(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118922448 A
(43)申请公布日 2024.11.08

(21)申请号 202380029580.4
(22)申请日 2023.03.21
(30)优先权数据
22163663.2 2022.03.22 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.09.23
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2023/057248 2023.03.21
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/180346 EN 2023.09.28
(71)申请人 莫佛塞斯公司
地址 德国
(72)发明人 M·莫斯梅尔 A·布特曼 S·林茨
(74)专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322
专利代理师 顾小曼 邹亮
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)

权利要求书2页 说明书76页 附图14页

(54)发明名称

CD3特异性的去免疫抗体

(57)摘要

本发明提供亲和力优化和去免疫的特异性结合CD3的人抗体。本公开还提供包含优化的人抗体的双特异性抗体,例如用于活化T细胞。本发明还涉及产生人抗体的方法以及使用它们治疗疾病的方法。

CN 118922448 A

1.一种分离的特异性针对分化簇3(CD3)的人抗体或其抗原结合片段,所述人抗体或其抗原结合片段包含

i.重链可变区(VH),其包括

(a)包含氨基酸序列GFSFGSHYMS(SEQ ID NO:1)的重链互补决定区(HCDR)1,

(b)包含氨基酸序列NINQIGYSSYYVESVKG(SEQ ID NO:2)、NINQIGYSSYYGESVKG(SEQ ID NO:3)或NINQIGYSSYYEESVKG(SEQ ID NO:4)的HCDR2,和

(c)包含氨基酸序列GYSAEFAHRSGLDV(SEQ ID NO:5)、GYSDEFATRSGLDV(SEQ ID NO:6)、GYSEEFAHRSGLDV(SEQ ID NO:7)、GYSDEFAKRSGLDV(SEQ ID NO:8)或GYSDEFAHRSGLDV(SEQ ID NO:9)的HCDR3,和

ii.可变轻链区(VL),其包括

(a)包含氨基酸序列SGSSSNIGSNYVY(SEQ ID NO:10)的轻链互补决定区(LCDR)1,

(b)包含氨基酸序列RNNQRPS(SEQ ID NO:11)的LCDR2,和

(c)包含氨基酸序列AGWSRSLHGAV(SEQ ID NO:12)或AGWSRELHGAV(SEQ ID NO:13)的LCDR3。

2.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与食蟹猴CD3交叉反应性结合。

3.根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是去免疫抗体。

4.根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段在人类中引发免疫应答的风险降低。

5.根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中VH包含与选自SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的氨基酸序列具有至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,且/或VL包含与氨基酸序列SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21具有至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

6.根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中VH和VL选自:

i.包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:20的VL,

ii.包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL,

iii.包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL,

iv.包含氨基酸序列SEQ ID NO:17的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL,

v.包含氨基酸序列SEQ ID NO:18的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL,以及

vi.包含氨基酸序列SEQ ID NO:19的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL。

7.根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是重组抗体或其抗原结合片段。

8.根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体或其抗原结合片段。

9.根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段是Fab、Fab'、$(Fab')_2$、Fv或scFv。

10.根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是全长

抗体。

11.一种双特异性抗体,其包含根据前述权利要求中任一项所述的抗体的抗原结合片段和结合与所述第一抗原结合片段不同的靶抗原的抗体的第二抗原结合片段。

12.根据权利要求11所述的双特异性抗体,其中所述第二抗原结合片段与细胞表面抗原结合,特别是与肿瘤相关细胞表面抗原结合。

13.根据权利要求1-10中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求11-12所述的双特异性抗体,其包含Fc区,所述Fc区包含降低与Fc受体的结合和/或效应功能的一个或多个氨基酸取代。

14.一种核酸组合物,其包含编码根据权利要求1-10和13所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求11-13所述的双特异性抗体的一个核酸序列或多个核酸序列。

15.一种载体组合物,其包含一个或多个载体,所述载体包含根据权利要求14所述的一个核酸序列或多个核酸序列。

16.一种宿主细胞,其包含根据权利要求15所述的载体组合物。

17.一种药物组合物,其包含根据权利要求1-10和13所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求11-13所述的双特异性抗体以及药学上可接受的载体或赋形剂。

18.根据权利要求1-10和13所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求11-13所述的双特异性抗体或根据权利要求17所述的药物组合物,其用作药物。

CD3特异性的去免疫抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及结合CD3的全人抗体,包括其结构修饰的变体,该抗体与HLA蛋白结合的可能性降低,因此一旦施用,在人类中引发免疫应答的风险降低。本发明还提供采用本文公开的CD3特异性抗体的双特异性抗体、生产此类抗体的方法以及使用它们治疗疾病(例如治疗癌症)的方法。

背景技术

[0002] CD3(分化簇3)是一种蛋白质复合物,由至少四条不变的多肽链组成,这些多肽链与T细胞表面上的T细胞受体(TCR)非共价结合,通常称为CD3抗原复合物。抗原与T细胞受体结合后,CD3抗原复合物在T细胞活化中起重要作用。CD3已广泛探索为药物靶标。基于靶向CD3的双特异性抗体的治疗概念依赖于同时结合肿瘤细胞上的细胞表面抗原和细胞毒性T细胞上存在的CD3,目的是结合的细胞毒性T细胞直接杀伤肿瘤细胞(Miller和Kontermann,Bispecific antibodies for cancer immunotherapy:Current perspectives.BioDrugs 2010,24(2):89-98)。

[0003] CD3靶向疗法的一个主要问题在于其剂量限制毒性,这是由脱靶T细胞活化引起的。此类毒性基本上是由CD3抗体固有的刺激T细胞的能力驱动的,而不管靶细胞是否存在。事实上,在基于CD3的抗体疗法中观察到的许多副作用似乎与异常的T细胞功能有关,例如相关的细胞因子产生,这可能导致毒性细胞因子释放综合征。因此,为了降低此类毒性,目前已充分确定以单价方式与T细胞上存在的CD3结合,并使用缺乏与辅助细胞(例如单核细胞、B细胞和NK细胞)上的Fc受体结合能力的抗体骨架。这种方法避免了T细胞上存在的CD3复合物的交联及其随后的活化。

[0004] 本领域已描述了大量与CD3结合的抗体。这包括啮齿动物来源的抗体,例如OKT-3(Kung P.等人,Science,19790ct 19;206(4416):347-9)或SP34(Yoshino N.等人,Exp.Anim 49:97-110,2000;Conrad ML.等人,Cytometry 71A:925-33,2007),以及其人源化衍生物。此外,在本领域中描述了大量从头生成的具有CD3特异性的人抗体或人源化抗体。由于其来源于鼠类,SP34或OKT-3在非免疫抑制的人类中诱导强烈的人抗-鼠抗体(HAMA)免疫原性反应,这限制了它们的给药潜力,并且还可能引发危险的过敏反应。一般来说,此类免疫应答需要抗原呈递细胞(APC)吸收治疗性(外来)蛋白质(即治疗性抗体)。一旦进入此类细胞,蛋白质就被加工,并且蛋白质的释放片段(某些短肽序列与MHC II类分子形成复合物)呈递在细胞表面上。如果此类复合物被T细胞上存在的T细胞受体结合识别,则此类细胞可被活化以产生刺激性细胞因子。细胞因子将引发B细胞分化为成熟的抗体生成细胞。此外,此类T细胞应答还可能对患者产生其他有害影响,例如炎症和可能的过敏反应。然而,据了解,某些被发现与MHC II类分子结合的肽在最终蛋白质被施用到的生物体中被识别为“自身”,因此不引起免疫应答。例如,在人胚系免疫球蛋白可变区蛋白序列中发现了此类肽。

[0005] 因此,设计了在人类中具有降低的免疫原性的人源化CD3特异性抗体。人源化过程

的一个共同方面是引入与人抗体蛋白中存在的氨基酸序列具有同一性的大量氨基酸序列，因此涉及例如将非人抗体的CDR移植到最接近的人胚系受体抗体框架中。与人源化过程相关的一个显著缺点是所得人源化抗体的结合亲和力显著降低以及生产率和稳定性较差。恢复原始特性通常通过将人类残基回复突变为非人类供体抗体中相同位置处的氨基酸的迭代过程来实现。然而，此类回复突变可能再次增加在人类中诱发免疫原性反应的风险。

[0006] 因此，使用人抗体似乎是克服使用鼠类或人源化抗体的上述缺点的理想解决方案，因为免疫应答通常不会对自体循环蛋白(autologous circulating protein)(例如免疫球蛋白)产生影响。但是，当施用于某些个体时，人抗体仍可能引发免疫应答或具有免疫原性。例如，从人噬菌体展示文库中选择的重组人抗体仍可能采用非胚系编码的蛋白质序列，例如来自人框架序列分析的共识(consensus)框架序列，这可能引发免疫反应。此外，CDR区域中引入的变异性(特别是在最初选择的抗体的亲和力成熟过程中)可能引起免疫反应。此类选定的CDR氨基酸序列可能与外来蛋白质相似，因此可以提供被认为通常不被免疫系统利用的表位。

[0007] 如上所述，对于CD3靶向疗法，避免任何不必要的T细胞活化是最重要的。针对治疗性CD3特异性抗体的免疫反应可以恢复T细胞上二价或多价CD3结合和CD3复合物的不需要的交联，从而恢复它们的活化。因此，本发明主要采用一种新方法，提供优化的针对CD3特异性的全人抗体，其特征在于去除其亲本全人抗体对应物的CDR区中存在的潜在T细胞表位，因此一旦施用，在人类中引发免疫应答的风险降低。

发明内容

[0008] 本公开提供亲和力优化的人CD3特异性抗体及其去免疫变体。亲和力优化的抗体在其互补决定区(CDR)中进行改变，以在施用后降低其在人类中的免疫原性或降低其在人类中引发免疫应答的风险。

[0009] 在一个实施方式中，本公开提供分离的特异性针对分化簇3(CD3)的人抗体或其抗原结合片段，其包含

[0010] i.重链可变区(VH)，其包括

[0011] (a)包含氨基酸序列GFSFGSHYMS(SEQ ID NO:1)的重链互补决定区(HCDR)1，

[0012] (b)包含氨基酸序列NINQIGYSSYYVESVKG(SEQ ID NO:2)、NINQIGYSSYYGESVKG(SEQ ID NO:3)或NINQIGYSSYYEESVKG(SEQ ID NO:4)的HCDR2，和

[0013] (c)包含氨基酸序列GYSAEFAHRSGLDV(SEQ ID NO:5)、GYSDEFATRSGLDV(SEQ ID NO:6)、GYSEEFAHRSGLDV(SEQ ID NO:7)、GYSDEFAKRSGLDV(SEQ ID NO:8)或GYSDEFAHRSGLDV(SEQ ID NO:9)的HCDR3，和

[0014] ii.可变轻链区(VL)，其包括

[0015] (a)包含氨基酸序列SGSSSNIGSNYVY(SEQ ID NO:10)的轻链互补决定区(LCDR)1，

[0016] (b)包含氨基酸序列RNNQRPS(SEQ ID NO:11)的LCDR2，和

[0017] (c)包含氨基酸序列AGWSRSLHGAV(SEQ ID NO:12)或AGWSRELHGAV(SEQ ID NO:13)的LCDR3。

[0018] 在一个实施方式中，本公开提供分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段与食蟹猴(cynomolgus)CD3交叉反应性结合。

[0019] 在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是去免疫抗体。

[0020] 在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段在人类中引发免疫应答的风险降低。

[0021] 在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:VH,所述VH包含与选自SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的氨基酸序列具有至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,和/或VL,所述VL包含与氨基酸序列SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21具有至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0022] 在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段,其中VH和VL选自:

[0023] i.包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:20的VL,

[0024] ii.包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL,

[0025] iii.包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL,

[0026] iv.包含氨基酸序列SEQ ID NO:17的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL,

[0027] v.包含氨基酸序列SEQ ID NO:18的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL,以及

[0028] vi.包含氨基酸序列SEQ ID NO:19的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL。

[0029] 在本公开的一个实施方式中,所述分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段是重组抗体或其抗原结合片段。在本公开的一个实施方式中,所述分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0030] 在本公开的一个实施方式中,所述分离的特异性针对CD3的抗原结合片段是Fab、Fab'、$(Fab')_2$、Fv或scFv。在本公开的一个实施方式中,所述分离的特异性针对CD3的人抗体是全长抗体。

[0031] 在一个实施方式中,本公开提供一种双特异性抗体,其包含根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体的第一抗原结合片段和抗体的第二抗原结合片段,该抗体结合与所述第一抗原结合片段不同的靶抗原。在本公开的一个实施方式中,所述第二抗原结合片段与细胞表面抗原结合,特别是与肿瘤相关细胞表面抗原结合。

[0032] 在本公开的一个实施方式中,根据本公开的所述分离的特异性针对CD3的人抗体或根据本公开的包含分离的特异性针对CD3的人抗体的抗原结合片段的双特异性抗体包含Fc区,所述Fc区包含降低与Fc受体的结合和/或效应功能的一个或多个氨基酸取代。

[0033] 在一个实施方式中,本公开提供一种核酸组合物,其包含编码分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段或根据本公开的包含分离的特异性针对CD3的人抗体的抗原结合片段的双特异性抗体的一个核酸序列或多个核酸序列。

[0034] 在一个实施方式中,本公开提供一种载体组合物,其包含:包含根据本公开的一个核酸序列或多个核酸序列的一个载体或多个载体。在一个实施方式中,本公开提供一种宿主细胞,其包含根据本公开的载体组合物。在一个方面,所述宿主细胞是哺乳动物细胞。在一个方面,所述宿主细胞是原核细胞。

[0035] 在一个方面,本公开提供一种产生根据本公开的抗体或其抗原结合片段的方法,

其包括在适合于抗体表达的条件下培养所述宿主细胞并任选地回收所述抗体或其抗原结合片段的步骤。在另一方面,本公开提供一种通过本文所述方法产生的抗体或其抗原结合片段。

[0036] 在一个实施方式中,本公开提供一种药物组合物,其包含:根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段、或根据本公开的包含分离的特异性针对CD3的人抗体的抗原结合片段的双特异性抗体、以及药学上可接受的载体或赋形剂。

[0037] 在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段或根据本公开的药物组合物用作药物的用途。

[0038] 所要求保护的抗体或其抗原结合片段具有实用性。此外,所要求保护的方法还具有生成此类抗体或其抗原结合片段的实用性。所要求保护的抗体或其抗原结合片段的用途是靶向表达CD3的T细胞,并刺激T细胞活化,例如在T细胞介导的杀伤是有益的或可取的情况下。特别是,所要求保护的抗体或其抗原结合片段用于治疗用途,例如治疗癌症。

附图说明

[0039] 图1:图1A描绘了实施例1中的双特异性2+1Fab_2-Fc-scFv抗体形式的基本结构。双特异性抗体形式包含无糖基化的单克隆IgG1骨架加上一个额外的scFv抗体,其中scFv的VL的N-端通过肽接头与一个IgG重链的C-端融合。为了促进两个不同重链的异二聚化,在两个CH3-Fc结构域中引入了旋钮入孔(knob-into-hole)突变。除了这些突变之外,Fc区还包括氨基酸取代,导致Fc区无法与IgG Fc受体(Fcγ受体)和补体相互作用。在本实施例中,双特异性抗体的两个Fab臂都与HER2结合,而scFv特异性针对CD3。图1B描绘了实施例2的双特异性1+1Fab_2-Fc抗体形式的基本结构。这种双特异性抗体形式反映了常规IgG分子的典型Y-形,其中一个Fab臂与肿瘤靶标结合,另一个Fab臂与CD3结合。双特异性1+1Fab_2-Fc抗体通过Fab臂交换在体外生成。为了能够通过这种方法产生双特异性抗体,生成了在CH3结构域中携带单个突变的源IgG1分子:在一个源IgG1抗体中是F405L突变(即CD3特异性抗体),在另一个源IgG1抗体中是K409R突变(即抗HER抗体)。除了这些突变之外,源IgG1抗体还包括取代,导致Fc区无法与IgG Fc受体(Fcγ受体)和补体相互作用。

[0040] 图2:实施例3和实施例4的双特异性Fab_2-Fv-Fc抗体形式的基本结构。该双特异性抗体形式由无糖基化的单克隆人IgG1抗体骨架加上一个额外的Fv片段构建,该片段被整合到Fc区和IgG1骨架的两个Fab臂之间。在本实施例中,两个Fab臂都与HER2结合,而“额外的”Fv片段包含根据本公开的特异性针对CD3的抗体的可变区。图2还描绘了用于将额外的Fv片段连接到Fab臂和Fc区的不同改进的肽接头。

[0041] 图3:根据实施例2.2的哺乳动物产生的对HER2和CD3具有特异性的双特异性抗体(包含根据本公开的亲和力成熟或交叉克隆的CD3特异性抗体的可变结构域)的细胞结合。显示的是通过流式细胞术测定的与CD3阳性Jurkat细胞的细胞结合(高于背景的信号(signal over background))作为双特异性抗体浓度的函数。

[0042] 图4:在来自一位供体的人类T细胞存在下,根据实施例2.4的哺乳动物产生的对HER2和CD3具有特异性的双特异性抗体(包含本公开的亲和力成熟或交叉克隆的CD3特异性抗体的可变结构域)对表达HER2的SKBR3细胞(图4A)或HER2阳性MCF-7细胞(图4B)的细胞毒性测定。通过测量掺入的CellToxGreen荧光来评估人类T细胞的细胞毒性活性。该图显示了

表达HER2的SKBR3或MCF-7细胞的相对荧光水平作为双特异性抗体浓度的函数。

[0043] 图5:根据实施例2.5的哺乳动物产生的对HER2和CD3具有特异性的双特异性抗体(包含根据本公开的亲和力成熟或交叉克隆的CD3特异性抗体的可变结构域)的T细胞活化测定。通过评估流式细胞术评估的CD8阳性T细胞上的CD69表达来测定T细胞的活化。显示的是来自3位不同供体的CD69+活化CD8+T细胞的百分比作为双特异性抗体浓度的函数。

[0044] 图6:根据实施例3.6的哺乳动物产生的对HER2和CD3具有特异性的双特异性抗体的细胞毒性测定,上述抗体包含实施例2的一个交叉克隆的CD3特异性抗体(CD3-MABopt-cc)的可变结构域和两个最有效的接头组合(接头组合2和接头组合5)(参考最初公开的接头组合P)。显示在来自一位供体的人类T细胞存在下杀伤表达HER2的SKBR3细胞。通过测量掺入的CellToxGreen荧光来评估人类T细胞的细胞毒性活性。该图显示了表达HER2的SKOV-3细胞的相对荧光水平作为双特异性抗体浓度的函数。

[0045] 图7:根据实施例3.7的哺乳动物产生的对HER2和CD3具有特异性的双特异性抗体的T细胞活化测定,上述抗体包含实施例2的一个交叉克隆的CD3特异性抗体(CD3-MABopt-cc)的可变结构域和6个接头组合(接头组合1-6)(参考最初公开的接头组合P)。通过评估CD4+T细胞(图7A)或CD8+T细胞(图7B)上的CD69表达来测定T细胞的活化,其通过流式细胞术评估。图7A是显示来自3位不同供体的CD69+活化CD4+T细胞的平均百分比作为双特异性抗体浓度的函数的图。图7B是显示来自3位不同供体的CD69+活化CD8+T细胞的平均百分比作为双特异性抗体浓度的函数的图。

[0046] 图8:对实施例2中交叉克隆的抗体CD3-MABopt-cc的HCDR3区进行的用于鉴定潜在的T细胞表位的Epibase™(Lonza,Epibase版本:v3.0)计算机筛选结果。人类抗体胚系编码序列区被排除在分析之外。为了进行分析,将整个VH序列拆分为重叠的10聚肽,每个肽移位一个氨基酸。图8的左侧图列出了所分析的10聚肽,从CD3-MABopt-cc的VH上的氨基酸位置90开始到位置112,跨越其整个HCDR3区。如图8上侧图/列所示,针对主要高加索人DRB1等位基因的HLAII类同种型测定了每个分析的10聚肽的潜在肽/HLA结合。对于每个DRB1同种型,提供了其自然发生频率(例如DRB1*01:01:15%)。例如,预计肽93与DRB1等位基因的3种同种型结合,亲和力为中等(M),与DRB1等位基因的2种同种型结合,亲和力为强(S)。此类肽反映了本文定义的“T细胞表位”。对于该肽所提供的风险评分为24.5,计算为此类肽与之结合的DRB1等位基因的同种型的自然发生频率之和(例如肽93:24+6+12+6+5=53(约),精确值:51.9)。总之,10个T细胞表位(肽92、93、94、95、97、100、102、104、110、112)和2个热点可分配到CD3-MABopt-cc的HCDR3区(第一个热点跨越肽92-97,第二个热点跨越肽110-112)。热点反映了邻近T细胞表位的积累。此类热点是根据”4 over 3“来鉴定的,这意味着DRB1等位基因的至少4种同种型必须以中等或强亲和力与三个连续分析的10聚肽中的至少两个结合。此外,至多一个未被鉴定为T细胞表位的10聚肽可以成为热点的一部分。因此,并非每个已鉴定的T细胞表位都必须是热点的一部分(参见例如图8中的肽100、102或104)。另一方面,未被鉴定为T细胞表位的肽仍可能是热点的一部分(参见例如图4中的肽96或肽111)。每个作为热点一部分所分析的10聚肽定义为H-线。热点的累积风险评分可以计算为热点内每个T细胞表位测定的风险评分之和,本文将其定义为“H-评分”。例如,HCDR3的第二个热点由3条H-线组成。因此,H-评分由此热点覆盖的每个T细胞表位的风险评分之和计算得出,例如27,8+60,3=88。

[0047] 图9:Epibase™计算机突变分析:CD3-MAB$_{opt-cc}$的每个HCDR3位置(位置92-112)的计算机单个氨基酸取代(上侧图)对CD3-MAB$_{opt-cc}$的VH的T细胞表位数量(图4左侧图)和相应的绝对风险评分(图4右侧图)的影响。带有粗边框的数字表示选择用于CD3-MAB$_{opt-cc}$的各个VH变体的基因合成的氨基酸取代。优选选择导致T细胞表位减少2个或更多并且允许进行保守氨基酸取代的氨基酸取代。此外,注意不要将潜在的翻译后修饰位点("PTM基序")引入CDR区。例如,对于HCDR3,选择了42个单个氨基酸取代(单点变体)进行基因合成。

[0048] 图10:在实施例4的双特异性Fab$_2$-Fv-Fc抗体形式中表征后,CD3-MAB$_{opt-cc}$的27个优选CDR单点变体的生物物理和功能特性总结。对于每个取代,显示了CD3-MAB$_{opt-cc}$的VH或VL中T细胞表位的减少,以及纯化的双特异性抗体制剂的单体含量和产量、ELISA结合和对重组人CD3ε的亲和力。图10的最后一列描绘了为组合计算机突变分析选择的变体。第一行(wt(亲本))表示针对包含抗体CD3-MAB$_{opt-cc}$的可变结构域的双特异性抗体测定的功能特性。

[0049] 图11:Epibase™计算机组合突变分析。CD3-MAB$_{opt-cc}$的HCDR1-3区中54个组合氨基酸取代的示例性结果,导致3个热点减少。所示表格的第一行表示CD3-MAB$_{opt-cc}$的VH的风险参数(绝对评分、热点、绝对H-评分和绝对H-线)。对于每个组合变体,提供了每个风险参数相对于CD3-MAB$_{opt-cc}$的VH所测定的风险参数的减少(作为Δ值)。

[0050] 图12:在实施例4的双特异性Fab$_2$-Fv-Fc抗体形式中表征后,33个优选的CD3-MAB$_{opt-cc}$的组合变体的生物物理和功能特性的总结。第一行表示针对包含CD3-MAB$_{opt-cc}$的VH和VL的双特异性抗体所测定的功能特性。对于每个组合变体,提供了每个风险参数(绝对评分、热点、绝对H值和绝对H-线)相对于CD3-MAB$_{opt-cc}$的VH所测定的风险参数的减少(作为Δ值)。此外,还显示了纯化的双特异性抗体制剂的单体含量、ELISA结合和对重组人CD3ε抗原的亲和力以及在两种双特异性抗体浓度下对SKOV-3细胞的受体基因测定中的功能活性。

[0051] 图13:根据实施例4.12,对一位供体进行的哺乳动物产生的双特异性抗体BissIg_21_CD3-MABdeimm_3的细胞毒性测定,上述抗体包含最优选的去免疫组合变体CD3-MABdeimm_3的VH和VL序列(参考包含未改变的CD3特异性CD3-MABopt_cc的可变结构域的双特异性抗体BissIg_21_CD3-MABopt_cc)。通过测量掺入的CellToxGreen荧光来评估人类T细胞的细胞毒性活性。该图显示了表达HER2的SKOV-3细胞的相对荧光水平作为双特异性抗体浓度的函数。

[0052] 图14:根据实施例4.13测定对于双特异性抗体BissIg_21_CD3-MABdeimm_1、BissIg_21_CD3-MABdeimm_2、BissIg_21_CD3-MABdeimm_3、BissIg_21_CD3-MABdeimm_4、BissIg_21_CD3-MABdeimm_5的示例性T细胞活化测定,上述抗体包含5个最优选的去免疫组合变体VH和VL序列(参考包含未改变的CD3特异性CD3-MABopt_cc的可变结构域的双特异性抗体BissIg_21_CD3-MABopt_cc)。作为阳性对照,显示了鼠类CD3特异性OKT-3IgG的结果。T细胞的活化通过流式细胞术所评估的CD4+T细胞(图14A)和CD8+T细胞(图14B)上的CD69表达来测定。图中显示的是分别来自一位供体的CD69+活化的CD4+T细胞或CD8+T细胞的平均百分比作为双特异性抗体浓度的函数。

具体实施方式

[0053] 定义

[0054] “CD3”是指在T细胞上表达的抗原,其作为多分子T细胞受体(TCR)的一部分,由四条受体链中的两条结合形成的同型二聚体或异型二聚体组成:CD3ε(CD3epsilon)、CD3δ、CD3ζ和CD3γ。

[0055] 人CD3ε(或人CD3e)具有UniProt P07766的氨基酸序列:

[0056] MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYP GSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPE DANFYLYLRARVCENCMEMD**VMSVATIVIVDICITGGLLLLVYYWS***KNRKAKAKP VTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRI* (SEQ ID

[0057] NO: 45)(信号序列下划线,胞内区斜体,跨膜区粗体)。

[0058] 不含信号序列的人CD3ε的成熟细胞外结构域包含氨基酸残基22-126,其氨基酸序列为:

[0059] QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIG SDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMD (SEQ ID NO: 46)

[0060] 食蟹猴CD3ε(或cyno CD3e)具有UniProt Q95LI5的氨基酸序列

[0061] MQSGTRWRVLGLCLLSIGVWGQDGNEEMGSITQTPYQVSISGTTVILTCSQHLG SEAQWQHNGKNKEDSGDRLFLPEFSEMEQSGYYVCYPRGSNPEDASHHLYLK ARVCENCMEMD**VMAVATIVIVDICITLGLLLLVYYWS***KNRKAKAKPVTRGAGAG GRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQQDLYSGLNQRRI* (SEQ ID NO: 47)

[0062] (信号序列下划线,胞内区斜体,跨膜区粗体)。

[0063] 不含信号序列的食蟹猴CD3ε的成熟细胞外区包含氨基酸残基22-198,其氨基酸序列为:

[0064] QDGNEEMGSITQTPYQVSISGTTVILTCSQHLGSEAQWQHNGKNKEDSGDRLF LPEFSEMEQSGYYVCYPRGSNPEDASHHLYLKARVCENCMEMDVMAVATIVIV DICITLGLLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYE PIRKGQQDLYSGLNQRRI (SEQ ID NO: 48)。

[0065] 当用于指代特定数值时,术语“约”是指该值可能与所述值相差不超过1%。例如,本文使用的表达“约100”包括99和101以及其间的所有值(例如99.1、99.2、99.3、99.4等)。

[0066] 本文使用的术语“抗原”或“靶抗原”是指任何可被抗体中存在的结合位点之一结合的目标分子。通常,抗原是肽、蛋白质或任何其他蛋白质分子。或者,抗原可以是任何其他有机或无机分子,例如碳水化合物、脂肪酸、脂质、染料或荧光团。

[0067] 本文使用的术语“抗体”是指包含通过二硫键相互连接的至少两条重链(H)和两条轻链(L)的蛋白质,其与抗原相互作用。每条重链由重链可变区(本文缩写为VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域CH1、CH2和CH3组成。每条轻链由轻链可变区(本文缩写为VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。VH和VL区可以进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),穿插着更保守的区域,称为框架区(FR)。每个VH和VL由三个CDR和四个FR组成,从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫

球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(Clq)。术语“抗体”包括例如单克隆抗体、人抗体、人源化抗体、骆驼抗体和嵌合抗体。抗体可以是任何同种型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。轻链和重链均分为结构和功能同源性区。免疫球蛋白可变结构域(例如CDR)的结构和位置可使用众所周知的编号方案定义,例如Kabat编号方案、Chothia编号方案或Kabat和Chothia的组合(参见例如Sequences of Proteins of Immunological Interest,美国卫生与公众服务部(1991),Kabat等编辑;Lazikani等人,(1997)J.Mol.Bio.273:927-948);Kabat等人,(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,NIH Publication no.91-3242美国卫生与公众服务部;Chothia等人,(1987)J.Mol.Biol.196:901-917;Chothia等人,(1989)Nature 342:877-883;和Al-Lazikani等人,(1997)J.Mol.Biol.273:927-948)。本文使用的术语“抗体”旨在包括单特异性抗体以及双特异性抗体和多特异性抗体。

[0068] 本文所用的术语抗体的“抗体片段”或“抗原结合片段”是指抗体的一个或多个部分,其保留与抗原特异性相互作用(例如,通过结合、空间位阻、稳定空间分布)的能力。抗体片段或抗原结合片段的实例包括但不限于,Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;F(ab)2片段,由铰链区处通过二硫键连接的两个Fab片段组成的二价片段;由VH和CH1结构域组成的Fd片段;由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;由VH结构域组成的dAb片段(Ward等人.,(1989)Nature 341:544-546);以及分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由分开的基因编码,但它们可以使用重组方法通过合成接头连接,从而将它们制成单个蛋白质链,其中VL和VH结构域配对形成单价分子(称为单链Fv(scFv);参见例如Bird等人,(1988)Science 242:423-426;和Huston等人,(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.85:5879-5883)。此类单链抗体也旨在包含在术语“抗体片段”或“抗原结合片段”中。这些抗体片段是使用本领域技术人员已知的常规技术获得的,并且以与完整抗体相同的方式筛选片段的效用。抗体片段还可并入单域抗体、大抗体(maxibody)、微小型抗体(minibody)、胞内抗体(intrabody)、双链抗体(diabody)、三链抗体(triabody)、四链抗体(tetrabody)、v-NAR和双-scFv(参见,例如,Hollinger和Hudson,(2005)Nature Biotechnology 23:1126-1136)。抗体片段可移植到基于多肽(例如纤连蛋白III型(Fn3))的支架中(参见美国专利号6,703,199,其中描述了纤连蛋白多肽单体)。抗体片段或抗原结合片段可以整合到包含一对串联Fv片段(VH-CH1-VH-CH1)的单链分子中,该Fv片段与互补轻链多肽一起形成一对抗原结合位点(Zapata等人,(1995)Protein Eng.8:1057-1062;和美国专利号5,641,870)。

[0069] 本文使用的术语“Fc区”是指能够彼此稳定结合从而形成免疫球蛋白的二聚C-端区域的两个Fc区亚基。因此,两个Fc区亚基(例如第一Fc区亚基和第二Fc区亚基)彼此互补。常规IgG分子的Fc区以二聚体形式存在,其每个亚基包含CH2和CH3 IgG重链恒定结构域。

[0070] 本文所用的“Fc区亚基”是指形成免疫球蛋白的二聚Fc区的两种多肽之一,即包含免疫球蛋白重链的C-端恒定区的多肽,能够稳定地自我结合。因此,形成二聚Fc区的两个Fc区亚基(例如,第一和第二Fc区亚基)彼此互补。例如,IgG Fc区亚基包含IgG CH2和IgG CH3恒定结构域。该术语包括天然序列Fc区亚基和变体Fc区亚基。尽管IgG重链的Fc区亚基的边界可能略有不同,但人IgG重链Fc区亚基通常定义为从Cys226或从Pro230延伸至重链的C-

端。然而,Fc区亚基的C-端赖氨酸(Lys447)可能存在或不存在。除非本文另有规定,Fc区中氨基酸残基的编号是根据EU编号系统,也称为EU索引,如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,公共卫生服务,国立卫生研究院,贝塞斯达,马里兰州,1991年中所述。

[0071] 本文所用的“人抗体”或“人抗体片段”或“人抗原结合片段”包括具有可变区的抗体和抗体片段,其中框架区和CDR区均源自人源序列。此外,如果抗体含有恒定区,则恒定区也源自此类序列。人源包括例如人胚系序列,或人胚系序列的突变版本,或含有源自人框架序列分析的共识框架序列的抗体,例如,如Knappik等人,(2000)J Mol Biol 296:57-86中所述。因此,所述人抗体可从技术平台获得,所述技术平台包括源自人胚系基因的抗体,所述人胚系基因通过PCR扩增从B细胞分离的VHA/L库生成或合成生成。技术平台包括基于文库的方法,包括在噬菌体、核糖体或酵母上展示的人免疫球蛋白基因。各自的展示技术是科学界的标准。此外,对携带人免疫球蛋白库的转基因小鼠进行免疫接种是生成针对目的抗原的人抗体的另一种方法。从基于MorphoSys HuCAL®概念(Knappik等人,(2000)J Mol Biol 296:57-86)或Ylanthia®概念库(Tiller等人mAbs 5:3,1-26;May/June(2013)和美国专利号8,728,981)的抗体库中选择的抗体或其片段被视为全人抗体。

