(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120202015 A
(43)申请公布日 2025.06.24

(21)申请号 202380065347.1

(22)申请日 2023.09.13

(30)优先权数据
63/406,475 2022.09.14 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.03.11

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2023/075190 2023.09.13

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/056758 EN 2024.03.21

(71)申请人 CDR-生物科技股份有限公司
地址 瑞士

(72)发明人 斯特凡妮·容米歇尔
法比安·贝尔特·沙伊费勒
安娜·玛丽亚·索别拉伊
菲利普·罗伯特·瑞克雷
汉内斯·梅尔滕
莱昂纳多·博拉斯
克里斯蒂安·瓦尔德马·温格·莱斯纳

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 张珊珊 何欣

(51)Int.Cl.
A61K 39/00(2006.01)
A61K 47/68(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C07K 16/30(2006.01)

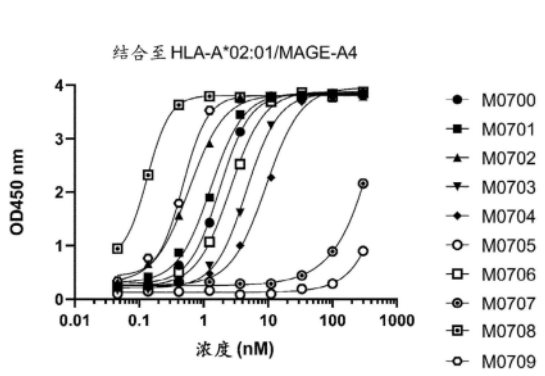
权利要求书11页 说明书66页
序列表（电子公布） 附图39页

(54)发明名称

MAGE-A4肽双重T细胞衔接子

(57)摘要

本文描述了对黑素瘤相关抗原A4(MAGE-A4)肽-MHC(pMHC)具有特异性的抗原结合蛋白。还描述了多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白包含对CD3的具有特异性的抗原结合结构域,以及至少一个MAGE-A4pMHC抗原结合结构域。还描述了用所述物质治疗癌症的方法。



CN 120202015 A

1.一种抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白特异性结合至黑素瘤相关抗原A4(MAGE-A4)肽-MHC(pMHC),所述抗原结合蛋白包含:

抗体重链可变(VH)结构域,所述抗体重链可变结构域包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列,以及

抗体轻链可变(VL)结构域,所述抗体轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列。

2.一种抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白特异性结合至黑素瘤相关抗原A4(MAGE-A4)肽-MHC(pMHC),所述抗原结合蛋白包含:

VH结构域,所述VH结构域包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列,以及

VL结构域,所述VL结构域包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列。

3.一种抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白特异性结合至黑素瘤相关抗原A4(MAGE-A4)肽-MHC(pMHC),所述抗原结合蛋白包含:

VH结构域,所述VH结构域包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列,其中所述VH结构域包含在SEQ ID NO:30的位置44的C氨基酸,以及

VL结构域,所述VL结构域包含与SEQ ID NO:35的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列,其中所述VL结构域包含在SEQ ID NO:35的位置102的C氨基酸。

4.一种抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白特异性结合至黑素瘤相关抗原A4(MAGE-A4)肽-MHC(pMHC),所述抗原结合蛋白包含:

VH结构域,所述VH结构域包含与SEQ ID NO:40的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列,其中所述VH结构域包含在SEQ ID NO:40的位置47的Y氨基酸、在位置71的R氨基酸以及在位置73的N氨基酸,以及

VL结构域,所述VL结构域包含与SEQ ID NO:45的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列。

5.如权利要求1-4中任一项所述的抗原结合蛋白,其中所述MAGE-A4 pMHC复合物是GVYDGREHTV(SEQ ID NO:3)HLA-A*02复合物。

6.如前述权利要求中任一项所述的抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白是全长免疫球蛋白或抗体片段,诸如Fab、Fab′、$F(ab')_2$、scFv、Fv片段。

7.如前述权利要求中任一项所述的抗原结合蛋白,其中:

所述VH结构域包含SNYAMS(SEQ ID NO:11)的HCDR1氨基酸序列、IVSSGGTTYYAX$_1$X$_2$X$_3$KG(SEQ ID NO:6)的HCDR2氨基酸序列,其中X_1对应于氨基酸S或D,X2对应于氨基酸W或S,并且X_3对应于氨基酸A或V,以及DLYYGPX$_4$TX$_5$YX$_6$X$_7$X$_8$NL的HCDR3氨基酸序列(SEQ ID NO:7),其中X_4对应于氨基酸T、N或S,X_5对应于氨基酸D或不存在,X6对应于氨基酸S或F,X_7对应于氨基酸A或V,并且X_8对应于氨基酸F或A;以及

所述VL结构域包含TADTLSRSYAS(SEQ ID NO:16)的LCDR1氨基酸序列、RDTSRPS(SEQ ID NO:17)的LCDR2氨基酸序列以及ATX$_9$X$_{10}$X$_{11}$SGSNFQX$_{12}$(SEQ ID NO:8)的LCDR3氨基酸序列,其

中X_9对应于氨基酸S或R,X_{10}对应于氨基酸D或P,X_{11}对应于氨基酸G、S或F,并且X_{12}对应于氨基酸L或A。

8.如前述权利要求中任一项所述的抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白连接至诸如可检测标记、治疗剂或PK修饰部分等功能实体或与其组合。

9.如前述权利要求中任一项所述的抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白是化学或生物学修饰的。

10.如权利要求9所述的抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白是糖基化的、PEG化的、PAS化的、XTEN化的或HES化的。

11.如权利要求1-10中任一项所述的抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白连接至诸如可检测标记、治疗剂或PK修饰部分等功能实体或与其组合。

12.一种嵌合抗原受体(CAR),所述嵌合抗原受体包含如前述权利要求中任一项所述的抗原结合蛋白。

13.一种免疫细胞,所述免疫细胞表达如权利要求12所述的CAR。

14.如权利要求13所述的免疫细胞,其中所述免疫细胞是T细胞。

15.一种多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白包含如权利要求1-11中任一项所述的抗原结合蛋白。

16.如权利要求15所述的多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白是双特异性或三特异性的。

17.如权利要求15或16中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白还包含至少一个其他结合结构域。

18.如权利要求17所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述其他结合结构域是免疫细胞衔接子。

19.如权利要求18所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述免疫细胞衔接子是CD3结合结构域或CD16a结合结构域。

20.如权利要求15-19中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白还包含第三抗原结合结构域。

21.如权利要求20所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述第三抗原结合结构域结合至HLA-A*02/MAGE-A4,特别是GVYDGREHTV(SEQ ID NO:3)HLA-A*02复合物。

22.如权利要求20或21所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述第三抗原结合结构域与所述第一抗原结合相同。

23.如权利要求20-22中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述第三抗原结合结构域包含:

抗体重链可变(VH)结构域,所述抗体重链可变结构域包含SNYA MS(SEQ ID NO:11)的HCDR1氨基酸序列、IVSSGGTTYYAX$_1$X$_2$X$_3$KG(SEQ ID NO:6)的HCDR2氨基酸序列,其中X_1对应于氨基酸S或D,X2对应于氨基酸W或S,并且X_3对应于氨基酸A或V,以及DLYYGPX$_4$TX$_5$YX$_6$X$_7$X$_8$NL的HCDR3氨基酸序列(SEQ ID NO:7),其中X_4对应于氨基酸T、N或S,X_5对应于氨基酸D或不存在,X_6对应于氨基酸S或F,X7对应于氨基酸A或V,并且X_8对应于氨基酸F或A;以及

抗体轻链可变(VL)结构域,所述抗体轻链可变结构域包含TADTLSRSYAS(SEQ ID NO:16)的LCDR1氨基酸序列、RDTSRPS(SEQ ID NO:17)的LCDR2氨基酸序列以及

$ATX_9X_{10}X_{11}SGSNFQX_{12}$(SEQ ID NO:8)的LCDR3氨基酸序列,其中X_9对应于氨基酸S或R,X_{10}对应于氨基酸D或P,X_{11}对应于氨基酸G、S或F,并且X_{12}对应于氨基酸L或A。

24.如权利要求20-23中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述第三抗原结合结构域包含:

i)抗体重链可变(V]田结构域,所述抗体重链可变结构域包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列,以及抗体轻链可变(VL)结构域,所述抗体轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列;

ii)VH结构域,所述VH结构域包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列,以及VL结构域,所述VL结构域包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列;

iii)VH结构域,所述VH结构域包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列,以及VL结构域,所述VL结构域包含与SEQ ID NO:35的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列;或

iv)VH结构域,所述VH结构域包含与SEQ ID NO:40的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列,以及VL结构域,所述VL结构域包含与SEQ ID NO:45的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列。

25.一种多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白包含:

a)特异性结合至CD3的第一抗原结合结构域;

b)特异性结合至黑素瘤相关抗原A4(MAGE-A4)肽-MHC(pM HC)的第二抗原结合结构域,所述第二抗原结合结构域包含:

b1)抗体重链可变(VH)结构域,所述抗体重链可变结构域包含SNYAMS(SEQ ID NO:11)的HCDR1氨基酸序列、$IVSSGGTTYYAX_1X_2X_3KG$(SEQ ID NO:6)的HCDR2氨基酸序列,其中X_1对应于氨基酸S或D,X_2对应于氨基酸W或S,并且X3对应于氨基酸A或V,以及$DLYYGPX_4TX_5YX_6X_7X_8NL$的HCDR3氨基酸序列(SEQ ID NO:7),其中X_4对应于氨基酸T、N或S,X_5对应于氨基酸D或不存在,X6对应于氨基酸S或F,X_7对应于氨基酸A或V,并且X_8对应于氨基酸F或A;以及

b2)抗体轻链可变(VL)结构域,所述抗体轻链可变结构域包含TADTLSRSYAS(SEQ ID NO:16)的LCDR1氨基酸序列、RDTSRPS(SEQ ID NO:17)的LCDR2氨基酸序列以及$ATX_9X_{10}X_{11}SGSNFQX_{12}$(SEQ ID NO:8)的LCDR3氨基酸序列,其中X_9对应于氨基酸S或R,X_{10}对应于氨基酸D或P,X_{11}对应于氨基酸G、S或F,并且X_{12}对应于氨基酸L或A;以及

c)特异性结合至MAGE-A4 pMHC的第三抗原结合结构域,所述第三抗原结合结构域包含:

c1)VH结构域,所述VH结构域包含SNYAMS(SEQ ID NO:11)的HCDR1氨基酸序列、$IVSSGGTTYYAX_1X_2X_3KG$(SEQ ID NO:6)的HCDR2氨基酸序列,其中X_1对应于氨基酸S或D,X_2对应于氨基酸W或S,并且X_3对应于氨基酸A或V,以及$DLYYGPX_4TX_5YX_6X_7X_8NL$的HCDR3氨基酸序列(SEQ ID NO:7),其中X_4对应于氨基酸T、N或S,X_5对应于氨基酸D或不存在,X_6对应于氨基酸S或F,X7对应于氨基酸A或V,并且X_8对应于氨基酸F或A;以及

c2)VL结构域,所述VL结构域包含TADTLSRSYAS(SEQ ID NO:16)的LCDR1氨基酸序列、RDTSRPS(SEQ ID NO:17)的LCDR2氨基酸序列以及$ATX_9X_{10}X_{11}SGSNFQX_{12}$(SEQ ID NO:8)的

LCDR3氨基酸序列,其中X_9对应于氨基酸S或R,X_{10}对应于氨基酸D或P,X_{11}对应于氨基酸G、S或F,并且X_{12}对应于氨基酸L或A。

26.如权利要求25所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述第二抗原结合结构域和所述第三抗原结合结构域包含:

VH,所述VH包含含有SNYAMS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列的HCDR1序列、含有IVSSGGTTYYADSVKG(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列的HCDR2序列以及含有DLYYGPNTDYSAANL(SEQ ID NO:13)的氨基酸序列的HCDR3序列;以及

VL,所述VL包含含有TADTLSRSYAS(SEQ ID NO:16)的氨基酸序列的LCDR1序列、含有RDTSRPS(SEQ ID NO:17)的氨基酸序列的LCDR2序列以及含有ATRPSSGSNFQA(SEQ ID NO:18)的氨基酸序列的LCDR3序列。

27.如权利要求26所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述第二抗原结合结构域和所述第三抗原结合结构域包含:

抗体重链可变(VH)结构域,所述抗体重链可变结构域包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列,以及

抗体轻链可变(VL)结构域,所述抗体轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列。

28.如权利要求25所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述第二抗原结合结构域和所述第三抗原结合结构域包含:

VH,所述VH包含含有SNYAMS(SEQ ID NO:21)的氨基酸序列的HCDR1序列、含有IVSSGGTTYYADSVKG(SEQ ID NO:22)的氨基酸序列的HCDR2序列以及含有DLYYGPSTYFVANL(SEQ ID NO:23)的氨基酸序列的HCDR3序列;以及

VL,所述VL包含含有TADTLSRSYAS(SEQ ID NO:26)的氨基酸序列的LCDR1序列、含有RDTSRPS(SEQ ID NO:27)的氨基酸序列的LCDR2序列以及含有ATRPSSGSNFQL(SEQ ID NO:28)的氨基酸序列的LCDR3序列。

29.如权利要求28所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述第二抗原结合结构域和所述第三抗原结合结构域包含:

VH结构域,所述VH结构域包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列,以及

VL结构域,所述VL结构域包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列。

30.如权利要求25所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述第二抗原结合结构域和所述第三抗原结合结构域包含:

VH,所述VH包含含有SNYAMS(SEQ ID NO:31)的氨基酸序列的HCDR1序列、含有IVSSGGTTYYASWAKG(SEQ ID NO:32)的氨基酸序列的HCDR2序列以及含有DLYYGPTTYSAANL(SEQ ID NO:33)的氨基酸序列的HCDR3序列;以及

VL,所述VL包含含有TADTLSRSYAS(SEQ ID NO:36)的氨基酸序列的LCDR1序列、含有RDTSRPS(SEQ ID NO:37)的氨基酸序列的LCDR2序列以及含有ATRDFSGSNFQL(SEQ ID NO:38)的氨基酸序列的LCDR3序列。

31.如权利要求30所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述第二抗原结合结构域和所

述第三抗原结合结构域包含:

VH结构域,所述VH结构域包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列,以及

VL结构域,所述VL结构域包含与SEQ ID NO:35的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列。

32.如权利要求25所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述第二抗原结合结构域和所述第三抗原结合结构域包含:

VH,所述VH包含含有SNYAMS(SEQ ID NO:41)的氨基酸序列的HCDR1序列、含有IVSSGGTTYYASWAKG(SEQ ID NO:42)的氨基酸序列的HCDR2序列以及含有DLYYGPTTYSAFNL(SEQ ID NO:43)的氨基酸序列的HCDR3序列;以及

VL,所述VL包含含有TADTLSRSYAS(SEQ ID NO:46)的氨基酸序列的LCDR1序列、含有RDTSRPS(SEQ ID NO:47)的氨基酸序列的LCDR2序列以及含有ATRPSSGSNFQA(SEQ ID NO:48)的氨基酸序列的LCDR3序列。

33.如权利要求25所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述第二抗原结合结构域和所述第三抗原结合结构域包含:

VH结构域,所述VH结构域包含与SEQ ID NO:40的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列,以及

VL结构域,所述VL结构域包含与SEQ ID NO:45的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列。

34.如权利要求15-33中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述第一抗原结合结构域、所述第二抗原结合结构域以及所述第三抗原结合结构域中的任何一者或多者包含抗体片段。

35.如权利要求34所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述抗体片段包含Fab片段、$F(ab')_2$片段、Fab′片段、Fv片段、单链可变片段(scFv)以及单域抗体片段。

36.如权利要求15-35中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述免疫细胞或CD3抗原结合结构域是Fab片段,其中所述Fab片段包含含有CH1结构域和所述VH的重链,以及含有CL结构域和所述VL的轻链。

37.如权利要求35或36所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述MAGE-A4 pMHC抗原结合结构域包含scFv。

38.如权利要求35或36所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述CH1结构域包含抗体铰链区的至少5个氨基酸。

39.如权利要求38所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述CH1结构域包含抗体铰链区的氨基酸序列EPKSC。

40.如权利要求36-39中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述第二抗原结合结构域可操作地连接至所述Fab片段的所述重链的C端或所述重链的N端。

41.如权利要求36-40中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述第三抗原结合结构域可操作地连接至所述Fab片段的所述重链的C端或所述重链的N端。

42.如权利要求36-41中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,其中:

a)所述第二抗原结合结构域包含连接至所述Fab结构域重链的C端的scFv并且所述第

三抗原结合结构域包含连接至所述Fab结构域轻链的C端的scFv;

b)所述第二抗原结合结构域包含连接至所述Fab结构域重链的N端的scFv并且所述第三抗原结合结构域包含连接至所述Fab结构域轻链的N端的scFv;

c)所述第二抗原结合结构域包含连接至所述Fab结构域重链的N端的scFv并且所述第三抗原结合结构域包含连接至所述Fab结构域轻链的C端的scFv;或

d)所述第二抗原结合结构域包含连接至所述Fab结构域重链的C端的scFv并且所述第三抗原结合结构域包含连接至所述Fab结构域轻链的N端的scFv。

43.如权利要求42所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述scFv用氨基酸接头连接至所述Fab结构域。

44.如权利要求43所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述氨基酸接头包含(GGGGS)n,其中n是1与5之间的整数。

45.如权利要求43或44所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述氨基酸接头包含氨基酸序列GGGGS、GGGGSGGGGSGGGGS、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGAS或GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS。

46.如权利要求25-45中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述第二抗原结合结构域VH和VL和/或所述第三抗原结合结构域VH和VL用氨基酸接头连接。

47.如权利要求46所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述氨基酸接头包含(GGGGS)n,其中n是1与5之间的整数。

48.如权利要求46或47所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述氨基酸接头包含氨基酸序列GGGGS、GGGGSGGGGSGGGGS、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGAS或GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS。

49.如权利要求15-48中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述多特异性抗原结合蛋白不包含Fc结构域。

50.如权利要求15-49中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白包含$(scFv)_2$、$(scFv)_3$、BiTE、BIKE、Dart、双抗体、三抗体、Fab_2、Fab_3、Fab_4、scFv-Fab-scFv或微型抗体-scFv。

51.如权利要求15-50中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白包含约75kDa至约110kDa的分子量。

52.如权利要求51所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白相对于具有<约75kDa的分子量的抗原结合蛋白具有延长的血清半衰期。

53.如权利要求15-52中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述CD3抗原结合结构域包含:

a1)VH,所述VH包含含有STYAMN(SEQ ID NO:51)的氨基酸序列的HCDR1序列、含有RIRSKYNNYATYYADSVKG(SEQ ID NO:52)的氨基酸序列的HCDR2序列以及含有HGNFGDSYVSWFAY(SEQ ID NO:53)的氨基酸序列的HCDR3序列;以及

a2)VL,所述VL包含含有GSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:56)的氨基酸序列的LCDR1序列、含有GTNKRAP(SEQ ID NO:57)的氨基酸序列的LCDR2序列以及含有ALWYSNHWV(SEQ ID NO:58)的氨基酸序列的LCDR3序列。

54.如权利要求15-53中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述CD3抗原结合

结构域包含:

-VH,所述VH包含与SEQ ID NO:50的氨基酸序列至少约90%同一的氨基酸序列,以及

-VL,所述VL包含与SEQ ID NO:55的氨基酸序列至少约90%同一的氨基酸序列。

55.如权利要求54所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述CD3抗原结合结构域包含:

-VH,所述VH包含与SEQ ID NO:49的氨基酸序列至少约90%同一的氨基酸序列,以及

-VL,所述VL包含与SEQ ID NO:54的氨基酸序列至少约90%同一的氨基酸序列。

56.如权利要求34-55中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述第二抗原结合结构域和/或所述第三抗原结合结构域包含根据Kabat编号在位置11、89和/或108具有极性氨基酸的可变重链。

57.如权利要求34-56中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述Fab结构域包含根据Kabat编号在位置11、89和/或108具有极性氨基酸的可变重链。

58.如权利要求56或57所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述可变重链包含:

根据Kabat编号在氨基酸位置11的亮氨酸(L)或丝氨酸(S);

根据Kabat编号在氨基酸位置89的缬氨酸(V)、丝氨酸(S)或苏氨酸(T);和/或

根据Kabat编号在氨基酸位置108的亮氨酸(L)、丝氨酸(S)或苏氨酸(T)。

59.如权利要求57或58所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述极性氨基酸是丝氨酸(S)和/或苏氨酸(T)。

60.如权利要求57-59中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述可变重链包含根据Kabat编号在氨基酸位置11的丝氨酸(S)、在氨基酸位置89的丝氨酸(S)或苏氨酸(T)以及在氨基酸位置108的丝氨酸(S)或苏氨酸(T)。

61.如权利要求57-60中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述可变重链包含根据Kabat编号在氨基酸位置11的丝氨酸(S)、在氨基酸位置89的丝氨酸(S)以及在氨基酸位置108的丝氨酸(S)。

62.一种多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白结合至GVYDGREHTV(SEQ ID NO:3)HLA-A*02复合物以及CD3,所述多特异性抗原结合蛋白包含:

(i)第一多肽链,所述第一多肽链包含SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:9至少90%、95%、96%、97%、98%或99%同一,以及第二多肽链,所述第二多肽链包含SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:14至少90%、95%、96%、97%、98%或99%同一;

(ii)第一多肽链,所述第一多肽链包含SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:19至少90%、95%、96%、97%、98%或99%同一,以及第二多肽链,所述第二多肽链包含SEQ ID NO:24中所示的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:24至少90%、95%、96%、97%、98%或99%同一;

(iii)第一多肽链,所述第一多肽链包含SEQ ID NO:29中所示的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:29至少90%、95%、96%、97%、98%或99%同一,以及第二多肽链,所述第二多肽链包含SEQ ID NO:34中所示的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:34至少90%、95%、96%、97%、98%或99%同一;或

(iv)第一多肽链,所述第一多肽链包含SEQ ID NO:39中所示的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:39至少90%、95%、96%、97%、98%或99%同一,以及第二多肽链,

所述第二多肽链包含SEQ ID NO:44中所示的氨基酸序列或其变体,所述变体与SEQ ID NO:44至少90%、95%、96%、97%、98%或99%同一。

63.一种多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白包含:

a)特异性结合至CD3的第一抗原结合结构域,所述第一抗原结合结构域包含:

a1)VH,所述VH包含含有STYAMN(SEQ ID NO:51)的氨基酸序列的HCDR1序列、含有RIRSKYNNYATYYADSVKG(SEQ ID NO:52)的氨基酸序列的HCDR2序列以及含有HGNFGDSYVSWFAY(SEQ ID NO:53)的氨基酸序列的HCDR3序列;以及

a2)VL,所述VL包含含有GSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:56)的氨基酸序列的LCDR1序列、含有GTNKRAP(SEQ ID NO:57)的氨基酸序列的LCDR2序列以及含有ALWYSNHWV(SEQ ID NO:58)的氨基酸序列的LCDR3序列;

b)特异性结合至黑素瘤相关抗原A4(MAGE-A4)肽-MHC(pMHC)的第二抗原结合结构域。

64.如权利要求63所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述第二抗原结合结构域包含:

b1)抗体重链可变(VH)结构域,所述抗体重链可变结构域包含SNYAMS(SEQ ID NO:11)的HCDR1氨基酸序列、IVSSGGTTYYA $X_1X_2X_3$KG(SEQ ID NO:6)的HCDR2氨基酸序列,其中X_1对应于氨基酸S或D,X_2对应于氨基酸W或S,并且X3对应于氨基酸A或V,以及DLYYGPX$_4$TX$_5$YX$_6$X$_7$X$_8$NL的HCDR3氨基酸序列(SEQ ID NO:7),其中X_4对应于氨基酸T、N或S,X_5对应于氨基酸D或不存在,X6对应于氨基酸S或F,X_7对应于氨基酸A或V,并且X_8对应于氨基酸F或A;以及

b2)抗体轻链可变(VL)结构域,所述抗体轻链可变结构域包含TADTLSRSYAS(SEQ ID NO:16)的LCDR1氨基酸序列、RDTSRPS(SEQ ID NO:17)的LCDR2氨基酸序列以及ATX$_9$X$_{10}$X$_{11}$SGSNFQX$_{12}$(SEQ ID NO:8)的LCDR3氨基酸序列,其中X_9对应于氨基酸S或R,X_{10}对应于氨基酸D或P,X_{11}对应于氨基酸G、S或F,并且X_{12}对应于氨基酸L或A。

65.如权利要求63或64所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述第一抗原结合结构域包含:

-VH,所述VH包含与SEQ ID NO:50的氨基酸序列至少约90%同一的氨基酸序列,以及

-VL,所述VL包含与SEQ ID NO:55的氨基酸序列至少约90%同一的氨基酸序列。

66.如权利要求65所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述第一抗原结合结构域包含:

-VH,所述VH包含与SEQ ID NO:49的氨基酸序列至少约90%同一的氨基酸序列,以及

-VL,所述VL包含与SEQ ID NO:54的氨基酸序列至少约90%同一的氨基酸序列。

67.如权利要求63-66中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白还包含第三抗原结合结构域。

68.如权利要求63-67中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白包含:

c)特异性结合至MAGE-A4 pMHC的第三抗原结合结构域,所述第三抗原结合结构域包含:

c1)VH结构域,所述VH结构域包含SNYAMS(SEQ ID NO:11)的HCDR1氨基酸序列、IVSSGGTTYYAX$_1$X$_2$X$_3$KG(SEQ ID NO:6)的HCDR2氨基酸序列,其中X_1对应于氨基酸S或D,X_2对应于氨基酸W或S,并且X_3对应于氨基酸A或V,以及DLYYGPX$_4$TX$_5$YX$_6$X$_7$X$_8$NL的HCDR3氨基酸序列(SEQ ID NO:7),其中X_4对应于氨基酸T、N或S,X_5对应于氨基酸D或不存在,X_6对应于氨基酸S

或F,X_7对应于氨基酸A或V,并且X_8对应于氨基酸F或A;以及c2)VL结构域,所述VL结构域包含TADTLSRSYAS(SEQ ID NO:16)的LCDR1氨基酸序列、RDTSRPS(SEQ ID NO:17)的LCDR2氨基酸序列以及ATX$_9$X$_{10}$X$_{11}$SGSNFQX$_{12}$(SEQ ID NO:8)的LCDR3氨基酸序列,其中X_9对应于氨基酸S或R,X_{10}对应于氨基酸D或P,X_{11}对应于氨基酸G、S或F,并且X_{12}对应于氨基酸L或A。

69.如权利要求15-68中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述MAGE-A4肽-MHC(pMHC)是GVYDGREHTV(SEQ ID NO:3)HLA-A*02复合物。

70.如权利要求15-68中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白如通过SEC-HPLC所测定在4℃下在1mg/ml和/或10mg/ml下在PBS中孵育14天之后保持至少94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%为单体。

71.如权利要求15-68中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白如通过LDH细胞毒性测定所确定显示对靶阳性肿瘤细胞的功效。

72.如权利要求15-68中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白在细胞系源性小鼠NSCLC异种移植模型中显示肿瘤生长抑制和肿瘤根除。

73.如权利要求15-72中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白是化学或生物学修饰的。

74.如权利要求53所述的多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白是糖基化的、PEG化的、HES化的、PAS化的或XTEN化的。

75.如权利要求15-74中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白连接至诸如可检测标记、治疗剂或PK修饰部分等功能实体或与其组合。

76.如权利要求75所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述功能实体是毒素。

77.如权利要求15-76中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述轻链和/或所述重链包含1、2、3、4或5个氨基酸的N端和/或C端截短。

78.如权利要求77所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述轻链包含1或2个氨基酸的N端截短。

79.如权利要求15-76中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白在所述轻链和/或所述重链的位置1包含焦谷氨酸(pE)而不是谷氨酰胺(Q)或谷氨酸(E)。

80.如权利要求79所述的多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白在所述轻链的位置1包含焦谷氨酸(pE)而不是谷氨酰胺(Q)或谷氨酸(E)。

81.如权利要求1-11中任一项所述的抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白用于诊断。

82.如权利要求15-80中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白用于抑制癌细胞生长或增殖的方法中。

83.如权利要求15-80中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白用于使T细胞重定向至表达MAGE-A4的癌细胞的方法中。

84.如权利要求1-11中任一项所述的抗原结合蛋白、如权利要求12所述的CAR、如权利要求13-14所述的免疫细胞或如权利要求15-80中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白、所述CAR、所述免疫细胞或所述多特异性抗原结合蛋白用作药剂。

85.如权利要求1-11中任一项所述的抗原结合蛋白、如权利要求12所述的CAR、如权利要求13-14所述的免疫细胞或如权利要求15-80中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,所

述抗原结合蛋白、所述CAR、所述免疫细胞或所述多特异性抗原结合蛋白用于疾病,特别是癌症的治疗。

86.一种核酸,所述核酸编码如权利要求1-11中任一项所述的抗原结合蛋白、如权利要求12所述的CAR或如权利要求15-80中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白。

87.一种载体,所述载体包含如权利要求86所述的核酸。

88.一种宿主细胞群体,所述宿主细胞群体包含如权利要求87所述的载体。

89.一种药盒,所述药盒包含如权利要求1-11中任一项所述的抗原结合蛋白或如权利要求15-80中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白。

90.一种制造如权利要求1-11中任一项所述的抗原结合蛋白或如权利要求15-80中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白的方法,所述方法包括以下步骤:

(i)在允许所述抗原结合蛋白或所述多特异性抗原结合蛋白表达的条件下培养如权利要求87所述的宿主细胞

(ii)回收所述抗原结合蛋白或所述多特异性抗原结合蛋白;以及任选地

(iii)进一步对所述抗原结合蛋白或所述多特异性抗原结合蛋白进行纯化和/或修饰和/或配制。

91.一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求1-11中任一项所述的抗原结合蛋白、如权利要求12所述的CAR、如权利要求13或14所述的免疫细胞或如权利要求15-80中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,以及药学上可接受的缓冲液。

92.如权利要求1-11中任一项所述的抗原结合蛋白、如权利要求12所述的CAR、如权利要求13或14所述的免疫细胞、如权利要求15-80中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白或如权利要求66所述的药物组合物在药剂的制造中的用途。

93.如权利要求1-11中任一项所述的抗原结合蛋白、如权利要求12所述的CAR、如权利要求13或14所述的免疫细胞、如权利要求15-80中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白或如权利要求66所述的药物组合物,所述抗原结合蛋白、所述CAR、所述免疫细胞、所述多特异性抗原结合蛋白或所述药物组合物用作药剂。

94.如权利要求1-11中任一项所述的抗原结合蛋白、如权利要求12所述的CAR、如权利要求13或14所述的免疫细胞、如权利要求15-80中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白、如权利要求88所述的细胞或如权利要求91所述的药物组合物在疾病,特别是癌症的治疗中的用途。

95.如权利要求1-11中任一项所述的抗原结合蛋白、如权利要求12所述的CAR、如权利要求13或14所述的免疫细胞、如权利要求15-80中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白、如权利要求88所述的细胞或如权利要求91所述的药物组合物,所述抗原结合蛋白、所述CAR、所述免疫细胞、所述多特异性抗原结合蛋白、所述细胞或所述药物组合物用于治疗疾病,特别是癌症。

96.一种治疗有需要的患者的表达MAGE-A4 pMHC的癌症的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的如权利要求1-11中任一项所述的抗原结合蛋白、如权利要求12所述的CAR、如权利要求13或14所述的免疫细胞、如权利要求15-80中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白、如权利要求88所述的细胞或如权利要求91所述的药物组合物。

97.如权利要求94所述的用途,如权利要求95所述的抗原结合蛋白或如权利要求96所

述的方法,其中癌症选自由以下组成的组:头部和颈部鳞状细胞癌(HNSC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、三阴性乳腺癌、尿路上皮癌、高级别子宫内膜癌,包括子宫癌肉瘤(UCS;特别是UCEC亚组)、粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤、胃或胃食管连接部(GEJ)腺癌、上皮卵巢癌,诸如高级别浆液性卵巢癌、滑膜肉瘤、膀胱尿路上皮癌(BLCA),特别是转移细胞癌、睾丸生殖细胞肿瘤(TGCT)以及宫颈鳞状细胞癌(CESC)。

98.如权利要求97所述的用途、如权利要求97所述的抗原结合蛋白或如权利要求97所述的方法,其中所述癌症是鳞状来源的,诸如头部和颈部鳞状细胞癌(HNSCC)或鳞状NSCLC。

99.一种选择适于用MAGE-A4拮抗剂治疗的患者的方法,所述方法包括以下依序进行的步骤:

(i)从患者获得肿瘤样品;

(ii)将抗MAGEA4检测抗体添加至所述样品中;

(iii)孵育所述检测抗体和所述样品;

(iv)检测结合至所述样品的所述检测抗体;以及

(v)如果所述检测抗体被所述样品结合,那么将所述患者选择为用MAGE-A4拮抗剂治疗。

100.如权利要求99所述的方法,其中所述检测抗体是OTI1F9、E7O1U或如权利要求1-11中任一项所述的抗原结合蛋白。

101.如权利要求99或100所述的方法,所述方法还包括进行RNA测序以检测总MAGE-A4的步骤。

102.如权利要求99至101中任一项所述的方法,其中在疾病,特别是癌症的所述治疗中,所述MAGE-A4拮抗剂是如权利要求1-11中任一项所述的抗原结合蛋白、如权利要求12所述的CAR、如权利要求13或14所述的免疫细胞、如权利要求15-80中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白、如权利要求88所述的细胞或如权利要求91所述的药物组合物。

MAGE-A4肽双重T细胞衔接子

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2022年9月14日提交的美国临时申请序列号63/40 6,475的权益,其全部公开内容在此以引用的方式并入本文中。

背景技术

[0003] 黑素瘤相关抗原A4(MAGE-A4)肽-MHC(pMHC)表达存在于许多癌症中,包括非小细胞肺癌(NSCLC)、黑素瘤、膀胱癌、头颈癌以及胃食管癌(Grossman等N Engl J Med.2016.375:1109-1112)。因此,它代表了基于TCR的T细胞疗法的有吸引力的靶标。不幸的是,TCR分子对其pMHC靶标具有低亲和力。此外,基于TCR的T细胞疗法开发和使用起来费力并且昂贵。相比之下,分离的单克隆抗体对其靶标提供基本上更高的结合亲和力,且脱靶活性可能降低。然而,由于HLA中结合肽的小表位,难以产生针对pMHC靶标的单克隆抗体。

[0004] 因此,本领域需要新颖的抗原结合蛋白,所述新颖的抗原结合蛋白适合作为治疗剂并且以高亲和力特异性识别靶MAGE-A4 pMHC同时保持高特异性(即对健康组织的脱靶效应低,甚至没有),具有有利的药物样特性,并且可以合理的成本以足够的数量和质量生产。

发明内容

[0005] 本公开涉及特异性结合至黑素瘤相关抗原A4(MAGE-A4)肽-MHC(pMHC)的抗原结合蛋白和多特异性抗原结合蛋白。本发明的抗原结合蛋白和多特异性抗原结合蛋白包含增强的对靶MAGE-A4 pMHC的结合亲和力和/或增强的稳定性,以及对非靶MAGE-A4 pMHC或其他分子的低脱靶结合。多特异性抗原结合蛋白还可包含特异性结合至免疫细胞的细胞表面蛋白(例如CD3)的Fab结构域,所述Fab结构域包含重链和轻链;可操作地连接至重链的至少第一pMHC结合结构域,其中第一pMHC结合结构域结合至第一靶肽-MHC(pMHC)复合物;以及c)可操作地连接至轻链的至少第二pMHC结合结构域,其中第二pMHC结合结构域结合至第二pMHC复合物。用本发明的双特异性抗原结合蛋白对pMHC的二价靶向使得与它们的单价双特异性对应物相比增加癌细胞杀伤作用,而针对携带相同HLA但不表达靶蛋白的细胞的总体特异性基本上不受影响。

[0006] 优选地,本发明的抗原结合蛋白缺乏Fc结构域,并且因此不通过效应细胞上的Fc受体(诸如巨噬细胞和活化的嗜中性粒细胞上的Fc受体Fcγ RIII)或抑制性受体(诸如Fcγ RIIb)和非细胞毒性细胞(诸如血小板和B细胞)上的Fcγ RIIa复合物识别。对于双特异性T细胞衔接子,为了避免由于CD3和Fcγ受体的交联继之以非特异性免疫细胞活化所导致的非抗原依赖性细胞因子释放综合征(CRS),Fc介导的免疫功能是不需要的。相反地,抗原结合蛋白的Fab结构域充当与其他pMHC结合结构域连接的特异性异二聚化支架。Fab片段的重链(Fd片段)和轻链(L)的天然和有效异源二聚化特性使Fab片段成为可用的支架。其他结合结构域可以是若干不同的模式,包括但不限于另一Fab结构域、scFv或sdAb。此外,在某些情况下,含Fc的抗原结合蛋白由于半衰期增加而可能是不利的。延长的半衰期可能会导致增加的毒性,尤其是从免疫细胞释放过量的细胞因子。延长的半衰期还可能会促进T细胞耗

竭。缺乏Fc结构域的本公开的抗原结合蛋白可具有降低的细胞毒性,部分原因是相对于含Fc的抗原结合蛋白具有较短的半衰期。

[0007] 除了对其靶标具有高度特异性之外,本发明的抗原结合蛋白还表现出有利的药物样特性,诸如内在稳定性和/或一般物理和化学稳定性。

[0008] 在一个方面中,本公开提供了一种特异性结合至黑素瘤相关抗原A4(MAGE-A4)肽-MHC(pMHC)的抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白包含:(i)抗体重链可变(VH)结构域,所述抗体重链可变结构域包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列,以及抗体轻链可变(VL)结构域,所述抗体轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列;(ii)VH结构域,所述VH结构域包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列,以及VL结构域,所述VL结构域包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列;(iii)VH结构域,所述VH结构域包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列,其中所述VH结构域包含在SEQ ID NO:30的位置44的C氨基酸,以及VL结构域,所述VL结构域包含与SEQ ID NO:35的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列,其中所述VL结构域包含在SEQ ID NO:35的位置102的C氨基酸;或(iv)VH结构域,所述VH结构域包含与SEQ ID NO:40的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列,其中所述VH结构域包含在SEQ ID NO:40的位置47的Y氨基酸、在位置71的R氨基酸以及在位置73的N氨基酸,以及VL结构域,所述VL结构域包含与SEQ ID NO:45的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列。

[0009] 在某些实施方案中,MAGE-A4 pMHC复合物是GVYDGREHTV(SEQ ID NO:3)HLA-A*02复合物。在某些实施方案中,MAGE-A4pMHC复合物是GVYDGREHTV(SEQ ID NO:3)HLA-A*02:01复合物。

[0010] 在某些实施方案中,如通过SEC-HPLC所测定,在约1mg/mL(例如0.90至1.10mg/mL)至约10mg/mL(例如9.9至10.1mg/mL)的浓度下在4℃下在PBS中储存至少两周期间,抗原结合蛋白保持至少94%为单体,诸如94%、95%、96%、97%、98%或99%。在某些实施方案中,如通过SEC-HPLC所测定,在约1mg/mL(例如0.90至1.10mg/mL)至约10mg/mL(例如9.9至10.1mg/mL)的浓度下在37℃下在PBS中储存至少两周期间,抗原结合蛋白保持至少80%为单体。在某些实施方案中,如通过SEC-HPLC所测定,在约1mg/mL(例如0.90至1.10mg/mL)至约10mg/mL(例如9.9至10.1mg/mL)的浓度下在37℃下在PBS中储存至少两周期间,抗原结合蛋白保持至少95%为单体。在某些实施方案中,如通过SEC-HPLC所测定,在约1mg/mL和约10mg/mL的浓度下在4℃下在PBS中储存至少两周期间,抗原结合蛋白保持至少94%为单体,诸如94%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0011] 在某些实施方案中,抗原结合蛋白包含全长免疫球蛋白或抗体片段,诸如Fab、Fab'、$F(ab')_2$、scFv或Fv片段。

[0012] 在某些实施方案中,VH结构域包含SNYAMS(SEQ ID NO:11)的HCDR1氨基酸序列、$IVSSGGTTYYAX_1X_2X_3KG$(SEQ ID NO:6)的HCDR2氨基酸序列(其中X_1对应于氨基酸S或D,X_2对应于氨基酸W或S,并且X_3对应于氨基酸A或V)以及$DLYYGPX_4TX_5YX_6X_7X_8NL$(SEQ ID NO:7)的

HCDR3氨基酸序列(其中X_4对应于氨基酸T、N或S,X_5对应于氨基酸D或不存在,X_6对应于氨基酸S或F,X_7对应于氨基酸A或V,并且X_8对应于氨基酸F或A);并且VL结构域包含TADTLSRSYAS(SEQ ID NO:16)的LCDR1氨基酸序列、RDTSRPS(SEQ ID NO:17)的LCDR2氨基酸序列以及$ATX_9X_{10}X_{11}SGSNFQX_{12}$(SEQ ID NO:8)的LCDR3氨基酸序列,其中X_9对应于氨基酸S或R,X_{10}对应于氨基酸D或P,X_{11}对应于氨基酸G、S或F,并且X_{12}对应于氨基酸L或A。

[0013] 在某些实施方案中,抗原结合蛋白连接至可检测标记、治疗剂或PK修饰部分或与其组合。

[0014] 在某些实施方案中,抗原结合蛋白是化学或生物学修饰的。在某些实施方案中,抗原结合蛋白是糖基化的、PEG化的、PAS化的、XTEN化的或HES化的。

[0015] 在一个方面中,本公开提供了一种包含上文所述的抗原结合蛋白的嵌合抗原受体(CAR)。

[0016] 在另一方面中,本公开提供了一种表达上文所述的CAR的免疫细胞。在某些实施方案中,免疫细胞是T细胞。

[0017] 在另一方面中,本公开提供了一种包含上文所述的抗原结合蛋白的多特异性抗原结合蛋白。

[0018] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白是双特异性或三特异性的。

[0019] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白还包含至少一个其他结合结构域。在某些实施方案中,所述其他结合结构域是免疫细胞衔接子,特别是CD3结合结构域或CD16a结合结构域。

[0020] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白还包含第三抗原结合结构域。在某些实施方案中,第三抗原结合结构域结合至HLA-A*02/MAGE-A4。在某些实施方案中,第三抗原结合结构域与如上文所定义的第一MAEG-A4 pMHC抗原结合结构域相同。

[0021] 在某些实施方案中,所述第三抗原结合结构域包含:抗体重链可变(VH)结构域,所述抗体重链可变结构域包含SNYAMS(SEQ ID NO:11)的HCDR1氨基酸序列、$IVSSGGTTYYAX_1X_2X_3KG$(SEQ ID NO:6)的HCDR2氨基酸序列(其中X_1对应于氨基酸S或D,X_2对应于氨基酸W或S,并且X_3对应于氨基酸A或V)以及$DLYYGP\ X_4TX_5YX_6X_7X_8NL$(SEQ ID NO:7)的HCDR3氨基酸序列(其中X_4对应于氨基酸T、N或S,X_5对应于氨基酸D或不存在,X_6对应于氨基酸S或F,X_7对应于氨基酸A或V,并且X_8对应于氨基酸F或A);以及抗体轻链可变(VL)结构域,所述抗体轻链可变结构域包含TADTLSRSYAS(SEQ ID NO:16)的LCDR1氨基酸序列、RDTSRPS(SEQ ID NO:17)的LCDR2氨基酸序列以及$ATX_9X_{10}X_{11}SGSNFQX_{12}$(SEQ ID NO:8)的LCDR3氨基酸序列,其中X_9对应于氨基酸S或R,X_{10}对应于氨基酸D或P,X_{11}对应于氨基酸G、S或F,并且X_{12}对应于氨基酸L或A。

[0022] 在某些实施方案中,所述第三抗原结合结构域包含:i)抗体重链可变(VH)结构域,所述抗体重链可变结构域包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列,以及抗体轻链可变(VL)结构域,所述抗体轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列;ii)VH结构域,所述VH结构域包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列,以及VL结构域,所述VL结构域包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序

列;iii)VH结构域,所述VH结构域包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列,以及VL结构域,所述VL结构域包含与SEQ ID NO:35的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列;或iv)VH结构域,所述VH结构域包含与SEQ ID NO:40的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列,以及VL结构域,所述VL结构域包含与SEQ ID NO:45的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列。

[0023] 在一个方面中,本公开提供了一种多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白包含:a)特异性结合至CD3的第一抗原结合结构域;b)特异性结合至黑素瘤相关抗原A4(MAGE-A4)肽-MHC(pMHC)的第二抗原结合结构域,所述第二抗原结合结构域包含:b1)抗体重链可变(VH)结构域,所述抗体重链可变结构域包含SNYAMS(SEQ ID NO:11)的HCDR1氨基酸序列、IVSSGGTTYYAX$_1$X$_2$X$_3$KG(SEQ ID NO:6)的HCDR2氨基酸序列(其中X$_1$对应于氨基酸S或D,X$_2$对应于氨基酸W或S,并且X$_3$对应于氨基酸A或V)以及DLYYGPX$_4$TX$_5$YX$_6$X$_7$X$_8$NL(SEQ ID NO:7)的HCDR3氨基酸序列(其中X$_4$对应于氨基酸T、N或S,X$_5$对应于氨基酸D或不存在,X$_6$对应于氨基酸S或F,X$_7$对应于氨基酸A或V,并且X$_8$对应于氨基酸F或A);以及b2)抗体轻链可变(VL)结构域,所述抗体轻链可变结构域包含TADTLSRSYAS(SEQ ID NO:16)的LCDR1氨基酸序列、RDTSRPS(SEQ ID NO:17)的LCDR2氨基酸序列以及ATX$_9$X$_{10}$X$_{11}$SGSNFQX$_{12}$(SEQ ID NO:8)的LCDR3氨基酸序列,其中X$_9$对应于氨基酸S或R,X$_{10}$对应于氨基酸D或P,X$_{11}$对应于氨基酸G、S或F,并且X$_{12}$对应于氨基酸L或A。

[0024] 在某些实施方案中,MAGE-A4肽-MHC(pMHC)是GVYDGREHTV(SEQ ID NO:3)HLA-A*02复合物。

[0025] 在某些实施方案中,如通过SEC-HPLC所测定,在4℃下在PBS中孵育14天之后,多特异性抗原结合蛋白保持至少94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%为单体。

[0026] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白还包含第三抗原结合结构域,特别地,所述第三结合结构域与所述第二结合结构域相同。

[0027] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白包含:c)特异性结合至MAGE-A4 pMHC的第三抗原结合结构域,所述第三抗原结合结构域包含:c1)VH结构域,所述VH结构域包含SNYAMS(SEQ ID NO:11)的HCDR1氨基酸序列、IVSSGGTTYYAX$_1$X$_2$X$_3$KG(SEQID NO:6)的HCDR2氨基酸序列(其中X$_1$对应于氨基酸S或D,X$_2$对应于氨基酸W或S,并且X$_3$对应于氨基酸A或V)以及DLYYGPX$_4$TX$_5$YX$_6$X$_7$X$_8$NL(SEQ ID NO:7)的HCDR3氨基酸序列(其中X$_4$对应于氨基酸T、N或S,X$_5$对应于氨基酸D或不存在,X$_6$对应于氨基酸S或F,X$_7$对应于氨基酸A或V,并且X$_8$对应于氨基酸F或A);以及c2)VL结构域,所述VL结构域包含TADTLSRSYAS(SEQ ID NO:16)的LCDR1氨基酸序列、RDTSRPS(SEQ ID NO:17)的LCDR2氨基酸序列以及ATX$_9$X$_{10}$X$_{11}$SGSNFQX$_{12}$(SEQ ID NO:8)的LCDR3氨基酸序列,其中X$_9$对应于氨基酸S或R,X$_{10}$对应于氨基酸D或P,X$_{11}$对应于氨基酸G、S或F,并且X$_{12}$对应于氨基酸L或A。

[0028] 在某些实施方案中,第二和第三抗原结合结构域包含:(i)VH,所述VH包含含有SNYAMS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列的HCDR1序列、含有IVSSGGTTYYADSVKG(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列的HCDR2序列以及含有DLYYGPNTDYSAANL(SEQ ID NO:13)的氨基酸序列的HCDR3序列;以及VL,所述VL包含含有TA DTLSRSYAS(SEQ ID NO:16)的氨基酸序列的LCDR1序列、含有RDTSRPS(SEQ ID NO:17)的氨基酸序列的LCDR2序列以及含有ATRPSSGSNFQA(SEQ

ID NO:18)的氨基酸序列的LCDR3序列;(ii)VH,所述VH包含含有SNYAMS(SEQ ID NO:21)的氨基酸序列的HCDR1序列、含有IVSSGGTTYYADSVKG(SEQ ID NO:22)的氨基酸序列的HCDR2序列以及含有DLYYGPSTYFVANL(SEQ ID NO:23)的氨基酸序列的HCDR3序列;以及VL,所述VL包含含有TADTLSRSYAS(SEQ ID NO:26)的氨基酸序列的LCDR1序列、含有RDTSRPS(SEQ ID NO:27)的氨基酸序列的LCDR2序列以及含有ATRPSSGSNFQL(SEQ ID NO:28)的氨基酸序列的LCDR3序列;(iii)VH,所述VH包含含有SNYAMS(SEQ ID NO:31)的氨基酸序列的HCDR1序列、含有IVSSGGTTYYASWAKG(SEQ ID NO:32)的氨基酸序列的HCDR2序列以及含有DLYYGPTTYSAANL(SEQ ID NO:33)的氨基酸序列的HCDR3序列;以及VL,所述VL包含含有TADTLSRSYAS(SEQ ID NO:36)的氨基酸序列的LCDR1序列、含有RDTSRPS(SEQ ID NO:37)的氨基酸序列的LCDR2序列以及含有ATRDFSGSNFQL(SEQ ID NO:38)的氨基酸序列的LCDR3序列;或(iv)VH,所述VH包含含有SNYAMS(SEQ ID NO:41)的氨基酸序列的HCDR1序列、含有IVSSGGTTYYASWAKG(SEQ ID NO:42)的氨基酸序列的HCDR2序列以及含有DLYYGPTTYSAFNL(SEQ ID NO:43)的氨基酸序列的HCDR3序列;以及VL,所述VL包含含有TADTLSRSYAS(SEQ ID NO:46)的氨基酸序列的LCDR1序列、含有RDTSRPS(SEQ ID NO:47)的氨基酸序列的LCDR2序列以及含有ATRPSSGSNFQA(SEQ ID NO:48)的氨基酸序列的LCDR3序列。

[0029] 在某些实施方案中,第二和第三抗原结合结构域包含:(i)抗体重链可变(VH)结构域,所述抗体重链可变结构域包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列,以及抗体轻链可变(VL)结构域,所述抗体轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列;(ii)VH结构域,所述VH结构域包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列,以及VL结构域,所述VL结构域包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列;(iii)VH结构域,所述VH结构域包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列,以及VL结构域,所述VL结构域包含与SEQ ID NO:35的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列;或(iv)VH结构域,所述VH结构域包含与SEQ ID NO:40的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列,以及VL结构域,所述VL结构域包含与SEQ ID NO:45的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或100%同一的氨基酸序列。

[0030] 在某些实施方案中,第一、第二和第三抗原结合结构域中的任何一者或多者包含抗体片段。在某些实施方案中,抗体片段包含Fab片段、F(ab')2片段、Fab'片段、Fv片段、单链可变片段(scFv)以及单域抗体片段。

[0031] 在某些实施方案中,免疫细胞或CD3抗原结合结构域是Fab片段,其中Fab片段包含含有CH1结构域和VH的重链以及含有C1结构域和VL的轻链。

[0032] 在某些实施方案中,CH1结构域包含抗体铰链区的至少5个氨基酸。在某些实施方案中,CH1结构域包含抗体铰链区的氨基酸序列EPKSC(SEQ ID NO:88)。

[0033] 在某些实施方案中,MAGE-A4 pMHC抗原结合结构域包含scFv。

[0034] 在某些实施方案中,第二抗原结合结构域可操作地连接至Fab结构域重链的C端或Fab结构域重链的N端。在某些实施方案中,第三抗原结合结构域可操作地连接至Fab结构域重链的C端或Fab结构域重链的N端。

