



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201720458 A

(43)公開日：中華民國 106 (2017) 年 06 月 16 日

(21)申請案號：105140030

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 12 月 02 日

(51)Int. Cl. : *A61K39/395 (2006.01)**A61K31/519 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)**C07K16/28 (2006.01)*

(30)優先權：2015/12/04 美國

62/263,257

(71)申請人：宏觀基因股份有限公司 (美國) MACROGENICS, INC. (US)

美國

(72)發明人：波維尼 愛利歐 BONVINI, EZIO (US)；強生 萊斯利 JOHNSON, LESLIE S.

(US)；寇尼格 史考特 KOENIG, SCOTT (US)；郭家穎 KAO, LAM CHIA-YING

(TW)；劉麗勤 LIU, LIQIN (CN)；摩爾 保羅 MOORE, PAUL A. (GB)

(74)代理人：李文賢

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：37 共 167 頁

(54)名稱

能夠結合 CD19 和 CD3 的雙特異性單價雙抗體以及其用途

BI-SPECIFIC MONOVALENT DIABODIES THAT ARE CAPABLE OF BINDING CD19 AND CD3,
AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明涉及聯合療法，所述聯合療法包括施用：(1)能夠特異性結合至 CD19 和結合至 CD3 的雙特異性分子(即，CD19 x CD3 雙特異性分子)，和(2)用於治療疾病，尤其治療與 CD19 的表達相關或特徵在於 CD19 的表達的疾病的布魯頓酪氨酸激酶(BTK)抑制劑。優選地，這類 CD19 x CD3 雙特異性分子是雙特異性單價雙抗體。本發明涉及藥物組合物，其包含這類 CD19 x CD3 雙特異性分子、BTK 抑制劑或這些劑的組合。本發明另外涉及使用這類藥物組合物治療疾病，尤其是治療與 CD19 的表達相關或特徵在於 CD19 的表達的癌症的方法。

The present invention is directed to a combination therapy involving the administration of: (1) a bi-specific molecule capable of specifically binding to CD19 and to CD3 (i.e., a CD19 x CD3 bi-specific molecule), and (2) a Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) inhibitor for the treatment of disease, in particular treatment of a disease associated with or characterized by the expression of CD19. Preferably, such a CD19 x CD3 bi-specific molecules are bi-specific monovalent diabodies. The invention is directed to pharmaceutical compositions that contain such a CD19 x CD3 bi-specific molecule, a BTK inhibitor, or a combination of such agents. The invention is additionally directed to methods for the use of such pharmaceutical compositions in the treatment of disease, in particular, treatment of a cancer associated with or characterized by the expression of CD19.

指定代表圖：

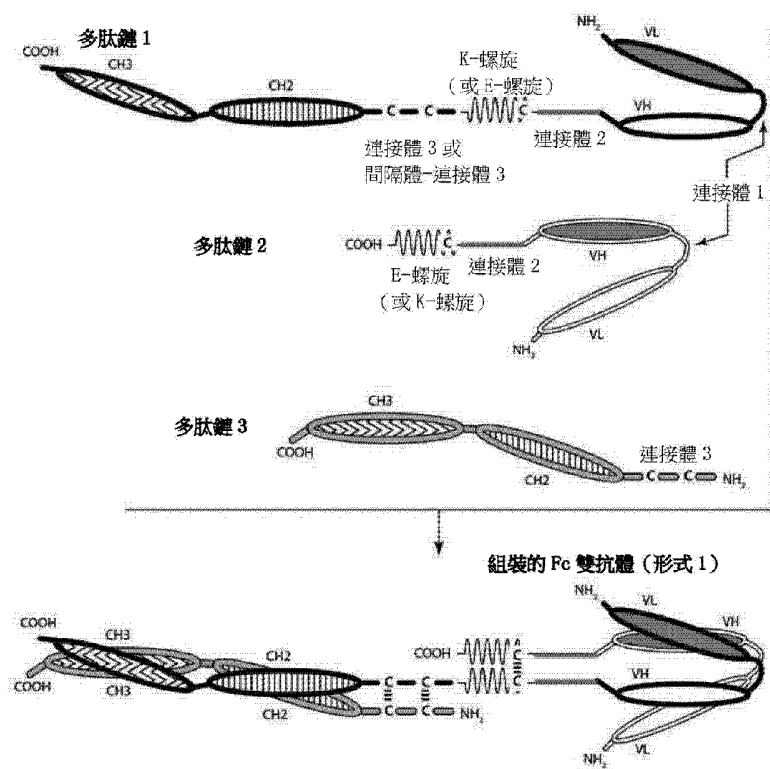


圖 2A

【發明說明書】

【中文發明名稱】 能夠結合CD19和CD3的雙特異性單價雙抗體以及其用途

【英文發明名稱】 Bi-Specific Monovalent Diabodies That Are Capable of Binding CD19 and CD3, and Uses Thereof

【技術領域】

【0001】 [相關申請的交叉引用] 本申請要求美國專利申請系列號 62/263,257 (2015 年 12 月 4 日提交；待決)的優先權，該申請以其整體通過引用併入本文。

【0002】 [參考序列表] 本申請根據 37 C.F.R. 1.821 以及下面的條款包括一個或多個序列表，其以電腦可讀的媒介公開(檔案名：1301-131WO_ST25.txt，2016 年 11 月 11 日創建，並且大小為 48,236 位元組)，該檔通過引用以其整體併入本文。

【0003】 本發明涉及聯合療法，其包括施用：(1)能夠特異性結合 CD19 和 CD3 的雙特異性分子(即，CD19 x CD3 雙特異性分子)和(2)布魯頓酪氨酸激酶 (Bruton's Tyrosine Kinase, BTK)抑制劑，用於治療疾病，尤其治療與 CD19 的表達相關或特徵在於 CD19 的表達的疾病。優選地，這類 CD19 x CD3 雙特異性分子是包括兩條多肽鏈的雙特異性單價雙抗體，並且其具有對 CD19 的表位特異性的一個結合位點和對 CD3 的表位特異性的一個結合位點(即，“CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體”)。最優選地，這類 CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體包括三條多肽鏈，並且具有對 CD19 的表位特異性的一個結合位點和對 CD3 的表位特異性的一個結合位點以及另外包括免疫球蛋白 Fc 結構域(即，“CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體”)。本發明涉及藥物組合物，其包含這類 CD19 x CD3

雙特異性分子、BTK 抑制劑或這類劑的組合。本發明另外涉及使用這類藥物組合物治療疾病，尤其是治療與 CD19 的表達相關或特徵在於 CD19 的表達的癌症的方法。

【先前技術】

【0004】 A. CD19

【0005】 CD19 (B 淋巴細胞表面抗原 B4，Genbank 獲取號 M28170)是免疫球蛋白超家族的 95 kDa I 型跨膜糖蛋白(Stamenkovic, I.等(1988) “*CD19, The Earliest Differentiation Antigen Of The B Cell Lineage, Bears Three Extracellular Immunoglobulin-Like Domains And An Epstein-Barr Virus-Related Cytoplasmic Tail,*” J. Exper. Med. 168(3):1205-1210；Tedder, T.F.等(1989) “*Isolation Of cDNAs Encoding The CD19 Antigen Of Human And Mouse B Lymphocytes. A New Member Of The Immunoglobulin Superfamily,*” J. Immunol. 143(2):712-717；Zhou, L.J.等(1991) “*Structure And Domain Organization Of The CD19 Antigen Of Human, Mouse, And Guinea Pig B Lymphocytes. Conservation Of The Extensive Cytoplasmic Domain,*” J. Immunol. 147(4):1424-1432)。CD19 在濾泡樹突細胞上表達，並且，在重鏈重排至漿細胞階段時在來自早期前 B 細胞的所有 B 細胞上表達，此時 CD19 表達被下調。CD19 不在造血幹細胞上表達或在祖 B 細胞(pro-B cell)階段之前不在 B 細胞上表達(Sato 等(1995) “*The CD19 Signal Transduction Molecule Is A Response Regulator Of B-Lymphocyte Differentiation,*” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 92:11558-62；Loken 等(1987) “*Flow Cytometric Analysis of Human Bone Marrow. II. Normal B Lymphocyte Development,*” Blood, 70:1316-1324；Wang 等(2012) “*CD19: A Biomarker For B Cell Development, Lymphoma Diagnosis And Therapy,*” Exp.

Hematol. and Oncol. 1:36)。

【0006】CD19 是 B 細胞-受體(BCR)複合物的組分，並且是 B 細胞信號傳導的正調節物，其調節 B 細胞啟動和體液免疫的閾值。通過兩個細胞外 C2 型 Ig 樣結構域，CD19 與 CD21 (CR2，C3d 片段受體)和 CD81 相互作用，與 CD225 一起形成 BCR 複合物。CD19 的細胞內結構域參與細胞內信號傳導級聯，主要地但不是專門地調節 BCR 和 CD22 下游的信號(Mei 等(2012) “*Rationale of Anti-CD19 Immunotherapy: An Option To Target Autoreactive Plasma Cells In Autoimmunity*,” Arthritis Res and Ther. 14(Suppl. 5):S1；Wang 等(2012) “*CD19: A Biomarker For B Cell Development, Lymphoma Diagnosis And Therapy*,” Exp. Hematol. and Oncol. 1:36)；Del Nagro 等(2005) “*CD19 Function in Central and Peripheral B-Cell Development*,” Immunologic Res. 31:119-131)。

【0007】CD19 的若干特性提示了其作為免疫療法靶標的潛在可能。CD19 是 B 細胞系中的最廣泛表達的抗原之一，並且在>95%的 B 細胞惡性腫瘤上表達，所述 B 細胞惡性腫瘤包括急性淋巴細胞白血病(ALL)、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)和非霍奇金淋巴瘤(NHL)(Wilson, K. 等(2010) “*Flow Minimal Residual Disease Monitoring Of Candidate Leukemic Stem Cells Defined By The Immunophenotype, CD34+CD38lowCD19+ In B-Lineage Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia*,” Haematologica 95(4):679-683；Maloney, D.G.等(1997) “*IDEC-C2B8 (Rituximab) Anti-CD20 Monoclonal Antibody Therapy In Patients With Relapsed Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma*,” Blood 90(6):2188-2195；Vose, J.M. (1998) “*Current Approaches To The Management Of Non-Hodgkin's Lymphoma*,” Semin. Oncol. 25(4):483-491；Nagorsen, D.等(2012) “*Blinatumomab: A Historical Perspective*,” Pharmacol. Ther. 136(3):334-342；Topp, M.S.等(2011) “*Targeted Therapy With The T-Cell-Engaging Antibody Blinatumomab Of*

Chemotherapy-Refractory Minimal Residual Disease In B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Results In High Response Rate And Prolonged Leukemia-Free Survival,” J. Clin Oncol. 2011 Jun 20;29(18):2493-2498 ; Nadler 等 (1983) “*B4, A Human B Lymphocyte-Associated Antigen Expressed On Normal, Mitogen-Activated, And Malignant B Lymphocytes.*” J. Immunol.;131:244-250 ; Ginaldi 等(1998) “*Levels Of Expression Of CD19 And CD20 In Chronic B Cell Leukaemias,*” J. Clin. Pathol. 51:364-369 ; Anderson 等(1984) “*Expression of Human B Cell-Associated Antigens on Leukemias and Lymphomas: A Model of Human B Cell Differentiation,*” Blood 63:1424-1433) 。CD19 在極少(如果存在的話)其他細胞類型上表達並且也不在終端分化的漿細胞上表達，其因此經 CD19 定向的療法可倖免於難。CD19 不落入到迴圈中，並且可快速內化(Ma 等(2002) “*Radioimmunotherapy For Model B Cell Malignancies Using 90Y-Labeled Anti-CD19 And Anti-CD20 Monoclonal Antibodies,*” Leukemia 16:60-66 ; Raufi 等(2013) “*Targeting CD19 in B-cell lymphoma: emerging role of SAR3419,*” Cancer Management Res 3:225-233) 。值得注意的是，CD19 表達保持在 B 細胞淋巴瘤上，其抵抗抗 CD20 療法(Davis 等(1999) “*Therapy of B-cell Lymphoma With Anti-CD20 Antibodies Can Result In The Loss Of CD20 Antigen Expression.*” Clin Cancer Res, 5:611-615, 1999) 。也已經建議 CD19 作為治療自身免疫性疾病的靶標(Tedder (2009) “*CD19: A Promising B Cell Target For Rheumatoid Arthritis,*” Nat. Rev. Rheumatol. 5:572-577) 。

【0008】B 細胞惡性腫瘤表示各種具有不同特徵和臨床表現的異質疾病類群。歷史上，患有症狀性疾病的大部分患者接收非交叉活性遺傳毒性劑的組合，期望實現持久緩解，並且在一些情況下，實現治癒。儘管有效，但是許多傳統方案也伴隨著大量的急性和長期毒性(見，例如，Stock, W.等(2013) “*Dose Intensification Of Daunorubicin And Cytarabine During Treatment Of Adult Acute*

Lymphoblastic Leukemia: Results Of Cancer And Leukemia Group B Study 19802,” Cancer. 2013 Jan 1;119(1):90-98)。*抗 CD20 單克隆抗體利妥昔單抗(rituximab)用於治療許多 B 細胞病症，其中其可聯合“護理標準(standard of care)”劑使用或作為單劑使用 (Fowler 等 (2013) “Developing Novel Strategies to Target B-Cell Malignancies,” Targeted Pathways, B-Cell Lymphoma，在 ASCO Educational Book 中, pp. 366-372；Bargou, R. 等(2008) “Tumor Regression In Cancer Patients By Very Low Doses Of A T Cell-Engaging Antibody,” Science 321(5891):974-977；Thomas, D.A.等(2010) “Chemoimmunotherapy With A Modified Hyper-CVAD And Rituximab Regimen Improves Outcome In De Novo Philadelphia Chromosome-Negative Precursor B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia,” J. Clin. Oncol. 28(24):3880-3889)。*儘管令人鼓舞的臨床結果，但用單劑利妥昔單抗再次治療患無痛淋巴瘤的患者伴隨僅僅 40% 的應答率，表明在惡性的 B 細胞可能出現抗性，作為對延長的暴露於利妥昔單抗的應答(Smith (2003) “Rituximab (Monoclonal Anti-CD20 Antibody): Mechanisms Of Action And Resistance.” Oncogene. 22:7359-68；Davis 等(1999) “Therapy of B-cell Lymphoma With Anti-CD20 Antibodies Can Result In The Loss Of CD20 Antigen Expression,” Clin Cancer Res, 5:611-615, 1999；Gabilovich, D. 等(2003) “Tumor Escape From Immune Response: Mechanisms And Targets Of Activity,” Curr. Drug Targets 4(7):525-536)。

已經報導了體外產生的利妥昔單抗抗性細胞系顯示針對多種化療劑的交叉抗性(Czuczman 等(2008) “Acquirement Of Rituximab Resistance In Lymphoma Cell Lines Is Associated With Both Global CD20 Gene And Protein Down-Regulation Regulated At The Pretranscriptional And Post-transcriptional Levels,” Clin Cancer Res. 14:1561-1570；Olejniczak 等 (2008) “Acquired Resistance To Rituximab Is Associated With Chemotherapy Resistance Resulting From Decreased Bax And Bak Expression,” Clin

Cancer Res. 14:1550-1560)。

【0009】治療性抗體靶向的另外的 B 細胞淋巴瘤表面抗原包括 CD19 (Hoelzer (2013) “*Targeted Therapy With Monoclonal Antibodies In Acute Lymphoblastic Leukemia*, Curr. Opin. Oncol. 25:701-706 ; Hammer (2012) “*CD19 As An Attractive Target For Antibody-Based Therapy*,” mAbs 4:571-577) 。但是，儘管針對具有抗 CD19 結合部分或抗體藥物綴合物(ADC)的各種抗 CD19 抗體雙特異性抗體報導了與複合物內化和游離藥物的細胞內釋放有關的有效的抗淋巴瘤活性，但是這些抗 CD19 抗體或 ADC 的抗腫瘤作用是可變的，表明抗體特異性特性，比如表位結合，誘導 CD19 寡聚的能力或細胞內信號傳導差異影響它們的效力(Du 等(2008) “*Differential Cellular Internalization Of Anti-CD19 And-CD22 Immunotoxins Results In Different Cytotoxic Activity*,” Cancer Res. 68:6300-6305 ; Press 等(1994) “*Retention Of B-Cell-Specific Monoclonal Antibodies By Human Lymphoma Cells. Blood*,” 83:1390-1397 ; Szatrowski 等(2003) “*Lineage Specific Treatment Of Adult Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia In First Remission With Anti-B4-Blocked Ricin Or High-Dose Cytarabine: Cancer And Leukemia Group B Study 9311*,” Cancer 97:1471-1480 ; Frankel 等(2013) “*Targeting T Cells To Tumor Cells Using Bispecific Antibodies*,” Curr. Opin. Chem. Biol. 17:385-392) 。

【0010】因此，儘管提高了許多人的存活，但是遭受 B 細胞惡性腫瘤的大部分患者在標準的化學免疫療法之後繼續復發並且在美國每年仍有超過 15,000 名患者死于 B 細胞癌症。因此，需要用新的非交叉抗性化合物進行治療，以進一步提高患者存活。

【0011】B. CD3

【0012】CD3 是 T 細胞共受體，包括四條不同的鏈(Wucherpfennig, K.W. 等(2010) “*Structural Biology Of The T-Cell Receptor: Insights Into Receptor Assembly*,

Ligand Recognition, And Initiation Of Signaling,” Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2(4):a005140 ; pages 1-14 ; Chetty, R.等(1994) “*CD3: Structure, Function, And Role Of Immunostaining In Clinical Practice,*” J. Pathol. 173(4):303-307 ; Guy, C.S. 等 (2009) “*Organization Of Proximal Signal Initiation At The TCR:CD3 Complex,*” Immunol. Rev. 232(1):7-21) 。

【0013】在哺乳動物中，複合物包含 CD3 γ 鏈、CD3 δ 鏈和兩條 CD3 ϵ 鏈。這些鏈與稱為 T 細胞受體(TCR)的分子締合，以便在 T 淋巴細胞中產生啟動信號 (Smith-Garvin, J.E.等(2009) “*T Cell Activation,*” Annu. Rev. Immunol. 27:591-619) 。在沒有 CD3 的情況下，TCR 不能適當地組裝，因而降解(Thomas, S.等(2010) “*Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T-Cell Receptor Gene Transfer,*” Immunology 129(2):170-177) 。發現 CD3 結合所有成熟 T 細胞的膜，並且事實上不結合其他細胞類型的膜(見，Janeway, C.A. 等(2005), 在以下文獻中：Immunobiology: The Immune System In Health And Disease,” 第六版, Garland Science Publishing, NY, pp. 214-216 ; Sun, Z. J. 等(2001) “*Mechanisms Contributing To T Cell Receptor Signaling And Assembly Revealed By The Solution Structure Of An Ectodomain Fragment Of The CD3 ϵ : γ Heterodimer,*” Cell 105(7):913-923 ; Kuhns, M.S.等 (2006) “*Deconstructing The Form And Function Of The TCR/CD3 Complex,*” Immunity. 2006 Feb;24(2):133-139) 。

【0014】T細胞上T細胞受體(TCR)複合物的不變的CD3 ϵ 信號傳導組分已經被用作促進 T 細胞和腫瘤細胞之間的免疫學突觸形成的靶標。CD3 和腫瘤抗原的共接合(engagement)啟動了 T 細胞，觸發表達腫瘤抗原的腫瘤細胞的裂解 (Baeuerle 等(2011) “*Bispecific T Cell Engager For Cancer Therapy,*” 在以下中：Bispecific Antibodies, Kontermann, R.E. (Ed.) Springer-Verlag ; 2011:273-287) 。該方法允許雙特異性抗體以針對腫瘤細胞的高特異性整體上與 T 細胞區域

(compartment)相互作用並且，廣泛適用於大量的細胞表面腫瘤抗原。

【0015】C. 抗體和其他結合分子

【0016】抗體是能夠通過位於免疫球蛋白分子的可變區中的至少一個抗原識別位點，特異性結合靶標，比如碳水化合物、多核苷酸、脂質、多肽等，的免疫球蛋白分子。如本文所使用，該術語不僅僅包括完整的多克隆抗體或單克隆抗體，而且也包括其突變體、天然存在的變體、包括具有必要的特異性的抗原結合位元點的抗體部分的融合蛋白、人源化抗體和嵌合抗體以及包括具有必要的特異性的抗原識別位點的免疫球蛋白分子的任何其他修飾構造。

【0017】完整的、未修飾的抗體(例如，IgG)結合抗原的表位的能力取決於免疫球蛋白輕鏈和重鏈上可變結構域的存在(即，分別為 VL 和 VH 結構域)。抗體輕鏈和抗體重鏈的相互作用，尤其是其 VL 和 VH 結構域的相互作用形成抗體的表位結合位點在。相比之下，scFv 構建體包括包含在單條多肽鏈中的抗體的 VL 和 VH 結構域，其中結構域被足夠長的柔性連接體分開，以允許兩個結構域自組裝成功能性表位結合位點。在 VL 和 VH 結構域的自組裝由於不足長度(小於約 12 個氨基酸殘基)的連接體而不可能的情況下，兩個 scFv 構建體彼此相互作用，以形成二價分子，其中一條鏈的 VL 與另一條鏈的 VH 締合(見 Marvin 等(2005) “*Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies*,” Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658)。

【0018】除了它們在診斷中的已知用途，已經證明抗體可用作治療劑。最近數十年已經看到對抗體治療潛力的興趣的復蘇，並且抗體已經成為一種主要類型的生物技術衍生的藥物(Chan, C.E.等(2009) “*The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases*,” Singapore Med. J. 50(7):663-666)。已經批准了幾乎 200 種基於抗體的藥物，用於使用或正在開發中。

【0019】天然抗體僅僅能夠結合一個表位種類(即，單-特異性的)，但是它們

可結合該種類的多個拷貝(即，展示二價或多價)。已經開發了各種重組體雙特異性抗體形式(見，例如，PCT 申請號 WO 2008/003116、WO 2009/132876、WO 2008/003103、WO 2007/146968)，其大部分使用連接體肽，以將抗體核心(IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM)與另外的結合蛋白(例如 scFv)融合，或融合例如兩個 Fab 片段或 scFv。典型地，這些方法涉及折中和權衡。例如，PCT 公開號 WO 2013/174873、WO 2011/133886 和 WO 2010/136172 公開了連接體的使用可造成治療情形(setting)中的問題，並且教導了三特異性抗體，其中 CL 和 CH1 結構域從它們各自的天然位置被轉變，並且 VL 和 VH 結構域已經被多樣化(WO 2008/027236、WO 2010/108127)，以允許它們結合多於一種抗原。因此，在這些文檔中公開的分子用結合特異性換取了結合另外抗原種類的能力。PCT 公開號 WO 2013/163427 和 WO 2013/119903 公開了修飾 CH2 結構域，以包含融合蛋白加合物，其包括結合結構域。文獻指出，CH2 結構域在介導效應子功能方面可能僅僅起到很小的作用。PCT 公開號 WO 2010/028797、WO2010028796 和 WO 2010/028795 公開了重組抗體，其 Fc 區域已經被另外的 VL 和 VH 結構域替換，以便形成三價結合分子。PCT 公開號 WO 2003/025018 和 WO2003012069 公開了重組雙抗體，其單獨的鏈包含 scFv 結構域。PCT 公開號 WO 2013/006544 公開了多價 Fab 分子，其作為單多肽鏈被合成，然後進行蛋白酶解，以產生異源二聚化結構。因此，這些文檔中公開的分子用所有或一些介導效應子功能的能力換取結合另外抗原種類的能力。PCT 公開號 WO 2014/022540、WO 2013/003652、WO 2012/162583、WO 2012/156430、WO 2011/086091、WO 2007/075270、WO 1998/002463、WO 1992/022583 和 WO 1991/003493 公開了將另外的結合結構域或官能團添加至抗體或抗體部分(例如，將雙抗體添加至抗體的輕鏈，或將另外的 VL 和 VH 結構域添加至抗體的輕鏈和重鏈，或添加異源融合蛋白或彼此連結多個 Fab 結構域)。因此，這些文檔中公開的分子用天然抗體結構換取結合另外

的抗原種類的能力。

【0020】本領域已經另外注意到產生在能夠結合兩個或多個不同表位種類(即,除了雙價或多價之外顯示雙特異性或多特異性)方面不同于這樣的天然抗體的雙抗體的能力(見,例如,Holliger 等(1993) “*Diabodies’: Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments,*” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448 ; US 2004/0058400 (Hollinger 等) ; US 2004/0220388 (Mertens 等) ; Alt 等(1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94 ; Lu , D.等(2005) “*A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity,*” J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672 ; WO 02/02781 (Mertens 等) ; Olafsen, T.等(2004) “*Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications,*” Protein Eng Des Sel. 17(1):21-27 ; Wu, A.等(2001) “*Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange,*” Protein Engineering 14(2):1025-1033 ; Asano 等 (2004) “*A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain,*” 摘要 3P-683, J. Biochem. 76(8):992 ; Takemura, S.等(2000) “*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,*” Protein Eng. 13(8):583-588 ; Baeuerle, P.A.等(2009) “*Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy,*” Cancer Res. 69(12):4941-4944)。

【0021】雙抗體的設計是基於單鏈可變區片段(scFv)。通過使用短的連接肽連接輕鏈和/或重鏈可變區來製備這類分子。Bird 等(1988) (“*Single-Chain Antigen-Binding Proteins,*” Science 242:423-426)描述了連接肽的例子,其在一個可變區的羧基末端和另一可變區的氨基末端之間橋接約 3.5 nm。已經設計和使

用了其他序列的連接體(Bird 等(1988) “*Single-Chain Antigen-Binding Proteins*,” Science 242:423-426)。連接體進而可被修飾用於另外的功能，比如藥物的附著或附著至固體載體。可重組或合成產生單鏈變體。為了合成產生 scFv，可使用自動合成儀。為了重組體產生 scFv，可將包含編碼 scFv 的多核苷酸的合適質粒引入適當的宿主細胞中，所述宿主細胞可以是真核細胞，比如酵母細胞、植物細胞、昆蟲細胞或哺乳動物細胞，或原核細胞，比如大腸埃希氏菌。可通過常規操作比如多核苷酸的連接製備編碼感興趣的 scFv 的多核苷酸。可使用本領域已知的標準蛋白質純化技術分離所得 scFv。

【0022】美國專利號 7,585,952 和美國專利公開號 2010-0173978 涉及對於 ErbB2 免疫特異性的 scFv 分子。已經描述了一類 scFv 分子，雙特異性 T 細胞接合體(engager) (“**BiTE**”)(WO 05/061547；Baeuerle, P 等(2008) “*BiTE: A New Class Of Antibodies That Recruit T Cells*,” Drugs of the Future 33: 137-147；Bargou, 等 2008) “*Tumor Regression in Cancer Patients by Very Low Doses of a T Cell-Engaging Antibody*,” Science 321: 974-977)。這類分子包括具有兩個抗原結合結構域的單多肽鏈分子，其中一個抗原結合結構域免疫特異性結合 CD3 表位和其中第二個抗原結合結構域免疫特異性結合靶細胞表面上存在的抗原。

【0023】已經描述了靶向 CD19 和 CD3 二者的雙特異性分子。布利妥莫單抗(Blinatumomab)，一種雙特異性 scFv-CD19 x CD3 BiTE 正處於臨床試驗中，並且據報導為對於 CD3 具有~100 nM 的親和力，並且對於 CD19 具有~1 nM 的親和力。在體外，布利妥莫單抗展示對於靶細胞裂解的 EC₅₀ 是~10-100 pg/ml (Frankel 等 (2013) “*Targeting T Cells To Tumor Cells Using Bispecific Antibodies*,” Curr. Opin. Chem. Biol. 17:385-392)。也已經開發了雙特異性 CD19 x CD3 雙親和性重定向(DART)(Moore 等(2011) “*Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma*,” Blood

117(17):4542-4551)。與雙特異性 scFv-CD19 x CD3 BiTE 相比，該分子展示了類似的結合親和力，但是對於體外靶細胞裂解具有更低的 EC_{50} ，為~0.5 至 5pg/ml，並且顯示持續更高水準的最大裂解。也已經描述了 AFM11，一種 CD19 x CD3 雙特異性 Tandab。報導了 AFM11 對於體外靶細胞裂解具有~0.5 至 5pg/ml 的 EC_{50} (Zhukovsky 等(2013) “*A CD19/CD3 Bispecific Tandab, AFM11, Recruits T Cells To Potently and Safely Kill CD19+ Tumor Cells,*” J Clin Oncol 31, 2013 (suppl; abstr 3068))。所有這些構建體都不包括 Fc 結構域。

【0024】儘管這些進展，但是仍需要用於治療癌症，尤其治療血液學惡性腫瘤的改善的療法。另外，如本文提到的，可通過在採用的多肽鏈中的一條或多條中仔細考慮和設置半胱氨酸殘基，而進一步優化穩定的、功能性異源二聚化的、非單-特異性雙抗體的產生。可以以更高的產率產生這類優化的雙抗體，其活性比非優化的雙抗體更高。本發明的目標是鑒定這類治療方案和組合物。

【發明內容】

【0025】本發明涉及聯合療法，所述聯合療法涉及施用：(1)能夠特異性結合 CD19 和 CD3 的雙特異性分子(即，CD19 x CD3 雙特異性分子)和(2)用於治療疾病，尤其治療與 CD19 的表達相關或特徵在於 CD19 的表達的疾病的布魯頓酪氨酸激酶(BTK)抑制劑。優選地，這類 CD19 x CD3 雙特異性分子是包括兩條多肽鏈的雙特異性單價雙抗體，並且其具有對 CD19 的表位特異性的一個結合位點和對 CD3 的表位特異性的一個結合位點(即，“CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體”)。最優選地，這類 CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體包括三條多肽鏈，並且具有對 CD19 的表位特異性的一個結合位點和對 CD3 的表位特異性的一個結合位點以及另外包括免疫球蛋白 Fc 結構域(即，“CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體”)。

本發明涉及藥物組合物，其包含這類 CD19 x CD3 雙特異性分子、BTK 抑制劑，或這些劑的組合。本發明另外涉及使用這類藥物組合物治療疾病，尤其治療與 CD19 的表達相關或特徵在於 CD19 的表達的癌症的方法。

【0026】在本發明的方法中使用的 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體和雙特異性單價 Fc 雙抗體包括至少兩條不同的多肽鏈。這類雙抗體的多肽鏈以異源二聚化方式彼此締合，以形成對 CD19 的表位特異性的一個結合位點和對 CD3 的表位特異性的一個結合位點。因此，本發明的 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體或雙特異性單價 Fc 雙抗體是單價的，因為其僅僅能夠結合一個拷貝的 CD19 的表位元並且僅僅結合一個拷貝的 CD3 的表位，但是是雙特異性的，因為單一的雙抗體能夠同時結合 CD19 的表位和 CD3 的表位。雙抗體的每條多肽鏈共價結合雙抗體的另一多肽鏈，例如通過位於這類多肽鏈中的半胱氨酸殘基的二硫鍵合，以便形成共價結合的複合物。在具體的實施方式中，本發明的雙抗體進一步具有免疫球蛋白 Fc 結構域和/或白蛋白-結合結構域，以延長體內半衰期。

【0027】具體地，本發明提供了治療與 CD19 的表達相關或特徵在於 CD19 的表達的疾病或病況的方法，包括向有需要的受試者施用能夠特異性結合 CD19 和 CD3 的雙特異性分子和布魯頓酪氨酸激酶(BTK)抑制劑。

【0028】本發明尤其涉及這類方法的實施方式，其中雙特異性分子是雙特異性單價雙抗體(CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體)；或包括 Fc 結構域的雙特異性單價雙抗體(CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體)。本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中雙特異性分子能夠與人和靈長類 CD19 和 CD3 二者交叉反應。

【0029】本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中雙特異性分子是能夠特異性結合 CD19 和 CD3 的 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體，其中雙抗體包括第一、第二和第三多肽鏈，其中多肽鏈形成共價結合的複合物，並且其中：

