



(21)申請案號：105131767

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 09 月 30 日

(51)Int. Cl. : *C07K16/28 (2006.01)* *C07K16/40 (2006.01)*
C12N15/13 (2006.01) *C12N15/63 (2006.01)*
A61K39/395 (2006.01) *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2015/10/02 歐洲專利局 15188037.4

(71)申請人：赫孚孟拉羅股份公司 (瑞士) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)
瑞士

(72)發明人：貝卡克 瑪莉娜 BACAC, MARINA (IT)；哈福 湯瑪士 HOFER, THOMAS (CH)；因霍夫 俊 沙賓 IMHOF-JUNG, SABINE (DE)；克萊 克莉絲汀 KLEIN, CHRISTIAN (DE)；克勞斯特曼 史蒂芬 KLOSTERMANN, STEFAN (DE)；莫賀 傑 麥可 MOLHOJ, MICHAEL (DK)；那亞克 達邦 NAYAK, TAPAN (IN)；瑞古拉 喬傑 湯瑪斯 REGULA, JOERG THOMAS (DE)；渥夫干 斯克佛 SCHAEFER, WOLFGANG (DE)；優瑪那 帕伯羅 UMANA, PABLO (CR)；溫瑟爾 蒂娜 WEINZIERL, TINA (DE)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：63 項 圖式數：14 共 203 頁

(54)名稱

雙特異性 T 細胞活化抗原結合分子

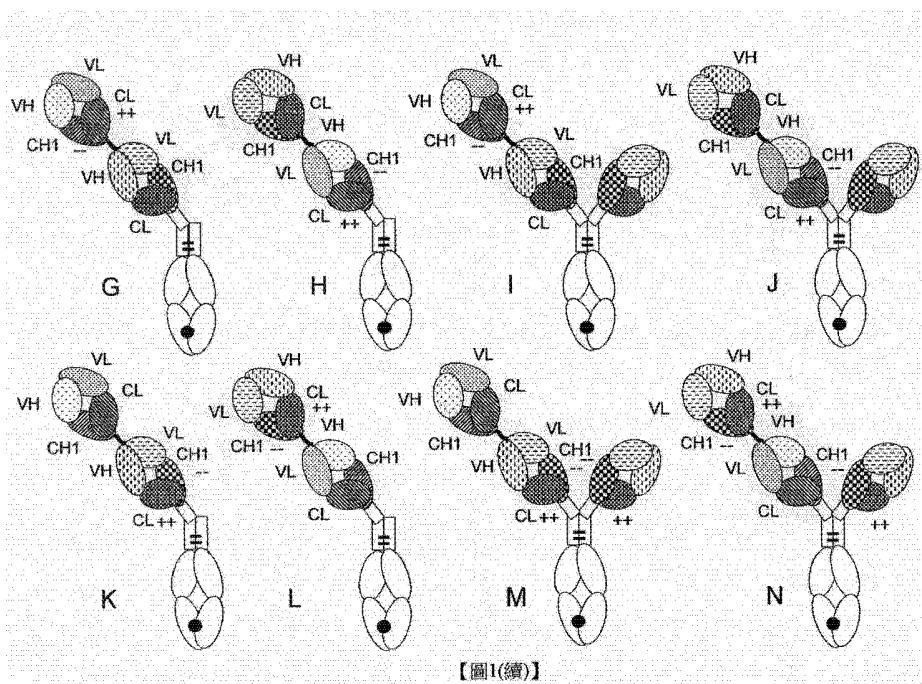
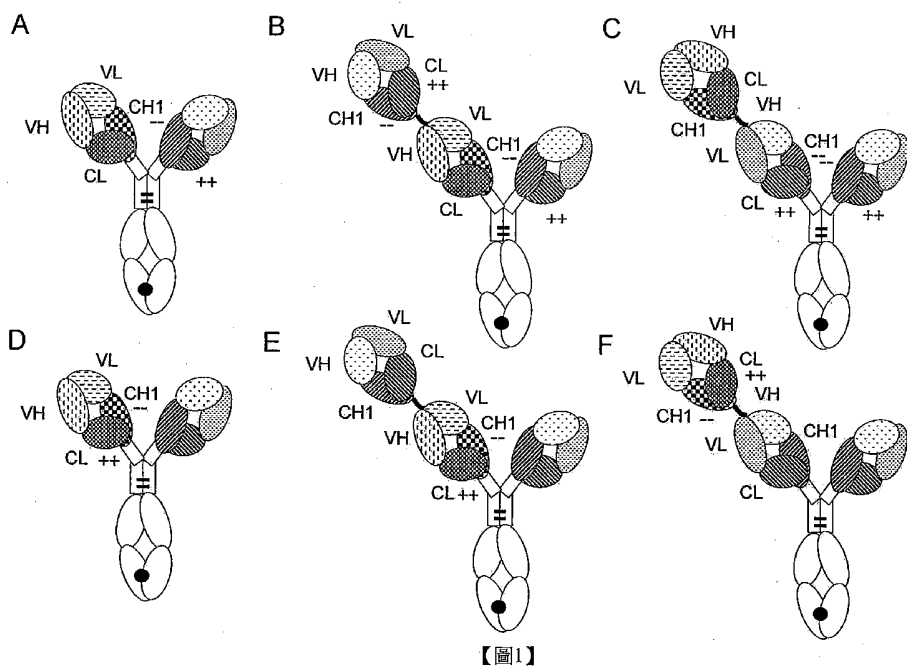
BISPECIFIC T CELL ACTIVATING ANTIGEN BINDING MOLECULES

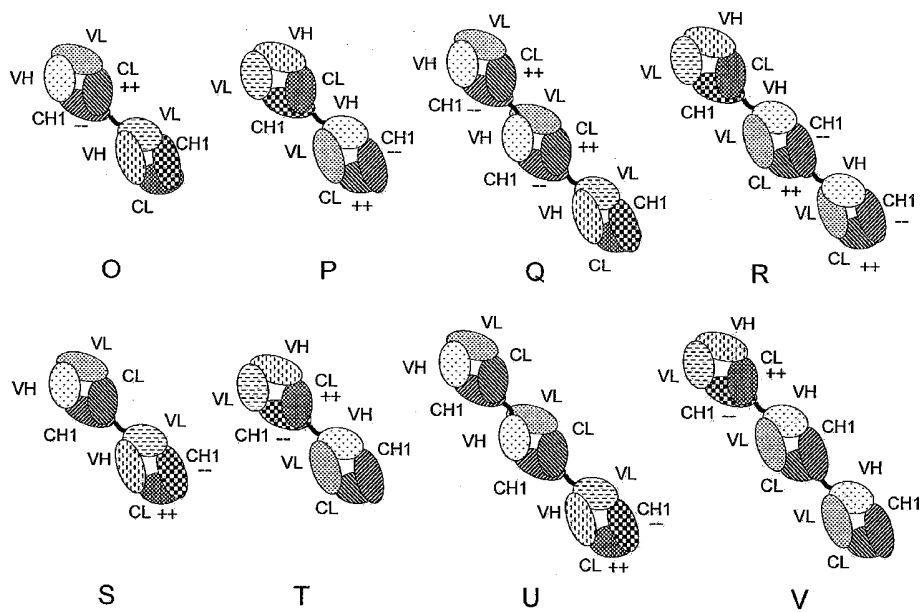
(57)摘要

本發明大體上係關於用於 T 細胞活化及使其再定向至特定靶細胞的新穎雙特異性抗原結合分子。另外，本發明係關於編碼此類雙特異性抗原結合分子的聚核苷酸，以及包含此類聚核苷酸的載體及宿主細胞。本發明進一步關於製造本發明之雙特異性抗原結合分子的方法，及使用此等雙特異性抗原結合分子治療疾病的方法。

