattacagca tgcattgggt gaggcaagct 120  
 cctggtaaag gattggaatg ggtagcggg atatcatgga actcaggaag caagggatac 180  
 gccgacagcg tgaagggccg attacaata tctagggaca acgcaaaaaa ctctctctac 240  
 ctcaaatga actctcttag ggcagaagac acagcattgt attattgcgc aaaagacggc 300  
 agtggttatg gcaagtttta tcattatgga atggactgt ggggacaagg gacaacagtg 360  
 acagtgagta gc 372

[0027]



<213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成  
 <400> 109  
 atatcatgga actcaggaag caag 24

<210> 110  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 110

Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Lys  
 1 5

<210> 111  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 111  
 gcaaaagacg gcagtggtta tggcaagttt tatcattatg gaatggacgt g 51

[0029]

<210> 112  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 112

Ala Lys Asp Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr His Tyr Gly Met Asp  
 1 5 10 15

Val

<210> 113  
 <211> 372  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 113  
 gaagtacagc ttgtagaatc cggcggagga ctggtacaac ctggaagaag tcttagactg 60  
 agttgctcag ctagtgggtt tacattcgac gattacagca tgcattgggt gaggaagct 120  
 cctggtaaag gattggaatg ggtagcggg atatcatgga actcaggaag caagggatac 180  
 gccgacagcg tgaaggccg attacaata tctagggaca acgcaaaaaa ctctctctac 240  
 ctcaaatga actctcttag gccagaagac acagcattgt attattgctc aaaatacggc 300  
 agtggttatg gcaagtttta ttattatgga atggacgtgt ggggacaagg gacaacactg 360

acagtgagta gc 372

<210> 114  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 114

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
 20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Lys Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

[0030]

Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp  
 100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 115  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 115  
 gggtttacat tcgacgatta cagc 24

<210> 116  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 116

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ser  
 1 5

<210> 117

<211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 117  
 atatcatgga actcaggaag caag 24

<210> 118  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 118

Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Lys  
 1 5

<210> 119  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 119  
 gcaaaatacg gcagtggta tggcaagttt tattattatg gaatggacgt g 51

[0031]

<210> 120  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 120

Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp  
 1 5 10 15

Val

<210> 121  
 <211> 372  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 121  
 gaagtacagc ttgtagaatc cggcggagga ctggtacaac ctggaagaag tcttagactg 60  
 agttgctcag ctagtgggtt tacattcgac gattacagca tgcattgggt gaggcaagct 120  
 cctggtaaag gattggaatg ggtagcggg atatcatgga actcaggaag catcggatac 180  
 gccgacagcg tgaaaggccg atttacaata tctagggaca acgcaaaaaa ctctctctac 240  
 ctcaaatga actctcttag gccagaagac acagcattgt attattgctc aaaagacggc 300

agtggttatg gcaagtttta ttattatgga ctggacgtgt ggggacaagg gacaacagtg 360

acagtgagta gc 372

<210> 122  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 122

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
 20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

[0032] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Lys Asp Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp  
 100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 123  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 123  
 gggtttacat tcgacgatta cagc 24

<210> 124  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 124

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ser  
 1 5

	<210> 125	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 125	
	atatcatgga actcaggaag catc	24
	<210> 126	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 126	
	Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile	
	1            5	
	<210> 127	
	<211> 51	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
[0033]	<400> 127	
	gcaaaagacg gcagtggta tggcaagttt tattattatg gactggacgt g	51
	<210> 128	
	<211> 17	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 128	
	Ala Lys Asp Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp	
	1            5            10            15	
	Val	
	<210> 129	
	<211> 372	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 129	
	gaagtacagc ttgtagaatc cggcggagga ctggtacaac ctggaagaag tcttagactg	60
	agttgcgcag ctagtgggtt tacattcgac gattacagca tgcatgggt gaggcaagct	120
	cctggtaaag gattggaatg ggttagcggg atatcatgga actcaggaag catcggatac	180
	gccgacagcg tgaaggccg atttacaata tctagggaca acgcaaaaaa ctctctctac	240

ctfcaaatga actctcttag ggcagaagac acagcattgt attattgcgc aaaagacggc 300

agtgggtatg gcaagtttta tcattatgga atggacgtgt ggggacaagg gacaacagtg 360

acagtgagta gc 372

<210> 130  
<211> 124  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成

<400> 130

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

[0034]

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

Ala Lys Asp Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr His Tyr Gly Met Asp  
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 131  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成

<400> 131  
gggtttacat tcgacgatta cagc 24

<210> 132  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成

<400> 132

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ser

1 5

<210> 133  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 133  
 atatcatgga actcaggaag cate 24

<210> 134  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 134  
 Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile  
 1 5

<210> 135  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

[0035]  
 <400> 135  
 gcaaaagacg gcagtggtta tggcaagttt tatcattatg gaatggacgt g 51

<210> 136  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 136  
 Ala Lys Asp Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr His Tyr Gly Met Asp  
 1 5 10 15

Val

<210> 137  
 <211> 372  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 137  
 gaagtacagc ttgtagaatc cggcggagga ctggtacaac ctggaagaag tcttagactg 60  
 agttgcgcag ctagtgggtt tacattcgac gattacagca tgcattgggt gaggcaagct 120  
 cctggtaaag gattggaatg ggftagcggg atatcatgga actcaggaag catcggatac 180

gccgacagcg tgaaggccg attacaata tctaggaca acgcaaaaaa ctctcttac 240  
 cticaaatga actccttag ggcaagaac acagcattgt attattgcgc aaaatacggc 300  
 agtggttatg gcaagtttta ttattatgga atggacgtgt ggggacaagg gacaacagtg 360  
 acagtgagta gc 372

<210> 138  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 138

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
 20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

[0036]

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

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

Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp  
 100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 139  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 139  
 gggtttacat tcgacgatta cage 24

<210> 140  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 140

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ser  
1 5

<210> 141  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成

<400> 141  
atatcatgga actcaggaag catc 24

<210> 142  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成

<400> 142  
Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile  
1 5

<210> 143  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> 人工序列

[0037]

<220>  
<223> 合成

<400> 143  
gcaaaatacg gcagtggtta tggcaagttt tattattatg gaatggacgt g 51

<210> 144  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成

<400> 144  
Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp  
1 5 10 15

Val

<210> 145  
<211> 372  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成

<400> 145  
gaagtacagc ttgtagaatc cggcggagga ctggtacaac ctggaagaag tcttagactg 60

agttgcgcag ctagtgggtt tacattcgac gattacagca tgcattgggt gaggcaagct 120

cctggtaaag gattggaatg ggtagcggg atatcatgga actcaggaag caagggatac 180  
 gccgacagcg tgaaggccg atttacaata tctagggaca acgcaaaaaa ctctctctac 240  
 ctcaaatga actctcttag gccagaagac acagcattgt attattgcgc aaaagacggc 300  
 agtgggtatg gcaagtttta ttattatgga atggacgtgt ggggacaagg gacaacagtg 360  
 acagtgagta gc 372

<210> 146  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 146

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
 20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Lys Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

[0038]

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

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

Ala Lys Asp Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp  
 100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 147  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 147  
 gggtttacat tcgacgatta cagc 24

<210> 148  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 148

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ser  
1 5

<210> 149

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 149

atatcatgga actcaggaag caag 24

<210> 150

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 150

Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Lys  
1 5

<210> 151

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 151

gcaaaagacg gcagtggtta tggcaagttt tattattatg gaatggacct g 51

<210> 152

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 152

Ala Lys Asp Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp  
1 5 10 15

Val

<210> 153

<211> 372

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 153

gaagtgcagc tggfegaaag cggcggcggc ctggtgcagc cgggccgag cctgcgcctg 60

[0039]

agctgcgagg cgagcggcgt tacctttgcg gattatacca tgcattgggt gcgccaggcg 120  
 ccgggcaaaag gccctggaatg ggtgagcgat attagctgga acagcggcag cattgcgtat 180  
 gcggatagcg tgaaggcccg cttaccatt agccgcgata acgcgaaaaa cagcctgtat 240  
 ctgcagatga acagcctgcg caccgaagat accgcgtttt attattgcbc gaaagatagc 300  
 cgcggctatg gccattataa atatctgggc ctggatgtgt ggggccaggg caccaccgtg 360  
 accgtgagca gc 372

<210> 154  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 154

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala Asp Tyr  
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

[0040] Ser Asp Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Ala Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly His Tyr Lys Tyr Leu Gly Leu Asp  
 100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 155  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 155

ggctttacct ttgcggatta tacc 24

<210> 156  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
<223> 合成

<400> 156

Gly Phe Thr Phe Ala Asp Tyr Thr  
1 5

<210> 157  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成

<400> 157  
attagctgga acagcggcag catt 24

<210> 158  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成

<400> 158  
Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile  
1 5

[0041]

<210> 159  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成

<400> 159  
gcgaaagata gccgcggcta tggccattat aaatatctgg gcctggatgt g 51

<210> 160  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成

<400> 160  
Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly His Tyr Lys Tyr Leu Gly Leu Asp  
1 5 10 15

Val

<210> 161  
<211> 324  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成

<400> 161  
gacatccaga tgaccagtc tccatctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcaactgcc gggcaagtc gagcattagc agctatttaa atggtatca gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaagctct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgta 180  
aggttcagtg gcagtggtac tgggacagat tcaactetca ccatcagcag tctgcaacct 240  
gaagattttg caactacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat cacctcggc 300  
caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 162  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成

<400> 162

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

[0042] Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro  
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 163  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成

<400> 163  
cagagcatta gcagctat 18

<210> 164  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成

<400> 164

	Gln Ser Ile Ser Ser Tyr 1           5	
	<210> 165 <211> 9 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成	
	<400> 165 gctgcatcc	9
	<210> 166 <211> 3 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成	
	<400> 166  Ala Ala Ser 1	
	<210> 167 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列	
[0043]	<220> <223> 合成	
	<400> 167 caacagagtt acagtacccc tcgateacc	30
	<210> 168 <211> 10 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成	
	<400> 168  Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr 1           5           10	
	<210> 169 <211> 124 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成	
	<400> 169  Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg 5           10           15	
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala Asp Tyr 20           25           30	

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Asp Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Ala Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly His Tyr Lys Tyr Leu Gly Leu Asp  
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 170

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

[0044]

<400> 170

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Lys Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr His Tyr Gly Leu Asp  
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120