I. 第一多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：

A. 結構域 IA，包括：

(1) 亞結構域(IA1)，其包括能夠結合 CD19 (VL_{CD19})或 CD3 (VL_{CD3})的 VL 結構域；和

(2) 亞結構域(IA2)，其包括能夠結合 CD19 (VH_{CD19})或 CD3 (VH_{CD3})的 VH 結構域；

其中亞結構域 IA1 和 IA2 通過多肽連接體彼此分開，並且是

(a) VL_{CD19} 和 VH_{CD3}；或

(b) VL_{CD3} 和 VH_{CD19}；

B. 結構域 IB，包括帶電荷的異源二聚體促進結構域，其中結構域 IB 通過多肽連接體與結構域 1A 分開；

C. 結構域 IC，包括抗體的 CH2-CH3 結構域；和

II. 第二多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：

A. 結構域 IIA，包括：

(1) 亞結構域(IIA1)，其包括能夠結合 CD19 (VL_{CD19})或 CD3 (VL_{CD3})的 VL 結構域；和

(2) 亞結構域(IIA2)，其包括能夠結合 CD19 (VH_{CD19})或 CD3 (VH_{CD3})的 VH 結構域；

其中亞結構域 IIA1 和 IIA2 通過多肽連接體彼此分開，並且是：

(a) VL_{CD19} 和 VH_{CD3}，如果亞結構域 IA1 和 IA2 是 VL_{CD3} 和 VH_{CD19}；

或

(b) VL_{CD3} 和 VH_{CD19}，如果亞結構域 IA1 和 IA2 是 VL_{CD19} 和 VH_{CD3}；

B. 結構域 IIB，包括帶電荷的異源二聚體促進結構域，其中結構域 IIB 通過多肽連接體與結構域 IIA 分開，並且其中結構域 IB 的帶電荷的異源二聚體促進結構域和結構域 IIB 的帶電荷的異源二聚體促進結構域具有相反的電荷；和

III. 第三多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括結構域 IIIC，所述結構域 IIIC 包括抗體的 CH2-CH3 結構域；

其中 VL_{CD19} 和 VH_{CD19} 結構域形成 CD19 結合結構域，並且 VL_{CD3} 和 VH_{CD3} 結構域形成 CD3 結合結構域；並且第一和第三多肽鏈的 CH2-CH3 結構域形成能夠結合 Fc 受體的 Fc 結構域，從而形成 CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體。

【0030】本發明另外提供了上述方法的實施方式，包括使用 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體，其中：

(A) 結構域 IB 和 IIB 各自包括經二硫鍵將第一多肽鏈共價鍵合至第二多肽鏈的半胱氨酸殘基；和

(B) 結構域 IC 和 IIIC 各自包括經二硫鍵將第一多肽鏈共價鍵合至第三多肽鏈的半胱氨酸殘基。

【0031】本發明另外提供了任何上述方法的實施方式，包括使用 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體，其中 VL_{CD19} 具有 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列和 VH_{CD19} 具有 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列。

【0032】本發明另外提供了任何上述方法的實施方式，包括使用 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體，其中 VL_{CD3} 具有 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列和 VH_{CD3} 具有 SEQ ID NO:29 的氨基酸序列。

【0033】本發明另外提供了任何上述方法的實施方式，包括使用 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體，其中結構域 IC 的 CH2-CH3 結構域具有 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列並且結構域 IIIC 的 CH2-CH3 結構域具有 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列。

【0034】本發明另外提供了任何上述方法的實施方式，包括使用 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體，其中

(A) 結構域 IB 的帶電荷的異源二聚體促進結構域具有 SEQ ID NO:10 的氨基

酸序列並且結構域 IIB 的帶電荷的異源二聚體促進結構域具有 **SEQ ID NO:11** 的氨基酸序列；或

(B) 結構域 IB 的帶電荷的異源二聚體促進結構域具有 **SEQ ID NO:12** 的氨基酸序列並且結構域 IIB 的帶電荷的異源二聚體促進結構域具有 **SEQ ID NO:13** 的氨基酸序列。

【0035】 本發明另外提供了任何上述方法的實施方式，包括使用 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體，其中：

(A) 第一多肽鏈具有 **SEQ ID NO:35** 的氨基酸序列；

(B) 第二多肽鏈具有 **SEQ ID NO:37** 的氨基酸序列；和

(C) 第三多肽鏈具有 **SEQ ID NO:39** 的氨基酸序列。

【0036】 本發明另外提供了任何上述方法，其中 BTK 抑制劑選自依魯替尼 (ibrutinib)、GDC-0834、RN-486、CGI-560、CGI-1746、HM-71224、CC-292、ONO-4059、CNX-774，和 LFM-A13，尤其地，其中 BTK 抑制劑是依魯替尼。

【0037】 本發明另外提供了任何上述方法，其中與 CD19 的表達相關或特徵在於 CD19 的表達的疾病或病況是癌症，並且更具體地，其中癌症選自：急性髓細胞樣白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)，包括 CML 的胚危象(blastic crisis)和與 CML 相關的 Abelson 癌基因(Bcr-ABL 易位)、骨髓增生異常綜合征(MDS)、急性 B 成淋巴細胞白血病(B-ALL)、彌散性大 B 細胞淋巴瘤(DLBCL)、濾泡淋巴瘤、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)，包括 Richter 綜合症或 CLL 的 Richter 轉化、毛細胞白血病(HCL)、急性漿細胞樣樹突細胞腫瘤(BPDCN)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)，包括套細胞白血病(MCL)，和小淋巴細胞淋巴瘤(SLL)、霍奇金淋巴瘤、系統性肥大細胞增多症和伯基特淋巴瘤。

【0038】 在本發明的方法中使用的 CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體和 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體優選地能夠展示對可溶性人和食蟹猴 CD3

類似的結合親和力，並且就結合 CD19 而言，展示 10 倍的差異，如通過表面等離子共振(SPR)技術(BIAcore)分析的，或如通過流式細胞術使用 CD4⁺和 CD8⁺設門的 T 細胞群體和 CD20⁺設門的 B 細胞群體分析的。

【0039】在本發明的方法中使用的 CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體和 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體在採用任何 3 個靶 B 淋巴瘤細胞系——Raji/GF (伯基特淋巴瘤)，HBL-2 (套細胞淋巴瘤)，或 Jeko-1 (套細胞淋巴瘤)——和使用純化的人原代 T 細胞作為效應細胞的試驗中，優選地能夠使用人 T 細胞介導對靶腫瘤細胞的重定向殺傷。在這類試驗中，如下測量靶腫瘤細胞殺傷：使用乳酸脫氫酶(LDH)釋放試驗，其中定量測量當細胞死亡時從細胞釋放的 LDH 的酶活性，或通過螢光素酶試驗，其中螢光素酶相對光單位(RLU)是指示 Raji/GF 靶細胞的相對生存力的讀數，所述 Raji/GF 靶細胞已經被工程化成表達綠色螢光蛋白(GFP)和螢光素酶報告基因。這類重定向殺傷的觀察到的 EC₅₀ 是約 5 pM 或更少、約 3 pM 或更少、約 1 pM 或更少、約 0.5 pM 或更少、約 0.3 pM 或更少、約 0.2 pM 或更少、約 0.1 pM 或更少、約 0.05 pM 或更少、約 0.04 pM 或更少、約 0.03 pM 或更少、約 0.02 pM 或更少或約 0.01 pM 或更少。

【0040】在本發明的方法中使用的 CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體和 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體優選地能夠介導人和食蟹猴外周血液單核細胞(PBMC)中的細胞毒性，以便在兩種這樣的細胞系統中以 2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1 或 9:1 的效應細胞與 T 細胞比而造成劑量依賴性的 CD20⁺ B 細胞消除。人 CD20⁺ B 細胞消除的觀察到的 EC₅₀ 是約 7 pM 或更少、約 5 pM 或更少、約 3 pM 或更少、約 1 pM 或更少、約 0.5 pM 或更少、約 0.3 pM 或更少、約 0.2 pM 或更少、約 0.1 pM 或更少、約 0.05 pM 或更少、約 0.04 pM 或更少、約 0.03 pM 或更少、約 0.02 pM 或更少或約 0.01 pM 或更少。食蟹猴 CD20⁺ B 細胞消除的觀察到的 EC₅₀ 是約 1000 pM 或更少、約 900 pM 或更少、約 800 pM 或更少、約

500 pM 或更少、約 300 pM 或更少、約 100 pM 或更少、約 50 pM 或更少、約 20 pM 或更少、約 10 pM 或更少、約 5 pM 或更少、約 2 pM 或更少或約 1 pM 或更少，以便自體人 B 細胞消除與食蟹猴 B 細胞消除的比例是約 500:1 或更少、約 300:1 或更少、約 100:1 或更少、約 50:1 或更少、約 20:1 或更少或約 10:1 或更少。

【0041】在本發明的方法中使用的 CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體和 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體優選地能夠通過人和食蟹猴 PBMC 介導細胞因數(例如，IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-4、IL-6 和 IL-10，尤其是 IFN- γ 和 TNF- α) 的釋放。這樣的釋放是約 5000 pg/mL 或更少、約 4000 pg/mL 或更少、約 3000 pg/mL 或更少、約 2000 pg/mL 或更少、約 1000 pg/mL 或更少、約 500 pg/mL 或更少、約 2000 pg/mL 或更少或約 100 pg/mL 或更少。從人 PBMC 釋放這類細胞因數的平均 EC₅₀ 是約 100 pM 或更少、約 90 pM 或更少、約 80 pM 或更少、約 50 pM 或更少、約 30 pM 或更少、約 20 pM 或更少、約 10 pM 或更少或約 5 pM 或更少。從食蟹猴 PBMC 釋放這類細胞因數的平均 EC₅₀ 是約 3000 pM 或更少、約 2000 pM 或更少、約 1000 pM 或更少、約 500 pM 或更少、約 300 pM 或更少、約 200 pM 或更少、約 100 pM 或更少或約 50 pM 或更少。

【0042】在本發明的方法中使用的 CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體和 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體優選地能夠在共混(co-mix)異種移植物中介導對人 B 細胞淋巴瘤腫瘤生長的抑制，在所述共混異種移植物中，這類分子連同比例為 1:5 的 HBL-2 (人套細胞淋巴瘤)或 Raji (伯基特淋巴瘤)腫瘤細胞和啟動人 T 細胞一起被引入到 NOD/SCID 小鼠中。優選地，當以大於約 100 μ g/ml 的濃度、約 100 μ g/kg(患者體重)的濃度、大於約 80 μ g/kg 的濃度、大於約 50 μ g/kg 的濃度、大於約 20 μ g/kg 的濃度、大於約 10 μ g/kg 的濃度、大於約 5 μ g/kg 的濃度、大於約 2 μ g/kg 的濃度、大於約 1 μ g/kg 的濃度、大於約 0.5 μ g/kg 的濃度、大於約 0.2 μ g/kg 的濃度、大於約 0.1 μ g/kg 的濃度、大於約 0.05 μ g/kg 的濃度、

大於約 0.02 µg/kg 的濃度、大於約 0.01 µg/kg 的濃度或大於約 0.005 µg/kg 的濃度或小於 0.005 µg/kg 的濃度提供時，這類雙抗體能夠抑制腫瘤生長。

【0043】在本發明的方法中使用的 CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體和 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體優選地能夠在雌性 NSG B2m^{-/-}小鼠中在 HBL-2 (人套細胞淋巴瘤)異種移植模型中展示抗腫瘤活性，在第 0 天皮內(ID)植入 HBL-2 腫瘤細胞，隨後在第 4 天腹膜內(IP)注射 PBMC 並且在第 17 天施用雙抗體，以便導致腫瘤體積減小約 10%、約 20%、約 40%、約 60%、約 80%、約 90%或大於 90%。

【0044】在本發明的方法中使用的 CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體和 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體優選地在引入到接收者人或非人動物中時，能夠展示延長的半衰期。可通過將雙抗體引入到人 FcRn 轉基因小鼠測量這類半衰期(美國專利號 6,992,234 和 7,358,416; Haraya, K. (2014) “*Application Of Human FcRn Transgenic Mice As A Pharmacokinetic Screening Tool Of Monoclonal Antibody*,” *Xenobiotica* 2014 Jul 17:1-8; Proetzel, G. 等(2014) “*Humanized FcRn mouse models for evaluating pharmacokinetics of human IgG antibodies*,” *Methods* 65(1):148-153; Stein, C. 等(2012) “*Clinical Chemistry Of Human FcRn Transgenic Mice*,” *Mamm. Genome* 23(3-4):259-269; Roopenian, D.C.等(2010) “*Human FcRn Transgenic Mice For Pharmacokinetic Evaluation Of Therapeutic Antibodies*,” *Methods Molec. Biol.* 602:93-104)。使用可獲得自 Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, US 的 B6.Cg-Fcgrt^{tm1Dcr} (CAG-FCGRT)276Dcr/DcrJ 小鼠(訂貨號(Stock Number) 004919)進行測量。

【0045】為了避免任何疑問，在本發明的方法中使用的雙抗體可展示本文所述的功能特性中一種、兩種、三種、大於三種或所有的功能特性。因此在本發明的方法中使用的雙抗體可展示本文所述的任何功能特性的組合。

【0046】與 CD19 的表達相關或特徵在於 CD19 的表達的疾病或病況可以是 B 細胞惡性腫瘤(Campo, E.等(2011) “*The 2008 WHO Classification Of Lymphoid Neoplasms And Beyond: Evolving Concepts And Practical Applications*,” Blood 117(19):5019-5032)。例如，癌症可選自：急性髓細胞樣白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)，包括 CML 的胚危象和與 CML 相關的 Abelson 癌基因 (Bcr-ABL 易位)、骨髓增生異常綜合征(MDS)、急性 B 成淋巴細胞白血病(B-ALL)、彌散性大 B 細胞淋巴瘤(DLBCL)、濾泡淋巴瘤、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)，包括 Richter 綜合症或 CLL 的 Richter 轉化、毛細胞白血病(HCL)、急性漿細胞樣樹突細胞腫瘤(BPDCN)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)，包括套細胞白血病(MCL)，和小淋巴細胞淋巴瘤(SLL)、霍奇金淋巴瘤、系統性肥大細胞增多症，和伯基特淋巴瘤。

【0047】本發明尤其涉及這類方法，其中治療的疾病或病況是難以用利妥昔單抗治療的。

【0048】術語比如“約”應解釋為指定值的 10%以內，更優選地 5%以內，除非上下文需要其他解釋。

【圖式簡單說明】

【0049】圖 1 闡釋了由兩條多肽鏈構成的共價締合的雙特異性單價雙抗體的結構。

【0050】圖 2A 和 2B 闡釋了本發明兩種形式的三鏈 CD19x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體的第一、第二和第三多肽鏈的結構(形式 1，圖 2A；形式 2，圖 2B)。

【0051】圖 3 顯示 CD19 和 CD3 通過 DART-A (●)的同時接合。對照 DART 1 (■)和對照 DART 2 (▲)都不能同時結合兩個靶標。

【0052】圖 4A-4B 顯示了 CD19 x CD3 雙特異性分子(DART-A)與人(圖 4A)和食蟹猴(圖 4B) CD20+ B 細胞的結合。

【0053】圖 5A-5B 顯示了 CD19 x CD3 雙特異性分子(DART-A)與人(圖 5A)和食蟹猴(圖 5B) CD4+和 CD8+ T 細胞的結合。

【0054】圖 6A-6F 顯示了相對於對照 DART 1，CD19 x CD3 雙特異性分子(DART-A)介導的對靶細胞的重定向殺傷。使用原代人 T 細胞作為效應細胞，針對以下靶細胞系，DART-A 介導的細胞毒性的劑量回應曲線：HBL-2 (圖 6A)、Raji/GF (綠色螢光)(圖 6B)、Jeko-1 (圖 6C)、Molm-13 (圖 6D)和 Colo205/Luc (圖 6F)，其中使用 LDH 試驗測量靶細胞殺傷。圖 6E 顯示了對 Raji/GF 細胞的殺傷，如使用螢光素酶試驗(RLU)來測量相對有活力的細胞所測定的。對於 1 個代表性實驗在每張圖上顯示 DART-A 的 EC₅₀ 值。DART-A：▲；對照 DART 1：▼。

【0055】圖 7A-7D 顯示了以不同的 E:T 細胞比(10:1 (●)、5:1 (■)和 2.5:1 (▲))，CD19 x CD3 雙特異性分子(DART-A)介導的對靶 Raji/GF 細胞的重定向殺傷。在 24 小時溫育之後(圖 7A)和 48 小時溫育之後(圖 7B)測量以原代人 T 細胞作為效應細胞對於 CD19+靶 Raji/GF 細胞的 DART-A 介導的細胞毒性(細胞毒性百分數)的劑量回應曲線。包括在 24 小時溫育之後(圖 7C)和 48 小時溫育之後(圖 7D)測量的以原代人 T 細胞作為效應細胞對於 CD19 陰性 JIMT-1 細胞的 DART-A 介導的細胞毒性(細胞毒性百分數)的劑量回應曲線作為對照。顯示了 3 個代表性實驗中的 1 個，每個實驗都使用來自獨立供體的 T 細胞。

【0056】圖 8A-8D 顯示了以 2.5:1 (●)或 1:1 (■)的較低的 E:T 細胞比例，CD19 x CD3 雙特異性分子(DART-A)介導的對靶 Raji/GF 細胞的重定向殺傷。以原代人 T 細胞作為效應細胞，在 72 小時溫育之後(圖 8A)和 96 小時溫育之後(圖 8B)測定 DART-A 介導的針對 CD19+靶 Raji/GF 細胞的細胞毒性(細胞毒性百分數)的劑量回應曲線。包括在 72 小時溫育之後(圖 8C)和 96 小時溫育之後(圖 8D)

測定的以原代人 T 細胞作為效應細胞對於 CD19 陰性 JIMT-1 細胞的 CD19 x CD3 雙特異性 **DART-A** 介導的細胞毒性(細胞毒性百分數)的劑量回應曲線作為對照。顯示了 3 個代表性實驗中的 1 個，每個實驗都使用來自獨立供體的 T 細胞。

【0057】圖 9A-9B 顯示了在人或食蟹猴 PBMC 中，CD19 x CD3 雙特異性分子(**DART-A**)介導的自體 B 細胞消除。呈現了 DART (**DART-A** 或**對照 DART 1**) 介導的自體 B 細胞消除的劑量回應曲線。圖 9A：在用各種劑量的 **DART-A** 或**對照 DART 1** 進行 PBMC 處理之後，人 CD20+細胞的百分數。圖 9B：在用各種劑量的 **DART-A** 或**對照 DART 1** 進行 PBMC 處理之後，食蟹猴 CD20+細胞的百分數。**DART-A** 的 EC_{50} 值顯示在每個圖上。平行分析 CD3+細胞的百分數並且用作內參對照——在測試的任何濃度下沒有觀察到改變。**DART-A**：▲；**對照 DART 1**：▼。

【0058】圖 10 顯示了用食蟹猴 PBMC，以 E:T = 30:1，CD19 x CD3 雙特異性分子(**DART-A**)介導的對靶細胞的重定向殺傷。**DART-A**：▲；**對照 DART 1**：▼。

【0059】圖 11A-11C 顯示了在存在靶細胞的情況下，CD19 x CD3 雙特異性分子(**DART-A**)介導的來自人 T 細胞的細胞因數釋放。在存在 Raji/GF 靶細胞的情況下，人 T 細胞用 **DART-A** 或**對照 DART 1** 處理約 24 小時。收集培養物上清液並且進行基於 ELISA 的細胞因數測量。顯示了 2 個使用不同供體的代表性實驗中的 1 個代表性實驗。圖 11A： γ -干擾素($IFN\gamma$)釋放；圖 11B：腫瘤壞死因數- α (TNF- α)釋放；圖 11C：白介素 2 (IL-2)釋放。**DART-A**：▲；**對照 DART 1**：▼。

【0060】圖 12A-12D 顯示，相對於**對照 DART 1**，在通過 CD19 x CD3 雙特異性分子(**DART-A**)的重定向細胞殺傷期間人 T 細胞啟動。使用 Raji/GF 靶細胞，**DART-A**-介導的對 CD8+ (圖 12A 和 12C)和 CD4+ (圖 12B 和 12D)人 T 細胞上的 T 細胞啟動標記物 CD25 (圖 12A-12B)和 CD69 (圖 12C-12D)的誘導的劑量回應。

顯示了 2 個代表性實驗中的 1 個代表性實驗，每個實驗使用來自不同供體的 T 細胞。**DART-A**：▲；**對照 DART 1**：▼。

【0061】圖 13A-13D 顯示，相對於**對照 DART 1**，通過 CD19 x CD3 雙特異性分子(**DART-A**)的重定向細胞殺傷期間的食蟹猴 T 細胞啟動。使用 Raji/GF 靶細胞，**DART-A**-介導的對 CD8+ (圖 13A 和 13C)和 CD4+ (圖 13B 和 13D)食蟹猴 T 細胞或 PBMC 上的 T 細胞啟動標記物 CD25 (圖 13A 和 13B)和 CD69 (圖 13C 和 13D)的誘導的劑量回應。顯示了使用 T 細胞的 1 個代表性實驗。**DART-A**：▲；**對照 DART 1**：▼。

【0062】圖 14A-14D 顯示了在存在 CD19 陰性 JIMT1 細胞的情況下，CD19 x CD3 雙特異性分子(**DART-A**)和**對照 DART 1** 不能介導人 T 細胞啟動。顯示的是 **DART-A**-介導的對來自如圖 12A-12D 中相同供體的 CD8+ (圖 14A 和 14C)和 CD4+ (圖 14B 和 14D)上的 T 細胞啟動標記物 CD25 (圖 14A 和 14B)和 CD69 (圖 14C 和 14D)的誘導的劑量回應。**DART-A**：▲；**對照 DART 1**：▼。

【0063】圖 15A-15B 顯示了以 10:1 的 E:T 比例，用 Raji/GF 靶細胞和 **DART-A** 或**對照 DART 1** 以不同濃度溫育 24 小時之後，在 CD4+和 CD8+人 T 細胞中的粒酶 B (圖 15A)和穿孔蛋白(圖 15B) 染色的細胞內水準。

【0064】圖 16A 和 16B 顯示，以 10:1 的 E:T 比例，在存在 200 ng/mL 的 **DART-A** 或**對照 DART 1** 的情況下，在與 HBL-2 靶細胞共培養 24 小時(圖 16A) 或 72 小時(圖 16B)之後，通過 FACS 分析的 CFSE 標記的人 T 細胞的增殖。顯示了在存在**DART-A**的情況下(黑線)或在存在**對照 DART 1**的情況下(灰色填充)，與 HBL-2 細胞共培養之後的染色特徵。

【0065】圖 17 顯示了在植入 HBL-2 腫瘤細胞的小鼠中，在存在啟動的人 T 細胞的情況下，CD19 x CD3 雙特異性分子(**DART-A**)對腫瘤生長的抑制。雌性非肥胖型糖尿病/嚴重聯合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠(n = 8/組)在第 0 天經皮下(SC)

植入 HBL-2 腫瘤細胞+啟動的人 T 細胞，隨後在第 0-3 天用媒介對照、**對照 DART 1** 或 **DART-A** 處理，總共 IV 施用 4 個劑量。以 1:5 (分別 1×10^6 和 5×10^6 個細胞) 的比例，溫育人 T 細胞和 HBL-2 細胞。腫瘤體積顯示為組平均值 $\pm$ SEM。

【0066】**圖 18** 顯示了在植入 Raji 腫瘤細胞的小鼠中，在存在啟動的人 T 細胞的情況下，CD19 x CD3 雙特異性分子(**DART-A**)對腫瘤生長的抑制。在第 0 天，雌性 NOD/SCID 小鼠($n = 8/\text{組}$)經 SC 植入 Raji 腫瘤細胞+啟動的人 T 細胞，隨後在第 0-3 天，用媒介對照、**對照 DART 1** 或 **DART-A** 處理，總共 IV 施用 4 個劑量。以 1:5 (分別 1×10^6 和 5×10^6 個細胞)的比例溫育人 T 細胞和 Raji 細胞。腫瘤體積顯示為組平均值 $\pm$ SEM。

【0067】**圖 19A-19B** 顯示了在植入 HBL-2 腫瘤細胞的小鼠中，腫瘤體積隨著時間的改變。**圖 19A**：在第 0 天，雌性 NSG B2m-/-小鼠($n = 8/\text{組}$)經皮內(ID)植入 HBL-2 腫瘤細胞(5×10^6)。在第 4 天，小鼠經腹膜內(IP)植入 PBMC (5×10^7)。接著，如指示的(見 Rx 箭頭)，用媒介、**對照 DART 1** 或 CD19 x CD3 雙特異性 **DART-A** 經靜脈內(IV)處理小鼠。腫瘤體積顯示為組平均值 $\pm$ SEM。**圖 19B**：在第 0 天，雌性 NSG B2m-/-小鼠($n = 8/\text{組}$)經皮內(ID)植入 HBL-2 腫瘤細胞(5×10^6)。在第 4 天，小鼠經腹膜內(IP)植入 PBMC (5×10^7)。接著，如指示的(見 Rx 箭頭)，用媒介、**對照 DART 1** 或 CD19 x CD3 雙特異性 **DART-A** 靜脈內(IV)經處理小鼠。腫瘤體積顯示為組平均值 $\pm$ SEM。

【0068】**圖 20A-20B** 顯示了在 IV 施用多達 4 個迴圈的每週遞增劑量的 CD19 x CD3 雙特異性 **DART-A** 之後，食蟹猴中隨著時間的推移的迴圈 B 細胞水準。組 1 中的食蟹猴($n = 4$)在第 1、8、15、22 和 29 天用 IV 施用的媒介 $\rightarrow 0.5 \rightarrow 5 \rightarrow 50 \rightarrow 50 \mu\text{g/kg}$ **DART-A** 處理(由點狀垂直線指示) (**圖 20A**)。組 2 中的食蟹猴($n = 4$)在第 1、8、15、22 和 29 天用 IV 施用的媒介 $\rightarrow 2 \rightarrow 10 \rightarrow 100 \rightarrow 100 \mu\text{g/kg}$ **DART-A** 處理(由點狀垂直線指示) (**圖 20B**)。顯示了每個食蟹猴的資料。

【0069】圖 21A-21D 顯示了在 IV 施用多達 3 個迴圈的每週固定劑量或多達 5 個迴圈的每 3 天固定劑量的 **DART-A** 之後，食蟹猴中隨著時間的推移的迴圈 B 細胞水準。組 3-5 中的食蟹猴(n = 2/組)用 CD19 x CD3 雙特異性 **DART-A** 處理。組 3 (圖 21A)接收 5 ng/kg **DART-A**；組 4 (圖 21B)接收 50 ng/kg **DART-A**；和組 5 (圖 21C)接收 500 ng/kg **DART-A**。在第 1、8 和 15 天 IV 施用 **DART-A** (由點狀垂直線指示)。組 6 中的食蟹猴 (n = 2) (圖 21D)在第 1、4、8、11 和 15 天用 IV 施用的 500 ng/kg **DART-A** 處理(由點狀垂直線指示)。顯示了每個食蟹猴的資料。

【0070】圖 22 顯示了 **DART-A** 人 FcRn 轉基因小鼠藥物代謝動力學(PK)分析。mAb 1、mAb 2 和 mAb 3 是用作對照的不相關的人源化的 IgG1 抗體，以允許測定轉基因動物中典型的抗體半衰期。

【0071】圖 23 顯示了在人 PBMC 重建的小鼠的侵染性 Raji-luc 細胞白血病模型中，用 500 µg/kg **DART-A** (■)、500 µg/kg 對照 **DART 1** (▲)或媒介對照(●)處理之後的存活曲線。

【0072】圖 24 顯示了在人 PBMC 重構的小鼠中散播性 Raji-luc 細胞白血病模型中，用 500 µg/kg (●)、100 µg/kg (■)、20 µg/kg (○)、4 µg/kg (▲)、0.8 µg/kg (▼)或 0.16 µg/kg (□) **DART-A**、500 mg/kg (Δ)對照 **DART 1** 或媒介對照(◆)處理之後的存活曲線。

【0073】圖 25 顯示了用 0.5 mg/kg **DART-A** (▲)、0.1 mg/kg **DART-A** (■)或媒介對照(●)處理之後，在人 PBMC 重構的小鼠中 Raji.luc 細胞淋巴瘤模型中的存活曲線。

【0074】圖 26 顯示了用 500 µg/kg (■)、100 µg/kg (▲)、20 µg/kg (▼)、4 µg/kg (◆)、0.8 µg/kg (□)或 0.16 µg/kg (Δ) **DART-A**、0.1 mg/kg 對照 **DART 1** (○)或媒介對照(●)處理之後，人 PBMC 重構的小鼠中的 Raji.luc 細胞淋巴瘤模型中的存活曲線。

【0075】圖 27 顯示了給藥 10 $\mu\text{g/kg}$ DART-A 的食蟹猴中 DART-A 的血清濃度-時間曲線。

【0076】圖 28 顯示了通過針對研究天和組的流式細胞術測定的 CD45+/CD20+細胞/ μL 的平均值 $\pm$ SEM 數。在第 8、15、22 和 29 天的虛垂直線指示，對於組 2-5 的動物，通過 2-小時 IV 輸注的 DART-A 的每個劑量(D)；而組 1 的動物繼續接收媒介對照。x 軸指示研究天，其分成覆蓋第-7 至-1 天、第 0 至 63 天和第 64-121 天的 3 段。

【0077】[E:T 比例]圖 29A-29I 顯示了在 CLL PBMC (E:T = 1:23)中，在沒有處理(圖 29A)、用 DART-A (圖 29C、29E、29G 和 29I)或對照 DART 1 (圖 29B、29D、29F 和 29H)處理 6 天之後，惡性 B 細胞(CD20+/CD5+) (圖 29A-29C)、T 細胞(CD4+或 CD8+) (圖 29D-29E)和 T 細胞啟動(CD4+ (圖 29F-29G)或 CD8+ (圖 29H-29I) T 細胞中的 CD25)的代表性 FACS 分析。

【0078】圖 30A-30C 顯示了以 10:1 的 E:T 比例，與 DART-A 溫育 24 小時之後，依魯替尼-預處理的 T 細胞對 CD19 x CD3 雙特異性分子(DART-A)介導的對 Raji/GF 靶細胞的重定向 T 細胞殺傷的作用。使用依魯替尼預處理 24 小時(圖 30A)、48 小時(圖 30B)或 72 小時(圖 30C) 的人 T 細胞，通過螢光素酶試驗(RLU)測量 Raji/GF 靶細胞殺傷。

【0079】圖 31A 和 31B 顯示了在存在不同濃度的依魯替尼的情況下，CD19 x CD3 雙特異性分子(DART-A)介導的對表達 CD19 的靶細胞的重定向 T 細胞殺傷。使用純化的人 T 細胞作為效應細胞，對於 CD19+ Raji/GF 靶細胞，以 E:T 細胞比例 = 10:1，DART-A 介導的細胞毒性的劑量回應曲線。使用與依魯替尼和 DART-A 同時溫育 24 小時(圖 31A)或 48 小時(圖 31B)的人 T 細胞，通過螢光素酶試驗(RLU)測量 Raji/GF 靶細胞殺傷。

【0080】圖 32A-32D 顯示了在存在表達 CD19 的靶細胞和不同濃度的依魯替

尼的情況下，CD19 x CD3 雙特異性分子(**DART-A**)介導的 T 細胞啟動。在存在依魯替尼和 **DART-A** 的情況下，在與 Raji/GF 靶細胞以 E:T 細胞比= 10:1 溫育 24 (圖 32A 和 32B)和 48 小時(圖 32C 和 32D)之後，**DART-A** 介導的對 CD8+ (圖 32A 和 32C)和 CD4+ (圖 32B 和 32D) T 細胞中 T-細胞啟動標記物 CD25 的誘導的劑量回應。

【0081】圖 33A-33C 顯示了在存在表達 CD19 的靶細胞和不同濃度的依魯替尼的情況下，CD19 x CD3 雙特異性分子(**DART-A**)介導的 T 細胞細胞因數釋放。在存在指示濃度的依魯替尼的情況下，E:T = 10:1 的人 T 細胞和 Raji/GF 靶細胞被 **DART-A** 處理 24 小時。收集培養物上清液並且進行基於 ELISA 的 IL-2 (圖 33A)、IFN- γ (圖 33B)和 TNF- α (圖 33C)測量。

【0082】圖 34 顯示了用人 PBMC，依魯替尼對 CD19 x CD3 雙特異性分子(**DART-A**)-介導的自體 B 細胞消除的作用。在人 PBMC (200,000/孔)與指示劑量的 **DART-A** 和依魯替尼溫育 48 小時之後，通過流式細胞術在設門的淋巴細胞中的分析人 CD20+/7AAD-細胞的百分數。

【0083】圖 35A-35D 顯示了依魯替尼對與用人 PBMC 的 CD19 x CD3 雙特異性分子(**DART-A**)介導的自體 B 細胞消除相關的人 T 細胞啟動的作用。在 PBMC (200,000/孔)與指示濃度的 **DART-A** 和依魯替尼同時溫育 24 (圖 35A 和 35B)和 48 小時(圖 35C 和 35D)之後，**DART-A** 介導的對 CD8+ (圖 35A 和 35C)和 CD4+ (圖 35B 和 35D) T-細胞群中 T-細胞啟動標記物 CD25 的誘導的劑量回應。

【0084】圖 36A-36C 顯示了依魯替尼對與用人 PBMC 的 CD19 x CD3 雙特異性分子(**DART-A**)介導的自體 B 細胞消除相關的 T 細胞細胞因數釋放的作用。在存在指示濃度的依魯替尼的情況下，用 **DART-A** 處理人 PBMC (200,000/孔) 24 小時。收集培養物上清液並且進行基於 ELISA 的 IL-2 (圖 36A)、IFN- γ (圖 36B)和 TNF- α (圖 36C)測量。

