(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119546644 A
(43)申请公布日 2025.02.28

(21)申请号 202380051430.3
(22)申请日 2023.05.17
(30)优先权数据
63/343,441 2022.05.18 US
63/478,625 2023.01.05 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.12.31
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/022556 2023.05.17
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/225098 EN 2023.11.23
(71)申请人 瑞泽恩制药公司
地址 美国纽约州
(72)发明人 R·巴布 D·迪利略 A·赫尔曼 K·奥森 Y·沈 E·乌尔曼
(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所 11517
专利代理师 张怡 林晓航
(51)Int.Cl.
C07K 16/46(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)

权利要求书7页 说明书58页
序列表（电子公布） 附图7页

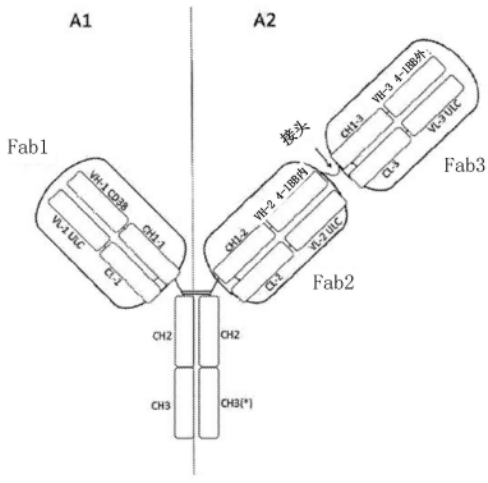
(54)发明名称

结合CD38和4-1BB的多特异性抗原结合分子及其用途

(57)摘要

CD38在恶性浆细胞上表达。4-1BB是T细胞活化和存活所需的共刺激分子。本文提供了新的多特异性抗原结合分子(MABM),其与CD38和4-1BB两者结合例如以提供“信号2”,以便在由肿瘤相关抗原(TAA)x CD3双特异性抗体提供的“信号1”或由抗原呈递细胞提供的同种异体反应的存在下增强T细胞活化。在某些实施方案中,本发明的多特异性抗原结合分子能够抑制表达CD38的肿瘤的生长。本发明的多特异性抗原结合分子可用于治疗其中上调或诱导CD38靶向免疫应答是期望的和/或具有治疗益处的疾病和病症。例如,本发明的多特异性抗原结合分子可用于治疗各种癌症,包括多发性骨髓瘤、淋巴瘤和白血病。

CD38 X 4-1BB多特异性抗体



CN 119546644 A

1.一种双特异性抗原结合分子,所述双特异性抗原结合分子包含:

(a)第一抗原结合臂,其包含重链可变区(HCVR)的三个互补决定区(CDR)和LCVR的三个CDR,其中所述第一抗原结合臂与CD38特异性结合;以及

(b)第二抗原结合臂,其包含含有HCVR(R1-HCVR)的三个CDR和LCVR(R1-LCVR)的三个CDR的第一抗原结合区(R1);以及含有HCVR(R2-HCVR)的三个CDR和LCVR(R2-LCVR)的三个CDR的第二抗原结合区(R2),其中所述第二抗原结合臂与4-1BB特异性结合。

2.如权利要求1所述的双特异性抗原结合分子,其中R1和R2与4-1BB上的同一表位结合。

3.如权利要求1所述的双特异性抗原结合分子,其中R1和R2与4-1BB上的不同表位结合。

4.如权利要求1-3中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中R1和R2通过肽接头连接。

5.如权利要求4所述的双特异性抗原结合分子,其中所述肽接头包含(GGGGS)n的肽序列,其中n为1至6。

6.如权利要求1-5中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中所述第一抗原结合臂包含HCVR的三个CDR,所述HCVR包含选自由SEQ ID NO:2和40组成的组的氨基酸序列。

7.如权利要求1-6中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中所述第一抗原结合臂包含LCVR的三个CDR,所述HCVR包含选自由SEQ ID NO:18和48组成的组的氨基酸序列。

8.如权利要求1-7中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中所述第一抗原结合臂包含分别含有选自由SEQ ID NO:4-6-8和42-44-46组成的组的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1-HCDR2-HCDR3)。

9.如权利要求1-8中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中所述第一抗原结合臂包含分别含有选自由SEQ ID NO:20-22-24和50-52-54组成的组的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1-LCDR2-LCDR3)。

10.如权利要求1-9中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中所述第一抗原结合臂包含HCVR,所述HCVR包含选自由SEQ ID NO:2和40组成的组的氨基酸序列。

11.如权利要求1-10中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中所述第一抗原结合臂包含LCVR,所述HCVR包含选自由SEQ ID NO:18和48组成的组的氨基酸序列。

12.如权利要求1-11中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中所述第一抗原结合臂包含含有选自由SEQ ID NO:2和40组成的组的氨基酸序列的HCVR;以及含有选自由SEQ ID NO:18和48组成的组的氨基酸序列的LCVR。

13.如权利要求1-12中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中R1包含HCVR(R1-HCVR)的三个CDR,所述HCVR包含选自由SEQ ID NO:10、32、62、72、86和94组成的组的氨基酸序列。

14.如权利要求1-13中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中R1包含LCVR(R1-LCVR)的三个CDR,所述LCVR包含选自由SEQ ID NO:18和48组成的组的氨基酸序列。

15.如权利要求1-14中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中R1包含三个重链互补决定区(R1-HCDR1-R1-HCDR2-R1-HCDR3),所述三个重链互补决定区分别包含选自由SEQ ID NO:12-14-16、34-36-38、64-66-68、74-76-78、88-90-92和96-98-100组成的组的氨基酸

序列。

16.如权利要求1-15中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中R1包含三个轻链互补决定区(R1-LCDR1-R1-LCDR2-R1-LCDR3),所述三个轻链互补决定区分别包含选自由SEQ ID NO:20-22-24和50-52-54组成的组的氨基酸序列。

17.如权利要求1-16中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中R1包含含有选自由SEQ ID NO:10、32、62、72、86和94组成的组的氨基酸序列的HCVR(R1-HCVR)。

18.如权利要求1-17中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中R1包含含有选自由SEQ ID NO:18和48组成的组的氨基酸序列的LCVR(R1-LCVR)。

19.如权利要求1-18中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中R1包含含有选自由SEQ ID NO:10、32、62、72、86和94组成的组的氨基酸序列的R1-HCVR;以及含有选自由SEQ ID NO:18和48组成的组的氨基酸序列的R1-LCVR。

20.如权利要求1-19中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中R2包含HCVR(R2-HCVR)的三个CDR,所述HCVR包含选自由SEQ ID NO:10、32、62、72、86和94组成的组的氨基酸序列。

21.如权利要求1-20中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中R2包含LCVR(R2-LCVR)的三个CDR,所述LCVR包含选自由SEQ ID NO:18和48组成的组的氨基酸序列。

22.如权利要求1-21中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中R2包含三个重链互补决定区(R2-HCDR1-R2-HCDR2-R2-HCDR3),所述三个重链互补决定区分别包含选自由SEQ ID NO:12-14-16、34-36-38、64-66-68、74-76-78、88-90-92和96-98-100组成的组的氨基酸序列。

23.如权利要求1-22中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中R2包含三个轻链互补决定区(R2-LCDR1-R2-LCDR2-R2-LCDR3),所述三个轻链互补决定区分别包含选自由SEQ ID NO:20-22-24和50-52-54组成的组的氨基酸序列。

24.如权利要求1-23中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中R2包含含有选自由SEQ ID NO:10、32、62、72、86和94组成的组的氨基酸序列的HCVR(R2-HCVR)。

25.如权利要求1-24中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中R2包含含有选自由SEQ ID NO:18和48组成的组的氨基酸序列的LCVR(R2-LCVR)。

26.如权利要求1-25中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中R2包含含有选自由SEQ ID NO:10、32、62、72、86和94组成的组的氨基酸序列的R2-HCVR;以及含有选自由SEQ ID NO:18和48组成的组的氨基酸序列的R2-LCVR。

27.如权利要求1-26中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中:

(a)所述第一抗原结合臂包含含有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HCVR的三个CDR、以及含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的LCVR的三个CDR;并且

(b)所述第二抗原结合臂包含:

(i)第一抗原结合区(R1),其包含含有选自由SEQ ID NO:32、62和72组成的组的氨基酸序列的R1-HCVR的三个CDR;和含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的R1-LCVR的三个CDR;以及

(ii)第二抗原结合区(R2),其包含含有选自由SEQ ID NO:62、86和94组成的组的氨基酸序列的R2-HCVR的三个CDR;以及含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的R2-LCVR的三个CDR。

28.如权利要求1-27中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中:

(a)所述第一抗原结合臂包含分别含有选自由SEQ ID NO:42-44-46-50-52-54组成的组的氨基酸序列的HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3;并且

(b)所述第二抗原结合臂包含:

(i)第一抗原结合区(R1),其包含分别含有选自由SEQ ID NO:34-36-38-50-52-54、64-66-68-50-52-54和74-76-78-50-52-54组成的组的氨基酸序列的

R1-HCDR1-R1-HCDR2-R1-HCDR3-R1-LCDR1-R1-LCDR2-R1-LCDR3;以及

(ii)第二抗原结合区(R2),其包含分别含有选自由SEQ ID NO:64-66-68-50-52-54、74-76-78-50-52-54和88-90-92-50-52-54组成的组的氨基酸序列的

R2-HCDR1-R2-HCDR2-R2-HCDR3-R2-LCDR1-R2-LCDR2-R2-LCDR3。

29.如权利要求1-28中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中:

(a)所述第一抗原结合臂包含含有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HCVR和含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的LCVR;并且

(b)所述第二抗原结合臂包含:

(i)第一抗原结合区(R1),其包含含有选自由SEQ ID NO:32、62和72组成的组的氨基酸序列的R1-HCVR;以及含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的R1-LCVR;以及

(ii)第二抗原结合区(R2),其包含含有选自由SEQ ID NO:62、86和94组成的组的氨基酸序列的R2-HCVR;以及含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的R2-LCVR。

30.如权利要求1-29中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中:

(a)所述第一抗原结合臂包含含有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HCVR和含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的LCVR;并且

(b)所述第二抗原结合臂包含:

(i)第一抗原结合区(R1),其包含含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的R1-HCVR;和含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的R1-LCVR;以及

(ii)第二抗原结合区(R2),其包含含有SEQ ID NO:86的R2-HCVR;和含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的R2-LCVR。

31.如权利要求1-29中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中:

(a)所述第一抗原结合臂包含含有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HCVR和含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的LCVR;并且

(b)所述第二抗原结合臂包含:

(i)第一抗原结合区(R1),其包含含有SEQ ID NO:72的氨基酸序列的R1-HCVR;和含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的R1-LCVR;以及

(ii)第二抗原结合区(R2),其包含含有SEQ ID NO:94的R2-HCVR;和含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的R2-LCVR。

32.如权利要求1-29中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中:

(a)所述第一抗原结合臂包含含有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HCVR和含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的LCVR;并且

(b)所述第二抗原结合臂包含:

(i)第一抗原结合区(R1),其包含含有SEQ ID NO:62的氨基酸序列的R1-HCVR;和含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的R1-LCVR;以及

(ii)第二抗原结合区(R2),其包含含有SEQ ID NO:62的R2-HCVR;和含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的R2-LCVR。

33.如权利要求1-32中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中所述分子是双特异性抗体。

34.如权利要求33所述的双特异性抗体,其中所述双特异性抗体包含IgG1或IgG4同种型的重链恒定区。

35.如权利要求33或34所述的双特异性抗体,其中所述双特异性抗体包含含有所述第一抗原结合臂的所述HCVR的第一重链,以及含有所述第二抗原结合臂的R1-HCVR和R2-HCVR的第二重链,其中所述第二重链包含突变H435R和Y436F(EU编号)。

36.如权利要求33-35中任一项所述的双特异性抗体,所述双特异性抗体包含含有所述第一抗原结合臂的所述HCVR的第一重链,所述第一重链与含有所述第一抗原结合臂的所述LCVR的轻链配对,其中所述第一重链包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列,并且所述轻链包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列。

37.如权利要求36所述的双特异性抗体,所述双特异性抗体包含含有所述第二抗原结合臂的R1-HCVR和R2-HCVR的第二重链,所述第二重链与含有R1-LCVR的第一轻链和含有R2-LCVR的第二轻链配对,其中所述第二重链包含选自由SEQ ID NO:56、70、80、82和84组成的组的氨基酸序列;并且所述第一轻链包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列,并且所述第二轻链包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列。

38.如权利要求33-37中任一项所述的双特异性抗体,其中:

(a)所述特异性结合人CD38的第一抗原结合臂包含含有SEQ ID NO:58的序列的重链、以及含有SEQ ID NO:60的序列的轻链;并且

(b)所述特异性结合人4-1BB的第二抗原结合臂包含含有SEQ ID NO:56的序列的重链、含有SEQ ID NO:60的序列的第一轻链、以及含有SEQ ID NO:60的序列的第二轻链。

39.如权利要求33-37中任一项所述的双特异性抗体,其中:

(a)所述特异性结合人CD38的第一抗原结合臂包含含有SEQ ID NO:58的序列的重链、以及含有SEQ ID NO:60的序列的轻链;并且

(b)所述特异性结合人4-1BB的第二抗原结合臂包含含有SEQ ID NO:70的序列的重链、含有SEQ ID NO:60的序列的第一轻链、以及含有SEQ ID NO:60的序列的第二轻链。

40.如权利要求33-37中任一项所述的双特异性抗体,其中:

(a)所述特异性结合人CD38的第一抗原结合臂包含含有SEQ ID NO:58的序列的重链、以及含有SEQ ID NO:60的序列的轻链;并且

(b)所述特异性结合人4-1BB的第二抗原结合臂包含含有SEQ ID NO:80的序列的重链、含有SEQ ID NO:60的序列的第一轻链、以及含有SEQ ID NO:60的序列的第二轻链。

41.如权利要求33-37中任一项所述的双特异性抗体,其中:

(a)所述特异性结合人CD38的第一抗原结合臂包含含有SEQ ID NO:58的序列的重链、以及含有SEQ ID NO:60的序列的轻链;并且

(b)所述特异性结合人4-1BB的第二抗原结合臂包含含有SEQ ID NO:82的序列的重链、含有SEQ ID NO:60的序列的第一轻链、以及含有SEQ ID NO:60的序列的第二轻链。

42.如权利要求33-37中任一项所述的双特异性抗体,其中:

(a)所述特异性结合人CD38的第一抗原结合臂包含含有SEQ ID NO:58的序列的重链、以及含有SEQ ID NO:60的序列的轻链;并且

(b)所述特异性结合人4-1BB的第二抗原结合臂包含含有SEQ ID NO:84的序列的重链、含有SEQ ID NO:60的序列的第一轻链、以及含有SEQ ID NO:60的序列的第二轻链。

43.一种双特异性抗原结合分子,所述双特异性抗原结合分子包含与CD38特异性结合的第一抗原结合臂和与4-1BB特异性结合的第二抗原结合臂,其中:

(a)所述第一抗原结合臂包含含有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HCVR的三个CDR、以及含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的LCVR的三个CDR;并且

(b)所述第二抗原结合臂包含:

(i)第一抗原结合区(R1),其包含含有SEQ ID NO:62的氨基酸序列的HCVR(R1-HCVR)的三个CDR,和含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的LCVR(R1-LCVR)的三个CDR;以及

(ii)第二抗原结合区(R2),其包含含有SEQ ID NO:62的氨基酸序列的HCVR(R2-HCVR)的三个CDR,和含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的LCVR(R2-LCVR)的三个CDR。

44.如权利要求43所述的双特异性抗原结合分子,其中所述分子是双特异性抗体。

45.如权利要求44所述的双特异性抗原结合分子,其中所述双特异性抗体包含第一重链,所述第一重链包含所述第一抗原结合臂的HCVR,其中所述第一重链与包含所述第一抗原结合臂的所述LCVR的轻链配对,其中所述第一重链包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列,并且所述轻链包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列。

46.如权利要求45所述的双特异性抗原结合分子,其中所述双特异性抗体包含第二重链,所述第二重链包含所述第二抗原结合臂的R1-HCVR和R2-HCVR,其中所述第二重链与含有R1-LCVR的第一轻链和含有R2-LCVR的第二轻链配对,其中所述第二重链包含SEQ ID NO:70、82和84的氨基酸序列;所述第一轻链包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列,并且所述第二轻链包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列。

47.如权利要求43-46中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中:

(a)所述特异性结合人CD38的第一抗原结合臂包含含有SEQ ID NO:58的序列的重链、以及含有SEQ ID NO:60的序列的轻链;并且

(b)所述特异性结合人4-1BB的第二抗原结合臂包含:

(i)含有SEQ ID NO:70的序列的重链、含有SEQ ID NO:60的序列的第一轻链和含有SEQ ID NO:60的序列的第二轻链;

(ii)含有SEQ ID NO:82的序列的重链、含有SEQ ID NO:60的序列的第一轻链和含有SEQ ID NO:60的序列的第二轻链;或

(iii)含有SEQ ID NO:84的序列的重链、含有SEQ ID NO:60的序列的第一轻链和含有SEQ ID NO:60的序列的第二轻链。

48.一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求1-47中任一项所述的双特异性抗原结合分子和药学上可接受的载剂。

49.一种分离的核酸分子,所述分离的核酸分子包含核酸序列,所述核酸序列编码如权利要求1-47中任一项所述的双特异性抗原结合分子的所述第一抗原结合臂的HCVR。

50.一种分离的核酸分子,所述分离的核酸分子包含核酸序列,所述核酸序列编码如权利要求1-47中任一项所述的双特异性抗原结合分子的所述第二抗原结合臂的R1-HCVR和

R2-HCVR。

51.一种分离的核酸分子,所述分离的核酸分子包含核酸序列,所述核酸序列编码如权利要求1-47中任一项所述的双特异性抗原结合分子的LCVR。

52.一种表达载体,所述表达载体含有如权利要求49-51中任一项所述的分离的核酸分子。

53.一种宿主细胞,所述宿主细胞含有如权利要求52所述的表达载体。

54.如权利要求53所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是大肠杆菌(E.coli)或CHO细胞。

55.一种产生多特异性抗原结合分子的方法,所述方法包括在允许产生所述多特异性抗原结合分子的条件下使如权利要求53所述的宿主细胞生长,其中所述宿主细胞包含含有编码多特异性抗原结合分子抗原结合臂A1的重链可变区(HCVR)的核酸序列的核酸分子、编码多特异性抗原结合分子抗原结合臂A2的重链可变区(HCVR)的核酸序列的第二核酸分子、以及包含编码共同轻链可变区(LCVR)的核酸序列的第三核酸分子。

56.如权利要求55所述的方法,其中所述宿主细胞包含含有编码多特异性抗原结合分子抗原结合臂A1的重链的核酸序列的第一核酸分子、编码多特异性抗原结合分子抗原结合臂A2的重链的第二核酸分子、以及含有编码共同轻链的核酸序列的第三核酸分子。

57.一种抑制受试者的浆细胞肿瘤生长的方法,所述方法包括向所述受试者施用如权利要求1至47中任一项所述的多特异性抗原结合分子或如权利要求48所述的药物组合物。

58.如权利要求57所述的方法,其中所述浆细胞肿瘤是多发性骨髓瘤。

59.一种抑制受试者的肿瘤生长的方法,所述方法包括向所述受试者施用如权利要求1至47中任一项所述的多特异性抗原结合分子或如权利要求48所述的药物组合物,其中所述肿瘤选自由以下组成的组:多发性骨髓瘤、淋巴瘤、B细胞白血病、肝细胞癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、胰腺导管腺癌、神经胶质瘤或乳腺癌或特征部分在于具有CD38+细胞的另一种癌症。

60.一种治疗患有表达BCMA的B细胞恶性肿瘤的患者的方法,所述方法包括向所述受试者施用如权利要求1至47中任一项所述的多特异性抗原结合分子或如权利要求48所述的药物组合物。

61.如权利要求60所述的方法,其中所述表达BCMA的B细胞恶性肿瘤选自选自由以下组成的组:华氏巨球蛋白血症、伯基特淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤和霍奇金淋巴瘤。

62.如权利要求57至61中任一项所述的方法,所述方法还包括施用第二治疗剂或治疗方案。

63.如权利要求62所述的方法,其中所述第二治疗剂是结合浆细胞肿瘤的抗体。

64.如权利要求62所述的方法,其中所述第二治疗剂是抗BCMA/抗CD3双特异性抗原结合分子。

65.如权利要求62所述的方法,其中所述第二治疗剂是抗CD20/抗CD3双特异性抗原结合分子。

66.如权利要求62所述的方法,其中所述第二治疗剂是CD28的激动剂或4-1BB的激动

剂。

67.如权利要求62所述的方法,其中所述第二治疗剂或治疗方案包括化学治疗药物、DNA烷基化剂、免疫调节剂、蛋白酶体抑制剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂、放射疗法、干细胞移植、与不同肿瘤细胞表面抗原和T细胞或免疫细胞抗原相互作用的不同双特异性抗体、抗体药物缀合物、与抗肿瘤剂缀合的双特异性抗体、PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂、CTLA-4检查点抑制剂、CD28激动剂、4-1BB激动剂、抗BCMA/抗CD3双特异性抗原结合分子、抗CD20/抗CD3双特异性抗原结合分子、癌症疫苗、溶瘤病毒、免疫细胞因子、CD22抑制剂、IL4抑制剂、IL6抑制剂、包含嵌合抗原受体的T细胞(CAR-T细胞)或其组合。

68.一种治疗患有CD38+肿瘤和/或表达BCMA的肿瘤的患者的方法,所述方法包括向所述受试者施用如权利要求1至47中任一项所述的多特异性抗原结合分子或如权利要求48所述的药物组合物与PD-1抑制剂的组合。

69.如权利要求68所述的方法,其中所述PD-1抑制剂是抗PD-1抗体或其抗原结合片段或抗PD-L1抗体或其抗原结合片段。

70.如权利要求69所述的方法,其中所述抗PD-1抑制剂选自西米普利单抗、纳武单抗、帕博利珠单抗、度伐利尤单抗、阿替利珠单抗抗和阿维鲁单抗。

71.如权利要求69所述的方法,其中所述PD-1抑制剂是西米普利单抗。

72.如权利要求1至47中任一项所述的多特异性抗原结合分子或如权利要求48所述的药物组合物在治疗与CD38、CD20和/或BCMA的表达相关的疾病或病症中的用途。

73.如权利要求72所述的用途,其中所述疾病或病症是癌症。

74.如权利要求73所述的用途,其中所述癌症是多发性骨髓瘤、淋巴瘤、B细胞白血病、肝细胞癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、胰腺导管腺癌、神经胶质瘤或乳腺癌或特征部分在于具有CD38+细胞的另一种癌症。

75.如权利要求72至74中任一项所述的用途,其中所述多特异性抗原结合分子或药物组合物用于与抗PD-1抗体或其抗原结合片段组合使用。

76.如权利要求72所述的用途,其中所述多特异性抗原结合分子或药物组合物静脉内、肌内或皮下注射。

结合CD38和4-1BB的多特异性抗原结合分子及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及对CD38和4-1BB具有特异性的多特异性抗原结合分子及其使用方法。

[0002] 序列表

[0003] 序列表的正式副本与说明书同时通过专利中心以电子方式提交。电子序列表(10927WO01_Sequence_Listing_ST26.xml;大小:151,552字节;以及创建日期:2023年5月17日)的内容全文以引用的方式并入本文。

背景技术

[0004] 多发性骨髓瘤(MM)是继非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)的第二大常见血液癌,在美国的患病率为约120,000,并且每年约有30,000例新发病例和13,000例死亡。MM的特征在于以不受调节的方式分泌细胞因子的恶性浆细胞的克隆扩增。细胞因子,尤其是IL-6的产生引起局部器官和组织损伤,造成许多与骨髓瘤相关的症状。患有MM的受试者患有骨痛和骨质疏松症、贫血、肾功能受损和肾衰竭、细菌感染和神经损伤。MM很少能治愈,平均预期寿命为4-5年。尽管在治疗MM方面已经取得了进展,但新的疗法对年轻患者的受益不成比例。复发的MM患者预后较差,并且急需新的治疗方法。

[0005] CD38,也称为环状ADP核糖水解酶,是在胸腺细胞、一些活化的外周血T细胞和B细胞、浆细胞和树突细胞上表达的45KDa表面糖蛋白。CD38作为胞外酶起作用,参与细胞外烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)和细胞质烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP)的代谢(Howard等人.Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38.Science(1993)262:1056-9),导致产生Ca^{2+}动员化合物,诸如环腺苷二磷酸(ADP)核糖、ADP核糖(ADPR)和烟酸腺嘌呤二核苷酸磷酸。钙调节导致信号传导途径的活化,该信号传导途径控制广泛的生理功能,包括淋巴细胞增殖、胰腺的胰岛素释放、心肌收缩、嗜中性粒细胞趋化性和T细胞活化。CD38酶活性调节NAD^+水平并改善蛋白酶体抑制剂的功能(Cagnetta等人.Intracellular NAD(+)depletion enhances bortezomib-induced anti-myeloma activity.Blood(2013)122:1243-55)。此外,ADPR可以被CD203a/PC-1和CD73代谢以产生免疫抑制分子腺苷(ADO),促进肿瘤细胞从免疫系统的控制中逃逸(Chillemi等人.Roles and modalities of ectonucleotidases in remodeling the multiple myeloma niche.Front Immunol.(2017)8:305)。CD38似乎有助于B慢性白血病/小淋巴细胞淋巴瘤的增殖潜力;骨髓中的恶性浆细胞表达高且均匀水平的CD38。抗CD38单克隆抗体被认为会消耗CD38+免疫抑制细胞,诸如骨髓来源的抑制细胞、调节性T细胞和调节性B细胞,从而导致免疫效应细胞的抗肿瘤活性增加。达雷木单抗是一种抗CD38抗原结合分子,已被批准用于治疗对常规疗法有耐药性的多发性骨髓瘤患者。

[0006] T细胞活化涉及经由TNF受体超家族的共刺激,并且是生存、获得效应子功能和记忆分化的关键。4-1BB(Tnfrsf9),也称为CD137,是表面糖蛋白和TNF受体超家族的成员。受体表达由TCR介导的初免后的淋巴细胞活化诱导,但是其水平可以通过CD28共刺激来增加。向$CD8^+$T细胞上的配体或激动性单克隆抗体的暴露对4-1BB产生共刺激,这有助于T细胞的

克隆扩增、存活和发育、外周单核细胞的诱导增殖、NF-κB的活化、TCR/CD3触发的活化诱导的T细胞凋亡增强、记忆生成以及CD28共刺激的调节(以促进Th1细胞应答)。乌瑞芦单抗(BMS-663513)是一种完全人源IgG4单克隆抗体,是首个进入临床试验的抗4-1BB治疗剂。当发现与该抗体相关的肝脏毒性时,临床开发停止了。乌托鲁单抗(PF-05082566)是一种活化4-1BB同时阻断与内源性4-1BBL的结合的人源化IgG2单克隆抗体。因此,本领域需要治疗癌症的替代方法。

发明内容

[0007] 本发明部分涉及结合CD38和4-1BB的多特异性抗原结合分子及其在治疗各种疾病(包括癌症)中的用途。

[0008] 多特异性抗原结合分子可以单独使用或与其他用于治疗表达CD38的癌症的药剂组合使用。

[0009] 本文提供的多特异性抗原结合分子包含两个抗原结合臂,A1和A2。A1臂与CD38特异性结合。A2臂包含第一抗原结合结构域(R1)和第二抗原结合结构域(R2),并且A2与4-1BB特异性结合。R1通过接头与R2连接,在A2臂上形成堆叠的抗原结合结构域。A1臂和堆叠的A2臂的组合称为1+2形式。A2的抗原结合结构域可以包含在Fab中。参见图1。在一些方面,R1和R2结合不同的4-1BB表位。在一些方面,R1和R2结合相同的4-1BB表位。在一些方面,R1和R2重链可变区的氨基酸序列相同或基本相似,即,重链可变区或重链互补决定区中有小于5个、小于4个、小于3个氨基酸差异,或者重链可变区或重链互补决定区中有2个或1个氨基酸差异。在一些方面,R1和R2重链可变区不同,即具有不同的抗原结合序列。在一些实施方案中,R1包含在第一Fab(Fab2)中,并且R2包含在第二Fab(Fab3)中。抗CD38x抗4-1BB1+2构建体的Fab2和Fab3通过接头从VH-2 4-1BB“内”Fab2的N末端连接到CH1-3“外”Fab3的C末端。

[0010] 包含抗CD38和抗4-1BB抗原结合结构域的多特异性抗原结合分子

[0011] 本公开提供了结合CD38和4-1BB的多特异性抗原结合分子。此类多特异性抗原结合分子在本文中也称为“抗CD38/抗4-1BB多特异性抗原结合分子”。CD38抗原结合臂A1包含一个抗原结合结构域。4-1BB抗原结合臂A2包含两个抗原结合结构域,R1和R2。R1在本文中称为4-1BB“内”结合结构域,并且R2在本文中称为4-1BB“外”结构域。具有堆叠的抗原结合结构域的多特异性抗原结合分子在本文中称为抗CD38/抗4-1BB 1+2多特异性抗原结合分子,或抗CD38x抗4-1BB 1+2多特异性抗原结合分子等。

[0012] 抗CD38/抗4-1BB多特异性分子的抗CD38部分可用于靶向表达CD38的肿瘤细胞(例如浆细胞),并且所述多特异性分子的抗4-1BB部分可用于提供由同源MHC肽或肿瘤靶向CD3多特异性抗原结合分子活化的T细胞的共刺激。CD38结合在肿瘤细胞上和4-1BB结合在T细胞上促进了活化的T细胞对被靶向的肿瘤细胞的定向杀死(细胞裂解)。因此,本文提供的抗CD38/抗4-1BB 1+2多特异性分子尤其可用于治疗与表达CD38的肿瘤相关或由其引起的疾病和病症(例如,淋巴瘤、白血病、多发性骨髓瘤、肝细胞癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、胰腺导管腺癌、神经胶质瘤或乳腺癌)。

[0013] 本文提供的多特异性抗原结合分子包含含有特异性结合人CD38的抗原结合结构域的第一抗原结合臂A1、以及含有特异性结合4-1BB的两个抗原结合结构域R1和R2的第二抗原结合臂A2。本公开包括抗CD38/抗4-1BB 1+2多特异性分子(例如,多特异性抗原结合分

子),其中每个抗原结合结构域包含与轻链可变区(LCVR)配对的重链可变区(HCVR)。在本发明的某些示例性实施方案中,抗CD38抗原结合结构域和抗4-1BB抗原结合结构域各自包含与共同LCVR或通用LCVR配对的不同的、独特的HCVR。例如,如本文实施例4中所示,构建了多特异性抗原结合分子,其包含特异性结合CD38的第一抗原结合结构域,其中所述第一抗原结合结构域包含源自抗CD38抗原结合分子的HCVR;以及特异性结合4-1BB的第二抗原结合结构域(R1)和第三抗原结合结构域(R2),其中所述第二抗原结合结构域(R1)和第三抗原结合结构域(R2)各自包含源自抗4-1BB抗原结合分子的HCVR,其中每个HCVR与通用轻链LCVR配对。在此类实施方案中,第一、第二和第三抗原结合结构域分别包含不同的抗CD38和抗4-1BB HCVR,但共享共同的轻链LCVR。

[0014] 本文提供了双特异性抗原结合分子,所述双特异性抗原结合分子包含:

[0015] (a)第一抗原结合臂,其包含重链可变区(HCVR)的三个CDR和LCVR的三个CDR,其中所述第一抗原结合臂与CD38特异性结合;以及

[0016] (b)第二抗原结合臂,其包含含有HCVR(R1-HCVR)的三个CDR和LCVR(R1-LCVR)的三个CDR的第一抗原结合区(R1);以及含有HCVR(R2-HCVR)的三个CDR和LCVR(R2-LCVR)的三个CDR的第二抗原结合区(R2),其中所述第二抗原结合臂与4-1BB特异性结合。

[0017] 在一些方面,R1和R2与4-1BB上的同一表位结合。在一些方面,R1和R2与4-1BB上的不同表位结合。

[0018] 在一些方面,R1和R2通过肽接头连接。示例性肽接头包含(GGGGS)n的肽序列,其中n为1至6。

[0019] 在一些方面,双特异性抗原结合分子包含第一抗原结合臂,其中所述第一抗原结合臂包含HCVR的三个CDR,所述HCVR包含选自由SEQ ID NO:2和40组成的组的氨基酸序列。