图1A



图1B

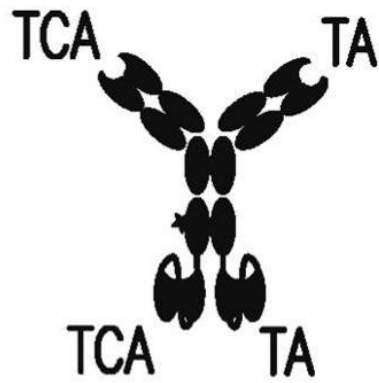


图1C

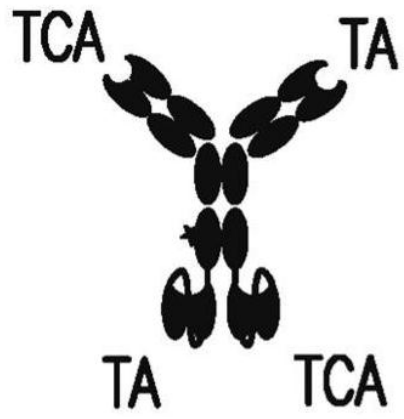


图1D

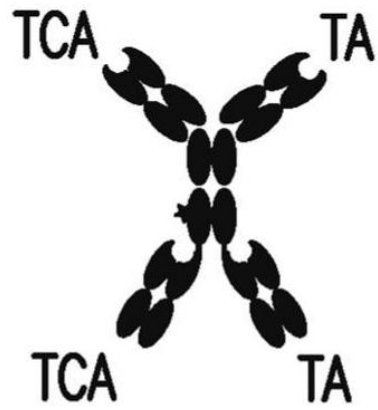


图1E

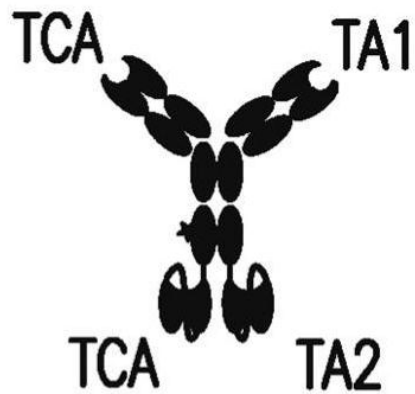


图1F

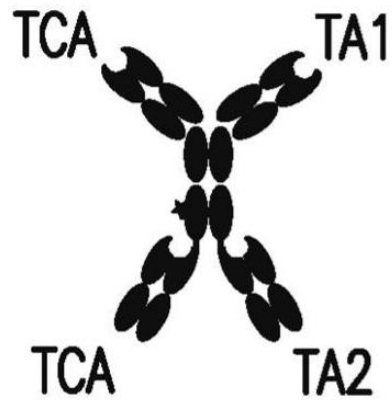


图1G

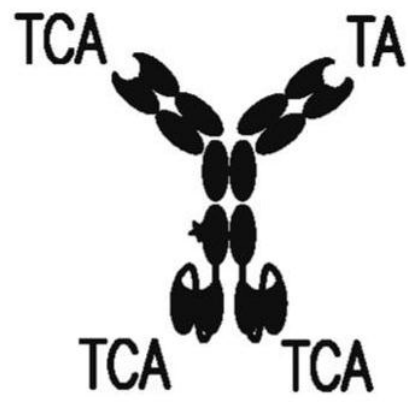


图1H

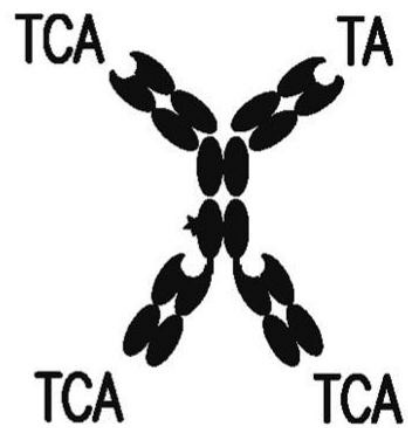


图1I

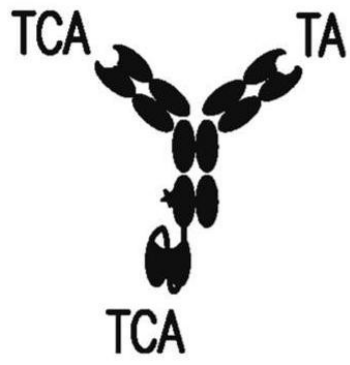


图1J



图1K

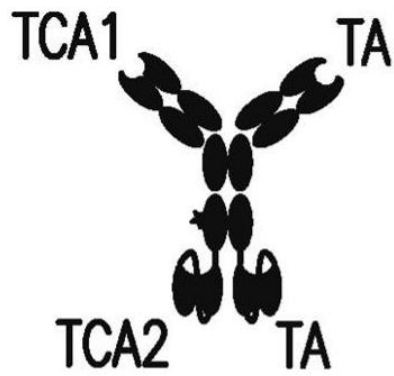


图1L

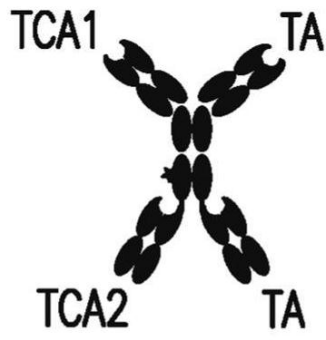


图1M

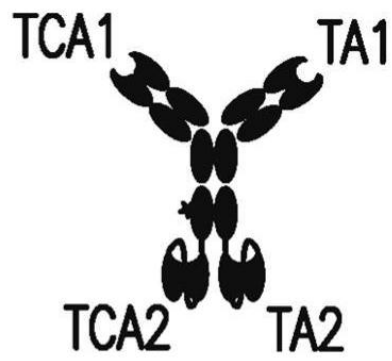


图1N

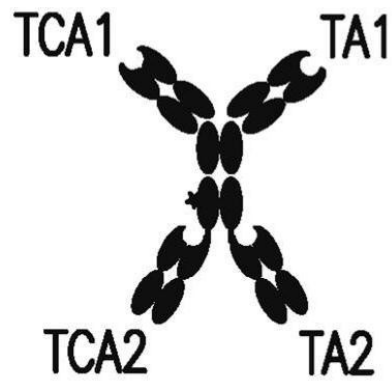


图10

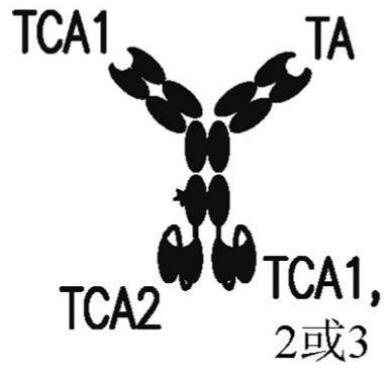


图1P

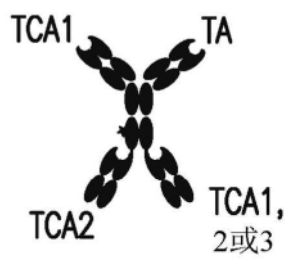


图1Q

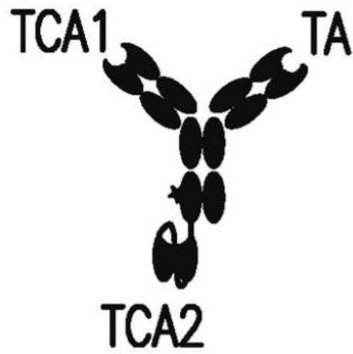


图1R

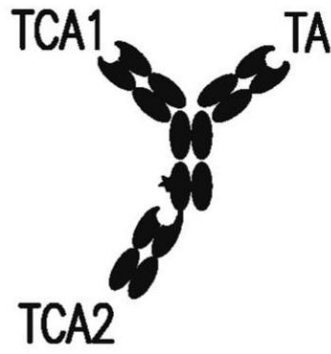


图1S