【0085】圖 37 顯示了用依魯替尼和 CD19 x CD3 雙特異性分子(DART-A)的組合處理的依魯替尼敏感 B-細胞淋巴瘤細胞的細胞殺傷曲線。在存在指示濃度的依魯替尼的情況下，處理依魯替尼敏感細胞(20,000/孔) 24 小時。以指示的濃度將 DART-A 添加至孔，並且以 3:1 的 E:T 比例添加全 T 細胞。在與 DART-A 溫育 48 小時之後，測定 CD19 x CD3 雙特異性 DART-A 介導的細胞毒性(相對於 0.1% DMSO 處理細胞的細胞殺傷的百分數)的劑量回應曲線。顯示了 2 個代表性實驗中的 1 個，每個實驗使用來自獨立供體的 T 細胞。

【實施方式】

【0086】本發明涉及聯合療法，包括施用：(1)能夠特異性結合 CD19 和 CD3 的雙特異性分子(即，CD19 x CD3 雙特異性分子)，和(2)用於治療疾病，尤其治療與 CD19 的表達相關或特徵在於 CD19 的表達的疾病的布魯頓酪氨酸激酶(BTK)抑制劑。優選地，這類 CD19 x CD3 雙特異性分子是包括兩條多肽鏈的雙特異性單價雙抗體，並且其具有對 CD19 的表位特異性的一個結合位點和對 CD3 的表位特異性的一個結合位點(即，“CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體”)。最優選地，這類 CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體包括三條多肽鏈，並且具有對 CD19 的表位特異性的一個結合位點和對 CD3 的表位特異性的一個結合位點以及另外包括免疫球蛋白 Fc 結構域(即，“CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體”)。本發明涉及藥物組合物，其包含這類 CD19 x CD3 雙特異性分子、BTK 抑制劑或這些劑的組合。本發明另外涉及使用這類藥物組合物治療疾病，尤其治療與 CD19 的表達相關或特徵在於 CD19 的表達的癌症的方法。

【0087】A.抗體和其他結合分子

【0088】1.抗體

【0089】如本文所使用，術語“**抗體**”不僅僅包括完整的多克隆抗體或單克隆抗體，而且也包括其突變體、天然存在的突體、包括具有必要的特異性的抗原識別位元點的抗體部分的融合蛋白、人源化抗體和嵌合抗體以及包括具有必要的特異性的抗原識別位點的免疫球蛋白分子的任何其他修飾構造。遍及本申請，抗體的輕鏈和重鏈的氨基酸殘基的編號是根據如 Kabat 等(1992)Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health Publication No. 91-3242 中的 EU 索引。如本文所使用，“抗體的抗原-結合片段”是具有至少一種抗原識別位點的抗體的一部分。如本文所使用，該術語包括片段(比如 Fab、Fab'、F(ab')₂ Fv)和單鏈(scFv)。

【0090】術語“**單克隆抗體**”指同質型(homogeneous)抗體群體，其中單克隆抗體由參與抗原的選擇性結合的氨基酸(天然產生的和非天然產生的)構成。單克隆抗體是高度特異性的，直接針對單個抗原位點。術語“單克隆抗體”不僅僅包括完整的單克隆抗體和全長單克隆抗體，而且也包括其片段(比如 Fab、Fab'、F(ab')₂ Fv)、單鏈(scFv)、其突變體、包括抗體部分的融合蛋白、人源化的單克隆抗體、嵌合單克隆抗體和包括具有結合抗原的必要的特異性和能力的抗原識別位點的免疫球蛋白分子的任何其他修飾構造。就抗體的來源或製備其的方式(例如，通過雜交瘤、噬菌體選擇、重組表達、轉基因動物等)而言，不旨在是限制性的。術語包括完整的免疫球蛋白以及上面根據“抗體”的定義描述的片段等。製備單克隆抗體的方法是本領域已知的。可使用的一種方法是 Kohler, G.等(1975) “Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity,” Nature 256:495-497 的方法或其改良。典型地，在小鼠、大鼠或兔子中產生單克隆抗體。通過用免疫原性量的、包含期望表位的細胞、細胞提取物，或蛋白質製品免疫動物而產生抗體。免疫原可以是但不限於原代細胞、培養的細胞系、癌細胞、蛋白質、肽、核酸或組織。用於免疫的細胞可被培養一段時

間(例如，至少 24 小時)，然後將它們用作免疫原。細胞它們本身或聯合非變性佐劑，比如 Ribi，可用作免疫原。一般而言，在用作免疫原時，細胞應保持完整並且優先地有活性。相比於破裂的細胞，完整的細胞可允許抗原被免疫的動物更好地檢測。變性或烈性佐劑，例如，弗氏佐劑的使用，可使細胞破裂，因此，其應用不受到鼓勵。免疫原可以週期性間隔被多次施用，諸如兩週一次或一週一次，或者可以以維持在動物(例如，在組織重組體中)中的生存力這樣的方式被施用。可選地，對於期望的致病表位是免疫特異性的現有單克隆抗體和任意其他等價抗體可被測序，並通過本領域中已知的任意手段重組產生。在一個實施方式中，對這樣的抗體測序，然後將多核苷酸序列克隆至載體中，用於表達或增殖。編碼感興趣的抗體的序列可在宿主細胞中保持在載體中，並且，可然後擴展和冷凍宿主細胞，用於將來的使用。這樣的抗體的多核苷酸序列可用於遺傳操作，以產生本發明的雙特異性分子、嵌合抗體、人源化抗體或犬源化(caninized)抗體，或以改善抗體的親和力或其他特徵。人源化抗體的一般原則涉及保留抗體的抗原-結合部分的基本序列，同時用人抗體序列交換抗體的非人剩餘部分。人源化單克隆抗體有四個一般步驟。這些是：(1)確定開始抗體輕鏈和重鏈可變結構域的核苷酸和預測的氨基酸序列；(2)設計人源化抗體或犬源化抗體，即，決定在人源化或犬源化過程中使用哪種抗體框架區域；(3)實際人源化或犬源化方法/技術；和(4)人源化抗體的轉染和表達。見，例如，美國專利號 4,816,567、5,807,715、5,866,692 和 6,331,415。

【0091】2.雙特異性抗體、多特異性雙抗體和 DART™雙抗體

【0092】 本發明涉及聯合療法，其包括施用 CD19 x CD3 雙特異性分子和 BTK 抑制劑。尤其地，本發明包括使用雙特異性雙抗體、BiTE、雙特異性抗體(例如，併入杵/臼(knob/hole))等，其包括：(i)能夠結合 CD19 的結構域和(ii)能夠結合 CD3 的結構域。

【0093】在一些實施方式中，本發明包括使用下面文獻描述的任何方法產生的 CD19 x CD3 雙特異性抗體的用途：PCT 公佈號 WO 1998/002463、WO 2005/070966、WO 2006/107786 WO 2007/024715、WO 2007/075270、WO 2006/107617、WO 2007/046893、WO 2007/146968、WO 2008/003103、WO 2008/003116、WO 2008/027236、WO 2008/024188、WO 2009/132876、WO 2009/018386、WO 2010/028797、WO2010028796、WO 2010/028795、WO 2010/108127、WO 2010/136172、WO 2011/086091、WO 2011/133886、WO 2012/009544、WO 2013/003652、WO 2013/070565、WO 2012/162583、WO 2012/156430、WO 2013/174873 和 WO 2014/022540，其每一篇通過引用以其整體併入本文。

【0094】在一些實施方式中，本發明包括使用下面文獻描述的任何方法產生的 CD19 x CD3 BiTE®的用途：PCT 公佈號 WO99/54440、WO 05/061547，其每一篇通過引用以其整體併入本文。在具體的實施方式中，CD19 x CD3 BiTE®分子布利妥莫單抗(CAS 登記號 853426-35-4，之前的 AMG105/MT103，並且作為 BLINCYTO®銷售)可用在本發明的方法中。

【0095】在一些實施方式中，本發明包括 CD19 x CD3 雙抗體的用途。非單特異性“**雙抗體**”的供應提供了相對於抗體的明顯優勢：能夠共結合和共定位表達不同表位的細胞。因此，二價雙抗體具有寬範圍的應用，包括治療和免疫診斷。在各種應用中，二價在設計和工程化雙抗體方面允許大的靈活性，提供對多聚抗原的增強的親合力、不同抗原的交聯和對特定細胞類型的定向靶向，這取決於兩個靶抗原的存在。由於其增加的價、低離解速率和從迴圈中快速清除(對於小尺寸的雙抗體，為~50 kDa 或以下)，本領域中已知的雙抗體分子在腫瘤成像領域還顯示特別的用途(Fitzgerald 等(1997) “*Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In Pichia pastoris*,” Protein Eng. 10:1221)。

尤其重要的是共連接不同的細胞，例如，將細胞毒性 T 細胞交聯至腫瘤細胞 (Staerz 等(1985) “*Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells*,” *Nature* 314:628-631 ; 和 Holliger 等(1996) “*Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody*,” *Protein Eng.* 9:299-305) 。

【0096】雙抗體表位元結合結構域也可被引導至 B 細胞，比如 CD19、CD20、CD22、CD30、CD37、CD40 和 CD74 的表面決定子 (Moore, P.A. 等(2011) “*Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma*,” *Blood* 117(17):4542-4551 ; Cheson, B.D. 等(2008) “*Monoclonal Antibody Therapy For B-Cell Non-Hodgkin’s Lymphoma*,” *N. Engl. J. Med.* 359(6):613-626 ; Castillo, J. 等(2008) “*Newer monoclonal antibodies for hematological malignancies*,” *Exp. Hematol.* 36(7):755-768 。在許多研究中，也發現了結合至效應細胞決定子，例如 Fc γ 受體 (Fc γ R)，的雙抗體啟動效應細胞 (Holliger 等(1996) “*Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody*,” *Protein Eng.* 9:299-305 ; Holliger 等(1999) “*Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Specific T-Cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-CD3 x Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7 x Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins*,” *Cancer Res.* 59:2909-2916 ; WO 2006/113665、WO 2008/157379、WO 2010/080538、WO 2012/018687、WO 2012/162068) 。通常，通過結合抗原的抗體經 Fc-Fc γ R 相互作用與效應細胞的結合，引發效應細胞啟動；因此，在這點上，雙抗體分子可展示 Ig 樣功能，這不依賴於它們是否包括 Fc 結構域(例如，在本領域已知的或本文列舉的任何效應子功能試驗(例如，ADCC 試驗)中測定的) 。通過交聯腫瘤和效應細胞，雙抗體不僅僅使得效應細胞靠近腫瘤細胞而且也導致有效的腫瘤殺傷(見例如，Cao 等(2003) “*Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics*,” *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55:171-197) 。

【0097】但是，上述優勢需要突出的成本。這類非單特異性雙抗體的形成需要成功組裝兩個或更多個獨特和不同的多肽(即，這樣的形成需要通過不同多肽鏈種類的異源二聚化而形成雙抗體)。該事實與單特異性雙抗體不同，其通過一致的多肽鏈的同源二聚化而形成。由於至少兩個不同的多肽(即，兩個多肽種類)必須被提供以形成非單特異性雙抗體，並且由於這樣的多肽的同源二聚化導致失活分子 (Takemura, S.等(2000) “*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*,” Protein Eng. 13(8):583-588)，這樣的多肽的產生必須以防止相同種類的多肽之間的共價結合的方式完成(即，以防止同源二聚化) (Takemura, S.等(2000) “*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*,” Protein Eng. 13(8):583-588)。因此，本領域教導了這類多肽的非共價締合(見，例如，Olafsen 等 (2004) “*Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications*,” Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27；Asano 等(2004) “*A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain*,” 摘要 3P-683, J. Biochem. 76(8):992；Takemura, S.等(2000) “*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*,” Protein Eng. 13(8):583-588；Lu, D. 等(2005) “*A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity*,” J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672)。

【0098】但是，現有技術已經認識到由非共價締合的多肽構成的雙特異性雙抗體是不穩定的並且容易解離成非功能單體(見，例如，Lu, D. 等(2005) “*A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced*

Antitumor Activity,” J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672)。

【0099】面對這樣的挑戰，，本領域已經成功開發了穩定、共價結合的異源二聚化非單-特異性雙抗體，稱為 **DARTs™**(見，例如，美國專利公開號 2013-0295121、2010-0174053 和 2009-0060910；歐洲專利公開號 EP 2714079、EP 2601216、EP 2376109、EP 2158221 和 PCT 公開號 WO 2012/162068、WO 2012/018687、WO 2010/080538；和 Moore, P.A.等(2011) “*Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Re directed T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma*,” Blood 117(17):4542-4551；Veri, M.C.等(2010) “*Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold*,” Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943；Johnson, S.等(2010) “*Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion*,” J. Mol. Biol. 399(3):436-449)。這樣的雙抗體包括兩個或多個共價複合的多肽並涉及將一個或多個半胱氨酸殘基工程化到每個應用的多肽種類中。例如，將半胱氨酸殘基添加至這樣的構建體的 c-末端已經被證明允許多肽鏈之間的二硫鍵合，穩定了產生的異源二聚體，而不干擾二價分子的結合特性。

【0100】最簡單的 **DART™**的兩條多肽的每一條包括三個結構域(圖 1)。第一多肽包括：(i)包括第一免疫球蛋白的輕鏈可變結構域的結合區域的結構域(VL1)，(ii)包括第二免疫球蛋白的重鏈可變結構域的結合區域的第二結構域(VH2)，和(iii)用於促進與雙抗體的第二多肽的異源二聚化和第一多肽與第二多肽的共價結合的第三結構域。第二多肽包含互補的第一結構域(VL2 結構域)、互補的第二結構域(VH1 結構域)和與第一多肽鏈的第三結構域複合的第三結構域，以便促進與第一多肽鏈的異源二聚化和共價結合。這類分子是穩定的、有

效的並且具有同時結合兩個或更多個抗原的能力。它們能夠促進對表達靶抗原的細胞的重定向 T 細胞介導的殺傷。

【0101】在一種實施方式中，第一多肽和第二多肽的第三結構域各自包含半胱氨酸殘基，其用於將多肽經二硫鍵結合在一起。多肽之一或二者的第三結構域可另外具有 CH2-CH3 結構域的序列，以便雙抗體多肽的複合形成能夠結合細胞(比如 B 淋巴細胞、樹突細胞、天然殺傷細胞細胞、巨噬細胞、嗜中性粒細胞、嗜伊紅粒細胞、嗜鹼性粒細胞和肥大細胞)的 Fc 受體的 Fc 結構域(圖 2A-2B)。已經描述了這類分子的許多變型(見，例如，美國專利公開號 2013-0295121、2010-0174053 和 2009-0060910；歐洲專利公開號 EP 2714079、EP 2601216、EP 2376109、EP 2158221；和 PCT 公開號 WO 2012/162068、WO 2012/018687、WO 2010/080538)。這些具有 Fc 的 DART 可包括三條多肽鏈。這類雙抗體的第一多肽包含三個結構域：(i)包含 VL1 的結構域、(ii)包含 VH2 的結構域，(iii)促進與雙抗體的第一多肽鏈異源二聚化和共價結合的結構域和(iv)包含 CH2-CH3 序列的結構域。這類 DART™的第二多肽包含：(i) 包含 VL2 的結構域、(ii)包含 VH1 的結構域和(iii)促進與雙抗體的第一多肽鏈異源二聚化和共價結合的結構域。這類 DART™的第三多肽包括 CH2-CH3 序列。因此，這類 DART™的第一和第二多肽鏈締合在一起，而形成能夠結合表位的 VL1/VH1 結合位點，以及能夠結合第二表位的 VL2/VH2 結合位點。第一和第二多肽通過涉及它們各自第三結構域中的半胱氨酸殘基的二硫鍵彼此結合。值得注意的是，第一和第三多肽鏈彼此複合，而形成經二硫鍵穩定的 Fc 結構域。這類雙抗體具有增強的效力。這類具有 Fc 的 DARTs™可具有兩個取向(表 1):

表 1		
第一取	第三鏈	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -COOH

向	第一鏈	NH ₂ -VL1-VH2-異源二聚體促進結構域 -CH ₂ -CH ₃ -COOH
	第二鏈	NH ₂ -VL2-VH1-異源二聚體促進結構域 -COOH
第二取向	第三鏈	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -COOH
	第一鏈	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -VL1-VH2-異源二聚體促進結構域-COOH
	第二鏈	NH ₂ -VL2-VH1-異源二聚體促進結構域 -COOH

【0102】 B.本發明優選的 CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體

【0103】 本發明尤其涉及 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體，其能夠同時結合 CD19 和 CD3，並且涉及這類分子在治療血液學惡性腫瘤中的用途。儘管非優化的 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體是完全有功能的，類似於通過密碼子優化在基因表達中獲得的改進(見，例如，Grosjean, H.等(1982) “*Preferential Codon Usage In Prokaryotic Genes: The Optimal Codon-Anticodon Interaction Energy And The Selective Codon Usage In Efficiently Expressed Genes*” Gene 18(3):199-209)，但是可能通過修飾或改進它們的序列而進一步增強 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體的穩定性和/或功能。

【0104】 本發明優選的 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體是 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體，其包含三條多肽鏈，所述多肽鏈彼此締合以形成對 CD19 的表位特異性的一個結合位點和對 CD3 的表位特異性的一個結合位點(見，圖 2A-2B)，以便能夠同時結合 CD19 和 CD3。因此，這類雙抗體結合“第一抗原”，

所述“第一抗原”可以是 CD3 或 CD19，和“第二抗原”，當第一表位是 CD3 時，所述“第二抗原”是 CD19，並且當第一表位是 CD19 時，所述“第二抗原”是 CD3。

【0105】 優選地，如圖 2A 中顯示，這樣的三條多肽鏈中的第一條多肽鏈將在 N-末端至 C-末端方向上包含 N-末端、“第一”抗原(CD3 或 CD19)的輕鏈可變結構域(VL)的抗原-結合結構域、第二抗原(如果第一抗原是 CD3，則第二抗原是 CD19；如果第一抗原是 CD19，則第二抗原是 CD3)的重鏈可變結構域(VH)的抗原-結合結構域、異源二聚體促進結構域和 C-末端。間插連接體肽(**連接體 1**)將輕鏈可變結構域的抗原-結合結構域與重鏈可變結構域的抗原-結合結構域分開。優選地，重鏈可變結構域的抗原-結合結構域通過間插連接體肽(**連接體 2**)連接至異源二聚體促進結構域。在 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體的情況下，異源二聚體促進結構域的 C-末端通過間插連接體肽(**連接體 3**)或通過間插間隔體-連接體肽(**間隔體-連接體 3**)連接至 Fc 區域(“Fc 結構域”)的 CH2-CH3 結構域。最優選地，三條多肽鏈中的第一多肽鏈因此在 N-末端至 C-末端方向上包含：VL_{第一抗原}—**連接體 1**—VH_{第二抗原}—**連接體 2**—異源二聚體促進結構域—**間隔體-連接體 3**—Fc 結構域。

【0106】 可選地，如圖 2B 中顯示，這樣的三條多肽鏈中的第一多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包含 N-末端、**連接體 3**、Fc 區域(“Fc 結構域”)的 CH2-CH3 結構域、間插間隔體肽(**連接體 4**)(其具有例如氨基酸序列：APSSS (SEQ ID NO:47)或氨基酸序列 APSSSPME (SEQ ID NO:48))、第一抗原(CD3 或 CD19)的輕鏈可變結構域(VL)的抗原-結合結構域、第二抗原(如果第一抗原是 CD3，則第二抗原 is CD19；如果第一抗原 is CD19，則第二抗原 is CD3)的重鏈可變結構域(VH)的抗原-結合結構域、異源二聚體促進結構域和 C-末端。間插連接體肽(**連接體 1**)將輕鏈可變結構域的抗原-結合結構域與重鏈可變結構域的抗原-結合結構域分開。優選地，重鏈可變結構域的抗原-結合結構域通過間插連接體肽(**連接**

體 2)連接至異源二聚體促進結構域。最優選地，三條多肽鏈中的第一多肽鏈因此在此在 N-末端至 C-末端方向上包含：**連接體 3**—Fc 結構域—**連接體 4**—VL_{第一抗原}—**連接體 1**—VH_{第一抗原}—**連接體 2**—異源二聚體促進結構域。

【0107】 優選地，這樣的三條多肽鏈中的第二多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包含 N-末端、第二抗原的輕鏈可變結構域(VL)的抗原-結合結構域、第一抗原的重鏈可變結構域(VH)的抗原-結合結構域、異源二聚體促進結構域和 C-末端。間插連接體肽(**連接體 1**)將輕鏈可變結構域的抗原-結合結構域與重鏈可變結構域的抗原-結合結構域分開。優選地，重鏈可變結構域的抗原-結合結構域通過間插連接體肽(**連接體 2**)連接至異源二聚體促進結構域。最優選地，三條多肽鏈中的第二多肽鏈因此在此在 N-末端至 C-末端方向上包含：VL_{第二抗原}—**連接體 1**—VH_{第一抗原}—**連接體 2**—異源二聚體促進結構域。

【0108】 優選地，這樣的三條多肽鏈中的第三多肽鏈包含連接體肽(**連接體 3**)和 Fc 區域(“Fc 結構域”)的 CH2-CH3 結構域。

【0109】 第一多肽鏈的輕鏈可變結構域的抗原-結合結構域與第二多肽鏈的重鏈可變結構域的抗原-結合結構域相互作用，以便形成對第一抗原(即，CD19 或 CD3)特異性的功能性抗原-結合位點。同樣地，第二多肽鏈的輕鏈可變結構域的抗原-結合結構域與第一多肽鏈的重鏈可變結構域的抗原-結合結構域相互作用，以便形成對第二抗原(即，CD3 或 CD19，取決於第一抗原的身份)特異性的第二功能性抗原-結合位點。因此，第一和第二多肽鏈的輕鏈可變結構域的抗原-結合結構域和重鏈可變結構域的抗原-結合結構域的選擇是協調的，以便兩條多肽鏈總共包括能夠結合 CD19 和 CD3 的輕鏈和重鏈可變結構域的抗原-結合結構域。

【0110】 1.優選的連接體

【0111】 最優選地，選擇將多肽鏈的這類 VL 和 VH 結構域分開的**連接體 1**

的長度，以基本上或完全防止這類 VL 和 VH 結構域彼此結合。因此，第一多肽鏈的 VL 和 VH 結構域基本上或完全不能夠彼此結合。同樣地，第二多肽鏈的 VL 和 VH 結構域基本上或完全不能夠彼此結合。優選的間插間隔體肽(連接體 1)具有序列(SEQ ID NO:1)：GGGSGGGG。

【0112】 **連接體 2** 的目的是將多肽鏈的 VH 結構域與該多肽鏈的異源二聚體促進結構域分開。各種連接體中任何一種均可用於**連接體 2** 的目的。這類**連接體 2** 的優選的序列具有氨基酸序列：ASTKG (SEQ ID NO:2)，其源自 IgG CH1 結構域，或具有氨基酸序列 GGCGGG(SEQ ID NO:3)，其具有可用於經二硫鍵彼此共價結合第一和第二多肽鏈的半胱氨酸殘基。因為連接體 2，ASTKG (SEQ ID NO:2)不具有這類半胱氨酸，這類**連接體 2** 的使用優選地與包含半胱氨酸的異源二聚體促進結構域，比如 SEQ ID NO:12 的 E-螺旋或 SEQ ID NO:13 的 K-螺旋(見下方)，的使用相關。

【0113】 **連接體 3** 的目的是將多肽鏈的異源二聚體促進結構域與該多肽鏈的 Fc 結構域分開。各種連接體中的任何一種均可用於**連接體 3** 的目的。這類**連接體 3** 的優選的序列具有氨基酸序列：DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:4)。間隔體-**連接體 3** 的優選的序列具有氨基酸序列：GGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:5)。

【0114】 2.優選的異源二聚體促進結構域

【0115】 第一和第二多肽鏈的異源二聚體的形成可通過包括異源二聚體促進結構域來驅動。這類結構域在一條多肽鏈上包括 GVEPKSC(SEQ ID NO:6)或 VEPKSC (SEQ ID NO:7)並且在另一多肽鏈上包括 GFNRGEC(SEQ ID NO:8)或 FNRGEC (SEQ ID NO:9)(US2007/0004909)。

【0116】 但是，更優選地，本發明的異源二聚體促進結構域由具有相反電荷的一個、兩個、三個或四個串聯重複的螺旋結構域形成，所述螺旋結構域包括至少六個、至少七個或至少八個帶電荷的氨基酸殘基的序列(Apostolovic, B.

等 (2008) “*pH-Sensitivity of the E3/K3 Heterodimeric Coiled Coil*,” *Biomacromolecules* 9:3173–3180 ; Arndt, K.M.等(2001) “*Helix-stabilized Fv (hsFv) Antibody Fragments: Substituting the Constant Domains of a Fab Fragment for a Heterodimeric Coiled-coil Domain*,” *J. Molec. Biol.* 312:221-228 ; Arndt, K.M.等 (2002) “*Comparison of In Vivo Selection and Rational Design of Heterodimeric Coiled Coils*,” *Structure* 10:1235-1248 ; Boucher, C.等(2010) “*Protein Detection By Western Blot Via Coiled–Coil Interactions*,” *Analytical Biochemistry* 399:138-140 ; Cachia, P.J. 等 (2004) “*Synthetic Peptide Vaccine Development: Measurement Of Polyclonal Antibody Affinity And Cross-Reactivity Using A New Peptide Capture And Release System For Surface Plasmon Resonance Spectroscopy*,” *J. Mol. Recognit.* 17:540-557 ; De Crescenzo, G.D. 等 (2003) “*Real-Time Monitoring of the Interactions of Two-Stranded de novo Designed Coiled-Coils: Effect of Chain Length on the Kinetic and Thermodynamic Constants of Binding*,” *Biochemistry* 42:1754-1763 ; Fernandez-Rodriguez, J.等(2012) “*Induced Heterodimerization And Purification Of Two Target Proteins By A Synthetic Coiled-Coil Tag*,” *Protein Science* 21:511-519 ; Ghosh, T.S.等(2009) “*End-To-End And End-To-Middle Interhelical Interactions: New Classes Of Interacting Helix Pairs In Protein Structures*,” *Acta Crystallographica D* 65:1032-1041 ; Grigoryan, G. 等 (2008) “*Structural Specificity In Coiled-Coil Interactions*,” *Curr. Opin. Struc. Biol.* 18:477-483 ; Litowski, J.R.等(2002) “*Designing Heterodimeric Two-Stranded α -Helical Coiled-Coils: The Effects Of Hydrophobicity And α -Helical Propensity On Protein Folding, Stability, And Specificity*,” *J. Biol. Chem.* 277:37272-37279 ; Steinkruger, J.D.等(2012) “*The $d \uparrow \text{---} d \uparrow$ Vertical Triad is Less Discriminating Than the $a \uparrow \text{---} a \uparrow$ Vertical Triad in the Antiparallel Coiled-coil Dimer Motif*,” *J. Amer. Chem. Soc.* 134(5):2626–2633 ; Straussman, R.

等(2007) “*Kinking the Coiled Coil – Negatively Charged Residues at the Coiled-coil Interface*,” J. Molec. Biol. 366:1232-1242 ; Tripet, B.等(2002) “*Kinetic Analysis of the Interactions between Troponin C and the C-terminal Troponin I Regulatory Region and Validation of a New Peptide Delivery/Capture System used for Surface Plasmon Resonance*,” J. Molec. Biol. 323:345–362 ; Woolfson, D.N. (2005) “*The Design Of Coiled-Coil Structures And Assemblies*,” Adv. Prot. Chem. 70:79-112 ; Zeng, Y.等(2008) “*A Ligand-Pseudoreceptor System Based On de novo Designed Peptides For The Generation Of Adenoviral Vectors With Altered Tropism*,” J. Gene Med. 10:355-367)。

【0117】 這樣的重複的螺旋結構域可以是準確的重複或可具有取代。例如，第一多肽鏈的異源二聚體促進結構域可包括具有八個帶負電荷的氨基酸殘基的序列並且第二多肽鏈的異源二聚體促進結構域可包括具有八個帶正電荷的氨基酸殘基的序列(或反之亦然)。哪個螺旋被提供至第一或第二多肽鏈不重要，只要具有相反電荷的螺旋用於另一條多肽鏈。但是，本發明優選的 CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體的第一多肽鏈具有帶負電荷的螺旋。帶正電荷的氨基酸可以是賴氨酸、精氨酸、組氨酸等和/或帶負電荷的氨基酸可以是谷氨酸、天冬氨酸等。帶正電荷的氨基酸優選地是賴氨酸和/或帶負電荷的氨基酸優選地是谷氨酸。僅僅使用單個異源二聚體-促進結構域是可能的(因為這類結構域將抑制同源二聚化，從而促進異源二聚化)，但是，優選本發明雙抗體的第一和第二多肽鏈都包含異源二聚體-促進結構域。

【0118】 在優選的實施方式中，異源二聚體促進結構域之一包括四個串聯“E- 螺旋”螺旋結構域 (SEQ ID NO:10 : EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK)，其谷氨酸殘基在 pH7 形成負電荷，同時異源二聚體促進結構域的另一個包括四個串聯“K-螺旋”結構域(SEQ ID

NO:11：KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE)，其賴氨酸殘基在 pH 7 形成正電荷。這類帶電結構域的存在促進了第一和第二多肽之間的締合，因此有助於異源二聚化。尤其優選是這樣的異源二聚體促進結構域：其中 **SEQ ID NO:10** 的四個串聯“E-螺旋”螺旋結構域之一已經被修飾成包含半胱氨酸殘基：EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK(**SEQ ID NO:12**)。同樣地，尤其優選的是這樣的異源二聚體促進結構域：其中 **SEQ ID NO:11** 的四個串聯“K-螺旋”螺旋結構域之一已經被修飾成包含半胱氨酸殘基：KVAACEK-KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE (**SEQ ID NO:13**)。

【0119】 3.多肽鏈的共價結合

【0120】 本發明的 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體被工程化，從而它們的第一和第二多肽鏈經沿著它們的長度設置的一個或多個半胱氨酸殘基而彼此共價結合。這類半胱氨酸殘基可被引入到將多肽的 VL 和 VH 結構域分開的間插連接體中。可選地，**連接體 2** 可包含半胱氨酸殘基。另外或可選地，**連接體 3** 可包含半胱氨酸殘基，如在 **SEQ ID NO:4** 或 **SEQ ID NO:5** 中。最優選地，異源二聚體促進結構域的一個或多個螺旋結構域將被取代，以包含半胱氨酸殘基，如在 **SEQ ID NO:12** 或 **SEQ ID NO:13** 中。

【0121】 在具體的實施方式中，本發明的 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體可進一步具有白蛋白-結合結構域，以延長體內半衰期。

【0122】 4.優選的 Fc 結構域

【0123】 本發明的 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體的 Fc 結構域可以是完整的 Fc 區域(例如，完整的 IgG Fc 區域)或僅僅是完整的 Fc 區域的片段。儘管本發明的雙特異性單價 Fc 雙抗體的 Fc 結構域可具有結合一個或多個 Fc 受體(例如，FcγR)的能力，但是更優選地，這類 Fc 結構域將導致對 FcγRIA (CD64)、FcγRIIA (CD32A)、FcγRIIB (CD32B)、FcγRIIIA (CD16a)或 FcγRIIIB (CD16b)降

低的結合(相對於野生型 Fc 區域展示的結合)或基本上消除這類 Fc 結構域結合這類受體的能力。本發明的雙特異性單價 Fc 雙抗體的 Fc 結構域可包括完整 Fc 區域的一些或所有的 CH2 結構域和/或一些或所有的 CH3 結構域，或可包括變異的 CH2 和/或變異的 CH3 序列(相對於完整的 Fc 區域的 CH2 或 CH3 結構域，其可包括，例如，一個或多個插入和/或一個或多個缺失)。本發明的雙特異性單價 Fc 雙抗體的 Fc 結構域可包括非 Fc 多肽部分，或可包括非天然產生的完整 Fc 區域的部分，或可包括非天然產生的取向的 CH2 和/或 CH3 結構域 (比如，例如，兩個 CH2 結構域或兩個 CH3 結構域，或在 N-末端至 C-末端方向上，與 CH2 結構域連接的 CH3 結構域等)。

【0124】 在優選的實施方式中，本發明的 CD19x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體的第一和第三多肽鏈各包括 CH2-CH3 結構域，其複合在一起以形成免疫球蛋白(IgG) Fc 結構域。人 IgG1 的 CH2-CH3 結構域的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:14**)：

```
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL
TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
```