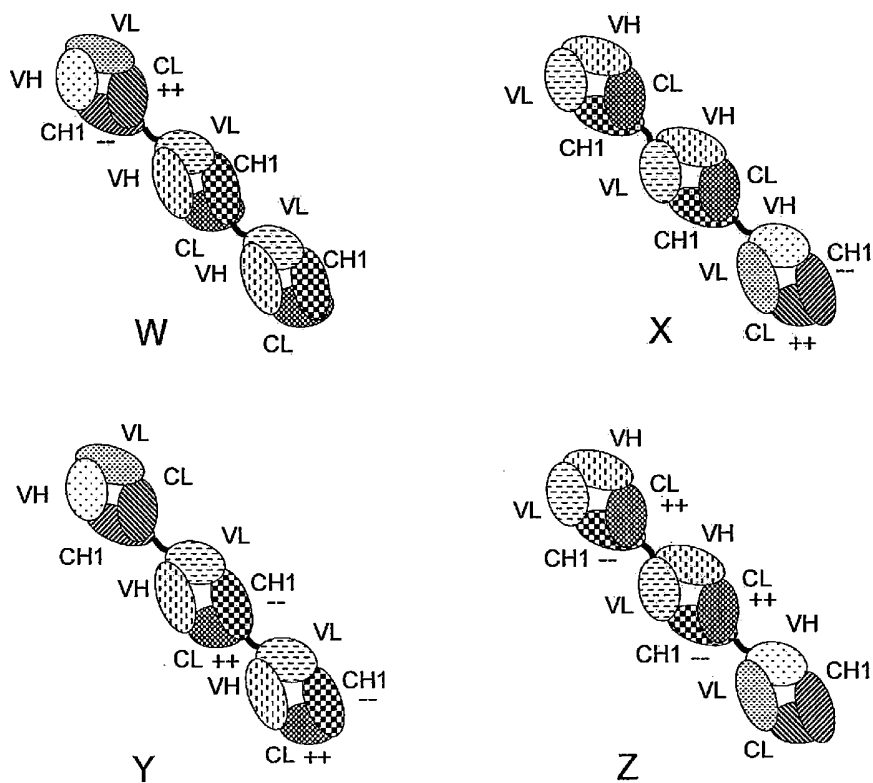
The present invention generally relates to novel bispecific antigen binding molecules for T cell activation and re-direction to specific target cells. In addition, the present invention relates to polynucleotides encoding such bispecific antigen binding molecules, and vectors and host cells comprising such polynucleotides. The invention further relates to methods for producing the bispecific antigen binding molecules of the invention, and to methods of using these bispecific antigen binding molecules in the treatment of disease.

指定代表圖：





【圖1(續)】



【圖1(續)】

【發明說明書】

【中文發明名稱】

雙特異性T細胞活化抗原結合分子

【英文發明名稱】

BISPECIFIC T CELL ACTIVATING ANTIGEN BINDING
MOLECULES

【技術領域】

本發明大體上係關於用於活化T細胞的雙特異性抗原結合分子。另外，本發明係關於編碼此類雙特異性抗原結合分子的聚核苷酸，以及包含此類聚核苷酸的載體及宿主細胞。本發明進一步關於製造本發明之雙特異性抗原結合分子的方法，及使用此等雙特異性抗原結合分子治療疾病的方法。

【先前技術】

多個臨床背景中通常需要選擇性摧毀個別細胞或特定細胞類型。舉例而言，癌症療法的主要目標為特異性地摧毀腫瘤細胞，同時使健康細胞及組織完整且不受損害。

達成此目標的一種有吸引力之方式為誘導針對腫瘤的免疫反應，以使免疫效應細胞(諸如天然殺手(NK)細胞或細胞毒性T淋巴細胞(CTL))攻擊及摧毀腫瘤細胞。CTL構成免疫系統之最強效應細胞，然而其不能藉由習知治療抗體之Fc域介導的效應機制活化。

就此而言，設計成以一個「臂」結合至靶細胞上之表面抗原且以第二「臂」結合至T細胞受體(TCR)複合物之活化非變異組分的雙特異性抗體近年來已變得受人關注。此類抗體同時結合至其兩個標靶將迫使靶細胞

與T細胞之間產生暫時性相互作用，引起任何細胞毒性T細胞活化及隨後靶細胞溶胞。從而使免疫反應再定向至靶細胞且不依賴於靶細胞呈遞肽抗原或不依賴於T細胞之特異性，此與CTL之正常MHC限制性活化有關。在此情形中，關鍵的是，當靶細胞向CTL呈遞雙特異性抗體時，亦即模擬免疫學突觸時，CTL僅被活化。特別需要的是，雙特異性抗體不需要淋巴細胞預處理或共刺激以便誘發靶細胞發生有效溶胞。

已開發出若干種雙特異性抗體形式且已研究其用於T細胞介導之免疫療法的適合性。其中，所謂的BiTE (雙特異性T細胞接合子)分子已得到極充分的表徵且已在臨床中顯示一些前景(評述於Nagorsen及Bäuerle, *Exp Cell Res* 317, 1255-1260 (2011))中。BiTE為串聯scFv分子，其中兩個scFv分子經可撓性連接子融合。針對T細胞接合所評價的其他雙特異性形式包括雙功能抗體(Holliger等人, *Prot Eng* 9, 299-305 (1996))及其衍生物，諸如串聯雙功能抗體(Kipriyanov等人, *J Mol Biol* 293, 41-66 (1999))。最近開發出所謂的DART (雙親和性再靶向)分子，其係基於雙功能抗體形式，但特徵為C端二硫橋鍵以達成額外穩定化(Moore等人, *Blood* 117, 4542-51 (2011))。所謂的特瑞單抗(triomabs)(其為完整的小鼠/大鼠IgG雜交分子且目前亦在臨床試驗中評價)代表一種較大型的形式(評述於Seimetz等人, *Cancer Treat Rev* 36, 458-467 (2010))中。

正開發的多種形式顯示因T細胞再靶向及活化而產生的用於免疫療法中的潛力巨大。然而，產生適於其之雙特異性抗體的任務決非無足輕重的，而是涉及必定遇到的與抗體之功效、毒性、應用性及可製造性有關的多種挑戰。

小構築體(諸如BiTE分子)雖然能夠有效地使效應子與靶細胞交聯，

但其血清半衰期極短，需要藉由連續輸注將其投與患者。另一方面，IgG樣形式雖然具有半衰期長的較大益處，但困擾於與IgG分子固有之原生效應功能相關的毒性。其免疫原性潛在性構成IgG樣雙特異性抗體(尤其是非人類形式)對於成功治療性開發而言之另一不利特徵。最後，雙特異性抗體之一般性開發中的主要挑戰已為生產臨床上足量且足夠純度的雙特異性抗體構築體，原因在於共表現時不同特異性之抗體重鏈與輕鏈發生錯配，使正確組裝之構築體產量降低且產生多種非功能性副產物，所要雙特異性抗體可能難以與此等非功能性副產物分離。

已採用不同方法來克服雙特異性抗體中的鏈結合問題(參見例如Klein等人, mAbs 6, 653-663 (2012))。舉例而言，『臼包杵(knobs-into-holes)』策略旨在藉由將突變引入CH3域以修飾接觸界面來迫使兩個不同抗體重鏈配對。一個鏈上的龐大胺基酸經具有短側鏈的胺基酸置換以產生『臼』。反之，將具有大型側鏈的胺基酸引入另一CH3域中以產生『杵』。藉由共表現此等兩個重鏈(及兩個相同輕鏈，此兩個輕鏈對於兩個重鏈而言必須適當)，觀測到雜二聚體(『杵-臼』)的產量高於均二聚體(『臼-臼』或『杵-杵』)(Ridgway, J.B.等人, Protein Eng. 9 (1996) 617-621；及WO 96/027011)。藉由使用噬菌體呈現方法改造兩個CH3域之相互作用表面及引入二硫橋鍵來使雜二聚體穩定可進一步提高雜二聚體的百分比(Merchant, A. M.等人, Nature Biotech. 16 (1998) 677-681；Atwell, S.等人, J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35)。臼包杵技術的新穎方法描述於例如EP 1870459 A1中。