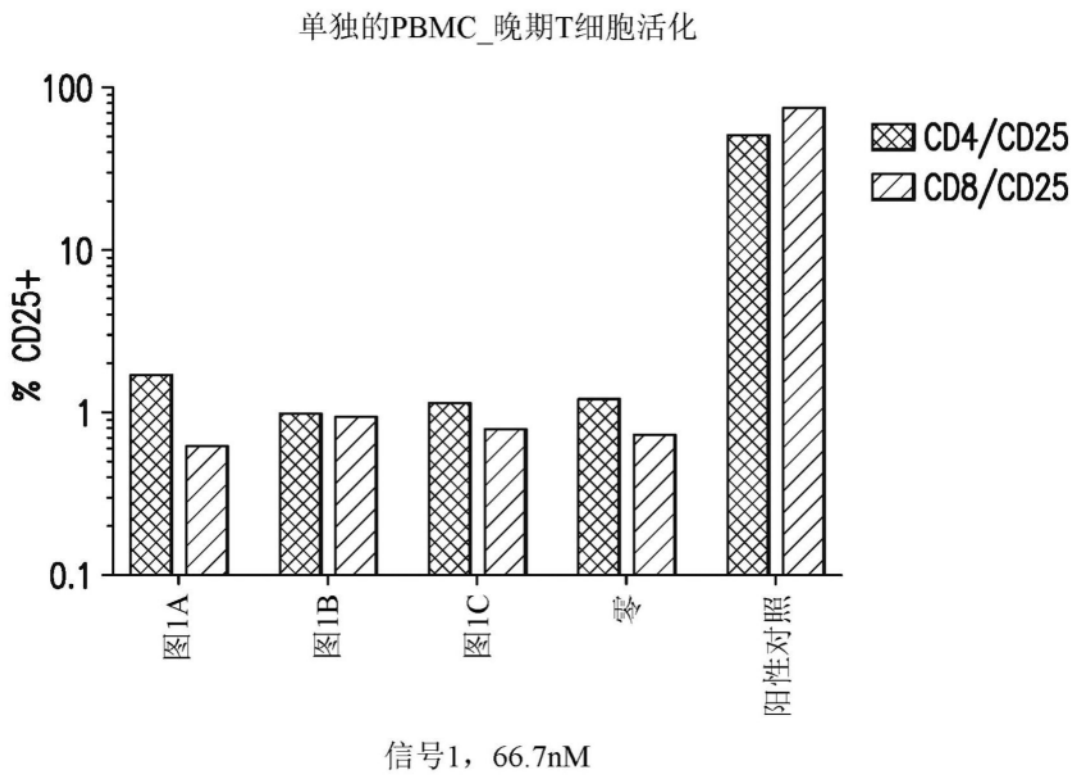


图2

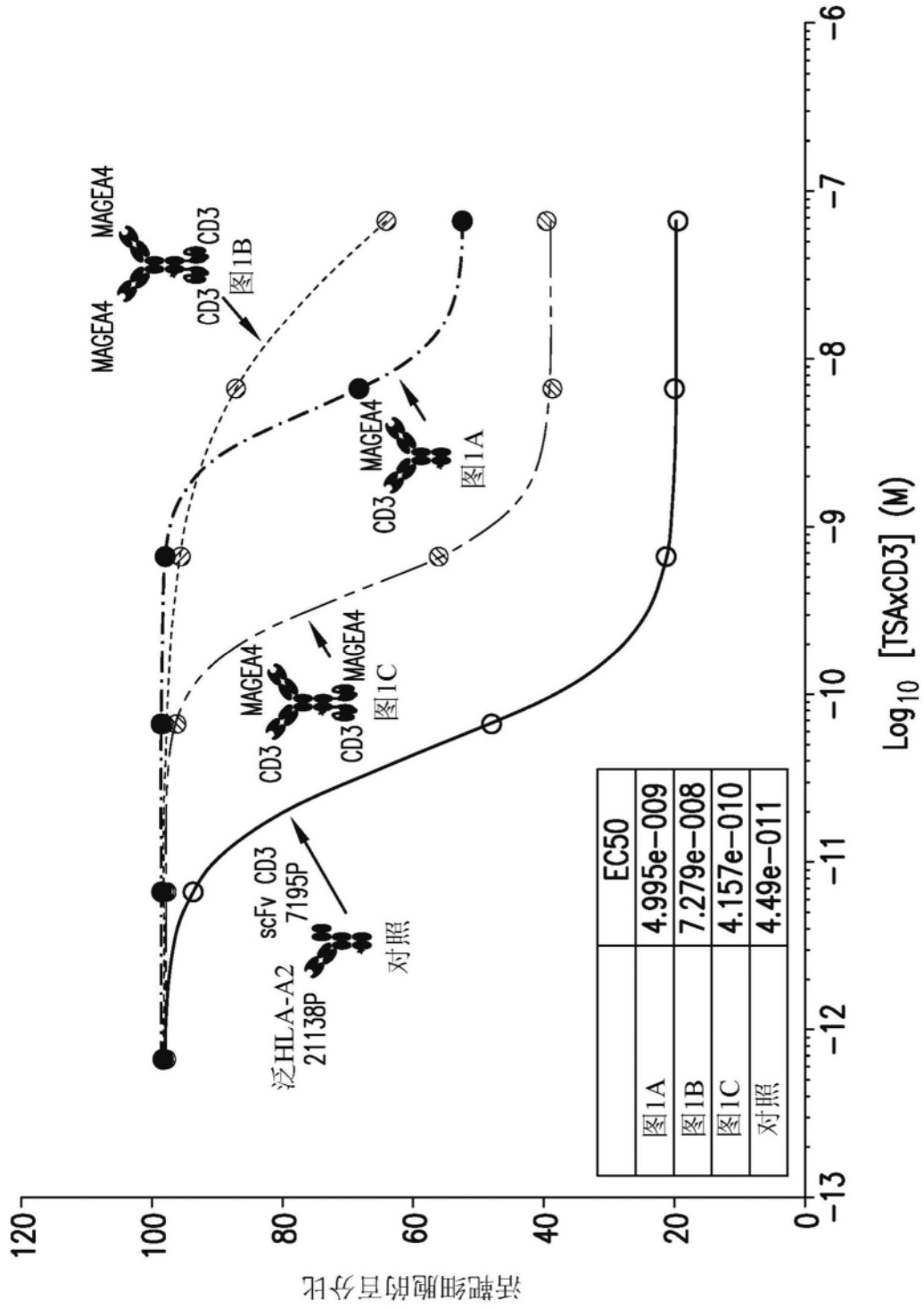


图3

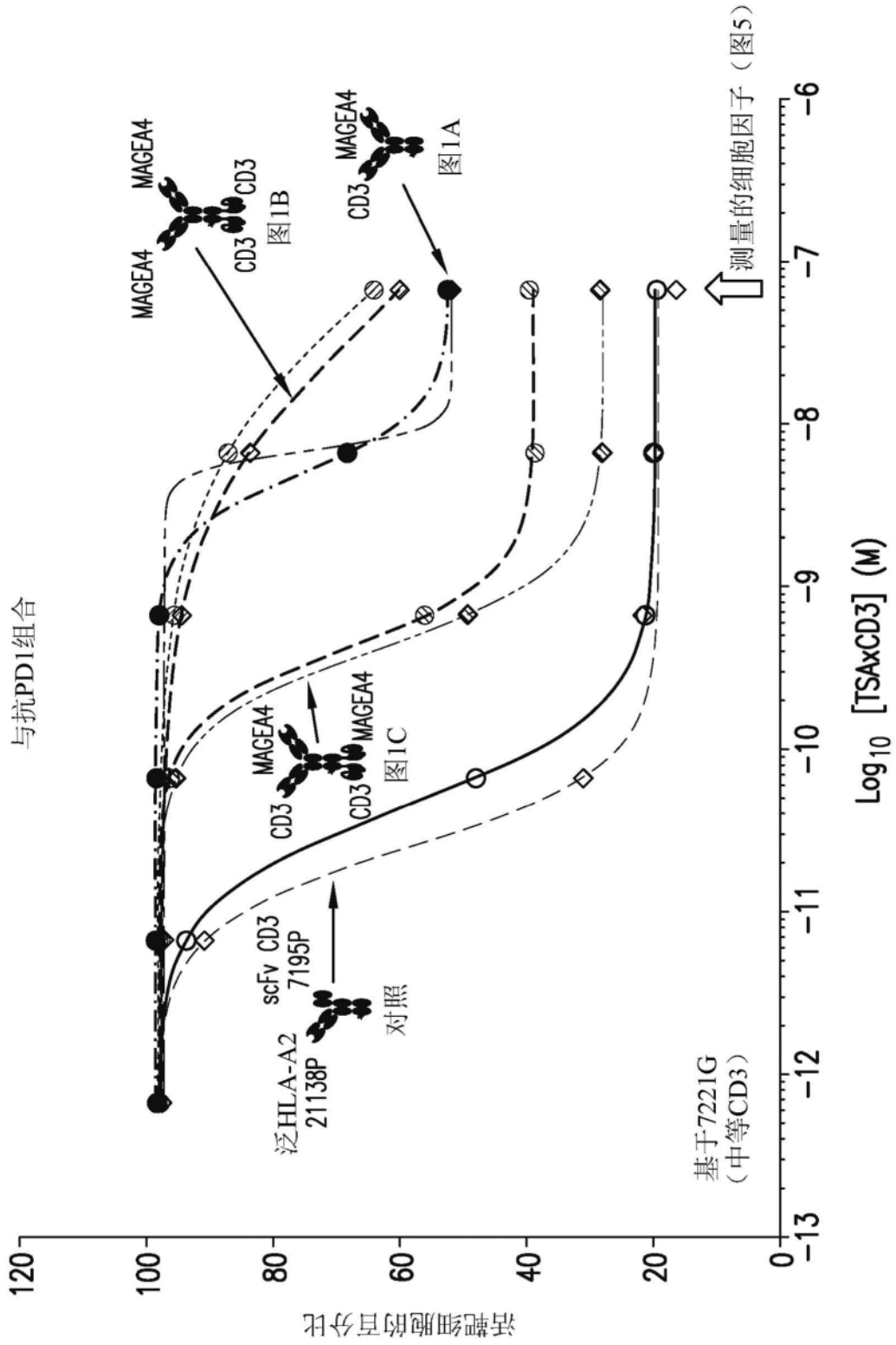


图4A

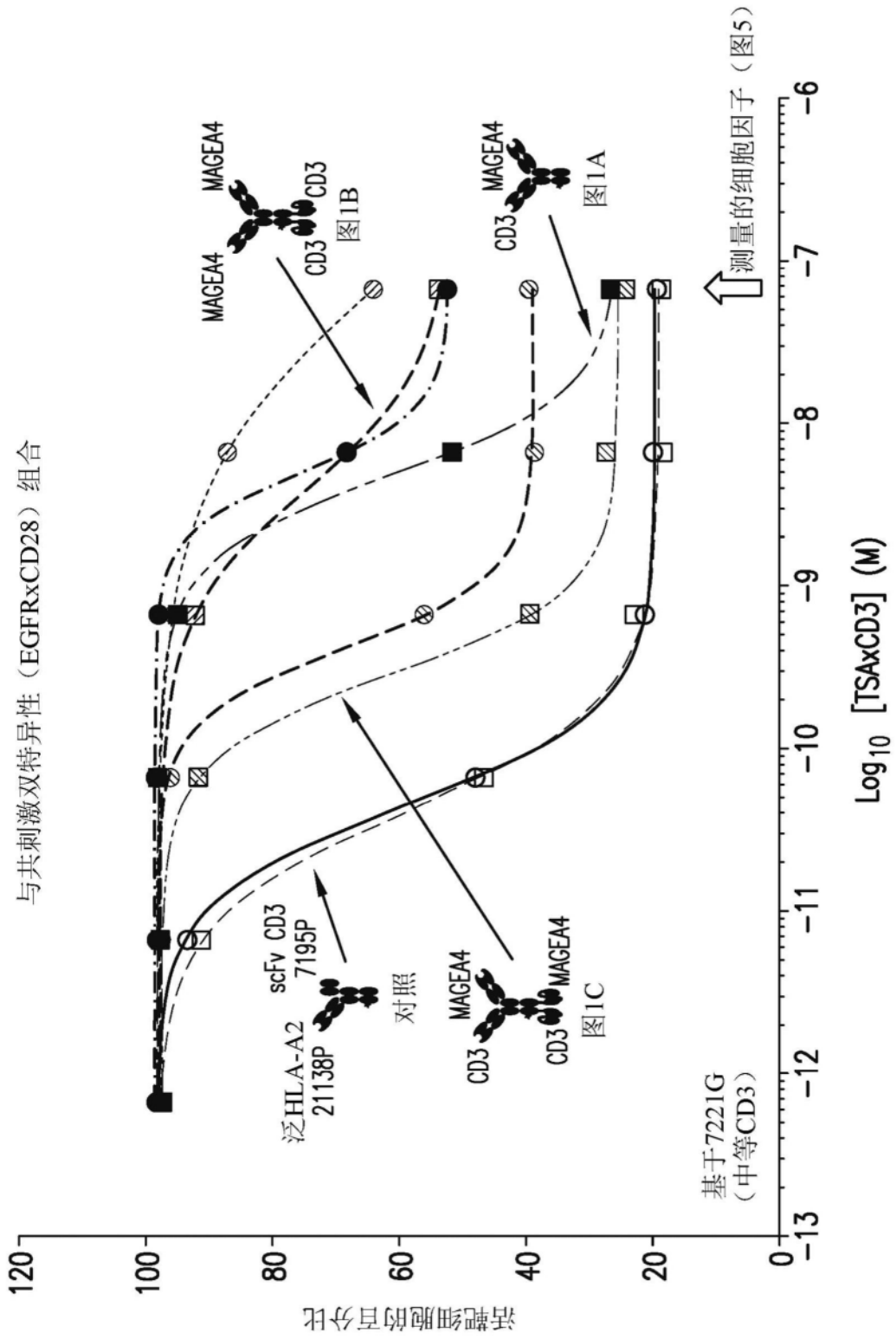


图4B

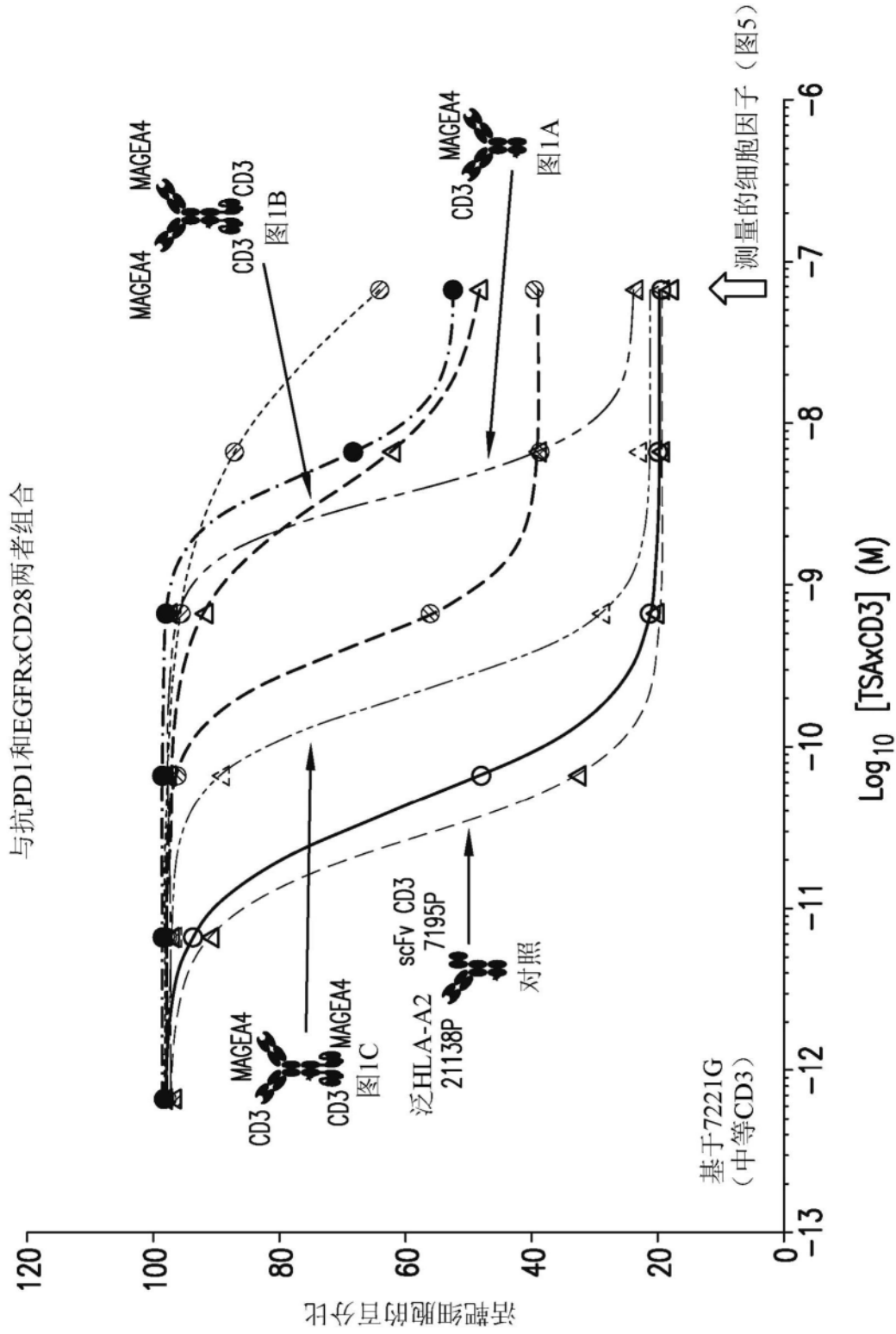


图4C

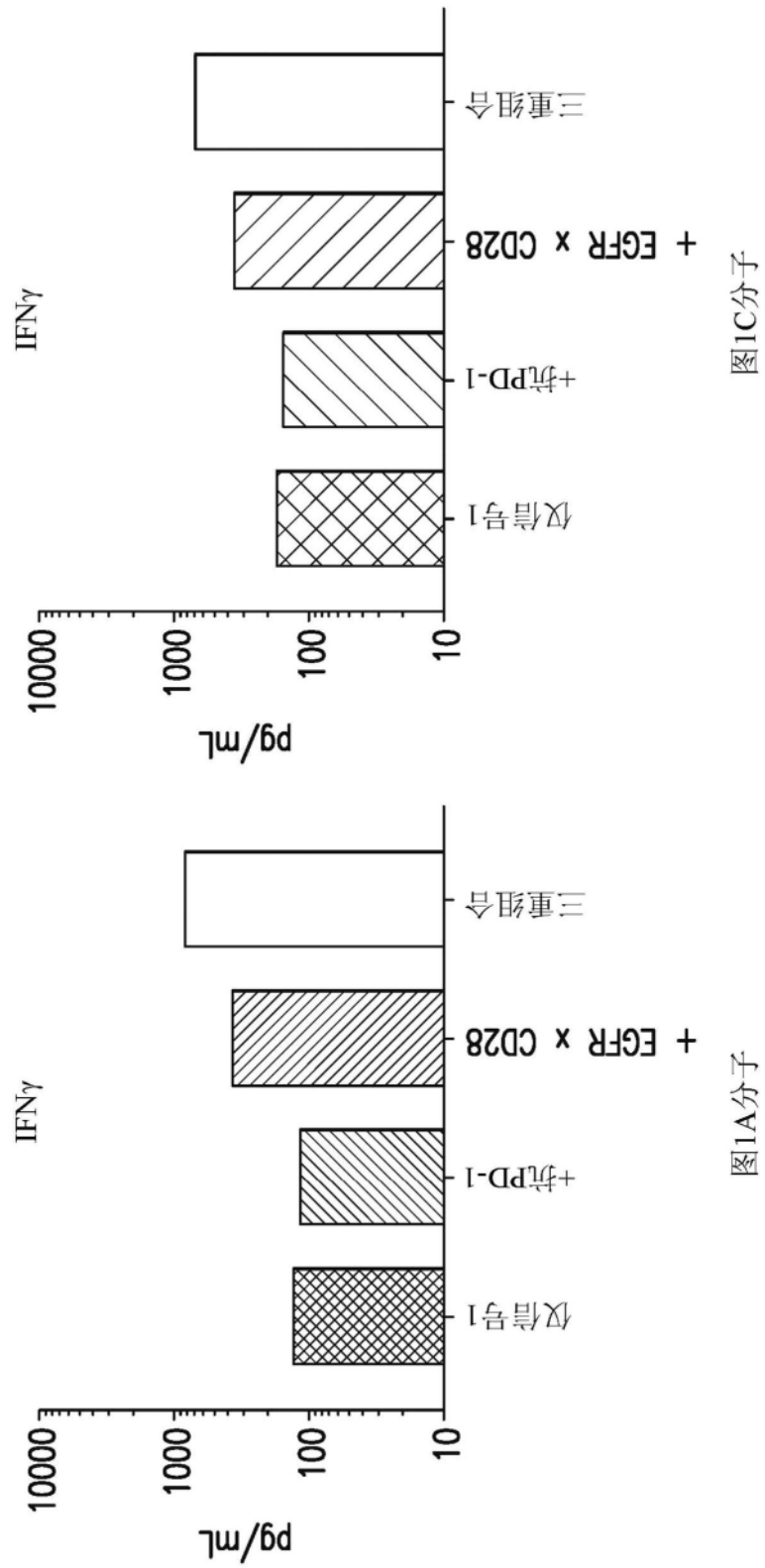


图5

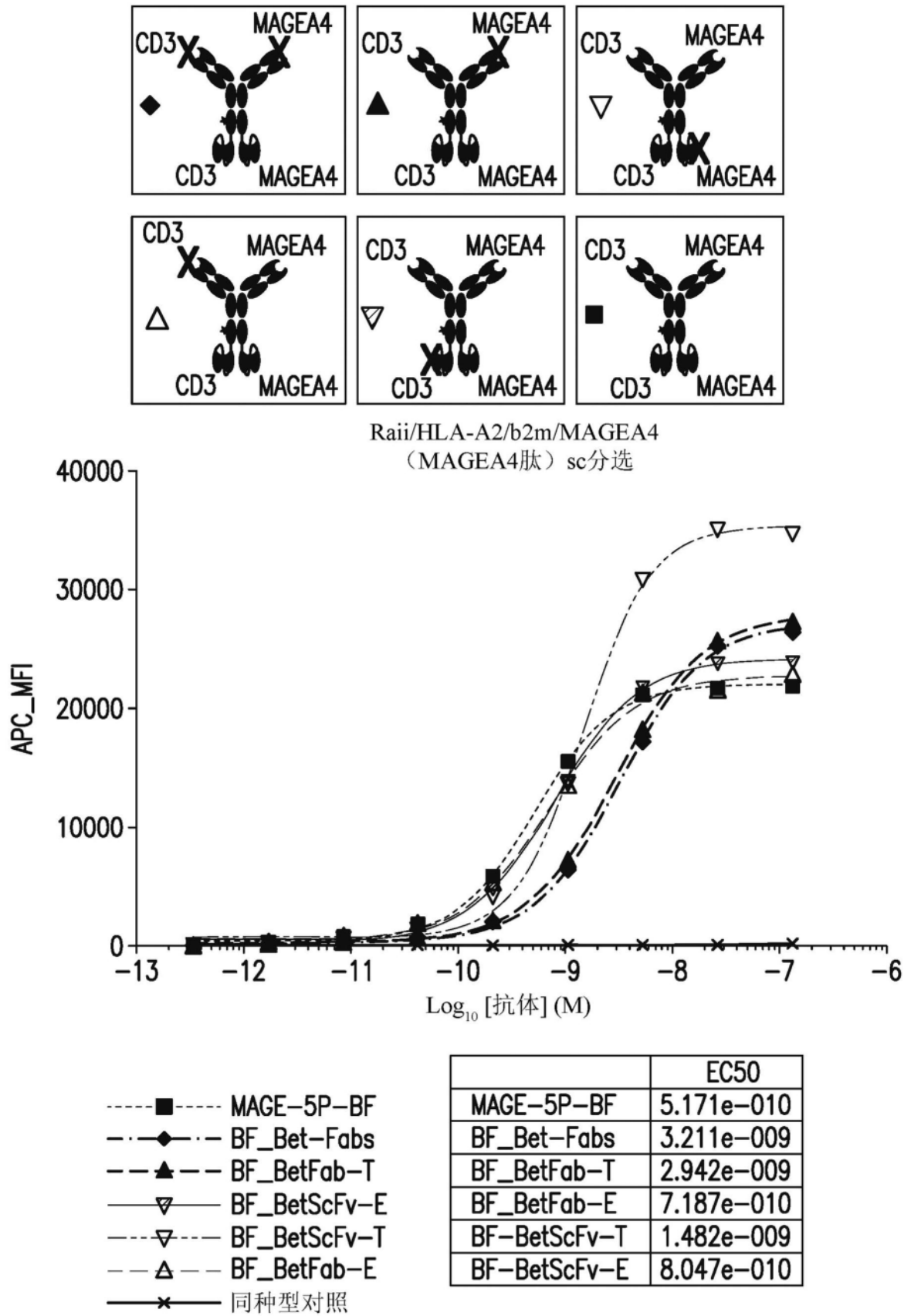


图6A

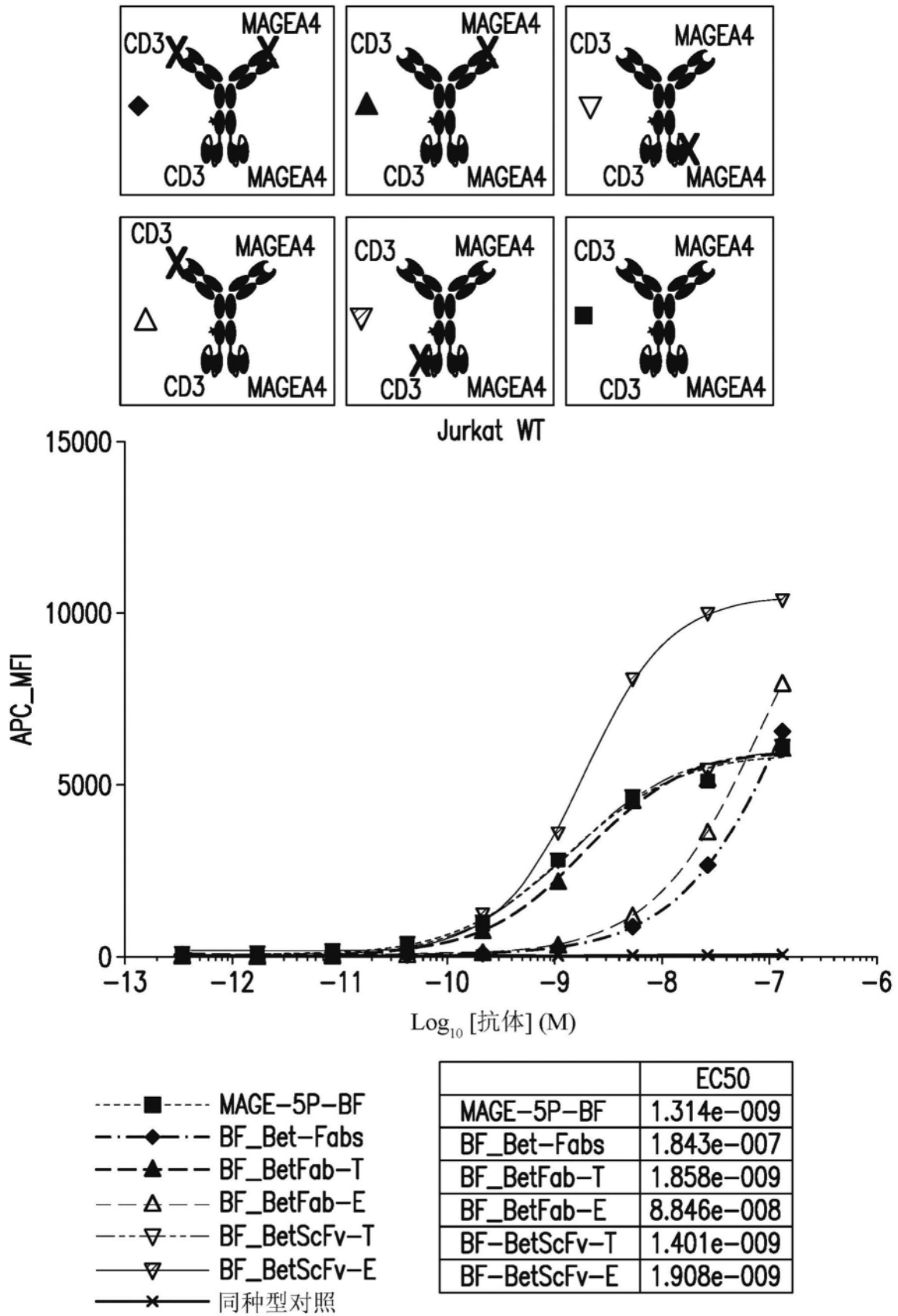


图6B

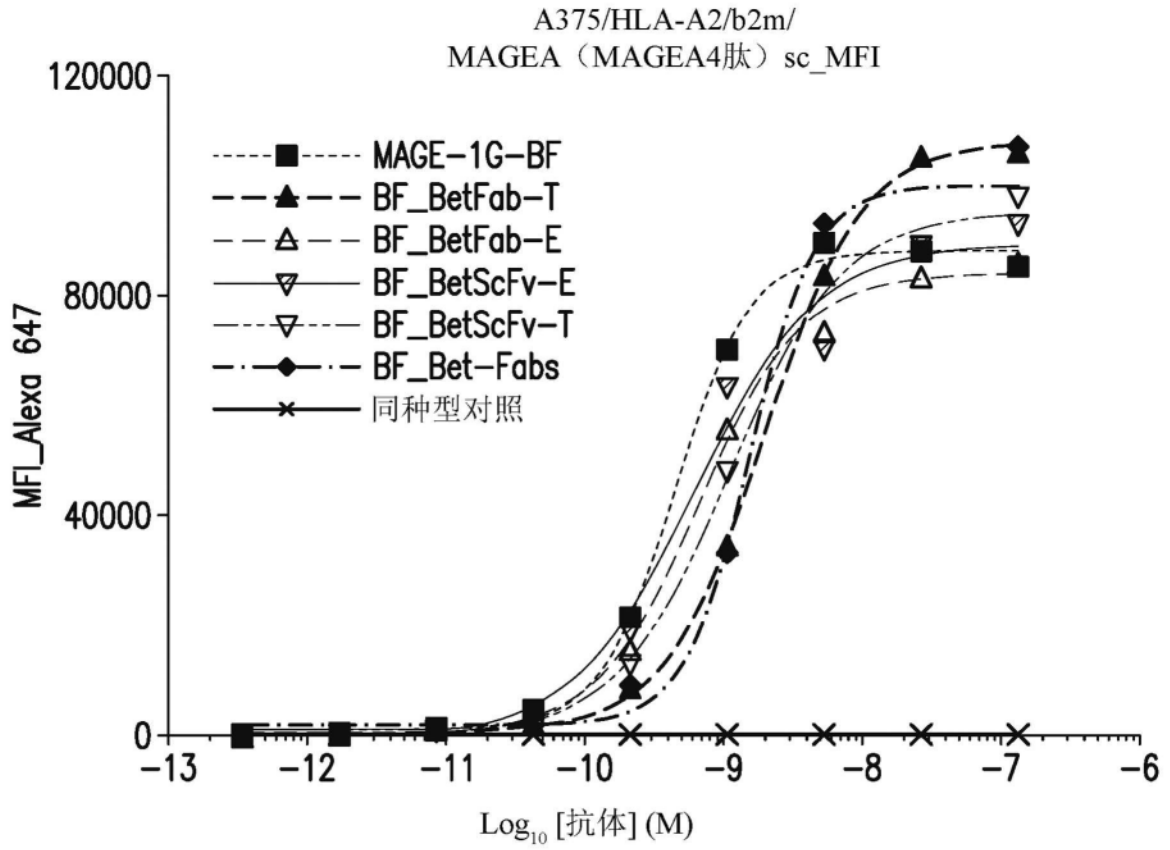
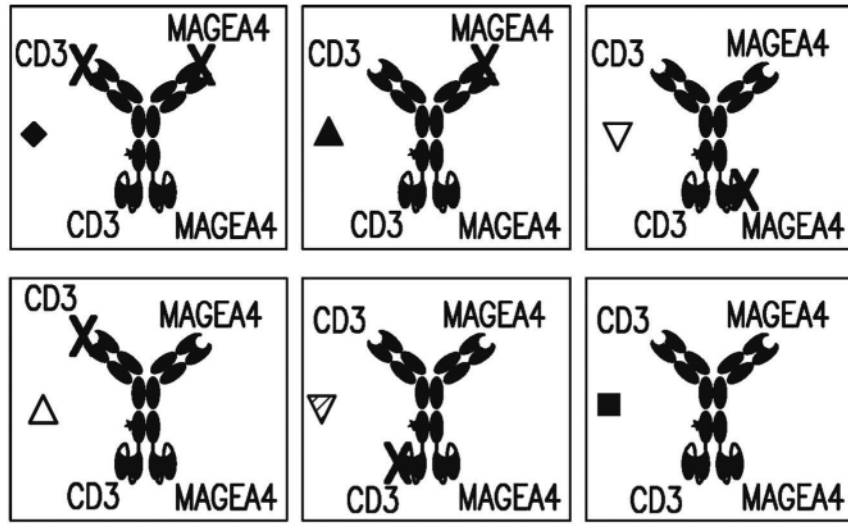


图6C

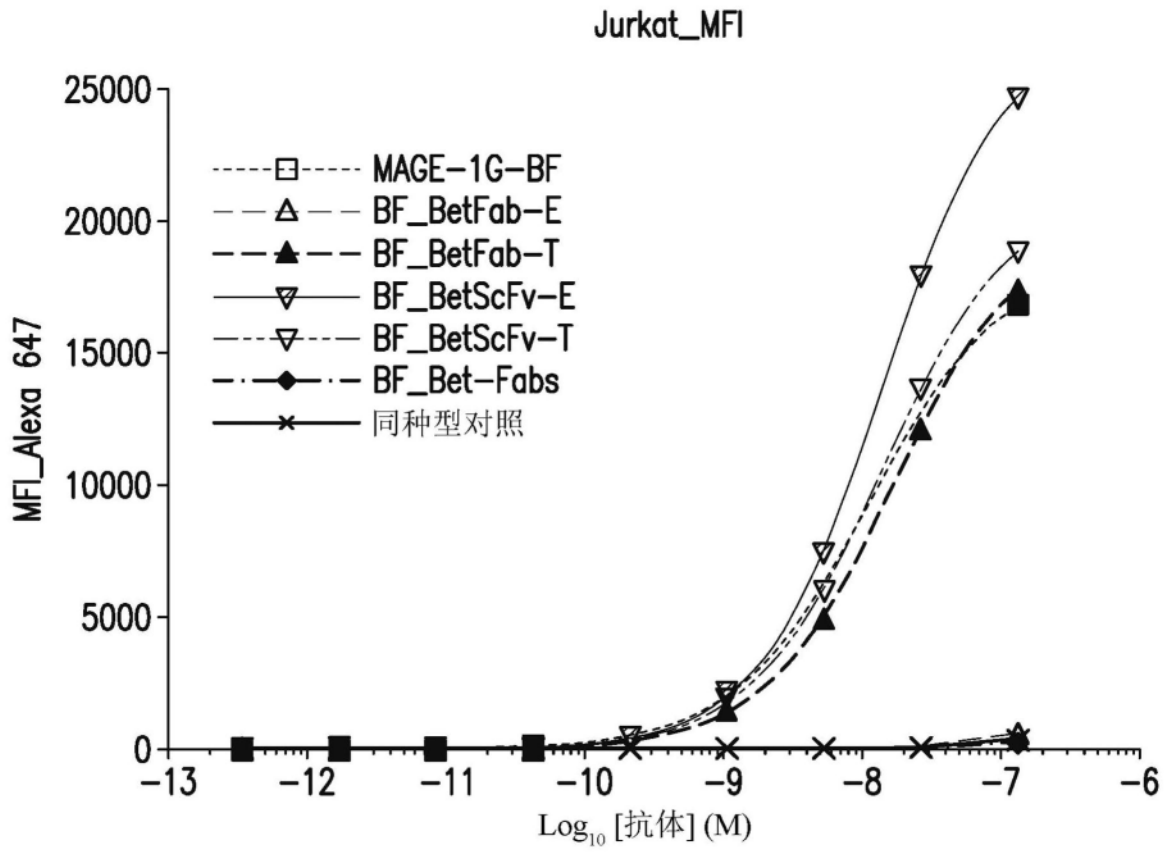
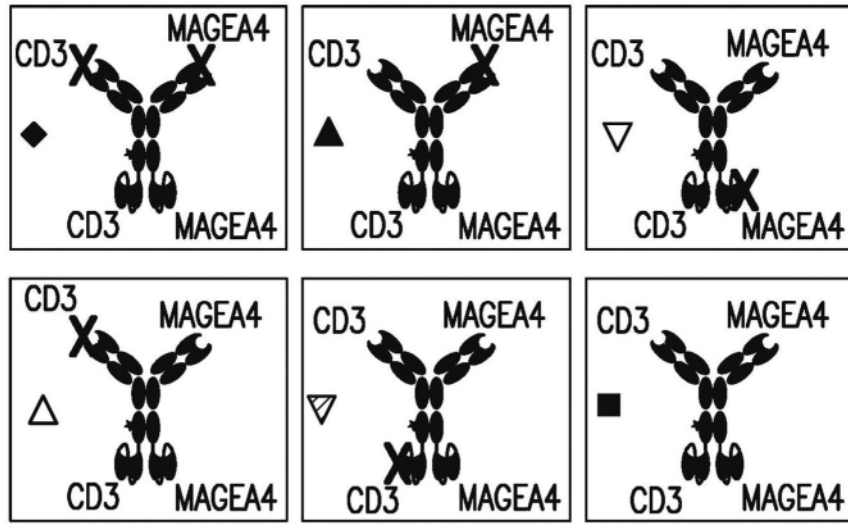


图6D

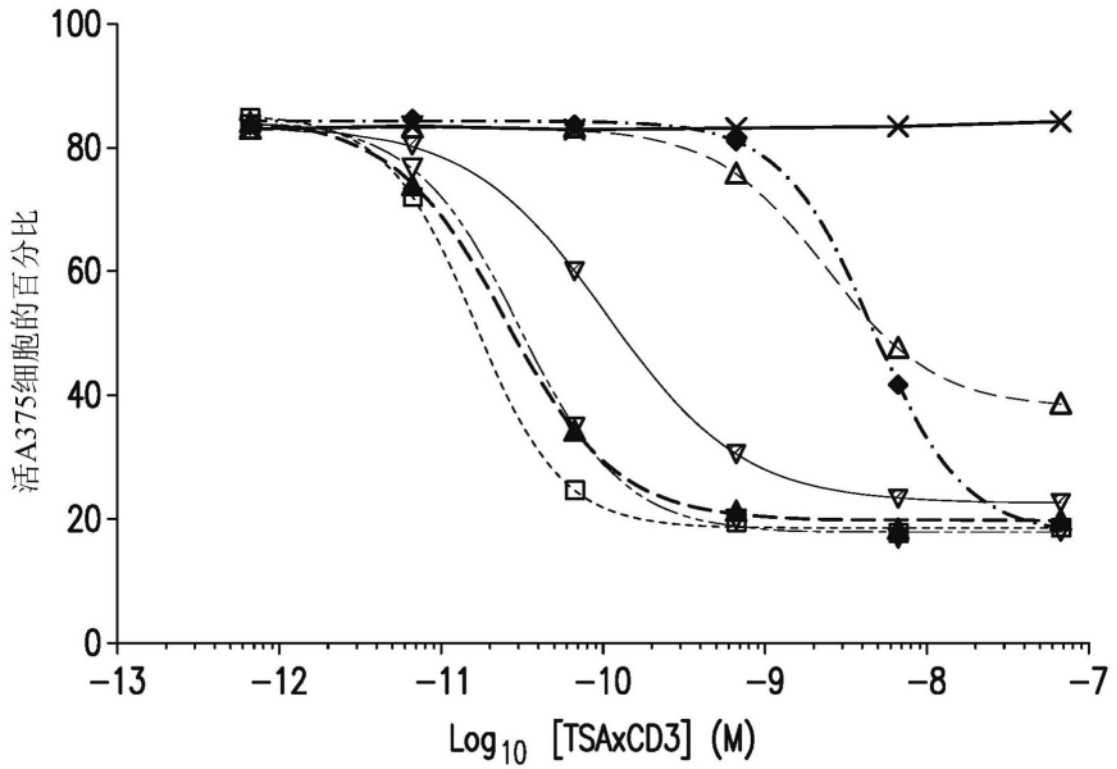
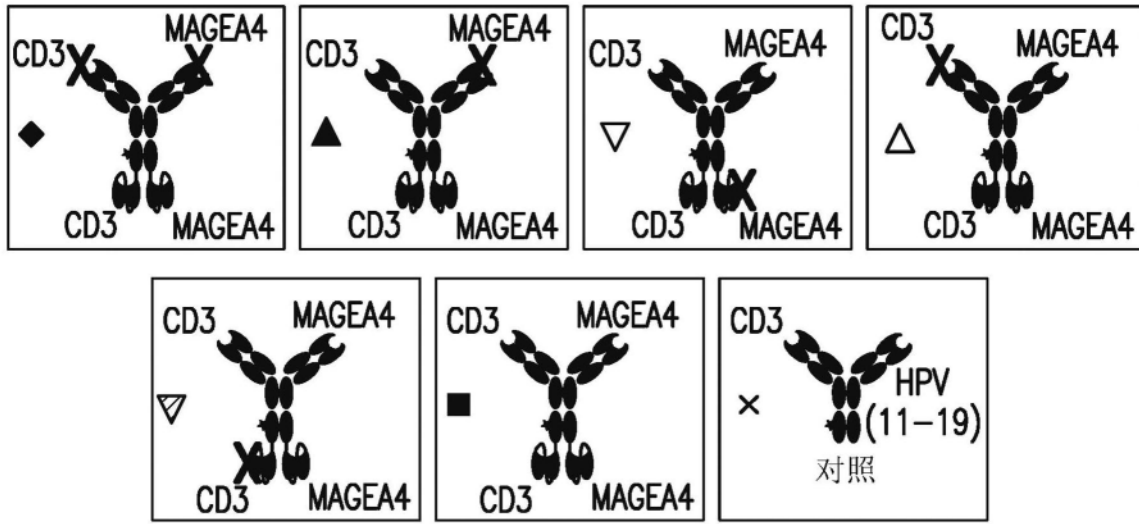


图7A

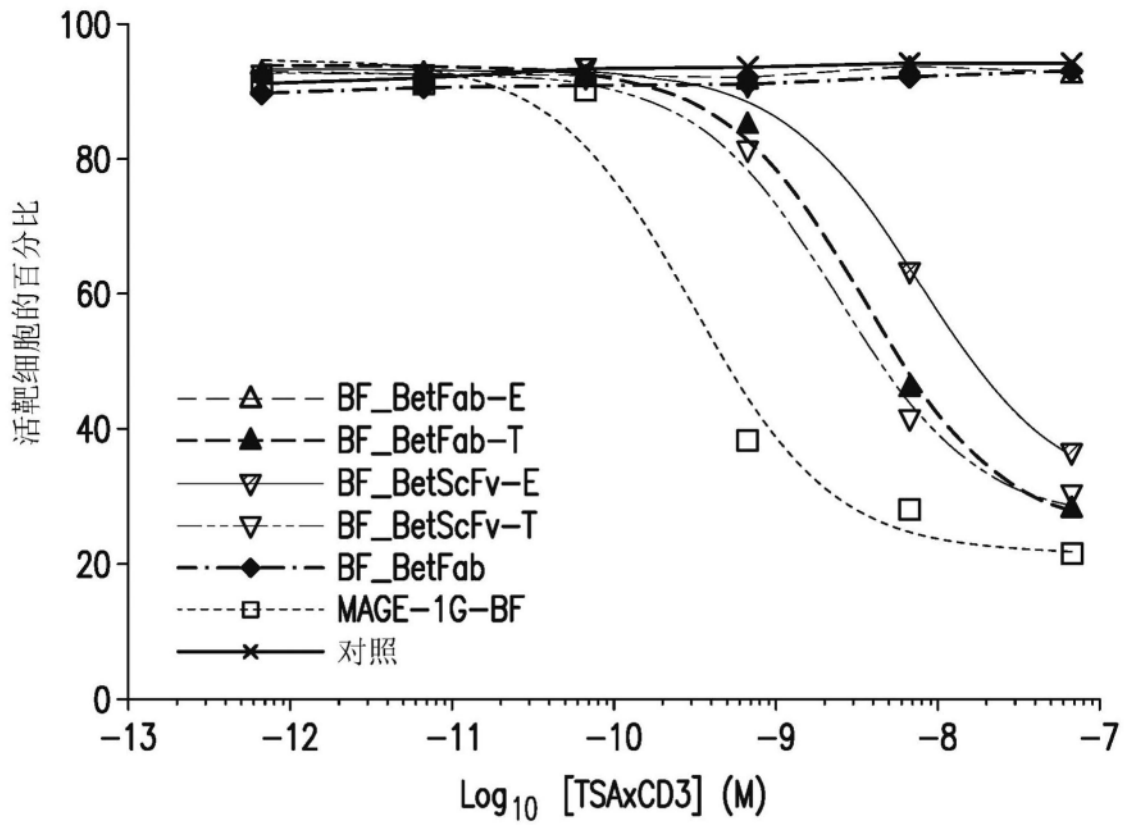
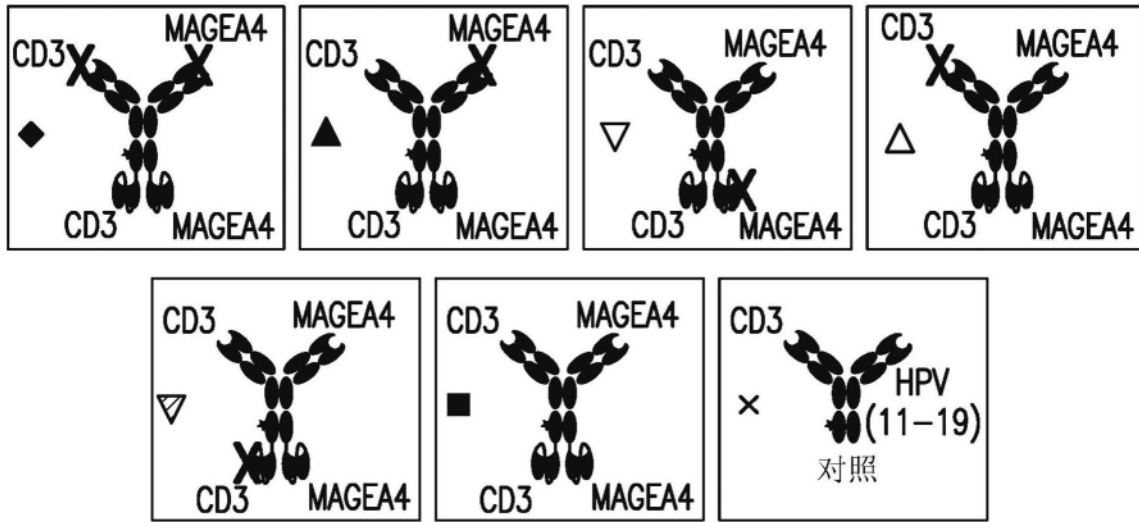
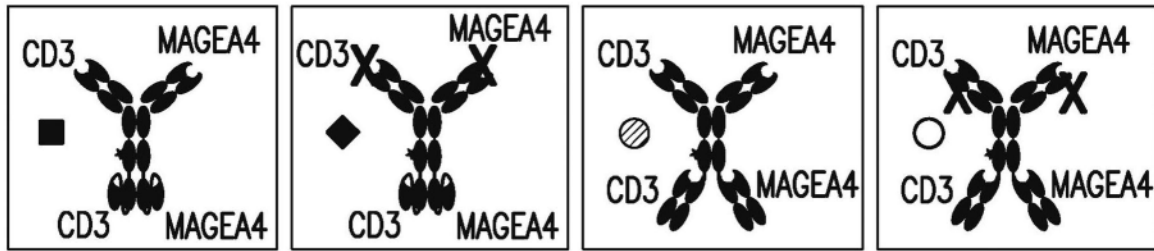
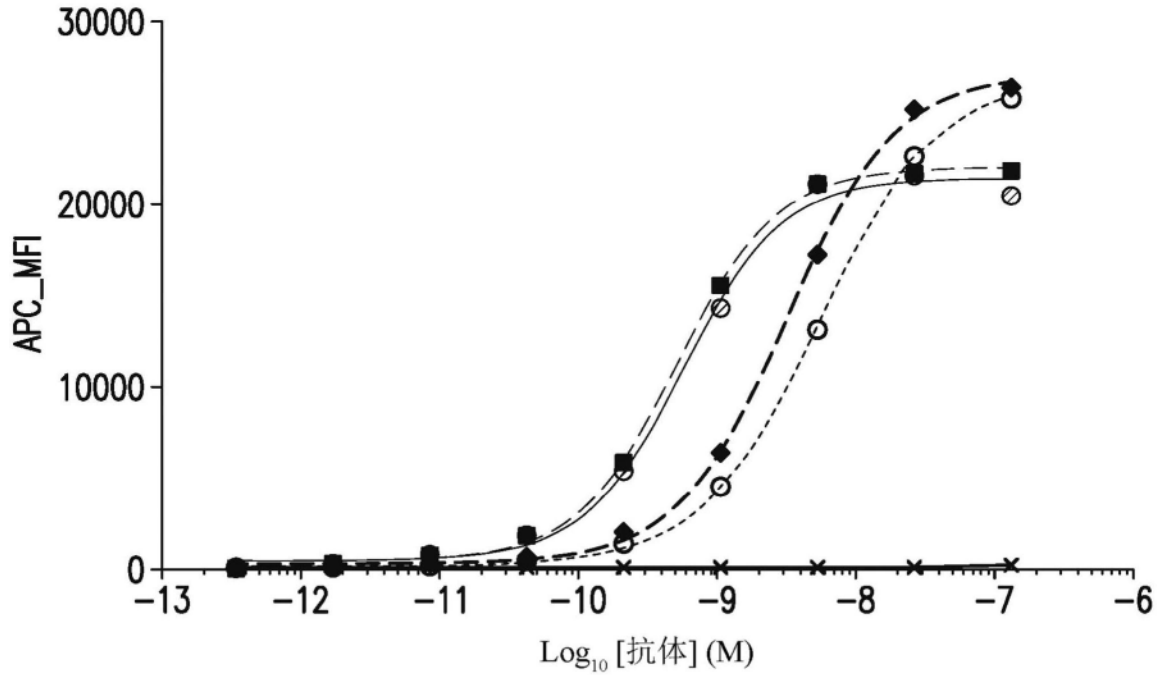