【0125】 因此，第一和第三多肽鏈的 CH2 和/或 CH3 結構域可都由 **SEQ ID NO:14** 或其變體構成。

【0126】 尤其地，對於本發明的 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體的第一和第三多肽鏈的 CH2-CH3 結構域，優選地展示對 FcγRIA (CD64)、FcγRIIA (CD32A)、FcγRIIB (CD32B)、FcγRIIIA (CD16a)或 FcγRIIIB (CD16b)降低的(或基本上沒有)結合(相對於野生型 Fc 區域(**SEQ ID NO:14**)展示的結合)。能夠介導這類改變的結合的 Fc 變體和突變體形式是本領域熟知的，並且包括在 234 和 235

位的氨基酸取代、在 265 位的取代或在 297 位的取代(見，例如，US 專利號 5,624,821，通過引用併入本文)。在優選的實施方式中，本發明的 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體的第一和/或第三多肽鏈的 CH2-CH3 結構域包括在 234 位元用丙氨酸的取代和在 235 位用丙氨酸的取代。

【0127】 第一和第三多肽鏈的 CH2 和/或 CH3 結構域不需要序列相同，並且有利地被修飾以促進兩條多肽鏈之間的複合。例如，氨基酸取代(優選以包括形成“杵”的大側基的氨基酸例如色氨酸進行取代)可被引入 CH2 或 CH3 結構域中，以便空間干擾將防止與類似的突變結構域的相互作用並將迫使突變的結構域與互補或適應性突變已經被工程化到其中的結構域——即“臼(hole)” (例如，用甘氨酸取代)——配對。這樣的突變組可被工程化到構成雙特異性單價 Fc 雙抗體分子的任意對的多肽中，並且進一步地被工程化到所述對的多肽鏈的任何部分中。蛋白質工程化以相對於同源二聚化利於異源二聚化的方法在本領域中是悉知的，尤其就工程化免疫球蛋白樣分子而言，這些都包括在本文中(見例如，Ridgway 等(1996) “‘Knobs-Into-Holes’ Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization,” Protein Engr. 9:617-621；Atwell 等(1997) “Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library,” J. Mol. Biol. 270: 26-35；和 Xie 等(2005) “A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis,” J. Immunol. Methods 296:95-101；其每一篇通過引用以其整體併入本文)。優選地，“杵”被工程化至第一多肽鏈的 CH2-CH3 結構域中和“臼”被工程化至第三多肽鏈的 CH2-CH3 結構域中。因此，“杵”有助於防止第一多肽鏈經其 CH2 和/或 CH3 結構域而同源二聚化。因為第三多肽鏈優選地包含“臼”取代，其將與第一多肽鏈異源二聚化以及和本身同源二聚化。通過修飾天然 IgG Fc 結構域以包含修飾 T366W 而產生優選的杵。通過修飾天然 IgG Fc 結構域以

包含修飾 T366S、L368A 和 Y407V 而產生優選的白。為了有助於從包括第一、第二和第三多肽鏈的最終雙特異性單價 Fc 雙抗體純化第三多肽鏈同源二聚體，第三多肽鏈的 CH2 和 CH3 結構域的蛋白質 A 結合位點優選地通過在 435 位的氨基酸取代(H435R)而被突變。因此，第三多肽鏈同源二聚體將不結合蛋白 A，而雙特異性單價 Fc 雙抗體經在第一多肽鏈上的蛋白質 A 結合位點保持其結合蛋白 A 的能力。

【0128】 本發明的 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體的第一多肽鏈的 CH2 和 CH3 結構域的優選的序列具有“**包含杵的**”序列(SEQ ID NO:15)：

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
 PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK

【0129】 本發明的 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體的第三多肽鏈的 CH2 和 CH3 結構域的優選的序列具有“**包含白的**”序列(SEQ ID NO:16)：

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
 PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLVSKL
 TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNRYTQKS LSLSPGK

【0130】 如敘述的，SEQ ID NO:15 和 SEQ ID NO:16 的 CH2-CH3 結構域包括在 234 位元丙氨酸的取代和在 235 位丙氨酸的取代，因此形成的 Fc 結構域，其展示對 FcγRIA (CD64)、FcγRIIA (CD32A)、FcγRIIB (CD32B)、FcγRIIIA (CD16a) 或 FcγRIIIB (CD16b) 降低的(或基本上沒有)結合(相對於野生型 Fc 區域展示的結合(SEQ ID NO:14))。

【0131】 優選地，第一多肽鏈具有“**包含杵的**”CH2-CH3 序列，比如 SEQ ID

NO:15 的序列。但是，如將認識到，“包含白的”CH2-CH3 結構域(例如，SEQ ID NO:16)可在第一多肽鏈中使用，在該情況下，“包含杵的”CH2-CH3 結構域(例如，SEQ ID NO:15)將用在第三多肽鏈中。

【0132】 5.優選的 CD19 可變結構域

【0133】 可根據本發明使用任何抗 CD19 抗體的輕鏈可變結構域的抗原-結合結構域。但是，優選地，這類 VL_{CD19} 結構域具有氨基酸序列(SEQ ID NO:17)：

ENVLTQSPAT LSVTPGEKAT ITCRASQSVS YMHWYQQKPG QAPRLLIYDA
SNRASGVPSR FSGSGSGTDH TLTISSEAE DAATYYCFQG SVYPFTFGQG
 TKLEIK

其中加底線的序列分別是其 CDR1、CDR2 和 CDR3：

VL_{CD19} CDR1: RASQSVSYMH(SEQ ID NO:18)

VL_{CD19} CDR2: DASNRAS (SEQ ID NO:19)

VL_{CD19} CDR3: FQGSVYPFT (SEQ ID NO:20)

【0134】 同樣地，可根據本發明使用任何抗 CD19 抗體的重鏈可變結構域的抗原-結合結構域。但是，優選地，這類 VH_{CD19} 結構域具有氨基酸序列(SEQ ID NO:21)：

QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSL TSGMGVGWIR QPPGKALEWL
AHIWWDDDKR YNPALKSRILT ISKDTSKNQV FLTMTNMDPV DTATYYCARM
ELWSYYFDYW GQGTITVTSS

其中加底線的序列分別是其 CDR1、CDR2 和 CDR3：

VH_{CD19} CDR1: TSGMGVG (SEQ ID NO:22)

VH_{CD19} CDR2: HIWWDDDKRYNPALKS (SEQ ID NO:23)

VH_{CD19} CDR3: MELWSYYFDY (SEQ ID NO:24)

【0135】 6.優選的 CD3 可變結構域

【0136】 可根據本發明使用任何抗 CD3 抗體的輕鏈可變結構域的抗原-結合結構域。但是，優選地，這類 VL_{CD3} 結構域具有氨基酸序列(SEQ ID NO:25)：

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG

其中加底線的序列分別是其 CDR1、CDR2 和 CDR3：

VL_{CD3} CDR1: RSSTGAVTTTSNYAN (SEQ ID NO:26)

VL_{CD3} CDR2: GTNKRAP (SEQ ID NO:27)

VL_{CD3} CDR3: ALWYSNLWV (SEQ ID NO:28)

【0137】 同樣地，可根據本發明使用任何抗 CD3 抗體的重鏈可變結構域的抗原-結合結構域。但是，優選地，這類 VH_{CD3} 結構域具有氨基酸序列(SEQ ID NO:29)：

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
IRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

其中加底線的序列分別是其 CDR1、CDR2 和 CDR3：

VH_{CD3} CDR1: TYAMN (SEQ ID NO:30)

VH_{CD3} CDR2: RIRSKYNNYATYYADSVKG (SEQ ID NO:31)

VH_{CD3} CDR3: HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO:32)

【0138】 7.任選的白蛋白-結合結構域

【0139】 如在 WO 2012/018687 中公開，為了進一步提高發明的 CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體和 CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體 Fc 雙抗體的體內藥物代謝動力學特性，這樣的雙抗體可被修飾，以在雙抗體的一個或多個末端處包含血清結合蛋白的多肽部分。最優選地，血清結合蛋白的這類多肽部分設置

在雙抗體的 C-末端。為了該目的，血清-結合蛋白尤其優選的多肽部分是來自鏈球菌蛋白質 G 的白蛋白-結合結構域(ABD)。鏈球菌屬(*Streptococcus*)菌株 G148 的蛋白質 G 的白蛋白結合結構域 3 (ABD3)是尤其優選的。

【0140】 鏈球菌屬菌株 G148 的蛋白質 G 的白蛋白-結合結構域 3 (ABD3)由形成穩定三-螺旋束的 46 個氨基酸殘基組成並且具有廣泛的白蛋白-結合特異性 (Johansson, M.U.等(2002) “*Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules,*” J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120)。白蛋白是血漿中最豐富的蛋白質並且在人中半衰期為 19 天。白蛋白具有若干小的分子結合位點，這允許其非共價結合其他蛋白質並且從而延長它們的血清半衰期。

【0141】 因此，具有白蛋白-結合結構域的這類 CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體或雙特異性單價 Fc 雙抗體的第二多肽鏈包含連接體(連接體 4)，其將這類多肽鏈的 E-螺旋(或 K-螺旋)與白蛋白-結合結構域分開。這類連接體 4 的優選的序列是 SEQ ID NO:33：GGGS。優選的白蛋白-結合結構域(ABD)具有序列(SEQ ID NO:34)：

LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLIDNAKSAEGVKALIDEILAAPL。

【0142】 C.示例性 CD19x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體，“DART-A”

【0143】 本發明提供了能夠同時和特異性結合 CD19 和 CD3 的示例性 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體。該示例性雙抗體表示為“DART-A”。發現本發明的雙抗體相對於其他 CD19x CD3 雙抗體展示增強的功能活性。

【0144】 如上敘述的，本發明的 CD19x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體包括三條多肽鏈。DART-A 的第一多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括 N-末端、能夠結合 CD19 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{CD19}) (SEQ ID NO:17)、間插連接體肽(連接體 1；GGGSGGGG (SEQ ID NO:1))、能夠結合 CD3 的單克隆抗體的 VH 結構域 (VH_{CD3}) (SEQ ID NO:29)、間插連接體肽(連接體 2；ASTKG (SEQ ID

NO:2))、異源二聚體促進(E-螺旋)結構域(**EVAACEk-**EVAALEk-EVAALEk-EVAALEk (SEQ ID NO:12))**、間插連接體肽(**間隔體-連接體 3**；GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:5))、包括“包含杵的”CH2 和 CH3 結構域的多肽(Fc 結構域序列，**SEQ ID NO:15**)和 C-末端。**

【0145】 因此，**DART-A** 的第一多肽鏈由以下構成：**SEQ ID NO:17—SEQ ID NO:1—SEQ ID NO:29—SEQ ID NO:2—SEQ ID NO:12—SEQ ID NO:5—SEQ ID NO:15**。

【0146】 **DART-A** 的第一多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:35**)：

```
ENVLTQSPAT LSVTPGEKAT ITCRASQSVS YMHWYQQKPG QAPRLLIYDA
SNRASGVPSR FSGSGSGTDH TLTISSEAE DAATYYCFQG SVYPFTFGQG
TKLEIKGGGS GGGGEVQLVE SGGGLVQPGG SLRLSCAASG FTFSTYAMNW
VRQAPGKGLE WVGRIRSKYN NYATYYADSV KGRFTISRDD SKNSLYLQMN
SLKTEDTAVY YCVRHGNFGN SYVSWFAYWG QGTLVTVSSA STKGEVAACE
KEVAALEKEV AALEKEVAAL EKGGGDKTHT CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP
KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL WCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP
PVLDSDSGFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP
GK
```

【0147】 編碼這類多肽的優選的多核苷酸是(**SEQ ID NO:36**)：

gagaatgtgc	tcacacagtc	ccctgcaact	ctgagcgtaa	ctccagggga
gaaggccacc	atcacgtgta	gagcctccca	gagtgtgagc	tacatgcact
ggtatcagca	gaaacctgga	caagctccca	ggttgctgat	ctatgacgcg
agcaaccggg	ctagtggcgt	tccatcccgg	ttttctggct	caggatctgg
cactgaccac	accctcacca	tatccagcct	tgaagccgaa	gatgccgcaa
cctactactg	ctttcagggg	agtgtgtatc	ccttcacatt	cggtcagggt
acaaagctgg	agattaaggg	tggaggatcc	ggcggcggag	gcgagggtgca
gctggtggag	tctgggggag	gcttggtcca	gcctggaggg	tcctgagac
tctcctgtgc	agcctctgga	ttcaccttca	gcacatacgc	tatgaattgg
gtccgccagg	ctccagggaa	ggggctggag	tgggttgga	ggatcaggtc
caagtacaac	aattatgcaa	cctactatgc	cgactctgtg	aagggtagat
tcaccatctc	aagagatgat	tcaaagaact	cactgtatct	gcaaataaac
agcctgaaaa	ccgaggacac	ggcgtgtat	tactgtgtga	gacacggtaa
cttcggcaat	tcttacgtgt	cttggtttgc	ttattgggga	caggggacac
tggtgactgt	gtcttccgcc	tccaccaagg	gcgaagtggc	cgcattgtgag

```

aaagaggttg ctgctttgga gaaggaggtc gctgcacttg aaaaggaggt
cgcagccctg gagaaaggcg gcggggacaa aactcacaca tgcccaccgt
gcccagcacc tgaagccgcg gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca
aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt
ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg
tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga
ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc
cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca
ggtcagcctg tgggtgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg
tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct
cccgtgctgg actccgacgg ctctttcttc ctctacagca agtcaccgt
ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc
atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa

```

【0148】 **DART-A** 的第二多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括 N-末端、能夠結合 CD3 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{CD3}) (SEQ ID NO:25)、間插連接體肽(連接體 1；GGSGGGG (SEQ ID NO:1))、能夠結合 CD19 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{CD19}) (SEQ ID NO:21)、間插連接體肽(連接體 2；ASTKG (SEQ ID NO:2))、異源二聚體促進 (K-螺旋) 結構域(KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:13))和 C-末端。

【0149】 因此，**DART-A** 的第二多肽鏈由以下構成：SEQ ID NO:25—SEQ ID NO:1—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:2—SEQ ID NO:13。

【0150】 **DART-A** 的第二多肽鏈的氨基酸序列是(SEQ ID NO:37)：

```

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDeadYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV TLRESGPALV KPTQTLTLTC TFSGFSLSTS
GMGVGWIRQP PGKALEWLAH IWWD DDKRYN PALKSRLTIS KDTSKNQVFL
TMTNMDPVDT ATYYCARMEL WSYYFDYWGQ GTTVTVSSAS TKGKVAACKE
KVAALKEKVA ALKEKVAALK E

```

【0151】 編碼這類多肽的優選的多核苷酸具有序列(SEQ ID NO:38)：

```

caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac
tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact
acgccaatg ggtgcagcag aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc

```

```

gggggtacaa acaaaagggc tccctggacc cctgcacggt tttctggaag
tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga ggggggtgat ccggcggagg
tggaacaggtg aactgagggg aatctggtcc agctctggtg aaacccactc
agacgctcac tctcacttgc accttttagtg ggttctcact gtccacatct
ggcatgggag taggctggat tcgacagcca cctgggaaag ccttgagtg
gcttgccac atctggtggg atgacgacaa gcggtataat cccgcactga
agagcagact gaccatcagc aaggatacat ccaagaacca ggtgtttctg
accatgacca acatggaccc tgtcgataca gccacctact attgtgctcg
catggagttg tggctcctact acttcgacta ttggggacaa ggcacaaccg
tgactgtctc atccgcctcc accaagggca aagtggccgc atgtaaggag
aaagttgctg ctttgaaaga gaaggtcgcc gcacttaagg aaaaggtcgc
agccctgaaa gag

```

【0152】 **DART-A** 的第三多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括 N-末端、肽(連接體 3；DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:4))、包括“包含白的” CH2 和 CH3 結構域的多肽(Fc 結構域序列，SEQ ID NO:16)和 C-末端。

【0153】 因此，**DART-A** 的第三多肽鏈由以下構成：SEQ ID NO:4—SEQ ID NO:16。

【0154】 **DART-A** 的第三多肽鏈的氨基酸序列是(SEQ ID NO:39)：

```

DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNKEYK
CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG
NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSPGK

```

【0155】 編碼這類多肽的優選的多核苷酸具有序列(SEQ ID NO:40)：

```

gacaaaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaag ccgcggggggg
accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct
cccggaacccc tgagggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac
cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc
caagacaaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca
gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc
caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat
cccgggagga gatgaccaag aaccagggtca gcctgagttg cgcagtcaaa
ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc
ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc gacggctcct
tcttcctcgt cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg

```

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accgctacac
gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a

【0156】 D.對照 DARTS

【0157】 為了更充分顯示本發明的 CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體的特性，構建了兩個對照 DARTS。第一對照 DART (“對照 DART 1”)能夠結合螢光素和 CD3。第二對照 DART (“對照 DART 2”)能夠結合螢光素和 CD19。

【0158】 用於形成對照 DART 1 和 2 的抗螢光素抗體是抗體 4-4-20 (Gruber, M.等(1994) “*Efficient Tumor Cell Lysis Mediated By A Bispecific Single Chain Antibody Expressed In Escherichia coli*,” J. Immunol. 152(11):5368-5374 ; Bedzyk, W.D.等(1989) “*Comparison Of Variable Region Primary Structures Within An Anti-Fluorescein Idiotypic Family*,” J. Biol. Chem. 264(3): 1565-1569)，用在對照雙抗體中。抗螢光素抗體 4-4-20 的輕鏈可變結構域和重鏈可變結構域的氨基酸序列如下：

【0159】 抗螢光素抗體 4-4-20 的輕鏈可變結構域的氨基酸序列(CDR 殘基加底線) (SEQ ID NO:41)：

DVVMTQTPFS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNGNTYLRW YLQKPGQSPK
VLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP
WTFGGGTKLE IK

【0160】 抗螢光素抗體 4-4-20 的重鏈可變結構域的氨基酸序列(CDR 殘基加底線)(SEQ ID NO:42)：

EVKLDETGGG LVQPGRPMKL SCVASGFTFS DYWMNWVRQS PEKGLEWVAQ
IRNKPYNYET YYSDSVKGRF TISRDDSKSS VYLQMNNLRV EDMGIYYCTG
SYGMDYWGQ GTSVTVSS

【0161】 1.對照 DART 1 (螢光素 x CD3)

【0162】 對照 DART 1 的第一多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括 N-末端、能夠結合螢光素的單克隆抗體的 VL 結構域(VL₄₋₄₋₂₀) (SEQ ID NO:41)、間插連接體肽(連接體 1；GGGSGGGG (SEQ ID NO:1))、能夠結合 CD3 的單克隆抗

體的 VH 結構域(VH_{CD3}) (SEQ ID NO:29)、間插連接體肽(連接體 2; ASTKG(SEQ ID NO:2))、異源二聚體促進 (E-螺旋) 結構域(EVAACKE-EVAALKE-EVAALKE-EVAALKE (SEQ ID NO:12))、間插連接體肽(間隔體-連接體 3; GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:5))，包括“包含杵的”CH2 和 CH3 結構域的多肽(Fc 結構域序列，SEQ ID NO:15)和 C-末端。

【0163】 因此，對照 DART 1 的第一多肽鏈由以下構成：SEQ ID NO:41—SEQ ID NO:1—SEQ ID NO:29—SEQ ID NO:2—SEQ ID NO:12—SEQ ID NO:5—SEQ ID NO:15。

【0164】 對照 DART 1 的第一多肽鏈的氨基酸序列是(SEQ ID NO:43)：

DVVMTQTPFS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNNGNTYLRW YLQKPGQSPK VLIYKVSNR
SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLG VYFCSQSTHVP WTFGGGTKLE IKGGGSGGGG
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT
YYADSVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNFGNSYVS WFAYWGQGT
LTVSSASTKG EVAACEKEVA ALEKEVAAL KEVAALEKGG GDKTHTCPPC PAPEAAGGPS
VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT
KNQVSLWCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK

【0165】 對照 DART 1 的第二多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括 N-末端、能夠結合 CD3 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{CD3}) (SEQ ID NO:25)、間插連接體肽(連接體 1; GGGSGGGG (SEQ ID NO:1))、能夠結合螢光素的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{螢光素}) (SEQ ID NO:42)、間插連接體肽(連接體 2; ASTKG(SEQ ID NO:2))、異源二聚體促進 (K-螺旋) 結構域(KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:13))和 C-末端。

【0166】 因此，對照 DART 1 的第二多肽鏈由以下構成：SEQ ID NO:25—SEQ ID NO:1—SEQ ID NO:42—SEQ ID NO:2—SEQ ID NO:13。

【0167】 對照 DART 1 的第二多肽鏈的氨基酸序列是(SEQ ID NO:44)：

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GG TNKRAPWT

PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV
 KLDETGGGLV QPGRPMKLSC VASGFTFSDY WMNWVRQSPE KGLEWVAQIR NKPYNYYETYY
 SDSVKGRFTI SRDDSKSSVY LQMNNLRVED MGIYYCTGSY YGMDYWGQGT SVTVSSASTK
 GKVAACEKV AALKEKVAAL KEKVAALKE

【0168】 對照 DART 1 的第三多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括 N-末端、肽(連接體 3；DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:4))、包括“包含白的”CH2 和 CH3 結構域的多肽(Fc 結構域序列，SEQ ID NO:16)和 C-末端。

【0169】 因此，對照 DART 1 的第三多肽鏈由以下構成：SEQ ID NO:4—SEQ ID NO:16。

【0170】 對照 DART 1 的第三多肽鏈的氨基酸序列是 SEQ ID NO:39)：

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSK
 LTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK

【0171】 2.對照 DART 2 (螢光素 x CD19)

【0172】 對照 DART 2 的第一多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括 N-末端、能夠結合 CD19 的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{CD19}) (SEQ ID NO:17)、間插連接體肽(連接體 1；GGGSGGGG (SEQ ID NO:1))、能夠結合螢光素的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{螢光素}) (SEQ ID NO:42)、間插連接體肽(連接體 2；ASTKG (SEQ ID NO:2))、異源二聚體促進 (E-螺旋) 結構域(EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:12))、間插連接體肽(間隔體-連接體 3；GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:5))、包括“包含杵的”CH2 和 CH3 結構域的多肽(Fc 結構域序列，SEQ ID NO:15)和 C-末端。

【0173】 因此，對照 DART 2 的第一多肽鏈由以下構成：SEQ ID NO:17—SEQ ID NO:1—SEQ ID NO:42—SEQ ID NO:2—SEQ ID NO:12—SEQ ID NO:5—SEQ ID NO:15。

【0174】 對照 DART 2 的第一多肽鏈的氨基酸序列是(SEQ ID NO:45)：

ENVLTQSPAT LSVTPGEKAT ITCRASQSVS YMHWYQQKPG QAPRLLIYDA SNRASGVPSR
 FSGSGSGTDH TLTISSEAE DAATYYCFQG SVYPFTFGQG TKLEIKGGGS GGGGEVKLDE
 TGGGLVQPGR PMKLSCVASG FTFSDYWMNW VRQSPEKGLE WVAQIRNKPY NYETYYSDSV
 KGRFTISRDD SKSSVYLQMN NLRVEDMGIY YCTGSYYGMD YWGQGTSTVTV SSASTKGEVA
 ACEKEVAAL KEVAALKEV AALEKGGGDK THTCPPCPAP EAAGGPSVFL FPPKPKDTLM
 ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSREEMTKNQ VSLWCLVKGF
 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMEAL
 HNHYTQKSL LSPGK

【0175】 對照 DART 2 的第二多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括 N-末端、能夠結合螢光素的單克隆抗體的 VL 結構域(VL_{螢光素}) (SEQ ID NO:41)、間插連接體肽(連接體 1；GGGSGGGG (SEQ ID NO:1))、能夠結合 CD3 的單克隆抗體的 VH 結構域(VH_{CD3}) (SEQ ID NO:29)、間插連接體肽(連接體 2；ASTKG(SEQ ID NO:2))、異源二聚體促進 (K-螺旋) 結構域(KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:11))和 C-末端。

【0176】 因此，對照 DART 2 的第二多肽鏈由以下構成：SEQ ID NO:41—SEQ ID NO:1—SEQ ID NO:29—SEQ ID NO:2—SEQ ID NO:13。

【0177】 對照 DART 2 的第二多肽鏈的氨基酸序列是(SEQ ID NO:46)：

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT
 PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV
 KLDETTGGGLV QPGRPMKLSC VASGFTFSDY WMNWVRQSPE KGLEWVAQIR NKPYN YETYY
 SDSVKGRFTI SRDDSKSSVY LQMNNLRVED MGIYYCTGSY YGMDYWGQGT SVTVSSASTK
 GKVAACKEKV AALKEKVAAL KEKVAALKE

【0178】 對照 DART 2 的第三多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括 N-末端、肽(連接體 3；DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:4))、包括“包含臼的”CH2 和 CH3 結構域的多肽(Fc 結構域序列，SEQ ID NO:16)和 C-末端。

【0179】 因此，對照 DART 2 的第三多肽鏈由以下構成：SEQ ID NO:4—SEQ ID NO:16。

【0180】 對照 DART 2 的第三多肽的氨基酸序列是 SEQ ID NO:39)：

DKTHTCPPCP APEAAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK

GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSPGK

【0181】 E.布魯頓酪氨酸激酶(BTK)抑制劑

【0182】 布魯頓酪氨酸激酶(BTK)是細胞質(非受體)酪氨酸-蛋白質激酶，其在 B-細胞成熟和肥大細胞啟動中起到關鍵作用。磷脂酰肌醇(3,4,5)-三磷酸(PIP3)結合並啟動 BTK，在 B-細胞信號傳導期間引發信號傳導事件級聯。在各種 B-細胞淋巴增殖性病變，包括慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、急性淋巴細胞白血病(ALL)、慢性髓性白血病(CML)、套細胞淋巴瘤(MCL)和彌散性大 B-細胞淋巴瘤(DLBCL)中，已經暗示了 BTK 活性的調節異常，(見，例如，Buggy, J.J.和 Elias, L. (2012) “*Bruton Tyrosine Kinase (BTK) And Its Role In B-Cell Malignancy*,” Int Rev Immunol. 31:119-32 ; Davis, R.E. 等 (2010) “*Chronic Active B-Cell-Receptor Signalling In Diffuse Large B-Cell Lymphoma*,” Nature 463:88–92 ; Goodman, P.A., 等(2003) “*Defective Expression Of Bruton’s Tyrosine Kinase In Acute Lymphoblastic Leukemia*,” Leuk. Lymphoma 44:1011–1018 ; Backesjo C.M., 等 (2002) “*Phosphorylation of Bruton’s tyrosine kinase by c-Abl*,” Biochem. Biophys. Res. Commun. 299:510–515)。已經批准了若干 BTK 抑制劑用於使用或正在開發用於治療血液學惡性腫瘤(見，例如，Akinleye, A.等, (2013) “*Ibrutinib And Novel BTK Inhibitors In Clinical Development*,” J. Hematol. Oncol. 6:59)。

【0183】 可在本發明的方法中使用的示例性 BTK 抑制劑包括但不限於依魯替尼(以 IMBRUVICA™銷售，CAS 登記號：936563-96-1, (1-[(3R)-3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑並[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]丙-2-烯-1-酮)，Honigberg, L.A. (2010) “*The Bruton Tyrosine Kinase Inhibitor PCI-32765 Blocks B-Cell Activation And Is Efficacious In Models Of Autoimmune Disease And B-Cell Malignancy*,” Proc. Natl. Acad. Sci.(USA) 107:13075-80); **GDC-0834** (CAS 登記號：

1133432-46-8, ([R-N-(3-(6-(4-(1,4-二甲基-3-氧呋嗪-2-基)苯基氨基)-4-甲基-5-氧-4,5-二氫吡嗪-2-基)-2-甲基苯基)-4,5,6,7-四氫苯並[b]噻吩-2-醯甲胺), Young, W.B. (2015) “*Potent and Selective Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors: Discovery Of GDC-0834,*” Bioorg Med Chem Lett. Mar 15;25(6):1333-7); **RN-486** (CAS 登記號: 1242156-23-5, (6-環丙基-8-氟-2-(2-羥甲基-3-{1-甲基-5-[5-(4-甲基-呋嗪-1-基)-吡啶-2-基氨基]-6-氧-1,6-二氫-吡啶-3-基}-苯基)-2H-異喹啉-1-酮), Xu, D.等(2012) “*RN486, A Selective Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor, Abrogates Immune Hypersensitivity Responses And Arthritis In Rodents,*” J. Pharmacol. Exp. Ther. 341:90-103); **CGI-560** (CAS 登記號: 845269-74-1, (4-(叔丁基)-N-(3-(8-(苯基氨基)咪唑並[1,2-a]吡嗪-6-基)苯基)苯甲醯胺), Di Paolo, J.A.等(2011) “*Specific Btk Inhibition Suppresses B Cell- And Myeloid Cell-Mediated Arthritis,*” Nat. Chem. Biol. 7:41-50); **CGI-1746** (CAS 登記號: 910232-84-7, (4-叔丁基-N-[2-甲基-3-[4-甲基-6-[4-(嗎啉-4-羰基)苯胺基]-5-氧吡嗪-2-基]苯基]苯甲醯胺), Di Paolo, J.A.等(2011) “*Specific Btk Inhibition Suppresses B Cell- And Myeloid Cell-Mediated Arthritis,*” Nat. Chem. Biol. 7:41-50); **HM-71224** (CAS 登記號: 1353550-13-6, (N-(3-((5-氟-2-((4-(2-甲氧基乙氧基)苯基)氨基)嘧啶-4-基)氨基)苯基)丙烯醯基-醯胺), Park, J.K.等(2014) “*THU0499 Hm71224, A Novel Oral BTK Inhibitor, Inhibits Human Immune Cell Activation: New Drug Candidate to Treat B-Cell Associated Autoimmune Diseases,*” Ann Rheum Dis. 73:355-356); **CC-292** (之前的 AVL-292, (N-(3-(5-氟-2-(4-(2-甲氧基乙氧基)苯基氨基)嘧啶-4-基氨基)苯基)丙烯醯基-醯胺), Evans, E.K. (2013) “*Inhibition of Btk with CC-292 Provides Early Pharmacodynamic Assessment of Activity in Mice and Humans,*” The J. of Pharmacol. 346:219-228); **ONO-4059** (CAS 登記號: 1351635-67-0, ((S)-9-(1-丙烯醯基呋啶-3-基)-6-氨基-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氫-8H-嘌呤-8-酮), Rule, S.等(2013) “*A Phase I Study Of The Oral Btk*

Inhibitor ONO-4059 In Patients With Relapsed/Refractory B-Cell Lymphoma,” Blood 122:4397 – 4397) ; **CNX-774**(CAS 登記號 : 1202759-32-7, (4-(4-((4-((3-丙烯醯胺基苯基)氨基)-5-氟嘧啶-2-基)氨基)苯氧基)-N-甲基吡啶醯胺), Labenski M., (2011) “*In Vitro Reactivity Assessment Of Covalent Drugs Targeting Bruton’s Tyrosine Kinase,*” 17th North Am Meet Int Soc Study Xenobiot (ISSX), Abst. P211) ; 和 **LFM-A13** (CAS 登記號 : 62004-35-7, (2-氰基-N-(2,5-二溴苯基)-3-羥基-2-丁烯醯胺(butenamide)), Uckun, F.M. (2002) “*In vivo Pharmacokinetic Features, Toxicity Profile, And Chemosensitizing Activity Of Alpha-Cyano-Beta-Hydroxy-Beta-Methyl-N-(2,5-Dibromophenyl)Propenamide (LFM-A13), A Novel Antileukemic Agent Targeting Bruton's Tyrosine Kinase,*” Clin Cancer Res. 8:1224-33)。

【0184】 F.藥物組合物

【0185】 本發明包括組合物,所述組合物包括 CD19 x CD3 雙特異性分子(例如, CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體)、BTK 抑制劑或這類分子的組合。本發明的組合物包括原料藥物組合物(bulk drug composition),其可用於製備藥物組合物(例如,不純或非無菌組合物)和可用於製備以單位劑型製劑被施用的藥物組合物(即,適於施用至受試者或患者的組合物)。這類組合物包括預防有效量或治療有效量的 CD19 x CD3 雙特異性分子(例如,本發明的 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體)、BTK 抑制劑或這類劑和藥學上可接受的載體的組合。在優選的方面中,這類組合物基本上是純化的(即,基本上不含限制其作用或產生非期望的副作用的物質)。

【0186】 在僅僅施用單一的這類治療劑(例如,CD19 x CD3 雙特異性分子或 BTK 抑制劑)的情況下,接收受試者優選地還在之前被施用有效量的其他治療劑,以便在這樣的單一施用後,受試者已經接收了有效量的期望的 CD19 x CD3 雙特異性分子(例如,CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體)和有效量的 BTK 抑制劑二者。

最優選地，選擇施用這類治療劑的時機，以便同時實現每種這樣的治療劑的有效劑量。在待施用大於一種治療劑的情況下，可以相在的製劑中將劑配製在一起，或可將劑配製成單獨的組合物。因此，在一些實施方式中，CD19 x CD3 雙特異性分子(例如，CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體)和 BTK 抑制劑(例如，依魯替尼)在相同的藥物組合物中被配製在一起。在優選的實施方式中，分子在單獨的藥物組合物中被配製。