[0072] 术语“分离的”是指化合物,其可以是例如抗体或抗体片段或抗原结合片段,其基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体或抗体片段。因此,在某些方面,所提供的抗体是分离的抗体,其已与具有不同特异性的抗体分离。分离的抗体可以是单克隆抗体。分离的抗体可以是重组单克隆抗体。然而,特异性结合靶标的表位、异构体或变体的分离的抗体可能与其他相关抗原具有交叉反应性,例如来自其他物种(例如物种同源物)。

[0073] 本文中使用的术语“重组抗体”包括通过自然界中不存在的方式制备、表达、产生或分离的所有抗体或抗原结合片段。例如,从转化以表达抗体的宿主细胞中分离的抗体,从重组、组合人抗体库中选择和分离的抗体以及通过任何其他方式制备、表达、产生或分离的抗体,所述方式涉及将人免疫球蛋白基因的全部或部分序列剪接为其他DNA序列、或从转基因或转染色体的人免疫球蛋白基因动物(例如小鼠)或由此制备的杂交瘤中分离的抗体。优选地,此类重组抗体具有可变区,其中框架和CDR区源自人胚系免疫球蛋白序列。然而,在某些实施方式中,此类重组人抗体可以进行体外诱变(或者,当使用转基因人Ig序列的动物时,进行体内体细胞诱变),因此重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是这样的序列,虽然它们源自人胚系VH和VL序列并与之相关,但可能不天然存在于体内的人抗体胚系库中。重组抗体可以是单克隆抗体。

[0074] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指源自单个克隆的抗体,包括任何真核、原核或噬菌体克隆,而不是其产生方法。本文所公开的单克隆抗体可以通过Kohler等人;Nature,256:495(1975)中描述的杂交瘤方法制备,或者可以使用本文所述的技术从噬菌体文库中分离。用于制备克隆细胞系及其表达的单克隆抗体的其他方法是本领域众所周知的(参见,例如,Short Protocols in Molecular Biology,(2002)第5版,第11章,Ausubel等人编辑,John Wiley and Sons,纽约)。本文的实施例中提供了产生其他单克隆抗体的其他示例性方法。

[0075] 如本文所用,如果抗体能够区分此类抗原和一种或多种参考抗原,则该抗体“特异性结合”、“特异性地结合”、“特异性针对”或“特异性识别”该抗原,因为结合特异性不是绝

对的,而是相对的。例如,可以进行标准ELISA测定。评分可以通过标准显色进行(例如,二抗与辣根过氧化物和四甲基联苯胺与过氧化氢)。某些孔中的反应通过光密度进行评分,例如在450nm处。典型的背景(=阴性反应)可能是0.1OD;典型的阳性反应可能是1OD。这意味着阳性/阴性差异可能超过10倍。通常,结合特异性的测定不是通过使用单个参考抗原,而是通过使用一组约三到五种不相关的抗原(例如奶粉、BSA、转铁蛋白等)来进行的。

[0076] 如本文所用,“与CD3结合的抗体或其抗原结合片段”或“抗CD3抗体或其抗原结合片段”或“特异性针对CD3的抗体或其抗原结合片段”包括特异性识别一个或多个CD3亚基(例如,ε)的抗体及其抗体片段或其抗原结合片段,以及特异性识别两个CD3亚基的二聚复合物(例如,γ/ε、δ/ε)的抗体和抗体片段。本公开的抗体及其抗原结合片段可以结合可溶性CD3和/或细胞表面表达的CD3。可溶性CD3包括天然CD3蛋白以及重组CD3蛋白变体,例如,单体和二聚CD3构建体,其缺乏跨膜结构域或与细胞膜不相关。

[0077] 如本文所用,术语“细胞表面”是指在体外或体内细胞表面上表达的一种或多种蛋白质,使得蛋白质的至少一部分暴露于细胞膜的细胞外侧并且可被抗体的抗原结合部分或片段接触。“细胞表面表达的CD3”包括包含在细胞膜中的功能性T细胞受体中的CD3蛋白。表述“细胞表面表达的CD3”包括作为同型二聚体或异型二聚体的一部分在细胞表面上表达的CD3蛋白(例如,γ/ε、δ/ε和ζ/ζCD3二聚体)。表述“细胞表面表达的CD3”还包括在细胞表面上单独表达的CD3链(例如,CD3ε),而没有其他CD3链类型。“细胞表面表达的CD3”可以包括在通常表达CD3蛋白的细胞表面上表达的CD3蛋白,或由其组成。或者,“细胞表面表达的CD3”可以包括在细胞表面表达的CD3蛋白,或由其组成,该细胞通常不在其表面表达人CD3,但已被人工改造以在其表面表达CD3。

[0078] 术语“交叉反应性结合”或术语“具有交叉反应性”在本文中可互换使用,是指具有特异性结合多种抗原的能力的抗体或抗原结合片段。例如,根据本公开的抗体与食蟹猴CD3(例如食蟹猴CD3ε)交叉反应性结合。

[0079] 如本文所用,术语“亲和力”是指抗体与其靶标在单个位点的相互作用强度。在每个位点内,抗体的结合结构域通过弱非共价力与其靶标在多个位点相互作用;相互作用越多,亲和力越强。

[0080] 本文所用的术语“K_D”是指解离常数,该常数由K_d与K_a的比率(即K_d/K_a)获得,并以摩尔浓度(M)表示。抗原结合部分(例如单克隆抗体)的K_D值可使用本领域中已建立的方法测定。测定抗原结合部分(例如单克隆抗体)的K_D的方法是SET(可溶性平衡滴定)或使用生物传感器系统(例如Biacore®系统)的表面等离子共振。在本公开中,特异性针对CD3ε多肽的抗体通常具有小于$5x10^{-2}$M、小于10^{-2}M、小于$5x10^{-3}$M、小于10^{-3}M、小于$5x10^{-4}$M、小于10^{-4}M、小于$5x10^{-5}$M、小于10^{-5}M、小于$5x10^{-6}$M、小于10^{-6}M、小于$5x10^{-7}$M、小于10^{-7}M、小于$5x10^{-8}$M、小于10^{-8}M、小于$5x10^{-9}$M、小于10^{-9}M、小于$5x10^{-10}$M、小于10^{-10}M、小于$5x10^{-11}$M、小于10^{-11}M、小于$5x10^{-12}$M、小于10^{-12}M、小于$5x10^{-13}$M、小于10^{-13}M、小于$5x10^{-14}$M、小于10^{-14}M、小于$5x10^{-15}$M、或小于10^{-15}M或更低的解离速率常数(K_D) (k_{off}/k_{on})。

[0081] 本公开的组合物可用于治疗或预防应用。因此,本公开包括含有本文公开的抗体(或其抗原结合片段)和药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物。在相关方面,本公开提供一种治疗癌症的方法。该方法包含向需要其的受试者施用有效量的含有本文描述的抗体(或其抗原结合片段)的药物组合物的步骤。本公开提供治疗方法,包括向需要此类治疗

的受试者施用治疗有效量的本文公开的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段。本文使用的“治疗有效量”或“有效量”是指引发所需生物应答所需的CD3特异性抗体的量。根据本公开,治疗有效量是治疗和/或预防疾病所需的CD3特异性抗体或其抗原结合片段的量。

[0082] 术语“细胞增殖性疾病”或“增殖性疾病”是指与某种程度的异常细胞增殖相关的疾病。在一个实施方式中,细胞增殖性疾病是癌症。在一个实施方式中,细胞增殖性疾病是肿瘤。术语“癌症”和“癌性”是指或描述哺乳动物的生理状况,其通常以不受调节的细胞生长为特征。

[0083] 术语“肿瘤相关抗原”是指在肿瘤或肿瘤基质细胞表面表达或存在的抗原。

[0084] “增加”是指引起总体增加的能力,例如,20%或更高、50%或更高,或75%、85%、90%、95%或更高。

[0085] 本文所用的术语“EC50”是指在测定中诱导介于基线和最大值之间的一半反应的抗体或抗体片段或双特异性抗体的浓度。它表示观察到50%最大效应的抗体浓度。

[0086] 本文所用的术语“IC50”是指在测定中抑制介于最大应答和基线之间的一半应答的抗体或抗体片段或双特异性抗体的浓度。它表示将给定应答降低50%的抗体浓度。

[0087] 术语“抑制(inhibition或inhibit)”或“减少(reduction或reduce)”或“中和(neutralization或neutralize)”等是指任何表型特征(例如结合、生物活性或功能)的减少或停止,或该特征的发生率、程度或可能性的减少或停止。“抑制”、“减少”或“中和”等不需要完全,只要可以使用适当的测定法检测到即可。在某些方面,“减少”或“抑制”等是指能够导致20%或更多的减少。在另一个方面,“减少”或“抑制”是指能够导致50%或更多的减少。在另一个方面,“减少”或“抑制”等是指能够导致总体减少75%、85%、90%、95%或更多。

[0088] “给药”或“施用”包括但不限于通过可注射形式递送药物,例如静脉内、肌肉内、皮内或皮下途径或粘膜途径,例如作为鼻腔喷雾剂或吸入气雾剂或作为可摄取溶液、胶囊或片剂。优选地,给药为注射形式。

[0089] 如本文所用,“治疗(treatment、treat或treating)”等是指试图改变受治疗对象的疾病自然进程的临床干预,可以用于预防或在临床病理过程中进行。治疗的期望效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、缓解症状、减轻疾病的任何直接或间接病理后果、预防转移、降低疾病进展速度、改善或缓解疾病状态以及缓解或改善预后。在某些方面,根据本公开的抗体或其抗原结合片段用于延缓疾病的发展或减缓疾病的进展。

[0090] 术语“多特异性”是指抗体能够特异性地结合两种或多种不同的抗原。通常,多特异性抗体由两个或多个抗原结合位点组成,每个位点特异性针对不同的抗原或表位。

[0091] 术语“双特异性”是指抗体能够特异性结合两种不同的抗原。通常,双特异性抗体包含两个抗原结合位点,每个位点特异性针对不同的抗原或表位。

[0092] 如本文所用,术语“第一”和“第二”等用于区分每种类型的组分或类型有多于一个的情况。除非明确说明,否则使用这些术语并不旨在赋予特定的顺序或方向。

[0093] 如本文所用,“氨基酸残基”或“氨基酸”将以其全名或根据标准的三字母或单字母氨基酸代码表示。“天然存在的氨基酸”是指以下氨基酸:

[0094] 表1:天然存在的氨基酸

[0095]

氨基酸	三字母密码	单字母密码
丙氨酸	Ala	A
精氨酸	Arg	R
天冬酰胺	Asn	N
天冬氨酸	Asp	D
半胱氨酸	Cys	C
谷氨酸	Glu	E
谷氨酰胺	Gln	Q

[0096]

甘氨酸	Gly	G
组氨酸	His	H
异亮氨酸	Ile	I
亮氨酸	Leu	L
赖氨酸	Lys	K
甲硫氨酸	Met	M
苯丙氨酸	Phe	F
脯氨酸	Pro	P
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T
色氨酸	Trp	W
酪氨酸	Tyr	Y
缬氨酸	Val	V

[0097] “效应功能”是指那些归因于抗体Fc区的生物活性,这些活性随抗体同种型而变化。抗体效应功能的实例包括:C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如B细胞受体)的下调;以及B细胞活化。

[0098] 本文中使用的“物种”是指任何哺乳动物,包括啮齿动物,例如小鼠或大鼠,以及灵长类动物,例如食蟹猴(Macaca fascicularis)、恒河猴(Macaca mulatta)或人类(Homo sapiens)。优选地,受试者是灵长类动物,最优选是人类。

[0099] “去免疫”是指一种方法,其中预测有效结合HLA分子的给定抗体序列中的氨基酸被改变,使得它们不再结合HLA,因此不再能够刺激T细胞应答。因此,去免疫使给定的蛋白质或多肽对给定物种无免疫原性或免疫原性较低。先前已公开了从蛋白质中消除T细胞表位(参见WO 98/52976)。描述了一种用于去免疫抗体的合适技术,例如WO 00/34317或WO 2003/105058。对于治疗性抗体,优选去除所有潜在的T细胞表位,同时保留未修饰亲本抗体的功能活性。

[0100] 本文中使用的“去免疫”抗体是指经过去免疫的抗体。与体内使用时未修饰的亲本

抗体相比,“去免疫”抗体在给定物种中的免疫原性可能较低或无免疫原性。

[0101] 本文使用的术语“T细胞表位”或“潜在T细胞表位”或“MHC II类结合基序”是指给定蛋白质或多肽序列内的特定10聚肽序列,该序列可以合理的效率与MHC II类分子结合,或以肽:MHC复合物的形式与物种的T细胞受体强力结合以接收治疗性蛋白质,或显示通过MHC II类上的呈递刺激T细胞的能力。可以通过任何计算或物理方法测量潜在T细胞表位以建立MHC结合。

[0102] 本文使用的术语“热点(Hotspot)”是指给定抗体重链或轻链可变区内具有相邻(预测)T细胞表位积累的区域。根据本公开的热点是通过图例8和实施例4.1中详述的4over3算法来鉴定的,并且要求DRB1等位基因的至少4种同种型与三个连续分析的10聚肽中的至少两个以中等(M)或强(S)亲和力结合。此外,至多一个未被鉴定为T细胞表位的10聚肽可以成为热点的一部分。

[0103] 本文使用的术语“风险评分”提供了一个数值,作为T细胞表位(分析的10聚肽)在特定人群(例如高加索人群)中引起免疫反应或免疫应答的风险的量度。值越大,风险越高。T细胞表位的风险评分计算为此类T细胞表位(10聚肽)结合的DRB1等位基因(HLA同种异型)的自然发生群体频率之和。风险评分通过本文实施例4中描述的计算方法测定,使用市售的计算机筛选工具:Epibase™,Epibase版本:v3.0(Lonza)。其基本方法在WO 2003/105058中描述。

[0104] 本文使用的术语“绝对风险评分”或“评分”提供了一个数值,作为整个分析的多肽在给定人群(例如高加索人群)中引起免疫反应或免疫应答的风险的量度。“绝对风险评分”计算为针对分析的多肽序列中存在的所有T细胞表位(例如抗体的整个VH或VL序列)测定的所有单个风险评分的总和。

[0105] 本文使用的“H-线(H-line)”是指被鉴定为热点一部分的抗体重链或轻链可变区的一个分析的10聚肽序列。

[0106] 本文使用的“H-线(H-line)”提供了被鉴定为热点一部分的抗体重链或轻链可变区的分析的10聚肽序列的总和的数值。

[0107] 本文使用的“绝对H-线”提供了多肽中所有被鉴定的热点的一部分的H-线的总和的数值。

[0108] 本文使用的“H-评分”提供了一个数值,作为一个热点在给定人群(例如高加索人群)中引起免疫反应或免疫应答的风险的量度。H-评分计算为针对热点的所有T细胞表位测定的个体风险评分的总和。

[0109] 本文使用的“绝对H-评分”提供了一个数值,作为给定抗体重链或轻链可变区中鉴定的所有热点在给定人群(例如高加索人群)中引起免疫反应或免疫应答的累积风险的量度。绝对H-评分计算为针对给定抗体重链或轻链可变区中所有鉴定的热点的所有T细胞表位测定的风险评分的总和。

[0110] 本公开的实施方式

[0111] 根据本公开,亲和力优化的特异性针对CD3的人抗体列于表5和表6中。根据本公开,去免疫的特异性针对CD3的人抗体列于表7中。在一个方面,本公开涉及分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段,其包含表5-7中列出的任一抗体的6个CDR。在一个方面,本公开涉及分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含表5-7中所列任一抗体的VH和VL。

[0112] 在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对分化簇3(CD3)的人抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包含

[0113] i.重链可变区(VH),其包括

[0114] (a)包含氨基酸序列GFSFGSHYMS(SEQ ID NO:1)的重链互补决定区(HCDR)1,

[0115] (b)包含氨基酸序列NINQIGYSSYYVESVKG(SEQ ID NO:2)、NINQIGYSSYYGESVKG(SEQ ID NO:3)或NINQIGYSSYYEESVKG(SEQ ID NO:4)的HCDR2,和

[0116] (c)包含氨基酸序列GYSAEFAHRSGLDV(SEQ ID NO:5)、GYSDEFATRSGLDV(SEQ ID NO:6)、GYSEEFAHRSGLDV(SEQ ID NO:7)、GYSDEFAKRSGLDV(SEQ ID NO:8)或GYSDEFAHRSGLDV(SEQ ID NO:9)的HCDR3,和

[0117] ii.可变轻链区(VL),其包括

[0118] (d)包含氨基酸序列SGSSSNIGSNYVY(SEQ ID NO:10)的轻链互补决定区(LCDR)1,

[0119] (e)包含氨基酸序列RNNQRPS(SEQ ID NO:11)的LCDR2,和

[0120] (f)包含氨基酸序列AGWSRSLHGAV(SEQ ID NO:12)或AGWSRELHGAV(SEQ ID NO:13)的LCDR3。

[0121] 在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段,其包含VH和VL,所述VH包含:

[0122] a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:22的HCDR1区,

[0123] b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:23的HCDR2区,和

[0124] c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的HCDR3区,

[0125] 所述VL包含:

[0126] d)包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的LCDR1区,

[0127] e)包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的LCDR2区,和

[0128] f)包含氨基酸序列SEQ ID NO:12的LCDR3区。

[0129] 在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段,其包含VH和VL,所述VH包含:

[0130] a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的HCDR1区,

[0131] b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的HCDR2区,和

[0132] c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的HCDR3区,

[0133] 所述VL包含:

[0134] d)包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的LCDR1区,

[0135] e)包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的LCDR2区,和

[0136] f)包含氨基酸序列SEQ ID NO:24的LCDR3区。

[0137] 在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段,其包含VH和VL,所述VH包含:

[0138] a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的HCDR1区,

[0139] b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的HCDR2区,和

[0140] c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的HCDR3区,

[0141] 所述VL包含:

[0142] d)包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的LCDR1区,

[0143] e)包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的LCDR2区,和

[0144] f)包含氨基酸序列SEQ ID NO:12的LCDR3区。

[0145] 在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段,其包含VH和VL,所述VH包含:

[0146] a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的HCDR1区,

[0147] b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的HCDR2区,和

[0148] c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:7的HCDR3区,

[0149] 所述VL包含:

[0150] d)包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的LCDR1区,

[0151] e)包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的LCDR2区,和

[0152] f)包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的LCDR3区。

[0153] 在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段,其包含VH和VL,所述VH包含:

[0154] a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的HCDR1区,

[0155] b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的HCDR2区,和

[0156] c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:9的HCDR3区,

[0157] 所述VL包含:

[0158] d)包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的LCDR1区,

[0159] e)包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的LCDR2区,和

[0160] f)包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的LCDR3区。

[0161] 在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段,其包含VH和VL,所述VH包含:

[0162] a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的HCDR1区,

[0163] b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的HCDR2区,和

[0164] c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:6的HCDR3区,

[0165] 所述VL包含:

[0166] d)包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的LCDR1区,

[0167] e)包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的LCDR2区,和

[0168] f)包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的LCDR3区。

[0169] 在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段,其包含VH和VL,所述VH包含:

[0170] a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的HCDR1区,

[0171] b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的HCDR2区,和

[0172] c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:7的HCDR3区,

[0173] 所述VL包含:

[0174] d)包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的LCDR1区,

[0175] e)包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的LCDR2区,和

[0176] f)包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的LCDR3区。

[0177] 在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片

段,其包含VH和VL,所述VH包含:

[0178] a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的HCDR1区,

[0179] b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的HCDR2区,和

[0180] c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:8的HCDR3区,

[0181] 所述VL包含:

[0182] d)包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的LCDR1区,

[0183] e)包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的LCDR2区,和

[0184] f)包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的LCDR3区。

[0185] 在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对分化簇3(CD3)的人抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区(VH),所述重链可变区包含与选自SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对分化簇3(CD3)的人抗体或其抗原结合片段,其包含轻链可变区(VL),所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对分化簇3(CD3)的人抗体或其抗原结合片段,其包含:重链可变区(VH),所述重链可变区包含与选自SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,以及轻链可变区(VL),所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对分化簇3(CD3)的人抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区(VH),所述重链可变区包含选自SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ IDNO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对分化簇3(CD3)的人抗体或其抗原结合片段,其包含轻链可变区(VL),所述轻链可变区包含氨基酸序列SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21。在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对分化簇3(CD3)的人抗体或其抗原结合片段,其包含:重链可变区(VH),所述重链可变区包含选自SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的氨基酸序列,以及轻链可变区(VL),所述轻链可变区包含氨基酸序列SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21。

[0186] 在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对分化簇3(CD3)的人抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH和VL选自:

[0187] i.包含氨基酸序列SEQ ID NO:25的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:20的VL,和

[0188] ii.包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:26的VL。

[0189] 在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对分化簇3(CD3)的人抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH和VL选自:

[0190] i.包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:20的VL,

[0191] ii.包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL,

[0192] iii.包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL,

[0193] iv.包含氨基酸序列SEQ ID NO:17的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL,

[0194] v.包含氨基酸序列SEQ ID NO:18的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL,和

[0195] vi.包含氨基酸序列SEQ ID NO:19的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL。

[0196] 在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对分化簇3(CD3)的人抗体或其抗原结合片段,其包括:包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的重链可变区(VH)和包含氨基酸序列SEQ ID NO:20的轻链可变区(VL)。

[0197] 在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对分化簇3(CD3)的人抗体或其抗原结合片段,其包括:包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的重链可变区(VH)和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的轻链可变区(VL)。

[0198] 在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对分化簇3(CD3)的人抗体或其抗原结合片段,其包括:包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的重链可变区(VH)和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的轻链可变区(VL)。

[0199] 在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对分化簇3(CD3)的人抗体或其抗原结合片段,其包括:包含氨基酸序列SEQ ID NO:17的重链可变区(VH)和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的轻链可变区(VL)。

[0200] 在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对分化簇3(CD3)的人抗体或其抗原结合片段,其包括:包含氨基酸序列SEQ ID NO:18的重链可变区(VH)和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的轻链可变区(VL)。

[0201] 在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对分化簇3(CD3)的人抗体或其抗原结合片段,其包括:包含氨基酸序列SEQ ID NO:19的重链可变区(VH)和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的轻链可变区(VL)。

[0202] 在一个方面,所述分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体或抗原结合片段。在另一个方面,所述分离的人抗体或其抗原结合片段是重组抗体或抗原结合片段。在一个方面,所述分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段是合成抗体或抗原结合片段。在本公开的一个方面,所述特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段是选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的同种型的全长IgG。

[0203] 特异性

[0204] 在一个实施方式中,本公开提供分离的特异性针对分化簇3(CD3)的人抗体或其抗原结合片段。在一个方面,根据本公开的所述分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段特异性针对人CD3。在一个方面,根据本公开的所述分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段特异性针对食蟹猴CD3。在一个方面,根据本公开的所述分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段特异性针对人和食蟹猴CD3。

[0205] 在本公开的一个方面,根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段特异性针对人CD3ε。在一个方面,根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段特异性针对食蟹猴CD3ε。在一个方面,根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段特异性针对人和食蟹猴CD3ε。在一个方面,根据本公开的分离的人抗体或其抗原结合片段特异性针对人和食蟹猴CD3ε。

[0206] 在一个方面,本公开提供根据本公开的分离的特异性针对人CD3的人抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与食蟹猴CD3交叉反应性结合。在一个方面,本公开提供分离的特异性针对人CD3ε的人抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原

结合片段与食蟹猴CD3ε交叉反应性结合。在一个方面,本公开提供分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与人CD3ε特异性结合。在本公开的一个方面,分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段与人和食蟹猴CD3ε特异性结合。

[0207] 在一个方面,本公开提供分离的特异性针对人CD3的人抗体或其抗原结合片段,其中所述人CD3是包含氨基酸序列SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:46的人CD3ε。在一个方面,本公开提供分离的特异性针对人CD3的人抗体或其抗原结合片段,其中所述分离的人抗体或其抗原结合片段特异性地结合包含选自SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:43的氨基酸序列的人CD3ε多肽。

[0208] 在一个方面,本公开提供分离的特异性针对人CD3的人抗体或其抗原结合片段,其中所述食蟹猴CD3是包含氨基酸序列SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:48的食蟹猴CD3ε。在一个方面,本公开提供分离的特异性针对人CD3的人抗体或其抗原结合片段,其中所述分离的人抗体或其抗原结合片段特异性地结合包含选自SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:44的氨基酸序列的食蟹猴CD3ε多肽。

[0209] 在一个方面,本公开提供分离的特异性针对人CD3的人抗体或其抗原结合片段,其中所述分离的人抗体或其抗原结合片段特异性地结合包含选自SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:44的氨基酸序列的多肽。在本公开的一个方面,根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段特异性地结合人CD3ε的胞外区。在一个方面,根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段特异性地结合人和食蟹猴CD3ε的胞外区。在本公开的一个方面,所述人CD3ε的胞外区包含氨基酸序列SEQ ID NO:46。在另一个方面,所述食蟹猴CD3ε的胞外区包含氨基酸序列SEQ ID NO:48。在一个方面,本公开涉及一种分离的人抗体或其抗原结合片段,其特异性针对包含选自SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44的氨基酸序列的多肽。在一个方面,本公开涉及一种根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段,其特异性结合由SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:43编码的多肽以及由SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:44编码的多肽。

[0210] 在本公开的一个方面,所述分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段包含

[0211] i.重链可变区(VH),其包括

[0212] (a)包含氨基酸序列GFSFGSHYMS(SEQ ID NO:1)的HCDR1,

[0213] (b)包含氨基酸序列NINQIGYSSYYVESVKG(SEQ ID NO:2)、NINQIGYSSYYGESVKG(SEQ ID NO:3)或NINQIGYSSYYEESVKG(SEQ ID NO:4)的HCDR2,和

[0214] (c)包含氨基酸序列GYSAEFAHRSGLDV(SEQ ID NO:5)、GYSDEFATRSGLDV(SEQ ID NO:6)、GYSEEFAHRSGLDV(SEQ ID NO:7)、GYSDEFAKRSGLDV(SEQ ID NO:8)或GYSDEFAHRSGLDV(SEQ ID NO:9)的HCDR3,和

[0215] ii.可变轻链区(VL),其包括

[0216] (d)包含氨基酸序列SGSSSNIGSNYVY(SEQ ID NO:10)的LCDR1,

[0217] (e)包含氨基酸序列RNNQRPS(SEQ ID NO:11)的LCDR2,和

[0218] (f)包含氨基酸序列AGWSRSLHGAV(SEQ ID NO:12)或AGWSRELHGAV(SEQ ID NO:13)的LCDR3。

[0219] 在本公开的一个方面,所述分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段包含VH和VL,所述VH和VL选自:

[0220] i.包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:20的VL,

[0221] ii.包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL,

[0222] iii.包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL,

[0223] iv.包含氨基酸序列SEQ ID NO:17的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL,

[0224] v.包含氨基酸序列SEQ ID NO:18的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL,和

[0225] vi.包含氨基酸序列SEQ ID NO:19的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL。

[0226] 动力学

[0227] 在一个方面,本公开涉及分离的特异性针对人CD3的人抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段对包含SEQ ID NO:41和/或SEQ ID NO:43的人CD3ε肽具有单价亲和力,其K_D与包含VH和VL(其分别包含SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26的氨基酸序列)的抗体的K_D相比较低。

[0228] 在一个方面,本公开涉及分离的特异性针对人CD3的人抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段对包含SEQ ID NO:41和/或SEQ ID NO:43的人CD3ε肽具有单价亲和力,其K_D为10nM或更小,例如8nM或更小、7nM或更小、6nM或更小、5nM或更小、4nM或更小、3nM或更小、2nM或更小、1nM或更小、0.1nM或更小、0.2nM、或0.1nM更小。

[0229] 在一个方面,本公开涉及分离的特异性针对人CD3的人抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段对包含SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:43的人CD3ε肽具有单价亲和力,其K_D为约10nM、约9nM、约7nM、约6nM、约5nM、约4nM、约3nM、约2nM、约1nM、约0.9nM、约0.8nM、约0.7nM、约0.6nM、约0.5nM、约0.4nM、约0.3nM、约0.2nM、约0.1nM。

[0230] 在一个方面,本公开涉及分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段对包含SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:34的人CD3ε多肽具有单价亲和力,其K_D在0.1nM至10nM之间。

[0231] 在某些方面,所述单价亲和力是针对scFv、Fv或Fab测定的。在一个方面,所述单价亲和力如本文实施例2.1、实施例3.4、实施例4.4或实施例4.8中所述测定。在一个方面,所述单价亲和力以如本文实施例2、实施例3或实施例4中所述的抗体形式测定。

[0232] 在一个方面,所述分离的特异性针对分化簇3(CD3)的人抗体或其抗原结合片段包括:包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的重链可变区(VH),和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的轻链可变区(VL)。

[0233] 细胞结合

[0234] 在一个方面,本公开涉及分离的特异性针对人CD3的人抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段特异性地结合人Jurkat细胞(ATCC#TIB-152),其EC_{50}浓度在40nM至120nM之间,例如在1nM至10nM之间。

[0235] 在一个方面,本公开涉及分离的特异性针对人CD3的人抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段特异性地结合人Jurkat细胞(ATCC#TIB-152),其EC_{50}浓度为约1nM、约2nM、约3nM、约4nM、约5nM、约6nM、约7nM、约8nM、约9nM、约10nM、约20nM、约30nM、约

40nM、约50nM、约60nM、约70nM、约80nM、约90nM、约100nM。

[0236] 在一个方面,所述EC_{50}浓度在如本文实施例2.2或实施例3.5中所述的FACS测定中测定。在一个方面,所述EC_{50}浓度以Fab形式测定。在一个方面,所述EC_{50}浓度以抗体Fv形式测定。在一个方面,所述EC_{50}浓度针对根据实施例2或实施例3的双特异性抗体形式测定,所述双特异性抗体形式包括根据本公开的分离的特异性针对人CD3的人抗体或其抗原结合片段。

[0237] 在一个方面,所述分离的特异性针对分化簇3(CD3)的人抗体或其抗原结合片段包括:包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的重链可变区(VH),和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的轻链可变区(VL)。

[0238] ELISA结合

[0239] 在一个方面,本公开提供分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段,其特异性地结合包含SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:43的重组人CD3ε多肽,其EC_{50}浓度在1-40nM之间,优选在1-15nM之间。在一个方面,所述分离的人抗体或其抗原结合片段特异性地结合具有SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:43的重组人CD3ε多肽,其EC_{50}浓度小于40nM,优选小于15nM。在一个方面,所述抗体或其抗原结合片段特异性地结合具有SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:43的重组人CD3ε多肽,其EC_{50}浓度是包含SEQ ID NO:14的VH和SEQ ID NO:20的VL或SEQ ID NO:25的VH和SEQ ID NO:26的VL的特异性针对CD3的抗体或其抗原结合片段所测定的EC_{50}浓度的约0.5倍更低、约1倍更低、约1.5倍更低、约2倍更低、约2.5倍更低或约3倍更低。

[0240] 在一个方面,所述EC_{50}浓度如本文实施例4.7中所述测定。在一个方面,所述EC_{50}浓度在ELISA测定中测定。在一个方面,所述EC_{50}浓度针对抗体Fv测定。在一个方面,所述EC_{50}浓度针对根据实施例4的双特异性抗体形式测定,所述双特异性抗体形式包括根据本公开的分离的特异性针对人CD3的人抗体或其抗原结合片段。

[0241] 在一个方面,所述分离的特异性针对分化簇3(CD3)的人抗体或其抗原结合片段包括:包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的重链可变区(VH),和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的轻链可变区(VL)。

[0242] 安全性

[0243] 在一个方面,本公开提供一种分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与包含SEQ ID NO:14的VH和SEQ ID NO:20的VL的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段相比,诱导CD4+和/或CD8+T细胞上CD69表达的上调较少。

[0244] 在一个方面,本公开提供一种分离的人抗体或其抗原结合片段,所述分离的人抗体或其抗原结合片段特异性结合CD4+和/或CD8+T细胞上表达的CD3并且与包含SEQ ID NO:14的VH和SEQ ID NO:20的VL的特异性针对CD3的抗体或其抗原结合片段相比,诱导CD4+和/或CD8+T细胞中CD69表达上调数量较低。

[0245] 在某些方面,通过本文实施例4.13中所述方法测定CD4+和/或CD8+T细胞上CD69的上调。在某些方面,针对根据实施例4的双特异性抗体测定CD69的上调,所述双特异性抗体包括根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段。在一个方面,所述抗体是双特异性抗体。在一个方面,所述双特异性抗体单价结合CD4+和/或CD8+阳性T细胞上表达的CD3。在一个方面,针对Fv片段测定所述CD69的上调。在某些方面,所述特异性针对

CD3的抗体或其抗原结合片段是表8中列出的抗体或其抗原结合片段。

[0246] 在一个方面,所述分离的特异性针对分化簇3(CD3)的人抗体或其抗原结合片段包括:包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的重链可变区(VH),和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的轻链可变区(VL)。

[0247] 去免疫

[0248] T细胞表位是多肽序列中的特定肽序列,其可以合理的效率与MHC II类分子结合,或以肽:MHC复合物的形式与物种的T细胞受体强力结合以接收(治疗性)蛋白质或多肽,或其显示通过MHC II类上的呈递刺激T细胞的能力。(潜在)T细胞表位可以通过任何计算或物理方法测量以建立MHC结合。然而,据了解,某些被发现与MHC II类分子结合的肽在被施用蛋白质的生物体中被识别为“自身”,因此不引起免疫应答。例如,在人胚系免疫球蛋白可变区蛋白序列中发现了此类肽。通过去除特异性针对CD3的亲本人抗体中存在的潜在T细胞表位,本公开采用设计改进的特异性针对CD3的人抗体的方法。这涉及选择氨基酸取代,以便去除已鉴定的T细胞表位,并测试一系列具有不同氨基酸取代的变体分子。本公开的原理是,通过鉴定潜在T细胞表位及其随后在CDR内的改变来改变人CD3特异性抗体的一级CDR序列,以消除此类潜在T细胞表位。可以通过任何合适的方法分析治疗性抗体的一级序列是否存在T细胞表位。在本公开的方法中,计算筛选方法如Lonza(Epibase™,Epibase版本:v3.0,WO 2003/105058)提供的方法。

