



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106661108 A

(43)申请公布日 2017.05.10

(21)申请号 201580019685.7

(22)申请日 2015.04.12

(30)优先权数据

14164523.4 2014.04.13 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.10.13

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2015/057919 2015.04.12

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/158636 EN 2015.10.22

(71)申请人 阿菲姆德股份有限公司

地址 德国海德堡

(72)发明人 梅尔文·利特尔

尤金·朱可夫斯基

马库斯·埃泽尔 迈克尔·维柴尔

索斯藤·甘特克 乌维·罗伊施

克里斯蒂娜·埃尔旺格

伐布芮斯·勒盖尔

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王朋飞 张晶

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

C07K 16/46(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书12页

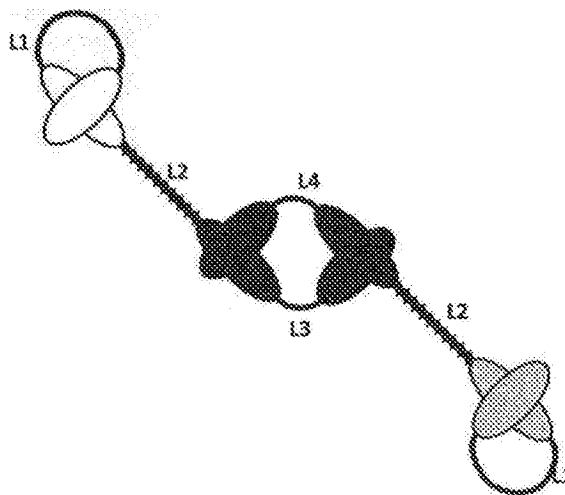
序列表12页 附图2页

(54)发明名称

三功能抗原结合分子

(57)摘要

本发明涉及三特异性抗原结合分子及其作为药物用于肿瘤治疗的用途,其中所述抗原结合分子至少是四价的,且包含对第一抗原表位有特异性的抗原结合位点、对第二抗原表位有特异性的抗原结合位点以及对第三抗原表位有特异性的两个抗原结合位点。



1. 三特异性抗原结合分子,其中所述抗原结合分子至少是四价的,且包含对第一抗原表位有特异性的抗原结合位点、对第二抗原表位有特异性的抗原结合位点以及对第三抗原表位有特异性的两个抗原结合位点。

2. 根据权利要求1所述的三特异性抗原结合分子,其中每个所述抗原结合位点均由VH/VL对组成,其中第一VH/VL对的VH结构域和VL结构域彼此非共价结合(bonded),所述非共价结合的VH结构域和VL结构域中的每一个都通过肽接头或肽键与并列于所述第一VH/VL对的第二VH/VL对的另一VH结构域或VL结构域结合。

3. 根据权利要求2所述的三特异性抗原结合分子,其中所述VH/VL对的VH结构域通过肽接头或肽键与所述VH/VL对的VH结构域结合,且所述第一VH/VL对的VL结构域通过肽接头或肽键与所述第二VH/VL对的VL结构域结合。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的三特异性抗原结合分子,其中所述分子是包含第一多肽和第二多肽的抗原结合多肽二聚体,每条多肽均具有顺次连接的至少四个抗体可变结构域,

(a) 所述第一多肽包含通过具有约12个或更少氨基酸残基的接头彼此连接的第一抗体可变结构域和第二抗体可变结构域以及单链Fv抗原结合单元,所述单链Fv抗原结合单元具有与抗体可变轻链结构域(VL)连接的抗体可变重链结构域(VH),所述抗体可变重链结构域(VH)和所述抗体可变轻链结构域(VL)能够缔合成第一抗原结合位点,其中所述第一抗体可变结构域或所述第二抗体可变结构域通过肽接头与所述单链Fv抗原结合单元连接;

(b) 所述第二多肽包含通过具有约12个或更少氨基酸残基的接头彼此连接的第一抗体可变结构域和第二抗体可变结构域以及单链Fv抗原结合单元,所述单链Fv抗原结合单元具有与抗体可变重链结构域(VH)连接的抗体可变轻链结构域(VL),所述抗体可变轻链结构域(VL)和所述抗体可变重链结构域(VH)能够缔合成第二抗原结合位点,所述第一抗体可变结构域或所述第二抗体可变结构域通过肽接头与所述单链Fv抗原结合单元连接;

(c) 所述第一多肽的第一抗体可变结构域与所述第二多肽的第二抗体可变结构域缔合成第三抗原结合位点;

(d) 所述第一多肽的第二抗体可变结构域与所述第二多肽的第一抗体可变结构域缔合成第四抗原结合位点;以及

(e) 所述四个抗原结合位点中的两个对相同的抗原有特异性。

5. 三特异性抗原结合分子,其中所述分子为权利要求4所述的抗原结合多肽二聚体,其中

(a) 所述第一多肽包含通过具有约12个或更少氨基酸残基的接头彼此连接的第一抗体可变重链结构域(VH)和第二抗体可变重链结构域(VH)以及单链Fv抗原结合单元,所述单链Fv抗原结合单元具有与抗体可变轻链结构域(VL)连接的第三抗体可变重链结构域(VH),所述第三抗体可变重链结构域(VH)和所述抗体可变轻链结构域(VL)能够缔合成第一抗原结合位点,其中所述第一抗体可变重链结构域(VH)或所述第二抗体可变重链结构域(VH)通过肽接头与所述单链Fv抗原结合单元连接;

(b) 所述第二多肽包含通过具有约12个或更少氨基酸残基的接头彼此连接的第一抗体可变轻链结构域(VL)和第二抗体可变轻链结构域(VL)以及单链Fv抗原结合单元,所述单链Fv抗原结合单元具有与抗体可变重链结构域(VH)连接的第三抗体可变轻链结构域(VL),所

述第三抗体可变轻链结构域 (VL) 和所述抗体可变重链结构域 (VH) 能够缔合成第二抗原结合位点,所述第一抗体可变结构域或所述第二抗体可变结构域 (VL) 通过肽接头与所述单链 Fv 抗原结合单元连接;

(c) 所述第一多肽的第一抗体可变重链结构域 (VH) 与所述第二多肽的第二抗体可变轻链结构域 (VL) 缔合成第三抗原结合位点;

(d) 所述第一多肽的第二抗体可变重链结构域 (VH) 与所述第二多肽的第一抗体可变轻链结构域 (VL) 缔合成第四抗原结合位点;以及

(e) 所述四个抗原结合位点中的两个对相同的抗原有特异性。

6. 根据权利要求4或5所述的抗原结合分子,其中所述第一多肽的第一可变结构域和第二可变结构域以及所述第二多肽的第一可变结构域和第二可变结构域通过具有3-9个氨基酸残基的接头连接。

7. 根据权利要求4-6中任一项所述的抗原结合分子,其中所述第一多肽的第二可变结构域和单链Fv单元与所述第二多肽的第二可变结构域和单链Fv单元通过具有2-35个氨基酸残基的接头连接。

8. 根据权利要求4-7中任一项所述的抗原结合分子,其中所述第一多肽的单链Fv单元的可变重链结构域和可变轻链结构域与所述第二多肽的单链Fv单元的可变轻链结构域和可变重链结构域通过具有12个或更多氨基酸残基的接头连接。

9. 根据权利要求4-8中任一项所述的抗原结合分子,其中两个单链Fv单元的第一抗原结合位点和第二抗原结合位点对相同的抗原有特异性。

10. 根据权利要求4-9中任一项所述的抗原结合分子,其中通过所述第一多肽和所述第二多肽之间的缔合形成的第三抗原结合位点和第四抗原结合位点对相同的抗原有特异性。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的抗原结合分子,其中对相同抗原有特异性的两个抗原结合位点对T细胞或自然杀伤(NK)细胞上存在的抗原有特异性。

