



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104640562 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 20

(21) 申请号 201380037369. 3

G · Y · K · 吴 N · E · 韦塞

(22) 申请日 2013. 07. 13

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

(30) 优先权数据

代理人 陈文平

61/671, 640 2012. 07. 13 US

61/845, 948 2013. 07. 12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2015. 01. 13

A61K 39/00(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

C12P 21/08(2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/050411 2013. 07. 13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/012085 EN 2014. 01. 16

(71) 申请人 醇活有限公司

地址 加拿大不列颠哥伦比亚省

(72) 发明人 S · B · 迪克西特

T · 斯普雷特冯克罗登斯泰恩

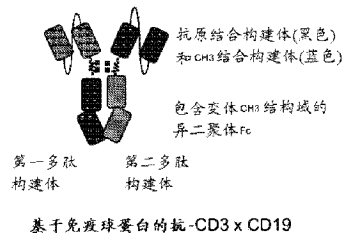
权利要求书7页 说明书73页 附图40页

(54) 发明名称

包含抗-CD3 构建体的双特异性不对称异二聚体

(57) 摘要

公开了包含多特异性异多聚体构建体的分离的多特异性异多聚体构建体,所述多特异性异多聚体构建体包含:第一多肽构建体,其包含第一重链多肽和结合至少一种表达 CD3 的细胞上的 CD3 复合物的 CD3 结合多肽构建体;第二多肽构建体,其包含与所述第一重链多肽不同的第二重链多肽和结合至少一种 B 细胞上的靶抗原的抗原结合多肽构建体。还提供分离的多特异性异多聚体构建体,其包含与至少一种 CD3 结合多肽构建体融合的第一转运蛋白多肽;和第二多肽构建体,其包含与至少一种抗原结合多肽构建体融合的、与所述第一转运蛋白多肽不同的第二转运蛋白多肽,所述至少一种抗原结合多肽构建体结合至少一种 B 细胞上的靶抗原。还公开了使用所公开的构建体治疗癌症的方法。



CN 104640562 A

1. 一种分离的多特异性异多聚体构建体,其包含:

第一多肽构建体,其包含第一重链多肽和结合至少一种表达 CD3 的细胞上的 CD3 复合物的 CD3 结合多肽构建体;

第二多肽构建体,其包含与所述第一重链多肽不同的第二重链多肽和结合至少一种 B 细胞上的靶抗原的抗原结合多肽构建体;其中:

所述 CD3 结合多肽构建体和所述抗原结合多肽构建体中的至少一个包含单链 Fv 区;

所述多特异性异多聚体构建体同时接合所述至少一种 B 细胞和所述至少一种表达 CD3 的细胞,以使得所述表达 CD3 的细胞被活化,从而诱导所述 B 细胞的杀伤;以及

所述第一重链多肽和所述第二重链多肽形成包含变体免疫球蛋白 CH3 区的异二聚体 Fc 区,所述变体免疫球蛋白 CH3 区包含促进所述异二聚体 Fc 的形成的至少一个氨基酸突变,其中:

所述异二聚体 Fc 被形成为具有至少比得上天然同二聚体 Fc 的稳定性,以及

所述异二聚体 Fc 被形成为具有如下纯度,所述纯度使得当所述多特异性异多聚体构建体由稳定哺乳动物细胞共表达于表达产物中时,所述表达产物包含至少约 70% 的所述多特异性异多聚体和小于 10% 的所述第一多肽构建体或所述第二多肽构建体的单体或同二聚体。

2. 如权利要求 1 所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述第一多肽构建体或所述第二多肽构建体缺乏免疫球蛋白轻链和免疫球蛋白第一恒定 (CH1) 区中的至少一个。

3. 如权利要求 1 至 2 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述异二聚体 Fc 区包含变体 CH2 结构域或铰链,所述变体 CH2 结构域或铰链包含阻止与所有 Fc γ 受体的功能有效结合的氨基酸修饰。

4. 如权利要求 3 所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述变体 CH2 结构域或铰链包含还阻止与补体蛋白 (C1q 复合物) 的功能有效结合的氨基酸修饰。

5. 如权利要求 1 至 2 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述异二聚体 Fc 区包含变体 CH2 结构域或铰链,所述变体 CH2 结构域或铰链包含增强与 Fc γ RIIb 受体的结合的氨基酸修饰。

6. 一种分离的多特异性异多聚体构建体,其包含:

第一多肽构建体,其包含第一重链多肽和结合至少一种表达 CD3 的细胞上的 CD3 复合物的 CD3 结合多肽构建体;

第二多肽构建体,其包含与所述第一重链多肽不同的第二重链多肽和结合至少一种 B 细胞上的靶抗原的抗原结合多肽构建体;其中:

所述 CD3 结合多肽构建体和所述抗原结合多肽构建体中的至少一个任选地包含单链 Fv 区;

所述第一重链多肽和所述第二重链多肽形成包含变体免疫球蛋白 CH3 区的异二聚体 Fc 区,所述变体免疫球蛋白 CH3 区包含促进所述异二聚体 Fc 的形成的至少一个氨基酸突变,其中:

所述异二聚体 Fc 被形成为具有至少比得上天然同二聚体 Fc 的稳定性,以及

所述异二聚体 Fc 被形成为具有如下纯度,所述纯度使得当所述多特异性异多聚体构建体由哺乳动物细胞共表达于表达产物中时,所述表达产物包含大于 70% 的所述多特异

性异多聚体和小于 10% 的所述第一多肽构建体或所述第二多肽构建体的单体或同二聚体；以及

所述多特异性异多聚体构建体以大于 1 的效价结合所述至少一种 B 细胞，并且所述多特异性异多聚体同时接合所述至少一种 B 细胞和所述至少一种表达 CD3 的细胞，以使得所述表达 CD3 的细胞被活化，从而诱导所述 B 细胞的杀伤。

7. 一种分离的多特异性异多聚体构建体，其包含：

第一多肽构建体，其包含第一重链多肽和结合至少一种表达 CD3 的细胞上的 CD3 复合物的 CD3 结合多肽构建体；

第二多肽构建体，其包含与所述第一重链多肽不同的第二重链多肽和表现出可忽略不计的受体结合的空间调节剂构建体；其中：

所述多特异性异多聚体构建体同时接合至少一种 B 细胞和所述至少一种表达 CD3 的细胞，以使得所述表达 CD3 的细胞被活化，从而诱导所述 B 细胞的杀伤；以及

所述第一重链多肽和所述第二重链多肽形成包含变体免疫球蛋白 CH3 区的异二聚体 Fc 区，所述变体免疫球蛋白 CH3 区包含促进所述异二聚体 Fc 的形成的至少一个氨基酸突变，其中：

所述异二聚体 Fc 被形成为具有至少比得上天然同二聚体 Fc 的稳定性，以及

所述异二聚体 Fc 被形成为具有如下纯度，所述纯度使得当所述多特异性异多聚体构建体由稳定哺乳动物细胞共表达于表达产物中时，所述表达产物包含至少约 75% 的所述多特异性异多聚体和小于 10% 的所述第一多肽构建体或所述第二多肽构建体的单体或同二聚体。

8. 一种分离的多特异性异多聚体构建体，其包含：

第一多肽构建体，其包含第一重链多肽和结合至少一种表达 CD3 的细胞上的 CD3 复合物的 CD3 结合多肽构建体；

第二多肽构建体，其包含与所述第一重链多肽不同的第二重链多肽，并且其中所述第二多肽构建体不包含抗原结合多肽构建体；其中：

所述多特异性异多聚体构建体同时接合至少一种 B 细胞和所述至少一种表达 CD3 的细胞，以使得所述表达 CD3 的细胞被活化，从而诱导所述 B 细胞的杀伤；以及

所述第一重链多肽和所述第二重链多肽形成包含变体免疫球蛋白 CH3 区的异二聚体 Fc 区，所述变体免疫球蛋白 CH3 区包含促进所述异二聚体 Fc 的形成的至少一个氨基酸突变，其中：

所述异二聚体 Fc 被形成为具有至少比得上天然同二聚体 Fc 的稳定性，以及

所述异二聚体 Fc 被形成为具有如下纯度，所述纯度使得当所述多特异性异多聚体构建体由稳定哺乳动物细胞共表达于表达产物中时，所述表达产物包含至少约 75% 的所述多特异性异多聚体和小于 10% 的所述第一多肽构建体或所述第二多肽构建体的单体或同二聚体。

9. 如权利要求 1 至 8 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体，其中所述异二聚体 Fc 区包含变体 CH2 结构域，所述变体 CH2 结构域包含氨基酸修饰以促进 Fc γ 受体的选择性结合。

10. 如权利要求 9 中所述的分离的多特异性异多聚体，其中所述变体 CH2 结构域选择性

地结合 Fc γ IIb 受体大于结合野生型 CH2 结构域。

11. 如权利要求 9 中所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述变体 CH2 结构域选择性地结合 Fc γ IIIa 和 Fc γ IIa 受体中的至少一个,并大于结合野生型 CH2 结构域。

12. 如权利要求 1 至 11 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述变体 CH3 结构域具有约 73°C 或更大的溶解温度 (T_m)。

13. 如权利要求 1 至 12 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述异二聚体 Fc 区被形成为具有大于约 90% 的纯度。

14. 如权利要求 1 至 13 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述异二聚体 Fc 区被形成为具有约 95% 或更大的纯度并且所述 T_m 是至少约 75°C。

15. 如权利要求 1 至 13 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述异二聚体 Fc 区被形成为具有至少约 90% 的纯度并且所述 T_m 是约 75°C。

16. 如权利要求 1 至 15 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中

a. 所述第一重链多肽的所述变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 L351Y、F405A 和 Y407V,并且所述第二转运蛋白多肽的所述变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 T366L、K392M 和 T394W;

b. 所述第一重链多肽的所述变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 L351Y、F405A 和 Y407V,并且所述第二重链多肽的所述变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 T366L、K392L 和 T394W;

c. 所述第一重链多肽的所述变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 T350V、L351Y、F405A 和 Y407V,并且所述第二重链多肽的所述变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 T350V、T366L、K392M 和 T394W;

d. 所述第一重链多肽的所述变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 T350V、L351Y、F405A 和 Y407V,并且所述第二重链多肽的所述变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 T350V、T366L、K392L 和 T394W;

e. 所述第一重链多肽的所述变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 T366L、N390R、K392R 和 T394W,并且所述第二重链多肽的所述变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 L351Y、S400E、F405A 和 Y407V;或

f. 所述第一重链多肽的所述变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 T350V、T366L、N390R、K392R 和 T394W,并且所述第二重链多肽的所述变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 T350V、L351Y、S400E、F405A 和 Y407V。

17. 如权利要求 1 至 16 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述异二聚体 Fc 是糖基化的。

18. 如权利要求 1 至 16 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述异二聚体 Fc 是无岩藻糖基化的。

19. 如权利要求 1 至 16 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述异二聚体 Fc 是无糖基化的。

20. 如权利要求 1 至 6 和 9 至 19 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述结合至少一种 B 细胞上的靶抗原的抗原结合多肽构建体包含衍生自抗体、纤连蛋白、亲和体、抗运载蛋白、半胱氨酸结蛋白、DARPin、avimer、Kunitz 结构域或其变体或衍生物的至少一个靶抗原结合结构域。

21. 如权利要求 20 所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述抗体是缺乏轻链的重链

抗体。

22. 如权利要求 1 至 6 和 9 至 21 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述抗原结合多肽构建体包含至少一个 CD19 结合结构域。

23. 如权利要求 1 至 6 和 9 至 21 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述抗原结合多肽构建体包含至少一个 CD20 结合结构域。

24. 一种分离的多特异性异多聚体构建体,其包含:

第一多肽构建体,其包含与至少一种 CD3 结合多肽构建体融合的第一转运蛋白多肽,所述至少一种 CD3 结合多肽构建体结合至少一种表达 CD3 的细胞上的 CD3 复合物;

第二多肽构建体,其包含与至少一种抗原结合多肽构建体融合的、与所述第一转运蛋白多肽不同的第二转运蛋白多肽,所述至少一种抗原结合多肽构建体结合至少一种 B 细胞上的靶抗原;

其中所述第一转运蛋白多肽和所述第二转运蛋白多肽通过一种蛋白质的节段化而衍生自所述蛋白质,每个转运蛋白多肽包含与所述蛋白质的区段具有至少 90% 同一性的氨基酸序列,并且其中所述转运蛋白多肽自组装以形成所述单体蛋白的准天然结构。

25. 如权利要求 24 所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述转运蛋白多肽不是衍生自抗体。

26. 如权利要求 24 至 25 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中每个转运蛋白多肽是白蛋白衍生物。

27. 如权利要求 26 所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述白蛋白是人血清白蛋白。

28. 如权利要求 24 至 25 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中至少一个转运蛋白多肽是异白蛋白衍生物。

29. 如权利要求 24 至 25 和 28 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中每个转运蛋白多肽衍生自不同的异白蛋白。

30. 一种分离的多特异性异多聚体构建体,其包含:

第一多肽构建体,其包含与至少一种 CD3 结合多肽构建体融合的第一转运蛋白多肽,所述至少一种 CD3 结合多肽构建体结合至少一种表达 CD3 的细胞上的 CD3 复合物;

第二多肽构建体,其包含与至少一种抗原结合多肽构建体融合的、与所述第一转运蛋白多肽不同的第二转运蛋白多肽,所述至少一种抗原结合多肽构建体结合至少一种 B 细胞上的靶抗原;

其中所述第一转运蛋白多肽和所述第二转运蛋白多肽通过白蛋白的节段化而获得,并且每个转运蛋白多肽包含与白蛋白的区段具有至少 90% 同一性的氨基酸序列,以使得所述转运蛋白多肽自组装以形成准天然白蛋白,并且其中所述第一货物多肽不具有存在于所述第二货物多肽中的任何结合结构域。

31. 如权利要求 24 至 30 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述多特异性异多聚体构建体同时接合所述至少一种 B 细胞和所述至少一种表达 CD3 的细胞,以使得所述表达 CD3 的细胞被活化,从而诱导所述 B 细胞的杀伤。

32. 如权利要求 24 至 30 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述结合至少一种 B 细胞上的靶抗原的抗原结合多肽构建体包含衍生自抗体、纤连蛋白、亲和体、抗运载

蛋白、半胱氨酸结蛋白、DARPin、avimer、Kunitz 结构域或其变体或衍生物的至少一个靶抗原结合结构域。

33. 如权利要求 24 至 32 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述抗原结合多肽构建体包含至少一个 CD19 结合结构域。

34. 如权利要求 24 至 32 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述抗原结合多肽构建体包含至少一个 CD20 结合结构域。

35. 如权利要求 1 至 34 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述至少一种 CD3 结合多肽构建体包含衍生自 CD3 特异性抗体、纳米抗体、纤连蛋白、亲和体、抗运载蛋白、半胱氨酸结蛋白、DARPin、avimer、Kunitz 结构域或其变体或衍生物的至少一个 CD3 结合结构域。

36. 如权利要求 35 所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述至少一个 CD3 结合结构域包含至少一个氨基酸修饰,所述至少一个氨基酸修饰与不包含所述修饰的对应 CD3 结合结构域相比降低免疫原性。

37. 如权利要求 1 至 36 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述至少一个 CD3 结合结构域包含至少一个氨基酸修饰,所述至少一个氨基酸修饰与不包含所述修饰的对应 CD3 结合结构域相比增加其稳定性,如通过 T_m 所测量。

38. 如权利要求 36 至 37 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述 CD3 特异性抗体是缺乏轻链的重链抗体。

39. 如权利要求 36 至 37 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述至少一种 CD3 结合多肽构建体包含衍生自非抗体蛋白支架结构域的至少一个 CD3 结合结构域。

40. 如权利要求 1 至 39 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述第一多肽构建体和所述第二多肽构建体中的至少一个还包含单链 Fv 多肽。

41. 如权利要求 1 至 40 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述第一多肽构建体和所述第二多肽构建体中的至少一个还包含单链 Fab 多肽。

42. 如权利要求 1 至 41 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述表达 CD3 的细胞是 T 细胞。

43. 如权利要求 42 所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述异多聚体以足够亲和力结合所述 T 细胞并且在所述 T 细胞与所述 B 细胞桥联时以足够诱导所述 T 细胞展示 B 细胞杀伤活性的能力修饰所述 T 细胞。

44. 如权利要求 1 至 43 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述表达 CD3 的细胞是人细胞。

45. 如权利要求 1 至 44 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述表达 CD3 的细胞是非人哺乳动物细胞。

46. 如权利要求 1 至 45 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述至少一种 CD3 结合多肽构建体结合跨多种物种的 CD3 构建体。

47. 如权利要求 1 至 46 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述至少一种 B 细胞与疾病相关联。

48. 如权利要求 47 所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述疾病是选自癌、肉瘤、白血病、淋巴瘤和神经胶质瘤的癌症。

49. 如权利要求 48 所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述癌症是鳞状细胞癌、腺癌、移行细胞癌、骨肉瘤和软组织肉瘤中的至少一种。

50. 如权利要求 1 至 49 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述至少一种 B 细胞是为淋巴或骨髓细胞的自身免疫反应性细胞。

51. 如权利要求 1 至 50 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述异多聚体还包含结合以下中的至少一种的至少一个结合结构域:EpCAM、EGFR、IGFR、HER-2neu、HER-3、HER-4、PSMA、CEA、MUC-1(粘蛋白)、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5、MUC7、CCR4、CCR5、CD19、CD20、CD33、CD30、神经节苷脂 GD3、9-O-乙酰基-GD3、GM2、聚 SA、GD2、碳酸酐酶 IX(MN/CA IX)、CD44v6、音猬(Shh)、Wue-1、浆细胞抗原,(膜结合的)、黑色素瘤硫酸软骨素蛋白聚糖(MCSP)、CCR8、TNF- α 前体、STEAP、间皮素、A33 抗原、前列腺干细胞抗原(PSCA)、Ly-6;桥粒芯糖蛋白 4、E-钙粘着蛋白新表位、胎儿乙酰胆碱受体、CD25、CA19-9 标记物、CA-125 标记物和 Muellerian 抑制物质(MIS)受体 II 型、sTn(唾液酸化 Tn 抗原;TAG-72)、FAP(成纤维细胞活化抗原)、内皮唾液酸蛋白、LG、SAS、Epha4CD63、CD3BsAb 免疫细胞因子 TNF、IFN γ 、IL-2 以及 TRAIL。

52. 如权利要求 1 至 51 中任一项所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述异多聚体任选地包含至少一个接头。

53. 如权利要求 52 所述的分离的多特异性异多聚体,其中所述至少一个接头是包含约 1 至约 100 个氨基酸的多肽。

54. 一组用于表达如权利要求 1 至 53 中任一项所述的多特异性异多聚体的表达载体,所述表达载体包含编码所述第一多肽构建体的至少一个第一 DNA 序列和编码所述第二多肽构建体的至少一个第二 DNA 序列。

55. 一种在稳定哺乳动物细胞中产生含有如权利要求 1 至 53 中任一项所述的多特异性异多聚体的表达产物的方法,所述方法包括:用以下转染至少一种哺乳动物细胞:

编码所述第一多肽构建体的至少一个第一 DNA 序列和编码所述第二多肽构建体的至少一个第二 DNA 序列,以使得所述至少一个第一 DNA 序列、所述至少一个第二 DNA 序列在所述至少一种哺乳动物细胞中以预定比例转染,以产生稳定哺乳动物细胞;

培养所述稳定哺乳动物细胞以产生包含所述多特异性异多聚体的所述表达产物。

56. 如权利要求 55 所述的方法,其中所述至少一个第一 DNA 序列:所述至少一个第二 DNA 序列的所述预定比例是约 1:1。

57. 如权利要求 55 至 56 中任一项所述的方法,其中所述哺乳动物细胞选自由以下组成的组:VERO、HeLa、HEK、NS0、中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、W138、BHK、COS-7、Caco-2 和 MDCK 细胞,以及其亚类和变体。

58. 一种药物组合物,其包含如权利要求 1 至 53 中任一项所定义的多特异性异多聚体和适合的赋形剂。

59. 一种用于产生如权利要求 57 所述的药物组合物的方法,所述方法包括:

a. 在允许如权利要求 1 至 53 中任一项所定义的异多聚体表达的条件下培养宿主细胞;

b. 从所述培养物回收所产生的异多聚体;以及产生所述药物组合物。

60. 一种用于预防、治疗或改善以下的至少一种的方法:

增生性疾病、最小残留癌症、肿瘤性疾病、炎性疾病、免疫病症、自身免疫性疾病、传染性疾病、病毒性疾病、过敏性反应、寄生反应、移植物抗宿主病或宿主抗移植物病或细胞恶性肿瘤，

所述方法包括向需要这种预防、治疗或改善的受试者施用如权利要求 58 所述的药物组合物。

61. 一种治疗有需要的哺乳动物中的癌症的方法，所述方法包括向所述哺乳动物施用包含有效量的如权利要求 58 所述的药物组合物任选地与其它药学上可接受的活性分子组合的组合物。

62. 如权利要求 61 所述的方法，其中所述癌症是实体肿瘤。

63. 如权利要求 62 所述的方法，其中所述实体肿瘤是肉瘤、癌和淋巴瘤中的一种或多种。

64. 如权利要求 61 所述的方法，其中所述癌症是血液癌。

65. 如权利要求 64 所述的方法，其中所述癌症是 B 细胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤和白血病中的一种或多种。

66. 一种治疗癌细胞的方法，所述方法包括向所述细胞提供包含如权利要求 1 至 53 中的一项所提供的异多聚体的组合物。

67. 如权利要求 66 所述的方法，其还包括提供与另一种治疗剂缀合的所述异多聚体。

68. 一种治疗有需要的哺乳动物中对 CD19 细胞溶解抗体、CD20 细胞溶解抗体和兰妥莫单抗中的至少一种无反应的癌症的方法，所述方法包括向所述哺乳动物施用包含有效量的如权利要求 58 所述的药物组合物的组合物。

69. 一种治疗在用兰妥莫单抗治疗之后的癌细胞退行的方法，所述方法包括向所述癌细胞提供包含有效量的如权利要求 58 所述的药物组合物的组合物。

70. 一种治疗患有以 B 细胞的表达为特征的疾病的个体的方法，所述方法包括向所述个体提供有效量的组合物，所述组合物包含有效量的如权利要求 58 所述的药物组合物。

71. 如权利要求 70 所述的方法，其中所述疾病对用抗 -CD19 抗体和抗 -CD20 抗体中的至少一种治疗无反应。

72. 一种治疗有需要的哺乳动物中的自身免疫性病状的方法，所述方法包括向所述哺乳动物施用包含有效量的如权利要求 58 中所提供的药物组合物的组合物。

73. 如权利要求 72 所述的方法，其中所述自身免疫性病状是以下中的一种或多种：多发性硬化症、类风湿性关节炎、红斑狼疮、银屑病性关节炎、银屑病、血管炎、葡萄膜炎、克罗恩氏病和 1 型糖尿病。

74. 一种治疗有需要的哺乳动物中的炎性病状的方法，所述方法包括向所述哺乳动物施用包含有效量的包含如权利要求 1 至 53 中的一项所提供的异多聚体的药物组合物的组合物。

75. 一种试剂盒，其包括如权利要求 1 至 53 中任一项所定义的异多聚体及其使用说明书。

包含抗-CD3 构建体的双特异性不对称异二聚体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2012 年 7 月 13 日提交的美国申请序列号 61/671,640 和 2013 年 7 月 13 日提交的美国申请序列号 61/845,948 的权益,所述申请在此以引用的方式整体并入。

技术领域

[0003] 本发明的领域是合理设计包含 CD3 结合结构域的多特异性支架以用于生物治疗剂的定制研发。

背景技术

[0004] 在治疗性蛋白的领域中,具有其多价靶结合特征的抗体是用于设计药物候选物的优异支架。进一步推进这些特征,设计的双特异性抗体和其它特融合的多特异性治疗剂表现出双重或多重靶特异性和产生具有新颖的作用模式的药物的机会。这类具有有利的药物代谢动力学和功能活性的多价和多特异性治疗性蛋白的研发一直是挑战。

[0005] 人和动物两者的免疫系统包括两种主要类别的淋巴细胞:衍生自胸腺的细胞(T 细胞)和衍生自细胞的骨髓(B 细胞)。T 细胞表现出免疫特异性并且直接参与细胞介导的免疫应答(如移植物排斥)。T 细胞针对或响应于多种外来结构(抗原)作用。在许多情况下,这些外来抗原由于感染而在宿主细胞上表达。然而,外来抗原还可以来自已被瘤形成或感染改变的宿主。

[0006] T 细胞活化是依赖于在应答 T 细胞群体上表达的多种细胞表面分子的参与的复杂的现象。例如,抗原特异性 T 细胞受体(TcR)由二硫键连接的异二聚体组成,所述异二聚体含有与低分子量不变蛋白质的复合物(通常被指定为 CD3)非共价缔合的两个同源分布的整合膜糖蛋白链 α 和 β (α 和 β) 或 γ 和 δ (γ 和 δ)。

[0007] 发明概述

[0008] 本文提供包含 CD3 结合结构域的多特异性异多聚体。在一个实施方案中提供一种包含抗-CD3 构建体的双特异性不对称异二聚体。

[0009] 本文提供包含以下各项的分离的多特异性异多聚体构建体:第一多肽构建体,其包含第一重链多肽和结合至少一种表达 CD3 的细胞上的 CD3 复合物的 CD3 结合多肽构建体;第二多肽构建体,其包含与所述第一重链多肽不同的第二重链多肽和结合至少一种 B 细胞上的靶抗原的抗原结合多肽构建体;其中:所述 CD3 结合多肽构建体和所述抗原结合多肽构建体中的至少一个包含单链 Fv 区;其中所述多特异性异多聚体构建体同时接合所述至少一种 B 细胞和所述至少一种表达 CD3 的细胞,以使得所述表达 CD3 的细胞被活化,从而诱导所述 B 细胞的杀伤;并且所述第一和第二重链多肽形成包含变体免疫球蛋白 CH3 区的异二聚体 Fc 区,所述变体免疫球蛋白 CH3 区包含促进所述异二聚体 Fc 的形成的至少一个氨基酸突变,所述异二聚体 Fc 具有至少比得上天然同二聚体 Fc 的稳定性并且具有纯度,所述纯度使得当所述多特异性异多聚体构建体由稳定哺乳动物细胞共表达于表达产物中时,所述表达产物包含至少约 70% 的所述多特异性异多聚体和小于 10% 的所述第一或第

二多肽构建体的单体或同二聚体。在某些实施方案中,所述稳定哺乳动物细胞用呈 1:1 的预定比例的编码所述第一多肽构建体的至少一个第一 DNA 序列和编码所述第二多肽构建体的至少一个第二 DNA 序列转染。在某些实施方案中,所述第一或第二多肽构建体缺乏免疫球蛋白轻链和免疫球蛋白第一恒定(CH1)区中的至少一个。

[0010] 在某些实施方案中是本文所描述的分离的异多聚体构建体,其中所述异二聚体 Fc 区包含变体 CH2 结构域或铰链,所述变体 CH2 结构域或铰链包含阻止与所有 Fc γ 受体的功能有效结合的氨基酸修饰。在一些实施方案中提供本文所描述的分离的多特异性异多聚体,其中所述变体 CH2 结构域或铰链包含还阻止与补体蛋白(C1q 复合物)的功能有效结合的氨基酸修饰。在一个实施方案中是本文所描述的分离的多特异性异多聚体,其中所述异二聚体 Fc 区包含变体 CH2 结构域或铰链,所述变体 CH2 结构域或铰链包含增强与 Fc γ RIIB 受体的结合的氨基酸修饰。

[0011] 在一个实施方案中提供一种包含以下各项的分离的多特异性异多聚体构建体:第一多肽构建体,其包含第一重链多肽和结合至少一种表达 CD3 的细胞上的 CD3 复合物的 CD3 结合多肽构建体;第二多肽构建体,其包含与所述第一重链多肽不同的第二重链多肽和结合至少一种 B 细胞上的靶抗原的抗原结合多肽构建体;其中:所述 CD3 结合多肽构建体和所述抗原结合多肽构建体中的至少一个任选地包含单链 Fv 区;所述第一和第二重链多肽形成包含变体免疫球蛋白 CH3 区的异二聚体 Fc 区,所述变体免疫球蛋白 CH3 区包含促进所述异二聚体 Fc 的形成的至少一个氨基酸突变,其中:所述异二聚体 Fc 被形成为具有至少比得上天然同二聚体 Fc 的稳定性,并且所述异二聚体 Fc 被形成为具有纯度,所述纯度使得当所述多特异性异多聚体构建体由哺乳动物细胞共表达于表达产物中时,所述表达产物包含大于 70% 的所述多特异性异多聚体和小于 10% 的所述第一或第二多肽构建体的单体或同二聚体;并且所述多特异性异多聚体构建体以大于 1 的效价结合所述至少一种 B 细胞,并且所述多特异性异多聚体同时接合所述至少一种 B 细胞和所述至少一种表达 CD3 的细胞,以使得所述表达 CD3 的细胞被活化,从而诱导所述 B 细胞的杀伤。在某些实施方案中,所述多特异性异多聚体构建体以二效价结合所述至少一种 B 细胞。

[0012] 本文提供一种包含以下各项的分离的多特异性异多聚体构建体:第一多肽构建体,其包含第一重链多肽和结合至少一种表达 CD3 的细胞上的 CD3 复合物的 CD3 结合多肽构建体;第二多肽构建体,其包含与所述第一重链多肽不同的第二重链多肽和表现出可忽略不计的受体结合的空间调节剂构建体;其中:所述多特异性异多聚体构建体同时接合至少一种 B 细胞和所述至少一种表达 CD3 的细胞,以使得所述表达 CD3 的细胞被活化,从而诱导所述 B 细胞的杀伤;并且所述第一和第二重链多肽形成包含变体免疫球蛋白 CH3 区的异二聚体 Fc 区,所述变体免疫球蛋白 CH3 区包含促进所述异二聚体 Fc 的形成的至少一个氨基酸突变,其中:所述异二聚体 Fc 被形成为具有至少比得上天然同二聚体 Fc 的稳定性,并且所述异二聚体 Fc 被形成为具有纯度,所述纯度使得当所述多特异性异多聚体构建体由稳定哺乳动物细胞共表达于表达产物中时,所述表达产物包含至少约 75% 的所述多特异性异多聚体和小于 10% 的所述第一或第二多肽构建体的单体或同二聚体。

[0013] 提供一种包含以下各项的分离的多特异性异多聚体构建体:第一多肽构建体,其包含第一重链多肽和结合至少一种表达 CD3 的细胞上的 CD3 复合物的 CD3 结合多肽构建体;第二多肽构建体,其包含与所述第一重链多肽不同的第二重链多肽,并且其中所述第二

多肽构建体不包含抗原结合多肽构建体；其中：所述多特异性异多聚体构建体同时接合至少一种 B 细胞和所述至少一种表达 CD3 的细胞，以使得所述表达 CD3 的细胞被活化，从而诱导所述 B 细胞的杀伤；并且所述第一和第二重链多肽形成包含变体免疫球蛋白 CH3 区的异二聚体 Fc 区，所述变体免疫球蛋白 CH3 区包含促进所述异二聚体 Fc 的形成的至少一个氨基酸突变，其中：所述异二聚体 Fc 被形成为具有至少比得上天然同二聚体 Fc 的稳定性，并且所述异二聚体 Fc 被形成为具有纯度，所述纯度使得当所述多特异性异多聚体构建体由稳定哺乳动物细胞共表达于表达产物中时，所述表达产物包含至少约 75% 的所述多特异性异多聚体和小于 10% 的所述第一或第二多肽构建体的单体或同二聚体。

[0014] 在某些实施方案中是本文所描述的分离的多特异性异多聚体，其中所述异二聚体 Fc 区包含变体 CH2 结构域，所述变体 CH2 结构域包含氨基酸修饰以促进 Fc γ 受体的选择性结合。在一些实施方案中，变体 CH2 结构域选择性地结合 Fc γ IIb 受体大于结合野生型 CH2 结构域。在某些实施方案中，变体 CH2 结构域选择性地结合 Fc γ IIIa 和 Fc γ IIa 受体中的至少一个大于结合野生型 CH2 结构域。

[0015] 在某些实施方案中是一种本文所描述的分离的多特异性异多聚体构建体，其中所述变体 CH3 结构域具有约 73°C 或更大的熔解温度 (T_m)。在一些实施方案中，所述异二聚体 Fc 区被形成为具有大于约 90% 的纯度。在某些实施方案中，所述异二聚体 Fc 区被形成为具有约 95% 或更大的纯度并且 T_m 是至少约 75°C。在一些其他实施方案中，所述异二聚体 Fc 区被形成为具有至少约 90% 的纯度并且 T_m 是约 75°C。在一个实施方案中，所述第一重链多肽的变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 L351Y、F405A 和 Y407V，并且所述第二转运蛋白多肽的变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 T366L、K392M 和 T394W。在另一个实施方案中，所述第一重链多肽的变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 L351Y、F405A 和 Y407V，并且所述第二重链多肽的变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 T366L、K392L 和 T394W。在另一个实施方案中，所述第一重链多肽的变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 T350V、L351Y、F405A 和 Y407V，并且所述第二重链多肽的变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 T350V、T366L、K392M 和 T394W。在一些实施方案中，所述第一重链多肽的变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 T350V、L351Y、F405A 和 Y407V，并且所述第二重链多肽的变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 T350V、T366L、K392L 和 T394W。在另一个实施方案中，所述第一重链多肽的变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 T366L、N390R、K392R 和 T394W，并且所述第二重链多肽的变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 L351Y、S400E、F405A 和 Y407V。在一些实施方案中，所述第一重链多肽的变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 T350V、T366L、N390R、K392R 和 T394W，并且所述第二重链多肽的变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 T350V、L351Y、S400E、F405A 和 Y407V。

[0016] 在某些实施方案中提供一种本文所描述的分离的多特异性异多聚体，其中所述异二聚体 Fc 是糖基化的。在一些实施方案中提供一种本文所描述的分离的多特异性异多聚体，其中所述异二聚体 Fc 是无岩藻糖基化的。在另一个实施方案中提供一种本文所描述的分离的多特异性异多聚体，其中所述异二聚体 Fc 是无糖基化的。

[0017] 在一些实施方案中是本文所描述的分离的多特异性异多聚体，其中结合至少一种 B 细胞上的靶抗原的抗原结合多肽构建体包含衍生自抗体、纤连蛋白、亲和体 (affibody)、抗运载蛋白 (anticalin)、半胱氨酸结蛋白、DARPin、avimer、Kunitz 结构域或其变体或衍生物的至少一个靶抗原结合结构域。在一个实施方案是本文所描述的分离的多特异性异多

聚体,其中所述抗体是缺乏轻链的重链抗体。在其它实施方案中是本文所描述的分离的多特异性异多聚体,其中所述抗原结合多肽构建体包含至少一个 CD19 结合结构域。在某些实施方案中是本文所描述的分离的多特异性异多聚体,其中所述抗原结合多肽构建体包含至少一个 CD20 结合结构域。

[0018] 本文提供一种分离的多特异性异多聚体构建体,其包含:第一多肽构建体,其包含与至少一种 CD3 结合多肽构建体融合的第一转运蛋白多肽,所述至少一种 CD3 结合多肽构建体结合至少一种表达 CD3 的细胞上的 CD3 复合物;第二多肽构建体,其包含与至少一种抗原结合多肽构建体融合的、与所述第一转运蛋白多肽不同的第二转运蛋白多肽,所述至少一种抗原结合多肽构建体结合至少一种 B 细胞上的靶抗原;其中所述第一和第二转运蛋白多肽通过一种蛋白质的节段化而衍生自所述蛋白质,每个转运蛋白多肽包含与所述蛋白质的区段具有至少 90% 同一性的氨基酸序列,并且其中所述转运蛋白多肽自组装以形成所述单体蛋白的准天然结构。

[0019] 在某些实施方案中,所述转运蛋白多肽不是衍生自抗体。在某些实施方案中,每个转运蛋白多肽是白蛋白衍生物。在一些实施方案中,所述白蛋白是人血清白蛋白。在一些实施方案中,至少一个转运蛋白多肽是异白蛋白衍生物。在某些实施方案中,每个转运蛋白多肽衍生自不同的异白蛋白。

[0020] 本文提供分离的多特异性异多聚体构建体,其包含:第一多肽构建体,其包含与至少一种 CD3 结合多肽构建体融合的第一转运蛋白多肽,所述至少一种 CD3 结合多肽构建体结合至少一种表达 CD3 的细胞上的 CD3 复合物;第二多肽构建体,其包含与至少一种抗原结合多肽构建体融合的、与所述第一转运蛋白多肽不同的第二转运蛋白多肽,所述至少一种抗原结合多肽构建体结合至少一种 B 细胞上的靶抗原;其中所述第一和第二转运蛋白多肽通过白蛋白的节段化而获得,并且每个转运蛋白多肽包含与白蛋白的区段具有至少 90% 同一性的氨基酸序列,以使得所述转运蛋白多肽自组装以形成准天然白蛋白,并且其中所述第一货物多肽不具有存在于所述第二货物多肽中的任何结合结构域。

[0021] 在某些实施方案中提供一种本文所描述的异多聚体,其中所述多特异性异多聚体构建体同时接合所述至少一种 B 细胞和所述至少一种表达 CD3 的细胞,以使得所述表达 CD3 的细胞被活化,从而诱导所述 B 细胞的杀伤。在一些实施方案中,所述结合至少一种 B 细胞上的靶抗原的抗原结合多肽构建体包含衍生自抗体、纤连蛋白、亲和体、抗运载蛋白、半胱氨酸结蛋白、DARPin、avimer、Kunitz 结构域或其变体或衍生物的至少一个靶抗原结合结构域。在某些实施方案中,所述抗原结合多肽构建体包含至少一个 CD19 结合结构域。

[0022] 在某些实施方案中提供一种本文所描述的多特异性异多聚体,其中所述抗原结合多肽构建体包含至少一个 CD20 结合结构域。

[0023] 在某些实施方案中提供一种本文所描述的多特异性异多聚体,其中所述至少一种 CD3 结合多肽构建体包含衍生自 CD3 特异性抗体、纳米抗体、纤连蛋白、亲和体、抗运载蛋白、半胱氨酸结蛋白、DARPin、avimer、Kunitz 结构域或其变体或衍生物的至少一个 CD3 结合结构域。在一些实施方案中,所述至少一个 CD3 结合结构域包含至少一个氨基酸修饰,所述至少一个氨基酸修饰与不包含所述修饰的对应 CD3 结合结构域相比降低免疫原性。在一些实施方案中是本文所描述的分离的多特异性异多聚体,其中所述至少一个 CD3 结合结构域包含至少一个氨基酸修饰,所述至少一个氨基酸修饰与不包含所述修饰的对应 CD3 结合

结构域相比增加其稳定性（如通过 T_m 所测量）。在一些实施方案中，所述至少一种 CD3 结合多肽构建体包含衍生自 CD3 特异性抗体的至少一个 CD3 结合结构域，所述 CD3 特异性抗体是缺乏轻链的重链抗体。在某些实施方案中，所述至少一种 CD3 结合多肽构建体包含衍生自非抗体蛋白支架结构域的至少一个 CD3 结合结构域。

[0024] 在一个实施方案中提供本文所描述的分离的异多聚体构建体，其中所述第一和第二多肽构建体中的至少一个还包含单链 Fv 多肽。在某些实施方案中提供本文所描述的分离的异多聚体构建体，其中所述第一和第二多肽构建体中的至少一个还包含单链 Fab 多肽。

[0025] 在一些实施方案中是本文所描述的分离的异多聚体构建体，其中所述表达 CD3 的细胞是 T 细胞。在某些实施方案中是本文所描述的分离的异多聚体，其中所述异多聚体以足够亲和力结合 T 细胞并且在所述 T 细胞与 B 细胞桥联时以足够诱导所述 T 细胞展示 B 细胞杀伤活性的能力修饰所述 T 细胞。

[0026] 提供一种本文所描述的分离的异多聚体构建体，其中所述表达 CD3 的细胞是人细胞。在某些实施方案中，所述表达 CD3 的细胞是非人哺乳动物细胞。在一些实施方案中，所述哺乳动物细胞是灵长类动物细胞。在某些实施方案中，所述灵长类动物是猴。在一些实施方案中，所述至少一种 CD3 结合多肽构建体结合跨多种物种的 CD3 构建体。在某些实施方案中，所述 CD3 结合多肽结合跨多种物种的 CD3 构建体，所述物种包括人、大鼠、小鼠和猴中的至少一种或多种。

[0027] 提供一种本文所描述的分离的异多聚体构建体，其中所述至少一种 B 细胞与疾病相关。在某些实施方案中，所述疾病是选自癌、肉瘤、白血病、淋巴瘤和神经胶质瘤的癌症。在一些实施方案中，所述癌症是鳞状细胞癌、腺癌、移行细胞癌、骨肉瘤和软组织肉瘤中的至少一种。在一个实施方案中，所述至少一种 B 细胞是为淋巴或骨髓细胞的自身免疫反应性细胞。

[0028] 提供一种本文所描述的分离的异多聚体，其中所述异多聚体还包含结合以下中的至少一种的至少一个结合结构域：EpCAM、EGFR、IGFR、HER-2neu、HER-3、HER-4、PSMA、CEA、MUC-1（粘蛋白）、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5、MUC7、CCR4、CCR5、CD19、CD20、CD33、CD30、神经节苷脂 GD3、9-O-乙酰基-GD3、GM2、聚 SA、GD2、碳酸酐酶（Carboanhydrase）IX（MN/CA IX）、CD44v6、音猬（Sonic Hedgehog）（Shh）、Wue-1、浆细胞抗原（膜结合的）、黑色素瘤硫酸软骨素蛋白聚糖（MCSP）、CCR8、TNF- α 前体、STEAP、间皮素、A33 抗原、前列腺干细胞抗原（PSCA）、Ly-6；桥粒芯糖蛋白（desmoglein）4、E-钙粘着蛋白新表位、胎儿乙酰胆碱受体、CD25、CA19-9 标记物、CA-125 标记物和 Muellerian 抑制物质（MIS）受体 II 型、sTn（唾液酸化 Tn 抗原；TAG-72）、FAP（成纤维细胞活化抗原）、内皮唾液酸蛋白（endosialin）、LG、SAS、EPHA4CD63、CD3BsAb 免疫细胞因子 TNF、IFN γ 、IL-2 以及 TRAIL。

[0029] 提供一种本文所描述的分离的异多聚体构建体，其中所述异多聚体任选地包含至少一个接头。在一些实施方案中，所述至少一个接头是包含约 1 至约 100 个氨基酸的多肽。

[0030] 提供一组用于表达本文所描述的多特异性异多聚体的表达载体，所述表达载体包含编码所述第一多肽构建体的至少一个第一 DNA 序列和编码所述第二多肽构建体的至少一个第二 DNA 序列。

[0031] 提供一种在稳定哺乳动物细胞中产生含有本文所描述的多特异性异多聚体的表

达产物的方法,所述方法包括:用以下各项转染至少一种哺乳动物细胞:编码所述第一多肽构建体的至少一个第一 DNA 序列和编码所述第二多肽构建体的至少一个第二 DNA 序列,以使得所述至少一个第一 DNA 序列、所述至少一个第二 DNA 序列在所述至少一种哺乳动物细胞中以预定比例转染,以产生稳定哺乳动物细胞;培养所述稳定哺乳动物细胞以产生包含所述多特异性异多聚体的所述表达产物。在一些实施方案中是产生含有本文所描述的多特异性异多聚体构建体的表达产物的方法,其中所述至少一个第一 DNA 序列:至少一个第二 DNA 序列的所述预定比例是约 1:1。在一些实施方案中,所述哺乳动物细胞选自自由以下各项组成的组:VERO、HeLa、HEK、NS0、中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、W138、BHK、COS-7、Caco-2 和 MDCK 细胞,以及其亚类和变体。

[0032] 提供一种包含本文所描述的多特异性异多聚体和适合的赋形剂的药物组合物。还提供一种用于产生所述药物组合物的方法,所述方法包括:在如本文所定义的允许异多聚体表达的条件下培养宿主细胞;从所述培养物回收所产生的异多聚体;以及产生所述药物组合物。

[0033] 提供一种用于预防、治疗或改善以下各项中的至少一种的方法:增生性疾病、最小残留癌症、肿瘤性疾病、炎性疾病、免疫病症、自身免疫性疾病、传染性疾病、病毒性疾病、过敏反应、寄生反应、移植物抗宿主病或宿主抗移植物病或细胞恶性肿瘤,所述方法包括向需要这种预防、治疗或改善的受试者施用本文所描述的药物组合物。提供一种治疗有需要的哺乳动物中的癌症的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用包含有效量的本文所描述的药物组合物任选地与其它药物活性分子组合的组合物。在某些实施方案中,所述癌症是实体肿瘤。在一些其它实施方案中,所述实体肿瘤是肉瘤、癌和淋巴瘤中的一种或多种。在某些其它实施方案中,所述癌症是血液癌。在另一实施方案中,所述癌症是 B 细胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤和白血病中的一种或多种。

[0034] 提供一种治疗癌细胞的方法,所述方法包括向所述细胞提供包含本文所描述的异多聚体的组合物。在某些实施方案中,所述异多聚体被提供为与另一种治疗剂缀合。

[0035] 提供一种治疗有需要的哺乳动物中对 CD19 溶胞抗体、CD20 溶胞抗体和兰妥莫单抗(blinatumomab)中的至少一种无反应的癌症的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用包含有效量的本文所描述的药物组合物的组合物。

[0036] 提供一种治疗在用兰妥莫单抗治疗之后的癌细胞退行的方法,所述方法包括向所述癌细胞提供包含有效量的本文所描述的药物组合物的组合物。

[0037] 提供一种治疗患有以 B 细胞的表达为特征的疾病的个体的方法,所述方法包括向所述个体提供有效量的组合物,所述组合物包含有效量的本文所描述的药物组合物。在某些实施方案中,所述疾病对用抗-CD19 抗体和抗-CD20 抗体中的至少一种治疗无反应。

[0038] 提供一种治疗有需要的哺乳动物中的自身免疫性病状的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用包含有效量的本文所提供的药物组合物的组合物。在某些实施方案中,所述自身免疫性病状是以下中的一种或多种:多发性硬化症、类风湿性关节炎、红斑狼疮(lupus erythematosus)、银屑病性关节炎、银屑病、血管炎、葡萄膜炎、克罗恩氏病和 1 型糖尿病。

[0039] 提供一种治疗有需要的哺乳动物中的炎性病状的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用包含有效量的包含本文所提供的异多聚体的药物组合物的组合物。

[0040] 提供一种包括如本文所定义的异多聚体及其使用说明书的试剂盒。

[0041] 本文提供一种包含以下各项的异多聚体构建体：第一单体，其包含与第一货物多肽融合的第一转运蛋白多肽，所述第一货物多肽包含至少一个 HER2 结合结构域；第二单体，其包含与第二货物多肽融合的、与所述第一转运蛋白多肽不同的第二转运蛋白多肽，所述第二货物多肽包含至少一个 HER3 结合结构域；其中所述第一货物多肽不具有存在于所述第二货物多肽中的任何结合结构域；其中所述第一和第二转运蛋白多肽形成包含变体免疫球蛋白 CH3 区的异二聚体 Fc 区，所述变体免疫球蛋白 CH3 区包含至少一个氨基酸突变，所述至少一个氨基酸突变促进具有比得上天然同二聚体 Fc 的稳定性的所述异二聚体的形成。

[0042] 本文提供一种包含以下各项的异多聚体构建体：第一单体，其包含与第一货物多肽融合的第一转运蛋白多肽，所述第一货物多肽包含至少一个 HER2 结合结构域；第二单体，其包含与第二货物多肽融合的、与所述第一转运蛋白多肽不同的第二转运蛋白多肽，所述第二货物多肽包含至少一个 HER3 结合结构域的；其中所述第一和第二转运蛋白多肽通过白蛋白的节段化而获得，以使得所述转运蛋白多肽自组装以形成准天然白蛋白。

[0043] 本文提供一种包含如本文所定义的分离的多特异性异多聚体和适合的赋形剂的药物组合物。还提供一种用于产生这种药物组合物的方法，所述方法包括：在如本文所定义的允许异多聚体表达的条件下培养宿主细胞；从所述培养物回收所产生的异多聚体；以及产生所述药物组合物。

[0044] 本文提供包含编码本文所描述的异多聚体的核酸的宿主细胞。在某些实施方案中，编码所述第一单体蛋白的核酸和编码所述第二单体蛋白的核酸存在于单个载体中。在某些实施方案中，编码所述第一单体蛋白的核酸和编码所述第二单体蛋白的核酸存在于单独的载体中。

[0045] 还提供一种包括如本文所定义的异多聚体及其使用说明书的试剂盒。

[0046] 附图简述

[0047] 图 1A 至 1B：图 1A 描绘本文所提供的异多聚体构建体的示例性示意性图示。例如，基于免疫球蛋白的抗-CD3x CD19 构建体展示所述异多聚体的不同方面，例如草图示出第一和第二多肽构建体，其中所述第一多肽构建体包含 CH3 结合构建体（黑色），并且所述第二多肽构建体包含抗原结合构建体（蓝色）。在一些实施方案中，所述抗原结合构建体不存在或被空间调节构建体置换。还示出由所述第一和第二多肽构建体的变体 CH3 区形成的 Fc 异多聚体。图 1B 示出通过 FACS 测定的本文所描述的异多聚体构建体（v873）和不包含异多聚体 Fc 的构建体（兰妥莫单抗 CD19-CD3 BiTE (v891, MT-103)）桥联 Jurkat CD3 T 细胞（左上象限）与 Raji CD19 B 细胞（右下象限）的能力

[0048] 图 2 证明本文所描述的异多聚体（v873）能够选择性地结合和桥联表达 CD3 的 Jurkat T 细胞（右下图）和表达 CD19 的 Raji B 细胞（右上图）。图 2 还证明单臂抗-CD3 抗体特异性地结合 Jurkat T 细胞（下中图）并且不与表达 CD19 的 B 细胞交叉反应（上中图），并且所述单臂抗-CD19 抗体特异性地结合 Raji B 细胞（左上图）并且不与 Jurkat T 细胞交叉反应（左下图）。

[0049] 图 3A 至 3B：图 3A 描绘本文所描述的异多聚体（v873）重定向 IL-2 活化的 PBMC 以杀死来自 3 个供体的靶 Raji B 细胞的能力。图 3B 证明与所述供体中的一个中的缺乏异二

聚体 Fc 的构建体相比,本文所描述的异多聚体能够介导更高的重定向 T 细胞细胞毒性。

[0050] 图 4 示出本文所描述的异多聚体能够结合表达 CD3 的 Jurkat T 细胞和表达 CD19 的 Raji B 细胞。

[0051] 图 5A 至 5B:图 5A 指示在所测试的浓度下,为本文所描述的异多聚体的 v1093 能够桥联 31% 的总细胞,并且本文所描述的另一种异多聚体构建体 v873 能够桥联 25% 的总细胞。图 5B 证明 v1093 能够以大于 v221 并且类似于 v891 和 v873 的程度桥联 Jurkat T 细胞和 Raji B 细胞。

[0052] 图 6 示出可与本文所描述的异多聚体一起提供以用于治疗某些适应症的抗体治疗剂。

[0053] 图 7 示出证明本文所描述的示例性异多聚体构建体在 CHO3E7 细胞中瞬时表达(具有 >80% 的细胞存活力)的 SDS-PAGE。

[0054] 图 8 示出当跨个体供体比较时,本文所描述的异多聚体(v873)当与阴性对照人 IgG1(G1)人相比时诱导针对靶 B 细胞的更高细胞毒性%。

[0055] 图 9A 至 9B:图 9A 示出人 IgG(hIgG)不结合 Jurkat T 细胞并且具有与 Raji B 细胞的低水平结合。图 9A 还示出抗-CD19 单臂构建体选择性地结合 Raji B 细胞并且不与 Jurkat T 细胞交叉反应。图 9B 证明 FACS 测定示出本文所描述的 v873-a 异多聚体选择性地结合 Jurkat T 细胞和 Raji B 细胞。

[0056] 图 10 示出本文所描述的 v873-a 异多聚体不结合 K562 细胞系,所述细胞系不表达 CD19 或 CD3。

[0057] 图 11 示出本文所描述的 v873-a 异多聚体不结合小鼠淋巴细胞,所述细胞不表达 CD19 或 CD3。

[0058] 图 12A 至 12B:图 12A 和图 12B 示出本文所描述的异多聚体构建体(v873, v875)和缺乏异二聚体 Fc 的构建体(v891)与表达 CD3 的 HPB-ALL T 细胞和表达 CD3 的 Jurkat T 细胞以及与表达 CD19 的 Raji B 细胞的 FACS 结合曲线。

[0059] 图 13A 至 13B:图 13A 示出以 0.1 至 300nM 范围测试的异多聚体构建体 v875、v1379、v1380、v1381 和对照 v891 结合表达 CD19 的 Raji 细胞的 FACS 结合曲线。图 13B 示出以 0.1 至 300nM 范围测试的异多聚体构建体 v875、v1379、v1380 结合 HBP-ALL T 细胞的 FACS 结合曲线。

[0060] 图 14 指示本文所描述的异多聚体构建体(v875 和 v891)促进 Raji B 细胞与 Jurkat T 细胞之间的可比较的桥联。使用对照人 IgG 导致 Raji 细胞与 Jurkat 细胞之间的 2.5% 桥联,而 v875 促进 22.9% 的总细胞桥联,并且 v891 促进 14.5% 的总细胞桥联。