然而，『臼包杵』策略卻未解決包含結合至不同靶抗原之不同輕鏈之雙特異性抗體中發生的重鏈-輕鏈錯配問題。

防止重鏈-輕鏈錯配的策略為使雙特異性抗體之結合臂之一中的重鏈與輕鏈之間發生域交換(參見WO 2009/080251、WO 2009/080252、WO 2009/080253、WO 2009/080254及Schaefer, W.等人, PNAS, 108(2011)11187-11191, 其係關於發生域交換的雙特異性IgG抗體)。

使雙特異性抗體之結合臂之一中的重鏈與輕鏈可變域VH與VL發生交換(WO2009/080252, 亦參見Schaefer, W.等人, PNAS, 108 (2011) 11187-11191)明顯地減少因針對第一抗原之輕鏈與針對第二抗原之錯誤重鏈發生錯配所產生的副產物(相較於不使用此類域交換的方法)。儘管如此, 此等抗體製劑仍不能澈底地不含副產物。主要副產物係基於瓊斯本型相互作用(Bence Jones-type interaction)(Schaefer, W.等人, PNAS, 108 (2011) 11187-11191; 於增刊之圖S1I中)。因此需要進一步減少此類副產物以改良例如此類雙特異性抗體之產量。

選擇靶抗原及針對T細胞抗原與靶細胞抗原的適當結合子為產生用於治療應用中之T細胞雙特異性(TCB)抗體的另一關鍵態樣。

STEAP-1 (前列腺-1的六跨膜上皮抗原)為339個胺基酸細胞表面蛋白質, 在正常組織中, 其主要表現於前列腺細胞中。STEAP-1蛋白質表現在各種狀態的前列腺癌中係以高含量維持, 且STEAP-1亦高度過度表現於其他人類癌症, 諸如肺及結腸癌。STEAP-1在正常及癌症組織中的表現特徵表明其用作免疫治療標靶的潛在用途。WO 2008/052187報導抗STEAP-1抗體及其免疫結合物。STEAP-1/CD3 (scFv)₂雙特異性抗體描述於WO 2014/165818中。

本發明提供新穎的經改良之雙特異性抗原結合分子, 其設計是針對T細胞活化及再定向、靶向STEAP-1及活化T細胞抗原, 諸如CD3; 該等雙

特異性抗原結合分子具有良好功效及可製造性與低毒性及有利藥物動力學特性的組合。

【發明內容】

本發明人已開發出一種新穎的T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其具有出乎意外的經改良之靶向STEAP-1的特性。

因此，在第一態樣中，本發明提供T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其包含：

(a)特異性結合至第一抗原的第一抗原結合部分；

(b)特異性結合至第二抗原的第二抗原結合部分；

其中第一抗原為活化T細胞抗原且第二抗原為STEAP-1，或第一抗原為STEAP-1且第二抗原為活化T細胞抗原；及

其中特異性結合至STEAP-1的抗原結合部分包含重鏈可變區，特定言之，人類化重鏈可變區，其包含SEQ ID NO:14之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO:15之HCDR 2及SEQ ID NO:16之HCDR 3；及輕鏈可變區，特定言之，人類化輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO:17之輕鏈互補決定區(LCDR) 1、SEQ ID NO:18之LCDR 2及SEQ ID NO:19之LCDR 3。

在一個實施例中，特異性結合至STEAP-1的抗原結合部分包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含與胺基酸序列SEQ ID NO:20至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列；及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含與胺基酸序列SEQ ID NO:21至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列。

在一個實施例中，特異性結合至STEAP-1的抗原結合部分包括包含

胺基酸序列SEQ ID NO:32的重鏈可變區及包含胺基酸序列SEQ ID NO:21的輕鏈可變區。

在特定實施例中，第一及/或第二抗原結合部分為Fab分子。在一個特定實施例中，第二抗原結合部分為特異性結合至第二抗原的Fab分子，且其中Fab輕鏈與Fab重鏈中的可變域VL與VH或恆定域CL與CH1彼此間置換(亦即根據此類實施例，第二Fab分子為互換型Fab分子，其中Fab輕鏈與Fab重鏈中的可變域或恆定域發生交換)。

在特定實施例中，第一(及第三，若存在)Fab分子為習知Fab分子。在另一特定實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子中存在不超過一個能夠特異性結合至活化T細胞抗原的Fab分子(亦即T細胞活化雙特異性抗原結合分子向活化T細胞抗原提供單價結合)。

在一個實施例中，第一抗原為STEAP-1且第二抗原為活化T細胞抗原。在一個更特定的實施例中，活化T細胞抗原為CD3，特定言之，CD3 ϵ 。

在一個特定實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含

(a)特異性結合至第一抗原的第一Fab分子；

(b)特異性結合至第二抗原的第二Fab分子，且其中Fab輕鏈與Fab重鏈中的可變域VL與VH或恆定域CL與CH1彼此間置換；

其中第一抗原為STEAP-1且第二抗原為活化T細胞抗原；

其中(a)項下的第一Fab分子包含重鏈可變區，特定言之人類化重鏈可變區，其包含SEQ ID NO:14之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO:15之HCDR 2及SEQ ID NO:16之HCDR 3；及輕鏈可變區，特定言

之，人類化輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO:17之輕鏈互補決定區(LCDR 1、SEQ ID NO:18之LCDR 2及SEQ ID NO:19之LCDR 3。

根據本發明之另一態樣，所要雙特異性抗體相較於非所要副產物(詳言之，結合臂之一中發生VH/VL域交換之雙特異性抗體中所出現的瓊斯本型副產物)的比率可藉由將具有相反電荷的帶電胺基酸引入CH1及CL域中的特定胺基酸位置來改良(在本文中有時稱為「電荷修飾」)。

因此，在一些實施例中，(a)項下的第一抗原結合部分為特異性結合至第一抗原的第一Fab分子，(b)項下的第二抗原結合部分為特異性結合至第二抗原的第二Fab分子，其中Fab輕鏈與Fab重鏈中的可變域VL與VH彼此間置換；

及

i)在a)項下之第一Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)，且其中在a)項下之第一Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸或位置213之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)；或

ii)在b)項下之第二Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)，且其中在b)項下之第二Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸或位置213之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)。

在一個此類實施例中，在a)項下之第一Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)(在一個較佳實施例中，獨立地經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代)，且在a)項下之第一Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸或位置213之胺

基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)。

在另一實施例中，在a)項下之第一Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)，且在a)項下之第一Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)。

在又另一個實施例中，在a)項下之第一Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)(在一個較佳實施例中，獨立地經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代)且位置123之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)(在一個較佳實施例中，獨立地經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代)，且在a)項下之第一Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)且位置213之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)。

在一個特定實施例中，在a)項下之第一Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)且位置123之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)，且在a)項下之第一Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)且位置213之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)。

在另一特定實施例中，在a)項下之第一Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)且位置123之胺基酸經精胺酸(R)取代(根據Kabat編號)，且在a)項下之第一Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)且位置213之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)。

在一個替代性實施例中，在b)項下之第二Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)(在一個較佳實施例中，獨立地經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代)，且在b)項下之第二Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸或位置213之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)。

在另一實施例中，在b)項下之第二Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)，且在b)項下之第二Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)。

在再另一個實施例中，在b)項下之第二Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)(在一個較佳實施例中，獨立地經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代)且位置123之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)(在一個較佳實施例中，獨立地經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代)，且在b)項下之第二Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)且位置213之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)。

在一個實施例中，在b)項下之第二Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)且位置123之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)，且在b)項下之第二Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)且位置213之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)。