[0020] 在一些方面,双特异性抗原结合分子包含第一抗原结合臂,其中所述第一抗原结合臂包含LCVR的三个CDR,所述HCVR包含选自由SEQ ID NO:18和48组成的组的氨基酸序列。

[0021] 在一些方面,双特异性抗原结合分子包含第一抗原结合臂,其中所述第一抗原结合臂包含分别含有选自由SEQ ID NO:4-6-8和42-44-46组成的组的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1-HCDR2-HCDR3)。

[0022] 在一些方面,双特异性抗原结合分子包含第一抗原结合臂,其中所述第一抗原结合臂包含分别含有选自由SEQ ID NO:20-22-24和50-52-54组成的组的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1-LCDR2-LCDR3)。

[0023] 在一些方面,双特异性抗原结合分子包含第一抗原结合臂,其中所述第一抗原结合臂包含HCVR,所述HCVR包含选自由SEQ ID NO:2和40组成的组的氨基酸序列。

[0024] 在一些方面,双特异性抗原结合分子包含第一抗原结合臂,其中所述第一抗原结合臂包含LCVR,所述HCVR包含选自由SEQ ID NO:18和48组成的组的氨基酸序列。

[0025] 在一些方面,双特异性抗原结合分子包含第一抗原结合臂,其中所述第一抗原结合臂包含含有选自由SEQ ID NO:2和40组成的组的氨基酸序列的HCVR;以及含有选自由SEQ ID NO:18和48组成的组的氨基酸序列的LCVR。

[0026] 在一些方面,双特异性抗原结合分子包含第一抗原结合臂,其中所述第二抗原结合臂包含第一抗原结合区(R1);和第二抗原结合区(R2)。

[0027] 在一些方面,R1包含HCVR(R1-HCVR)的三个CDR,所述HCVR包含选自由SEQ ID NO:

10、32、62、72、86和94组成的组的氨基酸序列。

[0028] 在一些方面,R1包含LCVR(R1-LCVR)的三个CDR,所述LCVR包含选自由SEQ ID NO:18和48组成的组的氨基酸序列。

[0029] 在一些方面,R1包含三个重链互补决定区(R1-HCDR1-R1-HCDR2-R1-HCDR3),所述三个重链互补决定区分别包含选自由SEQ ID NO:12-14-16、34-36-38、64-66-68、74-76-78、88-90-92和96-98-100组成的组的氨基酸序列。

[0030] 在一些方面,R1包含三个轻链互补决定区(R1-LCDR1-R1-LCDR2-R1-LCDR3),所述三个轻链互补决定区分别包含选自由SEQ ID NO:20-22-24和50-52-54组成的组的氨基酸序列。

[0031] 在一些方面,R1包含含有选自由SEQ ID NO:10、32、62、72、86和94组成的组的氨基酸序列的HCVR(R1-HCVR)。

[0032] 在一些方面,R1包含含有选自由SEQ ID NO:18和48组成的组的氨基酸序列的LCVR(R1-LCVR)。

[0033] 在一些方面,R1包含含有选自由SEQ ID NO:10、32、62、72、86和94组成的组的氨基酸序列的R1-HCVR;以及含有选自由SEQ ID NO:18和48组成的组的氨基酸序列的R1-LCVR。

[0034] 在一些方面,R2包含HCVR(R2-HCVR)的三个CDR,所述HCVR包含选自由SEQ ID NO:10、32、62、72、86和94组成的组的氨基酸序列。

[0035] 在一些方面,R2包含LCVR(R2-LCVR)的三个CDR,所述LCVR包含选自由SEQ ID NO:18和48组成的组的氨基酸序列。

[0036] 在一些方面,R2包含三个重链互补决定区(R2-HCDR1-R2-HCDR2-R2-HCDR3),所述三个重链互补决定区分别包含选自由SEQ ID NO:12-14-16、34-36-38、64-66-68、74-76-78、88-90-92和96-98-100组成的组的氨基酸序列。

[0037] 在一些方面,R2包含三个轻链互补决定区(R2-LCDR1-R2-LCDR2-R2-LCDR3),所述三个轻链互补决定区分别包含选自由SEQ ID NO:20-22-24和50-52-54组成的组的氨基酸序列。

[0038] 在一些方面,R2包含含有选自由SEQ ID NO:10、32、62、72、86和94组成的组的氨基酸序列的HCVR(R2-HCVR)。

[0039] 在一些方面,R2包含含有选自由SEQ ID NO:18和48组成的组的氨基酸序列的LCVR(R2-LCVR)。

[0040] 在一些方面,R2包含含有选自由SEQ ID NO:10、32、62、72、86和94组成的组的氨基酸序列的R2-HCVR;以及含有选自由SEQ ID NO:18和48组成的组的氨基酸序列的R2-LCVR。

[0041] 在一些方面,双特异性抗原结合分子包含:

[0042] (a)第一抗原结合臂,其包含含有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HCVR的三个CDR,和含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的LCVR的三个CDR;以及

[0043] (b)第二抗原结合臂,其包含:

[0044] (i)第一抗原结合区(R1),其包含含有选自由SEQ ID NO:32、62和72组成的组的氨基酸序列的R1-HCVR的三个CDR;和含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的R1-LCVR的三个CDR;以及

[0045] (ii)第二抗原结合区(R2),其包含含有选自由SEQ ID NO:62、84和94组成的组的

氨基酸序列的R2-HCVR的三个CDR;以及含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的R2-LCVR的三个CDR。

[0046] 在一些方面,双特异性抗原结合分子包含:

[0047] (a)第一抗原结合臂,其包含分别含有选自由SEQ ID NO:42-44-46-50-52-54组成的组的氨基酸序列的HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3;以及

[0048] (b)第二抗原结合臂,其包含:

[0049] (i)第一抗原结合区(R1),其包含分别含有选自由SEQ ID NO:34-36-38-50-52-54、64-66-68-50-52-54和74-76-78-50-52-54组成的组的氨基酸序列的R1-HCDR1-R1-HCDR2-R1-HCDR3-R1-LCDR1-R1-LCDR2-R1-LCDR3;以及

[0050] (ii)第二抗原结合区(R2),其包含分别含有选自由SEQ ID NO:64-66-68-50-52-54、74-76-78-50-52-54和88-90-92-50-52-54组成的组的氨基酸序列的R2-HCDR1-R2-HCDR2-R2-HCDR3-R2-LCDR1-R2-LCDR2-R2-LCDR3。

[0051] 在一些方面,双特异性抗原结合分子包含:

[0052] (a)第一抗原结合臂,其包含含有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HCVR,和含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的LCVR;以及

[0053] (b)第二抗原结合臂,其包含:

[0054] (i)第一抗原结合区(R1),其包含含有选自由SEQ ID NO:32、62和72组成的组的氨基酸序列的R1-HCVR;以及含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的R1-LCVR;以及

[0055] (ii)第二抗原结合区(R2),其包含含有选自由SEQ ID NO:62、86和94组成的组的氨基酸序列的R2-HCVR;以及含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的R2-LCVR。

[0056] 在一些方面,双特异性抗原结合分子包含:

[0057] (a)第一抗原结合臂,其包含含有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HCVR,和含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的LCVR;以及

[0058] (b)第二抗原结合臂,其包含:

[0059] (i)第一抗原结合区(R1),其包含含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的R1-HCVR;和含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的R1-LCVR;以及

[0060] (ii)第二抗原结合区(R2),其包含含有SEQ ID NO:86的R2-HCVR;和含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的R2-LCVR。

[0061] 在一些方面,双特异性抗原结合分子包含:

[0062] (a)第一抗原结合臂,其包含含有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HCVR,和含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的LCVR;以及

[0063] (b)第二抗原结合臂,其包含:

[0064] (i)第一抗原结合区(R1),其包含含有SEQ ID NO:72的氨基酸序列的R1-HCVR;和含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的R1-LCVR;以及

[0065] (ii)第二抗原结合区(R2),其包含含有SEQ ID NO:94的R2-HCVR;和含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的R2-LCVR。

[0066] 在一些方面,双特异性抗原结合分子包含:

[0067] (a)第一抗原结合臂包含含有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HCVR和含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的LCVR;并且

[0068] (b)第二抗原结合臂包含:

[0069] (i)第一抗原结合区(R1),其包含含有SEQ ID NO:62的氨基酸序列的R1-HCVR;和含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的R1-LCVR;以及

[0070] (ii)第二抗原结合区(R2),其包含含有SEQ ID NO:62的R2-HCVR;和含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的R2-LCVR。

[0071] 在一些方面,双特异性抗原结合分子是双特异性抗体。

[0072] 在一些方面,双特异性抗原结合分子是包含IgG1或IgG4同种型的重链恒定区的双特异性抗体。

[0073] 在一些方面,双特异性抗体包含含有第一抗原结合臂的HCVR的第一重链,以及含有第二抗原结合臂的R1-HCVR和R2-HCVR的第二重链,其中所述第二重链包含突变H435R和Y436F(EU编号)。

[0074] 在一些方面,双特异性抗体包含含有第一抗原结合臂的HCVR的第一重链,所述第一重链与含有第一抗原结合臂的LCVR的轻链配对,其中所述第一重链包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列,并且所述轻链包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列。

[0075] 在一些方面,双特异性抗体包含含有第二抗原结合臂的R1-HCVR和R2-HCVR的第二重链,所述第二重链与含有R1-LCVR的第一轻链和含有R2-LCVR的第二轻链配对,其中所述第二重链包含选自由SEQ ID NO:56、70、80、82和84组成的组的氨基酸序列;并且所述第一轻链包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列,并且所述第二轻链包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列。

[0076] 在一些方面,双特异性抗体包含:

[0077] (a)特异性结合人CD38的第一抗原结合臂,所述第一抗原结合臂包含含有含SEQ ID NO:58的序列的重链和含有SEQ ID NO:60的序列的轻链;以及

[0078] (b)特异性结合人4-1BB的第二抗原结合臂,所述第二抗原结合臂包含含有SEQ ID NO:56的序列的重链、含有SEQ ID NO:60的序列的第一轻链、以及含有SEQ ID NO:60的序列的第二轻链。

[0079] 在一些方面,双特异性抗体包含:

[0080] (a)特异性结合人CD38的第一抗原结合臂,所述第一抗原结合臂包含含有含SEQ ID NO:58的序列的重链和含有SEQ ID NO:60的序列的轻链;以及

[0081] (b)特异性结合人4-1BB的第二抗原结合臂,所述第二抗原结合臂包含含有SEQ ID NO:70的序列的重链、含有SEQ ID NO:60的序列的第一轻链、以及含有SEQ ID NO:60的序列的第二轻链。

[0082] 在一些方面,双特异性抗体包含:

[0083] (a)特异性结合人CD38的第一抗原结合臂,所述第一抗原结合臂包含含有含SEQ ID NO:58的序列的重链和含有SEQ ID NO:60的序列的轻链;以及

[0084] (b)特异性结合人4-1BB的第二抗原结合臂,所述第二抗原结合臂包含含有SEQ ID NO:80的序列的重链、含有SEQ ID NO:60的序列的第一轻链、以及含有SEQ ID NO:60的序列的第二轻链。

[0085] 在一些方面,双特异性抗体包含:

[0086] (a)特异性结合人CD38的第一抗原结合臂,所述第一抗原结合臂包含含有含SEQ

ID NO:58的序列的重链和含有SEQ ID NO:60的序列的轻链;以及

[0087] (b)特异性结合人4-1BB的第二抗原结合臂,所述第二抗原结合臂包含含有SEQ ID NO:82的序列的重链、含有SEQ ID NO:60的序列的第一轻链、以及含有SEQ ID NO:60的序列的第二轻链。

[0088] 在一些方面,双特异性抗体包含:

[0089] (a)特异性结合人CD38的第一抗原结合臂,所述第一抗原结合臂包含含有含SEQ ID NO:58的序列的重链和含有SEQ ID NO:60的序列的轻链;以及

[0090] (b)特异性结合人4-1BB的第二抗原结合臂,所述第二抗原结合臂包含含有SEQ ID NO:84的序列的重链、含有SEQ ID NO:60的序列的第一轻链、以及含有SEQ ID NO:60的序列的第二轻链。

[0091] 本文提供了双特异性抗原结合分子,所述双特异性抗原结合分子包含与CD38特异性结合的第一抗原结合臂和与4-1BB特异性结合的第二抗原结合臂,其中:

[0092] (a)所述第一抗原结合臂包含含有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HCVR的三个CDR、以及含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的LCVR的三个CDR;并且

[0093] (b)所述第二抗原结合臂包含:

[0094] (i)第一抗原结合区(R1),其包含含有SEQ ID NO:62的氨基酸序列的HCVR(R1-HCVR)的三个CDR,和含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的LCVR(R1-LCVR)的三个CDR;以及

[0095] (ii)第二抗原结合区(R2),其包含含有SEQ ID NO:62的氨基酸序列的HCVR(R2-HCVR)的三个CDR,和含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的LCVR(R2-LCVR)的三个CDR。

[0096] 在一些方面,双特异性抗原结合分子是双特异性抗体。

[0097] 在一些方面,双特异性抗体包含第一重链,所述第一重链包含第一抗原结合臂的HCVR,其中所述第一重链与包含第一抗原结合臂的LCVR的轻链配对,其中所述第一重链包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列,并且所述轻链包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列。在一些方面,双特异性抗体包含第二重链,所述第二重链包含第二抗原结合臂的R1-HCVR和R2-HCVR,其中所述第二重链与含有R1-LCVR的第一轻链和含有R2-LCVR的第二轻链配对,其中所述第二重链包含SEQ ID NO:70、82或84的氨基酸序列,所述第一轻链包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列,并且所述第二轻链包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列。

[0098] 在一些方面,双特异性抗原结合分子包含:

[0099] (a)特异性结合人CD38的第一抗原结合臂,所述第一抗原结合臂包含含有含SEQ ID NO:58的序列的重链和含有SEQ ID NO:60的序列的轻链;以及

[0100] (b)特异性结合人4-1BB的第二抗原结合臂,所述第二抗原结合臂包含:

[0101] (i)含有SEQ ID NO:70的序列的重链、含有SEQ ID NO:60的序列的第一轻链和含有SEQ ID NO:60的序列的第二轻链;

[0102] (ii)含有SEQ ID NO:82的序列的重链、含有SEQ ID NO:60的序列的第一轻链和含有SEQ ID NO:60的序列的第二轻链;或

[0103] (iii)含有SEQ ID NO:84的序列的重链、含有SEQ ID NO:60的序列的第一轻链和含有SEQ ID NO:60的序列的第二轻链。

[0104] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子抑制选自由以下组成的组的CD38+肿瘤细胞的增殖:骨髓瘤细胞、白血病细胞、淋巴瘤细胞、肝细胞癌细胞、非小细胞肺癌细胞、

黑色素瘤细胞、胰腺导管腺癌细胞、神经胶质瘤细胞或乳腺癌细胞。

[0105] 在另一个方面,提供了药物组合物,所述药物组合物包含多特异性抗原结合分子和药学上可接受的载剂或稀释剂。在相关方面,本发明的特征在于组合物,其是抗CD38/抗4-1BB 1+2多特异性抗原结合分子和第二治疗剂的组合。在一个实施方案中,第二治疗剂是与抗CD38/抗4-1BB 1+2多特异性抗原结合分子有利地组合的任何药剂。

[0106] 在另一个方面,提供了包含编码A1或A2中任一者的核苷酸序列的核酸分子。在一些方面,提供了包含编码HCVR、LCVR、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3、重链和/或轻链中任一者的核苷酸序列的核酸分子。在一些实施方案中,提供了包含表2、4、6、8或10中列出的一个或多个核苷酸序列的核酸分子。包含核酸序列的核酸分子可以处于其任何功能组合或排列中。

[0107] 在一些方面,本文提供了分离的核酸分子,所述分离的核酸分子包含编码多特异性抗原结合分子抗原结合臂A1的重链可变区(HCVR)的核酸序列,其中A1与CD38结合,并且其中(a)所述HCVR包含分别含有SEQ ID NO:42、44和46的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1-HCDR2-HCDR3),或(b)所述HCVR包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列。

[0108] 在一些方面,本文提供了分离的核酸分子,所述分离的核酸分子包含编码多特异性抗原结合分子抗原结合臂A1的重链的核酸序列,其中A1与CD38结合,并且其中所述重链包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列。

[0109] 在一些方面,本文提供了分离的核酸分子,所述分离的核酸分子包含编码多特异性抗原结合分子抗原结合臂A2的重链可变区(HCVR)的核酸序列,其中A2包含与4-1BB结合的第一抗原结合结构域(R1)和与4-1BB结合的第二抗原结合结构域(R2),并且其中(a)R1-HCVR包含含有SEQ ID NO:34、36和38的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3),并且R2-HCVR包含含有SEQ ID NO:88、90和92的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3),或者(b)R1-HCVR包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列,并且R2-HCVR包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列。

[0110] 本文提供了分离的核酸分子,所述分离的核酸分子包含编码多特异性抗原结合分子抗原结合臂A2的重链的核酸序列,其中A2与4-1BB结合,并且其中所述重链包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列。

[0111] 本文还提供了分离的核酸分子,所述分离的核酸分子包含编码多特异性抗原结合分子抗原结合臂A2的第一重链可变区(HCVR)和第二HCVR的核酸序列,其中A2与4-1BB结合,并且其中(a)所述第一HCVR包含含有SEQ ID NO:64、66和68的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3),并且所述第二HCVR包含含有SEQ ID NO:64、66和68的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3),或者(b)所述第一HCVR包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列,并且所述第二HCVR包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列。

[0112] 本文还提供了分离的核酸分子,所述分离的核酸分子包含编码多特异性抗原结合分子抗原结合臂A2的重链的核酸序列,其中A2与4-1BB结合,并且其中所述重链包含选自由SEQ ID NO:70、82和84组成的组的氨基酸序列。

[0113] 本文提供了分离的核酸分子,所述分离的核酸分子包含编码多特异性抗原结合分子抗原结合臂A2的第一重链可变区(HCVR)和第二HCVR的核酸序列,其中A2与4-1BB结合,并且其中(a)所述第一HCVR包含含有SEQ ID NO:74、76和78的氨基酸序列的三个重链互补决

定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3),并且所述第二HCVR包含含有SEQ ID NO:96、98和100的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3),或者(b)所述第一HCVR包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列,并且所述第二HCVR包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列。

[0114] 本文提供了分离的核酸分子,所述分离的核酸分子包含编码多特异性抗原结合分子抗原结合臂A2的重链的核酸序列,其中A2与4-1BB结合,并且其中所述重链包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列。

[0115] 本文还提供了分离的核酸分子,所述分离的核酸分子包含编码多特异性抗原结合分子的轻链可变区(LCVR)的核酸序列,其中(a)所述LCVR包含含有SEQ ID NO:50、52和54的氨基酸序列的三个重链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3),或者(b)所述LCVR包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列。

[0116] 并且本文提供了分离的核酸分子,所述分离的核酸分子包含编码多特异性抗原结合分子的轻链的核酸序列,其中所述轻链包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列。

[0117] 本文提供了包含任何上文所述核酸的一个或多个核酸分子的一个表达载体或一组表达载体。还提供了宿主细胞,其包含本文提供的一个或多个表达载体。在一些方面,宿主细胞是哺乳动物细胞或原核生物细胞。在一些方面,宿主细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或大肠杆菌(E.coli)细胞。还提供了包含本文所述的一个或多个核酸分子的组合物。

[0118] 在一些实施方案中,提供了用于产生多特异性抗原结合分子的方法。如本文所提供,所述方法包括在允许产生多特异性抗原结合分子的条件下使宿主细胞生长,其中所述宿主细胞包含含有编码多特异性抗原结合分子抗原结合臂A1的重链可变区(HCVR)的核酸序列的核酸分子、编码多特异性抗原结合分子抗原结合臂A2的重链可变区(HCVR)的核酸序列的核酸分子、和/或包含编码共同轻链可变区(LCVR)的核酸序列的核酸分子。在一些方面,每个核酸分子在同一个表达载体中。在一些方面,一个或多个核酸分子在不同的表达载体中。在一些方面,宿主细胞包含含有编码多特异性抗原结合分子抗原结合臂A1的重链的核酸序列的核酸分子,含有编码多特异性抗原结合分子抗原结合臂A2的重链的核酸分子,和/或含有编码共同轻链的核酸序列的核酸分子。在一些方面,每个核酸分子在同一个表达载体中。在一些方面,一个或多个核酸分子在不同的表达载体中。

[0119] 本文提供了抑制受试者中浆细胞肿瘤的生长的方法,所述方法包括向所述受试者施用本文所述的任何一种或多种多特异性抗原结合分子或本文提供的药物组合物。在一些方面,浆细胞肿瘤是多发性骨髓瘤。

[0120] 本文还提供了本文所述的多特异性抗原结合分子或本文提供的药物组合物在制造用于抑制受试者中浆细胞肿瘤的生长的药物中的用途。可以向所述受试者施用多特异性抗原结合分子或药物组合物。在一些方面,浆细胞肿瘤是多发性骨髓瘤。

[0121] 本文提供了抑制受试者中肿瘤的生长的方法,所述方法包括向所述受试者施用本文所述的任何一种或多种多特异性抗原结合分子或本文提供的药物组合物。在一些方面,所述肿瘤选自由以下组成的组:多发性骨髓瘤、淋巴瘤、B细胞白血病、肝细胞癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、胰腺导管腺癌、神经胶质瘤或乳腺癌或特征部分在于具有CD38+细胞的另一种癌症。

[0122] 本文还提供了本文所述的多特异性抗原结合分子或本文提供的药物组合物在制造用于抑制受试者中肿瘤的生长的药物中的用途。可以向所述受试者施用多特异性抗原结

合分子或药物组合物。在一些方面,所述肿瘤选自由以下组成的组:多发性骨髓瘤、淋巴瘤、B细胞白血病、肝细胞癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、胰腺导管腺癌、神经胶质瘤或乳腺癌或特征部分在于具有CD38+细胞的另一种癌症。

[0123] 本文提供了治疗患有多发性骨髓瘤或患有另一种表达BCMA的B细胞恶性肿瘤的患者的方法,所述方法包括向所述受试者施用本文提供的多特异性抗原结合分子或本文提供的药物组合物。在一些方面,表达BCMA的B细胞恶性肿瘤选自由以下组成的组:华氏巨球蛋白血症(Waldenström'smacroglobulinemia)、伯基特淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤。

[0124] 本文还提供了本文所述的多特异性抗原结合分子或本文提供的药物组合物在制造用于治疗患有多发性骨髓瘤或患有另一种表达BCMA的B细胞恶性肿瘤的患者的药物中的用途。可以向所述受试者施用多特异性抗原结合分子或药物组合物。

[0125] 本文提供了治疗患有CD38+肿瘤和/或表达BCMA的肿瘤的患者的方法。所述方法包括向所述受试者施用与抗PD-1抗体或其抗原结合片段组合的本文所述的多特异性抗原结合分子或本文所述的药物组合物。在一些方面,抗PD-1抗体或抗原结合片段是抗PD-1抗体,例如西米普利单抗(cemiplimab)(bsAb2810)。

[0126] 本文还提供了本文所述的多特异性抗原结合分子或本文提供的药物组合物在制造用于治疗患有CD38+肿瘤和/或表达BCMA的肿瘤的患者的药物中的用途。

[0127] 在一些实施方案中,本文提供的方法或用途还包括施用第二治疗剂或治疗方案。在一些方面,第二治疗剂是结合浆细胞肿瘤的抗体。在一些方面,第二治疗剂是抗BCMA/抗CD3双特异性抗原结合分子。在一些方面,第二治疗剂是抗CD20/抗CD3双特异性抗原结合分子。在一些方面,第二治疗剂是抗CD28/抗4-1BB双特异性抗原结合分子。在一些方面,第二治疗剂或治疗方案包括化学治疗药物、DNA烷化剂、免疫调节剂、蛋白酶体抑制剂、组蛋白去乙酰化酶抑制剂、放射疗法、干细胞移植、溶瘤病毒、癌症疫苗、免疫细胞因子、CAR-T细胞、与不同肿瘤细胞表面抗原和T细胞或免疫细胞抗原相互作用的不同双特异性抗体、抗体药物偶联物、与抗肿瘤剂缀合的双特异性抗体、PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂、CTLA-4检查点抑制剂、CD22抑制剂、BCMA抑制剂、CD28激动剂、CD20抑制剂或其组合。

[0128] 还提供了本文提供的多特异性抗原结合分子或本文提供的药物组合物在治疗与CD38、CD20和/或BCMA表达相关的疾病或病症中的用途。在一些方面,所述疾病或病症是癌症。在一些方面,所述癌症是多发性骨髓瘤。在一些方面,所述多特异性抗原结合分子或药物组合物用于与抗PD-1抗体或其抗原结合片段组合使用。所述多特异性抗原结合分子或包含所述多特异性抗原结合分子的药物组合物通过静脉内、肌内或皮下注射。

[0129] 本文提供了具有修饰的糖基化模式的抗CD38/抗4-1BB 1+2多特异性抗原结合分子。在一些应用中,去除不希望的糖基化位点的修饰可能是有用的,或缺乏岩藻糖部分的抗原结合分子存在于寡糖链上,例如,以增加抗原结合分子依赖性细胞毒性(ADCC)功能(参见Shield等人(2002)JBC 277:26733)。在其他应用中,可以进行半乳糖基化的修饰以改变补体依赖性的细胞毒性(CDC)。

[0130] 在又另一个方面,本文提供了使用本发明的抗CD38/抗4-1BB多特异性抗原结合分子靶向/杀伤表达CD38的肿瘤细胞的治疗方法,其中所述治疗方法包括向有需要的受试者

施用治疗有效量的包含本文提供的抗CD38/抗4-1BB多特异性抗原结合分子的药物组合物。

[0131] 本公开还包括本文提供的抗CD38/抗4-1BB多特异性抗原结合分子在制备用于治疗与CD38表达相关或由其引起的疾病或病症的药物中的用途。

[0132] 通过参阅接下来的详细说明,其他实施方案将变得显而易见。

附图说明

[0133] 图1是描绘示例性抗CD38 x抗4-1BB 1+2多特异性抗原结合分子的结构的示意图。A1抗原结合臂包含Fab1,其对CD38具有特异性,而A2抗原结合臂包含两个Fab(Fab2和Fab3),其各自对4-1BB具有特异性。抗CD38x抗4-1BB 1+2构建体的Fab2和Fab3通过接头从VH-2 4-1BB“内”Fab2的N末端连接到CH1-3“外”Fab3的C末端。Fab1、Fab2和Fab3轻链分别包含VL-1、VL-2和VL-3通用轻链。

[0134] 图2A比较了多种形式的多特异性抗原结合分子在Jurkat报告基因测定中对4-1BB的活化百分比,包括相同分裂的4-1BB Fab、相同堆叠的4-1BB Fab和混合堆叠的4-1BB Fab。图2B示出了在筛选中测试的各种构建体,并描绘了靶标依赖性生物测定。

[0135] 图3示出了向腹膜内注射了$4x10^6$个人外周血单核细胞(PBMC)的免疫缺陷NOD.Cg-$Prkdc^{scid}$$Il2rg^{tm1Wjl}$/SzJ(NSG)小鼠施用人多发性骨髓瘤肿瘤细胞之后随时间推移的体内肿瘤负荷。

[0136] 图4A示出了相对于未接受肿瘤细胞的小鼠,用PBS治疗的小鼠中随时间推移的肿瘤负荷;图4B示出了相对于未接受肿瘤细胞的小鼠,用结合CD3的对照bsAb(0.4mg/kg)+结合4-1BB的对照bsAb(4mg/kg)治疗的小鼠中随时间推移的肿瘤负荷;图4C示出了相对于未接受肿瘤细胞的小鼠,用结合CD3的对照bsAb(0.4mg/kg)+CD38x4-1BB(4mg/kg)治疗的小鼠中随时间推移的肿瘤负荷;图4D示出了相对于未接受肿瘤细胞的小鼠,用BCMAxCD3bsAb(0.4mg/kg)+结合4-1BB的对照bsAb(4mg/kg)治疗的小鼠中随时间推移的肿瘤负荷;图4E示出了相对于未接受肿瘤细胞的小鼠,用BCMAxCD3bsAb(0.4mg/kg)+CD38x4-1BB(4mg/kg)治疗的小鼠中随时间推移的肿瘤负荷。

具体实施方式

[0137] 在描述本发明前,应当理解,本发明不限于所述的特定方法和实验条件,因为这类方法和条件可以变化。还应当理解,本文所用的术语仅用于描述具体实施方案的目的,而无意进行限制,因为本发明的范围将仅由所附权利要求书限制。

[0138] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。

[0139] 如本文所用,在提到具体列举的数值中使用时,术语“约”意指所述值可以从列举的值变动不大于1%。举例来说,如本文所用,表述“约100”包括99和101以及它们之间的全部值(例如,99.1、99.2、99.3、99.4等)。

[0140] 尽管与本文中描述的那些方法和材料类似或等效的任何方法和材料均可以用于本发明的实践或检验,但现在描述优选的方法和材料。本说明书中提及的所有专利、申请和非专利出版物全文以引用的方式并入本文中。

[0141] 定义

[0142] 如本文所用,表述“4-1BB”是指4-1BBL的受体。4-1BB被4-1BBL交联增强T细胞活化。具有UniProt登录号Q07011的人4-1BB(或CD137)包含如SEQ ID NO:101所示的氨基酸序列;氨基酸残基1-23是信号肽。残基24-186构成受体的胞外结构域。

[0143] 人4-1BB(免疫原)氨基酸序列

[0144] MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL(SEQ ID NO:101)

[0145] 本文对蛋白、多肽和蛋白片段的所有提及意图表示各种蛋白、多肽或蛋白片段的人类形式,除非明确指出其来自非人物种。因此,表述“4-1BB”意指人4-1BB,除非指定为来自非人物种,例如,“小鼠4-1BB”、“猴4-1BB”等。

[0146] 如本文所用,“结合4-1BB的抗原结合分子”或“抗4-1BB抗原结合分子”包括特异性识别在细胞表面上表达的4-1BB的抗原结合分子。本文提供的抗4-1BB抗原结合分子包含如本文所公开的VR和CDR。在某些实施方案中,抗原结合分子是抗体。在某些实施方案中,抗原结合分子是双特异性抗体。

[0147] 如本文所用,表述“CD38”也称为环状ADP核糖水解酶,是指在恶性浆细胞上表达的糖蛋白。CD38在调节细胞内钙水平中起着重要作用。所述蛋白质具有N末端细胞质尾巴,单个跨膜结构域和一个具有四个N-糖基化位点的C末端胞外区。如本文所用的术语“CD38”是指人CD38蛋白,除非指定为来自非人物种(例如,“小鼠CD38”、“猴CD38”等)。人CD38蛋白具有如SEQ ID NO:102(人CD38胞外结构域(V43-I300).mFc)所示的氨基酸序列,和/或具有如NCBI登录号NP_001766.2或NM_001775.3所示的氨基酸序列。

[0148] 人CD38胞外结构域(V43-I300).mFc(免疫原)氨基酸

[0149] VPRWRQQWSGPGTTKRFPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLLGYLADDLTWCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQTLEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRNIQFSCKNIYRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK*(SEQ ID NO:102)mFc序列加下划线

[0150] 如本文所用,“结合CD38的抗原结合分子”或“抗CD38抗原结合分子”包括特异性识别CD38的抗原结合分子。

[0151] 术语“抗原结合分子”包括多特异性抗原结合分子,例如抗CD38 x抗4-1BB 1+2多特异性抗原结合分子。本文提供的抗CD38抗原结合分子包含VR和CDR,如本文所公开。在某些实施方案中,抗原结合分子是抗体。在某些实施方案中,抗原结合分子是双特异性抗体。

[0152] 如本文所用的术语“抗原结合分子”意指与特定抗原(例如,CD38或4-1BB)特异性结合或相互作用的包含至少一个互补决定区(CDR)的任何抗原结合分子或分子复合物。术语“抗原结合分子”包括包含通过二硫键相互连接的四个多肽链(两个重(H)链和两个轻(L)链)的免疫球蛋白分子及其多聚体(例如,IgM)。术语“抗原结合分子”包括包含两个抗原结合臂A1和A2的免疫球蛋白分子。术语“抗原结合分子”还包括由通过二硫键相互连接的四条