11. 根据权利要求10所述的抗原结合分子,其中所述抗原为CD3、CD16或CD16A。

12. 根据权利要求10或11所述的抗原结合分子,其中另外两个结合位点对相同细胞上的两种不同抗原有特异性。

13. 根据权利要求12所述的抗原结合分子,其中所述细胞为肿瘤细胞。

14. 根据权利要求13所述的抗原结合分子,其中所述两种不同的抗原选自下组:CD19、CD20、CD26、CD29、CD30、CD33、CD200、CD267、EGFR、EGFRvIII、HER2、HER3、IGFR、IGF-1R、Ep-CAM、PLAP、Thomsen-Friedenreich (TF) 抗原、MUC-1 (粘蛋白)、CD5、IL4-R $\alpha$ 、IL13-R、Fc $\epsilon$ RI和IgE、gpA33、MHCI/肽复合物。

15. 根据权利要求1-9中任一项所述的抗原结合分子,其中第一抗原结合位点和第二抗原结合位点对自然杀伤(NK)细胞上存在的两种不同抗原表位有特异性。

16. 编码权利要求1-15中任一项所述的抗原结合分子的载体。

17. 用权利要求16所述的载体转化的宿主细胞。

18. 权利要求13或14所述的抗原结合分子在肿瘤治疗中的用途。

### 三功能抗原结合分子

[0001] 本发明涉及多功能抗原结合分子例如三功能抗原结合分子,及其治疗应用例如在免疫疗法中的治疗应用。该分子是Fv-抗体衍生物。在某些实施方案中,本发明涉及多聚抗原结合分子,例如二聚抗原结合分子。

[0002] 双特异性即双功能(bifunctional)抗体可用于结合(engage)两种不同的治疗靶标或执行两种不同的功能。这样的抗体可用于例如向特定靶细胞募集免疫效应细胞例如T细胞或NK细胞。各种基于抗体片段的分子是已知的并且处于研究之中,例如用于癌症治疗。

[0003] 可仅使用抗体可变结构域构建双功能二聚抗体。例如可将VH和VL结构域之间的接头序列缩短到它们不能折叠(fold over)并且以分子内方式彼此结合的程度。这样的短接头,例如2-12个残基,阻止了scFv分子的上述折叠并且有利于形成二聚“双价抗体(diabody)”的不同多肽链的互补可变结构域之间的分子间VH-VL配对(Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. (美国科学院学报) USA 90, 6444-6448)。这样的双价抗体可用于双功能抗体,其可通过两个单链多肽融合产物的非共价缔合(non-covalent association)获得,每个单链多肽融合产物由通过短接头与一个抗体的VL结构域连接的另一抗体的VH结构域组成。

[0004] WO 03/025018公开了双特异性多聚抗原结合分子,其结构由具有至少四个结合结构域的不同单链多肽形成。每条多肽链末端部的VH结构域和VL结构域由短接头连接并且与另一条多肽链的相应的VH结构域和VL结构域分子间缔合,同时,每条多肽链的另一VH结构域和VL结构域在同一条链内彼此分子内结合,得到抗原结合ScFv单元。这样的构建体是同源二聚体,即,它们由彼此缔合的相同单链多肽组成。

[0005] 本文提供多功能抗原结合分子,其至少是三功能的。在一些实施方案中,三功能抗原结合分子至少是三特异性的,即,对至少三种不同的抗原表位具有特异性。

[0006] 本发明的抗原结合分子是仅包含可变(Fv)抗体结构域而不含恒定抗体结构域的Fv-衍生物。所述抗原结合分子的可变(Fv)抗体结构域通过肽接头或肽键彼此连接。本发明的抗原结合分子可以为单个多肽链的单体或者为多链多肽的多聚体。例如,多聚抗原结合分子可以为例如具有两条多肽链的二聚体、具有三条多肽链的三聚体或具有四条多肽链的四聚体。

[0007] 在一些实施方案中,三特异性抗原结合分子至少是四价的。“四价的”意指抗原结合分子包含四个抗原结合位点,其中每个抗原结合位点包含VH/VL对,该VH/VL对具有彼此缔合的相同抗原表位特异性的可变重链(VH)结构域和可变轻链(VL)结构域。因此,这样的四价抗原结合分子包含至少8个可变抗体结构域,即,四个可变重链(VH)结构域和四个可变轻链(VL)结构域。三特异性的四价抗原结合分子包含对第一抗原表位有特异性的抗原结合位点、对第二抗原表位有特异性的抗原结合位点以及对第三抗原表位有特异性的两个抗原结合位点。因此,该三特异性的四价抗原结合分子对三种不同的抗原表位具有不同的特异性。例如,这样的抗原结合分子包含对第一抗原表位有特异性的第一抗原结合位点、对第二抗原表位有特异性的第二抗原结合位点、对第三抗原表位有特异性的第三抗原结合位点和第四抗原结合位点。在一些实施方案中,当三特异性的四价抗原结合分子是多聚体时,该抗

原结合分子是异源二聚体,即,包含至少两条不同的多肽链,其中这两条多肽链在至少一个可变结构域上不同,例如一条多肽链仅包含VH结构域,另一条仅包含具有相同抗原表位特异性的对应VL结构域。

[0008] 因为四价抗原结合分子包含8个抗体可变结构域,所以它的分子量高于100kDa,这导致与三价的三特异性单链Fv分子相比,这种分子的半衰期更长。

[0009] 此外,每个三特异性的四价抗原结合分子包含对同一抗原表位有特异性的两个抗原结合位点。因此,提高了抗体亲抗原性,即,抗原表位和抗原结合位点之间相互作用的强度。较高的抗体亲抗原性的优势在于增强相互作用的稳定性和在靶标上的滞留(retention)。例如,如果靶标是细胞毒性免疫效应细胞例如T细胞或NK细胞,则较高的抗体亲抗原性可导致抗原结合分子溶细胞潜能(cytolytic potential)的增加。在另一实例中,如果靶标是肿瘤细胞,则较高的抗体亲抗原性提高在靶标上的滞留时间并降低脱离靶标的速率(off-rates from the target)。在本发明的某一实施方案中,三特异性的四价抗原结合分子包含对同一种肿瘤细胞的两种不同抗原表位有特异性的第一抗原结合位点和第二抗原结合位点,以及对免疫效应细胞例如T细胞或NK细胞上的抗原表位有特异性的第三抗原结合位点和第四抗原结合位点。这种抗原结合分子导致对特定种类的肿瘤细胞的特异性以及抗体亲抗原性的增加,并导致对活化免疫效应细胞上的受体的抗体亲抗原性增加,这使得抗原结合分子的特异性溶细胞潜能有利地增加。与两种不同肿瘤抗原表位的结合导致靶向特异性的增加,并通过降低脱靶(off-target)毒性延长治疗窗口。重要的是,尽管结构复杂,本发明的这种三特异性四价抗原结合分子依然稳定。

[0010] 因此,可以不同方式利用本发明的抗原结合分子来重新定向(redirecting)免疫效应细胞的细胞毒性潜能,以破坏肿瘤细胞或致病原。在一些实施方案中,三特异性抗原结合分子可结合靶标上两种不同的抗原表位。例如,两种不同的表位可以位于同一抗原上,以防止突变体逃逸(escape mutants)或增强疗效,或者,两种表位可位于靶标的两种不同的抗原上。在其他实施方案中,三特异性抗原结合分子可结合免疫效应细胞上两种不同的抗原表位。例如,第一抗原结合位点对活化受体例如CD16A或CD3有特异性,第二抗原结合位点对共刺激受体例如CD137或CD28有特异性。在另一个实例中,第一抗原结合位点对CD16A有特异性,第二抗原结合位点对NK细胞上的另一活化受体例如NKG2D、DNAM、NCR)有特异性。