在另一個實施例中，在b)項下之第二Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)且位置123之胺基酸經精胺酸(R)取代(根據Kabat編號)，且在b)項下之第二Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)且位置213之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)。

在一個特定實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含

(a)特異性結合至第一抗原的第一Fab分子；

(b)特異性結合至第二抗原的第二Fab分子，其中Fab輕鏈可變域VL與Fab重鏈可變域VH彼此間置換；

其中第一抗原為STEAP-1且第二抗原為活化T細胞抗原；

其中(a)項下的第一Fab分子包含重鏈可變區，特定言之人類化重鏈可變區，其包含SEQ ID NO:14之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO:15之HCDR 2及SEQ ID NO:16之HCDR 3；及輕鏈可變區，特定言之，人類化輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO:17之輕鏈互補決定區(LCDR) 1、SEQ ID NO:18之LCDR 2及SEQ ID NO:19之LCDR 3；及

其中在a)項下之第一Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)(在一個較佳實施例中，獨立地經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代)且位置123之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)(在一個較佳實施例中，獨立地經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代)，且在a)項下之第一Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)且位置213之胺基酸獨立地經麩胺酸

(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)。

在一些實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含特異性結合至第一抗原的第三抗原結合部分。在特定實施例中，第三抗原結合部分與第一抗原結合部分一致。在一個實施例中，第三抗原結合部分為Fab分子。

在特定實施例中，第三及第一抗原結合部分各自為Fab分子且第三Fab分子與第一Fab分子一致。在此等實施例中，第三Fab分子因此包含與第一Fab分子相同的胺基酸取代(若存在)。如同第一Fab分子，第三Fab分子尤其為習知Fab分子。

若存在第三抗原結合部分，則在一個特定實施例中，第一及第三抗原部分特異性結合至STEAP-1，且第二抗原結合部分特異性結合至活化T細胞抗原，特定言之，CD3，更特定言之，CD3 ϵ 。

在本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子的一些實施例中，a)項下的第一抗原結合部分與b)項下的第二抗原結合部分彼此間融合，視情況經由肽連接子融合。在特定實施例中，第一及第二抗原結合部分各自為Fab分子。在一個特定的此類實施例中，第二Fab分子在Fab重鏈之C端與第一Fab分子Fab重鏈的N端融合。在一個替代的此類實施例中，第一Fab分子在Fab重鏈之C端與第二Fab分子Fab重鏈的N端融合。在其中(i)第二Fab分子在Fab重鏈C端與第一Fab分子Fab重鏈N端融合或(ii)第一Fab分子在Fab重鏈C端與第二Fab分子Fab重鏈N端融合的實施例中，Fab分子之Fab輕鏈與第二Fab分子之Fab輕鏈可彼此間融合，視情況經由肽連接子融合。

在特定實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子另外包

含由能夠穩定結合之第一亞單元與第二亞單元組成的Fc域。

本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子可以具有不同組態，即第一、第二(及視情況第三)抗原結合部分可以不同方式彼此間及與Fc域融合。組分可彼此間直接融合或較佳經由一或多個適合肽連接子融合。在Fab分子與Fc域亞單元之N端融合的情況下，其典型地經由免疫球蛋白鉸鏈區進行。

在一個實施例中，第一及第二抗原結合部分各自為Fab分子且第二抗原結合部分在Fab重鏈之C端與Fc域之第一或第二亞單元之N端融合。在此類實施例中，第一抗原結合部分可在Fab重鏈之C端與第二抗原結合部分之Fab重鏈的N端或與Fc域亞單元中之另一者之N端融合。

在一個實施例中，第一及第二抗原結合部分各自為Fab分子且第一及第二抗原結合部分各自在Fab重鏈之C端與Fc域亞單元之一之N端融合。在此實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子基本上包含免疫球蛋白分子，其中在Fab臂之一中，重鏈可變區VH與輕鏈可變區VL (或恆定區CH1與CL，在如本文所述的電荷修飾未引入CH1及CL域中的實施例中)彼此間交換/置換(參見圖1A、D)。

在替代實施例中，第三抗原結合部分(特定言之，第三Fab分子)在Fab重鏈之C端與Fc域之第一或第二亞單元的N端融合。在一個特定的此類實施例中，第二及第三抗原結合部分各自在Fab重鏈之C端與Fc域亞單元之一之N端融合，且第一抗原結合部分在Fab重鏈之C端與第二Fab分子Fab重鏈N端融合。在此實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子基本上包含免疫球蛋白分子，其中在Fab臂之一中，重鏈可變區VH與輕鏈可變區VL (或恆定區CH1與CL，在如本文所述的電荷修飾未引入CH1及CL域

中的實施例中)彼此間交換/置換，且其中另一個(習知)Fab分子在N端與該Fab臂融合(參見圖1B、E)。在另一個此類實施例中，第一及第三抗原結合部分各自在Fab重鏈之C端與Fc域亞單元之一之N端融合，且第二抗原結合部分在Fab重鏈之C端與第一抗原結合部分Fab重鏈N端融合。在此實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子基本上包含免疫球蛋白分子，其中另一個Fab分子在N端與免疫球蛋白Fab臂之一融合，其中在該另一個Fab分子中，重鏈可變區VH與輕鏈可變區VL (或恆定區CH1與CL，在其中如本文所述的電荷修飾未引入CH1及CL域的實施例中)彼此間交換/置換(參見圖1C、F)。

在一個特定實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子中所包含之免疫球蛋白分子為IgG類免疫球蛋白。在一甚至更特定實施例中，免疫球蛋白為IgG₁子類免疫球蛋白。在另一個實施例中，免疫球蛋白為IgG₄子類免疫球蛋白。

在一個特定實施例中，本發明提供T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其包含：

- a)特異性結合至第一抗原的第一Fab分子；
- b)特異性結合至第二抗原的第二Fab分子，且其中Fab輕鏈與Fab重鏈中的可變域VL與VH或恆定域CL與CH1彼此間置換；
- c)特異性結合至該第一抗原的第三Fab分子；及
- d)由能夠穩定結合之第一亞單元及第二亞單元組成的Fc域；

其中第一抗原為STEAP-1且第二抗原為活化T細胞抗原，特定言之，CD3，更特定言之，CD3 ϵ ；

其中c)項下的該第三Fab分子與a)項下的該第一Fab分子相同；

其中

(i) a)項下之第一Fab分子在Fab重鏈C端與b)項下之第二Fab分子Fab重鏈N端融合，且b)項下之第二Fab分子及c)項下之第三Fab分子各自在Fab重鏈C端與d)項下之Fc域之亞單元之一的N端融合，或

(ii) b)項下之第二Fab分子在Fab重鏈C端與a)項下之第一Fab分子Fab重鏈N端融合，且a)項下之第一Fab分子及c)項下之第三Fab分子各自在Fab重鏈C端與d)項下之Fc域之亞單元之一的N端融合；及

其中a)項下的第一Fab分子與c)項下的第三Fab分子包含重鏈可變區，特定言之，人類化重鏈可變區，其包含SEQ ID NO:14之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO:15之HCDR 2及SEQ ID NO:16之HCDR 3；及輕鏈可變區，特定言之，人類化輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO:17之輕鏈互補決定區(LCDR) 1、SEQ ID NO:18之LCDR 2及SEQ ID NO:19之LCDR 3。