【0187】 本發明包括組合物，所述組合物包括預防有效量或治療有效量的 CD19 x CD3 雙特異性分子(例如，CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體)和藥學上可接受的載體，該組合物聯合包括預防有效量或治療有效量的 BTK 抑制劑(例如，依魯替尼)和藥學上可接受的載體的組合物被使用。

【0188】 本發明也包括藥物組合物，所述藥物組合物包括 CD19 x CD3 雙特異性分子(例如，本發明的 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體，尤其是 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體)，和對於具體的癌症抗原特異性的第二治療性抗體(例如，腫瘤特異性單克隆抗體)，以及藥學上可接受的載體。

【0189】 在具體的實施方式中，術語“藥學上可接受的”表示獲得聯邦政府或州政府管理機構的許可或列於美國藥典(U.S. Pharmacopeia)或其他通常獲得認可的藥典中，供用於動物，特別是用於人類。術語“載體”指與治療劑一起施用的稀釋劑、佐劑(例如弗氏佐劑(完全和不完全)、賦形劑或媒介。這類藥學載體可以是無菌液體，如水和油，包括石油、動物油、植物油或合成來源的油，如花生油、大豆油、礦物油、芝麻油等。當靜脈內施用藥物組合物時，水是優選的載體。鹽水溶液和含水右旋糖以及甘油溶液也可以用作液體載體，特別是對於可注射溶液而言。合適的藥用賦形劑包括澱粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明膠、麥芽、米、麵粉、白堊、矽膠、硬脂酸鈉、單硬脂酸甘油酯、滑石、氯化鈉、脫脂乳粉(dried skim milk)、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。若需要，

組合物也可以含有小量濕潤劑或乳化劑或 pH 緩衝劑。這些組合物可以採用溶液、懸液、乳液、片劑、丸劑、膠囊、粉劑、緩釋製劑等形式。

【0190】 一般而言，本發明組合物的成分被單獨提供或以單位劑型混合在一起，例如作為標明活性劑的量的密封容器中的凍乾粉或無水濃縮物，所述密封容器如安瓿或小袋(sachette)。當通過輸注施用組合物時，其可以用含有無菌的藥學級水或鹽水的輸注瓶分配。如果通過注射施用所述組合物，則可以提供一安瓿注射用無菌水或鹽水，以便可以在施用前混合所述成分。

【0191】 可以將本發明的組合物配製為中性或鹽形式。藥學上可接受的鹽包括但不限於用陰離子形成的鹽以及用陽離子形成的鹽，所述陰離子例如來源於鹽酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的陰離子，並且所述陽離子例如來自氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫氧化銨、氫氧化鈣、氫氧化鐵、異丙胺、三乙胺、2-乙基氨基乙醇、組氨酸、普魯卡因等的陽離子。

【0192】 本發明也提供了藥學包裝或試劑盒，其包括一個或多個容器，所述容器填充本發明的 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體(尤其是 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體)，單獨地或聯合這類藥學上可接受的載體。另外，用於治療疾病的一種或多種其他預防性或治療劑也可包括在藥學包裝或試劑盒中。本發明也提供了藥學包裝或試劑盒，其包括一個或多個容器，所述容器填充一種或多種本發明的藥物組合物的成分。尤其地，本發明提供了藥學包裝或試劑盒，其包括一個或多個容器，所述容器填充本發明的 CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體(尤其是 CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體)，單獨地或聯合這類藥學上可接受的載體，和其包括一個或多個容器，所述容器填充 BTK 抑制劑(尤其是依魯替尼)，單獨地或結合這類藥學上可接受的載體。任選地與這類容器(一個或多個)關聯的可以是管理藥物或生物產品的製造、使用或銷售的政府機構規定的形式的佈告(notice)，所述佈告反映了管理機構許可用於人類施用的製造、使用或銷售。

【0193】 本發明提供了可用於上述方法的試劑盒。試劑盒可包括 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體，更優選地，本發明的 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體。試劑盒可在一個或多個容器中進一步包括一種或多種用於治療癌症的其他預防性和/或治療劑，優選地 BTK 抑制劑。

【0194】 G.施用方法

【0195】 可提供包括 CD19 x CD3 雙特異性分子和 BTK 抑制劑的聯合療法，用於通過向受試者施用有效量的這類組合或包括其的藥物組合物(一種或多種)而治療、預防和緩解與癌症或其他疾病或病症有關的一個或多個症狀。在下面的任何實施方式中，疾病優選地與 CD19 的表達相關或特徵在於 CD19 的表達。

【0196】 如本文所使用，術語“組合(聯合，combination)”指使用大於一種治療劑(例如，CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體和 BTK 抑制劑)。術語“組合”的使用不限制將治療劑施用至患疾病的受試者的順序，也不意味著在精確的同一時間施用劑，而是其意思是按順序和在一定的時間隔內向受試者施用劑，以便劑可同時發揮作用，以相對於在以其他方式施用這些劑的情況下實現的益處而提供增加的益處。例如，每種治療劑(例如，CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體和 BTK 抑制劑)可同時或以任何順序相繼施用和/或在不同的時間點施用，以便提供期望的治療效果或預防效果。此外，每種劑不需要在整個治療療程中施用。例如，兩種劑可都被施用一段時間，之後中止一種劑。可分別施用每種治療劑——以任何適當的形式和通過任何適當的途徑，例如，一種通過口服途徑和一種通過腸胃外被施用。

【0197】 通過向受試者施用有效量的本發明的融合蛋白或綴合分子或包括本發明的融合蛋白或綴合分子的藥物組合物，本發明的方法可用於治療、預防和改善與疾病、病症或感染相關的一種或多種症狀。在優選的方面，這類組合物基本上是純的(即，基本上不含限制其效果或產生不期望的副作用的物質)。在

具體實施方式中，受試者是動物，優選哺乳動物，如非靈長類(例如牛、馬、貓科動物、犬科動物、齧齒動物等)或靈長類(例如，猴子，如食蟹猴、人等)。在優選的實施方式中，受試者是人患者。

【0198】 各種遞送系統是已知的並且可用於施用 CD19 x CD3 雙特異性分子和 BTK 抑制劑，例如封裝於脂質體中、微粒、微膠囊、能表達抗體或融合蛋白的重組細胞、受體介導的內吞作用(見，例如，Wu 等(1987) “*Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System*,” J. Biol. Chem. 262:4429-4432)、構建核酸作為逆轉錄病毒或其他載體的一部分等。

【0199】 施用本發明分子的方法包括但不限於腸胃外施用(例如，皮內、肌內、腹膜內、靜脈內和皮下)、硬膜外和粘膜(例如，鼻內和口腔途徑)。在具體的實施方式中，肌內、靜脈內或皮下施用本發明的 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體或 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體。在具體的實施方式中，口服、肌內、靜脈內或皮下施用 BTK 抑制劑(優選依魯替尼)。這類分子可通過任何常規途徑被施用，例如，通過輸注或彈丸注射、通過上皮或黏膜皮膚被覆(lining)(例如口腔粘膜、直腸和腸粘膜等)吸收，並且可以與其他生物活性劑一起施用。給藥可以是全身的或局部的。另外，也可以應用肺給藥，例如通過使用吸入器或噴霧器，並且與霧化劑一起配製。見，例如，美國專利號 6,019,968、5,985,320、5,985,309、5,934,272、5,874,064、5,855,913、5,290,540 和 4,880,078；和 PCT 公佈號 WO 92/19244、WO 97/32572、WO 97/44013、WO 98/31346；和 WO 99/66903，其每一篇通過引用以其整體併入本文。

【0200】 本發明也使得本發明的 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體(尤其是 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體)包裝在密封容器中，比如指示分子的量的安瓿或小袋中。在一個實施方式中，本發明的 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體作為凍幹無菌粉或無水濃縮物提供於密封容器中，並且可以用例如水或鹽水重

構至適當濃度，用於施用於受試者。優選地，本發明的 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體以至少 5 µg、更優選地至少 10 µg、至少 15 µg、至少 25 µg、至少 50 µg、至少 100 µg 或至少 200 µg 的單位劑量，作為乾燥凍幹無菌粉提供於密封容器中。

【0201】 本發明凍幹的 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體或 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體應在它們初始容器中儲存在 2 和 8°C 之間，並且分子應在重構之後的 12 小時內，優選地 6 小時內、5 小時內、3 小時內，或 1 小時內施用。在可選的實施方式中，本發明的 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體以液體形式提供在指示分子、融合蛋白或綴合分子的量和濃度的密封容器中。優選地，本發明的液體形式的 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體被供應在密封容器中，其中分子以至少 1 µg/ml，更優選地至少 2.5 µg/ml、至少 5 µg/ml、至少 10 µg/ml、至少 50 µg/ml 或至少 100 µg/ml 的濃度存在。

【0202】 在本發明的方法中施用的有效治療、預防或改善與病症相關的一個或多個症狀的每種分子的量可通過標準臨床技術確定。製劑中採用的精確劑量還將取決於施用的路徑和病況的嚴重性，並且應根據從業者的判斷和每個患者的情況決定。有效的劑量可從源自體外或動物模型測試系統的劑量回應曲線推斷。

【0203】 如本文提供的，CD19 x CD3 雙特異性分子和 BTK 抑制劑可以以不同的劑量、不同的濃度、不同的次數和/或以不同的時刻表施用。

【0204】 對於本發明包括的 BTK 抑制劑，向患者施用的劑量可基於接收受試者的體重(kg)確定。可選地，向患者施用固定劑量的 BTK 抑制劑，無論體重如何。在某些實施方式中，每天一次、每天兩次、每天三次或每天更多次施用 BTK 抑制劑。施用 BTK 抑制劑的劑量和途徑取決於適應症和/或施用的具體 BTK 而變化，並且可容易由本領域技術人員確定。例如，依魯替尼通常每天口服施

用一次，劑量在 420-560 mg 之間，但是在出現不良反應的情況下，這類給藥可降低至每天口服一次，劑量在 140-280 mg 之間(依魯替尼包裝插入物(Insert))。

【0205】 對於本發明包括的 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體，或 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體，優選地基於接收受試者的體重(kg)決定向患者施用的劑量。施用的本發明 CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體或 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體的劑量通常是至少約 0.3 ng/kg/天至約 0.9 ng/kg/天、至少約 1 ng/kg/天至約 3 ng/kg/天、至少約 3 ng/kg/天至約 9 ng/kg/天、至少約 10 ng/kg/天至約 30 ng/kg/天、至少約 30 ng/kg/天至約 90 ng/kg/天、至少約 100 ng/kg/天至約 300 ng/kg/天、至少約 200 ng/kg/天至約 600 ng/kg/天、至少約 300 ng/kg/天至約 900 ng/kg/天、至少約 400 ng/kg/天至約 800 ng/kg/天、至少約 500 ng/kg/天至約 1000 ng/kg/天、至少約 600 ng/kg/天至約 1000 ng/kg/天、至少約 700 ng/kg/天至約 1000 ng/kg/天、至少約 800 ng/kg/天至約 1000 ng/kg/天、至少約 900 ng/kg/天至約 1000 ng/kg/天，或至少約 1,000 ng/kg/天。

【0206】 在另一實施方式中，患者被施用治療方案，所述治療方案包括這類預防有效量或治療有效量的本發明包括的 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體(尤其是 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體)的一個或多個劑量，其中治療方案在 2 天內、3 天內、4 天內、5 天內、6 天內、7 天內或大於 7 天內施用。在某些實施方式中，治療方案包括間歇地施用預防有效量或治療有效量的本發明包括的 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體的劑量(例如，在給定周的第 1 天、第 2 天、第 3 天和第 4 天施用劑量，並且在相同周的第 5 天、第 6 天和第 7 天不施用本發明包括的預防有效量或治療有效量的 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體的劑量(尤其是 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體))。典型地，存在 1、2、3、4、5 或更多個治療療程。每個療程可以是相同的方案或不同的方案。

【0207】 在另一實施方式中，施用劑量在方案的前四分之一、前一半或前

三分之二或四分之三(例如，4 個療程治療的第一、第二或協力廠商案)中上升，直到實現每天預防有效量或治療有效量的本發明包括的 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體(尤其是 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體)。

【0208】 表 2 提供了上面針對典型的治療療程描述的 CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體(尤其是 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體)的不同給藥方案的 5 個例子。

表 2						
方案	天	雙抗體劑量(ng 雙抗體/kg 受試者體重/天)				
1	1、2、3、4	100	100	100	100	100
	5、6、7	無	無	無	無	無
2	1、2、3、4	300	500	700	900	1,000
	5、6、7	無	無	無	無	無
3	1、2、3、4	300	500	700	900	1,000
	5、6、7	無	無	無	無	無
4	1、2、3、4	300	500	700	900	1,000
	5、6、7	無	無	無	無	無

【0209】 施用本發明的 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體或 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體的劑量和頻率可通過修飾比如，例如，脂質化來增強 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體的吸收和組織滲透而被減少或改變。

【0210】 向患者施用的 CD19 x CD3 雙特異性分子(例如，本發明的 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體或 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體)和/或 BTK 抑制劑(例如，依魯替尼)的劑量可以與所述劑作為單劑療法施用而被使用時的劑量

相同。可選地，聯合使用的本發明的 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體或 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體和/或 BTK 抑制劑的劑量小於當所述分子用作單劑療法時的劑量。

【0211】 本發明的藥物組合物可被局部施用至需要治療的區域；這可通過例如，但不限於下述方式實現：局部注入、通過注射、或通過植入物的手段，所述植入物是多孔的、非多孔的或膠狀材料，包括膜，比如矽橡膠膜或纖維。優選地，當施用本發明的分子時，必須注意使用不吸收該分子的材料。

【0212】 本發明的組合物可在泡狀體(vesicle)，尤其是脂質體中遞送(見 Langer (1990) “*New Methods Of Drug Delivery*,” Science 249:1527-1533)；Treat 等，在 *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein 和 Fidler (編輯), Liss, New York, pp. 353- 365 (1989)中；Lopez-Berestein, 同上, pp. 317-327)。

【0213】 本發明的組合物可以在控釋或緩釋系統中遞送。本領域技術人員已知的任何技術均可用於產生包括本發明的一種或多種 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體的緩釋製劑。見，例如，美國專利號 4,526,938；PCT 公開 WO 91/05548；PCT 公開 WO 96/20698；Ning 等(1996) “*Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained -Release Gel*,” Radiotherapy & Oncology 39:179-189；Song 等(1995) “*Antibody Mediated Lung Targeting Of Long -Circulating Emulsions*,” PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372 - 397；Cleek 等(1997) “*Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application*,” Pro. Int’l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853 - 854；和 Lam 等(1997) “*Microencapsulation Of Recombinant*

Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery, "Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760，其每一篇通過引用以其整體併入本文。在一個實施方式中，泵可用於控釋系統(見 Langer, 上文；Sefton, (1987) "*Implantable Pumps*,"CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240；Buchwald 等(1980) "*Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis*," Surgery 88:507-516；和 Saudek 等(1989) "*A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery*,"N. Engl. J. Med. 321:574-579)。在另一實施方式中，聚合材料可用于實現分子的控釋(見例如，Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974)；Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (編輯), Wiley, New York (1984)；Levy 等(1985) "*Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate*,"Science 228:190-192；During 等(1989) "*Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization*," Ann. Neurol. 25:351-356；Howard 等 (1989) "*Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits*,"J. Neurosurg. 7(1):105-112)；美國專利號 5,679,377、美國專利號 5,916,597、美國專利號 5,912,015、美國專利號 5,989,463、美國專利號 5,128,326、PCT 公開號 WO 99/15154 和 PCT 公開號 WO 99/20253)。緩釋製劑中所用的聚合物的實例包括但不限於聚(甲基丙烯酸 2-羥乙酯)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸)、乙烯-乙烯基乙酸酯共聚物(poly(ethylene-co-vinyl acetate))、聚(甲基丙烯酸)、聚乙醇酸交酯(PLG)、聚酞、聚(N-乙基吡咯烷酮)、聚(乙烯醇)、聚丙烯醯胺、聚(乙二醇)、

聚交酯(PLA)、丙交酯-乙交酯共聚物(PLGA)以及聚原酸酯(polyorthoester)。控釋系統可接近治療靶(例如，肺)佈置，因此僅僅需要全身劑量的一部分(見，例如，Goodson, 在以下中：Medical Applications of Controlled Release, 上文, vol. 2，pp. 115-138 (1984))。根據 Dunn 等 (見 U.S. 5,945,155)，使用可用作控釋移植物的聚合物組合物。該特定方法基於聚合物系統中生物活性材料原位控釋的治療效果。移植可通常發生于患者身體內需要治療的任何地方。可使用非聚合物持續遞送系統，由此受試者身體內的非聚合物移植物被用作藥物遞送系統。一旦移植到身體中，移植物的有機溶劑會從組合物中消散、分散或滲漏到周圍組織流中，並且非聚合物材料會逐漸凝結或沉澱，形成固體微孔基質。

【0214】 Langer 的綜述中討論了控釋系統(1990, “*New Methods Of Drug Delivery*,” Science 249:1527-1533)。可以使用本領域技術人員已知的任何技術來產生包含本發明的一種或多種治療劑的緩釋製劑。見，例如美國專利號 4,526,938；國際公開號 WO 91/05548 和 WO 96/20698；Ning 等(1996) “*Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained - Release Gel*,” Radiotherapy & Oncology 39:179-189；Song 等(1995) “*Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions*,” PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397；Cleek 等(1997) “*Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application*,” Pro. Int’l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853 - 854；和 Lam 等 (1997) “*Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery*,” Proc. Int’l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760，其每一篇通過引用以其整體併入本文。

【0215】 在本發明的組合物是編碼本發明的 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體的核酸的情況下，可體內施用核酸，以通過如下方式促進其編碼的 CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體或 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體的表達：將其構建為適當的核酸表達載體的一部分並且施用其從而其成為細胞內的，例如，通過使用逆轉錄病毒載體(見美國專利號 4,980,286)，或通過直接注射，或通過使用微粒轟擊(例如，基因槍；生物彈道技術(Biolistic), Dupont)，或用脂質或細胞表面受體或轉染試劑包被，或通過與已知進入核的同源框樣肽聯合施用(見例如，Joliot 等 (1991) “*Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis*,” Proc. Natl. Acad.Sci. (U.S.A.) 88:1864-1868)等。可選地，可以將核酸引入細胞內並通過同源重組整合到宿主細胞 DNA 中，以進行表達。

【0216】 用治療或預防有效量的 CD19 x CD3 雙特異性分子(例如，CD19x CD3 雙特異性單價雙抗體(尤其是 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體))和治療或預防有效量的 BTK 抑制劑(例如，依魯替尼)的組合治療受試者可包括單治療或，優選地，可包括一系列治療。在優選的實施例中，用這樣的組合治療受試者，持續約 1 至 10 週，優選地 2 至 8 週，更優選地約 3 至 7 週，甚至更優選地約 4、5 或 6 週。本發明的藥物組合物可每天施用一次、一天兩次或一天三次。可選地，藥物組合物可每週施用一次、每週兩次、每兩週一次、每月一次、每六週一次、每兩個月一次、每年兩次或每年一次。也將認識到，用於治療的分子的有效劑量可隨著具體治療的療程而增加或降低。

【0217】 H.使用方法

【0218】 如本文提供的，CD19 x CD3 雙特異性分子可與 BTK 抑制劑聯合，用於患有癌症或其他疾病的受試者中的治療性目的。因此，本發明提供了治療

疾病(尤其是與 CD19 的表達相關或特徵在於 CD19 的表達的任何疾病或病況)的方法，包括向有需要的受試者施用 CD19 x CD3 雙特異性分子和 BTK 抑制劑。尤其地，本發明包括這樣的方法，其中，CD19 x CD3 雙特異性分子是如本文提供的 CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體或 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體，並且其中 BTK 抑制劑選自依魯替尼、GDC-0834、RN-486、CGI-1746、HM-71224、CC-292、ONO-4059、CNX-774 和 LFM-A13。在一種實施方式中，CD19 x CD3 雙特異性分子是 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體，並且 BTK 抑制劑是依魯替尼。

【0219】 在各種實施方式中，本發明包括用於治療、預防或管理受試者中的疾病或病症(尤其是與 CD19 的表達相關或特徵在於 CD19 的表達的任何疾病或病況)的方法和組合物，包括向受試者施用治療有效量的 CD19 x CD3 雙特異性分子聯合治療有效量的 BTK 抑制劑。

【0220】 在一種實施方式中，同時施用 CD19 x CD3 雙特異性分子和 BTK 抑制劑。如本文所使用，這樣的“同時”施用旨在表示：

(A)施用單藥物組合物，其包含 CD19 x CD3 雙特異性分子和 BTK 抑制劑；
或

(B)單獨施用兩種或更多種藥物組合物，其中一種組合物包含 CD19 x CD3 雙特異性分子，並且其中另一種組合物包含 BTK 抑制劑，其中組合物在一段時間(例如，24 小時時間段)內被施用，在所述一段時間中，CD19 x CD3 雙特異性分子和 BTK 抑制劑在接收受試者中均以治療有效的濃度、水準或量存在。

【0221】 在第二實施方式中，採用兩種不同的組合物，並且“相繼”施用組合物(例如，首先施用 BTK 抑制劑，並且，稍後施用 CD19 x CD3 雙特異性分子，

或反之亦然)。在這樣的相繼施用中，優選地在施用第一施用組合物之後的至少 24 小時或更長時間施用第二施用組合物。

【0222】 可通過本發明的各種方法和組合物治療的示例性病症包括但不限於與 CD19 的表達相關或特徵在於 CD19 的表達的任何疾病或病況。因此，不受限制的，這類方法和組合可用於治療急性髓細胞樣白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)，包括 CML 的胚危象和與 CML 相關的 Abelson 癌基因(Bcr-ABL 易位)、骨髓增生異常綜合征(MDS)、急性 B 成淋巴細胞白血病(B-ALL)、彌散性大 B 細胞淋巴瘤(DLBCL)、濾泡淋巴瘤、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)，包括 Richter 綜合症或 CLL 的 Richter 轉化、毛細胞白血病(HCL)、急性漿細胞樣樹突細胞腫瘤(BPDCN)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)，包括套細胞白血病(MCL)和小淋巴細胞淋巴瘤(SLL)、霍奇金淋巴瘤、系統性肥大細胞增多症，和伯基特淋巴瘤；自身免疫性狼瘡(SLE)、過敏症、哮喘和類風濕性關節炎。本發明的雙特異性單價雙抗體可另外用於製造用於治療上述病況的藥物。

【0223】 實施例

【0224】 現在已經大體上描述了本發明，通過參考下述實施例將更容易理解本發明，所述實施例通過示例的方式被提供而不旨在限制本發明，除非另外指出。

【0225】 實施例 1

【0226】 CD19 細胞表面表達的定量

【0227】 為了鑒定用於評估 CD19 x CD3 雙特異性雙抗體的生物活性的適當的靶細胞系，首先使用定量 FACS (QFACS)確認一系列人 B-細胞淋巴瘤/白血病細胞系，包括 Nalm-6 (急性淋巴細胞白血病)、Raji (伯基特淋巴瘤)、Daudi (伯

基特淋巴瘤)、HBL-2(套細胞淋巴瘤)、MEC-1 (慢性淋巴細胞性白血病)和 Jeko-1 (套細胞淋巴瘤)、MOLM-13 (急性髓細胞樣白血病細胞系)、JIMT1 (乳腺癌)和 Colo205 (結腸癌), 上的 CD19 細胞表面表達水準。使用 QFACS 試劑盒計算表面上的 CD19 抗體結合位點的絕對數。如表 3 中顯示, 細胞系上 CD19 結合位點的絕對數為下述順序: Raji (高) > Nalm-6 (中等) > Daudi (中等) > HBL2 (中等) > MEC-1 (低) > Jeko-1 (低)。如預期的, MOLM-3、JIMT-1 和 Colo205 缺少 CD19 表達, 這與 CD19 是 B-細胞特異性抗原一致。

表 3	
靶細胞系	CD19 表面表達 (抗體結合位點)
Raji	670,322
Nalm-6	442,730
Daudi	369,860
HBL-2	334,725
MEC-1	177,025
Jeko-1	124,396

【0228】 實施例 2

【0229】 結合親和力

【0230】 為了量化 CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體和人或食蟹猴 CD3 之間的結合程度, 使用示例性 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體, **DART-A** 進行 BIACORE™ 分析。BIACORE™ 分析測量解離速率, k_d 。根據下式: $KD =$

$[kd]/[ka]$ ，抗體和其靶標之間的結合親和力(KD)隨著針對結合(結合速率(on rate)， k_a)和解離(解離速率(off-rate)， kd)的動力學常數而變化。BIAcore™ 分析使用表面等離子共振，以直接測量這些動力學參數。

【0231】 通過表面等離子共振(SPR)技術(BIAcore)分析的 **DART-A** (0-100 nM)與可溶性人和食蟹猴 CD3 和 CD19 的結合的結果顯示在表 4 中。

【0232】 對於人和食蟹猴 CD3，**DART-A** 的結合親和力是類似的(分別為 $KD = 21.2 \text{ nM}$ 和 21.9 nM)。但是，**DART-A** 對於食蟹猴 CD19 比對於人 CD19 的親和力低大約 10 倍(分別為 $KD = 20.3 \text{ nM}$ 和 2.0 nM)，原因是來自食蟹猴 CD19 增加的解離速率常數(kd)。食蟹猴仍是用於毒理學評估的相關物種，儘管應考慮 CD19 結合親和力的差異。

表 4			
抗原	$ka (\pm SD)$ ($M^{-1}s^{-1}$)	$kd (\pm SD)$ (s^{-1})	$KD (\pm SD)$ (nM)
人 CD3 ϵ/δ	2.2×10^5	$4.5 (\pm 0.1) \times 10^{-3}$	$21.2 (\pm 1.7)$
食蟹猴 CD3 ϵ/δ	$2.0 (\pm 0.1) \times 10^5$	$4.3 (\pm 0.2) \times 10^{-3}$	$21.9 (\pm 1.2)$
人 CD19-His	$2.8 (\pm 0.3) \times 10^5$	$5.6 (\pm 0.6) \times 10^{-4}$	$2.0 (\pm 0.2)$
食蟹猴 CD19-His	$2.4 (\pm 0.1) \times 10^5$	$4.7 (\pm 1.1) \times 10^{-3}$	$20.3 (\pm 1.3)$

【0233】 實施例 3

【0234】 細胞結合特徵

【0235】 通過流式細胞術體外評估與小鼠、大鼠、兔子、食蟹猴和人血液白細胞(從全血純化)的結合的 **DART-A**。將白細胞與 **DART-A** 以及對照 **DART 1**

和**對照 DART 2**，以 25 或 100 nM 的濃度一起染色，約 1 小時。**對照 DART 2** 包含與 **DART-A** 相同的 CD19 結合組分，而**對照 DART 1** 包含與 **DART-A** 相同的 CD3 結合組分。溫育之後，用識別 DART 蛋白質的 EK 螺旋異源二聚化區域的抗 E-螺旋/K-螺旋(EK) mAb 檢測結合至白細胞的 DART 蛋白質。在小鼠、大鼠或兔子血液白細胞上沒有觀察到 **DART-A** 結合。同樣地，對照 DART 雙抗體也不顯示與小鼠、大鼠或兔子白細胞的任何結合。如預期的，測試的兩種濃度的 **DART-A** 顯示與人和食蟹猴血液白細胞的特異性結合。

【0236】 雙功能 ELISA 試驗用於表明 **DART-A** 與兩個靶標抗原的同時接合。ELISA 平板被包被以可溶性人 CD3 ϵ/δ 異源二聚體，並且在 4C 溫育過夜，然後用 BSA 封閉。添加各種濃度的 **DART-A**，隨後添加可溶性人 CD19-生物素。洗滌平板，並且用綴合鏈黴抗生物素的化學發光底物檢測免疫複合物。如圖 3 中顯示，**DART-A** 能夠同時結合 CD19 和 CD3。

【0237】 通過流式細胞術，在食蟹猴和人血液白細胞(從全血純化的)中進一步評估 **DART-A** 的雙特異性結合。將白細胞與 0.005 至 80 nM 範圍的濃度的 **DART-A**、**對照 DART 1** 或**對照 DART 2** 一起染色，約 1 小時。溫育之後，使用識別 DART 蛋白質的 EK 螺旋異源二聚化區域和鏈黴抗生物素-PE 的生物素化的抗 E-螺旋/K-螺旋(EK) mAb 檢測與白細胞的結合。因為 **DART-A** 結合 CD3, CD4 和 CD8 的組合用於定義 T 細胞群體。類似地，CD20 代替 CD19 被用作 B 細胞標記物。所以，在該研究中，CD4⁺和 CD8⁺設門的事件表示 T 細胞群體，並且 CD20⁺設門的事件表示 B 細胞群體。**DART-A** 表明與人和食蟹猴 B 細胞和 T 細胞的雙特異性結合。相比之下，對照 DART 雙抗體顯示與 B 細胞(**對照 DART 2**) 或 T 細胞(**對照 DART 1**)的僅僅單-特異性結合，與它們相應的結合特異性一致。

針對人和食蟹猴 B 和 T 細胞的 **DART-A** 和對照 DART 雙抗體結合滴定曲線提供在圖 4A-4B 和圖 5A-5B 中。

【0238】 實施例 4

【0239】 使用人 T 細胞進行 **DART-A** 介導的對靶腫瘤細胞的重定向殺傷

【0240】 使用純化的人原代 T 細胞作為效應細胞，針對展示一定範圍 CD19 表達的 3 個靶 B 淋巴瘤細胞系——Raji/GF (伯基特淋巴瘤)、HBL-2 (套細胞淋巴瘤)和 Jeko-1 (套細胞淋巴瘤)評估 **DART-A** 介導重定向靶細胞殺傷的能力。Raji/GF 細胞顯示最高水準的 CD19 表達，隨後 HBL-2 細胞顯示中等水準的 CD19 表達，和 Jeko-1 細胞顯示更低水準的 CD19 表達。使用乳酸脫氫酶(LDH)釋放試驗測量靶腫瘤細胞殺傷，在所述試驗中定量測量細胞死亡後從細胞釋放的 LDH 的酶活性，或通過螢光素酶試驗測量靶腫瘤細胞殺傷，其中螢光素酶相對光單位(RLU)是指示Raji/GF 靶細胞的相對生活力的讀數，所述靶細胞已經被工程化，以表達綠色螢光蛋白(GFP)和螢光素酶報告基因。

【0241】 當以 10:1 的效應子與靶 (E:T)細胞比使用來自多個獨立人供體的純化的 T 細胞時，**DART-A** 在所有 3 個細胞系中均展示有效的重定向細胞殺傷(圖 6A-6C)。對於 HBL-2 細胞，在 50%的最大活性(EC_{50})值的平均有效濃度是 1.05×10^{-1} pM；對於 Raji/GF 細胞是 3.07×10^{-1} pM；和對於 Jeko-1 細胞是 1.46×10^{-1} pM (表 5)。對照 **DART 1** 不介導靶細胞的 T 細胞重定向殺傷。最重要地，在不表達 CD19 的細胞系(Molm-13 和 Colo205)中沒有觀察到細胞殺傷活性(圖 6D-6F)。

表 5

在不同的 E:T 細胞比例，代表性 **DART-A** 介導的對靶 Raji/GF 細胞的重定向殺傷的 EC_{50} 值的總結

	E:T = 10:1		E:T = 5:1		E:T = 2.5:1	
細胞毒性	EC ₅₀ (pM)	E _{最大} (%)	EC ₅₀ (pM)	E _{最大} (%)	EC ₅₀ (pM)	E _{最大} (%)
24 小時	0.14	63	0.67	24	N/A	4
48 小時	0.0441	73	0.38	48	1.08	11

【0242】 為了評估 **DART-A** 在存在較少量效應細胞的情況下的活性，在與 **DART-A** 溫育 24 至 96 小時之後，以 5:1、2.5:1 和 1:1 的較低的 E:T 細胞比例，在 Raji/GF 細胞中測試重定向細胞殺傷。在 5:1 的比例觀察的細胞毒性活性大約是在 10:1 比例觀察到的最大活性的一半；以 2.5:1 的 E:T 細胞比例，在 24 和 48 小時時間點也都觀察到了較低的特異性活性(圖 7A-7D 和表 5)。溫育 72 或 96 小時之後，在 2.5:1 和 1:1 比例，Raji/GF 細胞的細胞毒性明顯增加(見圖 8A-8D 和表 6)。值得注意的是，在較低的 E:T 細胞比例，Raji/GF 細胞中的有效的細胞裂解隨著時間的推移而增加，表明通過 **DART-A**-啟動的 T 細胞的連續靶細胞殺傷。動力學提示，時間是少量 T 細胞有效消除大量的靶細胞的限制因素。總之，來自使用來自不同供體的人 T 細胞的多個實驗的資料指示，**DART-A** 重定向細胞殺傷活性取決於 E:T 細胞比例時間，尤其在較低的 E:T 細胞比例的情況下。