[0035] 在某些实施方案中,a)第二抗原结合结构域包含连接至Fab结构域重链的C端的scFv,并且第三抗原结合结构域包含连接至Fab结构域轻链的C端的scFv;b)第二抗原结合结构域包含连接至Fab结构域重链的N端的scFv,并且第三抗原结合结构域包含连接至Fab结构域轻链的N端的scFv;c)第二抗原结合结构域包含连接至Fab结构域重链的N端的scFv,并且第三抗原结合结构域包含连接至Fab结构域轻链的C端的scFv;或d)第二抗原结合结构域包含连接至Fab结构域重链的C端的scFv,并且第三抗原结合结构域包含连接至Fab结构域轻链的N端的scFv。

[0036] 在某些实施方案中,scFv用氨基酸接头连接至Fab结构域。在某些实施方案中,氨基酸接头包含(GGGGS)n(SEQ ID NO:73),其中n是1与5之间的整数。在某些实施方案中,氨基酸接头包含氨基酸序列GGGGS(SEQ ID NO:74)、GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:75)、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:76)、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGAS(SEQ ID NO:77)或GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:78)。

[0037] 在某些实施方案中,第二和/或第三抗原结合结构域VH和VL用氨基酸接头连接。在某些实施方案中,氨基酸接头包含(GGGGS)n(SEQ ID NO:73),其中n是1与5之间的整数。在某些实施方案中,氨基酸接头包含氨基酸序列GGGGS(SEQ ID NO:74)、GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:75)、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:76)、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGAS(SEQ ID NO:77)或GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:78)。

[0038] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白不包含Fc结构域。

[0039] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白包含$(scFv)_2$、$(scFv)_3$、BiTE、BIKE、Dart、双抗体、三抗体、Fab_2、Fab_3、Fab_4、scFv-Fab-scFv或微型抗体-scFv。

[0040] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白包含约75kDa至约100kDa或约110kDa的分子量。在某些实施方案中,抗原结合蛋白相对于具有<约75kDa的分子量的抗原结合蛋白具有延长的血清半衰期。

[0041] 在某些实施方案中,CD3抗原结合结构域包含:a1)VH,所述VH包含含有STYAMN(SEQ ID NO:51)的氨基酸序列的HCDR1序列、含有RIRSKYNNYATYYADSVKG(SEQ ID NO:52)的氨基酸序列的HCDR2序列以及含有HGNFGDSYVSWFAY(SEQ ID NO:53)的氨基酸序列的HCDR3序列;以及a2)VL,所述VL包含含有GSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:56)的氨基酸序列的LCDR1序列、含有GTNKRAP(SEQ ID NO:57)的氨基酸序列的LCDR2序列以及含有ALWYSNHWV(SEQ ID NO:58)的氨基酸序列的LCDR3序列。

[0042] 在某些实施方案中,CD3抗原结合结构域包含:VH,所述VH包含与SEQ ID NO:50的氨基酸序列至少约90%同一(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一)的氨基酸序列,以及VL,所述VL包含与SEQ ID NO:55的氨基酸序列至少约90%同一(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一)的氨基酸序列。

[0043] 在某些实施方案中,CD3抗原结合结构域包含:重链,所述重链包含与SEQ ID NO:49的氨基酸序列至少约90%同一(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一)的氨基酸序列,以及轻链,所述轻链包含与SEQ ID NO:54的氨基酸序列至少约90%同一(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一)的氨基酸序列。

[0044] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白包含:(i)第一多肽链,所述第一多肽链包含SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列,以及第二多肽链,所述第二多肽链包含SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列;(ii)第一多肽链,所述第一多肽链包含SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列,以及第二多肽链,所述第二多肽链包含SEQ ID NO:24中所示的氨基酸序列;(iii)第一多肽链,所述第一多肽链包含SEQ ID NO:29中所示的氨基酸序列,以及第二多肽链,所述第二多肽链包含SEQ ID NO:34中所示的氨基酸序列;或(iv)第一多肽链,所述第一多肽链包含SEQ ID NO:39中所示的氨基酸序列;以及第二多肽链,所述第二多肽链包含SEQ ID NO:44中所示的氨基酸序列,或所述序列的变体,所述变体与其至少90%、95%、96%、97%、98%或99%同一,同时保留抗原特异性(即保留对(SEQ ID NO:3)HLA-A*02复合物和对CD3的特异性)。

[0045] 在某些实施方案中,特别是在scFv模式中时,MAGE-A4 pMHC结合结构域(诸如以上第二抗原结合结构域和/或第三抗原结合结构域)包含根据Kabat编号在位置11、89和/或108具有极性氨基酸的可变重链。在某些实施方案中,Fab结构域包含根据Kabat编号在位置11、89和/或108具有极性氨基酸的可变重链。

[0046] 在某些实施方案中,可变重链包含:根据Kabat编号在氨基酸位置11的亮氨酸(L)或丝氨酸(S);根据Kabat编号在氨基酸位置89的缬氨酸(V)、丝氨酸(S)或苏氨酸(T);和/或根据Kabat编号在氨基酸位置108的亮氨酸(L)、丝氨酸(S)或苏氨酸(T)。

[0047] 在某些实施方案中,极性氨基酸是丝氨酸(S)和/或苏氨酸(T)。

[0048] 在某些实施方案中,可变重链包含根据Kabat编号在氨基酸位置11的丝氨酸(S)、在氨基酸位置89的丝氨酸(S)或苏氨酸(T)以及在氨基酸位置108的丝氨酸(S)或苏氨酸(T)。

[0049] 在某些实施方案中,可变重链包含根据Kabat编号在氨基酸位置11的丝氨酸(S)、在氨基酸位置89的丝氨酸(S)以及在氨基酸位置108的丝氨酸(S)。

[0050] 在一个方面中,本公开提供了一种多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白包含:a)特异性结合至CD3的第一抗原结合结构域,所述第一抗原结合结构域包含:a1)VH,所述VH包含含有STYAMN(SEQ ID NO:51)的氨基酸序列的HCDR1序列、含有RIRSKYNNYATYYADSVKG(SEQ ID NO:52)的氨基酸序列的HCDR 2序列以及含有HGNFGDSYVSWFAY(SEQ ID NO:53)的氨基酸序列的HCDR3序列;以及a2)VL,所述VL包含含有GSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:56)的氨基酸序列的LCDR1序列、含有GTNKRAP(SEQ ID NO:57)的氨基酸序列的LCDR2序列以及含有ALWYSNHWV(SEQ ID NO:58)的氨基酸序列的LCDR3序列;以及b)特异性结合至黑素瘤相关抗原A4(MAGE-A4)肽-MHC(pMHC)的第二抗原结合结构域。

[0051] 在某些实施方案中,所述第二抗原结合结构域包含:b1)抗体重链可变(VH)结构域,所述抗体重链可变结构域包含SNYAMS(SEQ ID NO:11)的HCDR1氨基酸序列、IVSSGGTTYYAX$_1$X$_2$X$_3$KG(SEQ ID NO:6)的HCDR2氨基酸序列(其中X$_1$对应于氨基酸S或D,X$_2$对应于氨基酸W或S,并且X$_3$对应于氨基酸A或V)以及DLYYGPX$_4$TX$_5$YX$_6$X$_7$X$_8$NL(SEQ ID NO:7)的HCDR3氨基酸序列(其中X$_4$对应于氨基酸T、N或S,X$_5$对应于氨基酸D或不存在,X$_6$对应于氨基酸S或F,X$_7$对应于氨基酸A或V,并且X$_8$对应于氨基酸F或A);以及b2)抗体轻链可变(VL)结构域,所述抗体轻链可变结构域包含TADTLSRSYAS(SEQ ID NO:16)的LCDR1氨基酸序列、RDTS

RPS(SEQ ID NO:17)的LCDR2氨基酸序列以及ATX$_9$X$_{10}$X$_{11}$SGSN FQX$_{12}$(SEQ ID NO:8)的LCDR3氨基酸序列,其中X$_9$对应于氨基酸S或R,X$_{10}$对应于氨基酸D或P,X$_{11}$对应于氨基酸G、S或F,并且X$_{12}$对应于氨基酸L或A。

[0052] 在某些实施方案中,CD3结合结构域包含:-VH,所述VH包含与SEQ ID NO:50的氨基酸序列至少约90%同一(诸如95%、96%、97%、98%或99%同一)的氨基酸序列,以及-VL,所述VL包含与SEQ ID NO:55的氨基酸序列至少约90%同一(诸如95%、96%、97%、98%或99%同一)的氨基酸序列。

[0053] 在某些实施方案中,CD3结合结构域包含:-VH,所述VH包含与SEQ ID NO:49的氨基酸序列至少约90%同一(诸如95%、96%、97%、98%或99%同一)的氨基酸序列,以及-VL,所述VL包含与SEQ ID NO:54的氨基酸序列至少约90%同一(诸如95%、96%、97%、98%或99%同一)的氨基酸序列。

[0054] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白还包含第三抗原结合结构域。

[0055] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白包含:c)特异性结合至MAGE-A4 pMHC的第三抗原结合结构域,所述第三抗原结合结构域包含:c1)VH结构域,所述VH结构域包含SNYAMS(SEQ ID NO:11)的HCDR1氨基酸序列、IVSSGGTTYYAX$_1$X$_2$X$_3$KG(SEQ ID NO:6)的HCDR2氨基酸序列(其中X$_1$对应于氨基酸S或D,X$_2$对应于氨基酸W或S,并且X$_3$对应于氨基酸A或V)以及DLYYGPX$_4$TX$_5$YX$_6$X$_7$X$_8$NL(SEQ ID NO:7)的HCDR3氨基酸序列(其中X$_4$对应于氨基酸T、N或S,X$_5$对应于氨基酸D或不存在,X$_6$对应于氨基酸S或F,X$_7$对应于氨基酸A或V,并且X$_8$对应于氨基酸F或A);以及c2)VL结构域,所述VL结构域包含TADTLSRSYAS(SEQ ID NO:16)的LCDR1氨基酸序列、RDTSRPS(SEQ ID NO:17)的LCDR2氨基酸序列以及ATX$_9$X$_{10}$X$_{11}$SGSNFQX$_{12}$(SEQ ID NO:8)的LCDR3氨基酸序列,其中X$_9$对应于氨基酸S或R,X$_{10}$对应于氨基酸D或P,X$_{11}$对应于氨基酸G、S或F,并且X$_{12}$对应于氨基酸L或A。

[0056] 在一个方面中,本公开提供了一种结合至MAGE-A4-pMHC和CD3的多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白包含:(i)第一多肽链,所述第一多肽链包含SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列,以及第二多肽链,所述第二多肽链包含SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列;(ii)第一多肽链,所述第一多肽链包含SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列,以及第二多肽链,所述第二多肽链包含SEQ ID NO:24中所示的氨基酸序列;(iii)第一多肽链,所述第一多肽链包含SEQ ID NO:29中所示的氨基酸序列,以及第二多肽链,所述第二多肽链包含SEQ ID NO:34中所示的氨基酸序列;或(iv)第一多肽链,所述第一多肽链包含SEQ ID NO:39中所示的氨基酸序列;以及第二多肽链,所述第二多肽链包含SEQ ID NO:44中所示的氨基酸序列,或所述序列的变体,所述变体与其至少90%、95%、96%、97%、98%或99%同一,同时保留抗原特异性(即保留对GVYDGREHTV(SEQ ID NO:3)HLA-A*02复合物以及对CD3的特异性)。

[0057] 在一个方面中,本公开提供了一种结合至GVYDGREHTV(SEQ ID NO:3)HLA-A*02复合物和CD3的多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白包含:(i)第一多肽链,所述第一多肽链包含SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列,以及第二多肽链,所述第二多肽链包含SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列;(ii)第一多肽链,所述第一多肽链包含SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列,以及第二多肽链,所述第二多肽链包含SEQ ID NO:24中所示的氨基酸序列;(iii)第一多肽链,所述第一多肽链包含SEQ ID NO:29中所示的氨基酸序列,以

及第二多肽链,所述第二多肽链包含SEQ ID NO:34中所示的氨基酸序列;或(iv)第一多肽链,所述第一多肽链包含SEQ ID NO:39中所示的氨基酸序列;以及第二多肽链,所述第二多肽链包含SEQ ID NO:44中所示的氨基酸序列。

[0058] 在本文所述的多特异性抗原结合蛋白的某些实施方案中,所述MAGE-A4肽-MHC(pMHC)是GVYDGREHTV(SEQ ID NO:3)HLA-A*02复合物。

[0059] 在本文所述的多特异性抗原结合蛋白的某些实施方案中,如通过SEC-HPLC所测定,在1mg/mL和/或10mg/mL下在4℃下在PBS中孵育14天之后,多特异性抗原结合蛋白保持至少94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%为单体。

[0060] 在本文所述的多特异性抗原结合蛋白的某些实施方案中,如通过LDH细胞毒性测定所确定,多特异性抗原结合蛋白显示对靶阳性肿瘤细胞的功效(例如细胞毒性)。

[0061] 在本文所述的多特异性抗原结合蛋白的某些实施方案中,在细胞系衍生的小鼠非小细胞肺癌(NSCLC)异种移植模型中,多特异性抗原结合蛋白显示肿瘤生长抑制和肿瘤根除。

[0062] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白是化学或生物学修饰的。在某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白是糖基化的、PEG化的、HES化的、PAS化的或XTEN化的。

[0063] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白连接至诸如可检测标记、治疗剂或PK修饰部分等功能实体或与其组合。

[0064] 在某些实施方案中,功能实体是毒素。

[0065] 在本文所述的多特异性抗原结合蛋白的某些实施方案中,轻链和/或重链包含1、2、3、4或5个氨基酸的N端和/或C端截短。

[0066] 在本文所述的多特异性抗原结合蛋白的某些实施方案中,轻链包含1或2个氨基酸的N端截短。

[0067] 在本文所述的多特异性抗原结合蛋白的某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白在轻链和/或重链的位置1包含焦谷氨酸(pE),而不是谷氨酰胺(Q)或谷氨酸(E)。

[0068] 在本文所述的多特异性抗原结合蛋白的某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白在轻链的位置1包含焦谷氨酸(pE),而不是谷氨酰胺(Q)或谷氨酸(E)。

[0069] 在某些实施方案中,抗原结合蛋白用于诊断。

[0070] 在某些实施方案中,上文所述的多特异性抗原结合蛋白用于抑制癌细胞生长或增殖的方法中。

[0071] 在某些实施方案中,上文所述的多特异性抗原结合蛋白用于使T细胞重定向至表达MAGE-A4的癌细胞的方法中。

[0072] 在某些实施方案中,上文所述的抗原结合蛋白或上文所述的多特异性抗原结合蛋白用作药剂。

[0073] 在一个方面中,本公开提供了一种编码上文所述的抗原结合蛋白或上文所述的多特异性抗原结合蛋白的核酸。

[0074] 在一个方面中,本公开提供了一种包含上文所述的核酸的载体。

[0075] 在一个方面中,本公开提供了一种包含上文所述的载体的宿主细胞群体。

[0076] 在一个方面中,本公开提供了一种药盒,所述药盒包含上文所述的抗原结合蛋白或上文所述的多特异性抗原结合蛋白。

[0077] 在一个方面中,本公开提供了一种制造上文所述的抗原结合蛋白或上文所述的多特异性抗原结合蛋白的方法,所述方法包括以下步骤:(i)在允许抗原结合蛋白或多特异性抗原结合蛋白表达的条件下培养上文所述的宿主细胞;(ii)回收抗原结合蛋白或多特异性抗原结合蛋白;以及任选地(iii)进一步对抗原结合蛋白或多特异性抗原结合蛋白进行纯化和/或修饰和/或配制。

[0078] 在一个方面中,本公开提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含上文所述的抗原结合蛋白或上文所述的多特异性抗原结合蛋白以及药学上可接受的缓冲液。

[0079] 在一个方面中,本公开提供了一种上文所述的抗原结合蛋白、上文所述的多特异性抗原结合蛋白或上文所述的药物组合物在药剂的制造中的用途。

[0080] 在一个方面中,本公开提供了一种上文所述的抗原结合蛋白、上文所述的CAR、上文所述的免疫细胞、上文所述的多特异性抗原结合蛋白、上文所述的细胞或上文所述的药物组合物在疾病,特别是癌症的治疗中的用途。

[0081] 在一个方面中,本公开提供了一种治疗有需要的患者的表达MAGE-A4 pMHC的癌症的方法,所述方法包括向患者施用治疗有效量的上文所述的抗原结合蛋白、上文所述的CAR、上文所述的免疫细胞、上文所述的多特异性抗原结合蛋白、上文所述的细胞或上文所述的药物组合物。

[0082] 在某些实施方案中,癌症选自由以下组成的组:头部和颈部鳞状细胞癌(HNSC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、三阴性乳腺癌、尿路上皮癌、高级别子宫内膜癌(包括子宫癌肉瘤(UCS;特别是UCEC亚组))、粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤、胃或胃食管连接部(GEJ)腺癌、上皮卵巢癌(诸如高级别浆液性卵巢癌)、滑膜肉瘤、膀胱尿路上皮癌(BLCA)(特别是移行细胞癌瘤)、睾丸生殖细胞肿瘤(TGCT)以及宫颈鳞状细胞癌(CESC)。

[0083] 在某些实施方案中,癌症是鳞状来源的,诸如头部和颈部鳞状细胞癌(HNSCC)或鳞状NSCLC。

[0084] 在一个方面中,本公开提供了一种选择适于用MAGE-A4拮抗剂治疗的患者的方法,所述方法包括以下依序进行的步骤:(i)从患者获得肿瘤样品;(ii)将抗MAGEA4检测抗体添加至样品中;(iii)孵育所述检测抗体和样品;(iv)检测结合至样品的所述检测抗体;以及(v)如果所述检测抗体被样品结合,那么将患者选择为用MAGE-A4拮抗剂治疗。

[0085] 在某些实施方案中,检测抗体是OTI1F9、E7O1U或本文所述的抗原结合蛋白。

[0086] 在某些实施方案中,所述方法还包括进行RNA测序以检测总MAGE-A4的步骤。

[0087] 在某些实施方案中,在疾病(特别是癌症)的治疗中,MAGE-A4拮抗剂是本文所述的抗原结合蛋白、本文所描述的CAR、本文所述的免疫细胞、本文所述的多特异性抗原结合蛋白或本文所述的药物组合物。

附图说明

[0088] 结合随附图式,从以下说明性实施方案的详细描述将更加充分地理解本发明的前述和其他特征和优点。本专利或申请文件含有至少一个以彩色显示的图式。在有要求并且支付必要费用后,办公室将提供此具有彩色图式的专利或专利申请公布的副本。

[0089] 图1展示了如通过直接ELISA所确定的抗体与HLA-A*02:01/MAGE-A4(图1A和图1B)或对照复合物HLA-A*02:01/肽混合物(图1C和图1D)的结合。

[0090] 图2示出了抗体M0709(图2A)和M0763(图2B)与展示MAGE-A4或对照肽1、2以及3的T2细胞的结合。

[0091] 图3示出了如通过直接ELISA所确定的人源化M0763变体与HLA-A*02:01/MAGE-A4(图3A)或对照复合物HLA-A*02:01/肽混合物(图3B)的结合。

[0092] 图4展示了本发明的双特异性抗体的一个实施方案的示意图。所呈现的实施方案包含抗CD3 Fab片段和两个单链抗体片段(scFv),其特异性结合MHC复合物上呈递的靶肽。结合pMHC的scFv可经由甘氨酸-丝氨酸柔性接头连接至CH1-结构域和CL-结构域的C端。

[0093] 图5示出了双重T细胞衔接子M1048和其单价对应物M1041在MAGE-A4阳性HLA-A*02:01阳性U2OS癌细胞(图5A)和MAGE-A4阴性HLA-A*02:01阳性SK-MEL-30(图5B)、MDA-MB-231(图5C)以及PANC-1(图5D)癌细胞中的细胞毒性。

[0094] 图6示出了如通过SEC-HPLC所测定历时0、3、7以及14天双重衔接子M1397和M1403在PBS中的稳定性。图6A示出了在4℃下孵育的数据,图6B为在37℃下孵育。

[0095] 图7示出了在37℃下双重衔接子M1397(图7A)和M1403(图7B)在人血清中的稳定性。

[0096] 图8示出了双重衔接子M1397和M1403或比较物1在MAGE-A4阳性HLA-A*02:01阳性癌细胞(图8A至图8E)和MAGE-A4阴性HLA-A*02:01阳性癌细胞(图8F至图8K)中的细胞毒性。图8A:双重衔接子M1397和比较物1在U2OS中;图8B:双重衔接子M1403和比较物1在U2OS中;图8C:双重衔接子M1397和比较物1在NCI-H1703中;图8D:双重衔接子M1403和比较物1在NCI-H1703中;图8E:双重的衔接子M1397和M1403以及比较物1在A375中;图8F:双重衔接子M1397和比较物1在PANC-1中;图8G:双重衔接子M1403和比较物1在PANC-1中;图8H:双重衔接子M1397和比较物1在MDA-MB-231中;图8I:双重衔接子M1397和比较物1在MDA-MB-231中;图8J:双重衔接子M1397和比较物1在NCI-H441中;图8K:双重衔接子M1403和比较物1在NCI-H441中。

[0097] 图9示出了由双重衔接子M1397、比较物1或比较物2对MAGE-A4阳性HLA-A*02:01阳性癌细胞系U2OS和NCI-H1703(分别为图9A和图9B)以及MAGE-A4阴性HLA-A*02:01阳性癌细胞系PANC-1和SKMEL-30(分别为图9C和图9D)介导的癌细胞杀伤作用。

[0098] 图10示出了在MAGE-A4阳性HLA-A*02:01阳性癌细胞(图10A:M1397和比较物1在U2OS中;图10B:M1403和比较物1在U2OS中;图10C:M1397和比较物1在NCI-H1703中;图10D:M1403和比较物1在NCI-H1703中)以及MAGE-A4阴性HLA-A*02:01阳性癌细胞(图10E:M1397和比较物1在PANC-1中;图10F:M1403和比较物1在PANC-1中;图10G:M1397和比较物1在MDA-MB-231中;图10H:M1403和比较物1在MDA-MB-231中;图10I:M1397和比较物1在NCI-H441中;图10J:M1403和比较物1在NCI-H441中)中在用双重T细胞衔接子M1397和M1403或比较物1处理后的IFNγ释放。

[0099] 图11示出了在MAGE-A4阳性HLA-A*02:01阳性癌细胞NCI-H1703(图11A和图11C)以及MAGE-A4阴性HLA-A*02:01阳性癌细胞SKMEL-30(图11B和图11D)中在用双重衔接子M1397、比较物1或比较物2处理后作为T细胞活化的度量的颗粒酶B(图11A至图11B)和IFNγ释放(图11C至图11D)。

[0100] 图12示出了在用双重T细胞衔接子M1397或M1403以及比较物1处理后MAGE-A4阳性HLA-A*02:01阳性U2OS和MAGE-A4阴性HLA-A*02:01阳性PANC-1细胞中的细胞因子释放。定

量IL-2(图12A至图12D)、IL-6(图12G至图12H)以及TNFα(图12I至图12L)。

[0101] 图13示出了用MAGE-A4或生理学相关高度类似肽对照1或对照2脉冲处理的TAP缺陷型T2细胞与作为效应细胞的PBMC和双重衔接子M1397(图13A)、比较物1(图13B)或比较物2(图13C)一起孵育后的IFN-γ表达。对照使用T2细胞加仅PBMC、PBMC加测试化合物以及仅PBMC。

[0102] 图14示出了在用双重T细胞衔接子M1397、比较物1或比较物2处理抗原阴性癌细胞系KLE、LNCaP、KMRC-2、KMRC-3、639-V、EKVX以及HCT116(图14B至图14H)后的颗粒酶B释放。抗原阳性细胞系NCI-H1703充当阳性对照(图14A)。

[0103] 图15示出了双重衔接子M1397和M1403或比较物1在HLA-A*02:01阳性原代细胞中的安全性。图15A:HMVEC-C细胞;图15B:NHBE细胞;图15C:NHA细胞。

[0104] 图16示出了双重衔接子M1397、比较物1以及比较物2在各种HLA-A*02:01阳性原代细胞中的安全性。图16A:在HCM_679细胞中;图16B:在HCM_639细胞中;图16C:在HCM_745细胞中;图16D:在HCM_746细胞中;图16E:在HMVEC-L_73809细胞中;图16F:在HCF_251细胞中;图16G:在RPTEC_82573细胞中;图16H:在NHLF_19232细胞中;图16I:在NHLF_76039细胞中;图16J:在NHA_72445细胞中;图16K:在NHBE_35497细胞中;图16L:在RPTEC_49985细胞中;图16M:在HAoSMC_735细胞中。

[0105] 图17示出了在实施例14中详述的细胞系源性小鼠NSCLC异种移植模型中M1397的体内功效。示出了在研究期内在活性化合物的各种剂量下的平均肿瘤体积。

具体实施方式

[0106] 通常,结合本文所述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学以及蛋白质和核酸化学以及杂交使用的命名法是本领域中熟知并且常用的。除非另外指出,否则本文所提供的方法和技术通常根据本领域中熟知的常规方法并且如本说明书中引用和论述的各种通用和更具体的参考文献中所述来进行。酶促反应和纯化技术如本领域通常所完成或如本文所述根据制造商的说明书来进行。与本文所述的分析化学、合成有机化学以及医学和药物化学结合使用的命名法以及其实验室程序和技术是本领域中熟知并且常用的。化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及患者的治疗使用标准技术。

[0107] 除非另外定义,否则在本文中,本文使用的科学和技术术语具有本领域技术人员通常所理解的含义。在有任何潜在的歧义的情况下,本文提供的定义优先于任何字典或外部定义。除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数,并且复数术语应包括单数。除非另外说明,否则“或”的使用意味着“和/或”。术语“包括(including)”和其他形式(诸如“包括(includes)”和“包括(included)”)的使用不具限制性。

[0108] 为了可更容易地理解本发明,首先定义某些术语。

[0109] 抗原结合蛋白

[0110] “MAGE-A4”代表“黑素瘤相关抗原4”,它是癌症睾丸抗原(CTA)的MAGE家族的成员。MAGE A家族蛋白涵盖在Xq28处聚集的12个高度同源基因并且以保守结构域(MAGE同源性结构域,MHD)的存在为特征。UniProt(www.uniprot.org)登录号P43358(条目版本163)中描述了人MAGE-A4。“$MAGE\text{-}A4_{p230\text{-}239}$”或“203-239肽”是指在MAGE-A4蛋白的位置230-239具有氨基酸序列GVYDGREHTV(SEQ ID NO:3)的MAGE-A4衍生肽。

[0111] T细胞受体的分化簇3共受体(或共受体复合物)“CD3”是一种由四个独特的链组成的复合物。在哺乳动物中,复合物含有CD3γ(γ)链/亚单位、CD3δ(δ)链/亚单位以及两个CD3ε(ε)链/亚单位。本文通篇提到CD3作为免疫细胞的细胞表面蛋白。术语“CD3”是指来自任何脊椎动物来源,包括灵长类动物的任何天然CD3。在某些实施方案中,本公开的抗原结合蛋白特异性结合至人CD3,特别是CD3的CD3ε(ε)链/亚单位(参见例如UniProt(www.uniprot.org)登录号P07766(版本189),或NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov/)NP_000724.1.)CD3分子可以是全长、未加工的CD3分子或其例如由在细胞中加工产生的片段或变体。举例来说,此类变体可以是天然存在的变体,如剪接变体或等位基因变体。在某些实施方案中,本文公开的抗原结合蛋白结合至来自不同物种(诸如非人灵长类动物(例如食蟹猴)或啮齿动物(例如小鼠、大鼠))的CD3抗原中保守的CD3表位。在某些实施方案中,抗原结合蛋白与来自啮齿动物(例如小鼠或大鼠)或小型猪的CD3抗原不具交叉反应性。

[0112] 如本文所用,术语“抗体”或“抗原结合蛋白”是指特异性结合至抗原或表位或与其具免疫反应性的免疫球蛋白分子或免疫球蛋白衍生的分子,并且包括多克隆与单克隆抗体以及功能抗体片段,包括但不限于抗原结合(Fab)片段、$F(ab')_2$片段、Fab'片段、Fv片段、重组IgG(rIgG)片段、单链可变片段(scFv)和单域抗体(例如sdAb、sdFv、纳米抗体、VHH)片段。因此,抗体可以是单域抗体或包含至少一个可变轻链和至少一个可变重链。在一个实施方案中,至少一个可变轻链和至少一个可变重链展示为单个多肽链。术语“抗体”或“抗原结合蛋白”包括种系衍生抗体。术语“抗体”或“抗原结合蛋白”包括基因工程化或以其他方式修饰的形式的免疫球蛋白,诸如内抗体、肽体、嵌合抗体、完全人抗体、人源化抗体、杂缀合抗体(例如双特异性抗体、双抗体、三抗体、四抗体、串联二scFv、串联三scFv)等。除非另外说明,否则术语“抗体”或“抗原结合蛋白”应理解为涵盖其功能抗体片段。

[0113] 在某些实施方案中,抗原结合蛋白是多特异性的(即结合至两个或更多个不同的靶分子或相同靶分子上的两个或更多个表位)。在某些实施方案中,抗原结合蛋白是双特异性的并且例如结合至两个不同的靶分子或相同靶分子上的两个表位。在某些实施方案中,抗体是三特异性的并且例如结合至至少三个不同的靶分子。

[0114] 抗原结合蛋白可以是单价或多价的,即具有一个或多个抗原结合位点。单价抗原结合蛋白的非限制性实例包括scFv、Fab、scFab、dAb、VHH、V(NAR)、DARPin、affilin以及纳米抗体。多价抗原结合蛋白可具有两个、三个、四个或更多个抗原结合位点。多价抗原结合蛋白的非限制性实例包括全长免疫球蛋白、$F(ab')_2$片段、双scFv(或串联scFv或BiTE)、DART、双抗体、scDb、DVD-Ig、IgG-scFab、scFab-Fc-scFab、IgG-scFv、scFv-Fc、scFv-fc-scFv、Fv_2-Fc、FynomAB、四体瘤、CrossMab、DuoBody、三抗体以及四抗体。在一些实施方案中,多价抗原结合蛋白是二价的,即存在两个结合位点。在一些实施方案中,多价抗原结合蛋白是双特异性的,即抗原结合蛋白是针对两个不同的靶标或一个靶分子上的两个不同的靶位点。在一些实施方案中,多价抗原结合蛋白包括超过两种不同的结合位点,例如分别针对三种或四种不同的抗原的三个或四个不同的结合位点。此类抗原结合蛋白是多价的并且多特异性的,具体来说分别是三特异性或四特异性。

[0115] 在一些实施方案中,抗原结合蛋白是多特异性(例如双特异性)的,诸如但不限于双抗体、单链双抗体、DART、BiTE、BIKE、串联scFv或IgG样不对称异源双特异性抗体。在某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白的结合特异性中的一者是免疫细胞衔接子(即包括对

免疫细胞的细胞表面蛋白的结合亲和力)。可募集的免疫细胞的实例包括但不限于T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、嗜中性细胞、单核细胞以及巨噬细胞。可用于募集免疫细胞的表面蛋白质的实例包括但限于CD3、TCRα、TCRβ、CD16、NKG2D、CD94/NKG2C、NKp30、NKp46、CD89、CD64以及CD32。在某些实施方案中,免疫细胞靶抗原是CD3。

[0116] 如本文所用,术语"单克隆抗体"是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体,即结合相同表位和/或序列相同的抗体。相比之下,多克隆抗体群体将结合至多个表位并且包含不同序列的抗体。单克隆抗体制剂可包含或可不包含较小程度的变体抗体,例如因为天然存在的突变。此类变体可例如通过翻译后修饰产生,诸如在轻链和/或重链的N端或C端进行剪切,或在多肽链的N端形成焦谷氨酸(参见例如Liu YD等J Biol Chem.2011年4月1日;286(13):11211-7)。根据所用的方法和抗体,混合物中变体的百分比不同,并且可涉及所产生的基本上所有抗体,或者非常低的百分比。

[0117] 如本文所用,"单链可变片段"(scFv)是包含连接至轻链可变结构域(VL)的重链可变结构域(VH)的抗原结合蛋白。scFv的VH和VL结构域经由任何适当的本领域认可的接头连接。此类接头包括但不限于重复的GGGGS(SEQ ID NO:74)氨基酸序列或其变体。scFv通常不含抗体恒定结构域区域,不过本公开的scFv可连接或附接至抗体恒定结构域区域(例如抗体Fc结构域)以改变scFv的各种特性,包括但不限于增加的血清或组织半衰期。scFv通常具有约25kDa的分子量和约2.5nm的流体动力学半径。

[0118] 如本文所用,"Fab片段"或"Fab"或"Fab结构域"是包含轻链片段的抗体片段,所述轻链片段包含轻链的可变轻链(VL)结构域和恒定结构域(CL),以及重链的可变重链(VH)结构域和第一恒定结构域(CH1)。$F(ab')_2$包含在铰链处通过二硫化物连接的两个抗原结合区。

[0119] 如本文所用,"VHH"、"纳米抗体"、"仅重链抗体"、"单域抗体"或"sdAb"是抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白包含源自骆驼科家族物种的单个重链可变结构域,所述物种包括骆驼、美洲驼、羊驼。VHH通常具有约15kDa的分子量。

[0120] 本公开的抗原结合蛋白可包含一个或多个用于连接抗原结合蛋白的结构域的接头(例如连接VH和VL以形成scFv,或连接多个结合结构域以形成多特异性抗原结合蛋白)。

[0121] 接头的说明性实例包括甘氨酸聚合物$(Gly)_n$;甘氨酸-丝氨酸聚合物$(Gly_nSer)_n$,其中n是至少为一、二、三、四、五、六、七或八的整数;甘氨酸-丙氨酸聚合物;丙氨酸-丝氨酸聚合物;以及本领域中已知的其他柔性接头。

[0122] 甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是相对非结构化的,并且因此可以能够充当融合蛋白(诸如本文所述的抗原结合蛋白)的结构域之间的中性系链。甘氨酸比其他小侧链氨基酸进入显著更多的phi-psi空间,并且比具有较长侧链的残基受到的限制少得多(Scheraga,Rev.Computational Chem.1:1173-142(1992))。本领域技术人员将认识到,在特定实施方案中,抗原结合蛋白的设计可以包括全部或部分柔性的接头,使得接头可以包括柔性接头段以及赋予较小柔性的一个或多个段以提供所需结构。

[0123] 然而,可以选择类似于天然接头序列的接头序列,例如使用对应于人CH1和Cκ序列的起始的氨基酸段或对应于人IgG铰链区下部的氨基酸段。

[0124] 连接scFv部分中的VL和VH结构域的肽接头的设计是柔性接头,所述柔性接头通常由小的非极性或极性残基(诸如Gly、Ser和Thr)组成。连接scFv部分的可变结构域的特定示

例性接头是$(Gly_4Ser)_4$接头(SEQ ID NO:76),其中4是基序的示例性重复数目。

[0125] 还设想了连接scFv抗原结合蛋白与Fab结构域的接头。在某些实施方案中,scFv抗原结合蛋白用Gly-Ser接头连接至Fab的CH1和CL结构域。在某些实施方案中,接头包含氨基酸序列GGGGS(SEQ ID NO:74)。在某些实施方案中,氨基酸接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:75)、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:76)、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGAS(SEQ ID NO:77)或GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:78)。

[0126] 其他示例性接头包括但不限于以下氨基酸序列:GGG;DGGGS(SEQ ID NO:79);TGEKP(SEQ ID NO:80)(Liu等,Proc.Natl.Acad.Sci.94:5525-5530(1997));GGRR(SEQ ID NO:81);$(GGGGS)_n$(SEQ ID NO:73),其中n=1、2、3、4或5(Kim等,Proc.Natl.Acad.Sci.93:1156-1160(1996));EGKSSGSGSESKVD(SEQ ID NO:82)(Chaudhary等,Proc.Natl.Acad.Sci.87:1066-1070(1990));KESGSVSSEQLAQFRSLD(SEQ ID NO:83)(Bird等,Science 242:423-426(1988))、GGRRGGGS(SEQ ID NO:84);LRQRDGERP(SEQ ID NO:85);LRQKDGGGSERP(SEQ ID NO:86);以及GSTSGSGKPGSGEGSTKG(SEQ ID NO:87)(Cooper等,Blood,101(4):1637-1644(2003))。或者,可以使用能够模拟蛋白质和肽的3D结构的计算机程序或通过噬菌体展示方法合理设计柔性接头。

[0127] 抗体可包含可变轻链(VL)结构域和可变重链(VH)结构域。每个VL和VH结构域还包含一组三个CDR。

[0128] 如本文所用,术语“互补决定区”或“CDR”是指抗体可变区内赋予抗原特异性和亲和力的非连续氨基酸序列。一般来说,每个重链可变结构域中存在三个CDR(HCDR1、HCDR2、HCDR3),并且每个轻链可变结构域中存在三个CDR(LCDR1、LCDR2、LCDR3)。“构架区”或“FR”在本领域中已知指重链和轻链的可变结构域的非CDR部分。一般来说,每个重链可变结构域中存在四个FR(HFR1、HFR2、HFR3以及HFR4),并且每个轻链可变结构域中存在四个FR(LFR1、LFR2、LFR3以及LFR4)。因此,抗体可变区氨基酸序列可以由式FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4表示。式子的每一段(即FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3以及FR4)表示可以突变的离散氨基酸序列(或编码它的多核苷酸序列),包括一个或多个氨基酸取代、缺失以及插入。在某些实施方案中,抗体可变轻链氨基酸序列可以由式LFR1-LCDR1-LFR2-LCDR2-LFR3-LCDR3-LFR4表示。在某些实施方案中,抗体可变重链氨基酸序列可以由式HFR1-HCDR1-HFR2-HCDR2-HFR3-HCDR3-HFR4表示。

[0129] 给定CDR或FR的精确氨基酸序列边界可容易地使用许多熟知方案中的任一者来确定,所述熟知方案包括Kabat等(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(“Kabat”编号方案);Al-Lazikani等,(1997)JMB 273,927-948(“Chothia”编号方案);MacCallum等,J.Mol.Biol.262:732-745(1996),“Antibody-antigen interactions:Contact analysis and binding site topography,”J.Mol.Biol.262,732-745.(“Contact”编号方案);Lefranc M P等,“IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains,”Dev Comp Immunol,2003January;27(1):55-77(“IMGT”编号方案);以及Honegger A和Plückthun A,“Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains:an automatic modeling and analysis tool,”J Mol Biol,2001 Jun.8;309(3):657-70

("AHo"编号方案)所描述的那些方案。

[0130] 给定CDR或FR的边界可以根据用于识别的方案而变化。举例来说,Kabat方案是基于结构比对,而Chothia方案是基于结构信息。Kabat与Chothia方案的编号是基于最常见的抗体区域序列长度,其中用插入字母(例如"30a")容纳插入,并且在一些抗体中出现缺失。这两种方案将某些插入和缺失("插入缺失")放置在不同的位置,产生不同的编号。Contact方案是基于复杂的晶体结构的分析,并且在许多方面类似于Chothia编号方案。

[0131] 下表1列出了如分别通过Kabat、Chothia以及Contact方案所鉴定的抗体的LCDR1、LCDR2、LCDR3以及HCDR1、HCDR2、HCDR3的示例性位置边界。对于HCDR1,使用Kabat与Chothia编号方案列出残基编号。CDR定位在FR之间,例如其中LCDR1定位在LFR1与LFR2之间等。应注意,由于所示的Kabat编号方案将插入放置于H35A和H35B处,所以当使用所示的Kabat编号惯例编号时,Chothia HCDR1环的末端根据环的长度在H32与H34之间变化。

[0132] 表1-CDR的示例性位置边界

[0133]

CDR	Kabat	Chothia	Contact
LCDR1	L24--L34	L24--L34	L30--L36
LCDR2	L50--L56	L50--L56	L46--L55
LCDR3	L89--L97	L89--L97	L89--L96
HCDR1 (Kabat 编号 [1])	H31--H35B	H26--H32..34	H30--H35B
HCDR1 (Chothia 编号 [2])	H31--H35	H26--H32	H30--H35
HCDR2	H50--H65	H52--H56	H47--H58
HCDR3	H95--H102	H95--H102	H93--H101

[0134] 1-Kabat等(1991),"Sequences of Proteins of Immunological Interest,"第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD

[0135] 2-Al-Lazikani等(1997),J Mol.Biol.273:927-948

[0136] 因此,除非另外指明,否则给定抗体或其片段(诸如其可变结构域)的"CDR"或"互补决定区"或个别指定的CDR(例如HCDR1、HCDR2)应理解为涵盖如已知方案中的任一者所定义的一个(或特定的)互补决定区。同样地,除非另外指明,否则给定抗体或其片段(诸如其可变结构域)的"FR"或"构架区"或个别指定的FR(例如"HFR1"、"HFR2")应理解为涵盖如已知方案中的任一者所定义的一个(或特定的)构架区。在一些情况下,用于鉴定特定CDR或FR的方案是指定的,诸如如Kabat、Chothia或Contact方法所定义的CDR。在其他情况下,CDR或FR的特定氨基酸序列是给定的。

[0137] 在某些实施方案中,本文公开的抗原结合蛋白是兔源性抗原结合蛋白。在某些实施方案中,抗原结合蛋白是人源化的。如本文所用,术语"人源化的"或"人源化"是指抗原结合蛋白已被改变以使其更像人抗体。非人抗原结合蛋白(诸如兔抗原结合蛋白)如果向人施用以进行治疗的话会引发负面的免疫反应。因此,将兔抗原结合蛋白人源化用于随后的治疗性用途是有利的。

[0138] 在某些实施方案中,通过表面重修(即重建非人构架的溶剂可接近的残基,使得它

们变得更像人样的)将抗原结合蛋白人源化。WO2004/016740、WO2008/144757以及WO2005/016950中更详细地描述了表面重修策略,其中的每一者以引用的方式并入本文中。

[0139] 在某些实施方案中,通过CDR移植(即将兔抗原结合蛋白CDR插入人抗体受体构架)将抗原结合蛋白人源化。以引用的方式并入本文中的WO2009/155726中更详细地描述了移植策略和人类受者构架。

[0140] 如本文所用,两种多肽之间的"序列同一性"通过将一种多肽的氨基酸序列与第二种多肽的序列相比较来确定。类似地,两个多核苷酸之间的"序列同一性"通过将一种多核苷酸的核苷酸序列与第二种多核苷酸的序列相比较来确定。术语"%同一"、"同一性百分比"或类似术语旨在特别地指在要比较的序列已经比对以产生最大同一性(潜在地引入空位)之后相同的核苷酸或氨基酸(在适用时)的百分比。所述百分比可以是纯统计的,并且两个序列之间的差异可以但不一定随机分布在要比较的序列的整个长度上。两个序列的比较通常通过在最佳比对后相对于区段或"比较窗口"比较序列来进行,以鉴定相应序列的局部区域。举例来说,用于比较的最佳比对可人工地或借助于Smith和Waterman,1981,Ads App.Math.2,482的局部同源算法,借助于Needleman和Wunsch,1970,J.Mol.Biol.48,443的局部同源算法,借助于Pearson和Lipman,1988,Proc.Natl Acad.Sci.USA 88,2444的相似性检索算法,或借助于计算机程序使用算法(威斯康星遗传学软件包(Wisconsin Genetics Software Package,Genetics Computer Group,575Science Drive,Madison,Wis.)中的GAP、BESTFIT、FASTA、BLAST P、BLAST N以及TFASTA,或Clustal Omega)来进行。在一些实施方案中,两个序列的同一性百分比使用如在美国国家生物技术信息(United States National Center,NCBI)中心网站(例如在blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE＝BlastSearch&BLAST_SPEC＝blast2seq&LINK_LOC＝align2seq)可获得的BLASTN或BLASTP算法来确定。通常,在进行分析的参考序列的整个长度上确定同一性百分比。

[0141] 变体多肽(诸如抗原结合蛋白)可相对于参考序列含有一个或多个取代(例如保守取代)、插入或缺失。在某些实施方案中,变体多肽相对于参考序列包含一个、两个或三个取代、插入和/或缺失。取代、插入或缺失可使得一个或多个生物物理学参数改变,但特别优选的是耐受的改变,使得多肽保留所需活性。在一些实施方案中,变体多肽包含一个或多个耐受的取代,诸如保守取代。在某些实施方案中,此类变体多肽在物理、生物、化学和/或功能上维持相应参考序列的特性。

[0142] "特异性识别"或"特异性结合"是指与同不包含结合表位的不相关蛋白质非特异性相互作用相比之下,抗原结合蛋白选择性地结合至抗原的能力。下文描述了用于确定特异性结合的合适的测定。在某些实施方案中,如例如通过SPR所确定,抗原结合蛋白与不相关蛋白质的平衡解离常数(K_D)比抗原结合蛋白对其抗原的平衡解离常数低小于约50倍。

[0143] 如本文所用,术语"亲和力"(或如本文中可互换使用的"结合亲和力")是指抗体的抗原结合位点与同其结合的表位之间的相互作用的强度。如本领域技术人员容易理解的,抗体或抗原结合蛋白亲和力可以报道为以摩尔浓度(M)计的平衡解离常数(K_D)。平衡解离常数K_D由缔合速率常数k_a(单位为$M^{-1}s^{-1}$)和解离速率常数k_d(单位为s^{-1})通过k_d/k_a计算。本公开的抗体可具有在10^{-8}至10^{-14}M范围内的K_D值。

[0144] 抗体结合至特定抗原决定位(例如靶肽-MHC)的能力可通过酶联免疫吸附测定(ELISA)或本领域技术人员所熟悉的其他技术(例如表面等离子共振(SPR)技术(例如使用

BIAcore仪器进行))(Liljeblad等,Glyco J 17,323-329(2000))以及传统的结合测定(Heeley,Endocr Res 28,217-229(2002))来测量。通常,动力学速率常数可在15℃至37℃范围内的温度下确定。本说明书通篇参考通过SPR确定的动力学速率常数。通常,在与本说明书中每次提到SPR有关的实施方案中,本文所述的缔合速率常数值、解离速率常数值以及平衡解离常数值通过SPR在25℃下基于单价抗原结合蛋白的SPR来确定。优选地,所用的基于SPR的系统是Biacore SPR系统。熟练人员将理解,结合参数可以在单价或二价双特异性、三特异性或多特异性构建体的背景下测量。

[0145] 在某些实施方案中,抗原结合蛋白不是T细胞受体(TCR),包括但不限于可溶性TCR。如本文所用,术语"T细胞受体"或"TCR"是指由两个不同的链(TCRα和TCRβ)组成的异二聚蛋白质,所述异二聚蛋白质在结构上属于免疫球蛋白(Ig)超家族。每个链的细胞外部分由可变("Vα"和"Vβ")和恒定("Cα"和"Cβ")结构域以及铰链区组成,铰链区中形成稳定的二硫键。细胞内区域与另一种跨膜蛋白CD3形成非共价相互作用,在正确靶标识别的情况下,这导致一系列构象变化和第一T细胞活化信号。TCR对肽-MHC(pMHC)的识别和结合由位于TCRα(CDRα1、CDRα2、CDRα3)和TCRβ(CDRβ1、CDRβ2、CDRβ3)的可变结构域上的称为互补决定区(CDR)的六个高变环控制。CDR3环(CDRα3和CDRβ3)在CDRα1和CDRβ1的支持下引起对加工过的抗原的识别,CDRα1和CDRβ1分别参与了对呈递的肽的N端和C端氨基酸的识别(Rudolph等Annu Rev Immunol.24:419-66.2006)。MHC的识别通常通过与CDRα2和CDRβ2的相互作用来实现。TCR的高序列多样性是通过V(D)J重组过程实现的,其中可变结构域由以下基因的组合产生:TCRα和TCRβ的V(可变)和J(连接),以及TCRβ的额外D(多样性)基因。TCR的高抗原特异性由胸腺成熟过程控制,其中自反应T细胞被负选择。TCR对特异性pMHC的亲和力和功能性亲合力是控制T细胞活化的关键因素。然而,抗原识别中的关键作用是由亲和力(即TCR与细胞展示的pMHC之间的结合强度)发挥的(Tian等J Immunol.179:2952-2960.2007)。TCR的生理亲和力在1μM至100μM范围内(Davis等Annu Rev Immunol.16:523-544.1998),这与抗体相比相对较低。

[0146] 如本文所用,术语"肽-MHC"或"pMHC"或"pMHC复合物"在本文中可互换地用于指具有结合在MHC的肽结合口袋中的抗原肽的主要组织相容性复合体(MHC)分子(MHC-I或MHC-II)。如本领域中已知的,MHC分子在细胞表面上呈递肽,特别是抗原肽,以被免疫细胞识别。因此,如熟练技工将理解,本文所用的术语"pMHC"是指MHC分子和由MHC分子呈递的肽(特别是抗原肽)的复合物。这通常被称为MHC限制性抗原呈递。因此,pMHC结合结构域靶向的肽是MHC限制性肽。因此,肽可被认为是靶肽或靶抗原肽。此外,根据本公开,术语"靶pMHC结合结构域"和"pMHC结合结构域"在本文中可互换使用,并且在任何情况下都是指本文通篇提到的至少第一和至少第二pMHC结合结构域。术语"由MHC分子/复合物呈递的靶肽/抗原"和"MHC限制性靶肽/抗原"或本说明书中使用的类似表述在本文中可互换使用。

[0147] 在某些实施方案中,MHC是人MHC。虽然MHC出现在所有脊椎动物中,但人中的MHC称为HLA(人白细胞抗原)。HLA是高度多基因的,并且可以广泛地分为三类MHC分子:I类、II类和III类。此外,HLA基因在人类基因组中具有最高水平的多态性。靶肽可以呈递在MHC I类复合物(诸如血清型HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、HLA-G、HLA-K或HLA-L,或其相应亚型)或MHC II类复合物(诸如血清型HLA-DP、HLA-DQ、HLA-DR、DM或DO,或其相应亚型)上。HLA-A蛋白构成相应I类MHC(主要组织相容性复合体)蛋白的α链,所述蛋白还包含β2微球蛋

白亚基。如本文可互换使用的“HLA-A2”、“HLA-A*02”、“HLA-A02”或“HLA-A*2”是指HLA-A血清型组2中的人白细胞抗原血清型。每种血清型包含不同的亚型。HLA-A*02:01(也称为HLA-A0201、HLA-A02.01或HLA-A201)是HLA-A*02蛋白的特定亚型。“MAGE-A4 pMHC”是指HLA-A*02分子和MAGE-A4衍生肽(本文中也称为“MAGE-A4肽”),特别是GVYDGREHTV(SEQ ID NO:3)的复合物。“MAGE-A8 pMHC”是指HLA-A*02分子和MAGE-A8衍生肽(本文中也称为“MAGE-A8肽”),特别是GLYDGREHSV(SEQ ID NO:71)的复合物。“MAGE-B4 pMHC”是指HLA-A*02分子和MAGE-B4衍生肽(本文中也称为“MAGE-B4肽”),特别是GIYDGKRHLI(SEQ ID NO:72)的复合物。

[0148] 如本文所用,术语“PBS”是指磷酸盐缓冲盐水。PBS是一种经pH值调节的磷酸盐缓冲液与盐水溶液的掺混物。在某些实施方案中,PBS包含约100-150mM NaCl、约1-5mM KCl、约1-10mM Na_2HPO_4以及1-5mM KH_2PO_4。在某些实施方案中,PBS包含130mM NaCl、10mM Na_2HPO_4,并且pH值为6.0。

[0149] MAGE-A4肽-MHC和其抗原结合蛋白

[0150] 本文所述的抗原结合蛋白和多特异性抗原结合蛋白对MAGE-A4肽-MHC具有结合特异性。

[0151] 在某些实施方案中,提供了结合至HLA呈递的GVYDGREHTV(SEQ ID NO:3)的分离的抗原结合蛋白,即分离的抗原结合蛋白不缔合或结合至细胞(诸如T细胞)的表面。分离的抗原结合蛋白与其天然环境的组分分离。在某些实施方案中,如通过例如电泳法(例如SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳)或色谱法(例如离子交换或反相HPLC、亲和色谱、尺寸排阻色谱)所确定,将分离的抗原结合蛋白纯化至大于95%或99%的纯度。在某些实施方案中,抗原结合蛋白不是可溶性TCR(例如缺少跨膜结构域、胞内信号传导结构域和恒定结构域中的一者或多者的TCR)。在某些实施方案中,抗原结合蛋白是单克隆抗体,特别是抗体片段,诸如scFv。