在另一個實施例中，本發明提供T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其包含：

a)特異性結合至第一抗原的第一Fab分子；

b)特異性結合至第二抗原的第二Fab分子，且其中Fab輕鏈與Fab重鏈中的可變域VL與VH或恆定域CL與CH1彼此間置換；

c)由能夠穩定結合之第一亞單元及第二亞單元組成的Fc域；

其中第一抗原為STEAP-1且第二抗原為活化T細胞抗原，特定言之，CD3，更特定言之，CD3 ϵ ；

其中

(i) a)項下的第一Fab分子在Fab重鏈之C端與b)項下之第二Fab分子之

Fab重鏈之N端融合，且b)項下之第二Fab分子在Fab重鏈之C端與c)項下之Fc域亞單元之一之N端融合，或

(ii) b)項下的第二Fab分子在Fab重鏈之C端與a)項下之第一Fab分子Fab重鏈之N端融合，且a)項下之第一Fab分子在Fab重鏈之C端與c)項下之Fc域亞單元之一之N端融合；及

其中(a)項下的第一Fab分子包含重鏈可變區，特定言之，人類化重鏈可變區，其包含SEQ ID NO:14之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO:15之HCDR 2及SEQ ID NO:16之HCDR 3；及輕鏈可變區，特定言之，人類化輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO:17之輕鏈互補決定區(LCDR) 1、SEQ ID NO:18之LCDR 2及SEQ ID NO:19之LCDR 3。

在另一實施例中，本發明提供T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其包含：

a)特異性結合至第一抗原的第一Fab分子；

b)特異性結合至第二抗原的第二Fab分子，且其中Fab輕鏈與Fab重鏈中的可變域VL與VH或恆定域CL與CH1彼此間置換；及

c)由能夠穩定結合之第一亞單元及第二亞單元組成的Fc域；

其中

(i)第一抗原為STEAP-1且第二抗原為活化T細胞抗原，特定言之，CD3，更特定言之，CD3 ϵ ；或

(ii)第二抗原為STEAP-1且第一抗原為活化T細胞抗原，特定言之，CD3，更特定言之，CD3 ϵ ；

其中a)項下之第一Fab分子及b)項下之第二Fab分子各自在Fab重鏈C端與c)項下之Fc域之亞單元之一的N端融合；及

其中特異性結合至STEAP-1的Fab分子包含重鏈可變區，特定言之，人類化重鏈可變區，其包含SEQ ID NO:14之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO:15之HCDR 2及SEQ ID NO:16之HCDR 3；及輕鏈可變區，特定言之，人類化輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO:17之輕鏈互補決定區(LCDR) 1、SEQ ID NO:18之LCDR 2及SEQ ID NO:19之LCDR 3。

在本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子之所有不同組態中，本文所述之胺基酸取代若存在則可發生於第一Fab分子及(若存在)第三Fab分子之CH1及CL域中，或發生於第二Fab分子之CH1及CL域中。其較佳發生於第一Fab分子及(若存在)第三Fab分子之CH1及CL域中。根據本發明之構思，若如本文所述之胺基酸取代發生於第一(及第三，若存在)Fab分子中，則第二Fab分子中不發生此類胺基酸取代。反之，若如本文所述之胺基酸取代發生於第二Fab分子中，則第一(及第三，若存在)Fab分子中不發生此類胺基酸取代。包含Fab分子的活化T細胞之雙特異性抗原結合分子中不發生胺基酸取代，其中Fab輕鏈與Fab重鏈中之恆定域CL與CH1彼此間置換。

在本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子之特定實施例中，特定言之，在其中如本文所述之胺基酸取代發生於第一(及第三，若存在)Fab分子中的特定實施例中，第一(及第三，若存在)Fab分子之恆定域CL具有 κ 同型。在本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子之其他實施例中，特定言之，在其中如本文所述之胺基酸取代發生於第二Fab分子中的其他實施例中，第二Fab分子之恆定域CL具有 κ 同型。在一些實施例中，第一(及第三，若存在)Fab分子之恆定域CL及第二Fab分子之恆定域CL為 κ 同型。

在一個特定實施例中，本發明提供T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其包含：

a)特異性結合至第一抗原的第一Fab分子；

b)特異性結合至第二抗原的第二Fab分子，其中Fab輕鏈可變域VL與Fab重鏈可變域VH彼此間置換；

c)特異性結合至第一抗原的第三Fab分子；及

d)由能夠穩定結合之第一亞單元及第二亞單元組成的Fc域；

其中第一抗原為STEAP-1且第二抗原為活化T細胞抗原，特定言之，CD3，更特定言之，CD3 ϵ ；

其中c)項下的第三Fab分子與a)項下的第一Fab分子一致；

其中在a)項下之第一Fab分子及c)項下之第三Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)且位置123之胺基酸經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代(根據Kabat編號)，且其中在a)項下之第一Fab分子及c)項下之第三Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)且位置213之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)；

其中

(i) a)項下之該第一Fab分子在Fab重鏈C端與b)項下之該第二Fab分子Fab重鏈N端融合，且b)項下之該第二Fab分子及c)項下之該第三Fab分子各自在Fab重鏈C端與d)項下之該Fc域之亞單元之一的N端融合，或

(ii) b)項下之第二Fab分子在Fab重鏈C端與a)項下之第一Fab分子Fab重鏈N端融合，且a)項下之第一Fab分子及c)項下之第三Fab分子各自在Fab重鏈C端與d)項下之Fc域之亞單元之一的N端融合；及

其中a)項下的第一Fab分子與c)項下的第三Fab分子包含重鏈可變區，特定言之，人類化重鏈可變區，其包含SEQ ID NO:14之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO:15之HCDR 2及SEQ ID NO:16之HCDR 3；及輕鏈可變區，特定言之，人類化輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO:17之輕鏈互補決定區(LCDR) 1、SEQ ID NO:18之LCDR 2及SEQ ID NO:19之LCDR 3。

在一個甚至更特定的實施例中，本發明提供T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其包含：

a)特異性結合至第一抗原的第一Fab分子；

b)特異性結合至第二抗原的第二Fab分子，其中Fab輕鏈可變域VL與Fab重鏈可變域VH彼此間置換；

c)特異性結合至第一抗原的第三Fab分子；及

d)由能夠穩定結合之第一亞單元及第二亞單元組成的Fc域；

其中第一抗原為STEAP-1且第二抗原為活化T細胞抗原，特定言之，CD3，更特定言之，CD3 ϵ ；

其中c)項下的第三Fab分子與a)項下的第一Fab分子一致；

其中在a)項下之第一Fab分子及c)項下之第三Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)且位置123之胺基酸經精胺酸(R)取代(根據Kabat編號)，且其中在a)項下之第一Fab分子及c)項下之第三Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)且位置213之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)；

其中a)項下之第一Fab分子在Fab重鏈C端與b)項下之第二Fab分子之

Fab重鏈N端融合，且b)項下之第二Fab分子及c)項下之第三Fab分子各自在Fab重鏈C端與d)項下之Fc域之亞單元之一的N端融合；及

其中a)項下的第一Fab分子與c)項下的第三Fab分子包含重鏈可變區，特定言之，人類化重鏈可變區，其包含SEQ ID NO:14之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO:15之HCDR 2及SEQ ID NO:16之HCDR 3；及輕鏈可變區，特定言之，人類化輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO:17之輕鏈互補決定區(LCDR) 1、SEQ ID NO:18之LCDR 2及SEQ ID NO:19之LCDR 3。

在另一個實施例中，本發明提供T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其包含：

a)特異性結合至第一抗原的第一Fab分子；

b)特異性結合至第二抗原的第二Fab分子，其中Fab輕鏈可變域VL與Fab重鏈可變域VH彼此間置換；

c)由能夠穩定結合之第一亞單元及第二亞單元組成的Fc域；

其中第一抗原為STEAP-1且第二抗原為活化T細胞抗原，特定言之，CD3，更特定言之，CD3 ϵ ；

其中在a)項下之第一Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)且位置123之胺基酸經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代(根據Kabat編號)，且其中在a)項下之第一Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)且位置213之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)；