[0249] 在一个方面,本公开提供分离的特异性针对CD3的去免疫人抗体或其抗原结合片段。在一个方面,本公开提供特异性针对CD3的抗体或其抗原结合片段,其是分离的特异性针对CD3的去免疫人抗体或其抗原结合片段。在一个方面,本公开提供分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段,其与包含SEQ ID NO:14的VH和SEQ ID NO:20的VL的特异性针对CD3的抗体或其抗原结合片段相比,在人类中免疫原性较低或无免疫原性。

[0250] 在一个方面,本公开提供分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段在人类中引发免疫应答或免疫原性反应的风险降低。在一个方面,本公开提供分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段在人类中引发人类抗人抗体应答的风险降低。

[0251] 在一个方面,所述抗体或其抗原结合片段一旦施用于人类,则在所述人类中引发免疫应答或免疫原性反应的风险降低。在一个方面,所述降低的风险是指对于包含SEQ ID NO:14的VH和SEQ ID NO:20的VL的人抗体或其抗原结合片段在人类中引发免疫应答或免疫原性反应的风险。在本公开的一个方面,所述在人类中引发免疫应答或免疫原性反应的风险降低如本文实施例4中所述测定。在本公开的一个方面,所述降低的风险针对根据本公开的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段的VH和/或VL测定。

[0252] 在本公开的一个方面,所述风险或降低的风险以针对T细胞表位、风险评分、绝对评分、H-线、绝对H-线、H-评分和绝对H-评分和/或热点测定的数值提供,上述所有内容均如本文所定义。在本公开的一个方面,所述风险或降低的风险是指针对包含SEQ ID NO:14的VH和SEQ ID NO:20的VL的人抗体或其抗原结合片段测定的风险。在一个方面,使用基于WO 2003/105058(其全文并入本文中)的计算机T细胞表位筛选工具Epibase™,Epibase版本:v3.0(Lonza)针对T细胞表位、风险评分、绝对评分、H-线、绝对H-线、H-评分和绝对H-评分和/或热点测定的所述数值。在一个方面,等位基因集合是主要高加索人DRB1等位基因。在

一个方面,针对高加索人DRB1等位基因的不同同种型测定风险。在一个方面,过滤集合是针对人抗体胚系序列。在一个方面,通过排除根据本公开的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段的VH和/或VL中存在的人抗体胚系序列来测定风险。在一个方面,针对根据本公开的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段的HCDR1、HCDR2、HCDR3和LCDR3区来测定风险。在一个方面,所述风险排除了人抗体胚系序列在人类中引发免疫应答的风险。在一个方面,所选人群是高加索人。在一个方面,根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段在高加索人群体的人类中引发免疫应答或免疫原性反应的风险降低。在一个方面,与包含SEQ ID NO:14的VH和SEQ ID NO:20的VL的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段的风险相比,根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段在高加索人群体的人类中引发免疫应答或免疫原性反应的风险降低。

[0253] 在一个方面,根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段具有如本文所测定的绝对评分在约380-450范围内、优选地在约390-425范围内的VH。在一个方面,根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段具有绝对评分小于440、小于430、小于420、小于410、小于400、小于395的VH。在一个方面,根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段具有与包含SEQ ID NO:14的VH相比降低的绝对评分的VH。在一个方面,所述降低的绝对评分降低大于200,例如大于210、215、220、230、235、240、245或250。

[0254] 在一个方面,根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段具有绝对H-评分在约330-370、优选约335-365范围内的VH。在一个方面,根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段具有绝对H-评分为约335或365的VH。在一个方面,根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段具有绝对H-评分小于370、小于364、小于360、小于355、小于350、小于345、小于340或小于335的VH。在一个方面,根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段具有与包含SEQ ID NO:14的VH相比降低的绝对H-评分的VH。在一个方面,所述降低的绝对H-评分降低大于200,例如大于210、215、220、230、235、240、245或250。

[0255] 在一个方面,根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段具有绝对H-线为14的VH。在一个方面,根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段具有与包含SEQ ID NO:14的VH相比降低的绝对H-线的VH。在一个方面,所述降低的绝对H-线降低11。在一个方面,根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段具有绝对热点为4的VH。在一个方面,根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段具有与包含SEQ ID NO:14的VH相比降低的绝对热点的VH。在一个方面,所述降低的绝对热点降低了2。在一个方面,根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段具有绝对评分和/或绝对H-评分为62的VL。在一个方面,根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段具有与包含SEQ ID NO:14的VH相比降低的绝对评分和/或绝对H-评分的VL。在一个方面,根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段具有绝对H-线为2的VL。在一个方面,根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段具有绝对热点为0的VL。

[0256] 在一个实施方式中,所述分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段包含VH和VL,所述VH和VL选自:

[0257] i.包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL,

[0258] ii.包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL,

[0259] iii.包含氨基酸序列SEQ ID NO:17的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL,

[0260] iv.包含氨基酸序列SEQ ID NO:18的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL,以及

[0261] v.包含氨基酸序列SEQ ID NO:19的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL。

[0262] 多特异性抗体

[0263] 根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段优选以双特异性或多特异性抗体形式使用,以靶向表达CD3的细胞毒性T细胞并刺激细胞毒性T细胞活化,例如在T细胞介导杀伤特定细胞类型(例如肿瘤细胞)是有益或可取的情况下。

[0264] 根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段可以与另一种功能分子(例如另一种肽或蛋白质)连接或共表达。在一个方面,本公开涉及分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与异源蛋白质或多肽融合。在一个方面,本公开涉及融合蛋白,其包含根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段和异源蛋白质或多肽。例如,抗体或其抗原结合片段可以功能性地连接(例如通过化学偶联、基因融合、非共价结合或其他方式)到一种或多种其他分子实体,例如另一种抗体或其抗原结合片段,以产生具有第二或可选第三结合特异性的双特异性或多特异性抗体。能够结合两种或更多种抗原的双特异性或多特异性抗体对于治疗应用具有重要意义。在另一个方面,本公开提供分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是单特异性、双特异性或多特异性抗体或其抗原结合片段。多特异性抗体可以包含对同一靶抗原上的不同表位具有特异性的抗体或其抗原结合片段,或者可以包含对多于一种靶抗原具有特异性的抗体或其抗原结合片段。在根据本公开的双特异性或多特异性抗体的背景下,细胞表面靶抗原可以是肿瘤相关抗原(TAA)。肿瘤相关抗原的非限制性实例包括例如在肿瘤或癌细胞表面表达的抗原。可用于本公开上下文中的示例性多特异性抗体形式包括但不限于例如基于scFv或双链抗体双特异性形式、IgG-scFv融合、双可变结构域(DVD)-Ig、Quadroma、旋钮入孔、共同轻链(例如具有旋钮入孔的共同轻链等)、CrossMab、CrossFab、(SEED)体、亮氨酸拉链、Duobody、IgG1/IgG2、双重作用Fab(DAF)-IgG、Mab_2双特异性形式(参见例如Klein等人2012年,mAbs 4:6、1-11)和半抗体(参见例如Stuhler等人Nat Commun.2019;10:5387)。优选地,按照本文实施例3或实施例5或WO 2020/115115中描述的形式使用根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段。

[0265] 在一个方面,本公开提供一种双特异性或多特异性抗体,其包括根据本公开的特异性针对CD3的人抗体的抗原结合片段和与所述第一抗原结合片段结合不同抗原的第二抗体的第二抗原结合片段。在本公开的一个方面,所述第二抗原结合片段与细胞表面抗原结合。在一个方面,所述细胞表面靶抗原是肿瘤相关抗原。在一个方面,所述第一抗原结合片段与免疫效应细胞上存在或表达的CD3结合。在一个方面,所述免疫效应细胞是T细胞。在一个方面,所述T细胞是细胞毒性T细胞。在一个方面,本公开提供双特异性或多特异性抗体,其包括根据本公开的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段,其中双特异性或多特异性抗体介导靶抗原表达细胞的重定向T细胞杀伤。在某些方面,所述靶细胞杀伤可以通过本文所述的方法来测定,例如实施例4.12中所述。

[0266] 在本公开的一个方面,根据本公开的双特异性或多特异性抗体特异性结合T细胞上表达的CD3和存在于除T细胞之外的细胞上的第二抗原。在某些方面,所述双特异性或多特异性抗体在结合T细胞上表达的CD3和存在于除T细胞之外的靶细胞上的第二抗原后活化T细胞。在某些方面,活化的T细胞能够对另一细胞发挥细胞毒性作用和/或凋亡作用。在一个方面,本公开提供包含根据本公开的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段的双特异性或多特异性抗体,其中在存在细胞表面靶抗原表达细胞的情况下,所述双特异性或多特异性抗体在结合T细胞上表达的CD3和结合细胞表面靶表达细胞后诱导人类T细胞增殖。

[0267] 接头优化

[0268] 在一个方面,根据本公开的双特异性抗体由三个Fv区组成。这通过使用常规免疫球蛋白(例如IgG)抗体结构(两条重链与两条轻链相关联形成两个Fv区)来实现,该结构在两个Fab臂和常规免疫球蛋白结构的Fc部分之间合并了另外的Fv区。在一个方面,根据本公开的双特异性抗体具有如图2中所描绘的一般结构。

[0269] 在一个方面,本公开提供双特异性抗体,其包含

[0270] a)包含第一Fv区的第一Fab,所述第一Fv区特异性结合第一抗原,

[0271] b)特异性结合第二抗原的第二Fv区,和

[0272] c)包含第三Fv区的第二Fab,所述第三Fv区特异性结合第三抗原,和

[0273] d)由第一和第二Fc区亚基组成的Fc区,其中

[0274] i.第一Fab重链的C-端通过第一肽接头与第二Fv区的VH或VL的N-端融合,其中

[0275] ii.第二Fv区的VH或VL的C-端通过第二肽接头与第一Fc区亚基的N-端融合,其中

[0276] iii.第二Fc区亚基的N-端通过第四肽接头与第二Fv区的互补可变结构域的C-端融合,并且其中

[0277] iv.第二Fab重链的C-端通过第三肽接头与第二Fv区的VH或VL的N-端融合,前提是第一和第二Fab与第二Fv区的不同可变区融合。

[0278] 在一个方面,第一Fab的CH1结构域的C-端通过第一肽接头与第二Fv区的VH或VL的N-端融合,前提是第一和第二Fab与第二Fv区的不同可变结构域融合。在一个方面,第一Fab的CH1结构域的C-端通过第一肽接头与第二Fv区的VH的N-端融合,前提是第一和第二Fab与第二Fv区的不同可变结构域融合。在一个方面,第一Fab的CH1结构域的C-端通过第一肽接头与第二Fv区的VL的N-端融合,前提是第一和第二Fab与第二Fv区的不同可变结构域融合。

[0279] 在一个方面,第二Fab的CH1结构域的C-端通过第三肽接头与第二Fv区的VH或VL的N-端融合,前提是第一和第二Fab与第二Fv区的不同可变结构域融合。在一个方面,第二Fab的CH1结构域的C-端通过第三肽接头与第二Fv区的VH的N-端融合,前提是第一和第二Fab与第二Fv区的不同可变结构域融合。在一个方面,第二Fab的CH1结构域的C-端通过第三肽接头与第二Fv区的VL的N-端融合,前提是第一和第二Fab与第二Fv区的不同可变结构域融合。

[0280] 在一个方面,第一Fab的重链的C-端通过第一肽接头与第二Fv区的VL的N-端融合,并且第二Fab的重链的C-端通过第三肽接头与第二Fv区的VH的N-端融合。在一个方面,第一Fab的重链的C-端通过第一肽接头与第二Fv区的VH的N-端融合,并且第二Fab的重链的C-端通过第三肽接头与第二Fv区的VL的N-端融合。

[0281] 在一个方面,根据本公开的双特异性抗体包含4种多肽,其中

[0282] a)第一多肽包含第一Fab的轻链,

[0283] b)第二多肽从其N-端到其C-端包含

[0284] i.第一Fab的重链,

[0285] ii.第一肽接头,

[0286] iii.第二Fv区的VL,

[0287] iv.第二肽接头,和

[0288] v.第一Fc区亚基

[0289] c)第三多肽从其N-端到其C-端包含

[0290] i.第二Fab的重链,

[0291] ii.第三肽接头,

[0292] iii.第二Fv区的VH,

[0293] iv.第四肽接头

[0294] v.第二Fc区亚基,和

[0295] d)第四多肽包含第二Fab的轻链。

[0296] 在一个方面,根据本公开的双特异性抗体包含4种多肽,其中

[0297] a)第一多肽包含第一Fab的轻链,

[0298] b)第二多肽从其N-端到其C-端包含

[0299] i.第一Fab的重链,

[0300] ii.第一肽接头,

[0301] iii.第二Fv区的VH,

[0302] iv.第二肽接头,和

[0303] iii.第一Fc区亚基

[0304] c)第三多肽从其N-端到其C-端包含

[0305] i.第二Fab的重链,

[0306] ii.第三肽接头,

[0307] iii.第二Fv区的VL,

[0308] iv.第四肽接头,和

[0309] v.第二Fc区亚基

[0310] d)第四多肽包含第二Fab的轻链。

[0311] 在本公开的一个方面,第一、第二、第三和第四肽接头选自以下氨基酸序列:

[0312]
a) GGSGGSGGS (SEQ ID NO: 30),
b) GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 31),
c) AQPAAPAPDAHEAPAPAQGS (SEQ ID NO: 33),
d) AHPAAPAPAHPAAPAPAHGH (SEQ ID NO: 32),
e) PKAAP (SEQ ID NO: 36),
f) PKAAPSVTLFPPSSEELQAN (SEQ ID NO: 34),
g) ASTKGP (SEQ ID NO: 37), 和
h) ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG (SEQ ID NO: 35)

[0313] 在本公开的一个方面,第二和第四肽接头在C-端与氨基酸序列DKTHTCPPCP(SEQ

ID NO:38)融合。在本公开的一个方面中,第二和第四肽接头在C-端另外包含氨基酸序列DKTHTCPPCP(SEQ ID NO:38)。

[0314] 在本公开的一个方面,第二和第四肽接头选自以下氨基酸序列:

a) PKAAPDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 76),

b) ASTKGPDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 77),和

[0315] c) AQPAAPAPDAHEAPAPAQGSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 78),

d) PKAAPSVTLFPPSSEELQANDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 79),

e) ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 80)。

[0316] 在本公开的一个方面,

[0317] a)第一和第三肽接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:31),第二肽接头包含氨基酸序列PKAAP(SEQ ID NO:36),第四肽接头包含氨基酸序列ASTKGP(SEQ ID NO:37),或

[0318] b)第一和第三肽接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:31),第二和第四肽接头包含氨基酸序列AQPAAPAPDAHEAPAPAQGS(SEQ ID NO:33),或

[0319] c)第一和第三肽接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:31),第二肽接头包含氨基酸序列PKAAPSVTLFPPSSEELQAN(SEQ ID NO:34),第四肽接头包含氨基酸序列ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG(SEQ ID NO:35),或

[0320] d)第一和第三肽接头包含氨基酸序列AHPAAPAPAHPAAPAPAHGH(SEQ ID NO:32),第二肽接头包含氨基酸序列PKAAPSVTLFPPSSEELQAN(SEQ ID NO:34),第四肽接头包含氨基酸序列ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG(SEQ ID NO:35),或

[0321] e)第一和第三肽接头包含氨基酸序列AQPAAPAPDAHEAPAPAQGS(SEQ ID NO:33),第二肽接头包含氨基酸序列PKAAPSVTLFPPSSEELQAN(SEQ ID NO:34),第四肽接头包含氨基酸序列ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG(SEQ ID NO:35),或

[0322] f)第一和第三肽接头包含氨基酸序列GGSGGSGGS(SEQ ID NO:30),第二肽接头包含氨基酸序列PKAAPSVTLFPPSSEELQAN(SEQ ID NO:34),第四肽接头包含氨基酸序列ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG(SEQ ID NO:35)。

[0323] 在本公开的一个方面,

[0324] a)第一和第三肽接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:31),第二肽接头包含氨基酸序列PKAAPDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:76),第四肽接头包含氨基酸序列ASTKGPDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:77),或

[0325] b)第一和第三肽接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:31),第二和第四肽接头包含氨基酸序列AQPAAPAPDAHEAPAPAQGSDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:78),或

[0326] c)第一和第三肽接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:31),第二肽接头包含氨基酸序列PKAAPSVTLFPPSSEELQANDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:79),第四肽接头包含氨基酸序列ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:80),或

[0327] d)第一和第三肽接头包含氨基酸序列AHPAAPAPAHPAAPAPAHGH(SEQ ID NO:32),第二肽接头包含氨基酸序列PKAAPSVTLFPPSSEELQANDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:79),第四肽接头包含氨基酸序列ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:80),或

[0328] e)第一和第三肽接头包含氨基酸序列AQPAAPAPDAHEAPAPAQGS(SEQ ID NO:33),第二肽接头包含氨基酸序列PKAAPSVTLFPPSSEELQANDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:79),第四肽接头包含氨基酸序列ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:80),或

[0329] f)第一和第三肽接头包含氨基酸序列GGSGGSGGS(SEQ ID NO:30),第二肽接头包含氨基酸序列PKAAPSVTLFPPSSEELQANDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:79),第四肽接头包含氨基酸序列ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:80)。

[0330] 在本公开的一个方面,第一和第三肽接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:31),第二和第四肽接头包含氨基酸序列AQPAAPAPDAHEAPAPAQGS(SEQ ID NO:33)。在本公开的一个方面,第一和第三肽接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:31),而第二和第四肽接头包含氨基酸序列AQPAAPAPDAHEAPAPAQGSDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:78)。

[0331] 在本公开的一个方面,第二Fv区特异性结合CD3。在一个方面,第二Fv特异性针对CD3,特别是特异性针对人CD3,更特别是特异性针对人CD3ε。

[0332] 在本公开的一个方面,第二Fv包含

[0333] i.重链可变区(VH),其包括

[0334] (a)包含氨基酸序列GFSFGSHYMS(SEQ ID NO:1)的重链互补决定区(HCDR)1,

[0335] (b)包含氨基酸序列NINQIGYSSYYVESVKG(SEQ ID NO:2)、NINQIGYSSYYGESVKG(SEQ ID NO:3)或NINQIGYSSYYEESVKG(SEQ ID NO:4)的HCDR2,和

[0336] (c)包含氨基酸序列GYSAEFAHRSGLDV(SEQ ID NO:5)、GYSDEFATRSGLDV(SEQ ID NO:6)、GYSEEFAHRSGLDV(SEQ ID NO:7)、GYSDEFAKRSGLDV(SEQ ID NO:8)或GYSDEFAHRSGLDV(SEQ ID NO:9)的HCDR3,和

[0337] ii.可变轻链区(VL),其包括

[0338] (d)包含氨基酸序列SGSSSNIGSNYVY(SEQ ID NO:10)的轻链互补决定区(LCDR)1,

[0339] (e)包含氨基酸序列RNNQRPS(SEQ ID NO:11)的LCDR2,和

[0340] (f)包含氨基酸序列AGWSRSLHGAV(SEQ ID NO:12)或AGWSRELHGAV(SEQ ID NO:13)的LCDR3。

[0341] 在本公开的一个方面,第二Fv包含选自以下的VH和VL:

[0342] i.包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:20的VL,

[0343] ii.包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL,

[0344] iii.包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL,

[0345] iv.包含氨基酸序列SEQ ID NO:17的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL,

[0346] v.包含氨基酸序列SEQ ID NO:18的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL,以及

[0347] vi.包含氨基酸序列SEQ ID NO:19的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL。

[0348] 在本公开的一个方面,第一Fab或第二Fab的轻链分别包含第一Fab或第二Fab的VL和CL。在本公开的一个方面,第一Fab和第二Fab的轻链是相同的。在本公开的一个方面,第一Fab和第二Fab的重链是相同的。在本公开的一个方面,第一Fab和第二Fab是相同的。

[0349] 在一个方面,第一和第二Fc区亚基形成Fc区。在一个方面,Fc区是IgG1 Fc区。在一个方面,所述IgG1 Fc区是人IgG1 Fc区。在一个方面,Fc区包含促进第一和第二Fc区亚基结合的一个或多个氨基酸修饰。在一个方面,在第一Fc区亚基的CH3结构域中,位置366的苏氨

酸残基被色氨酸残基(T366W)取代,并且位置354的丝氨酸残基被半胱氨酸残基(S354C)取代,并且在第二Fc区亚基的CH3结构域中,位置407的酪氨酸残基被缬氨酸残基(Y407V)取代,位置366的苏氨酸残基被丝氨酸残基(T366S)取代,位置368的亮氨酸残基被丙氨酸残基(L368A)取代,并且位置349的酪氨酸残基被半胱氨酸残基(Y349C)取代,其中根据EU索引进行编号。在本公开的一个方面,根据本公开的双特异性抗体的Fc区对Fc受体和/或C1q的结合亲和力降低和/或效应功能降低。在本公开的一个方面,Fc区在每个Fc区亚基中包含一个或多个氨基酸突变,其中所述一个或多个氨基酸突变选自:L234A、L235E、G237A、A330S和P331S,其中根据EU索引进行编号。在一个方面,在每个Fc区亚基中,对应于人IgG1中根据EU索引编号的位置L234、L235、G237、A330、P331的位置中的至少5个氨基酸残基分别突变为A、E、A、S和S。

[0350] 在一个方面,第一抗原和第三抗原是相同的。在一个方面,第一和第三抗原是肿瘤相关抗原。在一个方面,第一和第三抗原是肿瘤相关抗原,其表达于肿瘤细胞或癌细胞上。在一个方面,第二抗原是免疫细胞相关抗原。在一个方面,第二抗原在免疫细胞上表达。在一个方面,第二抗原在免疫效应细胞上表达。在一个方面,第二抗原在细胞毒性T细胞上表达。在一个方面,第二抗原是CD3。在一个方面,第二抗原是CD3ε。在一个方面,第二抗原是人CD3。在一个方面,第二抗原是人CD3ε。在一个方面,根据本公开的双特异性抗体提供与第一抗原的二价结合和与第二抗原的单价结合。在一个方面,所述双特异性抗体是三价双特异性抗体。

[0351] 功效

[0352] 在某些方面,本公开提供根据本公开的双特异性抗体,其包括根据本公开的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段,其中所述双特异性抗体介导靶细胞对靶抗原表达细胞的杀伤。在一个方面,该靶细胞杀伤是在细胞毒性T细胞的存在下介导的。在某些方面,所述双特异性抗体包括抗体的第二抗原结合片段,其特异性结合细胞表面靶抗原。在某些方面,所述靶抗原是肿瘤相关抗原。在一个方面,该靶抗原是HER2。在一个方面,抗体的第二抗原结合片段与HER2(UniProtKB-P04626)结合。在一个方面,该靶细胞是肿瘤细胞或癌细胞。在一个方面,该靶细胞是SKOV-3(ATCC®HTB-77™)、SKBR3(ATCC®HTB-30™)或MCF-7(ATCC®HTB-22™)细胞。在某些方面,靶细胞杀伤通过本文实施例4.13中描述的方法测定。

[0353] 治疗

[0354] 在一个方面,本公开提供分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段或根据本公开的双特异性抗体,用于用作药物。在一个方面,本公开涉及分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段或根据本公开的双特异性抗体,用于制备或制造药物。在一个方面,本公开提供分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段或根据本公开的双特异性抗体,用于增强患有细胞增殖性疾病的受试者的免疫功能。

[0355] 在一个方面,本公开提供治疗或延缓有需要的受试者的细胞增殖性疾病进展的方法,该方法包括向所述受试者施用有效量的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段或根据本公开的双特异性抗体。在一个方面,所述分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段或根据本公开的双特异性抗体用于治疗有需要的受试者的细胞增殖性疾病或延缓其进展。在一个方面,所述细胞增殖性疾病是癌症。在一个方面,所述癌症选自但不

限于:食道癌、胃癌、小肠癌、大肠癌、结直肠癌、乳腺癌、非小细胞肺癌、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、B细胞淋巴瘤、B细胞白血病、多发性骨髓瘤、肾癌、前列腺癌、肝癌、头颈癌、黑色素瘤、卵巢癌、间皮瘤、胶质母细胞瘤、生发中心B细胞样(GCB)DLBCL、活化B细胞样(ABC)DLBCL、滤泡性淋巴瘤(FL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、急性髓细胞白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、边缘区淋巴瘤(MZL)、小淋巴细胞白血病(SLL)、淋巴浆细胞淋巴瘤(LL)、瓦尔登斯特伦(Waldenstrom)巨球蛋白血症(WM)、中枢神经系统淋巴瘤(CNSL)、伯基特(Burkitt's)淋巴瘤(BL)、B细胞幼淋巴细胞白血病、脾边缘区淋巴瘤、毛细胞白血病、脾淋巴瘤/白血病,无法分类、脾弥漫性红髓小B细胞淋巴瘤、毛细胞白血病变体、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、浆细胞骨髓瘤、骨孤立性浆细胞瘤、骨外浆细胞瘤、粘膜相关淋巴组织的淋巴结外边缘区淋巴瘤(MALT淋巴瘤)、结节边缘区淋巴瘤、儿童结节边缘区淋巴瘤、儿童滤泡性淋巴瘤、原发性皮肤滤泡中心淋巴瘤、富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤、中枢神经系统原发性DLBCL、原发性皮肤DLBCL,腿型、老年人EBV阳性DLBCL、与慢性炎症相关的DLBCL、淋巴瘤样肉芽肿、原发性纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、ALK阳性大B细胞淋巴瘤、浆母细胞淋巴瘤、HHV8相关多中心卡斯尔曼(Castleman)病中出现的大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤:无法分类的B细胞淋巴瘤,其特征介于弥漫大B细胞淋巴瘤和伯基特淋巴瘤之间,以及无法分类的B细胞淋巴瘤,其特征介于弥漫大B细胞淋巴瘤和经典霍奇金淋巴瘤之间。

[0356] 在一个方面,本公开提供根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体用于制造药物的用途,所述药物用于治疗细胞增殖性疾病或延缓其进展。在一个方面,本公开提供根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体用于制造药物的用途,所述药物用于增强患有细胞增殖性疾病的受试者的免疫功能。在一个方面,本公开提供使用根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体来治疗有需要的受试者的方法。

[0357] 在一个方面,根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体或包含所述抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体的药物组合物通过皮下、静脉内、肌肉内、局部、口服、透皮、腹膜内、眶内(intraorbitally)、植入、吸入、鞘内、心室内或鼻内施用。

[0358] 组合物

[0359] 在一个方面,本公开提供一种药物组合物,其包含根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体以及药学上可接受的载体或赋形剂。此类载体或赋形剂在本领域中是众所周知的,并且本领域技术人员将找到最适合用根据本公开的抗体或其抗原结合片段治疗受试者的配方和给药途径。在一个方面,本公开涉及包含根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体的药物组合物在制备用于治疗疾病的药物中的用途。在一个方面,本公开涉及所述药物组合物用于治疗疾病的用途。在一个方面,本公开提供一种治疗受试者的细胞增殖性疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含治疗有效量的根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体的药物组合物。在一个方面,本公开提供一种药物组合物,所述药物组合物包含根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体与第二治疗剂的组合。在一个方面,所述第二治疗剂是任何有利地与根

据本公开的所述人抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体组合的药剂。本公开提供一种使用根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体刺激T细胞活化的治疗方法,其中治疗方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的包含根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体的药物组合物。本公开还提供一种使用根据本公开的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体将T细胞杀伤重定向至癌细胞或组织的治疗方法,其中治疗方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的包含根据本公开的所述抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体的药物组合物。

[0360] 生产

[0361] 在另一方面,本公开涉及生产表5-7中列出的任何抗体的分离的特异性针对CD3的人抗体或其抗原结合片段的方法。

[0362] 根据本公开的特异性针对CD3的抗体或其抗原结合片段的重链和轻链的编码序列可以是重组DNA分子,其通过将DNA可操作地连接到基因表达所需的必要表达控制区(例如调节区)而引入表达载体中。技术人员将认识到,编码重链或轻链的多核苷酸可以克隆到不同的载体中或克隆到相同的载体中。载体可通过本领域公知的方法引入到适当的宿主细胞,例如原核细胞(例如,细菌)或真核细胞(例如,酵母或哺乳动物)细胞(参见例如,"Current Protocol in Molecular Biology",Ausubel等人(编辑),Greene Publishing Assoc.和John Wiley Interscience,New York,1989和1992)。本领域技术人员已知许多克隆载体,选择适当的克隆载体是选择的问题。基因可置于启动子、核糖体结合位点(用于细菌表达)和任选操纵子(本文统称为"控制"元件)的控制下,从而编码所需蛋白质的DNA序列在由包含此表达构建体的载体转化的宿主细胞中转录成RNA。编码序列可以包含或不包含信号肽或前导序列。在宿主细胞中表达后,获得本公开的抗体或其抗原结合片段。这些步骤可以以不同的方式实现,如本领域技术人员所知。一般而言,此类步骤通常包括用编码抗体分子的核酸或载体或感染性颗粒转化或转染合适的宿主细胞。此外,此类步骤通常包括在适合所述宿主细胞繁殖(增殖、生长)的条件下培养所述宿主细胞,以及在适合生产(表达、合成)编码的抗体或抗原结合片段的条件下进行培养步骤。在适合其增殖或表达的条件下培养宿主细胞通常在包含适合细胞生长或诱导表达的成分的培养基中完成。在特定方面,本公开的生产抗体或其抗原结合片段的方法还包括从宿主细胞或培养基中分离产生的抗体或其抗原结合片段的步骤。根据所选的表达系统和宿主,本公开的抗体或其抗原结合片段通过在表达目的蛋白质的条件下培养由上述表达载体转化的宿主细胞来产生。然后从宿主细胞中分离并纯化蛋白质。如果表达系统将蛋白质分泌到生长培养基中,则可以直接从培养基中纯化蛋白质。如果蛋白质没有分泌,则从细胞裂解物中分离蛋白质或从细胞膜级分中回收蛋白质。选择适当的生长条件和回收方法在本领域的技能内。然后可以通过本领域技术人员已知的多种技术纯化本公开的抗体或其抗原结合片段。应当注意,本公开的Fab不是天然存在的蛋白质。本公开还提供能够表达包含根据本公开的特异性针对CD3的抗体或其抗原结合片段的重链可变区或轻链可变区的多肽的重组表达载体。例如,本公开包括编码表5-7中提到的任何氨基酸序列的重组表达载体。本公开的范围还包括已引入此类载体的宿主细胞,以及通过在允许生产抗体或其抗原结合片段的条件下培养宿主细胞并回收如此产生的抗体及其抗原结合片段来产生抗体或其部分的方法。

[0363] 抗原序列

[0364] 表2:本实施例中使用的与人IgG Fc或FLAG-标签融合的重组人和食蟹猴CD3ε细胞外结构域抗原的氨基酸序列。

[0365]

CD3 抗原	SEQ ID NO:	[aa]
成熟人 CD3e(22-49)_ Fc2(K105-K330)	41	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCDIKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
成熟食蟹猴 CD3e(22-49)_ Fc2(K105-K330)	42	QDGNEEMGSITQTPYQVSISGTTVILTCDIKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
成熟人 CD3e(22-118)_FLAG-chLys_Avi	43	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQH NDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYP RGSKPEDANFYLYLRARVDIDYKDDDDKIEGRMDKVFGR CELAAAMKRHGLDNYRGYSLGNWVCAAKFESNFNTQAT NRNTDGSTDYGILQINSRWWCNDGRTPGSRNLCNIPCSA LLSSDITASVNCAKKIVSDGNGMNAWVAWRNRCKGTDV QAWIRGCRLVNSRGLNDIFEAQKIEWHE
成熟食蟹猴 CD3e(22-109)_FLAG-chLys_Avi	44	QDGNEEMGSITQTPYQVSISGTTVILTCSQHLGSEAQWQ HNGKNKEDSGDRLFLPEFSEMEQSGYYVCYPRGSNPED ASHHLYLKARVVIDYKDDDDKIEGRMDKVFGRCELAAAM KRHGLDNYRGYSLGNWVCAAKFESNFNTQATNRNTDGS TDYGILQINSRWWCNDGRTPGSRNLCNIPCSALLSSDITA SVNCAKKIVSDGNGMNAWVAWRNRCKGTDVQAWIRGC RLVNSRGLNDIFEAQKIEWHE

[0366] 抗体序列

[0367] 表3:本公开的实施例中使用的抗-HER2抗体曲妥珠单抗的抗体可变轻链(VL)和可变重链(VH)区序列。

[0368]

抗体	链	SEQ ID NO:	[aa]
曲妥珠单抗	VH	28	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSS
	VL	29	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRT

[0369] 表4:如PCT/EP2021/076052中所述的祖代CD3特异性抗体CD3-MAB_{GP}的抗体可变轻链(VL)和可变重链(VH)区以及CDR序列(CDR序列以联合Kabat+Chothia注释提供)。

[0370]

抗体	VH/VL/CDR	SEQ ID NO:	[aa]
CD3-MAB$_{GP}$	VH	25	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKG LEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGQGTLVTVSS
	VL	26	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPK LLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAW DHHRSGAVFGGGTKLTVLGQ
	HCDR1	22	GFTFSSYWMS
	HCDR2	23	NIKQDGSEKYYVDSVKG
	HCDR3	5	GYSAEFAHRSGLDV
	LCDR1	10	SGSSSNIGSNYVY
	LCDR2	11	RNNQRPS
	LCDR3	24	AAWDHHRSGAV

[0371] 表5:亲和力优化的抗体CD3-MABopt_VL和CD3-MABopt_VH#1的抗体VL、VH和CDR序列,两个抗体均为祖代抗体CD3-MAB$_{GP}$的衍生物(CDR以联合Kabat+Chothia注释提供)。

[0372]