[0061] 图 15A 至图 15B:图 15A 示出使用 1:1 比例的 T 细胞与 B 细胞的桥联的量,其中异多聚体浓度为 0.3nM 至 3nM 的范围。图 15B 示出使用 15:1 比例的 T 细胞与 B 细胞的桥联的量,其中异多聚体浓度为 0.3nM 至 3nM 的范围。当表示为超过背景的倍数时,用 v875 测试的两个 E:T 比例(1:1 和 15:1)导致类似的总 T 细胞-B 细胞桥联。

[0062] 图 16A 至 16E:图 16A 描绘 v875、v1379 和 v1380 通过针对 Raji B 细胞重定向的 CD4+ 和 CD8+ T 细胞介导抗体依赖性 B 细胞细胞毒性的能力。图 16B 至 16E 描绘针对 v875(图 16B 和图 16C)以及 v1379 和 v1380(图 16D 和图 16E)的标准化至人 IgG 的图 16A 中的数据图示,并且包括在每个测试抗体浓度下所指示的细胞毒性%。

[0063] 图 17A 至 17B :图 17A 示出 IL-2 活化的 PBMC 的 Fc 阻断导致靶 Raji B 细胞的细胞毒性%的较小降低 (v875) 或无降低 (v873)。图 17B 示出对于 v875 和 v873 来说,静止 PBMC 的 Fc 封闭导致靶 Raji B 细胞的细胞毒性%降低。

[0064] 图 18A 至 18B :图 18A 示出在针对 v875 和 v873 所测试的所有抗体浓度下,IL-2 活化的 PBMC 的 Fc 阻断导致靶 Raji B 细胞的细胞毒性%的降低。图 18B 示出在针对 v875 和 v873 所测试的所有抗体浓度下,静止 PBMC 的 Fc 阻断导致靶 Raji B 细胞的细胞毒性%的降低。

[0065] 图 19A 至 19B :图 19A 示出在 IL-2 活化的 CD8⁺ T 细胞作为效应子的情况下,v875 和 v873 引出针对靶 Raji B 细胞的 >30% 细胞毒性,并且在 3nM 浓度下观察到最大靶细胞杀死。图 19B 示出在静止 CD8⁺ T 细胞作为效应子的情况下,v875 和 v873 引出针对靶 Raji B 细胞的剂量依赖性 (>20%) 细胞毒性。

[0066] 图 20A 至 20B :图 20A 示出在 IL-2 活化的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的情况下,v875 的靶 Raji B 细胞细胞毒性。图 20B 示出在静止 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的情况下,v875 的靶 Raji B 细胞细胞毒性。

[0067] 图 21 示出,相对于未处理的培养基和人 IgG 对照,v875 和 v873 (300nM) 介导总静止 PBMC 和总 IL-2 活化的 PBMC 中的自体 B 细胞杀伤。

[0068] 图 22 示出,与 v873 和 v891 相比,相对于未处理的培养基和人 IgG 对照,v875 通过不损害更多的自体 T 细胞而具有更具选择性的 B 细胞杀伤。

[0069] 图 23A 至 23D :图 23A 示出 v875 对 IL-2 活化的细胞培养物中的 CD20⁺、CD4⁺、CD8⁺ 亚群的存活力的作用。图 23B 示出 v875 对静止细胞培养物中的 CD20⁺、CD4⁺、CD8⁺ 亚群的存活力的作用。图 23C 示出 v1379 和 v1380 对 IL-2 活化的细胞培养物中的 CD20⁺、CD4⁺、CD8⁺ 亚群的存活力的作用。图 23D 示出 v1379 和 v1380 对静止细胞培养物中的 CD20⁺、CD4⁺、CD8⁺ 亚群的存活力的作用。

[0070] 图 24A 至 24B :静止效应子和 Raji B 细胞中的抗体介导的 LDH 释放的结果在图 24A 中示出。活化的效应子中的抗体介导的 LDH 释放的结果在图 24B 中示出。

[0071] 图 25A 至 25D :图 25A 示出通过利妥昔单抗和通过本文所描述的具有 WT Fc 的异多聚体 (v875) (大约 40% 最大细胞溶解) 介导 ADCC。图 25B 示出为本文所描述的具有 WT Fc 的异多聚体 v1379 能够介导 ADCC,而具有 L234A_L235A 敲除 Fc 突变的 v1380 在靶向 Daudi B 细胞的 ADCC 中受损。图 25C 至 25D 示出与阳性对照利妥昔单抗相比,使用 v1380 和 v1379 (图 25C) 以及 v875 (图 25D) 进行的靶 Daudi B 细胞的 CDC 测定的结果。

[0072] 图 26 示出在 0.3nM 下,与人 IgG 相比,v875 和 v1380 不诱导 PBMC 增殖。图 26 的下图示出 100nM 抗体浓度的结果,并且示出相对于人 IgG, v875、v1380 和 v891 诱导更高的细胞增殖。图 26 (下图) 还示出在 100nM 下,在所有四种 PBMC 群体中 v875 具有与抗 -CD3 OKT3 相比类似的增殖指数。

[0073] 图 27A 至 27E :示出当与 v875 (WT Fc) 和 OKT3 相比时,v1380 (L234A_L235A Fc 敲除) 诱导更少的 TNF α 、INF γ 、IL-2、IL-4 以及 IL-10 细胞因子释放。来自如图 27A 至 27E 中所示的细胞因子测定的结果包括在用 0.3nM 浓度的测试项目孵育 4 天之后,PBMC 上清液 TNF α (图 27A)、INF γ (图 27B)、IL-2 (图 27C)、IL-4 (图 27D) 以及 IL-10 (图 27E) 水平的总图 (图 y 轴表示来自 4 个供体的 pg/mL 中的对数细胞因子水平)。

[0074] 图 28A 至 28B :示出在 4 天孵育时间点在不存在或存在纯化的 CD19⁺ B 细胞的情况下,来自 0.3nM 浓度(图 28A)和 100nM 浓度(图 28B)的 v875 诱导的对纯化的 CD8⁺ T 细胞的平均刺激指数的结果。

[0075] 图 29A 至 29B :示出在 4 天孵育时间点在不存在或存在纯化的 CD19⁺ B 细胞的情况下,来自 0.3nM 浓度(图 29A)和 100nM 浓度(图 29B)的 v1380 诱导的对纯化的 CD8⁺ T 细胞的平均刺激指数的结果。

[0076] 图 30A 至 30C :示出来自在 200X 和 400X 放大倍数下比较 v875 和人 IgG(3nM)的 T:B 细胞桥联显微图像的结果。图 30A 示出在 200X 放大倍数下的人 IgG 和 v875 的直接比较,并且示出与人 IgG 相比,Raji B 细胞与 Jurkat T 细胞之间可见的更高桥联量。图 30B 和图 30C 示出在 400X 放大倍数下的 v875(图 30B)和人 IgG(图 30C)的两个视场。

[0077] 图 31A 至 31B :图 31A 示出在蛋白质 A 和 SEC 纯化之后并且在 4°C 下储存 47 天之后,v875、v1380、v1379 和 v891 的 SDS-PAGE 分析和相对纯度。图 31B 示出在蛋白质 A 和 SEC 纯化之后,包括 v875、v1653、v1654、v1655、v1656、v1660、v1800 和 v1802 的另外示例性异多聚体的 SDS-PAGE 分析和相对纯度。

[0078] 图 32 示出 v875 的 Max Ent. 分子量曲线的 LC-MS 结果。

[0079] 图 33A 至 33C :示出本文所描述的异多聚体构建体的 DSC 结果,其示出 v875 具有 >76°C 的估计 CH₃T_m(图 33A),v1380 具有 >82.3°C 的估计 CH₃T_m,并且 v1379 具有 >82.5°C 的估计 CH₃T_m(图 33C)。

[0080] 图 34A 至 34C :示出通过 FACS 评定的本文所描述的异多聚体桥联 Raji B 细胞与 Jurkat T 细胞(B:T)的能力,以及 Raji:Raji B 细胞桥联(B:B)和 Jurkat:Jurkat T 细胞桥联(T:T)。图 34A 示出在三次实验重复内 v875、v1379、v1380、v891、v1381、商业 OKT3 以及人 IgG 的 T:B、B:B 和 T:T 桥联的量。图 34B 示出具有用于稳定性增强的工程化抗-CD3 弹头的变体(v1653、v1654、v1655、v1656、v1660、v1800、v1802)和 v875 以及人 IgG 的 T:B、B:B 和 T:T 桥联的量。图 34C 示出具有用于稳定性增强的工程化的抗-CD3 弹头的 Fc 敲除变体(v1666)或具有人/食蟹猴交叉反应性抗-CD3 和抗-CD19 scFv 的 Fc 敲除变体(v4541、v4543、v4545、v4548)、商业 OKT3 抗-CD3 对照、v2176 抗-CD19 对照和人 IgG 阴性对照的 T:B、B:B 和 T:T 桥联的量,并且所有变体介导低 T:T 桥联。

[0081] 图 35 示出如通过 ELISA 测定的本文所描述的异多聚体与人 CD3 的结合(上图)和与食蟹猴 CD3 受体的结合(下图)。

[0082] 图 36A 至 36B :分别示出展示双特异性和亲合力两者的 HER2/HER3 het-Fc 构建体的线性标度和对数标度的亲和力。

[0083] 图 37 描绘在 MALME-3M 细胞中与对照 1087 相比变体 1090 的结合,并且指示 v1090 对靶 MALME-3M 细胞具有与 v1087 类似的结合。

[0084] 发明详述

[0085] 除非另外定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语均具有与所要求保护的主体所属领域中的技术人员通常所理解的相同的含义。在本文的术语存在多个定义的情况下,以本章节中的那些为准。当提到一个 URL 或其它这种标识符或地址时,应了解这类标识符可以改变,并且互联网上的特定信息可以发生变动,但是等效信息可以通过搜索互联网来发现。对这类信息的援引显示了它们的可用性和公众传播。

[0086] 应了解上文一般描述与下文详细描述仅是示例性和解释性的,并且不限制所要求保护的任何主题。在本申请中,除非另外明确陈述,否则使用单数包括复数。

[0087] 除非本文明确不同地定义,否则由抗体技术领域中的技术人员所理解的术语各自被给予本领域中所获得的含义。抗体已知具有可变区、铰链区和恒定结构域。免疫球蛋白结构和功能综述于例如,Harlow等人编辑,Antibodies:A Laboratory Manual,第14章(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,1988)中。

[0088] 在本说明书中,除非另外指明,否则任何浓度范围、百分比范围、比例范围或整数范围应被理解为包括所列举范围内的任何整数值,并且在适当时其分数(如整数的十分之一和百分之一)。如本文所用,除非另外指明,“约”意指所指示范围、值、序列或结构的±10%。应理解,除非另外说明或由其上下文指定,术语“一个(a/an)”如本文所用是指所列举组分中的“一个或多个”。替代(例如,“或”)的使用应被理解为意指所述替代中的任一者、两者或其任何组合。如本文所用,术语“包括(include)”和“包含(comprise)”同义地使用。另外,应理解衍生自本文所描述的结构和取代基的不同组合的单独单链多肽或免疫球蛋白构建体由本申请公开,其公开程度就如同每个单链多肽或异二聚体单独地进行阐述。因此,选择具体组分以形成单独单链多肽或异二聚体在本公开的范围

[0089] 本文所用的章节标题仅出于组织性目的,并且不应解释为限制所描述的主题。本申请中引用的所有文献或文献的部分,包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍手册以及论文,皆据此出于任何目的以引用的方式明确地整体并入本文。

[0090] 应了解本文所描述的方法和组合物不限于本文所描述的特定方法、方案、细胞系、构建体和试剂,并且这些可变化。还应了解,本文所使用的术语仅出于描述具体实施方案的目的而不意图限制本文所描述的方法和组合物的范围,所述范围将仅受所附权利要求书限制。

[0091] 本文提及的所有公布和专利出于描述和公开例如在所述公布中描述的构建体和方法的目的以引用的方式整体并入本文,所述构建体和方法可结合本文所描述的方法、组合物和化合物使用。本文所论述的公布仅因其公开内容在本申请的提交日期之前而提供。本文的任何内容都不应解释为认可由于先前发明或出于任何其它原因而使本文所描述的发明者无权先于所述公开。

[0092] 在本申请中,氨基酸名称和原子名称(例如N、O、C等)如由蛋白质数据库(PDB)(www.pdb.org)所定义来使用,所述蛋白质数据库是基于IUPAC命名法(IUPAC Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides(残基名称、原子名称等),Eur. J. Biochem., 138, 9-37(1984)连同Eur. J. Biochem., 152, 1(1985)中的其修正。

[0093] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,以指氨基酸残基的聚合物。也就是说,针对多肽的描述同样适用于肽的描述和蛋白质的描述,反之亦然。所述术语适用于天然存在的氨基酸聚合物,以及其中一个或多个氨基酸残基是非天然编码的氨基酸的氨基酸聚合物。如本文所用,术语涵盖任何长度的氨基酸链,包括全长蛋白质,其中氨基酸残基通过共价肽键相连接。

[0094] 术语“核苷酸序列”意图指示两个或更多个核苷酸分子的连续段。核苷酸序列可具有基因组、cDNA、RNA、半合成或合成来源或其任何组合。

[0095] 术语“聚合酶链式反应”或“PCR”通常是指用于在体外扩增所需核苷酸序列的方

法,如描述于例如美国专利号 4,683,195 中。一般来说,PCR 方法涉及引物延伸合成的反复循环,其使用能够与模板核酸优先杂交的寡核苷酸引物。

[0096] “细胞”、“宿主细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”在本文中可互换使用,并且所有这类术语应被理解为包括由细胞的生长或培养产生的子代。“转化”和“转染”可互换用于指将 DNA 引入细胞中的过程。

[0097] 术语“氨基酸”是指天然存在的和非天然存在的氨基酸,以及以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然编码的氨基酸是 20 种常见氨基酸(丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸)以及吡咯赖氨酸和硒代半胱氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构(即,结合氢的 α 碳、羧基、氨基和 R 基),如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。所述类似物具有经过修饰的 R 基(如正亮氨酸)或经过修饰的肽主链,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。提及氨基酸包括,例如天然存在的蛋白质性 L-氨基酸;D-氨基酸;化学修饰的氨基酸,如氨基酸变体和衍生物;天然存在的非蛋白质性氨基酸,如 β -丙氨酸、鸟氨酸等;以及具有本领域已知的作为氨基酸的特征的性质的化学合成的化合物。非天然存在的氨基酸的实例包括但不限于, α -甲基氨基酸(例如 α -甲基丙氨酸)、D-氨基酸、组氨酸样氨基酸(例如,2-氨基-组氨酸、 β -羟基-组氨酸、高组氨酸)、在侧链中具有额外亚甲基的氨基酸(“高”氨基酸)、以及其中侧链中的羧酸官能团被磺酸基团置换的氨基酸(例如,半胱氨酸)。将非天然氨基酸,包括合成的非天然氨基酸、取代的氨基酸或一个或多个 D-氨基酸并入本发明的蛋白质中可以是多种不同的方式有利的。含有 D-氨基酸的肽等与含有 L-氨基酸的对应物相比表现出在体外或在体内增加的稳定性。因此,当需要或要求较大的细胞内稳定性时,并入 D-氨基酸的肽等的构建可以是特别有利的。更具体地说,D-肽等是对内源性肽酶和蛋白酶抗性的,从而在需要这类特性时提供改进的分子生物利用度以及延长的体内寿命。此外,D-肽等不能进行有效加工以用于向 T 辅助细胞进行 II 类主要组织相容性复合物限制的呈递,并且因此不太可能诱导完整生物体中的体液免疫应答。

[0098] 氨基酸可在本文以其通常已知的三字母符号或以由国际纯化学与应用化学联合会生物化学命名委员会(IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission)推荐的单字母符号表示。同样,核苷酸可以其通常公认的单字母代码表示。

[0099] “经过保守修饰的变体”适用于氨基酸和核酸序列两者。关于特定核酸序列,“经过保守修饰的变体”是指编码相同或基本上相同的氨基酸序列的那些核酸,或当核酸并不编码氨基酸序列时,是指基本上相同的序列。大量功能上相同的核酸由于遗传密码的简并性而对任何给定蛋白质进行编码。例如,密码子 GCA、GCC、GCG 以及 GCU 皆编码氨基酸丙氨酸。因此,在丙氨酸由密码子指定的每个位置处,密码子可以被改变成所描述的相应密码子中的任一个,而不改变所编码的多肽。所述核酸变异是“沉默变异”,其是一种经过保守修饰的变异的物种。本文中编码多肽的每个核酸序列还描述每种可能的核酸沉默变异。本领域的普通技术人员将认识到核酸中的各密码子(除了通常为甲硫氨酸的唯一密码子的 AUG 和通常为色氨酸的唯一密码子的 TGG 以外)可被修饰以获得功能上相同的分子。因此,编码多肽的核酸的每个沉默变异均暗含于每个描述的序列中。

[0100] 关于氨基酸序列,本领域的普通技术人员将认识到改变、添加或缺失编码序列中的单个氨基酸或小百分比的氨基酸的对于核酸、肽、多肽或蛋白质序列的个别取代、缺失或添加是“经过保守修饰的变体”,其中变化产生氨基酸的缺失、氨基酸的添加或氨基酸被化学上类似的氨基酸取代。提供功能相似的氨基酸的保守取代表是本领域中的普通技术人员已知的。所述保守性修饰的变体附加于并且不排除本发明的多态变体、种间同源物和等位基因。

[0101] 提供功能相似的氨基酸的保守取代表是本领域中的普通技术人员已知的。以下八组各自包含为彼此的保守性取代的氨基酸:

[0102] 1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G);

[0103] 2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);

[0104] 3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);

[0105] 4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);

[0106] 5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);

[0107] 6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);

[0108] 7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T);以及 [0139]8) 半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)

[0109] (参见,例如 Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W H Freeman&Co. ;第2版(1993年12月))

[0110] 术语“相同”或百分比“同一性”,在两种或更多种核酸或多肽序列的背景下是指两个或更多个序列或子序列是相同的。当在比较窗或指定区上针对最大对应进行比较和比对时,如使用以下序列比较算法中的一种(或对于本领域中的普通技术人员来说可供使用的其它算法)或通过人工比对和目视检查所测量,如果序列具有一定百分比的相同的氨基酸残基或核苷酸(即在指定区上约50%同一性、约55%同一性、60%同一性、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%或约95%同一性),那么所述序列是“大致上相同的”。此定义还指测试序列的补体。同一性可以存在于长度为至少约50个氨基酸或核苷酸的区上,或长度75至100个氨基酸或核苷酸的区上,或者在未指定的情况下,跨多核苷酸或多肽的整个序列存在。编码本发明的多肽的多核苷酸(包括来自除人以外的物种的同系物)可以通过包括以下步骤的方法来获得:在严格杂交条件下使用具有本发明的多核苷酸序列或其片段的标记的探针来筛选文库,以及分离含有所述多核苷酸序列的全长cDNA和基因组克隆。这类杂交技术是熟练的技术人员众所周知的。

[0111] 如果多肽的衍生物或变体的氨基酸序列与来自原始肽的一个100个氨基酸的序列具有至少50%同一性,则所述衍生物或变体被称为与所述肽共有“同源性”或“同源”的。在某些实施方案中,所述衍生物或变体与所述肽或所述肽的具有相同数目的氨基酸残基作为衍生物的片段的衍生物或变体至少75%相同。在某些实施方案中,所述衍生物或变体与所述肽或所述肽的具有相同数目的氨基酸残基作为衍生物的片段的衍生物或变体至少85%相同。在某些实施方案中,所述衍生物的氨基酸序列与所述肽或所述肽的具有相同数目的氨基酸残基作为衍生物的片段至少90%相同。在一些实施方案中,所述衍生物的氨基酸序列与所述肽或所述肽的具有相同数目的氨基酸残基作为衍生物的片段至少95%相同。某些实施方案中,所述衍生物或变体与所述肽或所述肽的具有相同数目的氨基酸残基作为衍生物的片段的衍生物或变体至少99%相同。

[0112] 术语“双特异性”意图包括具有两种不同的结合特异性的任何试剂,例如,异多聚体、单体、蛋白质、肽、或蛋白质或肽复合物。例如,在一些实施方案中,所述分子可以与以下各项结合或相互作用:(a) 细胞表面靶分子和 (b) 效应细胞表面上的 Fc 受体。在本文所描述的异多聚体的某些实施方案中,至少一个单体是双特异性的,其通过附接至同一转运蛋白多肽形成,两个货物分子具有不同的结合特异性。在本文所描述的异多聚体的某些实施方案中,所述异多聚体本身是双特异性的,其通过附接至转运蛋白多肽形成,至少两个货物分子具有不同的特异性。

[0113] 术语“多特异性”或“异种特异性”意图包括具有多于两种不同的结合特异性的任何试剂,例如,蛋白质、肽、或蛋白质或肽复合物。例如,分子可以与以下各项结合或相互作用:(a) 细胞表面靶分子如但不限于细胞表面抗原,(b) 效应细胞表面上的 Fc 受体,以及任选地 (c) 至少一种其它组分。因此,本文所描述的异多聚体的实施方案包括但不限于双特异性、三特异性、四特异性以及其它多特异性分子。在某些实施方案中,这些分子是针对细胞表面抗原,如 CD30;并且针对其它靶标,如效应细胞上的 Fc 受体。

[0114] 如本文所用,“分离的”异多聚体意指已经被鉴别并且从其天然细胞培养环境的组分中分离和/或回收的异多聚体。其天然环境的污染物组分是将干扰所述异多聚体的诊断或治疗用途的物质,并且可包括酶、激素和其它蛋白质或非蛋白质溶质。

[0115] 短语“选择性地(或特异性地)与……杂交”是指当特定核苷酸序列存在于复合物混合物(包括但不限于,总细胞或文库 DNA 或 RNA)中时,在严格杂交条件下分子仅与所述序列结合、形成双链(duplexing)或杂交。

[0116] 短语“严格杂交条件”是指 DNA、RNA 或其它核酸、或其组合的序列在低离子强度和高温条件下的杂交,如本领域中所已知。通常,在严格杂交条件下,探针将与核酸的复合物混合物(包括但不限于,总细胞或文库 DNA 或 RNA)中的其靶序列杂交,但不与所述复合物混合物中的其它序列杂交。严格条件是序列依赖性的并且在不同情况下将是不同的。较长序列在较高温度下特异性杂交。有关核酸杂交的深入指南见于 Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays"(1993)。

[0117] 如本文所用,“抗体”或“免疫球蛋白”是指基本上由特异性地结合和识别分析物(抗原)的一个或多个免疫球蛋白基因或其片段编码的多肽。已识别的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因,以及无数的免疫球蛋白可变区基因。轻链被分类为 κ 或 λ 。重链被分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,其进而分别定义了所述免疫球蛋白类别 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。

[0118] 示例性免疫球蛋白(抗体)结构单元由两对多肽链组成,每一对具有一个“轻链”(约 25kD)和一个“重链”(约 50-70kD)。每个链的 N-末端结构域定义具有约 100 至 110 个或更多个氨基酸的主要负责抗原识别的可变区。术语可变轻链(VL)和可变重链(VH)分别是指这些轻链结构域和重链结构域。IgG1 重链从 N 末端至 C 末端分别包含 VH、CH1、CH2 和 CH3 结构域。轻链从 N 末端至 C 末端包含 VL 和 CL 结构域。IgG1 重链在 CH1 结构域与 CH2 结构域之间包含一个铰链。在某些实施方案中,免疫球蛋白构建体包含来自连接至治疗性多肽的 IgG、IgM、IgA、IgD 或 IgE 的至少一个免疫球蛋白结构域。在一些实施方案

中,本文所提供的免疫球蛋白构建体中包含的免疫球蛋白结构域是来自基于免疫球蛋白的构建体,如双抗体或纳米抗体。在某些实施方案中,本文所描述的免疫球蛋白构建体包含来自重链抗体如骆驼科动物抗体的至少一个免疫球蛋白结构域。在某些实施方案中,本文所提供的免疫球蛋白构建体包含来自哺乳动物抗体如牛抗体、人抗体、骆驼科动物抗体、小鼠抗体或任何嵌合抗体的至少一个免疫球蛋白结构域。

[0119] 如本文所用,术语“抗原决定簇”与“抗原”和“表位”同义,并且是指抗原结合部分所结合、从而形成抗原结合部分-抗原复合物的多肽大分子上的位点(例如,氨基酸的连续段或由非连续氨基酸的不同区组成的构象构型)。有用的抗原决定簇可以被发现于例如肿瘤细胞的表面上、病毒感染的细胞的表面上、其它患病的细胞的表面上、免疫细胞的表面上、在血清中游离和/或细胞外基质(ECM)中。除非另外指明,在本文被称为抗原的蛋白质(例如,MCSP、FAP、CEA、EGFR、CD33、CD3)可以是来自任何脊椎动物来源的蛋白质的任何天然形式,所述脊椎动物包括哺乳动物如灵长类动物(例如,人)和啮齿类动物(例如小鼠和大鼠)。在特定实施方案中,抗原是人蛋白质。在提及本文的特定蛋白质的情况下,所述术语涵盖“全长的”、未加工的蛋白质以及从在细胞中加工而产生的任何形式的蛋白质。所述术语还涵盖天然存在的蛋白质变体,例如剪接变体、等位基因变体。适用作抗原的示例性人蛋白质包括但不限于:黑色素瘤相关的硫酸软骨素蛋白聚糖(MCSP),还被称为硫酸软骨素蛋白聚糖4(UniProt no. Q6UVK1(70版),NCBI RefSeq no. NP_001888.2);成纤维细胞活化蛋白(FAP),还被称为 Seprase(Uni Prot no. Q12884、Q86Z29、Q99998,NCBI 登录号 NP_004451);癌胚抗原(Carcinoembryonic antigen)(CEA),还被称为癌胚抗原相关的细胞粘附分子5(UniProt no. P06731(119版),NCBI RefSeq no. NP_004354.2);CD33,还被称为 gp67 或 Siglec-3(UniProt no. P20138,NCBI 登录号 NP_001076087、NP_001171079);表皮生长因子受体(EGFR),还被称为 ErbB-1 或 Her1(UniProt no. P0053,NCBI 登录号 NP_958439、NP_958440);以及 CD3,特别是 CD3 的 ϵ 亚基(参见对于人序列来说,UniProt no. P07766(130版),NCBI RefSeq no. NP_000724.1,SEQ ID NO:265;或对于猕猴[食蟹猴]序列来说,UniProt no. Q95LI5(49版),NCBI GenBank no. BAB71849.1,SEQ ID NO:266)。在某些实施方案中,本发明的 T 细胞活化双特异性抗原结合分子结合活化 T 细胞抗原或靶细胞抗原的表位,所述表位在来自不同物种的活化 T 细胞抗原或靶抗原之中是保守的。

[0120] “特异性结合”或“选择性结合”意指所述结合是针对所述抗原选择性的,并且可与不需要的或非特异性相互作用区别。抗原结合部分结合特异性抗原决定簇的能力可以通过酶联免疫吸附测定(ELISA)或本领域技术人员熟悉的其它技术,例如表面等离子体共振(SPR)技术(在 BIAcore 仪器上进行分析)(Liljebblad 等,Glyco J 17,323-329(2000))和传统结合测定(Heeley,Endocr Res 28,217-229(2002))来进行测量。在一个实施方案中,抗原结合部分与不相关的蛋白质的结合程度小于约 10%的所述抗原结合部分与所述抗原的结合,如例如通过 SPR 所测量的。在某些实施方案中,结合抗原的抗原结合部分或包含所述抗原结合部分的抗原结合分子具有的解离常数(K_D) $<1\ \mu\text{M}$ 、 $<100\text{nM}$ 、 $<10\text{nM}$ 、 $<1\text{nM}$ 、 $<0.1\text{nM}$ 、 $<0.01\text{nM}$ 或 $<0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更少,例如, 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如, 10^{-9}M 至 10^{-13}M)。

[0121] “亲和力”是指一个分子(例如,受体)的单一结合位点与它的结合配偶体(例如,配体)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指明,否则如本文所用,“结合亲和

力”是指反映结合对的成员（例如，抗原结合部分与抗原，或受体与其配体）之间的 1:1 相互作用的固有结合亲和力。分子 X 对它的配偶体 Y 的亲和力通常可以由解离常数 (K_D) 表示，所述解离常数是解离速率常数与缔合速率常数（分别 $k_{\text{解离}}$ 和 $k_{\text{缔合}}$ ）之比。因此，等效亲和力可以包括不同的速率常数，只要所述速率常数之比保持相同。可以通过本领域中已知的良好确立的方法来测量亲和力，包括本文所描述的那些方法。用于测量亲和力的特定方法是表面等离子体共振 (SPR)。

[0122] “降低的结合”，例如降低的与 Fc 受体的结合是指对相应相互作用的亲和力减少，例如通过 SPR 所测量。为清楚起见，所述术语还包括亲和力减少至零（或低于分析方法的检测限），即相互作用的完全消除。相反，“增加的结合”是指对相应相互作用的结合亲和力的增加。

[0123] 如本文所用“活化 T 细胞抗原”是指在 T 淋巴细胞（特别是细胞毒性 T 淋巴细胞）的表面上表达的抗原决定簇，所述抗原决定簇能够在与抗原结合分子相互作用时诱导 T 细胞活化。具体地说，抗原结合分子与活化 T 细胞抗原的相互作用可以通过触发 T 细胞受体复合物的信号传导级联来诱导 T 细胞活化。在一个具体实施方案中，所述活化 T 细胞抗原是 CD3。

[0124] 如本文所用的“T 细胞活化”是指 T 淋巴细胞、特别是细胞毒性 T 淋巴细胞的一种或多种细胞应答，所述细胞应答选自：增殖、分化、细胞因子分泌、细胞毒性效应分子释放、细胞毒性活性以及活化标记物的表达。本发明的 T 细胞活化双特异性抗原结合分子能够诱导 T 细胞活化。用于测量 T 细胞活化的适合测定是本文所描述的领域中已知的。

[0125] 如本文所用的“靶细胞抗原”是指靶细胞的表面上呈递的抗原决定簇，例如肿瘤（如癌细胞或肿瘤间质细胞）中的 B 细胞。如本文所用，关于抗原结合部分等的术语“第一”和“第二”是当存在多于一种每种类型的部分时为了方便区分而使用。这些术语的使用不意图赋予 T 细胞活化双特异性抗原结合分子的特定顺序或取向，除非如此明确地说明。

[0126] “Fab 分子”是指由免疫球蛋白的重链的 VH 和 CH1 结构域（“Fab 重链”）和轻链的 VL 和 CL 结构域（“Fab 轻链”）组成的蛋白质。

[0127] “融合”意指组分（例如 Fab 分子和 Fc 结构域亚基）通过肽键连接，直接地或通过一个或多个肽接头。

[0128] 如本文所用，术语“单链”是指包含通过肽键线性连接的氨基酸单体的分子。在某些实施方案中，抗原结合部分之一是单链 Fab 分子，即其中 Fab 轻链和 Fab 重链通过肽接头连接以形成单肽链的 Fab 分子。在一个具体的这种实施方案中，在单链 Fab 分子中 Fab 轻链的 C 末端连接至 Fab 重链的 N 末端。在某些其它实施方案中，抗原结合部分之一是单链 Fv 分子。

[0129] “交换 (crossover)”Fab 分子（还被称为“Crossfab”）意指其中交换 Fab 重链和轻链的可变区或恒定区的 Fab 分子，即交换 Fab 分子包含由轻链可变区和重链恒定区组成的肽链，和由重链可变区和轻链恒定区组成的肽链。为了清楚起见，在其中交换 Fab 轻链和 Fab 重链的可变区的交换 Fab 分子中，包含重链恒定区的肽链在本文被称为交换 Fab 分子的“重链”。相反，在其中交换 Fab 轻链和 Fab 重链的恒定区的交换 Fab 分子中，包含重链可变区的肽链在本文被称为交换 Fab 分子的“重链”。

[0130] “构架”或“FR”是指除高变区 (HVR) 残基以外的可变结构域残基。可变结构域的

FR 通常由四个 FR 结构域组成 :FR1、FR2、FR3 和 FR4。因此,HVR 序列和 FR 序列通常按以下顺序出现在 VH(或 VL) 中 :FR1-H1 (L1)-FR2-H2 (L2)-FR3-H3 (L3)-FR4。

[0131] 抗体或免疫球蛋白的“类别”是指由其重链具有的恒定结构域或恒定区的类型。存在五种主要类别的抗体 :IgA、IgD、IgE,

[0132] IgG 和 IgM, 并且这些中的若干可进一步分成亚类 (同种型), 例如 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁ 和 IgA₂。对应于免疫球蛋白的不同类别的重链恒定结构域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

[0133] 术语“Fc 结构域”或“Fc 区”在本文用于定义免疫球蛋白重链的 C 末端区域, 其包含恒定区的至少一部分。所述术语包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。虽然 IgG 重链的 Fc 区的边界可能略微变化, 但人 IgG 重链 Fc 区通常被定义为从 Cys226 或从 Pro230 延伸至重链的羧基末端。然而, Fc 区的 C 末端赖氨酸 (Lys447) 可以存在或可以不存在除非本文另外指明, 否则 Fc 区或恒定区中的氨基酸残基的编号是根据 EU 编号系统 (还被称为 EU 指数), 如 Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 中所描述。如本文所用 Fc 结构域的“亚基”是指形成二聚体 Fc 结构域的两个多肽中的一个, 即包含免疫球蛋白重链的 C 末端恒定区、能够稳定自缔合的多肽。例如, IgG Fc 结构域的亚基包含 IgG CH2 和 IgG CH3 恒定结构域。

[0134] “促进 Fc 结构域的第一和第二亚基的缔合的修饰”是对 Fc 结构域亚基的肽主链或翻译后修饰的操作, 所述操作减少或防止包含所述 Fc 结构域亚基的多肽与相同多肽缔合而形成同二聚体。如本文所用促进缔合的修饰具体地包括对希望缔合的两个 Fc 结构域亚基 (即 Fc 结构域的第一和第二亚基) 中的每一个进行的单独修饰, 其中所述修饰促进两个 Fc 结构域亚基的缔合和异二聚体的形成。例如, 在某些实施方案中, 促进缔合的修饰可以改变所述 Fc 结构域亚基中的一个或两个的结构或电荷, 以便使其缔合是有利的。

[0135] 术语“效应子功能”是指可归因于抗体的 Fc 区的那些生物活性, 其随抗体同种型而变化。抗体效应子功能的实例包括 :C1q 结合和补体依赖性细胞毒性 (CDC)、Fc 受体结合、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP)、细胞因子分泌、免疫复合物介导的抗原呈递细胞摄取抗原、细胞表面受体 (例如 B 细胞受体) 的下调以及 B 细胞活化。

[0136] 如本文所用, “白蛋白”统指具有白蛋白的一种或多种功能活性 (例如生物活性) 的白蛋白蛋白或氨基酸序列、或白蛋白区段或变体。具体地说, “白蛋白”是指人白蛋白或其区段 (参见例如, EP 201 239、EP 322 094、WO 97/24445、WO95/23857)、尤其是成熟形式的人白蛋白, 或来自其它脊椎动物的白蛋白或其区段, 或这些分子的类似物或变体或其片段。在某些实施方案中, 白蛋白是指白蛋白的截短型式。

[0137] 术语“准白蛋白”是指具有类似于全白蛋白的结构和 / 或功能的异多聚体分子, 并且其中所述异多聚体分子是由基于全白蛋白的序列设计的两个或更多个单体多肽的组装形成的。在某些实施方案中, 所述单体多肽是优先缔合为异多聚体对以形成准蛋白质的“区段”。在一些实施方案中, 准白蛋白具有 90% 的全白蛋白活性。在一些实施方案中, 准白蛋白具有 75% 的全白蛋白活性。在一个实施方案中, 准白蛋白具有 50% 的全白蛋白活性。在一些实施方案中, 准白蛋白具有 50% -75% 的全白蛋白活性。在一个实施方案中, 准白蛋白

具有 80% 的全白蛋白活性。在一些实施方案中, 准白蛋白具有 90% 的全白蛋白的结构, 如通过分子建模所确定。在一些实施方案中, 准白蛋白具有 80% 的全白蛋白的结构, 如通过分子建模所确定。在一些实施方案中, 准白蛋白具有 70% 的全白蛋白的结构, 如通过分子建模所确定。在一些实施方案中, 准白蛋白具有 50% 的全白蛋白的结构, 如通过分子建模所确定。在一些实施方案中, 准白蛋白具有 50% -75% 的全白蛋白的结构, 如通过分子建模所确定。

[0138] 术语人血清白蛋白 (HSA) 和人白蛋白 (HA) 在本文中可互换使用。术语“白蛋白和血清白蛋白”范围更广, 并且涵盖人血清白蛋白 (及其片段和变体) 以及来自其它物种的白蛋白 (及其片段和变体)。

[0139] 在某些实施方案中, 本文所描述的每个基于白蛋白的构建体是基于正常 HA 的变体。术语“变体”包括保守的或非保守的插入、缺失和取代, 其中这类变化大体上不改变白蛋白的一种或多种抗肿瘤 (oncotic) 特性、有用的配体结合特性和非免疫原性特性, 或赋予治疗性蛋白治疗活性的活性位点或活性结构域。

[0140] 在某些实施方案中, 本文所描述的分离的异多聚体构建体包括人白蛋白的天然存在的多态变体和人白蛋白的片段, 例如 EP 322 094 中所公开的那些片段 (即 HA (P_n), 其中 n 是 369 至 419)。

[0141] 在某些实施方案中, 白蛋白衍生自任何脊椎动物, 尤其是包括但不限于人、牛、绵羊、大鼠、小鼠、兔、马、狗或猪的任何哺乳动物。在某些实施方案中, 白蛋白衍生自非哺乳动物白蛋白, 包括但不限于母鸡和鲑鱼。

[0142] 人白蛋白的序列是如所示: SEQ ID NO: 1

[0143] MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRDRAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLV
NEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPPLPRLVRP
EVDVMCTAFHDNEETFLKLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASS
AKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQ
DSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV
VLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFELGGEYKFNALLVRYTKKVPQV
STPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTCKCTESLVNRRPCFSALEV
DETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF
AEEGKKLVAASQAALGL

[0144] “异白蛋白”是白蛋白的遗传变体。在某些实施方案中, 所述异白蛋白是人异白蛋白 (HAA)。已通过临床电泳过程中的群体遗传学调查或在供血者调查中鉴别了在电泳迁移率方面与白蛋白不同的异白蛋白。作为突变和迁移的标记物, 异白蛋白引起遗传学家、生物化学家和人类学家的兴趣, 但这些异白蛋白中的大多数都不与疾病相关 (Minchioti 等 Human Mutations 29(8), 1007-1016(2008))。

[0145] 表 1: 与 SEQ ID NO: 1 的 HA 相比, 由不同异白蛋白包含的取代的列表。热稳定性、半衰期信息以及其它 HAA 提供于 Krogh-hansen 等 Biochim Biophys Acta 1747, 81-88(2005); 和 W02011051489 (以引用的方式并入本文) 中。

[0146]

突变	热稳定性(°C) (正数=稳定, 负数=不稳定)	对半衰期的 作用 (变化%)
H3Y	N/A	N/A
H3Q	N/A	N/A
Q32 终止	N/A	N/A
E60K	N/A	N/A
D63N	6.07	N/A
L66P	N/A	N/A
E82K	2.03	N/A
R114G	N/A	N/A
R114 终止	N/A	N/A
E119K	N/A	N/A
V122E	0.57	N/A
H128R	N/A	N/A
Y140C	N/A	N/A
A175 终止	N/A	N/A
C177F	-1.59	N/A
R218H	N/A	N/A
R218P	N/A	N/A
K225Q*	-4.86	N/A

[0147]

K240E	N/A	
E244 终止	N/A	N/A
Q268R	N/A	N/A
D269G	3.67	N/A
K276N	4.87	N/A
K313N	-7.16	N/A
D314G	-0.38	N/A
D314V	N/A	N/A
N318K	N/A	N/A
A320T, & -1R	N/A	6.16
E321K	1.42	N/A
E333K	-2.56	N/A
E354K	N/A	N/A
E358K	N/A	N/A
K359K	-6.56	N/A
D365H	0.89	N/A
D365V	N/A	N/A
E368G	N/A	N/A
K372E	N/A	N/A
D375N	N/A	N/A
D375H	-0.09	N/A
E376K	N/A	N/A
E376Q	N/A	N/A
E382K	N/A	N/A
Q385 终止	N/A	N/A
Y401 终止	N/A	N/A
R410C	N/A	N/A
E479K	N/A	N/A

[0148]

D494N	N/A	
E501K	0.13	N/A
E505K	1.87	N/A
I513N	N/A	N/A
V533M	N/A	N/A
K536E	N/A	N/A
K541E	6.12	N/A
D550G	N/A	N/A
D550A	N/A	N/A
K560E	0.70	N/A
D563N	4.17	N/A
E565K	N/A	N/A
E570K	-6.53	N/A
K573E	2.08	2.7
K574N	N/A	N/A
L575 插入 (TCC CKSSCLRLITSHLKA SQPTMRIRERK)	-5.30	N/A
在 567 之后移码; 在 582 处终止	N/A	-5.7 %
在 572 之后移码; 在 578 处终止	N/A	-8.9 %

[0149] 术语“节段化”是指原始蛋白质序列的精确内部剪接,其产生优先缔合为异多聚体以形成准蛋白质的蛋白质序列的“区段”。

[0150] 准天然结构:

[0151] 参照天然蛋白质或其结构,准天然蛋白质和/或“准天然结构”呈现天然蛋白质样功能和结构特征。蛋白质是天然动力学分子并且展示结构构型的系综,但是将一种天然结构归属于它,如通过 X 射线晶体学所获得的一种天然结构。在所述蛋白质的几何形状的系综中观察到的替代结构构型可以被认为是相对于彼此或相对于在晶体中观察到的结构的

准天然结构。在不同角度,属于共同结构家族的同源蛋白质序列或蛋白质倾向于折叠成类似的结构几何形状。术语所述家族的成员蛋白质可以被认为实现相对于彼此的准天然结构。所述蛋白质家族中的一些独特序列也可以表现出类似的功能属性并且因此可以被称为相对于彼此的准天然蛋白质。在在此所描述的包含两个或更多个蛋白质构建体(各自具有转运蛋白多肽组分)的异多聚体的情况下,所述转运蛋白多肽组装以形成准天然结构。在这种情况下参考天然蛋白质是所述转运蛋白多肽所衍生自的蛋白质并且参考天然结构是所述转运蛋白多肽所衍生自的单体蛋白的结构。描述了一种情况,其中两个或更多个不同的多肽自组装以形成异多聚体结构并且表现出如同天然蛋白质(其本身是单体实体)的功能特征。在某些实施方案中提供包含衍生自白蛋白的转运蛋白多肽的异多聚体构建体,所述转运蛋白多肽自组装以形成异多聚体,所述异多聚体表现出天然白蛋白样功能特征,如 FcRn 结合和结构特征。这些异多聚体被称为是准天然的。

[0152] 如本文所描述的“CD3 复合物”是成熟 T 淋巴细胞中与彼此并且与 T 细胞受体非共价缔合的至少五个膜结合多肽的复合物。CD3 复合物包括 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 以及 η 链(还被称为亚基)。已经研发了针对这些链中的一些的非人单克隆抗体,如由鼠类抗体 OKT3、SP34、UCHT1 或 64.1 所例证。(参见例如,June 等, J. Immunol. 136:3945-3952(1986); Yang 等, J. Immunol. 137:1097-1100(1986); 以及 Hayward 等, Immunol. 64:87-92(1988))。某些 CD 抗原的表达高度局限于特定谱系。淋巴造血细胞并且在过去的几年内,针对淋巴特异性抗原的抗体已用于发展在体外或在动物模型中有效的治疗(5-13)。在此方面 CD19 已被证明是非常有用的靶标。CD19 表达于从原 B(pro B) 细胞至成熟 B 细胞的全 B 谱系中,它不脱落,在所有淋巴瘤细胞上均匀地表达,并且不存在于干细胞。

[0153] 如本文所用的术语“有效量”是指所施用的多特异性异多聚体构建体的量,所述量将在一定程度上缓解所治疗的疾病、病状或病症的一种或多种症状。含有本文所描述的多特异性异多聚体构建体的组合物可以被施用以用于预防性、增强和/或治疗性治疗。

[0154] 如本文所用,术语“工程化(engineer)、工程化的(engineered)、工程化的(engineering)”被视为包括对肽主链的任何操作或对天然存在或重组多肽或其片段的翻译后修饰。工程化包括氨基酸序列、糖基化模式或单个氨基酸的侧链基团的修饰,以及这些方法的组合。工程化的蛋白质通过标准分子生物学技术来表达和产生。

[0155] “分离的核酸分子或多核苷酸”意图是已从其天然环境中移除的核酸分子、DNA 或 RNA。例如,载体中所含有的编码多肽的重组多核苷酸被认为是分离的。分离的多核苷酸的其它实例包括维持在异源宿主细胞中的重组多核苷酸或溶液中的纯化(部分或实质性)的多核苷酸。分离的多核苷酸包括以下细胞中所含有的多核苷酸分子,所述细胞通常包含所述多核苷酸分子,但是所述多核苷酸分子存在于染色体外或存在于不同于其天然染色体位置的染色体位置处。分离的 RNA 分子包括体内或体外 RNA 转录物,以及正链和负链形式,以及双链形式。本文所描述的分离的多核苷酸或核酸还包括合成产生的所述分子。另外,在某些实施方案中,多核苷酸或核酸包括调控元件,如启动子、核糖体结合位点或转录终止子。

[0156] 具有与本发明的参考核苷酸序列至少(例如)95%“相同”的核苷酸序列的核酸或多核苷酸是意指所述多核苷酸的核苷酸序列与参考序列相同,除了所述多核苷酸序列可能包含参考核苷酸序列的每 100 个核苷酸最多五个点突变。换句话说,为了获得具有与参考核苷酸序列至少 95% 相同的核苷酸序列的多核苷酸,可使参考序列中至多 5% 的核苷酸缺

失或由另一核苷酸取代,或可将参考序列中全部核苷酸的至多 5% 的核苷酸数插入参考序列中。参考序列的这些改变可出现在参考核苷酸序列的 5' 或 3' 末端位置处或在那些末端位置之间的任何处,单独地散置在参考序列中的残基间或在参考序列内的一个或多个连续群组中。实际上,任何特定多核苷酸序列是否与本发明的核苷酸序列至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同可使用已知计算机程序(如以上针对多肽所讨论的那些计算机程序(例如 ALIGN-2)) 常规地确定。

[0157] 术语“表达盒”是指重组或合成产生的多核苷酸,所述多核苷酸具有允许特定核酸在靶细胞中转录的一系列指定的核酸元件。重组表达盒可以并入到质粒、染色体、线粒体 DNA、质体 DNA、病毒或核酸片段中。通常,表达载体的重组表达盒部分除了其它序列外还包括待转录的核酸序列和启动子。在某些实施方案中,本发明的表达盒包含编码本发明的双特异性抗原结合分子或其片段的多核苷酸序列。

[0158] 术语“载体”或“表达载体”与“表达构建体”同义,并且是指用于引入并指导与其可操作缔合的特定基因在靶细胞中的表达的 DNA 分子。所述术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及并入它所已经引入至其中的宿主细胞的基因组中的载体。本发明的表达载体包含表达盒。表达载体允许转录大量稳定的 mRNA。一旦表达载体位于靶细胞内部,就通过细胞转录和 / 或翻译机器产生由所述基因编码的核糖核酸分子或蛋白质。在一个实施方案中,本发明的表达载体包含表达盒,所述表达盒包含编码本发明的双特异性抗原结合分子或其片段的多核苷酸序列。

[0159] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,并且是指已引入外源核酸的细胞,包括这类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化细胞”,其包括原代转化细胞及自其衍生的子代,而不考虑传代数。在某些实施方案中,子代在核酸内容物方面不完全与亲本细胞相同,但可包含突变。本文包括具有如在原始转化细胞中所筛选或选择的相同功能或生物活性的突变子代。宿主细胞是可用于产生本发明的双特异性抗原结合分子的任何类型的细胞系统。宿主细胞包括培养的细胞,例如哺乳动物培养细胞,如 CHO 细胞、BHK 细胞、NS0 细胞、SP2/0 细胞、YO 骨髓瘤细胞、P3X63 小鼠骨髓瘤细胞、PER 细胞、PER.C6 细胞或杂交瘤细胞、酵母细胞、昆虫细胞以及植物细胞等,而且还包括在转基因动物、转基因植物或培养的植物或动物组织内所包含的细胞。

[0160] “活化 Fc 受体”是在被抗体的 Fc 结构域接合后引出刺激携带所述受体的细胞执行效应子功能的信号传导事件的 Fc 受体。人活化 Fc 受体包括 Fc γ RIIIa (CD 16a)、Fc γ RI (CD64) 和 Fc γ RIIa (CD32)。

[0161] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 是导致免疫效应细胞溶解抗体包覆的靶细胞的免疫机制。靶细胞是包含 Fc 区的抗体或其衍生物通常通过 Fc 区的 N 端的蛋白质部分所特异性地结合的细胞。如本文所用,术语“降低的 ADCC”被定义为在靶细胞周围的介质中给定抗体浓度下,在给定时间内,通过上文定义的 ADCC 机制溶解的靶细胞数目的减少,和 / 或在给定的时间内通过 ADCC 机制实现给定数目的靶细胞的溶解所需的靶细胞周围介质中抗体浓度的增加。ADCC 的降低是相对于由使用相同的标准产生、纯化、配制和储存方法(所述方法是本领域技术人员所已知的)由相同类型的宿主细胞产生、但尚未工程化的同一抗体介导的 ADCC 而言。例如,由在其 Fc 结构域中包含降低 ADCC 的氨基酸取代的抗体介导的 ADCC 的降低是相对于在 Fc 结构域中无此氨基酸取代的同一抗体介导的 ADCC 而言。

[0162] 药剂如本文所描述的多特异性异多聚体的“有效量”是指在它所施用至的细胞或组织中产生生理变化所需的量。

[0163] 药剂,例如包含本文所描述的多特异性异多聚体的药物组合物的“治疗有效量”是指在必要的剂量和时段下有效实现所需治疗或预防结果的量。药剂的治疗有效量例如消除、减少、延迟、最小化或预防疾病的不良作用。

[0164] “个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于家养动物(例如牛、绵羊、猫、狗和马)、灵长类动物(例如人和非人灵长类,如猴)、兔和啮齿类动物(例如小鼠和大鼠)。具体地,所述个体或受试者是人。

[0165] 术语“药物组合物”是指处于允许其中所包含的多特异性异多聚体构建体的生物活性有效的形式并且不含对将向其施用所述制剂的受试者具有不可接受的毒性的另外组分的制剂。

[0166] “药学上可接受的载体”是指药物组合物中除活性成分以外的成分,所述成分对受试者无毒性。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0167] 如本文所用,“治疗(treatment)”(及其语法变化形式,如“治疗(treat)”或“治疗(treating)”)是指试图改变所治疗的个体的疾病的自然过程的临床干预,并且可以为了预防而进行或在临床病理学的过程中进行。希望的治疗作用包括但不限于,预防疾病的发生或复发、减轻症状、降低疾病的任何直接或间接病理学后果、预防转移、减缓疾病进展的速度、改善或缓和疾病状态、以及缓解或改善的预后。在一些实施方案中,本文所描述的多特异性异多聚体构建体用于延迟疾病的发展或减慢疾病的进展。术语“说明书”用来指通常包括在治疗产品的商业包装中的说明书,其含有关于适应症、用法、剂量、施用、组合法、禁忌症的信息和/或关于使用这类治疗产品的警告。

[0168] 如本文所用,术语“交叉物种结合”或“种间结合”意指本文所描述的结合结构域与人和其它生物体(例如但不限于非黑猩猩灵长类)中的相同靶分子的结合。因此,“交叉物种结合”或“种间结合”应被理解为与在不同物种中表达的相同分子“X”(即同源物)而不是与不同于“X”的分子的种间反应性。识别例如人 CD3 ϵ 的单克隆抗体与非黑猩猩灵长类 CD3 ϵ (例如猕猴 CD3 ϵ)的交叉物种特异性可例如通过 FACS 分析来测定。FACS 分析是按以下方式进行:将相应单克隆抗体针对与分别表达所述人 CD3 ϵ 抗原和非黑猩猩灵长类 CD3 ϵ 抗原的人细胞和非黑猩猩灵长类细胞(例如猕猴细胞)的结合进行测试。适当的测定在以下实施例中示出。上述主题加以必要的变更适用于 PSCA、CD19、C-MET、内皮唾液酸蛋白、EpCAM、IGF-1R 以及 FAP α 抗原;识别例如人 PSCA、CD19、C-MET、内皮唾液酸蛋白、EpCAM、IGF-1R 或 FAP α 的单克隆抗体与非黑猩猩灵长类 PSCA、CD19、C-MET、内皮唾液酸蛋白、EpCAM、IGF-1R 或 FAP α (例如猕猴 PSCA、CD19、C-MET、内皮唾液酸蛋白、EpCAM、IGF-1R 或 FAP α)的交叉物种特异性可例如通过 FACS 分析来测定。FACS 分析是按以下方式进行:将相应单克隆抗体针对与分别表达所述人和非黑猩猩灵长类 PSCA、CD19、C-MET、内皮唾液酸蛋白、EpCAM、IGF-1R 或 FAP α 抗原的人细胞和非黑猩猩灵长类细胞(例如猕猴细胞)的结合进行测试。

[0169] 某些实施方案的详述

[0170] 基于免疫球蛋白的多特异性异多聚体构建体:

[0171] 本文提供包含以下各项的分离的多特异性异多聚体构建体:第一多肽构建体,其

包含第一重链多肽和结合至少一种表达 CD3 的细胞上的 CD3 复合物的 CD3 结合多肽构建体；以及第二多肽构建体，其包含与所述第一重链多肽不同的第二重链多肽和结合至少一种 B 细胞上的靶抗原的抗原结合多肽构建体，其中：所述 CD3 结合多肽构建体和所述抗原结合多肽构建体中的至少一个包含单链 Fv 区；所述多特异性异多聚体构建体同时接合所述至少一种 B 细胞和所述至少一种表达 CD3 的细胞，以使得所述表达 CD3 的细胞被活化，从而诱导所述 B 细胞的杀伤；并且所述第一和第二重链多肽形成包含变体免疫球蛋白 CH3 区的异二聚体 Fc 区，所述变体免疫球蛋白 CH3 区包含促进所述异二聚体 Fc 的形成的至少一个氨基酸突变，所述异二聚体 Fc 被形成为具有至少比得上天然同二聚体 Fc 的稳定性并且具有纯度，所述纯度使得当所述多特异性异多聚体构建体由哺乳动物细胞表达于表达产物中时，所述表达产物包含至少约 70% 的所述多特异性异多聚体和小于 10% 的所述第一或第二多肽构建体的单体或同二聚体。在一些实施方案中，所述表达产物包含至少约 75% 的所述多特异性异多聚体和小于 15% 的所述第一或第二多肽构建体的单体或同二聚体。在某些实施方案中，所述表达产物包含至少约 80% 的所述多特异性异多聚体和小于 10% 的所述第一或第二多肽构建体的单体或同二聚体。在另外的实施方案中，所述表达产物包含至少约 85% 的所述多特异性异多聚体和小于 10% 的所述第一或第二多肽构建体的单体或同二聚体。在另一实施方案中，所述表达产物包含至少约 90% 的所述多特异性异多聚体和小于 10% 的所述第一或第二多肽构建体的单体或同二聚体。

[0172] 在某些实施方案中是分离的多特异性异多聚体构建体，其中所述第一或第二多肽构建体缺乏免疫球蛋白轻链和免疫球蛋白第一恒定 (CH1) 区中的至少一个。

[0173] 在某些实施方案中提供一种包含以下各项的分离的多特异性异多聚体构建体：第一多肽构建体，其包含第一重链多肽和结合至少一种表达 CD3 的细胞上的 CD3 复合物的 CD3 结合多肽构建体；第二多肽构建体，其包含与所述第一重链多肽不同的第二重链多肽，并且其中所述第二多肽构建体不包含结合 B 细胞上的靶抗原的抗原结合多肽构建体；其中：所述多特异性异多聚体构建体同时接合至少一种 B 细胞和所述至少一种表达 CD3 的细胞，以使得所述表达 CD3 的细胞被活化，从而诱导所述 B 细胞的杀伤；并且所述第一和第二重链多肽形成包含变体免疫球蛋白 CH3 区的异二聚体 Fc 区，所述变体免疫球蛋白 CH3 区包含促进所述异二聚体 Fc 的形成的至少一个氨基酸突变，其中：所述异二聚体 Fc 被形成为具有至少比得上天然同二聚体 Fc 的稳定性，并且所述异二聚体 Fc 被形成为具有纯度，所述纯度使得当所述多特异性异多聚体构建体由稳定哺乳动物细胞表达于表达产物中时，所述表达产物包含至少约 75% 的所述多特异性异多聚体和小于 10% 的所述第一或第二多肽构建体的单体或同二聚体。在一些实施方案中，所述异二聚体 Fc 与细胞表面受体如 B 细胞上的 FcγRIIb 相互作用。在某些实施方案中，所述异二聚体 Fc 被工程化以便相对于正常抗体优先与 FcγRIIb 受体相互作用。

[0174] 本文提供一种包含以下各项的分离的多特异性异多聚体构建体：第一多肽构建体，其包含第一重链多肽和结合至少一种表达 CD3 的细胞上的 CD3 复合物的 CD3 结合多肽构建体；第二多肽构建体，其包含与所述第一重链多肽不同的第二重链多肽和表现出可忽略不计的受体结合的空间调节剂构建体；其中：所述多特异性异多聚体构建体同时接合至少一种 B 细胞和所述至少一种表达 CD3 的细胞，以使得所述表达 CD3 的细胞被活化，从而诱导所述 B 细胞的杀伤；并且所述第一和第二重链多肽形成包含变体免疫球蛋白 CH3 区的异

二聚体 Fc 区,所述变体免疫球蛋白 CH3 区包含促进所述异二聚体 Fc 的形成的至少一个氨基酸突变,其中:所述异二聚体 Fc 被形成为具有至少比得上天然同二聚体 Fc 的稳定性,并且所述异二聚体 Fc 被形成为具有纯度,所述纯度使得当所述多特异性异多聚体构建体由稳定哺乳动物细胞共表达于表达产物中时,所述表达产物包含至少约 75%的所述多特异性异多聚体和小于 10%的所述第一或第二多肽构建体的单体或同二聚体。在某些实施方案中,所述空间调节剂构建体实际上不能结合任何已知的靶组织或细胞表面,并且因此充当在所述多特异性异多聚体构建体的相互作用中仅起空间调节作用的虚拟多肽臂。在一些实施方案中,所述空间调节剂构建体是在多特异性异多聚体结合 T 细胞和 / 或 B 细胞时帮助调节所述多聚体的空间特征的多肽序列。在某些实施方案中,所述空间调节剂构建体包含从头设计的多肽结构域。在某些实施方案中,所述空间调节剂构建体包含通过对已知多肽结构域进行工程化以去除其结合特性所获得的多肽结构域。例如,在某些实施方案中,所述空间调节剂构建体包含工程化的 Fab 区或其片段,所述 Fab 区或其片段被工程化以去除结合特性。

[0175] 提供一种包含以下各项的分离的多特异性异多聚体构建体:第一多肽构建体,其包含第一重链多肽和结合至少一种表达 CD3 的细胞上的 CD3 复合物的 CD3 结合多肽构建体;第二多肽构建体,其包含与所述第一重链多肽不同的第二重链多肽,并且其中所述第二多肽构建体不包含抗原结合多肽构建体;其中:所述多特异性异多聚体构建体同时接合至少一种 B 细胞和所述至少一种表达 CD3 的细胞,以使得所述表达 CD3 的细胞被活化,从而诱导所述 B 细胞的杀伤;并且所述第一和第二重链多肽形成包含变体免疫球蛋白 CH3 区的异二聚体 Fc 区,所述变体免疫球蛋白 CH3 区包含促进所述异二聚体 Fc 的形成的至少一个氨基酸突变,其中:所述异二聚体 Fc 被形成为具有至少比得上天然同二聚体 Fc 的稳定性,并且所述异二聚体 Fc 被形成为具有纯度,所述纯度使得当所述多特异性异多聚体构建体由稳定哺乳动物细胞共表达于表达产物中时,所述表达产物包含至少约 75%的所述多特异性异多聚体和小于 10%的所述第一或第二多肽构建体的单体或同二聚体。

[0176] 在一些实施方案中是本文所描述的分离的多特异性异多聚体构建体,其中所述异二聚体 Fc 区包含变体 CH2 结构域或铰链,所述变体 CH2 结构域或铰链包含阻止与所有 Fc γ 受体的功能有效结合的氨基酸修饰。

[0177] 提供分离的多特异性异多聚体构建体,所述多特异性异多聚体构建体以大于一的效价结合至少一种 B 细胞,并且同时接合所述至少一种 B 细胞和至少一种表达 CD3 的细胞,以使得表达 CD3 的细胞被活化,从而诱导所述 B 细胞的杀伤。在某些实施方案中,所述多特异性异多聚体构建体包含:第一多肽构建体,其包含第一重链多肽和结合至少一种表达 CD3 的细胞上的 CD3 复合物的 CD3 结合多肽构建体;和第二多肽构建体,其包含与所述第一重链多肽不同的第二重链多肽和结合至少一种 B 细胞上的靶抗原的抗原结合多肽构建体;其中:所述 CD3 结合多肽构建体和所述抗原结合多肽构建体中的至少一个任选地包含单链 Fv 区;所述第一和第二重链多肽形成包含变体免疫球蛋白 CH3 区的异二聚体 Fc 区,所述变体免疫球蛋白 CH3 区包含促进所述异二聚体 Fc 的形成的至少一个氨基酸突变,所述异二聚体 Fc 具有至少比得上天然同二聚体 Fc 的稳定性并且具有纯度,所述纯度使得当所述多特异性异多聚体构建体由哺乳动物细胞表达于表达产物中时,所述表达产物包含大于 75%的所述多特异性异多聚体和小于 10%的所述第一或第二多肽构建体的单体或同二聚体。所述

多特异性异多聚体构建体能够通过所述第二重链上的所述抗原结合多肽构建体与 B 细胞相互作用以及通过所述异二聚体 Fc 与 B 细胞上的 FcγRIIb 受体相互作用,以在 B 细胞接合过程中显示大于一的效价。

[0178] 在某些实施方案中是本文所描述的分离的多特异性异多聚体,其中所述异二聚体 Fc 区包含变体 CH2 结构域,所述变体 CH2 结构域包含氨基酸修饰以促进 Fcγ 受体的选择性结合。

[0179] 在一些实施方案中是异多聚体,其中与野生型 CH2 结构域相比,所述变体 CH2 结构域选择性地结合 Fcγ IIIa 和 Fcγ IIb 受体中的至少一个。

[0180] 在某些实施方案中是一种本文所描述的分离的多特异性异多聚体构建体,其中所述异二聚体 Fc 是糖基化的。

[0181] 在一些实施方案中是一种本文所描述的分离的多特异性异多聚体,其中所述异二聚体 Fc 是无岩藻糖基化的。

[0182] 在某些实施方案中是一种本文所描述的分离的多特异性异多聚体构建体,其中所述异二聚体 Fc 是无糖基化的。

[0183] 促进异二聚化的 Fc 区修饰:

[0184] 本文提供包含与 Fc 结构域的两个亚基中的一个或另一个融合的不同抗原结合部分的多特异性异多聚体构建体,因此所述 Fc 结构域的两个亚基通常包含两个不相同的多肽链。为了改进本文所描述的异多聚体的产率和纯度,对所述多肽的 Fc 区进行修饰以促进所需多肽的缔合。

[0185] 在一些实施方案中,本文所描述的异多聚体构建体的第一和第二重链多肽形成包含变体免疫球蛋白 CH3 区的异二聚体 Fc 区,所述变体免疫球蛋白 CH3 区包含促进所述异二聚体 Fc 的形成的至少一个氨基酸突变,所述异二聚体 Fc 被形成为具有至少比得上天然同二聚体 Fc 的稳定性,并且具有纯度,所述纯度使得当所述多特异性异多聚体构建体由哺乳动物细胞共表达作为表达产物时,所述表达产物包含至少约 75% 的所述多特异性异多聚体和小于 10% 的所述第一或第二多肽构建体的单体或同二聚体。

[0186] 在一些实施方案中,本文所描述的异多聚体构建体的第一和第二重链多肽形成包含变体免疫球蛋白 CH3 区的异二聚体 Fc 区,所述变体免疫球蛋白 CH3 区包含促进所述异二聚体 Fc 的形成的至少一个氨基酸突变,所述异二聚体 Fc 被形成为具有至少比得上天然同二聚体 Fc 的稳定性,并且具有纯度,所述纯度使得当所述多特异性异多聚体构建体由哺乳动物细胞共表达作为表达产物时,所述表达产物包含至少约 90% 的所述多特异性异多聚体和小于 10% 的所述第一或第二多肽构建体的单体或同二聚体。

[0187] 在一些实施方案中,本文所描述的异多聚体构建体的第一和第二重链多肽形成包含变体免疫球蛋白 CH3 区的异二聚体 Fc 区,所述变体免疫球蛋白 CH3 区包含促进所述异二聚体 Fc 的形成的至少一个氨基酸突变,所述异二聚体 Fc 被形成为具有至少比得上天然同二聚体 Fc 的稳定性,并且具有纯度,所述纯度使得当所述多特异性异多聚体构建体由哺乳动物细胞共表达作为表达产物时,所述表达产物包含至少约 95% 的所述多特异性异多聚体和小于 10% 的所述第一或第二多肽构建体的单体或同二聚体。

[0188] 在一些实施方案中是本文所提供的分离的多特异性异多聚体,其中所述变体 CH3 结构域具有约 73°C 或更大的熔解温度 (T_m)。

[0189] 在某些实施方案中是本文所描述的分离的多特异性异多聚体,其中所述异二聚体 Fc 区被形成为具有大于约 78% 的纯度。

[0190] 在一个实施方案中是本文所描述的分离的多特异性异多聚体,其中所述异二聚体 Fc 区被形成为具有至少约 78% 或更大的纯度并且 T_m 是至少约 75°C。

[0191] 在一些实施方案中是本文所描述的分离的多特异性异多聚体,其中所述异二聚体 Fc 区被形成为具有至少约 75% 的纯度并且 T_m 是约 75°C 或更高。

[0192] 在某些实施方案中提供分离的多特异性异多聚体构建体,其中:a) 所述第一重链多肽的变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 L351Y、F405A 和 Y407V,并且所述第二转运蛋白多肽的变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 T366L、K392M 和 T394W;b) 所述第一重链多肽的变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 L351Y、F405A 和 Y407V,并且所述第二重链多肽的变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 T366L、K392L 和 T394W;c) 所述第一重链多肽的变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 T350V、L351Y、F405A 以及 Y407V,并且所述第二重链多肽的变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 T350V、T366L、K392M 以及 T394W;d) 所述第一重链多肽的变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 T350V、L351Y、F405A 以及 Y407V,并且所述第二重链多肽的变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 T350V、T366L、K392L 以及 T394W;e) 所述第一重链多肽的变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 T366L、N390R、K392R 以及 T394W,并且所述第二重链多肽的变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 L351Y、S400E、F405A 以及 Y407V;或 f) 所述第一重链多肽的变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 T350V、T366L、N390R、K392R 以及 T394W,并且所述第二重链多肽的变体 CH3 序列包含氨基酸修饰 T350V、L351Y、S400E、F405A 以及 Y407V。

[0193] 降低 Fc 受体结合和 / 或效应子功能的 Fc 区修饰:

[0194] 在某些实施方案中,本文所描述的异多聚体构建体的 Fc 区包含变体 CH2 结构域,所述变体 CH2 结构域包含氨基酸修饰以促进 Fc γ 受体的选择性结合。在一些实施方案中,本文所描述的分离的多特异性异多聚体包含变体 CH2 结构域,所述变体 CH2 结构域以大于野生型 CH2 结构域结合 Fc γ IIb 受体的亲和力选择性地结合 Fc γ IIb 受体。在一些实施方案中,本文所描述的分离的多特异性异多聚体包含变体 CH2 结构域,所述变体 CH2 结构域以大于野生型 CH2 结构域结合 Fc γ IIA 和 / 或 Fc γ IIIA 受体的亲和力选择性地结合 Fc γ IIA 和 / 或 Fc γ IIIA 受体。

[0195] 在某些实施方案中,本文所描述的异多聚体构建体的 Fc 区与 na 天然 IgG1 Fc 区相比表现出降低的与 Fc 受体的结合亲和力和 / 或降低的效应子功能。在一个这种实施方案中,所述 Fc 区与天然 IgG1 Fc 区相比表现出小于 50%、或者小于 20%、或者小于 10% 并且在一些实施方案中小于 5% 的与 Fc 受体的结合亲和力,和 / 或与天然 IgG1 Fc 区相比小于 50%、或者小于 20%、或者小于 10% 并且在一些实施方案中小于 5% 的效应子功能。

[0196] 在一个实施方案中,本文所描述的异多聚体构建体的 Fc 区大体上不结合 Fc 受体或诱导可观量的效应子功能。在某些实施方案中,所述 Fc 受体是 Fc γ 受体。在一个实施方案中,所述 Fc 受体是哺乳动物 Fc 受体。在某些实施方案中,所述哺乳动物 Fc 受体是人 Fc 受体。在一个实施方案中,所述 Fc 受体是活化 Fc 受体。在一个具体实施方案中,所述 Fc 受体是活化人 Fc γ 受体,更具体地说人 Fc γ RIIIa、Fc γ RI 或 Fc γ RIIa,最具体地人 Fc γ RIIIa。在一个实施方案中,所述效应子功能是选自 CDC、ADCC、ADCP 以及细胞因子分泌组成的组的一种或多种功能。在一个具体实施方案中,所述效应子功能是 ADCC。在一个

实施方案中,所述 Fc 区表现出与新生 Fc 受体 (FcRn) 的结合亲和力。在某些实施方案中,所述 FcRn 结合亲和力大体上类似于天然 IgG1 Fc 的结合亲和力。在一些实施方案中,当本文所描述的异多聚体构建体的 Fc 区表现出大于约 70%、或在一些实施方案中大于约 80%、并且在一些具体实施方案中大于约 90%的天然 IgG1 Fc 结构域与 FcRn 的结合亲和力时,实现与 FcRn 的大体上类似的结合。

[0197] 在某些实施方案中,本文所描述的异多聚体构建体的 Fc 区被工程化以便与非工程化的 Fc 结构域相比具有降低的与 Fc 受体的结合亲和力和 / 或降低的效应子功能。在一些实施方案中,工程化的突变存在于下游铰链 (lower hinge) 和 CH2 结构域中。在具体实施方案中,本文所描述的异多聚体的 Fc 区包含降低所述 Fc 区与 Fc 受体的结合亲和力和 / 或效应子功能的一个或多个氨基酸突变。在一些实施方案中,相同的一个或多个氨基酸突变存在于所述 Fc 区的两个亚基的每个中。在一些实施方案中,将不同的氨基酸突变引入所述 Fc 区的两个亚基的每个中。在一个实施方案中,氨基酸突变降低所述 Fc 区与 Fc 受体的结合亲和力。在一个实施方案中,氨基酸突变使所述 Fc 区与 Fc 受体的结合亲和力降低至少 2 倍,或在一些实施方案中至少 5 倍,或在一个实施方案中至少 10 倍。在某些实施方案中,在存在多于一个降低所述 Fc 区与 Fc 受体的结合亲和力的氨基酸突变的情况下,这些氨基酸突变的组合使所述 Fc 区与 Fc 受体的结合亲和力降低至少 10 倍,或在一些实施方案中至少 20 倍,或在某些实施方案中至少 50 倍。在某些实施方案中,所述 Fc 区对于所述 Fc 受体的结合亲和力被降低至一定程度,其中在如使用 SPR 仪器的标准结合测定中不再存在突变 Fc 对于所述 Fc 受体的任何可检测的结合。在一个实施方案中,本文所描述的包含工程化 Fc 结构域的异多聚体构建体与包含未工程化来降低与 Fc 受体的结合的 Fc 结构域的对构建体相比表现出小于 20%,并且在某些实施方案中小于 10%,并且在选择实施方案中小于 5%的与 Fc 受体的结合亲和力。在一个具体实施方案中,所述 Fc 受体是 Fc 受体。在一些实施方案中,所述 Fc 受体是人 Fc 受体。在一些实施方案中,所述 Fc 受体是活化 Fc 受体。在一个具体实施方案中,所述 Fc 受体是活化人 Fc γ 受体,在某些实施方案中其是人 Fc γ RIIIa、Fc γ RI 和 Fc γ RIIa 中的一个。在一些实施方案中,与这些受体中的每一个的结合被降低。在一些实施方案中,与补体组分例如但不限于 C1q 的结合亲和力也被降低。在一个实施方案中,与新生 Fc 受体 (FcRn) 的结合亲和力未被降低。在某些实施方案中,本文所描述的异多聚体的 Fc 区被工程化以便与非工程化的 Fc 区相比具有降低的效应子功能。在某些实施方案中,降低的效应子功能可以包括但不限于以下中的一个或多个:降低的补体依赖性细胞毒性 (CDC)、降低的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)、降低的抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP)、降低的细胞因子分泌、降低的免疫复合物介导的抗原呈递细胞摄取抗原、降低的与 NK 细胞的结合、降低的与巨噬细胞的结合、降低的与单核细胞的结合、降低的与多形核细胞的结合、降低的诱导细胞凋亡的直接信号传导、降低的靶结核抗体的交联、降低的树突细胞成熟或降低的 T 细胞引发。在一个实施方案中,降低的效应子功能是选自降低的 CDC、降低的 ADCC、降低的 ADCP 以及降低的细胞因子分泌的组中的一个或多个。在某些实施方案中,降低的效应子功能是降低的 ADCC。在一个实施方案中,降低的 ADCC 是小于 20%的由非工程化 Fc 结构域 (或包含非工程化 Fc 结构域的 T 细胞活化双特异性抗原结合分子) 诱导的 ADCC。在另一个实施方案中,降低的 ADCC 是小于 50%的由非工程化 Fc 结构域 (或包含非工程化 Fc 结构域的 T 细胞活化双特异性抗原结合分子) 诱导的 ADCC。在

另一实施方案中,降低的 ADCC 是小于 10% 的由非工程化 Fc 结构域(或包含非工程化 Fc 结构域的 T 细胞活化双特异性抗原结合分子)诱导的 ADCC。

[0198] 在某些实施方案中是本文所描述的分离的多特异性异多聚体,其中所述异二聚体 Fc 区包含变体 CH2 结构域,所述变体 CH2 结构域包含氨基酸修饰以促进如本文所描述的 Fc γ 受体的选择性结合。

[0199] 在一些实施方案中是本文所描述的分离的多特异性异多聚体,其中与野生型 CH2 结构域相比,所述变体 CH2 结构域选择性地结合 Fc γ IIIa 和 Fc γ IIb 受体中的至少一个。

[0200] 在某些实施方案中,所述多特异性异多聚体构建体包含结合至少一种 B 细胞的变体 CH2 区,以使得所述异多聚体构建体以大于一的效价结合 B 细胞。

[0201] 基于白蛋白的多特异性异多聚体构建体:

[0202] 提供分离的多特异性异多聚体构建体,其包含:第一多肽构建体,其包含与结合至少一种表达 CD3 的细胞上的 CD3 复合物的至少一种 CD3 结合多肽构建体融合的第一转运蛋白多肽;第二多肽构建体,其包含与结合至少一种 B 细胞上的靶抗原的至少一种抗原结合多肽构建体融合的、与所述第一转运蛋白多肽不同的第二转运蛋白多肽;其中所述第一和第二转运蛋白多肽通过一种蛋白质的节段化而衍生自所述蛋白质,每个转运蛋白多肽包含与所述蛋白质的区段具有至少 90% 同一性的氨基酸序列,并且其中所述转运蛋白多肽自组装以形成所述单体蛋白的准天然结构。在一些实施方案中,每个转运蛋白多肽包含与所述蛋白质的区段具有至少 85% 同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,每个转运蛋白多肽包含与所述蛋白质的区段具有至少 80% 同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,每个转运蛋白多肽包含与所述蛋白质的区段具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。在一些其它实施方案中,每个转运蛋白多肽包含与所述蛋白质的区段具有至少 99% 同一性的氨基酸序列。

[0203] 在某些实施方案中是本文所描述的分离的多头特异性异多聚体,其中所述转运蛋白多肽不是衍生自抗体。在另一实施方案中是一种本文所描述的分离的多特异性异多聚体,其中每个转运蛋白多肽是白蛋白衍生物。在一些实施方案中是基于白蛋白的分离的多特异性异多聚体,其中所述白蛋白是人血清白蛋白。在一些实施方案中,至少一个转运蛋白多肽是异白蛋白衍生物。在某些实施方案中是一种本文所描述的分离的多特异性异多聚体,其中每个转运蛋白多肽衍生自不同的异白蛋白。在一些实施方案中,每个转运蛋白多肽包含与白蛋白的区段具有至少 75% 同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,每个转运蛋白多肽包含与白蛋白的区段具有至少 80% 同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,每个转运蛋白多肽包含与白蛋白的区段具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。在一些其它实施方案中,每个转运蛋白多肽包含与白蛋白的区段具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。在一些其它实施方案中,每个转运蛋白多肽包含与白蛋白的区段具有至少 99% 同一性的氨基酸序列。

[0204] 本文提供一种基于白蛋白的分离的多特异性异多聚体构建体,其包含:第一单体,其包含与至少一种 CD3 结合多肽构建体融合的第一转运蛋白多肽,所述至少一种 CD3 结合多肽构建体结合至少一种表达 CD3 的细胞上的 CD3 复合物;第二多肽构建体,其包含与至少一种抗原结合多肽构建体融合的、与所述第一转运蛋白多肽不同的第二转运蛋白多肽,所述至少一种抗原结合多肽构建体结合至少一种 B 细胞上的靶抗原;其中所述第一和第二转运蛋白多肽通过白蛋白的节段化而获得,并且每个转运蛋白多肽包含与白蛋白的区段具有

至少 90% 同一性的氨基酸序列, 以使得所述转运蛋白多肽自组装以形成准天然白蛋白, 并且其中所述第一货物多肽不具有存在于所述第二货物多肽中的任何结合结构域。

[0205] 本文提供如以上所描述的基于白蛋白的多特异性异多聚体构建体, 其中所述第一转运蛋白多肽包含选自 A194C、L198C、W214C、A217C、L331C 以及 A335C 的至少一个突变。在某些实施方案中, 所述第二转运蛋白多肽包含选自 L331C、A335C、V343C、L346C、A350C、V455C 以及 N458C 的至少一个突变。

[0206] 提供本文所描述的分离的多特异性异多聚体构建体, 其中所述多特异性异多聚体构建体同时接合所述至少一种 B 细胞和所述至少一种表达 CD3 的细胞, 以使得所述表达 CD3 的细胞被活化, 从而诱导所述 B 细胞的杀伤。

[0207] 在某些实施方案中提供包含衍生自白蛋白的转运蛋白多肽的异多聚体构建体, 所述转运蛋白多肽自组装以形成异多聚体, 所述异多聚体表现出天然白蛋白样功能特征, 如 FcRn 结合和结构特征。在某些实施方案中, 本文所描述的基于白蛋白的异多聚体构建体当施用至有需要的人时归巢 (home) 于肿瘤细胞。在一些实施方案中, 所述肿瘤细胞来自实体肿瘤。在一些实施方案中, 本文所描述的异多聚体构建体归巢于肿瘤细胞并且随后结合所述肿瘤细胞。在某些实施方案中, 本文所描述的异多聚体构建体归巢于至少一种肿瘤细胞, 以导致所述肿瘤细胞溶解的方式同时结合所述至少一种肿瘤细胞和至少一种 T 细胞。在某些实施方案中, 本文所描述的异多聚体构建体归巢于至少一种肿瘤细胞, 同时结合所述至少一种肿瘤细胞和至少一种 T 细胞, 以使得与所述肿瘤细胞的结合是以比与所述 T 细胞的结合更高的效价, 并且引起所述肿瘤细胞的溶解。

[0208] CD3 复合物结合多肽构建体:

[0209] 在本文提供的基于免疫球蛋白和基于白蛋白的多特异性异多聚体构建体的某些实施方案中, 所述异多聚体构建体包含结合至少一种表达 CD3 的细胞上的 CD3 复合物的至少一种 CD3 结合多肽构建体。在一些实施方案中, 所述至少一种 CD3 结合多肽构建体包含来自 CD3 特异性抗体、纳米抗体、纤连蛋白、亲和体、抗运载蛋白、半胱氨酸结蛋白、DARPin、avimer、Kunitz 结构域或其变体或衍生物的至少一个 CD3 结合结构域。在一些实施方案中, 所述至少一个 CD3 结合结构域包含至少一个氨基酸修饰, 所述至少一个氨基酸修饰与不包含所述修饰的对应 CD3 结合结构域相比降低免疫原性。在一个实施方案中, 所述至少一个 CD3 结合结构域包含至少一个氨基酸修饰, 所述至少一个氨基酸修饰与不包含所述修饰的对应 CD3 结合结构域相比增加其稳定性, 如通过 T_m 所测量。在一些实施方案中, 与不包含所述至少一个修饰的天然 CD3 结合结构域相比, 存在 T_m 的约 3 度增加。在一些实施方案中, 与不包含所述至少一个修饰的天然 CD3 结合结构域相比, 存在 T_m 的约 5 度增加。在一些实施方案中, 与不包含所述至少一个修饰的天然 CD3 结合结构域相比, 存在 T_m 的约 8 度增加。在一些实施方案中, 与不包含所述至少一个修饰的天然 CD3 结合结构域相比, 存在 T_m 的约 10 度增加。

[0210] 在一些实施方案中, 本文所描述的至少一种 CD3 结合多肽构建体包含来自 CD3 特异性抗体的至少一个 CD3 结合结构域, 其中所述 CD3 特异性抗体是缺乏轻链的重链抗体。

[0211] 在某些其它实施方案中, 本文所描述的至少一种 CD3 结合多肽构建体包含衍生自非抗体蛋白支架结构域的至少一个 CD3 结合结构域。

[0212] 在某些实施方案中, 所述 CD3 结合多肽构建体是 CD3 结合 Fab 构建体 (即包含各

自含有可变区和恒定区的重链和轻链的抗原结合构建体)。在一些实施方案中,所述 Fab 构建体是哺乳动物的。在一个实施方案中,所述 Fab 构建体是人的。在另一个实施方案中,所述 Fab 构建体是人源化的。在又一实施方案中,所述 Fab 构建体包含人重链恒定区和轻链恒定区中的至少一个。在另一实施方案中,所述 Fab 构建体是单链 Fab(scFab)。

[0213] 在某些实施方案中,所述 CD3 结合多肽构建体包含 CD3 结合 scFab 构建体,其中 Fab 轻链的 C 末端通过肽接头连接至 Fab 重链的 N 末端。所述肽接头允许 Fab 重链和轻链的布置以形成功能性 CD3 结合部分。在某些实施方案中,适合用于连接 Fab 重链和轻链的肽接头包括包含甘氨酸-丝氨酸接头例如但不限于 $((G_mS)_n-GG, (SG_n)_m, (SEG_n)_m)$ 的序列,其中 m 和 n 是 0 至 20 之间。在某些实施方案中,scFab 构建体是交换构建体,其中 Fab 轻链和 Fab 重链的恒定区交换。在交换 Fab 的另一实施方案中,Fab 轻链和 Fab 重链的可变区交换。

[0214] 在某些实施方案中,所述 CD3 结合多肽构建体包含 CD3 结合 Fv 构建体(即包含各自含有可变区的重链和轻链的抗原结合构建体)。在一些实施方案中,所述 Fv 构建体是哺乳动物的。在一个实施方案中,所述 Fv 构建体是人的。在另一个实施方案中,所述 Fv 构建体是人源化的。在又一实施方案中,所述 Fv 构建体包含人重链可变区和轻链可变区中的至少一个。在另一实施方案中,所述 Fv 构建体是单链 Fv(scFv)。

[0215] 在一些实施方案中,本文所描述的多特异性异多聚体构建体的 CD3 结合多肽构建体结合所述 CD3 复合物的至少一种组分。在一个具体实施方案中,所述 CD3 结合多肽构建体结合所述 CD3 复合物的 CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 或 CD3 ζ 中的至少一个。在某些实施方案中,CD3 结合多肽构建体结合 CD3 ϵ 结构域。在某些实施方案中,结合多肽构建体结合人 CD3 复合物。在某些实施方案中,CD3 结合多肽构建体表现出与所述 CD3 复合物的至少一个成员的交叉物种结合。

[0216] 本文提供包含至少一种 CD3 结合多肽构建体的基于免疫球蛋白和基于白蛋白的多特异性异多聚体构建体,所述至少一种 CD3 结合多肽构建体结合至少一种表达 CD3 的细胞上的 CD3 复合物,其中所述表达 CD3 的细胞是 T 细胞。在某些实施方案中,所述表达 CD3 的细胞是人细胞。在一些实施方案中,所述表达 CD3 的细胞是非人哺乳动物细胞。在一些实施方案中,所述 T 细胞是细胞毒性 T 细胞。在一些实施方案中,所述 T 细胞是 CD4⁺或 CD8⁺T 细胞。

[0217] 在本文所提供的基于免疫球蛋白和基于白蛋白的多特异性异多聚体构建体的某些实施方案中,所述构建体能够活化且重定向 T 细胞针对靶细胞如 B 细胞的细胞毒性活性。在一个具体实施方案中,所述重定向独立于由靶细胞进行的 MHC 介导的肽抗原呈递和 / 或 T 细胞的特异性。

[0218] 本文提供异多聚体构建体,所述异多聚体构建体能够同时结合 B 细胞抗原(例如肿瘤细胞抗原)和活化 T 细胞抗原。在一个实施方案中,所述异多聚体构建体能够通过同时结合 B 细胞抗原(例如 CD19 或 CD20)和活化 T 细胞抗原(例如 CD3)来使 T 细胞和靶 B 细胞交联。在一个实施方案中,所述同时结合导致靶 B 细胞例如肿瘤细胞的溶解。在一个实施方案中,所述同时结合导致 T 细胞的活化。在其它实施方案中,所述同时结合导致 T 淋巴细胞例如细胞毒性 T 淋巴细胞的选自下组的细胞应答:增殖、分化、细胞因子分泌、细胞毒性效应分子释放、细胞毒性活性以及活化标记物的表达。在一个实施方案中,T 细胞活化双特异性抗原结合分子与活化 T 细胞抗原的结合在无同时结合靶细胞抗原的情况下不会

导致 T 细胞活化。

[0219] B 细胞结合多肽构建体：

[0220] 本文提供包含至少一种抗原结合多肽构建体的分离的异多聚体构建体，所述至少一种抗原结合多肽构建体结合至少一种 B 细胞上的靶抗原。在某些实施方案中，所述抗原结合多肽构建体结合 B 细胞 CD21-CD19-CD81 复合物的至少一个成员。在一些实施方案中，所述抗原结合多肽构建体包含至少一个 CD19 结合结构域或其片段。在一个实施方案中，所述抗原结合多肽构建体包含至少一个 CD20 结合结构域。

[0221] 在一些实施方案中，所述至少一个抗原结合结构域是 CD19 或 CD20 结合结构域，其是自 CD19 或 CD20 特异性抗体、纳米抗体、纤连蛋白、亲和体、抗运载蛋白、半胱氨酸结蛋白、DARPin、avimer、Kunitz 结构域或其变体或衍生物获得。在一些实施方案中，本文所描述的至少一种抗原结合多肽构建体包含至少一个抗原结合结构域，所述至少一个抗原结合结构域是来自抗体的 CD19 或 CD20 结合结构域，所述抗体是缺乏轻链的重链抗体。

[0222] 在一些实施方案中，所述至少一个抗原结合结构域是包含至少一个氨基酸修饰的 CD19 或 CD20 结合结构域，所述至少一个氨基酸修饰与不包含所述修饰的对应抗原结合结构域相比降低免疫原性。在一个实施方案中，所述至少一个抗原结合结构域是包含至少一个氨基酸修饰的 CD19 或 CD20 结合结构域，所述至少一个氨基酸修饰与不包含所述修饰的对应结构域相比增加其稳定性，如通过 T_m 所测量。

[0223] 在某些实施方案中，所述至少一种抗原结合多肽构建体是结合 B 细胞上的 CD19 和 CD20 中的至少一个的 Fab 构建体。在一些实施方案中，所述 Fab 构建体是哺乳动物的。在一个实施方案中，所述 Fab 构建体是人的。在另一个实施方案中，所述 Fab 构建体是人源化的。在又一实施方案中，所述 Fab 构建体包含人重链恒定区和轻链恒定区中的至少一个。在另一实施方案中，所述 Fab 构建体是单链 Fab(sc Fab)。

[0224] 在某些实施方案中，所述 CD19 和 / 或 CD20 结合多肽构建体包含 scFab 构建体，其中 Fab 轻链的 C 末端通过肽接头连接至 Fab 重链的 N 末端。所述肽接头允许 Fab 重链和轻链的布置以形成功能性 CD19 和 / 或 CD20 结合部分。在某些实施方案中，适合用于连接 Fab 重链和轻链的肽接头包括包含甘氨酸-丝氨酸接头例如但不限于 $(G_mS)_n$ -GG, $(SG_n)_m$, $(SEG_n)_m$ 的序列，其中 m 和 n 是 0 至 20 之间。在某些实施方案中，scFab 构建体是交换构建体，其中 Fab 轻链和 Fab 重链的恒定区交换。在交换 Fab 的另一实施方案中，Fab 轻链和 Fab 重链的可变区交换。

[0225] 在某些实施方案中，所述至少一种抗原结合多肽构建体是结合 B 细胞上的 CD19 和 CD20 中的至少一个的 Fv 构建体。在一些实施方案中，所述 Fv 构建体是哺乳动物的。在一个实施方案中，所述 Fv 构建体是人的。在另一个实施方案中，所述 Fv 构建体是人源化的。在又一实施方案中，所述 Fv 构建体包含人重链可变区和轻链可变区中的至少一个。在另一实施方案中，所述 Fv 构建体是单链 Fv(scFv)。

[0226] 在某些实施方案中，所述抗原结合多肽构建体表现出与 B 细胞表面上表达的至少一种抗原的交叉物种结合。在一些实施方案中，本文所描述的多特异性异多聚体构建体的抗原结合多肽构建体结合哺乳动物 CD19 和 CD20 中的至少一个。在某些实施方案中，结合多肽构建体结合人 CD19 或 CD20。

[0227] 本文提供异多聚体构建体，所述异多聚体构建体能够同时结合 B 细胞抗原（例如

肿瘤细胞抗原)和活化 T 细胞抗原。在一个实施方案中,所述异多聚体构建体能够通过同时结合 B 细胞抗原(例如 CD19 或 CD20)和活化 T 细胞抗原(例如 CD3)来使 T 细胞和靶 B 细胞交联。

[0228] 在某些实施方案中,本文所描述的异多聚体包含至少一种抗原结合多肽构建体,所述至少一种抗原结合多肽构建体结合与疾病相关的至少一种 B 细胞上的靶抗原,如 CD19 或 CD20。在一些实施方案中,所述疾病是选自癌、肉瘤、白血病、淋巴瘤和神经胶质瘤的癌症。在一个实施方案中,所述癌症是鳞状细胞癌、腺癌、移行细胞癌、骨肉瘤和软组织肉瘤中的至少一种。在某些实施方案中,所述至少一种 B 细胞是为淋巴或骨髓细胞的自身免疫反应性细胞。

[0229] 另外的抗原结合构建体:

[0230] 在某些实施方案中,本文所描述的基于白蛋白或免疫球蛋白的多特异性异多聚体还包含结合以下中的至少一种的至少一个结合结构域:EpCAM、EGFR、IGFR、HER-2neu、HER-3、HER-4、PSMA、CEA、MUC-1(粘蛋白)、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5、MUC7、CCR4、CCR5、CD19、CD20、CD33、CD30、神经节苷脂 GD3、9-O-乙酰基-GD3、GM2、聚 SA、GD2、碳酸酐酶 IX(MN/CA IX)、CD44v6、音猬(Shh)、Wue-1、浆细胞抗原(膜结合的)、黑色素瘤硫酸软骨素蛋白聚糖(MCSP)、CCR8、TNF- α 前体、STEAP、间皮素、A33 抗原、前列腺干细胞抗原(PSCA)、Ly-6;桥粒芯糖蛋白 4、E-钙粘着蛋白新表位、胎儿乙酰胆碱受体、CD25、CA19-9 标记物、CA-125 标记物和 Muellierian 抑制物质(MIS)受体 II 型、sTn(唾液酸化 Tn 抗原;TAG-72)、FAP(成纤维细胞活化抗原)、内皮唾液酸蛋白(endosialin)、LG、SAS、EPhA4 CD63、包含衔接至细胞因子的 CD3 抗体的 CD3 BsAb 免疫细胞因子 TNF、IFN γ 、IL-2 以及 TRAIL。

[0231] 翻译后修饰:

[0232] 在某些实施方案中是本文所描述的多特异性异多聚体构建体,其在翻译过程中或之后进行不同地修饰。在一些实施方案中,所述修饰是以下中的至少一种:糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/封闭基团衍生化,蛋白水解裂解以及与抗体分子或其它细胞配体的键联。在一些实施方案中,通过已知技术对所述异多聚体构建体进行化学修饰,所述技术包括但不限于通过溴化氰、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、木瓜蛋白酶、V8 蛋白酶、 NaBH_4 进行特异性化学裂解;乙酰化、甲酰化、氧化、还原;以及在衣霉素存在下代谢合成。

[0233] 本文所描述的异多聚体的另外翻译后修饰包括例如,N-连接或 O-连接的碳水化合物链、N-末端或 C-末端的加工)、化学部分衔接至氨基酸主链、N-连接或 O-连接的碳水化合物链的化学修饰、以及由于原核宿主细胞表达而产生的 N-末端甲硫氨酸残基的添加或缺失。本文所描述的异多聚体构建体用可检测的标记进行修饰,所述标记如酶、荧光、同位素或亲和标记以允许检测和分离蛋白质。在某些实施方案中,适合酶标记的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;适合辅基复合物的实例包括抗生物素链菌素生物素和抗生物素蛋白/生物素;适合荧光物质的实例包括伞酮(umbelliferone)、荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红素;发光物质的实例包括鲁米诺(luminol);并且适合放射性物质的实例包括碘、碳、硫、氟、铟、镓、铊、铋、钋、钋、钋、钋、钋、钋。

[0234] 在具体实施方案中,本文所描述的异多聚体构建体被衔接至与放射性金属离子缔合的大环螯合剂。

[0235] 在一些实施方案中,本文所描述的异多聚体构建体通过自然过程(如翻译后加工)或通过本领域熟知的化学修饰技术进行修饰。在某些实施方案中,相同类型的修饰可以以相同或不同程度存在于给定多肽中的若干位点处。在某些实施方案中,来自本文所描述的异多聚体的多肽是支链的,例如由于泛素化;环状的,有或无分支。环状、支链和支链环状多肽是来自翻译后自然过程的结果或通过合成方法制备。修饰包括例如乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、黄素(flavin)的共价附接、原血红素(heme)部分的共价附接、核苷酸或核苷酸衍生物的共价附接、脂质或脂质衍生物的共价附接、磷脂酰肌醇的共价附接、交联、环化、二硫键形成、脱甲基、形成共价交联、形成半胱氨酸、形成焦谷氨酸、甲酰化、 γ -羧化、糖基化、GPI 锚形成、羟基化、碘化、甲基化、肉豆蔻酰化、氧化、聚乙二醇化、蛋白水解加工、磷酸化、异戊烯化、外消旋化、硒化、硫酸化、转移 RNA 介导的向蛋白质添加氨基酸(如精氨酰化)和泛素化。(参见,例如 PROTEINS—STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 第 2 版, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993); POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, 编辑, Academic Press, New York, 第 1-12 页 (1983); Seifter 等, Meth. Enzymol. 182:626-646 (1990); Rattan 等, Ann. N. Y. Acad. Sci. 663:48-62 (1992))。

[0236] 在某些实施方案中,本文所描述的异多聚体的构建体附接至固相支持体,所述固相支持体特别适用于通过本发明的白蛋白融合蛋白结合、与本发明的白蛋白融合蛋白结合或缔合的多肽的免疫测定或纯化。所述固相支持体包括但不限于玻璃、纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。

[0237] 多核苷酸:

[0238] 本文提供编码本文所描述的多特异性异多聚体构建体的多核苷酸构建体。在某些实施方案中,多核苷酸或核酸是 DNA。在其它实施方案中,本文所描述的多核苷酸是 RNA,例如,呈信使 RNA (mRNA) 的形式。本发明的 RNA 可以是单链或双链的。

[0239] 在某些实施方案中是一组用于表达本文所描述的包含第一和第二多肽构建体的多特异性异多聚体构建体的表达载体,所述组包含编码所述第一多肽构建体的至少一个第一 DNA 序列和编码所述第二多肽构建体的至少一个第二 DNA 序列。

[0240] 在某些实施方案中是编码本文所描述的异多聚体构建体或其多肽构建体的具有如本文所提供的序列的多核苷酸序列。在某些实施方案中是包含与图 ___ 中所示的核苷酸序列至少约 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同的序列的多核苷酸。在某些实施方案中是编码本文所描述的异多聚体构建体或其多肽构建体的多核苷酸序列,其中所述多核苷酸包含如本文所提供的序列的保守性突变。

[0241] 多特异性异多聚体构建体的重组和合成产生方法:

[0242] 提供在稳定哺乳动物细胞中产生含有如本文所描述的多特异性异多聚体构建体的表达产物的方法,所述方法包括:用以下各项转染至少一种哺乳动物细胞:编码所述第一多肽构建体的至少一个第一 DNA 序列和编码所述第二多肽构建体的至少一个第二 DNA 序列,以使得所述至少一个第一 DNA 序列、所述至少一个第二 DNA 序列在所述至少一种哺乳动物细胞中以预定比例转染,以产生稳定哺乳动物细胞;培养所述稳定哺乳动物细胞以产生包含所述多特异性异多聚体的所述表达产物。在某些实施方案中,所述至少一个第一 DNA 序列:至少一个第二 DNA 序列的所述预定比例是约 1:1。在某些其它实施方案中,所述至少

一个第一 DNA 序列：至少一个第二 DNA 序列的所述预定比例向较大量的所述一个第一 DNA 序列偏斜如约 2:1。在其它实施方案中，所述至少一个第一 DNA 序列：至少一个第二 DNA 序列的所述预定比例向较大量的所述一个第一 DNA 序列偏斜如约 1:2。在选择实施方案中，所述哺乳动物细胞选自 VERO、HeLa、HEK、NS0、中国仓鼠卵巢 (CHO)、W138、BHK、COS-7、Caco-2 和 MDCK 细胞以及其亚类和变体组成的组。

[0243] 在某些实施方案中是通过从酵母、微生物如细菌、或人或动物细胞系分泌作为重组分子产生的异多聚体。在实施方案中，所述多肽是从宿主细胞分泌的。

[0244] 实施方案包括细胞，如被转化以表达本文所描述的异多聚体蛋白的酵母细胞。除了转化的宿主细胞自身以外，提供那些细胞在营养培养基中的培养物，优选地单克隆（同源克隆地）培养物，或衍生自单克隆培养物的细胞。如果分泌多肽，则所述培养基将包含所述多肽与所述细胞，或无所述细胞（如果它们已经被过滤或离心掉）。许多表达系统是已知的并且可以使用，包括细菌（例如大肠杆菌和枯草芽孢杆菌）、酵母（例如酿酒酵母、乳酸克鲁维酵母以及巴斯德毕赤酵母）、丝状真菌（例如曲霉）、植物细胞、动物细胞以及昆虫细胞。

[0245] 本文所描述的异多聚体以常规方式产生，例如从插入宿主染色体中或游离质粒上的编码序列产生。所述酵母以任何通常方式例如电穿孔用所需蛋白质的编码序列进行转化。用于通过电穿孔转化酵母的方法公开于 Becker&Guarente (1990) *Methods Enzymol.* 194, 182 中。

[0246] 成功转化的细胞，即包含本发明的 DNA 构建体的细胞可通过熟知技术来鉴别。例如，由引入表达构建体产生的细胞可生长以产生所需多肽。可收获并溶解细胞并且使用方法如由 Southern (1975) *J. Mol. Biol.* 98, 503 或 Berent 等 (1985) *Biotech.* 3, 208 所描述的方法将其 DNA 内容物针对所述 DNA 的存在进行检查。或者，可使用抗体来检测上清液中蛋白质的存在。

[0247] 有用的酵母质粒载体包括 pRS403-406 和 pRS413-416 并且通常可从 Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Calif. 92037, USA 获得。质粒 pRS403、pRS404、pRS405 以及 pRS406 是酵母整合质粒 (YIp) 并且并入酵母选择性标记物 HIS3、7RP1、LEU2 以及 URA3。质粒 pRS413-416 是酵母着丝粒质粒 (Ycp)。

[0248] 已发展多种方法用于通过互补粘性末端将 DNA 可操作地连接至载体。例如，互补同聚物序列 (tract) 可以被添加至有待插入至载体 DNA 的 DNA 区段。所述载体和 DNA 区段然后通过所述互补同聚尾部之间的氢键合连接以形成重组 DNA 分子。

[0249] 含有一个或多个限制性位点的合成接头提供将 DNA 区段连接至载体的替代方法。将通过内切核酸酶限制性消化产生的 DNA 片段用噬菌体 T4 DNA 聚合酶或大肠杆菌 DNA 聚合酶 1 进行处理，所述酶用其 3' 5' 外切核酸酶活性去除突出的 _ 单链末端，并且用其聚合活性填充 3' - 凹端。

[0250] 这些活性的组合因此产生平末端 DNA 区段。平末端区段然后在能够催化平末端 DNA 分子的连接的酶（如噬菌体 T4 DNA 连接酶）存在下与大量摩尔过量的接头分子一起孵育。因此，反应产物是在其端处携带聚合物接头序列的 DNA 区段。这些 DNA 区段然后用适当的限制性酶裂解并且连接至表达载体，所述表达载体已用产生与所述 DNA 区段的末端相容的末端的酶裂解。

[0251] 含有多个限制性内切核酸酶位点的合成接头可自多个来源商购,包括 International Biotechnologies Inc, New Haven, Conn., USA。

[0252] 预期作为用于表达白蛋白融合蛋白的宿主适用于实施本发明的示例性酵母属是毕赤酵母属 (*Pichia*) (以前被分类为汉逊酵母属 (*Hansenula*))、酵母属 (*Saccharomyces*)、克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*)、曲霉属、假丝酵母属 (*Candida*)、球拟酵母属 (*Torulopsis*)、有孢圆酵母属 (*Torulasporea*)、裂殖酵母属 (*Schizosaccharomyces*)、固囊酵母属 (*Citeromyces*)、管囊酵母属 (*Pachysolen*)、接合酵母属 (*Zygosaccharomyces*)、德巴里酵母属 (*Debaromyces*)、木霉属 (*Trichoderma*)、头孢酶属 (*Cephalosporium*)、腐质霉属 (*Humicola*)、毛霉属 (*Mucor*)、脉孢菌属 (*Neurospora*)、亚罗酵母属 (*Yarrowia*)、梅奇酵母属 (*Metschnikowia*)、红冬孢酵母属 (*Rhodospiridium*)、白冬孢酵母属 (*Leucosporidium*)、葡状子囊菌属 (*Botryosphaeria*)、锁掷酵母属 (*Sporidiobolus*)、拟内孢霉属 (*Endomyces*) 等。优选的属是选自自由酵母属、裂殖酵母属、克鲁维酵母属、毕赤酵母属以及有孢圆酵母属组成的组的那些。酵母属菌种的实例是酿酒酵母、意大利糖酵母 (*S. italicus*) 以及鲁氏糖酵母 (*S. rouxii*)。

[0253] 克鲁维酵母属菌种的实例是胞壁克鲁维酵母 (*K. fragilis*)、乳酸克鲁维酵母 (*K. lactis*) 以及马克斯克鲁维酵母 (*K. marxianus*)。适合的有孢圆酵母属菌种是德布尔有孢酵母 (德布尔有孢酵母)。毕赤酵母属 (汉逊酵母属) 菌种的实例是安格斯毕赤酵母 (*P. angusta*) (之前多形汉逊酵母 (*H. polymorpha*))、异常毕赤酵母 (*P. anomala*) (之前异常汉逊酵母 (*H. anomala*)) 以及巴斯德毕赤酵母。用于转化酿酒酵母的方法是 EP 251 744、EP 258 067 以及 WO 90/01063 中通常所教导的,所述专利以引用的方式并入本文。

[0254] 适用于合成本文所描述的异多聚体构建体的示例性酵母属菌种包括酿酒酵母、意大利糖酵母、糖化酵母 (*S. diastaticus*) 以及鲁氏酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*)。优选的示例性克鲁维酵母属菌种包括胞壁克鲁维酵母和乳酸克鲁维酵母。优选的示例性汉逊酵母属菌种包括多形汉逊酵母 (现在安格斯毕赤酵母)、异常汉逊酵母 (现在异常毕赤酵母) 以及荚膜毕赤氏酵母 (*Pichia capsulata*)。另外优选的示例性毕赤酵母菌种包括巴斯德毕赤酵母。优选的示例性曲霉属菌种包括黑曲霉和构巢曲霉。优选的示例性亚罗酵母属菌种包括解脂亚罗酵母 (*Y. lipolytica*)。许多优选的酵母菌种可从 ATCC 获得。例如,以下优选的酵母菌种可从 ATCC 获得并且适用于表达白蛋白融合蛋白:酿酒酵母 Hansen, 有性型菌株 (teleomorph strain) BY4743yap3 突变体 (ATCC 登录号 4022731); 酿酒酵母 Hansen, 有性型菌株 BY4743 hsp150 突变体 (ATCC 登录号 4021266); 酿酒酵母 Hansen, 有性型菌株 BY4743 pmt1 突变体 (ATCC 登录号 4023792); 酿酒酵母 Hansen, 有性型 (ATCC 登录号 20626; 44773; 44774; 以及 62995); 糖化酵母 (*Saccharomyces diastaticus*) Andrews 和 Gilliland 不包括 van der Walt, 有性型 (ATCC 登录号 62987); 乳酸克鲁维酵母 (*Dombrowski*) van der Walt, 有性型 (ATCC 登录号 76492); 安格斯毕赤酵母 (Teunisson 等) Kurtzman, 保藏为多形汉逊酵母 (*Hansenula polymorpha*) de Moraes 和 Maia 的有性型, 有性型 (ATCC 登录号 26012); 黑曲霉 van Tieghem, 无性型 (ATCC 登录号 9029); 黑曲霉 van Tieghem, 无性型 (ATCC 登录号 16404); 构巢曲霉 (*Eidam*) Winter, 无性型 (ATCC 登录号 48756); 以及解脂耶氏酵母 (Wickerham 等) van der Walt 和 von Arx, 有性型 (ATCC 登录号 201847)。