其中

(i) a)項下的第一Fab分子在Fab重鏈之C端與b)項下之第二Fab分子之

Fab重鏈之N端融合，且b)項下之第二Fab分子在Fab重鏈之C端與c)項下之Fc域亞單元之一之N端融合，或

(ii) b)項下的第二Fab分子在Fab重鏈之C端與a)項下之第一Fab分子Fab重鏈之N端融合，且a)項下之第一Fab分子在Fab重鏈之C端與c)項下之Fc域亞單元之一之N端融合；及

其中(a)項下的第一Fab分子包含重鏈可變區，特定言之，人類化重鏈可變區，其包含SEQ ID NO:14之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO:15之HCDR 2及SEQ ID NO:16之HCDR 3；及輕鏈可變區，特定言之，人類化輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO:17之輕鏈互補決定區(LCDR) 1、SEQ ID NO:18之LCDR 2及SEQ ID NO:19之LCDR 3。

在另一實施例中，本發明提供T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其包含：

a)特異性結合至第一抗原的第一Fab分子；

b)特異性結合至第二抗原的第二Fab分子，其中Fab輕鏈可變域VL與Fab重鏈可變域VH彼此間置換；及

c)由能夠穩定結合之第一亞單元及第二亞單元組成的Fc域；

其中

(i)第一抗原為STEAP-1且第二抗原為活化T細胞抗原，特定言之，CD3，更特定言之，CD3 ϵ ；或

(ii)第二抗原為STEAP-1且第一抗原為活化T細胞抗原，特定言之，CD3，更特定言之，CD3 ϵ ；

其中在a)項下之第一Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)且位置123之胺基酸經離胺酸(K)或精胺酸

(R)取代(根據Kabat編號)，且其中在a)項下之第一Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)且位置213之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)；

其中a)項下之第一Fab分子及b)項下之第二Fab分子各自在Fab重鏈C端與c)項下之Fc域之亞單元之一的N端融合；及

其中特異性結合至STEAP-1的Fab分子包含重鏈可變區，特定言之，人類化重鏈可變區，其包含SEQ ID NO:14之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO:15之HCDR 2及SEQ ID NO:16之HCDR 3；及輕鏈可變區，特定言之，人類化輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO:17之輕鏈互補決定區(LCDR) 1、SEQ ID NO:18之LCDR 2及SEQ ID NO:19之LCDR 3。

在T細胞活化雙特異性抗原結合分子之特定實施例中，Fc域為IgG Fc域。在一個特定實施例中，Fc域為IgG₁ Fc域。在另一特定實施例中，Fc域為IgG₄ Fc域。在一個甚至更特定的實施例中，Fc域為包含胺基酸取代S228P (Kabat編號)的IgG₄ Fc域。在特定實施例中，Fc域為人類Fc域。

在特定實施例中，Fc域包含促進第一Fc域亞單元與第二Fc域亞單元結合的修飾。在一個特定的此類實施例中，Fc域之第一亞單元之CH3域中的胺基酸殘基經具有較大側鏈體積的胺基酸殘基置換，藉此在第一亞單元之CH3域內產生可定位於第二亞單元之CH3域內之空腔中的隆凸，且Fc域之第二亞單元之CH3域中的胺基酸殘基經具有較小側鏈體積的胺基酸殘基置換，藉此在第二亞單元之CH3域內產生可供第一亞單元之CH3域內之隆凸可定位於其中的空腔。

在一個特定實施例中，相較於原生IgG₁ Fc域，Fc域對Fc受體展現減小的結合親和力及/或減少的效應功能。在某些實施例中，相較於未經工

程改造的Fc域，經工程改造的Fc域對Fc受體的結合親和力減小且/或效應功能減少。在一個實施例中，Fc域包含使與Fc受體之結合及/或效應功能減少的一或多個胺基酸取代。在一個實施例中，Fc域中之使與Fc受體之結合及/或效應功能減少的一或多個胺基酸取代為一或多個選自L234、L235及P329之群的位置(Kabat EU索引編號)。在特定實施例中，Fc域之各亞單元包含使與Fc受體之結合及/或效應功能減少的三個胺基酸取代，其中該等胺基酸取代為L234A、L235A及P329G (Kabat EU索引編號)。在一個此類實施例中，Fc域為IgG₁ Fc域，特定言之，人類IgG₁ Fc域。在其他實施例中，Fc域之各亞單元包含使與Fc受體之結合及/或效應功能減少的兩個胺基酸取代，其中該等胺基酸取代為L235A及P329G (Kabat EU索引編號)。在一個此類實施例中，Fc域為IgG₄ Fc域，特定言之，人類IgG₄ Fc域。在一個實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子之Fc域為IgG₄ Fc域且包含胺基酸取代L235E及S228P (SPLE)(Kabat EU索引編號)。

在一個實施例中，Fc受體為Fc γ 受體。在一個實施例中，Fc受體為人類Fc受體。在一個實施例中，Fc受體為活化Fc受體。在一個特定實施例中，Fc受體為人類Fc γ RIIa、Fc γ RI及/或Fc γ RIIIa。在一個實施例中，效應功能為抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)。

在本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子的一個特定實施例中，特異性結合至活化T細胞抗原(特定言之，CD3，更特定言之，CD3 ϵ)的抗原結合部分包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含SEQ ID NO:4之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO:5之HCDR 2、SEQ ID NO:6之HCDR 3；及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含SEQ ID NO:8之輕鏈互補決定區

(LCDR) 1、SEQ ID NO:9之LCDR 2及SEQ ID NO:10之LCDR 3。在一個甚至更特定的實施例中，特異性結合至活化T細胞抗原(特定言之，CD3，更特定言之，CD3 ϵ)的抗原結合部分包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含與胺基酸序列SEQ ID NO:3至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列；及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含與胺基酸序列SEQ ID NO:7至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，特異性結合至活化T細胞抗原的抗原結合部分為Fab分子。在一個特定實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子中所包含之第二抗原結合部分(特定言之，Fab分子)特異性結合至CD3，更特定言之，CD3 ϵ ，且包含SEQ ID NO:4之重鏈互補決定區(CDR)1、SEQ ID NO:5之重鏈CDR 2、SEQ ID NO:6之重鏈CDR 3、SEQ ID NO:8之輕鏈CDR 1、SEQ ID NO:9之輕鏈CDR 2及SEQ ID NO:10之輕鏈CDR 3。在一個甚至更特定的實施例中，該第二抗原結合部分(特定言之，Fab分子)包括包含胺基酸序列SEQ ID NO:3的重鏈可變區及包含胺基酸序列SEQ ID NO:7的輕鏈可變區。

在本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子之另一個特定實施例中，特異性結合至STEAP-1的抗原結合部分(特定言之，Fab分子)包含SEQ ID NO:14之重鏈互補決定區(CDR)、SEQ ID NO:15之重鏈CDR 2、SEQ ID NO:16之重鏈CDR 3、SEQ ID NO:17之輕鏈CDR 1、SEQ ID NO:18之輕鏈CDR 2及SEQ ID NO:19之輕鏈CDR 3。在一個甚至更特定的實施例中，特異性結合至STEAP-1的抗原結合部分(特定言之，Fab分子)包含胺基酸序列與胺基酸序列SEQ ID NO:20至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的重鏈可變區及胺基酸序列與胺基酸序列

SEQ ID NO:21至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的輕鏈可變區。在一個特定實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子中所包含之第一(及若存在，第三)抗原結合部分(特定言之，Fab分子)特異性結合至STEAP-1，且包含SEQ ID NO:14之重鏈互補決定區(CDR)1、SEQ ID NO:15之重鏈CDR 2、SEQ ID NO:16之重鏈CDR 3、SEQ ID NO:17之輕鏈CDR 1、SEQ ID NO:18之輕鏈CDR 2及SEQ ID NO:19之輕鏈CDR 3。在一個甚至更特定的實施例中，該第一(及若存在，該第三)抗原結合部分(特定言之，Fab分子)包括包含胺基酸序列SEQ ID NO:32的重鏈可變區及包含胺基酸序列SEQ ID NO:21的輕鏈可變區。在另一特定實施例中，該第一(及若存在，該第三)抗原結合部分(特定言之，Fab分子)包括包含胺基酸序列SEQ ID NO:20的重鏈可變區及包含胺基酸序列SEQ ID NO:21的輕鏈可變區。