[0152] 靶肽可以呈递在MHC I类复合物(诸如血清型HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、HLA-G、HLA-K或HLA-L,或其相应亚型)或MHC II类复合物(诸如血清型HLA-DP、HLA-DQ、HLA-DR、DM或DO,或其相应亚型)上。血清型中的每一者包含不同的亚型。在一个实施方案中,抗原结合蛋白靶向结合至HLA-A2 pMHC复合物(也称为HLA-A*02,特别是HLA-A*02:01)的肽。

[0153] 抗原结合蛋白具有令人惊讶的高结合亲和力,同时保留对靶标的高特异性(即对展示非相关肽或β-2-微球蛋白的pMHC具有低亲和力,甚至不结合)。如本文所用,“非相关肽”对应于不包含本公开的抗原结合蛋白的结合表位的肽。在某些实施方案中,如例如通过SPR所确定,抗原结合蛋白对不相关肽MHC的亲和力比抗原结合蛋白与HLA呈递的GVYDGREHTV(SEQ ID NO:3)的结合低小于约50倍。

[0154] 在某些实施方案中,抗原结合蛋白包含对SEQ ID NO:3(GVY DGREHTV)中所示的MAGE-A4肽氨基酸序列的特异性,所述氨基酸序列对应于MAGE-A4的氨基酸230-239。

[0155] 在某些实施方案中,抗原结合蛋白以类似的亲和力范围结合相关HLA展示的MAGE-A4、MAGE-A8以及MAGE-B4肽。因此,本公开提供了一种抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白包含对MAGE-A4 pMHC、MAGE-A8 pMHC以及MAGE-B4 pMHC,特别是MAGE-A4衍生的GVYDGREHTV(SEQ ID NO:3)、MAGE-A8衍生的GLYD GREHSV(SEQ ID NO:71)以及MAGE-B4衍生的GIYDGKRHLI(SEQ ID NO:72)的结合特异性。

[0156] 在某些实施方案中,所述MAGE-A4肽、所述MAGE-A8肽和/或所述MAGE-B4肽与HLA-A*02多肽复合。

[0157] 在某些实施方案中,HLA-A*02多肽包含SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列。

[0158] 在某些实施方案中,β-2-微球蛋白多肽包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列。

[0159] 因此,在某些实施方案中,抗原结合蛋白包含对HLA-A*02/MA GE-A4,特别是对HLA-A*02,更特别是HLA-A*02亚型HLA-A*02:01所展示的肽GVYDGREHTV(SEQ ID NO:3)的特异性。

[0160] 在一个方面中,本公开提供了一种特异性结合至黑素瘤相关抗原A4(MAGE-A4)肽-MHC(pMHC)的抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白包含:抗体重链可变(VH)结构域,所述抗体重链可变结构域包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列或由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成;以及抗体轻链可变(VL)结构域,所述抗体轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列或由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成。

[0161] 在某些实施方案中,此类抗原结合蛋白是scFv,所述scFv包含SEQ ID NO:61或其变体或由其组成,所述变体与SEQ ID NO:61的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一。

[0162] 在一个方面中,本公开提供了一种特异性结合至黑素瘤相关抗原A4(MAGE-A4)肽-MHC(pMHC)的抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白包含:VH结构域,所述VH结构域包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列或由SEQ ID NO:20的氨基酸序列组成;以及VL结构域,所述VL结构域包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列或由SEQ ID NO:25的氨基酸序列组成。

[0163] 在某些实施方案中,抗原结合蛋白是scFv,所述scFv包含SEQ ID NO:62或其变体或由其组成,所述变体与SEQ ID NO:62的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一。

[0164] 在一个方面中,本公开提供了一种特异性结合至黑素瘤相关抗原A4(MAGE-A4)肽-MHC(pMHC)的抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白包含:VH结构域,所述VH结构域包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列,其中所述VH结构域包含在SEQ ID NO:30的位置44的C氨基酸;以及VL结构域,所述VL结构域包含与SEQ ID NO:35的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列,其中所述VL结构域包含在SEQ ID NO:35的位置102的C氨基酸。

[0165] 在某些实施方案中,抗原结合蛋白包含由SEQ ID NO:30的氨基酸序列组成VH结构域,以及由SEQ ID NO:35的氨基酸序列组成的VL结构域。

[0166] 在某些实施方案中,抗原结合蛋白是scFv,所述scFv包含SEQ ID NO:63或其变体或由其组成,所述变体与SEQ ID NO:63的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一。

[0167] 在一个方面中,本公开提供了一种特异性结合至黑素瘤相关抗原A4(MAGE-A4)肽-MHC(pMHC)的抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白包含:VH结构域,所述VH结构域包含与SEQ

ID NO:40的氨基酸序列至少约90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列,其中所述VH结构域包含在SEQ ID NO:40的位置47的Y氨基酸、在位置71的R氨基酸以及在位置73的N氨基酸,以及VL结构域,所述VL结构域包含与SEQ ID NO:45的氨基酸序列至少约90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列。

[0168] 在某些实施方案中,抗原结合蛋白包含由SEQ ID NO:40的氨基酸序列组成VH结构域,以及由SEQ ID NO:45的氨基酸序列组成的VL结构域。

[0169] 在某些实施方案中,抗原结合蛋白是scFv,所述scFv包含SEQ ID NO:64或其变体或由其组成,所述变体与SEQ ID NO:62的氨基酸序列至少约90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一。

[0170] 2022年3月9日提交的PCT/IB2022/052117和2022年3月9日提交的PCT/IB2022/052119中描述了其他示例性MAGE-A4 pMHC抗原结合蛋白,每个专利的内容以引用的方式并入本文中。

[0171] 抗原结合蛋白可以是单价或多价的,诸如双特异性或三特异性的。在某些实施方案中,抗原结合蛋白是单价的。在某些方面中,提供了包含上述VL和/或VH序列的CDR的单价抗原结合蛋白。此类单价抗原结合蛋白包括但不限于scFv、Fab、scFab、dAb、VHH、V(NAR)、DARPin、affilin以及纳米抗体。

[0172] MAGE-A4肽-MHC-免疫细胞衔接抗原结合蛋白

[0173] 本文所述的多特异性抗原结合蛋白具有至少一个MAGE-A4肽-MHC结合结构域以及对免疫细胞的细胞表面蛋白(例如T细胞的表面的CD3或在NK细胞的表面表达的CD16a)具有结合特异性的结合结构域。或者,本文所述的多特异性抗原结合蛋白具有至少两个MAGE-A4肽-MHC结合结构域以及任选的对免疫细胞的细胞表面蛋白(例如T细胞的表面的CD3或在NK细胞的表面表达的CD16a)具有结合特异性的结合结构域。在某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白包含上文所述的MAGE-A4肽-MHC抗原结合蛋白。

[0174] 就双重pMHC衔接来说,靶向在靶细胞(例如癌细胞)的表面的两个MAGE-A4肽-MHC通过增强的结合亲合力改善靶细胞衔接。相对于仅具有一个pMHC结合结构域的抗原结合蛋白,增强的结合亲合力又可以促成改善的靶细胞杀伤作用。当靶向靶细胞表面的低拷贝数的pMHC复合物时,由至少两个pMHC结合结构域形成的增强的结合亲和力可能特别有用(例如癌细胞)。在2021年12月14日提交的U.S.63/289,380和2022年3月7日提交的U.S.63/317,256中进一步详细描述了双重pMHC衔接多特异性结合蛋白,每个专利的内容以引用的方式并入本文中。

[0175] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白是双特异性或三特异性的。

[0176] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白是二价或多价的,诸如三价的。

[0177] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白还包含至少一个其他结合结构域。

[0178] 在某些实施方案中,所述其他结合结构域是免疫细胞衔接子,特别是CD3结合结构域或CD16a结合结构域。

[0179] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白还包含第三抗原结合结构域。

[0180] 在某些实施方案中,第三抗原结合结构域结合至HLA-A*02/MAGE-A4。

[0181] 在某些实施方案中,第三抗原结合结构域与上文所述的第一HLA-A*02/MAGE-A4抗原结合结构域相同。

[0182] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白可结合至HLA-A2/MAGE-A4的两个(或更多个)不同的表位。

[0183] 在一个方面中,本公开提供了一种多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白包含:a)特异性结合至CD3的第一抗原结合结构域;b)特异性结合至黑素瘤相关抗原A4(MAGE-A4)肽-MHC(pM HC)的第二抗原结合结构域,所述第二抗原结合结构域包含:b1)抗体重链可变(VH)结构域,所述抗体重链可变结构域包含SNYAMS(SEQ ID NO:11)的HCDR1氨基酸序列、IVSSGGTTYYAX$_1$X$_2$X$_3$KG(SEQ ID NO:6)的HCDR2氨基酸序列(其中X$_1$对应于氨基酸S或D,X$_2$对应于氨基酸W或S,并且X$_3$对应于氨基酸A或V)以及DLYYGPX$_4$TX$_5$YX$_6$X$_7$X$_8$NL(SEQ ID NO:7)的HCDR3氨基酸序列(其中X$_4$对应于氨基酸T、N或S,X$_5$对应于氨基酸D或不存在,X$_6$对应于氨基酸S或F,X$_7$对应于氨基酸A或V,并且X$_8$对应于氨基酸F或A);以及b2)抗体轻链可变(VL)结构域,所述抗体轻链可变结构域包含TADTLSRSYAS(SEQ ID NO:16)的LCDR1氨基酸序列、RD TSRPS(SEQ ID NO:17)的LCDR2氨基酸序列以及ATX$_9$X$_{10}$X$_{11}$SGSNFQX$_{12}$(SEQ ID NO:8)的LCDR3氨基酸序列,其中X$_9$对应于氨基酸S或R,X$_{10}$对应于氨基酸D或P,X$_{11}$对应于氨基酸G、S或F,并且X$_{12}$对应于氨基酸L或A。

[0184] 在某些实施方案中,MAGE-A4肽-MHC(pMHC)是GVYDGREHTV(SEQ ID NO:3)HLA-A*02复合物。

[0185] 在某些实施方案中,如通过SEC-HPLC所测定,在4℃下在1mg/ml和/或10mg/ml下在PBS中孵育14天之后,多特异性抗原结合蛋白保持至少94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%为单体。

[0186] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白还包含第三抗原结合结构域,具体地说,所述第三结合结构域与所述第二结合结构域(即MAGE-A4 pMHC结合结构域)相同。

[0187] 在某些实施方案中,此类多特异性抗原结合蛋白包含:c)特异性结合至MAGE-A4 pMHC的第三抗原结合结构域,所述第三抗原结合结构域包含:c1)VH结构域,所述VH结构域包含SNYAMS(SEQ ID NO:11)的HCDR1氨基酸序列、IVSSGGTTYYAX$_1$X$_2$X$_3$KG(SEQ ID NO:6)的HCDR2氨基酸序列(其中X$_1$对应于氨基酸S或D,X$_2$对应于氨基酸W或S,并且X$_3$对应于氨基酸A或V)以及DLYY GPX$_4$TX$_5$YX$_6$X$_7$X$_8$NL(SEQ ID NO:7)的HCDR3氨基酸序列(其中X$_4$对应于氨基酸T、N或S,X$_5$对应于氨基酸D或不存在,X$_6$对应于氨基酸S或F,X$_7$对应于氨基酸A或V,并且X$_8$对应于氨基酸F或A);以及c2)VL结构域,所述VL结构域包含TADTLSRSYAS(SEQ ID NO:16)的LCDR1氨基酸序列、RDTSRPS(SEQ ID NO:17)的LCDR2氨基酸序列以及ATX$_9$X$_{10}$X$_{11}$SGSNFQX$_{12}$(SEQ ID NO:8)的LCDR3氨基酸序列,其中X$_9$对应于氨基酸S或R,X$_{10}$对应于氨基酸D或P,X$_{11}$对应于氨基酸G、S或F,并且X$_{12}$对应于氨基酸L或A。

[0188] 在某些实施方案中,第二和第三抗原结合结构域包含:

[0189] (i)VH,所述VH包含含有SNYAMS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列的HCDR1序列、含有IVSSGGTTYYADSVKG(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列的HCDR2序列以及含有DLYYGPNTDYSAANL(SEQ ID NO:13)的氨基酸序列的HCDR3序列;以及VL,所述VL包含含有TADTLSRSYAS(SEQ ID NO:16)的氨基酸序列的LCDR1序列、含有RDTSRPS(SEQ ID NO:17)的氨基酸序列的LCDR2序列以及含有ATRPSSGSNFQA(SEQ ID NO:18)的氨基酸序列的LCDR3序列;

[0190] (ii)VH,所述VH包含含有SNYAMS(SEQ ID NO:21)的氨基酸序列的HCDR1序列、含有IVSSGGTTYYADSVKG(SEQ ID NO:22)的氨基酸序列的HCDR2序列以及含有DLYYGPSTYFVANL

(SEQ ID NO:23)的氨基酸序列的HCDR3序列;以及VL,所述VL包含含有TADTLSRSYAS(SEQ ID NO:26)的氨基酸序列的LCDR1序列、含有RDTSRPS(SEQ ID NO:27)的氨基酸序列的LCDR2序列以及含有ATRPSSGSNFQL(SEQ ID NO:28)的氨基酸序列的LCDR3序列;

[0191] (iii)VH,所述VH包含含有SNYAMS(SEQ ID NO:31)的氨基酸序列的HCDR1序列、含有IVSSGGTTYYASWAKG(SEQ ID NO:32)的氨基酸序列的HCDR2序列以及含有DLYYGPTTYSAANL(SEQ ID NO:33)的氨基酸序列的HCDR3序列;以及VL,所述VL包含含有TADTLSRSYAS(SEQ ID NO:36)的氨基酸序列的LCDR1序列、含有RDTSRPS(SEQ ID NO:37)的氨基酸序列的LCDR2序列以及含有ATRDFSGSNFQL(SEQ ID NO:38)的氨基酸序列的LCDR3序列;或

[0192] (iv)VH,所述VH包含含有SNYAMS(SEQ ID NO:41)的氨基酸序列的HCDR1序列、含有IVSSGGTTYYASWAKG(SEQ ID NO:42)的氨基酸序列的HCDR2序列以及含有DLYYGPTTYSAFNL(SEQ ID NO:43)的氨基酸序列的HCDR3序列;以及VL,所述VL包含含有TADTLSRSYAS(SEQ ID NO:46)的氨基酸序列的LCDR1序列、含有RDTSRPS(SEQ ID NO:47)的氨基酸序列的LCDR2序列以及含有ATRPSSGSNFQA(SEQ ID NO:48)的氨基酸序列的LCDR3序列。

[0193] 在某些实施方案中,第二和第三抗原结合结构域包含:

[0194] (i)抗体重链可变(VH)结构域,所述抗体重链可变结构域包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列,以及抗体轻链可变(VL)结构域,所述抗体轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列;

[0195] (ii)VH结构域,所述VH结构域包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列,以及VL结构域,所述VL结构域包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列;

[0196] (iii)VH结构域,所述VH结构域包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列,以及VL结构域,所述VL结构域包含与SEQ ID NO:35的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列;或

[0197] (iv)VH结构域,所述VH结构域包含与SEQ ID NO:40的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列,以及VL结构域,所述VL结构域包含与SEQ ID NO:45的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列。

[0198] 在某些实施方案中,第一、第二和第三抗原结合结构域中的任何一者或多者包含抗体片段。在某些实施方案中,抗体片段包含Fab片段、$F(ab')_2$片段、Fab'片段、Fv片段、单链可变片段(scFv)以及单域抗体片段。

[0199] 在某些实施方案中,MAGE-A4 pMHC抗原结合结构域包含scFv。在某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白包含至少一个scFv,所述至少一个scFv包含SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63和/或SEQ ID NO:64的氨基酸序列或其变体,所述变体分别与SEQ ID NO:SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63和/或SEQ ID NO:64的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或99%同一。

[0200] 在某些实施方案中,免疫细胞或CD3抗原结合结构域是Fab片段,其中Fab片段包含

含有CH1结构域和VH的重链以及含有Cl结构域和VL的轻链。

[0201] 在某些实施方案中,CH1结构域包含抗体铰链区的至少5个氨基酸。在某些实施方案中,CH1结构域包含抗体铰链区的氨基酸序列EPKSC(SEQ ID NO:88)。

[0202] 在某些实施方案中,第二抗原结合结构域可操作地连接至重链的C端或重链的N端。

[0203] 在某些实施方案中,第三抗原结合结构域可操作地连接至重链的C端或重链的N端。

[0204] 在某些实施方案中,第二抗原结合结构域可操作地连接至轻链的C端或轻链的N端。

[0205] 在某些实施方案中,第三抗原结合结构域可操作地连接至轻链的C端或轻链的N端。

[0206] 在某些实施方案中,a)第二抗原结合结构域包含连接至Fab结构域重链的C端的scFv并且第三抗原结合结构域包含连接至Fab结构域轻链的C端的scFv;b)第二抗原结合结构域包含连接至Fab结构域重链的N端的scFv并且第三抗原结合结构域包含连接至Fab结构域轻链的N端的scFv;c)第二抗原结合结构域包含连接至Fab结构域重链的N端的scFv并且第三抗原结合结构域包含连接至Fab结构域轻链的C端的scFv;或d)第二抗原结合结构域包含连接至Fab结构域重链的C端的scFv并且第三抗原结合结构域包含连接至Fab结构域轻链的N端的scFv。

[0207] 在某些实施方案中,scFv用氨基酸接头连接至Fab结构域。

[0208] 在某些实施方案中,氨基酸接头包含(GGGGS)n(SEQ ID NO:73),其中n是1与5之间的整数。在某些实施方案中,氨基酸接头包含氨基酸序列GGGGS(SEQ ID NO:74)、GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:75)、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:76)、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGAS(SEQ ID NO:77)或GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:78)。

[0209] 在某些实施方案中,第二和/或第三抗原结合结构域VH和VL用氨基酸接头连接。

[0210] 在某些实施方案中,氨基酸接头包含(GGGGS)n(SEQ ID NO:73),其中n是1与5之间的整数。在某些实施方案中,氨基酸接头包含氨基酸序列GGGGS(SEQ ID NO:74)、GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:75)、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:76)、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGAS(SEQ ID NO:77)或GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:78)。

[0211] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白不包含Fc结构域。

[0212] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白包含$(scFv)_2$、$(scFv)_3$、BiTE、BIKE、Dart、双抗体、三抗体、Fab_2、Fab_3、Fab_4、scFv-Fab-scFv或微型抗体-scFv。

[0213] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白包含约75kDa至约110kDa的分子量。

[0214] 在某些实施方案中,抗原结合蛋白相对于具有＜约75kDa的分子量的抗原结合蛋白具有较长的血清半衰期。

[0215] 适合用于本文公开的多特异性抗原结合结构域的抗CD3结合结构域是本领域已知的,特别是T细胞活化性CD-ε结合结构域。US6750325、WO2008079713、US7635475、WO2005040220、US7728114、WO9404679、US7381803、WO2008119567、WO2014110601、WO2014145806、WO2016086189和/或WO2019195535A1中公开了示例性CD3结合结构域,所述专利中的每一者以引用的方式并入本文中。在某些实施方案中,CD3结构域不与小型猪CD3

或啮齿动物CD3,特别是大鼠或小鼠CD3交叉反应。

[0216] 在某些实施方案中,CD3抗原结合结构域包含:a1)VH,所述VH包含含有STYAMN(SEQ ID NO:51)的氨基酸序列的HCDR1序列、含有RIRSKYNNYATYYADSVKG(SEQ ID NO:52)的氨基酸序列的HCDR2序列以及含有HGNFGDSYVSWFAY(SEQ ID NO:53)的氨基酸序列的HCDR3序列;以及a2)VL,所述VL包含含有GSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:56)的氨基酸序列的LCDR1序列、含有GTNKRAP(SEQ ID NO:57)的氨基酸序列的LCDR2序列以及含有ALWYSNHWV(SEQ ID NO:58)的氨基酸序列的LCDR3序列。

[0217] 在某些实施方案中,CD3抗原结合结构域包含:VH,所述VH包含与SEQ ID NO:50的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列,以及VL,所述VL包含与SEQ ID NO:55的氨基酸序列至少约90%、%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列。

[0218] 在某些实施方案中,CD3抗原结合结构域包含:由SEQ ID NO:50的氨基酸序列组成的VH,以及由SEQ ID NO:55的氨基酸序列组成的VL。

[0219] 在某些实施方案中,CD3抗原结合结构域包含:重链,所述重链包含与SEQ ID NO:49的氨基酸序列至少约90%、%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列,以及轻链,所述轻链包含与SEQ ID NO:54的氨基酸序列至少约90%、%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列。

[0220] 在某些实施方案中,CD3抗原结合结构域包含:由SEQ ID NO:49的氨基酸序列组成的VH,以及由SEQ ID NO:54的氨基酸序列组成的VL。

[0221] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白包含:a)特异性结合至CD3的第一抗原结合结构域,所述第一抗原结合结构域包含:a1)VH,所述VH包含含有STYAMN(SEQ ID NO:51)的氨基酸序列的HCDR1序列、含有RIRSKYNNYATYYADSVKG(SEQ ID NO:52)的氨基酸序列的HCDR2序列以及含有HGNFGDSYVSWFAY(SEQ ID NO:53)的氨基酸序列的HCDR3序列;以及a2)VL,所述VL包含含有GSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:56)的氨基酸序列的LCDR1序列、含有GTNKRAP(SEQ ID NO:57)的氨基酸序列的LCDR2序列以及含有ALWYSNHWV(SEQ ID NO:58)的氨基酸序列的LCDR3序列;以及b)特异性结合至黑素瘤相关抗原A4(MAGE-A4)肽-MHC(pMHC)的第二抗原结合结构域。上文已详细描述合适的第二抗原结合结构域的实施方案。此类多特异性抗原结合蛋白可包含可与第二结合结构域相同的第三结合结构域。上文还详细描述了可能的模式和修饰。

[0222] 在一个方面中,本公开提供了一种多特异性的抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白包含:a)特异性结合T细胞上的CD3的单个Fab结构域,所述Fab结构域包含重链和轻链以及CD3抗原结合结构域,所述CD3抗原结合结构域包含含有与SEQ ID NO:50的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列的VH,以及含有与SEQ ID NO:55的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列的VL;b)可操作地连接至Fab重链的C端的MAGE-A4 pMHC结合结构域,所述MAGE-A4 pMHC结合结构域包含含有与SEQ ID NO:10的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列的VH以及含有与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少约90%同一的氨基酸序列的VL;以及c)可操作地连接至Fab轻链的C端的MAGE-A4 pMHC结合结构域,所述MAGE-A4 pMHC结合结构域包含含有与SEQ ID NO:10的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、

97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列的VH以及含有与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少约90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列的VL。在某些实施方案中,所述多特异性抗原结合蛋白是如例如图4中所示的双特异性Fab(scFv)$_2$。

[0223] 在一个方面中,本公开提供了一种多特异性的抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白包含:a)特异性结合T细胞上的CD3的单个Fab结构域,所述Fab结构域包含重链和轻链以及CD3抗原结合结构域,所述CD3抗原结合结构域包含含有与SEQ ID NO:50的氨基酸序列至少约90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列的VH,以及含有与SEQ ID NO:55的氨基酸序列至少约90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列的VL;b)可操作地连接至Fab重链的C端的MAGE-A4 pMHC结合结构域,所述MAGE-A4 pMHC结合结构域包含含有与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少约90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列的VH以及含有与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少约90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列的VL;以及c)可操作地连接至Fab轻链的C端的MAGE-A4 pMHC结合结构域,所述MAGE-A4 pMHC结合结构域包含含有与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少约90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列的VH以及含有与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少约90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列的VL。在某些实施方案中,所述多特异性抗原结合蛋白是如例如图4中所示的双特异性Fab(scFv)$_2$。

[0224] 在一个方面中,本公开提供了一种多特异性的抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白包含:a)特异性结合T细胞上的CD3的单个Fab结构域,所述Fab结构域包含重链和轻链以及CD3抗原结合结构域,所述CD3抗原结合结构域包含含有与SEQ ID NO:50的氨基酸序列至少约90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列的VH,以及含有与SEQ ID NO:55的氨基酸序列至少约90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列的VL;b)可操作地连接至Fab重链的C端的MAGE-A4 pMHC结合结构域,所述MAGE-A4 pMHC结合结构域包含含有与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少约90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列的VH以及含有与SEQ ID NO:35的氨基酸序列至少约90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列的VL;以及c)可操作地连接至Fab轻链的C端的MAGE-A4 pMHC结合结构域,所述MAGE-A4 pMHC结合结构域包含含有与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少约90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列的VH以及含有与SEQ ID NO:35的氨基酸序列至少约90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列的VL。在某些实施方案中,所述多特异性抗原结合蛋白是如例如图4中所示的双特异性Fab(scFv)$_2$。

[0225] 在一个方面中,本公开提供了一种多特异性的抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白包含:a)特异性结合T细胞上的CD3的单个Fab结构域,所述Fab结构域包含重链和轻链以及CD3抗原结合结构域,所述CD3抗原结合结构域包含含有与SEQ ID NO:50的氨基酸序列至少约90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列的VH,以及含有与SEQ ID NO:55的氨基酸序列至少约90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列的VL;b)可操作地连接至Fab重链的C端的MAGE-A4 pMHC结合结构域,所述MAGE-A4 pMHC结合结构域包含含有与SEQ ID NO:40的氨基酸序列至少约90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列的VH以及含有与SEQ ID NO:45的氨基酸序列至少约90％、95％、

96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列的VL;以及c)可操作地连接至Fab轻链的C端的MAGE-A4 pMHC结合结构域,所述MAGE-A4 pMHC结合结构域包含含有与SEQ ID NO:40的氨基酸序列至少约90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列的VH以及含有与SEQ ID NO:45的氨基酸序列至少约90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列的VL。在某些实施方案中,所述多特异性抗原结合蛋白是如例如图4中所示的双特异性Fab(scFv)$_2$。

[0226] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合蛋白是Fab(scFv)$_2$,所述Fab(scFv)2包含(a)靶向CD3的单个Fab结构域,所述Fab结构域包含重链和轻链,其中所述重链包含与SEQ ID NO:49的氨基酸序列至少约90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列或由其组成并且所述轻链包含与SEQ ID NO:54的氨基酸序列至少约90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列或由其组成;以及(b)靶向HLA展示的SEQ ID NO:3的两个scFv,每个scFv包含与SEQ ID NO:SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63和/或SEQ ID NO:64的氨基酸序列至少约90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列或由其组成。在某些实施方案中,一个scFv连接至Fab重链的C端并且第二个连接至轻链的C端,参见图4的示例性实施方案。

[0227] 在一个方面中,本公开提供了一种结合至GVYDGREHTV(SEQ ID NO:3)HLA-A*02复合物和CD3的多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白包含:

[0228] (i)第一多肽链,所述第一多肽链包含SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列或由其组成,以及第二多肽链,所述第二多肽链包含SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列;

[0229] (ii)第一多肽链,所述第一多肽链包含SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列或由其组成,以及第二多肽链,所述第二多肽链包含SEQ ID NO:24中所示的氨基酸序列;

[0230] (iii)第一多肽链,所述第一多肽链包含SEQ ID NO:29中所示的氨基酸序列或由其组成,以及第二多肽链,所述第二多肽链包含SEQ ID NO:34中所示的氨基酸序列;或

[0231] (iv)第一多肽链,所述第一多肽链包含SEQ ID NO:39中所示的氨基酸序列或由其组成;以及第二多肽链,所述第二多肽链包含SEQ ID NO:44中所示的氨基酸序列;

[0232] 或所述序列的变体,所述变体与其至少90％、95％、96％、97％、98％或99％同一,同时保留抗原特异性(即保留对GVYDGREHTV(SEQ ID NO:3)HLA-A*02复合物和CD3的特异性)。在某些实施方案中,pMHC结合结构域特别是在scFv模式中时包含根据Kabat编号在位置11、89和/或108具有极性氨基酸的可变重链。

[0233] 在某些实施方案中,Fab结构域包含根据Kabat编号在位置11、89和/或108具有极性氨基酸的可变重链。

[0234] 在某些实施方案中,可变重链包含:根据Kabat编号在氨基酸位置11的亮氨酸(L)或丝氨酸(S);根据Kabat编号在氨基酸位置89的缬氨酸(V)、丝氨酸(S)或苏氨酸(T);和/或根据Kabat编号在氨基酸位置108的亮氨酸(L)、丝氨酸(S)或苏氨酸(T)。

[0235] 在某些实施方案中,根据Kabat编号,当亮氨酸(L)存在于氨基酸位置11时,那么丝氨酸(S)或苏氨酸(T)存在于氨基酸位置89,并且丝氨酸(S)或苏氨酸(T)存在于氨基酸位置108。

[0236] 在某些实施方案中,根据Kabat编号,当缬氨酸(V)存在于氨基酸位置89时,那么丝氨酸(S)存在于氨基酸位置11,并且丝氨酸(S)或苏氨酸(T)存在于氨基酸位置108。

[0237] 在某些实施方案中,根据Kabat编号,当亮氨酸(L)存在于氨基酸位置108时,那么丝氨酸(S)或苏氨酸(T)存在于氨基酸位置11,并且丝氨酸(S)或苏氨酸(T)存在于氨基酸位置89。

[0238] 在某些实施方案中,极性氨基酸是丝氨酸(S)和/或苏氨酸(T)。

[0239] 在某些实施方案中,可变重链包含根据Kabat编号在氨基酸位置11的丝氨酸(S)、在氨基酸位置89的丝氨酸(S)或苏氨酸(T)以及在氨基酸位置108的丝氨酸(S)或苏氨酸(T)。

[0240] 在某些实施方案中,可变重链包含根据Kabat编号在氨基酸位置11的丝氨酸(S)、在氨基酸位置89的丝氨酸(S)以及在氨基酸位置108的丝氨酸(S)。

[0241] 在某些实施方案中,根据Kabat编号,Fab结构域包含在位置113的丝氨酸(S)缺失的可变重链。

[0242] 在某些实施方案中,根据Kabat编号,pMHC结合结构域(诸如第一和/或第二pMHC结合结构域)包含在113位置的丝氨酸(S)缺失的可变重链。

[0243] 在某些实施方案中,根据Kabat编号,Fab结构域包含在位置112的丝氨酸(S)缺失并且在位置113的丝氨酸(S)缺失的可变重链。

[0244] 在某些实施方案中,根据Kabat编号,pMHC结合结构域(诸如第一和/或第二pMHC结合结构域)包含在位置112的丝氨酸(S)缺失并且在位置113的丝氨酸(S)缺失的可变重链。

[0245] 在某些实施方案中,根据Kabat编号,抗原结合蛋白包含S113A、S113G或S113T取代。

[0246] 在某些实施方案中,根据Kabat编号,抗原结合蛋白包含S113A、S113G或S113T取代,并且其中S112缺失。

[0247] 在某些实施方案中,根据Kabat编号,抗原结合蛋白包含S112A、S112G或S112T取代。

[0248] 在某些实施方案中,根据Kabat编号,抗原结合蛋白包含S112A、S112G或S112T取代,并且其中S113缺失。

[0249] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合分子经由免疫细胞衔接子结合臂结合的免疫细胞选自由以下组成的组:T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、嗜中性细胞、单核细胞以及巨噬细胞。在某些实施方案中,免疫细胞是T细胞。

[0250] 在某些实施方案中,如通过SPR所确定,Fab结构域以约1nM至约100nM之间(例如1nM、2nM、3nM、4nM、5nM、6nM、7nM、8nM、9nM、10nM、11nM、12nM、13nM、14nM、15nM、16nM、17nM、18nM、19nM、20nM、21nM、22nM、23nM、24nM、25nM、26nM、27nM、28nM、29nM、30nM、31nM、32nM、33nM、34nM、35nM、36nM、37nM、38nM、39nM、40nM、41nM、42nM、43nM、44nM、45nM、46nM、47nM、48nM、49nM、50nM、51nM、52nM、53nM、54nM、55nM、56nM、57nM、58nM、59nM、60nM、61nM、62nM、63nM、64nM、65nM、66nM、67nM、68nM、69nM、70nM、71nM、72nM、73nM、74nM、75nM、76nM、77nM、78nM、79nM、80nM、81nM、82nM、83nM、84nM、85nM、86nM、87nM、88nM、89nM、90nM、91nM、92nM、93nM、94nM、95nM、96nM、97nM、98nM、99nM或100nM)的结合亲和力特异性结合至CD3。在某些实施方案中,如通过SPR所确定,Fab结构域以约1nM至约50nM之间的结合亲和力特异性结合至CD3。在某些实施方案中,如通过SPR所确定,Fab结构域以约20nM至约50nM之间的结合亲和力特异性结合至CD3。

[0251] 在某些实施方案中,如通过SPR所确定,Fab结构域以约1nM、约10nM或约50nM的结合亲和力特异性结合至CD3。

[0252] 在一些实施方案中,抗CD3结合结构域的缔合速率常数ka介于约1×10^{5}至约$1\times10^{7}M^{-1}s^{-1}$之间,诸如至少$1\times10^{6}M^{-1}s^{-1}$或至少$2\times10^{6}M^{-1}s^{-1}$。在一些实施方案中,抗CD3结合结构域的解离速率常数k_d介于约1×10^{-1}至约$1\times10^{-6}s^{-1}$之间,诸如至少$2\times10^{-3}s^{-1}$或至少$3\times10^{-3}s^{-1}$或至少$4\times10^{-3}s^{-1}$。不受理论约束,快速解离速率(例如$2-3\times10^{-3}s^{-1}$的k_d值)可引起较少的T细胞过度活化,并且从而引起较少的细胞因子释放。

[0253] 在一个实施方案中,对于CD3-异二聚体CD3εγ(ε/γ)与CD3εδ(ε/δ)两者来说,缔合速率常数k_a和/或解离速率常数k_d是等效的或类似的,即当在相同条件下测量时,特别是当在25℃下通过SPR确定时,抗CD3结合结构域对CD3εγ(ε/γ)和CD3εδ(ε/δ)的k_a或k_d或两者没有显著差异。在某些其实施方案中,缔合速率常数k_a和/或解离速率常数k_d值在彼此的1倍、彼此的1.5倍、彼此的2倍、彼此的2.5倍或彼此的3倍以内,即缔合速率常数k_a值为$1\times10^{5}M^{-1}s^{-1}$和$3\times10^{5}M^{-1}s^{-1}$。

[0254] 在某些实施方案中,pMHC结合结构域以约100pM至约5nM(例如约100pM、约150pM、约200pM、约250pM、约300pM、约350pM、约400pM、约450pM、约500pM、约550pM、约600pM、约650pM、约700pM、约750pM、约800pM、约850pM、约900pM、约950pM、约1nM(1,000pM)、约2nM、约3nM、约4nM或约5nM)的结合亲和力结合靶MAGE-A4-pMHC复合物。在某些实施方案中,pMHC结合结构域以约100pM至约1nM的结合亲和力结合靶pMHC复合物。在某些实施方案中,pMHC结合结构域以约100pM至约400pM的结合亲和力结合靶pMHC复合物。

[0255] 在某些实施方案中,本文公开的pMHC结合结构域以类似于pMHC展示的MAGE-A4肽的结合亲和力结合pMHC展示的MAGE-A8和MAGE-B4肽。在某些实施方案中,pMHC结合结构域以约1.5nM至约2.5nM(诸如1.6nM、1.7nM、1.8nM、1.9nM、2nM、2.1nM、2.2nM、2.3nM、2.4nM或2.5nM)的结合亲和力结合pMHC展示的MAGE-A8肽和/或pMHC展示的MAGE-B4肽。在某些实施方案中,如通过SPR所测量,pMHC结合结构域以约2.2nM的结合亲和力结合pMHC展示的MAGE-A8肽,和/或以约1.9nM的结合亲和力结合pMHC展示的MAGE-B4肽。在某些实施方案中,pMHC结合结构域以在约1.9nM至约2.2nM范围内的类似结合亲和力结合pMHC展示的MAGE-A4、MAGE-A8以及MAGE-B4肽。在某些实施方案中,MAGE-A8肽是GLYDGREHSV(SEQ ID NO:71)。在某些实施方案中,MAGE-B4肽是GIYDGKRHLI(SEQ ID NO:72)。

[0256] 在一些实施方案中,pMHC结合结构域包含介于约1×10^{5}至约$1\times10^{7}M^{-1}s^{-1}$之间,优选约$0.5\times10^{6}M^{-1}s^{-1}$至约$3\times10^{6}M^{-1}s^{-1}$之间(诸如至少$0.5\times10^{6}M^{-1}s^{-1}$、至少$1\times M^{-1}s^{-1}$、至少$2\times10^{6}M^{-1}s^{-1}$或至少$3\times10^{6}M^{-1}s^{-1}$)的对MAGE-A4 pMHC的缔合速率常数ka。在一些实施方案中,pMHC结合结构域包含介于约1×10^{-1}至约$1\times10^{-6}s^{-1}$之间(诸如约1×10^{-2}至约$1\times10^{-5}s^{-1}$之间,诸如至少$2\times10^{-3}s^{-1}$、至少$4\times10^{-3}s^{-1}$、至少$6\times10^{-3}s^{-1}$、至少$8\times10^{-3}s^{-1}$、至少$2\times10^{-4}s^{-1}$、至少$4\times10^{-4}s^{-1}$、至少$6\times10^{-4}s^{-1}$或至少$8\times10^{-4}s^{-1}$)的对MAGE-A4 pMHC的解离速率常数k_d。

[0257] 在某些实施方案中,抗原结合蛋白包含约75kDa至约110kDa(例如约75kDa、约80kDa、约85kDa、约90kDa、约95kDa、约100kDa、约105kDa或约110kDa)的分子量。在某些实施方案中,抗原结合蛋白相对于具有<约75kDa的分子量的抗原结合蛋白具有延长的血清半衰期。

[0258] 本公开的抗原结合蛋白支架的优点是约75-110kDa的中间物分子大小。博纳吐单

抗(Blinatumomab)(一种双特异性T细胞衔接子(BiTE))在复发性或难治性急性成淋巴细胞性白血病患者中显示优异的结果。由于尺寸小(54kDa),博纳吐单抗的特征为几小时的短血清半衰期,并且因此需要连续输注(参见U.S.7,112,324 Bl)。预期本公开的抗原结合蛋白与较小的双特异性抗体(诸如像博纳吐单抗一样的BiTE)相比具有显著更长的半衰期,并且因此因其有利的半衰期而不需要连续输注。中等大小的分子可以避免肾清除并且提供足以改善肿瘤累积的半衰期。虽然本公开的抗原结合蛋白与其他小的双特异性模式相比具有增加的血浆半衰期,但它们仍然保留肿瘤穿透能力。

[0259] 本公开的抗原结合蛋白的Fab结构域可以充当与其他pMHC结合结构域连接的特异性异二聚化支架。Fab片段的重链(Fd片段)和轻链(L)的天然和有效异源二聚化特性使Fab片段成为可用的支架。其他结合结构域可呈若干不同的模式,包括但不限于另一Fab结构域、scFv或sdAb。

[0260] Fab片段的每个链可以在N端或C端延伸具有其他结合结构域。这些链可以在哺乳动物细胞中共表达,其中宿主细胞结合免疫球蛋白蛋白质(BiP)伴侣蛋白驱使形成重链-轻链异二聚体(Fd:L)。这些异源二聚体是稳定的,每种结合剂都保留其特异性亲和力。然后可以将两个剩余的pMHC结合结构域作为scFv或sdAb融合至不同的Fab链,其中每条链可以例如在C端延伸具有另一scFv或sdAb结构域(参见例如Schoonjans等J.Immunology,165(12):7050-7057,2000;Schoonjans等Biomolecular Engineering,17:193-202,2001)。使用Fab作为异二聚化单元的另一优点是Fab分子大量存在于血清中,并且因此当向受试者施用时可以是非免疫原性的。

[0261] 在某些实施方案中,本公开的(多特异性)抗原结合蛋白具有以下特性中的一者或多者:(i)例如在诸如实施例14中示例性显示的细胞系源性小鼠NSCLC异种移植模型中,它能够抑制肿瘤生长和根除肿瘤;和/或(ii)如通过LDH细胞毒性所确定,它显示对靶阳性肿瘤细胞的功效;和/或(iii)如例如通过IncuCyte S3系统所确定,它显示对靶阳性肿瘤细胞的功效;和/或(iv)与比较物1相比,它在抗原阳性和抗原阴性细胞系中诱导较低水平的促炎性细胞因子IFN γ(示例性测定参见例如实施例12);和/或(v)与比较物1相比,它诱导较低水平的促炎性细胞因子IL-2、IL-6和/或TNFα细胞因子释放(示例性测定参见例如实施例12);(vi)它具有T细胞活化特性,示例性测定参见例如实施例12;和/或(vii)如例如通过颗粒酶B释放所测量的安全性(例如在抗原阴性癌细胞系KLE(子宫内膜癌)、LNCaP(前列腺淋巴结癌)、KMRC-2(透明细胞肾细胞癌)、KMRC-3(透明细胞肾细胞癌)、639-V(尿路上皮膀胱癌)、EKVX(肺腺癌)和/或HCT 116(结肠直肠癌)中,参见例如实施例12)和/或如例如通过T细胞活化测定所确定的在健康组织中的反应性,示例性测定参见实施例12和13;和/或(viii)在4℃下在1mg/ml和/或10mg/ml下在PBS中储存至少两周期间,如通过SEC-HPLC所测定,保持至少94%为单体。

[0262] 还涵盖本文公开的序列的变体。变体氨基酸或核酸序列分别由于一个或多个氨基酸残基或核碱基的插入(包括添加)、缺失和/或取代而不同于其亲本序列,同时保留本文公开的亲本序列的至少一种所需特性,例如特异性抗原结合、对靶阳性肿瘤细胞的功效、稳定性(例如血清稳定性、热稳定性和/或储存稳定性)、可生产性(例如表达水平)、安全性(例如在健康组织中的反应性、颗粒酶B释放、促炎性细胞因子IFNγ抗原阳性或抗原阴性细胞系和/或低程度诱导、甚至不诱导促炎性细胞因子IL-2、IL-6以及TNFα细胞因子释放)、功效

(例如肿瘤生长抑制、肿瘤根除和/或如例如在体外确定的T细胞活化特性)或以类似的亲和力范围结合MAGE-A4 GVYDGREHTV(SEQ ID NO:3)HLA-A*02复合物、MAGE-A8衍生的GLYDGREHSV (SEQ ID NO:71)HLA-A*02复合物以及MAGE-B4衍生的GIYDGKRHLI(SEQ ID NO:72)HLA-A*02复合物)。在某些实施方案中,变体抗原结合蛋白保持与GVYDGREHTV(SEQ ID NO:3)HLA-A*02:01复合物的结合为参考抗原结合蛋白(即没有所述取代、插入和/或缺失的相应抗原结合蛋白)的平衡解离常数K_D的至少50%,诸如60%、70%、80%、90%或95%。变体可以是人工工程化的或天然存在的,诸如等位基因或剪接变体。在一些实施方案中,变体抗原结合蛋白包含与本文公开的氨基酸序列至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一的氨基酸序列。

[0263] 因此,在某些实施方案中,变体抗原结合蛋白保持对靶标(即分别对MAGE-A4 pMHC,特别是GVYDGREHTV(SEQ ID NO:3)HLA-A*02:01复合物,或CD3)的特异性结合和/或与本文公开的抗原结合蛋白竞争结合至其靶标。在某些实施方案中,如通过SEC-HPLC所测定,在4℃下在1mg/ml和/或10mg/ml下在PBS中孵育14天之后,抗原结合蛋白保持稳定性并且保持至少94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%为单体。

[0264] 抗药物抗体结合的减少

[0265] 抗药物抗体(ADA)可能会影响风险型态和生物药物的功效。如果中和,那么它们可阻断药物结合至其靶标的能力。因此,测试生物药物的抗药物抗体结合以及其中和潜力是一项监管要求。例如WO2007101661A1(Hoffmann La Roche)、WO2018178307A1(Ablynx)、WO2021046316A2(Adverum Biotechnologies,Charles River)以及US20180088140A1(Genzyme公司)中详细描述了抗药物抗体测定,所述专利各自以引用的方式并入本文中。

[0266] 当ADA的每个可变结构域结合至两种抗原结合蛋白的一个肿瘤靶向结构域时,抗药物抗体结合至抗原结合蛋白的肿瘤靶向结构域可使得所述抗原结合蛋白聚集。所述抗原结合蛋白上的两个或更多个CD3结合结构域在不存在靶标衔接的情况下聚集并且过度刺激靶向的T细胞,从而导致脱靶毒性。T细胞的非特异性刺激可引起全身性细胞因子释放。

[0267] 总地来说,本领域需要开发用于癌症免疫疗法的更安全并且更有效的双特异性抗体。

[0268] 本发明人已经发现,T细胞衔接子的肿瘤抗原结合结构域中的某些突变降低ADA反应,并且同时在不存在靶标衔接的情况下降低非特异性T细胞刺激。从而提供了一种高度有效并且安全的用于癌症免疫疗法的方法。

[0269] 为此目的,将根据Kabat编号在位置11、89和/或108的可变重链氨基酸用极性氨基酸取代;和/或使根据Kabat编号在位置113的丝氨酸(S)缺失。当结合结构域在scFv模式中时,此类取代是特别有利的。在Fab(scFv)$_2$的情况下,一个或两个scFv可包含此类取代或缺失。

[0270] 在某些实施方案中,极性氨基酸是丝氨酸(S)和/或苏氨酸(T)。

[0271] 在某些实施方案中,根据Kabat编号,重链氨基酸在重链氨基酸位置11用丝氨酸(S)、在重链氨基酸位置89用丝氨酸(S)或苏氨酸(T)和/或在重链氨基酸位置108用丝氨酸(S)或苏氨酸(T)取代。

[0272] 在某些实施方案中,根据Kabat编号,重链氨基酸在重链氨基酸位置11用丝氨酸(S)、在重链氨基酸位置89用丝氨酸(S)并且在重链氨基酸位置108用丝氨酸(S)取代。

[0273] 在某些实施方案中,根据Kabat编号,除了在位置113的丝氨酸的缺失外,在位置112的丝氨酸(S)也缺失。

[0274] 在某些实施方案中,方法还包括在Kabat氨基位置112或113添加丙氨酸(A)、甘氨酸(G)或苏氨酸(T),特别是丙氨酸(A)。

[0275] 在某些实施方案中,方法还包括在Kabat氨基位置112或113添加丙氨酸(A)。

[0276] 抗原结合蛋白的表达

[0277] 在一个方面中,提供了编码本文公开的抗原结合蛋白(包括多特异性抗原结合蛋白)的多核苷酸或核酸。此类多核苷酸或核酸通常是分离的合成的。还提供了制备抗原结合蛋白的方法,所述方法包括使这些多核苷酸表达。

[0278] 通常将编码本文公开的抗原结合蛋白的多核苷酸插入克隆载体中或表达载体中以便引入可用于产生所需量的抗原结合蛋白的宿主细胞中。因此,在某些方面中,本发明提供了包含本文公开的多核苷酸的表达载体以及包含这些载体和多核苷酸的宿主细胞。

[0279] 术语“载体”或“表达载体”在本文中用于指根据本发明用作将所需基因引入细胞并且使其在细胞中表达的媒介物。如本领域技术人员已知的,此类载体可容易地从由以下组成的组选择:质粒、噬菌体、病毒以及逆转录病毒。一般来说,与本发明相容的载体将包含选择标记物、促进所需基因的克隆的适当限制位点以及进入真核或原核细胞和/或在其中复制的能力。

[0280] 许多表达载体系统可用于本发明的目的。举例来说,一类载体使用来源于动物病毒(诸如牛类乳头瘤病毒、多瘤病毒、腺病毒、痘苗病毒、杆状病毒、逆转录病毒(例如RSV、MMTV、MOMLV等)或SV40病毒)的DNA元件。其他涉及使用具有内部核糖体结合位点的多顺反子系统。另外,已将DNA整合至其染色体中的细胞可通过引入允许选择转染的宿主细胞的一个或多个标记物来选择。所述标记物可以向营养缺陷型宿主提供原养型、提供抗微生物剂抗性(例如抗生素)或提供对重金属(诸如铜)的抗性。可选标志基因可直接连接至要表达的DNA序列,或通过共转化引入相同细胞中。mRNA的最佳合成还可能需要其他元件。这些元件可包括信号序列、剪接信号以及转录启动子、增强子以及终止信号。在一些实施方案中,将克隆的可变区基因与如上文所论述合成的重链和轻链恒定区基因(例如人恒定区基因)一起插入表达载体中。

[0281] 在其他实施方案中,可使用多顺反子构建体表达抗原结合蛋白。在此类表达系统中,感兴趣的多基因产物(诸如抗体的重链和轻链)可由单个多顺反子构建体产生。这些系统有利地使用内部核糖体进入位点(IRES)在真核宿主细胞中提供相对高水平的多肽。美国专利号6,193,980中公开了相容IRES序列,所述专利出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。本领域技术人员将理解,此类表达系统可用于有效地产生本申请中公开的全部范围的多肽。

[0282] 更通常地,一旦制备了编码抗原结合蛋白的载体或DNA序列,就可以将表达载体引入适当的宿主细胞中。也就是说,宿主细胞可以被转化。将质粒引入宿主细胞中可以通过本领域技术人员熟知的各种技术来实现。这些方法包括但不限于转染(包括电泳和电穿孔)、原生质体融合、磷酸钙沉淀、细胞与包膜DNA融合、微量注射以及感染完整病毒。参见Ridgway,A.A.G.“Mammalian Expression Vectors”第24.2章,第470-472页Vectors,Rodriguez和Denhardt编(Butterworths,Boston,Mass.1988)。可通过电穿孔将质粒引入宿

主中。使转化的细胞在适合制备轻链和重链的条件下生长,并且测定重链和/或轻链蛋白质的合成。示例性测定技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫分析(RIA)、荧光活化细胞分选仪分析(FACS)、免疫组织化学等。

[0283] 如本文所用,术语“转化”应在广义上用于指将DNA引入受体宿主细胞中,从而改变基因型并且因此使得受体细胞改变。

[0284] 沿用同样的思路,“宿主细胞”是指已经用载体转化的细胞,所述载体使用重组DNA技术构建并且编码至少一种异源基因。除非另有明确说明,否则在用于从重组宿主分离多肽的方法的描述中,术语“细胞”和“细胞培养物”可互换使用以表示抗体的来源。换句话说,从“细胞”回收多肽可意味着从离心的全细胞或从含有培养基与悬浮细胞两者的细胞培养物回收。

[0285] 在一个实施方案中,用于抗体表达的宿主细胞系是哺乳动物来源的。本领域技术人员可以确定最适合于在其中表达所需基因产物的特定宿主细胞系。示例性宿主细胞系包括但不限于DG44和DUXB11(中国仓鼠卵巢系,DHFR-)、HELA(人宫颈癌)、CV-1(猴肾脏系)、COS(具有SV40 T抗原的CV-1的衍生物)、R1610(中国仓鼠成纤维细胞)BALBC/3T3(小鼠成纤维细胞)、HAK(仓鼠肾脏系)、SP2/0(小鼠骨髓瘤)、BFA-1c1BPT(牛类内皮细胞)、RAJI(人淋巴细胞)、293(人肾脏)等。在一个实施方案中,细胞系提供由其表达的抗体的改变的糖基化,例如非海藻糖基化(例如PER.C6®(Crucell)或FUT8-敲出CHO细胞系(Potelligent®细胞)(Biowa,Princeton,N.J.))。宿主细胞系通常可从商业服务(例如美国组织培养物保藏中心(American Tissue Culture Collection))或从出版的文献获得。