抗体	VH/VL/CDR	SEQ ID NO:	[aa]
CD3-MAB$_{opt_VL}$ (CD3-MAB$_{GP}$的LCDR3衍生物)	VH	25	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPG KGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGQGTLVTVSS
	VL	20	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTA PKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYY CAGWSRSLHGAVFGGGTKLTVLGQ
	HCDR1	22	GFTFSSYWMS
	HCDR2	23	NIKQDGSEKYYVDSVKG
	HCDR3	5	GYSAEFAHRSGLDV
	LCDR1	10	SGSSSNIGSNYVY
	LCDR2	11	RNNQRPS
	LCDR3	12	AGWSRSLHGAV
CD3-MAB$_{opt_VH\#1}$ (CD3-MAB$_{GP}$的HCDR1-2衍生物)	VH	14	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYMSWVRQAPG KGLEWVANINQIGYSSYYVESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGQGTLVTVSS
	VL	26	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTA PKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYY CAAWDHHRSGAVFGGGTKLTVLGQ
	HCDR1	1	GFSFGSHYMS
	HCDR2	2	NINQIGYSSYYVESVKG
	HCDR3	5	GYSAEFAHRSGLDV

[0373]

抗体	VH/VL/CDR	SEQ ID NO:	[aa]
	LCDR1	10	SGSSSNIGSNYVY
	LCDR2	11	RNNQRPS
	LCDR3	24	AAWDHHRSGAV

[0374] 表6:包含亲和力优化的抗体CD3-MAB$_{opt_VH\#1}$的可变重链区(VH)和亲和力优化的抗

体CD3-MAB$_{opt_VL}$的可变轻链区(VL)的交叉克隆CD3-MABopt_cc的抗体VL、VH和CDR序列(CDR序列以联合Kabat+Chothia注释提供)

[0375]

抗体	VH/VL/CDR	SEQ ID NO:	[aa]
CD3-MAB$_{opt_cc}$	VH	14	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYMSWVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYYVESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGQGTLVTVSS
	VL	20	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAGWSRSLHGAVFGGGTKLTVLGQ
	HCDR1	1	GFSFGSHYMS
	HCDR2	2	NINQIGYSSYYVESVKG
	HCDR3	5	GYSAEFAHRSGLDV
	LCDR1	10	SGSSSNIGSNYVY
	LCDR2	11	RNNQRPS
	LCDR3	12	AGWSRSLHGAV

[0376] 表7:交叉克隆CD3-MABopt_cc的去免疫CDR变体的抗体VL、VH和CDR序列(CDR序列以联合Kabat+Chothia注释提供)

[0377]

抗体	VH/VL/CDR	SEQ ID NO:	[aa]
CD3-MAB$_{deimm_1}$	VH	18	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYMSWVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYYEESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSEEFAHRSGLDVWGQGTLVTVSS
	VL	21	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAGWSRELHGAVFGGGTKLTVLGQ
	HCDR1	1	GFSFGSHYMS
	HCDR2	4	NINQIGYSSYYEESVKG
	HCDR3	7	GYSEEFAHRSGLDV
	LCDR1	10	SGSSSNIGSNYVY

[0378]

抗体	VH/VL/CDR	SEQ ID NO:	[aa]
	LCDR2	11	RNNQRPS
	LCDR3	13	AGWSRELHGAV
CD3-MAB$_{deimm_2}$	VH	19	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYMSWVRQAPG KGLEWVANINQIGYSSYYGESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGYSDEFAHRSGLDVWGQGTLVTVSS
	VL	21	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTA PKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYY CAGWSRELHGAVFGGGTKLTVLGQ
	HCDR1	1	GFSFGSHYMS
	HCDR2	3	NINQIGYSSYYGESVKG
	HCDR3	9	GYSDEFAHRSGLDV
	LCDR1	10	SGSSSNIGSNYVY
	LCDR2	11	RNNQRPS
	LCDR3	13	AGWSRELHGAV
CD3-MAB$_{deimm_3}$	VH	15	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYMSWVRQAPG KGLEWVANINQIGYSSYYGESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGYSDEFATRSGLDVWGQGTLVTVSS
	VL	21	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTA PKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYY CAGWSRELHGAVFGGGTKLTVLGQ
	HCDR1	1	GFSFGSHYMS
	HCDR2	3	NINQIGYSSYYGESVKG
	HCDR3	6	GYSDEFATRSGLDV
	LCDR1	10	SGSSSNIGSNYVY
	LCDR2	11	RNNQRPS
	LCDR3	13	AGWSRELHGAV
CD3-MAB$_{deimm_4}$	VH	16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYMSWVRQAPG KGLEWVANINQIGYSSYYGESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGYSEEFAHRSGLDVWGQGTLVTVSS
	VL	21	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTA PKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYY CAGWSRELHGAVFGGGTKLTVLGQ
	HCDR1	1	GFSFGSHYMS
	HCDR2	3	NINQIGYSSYYGESVKG
	HCDR3	7	GYSEEFAHRSGLDV
	LCDR1	10	SGSSSNIGSNYVY
	LCDR2	11	RNNQRPS
	LCDR3	13	AGWSRELHGAV
CD3-MAB$_{deimm_5}$	VH	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYMSWVRQAPG KGLEWVANINQIGYSSYYGESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGYSDEFAKRSGLDVWGQGTLVTVSS

[0379]

抗体	VH/VL/CDR	SEQ ID NO:	[aa]
	VL	21	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTA PKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYY CAGWSRELHGAVFGGGTKLTVLGQ
	HCDR1	1	GFSFGSHYMS
	HCDR2	3	NINQIGYSSYYGESVKG
	HCDR3	8	GYSDEFAKRSGLDV
	LCDR1	10	SGSSSNIGSNYVY
	LCDR2	11	RNNQRPS
	LCDR3	13	AGWSRELHGAV

[0380] 表8:根据实施例3的双特异性2+1 Fab_2-Fv-Fc抗体中使用的肽接头的氨基酸序列。

[0381]

接头	序列[aa]	SEQ ID NO:
$(GGS)_3$	GGSGGSGGS	30
$(GGGGS)_4/(G_4S)_4$	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	31
20aa-PAH	AHPAAPAPAHPAAPAPAHGH	32
20aa-PAPDA	AQPAAPAPDAHEAPAPAQGS	33
20aa-Cλ	PKAAPSVTLFPPSSEELQAN	34
20aa-CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG	35
5aa-Cλ	PKAAP	36
6aa-CH1	ASTKGP	37
铰链截短的	DKTHTCPPCP	38

[0382] 表9:根据实施例1的双特异性2+1 Fab_2-Fc-scFv抗体形式中使用的肽接头的氨基酸序列。

[0383]

接头	序列 [aa]	SEQ ID NO:
10aa-PAPAE [将一个 Fc 区亚基连接至 scFv 的接头]	AQPAAPAPAE	39
20aa-PAPNA [scFv-接头]	AQPAAPAPNAHEAPAPAQGS	40

[0384] 表10:形成根据实施例1.2以及如图1A所示的三价双特异性Fab_2-Fc-scFv抗体形式的示例性多肽的氨基酸序列,其具有与HER2的二价结合和与CD3的单价结合。双特异性抗体BissIg_08_#1包含CD3-MABopt_VL的抗体可变结构域,而BissIg_08_#2包含MABopt_VH#1的抗体可变结构域。

[0385]

抗体		SEQ ID NO:	[aa]
BissIg_08_#1	Fab HC(Trast) - CH2AEASS - CH3Knob – 接头 – scFv(CD3-MABopt_VL)	49	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGAQPAAPAPAEQ SVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQL PGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCAGWSRSLHGAVFGGGTKLTVLGQAQPA APAPNAHEAPAPAQGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKY YVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR GYSAEFAHRSGLDVWGQGTLVTVSS
	Fab-HC(Trast) - CH2AEASS - CH3Hole	50	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQP REPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Fab-LC(Trast.)	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
BissIg_08_#2	Fab-HC(Trast) - CH2AEASS - CH3Knob – 接头 – scFv(CD3-MABopt_VH#1)	52	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW

[0386]

抗体		SEQ ID NO:	[aa]
			ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGAQPAAPAPAEQ SVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQL PGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCAAWDHHRSGAVFGGGTKLTVLGQAQPA APAPNAHEAPAPAQGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFSFGSHYMSWVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYY VESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG YSAEFAHRSGLDVWGQGTLVTVSS
	Fab-HC(Trast)-CH2AEASS - CH3Hole	50	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQP REPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Fab-LC(Trast.)	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0387] 表11:形成实施例2中对HER2(IgG1#)和CD3(IgGopt_cc)具有特异性的源IgG1分子的多肽的氨基酸序列,用于通过Fab臂交换生成双特异性抗体BissIg_18_opt_cc#。CD3特异性IgG包含CD3-MABopt_VL的VL和MABopt_VH#1的VH,因此反映出交叉克隆抗体CD3-MABopt_cc。

[0388]

抗体		SEQ ID NO:	[aa]
IgG#1	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 — $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(K409R)}$	53	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTA YLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA EGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VL_{(Trast.)}$ – CL	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQK PGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
IgGopt_cc	$VH_{(CD3\text{-}MABopt_VH\#1)}$ – CH1 – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(K409L)}$	54	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYMSWVR QAPGKGLEWVANINQIGYSSYYVESVKGRFTISRDNAKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VL_{(CD3\text{-}MABopt_VL)}$ – CL	55	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQ LPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLR SEDEADYYCAGWSRSLHGAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPV KAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS

[0389] 表12:形成根据表11、实施例2以及如图1B所示的二价双特异性1+1抗体BissIg_18_opt_cc#(IgG#1和IgGopt_cc的Fab臂交换之后)的多肽的氨基酸序列。

[0390]

双特异性抗体		SEQ ID NO:	[aa]
BissIg_18_opt_cc#	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 — $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(K409R)}$	53	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VL_{(Trast.)}$ – CL	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	$VH_{(CD3\text{-}MABopt_VH\#1)}$ – CH1 – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(K409L)}$	54	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYMSWVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYYVESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VL_{(CD3\text{-}MABopt_VL)}$ – CL	55	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAGWSRSLHGAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0391] 表13:形成根据实施例3(以及如图2所示)的具有如表23所列的改进的肽接头组合的双特异性抗体的多肽的氨基酸序列。所有双特异性抗体均采用交叉克隆抗体CD3-MABopt_cc的VH和VL。

[0392]

双特异性抗体		SEQ ID NO:	[aa]
BissIg_21#P 接头组合 P	$VH_{(a\text{-}HER2)}$ – CH1 – 接头 $(GGS)_3$ – $VL_{(a\text{-}CD3)}$ – 接头 $(5aaCL\lambda)$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(knob)}$	56	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGGSGGSGGSQSVLTQP PSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKL LIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYY CAGWSRSLHGAVFGGGTKLTVLGQPKAAPDKTHTCPPCP APEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – 接头 $(GGS)_3$ – $VH_{(a\text{-}CD3)}$ – 接头 $(6aaCH1)$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(hole)}$	57	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGGSGGSGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYMSWVRQAPGKGL EWVANINQIGYSSYYVESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGQGTLVTVSSAS TKGPDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIS KAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VL_{(Trast.)}$ – CL	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC

[0393]

双特异性抗体		SEQ ID NO:	[aa]
BissIg_21#1 接头组合1	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – 接头$_{(G4S)4}$ – $VL_{(a\text{-}CD3)}$ – 接头$_{(5aaCL\lambda)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(knob)}$	58	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTA YLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGS NYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGT SASLAISGLRSEDEADYYCAGWSRSLHGAVFGGGTKLTVL GQPKAAPDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – 接头$_{(G4S)4}$ – $VH_{(a\text{-}CD3)}$ – 接头$_{(6aaCH1)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(hole)}$	59	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTA YLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFG SHYMSWVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYYVESVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFAHRS GLDVWGQGTLVTVSSASTKGPDKTHTCPPCPAPEAEGAP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
	$VL_{(Trast.)}$ – CL	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQK PGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC

[0394]

双特异性抗体		SEQ ID NO:	[aa]
BissIg_21#2 接头组合2	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – 接头$_{(G4S)4}$ – $VL_{(a\text{-}CD3)}$ – 接头$_{(20aaPAPDA)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(knob)}$	60	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVY WYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLA ISGLRSEDEADYYCAGWSRSLHGAVFGGGTKLTVLGQAQ PAAPAPDAHEAPAPAQGSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – 接头$_{(G4S)4}$ – $VH_{(a\text{-}CD3)}$ – 接头$_{(20aaPAPDA)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(hole)}$	61	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYM SWVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYYVESVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVW GQGTLVTVSSAQPAAPAPDAHEAPAPAQGSDKTHTCPPC PAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VL_{(Trast.)}$ – CL	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC

[0395]

双特异性抗体		SEQ ID NO:	[aa]
BissIg_21#3 接头组合3	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – 接头$_{(G4S)4}$ – $VL_{(a-CD3)}$ – 接头$_{(20aaCL\lambda)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(knob)}$	62	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVY WYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLA ISGLRSEDEADYYCAGWSRSLHGAVFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQANDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – 接头$_{(G4S)4}$ – $VH_{(a-CD3)}$ – 接头$_{(20aaCH1)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(hole)}$	63	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYM SWVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYYVESVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGDKTHTCPPCP APEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VL_{(Trast.)}$ – CL	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC

[0396]

双特异性抗体		SEQ ID NO:	[aa]
BissIg_21#4 接头组合4	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – 接头$_{(20aaPAH)}$ – $VL_{(a-CD3)}$ – 接头$_{(20aaCL\lambda)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(knob)}$	64	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCAHPAAPAPAHPAAPAPA HGHQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWY QQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYYCAGWSRSLHGAVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – 接头$_{(20aaPAH)}$ – $VH_{(a-CD3)}$ – 接头$_{(20aaCH1)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(hole)}$	65	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCAHPAAPAPAHPAAPAPA HGHEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYMS WVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYYVESVKGRFTISRDNA KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGDKTHTCPPCPA PEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VL_{(Trast.)}$ – CL	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC

[0397]

双特异性抗体		SEQ ID NO:	[aa]
BissIg_21#5 接头组合5	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – 接头$_{(20aaPAPDA)}$ – $VL_{(a\text{-}CD3)}$ – 接头$_{(20aaCL\lambda)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(knob)}$	66	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCAQPAAPAPDAHEAPAPA QGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWY QQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYYCAGWSRSLHGAVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – 接头$_{(20aaPAPDA)}$ – $VH_{(a\text{-}CD3)}$ – 接头$_{(20aaCH1)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(hole)}$	67	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYMS WVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYYVESVKGRFTISRDNA KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGDKTHTCPPCPA PEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VL_{(Trast.)}$ – CL	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC

[0398]

双特异性抗体		SEQ ID NO:	[aa]
BissIg_21#6 接头组合6	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – 接头$_{(GGS)3}$ – $VL_{(a-CD3)}$ – 接头$_{(20aaCL\lambda)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(knob)}$	68	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGGSGGSGGSQSVLTQP PSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKL LIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYY CAGWSRSLHGAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEE LQANDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – 接头$_{(GGS)3}$ – $VH_{(a-CD3)}$ – 接头$_{(20aaCH1)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(hole)}$	69	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGGSGGSGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYMSWVRQAPGKGL EWVANINQIGYSSYYVESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
	$VL_{(Trast.)}$ – CL	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC

[0399] 表14:采用根据本公开的优选去免疫CD3特异性结合抗体形成根据实施例4的三价双特异性抗体的多肽的氨基酸序列。

[0400]

双特异性抗体		SEQ ID NO:	[aa]
BissIg_21# CD3-MAB$_{deimm_1}$	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – 接头$_{(20aaPAPDA)}$ – $VL_{(CD3\text{-}MABdeimm_1)}$ – 接头$_{(20aaCL\lambda)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(knob)}$	70	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCAQPAAPA PDAHEAPAPAQGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGS SSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFS GSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAGWSRELHGAVFG GGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANDKTHTCPPC PAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – 接头$_{(20aaPAPDA)}$ – $VH_{(CD3\text{-}MABdeimm_1)}$ – 接头$_{(20aaCH1)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(hole)}$	71	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCAQPAAPA PDAHEAPAPAQGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSFGSHYMSWVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYYEES VKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSE EFAHRSGLDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VL_{(Trast.)}$ – CL	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0401]

双特异性抗体		SEQ ID NO:	[aa]
BissIg_21# CD3-MAB$_{deimm_2}$	VH$_{(Trast.)}$ – CH1 – 接头$_{(20aaPAPDA)}$ – VL$_{(CD3\text{-}MABdeimm_2)}$ – 接头$_{(20aaCL\lambda)}$ – CH2$_{(AEASS)}$ – CH3$_{(knob)}$	70	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCAQPAAPA PDAHEAPAPAQGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGS SSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFS GSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAGWSRELHGAVFG GGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANDKTHTCPPC PAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	VH$_{(Trast.)}$ – CH1 – 接头$_{(PAPDA_20aa)}$ – VH$_{(CD3\text{-}MABdeimm_2)}$ – 接头$_{(20aaCH1)}$ – CH2$_{(AEASS)}$ – CH3$_{(hole)}$	72	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCAQPAAPA PDAHEAPAPAQGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSFGSHYMSWVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYYGES VKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSD EFAHRSGLDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	VL$_{(Trast.)}$ – CL	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0402]

双特异性抗体		SEQ ID NO:	[aa]
BissIg_21# CD3-MAB$_{deimm_3}$	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – 接头$_{(20aaPAPDA)}$ – $VL_{(CD3\text{-}MABdeimm_3)}$ – 接头$_{(20aaCL\lambda)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(knob)}$	70	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCAQPAAPA PDAHEAPAPAQGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGS SSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFS GSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAGWSRELHGAVFG GGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANDKTHTCPPC PAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – 接头$_{(20aaPAPDA)}$ – $VH_{(CD3\text{-}MABdeimm_3)}$ – 接头$_{(20aaCH1)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(hole)}$	73	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCAQPAAPA PDAHEAPAPAQGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSFGSHYMSWVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYYGES VKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSD EFATRSGLDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEK TISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VL_{(Trast.)}$ – CL	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0403]

双特异性抗体		SEQ ID NO:	[aa]
BissIg_21# CD3-MAB$_{deimm_4}$	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – 接头$_{(20aaPAPDA)}$ – $VL_{(CD3\text{-}MABdeimm_4)}$ – 接头$_{(20aaCL\lambda)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(knob)}$	70	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCAQPAAPA PDAHEAPAPAQGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGS SSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFS GSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAGWSRELHGAVFG GGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANDKTHTCPPC PAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – 接头$_{(20aaPAPDA)}$ – $VH_{(CD3\text{-}MABdeimm_4)}$ – 接头$_{(20aaCH1)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(hole)}$	74	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCAQPAAPA PDAHEAPAPAQGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSFGSHYMSWVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYYGES VKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSE EFAHRSGLDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VL_{(Trast.)}$ – CL	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0404]

双特异性抗体		SEQ ID NO:	[aa]
BissIg_21# CD3-MAB$_{deimm_5}$	VH$_{(Trast.)}$ – CH1 – 接头$_{(20aPAPDA)}$ – VL$_{(CD3\text{-}MABdeimm_5)}$ – 接头$_{(20aCL\lambda)}$ – CH2$_{(AEASS)}$ – CH3$_{(knob)}$	70	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCAQPAAPA PDAHEAPAPAQGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGS SSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFS GSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAGWSRELHGAVFG GGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANDKTHTCPPC PAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	VH$_{(Trast.)}$ – CH1 – 接头$_{(20aPAPDA)}$ – VH$_{(CD3\text{-}MABdeimm_5)}$ – 接头$_{(20aCH1)}$ – CH2$_{(AEASS)}$ – CH3$_{(hole)}$	75	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCAQPAAPA PDAHEAPAPAQGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSFGSHYMSWVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYYGES VKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSD EFAKRSGLDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	VL$_{(Trast.)}$ – CL	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0405] 实施例

[0406] 实施例1:亲和力优化的CD3特异性人抗体的鉴定

[0407] PCT/EP2021/076052描述了祖代人食蟹猴CD3交叉反应全人抗体CD3-MAB$_{GP}$(包含SEQ ID NO:25的VH和SEQ ID NO:26的VL)的生成。简而言之,为了鉴定CD3-MAB$_{GP}$,使用MorphoSys Ylanthia®文库来选择针对人和食蟹猴CD3的Fab片段。MorphoSys Ylanthia®文库(Tiller等人,mAbs 5:3,1-26;5月/6月(2013)和美国专利号8,728,981)是一种市售的噬菌粒文库,采用CysDisplay®技术将Fab展示在噬菌体表面上(Lohning等人,WO2001/05950)。为了进一步提高亲和力、物种交叉反应性和生物活性,使用先前用Slonomics®技术生成的多样化Ylanthia®成熟模块(van den Brulle等人,2008)同时优化CD3-MAB$_{GP}$的LCDR3和HCDR1/HCDR2区。为了选择亲和力改善的CD3-MAB$_{GP}$衍生物,对来自成熟文库的噬菌体进行了三轮成熟淘选。通过降低每轮淘选的CD3抗原浓度或表达CD3细胞的细胞数来提高淘选严格性(Low等人,1996)。除了降低抗原外,还进行了解离率选择(Hawkins等人,1992),使用过量的未生物素化的CD3ε抗原作为竞争物,以进一步提高选择严格性。所有策略都与

延长的洗涤步骤相结合。

[0408] 实施例1.1:亲和力成熟后的SET亲和力筛选

[0409] 为了生成用于初级亲和力筛选的含有Fab的粗细菌裂解物(BEL提取物),使用含有Fab的细菌甘油原液接种预装有生长培养基(含有氯霉素、IPTG和低葡萄糖的2xYT)的微量滴定板。将板在37℃孵育使细菌生长,并在22℃摇动过夜以表达Fab。第二天,通过添加含有硼酸盐缓冲液、EDTA和溶菌酶的BEL缓冲液来裂解表达培养物。根据所选的板形式和应用,调整体积。

[0410] SET(溶液平衡滴定)筛选(Della Ducata等人,2015)原则上按照Haenel及其同事(Haenel等人,2005)的描述进行。将恒定量的含有稀释Fab的BEL提取物与不同浓度的CD3ε抗原(hCD3e(22-118)_FLAG_chLys_avi(SEQ ID NO:43))平衡过夜。然后将混合物转移到先前用抗原包被的MSD板中,孵育和洗涤后,加入合适的MSD-Sulfo-标签标记的检测抗体。随后,使用Sector Imager 6000(Meso Scale Discovery|Gaithersburg|MD|USA)通过ECL检测对未结合Fab的浓度进行量化。使用XLfit(IDBS)软件处理结果,应用如上所述的相应拟合模型来估计亲和力,从而鉴定出成熟后改善最多的克隆。

[0411] 从第3轮淘选获得的约1000个克隆进行亲和力筛选,其中189个克隆对重组人CD3ε抗原SET K_D估计值≤40nM,根据需要进行VH或VL测序。测序结果鉴定出101个序列独特的HCDR1+2亲和力成熟衍生物,但仅鉴定出15个序列独特的LCDR3亲和力成熟CD3-MAB_{GP}衍生物。

[0412] 实施例1.2:转化为并产生双特异性2+1Fab_2-Fc-scFv抗体形式

[0413] 为了确定实施例1.1中序列独特亲和力优化的CD3特异性抗体是否适合用于双特异性抗体形式,将CD3-MAB_{GP}、48x序列独特HCDR1-3和3x序列独特LCDR3衍生物(对人CD3ε的SET K_D估计值≤10nM)的VH和VL转化为双特异性2+1Fab_2-Fc-scFv抗体形式,如图1A所示。这种双特异性抗体形式由无糖基化(aglycosylated)人IgG1骨架构建,包含一个额外的scFv片段,scFv VL结构域的N-端通过肽接头与一个IgG重链的C-端融合。为了促进两种不同重链的异二聚化,在两个CH3-Fc结构域中引入了旋钮入孔突变。在本实施例中,IgG骨架的两个Fab臂均与肿瘤靶标HER2结合,同时额外的scFv包含本公开的CD3特异性抗体的可变结构域。对于HER2结合,使用Baselga等人1998年,Cancer Res 58(13):2825-2831中描述的编码“曲妥珠单抗”(HERCEPTIN®)的VH和VL结构域的核苷酸序列。曲妥珠单抗及其制备方法描述于US 5,821,337中。表10中列出了按照实施例1.2制备的形成携带亲和力改善的CD3-MAB_{opt_VL}的VL结构域(SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:20)的示例性双特异性抗体BissIg_08_#1或携带亲和力改善的CD3-$MAB_{opt_VH\#1}$的VH结构域(SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:26)的示例性双特异性抗体BissIg_08_#2的多肽序列的总结。

[0414] 所有核酸序列或所需基因片段要么通过PCR使用适当的模板生成,要么由内部或外部供应商基因合成为具有适当侧翼区(例如合适的限制性内切酶识别位点、接头序列)的线性DNA片段。使用标准分子生物学方法将侧翼有单个限制性内切酶切割位点的核酸序列或基因片段克隆到相应的哺乳动物表达载体中。当打算用于哺乳动物表达载体时,所有构建体都设计有5’-端DNA序列,该序列编码前导肽,该前导肽靶向真核细胞中用于分泌的蛋白质。通过双链测序用DNA确认亚克隆基因片段的DNA序列。用编码双特异性抗体重链和轻链所有成分的哺乳动物表达载体DNA转染真核HEK293-6E细胞,产生2:1:1异二聚双特异性

抗体。转染后7天收获细胞培养上清液,并使用液体处理站进行Protein A亲和层析(MabSelect SURE|GE Healthcare)。样品保留在中和洗脱缓冲液(NaPS:137mM磷酸钠、81mM NaCl、pH 7)中。样品经过无菌过滤(0.2μm孔径)。通过紫外分光光度法测定蛋白质浓度,并在变性、还原条件下使用CE-SDS(LabChip GXII|Perkin Elmer|USA)分析抗体纯度。进行HP-SEC以分析天然状态的双特异性抗体制剂。

[0415] 总之,通过分析尺寸排阻色谱法测定,可以产生出41/51种双特异性抗体,其单体含量>85%,质量和产量均可接受。表16概述了7种产生的双特异性抗体制剂的单体含量,这些制剂包含祖代CD3抗体CD3-MAB_{GP}的可变结构域或如上所述的6种优选亲和力优化的CD3抗体的可变结构域,包括CD3-MABopt_VL和CD3-MABopt_VH#1。

[0416] 双特异性2+1Fab2-Fc-scFv抗体形式中亲和力优化的CD3特异性抗体的功能表征

[0417] 实施例1.2中产生的所有双特异性抗体均在体外测定中进行了测试,包括:

[0418] • 通过表面等离子体共振(SPR)的亲和力测定

[0419] • 与内源性表达CD3的人类T细胞和Jurkat细胞以及不表达CD3的J.RT-T3.5细胞的结合

[0420] • 使用癌细胞系SKBR3进行功能性NFAT报告基因测定。

[0421] • 对SKBR3细胞进行功能性细胞毒性测定。

[0422] 实施例1.3:通过抗体捕获装置测定K_D

[0423] 以抗体捕获形式,对人CD3ε与实施例1.2中产生的41种双特异性Fab_2-Fc-scFv抗体之间的相互作用进行动力学表征,其中抗原作为溶液中的分析物应用。通过将生物素化的MabSelect SuRe配体(非生物素化的配体:GE Healthcare,28-4018-60)负载到多个链霉亲和素传感器(fortébio,部件18-5021)上来制备高容量捕获表面。动力学实验的每个循环包括(并行使用的多个传感器上的一个配体的)捕获步骤,然后是分析物结合步骤(结合阶段,不同的分析物浓度和测定缓冲液,即抗原浓度为0用于减去空白)。结合后,监测结合抗原的解离(传感器暴露于测定缓冲液)。在每个循环结束时,使用10mM甘氨酸/HCl pH1.5(GE Healthcare,BR 100354)通过2个连续的再生步骤à20s从传感器表面去除结合的配体和/或配体-抗原复合物,同时保持捕获表面的完整性。将传感器上记录的捕获配体(在结合期间不暴露于抗原而暴露于测定缓冲液)的信号从具有非零抗原浓度的传感器图中减去,以校正例如捕获配体的潜在解离。在1000rpm的轨道摇动速度下记录结合300s和解离300s。使用补充有0.05%(v/v)聚山梨醇酯20(Merck,8.22184.0500)和0.1%(w/v)牛血清白蛋白(Sigma,A7906)的DPBS(GIBCO,无Ca^{2+},无Mg^{2+};Thermo Fisher Cat.No.14190)作为测定缓冲液。将配体的捕获水平调整至约2nm,以达到人CD3e分析物的饱和水平Rmax约为0.2nm。在动力学实验期间,使用七种不同的分析物浓度进行分析(hCD3e(22-118)_F-chLys_avi(SEQ ID NO:43);应用摩尔浓度15.6-1000nM,以2倍连续稀释系列)。使用数据分析软件v 10(Octet/fortébio)评估传感图。所有传感图均按照1:1结合模型进行拟合,以确定k_{on}和k_{off}速率常数,然后使用它们计算K_D值。对于偏离预期1:1结合的动力学曲线,使用单价动力学的最佳近似值评估传感图,并将结果标记为“异质结合”。这些结果被认为不如完全遵循预期单价结合动力学的动力学曲线精确,但被认为是K_D的良好近似值。

[0424] 总体而言,所有41种经过测试的亲和力优化的CD3特异性抗体对人CD3e抗原所测定的单价亲和力均在39nM至120nM的范围内,而祖代抗体CD3-MAB_{GP}在以相同双特异性抗体

形式测试时显示K_D为240nM。表16总结了针对CD3-MAB_{GP}和根据本公开的6种优选亲和力优化的CD3抗体(包括CD3-MABopt_VL(BissIg_08_#1)和CD3-MABopt_VH#1(BissIg_08_#2))测定的动力学研究结果。

[0425] 实施例1.4:细胞结合

[0426] 测试实施例1.2中产生的41种双特异性Fab_2-Fc-scFv抗体(包含亲和力改善的CD3特异性抗体)与CD3阳性人T细胞和CD3阴性细胞系J.RT3-T3.5的结合能力。

[0427] 为了分离和纯化人T细胞,将来自健康供体的人全血收集在含有Li-Heparin的S-Monovette容器(Sarstedt)中。将血液转移到50ml锥形管中,并与等体积的含有2%胎牛血清(Sigma,#F7524)和2mM EDTA的PBS混合。将稀释的血液转移到含有15ml Biocoll溶液(Biochrom,#L6115)的SepMate-50管(StemCell Technologies,#86450)中,并在1200xg离心10分钟。将上清液转移到50ml锥形管中,用PBS稀释至45ml,并以300xg离心8分钟。弃去上清液,将细胞沉淀物用1ml PBS重悬,并使用Neubauer室对细胞计数。根据供应商的说明,使用EasySep™人T细胞分离试剂盒(StemCell Technologies)分离和纯化T细胞。通过流式细胞术使用抗人CD3 PE偶联抗体(Biolegend#12-0037-42)对CD3+T细胞进行纯度评估。将Jurkat和J.RT3-T3.5.细胞用Superblock(ThermoScientific,#37515)重悬并计数,并在冰上封闭1小时。用在Superblock中连续稀释的双特异性抗体(起始终浓度:500nM-0.69nM/0.23nM;1:3稀释系列)重悬封闭的细胞,并在冰上孵育1小时。用含有3%胎牛血清(Sigma,#F7524)的D-PBS(Gibco)洗涤细胞2次。使用AlexaFluor 647标记的山羊抗人IgG、F(ab')2片段特异性(Jackson Immuno Research Cat#109-606-097)检测结合的双特异性抗体。使用FACS Array(Beckton Dickinson)或IntelliCyt iQue流式细胞仪测量抗体染色,并分别在FlowJo或ForeCyt(IntelliCyt)软件中进行分析。使用Prism软件(GraphPad Software Inc.)中的4-参数非线性回归分析计算EC_{50}值。

[0428] 表16总结了针对根据本公开的包含CD3-MAB_{GP}或6种优选亲和力优化的CD3抗体的可变结构域的根据实施例1.2的双特异性抗体测定的细胞结合研究的结果,包括CD3-MABopt_VL(BissIg_08_#1)和CD3-MABopt_VH#1(BissIg_08_#2)。细胞结合显示为所选抗体浓度为167nM的高于背景的信号。与祖代抗体CD3-MAB_{GP}相比,亲和力改善的CD3特异性抗体表现出对人T细胞的显著更强的信号强度。此外,没有观察到与CD3阴性细胞系J.RT3-T3.5.的结合或仅观察到非常弱的结合(未显示数据)。

[0429] 实施例1.5Jurkat NFAT报告基因细胞测定

[0430] 为了评估根据实施例1.2的双特异性Fab2-Fc-scFv抗体的功能活性,使用瞬时转染NFAT报告基因构建体的Jurkat细胞(ATCC#TIB-152)作为替代效应细胞。作为靶细胞,使用HER2阳性人腺癌SKBR-3(ATCC® HTB-30™)细胞系。使用以下生长培养基来维持细胞系:(a)Jurkat:RPMI-1640+L-谷氨酰胺(Thermo Fisher,#21875-034),补充有10% FCS(Sigma,#F7524);(b)SKBR-3:McCoys 5a(Gibco,#26600),补充有10% FCS(Sigma#F7524)。SKBR-3细胞在生长培养基中稀释至密度为4E+05个细胞/ml。将相当于40,000个细胞的100µl细胞悬浮液接种到组织培养处理的96孔板(Corning,#3917)的每个孔中,并在37℃和5%CO_2的加湿培养箱中孵育过夜。将Jurkat细胞重悬在生长培养基中,浓度为2.5E+05个细胞/ml。转染成分pGL4.30[luc2P/NFAT-RE/Hygro]报告基因载体(Promega#9PIE848)、OptiMEM-I培养基(Life Technologies,#31985-047)和TransIT-LT1转染试剂(Mirus,#MIR2304)在