在一個特定態樣中，本發明提供T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其包含：

c)特異性結合至第一抗原的第一Fab分子；

b)特異性結合至第二抗原的第二Fab分子，且其中Fab輕鏈與Fab重鏈中的可變域VL與VH或恆定域CL與CH1彼此間置換；

c)特異性結合至第一抗原的第三Fab分子；及

d)由能夠穩定結合之第一亞單元及第二亞單元組成的Fc域；

其中

(i)第一抗原為STEAP-1且第二抗原為CD3，特定言之，CD3 ϵ ；

(ii) a)項下之第一Fab分子及c)項下之第三Fab分子各自包含SEQ ID NO:14之重鏈互補決定區(CDR)1、SEQ ID NO:15之重鏈CDR 2、SEQ

ID NO:16之重鏈CDR 3、SEQ ID NO:17之輕鏈CDR 1、SEQ ID NO:18之輕鏈CDR 2及SEQ ID NO:19之輕鏈CDR 3，且b)項下之第二Fab分子包含SEQ ID NO:4之重鏈CDR 1、SEQ ID NO:5之重鏈CDR 2、SEQ ID NO:6之重鏈CDR 3、SEQ ID NO:8之輕鏈CDR 1、SEQ ID NO:9之輕鏈CDR 2及SEQ ID NO:10之輕鏈CDR 3；及

(iii) a)項下之第一Fab分子在Fab重鏈C端與b)項下之第二Fab分子Fab重鏈N端融合，且b)項下之第二Fab分子及c)項下之第三Fab分子各自在Fab重鏈C端與d)項下之Fc域亞單元之一的N端融合。

在一個實施例中，在b)項下的第二Fab分子中，可變域VL與VH彼此間置換且另外(iv)，在a)項下之第一Fab分子及c)項下之第三Fab分子的恆定域CL中，位置124之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)且位置123之胺基酸經離胺酸(K)或精胺酸(R)(特定言之，精胺酸(R))取代(根據Kabat編號)，且在a)項下之第一Fab分子與c)項下之第三Fab分子的恆定域CH1中，位置147之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)且位置213之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)。

根據本發明之另一態樣，提供一或多種編碼本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子的經分離之聚核苷酸。本發明進一步提供一或多種包含本發明之經分離聚核苷酸的表現載體，及包含本發明之經分離聚核苷酸或表現載體的宿主細胞。在一些實施例中，宿主細胞為真核生物細胞，特定言之，哺乳動物細胞。

在另一態樣中，提供一種製造本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子的方法，包含以下步驟：a)在適於表現T細胞活化雙特異性抗原結合分子的條件下培養本發明之宿主細胞及b)回收T細胞活化雙特異性抗原結

合分子。本發明亦涵蓋藉由本發明方法製得的T細胞活化雙特異性抗原結合分子。

本發明進一步提供包含本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。

本發明亦涵蓋使用本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子及醫藥組合物的方法。在一個態樣中，本發明提供用作藥物的本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子或醫藥組合物。在一個態樣中，提供用於治療有需要之個體之疾病的本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子或醫藥組合物。在一個特定實施例中，該疾病為癌症。

亦提供本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子用於製造供治療有需要之個體之疾病用之藥物的用途；以及治療個體之疾病的方法，該方法包含向該個體投與治療有效量之包含本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子、呈醫藥學上可接受之形式的組合物。在一個特定實施例中，該疾病為癌症。在任一上述實施例中，個體較佳為哺乳動物，特定言之，人類。

本發明亦提供一種誘導靶細胞(特定言之，腫瘤細胞)溶胞的方法，包含在T細胞(特定言之，細胞毒性T細胞)存在下使靶細胞與本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子接觸。

【圖式簡單說明】

圖1. 本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子(TCB)之例示性組態。(A, D)「1+1 互換Mab (CrossMab)」分子的圖示。(B, E)「2+1 IgG互換Fab」分子的圖示，其中互換Fab及Fab組分的次序為替代的(「倒置式」)。(C, F)「2+1 IgG互換Fab」分子的圖示。(G, K)「1+1 IgG互

換Fab」分子的圖示，其中互換Fab及Fab組分的次序為替代的(「倒置式」)。(H，L)「1+1 IgG互換Fab」分子的圖示。(I，M)具有兩個互換Fab之「2+1 IgG互換Fab」分子的圖示。(J，N)具有兩個互換Fab之「2+1 IgG互換Fab」分子的圖示，其中互換Fab及Fab組分之次序為替代的(「倒置式」)。(O，S)「Fab-互換Fab」分子的圖示。(P，T)「互換Fab-Fab」分子的圖示。(Q，U)「(Fab)₂-互換Fab」分子的圖示。(R，V)「互換Fab-(Fab)₂」分子的圖示。(W，Y)「Fab-(互換Fab)₂」分子的圖示。(X，Z)「(互換Fab)₂-Fab」分子的圖示。黑點：視情況存在於Fc域中之促進雜二聚化的修飾。++，--：視情況引入CH1及CL域中之帶相反電荷的胺基酸。互換Fab分子描繪為包含VH與VL區域之交換，但在CH1及CL域中未引入電荷修飾的實施例中，可替代地包含CH1與CL域之交換。

圖2. 實例1中所製備之TCB分子的圖示。(A，F)具有電荷修飾的「2+1 IgG互換Fab，倒置式」(CD3結合子中的VH/VL交換，STEAP-1結合子中的電荷修飾，EE=147E、213E；RK=123R，124K)。(B)不具有電荷修飾的「2+1 IgG互換Fab，倒置式」(CD3結合子中之VH/VL交換)。(C)具有電荷修飾的「2+1 IgG互換Fab，倒置式」(CD3結合子中的CH1/CL交換，STEAP-1結合子中的電荷修飾，EE=147E、213E；RK=123R、124K)。(D)「STEAP-1/CD3 (scFv)₂」。(E)具有電荷修飾的「1+1 IgG互換Mab」(CD3結合子中的VH/VL交換，STEAP-1結合子中的電荷修飾，EE=147E、213E；RK=123R、124K)。

圖3. 實例1中所製備之TCB分子在非還原SDS-PAGE (4-12% Bis/Tris (NuPage, Invitrogen)，庫馬斯染色，尺寸標記物標記12 (Invitrogen))上進行蛋白質A層析的溶離份。(A)含有分子A之溶離份6至

15的泳道1至10。(B)含有分子B之溶離份D10至F10的泳道1至13。(C)含有分子C之溶離份D12至G6的泳道1至12。(D)含有分子D之溶離份D9至F5的泳道1至11。(E)泳道1至9：分子E的溶離份D6至F3。

圖4. 實例1中所製備之TCB分子的CE-SDS分析(最終純化製劑，電泳圖，泳道A=非還原，泳道B=還原)。(A)分子A，(B)分子B，(C)分子C，(D)分子D，(E)分子E，(F)分子F。

圖5. STEAP-1 TCB分子F對表現LnCAP細胞(A)及傑卡特(CD3+)細胞(B)之STEAP-1的結合。

圖6. (E:T=10:1，效應子人類PBMC)培育24小時之後，STEAP-1 TCB分子F誘導T細胞殺死表現STEAP-1的LnCAP (A)及MKN45 (B)細胞。

圖7. 24小時(A)或48小時(B)之後，不同STEAP-1 TCB分子(E:T=10:1，人類PBMC效應細胞)誘導T細胞介導表現STEAP-1的LnCaP細胞溶解。所描繪為一式三份，使用SD。