[0286] 体外制备允许放大以得到大量的所需多肽。在组织培养条件下培养哺乳动物细胞的技术是本领域已知的,并且包括均匀悬浮培养,例如在气升式反应器中或在连续搅拌反应器中;或固定化或截留细胞培养,例如在中空纤维、微胶囊中、在琼脂糖微珠或陶瓷盒上。如果需要和/或期望的话,可以通过常规色谱方法纯化多肽溶液,例如凝胶过滤、离子交换色谱、DEAE-纤维素色谱和/或(免疫)亲和色谱。

[0287] 编码本发明提供的抗原结合蛋白的基因还可以在非哺乳动物细胞(诸如细菌或酵母或植物细胞)中表达。在此方面中,应理解,各种单细胞非哺乳动物微生物(诸如细菌)(即能够在培养物或发酵物中生长的那些)也可以被转化。对转化敏感的细菌包括肠杆菌科的成员,诸如大肠杆菌(Escherichia coli)或沙门氏菌(Salmonella)的菌株;芽孢杆菌科(Bacillaceae),诸如枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis);肺炎球菌(Pneumococcus);链球菌(Streptococcus)和流感嗜血杆菌(Haemophilus influenzae)。还应理解,当在细菌中表达时,蛋白质可以成为包涵体的一部分。必须将蛋白质分离,纯化,然后组装至功能分子中。

[0288] 除原核生物外,还可使用真核微生物。酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)或普通面包酵母是真核微生物中最常用的,不过许多其他菌株通常也是可获得的。为了在糖酵母属(Saccharomyces)中表达,通常使用质粒Yrp7,例如(Stinchcomb等,Nature,282:39(1979);Kingsman等,Gene,7:141(1979);Tschemper等,Gene,10:157(1980))。此质粒已含有TRP1基因,所述基因为缺乏在色氨酸中生长的能力的酵母突变株(例如ATCC编号44076或PEP4-1)提供选择标记物(Jones,Genetics,85:12(1977))。作为酵母宿主细胞基因组特征的trp1损伤的存在则提供了通过在不存在色氨酸的情况下生长来检测转化的有效环境。

[0289] 抗原结合蛋白的工程化和优化

[0290] 本公开的抗原结合蛋白,包括多特异性抗原结合蛋白,可以被工程化或优化。如本文所用,“优化的”或“优化”是指改变抗原结合蛋白以改善一种或多种功能特性。改变包括但不限于抗原结合蛋白内的一个或多个氨基酸的缺失、取代、添加和/或修饰。

[0291] 如本文所用,术语“功能特性”是抗原结合蛋白的特性,其改善(例如相对于常规抗原结合蛋白,诸如抗体)是本领域技术人员所期望的和/或有利的,例如为了改善抗原结合蛋白的制造特性或治疗功效。在一个实施方案中,功能特性是稳定性(例如热稳定性)。在另一实施方案中,功能特性是溶解度(例如在细胞条件下)。在另一实施方案中,功能特性是聚集行为。在另一个实施方案中,功能特性是蛋白质表达(例如在原核细胞中)。在另一实施方案中,功能特性是在制造过程中包涵体溶解后的再折叠行为。在某些实施方案中,功能特性不是抗原结合亲和力的改善。在另一实施方案中,一种或多种功能特性的改善对抗原结合蛋白的结合亲和力没有实质影响。

[0292] 在某些实施方案中,本公开的抗原结合蛋白包含scFv,并且通过鉴定在感兴趣的氨基酸位置(例如通过将例如如用质量控制(QC)测定所选择的具有至少一种所需特性的scFv序列的数据库与成熟抗体序列的数据库(例如Kabat数据库)相比较所鉴定的氨基酸位置)取代、缺失和/或添加的优选氨基酸残基来进行优化。因此,本公开还提供了用于选择特定氨基酸残基的“富集/排除”方法。另外,本公开还提供了通过使使用本文所述的“功能性共有”方法鉴定的特定构架氨基酸位置发生突变来工程化抗原结合蛋白(例如scFv)的方法。在某些实施方案中,通过用使用本文所述的“富集/排除”分析方法发现是“富集”残基的残基取代现有氨基酸残基来使构架氨基酸位置发生突变。在一个方面中,本公开提供了一种鉴定单链抗体(scFv)中用于突变的氨基酸位置的方法,所述scFv具有VH和VL氨基酸序列,所述方法包括:a)将scFv VH、VL或VH和VL氨基酸序列输入包含许多抗体VH、VL或VH和VL氨基酸序列的数据库,使得scFv VH、VL或VH和VL氨基酸序列与数据库的抗体VH、VL或VH和VL氨基酸序列比对;b)将scFv VH或VL氨基酸序列内的氨基酸位置与数据库的抗体VH或VL氨基酸序列内的相应位置相比较;c)确定scFv VH或VL氨基酸序列内的氨基酸位置是否被在数据库的抗体VH或VL氨基酸序列内的相应位置保守的氨基酸残基占据;以及d)当氨基酸位置被在数据库的抗体VH或VL氨基酸序列内的相应位置的不保守氨基酸残基占据时,将scFv VH或VL氨基酸序列内的所述氨基酸位置鉴定为用于突变的氨基酸位置。WO2008110348、WO2009000099、WO2009000098以及WO2009155725中进一步详细描述了scFv优化,所述专利全部以引用的方式并入本文中。

[0293] 在某些实施方案中,抗原结合蛋白包含经过修饰使其不诱导细胞毒性免疫反应和/或不活化补体的Fc结构域。举例来说,可将一个或多个取代引入Fc结构域中,使得其ADCC/ADCP或CDC效应功能失活。当与具有低于75kDa的分子量的抗体片段相比较时,此类抗原结合蛋白具有半衰期增加的优点,而不介导细胞毒性免疫反应。

[0294] 化学和/或生物修饰

[0295] 在一个方面中,抗原结合蛋白(诸如上文所述的多特异性抗原结合蛋白)是化学和/或生物学修饰的。举例来说,抗原结合蛋白可以是糖基化的、磷酸化的、羟基化的、PEG化的、HES化的、PAS化的、XTEN化的、硫酸盐化的、用染料和/或放射性同位素标记的、与酶和/或毒素缀合的和/或使用白蛋白融合技术。同样地,本文所述的任何核酸序列、质粒或载体和/或宿主细胞都可以相应地进行修饰。

[0296] 此类修饰可能例如是为了优化药效动力学、其水溶性或为了降低其副作用而进行。举例来说,可应用PEG化、PAS化、XTEN化、HES化和/或融合至血清白蛋白来减慢肾脏清除,从而增加抗原结合蛋白的血浆半衰期。在一个实施方案中,修饰向抗原结合蛋白添加不同的功能性,例如添加检测标记以便诊断或添加毒素以甚至更有效地对抗癌细胞。

[0297] 或者或另外,在一些实施方案中,本文提供的抗原结合蛋白和其他多肽经历如本领域中已知的共翻译和翻译后修饰。翻译后修饰的实例包括但不限于二硫键形成、糖基化、环化(例如N端焦谷氨酸形成)、将N端或C端残基去除或"剪切"(例如C端赖氨酸残基通常在制造过程中被去除)、去酰胺化、异构化、氧化、糖化、酰化、海藻糖基化、肽键切割、不可还原的交联、截短和/或将部分或全部信号序列不完全加工。

[0298] 在某些实施方案中,CD3抗原结合结构域包含1个或多个氨基酸的N端截短(例如1、2、3、4或5个氨基酸的N端截短)。在某些实施方案中,CD3抗原结合结构域包含1个或多个氨基酸的C端截短(例如1、2、3、4或5个氨基酸的C端截短)。在某些实施方案中,N端和/或C端截短是SEQ ID NO:49的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:54的轻链氨基酸序列的靶向CD3的Fab片段的截短。在某些实施方案中,SEQ ID NO:54的轻链氨基酸序列包含1、2、3、4或5个氨基酸的N端截短,诸如1个或2个截短。在某些实施方案中,SEQ ID NO:49的重链氨基酸序列包含1、2、3、4或5个氨基酸的N端截短,诸如1个或2个截短。在某些实施方案中,SEQ ID NO:54的轻链氨基酸序列包含1、2、3、4或5个氨基酸的C端截短。在某些实施方案中,SEQ ID NO:49的重链氨基酸序列包含1、2、3、4或5个氨基酸的C端截短。

[0299] 在某些实施方案中,(多特异性)抗原结合蛋白包含焦谷氨酸(pE、pyrGlu、pyre或pGlu)而不是N端谷氨酰胺或N端谷氨酰胺。在某些实施方案中,抗原结合蛋白的轻链包含焦谷氨酸(pE)而不是N端谷氨酰胺。在某些实施方案中,SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:61或SEQ ID NO:62的变体序列包含在氨基酸位置1的焦谷氨酸。在某些实施方案中,抗原结合蛋白的轻链包含焦谷氨酸(pE)而不是N端谷氨酸。在某些实施方案中,SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:65的变体序列包含在氨基酸位置1的焦谷氨酸。在某些实施方案中,此类焦谷氨酸(pE)修饰对(多特异性)抗原结合蛋白的安全性和/或功效没有影响。

[0300] 在一个实施方案中,抗原结合蛋白是糖基化的。糖基化是指将碳水化合物附接至蛋白质的过程。在生物系统中,此过程是以共翻译和/或翻译后修饰的形式在细胞内酶促进行。蛋白质还可以是化学糖基化的。碳水化合物可以N-连接至天冬酰胺或精氨酸侧链的氮;O-连接至丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、羟基赖氨酸或羟基脯氨酸侧链的羟基氧;使用附接至磷酸丝氨酸的木糖、海藻糖、甘露糖以及N-乙酰葡糖胺;和/或将甘露糖添加至在特异性识别序列中发现的色氨酸残基。糖基化模式可以例如通过选择适当的细胞系、培养基、蛋白质工程化制造模式以及工艺策略来控制(参见HOSSLER,P.Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture.Glycobiology 2009,第19卷,第9期,第936-949页)。在一些实施方案中,对本文所述的抗原结合蛋白的糖基化模式进行修饰以增强ADCC和CDC效应功能。

[0301] 可以例如通过缺失和/或添加一个或多个糖基化位点对抗原结合蛋白进行工程化以控制或改变糖基化模式。糖基化位点的形成可以例如通过将相应的酶识别序列引入抗原

结合蛋白的氨基酸序列来实现。

[0302] 在一些实施方案中,抗原结合蛋白是PEG化的。PEG化可改变蛋白质的药效动力学和药代动力学特性。另外,PEG化可以通过将PEG化的抗原结合蛋白与免疫系统屏蔽来降低免疫原性和/或通过例如以下方式改变其药代动力学:增加抗原结合蛋白的体内稳定性、防止其发生蛋白水解降解、延长其半衰期以及改变其生物分布。通常,将适当分子量的聚乙二醇(PEG)共价连接至蛋白质。类似效应可使用PEG模拟物(例如将抗原结合蛋白HES化、XTEN化或PAS化)实现。HES化使用羟乙基淀粉("HES")衍生物。在PAS化过程中,抗原结合蛋白连接至由氨基酸脯氨酸(P)、丙氨酸(A)以及丝氨酸(S)组成的构象无序的多肽序列。

[0303] 在某些实施方案中,抗原结合蛋白(例如多特异性抗原结合蛋白)连接至可检测标记、治疗剂或PK修饰部分或与其组合。举例来说,抗原结合蛋白可用赋予抗原结合蛋白一种或多种辅助功能的第二部分标记或与其缀合。举例来说,第二部分可具有另一免疫效应功能,在药物靶向中有效或可用于检测。第二部分可以例如使用本领域中已知的方法化学连接或基因融合至抗原结合蛋白。如本文所用,术语"标记"是指当通过物理或化学手段直接或间接检测或测量时指示抗原结合蛋白存在的任何物质或离子。举例来说,标记可以通过但不限于光吸收、荧光、反射率、光散射、磷光或发光特性、通过放射性特性可检测的分子或离子或通过核磁共振或顺磁特性可检测的分子或离子直接检测。间接检测的实例包括光吸收或荧光;例如引起适当底物例如从非光吸收分子转化为光吸收分子或从非荧光分子转化到荧光分子的各种酶。标记的抗原结合蛋白尤其可用于体外和体内检测或诊断目的。举例来说,用合适的放射性同位素、酶、荧光团或发色团标记的抗原结合蛋白可以通过放射免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)或基于流式细胞术的单细胞分析(例如FACS分析)来检测。类似地,本文公开的核酸和/或载体可经过标记用于检测或诊断目的,例如在杂交测定中使用其标记的片段作为探针。

[0304] 第二部分的非限制性实例包括放射性同位素(35S、32P、14C、18F和/或125I)、脱辅基酶、酶(例如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、β-半乳糖苷酶和/或血管生成素)、辅因子、肽部分(例如HIS标签)、蛋白质(例如凝集素、血清白蛋白)、碳水化合物(例如甘露糖-6-磷酸标签)、荧光团(例如异硫氰酸荧光素(FITC))、藻红素、绿色/蓝色/红色或其他荧光蛋白、别藻蓝素(APC)、发色团、维生素(例如生物素)、螯合剂、抗代谢物(例如甲氨蝶呤)、毒素(例如细胞毒性药物或放射性毒素)。

[0305] 在一个方面中,本发明涉及包含缀合至毒素的本文所述的抗原结合蛋白(例如本文所述的单价或多特异性抗原结合蛋白)的药物缀合物(特别是抗体-药物缀合物ADC),所述毒素进一步增强特定细胞(诸如MAGE-A4阳性细胞)的有效杀伤作用。毒素部分通常是小分子量部分,诸如蒽环类毒素、紫杉醇、短杆菌素D和/或秋水仙碱,所述小分子量部分可经由肽接头连接至抗原结合蛋白。

[0306] 毒素可非位点特异性或位点特异性地缀合至抗原结合蛋白。非位点特异性缀合通常涉及使用化学接头,例如用马来酰亚胺官能团,所述化学接头介导与抗原结合蛋白的赖氨酸或半胱氨酸氨基酸侧链或与N端的氨基的缀合。位点特异性缀合可以使用本领域中已知的化学、化学-酶促或酶促缀合来实现,例如使用双功能接头、细菌转谷氨酰胺酶或分选酶、允许在甲酰基-甘氨酸形成酶修饰的抗原结合蛋白上进行皮克特-施彭格勒化学反应(Pictet-Spengler chemistry)的接头或聚糖重建的抗原结合蛋白。

[0307] 施用抗原结合蛋白的方法

[0308] 制备和向受试者施用本公开的抗原结合蛋白(诸如上文所述的多特异性抗原结合蛋白)以及本文所述的核酸、本文所述的载体、本文所述的宿主细胞或本文所述的组合物的方法是熟知的或本领域技术人员容易确定的。本公开的抗原结合蛋白的施用途径可例如是经口、肠胃外、通过吸入或经表面进行。如本文所用,术语肠胃外包括静脉内、动脉内、腹膜内、肌肉内、皮下、经直肠或经阴道施用。如本文所用,术语眼内包括但不限于结膜下、玻璃体内、眼球后或前房内。如本文所用,术语经表面包括但不限于用液体或溶液滴眼剂、乳液(例如水包油乳液)、悬浮液以及软膏施用。

[0309] 虽然所有这些施用形式都清楚地被认为在本公开的范围内,但施用形式将会是注射用溶液。通常,适合注射的药物组合物可包含缓冲液(例如乙酸盐、磷酸盐或柠檬酸盐缓冲液)、表面活性剂(例如聚山梨醇酯)、任选的稳定剂(例如人白蛋白)等。然而,在与本文中的教示相容的其他方法中,可将经过修饰的抗体直接递送至有害细胞群体的位点从而增加患病组织对治疗剂的暴露。

[0310] 本公开的组合物用于治疗相关疾患的有效剂量根据许多不同因素而变化,所述因素包括施用手段、靶位点、患者的生理状态、患者是人还是动物、施用的其他药物以及治疗是预防性还是治疗性的。通常,患者是人,但也可治疗非人哺乳动物,包括转基因哺乳动物。可使用本领域技术人员已知的常规方法滴定治疗剂量以优化安全性和功效。

[0311] 如先前所论述,本公开的抗原结合蛋白(例如多特异性抗原结合蛋白)、其缀合物或重组体可以药学有效量施用以对哺乳动物病症进行体内治疗。在此方面中,应理解,所公开的抗原结合蛋白将被配制成便于施用并且促进活性剂的稳定性。

[0312] 根据本公开的药物组合物通常包括药学上可接受的无毒的无菌载体,诸如生理盐水、无毒缓冲液、防腐剂等。出于本申请的目的,抗原结合蛋白(诸如多特异性抗原结合蛋白)的药学有效量应被认为是指足以实现与抗原的有效结合并且实现例如改善疾病或病症的症状或检测物质或细胞的益处的量。在肿瘤细胞的情况下,抗原结合蛋白通常能够与赘生细胞或免疫反应性细胞上的选定免疫反应性抗原相互作用,并且增加这些细胞的死亡。当然,本公开的药物组合物可以单一或多个剂量施用以提供药学有效量的修饰的结合多肽。

[0313] 与本公开的范围一致,本公开的抗原结合蛋白(诸如上文所述的多特异性抗原结合蛋白)可以根据上述治疗方法以足以产生治疗或预防效果的量向人或其他动物施用。本公开的抗原结合蛋白可以常规剂型向此类人或其他动物施用,所述常规剂型通过根据已知技术将本公开的抗原结合蛋白与常规药学上可接受的载体或稀释剂组合来制备。本领域技术人员将认识到,药学上可接受的载体或稀释剂的形式和特征由与其组合的活性成分的量、施用途径以及其他熟知的变量指示。本领域技术人员将进一步理解,包含本公开中描述的一种或多种抗原结合蛋白种类的混合物可被证明是特别有效的。类似地,本文所述的核酸、本文所述的载体、本文所述的宿主细胞(特别是带有CAR的免疫细胞)或本文所述的组合物可根据上文所述的治疗方法以足以产生治疗或预防效果的量向人或其他动物施用。

[0314] 如本文所用,“功效”或“体内功效”是指使用例如标准化的反应标准的对用本公开的药物组合物治疗的反应。使用本公开的药物组合物的疗法的成功或体内功效是指组合物对其预期目的来说是有效的,即组合物能够引起其所需效果。体内功效可通过确定的针对

特定疾病的标准方法来监测。另外,可使用各种疾病特异性临床化学参数和其他确定的标准方法。

[0315] 在一些实施方案中,本文所述的化合物和细胞与一种或多种不同的药物化合物组合施用。通常,本文所述的化合物和细胞的治疗用途可以是与选自以下组的一种或多种疗法组合:抗体疗法、化学疗法、细胞因子疗法、树突细胞疗法、基因疗法、激素疗法、激光疗法、放射疗法或疫苗疗法。

[0316] 嵌合抗原受体

[0317] 在一个方面中,本公开提供了嵌合抗原受体(CAR)和经过工程化以表达此类CAR的免疫细胞,所述CAR包含本文所述的抗原结合蛋白序列。如本文所用,术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指能够响应于抗原结合活化免疫细胞的受体。CAR是重组跨膜分子并且有利地在免疫细胞上表达。其结构通常包含(i)细胞外结构域(胞外结构域或抗体结构域)、(ii)跨膜结构域以及(iii)胞质结构域(胞内结构域或细胞内信号传导结构域)。

[0318] 胞外结构域(即抗体结构域)通常包含scFv,但也可使用其他模式。间隔子连接胞外结构域和跨膜结构域,跨膜结构域又连接至胞内结构域。在胞外结构域结合至抗原后,受体聚集并且活化信号被传递至细胞,从而使得起始免疫反应。第一代CAR具有包含CD3-ξ的简单结构胞内结构域。为了增加活化信号,在第二代CAR中添加共刺激结构域;并且第三代CAR包括两个或更多个共刺激结构域(Maus MV等(2014)Blood,123:2625-2635)。所述共刺激结构域可选自由以下组成的组:CD28、OX40和/或4-1BB。除CD3-ξ外,还探索了其他含ITAM结构域,包括IgE-γ结构域的Fc受体。

[0319] 在某些实施方案中,CAR包含scFv,所述scFv包含SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63和/或SEQ ID NO:64的氨基酸序列,或其分别与SEQ ID NO:SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63和/或SEQ ID NO:64的氨基酸序列至少约90%、95%、96%、97%、98%或99%同一的变体。

[0320] 经过工程化以表达此类CAR的合适的免疫细胞包括但不限于T细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、自然杀伤(NK)细胞、人胚胎干细胞、造血干细胞(HSC)或诱导多能干细胞(iPS)。此类T细胞可以是细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调控T淋巴细胞、炎性T-淋巴细胞或辅助T-淋巴细胞或γ-δT细胞。T细胞可以是CD4+或CD8+或CD4+和CD8+细胞的混合群体。

[0321] 在一个方面中,本公开提供了一种特异性识别肽-MHC的嵌合抗原受体(CAR),所述嵌合抗原受体包含:i)从核酸文库或本文所述的方法鉴定的抗原结合蛋白;ii)跨膜结构域;以及iii)细胞内信号传导结构域。

[0322] 在某些实施方案中,跨膜结构域选自由以下组成的组:人工疏水序列和I型跨膜蛋白的跨膜结构域、T细胞受体的α、β或ξ链、CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137以及CD154。

[0323] 在某些实施方案中,细胞内信号传导结构域选自由以下组成的组:人CD3ξ链的细胞质信号传导结构域、FcyRIII、Fc受体的细胞质尾部、带有免疫受体酪氨酸基活化基序(ITAM)的胞浆受体、TCRξ、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b以及CD66d。

[0324] 抗体结构域可以是以上概述的抗原结合蛋白中的任一者。因此,在某些实施方案中,抗体结构域包含含有由式LFR1-LCDR1-LFR2-LCDR2-LFR3-LCDR3-LFR4表示的氨基酸序

列的抗体可变轻结构域(VL)。在某些实施方案中,抗体结构域包含含有由式HFR1-HCDR1-HFR2-HCDR2-HFR3-HCDR3-HFR4表示的氨基酸序列抗体可变重结构域(VH)。在某些实施方案中,抗体结构域包含如本文所述的scFv。

[0325] 治疗癌症的方法

[0326] 本文提供了用本公开的抗原结合蛋白和特别是多特异性抗原结合蛋白(例如MAGE-A4 pMHC抗原结合蛋白)治疗癌症的方法。所述方法可用于治疗具有任何肿瘤类型的患者,其中至少一些癌细胞表达pMHC上展示的MAGE-A4抗原,诸如GVYDGREHTV(SEQ ID NO:3)-HLA-A*02:01复合物。此类MAGE-A4阳性癌症或癌细胞可使用本领域中已知的任何方法进行评估,包括但不限于检测RNA表达水平或组织学方法,诸如免疫组织化学(IHC)。

[0327] 在一些实施方案中,MAGE-A4阳性癌症选自由以下组成的组:膀胱癌、乳腺癌、结肠直肠癌、胃癌、头颈癌、肺癌、黑素瘤、食道癌、卵巢癌、肾癌、滑膜肉瘤以及具有鳞状细胞组织学的肿瘤。在某些实施方案中,癌症是鳞状来源的。实验数据表明,鳞状细胞癌具有MAGE-A4 mRNA最高出现率与中值表达。在某些实施方案中,癌症选自由以下组成的组:头部和颈部鳞状细胞癌(HNSC)、头部和颈部鳞状细胞癌(HNSCC)、非小细胞肺癌(NSCLC)(特别是鳞状NSCLC)、三阴性乳腺癌、尿路上皮癌、高级别子宫内膜癌(包括子宫癌肉瘤(UCS;特别是UCEC亚组))、粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤、胃或胃食管连接部(GEJ)腺癌、上皮卵巢癌(诸如高级别浆液性卵巢癌)、滑膜肉瘤、膀胱尿路上皮癌(BLCA)(特别是移行细胞癌)、睾丸生殖细胞肿瘤(TGCT)以及宫颈鳞状细胞癌(CESC)。

[0328] 本文所述的抗原结合蛋白还包含对某些相关MAGE pMHC靶标,特别是MAGE-A8衍生的GLYDGREHSV(SEQ ID NO:71)HLA-A*02复合物和/或MAGE-B4衍生的GIYDGKRHLI (SEQ ID NO:72#)HLA-A*02复合物的结合特异性。因此,本公开提供了一种治疗此类相关MAGE-pMHC阳性癌症的方法。

[0329] 在一个方面中,本公开提供了本文所述的抗原结合蛋白、本文所述的多特异性抗原结合蛋白或本文所述的药物组合物在药剂制造中的用途。

[0330] 在另一方面中,本公开提供了本文所述的抗原结合蛋白、本文所述的CAR、本文所述的免疫细胞、本文所述的多特异性抗原结合蛋白或本文所述的药物组合物用于治疗疾病(特别是癌症)的用途。

[0331] 在另一方面中,本公开提供了一种治疗有需要的患者的表达MAGE-A4 pMHC的癌症的方法,所述方法包括向患者施用治疗有效量的本文所述的抗原结合蛋白、本文所述的CAR、本文所述的免疫细胞、本文所述的多特异性抗原结合蛋白或本文所述的药物组合物。

[0332] 在某些方面中,适于用MAGE-A4拮抗剂治疗的患者基于RNA测序和/或免疫组织化学(IHC)(诸如用于检测总MAGE-A4)来选择。

[0333] 在某些方面中,适于用本文所述的MAGE-A4拮抗剂(例如本文所述的抗原结合蛋白、本文所述的CAR、本文所述的免疫细胞、本文所述的多特异性抗原结合蛋白或本文所述的药物组合物)治疗的患者基于免疫组织学方法来选择,所述免疫组织学方法包括以下依序进行的步骤:

[0334] (i)从患者获得肿瘤样品;

[0335] (ii)将抗MAGEA4检测抗体添加至所述样品中;

[0336] (iii)孵育所述检测抗体和所述样品;

[0337] (iv)检测结合至所述样品的所述检测抗体;以及

[0338] (v)如果所述检测抗体被所述样品结合,那么将所述患者选择为用MAGE-A4拮抗剂治疗。

[0339] 在某些实施方案中,检测抗体是OTI1F9、E701U或本文所述的抗原结合蛋白。WO2019171064A1进一步描述了OTI1F9检测抗体。体外过表达实验证实E701U仅结合至MAGE-A4,而OTI1F9广泛地与MAGE-A3、MAGE-A6、MAGE-A8、MAGE-A10、MAGE-A11以及MAGE-A12交叉反应。因此,E701U比OTI1F9更具特异性。因此,在某些实施方案中,抗MAGE-A4检测抗体是E701U。举例来说,E701U可作为MAGE-A4(E701U)XP兔MAb商购获得。

[0340] 在某些实施方案中,MAGE-A4拮抗剂是本文所述的抗原结合蛋白、本文所述的CAR、本文所述的免疫细胞、本文所述的多特异性抗原结合蛋白或本文所述的药物组合物。

[0341] 药盒

[0342] 还涵盖了药盒,所述药盒包含至少一种核酸文库或抗原结合蛋白,包括多特异性抗原结合蛋白,或如本文所述的药物组合物,通常连同包装的试剂与说明书的组合一起。在一个实施方案中,药盒包括呈单位剂型的含有有效量的所述抗原结合蛋白的组合物。此类药盒可包括包含组合物的无菌容器;此类容器的非限制性实例包括但不限于小瓶、安瓿、瓶、管、注射器、泡罩包装。在一些实施方案中,组合物是药物组合物并且容器由适合于容纳药剂的材料制成。在一个实施方案中,药盒可在第一容器中包含冻干形式的抗原结合蛋白,并且第二容器包含用于复原或稀释抗原结合蛋白的稀释剂(例如无菌水)。在一些实施方案中,所述稀释剂是药学上可接受的稀释剂。在一个实施方案中,药盒用于诊断目的并且抗原结合蛋白被配制成用于诊断性应用。在一个实施方案中,药盒用于治疗目的并且抗原结合蛋白被配制成用于治疗性应用。

[0343] 通常,药盒还将包括在容器中或与容器一起提供的具有使用说明书的单独的纸张、小册子或卡片。如果药盒旨在用于药物用途,那么它还可包含以下中的一者或多者:用于向患有相关疾病或病症的受试者施用组合物的信息和剂量时程、治疗剂的描述、注意事项、警告、适应征、禁忌症、过量信息和/或有害反应。

[0344] 对于本领域技术人员来说将显而易见的是,在不背离本文公开的实施方案的范围的情况下,可以使用合适的等效物对本文所述的方法进行其他合适的修改和变更。现已详细描述某些实施方案,通过参考以下实施例将更清楚地理解这些实施方案,所述实施例仅出于说明目的而被包括,并且不旨在是限制性的。

[0345] 实施例

[0346] 实施例1-用于动物免疫的pMHC抗原的制备

[0347] 使用标准分子生物学技术将MHC I类重链和β2m克隆至pET-24D(+)载体中(J Biol Chem.1995年1月13日;270(2):971-7)。将大肠杆菌BL-21(DE3)根据供应商的方案用表达载体转化。如供应商所述,在37℃下在220rpm振荡下在MagicMedium(Invitrogen)中进行16-18小时蛋白质表达。收获细胞并且用BugBuster(Invitrogen)溶解,并且将包涵体用补充有0.5%LDAO的TBS洗涤两次,并且用TBS洗涤两次。将这样制备的包涵体溶解于变性缓冲液(8M尿素,100mM Tris-HCl pH 8)中,每1g包涵体球粒使用5mL缓冲液。实质上如Rodenko等(2006)所述,用靶肽(HLA-A*02:01细胞外结构域、人β2m以及MAGE-A4肽230-239)进行MHC的再折叠和纯化。下表1中列出了pMHC抗原的每个组分的氨基酸序列。

[0348] 表1-pMHC抗原组分的氨基酸序列

[0349]

序列编号	序列
HLA-A*02:01 细胞外结构域 SEQ ID NO: 1	GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQF VRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETR KVKAHSQTHRVDLGTLRGYYNQSEAGSHTVQR MYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKE DLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRA YLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMT HHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGE DQTQDTELVETRPAGDGTFQKWAAVVVPSGQE QRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE
人 β2m SEQ ID NO: 2	IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSD IEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYT EFTPTEKDEYACRVNHVTLSQPKIVKWDRDM
MAGE-A4 $_{230-239}$ SEQ ID NO: 3	GVYDGREHTV

[0350] 实施例2-兔免疫

[0351] 为了产生能够在HLA-A*02:01复合物情形下特异性识别靶肽的抗体,将3个新西兰白兔(New Zealand white rabbits)用重组产生的HLA-A*02:01/MAGE-A4复合物免疫。每个动物在不同的时间点接受HLA-A*02:01/MAGE-A4复合物与完全或不完全弗氏佐剂(Freund's adjuvant)的4次注射。在ELISA中测试动物的免疫反应以定量存在于免疫的动物的血清样品中的抗pMHC抗体。

[0352] 实施例3-源自兔子的免疫文库的构建

[0353] 经由PCR扩增从由分离自兔子的PBMC和脾淋巴细胞提取的RNA构建scFv抗体cDNA文库。单独地扩增可变轻链(VL)和重链(VH)结构域的编码序列,并且通过一系列重叠PCR步骤连接,得到最终的scFv产物。使用适当的限制酶消化编码来自兔子的scFv的扩增的DNA序列,并且随后连结至噬菌粒载体中。将噬菌粒载体转化至大肠杆菌TG1电转感受态细胞中,所述大肠杆菌TG1电转感受态细胞非常适合于创建抗体噬菌体展示文库。这些过程产生了两个抗体文库,这两个抗体文库包含基于K的文库的$5.2x10^8$的多样性与87.5%的序列准确性,以及基于λ的文库的$2.0x10^9$的多样性与91.7%的准确性。

[0354] 实施例4-兔源性免疫文库的筛选

[0355] 针对HLA-A*02:01/MAGE-A4特异性结合剂筛选兔源性免疫文库。简单来说,进行三轮针对HLA-A*02:01/MAGE-A4抗原的噬菌体展示生物淘选,然后针对特定命中对文库进行筛选。使用单克隆噬菌体ELISA针对特异性(即HLA-A*02:01/MAGE-A4)和非特异性(即HLA-A*02:01/肽混合物)靶标进行筛选。对照HLA-A*02:01/肽混合物复合物包含加载有49种不相关肽的混合物的HLA-A*02:01复合物。计算特异性靶标结合与非特异性结合的信号比,以确定特异性结合至靶标的命中。鉴定的命中表达为嵌合Fab。

[0356] 实施例5-抗体作为单价单特异性Fab的表达

[0357] 单价单特异性抗体以Fab模式表达。将兔可变结构域与人恒定结构域(重链和K轻

链)配对以产生嵌合Fab,嵌合Fab结合至靶pMHC。下表2中列出了恒定结构域的氨基酸序列。

[0358] 表2-用于产生嵌合Fab的氨基酸序列

[0359]

序列编号	序列
人恒定κ链 SEQ ID NO: 4	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
人恒定重链 SEQ ID NO: 5	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSC

[0360] 在Twist Bioscience公司构建编码不同抗体链(即重链和轻链)的合成基因并且单独克隆至表达载体中以在HEK 2936E细胞中瞬时表达。使用常规质粒DNA纯化方法(例如Qiagen HiSpeed质粒maxi试剂盒,目录号编号12662)制备表达载体DNA。

[0361] 通过在使用聚乙烯亚胺(PEI 40kD线性)在悬浮液中培养的HEK293-6E细胞中相应哺乳动物表达载体的瞬时共转染表达抗原结合蛋白。在补充有2mM L-谷氨酰胺的Freestyle F17培养基中以1.7x10^6个细胞/mL接种HEK293-6E细胞。通过将DNA和PEI单独添加至不含补充物的50μL培养基中制备每毫升最终制备体积的DNA。将两种级分混合,涡旋并且静置15分钟,产生1:2.5的DNA:PEI比率(每毫升细胞1μg DNA)。将细胞和DNA/PEI混合物放在一起,然后转移至适当的容器中,将容器放置于振荡装置中(37℃,5%CO2,80%RH)。24小时之后,每毫升的最终制备体积添加25μL的胰蛋白胨N1。

[0362] 7天之后,通过离心收获细胞并且无菌过滤。对于基于Fab的构建体的亲和力纯化,将上清液加载于用6CV PBS(pH 7.4)平衡的CaptureSelect™ CH1-XL柱(Thermo Fisher Scientific)上。在使用相同缓冲液的洗涤步骤之后,通过用100mM柠檬酸(pH 3.0)洗脱的步骤将抗原结合蛋白从柱子洗脱。将具有所需抗原结合蛋白的级分以1:10比率用1M Tris缓冲液(pH 9.0)立即中和,然后汇集,用PBS缓冲液渗析并且通过离心浓缩。通过SDS-PAGE和尺寸排阻HPLC评估蛋白质的纯度。

[0363] 实施例6-命中的表征

[0364] 在直接结合ELISA测定中评估命中结合HLA-A*02:01/MAGE-A4复合物和对照HLA-A*02:01/肽混合物复合物的能力。简单来说,用HLA-A*02:01/MAGE-A4复合物或对照HLA-A*02:01复合物包被96孔ELISA板。将呈Fab模式的抗原结合蛋白的连续稀释液添加至板中并且依次通过抗K轻链-HRP(Invitrogen)和山羊抗兔IgG(H+L)HR P(Southern Biotech)检测。当显示与HLA-A*02:01/MAGE-A4复合物的高结合并且不结合至对照HLA-A*02:01/肽混合物复合物时,考虑对结合剂进一步表征。图1A和图1B中示出了如通过ELISA所确定的所选抗体M0700、M0701、M0703、M0704、M0705、M0706、M0707、M0708、M0709、M0710、M0762、M0763、M0764、M0765以及M0766与HLA-A*02:01/MAGE-A4复合物的结合。图1C和图1D中分别示出了如通过ELISA所确定的与阴性对照复合物HLA-A*02:01/肽混合物的结合。所有所测试的分子都显示特异性结合至HLA-A*02:01/MAGE-A4复合物并且不结合至对照HLA-A*02:01/肽混合物复合物。

[0365] 测定了特定抗体MO709和MO763与存在于细胞上的HLA-A*02:01/MAGE-A4复合物的结合。简单来说,将T-B杂合T2细胞与含有MAGE-A4或对照肽的不含血清的RPMI1640培养基一起孵育。对照肽构成与MAGE-A4具有高同一性的序列并且先前已在健康人组织中被鉴定,即对照1(GLADGRTHTV;SEQ ID NO:68)、对照2(GLYDGPVHEV;SEQ ID NO:69)以及对照3(GVFDGLHTV;SEQ ID NO:70)(US20180171024,以引用的方式并入本文中)。通过使用加载肽的T2细胞上的HLA-A*02:01结合抗体BB7.2的中值荧光强度(MFI)与未加载T2细胞的MFI之间的比率(>1)验证肽加载效率。将T2细胞依次与特定抗体中的每一者和荧光团标记的检测抗体(抗κ轻链)一起孵育。将细胞固定并且通过流式细胞术测量荧光。图2中呈现了MO709和MO763与展示MAGE-A4或对照肽1、2以及3的T2细胞的结合和特异性。两种所测试的分子均显示结合至T2细胞上展示的HLA-A*02:01/MAGE-A4。此外,MO763对MAGE-A4肽显示非常高的特异性并且未显示结合至T2细胞上由HLA-A*02:01展示的对照肽中的任一者。与MO763相比,MO709显示较低的特异性并且也结合对照肽1和2。

[0366] 实施例7-MO763的优化

[0367] 通过CDR移植将命名为MO763的兔抗体人源化。简单来说,将展示与MO763 VH和VL的高序列同一性的人V基因种系(即IMGT_hVH_3_23和IMGT_hVL_3-1)分别选择为CDR受体支架。如通过直接ELISA所确定(如实施例6中所述),所得人源化抗体MO871-M874保留HLA-A*02:01/MAGE-A4结合,EC50值为1.18-16.02nM并且未显示结合至HLA-A*02:01/肽混合物阴性对照(图3)。

[0368] 在接下来的优化步骤中,MO873经历亲和力成熟。简单来说,将多个抗体文库设计成跨越所有6个CDR的整个长度,同时随机化3个连续氨基酸。使用用于位点饱和诱变的引物产生文库。因此,被靶向以便随机化的三个氨基酸位置含有19种可能的氨基酸变异中的一者。在电穿孔至大肠杆菌TG-1细胞中之后,通过使用转染的TG-1细胞的连续稀释液将文库涂铺在琼脂板上来确定文库的多样性。使用平板上生长的集落的数目作为文库多样性的指示,假设每个大肠杆菌集落中有一个插入的质粒。另外,通过对每个文库10个克隆的样品进行测序来评估文库质量。

[0369] 将在轻链中包含位点饱和诱变的文库合并成一个文库,并且将在重链中包含位点饱和诱变的文库合并成另一个文库。对轻链和重链中随机化CDR的两个所得文库进行亲和力选择,此后称为针对HLA-A*02:01/MAGE-A4复合物进行生物淘选。将HLA-A*02:01/MAGE-A4特异性噬菌体文库在吸附于聚苯乙烯管或板上的抗原上进行淘选(选择)。简单来说,针对HLA-A*02:01/MAGE-A4抗原进行三轮噬菌体展示生物淘选,然后筛选文库的命中。使用单克隆噬菌体ELISA针对特异性(即HLA-A*02:01/MAGE-A4)和非特异性(即HLA-A*02:01/肽混合物)靶标进行筛选。

[0370] 然后,针对靶复合蛋白并且针对HLA-A*02:01与不相关肽的复合物,在ELISA中将噬菌体展示的抗体克隆分为高、中和低信号。将对靶复合物具有高结合信号并且对HLA-A*02:01/肽混合物复合物具有弱结合的克隆测序。序列分析促使鉴定独特的克隆,所述独特的克隆然后被选择为以双特异性模式重组表达抗CD3 Fab x抗MAGE-A4 scFv。然后在SPR中评价所得构建体对HLA-A*02:01/MAGE-A4复合物的结合亲和力(表3)。

[0371] 表3-变体抗体对HLA-A2/MAGE-A4复合物的结合亲和力值

[0372]

单价	亲和力 K_D (nM)
M1036	4.90
M1037	0.40
M1038	3.60
M1040	0.45
M1041	0.24
M1051	5.00
M1086	7.02
M1087	0.82
M1088	3.90
M1089	1.34
M1090	1.80
M1096	3.23
M1097	0.99
M1098	1.73
M1099	2.13
M1100	0.66
M1101	1.69
M1105	4.12
M1107	1.45
M1108	19.00
M1109	11.70

[0373]

M1110	9.65
M1111	0.65
M1112	35.90
M1113	15.30
M1114	1.18
M1115	0.48
M1116	3.88
M1117	4.20
M1119	0.91
M1120	1.21
M1121	6.53
M1122	0.75
M1089	0.79
M1123	0.79
M1124	0.65
M1125	0.89
M1127	0.89
M1128	1.32
M1129	0.46
M1130	2.20
M1131	3.20
M1132	4.10
M1133	12.40
M1134	4.20
M1135	2.40
M1136	2.70
M1137	2.20
M1138	3.10
M1139	2.10
M1140	2.80
M1141	1.20
M1142	2.90
M1143	2.40
M1144	2.30
M1145	2.10
M1169	3.20
M1171	4.40
M1172	1.50
M1176	6.00
M1177	4.20
M1178	8.30
M1202	3.90
M1253	2.55

[0374]

M1297	0.09
M1298	0.07
M1299	0.05
M1300	0.12
M1301	0.12
M1302	0.60
M1309	0.09
M1310	0.35
M0763	44.00

[0375] 表3的抗HLA-A*02:01/MAGE-A4×CD3双特异性抗体的亲和力表征使用Biacore™ T200装置(Cytiva)通过表面等离子体共振(SPR)来进行。为了确定双特异性抗体对HLA-A*02:01/MAGE-A4复合物的亲和力,根据制造商的说明书用500RU HLA-A*02:01与MAGE-A4肽的复合物包被链霉亲和素芯片(SAHC30M,XanTec)。为了确定双特异性抗体对CD3的亲和力,根据制造商的说明书用400RU的CD3异二聚体(Acro Biosystems)包被HC30M芯片(XanTec)。使用未包被的通道进行参考。使用1:1朗缪尔模型(Langmuir model)进行数据拟合。亲和力成熟的克隆产生低至两位数皮摩尔的结合亲和力,这与亲本M0763抗体相比是提高几乎1000倍的结合亲和力。

[0376] 通过抗HLA-A*02:01/MAGE-A4结合scFv臂的进一步人源化和稳定化对亲和力成熟的M1041进行优化。通过合并氨基酸取代S2V和V4L使VH FR1中的兔起始残基进一步突变,产生M1067。通过合并VH FR3中(即氨基酸取代K71R和T73N)和CDR-L3中(即氨基酸取代L97A)的突变对M1067进一步修饰,产生M1402。如表4中所示,每个优化步骤均改善人序列同一性评分、热稳定性以及对靶抗原的亲和力。如来自Applied Biosystems(Thermo Fisher)的蛋白质热转移手册(Protein Thermal Shift manual)MAN4461806B中所述,使用差异扫描荧光测定法(DSF)测量双特异性抗体的热稳定性。

[0377] 表4-M1041的稳定并且人源化的变体的特征.

[0378]

分子	对HLA-A*02:01/MAGE-A4 的亲和力[pM]	熔解温度[℃]	人序列同一性，抗HLA-A*02:01/MAGE-A4 scFv [%]	
			VL	VH
M1041	250	59.9	89.8	77.8
M1067	120	63.6	89.8	79.6
M1402	110	68.0	89.8	81.5

[0379] 同时,通过合并VH FR2中的突变(即氨基酸取代Y47W)对M1067进一步修饰以获得对HLA-A*02:01/MAGE-A4抗原具有较低亲和力的更稳定的分子,产生M1068。比较M1067和M1068在各种浓度下以及在4℃下和在37℃下在PBS pH 7.4中在延长的孵育期间的稳定性。通过SEC-HPLC定量靶蛋白单体来评估稳定性,并且将相应数据呈现于表5中。M1068显示优于M1067的稳定性并且在所有的测试的浓度和孵育温度下在两周孵育后保持＞90％的单体

含量。

[0380] 表5-M1067和M1068的稳定性

[0381]

分子	浓度 [mg/mL]	孵育温度 [℃]	稳定性[单体靶蛋白%] 孵育时间 0 天	3 天	7 天	14 天
M1067	1.02	4	94.1	94.7	96.9	94.6
		37		83.5	82.6	80.4
	5.13	37	91.6	79.2	78.9	77.3
M1068	0.97	4	98.2	98.8	98.8	98.5
		37		98.7	98.2	97.1
	4.98	4	95.7	96.0	96.0	94.5
		37		96.4	94.7	93.2
	10.37	37	92.8	94.1	93.5	91.7

[0382] M1068如先前所描述进一步经历亲和力成熟。亲和力成熟活动使得产生具有独特特性的新颖CDR-L3和CDR-H3序列。含有这些新颖CDR序列的分子包括M1302、M1382以及M1386,并且与M1068的1.0nM的K_D相比,它们都显示改善的对HLA-A*02:01/MAGE-A4抗原的亲和力,K_D值分别为0.6nM、0.23nM以及0.15nM。还针对人序列含量和稳定性对M1302进行了优化。选择一种不同的人种系VL构架(即IMGT_hVL_3-19)来移植M1302的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,产生M1312。IMGT_hVL_3-19显示与先前选择的IMGT_hVL_3-1类似的与MO763 VL序列的高序列相似性,然而IMGT_hVL_3-19提供了具有改善的生物物理特性的分子。通过合并VH FR3中的突变(即氨基酸取代K71R和T73N)对M1312进一步人源化,产生M1394。M1394的最终人源化包括CDR-H2中(即氨基酸取代S61D、W62S以及A63V)、VL FR1(即氨基酸取代S1Q和E3V)以及CDR-L3中(即氨基酸取代L97A)的取代,产生M1396。如表6所示,每个合并的取代都改善了人序列同一性评分和/或分子的稳定性。

[0383] 表6-M1068的稳定和人源化变体的特征.

[0384]

分子	对 HLA-A*02:01/MAGE-A4 的亲和力 [nM]	熔解温度 (Tm) [℃]	人序列同一性，抗 HLA-A*02:01/MAGE-A4 scFv [%] VL	VH
M1068	1.0	64.9	89.8	82.4
M1302	0.6	55.7	89.8	82.4
M1312	0.8	74.4	89.8	82.4
M1394	1.4	74.6	89.8	84.3
M1396	1.6	76.6	87.8	87.0

[0385] 实施例8-单价和二价pMHC靶向T细胞衔接子的制备

[0386] 通过在HEK293-6E细胞中瞬时共转染来表达单价双特异性抗原结合蛋白。使用聚乙烯亚胺(PEI 40kD线性)将细胞在悬浮液中培养。在补充有2mM L-谷氨酰胺的Freestyle F17培养基中以1.7x10^6个细胞/mL接种HEK293-6E细胞。将DNA和PEI单独添加至50μL不含补

充物的培养基中。将两种级分以1:2.5DNA:PEI比率混合,涡旋并且静置15分钟。将细胞和DNA/PEI混合物组合(1μgDNA/mL细胞)并且在37℃,5%CO_2,80%RH下孵育。24小时之后,以每毫升制备体积25μL为细胞补充胰蛋白胨N1。7天之后,通过离心收获细胞并且将上清液无菌过滤。通过亲和色谱从上清液纯化抗原结合蛋白。将上清液加载至用6CV PBS(pH 7.4)平衡的CaptureSelect™ CH1-XL柱(Thermo Fisher Scientific)上。在使用相同缓冲液的洗涤步骤之后,通过用100mM柠檬酸(pH 3.0)洗脱的步骤将蛋白质从柱子洗脱。将含有所需抗原结合蛋白的级分立即以1:10比率用1M Tris缓冲液(pH 9.0)中和。进行尺寸排阻色谱法作为另一纯化步骤。使用PBS(pH 7.4)作为操作缓冲液,将样品在Superdex 200 10/300GL柱上操作。通过SE-HPLC针对单体含量对收集的级分进行分析并且相应地进行汇集。最终蛋白质纯度通过SDS-PAGE和SE-HPLC评估。

[0387] 通过在CHO-K1细胞中瞬时共转染产生二价双特异性抗原结合蛋白。使用2:1载体比率使HC和LC的基因在摇瓶培养物中表达7天。通过亲和色谱和Amsphere A3树脂(JSR Life Science)从净化的无菌过滤的培养物上清液捕获靶蛋白。通过Source 30S树脂(Cytiva)上的强阳离子交换色谱(CEC)和Toyopearl PPG-600M树脂(Tosoh Bioscience)上的疏水相互作用色谱(HIC)进一步精制捕获的抗原结合蛋白。应用Amicon搅拌池(Merck)将靶蛋白转移至最终缓冲液(130mM NaCl,10mM磷酸钠,pH 6.5)中。

[0388] 实施例9-双重pMHC靶向T细胞衔接子

[0389] 将抗原结合蛋白设计成具有两个靶向特定pMHC的结合结构域和靶向CD3的Fab结合结构域作为T细胞募集结构域。图4展示具有Fab T细胞结合结构域(例如抗CD3 Fab)和呈scFv模式的两个pMHC结合结构域(例如每个pMHC结合结构域特异性结合至肿瘤细胞表面的相同靶pMHC分子)的示例性双特异性抗原结合蛋白的示意图。这些双重pMHC靶向T细胞衔接子通过将T细胞募集至表面表达靶pMHC分子的肿瘤细胞来发挥功能。

[0390] 为了测试双重pMHC靶向T细胞衔接子的功能性,对pMHC-MAGE-A4具有结合特异性的两个相同的scFv抗原结合蛋白连接至抗CD3 Fab,一个scFv连接至Fab重链(HC)并且一个scFv连接至Fab轻链(LC)。CD3 Fab对CD3具有10nM KD的结合亲和力并且每个pMHC-MAGE-A4 scFv对pMHC-MAGE-A4具有250pM KD的结合亲和力。这种多特异性抗原结合蛋白被命名为“抗MAGE-A4双重衔接子”或简称为“双重衔接子”。在LDH测定中比较双重衔接子M1048和其单价对应物M1041的功效和安全性。将MAGE-A4阳性HLA-A*02:01阳性骨肉瘤细胞系U2OS和三个MAGE-A4阴性HLA-A*02:01阳性细胞系SK-MEL-30、MDA-MB-231以及PANC-1与人PBMC以10:1的E:T比率一起孵育。在各种浓度的单价T细胞衔接子M1041和双重T细胞衔接子M1048下测量癌细胞杀伤作用。通过48h之后由损伤细胞释放至培养基中的LDH的量的比色吸光度测量来定量细胞毒性(图5)。双重T细胞衔接子M1048与其单价对应物M1041相比显示优良的癌细胞杀伤作用。同时,相较于其单价对应物M1041,M1048类似地显示对抗原阴性癌细胞SK-MEL-30、MDA-MB-231以及PANC-1的低细胞毒性,在PANC-1和MDA-MB-231细胞系中仅在1nM的最高所测试化合物浓度下观测到M1048的细胞毒性较高。总的来说,数据显示双重T细胞衔接子优于其单价对应物,双重pMHC靶向T细胞衔接子的抗原阳性癌细胞杀伤效力增加约10倍,并且在抗原阴性癌细胞系中具有类似的低细胞毒性。

[0391] 实施例10-优化的抗HLA-A*02:01/MAGE-A4xCD3双重pMHC靶向T细胞衔接子的表征

[0392] 优化M1041变体(即M1382、M1386、M1396以及M1402)重新模式化为双重pMHC T细胞

衔接子模式,分别产生分子M1383、M1387、M1397以及M1403。分子制备显示M1397与M1403的效价类似。根据标准化方案纯化后,M1397显示比M1403低得多的电荷变体量。

[0393] 在4℃下以及在37℃下,在补充有130mM NaCl的10mM磷酸盐缓冲液pH 6.0中的延长的孵育期间,在1mg/mL和10mg/mL浓度下测试了M1403和M1397的稳定性。通过SEC-HPLC定量靶蛋白单体评估稳定性,并且相应数据呈现于图6中。在4℃下,分子M1397与M1403在补充有130mM NaCl的10mM磷酸盐缓冲液pH 6.0中持续14天显示出良好的稳定性,在两种测试浓度下均保持>98%的靶蛋白单体含量。当在37℃下孵育时,M1397显示优于M1403的稳定性,在两种测试浓度下均保持>95%的靶蛋白单体含量。

[0394] 使用动态光散射(DLS)对M1397和M1403进行详细的生物物理表征。简单来说,使用Prometheus Panta仪器通过DLS测定分子累积半径(颗粒的平均尺寸)和多分散指数(PDI)。将样品混合并且在测量之前进行0.1μm过滤。在20℃下并且在100%DLS激光功率下进行分析。使用PR Panta分析(x64)软件分析数据。使用差示扫描荧光测定法(DSF)测量双重衔接子M1397和M1403的热稳定性。为此目的,将样品稀释至1mg/ml的浓度。温度按1℃/min从20℃增加至95℃。使用PR Panta分析(x64)软件分析数据。测定热稳定性,包括蛋白质开始去折叠(T开始)、熔解温度™以及聚集温度(T聚集)。所得数据呈现于表7中。M1397显示非常有利的热稳定性型态,在47.01℃下开始去折叠以及两步去折叠过程。第一次转变发生在53.33℃,对应于scFv结构域去折叠,并且第二次在72.47℃,对应于Fab结构域去折叠。M1403显示在比M1397低>10℃的温度下开始去折叠以及三步去折叠过程。

[0395] 表7-M1397和M1403的热稳定性和累积分析.