多肽链(两条重链(H)和两条轻链(L))组成的免疫球蛋白分子。每个抗原结合臂包含重链,所述重链进而包含至少一个重链可变区(本文中缩写为HCVR或VH-1、VH-2或VH-3)和重链恒定区(CH1-1、CH1-2和CH1-3)。重链恒定区还包含CH2和CH3。每个轻链包含轻链可变区(本文中缩写为LCVR;在A1臂上,VL-1;在A2臂上,VL-2和VL-3)和轻链恒定区(在A1臂上,CL-1,以及在A2臂上,CL-2和CL-3)。VH和VL区还可以细分为高变区(称为互补决定区(CDR)),所述高变区之间散布有更保守的区域(称为构架区(FR))。每个VH和VL由从氨基末端到羧基末端按照以下次序排列的三个CDR和四个FR构成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本发明的不同实施方案中,抗CD38抗原结合臂或抗4-1BB抗原结合臂(或其抗原结合部分)的FR可以与人种系序列相同,或者可以是经天然或人工修饰的。可以基于两个或更多个CDR的并排(side-by-side)分析来定义氨基酸共有序列。

[0153] 如本文中使用的术语抗原结合分子的"抗原结合部分"、抗原结合分子的"抗原结合片段"等包括特异性地结合抗原以形成复合物的任何天然存在的、酶促可获得的、合成的或遗传工程改造的多肽或糖蛋白。可以例如使用任何合适的标准技术(诸如蛋白水解消化或涉及编码抗原结合分子可变结构域和任选地抗原结合分子恒定结构域的DNA的操作和表达的重组基因工程技术)例如从全抗原结合分子分子中衍生出抗原结合分子的抗原结合片段。这样的DNA是已知的,并且/或者可以容易地从例如商业来源、DNA文库(包括,例如噬菌体-抗原结合分子文库)获得,或者可以被合成。可以对DNA测序,并化学地或通过使用分子生物学技术进行操作,例如,以将一个或多个可变结构域和/或恒定结构域排列为合适的构型,或导入密码子,产生半胱氨酸残基,修饰、添加或删除氨基酸等。

[0154] 抗CD38 x抗4-1BB 1+2抗原结合分子通常将包含至少三个可变结构域。可变结构域可以具有任何尺寸或氨基酸组成并且通常将包括与一个或多个框架序列毗邻或符合读框的至少一个CDR。在具有与VL结构域关联的VH结构域时,VH和VL结构域可以相对于彼此以任何合适的布置定位。例如,可变区可以是二聚体并且含有VH-VH、VH-VL或VL-VL二聚体。可替代地,抗原结合分子可以含有单体VH或VL结构域。

[0155] 在某些实施方案中,抗原结合分子可以含有与至少一个恒定结构域共价连接的至少一个可变结构域。在本发明的多特异性抗原结合分子中可以发现的可变结构域和恒定结构域的非限制性示例性配置包括:(i)V_H1-C_H1-1;(ii)V_H2-C_H1-2;(iii)V_H3-C_H1-3;(iv)V_H1-C_H1-C_H2;(v)V_H1-C_H1-C_H2-C_H3;(vi)V_H2-C_H1-2-C_H2;(vii)V_H2-C_H1-2-C_H2-C_H3;(viii)V_H3-C_H1-3;(ix)V_H3-C_H1-3-V_H2-C_H1-2;(x)V_H3-C_H1-3-V_H2-C_H1-2-C_H2;(xi)V_H3-C_H1-3-V_H2-C_H1-2-C_H2-C_H3;(xii)V_H-C_L;(xiii)V_L-1-C_L1;(xiv)V_L-2-C_L2;(xv)V_L-3-C_L3;(xvi)V_L-3-C_L3-C_H1-3;(xvii)V_L-2-C_L-2-C_H1-2;(xviii)V_L1-C_L1-C_H1-C_H2-C_H3;(xix)V_L-2-C_L2-C_H1-2;(xx)V_L-2-C_L2-C_H1-2-C_H2;(xxi)V_L-2-C_L2-C_H1-2-C_H2-C_H3;(xxii)V_L-3-C_L3-C_H1-3-V_H2-C_H1-2-C_H2;(xxiii)V_L-3-C_L3-C_H1-3-V_H2-C_H1-2-C_H2-C_H3;和(xxiv)V_L-C_L。在可变结构域和恒定结构域的任何构型(包括上文列出的任何示例性构型)中,可变结构域和恒定结构域可以彼此直接连接或者可以通过全长或部分铰链或接头区相连。铰链区可以由至少2个(例如5、10、15、20、40、60或更多个)氨基酸组成,其导致在单个多肽分子中的相邻可变结构域和/或恒定结构域之间的柔性的或半柔性的连接。

[0156] 举例来说,图1显示了包含对CD38具有特异性的Fab1的A1抗原结合臂、以及包含各自对4-1BB具有特异性的两个Fab(Fab2和Fab3)的A2抗原结合臂。Fab1、Fab2和Fab3轻链可

以是通用轻链。在该实例中,V_L-1连接至C_L-1,后者连接至A1臂上的C_H1-1。在A2臂上,V_L-3连接至C_L-3,后者连接至C_H1-3。同样,V_L-2连接至C_L-2,后者连接至C_H1-2。抗CD38x抗4-1BB 1+2构建体的Fab2和Fab3通过接头从V_H-2 4-1BB“内”Fab2的N末端连接到C_H1-3“外”Fab3。

[0157] 本发明的抗原结合分子可以通过补体依赖性细胞毒性(CDC)或抗原结合分子依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)起作用。“互补依赖性细胞毒性”(CDC)是指在补体的存在下通过本发明的抗原结合分子来裂解表达抗原的细胞。“抗原结合分子依赖性细胞介导的细胞毒性”(ADCC)是指其中表达Fc受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞(例如,天然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)识别靶细胞上结合的抗原结合分子并由此导致靶细胞的裂解的细胞介导的反应。可以使用本领域熟知且可获得的测定来测量CDC和ADCC。(参见例如,美国专利号5,500,362和5,821,337,以及Clynes等人(1998)Proc.Natl.Acad.Sci.(USA)95:652-656)。抗原结合分子的恒定区对于抗原结合分子固定补体和介导细胞依赖性细胞毒性的能力很重要。因此,可以根据抗原结合分子介导细胞毒性是否需要抗原结合分子来选择抗原结合分子的同种型。

[0158] 在本发明的某些实施方案中,本文提供的抗CD38 x抗4-1BB 1+2多特异性抗原结合分子是人抗原结合分子。如本文所用的术语“人抗原结合分子”旨在包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗原结合分子。本发明的人抗原结合分子可以包括不由人生殖系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如通过体外随机或定点诱变或通过体内体细胞突变引入的突变),例如在CDR特别是CDR3中。然而,如本文所用,术语“人抗原结合分子”不旨在包括已经将衍生自另一个哺乳动物物种(诸如小鼠)的种系的CDR序列植入到人框架序列上的抗原结合分子。

[0159] 在一些实施方案中,本文提供的多特异性抗原结合分子可以是重组人抗原结合分子。如本文所用,术语“重组人抗原结合分子”旨在包括通过重组手段所制备、表达、产生或分离的全部人抗原结合分子,诸如使用转染到宿主细胞(在下文进一步描述)中的重组表达载体表达的抗原结合分子、从重组的人抗原结合分子组合文库(在下文进一步描述)分离的抗原结合分子、从对于人免疫球蛋白基因而言是转基因的动物(例如,小鼠)(参见例如,Taylor等人,(1992)Nucl.Acids Res.20:6287-6295)分离的抗原结合分子或通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接至其他DNA序列的任何其他手段所制备、表达、产生或分离的抗原结合分子。这样的重组人抗原结合分子具有从人种系免疫球蛋白序列衍生出的可变区和恒定区。然而,在某些实施方案中,此类重组人抗原结合分子经历体外诱变(或,使用就人Ig序列而言为转基因的动物时,经历体内体细胞诱变)并且因此重组抗原结合分子的V_H和V_L区的氨基酸序列是尽管源自人种系V_H和V_L序列并且与之相关,但可能在体内人抗原结合分子种系库内部不天然存在的序列。

[0160] 人抗原结合分子能够以与铰链异质性相关的两种形式存在。在一种形式中,免疫球蛋白分子包含大约150-160kDa的稳定四链构建体,其中二聚体通过链间重链二硫键保持在一起。在第二种形式中,二聚体不经由链间二硫键连接,并且约75-80kDa的分子由共价偶联的轻链和重链(半抗原结合分子)构成。即使在亲和纯化之后,这些形式也极难分离。

[0161] 第二种形式在各种完整IgG同种型中的出现频率是由于但不限于与抗原结合分子的铰链区同种型相关的结构差异。人IgG4铰链的铰链区中的单个氨基酸取代可以显著减少第二种形式的出现(Angal等人(1993)Molecular Immunology 30:105)至通常使用人IgG1

铰链观察到的水平。本发明涵盖在铰链、C_H2或C_H3区中具有一个或多个突变的抗原结合分子,这例如在产生中可以是所需的,以提高所需的抗原结合分子形式的产率。

[0162] 本发明的多特异性抗原结合分子可以是分离的抗原结合分子。如本文所用,“分离的多特异性抗原结合分子”意指已经从天然环境的至少一种组分中鉴定和分离和/或回收的抗原结合分子。例如,出于本发明的目的,已经从生物体的至少一种组分分离或移除或者从抗原结合分子天然存在或天然产生的组织或细胞分离或移除的抗原结合分子是“分离的抗原结合分子”。分离的抗原结合分子还包括重组细胞内的原位抗原结合分子。分离的抗原结合分子是已经进行至少一个纯化或分离步骤的抗原结合分子。根据某些实施方案,分离的抗原结合分子可以基本上不含其他细胞物质和/或化学物质。

[0163] 如与抗原结合分子所衍生的对应种系序列相比,本文公开的抗CD38 x抗4-1BB 1+2抗原结合分子可能在重链和轻链可变结构域的框架和/或CDR中包含一个或多个氨基酸置换、插入和/或缺失。通过将本文公开的氨基酸序列与可从例如公共抗原结合分子序列数据库获得的种系序列进行比较,可以容易地确定此类突变。本公开包括衍生自本文公开的任何氨基酸序列的多特异性抗原结合分子或其抗原结合片段,其中一个或多个框架和/或CDR内的一个或多个氨基酸相对于本文提供的序列发生了突变。在一些方面,突变是为了反映抗原结合分子所衍生的种系序列的对应残基,或反映另一个人种系序列的对应残基,或反映对应种系残基的保守氨基酸置换而进行的(此类序列变化在本文中统称为“种系突变”)。本领域的普通技术人员从本文所公开的重链和轻链可变区序列开始,可以容易地产生多种抗原结合分子,所述抗原结合分子包含一个或多个突变,诸如单独的种系突变或其组合。在某些实施方案中,V_H和/或V_L结构域内的所有框架和/或CDR残基突变回存在于衍生出抗原结合分子的原始种系序列中的残基。在其他实施方案中,仅某些残基被突变回原始种系序列,例如,仅存在于FR1的前8个氨基酸内或FR4的后8个氨基酸内的突变残基,或仅存在于CDR1、CDR2或CDR3内的突变残基。在其他实施方案中,框架和/或CDR残基中的一个或多个突变成不同的种系序列(即,不同于最初衍生出抗原结合分子的种系序列的种系序列)的一个或多个对应残基。

[0164] 此外,本发明的多特异性抗原结合分子可以在框架和/或CDR区内含有两个或更多个突变的任何组合,例如其中某些单独的残基相对于本文提供的序列是突变的或被突变为特定种系序列的对应残基,而不同于原始种系序列的某些其他残基得以维持或被突变为不同种系序列的对应残基。在获得含有一个或多个突变的抗原结合分子后,可以容易地测试所述抗原结合结构域的一种或多种所需特性,诸如改善的结合特异性、增加的结合亲和力、改善或增强的拮抗性或激动性生物特性(视具体情况而定)、降低的免疫原性等。以这种一般方式获得的抗原结合分子涵盖在本发明内。

[0165] 本文提供了抗CD38 x抗4-1BB抗原结合分子,其包括本文所公开的任何HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列的具有一个或多个置换的变体。在一些方面,所述置换是保守氨基酸置换。例如,本公开包括具有HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列的抗CD38 x抗4-1BB抗原结合分子,所述HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列相对于本文表1、3、5或7中所示的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中的任一者具有例如10个或更少、8个或更少、6个或更少、4个或更少、3个或更少、2个或1个氨基酸置换。

[0166] 术语“表位”是指与抗原结合分子的可变区中的特定抗原结合位点(称为互补位)

相互作用的抗原决定簇。单个抗原可以具有超过一个表位。因此,不同的抗原结合分子可以与抗原上的不同区域结合并且可以具有不同的生物效应。表位可以是构象的或线性的。构象表位由来自线性多肽链的不同区段的氨基酸在空间上并列而产生。线性表位由多肽链中的邻近氨基酸残基来产生。在某些情况下,表位可以包括抗原上的糖、磷酰基基团或磺酰基基团部分。

[0167] 当提及核酸或其片段时,术语“基本同一性”或“基本相同”指示当通过适当的核苷酸插入或缺失与另一核酸(或其互补链)最佳对齐时,如通过下文所论述的任何众所周知的序列同一性算法如FASTA、BLAST或Gap所测量,至少约95%,并且更优选地至少约96%、97%、98%或99%的核苷酸碱基存在核苷酸序列同一性。在某些情况下,与参考核酸分子具有基本同一性的核酸分子可以编码与参考核酸分子所编码的多肽具有相同或基本上类似的氨基酸序列的多肽。

[0168] 当应用于多肽时,术语“基本上相似性”或“基本上相似”意指当两个肽序列诸如通过程序GAP或BESTFIT使用默认空位权重进行最佳比对时,共有至少95%序列同一性,甚至更优选地至少98%或99%序列同一性。本文考虑了不会实质上改变多特异性抗原结合分子的功能特性的氨基酸置换。在一些方面,不相同的残基位置因保守氨基酸取代而不同。“保守氨基酸取代”是氨基酸残基被具有相似化学特性(例如,电荷或疏水性)的侧链(R基团)的另一氨基酸残基取代的氨基酸取代。通常,保守氨基酸置换大体上不会改变蛋白质的功能特性。在两个或更多个氨基酸序列的保守置换彼此不同的情况下,可以向上调整序列同一性百分比或相似性程度以校正置换的保守性质。用于进行该调整的手段是本领域的技术人员熟知的。参见例如,Pearson(1994)Methods Mol.Biol.24:307-331,该文献以引用的方式并入本文。含有具有相似的化学性质的侧链的氨基酸组的实例包括:(1)脂族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;(2)脂族-羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;(3)含酰胺的侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;(4)芳族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;(5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;(6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸,以及(7)含硫侧链,即半胱氨酸和甲硫氨酸。示例性保守氨基酸置换组是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸以及天冬酰胺-谷氨酰胺。可替换地,保守替换是在Gonnet等人(1992)Science256:1443-1445(通过引用并入本文)中公开的PAM250 log-似然矩阵中具有正值的任何变化。“适度保守”替换是在PAM250对数似然矩阵中具有非负值的任何变化。

[0169] 通常使用序列分析软件来测量多肽的序列相似性,所述序列相似性也称为序列同一性。蛋白质分析软件使用关于指定到各种置换、缺失和其他修饰(包括保守氨基酸置换)的相似性度量来匹配相似序列。例如,GCG软件含有诸如Gap和Bestfit的程序,这些程序可以以默认参数使用,以确定紧密相关的多肽(诸如来自不同物种的生物体的同源多肽)之间,或野生型蛋白及其突变型蛋白之间的序列同源性或序列同一性。参见例如,GCG 6.1版。还可以使用FASTA(GCG 6.1版中的程序)使用默认或推荐参数对多肽序列进行比较。FASTA(例如,FASTA2和FASTA3)提供查询与搜索序列之间的最佳重叠区域的比对和序列一致性百分比(Pearson(2000)同上)。当将本发明的序列与含有大量来自不同生物体的序列的数据库进行比较时,另一种优选的算法是使用默认参数的计算机程序BLAST,尤其是BLASTP或TBLASTN。参见例如,Altschul等人.(1990)J.Mol.Biol.215:403-410以及Altschul等人.

(1997)Nucleic Acids Res.25:3389-402,每一篇以引用的方式并入本文。

[0170] 抗原结合分子的结合特性

[0171] 如本文所用,术语“结合”在抗原结合分子、免疫球蛋白、抗原结合分子结合片段或含Fc蛋白与例如预定抗原(诸如细胞表面蛋白)或其片段结合的语境中,通常是指两个实体或分子结构之间的相互作用或关联,诸如抗原结合分子-抗原相互作用。

[0172] 例如,当通过例如表面等离子体共振(SPR)技术在BIAcore仪器中使用抗原作为配体并且使用抗原结合分子、Ig、抗原结合分子结合片段或含Fc蛋白作为分析物(或抗配体)测定时,结合亲和力通常对应的K_D值为约10^{-7}M或更小,诸如约10^{-8}M或更小,诸如约10^{-9}M或更小。基于细胞的结合策略,诸如荧光活化细胞分选(FACS)结合测定也经常使用,并且FACS数据与其他方法(诸如放射性配体竞争结合和SPR)很好地关联(Benedict,CA,JImmunol Methods.1997,201(2):223-31;Geuijen,CA等人,J Immunol Methods.2005,302(1-2):68-77)。

[0173] 因此,本发明的多特异性抗原结合分子或抗原结合蛋白与预定的抗原或细胞表面分子(受体)结合,其亲和力对应于K_D值比其结合至非特异性抗原(例如,BSA、酪蛋白)的亲和力低至少十倍。根据本公开,对应于K_D值等于或小于非特异性抗原十倍的抗原结合分子的亲和力可以被认为是不可检测的结合,然而这样的抗原结合分子可以与用于产生本发明的多特异性抗原结合分子的第二抗原结合臂配对。

[0174] 术语“K_D”(M)是指特定抗原结合分子-抗原相互作用的解离平衡常数,或抗原结合分子或抗原结合分子结合片段与抗原结合的解离平衡常数。K_D与结合亲和力之间存在反比关系,因此K_D值越小,亲和力越高,即越强。因此,术语“较高亲和力”或“较强亲和力”涉及较高的形成相互作用的能力,因此K_D值较小,相反,术语“较低亲和力”或“较弱亲和力”涉及较低的形成相互作用的能力,因此K_D值更大。在一些情况下,与分子($_{例如}$抗原结合分子)与另一个相互作用配偶体分子(例如抗原Y)的结合亲和力相比,特定分子(例如抗原结合分子)与其相互作用配偶体分子(例如抗原X)的更高的结合亲和力(或KD)可以表示为通过将较大的K_D值(较低或较弱的亲和力)除以较小的K_D(较高或较强的亲和力)而确定的结合比率,例如表示为结合亲和力大5倍或10倍,视情况而定。

[0175] 术语“k_d”(秒-1或1/s)是指特定抗原结合分子-抗原相互作用的解离速率常数,或抗原结合分子或抗原结合分子结合片段的解离速率常数。所述值也称为k_{off}值。

[0176] 术语“k_a”(M-1x秒-1或1/M/s)是指特定抗原结合分子-抗原相互作用的结合速率常数,或抗原结合分子或抗原结合分子结合片段的结合速率常数。

[0177] 术语“K_A”(M-1或1/M)是指特定抗原结合分子-抗原相互作用的结合平衡常数,或抗原结合分子或抗原结合分子结合片段的结合平衡常数。结合平衡常数通过将k_a除以k_d来获得。

[0178] 术语“EC50”或“EC_{50}”是指半最大有效浓度,其包括在特定暴露时间后诱导在基线和最大值之间的反应一半的抗原结合分子浓度。EC_{50}基本上代表了观察到最大作用的50%时的抗原结合分子浓度。在某些实施方案中,EC_{50}值等于本发明的抗原结合分子对表达4-1BB或肿瘤相关抗原(例如,CD38)的细胞产生半最大结合的浓度,如通过例如FACS结合测定所确定的。因此,随着EC_{50}或半最大效应浓度值的增加,观察到结合减少或减弱。

[0179] 在一个实施方案中,结合降低可以定义为能够与半数最大量的靶细胞结合的EC_{50}

抗原结合分子浓度增加。

[0180] 在另一个实施方案中,EC_{50}值代表通过T细胞毒活性引起靶细胞半数最大消耗的本发明抗原结合分子的浓度。因此,随着EC_{50}或半最大效应浓度值降低,观察到细胞毒性活性增加(例如,T细胞介导的肿瘤细胞杀死)。

[0181] 多特异性抗原结合分子

[0182] 本发明的抗原结合分子结合CD38和4-1BB两者。多特异性抗原结合分子可以对一种靶多肽的不同表位具有特异性,或者可以含有对多于一种靶多肽具有特异性的抗原结合结构域。参见例如,Tutt等人,1991,J.Immunol.147:60-69;Kufer等人.,2004,Trends Biotechnol.22:238-244。

[0183] 根据某些示例性实施方案,本发明包括特异性结合4-1BB和CD38的多特异性抗原结合分子。此类分子在本文中可以称为例如,“抗CD38 x抗4-1BB 1+2”或“抗CD38/抗4-1BB 1+2”或“抗CD38x4-1BB 1+2”或“CD38x4-1BB 1+2”多特异性分子或其他类似的术语。

[0184] 本公开包括多特异性抗原结合分子,其中免疫球蛋白的一个臂A2具有两个抗原结合结构域,其结合人4-1BB、4-1BB“内”结构域和4-1BB“外”结构域,并且免疫球蛋白的另一个臂A1对于结合人CD38具有特异性。4-1BB结合臂可以包含如表3(抗4-1BB“内”)或表5(抗4-1BB“外”)中所示的HCVR/LCVR或CDR氨基酸序列中的任一者,以堆叠的形式。

[0185] 在某些实施方案中,4-1BB结合臂与人4-1BB结合并促进人T细胞活化。在某些实施方案中,4-1BB结合臂与人4-1BB结合并诱导人T细胞活化。在其他实施方案中,4-1BB结合臂与人4-1BB结合,并且在多特异性或多特异性抗原结合分子的语境中诱导与肿瘤相关的表达抗原的细胞杀死。CD38结合臂可以包含本文的表1中所示的HCVR/LCVR或CDR氨基酸序列中的任一者。

[0186] 如本文所用,表述“抗原结合分子”意指包含或由与特定抗原特异性地结合的单独或与一个或多个另外的CDR和/或框架区(FR)组合的至少一个互补决定区(CDR)组成的蛋白质、多肽或分子复合物。在某些实施方案中,抗原结合分子是抗原结合分子或抗原结合分子的片段,如本文别处定义的那些术语。

[0187] 如本文所用,表述“多特异性抗原结合分子”意指包含至少第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的蛋白质、多肽或分子复合物。多特异性抗原结合分子内的每个抗原结合结构域包含至少一个特异性结合特定抗原的单独或与一个或多个另外的CDR和/或FR组合的CDR。在本发明的语境中,第一抗原结合臂A1特异性结合第一抗原(例如CD38),并且第二抗原结合臂A2特异性结合与第一抗原不同的第二和第三抗原(例如,4-1BB)。

[0188] 本文讨论的多特异性抗原结合分子可以包含人IgG重链恒定区。在一些情况下,人IgG重链恒定区是同种型IgG1。在一些情况下,人IgG重链恒定区是同种型IgG4。在各种实施方案中,多特异性抗原结合分子包含嵌合铰链,所述嵌合铰链与相同同种型的野生型铰链相比减少Fc γ 受体结合。

[0189] 第一抗原结合臂A1和第二抗原结合臂A2可以彼此直接或间接连接,以形成本发明的多特异性抗原结合分子。可替代地,第一抗原结合臂A1和第二抗原结合臂A2可以各自连接至分开的多聚化结构域。一个多聚结构域与另一个多聚结构域的结合促进两个抗原结合结构域之间的结合,从而形成多特异性抗原结合分子。如本文所用,“多聚结构域”是任何大分子、蛋白质、多肽、肽或氨基酸,其具有与相同或相似结构或构造的第二多聚结构域结合

的能力。例如,多聚结构域可以是包含免疫球蛋白C_H3结构域的多肽。多聚组分的非限制性实例是免疫球蛋白的Fc部分(包含C_H2-C_H3结构域),例如选自同种型IgG1、IgG2、IgG3和IgG4以及每个同种型组内的任何同种异型的IgG的Fc结构域。

[0190] 本发明的多特异性抗原结合分子通常将包含两个多聚化结构域,例如两个Fc结构域,其各自单独地是分开的抗原结合分子重链的部分。第一多聚结构域和第二多聚结构域可以具有相同的IgG同种型,例如IgG1/IgG1、IgG2/IgG2、IgG4/IgG4。可替代地,第一多聚结构域和第二多聚结构域可以具有不同的IgG同种型,例如IgG1/IgG2、IgG1/IgG4、IgG2/IgG4等。

[0191] 在某些实施方案中,多聚结构域是Fc片段或长度为1至约200个氨基酸的氨基酸序列,其包含至少一个半胱氨酸残基。在其他实施方案中,多聚结构域是半胱氨酸残基或含半胱氨酸的短肽。其他多聚化结构域包括包含亮氨酸拉链、螺旋环基序或卷曲螺旋基序或由其组成的肽或多肽。

[0192] 任何多特异性抗原结合分子形式或技术都可以用于制备本发明的多特异性抗原结合分子。例如,具有第一抗原结合特异性的抗原结合分子或其片段可以与一种或多种其他分子实体,例如具有第二抗原结合特异性的另一种抗原结合分子或抗原结合分子片段功能性连接(例如,通过化学偶联、遗传融合、非共价结合或其他方式),以产生多特异性抗原结合分子。可以在本发明的语境中使用的特定示例性多特异性形式包括但不限于例如基于scFv的或双体多特异性形式、IgG-scFv融合体、双可变结构域(DVD)-Ig、四源杂交瘤、钮入孔、共同轻链(例如,具有钮入孔的共同轻链等)、CrossMab、CrossFab、(SEED)体、亮氨酸拉链、Duobody、IgG1/IgG2、双重作用Fab(DAF)-IgG和Mab^2多特异性形式(关于前述形式的综述,参见例如,Klein等人,2012,mAbs 4:6,1-11,以及其中引用的参考文献)。

[0193] 在本发明的多特异性抗原结合分子的语境中,与野生型、天然存在的形式的Fc结构域相比,多聚化结构域(例如,Fc结构域)可以包含一个或多个氨基酸改变(例如,插入、缺失或取代)。例如,本发明包括在Fc结构域中包含一个或多个修饰的多特异性抗原结合分子,其导致经修饰的Fc结构域在Fc和FcRn之间具有经修饰的结合相互作用(例如,增强或减弱)。在一个实施方案中,多特异性抗原结合分子在C_H2或C_H3区中包含修饰,其中所述修饰在酸性环境下(例如,在pH范围为从约5.5至约6.0的胞内体中)增加了Fc结构域与FcRn的亲和力。此类Fc修饰的非限制性实例包括例如,位置250(例如,E或Q);250和428(例如,L或F);252(例如,L/Y/F/W或T)、254(例如,或T)和256(例如,S/R/Q/E/D或T)处的修饰;或位置428和/或433(例如,L/R/S/P/Q或K)和/或434(例如,H/F或Y)处的修饰;或位置250和/或428处的修饰;或位置307或308(例如,308F、V308F)和434处的修饰。在一个实施方案中,修饰包含428L(例如M428L)和434S(例如N434S)修饰;428L、259I(例如V259I)和308F(例如V308F)修饰;433K(例如H433K)和434(例如434Y)修饰;252、254和256(例如252Y、254T和256E)修饰;250Q和428L修饰(例如T250Q和M428L);以及307和/或308修饰(例如308F或308P)。

[0194] 本公开还包括包含第一C_H3结构域和第二Ig C_H3结构域的多特异性抗原结合分子,其中所述第一和第二Ig C_H3结构域的至少一个氨基酸彼此不同,并且其中至少一个氨基酸差异与缺乏氨基酸差异的双特异性抗原结合分子相比减少了多特异性抗原结合分子与蛋白A的结合。在一个实施方案中,第一Ig C_H3结构域结合蛋白A并且第二Ig C_H3结构域含有降低或消除蛋白A结合的突变,例如H95R修饰(根据IMGT外显子编号;根据EU编号的H435R)。第

二C_H3还可以包含Y96F修饰(按照IMGT;按照EU的Y436F)。第二C_H3可能还包含L105P修饰(按照IMGT;按照EU的L455P)。参见例如美国专利号8,586,713。可以存在于第二C_H3内的其他修饰包括:在IgG1抗原结合分子的情况下,D16E、L18M、N44S、K52N、V57M和V82I(按照IMGT;按照EU的D356E、L358M、N384S、K392N、V397M和V422I);在IgG2抗原结合分子的情况下,N44S、K52N和V82I(IMGT;按照EU的N384S、K392N和V422I);以及在IgG4抗原结合分子的情况下,Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q和V82I(按照IMGT;按照EU的Q355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q和V422I)。

[0195] 在某些实施方案中,Fc结构域可以是嵌合的,其组合了源自多于一种免疫球蛋白同种型的Fc序列。例如,嵌合Fc结构域可以包含来源于人IgG1、人IgG2或人IgG4 C_H2区的C_H2序列的部分或全部,以及来源于人IgG1、人IgG2或人IgG4的C_H3序列的部分或全部。嵌合Fc结构域也可以含有嵌合铰链区。例如,嵌合铰链可以包含源自人IgG1、人IgG2或人IgG4铰链区的“上铰链”序列,其与源自人IgG1、人IgG2或人IgG4铰链区的“下铰链”序列组合。可以包括在本文所述的任何抗原结合分子中的嵌合Fc结构域的特定例子从N末端到C末端包含:[IgG4 C_H1]-[IgG4上铰链]-[IgG2下铰链]-[IgG4CH2]-[IgG4 CH3]。可以包括在本文所述的任何抗原结合分子中的嵌合Fc结构域的另一个例子从N末端到C末端包含:[IgG1 C_H1]-[IgG1上铰链]-[IgG2下铰链]-[IgG4 CH2]-[IgG1 CH3]。在美国专利号9,359,437中描述了可以包含在本发明的任何抗原结合分子中的嵌合Fc结构域的这些和其他实例,所述专利公开号全文并入本文。具有这些一般结构安排的嵌合Fc结构域及其变体可以具有改变的Fc受体结合,其依次又影响Fc效应子功能。

[0196] 序列变体

[0197] 与衍生出单独抗原结合结构域的对应的种系序列相比,本发明的抗原结合分子和多特异性抗原结合分子可以在重链可变结构域和轻链可变结构域的框架区和/或CDR区中包含一个或多个氨基酸置换、插入和/或缺失。通过将本文公开的氨基酸序列与可从例如公共抗原结合分子序列数据库获得的种系序列进行比较,可以容易地确定此类突变。本发明的抗原结合分子可包含源自本文公开的示例性氨基酸序列的抗原结合结构域,其中一个或多个框架区和/或CDR区内的一个或多个氨基酸突变成衍生出所述抗原结合分子的种系序列的对应残基、或另一人种系序列的对应残基、或对应种系残基的保守氨基酸置换(此类序列变化在本文中统称为“种系突变”)。本领域的普通技术人员从本文所公开的重链和轻链可变区序列开始,可以容易地产生多种抗原结合分子,所述抗原结合分子包含一个或多个单独的种系突变或其组合。在某些实施方案中,V_H和/或V_L结构域内的所有框架和/或CDR残基突变回存在于最初衍生出抗原结合结构域的原始种系序列中的残基。在其他实施方案中,仅某些残基被突变回原始种系序列,例如,仅存在于FR1的前8个氨基酸内或FR4的后8个氨基酸内的突变残基,或仅存在于CDR1、CDR2或CDR3内的突变残基。在其他实施方案中,框架和/或CDR残基中的一个或多个突变成不同的种系序列(即,不同于最初衍生出抗原结合结构域的种系序列的种系序列)的一个或多个对应残基。

[0198] 此外,抗原结合结构域可以含有框架区和/或CDR区内的两个或更多个种系突变的任何组合,例如,其中某些个别残基突变成特定种系序列的对应残基,而不同于原始种系序列的某些其他残基得以保持或突变成不同种系序列的对应残基。在获得含有一个或多个种系突变的抗原结合结构域后,可以容易地测试所述抗原结合结构域的一种或多种所需特