[0011] 在另一实施方案中,三特异性抗原结合分子具有对肿瘤细胞上的抗原表位有特异性的第一抗原结合位点、对免疫效应细胞上的抗原表位有特异性的第二抗原结合位点以及对可溶性蛋白上的抗原表位有特异性的第三抗原结合位点,所述可溶性蛋白选自生长因子、细胞因子、趋化因子、有丝分裂原(mitogens)和白蛋白。这种可溶性蛋白的实例为IL-6、BAFF、APRIL、TGF- $\beta$ 、IL-10、VEGF-A、HB-EGF、血管形成素-2(angiotensin-2)和人血清白蛋白(HSA)。

[0012] 在可替代的实施方案中,抗原结合分子具有对一种类型的细胞上存在抗原的抗原表位有特异性的一个抗原结合位点和对一种或多种其他类型的细胞上的抗原表位有特异性的三个抗原结合位点。

[0013] “效应细胞”是可刺激或引发细胞毒性、吞噬作用、抗原呈递、细胞因子释放的免疫系统细胞。这种效应细胞例如但并不限于T细胞、自然杀伤(NK)细胞、粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞和抗原呈递细胞。对效应细胞有合适特异性的实例包括但不限于:对于T

细胞,为CD2、CD3和CD3亚基例如CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD28和T细胞受体(TCR)的其他组成部分;对于NK细胞,为CD16、CD16A、CD25、CD38、CD44、CD56、CD69、CD94、CD335(NKp46)、CD336(NKp44)、CD337(NKp30)、NKp80、NKG2C和NKG2D、DNAM和NCR;对于粒细胞,为CD18、CD64和CD89;对于单核细胞和巨噬细胞,为CD18、CD32、CD64、CD89和甘露糖受体;对于树突细胞,为CD64和甘露糖受体;以及CD35。在本发明的某些实施方案中,效应细胞的这些特异性,即细胞表面分子,适于在三特异性抗原结合分子与这种细胞表面分子结合后介导细胞杀伤,从而诱导细胞溶解或细胞凋亡。

[0014] CD3抗原与T细胞上的T细胞受体复合物相关。在CD3对效应细胞有特异性(where specificity for an effector cell is CD3)的情况下,本发明的抗原结合分子与CD3的结合触发T细胞的细胞毒性活性。通过抗原结合分子与CD3的结合以及抗原结合分子与靶细胞例如肿瘤细胞的结合,可诱导靶细胞的细胞溶解。

[0015] CD16A(Fc $\gamma$  IIIA)抗原是在NK细胞表面上表达的受体。NK细胞具有固有的溶细胞(cytolytic)活性,通过本发明的抗原结合分子与CD16或CD16A的结合可触发NK细胞对靶标的细胞毒性活性。

[0016] “靶标”是抗原表位所在的位点,且是抗原结合分子应结合的位点。靶标的实例是细胞、诸如病毒病原体或细菌病原体的致病原,例如登革热病毒;单纯疱疹病毒;流感病毒;HIV;HCV或携带诸如IL-2/IL2R的自体免疫靶标、自体免疫标记物或自体免疫抗原的细胞或肿瘤细胞。在实施方案中,其中至少一个抗原结合位点对效应细胞有特异性,靶标可以是肿瘤细胞,效应细胞被重新定向至该肿瘤细胞以诱导或触发各生物反应,例如免疫反应。

[0017] 对肿瘤细胞的合适的特异性可以是各肿瘤细胞上的肿瘤抗原和细胞表面抗原,例如特定的肿瘤标记物。本文使用的术语“肿瘤抗原”包括肿瘤相关抗原(TAA)和肿瘤特异性抗原(TSA)。本文使用的“肿瘤相关抗原(TAA)”是指存在于肿瘤细胞上和在胎儿期期间(曾经-胎儿抗原(once-fetal antigens))和出生后在选定器官中以比在肿瘤细胞上低得多的浓度存在于正常细胞上的蛋白。TAA还可存在于肿瘤细胞附近的基质中,但是在身体其他地方的基质中以更低的量表达。相反,术语“肿瘤特异性抗原(TSA)”是指由肿瘤细胞表达的蛋白。术语“细胞表面抗原”是指能够被细胞表面上的抗体识别的任何抗原或其片段分子。

[0018] 对肿瘤细胞有特异性(specificities)的实例包括但不限于CD19、CD20、CD26、CD29、CD30、CD33、CD52、CD200、CD267、EGFR、EGFR2、EGFR3、EGFRvIII、HER2、HER3、IGFR、IGF-1R、Ep-CAM、PLAP、Thomsen-Friedenreich(TF)抗原、TNFRSF17、gpA33、MUC-1(粘蛋白)、IGFR、CD5、IL4-R $\alpha$ 、IL13-R、Fc $\epsilon$ RI、MHC I/肽复合物和IgE。

[0019] 本发明的抗原结合分子,其中对CD19抗原的肿瘤特异性可用于B-细胞恶性肿瘤的免疫疗法,因为CD19抗原几乎在从淋巴细胞性白血病(ALL)到非霍奇金淋巴瘤(NHL)的所有B系恶性肿瘤上表达。

[0020] 本发明的抗原结合分子,其中对CD30的肿瘤特异性尤其可用于治疗霍奇金病和T细胞淋巴瘤。

[0021] 为了提高本发明的抗原结合分子在体内的血清半衰期,需要时可将抗原结合分子与诸如HSA的白蛋白融合,或者将其聚乙二醇化、唾液酸化或糖基化(例如参见Stork et al., 2008, J. Biol. Chem. (生物化学杂志), 283:7804-7812)。

[0022] 在一些实施方案中,三特异性抗原结合分子包含至少一个抗原结合位点,其中所

述抗原结合位点的VH/VL对的VH结构域和VL结构域彼此非共价结合,即,该VH/VL对的VH结构域和VL结构域不通过肽接头或肽键连接。在某些实施方案中,这些非共价结合的VH结构域和VL结构域位于多聚抗原结合分子的不同多肽链即第一多肽链和第二多肽链上。在其他实施方案中,这些非共价结合的VH结构域和VL结构域位于单体抗原结合分子的同一条多肽链上,其中至少一个另外的可变结构域被布置在单体的这些非共价结合的VH结构域和VL结构域之间。在一些实施方案中,该抗原结合位点的这些非共价结合的VH结构域和VL结构域中的每一个都通过肽接头或肽键与并列于抗原结合位点的第二VH/VL对的VH或VL结构域结合。优选地,与并列于抗原结合位点的VH/VL对的VH结构域或VL结构域连接的肽接头是短的,以防止并列结构域之间的分子内折叠并迫使两个非共价结合的VH结构域和VL结构域彼此缔合。例如,肽接头包含12个以下的氨基酸残基,优选3-9个氨基酸残基。通过非共价结合的VH结构域和VL结构域如此形成至少一个抗原结合位点有利于抗原结合分子的稳定性,因为这导致更紧凑的抗原结合分子。

[0023] 例如,图1和图2示出了三特异性抗原结合分子,其中中央的VH/VL对(用黑色示出)的VH结构域和VL结构域彼此非共价结合。在该实例中,非共价结合的VH结构域和VL结构域位于不同的多肽链上。该抗原的这些非共价结合的VH结构域和VL结构域中的每一个都通过肽接头L3或L4与并列于抗原结合位点的第二VH/VL对的VH结构域或VL结构域结合。