[0396]

分子	$T_{开始}$ [℃]	T_m峰 1 [℃]	T_m峰 2 [℃]	T_m峰 3 [℃]	$T_{聚集}$ [℃]	累积半径 [nm]	累积 PDI
M1397	47.01	53.33	-	72.47	55.22	4.76	0.08
M1403	36.41	46.76	52.52	73.97	52.83	4.79	0.09

[0397] 测量M1397和M1403的人血清稳定性。简单来说,通过将全部凝结的血液在2'000×g下离心来制备人血清。将所得上清液命名为血清,并且直接冷冻并储存在-80℃下。将无菌过滤样品在血清中稀释至100ug/ml的浓度。在无菌艾本德管(Eppendorf tube)中在潮湿CO2孵育器中在8%CO_2下并且在37℃下进行孵育。在孵育开始之前获取参考样品(T0)并且在7h和24h之后收集血清孵育的样品。通过SPR直接定量样品。在Biacore T200仪器上进行SPR定量。通过SP R测定定量HLA-A*02:01/MAGE-A4结合分子,其中使用HLA-A*02:01/MAGE-A4作为配体,并且在SPR操作缓冲液中1:100稀释之后注射血清样品。通过直接比较血清样品注射之后的信号高度对样品进行评估。计算与T0样品相比结合信号的相对降低。相应结果呈现于图7中。

[0398] 实施例11-比较分子的制备:可溶性TCR-抗CD3融合蛋白(比较物1)和TCR样CD3 T细胞双特异性抗体(比较物2)

[0399] 使用标准分子生物学技术将编码可溶性TCR-抗CD3融合物(比较物1)的α(SEQ ID NO:59)和β(SEQ ID NO:60)链的胞外区的DNA序列单独克隆至pET-24D(+)载体中(J Biol Chem.1995年1月13日;270(2):971-7)。将大肠杆菌BL-21(DE3)根据供应商的方案用表达载体转化。如供应商所述,在37℃下在220rpm振荡下在Magic Medium(Invitrogen)中进行16-18小时蛋白质表达。收获细胞,再悬浮于TBS中并且经由溶菌酶处理和超声处理溶解。将包

涵体用补充有Triton-X100的TBS(50mM Tris-HCl pH 8.1,0.5％Triton-X100,100mM NaCl,10mM NaEDTA)洗涤两次并且用TBS(50mM Tris,100mM NaCl,10mM EDTA,pH 8.1)洗涤两次。将这样制备的包涵体溶解于变性缓冲液(9M尿素,0.5M Gua,25mM Tris,1.25mM EDTA,pH 8.1)中。来自α链和β链-抗CD3 scFv融合物的溶解的包涵体与还原剂组合并且以20mM的最终DTT浓度混合。将溶解并且还原的包涵体缓慢地与再折叠缓冲液(4M尿素,400mM L-Ar g,2mM EDTA,100mM Tris,10mM L-半胱氨酸,2.5mM L-胱氨酸,pH 8.1)混合并且在室温下孵育过夜。通过阴离子交换色谱使用POROS 50HQ柱从稀释的并且pH值调节的再折叠溶液捕获分子。通过在Akta®纯化器装置(Cytiva)上施加于20mM Tris pH 8.1中的0-500mM NaCl的梯度超过50个柱体积来洗脱分子。进行尺寸排阻色谱法作为另一纯化步骤。使用PBS(pH 7.4)作为操作缓冲液,将样品在HiLoad Superdex 75,26/600柱上操作。通过SE-HPLC针对单体含量对收集的级分进行分析并且相应地进行汇集。最终蛋白质纯度通过SDS-PAGE和SE-HPLC评估。

[0400] 通过在HEK293-6E细胞中瞬时共转染来表达TCR样CD3 T细胞双特异性抗体(比较物2,SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67)。使用聚乙烯亚胺(PEI 40kD线性)将细胞在悬浮液中培养。在补充有2mM L-谷氨酰胺的Freestyle F17培养基中以1.7x10^6个细胞/mL接种HEK293-6E细胞。将DNA和PEI单独添加至50μL不含补充物的培养基中。将两种级分以1:2.5DNA:PEI比率混合,涡旋并且静置15分钟。将细胞和DNA/PEI混合物组合(1μgDNA/mL细胞)并且在37℃,5％CO_2,80％RH下孵育。24小时之后,以每毫升制备体积25μL为细胞补充胰蛋白胨N1。7天之后,通过离心收获细胞并且将上清液无菌过滤。通过亲和色谱从上清液纯化抗原结合蛋白。将上清液加载至用6CV PBS(pH 7.4)平衡的CaptureSelect™ CH1-XL柱(Thermo Fisher Scientific)上。在使用相同缓冲液的洗涤步骤之后,通过用100mM柠檬酸(pH 3.0)洗脱的步骤将蛋白质从柱子洗脱。将含有所需抗原结合蛋白的级分立即以1:10比率用1M Tris缓冲液(pH9.0)中和。进行尺寸排阻色谱法作为另一纯化步骤。使用PBS(pH 7.4)作为操作缓冲液,将样品在Superdex 200 10/300GL柱上操作。通过SE-HPLC针对单体含量对收集的级分进行分析并且相应地进行汇集。最终蛋白质纯度通过SDS-PAGE和SE-HPLC评估。

[0401] 实施例12-优化的双重pMHC靶向T细胞衔接子的体外功效

[0402] 在体外细胞毒性测定中,双重衔接子M1048与其单价对应物M1041相比显示改善的功效。将优化的M1041变体(即M1402和M1396)重新模式化成双重衔接子模式,分别产生M1403和M1397。优化的M1048变体(即M1403和M1397)具有更高人序列含量、更高稳定性和/或更高亲和力。在LDH测定中比较双重pMHC靶向T细胞衔接子M1403和M1397的功效和安全性。另外,将双重T细胞衔接子M1397和M1403与两种比较抗原结合分子(即比较物1和比较物2)进行比较。比较物1由可溶性亲和力增强的TCR组成,所述可溶性亲和力增强的TCR对相同pMHC-MAGE-A4抗原具有K_D值为87pM的结合特异性,以1nM的结合亲和力连接至抗CD3 scFv。比较物1对于靶pMHC和CD3是单价的,而双重衔接子对于靶pMHC是二价的并且对于CD3是单价的。以引用的方式并入本文中的US20190092834中进一步详细描述了比较物1。比较物2是连接至抗CD3 Fab的对相同pMHC-MAGE-A4抗原具特异性的双特异性TCR样抗体。比较物2对于靶pMHC是二价的,对于CD3是单价的并且含有用于半衰期延长的Fc结构域。以引用的方式并入本文中的US20210230278A1中进一步详细描述了比较物2。

[0403] 如图9中所示,测量了在若干MAGE-A4阳性HLA-A*02:01阳性细胞系(即U2OS(骨肉瘤)、NCI-H1703(肺鳞状细胞癌)以及A375(黑素瘤))以及MAGE-A4阴性HLA-A*02:01阳性细胞系(即PANC1(胰腺癌)、MDA-MB-231(乳腺癌)以及NCI-H441(肺腺癌))中的癌细胞杀伤作用百分比。将癌细胞系与双重衔接子M1397、M1403或比较物1以及人PBMC(E:T比率为10:1)一起孵育。对于所有细胞系,通过48h之后从损伤细胞释放至培养基中的LDH的量的比色吸光度测量来定量各种浓度下的三种不同抗原结合蛋白的细胞毒性,NCI-H1703例外。NCI-H1703中的细胞毒性根据由试剂盒制造商提供的说明书通过CellTiter-Glo测定(Promega)来确定。数据显示,对于所有所测试的MAGE-A4阳性HLA-A*02:01阳性细胞系来说,与比较物1相比由双重衔接子M1403介导的类似的细胞杀伤作用,而M1397显示较低的功效。另外,对于所有所测试的MAGE-A4阴性HLA-A*02:01阳性癌细胞系来说,尤其对于M1397来说,与比较物1相比,两种双重T细胞衔接子均观测到较低的癌细胞杀伤作用,指示M1397和M1403的较佳治疗窗口。

[0404] 另外,使用IncuCyte S3系统以时间分辨方式分析由M1397、比较物1以及比较物2介导的细胞杀伤作用。简单来说,将抗原阳性靶细胞(NCI-H1703和U2OS)和抗原阴性靶细胞(SKMEL-30和PANC-1)用Nuclight Red慢病毒(Sartorius)转导以稳定地表达NucLight Red荧光蛋白。在37℃和5%CO2下在孵育器中在无菌384孔平底粘附组织培养板中以1.5×10^3个细胞/孔的密度接种癌细胞过夜。以所示浓度(0.2pM至50nM的范围)添加分子M1397、比较物1以及比较物2。将PBMC作为效应细胞以10:1的E:T比率添加至每个孔中。通过荧光显微术使板成像以监测细胞生长持续72h。通过比较荧光靶癌细胞随时间推移相对于其在时间0的数目的倍数生长比率来定量细胞杀伤程度。如图9中所展示,与比较物2相比,M1397对两种所测试的抗原阳性癌细胞系均显示优良的效力,并且效力低于比较物1。此外,与两种比较物相比,M1397对SK-MEL-30抗原阴性癌细胞系显示优良的安全性,并且对PANC-1抗原阴性癌细胞系显示与两种比较物类似的安全性型态。

[0405] 如图10中所示,在若干MAGE-A4阳性HLA-A*02:01阳性细胞系(即U2OS(骨肉瘤)和NCI-H1703(肺鳞状细胞癌))以及MAGE-A4阴性HLA-A*02:01阳性细胞系(即PANC1(胰腺导管腺癌)、MDA-MB-231(乳腺癌)以及NCI-H441(肺腺癌))中测量促炎性细胞因子IFNγ的释放。将细胞与双重衔接子或比较物1和人PBMC (E:T比率为10:1)一起孵育。在24h孵育之后在各种浓度的三种抗原结合蛋白下测量IFNγ。数据表明,在抗原阳性(图10A至图10D)与抗原阴性细胞系(图10E至图10J)中,双重衔接子均诱导更低水平的促炎性细胞因子IFNγ,指示诱导细胞因子风暴综合征的可能性更低。

[0406] 接下来,在作为T细胞活化特性的度量的颗粒酶B和IFNγ释放测定中进一步比较M1397、比较物1以及比较物2。简单来说,将抗原阳性(NCI-H1703)和抗原阴性(SK-MEL-30)癌细胞系与所示浓度(7.6pM至50nM的范围)的M1397、比较物1或比较物2以及人PBMC(E:T比率为5:1)一起孵育。在24h孵育之后测量颗粒酶B和IFNγ水平,并且分别在图11图A至图B和图C至图D中示出相应结果。与两种比较物相比,M1397显示优良的安全性型态,当对抗原阴性细胞系SK-MEL-30测试时没有颗粒酶B或IFNγ释放。此外,与比较物2相比,M1397对抗原阳性细胞系诱导更高的颗粒酶B和IFNγ释放,并且与比较物1相比,对抗原阳性与抗原阴性细胞系诱导更低的颗粒酶B和IFNγ释放。

[0407] 如图12中所示,测量在MAGE-A4阳性HLA-A*02:01阳性U2OS和MAGE-A4阴性HLA-A*

02:01阳性PANC-1细胞中的IL-2、IL-6以及TNFα细胞因子释放。将各种浓度的双重衔接子M1397和M1403或比较物1与癌细胞和人PBMC(E:T比率为10:1)一起孵育。在24h孵育之后测量细胞因子IL-2、IL-6以及TNFα。数据表明,双重衔接子M1397与M1403均诱导更低水平的促炎细胞因子,指示诱导细胞因子风暴综合征的可能性更低。

[0408] 实施例13-优化的双重pMHC靶向T细胞衔接子的体外安全性

[0409] 通过SPR分别研究了M1397和M1403的单价对应物(即M1396和M1402)与MAGE-A4相似生理学相关肽的潜在脱靶结合。对照肽构成与MAGE-A4具有高同一性的序列并且先前已在健康人组织中被鉴定,即对照1(GLADGRTHTV;SEQ ID NO:68)、对照2(GLYDGPVHEV;SEQ ID NO:69)以及对照3(GVFDGLHTV;SEQ ID NO:70)(US20180171024,以引用的方式并入本文中)。相应数据呈现于表8中。

[0410] 表8-M1396和M1402结合至HLA-A*02:01与同MAGE-A4具有高同一性的生理学相关对照肽的复合物.

[0411]

分子	对 HLA-A*02:01/MAGE-A4 的亲和力[nM]	对 HLA-A*02:01/对照 1 的亲和力[nM]	对 HLA-A*02:01/对照 2 的亲和力[nM]	对 HLA-A*02:01/对照 3 的亲和力[nM]
M1396	1.6	127	121	无结合
M1402	0.11	12	6.2	761

[0412] 为了确定M1397、比较物1或比较物2的效力和安全性,确定在存在靶HLA-A2/MAGE-A4或生理学相关对照肽抗原HLA-A2/对照1和HLA-A2/对照2的情况下的T细胞活化。简单来说,将TAP缺陷型T2细胞与含有所示浓度(0.1nM至1000nM的范围)的肽MAGE-A4(SEQ ID NO:3)、对照1(SEQ ID NO:61)以及对照2(SEQ ID NO:62)的不含血清的RPMI1640培养基一起孵育过夜。然后,将细胞在不含血清的RPMI 1640培养基中洗涤并且与PBMC(E:T 5:1)以及浓度为1nM的M1397、比较物1或比较物2共孵育24h。通过定量细胞上清液中的IFN-γ确定T细胞活化并且在图13示出。一致地,M1397当在用靶肽MAGE-A4脉冲处理的T2细胞上测试时显示极好的T细胞活化型态,EC50为5.75nM,并且显示对两种所测试的对照肽的有利安全窗口,其中仅在1μM的最高所测试肽浓度下观测到IFNγ释放。比较物1与M1397相比显示次级安全性型态,在存在脱靶HLA-A2/对照1抗原的情况下具有增加的T细胞活化,同时比较物2与M1397相比显示次级T细胞活化特性,在用靶肽MAGE-A4脉冲处理的T2细胞上EC50为105.8nM。

[0413] 为了确定M1397的安全性,通过确定颗粒酶B释放测试了一组各种抗原阴性癌细胞系的化合物诱导的T细胞活化。简单来说,将抗原阴性癌细胞系KLE(子宫内膜癌)、LNCaP(前列腺淋巴结癌)、KMRC-2(透明细胞肾细胞癌)、KMRC-3(透明细胞肾细胞癌)、639-V(尿路上皮膀胱癌)、EKVX(肺腺癌)以及HCT116(结肠直肠癌)与所示浓度(7.6pM至50nM的范围)的M1397、比较物1或比较物2以及人PBMC(E:T比率为5:1)一起孵育。抗原阳性细胞系NCI-H1703充当阳性对照。在24h孵育之后测量颗粒酶B水平并且将相应结果呈现于图14中。与比较物1和比较物2分子相比,M1397对所有所测试的抗原阴性癌细胞系显示优良的安全性型态。

[0414] 对于体外安全性实验,将各种原代细胞类型和来自健康人供体的PBMC与化合物共

培养24h,并且随后针对随细胞介导的细胞毒性而变颗粒酶B从效应细胞的释放对上清液进行分析。靶细胞包括人心脏微血管内皮细胞(HMVEC-C)、正常人支气管上皮细胞(NHBE)以及正常人星形胶质细胞(NHA)。在测定培养基(含有10％FBS和1％青霉素-链霉素的RPMI 1640)中准备靶细胞并且以50μL测定培养基体积以20,000个细胞/孔进行涂铺。以50μL测定培养基体积以100,000个细胞/孔涂铺PBMC效应细胞。将不同浓度的化合物M1397、M1403或比较物1(涵盖预期的临床相关范围)以15μL测定体积添加至涂铺的孔中。最终测定培养基补足至每孔150μL。阳性对照孔包括ImmunoCult人CD3/CD28 T细胞活化剂。阴性对照孔包括单独的靶细胞和效应细胞或单独PBMC与最大浓度的化合物。所有反应一式两份地进行。将板在37℃/5％CO_2下孵育24h。收集上清液并且根据制造商的说明书通过人颗粒酶B ELISA试剂盒(MabTech)分析。相应结果展示于图15中。与可溶性TCR双特异性比较物1分子相比,M1397和M1403显示优良的安全性型态。

[0415] M1397相对于比较物1和比较物2的进一步安全性评估来通过测试来源于各种重要组织的更宽组的原代细胞来进行,即人主动脉平滑肌细胞(HAoSMC_735)、人肺微血管内皮细胞(HMVEC-L_73809)、肾近端小管上皮细胞(RPTEC_49985和RPTEC_82573)、支气管上皮细胞(NHBE_35497)、正常人肺成纤维细胞(NHLF_19232和NHLF_76039)、正常人星形胶质细胞(NHA_72445)、人心脏肌细胞(HCM_679、HCM_693、HCM_745、HCM_746)以及人心脏成纤维细胞(HCF_251)。实质上如上文所述进行测定,改变化合物浓度范围(最大测试浓度50nM),并且排除ImmunoCult人CD3/CD28 T细胞活化剂阳性对照。数据在图16中示出。M1397相较于两种比较物对所测试的原代细胞显示有利的并且优良的安全性型态。

[0416] 实施例14-在细胞系源性小鼠NSCLC异种移植模型中的体内功效

[0417] 在使用人NSCLC细胞系NCI-H1703衍生的小鼠细胞系源性异种移植模型中评估在0.5至5.0mg/kg范围内的剂量下M1397的抗肿瘤活性,所述人NSCLC细胞系表达MAGE-A4和HLA-A*02:01。

[0418] 为免疫缺陷雌性NCG小鼠皮下(SC)植入人鳞状NSCLC细胞系NCI-H1703的$5x10^6$个细胞,所述人鳞状NSCLC细胞系表达MAGE-A4和HLA-A*02:01。在肿瘤达到120mm^3的平均大小后,将小鼠随机化并且腹膜内植入来自两个健康的未经治疗的供体的$1x10^7$个人外周血单核细胞(PBMC)。第二天开始用M1397处理,每天静脉内剂量在0.5至5mg/kg/天范围内,持续长达28天。使用卡尺和体重测量每周两次对每个PBMC供体以及每个给药或媒介物(磷酸盐缓冲盐水)组的三个小鼠进行评估。

[0419] 在所有M1397组中都观察到强肿瘤生长抑制,大部分小鼠在研究结束时显示完全肿瘤根除(图17)。在所有组,包括媒介物对照组中在第18天后都注意到适度移植物抗宿主疾病迹象。在整个研究中M1397是良好耐受的并且观测到恒定的体重。

[0420] 序列

[0421]

编号	序列
共有 CDRH2 SEQ ID NO: 6	IVSSGGTTYYAX$_1$X$_2$X$_3$KG，其中 X$_1$ 对应于氨基酸 S 或 D，X$_2$ 对应于氨基酸 W 或 S，并且 X$_3$ 对应于氨基酸 A 或 V
共有 CDRH3 SEQ ID NO: 7	DLYYGPX$_4$TX$_5$YX$_6$X$_7$X$_8$NL，其中 X$_4$ 对应于氨基酸 T、N 或 S，X$_5$ 对应于氨基酸 D 或不存在，X$_6$ 对应于氨基酸 S 或 F，X$_7$ 对应于氨基酸 A 或 V，并且 X$_8$ 对应于氨基酸 F 或 A
共有 CDRL3 SEQ ID NO: 8	ATX$_9$X$_{10}$X$_{11}$SGSNFQX$_{12}$，其中 X$_9$ 对应于氨基酸 S 或 R，X$_{10}$ 对应于氨基酸 D 或 P，X$_{11}$ 对应于氨基酸 G、S 或 F，并且 X$_{12}$ 对应于氨基酸 L 或 A

[0422]

M1397 重链 SEQ ID NO: 9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF**STYA MN**WVRQAPGKGLEWVG**RIRSKYNNYATYYA DSVKG**RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVR**HGNFGDSYVSWFAY**WGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CGGGGSQSVLTQDPAVSVALGQTVRITC**TADTL SRSYAS**WYQQKPGQAPVLVIY**RDTSRPS**GIPDR FSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC**ATRPSS GSNFQA**FGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSEVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGF SL**SNYAMS**WVRQAPGKGLEWIG**IVSSGGTTYY ADSVKG**RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA SYYCAK**DLYYGPNTDYSAANL**WGQGTSVTVS S
M1397 抗 MAGE-A4 pMHC VH SEQ ID NO: 10	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGFSL**SNYA MS**WVRQAPGKGLEWIG**IVSSGGTTYYADSVK G**RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTASYYCA K**DLYYGPNTDYSAANL**WGQGTSVTVSS
M1397 抗 MAGE-A4 pMHC HCDR1 SEQ ID NO: 11	SNYAMS
M1397 抗 MAGE-A4 pMHC HCDR2 SEQ ID NO: 12	IVSSGGTTYYADSVKG
M1397 抗 MAGE-A4 pMHC HCDR3 SEQ ID NO:	DLYYGPNTDYSAANL

[0423]

13	
M1397 轻链 SEQ ID NO: 14	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTTSN YAN**WVQQKPGKSPRGLIG**GTNKRAP**GVPARFS GSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYC**ALWYSNH WV**FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVE TTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECSGGGGSQSVLTQDPA VSVALGQTVRITC**TADTLSRSYAS**WYQQKPGQ APVLVIY**RDTSRPS**GIPDRFSGSSSGNTASLTITG AQAEDEADYYC**ATRPSSGSNFQA**FGGGTKLTV LGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGG GSVQPGGSLRLSCTVSGFSL**SNYAMS**WVRQAP GKGLEWIG**IVSSGGTTYYADSVKG**RFTISRDNS KNTVYLQMNSLRAEDTASYYCAK**DLYYGPNT DYSAANL**WGQGTSVTVSS
M1397 抗 MAGE-A4 pMHC VL SEQ ID NO: 15	QSVLTQDPAVSVALGQTVRITC**TADTLSRSYAS** WYQQKPGQAPVLVIY**RDTSRPS**GIPDRFSGSSS GNTASLTITGAQAEDEADYYC**ATRPSSGSNFQA** FGGGTKLTVLG
M1397 抗 MAGE-A4 pMHC LCDR1 SEQ ID NO: 16	TADTLSRSYAS
M1397 抗 MAGE-A4 pMHC LCDR2 SEQ ID NO: 17	RDTSRPS
M1397 抗 MAGE-A4 pMHC LCDR3 SEQ ID NO:	ATRPSSGSNFQA

[0424]

18	
M1383 重链 SEQ ID NO: 19	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF**STYA MN**WVRQAPGKGLEWVG**RIRSKYNNYATYYA DSVKG**RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVR**HGNFGDSYVSWFAY**WGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CGGGGSQSVLTQDPAVSVALGQTVRITC**TADTL SRSYAS**WYQQKPGQAPVLVIY**RDTSRPS**GIPDR FSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC**ATRPSS GSNFQL**FGCGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSEVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGFS L**SNYAMS**WVRQAPGKCLEWIG**IVSSGGTTYYA DSVKG**RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAS YYCAK**DLYYGPSTYFVANL**WGQGTSVTVSS
M1383 抗 MAGE-A4 pMHC VH SEQ ID NO: 20	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGFSL**SNYA MS**WVRQAPGKCLEWIG**IVSSGGTTYYADSVK G**RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTASYYCA K**DLYYGPSTYFVANL**WGQGTSVTVSS
M1383 抗 MAGE-A4 pMHC HCDR1 SEQ ID NO: 21	SNYAMS
M1383 抗 MAGE-A4 pMHC HCDR2 SEQ ID NO: 22	IVSSGGTTYYADSVKG
M1383 抗 MAGE-A4 pMHC HCDR3 SEQ ID NO:	DLYYGPSTYFVANL

[0425]

23	
M1383 轻链 SEQ ID NO: 24	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTTSN YAN**WVQQKPGKSPRGLIG**GTNKRAP**GVPARFS GSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYC**ALWYSNH WV**FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVE TTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECSGGGGSQSVLTQDPA VSVALGQTVRITC**TADTLSRSYAS**WYQQKPGQ APVLVIY**RDTSRPS**GIPDRFSGSSSGNTASLTITG AQAEDEADYYC**ATRPSSGSNFQL**FGCGTKLTV LGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGG GSVQPGGSLRLSCTVSGFSL**SNYAMS**WVRQAP GKCLEWIG**IVSSGGTTYYADSVKG**RFTISRDNS KNTVYLQMNSLRAEDTASYYCAK**DLYYGPST YFVANL**WGQGTSVTVSS
M1383 抗 MAGE-A4 pMHC VL SEQ ID NO: 25	QSVLTQDPAVSVALGQTVRITC**TADTLSRSYAS** WYQQKPGQAPVLVIY**RDTSRPS**GIPDRFSGSSS GNTASLTITGAQAEDEADYYC**ATRPSSGSNFQL** FGCGTKLTVLG
M1383 抗 MAGE-A4 pMHC LCDR1 SEQ ID NO: 26	TADTLSRSYAS
M1383 抗 MAGE-A4 pMHC LCDR2 SEQ ID NO: 27	RDTSRPS
M1383 抗 MAGE-A4 pMHC LCDR3 SEQ ID NO:	ATRPSSGSNFQL

[0426]

28	
M1387 重链 SEQ ID NO: 29	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF**STYA MN**WVRQAPGKGLEWVG**RIRSKYNNYATYYA DSVKG**RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVR**HGNFGDSYVSWFAY**WGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CGGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTASITC**TADTLS RSYAS**WYQQKPGQSPVLVIY**RDTSRPS**GIPERF SGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC**ATRDFSG SNFQL**FGCGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGFSL **SNYAMS**WVRQAPGKCLEWIG**IVSSGGTTYYAS WAKG**RFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTASY YCAK**DLYYGPTTYSAANL**WGQGTSVTVSS
M1387 抗 MAGE-A4 pMHC VH SEQ ID NO: 30	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGFSL**SNYA MS**WVRQAPGKCLEWIG**IVSSGGTTYYASWAK G**RFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTASYYCA K**DLYYGPTTYSAANL**WGQGTSVTVSS
M1387 抗 MAGE-A4 pMHC HCDR1 SEQ ID NO: 31	SNYAMS
M1387 抗 MAGE-A4 pMHC HCDR2 SEQ ID NO: 32	IVSSGGTTYYASWAKG
M1387 抗 MAGE-A4 pMHC HCDR3 SEQ ID NO:	DLYYGPTTYSAANL

[0427]

33	
M1387 轻链 SEQ ID NO: 34	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTTSN YAN**WVQQKPGKSPRGLIG**GTNKRAP**GVPARFS GSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYC**ALWYSNH WV**FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVE TTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECSGGGGSSYELTQPPS VSVSPGQTASITC**TADTLSRSYAS**WYQQKPGQS PVLVIY**RDTSRPS**GIPERFSGSNSGNTATLTISGT QAMDEADYYC**ATRDFSGSNFQL**FGCGTKLTV LGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGG GSVQPGGSLRLSCTVSGFSL**SNYAMS**WVRQAP GKCLEWIG**IVSSGGTTYYASWAKG**RFTISKDTS KNTVYLQMNSLRAEDTASYYCAK**DLYYGPTT YSAANL**WGQGTSVTVSS
M1387 抗 MAGE-A4 pMHC VL SEQ ID NO: 35	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC**TADTLSRSYAS**W YQQKPGQSPVLVIY**RDTSRPS**GIPERFSGSNSGN TATLTISGTQAMDEADYYC**ATRDFSGSNFQL**FG CGTKLTVLG
M1387 抗 MAGE-A4 pMHC LCDR1 SEQ ID NO: 36	TADTLSRSYAS
M1387 抗 MAGE-A4 pMHC LCDR2 SEQ ID NO: 37	RDTSRPS
M1387 抗 MAGE-A4 pMHC LCDR3 SEQ ID NO:	ATRDFSGSNFQL

[0428]

38	
M1403 重链 SEQ ID NO: 39	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF**STYA MN**WVRQAPGKGLEWVG**RIRSKYNNYATYYA DSVKG**RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVR**HGNFGDSYVSWFAY**WGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CGGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTASITC**TADTLS RSYAS**WYQQKPGQSPVLVIY**RDTSRPS**GIPERF SGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC**ATRPSSG SNFQA**FGGGTKLTVLGGGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSEVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGFS L**SNYAMS**WVRQAPGKGLEYIG**IVSSGGTTYYA SWAKG**RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAS YYCAK**DLYYGPTTYSAFNL**WGQGTSVTVSS
M1403 抗 MAGE-A4 pMHC VH SEQ ID NO: 40	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGFSL**SNYA MS**WVRQAPGKGLEYIG**IVSSGGTTYYASWAK G**RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTASYYCA K**DLYYGPTTYSAFNL**WGQGTSVTVSS
M1403 抗 MAGE-A4 pMHC HCDR1 SEQ ID NO: 41	SNYAMS
M1403 抗 MAGE-A4 pMHC HCDR2 SEQ ID NO: 42	IVSSGGTTYYASWAKG
M1403 抗 MAGE-A4 pMHC HCDR3 SEQ ID NO:	DLYYGPTTYSAFNL

[0429]

43	
M1403 轻链 SEQ ID NO: 44	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTTSN YAN**WVQQKPGKSPRGLIG**GTNKRAP**GVPARFS GSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYC**ALWYSNH WV**FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVE TTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECSGGGGSSYELTQPPS VSVSPGQTASITC**TADTLSRSYAS**WYQQKPGQS PVLVIY**RDTSRPS**GIPERFSGSNSGNTATLTISGT QAMDEADYYC**ATRPSSGSNFQA**FGGGTKLTVL GGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGG GSVQPGGSLRLSCTVSGFSL**SNYAMS**WVRQAP GKGLEYIG**IVSSGGTTYYASWAKG**RFTISRDNS KNTVYLQMNSLRAEDTASYYCAK**DLYYGPTT YSAFNL**WGQGTSVTVSS
M1403 抗 MAGE-A4 pMHC VL SEQ ID NO: 45	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC**TADTLSRSYAS**W YQQKPGQSPVLVIY**RDTSRPS**GIPERFSGSNSGN TATLTISGTQAMDEADYYC**ATRPSSGSNFQA**FG GGTKLTVLG
M1403 抗 MAGE-A4 pMHC LCDR1 SEQ ID NO: 46	TADTLSRSYAS
M1403 抗 MAGE-A4 pMHC LCDR2 SEQ ID NO: 47	RDTSRPS
M1403 抗 MAGE-A4 pMHC LCDR3 SEQ ID NO:	ATRPSSGSNFQA

[0430]

48	
抗 CD3 重链 SEQ ID NO: 49	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF**STYA MN**WVRQAPGKGLEWVG**RIRSKYNNYATYYA DSVKG**RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVR**HGNFGDSYVSWFAY**WGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS C
抗 CD3 VH SEQ ID NO: 50	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF**STYA MN**WVRQAPGKGLEWVG**RIRSKYNNYATYYA DSVKG**RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVR**HGNFGDSYVSWFAY**WGQGTLVTVSS
抗 CD3 HCDR1 SEQ ID NO: 51	STYAMN
抗 CD3 HCDR2 SEQ ID NO: 52	RIRSKYNNYATYYADSVKG
抗 CD3 HCDR3 SEQ ID NO: 53	HGNFGDSYVSWFAY
抗 CD3 轻链 SEQ ID NO: 54	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTTSN YAN**WVQQKPGKSPRGLIG**GTNKRAP**GVPARFS GSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYC**ALWYSNH WV**FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVE TTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS
抗 CD3	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTTSN YAN**WVQQKPGKSPRGLIG**GTNKRAP**GVPARFS

[0431]

VL SEQ ID NO: 55	GSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYC**ALWYSNHWV**FGGGTKLTVLG
抗 CD3 LCDR1 SEQ ID NO: 56	GSSTGAVTTSNYAN
抗 CD3 LCDR2 SEQ ID NO: 57	GTNKRAP
抗 CD3 LCDR3 SEQ ID NO: 58	ALWYSNHWV
比较物 1 α 链 SEQ ID NO: 59	MANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCNYTVSPFSN LRWYKQDTGRGPVSLTILTFSENTKSNGRYTATL DADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQGLYI PTFGRGTSLIVHPYIQKPDPAVYQLRDSKSSDKS VCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMR SMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDT
比较物 1 β 链 SEQ ID NO: 60	MAIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNY LNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGS GSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTF GQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFT GYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYN QKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY YCARSGYYGDSDWYFDVWGQGTLVTVSSGGG GSDVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDLDHE NMFWYRQDPGLGLRLIYFSRFATGKEKGDIPEG YSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQ NSGDPYEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVF EPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWV

[0432]

	NGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRL RVSATFWQDPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQD RAKPVTQIVSAEAWGRAD
M1397 的 MAGE-A4 scFv SEQ ID NO: 61	QSVLTQDPAVSVALGQTVRITCTADTLSRSYAS WYQQKPGQAPVLVIYRDTSRPSGIPDRFSGSSSG NTASLTITGAQAEDEADYYCATRPSSGSNFQAF GGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSE VQLLESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGFSLSNYAM SWVRQAPGKGLEWIGIVSSGGTTYYADSVKGR FTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTASYYCAKDL YYGPNTDYSAANLWGQGTSVTVSS
M1383 的 MAGE-A4 scFv SEQ ID NO: 62	QSVLTQDPAVSVALGQTVRITCTADTLSRSYAS WYQQKPGQAPVLVIYRDTSRPSGIPDRFSGSSSG NTASLTITGAQAEDEADYYCATRPSSGSNFQLF GCGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSE VQLLESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGFSLSNYAM SWVRQAPGKCLEWIGIVSSGGTTYYADSVKGR FTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTASYYCAKDL YYGPSTYFVANLWGQGTSVTVSS
M1387 的 MAGE-A4 scFv SEQ ID NO: 63	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCTADTLSRSYASW YQQKPGQSPVLVIYRDTSRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISGTQAMDEADYYCATRDFSGSNFQLFG CGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLLESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGFSLSNYAMS WVRQAPGKCLEWIGIVSSGGTTYYASWAKGRF TISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTASYYCAKDL YYGPTTYSAANLWGQGTSVTVSS
M1403 的 MAGE-A4 scFv SEQ ID NO: 64	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCTADTLSRSYASW YQQKPGQSPVLVIYRDTSRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISGTQAMDEADYYCATRPSSGSNFQAFG GGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSE VQLLESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGFSLSNYAM SWVRQAPGKGLEYIGIVSSGGTTYYASWAKGR FTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTASYYCAKDL YYGPTTYSAFNLWGQGTSVTVSS
比较物 2 重链 1 SEQ ID NO: 65	AQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASAYFSFKAMS WVRQAPGKGLEWVGSISPSGGSTYYNDNVLGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDV GFFDEWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSDI

[0433]

	QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNW YQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSG TDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQG TKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSP
比较物 2 重链 2 SEQ ID NO: 66	AQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASAYFSFKAMS WVRQAPGKGLEWVGSISPSGGSTYYNDNVLGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDV GFFDEWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQV SLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSP
比较物 2 轻链 SEQ ID NO: 67	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLA WYQQKPGKAPKLLIYDASIRDIGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSYPYTFGQG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC

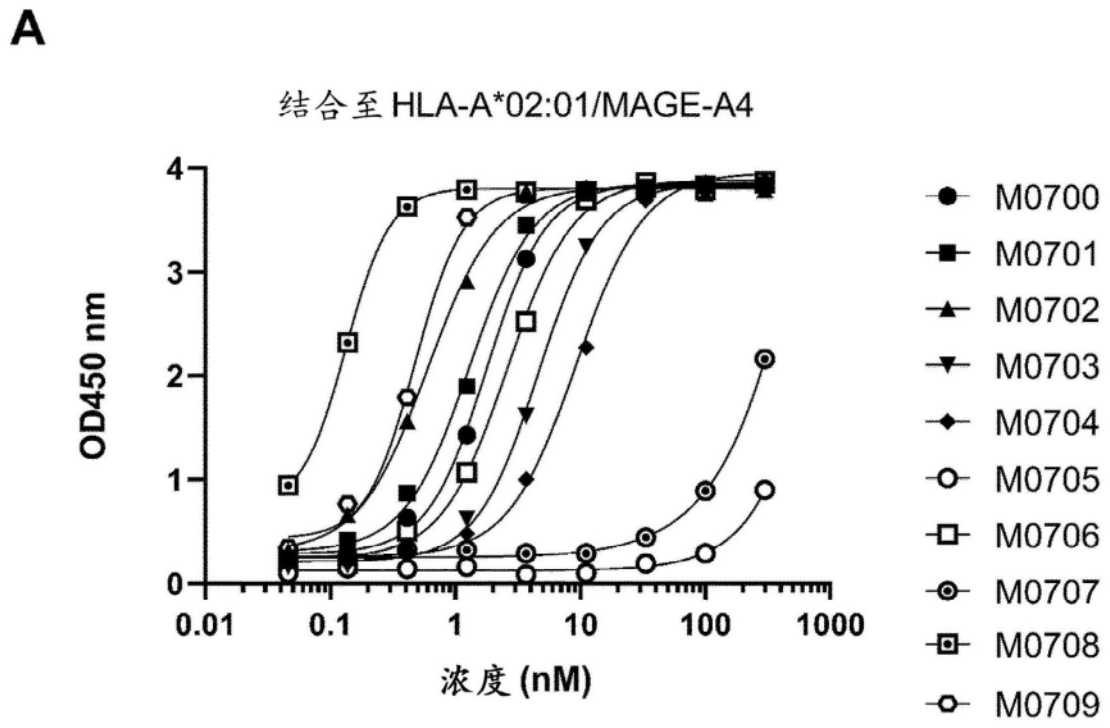

A
结合至 HLA-A*02:01/MAGE-A4
OD450 nm
浓度 (nM)
0.01
0.1
1
10
100
1000
M0700
M0701
M0702
M0703
M0704
M0705
M0706
M0707
M0708
M0709

图1A

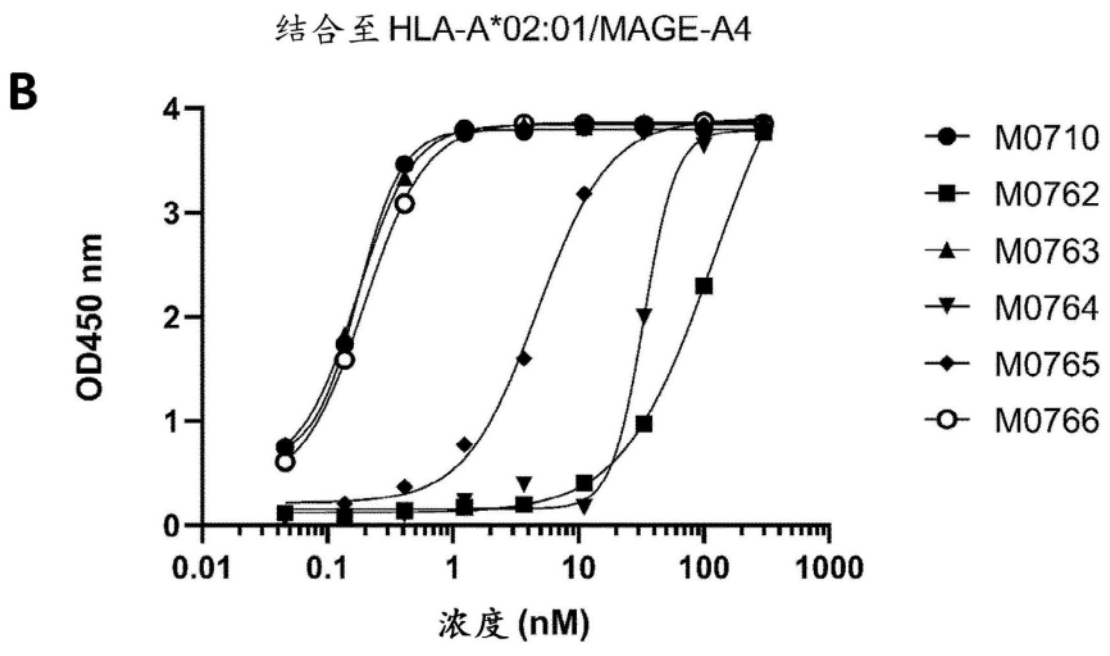

B
结合至 HLA-A*02:01/MAGE-A4
OD450 nm
浓度 (nM)
0.01
0.1
1
10
100
1000
M0710
M0762
M0763
M0764
M0765
M0766

图1B

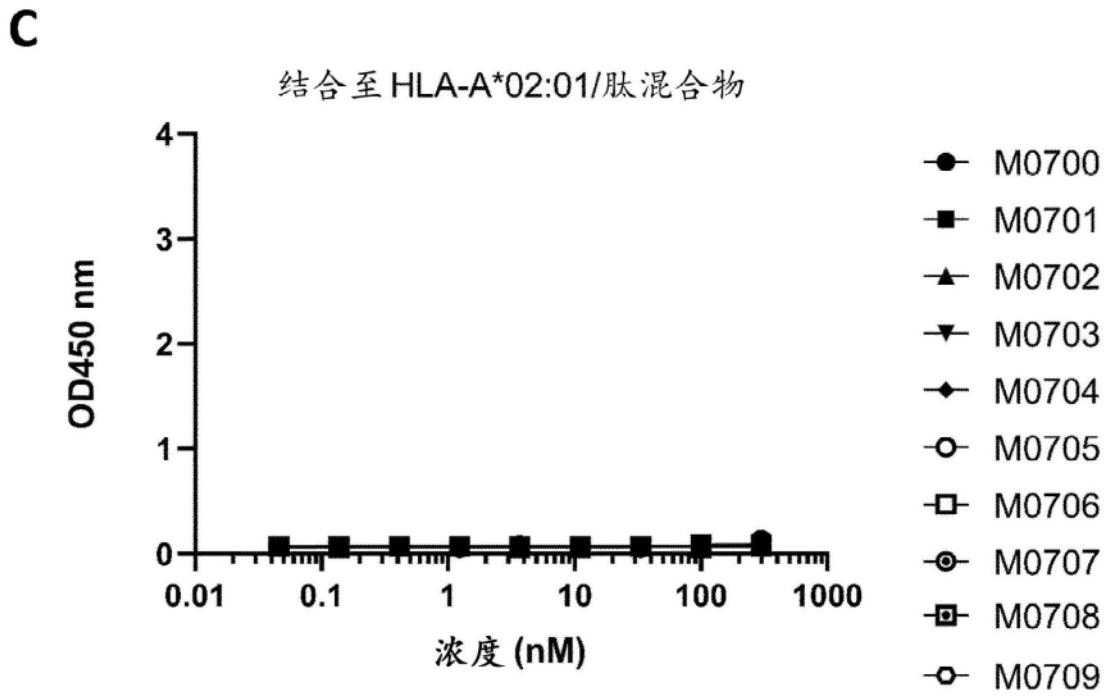

C
结合至HLA-A*02:01/肽混合物
OD450 nm
4
3
2
1
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度 (nM)
M0700
M0701
M0702
M0703
M0704
M0705
M0706
M0707
M0708
M0709

图1C

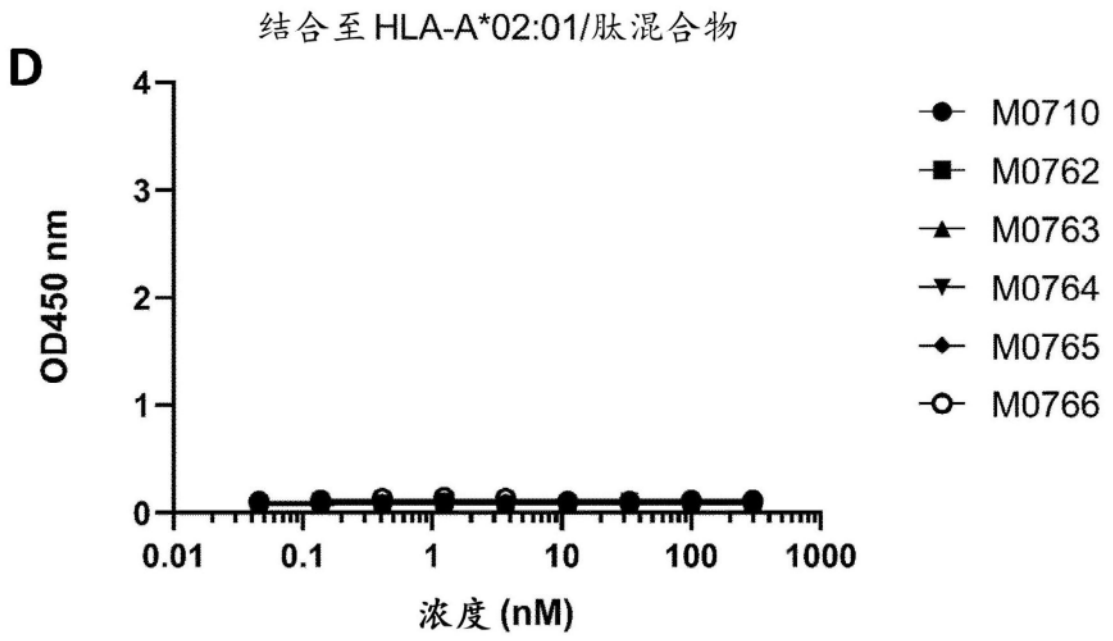

D
结合至HLA-A*02:01/肽混合物
OD450 nm
4
3
2
1
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度 (nM)
M0710
M0762
M0763
M0764
M0765
M0766

图1D

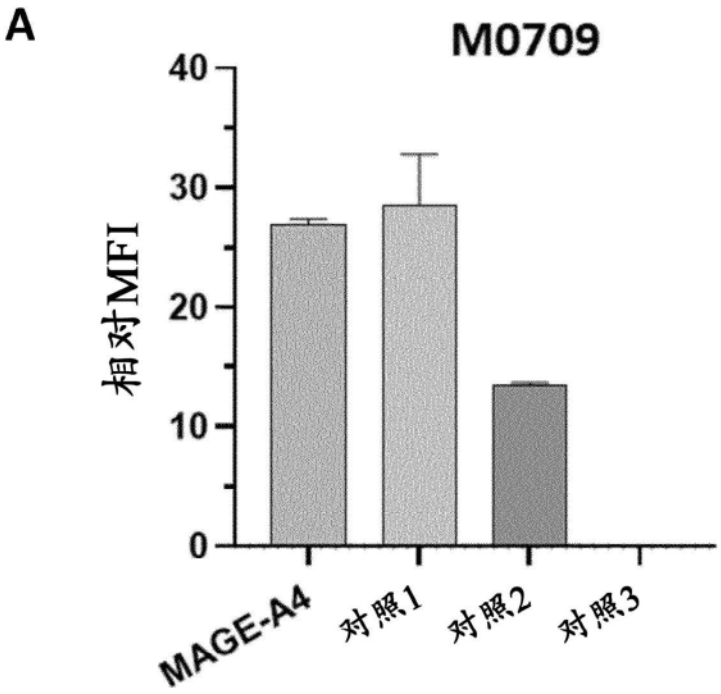

A
M0709
相对MFI
40
30
20
10
0
MAGE-A4
对照1
对照2
对照3

图2A

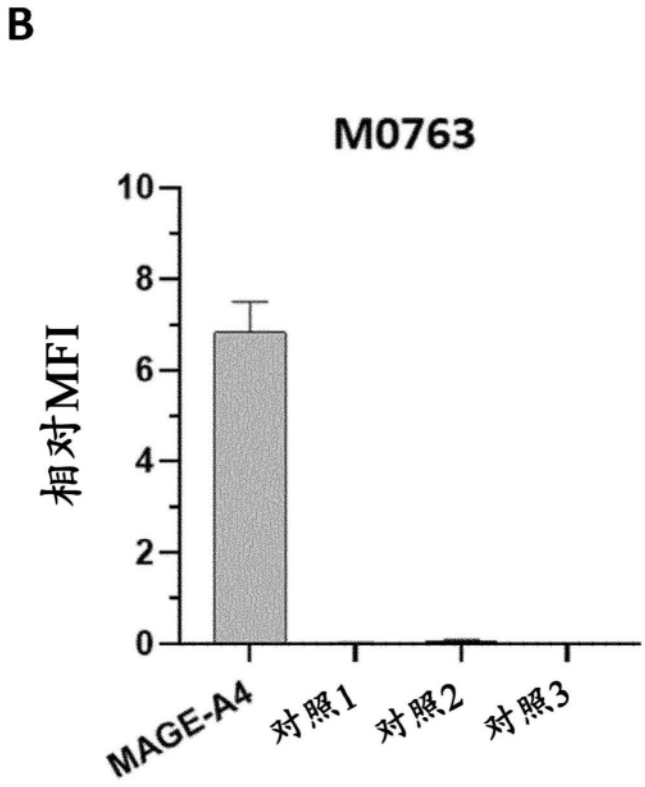

B
M0763
相对MFI
10
8
6
4
2
0
MAGE-A4
对照1
对照2
对照3

图2B

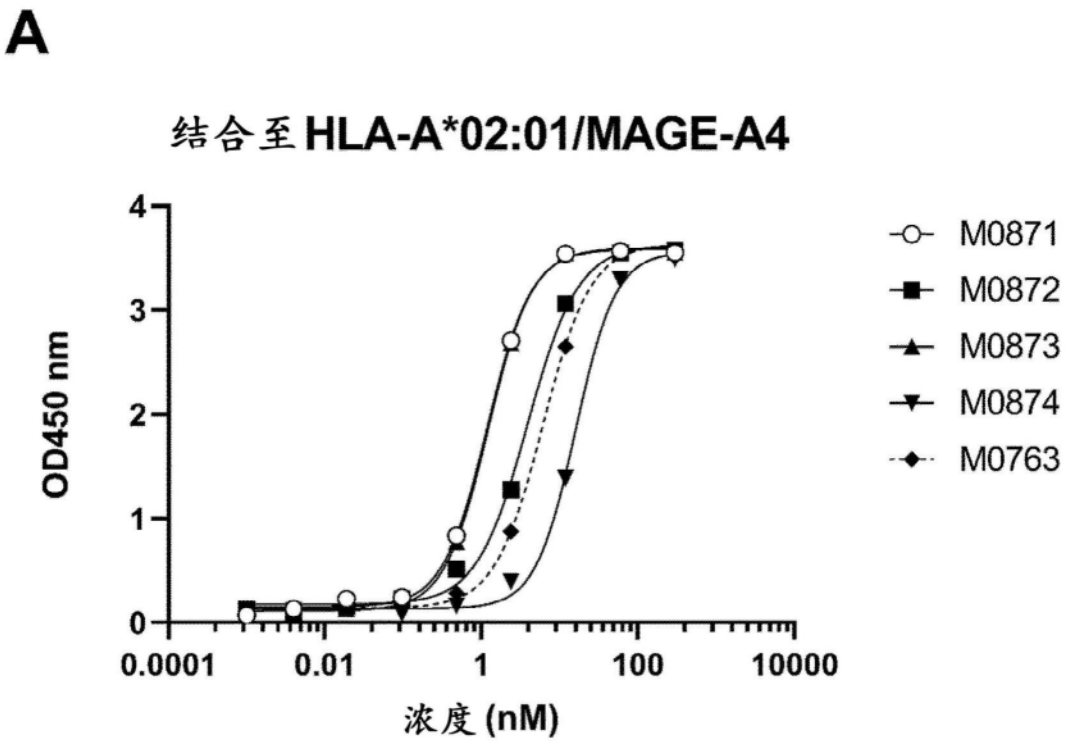

A
结合至HLA-A*02:01/MAGE-A4
OD450 nm
浓度 (nM)
0.0001
0.01
1
100
10000
0
1
2
3
4
M0871
M0872
M0873
M0874
M0763