[0255] 酿酒酵母的适合启动子包括与以下相关的那些:PGKI 基因、GAL1 或 GAL10 基因, CYCI、PH05、TRP1、ADH1、ADH2, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、丙糖磷酸异构酶、磷酸葡萄糖异构酶、葡萄糖激酶、 α -交配因子信息素[一种交配因子信息素]的基因, PRBI 启动子、GUT2 启动子、GPDI 启动子、以及涉及 5' 调控区的部分与其它启动子的 5' 调控区的部分或与上游活化位点的杂合体的杂合启动子(例如 EP-A-258067 的启动子)。

[0256] 用于粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 的方便可调控启动子是由 Maundrell (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 10857-10864 所描述的来自 nmt 基因的硫胺素可抑制启动子和由 Hoffman & Winston (1990) *Genetics* 124, 807-816 所描述的葡萄糖可抑制 jbp1 基因启动子。

[0257] 转化用于表达外源基因的毕赤酵母的方法在例如 Cregg 等 (1993) 和不同 Phillips 专利(例如美国专利号 4,857,467, 以引用的方式并入本文)中教导, 并且毕赤酵母表达试剂盒可从 Invitrogen BV, Leek, Netherlands 和 Invitrogen Corp., San Diego, Calif 商购。适合的启动子包括 AOX1 和 AOX2。Gleeson 等 (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132, 3459-3465 包括关于汉逊酵母载体和转化的信息, 适合的启动子是 MOX1 和 FMD1; 而 EP 361 991, Fleer 等 (1991) 和来自 Rhone-Poulenc Rorer 的其它公布教导如何在克鲁维酵母属菌种中表达外源蛋白质, 适合的启动子是 PGKI。

[0258] 转录终止信号优选地是真核基因的 3' 侧翼序列, 所述序列包含转录终止和多腺苷酸化的正确信号。适合的 3' 侧翼序列可以是例如与所使用的表达控制序列天然地连接的基因的那些, 即可与启动子相对应。或者, 它们可以是不同的, 在这种情况下优选酿酒酵母 ADHI 基因的终止信号。

[0259] 在某些实施方案中, 所需异多聚体蛋白最初使用分泌性前导序列表达, 所述前导序列可以是所选择的酵母中有效的任何前导序列。适用于酿酒酵母中的前导序列包括来自交配因子 α 多肽 (MF α -1) 的前导序列和 EP-A-387 319 的杂合前导序列。所述前导序列(或信号)在成熟白蛋白释放到周围培养基中之前被酵母裂解。此外, 所述前导序列包括 JP 62-096086(授权号为 911036516)中所公开的酿酒酵母转化酶 (SUC2)、酸性磷酸酶 (PH05)、MF α -1 的前序列、 α 葡聚糖酶 (BGL2) 和杀伤毒素; 糖化酵母葡糖淀粉酶 II; 卡尔酵母 α -半乳糖苷酶 (MEL 1); 乳酸克鲁维酵母杀伤毒素; 以及假丝酵母属葡萄糖淀粉酶的前导序列。

[0260] 提供含有编码本文所描述的异多聚体构建体的多核苷酸的载体、宿主细胞、以及通过合成和重组技术产生异多聚体蛋白。载体可以是例如噬菌体、质粒、病毒或逆转录病毒载体。逆转录病毒载体可以是复制感受态型或复制缺陷型的。在后者情况下, 病毒繁殖通常将仅发生于互补宿主细胞中。

[0261] 在某些实施方案中, 编码本文所描述的异多聚体蛋白的多核苷酸连接至含有选择性标记物的载体以用于在宿主中繁殖。一般来说, 将质粒载体引入沉淀物如磷酸钙沉淀物中, 或引入具有带电荷脂质的复合物中。如果载体是病毒, 可使用适当的包装细胞系在体外对其进行包装并且然后转导至宿主细胞中。

[0262] 在某些实施方案中, 多核苷酸插入片段 (insert) 可操作地连接至适当的启动子, 如噬菌体 λ PL 启动子, 大肠杆菌 lac、trp、phoA 和 rac 启动子, SV40 早期和晚期启动子以及逆转录病毒 LTR 的启动子等。其它适合的启动子对于本领域的技术人员将是已知的。所

述表达构建体将还包含转录起始、终止位点,以及在转录区中用于翻译的核糖体结合位点。由构建体表达的转录物的编码部分将优选包括在待翻译的多肽的起始处的翻译起始密码子和适当地位于待翻译多肽的末端处的终止密码子(UAA、UGA 或 UAG)。

[0263] 如所指示,所述表达载体将优选包括至少一种选择性标记物。所述标记物包括用于真核细胞培养的二氢叶酸还原酶、G418、谷氨酰胺合酶或新霉素抗性,和用于在大肠杆菌和其它细菌中培养的四环素、卡那霉素或氨基青霉素抗性基因。适当宿主的代表性实例包括但不限于细菌细胞,如大肠杆菌、链霉菌属和鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)细胞;真菌细胞,如酵母细胞(例如酿酒酵母或巴斯德毕赤酵母(ATCC 登录号 201178));昆虫细胞如果蝇属 S2 和夜蛾属 Sf9 细胞;动物细胞如 CHO、COS、NS0、293 以及人黑色素瘤细胞;以及植物细胞。用于上述宿主细胞的适当培养基和条件是本领域中已知的。

[0264] 优选用于细菌的载体包括可从 QIAGEN, Inc. 获得的 pQE70、pQE60 和 pQE-9;可从 Stratagene Cloning Systems, Inc. 获得的 pBluescript 载体、Phagescript 载体、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A;以及可从 Pharmacia Biotech, Inc. 获得的 ptrc99a、pKK223-3、pKK23 3-3、pDR540、pRIT5。优选的真核载体是可从 Stratagene 获得的 pW LNE0、pSV2CAT、pOG44、pXT1 和 pSG;以及可从 Pharmacia 获得的 pSVK3、pBPV、pMSG 和 pSVL。用于酵母系统的优选表达载体包括但不限于 pYES2、pYD1、pTEF1/Zeo、pYES2/GS、pPICZ、pGAPZalph、pPIC9、pPIC3.5、pHIL-D2、pHIL-S1、pPIC3.5K、pPIC9K 以及 PA0815(全部可从 Invitrogen, Carlsbad, CA 获得)。其它适合的载体对于本领域的技术人员将是显而易见的。

[0265] 在一个实施方案中,编码本文所描述的多特异性异多聚体构建体的多核苷酸与信号序列融合,所述信号序列将指导本发明的蛋白质定位至原核或真核细胞的特定隔室和/或指导本发明的蛋白质自原核或真核细胞的分泌。举例来说,在大肠杆菌中,可能希望指导所述蛋白质表达至周质间隙。所述异多聚体蛋白与其融合以便指导所述多肽表达至细菌的周质间隙的信号序列或蛋白质(或其片段)的实例包括但不限于 pelB 信号序列、麦芽糖结合蛋白(MBP)信号序列、MBP、ompA 信号序列、周质大肠杆菌热不稳定肠毒素 B-亚基的信号序列、以及碱性磷酸酶的信号序列。几种载体可商购用于构建将指导蛋白质的定位的融合蛋白,如可从 New England Biolabs 获得的 pMAL 系列载体(具体地是 pMAL-.rho. 系列)。在一个具体实施方案中,本发明的多核苷酸白蛋白融合蛋白可与 pelB 果胶酸裂解酶信号序列融合以增加所述多肽在革兰氏阴性细菌中的表达和纯化效率。参见美国专利号 5,576,195 和 5,846,818,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0266] 与异多聚体蛋白融合以便指导其在哺乳动物细胞中的分泌的信号肽的实例包括但不限于 MPIF-1 信号序列(例如 GenBank 登录号 AA B51134 的氨基酸 1-21)、司腺钙蛋白(stanniocalcin)信号序列(MLQNS AVLLLLVISASA)以及共有信号序列(MPTWAWWLFLVLLLALWAPA RG)。可与杆状病毒表达系统结合使用的适合信号序列是 gp67 信号序列(例如,GenBank 登录号 AAA72759 的氨基酸 1-19)。

[0267] 使用谷氨酰胺合酶(GS)或 DHFR 作为选择性标记物的载体可分别在药物甲硫氨酸磺亚胺(methionine sulphoximine)或甲氨蝶呤存在下扩增。基于谷氨酰胺合酶的载体的优点是可利用为谷氨酰胺合酶阴性的细胞系(例如,鼠类骨髓瘤细胞系,NS0)。谷氨酰胺合酶表达系统还可通过提供另外抑制剂来防止内源性基因的作用而在表达谷氨酰胺

合酶的细胞（例如，中国仓鼠卵巢（CHO）细胞）中起作用。谷氨酰胺合酶表达系统及其组分在以下 PCT 公布中详述：W087/04462；W086/05807；W089/10036；W089/10404；以及 W091/06657，所述公布特此以引用的方式整体并入本文。另外，谷氨酰胺合酶表达载体可从 Lonza Biologics, Inc. (Portsmouth, N. H.) 获得。使用 GS 表达系统在鼠类骨髓瘤细胞中表达和产生单克隆抗体描述于 Bebbington 等, *Bio/technology* 10:169(1992) 和 *Biblia and Robinson Biotechnol. Prog.* 11:1(1995) 中，所述文献以引用的方式并入本文。

[0268] 还提供含有本文所描述的载体构建体的宿主细胞，并且另外提供含有核苷酸序列的宿主细胞，所述核苷酸序列使用本领域中已知的技术与一个或多个异源调控区（例如，启动子和 / 或增强子）可操作地缔合。所述宿主细胞可以是高等真核细胞如哺乳动物细胞（例如，源于人的细胞）或低等真核细胞如酵母细胞，或所述宿主细胞可以是原核细胞如细菌细胞。可选择调节插入基因序列的表达或以所需特定方式修饰并加工基因产物的宿主菌株。在某些诱导物存在下可提高从某些启动子的表达，从而可控制遗传工程化的多肽的表达。。此外，不同宿主细胞具有翻译和翻译后加工和修饰（例如，磷酸化、裂解）蛋白质的特征和特定机制。可选择适当细胞系以确保对所表达的外来蛋白质的所需修饰和加工。

[0269] 将本发明的核酸和核酸构建体引入宿主细胞中可通过磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、感染或其它方法来实现。所述方法描述于许多标准实验室手册中，如 Davis 等, *Basic Methods In Molecular Biology* (1986)。具体考虑本发明的多肽可事实上由缺乏重组载体的宿主细胞表达。

[0270] 除涵盖本文讨论的载体构建体的宿主细胞外，本发明还涵盖已被工程化为缺失或取代内源性遗传物质（例如，对应于货物多肽的编码序列被对应于货物多肽的异多聚体蛋白取代）和 / 或包括遗传物质的脊椎动物来源、特别是哺乳动物来源的原代、传代和无限增殖化宿主细胞。与内源多核苷酸可操作缔合的遗传物质可活化、改变和 / 或扩增内源多核苷酸。

[0271] 此外，本领域中已知的技术可用于通过同源重组将异源多核苷酸（例如编码白蛋白蛋白的多核苷酸或其片段或变体）和 / 或异源调控区（例如启动子和 / 或增强子）与编码治疗性蛋白的内源多核苷酸可操作地缔合（参见例如 1997 年 6 月 24 日发布的美国专利号 5,641,670；国际公布号 W0 96/29411；国际公布号 W0 94/12650；Koller 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8932-8935(1989)；以及 Zijlstra 等, *Nature* 342:435-438(1989)，所述文献各自的公开内容以引用的方式整体并入）。

[0272] 本文所描述的异多聚体蛋白可通过熟知的方法从重组细胞培养物中回收并纯化，所述方法包括硫酸铵或乙醇沉淀法、酸萃取法、阴离子或阳离子交换色谱法、磷酸纤维素色谱法、疏水相互作用色谱法、亲和色谱法（如用蛋白质 A）、羟基磷灰石色谱法、疏水电荷相互作用色谱法和凝集素色谱法。最优选地，高效液相色谱法（“HPLC”）用于纯化。

[0273] 在某些实施方案中，本发明的异多聚体蛋白使用阴离子交换色谱法进行纯化，所述阴离子交换色谱法包括但不限于 Q-琼脂糖、DEAE 琼脂糖、poros HQ、poros DEAF、Toyopearl Q、Toyopearl QAE、Toyopearl DEAE、Resource/Source Q 和 DEAE、Fractogel Q 以及 DEAE 柱色谱法。

[0274] 在具体实施方案中，本文所描述的蛋白质使用阳离子交换色谱法进行纯化，所述阳离子色谱法包括但不限于 SP-琼脂糖、CM 琼脂糖、poros HS、poros CM、Toyopearl SP、

Toyopearl CM、Resource/Source S 和 CM、Fractogel S 和 CM 柱以及其等效物和可比物。

[0275] 此外,本文所描述的异多聚体蛋白可使用本领域中已知的技术化学地合成(例如,参见 Creighton, 1983, *Proteins: Structures and Molecular Principles*, W. H. Freeman & Co., N. Y 和 Hunkapiller 等, *Nature*, 310:105-111(1984))。例如,对应于多肽的片段的多肽可通过使用肽合成仪来合成。此外,如果需要,非经典氨基酸或化学氨基酸类似物可作为取代或添加引入多肽序列中。一般来说,非经典氨基酸包括但不限于,常见氨基酸的 D 型异构体、2,4 二氨基丁酸、 α -氨基异丁酸、4 氨基丁酸、Abu、2-氨基丁酸、g-Abu、e-Ahx、6 氨基己酸、Aib、2-氨基异丁酸、3-氨基丙酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟基脯氨酸、肌氨酸、瓜氨酸、高瓜氨酸、半胱氨酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、 β -丙氨酸、氟代氨基酸、设计产生氨基酸 (designer amino acids), 如 β -甲基氨基酸、C α -甲基氨基酸、N α -甲基氨基酸,以及氨基酸类似物。此外,氨基酸可以是 D(右旋的)或 L(左旋的)。

[0276] 测定:

[0277] 本文所描述的异多聚体构建体可使用本领域中已知的常规改良的测定以及本文所描述的测定针对功能活性(例如,生物活性)进行测定。

[0278] 例如,在一个实施方案中,其中针对本文所描述的异多聚体的构建结合抗原或与另一种多肽竞争结合抗原、或结合 Fc 受体和 / 或抗白蛋白抗体的能力进行测定,可使用本领域中已知的各种免疫测定,包括但不限于,竞争性和非竞争性测定系统,所述系统使用技术如放射免疫测定、ELISA(酶联免疫吸附测定)、“夹心”免疫测定、免疫放射测定、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散测定、原位免疫测定(使用例如胶体金、酶或放射性同位素标记)、蛋白质印迹、沉淀反应、凝集测定(例如凝胶凝集测定、血凝测定)、补体结合测定、免疫荧光测定、蛋白 A 测定以及免疫电泳测定等。在一个实施方案中,通过检测第一抗体上的标记来检测抗体结合。在另一个实施方案中,通过检测第二抗体或试剂与第一抗体的结合来检测第一抗体。在另一实施方案中,第二抗体是标记的。用于在免疫测定中检测结合的许多方式是本领域中已知的并且在本发明的范围内。

[0279] 在某些实施方案中,其中针对由本文所描述的异多聚体包含的抗原结合结构域来鉴别结合配偶体(例如受体或配体),对本文所描述的异多聚体结合所述结合配偶体进行测定,所述测定是例如通过本领域中熟知的方式例如像还原和非还原凝胶色谱法、蛋白质亲和色谱法以及亲和印迹。通常参见 Phizicky 等, *Microbiol. Rev.* 59:94-123(1995)。在另一个实施方案中,异多聚体蛋白结合本文所描述的异多聚体的抗原结合多肽构建体的一种或多种底物的生理相关的能力可使用本领域中已知的技术常规地测定。

[0280] 治疗用途:

[0281] 一方面,本文所描述的异多聚体涉及基于抗体的疗法,所述疗法涉及向患者施用所描述的包含一个或多个货物多肽(其是抗体、抗体的片段或变体)的异多聚体以用于治疗一种或多种所公开的疾病、病症或病状。本文所描述的治疗性化合物包括但不限于本文所描述的异多聚体、编码本文所描述的异多聚体的核酸。

[0282] 在某些实施方案中,提供一种用于预防、治疗或改善以下各项中的至少一种的方法:增生性疾病、最小残留癌症、肿瘤性疾病、炎性疾病、免疫病症、自身免疫性疾病、传染性疾病、病毒性疾病、过敏性反应、寄生反应、移植物抗宿主病或宿主抗移植物病或细胞恶性

肿瘤,所述方法包括向需要这种预防、治疗或改善的受试者施用包含本文所描述的异多聚体构建体的药物组合物。

[0283] 在某些实施方案中是一种治疗有需要的哺乳动物中的癌症的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用包含有效量的本文所描述的组合物任选地与其它药物活性分子组合的组合物。在某些实施方案中,所述癌症是实体肿瘤。在一些实施方案中,所述实体肿瘤是肉瘤、癌和淋巴瘤中的一种或多种。在某些其它实施方案中,所述癌症是血液癌。在一些实施方案中,所述癌症是B细胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤和白血病中的一种或多种。

[0284] 提供一种治疗癌细胞的方法,所述方法包括向所述细胞提供包含本文所描述的异多聚体构建体的组合物。在一些实施方案中,所述方法还包括提供与另一种治疗剂缀合的所述异多聚体。

[0285] 提供一种治疗有需要的哺乳动物中对兰妥莫单抗无反应的癌症的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用包含有效量的包含本文所描述的异多聚体构建体的药物组合物的组合物。

[0286] 在一些实施方案中是一种治疗在用兰妥莫单抗治疗之后的癌细胞退行的方法,所述方法包括向所述癌细胞提供包含有效量的包含本文所描述的异多聚体构建体的药物组合物的组合物。

[0287] 在一些实施方案中是一种治疗患有以B细胞的表达为特征的疾病的个体的方法,所述方法包括向所述个体提供有效量的组合物,所述组合物包含有效量的包含本文所描述的异多聚体构建体的药物组合物。在一些实施方案中,所述疾病对用抗-CD19抗体和抗-CD20抗体中的至少一种治疗无反应。在某些实施方案中,所述疾病是对CD19或CD20溶胞抗体抗性的癌症或自身免疫性病状。

[0288] 提供一种治疗有需要的哺乳动物中的自身免疫性病状的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用包含有效量的本文所描述的组合物。在某些实施方案中,所述自身免疫性病状是以下中的一种或多种:多发性硬化症、类风湿性关节炎、红斑狼疮、银屑病性关节炎、银屑病、血管炎、葡萄膜炎、克罗恩氏病和1型糖尿病。

[0289] 提供一种治疗有需要的哺乳动物中的炎性病状的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用包含有效量的包含本文所描述的异多聚体的药物组合物的组合物。

[0290] 根据本文所提供的教义,本领域的普通技术人员将知道如何出于诊断、监测或治疗目的来使用本文所描述的异多聚体而无需过多实验。

[0291] 本文所描述的包含抗体的至少一个片段或变体的异多聚体可单独或与其它类型的治疗(例如,放射疗法、化学疗法、激素疗法、免疫疗法以及抗肿瘤剂)组合施用。一般来说,优选的是施用具有与所述患者的物种相同的物种的物种起源或物种反应性(在抗体的情况下)的产品。因此,在一个实施方案中,为了治疗或预防将人抗体、片段衍生物、类似物或核酸施用至人患者。

[0292] 基因疗法:

[0293] 在一个具体实施方案中,施用包含编码本文所描述的异多聚体蛋白的序列的核酸以通过基因疗法来治疗、抑制或预防与蛋白质的异常表达和/或活性相关的疾病或病症。基因疗法是指通过向受试者施用已表达或可表达的核酸所进行的疗法。在本发明的这个实施方案中,所述核酸产生其编码的介导治疗作用的蛋白质。可使用本领域中可用的任何基

因疗法方法。

[0294] 虽然本领域中描述的接合 T 细胞的双特异性单链抗体对于治疗恶性疾病具有巨大治疗潜力,但这些双特异性分子中的大多数受限制,在于它们是物种特异性的并且仅识别人抗原和(由于遗传相似性)可能黑猩猩对应物。本发明的优点是提供包含 CD3 ϵ 链的结合结构域的双特异性单链抗体,所述结合结构域表现出对人和非黑猩猩灵长类的交叉物种特异性。

[0295] 治疗或预防活性的证明:

[0296] 将本文所描述的异多聚体或药物组合物在人中使用之前针对所需的治疗或预防活性在体外、并且然后在体内进行测试。例如,用于证明化合物或药物组合物的治疗或预防效用的体外测定包括化合物对细胞系或患者组织样品的作用。所述化合物或组合物对所述细胞系和/或组织样品的作用可使用本领域技术人员已知的技术进行测定,所述技术包括但不限于玫瑰花结(rosette)形成测定和细胞溶解测定。根据本发明,可用于确定是否指示施用特定化合物的体外测定包括体外细胞培养测定,其中将患者组织样品生长在培养物中并且暴露于异多聚体或以另外的方式施用异多聚体,并且观察所述异多聚体对所述组织样品的作用。

[0297] 治疗性/预防性施用和组合物:

[0298] 提供通过向受试者施用有效量的本文所描述的异多聚体或药物组合物来治疗、抑制和预防的方法。在一个实施方案中,所述异多聚体是大体上纯化的(即,大体上不含限制其作用或产生所不希望的副作用的物质)。在某些实施方案中,所述受试者是动物,包括但不限于动物如牛、猪、马、鸡、猫、狗等,并且在某些实施方案中是哺乳动物,并且最优选人。

[0299] 不同递送系统是已知的并且可用于施用本文所描述的异多聚体制剂,例如封装在脂质体、微颗粒、微胶囊中,能够表达所述化合物的重组细胞,受体介导的内吞作用(参见,例如 Wu 和 Wu, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432(1987))、构建作为逆转录病毒或其它载体的一部分的核酸等。引入方法包括但不限于皮内、肌肉、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。所述化合物或组合物可通过任何适宜途径施用,例如通过输注或弹丸注射,通过经上皮或粘膜皮肤衬层(例如口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收,并且可与其它生物活性剂一起施用。施用可为全身性或局部施用。此外,在某些实施方案中,希望通过任何适合的途径(包括心室内和鞘内注射)将本文所描述的异多聚体组合物引入中枢神经系统中;心室内注射可通过例如附接至储库(如 Ommaya 储库)的心室内导管来促进。还可以采用肺部施用,例如通过使用吸入器或喷雾器以及具有雾化剂的制剂。

[0300] 在一个具体实施方案中,希望将本文所描述的异多聚体或组合物局部施用于需要治疗的区域;这可通过例如但不限于以下的方式来实现:在外科手术过程中局部输注、局部应用例如在外科手术之后结合伤口敷料、通过注射、借助于导管、借助于栓剂或借助于植入物,所述植入物是多孔或无孔或凝胶状材料,包括膜如硅橡胶膜(sialastic membrane)或纤维。优选地,当施用本发明的蛋白质(包括抗体)时,必须注意使用所述蛋白质不会吸收的材料。

[0301] 在另一个实施方案中,所述异多聚体或组合物可以囊泡、具体地说脂质体的形式递送(参见 Langer, *Science* 249:1527-1533(1990); Treat 等,于 *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein 和 Fidler(编

著), Liss, New York, 第 353-365 页 (1989); Lopez-Berestein, 同上, 第 317-327 页; 参见通常同上)。

[0302] 在另一实施方案中, 可以控制释放系统来递送异多聚体或组合物。在一个实施方案中, 可使用泵 (参见 Langer, 同上; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald 等人, *Surgery* 88:507 (1980); Saudek 等人, *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989))。在另一个实施方案中, 可使用聚合材料 (参见 *Medical Applications of Controlled Release*, Langer 和 Wise (编著), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen 和 Ball (编著), Wiley, New York (1984); Ranger 和 Peppas, J., *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61 (1983); 还参见 Levy 等, *Science* 228:190 (1985); During 等, *Ann. Neurol.* 25:351 (1989); Howard 等, *J. Neurosurg.* 71:105 (1989))。在另一实施方案中, 控制释放系统可邻近治疗性靶标 (例如脑) 置放, 由此仅需要全身剂量的一部分 (参见例如 Goodson, *Medical Applications of Controlled Release*, 同上, 第 2 卷, 第 115-138 页 (1984))。

[0303] 其它控制释放系统在 Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)) 的综述中论述。

[0304] 在包含编码本文所描述的异多聚体的核酸的一个具体实施方案中, 所述核酸可通过将其构建为适当核酸表达载体的一部分并且施用它以使得它变成细胞内核酸来体内施用以促进它所编码的蛋白质的表达, 此举的实现是例如通过使用反转录病毒载体 (参见美国专利号 4, 980, 286), 或通过直接注射, 或通过使用微粒轰击 (例如基因枪; Biolistic, Dupont), 或用脂质或细胞表面受体或转染剂包覆, 或通过将它与已知会进入核的同源盒样肽 (homeobox-like peptide) 连接来施用 (参见例如 Joliot 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1864-1868 (1991))。或者, 可通过同源重组将核酸引入细胞内并且并入宿主细胞 DNA 内以用于表达。

[0305] 本文还提供药物组合物。所述组合物包含治疗有效量的化合物和药学上可接受的载体。在一个具体实施方案中, 术语“药学上可接受的”意指由联邦或州政府的监管机构批准、或在美国药典或其它一般公知的药典中列出的用于动物并且更具体地说人。术语“载体”是指使用其来施用治疗剂的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。这类药物载体可以是无菌液体, 如水和油, 包括石油、动物、植物或合成来源的那些油, 如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内施用药物组合物时, 水是优选的载体。盐水溶液和水性右旋糖和甘油溶液也可用作液体载体, 尤其用于可注射溶液。适合的药用赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂乳粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。必要时, 组合物还可含有少量湿润剂或乳化剂或 pH 缓冲剂。这些组合物可采取溶液、悬浮液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊、散剂、缓释制剂等的形式。所述组合物可用传统粘合剂和载体 (如甘油三酯) 配制成栓剂。口服制剂可包括标准载体, 如药用级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。适合的药物载体的实例描述于 E. W. Martin 的“*Remington's Pharmaceutical Sciences*”中。所述组合物将包含治疗有效量的所述化合物 (优选呈纯化形式) 连同适合量的载体, 以便提供适于施用至患者的形式。所述制剂应该符合施用方式的要求。

[0306] 在某些实施方案中, 将包含所述异多聚体的组合物根据常规工序配制为适用于静

脉内施用至人类的药物组合物。通常,用于静脉内施用的组合物是无菌等渗水性缓冲液中的溶液。必要时,组合物还可包含增溶剂和局部麻醉剂(如利多卡因)以减轻注射部位的疼痛。一般来说,所述成分是单独或混合在一起以单位剂型(例如作为干燥冻干粉末或无水浓缩物)提供于指示活性剂的量的密闭容器(如安瓿或药囊)中。在组合物有待通过输注施用的情况下,所述组合物可用含有无菌药用级水或盐水的输注瓶分配。在组合物通过注射施用的情况下,可提供含注射用无菌水或盐水的安瓿以便可在施用前混合各成分。

[0307] 在某些实施方案中,本文所描述的组合物被配制为中性或盐形式。药学上可接受的盐包括与阴离子形成的那些盐,如衍生自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的盐;和与阳离子形成的那些盐,如衍生自钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的盐。

[0308] 可通过标准临床技术来确定本文所描述的组合物将有效于治疗、抑制和预防与治疗性蛋白的异常表达和/或活性相关的疾病或病症的量。另外,可任选地采用体外测定以帮助鉴别最佳剂量范围。待用于所述制剂中的精确剂量还将取决于给药途径,和疾病或病症的严重程度,并且应该根据从业者的判断和每位患者的状况决定。由来源于体外或动物模型测试系统的剂量-反应曲线推算有效剂量。

[0309] 在某些实施方案中,本文所描述的异多聚体构建体适合一次或经由一系列治疗对患者施用。取决于疾病的类型和严重性,约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $15\text{mg}/\text{kg}$ (例如 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ - $10\text{mg}/\text{kg}$)的T细胞活化双特异性抗原结合分子可以是用于施用至患者的最初候选剂量,无论例如通过一次或多次单独的施用或通过连续输注。取决于上文提及的因素,一种典型每日剂量可能在约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $100\text{mg}/\text{kg}$ 或更高的范围内。为在若干天或更长时间内重复施用,取决于病状,治疗将通常持续直至出现所需的疾病症状抑制。本文所描述的异多聚体的一种示例性剂量将是在约 $0.005\text{mg}/\text{kg}$ 至约 $10\text{mg}/\text{kg}$ 的范围内。在其它非限制性实例中,剂量还可包括每次施用约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、约 $5\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、约 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、约 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、约 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、约 $200\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、约 $350\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、约 $500\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、约 $1\text{mg}/\text{kg}$ 体重、约 $5\text{mg}/\text{kg}$ 体重、约 $10\text{mg}/\text{kg}$ 体重、约 $50\text{mg}/\text{kg}$ 体重、约 $100\text{mg}/\text{kg}$ 体重、约 $200\text{mg}/\text{kg}$ 体重、约 $350\text{mg}/\text{kg}$ 体重、约 $500\text{mg}/\text{kg}$ 体重至约 $1000\text{mg}/\text{kg}$ 体重或更多以及可从中推论出的任何范围。在来自本文所列出的数字的可推论的范围的非限制性实例中,基于以上所述的数字,可施用约 $5\text{mg}/\text{kg}$ 体重至约 $100\text{mg}/\text{kg}$ 体重、约 $5\text{mg}/\text{kg}$ 体重至约 $500\text{mg}/\text{kg}$ 体重等的范围。因此,约 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $5.0\text{mg}/\text{kg}$ 或 $10\text{mg}/\text{kg}$ (或其任何组合)的一种或多种剂量可施用至患者。所述剂量可间歇地施用,例如每周或每三周(例如,以使得患者接受约二至约二十或例如约六个剂量的T细胞活化双特异性抗原结合分子)。可施用初始较高负载剂量,接着一个或多个较低剂量。然而,其它剂量方案可为有用的。通过常规技术和测定容易地监测此疗法的进展。

[0310] 本文所描述的异多聚体通常以有效于实现意图目的的量使用。为了用于治疗或预防疾病病状,以治疗有效量施用或应用本文所描述的异多聚体或其药物组合物。确定治疗有效量完全在本领域技术人员的能力范围内,尤其是根据本文所提供的详细公开内容。

[0311] 对于全身性施用,可由体外测定如细胞培养测定来初始地评估治疗有效剂量。接着可在动物模型中配制剂量以实现循环浓度范围,所述范围包括如在细胞培养中测定的 IC_{50} 。所述信息可用于更准确地确定人的有用剂量。

[0312] 还可使用本领域中熟知的技术由体内数据例如动物模型来评估初始剂量。本领域的普通技术人员可基于动物数据容易地优化对人的施用。

[0313] 本领域的普通技术人员可基于动物数据容易地优化对人的施用。用于通过注射施用的常见患者剂量在约 0.1 至 50mg/kg/天、通常约 0.5 至 1mg/kg/天的范围内。治疗上有有效的血浆水平可通过每天施用多个剂量来实现。血浆水平可例如通过 HPLC 来测量。

[0314] 在局部施用或选择性摄入的情况下,本文所描述的异多聚体的有效局部浓度可能不涉及血浆浓度。本领域技术人员将能够在不进行过度实验的情况下优化治疗上有有效的局部剂量。

[0315] 本文所描述的异多聚体构建体的治疗上有有效的剂量将通常提供治疗益处而不会引起实质性毒性。本文所描述的异多聚体的毒性和治疗功效了通过标准制药工序在细胞培养或实验动物中进行测定。细胞培养测定和动物研究可用于测定 LD₅₀(对群体的 50% 的致命剂量)以及 ED₅₀(在群体的 50% 中的治疗有效剂量)。毒性作用与治疗效果之间的剂量比是疗效指数,所述指数可表示为比例 LD₅₀/ED₅₀。优选表现出较大疗效指数的 T 细胞活化双特异性抗原结合分子。在一个实施方案中,根据本发明的本文所描述的异多聚体构建体表现出较高治疗指数。由细胞培养测定和动物研究获得的数据可用于配制适用于人的剂量范围。所述剂量优选处于包括 ED₅₀ 的具有极小毒性或无毒性的循环浓度范围内。剂量可取决于多种因素例如所采用的剂型、所利用的施用途径、受试者的病状等而在这个范围内变化。可以由个体医师鉴于患者的病状来选择确切制剂、施用途径以及剂量(参见,例如 Fingl 等,1975, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第 1 章, 第 1 页,其以引用的方式整体并入本文)。

[0316] 用本文所描述的异多聚体构建体治疗的患者的主治医师将知道如何和何时由于毒性、器官功能障碍等而终止、中断或调整施用。反之,主治医师还将知道在临床反应不适当时将治疗调整至较高水平(排除毒性)。在处置目标病症时,所施用的剂量的量值将随治疗的病状的严重程度、施用途径等而变化。可以(例如)通过标准预后评估方法来部分评估病状的严重程度。此外,剂量并且或许剂量频率还将根据个体患者的年龄、体重以及反应而变化。

[0317] 还提供一种用于产生包含本文所描述的异多聚体的药物组合物的方法,所述方法包括:在允许异多聚体表达的条件下培养宿主细胞;从所述培养物回收所产生的异多聚体;以及产生所述药物组合物。

[0318] 其它药剂和治疗:

[0319] 在某些实施方案中,本文所描述的异多聚体构建体在疗法中与一种或多种其它药剂组合施用。例如,在一个实施方案中,本文所描述的异多聚体与至少一种另外治疗剂共同施用。术语“治疗剂”涵盖被施用以治疗需要所述治疗的个体中的症状或疾病的任何药剂。所述另外治疗剂可包含适用于所治疗的特定适应症的任何活性成分,优选为具有不会不利地影响彼此的互补活性的那些。在某些实施方案中,另外治疗剂是免疫调节剂、细胞生长抑制剂、细胞粘附的抑制剂、细胞毒性剂、细胞凋亡的活化剂或增加细胞对细胞凋亡诱导物的敏感度的药剂。在具体实施方案中,另外治疗剂是抗癌剂,例如微管破坏剂、抗代谢药、拓扑异构酶抑制剂、DNA 嵌入剂、烷化剂、激素疗法、激酶抑制剂、受体拮抗剂、肿瘤细胞凋亡的活化剂或抗血管生成剂(antiangiogenic agent)。

[0320] 所述其它药剂适合以有效达到意图目的的量存在于组合中。所述其它药剂的有效量取决于所使用的 T 细胞活化双特异性抗原结合分子的量、病症或治疗的类型以及以上讨论的其它因素。本文所描述的异多聚体通常以与本文所描述的相同剂量和给药途径使用，或以约 1% 至 99% 的本文所描述的剂量使用，或以在经验和 / 临床上被确定为适当的任何剂量和任何途径使用。

[0321] 以上指出的这类组合疗法涵盖组合施用（其中两种或更多种治疗剂被包含在同一或单独组合物中）和单独施用，在这种情况下，施用本文所描述的异多聚体可在施用另外治疗剂和 / 或佐剂之前、同时和 / 或之后发生。本文所描述的异多聚体构建体还可与放射疗法组合使用。

[0322] 制品：

[0323] 在本发明的另一方面，提供含有适用于治疗、预防和 / 或诊断上述病症的材料的制品。所述制品包括容器和在所述容器上或与所述容器相关联的标签或药品说明书。适合的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器、IV 溶液袋等。所述容器可由多种材料如玻璃或塑料形成。容器保存为本身或与另一种组合物组合的对治疗、预防和 / 或诊断病状有效的组合物并且可具有无菌入口 (sterile access port) (例如，容器可为具有可经皮下注射用注射针刺破的塞子的静脉输液袋或小瓶)。所述组合物中的至少一种活性剂是本发明的 T 细胞活化双特异性抗原结合分子。所述标签或药品说明书指示组合物用于治疗所选的病状。此外，制品可以包括 (a) 其中含有组合物的第一容器，其中所述组合物包含本文所描述的异多聚体；和 (b) 其中含有组合物的第二容器，其中所述组合物包含另一细胞毒性剂或另外治疗剂。本发明的这个实施方案中的制品可还包括指示所述组合物可用于治疗特定病状的药品说明书。或者或另外地，制品可还包括第二（或第三）容器，其包括药学上可接受的缓冲剂，如抑菌性注射用水 (BWF1)、磷酸盐缓冲食盐水、林格氏溶液以及右旋糖溶液。所述制品可还包括在商业和使用者看来可取的其它材料，包括其它缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

实施例

[0324] 以下特定和非限制性实施例应仅被解释为说明性的，并且不以任何方式限定本公开。无需进一步详述，据信本领域的技术人员可基于本文描述而在最大程度上利用本公开。本文所引用的所有公布均特此以引用的方式整体并入。当提到一个 URL 或其它这种标识符或地址时，应了解这类标识符可以改变，并且互联网上的特定信息可以发生变动，但是等效信息可以通过搜索互联网来发现。对这类信息的援引显示了它们的可用性和公众传播。

[0325] 实施例 1：与不对称 IgG1 Fc 融合的双特异性 CD3-CD19 scFv。

[0326] 表现出可比得上天然 Fc 同二聚体的稳定性的与不对称 IgG1 Fc 异二聚体融合的双特异性 CD3-CD19 scFv 是被鉴别为 v873 的新颖组合物。v873 属于基于 CD3 的双特异性不对称 (azymetric) IgG1 抗体的新颖家族，所述抗体相较于 Amgen/Micromet bscCD19xCD3 BiTE 双特异性可在哺乳动物 CHO 细胞中以显著更高产率表达和纯化。V873 显示出出人意料的效应细胞：靶细胞结合、桥联以及靶细胞杀伤。

[0327] V873 和基于 CD3 的双特异性不对称抗体在靶向 T 细胞介导的患病细胞杀伤中具有效用并且因此可适用于治疗癌症以及自身免疫性和炎症性疾病。v873 是与不对称 IgG1 Fc 融

合的双特异性 CD3-CD19 scFv。v873 代表一种新颖的双特异性不对称抗体类别,所述抗体包含一个抗 -CD3 弹头和包含靶细胞的细胞表面抗原的第二弹头,以及包含异二聚体 IgG1 Fc 的抗体 Fc 异二聚体。CD3 弹头与 Fc 的链 A 或 B 的融合对于其成药特性是重要的。作为另外实例, V874 和 V875 是与不对称 IgG1 Fc 融合但具有不同 CD3 氨基酸组成的两种其它双特异性 CD3-CD19 scFv。

[0328] v873 显示出与 Amgen/Micromet 兰妥莫单抗 CD3-CD19 BiTE 串联 scFv 相比,出人意料的良好哺乳动物 CHO 表达和纯化产率。v873 桥联 T 细胞与 B 细胞并且使用静止和 IL-2 活化的人 PBMC 产生对培养的人伯基特氏淋巴瘤细胞 (B 细胞淋巴瘤系) 的有效杀伤。

[0329] v873 及其相关的双特异性 CD3 不对称抗体与 Amgen/Micromet CD3-CD19 BiTE 不同并且具有可结合 FcγR 以介导 ADCC、CDC、ADCP 效应子活性的 IgG1 异二聚体 Fc。v873 可结合 FcRn 并且这一异二聚体 Fc 类别显示出典型的抗体可制造性特征和在食蟹猴中大于 8 天的较长半衰期。相比之下,兰妥莫单抗在非人猴和人患者中具有小于数小时的半衰期。

[0330] v873 及其相关的基于 CD3 的双特异性构建体解决了已知的串联 scFv 的稳定性问题和公认的兰妥莫单抗的较差可制造性。v873 解决了兰妥莫单抗的短 PK 和由于其野生型 FcRn 结合亲和力所致的 CNS 不良作用以及限制其分布至外周隔室的 MWT。最后,不对称异二聚体 Fc 赋予另外定制的 FcγR 效应子 ADCC、CDC 和 ADCP 活性并且因此对药物抗性肿瘤赋予功效。

[0331] v873 介导 PBMC(T 细胞)-B 细胞杀伤的能力是高度出人意料的。据报道兰妥莫单抗 bscCD 19xCD3 和相关 BiTE 的特性依赖于使用灵活连接的单链可变片段 (scFv),所述片段被布置成通过短接头连接的串联形式,这将允许与使用较大双特异性形式如四源杂交瘤 (quadroma) 抗体所可能的相比,更紧密接近相对细胞。所述灵活键联预期使 2 个 scFv 臂能够自由旋转和扭结,从而有助于同时识别 2 个相对细胞膜上存在的 2 个表位和形成细胞溶解性免疫突触 (synapse)。因此,基于所报道和公认为 BiTE 所独有的,出人意料的是,如本文所描述的在异二聚体 Fc 上具有 CD3 和 CD19 scFv 弹头的显著不同结构呈现的双特异性 CD3-CD19 构建体可结合、桥联 T 细胞和 B 细胞,并且介导 PBMC(T 细胞)-B 细胞杀伤。其它应用包括 B 细胞驱动的自身免疫性和炎性疾病如 RA、狼疮、MS、IBD 中的 B 细胞的消减。此外, V873 相关的基于 CD3 的双特异性不对称抗体可适用于诊断目的。

[0332] 关于上述的另外细节在以下实施例中找到。

[0333] 实施例 2。具有异二聚体 Fc 的异多聚体构建体的设计、表达和纯化。

[0334] 示例性双特异性抗 -CD3 和抗 -CD19 异二聚体抗体

[0335] 在图 1A 中示出抗 -CD3/ 抗 -CD19 抗体的示例性示意性图示。

[0336] v873、v874、v875 举例说明了双特异性抗 -CD3/ 抗 -CD19 异二聚体 Fc 构建体并且如以下所描述来制备和测试。当所述描述包括对 BiTE 的参考时,它是指在有或没有如以下所指示的对可变重链和轻链取向 (例如 VH-VL) 的修饰的情况下抗体构建体具有与抗 -CD3 抗 -CD19 BiTE 分子的 VH 或 VL 相同的氨基酸序列。

[0337] v873 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗 -CD19 BiTE (VL-VH) scFv 和链 B 上的 CD3 BiTE™ (VH-VL) scFv,其中链 A 上具有突变 L351Y_F405A_Y407V,并且链 B 上具有突变 T366L_K392M_T394W。[多肽序列对应于 SEQ ID No:26 和 28]

[0338] v874 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗 -CD19 BiTE™ (VL-VH) scFv 和链 B 上的 CD3

BiTE™(VLVH) scFv, 其中链 A 上具有突变 L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 T366L_K392M_T394W。[多肽序列对应于 SEQ ID No:30 和 32]

[0339] v875 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗 -CD19 BiTE™(VL-VH) scFv 和链 B 上的 CD3 OKT3(VL-VH) scFv, 其中链 A 上具有突变 L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 T366L_K392M_T394W。[多肽序列对应于 SEQ ID No:34 和 36]

[0340] v1379 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗 -CD19 BiTE™(VL-VH) scFv 和链 B 上的抗 -CD3(VH-VL)BiTE, 其中链 A 上具有突变 T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 T350V_T366L_K392L_T394W。[多肽序列对应于 SEQ ID No:87 和 88]

[0341] 二价单特异性抗 -CD3 和抗 -CD19 抗体

[0342] v865、v866、v867、v868 举例说明了单特异性抗 -CD3 或 CD19 二价 scFv-Fc 构建体并且如以下所描述来制备和测试:

[0343] v865 具有链 A 上的抗 -CD19 BiTE(VL-VH) scFv 和链 B 上的抗 -CD19BiTE scFv(具有 WT Fc)(105kDa)。[多肽序列对应于 SEQ ID No:2]

[0344] v866 具有链 A 上的抗 -CD3 BiTE™(VH-VL) 和链 B 上的抗 -CD3 BiTE™(VH-VL) scFv(具有 WT Fc)(105kDa)。[多肽序列对应于 SEQ ID No:4]

[0345] v867 具有链 A 上的抗 -CD3 BiTE™(VL-VH) scFv 和链 B 上的抗 -CD3 BiTE™(VL-VH) scFv(具有 WT Fc)(105kDa)。[多肽序列对应于 SEQ ID No:6]

[0346] v868 具有链 A 上的抗 -CD3 OKT3(VL-VH) scFv 和链 B 上的抗 -CD3 OKT3 VL-VH scFv(具有 WT Fc)(105kDa)。[多肽序列对应于 SEQ ID No:8]。

[0347] 单价单特异性抗 -CD3

[0348] v869 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗 -CD19 BiTE™ scFv(VL-VH) 和链 B 上的 Fc, 其中链 A 上具有突变 L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 T366L_K392M_T394W(80kDa)。[多肽序列对应于 SEQ ID No:10 和 12]。

[0349] v870 具有在异二聚体 Fc 的链 B 上的抗 -CD3 BiTE™(VH-VL) scFv 和链 A 上的 Fc, 其中链 A 上具有突变 L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 T366L_K392M_T394W(80kDa)。[多肽序列对应于 SEQ ID No:14 和 16]。

[0350] v871 具有在异二聚体 Fc 的链 B 上的抗 -CD3 BiTE™(VL-VH) scFv 和链 A 上的 Fc, 其中链 A 上具有突变 L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 T366L_K392M_T394W(80kDa)。[多肽序列对应于 SEQ ID No:18 和 20]。

[0351] v872 具有在异二聚体 Fc 的链 B 上的抗 -CD3 OKT3(VL-VH) scFv 和链 A 上的 Fc, 其中链 A 上具有突变 L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 T366L_K392M_T394W(80kDa)。[多肽序列对应于 SEQ ID No:22 和 24]。

[0352] 基准对照

[0353] v891 具有相同序列兰妥莫单抗 BiTE™抗 -CD3 BiTE scFv 和抗 -CD19 BiTE scFv(50kDa)[多肽序列对应于 SEQ ID No:90]

[0354] 示例性具有敲除 Fc 的单特异性或双特异性抗 -CD3 和抗 -CD19 异二聚体抗体

[0355] v1380 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗 -CD19 BiTE™(VL-VH) scFv 和链 B 上的抗 -CD3 VHVL BiTE™, 其中链 A 上具有突变 L234A_L235A_T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 L234A_L235A_T350V_T366L_K392L_T394W(对应于多肽序列 SEQ I D NO:93)

和 94)。

[0356] v1381 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗 -CD19 BiTE™(VL-VH) scFv 和链 B 上的抗 -CD3 BiTE™ scFv (VH-VL), 其中链 A 上具有突变 N297A_T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 N297A_T350V_T366L_K392L_T394W。(对应于多肽序列 SEQ ID NO:93 和 98)

[0357] 具有用于稳定性增强的工程化抗 -CD3 弹头的变体

[0358] 以下变体含有抗 -CD3 scFv 的突变, 所述突变包括接头长度、VH-VL 取向或点突变的任一变化, 以改进稳定性和产率。

[0359] v1653 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗 -CD19 BiTE™(VL-VH) scFv 和链 B 上的抗 -CD3 OKT3 (VL-VH) (在 VH CDR3 的位置 100A 处具有 C 至 S 突变), 其中链 A 上具有突变 T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 T350V_T366L_K392L_T394W。(对应于多肽序列 SEQ ID NO:101 和 102)

[0360] v1654 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗 -CD19 BiTE™ scFv 和链 B 上的抗 -CD3 OKT3 OKT3 (VH-VL) (具有 18 个氨基酸的接头), 其中链 A 上具有突变 T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 T350V_T366L_K392L_T394W。(对应于多肽序列 SEQ ID NO:105 和 106)

[0361] v1655 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗 -CD19 BiTE™ scFv 和链 B 上的抗 -CD3 OKT3 OKT3 (VH-VL) (具有 10 个氨基酸的接头), 其中链 A 上具有突变 T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 T350V_T366L_K392L_T394W。(对应于多肽序列 SEQ ID NO:109 和 110)

[0362] v1656 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗 -CD3 BiTE™ VHVL s cFv 和链 B 上的抗 -CD19 BiTE™(VL-VH), 其中链 A 上具有突变 T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 T350V_T366L_K392L_T394W。(对应于多肽序列 SEQ ID NO:113 和 114)

[0363] v1657 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗 -CD3 OKT3 (VL-VH) scFv (在 VH CDR3 的位置 100A 处具有 C 至 S 突变) 和链 B 上的抗 -CD19 BiTE™(VL-VH) scFv, 其中链 A 上具有突变 T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 T350V_T366L_K392L_T394W。(对应于多肽序列 SEQ ID NO:117 和 118)

[0364] v1658 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗 -CD3 OKT3 (VH-VL) scFv (具有 18 个氨基酸的接头) 和链 B 上的抗 -CD19 BiTE™(VL-VH) scFv, 其中链 A 上具有突变 T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 T350V_T366L_K392L_T394W。(对应于多肽序列 SEQ ID NO:121 和 122)

[0365] v1659 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗 -CD3 OKT3 (VH-VL) scFv (具有 10 个氨基酸的接头) 和链 B 上的抗 -CD19 BiTE™(VL-VH) scFv, 其中链 A 上具有突变 T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 T350V_T366L_K392L_T394W。(对应于多肽序列 SEQ ID NO:125 和 126)

[0366] v1660 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗 -CD3 OKT3 (VH-VL) scFv (具有 19 个氨基酸的接头) 和链 B 上的抗 -CD19 BiTE™(VL-VH) scFv, 其中链 A 上具有突变 T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 T350V_T366L_K392L_T394W。(对应于多肽序列 SEQ ID NO:129 和 130)

[0367] 具有用于稳定性增强的工程化抗-CD3 弹头的 Fc 敲除变体

[0368] 以下变体是含有抗-CD3 scFv 的突变的 Fc 敲除变体,所述突变包括接头长度、VH-VL 取向或点突变的任一变化,以改进稳定性和产率。

[0369] v1661 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗-CD19 BiTE™(VL-VH) scFv 和链 B 上的抗-CD3 OKT3 (VL-VH) scFv,其中链 A 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_L351Y_F405A_Y407V,并且链 B 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_T366L_K392L_T394W。[多肽序列对应于 SEQ ID No:38 和 40]

[0370] v1662 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗-CD19 BiTE™(VL-VH) scFv 和链 B 上的抗-CD3 OKT3 (VL-VH) scFv (在 VH CDR3 的位置 100A 处具有 C 至 S 突变),其中链 A 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_L351Y_F405A_Y407V,并且链 B 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_T366L_K392L_T394W。[多肽序列对应于 SEQ ID No:42 和 44]

[0371] v1663 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗-CD19 BiTE™(VL-VH) scFv 和链 B 上的抗-CD3 OKT3 (VL-VH) scFv (具有 18 个氨基酸的接头),其中链 A 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_L351Y_F405A_Y407V,并且链 B 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_T366L_K392L_T394W。(对应于多肽序列 SEQ ID NO:133 和 134)

[0372] v1664 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗-CD19 BiTE™(VL-VH) scFv 和链 B 上的抗-CD3 OKT3 (VH-VL) scFv (具有 10 个氨基酸的接头),其中链 A 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_L351Y_F405A_Y407V,并且链 B 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_T366L_K392L_T394W。(对应于多肽序列 SEQ ID NO:137 和 138)

[0373] v1665 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗-CD3 BiTE™(VH-VL) scFv 和链 B 上的抗-CD19 BiTE™(VL-VH) scFv,其中链 A 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_L351Y_F405A_Y407V,并且链 B 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_T366L_K392L_T394W。(对应于多肽序列 SEQ ID NO:141 和 142)

[0374] v1666 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗-CD3 OKT3 (VH-VL) scFv (具有 19 个氨基酸的接头)和链 B 上的抗-CD19 BiTE™(VL-VH) scFv,其中链 A 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_L351Y_F405A_Y407V,并且链 B 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_T366L_K392L_T394W[多肽序列对应于 SEQ ID No:46 和 48]。

[0375] v1667 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗-CD19 BiTE™(VL-VH) scFv 和链 B 上的抗-CD3 OKT3 (VL-VH) scFv,其中链 A 上具有突变 N297A_T350V_L351Y_F405A_Y407V,并且链 B 上具有突变 N297A_T350V_T366L_K392L_T394W。(对应于多肽序列 SEQ ID NO:145 和 146)

[0376] v1668 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗-CD19 BiTE™(VL-VH) scFv 和链 B 上的抗-CD3 OKT3 (VL-VH) scFv (在 VH CDR3 的位置 100A 处具有 C 至 S 突变),其中链 A 上具有突变 N297A_T350V_L351Y_F405A_Y407V,并且链 B 上具有突变 N297A_T350V_T366L_K392L_T394W。(对应于多肽序列 SEQ ID NO:149 和 150)

[0377] v1669 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗-CD19 BiTE™(VL-VH) scFv 和链 B 上的抗-CD3 OKT3 (VH-VL) scFv (具有 18 个氨基酸的接头),其中链 A 上具有突变 N297A_T350V_L351Y_F405A_Y407V,并且链 B 上具有突变 N297A_T350V_T366L_K392L_T394W。(对应于多肽序列 SEQ ID NO:153 和 154)

[0378] v1670 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗-CD19 BiTE™(VL-VH) scFv 和链 B 上的

抗-CD3 OKT3 (VH-VL) scFv (具有 10 个氨基酸的接头), 其中链 A 上具有突变 N297A_T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 N297A_T350V_T366L_K392L_T394W。(对应于多肽序列 SEQ ID NO:157 和 158)

[0379] v1671 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗-CD3 BiTE™(VH-VL) scFv 和链 B 上的抗-CD19 BiTE™(VL-VH) scFv, 其中链 A 上具有突变 N297A_T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 N297A_T350V_T366L_K392L_T394W。(对应于多肽序列 SEQ ID NO:161 和 162)

[0380] v1672 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗-CD3 OKT3 (VH-VL) scFv (具有 19 个氨基酸的接头) 和链 B 上的抗-CD19 BiTE™(VL-VH) scFv, 其中链 A 上具有突变 N297A_T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 N297A_T350V_T366L_K392L_T394W。(对应于多肽序列 SEQ ID NO:165 和 166)