[0024] 在其他实施方案中,三特异性抗原结合分子包含至少一个第一抗原结合位点,其中该第一抗原结合位点的VH/VL对的VH结构域和VL结构域彼此非共价结合,即,该VH/VL对的VH结构域和VL结构域不通过肽接头或肽键连接,并且该第一抗原结合位点的非共价结合的VH结构域通过肽接头与并列于第一抗原结合位点的第二抗原结合位点的VH/VL对的VH结构域结合,且该第一抗原结合位点的非共价结合的VL结构域通过肽接头与并列于第一抗原结合位点的第二抗原结合位点的VH/VL对的VL结构域结合。在抗原结合分子为单链多肽即单体多肽的实施方案中,VH结构域和VL结构域被布置在同一条多肽链上。在抗原结合分子为多聚多肽即多链多肽的实施方案中,通过肽接头或肽键与第二抗原结合位点的VH结构域结合的第一抗原结合位点的VH结构域位于第一多肽上,且通过肽接头或肽键与第二抗原结合位点的VL结构域结合的第一抗原结合位点的VL结构域位于第二多肽上。优选地,肽接头是短的,例如少于12个氨基酸残基,优选3-9个氨基酸残基,以分别防止并列的VH-VH结构域和并列的VL-VL结构域之间的分子内折叠,并迫使VH-VH结构域与VL-VL结构域缔合以形成第一抗原结合位点和第二抗原结合位点。该VH-VH结构域和VL-VL结构域布置有利于三特异性抗原结合分子的正确折叠。

[0025] “抗原结合分子”是指具有多价抗原结合特性,优选具有至少四个抗原结合位点的免疫球蛋白衍生物分子。抗原结合分子可以是单链多肽即单体多肽或多链多肽即多聚多肽。抗原结合分子的每条多肽包含通过肽接头或肽键彼此连接的抗体可变(Fv)结构域。每个抗原结合位点由与同一抗原表位结合的抗体(即免疫球蛋白)可变重链结构域(VH)和抗体可变轻链结构域(VL)形成。抗原表位可位于相同或不同的抗原上。优选地,本发明的抗原结合分子没有免疫球蛋白恒定结构域或其片段。

[0026] 术语“多肽”是指通过酰胺键连接的氨基酸残基的聚合物。多肽优选为没有支链的单链融合蛋白。在多肽内,抗体可变(Fv)结构域顺次连接。除了N末端和/或C末端,多肽可具有连续的氨基酸残基。例如,多肽可包含Tag序列,优选在C末端处,该Tag序列可用于多肽纯

化。Tag序列的实例为His-Tag如由六个His残基组成的His-Tag、FLAG如DYKDDDDK八肽 (SEQ ID NO:5) 或STREP®II如WSHPQFEK八肽 (SEQ ID NO:6)。对于多聚抗原结合分子,优选地,不同的Tag序列用于不同的多肽。

[0027] 对于肽接头的氨基酸组成,选择不干扰结构域的缔合以及不干扰多聚分子的多聚化例如二聚化的肽。例如,含有甘氨酸残基和丝氨酸残基的接头通常提供蛋白酶抗性。可通过例如噬菌体展示法优化接头的氨基酸序列以改善抗原结合分子的抗原结合和产率。在一个实施方案中,使用了 $(G_2S)_x$ 肽接头。

[0028] 在本发明的一些实施方案中,至少一个、优选全部的抗体可变结构域是全人结构域、人源化结构域或嵌合结构域。通过广为接受的方法例如CDR移植(例如参见Antibody engineering:methods and protocols(抗体工程:方法和方案)/由Benny K.C.Lo编辑; Benny K.C.II Series:Methods in molecular biology(Totowa,N.J.))产生人源化抗体。因此,本领域技术人员能够容易地用本领域已知的降低免疫原性和改善抗原结合分子在人免疫系统中的效率的标准分子生物学技术,由非人来源例如鼠或非灵长类来源制备人源化或全人版的抗原结合分子以及可变结构域。在本发明的优选实施方案中,所有的抗体可变结构域是人源化的或全人的;更优选地,本发明的抗原结合分子是人源化的或全人的。本文使用的术语“全人”意指可变结构域的氨基酸序列以及多肽中连接可变结构域的肽的氨基酸序列源自人类或可在人类中找到。在本发明的某些实施方案中,可变结构域可以是人的或人源化的,但连接抗体可变结构域的肽可以不是人的或人源化的。

[0029] 在一些实施方案中,本发明提供多功能抗原结合多肽多聚体。

[0030] 在一些实施方案中,本发明提供被设计成靶向三种不同抗原或表位的三功能抗原结合多肽多聚体的抗原结合分子。这种多聚体包含第一多肽和第二多肽。这两条多肽中的每一条均为具有从每条多肽的N末端到C末端顺次连接的至少四个抗体可变结构域的单链融合肽。每条多肽包含通过短接头连接以防止同一条多肽内分子内配对的两个抗体可变结构域和单链Fv单元,单链Fv单元具有另外两个可变结构域的抗体可变结构域对,其通过同一条多肽内的该可变结构域对能够分子内形成抗原结合位点。通过两条多肽之间的非共价缔合形成多聚体,然而一条多肽的通过短接头连接的两个抗体可变结构域与另一条多肽的两个相应的抗体可变结构域缔合,从而形成两个另外的抗原结合位点。因此,该多聚体包含至少四个抗原结合位点,并且至少是四价的。在本发明的具体方面,多聚体是二聚体,即由两条多肽链组成。

[0031] 为了生成这种三特异性四价抗原结合二聚体,两条多肽应具有不同的抗体可变结构域组成,因为对于三种特异性中的至少一种特异性来说,各个抗体可变轻链结构域和可变重链结构域应被插入至不同的多肽中,以使得一条多肽仅含有该特异性的可变重链结构域,另一条多肽链仅含有该特异性的可变轻链结构域。因此,本发明的这种二聚体是异源二聚体,因为其由两条不同的多肽组成。

[0032] 可采取特定措施以使含有三种不同特异性的抗体可变结构域的两条不同多肽能够正确缔合并防止两条相同多肽之间错误的同源二聚化。例如,本发明人已经通过在一条多肽中插入由短接头连接的两个抗体可变重链结构域并在另一条多肽中插入由短接头连接的两个相应的抗体可变轻链结构域获得了两条不同的三特异性多肽的正确异源二聚化。令人惊讶的是,只形成异源二聚体形式(species)的三特异性抗原结合多肽二聚体。

[0033] 因此,在一个实施方案中,本发明提供:三特异性抗原结合分子,其中所述分子是包含第一多肽和第二多肽的三特异性抗原结合多肽二聚体,每条多肽均具有顺次连接的至少四个抗体可变结构域,

[0034] (a) 所述第一多肽包含通过防止在同一条多肽内分子内配对的第一接头如具有约12个或更少氨基酸残基的接头彼此连接的第一抗体可变重链结构域(VH)和第二抗体可变重链结构域(VH)以及单链Fv抗原结合单元,所述单链Fv抗原结合单元具有通过第二肽接头与抗体可变轻链结构域(VL)连接的第三抗体可变重链结构域(VH),所述第三抗体可变重链结构域(VH)和所述抗体可变轻链结构域(VL)能够缔合成第一抗原结合位点,其中所述第二抗体可变重链结构域(VH)通过第三肽接头与所述单链Fv抗原结合单元连接;

[0035] (b) 所述第二多肽包含通过防止在同一条多肽内分子内配对的第二肽接头如具有约12个或更少氨基酸残基的接头彼此连接的第一抗体可变轻链结构域(VL)和第二抗体可变轻链结构域(VL)以及单链Fv抗原结合单元,所述单链Fv抗原结合单元具有通过第二肽接头与抗体可变重链结构域(VH)连接的第三抗体可变轻链结构域(VL),所述第三抗体可变轻链结构域(VL)和所述抗体可变重链结构域(VH)能够缔合成第二抗原结合位点,其中所述第二抗体可变轻链结构域(VL)通过第三肽接头与所述单链Fv抗原结合单元连接;并且

[0036] (c) 所述第一多肽的第一抗体可变重链结构域(VH)和第二抗体可变重链结构域(VH)与第二多聚体的第一抗体可变轻链结构域(VL)和第二抗体可变轻链结构域(VL)缔合成两个另外的抗原结合位点,即第三抗原结合位点和第四抗原结合位点,然而在优选的实施方案中,所述第一多肽的第一抗体可变重链结构域(VH)与所述第二多肽的第二抗体可变轻链区(VL)缔合成第三抗原结合位点;所述第一多肽的第二抗体可变重链结构域(VH)与所述第二多肽的第一抗体可变轻链结构域(VL)缔合成第四抗原结合位点。