图3A

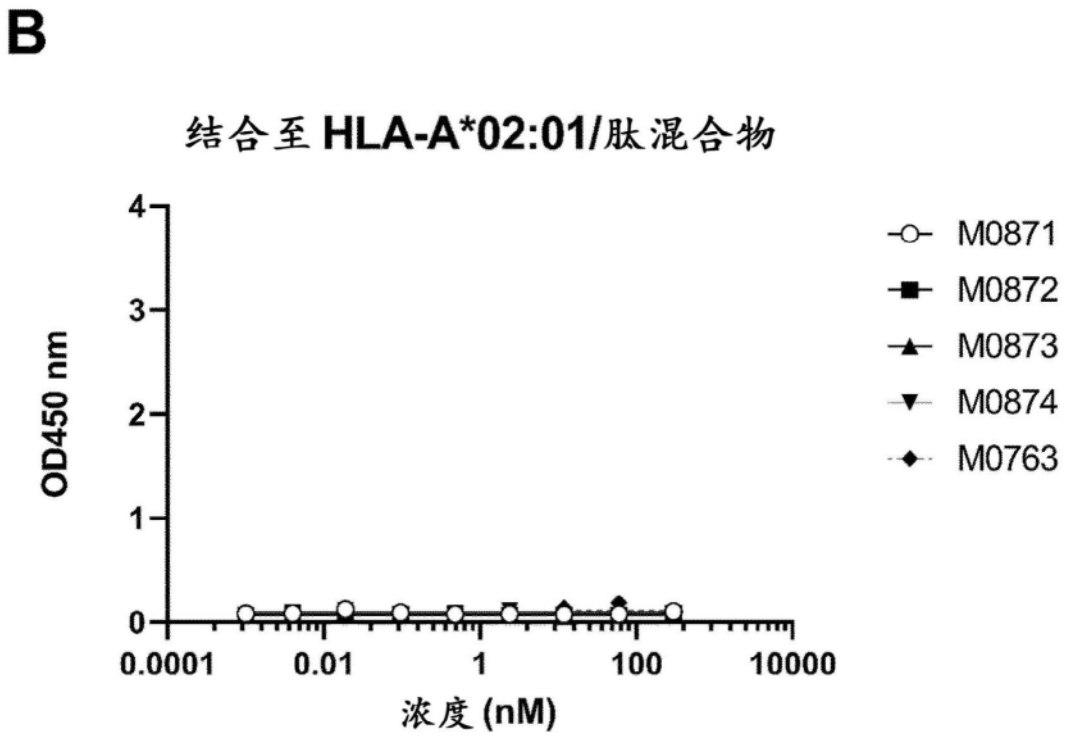

B
结合至HLA-A*02:01/肽混合物
OD450 nm
浓度 (nM)
0.0001
0.01
1
100
10000
0
1
2
3
4
M0871
M0872
M0873
M0874
M0763

图3B

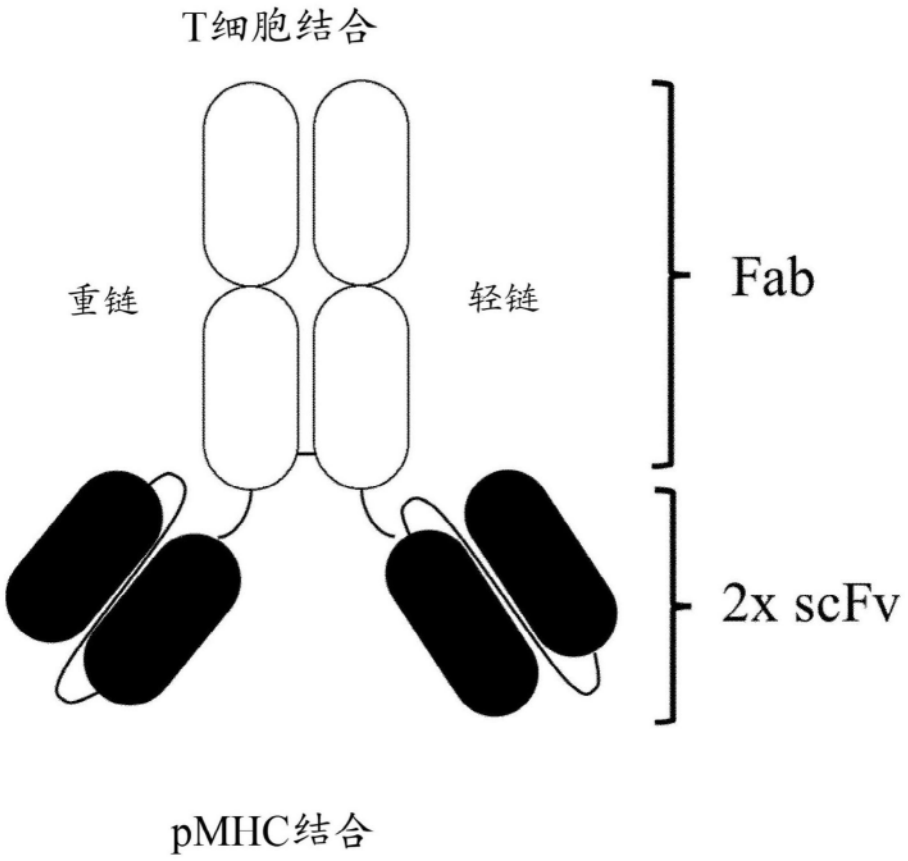

T细胞结合
重链
轻链
Fab
2x scFv
pMHC结合

图4

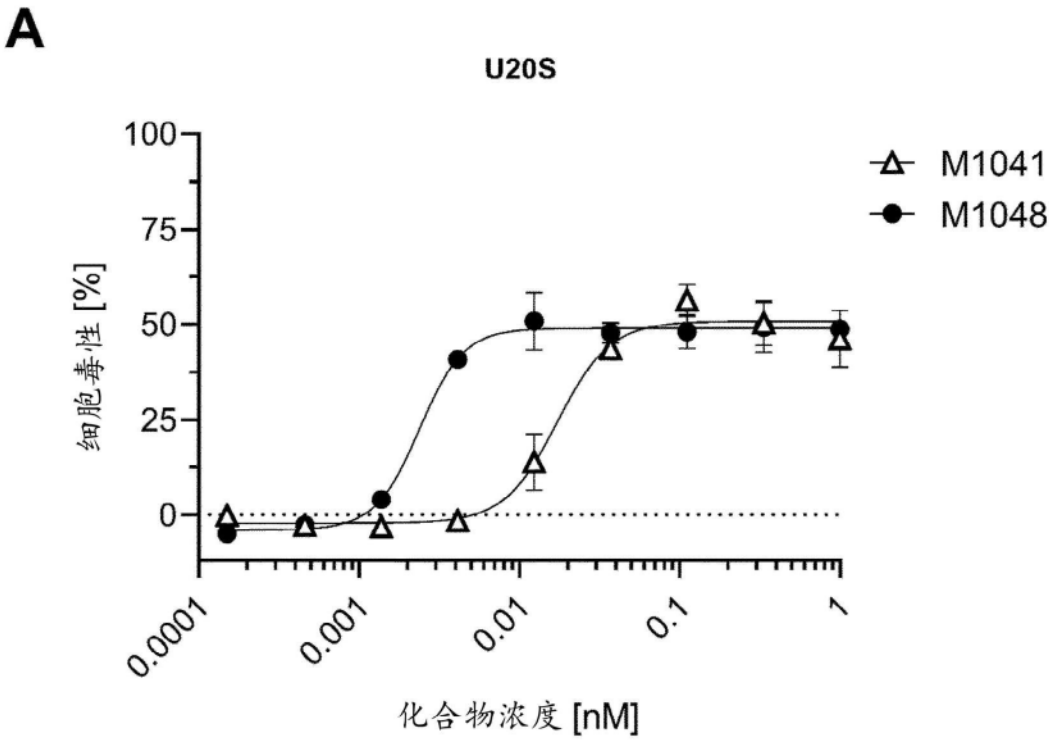

A
U20S
100
75
50
25
0
细胞毒性 [%]
M1041
M1048
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
化合物浓度 [nM]

图5A

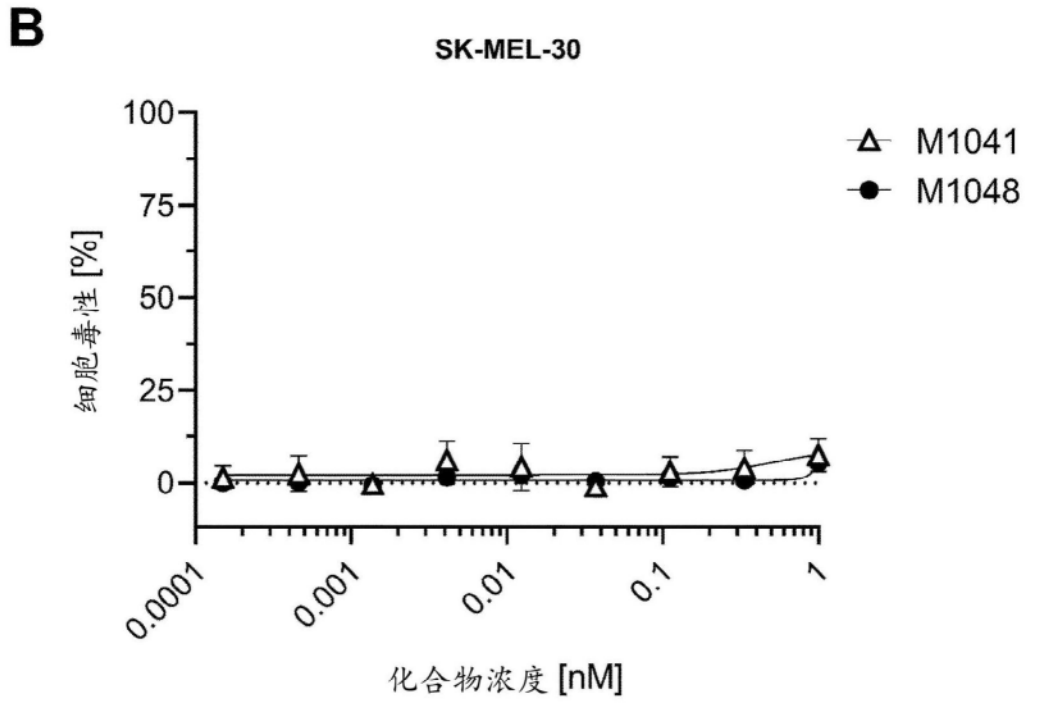

B
SK-MEL-30
M1041
M1048
细胞毒性 [%]
100
75
50
25
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
化合物浓度 [nM]

图5B

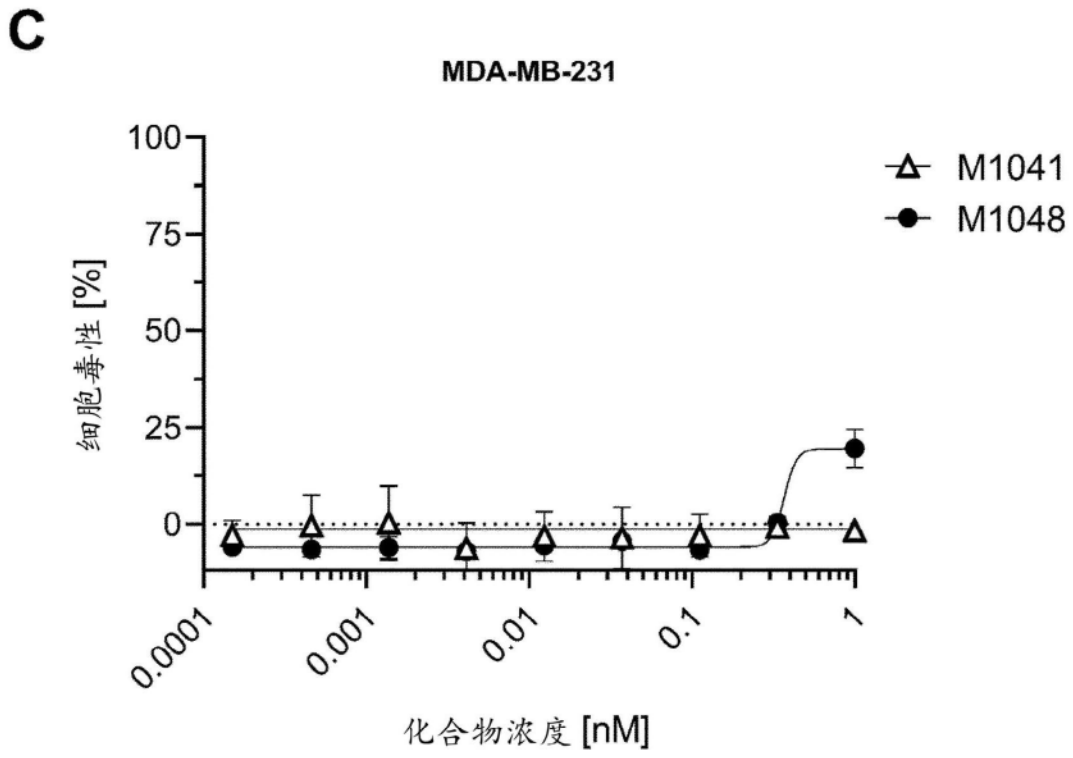

C
MDA-MB-231
M1041
M1048
细胞毒性 [%]
100
75
50
25
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
化合物浓度 [nM]

图5C

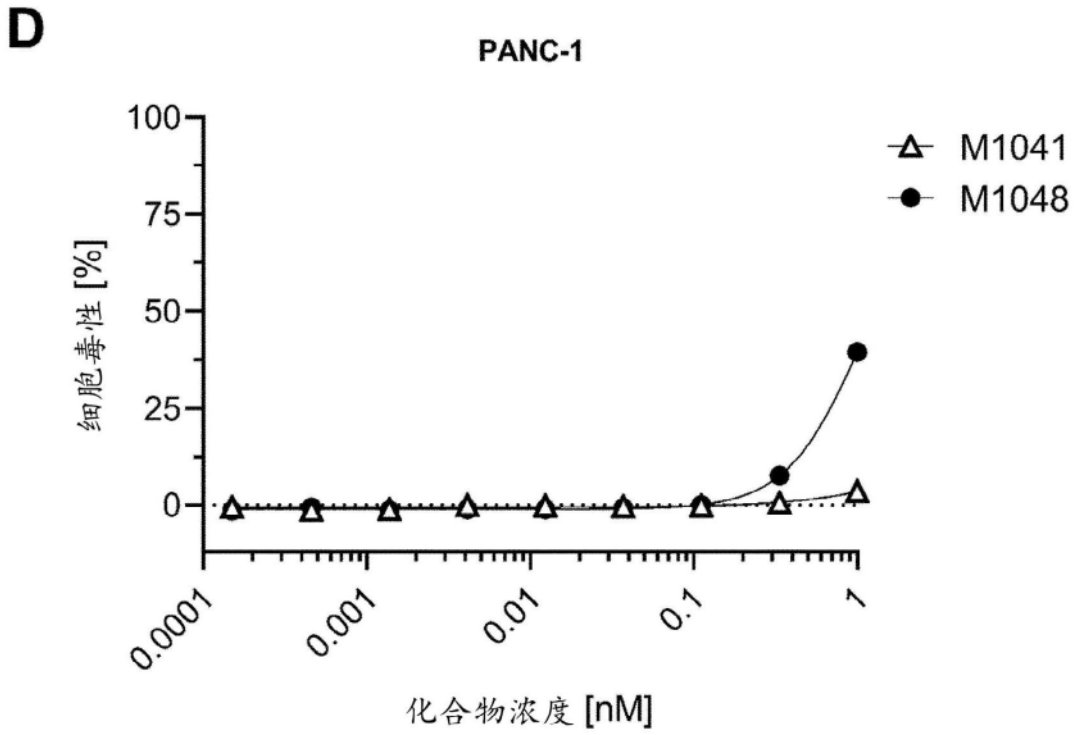

D
PANC-1
M1041
M1048
细胞毒性 [%]
100
75
50
25
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
化合物浓度 [nM]

图5D

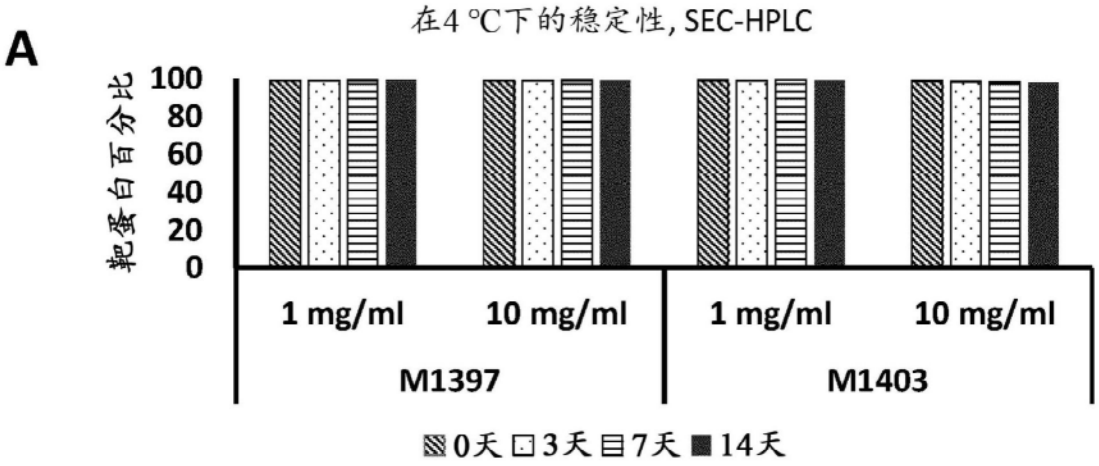

A
在4 ℃下的稳定性, SEC-HPLC
靶蛋白百分比
100
80
60
40
20
0
1 mg/ml
10 mg/ml
1 mg/ml
10 mg/ml
M1397
M1403
0天 3天 7天 14天

图6A

B

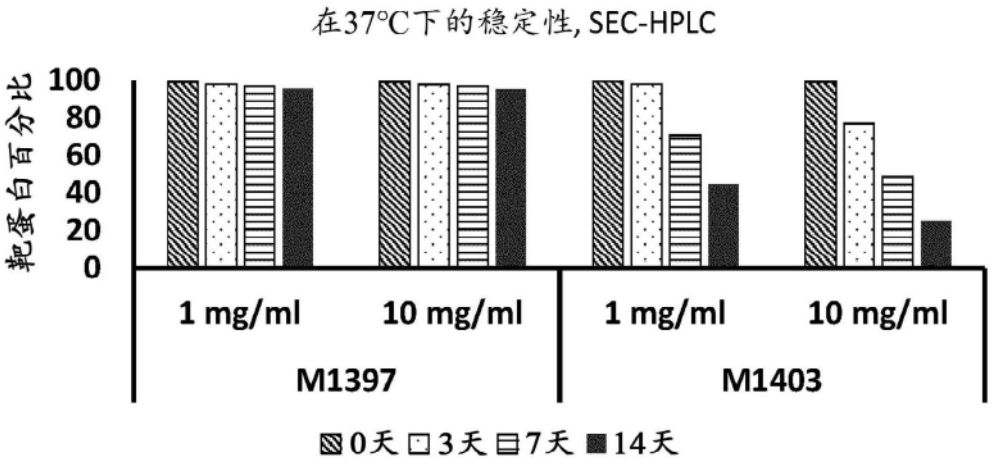

在37℃下的稳定性, SEC-HPLC
靶蛋白百分比
100
80
60
40
20
0
1 mg/ml
10 mg/ml
1 mg/ml
10 mg/ml
M1397
M1403
0天 3天 7天 14天

图6B

A

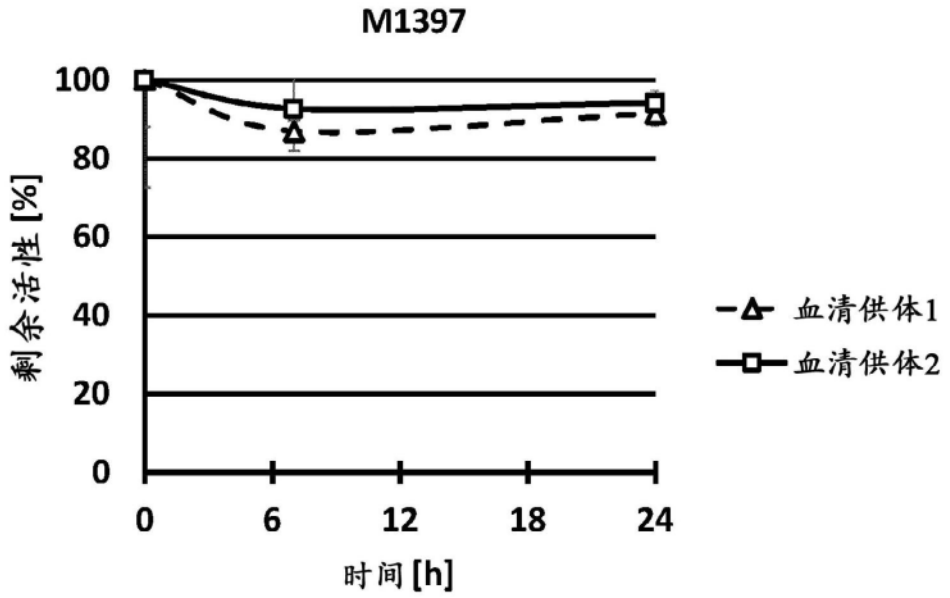

M1397
剩余活性 [%]
100
80
60
40
20
0
0
6
12
18
24
时间 [h]
血清供体1
血清供体2

图7A

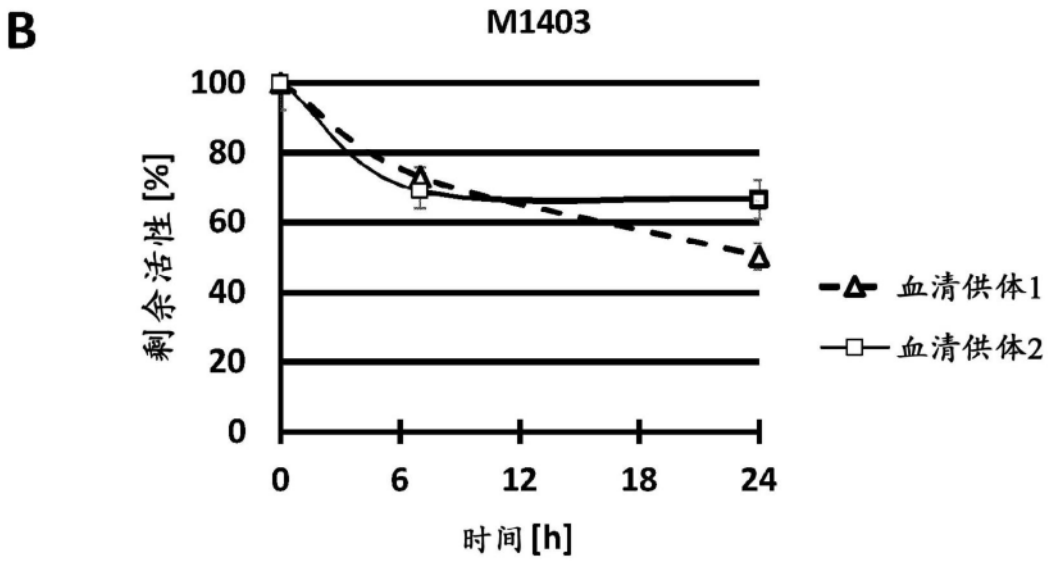

B
M1403
剩余活性 [%]
100
80
60
40
20
0
0
6
12
18
24
时间 [h]
血清供体1
血清供体2

图7B

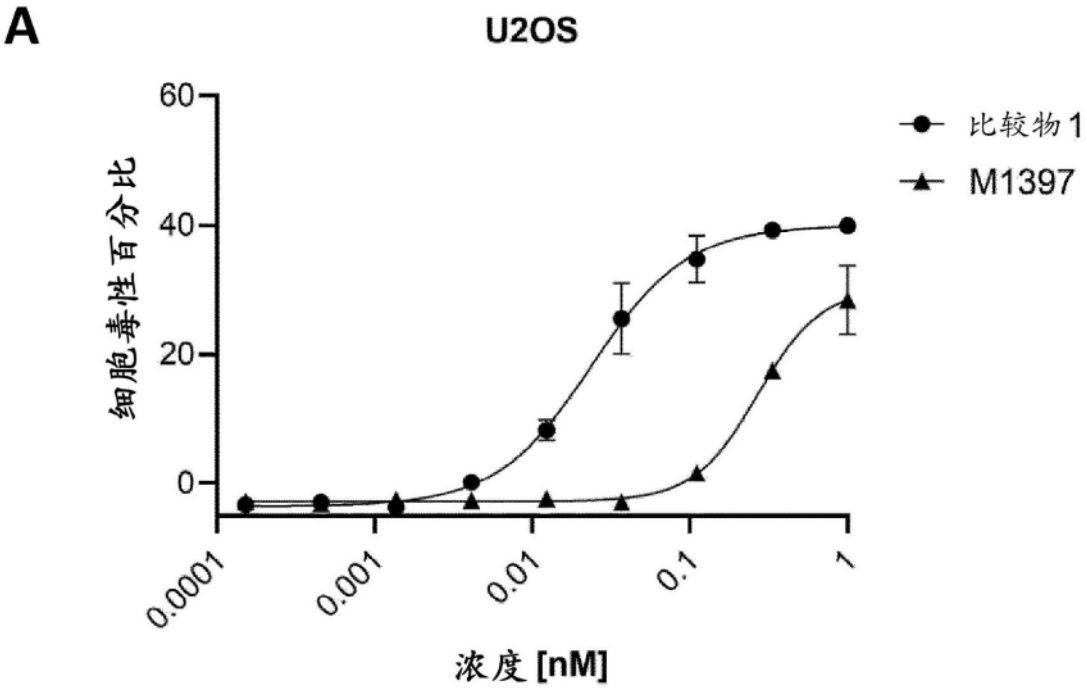

A
U2OS
细胞毒性百分比
60
40
20
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
浓度 [nM]
比较物1
M1397

图8A

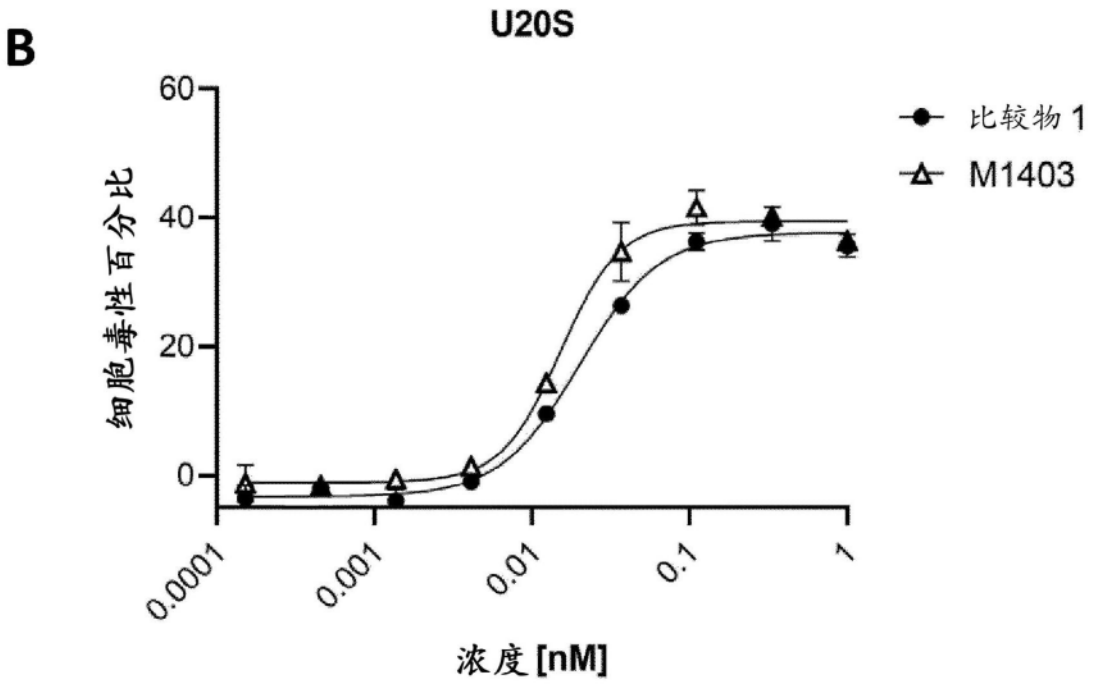

B
U20S
细胞毒性百分比
60
40
20
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
浓度 [nM]
比较物 1
M1403

图8B

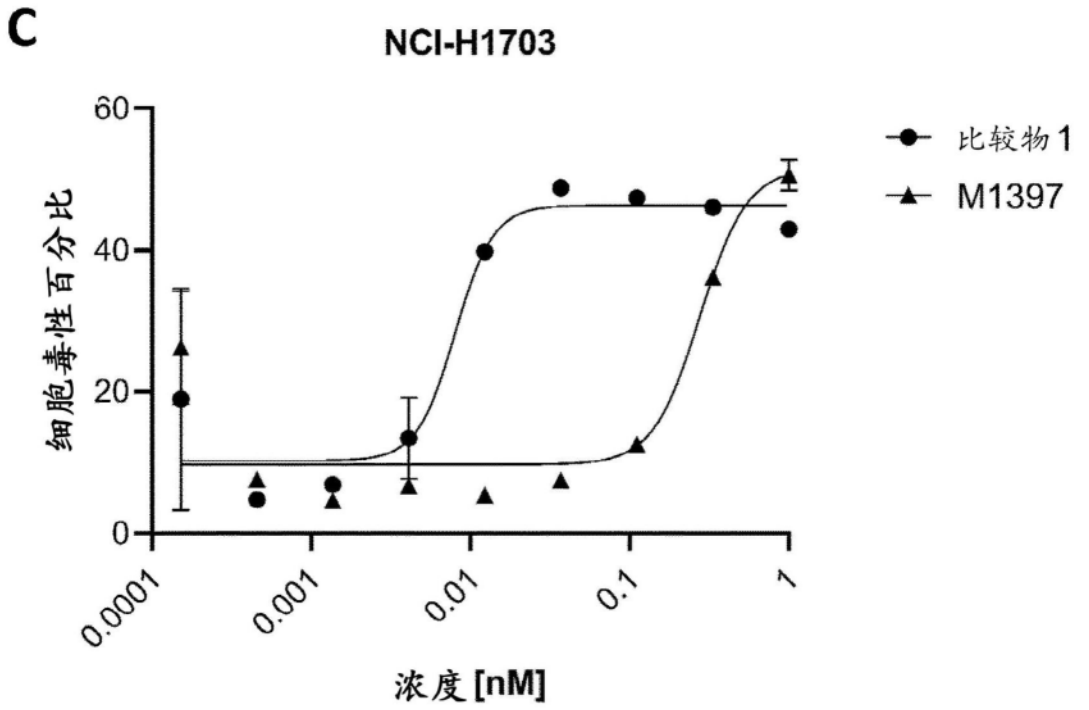

C
NCI-H1703
细胞毒性百分比
60
40
20
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
浓度 [nM]
比较物 1
M1397

图8C

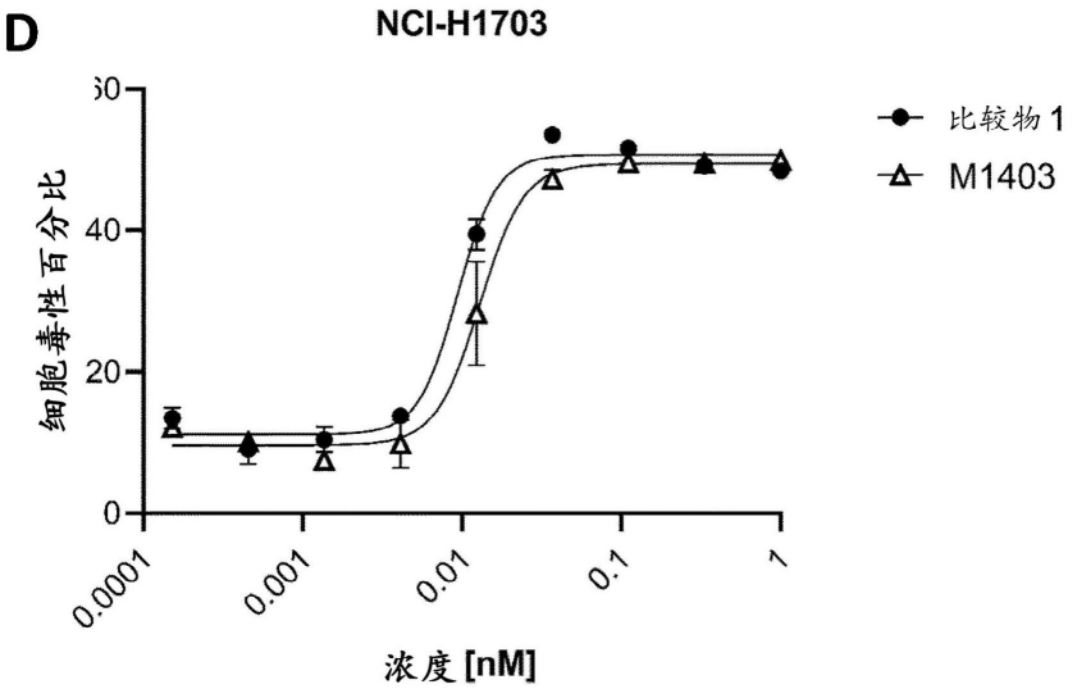

D
NCI-H1703
细胞毒性百分比
0
20
40
0.0001
0.001
0.01
0.1
浓度 [nM]
比较物 1
M1403

图8D

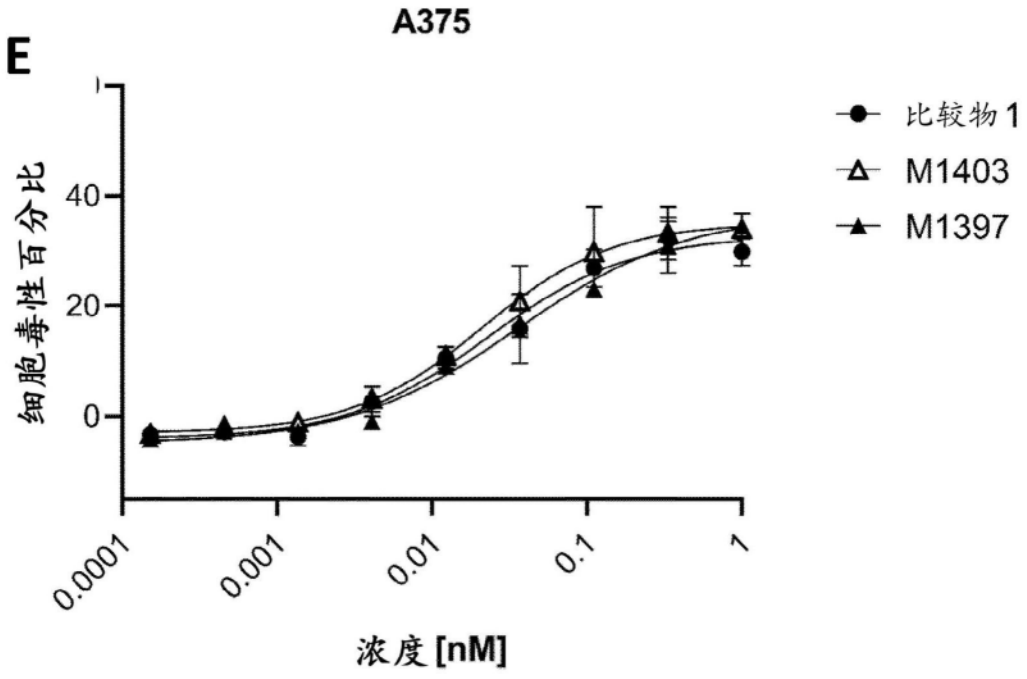

E
A375
细胞毒性百分比
0
20
40
0.0001
0.001
0.01
0.1
浓度 [nM]
比较物 1
M1403
M1397

图8E

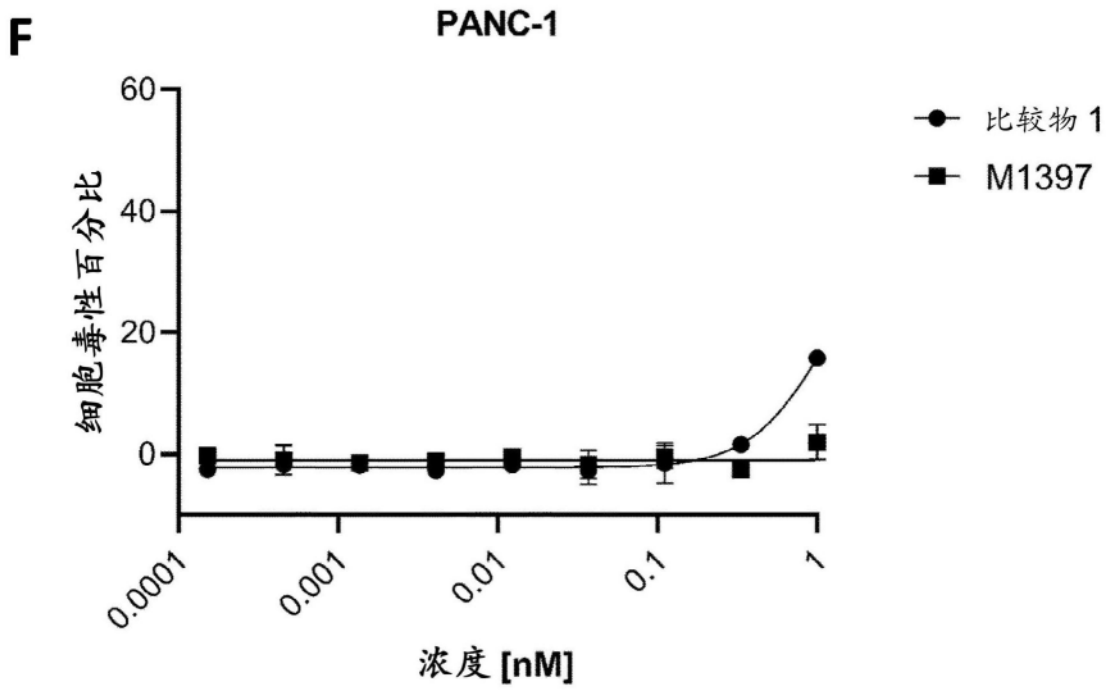

F
PANC-1
60
40
20
0
细胞毒性百分比
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
浓度 [nM]
比较物 1
M1397

图8F

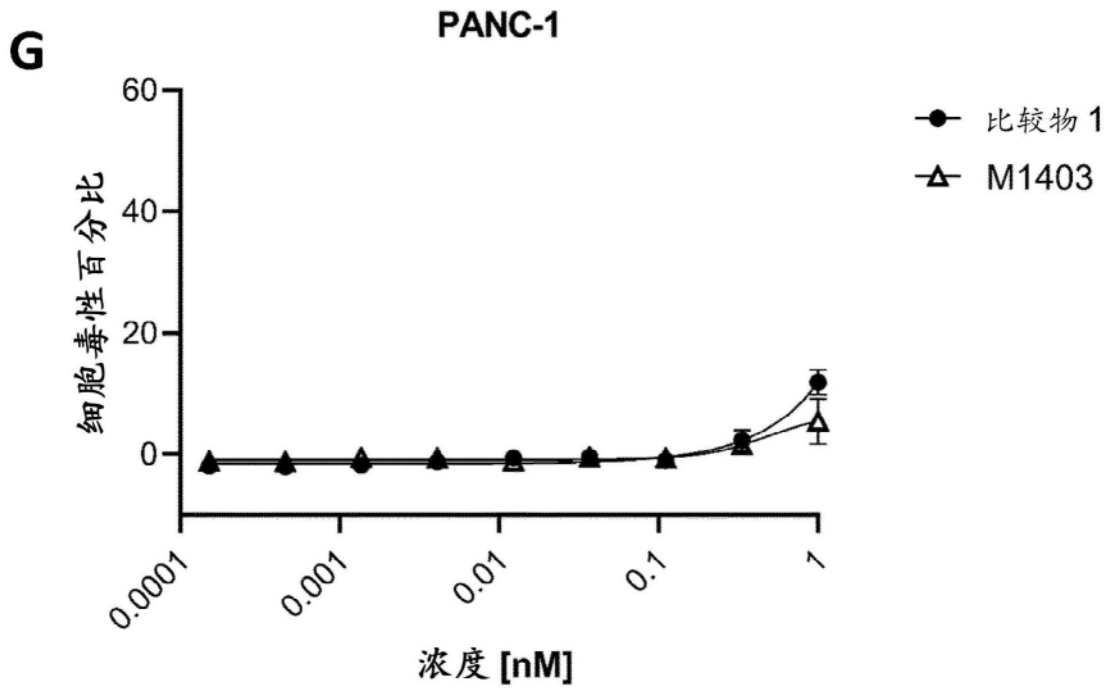

G
PANC-1
60
40
20
0
细胞毒性百分比
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
浓度 [nM]
比较物 1
M1403

图8G

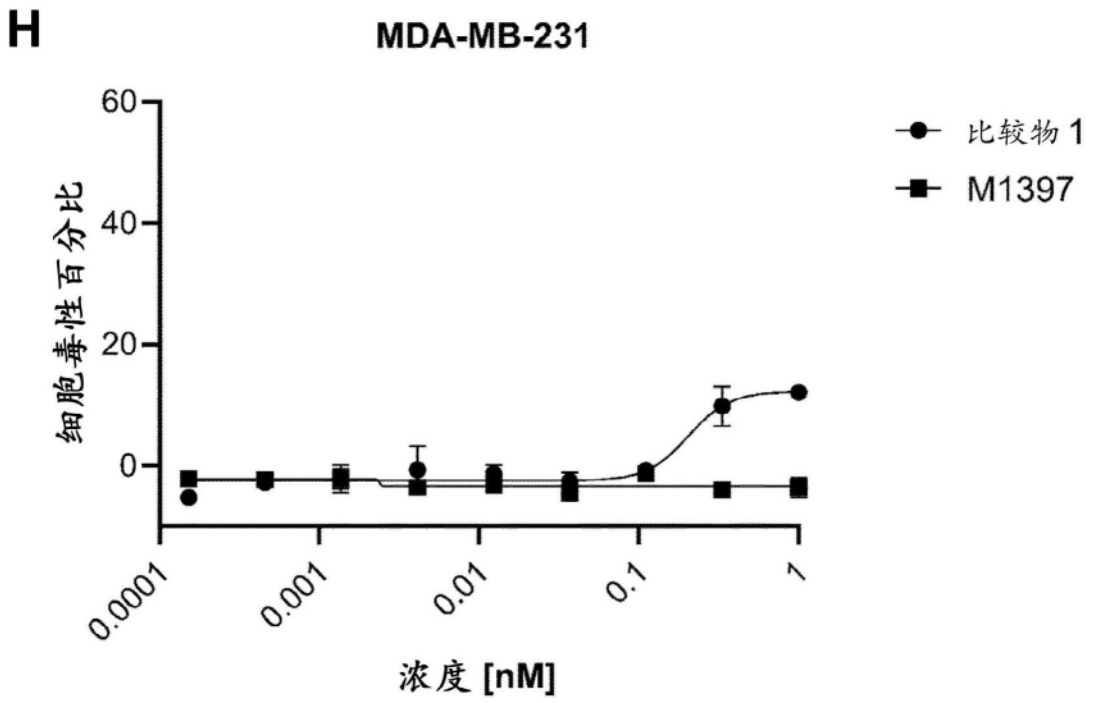

H
MDA-MB-231
细胞毒性百分比
60
40
20
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
浓度 [nM]
比较物 1
M1397

图8H

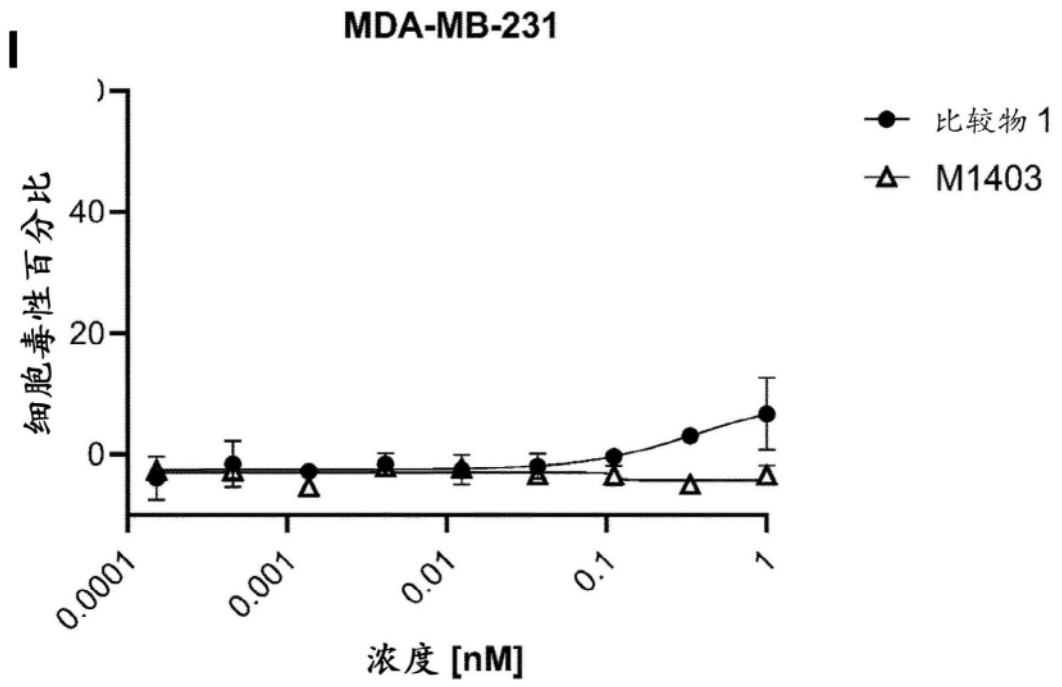

I
MDA-MB-231
细胞毒性百分比
40
20
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
浓度 [nM]
比较物 1
M1403

图8I

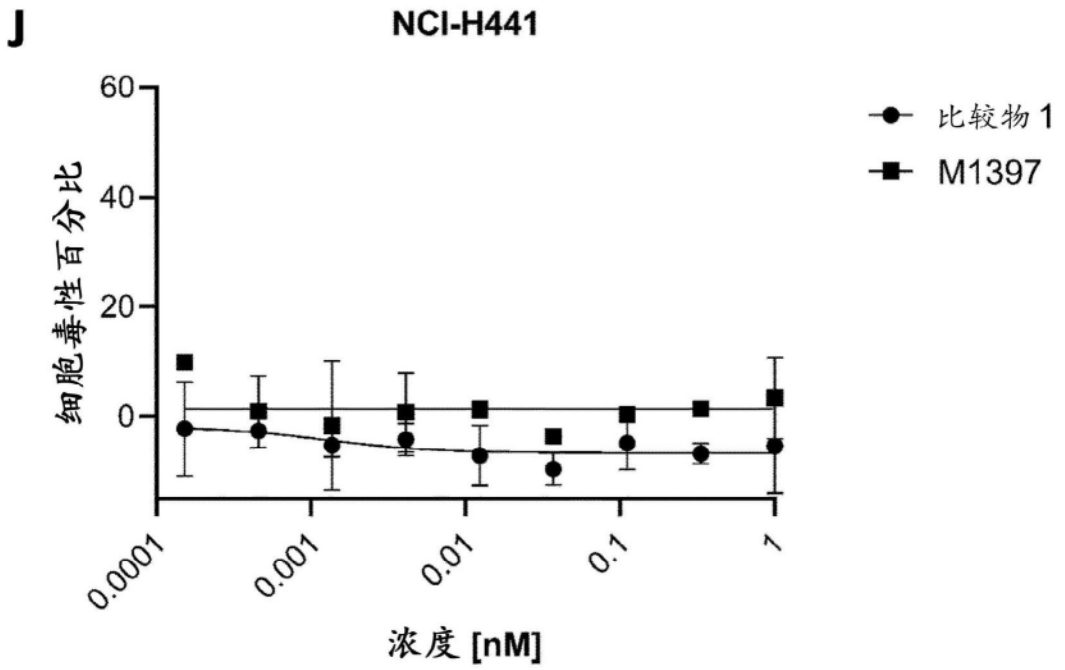

J
NCI-H441
60
40
20
0
细胞毒性百分比
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
浓度 [nM]
比较物 1
M1397

图8J

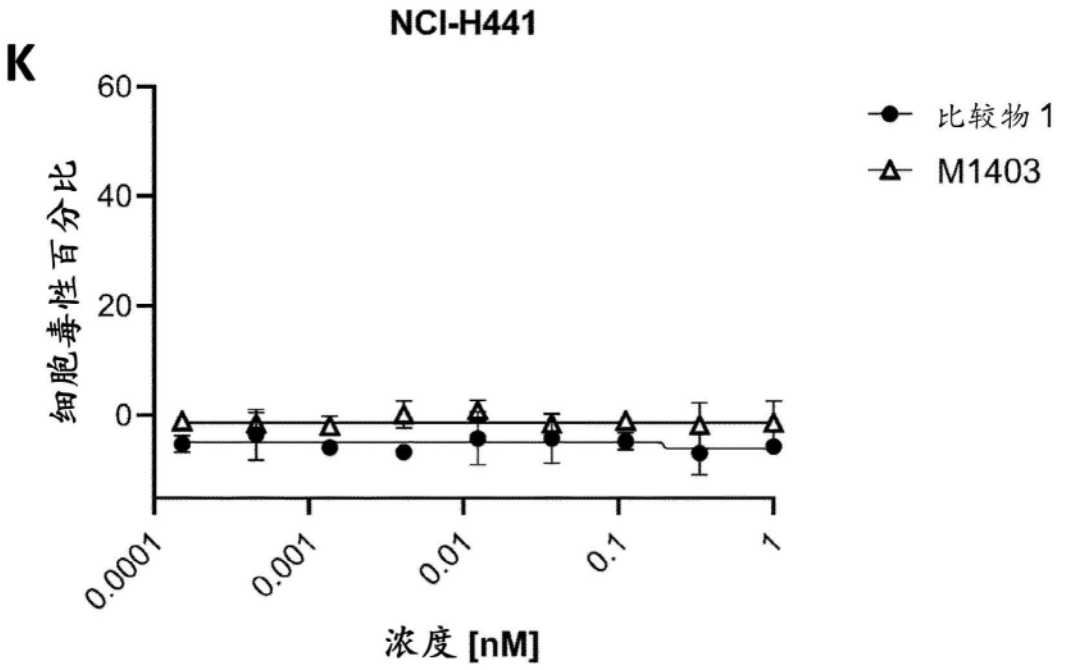

K
NCI-H441
60
40
20
0
细胞毒性百分比
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
浓度 [nM]
比较物 1
M1403