室温下孵育15分钟,然后添加到Jurkat细胞悬浮液中,并在37℃和5% CO_2的加湿培养箱中孵育17小时。收获Jurkat细胞并以1.2E+06/ml的浓度重悬在生长培养基中。从包被的靶细胞中去除培养基,并用50μl Jurkat细胞悬浮液替换,相当于每孔60,000个细胞。双特异性抗体在Jurkat生长培养基中连续稀释。每个孔中加入50μl抗体稀释液,终浓度范围为10nM至0.01nM(4步稀释)。将检测板在37℃和5% CO_2的加湿培养箱中孵育5小时。根据制造商的说明书重构Bright-Glo™试剂(Promega,#E2620)。检测板和试剂在室温下平衡。将100μl Bright-Glo™试剂加入检测板的每个孔中并混合。使用InfiniteM1000 Pro平板读数仪(Tecan)测量发光。

[0431] 表16总结了针对根据本公开的包含CD3-MAB_{GP}或6种优选亲和力优化的CD3特异性抗体的可变结构域(包括CD3-MABopt_VL(BissIg_08_#1)和CD3-MABopt_VH#1(BissIg_08_#2))的双特异性抗体测定的报告基因测定结果。结果显示为双特异性抗体浓度为1nM时的高于背景的信号。与包含祖代CD3特异性抗体CD3-MAB_{GP}的可变结构域的双特异性抗体(几乎未显示任何活性)相比,包含亲和力优化的CD3特异性抗体的双特异性抗体在Jurkat细胞中表现出显著更强的报告基因系统活化。

[0432] 实施例1.6:使用双特异性抗体进行细胞毒性测定。

[0433] 测试了根据实施例1.2的41种双特异性Fab_2-Fc-scFv抗体(包含亲和力优化的CD3特异性抗体)介导T细胞依赖性杀伤表达HER2的SKBR3细胞或HER2阴性的MDA-MB468细胞的能力。PBMC按照实施例1.4中所述制备。将5,000个SKBR3或MDA-MB468细胞悬浮在培养基中(SKBR3:McCoy's 5A培养基(Gibco,#26600),10% FCS(Sigma,#F7524);MDA-MB468:DMEM(Gibco,#10938),GlutaMax(Gibco,#35050),10% FCS,1x丙酮酸钠(Gibco,#11360-039)),接种在黑色96孔分析板(Corning,#3340)中,并在37℃和5% CO_2下孵育过夜。将CellToxGreen染料(Promega,#G8731)、连续稀释的双特异性抗体构建体(终浓度:5nM-100pM)和100,000个纯化的PBMC(均在包含RPMI 1640w/o酚红(Gibco,#32404-014)、GlutaMax和10%胎牛血清的测定培养基中稀释)添加到细胞中并在37℃和5% CO_2下孵育48小时。使用Tecan Infinite F500设备在485nm激发和535nm发射下测量掺入的CellToxGreen荧光,在72小时后评估细胞毒性活性。使用Prism软件(GraphPad Software Inc.)中的4-参数非线性回归分析计算EC_{50}值。

[0434] 总体而言,仅24种测试的实施例1.2的包含亲和力优化的CD3特异性可变结构域的双特异性抗体介导T细胞杀伤SKBR3细胞。与实施例1.5的RGA测定结果一致,对于包含祖代抗体CD3-MAB_{GP}可变结构域的双特异性抗体未观察到杀伤。表16总结了针对根据本公开的包含CD3-MAB_{GP}或6种优选亲和力优化的CD3抗体的可变结构域的双特异性抗体测定的T细胞重定向杀伤SKBR3细胞的结果(IC_{50}浓度),包括对于CD3-MABopt_VL(BissIg_08_#1)和CD3-MABopt_VH#1(BissIg_08_#2)的那些。

[0435] 实施例1.7:ELISA结合

[0436] 在ELISA中测试根据实施例1.2的双特异性Fab_2-Fc-scFv抗体与重组人和食蟹猴CD3ε抗原的结合能力。将5nM重组人CD3e(22-49)-Fc2(K105-K330)(SEQ ID NO:41)或1nM重组食蟹猴CD3e(22-49)-Fc2(K105-K330)(SEQ ID NO:42)包被在Maxisorp板(Nunc,#460518)上。用PBS中的5%脱脂奶粉封闭包被的板。将抗体在含有0.5%脱脂奶粉和0.5% Tween-20的PBS中连续稀释。使用针对人F(ab')2片段的碱性磷酸酶偶联检测抗体(Jackson

Immuno Research,#109-055-097)检测结合抗体。使用Prism软件(GrapPad Software Inc.)中的4-参数非线性回归分析计算EC_{50}值。

[0437] 表15总结了针对根据本公开的包含祖代抗体CD3-MAB_{GP}和6种优选亲和力优化的CD3抗体的可变结构域(包括CD3-MABopt_VL(BissIg_08_#1)和CD3-MABopt_VH#1(BissIg_08_#2))的双特异性抗体测定的ELISAEC_{50}值。结果表明,与祖代抗体CD3-MAB_{GP}相比,亲和力优化的CD3特异性抗体对人和食蟹猴CD3ε抗原的结合提高了10到20倍。

[0438] 表15:当以实施例1的双特异性抗体形式Fab_2-Fc-scFv进行测试时,本公开的亲和力改善的CD3特异性抗体与重组人或食蟹猴CD3ε抗原的ELISA结合。

[0439]

双特异性抗体		抗CD3抗体			EC_{50} [nM]	
	SEQ ID Nos (表 10)		SEQ ID NO: VH	SEQ ID NO: VL	hCD3e(22-49)_ Fc2(K105-K330)	cyCD3e(22-49)_ Fc2(K105-K330)
BissIg_08_#GP	n.a	CD3-MAB_{GP}	25	26	248,0	369
BissIg_08_#3	n.a	CD3-MABopt_VH#2	n.a.	n.a.	11,8	15,6
BissIg_08_#4	n.a	CD3-MABopt_VH#3	n.a.	n.a.	17,0	30,9
BissIg_08_#5	n.a	CD3-MABopt_VH#4	n.a.	n.a.	9,9	11,0
BissIg_08_#6	n.a	CD3-MABopt_VH#5	n.a.	n.a.	20,3	30,9
BissIg_08_#2	52, 50, 51	CD3-MABopt_VH#1	14	26	11,1	15,0
BissIg_08_#1	49, 50, 51	CD3-MABopt_VL	25	20	26,1	29,5

[0440] n.a.:不适用

[0441] 亲和力改善的抗体的功能特性总结

[0442] 祖代抗体CD3-MAB_{GP}的亲和力成熟导致鉴定出5种CD3-MAB_{GP}的亲和力优化的HCDR1-2变体和1种亲和力优化的LCDR3变体,它们具有优选特性并适合用于双特异性抗体形式。表16概述了在实施例1的双特异性抗体形式中测试时这些抗体与祖代抗体相比具有的有利功能和生物物理特性。

[0443] 表16:根据本公开的亲和力优化的CD3特异性抗体的功能和生物物理特性总结。

[0444]

双特异性抗体		抗CD3抗体								
	SEQ ID Nos (表 10)		SEQ ID NO: VH	SEQ ID NO: VL	优化的CDR	SEC 单体含量 [%]	K_D [nM] 人CD3e	T细胞结合@抗体浓度为167nM [S/BG]	RGA@抗体浓度为1nM [S/BG] SKBR3	SKBR3杀伤 IC_{50} [pM]
BissIg_08_#GP	n.a	CD3-MAB_{GP}	25	26	n.a.	85,7	240	1,4	1	无活性
BissIg_08_#3	n.a	CD3-MABopt_VH#2	n.a.	n.a.	HCDR1+2	87,1	83	13,9	917	26
BissIg_08_#4	n.a	CD3-MABopt_VH#3	n.a.	n.a.	HCDR1+2	86,0	94	8,2	209	39
BissIg_08_#5	n.a	CD3-MABopt_VH#4	n.a.	n.a.	HCDR1+2	86,5	39	14,4	693	82
BissIg_08_#6	n.a	CD3-MABopt_VH#5	n.a.	n.a.	HCDR1+2	85,3	93	11,6	205	59
BissIg_08_#2	52, 50, 51	CD3-MABopt_VH#1	14	26	HCDR1+2	86,1	55	15,8	306	46
BissIg_08_#1	49, 50, 51	CD3-MABopt_VL	25	20	LCDR3	85,4	62	20,0	367	40

[0445] n.a.:不适用

[0446] 实施例2:进一步优化亲和力改善的CD3特异性抗体-交叉克隆亲和力优化的可变

结构域并转化为另一种双特异性抗体形式

[0447] 为了进一步改善先前鉴定的亲和力优化的CD3特异性抗体的功能特性,通过将CD3-MABopt_VH#1(SEQ ID NO:14)、CD3-MABopt_VH#2、CD3-MABopt_VH#3、CD3-MABopt_VH#4和CD3-MABopt_VH#5的VH与CD3-MABopt_VL(SEQ ID NO:20)的VL相结合,生成了5种交叉克隆。

[0448] 随后,将亲和力改善的抗体CD3-MABopt_VH#1、CD3-MABopt_VH#2、CD3-MABopt_VH#3、CD3-MABopt_VH#4、CD3-MABopt_VH#5和CD3-MABopt_VL以及由此生成的5种交叉克隆转化为双特异性1+1抗体形式,如图1B所示。实施例2的双特异性抗体形式具有常规IgG分子的典型Y-形,其中一个Fab臂与肿瘤靶标(HER2)结合,另一个Fab臂与CD3结合。对于HER2结合,使用Baselga等人1998年Cancer Res 58(13):2825-2831中描述的“曲妥珠单抗”(HERCEPTIN®)的VH和VL结构域(分别为SEQ ID NO:28和SEQ ID NO 29)。曲妥珠单抗及其制备方法在US 5,821,337中有描述。

[0449] 双特异性1+1抗体通过2-MEA-诱导的Fab-臂交换在体外生成,如WO2011147986、WO2011131746和WO2013060867以及Labrijn等人(Labrijn等人,PNAS2013,110:5145-50;Gramer等人,MAbs 2013,5:962-973)所述。为了能够通过这种方法生产双特异性抗体,生成了两种携带CH3结构域突变的源IgG1分子:一种源IgG1抗体中有F405L突变(即CD3特异性抗体),另一种源IgG1抗体中有K409R突变(例如抗-HER2抗体)。除了这些突变之外,源IgG1分子还包括取代,导致Fc区无法与IgG Fc受体(Fcγ受体)和补体:L234A、L235E、G237A、A330S和P331S(“AEASS”)相互作用。

[0450] 表11列出了形成两种示例性产生的源IgG1分子的多肽序列的总结,其分别对HER2(IgG#1:SEQ ID NO:53和51)或CD3(IgGopt_cc:(SEQ ID NO:54和55)具有特异性,并且根据实施例2制备。CD3特异性IgG包含交叉克隆CD3-MABopt-cc的VH和VL(分别为SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:20)。表12列出了形成所得(Fab臂交换后)双特异性1+1抗体BissIg_18_opt_cc#的多肽序列(SEQ ID NO:53、51、54、55)的总结。

[0451] 为了常规生产源IgG1分子,用编码源IgG分子重链和轻链的哺乳动物表达载体DNA转染真核HEK293-6E细胞。转染后第3天或第6天收获细胞培养上清液,并进行标准Protein A亲和层析(MabSelect SURE|GE Healthcare)。缓冲液交换为1x Dulbcecco's PBS(pH 7.2|Invitrogen),样品经无菌过滤(0.2μm孔径)。通过紫外分光光度法测定蛋白质浓度,并使用CE-SDS(LabChip GXII|Perkin Elmer|USA)在变性、还原和非还原条件下分析IgG的纯度。进行HP-SEC分析天然状态的IgG制剂。

[0452] 为了通过Fab臂交换生成双特异性1+1抗体,将产生的两种源IgG等量混合在PBS缓冲液(磷酸盐缓冲盐水;8.7mM HPO_4^{2-}、1.8mM H_2PO^{4-}、163.9mM Na+、140.3mM Cl-、pH 7.4)中。加入2-巯基乙胺-HCl(2-MEA)至终浓度为75mM,并将反应混合物在室温下孵育5小时。使用PD-10柱通过将缓冲液交换为PBS来去除2-MEA,以重新氧化链间二硫键并形成完整的双特异性抗体。通过紫外分光光度法测定蛋白质浓度,并使用CE-SDS(LabChip GXII|Perkin Elmer|USA)在变性、还原和非还原条件下分析双特异性IgG制剂的纯度。进行HP-SEC以分析天然状态的双特异性IgG制剂。

[0453] 表17-1总结了在受控Fab臂交换(FAE)之前,对于根据实施例1的亲和力改善的CD3特异性抗体CD3-MABopt_VH#1、CD3-MABopt_VH#2、CD3-MABopt_VH#3、CD3-MABopt_VH#4、

CD3-MABopt_VH#5和CD3-MABopt_VL,哺乳动物产生的源IgG1分子的质量控制。表17-2总结了在受控Fab臂交换(FAE)之前,根据实施例2的相应的交叉克隆CD3特异性抗体CD3-MAB_{opt_cc}、CD3-$MAB_{opt_cc\#2}$、CD3-$MAB_{opt_cc\#3}$、CD3-$MAB_{opt_cc\#4}$和CD3-$MAB_{opt_cc\#5}$的哺乳动物产生的源IgG1分子的质量控制。

[0454] 总体而言,与仅包含亲和力改善的CD3特异性抗体可变结构域的IgG相比,包含交叉克隆的CD3特异性抗体可变结构域的IgG显示出较低的IgG制剂单体含量。

[0455] 表17-1:Fab臂交换之前产生的包含亲和力优化的CD3特异性抗体的源IgG的质量控制

[0456]

IgG	亲和力优化的抗-CD3抗体	Seq ID NO: VH	Seq ID NO: VL	单体含量[%] IgG
IgG#opt_VH#2	CD3-MABopt_VH#2	n.a.	20	95.1
IgG#opt_VH#3	CD3-MABopt_VH#3	n.a.	20	84.8 / 94.3
IgG#opt_VH#4	CD3-MABopt_VH#4	n.a.	20	90.6
IgG#opt_VH#5	CD3-MABopt_VH#5	n.a.	20	90.6
IgG#opt_VH#1	CD3-MABopt_VH#1	14	26	96.1
IgG#opt_VL	CD3-MABopt_VL	25	20	90.8

[0457] n.a.:不适用

[0458] 表17-2:Fab臂交换之前产生的包含CD3特异性交叉克隆的源IgG的质量控制

[0459]

IgG		交叉克隆的抗CD3抗体		单体含量[%] IgG
ID	Seq ID NOs (HC, LC)	ID	产生CD3可变结构域	
IgG#opt_cc#2	n.a.	CD3-$MAB_{opt_cc\#2}$	CD3 -MABopt_VH#2 CD3-MABopt_VL	85.9
IgGopt_cc#3	n.a.	CD3-$MAB_{opt_cc\#3}$	CD3-MABopt _VH#3 CD3-MABopt_VL	78 / 84.5
IgGopt_cc#4	n.a.	CD3-$MAB_{opt_cc\#4}$	CD3-MABopt_VH#4 CD3-MABopt_VL	80.8 / 90.2
IgGopt_cc#5	n.a.	CD3-$MAB_{opt_cc\#5}$	CD3-MABopt_VH#5 CD3-MABopt_VL	90.9
IgGopt_cc#	54, 55	CD3-MAB_{opt_cc}	CD3-MABopt_VH#1 CD3-MABopt_VL	82.8 / 94.4 / 95.7

[0460] 表18总结了受控Fab臂交换(FAE)后包含交叉克隆CD3特异性结合结构域的双特异性IgG制剂的质量控制。总体而言,与相应的源单特异性IgG制剂相比,双特异性抗体制剂显示出较高的单体含量。

[0461] 表18:Fab臂交换后生成的包含交叉克隆CD3特异性结合结构域的双特异性抗体的质量控制。

[0462]

双特异性抗体		交叉克隆的抗CD3抗体		单体含量[%] IgG
ID	Seq ID NOs	ID	产生CD3可变结构域	
BissIg_18_opt_cc#2	n.a.	CD3-MAB$_{opt_cc\#2}$	CD3 -MABopt_VH#2	89,8
			CD3-MABopt_VL	
BissIg_18_opt_cc#3	n.a.	CD3-MAB$_{opt_cc\#3}$	CD3-MABopt _VH#3	87,3
			CD3-MABopt_VL	
BissIg_18_opt_cc#4	n.a.	CD3-MAB$_{opt_cc\#4}$	CD3-MABopt_VH#4	87,1
			CD3-MABopt_VL	
BissIg_18_opt_cc#5	n.a.	CD3-MAB$_{opt_cc\#5}$	CD3-MABopt_VH#5	90,4
			CD3-MABopt_VL	
BissIg_18_opt_cc#	51, 53,54, 55	CD3-MAB$_{opt_cc}$	CD3-MABopt_VH#1	88,3
			CD3-MABopt_VL	

[0463] 实施例2.1:通过抗体捕获装置测定K_D

[0464] 在Octet HTX(FortéBIO,Sartorius AG)仪器上通过测定动力学速率常数进行亲和力测定。将实施例2的双特异性抗体制剂用补充有0.05％(v/v)聚山梨醇酯20(Merck,8.22184.0500)和0.1％(w/v)牛血清白蛋白(Sigma,A7906)的测定缓冲液(DPBS(GIBCO,无Ca^{2+},无Mg^{2+};Thermo Fisher Cat.No.14190)中稀释,以约2nm的负载水平捕获到IgG-特异性BLI传感器上。为了进行分析,将人CD3ε抗原hCD3e(22-118)_F-chLys_avi-生物素(SEQ ID NO:43)用测定缓冲液稀释至浓度范围从7.8nM到500nM(连续1:2稀释)。包括具有测定缓冲液的空白样品用于参考,即校正捕获抗体的解离。记录结合相180s,随后是300s的解离阶段。每次循环后,用10mM甘氨酸HCl pH 1.7再生生物传感器两次,以去除结合的配体/抗体复合物,同时保持捕获表面的完整性。在再生步骤之间,用测定缓冲液洗涤生物传感器20秒。用数据分析软件v 10(Octet/fortébio)评估传感器图。所有传感器图都拟合到1:1结合模型以测定k_{on}和k_{off}速率常数,用于计算K_D值。对于偏离预期1:1结合的动力学曲线,使用对单价动力学的最佳近似值评估传感器图,并将结果标记为“异质结合”。这些结果被认为不如完全遵循预期的单价结合动力学的动力学曲线精确,但被认为是K_D的良好近似值。

[0465] 表19总结了根据本公开的包含亲和力优化或交叉克隆的CD3特异性结合结构域的双特异性抗体的K_D值。优化或交叉克隆的CD3特异性抗体识别重组人CD3ε抗原,K_D值在低个位数纳摩尔范围内,HCDR1-2成熟抗体CD3-MABopt_VH#1(SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:26)和LCDR3成熟抗体CD3-MABopt_VL(SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:20)除外。这两种抗体在低两位数纳摩尔范围内显示出与CD3e的异质结合。令人惊讶的是,发现由CD3-MABopt_VH#1的VH和CD3-MABopt_VL的VL构建生成的交叉克隆CD3-MABopt_cc(SEQ ID NO 14和SEQ ID NO:20)与其来源抗体相比,显示出对CD3e的结合亲和力提高了约20至30倍。

[0466] 表19:根据实施例2对CD3和HER2具有特异性的双特异性1+1抗体对人CD3ε的K_D值。

[0467]

双特异性抗体	CD3 特异性抗体	对人 CD3e 的动力学		
		k_{on} [1/Ms]	k_{off} [1/s]	K_D [nM]
BissIg_18 opt_VH#2	CD3-MABopt_VH#2	1,4E+05	3,4E-04	2,5
BissIg_18 opt_VH#3	CD3-MABopt_VH#3	9,5E+04	3,2E-04	3,4
BissIg_18 opt_VH#4	CD3-MABopt_VH#4	1,8E+05	3,3E-04	1,9
BissIg_18 opt_VH#5	CD3-MABopt_VH#5	1,6E+05	2,9E-04	1,9
BissIg_18 opt_VH#1	CD3-MABopt_VH#1	2,5E+05	*4,4E-03*	*17**
BissIg_18 opt_VL	CD3-MABopt_VL	1,5E+05	*4,1E-03*	*28**
BissIg_18_opt_cc#2	CD3-MABopt_cc#2	3,9E+05	1,6E-03	4,2
BissIg_18_opt_cc#3	CD3-MABopt_cc#3	2,4E+05	1,1E-03	4,4
BissIg_18_opt_cc#4	CD3-MABopt_cc#4	5,3E+05	1,4E-03	2,6
BissIg_18_opt_cc#5	CD3-MABopt_cc#5	3,2E+05	6,2E-04	1,9
BissIg_18_opt_cc#	CD3-MAB_{opt_cc}	*1,2E+06*	1,1E-03	*0,9**
		** 异质结合*		

[0468] 实施例2.2:细胞结合

[0469] 测试了根据本公开的实施例2中的双特异性抗体(包含亲和力改善或交叉克隆的CD3特异性抗体)与Jurkat(CD3+)和J.RT3-T3.5(CD3-)细胞的结合能力。将靶细胞与在含有3%胎牛血清(Sigma,#F7524)的D-PBS(Gibco)中连续稀释(终浓度:0.1nM-200nM)的双特异性抗体混合,并在冰上孵育1小时。在含有3%胎牛血清(Sigma,#F7524)和0.02%硫酸钠的D-PBS(Gibco)中洗涤细胞2次。使用AlexaFluor 647标记的山羊抗人IgG、F(ab')2片段特异性(Jackson Immuno Research Cat#109-606-097)检测双特异性抗体。使用FACS Array(Beckton Dickinson)或IntelliCyt iQue流式细胞仪测量抗体染色,并分别在FlowJo或ForeCyt(IntelliCyt)软件中分析。使用Prism软件(GraphPad Software Inc.)中的4-参数非线性回归分析计算EC_{50}值。

[0470] 表20和图3总结了根据本公开的包含亲和力成熟或交叉克隆的CD3特异性抗体可变结构域的测试双特异性抗体制剂的细胞结合。总体而言,与仅亲和力成熟的对应物相比,CD3特异性交叉克隆显示出与Jurkat细胞更强的结合。具体而言,交叉克隆CD3-MABopt_cc(SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:20)表现出与Jurkat细胞最强的结合。与CD3阴性细胞系J.RT3-T3.5.的结合对于两种亲和力改善的CD3特异性抗体(CD3-MABopt_VH#2和CD3-MABopt_VH#5)及其两种交叉克隆对应物(CD3-MABopt_cc#2和CD3-CD3-MABopt_cc#5)是可观察到的。

[0471] 表20:表20:根据实施例2的对HER2和CD3具有特异性的双特异性抗体(包括本公开的亲和力成熟或交叉克隆的CD3特异性结合抗体)的细胞结合(EC_{50}值)。

[0472]

双特异性抗体	CD3 特异性抗体	细胞结合	
		Jurkat EC_{50} [nM]	J.RT3-T3.5 结合@200nM
BissIg_18_opt_VH#2	CD3-MABopt_VH#2	>50	是
BissIg_18_opt_VH#3	CD3-MABopt_VH#3	>100	否
BissIg_18_opt_VH#4	CD3-MABopt_VH#4	44	否
BissIg_18_opt_VH#5	CD3-MABopt_VH#5	>50	是
BissIg_18_opt_VH#1	CD3-MABopt_VH#1	9	否
BissIg_18_opt_VL	CD3-MABopt_VL	18 / >100	否
BissIg_18_opt_cc#2	CD3-MABopt_cc#2	>50	是
BissIg_18_opt_cc#3	CD3-MABopt_cc#3	>50	否
BissIg_18_opt_cc#4	CD3-MABopt_cc#4	>20	否
BissIg_18_opt_cc#5	CD3-MABopt_cc#5	>50	是
BissIg_18_opt_cc#	CD3-MAB_{opt_cc}	7	否

[0473] 实施例2.3Jurkat NFAT报告基因细胞测定

[0474] 为了评估实施例2的双特异性抗体的功能活性,使用瞬时转染NFAT报告基因构建体的Jurkat细胞(ATCC#TIB-152)作为替代效应细胞。作为HER2阳性靶肿瘤细胞系,使用SKOV-3(ATCC®HTB-77™)和MCF-7(ATCC®HTB-22™)。测定基本按照实施例1.5中所述进行。使用以下生长培养基来维持细胞系:Jurkat:RPMI-1640+L-谷氨酰胺(Thermo Fisher,#21875-034),补充有10% FCS(Sigma,#F7524);SKOV-3:McCoys 5a(Gibco,#26600),补充有10% FCS(Sigma#F7524)MCF-7:DMEM(Gibco#10938),补充有+10% FCS(Sigma#F7524)+1xGlutamax(Gibco#35050-061)+1x丙酮酸钠(Gibco#11360-039)。将SKOV-3和MCF-7细胞在生长培养基中稀释至4E+05个细胞/ml的密度。将相当于40,000个细胞的100µl细胞悬浮液接种到组织培养处理的96孔板(Corning,#3917)的每个孔中,并在37℃和5% CO_2的加湿培养箱中孵育过夜。将Jurkat细胞悬浮在生长培养基中,浓度为2.5E+05个细胞/ml。将转染成分pGL4.30[luc2P/NFAT-RE/Hygro]报告基因载体(Promega#9PIE848)、OptiMEM-I培养基(Life Technologies,#31985-047)和TransIT-LT1转染试剂(Mirus,#MIR2304)在室温下孵育15分钟,然后添加到Jurkat细胞悬浮液中,并在37℃和5% CO_2的加湿培养箱中孵育17小时。收获Jurkat细胞并以1.2E+06/ml的浓度重悬在生长培养基中。从包被的靶细胞中去除培养基,并用50µl Jurkat细胞悬浮液替换,相当于每孔60,000个细胞。双特异性抗体在Jurkat生长培养基中连续稀释。向每个孔中加入50µl抗体稀释液,得到终浓度范围为50nM至0.01nM(4步稀释)。将测定板在37℃和5% CO_2的加湿培养箱中孵育5小时。根据制造商的说明书重构Bright-Glo™试剂(Promega,#E2620)。测定板和试剂在室温下平衡。向测定板的每个孔中加入100µl Bright-Glo™试剂并混合。使用Infinite M1000 Pro平板读数仪(Tecan)测量发光。

[0475] 表21总结了本公开的双特异性抗体介导的Jurkat细胞/NFAT报告系统的活化。再次,包含交叉克隆抗体CD3-MABopt_cc(SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:20)的双特异性抗体BissIg_18_opt_cc#在SKOV-3和MCF-7细胞存在下表现出对Jurkat细胞/NFAT报告系统的最强活化,EC_{50}值小于0.2nM。

[0476] 表21:使用本公开的根据实施例2的对HER2和CD3具有特异性的双特异性抗体(包含亲和力成熟或交叉克隆的CD3特异性结合结构域)的报告基因测定。

[0477]

双特异性抗体	CD3 特异性抗体	报告基因测定	
		SKOV3 EC_{50} [nM]	MCF-7 EC_{50} [nM]
BissIg_18 opt_VH#2	CD3-MABopt_VH#2	1,18	>5
BissIg_18 opt_VH#3	CD3-MABopt_VH#3	1,62	0,85
BissIg_18 opt_VH#4	CD3-MABopt_VH#4	0,89	2,04
BissIg_18 opt_VH#5	CD3-MABopt_VH#5	1,73	>5
BissIg_18 opt_VH#1	CD3-MABopt_VH#1	0,18	0,33
BissIg_18 opt_VL	CD3-MABopt_VL	0,81/2,18	0,44/0,48
BissIg_18_opt_cc#2	CD3-MABopt_cc#2	0,61	0,39
BissIg_18_opt_cc#3	CD3-MABopt_cc#3	0,04	0,43
BissIg_18_opt_cc#4	CD3-MABopt_cc#4	0,33	<0.5
BissIg_18_opt_cc#5	CD3-MABopt_cc#5	1,15	0,39
BissIg_18_opt_cc#	CD3-MAB_{opt_cc}	0,07	<0.2

[0478] ″>″=不完全滴定/拟合差

[0479] 实施例2.4:使用双特异性抗体进行细胞毒性测定。

[0480] 测试根据实施例2的双特异性抗体介导T细胞依赖性杀伤表达HER2的肿瘤细胞系SKBR3、MCF-7和HER2阴性细胞系MDA-MB-468的能力。测定按照实施例1.6中的描述进行。作为效应细胞,使用人类PBMC(用于SKBR3)细胞或纯化的人类T细胞(用于MCF-7细胞)。人类PBMC和人类T细胞的制备和纯化按照实施例1.4中的描述进行。将5000个SKBR-3、MDA-MB-468或MCF-7细胞接种在黑色96孔测定板(Corning,#3340)中,并在37℃和5% CO_2下孵育过夜。CellToxGreen染料(Promega,#G8731)、连续稀释的双特异性抗体构建体和100.000个纯化的PBMC(用于SKBR-3细胞)(靶细胞/效应细胞比率为1:20)或50.000个纯化的T细胞(用于MCF-7细胞)(靶细胞/效应细胞比率为1:10),全部在测定培养基中稀释,加入细胞中并在37℃和5% CO_2下孵育72小时。72小时后,通过使用Tecan Infinite F500装置测量485nm激发和535nm发射下的掺入CellToxGreen荧光来评估细胞毒性活性。使用Prism软件(GraphPad Software Inc.)中的4-参数非线性回归分析计算EC_{50}值。

[0481] 表22和图4(一位供体)总结了本公开的双特异性抗体介导的癌细胞系的T细胞重定向杀伤。包含交叉克隆的CD3特异性抗体的双特异性抗体明显表现出对SKBR3细胞和MCF-7细胞两者的优异杀伤力。其中,包含交叉克隆抗体CD3-MABopt_cc(SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:20)的双特异性抗体BissIg_18_opt_cc#对两种癌细胞系表现出最好的杀伤活性。在较高的测试抗体浓度下,交叉克隆CD3-MABopt_cc#4对HER2阴性细胞系MDA-MB-468的细胞杀伤力较弱(未显示数据)。

[0482] 表22:使用本公开的根据实施例2的对HER2和CD3具有特异性的双特异性抗体(包括亲和力成熟或交叉克隆的CD3特异性抗体)进行T细胞介导的杀伤试验。

[0483]

双特异性抗体	CD3 特异性抗体	SKBR3 [PBMCs] IC_{50} [pM]	MCF-7 [T 细胞] IC_{50} [pM]
BissIg_18_opt_VH#2	CD3-MABopt_VH#2	n.t.	n.t.
BissIg_18_opt_VH#3	CD3-MABopt_VH#3	n.t.	146,9 / >300*
BissIg_18_opt_VH#4	CD3-MABopt_VH#4	n.t.	n.t.
BissIg_18_opt_VH#5	CD3-MABopt_VH#5	n.t.	n.t.
BissIg_18_opt_VH#1	CD3-MABopt_VH#1	15,0	209,7 /inc. Tit.
BissIg_18_opt_VL	CD3-MABopt_VL	12,6 / 13,9	n.t.
BissIg_18_opt_cc#2	CD3-MABopt_cc#2	1,9	n.t.
BissIg_18_opt_cc#3	CD3-MABopt_cc#3	2,1	28,9 /62,7
BissIg_18_opt_cc#4	CD3-MABopt_cc#4	1,4	28,9 /46,1
BissIg_18_opt_cc#5	CD3-MABopt_cc#5	2,9	n.t.
BissIg_18_opt_cc#	CD3-MAB_{opt_cc}	1,8	<10* /13,2

[0484] *拟合差;n.t.=未测试

[0485] 实施例2.5:在没有靶癌细胞的情况下活化T细胞(高密度PBMC测定)

[0486] 测试了实施例2中的双特异性抗体在没有靶癌细胞的情况下活化来自三位不同供体的人类血液样品的人类T细胞的能力。测定在高PBMC密度预培养条件下进行,如Römer及其同事所建议的(Römer等人BLOOD,2011年12月22日,第118卷,第26号,第6772-6781页)。人类PBMC的制备和纯化如前所述(参见实施例1.4)。将T细胞重悬在补充有GlutaMax(Gibco,#35050-038)、非必需氨基酸(Gibco,#11140-035)、HEPES缓冲溶液(Gibco#15630-056)、丙酮酸钠(Gibco,#11360-039)、β-巯基乙醇、青霉素/链霉素(Gibco#15140-122)和人血清(Sigma,#H4522)的RPMI 1640培养基(Gibco,#31870-025)中,密度为1E+07个细胞/mL,并在37℃和5% CO_2下孵育48小时。高密度预孵育后,将培养基中的200,000个PBMC与等体积的连续稀释抗体(终浓度:1000nM、200nM和40nM)混合,并在37℃和5% CO_2下孵育24小时。作为阳性对照,使用市售的鼠类IgG抗体OKT3。通过评估CD3阳性淋巴细胞上CD69表达的上调来评估T细胞的活化。为此,用分别与BV/PE和APC结合的CD3和CD69抗体(Biolegend,#300434、#12003742、#310910)对PBMC进行染色。使用NovoCyte 3000流式细胞仪(Acea Biosciences,Inc.)测量抗体染色,并使用FlowJo软件进行分析。

[0487] 图5显示从3位供体获得的人$CD8^+$T细胞的T细胞活化实验的平均示例性结果。如预期的那样,在阳性鼠类对照IgG OKT-3中观察到CD69表达的强烈上调。对于所有测试的双特异性抗体(包括亲和力优化或交叉克隆的CD3特异性抗体),都可以观察到供体依赖性的$CD8^+$T细胞活化。其中,在没有靶癌细胞系的情况下,包括CD3-MABopt_VH#1(SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:26)或其交叉克隆对应物CD3-MABopt_cc(SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:20)的双特异性抗体表现出最低水平的人类T细胞活化。

[0488] 实施例2.6:亲和力改善和交叉克隆的CD3特异性抗体的总结

[0489] 亲和力强烈改善的交叉克隆CD3-MABopt_cc(SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:20)被鉴定为源自亲和力成熟活动的祖代抗体CD3-MAB_{GP}的最有效和最安全的CD3特异性抗体。