[0037] 当所述四个抗原结合位点中的两个对同一抗原有特异性时,形成了三特异性抗原结合多肽二聚体。

[0038] 这种三特异性二聚体识别三种不同的特异性,例如能够靶向靶细胞上两种不同的抗原或表位且具有第三种功能,即特异性结合免疫效应细胞例如T细胞或NK细胞。

[0039] 可以不同的方式使用本发明的三特异性二聚体。

[0040] 例如,可将抗体可变结构域布置在多肽内,使得能够将与另一条多肽的两个相应的抗体可变结构域缔合的两个抗体可变结构域置于例如该多肽的N末端或C末端。这两个抗体可变结构域可具有相同的特异性或具有不同的特异性。例如,两个抗体可变结构域可对相同的免疫效应细胞有特异性,或者对肿瘤细胞上的两种抗原有不同的特异性。

[0041] 此外,形成单链Fv单元的两个抗体可变结构域在多肽N末端至C末端的方向上的顺序可以为VH-VL或VL-VH。两条二聚化多肽的单链Fv单元可以具有相同或不同的特异性。例如,如果与另一条多肽的两个相应抗体可变结构域缔合的两个抗体可变结构域具有相同的特异性,则两条多肽的单链Fv单元具有不同的特异性以获得三特异性二聚体。

[0042] 因此,例如,可将至少四个抗体可变结构域布置为使得与另一条多肽的两个相应抗体可变结构域缔合的两个抗体可变结构域对免疫效应细胞有特异性,而两条多肽的单链Fv单元对两种不同的肿瘤抗原有特异性,或者,与另一条多肽的两个相应抗体可变结构域缔合的两个抗体可变结构域对不同的肿瘤抗原有特异性,而两条多肽的两个单链Fv单元对免疫效应细胞的具有相同的特异性。

[0043] 抗原结合多肽是“二聚体”，术语“二聚体”是指第一多肽单体和第二多肽单体的复合体。在一个方面，抗原结合多肽二聚体是“异源二聚体”，术语“异源二聚体”意指抗原结合多肽由两条不同的多肽单体组成，所述两条不同的多肽单体由两条不同的多核苷酸编码。

[0044] 优选地，在抗原结合二聚体中，第一多肽和第二多肽彼此非共价缔合，特别地，条件是第一多肽和第二多肽之间没有共价结合 (bound)。然而，如果需要，可通过至少一种共价连接，例如通过不同多肽的半胱氨酸残基之间的二硫桥来额外地稳定两条多肽。

[0045] 接头的长度影响抗原结合多肽二聚体的柔性 (flexibility)。所期望的抗原结合多肽二聚体的柔性依赖于靶抗原密度和靶抗原即表位的可及性。较长的接头提供具有更多灵活的抗原结合位点且更具柔性的抗原结合多肽二聚体。接头长度对形成二聚抗原结合多肽的影响描述于例如 Todorovska et al., 2001 Journal of Immunological Methods (免疫方法杂志) 248:47-66; Perisic et al., 1994 Structure (结构) 2:1217-1226; Le Gall et al., 2004, Protein Engineering (蛋白工程) 17:357-366 和 WO 94/13804。

[0046] 根据本发明，优选的是，第一多肽中第一抗体可变重链结构域和第二抗体可变重链结构域的第一肽接头以及第二多肽中第一抗体可变轻链结构域和第二抗体可变轻链结构域的肽接头的长度使得第一多肽的结构域能够与第二多肽的结构域分子间缔合，以形成二聚的抗原结合多肽。这种接头较“短”，即，由 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或约 12 个氨基酸残基组成。在 0 个氨基酸残基的情况下，接头是肽键。这样的短接头有利于通过在不同多肽的抗体可变轻链结构域和抗体可变重链结构域之间的结合并形成抗原结合位点来进行第一多肽与第二多肽的正确二聚化。将接头缩短至约 12 个或更少氨基酸残基通常防止同一条多肽链的邻近结构域彼此相互作用。在本发明的实施方案中，这些接头由约 3 至约 10 个例如 7 个连续的氨基酸残基组成。此外，可变抗体结构域之间具有多于 12 个氨基酸残基的接头的两条多肽彼此正确地二聚化，这在原则上是可能的 (例如，参见 Le Gall et al., 2004, Protein Engineering (蛋白工程) 17:357-366)。

[0047] 对于多肽的单链 Fv 单元，第二肽接头是长且有柔性的 (通常由约 12 个或更多氨基酸残基组成) 以分子内头尾折叠并形成单链抗原结合 (scFv) 单元。另外的氨基酸残基提供额外的柔性。例如，多肽中单链 Fv 单元的 VH 和 VL 之间或 VL 和 VH 之间的接头可由约 12 至约 35 个连续的氨基酸残基组成，尤其是由 15-25 个连续的氨基酸残基组成。

[0048] 用于连接单链 Fv 单元与另外两个抗体可变结构域 (其与另一条多肽的相应可变结构域缔合) 的多肽的第三肽接头可以为例如 5-30 个连续的氨基酸残基，优选为至少 6、7、8、9、10、11 或 12 个连续的氨基酸残基。

[0049] 在本发明的实施方案中，三特异性抗原结合多肽二聚体对肿瘤细胞上的两种不同抗原有双特异性，并且另外对效应细胞尤其是 T 细胞或 NK 细胞有特异性。对肿瘤细胞的合适特异性可以是各肿瘤细胞上的肿瘤抗原和细胞表面抗原，例如特定的肿瘤标记物。这种三特异性抗原结合二聚体双功能地结合肿瘤细胞和免疫效应细胞，从而触发由 T 细胞或 NK 细胞诱导的细胞毒性反应。

[0050] 可通过表达编码形成抗原结合分子的单个多肽链的多核苷酸来产生本文之前描述的任一实施方案的抗原结合分子。因此，本发明的另一个实施方案是编码如上所述的抗原结合分子的多肽链的多核苷酸例如 DNA 或 RNA。

[0051] 多核苷酸可通过本领域技术人员已知的方法构建，例如通过将编码多肽中被肽接

头隔开或由肽键直接连接的抗体可变结构域的基因组合至可操作连接至合适的启动子以及可选的合适转录终止子的基因构建体中,并在细菌或其他合适的表达系统例如CHO细胞中表达该基因构建体。取决于所用的载体系统和宿主,可使用任意数目的合适的转录元件和翻译元件,包括组成型启动子和诱导型启动子。选择启动子以使得它在各宿主细胞中驱动多核苷酸的表达。

[0052] 可将多核苷酸插入至载体、优选表达载体中,这代表本发明的另一个实施方案。可根据本领域技术人员熟知的方法构建这些重组载体。

[0053] 多种表达载体/宿主系统可用于包含并表达编码本发明的多肽链的多核苷酸。用于在大肠杆菌(*E. coli*)中进行表达的载体的实例为pSKK (LeGall et al., *J Immunol Methods*. (免疫方法杂志) (2004) 285 (1):111-27),或用于在哺乳动物细胞中进行表达的载体的实例为pcDNA5 (Invitrogen)。

[0054] 因此,可通过将编码如上所述多肽链的载体引入至宿主细胞并在某条件下培养所述宿主细胞,从而表达多肽链,来产生本文所述的抗原结合分子,可分离并可选地进一步纯化本文所述的抗原结合分子。

[0055] 在本发明的另一个实施方案中,提供组合物,其包含如上所述的抗原结合分子或多核苷酸以及至少一种其他组分。

[0056] 本发明还提供了一种方法,其中向个体例如患者施用有效剂量的如上所述的抗原结合分子,以治疗癌症(例如非霍奇金淋巴瘤;慢性淋巴白血病)。抗原结合分子可用作药物。