图8K

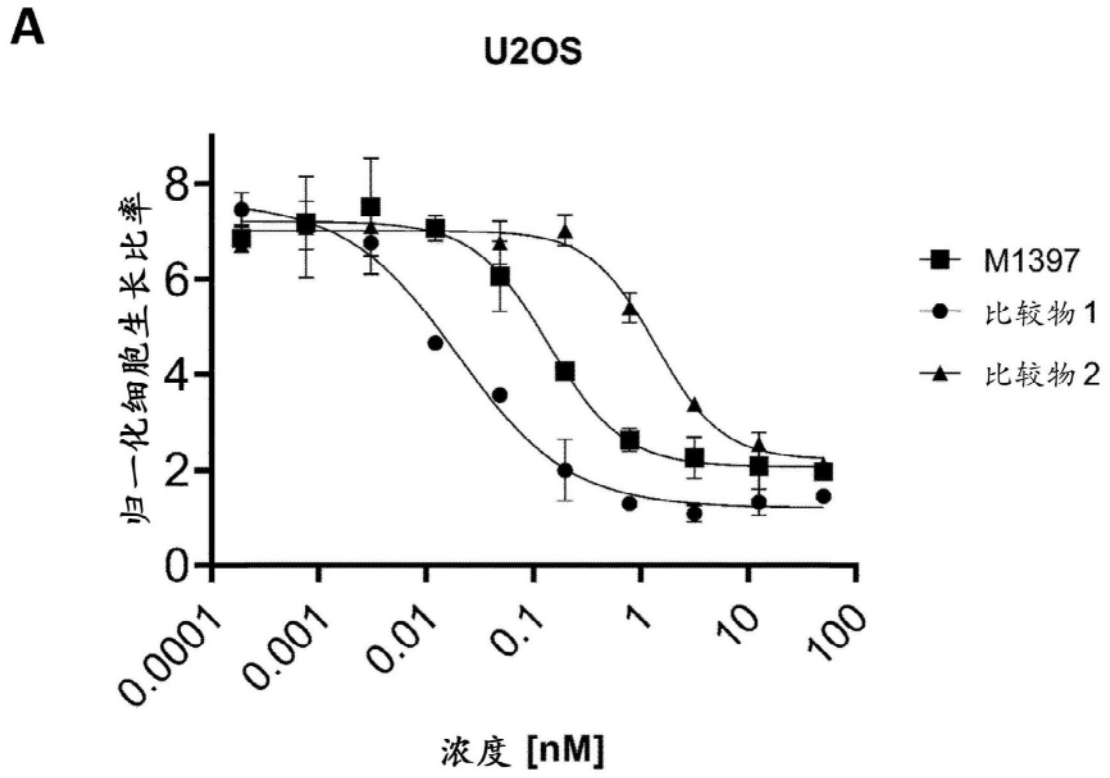

A
U2OS
归一化细胞生长比率
浓度 [nM]
M1397
比较物1
比较物2

图9A

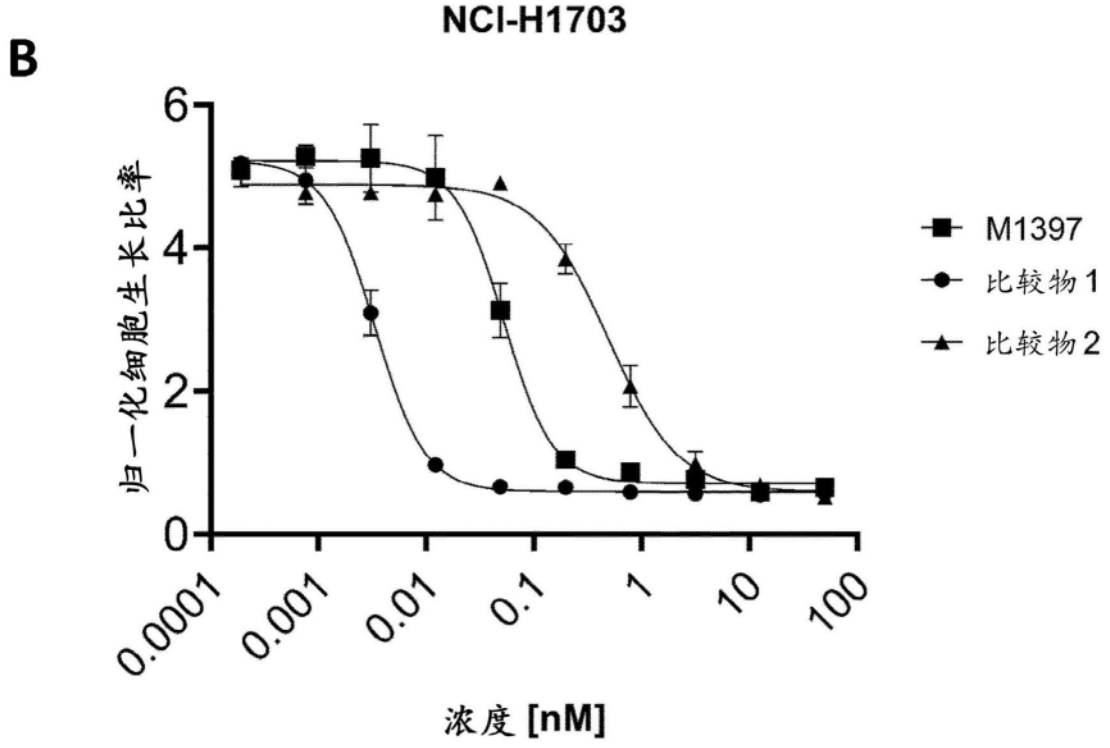

B
NCI-H1703
归一化细胞生长比率
浓度 [nM]
M1397
比较物1
比较物2

图9B

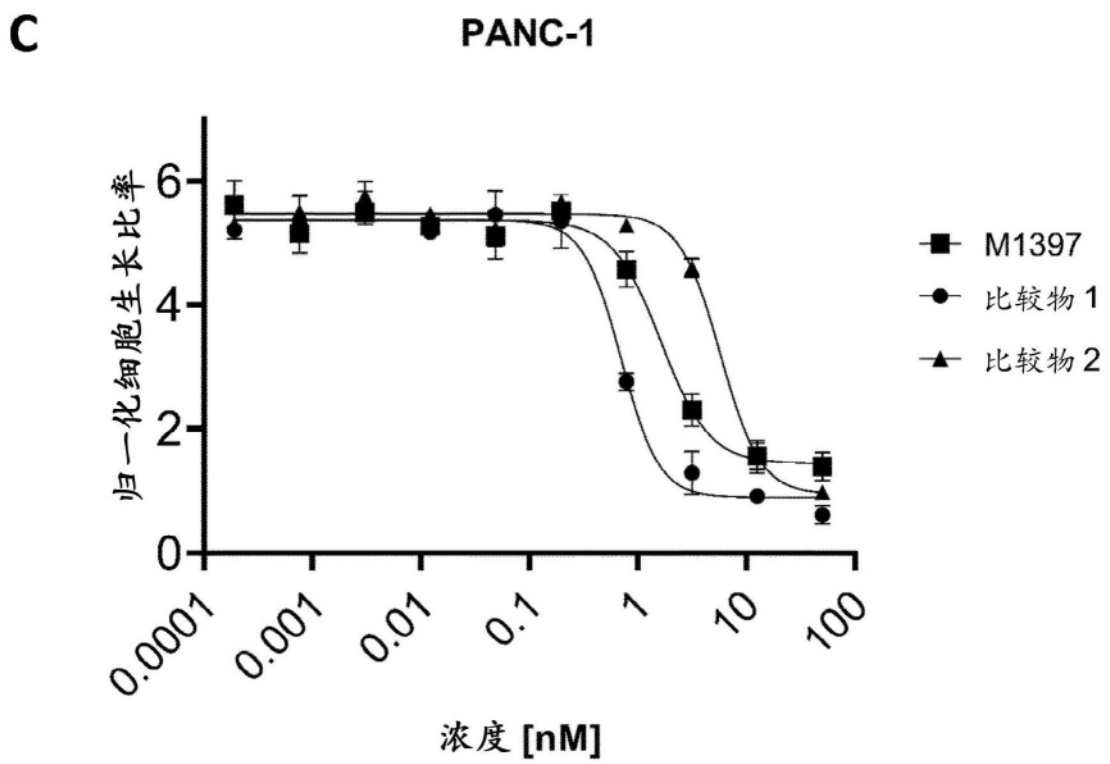

C
PANC-1
归一化细胞生长比率
0
2
4
6
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度 [nM]
M1397
比较物 1
比较物 2

图9C

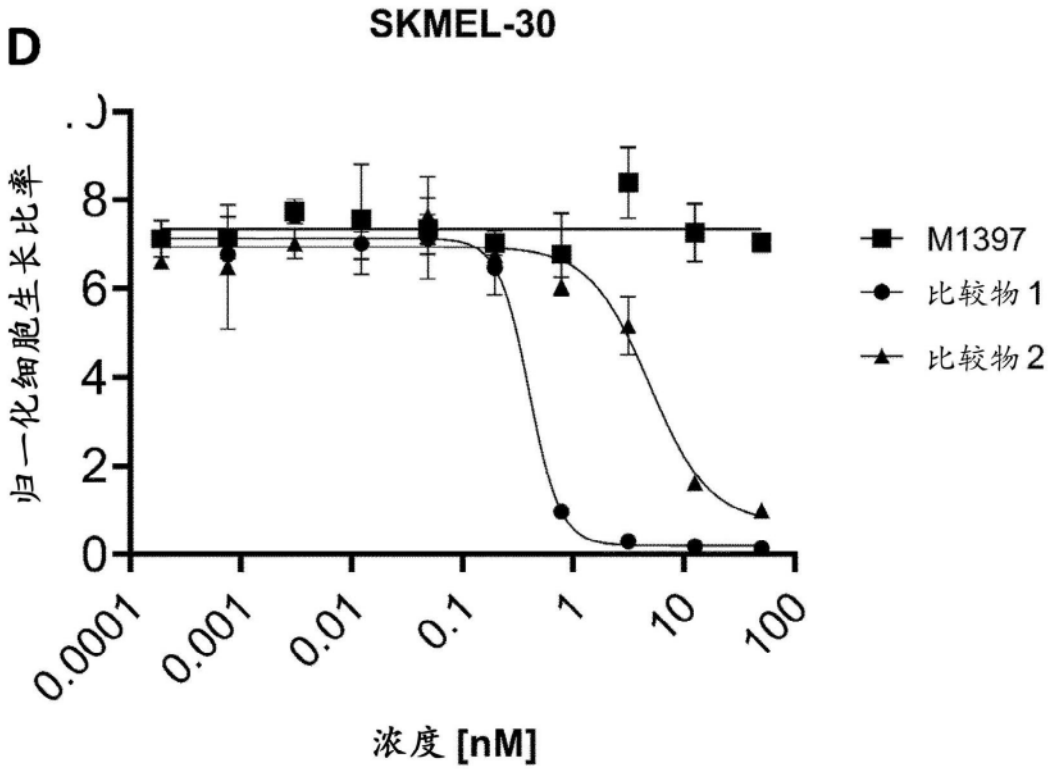

D
SKMEL-30
归一化细胞生长比率
0
2
4
6
8
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度 [nM]
M1397
比较物 1
比较物 2

图9D

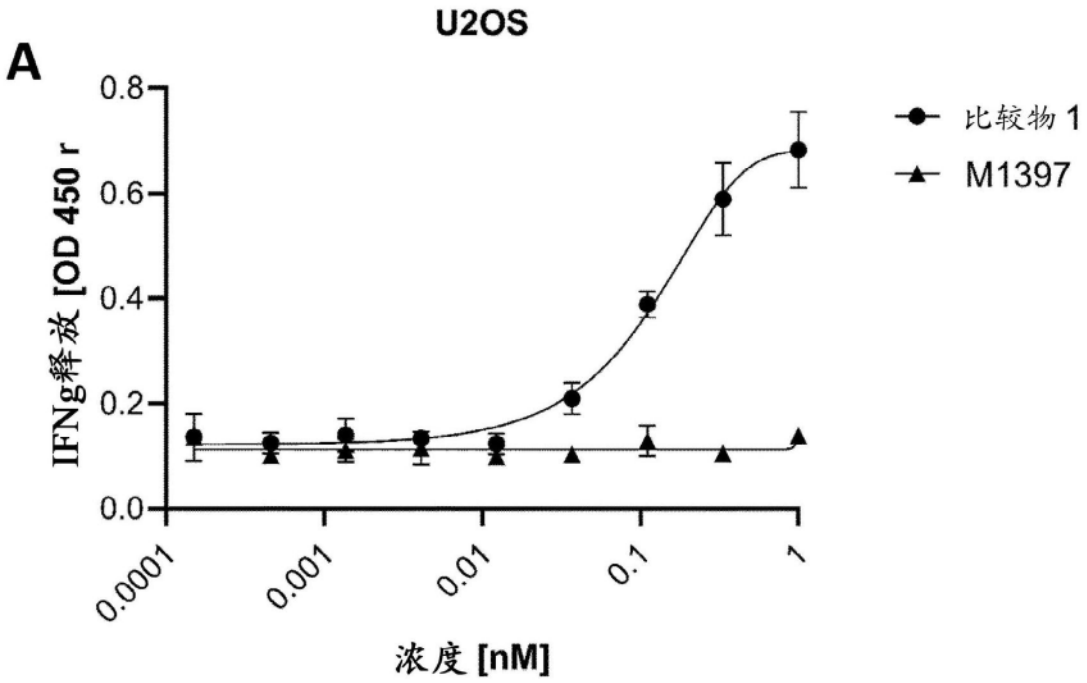

U2OS
A
IFNg释放 [OD 450 r
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
浓度 [nM]
比较物 1
M1397

图10A

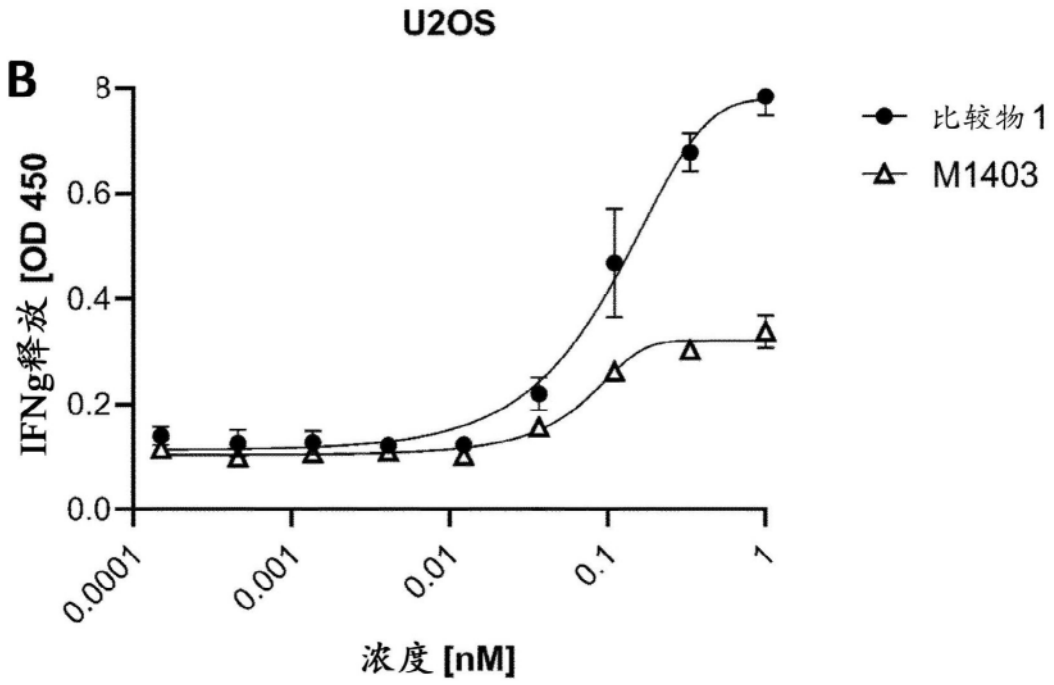

U2OS
B
IFNg释放 [OD 450
8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
浓度 [nM]
比较物 1
M1403

图10B

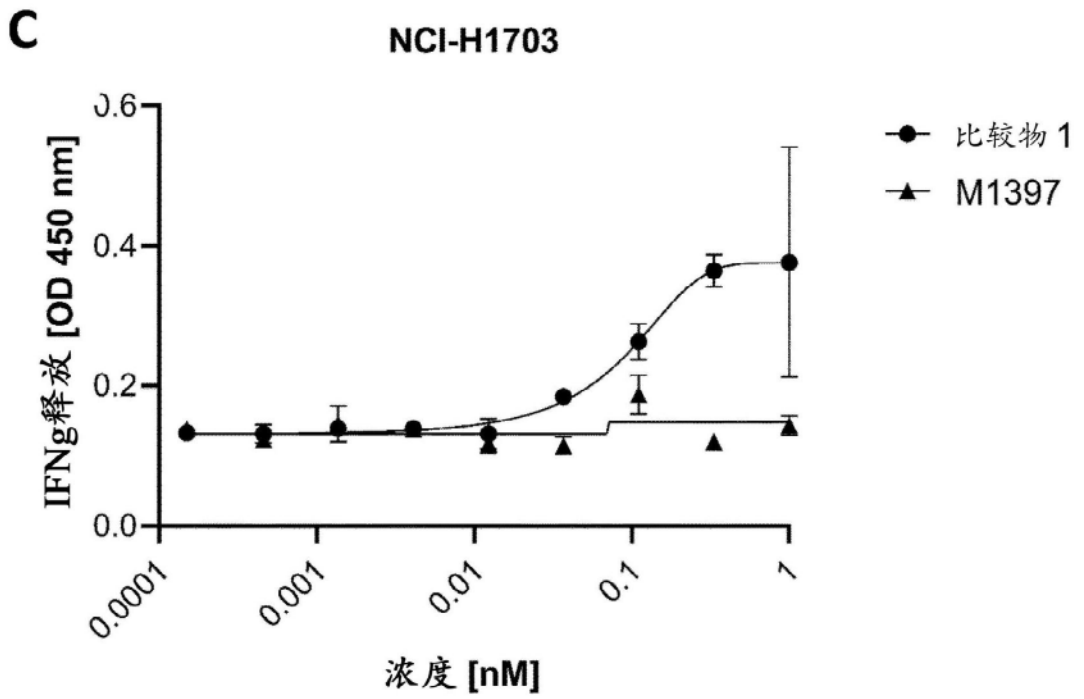

C
NCI-H1703
IFNg释放 [OD 450 nm]
0.6
0.4
0.2
0.0
0.0001
0.001
0.01
0.1
浓度 [nM]
比较物 1
M1397

图10C

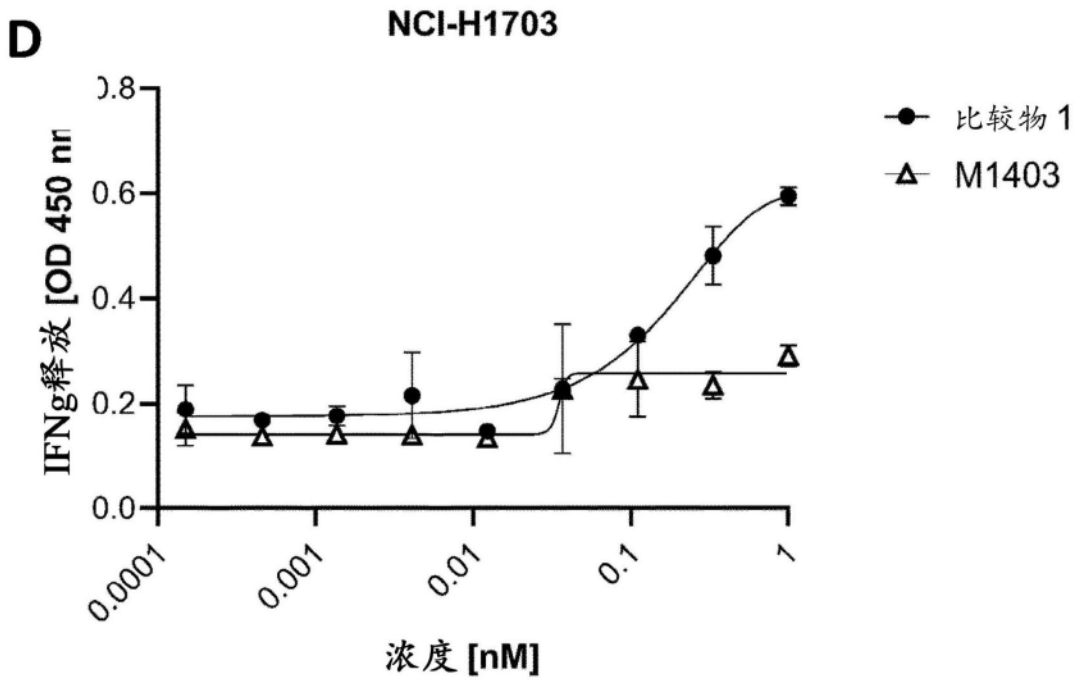

D
NCI-H1703
IFNg释放 [OD 450 nm]
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.0001
0.001
0.01
0.1
浓度 [nM]
比较物 1
M1403

图10D

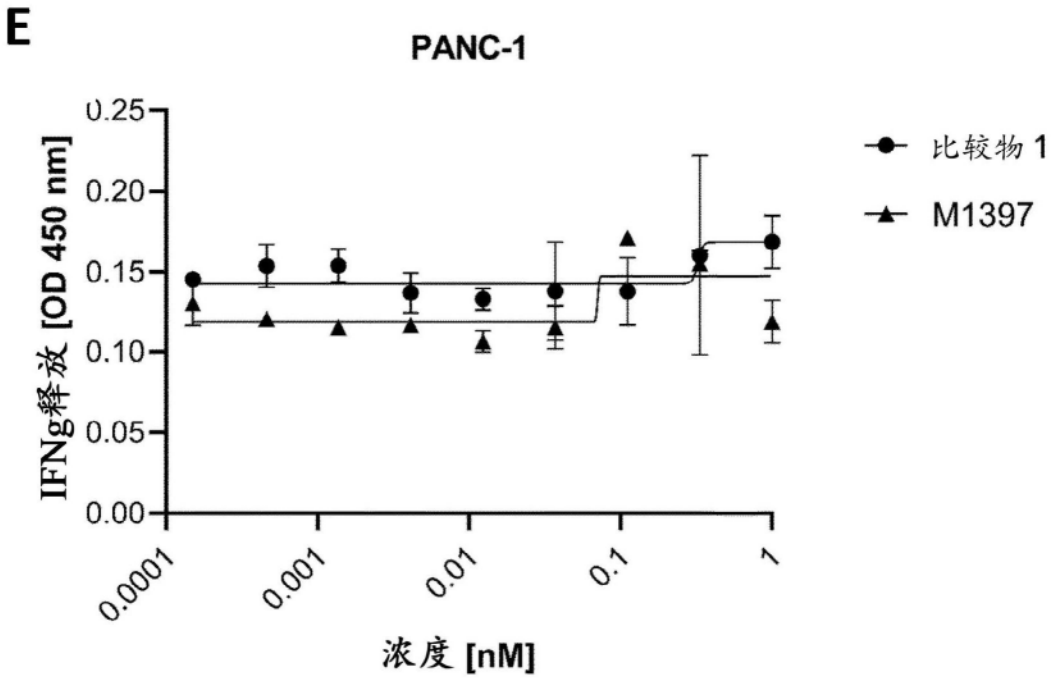

E
PANC-1
IFNg释放 [OD 450 nm]
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
浓度 [nM]
比较物 1
M1397

图10E

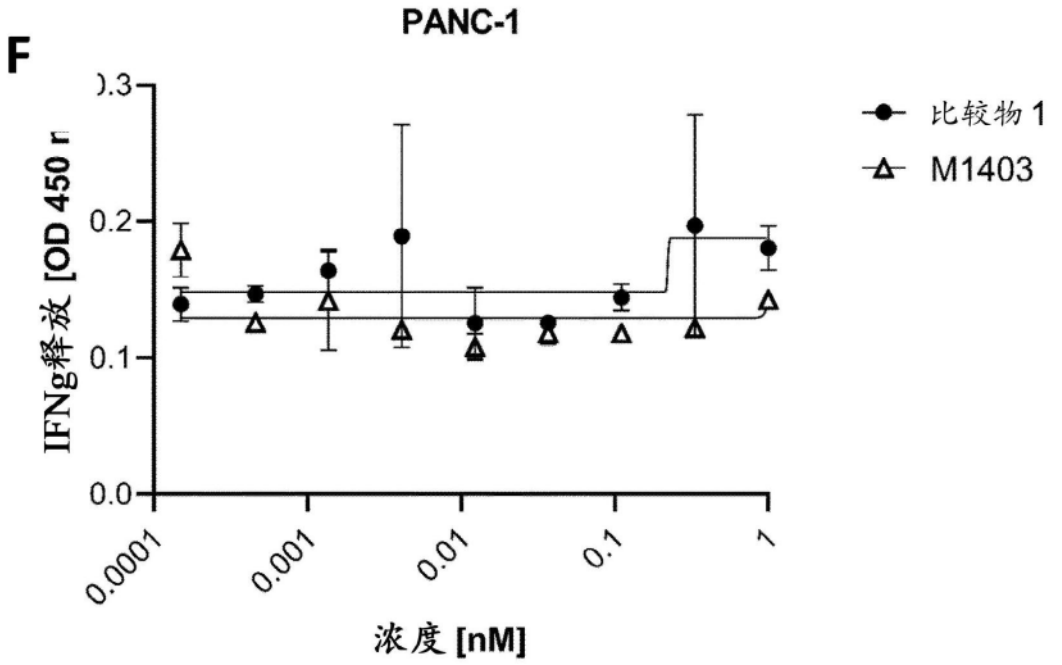

F
PANC-1
IFNg释放 [OD 450 r
0.3
0.2
0.1
0.0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
浓度 [nM]
比较物 1
M1403

图10F

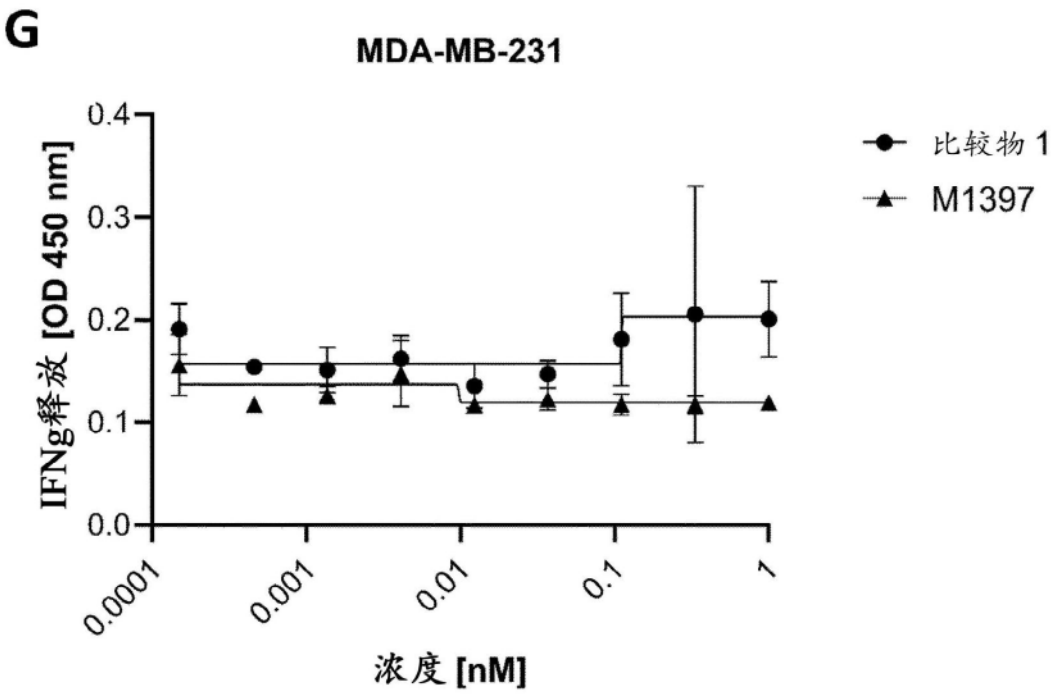

G
MDA-MB-231
IFNg释放 [OD 450 nm]
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
浓度 [nM]
比较物 1
M1397

图10G

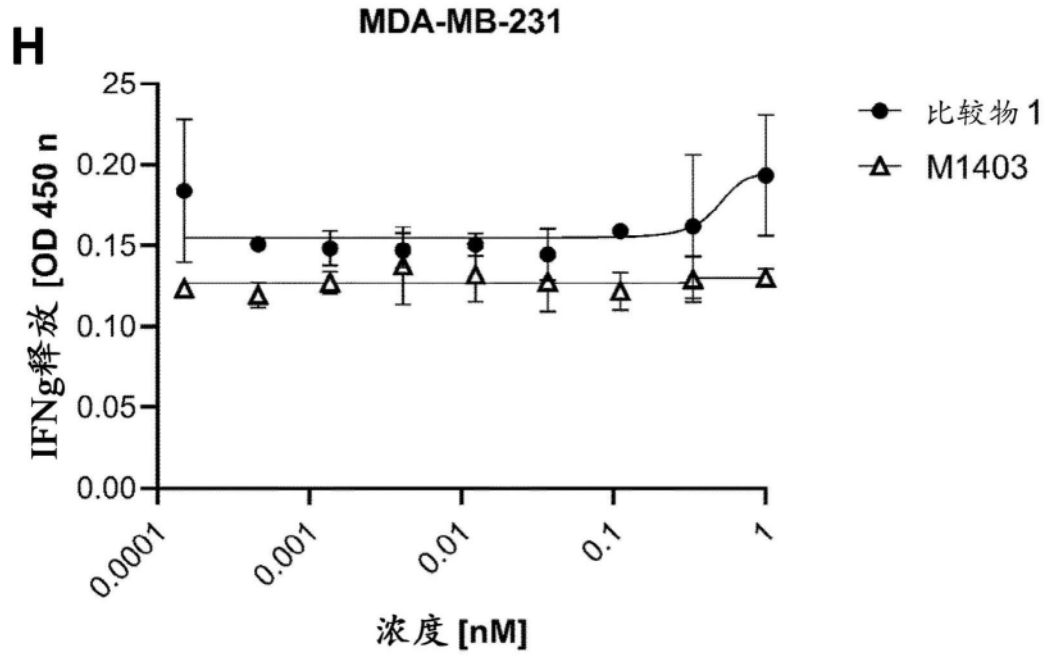

H
MDA-MB-231
IFNg释放 [OD 450 n
25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
浓度 [nM]
比较物 1
M1403

图10H

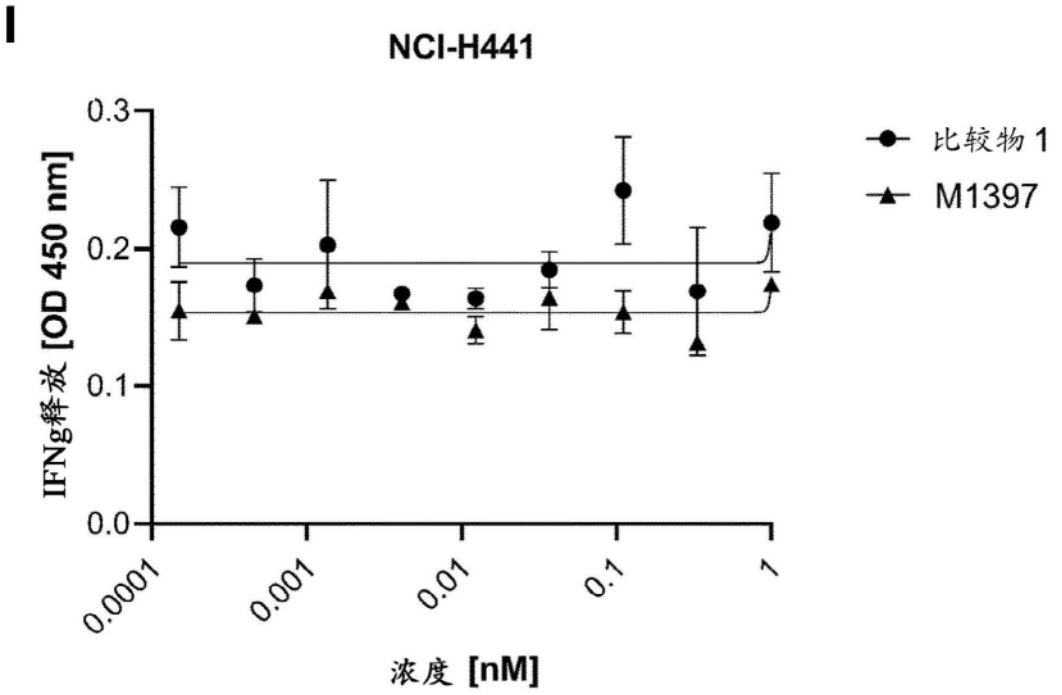

I
NCI-H441
IFNg释放 [OD 450 nm]
0.3
0.2
0.1
0.0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
浓度 [nM]
比较物 1
M1397

图10I

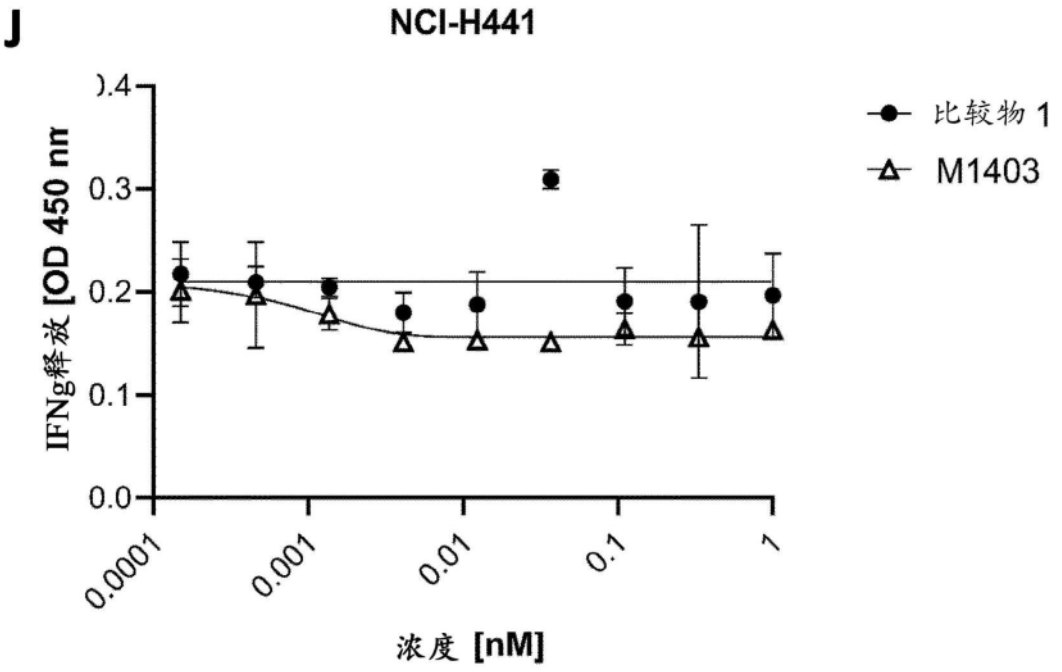

J
NCI-H441
IFNg释放 [OD 450 nm]
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
浓度 [nM]
比较物 1
M1403

图10J

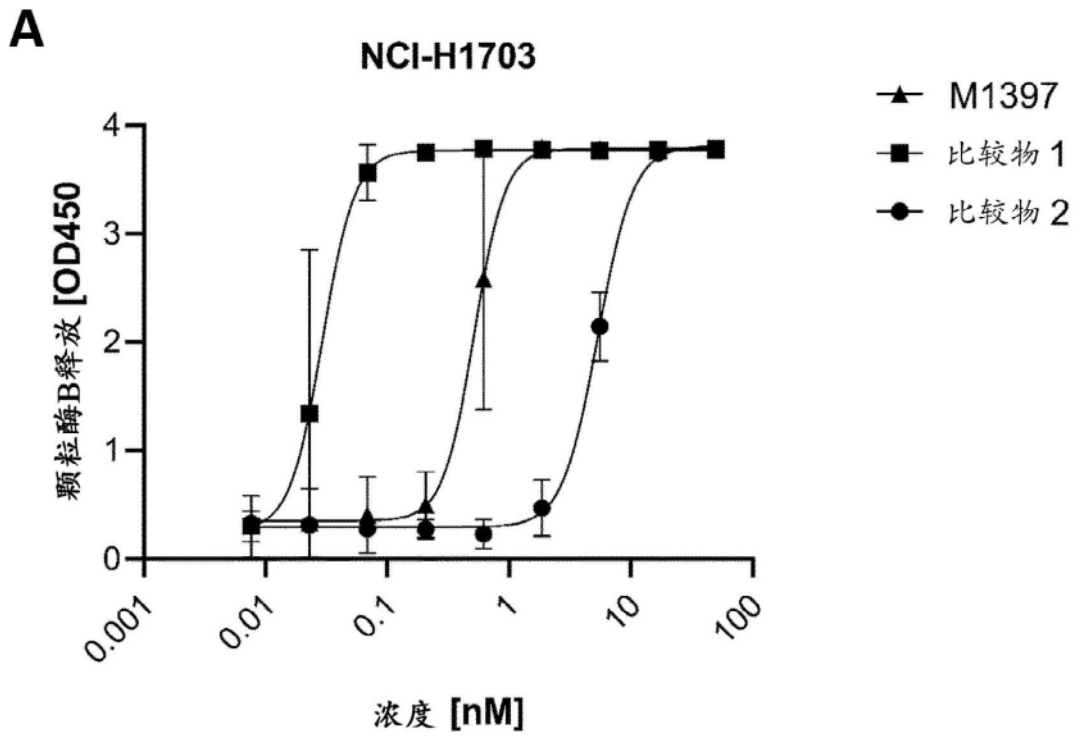

A
NCI-H1703
M1397
比较物 1
比较物 2
颗粒酶B释放 [OD450
0
1
2
3
4
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度 [nM]

图11A

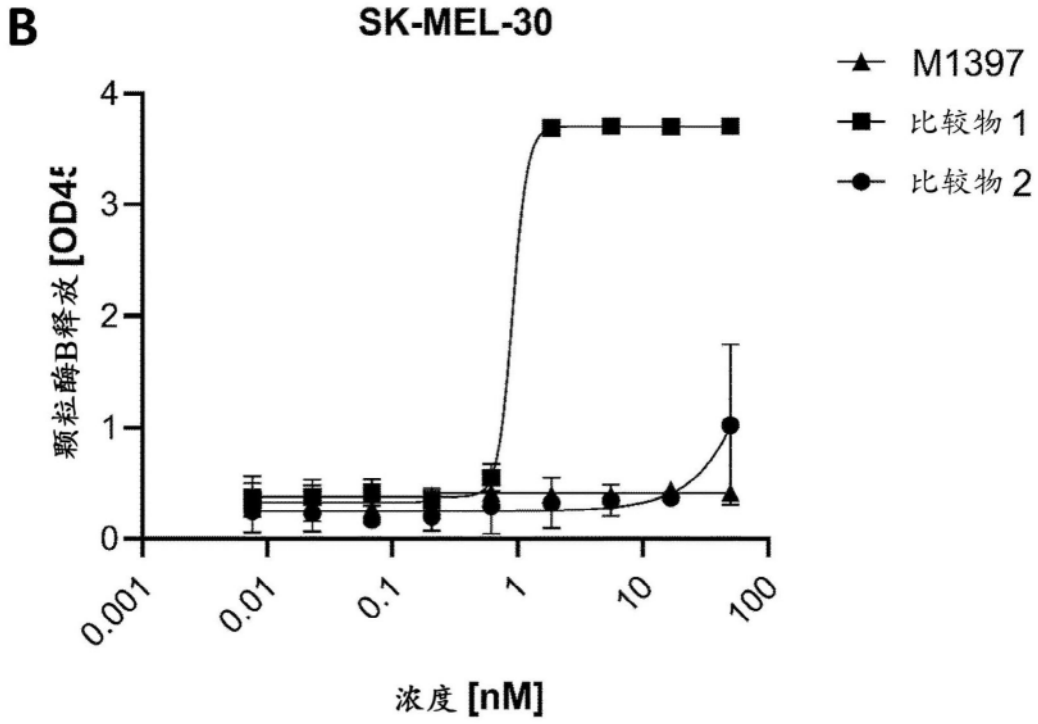

B
SK-MEL-30
M1397
比较物 1
比较物 2
颗粒酶B释放 [OD4
0
1
2
3
4
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度 [nM]

图11B

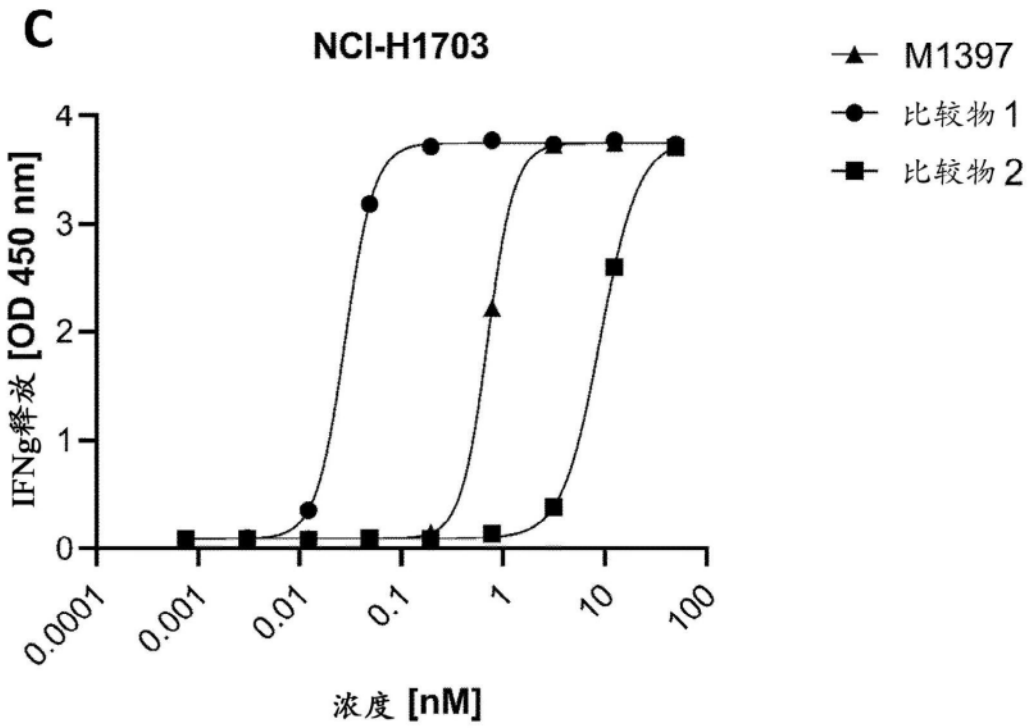

C
NCI-H1703
M1397
比较物 1
比较物 2
IFNg释放 [OD 450 nm]
0
1
2
3
4
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度 [nM]

图11C

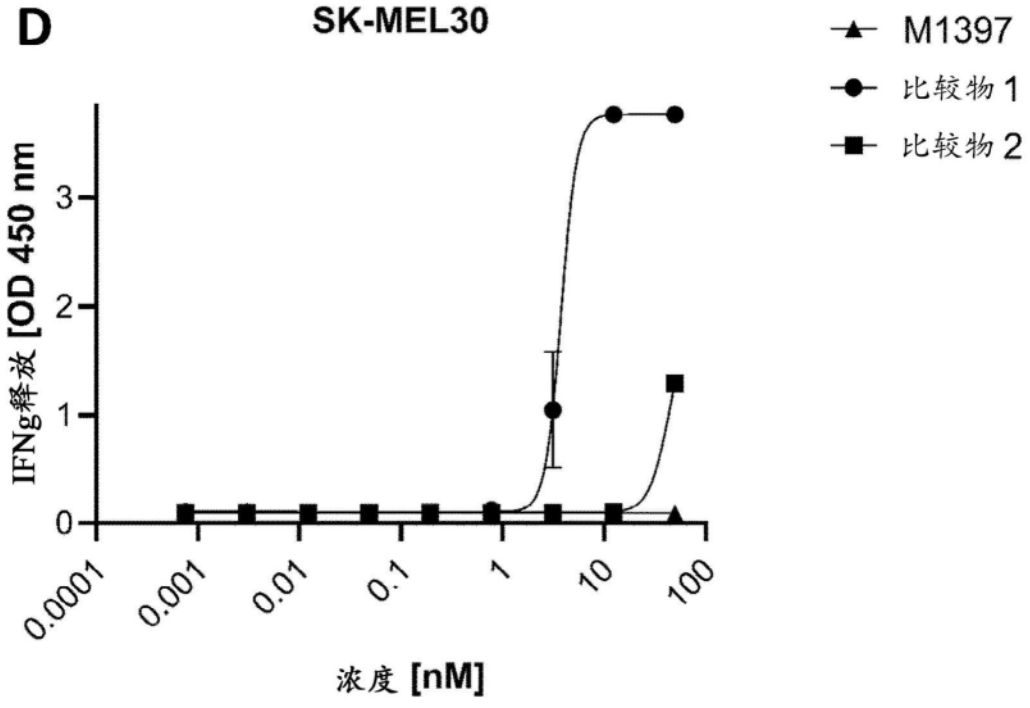

D
SK-MEL30
M1397
比较物 1
比较物 2
IFNg释放 [OD 450 nm]
0
1
2
3
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度 [nM]

图11D

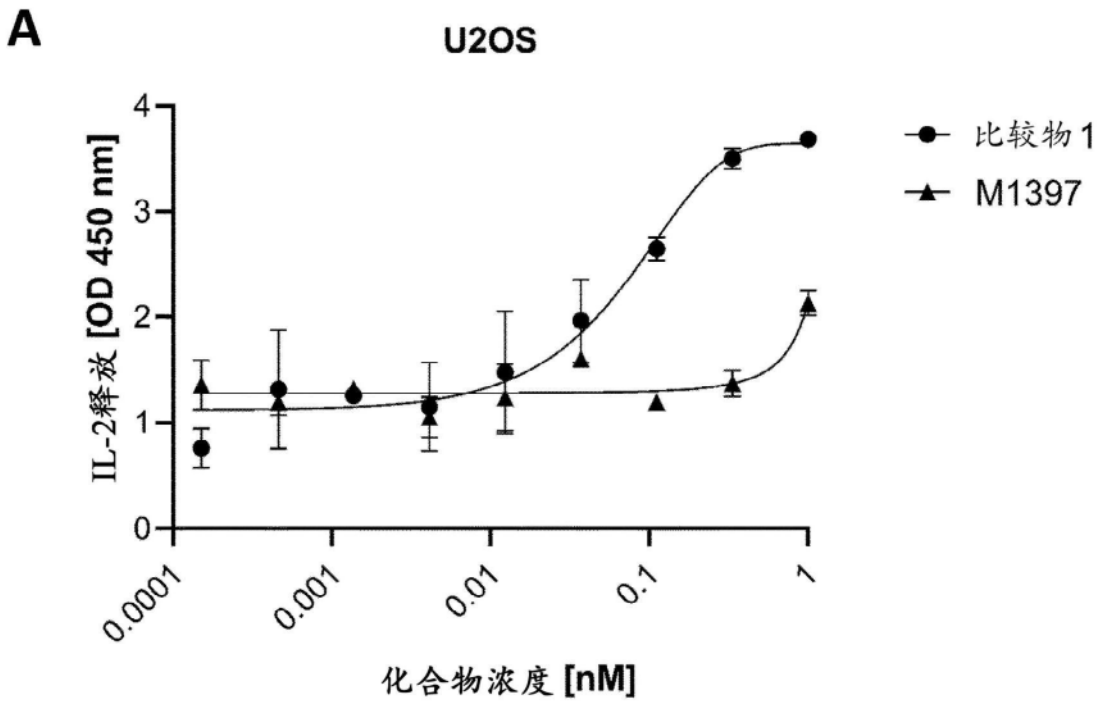

A
U2OS
IL-2释放 [OD 450 nm]
0
1
2
3
4
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
化合物浓度 [nM]
比较物1
M1397

图12A

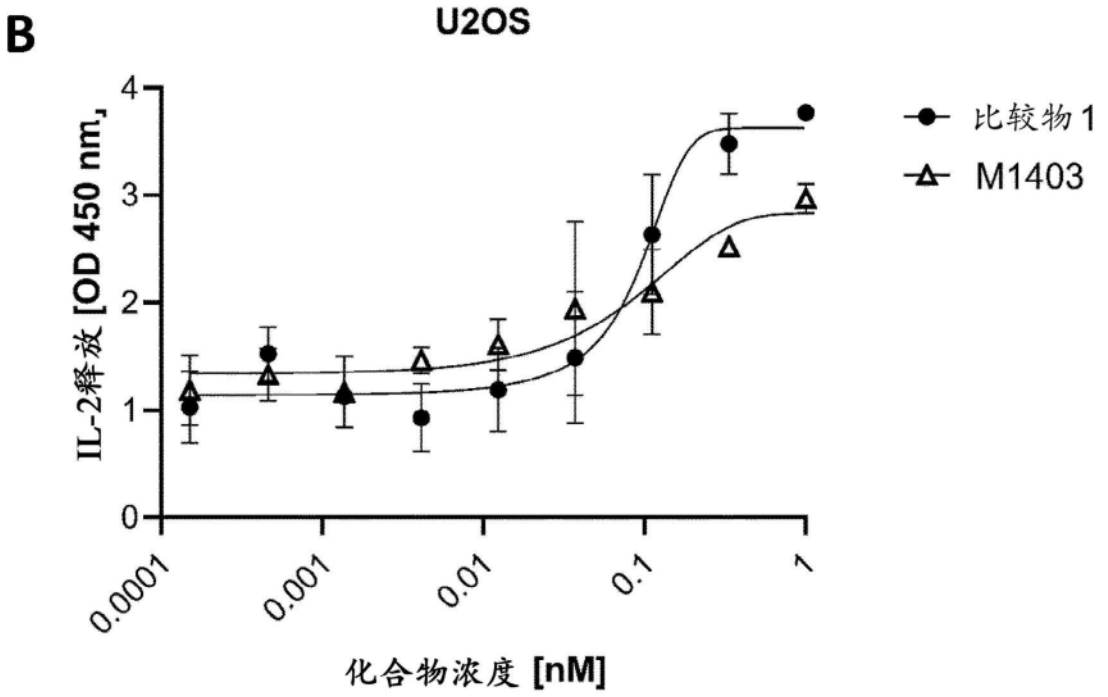

B
U2OS
IL-2释放 [OD 450 nm,
0
1
2
3
4
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
化合物浓度 [nM]
比较物1
M1403

图12B

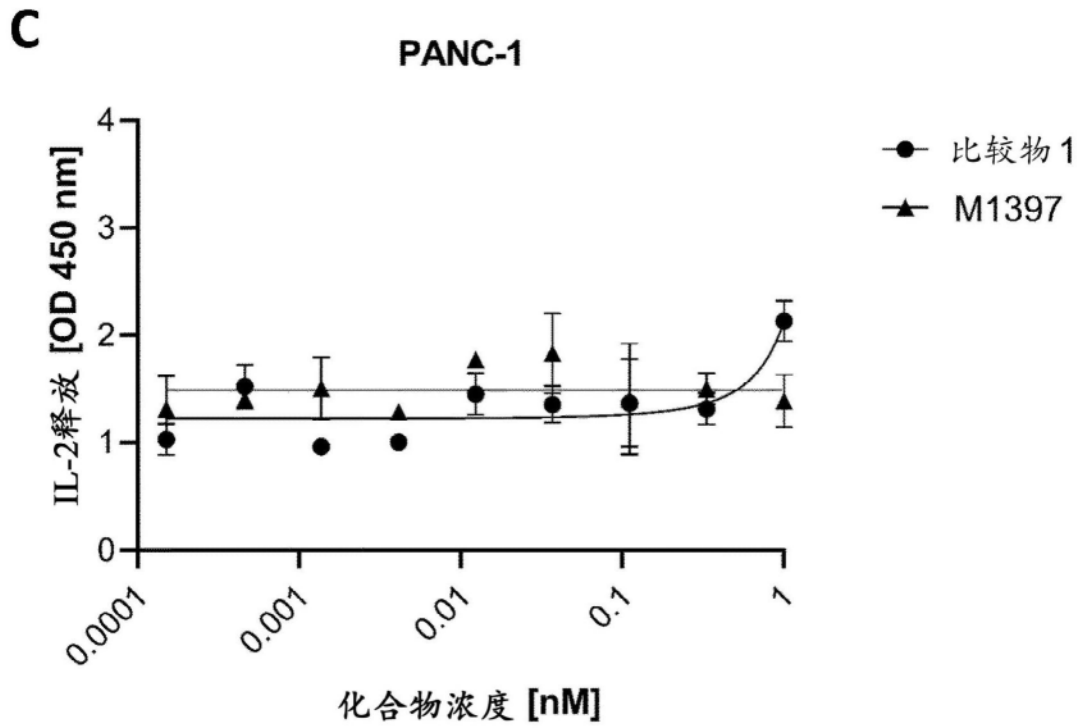

C
PANC-1
IL-2释放 [OD 450 nm]
0
1
2
3
4
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
化合物浓度 [nM]
比较物 1
M1397