表 6 在較低的 E:T 細胞比例，代表性 DART-A 介導的對靶 Raji/GF 細胞的重定向殺傷的 EC ₅₀ 值的總結				
	E:T = 2.5:1		E:T = 1:1	
細胞毒性	EC ₅₀ (pM)	E _{最大} (%)	EC ₅₀ (pM)	E _{最大} (%)

72 小時	1.54	64	2.79	33
96 小時	0.422	87	0.440	56

【0243】 實施例 5

【0244】 人和食蟹猴 PBMC 中 DART-A-介導的自體 B 細胞消除

【0245】 因為正常 B 細胞表達 CD19 並且因為 DART-A 被證明與食蟹猴 CD19 和 CD3 交叉反應(實施例 2，圖 4A-4B 和圖 5A-5B)，因此在人和食蟹猴外周血液單核細胞(PBMC)二者中研究 DART-A 介導的細胞毒性。在用 DART-A 治療之後，在人和食蟹猴 PBMC 中都觀察到了劑量依賴性 CD20+ B 細胞消除(圖 9A-9B)。如預期的，在用對照 DART 1 治療之後，沒有觀察到 B 細胞消除。

【0246】 為了進一步確認 PBMC 中的 DART-A 活性，使用多個獨立的人或食蟹猴 PBMC 供體，以不同的 T 細胞(效應子)與 B 細胞(靶) E:T 細胞比例，評估效力。在總結(表 7)中，人 B 細胞消除的 EC₅₀ 值的範圍是 1.84 至 6.27 pM；而對於食蟹猴 B 細胞消除，EC₅₀ 值在 106.8 至 859.1 pM 之間。對於自體人 B 細胞消除，DART-A 的效力好像大於對於食蟹猴 B 細胞消除的效力(平均約為 100 倍；範圍：19 至 312 倍)。但是，值得注意的是，食蟹猴 PBMC 中 E:T 細胞比例 (平均約 4:1)小於人 PBMC 中的 E:T 細胞比例(約平均 8:1)，考慮到 DART-A 重定向殺傷活性取決於 E:T 細胞比例，其可能造成 EC₅₀ 值的巨大差異。人和食蟹猴 B 細胞之間的 CD19 表達水準的潛在差異可能是造成效力明顯差異的另一可變因素。

表 7			
用 DART-A 處理人或食蟹猴 PBMC 之後，自體 B 細胞消除的 EC ₅₀ 值的總結			
	EC ₅₀ 值(pM)		EC ₅₀ 值(pM)

	DART-A	對照 DART		DART-A	對照 DART
人 5 (E:T= 8:1)	6.27	無活性	食蟹猴 5 (E:T= 3:1)	166.2	無活性
人 6 (E:T= 8:1)	2.75	無活性	食蟹猴 6 (E:T= 2:1)	859.1	無活性
人 7 (E:T= 5:1)	5.52	無活性	食蟹猴 7 (E:T= 3:1)	106.8	無活性
人 8 (E:T= 9:1)	1.84	無活性	食蟹猴 8 (E:T= 7:1)	239.1	無活性
平均值	4.20	不適用	平均值	342.8	不適用

【0247】 重要地，需注意當食蟹猴 PBMC 用作效應細胞時，**DART-A** 介導的針對 Raji/GF 靶細胞的有效的細胞毒性， EC_{50} 是 1.30×10^{-2} pM (圖 10)，與當人 T 細胞用作效應細胞時觀察到的類似(平均 $EC_{50} = 3.07 \times 10^{-1}$ pM)，指示人和食蟹猴 T 細胞針對相同靶細胞系具有相當的活性。這些資料進一步支援了使用食蟹猴作為用於在非臨床毒理學研究中評估 **DART-A** 的相關物種。

【0248】 實施例 6

【0249】 使用人或食蟹猴效應細胞評估 **DART-A**-介導細胞因數釋放

【0250】 **DART-A** 介導的人和食蟹猴 PBMC 中的 B 細胞群體的消除與人和食蟹猴 PBMC 中的細胞因數釋放相關。如下面表 8 中總結，針對細胞因數釋放的 EC_{50} 值等於或大於針對人或食蟹猴自體 B 細胞消除的 EC_{50} 值，指示 **DART-A** 比體外誘導細胞因數釋放更有效介導 B 細胞消除。人和食蟹猴之間的體外細胞因數釋放特徵具有一些類似性和差異。IFN- γ 和 TNF- α 是兩個物種中用 **DART-A** 處理之後釋放的主要的細胞因數。但是，基於 E_{max} 值，IL-6 是人中產生的第三最主要的細胞因數，而 IL-2 僅在食蟹猴 PBMC 中以基本量產生。用 **DART-A** 溫

育之後針對 PBMC 中產生的最敏感細胞因數(人中 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-6)的平均 EC₅₀ 值與針對自體 B 細胞消除的平均 EC₅₀ 值之間的比較，提示存在至少 6 倍表觀安全性邊緣(apparent safety margin)，如 B 細胞消除和人中的細胞因數產生之間的差異所反映的(表 9)。

表 8	
在用 DART-A 處理人或食蟹猴 PBMC 之後，自體 B 細胞消除和細胞因數產生的 EC ₅₀ 值的總結	
人 PBMC	
試驗(測試供體的數量)	平均 EC ₅₀ (pM)
人 B 細胞消除(n = 4)	4.20
人細胞因數釋放(n = 2)	
IFN- γ	25.21
TNF- α	31.83
IL-10	70.11
IL-6	23.55
IL-4	不適用*
IL-2	56.77
食蟹猴 PBMC	
食蟹猴 B 細胞消除(n = 4)	342.8
食蟹猴細胞因數釋放(n = 2)	
IFN- γ	925.24
TNF- α	262.22
IL-6	306.68

IL-5	486.22
IL-4	1718.63
IL-2	2930.19
*在檢測的界限以下	

表 9 體外評估人細胞中的 DART-A 之後，細胞毒性對比對細胞因數產生的 EC₅₀ 值的總結			
CTL 試驗 ¹		人 PBMC ²	
試驗 (供體數量)	平均 EC ₅₀ (pM)	試驗 (供體數量)	平均 EC ₅₀ (pM)
細胞毒性		自體 B 細胞消除	
HBL-2 (n = 5)	0.11	PBMC (n = 7)	4.20
Raji/GF (n = 5)	0.31		
Jeko-1 (n = 3)	0.15		
細胞因數釋放(n = 2)		細胞因數釋放(n = 2)	
IFN- γ	5.51	IFN- γ	25.21
TNF- α	3.71	TNF- α	31.83
IL-2	6.32	IL-6	23.55
EC ₅₀ 倍數差異 (指示安全性邊緣)	12-58	EC ₅₀ 倍數差異 (指示安全性邊緣)	6-8
1 用表達 CD19 的腫瘤細胞(HBL-2、Raji/GF 或 Jeko-1)在存在純化的人 T 細胞(E:T = 10:1)的情況下，使用 CTL 試驗評估的活性。使用			

表 9			
體外評估人細胞中的 DART-A 之後，細胞毒性對比對細胞因數產生的 EC ₅₀ 值的總結			
CTL 試驗 ¹		人 PBMC ²	
試驗 (供體數量)	平均 EC ₅₀ (pM)	試驗 (供體數量)	平均 EC ₅₀ (pM)
Raji/GF 腫瘤細胞評估細胞因數釋放。			
2 在正常人 PBMC 中評估的活性。			

【0251】也研究了在存在靶細胞的情況下通過 T 細胞的 **DART-A** 介導的細胞因數釋放。在與 Raji/GF 靶細胞共同溫育之後，觀察到來自人 T 細胞的 TNF- α 、IFN- γ 和 IL-2 的 **DART-A** 劑量依賴性細胞因數產生，其中針對 IL-2 觀察到最高水準(Emax) (> 7000 pg/mL) (圖 11A-11C；表 10)。也產生了基本水準的 TNF- α 和 IFN- γ (~2000-4000 pg/mL)。如預期的，用對照 DART 雙抗體溫育不產生任何可檢測的細胞因數產生(圖 11A-11C)。與在最不敏感靶細胞系(Raji/GF)中對靶細胞細胞毒性的平均 EC₅₀ 值相比，考慮到用 **DART-A** 溫育之後在存在表達 CD19 的靶細胞(Raji/GF)的情況下，通過純化的人 T 細胞(TNF- α)產生的對最敏感細胞因數的平均 EC₅₀ 值，在靶細胞殺傷和細胞因數產生之間存在至少 12 倍的表觀安全性邊緣(見上面表 9)。

表 10
通過人 T 細胞在存在來自兩個獨立供體的 Raji/GF 靶細胞的情況下， 以 E:T = 10:1，DART-A 介導的細胞因數產生的 EC ₅₀ 值

	D47067		D44284	
細胞因數	EC ₅₀ (pM)	E _{最大} (pg/mL)	EC ₅₀ (pM)	E _{最大} (pg/mL)
IFN- γ	8.58	3885	2.44	2219
TNF- α	6.79	3722	0.626	2361
IL-2	11.31	8496	1.33	7492

【0252】實施例 7

【0253】DART-A 介導的人和食蟹猴 T 細胞啟動的評估

【0254】在 DART-A-介導重定向靶細胞(Raji/GF 細胞)裂解期間，通過評估 T 細胞啟動標記物 CD69 和 CD25 的表達，對 T 細胞的作用進行表徵。在人和食蟹猴 CD4⁺和 CD8⁺ T 細胞中，CD25 和 CD69 都以劑量依賴性方式上調(圖 12A-12D 和圖 13A-13D)，指示 DART-A-介導重定向細胞殺傷與 T 細胞的伴隨啟動相關聯。在存在 CD19 陰性 JIMT-1 細胞的情況下未觀察到 T 細胞啟動(圖 14A-14D)。這些資料提示，T 細胞啟動取決於靶細胞共接合。進一步支持該結論，對照 DART 1 不介導對 T 細胞啟動標記物的誘導(圖 12A-12D 和圖 13A-13D)。

【0255】實施例 8

【0256】CD19 x CD3 的作用機制的評估

【0257】為了確認預期的 CD19 x CD3 通過 T 細胞介導的重定向細胞殺傷的機制由粒酶 B 和穿孔蛋白介導，在 CTL 試驗中測量了 T 細胞中暴露於 DART-A 或對照 DART 1 之後的粒酶 B 和穿孔蛋白的細胞內水準。在存在 Raji/GF 靶細胞的情況下，以 10:1 的 E:T 細胞比例，在 24 小時溫育人 T 細胞與 DART-A 之後，在 CD8⁺和 CD4⁺ T 細胞中都觀察到了粒酶 B 和穿孔蛋白水準的劑量依賴性上調

(圖 15A-15B)。相反，當人 T 細胞與 Raji/GF 靶細胞和**對照 DART 1** 一起溫育時，沒有過觀察到粒酶 B 或穿孔蛋白的上調。這些資料支援，**DART-A** 介導的靶細胞殺傷可通過粒酶 B 和穿孔蛋白途徑來介導。值得注意的是，粒酶 B (圖 15A) 和穿孔蛋白(圖 15B)的上調與 CD4⁺ T 細胞相比，在 CD8⁺ T 細胞中更高，這與預期的 CD8⁺ T 細胞更高的 CTL 效力一致。

【0258】考慮到先前已經報導了伴隨 T 細胞啟動的增殖，也評估了通過 CD9 x CD3 的效應子:靶細胞共接合期間的 T 細胞的擴展。CFSE 標記的人 T 細胞與 HBL-2 靶細胞以 10:1 的 E:T 細胞比例，在存在 200 ng/mL 濃度 **DART-A** 或**對照 DART 1** 的情況下共培養。通過 FACS 分析，經隨著時間的推移的 CFSE 稀釋的水準監測 CFSE 標記的 T 細胞的增殖(圖 16A-16B)。圖 16A 顯示了在存在 **DART-A** 或**對照 DART 1** 和靶細胞的情況下 CFSE-染色特徵。添加 **DART-A** 導致增殖 (CFSE 稀釋)，其中，72 小時溫育之後，約 75%的細胞增殖(圖 16B)。相反，在存在**對照 DART 1** 的情況下沒有觀察到 CFSE 標記的 T 細胞增殖。

【0259】實施例 9

【0260】在共混(Co-Mix)異種移植物中的效力

【0261】在注入與啟動的人 T 細胞共混合的 HBL-2 (人套細胞淋巴瘤)或 Raji (伯基特淋巴瘤)腫瘤細胞的雌性 NOD/SCID 小鼠(n = 8/組)中評估通過 **DART-A** 對人 B 細胞淋巴瘤腫瘤生長的抑制。在兩個研究中，人 T 細胞和腫瘤細胞(HBL-2 或 Raji)以 1:5 (分別為 1×10^6 和 5×10^6 個細胞)的比例組合，並且在第 0 天經 SC 注入小鼠中。隨後在第 0、1、2 和 3 天 IV 施用媒介對照(僅腫瘤細胞)、**DART-A** 或**對照 DART 1**。

【0262】如圖 17 中顯示，在用 **DART-A** 以 $\geq 0.2 \mu\text{g/kg}$ 的劑量水準 IV 治療

之後，HBL-2 腫瘤細胞的生長被完全抑制。儘管用 0.02 $\mu\text{g/kg}$ **DART-A** 治療好像延遲了 HBL-2 腫瘤的生長，但是應答不是統計學上顯著的。在媒介和對照 **DART** 組中的 HBL-2 腫瘤到第 13 天達到約 1000 mm^3 的平均腫瘤體積。

【0263】如圖 18 中顯示，在用所有評估劑量(0.8 至 100 $\mu\text{g/kg}$)的 **DART-A** 治療的小鼠中，到研究結束時(第 28 天)，沒有觀察到 Raji 腫瘤細胞的明顯生長。用 0.8 $\mu\text{g/kg}$ **DART-A** 治療導致 7/8 小鼠的完全應答。媒介和對照 **DART 1** 組中的 Raji 腫瘤表現出體內腫瘤生長，到研究結束時(第 28 天)，平均腫瘤體積分別達到 $2449.4 \pm 421.1 \text{ mm}^3$ 和 $2968.2 \pm 200.0 \text{ mm}^3$ 。

【0264】實施例 10

【0265】在建立的腫瘤模型中的效力

【0266】評估雌性 NSG B2m^{-/-}小鼠($n = 8/\text{組}$)的 HBL-2 (人套細胞淋巴瘤)異種移植模型中 **DART-A** 的抗腫瘤活性。在第 0 天，小鼠經皮內(ID)植入 HBL-2 腫瘤細胞(5×10^6 細胞)，隨後在第 4 天，腹膜內(IP)注射 PBMC (5×10^7 細胞)。當接收媒介、對照 **DART 1** 或 **DART-A** 的組的平均腫瘤體積分別為 438.4 ± 80.2 、 433.7 ± 63.8 和 $531.7 \pm 122.5 \text{ mm}^3$ 時，在第 17 天啟動用 IV 施用的媒介、對照 **DART 1** 或 **DART-A** 進行治療。在第 21 天(第二劑量施用)，在用媒介、對照 **DART 1** 和 **DART-A** 治療的組中，平均腫瘤體積已經分別增加至 1306.1 ± 240.4 、 1185.6 ± 138.7 和 $958.5 \pm 216.1 \text{ mm}^3$ 。在第 24 天(第三劑量施用)，媒介和對照 **DART 1** 組中的平均腫瘤體積已經分別增加至 2401.3 ± 397.4 和 $2623.7 \pm 351.5 \text{ mm}^3$ 。相反，接收 **DART-A** 的組的體積已經降低 45%，達到 $527.3 \pm 148.3 \text{ mm}^3$ 。在 **DART-A** 治療組中，腫瘤的尺寸繼續降低，最終在第 42 天，達到終體積為 $111.4 \pm 38.9 \text{ mm}^3$ ，從記錄的最大腫瘤體積降低了 88.3% (圖 19A)。總之，用 0.5 mg/kg 的 **DART-A**

治療導致大的建立的 HBL-2 套細胞淋巴瘤腫瘤收縮。到第 42 天，當研究結束時，沒有記錄到復發。

【0267】 另一組具有腫瘤的小鼠，平均腫瘤尺寸為 541 mm^3 ($n = 4$ 只小鼠)，在研究的第 14 天按計劃用 $500\text{ }\mu\text{g/kg}$ **DART-A** 治療。在第一次劑量時(研究的第 17 天)，腫瘤已經達到 $2279 \pm 61\text{ mm}^3$ 的平均體積(圖 19B)。但是，在第三次(研究的第 24 天)和第四次(研究的第 28 天)劑量之前，腫瘤體積分別是 1469 ± 162 和 $848 \pm 74\text{ mm}^3$ ，相對於在研究的第 21 天記錄的峰值體積，分別代表 36%和 63% 的腫瘤體積下降(圖 19B)。腫瘤尺寸繼續下降達到這樣的程度：在第 42 天，平均腫瘤體積為 $248 \pm 52\text{ mm}^3$ ，腫瘤體積下降了 89% (圖 19B)。

【0268】 實施例 11

【0269】 食蟹猴中 **DART-A** 的毒代動力學研究

【0270】 在食蟹猴中進行非 GLP (良好實驗室規範)毒理學研究，以評估 **DART-A** 的不同劑量和方案。首先進行 A 階段，以評估每個連續周動物內遞增劑量的 **DART-A** 的 2-小時 IV 輸注，持續 4 周，如在表 11 中總結(A 階段)。在第 36 或 64 天，處死每組中的 A 階段食蟹猴的一半(1M/1F)。隨後進行研究的 B 階段，以評估在每組中以固定劑量施用的 **DART-A** 的 2-小時 IV 輸注 (表 11，B 階段)。對於組 3、4 和 5，每個連續周施用相同的劑量(分別為 5、50 或 500 ng/kg)，每個動物總共 3 個劑量。對於組 6，在研究的第 1、4、8、11 和 15 天施用 500 ng/kg ，作為 2-小時 IV 輸注，每個動物總共 5 個劑量。在第 18 天處死所有 B 階段動物。

表 11								
實驗設計(A 階段)								
組編	雄	雌	測試材料	劑	研究給	劑量水準(ng/kg)	劑量體積	劑量濃度

表 11								
號	性	性		量	藥天		(mL/kg)	(ng/mL)
1	2	2	媒介	1	1	0	0.3	0
			DART-A	2	8	500	0.3	1700
				3	15	5000	0.3	16,700
				4	22	50,000	0.3	166,700
				5	29	50,000	0.3	166,700
2	2	2	DART-A	1	1	0	0.3	0
				2	8	2000	0.3	7000
				3	15	10,000	0.3	33,300
				4	22	100,000	0.3	333,300
				5	29	100,000	0.3	333,300
實驗設計(B 階段)								
組編 號	雄 性	雌 性	測試材料	劑 量	研究給 藥天	實際劑量水準* (ng/kg)	劑量體積 (mL/kg)	實際 劑量濃度 (ng/mL)
3	1	1	DART-A	1	1	5	0.3	15.0
				2	8	5	0.3	15.0
				3	15	5	0.3	15.0
4	1	1	DART-A	1	1	50	0.3	150.0
				2	8	50	0.3	150.0
				3	15	50	0.3	150.0
5	1	1	DART-A	1	1	500	0.3	1500.0

表 11								
				2	8	500	0.3	1500.0
				3	15	500	0.3	1500.0
6	1	1	DART-A	1	1	500	0.3	1500.0
				2	4	500	0.3	1500.0
				3	8	500	0.3	1500.0
				4	11	500	0.3	1500.0
				5	15	500	0.3	1500.0

* 顯示了基於給藥製劑濃度的分析施用的實際劑量水準。值得注意的是，對於 B 階段，實際劑量是方案指定的劑量水準的十分之一。

【0271】食蟹猴中 DART-A 的毒代動力學研究(A 階段)

【0272】在食蟹猴中進行 **DART-A** 的非 GLP、實驗性(pilot)、探索性(exploratory)、劑量遞增研究。在研究的 A 階段中，在第 1、8、15、22 和 29 天，兩組食蟹猴(n = 4/組；2M/2F)被施用內在遞增劑量的媒介(第 1 天)或 **DART-A**，作為 2-小時 IV 輸注。組 1 中的食蟹猴接收媒介對照→ 500 → 5000 → 50,000 → 50,000 ng/kg **DART-A**。組 2 中的食蟹猴接收媒介對照→ 2000 → 10,000 → 100,000 → 100,000 ng/kg **DART-A**。在第 36 天或第 64 天處死每組中一半的 A 階段食蟹猴(1M/1F)。

【0273】在研究的 A 階段期間，沒有 **DART-A** 相關的死亡率，並且沒有 **DART-A** 相關的肉眼可見的或器官重量改變。但是，如下面詳細描述的，在 ≥ 500 ng /kg 的劑量水準，存在 **DART-A** 相關的作用。這些作用與測試品的藥理學一

致，並且不認為是毒理學上明顯的。

【0274】 在第 36 天的 A 階段，對於所有組 1 和 2 動物，**DART-A** 相關的微觀發現限於淋巴結(腹股溝、下頷和腸系膜)、脾和內臟相關的淋巴組織(GALT)，到第 64 天，沒有微觀發現的恢復。在第 36 天，淋巴結和脾中的微觀發現是類似的，並且由鑒定的淋巴濾泡發生中心的數量和尺寸的中等至顯著的下降組成；在 GALT 中，淋巴濾泡發生中心的數量和尺寸存在最小的下降。到第 64 天，測試品相關的發現仍存在於淋巴結、脾和 GALT 中；在淋巴結和脾中，微觀發現由淋巴濾泡發生中心的數量和尺寸的輕微至顯著下降組成，並且在 GALT 中，淋巴濾泡發生中心的數量和尺寸的下降最小。

【0275】 通過免疫組織化學(IHC)對骨髓(胸骨)、淋巴結(腹股溝、下頷和腸系膜)和脾的評估揭示，在第 36 天，A 階段動物中 CD20 陽性細胞的數目大大減少，到第 64 天，CD20 染色僅僅部分恢復。在第 36 天，在 A 階段動物的骨髓或淋巴結中大體上沒有注意到 CD20 陽性染色，除了來自組 1 的一隻動物以外，在該動物中，僅僅在腹股溝淋巴結的發生中心和淋巴細胞冠(lymphocyte corona)中分別存在非常稀少、輕微至中度的 CD20 陽性染色。在脾中，僅僅在 3 只動物(1 只動物來自組 1; 2 只動物來自組 2)的紅髓中鑒定到了 CD20 陽性細胞，其中 CD20 陽性細胞的頻率非常稀少至稀少和很小或輕微至中等強度。

【0276】 在恢復的動物中(第 64 天)，僅僅在組 1 動物的骨髓中注意到非常稀少至偶爾、適度染色的 CD20 陽性細胞。在淋巴結(腹股溝、下頷和腸系膜)中，僅僅在來自組 1 的一隻動物中鑒定到了 CD20 陽性染色；在所有淋巴結中，CD20 陽性細胞的頻率通常大大降低，而陽性細胞的染色強度是中等至顯著。在所有組 1 和 2 動物的脾中鑒定到了 CD20 陽性細胞。在組 1 動物中，在一隻動物的淋

巴濾泡、動脈周圍淋巴鞘(PALS)和紅髓和在另一隻動物的 PALS 和紅髓中，鑒定到了 CD20 陽性細胞。在組 2 動物中，僅僅在紅髓中以中等染色強度鑒定到了非常稀少至稀少的 CD20 陽性細胞。

【0277】 在該研究的 A 階段部分的基於 FACS 的 B 細胞消除、細胞因數和 ADA 的評估總結在下面。

【0278】 針對 B、T、NK 細胞和單核細胞的 FACS 評估

【0279】 收集全血樣品，用於各種淋巴細胞亞集和單核細胞細胞群的流式細胞術評估。在以下時期評估 A 階段動物：第-1 周；在第 1、8、15、22 和 29 天給藥之前；在第 2、9、16、23 和 30 天開始輸注(“SOI”)後 24 小時；在第 4、11、18、25 和 32 天 SOI 後 72 小時；第 35 天；和在第 43、50、57 和 63 天 (僅僅適用於來自每組的 A 階段食蟹猴的一半，在第 64 天恢復處死(recovery sacrifice))。

【0280】 對於兩個組(組 1 和 2)，在第 9 天(SOI 後 24 小時)開始出現 B 淋巴細胞(CD20+)的絕對計數的劑量依賴性降低。對於 500 ng/kg/劑量動物(組 1)，B 淋巴細胞群在第 11 和 15 天趨於研究前水準，而對於 2000 ng/kg/劑量動物(組 2)，值仍保持下降。對於兩個劑量組，在第二 **DART-A** 劑量施用之後第 16 天(SOI 後 24 小時)，B 淋巴細胞實際上被消除，並且對於所有隨後的時間點，仍保持被消除(圖 20A-20B)。B 淋巴細胞消除是 **DART-A** 的預期的藥理學作用。

【0281】 也通過流式細胞術評估其他免疫細胞群，包括單核細胞、天然殺傷細胞(NK)和 T 細胞。

【0282】 對於以 2000 ng/kg 給藥的大部分動物，在第 9 天，SOI 後 24 小時，開始出現 CD14+單核細胞數量的暫態、劑量依賴性減少(組 2)。對於分別以 5000

ng/kg 和 50,000 ng/kg 給藥的大部分動物(組 1)，和對於分別以 10,000 ng/kg 和 100,000 ng/kg 給藥的所有動物(組 2)，在第 16 天和第 23 天，SOI 後 24 小時，也出現 CD14+單核細胞數量的減少。在每次輸注結束之後，CD14+單核細胞群快速恢復，並且到下一個劑量前(pre-dose)時間點通常達到或超過研究前基線值，然後在隨後劑量之後 24 小時再次下降。在給藥階段結束時，CD14+單核細胞的值波動，所述值趨於研究前水準，並且保持在研究前的基線水準或高於研究前的基線水準的值。

【0283】 對於總體 T 淋巴細胞、CD4+ T 淋巴細胞、CD8+ T 淋巴細胞、T 調節淋巴細胞(CD4+/CD25+/FoxP3+)、CD159a+ NK 細胞、CD16+ NK 細胞和 CD16+/CD159a+ NK 細胞，也觀察到了暫態、劑量依賴性下降，其中針對 2000 ng/kg/劑量動物(組 2)在第 9 天(SOI 後 24 小時)觀察到最大的下降，接下來是在組 1 動物中以 5000 ng/kg/劑量在第 16 天(SOI 後 24 小時)觀察到的。在每次輸注結束時，T 淋巴細胞和 NK 細胞亞集快速恢復，並且通常在第 15 和 22 天的下一劑量之前達到或超過研究前基線水準，然後在每次劑量之後的 24 小時再次下降。對於組 1 或 2，在第 29 天施用劑量之後，在第 30 天(SOI 後 24 小時)沒有進一步下降。

【0284】 也評估 CD4+和 CD8+ T 淋巴細胞群對於啟動標記物 PD-1、TIM-3、CD25 和 CD69 的上調，以確定在 **DART-A** 劑量施用之後的細胞的啟動狀態。在給藥之後，CD4+ T 淋巴細胞中 PD-1+、CD69+和 CD25+以及 CD8+T 淋巴細胞中 PD-1+和 CD69+的頻率存在不同的提高，指示給藥之後全血中啟動的 CD4+和 CD8+ T 淋巴細胞的頻率的增加。CD4+ T 淋巴細胞中 CD69+、PD-1+和 CD25+的頻率(在較小的程度上，出現在一些但不是所有動物中)和 CD8+ T 淋巴細胞中

PD-1⁺和 CD69⁺的頻率在 500 ng/kg (組 1)和 2000 ng/kg (組 2)劑量之後，在第 9 天 (SOI 後 24 小時)開始增加。這些值一般保持高於基線水準並且對於隨後的時間點是高度可變的。CD25⁺/CD69⁺、TIM-3⁺和 PD-1⁺/TIM3⁺淋巴細胞群的相對百分數一般< 總體 CD4⁺和 CD8⁺ T 淋巴細胞群的 1%，使得任何 **DART-A** 相關的改變難以被評估。總之，這些資料提示，**DART-A** 施用導致在 CD4⁺和 CD8⁺ T 淋巴細胞上 PD-1 和 CD69 表達上升的趨勢，同時還導致在一些但不是所有動物中 CD4⁺ T 淋巴細胞中的 CD25⁺比較適度的增加。

【0285】 b.細胞因數評估

【0286】 在劑量前和每次輸注開始之後 4 和 24 小時測定(EMD Millipore 試驗)血清 IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、TNF- α 和 IFN- γ 水準。當對於前 3 個劑量食蟹猴在 2-小時時間內被 IV 輸注從 500 至 50,000 ng/kg 範圍的遞增劑量(組 1)和從 2000 至 100,000 ng/kg 的遞增劑量(組 2)時，在開始輸注之後 4 小時觀察到 IL-10 水準(多達 1918 pg/mL)的暫態 **DART-A** 劑量相關的增加；在開始輸注的 24 小時內水準通常回到基線。在每個組(組 1 中 50,000 ng/kg 或組 2 中 100,000 ng/kg)中最後一次 **DART-A** 輸注開始後 4 小時一般沒有檢測到 IL-10，只有一個例外(動物 2502)。在最後一次劑量(在第 29 天 100,000 ng/kg)之後，動物 2502 經歷暫態 IL-10 增加，達到 332 pg/mL，但是該增加小於在第 22 天第一次 100 μ g/kg 劑量之後 IL-10 增加的幅度(570 pg/mL)。以 50,000 ng/kg 劑量水準的一隻食蟹猴(動物 1001)，其經歷了最高 IL 10 水準(在第 22 天 1918 pg/mL)，也經歷了 IL-2 (32 pg/mL)、IL 5 (45 pg/mL)和 IL-6 (357 pg/mL)的同時的暫態增加。在輸注 **DART-A** 之後 4 小時，在大部分食蟹猴中觀察到 IL-6 水準的暫態增加，但是，與在第 1 天輸注媒介對照之後的觀察到的水準相比(多達 190 pg/mL)，該增加通常類似或幅度更

低(除了上述動物 1001)，沒有明顯的劑量應答。沒有與增加的細胞因數水準相關的明顯的臨床觀察。

【0287】 在輸注 **DART-A** 之後，IL-5、IL-4、IL-2、IFN- γ 或 TNF- α 水準的沒有一致的變化。IL-5 的水準是可變的，每組中約一半的動物在第 15 天或 22 天 **DART-A** 輸注之後經歷小的和暫態增加(~10-20 pg/mL；上面討論的動物 1001 除外)。在整個研究過程中，IFN- γ 的水準也是可變的，在一些動物中輸注之後具有小的(< ~10 pg/mL)和暫態增加。

【0288】 食蟹猴中 **DART-A** 的毒代動力學研究(B 階段)

【0289】 在研究的 B 階段中，4 組食蟹猴(n = 2/組；1M/1F)施用固定劑量的 **DART-A**，作為 2-小時 IV 輸注，其中對於組 3 (5 ng/kg)、組 4 (50 ng/kg)和組 5 (500 ng/kg)，在第 1、8 和 15 天施用 3 個劑量；並且對於組 6 (500 ng/kg)，在第 1、4、8、11 和 15 天施用 5 個劑量。在第 18 天對所有 B 階段動物實施安樂死。

【0290】 在研究的 B 階段期間，沒有 **DART-A** 相關的死亡率，並且沒有 **DART-A** 相關的肉眼可見的或器官重量改變。

【0291】 在第 18 天，**DART-A** 相關的微觀發現限於組 4、5 和 6 動物的淋巴結(腹股溝、下頷和腸系膜)和脾，並且由鑒定的淋巴濾泡發生中心的數量和尺寸最小至輕微降低組成，其中，淋巴組織，包括脾中 PALS 的尺寸和/或細胞密度沒有明顯變化。在組 3 中沒有注意到報導的微觀發現(5 ng/kg)。

【0292】 對於表達 CD20 的細胞群，通過 IHC 評估骨髓(胸骨)、淋巴結(腹股溝、下頷和腸系膜)和脾的另外的福馬林-固定的石蠟包埋的切片(Mordenti, J. 等(1991) “*Interspecies Scaling Of Clearance And Volume Of Distribution Data For Five Therapeutic Proteins*,” Pharm. Res. 8(11):1351-1359)。組 3、4、5 或 6 中骨髓

(胸骨)、淋巴結(腹股溝、下頷和腸系膜)或脾中 CD20 陽性細胞的分佈和/或染色強度沒有明顯差異。在所有組織中，陽性染色與細胞膜相關。一般而言，在骨髓中，偶爾的 CD20 陽性細胞遍佈骨髓基質而定位並且陽性細胞的染色強度是中等至顯著的。在淋巴結中，CD20 陽性細胞主要與濾泡的發生中心和淋巴細胞冠相關，極少的 CD20 陽性細胞定位於副皮質區、髓索和髓竇和被膜下竇中。發生中心、淋巴細胞冠、髓索和髓竇以及被膜下竇中的染色強度是中等至顯著的。副皮質區中的染色強度是輕微至顯著的。在脾中，CD20 陽性細胞主要與發生中心、濾泡套和淋巴濾泡邊緣區相關，在 PALS 和紅髓中具有極少的 CD20 陽性細胞，並且染色是中等至顯著的強度。