[0057] 本领域技术人员能够容易地利用已建立的技术和本领域已知的标准方法构建并获得本文所述的抗原结合分子而无需过度的负担,例如参见Sambrook, *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (分子克隆实验手册), Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y.; *The Protein Protocols Handbook* (蛋白方案手册), 由John M. Walker编辑, Humana Press Inc. (2002); 或 *Antibody engineering: methods and protocols* (抗体工程: 方法和方案)/由Benny K.C. Lo编辑; Benny K.C. II Series: *Methods in molecular biology* (Totowa, N.J.)。

## 附图说明

[0058] 图1示出了用于形成本发明的三功能即三特异性抗原结合多肽二聚体的第一多肽和第二多肽。第一多肽具有顺次连接的四个抗体可变结构域VH、VL、VH、VH。第一VH抗体可变结构域和第二VH抗体可变结构域(黑色)具有相同的第一特异性并由短接头L3连接,以防止同一条多肽内的分子内配对,单链Fv单元具有通过第二接头L1连接的另外的第三可变抗体结构域VL和第四可变抗体结构域VH(白色)的抗体可变结构域对,同一条多肽内的该可变结构域对能够分子内形成第二特异性的抗原结合位点。由第三接头L2连接特异性不同的第二抗体可变结构域VH和第三抗体可变结构域VL。

[0059] 第二多肽具有顺次连接的四个抗体可变结构域VL、VL、VL、VH。第一VL抗体可变结构域和第二VL抗体可变结构域(黑色)具有相同的第一特异性并由短接头L4连接,以防止同一条多肽内的分子内配对,单链Fv单元具有由第二接头L1连接的具有第三特异性的另外的第三可变抗体结构域VL和第四可变抗体结构域VH(灰色)的抗体可变结构域对,同一条多肽

内的该可变结构域对能够分子内形成抗原结合位点。由第三接头L2连接特异性不同的第二抗体可变结构域VL和第三抗体可变结构域VL。

[0060] 图2示出了通过图1的两条多肽的非共价缔合形成的抗原结合多肽二聚体,其中第一多肽由短接头连接的两个抗体可变VH结构域与第二多肽的两个相应的抗体可变VL结构域缔合,从而形成具有相同特异性的两个抗原结合位点(黑色),其中由第一多肽的单链Fv单元(白色)提供第二特异性,由第二多肽的单链Fv单元(灰色)提供第三特异性。

[0061] 图3示出了本发明的三功能抗原结合分子,尤其是三功能抗原结合多肽,其是用于双靶向肿瘤细胞的三特异性抗体。抗体即抗原结合多肽被设计成靶向肿瘤细胞上两种不同的靶标/表位且具有以高亲和力结合效应细胞的第三功能。抗原结合多肽由四个抗原结合位点组成,其中两个中央的抗原结合位点结合肿瘤细胞上两种不同的抗原,两个外围(peripheral)抗原结合位点结合效应细胞。

## 具体实施方式

[0062] 以下实施例进一步阐述本发明但并不限制本发明的范围。

### [0063] 实施例1

[0064] DNA构建体:

[0065] 通过DNA工程或通过基因合成和测序来生成编码多肽链的质粒DNA。用于瞬时转染或稳定转染哺乳动物细胞的表达构建体基于真核细胞表达载体pCDNA5/FRT (Life Technologies),且包含处于病毒启动子或普遍存在的启动子控制之下的目的产物基因以及作为选择标记物的潮霉素抗性盒。为了进行纯化和分析,产物链与His-标签、FLAG-标签或StrepII-标签一起表达。

[0066] 细胞系和细胞培养:

[0067] 将Flp-In CHO细胞(Life Technologies)即CHO-K1中国仓鼠卵巢细胞的衍生细胞(derivative) (ATCC, CCL-61) (Kao和Puck, 1968) 培养于补充有L-谷氨酰胺、10%FCS和100 $\mu$ g/ml博来霉素(Zeocin)的Ham's F-12 Nutrient Mix中。贴壁细胞用0.25%胰蛋白酶-EDTA分离(detach)并根据标准细胞培养方案进行继代培养。

[0068] 为了适应在悬浮液中生长,从组织培养瓶分离细胞并置于无血清培养基中,用于随后在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>和120rpm下在摇瓶(Corning)中孵育。用于培养适应悬浮(suspension-adapted)的Flp-In CHO细胞的标准培养基是补充有L-谷氨酰胺(Life Technologies)、HT补充剂(Life Technologies)、青霉素(Penicillin)/链霉素(Life Technologies)和100 $\mu$ g/ml博来霉素(Life Technologies)的HyClone CDM4CHO (Thermo Scientific)。每2-3天以2E+6至3E+6个细胞/ml的接种密度继代培养适应悬浮的细胞。使用台盼蓝排除法测定所有培养物中的细胞浓度和活力。将细胞冷冻保存于具有10%DMSO的培养基中,用MycoAlert支原体检测试剂盒(Lonza)检测为支原体阴性。

[0069] 生成稳定转染的细胞池(cell pools):

[0070] 通过转染适应悬浮的细胞生成稳定表达三特异性候选抗体的重组Flp-In CHO细胞系。为此,在使用聚乙烯亚胺(PEI)用编码目的蛋白(pCDNA5/FRT)和Flp重组酶(pOG44, Life Technologies)的表达质粒(2.5 $\mu$ g)进行共转染的前一天,将细胞置于不含博来霉素的标准培养基中。简言之,将载体DNA和转染试剂以1:3的DNA:PEI质量比混合在总共100 $\mu$ L

的OptiMEM I培养基(Life Technologies)中,孵育10分钟,然后加入悬浮在1ml CHO-S-SFMII培养基(Life Technologies)中的 $2E+6$ 个Flp-In CHO细胞。孵育24小时后,通过加入 $500\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素B,然后将培养物在CHO-S-SFMII培养基中稀释至浓度为 $0.1E+6$ 个活细胞/ $\text{mL}$ 并接种于T75培养瓶中,来开始筛选稳定转染的细胞。Flp重组酶介导通过位点特异性DNA重组将Flp-In表达构建体在整合(integrated)FRT位点处插入至基因组中(O' Gorman et al 1991)。在筛选期间,每周两次测量活细胞密度,将细胞离心并以 $0.1E+6$ 个活细胞/ $\text{mL}$ 的最大密度重悬于新鲜的选择培养基中。在约三周的筛选之后(此时将细胞转移至摇瓶中的标准培养基)回收稳定表达重组蛋白产物的细胞池。使用Criterion Stain-Free(Bio-Rad)技术通过细胞培养物上清的蛋白凝胶电泳确认重组分泌蛋白的表达。将稳定的细胞池冷冻保存于含50%ProFreeze(Lonza)和7.5%DMSO的培养基中。

[0071] 流加式培养(Fed-batch)CHO细胞悬浮培养物中重组蛋白的产生(production):

[0072] 在稳定转染的CHO细胞系的10-天流加式培养培养物中,通过分泌至细胞培养物上清液来产生重组蛋白。为此,将稳定表达目的产物的细胞池以 $6E+5$ 个细胞/ $\text{mL}$ 的初始密度接种于带有透气盖的聚碳酸酯锥形瓶(Corning)中的标准培养基中,并在 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 和140rpm的搅拌下孵育。在流加培养期间,在第0天(起始日)用40mL/L ActiCHO Feed A(PAA)和4mL/L ActiCHO Feed B(PAA)补充培养基,在第3、5和7天用双倍量补充。10天后(培养物活力通常大于75%)收集细胞培养物上清液。每隔一天在进料前从生产培养物中收集样品,然后评估细胞密度和活力。在进一步使用之前,在收集当天通过离心和使用Millipore Express PLUS膜过滤器(Millipore)的真空过滤( $0.22\mu\text{m}$ )使细胞培养物上清液澄清。

[0073] 表达滴度(expression titer)的测定:

[0074] 在第7天和第10天( $0.22\mu\text{m}$ 过滤之前和之后),使用Criterion Stain-Free凝胶成像系统(Bio-Rad)通过SDS-PAGE分析细胞培养物上清液(CCS)中的蛋白表达滴度和产物完整性。通过与已知浓度的参考蛋白进行比较来半定量地测定产物滴度。

[0075] 三特异性抗原结合多肽的纯化:

[0076] 在包括Ni-NTA-色谱和制备型尺寸排阻色谱的两步法中,从CHO细胞培养物上清液纯化His标记的产物。首先,通过真空过滤( $0.22\mu\text{m}$ )使上清液澄清并调整至5mM咪唑,然后以5mL/分钟的流速加载到在IMAC缓冲液A中平衡的HisTrap FF色谱柱(GE Healthcare)上。随后用5柱体积(CV)的IMAC缓冲液A和10柱体积的IMAC缓冲液A与IMAC缓冲液B的混合物(7%)洗涤柱。然后,通过用10柱体积的30%IMAC缓冲液B和5柱体积的100%IMAC缓冲液B以相同的流速顺序洗涤来洗脱His标记的产物。收集2.5mL洗脱级分,通过对每个级分(fraction)进行一维SDS-PAGE然后使用Criterion Stain-Free技术(Bio-Rad)使蛋白可视化来评估蛋白含量和纯度。将含产物的级分合并并且超滤浓缩。随后,使用HiLoad 26/600Superdex200pg(GE Healthcare)柱通过凝胶过滤纯化浓缩的样品,并在2.5mL/分钟下的SEC缓冲液(20mM Tris-HCl,100mM NaCl,pH 7.5)中洗脱。收集并合并通过比较洗脱体积与分子量标记蛋白(GE Healthcare)的柱滞留(column retention)测定的含有纯化产物的级分。在使用PD-10脱盐柱(GE Healthcare)进行最终的缓冲液交换(10mM乙酸钠,pH 5.0)之后,通过如上所述的超滤将样品浓缩至1.0-1.5mg/mL。最终样品的纯度和均一性(通常大于90%)分别通过在如上所述的还原SDS-PAGE和非还原SDS-PAGE之后的Criterion Stain-Free凝胶蛋白可视化,和在选定的情况下随后用特异性抗体进行免疫印迹以及分析型SEC

进行评估。将纯化的蛋白分等份保存于-80℃下,直至进一步使用。

[0077] 实施例2CD3×CD19×CD30三特异性分子

[0078] 根据实施例1产生包含分别源自抗体OKT3、HD37和HRS3的CD3-抗体可变结合结构域、CD19-抗体可变结合结构域和CD30-抗体可变结合结构域的抗原结合多肽二聚体:

[0079] 三特异性 (Trispec) 1:

[0080] VH (CD3) - (G<sub>2</sub>S)<sub>2</sub>-VH (CD3) - (G<sub>2</sub>S)<sub>3</sub>-VH (CD30) - (G<sub>2</sub>S)<sub>5</sub>-VL (CD30) -His<sub>6</sub> (SEQ ID NO:1)

[0081] VL (CD3) - (G<sub>2</sub>S)<sub>2</sub>-VL (CD3) - (G<sub>2</sub>S)<sub>3</sub>-VH (CD19) - (G<sub>2</sub>S)<sub>5</sub>VL (CD19) -FLAG (SEQ ID NO:2)

[0082] 三特异性2:

[0083] VH (CD30) - (G<sub>2</sub>S)<sub>2</sub>-VH (CD19) - (G<sub>2</sub>S)<sub>2</sub>-VH (CD3) - (G<sub>2</sub>S)<sub>5</sub>-VL (CD3) -His<sub>6</sub> (SEQ ID NO:3)

[0084] VL (CD19) - (G<sub>2</sub>S)<sub>2</sub>-VL (CD30) - (G<sub>2</sub>S)<sub>2</sub>-VH (CD3) - (G<sub>2</sub>S)<sub>5</sub>-VL (CD3) -FLAG (SEQ ID NO:4)

[0085] 接头1 = (G<sub>2</sub>S)<sub>2</sub>, 接头2 = (G<sub>2</sub>S)<sub>5</sub>, 接头3 = (G<sub>2</sub>S)<sub>3</sub>

[0086] 三特异性1和三特异性2的免疫沉淀表明仅检测到异源二聚体形式的抗原结合多肽二聚体。在40℃下7天后以及在pH 3.5下1小时后,三特异性1和三特异性2展现出了极佳的稳定性。

[0087] 实施例:评估由三特异性抗体介导的细胞毒性活性

[0088] 研究过程

[0089] 从血沉棕黄层分离PBMC和富集T细胞:

[0090] 通过密度梯度离心从血沉棕黄层分离PBMC。按照制造商的说明书使用用于免疫磁性分离未接触的人T细胞的EasySep™人T细胞富集试剂盒和Big Easy EasySep™Magnet从PBMC群富集T细胞。

[0091] 基于FACS的细胞毒性测定:

[0092] 通过所描述的流式细胞术表征用作效应细胞的T细胞。

[0093] 在如下所述的标准条件下培养靶细胞 (MEC-1:DSMZ, 目录号 (cat.):ACC 497; NALM-6:DSMZ, 目录号:ACC 128)。为了细胞毒性测定,收集靶细胞,用不含FCS的RPMI 1640培养基洗涤两次,并重悬于PKH67绿色荧光细胞接头迷你试剂盒 (Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit) 中提供的稀释液C中至密度为 $2 \times 10^7$ /mL。然后将细胞悬浮液与等体积的二倍浓缩的PKH67-标记溶液 (例如1μL PKH67在250μL稀释液C中) 混合并按照制造商的说明书孵育。终止染色反应。用完全RPMI培养基洗涤标记的靶细胞之后,对细胞计数并将细胞重悬于完全RPMI培养基中至密度为 $2 \times 10^5$ /mL。

[0094] 然后将 $2 \times 10^4$ 个靶细胞与T细胞和所示的抗体一起接种于各个孔中。测定在没有抗体的情况下自发的细胞死亡和效应分子对靶标的杀伤。

[0095] 孵育之后,将培养物用FACS缓冲液洗涤一次,然后重悬于150μL补充有2μg/mL PI的FACS缓冲液中。使用Beckman-Coulter FC500MPL流式细胞仪 (Beckman-Coulter) 或 Millipore Guava EasyCyte流式细胞仪 (Merck Millipore) 测量由阳性绿色PKH67染色和阴性PI染色表征的活靶细胞的绝对量。

[0096] 基于所测量到的剩余的活靶细胞,按照以下公式计算特异性细胞溶解 (specific cell lysis) 的百分比:  $[1 - (\text{活靶标的数目}_{\text{样品}}) / (\text{活靶标的数目}_{\text{自发}})] \times 100\%$ 。使用

GraphPad Prism软件(GraphPad Prism Windows 6.00版,GraphPad Software,La Jolla California USA)通过非线性回归/4-参数逻辑拟合(logistic fit)计算S形剂量反应曲线和EC<sub>50</sub>值。

[0097] 统计分析

[0098] 测定给定抗体浓度所获得的溶解值(lysis value),并使用Prism软件(GraphPad Prism Windows 6.00版,GraphPad Software,La Jolla California USA)通过S形剂量反应/4-参数逻辑拟合分析来进行分析,并使用该值计算EC<sub>50</sub>值、溶解百分比重复测定(replicate)的平均值和SD。

[0099] 结果:

[0100] 与各单阳性细胞系相比,三特异性1和三特异性2表现出了对双阳性细胞系(CD19<sup>+</sup>和CD30<sup>+</sup>)更高的细胞毒性效力。

## 序列表

<110> 阿菲姆德股份有限公司

<120> 三功能抗原结合分子

<130> A 3264PCT

<150> EP14164523.4

<151> 2014-04-13

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 509

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽链

<400> 1

[0001]