图12C

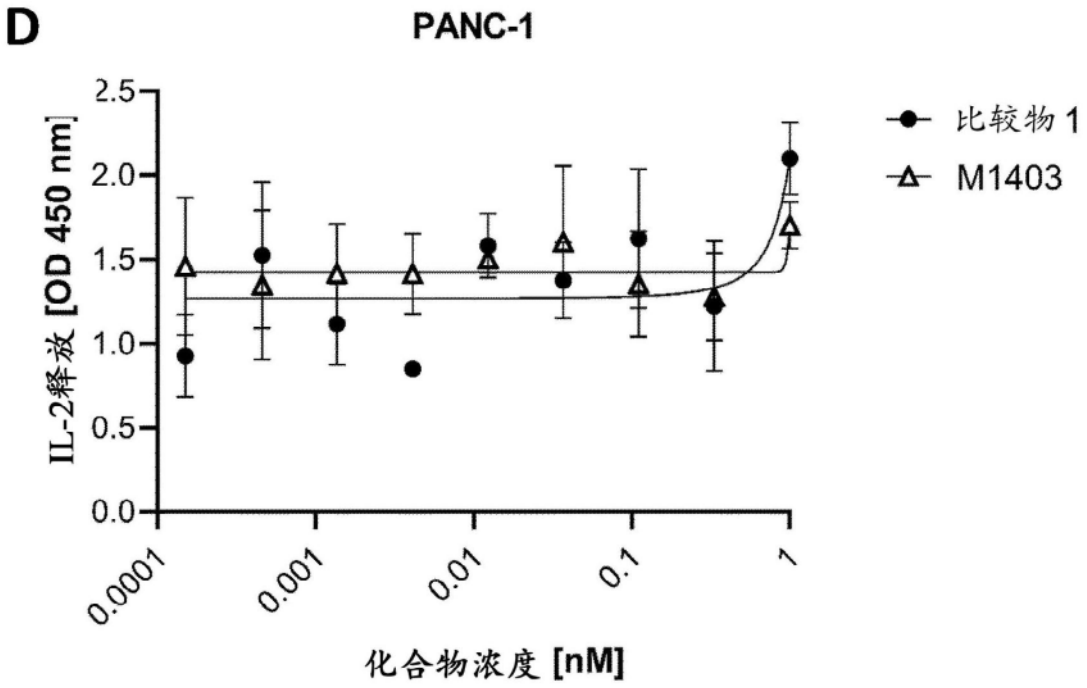

D
PANC-1
IL-2释放 [OD 450 nm]
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
化合物浓度 [nM]
比较物 1
M1403

图12D

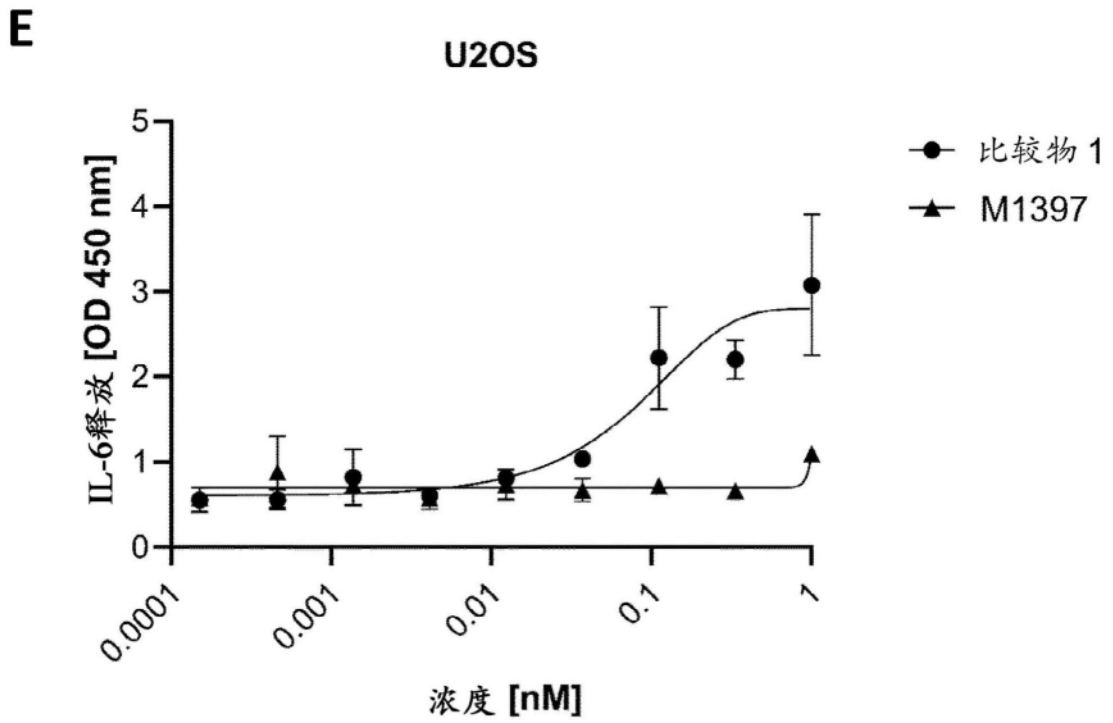

E
U2OS
IL-6释放 [OD 450 nm]
浓度 [nM]
比较物 1
M1397

图12E

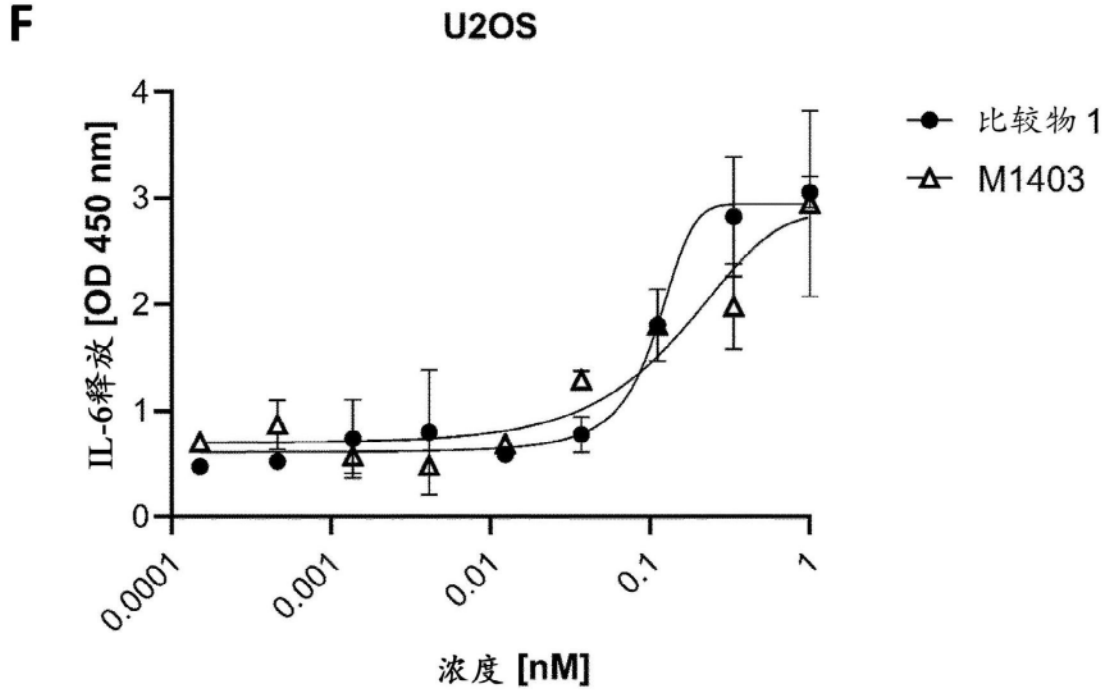

F
U2OS
IL-6释放 [OD 450 nm]
浓度 [nM]
比较物 1
M1403

图12F

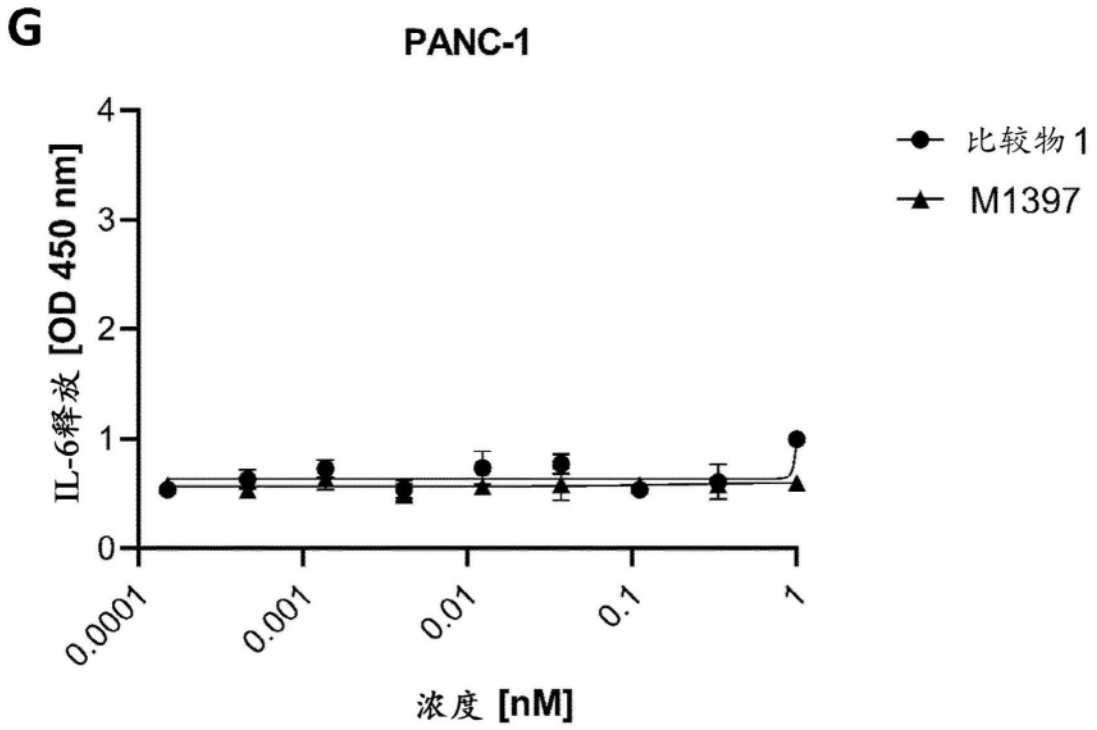

G
PANC-1
比较物1
M1397
IL-6释放 [OD 450 nm]
4
3
2
1
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
浓度 [nM]

图12G

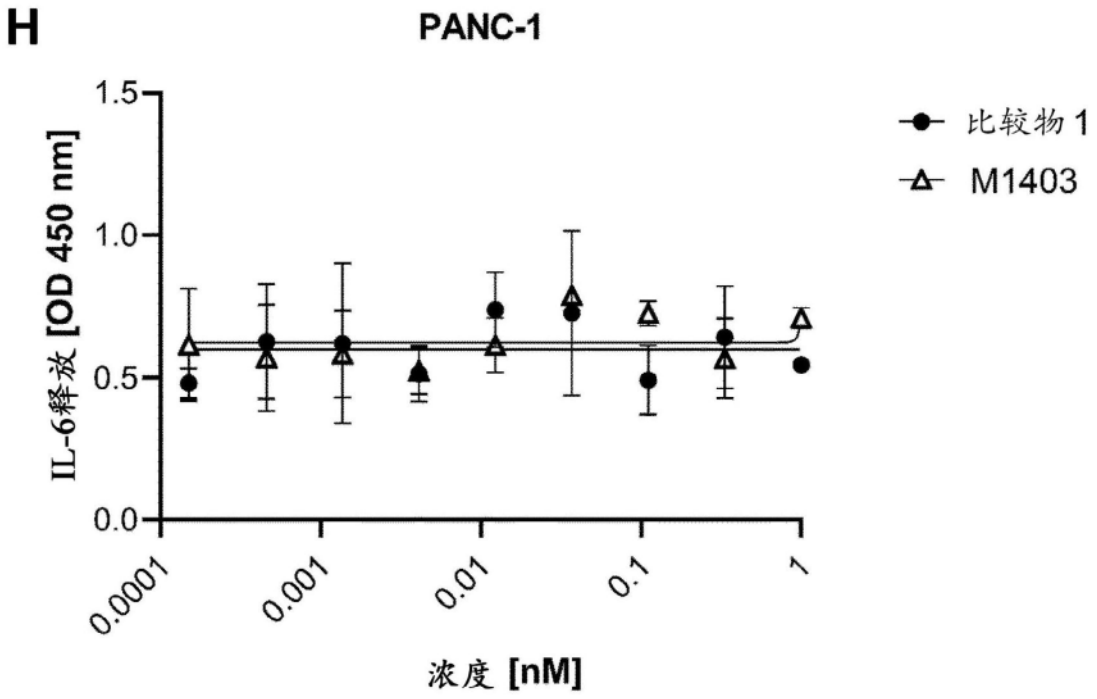

H
PANC-1
比较物1
M1403
IL-6释放 [OD 450 nm]
1.5
1.0
0.5
0.0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
浓度 [nM]

图12H

I

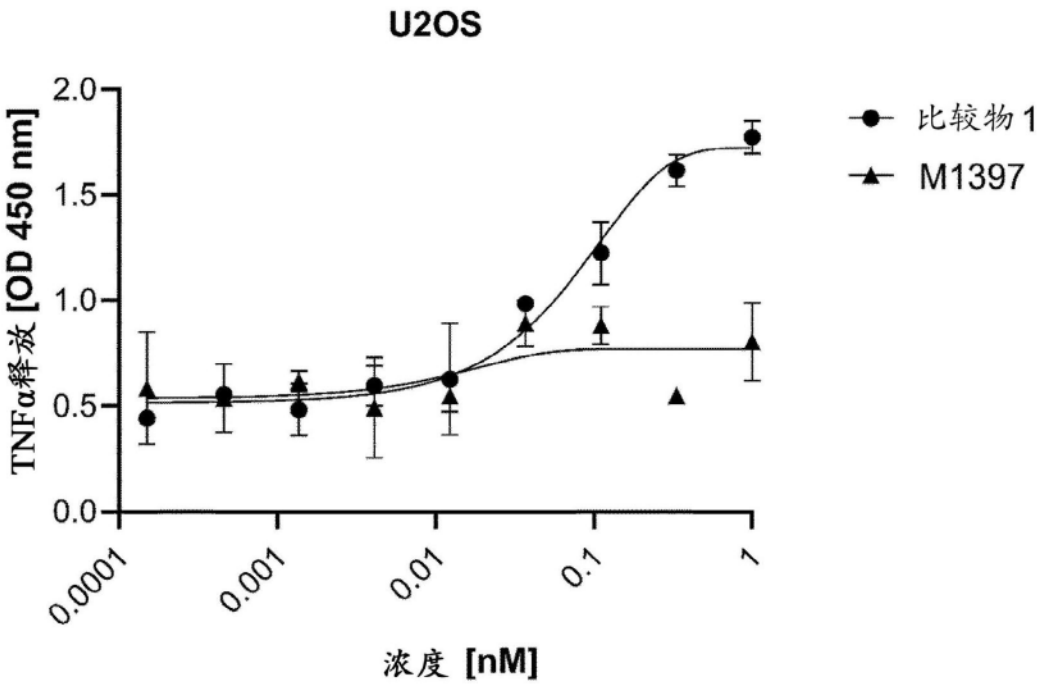

U2OS
TNFα释放 [OD 450 nm]
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
浓度 [nM]
比较物1
M1397

图12I

J

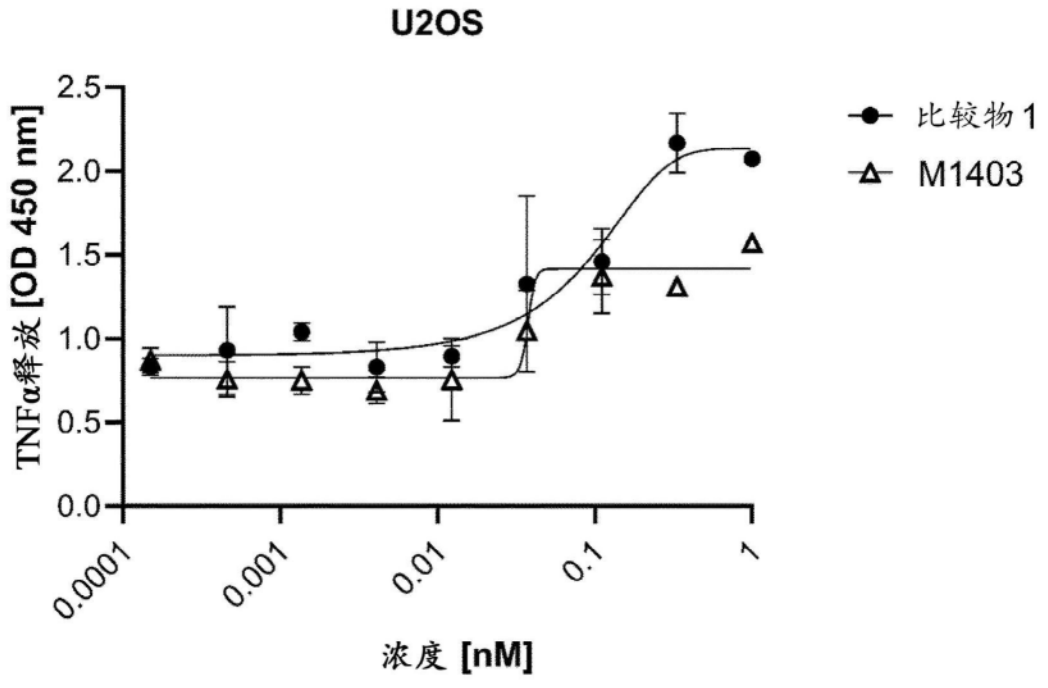

U2OS
TNFα释放 [OD 450 nm]
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
浓度 [nM]
比较物1
M1403

图12J

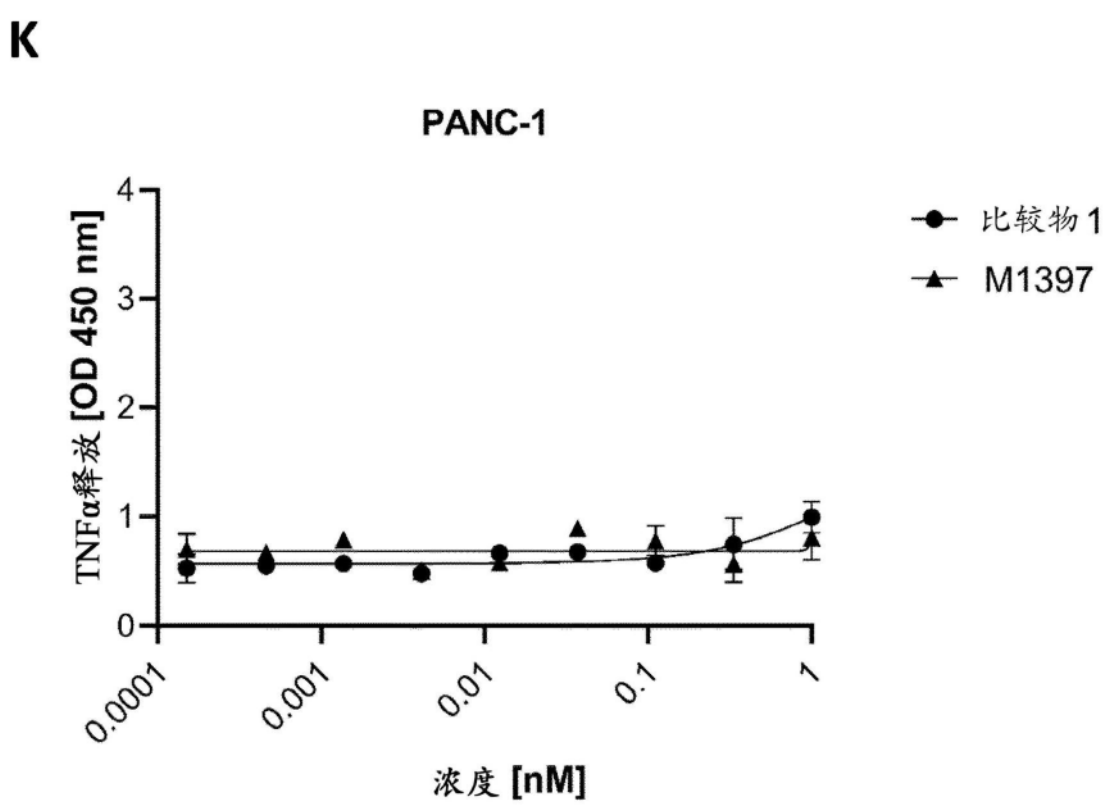

K
PANC-1
TNFα释放 [OD 450 nm]
4
3
2
1
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
浓度 [nM]
比较物1
M1397

图12K

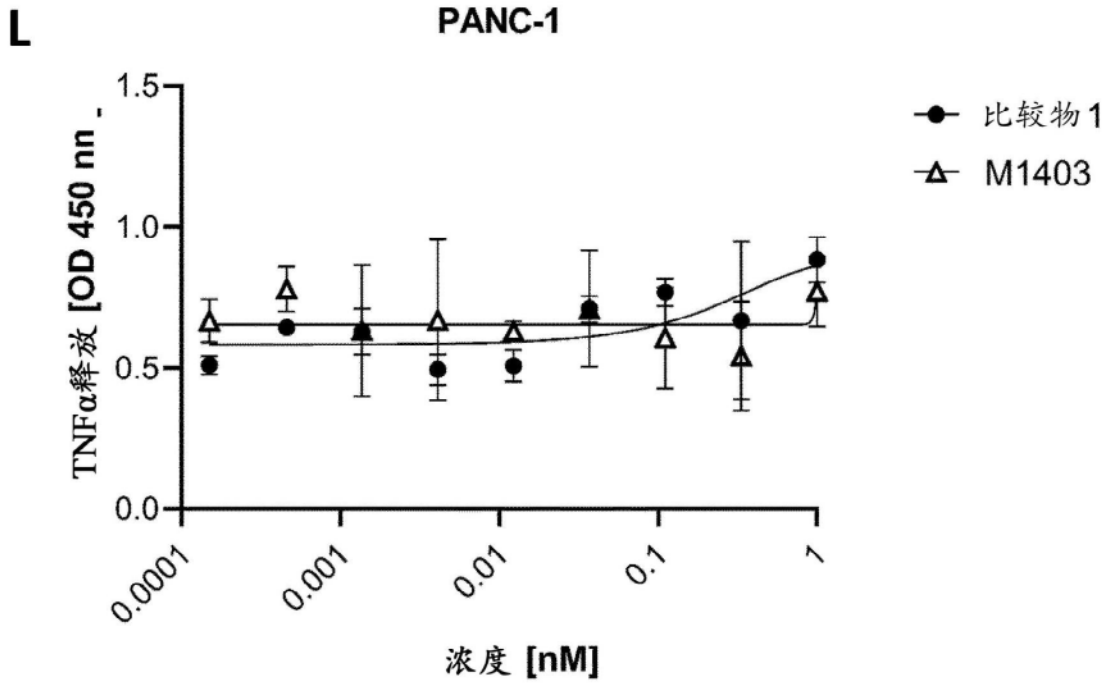

L
PANC-1
TNFα释放 [OD 450 nm]
1.5
1.0
0.5
0.0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
浓度 [nM]
比较物1
M1403

图12L

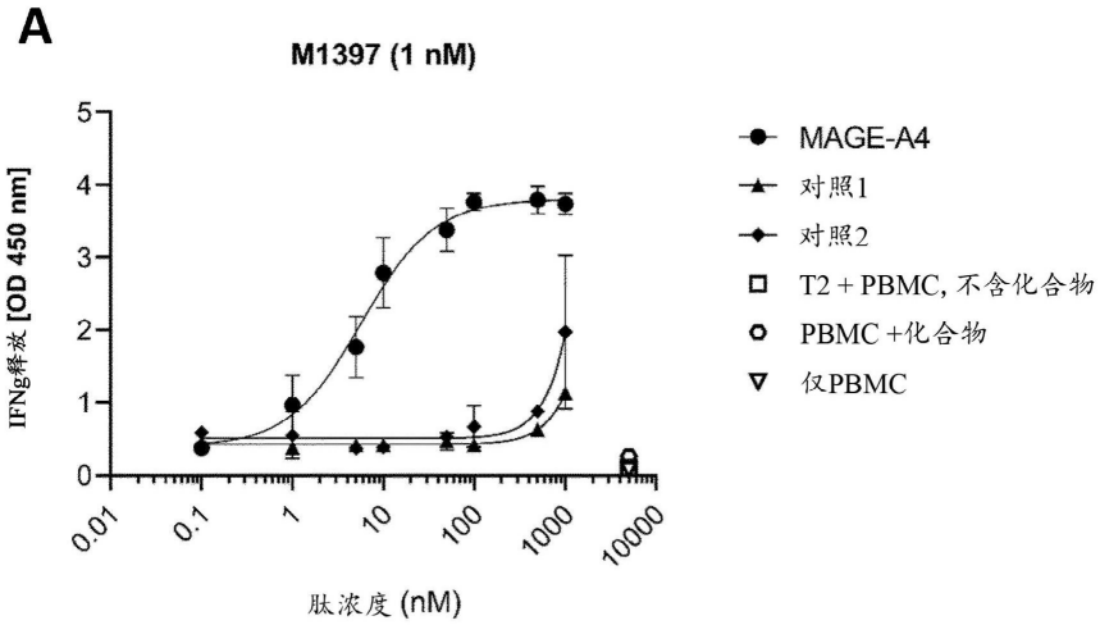

A
M1397 (1 nM)
IFNg释放 [OD 450 nm]
0
1
2
3
4
5
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
肽浓度 (nM)
MAGE-A4
对照1
对照2
T2 + PBMC, 不含化合物
PBMC +化合物
仅PBMC

图13A

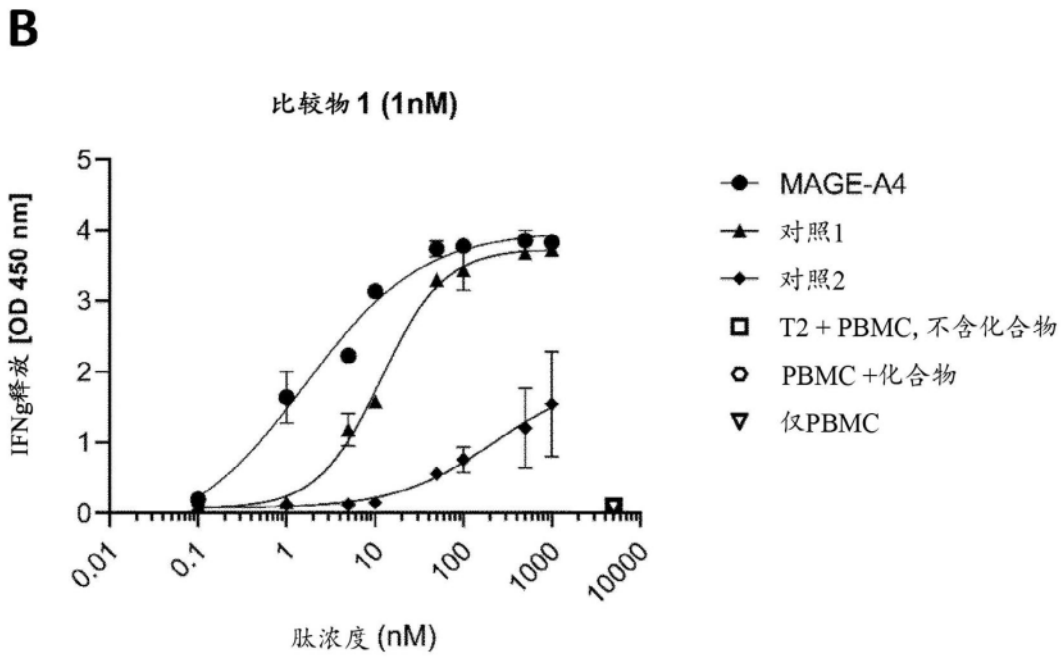

B
比较物 1 (1nM)
IFNg释放 [OD 450 nm]
0
1
2
3
4
5
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
肽浓度 (nM)
MAGE-A4
对照1
对照2
T2 + PBMC, 不含化合物
PBMC +化合物
仅PBMC

图13B

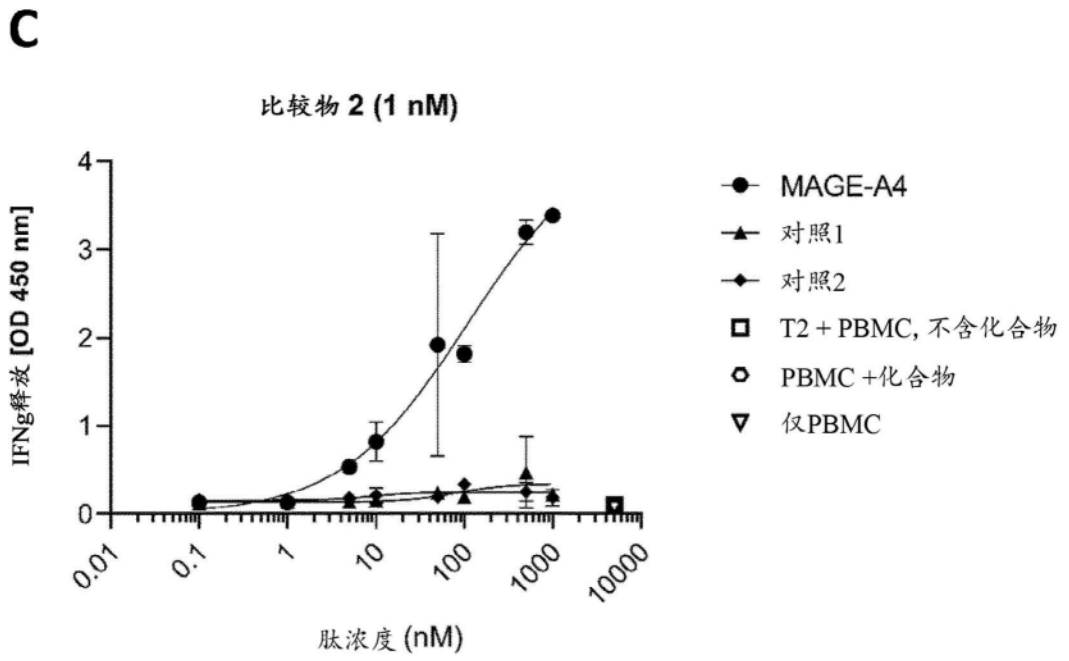


图13C

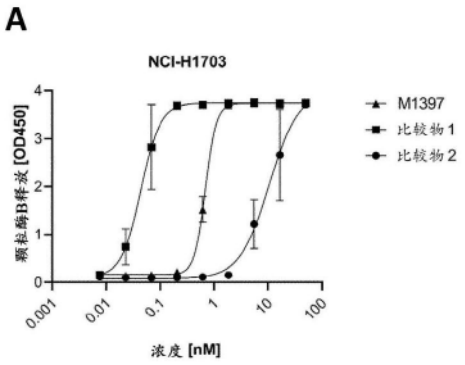


图14A

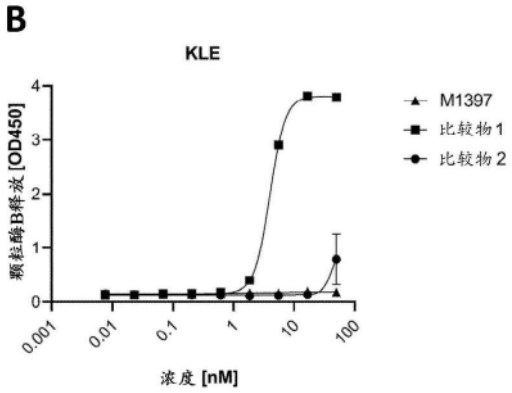


图14B

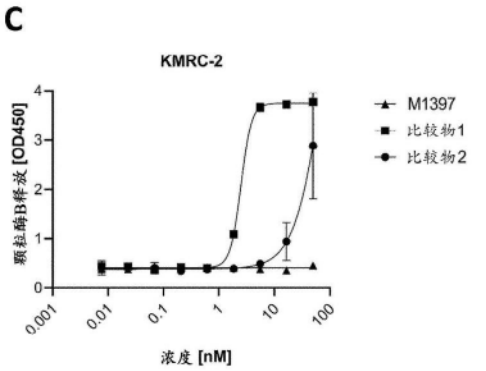


图14C

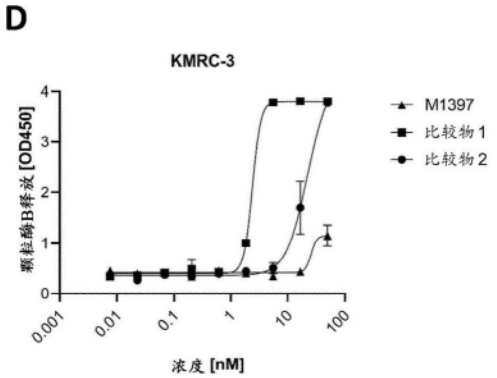


图14D

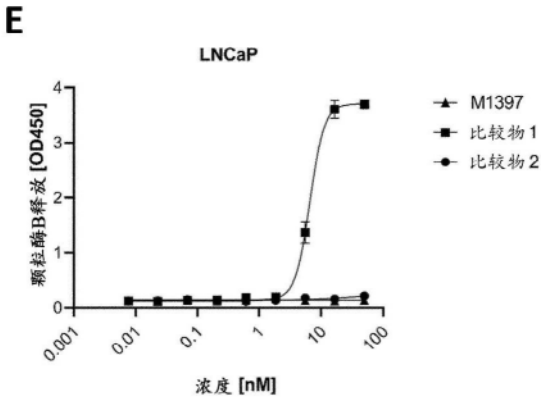


图14E

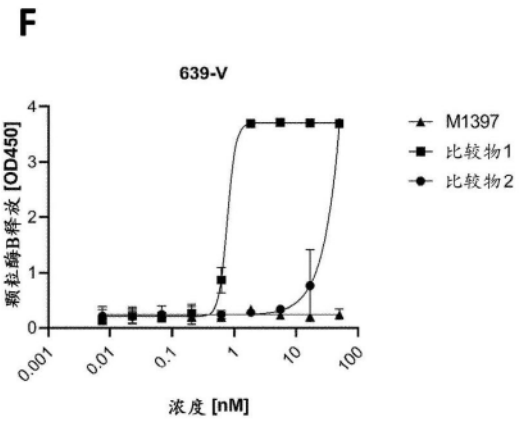


图14F

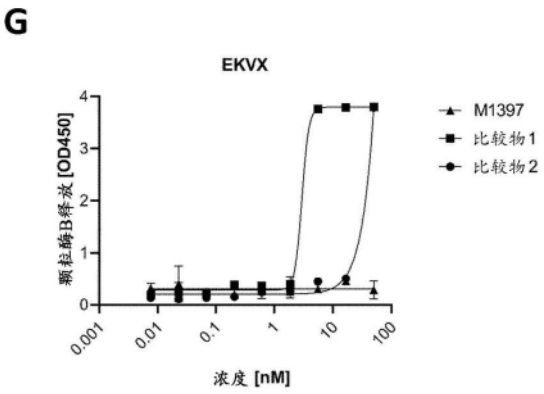


图14G

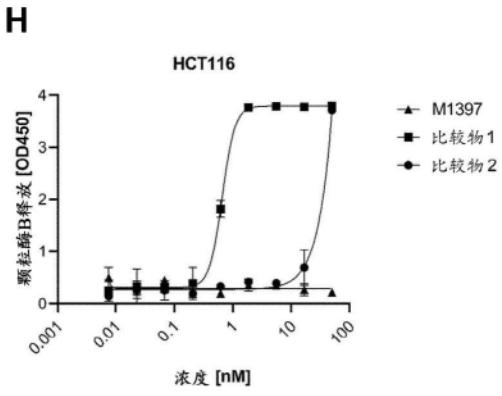


图14H

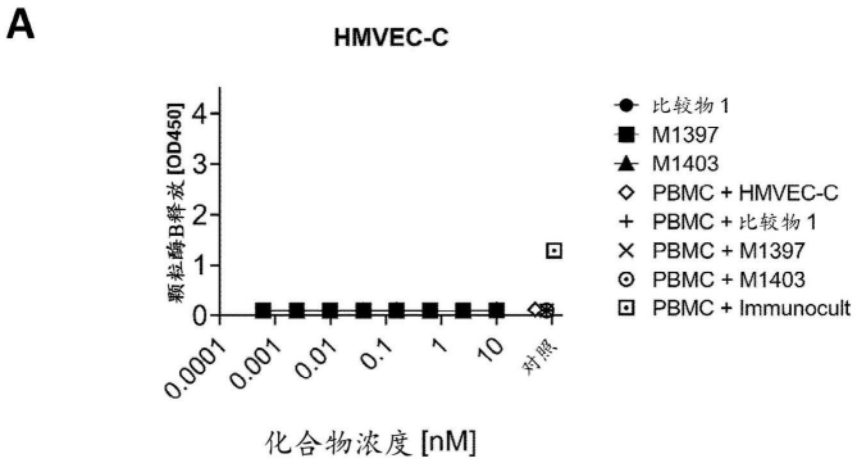


图15A

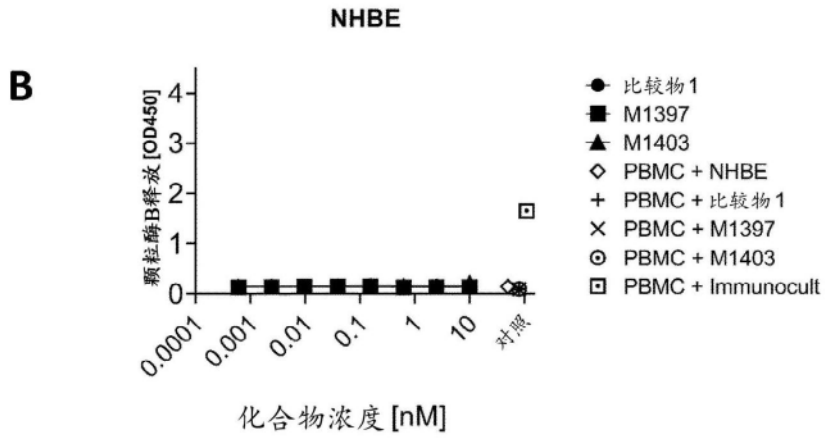


图15B

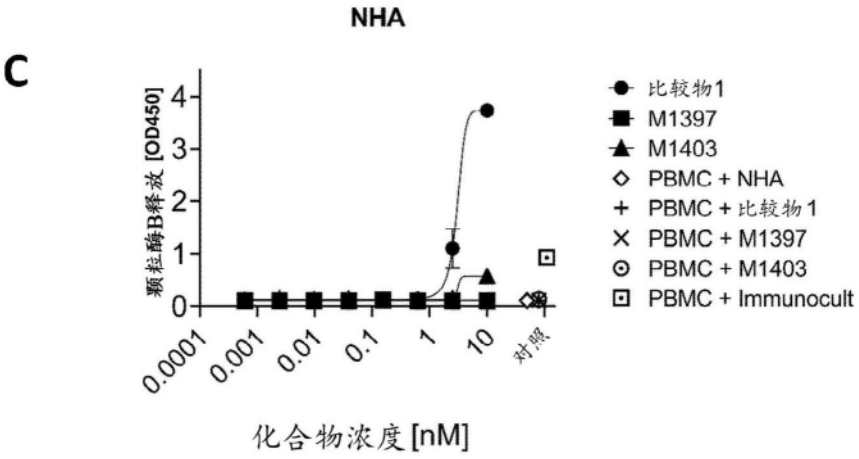


图15C

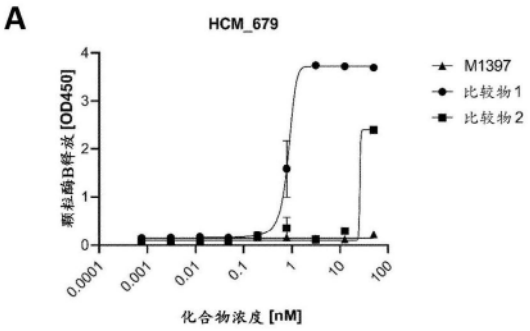


图16A

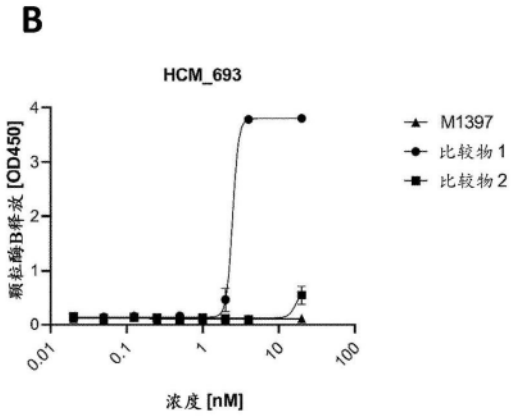


图16B

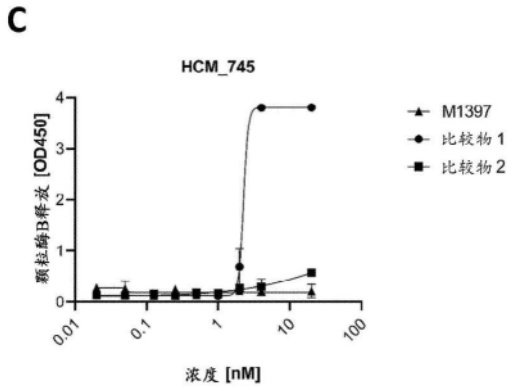


图16C

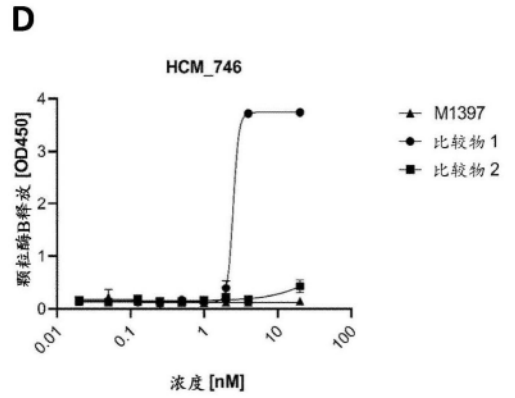


图16D

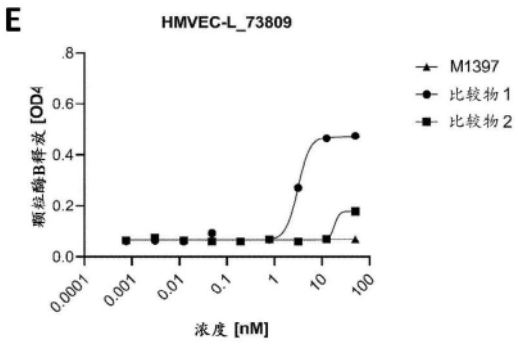


图16E

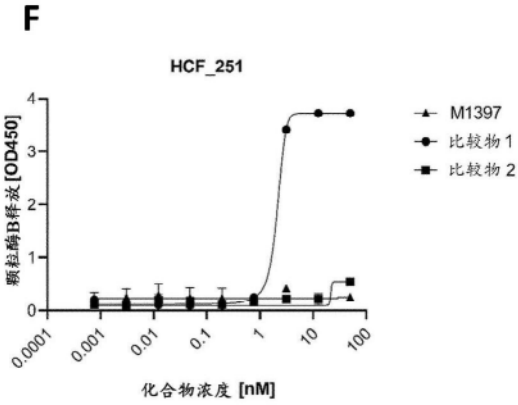


图16F

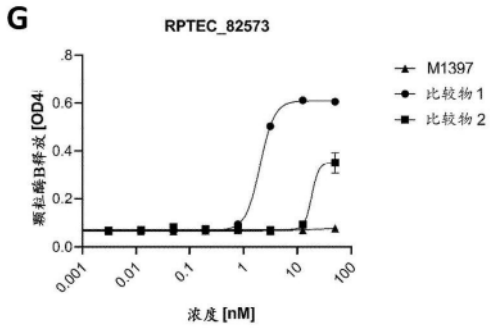


图16G

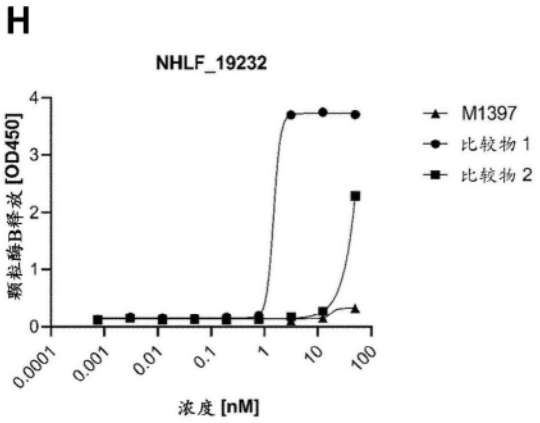


图16H

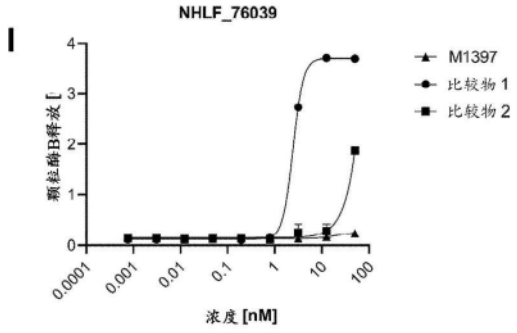


图16I

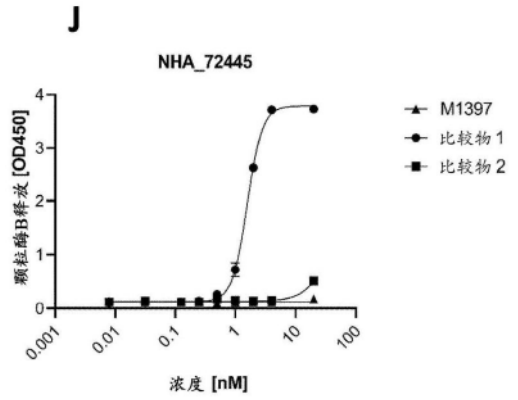


图16J

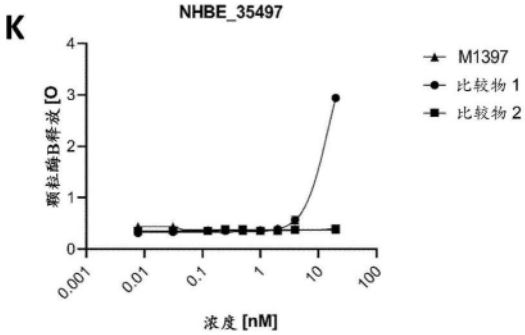


图16K

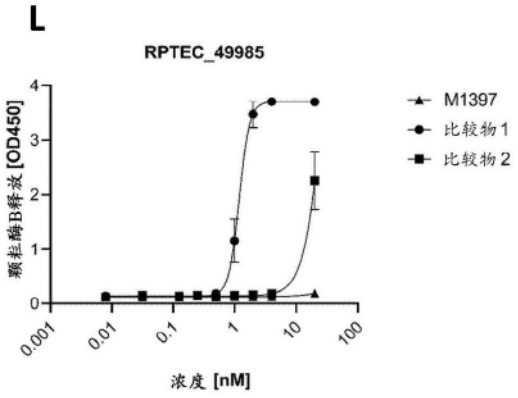


图16L

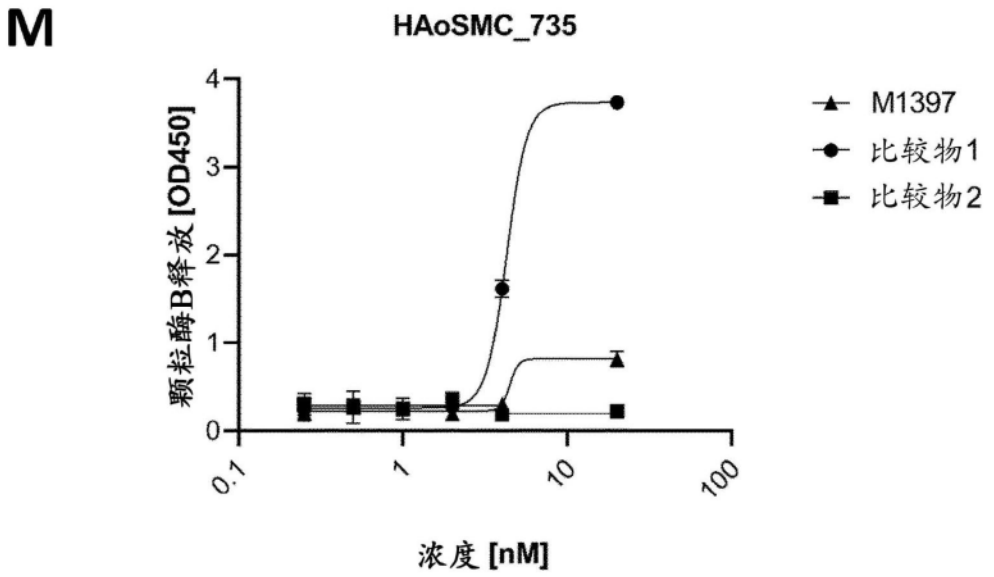

M
HAoSMC_735
颗粒酶B释放 [OD450]
浓度 [nM]
M1397
比较物1
比较物2

图16M

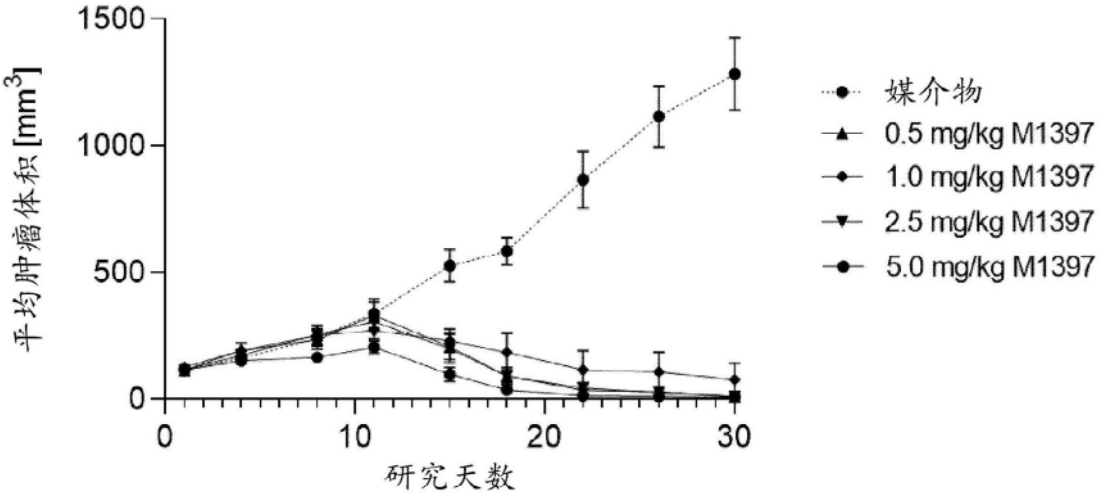

平均肿瘤体积 [mm3]
研究天数
媒介物
0.5 mg/kg M1397
1.0 mg/kg M1397
2.5 mg/kg M1397
5.0 mg/kg M1397

图17