图7B



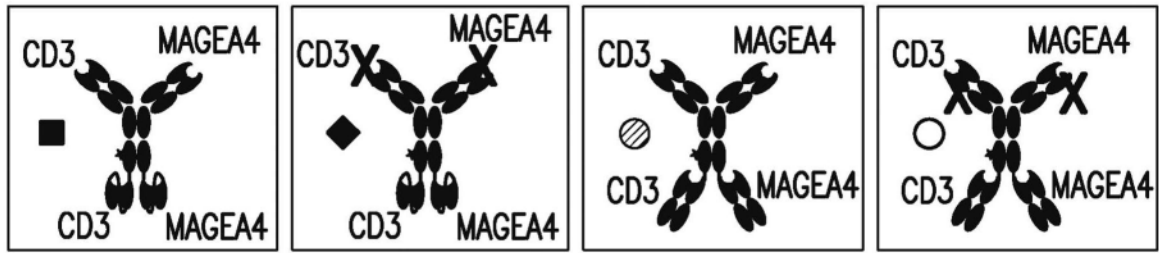
Raji/HLA-A2/b2m/MAGEA4  
(MAGEA4肽) sc分选



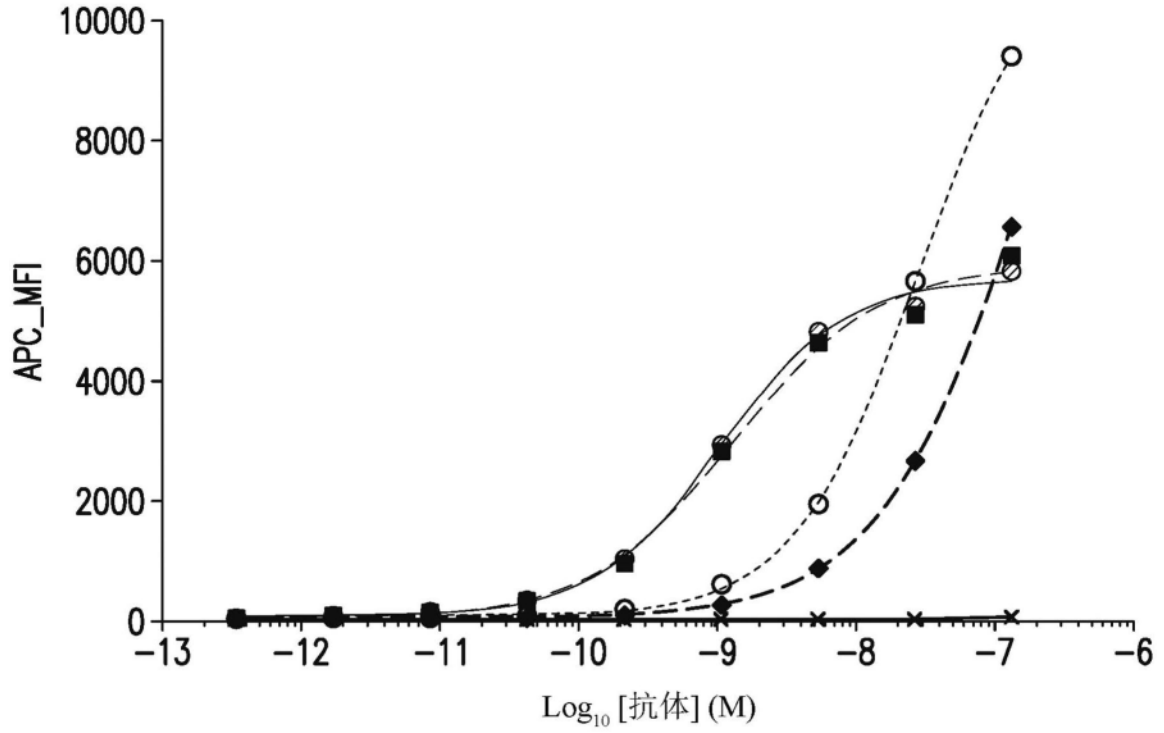
- ■ --- MAGE-5P-BF
- ◆ --- BF\_Bet-Fabs
- ○ — BF-Fab
- ○ --- Bet-BF-Fab
- × — 同种型对照

	EC50
MAGE-5P-BF	5.171e-010
BF_Bet-Fabs	3.211e-009
BF-Fab	5.757e-010
Bet-BF-Fab	5.548e-009

图8A



Jurkat WT



- MAGE-5P-BF
- ◆--- BF\_Bet-Fabs
- BF-Fab
- Bet-BF-Fab
- ×— 同种型对照

	EC50
MAGE-5P-BF	1.314e-009
BF_Bet-Fabs	1.843e-007
BF-Fab	1.043e-009
Bet-BF-Fab	2.814e-008