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr  
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

	100	105	110
	Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln 115	120	125
	Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys 130	135	140
	Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His 145	150	155 160
	Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile 165	170	175
	Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys 180	185	190
[0002]	Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu 195	200	205
	Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr 210	215	220
	Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu 225	230	235 240
	Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln 245	250	255
	Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys 260	265	270
	Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Thr Ile His 275	280	285
	Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly His Asp Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile 290	295	300

Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Ser Asp Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Lys  
 305 310 315 320

Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu  
 325 330 335

Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg  
 340 345 350

Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Glu Tyr Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
 355 360 365

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly  
 370 375 380

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys  
 385 390 395 400

[0003] Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Val Thr Cys Lys Ala  
 405 410 415

Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly  
 420 425 430

Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly  
 435 440 445

Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
 450 455 460

Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln  
 465 470 475 480

Gln Tyr His Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu  
 485 490 495

Ile Asn Ala Ala Ala Gly Ser His His His His His His





Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile  
 355 360 365

Leu Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg  
 370 375 380

Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp  
 385 390 395 400

Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu  
 405 410 415

Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe  
 420 425 430

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val  
 435 440 445

[0006]

Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp  
 450 455 460

Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Ala Ala Ala  
 465 470 475 480

Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
 485 490

<210> 3

<211> 513

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽链

<400> 3

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr  
 20 25 30

Thr Ile His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly His Asp Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Ser Asp Tyr Asn Gln Asn Phe  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Glu Tyr Thr Trp Phe Ala Tyr  
 100 105 110

[0007] Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly  
 115 120 125

Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly  
 130 135 140

Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser  
 145 150 155 160

Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp  
 165 170 175

Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys  
 180 185 190

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala  
 195 200 205

Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe



Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln  
420 425 430

Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys  
435 440 445

Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
450 455 460

Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr  
465 470 475 480

Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly  
485 490 495

Thr Lys Leu Glu Ile Asn Ala Ala Ala Gly Ser His His His His His  
500 505 510

[0009]

His

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 486

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 多肽链

&lt;400&gt; 4

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

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

Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His  
 65 70 75 80

Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr  
 85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Gly  
 100 105 110

Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met  
 115 120 125

Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln  
 130 135 140

[0010] Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 145 150 155 160

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro  
 165 170 175

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
 180 185 190

Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr  
 195 200 205

His Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn  
 210 215 220

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser  
 225 230 235 240

Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys

					245					250						255
	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	Thr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln
				260					265					270		
	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Arg
			275					280					285			
	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr
		290					295					300				
	Thr	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr
	305					310					315					320
	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His
					325					330					335	
[0011]	Tyr	Cys	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser
				340					345					350		
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gln
			355					360					365			
	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu
			370				375					380				
	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Asn
	385					390					395					400
	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp
					405					410					415	
	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	His	Phe	Arg	Gly	Ser	Gly
				420					425					430		
	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Met	Glu	Ala	Glu	Asp
			435					440					445			

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe  
 450 455 460

Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Ala Ala Ala Gly Ser Trp Ser  
 465 470 475 480

His Pro Gln Phe Glu Lys  
 485

<210> 5  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

[0012] <220>  
 <223> Tag-序列

<400> 5

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
 1 5

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

<220>  
 <223> Tag-序列

<400> 6

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys  
 1 5

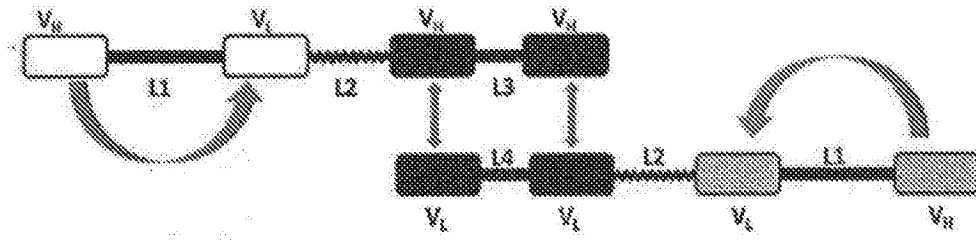


图1

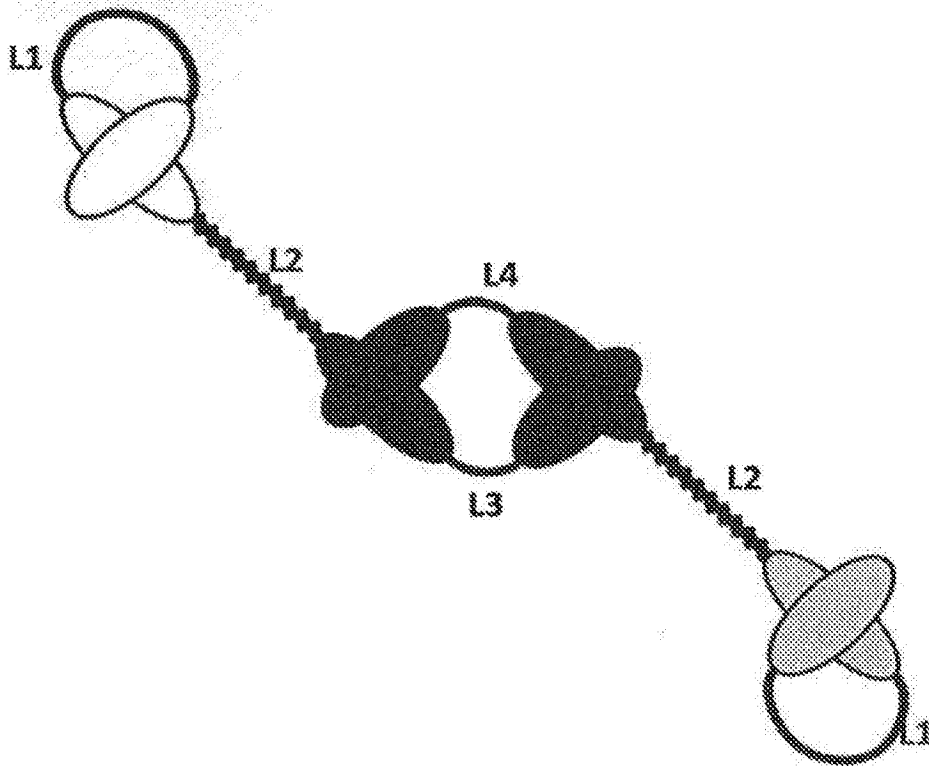


图2

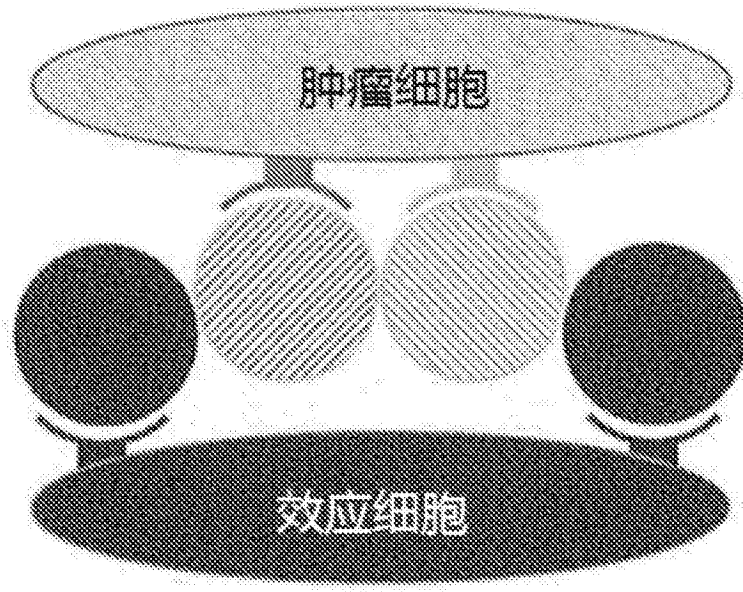


图3