[0490] 当在实施例2的双特异性抗体形式中测试时,CD3-MABopt_cc显示出与人和食蟹猴CD3的良好结合,并在低、中和高表达HER2的癌细胞系上介导优异的细胞毒性活性,不杀伤HER2阴性癌细胞系,并且在没有靶细胞的情况下仅具有低水平的T细胞活化。

[0491] 实施例3:将优化的CD3特异性抗体CD3-MABopt-cc转化为改进的2+1Fab_2-Fv-Fc抗

体形式

[0492] 实施例3.1:接头优化的三价双特异性抗体的制备、生产和表征。

[0493] 双特异性Fab_2-Fv-Fc抗体使用双特异性抗体平台技术在体外生成,如WO 2020/115115中所述,该文献以其全文并入本文中。这种双特异性抗体形式由无糖基化单克隆人IgG1抗体骨架构建,该骨架包括一个额外的抗体Fv片段,其插入在Fc区和常规人IgG1分子的两个Fab臂之间。图2提供了此类双特异性抗体的基本结构。此类形式的优点是可以二价结合靶细胞表面抗原,例如肿瘤相关抗原,但单价结合T细胞上表达的CD3。这种形式还允许一旦通过双特异性抗体桥接,靶细胞和细胞毒性T细胞之间的距离很短。这种狭窄的免疫突触导致招募的细胞毒性T细胞有效杀伤靶细胞。

[0494] 实施例3.2:接头优化

[0495] 选择正确的肽接头(就氨基酸序列和长度而言)连接双特异性抗体形式的各个组成部分尤为重要,因为这些接头决定了额外Fv片段的灵活性及其与双特异性抗体两个Fab臂的结合区域的距离。为了进一步优化WO 2020/115115中先前公开的肽接头,现在延长了相应的接头并优化了序列。

[0496] N-端接头与CD3特异性Fv片段融合

[0497] 使用以下肽接头之一将每个Fab重链的C-端与所结合的CD3特异性Fv片段的VH或VL的N-端融合:

[0498] a)9聚甘氨酸-丝氨酸接头$(GGS)_3$:GGSGGSGGS(SEQ ID NO:30)

[0499] b)20聚$(G_4S)_4$接头:GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:31)

[0500] c)20聚PAPDA接头:AQPAAPAPDAHEAPAPAQGS(SEQ ID NO:33),或

[0501] d)20聚PAH接头:AHPAAPAPAHPAAPAPAHGH(SEQ ID NO:32)

[0502] C-端接头与CD3特异性Fv片段融合

[0503] CD3特异性Fv片段的VH和VL结构域各自的C-端与两个Fc区亚基之一的N-端之间的融合通过使用以下肽接头之一实现:

[0504] i)如果将CD3特异性Fv片段的VL结构域与两个Fc区亚基之一融合:

[0505] a)CLλ恒定结构域的前5个氨基酸残基:PKAAP(SEQ ID NO:36)

[0506] b)20聚PAPDA接头:AQPAAPAPDAHEAPAPAQGS(SEQ ID NO:33),或

[0507] c)CLλ恒定结构域的前20个氨基酸残基:PKAAPSVTLFPPSSEELQAN(SEQ ID NO:34),或

[0508] ii)如果将CD3特异性Fv片段的VH结构域与两个Fc区亚基之一融合:

[0509] a)CH1恒定结构域的前6个氨基酸残基:ASTKGP(SEQ ID NO:37),

[0510] b)20聚PAPDA接头:AQPAAPAPDAHEAPAPAQGS(SEQ ID NO:33),或

[0511] c)CH1恒定结构域的前20个氨基酸残基:ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG(SEQ ID NO:35)

[0512] 表23列出了测试的接头组合的总结。图2描述了用于连接实施例3的双特异性抗体形式的不同成分的不同肽接头。

[0513] 表23:用于将掺入的额外CD3特异性Fv片段的VH和VL结构域连接到双特异性Fab_2-Fv-Fc抗体形式中的Fab臂和Fc区亚基的接头组合。

[0514]

	CD3特异性Fv片段的VL结构域（旋钮链（knob-chain））				CD3特异性Fv片段的VH结构域（孔链（hole chain））			
接头组合	N-端接头	SEQ ID NO:	C-端接头	SEQ ID NO:	N-端接头	SEQ ID NO:	C-端接头	SEQ ID NO:
P(亲本)*	$(GGS)_3$	30	5aa-Cλ	36	$(GGS)_3$	30	6aa-CH1	37
1	$(G_4S)_4$	31	5aa-Cλ	36	$(G_4S)_4$	31	6aa-CH1	37
2	$(G_4S)_4$	31	20aa-PAPDA	33	$(G_4S)_4$	31	20aa-PAPDA	33
3	$(G_4S)_4$	31	20aa-Cλ	34	$(G_4S)_4$	31	20aa-CH1	35
4	20aa-PAH	32	20aa-Cλ	34	20aa-PAH	32	20aa-CH1	35
5	20aa-PAPDA	33	20aa-Cλ	34	20aa-PAPDA	33	20aa-CH1	35
6	$(GGS)_3$	30	20aa-Cλ	34	$(GGS)_3$	30	20aa-CH1	35

[0515] *如WO 2020/115115中最初公开

[0516] 所有C-端接头均通过人类IgG1铰链序列DKTHTCPPCP(SEQ ID NO:38)的一部分在C-端进一步延长。使用截短的人类IgG1铰链序列可以通过在包含Fab重链的两条多肽链之间形成链间二硫键来进一步稳定异二聚体分子。根据“旋钮入孔”技术,通过在每个Fc区亚基的CH3结构域中引入突变来修饰Fc区。因此,包含一个突变CH3结构域的多肽被迫与以互补方式设计的包含另一个CH3结构域的另一个多肽发生异二聚化。对于HER2结合,使用Baselga等人在1998年Cancer Res 58(13):2825-2831中描述的“曲妥珠单抗”(HERCEPTIN®)的VH和VL结构域(分别为SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:29)。曲妥珠单抗及其制备方法描述于US 5,821,337中。对于CD3结合,使用实施例2的CD3特异性交叉克隆CD3-MABopt-cc的VH和VL(分别为SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:20)。表13列出了使用根据实施例3制备的表23的不同接头组合形成所产生的双特异性三价Fab_2-Fv-Fc抗体的单个多肽的总结。

[0517] 实施例3.3:基因合成和生产

[0518] 所有核酸序列或所需基因片段均使用适当的模板通过PCR生成,或由内部或外部供应商合成为具有适当侧翼区域(例如合适的限制性酶识别位点、接头序列)的线性DNA片段。使用标准分子生物学方法将侧翼有单个限制性内切酶切割位点的核酸序列或基因片段克隆到相应的表达载体(例如哺乳动物表达载体)或测序载体中。当用于哺乳动物表达载体时,所有构建体均设计有5'-端DNA序列,该序列编码前导肽,该肽靶向真核细胞中用于分泌的蛋白质。通过双链测序用DNA确认亚克隆基因片段的DNA序列。为了表达双特异性抗体,用编码双特异性抗体所有成分的哺乳动物载体表达系统转染指数生长的真核HEK293-6E细胞,导致包含两个Fc区亚基的两种多肽和包含曲妥珠单抗Fab轻链的2种多肽的比例分别为1:1:2。转染后第6天收获细胞培养上清液,并进行标准Protein A亲和层析(MabSelect SURE|GE Healthcare)。缓冲液交换为1x Dulbcecco's PBS(pH 7.2|Invitrogen),样品经过无菌过滤(0.2μm孔径)。通过紫外分光光度法测定蛋白质浓度,并使用CE-SDS(LabChip

GXII|Perkin Elmer|USA)在变性、还原和非还原条件下分析构建体的纯度。进行HP-SEC分析天然状态下的双特异性抗体制剂。此外,通过质谱分析确认双特异性抗体的分子量和均一性。

[0519] 表24总结了对于所生产的双特异性抗体获得的不同制剂的单体含量和体积产量。所有生产的双特异性抗体都显示出可比的生产特性。

[0520] 然而,所有使用CH1-或Cλ-衍生肽接头的双特异性抗体都显示出非常异质的质量模式,表明这些接头可能存在O-连接糖基化。只有使用接头组合2(即20聚甘氨酸-丝氨酸接头(SEQ ID NO:31)与20聚PAPDA接头(SEQ ID NO:33)组合)的双特异性抗体BissIg_21#2显示出均质的质量模式,没有潜在的O-连接糖基化迹象。

[0521] 表24:哺乳动物产生的包含相同HER2和CD3结合结构域但不同接头组合的双特异性Fab_2-Fv-Fc抗体的质量控制。

[0522]

双特异性抗体（表 13）	接头组合（表 23）	SEC 单体含量[%]	体积产量 [mg/L]	质谱分析
BissIg_21#P	P	92.3*	61.7	异质模式-潜在的 O-连接糖基化
BissIg_21#1	1	91.2*	73.3	异质模式-潜在的 O-连接糖基化
BissIg_21#2	**2**	**84.0** / 91.4***	**81.3 / 58.3**	**均质模式-无 O-连接糖基化迹象**
BissIg_21#3	3	91.3*	70.0	异质模式-潜在的 O-连接糖基化
BissIg_21#4	4	91.4*	67.1	异质模式-潜在的 O-连接糖基化
BissIg_21#5	5	91.9*/ 90.9***	61.3 / 48.2	异质模式-潜在的 O-连接糖基化
BissIg_21#6	6	91.0*	68.3	异质模式-潜在的 O-连接糖基化

[0523] 实施例3.4:通过抗体捕获装置测定K_D

[0524] 在Octet HTX(FortéBIO,Sartorius AG)仪器上通过测定动力学速率常数进行亲和力测定。将实施例3中稀释在测定缓冲液(D-PBS、0.05％(v/v)PS20、0.1％(w/v)BSA)中的不同双特异性抗体制剂捕获到IgG-特异性BLI传感器上,负载水平为约2nm。为了进行分析,将人CD3ε抗原hCD3e(22-118)_F-chLys_avi(SEQ ID NO:43)用测定缓冲液稀释至浓度范围从1.56nM到500nM(连续1:3稀释)。包括含有测定缓冲液的空白样品用于参考,即校正捕获抗体的解离。记录了180秒的结合阶段,随后是300秒的解离阶段。使用Octet数据分析软件10.0(FortéBio,Sartorius AG)拟合传感器图以测定k_{on}和k_{off}速率常数(使用1:1结合模型),这些常数用于计算K_D。

[0525] 表25总结了本实施例使用表23的不同接头组合的双特异性抗体对人CD3ε抗原的K_D值。对于所有测试的接头组合都观察到了相当的CD3结合。

[0526] 表25:包含CD3-MABopt-cc可变结构域但不同接头组合的双特异性抗体对人CD3ε抗原的亲和力

[0527]

双特异性抗体（表 13）	接头组合（表 23）	k_{on} [1/Ms]	k_{off} [1/s]	K_D [nM]
BissIg_21#P	P	3.04E+05	1.21E-03	4.0*
BissIg_21#1	1	2.67E+05	1.12E-03	4.2*

[0528]

BissIg_21#2	2	2.66E+05	9.74E-04	3.7*
BissIg_21#3	3	2.46E+05	1.08E-03	4.4*
BissIg_21#4	4	2.14E+05	1.13E-03	5.3*
BissIg_21#5	5	1.92E+05	9.84E-04	5.1*
BissIg_21#6	6	2.87E+05	1.02E-03	3.6*

[0529] *略微异质结合;值代表与1:1结合的最佳近似值

[0530] 实施例3.5:细胞结合

[0531] 测试了包含表23的不同接头组合的实施例3的双特异性抗体与CD3阳性Jurkat细胞和CD3阴性J.RT3-T3.5细胞的结合能力。将Jurkat和J.RT3-T3.5.细胞重悬、计数并在冰上用洗涤缓冲液(DPBS+(Gibco)/3% FBS(Sigma)/0.02%钠酸)封闭1小时。将封闭的细胞重悬于在洗涤缓冲液中连续稀释的双特异性抗体中(终浓度:500nM-31pM)并在冰上孵育1小时。在洗涤缓冲液中洗涤细胞2次。使用AlexaFluor647标记的山羊抗人IgG、F(ab')$_2$片段特异性(Jackson Immuno Research Cat#109-606-097)检测结合抗体。使用Prism软件(GraphPad Software Inc.)中的4-参数非线性回归分析计算EC_{50}值。

[0532] 表26总结了两个独立实验的细胞结合结果(EC_{50}值)。与最初描述的接头组合P相比,包含不同的接头组合的对HER和CD3具有特异性的双特异性抗体表现出对Jurkat细胞相当的结合。未观察到与CD3阴性Jurkat细胞(RT3-T3.5)的结合(未显示数据)。

[0533] 表26:细胞结合

[0534]

双特异性抗体（表 13）	接头组合（表 23）	Jurkat EC_{50} [nM]
BissIg_21#P	P	61,5 / 83.7
BissIg_21#1	1	54,8 / 53.9
BissIg_21#2	2	71,7
BissIg_21#3	3	89,2 / 58.2
BissIg_21#4	4	43,2 / 64.1
BissIg_21#5	5	98,3 / 132.7
BissIg_21#6	6	60,9 / 64.1

[0535] 实施例3.6:包含不同接头组合的双特异性抗体的细胞毒性测定

[0536] 测试了实施例3中包含不同接头组合的双特异性抗体诱导T细胞介导杀伤表达HER2的SKOV-3和HER-2阴性MDA-MB468细胞的能力。如前所述,制备并纯化来自两位供体的人类泛T细胞(参见实施例1.4)。将5,000个表达HER2的SKOV-3细胞重悬在培养基(SKOV-3:McCoy's 5A培养基(ThermoFisher,#26600)、10% FCS(Sigma,#F7524)中,接种在黑色96孔检测板(Corning,#3340)中,在37℃和5% CO_2下孵育过夜。CellToxGreen染料(Promega,#G8731)、连续稀释的双特异性抗体(0.3nM-1.2pM)和50,000个纯化的T细胞(靶细胞/效应细胞比为1:10),全部在包含RPMI 1640w/o酚红(Gibco,#32404-014)、GlutaMAX和10%胎牛血清的检测培养基中稀释,加入细胞中,在37℃和5% CO_2下孵育72小时。使用Tecan

Infinite F500装置测量485nm激发和535nm发射下的掺入CellToxGreen荧光来评估细胞毒性活性。使用Prism软件(GraphPad Software Inc.)中的4-参数非线性回归分析计算EC_{50}值。

[0537] 表27总结了由包含不同接头组合的双特异性抗体介导的T细胞重定向杀伤SKOV-3细胞的平均IC_{50}值。确认所有双特异性抗体均具有剂量依赖性杀伤作用。与最初公开的接头组合P(BissIg_21#P)相比,5种接头组合导致细胞杀伤力增强。对于任何测试的双特异性抗体,均未观察到HER2独立的MDA-MB468细胞杀伤作用(未显示数据)。

[0538] 图6显示了与最初公开的接头组合P(BissIg_21#P)相比,由包含最有效的接头组合2和接头组合5的双特异性抗体BissIg_21#2和BissIg_21#5介导的示例性SKOV-3杀伤结果。

[0539] 表27:T细胞重定向杀伤HER2阳性SKOV-3细胞

[0540]

双特异性抗体(表13)	接头组合 表23	SKOV-3细胞的杀伤
		IC_{50} [nM]*
BissIg_21#P	P	48**
BissIg_21#1	1	23
BissIg_21#2	**2**	**21**
BissIg_21#3	3	39
BissIg_21#4	4	21
BissIg_21#5	**5**	**20****
BissIg_21#6	6	74

[0541] *4位供体的平均值**6位供体的平均值

[0542] 实施例3.7:在没有靶癌细胞的情况下的T细胞活化(高密度PBMC测定)

[0543] 测试了实施例3中包含不同接头组合的双特异性抗体在没有靶癌细胞的情况下活化来自三位不同供体的人类血液样品的人类T细胞的能力。测定基本按照实施例2.5中所述进行。在终浓度为1000nM、200nM、40nM、8nM、1.6nM和0.32nM的情况下测试双特异性抗体。作为阳性对照,使用市售的鼠类IgG抗体OKT3。通过评估CD4+和CD8+T细胞上CD69表达的上调来评估T细胞的活化。为此,分别用与APC、PE、Pacific Blue结合的CD69、CD4和CD8抗体(Biolegend,#310910/#300508/#300928)对PBMC进行染色。使用NovoCyte 3000流式细胞仪(Acea Biosciences,Inc.)测量抗体染色,并使用FlowJo软件进行分析。

[0544] 显示了从3位供体获得的T细胞活化实验的平均结果,图7A为CD4+/CD8-T细胞,图7B为CD4-/CD8+T细胞。如预期的那样,对于阳性对照IgG OKT-3,可以观察到CD4阳性和CD8阳性T细胞上CD69表达的强烈上调。在没有表达HER2的靶细胞的情况下,即使在最高测试浓度为1μM(抗体浓度从左到右降低)的情况下,任何测试的双特异性抗体均未观察到CD4+T细胞的活化。对于某些测试的接头组合,可以观察到轻微的供体依赖性CD8+T细胞活化,但仅限于最高测试抗体浓度1μM。对于最初公开的接头组合P(BissIg_21#P)、接头组合1(BissIg_21#1)和接头组合6(BissIg_21#6),可以观察到最明显的活化。

[0545] 实施例3.8:总结接头优化

[0546] 与包含最初描述的接头组合P(BissIg_21#P)的双特异性抗体相比,实施例3中采用新接头组合的所有双特异性2+1Fab_2-Fv-Fc抗体在生产和与CD3结合方面均表现出相似

的特性。

[0547] 然而,与包含最初描述的接头组合P的BissIg_21#P相比,分别包含接头组合1、2、3、4和5的双特异性抗体BissIg_21#1、BissIg_21#2、BissIg_21#3、BissIg_21#4和BissIg_21#5在T细胞介导的SKOV-3细胞杀伤中表现出改善的功效,并且靶标非依赖性T细胞活化更少。然而,通过质谱分析测定,所有包含CH1或Cλ类的肽接头的双特异性抗体在哺乳动物生产后均显示出O-糖基化的迹象。只有包括包含延长的20聚肽接头$(G_4S)_4$(SEQ ID NO:31)和20aa-PAPDA(SEQ ID NO:33)的接头组合2的双特异性抗体BissIg_21#2没有表现出O-糖基化的迹象。因此,接头组合2被鉴定为在实施例3的改进的双特异性2+1Fab_2-Fv-Fc抗体形式中使用的最优选的接头组合。

[0548] 实施例4:优化的CD3特异性抗体CD3-MAB_{opt-cc}的去免疫变体抗体的生成

[0549] 制备实施例2的CD3-MAB_{opt-cc}的人CD3特异性抗体的去免疫变体,其具有SEQ ID:14的VH和SEQ ID NO:20的VL。

[0550] 该抗体的特征在于其VH和VL中的胚系编码的人类框架区以及胚系编码的LCDR1和LCDR2区。以下实施例描述了CD3-MAB_{opt-cc}的非人类胚系编码的HCDR1、HCDR2、HCDR3和LCDR3区的去免疫。

[0551] 实施例4.1:CD3-MAB_{opt-cc}的CDR区中的(潜在)T细胞表位、H-线和热点的鉴定

[0552] 使用计算机模拟T细胞表位筛选工具(Lonza,The Epibase™,Epibase版本:v3.0)分析CD3-MAB_{opt-cc}的VH(SEQ ID:14)和VL(SEQ ID NO:20)的氨基酸序列中的潜在T细胞表位、H-线和热点。其基本计算程序在WO 2003/105058(全文并入本文)中进行了描述。该筛选工具可用于识别生物治疗蛋白(例如抗体)中的潜在T细胞表位。该工具使用HLA受体的结构特征以及实验测定的结合亲和力来预测潜在的肽/HLA结合,这是T细胞活化的必要条件。

[0553] 为了进行分析,将整个VH或VL序列拆分为重叠的10聚肽(本文称为“分析的10聚肽”),每个肽移位一个氨基酸。测定了主要高加索人DRB1等位基因的HLA II类同种型的每个10聚肽的潜在肽/HLA结合。人类抗体胚系编码序列区被排除在分析之外。

[0554] Epibase™分析结果

[0555] 计算机“搜索”过程的结果显示,CD3-MAB_{opt-cc}的HCDR1、HCDR2、HCDR3区内存在6个热点,CD3-MAB_{opt-cc}的LCDR3区内存在一个热点。热点反映了相邻T细胞表位的积累。此类热点是根据图例8和图8中详述的”4 over 3“算法鉴定的,并且要求DRB1等位基因的至少4种同种型与三种连续分析的10聚肽中的至少两种结合,亲和力为中等(M)或强(S)。此外,最多一个未被鉴定为T细胞表位的10聚肽可以成为热点的一部分。因此,并非每个已鉴定的T细胞表位都必须是热点的一部分(参见例如图4的肽100、102或104)。另一方面,未被鉴定为T细胞表位的肽可能仍然是热点的一部分(参见例如图4中的肽96或肽111)。每个作为热点一部分的10聚肽定义为H-线。热点的绝对风险评分可以计算为热点内每个T细胞表位测定的风险评分的总和,并以“H-评分”的形式提供。

[0556] 表28和表29提供了CD3-MAB_{opt-cc}的VH和VL的总体测定免疫原性风险参数的总结。由于LCDR1+2区是胚系编码序列,因此没有热点分配给这些区。

[0557] 表28:抗体CD3-MAB_{opt-cc}的VH的Epibase筛选结果

[0558]

绝对评分	652.5
绝对热点	6

绝对H-评分	580
绝对H-线	25
绝对T细胞表位	23

[0559] 表29:CD3-MABopt-cc的VL的Epibase筛选结果

[0560]

绝对评分	188,8
绝对热点	1
绝对H-评分	188,8
绝对H-线	7
绝对T细胞表位	6

[0561] 图8显示了CD3-MAB_{opt-cc}的HCDR3区的示例性详细筛选分析(有关详细说明,请参阅图8的图例)。总之,对于HCDR3区,鉴定了2个热点,包括7个T细胞表位和9个H-线,H-评分为236。对于HCDR2区,鉴定了3个热点,包括10个T细胞表位和12个H-线,H-评分为254.1。对于HCDR1区,鉴定了1个热点,包括3个T细胞表位和4个H-线,H-评分为89.9。对于LCDR3区,鉴定了1个热点,包括6个T细胞表位和7个H-线,H-评分为188.8。

[0562] 实施例4.2:通过CDR区中的单个氨基酸取代生成抗体CD3-MAB_{opt-cc}的去免疫变体VH和VL序列

[0563] 为了从CD3-MAB_{opt-cc}的CDR区中去除或减少先前鉴定的热点、T细胞表位和/或H-线,进行了计算机Epibase™突变分析,其中CD3-MAB_{opt-cc}的VH和VL中的每个氨基酸位置实际上被取代/随机化为除半胱氨酸、脯氨酸和组氨酸之外的每个天然存在的氨基酸残基。氨基酸取代优选导致鉴定的热点内的T细胞表位减少>=2,并且优选允许进行保守氨基酸取代,例如选择具有相似电荷或极性的氨基酸,被选择用于去免疫变体VH和VL抗体序列的基因合成。此外,注意不要将潜在的翻译后修饰位点("PTM基序")引入CDR区。

[0564] 图9描绘了与未修饰的亲本序列相比,CD3-MAB_{opt-cc}的每个HCDR3位置上的单个氨基酸取代对T细胞表位数量(图4左图)和相应的绝对风险评分(图4右图)的影响。图10描绘了优选单个氨基酸取代对24种实际生产和表征的双特异性抗体(如下所述)的T细胞表位数量的影响,这些抗体包含VH或VL单点突变变体。

[0565] 总共,通过基于PCR的诱变策略生成了92种CD3-MAB_{opt-cc}的物理VH或VL单点变体。简而言之,通过PCR用含有优选突变和同源重叠序列的合适寡核苷酸产生线性DNA片段,随后将其克隆到相应的哺乳动物双特异性抗体表达载体中,该载体编码双特异性2+1Fab_2-Fv-Fc抗体形式,如实施例3所述,对HER2和CD3具有特异性。VH变体与CD3-MAB_{opt-cc}的亲本未修饰VL(SEQ ID NO:20)组合,而VL变体与CD3-MAB_{opt-cc}的亲本未修饰VH(SEQ ID NO:14)组合。双特异性抗体的产生如实施例3中所述。

[0566] 总体而言,可以产生约50%的双特异性抗体,其可接受的单体含量>85%(见表30)。图10总结了包含上述24种优选单点变体的双特异性抗体制剂的产量和最终单体含量

[0567] 表30:所产生的包含CD3-MABopt-cc的CDR单点变体的双特异性抗体的总结,通过分析尺寸排阻色谱法测定其单体含量>85%。

[0568]

CDR 区中的单点变体	单体含量>85%的双特异性抗体制剂的数量参照所产生双特异性抗体的总数量
HCDR1	5/6
HCDR2	13/22
HCDR3	18/42
LCDR3	10/23

[0569] 令人惊讶的是,发现特定CDR位置的氨基酸交换(即使是保守的)对双特异性抗体的可生产性具有强烈的负面影响,即导致聚集倾向增加。表31描述了CD3-MAB$_{opt-cc}$的CDR内取代的氨基酸位置,这导致相应产生的双特异性抗体的单体含量显著降低。

[0570] 表31:CD3-MAB$_{opt-cc}$的CDR内取代的氨基酸位置,这导致双特异性抗体制剂的聚集体形成显著增加。

[0571]

CDR 区内突变的 aa 位置	突变的 CDR 区	每个位置产生的变体#	所有<77%的 SEC 单体含量范围[%]
W47	HCDR2	1	64
V48		2(+1)	7-8
Y94	HCDR3	2	8-10
Y95		1	n.a.
R98		3(+1)	61-76
L110		6(+2)	12-35
V112		5(+1)	17-70
Y87	LCDR3	3	20-24
Y88		1	25
G91		1	64
G98		1	65

[0572] 实施例4.3:ELISA结合

[0573] 根据实施例4.2的46种产生的双特异性单点变体抗体,单体含量>85%,其特征是ELISA结合人CD3ε抗原(hCD3e(22-118)_F-chLys_avi(SEQ ID NO:43),包被在Maxisorp板(Nunc,#460518)上。最终抗体浓度分别设置为50、10、2、0.4nM。使用针对人F(ab)'2片段的碱性磷酸酶偶联检测抗体(Jackson Immuno Research,#109-055-097)检测结合抗体。使用Prism软件(GrapPad Software Inc.)中的4-参数非线性回归分析计算EC$_{50}$值。

[0574] 图10总结了24种双特异性单点变体抗体对人CD3ε抗原的ELISA EC$_{50}$估计值,揭示了与亲本抗体CD3-MAB$_{opt-cc}$相比,相似甚至更好的与CD3的结合(提供的是EC$_{50}$估计值+所有测试抗体浓度的高于背景的信号的总和)。

[0575] 实施例4.4:通过抗体捕获装置测定K$_D$

[0576] 通过测定动力学速率常数对双特异性单点变体抗体进行亲和力测定,如先前在实

施例3.4中所述。在测定缓冲液(1％ BPBS+0.05％ Tween20)中稀释的不同双特异性抗体样品被捕获到IgG-特异性BLI传感器上,负载水平为约2nm。为了进行分析,用测定缓冲液将人CD3ε抗原hCD3e(22-118)_F-chLys_avi(SEQ ID NO:43)稀释至浓度范围从200nM到3.1nM。包括含有测定缓冲液的空白样品用于参考,即校正捕获抗体的解离。记录了180秒的结合阶段,随后是300秒的解离阶段。使用Octet数据分析软件10.0(FortéBio,Sartorius AG)拟合传感器图以测定k_{on}和k_{off}速率常数(使用1:1结合模型),这些常数用于计算K_D。

[0577] 图10总结了24种优选的双特异性单点变体抗体对人CD3ε抗原的K_D值。这些变体显示出与亲本抗体CD3-MAB_{opt-cc}相当的个位数纳摩尔范围内的单价亲和力。

[0578] 实施例4.5:CD3-MAB_{opt-cc}的去免疫单点变体总结

[0579] 图10总结了24种优选的双特异性单点变体抗体(5种LCDR3变体和19种HCDR变体)的生物物理和功能特征,这些抗体是根据其可生产性和ELISA结合而选择的。所有变体均显示出降低的免疫原性风险,如通过T细胞表位、H-线、绝对评分和H-评分的减少所测定的,但当以本文所述的双特异性抗体形式进行测试时,保留了亲本CD3-MAB_{opt-cc}的生物物理和功能特性。

[0580] 19种单点变体中的14种(如表32所列)是从组合T细胞表位Epibase™分析中选择的,如下所述(参见实施例4.6),因为只能测定19种单点变体中的5种热点减少。表32总结了与亲本抗体的参数相比,所选的14种单点变体中的每一个对免疫原性风险参数的影响。值得注意的是,只有HCDR2位置V61和HCDR1位置Y33的取代导致热点减少。

[0581] 对于CD3-MAB_{opt-cc}的VL,LCDR3变体S95E被选为唯一优选的VL变体,与任何其他VH变体一起使用。当在实施例4.2的双特异性抗体形式中测试时,该单点LCDR3变体导致LCDR3中4条H-线减少,并显示出与CD3-MAB_{opt-cc}的亲本抗体VH相似的功能和生物物理特性。

[0582] 表32:针对CD3-MAB_{opt-cc}的VH的优选HCDR单点变体的Epibase™ T细胞表位筛选总结

[0583]

HCDR 变体	突变的区	EpiBase™ 筛选							
		绝对评分	Δ 绝对评分	热点	Δ 热点	绝对H评分	Δ 绝对H评分	绝对H线	Δ 绝对H线
wt (CD3-MAB_{opt-cc})	n.a	653	n.a	6	n.a.	580	n.a.	25	n.a.
F104A	HCDR3	610	-43	6	0	556	-24	23	-2
A105G		595	-58	6	0	556	-24	23	-2
H106G		626	-27	6	0	556	-24	23	-2
H106K		611	-42	6	0	556	-24	23	-2
H106T		626	-27	6	0	556	-24	23	-2
A102D		548	-104	6	0	494	-86	22	-3
A102E		578	-75	6	0	524	-56	22	-3
Y56S	HCDR2	643	-9	6	0	571	-9	20	-5
Y56T		599	-54	6	0	526	-54	20	-5
V61A		618	-35	5	-1	479	-101	20	-5
V61D		497	**-155**	4	**-2**	421	**-159**	17	**-8**
V61E		497	**-155**	4	**-2**	421	**-159**	17	**-8**
V61G		512	-140	4	**-2**	421	**-159**	17	**-8**
Y33W	HCDR1	607	-45	5	-1	490	-90	21	-4

[0584] 实施例4.6通过组合氨基酸取代变体(“组合变体”)生成去免疫序列

[0585] 为了进一步减少CD3-MAB_{opt-cc}的VH-CDR区中潜在T细胞表位和其他免疫原性风险

参数的数量,进行了计算机Epibase™突变分析,其中表32中先前鉴定的14种优选HCDR单点变体中的每一种都虚拟地相互组合,包括每个位置上的CD3-MAB$_{opt-cc}$的野生型残基。因此,筛选了251种新的组合VH-CDR序列变体(包括双重、三重和四重突变)以获得潜在的T细胞表位。

[0586] 组合突变变体的Epibase™筛选分析结果

[0587] 图11描绘了CD3-MAB$_{opt-cc}$的VH_HCDR1-3区中54种组合氨基酸取代对不同免疫原性风险参数影响的示例性结果,导致热点最多减少3个。表格的第一行表示CD3-MAB$_{opt-cc}$的VH(表示为"wt(亲本)")的风险参数:绝对评分、热点、绝对H-评分和绝对H-线。

[0588] 令人惊讶的是,减少热点、绝对H-线和绝对H-评分的关键组合变体可以分配给Y33W(HCDR1)+wt Y56(HCDR2)+V61D/E/或G(HCDR2)的突变组合。

[0589] 选择所有54种VH组合变体(导致热点减少3个)和40种额外的变体组合(导致热点减少2个(未显示)并且显示H-线和绝对评分减少最强),以双特异性抗体形式进行克隆和生产,如实施例3中所述。为此,54种组合VH变体中的每一种都与包含LCDR3变体S95E(SEQ ID NO:21)的VL变体一起表达。25/94产生的双特异性组合变体抗体显示单体含量>85%。图12总结了通过分析尺寸排阻色谱法测定的33种优选双特异性组合变体抗体制剂的单体含量。

[0590] 实施例4.7:双特异性抗体与重组人CD3ε的ELISA结合。

[0591] 对实施例4.6中所有94种产生的双特异性组合变体抗体测试对于如实施例4.3中先前所述的重组CD3ε抗原的ELISA结合。总之,与亲本抗体CD3-MAB$_{opt-cc}$相比,46种双特异性组合变体抗体显示出与CD3ε更好的结合,EC_{50}值<30nM。图12总结了针对人CD3ε抗原测定的33种优选双特异性组合变体的ELISA EC_{50}值。

[0592] 实施例4.8:通过抗体捕获装置测定K_D

[0593] 如实施例4.4中先前所述,通过测定实施例4.6中46种双特异性组合变体的动力学速率常数来测定亲和力,这些变体显示出与CD3更好的ELISA结合(实施例4.7)。总体而言,双特异性组合变体抗体在中个(mid-single)至低两位纳摩尔范围内对CD3ε显示出单价亲和力。与包含亲本抗体CD3-MAB$_{opt-cc}$(K_D=5nM)的双特异性抗体相比,无法实现与CD3的结合改善。图12总结了33种优选的双特异性组合变体抗体对人CD3ε抗原的K_D值。这些变体显示的K_D值在5-11nM范围内,与包含亲本抗体CD3-MAB$_{opt-cc}$的相应双特异性抗体所测定的亲和力相当。