[0381] 单价抗-CD3 抗体

[0382] 以下变体含有抗-CD3 scFv 的突变, 所述突变包括接头长度、VH-VL 取向或点突变的任一变化, 以改进稳定性和产率。

[0383] v1673 具有在异二聚体 Fc 的链 B 上的抗-CD3 OKT3 (VL-VH) s cFv (在 VH CDR3 的位置 100A 处具有 C 至 S 突变) 和链 A 上的 Fc, 其中链 A 上具有突变 T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 T350V_T366L_K392L_T394W。(对应于多肽序列 SEQ ID N O:169 和 170)

[0384] v1674 具有在异二聚体 Fc 的链 B 上的抗-CD3 OKT3 (VH-VL) s cFv (具有 18 个氨基酸的接头) 和链 A 上的 Fc, 其中链 A 上具有突变 T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 T350V_T366L_K392L_T394W。(对应于多肽序列 SEQ ID NO:173 和 174)

[0385] v1798 具有在异二聚体 Fc 的链 B 上的抗-CD3 OKT3 (VH-VL) s cFv (具有 10 个氨基酸的接头) 和链 A 上的 Fc, 其中链 A 上具有突变 T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 T350V_T366L_K392L_T394W。(对应于多肽序列 SEQ ID NO:177 和 178)

[0386] v1799 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗-CD3 OKT3 (VH-VL) scFv (具有 19 个氨基酸的接头) 和链 B 上的 Fc, 其中链 A 上具有突变 T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 T350V_T366L_K392L_T394W。(对应于多肽序列 SEQ ID NO:181 和 182)

[0387] 双特异性二硫化物 44-100 稳定化变体

[0388] 以下变体含有在可变轻链中的位置 100 处和可变重链中的位置 44 处的针对二硫化物稳定化的点突变 (指定为 44-100SS)。

[0389] v1800 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗-CD19 BiTE™(VL-VH) scFv 和链 B 上的抗-CD3 OKT3 (VL-VH) 44-100SS, 其中链 A 上具有突变 T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 T350V_T366L_K392L_T394W。(对应于多肽序列 SEQ ID NO:185 和 186)

[0390] v1801 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗-CD19 BiTE™(VL-VH) scFv 和链 B 上的抗-CD3 OKT3 (VL-VH) (在 VH CDR3 的位置 100A 处具有 C 至 S 突变) 44-100SS, 其中链 A 上具有突变 T350V_L351Y_F405A_Y407V 并且链 B 上具有突变 T350V_T366L_K392L_T394W。(对应于多肽序列 SEQ ID NO:189 和 190)

[0391] v1802 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗-CD3 BiTE™(VH-VL) 44-100SS scFv 和链 B 上的抗-CD19 BiTE™(VL-VH) scFv, 其中链 A 上具有突变 T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且

链 B 上具有突变 T350V_T366L_K392L_T394W。(对应于多肽序列 SEQ ID NO:193 和 194)

[0392] v4541 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的抗-CD3 BiTE™(VH-VL)44-100SS scFv 和链 B 上的抗-CD19 BiTE™(VL-VH) scFv, 其中链 A 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_T366L_K392L_T394W。[多肽序列对应于 SEQ ID No:50 和 52]

[0393] 有或没有二硫化物 44-100 稳定化的食蟹猴 (Cyno)/ 人交叉反应性抗-CD3 和抗-CD19 双特异性 Fc 敲除变体

[0394] v4542 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的食蟹猴 / 人交叉反应性抗 -C D3 BiTE™ 12C(VH-VL) scFv 和链 B 上的食蟹猴 / 人交叉反应性抗-CD19 MOR208(VH-VL) scFv, 其中链 A 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_T366L_K392L_T394W。[多肽序列对应于 SEQ ID No:54 和 56]。

[0395] v4543 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的食蟹猴 / 人交叉反应性抗 -C D3 BiTE™ 12C(VH-VL)44-100SS scFv 和链 B 上的食蟹猴 / 人交叉反应性抗-CD19 MOR208(VH-VL)44-100SS scFv, 其中链 A 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_T366L_K392L_T394W。[多肽序列对应于 SEQ ID No:58 和 60]

[0396] v4544 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的食蟹猴 / 人交叉反应性抗 -C D3 BiTE™ 12C(VH-VL) scFv 和链 B 上的食蟹猴 / 人交叉反应性抗-CD19 MOR208(VL-VH) scFv, 其中链 A 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_T366L_K392L_T394W。[多肽序列对应于 SEQ ID No:62 和 64]

[0397] v4545 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的食蟹猴 / 人交叉反应性抗 -C D3 BiTE™ 12C(VH-VL)44-100SS scFv 和链 B 上的食蟹猴 / 人交叉反应性抗-CD19 MOR208(VL-VH)44-100SS scFv, 其中链 A 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_T366L_K392L_T394W。[多肽序列对应于 SEQ ID No:66 和 68]

[0398] v4546 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的食蟹猴 / 人交叉反应性抗 -C D3 BiTE™ 12C(VH-VL) scFv 和链 B 上的食蟹猴 / 人交叉反应性抗-CD19 MDX-1342(VH-VL) scFv, 其中链 A 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_T366L_K392L_T394W。[多肽序列对应于 SEQ ID No:70 和 72]

[0399] v4547 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的食蟹猴 / 人交叉反应性抗 -CD3 BiTE™ 12C(VH-VL)44-100SS scFv 和链 B 上的食蟹猴 / 人交叉反应性抗-CD19 MDX-1342(VH-VL)44-100SS scFv, 其中链 A 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_T366L_K392L_T394W。[多肽序列对应于 SEQ ID No:74 和 76]。

[0400] v4548 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的食蟹猴 / 人交叉反应性抗 -C D3 BiTE™ 12C(VH-VL) scFv 和链 B 上的食蟹猴 / 人交叉反应性抗-CD19 MDX-1342(VL-VH) scFv, 其中链 A 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_T366L_K392L_T394W。[多肽序列对应于 SEQ ID No:78 和 80]

[0401] v4549 具有在异二聚体 Fc 的链 A 上的食蟹猴 / 人交叉反应性抗 -CD3

BiTE™ 12C(VH-VL)44-100SS scFv 和链 B 上的食蟹猴 / 人交叉反应性抗 -CD19 MDX-1342(VL-VH)44-100SS scFv, 其中链 A 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且链 B 上具有突变 D265S_L234A_L235A_T350V_T366L_K392L_T394W。[多肽序列对应于 SEQ ID No:82 和 84]

[0402] 所述抗体和抗体对照如下进行克隆和表达。使用针对人 / 哺乳动物表达优化的密码子通过基因合成构建编码抗体重链和轻链的基因。从已知的 Her2/neu 结合 Ab 产生 Fab 序列 (Carter P. 等 (1992) Humanization of an anti P185Her2 antibody for human cancer therapy. Proc Natl Acad Sci 89, 4285.) 并且 Fc 是 IgG1 同种型。从以下各项产生 scFv-Fc 和 OAA 序列: 已知的抗 -CD3 和 CD19 scFv Bite 抗体 (Kipriyanov 等, 1998, Int. J Cancer:77, 763-772)、抗 -CD3 BiTE 抗体 (US2011/0275787)、抗 -CD3 单克隆抗体 OKT3 (Drug Bank 参考:DB00075)、抗 -CD19 抗体 MDX-1342 (WO2009054863 ;WO2007002223)。

[0403] 将最终基因产物亚克隆至哺乳动物表达载体 pTT5 (NRC-BRI, 加拿大) 中并且在 CHO 细胞中表达 (Durocher, Y., Perret, S. & Kamen, A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing CHO cells. Nucleic acids research 30, E9 (2002))。

[0404] 将 CHO 细胞在指数生长期 (1.5 至 2 百万个细胞 /mL) 用水性 1mg/mL 25kDa 聚乙烯亚胺 (PEI, Polysciences) 以 2.5:1. 的 PEI:DNA 比率转染。(Raymond C. 等 A simplified polyethylenimine-mediated transfection process for large-scale and high-throughput applications. Methods. 55(1):44-51 (2011))。为了确定用于形成异二聚体的最佳浓度范围, 将 DNA 以允许异二聚体形成的重链 A (HC-A)、轻链 (LC) 以及重链 B 的最佳 DNA 比率进行转染 (例如 HC-A/HC-B/ 比率 = 50:50% (OAA ;HC/Fc), 50:50%。在 5 至 6 天之后收获转染的细胞, 其中在于 4000rpm 下离心之后收集培养基并且使用 0.45 μm 过滤器澄清。

[0405] 将澄清的培养基负载到 MabSelect SuRe (GE Healthcare) 蛋白质 -A 柱上并且用 10 柱体积的 PBS 缓冲液 (pH 7.2) 洗涤。将抗体用 10 柱体积的柠檬酸盐缓冲液 (pH 3.6) 洗脱, 其中将含有抗体的合并部分用 TRIS (pH 11) 中和。将蛋白质使用 Econo-Pac 10DG 柱 (Bio-Rad) 进行最终脱盐。

[0406] 在一些情况下, 将蛋白质通过如下的方法经由蛋白质 L 层析进行进一步纯化。将 Capto L 树脂 PBS 用 PBS 平衡并且将用 1M Tris 中和的蛋白质 A 纯化的 v875, 添加至树脂并且在室温下孵育 30 分钟。将树脂用 PBS 洗涤并且收集流过物, 将结合的蛋白质用 0.5ml 0.1M 甘氨酸 (pH 3) 洗脱。

[0407] 在一些情况下, 将蛋白质通过凝胶过滤进行进一步纯化, 并且将 3.5mg 的抗体混合物浓缩至 1.5mL 并通过 AKTA Express FPLC 以 1mL/ 分钟的流速负载到 Superdex 200 HiLoad 16/600200pg 柱 (GE Healthcare) 上。pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液以 1mL/ 分钟的流速使用。收集对应于纯化的抗体的部分, 将其浓缩至约 1mg/mL 并且储存在 -80°C 下。

[0408] 在图 7 中示出示例性 v873、874、875 以及其它不对称抗体相较于参考 v891 的瞬时表达。图 7 中的 SDS-PAGE 显示所有示例性异多聚体可在 CHO3E7 细胞中瞬时表达, 其中细胞存活力 >80%。

[0409] 实施例 3: 异多聚体 v873 能够桥联 Jurkat CD3T 细胞与 Raji CD19B 细胞。

- [0410] 通过如下的 FACS 分析对 v873 桥联 T 细胞与 B 细胞的能力进行测试。
- [0411] 通过 FACS 进行的全细胞桥联
- [0412] 将悬浮在 RPMI 中的 1×10^6 个细胞 /ml 用 $0.3 \mu\text{M}$ 的适当 CellTrace 标记进行标记并混合, 并且在水浴中在 37°C 下孵育 25 分钟
- [0413] 将沉淀再悬浮于 2ml 的 L10+GS1+NaN3 中至终浓度 5×10^6 个细胞 /ml。
- [0414] 通过流式细胞术对细胞悬浮液进行分析 (1/5 稀释) 以验证适当的细胞标记和激光设置。flow-check 和 flow-set 荧光团用于验证仪器标准化、光学对准和流体学
- [0415] 在流式细胞术验证之后并且在桥联之前, 将各细胞系以所需比例、以 1×10^6 个细胞 /ml 的最终浓度混合在一起。
- [0416] 用 Jurkat-紫色 +Jurkat-远红色评定 T:T 桥联, 用 RAJI-violet+RAJI-FarRed 评定 B:B 桥联并且用 Jurkat-violet+RAJI-FarRed 评定 T:B 桥联。
- [0417] 将抗体在室温下在 L10+GS1+NaN3 中稀释至 2x, 然后添加至细胞, 接着轻轻混合并且孵育 30 分钟。
- [0418] 在 30 分钟孵育之后, 添加 $2 \mu\text{l}$ 的碘化丙啶并缓慢混合, 并且立即通过流式细胞术进行分析。
- [0419] 桥联%被计算为同时标记紫色和远红色 (Far-red) 的事件的百分比。
- [0420] 图 1B 示出通过 FACS 测定的 v873 和兰妥莫单抗 CD19-CD3 BiTE (v891, MT-103) 桥联 Jurkat CD3 T 细胞 (左上象限) 与 Raji CD19 B 细胞 (右下象限) 的能力。桥联的 T-B 细胞出现在右上象限。这一结果证明在 300nM 下, 异多聚体 v873 能够以与 BiTE (总细胞的 21%) 类似的程度 (总细胞的 23%) 特异性地桥联 Jurkat T 细胞与 Raji B 细胞。
- [0421] 实施例 4: 异多聚体选择性地结合表达 CD3 和 CD19 的细胞。
- [0422] 通过 FACS 对示例性异多聚体 v873 特异性地结合 CD3 和 CD19 的能力进行评定。也如实施例 2 中所描述制备针对 CD3 和 CD19 的单臂抗体 (OAA) 并且将其在以下所描述的全细胞 FACS 结合测定中作为对照进行测试。
- [0423] 通过 FACS 方案进行全细胞结合:
- [0424] 将 2×10^6 个细胞 /ml 细胞 (>80% 存活力) 再悬浮于 L10+GS1 培养基中, 与抗体稀释液混合并且在冰上孵育 1 小时。
- [0425] 将细胞通过添加 10ml 的冰冷 R-2 缓冲液洗涤并且在 $233g$ 下在 4°C 下离心 10 分钟。将细胞沉淀用 $100 \mu\text{l}$ (在 L10+GS1 培养基中 1/100 稀释) 的荧光标记的抗小鼠或抗人 IgG 再悬浮并且在室温下孵育 1 小时。
- [0426] 如之前所描述通过添加 10ml 的冰冷 R-2 洗涤细胞处理, 并且将细胞沉淀用 $400 \mu\text{l}$ 的冰冷 L-2 再悬浮, 并且将样品通过 Nitex 过滤并添加至含有 $4 \mu\text{l}$ 碘化丙啶的管。
- [0427] 通过流式细胞术对样品进行分析。
- [0428] 结果在图 2 中示出并且证明 v873 能够选择性地结合并且桥联表达 CD3 的 Jurkat T 细胞 (下图) 和表达 CD19 的 Raji B 细胞 (上图)。图 2 还证明单臂抗 -CD3 抗体特异性地结合 Jurkat T 细胞并且不与表达 CD19 的 B 细胞交叉反应, 并且所述单臂抗 -CD19 抗体特异性地结合 Raji B 细胞并且不与 Jurkat T 细胞交叉反应。
- [0429] 重复这一实验并且结果在图 9 中示出。如之前实验中, FACS 测定显示 v873 选择性地结合 Jurkat T- 细胞和 Raji B- 细胞 (图 9B)。图 9A 显示人 IgG (hIgG) 不与 Jurkat

T- 细胞结合并且与 Raji B- 细胞具有低水平结合 (如所预期), 这是由于 Raji B- 细胞上 hIgG Fc 与 CD32B 之间的相互作用。图 9A 还显示抗 -CD19 OAA 选择性地结合 Raji B 细胞并且不与 Jurkat T 细胞交叉反应。

[0430] 还进行 FACS 测定以确认 v873 不结合不表达 CD3 或 CD19 的对照细胞系。图 10 显示 v873 不结合 K562 细胞系, 所述细胞系不表达 CD19 或 CD3。图 11 显示 v873 也不结合小鼠淋巴样细胞, 所述细胞不表达 CD19 或 CD3。

[0431] 实施例 5 : 异多聚体介导靶 Raji B 细胞的 PBMC 杀伤

[0432] 在初步实验中, 如下使用 IL-2 刺激的 PBMC 对示例性异多聚体 v873 介导针对靶 Raji B 细胞的 T 细胞细胞毒性的能力进行测量。

[0433] 连续两天从选定供体收集用于单独研究的人血 (120-140mL)。在两天, 从供体新鲜分离 PBMC 并且在需要时将所述 PMBC 的一部分穿过 EasySep (STEMCELL Technologies Inc.) 柱以用于 CD4+ 和 CD8+ 富集。在第一天, 将所述 PBMC 和富集部分用每 mL 1000-3000 单位的 IL-2 活化, 孵育过夜。将培养物用阴性选择柱进行处理以分离活化的 CD4+ 和 CD8+ 细胞。然后标记细胞并且将其通过细胞计数进行分析以评估制剂中 CD69+ 细胞的含量。来自第二天的 PBMC 和富集部分在无 IL-2 活化的情况下或以静止状态用于测定中。

[0434] 在细胞毒性测定中静止和 IL-2 活化的 PBMC 以及纯化的 CD4+ 和 CD8+ 用作效应细胞并且 Raji 人 B 细胞用作靶细胞。针对 PBMC 测试 30:1 的效应细胞 : 靶细胞比例并且针对纯化的 CD4+ 和 CD8+ 测试 15:1 的效应细胞 : 靶细胞比例。PBMC 还在 20ug/mL 的 het-FC 存在下测试且在不同测试浓度的测试项目下评估细胞的细胞毒性。

[0435] 在将细胞与测试品一起孵育 20 至 26 小时之后, 收集 50uL 细胞培养物上清液以用于使用 Promega LDH 酶试剂盒进行 LDH 分析。。在一些研究中, 将自体 T 细胞和 B 细胞和 / 或同种异体 B 细胞针对其在培养物中的相应比例以及其 7AAD+ 细胞含量进行评定

[0436] CFSE 作为 Raji B 细胞与自体 B 细胞之间的差别标记使用并测试。将 Raji 靶细胞在有或没有测试项目的情况下在与效应子一起孵育之前用最小量的 CFSE 预先标记。将细胞沉淀再悬浮于不同的抗体混合物中以用于流式细胞术分析。Guava 8HT 流式细胞仪用于分析细胞亚群。除非指明, 所有抗体均自 BD Biosciences 获得。

[0437] 所测试的每种条件包括适当的对照 ; 对于所有供体, 将分别具有所有效应子和靶细胞类型的孔与在用于效力测定中的所有浓度下与所有测试项目一起孵育。

[0438] 为了避免所述测试项目与其靶标 (CD3 和 CD19) 的结合之间的任何位阻, 对于图 23 中所示的研究, 用于 B 细胞和 T 细胞染色的标记物分别是抗 -CD20 和抗 -CD7。这一测定是用静止和 IL2 活化的 PBMC、纯化的 CD4+ 和 CD8+ T 细胞进行。

[0439] 数据分析 :

[0440] 对于 LDH 分析, 使用 Molecular Devices Emax 测定每个孔在 490nm 下的光密度 (OD)。使用 LibreOffice Calc 软件进行数据分析。以下分析方案用于计算细胞毒性应答 :

[0441] 首先, 在评估细胞毒性应答之前从所有孔减去平均培养基背景信号 (OD 值)。对于去污剂诱导的纯靶细胞的最大释放, 使用考虑去污剂的存在体积校正的特异性背景信号并且将其从最大释放 OD 值中减去。

[0442] 对于所测试的每种效应细胞群体 : PBMC、CD4 和 CD8 阴性选择的群体, 从无任何测试项目的孔中获得组合的效应细胞和靶细胞的自发释放。测试系统的背景 LDH 活性在无任

何测试项目存在的含有效应细胞-靶细胞群体的实验混合物的孔中更好地评估。

[0443] 在所有供体的所有板之间,来自 Raji 细胞、培养基对照孔以及 LDH 阳性对照孔的自发和最大 LDH 释放用于监测板之间的变化。

[0444] 图 3A 描绘 v873 重定向 IL-2 活化的 PBMC 以杀死来自 3 个供体的靶 Raji B 细胞的能力。图 3B 证明 v873 能够比所述供体之一中的 v891 介导更高的重定向 T- 细胞细胞毒性。这些初步结果指示如由 v873 例证的异多聚体可能能够比 v891 介导更高的 T 细胞细胞毒性。

[0445] 对相较于人 IgG1 对照, v873 介导 3 个供体中的 Raji B 细胞的 PBMC 杀伤的能力进行了评定。用于这一实验的方法遵循实施例 5 中所概述的方法,其中进行以下修改:在每 mL 1000-3000 单位下对 PBMC 的 IL-2 刺激进行测试。

[0446] 图 8 中所示的结果指示当跨个体供体比较时,当与阴性对照人 IgG1 (G1) 人相比时, v873 诱导针对靶 B 细胞的更高细胞毒性%。在一些情况下,在每 mL 3000 单位下用更高浓度的 IL-2 刺激产生更高的针对靶 B 细胞的细胞毒性%。

[0447] 实施例 6:异多聚体用静止和 IL-2 活化的 CD4+ 和 CD8+ T 细胞介导靶 Raji B 细胞的重定向杀伤。

[0448] 如实施例 5 中所描述对示例性异多聚体 v875、v1379、v1380 介导针对靶 Raji B 细胞的 CD4+ 和 CD8+ T 细胞细胞毒性的能力进行测量。

[0449] 图 16A 描绘 v875、v1379 和 v1380 通过针对 Raji B 细胞重定向的 CD4+ 和 CD8+ T 细胞介导抗体依赖性 B 细胞细胞毒性的能力。图 16 的上图说明静止 CD4+ 和 CD8+ T 细胞针对 Raji B 细胞的细胞毒性。这些结果说明 v875、v1380 和 v891 引出在 CD8+ T 细胞中更显著的浓度依赖性细胞毒性应答。图 16 的下图说明 IL-2 刺激的 CD4+ 和 CD8+ T 细胞针对靶 Raji B 细胞的细胞毒性。这些结果指示使用 IL-2 活化的 CD8+ 效应 T 细胞, v875 和 v1379 引出与 v891 相比类似的 RajiB 细胞细胞毒性。在所有情况下,与 IL-2 活化的 CD4+ T 细胞相比,使用 IL-2 活化的 CD8+ T 细胞引出更大的细胞毒性应答。这些结果还指示 FcGr 敲除变体 v1380 是针对靶 Raji B 细胞细胞毒性的,但与具有 WT 异二聚体 Fc 的 v875 和 v1379 (大约 60%最大) 相比有效性略低 (大约 40%最大细胞毒性)。

[0450] 图 16B 至 16E 描绘针对 v875 (图 16B 和图 16C) 以及 v1379 和 v1380 (图 16D 和图 16E) 的标准化至人 IgG 的图 16A 中的数据图示,并且包括在每个测试抗体浓度下所指示的细胞毒性%。图 16B 显示使用 v875,用 IL-2 活化的 CD4+ 和 CD8+ 效应 T 细胞,针对靶 Raji B 细胞的细胞毒性%。图 16C 显示使用 v875,用静止 CD4+ 和 CD8+ 效应 T 细胞,针对靶 Raji B 细胞的细胞毒性%。图 16D 和 16E 显示 IL-2 活化的 (图 16D) 和静止 (图 16E) CD4+ 和 CD8+ T 细胞中 v1379 (WT Fc) 和 v1380 (L234A_L235A Fc 敲除) 的直接比较。在 IL-2 活化的 CD8+ T 细胞群体 (图 16D, 左图) 中观察到 L234A_L235A Fc 敲除 (v1380) 针对靶 B 细胞细胞毒性的最显著影响,其中 v1380 与 v1379 相比细胞毒性更弱。

[0451] 使用 v875、v873 和人 IgG 如图 19 中所示重复所述实验,使用静止 (图 19A) 和 IL-2 活化的 CD8+ T 细胞 (图 19B) 作为靶向 Raji B 细胞的效应细胞。图 19A 示出在 IL-2 活化的 CD8+ T 细胞作为效应子的情况下, v875 和 v873 引出针对靶 Raji B 细胞的 >30% 细胞毒性,并且在 3nM 浓度下观察到最大靶细胞杀死。图 19B 示出在静止 CD8+ T 细胞作为效应子的情况下, v875 和 v873 引出针对靶 Raji B 细胞的剂量依赖性 (>20%) 细胞毒性。当 IL-2

活化的 CD8⁺ T 细胞用作效应细胞时观察到更大的靶 Raji B 细胞杀伤。

[0452] 如图 20 中所示重复所述实验,以便比较在 0.06-10.0nM 范围内的 v875 浓度下, CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞针对靶 Raji B 细胞的杀伤的相对贡献。图 20A 示出在 IL-2 活化的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的情况下, v875 的靶 Raji B 细胞细胞毒性。用 IL-2 活化的 CD4⁺ 细胞和 CD8⁺ T 细胞引出的靶 B 细胞杀伤百分比在高于 0.06nM 的 v875 浓度下未增加。如所预期,与 IL-2 活化的 CD4⁺ T 细胞相比,使用 IL-2 活化的 CD8⁺ T 细胞,靶 B 细胞杀伤更大。图 20B 示出在静止 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的情况下, v875 的靶 Raji B 细胞细胞毒性。用静止 CD8⁺ 细胞引发的靶 B 细胞杀伤百分比在高于 0.1nM 的 v875 浓度下未极大增加。当使用 CD4⁺ 和 CD8⁺ 效应 T 细胞时,用 v875 和 v873 观察到剂量依赖性 B 细胞杀伤。如所预期,与静止 CD4⁺ T 细胞相比,使用静止 CD8⁺ T 细胞,靶 B 细胞杀伤更大。

[0453] 实施例 7:异二聚体 Fc 促成靶 Raji B 细胞细胞毒性

[0454] 如实施例 5 中所描述对示例性异多聚体 v875 和 v873 在存在和不存在 Fc 的情况下介导靶 Raji B 细胞细胞毒性的能力进行测量。

[0455] 图 17 描绘如通过 LDH 测定确定的在存在或不存在 Fc 封闭的情况下, v875 和 v873 不对称抗体介导的 IL-2 活化的 PBMC 和靶 Raji B 细胞细胞毒性。图 17A 示出 IL-2 活化的 PBMC 的 Fc 封闭导致靶 Raji B 细胞的细胞毒性%略微降低 (v875) 或无降低 (v873)。图 17B 示出对于 v875 和 v873 来说,静止 PBMC 的 Fc 封闭导致靶 Raji B 细胞的细胞毒性%降低。

[0456] 重复所述实验并且结果在图 18 中示出。图 18A 示出在针对 v875 和 v873 所测试的所有抗体浓度下, IL-2 活化的 PBMC 的 Fc 封闭导致靶 Raji B 细胞的细胞毒性%降低。图 18B 示出在针对 v875 和 v873 所测试的所有抗体浓度下,静止 PBMC 的 Fc 封闭导致靶 Raji B 细胞的细胞毒性%降低。图 17 和 18 示出 Fc 促成异二聚体 v875 和 v873 抗体中的靶 Raji B 细胞细胞毒性。

[0457] 实施例 8:异多聚体介导自体 B 细胞细胞毒性

[0458] 在总静止和 IL-2 刺激的 PBMC 中对示例性异多聚体 v875 和 v873 杀伤自体 B 细胞的能力进行测量,其中如实施例 5 中所描述通过流式细胞术对在与 v875 和 v873 (300nM, n = 3 个供体) 一起孵育之后 CD19⁺7AAD⁺ 细胞的百分比进行测定。

[0459] 图 21 示出相对于未处理的培养基和人 IgG 对照, v875 和 v873 (300nM) 在总静止 PBMC (左图) 和总 IL-2 活化的 PBMC 中介导自体 B 细胞杀伤。

[0460] 实施例 9:与 BiTE 相比,异多聚体 v875 不损害自体 T 细胞细胞毒性

[0461] 在总静止和 IL-2 刺激的 PBMC 中对示例性异多聚体 v875 和 v873 处理对自体 T 细胞群体的作用进行评定,其中如实施例 5 中所描述通过流式细胞术对在与 v875 和 v873 (300nM, n = 3 个供体) 一起孵育之后 CD3⁺7AAD⁺ 细胞的百分比进行测定。

[0462] 图 22 示出相对于未处理的培养基和人 IgG 对照,与 v873 和 v891 相比, v875 通过不损害更多自体 T 细胞而具有更具选择性的 B 细胞杀伤。

[0463] 实施例 10:具有白蛋白支架的异多聚体的设计、表达和纯化。

[0464] 如下设计并制备基于白蛋白支架的以下示例性 CD3-CD19 结合异多聚体。

[0465] 抗 -CD19 和抗 -CD3 scFv 的序列选自两种分子,所述分子目前处于临床试验并且被充分证明且针对稳定性和产生进行了测试。抗 -CD19 和抗 -CD3 scFv 直接从 BiTE 分子

兰妥莫单抗采用。与 BiTE 中所使用的一致,以 VH-VL 取向选择抗 CD3 scFv。基准分子是基于 BiTE 的 scFv 分子 (v891)。通过使抗 CD3 弹头附接至片段 1 的天然 N 末端并且使抗 CD19 附接至片段 2 的 C 末端来产生 AlbuCORE_1 (ABH2) CD3/CD19 融合 (v1092, 多肽序列对应于 SEQ ID NO:264 和 266)。所使用的接头与用于多价 HER2 AlbuCORE 实验的接头相同:在片段 1 的 N 末端处 GGGs 并且在片段 2 的 C 末端处 (GGSG)₄GG。产生第二分子 v1093, 其中将弹头进行反转 (即抗 -CD19 弹头在片段 1 的天然 N 末端处并且抗 -CD3 在片段 2 的 C 末端处)。1094 被设计成在白蛋白多肽的天然末端处容纳两种不同的融合 (多肽序列对应于 SEQ ID NO:268)。scFv 融合通过在 N 末端处的 GGS 接头和在 C 末端处的 GGSG 接头连接至白蛋白分子。接头的长度反映 MM-111 分子中所使用的接头,尽管具有不同的序列类型。

[0466] V221 是用于构建 v1092 的基于白蛋白的异多聚体,但无货物分子 (多肽序列对应于 SEQ ID NO:269 和 270)。

[0467] 如之前针对多价 HER2 所描述进行表达和纯化。

[0468] 实施例 11:具有白蛋白支架的异多聚体特异性地结合表达 CD3 或 CD19 的细胞

[0469] 使用 FACS 对负载抗 -CD3x CD19 的 AlbuCORE-1 (v1092) 结合 CD3⁺和 CD19⁺细胞的能力进行评定并且将其与负载有相同抗 -CD scFv 的 WT-HSA (v1094) 进行比较。

[0470] 结果在图 4 中示出并且证明 v1092 和 v1094 两者均能够结合表达 CD3 的 Jurkat T 细胞和表达 CD19 的 Raji B 细胞。

[0471] 实施例 12:具有异二聚体 Fc 或白蛋白支架的异多聚体显示可比较的 B 细胞靶向和 T 细胞桥联

[0472] 根据实施例 3 中所描述的方法通过 FACS 分析来比较具有不同支架的异多聚体指导 B 细胞靶向和 T 细胞桥联的能力。根据实施例 4 中所描述的方法针对 B 细胞和 T 细胞结合将 v1092 构建体针对 v873 和 v891 BiTE 对照进行另外测试。

[0473] 结果在图 5A 中示出并且指示在所测试的浓度下, v1093 能够桥联 31% 的总细胞, 并且 v873 能够桥联 25% 的总细胞 (下图)。上图是使用培养基作为对照的结果。如实施例 3 中所描述, v873 桥联 B 细胞和 T 细胞的能力可比得上 v891 BiTE 对照桥联 B 细胞和 T 细胞的能力。图 5A 进一步指示 v1093 桥联 B 细胞和 T 细胞的能力可比得上 v873 桥联 B 细胞和 T 细胞的能力。

[0474] 在另一实验中,将 v1092 桥联 T 细胞和 B 细胞的能力直接与 v221 对照和 v873 以及 v891 对照相比较。结果在图 5B 中示出,其证明 v1092 能够以大于 v221 并且类似于 v891 和 v873 的程度桥联 Jurkat T 细胞和 Raji B 细胞。

[0475] 实施例 13:示例性异多聚体在与 T 和 B 细胞的结合中具有较高抗 -CD3 KD 和较高 B_{max}, 如通过 FACS 所测定。

[0476] 如实施例 4 中所描述通过 FACS 对示例性异多聚体 v873 和 v875 的 K_d进行评定, 其中在 GraphPad Prism 中进行数据分析和曲线拟合。

[0477] 这一实验的结果在图 12 中示出并且指示与 v891 相比, v873 和 v875 两者具有较高的抗 -CD3 亲和力。v873 和 v875 结合表达 CD19 的 Raji 细胞的 KD 在所有抗体中类似并且可比得上 v891。图 12A 和 12B 示出 v873、v875 和 v891 与表达 CD3 的 HPB-ALL 和 Jurkat T 细胞以及表达 CD19 的 Raji B 细胞的 FACS 结合曲线。图 12B 还示出当与 v891 相比时, v875 具有针对结合 Raji B 细胞和 Jurkat T 细胞的较高 B_{max}。表 1 总结 v875、v873 和 v891

结合 HPB-ALL 细胞、Jurkat 细胞和 Raji 细胞的 KD 值。

[0478] 表 1 :通过 FACS 测定的 T 和 B 细胞结合的 KD 总结

[0479]

	Jurkat 结合 (nM)	HBP-ALL 结合 (nM)	Raji 结合 (nM)
v873	9.3 ± 0.6	11.2 ± 1.0	2.7 ± 0.5
v875	4.5 ± 0.003	4.7 ± 0.3	4.5 ± 0.9
v891	NA	64.5 ± 70.3	2.7 ± 1.2

[0480] 如实施例 4 中所描述通过 FACS 针对结合表达 CD19 的 Raji 细胞对示例性异多聚体 v875、v1379、v1380、v1381 以及 v891 的 K_D 进行评定,其中在 GraphPad Prism 中进行数据分析和曲线拟合。

[0481] 这一实验的结果在图 13A 和表 2 中示出并且指示异多聚体 v875、v1379、v1380、v1381 以及 v891 具有针对结合表达 CD19 的 Raji 细胞的类似 KD。图 13A 示出用以 0.1 至 300nM 范围测试的抗体获得的 FACS 结合曲线。表 2 总结从 FACS 结合实验获得的呈 nM 的导出 KD、Bmax 和 Hill 斜率。图 13A 还示出与 BiTE 相比,所测试的所有异多聚体具有针对结合表达 CD19 的 Raji 细胞的较高 Bmax。

[0482] 表 2 :异多聚体与 Raji B 细胞的结合特性的总结

[0483]

	875	1379	1380	1381	891
max	3140	0978	955	3892	153
hill 斜率	.9789	.067	.230	.206	.072
D	.491	.124	.946	.360	.841

[0484] 与 HBP-ALL T 细胞的 FACS 结合的结果在图 13B 和表 3 中示出并且指示与 v891 相比,异多聚体 v875、v1379、v1380 具有较低 KD。图 13B 示出用以 0.1 至 300nM 范围测试的抗体获得的 FACS 结合曲线。表 3 总结从 FACS 结合实验获得的呈 nM 的导出 KD、Bmax 和 Hill 斜率。图 13B 还示出与 v891 相比,所测试的所有异多聚体具有针对结合 HBP-ALL 的较高 Bmax。

[0485] 表 3 :异多聚体与 HBP-ALL T 细胞的结合特性的总结

[0486]

	875	1379	1380	1381	KT3	891
max	7118	7997	0420	9557	3339	295
III斜率	.099	.104	.296	.9148	.195	.8300
D	9.05	7.89	.547	08.4	.4607	68.4

[0487] 实施例 14 :异多聚体 v875 能够桥接 Jurkat CD3 T 细胞与 Raji CD19 B 细胞。

[0488] 如实施例 3 中所描述通过 FACS 分析对异多聚体 v875 桥接 T 细胞与 B 细胞的能力进行测试。

[0489] 这一实验的结果在图 14 中示出并且指示 v875 和 v891 两者均促进 Raji B 细胞与 Jurkat T 细胞之间的可比较的桥联。使用对照人 IgG 导致 Raji 细胞与 Jurkat 细胞之间的 2.5% 桥联,而 v875 促进 22.9% 的总细胞桥联,并且 v891 促进 14.5% 的总细胞桥联。这些结果还被呈现为超过背景的成倍桥联,其中 v875 介导超过背景的 9.2 倍桥联增加,而 v891 介导超过背景的 5.8 倍桥联增加。

[0490] 实施例 15 :通过异多聚体桥联 B 细胞与 T 细胞在不同抗体浓度或细胞比例下是稳健的。

[0491] 如实施例 3 中所描述通过 FACS 对 v875 在不同浓度下桥联 B 细胞与 T 细胞的能力进行评定,其中修改包括在 v875 的三种不同浓度下对效应细胞与靶细胞 (E:T) 比例 (1:1 或 15:1) 作出的变化。

[0492] 结果在图 15A 和 15B 中示出。图 15A 示出使用 1:1 比例的 T 细胞与 B 细胞的桥联的量,其中异多聚体浓度为 0.3nM 至 3nM 的范围。图 15B 示出使用 15:1 比例的 T 细胞与 B 细胞的桥联的量,其中异多聚体浓度为 0.3nM 至 3nM 的范围。当表示为超过背景的倍数时,用 v875 测试的两个 E:T 比例 (1:1 和 15:1) 导致类似的总 T 细胞 -B 细胞桥联。

[0493] 实施例 16 :B 细胞与 T 细胞的桥联在不同工程化的异多聚体构建体中是稳健的。

[0494] 如实施例 3 中所描述通过 FACS 对 v875 桥联 Raji B 细胞与 Jurkat T 细胞 (B:T) 的能力,以及 Raji:Raji B 细胞桥联 (B:B) 和 Jurkat:Jurkat T 细胞桥联 (T:T) 进行评定。

[0495] 结果在图 35A、34B 以及 34C 中示出。图 34A 示出在三次实验重复内 v875、v1379、v1380、v891、v1381、商业 OKT3 以及人 IgG 的 T:B、B:B 和 T:T 桥联的量。这些结果显示所有异多聚体抗体介导高百分比的 T:B 桥联并且所有变体具有高于 v891 的 % T:B 桥联。这些结果还显示对于所有变体,相对于 % T:B 桥联,低百分比的 T:T 和 B:B 桥联。

[0496] 图 34B 示出具有用于稳定性增强的工程化抗 -CD3 弹头的变体 (v1653、v1654、v1655、v1656、v1660、v1800、v1802) 和 v875 以及人 IgG 的 T:B、B:B 和 T:T 桥联的量。这些结果显示与人 IgG 阴性对照相比,所有异二聚体抗体 (v875、v1653、v1654、v1655、v1656、v1660、v1800、v1802) 介导较高百分比的 T:B 桥联,并且所有变体介导低 T:T 桥联。这些结果还显示相对于 T:B 桥联,一些变体 (v1660、v1654 和 v1655) 介导较高的 B:B 桥联。

[0497] 图 34C 示出具有用于稳定性增强的工程化的抗-CD3 弹头的 Fc 敲除变体 (v1666) 或具有人/食蟹猴交叉反应性抗-CD3 和抗-CD19 scFv 的 Fc 敲除变体 (v4541, v4543, v4545, v4548)、商业 OKT3 抗-CD3 对照、v2176 抗-CD19 对照和人 IgG 阴性对照的 T:B、B:B 和 T:T 桥联的量,并且所有变体介导低 T:T 桥联。这些结果显示,与人 IgG 阴性对照相比,所有异二聚体抗体 (v1666、v4541、v4543、v4545、v4548) 介导较高百分比的 T:B 桥联。这些结果还显示相对于 T:B 桥联,一些变体 (v1666、v4548) 介导较高的 B:B 桥联。

[0498] 实施例 17 :v875、v1380、v1379 对 IL-2 活化的和静止 CD20+、CD4+、CD8+ 亚群的作用

[0499] 如实施例 5 中所描述,通过 7AAD+ 染色和 FACS 对 v875、v1379 和 v1380 处理对 IL-2 活化的或静止 T 细胞和 B 细胞培养物中的 CD20+、CD4+、CD8+ 亚群的存活力的作用进行检查,并且将其标准化至同种型对照 (n = 4 个供体)。

[0500] 结果在图 23 中示出,并且说明相对于人 IgG 对照,示例性异多聚体 v875、v1379 和 v1380 介导 CD20+ B 细胞细胞毒性但不介导 CD4+ 或 CD8+ T 细胞细胞毒性。图 23A 示出 v875 对 IL-2 活化的细胞培养物中的 CD20+、CD4+、CD8+ 亚群的存活力的作用。图 23B 示出 v875 对静止细胞培养物中的 CD20+、CD4+、CD8+ 亚群的存活力的作用。图 23C 示出 v1379 和 v1380 对 IL-2 活化的细胞培养物中的 CD20+、CD4+、CD8+ 亚群的存活力的作用。图 23D 示出 v1379 和 v1380 对静止细胞培养物中的 CD20+、CD4+、CD8+ 亚群的存活力的作用。WT Fc 对 CD20+ B 细胞细胞毒性的贡献还在图 23C 和 23D 中示出,其中 v1379 在 IL-2 活化的和静止 CD4+ 和 CD8+ T 细胞两者中介导较大的 CD20+ B 细胞细胞毒性。

[0501] 实施例 18 :示例性异多聚体 v875 和 v873 需要效应 T 细胞和靶 B 细胞两者的存在来介导细胞毒性作用

[0502] 在以下修改的情况下,如实施例 5 中所描述,通过 LDH 释放对单独与效应细胞或靶细胞一起孵育 v875 和 v873 的影响进行评定。将总计 300,000 个静止和 IL-2 活化的 PBMC、150,000 个 CD8+ 效应细胞或 10,000 个 Raji 靶细胞孵育过夜,其中每种抗体在 300nM 下,连同针对每种条件无测试项目的对照。所呈现的数据是来自 3 个供体的平均结果

[0503] 静止效应细胞和 Raji B 细胞中抗体介导的 LDH 释放的结果在图 24A 中示出,并且活化的效应细胞中抗体介导的 LDH 释放的结果在图 24B 中示出。图 24A 示出相对于未处理的培养基和人 IgG 对照,v875 和 v873 不是针对 CD8+ T 细胞群体细胞毒性的。图 24A 还示出 v875 和 873 增加总 PBMC 群体中的细胞毒性,这可能是由于效应 T 细胞对靶 B 细胞的重定向杀伤。另外,图 24A 示出在不存在效应 T 细胞的情况下,相对于培养基和人 IgG 对照,v875 和 v873 不是针对 Raji B 细胞群体细胞毒性的。

[0504] 图 24B 示出活化的效应 PBMC 和 CD8+ T 细胞中 v875 和 v873 介导的 LDH 释放的结果。这些结果显示在存在效应 T 细胞和靶 B 细胞的情况下,当 v875 和 v873 与活化的 PBMC 一起孵育时细胞死亡的增加,这可能是由于异二聚体抗体所介导的重定向 B 细胞杀伤。图 24B 还示出相对于 v873 和培养基以及人 IgG 对照,v875 与活化的 CD8+ T 细胞一起孵育产生较高百分比的细胞死亡。

[0505] 实施例 19 :示例性异多聚体可以介导针对靶 Daudi B 细胞的 ADCC 或受损的 ADCC。

[0506] 使用 Daudi 细胞作为靶 B 细胞并且 FcR γ 3a 固定的 NK92 细胞作为效应细胞

(GS193761), 通过以下方法用 v875、v1379 和 v1380 进行抗体依赖性细胞介导的细胞毒性测定 (ADCC)。

[0507] 用具有预先优化的效应子 / 靶 (E/T) 比例 (5:1) 的不同浓度的样品进行剂量反应研究。将 Triton X-100 添加至最终浓度为 1% 的无效应细胞和抗体的细胞对照物以溶解靶细胞并且其用作最大溶解对照; 将测定缓冲液添加至无效应细胞和抗体的细胞对照物中并且其用作最小 LDH 释放对照。在无抗体存在下与效应细胞一起孵育的靶细胞被设定为当两种细胞一起孵育时非特异性 LDH 释放的背景对照。

[0508] 将测试品与细胞在 37°C /5% CO₂ 下一起孵育 5 至 6 小时并且用 LDH 试剂盒评定细胞存活力在 OD492nm 和 OD650nm 下读取吸光度。

[0509] 根据以下公式计算细胞溶解 (OD492nm) 的百分比:

[0510] $\text{细胞溶解}\% = 100 * (1 - (\text{OD 样品数据} - \text{OD 肿瘤细胞加效应细胞}) / (\text{OD 最大释放} - \text{OD 最小释放}))$ 。使用通过 GraphPad Prism 进行的 Sigmoidal 剂量反应非线性回归拟合来分析半最大有效浓度 (EC₅₀) 值。

[0511] 结果在图 25A 和 25B 中示出, 并且说明具有 WT Fc 的异多聚体 (v875 和 v1379) 可介导 ADCC (大约 40% 最大细胞溶解), 而具有 L234A_L235A 敲除 Fc 突变的 v1380 在针对靶 Daudi B 细胞的 ADCC 中受损。在图 25A 和 25B 中, 呈现与内部阳性对照利妥昔单抗的比较。

[0512] 实施例 20: 例性异多聚体具有受损的 CDC 介导的 Daudi B 细胞溶解

[0513] 使用 Daudi 细胞作为靶 B 细胞, 用 v875、v1379 和 v1380 进行基于细胞的补体依赖性细胞毒性测定 (CDC)。来自健康供体的人血清 (NHS) 用作补体的来源。将 10 μl NHS (于 40 反应体积中 10% 最终浓度) 添加至各孔以起始 CDC 级联反应并且孵育 2 小时。用 CellTiter-Glo® 发光细胞存活力测定试剂盒测量细胞存活力。

[0514] 用以下公式计算细胞存活力百分比:

[0515] $\text{细胞存活力}\% = 100 * ((\text{RLU 样品}) / (\text{RLU 细胞} + \text{NHS}))$, 气候 NHS 表示正常人血清。使用通过 GraphPad Prism 进行的 Sigmoidal 剂量反应非线性回归拟合来分析半最大有效浓度 (EC₅₀) 值。

[0516] 图 25C 和 25D 示出与阳性对照利妥昔单抗相比, 使用 v1380 和 v1379 (图 25C) 以及 v875 (图 25D) 进行的靶 Daudi B 细胞的 CDC 测定的结果。所有异多聚体显示相对于利妥昔单抗的受损的 CDC, 并且介导 15% 或更少的最大靶细胞溶解。

[0517] 实施例 21: 例性异多聚体的细胞增殖和细胞因子释放评定

[0518] 在 PBMC 和衍生自 PBMC 的亚群中检查孵育例性异多聚体对细胞增殖和细胞因子释放的影响。衍生自 PBMC 的亚群包括 PBMC、无 B 细胞的 PBMC (PBMC - B)、无 NK 细胞的 PBMC (PBMC - NK)、无 NK 细胞和 B 细胞的 PBMC (PBMC - NK - B)、具有 B 细胞的 CD8⁺ T 细胞以及无 B 细胞的 CD8⁺。简言之, 在 4 和 6 天的孵育期过程中将四个 (4) 供体针对 PBMC 和衍生自 PBMC 的亚群 (CD19⁻、CD56⁻ 或 CD19/CD56⁻ 消减的 PBMC 群体) 进行测试, 并且将两个 (2) 供体针对 CD8 和 CD8 加 B 细胞进行测试。用 2 种不同浓度 (0.3 和 100nM) 的测试项目进行增殖测定, 其中各自并入胸苷作为增殖读出。通过以下所描述的方法在流式细胞仪上使用 CBA (流式细胞珠阵列) 平台测量细胞因子。

[0519] 从 6 个正常供体收集血液样品 (用于 CD8 组中的潜在供体的 CD8 计数是之前测定), 在所述供体之中两个具有高 CD8 计数的供体被选择用于 CD8 实验组; 还安排一个供体

作为后补。在第 1 天,从 4 个供体中的每个收集约 135mL 血液(对于 PBMC 组),而在第 2 天从 2 个供体中的每个收集约 165ml 血液(对于 CD8 组)。在两天,将 PBMC 新鲜分离并且使 PBMC 穿过 EasySep 柱(STEMCELL 技术有限公司)以用于通过阳性选择消减 CD19 和 / 或 CD56(第 1 天)和通过阴性选择富集 CD8(±CD19)(第 2 天)。

[0520] 为了验证用于两天的选定亚群的组成 / 纯度 / 存活力,采用了由 CD8-FITC/CD56-PE/7AAD/CD19-PECY7/CD20-APC 组成的抗体混合物。

[0521] 在 2x 浓度下制备最终(在用细胞稀释之后)0.3 和 100nM 的测试项目;以 100 μ l 体积添加测试项目。将 PBMC 以 250,000 个细胞 / 孔接种于 100 μ l 的悬浮液中;将 CD8 级分以 150,000 个细胞 / 孔接种。将混合物分别孵育 3 天和 5 天,之后将 50 μ l / 孔的细胞上清液转移至低结合板中并且冷冻用于之后细胞因子分析。将 50 μ l 氟化胸苷添加至含有细胞的孔,最终 0.5uCi 胸苷 / 孔;将板孵育另外 18 小时,之后将板冷冻。总孵育时间是 4 天和 6 天。

[0522] 在两天之后将板解冻、过滤并且使用 β - 计数器计数 (CPM)。

[0523] 在 2 种浓度的测试项目 (0.3 和 100nM) 下测定细胞增殖。从平均值,如下计算刺激指数 (SI) 并且将数据制成表:测试项目的平均 CPM/ 仅培养基的平均 CPM

[0524] 在使用包括抗 CD8/CD56/7AAD/CD20/CD56 的抗体混合物选择之后将 PBMC 和富含 CD8 的细胞群体的组成 / 存活力(锥虫蓝,7AAD)针对其各自比例进行评定。

[0525] 一旦分析了增殖结果,汇集来自重复实验的上清液,从所述增殖结果中排除任何鉴别的异常值。使用来自 BD Biosciences 的 CBA 人 Th1/Th2 细胞因子试剂盒 II,将汇集的上清液一式两份用于细胞因子测量。这种试剂盒测量 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、TNF 以及 IFγ。

[0526] 对于 0.3nM(上图)和 100nM(下图)浓度,来自细胞增殖 4 天孵育测定的结果在图 26 中示出。图 26 的上图示出在 0.3nM 下,与人 IgG 相比,v875 和 v1380 不诱导 PBMC 增殖。图 26 的下图示出 100nM 抗体浓度的结果,并且示出相对于人 IgG,v875、v1380 和 v891 诱导更高的细胞增殖。图 26(下图)还示出在 100nM 下,在所有四种 PBMC 群体中,v875 具有与抗 -CD3 OKT3 相比类似的增殖指数。然而,与 v875 相比,v1380(L234A_L235A Fc 敲除变体)和 v891 介导降低的细胞增殖并且显示出对于细胞增殖朝向 B 细胞依赖性的趋势,其中细胞增殖在 PBMC-B 和 PBMC-B-NK 亚群中较低。

[0527] 图 28 示出在 4 天孵育时间点在不存在或存在纯化的 CD19+ B 细胞的情况下,来自 0.3nM 浓度(图 28A)和 100nM 浓度(图 28B)的 v875 诱导的对纯化的 CD8+ T 细胞的平均刺激指数的结果。图 28A 示出在 0.3nM 下,v875 具有与人 IgG 相比更高的刺激指数和与 OKT3 相比更低的刺激指数。图 28A 还示出在靶 B 细胞(CD8+B)存在下,v875 具有较高的 CD8+ T 细胞刺激指数。图 28B 示出在 100nM 下,在很少至没有靶 B 细胞群体影响的情况下,v875 具有与 OKT3 相比类似的刺激指数和与人 IgG 相比更高的刺激指数。

[0528] 图 29 示出在 4 天孵育时间点在不存在或存在纯化的 CD19+ B 细胞的情况下,来自 0.3nM 浓度(图 29A)和 100nM 浓度(图 28B)的 v1380 诱导的对纯化的 CD8+ T 细胞的平均刺激指数的结果。图 29A 示出在 0.3nM 下,v1380 具有与人 IgG 相比更高的刺激指数和与 OKT3 相比更低的刺激指数。图 28A 还示出在不存在靶 B 细胞(CD8)的情况下,v1380 具有较高的 CD8+ T 细胞刺激指数。图 29B 示出在 100nM 下,v1380 具有与 OKT3 相比类似

的 CD8+ T 细胞刺激指数和与人 IgG 相比更高的刺激指数。与 0.3nM 数据类似,在不存在靶 B 细胞 (CD8) 的情况下,v1380 具有较高的 CD8+ T 细胞刺激指数。v1380 中的 L234A_L235A Fc 敲除突变似乎降低用示例性 WT Fc 变体 v875 明显的 B 细胞依赖性 CD8+T 细胞刺激。

[0529] 来自细胞因子释放测定的结果在图 27 中示出并且包括在用 0.3nM 浓度的测试项目孵育 4 天之后,PBMC 上清液 TNF α (图 27A)、INF γ (图 27B)、IL-2 (图 27C)、IL-4 (图 27D) 以及 IL-10 (图 27E) 水平的总图 (图 y 轴表示来自 4 个供体的 pg/mL 中的对数细胞因子水平)。图 27 示出当与 v875 (WT Fc) 和 OKT3 相比时, v1380 (L234A_L235A Fc 敲除) 诱导更少的 TNF α 、INF γ 、IL-2、IL-4 以及 IL-10 细胞因子释放。

[0530] 实施例 22 :示例性异多聚体可桥联每效应 T 细胞两个或更多个靶 B 细胞

[0531] 在以下修改的情况下使用实施例 3 中所描述的方法,通过显微术用示例性异多聚体 v875 对 T 细胞与 B 细胞桥联的能力和数目比进行检查。

[0532] 将标记的 Raji B 细胞 (红色) 和标记的 Jurkat T 细胞 (蓝色) 与 3nM 的人 IgG 或 v875 一起在室温下孵育 30 分钟。通过移除 180 μ l 的上清液浓缩细胞悬浮液。将细胞再悬浮于剩余体积中并且在 200x 和 400X 下成像。