图8B

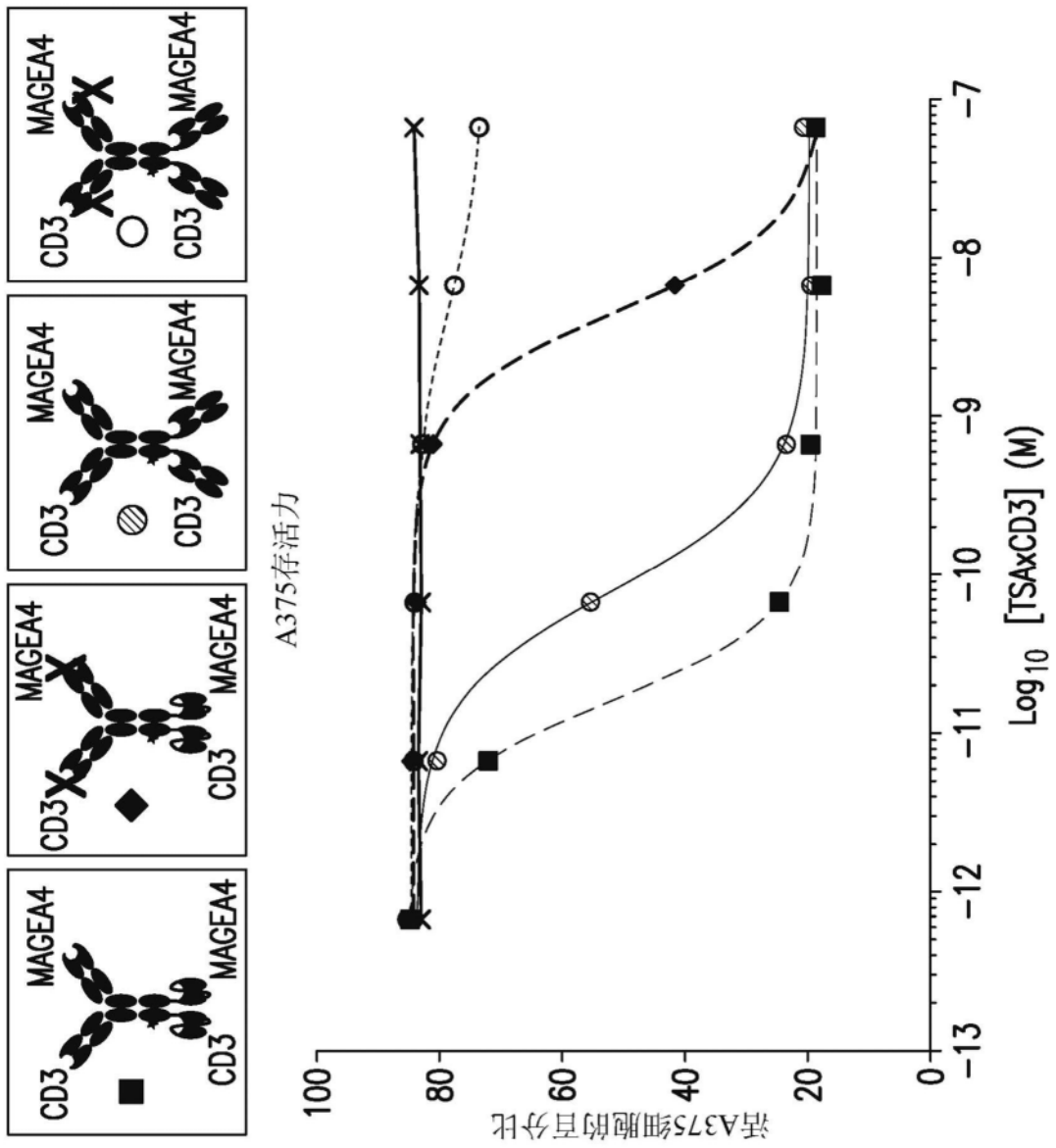


图6

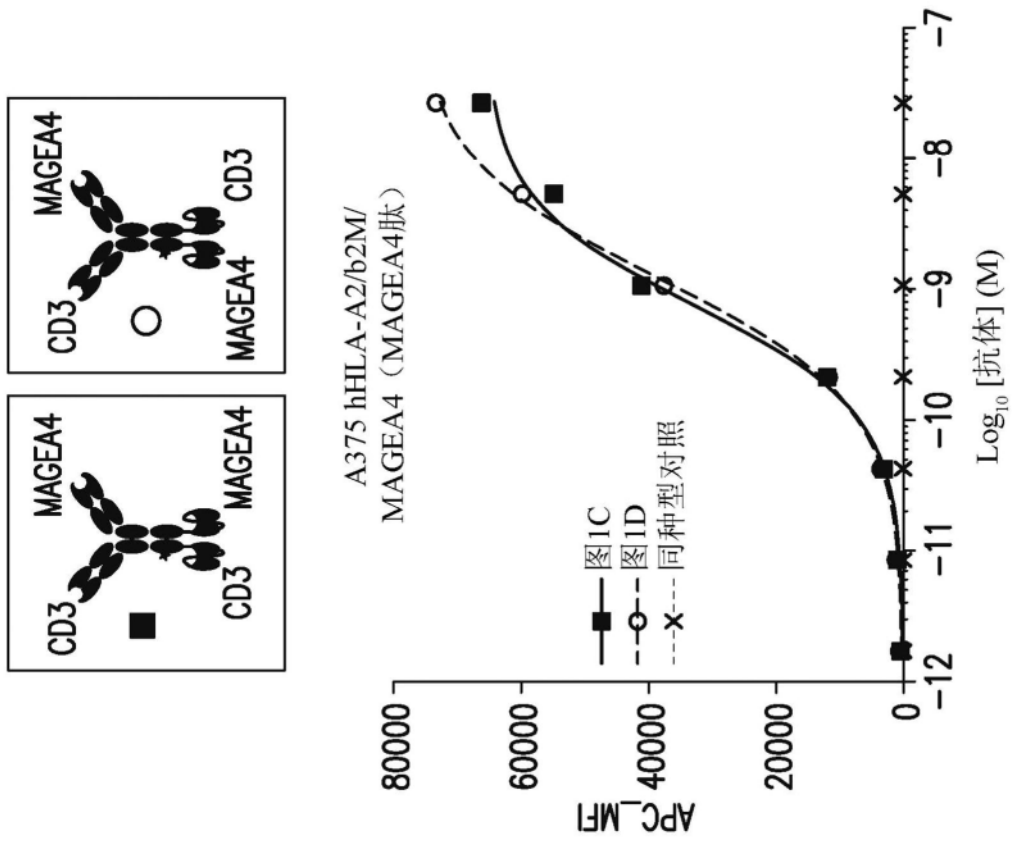


图10A

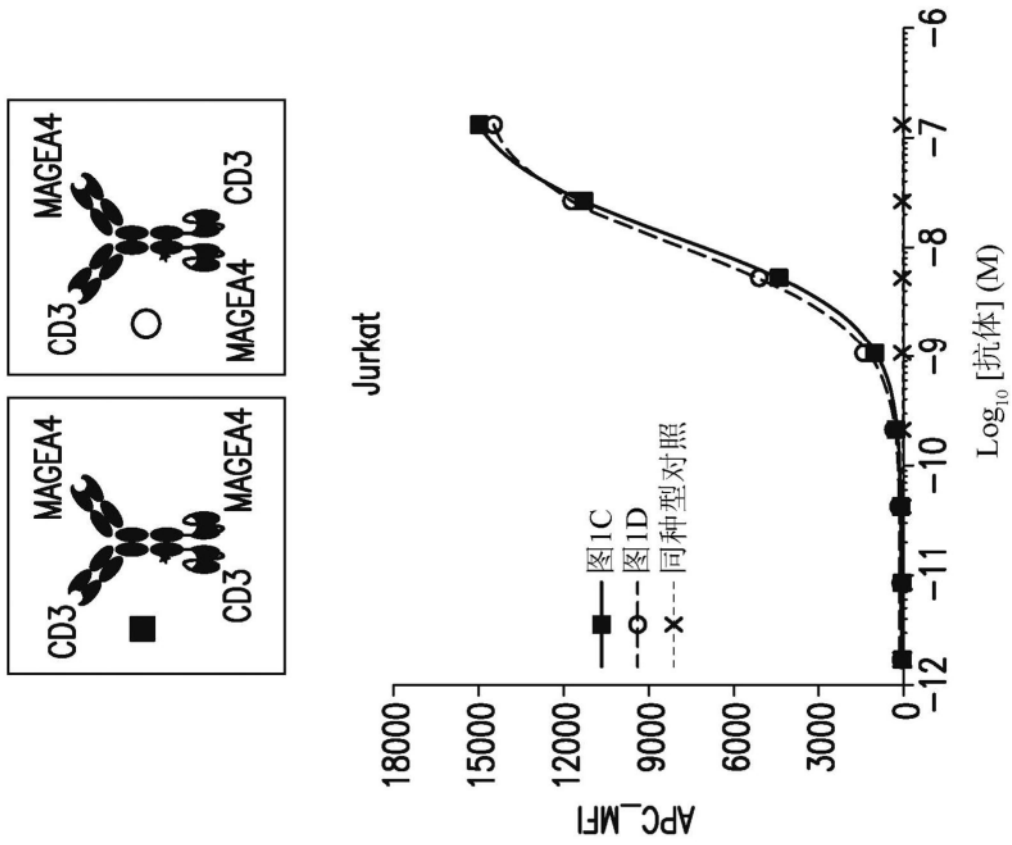


图10B

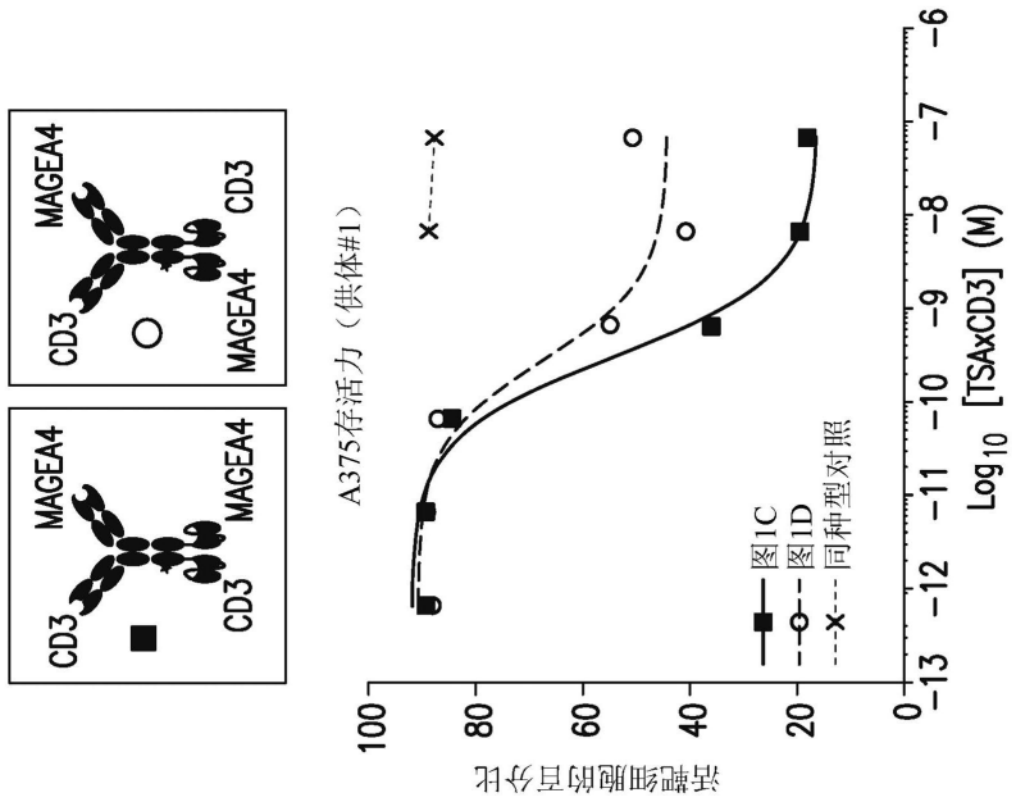


图11A

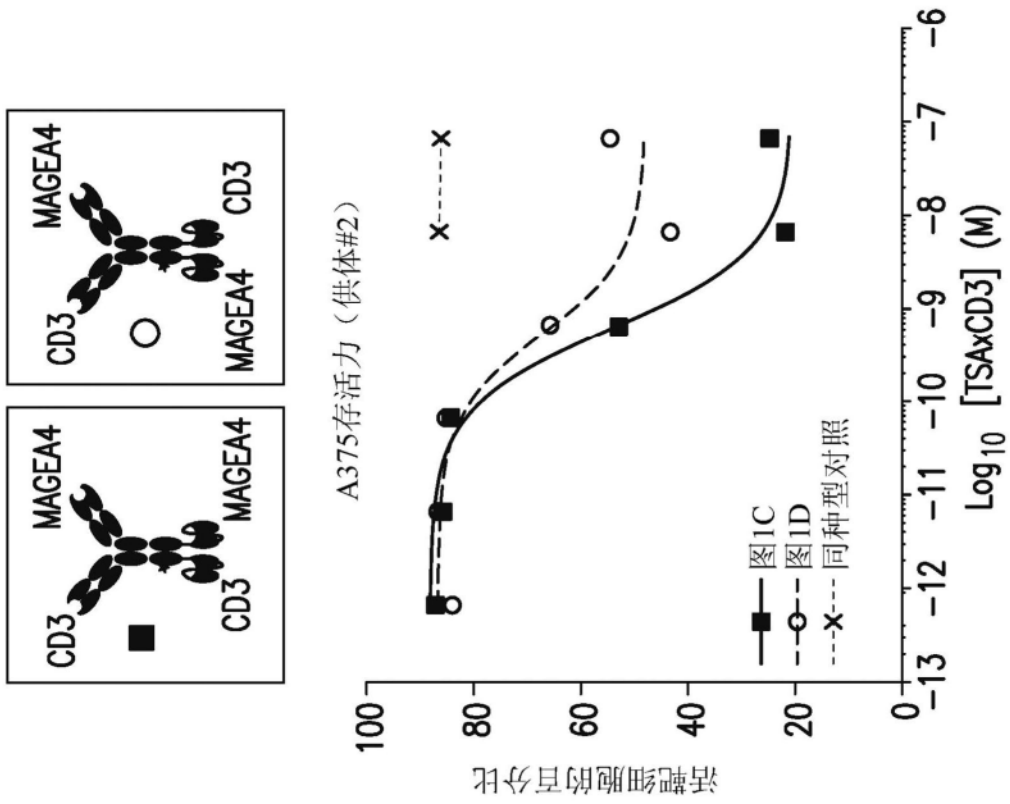


图11B

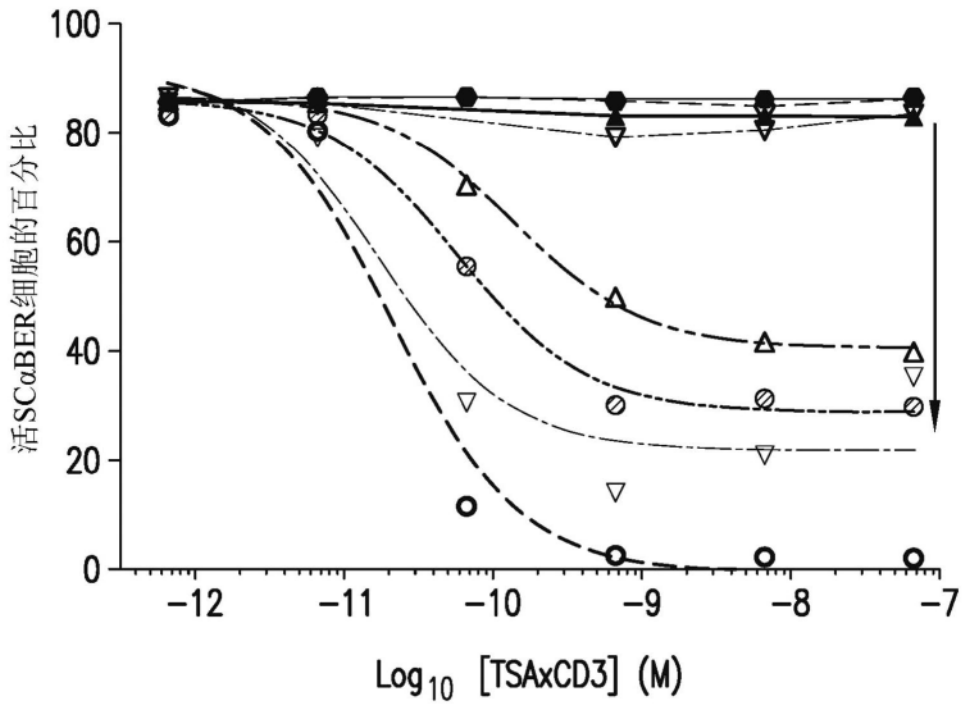
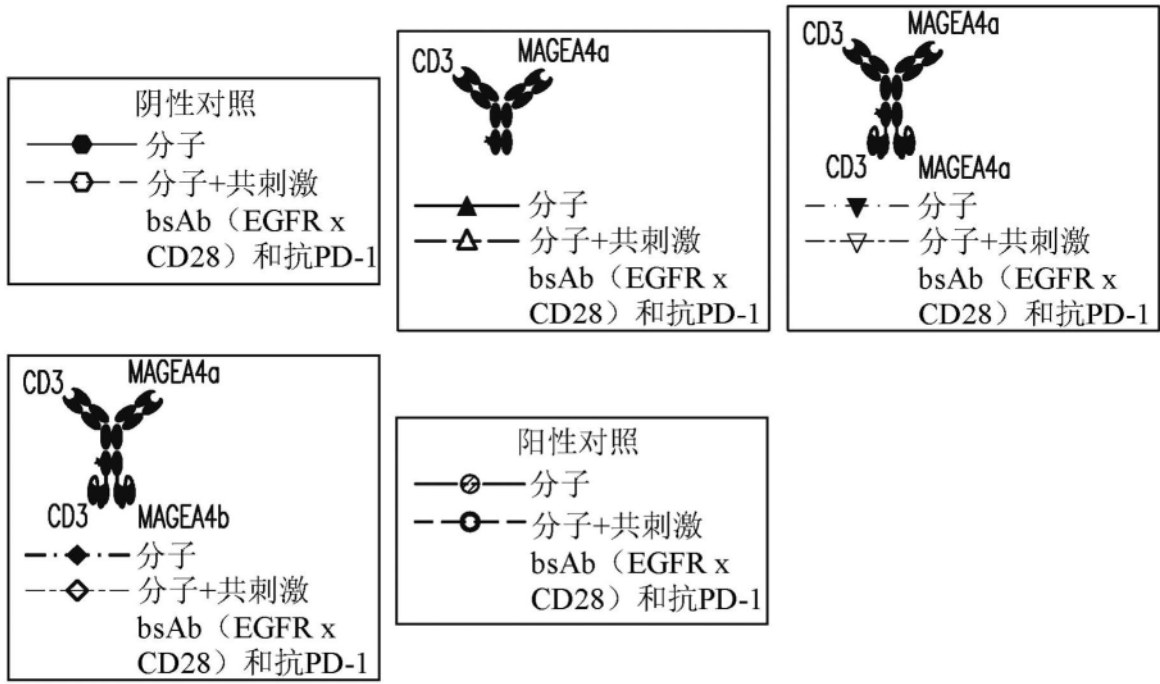


图12A

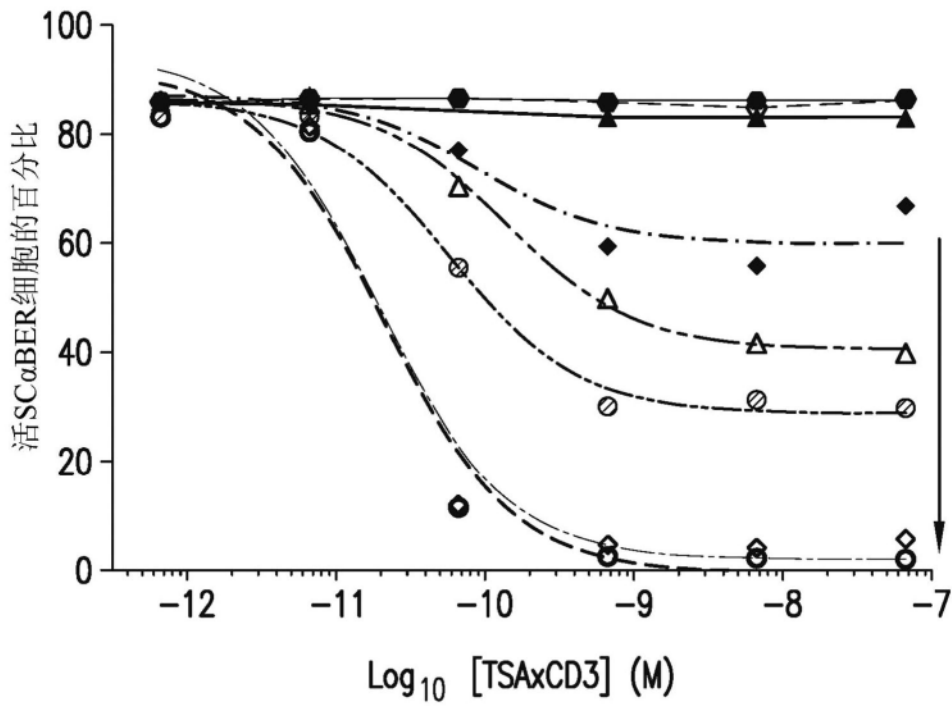
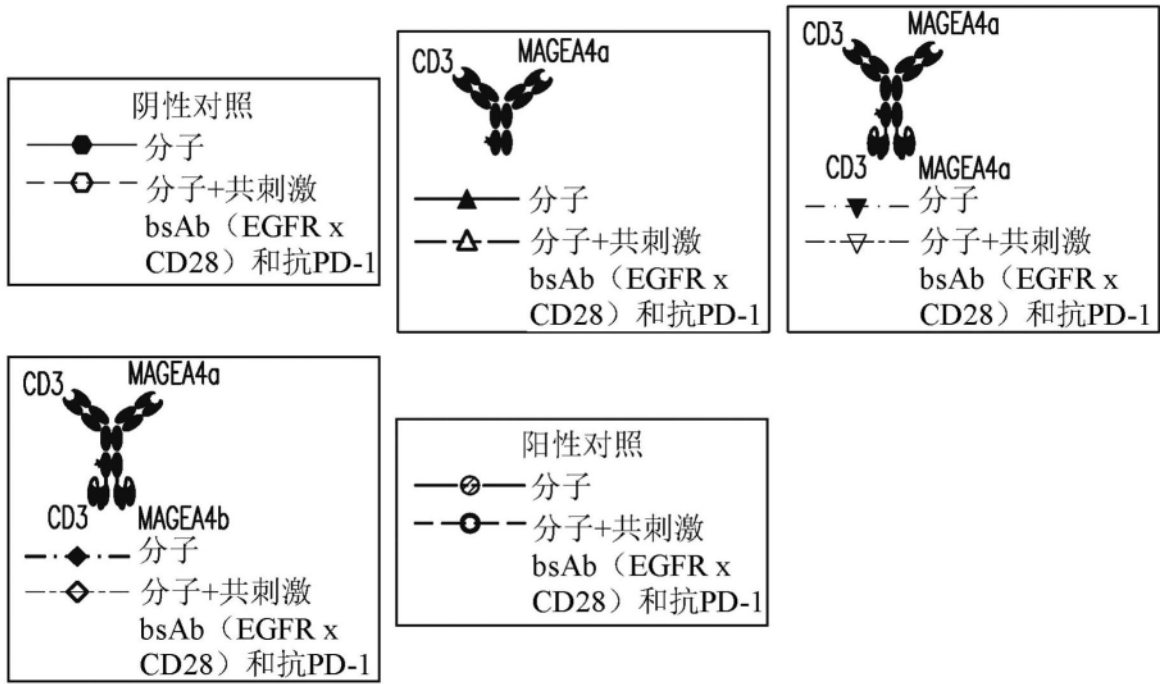