[0594] 实施例4.9Jurkat NFAT报告基因细胞测定

[0595] 进行了Jurkat NFAT报告基因细胞测定,以评估实施例4.8中对HER2和CD3具有特异性的46种双特异性组合变体抗体的功能活性。用NFAT报告基因构建体稳定转染的Jurkat细胞(ATCC#TIB-152)用作替代效应细胞。作为肿瘤靶细胞,使用HER2阳性人SKOV-3(ATCC®HTB-77)肿瘤细胞系。测定按照前面实施例2.3中所述进行。将双特异性抗体连续稀释至最终测定浓度范围为50nM至0.5nM(4步稀释)。

[0596] 大多数双特异性组合变体抗体在SKOV-3细胞存在下诱导荧光素酶活性。然而,在EC_{50}值和最大荧光素酶活性水平方面,没有一种测试的双特异性抗体显示出优于包含亲本抗体CD3-MAB$_{opt-cc}$的双特异性抗体的活性。

[0597] 图12总结了33种优选的双特异性组合变体抗体的RGA结果。结果以两种测试抗体浓度下的高于背景的信号提供,并据此对抗体进行分类。表格的上一行提供了亲本双特异

性抗体CD3-MAB$_{opt-cc}$的RGA结果,表明该抗体在抗体浓度为50nM和0.5nM时信号强度最高。总体而言,可以推测RGA中的活性与对CD3的结合亲和力之间存在正相关性。

[0598] 实施例4.10探索性规模生产

[0599] 实施例4.9的33种优选双特异性组合变体被选用于更大规模生产。选择标准包括对人CD3e的K_D值(实施例4.8)、报告基因测定中的功能活性(实施例4.9)和小规模生产后的单体含量(实施例4.6)。

[0600] 真核HEK293-6E细胞用编码双特异性抗体重链和轻链的哺乳动物表达载体DNA转染。转染后第6天收获细胞培养上清液并进行标准Protein A亲和层析(MabSelect SURE|GE Healthcare)。缓冲液交换为1x Dulbcecco's PBS(pH 7.2|Invitrogen),样品经过无菌过滤(0.2μm孔径)。双特异性抗体的蛋白质浓度和纯度按前面所述测定。

[0601] 图12总结了33种生产的双特异性组合变体抗体制剂的单体含量百分比。这些制剂中的15种显示出单体抗体含量超过90%。

[0602] 实施例4.11:选择最合适的组合变体CD3特异性抗体

[0603] 对CD3特异性抗体CD3-MABopt-cc的LCDR3区和HCDR1-3区进行平行去免疫,结果鉴定出5种优选的去免疫VH/VL变体。这些变体出现在上述实施例4的每个测定中的10种表现最佳的双特异性抗体中,因此在T细胞介导的细胞毒性测定中进一步表征(实施例4.12)及表征其在没有靶细胞的情况下诱导T细胞活化的潜力(实施例4.13)。

[0604] 上述5种去免疫的CD3特异性抗体在本文中表示为:CD3-MABdeimm_1、CD3-MABdeimm_2、CD3-MABdeimm_3、CD3-MABdeimm_4和CD3-MABdeimm_5。表7提供了5种去免疫抗体中每种抗体的VH、VL和CDR序列。包含5种去免疫抗体的相应双特异性抗体在本文中分别表示为:BissIg_21#CD3-MABdeimm_1、BissIg_21#CD3-MABdeimm_2、BissIg_21#CD3-MABdeimm_3、BissIg_21#CD3-MABdeimm_4和BissIg_21#CD3-MABdeimm_5。表14列出了形成根据实施例4制备的双特异性抗体的各个多肽的总结。表29提供了这5种去免疫的CD3特异性抗体和相应的双特异性抗体的生物物理和功能特性以及免疫原性风险参数的总结。

[0605] 实施例4.12:由包含5种优选的去免疫CD3特异性抗体的双特异性抗体介导的重定向T细胞细胞毒性。

[0606] 测试了双特异性组合变体抗体BissIg_21#CD3-MABdeimm_1、BissIg_21#CD3-MABdeimm_2、BissIg_21#CD3-MABdeimm_3、BissIg_21#CD3-MABdeimm_4和BissIg_21#CD3-MABdeimm_5在与CD3和HER2结合后诱导T细胞介导的肿瘤细胞杀伤的潜力。该方法按照实施例3.6中所述进行。作为靶细胞,使用5,000个表达HER2的SKOV-3细胞,导致靶细胞/效应细胞比例为1:10。

[0607] 表33总结了所有5种测试的双特异性组合变体抗体的T细胞介导杀伤的IC_{50}值。可以确认所有5种双特异性抗体均具有浓度依赖性杀伤高表达HER2的SKOV-3细胞的能力,与包含亲本抗体CD3-MABopt-cc的双特异性抗体相当。图13描绘了从一位供体获得的T细胞以及参考亲本抗体CD3-MABopt-cc(BissIg_21#CD3-MABopt-cc)最优选的组合变体抗体CD3-MABdeimm_3(BissIg_21#CD3-MABdeimm_3)的示例性SKOV-3杀伤结果。

[0608] 实施例4.13:在没有靶癌细胞的情况下双特异性抗体的T细胞活化(高密度PBMC测定)

[0609] 为了评估去免疫CD3特异性抗体的安全性,测试了5种相应的双特异性组合变体抗

体BissIg_21#CD3-MABdeimm_1(CD3-MABdeimm_1)、BissIg_21#CD3-MABdeimm_2(CD3-MABdeimm_2)、BissIg_21#CD3-MABdeimm_3(CD3-MABdeimm_3)、BissIg_21#CD3-MABdeimm_4(CD3-MABdeimm_4)和BissIg_21#CD3-MABdeimm_5(CD3-MABdeimm_5)在没有靶癌细胞的情况下活化人类T细胞的能力。测定如先前实施例3.7中所述进行。人类血液样品取自两个不同的供体。通过评估CD4阳性或CD8阳性T细胞上CD69表达的上调来评估T细胞的活化。

[0610] 表33定性总结了5种双特异性组合变体抗体的T细胞活化潜力。在没有表达HER2的靶细胞的情况下,即使在最高测试抗体浓度下,任何双特异性组合变体抗体均未观察到T细胞的活化。在更高的测试浓度下,可以观察到包含亲本抗体CD3-MABopt-cc的双特异性抗体BissIg_21#CD3-MABopt-cc的供体依赖性T细胞活化。阳性对照OKT-3在IgG浓度为20nM时强烈诱导CD4+和CD8+T细胞的CD69表达,范围为76-78%。图14显示了一位供体的T细胞活化实验的示例性结果。图14A描述了CD4+/CD8-T细胞的活化结果,图14B显示了CD4-/CD8+T细胞的活化结果。这些结果清楚地证明了本公开的去免疫的人CD3特异性抗体的显著安全性。

[0611] 实施例4.14:去免疫组合变体的总结:

[0612] 本发明首次提供了一种针对具有CD3特异性的全人抗体的CDR去免疫方法。表33提供了实施例2中鉴定的5种优选去免疫变体CD3-MABdeimm_1、CD3-MABdeimm_2、CD3-MABdeimm_3、CD3-MABdeimm_4和CD3-MABdeimm_5及其亲本人CD3特异性抗体CD3-MABopt-cc的功能和生物物理特性的概述。CD3-$MAB_{deimmun_3}$被鉴定为本发明最优选的去免疫CD3特异性抗体。亲本抗体CD3-MABopt-cc的CDR工程导致该抗体的HCDR2区中的热点总共减少2个,LCDR3区中的热点总共减少1个。此外,可以实现T细胞表位、H-线、绝对风险评分和绝对H-评分的显著减少。因此,CD3-$MAB_{deimmun_3}$一旦施用,在人类中诱导免疫原性反应的风险显著降低,这是T细胞接合疗法中非常关键的方面。CD3-$MAB_{deimmun_3}$的这种显著安全性特征因为它无法在没有靶细胞的情况下诱导T细胞活化而进一步增强。值得注意的是,与亲本抗体CD3-MABopt-cc相比,CDR工程化不会导致特异性、功能活性和可生产性的丧失。这更加引人注目,因为CDR工程化影响了CD3-MABopt-cc的HCDR3区,这是抗原识别最相关的CDR。

[0613] 表33:根据本发明的源自亲本抗体CD3-MABopt-cc的5种优选的去免疫组合变体抗体的功能和生物物理特性概述。

[0614]

双特异性抗体		抗CD3抗体			突变的CDR3位置				
组合变体	SEQ ID Nos	去免疫抗CD3抗体ID	SEQ ID NO: VH	SEQ ID NO: VL	HCDR1	HCDR2	HCDR3a	HCDR3b	LCDR3
BisslgG_21#CD3-MABopt-cc	66, 67, 51	CD3-MABopt_cc	14	20	wt	wt	wt	wt	wt
BisslgG_21#CD3-MABdeimm_1	70, 71, 51	CD3-MAB$_{deimm_1}$	18	21	wt	V61E	A102E	wt	S95E
BisslgG_21#CD3-MABdeimm_2	70, 72, 51	CD3-MAB$_{deimm_2}$	19	21	wt	V61G	A102D	wt	S95E
BisslgG_21#CD3-MABdeimm_3	70, 73, 51	CD3-MAB$_{deimm_3}$	15	21	wt	V61G	A102D	H106T	S95E
BisslgG_21#CD3-MABdeimm_4	70, 74, 51	CD3-MAB$_{deimm_4}$	16	21	wt	V61G	A102E	wt	S95E
BisslgG_21#CD3-MABdeimm_5	70, 75, 51	CD3-MAB$_{deimm_5}$	17	21	wt	V61G	A102D	H106K	S95E

双特异性抗体	抗CD3抗体	Epibase™ 风险分析 VH							Epibase™ 风险分析 VL							
组合变体	去免疫抗CD3抗体ID	绝对评分	Δ评分	绝对热点	Δ热点	绝对H评分	Δ H评分	绝对H线	Δ H线	绝对评分	Δ评分	绝对热点	Δ热点	绝对H评分	Δ H评分	绝对H线	Δ H线
BisslgG_21#CD3-MABopt-cc	CD3-MABopt_cc	653	-	6	-	580	-	25	-	189	-	1	-	189	-	7	-
BisslgG_21#CD3-MABdeimm_1	CD3-MAB$_{deimm_1}$	422	-230	4	-2	365	-215	14	-11								
BisslgG_21#CD3-MABdeimm_2	CD3-MAB$_{deimm_2}$	408	-245	4	-2	335	-245	14	-11								
BisslgG_21#CD3-MABdeimm_3	CD3-MAB$_{deimm_3}$	393	-260	4	-2	335	-245	14	-11	62	127	0	-1	62	127	2	-4
BisslgG_21#CD3-MABdeimm_4	CD3-MAB$_{deimm_4}$	437	-215	4	-2	365	-215	14	-11								
BisslgG_21#CD3-MABdeimm_5	CD3-MAB$_{deimm_5}$	393	-260	4	-2	335	-245	14	-11								

[0615]

双特异性抗体	抗CD3抗体	生产		结合		RGA SKOV-3		T细胞杀伤 SKOV-3	T细胞活化	
组合变体	去免疫抗CD3抗体ID	SEC单体含量[%]	体积产量[mg/L]	hCD3的ELISA EC50[nM]	hCD3e的KD[nM]	0.5nM的信号-BG	50nM的信号-BG	IC50 [pM] (n=2)	CD4+T细胞/CD64上调	CD8+T细胞/CD64上调
BisslgG_21#CD3-MABopt-cc	CD3-MABopt_cc	n.a	n.a.	30,1	4,9	10348	45145	9,8	是	是
BisslgG_21#CD3-MABdeimm_1	CD3-MAB$_{deimm_1}$	91,2	78,9	10,8	6,3	5025	35088	17,9	否	否
BisslgG_21#CD3-MABdeimm_2	CD3-MAB$_{deimm_2}$	87,0	90,3	10,2	6,0	7993	32409	10,5	否	否
BisslgG_21#CD3-MABdeimm_3	CD3-MAB$_{deimm_3}$	91,9	86,0	10,8	5,0	5680	36813	13,1	否	否
BisslgG_21#CD3-MABdeimm_4	CD3-MAB$_{deimm_4}$	91,8	73,6	8,3	3,9	4750	39388	10,9	否	否
BisslgG_21#CD3-MABdeimm_5	CD3-MAB$_{deimm_5}$	91,8	74,3	10,5	6,0	7592	37235	19,0	否	否

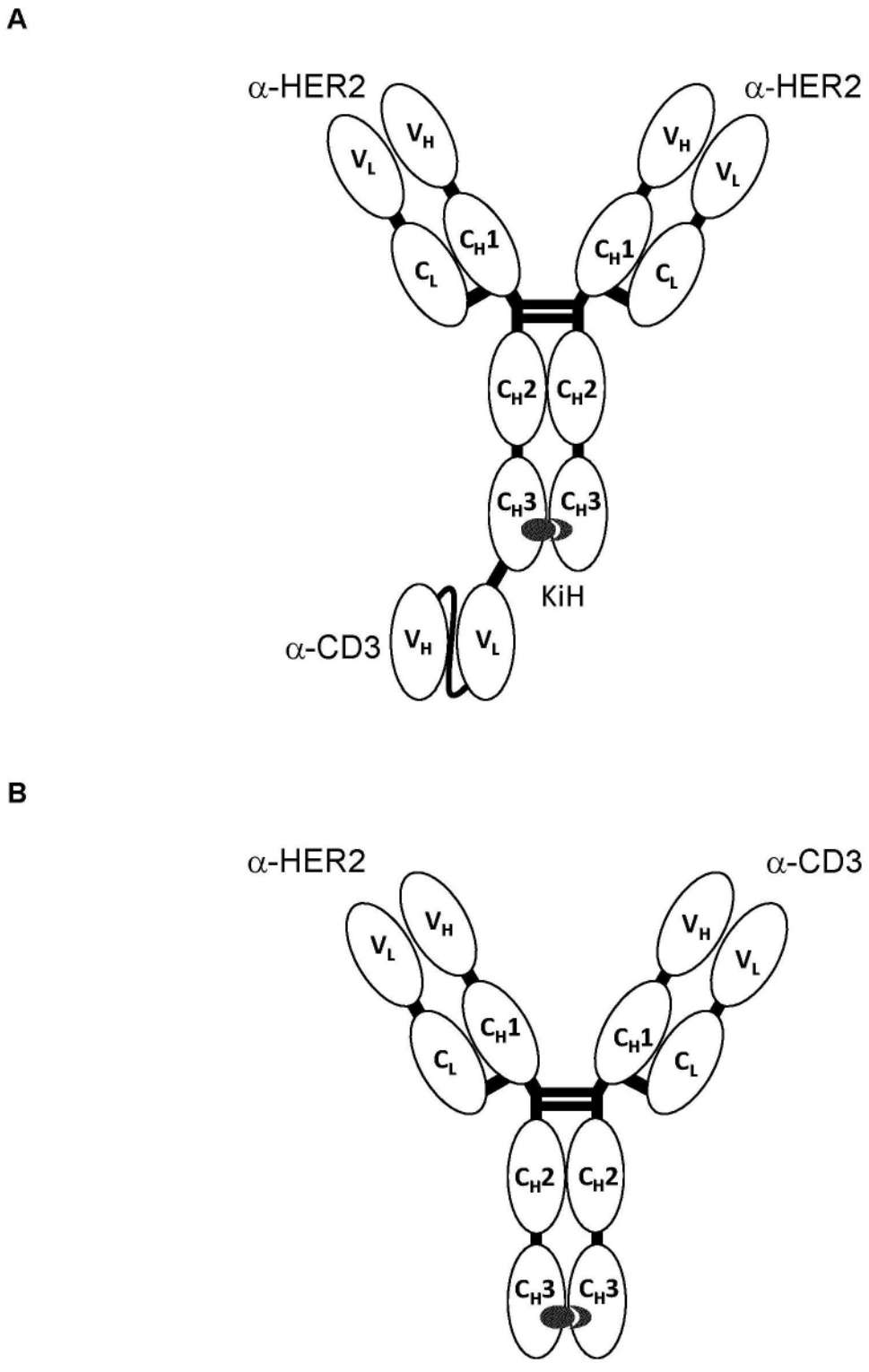


图1

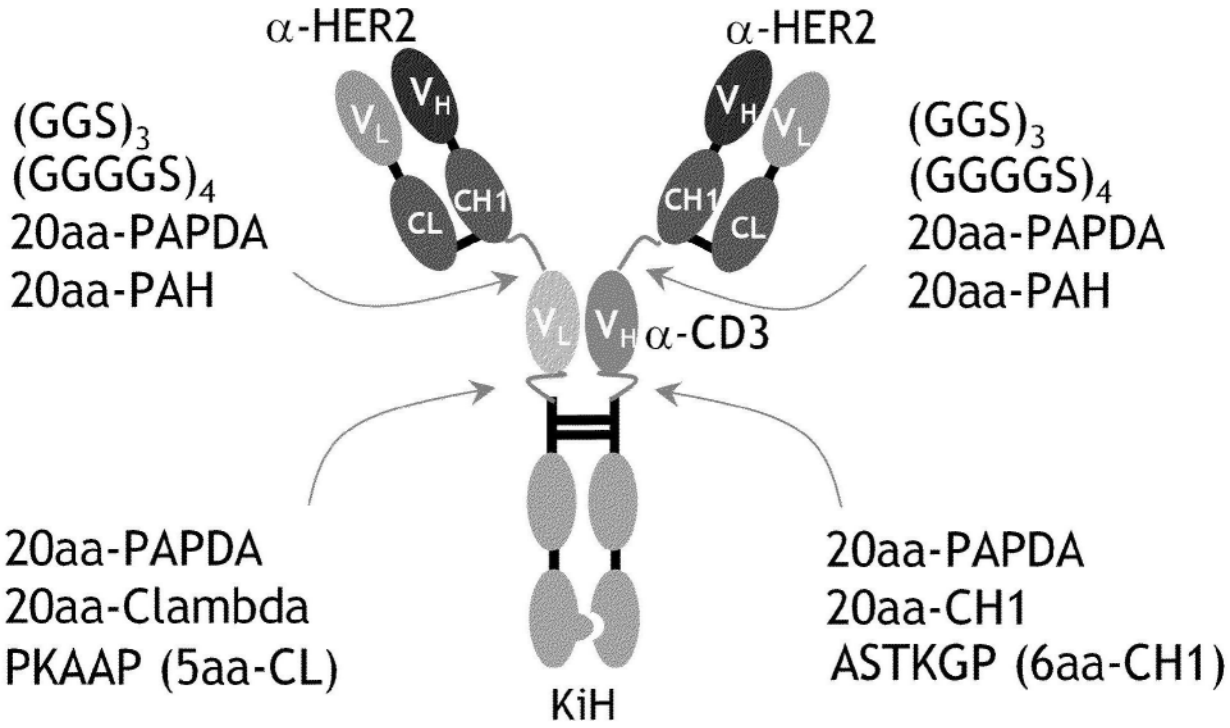

α-HER2
α-HER2
(GGS)3
(GGGGS)4
20aa-PAPDA
20aa-PAH
(GGS)3
(GGGGS)4
20aa-PAPDA
20aa-PAH
VL
VH
CH1
CL
VH
VL
CH1
CL
VL
VH
α-CD3
20aa-PAPDA
20aa-Clambda
PKAAP (5aa-CL)
20aa-PAPDA
20aa-CH1
ASTKGP (6aa-CH1)
KiH

图2

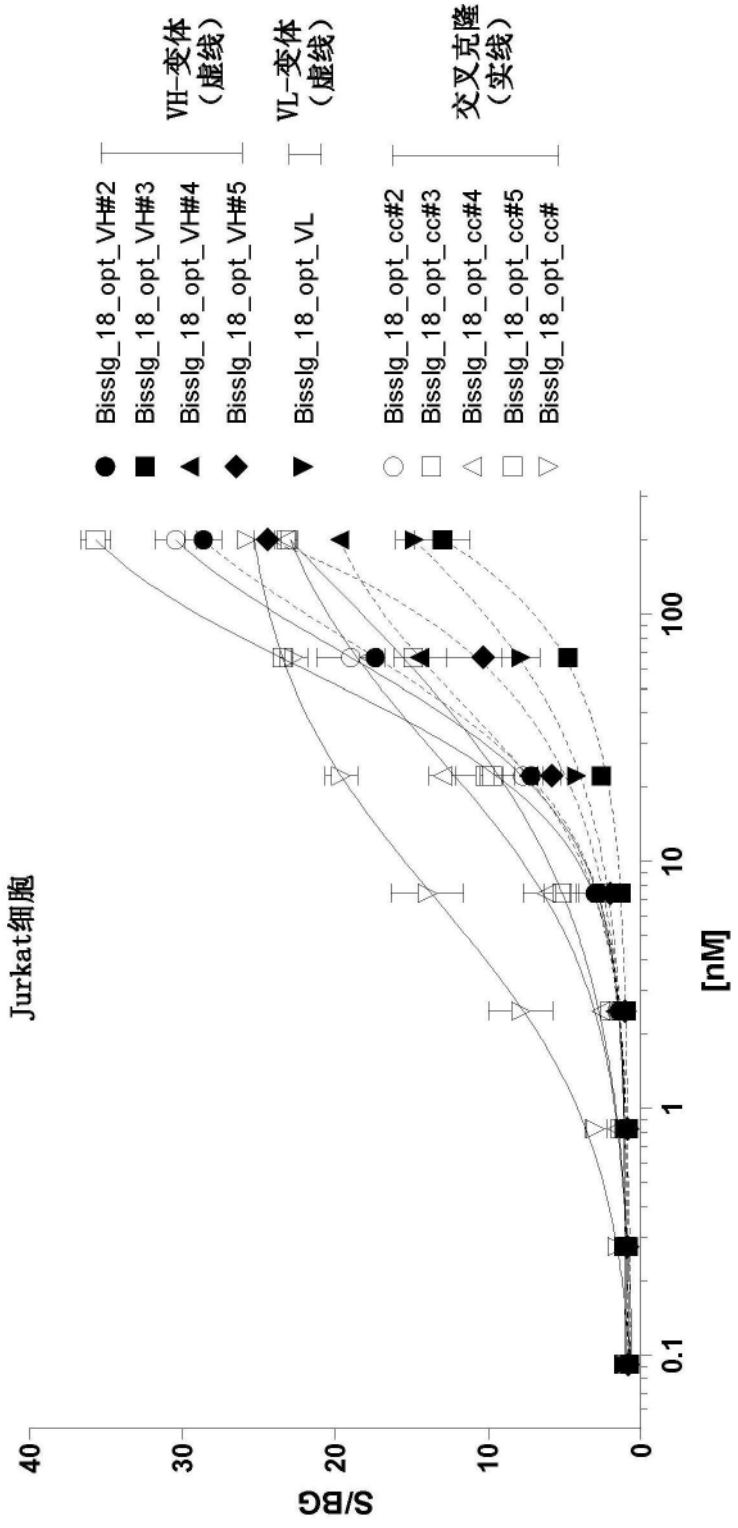

VH-变体（虚线）
VL-变体（虚线）
交叉克隆（实线）
Bisslg_18_opt_VH#2
Bisslg_18_opt_VH#3
Bisslg_18_opt_VH#4
Bisslg_18_opt_VH#5
Bisslg_18_opt_VL
Bisslg_18_opt_cc#2
Bisslg_18_opt_cc#3
Bisslg_18_opt_cc#4
Bisslg_18_opt_cc#5
Bisslg_18_opt_cc#
Jurkat细胞
S/BG
0
10
20
30
40
0.1
1
10
100
[nM]

图3

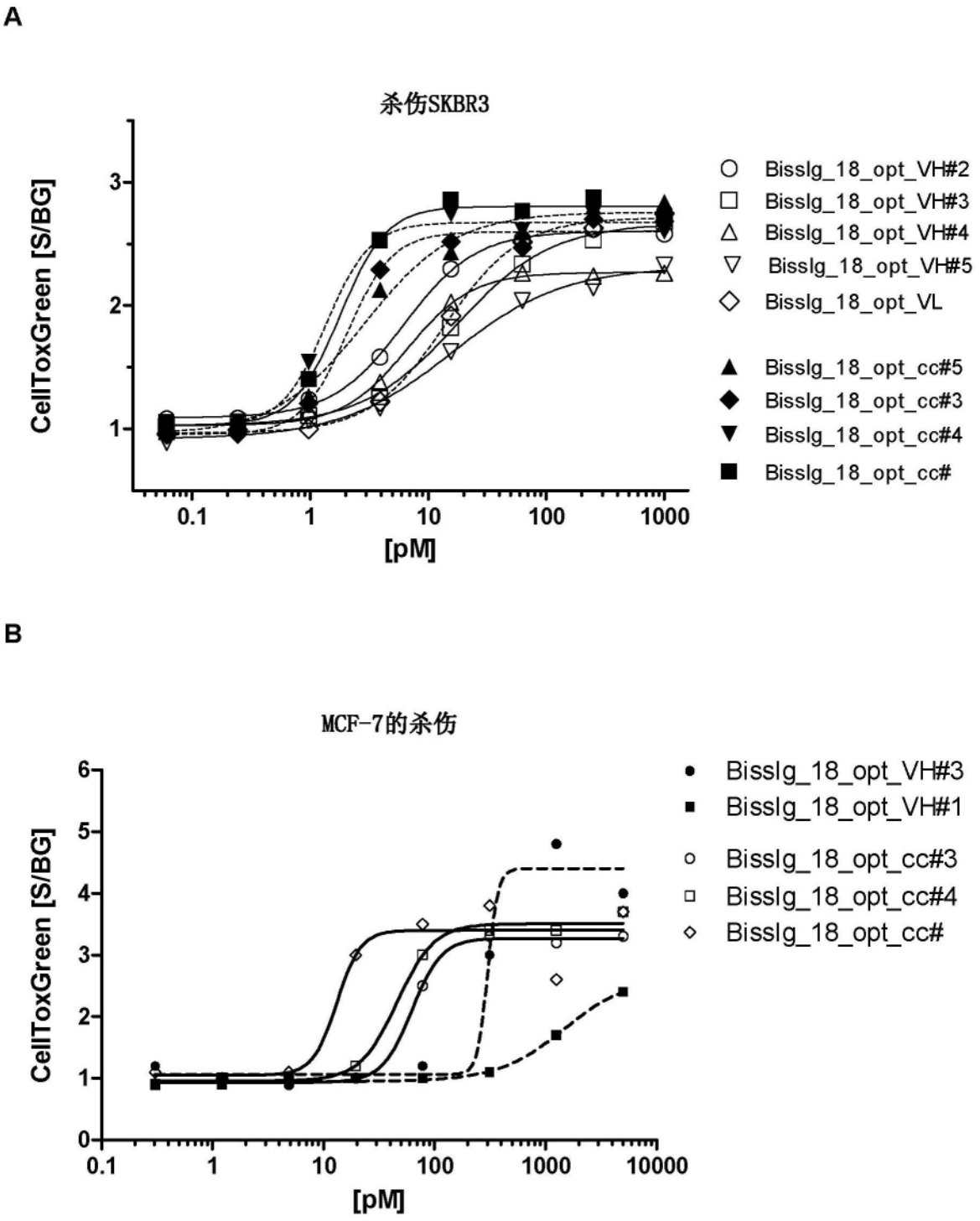

A
杀伤SKBR3
CellToxGreen [S/BG]
[pM]
Bisslg_18_opt_VH#2
Bisslg_18_opt_VH#3
Bisslg_18_opt_VH#4
Bisslg_18_opt_VH#5
Bisslg_18_opt_VL
Bisslg_18_opt_cc#5
Bisslg_18_opt_cc#3
Bisslg_18_opt_cc#4
Bisslg_18_opt_cc#
B
MCF-7的杀伤
CellToxGreen [S/BG]
[pM]
Bisslg_18_opt_VH#3
Bisslg_18_opt_VH#1
Bisslg_18_opt_cc#3
Bisslg_18_opt_cc#4
Bisslg_18_opt_cc#

图4

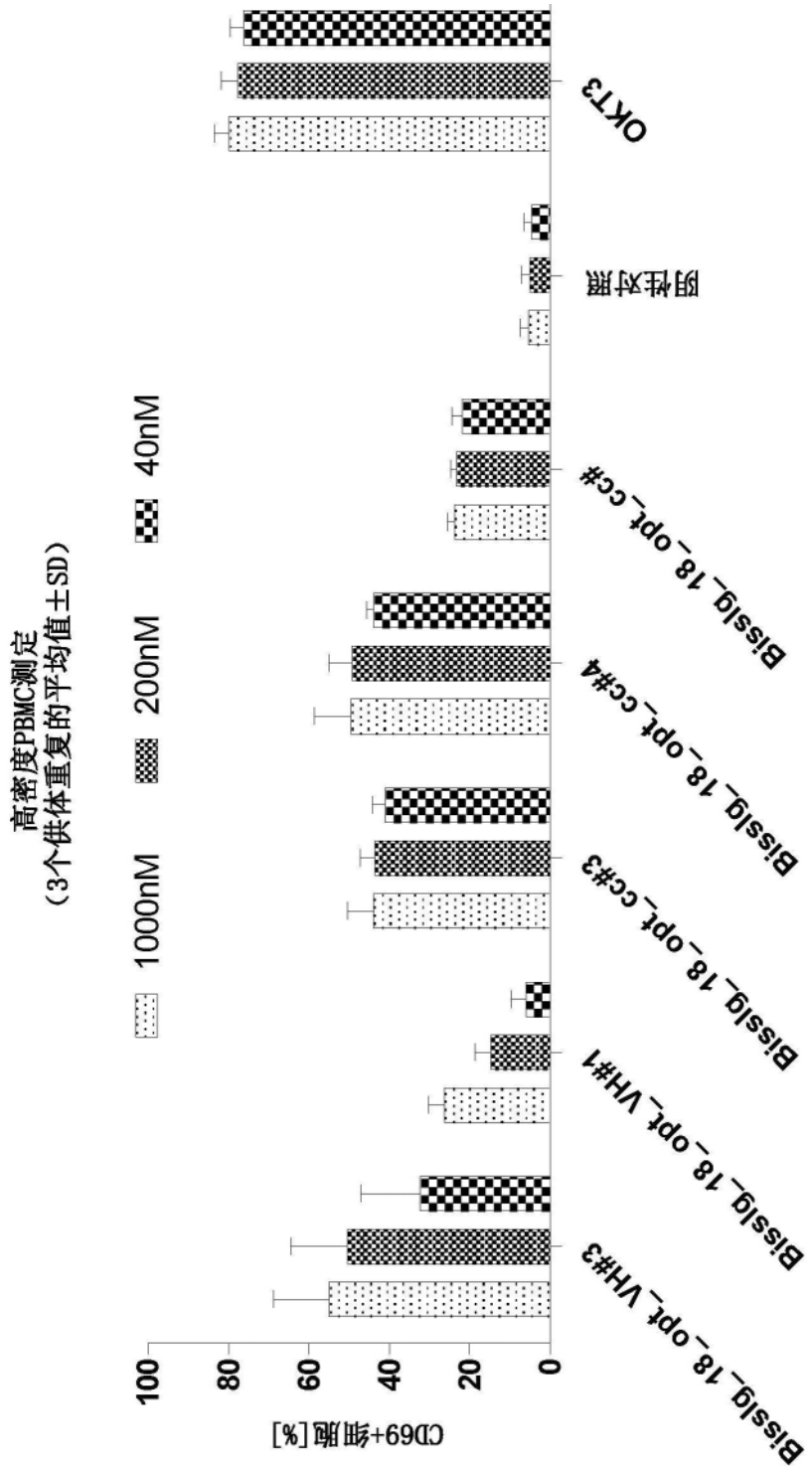

高密度PBMC测定
（3个供体重复的平均值±SD）
1000nM
200nM
40nM
CD69+细胞[%]
0
20
40
60
80
100
Bissig_18_opt_VH#3
Bissig_18_opt_VH#1
Bissig_18_opt_cc#3
Bissig_18_opt_cc#4
Bissig_18_opt_cc#
阴性对照
OKT3