[0533] 图 30 示出在 200X 和 400X 放大倍数下来自比较 v875 和人 IgG (3nM) 的 T:B 细胞桥联显微术的结果;呈现了相位图像 (上图)、荧光图像 (中图) 以及倒置荧光 (下图)。图 30A 示出在 200X 放大倍数下的人 IgG 和 v875 的直接比较,并且示出与人 IgG 相比,Raji B 细胞与 Jurkat T 细胞之间可见的更高的桥联量。图 30B 和图 30C 示出在 400X 放大倍数下的 v875 (图 30B) 和人 IgG (图 30C) 的两个视场。图 30B 示出 Jurkat T 细胞 (荧光倒像中的深灰色细胞) 与 Raji B 细胞 (荧光倒像中的浅灰色细胞) 之间 v875 介导的免疫复合物形成的图像,并且一个 Jurkat T 细胞可桥联 1 至 3 个 Raji B 细胞。图 30C 示出在人 IgG 与 Jurkat T 细胞和 Raji B 细胞一起孵育之后的图像。图 30C 示出与图 30B 中可见的 v875 介导的 Jurkat:Raji 桥联相比,在与人 IgG 一起孵育之后 Jurkat-Raji 桥联的不存在。

[0534] 实施例 23 :如通过表面等离子体共振评定的示例性异多聚体与 Fc γ 受体的结合

[0535] 使用表面等离子体共振 (SPR) 对示例性异多聚体抗体结合 Fc γ R CD16a 和 CD32a/b 的能力进行检查。

[0536] 表面等离子体共振分析:使用来自 BIO-RAD 的 ProteOn XPR36 系统通过 SPR 测量 Fc γ R 受体与抗体 Fc 的亲合力。在缓冲液注射以建立稳定基线之后,当以 25 μ L/分钟注射 240 秒时 (产生大约 500RU) 间接捕获基于纯化的抗 -CD3/抗 -CD19 抗体。

[0537] 将 Fc γ R 浓缩物 (10,000、3333、1111、370、123nM) 以 60 μ L/分钟注射 120 秒,连同 180 秒解离相以获得一组结合传感图 (sensogram)。将从结合等温线测定的所得 K_D 值全部拟合于 1:1Langmuir 结合模型,其中报道值作为三个独立试验的平均值。

[0538] SPR 结合研究的结果在表 4 中示出。

[0539] 表 4 :异二聚体抗体与 Fc γ 受体结合的 K_D

[0540]

	CD16aWT		CD16aV158		CD32aWT		CD32aR131		CD32bWT		CD32bY163	
	KD 平均值	标准 偏差	KD 平均值	标准 偏差	KD 平均值	标准 偏差	KD 平均值	标准 偏差	KD 平均值	标准 偏差	KD 平均值	标准 偏差
V875	1.0E-06	1.0E-07	3.6E-07	4E-08	5.9E-07	8E-08	6.0E-07	4E-08	4.3E-07	6E-08	1.3E-06	2E-07
V1379	1.1E-06	4.1E-07	4.1E-07	4E-08	6.0E-07	1E-07	7.8E-07	8E-08	4.7E-07	6E-08	1.1E-06	2E-07
V1380	5.0E-06	3.2E-06	3.2E-06	8E-07	低		NB		NB		低	
V1381	NB		NB		NB		NB		NB		NB	
WT 赫赛汀	2.4E-06	1.0E-07	8.6E-07	5E-08	1.2E-06	3E-07	1.6E-06	3E-07	9.9E-07	3E-08	2.9E-06	2E-07

[0541] 表 4 总结了示例性异多聚体与 CD16a、CD16aV158、CS32a、C D32aR131、CD32b 以及 CD32bY163 结合的 KD 数据。这些结果显示 WT Fc 变体 v875、v1379 以及 WT 赫赛汀结合所有 Fc γ 受体。这些结果还显示 Fc 敲除变体具有与一些 (v1380) 或所有 (v1381) Fc γ 受体的受损结合。

[0542] 实施例 24 : 示例性异多聚体可结合人和食蟹猴 CD3 T 细胞受体

[0543] 通过以下方法通过 ELISA 对示例性异多聚体对于结合人和食蟹猴 CD3 受体的结合进行检查。

[0544] 将人或食蟹猴 CD3 受体抗原在 Costar 3690 高结合半区域高结合微板中以 20 μ g/ml 稀释于 PBS 中, 在 4°C 下孵育过夜。将孔用 PBS 洗涤 3 次, 并且用 PBS 中的 1% BSA 阻断 30 分钟 (50 μ l/ 孔)。将第一异多聚体抗体以所指示的浓度稀释于 1% BSA 中并且在室温下孵育 2 小时, 并且将孔用 PBS-0.05% Tween 20 洗涤 4 次。将第二抗体 (Jackson 115-036-062 : 抗小鼠或 709-036-098 抗人 Fc γ 特异性) 1/5000 稀释于 1% BSA 中 (25 μ l/ 孔) 并且在室温下孵育一小时, 并且用 PBS-0.05% Tween 20 洗涤 4 次。添加 TMB 底物 (25 μ l/ 孔) 持续 25 至 30 分钟, 并且用 1M H₂SO₄ (12.5 μ l/ 孔) 终止反应, 并且在 450nm 下读取 OD。

[0545] ELISA 数据在图 35 中示出并且示出与人 CD3 的结合 (上图) 和与食蟹猴 CD3 受体的结合 (下图), 如通过 ELISA 所测定。图 35 示出 v4543、v4545 以及 v4548 显示出与食蟹猴 CD3 受体的最高程度的交叉反应性 (图 35 下图)。

[0546] 实施例 25 : 异多聚体的表达和纯化

[0547] 用于表达和纯化示例性异多聚体的方法的说明描述于实施例 2 中。

[0548] 图 31A 示出在蛋白质 A 和 SEC 纯化之后并且在 4°C 下储存 47 天之后, v875、v1380、v1379 和 v891 的 SDS-PAGE 分析和相对纯度。v891 样品中的两个可见蛋白质条带指示由于储存所致的这种样品的分解产物。

[0549] 图 31B 示出在蛋白质 A 和 SEC 纯化之后, 包括 v875、v1653、v1654、v1655、v1656、v1660、v1800 和 v1802 的另外示例性异多聚体的 SDS-PAGE 分析和相对纯度。

[0550] 实施例 26 : 示例性异多聚体可被纯化至 >99% 异二聚体纯度和 <1% 聚集体。

[0551] 通过 LC-MS 来测试示例性异多聚体的纯度。首先如实施例 2 中所描述通过蛋白质 A、蛋白质 L 以及 SEC 纯化来对异多聚体进行纯化。如以下所描述来进行异二聚体纯度的 LC-MS 分析。

[0552] 将纯化的样品用 PNGase F 在 37°C 下去糖基化持续 6 小时。在 MS 分析之前, 将样品注射至 Poros R2 柱上并且以使用 20-90% ACN、0.1% FA 的梯度洗脱 3 分钟, 从而产生一个单峰。

[0553] 使用以下设置用 LTQ-Orbitrap XL 质谱仪分析 LC 柱的峰: 锥电压: 50V', 镜筒透镜: 215V; FT 分辨率: 7,500。将质谱用软件 Promass 或 Max Ent. 整合以产生分子量曲线。

[0554] v875 的 Max Ent. 分子量曲线的 LC-MS 结果在图 32 中示出并且结果总结于表 5 中。

[0555] 表 5 :v875 的异二聚体纯度

[0556]

批	比例	SEC 级分指数	量 H1H1	量 H1H2	量 H2H2
v875-229-A	1 : 1	N/A	0.35	99.27	0.39

[0557] 表 5 示出在蛋白质 A 和 SEC 纯化之后, v875 由 99.27% 异二聚体纯度 (H1H2) 以及小于 1% 的抗 -CD3 同二聚体 (H2H2) 和抗 -CD19 同二聚体 (H1H1) 组成。

[0558] 通过所描述的方法通过 UPLC-SEC 来测定示例性蛋白质 A 和 SEC 纯化的异多聚体的纯度和聚集百分比。

[0559] 使用设定至 30°C 的 Waters BEH200 SEC 柱 (2.5mL, 4.6x 150mm, 不锈钢, 1.7 μm 颗粒) 以 0.4mL/分钟进行 UPLC-SEC 分析。运行时间包括 7 分钟, 和每次注射 2.8mL 的总体积, 其中运行缓冲液为 25mM 磷酸钠、150mM 乙酸钠 (pH 7.1); 以及 150mM 磷酸钠 (pH 6.4-7.1)。通过吸光度检测在 190-400nm 下促进并且用 280nm 下激发通过荧光检测, 并且收集 300-360nm 的发射。通过 Empower 3 软件分析峰积分。

[0560] 示例性异多聚体的 LC-MS 和 UPLC-SEC 结果总结于表 6 中。表 6 显示所有异多聚体具有 >95% 异二聚体纯度, 如通过 LC-MS 所测定; 并且所有异多聚体具有 <2% 聚集体, 如通过 UPLC-SEC 分析所测定。

[0561] 表 6 : 示例性异二聚体的 LC-MS 和 UPLC-SEC 分析的总结

[0562]

变体	UPLC	LCMS				
		异二聚体%	较轻同二聚体%	较重同二聚体%	较轻单体%	较重单体%
v875	NA	99.27	0.35	0.39		
1666	98.3	96.1	0	3.9#	0	0
4541	99	97.4	1.1	1.5	0	0
4543	99.97	98.0*	0	2	0	0
4545	99.94	96.6*	0	3.4	0	0
4548	98.5	95.9	0	4.1#	0	0
v4549	NA	97	1.5	1.5	0	0

[0563] #: 来自相邻峰的干扰使得准确量化不可能。

[0564] 这一峰的实际相对强度%可能小于所呈现的值。

[0565] * 在用神经氨酸酶处理之后通过 LC-MS

[0566] 实施例 27 : 示例性异多聚体具有大于 75°C 的 CH3Tm

[0567] 使用以下方法通过 DSC 对示例性异多聚体的 CH3 结构域稳定性进行检查。使用 GE VP-Capillary 仪器进行所有 DSC 实验。将蛋白质缓冲液交换为 PBS (pH 7.4) 并且稀释至 0.3 至 0.7mg/mL, 其中 0.137mL 负载至样品细胞中, 并且以 1°C / 分钟的扫描速率从 20°C 至 100°C 进行测量。使用 Origin 软件 (GE Healthcare) 分析数据, 其中减去 PBS 缓冲液背景。

[0568] 图 33A、33B 以及 33C 中所示的 DSC 结果示出 v875 具有 >76°C 的估计 CH3 Tm (图

33A), v1380 具有 >82.3°C 的估计 CH3 T_m(图 33B), 并且 v1379 具有 >82.5°C 的估计 CH3 T_m(图 33C)。

[0569] 实施例 28 :CD3/CD20 以及另外 CD3/CD19 异多聚体构建体的设计、表达和纯化。

[0570] V5850(对应于多肽序列 SEQ ID NO:203、205 和 207)、v5851(对应于多肽序列 SEQ ID NO:209、211 和 213)、v5852(对应于多肽序列 SEQ ID NO:215、217 和 219)、v6324(对应于多肽序列 SEQ ID NO:221、223 和 225)、v6325(对应于多肽序列 SEQ ID NO:225、227 和 229)、v1813(对应于多肽序列 SEQ ID NO:231、233 和 235)、v1821(对应于多肽序列 SEQ ID NO:237、239 和 241)、v1823(对应于多肽序列 SEQ ID NO:243、245 和 247) 举例说明双特异性 CD3/CD19 或 CD3/CD20 杂合异二聚体 Fc 构建体。双特异性杂合变体由与替代多肽链上的 scFv-Fc 配对的链 A 或 B 上的 F(ab') 组成。异二聚体 Fc 的链 A 包含以下突变:T350V_L351Y_F405A_Y407V, 并且异二聚体 Fc 的链 B 包含以下突变:T350V_T366L_K392L_T394W。v6324 举例说明双特异性 CD3/CD20scFv 异二聚体 Fc 构建体。V1813、v1821 和 v1823 举例说明 CD3/CD20 常见轻链异二聚体 Fc 构建体。常见轻链变体由各自在互补异二聚体 Fc 上的两个不同 F(ab') 组成, 所述 F(ab') 共用单个轻链。具体变体组成在表 7 中指示。

[0571] 用于 v5852 中的抗-CD19 MOR208_scFv-Fc(VHVL) 是通过使所公开的可变重链序列融合至表 7 中所指示的可变轻链序列来产生, 其中所述重链与轻链之间具有 (GGGGS)₃ 接头。使可变结构域融合至异二聚体 Fc 的链 B。

[0572] 用于 v6324 和 v6325 中的抗-CD20 奥法木单抗_scFv-Fc(VHVL) 是通过使所公开的可变重链序列融合至表 7 中所指示的可变轻链序列来产生, 其中所述重链与轻链之间具有 (GGGGS)₃ 接头。使可变结构域融合至异二聚体 Fc 的链 B。

[0573] 如实施例 2 中所指示进行克隆、表达和纯化。

[0574] 所述变体的产率和纯度在表 8 中指示。根据实施例 26 通过 LCMS 分析来测定异二聚体纯度。所有变体展示超过 73.8% 的异二聚体纯度, 其中对于所测试的所有变体来说平均纯度为 89.6%。所述样品具有少量不正确配对的同二聚体, 其范围在总产物的 0% 至 5.3%。报道值表示所有观察到的同二聚体物种的和。半抗体的存在比同二聚体更常观察到, 并且范围为总产物的 0% 至 20.7%。报道值表示所有观察到的半抗体物种的和。

[0575] 表 7. CD3/CD19 或 CD20 杂合变体的组成

[0576]

	v5850	V5851	V5852	V6324	V6325	v1813	V1821	V1823
形式	杂合	杂合	杂合	scFv-Fc	杂合	常见轻链	常见轻链	常见轻链
链A	aCD3-BiTE _x I2C_scFvFc (VHVL)	aCD3-BiTE _x I2C_scFvFc (VHVL)	aCD3-替利珠单抗-hOKT3_Fab	aCD3-BiTE _x I2C_scFvFc (VHVL)	aCD3-替利珠单抗-hOKT3_Fab	aCD3-foralumab_Fab	aCD3-12F6_Fab	aCD3-12F6_Fab
链B	aCD20-奥法木单抗_Fab	aCD19-MO R208_Fab	aCD19-MO R208_scFvFc (VHVL)	aCD20-奥法木单抗_scFvFc (VHVL)	aCD20-奥法木单抗_scFvFc (VHVL)	aCD20-奥法木单抗_Fab	aCD20-利妥昔单抗_Fab	aCD20-托西莫单抗_Fab
轻链	aCD20-奥法木单抗_Fab	aCD19-MO R208_Fab	aCD3-替利珠单抗-hOKT3	N/A	aCD3-替利珠单抗-hOKT3	aCD20-奥法木单抗_Fab	aCD20-利妥昔单抗_Fab	aCD20-托西莫单抗_Fab
参考	链A -US2011/0275787 链B -WO2004035607 链 -WO2004035607	链A -US2011/0275787 链B -WO2008022152 链 -WO2008022152	链A -US2007007246 链B -轻链 -US2007007246	链A -US2011/0275787 链B -轻链 -na	链A -US2007007246 链B -轻链 -US2007007246	链A - WHO 药物信息第24卷, 2号, 2010 链B -WO2004035607 链 -WO2004035607	链A - PubMed ID: 16313362 链B - Drug bank 登录号: DB00073 链 - Drug bank 登录号: DB00073	链A - PubMed ID: 16313362 链B - Drug bank 登录号: DB00081 链 - Drug bank 登录号: DB00081

[0577] 表 8. 变体表达和纯化

[0578]

	V5850	V5851	V5852	V6324*	V6325	v1813	V1821	V1823
表达规模 (ml)	50	50	50	50	50	500	500	500
在 SEC 之后的量 (mg)	1.25	0.72	0.57	0.34	0.42	17.4	2.16	8.8
异二聚体 % (AB)	95.6	100	95.1	85	97.5	78.4	91.4	73.8
同二聚体 % (AA+BB)	0	0	4.9	0	0	1.36	3.7	5.3
半抗体 % (A+B)	4.4	0	0	5.5	2.5	20.2	4.8	20.7

[0579] * 通过 LCMS 检测的未知物质导致较低纯度估计

[0580] 实施例 29 :CD3/CD20 和另外 CD3/CD19 异多聚体变体结合 T 细胞和 B 细胞。

[0581] 按照实施例 4 中所描述的工序通过 FACS 分析对示例性 CD3/CD20 异多聚体 v5850、v6324、v6325、v1813、v1821、v1823 结合 CD3 和 CD20 细胞的能力进行评定。另外,类似地评定示例性 CD3/CD19 异多聚体 v5851 和 v5852 结合 CD3 和 CD19 细胞的能力。还制备另一变体 v875、CD3/CD19BiTE Fc 抗体构建体并且将其作为基准进行测试。v875、v5850 和 v5851 在 Raji 和 Jurkat 细胞上的代表性结合曲线在图 36A 和 38B 中示出。以动力学常数 Bmax 和

Kd 表示的每个变体的结合结果在以下表 9 和 10 中列出。表 8 描述与表达 CD19 和 CD20 的 Raji B 细胞的结合,而表 10 描述与表达 CD3 的 Jurkat T 细胞的结合。在 Raji 结合研究中(表 9),与 875 相比,所有变体以更大 Bmax 和更高 Kd 结合。在 Jurkat 结合研究中(表 10),所有变体(除了 v1823)以高于 875 的 Bmax 结合并且具有一系列 KD。

[0582] 表 9(Raji)

[0583]

	v875	v4542	v5850	v5851	v5852	v6324	v6325	v1813	v1821	v1823
Bmax (OD450)	2.78	2.96	4.24	3.88	na	6.91	6.44	6.40	4.71	4.14
KD (nM)	0.36	0.70	3.60	1.38	na	25.35	11.87	4.04	122.5	21.05

[0584] 表 10(Jurkat)

[0585]

	v875	v4542	v5850	v5851	v5852	v6324	v6325	v1813	v1821	v1823
Bmax (OD450)	1.59	2.27	2.06	2.51	2.21	2.32	2.51	2.54	2.11	0.88
KD (nM)	21.36	6.66	4.04	4.24	25.24	11.62	1.58	691.4	181.5	68.77

[0586] 实施例 30 :CD3/CD20 和另外 CD3/CD19 异多聚体变体桥联 T 细胞和 B 细胞。

[0587] 按照实施例 3 中所描述的工序通过 FACS 分析对六种示例性 CD3/CD20 异多聚体即 v5850、v6324、v6325、v1813、v1821 和 v1823 以及两种示例性 CD3/CD19 异多聚体变体即 v5851 和 v5852 桥联 T 细胞与 B 细胞的能力进行测试。还制备另外构建体即 v792 和 v875 并且将其作为对照进行测试。v792 在异二聚体 Fc 的链 A 和链 B 上具有相同的基于曲妥珠单抗的抗-Her2 F(ab'),其中链 A 上具有突变 T350V_L351Y_F405A_Y407V,并且链 B 上具有突变 T350V_T366L_K392L_T394W(drug bank 登录号 -DB00072)

[0588] 表 11 和 12 提供每种变体的 Jurkat-Jurkat、Raji-Raji 以及 Jurkat-Raji 之间的桥联百分比,每个表表示单独的实验。所有变体均有效于桥联 Jurkat 细胞与 Raji 细胞。此外,没有变体桥联两个 jurkat 细胞并且观察到不同程度的一些 Raji-Raji 细胞桥联。

[0589] 表 11.

[0590]

桥联	792	875	5850	5851	1813	1821	1823
urkat/Jurkat	.5	.6	.8	.0	.6	.5	.7
aji/Raji	.6	0.2	.1	.6	.0	.4	.1
urkat/Raji	.6	7.0	1.6	3.2	6.2	.3	.1

[0591] 表 12.

[0592]

桥联%					
	792	875	5852		
Jurkat/Jurkat	.7	.5	.9	.8	.1
Raji/Raji	.7	.6	.2	.5	.7
Jurkat/Raji	.9	5.7	0.4	.7	5.7

[0593] 实施例 31 :HER2/HER3 异多聚体构建体的设计、表达和纯化。

[0594] 为了评定 HER2/HER3 双特异性异多聚体构建体的不同特性,如下产生并纯化了两种形式和不同对照。第一构建体是通过使 HER2- 和 HER3- 结合 scFv 融合至异二聚体 Fc 区上来产生 (v878, HER2/HER3 Het-Fc)。第二构建体是通过 Her2 和 Her3 scFv 融合至基于白蛋白的平台上来产生 (v1090, AlbuCORE 抗 -Her3xHer2)。不同对照,包括 Her2 单臂 het-Fc、Her3 单臂 het-Fc 以及对照 HSA 融合蛋白 v1087 也产生作为对照。

[0595] 设计

[0596] 双特异性 HER2/HER3 构建体是通过 Her2 和 Her3 scFv 融合至 het-Fc 或 AlbuCORE 平台上来产生。

[0597] 1. 变体 878 :单价单臂抗 -Her2 抗体,其中 Her2 结合结构域是链 A 上的 scFv,并且 Fc 区是具有链 A 中的突变 L351Y_F405A_Y407V 和链 B 中的突变 T366L_K392M_T394W 的异二聚体。抗原结合结构域的表位是 Her2 的结构域 1。

[0598] 2. 变体 879 :单价单臂抗 -Her3 抗体,其中 Her3 结合结构域是链 B 上的 scFv,并且 Fc 区是具有链 A 中的突变 L351Y_F405A_Y407V 和链 B 中的突变 T366L_K392M_T394W 的异二聚体。

[0599] 3. 变体 880 :双特异性抗 -Her2 抗体、抗 -Her3 抗体,其中 Her2 结合结构域是链 A 上的 scFv,Her3 结合结构域是链 B 上的 scFv,并且 Fc 区是具有链 A 中的突变 L351Y_F405A_Y407V 和链 B 中的突变 T366L_K392M_T394W 的异二聚体。

[0600] 4. 变体 1087 :MM-111 分子是具有分别连接至修饰的人血清白蛋白蛋白的 C 末端和 N 末端的两个 scFv,抗 -Her2 (B1D2) 和抗 -Her3 (H3) 的单一多肽融合蛋白并且由 Merrimack 产生。所得分子是双特异性和二价的。作为对照,构建了 MM-111 分子的变型,其中将抗 -Her3 (H3) 弹头通过短 AAS 接头融合至白蛋白的 N 末端,同时将抗 -Her2 (B1D2) 通过 AAAL 接头融合至 C 末端以产生基准对照变体 1087。这种对照变体在其 MM-111 分子中缺乏最初由 Merrimack 引入的 C34S/N504Q 突变,并且具有对应于 SEQ ID NO:258 的多肽序列。

[0601] 5. 变体 1090 :基于白蛋白的异多聚体是通过以下方式来形成 :将组合片段 1 在其 N 末端通过 GGGs 接头融合至抗 HER3 [SEQ ID NO:260] 并且片段 2 在其 C 末端通过 GGGs 接

头融合至抗 HER2 (B1D2) [SEQ ID NO:262] (变体编号 1090)。这种分子具有呈顺式形式的弹头或货物多肽并且几乎与 v1087 相同。1087 多肽与 1090 之间的主要差异在于 1) 1087 多肽中所使用的接头是疏水性更强的, 而 1090 变体中所使用的接头是聚 GLY (S), 以及 2) 1090 变体缺乏最初由 Merrimack 引入的 C34S/N504Q 突变。

[0602] 变体 878、879 和 880 是如实施例 2 中所描述表达和纯化。变体 1087 和 1090 是如实施例 10 中所描述表达和纯化。

[0603] 实施例 32 : 基于 Fc 的 HER2/HER3 异多聚体构建体双特异性地结合 MALME-3M 细胞上的 Her2 和 Her3 受体。

[0604] 使用 FACS 分析对 v878、v879 以及 v880HER2 和 HER3 构建体结合 Her2 和 Her3 的能力进行评定 :

[0605] 将一定剂量范围的两种单臂单价变体 (抗 -HER2 单臂 v878 和抗 -HER2 单臂 v879) 和双特异性抗 -HER2/HER3 异二聚体 v880 与 MALME-3M 黑色素瘤细胞一起孵育, 接着如实施例 4 中所描述进行 FACS 分析以确定每种分子的结合亲和力。

[0606] 图 37A 和图 37B 分别示出线性标度和对数标度的亲和力。如图显示, HER2/HER3 het-Fc 构建体展示双特异性和亲合力两者。

[0607] 实施例 33 : 以基于白蛋白的 HER2/HER3 为基础的构建体双特异性地结合 MALME-3 细胞上的 Her2 和 Her3 受体。

[0608] 对呈顺式构型负载有抗 -Her2 和抗 -Her3 scFv 的基于白蛋白的异多聚体对 MALME-3M 细胞的结合亲和力进行评定并且将其与 v1087 对照进行比较。

[0609] 如实施例 4 中所描述, 用 FITC 标记的抗 -HSA 抗体使用 FACS 对示例性基于白蛋白的异多聚体变体 1090 (抗 -Her2x 抗体 -Her3 ABH2) 针对 MALME-3M 细胞的结合亲和力进行评估。

[0610] 图 38 描绘在 MALME-3M 细胞中与对照 1087 相比, 变体 1090 的结合, 并且指示 v1090 对靶 MALME-3M 细胞具有与 v1087 类似的结合。

[0611] 实施例 34 : 单价单臂抗 -CD3 抗体能够桥联 Jurkat T 细胞与 Raji B 细胞

[0612] 如实施例 3 中所描述通过 FACS 分析对单特异性抗 -CD3 抗体 v870、v871、v872 桥联 T 细胞与 B 细胞的能力进行测试。

[0613] 结果总结在表 13 中并且显示当与培养基和人 IgG 对照相比时, v870、v871 和 v872 桥联更高百分比的 Jurkat T 细胞和 Raji B 细胞。表 13 还示出当与双特异性抗 -CD3 抗 -CD19 抗体 v873 相比时, v870、v871 和 v872 桥联更低百分比的 Jurkat T 细胞和 Raji B 细胞。

[0614] 表 13 : Jurkat T 细胞和 Raji B 细胞的单价抗 -CD3 抗体桥联

[0615]

变体	描述	Jurkat/Raji (%)
培养基		7,0
v870	OAA_抗-CD3 (VH-VL_BiTE)	9,0
v871	OAA_抗-CD3 (VL-VH_BiTE)	15,4
v872	OAA_抗-CD3 (VL-VH_OKT3)	
v873	双特异性 CD19-CD3(VH-VL-BiTE)	27,6
人 IgG		6
培养基		7,3

[0616] 应了解,本文所描述的实施例和实施方案仅用于说明性目的并且根据其产生的各种修改或变化可为本领域技术人员所想到且欲包括于本申请的精神和权限以及随附权利要求书的范围内。

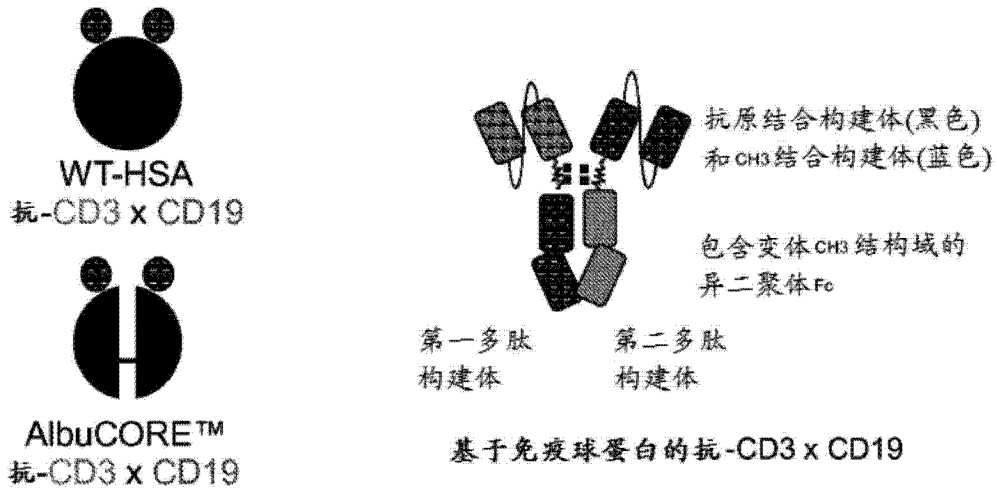


图 1a

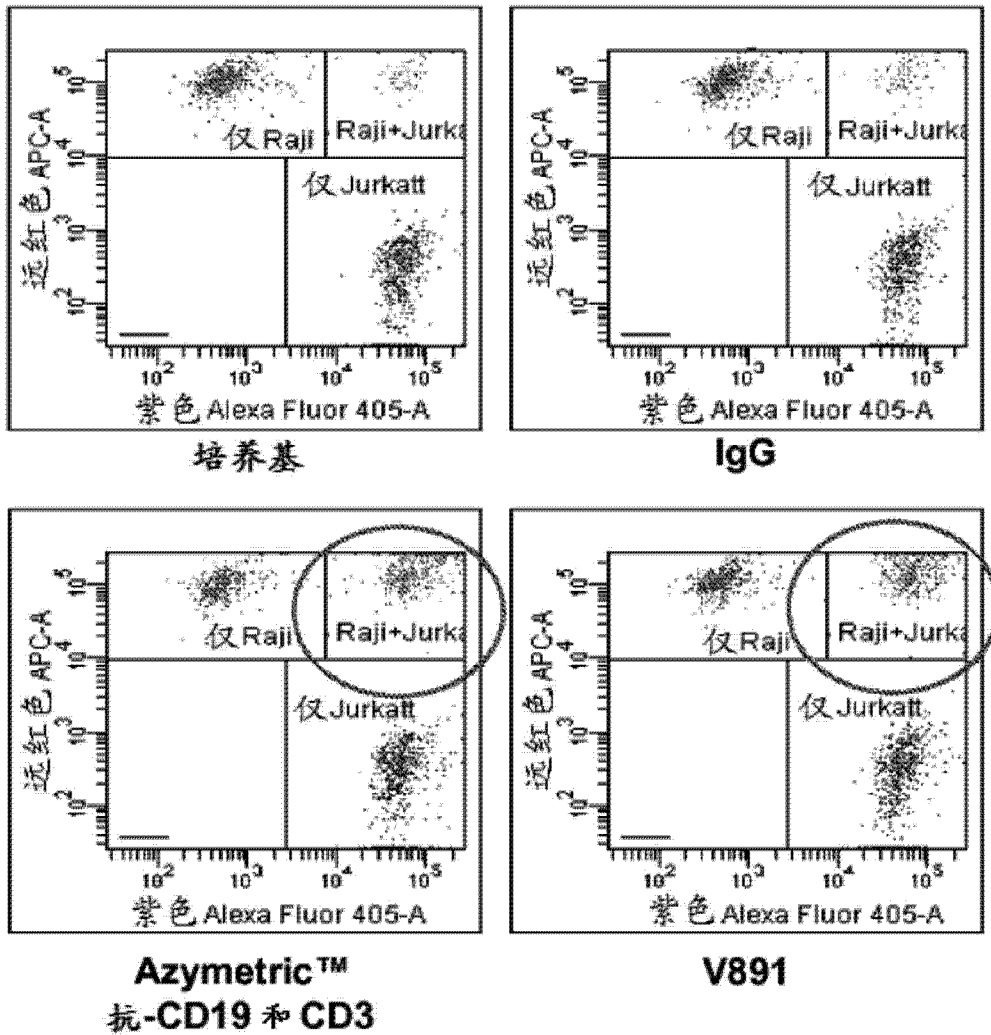


图 1b

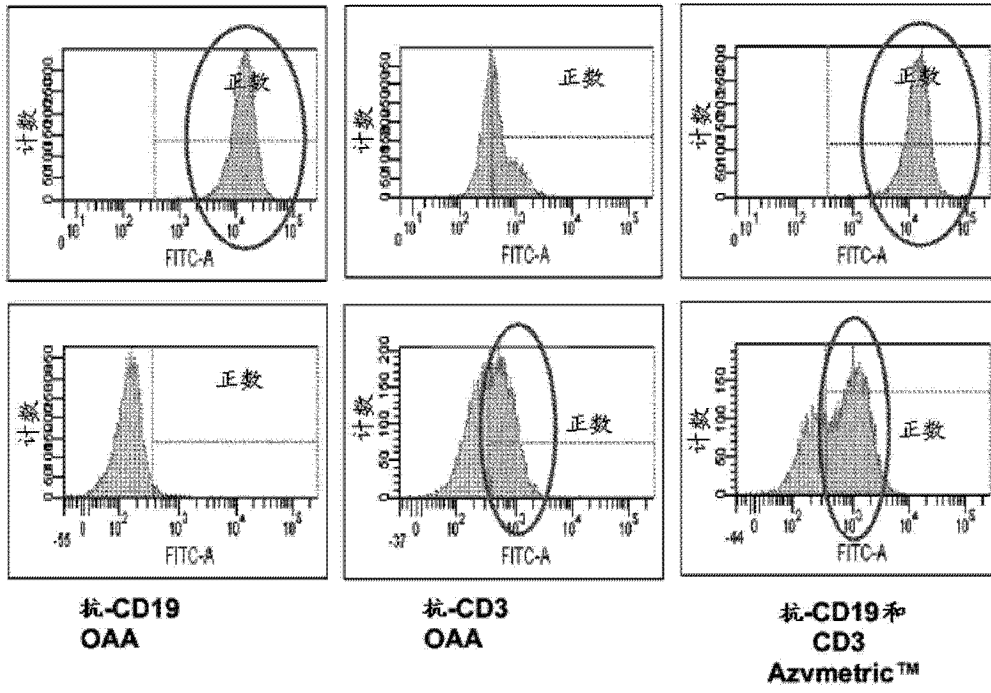


图 2

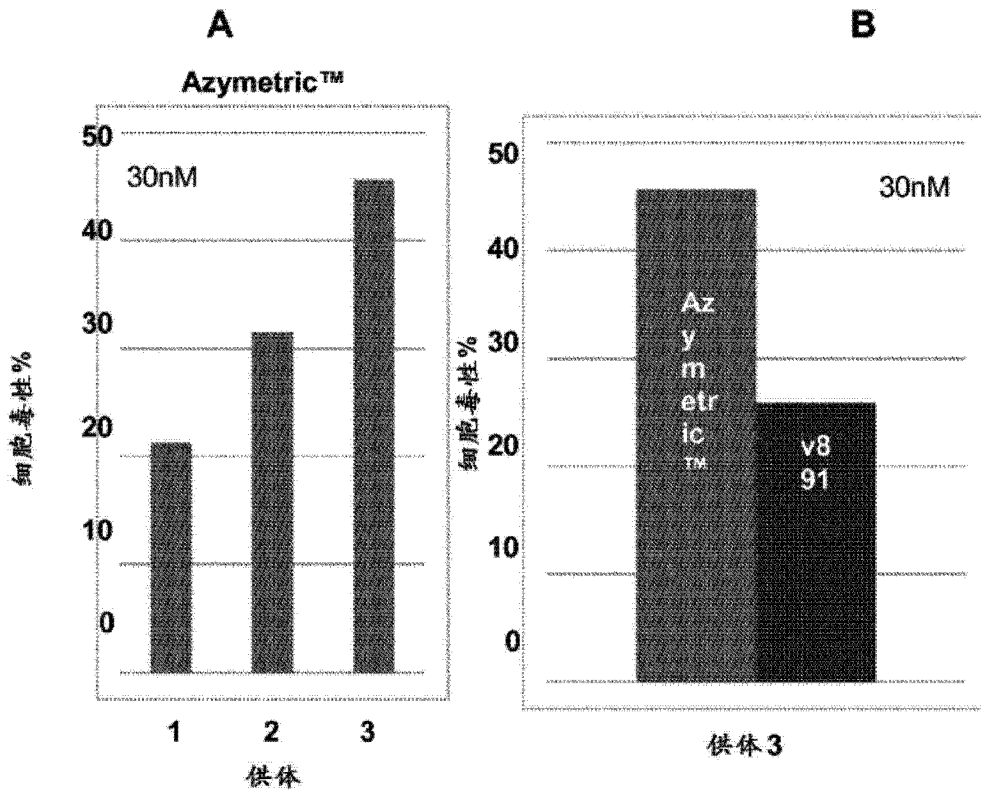


图 3

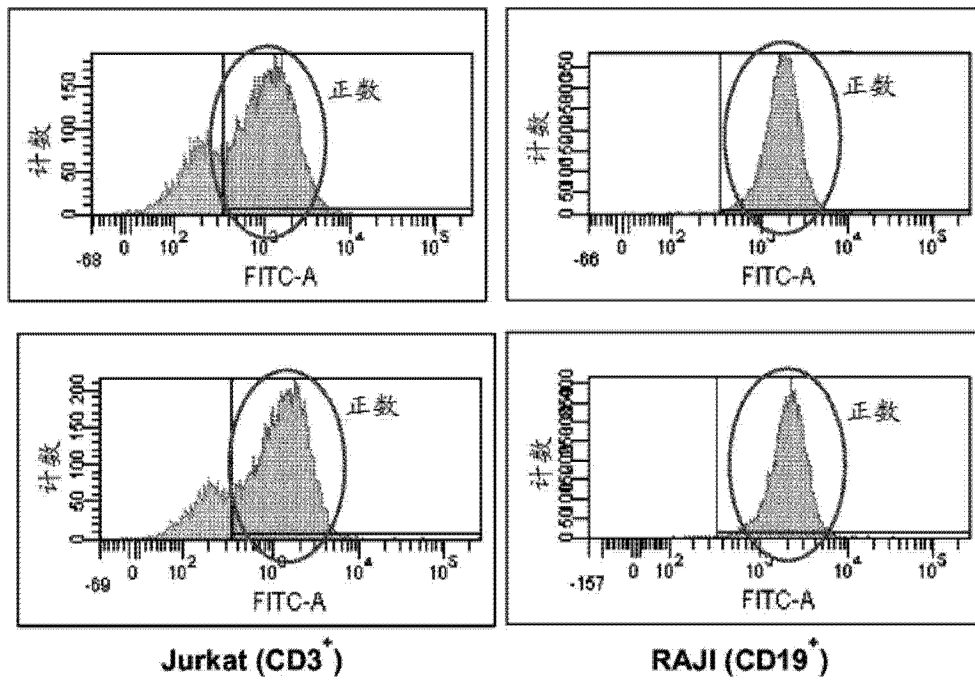


图 4

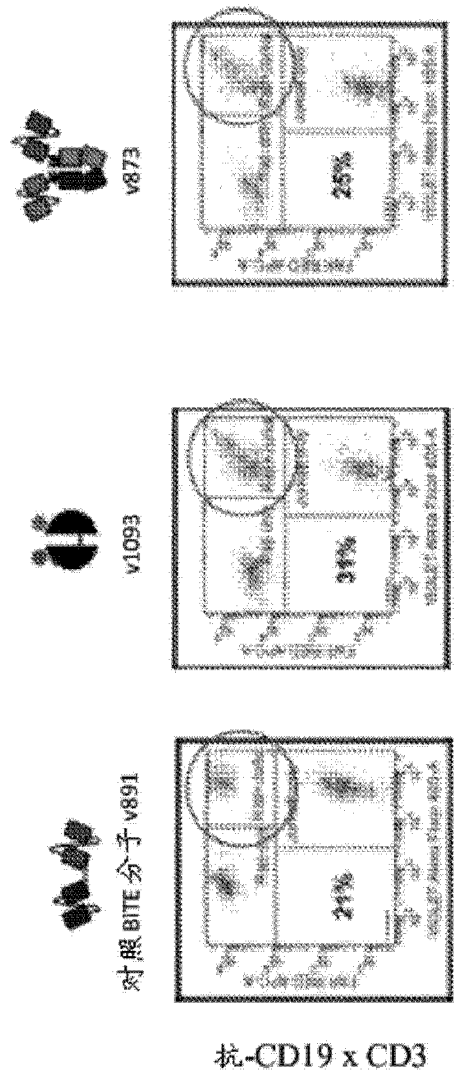


图 5A

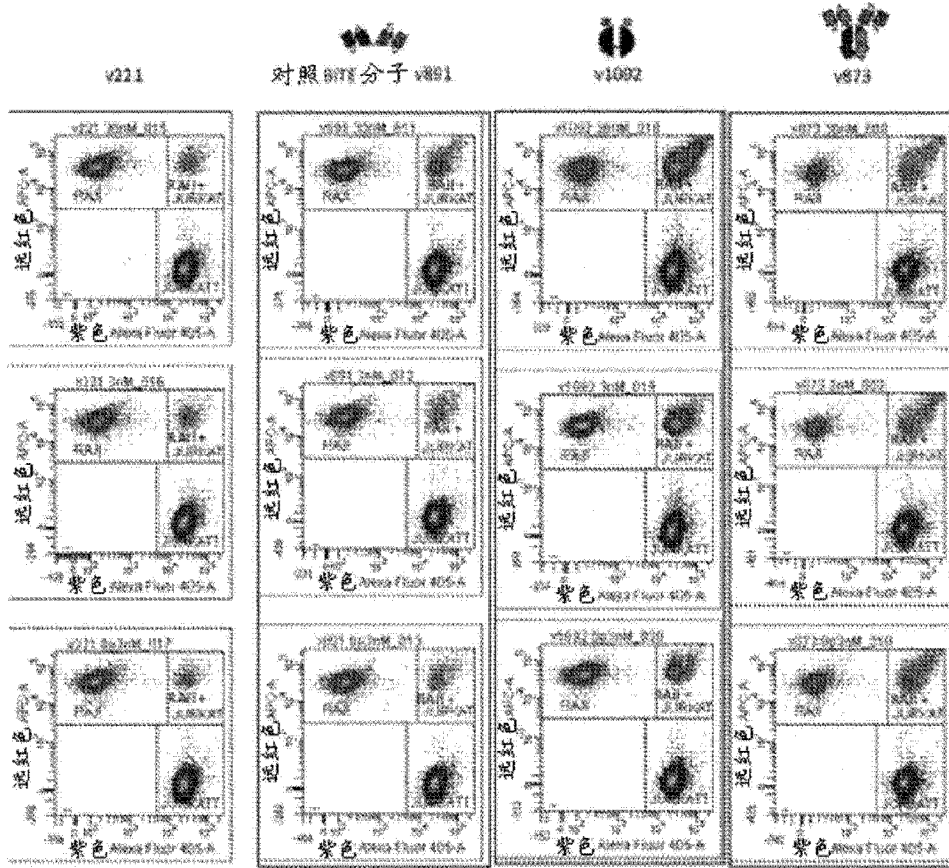


图 5B

疾病: 肿瘤学		标记的		PI3-2										
桥联和														
ADCC/CDX														
		EGFR-EGFR (卡尼单抗) EGFR (爱义安)	CD32 (坎帕斯)	HER2 (赫赛汀)	CD320 (美罗华)	CD133-CD3 (三安曼单抗) CD34 (赫赛汀)	CD25 (蔡尼咪)	CD136 (加利普单抗)	CD38 (赫赛汀)	CD74 (MM111)	CD44 (MM 0761)	SLIT3 (MM 0810)	EGFR (蔡尼咪) CD33 (赫赛汀)	CD42 (达西单抗)
标记的莫罗单抗	CD3	EGFR	CD32	HER2	CD320	CD133-CD3	CD25	CD136	CD74	CD44	SLIT3	EGFR	CD42	
PI1	CD4 (H1A1)													
PI2	IGF1R/HER3			HER2										
1														

■ 单一结构域抗体
 ■ 单一结构域抗体有效性期
 *EGFR-IGFR (卡尼单抗, EGFR, 标记的); Dalotuzumab (IGFR, 1期); E1-G4 (EGFR-IGFR Biogen 临床前)
 †与 MM111 (双特异性白蛋白, 2期) 相比, HER2-HER3 双特异性抗体将具有 ADCC/CDX 活性

图 6

来自50 ml培养物CHO3E7的scFv 变体 865-875和来自500 ml培养物
CHO3E7的scFv 变体 891的表达
在蛋白质A纯化之前

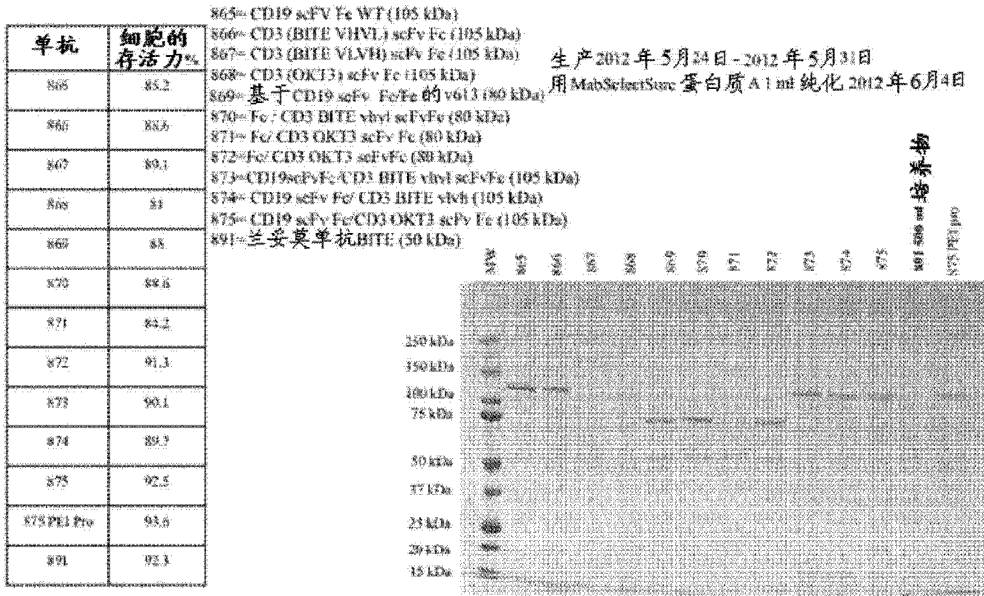


图 7

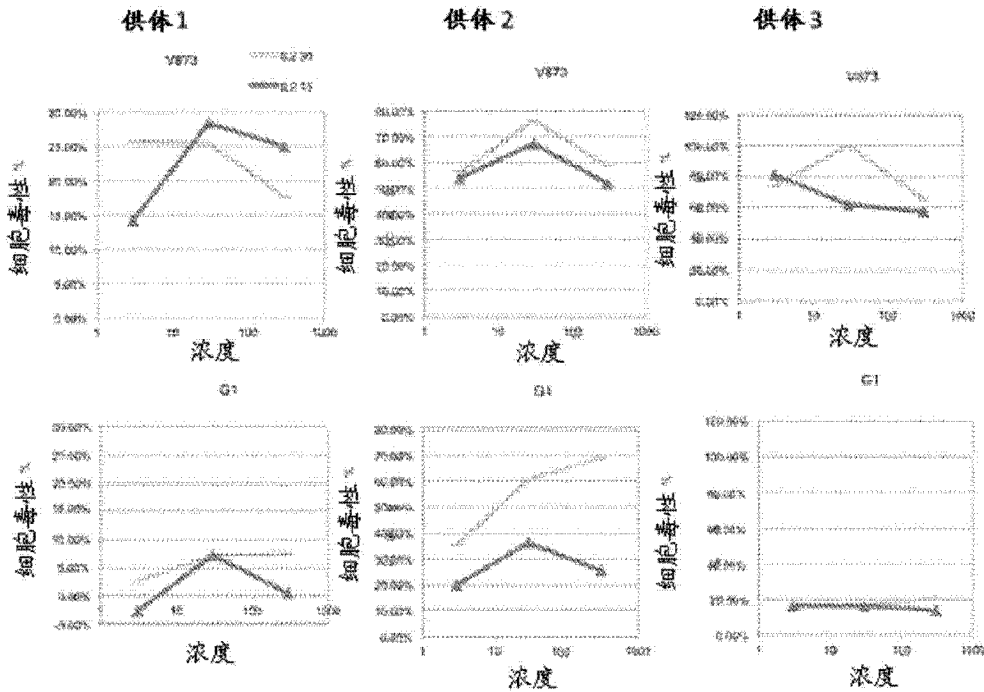


图 8

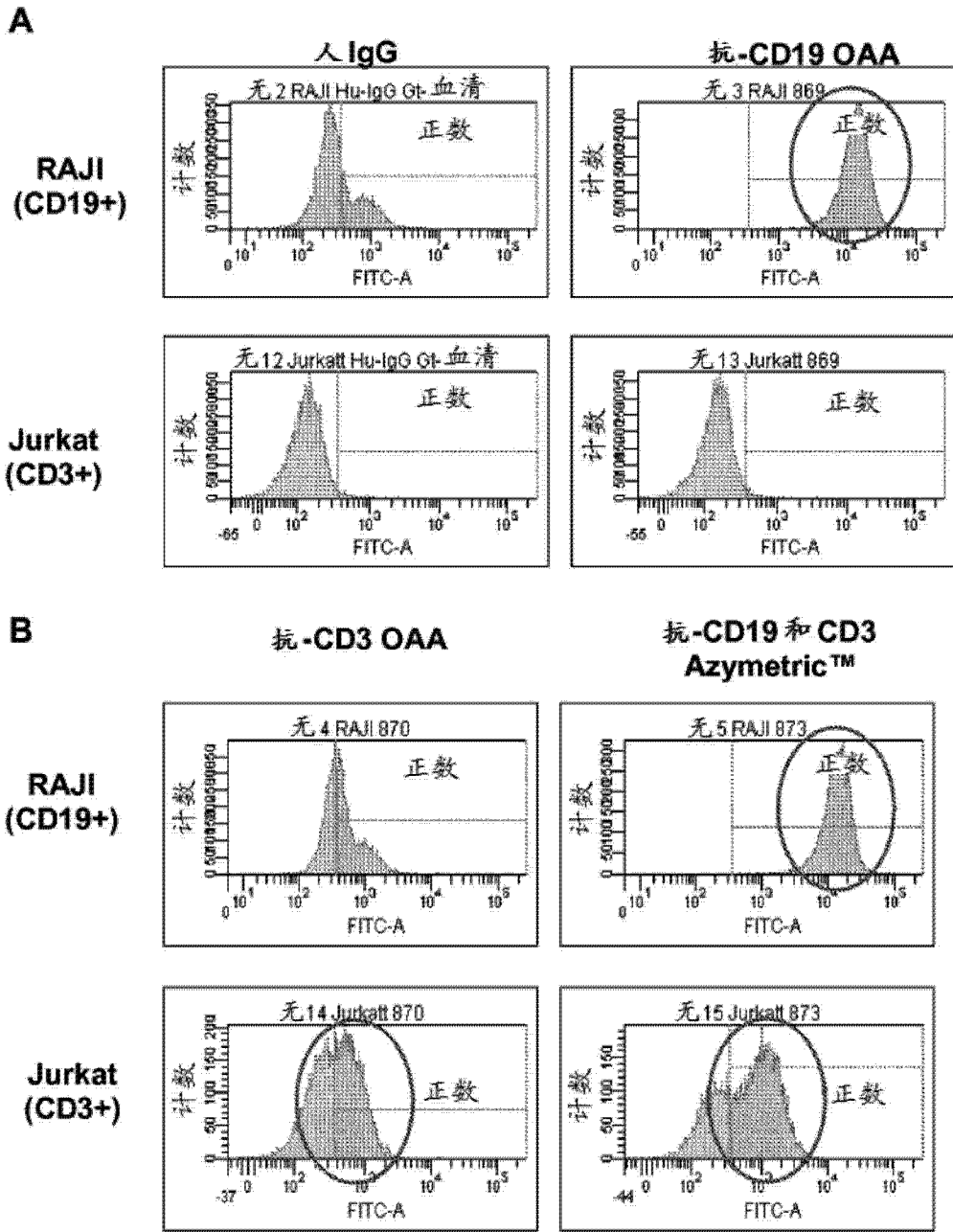


图 9

变体与细胞系的结合(标准化至人 IgG)

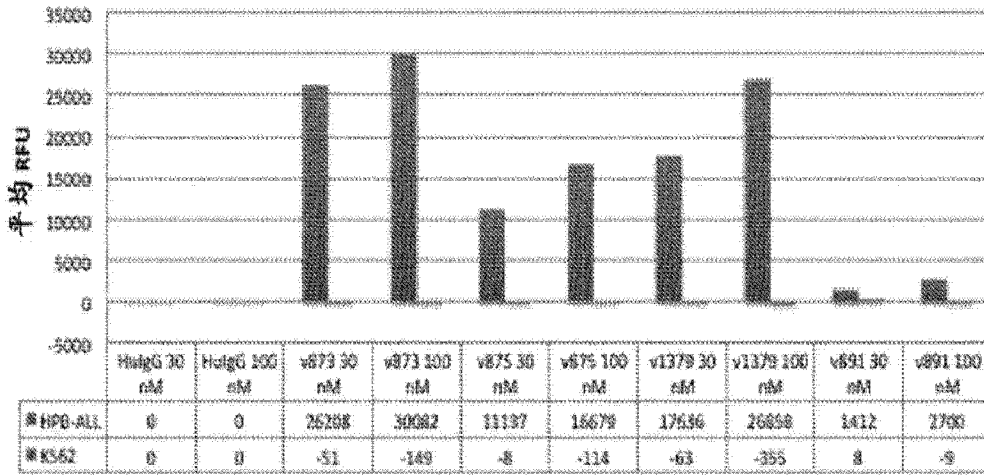


图 10

变体与新鲜分离的小鼠胸腺细胞或脾细胞的结合(标准化至人 IgG)