性,诸如改善的结合特异性、增加的结合亲和力、改善或增强的拮抗性或激动性生物特性(视具体情况而定)、降低的免疫原性等。以这种一般方式获得的包含一个或多个抗原结合结构域的多特异性抗原结合分子涵盖在本发明中。

[0199] pH依赖性结合

[0200] 本发明包括具有pH依赖性结合特性的抗CD38 x抗4-1BB多特异性抗原结合分子。例如,与在中性pH下相比,本发明的抗CD38抗原结合臂在酸性pH下可能表现出与CD38的结合降低。可替代地,与在中性pH下相比,本发明的抗CD38抗原结合臂在酸性pH下与CD38的结合增强。表述“酸性pH”包括小于约6.2,例如约6.0、5.95、5,9、5.85、5.8、5.75、5.7、5.65、5.6、5.55、5.5、5.45、5.4、5.35、5.3、5.25、5.2、5.15、5.1、5.05、5.0或更小的pH值。如本文所用,表述“中性pH”是指约7.0至约7.4的pH。表述“中性pH”包括约7.0、7.05、7.1、7.15、7.2、7.25、7.3、7.35和7.4的pH值。

[0201] 在某些情况下,“与在中性pH下相比在酸性pH下结合减少”以在酸性pH下抗原结合分子与其抗原结合的K_D值与在中性pH下抗原结合分子与其抗原结合的K_D值的比率来表述(反之亦然)。例如,出于本发明的目的,如果抗原结合分子表现出酸性/中性K_D比率为约3.0或更大,则抗原结合分子可以被视为表现出“与在中性pH下相比在酸性pH下与CD38的结合减少”。在某些示例性实施方案中,本发明的抗原结合分子的酸性/中性K_D比率可以为约3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、13.5、14.0、14.5、15.0、20.0、25.0、30.0、40.0、50.0、60.0、70.0、100.0或更大。

[0202] 可以例如通过就与中性pH相比在酸性pH与特定抗原结合减少(或增强)而筛选抗原结合分子群体来获得具有pH依赖性结合特征的抗原结合分子。另外,在氨基酸水平修饰抗原结合结构域可以产生具有pH依赖性特征的抗原结合分子。例如,通过将抗原结合结构域的一个或多个氨基酸(例如,在CDR内部)置换为组氨酸残基,可以获得相对于中性pH在酸性pH时抗原结合作用减少的抗原结合分子。

[0203] 包含Fc变体的抗原结合分子

[0204] 根据本发明的某些实施方案,提供了抗CD38 x抗4-1BB多特异性抗原结合分子,其包含具有一个或多个突变的Fc结构域,所述突变例如与在中性pH下相比在酸性pH下增强了或减弱了抗原结合分子与FcRn受体的结合。例如,本发明包括这样的抗原结合分子:所述抗原结合分子在Fc结构域的C_H2或C_H3区中包含突变,其中一个或多个突变在酸性环境下(例如,在pH范围为从约5.5至约6.0的胞内体中)增加了Fc结构域与FcRn的亲和力。当向动物施用时,此类突变可以导致抗原结合分子的血清半衰期增加。此类Fc修饰的非限制性实例包括例如,位置250(例如,E或Q);250和428(例如,L或F);252(例如,L/Y/F/W或T)、254(例如,或T)和256(例如,S/R/Q/E/D或T)处的修饰;或位置428和/或433(例如,H/L/R/S/P/Q或K)和/或434(例如,H/F或Y)处的修饰;或位置250和/或428处的修饰;或位置307或308(例如,308F、V308F)和434处的修饰。在一个实施方案中,修饰包含428L(例如M428L)和434S(例如N434S)修饰;428L、259I(例如V259I)和308F(例如V308F)修饰;433K(例如H433K)和434(例如434Y)修饰;252、254和256(例如252Y、254T和256E)修饰;250Q和428L修饰(例如T250Q和M428L);以及307和/或308修饰(例如308F或308P)。

[0205] 例如,本公开包括包含Fc结构域的抗CD38 x抗4-1BB 1+2多特异性抗原结合分子,

所述Fc结构域包含一对或多对或者一组或多组选自由以下组成的组的突变:250Q和248L(例如,T250Q和M248L);252Y、254T和256E(例如,M252Y、S254T和T256E);428L和434S(例如,M428L和N434S);以及433K和434F(例如,H433K和N434F)。在本发明的范围内设想了本文公开的抗原结合分子可变结构域内的前述Fc结构域突变和其他突变的所有可能的组合。

[0206] 抗原结合分子和多特异性抗原结合分子的生物学特性

[0207] 本文提供了与MOLP8细胞上表达的CD38结合的抗CD38 x抗4-1BB多特异性抗原结合分子。如实施例6中所示,在MOLP8细胞的存在下观察到CD38x4-1BB 1+2(REGN7633、REGN7647和REGN7650)和1+1(REGN7150)双特异性抗体的剂量依赖性结合,其中最大gMFI的范围为$8.8x10^{4}$至$1.4x10^{5}$,EC_{50}的范围为$4.23x10^{-9}$M至$9.27x10^{-9}$M。

[0208] 本文提供了结合在经工程化以表达4-1BB的HEK293细胞上表达的4-1BB的抗CD38 x抗4-1BB多特异性抗原结合分子。在HEK293/h4-1BB细胞的存在下观察到CD38x4-1BB 1+2(REGN7633、REGN7647和REGN7650)和1+1(REGN7150)双特异性抗体的剂量依赖性结合,其中最大gMFI的范围为$7.4x10^{5}$至$2.4x10^{6}$,EC_{50}的范围为$1.47x10^{-8}$M至$9.97x10^{-10}$M。

[0209] CD38x4-1BB(1+1和1+2)多特异性抗原结合分子通过将CD38+靶细胞与4-1BB受体阳性T细胞连接起来而模拟4-1BB的天然配体。这样做时,构建体提供“信号2”并在由肿瘤相关抗原(TAA)x CD3双特异性抗体提供的“信号1”或由APC提供的同种异体反应的存在下增强T细胞的活化。如实施例7中所示,本文提供的多特异性抗原结合分子在靶标和信号1(由REGN1979提供)的存在下在T细胞活化测定中导致比匹配的同种型对照更高的最大IL-2反应和更大的效力。如实施例8中所示,即使在Fab2与Fab3之间的接头长度发生变化,多特异性抗原结合分子也具有IL-2和IFN的剂量依赖性增加和更大的效力。

[0210] 根据某些实施方案,本文提供的多特异性抗原结合分子在表达CD38的靶细胞的存在下活化4-1BB受体并刺激4-1BB活性,如在工程化报告基因测定中所展示的。如实施例9中所示,使用具有不同接头长度的构建体实现了4-1BB活化。

[0211] 在某些实施方案中,本文提供的多特异性抗原结合分子导致IL-2和IFNγ释放的剂量依赖性增加。如实施例10中所示,在同种异体NALM-6细胞或经工程化以表达PD-L1的NALM-6细胞的存在下,CD38x4-1BB 1+2抗体治疗(REGN7633、REGN7647和REGN7650)导致IL-2和IFNγ释放的剂量依赖性增加和更高的效力。

[0212] 根据某些实施方案,当在体内与BCMAxCD3双特异性抗体组合施用时使用多特异性抗原结合分子治疗产生比单独使用任一治疗更有效的抗肿瘤功效。在实施例11中,向腹膜内注射过$4x10^{6}$个人外周血单核细胞(PBMC)的免疫缺陷NOD.Cg-$Prkdc^{scid}$$I12rg^{tm1Wjl}$/SzJ(NSG)小鼠施用人多发性骨髓瘤细胞。在接受肿瘤细胞之后,用0.4mg/kg的结合CD3的对照双特异性Ab或BCMAxCD3(REGN5458)bsAb与4mg/kg的结合4-1BB的对照双特异性Ab(1+2形式)或CD38x4-1BB(1+2形式;REGN9686)组合治疗小鼠。将治疗组合在第7天和第14天再施用两次,总共三剂。用BCMAxCD3 bsAb加CD38x4-1BB 1+2bsAb进行组合治疗表现出比单独使用任一种疗法更有效的组合抗肿瘤功效。

[0213] 表位作图和相关技术

[0214] 本发明的抗原结合分子结合的在CD38和/或4-1BB上的表位可以由相应CD38或4-1BB蛋白的3个或更多个(例如,3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或更多个)氨基酸的单个连续序列组成。可替代地,表

位可以由CD38或4-1BB的多个非邻接氨基酸(或氨基酸序列)组成。

[0215] 如本文所用,术语“表位”是指与抗原结合分子的可变区中的特异性抗原结合位点(p.m.称为互补位)发生相互作用的抗原决定簇。单个抗原可以具有超过一个表位。因此,不同的抗原结合分子可以与抗原上的不同区域结合并且可以具有不同的生物效应。表位可以是构象的或线性的。构象表位由来自线性多肽链的不同区段的氨基酸在空间上并列而产生。线性表位由多肽链中的邻近氨基酸残基来产生。在某些情况下,表位可以包括抗原上的糖、磷酰基基团或磺酰基基团部分。

[0216] 本领域普通技术人员已知的各种技术可以用于确定抗原结合分子的抗原结合结构域是否在多肽或蛋白质内“与一个或多个氨基酸相互作用”。示例性技术包括例如常规交叉阻断测定法(诸如Antigen binding molecules,Harlow and Lane(Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harb.,NY)所述)、丙氨酸扫描突变分析、肽印迹分析(Reineke,2004,Methods Mol Biol 248:443-463)和肽切割分析。此外,可以采用诸如抗原的表位切除、表位提取和化学修饰的方法(Tomer,2000,Protein Science9:487-496)。可以用于鉴定与抗原结合分子的抗原结合结构域相互作用的多肽内的氨基酸的另一种方法是通过质谱法检测的氢/氘交换。一般而言,氢/氘交换方法涉及对感兴趣的蛋白进行氘标记,然后使抗原结合分子与氘标记的蛋白结合。然后,将蛋白质/抗原结合分子复合物转移至水中,以允许在除了由抗原结合分子保护的残基(仍然是氘标记的)之外的所有残基处发生氢-氘交换。在抗原结合分子解离之后,对靶蛋白进行蛋白酶裂解和质谱分析,从而揭示氘标记的残基,这些残基对应于与抗原结合分子相互作用的特定氨基酸。参见例如,Ehring(1999)Analytical Biochemistry 267(2):252-259;Engen和Smith(2001)Anal.Chem.73:256A-265A。抗原/抗原结合分子复合物的X射线晶体学也可以用于表位作图目的。

[0217] 本文提供了抗CD38抗原结合臂A1,其与本文所述的任何特定示例性抗原结合臂(例如,包含如在本文表1中所示的任何氨基酸序列的抗原结合分子)结合同一表位。同样,本发明还包括抗CD38抗原结合臂A1,其与本文所述的任何特定示例性抗原结合臂(例如,包含如在本文表1中所示的任何氨基酸序列的抗原结合分子)竞争结合至CD38。

[0218] 本文提供了抗4-1BB抗原结合臂A2,其包含第一抗原结合结构域(R1)和第二抗原结合结构域(R2),其中R1或R2与本文所述的任何特定示例性抗原结合结构域(例如,包含如在本文表3或表5中所示的任何氨基酸序列的抗原结合臂)结合同一表位。同样,本发明还包括抗4-1BB抗原结合分子,其与本文所述的任何特定示例性抗原结合结构域(例如,包含如在本文表3或表5中所示的任何氨基酸序列的抗原结合臂)竞争结合至4-1BB。

[0219] 同样,本文提供了多特异性抗原结合分子,其包含特异性结合人CD38的第一抗原结合臂(Fab1)和特异性结合人4-1BB的第二抗原结合臂(Fab2和Fab3),其中所述第一抗原结合结构域与本文所述的任何特定示例性CD38特异性抗原结合臂竞争结合至CD38,和/或其中所述第二抗原结合臂与本文所述的任何特定示例性4-1BB特异性抗原结合Fab竞争结合至4-1BB。

[0220] 通过使用本领域已知的常规方法,可以容易地确定特定抗原结合分子(例如,多特异性1+2抗原结合分子)或其抗原结合片段是否结合至与本发明的参考抗原结合分子同一表位或与本公开的参考抗原结合分子竞争结合。例如,为了确定测试抗原结合分子是否与本发明的参考多特异性抗原结合分子结合至CD38(或4-1BB)上的同一表位,首先允许参考

多特异性分子与CD38蛋白(或4-1BB蛋白)结合。接下来,评估测试抗原结合分子与CD38(或4-1BB)分子结合的能力。如果测试抗原结合分子在与参考多特异性抗原结合分子饱和结合后能够与CD38(或4-1BB)结合,则可以得出结论,测试抗原结合分子与参考多特异性抗原结合分子结合至CD38(或4-1BB)的不同表位。在另一个方面,如果测试抗原结合分子在与参考多特异性抗原结合分子饱和结合后不能与CD38(或4-1BB)分子结合,则测试抗原结合分子可以结合至与由本发明的参考多特异性抗原结合分子结合的表位相同的CD38(或4-1BB)表位。然后可以进行另外的常规实验(例如,肽突变和结合分析),以确认所观察到的测试抗原结合分子结合的缺乏事实上是否是由于结合至与参考多特异性抗原结合分子同一表位,或者空间阻断(或另一个现象)是否是造成所观察的结合缺乏的原因。可以使用ELISA、RIA、Biacore、流式细胞计量术或本领域可获得的任何其他定量或定性抗原结合分子结合测定来进行这种实验。根据本发明的某些实施方案,如果例如1倍、5倍、10倍、20倍或100倍过量的一种抗原结合蛋白抑制另一种抗原结合蛋白的结合至少50%,但优选地75%、90%或甚至99%,如在竞争性结合测定中所测量,则两种抗原结合蛋白结合至相同的(或重叠的)表位(参见例如,Junghans等人,Cancer Res.1990:50:1495-1502)。可替代地,如果抗原中的减少或消除一种抗原结合蛋白的结合的基本上所有氨基酸突变都减少或消除另一种抗原结合蛋白的结合,则认为两种抗原结合蛋白结合至同一表位。如果只有减少或消除一种抗原结合蛋白的结合的氨基酸突变的子集减少或消除另一种抗原结合蛋白的结合,则认为两种抗原结合蛋白具有“重叠的表位”。

[0221] 为了确定抗原结合分子或其抗原结合结构域是否与参考抗原结合分子竞争结合,在两个方向上进行上文所述的结合方法:在第一方向上,允许参考抗原结合分子在饱和条件下结合至CD38蛋白(或4-1BB蛋白),然后评估测试抗原结合分子与CD38(或4-1BB)分子的结合。在第二方向上,允许测试抗原结合分子在饱和条件下结合至CD38(或4-1BB),然后评估参考抗原结合分子与CD38(或4-1BB)分子的结合。如果在两个方向上只有第一(饱和)抗原结合分子能够结合至CD38(或4-1BB)分子,则得出以下结论:测试抗原结合分子和参考抗原结合分子竞争与CD38(或4-1BB)结合。如本领域的普通技术人员所理解,竞争与参考抗原结合分子的结合的抗原结合分子可能未必结合至与参考抗原结合分子同一表位,但是可能通过重叠或邻近表位的结合来在空间上阻断参考抗原结合分子的结合。

[0222] 抗原结合结构域的制备和多特异性分子的构建

[0223] 可以通过本领域已知的任何抗原结合分子产生技术制备对特定抗原具有特异性的抗原结合结构域。一旦获得,对不同抗原(例如,CD38和4-1BB)具有特异性的本文提供的不同抗原结合结构域可以相对于彼此适当地排列以使用常规方法产生本发明的多特异性抗原结合分子。(可以用于构建本发明的多特异性抗原结合分子的示例性多特异性抗原结合分子形式的讨论在本文别处提供)。在某些实施方案中,本发明的多特异性抗原结合分子的一种或多种单独组件(例如,重链和轻链)来源于嵌合、人源化或完全人抗原结合分子。制备此类抗原结合分子的方法是本领域熟知的。例如,可以使用VELOCIMMUNE™技术制备本发明的多特异性抗原结合分子的一条或多条重链和/或轻链。使用VELOCIMMUNE™技术(或任何其他人抗原结合分子产生技术),首先分离具有人可变区和小鼠恒定区的对特定抗原(例如,CD38或4-1BB)的高亲和力嵌合抗原结合分子。针对期望特征,包括亲和力、选择性、表位等表征并且选择抗原结合分子。小鼠恒定区被所需的人恒定区替换以产生可掺入本发明的

多特异性抗原结合分子中的完全人重链和/或轻链。

[0224] 基因工程化动物可用于制备人多特异性抗原结合分子。例如,可以使用不能重排和表达内源性小鼠免疫球蛋白轻链可变序列的经遗传修饰的小鼠,其中所述小鼠仅表达一个或两个由人免疫球蛋白序列编码的人轻链可变结构域,所述人免疫球蛋白序列可操作地连接至内源性小鼠κ基因座处的小鼠κ恒定基因。此类经遗传修饰的小鼠可用于产生包含两条不同重链的完全人抗原结合分子,所述重链与包含来源于两个不同的人轻链可变区基因区段之一的可变结构域的相同轻链相关联。(参见例如US 2011/0195454)。完全人是指抗原结合分子或其抗原结合片段或其免疫球蛋白结构域在所述抗原结合分子或其抗原结合片段或其免疫球蛋白结构域的每个多肽的全长上包含由源自人序列的DNA编码的氨基酸序列。在某些情况下,完全人序列来源于人的内源性蛋白质。在其他情况下,完全人蛋白质或蛋白质序列包含嵌合序列,其中每个组分序列都来自人序列。尽管不受任何一种理论的束缚,但嵌合蛋白或嵌合序列通常被设计成例如与任何野生型人免疫球蛋白区域或结构域相比在组分序列的连接处最小化免疫原性表位的产生。生物等效物

[0225] 本文提供了具有与本文公开的示例性分子的氨基酸序列不同但保留结合CD38和/或4-1BB的能力的氨基酸序列的抗原结合分子。当与亲本序列相比时,此类变体分子可以包含一个或多个氨基酸添加、缺失或置换,但是表现出基本上相当于所描述的多特异性抗原结合分子的生物学活性。

[0226] 与本文所示的任何示例性抗原结合分子生物等效的抗原结合分子是药物等效物或药物替代物,其吸收速率和程度在相似实验条件下以相同摩尔剂量(单剂量或多剂量)施用时不显示显著的差异。如果一些抗原结合蛋白在吸收程度上是等效的,但是在吸收速率上不是等效的,则它们将被视为等效物或药物替代物,但是因为吸收速率的这种差异是有意的并且反映在标记中,所以可以被视为生物等效物,这些抗体对于例如在长期使用中达到有效体内药物浓度不是必需的,并且被认为对于所研究的特定药品不具有临床意义。

[0227] 在一个实施方案中,如果两种抗原结合蛋白的安全性、纯度和效力不存在临床上有意义的差异,则所述两种抗原结合蛋白是生物等效的。

[0228] 在一个实施方案中,如果与不进行参考产品和生物产品之间的切换的连续疗法相比,患者可以进行此类切换一次或多次,而没有预期的不良反应风险的增加,包括免疫原性的临床上显著的变化、或减少的有效性,则两种抗原结合蛋白是生物等效的。

[0229] 在一个实施方案中,如果两种抗原结合蛋白都通过针对一个或多个使用条件的一种或多种共同作用机制来发挥作用,以达到此类机制是已知的程度,则所述两种抗原结合蛋白是生物等效的。

[0230] 生物等效性可以通过体内和体外方法来展示。生物等效性度量包括,例如,(a)在人或其他哺乳动物中的体内试验,其中测量了随时间推移的血液、血浆、血清或其他生物流体中的抗原结合分子或其代谢物的浓度;(b)与人体内生物利用率数据相关联并且可以合理地预测人体内生物利用率数据的体外试验;(c)在人或其他哺乳动物中的体内试验,其中测量了随时间推移的抗原结合分子(或其靶标)的适当急性药理作用;以及(d)建立抗原结合蛋白的安全性、功效、或者生物利用率或生物等效性的良好对照的临床试验。

[0231] 可以通过例如进行残基或序列的各种置换或使生物学活性不需要的末端或内部残基或序列缺失来构建本文所阐述的抗原结合分子的示例性多特异性抗原结合分子的生

物等效变体。举例来说,可以缺失不是生物学活性必需的半胱氨酸残基或用其他氨基酸替换,以防止在复性时形成不必要的或不正确的分子内二硫桥键。在其他语境中,生物等效抗原结合蛋白可以包括本文所阐述的示例性多特异性抗原结合分子的包含修改所述分子的糖基化特征的氨基酸变化(例如消除或去除糖基化的突变)的变体。

[0232] 物种选择性和物种交叉反应性

[0233] 根据本发明的某些实施方案,提供了与人4-1BB结合但不与来自其他物种的4-1BB结合的抗原结合分子。还提供了与人CD38结合但不与来自其他物种的CD38结合的抗原结合分子。本发明还包括与人4-1BB和与来自一种或多种非人物种的CD38结合的抗原结合分子;和/或与人4-1BB和与来自一种或多种非人物种的4-1BB结合的抗原结合分子。

[0234] 根据本发明的某些示例性实施方案,提供了抗原结合分子,所述抗原结合分子与人CD38和/或人4-1BB结合并且可以结合或不结合(视情况而定)至小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、沙鼠、猪、猫、狗、兔、山羊、绵羊、奶牛、马、骆驼、食蟹猕猴、狨猴、恒河猴或黑猩猩CD38和/或4-1BB中的一者或多者。例如,在本文公开的特定示例性实施方案中,提供了多特异性抗原结合分子,所述多特异性抗原结合分子包含结合人CD38或食蟹猴CD38的第一抗原结合臂以及含有第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的第二抗原结合臂,其中所述第二抗原结合臂特异性结合人4-1BB;或者多特异性抗原结合分子,所述多特异性抗原结合分子包含第二抗原结合臂以及特异性结合人CD38的第一抗原结合臂,所述第二抗原结合臂包含结合人4-1BB和/或食蟹猴4-1BB的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域。

[0235] 治疗制剂和施用

[0236] 本发明提供了包含本文公开的多特异性抗原结合分子的药物组合物。本发明的药物组合物用合适的载剂、赋形剂、和提供改善的转移、递送、耐受性等等的其他药剂来配制。众多的适当配制物可以见于所有医药化学家已知的处方集中:Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Company,Easton,PA。这些制剂包括例如粉末剂、糊剂、软膏剂、凝胶剂、蜡、油、脂质、含脂质(阳离子或阴离子)囊泡(诸如LIPOFECTIN™,Life Technologies,Carlsbad,CA)、DNA缀合物、无水吸收糊剂、水包油和油包水乳液、乳剂碳蜡(各种分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶剂和含有碳蜡的半固体混合物。也参见Powell等人."Compendium of excipients for parenteral formulations"PDA(1998)J Pharm Sci Technol 52:238-311。

[0237] 施用于患者的多特异性抗原结合分子的剂量可以根据患者的年龄和体型、目标疾病、病症、施用途径等等而变化。优选的剂量通常根据体重或体表面积来计算。当本发明的多特异性抗原结合分子在成年患者中用于治疗目的时,通常以约0.01至约20mg/kg体重、更优选地约0.02至约7mg/kg体重、约0.03至约5mg/kg体重、或约0.05至约3mg/kg体重的单剂量静脉内施用本发明的多特异性抗原结合分子可能是有利的。视病症的严重程度而定,可以调整治疗的频率和持续时间。可以凭经验确定多特异性抗原结合分子施用的有效剂量和排程;例如,可以通过定期评估来监测患者进展,并且相应地调整剂量。此外,可以使用本领域熟知的方法进行剂量的物种间按比例缩放(例如Mordenti等人,1991,Pharmaceut.Res.8:1351)。

[0238] 各种递送系统是已知的,并且可以用于施用本发明的药物组合物,例如包封在脂质体、微粒、微胶囊、能够表达突变病毒的重组细胞、受体介导的内吞体中(参见例如Wu等

人,1987,J.Biol.Chem.262:4429-4432)。引入的方法包括但不限于真皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。所述组合物可以通过任何便利的途径,例如通过输注或团注、通过经上皮或粘膜皮肤内层(例如,口腔粘膜、直肠和肠道粘膜等)吸收施用,并且可以与其他生物活性剂一起施用。施用可以是全身性或局部的。

[0239] 本发明的药物组合物可以用标准针头和注射器皮下、肌内或静脉内递送。另外,对于皮下递送,笔式递送装置易于应用于递送本发明的药物组合物。这种笔式递送装置可以重复使用或是一次性的。可重复使用的笔式递送装置一般利用含有药物组合物的可更换的筒。一旦筒内的所有药物组合物都已施用并且筒变空时,就可以容易地丢弃空筒并且更换为含有药物组合物的新筒。然后可以再使用笔式递送装置。在一次性笔式递送装置中,没有可更换的筒。实际上,一次性笔式递送装置在装置内的储集器中预填充有药物组合物。一旦清空储集器中的药物组合物,就丢弃整个装置。

[0240] 多种可重复使用的笔式递送装置和自动注射器递送装置应用于皮下递送本发明的药物组合物。实例包括但不限于AUTOPEN™(Owen Mumford,Inc.,Woodstock,UK)、DISETRONIC™笔(Disetronic Medical Systems,Bergdorf,Switzerland)、HUMALOG MIX 75/25™笔、HUMALOG™笔、HUMALIN 70/30™笔(Eli Lilly and Co.,Indianapolis,IN)、NOVOPEN™I、II和III(Novo Nordisk,Copenhagen,Denmark)、NOVOPEN JUNIOR™(Novo Nordisk,Copenhagen,Denmark)、BD™笔(Becton Dickinson,Franklin Lakes,NJ)、OPTIPEN™、OPTIPEN PRO™、OPTIPEN STARLET™和OPTICLIK™(sanofi-aventis,Frankfurt,Germany)等等。可用于本发明的药物组合物的皮下递送的一次性笔递送装置的实例包括但不限于SOLOSTAR™笔(sanofi-aventis)、FLEXPEN™(Novo Nordisk)、和KWIKPEN™(Eli Lilly)、SURECLICK™自动注射器(Amgen,Thousand Oaks,CA)、PENLET™(Haselmeier,Stuttgart,Germany)、EPIPEN(Dey,L.P.)、和HUMIRA™笔(Abbott Labs,Abbott Park IL)等等。

[0241] 在某些情形下,可以在控释系统中递送药物组合物。在一个实施方案中,可以使用泵(参见Langer,同上;Sefton,1987,CRC Crit.Ref.Biomed.Eng.14:201)。在另一个实施方案中,可以使用聚合物材料;参见Medical Applications of Controlled Release,Langer和Wise(编辑),1974,CRC Pres.,Boca Raton,Florida。在又一个实施方案中,可以将控释系统放置于组合物靶标附近,因此只需要全身剂量的一小部分(参见例如,Goodson,1984,载于Medical Applications of Controlled Release,同上,第2卷,第115-138页)。在Langer,1990,Science 249:1527-1533的综述中讨论了其他控释系统。

[0242] 所述可注射制剂可以包括用于静脉内、皮下、皮内和肌肉内注射、点滴输注等的剂型。这些可注射制剂可以通过众所周知的方法制备。例如,可注射制剂可以例如将上文所描述的抗原结合分子或其盐溶解、悬浮或乳化于常规地用于注射的无菌水性介质或油性介质中来制备。作为用于注射的水性介质,有例如生理盐水、含有葡萄糖和其他辅助剂的等渗溶液等,它们可以与适当的增溶剂(诸如醇(例如,乙醇)、多元醇(例如,丙二醇、聚乙二醇)、非离子表面活性剂[例如,聚山梨醇酯80、HCO-50(氢化蓖麻油的聚氧乙烯(50mol)加合物)]等)组合使用。作为油性介质,采用例如芝麻油、大豆油等,其可以与增溶剂,如苯甲酸苯甲酯、苯甲醇等组合使用。由此制备的注射剂优选地填充于适当安瓿中。

[0243] 有利地,将用于上文所述的口服或不经肠使用的药物组合物制备成适合于符合活

性成分剂量的单位剂量的剂型。此类呈单位剂量的剂型包括例如片剂、丸剂、胶囊、注射液(安瓿)、栓剂等。所含有的前述抗原结合分子的量通常为在单位剂量中每剂型约1至约1000mg;尤其是在注射形式中,对于其他剂型,所含有的前述抗原结合分子的量为约1至约100mg和约10至约250mg是优选的。在一些实施方案中,单位剂量可以为高达约750mg、800mg、900mg或1000mg。

[0244] 抗原结合分子的治疗用途

[0245] 本发明包括方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗组合物,所述治疗组合物包含特异性结合CD38和4-1BB的多特异性抗原结合分子。所述治疗组合物可以包含如本文所公开的任何多特异性抗原结合分子以及药学上可接受的载剂或稀释剂。如本文所用,表述"有需要的受试者"是指表现出一种或多种癌症症状或标志的人类或非人动物(例如,表达肿瘤或患有本文下文提及的任何癌症的受试者),或否则将受益于CD38活性的抑制或降低或CD38+细胞(例如,多发性骨髓瘤细胞)的消耗。

[0246] 本发明的多特异性抗原结合分子(以及包含所述多特异性抗原结合分子的治疗组合物)尤其可用于治疗其中刺激、活化和/或靶向免疫应答将是有益的任何疾病或病症。具体地,本发明的抗CD38 x抗4-1BB 1+2多特异性抗原结合分子可以用于治疗、预防和/或改善与CD38和/或BCMA表达或活性或CD38+和/或BCMA+细胞增殖相关或由其介导的任何疾病或病症。实现本发明的治疗方法的作用机制包括在效应细胞存在下杀死表达CD38的细胞,例如通过CDC、细胞凋亡、ADCC、吞噬作用,或通过这些机制中的两种或更多种的组合。可以使用本发明的多特异性抗原结合分子抑制或杀死的表达CD38的细胞包括例如多发性骨髓瘤细胞。

[0247] 本公开的多特异性抗原结合分子可以用于治疗与CD38表达相关的疾病或病症,包括例如多发性骨髓瘤、B细胞白血病、肝细胞癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、胰腺导管腺癌、神经胶质瘤或乳腺癌或特征部分在于具有CD38+细胞的另一种癌症。

[0248] 根据某些实施方案,抗CD38 x抗4-1BB 1+2抗原结合分子可用于抑制受试者的浆细胞肿瘤生长。在一些方面,浆细胞肿瘤是多发性骨髓瘤。

[0249] 本公开的多特异性抗原结合分子可以用于抑制受试者的肿瘤生长。所述肿瘤选自由以下组成的组:多发性骨髓瘤、淋巴瘤、B细胞白血病、肝细胞癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、胰腺导管腺癌、神经胶质瘤或乳腺癌或特征部分在于具有CD38+细胞的另一种癌症。

[0250] 根据某些实施方案,抗CD38 x抗4-1BB 1+2抗原结合分子可用于治疗表达例如BCMA或CD20的肿瘤细胞。本文提供的抗原结合分子还可以用于治疗与BCMA表达相关的疾病或病症,包括例如癌症,包括多发性骨髓瘤或其他B细胞或浆细胞癌症,诸如华氏巨球蛋白血症、伯基特淋巴瘤、和弥漫性大B细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤。根据本发明的某些实施方案,抗CD38 x抗4-1BB抗原结合分子可用于治疗患有多发性骨髓瘤的患者。根据本发明的其他相关实施方案,提供了方法,所述方法包括向患有表达BCMA或CD20的癌细胞的患者施用本文提供的抗CD38x抗4-1BB多特异性抗原结合分子与如本文所公开的抗BCMA抗原结合分子、或抗BCMA x抗CD3多特异性抗原结合分子、或抗CD20 x抗CD3多特异性抗原结合分子、或抗CD28 x抗4-1BB多特异性抗原结合分子的组合。本领域已知的分析/诊断方法,诸如肿瘤扫描等可用于确定患者是否患有多发性骨髓瘤或另一种B细胞谱系癌症。

[0251] 在一些实施方案中,本文提供的抗CD38 x抗4-1BB多特异性抗原结合分子可以与第二治疗剂或治疗方案组合施用,所述第二治疗剂或治疗方案包括化学治疗药物、DNA烷化剂、免疫调节剂、蛋白酶体抑制剂、组蛋白去乙酰化酶抑制剂、放射疗法、干细胞移植、与不同肿瘤细胞表面抗原和T细胞或免疫细胞抗原相互作用的不同双特异性抗体、抗体药物缀合物、与抗肿瘤剂缀合的双特异性抗体、PD-1抑制剂(诸如抗PD-1抗体,例如西米普利单抗)、PD-L1抑制剂、CTLA-4检查点抑制剂或其组合。