图5

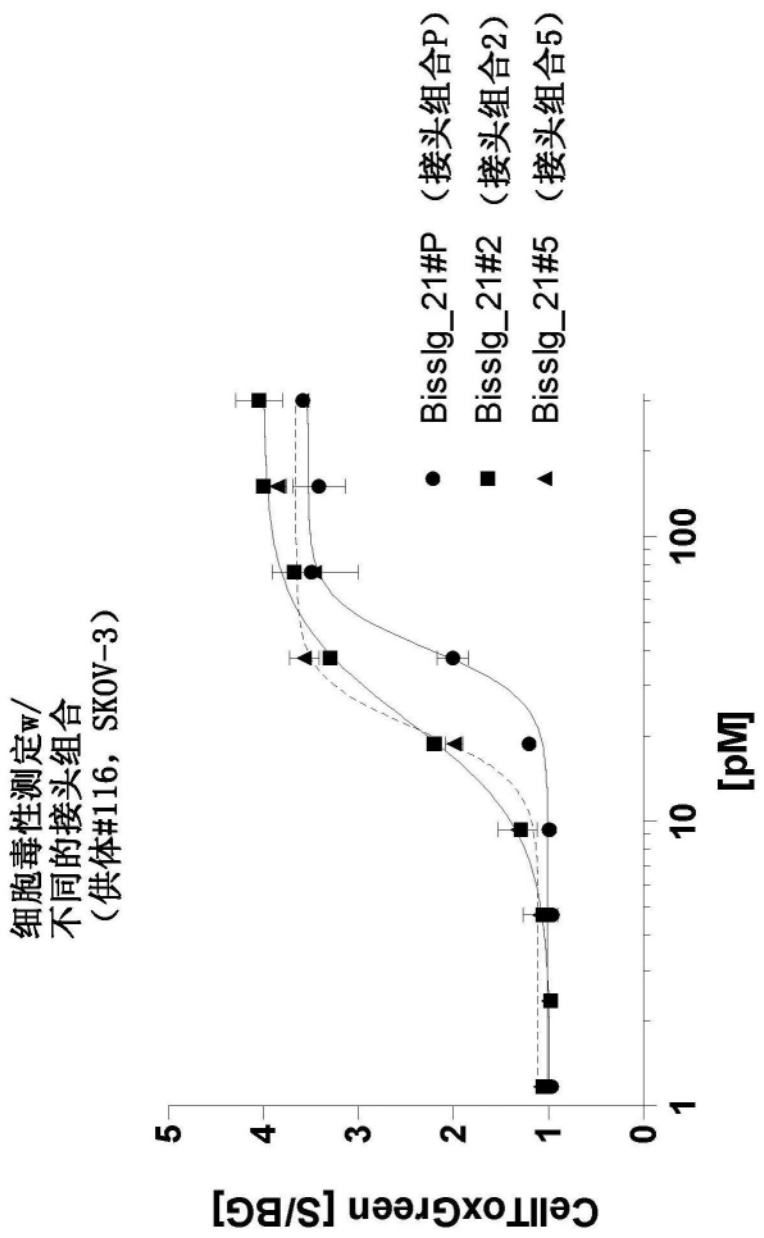
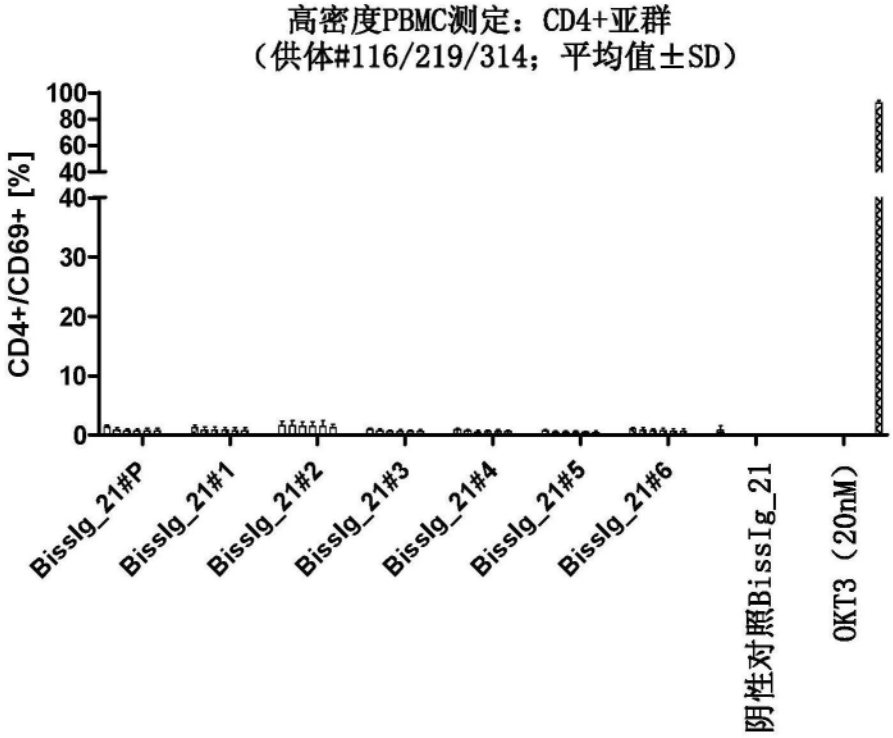

细胞毒性测定w/
不同的接头组合
（供体#116，SKOV-3）
CellToxGreen [S/BG]
0
1
2
3
4
5
1
10
100
[pM]
Bisslg_21#P （接头组合P）
Bisslg_21#2 （接头组合2）
Bisslg_21#5 （接头组合5）

图6

A


高密度PBMC测定：CD4+亚群
（供体#116/219/314；平均值±SD）
CD4+/CD69+ [%]
100
80
60
40
40
30
20
10
0
BisslG_21#P
BisslG_21#1
BisslG_21#2
BisslG_21#3
BisslG_21#4
BisslG_21#5
BisslG_21#6
阴性对照BissIg_21
OKT3（20nM）

B

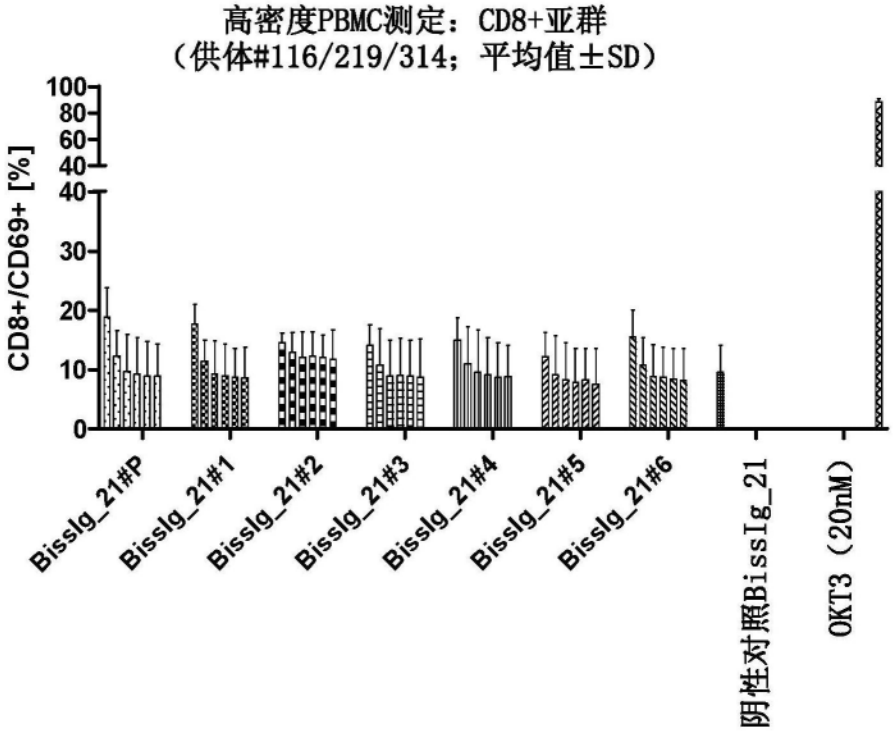

高密度PBMC测定：CD8+亚群
（供体#116/219/314；平均值±SD）
CD8+/CD69+ [%]
100
80
60
40
40
30
20
10
0
BisslG_21#P
BisslG_21#1
BisslG_21#2
BisslG_21#3
BisslG_21#4
BisslG_21#5
BisslG_21#6
阴性对照BissIg_21
OKT3（20nM）

图7

VH_HCDR3_ 亲本																	
Pos.	肽	同种异型（名称，%）														风险评分	H-线
		DRB1*01:01	DRB1*01:02	DRB1*03:01	DRB1*04:01	DRB1*04:04	DRB1*07:01	DRB1*08:01	DRB1*11:01	DRB1*11:04	DRB1*12:01/12:06/12:10	DRB1*13:01	DRB1*13:02	DRB1*14:01/14:54	DRB1*15:01	DRB1*16:01	
		15	4	24	16	6	23	5	12	6	3	11	8	5	25	5	
90	DTAVYYCARG																-
91	TAVYYCARGY																-
92	AVYYCARGYS														M		24,5	H
93	VYYCARGYSA			M		M			M	S				S			51,9	H
94	YYCARGYSAE	S	M				M										42,1	H
95	YCARGYSAEF							M									4,9	H
96	CARGYSAEFA																	H
97	ARGYSAEFAH														M		24,5	H
98	RGYSAEFAHR																	-
99	GYSAEFAHRS																	-
100	YSAEFAHRSG	M															15	-
101	SAEFAHRSGL																	-
102	AEFAHRSGLD										M						3,3	-
103	EFAHRSGLDV																	-
104	FAHRSGLDVW	M															15	-
105	AHRSGLDVWG																	-
106	HRSGLDVWGQ																	-
107	RSGLDVWGQG																	-
108	SGLDVWGQGT																	-
109	GLDVWGQGTL																	-
110	LDVWGQGTLV										M				M		27,8	H
111	DVWGQGTLVT																	H
112	VWGQGTLVTV		M		M	M								M	M	M	60,3	H

图8

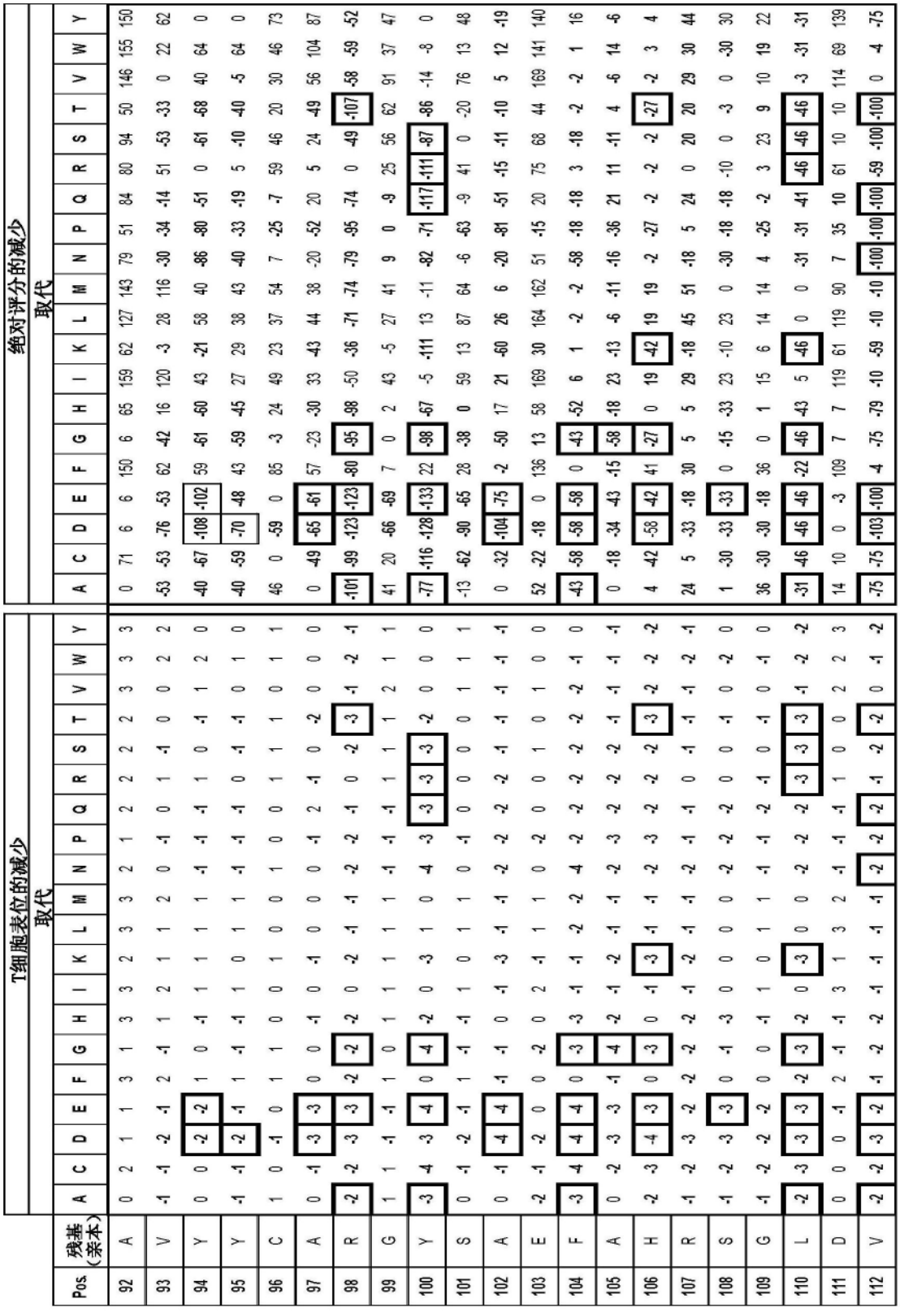


图9

单点突变	突变的热点区	减少H-线	SEC单体含量[%]	每单位纯化培养物的产量[mg/L]	对huCD3e进行ELISA的EC_{50} est. [nM]	所有测试的浓度的S/BG的ELISA总和[S/BG]	动力学huCD3e K_D [nM]	组合变体Epibase分析
wt（亲本）	wt	n.a.	87.50	44,7	10,9	283	5,4	是
VL_R94A	LCDR3	-2	87.70	53,7	14,9	197	12	否
VL_R94Q	LCDR3	-3	88.60	41,8	9,4	216	9,5	否
VL_S95D	LCDR3	-4	89.10	47,7	9,6	190	7,8	否
VL_S95E	LCDR3	-4	89.20	44,7	8,1	227	6,4	否
VL_L96Q	LCDR3	-3	86.70	38,8	13,7	144	8	否
VH_Y33W	HCDR1	-1	90,00	47,7	18,7	171	6,6	是
VH_Y56A	HCDR2_2	-4	90.60	56,7	13,5	277	7	否
VH_Y56E	HCDR2_2	-5	90.80	50,7	9,9	215	9,4	否
VH_Y56S	HCDR2_2	-4	90.70	53,7	6,0	318	5,2	是
VH_Y56T	HCDR2_2	-4	90.30	53,7	6,0	306	5,3	是
VH_S57E	HCDR2_2	-2	86.30	23,9	10,0	210	8,8	否
VH_S57T	HCDR2_2	-2	89,00	50,7	5,6	279	5,1	否
VH_S58T	HCDR2_2	-1	88.90	8,9	2,6	329	5,6	否
VH_V61A	HCDR2_2	-3	89.90	50,7	4,5	439	3,3	是
VH_V61D	HCDR2_2	-6	90.10	38,8	6,4	338	4,4	是
VH_V61E	HCDR2_2	-6	89.60	44,7	6,7	291	4,4	是
VH_V61G	HCDR2_2	-5	89.10	47,7	6,6	341	4	是
VH_A102D	HCDR3_1	-4	88.80	44,7	7,0	285	7,4	是
VH_A102E	HCDR3_1	-4	87.80	38,8	7,0	310	5,9	是
VH_F104A	HCDR3_2	-3	88.40	32,8	11,3	219	6,3	是
VH_A105G	HCDR3_2	-4	89.90	44,7	18,4	109	13	是
VH_H106G	HCDR3_2	-3	88.80	20,9	13,4	203	6,7	是
VH_H106K	HCDR3_2	-3	85.90	38,8	7,2	236	5,2	是
VH_H106T	HCDR3_2	-3	87.40	50,7	6,6	256	5,1	是

图10

组合变体	突变区							EpiBase™ 筛选			
	HCDR1	HCDR2		HCDR3a	HCDR3b			Δ 绝对评分	Δ 热点	Δ 绝对 H-评分	Δ 绝对 H-线
	33	56	61	102	104	105	106				
wt/（亲本）	Y33	Y56	V61	A102	104F	105A	106H	653	6	580	25
var_c198	Y33W	wt	V61D	wt	wt	wt	wt	-200,8	-3	-248,6	-12
var_c199	Y33W	wt	V61D	wt	F104A	wt	wt	-243,6	-3	-273,1	-14
var_c200	Y33W	wt	V61D	wt	wt	A105G	wt	-258,6	-3	-273,1	-14
var_c201	Y33W	wt	V61D	wt	wt	wt	H106G	-227,4	-3	-273,1	-14
var_c202	Y33W	wt	V61D	wt	wt	wt	H106K	-242,4	-3	-273,1	-14
var_c203	Y33W	wt	V61D	wt	wt	wt	H106T	-227,4	-3	-273,1	-14
var_c204	Y33W	wt	V61D	A102D	wt	wt	wt	-305,2	-3	-334,7	-15
var_c205	Y33W	wt	V61D	A102D	F104A	wt	wt	-320,2	-3	-334,7	-15
var_c206	Y33W	wt	V61D	A102D	wt	A105G	wt	-320,2	-3	-334,7	-15
var_c207	Y33W	wt	V61D	A102D	wt	wt	H106G	-320,2	-3	-334,7	-15
var_c208	Y33W	wt	V61D	A102D	wt	wt	H106K	-320,2	-3	-334,7	-15
var_c209	Y33W	wt	V61D	A102D	wt	wt	H106T	-320,2	-3	-334,7	-15
var_c210	Y33W	wt	V61D	A102E	wt	wt	wt	-275,6	-3	-305,1	-15
var_c211	Y33W	wt	V61D	A102E	F104A	wt	wt	-290,6	-3	-305,1	-15
var_c212	Y33W	wt	V61D	A102E	wt	A105G	wt	-290,6	-3	-305,1	-15
var_c213	Y33W	wt	V61D	A102E	wt	wt	H106G	-290,6	-3	-305,1	-15
var_c214	Y33W	wt	V61D	A102E	wt	wt	H106K	-290,6	-3	-305,1	-15
var_c215	Y33W	wt	V61D	A102E	wt	wt	H106T	-290,6	-3	-305,1	-15
var_c216	Y33W	wt	V61E	wt	wt	wt	wt	-200,8	-3	-248,6	-12
var_c217	Y33W	wt	V61E	wt	F104A	wt	wt	-243,6	-3	-273,1	-14
var_c218	Y33W	wt	V61E	wt	wt	A105G	wt	-258,6	-3	-273,1	-14
var_c219	Y33W	wt	V61E	wt	wt	wt	H106G	-227,4	-3	-273,1	-14
var_c220	Y33W	wt	V61E	wt	wt	wt	H106K	-242,4	-3	-273,1	-14
var_c221	Y33W	wt	V61E	wt	wt	wt	H106T	-227,4	-3	-273,1	-14
var_c222	Y33W	wt	V61E	A102D	wt	wt	wt	-305,2	-3	-334,7	-15
var_c223	Y33W	wt	V61E	A102D	F104A	wt	wt	-320,2	-3	-334,7	-15
var_c224	Y33W	wt	V61E	A102D	wt	A105G	wt	-320,2	-3	-334,7	-15
var_c225	Y33W	wt	V61E	A102D	wt	wt	H106G	-320,2	-3	-334,7	-15
var_c226	Y33W	wt	V61E	A102D	wt	wt	H106K	-320,2	-3	-334,7	-15
var_c227	Y33W	wt	V61E	A102D	wt	wt	H106T	-320,2	-3	-334,7	-15
var_c228	Y33W	wt	V61E	A102E	wt	wt	wt	-275,6	-3	-305,1	-15
var_c229	Y33W	wt	V61E	A102E	F104A	wt	wt	-290,6	-3	-305,1	-15
var_c230	Y33W	wt	V61E	A102E	wt	A105G	wt	-290,6	-3	-305,1	-15
var_c231	Y33W	wt	V61E	A102E	wt	wt	H106G	-290,6	-3	-305,1	-15
var_c232	Y33W	wt	V61E	A102E	wt	wt	H106K	-290,6	-3	-305,1	-15
var_c233	Y33W	wt	V61E	A102E	wt	wt	H106T	-290,6	-3	-305,1	-15
var_c234	Y33W	wt	V61G	wt	wt	wt	wt	-185,8	-3	-248,6	-12
var_c235	Y33W	wt	V61G	wt	F104A	wt	wt	-228,6	-3	-273,1	-14
var_c236	Y33W	wt	V61G	wt	wt	A105G	wt	-243,6	-3	-273,1	-14
var_c237	Y33W	wt	V61G	wt	wt	wt	H106G	-212,4	-3	-273,1	-14
var_c238	Y33W	wt	V61G	wt	wt	wt	H106K	-227,4	-3	-273,1	-14
var_c239	Y33W	wt	V61G	wt	wt	wt	H106T	-212,4	-3	-273,1	-14
var_c240	Y33W	wt	V61G	A102D	wt	wt	wt	-290,2	-3	-334,7	-15
var_c241	Y33W	wt	V61G	A102D	F104A	wt	wt	-305,2	-3	-334,7	-15
var_c242	Y33W	wt	V61G	A102D	wt	A105G	wt	-305,2	-3	-334,7	-15
var_c243	Y33W	wt	V61G	A102D	wt	wt	H106G	-305,2	-3	-334,7	-15
var_c244	Y33W	wt	V61G	A102D	wt	wt	H106K	-305,2	-3	-334,7	-15
var_c245	Y33W	wt	V61G	A102D	wt	wt	H106T	-305,2	-3	-334,7	-15
var_c246	Y33W	wt	V61G	A102E	wt	wt	wt	-260,6	-3	-305,1	-15
var_c247	Y33W	wt	V61G	A102E	F104A	wt	wt	-275,6	-3	-305,1	-15
var_c248	Y33W	wt	V61G	A102E	wt	A105G	wt	-275,6	-3	-305,1	-15
var_c249	Y33W	wt	V61G	A102E	wt	wt	H106G	-275,6	-3	-305,1	-15
var_c250	Y33W	wt	V61G	A102E	wt	wt	H106K	-275,6	-3	-305,1	-15
var_c251	Y33W	wt	V61G	A102E	wt	wt	H106T	-275,6	-3	-305,1	-15

图11

	突变的热点区				Epibase™ 筛选				产物	结合		功能活性	
组合变体	HCDR1	HCDR2	HCDR3a	HCDR3b	Δ 绝对评分	Δ 热点	Δ 绝对 H-评分	Δ 绝对 H-线	SEC 单体含量[%]	ELISA EC50 [nM] hCD3e	动力学 KD [nM] hCD3e	RGA (SKOV-3) 信号/BG	
												50nM	0.5nM
wt	wt	wt	wt	wt	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	30,1	4,9	45145	10348
var_c114	wt	V61G	A102D	wt	-245	-2	-245	-11	87	10,2	6,0	32409	7993
var_c118	wt	V61G	A102D	H106K	-260	-2	-245	-11	91,8	10,5	6,0	37235	7592
var_c96	wt	V61E	A102D	wt	-260	-2	-245	-11	89,6	10,1	6,8	26417	6536
var_c78	wt	V61D	A102D	wt	-260	-2	-245	-11	87,5	13,4	6,3	26758	6486
var_c119	wt	V61G	A102D	H106T	-260	-2	-245	-11	91,9	10,8	5,0	36813	5680
var_c240	Y33W	V61G	A102D	wt	-290	-3	-335	-15	90,2	15,4	7,8	35160	5028
var_c102	wt	V61E	A102E	wt	-230	-2	-215	-11	91,2	10,8	6,3	35088	5025
var_c89	wt	V61D	A102E	H106T	-245	-2	-215	-11	89,2	16,3	11,0	26196	4815
var_c124	wt	V61G	A102E	H106K	-230	-2	-215	-11	88,4	18,2	8,0	30771	4760
var_c120	wt	V61G	A102E	wt	-215	-2	-215	-11	91,8	8,3	3,9	39388	4750
var_c84	wt	V61D	A102E	wt	-230	-2	-215	-11	89,3	10,6	5,8	30354	4684
var_c125	wt	V61G	A102E	H106T	-230	-2	-215	-11	88	10,8	9,6	30721	4049
var_c117	wt	V61G	A102D	H106G	-260	-2	-245	-11	90,6	17,8	8,1	24615	3329
var_c246	Y33W	V61G	A102E	wt	-261	-3	-305	-15	n.a.	21,5	7,7	31833	3277
var_c107	wt	V61E	A102E	H106T	-245	-2	-215	-11	90,2	22,3	7,3	21083	2878
var_c115	wt	V61G	A102D	F104A	-260	-2	-245	-11	91,3	16,4	7,9	25488	2728
var_c97	wt	V61E	A102D	F104A	-275	-2	-245	-11	90,3	15,0	9,5	17487	2573
var_c106	wt	V61E	A102E	H106K	-245	-2	-215	-11	90,8	18,4	9,0	24108	2433
var_c88	wt	V61D	A102E	H106K	-245	-2	-215	-11	89,6	14,1	7,3	24540	2363
var_c241	Y33W	V61G	A102D	F104A	-305	-3	-335	-15	88,7	15,7	10,0	28739	2307
var_c101	wt	V61E	A102D	H106T	-275	-2	-245	-11	89,9	9,6	8,0	24690	2123
var_c237	Y33W	V61G	wt	H106G	-212	-3	-273	-14	90,9	27,5	7,9	20839	2026
var_c100	wt	V61E	A102D	H106K	-275	-2	-245	-11	90,3	15,6	10,0	20044	1963
var_c210	Y33W	V61D	A102E	wt	-276	-3	-305	-15	91,4	11,5	11,0	23892	1928
var_c190	Y33W	V61A	A102D	H106K	-200	-2	-277	-12	89,9	23,0	8,8	25368	1808
var_c82	wt	V61D	A102D	H106K	-275	-2	-245	-11	89,4	11,4	9,1	21790	1803
var_c205	Y33W	V61D	A102D	F104A	-320	-3	-335	-15	89,6	22,0	11,0	21524	1728
var_c228	Y33W	V61E	A102E	wt	-276	-3	-305	-15	91,7	28,9	10,0	27263	1706
var_c87	wt	V61D	A102E	H106G	-245	-2	-215	-11	89,7	12,9	10,0	20616	1583
var_c121	wt	V61G	A102E	F104A	-230	-2	-215	-11	88,3	11,9	11,0	25699	1528
var_c85	wt	V61D	A102E	F104A	-245	-2	-215	-11	89,4	16,5	11,0	19242	1293
var_c204	Y33W	V61D	A102D	wt	-305	-3	-335	-15	89,9	21,7	8,7	25498	1198
var_c208	Y33W	V61D	A102D	H106K	-320	-3	-335	-15	90,9	21,9	10,0	16920	448

图12

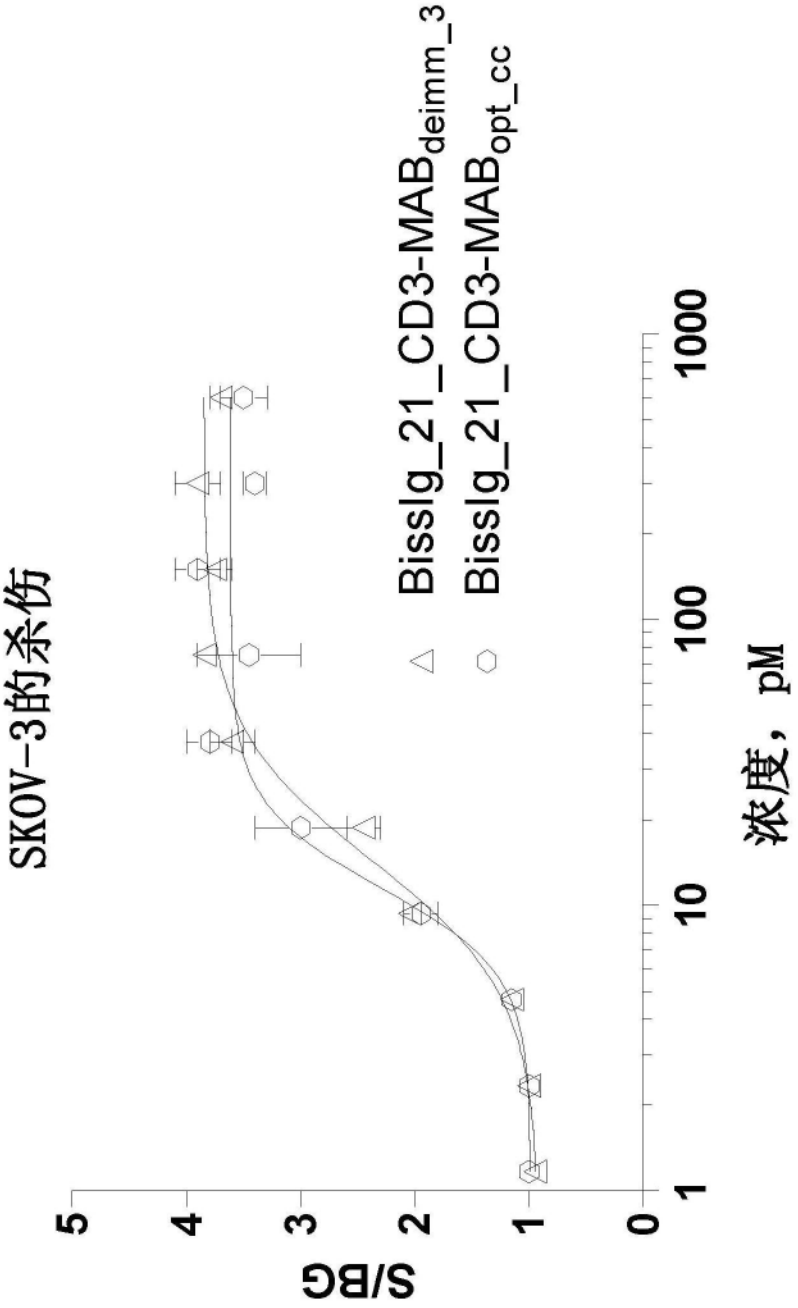
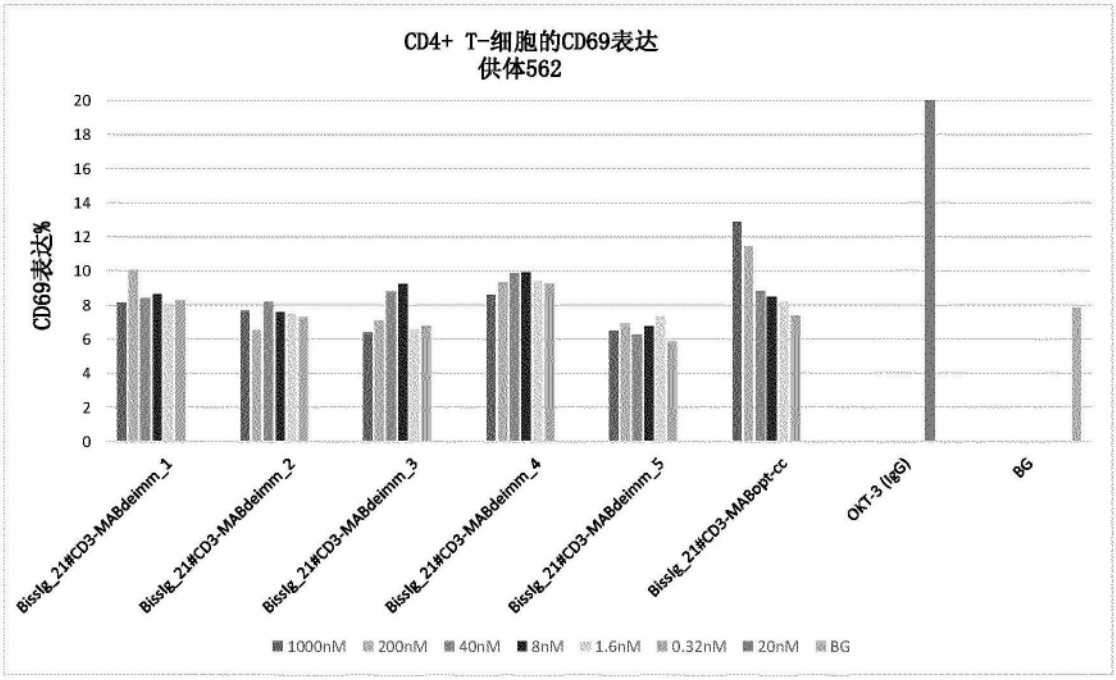

SKOV-3的杀伤
S/BG
0
1
2
3
4
5
1
10
100
1000
浓度，pM
Bisslg_21_CD3-MABdeimm_3
Bisslg_21_CD3-MABopt_cc

图13

A


CD4+ T-细胞的CD69表达
供体562
CD69表达%
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_1
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_2
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_3
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_4
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_5
Bisslg_21#CD3-MABopt-cc
OKT-3 (IgG)
BG
1000nM
200nM
40nM
8nM
1.6nM
0.32nM
20nM
BG

B

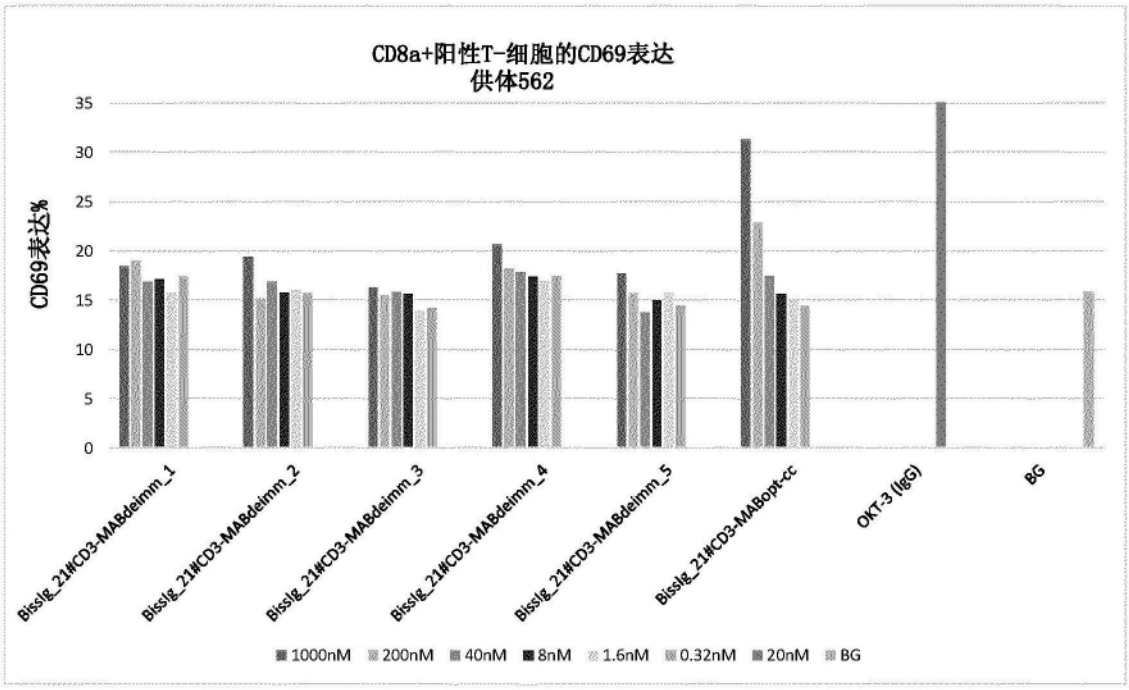

CD8a+阳性T-细胞的CD69表达
供体562
CD69表达%
35
30
25
20
15
10
5
0
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_1
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_2
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_3
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_4
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_5
Bisslg_21#CD3-MABopt-cc
OKT-3 (IgG)
BG
1000nM
200nM
40nM
8nM
1.6nM
0.32nM
20nM
BG

图14