【0293】 在該研究的 B 階段部分的基於 FACS 的 B 細胞消除、細胞因數和 ADA 的評估總結在下面。

【0294】 針對 B 細胞、T 細胞、NK 細胞和單核細胞的 FACS 評估

【0295】 收集全血樣品用於各種淋巴細胞亞集和單核細胞細胞群的流式細胞術評估。在以下時期評估 B 階段動物：第-1 周；在第 1、4 (僅僅組 6)、8、11 (僅僅組 6)和 15 天給藥之前；在第 2、9 和 16 天 SOI 後 24 小時；和在第 4 天和 11 天(僅僅組 3-5) SOI 後 72 小時。

【0296】 對於在第 1、8 和 15 天施用的劑量，B 淋巴細胞(CD20+)的總量在輸注開始之後的 24 小時出現顯著的劑量依賴性下降。對於 5 ng/kg (組 3)、50 ng/kg (組 4)和 500 ng/kg (組 5 和 6)治療組，最大下降出現在第 2 天(SOI 後 24 小時)。在組 3 和 4 中，B 淋巴細胞群在每次輸注之後快速恢復，並且在所有其他時間點呈現出接近研究前基線水準的波動值。組 5 和 6 在劑量之間出現最小恢復，並且在第 2 天之後的所有時間點大體上保持下降的值(圖 21A-21D)。持續的 B 淋巴細

胞消除是更高劑量的 **DART-A** 的預期的藥理學作用。

【0297】 也通過流式細胞術評估其他免疫細胞群，包括單核細胞、NK 細胞和 T 細胞。

【0298】 對於所有劑量組(組 3-6)中的大部分動物，總體 CD14+單核細胞在第 2 天 (SOI 後 24 小時)開始出現暫態、劑量依賴性下降。對於所有劑量組中的大部分動物，在第 9 天和 16 天也出現 CD14+單核細胞的另外的變化，並且值是高度可變的。

【0299】 總 T 淋巴細胞、T 調節淋巴細胞(CD4+/CD25+/FoxP3+)、CD4+ T 淋巴細胞、CD8+ T 淋巴細胞和 NK 細胞亞集的數量存在暫態、劑量依賴性下降，其中對於所有組(組 3-6)，最大下降一般出現在第 2 天(SOI 後 24 小時)。在所有組中，T 淋巴細胞亞集在每次輸注之後快速恢復，並且所有的劑量在接下來輸注之前一般達到或超過研究前水準。對於 50 ng/kg (組 4)、500 ng/kg (組 5)和多劑量的 500 ng/kg (組 6)給藥的動物，CD4+、CD8+和 T 調節淋巴細胞的另外的下降也出現在第 9 天和 16 天(SOI 後 24 小時)；但是，在這些時間點出現的下降與在第一次 **DART-A** 劑量之後第 2 天出現的那些相比幅度更低。NK 細胞亞集一般傾向於在輸注的第一天恢復並且在所有剩餘的時間點呈現不同的值。

【0300】 評估 CD4+和 CD8+ T 淋巴細胞群對啟動標記物 PD-1、TIM-3、CD25 和 CD69 的上調，以確定在 **DART-A** 劑量施用之後細胞的啟動狀態。CD4+和 CD8+ T 淋巴細胞群中 CD25+/CD69+ (僅僅對於 CD4+ T 淋巴細胞)、TIM-3+和 PD-1+/TIM3+的相對百分數一般<總體 CD4+和 CD8+ T 淋巴細胞群的 1%，使得難以評估任何 **DART-A** 相關的改變。對於組 5 和 6 中 500 ng/kg/劑量動物，在從第 2 天 (SOI 後 24 小時)開始的多個時間點，CD4+和 CD8+ T 淋巴細胞中 PD-1+

和 CD69+的頻率增加。另外，對於 500 ng/kg/劑量動物(組 5 和 6)，從第 2 天(SOI 後 24 小時)開始，出現 CD4+和 CD8+ T 淋巴細胞中 CD25+ 頻率更適度的增加，以及對於多劑量 500 ng/kg/劑量動物(組 6)，CD8+ T 淋巴細胞中 CD25+/CD69+ 的相對百分數的增加。與在第 2 天出現的那些增加幅度相當的增加增加幅度也一般出現在隨後劑量之後的第 9 天和 16 天(SOI 後 24 小時)。總之，這些資料指示 **DART-A** 施用導致 CD4+和 CD8+ T 淋巴細胞上 PD-1、CD69 和 CD25 表達上升的趨勢。

【0301】 b.細胞因數評估

【0302】 在第-7、8 和 15 天給藥之前；並且在第 1、8 和 15 天輸注開始後 4 和 24 小時，測定血清 IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、TNF- α 和 IFN- γ 水準(EMD Millipore 試驗)。當食蟹猴施用 5、50 或 500 ng/kg 的 **DART-A** 劑量時，在第一次 **DART-A** 輸注開始之後 4 小時，觀察到 IL-10 水準(多達 173 pg/mL)暫態和劑量相關的增加(組 3-6)；水準通常在輸注開始的 24 小時內回到基線。在所有組中，與第二次和第三次劑量之後的 IL-10 增加(在除了下面描述的動物 5001 之外的所有動物中，< 22 pg/mL)相比，在第一次劑量的 **DART-A** 之後，IL-10 的增加好像更顯著，提示在第一次劑量之後，細胞因數釋放的“脫敏”和/或靶細胞群體的快速減少/消除造成 T 細胞啟動。在所有劑量組的一些動物中，每次 **DART-A** 輸注開始後 4 小時，不定地觀察到 IL-6 水準(多達 162 pg/mL)的暫態增加，水準通常在 24 小時內回到基線水準或附近。但是，基於其中觀察到 IL-6 水準的增加達到 190 pg/mL 的 A 階段中的媒介施用產生的資料，在 B 階段中 IL-6 波動的水準($\leq$ 162 pg/mL)可能未必反映藥物相關的應答。在整個研究中，未觀察到 IL 5、IL-4、IL-2、IFN γ 或 TNF- α 水準的一致的變化。

【0303】 一隻食蟹猴(動物 5001)在第二次 **DART-A** 輸注之前的第 8 天，經歷升高水準的 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-4、IL 5 和 IL-10。在第 8 天第二次輸注之後 4 小時，細胞因數水準進一步增加(IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IFN- γ 和 TNF- α)或保持穩定(IL-2)。到第二次劑量後 24 小時，細胞因數水準開始下降，在第 15 天第三 **DART-A** 輸注之後，一些細胞因數具有不同的增加。儘管所有的細胞因數水準從它們的峰值下降，但是在該食蟹猴中，細胞因數水準在評估的最後時間點(第 16 天)仍高於基線水準。沒有明顯的與增加的細胞因數水準相關的臨床觀察。

【0304】 實施例 12

【0305】 人 FcRn 轉基因小鼠中 Ig 樣半衰期

【0306】 使用可獲得自 Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, US 的人 FcRn 轉基因小鼠品種 B6.Cg-*Fcgrt*^{tm1Dcr} (CAG-FCGRT)276Dcr/DcrJ 小鼠(訂貨號 004919)進行人 FcRn 轉基因小鼠藥物代謝動力學(PK)研究，以評估 **DART-A** 和對照 **DART 1** (圖 22)。終端半衰期(terminal half-life)分別是 85.6 和 92.1 小時。在相同的測試系統中也評估了三個人 mAb，用於比較，其終端半衰期範圍是 58.7 至 102.7 小時。

【0307】 實施例 13

【0308】 人 PBMC 重構的小鼠中散播性 Raji 細胞白血病/淋巴瘤模型的效力

【0309】 使用螢光素酶-轉導的 Raji 淋巴瘤細胞(Raji.luc)在用人 PBMC 重構的雌性 NSG B2m-/-小鼠中建立散播性腫瘤模型，其中，在腫瘤細胞注射後一天(“早期治療”或白血病典範(leukemia paradigm))或在體內生長至少兩周(“建

立的腫瘤”或淋巴瘤模型)後，用媒介、**對照 DART 1** 或 **DART-A** 處理小鼠。

【0310】 早期治療模型

【0311】 在研究的第-14 天人 PBMC 重構之後，在研究的第 0 天注入 Raji.luc 淋巴瘤細胞並且在次日(研究的第 1 天)啟動治療。將媒介對照、0.5 mg/kg **對照 DART 1** 或 0.5 mg/kg **DART-A** 經 IV 每 3-4 天注射一次，持續總共 12 個劑量(即，研究的第 1、4、6、8、11、13、15、18、20、22、25 和 27 天)。在研究的第 54 天或研究的第 56 天追蹤小鼠的存活。

【0312】 在接收媒介或**對照 DART 1** 的組中，彌散性散播性腫瘤細胞曲線快速合併(coalesced)並且到第 2 周和第 3 周在大部分小鼠中擴展。早在腫瘤細胞植入後兩周就注意到在這兩個對照組中的動物死亡。媒介或**對照 DART 1** 組中的所有小鼠到研究的第 40 天或第 53 天分別死亡或被人道地處死(即，如果動物垂死或丟失了大於它們體重的 15%)。存活曲線描述在圖 23 中。相反，用 **DART-A** 治療的組在任何時間點均顯示沒有腫瘤細胞生長，並且直到研究結束時也沒有觀察到動物死亡。存活曲線描繪在圖 23 中。

【0313】 在隨後實驗中，在上述相同的實驗條件下進行劑量範圍發現研究，除了每 3-4 天 IV 注射 0.16 µg/kg、0.8 µg/kg、4 µg/kg、20 µg/kg、0.1 mg/kg 或 0.5 mg/kg **DART-A** 一次，持續總共 12 個劑量(即，研究的第 1、4、6、8、11、13、15、18、20、22、25 和 27 天)之外。如上述在相同的研究天施用媒介和**對照 DART 1**。在用媒介或**對照 DART 1** 治療的小鼠中觀察到了 Raji.luc 腫瘤生長的快速進展。**DART-A** 在所有測試的劑量下都表現出效力，大部分小鼠是活的(>8%)並且在低至 20 µg/kg 的劑量，在研究結束時(第 56 天)無腫瘤 (圖 24)。

【0314】 建立的腫瘤模型

【0315】 在單獨的實驗組中測試了當延遲治療時 CD19 x CD3 控制 Raji.luc 細胞腫瘤負荷的能力。在建立的腫瘤模型中，人-PBMC 重構的小鼠在研究的第 0 天(大概在 PBMC 注射之後一周)被經 IV 接種 Raji.luc 細胞，並且使其生長 14 天，然後啟動治療。

【0316】 基於腫瘤負荷，在研究的第 12 天將小鼠隨機分成 3 組，並且隨後在研究的第 14 天(Raji.luc 細胞接種後 2 周)開始用媒介、0.1 mg/kg **DART-A** 或 0.5 mg/kg **DART-A** 治療，總共 10 個劑量(即，研究的第 14、15、16、19、21、23、30、33、35 和 37 天)。在媒介對照組中，到第一周治療結束時，初始病灶尺寸明顯增加，並且 5/7 的小鼠在啟動治療的 2 周內死亡(圖 25)。相反，在兩個 **DART-A** 治療組中的大部分動物中的腫瘤負荷顯著減少並且在第一周治療期間被清除。在每個 **DART-A** 治療組中的僅有一隻動物(在隨機化時每個具有相對高的腫瘤負荷)，在第一周的治療期間死亡(圖 25)。到研究的第 50 天時，0.1 mg/kg **DART-A** 治療組中的僅僅 2 只小鼠具有外周腫瘤殘留。

【0317】 在上述一般的實驗條件下進行延遲治療模型中的劑量範圍發現研究。在該實驗中，人 PBMC 重構的小鼠在研究的第 0 天(PBMC 注射後 5 天)被 IV 接種 Raji.luc 細胞，並且使其生長至研究的第 14 天，然後隨機化。在研究的第 15 天，用媒介、0.1 mg/kg **對照 DART 1** 或 0.16 µg/kg、0.8 µg/kg、4 µg/kg、20 µg/kg、0.1 mg/kg 或 0.5 mg/kg **DART-A** 啟動治療，總共 9 個劑量(即，研究的第 15、17、21、23、25、28、30、32 和 35 天)。

【0318】 在媒介對照組中，腫瘤負荷逐漸增加並且到第二周的治療結束時，所有的小鼠死亡或被處死(圖 26)。與用媒介治療的小鼠相比，用 0.1 mg/kg **對照 DART 1** 治療的小鼠顯示腫瘤進展的輕微延遲(圖 26)。相反，用 **DART-A** 治療的

動物中的腫瘤負荷顯示隨著時間的推移大體上劑量依賴性減少(圖 26)。

【0319】 實施例 14

【0320】 DART-A 在食蟹猴中的藥物動力學

【0321】 基於根據用前體 mAb 進行的免疫組織化學食蟹猴與人相比兩個靶抗原的等同分佈，選擇食蟹猴被作為適當的藥理學模型，用於 **DART-A** 分析。

【0322】 根據本發明進行的研究包括 5 個治療組，每個組由 10 只食蟹猴組成(5 只雄性、5 只雌性)。在 2 小時內通過 IV 輸注治療所述組，其中媒介對照在第 1 天用於第一次輸注，隨後用媒介對照(組 1)或 **DART-A** (組 2-5)每週治療一次，持續四周。在組 1 動物繼續接收媒介對照，持續所有 4 次隨後的輸注時，對於在第 8、15、22 和 29 天的所有隨後輸注，組 2-5 的動物以 0.2 $\mu\text{g/kg}$ 、2 $\mu\text{g/kg}$ 、5 $\mu\text{g/kg}$ 或 10 $\mu\text{g/kg}$ 接收 **DART-A** (表 12)。在第 37 天對 3 只雄性和 3 只雌性實施安樂死並且進行屍體剖檢，而剩下的恢復組猴子(2 只雄性和 2 只雌性)在 12-周恢復期之後第 121 天被實施安樂死並且進行屍體剖檢。

表 12							
研究輸注編號	DART-A 輸注編號(僅組 2-5)	研究天	DART-A ($\mu\text{g/kg}$) 作為 2-小時 IV 輸注而施用				
			組 1	組 2	組 3	組 4	組 5
1	NA	1	0	0	0	0	0
2	1	8	0	0.2	2	5	10
3	2	15	0	0.2	2	5	10
4	3	22	0	0.2	2	5	10
5	4	29	0	0.2	2	5	10

【0323】 通過 ELISA 對在各個時間點收集的血清中的 **DART-A** 進行濃度分析。來自組 5 的代表性動物的 **DART-A** 血清濃度-時間曲線顯示在圖 27 上。在 0.2、2、5 和 10 $\mu\text{g/kg}$ 劑量之後評估 PK 參數(二室模型(two-compartment model)) (表 13)。一般而言，在整個評估的劑量範圍內觀察到了最大血清濃度(C_{max})和 AUC_{inf} 的劑量成比例增加。儘管主要 PK 參數的若干成對劑量比較之間存在差異，但是總體上，就 **DART-A** 的清除(CL)、室間清除(intercompartmental clearance)(CLD_2)和分佈的體積(V_1 和 V_2)的變化而言，在可評估的劑量中沒有一致的趨勢，提示線性 PK。在組 2-5 的所有動物中的 CL 值小於食蟹猴的腎小球濾過率(GFR) ($\sim 125 \text{ mL/h/kg}$)，這指示通過腎過濾基本上不出現消除，如對於該分子量的蛋白質(109.3 kDa)所預期的。組 2、3、4 和 5 的動物的分佈的平均初始體積(V_1)與食蟹猴中的血漿體積類似或稍微更高($\sim 45 \text{ mL/kg}$)，提示在中心室中通過結合靶細胞而稍微消除了 **DART-A**。平均 β -期半衰期和 MRT 顯示隨著劑量增加而增加的趨勢，其中平均 β 半衰期($t_{1/2,\beta}$)是 161 小時(6.7 天)並且平均停留時間(MRT)是 191 小時(8 天)。值得注意的是，來自 GLP 研究的僅僅 3 只動物(2 $\mu\text{g/kg}$ 劑量組中 $n = 1$ ；5 $\mu\text{g/kg}$ 劑量組中 $n = 2$)在第二次和隨後的 **DART-A** 輸注($n = 2$)或在第四次 **DART-A** 輸注($n = 1$)之後具有異常 PK 特徵並且隨後確認為 ADA 陽性。因此，對於這 3 只動物，在受影響的輸注迴圈之後的血清濃度資料被排除在 PK 建模之外。

表 13

食蟹猴中 **DART-A** 的 PK 參數的二室分析

屬性	0.2 µg/kg/d (平均值± SD)	2 µg/kg/d (平均值± SD)	5 µg/kg/d (平均值± SD)	10 µg/kg/d (平均值± SD)
C _{max} (ng/mL)	3.18 ± 0.46	31.9 ± 3.0	82.9 ± 5.6	166.6 ± 11.0
AUC _{inf} (h*ng/mL)	155 ± 37	2258 ± 634	6714 ± 1846	13756 ± 2534
CL (mL/h/kg)	0.95 ± 0.17	0.80 ± 0.22	0.73 ± 0.24	0.70 ± 0.13
CLD ₂ (mL/h/kg)	0.87 ± 0.15	1.65 ± 0.36	1.70 ± 0.74	1.40 ± 0.40
V ₁ (mL/kg)	43.4 ± 5.8	50.9 ± 5.1	52.3 ± 3.5	54.5 ± 4.5
V ₂ (mL/kg)	65.3 ± 17.5	77.9 ± 17.9	93.4 ± 33.3	105.3 ± 33.0
V _{ss} (mL/kg)	108.7 ± 16.6	128.8 ± 17.2	145.8 ± 34.6	159.8 ± 36.0
t _{1/2} (h)	14.0 ± 1.5	11.0 ± 2.2	12.3 ± 3.8	15.0 ± 4.4
t _{1/2 · β} (h)	119.1 ± 27.6	143.4 ± 43.4	184.9 ± 72.0	205.6 ± 66.9
MRT (h)	116.3 ± 20.3	173.0 ± 54.5	221.2 ± 86.5	235.9 ± 72.0

【0324】 DART-A 治療的食蟹猴中的細胞因數釋放

【0325】 在輸注之前和在第 1、8、15、22 和 29 天輸注結束後 2 和 22 小時收集評估細胞因數水準的血清樣品。評估的細胞因數是 TNF- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10。

【0326】 第一次 DART-A 輸注(第 8 天)之後觀察到 IL-6、IL-10、IFN- γ 和

TNF- α 的水準的增加，細胞因數水準的最大增加出現在輸注結束後的 2 小時。在 $>2 \mu\text{g/kg}$ 的劑量水準觀察到 IL-10 和 IFN- γ 的 **DART-A** 劑量依賴性增加，而在 $\geq 5 \mu\text{g/kg}$ 的劑量水準觀察到 IL-6 的增加。TNF- α 水準的改變較小，並且僅僅在最高的劑量水準($10 \mu\text{g/kg}$)被觀察到。細胞因數水準的改變是暫態的，並且在輸注開始的 24 小時內回到基線處或附近，並且沒有與這些增加的細胞因數水準相關的臨床觀察。在第 15、22 和 29 天，**DART-A** 的隨後輸注導致較小的細胞因數水準增加，一般與對照品輸注之後觀察到的那些相當。個體動物中 IL-2、IL-4 和 IL-5 的平均水準顯示不同和單獨的改變，但是在整個研究期間在所有組中都保持 $<20 \text{ pg/mL}$ ，因此不視為是毒理學上顯著的。

【0327】 接收 $0.2 \mu\text{g/kg}$ **DART-A** 的動物中的細胞因數水準與對照品輸注之後觀察到的改變相當(組 1)。

【0328】 食蟹猴中 **DART-A** 介導的迴圈 B-細胞的消除

【0329】 在整個研究期間，測量 B 細胞、T 細胞，包括 T 細胞亞集(CD4 vs CD8)和啟動的標記物(CD25、CD69、PD-1 和 TIM-3)以及 NK 細胞的迴圈絕對水準，作為藥效學端點。在輸注之前和在第 1、8、22 和 29 天輸注結束後 2、22 和 70 小時，在第 37 天最終屍體剖檢之前，並且在恢復期間在第 36、43、50、57、64、78、92、106 和 119 天每週一次或每兩週一次收集樣品。

【0330】 圖 28 顯示，**DART-A** 治療導致 CD20+ B 細胞(預期的靶群體)的劑量依賴性消除。到以 $\geq 2 \mu\text{g/kg}$ 劑量水準的第一次輸注 **DART-A** 開始後的 24 小時，觀察到了 CD20+細胞完全的或幾乎完全消除。CD20+ B 細胞的消除在整個治療期間是持續的並且在最後一次劑量之後保持 3-5 周。在 12-周恢復期的最後數周期間，CD20+ B 細胞存在劑量依賴性回歸，達到劑量前水準。

【0331】 實施例 15**【0332】 在 CLL 初始患者樣品中惡性 B 細胞的自體消除**

【0333】 為了評估 CLL 初始患者樣品中 **DART-A** 介導的溶細胞活性，將患者 PBMC 與 **DART-A** 或**對照 DART 1** 一起溫育。由於有限的患者樣品可用性，僅僅測試了 2 個濃度(50 ng/mL 和 200 ng/mL)。在治療之前和治療 3 和 6 天之後，通過流式細胞術測量 CLL 惡性 B 細胞(CD19+/CD5+或 CD20+/CD5+)和 T 細胞(CD19-/CD5+或 CD4+和 CD8+)的百分數。在測試的濃度，**DART-A** 部分阻斷抗 CD19 抗體的染色，因此，不適合使用 CD19+/CD5+對用 **DART-A** 治療之後的惡性 B 細胞設門。因此，通過對 **DART-A** 治療之後 CD20+/CD5+細胞設門來測定惡性 B 細胞消除。

【0334】 從 CLL 惡性 B 細胞和 T 細胞頻率測定的 E:T 比例一般 $\leq 1:10$ 。在顯示的代表性 CLL 供體實驗中，基於包括僅僅 4% 的總 PBMC 和約 90%的鑒定為 CD19+/CD5+惡性 B 細胞的 PBMC 的 CD19-/CD5+ T 細胞，E:T 細胞比例在治療之前是約 1:23。**圖 29A-29I** 和**表 14** 顯示，與 CLL 患者樣品相比，**DART-A** 治療的作用。將 **DART-A** 與 CLL PBMC 一起溫育在評估的兩個 **DART-A** 濃度均導致惡性 B 細胞的時間依賴性消除，同時伴隨在第 6 天觀察到的 T 細胞(CD4 和 CD8)的增加。另外，T 細胞啟動標記物 CD25 在 **DART-A** 治療 6 天之後上調，指示 **DART-A** 在重定向殺傷惡性 B 細胞期間誘導 T 細胞啟動。相反，用**對照 DART 1** 直到第 6 天也沒有觀察到 B 細胞殺傷或 CD25 的上調。

【0335】 值得注意的是，**DART-A** 在評估的兩個濃度均介導相同水準的殺傷，但是殺傷水準隨著時間的推移而增加，在第 3 天和第 6 天分別有約 40%和 85%的惡性 B 細胞被殺死，提示當存在足夠的 **DART-A** 時，時間是在低的 T 細

胞與靶標比例下，有效消除靶細胞的關鍵因素。

表 14 在 DART-A 或對照 DART 1 治療 3 和 6 天之後，CLL PBMC 中惡性 B 細胞 (CD20+/CD5+)、T 細胞(CD4+、CD8+)和啟動的 T 細胞(CD25+/CD4+和 CD25+/CD8+) 的百分數(E:T = 1:23)					
時間點	百分數(%)				
	CD20+/CD5+	CD4+	CD8+	CD25+/CD4+	CD25+/CD8+
第 0 天					
預處理	70.7	n.d. ¹		在第 0 天沒有測量 CD4+和 CD8+ T 細胞亞集。如上述，CD19-/CD5+用於限定第 0 天的 T 細胞群體(4%)。	
第 3 天					
DART-A (50ng/mL)	40.5	1.01	1.78	在第 0 天或第 3 天，總體 T 細胞百分數太低 (<5%)，而無法評估 T 細胞啟動標記物 CD25	
對照 DART 1 (50 ng/mL)	73.5	3.08	1.81		
DART-A (200 ng/mL)	42.3	1.61	1.68		
對照 DART 1 (200 ng/mL)	72.9	3.23	1.62		
第 6 天					
DART-A (50ng/mL)	11.3	57.4	22.2	87.7	82.8
對照 DART 1 (50 ng/mL)	74.9	3.54	2.26	1.4	20.6
DART-A (200 ng/mL)	12.3	65.2	20.9	91.6	90.7
對照 DART 1 (200 ng/mL)	73.4	2.79	1.82	1.4	14.3

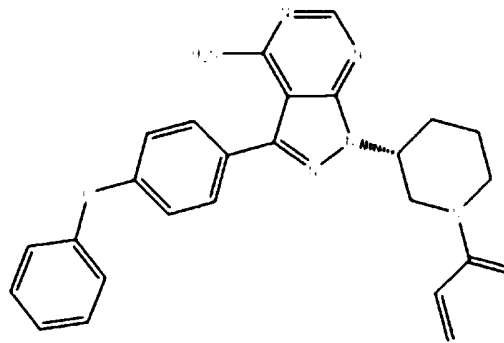
【0336】 實施例 16

【0337】 CD19 x CD3 雙特異性分子與依魯替尼的組合

【0338】 如上所顯示，DART-A 展示了對 CD19+ B 細胞，包括正常的 B 細胞和淋巴瘤/白血病 B 細胞，有效的重定向 T 細胞介導的殺傷。DART-A 介導的重定向細胞殺傷與 T 細胞的伴隨濃度依賴性和靶依賴性啟動相關(如通過 CD4 和

CD8 亞集中啟動標記物 CD25 和 CD69 的上調所測量的)，以及與細胞因數釋放的濃度依賴性和靶依賴性誘導相關，如由上清液中增加水準的 TNF- α 、IFN- γ 和 IL-2 所表示的。

【0339】 依魯替尼(一種布魯頓酪氨酸激酶(BTK)的不可逆的小分子抑制劑)被美國食品和藥品管理局批准為用於套細胞淋巴瘤(MCL)和慢性淋巴細胞性白血病(CLL)的第二線治療(依魯替尼包裝插入物；Wang, M.L.等(2013) “*Targeting BTK with Ibrutinib in Relapsed or Refractory Mantle-Cell Lymphoma,*” N. Engl. J. Med. 369(6):507-516)。



依魯替尼

【0340】 另外，依魯替尼與利妥昔單抗在復發性/難治癒的(R/R) CLL 的若干組合研究，或依魯替尼與利妥昔單抗和苯達莫司汀在 R/R 非霍奇金淋巴瘤(NHL)，包括濾泡淋巴瘤(FL)、邊緣區淋巴瘤(MZL)、MCL 和彌散性大 B-細胞淋巴瘤(DLBCL)的若干組合研究目前正在臨床研究中。BTK 和可誘導的 T-細胞激酶(ITK)是調節淋巴細胞發育、啟動和分化的酪氨酸激酶的 TEC 家族的成員。依魯替尼也不可逆地結合 ITK (Dubovsky, J.A.等(2013) “*Ibrutinib is An Irreversible Molecular Inhibitor of ITK Driving a Th1-Selective Pressure in T Lymphocytes,*” Blood 122(15):2239-2249)，其是 T 細胞中主要的 TEC 激酶並且在 T-細胞信號傳

導、增殖、啟動和細胞因數釋放中起到關鍵作用(Berg, L.J.等 (2005) “*Brunton Tyrosine Linase Inhibitor Ibrutinib (PCI-32765) Has Significant Activity in Patients with Relapsed/Refractory B-Cell Malignancies*,” Annu. Rev. Immunol. 23:549-600)。

【0341】 **DART-A** 和依魯替尼的組合在臨床上可能是有利的。但是，在沒有直接實驗情況下這無法被評估，因為報導的依魯替尼與 ITK 的交叉反應性；依魯替尼的這種交叉反應性可潛在地抑制 T-細胞功能。因此，確定了依魯替尼對 T 細胞的影響，並且研究了尤其關於 T 淋巴細胞暴露於臨床上相關的藥理學水準的依魯替尼是否通常會影響 T-細胞功能的問題，更具體而言，研究了 DART-A 介導的對 CD19 陽性靶細胞的重定向殺傷和 T-細胞啟動。

【0342】 用於體外測試的依魯替尼濃度的選擇

【0343】 在最高推薦的依魯替尼劑量[MCL 中每天一次口服劑量的 560 mg (依魯替尼包裝插入物；Advani, R.H.等(2013) “*Brunton Tyrosine Kinase Inhibitor Ibrutinib (PCI-32765) has Significant Activity in Patients With Relapsed/Refractory B-Cell Malignancies*,” J. Clin. Oncol. 31(1):88-94)]，依魯替尼最大($C_{\max}$)和最小($C_{\min}$)血清濃度值分別是約 250 和 25-50nM。在本文所述的實驗中，包括 $C_{\min}$ 和高達 2500 nM ($10 \times C_{\max}$)多個 $C_{\max}$ 的依魯替尼濃度被用於確保適當的劑量覆蓋以及擴大的藥理學條件。

【0344】 依魯替尼獨自對離體 T-細胞增殖、啟動和細胞因數產生的作用

【0345】 在離體 T-細胞增殖/啟動條件下，用增加濃度的依魯替尼(0 nM、25 nM、250nM、750 nM 或 2500 nM)處理正常人 T 細胞(100,000/孔) 0、24、48 和 72 小時，所述條件包含 T-細胞活化劑抗 CD3/CD28 磁珠(Dynabeads)和 rhIL-2。

【0346】 T 細胞增殖

【0347】 使用 CellTiter-Glo® Luminescent Viability Assay(螢光活力試驗)測定細胞活力,其中相對光單位(RLU)與存活細胞的數量成比例。用濃度為 25、250、750 或 2500 nM 的依魯替尼共處理人 T 細胞多達 3 天,對 T 細胞回應抗 CD3/CD28 和 rhIL-2 刺激的能力沒有影響,如通過針對未治療的和依魯替尼治療 T 細胞細胞數目在 72 小時內類似的增加所證明的。該結果與先前報導的資料一致,提示依魯替尼不明顯抑制 T 細胞生長(Herman, S.E.等(2011) “*Brunton Tyrosine Kinase Represents a Promising Therapeutic Target for Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia and is Effectively Targeted by PCI-32765*,” Blood 117(23):6287-6296 ; Honigberg, L.A.等(2010) “*The Brunton Tyrosine Kinase Inhibitor PCI-32765 Blocks B-Cell Activation and is Efficacious in Models of Autoimmune Disease and B-Cell Malignancy*,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 107(29):13075-13080)。

【0348】 T 細胞啟動

【0349】 通過流式細胞術測定 CD4⁺和 CD8⁺ T 細胞亞集中 CD25 的百分數。也對用抗 CD3/CD28 和 rhIL2 啟動的 T 細胞評估了單獨的依魯替尼治療對於 T-細胞啟動標記物 CD25 的上調的作用。依魯替尼以劑量依賴性方式抑制 CD25 上調。在依魯替尼濃度 ≤ 250 nM(在 560 mg 的口服劑量之後,等於或小於 C_{max} 的水準)時,觀察到了對 CD25 上調的極小或沒有抑制。在 750 nM,依魯替尼似乎對於 CD25⁺上調具有一些適度的影響。在測試的依魯替尼的最高濃度(2500 nM),在 24 小時孵育之後觀察到 CD25 上調的明顯下降,其中與在沒有依魯替尼的情況下觀察到的 CD25⁺ T 細胞的百分數相比,CD8⁺/CD25⁺ T 細胞的數量下降約 95%並且 CD4⁺/CD25⁺ T 細胞數量下降~60%。48 和 72 小時孵育之後,在存在 2500 nM 依魯替尼的情況下也觀察到了 CD4⁺/CD25⁺和 CD8⁺/CD25⁺ T 細胞的下

降。

【0350】 細胞因數產生

【0351】 通過 ELISA 測量 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-10 的產生。與未處理的 T 細胞相比，在用濃度為高達 750 nM 的依魯替尼處理多達 72 小時之後，觀察到回應抗 CD3/CD28 啟動對 TNF- α 、IL-10 和 IFN- γ 釋放沒有影響或影響極小。但是，在溫育短至 24 小時之後用 2500 nM 依魯替尼處理降低了 IL-10 和 TNF- α 產生；在 2500 nM 組的所有時間點也觀察到了 IFN- α 少量的下降。因為在測試的離體 T-細胞增殖/啟動條件下的最小 IL-6 細胞因數產生，評估依魯替尼對 IL-6 誘導的作用是不可行的。