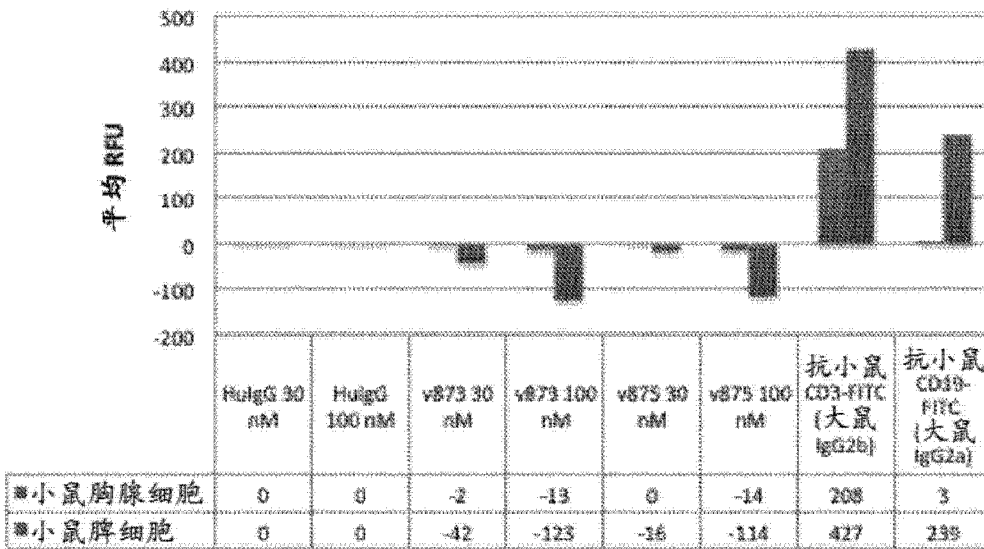


图 11

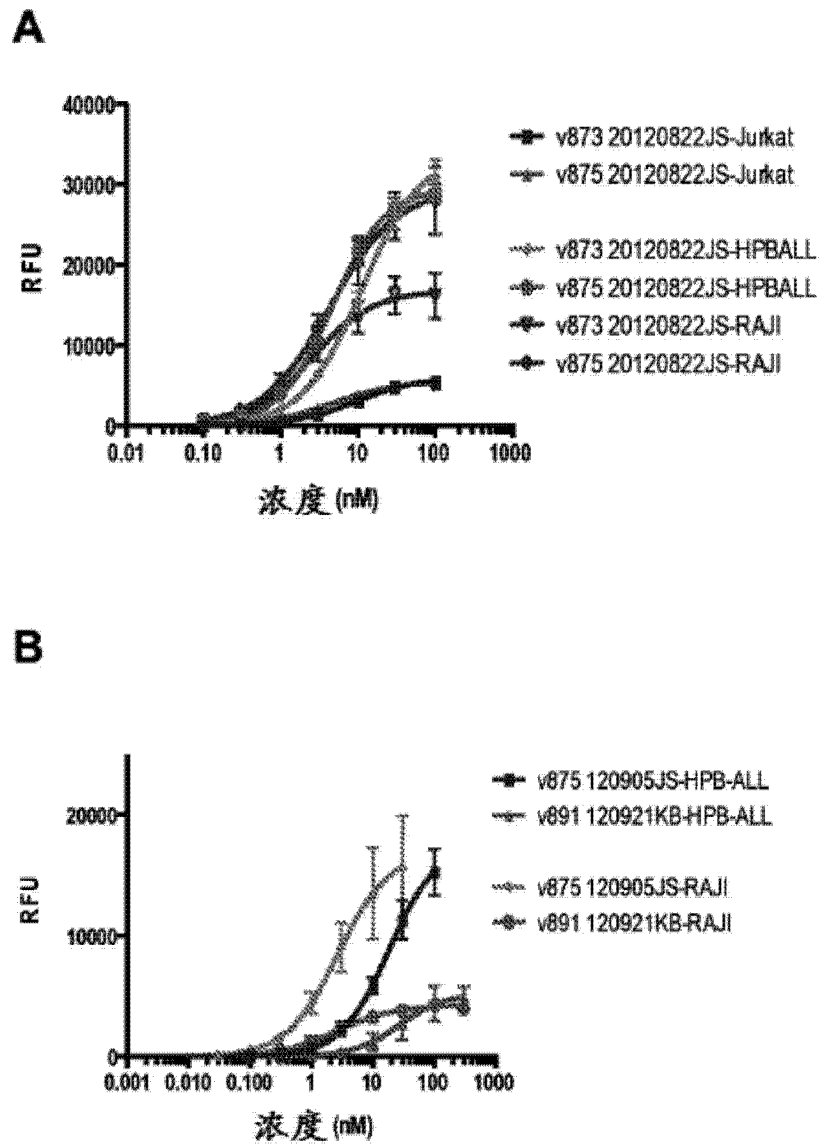
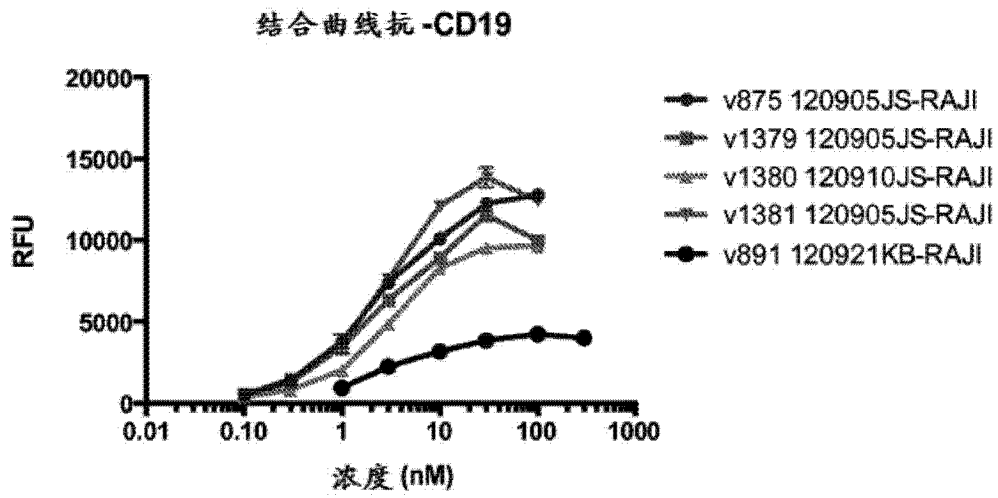


图 12

A



B

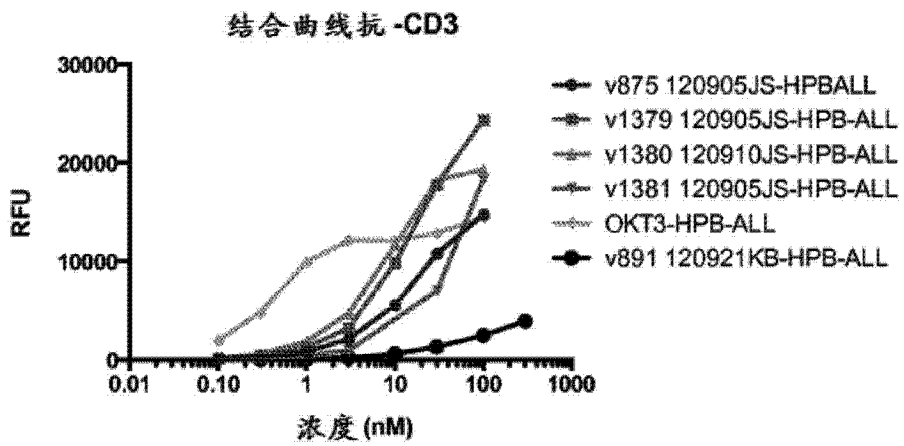
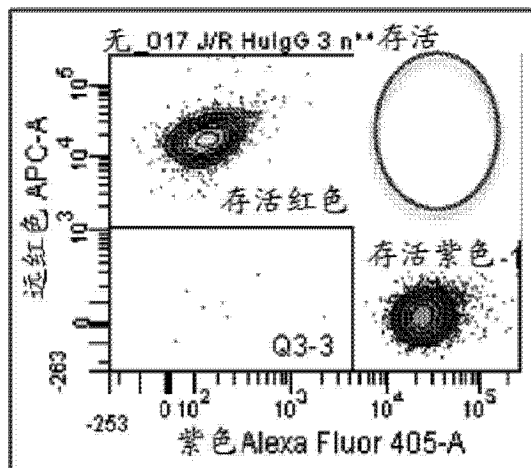
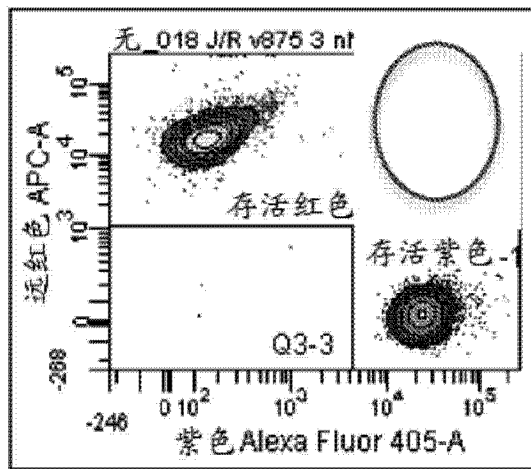


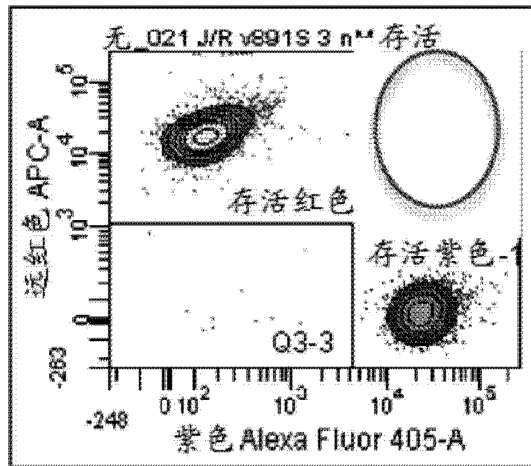
图 13



人 IgG



v875



v891

图 14

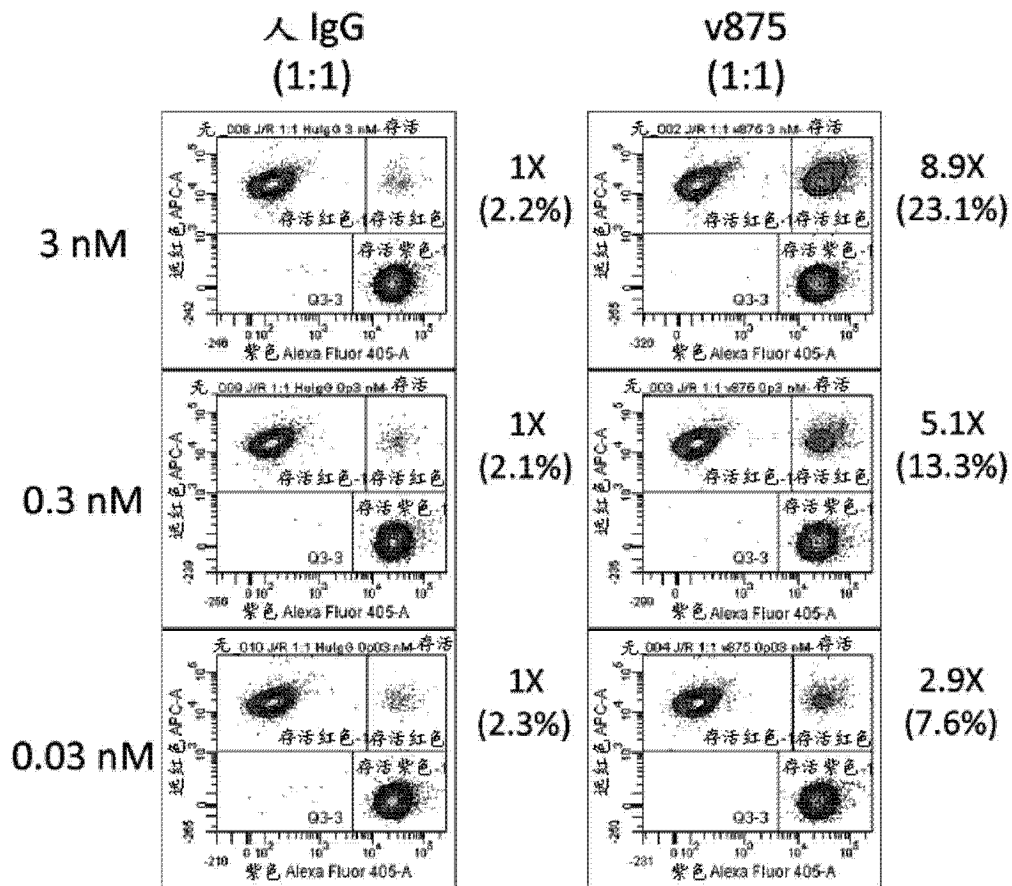


图 15A

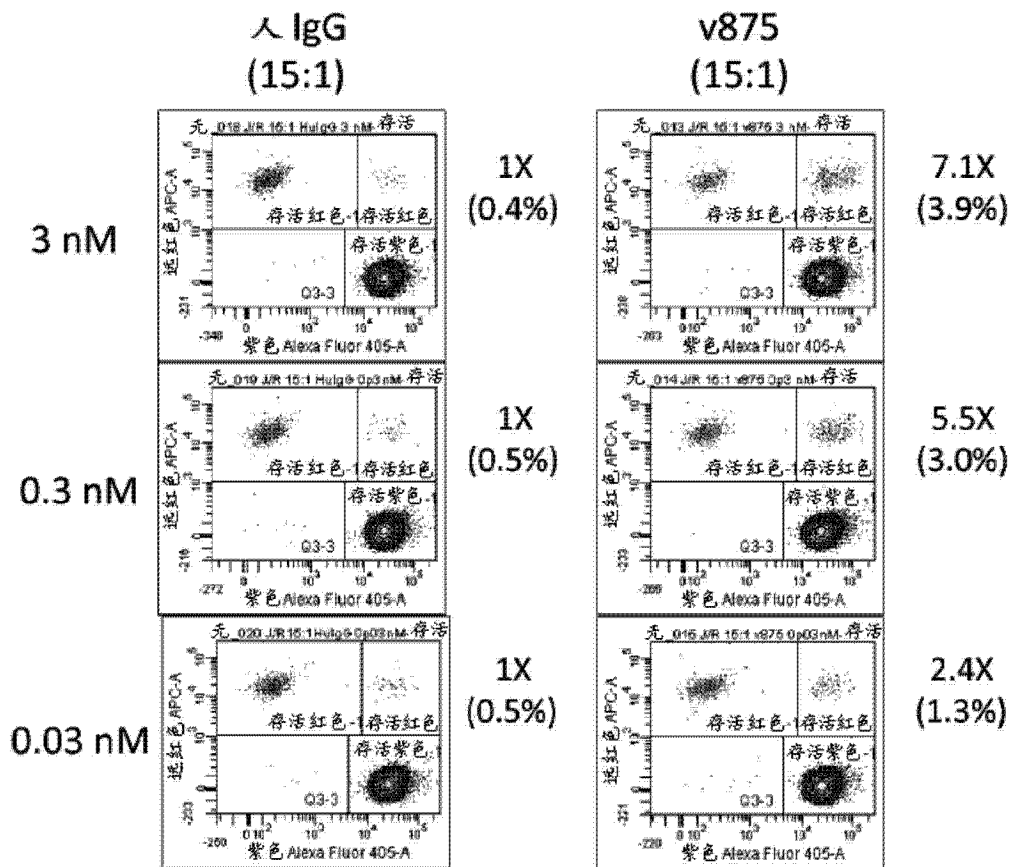
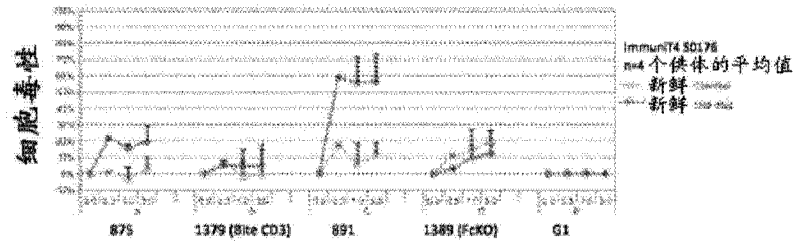
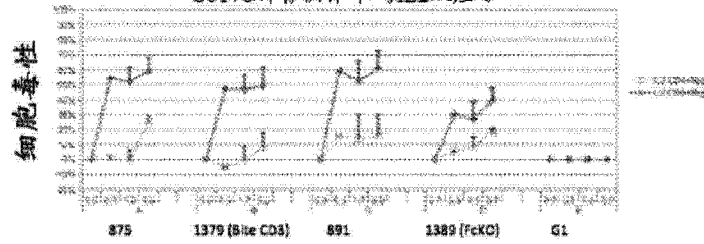


图 15B

CD3-CD19 不对称抗体依赖性 B 细胞细胞毒性由重定向的 T 细胞介导
S0176 所有供体平均新鲜效应子



使用 CD4 和 CD8 效应子, 由测试项目诱导的细胞毒性百分比
S0176 所有供体平均 IL2 效应子



将细胞毒性百分比针对四种浓度(0, 0.3, 1.0 和 3.0 nM)中的每种测试项目绘图在 y 轴上。所述曲线将针对每个测试项目用两种类型的效应子(CD4 和 CD8)(新鲜或用 IL-2 活化过夜的)所获得的结果进行比较。

保密

图 16A

IL-2 活化的 CD4+ 和 CD8+ T 细胞和 Raji B 细胞细胞毒性

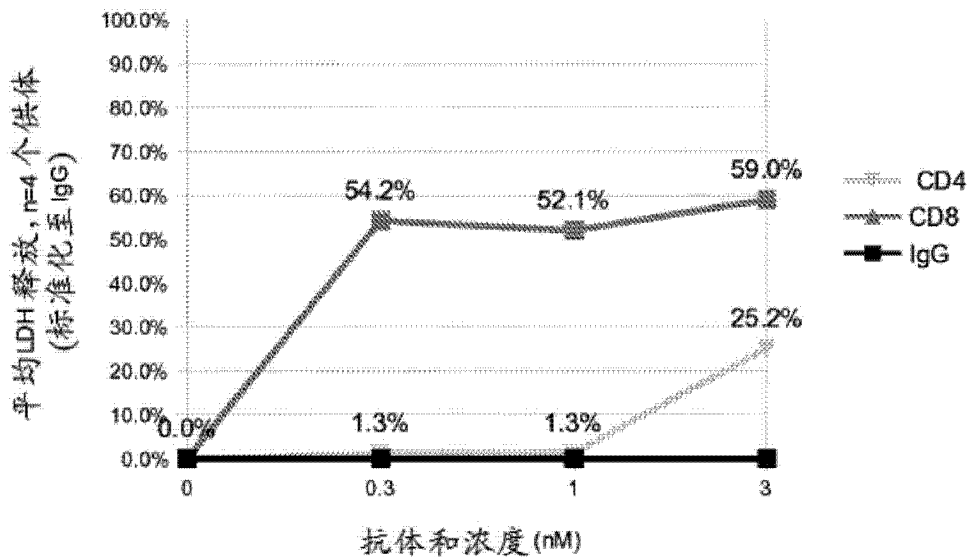


图 16B

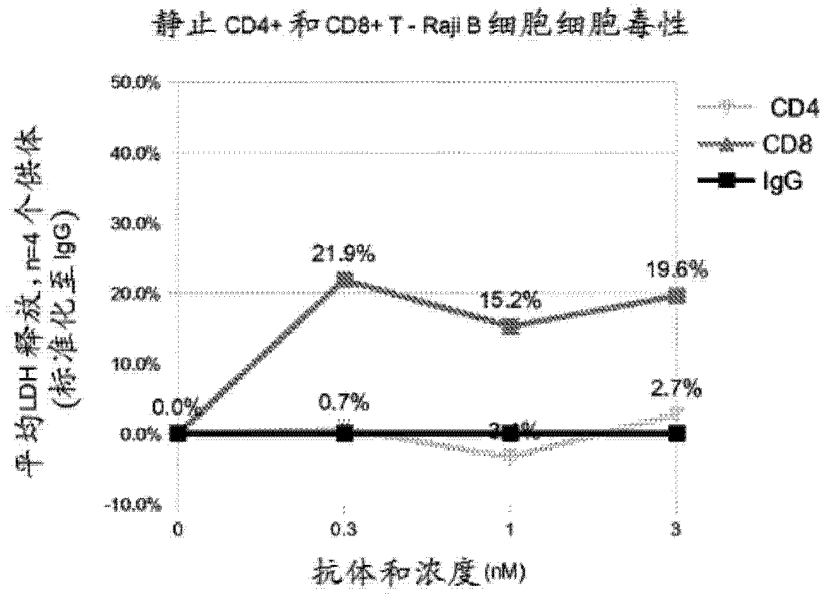


图 16C

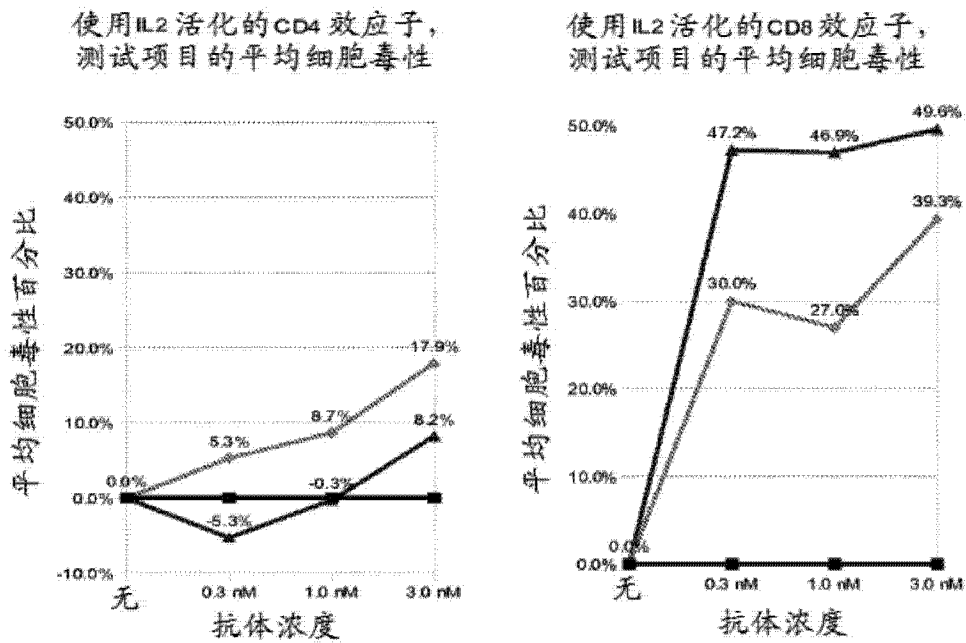


图 16D

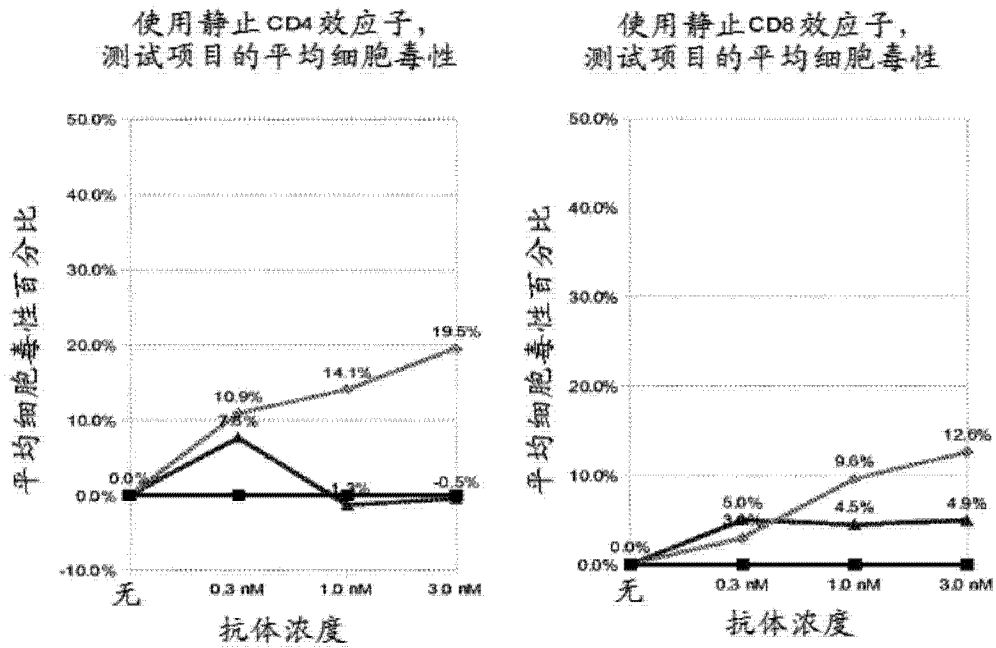


图 16E

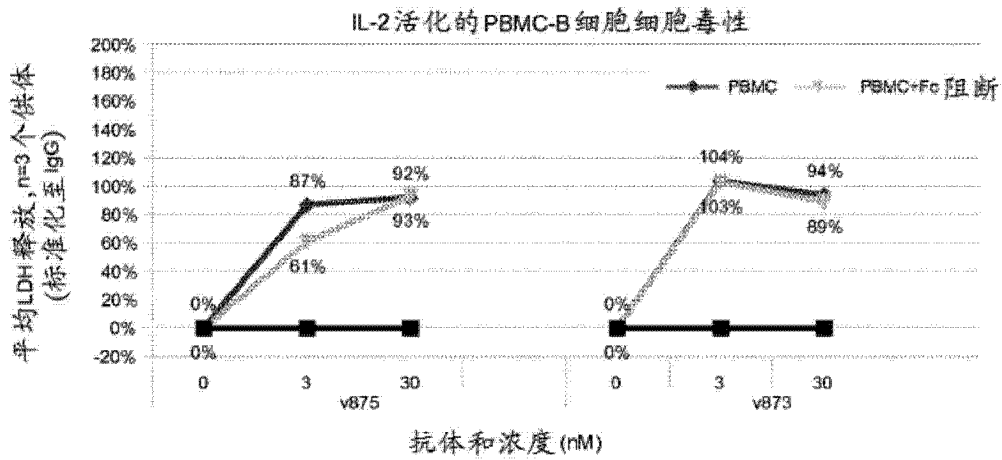


图 17A

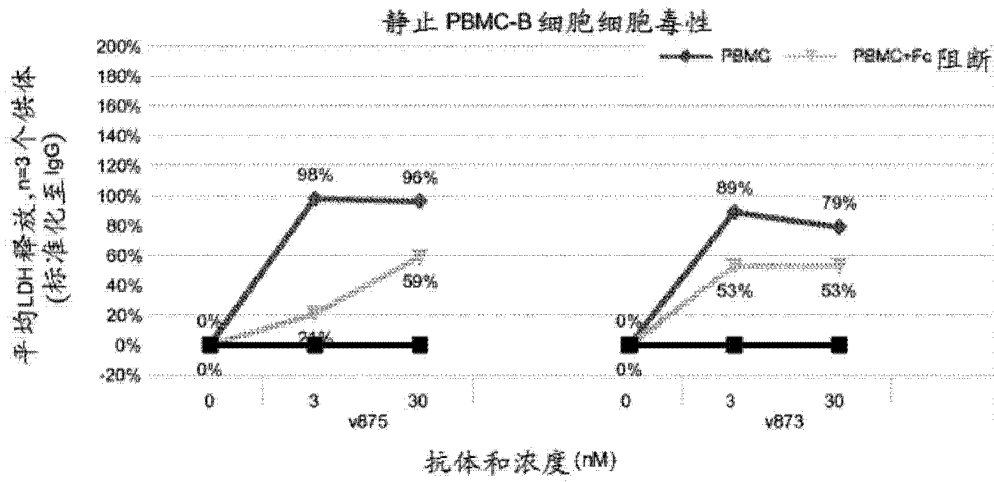


图 17B

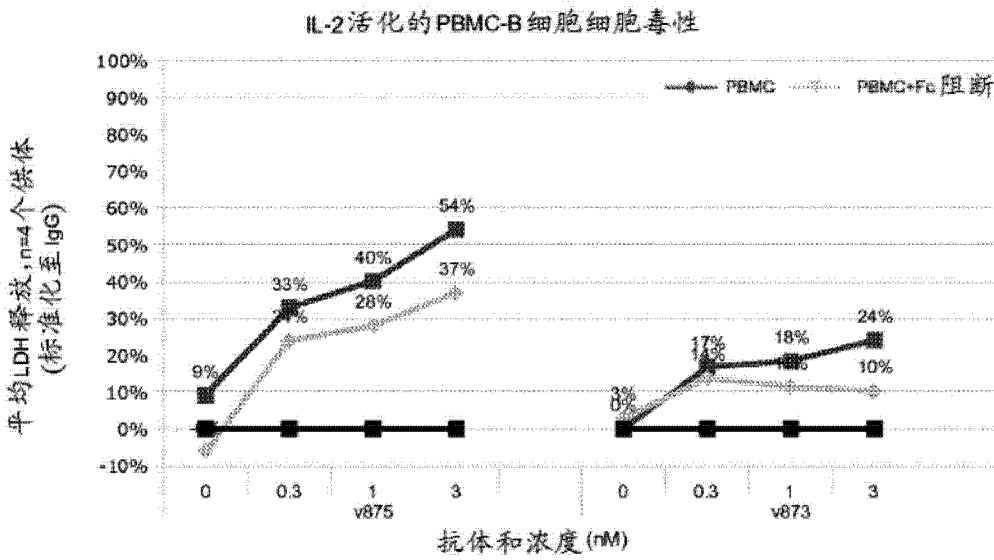


图 18A

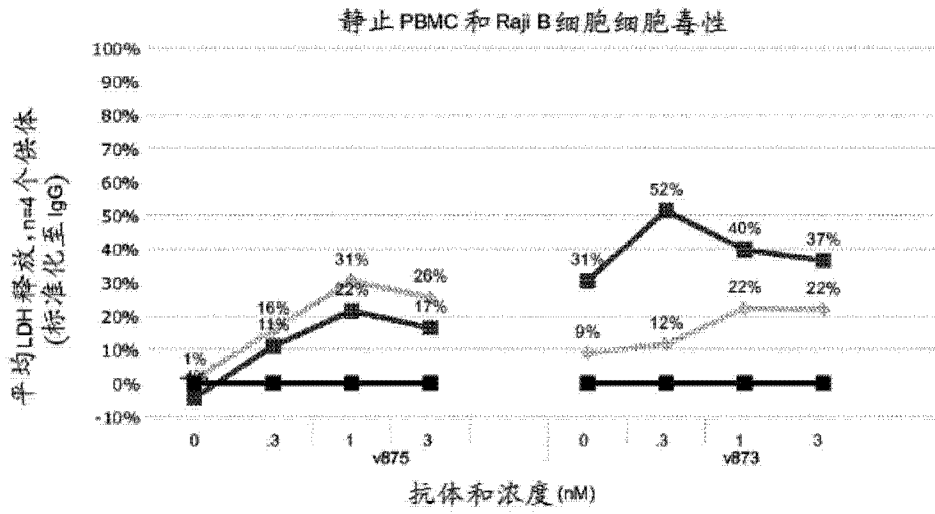


图 18B

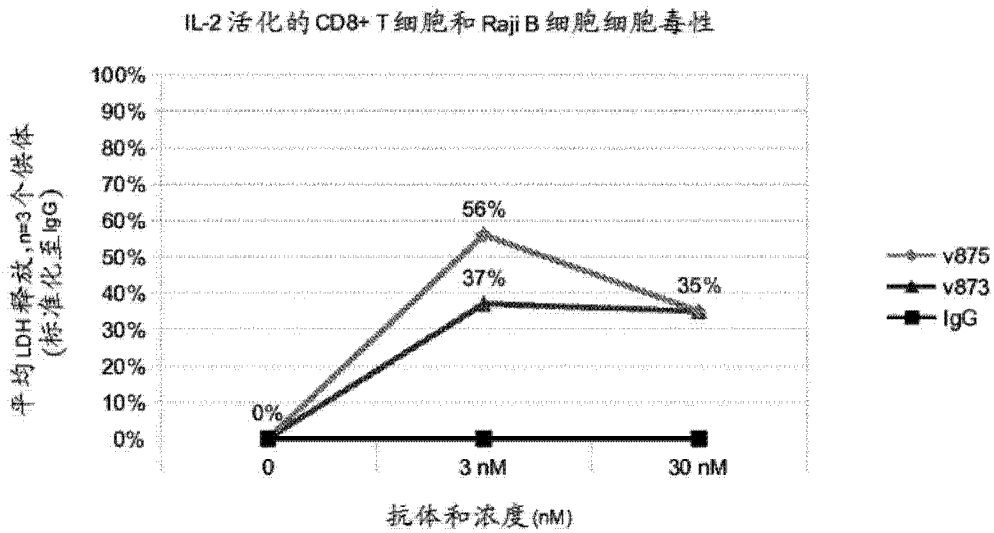


图 19A

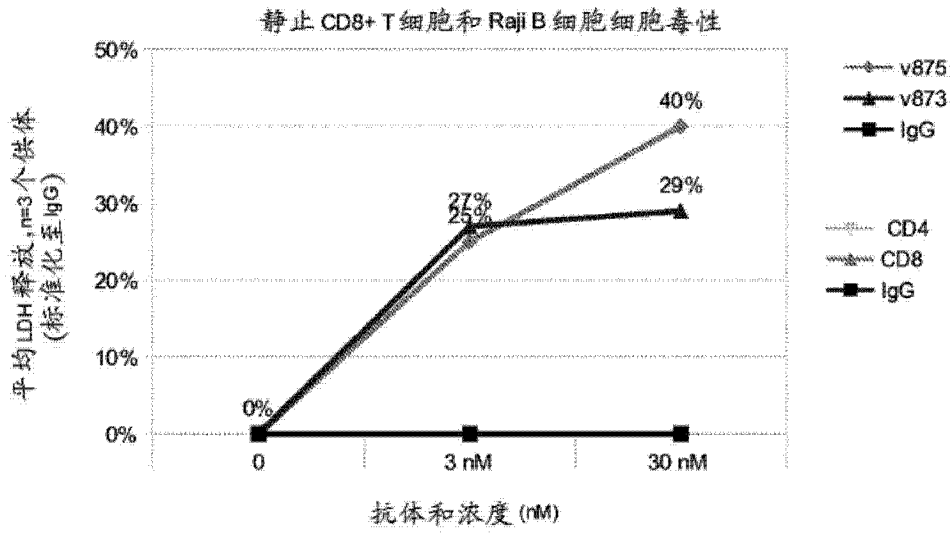


图 19B

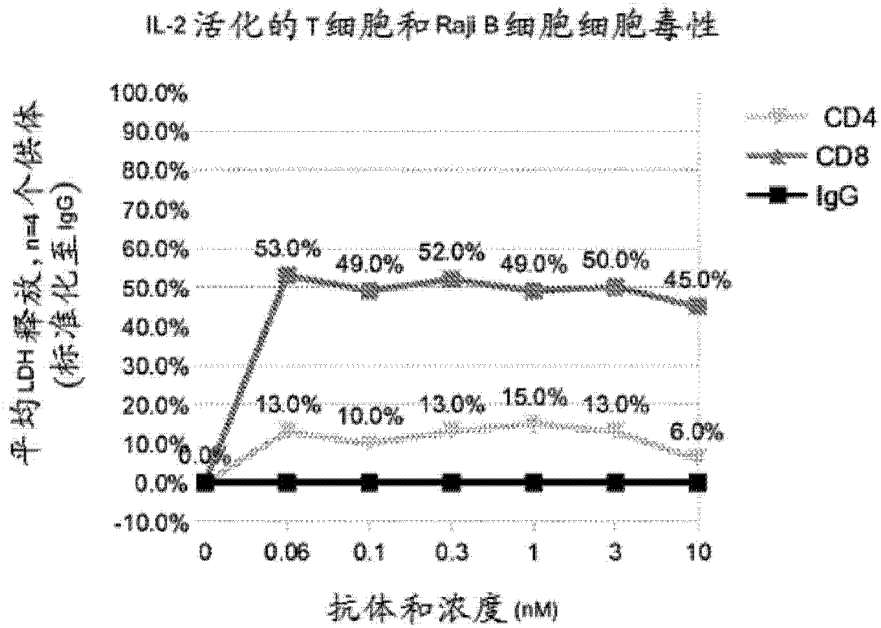


图 20A

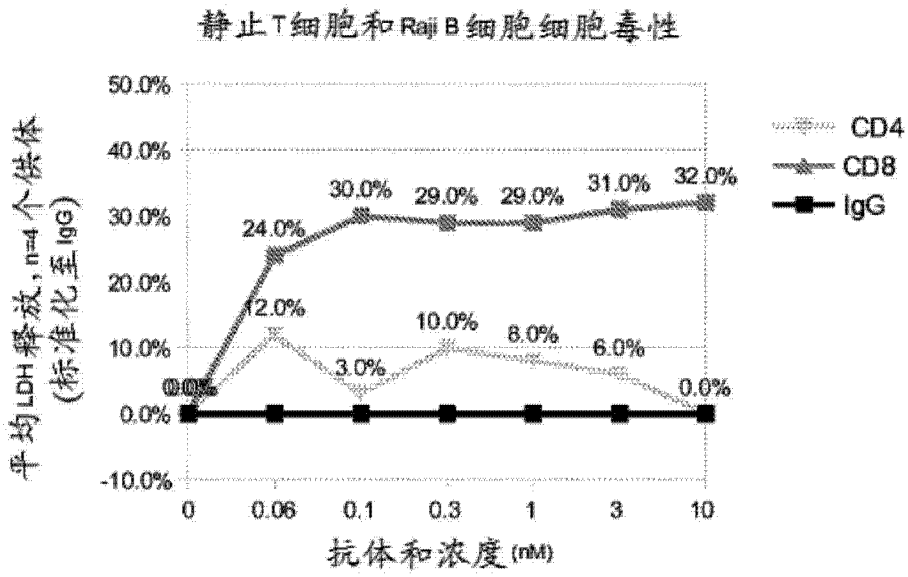


图 20B

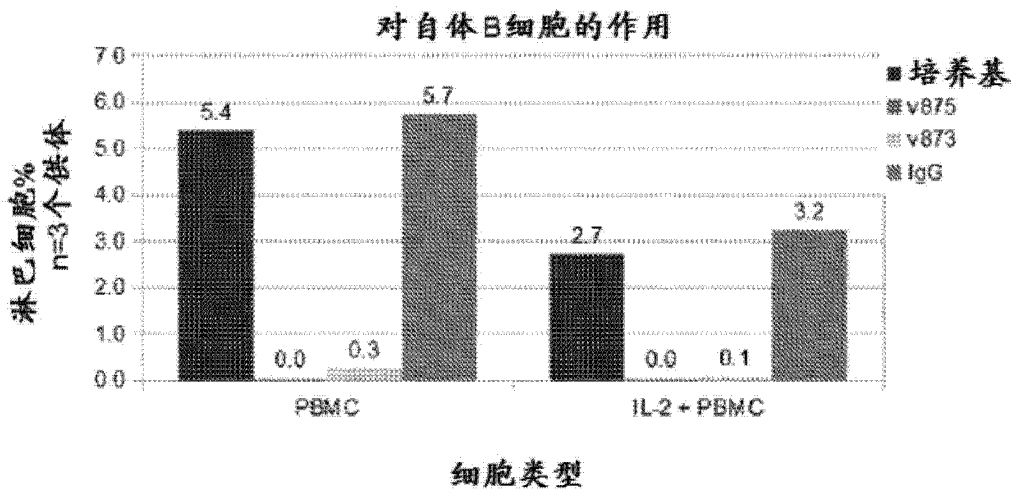


图 21

用测试项目解毒对T细胞群体的影响

所有供体

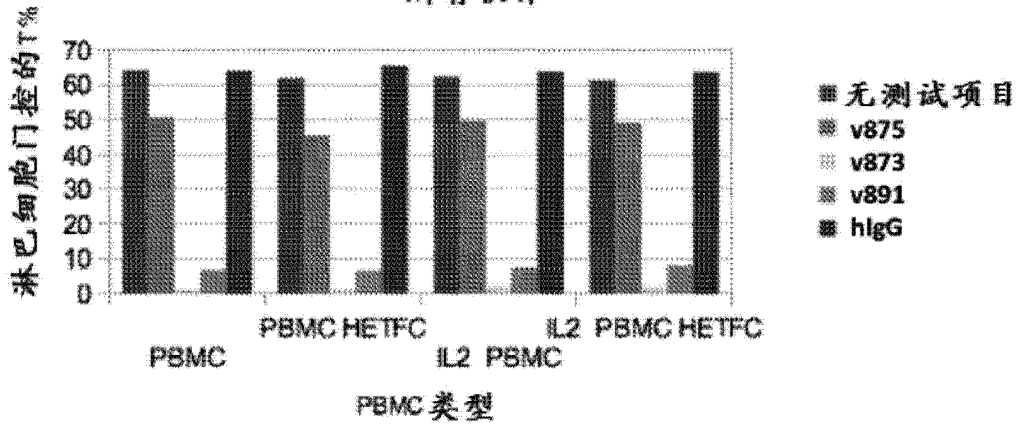


图 22

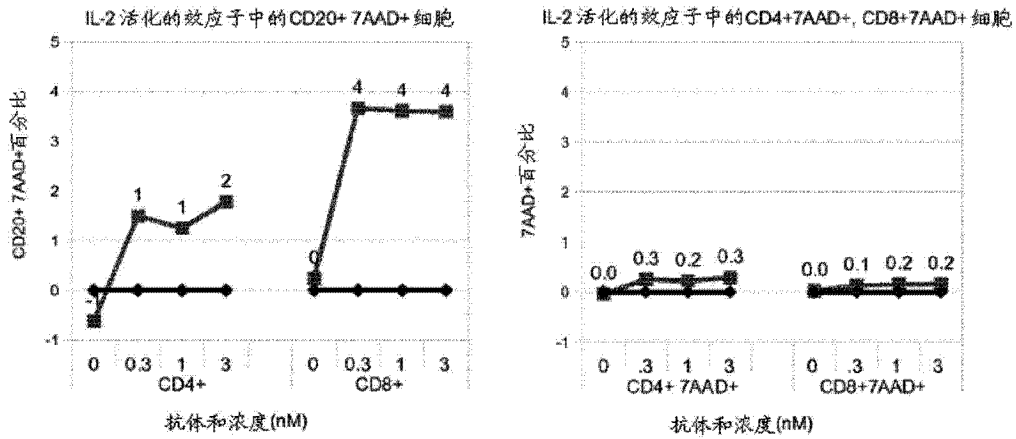


图 23A

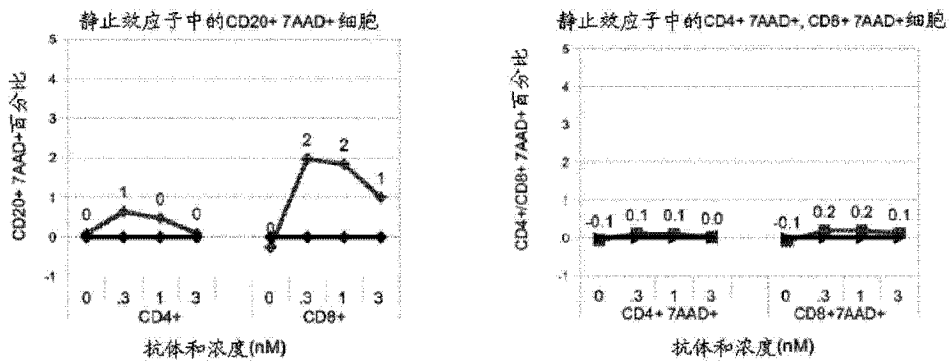


图 22B

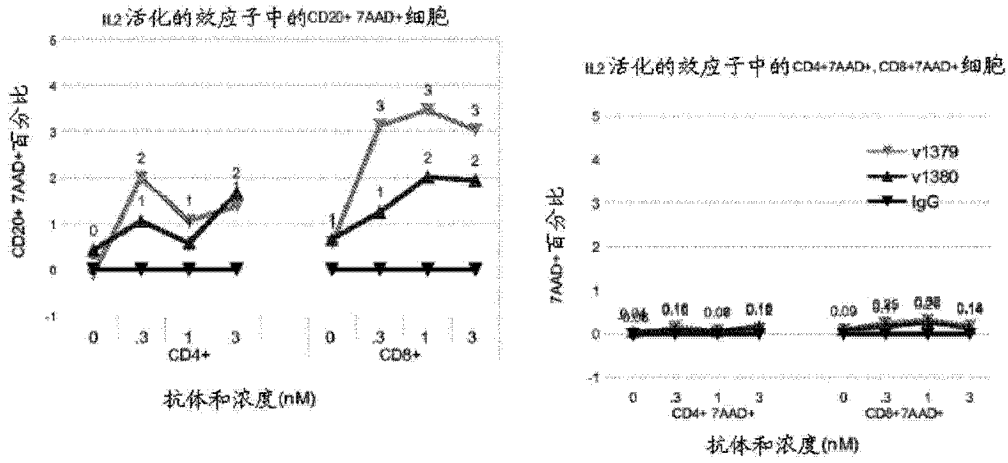


图 23C

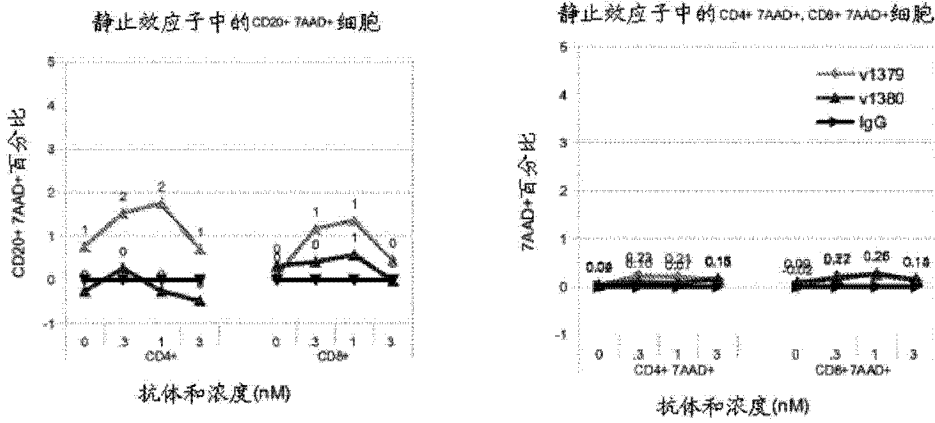


图 23D

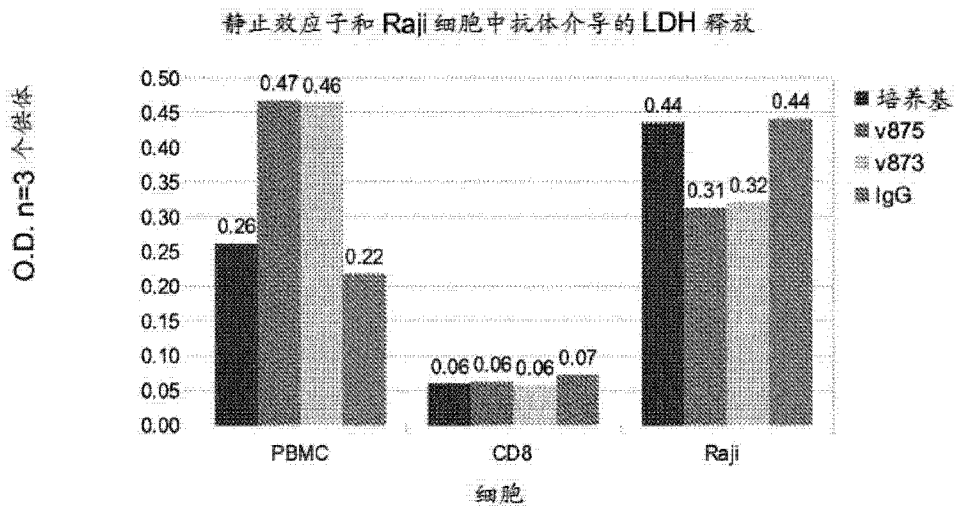


图 24A

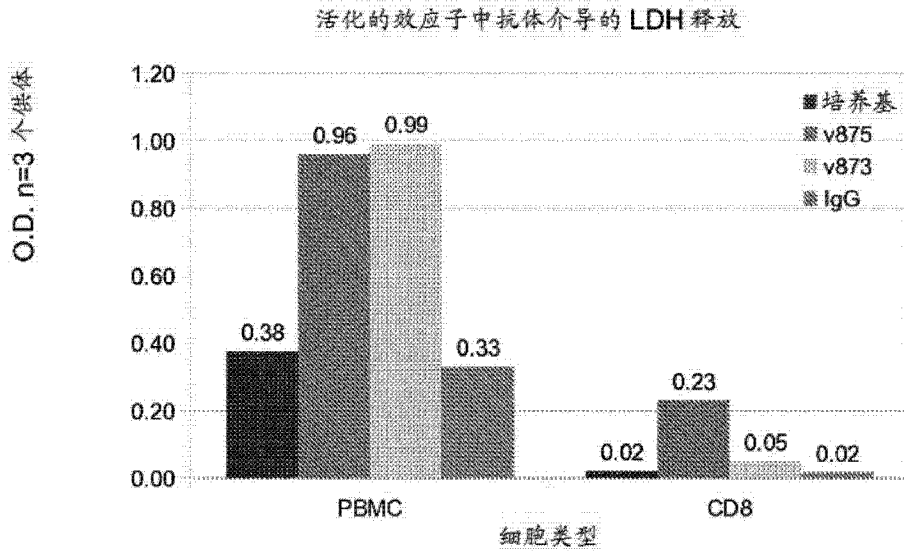


图 24B

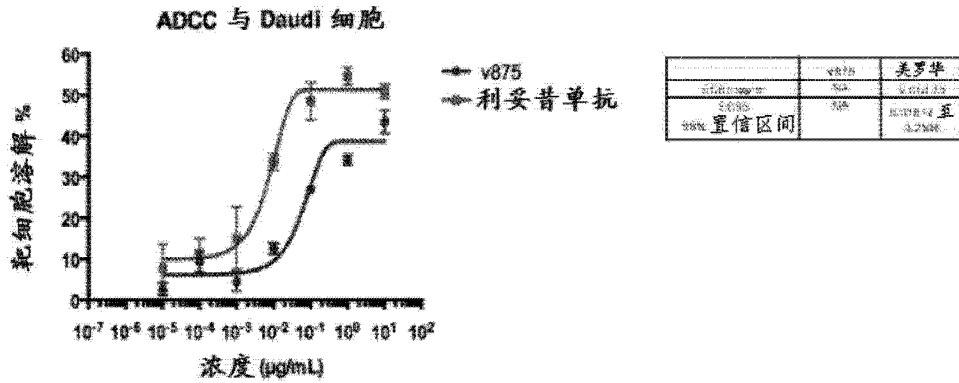


图 25A

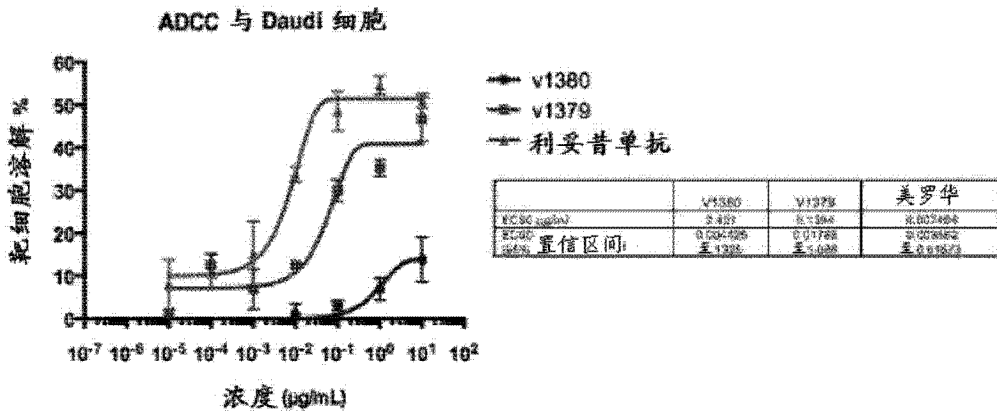


图 25B

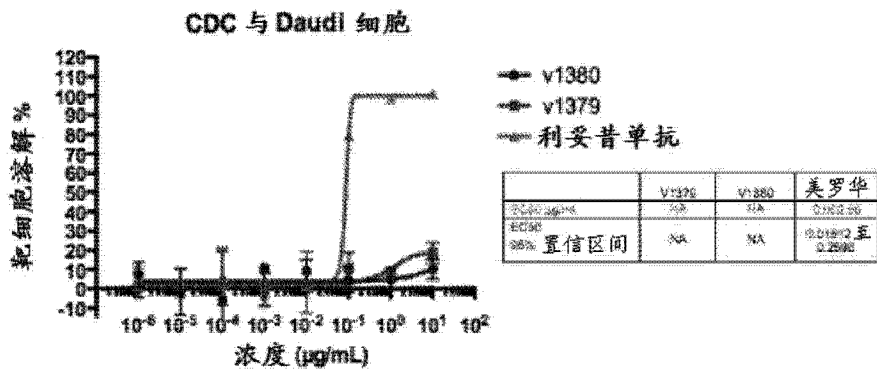


图 25C

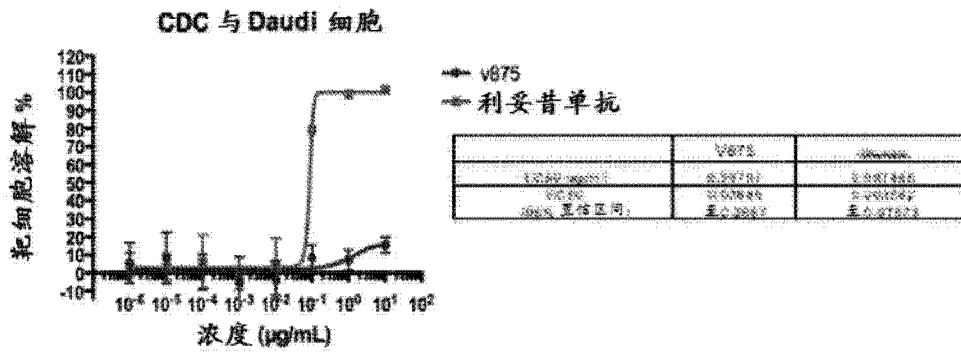


图 25D

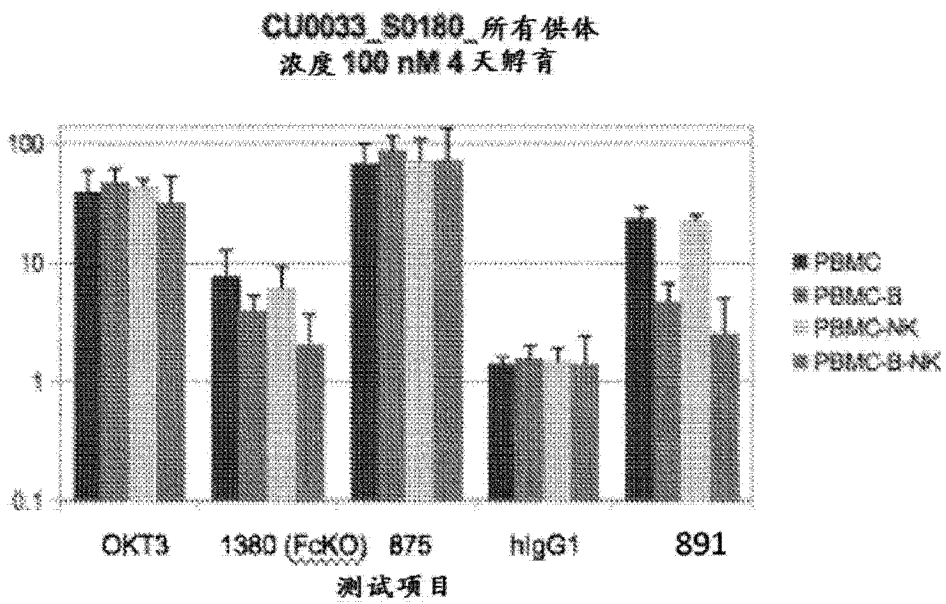
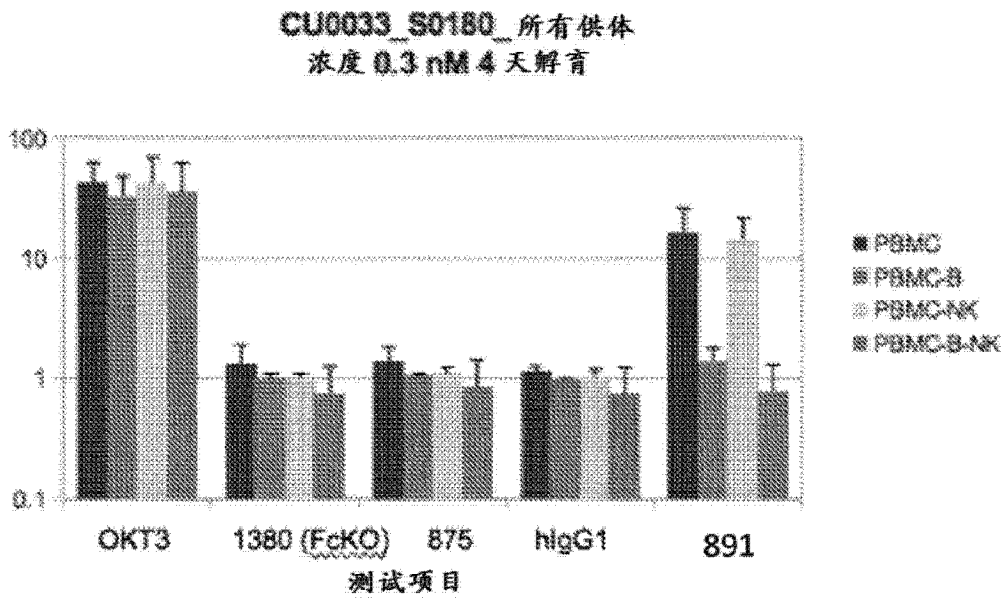