[0252] 本发明还包括用于治疗受试者中的残留癌症的方法。如本文所用,术语"残留癌症"是指在用抗癌疗法治疗后受试者中的一种或多种癌细胞的存在或持续存在。

[0253] 根据某些方面,本发明提供了治疗与CD38表达相关的疾病或病症(例如,多发性骨髓瘤)的方法,所述方法包括在已经确定受试者患有多发性骨髓瘤之后向所述受试者施用一种或多种本文所述的抗CD38 x抗4-1BB 1+2抗原结合分子。例如,本发明包括治疗多发性骨髓瘤的方法,所述方法包括在受试者已经接受其他免疫疗法或化学疗法之后1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周或4周、2个月、4个月、6个月、8个月、1年或更长时间向患者施用抗CD38 x抗4-1BB多特异性抗原结合分子。

[0254] 组合疗法和制剂

[0255] 本发明提供了方法,所述方法包括与一种或多种另外的治疗剂组合施用包含本文所述的示例性抗原结合分子和多特异性抗原结合分子中的任一种的药物组合物。可以与本发明的抗原结合分子进行治疗组合或组合施用的示例性附加治疗剂包括例如抗肿瘤剂(例如,化学治疗剂,包括美法仑、长春新碱(Oncovin)、环磷酰(Cytoxan)、依托泊苷(VP-16)、多柔比星(阿霉素)、脂质体多柔比星(Doxil)、奥苯达莫司汀(obendamustine)(Treanda)或任何已知可有效治疗受试者的浆细胞肿瘤的其他药物)。在一些实施方案中,第二治疗剂包括类固醇。在一些实施方案中,第二治疗剂包括靶向疗法,包括沙利度胺(thalidomide)、来那度胺(lenalidomide)和硼替佐米(bortezomib),它们是被批准用于治疗新诊断的患者的疗法。来那度胺、泊马度胺(pomalidomide)、硼替佐米、卡非佐米(carfilzomib)、帕比司他(panobinostat)、伊沙唑米(ixazomib)、艾洛珠单抗(elotuzumab)和达雷木单抗(daratumumab)是有效治疗复发性骨髓瘤的第二治疗剂的实例。

[0256] 在一些实施方案中,第二治疗剂是抗BCMAxCD3双特异性抗原结合分子。在U.S.2020/0024356(以引用的方式并入本文)中公开了说明性抗BCMAxCD3双特异性抗原结合分子。如在U.S.2020/0024356中所公开,示例性抗BCMAxCD3双特异性抗原结合分子是REGN5458。在一些实施方案中,第二治疗剂是抗CD20xCD3双特异性抗原结合分子。在美国专利号9,657,102(以引用的方式并入本文)中公开了说明性抗CD20xCD3双特异性抗原结合分子。示例性抗CD20xCD3双特异性抗原结合分子是REGN1979(美国专利9,657,102)。

[0257] 在某些实施方案中,第二治疗剂是包括放射疗法或干细胞移植的方案。在某些实施方案中,第二治疗剂可以是免疫调节剂。在某些实施方案中,第二治疗剂可以是蛋白酶体抑制剂,包括硼替佐米(万珂(Velcade))、卡非佐米(凯洛斯(Kyprolis))、伊沙唑米(免瘤诺(Ninlaro))。在某些实施方案中,第二治疗剂可以是组蛋白脱乙酰酶抑制剂,诸如帕比司他(法瑞达克(Farydak))。在某些实施方案中,第二治疗剂可以是单克隆抗体、抗体药物缀合物、与抗肿瘤剂缀合的多特异性/双特异性/单特异性抗原结合分子、检查点抑制剂、溶瘤病毒、癌症疫苗、CAR-T细胞或其组合。可以与本发明的抗原结合分子组合有利地施用的其他

药剂包括细胞因子抑制剂,包括小分子细胞因子抑制剂和与细胞因子(诸如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18)或它们各自的受体结合的抗原结合分子。本发明的药物组合物(例如例如,包含如本文所公开的抗CD38 x抗4-1BB多特异性抗原结合分子的药物组合物)也可以作为包含一种或多种治疗组合的治疗方案的一部分来施用,所述一种或多种治疗组合选自可能与浆细胞表面上的不同抗原相互作用的除了本文所述的那些以外的单克隆抗原结合分子;具有与肿瘤细胞表面上的抗原结合的一个臂和与T细胞上的抗原结合的另一个臂的多特异性抗原结合分子;抗体药物缀合物;与抗肿瘤剂、检查点抑制剂(例如,靶向PD-1或CTLA-4的检查点抑制剂)或其组合缀合的双特异性抗体。在某些实施方案中,检查点抑制剂可以选自PD-1抑制剂,诸如帕博利珠单抗(Keytruda)、纳武单抗(Opdivo)或西米普利单抗(REGN2810;Libtayo)。在某些实施方案中,检查点抑制剂可以选自PD-L1抑制剂,诸如阿替利珠单抗(atezolizumab)(泰圣奇(Tecentriq))、阿维鲁单抗(avelumab)(百稳益(Bavencio))或度伐利尤单抗(Durvalumab)(英飞凡(Imfinzi))。在某些实施方案中,检查点抑制剂可以选自CTLA-4抑制剂,诸如伊匹单抗(ipilimumab)(益伏(Yervoy))。上文描述了可以与本发明的抗原结合分子联合使用的其他组合。

[0258] 本发明还包括治疗组合,所述治疗组合包含本文提及的任何抗原结合分子和以下中的一者或多者的抑制剂:VEGF、Ang2、DLL4、EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EGFRvIII、cMet、IGF1R、B-raf、PDGFR-α、PDGFR-β、FOLH1(PSMA)、PRLR、STEAP1、STEAP2、TMPRSS2、MSLN、CA9、尿溶蛋白或任何上述细胞因子,其中所述抑制剂是适体、反义分子、核酶、siRNA、肽体、纳米抗体或抗原结合分子片段(例如,Fab片段;$F(ab')_2$片段;Fd片段;Fv片段;scFv;dAb片段;或其他经工程化的分子,诸如双抗体、三抗体、四抗体、微型抗体和最小识别单位)。本发明的抗原结合分子还可以与抗病毒剂、抗生素、镇痛剂、皮质类固醇和/或NSAID组合施用和/或共同配制。本发明的抗原结合分子还可以作为另外包含放射治疗和/或常规化疗的治疗方案的一部分施用。

[0259] 另外的治疗活性组分可以在本发明的抗原结合分子的施用之前、同步或之后立即施用;(出于本公开的目的,这种施用方案被视为抗原结合分子与另外的治疗活性组分“组合”施用)。

[0260] 本发明包括药物组合物,其中本发明的抗原结合分子与如本文其他地方所述的另外的治疗活性组分一起共同配制。

[0261] 施用方案

[0262] 根据本发明的某些实施方案,可以在定义的时间过程内向受试者施用多个剂量的抗原结合分子(例如,特异性结合CD38和4-1BB的多特异性抗原结合分子)。根据本发明的该方面的方法包括将多剂量的本发明的多特异性抗原结合分子按顺序施用于受试者。如本文所用,“按顺序施用”意指每个剂量的抗原结合分子在不同的时间点,例如在以预定间隔(例如,小时、日、周或月)分开的不同日施用于受试者。本发明包括这样的方法:所述方法包括向患者依次施用单一初始剂量的抗原结合分子、然后是一个或多个第二剂量的抗原结合分子、以及任选地随后是一个或多个第三剂量的抗原结合分子。

[0263] 术语“初始剂量”、“第二剂量”和“第三剂量”是指本发明的抗原结合分子的施用的时间顺序。因此,“初始剂量”为在治疗方案的开始时施用的剂量(也称为“基线量”);“第二

剂量”为在初始剂量之后施用的剂量;并且“第三剂量”为在第二剂量之后施用的剂量。初始剂量、第二剂量和第三剂量全部都可以含有相同量的抗原结合分子,但是通常在施用频率方面可以彼此不同。然而,在某些实施方案中,在初始剂量、第二剂量和/或第三剂量中含有的抗原结合分子的量在治疗过程期间彼此不同(例如,适当上调或下调)。在某些实施方案中,在治疗方案开始时施用两个或更多个(例如,2个、3个、4个或5个)剂量作为“负荷剂量”,接着以较低频率施用后续剂量(例如,“维持剂量”)。

[0264] 在本发明的一个示例性实施方案中,每个第二和/或第三剂量在紧接前一剂量之后1至26(例如,1、$1^1/_2$、2、$2^1/_2$、3、$3^1/_2$、4、$4^1/_2$、5、$5^1/_2$、6、$6^1/_2$、7、$7^1/_2$、8、$8^1/_2$、9、$9^1/_2$、10、$10^1/_2$、11、$11^1/_2$、12、$12^1/_2$、13、$13^1/_2$、14、$14^1/_2$、15、$15^1/_2$、16、$16^1/_2$、17、$17^1/_2$、18、$18^1/_2$、19、$19^1/_2$、20、$20^1/_2$、21、$21^1/_2$、22、$22^1/_2$、23、$23^1/_2$、24、$24^1/_2$、25、$25^1/_2$、26、$26^1/_2$或更多)周施用。如本文所用,短语“紧接前一剂量”是指在多次施用的顺序中,抗原结合分子的剂量在顺序中紧接着的下一剂量施用之前施用于患者,而没有中间剂量。

[0265] 根据本发明的这一方面的方法可以包括向患者施用任何数量的第二和/或第三剂量的抗原结合分子(例如,特异性结合CD38和4-1BB的多特异性1+2抗原结合分子)。举例来说,在某些实施方案中,仅向患者施用单次第二剂量。在其他实施方案中,向患者施用两次或更多次(例如,2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次或更多次)第二剂量。同样,在某些实施方案中,仅向患者施用单个第三剂量。在其他实施方案中,向患者施用两次或更多次(例如,2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次或更多次)第三剂量。

[0266] 在涉及多个第二剂量的实施方案中,每个第二剂量可以与其他第二剂量相同的频率施用。例如,可以在紧接前一剂量之后1至2周向患者施用每个第二剂量。类似地,在涉及多个第三剂量的实施方案中,每个第三剂量可以与其他第三剂量相同的频率施用。例如,可以在紧接前一剂量之后2至4周向患者施用每个第三剂量。可替代地,在治疗方案的过程中,向患者施用的第二剂量和/或第三剂量的频率可以变化。医师也可以在治疗过程中调节施用频率,取决于在临床检查以后各个患者的需要。

[0267] 抗原结合分子的诊断用途

[0268] 本文公开的抗CD38抗原结合分子可以用于检测和/或测量样品中的CD38或表达CD38的细胞,例如用于诊断目的。例如,抗CD38抗原结合分子或其片段可以用于诊断以CD38的异常表达(例如,过表达、表达不足、表达缺乏等)为特征的病症或疾病。CD38的示例性诊断测定可以包括例如使从患者获得的样品与本文所公开的抗CD38抗原结合分子接触,其中所述抗CD38抗原结合分子用可检测标记或报告分子进行标记。可替代地,未标记的抗CD38抗原结合分子可以与本身被可检测标记的第二抗原结合分子组合用于诊断应用。可检测标记或报告分子可以是放射性同位素,诸如^3H、^{14}C、^{32}P、^{35}S或^{125}I;荧光或化学发光部分,诸如异硫氰酸荧光素或罗丹明;或者酶,诸如碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶或萤光素酶。本发明的抗CD38抗原结合分子的另一种示例性诊断使用包括^{89}Zr标记的(诸如^{89}Zr-去铁胺标记的)抗原结合分子,用于非侵入性鉴定和跟踪受试者的肿瘤细胞的目的(例如,正电子发射断层扫描(PET)成像)。(参见,例如,Tavare,R.等人Cancer Res.2016年1月1日;76(1):73-82;和Azad,BB.等人Oncotarget.2016年3月15日;7(11):12344-58。)可以用于检测或测量样品中的CD38的具体示例性测定法包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)和荧光活化细胞分选(FACS)。

[0269] 可以用于根据本发明的CD38诊断测定的样品包括在正常或病理条件下可从患者获得的任何组织或流体样品,所述样品含有可检测数量的CD38蛋白或其片段。通常,将对从健康患者(例如,不患有与异常CD38水平或活性相关联的疾病或病症的患者)获得的特定样品中的CD38水平进行测量,以初步建立基线或标准CD38水平。然后可以将该CD38的基线水平与在从怀疑患有CD38相关疾病(例如,含有表达CD38细胞的肿瘤)或病症的个体获得的样品中测量的CD38水平进行比较。

[0270] 装置

[0271] 本发明还提供了包含本文所示的多特异性抗原结合分子(例如,它们的药物制剂)的器皿(例如,小瓶或色谱柱)或注射装置(例如,注射器、预填充注射器或自动注射器)。器皿或注射装置可以包装成试剂盒。

[0272] 注射装置是经由肠胃外途径(例如,眼内、玻璃体内、肌肉内、皮下或静脉内途径)将物质引入受试者(例如,人)体内的装置。例如,注射装置可以是注射器(例如,预填充有药物制剂的注射器,诸如自动注射器),所述注射器例如包括用于容纳待注射的流体(例如,包含抗原结合分子或其片段或药物制剂)的筒或桶,用于穿刺皮肤、血管或其他组织以注射液体的针;用于将流体从筒中推出并通过针孔进入受试者体内的柱塞。

[0273] 可以用标准针头和注射器皮下或静脉内递送本文提供的药物组合物。另外,对于皮下递送,笔式递送装置易于应用于递送本发明的药物组合物。这种笔式递送装置可以重复使用或是一次性的。可重复使用的笔式递送装置一般利用含有药物组合物的可更换的筒。一旦筒内的所有药物组合物都已施用并且筒变空时,就可以容易地丢弃空筒并且更换为含有药物组合物的新筒。然后可以再使用笔式递送装置。在一次性笔式递送装置中,没有可更换的筒。实际上,一次性笔式递送装置在装置内的储集器中预填充有药物组合物。一旦清空储集器中的药物组合物,就丢弃整个装置。

[0274] 多种可重复使用的笔式递送装置和自动注射器递送装置应用于皮下递送本发明的药物组合物。实例包括但不限于AUTOPEN™(Owen Mumford,Inc.,Woodstock,UK)、DISETRONIC™笔(Disetronic Medical Systems,Bergdorf,Switzerland)、HUMALOG MIX 75/25™笔、HUMALOG™笔、HUMALIN 70/30™笔(Eli Lilly and Co.,Indianapolis,Ind.)、NOVOPEN™I、II和III(Novo Nordisk,Copenhagen,Denmark)、NOVOPEN JUNIOR™(Novo Nordisk,Copenhagen,Denmark)、BD™笔(Becton Dickinson,Franklin Lakes,N.J.)、OPTIPEN™、OPTIPEN PRO™、OPTIPEN STARLET™和OPTICLIK™(sanofi-aventis,Frankfurt,Germany)等等。可应用于皮下递送本发明的药物组合物的一次性笔式递送装置的实例包括但不限于SOLOSTAR™笔(sanofi-aventis)、FLEXPEN™(Novo Nordisk)和KWIKPEN™(Eli Lilly)、SURECLICK™自动注射器(加利福尼亚州千橡树市(Thousand Oaks,CA)的Amgen)、PENLET™(德国斯图加特(Stuttgart,Germany)的Haselmeier)、EPIPEN(Dey,L.P.)以及HUMIRA™笔(伊利诺伊州阿博特帕克(Abbott Park IL)的Abbott Labs)等。

[0275] 本文提供了施用本公开的多特异性抗原结合分子的方法,所述方法包括例如用注射装置将所述分子引入(例如注射)到受试者的身体内。

[0276] 表达方法

[0277] 本文提供了用于制备本发明的多特异性抗原结合分子或其免疫球蛋白链的重组方法,所述重组方法包括(i)将编码这种多特异性抗原结合分子的免疫球蛋白轻链和/或重

链的一种或多种多核苷酸引入宿主细胞中,例如,其中所述一种或多种多核苷酸包含在一种或多种载体中;和/或整合到宿主细胞染色体中和/或可操作地连接至启动子;(ii)在有利于多核苷酸的表达的条件下培养宿主细胞(例如,哺乳动物、真菌、中国仓鼠卵巢(CHO)、毕赤酵母(Pichia)或巴斯德毕赤酵母(Pichia pastoris)),以及(iii)任选地,从宿主细胞和/或宿主细胞在中间生长的培养基分离多特异性抗原结合分子或免疫球蛋白链。这种方法的产物及其药物组合物也形成本公开的一部分。

[0278] 在一些方面,步骤(i)包括将单独的A1重链、A2重链和通用轻链克隆到单独的表达载体中。例如,可以将结合CD38的重链可变区(HCVR)(VH-1)克隆到重链表达质粒(CH1-1_CH2_CH3)中。结合4-1BB的重链可变区(HCVR)(VH-3)用各种长度的接头(接头)融合至CH1结构域(CH1-3),然后是另一个结合4-1BB的重链可变区(HCVR)(VH-2),可以将其克隆到含有突变H435R和Y436F(EU编号)(US 8,586,713)的重链表达质粒(CH1-2_CH2_CH3(*))中。与含有通用轻链的质粒一起,可以将表达质粒转染到宿主细胞(诸如CHO细胞)中。然后,宿主细胞可以产生本文所述的多特异性抗原结合分子。

[0279] 在一个实施方案中,制备多特异性抗原结合分子的方法包括例如通过柱色谱法、沉淀和/或过滤纯化分子的方法。这种方法的产物及其药物组合物也形成本公开的一部分。

[0280] 包含本公开的多特异性抗原结合分子和/或编码这种分子的免疫球蛋白链的多核苷酸(例如,在载体中)的宿主细胞也是本发明的一部分。宿主细胞包括例如哺乳动物细胞(诸如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞)和真菌细胞(诸如毕赤酵母细胞(例如,巴斯德毕赤酵母))。

[0281] 实施例

[0282] 提供以下实施例是为了向本领域普通技术人员提供关于如何制备和使用本发明的方法和组合物的完整公开和描述,而非旨在限制发明人认为是其发明的范围。已努力确保有关所用的数字(例如,量、温度等)的准确性,但应考虑某些实验误差和偏差。除非另外指明,否则份数是重量份,分子量是平均分子量,温度是按摄氏度计并且压力是大气压或接近大气压。

[0283] 实施例6至10中用作对照的抗原结合分子包括:

[0284] • CD20xCD3双特异性抗体(REGN1979)(US10,550,193)连同匹配的同种型对照(REGN7540)用作信号1。REGN1979和REGN7540两者均包含$hIgG4^{P\text{-}PVA}$同种型(US 9,359,437)。

[0285] • 第二CD20xCD3双特异性抗体(REGN2281)用作信号1。REGN2281包含与REGN1979相同的可变区,其中hIgG4同种型具有S108P置换($hIgG4^{P}$)

[0286] • BCMAxCD3(REGN5458)也用作信号1(US11,384,153)。

[0287] • 比较物1:包含抗体“10C7”(US 7,288,638)的可变区的4-1BB二价激动剂(REGN4249)。

[0288] • 抗PD-1抗体西米普利单抗(REGN2810;LIBTAYO®)(US 9,987,500)。

[0289] • 4-1BB二价激动剂(hIgG4P)(REGN1945)的同种型对照;REGN1945也用作西米普利单抗的同种型对照。

[0290] • 双特异性4-1BB x非TAA同种型对照(REGN13168)。

[0291] 正确T细胞活化需要两个信号,即“信号1”和“信号2”。“信号1”由T细胞上的T细胞受体(TCR)与抗原呈递细胞(APC)上的肽结合的主要组织相容性复合物(MHC)分子的结合诱导。“信号2”通过接合T细胞上的共刺激受体提供。一种这样的共刺激受体是4-1BB受体,其

是一种可诱导的I型膜蛋白并且是肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族的成员。在抗原或丝裂原诱导的活化之后,诱导T细胞表面上4-1BB受体的表达。4-1BB的活化通过与呈现在APC上的4-1BBL接合而发生。因此,4-1BB信号传导的活化提供了增强现有TCR信号传导的靶向方法。

[0292] 细胞系描述

[0293] 以下几个实施例中使用的细胞系的特征提供如下:

[0294] NALM6(ACL14036)

[0295] NALM6克隆是从19岁男性中分离出来的急性淋巴细胞白血病(ALL)细胞系[NALM6克隆G5(ATCC,#CRL-3273)]。NALM6细胞维持在RPMI 1640+10%FBS+P/S/G;37℃ 5% CO_2中。

[0296] 染色以确认表达

[0297] NALM6/hPD-L1(ACL16389)

[0298] 被基因工程化以稳定表达人PD-L1(登录号NP_054862.1的氨基酸M1-T290)的NALM6细胞。细胞维持在RPMI 1640+10% FBS+P/S/G+1ug/ml Puro;37℃ 5% CO_2中。

[0299] 病毒转染和转导

[0300] 染色以确认表达

[0301] HEK293亲本(ACL2397)

[0302] 从胎儿分离的人胚胎肾细胞系[HEK-293(ATCC,#CRL-1573)]。称为HEK293亲本细胞系。HEK293细胞维持在DMEM+10% FBS+P/S/G中。

[0303] HEK293/hCD20(ACL14268)

[0304] 通过用人CD20(Uniprot登录号:P11836,氨基酸M1至P297)稳定转导HEK293(HZ)细胞制备的细胞系。工程化细胞系维持在DME+10% FBS+青霉素/链霉素/谷氨酰胺(P/S/G)+100μg/mL潮霉素;5% CO_2中。

[0305] 病毒转染/生产

[0306] 细胞系转导

[0307] 染色以确认表达

[0308] HEK293/hCD20/hCD38(ACL14270)

[0309] 通过用人CD20(Uniprot登录号:P11836,氨基酸M1至P297)和人CD38(Uniprot登录号:P28907,氨基酸M1至I300)稳定转导HEK293(HZ)细胞制备的细胞系。工程化细胞系维持在DME+10% FBS+青霉素/链霉素/谷氨酰胺(P/S/G)+500μg/mL G418+100μg/mL潮霉素;5% CO_2中。

[0310] 病毒转染/生产

[0311] 细胞系转导

[0312] 染色以确认表达

[0313] HEK293/h4-1BB(ACL7888)

[0314] 通过用人TNFRSF9(4-1BB)(登录号:NM_001561,氨基酸M1至L255)稳定转导HEK293(HZ)细胞制备的细胞系。工程化细胞系维持在DME+10% FBS+青霉素/链霉素/谷氨酰胺(P/S/G)+500μg/mL G418;5% CO_2中。

[0315] 病毒转染/生产

[0316] 细胞系转导

[0317] 染色以确认表达

[0318] HEK293/NFkB-Luc(ACL5021)

[0319] 通过转染由位于最小TATA启动子上游的5个拷贝的NF-κB反应元件驱动的萤火虫荧光素酶-IRES-GFP基因制备的细胞系。通过流式细胞术进行阳性细胞系选择,并分离出单个克隆D9。

[0320] 质粒产生。

[0321] 染色以确认表达。

[0322] HEK293/NFkB-Luc/h4-1BB(ACL11090)

[0323] 通过用人TNFRSF9(4-1BB)(登录号:NM_001561,氨基酸M1至L255)稳定转导HEK293/NFkB-Luc细胞制备的细胞系。工程化细胞系维持在DME+10%FBS+青霉素/链霉素/谷氨酰胺(P/S/G)+500μg/mL G418;5% CO_2中。

[0324] 病毒转染/生产

[0325] 细胞系转导

[0326] 染色以确认表达

[0327] MOLP8(ACL14198)

[0328] 在2002年从一名52岁日本多发性骨髓瘤男性的外周血中建立的人多发性骨髓瘤系。通过DSMZ号:ACC 569获得。

[0329] 染色以确认表达

[0330] OPM2(ACL14164)

[0331] 在1982年从一名56岁白血病期的多发性骨髓瘤女性的外周血中建立。通过DSMZ号:ACC50获得。

[0332] 染色以确认表达

[0333] 实施例1.抗CD38抗体和抗4-1BB抗体的产生和筛选

[0334] 抗CD38抗体通过用表达CD38的细胞或用编码CD38的DNA免疫包含编码人免疫球蛋白重链和κ轻链可变区的DNA的基因工程化的小鼠而获得。通过CD38特异性免疫测定来监测抗体免疫应答。当达到期望的免疫应答时,收获脾细胞并与小鼠骨髓瘤细胞融合以保持其生存力并形成杂交瘤细胞系。筛选并选择杂交瘤细胞系以鉴定产生CD38特异性抗体的细胞系。使用该技术,获得了若干抗CD38嵌合抗体(即,具有人可变结构域和小鼠恒定结构域的抗体)。此外,如US2007/0280945A1中所述,直接从不与骨髓瘤细胞融合的抗原阳性B细胞中分离而产生若干完全人抗CD38抗体。

[0335] 同样,通过用表达4-1BB的细胞或用编码4-1BB的DNA赋予包含编码人免疫球蛋白重链和κ轻链可变区的DNA的基因工程化小鼠免疫性来获得抗4-1BB抗体。通过4-1BB特异性免疫测定来监测抗体免疫应答。当达到期望的免疫应答时,收获脾细胞并与小鼠骨髓瘤细胞融合以保持其生存力并形成杂交瘤细胞系。筛选并选择杂交瘤细胞系以鉴定产生4-1BB特异性抗体的细胞系。使用该技术,获得了若干抗4-1BB嵌合抗体(即,具有人可变结构域和小鼠恒定结构域的抗体)。此外,如US2007/0280945A1中所述,直接从不与骨髓瘤细胞融合的抗原阳性B细胞中分离而产生若干完全人抗4-1BB抗体。

[0336] 针对期望特征,包括亲和力、选择性等表征并且选择抗体。如果需要,用所需的人

恒定区(例如野生型或修饰的IgG1或IgG4恒定区)替换小鼠恒定区,以产生完全人抗CD38抗原结合分子或完全人抗4-1BB抗原结合分子。虽然选定的恒定区可以根据具体用途而变化,但高亲和力抗原结合和靶标特异性特征存在于可变区中。

[0337] 实施例2.抗CD38结合臂的重链和轻链可变区氨基酸和核酸序列。

[0338] 表1示出了本发明的选定抗CD38抗原结合臂的重链和轻链可变区和CDR的氨基酸序列标识符。相应的核酸序列标识符列于表2中。

[0339]

表1
抗CD38氨基酸序列标识符

Ab名称	HCVR (VH-1)	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR (VL-1)	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb26871P2	2	4	6	8	18 (3-20GL)	20	22 GAS	24
mAb26812P2	40	42	44	46	48 (1-39GL)	50	52 AAS	54

[0340]

表2
抗CD38核酸序列标识符

Ab名称	HCVR (VH-1)	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR (VL-1)	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb26871P2	1	3	5	7	17 (3-20GL)	19	21 ggggcaagt	23
mAb26812P2	39	41	43	45	47 (1-39GL)	49	51 gctgcatcc	53

[0341] 抗CD38结合臂可以包含如表1中所示的可变结构域和CDR序列以及同种型IgG4、IgG1等的人Fc结构域。对于某些应用或实验,Fc结构域可以是小鼠Fc结构域。如本领域的普通技术人员将理解的,可以将具有特定Fc同种型的抗原结合臂转化为具有不同的Fc同种型的抗原结合臂(例如,可以将具有小鼠IgG4 Fc的抗原结合分子转化为具有人IgG1等的抗原结合分子),但无论如何,可变结构域(包括CDR)(其由表1中所示的数字标识符表示)将保持相同,并且预期结合特性相同或基本上相似,无论Fc结构域的性质如何。

[0342] 实施例3:抗4-1BB结合臂的重链和轻链可变区氨基酸和核酸序列。

[0343] 表3示出了双特异性抗体的选定抗4-1BB结合臂的重链和轻链可变区和CDR的氨基酸序列标识符。对应的核酸序列标识符在表4中示出。

[0344]

表3
抗4-1bb氨基酸序列标识符

Ab名称	HCVR (VH-2)	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR (VL-2)	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb25921P	10	12	14	16	18	20	22	24
mAb25889P2	32	34	36	38	48	50	52	54
mAb35333P2	62	64	66	68	48	50	52	54
mAb25898P2	72	74	76	78	48	50	52	54
mAb35388P2	86	88	90	92	48	50	52	54
mAb35321P2	94	96	98	100	48	50	52	54

[0345]

表4
抗4-1bb核酸序列标识符

Ab名称	HCVR (VH-2)	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR (VL-2)	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb25921P	9	11	13	15	17	19	21	23
mAb25889P2	31	33	35	37	47	49	51	53
mAb35333P2	61	63	65	67	47	49	51	53
mAb25898P2	71	73	75	77	47	49	51	53
mAb35388P2	85	87	89	91	47	49	51	53
mAb35321P2	93	95	97	99	47	49	51	53

[0346] 抗4-1BB抗原结合臂可以包含如表3中所示的可变结构域和CDR序列以及同种型IgG4、IgG1等的人Fc结构域。对于某些应用或实验,Fc结构域可以是小鼠Fc结构域。如本领域的普通技术人员将理解的,可以将具有特定Fc同种型的抗原结合分子转化为具有不同的Fc同种型的抗原结合分子(例如,可以将具有小鼠IgG4 Fc的抗原结合分子转化为具有人IgG1等的抗原结合分子),但无论如何,可变结构域(包括CDR)(其由表3中所示的数字标识符表示)将保持相同,并且预期结合特性相同或基本上相似,无论Fc结构域的性质如何。

[0347] 实施例4:结合CD38和4-1BB的多特异性抗原结合分子的产生

[0348] 结合CD38和4-1BB的多特异性抗原结合分子在本文中也称为“抗CD38x抗4-1BB 1+2”或“抗CD38 x抗4-1BB多特异性分子”或“抗CD38/抗4-1BB 1+2”或“CD38x4-1BB多特异性分子”。抗CD38 x抗4-1BB多特异性分子的抗CD38部分可用于靶向表达CD38的肿瘤细胞,并且多特异性分子的抗4-1BB部分可用于活化T细胞。

[0349] 将与4-1BB表位1(ep1)或表位2(ep2)结合的各种4-1BB Fab(Fab3;具有重链CH1结构域的重链可变区(HCVR)和轻链)融合至靶向4-1BB和CD38两者的现有IgG样双特异性分子的4-1BB VH结构域的N末端。

[0350] 编码(i)各种4-1BB重链可变区(HCVR);(ii)重链CH1结构域,后接不同长度的接头用于将重链CH1结构域连接到第二个4-1BB重链可变区(HCVR);(iii)CD38重链可变区(HCVR)的DNA片段由Integrated DNA Technologies,Inc.(San Diego,California)合成。

[0351] InFusion Cloning(Takara Bio USA Inc.)按照由Takara Bio USA Inc.提供方案创建单个重链的哺乳动物表达载体。将CD38重链可变区(HCVR)(VH-1)克隆到重链表达质粒(CH1-1_CH2_CH3)中。4-1BB重链可变区(HCVR)(VH-3)用各种长度的接头(接头)融合至CH1结构域(CH1-3),然后是另一个4-1BB重链可变区(HCVR)(VH-2),将其克隆到含有星状突变(star mutation)(H435R、Y436F,EU编号)的重链表达质粒(CH1-2_CH2_CH3(*))中。

[0352] 在用3中表达质粒(i)CD38重链质粒、(ii)4-1BB+4-1BB重链星状质粒、(iii)含有

通用轻链的质粒转染之后,在CHO细胞中生产重组的CD38 x4-1BB x 4-1BB 1+2N-Fab MBM。在用400μg/ml潮霉素选择12天之后,分离出稳定转染的CHO细胞池。将CHO细胞池用于生产CD38 x 4-1BB x 4-1BB 1+2N-Fab MBM,其随后如先前所述进行纯化(Sci Rep.2015年12月11日;5:17943)。

[0353] 表5中示出了根据此实施例制备的选定多特异性抗原结合分子的抗原结合结构域的组分部分的概述。表6中提供了组分部分的相应核酸序列标识符。表7和表8分别提供了对照双特异性抗原结合分子的组分部分、多肽序列和核酸序列。

[0354]