图12B

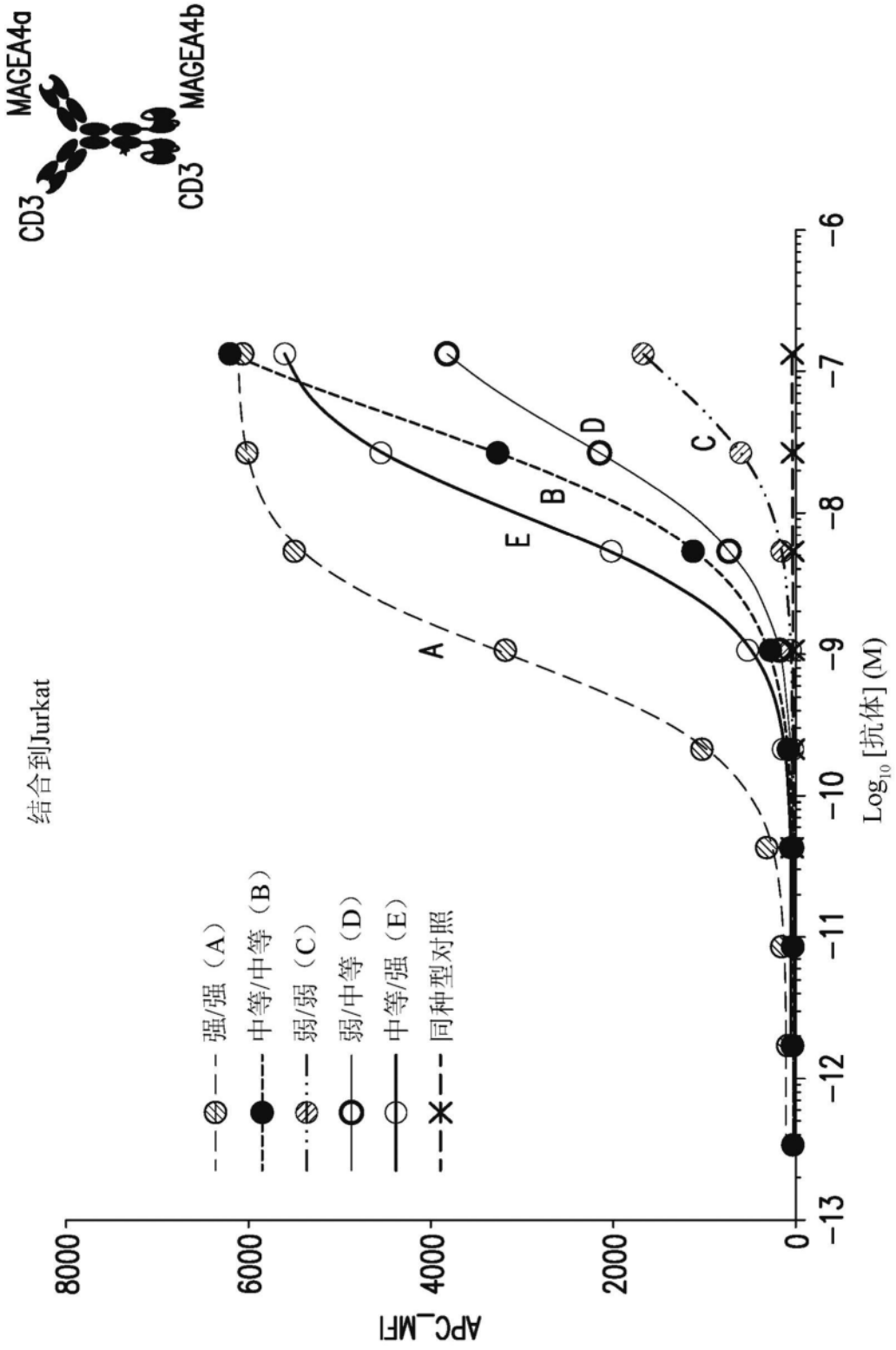


图13

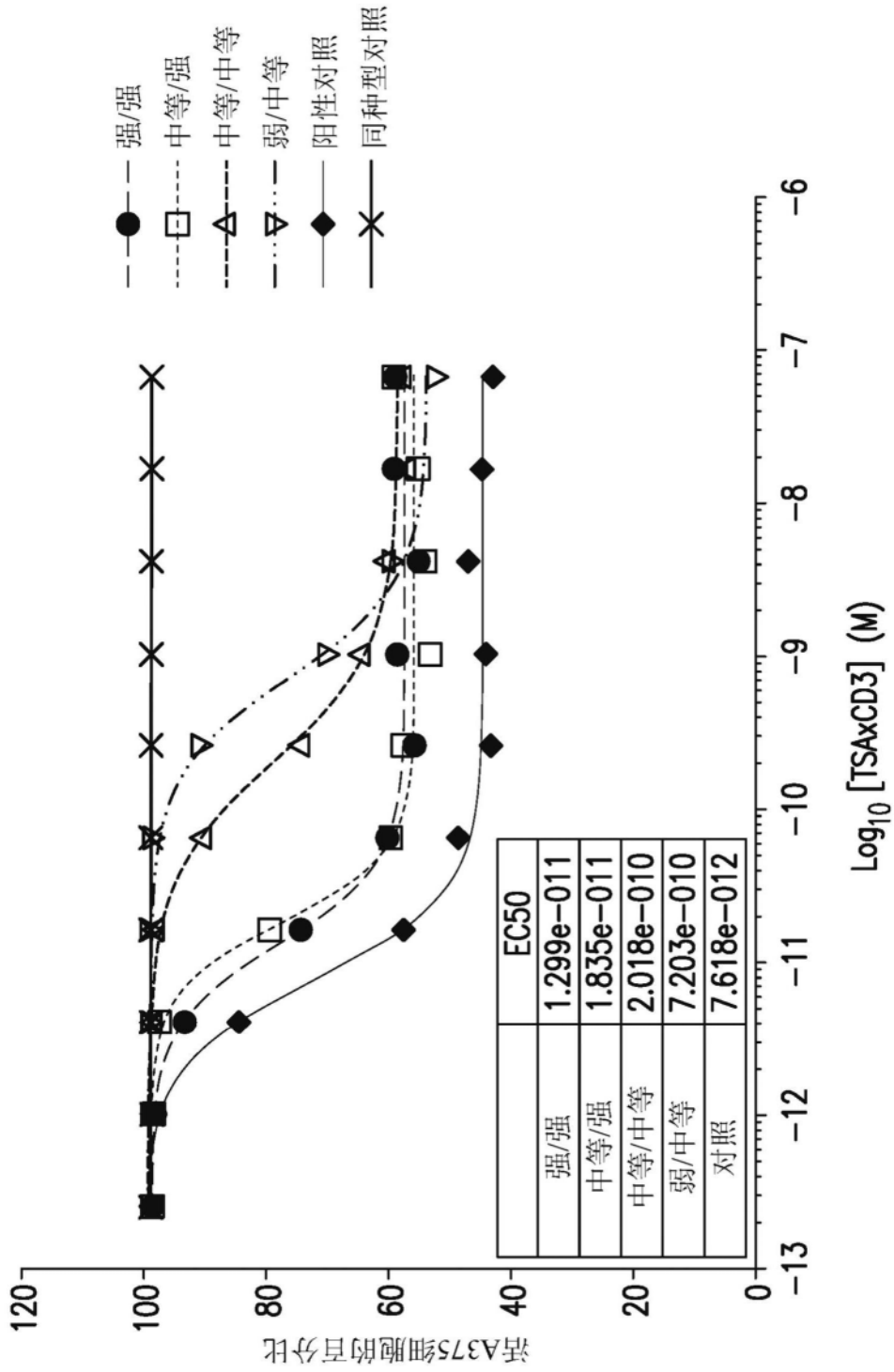


图14A

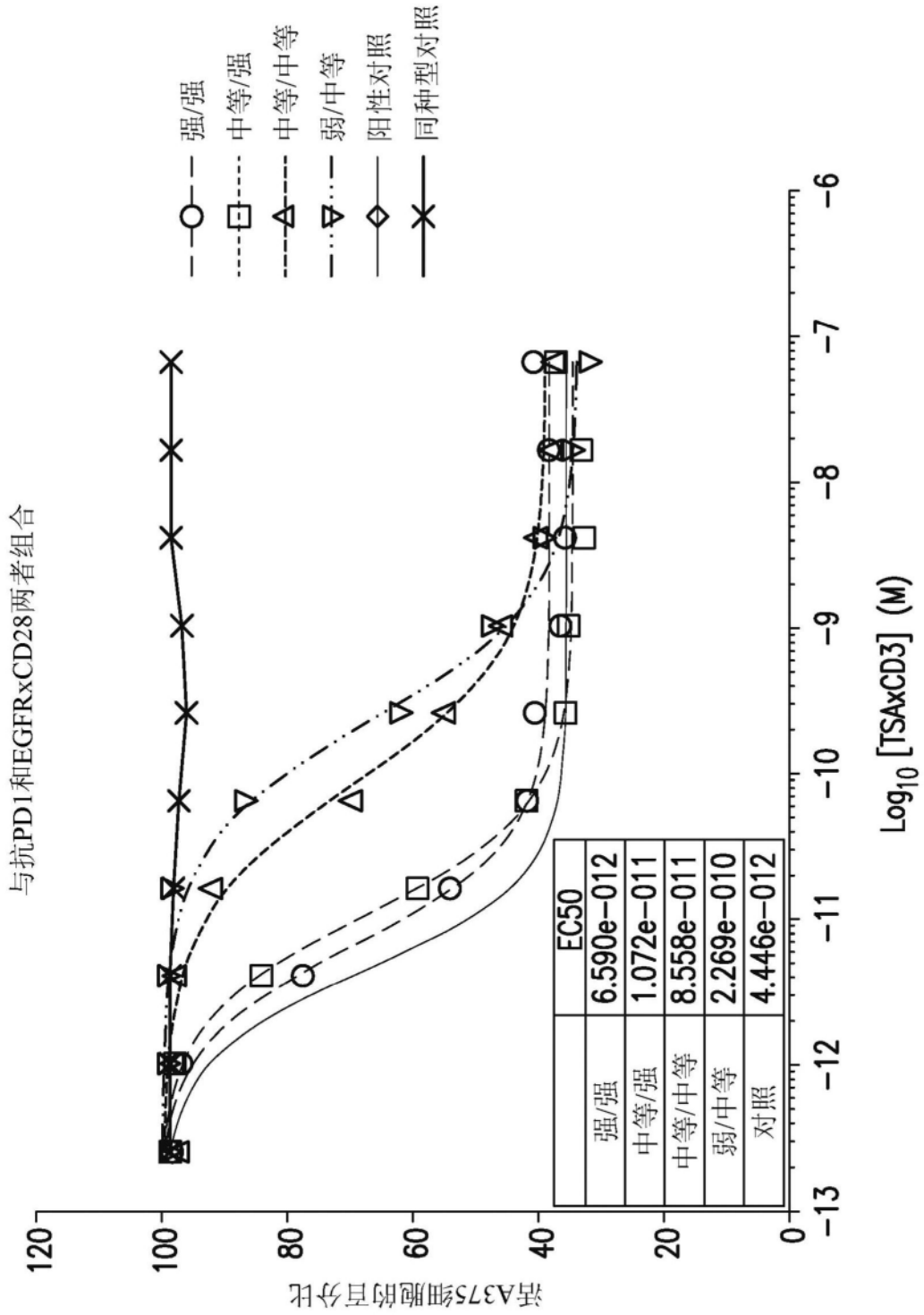


图14B

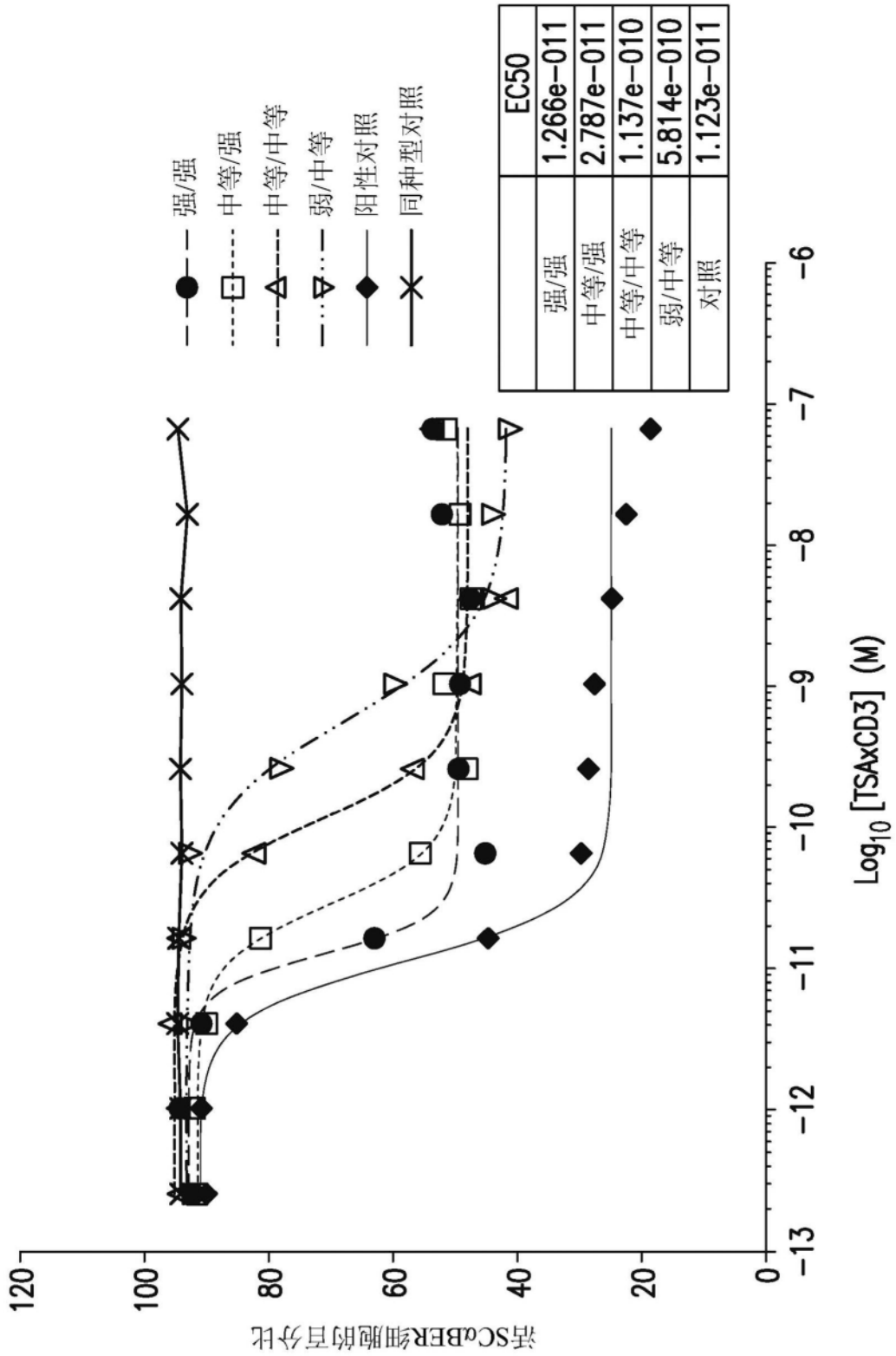


图15A

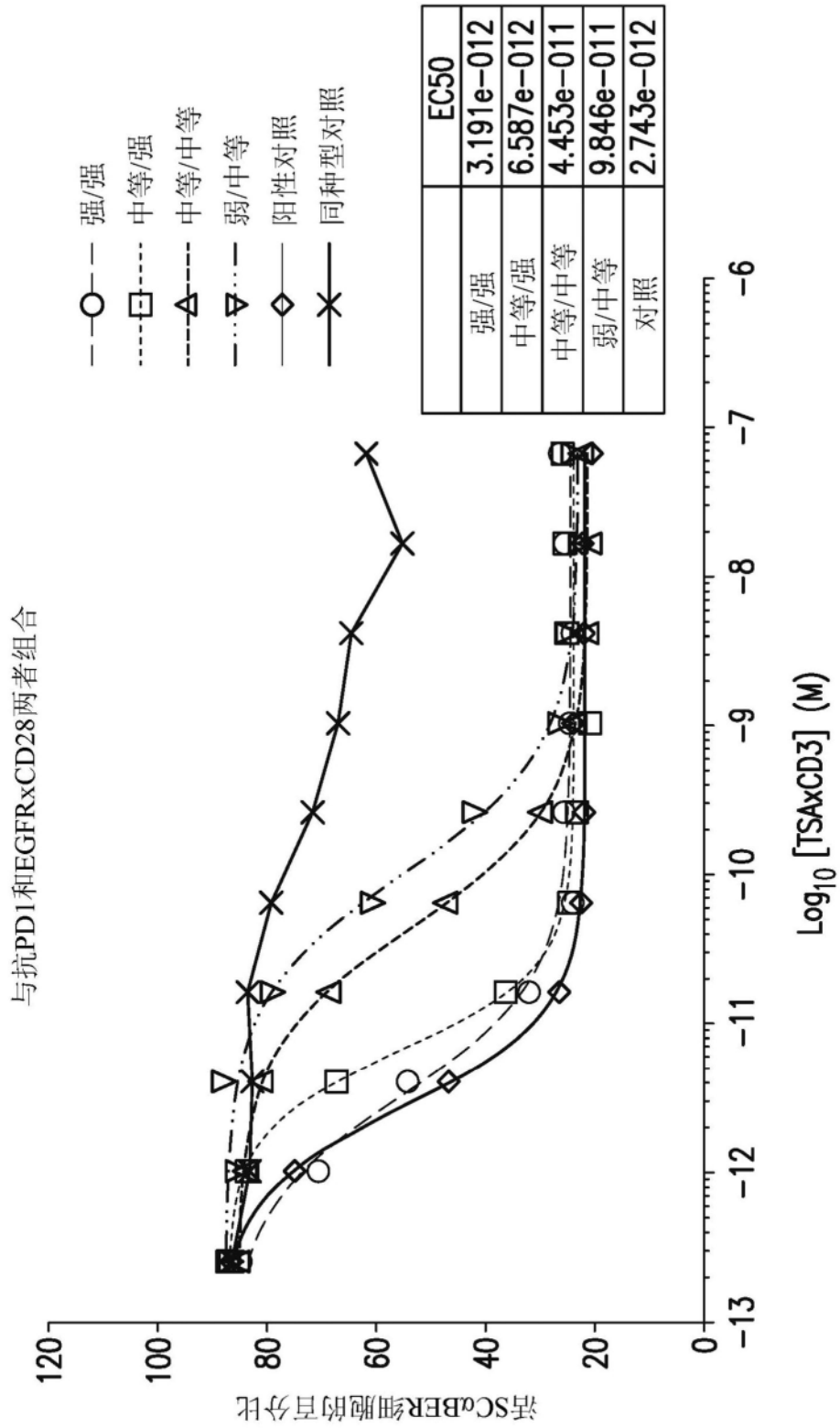


图15B

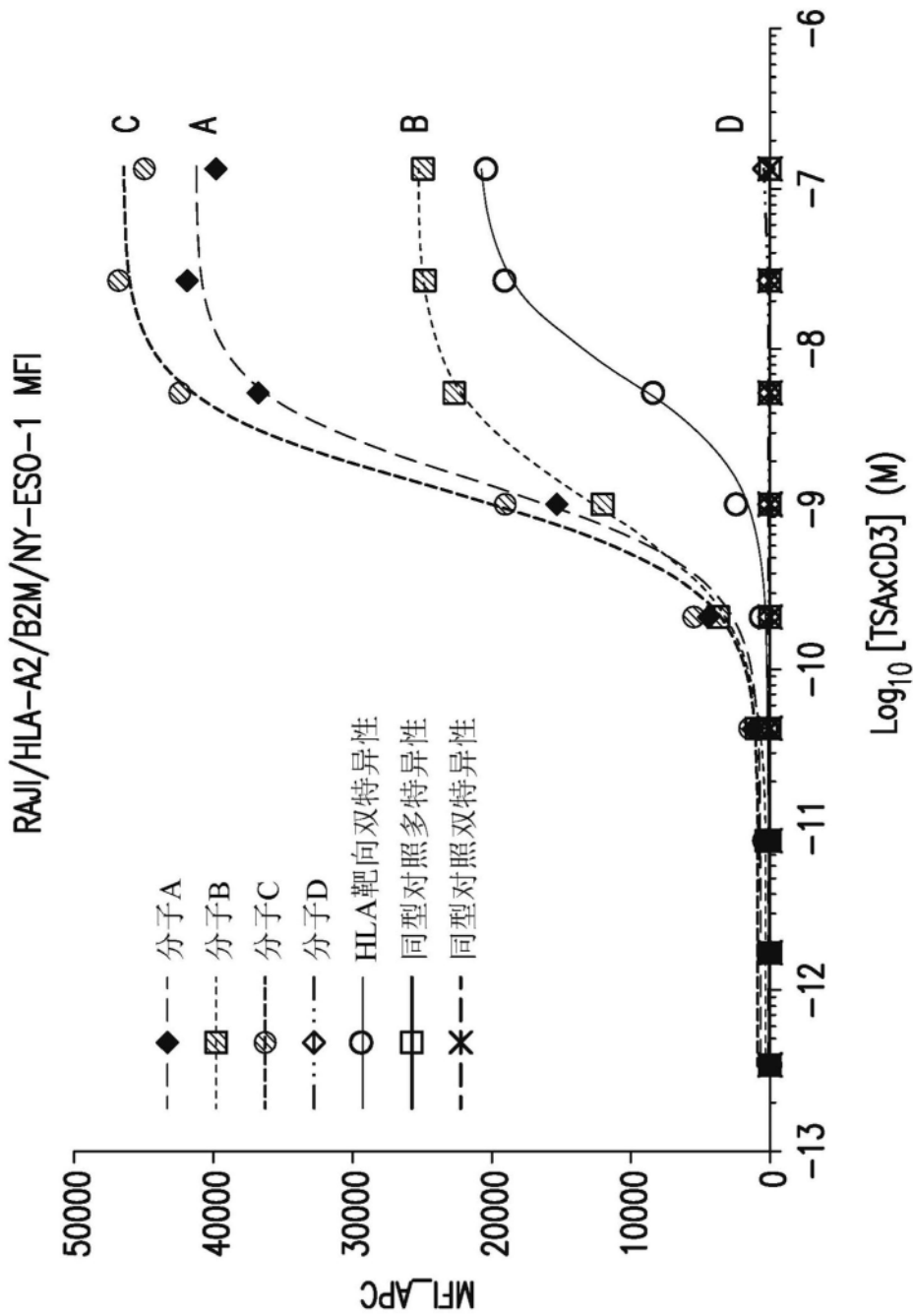
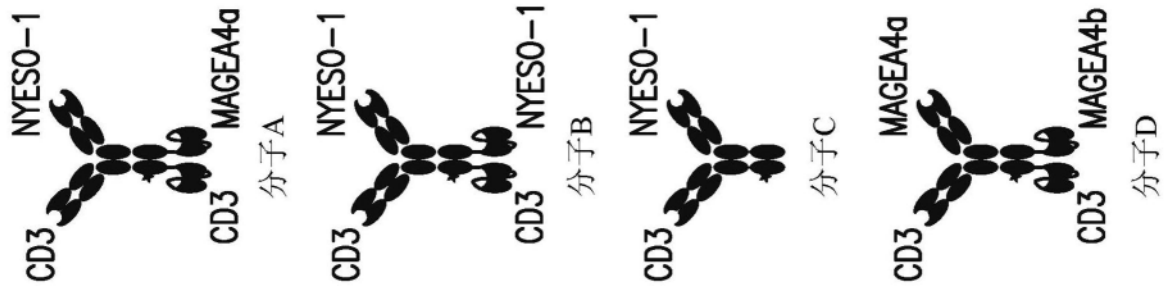