图 26

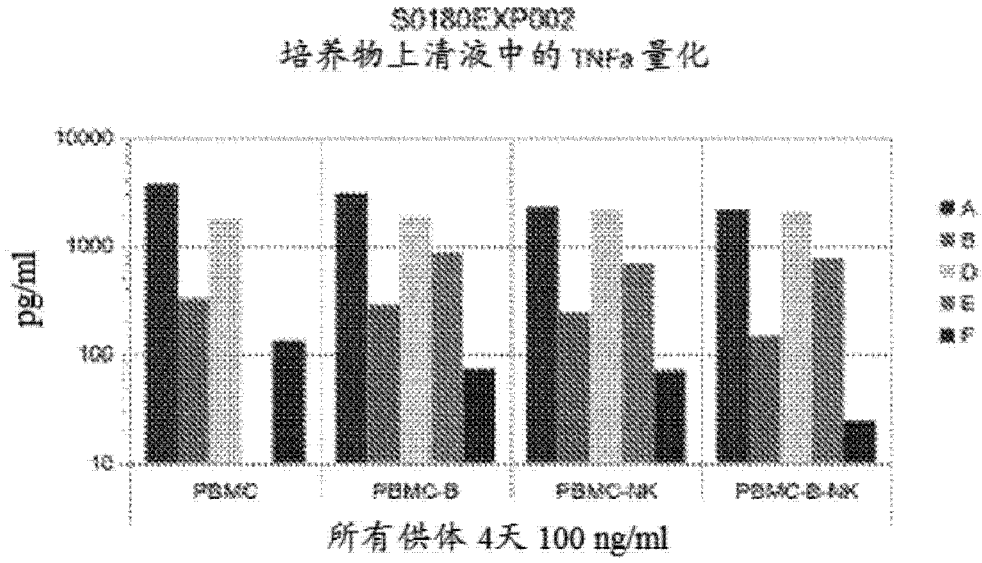


图 27A

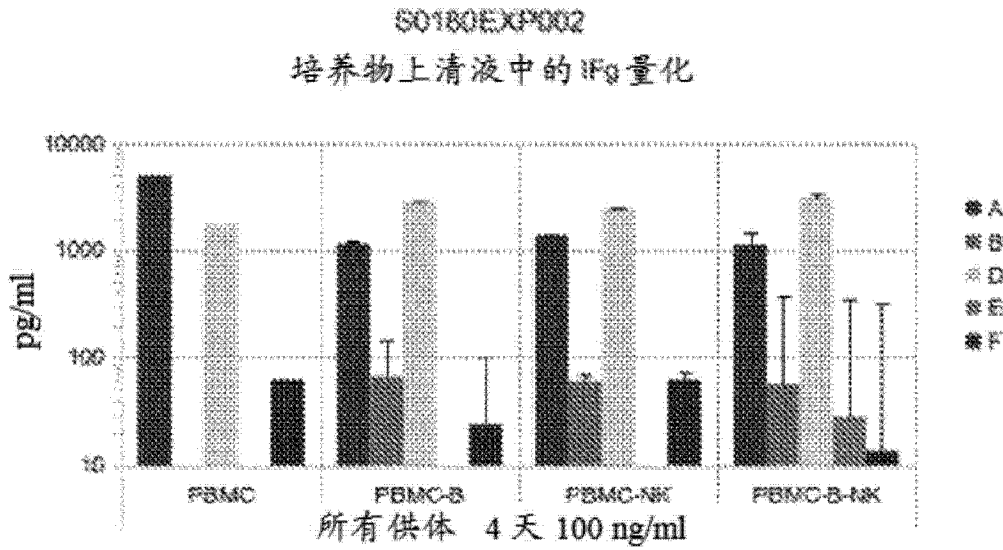


图 27B

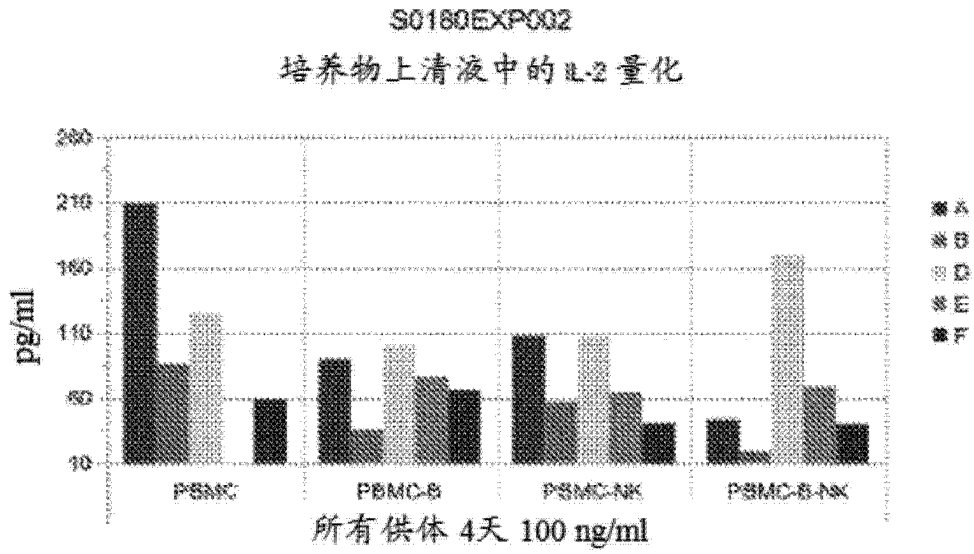


图 27C

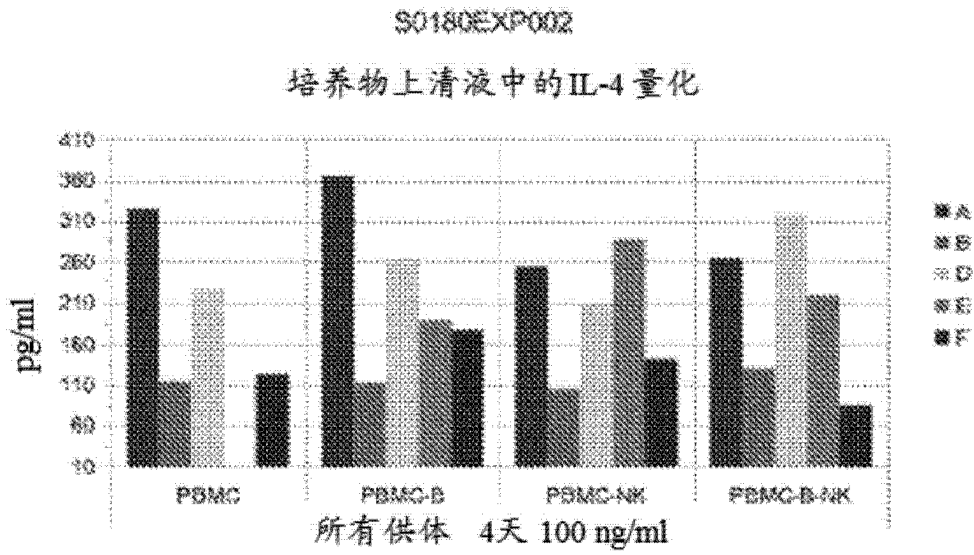
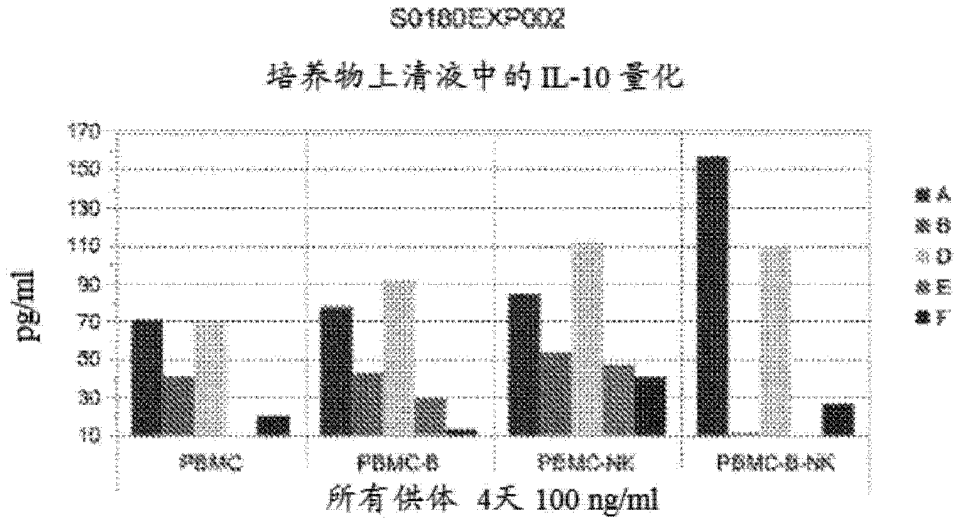


图 27D



A= OKT3, B= 1380, D=875, E=hlgG F= 891

图 27E

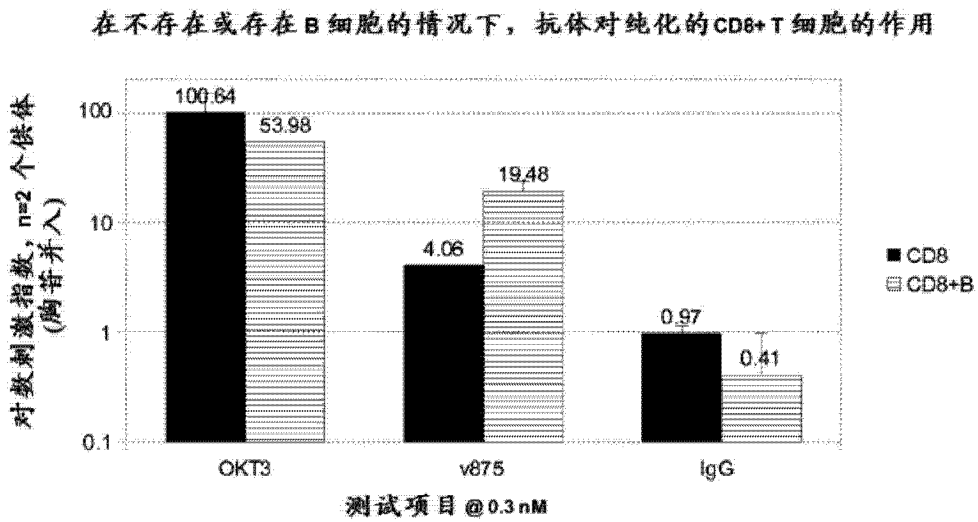


图 28A

在不存在或存在 B 细胞的情况下，抗体对 CD8+ T 细胞的作用

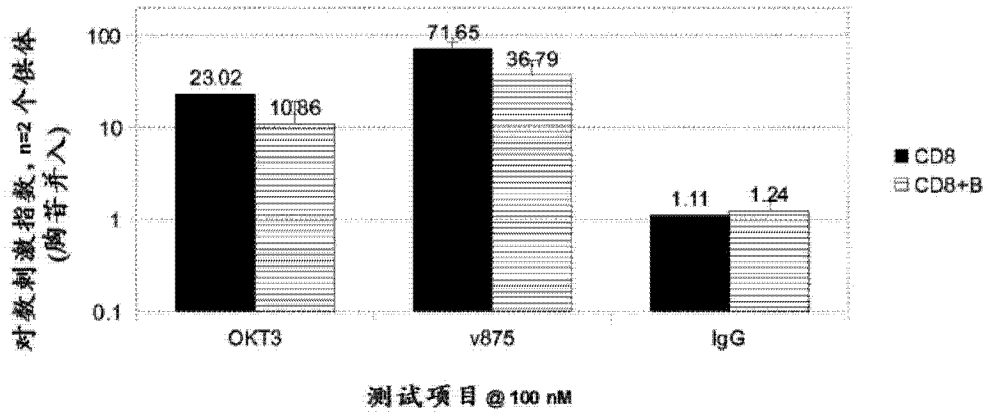


图 28B

在不存在或存在 B 细胞的情况下，抗体对 CD8+ T 细胞的作用

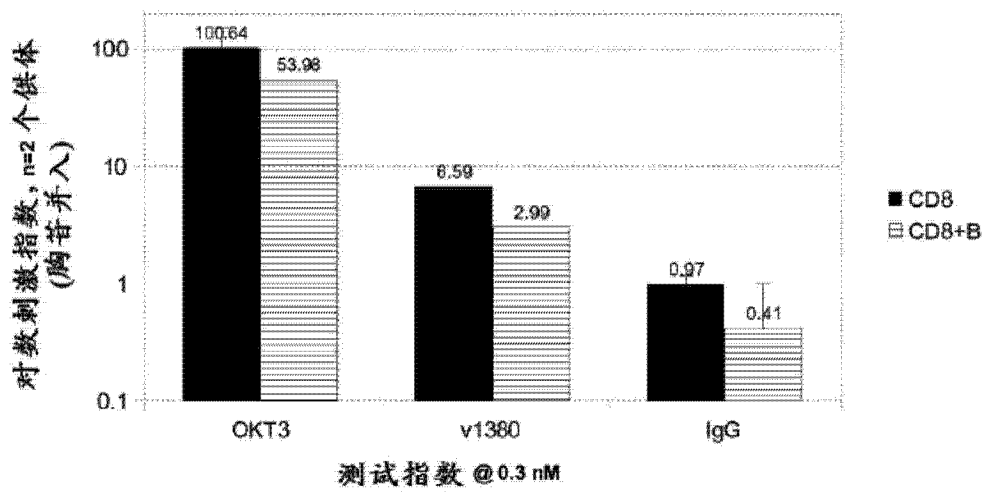


图 29A

在不存在或存在B细胞的情况下，抗体对CD8+ T细胞的作用

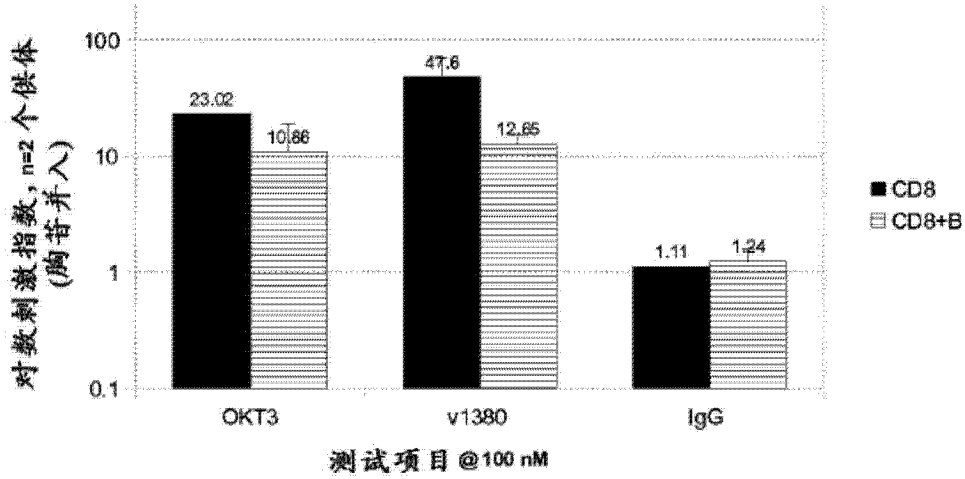


图 29B

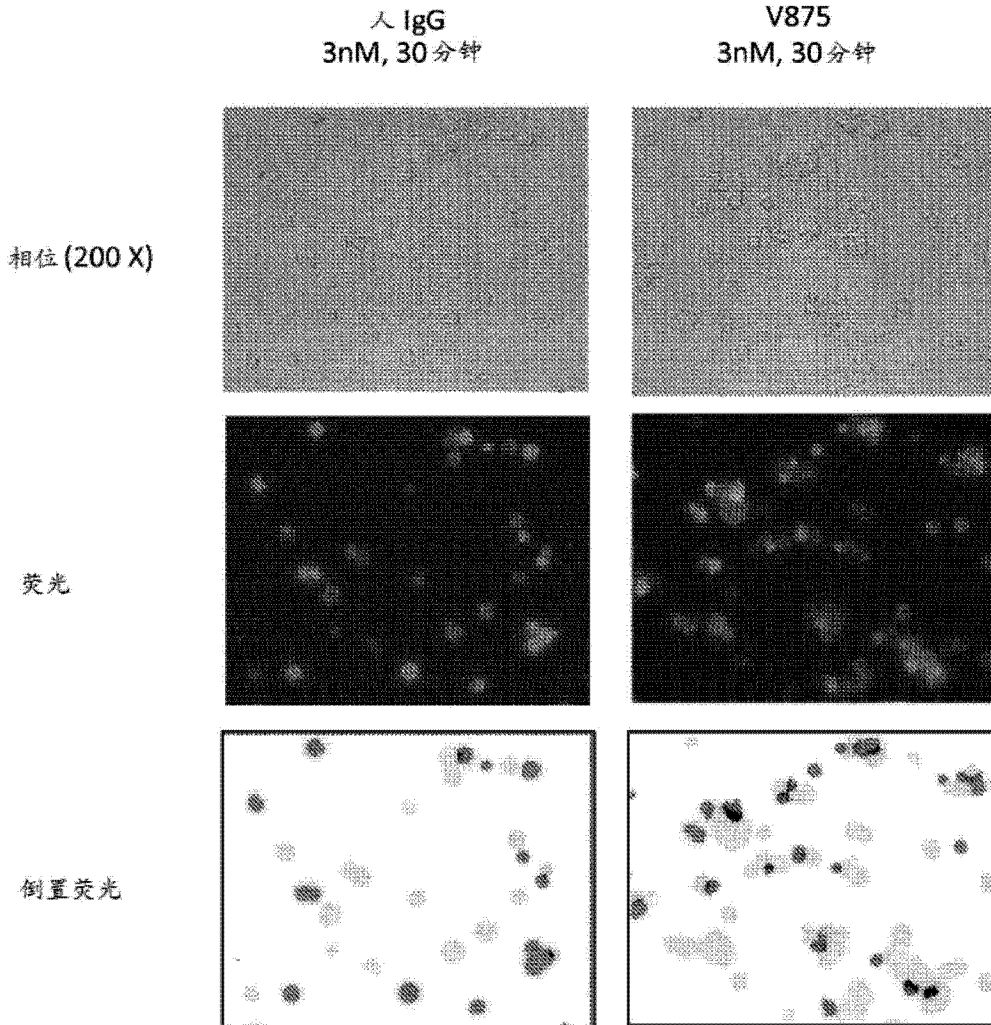


图 30A

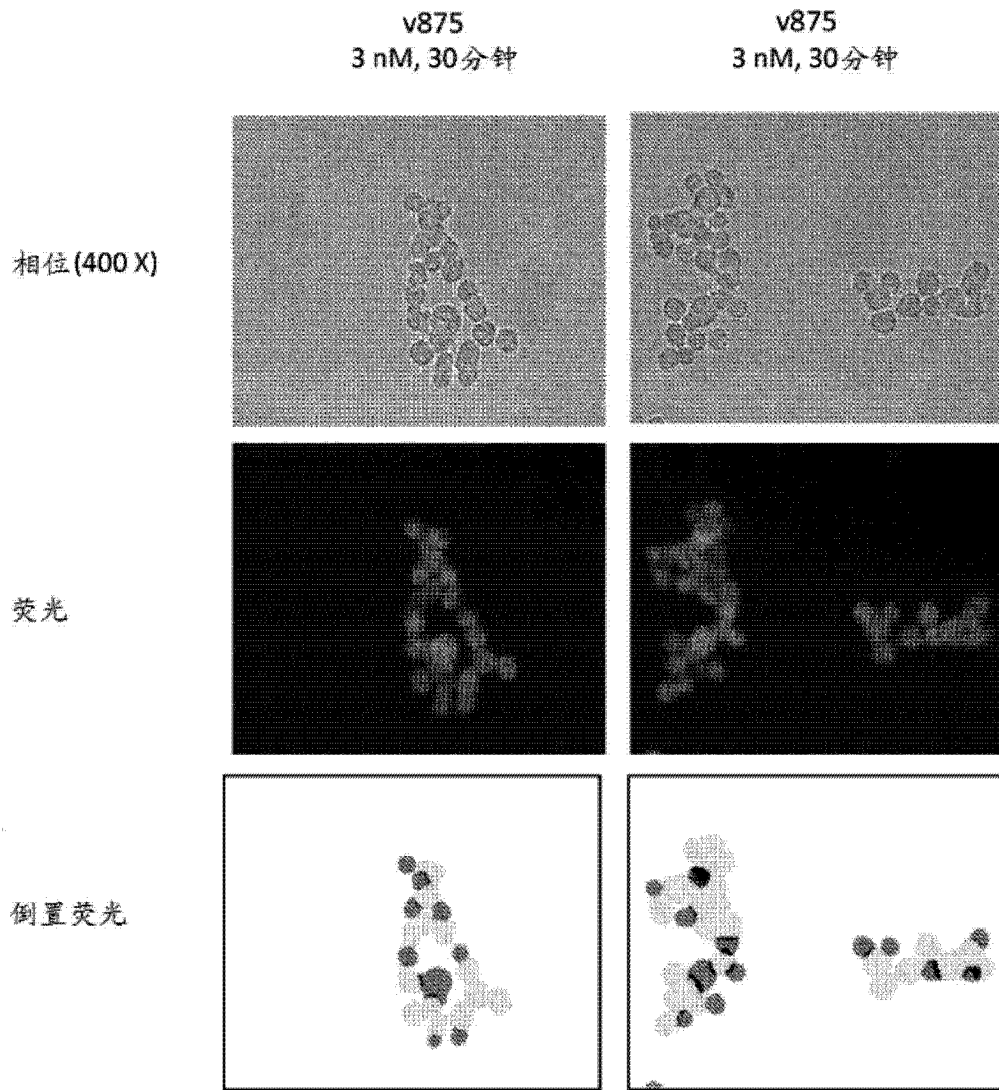


图 30B

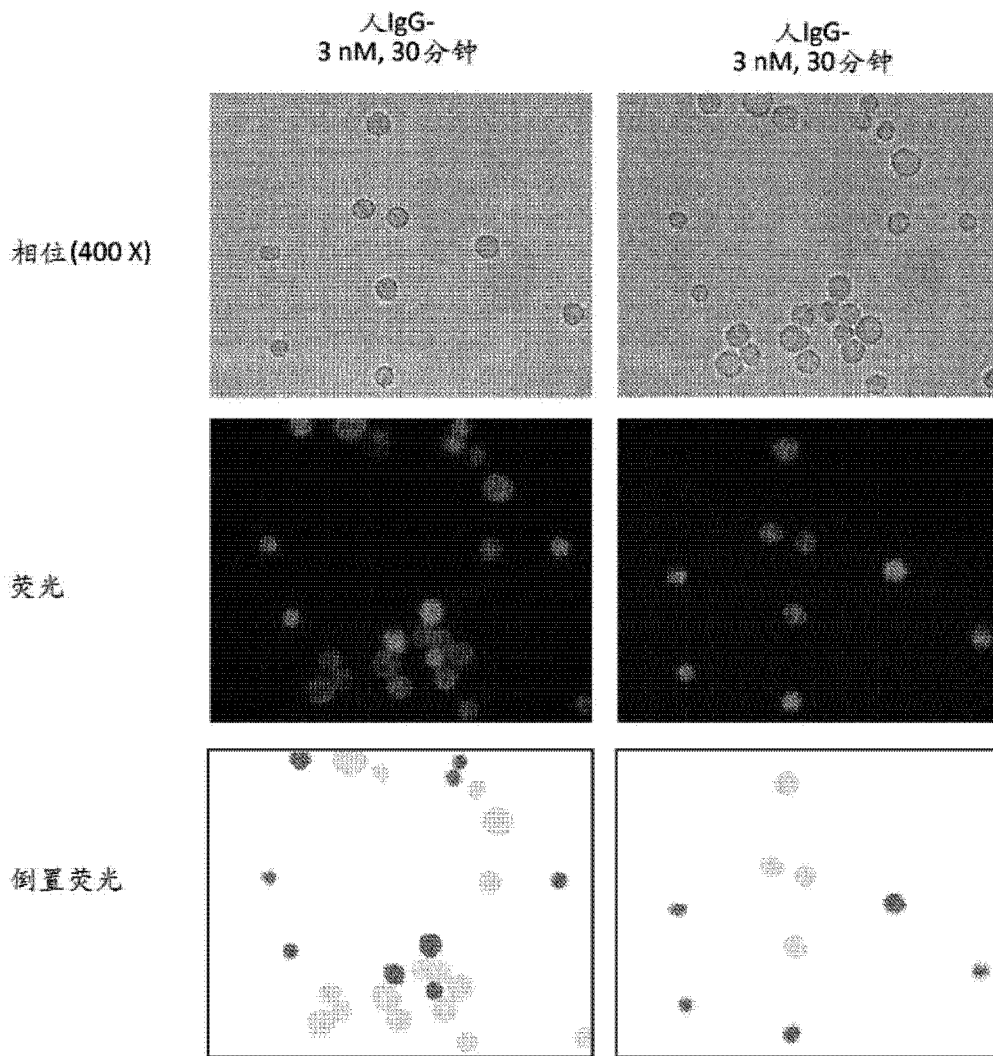


图 30C

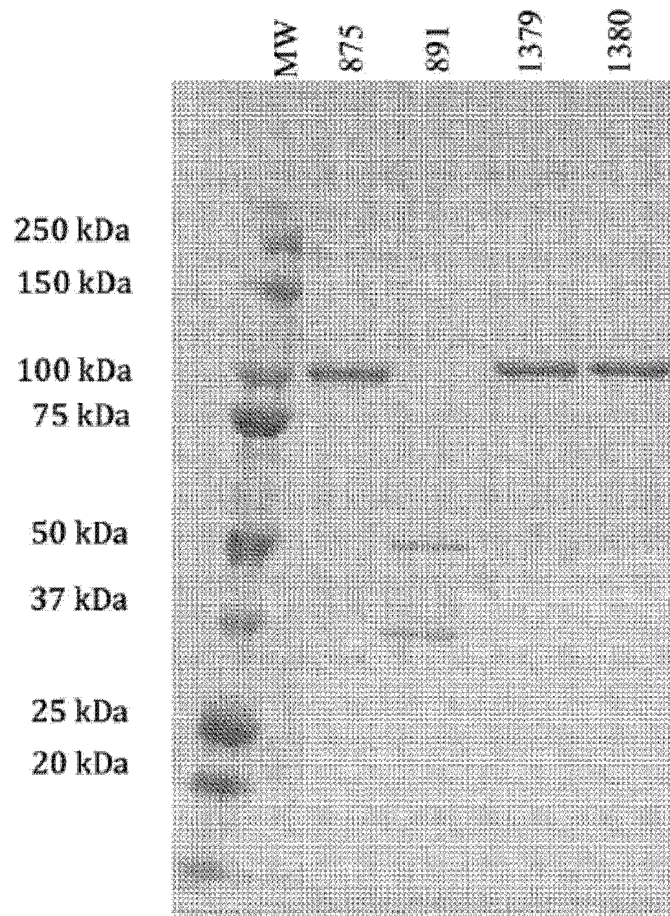


图 31A

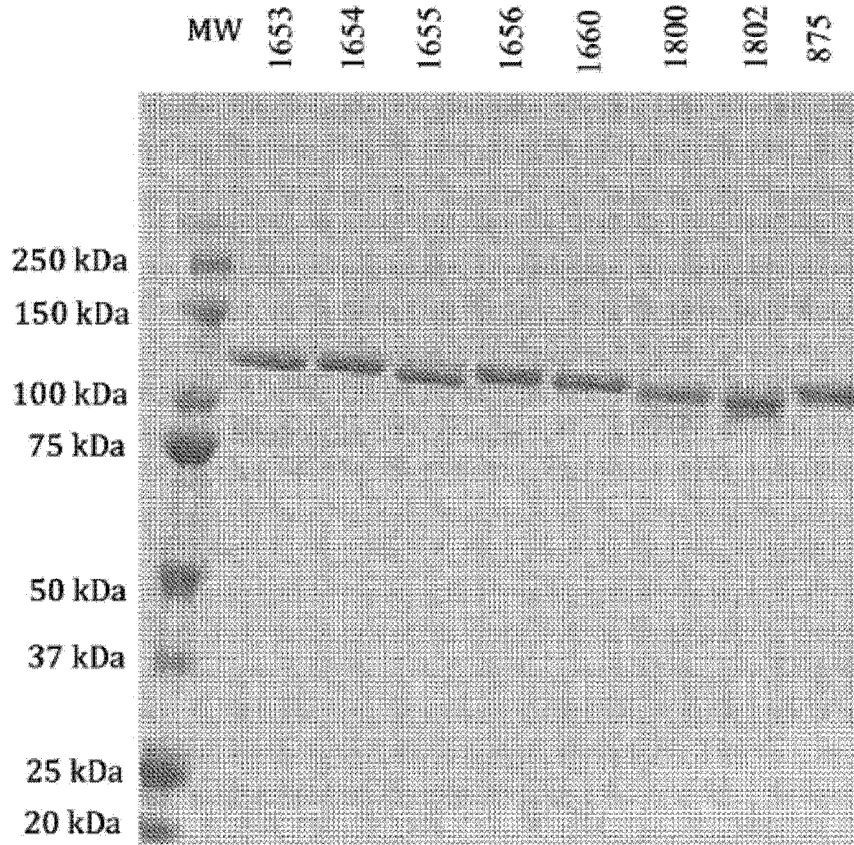


图 31B

MaxEnt 分子量曲线: m/z 1,700-2,700

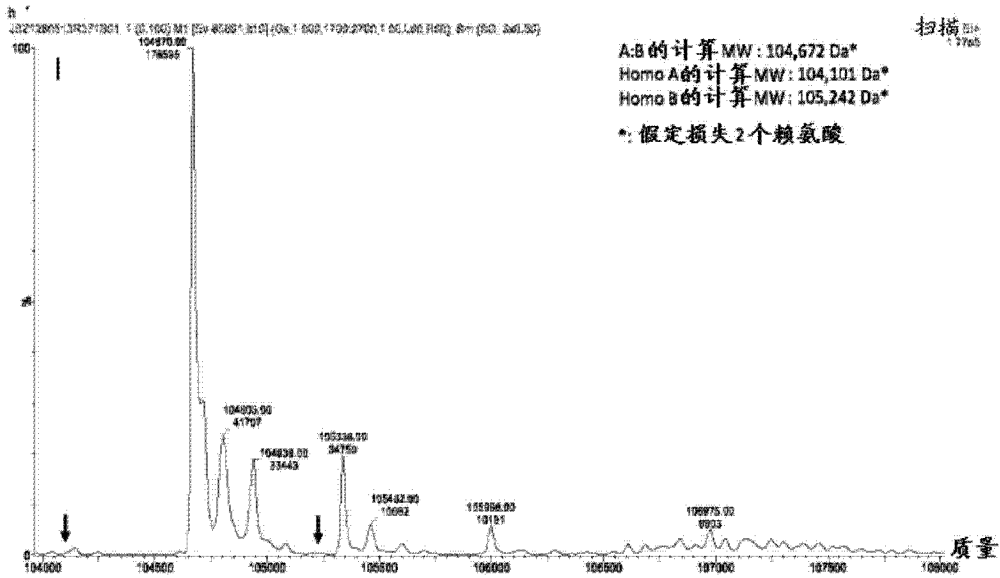


图 32

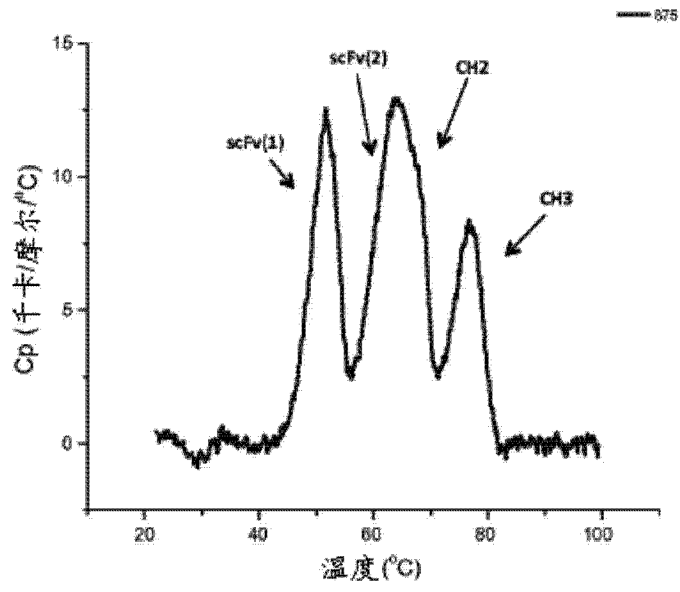


图 33A

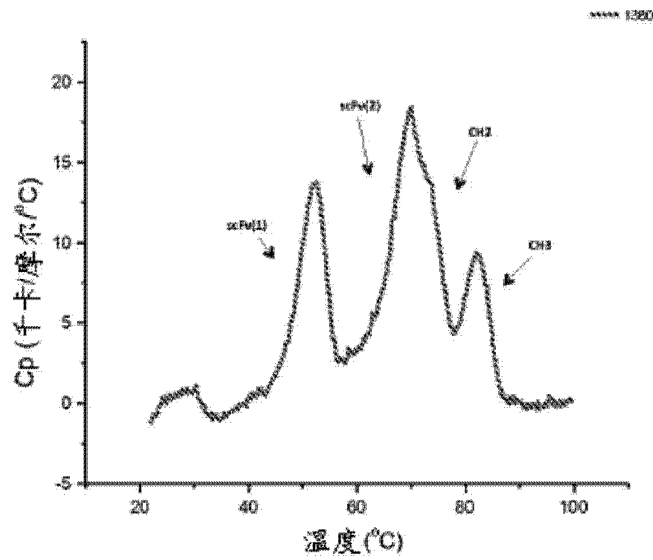


图 33B

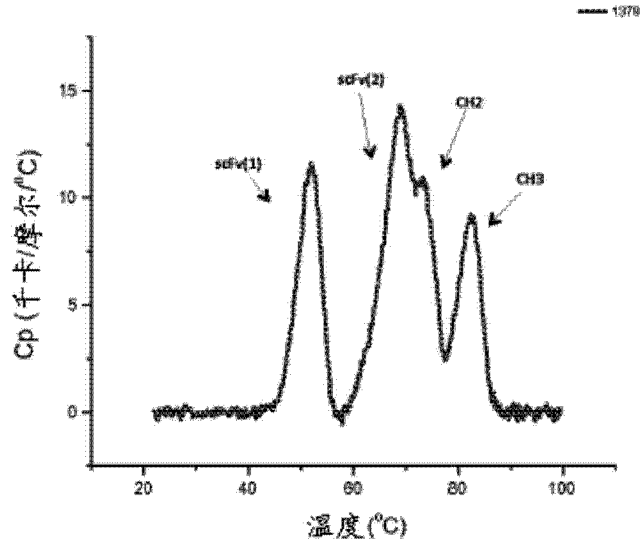


图 33C

结果(总活细胞群体的%)

变体	描述	no.1 (9月11日)			no.2 (9月18日)			no.3 (9月25日)		
		Jurkat / Jurkat	Raji/Raji	Jurkat-V / Raji-FR	Jurkat / Jurkat	Raji/Raji	Jurkat-V / Raji-FR	Jurkat / Jurkat	Raji/Raji	Jurkat-V / Raji-FR
培养基		0.6	1.6	5	0.4	1.3	6.5	1.3	1.4	6.1
1375 120801J5	双特异性CD19-CD3 (VL-VH-OKT3)	1.0	5.5	21.5	0.4	3.1	19.3	1.9	3.5	22.4
1375 120805J5	双特异性CD19-CD3 (VL-VH-OKT3)	1.0	4.3	21.1	1.5	4.3	20.1	1.6	1.5	23.4
1379 120905J5	基于前导序列 HEY ₁ 支架的 CD19-CD3 (VL-VL-BITE) 135775E	0.7	3.7	29.8	0.7	3.9	29.6	1.2	2.3	25.9
1380 120910J5	具有CH2 KO突变 LZ34A, LZ35A 的 CD19-CD3 (VL-VL-BITE)	0.7	2.6	28.2	0.6	2.6	28.6	1.0	1.5	29.8
1381 120917J5	BITE				0.5	4.7	20.4	1.4	4.5	19.3
1381 120908J5	具有CH2 KO突变 N297A 的 CD19-CD3 (VL-VL-BITE)	0.3	8.0	20.8	0.5	8.7	20.4	1.0	3.6	22.2
1383	CD3 ^{hi} 阳性对照	1.1	1.3	16.0	2.1	1.7	19.8	2.0	0.8	18.4
人 IgG		0.5	1.5	6.9	0.5	1.6	8.4	0.5	0.7	6.8
培养基		0.7	1.3	6.3	0.5	1.4	7.4	0.5	0.7	7

图 34A

FACS 桥联(超过背景的成倍差异)

变体	描述	Jurkat/Jurkat	Raji/Raji	Jurkat-V/Raji-FR
人 IgG	阴性对照	1,0	0,9	1,0
v875 120905JS	双特异性 CD19-CD3(VL-VH-Okt3)	1,8	8,0	7,6
v875 2012-10-29-YL	双特异性 CD19-CD3(VL-VH-Okt3)	2,0	5,2	7,1
v1653 2012-10-26-YL	CD19-CD3(Okt3_VL_VH_Ser)	1,8	5,9	8,0
v1656 2012-10-26-YL	CD19-CD3(BITE_VHVL)-等效于 v873, 但链取向 B/A 导致 Mw 差异	1,2	24,5	12,4
v1800 2012-10-29-YL	CD19-CD3(Okt3_VL_VH)_scFv-等效于 v875_CD3(Okt3), 具有 SS 稳定性	1,0	1,2	2,5
v1802 2012-10-29-YL	CD19-CD3(BITE_VHVL)-等效于 v873, 但链取向 B/A 导致 Mw 差异, 具有 SS 稳定性	1,6	2,0	8,7
人 IgG	阴性对照	1,0	1,1	1,0

变体	描述	Jurkat/Jurkat	Raji/Raji	Jurkat-V/Raji-FR
人 IgG	阴性对照	1,2	1,1	1,1
v875 120905JS	双特异性 CD19-CD3(VL-VH-Okt3)	1,8	7,4	7,3
v1654 2012-10-26-YL	双特异性 CD19-CD3(Okt3_VHVL18)_scFv	1,4	13,4	11,2
v1655 2012-10-25-YL	双特异性 CD19-CD3(Okt3_VHVL10)_scFv	1,6	12,5	9,2
v1660 2012-10-26-YL	双特异性 CD19-CD3(Okt3_VHVL19)_scFv	1,4	4,3	13,7
Okt3	CD3 mAb 阳性对照	1,6	1,0	1,9
人 IgG	阴性对照	0,8	0,9	0,9

图 34B

变体	描述	桥联(总群体的%)			桥联(超过背景的倍数)		
		Jurkat-紫色/ Jurkat-远红色	Raji-紫色/ Raji-远红色	Jurkat-紫色/ Raji-远红色	Jurkat/Jurkat	Raji/Raji	Jurkat-V/Raji-FR
人 IgG	阴性对照	0,3	1,4	3,1	0,7	1,1	1,1
v1666-213-A	CD19(CH-B)/CD3(CH-A) 双特异性 scFvFc KO (v81/831)- CD3(Okt3_VHVL19)	1,0	21,2	26,5	2,2	16,3	9,1
v4541-213-A	DIS_BITE_KO	1,1	3,3	25,1	2,4	2,5	8,7
v4543-213-A	DIS_BITEx_MOR208VHVL_KO	0,9	1,4	17,6	2,0	1,1	6,1
v4545-213-A	DIS_BITEx_MOR208VLVH_KO	0,5	5,6	15,5	1,1	4,3	5,3
v4548-213-A	BITEx_MDX1342VLVH_KO	0,5	22,6	9,9	1,1	17,6	3,4
Okt3	抗-CD3 阳性对照	1,1	1,0	6,1	2,4	0,8	2,1
2176-240-A	MOR208-CD19 FSA (抗- CD19 阳性对照)	0,7	10,0	1,8	1,6	7,7	0,6
人 IgG	阴性对照	0,6	1,3	2,7	1,3	1,0	0,9

图 34C

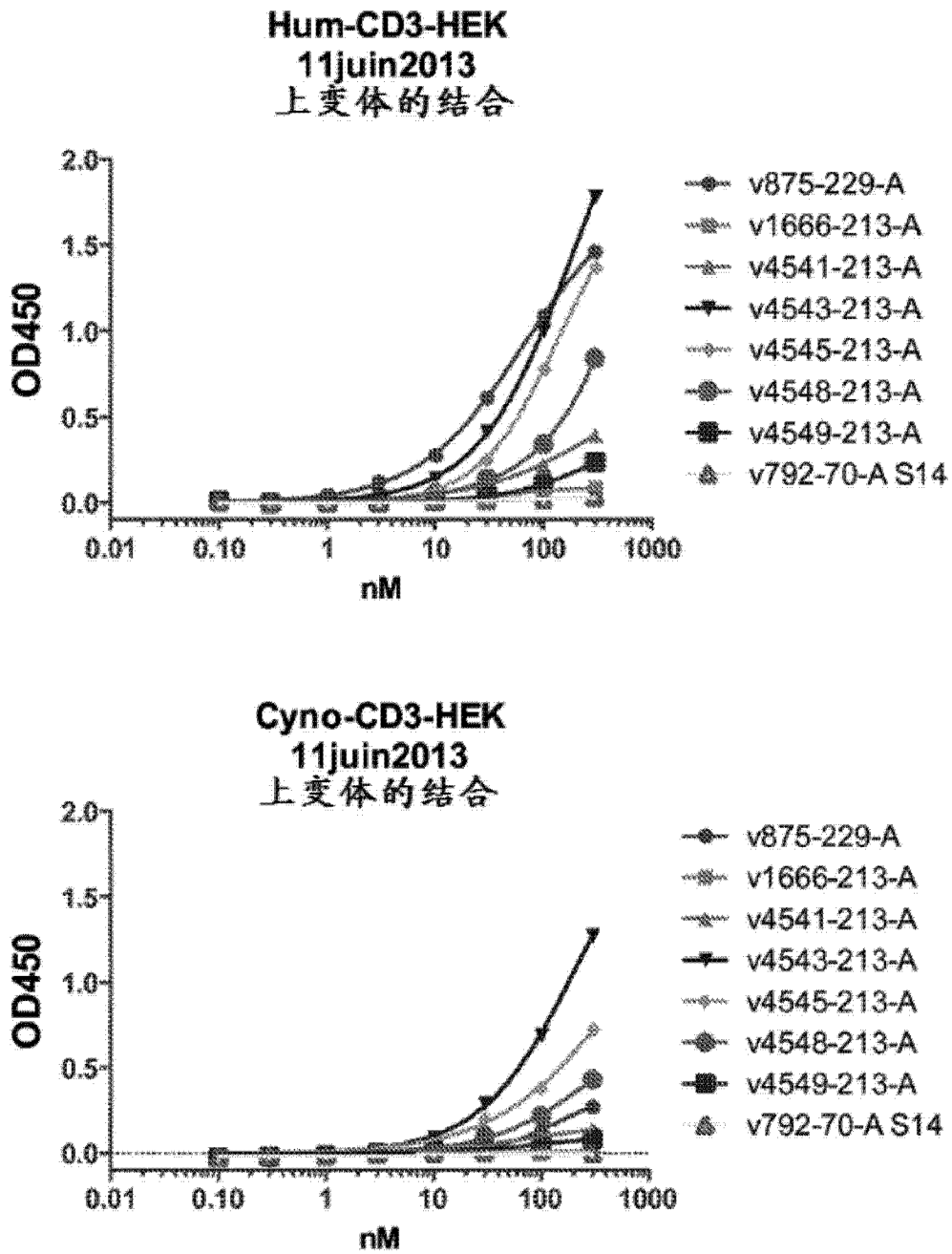


图 35

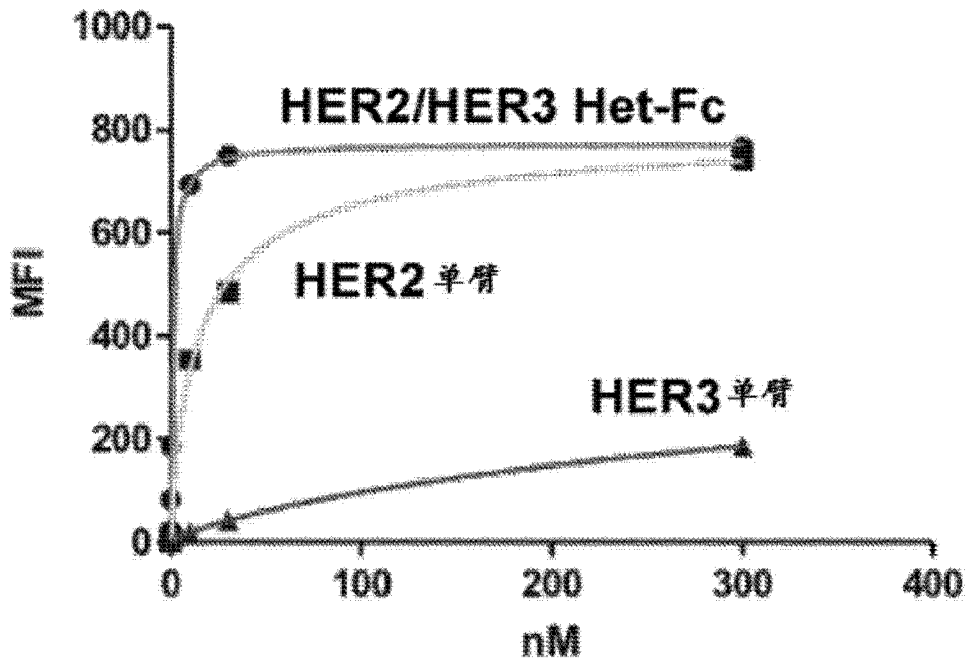


图 36A

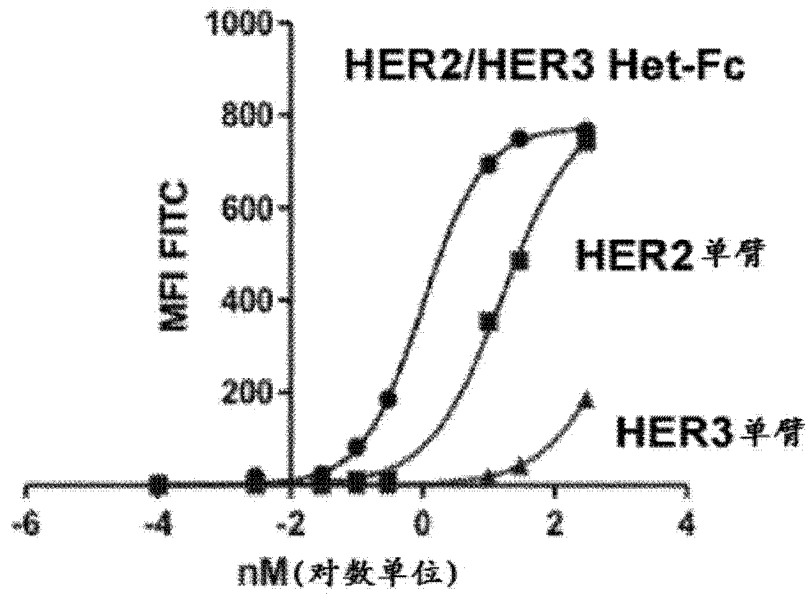


图 36B

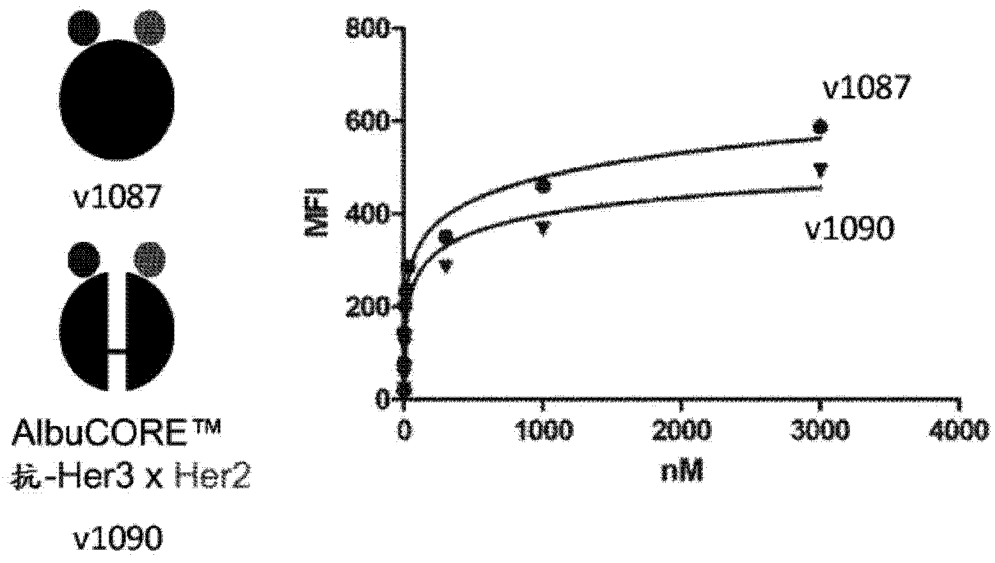


图 37