表5 选定的1+2形式抗体的组分部分 - 氨基酸序列标识符

REGN编号	CD38臂(Fab1)					4-1BB-“内”臂(Fab2)					4-1BB“外”臂(Fab3)					LCVR					全长重链和轻链		
	Ab名称	VH -1	CDR 1	CDR 2	CDR 3	Ab名称	VH- 2	CDR 1	CDR 2	CDR 3	Ab名称	VH- 3	CDR 1	CDR 2	CDR 3	Ab名称	Vk	CDR 1	CDR 2	CDR 3	HC- 4-1BB	HC- CD38	LC ULC 1-39 GL
7633	26812P2	40	42	44	46	25889P2	32	34	36	38	35388P2	86	88	90	92	1-39(PP)GL	48	50	52	54	56	58	60
7647	26812P2	40	42	44	46	35333P2	62	64	66	68	35333P2	62	64	66	68	1-39(PP)GL	48	50	52	54	70	58	60
7650	26812P2	40	42	44	46	25898P2	72	74	76	78	35321P2	94	96	98	100	1-39(PP)GL	48	50	52	54	80	58	60
9682	26812P2	40	42	44	46	35333P2	62	64	66	68	35333P2	62	64	66	68	1-39(PP)GL	48	50	52	54	82	58	60
9686	26812P2	40	42	44	46	35333P2	62	64	66	68	35333P2	62	64	66	68	1-39(PP)GL	48	50	52	54	84	58	60

表6 选定的1+2形式抗体的组分部分 - 核酸序列标识符

REGN编号	CD38臂(Fab1)					4-1BB-“内”臂(Fab2)					4-1BB“外”臂(Fab3)					LCVR					全长重链和轻链		
	Ab名称	VH -1	CDR 1	CDR 2	CDR3	Ab名称	VH -2	CDR 1	CDR 2	CDR 3	Ab名称	VH- 3	CDR 1	CDR 2	CDR 3	Ab名称	Vk	CDR 1	CDR 2	CDR 3	HC- 4-1BB	HC- CD 38	LC ULC 1-39 GL
7633	26812P2	39	41	43	45	25889P2	31	33	35	37	35388P2	85	87	89	91	1-39(PP)GL	47	49	51	53	55	57	59
7647	26812P2	39	41	43	45	35333P2	61	63	65	67	35333P2	61	63	65	67	1-39(PP)GL	47	49	51	53	69	57	59
7650	26812P2	39	41	43	45	25898P2	71	73	75	77	35321P2	93	95	97	99	1-39(PP)GL	47	49	51	53	79	57	59
9682	26812P2	39	41	43	45	35333P2	61	63	65	67	35333P2	61	63	65	67	1-39(PP)GL	47	49	51	53	81	57	59
9686	26812P2	39	41	43	45	35333P2	61	63	65	67	35333P2	61	63	65	67	1-39(PP)GL	47	49	51	53	83	57	59

表7 1+1形式对照抗体的组分部分 - 氨基酸序列标识符

REGN编号	CD38臂					4-1BB-“内”(Fab2)					4-1BB-“外”(Fab3)					LCVR					全长HC和LC		
	Ab名称	VH -1	CDR 1	CDR 2	CDR3	Ab名称	VH -2	CDR 1	CDR 2	CDR 3	Ab名称	VH- 3	CDR 1	CDR 2	CDR 3	Ab名称	Vk	CDR 1	CDR 2	CDR 3	HC	HC	LC
7150	26871P2	2	4	6	8	NA	NA	NA	NA	NA	25921P	10	12	14	16	3-20 GL	18	20	22	24	26	28	30

表8 1+1形式对照抗体的组分部分 - 核酸序列标识符

REGN编号	CD38臂					4-1BB-“内”(Fab2)					4-1BB-“外”(Fab3)					LCVR					全长HC和LC		
	Ab名称	VH -1	CDR 1	CDR 2	CDR3	Ab名称	VH -2	CDR 1	CDR 2	CDR 3	Ab名称	VH- 3	CDR 1	CDR 2	CDR 3	Ab名称	Vk	CDR 1	CDR 2	CDR 3	HC	HC	LC
7150	26871P2	1	3	5	7	NA	NA	NA	NA	NA	25921P	9	11	13	15	3-20 GL	17	19	21	23	25	27	29

[0355] 实施例5:多特异性抗原结合分子的筛选

[0356] 接下来通过筛选鉴定活化4-1BB信号传导途径的构建体。

[0357] 选择34个4-1BB结合抗体,基于细胞与人4-1BB的结合,共同轻链的利用和CDR3序列的多样性将其纳入1+2筛选中。对于筛选,将4-1BB可变结构域以两种不同的1+2形式(分裂的4-1BB或堆叠的4-1BB)排列。参见图2B。

[0358] 对于分裂的形式,维持了4-1BB的标准二价结构,并且通过在4-1BB分子一侧的N末端添加来自CD38肿瘤靶向臂(26812)的可变结构域和CH1(由G4Sx3间隔结构域分开)来实现肿瘤靶向。这些构建体表达为钮入孔(KiH)双特异性物,因此只有所表达分子的一个臂包含CD38靶向基序。

[0359] 对于堆叠的FAB形式,将串联4-1BB序列与上文所述的CD38 x 4-1BB相同的方式连接,并且通过表达为双特异性分子来实现肿瘤靶向,其中抗CD38存在于相反的臂上。将34个4-1BB可变结构域以及一个无关的对照序列(抗BetV1)组合在产生1225个组合的所有可能串联FAB组合中。这包括34个分子,其中两个堆叠的4-1BB可变序列是相同的。

[0360] 对于筛选,1+2构建体在CHO细胞中瞬时表达,并且在4天后收获含有双特异性物上清液。将上清液添加到含有过表达hCD38的HEK细胞和带有NFkB荧光素酶报告基因并过表达人4-1BB的Jurkat细胞的共培养物中。将测试样品的4-1BB接合和活化与Jurkat报告细胞和表达4-1BB配体的HEK细胞的共培养物(100%)进行了比较。来自分裂的FAB的筛选结果在Jurkat报告测定中显示出几乎没有活性至没有活性,观察到的最高活性为3.7%。相比之下,堆叠的FAB形式观察到稳健的活化,其中超过25%的测试样品产生大于30%的活性。当堆叠的FAB内的4-1BB可变结构域是相同或独特的序列时观察到活性,并且观察到高达66%的活性。在堆叠的FAB内的任何位置处引入无关对照FAB都会导致活性丧失。参见图2A。

[0361] 实施例6:使用流式细胞术表征CD38x4-1BB多特异性抗原结合分子结合

[0362] 使用内源性表达CD38的MOLP8细胞测试CD38臂的结合。使用工程化以表达h4-1BB的HEK293细胞(HEK293/h4-1BB)评估4-1BB臂的结合。将HEK293细胞用于确定非靶向细胞结合,因为它们不表达CD38或4-1BB。

[0363] 使用流式细胞术评估多特异性抗原结合分子结合细胞的能力。选择细胞系来确定抗CD38臂和抗4-1BB臂两者结合其靶标的能力。在第一个实验中,将测试抗体与MOLP8(内源性表达hCD38)和HEK293(不表达hCD38)细胞一起孵育。在第二个实验中,将测试抗体与HEK293/h4-1BB(经工程化以表达h4-1BB)和HEK293(不表达h4-1BB)细胞一起孵育。通过使用标记的二抗并在流式细胞仪上测量荧光来检测结合。

[0364] 多特异性抗原结合分子:

[0365] 在这两个实验中测试的多特异性抗原结合分子和对照如表9中所示。

[0366] 表9:CD38x4-1BB结合分子和对照

[0367]

MABM标识符	描述
REGN7633	CD38x4-1BB(1+2),($hIgG4^{P-PVA}$)
REGN7647	CD38x4-1BB(1+2),($hIgG4^{P-PVA}$)
REGN7650	CD38x4-1BB(1+2),($hIgG4^{P-PVA}$)
REGN7150	CD38x4-1BB(1+1),($hIgG4^{P-PVA}$)
REGN4249	比较物1

REGN7540	同种型对照(hIgG4^{P-PVA})
REGN1945	同种型对照(hIgG4^{P})

[0368] 实验1-CD38结合:

[0369] 用胰蛋白酶将HEK293细胞提起,洗涤并重悬于染色缓冲液(PBS中的2% FBS)中。将MOLP8细胞洗涤并重悬于染色缓冲液中。将细胞添加到96孔V底板的孔中(3x10^{5}个细胞/孔)。将1:4、9点、剂量滴定的测试抗体在染色缓冲液中稀释,并将其添加到细胞中,最终浓度范围为610fM至10nM("无抗体"对照作为第九点(153fM)被包括在内,标记为"仅二级")。将细胞和抗体在冰上孵育30分钟,然后在染色缓冲液中洗涤。将细胞重悬于2ug/ml别藻蓝蛋白(APC)偶联的山羊抗人二抗中,并在冰上孵育30分钟。然后洗涤细胞并将其悬浮于活力染料中(根据制造商的方案),并在冰上孵育30分钟。然后用染色缓冲液洗涤细胞,并在冰上将其重悬于2% PFA中30分钟。在洗涤之后,将细胞过滤并通过流式细胞术进行分析以确定荧光强度几何平均值(gMFI),其随后使用GraphPad Prism软件绘图。在9点剂量反应曲线(包括仅二级对照,代表第9个点)上根据4参数逻辑方程确定抗体的EC_{50}值。结果在表10中示出。

[0370] 在内源性表达CD38的MOLP8细胞的存在下观察到CD38x4-1BB 1+2(REGN7633、REGN7647和REGN7650)和1+1(REGN7150)多特异性抗原结合分子的剂量依赖性结合。然而,对于二价抗4-1BB抗体REGN4249未观察到结合。对于同种型对照抗体(REGN7540和REGN1945)也未观察到结合。

[0371] 在不表达CD38的HEK293细胞的存在下未观察到CD38x4-1BB 1+2抗体REGN7633或同种型对照抗体(REGN7540和REGN1945)的结合。在使用CD38x4-1BB 1+2(REGN7647和REGN7650)以及1+1双特异性(REGN7150)抗体以及二价抗4-1BB抗体REGN4249的情况下观察到弱的结合(比在MOLP8细胞上的gMFI低>100倍)。

[0372] 表10:对抗体的最大结合以及结合的EC50值

[0373]

	MOLP8		HEK293	
	最大 [gMFI]	EC50 [M]	最大 [gMFI]	EC50 [M]
REGN7633	8.8E+04	NC	7.1E+02	ND
REGN7647	1.2E+05	NC	1.2E+03	2.43E-10
REGN7650	1.4E+05	NC	9.5E+02	ND
REGN7150	2.1E+05	NC	1.1E+03	NC*
REGN4249	5.3E+02	ND	1.4E+03	NC*
REGN7540	4.6E+02	ND	7.4E+02	ND
REGN1945	4.5E+02	ND	7.5E+02	ND

[0374] 缩写:ND:未测定;NC:未计算,因为数据不符合4参数逻辑方程。

[0375] *最可能是由于非特异性结合

[0376] 实验2-4-1BB结合:

[0377] 用胰蛋白酶将HEK293和HEK293/4-1BB细胞提起,洗涤并重悬于染色缓冲液(PBS中的2% FBS)中,并且将其添加到96孔V底板的孔中(3x10^{5}个细胞/孔)。将1:5、9点、剂量滴定的测试抗体在染色缓冲液中稀释,并将其添加到细胞中,最终浓度范围为1.3pM至100nM

("无抗体"对照作为第九点(0.26nM)被包括在内,标记为"仅二级")。将细胞和抗体在冰上孵育30分钟,然后在染色缓冲液中洗涤。将细胞重悬于2ug/ml别藻蓝蛋白(APC)偶联的山羊抗人二抗中,并在冰上孵育30分钟。然后洗涤细胞并将其悬浮于活力染料中(根据制造商的方案),并在冰上孵育30分钟。然后用染色缓冲液洗涤细胞,并在冰上将其重悬于2% PFA中30分钟。在洗涤之后,将细胞过滤并通过流式细胞术进行分析以确定荧光强度几何平均值(gMFI),其随后使用GraphPad Prism软件绘图。在9点剂量反应曲线(包括仅二级对照)上根据4参数逻辑方程确定抗体的EC_{50}值。结果在表11中示出。

[0378] 在经工程化以表达h4-1BB的HEK293/h4-1BB细胞的存在下观察到CD38x4-1BB 1+2(REGN7633、REGN7647和REGN7650)和1+1(REGN7150)多特异性抗原结合分子的剂量依赖性结合。还观察到二价抗4-1BB抗体REGN4249的结合。对于同种型对照抗体(REGN7540和REGN1945)未观察到结合。

[0379] 在不表达h4-1BB的HEK293细胞的存在下未观察到CD38x4-1BB 1+2抗体REGN7633或同种型对照抗体(REGN7540和REGN1945)的结合。在使用CD38x4-1BB 1+2多特异性抗原结合分子(REGN7647和REGN7650)、CD38x4-1BB双特异性(REGN7150)和二价抗4-1BB抗体REGN4249的情况下观察到轻微结合(比在HEK293/h4-1BB细胞上的gMFI低大于1,000倍)。

[0380] 表11:对抗体的最大结合以及结合的EC50值

[0381]

	HEK293/4-1BB		HEK293	
	最大 [gMFI]	EC50 [M]	最大 [gMFI]	EC50 [M]
REGN7633	8.9E+05	1.47E-08	1.6E+04	ND
REGN7647	1.4E+06	6.08E-10	1.8E+04	ND
REGN7650	1.0E+06	9.97E-10	2.4E+04	NC*
REGN7150	2.4E+06	2.86E-09	2.5E+04	2.72E-09*
REGN4249	7.4E+05	8.86E-10	1.8E+04	ND
REGN7540	2.5E+04	ND	1.9E+04	ND
REGN1945	1.6E+04	ND	1.4E+04	ND

[0382] 缩写:ND:未测定;NC:未计算,因为数据不符合4参数逻辑方程。

[0383] *最可能是由于非特异性结合

[0384] 实施例7:使用HEK293/hCD20/hCD38、HEK293/hCD20、MOLP8和人原代T细胞在T细胞活化测定中对CD38x4-1BB双特异性抗体的表征。

[0385] 正确T细胞活化需要两个信号,即"信号1"和"信号2"。"信号1"由T细胞上的T细胞受体(TCR)与抗原呈递细胞(APC)上的肽结合的主要组织相容性复合物(MHC)分子的结合诱导。然而,"信号2"通过接合T细胞上的共刺激受体提供。一种这样的共刺激受体是4-1BB受体,其是一种可诱导的I型膜蛋白并且是肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族的成员。在抗原或丝裂原诱导的活化之后,诱导T细胞表面上4-1BB受体的表达。4-1BB的活化通过与呈现在APC上的4-1BBL接合而发生。因此,4-1BB信号传导的活化提供了增强现有TCR信号传导的靶向方法。

[0386] CD38x4-1BB(1+1和1+2)双特异性抗体被设计成通过将$CD38^{+}$靶细胞与4-1BB受体

阳性T细胞桥接来模拟4-1BB的天然配体以提供“信号2”,以便增强在由肿瘤相关抗原(TAA) x CD3双特异性抗体提供的“信号1”或由APC提供的同种异体反应的存在下的T细胞活化。

[0387] 多特异性抗原结合分子:

[0388] 在该实验中测试的多特异性抗原结合分子和对照如表12中所示。

[0389] 表12:CD38x4-1BB结合分子和对照

[0390]

MABM标识符	描述
REGN7633	CD38x4-1BB (1+2), ($hIgG4^{P-PVA}$)
REGN7647	CD38x4-1BB (1+2), ($hIgG4^{P-PVA}$)
REGN7650	CD38x4-1BB (1+2), ($hIgG4^{P-PVA}$)
REGN7150	CD38x4-1BB (1+1), ($hIgG4^{P-PVA}$)

[0391]

REGN4249	比较物1
REGN7540	同种型对照, ($hIgG4^{P-PVA}$)
REGN1945	同种型对照, ($hIgG4^{P}$)
REGN5458	BCMAxCD3, ($hIgG4^{P-PVA}$)
REGN1979	CD20xCD3, ($hIgG4^{P-PVA}$)

[0392] 使用REGN1979(CD20xCD3)充当“信号1”,在经工程化以表达hCD20和hCD38(HEK293/hCD20/hCD38)的人胚胎肾癌细胞的存在下,评价CD38x4-1BB多特异性抗原结合分子通过使CD38和4-1BB受体接合以递送“信号2”(如通过IL-2释放所确定的)活化人原代T细胞的能力。仅表达hCD20的HEK293细胞作为对照被包括在内,以测量在APC上缺乏CD38时可能发生的活性。此外,在测试CD38x4-1BB双特异性抗体中包括内源性表达hCD38的多发性骨髓瘤细胞系MOLP8。由于MOLP8细胞内源性表达BCMA,因此包括REGN5458(BCMAxCD3)充当“信号1”。值得注意的是,与HEK293细胞不同,在不存在由REGN5458提供的CD3刺激的情况下,MOLP8细胞能够提供可检测的T细胞同种异体刺激,充当“信号1”。

[0393] 人原代$CD3^+$T细胞的分离:

[0394] 使用密度梯度离心从来自Precision for Medicine的健康供体白细胞库(供体555105)中分离人外周血单核细胞(PBMC)。简言之,将15ml的Ficoll-Paque PLUS添加到50ml锥形管中,随后将30ml用含有2% FBS的PBS以1:1稀释的血液在顶部分层。在制动的情况下在400x g下离心30分钟之后,将血沉棕黄层(含有单核细胞)转移到新的管中,用含有2% FBS的PBS稀释5倍并在300x g下离心8分钟。随后,使用来自StemCell Technologies的EasySepTM人$CD3^+$T细胞分离试剂盒并遵循制造商推荐的说明书,将$CD3^+$T细胞从PBMC中分离出来。

[0395] IL-2释放测定:

[0396] 将重悬于刺激培养基中的富集的$CD3^+$T细胞以1×10^5个细胞/孔的浓度添加到96孔圆底板中。将生长停止的HEK293/hCD20/hCD38或HEK293/hCD20以$1x10^4$个细胞/孔的最终浓度添加到$CD3^+$T细胞中。将生长停止的MOLP8细胞以$5x10^4$个细胞/孔的最终浓度添加到$CD3^+$T细胞中。在添加细胞后,将恒量0.1nM REGN1979或其匹配的同种型对照(REGN7540)添加到含有HEK293/hCD20/hCD38或HEK293/hCD20的孔中。将恒量0.5nM REGN5458或同种型对照添加到含有MOLP8细胞的孔中。随后,将CD38x4-1BB(1+1或1+2)、二价4-1BB(REGN4249)或同种

型对照(REGN7540或REGN1945)从3pm到200nm以1:4稀释进行滴定,并添加到孔中。10点稀释的终点不含滴定的抗体。将板在37℃、5% CO_2下孵育72小时,并且将5μL总上清液用于测量IL-2。按照制造商的方案,使用来自PerkinElmer的AlphaLisa试剂盒来确定测定上清液中细胞因子的量。在Perkin Elmer多标酶标仪Envision上获得细胞因子测量值,并以pg/mL为单位报告该值。所有连续稀释液都一式两份进行测试。

[0397] 使用GraphPad Prism™软件在10点剂量反应曲线上根据四参数逻辑方程式确定抗体的EC_{50}值。最大IL-2以在测试的剂量范围内检测到的平均最大应答给出。在表13中提供结果。

[0398] 使用HEK293/hCD20和HEK293/hCD20/hCD38细胞系的结果

[0399] 与匹配的同种型对照(REGN7540和REGN1945)相比,在靶标和由REGN1979提供的“信号1”的存在下,4-1BB抗体治疗导致更高的IL-2应答。值得注意的是,与1+1CD38x4-1BB(REGN7150)和二价4-1BB(REGN4249)抗体相比,CD38x4-1BB的1+2形式导致更高的最大IL-2和更大的效力。在不存在CD38靶标的情况下,仅二价4-1BB(REGN4249)表现出IL-2释放的剂量依赖性增加。在不存在‘信号1’的情况下,没有任何抗体导致IL-2释放的剂量依赖性增强。

[0400] 使用MOLP8细胞系的结果

[0401] 在存在同种异体MOLP8细胞和不存在REGN5458的情况下,对于1+2CD38x4-1BB抗体REGN7647和REGN7650以及在较低程度上对于1+2CD38x4-1BB抗体REGN7633和二价4-1BB抗体REGN4249观察到IL-2的剂量依赖性增加。1+1CD38x4-1BB和同种型对照抗体未表现出IL-2释放的剂量依赖性增强。尽管同种异体MOLP8细胞可以提供“信号1”,但还评价了REGN5458的添加。在这些条件下,与匹配的同种型对照相比,所有4-1BB抗体均导致IL-2释放的剂量依赖性增加,其中1+2CD38x4-1BB抗体表现出IL-2的最大效力和最大增加。

[0402] 表13:抗体的最大IL-2释放和效力值

[0403]

	HEK293/CD20/CD38 + REGN1979		HEK293/CD20 + REGN1979		HEK293/CD20/CD38 + IsoC		MOLP-8 + IsoC		MOLP-8 + REGN5458	
	最大 [pg/ml]	EC50 [M]	最大 [pg/ml]	EC50 [M]	最大 [pg/ml]	EC50 [M]	最大 [pg/ml]	EC50 [M]	最大 [pg/ml]	EC50 [M]
REGN7633	1934	8.3E-11	218	2.16E-09	16	ND	177	1.31E-11	534	4.482E-10
REGN7647	2847	5.8E-12	199	NC	18	ND	331	2.21E-12	692	2.31E-11
REGN7650	2721	1.4E-11	184	NC	10	ND	288	NC	553	3.166E-11
REGN	1303	1E-1	182	ND	12	ND	163	ND	308	6.338E-08

[0404]

7150		0								
REGN 4249	931	1.4E -09	729	1.42E -09	15	ND	174	NC	183	5.883E-10
REGN 7540	176	ND	195	ND	9	ND	170	ND	156	ND
REGN 1945	173	ND	208	ND	10	ND	155	ND	164	ND

[0405] 缩写:ND:未测定;NC:未计算,因为数据不符合4参数逻辑方程。

[0406] 实施例8:使用HEK293/hCD20/hCD38、HEK293/hCD20、MOLP8、NALM6和人原代T细胞在T细胞活化测定中对CD38x4-1BB(1+2)多特异性抗原结合分子的表征。

[0407] 正确T细胞活化需要两个信号,即“信号1”和“信号2”。“信号1”由T细胞上的T细胞受体(TCR)与抗原呈递细胞(APC)上的肽结合的主要组织相容性复合物(MHC)分子的结合诱导。“信号2”通过接合T细胞上的共刺激受体提供。一种这样的共刺激受体是4-1BB受体,其是一种可诱导的I型膜蛋白并且是肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族的成员。在抗原或丝裂原诱导的活化之后,诱导T细胞表面上4-1BB受体的表达。4-1BB的活化通过与呈现在APC上的4-1BBL接合而发生。因此,4-1BB信号传导的活化提供了增强现有TCR信号传导的靶向方法。

[0408] CD38x4-1BB(1+1和1+2)双特异性抗体被设计成通过将$CD38^{+}$靶细胞与4-1BB受体阳性T细胞桥接来模拟4-1BB的天然配体以提供“信号2”,以便增强在由肿瘤相关抗原(TAA)x CD3双特异性抗体提供的“信号1”或由APC提供的同种异体反应的存在下的T细胞活化。

[0409] 多特异性抗原结合分子:

[0410] 在该实验中测试的多特异性抗原结合分子和对照如表14中所示。

[0411] 表14:CD38x4-1BB结合分子和对照

[0412]

MABM标识符	描述、接头、同种型
REGN7647	CD38x4-1BB (1+2), (G4S)3v15 ($hIgG4^{P-PVA}$)
REGN9682	CD38x4-1BB (1+2), (G4S)3 ($hIgG4^{P-PVA}$)
REGN9686	CD38x4-1BB (1+2), (G4S)2 ($hIgG4^{P-PVA}$)
REGN7150	CD38x4-1BB (1+1), ($hIgG4^{P-PVA}$)
REGN13168	非-TAAx4-1BB (1+2)对照, ($hIgG4^{P-PVA}$)
REGN4249	比较物1
REGN5458	BCMAxCD3, ($hIgG4^{P-PVA}$)
REGN2281	CD20xCD3, ($hIgG4^{P}$)

[0413]

REGN7540	同种型对照, ($hIgG4^{P-PVA}$)
REGN1945	同种型对照, ($hIgG4^{P}$)

[0414] 使用REGN2281(CD20xCD3)充当“信号1”,在经工程化以表达hCD20和hCD38(HEK293/hCD20/hCD38)的人胚胎肾癌细胞的存在下,评价在2个串联4-1BB结合Fab结构域之间具有不同连接的CD38x4-1BB 1+2多特异性抗原结合分子通过使CD38和4-1BB受体接合以递送“信号2”(如通过IL-2或IFNγ释放所确定的)活化人原代T细胞的能力。仅表达hCD20的HEK293细胞作为对照被包括在内,以测量在APC上缺乏CD38时可能发生的活性。此外,在

测试CD38x4-1BB(1+2)双特异性抗体中包括内源性表达hCD38的多发性骨髓瘤细胞系MOLP8。由于MOLP8细胞内源性表达BCMA,因此包括REGN5458(BCMAxCD3)充当“信号1”。最后,在不存在CD3双特异性抗体的情况下,测试了包括MOLP8或NALM-6(内源性表达CD38的急性淋巴细胞白血病细胞系)作为靶细胞的情况。值得注意的是,与HEK293细胞不同,在不存在CD3抗体刺激的情况下,MOLP8和NALM-6细胞能够提供可检测的T细胞同种异体刺激,充当“信号1”。

[0415] 人原代$CD3^+$T细胞的分离:

[0416] 使用来自StemCell Technologies的EasySep人T细胞分离试剂盒,按照制造商的建议,从来自Precision for Medicine的健康供体白细胞包(供体555114)中分离出人外周血单核细胞(PBMC)并冷冻。随后,使用来自StemCell Technologies的EasySepTM人$CD3^+$T细胞分离试剂盒并遵循制造商推荐的说明书,将$CD3^+$T细胞从PBMC中分离出来。

[0417] 原代T细胞活化测定:

[0418] 将重悬于刺激培养基中的富集的$CD3^+$T细胞以1×10^5个细胞/孔的浓度添加到96孔圆底板中。对于HEK293/hCD20/hCD38或HEK293/hCD20细胞以1x 10^4个细胞/孔的最终浓度以及对于MOLP8和NALM-6细胞,以5x 10^4个细胞/孔的最终浓度将靶细胞添加到$CD3^+$T细胞中。在添加细胞后,将恒量0.25nM REGN2281添加到含有HEK293/hCD20/hCD38或HEK293/hCD20细胞的孔中。将恒量0.5nM REGN5458或同种型对照添加到含有MOLP8细胞的孔中。未将CD3双特异性抗体添加到含有NALM-6靶细胞的孔中。随后,将CD38x4-1BB(1+1或1+2)、二价4-1BB(REGN4249)或同种型对照(REGN7540或REGN1945)从128fM到50nM以1:5稀释进行滴定,并添加到孔中。10点稀释的终点不含滴定的抗体。将板在37℃、5%CO_2下孵育72小时,并且将5μL总上清液用于测量IL-2或IFNγ。按照制造商的方案,使用来自PerkinElmer的AlphaLisa试剂盒来确定测定上清液中细胞因子的量。在Perkin Elmer多标酶标仪Envision上获得细胞因子测量值,并以pg/mL为单位报告该值。所有连续稀释液都一式两份进行测试。

[0419] 使用GraphPad Prism™软件在10点剂量反应曲线上根据四参数逻辑方程式确定抗体的EC_{50}值。最大细胞因子以在测试的剂量范围内检测到的平均最大应答给出。在表15和表16中提供结果。

[0420] HEK293/hCD20和HEK293/hCD20/hCD38

[0421] 与匹配的同种型$IgG4^{P-PVA}$、$IgG4^P$或双特异性抗体对照(分别为REGN7540、REGN1945和REGN13168)相比,在靶标和由REGN2281提供的“信号1”的存在下,4-1BB抗体治疗导致更高的IL-2和IFNγ应答。值得注意的是,与1+1CD38x4-1BB(REGN7150)和二价4-1BB(REGN4249)抗体相比,CD38x4-1BB的1+2形式导致更高的最大细胞因子释放和更大的效力,无论在2个串联4-1BB结合Fab结构域之间的连接如何,均观察到相似的细胞因子释放水平和效力。在不存在CD38靶标的情况下,仅二价4-1BB(REGN4249)表现出细胞因子释放的剂量依赖性增加。

[0422] MOLP8

[0423] 在存在同种异体MOLP8细胞和不存在CD3双特异性抗体刺激的情况下,1+2CD38x4-1BB抗体REGN7647、REGN9682和REGN9686介导IL-2和IFNγ的剂量依赖性增加。相比之下,1+1CD38x4-1BB抗体REGN7150和二价4-1BB抗体REGN4249导致IL-2的轻微剂量依赖性增加,但

IFNγ没有。对于同种型和非靶向1+2 4-1BB对照抗体,均未观察到IL-2或IFNγ的剂量依赖性增加。对于所有CD38靶向4-1BB抗体以及对于REGN4249,在使用MOLP8细胞和原代人T细胞的条件下添加固定量的REGN5458(BCMAxCD3)导致IL-2和IFNγ的剂量依赖性增加。如先前所述,与REGN7150和REGN4249相比,1+2CD38x4-1BB抗体表现出更大的效力和最大细胞因子增加,其中在4-1BB结合Fab之间的连接形式对效力或最大细胞因子释放几乎没有影响。同种型对照和非TAAx4-1BB 1+2对照抗体不导致剂量依赖性细胞因子释放。

[0424] NALM-6

[0425] 在存在同种异体NALM-6细胞和不存在CD3双特异性抗体刺激的情况下,所有CD38靶向4-1BB抗体(REGN7647、REGN9682、REGN9686和REGN7150)以及二价4-1BB抗体(REGN4249)都会导致IFNγ和IL-2的剂量依赖性增加。与1+1CD38x4-1BB抗体REGN7150和二价4-1BB抗体REGN4249相比,1+2CD38x4-1BB抗体REGN7647、REGN9682和REGN9686表现出更大的效力和最大细胞因子释放。如先前所述,所有1+2CD38x4-1BB多特异性抗原结合分子的表现都相似,无论在4-1BB结合Fab之间的接头如何。同种型对照和非TAAx4-1BB 1+2对照抗体不导致剂量依赖性细胞因子释放。

[0426]

表15：最大IL2释放和效力值

	HEK293/CD20/CD38 + REGN2281		HEK293/CD20 + REGN2281		MOLP-8 + REGN5458		MOLP-8 + IsoC		NALM-6	
	最大 [pg/ml]	EC50 [M]	最大 [pg/ml]	EC50 [M]	最大 [pg/ml]	EC50 [M]	最大 [pg/ml]	EC50 [M]	最大 [pg/ml]	EC50 [M]
REGN7647	781	5.35E-11	61	ND	66	2.16E-10	73	NC	192	4.85E-11
REGN9682	912	6.07E-11	52	ND	79	1.33E-10	96	NC	205	7.17E-11
REGN9686	709	4.53E-11	57	ND	62	8.33E-11	90	3.61E-11	169	7.23E-11
REGN7150	593	NC	63	ND	32	NC	48	NC	122	1.08E-10
REGN13168	41	ND	57	ND	16	ND	28	ND	48	ND
REGN4249	110	NC	126	8.19E-10	19	NC	54	NC	108	NC
REGN7540	37	ND	54	ND	17	ND	21	ND	35	ND
REGN1945	48	ND	63	ND	18	ND	33	ND	41	ND

缩写：NC，未计算，因为数据不符合4参数逻辑方程；ND，未确定，因为未观察到浓度依赖性增加。

表16：最大IFNγ释放和效力值

	HEK293/CD20/CD38 + REGN2281		HEK293/CD20 + REGN2281		MOLP-8 + REGN5458		MOLP-8 + IsoC		NALM-6	
	最大 [pg/ml]	EC50 [M]	最大 [pg/ml]	EC50 [M]	最大 [pg/ml]	EC50 [M]	最大 [pg/ml]	EC50 [M]	最大 [pg/ml]	EC50 [M]
REGN7647	6046	6.17E-11	1908	ND	3284	7.07E-11	103	NC	655	7.03E-11
REGN9682	5271	5.26E-11	1573	ND	3406	7.25E-11	161	NC	658	4.19E-11
REGN9686	6823	8.74E-11	1449	ND	3891	1.02E-10	85	NC	651	NC
REGN7150	3951	7.80E-10	1843	ND	1297	4.38E-08	56	NC	620	NC
REGN13168	1805	ND	1638	ND	656	ND	1	ND	102	ND
REGN4249	2474	6.40E-10	2279	4.29E-09	1003	NC	37	NC	400	NC
REGN7540	2080	ND	1455	ND	602	ND	1	ND	130	ND
REGN1945	2086	ND	1664	ND	542	ND	83	NC	117	ND