图16A

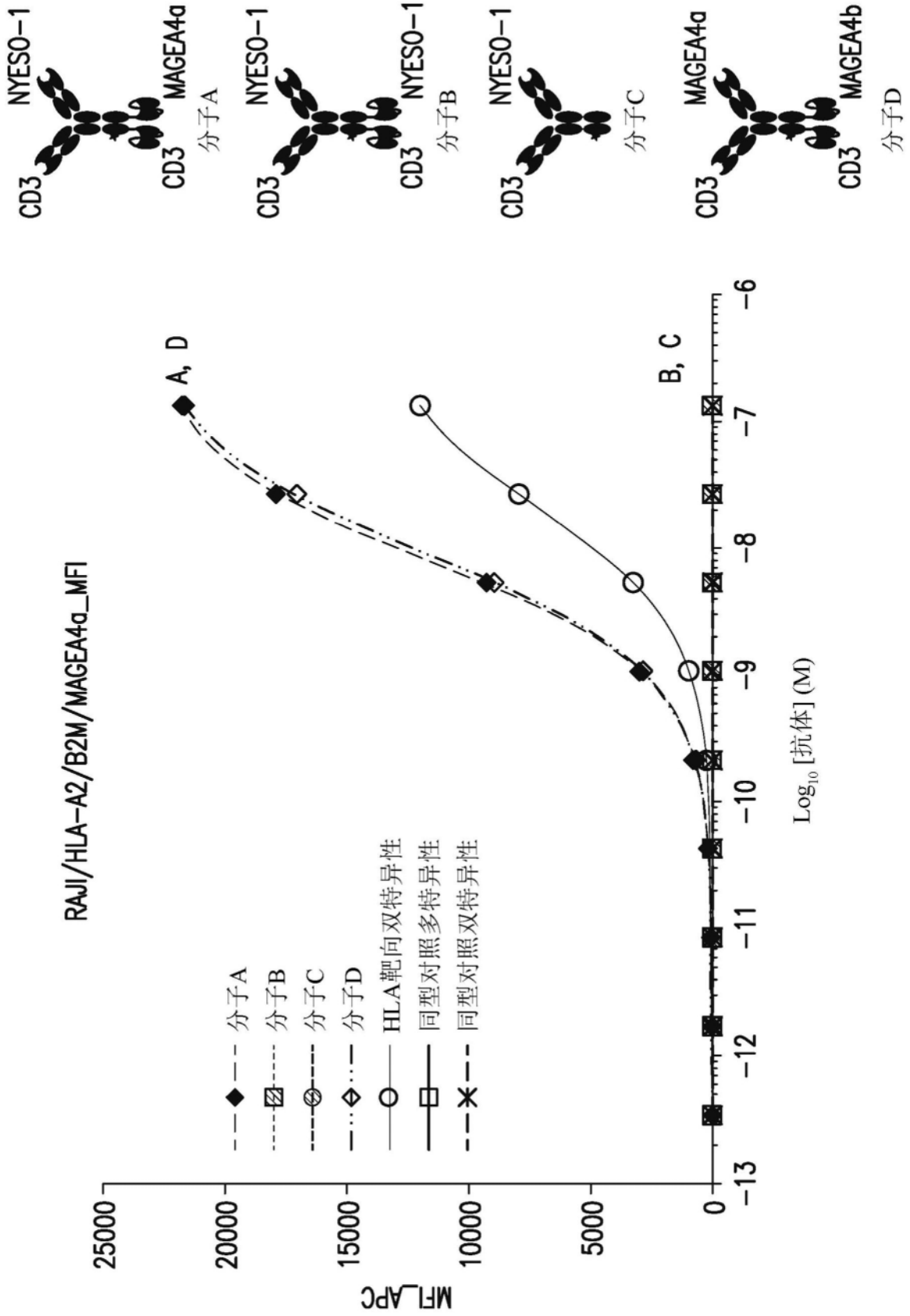


图16B

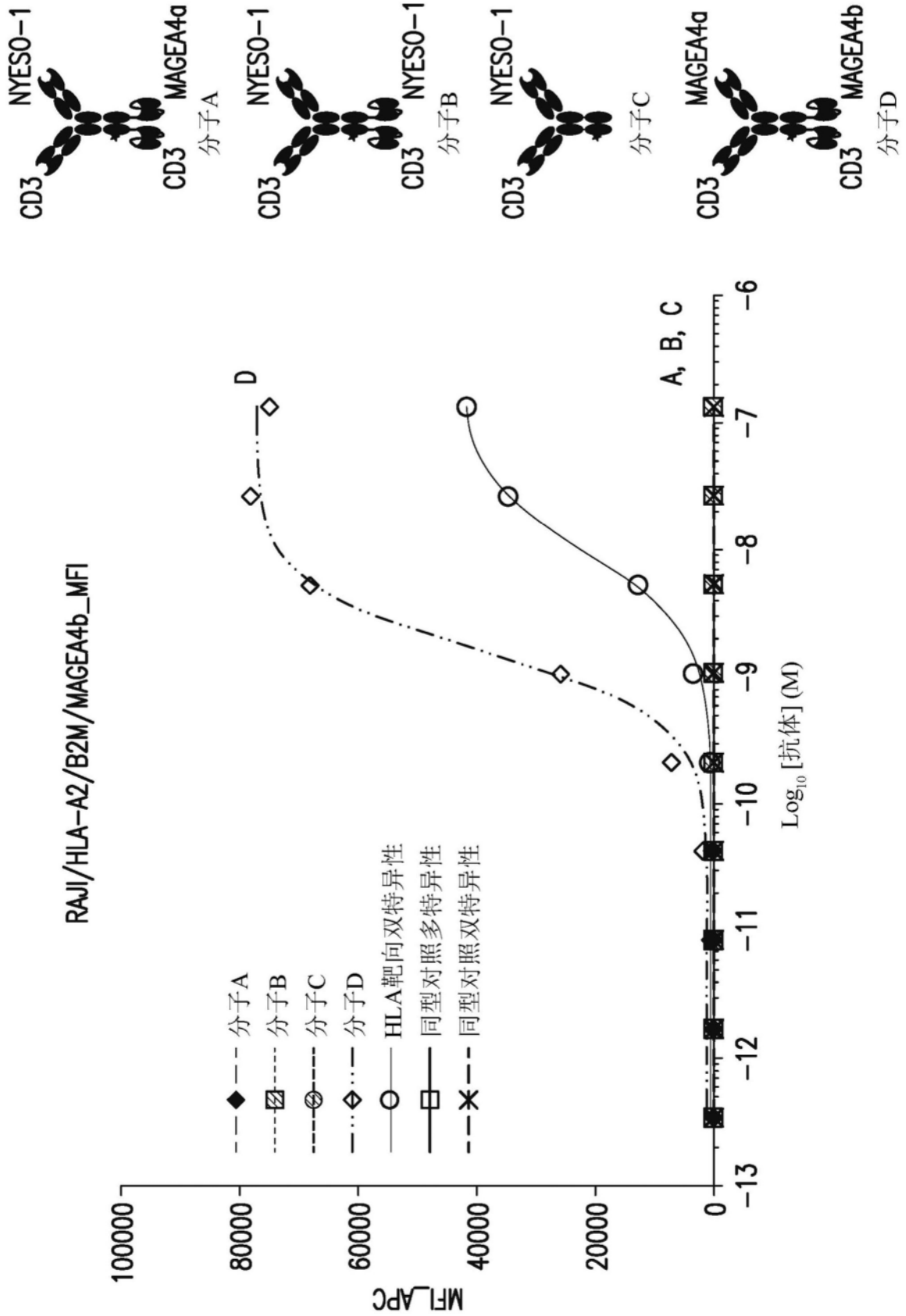


图16C

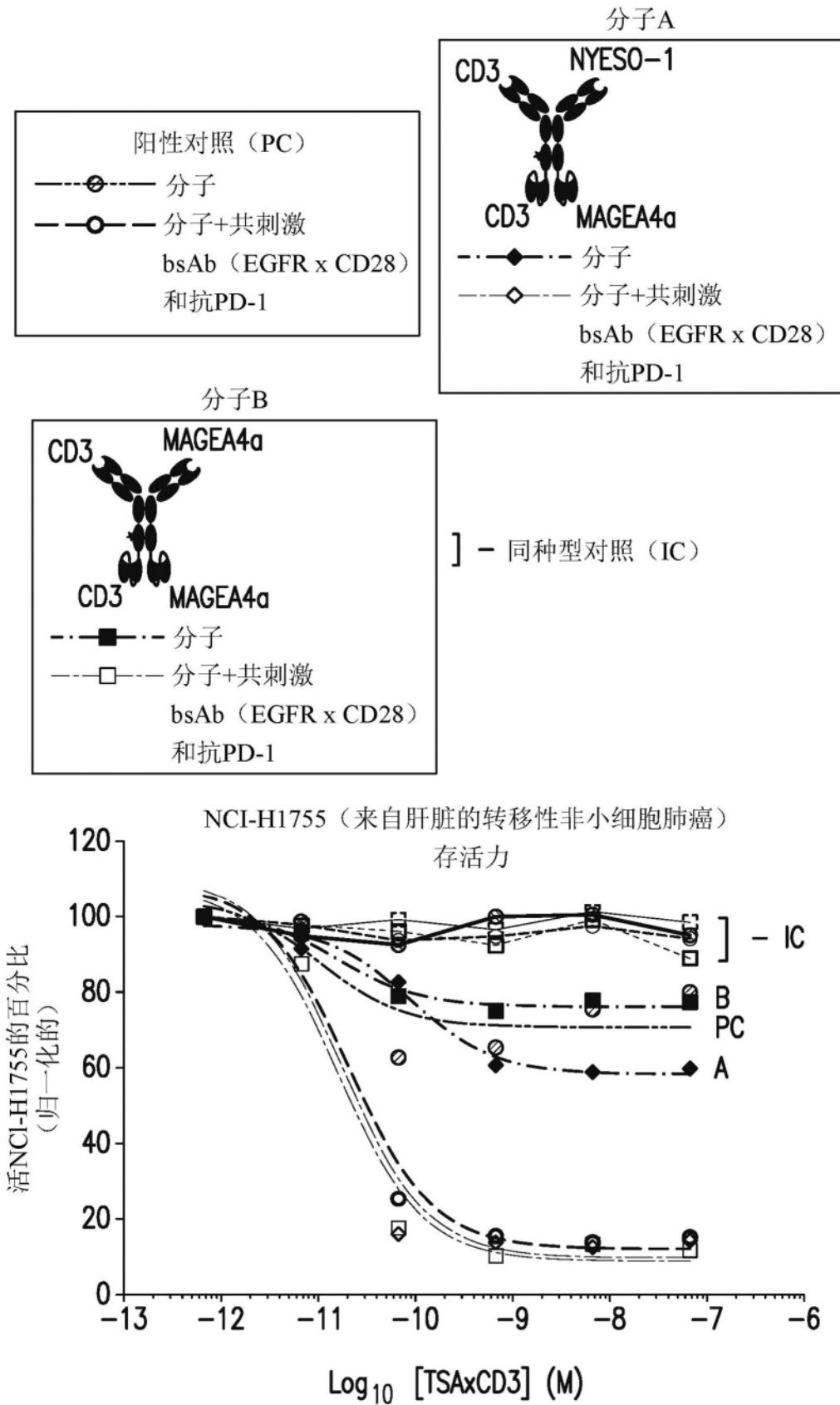


图17A

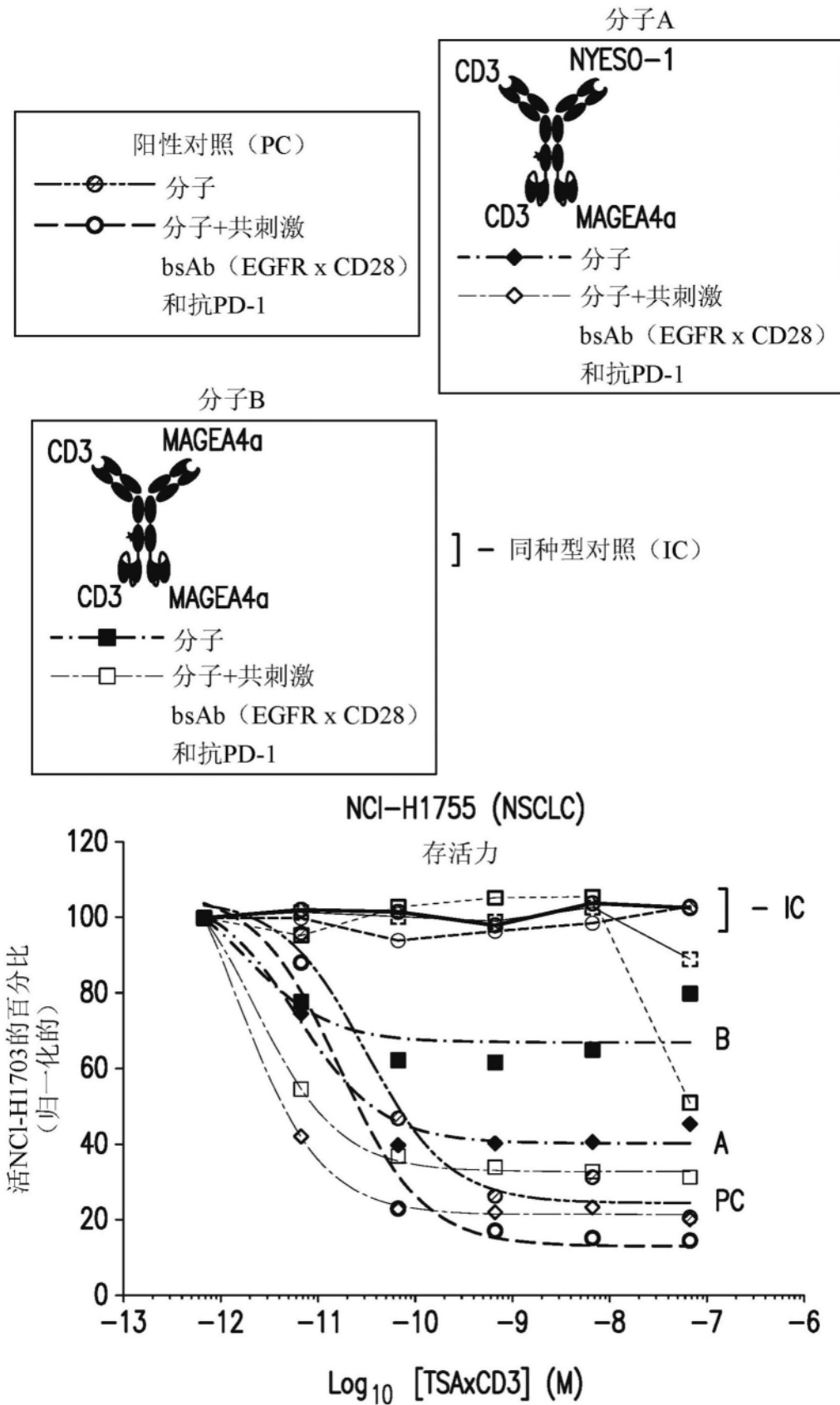


图17B

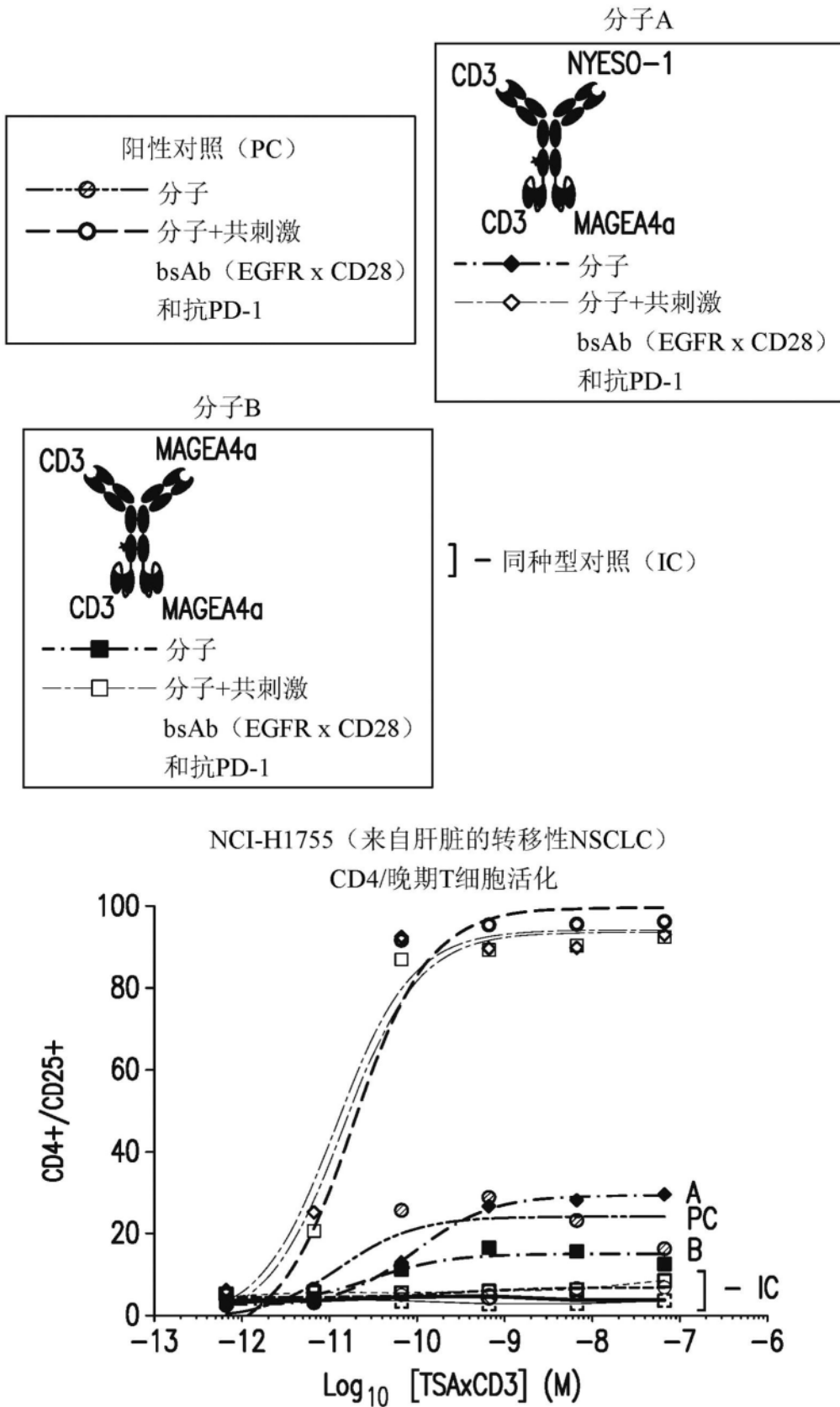


图17C

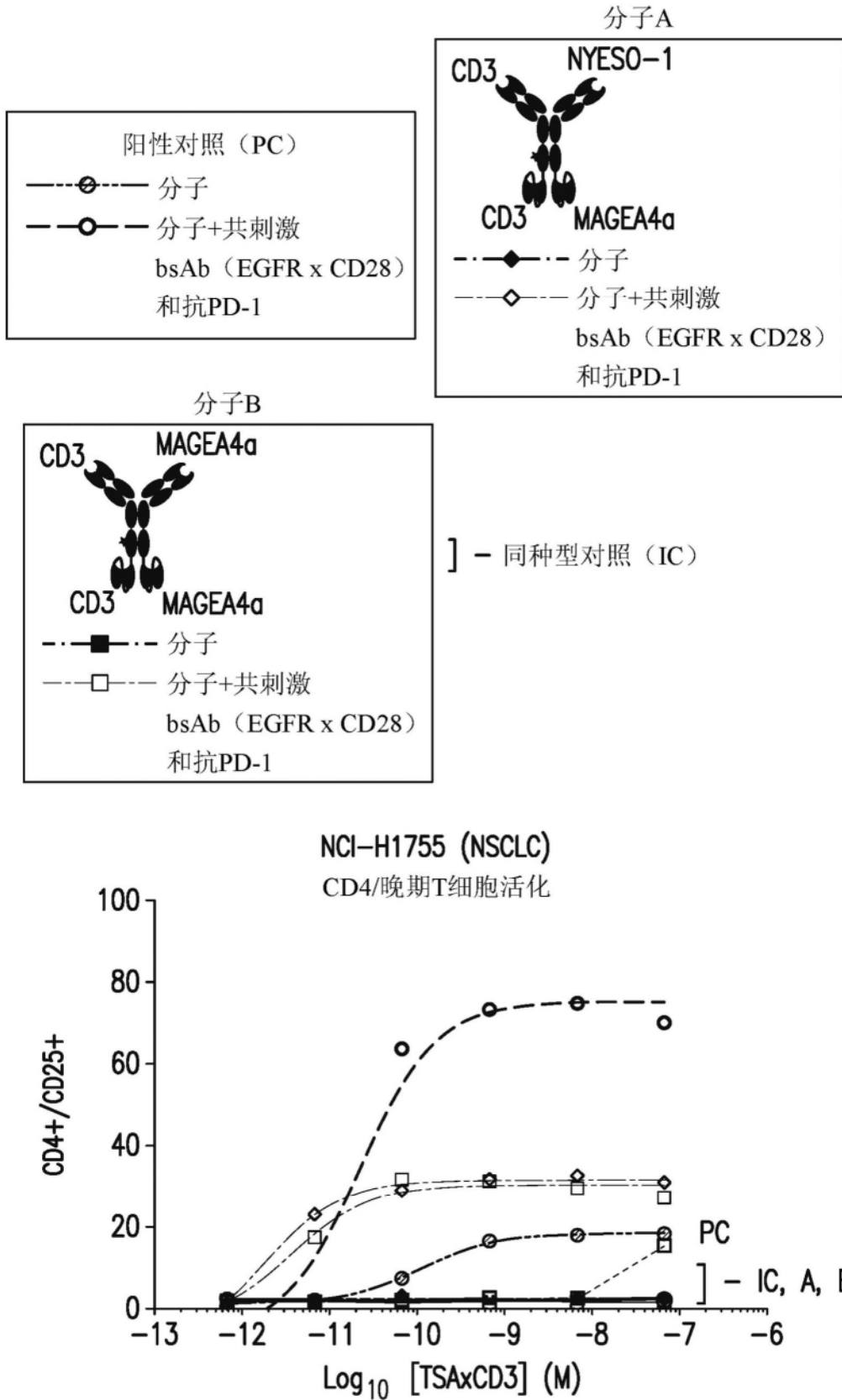


图17D

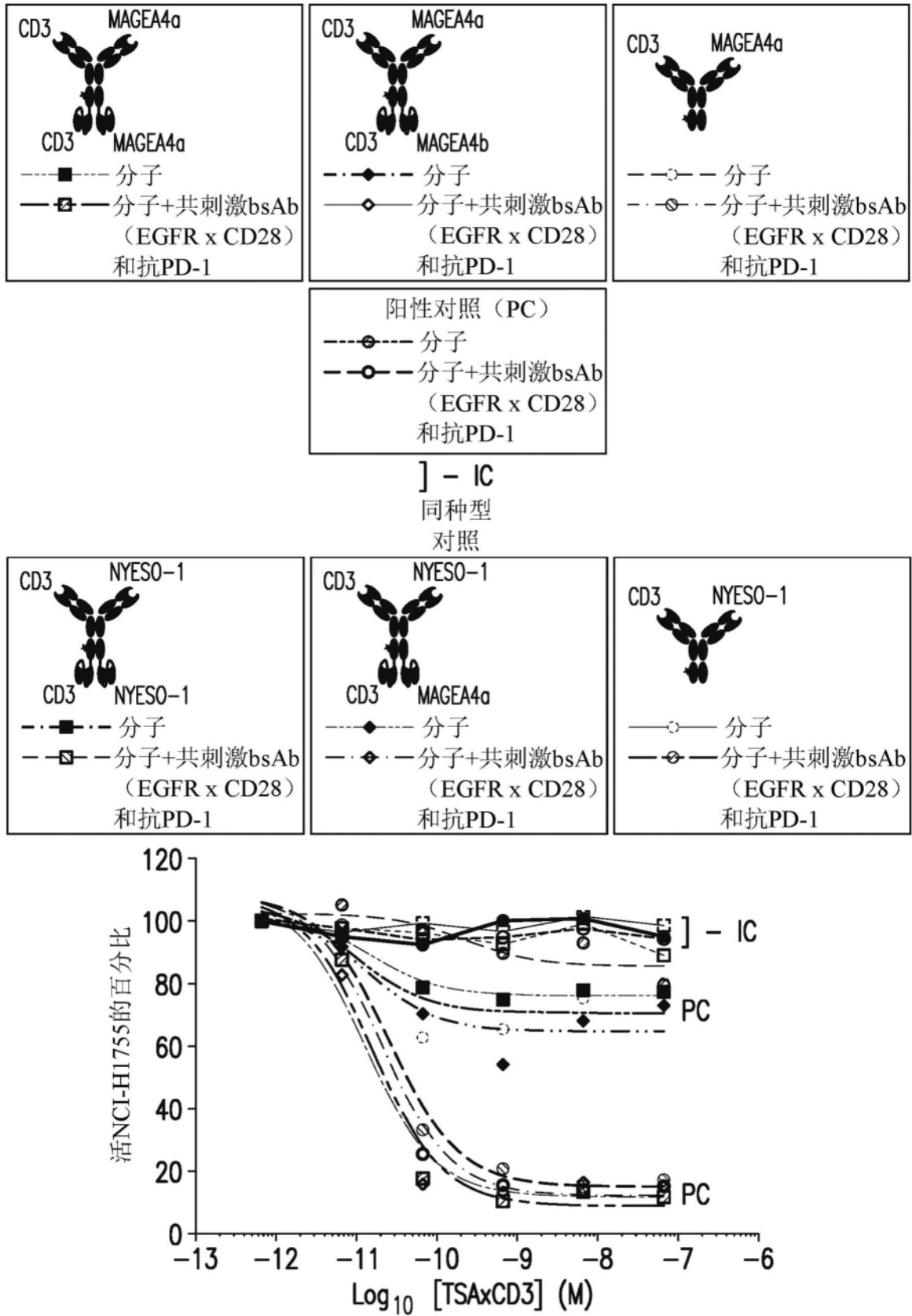
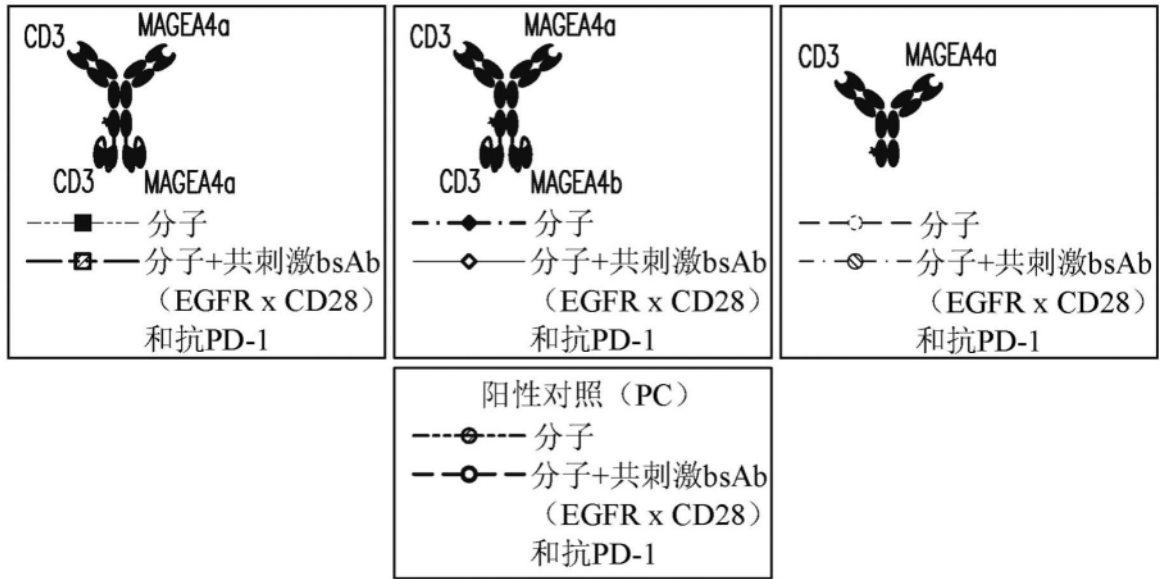


图18A





] - IC  
同种型  
对照

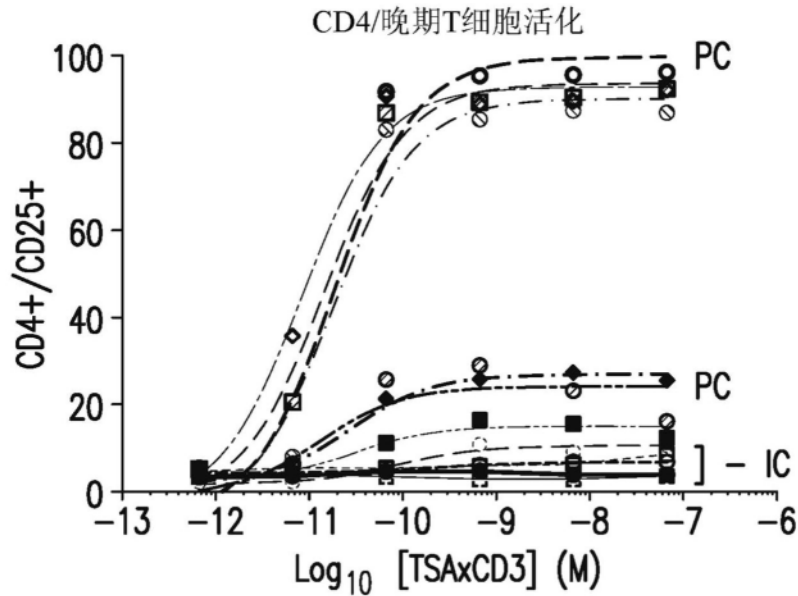
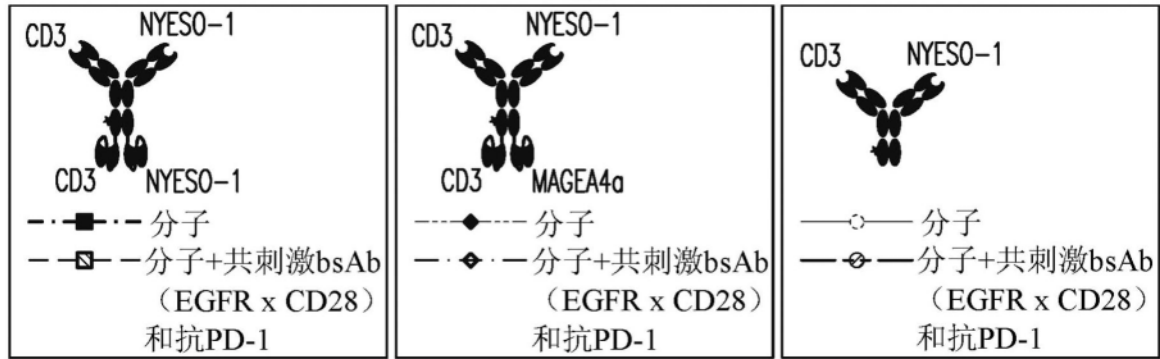
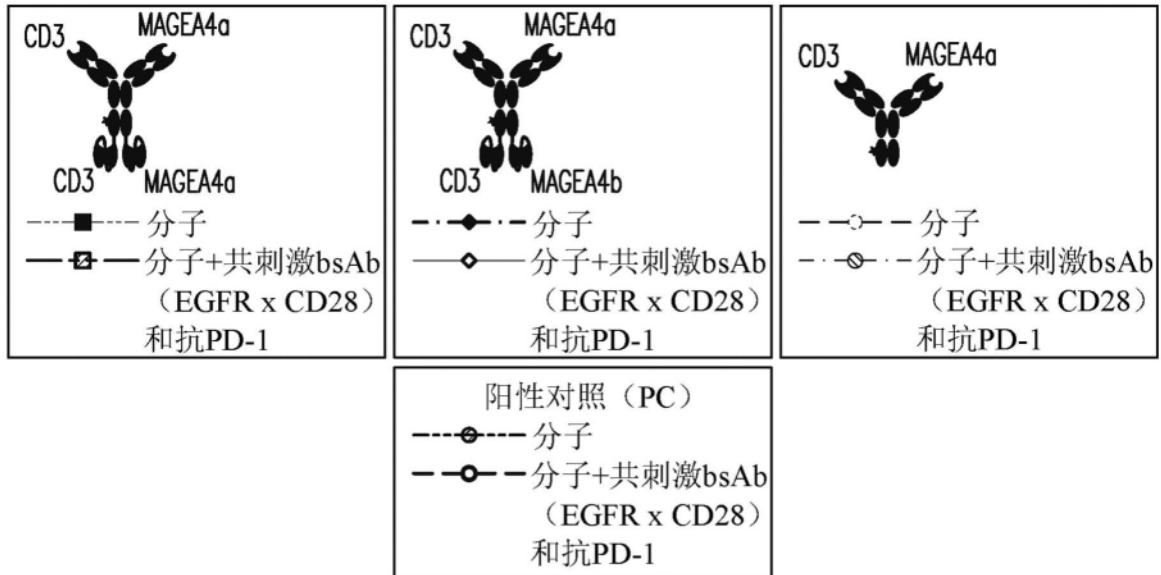