【0352】 儘管在任何評估的劑量(高達最高推薦的劑量的 $C_{\max}$ 的 10 倍)依魯替尼均不抑制 T-細胞增殖，但是微摩爾濃度為最高推薦的劑量的 $C_{\max}$ 的 3 倍以上的依魯替尼的確抑制抗 CD3/CD28 和 rhIL-2 誘導的 T-細胞啟動，如通過抑制 CD25 上調和細胞因數產生所例證的。這些發現與公開的、關於依魯替尼對 T 細胞的作用的資料一致(Herman, S.E.等(2011) “*Brunton Tyrosine Kinase Represents a Promising Therapeutic Target for Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia and is Effectively Targeted by PCI-32765,*” Blood 117(23):6287-6296；和 Honigberg, L.A.等(2010) “*The Brunton Tyrosine Kinase Inhibitor PCI-32765 Blocks B-Cell Activation and is Efficacious in Models of Autoimmune Disease and B-Cell Malignancy,*” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 107(29):13075-13080)。依魯替尼對 CD25 的上調和細胞因數產生的抑制作用可能是由失活 ITK 或影響 T 細胞中表達的備用激酶(一種或多種)造成的。

【0353】 依魯替尼-預處理 T 細胞對 CD19 x CD3 雙特異性分子(DART-A)

介導的針對表達 CD19 的靶細胞的重定向 T 細胞殺傷的作用

【0354】 收穫懸浮培養的 CD19 陽性 Raji/GF 細胞並且用 1x DPBS 或包含沒有酚紅的 RPMI 1640、10% FBS 和青黴素/鏈黴素(pen/strep)的試驗培養基洗滌。使用 Beckman Coulter Vi-細胞計數器，通過台盼藍染料排除法(Trypan Blue dye exclusion)，測量細胞濃度和活力。在試驗培養基中將靶細胞稀釋至細胞密度為 2×10^5 細胞/mL。將 50 μ L 的稀釋細胞懸浮添加至 96 孔平底 NUNCLON DELTA 白板(Thermo Scientific Cat#136101)中。對於每個處理，包括重複孔。在用依魯替尼處理上述不同的次數之後，收集人 T 細胞並且用試驗培養基洗滌 3 次。在最終洗滌之後，計數 T 細胞並且以 1×10^6 細胞/mL 的細胞密度再懸浮在試驗培養基中，以及每孔添加 100 μ L。初始將 **DART-A** 稀釋至待添加至板的最高濃度的 4 倍的濃度，然後製備 10 倍連續稀釋物。將 50 μ L/孔的 **DART-A** 添加至包含 100 μ L 效應 T 細胞/孔和 50 μ L 靶 Raji/GF 細胞/孔的板中。在 37°C，5% CO₂ 中溫育板 24 小時。溫育之後，在從每個孔去除 100 μ L 上清液之後，將 100 μ L/孔 Steady-Glo® 螢光素酶底物添加至板。在室溫下在黑暗中溫育板 10 分鐘，然後使用 Victor2 Multilabel 板閱讀器(Perkin Elmer #1420-014)測量螢光素酶強度，螢光素酶相對光單位(RLU)作為讀數。RLU 值指示靶細胞的相對活力。如下描述地計算細胞毒性百分數值，並且使用 GraphPad Prism 6 軟體產生濃度-回應曲線，所述 GraphPad Prism 6 軟體具有通過 S 形(sigmoidal)劑量應答函數的擬合曲線。

【0355】 由 RLU 資料使用下述公式計算特定細胞裂解：

$$\text{細胞毒性}(\%) = 100 - \frac{[\text{沒有DART-A的對照的RLU} - \text{具有DART-A的樣品的RLU}]}{[\text{沒有DART-A的對照的RLU}]}$$

【0356】 將依魯替尼-預處理的 T 細胞與 **DART-A** 溫育約 24 小時後測量 Raji/GF 細胞的活力並且測定細胞毒性百分數。如圖 30A-30C 中顯示，來自用依魯替尼預處理的所有組的 T 細胞均能夠被 **DART-A** 重定向，以有效殺傷 Raji/GF 靶細胞。更具體而言，依魯替尼-預處理的許多 T 細胞組的 $E_{\max}$ 值(最大細胞殺傷百分數) (82-96%)與未處理的 T 細胞的那些(89-95%)類似(表 15)。類似地， EC_{50} 值(一半最大殺傷活性的 **DART-A** 濃度)對於依魯替尼-預處理和未處理的 T-細胞組類似，除了當 T 細胞用 2500 nM 依魯替尼預處理時 EC_{50} 值的輕微增加(~3 倍)(表 15)。在 **DART-A** 處理之前，用依魯替尼預處理多達 72 小時的 T 細胞以與未處理的 T 細胞相當或幾乎相當的水準顯示 **DART-A** 介導的對表達 CD19 的靶細胞的重定向殺傷。

表 15

使用增加濃度的依魯替尼預處理不同時間的 T 細胞，**DART-A** 介導的對表達 CD19 的靶細胞的重定向殺傷的 EC_{50} 和 $E_{\max}$ 值

預處理時間 (小時)	依魯替尼預處理									
	0 nM		25 nM		250 nM		750 nM		2500 nM	
	DART-A		DART-A		DART-A		DART-A		DART-A	
	EC_{50}	$E_{\max}$	EC_{50}	$E_{\max}$	EC_{50}	$E_{\max}$	EC_{50}	$E_{\max}$	EC_{50}	$E_{\max}$
	(ng/mL)	(%)	(ng/mL)	(%)	(ng/mL)	(%)	(ng/mL)	(%)	(ng/mL)	(%)
24	0.042	89	0.028	90	0.033	90	0.037	90	0.104	82
48	0.0016	94	0.0015	93	0.0011	94	0.0012	95	0.0044	86
72	0.0031	95	0.0021	95	0.0020	94	0.0018	96	0.0085	94

【0357】 使用純化的人 T 細胞，評估伴隨暴露(concomitant exposure)于依

魯替尼和 DART-A 對 DART-A-介導的針對表達 CD19 的靶細胞的重定向 T-細胞殺傷、T-細胞啟動和細胞因數釋放

【0358】 如上述進行試驗，除了以下之外：1)用新鮮的人 T 細胞代替依魯替尼預處理的人 T細胞；2)將 50 μ L 包含 200,000 細胞的 T 細胞添加至每個孔中；和 3)將 10、3、1、0.2 或 0 μ M 的 50 μ L 依魯替尼溶液添加至試驗板中。也如上述添加 50 μ L/孔的 DART-A。通過將 1000 μ M 原料液在試驗培養基中的 100% DMSO 中稀釋製備依魯替尼溶液，DMSO 濃度被稀釋至 1% DMSO。板上的終依魯替尼濃度是 2500、750、250、50 或 0 nM 並且終 DMSO 濃度是 0.25%。如先前描述，將板溫育和處理。

【0359】 重定向 T 細胞殺傷

【0360】 DART-A 展示對表達 CD19 的 Raji/GF 靶細胞的濃度依賴性重定向 T-細胞殺傷。用依魯替尼同時處理不抑制 DART-A 最大殺傷活性(在每個時間點，對於每個依魯替尼處理組，與未處理的組相比， $E_{\max}$ 值類似；表 16)。但是，濃度為 750 和 2500 nM 的依魯替尼降低了 DART-A 介導的殺傷的效力，如在兩個時間點分別增加約 8-9 倍和超過 150 倍的 EC_{50} 值所證實的(見圖 31 和 31B 和表 16)。相反，依魯替尼濃度 $\leq$ 250 nM，每天一次最高推薦劑量 560 mg 的 $C_{\max}$ 濃度對於 DART-A 介導的對表達 CD19 的靶細胞的重定向 T-細胞殺傷沒有抑制作用或具有極小的抑制作用。

【0361】 值得注意的是，當依魯替尼與 DART-A 同時添加至 CTL 試驗時，觀察到的對 DART-A 介導的重定向殺傷活性的抑制作用大於當 T 細胞被依魯替尼預處理並且在 CTL 試驗和添加 DART-A 之前被洗滌時的觀察到的抑制作用(即，用 2500nM 依魯替尼， EC_{50} 值的 150 至 240 倍對比約 3 倍改變)(表 16 對表 15)。但是，不考慮由於依魯替尼暴露於 T 細胞的時機而導致的抑制作用的差異，濃度 $\leq$ 250 nM 的依魯替尼對於 DART-A 介導的針對表達 CD19 的靶細胞的重定

向 T-細胞殺傷沒有影響或具有極小的影響。

表 16

在存在不同濃度的依魯替尼的情況下，DART-A 介導的針對表達 CD19 的靶細胞的 T-細胞重定向殺傷的 EC_{50} 和 E_{max} 值

CTL 試驗 時間 (小 時)	依魯替尼處理									
	0 nM		50 nM		250 nM		750 nM		2500 nM	
	DART-A		DART-A		DART-A		DART-A		DART-A	
	EC_{50}	E_{max}	EC_{50}	E_{max}	EC_{50}	E_{max}	EC_{50}	E_{max}	EC_{50}	E_{max}
	(ng/mL)	(%)	(ng/mL)	(%)	(ng/mL)	(%)	(ng/mL)	(%)	(ng/mL)	(%)
24	0.014	82	0.013	82	0.022	86	0.11	92	2.18	83
48	0.0022	96	0.0016	96	0.0041	98	0.019	100	0.52	100

【0362】 T 細胞啟動

【0363】 為了確定通過劑量 ≥ 750 nM 的依魯替尼對 DART-A 介導的重定向 T-細胞殺傷的抑制是否與 T-細胞啟動的抑制相關，通過評估 T-細胞啟動標記物 CD25 的表達來評估 T 細胞的啟動特徵。T 細胞的人 CD4⁺和 CD8⁺亞集中 CD25 以 DART-A 濃度依賴性方式上調(圖 32A-32D)。但是，依魯替尼的存在以濃度依賴性方式抑制 DART-A 介導的 CD25 上調。對於濃度 ≤ 250 nm 的依魯替尼，與未處理的(即，沒有依魯替尼)組相比，以最大水準(E_{max})的 T 細胞啟動(%CD25)觀察到小於 20%抑制(表 17)。在依魯替尼濃度 750 和 2500 nM，以最大水準(E_{max})的 T-細胞啟動分別觀察到高達 36%或高達 63%抑制(表 17)。依魯替尼也抑制 DART-A 介導的 CD25 上調的效力，如通過隨著依魯替尼濃度增加而增加的 EC_{50} 值所例證的(圖 32A-32D)。

表 17

在存在表達 CD19 的靶細胞和不同濃度的依魯替尼的情況下，DART-A 介導的 T 細胞啟動的

$E_{\max}$ 值

CTL 試驗 時間(小 時)	依魯替尼處理									
	0 nM		50 nM		250 nM		750 nM		2500 nM	
	$E_{\max}$ (% CD25+)		$E_{\max}$ (% CD25+)		$E_{\max}$ (% CD25+)		$E_{\max}$ (% CD25+)		$E_{\max}$ (% CD25+)	
	CD8+	CD4+	CD8+	CD4+	CD8+	CD4+	CD8+	CD4+	CD8+	CD4+
24	65	69	53	65	53	65	42	44	24	32
48	66	69	60	63	56	65	49	53	27	38

【0364】 細胞因數產生

【0365】 也研究了在 DART-A 介導的針對表達 CD19 的靶細胞的重定向 T-細胞殺傷期間，同時暴露于依魯替尼和 DART-A 對 T 細胞的 TNF- α 、IFN- γ 和 IL-2 的伴隨細胞因數產生的影響。觀察到的 TNF- α 、IFN- γ 和 IL-2 的 DART-A 濃度依賴性細胞因數產生如通過在沒有依魯替尼的情況下產生的最高的細胞因數水準($E_{\max}$)所預期的(圖 33A-33C)。依魯替尼的存在導致 $E_{\max}$ 值降低並且 EC_{50} 值增加(表 18)。更具體而言，依魯替尼以濃度依賴性方式抑制細胞因數產生；對於每個評估的細胞因數，最高的依魯替尼濃度(2500 nM)導致 $E_{\max}$ 最大下降。依魯替尼也抑制 DART-A 介導的細胞因數產生的效力，如通過隨著依魯替尼濃度的增加而 EC_{50} 值增加所例證的(表 18)。

表 18

在存在表達 CD19 的靶細胞和不同濃度的依魯替尼的情況下，DART-A-介導的 T-細胞細胞

因數釋放的 EC ₅₀ 和 E _{max} 值										
細胞因 數	依魯替尼處理 (24 小時)									
	0 nM		50 nM		250 nM		750 nM		2500 nM	
	DART- AEC ₅₀	E _{max} pg/m	DART- AEC ₅₀	E _{max} pg/m	DART- AEC ₅₀	E _{max} pg/m	DART- AEC ₅₀	E _{max}	DART- AEC ₅₀	E _{max}
	ng/mL	L	ng/mL	L	ng/mL	L	ng/mL	pg/mL	ng/mL	pg/mL
IFN- γ	0.63	12095	0.93	10849	1.53	9184	2.23	6144	6.12	2291
TNF- α	0.31	3805	0.56	3514	0.23	2845	0.71	2558	2.17	2395
IL-2	0.030	8466	0.067	8158	0.13	8016	0.52	8235	4.75	6136

【0366】 綜合考慮，這些結果指示，以高達 250 nM 的濃度(每天一次最高推薦劑量 560 mg 的 C_{max} 濃度)，與依魯替尼同時處理不抑制或僅極小抑制(即，不明顯影響)DART-A 介導的 Raji/GF 靶細胞殺傷。但是，用 750 nM 的依魯替尼觀察到了輕微抑制，並且用 2500 nM 的依魯替尼誘導了明顯抑制。依魯替尼也誘導伴隨 T-細胞啟動和細胞因數產生的濃度依賴性抑制，在 250 nM 為中等抑制並且在 2500 nM 為更明顯抑制。

【0367】 使用人 PBMC 評估伴隨暴露于依魯替尼和 DART-A 對 DART-A 介導的自體 B-細胞消除、T 細胞啟動和細胞因數釋放

【0368】 在生理學上相關細胞背景下，用包括靶細胞(CD19+ B 細胞)和效應細胞(CD3+ T 細胞)二者的人 PBMC 的自體 B 細胞消除試驗來評估依魯替尼對 DART-A 介導的原代 B-細胞消除、伴隨 T-細胞啟動和細胞因數釋放的作用。

【0369】 如圖 34 和表 19 中顯示，依魯替尼劑量依賴性抑制人 PBMC 中 DART-A 介導的原代 B-細胞(CD20+)消除，在 ≤ 250 nM 的依魯替尼濃度觀察到

極小抑制至沒有抑制，並且在 750 或 2500 nM 依魯替尼，分別記錄了 8%或 60% 的抑制。與在之前使用純化的人 T 細胞和表達 CD19 的 Raji/GF 靶細胞的實驗中獲得的結果類似，存在伴隨 T-細胞啟動和細胞因數產生的依魯替尼濃度依賴性抑制，其中在 250 nM 依魯替尼部分抑制，並且在 2500 nM 幾乎完全抑制(圖 35A-35D 和圖 36A-36C)。依魯替尼不僅僅抑制 DART-A 介導的最大的細胞因數產生($E_{\max}$)，而且也降低了 DART-A 介導的細胞因數產生的效力，如通過隨著依魯替尼濃度的增加而增加的 EC_{50} 值所例證的(表 20)。總之，這些資料提示，濃度為近似於最大推薦的每日口服 560 mg 劑量的 $C_{\max}$ 的 250 nM 的依魯替尼可潛在地限制非期望的 T-細胞細胞因數應答，而不影響 DART-A 介導的對 CD19+靶細胞的期望的殺傷。

表 19

在存在不同濃度的依魯替尼的情況下，通過人 PBMC，針對 DART-A 介導的自體 B 細胞消除的 EC_{50} 和 B 細胞消除的百分數

依魯替尼處理 (48 小時)									
0 nM		50 nM		250 nM		750 nM		2500 nM	
DART-AEC ₅₀ (ng/mL)	B-細胞消除 (%)	DART-AEC ₅₀ (ng/mL)	B-細胞消除 (%)	DART-AEC ₅₀ (ng/mL)	B-細胞消除 (%)	DART-AEC ₅₀ (ng/mL)	B-細胞消除 (%)	DART-AEC ₅₀ (ng/mL)	B-細胞消除 (%)
0.79	100	0.52	100	0.91	100	2.55	92	3.56	40

表 20

在存在不同濃度的依魯替尼的情況下，通過人 PBMC，與 DART-A 介導的用人 PBMC 的自體 B-細胞

消除相關的 T-細胞細胞因數釋放的 EC ₅₀ 和 E _{max} 值										
細胞 因數	依魯替尼處理 (24 小時)									
	0 nM		50 nM		250 nM		750 nM		2500 nM	
	DART-AEC ₅₀	E _{max}	DART-AEC ₅₀	E _{max}	DART-AEC ₅₀	E _{max}	DART-AEC ₅₀	E _{max}	DART-AEC ₅₀	E _{max}
	ng/mL	pg/mL	ng/mL	pg/mL	ng/mL	pg/mL	ng/mL	pg/mL	ng/mL	pg/mL
IFN- γ	1.17	852	2.17	561	3.20	254	9.50	60	>200	0
TNF- α	6.18	648	1.26	299	4.36	214	16.87	81	>200	0
IL-2	6.07	230	3.79	86	39.84	101	>200	0	>200	0

【0370】 用依魯替尼和 DART-A 連續處理對細胞殺傷的評估

【0371】 依魯替尼敏感 B 淋巴瘤細胞系用作靶細胞，以評估依魯替尼和 **DART-A** 的聯合治療的作用，其使用純化的人原代 T 細胞(全 T 細胞)作為效應細胞。

【0372】 對於這些研究，將 20,000 個依魯替尼敏感 B 淋巴瘤細胞添加至每個孔中，並且用 330、66、13、2.6、0.53 或 0 nM 依魯替尼預處理 24 小時；在 24 小時依魯替尼處理之後，將 50 μ L/孔的連續稀釋的 **DART-A** (200 至 2.0×10^{-7} ng/mL，10 倍連續稀釋)和 50 μ L/孔的效應全 T 細胞，以 3:1 的 E:T 比例添加至每個孔。**DART-A** 處理之後 48 小時，收穫細胞混合物，並且在用抗 CD20-PE 和 7-氨基放線菌素 D(7-AAD)染色之後進行流式細胞術分析，以確定收集的細胞混合物中存活的細胞數目(CD20+/7-AAD-)。使存活細胞的百分數相對於對照(0.1% DMSO 媒介處理的)細胞歸一化，並且轉換成凋亡細胞百分數(100%- % 存活細胞)。使用 GraphPad Prism 6 軟體產生 **DART-A** 濃度響應曲線(相對於 0.1% DMSO 處理的細胞的殺傷百分數)，所述 GraphPad Prism 6 軟體具有通過 S 形劑量回應函

數的曲線擬合。如圖 37 中顯示，**DART-A** 介導的針對依魯替尼敏感 B 淋巴瘤細胞的重定向殺傷通過順序施用依魯替尼和 **DART-A** 而被增強。尤其地，最大 **DART-A** 介導的溶細胞殺傷被提高並且在較低濃度的 **DART-A** 觀察了高水準的細胞殺傷。

【0373】 結論

【0374】 **DART-A** 展示對 CD19+ B 細胞，包括正常 B 細胞和淋巴瘤/白血病 B 細胞和細胞系，的有效的重定向 T-細胞介導的殺傷。依魯替尼是 BTK 的不可逆抑制劑，在 B-細胞惡性腫瘤中具有有希望的活性。結果表明組合 **DART-A** 與依魯替尼的治療性策略的價值。考慮到依魯替尼也不可逆地結合 ITK，所述 ITK 是 TEC-激酶家族的 T-細胞主要成員(包括 BTK)，在 T-細胞增殖、啟動和細胞因數釋放中起到關鍵作用，進行關於依魯替尼對與 **DART-A** 活性相關的人 T-細胞功能的影響的研究。

【0375】 僅僅用依魯替尼，濃度範圍是 C_{50} (25 nM)至最高推薦的 560 mg 每日口服劑量的 C_{max} (250 nM)、3x C_{max} (750 nM)或 10x C_{max} (2500 nM)，處理人 T 細胞不抑制 T-細胞體外增殖。而高依魯替尼濃度(≥ 750 nM)抑制 T-細胞啟動標記物 CD25 的上調，較低的濃度(≤ 250 nM)對 CD25 上調具有極小的作用。此外，2500 nM 的依魯替尼抑制通過抗 CD3/CD28 接合刺激的細胞因數(IL-10、TNF- α 或 IFN- γ)的誘導，而濃度 ≤ 750 nM 對於細胞因數誘導沒有抑制作用。

【0376】 首先，在用依魯替尼隨後通過 **DART-A** 的連續處理之後，評估依魯替尼對 **DART-A** 介導的細胞毒性的潛在的抑制作用。當效應 T 細胞用濃度高達 750 nM 的依魯替尼預處理時，不抑制 **DART-A** 介導針對 CD19+靶細胞的重定向 T-細胞殺傷，而當 T 細胞用 2500 nM 依魯替尼預處理時觀察到一些極小的抑制作用。

【0377】 其次，在伴隨暴露於兩種藥物的環境下，在 CTL 試驗中使用純化

的人 T 細胞作為效應細胞和 CD19 陽性 (Raji/GF) 靶細胞(E:T 細胞比例為 10:1) 或使用具有處於生理學上相關的 E:T 細胞比例和細胞背景的人 PBMC 的自體 B-細胞消除試驗，評估依魯替尼對 **DART-A** 介導的活性的潛在的抑制作用。在兩個試驗中，在高達 250 nM 的依魯替尼濃度，依魯替尼對 **DART-A** 重定向殺傷的抑制作用極小或沒有，但是通過 2500 nM 依魯替尼觀察到實質的抑制。依魯替尼也以濃度依賴性方式降低 CD25 T-細胞啟動標記物的上調和細胞因數釋放，其中在 250nM 觀察到部分抑制並且在 2500 nM 下觀察到明顯的或幾乎全部的抑制。

【0378】 在 CTL 試驗中，在依魯替尼預處理靶細胞(依魯替尼敏感 B 淋巴瘤細胞)隨後伴隨暴露於兩種藥物的環境下，在存在純化的人 T 細胞作為效應細胞(E:T 細胞比例為 3:1)的情況下，評估在與 **DART-A** 的組合中依魯替尼處理對靶細胞的作用。在這些試驗中，**DART-A** 重定向殺傷通過用依魯替尼和 **DART-A** 的連續處理被增強。

【0379】 總結，濃度為 250 nM (對應於最高推薦的每日口服劑量的 C_{max}) 的依魯替尼，對於 T 細胞功能(增殖，T 細胞啟動，和細胞因數釋放)或當伴隨 **DART-A** 施用時對於 **DART-A** 介導的針對 CD19+靶細胞的重定向 T 細胞殺傷，具有極小或沒有抑制作用(即，沒有顯著的作用)。但是，在該 C_{max} 濃度，當細胞同時暴露于兩種劑時，依魯替尼部分抑制 CD25 T-細胞啟動標記物的上調和細胞因數產生。這些資料提示，濃度為 250 nM 的依魯替尼可潛在地限制 T 細胞細胞因數應答，減少有害的 T 細胞細胞因數產生，而不影響 **DART-A** 介導的針對 CD19+靶細胞的期望的重定向 T 細胞殺傷。另外，用濃度高達 750 nM 的依魯替尼預處理的 T 細胞保持了 **DART-A** 介導的針對 CD19+靶細胞的溶細胞殺傷活性，水準與不暴露于依魯替尼的 T 細胞的水準相當，提示順序施用依魯替尼和 **DART-A** 之後，依魯替尼對於 **DART-A** 介導的溶細胞活性沒有殘留的潛在抑制作用。而且，**DART-A** 介導的溶細胞活性在順序施用依魯替尼和 **DART-A** 之後

被增強。

【0380】 本說明書中提到的所有出版物和專利通過引用併入本文，達到如同具體和單獨指出每個單個出版物或專利申請通過參考以其整體併入的相同程度。另外，為了所有的目的，2015 年 9 月 22 日提交的美國專利申請系列號 PCT/US15/51314，和 2014 年 9 月 26 日提交的提交的美國專利申請號 62/055,695 通過引用以它們的整體併入本文。儘管已經結合其具體實施方式描述了本發明，但是應當理解，其能夠被進一步修改，並且本申請旨在覆蓋大體上根據本發明原理並且包括與本公開的偏離的本發明的任何變型、用途或改變，只要在本發明所屬領域的已知或習慣實踐內並且如可應用至本文之前所闡釋的本質特徵。

【符號說明】

【0381】 無



201720458

申請日: 105/12/02

【發明摘要】

IPC分類: *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
G07K 16/28 (2006.01)

【中文發明名稱】 能夠結合CD19和CD3的雙特異性單價雙抗體以及其用途

【英文發明名稱】 Bi-Specific Monovalent Diabodies That Are Capable of Binding CD19 and CD3, and Uses Thereof

【中文】

本發明涉及聯合療法，所述聯合療法包括施用：(1)能夠特異性結合至CD19和結合至CD3的雙特異性分子(即，CD19 x CD3雙特異性分子)，和(2)用於治療疾病，尤其治療與CD19的表達相關或特徵在於CD19的表達的疾病的布魯頓酪氨酸激酶(BTK)抑制劑。優選地，這類CD19 x CD3雙特異性分子是雙特異性單價雙抗體。本發明涉及藥物組合物，其包含這類CD19 x CD3雙特異性分子、BTK抑制劑或這些劑的組合。本發明另外涉及使用這類藥物組合物治療疾病，尤其是治療與CD19的表達相關或特徵在於CD19的表達的癌症的方法。

【英文】

The present invention is directed to a combination therapy involving the administration of: (1) a bi-specific molecule capable of specifically binding to CD19 and to CD3 (i.e., a CD19 x CD3 bi-specific molecule), and (2) a Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) inhibitor for the treatment of disease, in particular treatment of a disease associated with or characterized by the expression of CD19. Preferably, such a CD19 x CD3 bi-specific molecules are bi-specific monovalent diabodies. The invention is directed to pharmaceutical compositions that contain such a CD19 x CD3 bi-specific

molecule, a BTK inhibitor, or a combination of such agents. The invention is additionally directed to methods for the use of such pharmaceutical compositions in the treatment of disease, in particular, treatment of a cancer associated with or characterized by the expression of CD19.

【指定代表圖】 圖2A

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種治療與 CD19 的表達相關或特徵在於 CD19 的表達的疾病或病況的方法，所述方法包括向有需要的受試者施用：

- (a) 能夠特異性結合至 CD19 和 CD3 的雙特異性分子，和
- (b) 布魯頓酪氨酸激酶(BTK)抑制劑。

【第2項】 如請求項 1 所述的方法，其中所述雙特異性分子是雙特異性單價 CD19 x CD3 雙抗體。

【第3項】 如請求項 2 所述的方法，其中所述雙特異性單價 CD19 x CD3 雙抗體包括 Fc 結構域。

【第4項】 如請求項 1 至 3 中任一項所述的方法，其中所述雙特異性分子能夠與人和靈長類 CD19 都交叉反應以及與人和靈長類 CD3 都交叉反應。

【第5項】 如請求項 3 至 4 中任一項所述的方法，其中所述雙特異性分子是 CD19 x CD3 雙特異性單價 Fc 雙抗體，所述雙抗體包括第一多肽鏈、第二多肽鏈和第三多肽鏈，其中所述多肽鏈形成共價結合的複合物，並且其中：

I. 所述第一多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：

A. 結構域 IA，包括

(1) 亞結構域(IA1)，其包括能夠結合至 CD19 (VL_{CD19})或 CD3 (VL_{CD3})的 VL 結構域；和

(2) 亞結構域(IA2)，其包括能夠結合至 CD19 (VH_{CD19})或 CD3 (VH_{CD3})的 VH 結構域；

其中所述亞結構域 IA1 和 IA2 通過多肽連接體彼此分開，並且是

- (a) VL_{CD19} 和 VH_{CD3}；或
- (b) VL_{CD3} 和 VH_{CD19}；

B. 結構域 IB，包括帶電荷的異源二聚體促進結構域，其中所述結構域 IB 通過多肽連接體與所述結構域 1A 分開；

C. 結構域 IC，包括抗體的 CH2-CH3 結構域；並且

II. 所述第二多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括：

A. 結構域 IIA，包括

(1) 亞結構域(IIA1)，其包括能夠結合至 CD19 (VL_{CD19})或 CD3 (VL_{CD3})的 VL 結構域；和

(2) 亞結構域(IIA2)，其包括能夠結合至 CD19 (VH_{CD19})或 CD3 (VH_{CD3})的 VH 結構域；

其中所述亞結構域 IIA1 和 IIA2 通過多肽連接體彼此分開，並且是：

(a) VL_{CD19} 和 VH_{CD3}，前提是所述亞結構域 IA1 和 IA2 是 VL_{CD3} 和 VH_{CD19}；
或

(b) VL_{CD3} 和 VH_{CD19}，前提是所述亞結構域 IA1 和 IA2 是 VL_{CD19} 和 VH_{CD3}；

B. 結構域 IIB，其包括帶電荷的異源二聚體促進結構域，其中所述結構域 IIB 通過多肽連接體與所述結構域 IIA 分開，並且其中所述結構域 IB 的所述帶電荷的異源二聚體促進結構域和所述結構域 IIB 的所述帶電荷的異源二聚體促進結構域具有相反的電荷；和

III. 所述第三多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括結構域 IIIC，所述結構域 IIIC 包括抗體的 CH2-CH3 結構域；

其中所述 VL_{CD19} 和所述 VH_{CD19} 結構域形成 CD19 結合結構域，並且所述 VL_{CD3} 和 VH_{CD3} 結構域形成 CD3 結合結構域；並且所述第一多肽鏈和第三多肽鏈的所述 CH2-CH3 結構域形成能夠結合至 Fc 受體的 Fc 結構域，從而形成所述 CD19 x CD3 雙特異性單價雙抗體。

【第6項】 如請求項 5 所述的方法，其中：

(A)所述結構域 IB 和 IIB 各自包括半胱氨酸殘基，其將所述第一多肽鏈經二硫鍵共價結合至所述第二多肽鏈；和

(B)所述結構域 IC 和 IIIC 各自包括半胱氨酸殘基，其將所述第一多肽鏈經二硫鍵共價結合至所述第三多肽鏈。

【第7項】 如請求項 5 至 6 中任一項所述的方法，其中所述 VL_{CD19} 具有 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列並且所述 VH_{CD19} 具有 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列。

【第8項】 如請求項 5 至 7 中任一項所述的方法，其中所述 VL_{CD3} 具有 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列並且所述 VH_{CD3} 具有 SEQ ID NO:29 的氨基酸序列。

【第9項】 如請求項 5 至 8 中任一項所述的方法，其中所述結構域 IC 的所述 CH2-CH3 結構域具有 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列並且所述結構域 IIIC 的所述 CH2-CH3 結構域具有 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列。

【第10項】 如請求項 5 至 9 中任一項所述的方法，其中：

(A)所述結構域 IB 的所述帶電荷的異源二聚體促進結構域具有 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列並且所述結構域 IIB 的所述帶電荷的異源二聚體促進結構域具有 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列；或

(B)所述結構域 IB 的所述帶電荷的異源二聚體促進結構域具有 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列並且所述結構域 IIB 的所述帶電荷的異源二聚體促進結構域具有 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列。

【第11項】 如請求項 5 至 10 中任一項所述的方法，其中：

(A)所述第一多肽鏈具有 SEQ ID NO:35 的氨基酸序列；

(B)所述第二多肽鏈具有 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列；並且

(C)所述第三多肽鏈具有 SEQ ID NO:39 的氨基酸序列。

【第12項】 如請求項 1 至 11 中任一項所述的方法，其中所述 BTK 抑制劑是依魯替尼、GDC-0834、RN-486、CGI-560、CGI-1746、HM-71224、CC-292、ONO-4059、CNX-774 或 LFM-A13。

【第13項】 如請求項 12 所述的方法，其中所述 BTK 抑制劑是依魯替尼。

【第14項】 如請求項 1 至 13 中任一項所述的方法，其中與 CD19 的表達相關或特徵在於 CD19 的表達的所述疾病或病況是癌症。

【第15項】 如請求項 14 所述的方法，其中所述癌症選自：急性髓細胞樣白血病(AML)；慢性骨髓性白血病(CML)，包括 CML 的胚危象和與 CML 相關的 Abelson 癌基因(Bcr-ABL 易位)；骨髓增生異常綜合征(MDS)；急性 B 成淋巴細胞白血病(B-ALL)；彌散性大 B 細胞淋巴瘤(DLBCL)；濾泡淋巴瘤；慢性淋巴細胞性白血病(CLL)，包括 Richter 綜合症或 CLL 的 Richter 轉化；毛細胞白血病(HCL)；急性漿細胞樣樹突細胞腫瘤(BPDCN)；非霍奇金淋巴瘤(NHL)，包括套細胞白血病(MCL)和小淋巴細胞淋巴瘤(SLL)；霍奇金淋巴瘤；系統性肥大細胞增多症；和伯基特淋巴瘤。