缩写： NC，未计算，因为数据不符合4参数逻辑方程；ND，未确定，因为未观察到浓度依赖性增加。

[0427] 实施例9:使用HEK293/hCD20/hCD38、HEK293/hCD20、MOLP8、OPM2和HEK293/NFkB-Luc/h4-1BB细胞在工程化报告基因测定中对CD38x4-1BB(1+2)多特异性抗原结合分子的表征

[0428] 在工程化报告基因测定中测量了CD38x4-1BB多特异性抗原结合分子在表达CD38的靶细胞的存在下特异性活化4-1BB受体的能力。在该测定中,工程化HEK293细胞在转录因子NF-KB(NFKB-Luc)以及共刺激受体4-1BB(HEK293/NFkB-Luc/h4-1BB)的控制下表达报告基因荧光素酶。该测定中使用的靶细胞是经工程化以表达单独的或与CD38组合的CD20的HEK293细胞或内源性表达CD38的细胞系,即OPM2和MOLP8。通过将报告细胞与靶细胞组合和CD38x4-1BB 1+2抗体的滴定评估了4-1BB臂刺激4-1BB活性的能力。4-1BB的活化导致NFKB驱动的荧光素酶产生,其然后通过发光读数进行测量。在这些测定中,还评价了在2个串联4-1BB靶向结构域之间不同类型的连接的影响。

[0429] 多特异性抗原结合分子:

[0430] 在该实验中测试的多特异性抗原结合分子和对照如表17中所示。

[0431] 表17:CD38x4-1BB结合分子和对照

[0432]

MABM标识符	描述
REGN7647	CD38x4-1BB(1+2),($hIgG4^{P-PVA}$)
REGN7650	CD38x4-1BB(1+2),($hIgG4^{P-PVA}$)
REGN9682	CD38x4-1BB(1+2),(G4S)3($hIgG4^{P-PVA}$)
REGN9686	CD38x4-1BB(1+2),(G4S)2($hIgG4^{P-PVA}$)
REGN4249	比较物1
REGN7540	同种型对照($hIgG4^{P-PVA}$)
REGN1945	同种型对照($hIgG4^{P}$)

[0433] 实验前一天,在DMEM+10% FBS+P/S/G+500μg/ml G418生长培养基中,HEK293报告细胞分裂为5x 10^5个细胞/mL。

[0434] 在实验当天,将粘着的HEK293报告细胞和靶细胞受胰蛋白酶作用,洗涤并重悬于测定介质(DMEM+10% FBS+P/S/G)中。将报告HEK293/NFKB-Luc/h4-1BB细胞以5x 10^3个细胞/孔的最终浓度添加到96孔白色微量滴定板的孔中,然后以1x 10^4个细胞/孔的最终浓度添加靶细胞HEK293/hCD20或HEK293/hCD20/hCD38、或以2.5x 10^4个细胞/孔的最终浓度添加MOLP8和OPM2靶细胞。

[0435] 将CD38x4-1BB 1+2和对照抗体以1:3、10点、范围从3.0pM到20nM最终浓度的连续稀释进行滴定,其中最后一点不含抗体,包括作为对照。在添加抗体后,将96孔白色微量滴定板在37℃/5% CO_2下孵育5小时,然后添加等体积的ONE-Glo™(Promega)试剂以裂解细胞并检测荧光素酶活性。在多标酶标仪Envision(PerkinElmer)上以相对光单位(RLU)捕获发射的光。使用GraphPad Prism软件在10点剂量反应曲线(第10个点不含有抗体)上根据4参数逻辑方程式确定抗体的EC_{50}值。在表18中提供结果。

[0436] HEK293/hCD20和HEK293/hCD20/hCD38

[0437] 在HEK293/hCD20/hCD38靶细胞的存在下,CD38x4-1BB 1+2双特异性抗体(REGN7647、REGN9682、REGN9686和REGN7650)导致相似的荧光素酶活性增加,而不管在2个抗4-1BB结合Fab结构域之间的连接如何。抗4-1BB二价抗体(REGN4249)也导致荧光素酶活性的剂量依赖性增加,然而同种型对照抗体则没有。

[0438] 在缺乏CD38的HEK293/hCD20靶细胞的存在下,使用CD38x4-1BB双特异性抗体或使用同种型对照未看到应答。仅抗4-1BB二价抗体(REGN4249)才导致荧光素酶活性的剂量依

赖性增加。

[0439] MOLP8和OPM2细胞

[0440] 在MOLP8或OPM2靶细胞的存在下,CD38x4-1BB 1+2(REGN7647、REGN7650、REGN9682和REGN9686)抗体以及二价抗4-1BB抗体(REGN4249)导致荧光素酶活性的剂量依赖性增加,其中不同接头长度1+2CD38x4-1BB变体导致相似的活性。同种型对照抗体不导致任何信号。

[0441] 表18:抗体的最大荧光素酶活性和效力值

[0442]

	HEK293/CD20/CD38		HEK293/CD20		OPM2		MOLP-8	
	最大[RLU]	EC50 [M]	最大[RLU]	EC50 [M]	最大[RLU]	EC50 [M]	最大[RLU]	EC50 [M]
REGN7647	2.4E+06	NC	1.2E+06	ND	1.9E+06	7.35E-12	2.3E+06	NC
REGN7650	2.3E+06	NC	1.5E+06	NC	2.0E+06	9.89E-11	2.4E+06	NC
REGN9682	2.4E+06	NC	1.0E+06	ND	2.1E+06	2.19E-11	2.2E+06	NC
REGN9686	2.4E+06	NC	1.1E+06	NC	2.1E+06	1.80E-11	2.2E+06	NC
REGN4249	2.8E+06	4.28E-11	3.3E+06	6.82E-11	2.9E+06	5.25E-11	2.7E+06	4.59E-11
REGN7540	9.9E+05	ND	1.2E+06	ND	8.5E+05	ND	7.9E+05	ND
REGN1945	1.0E+06	ND	9.5E+05	ND	7.5E+05	ND	7.8E+05	ND

[0443] 缩写:ND:未确定,因为未观察到浓度依赖性增加;NC:未计算,因为数据不符合4参数逻辑方程。

[0444] 实施例10:使用NALM-6,NALM-6/PDL1和人原代T细胞在T细胞同种异体西米普利单抗组合测定中对CD38x4-1BB 1+2双特异性抗体的表征

[0445] 正确T细胞活化需要两个信号,即“信号1”和“信号2”。“信号1”由T细胞上的T细胞受体(TCR)与抗原呈递细胞(APC)上的肽结合的主要组织相容性复合物(MHC)分子的结合诱导。“信号2”通过接合T细胞上的共刺激受体提供。一种这样的共刺激受体是4-1BB受体,其是一种可诱导的I型膜蛋白并且是肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族的成员。在抗原或丝裂原诱导的活化之后,诱导T细胞表面上4-1BB受体的表达。4-1BB的活化通过与呈现在APC上的4-1BBL接合而发生。因此,4-1BB信号传导的活化提供了增强现有TCR信号传导的靶向方法。

[0446] CD38x4-1BB(1+2)双特异性抗体被设计成通过将$CD38^{+}$靶细胞与4-1BB受体阳性T细胞桥接来模拟4-1BB的天然配体以提供“信号2”,以便增强在由肿瘤相关抗原(TAA)x CD3双特异性抗体提供的“信号1”或由APC提供的同种异体反应的存在下的T细胞活化。然而,通过将T细胞上的程序性细胞死亡蛋白1受体(PD-1)与其在APC上的配体PD-L1连接可以抑制T细胞活化。连接的PD-1导致将磷酸酶募集到CD28和TCR复合物(Zou等人.Inhibitory B7-family molecules in the tumor microenvironment.Nature Reviews Immunology2008,8:467-477;Francisco等人.2010,Hui等人.T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition.Science.2017,355(6332):1428-33),这进而抵消TCR信号传导和4-1BB刺激。因此,使用PD-1拮抗剂西米普利单抗阻断PD-1/PD-L1相互作用,组合CD38x4-1BB双特异性抗体,可能会增强T细胞功能。

[0447] 多特异性抗原结合分子:

[0448] 在该实验中测试的多特异性抗原结合分子和对照如表19中所示。

[0449] 表19:CD38x4-1BB结合分子和对照

[0450]

MABM标识符	描述

REGN7633	CD38x4-1BB 1+2,hIgG4^{P-PVA}
REGN7647	CD38x4-1BB 1+2,hIgG4^{P-PVA}
REGN7650	CD38x4-1BB 1+2,hIgG4^{P-PVA}
REGN4249	比较物1
REGN2810	PD-1抗体(西米普利单抗),hIgG4^{P}
REGN7540	同种型对照,hIgG4^{P-PVA}
REGN1945	同种型对照,hIgG4^{P}

[0451] 在经工程化以表达PD-L1(NALM6/hPD-L1)的CD38^{+}人急性淋巴细胞白血病癌细胞系的存在下,评价了CD38x4-1BB 1+2多特异性抗原结合分子通过使CD38和4-1BB受体接合以递送“信号2”(如通过IL-2和IFNγ释放所确定的)活化人原代T细胞的能力。NALM6细胞提供了足以充当“信号1”的同种异体TCR反应。在CD38x4-1BB 1+2或对照抗体的滴定的存在下评价固定浓度的PD-1拮抗剂抗体西米普利单抗的添加。

[0452] 人原代CD3^{+}T细胞的分离:

[0453] 按照制造商建议的方案,使用EasySepTM直接人PBMC分离试剂盒,从来自Precision for Medicine的健康供体白细胞包(供体555192)中分离出人外周血单核细胞(PBMC)并冷冻。通过解冻小瓶的冷冻PBMC来分离CD3^{+}T细胞。使用来自StemCell Technologies的EasySepTM人CD3^{+}T细胞分离试剂盒并遵循制造商推荐的说明书,使供体PBMC富集CD3^{+}T细胞。

[0454] IL-2和IFNγ释放测定:

[0455] 将重悬于刺激培养基中的富集的CD3^{+}T细胞以1×10^{5}个细胞/孔的浓度添加到96孔圆底板中。将经工程化以表达hPD-L1的NALM6细胞或NALM-6细胞以5x10^{4}个细胞/孔的最终浓度添加到CD3^{+}T细胞中。随后,将REGN7633、REGN7647、REGN7650、REGN4249和REGN7540从0.76pM到50nM以1:4稀释进行滴定,并添加到孔中。10点稀释的终点不含滴定的抗体。在添加滴定抗体后,将恒量20nM的西米普利单抗或其匹配的同种型对照(REGN1945)添加到孔中。将板在37℃、5%CO_2下孵育72小时,并且将5μL上清液用于测量IL-2或IFNγ。按照制造商的方案,使用来自PerkinElmer的AlphaLisa试剂盒来确定测定上清液中细胞因子的量。在Perkin Elmer多标酶标仪Envision上获得细胞因子测量值,并以pg/mL为单位报告该值。所有连续稀释液都一式三份进行测试。

[0456] 结果

[0457] 使用GraphPad Prism^{TM}软件在10点剂量反应曲线上根据四参数逻辑方程式确定抗体的EC_{50}值。最大细胞因子以在测试的剂量范围内检测到的平均最大应答给出。在表20和表21中提供结果。

[0458] 在经工程化以表达PD-L1的同种异体NALM6细胞或NALM6细胞的存在下,CD38x4-1BB 1+2抗体治疗(REGN7633、REGN7647和REGN7650)与匹配的同种型对照(REGN7540)比较导致IL-2和IFNγ释放的剂量依赖性增加。与NALM-6(不表达PD-L1)相比,最大IL-2和IFNγ释放在使用NALM6/PD-L1细胞的条件下更低。与西米普利单抗的匹配的同种型对照REGN1945比较,在表达PD-L1的NALM6细胞的存在下,西米普利单抗增加了最大细胞因子释放。值得注意的是,与二价4-1BB(REGN4249)抗体相比,CD38x4-1BB抗体的1+2形式导致更高的最大细胞因子释放和更大的效力。

[0459] 表20:最大IL-2释放和效力值

[0460]

	NALM6 + IgG4P		NALM6 + 西米普利单抗		NALM6/PD-L1 + IgG4P		NALM6/PD-L1 + 西米普利单抗	
IL-2	最大 [pg/ml]	EC50 [M]	最大 [pg/ml]	EC50 [M]	最大 [pg/ml]	EC50 [M]	最大 [pg/ml]	EC50 [M]
REGN7633	853	6.22E-10	756	4.54E-10	205	4.13E-10	470	5.20E-10
REGN7647	1117	5.79E-11	1043	4.77E-11	433	1.17E-10	683	9.11E-11

[0461]

REGN7650	1242	1.79E-10	1359	1.55E-10	326	2.28E-10	665	2.83E-10
REGN7540	125	ND	135	ND	32	ND	102	ND
REGN4249	413	6.03E-10	307	4.132E-10	143	3.96E-10	259	2.43E-10

[0462] 缩写:ND:未测定;NC:未计算,因为数据不符合4参数逻辑方程。

[0463] 表21:最大IFNγ释放和效力值

[0464]

	NALM-6 + IgG4P		NALM-6 + 西米普利单抗		NALM-6/PD-L1 + IgG4P		NALM-6/PD-L1 + 西米普利单抗	
IFNγ	最大 [pg/ml]	EC50 [M]	最大 [pg/ml]	EC50 [M]	最大 [pg/ml]	EC50 [M]	最大 [pg/ml]	EC50 [M]
REGN7633	519	6.37E-10	1095	NC	1	ND	272	1.28E-09
REGN7647	707	8.15E-11	1067	NC	67	NC	557	NC
REGN7650	1008	NC	962	1.56E-10	15	NC	244	NC
REGN7540	86	ND	333	ND	1	ND	14	ND
REGN4249	616	NC	919	NC	7	NC	324	NC

[0465] 缩写:ND:未测定;NC:未计算,因为数据不符合4参数逻辑方程。

[0466] 实施例11:CD38x4-1BB双特异性抗体与BCMAxCD3双特异性抗体组合的体内抗肿瘤功效。

[0467] 在该实验中测试的多特异性抗原结合分子和对照如表22中所示。

[0468] 表22:CD38x4-1BB结合分子和对照

[0469]

MABM标识符	描述
REGN5458	BCMAxCD3 bsAB
REGN13168	非-TAAx4-1BB(1+2)对照,(hIgG4$^{P\text{-}PVA}$)
REGN9686	CD38x4-1BB(1+2),(G4S)2(hIgG4$^{P\text{-}PVA}$)

[0470] 为了确定CD38x4-1BB 1+2形式双特异性抗体(bsAb)与BCMAxCD3 bsAb组合的体内抗肿瘤功效,进行了异种肿瘤研究。在第-11天,向免疫缺陷的NOD.Cg-Prkdc^{scid}I12rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG)小鼠腹膜内注射来自正常健康供体的4x10^{6}个人外周血单核细胞(PBMC)。在第0天,向小鼠静脉内施用2×10^{6}BCMA$^+$CD38$^+$MOLP-8人多发性骨髓瘤肿瘤细胞,所述肿瘤细胞经工程化以还表达萤火虫荧光素酶(MOLP-8-荧光素酶细胞)。然后立即向小鼠(每组n=4-5)施用0.4mg/kg的结合CD3的对照双特异性Ab或BCMAxCD3双特异性抗体(REGN5458;美国专利申请公布20200024356),与4mg/kg的结合4-1BB的对照双特异性Ab(1+2形式)或CD38x4-1BB双特异性抗体(1+2形式;REGN9686)的组合。在第7天和第14天,向小鼠再施用两次这些抗体,总共三剂。通过测量麻醉动物的肿瘤生物发光(BLI)来评估53天内的肿瘤生长。作为阳性对照,一组小鼠(n=5)仅给予MOLP-8-荧光素酶细胞和PBMC,但不给予抗体(PBS治疗组)。为了测量背景BLI水平,一组小鼠(n=5)未经治疗且未接受肿瘤、PBMC或抗体(无肿瘤组)。

[0471] 这些研究表明,虽然BCMAxCD3双特异性抗体单一疗法仅表现出适度的抗肿瘤功效,并且CD38x4-1BB 1+2双特异性抗体单一疗法几乎没有/没有表现出抗肿瘤活性,但是使用BCMAxCD3双特异性抗体加CD38x4-1BB 1+2双特异性抗体进行组合治疗导致优于单独使用任一种疗法的组合抗肿瘤功效。

[0472] 异种肿瘤的植入和测量

[0473] 在第-11天,向免疫缺陷的NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG)小鼠腹膜内注射来自正常健康供体的4x10^{6}个人外周血单核细胞(PBMC)。在第0天,向小鼠静脉内施用2×10^{6}BCMA^{+}CD38^{+}MOLP-8人多发性骨髓瘤肿瘤细胞,所述肿瘤细胞经工程化以还表达萤火虫荧光素酶(MOLP-8-荧光素酶细胞)。然后立即向小鼠(每组n=4-5)施用0.4mg/kg的结合CD3的对照双特异性抗体或BCMAxCD3双特异性抗体(REGN5458),与4mg/kg的4-1BB结合对照双特异性抗体(1+2形式)或CD38x4-1BB双特异性抗体(1+2形式;REGN9686)的组合。在第7天和第14天,向小鼠再施用两次这些Ab,总共三剂。通过测量麻醉动物的肿瘤生物发光(BLI)来评估53天内的肿瘤生长。作为阳性对照,一组小鼠(n=5)仅给予MOLP-8-荧光素酶细胞和PBMC,但不给予抗体(PBS治疗组)。为了测量背景BLI水平,一组小鼠(n=5)未经治疗且未接受肿瘤、PBMC或抗体(无肿瘤组)。

[0474] 异种肿瘤生长的测量

[0475] BLI成像用于测量肿瘤负荷。给小鼠IP注射150mg/kg悬浮在PBS中的荧光素酶底物D-荧光素。在注射后五分钟,使用Xenogen IVIS系统在异氟醚麻醉下对小鼠进行BLI成像。图像采集通过在D处的视野、1.5cm的对象高度和中等框并水平进行,其中自动曝光时间由Living Image软件确定。使用Living Image软件提取BLI信号:围绕每个肿瘤块绘制所关注的区域,并将光子强度记录为总通量(光子/秒-p/s)。

[0476] 结果:

[0477] 表23-32提供了在施用人多发性骨髓瘤肿瘤细胞之后6天、10天、13天、17天、20天、24天、27天、31天、34天和38天治疗组合对肿瘤负荷和受试者存活率的影响结果。图3是38天内表格中所示数据的图形表示。图4A示出了相对于未接受肿瘤细胞的小鼠,用PBS治疗的小鼠中随时间推移的肿瘤负荷;图4B示出了相对于未接受肿瘤细胞的小鼠,用结合CD3的对照bsAb(0.4mg/kg)+结合4-1BB的对照bsAb(4mg/kg)治疗的小鼠中随时间推移的肿瘤负荷;图4C示出了相对于未接受肿瘤细胞的小鼠,用结合CD3的对照bsAb(0.4mg/kg)+CD38x4-1BB(4mg/kg)治疗的小鼠中随时间推移的肿瘤负荷;图4D示出了相对于未接受肿瘤细胞的小鼠,用BCMAxCD3 bsAb(0.4mg/kg)+结合4-1BB的对照bsAb(4mg/kg)治疗的小鼠中随时间推移的肿瘤负荷;图4E示出了相对于未接受肿瘤细胞的小鼠,用BCMAxCD3 bsAb(0.4mg/kg)+CD38x4-1BB(4mg/kg)治疗的小鼠中随时间推移的肿瘤负荷。

[0478] BCMAxCD3单一疗法:BCMAxCD3 bsAb(REGN5458)加结合4-1BB的对照bsAb提供了一些抗肿瘤功效,与接受结合CD3的对照bsAb加结合4-1BB的对照bsAb的小鼠相比,平均BLI读数降低,在第24天$p<0.0001$并且在第26天$p=0.0015$(双因子方差分析)。

[0479] CD38x4-1BB单一疗法:与接受结合CD3的对照bsAb加结合4-1BB的对照bsAb的小鼠相比,用结合CD3的对照bsAb加CD38x4-1BB 1+2bsAb(REGN9686)进行治疗不会显著降低平均BLI读数。

[0480] BCMAxCD3+CD38x4-1BB 1+2:BCMAxCD3 bsAb(REGN5458)加CD38x4-1BB 1+2bsAb

(REGN9686)的组合导致平均BLI读数低于接受BCMAxCD3 bsAb加结合4-1BB的对照bsAb(在第38天p<0.0001,双因子方差分析)。

[0481] 因此,这些研究表明,虽然BCMAxCD3 bsAb单一疗法仅表现出适度的抗肿瘤功效,并且CD38x4-1BB 1+2bsAb单一疗法几乎没有/没有表现出抗肿瘤活性,但是使用BCMAxCD3 bsAb加CD38x4-1BB 1+2bsAb进行组合治疗导致优于单独使用任一种疗法的组合抗肿瘤功效。

[0482] 表23:通过用BCMAxCD3 bsAb加CD38x4-1BB 1+2bsAb进行组合治疗获得的抗肿瘤功效-第6天

[0483]

抗体 治疗	肿瘤负荷-第6天的平均总通量(p/s)	第6天的总通量SEM	在第6天仍然存活的小鼠数量
PBS媒介物	8.67E+05	4.66E+04	5
结合CD3的对照bsAb (0.4mg/kg) + 结合4-1BB的对照bsAb (4mg/kg)	8.80E+05	4.38E+04	5
结合CD3的对照bsAb (0.4mg/kg) + CD38x4-1BB (4mg/kg)	7.81E+05	5.36E+04	5
BCMAxCD3 bsAb (0.4mg/kg) + 结合4-1BB的对照bsAb (4mg/kg)	8.40E+05	4.47E+04	4
BCMAxCD3 bsAb (0.4mg/kg) + CD38x4-1BB (4mg/kg)	7.82E+05	2.34E+04	5
无肿瘤(背景BLI)	9.54E+05	3.42E+04	5

[0484] 表24:通过用BCMAxCD3 bsAb加CD38x4-1BB 1+2bsAb进行组合治疗获得的抗肿瘤功效-第10天

[0485]

抗体 治疗	肿瘤负荷-第10天的平均总通量(p/s)	第10天的总通量SEM	在第10天仍然存活的小鼠数量
PBS媒介物	1.01E+06	4.01E+04	5
结合CD3的对照bsAb (0.4mg/kg) + 结合4-1BB的对照bsAb (4mg/kg)	8.84E+05	2.98E+04	5
结合CD3的对照bsAb (0.4mg/kg) + CD38x4-1BB (4mg/kg)	7.69E+05	3.04E+04	5
BCMAxCD3 bsAb (0.4mg/kg) + 结合4-1BB的对照bsAb (4mg/kg)	8.96E+05	4.41E+04	4
BCMAxCD3 bsAb (0.4mg/kg) + CD38x4-1BB (4mg/kg)	8.49E+05	4.95E+04	5
无肿瘤(背景BLI)	9.41E+05	3.62E+04	5

[0486] 表25:通过用BCMAxCD3 bsAb加CD38x4-1BB 1+2bsAb进行组合治疗获得的抗肿瘤功效-第13天

[0487]

抗体 治疗	肿瘤负荷-第13天的平均总通	第13天的总通量SEM	在第13天仍然存活的小

[0488]

	量(p/s)		鼠数量
PBS媒介物	1.24E+06	1.07E+05	5
结合CD3的对照bsAb (0.4mg/kg) + 结合4-1BB的对照bsAb (4mg/kg)	1.01E+06	1.60E+05	5
结合CD3的对照bsAb (0.4mg/kg) + CD38x4-1BB (4mg/kg)	7.67E+05	2.92E+04	5
BCMAxCD3 bsAb (0.4mg/kg) + 结合4-1BB的对照bsAb (4mg/kg)	7.20E+05	3.41E+04	4
BCMAxCD3 bsAb (0.4mg/kg) + CD38x4-1BB (4mg/kg)	6.37E+05	2.39E+04	5
无肿瘤(背景BLI)	7.88E+05	3.52E+04	5

[0489] 表26:通过用BCMAxCD3 bsAb加CD38x4-1BB 1+2bsAb进行组合治疗获得的抗肿瘤功效-第17天

[0490]

抗体 治疗	肿瘤负荷-第17天的平均总通量(p/s)	第17天的总通量SEM	在第17天仍然存活的小鼠数量
PBS媒介物	6.16E+06	1.51E+06	5
结合CD3的对照bsAb (0.4mg/kg) + 结合4-1BB的对照bsAb (4mg/kg)	3.81E+06	1.07E+06	5
结合CD3的对照bsAb (0.4mg/kg) + CD38x4-1BB (4mg/kg)	1.84E+06	3.30E+05	5
BCMAxCD3 bsAb (0.4mg/kg) + 结合4-1BB的对照bsAb (4mg/kg)	6.74E+05	7.70E+04	4
BCMAxCD3 bsAb (0.4mg/kg) + CD38x4-1BB (4mg/kg)	7.69E+05	5.96E+04	5
无肿瘤(背景BLI)	7.63E+05	4.76E+04	5

[0491] 表27:通过用BCMAxCD3 bsAb加CD38x4-1BB 1+2bsAb进行组合治疗获得的抗肿瘤功效-第20天

[0492]

抗体 治疗	肿瘤负荷-第20天的平均总通量(p/s)	第20天的总通量SEM	在第20天仍然存活的小鼠数量
PBS媒介物	1.10E+07	1.70E+06	5
结合CD3的对照bsAb (0.4mg/kg) + 结合4-1BB的对照bsAb (4mg/kg)	1.06E+07	5.11E+06	5
结合CD3的对照bsAb (0.4mg/kg) + CD38x4-1BB (4mg/kg)	3.81E+06	5.67E+05	5
BCMAxCD3 bsAb (0.4mg/kg) + 结合4-1BB的对照bsAb (4mg/kg)	7.88E+05	3.78E+04	4
BCMAxCD3 bsAb (0.4mg/kg) + CD38x4-1BB (4mg/kg)	7.36E+05	2.41E+04	5

[0493]

无肿瘤(背景BLI)	8.52E+05	1.57E+04	5

[0494] 表28:通过用BCMAxCD3 bsAb加CD38x4-1BB 1+2bsAb进行组合治疗获得的抗肿瘤功效-第24天

[0495]

抗体 治疗	肿瘤负荷-第24天的平均总通量(p/s)	第24天的总通量SEM	在第24天仍然存活的小鼠数量
PBS媒介物	2.44E+07	4.43E+06	5
结合CD3的对照bsAb (0.4mg/kg) + 结合4-1BB的对照bsAb (4mg/kg)	3.60E+07	1.18E+07	5
结合CD3的对照bsAb (0.4mg/kg) + CD38x4-1BB (4mg/kg)	1.82E+07	6.39E+06	5
BCMAxCD3 bsAb (0.4mg/kg) + 结合4-1BB的对照bsAb (4mg/kg)	1.14E+06	4.30E+05	4
BCMAxCD3 bsAb (0.4mg/kg) + CD38x4-1BB (4mg/kg)	7.15E+05	1.19E+04	5
无肿瘤(背景BLI)	7.91E+05	2.05E+04	5

[0496] 表29:通过用BCMAxCD3 bsAb加CD38x4-1BB 1+2bsAb进行组合治疗获得的抗肿瘤功效-第27天

[0497]

抗体 治疗	肿瘤负荷-第27天的平均总通量(p/s)	第27天的总通量SEM	在第27天仍然存活的小鼠数量
PBS媒介物	4.21E+07	7.71E+06	4
结合CD3的对照bsAb (0.4mg/kg) + 结合4-1BB的对照bsAb (4mg/kg)	2.67E+07	7.65E+06	2
结合CD3的对照bsAb (0.4mg/kg) + CD38x4-1BB (4mg/kg)	6.11E+07	3.02E+07	5
BCMAxCD3 bsAb (0.4mg/kg) + 结合4-1BB的对照bsAb (4mg/kg)	1.47E+06	5.55E+05	4
BCMAxCD3 bsAb (0.4mg/kg) + CD38x4-1BB (4mg/kg)	6.92E+05	5.29E+04	5
无肿瘤(背景BLI)	8.85E+05	6.27E+04	5

[0498] 表30:通过用BCMAxCD3 bsAb加CD38x4-1BB 1+2bsAb进行组合治疗获得的抗肿瘤功效-第31天

[0499]

抗体 治疗	肿瘤负荷-第31天的平均总通量(p/s)	第31天的总通量SEM	在第31天仍然存活的小鼠数量
PBS媒介物	没有老鼠还活着	不适用	0

[0500]

结合CD3的对照bsAb (0.4mg/kg) + 结合4-1BB的对照bsAb (4mg/kg)	7.95E+07	0.00E+00	1
结合CD3的对照bsAb (0.4mg/kg) + CD38x4-1BB (4mg/kg)	1.15E+08	5.50E+07	5
BCMAxCD3 bsAb (0.4mg/kg) + 结合4-1BB的对照bsAb (4mg/kg)	3.91E+06	2.35E+06	4
BCMAxCD3 bsAb (0.4mg/kg) + CD38x4-1BB (4mg/kg)	8.08E+05	8.44E+04	5
无肿瘤(背景BLI)	8.65E+05	3.41E+04	5

[0501] 表31:通过用BCMAxCD3 bsAb加CD38x4-1BB 1+2bsAb进行组合治疗获得的抗肿瘤功效-第34天

[0502]

抗体 治疗	肿瘤负荷-第34天的平均总通量(p/s)	第34天的总通量SEM	在第34天仍然存活的小鼠数量
PBS媒介物	没有老鼠还活着	不适用	0
结合CD3的对照bsAb (0.4mg/kg) + 结合4-1BB的对照bsAb (4mg/kg)	没有老鼠还活着	不适用	0
结合CD3的对照bsAb (0.4mg/kg) + CD38x4-1BB (4mg/kg)	2.24E+08	1.60E+08	2
BCMAxCD3 bsAb (0.4mg/kg) + 结合4-1BB的对照bsAb (4mg/kg)	3.25E+06	1.75E+06	4
BCMAxCD3 bsAb (0.4mg/kg) + CD38x4-1BB (4mg/kg)	9.27E+05	1.26E+05	5
无肿瘤(背景BLI)	9.75E+05	2.55E+04	5

[0503] 表32:通过用BCMAxCD3 bsAb加CD38x4-1BB 1+2bsAb进行组合治疗获得的抗肿瘤功效-第38天

[0504]

抗体 治疗	肿瘤负荷-第38天的平均总通量(p/s)	第38天的总通量SEM	在第38天仍然存活的小鼠数量
PBS媒介物	没有老鼠还活着	不适用	0
结合CD3的对照bsAb (0.4mg/kg) + 结合4-1BB的对照bsAb (4mg/kg)	没有老鼠还活着	不适用	0
结合CD3的对照bsAb (0.4mg/kg) + CD38x4-1BB (4mg/kg)	没有老鼠还活着	不适用	0
BCMAxCD3 bsAb (0.4mg/kg) + 结合4-1BB的对照bsAb (4mg/kg)	2.12E+07	1.11E+07	4
BCMAxCD3 bsAb (0.4mg/kg) + CD38x4-1BB (4mg/kg)	1.79E+06	1.13E+06	4

[0505]

无肿瘤(背景BLI)	8.22E+05	7.30E+04	5

[0506] 实施例12:抗CD38x4-1BB抗原结合分子的Biacore结合动力学。

[0507] 通过抗CD38x4-1BB 1+2抗体与单体和二聚体人4-1BB试剂结合的抗体捕获形式Biacore结合动力学和抗CD38x4-1BB 1+2抗体与二聚体人4-1BB试剂结合的抗原捕获形式Biacore结合动力学来确定抗CD38x4-1BB抗体的结合动力学。两个实验均在25℃下进行。

[0508] 抗体捕获形式方法:

[0509] 使用Biacore 8k仪器使用实时表面等离子体共振生物传感器确定了用C末端myc-myc-六组氨酸标签表达的人4-1BB(h4-1BB.mmH,REGN3584)或用C末端鼠Fc标签表达的人4-1BB(h4-1BB.mFc,REGN3585)与纯化的抗CD38x4-1BB 1+2抗体结合的平衡解离常数(K_D值)。CM5 Biacore传感器表面通过与单克隆小鼠抗人Fc抗体(REGN2567)进行胺偶联而衍生化。在由0.01M HEPES pH 7.4、0.15MNaCl、3mM EDTA、0.05%v/v表面活性剂P20构成的缓冲液(HBS-EP操作缓冲液)中进行所有Biacore结合研究。将在HBS-EP操作缓冲液中制备的不同浓度的h4-1BB.mmH(REGN3584)(范围从100nM到6.25nM,4倍连续稀释)或在HBS-EP操作缓冲液中制备的不同浓度的h4-1BB.mFc(REGN3585)(范围从100nM到1.56nM,4倍连续稀释液)以30μL/分钟的流速注射到捕获的抗CD38x4-1BB 1+2抗体上。监测抗体-试剂结合5分钟,而监

测在HBS-EP操作缓冲液中的解离10分钟。在每个循环结束时,使用10秒注射20mM磷酸再生抗CD38x4-1BB 1+2抗体捕获表面。所有结合动力学实验均在25℃下进行。结果呈现于表33和34中。

[0510] 抗原捕获形式方法:

[0511] 使用Biacore 4000仪器使用实时表面等离子体共振生物传感器确定了用C末端鼠Fc标签表达的人4-1BB(h4-1BB.mFc,REGN3585)与纯化的抗CD38x4-1BB 1+2抗体结合的平衡解离常数(K_D值)。CM5 Biacore传感器表面通过与多克隆兔抗鼠Fc抗体(GE,#BR-1008-38)进行胺偶联而衍生化。在由0.01M HEPES pH 7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.05%v/v表面活性剂P20构成的缓冲液(HBS-EP操作缓冲液)中进行所有Biacore结合研究。将在HBS-EP操作缓冲液中制备的不同浓度的CD38x4-1BB 1+2构建体(范围从100nM到6.25nM,4倍连续稀释液)以30μL/分钟的流速注射到h4-1BB.mFc(REGN3585)捕获表面上。监测抗体-试剂结合5分钟,而监测在HBS-EP操作缓冲液中的解离10分钟。在每个循环结束时,使用40秒注射10mM甘氨酸(pH 1.5)再生h4-1BB.mFc捕获表面。所有结合动力学实验均在25℃下进行。结果呈现于表35中。

[0512] 两种形式的数据分析:

[0513] 通过使用Cytiva Insight曲线拟合软件将实时传感图拟合至1:1结合模型,确定动力学结合速率常数(k_a)和解离速率常数(k_d)。从动力学速率常数计算结合解离平衡常数(K_D)和解离半衰期(t1/2)为:

[0514] $$K_D\,(M) = \frac{kd}{ka}, \quad \text{和} \quad t½\,(min) = \frac{\ln(2)}{60*kd}$$

[0515] 表33:在25℃下单体人4-1BB与表面捕获的抗CD38x4-1BB 1+2抗体的动力学和平衡结合参数

[0516]

REGN # / Ab PID #	Ab捕获(RU)	100nM h4-1BB.mmH结合(RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD(M)	t1/2(min)
REGN7633	394.6 ± 1.4	24.9*	IC**	IC**	IC**	IC**
REGN7647	506.8 ± 3.1	86.1	3.24E+05	5.33E-03	1.65E-08	2.2
REGN7650	458.9 ± 0.4	41.9	2.62E+05	5.35E-03	2.04E-08	2.2
REGN9682	607.1 ± 1.1	106.8	3.58E+05	4.94E-03	1.38E-08	2.3
REGN9686	606.9 ± 0.5	101.3	3.19E+05	4.74E-03	1.48E-08	2.4

[0517] *观察到h4-1bb.mmH的剂量依赖性结合

[0518] **IC:观察到的结合不符合结合模拟模型,并且在当前实验条件下未确定结合动

力学参数。

[0519] 表34:在25℃下二聚体人4-1BB与表面捕获的抗CD38x4-1BB 1+2抗体的动力学和平衡结合参数

[0520]

REGN # / Ab PID #	Ab捕获(RU)	100nM h4-1BB.mFc结合(RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD(M)	t1/2(min)
REGN7633	395.4 ± 0.3	82.1	2.74E+05	2.51E-04	9.17E-10	46.0
REGN7647	505.3 ± 1.4	223.6	1.95E+05	2.31E-04	1.18E-09	50.0
REGN7650	458.3 ± 0.6	152.0	1.02E+05	1.22E-04	1.20E-09	94.9
REGN9682	603.2 ± 1.7	283.3	2.06E+05	1.77E-04	8.60E-10	65.3
REGN9686	600.2 ± 2.4	267.4	1.71E+05	2.05E-04	1.20E-09	56.3

[0522] 表35:在25℃下抗CD38x4-1BB 1+2抗体与表面捕获的二聚体人4-1BB的动力学和平衡结合参数

[0523]

REGN # / Ab PID #	Ag+捕获	100nM Ab结合(RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD(M)	t1/2(min)
REGN7633	132.0 ± 0.4	285.3	1.86E+05	2.37E-03	1.27E-08	4.9
REGN7647	142.2 ± 0.5	205.8	6.26E+05	3.51E-04	5.60E-10	32.9
REGN7650	127.5 ± 0.8	265.7	2.12E+05	1.69E-04	7.97E-10	68.4
REGN9682	116.8 ± 0.4	233.7	4.30E+05	3.08E-04	7.16E-10	37.6
REGN9686	127.4 ± 0.8	232.3	4.70E+05	3.37E-04	7.17E-10	34.3

[0524] 本发明的范围不受本文所述的具体实施方案限制。实际上,除了本文中所描述的那些内容之外,本领域的技术人员根据前述说明和附图将显而易知本发明的各种修改。此类修改旨在落在所附权利要求的范围内。

CD38 X 4-1BB多特异性抗体

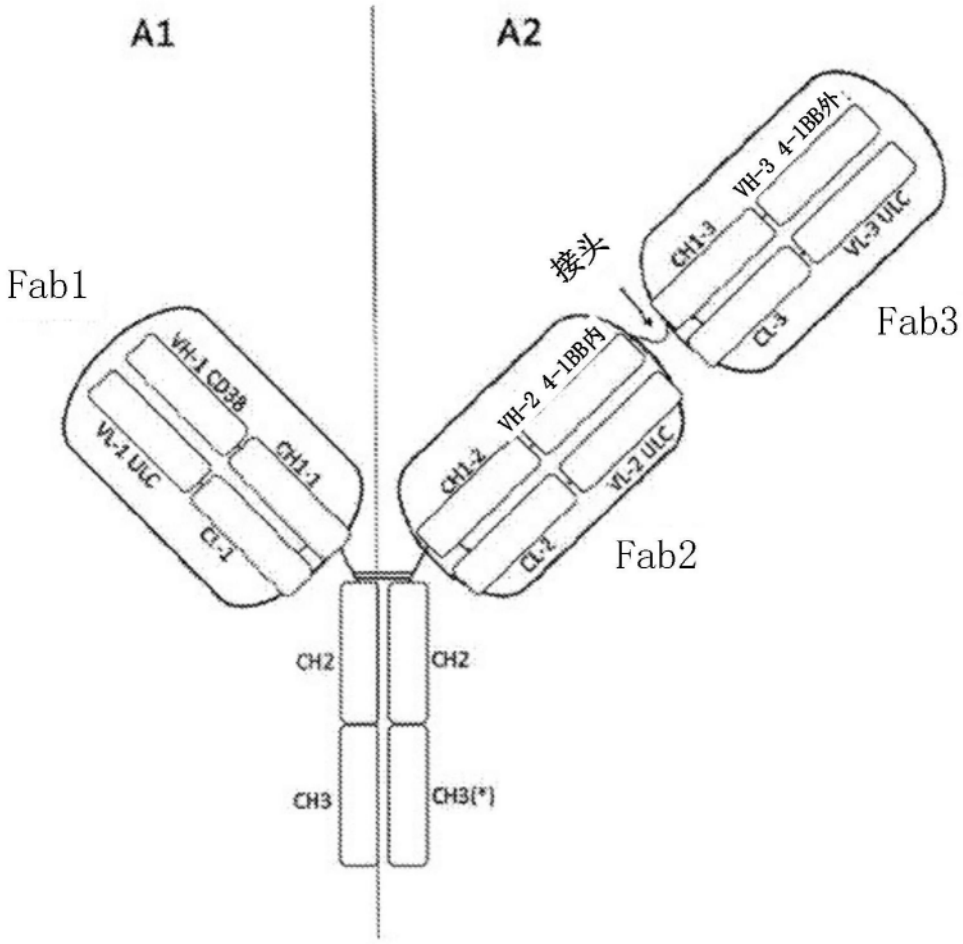


图1

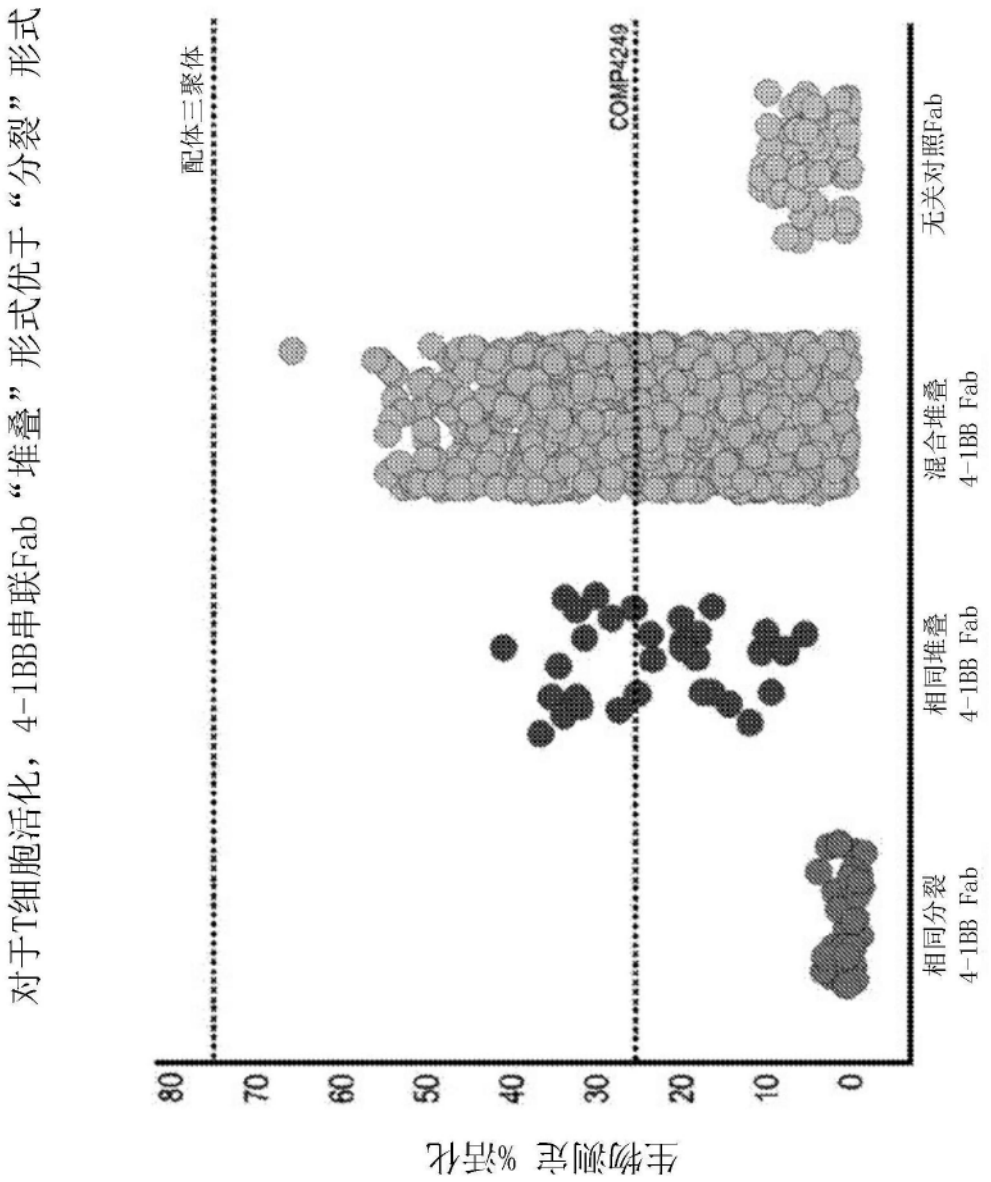

对于T细胞活化，4-1BB串联Fab“堆叠”形式优于“分裂”形式
配体三聚体
COMP4249
生物测定 %活化
80
70
60
50
40
30
20
10
0
相同分裂 4-1BB Fab
相同堆叠 4-1BB Fab
混合堆叠 4-1BB Fab
无关对照Fab

图2A

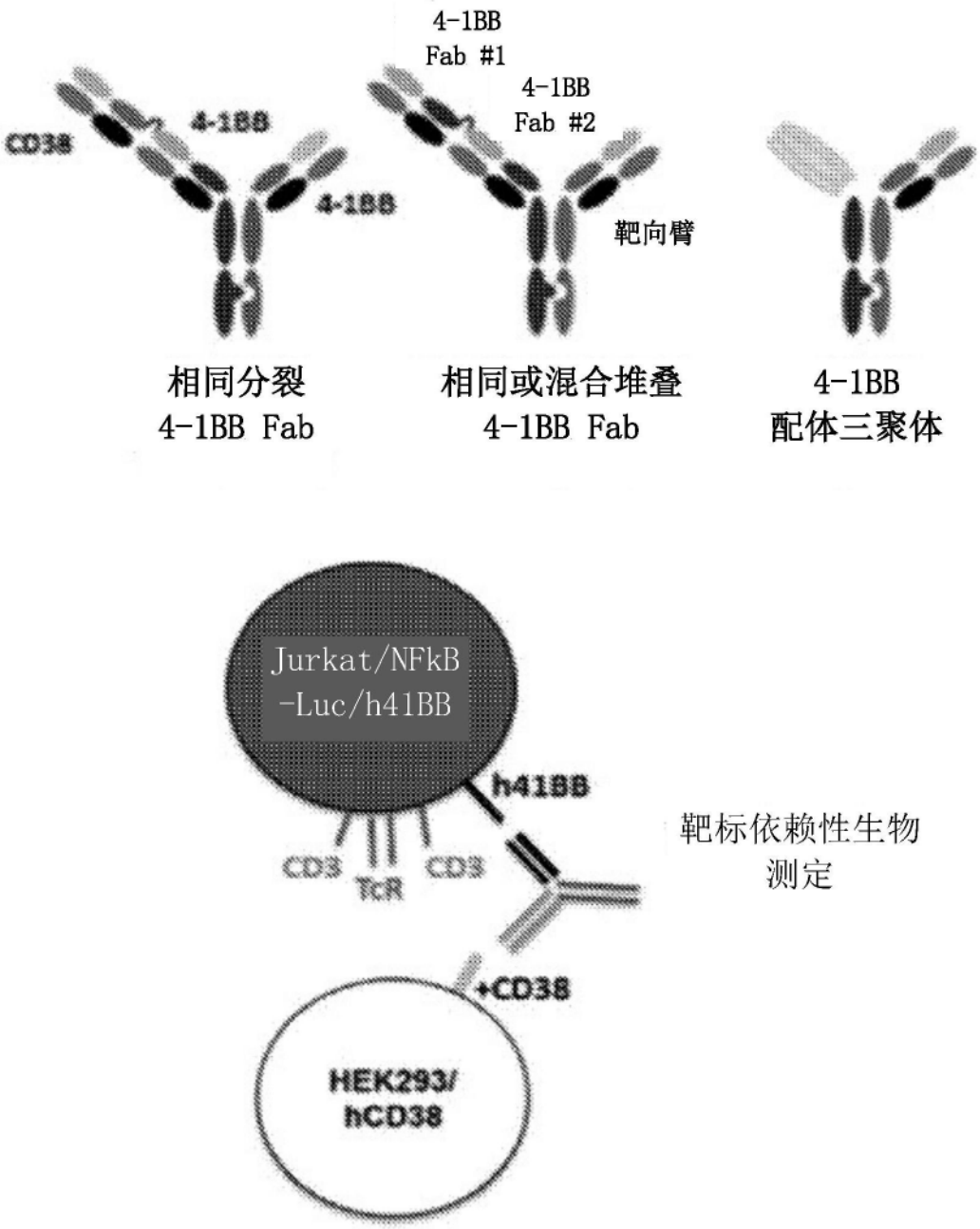

4-1BB
Fab #1
4-1BB
Fab #2
CD38
4-1BB
4-1BB
靶向臂
相同分裂
4-1BB Fab
相同或混合堆叠
4-1BB Fab
4-1BB
配体三聚体
Jurkat/NFkB
-Luc/h41BB
h41BB
CD3
TCR
CD3
靶标依赖性生物
测定
+CD38
HEK293/
hCD38

图2B

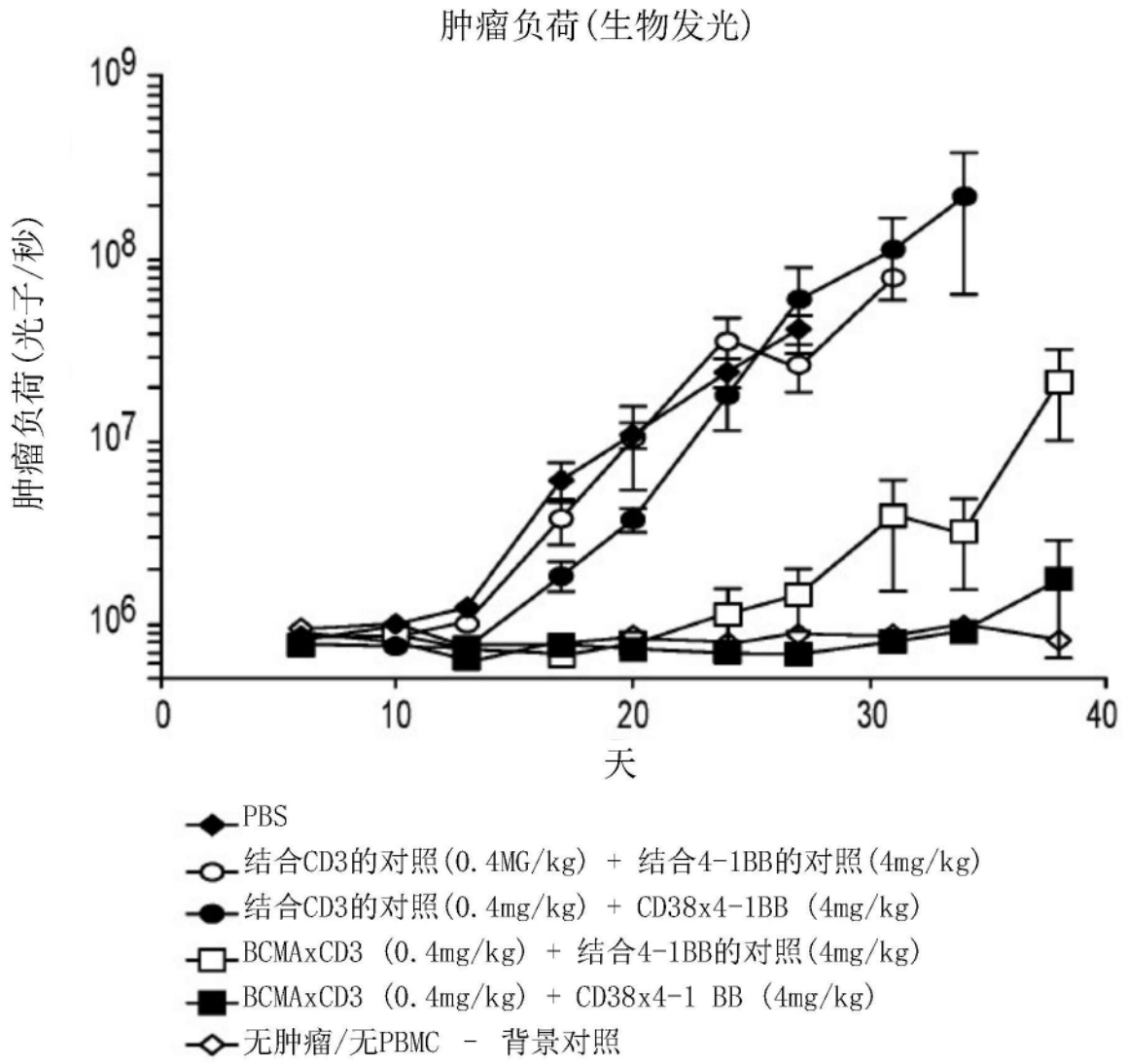

肿瘤负荷(生物发光)
肿瘤负荷(光子/秒)
10^9
10^8
10^7
10^6
0
10
20
30
40
天
PBS
结合CD3的对照(0.4MG/kg) + 结合4-1BB的对照(4mg/kg)
结合CD3的对照(0.4mg/kg) + CD38x4-1BB (4mg/kg)
BCMAxCD3 (0.4mg/kg) + 结合4-1BB的对照(4mg/kg)
BCMAxCD3 (0.4mg/kg) + CD38x4-1 BB (4mg/kg)
无肿瘤/无PBMC - 背景对照

图3

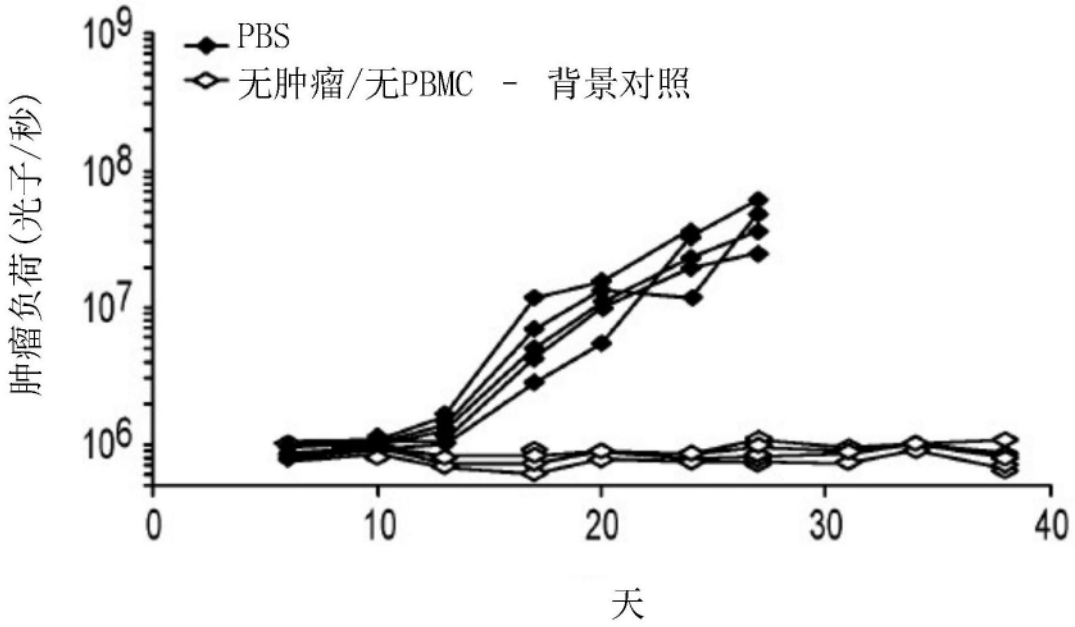

PBS
无肿瘤/无PBMC - 背景对照
肿瘤负荷(光子/秒)
10^9
10^8
10^7
10^6
0
10
20
30
40
天

图4A

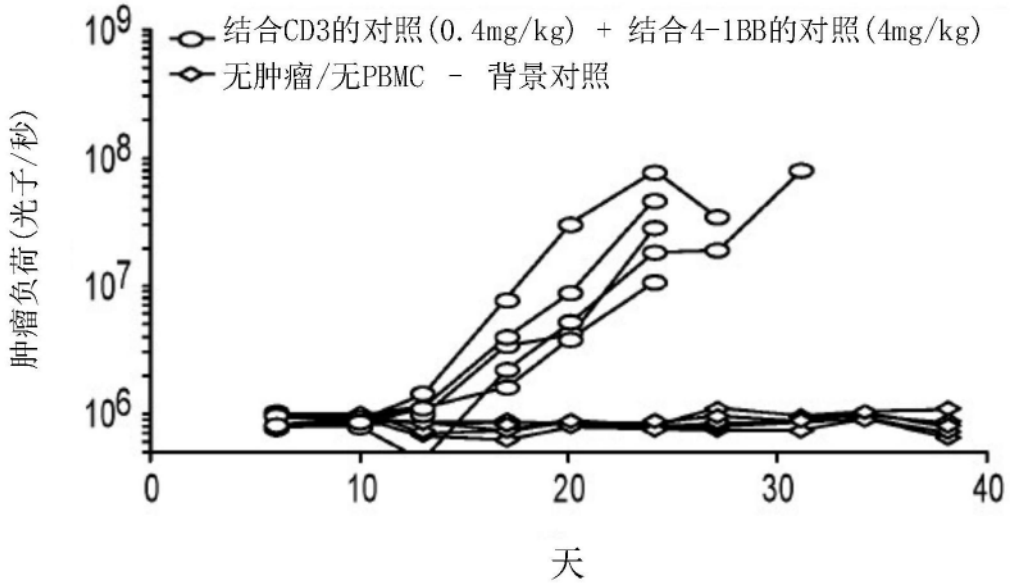

结合CD3的对照(0.4mg/kg) + 结合4-1BB的对照(4mg/kg)
无肿瘤/无PBMC - 背景对照
肿瘤负荷(光子/秒)
10^9
10^8
10^7
10^6
0
10
20
30
40
天

图4B

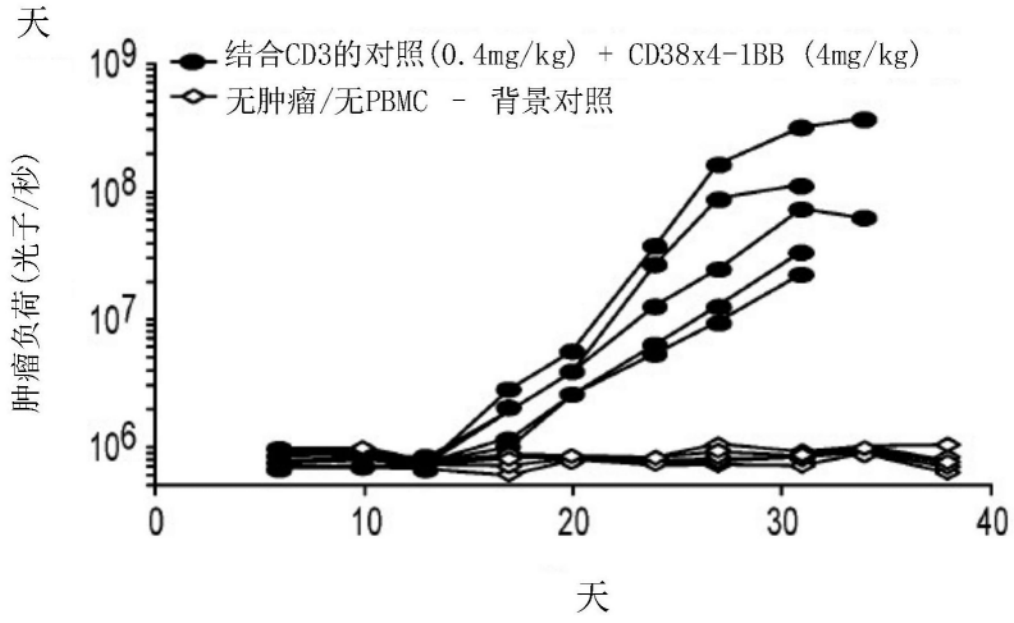

天
结合CD3的对照(0.4mg/kg) + CD38x4-1BB (4mg/kg)
无肿瘤/无PBMC - 背景对照
肿瘤负荷(光子/秒)
10^9
10^8
10^7
10^6
0
10
20
30
40
天

图4C

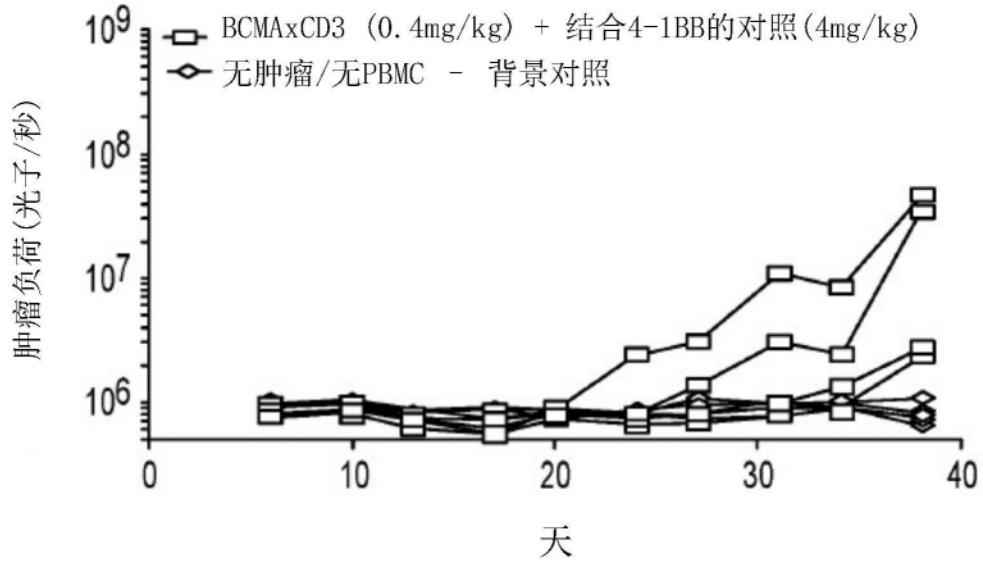

BCMAxCD3 (0.4mg/kg) + 结合4-1BB的对照(4mg/kg)
无肿瘤/无PBMC - 背景对照
肿瘤负荷(光子/秒)
10^9
10^8
10^7
10^6
0
10
20
30
40
天

图4D

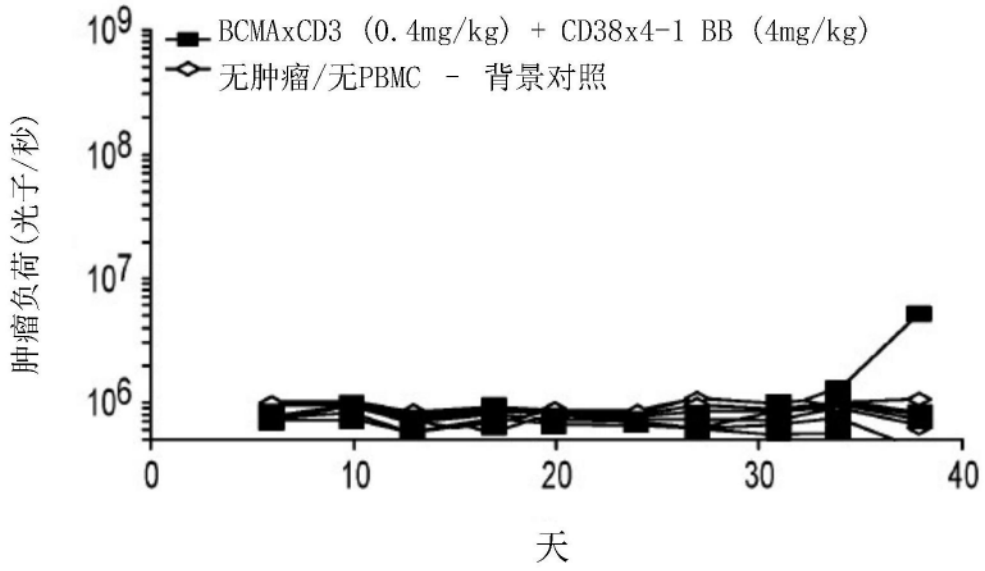

BCMAxCD3 (0.4mg/kg) + CD38x4-1 BB (4mg/kg)
无肿瘤/无PBMC - 背景对照
肿瘤负荷(光子/秒)
10^9
10^8
10^7
10^6
0
10
20
30
40
天

图4E