图18C



] - IC  
同种型  
对照

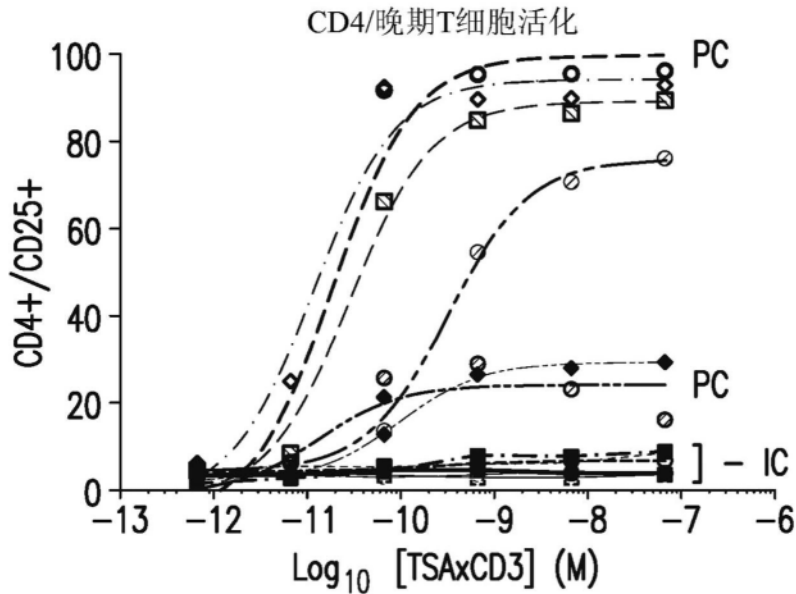
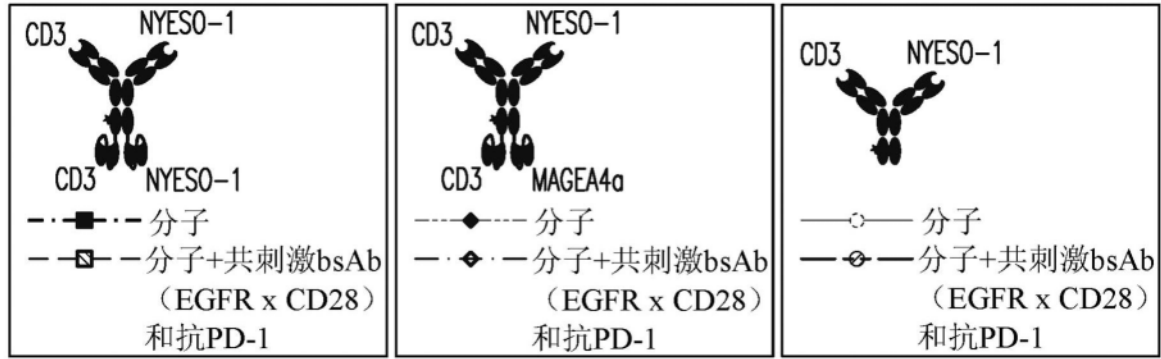
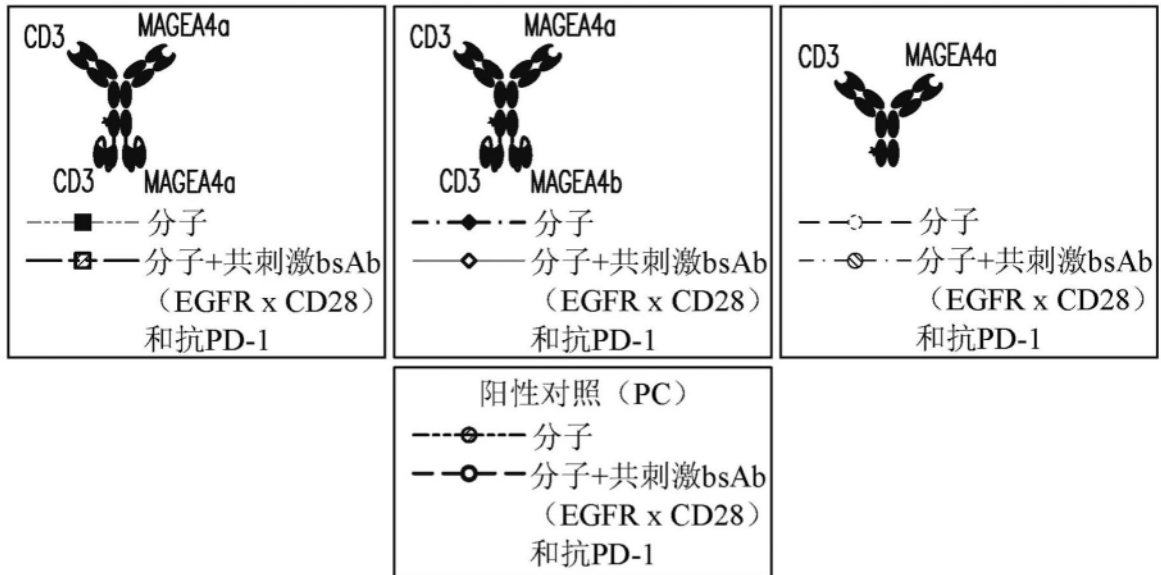


图18D



] - IC  
同种型  
对照

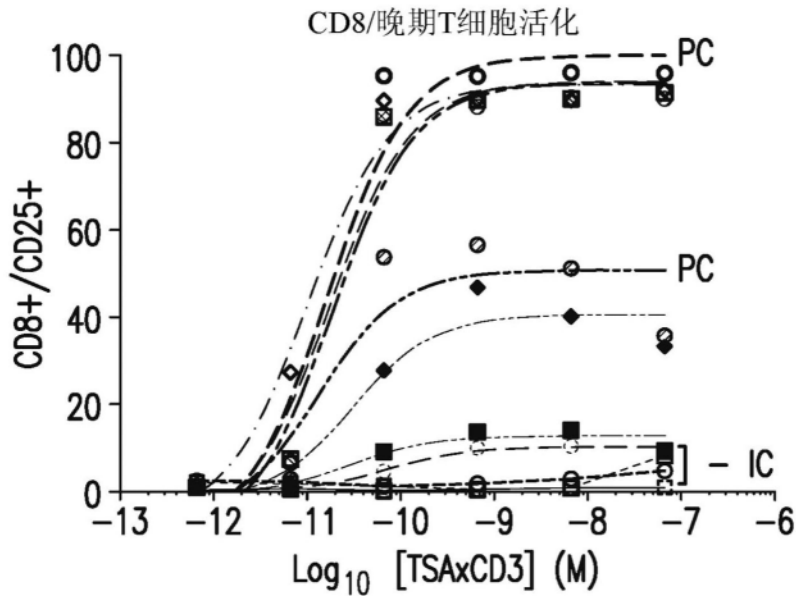
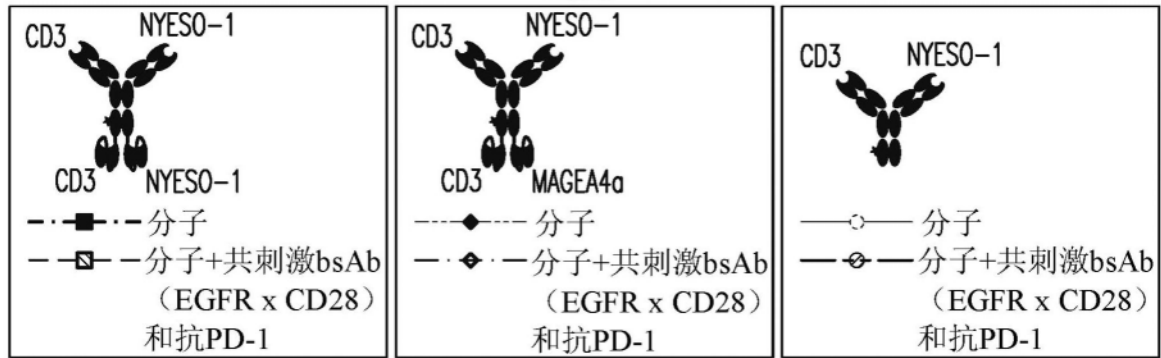


图18E

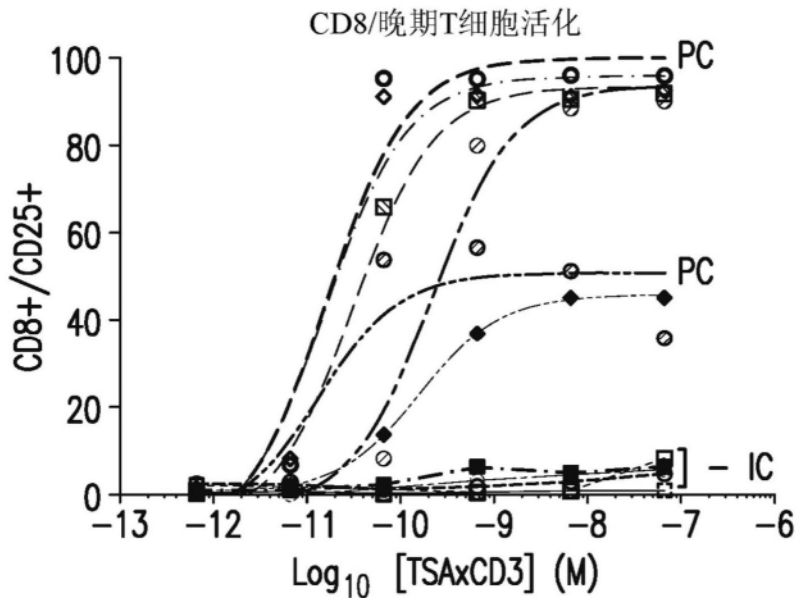
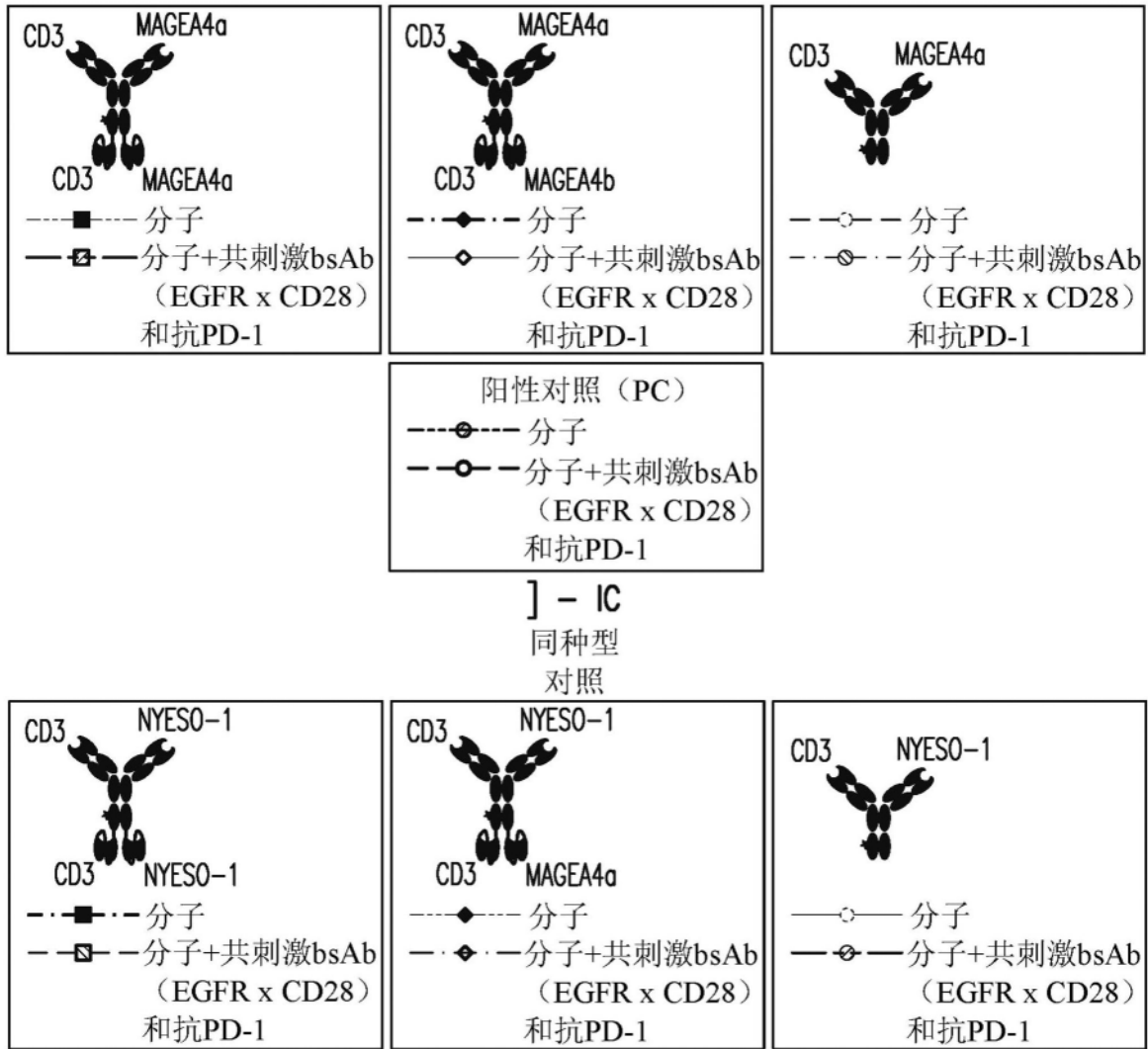


图18F

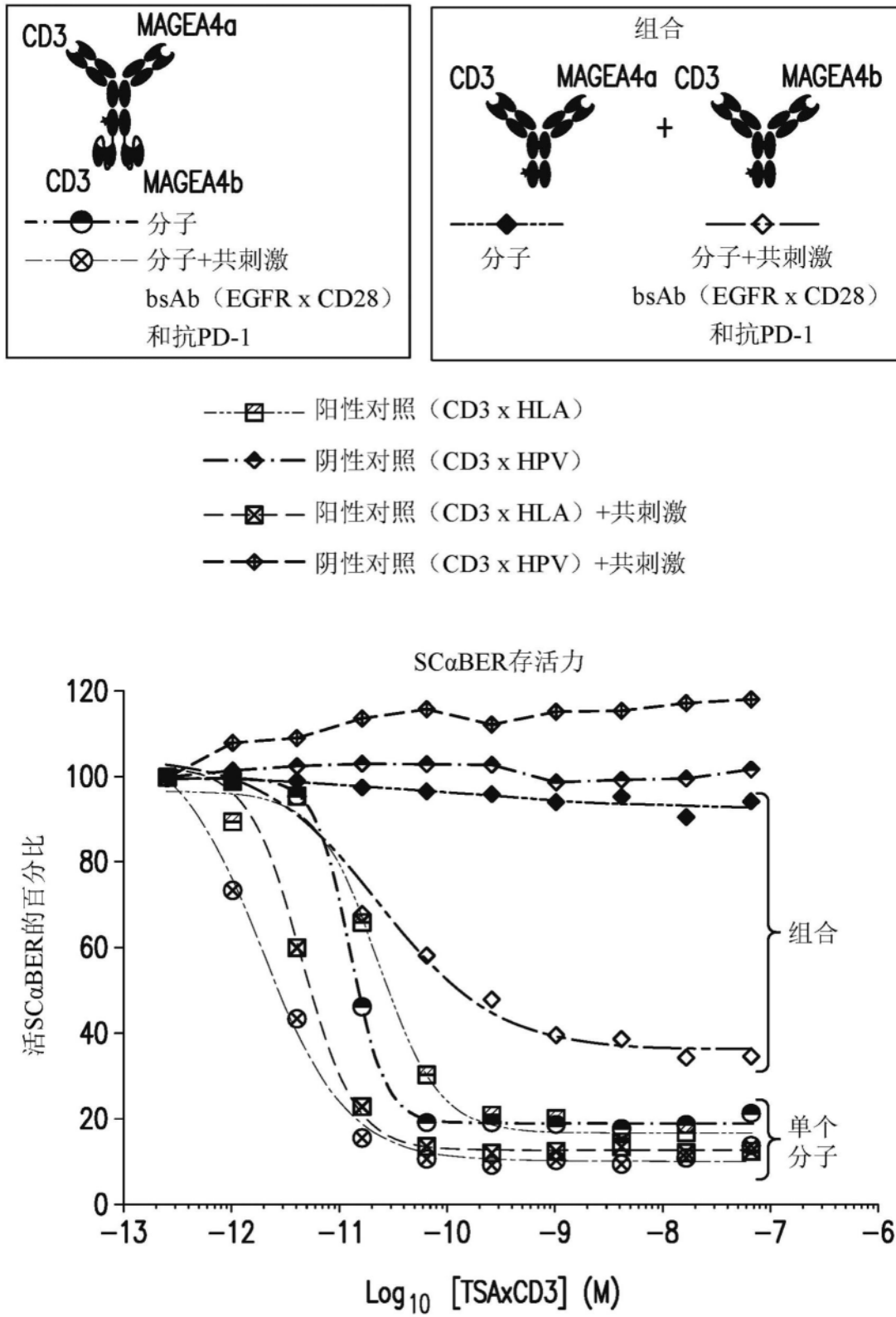
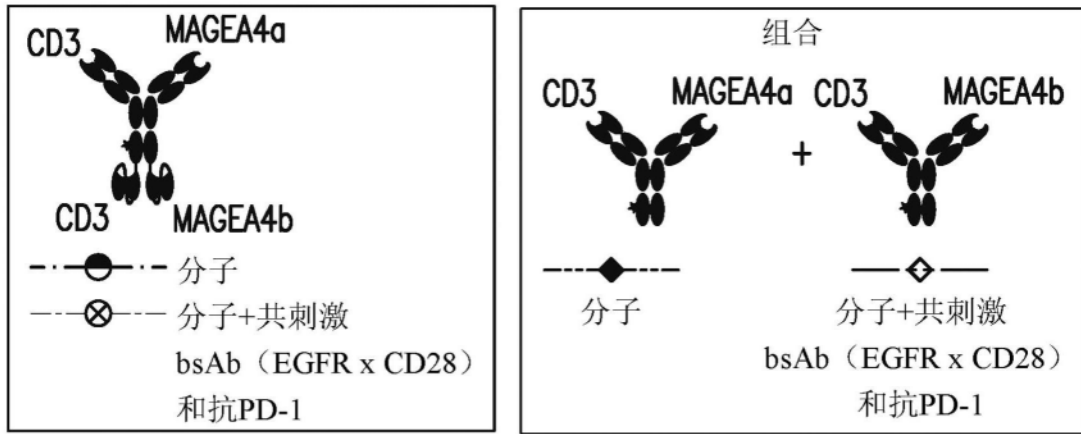


图19A



- ⊠— 阳性对照 (CD3 x HLA)
- ◆— 阴性对照 (CD3 x HPV)
- ⊠— 阳性对照 (CD3 x HLA) +共刺激
- ◆— 阴性对照 (CD3 x HPV) +共刺激

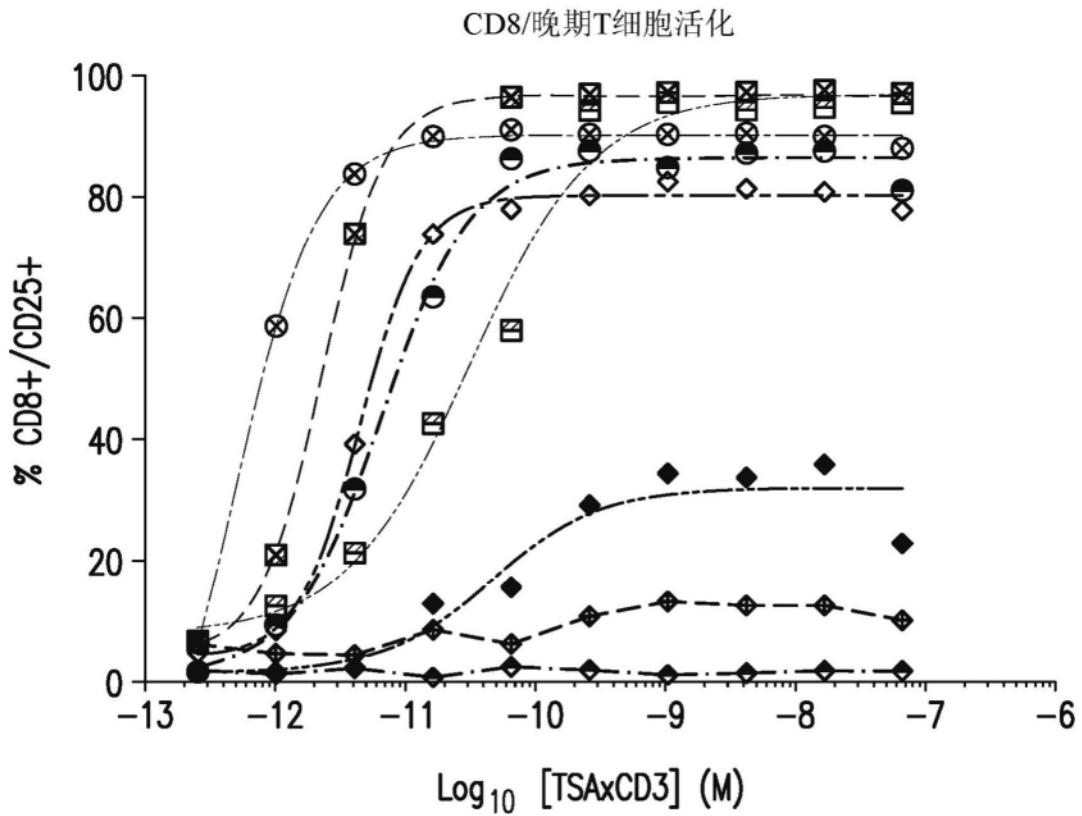


图19B