圖8. 不同STEAP-1 TCB分子同時結合至Jurkat-NFAT報導細胞上之人類CD3及LnCaP細胞上之人類STEAP-1後，如根據發光所測定的Jurkat活化。所描繪為一式三份，使用SD。

圖9. STEAP-1 TCB對表現人類STEAP-1之CHO細胞(CHO-hSTEAP1，純系2)(A)及表現CD3之傑卡特細胞(B)的結合。藉由Graph Pad Prism計算分子A結合至表現人類STEAP-1之細胞的EC50：20.17 nM。

圖10. 不同STEAP-1 TCB分子同時結合至Jurkat-NFAT報導細胞上之人類CD3及LnCaP (A)或CHO-hSTEAP1純系2 (B)細胞上之人類STEAP-1

後，如根據發光所測定的Jurkat活化。所描繪為一式三份，使用SD。

圖11. 相較於在親代CHO-k1細胞(B)存在下的抗原非依賴性Jurkat活化，不同STEAP-1 TCB分子同時結合至Jurkat-NFAT報導細胞上之人類CD3及CHO-hSTEAP1純系2細胞(A)上之人類STEAP-1後，如根據發光所測定的Jurkat活化。所描繪為一式三份，使用SD。

圖12. 24小時(A)或48小時(B)之後，不同STEAP-1 TCB分子(E:T=10:1，人類PBMC效應細胞)誘導T細胞介導表現STEAP-1的LnCaP細胞溶解。所描繪為一式三份，使用SD。

圖13. 在48小時之後，不同STEAP-1 TCB分子同時結合至T細胞上之人類CD3及表現STEAP-1之LnCaP細胞上之人類STEAP-1後的T細胞活化，如分別根據CD8 T細胞(A)或CD4 T細胞(B)上之早期活化標記物CD69、CD8 T細胞(C)或CD4 T細胞(D)上之晚期活化標記物CD25的上調所量測。所描繪為一式三份，使用SD。

圖14. 在48小時之後，不同STEAP-1 TCB分子與PBMC及人類STEAP-1陰性親代CHO-k1細胞一起培育後的抗原非依賴性T細胞活化，如分別根據CD8 T細胞(A)或CD4 T細胞(B)上之早期活化標記物CD69、CD8 T細胞(C)或CD4 T細胞(D)上之晚期活化標記物CD25的上調所量測。所描繪為一式三份，使用SD。

【實施方式】

定義

除非在下文中另外定義，否則術語在本文中的使用如此項技術一般性所用。

如本文所用，術語「抗原結合分子」在其最廣泛的意義上係指特異

性地結合抗原性決定子的分子。抗原結合分子之實例為免疫球蛋白及其衍生物，例如片段。

術語「雙特異性」意謂抗原結合分子能夠特異性結合至至少兩個不同抗原性決定子。典型地，雙特異性抗原結合分子包含兩個抗原結合位點，其中之每一者特異性針對不同抗原性決定子。在某些實施例中，雙特異性抗原結合分子能夠同時結合兩個抗原性決定子，詳言之，兩個不同細胞上所表現的兩個抗原性決定子。

如本文所用，術語「價」表示抗原結合分子中存在指定數目個抗原結合位點。因而，術語「單價結合至抗原」表示抗原結合分子中存在一個(及不超過一個)特異性針對抗原的抗原結合位點。

「抗原結合位點」係指抗原結合分子中之提供與抗原相互作用的位點，亦即一或多個胺基酸殘基。舉例而言，抗體之抗原結合位點包含來自互補決定區(CDR)的胺基酸殘基。原生免疫球蛋白分子典型地具有兩個抗原結合位點，Fab分子典型地具有單個抗原結合位點。

如本文所用，術語「抗原結合部分」係指特異性結合抗原性決定子的多肽分子。在一個實施例中，抗原結合部分能夠使其所連接的實體(例如第二抗原結合部分)定向靶點，例如攜帶抗原性決定子的特定類型腫瘤細胞或腫瘤基質。在另一個實施例中，抗原結合部分能夠經由其靶抗原(例如T細胞受體複合物抗原)活化信號傳導。抗原結合部分包括如本文進一步定義的抗體及其片段。特定抗原結合部分包括抗體之抗原結合域，包含抗體重鏈可變區及抗體輕鏈可變區。在某些實施例中，抗原結合部分可包含如本文進一步定義及此項技術中已知的抗體恆定區。適用的重鏈恆定區包括五種同型中的任一者： α 、 δ 、 ϵ 、 γ 或 μ 。適用的輕鏈恆定區包括兩

種同型中的任一者： κ 及 λ 。

如本文所用，術語「抗原性決定子」與「抗原」及「抗原決定基」同義且係指多肽大分子上的位點(例如相連胺基酸區段或由非相連胺基酸之不同區域組成的構形組態)，該位點由抗原結合部分結合，從而形成抗原結合部分-抗原複合物。適用的抗原性決定子可發現於例如腫瘤細胞表面上、病毒所感染細胞之表面上、其他病變細胞表面上、免疫細胞表面上、游離於血清中及/或細胞外基質中(ECM)。除非另外指明，否則本文中稱為抗原的蛋白質(例如CD3)可為來自任何脊椎動物來源(包括哺乳動物，諸如靈長類動物(例如人類)及啮齒動物(例如小鼠及大鼠))之蛋白質的任何原生形式。在一個特定實施例中，抗原為人類蛋白質。在本文中提及特定蛋白質的情況下，該術語涵蓋「全長」的未處理蛋白質，以及在細胞中處理所產生的任何形式之蛋白質。該術語亦涵蓋天然存在之蛋白質變異體，例如剪接變異體或對偶基因變異體。適用作抗原的例示性人類蛋白質為CD3，特定言之，CD3之 ϵ 亞單元(參見UniProt第P07766號(130版)，NCBI RefSeq第NP_000724.1號，SEQ ID NO:1 (人類序列)；或UniProt第Q95LI5號(49版)，NCBI基因庫第BAB71849.1號，SEQ ID NO:2 (食蟹獼猴[*Macaca fascicularis*]序列)，或STEAP-1 (六跨膜上皮前列腺抗原1；UniProt第Q9UHE8號；NCBI RefSeq第NP_036581號)。在某些實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子結合至CD3或STEAP-1的抗原決定基，該抗原決定基在來自不同物種之CD3或STEAP-1抗原中具保守性。

「特異性結合」意謂結合對於抗原而言具選擇性且可與非所需或非特異性相互作用區分。抗原結合部分結合至特定抗原性決定子的能力可經

由酶聯免疫吸附分析(ELISA)或熟習此項技術者熟悉的其他技術量測，例如表面電漿子共振(SPR)技術(在BIAcore儀器上分析)(Liljeblad等人, Glyco J 17, 323-329 (2000))及傳統結合分析(Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002))。在一個實施例中，抗原結合部分與無關蛋白質結合的程度小於抗原結合部分與抗原之結合的約10%，如藉由例如SPR所量測。在某些實施例中，結合至抗原的抗原結合部分或包含該抗原結合部分的抗原結合分子具有 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ 或 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (例如 10^{-8} M 或小於 10^{-8} M ，例如 10^{-8} M 至 10^{-13} M ，例如 10^{-9} M 至 10^{-13} M)的解離常數(K_D)。

「親和力」係指分子(例如受體)之單一結合位點與其結合搭配物(例如配位體)之間非共價相互作用力的總和。除非另外指明，否則如本文所用，「結合親和力」係指反映結合對成員(例如抗原結合部分與抗原，或受體與其配位體)之間1:1相互作用的固有結合親和力。分子X對其搭配物Y的親和力一般可由解離常數(K_D)表示，解離常數為解離速率常數與結合速率常數(分別為 k_{off} 與 k_{on})之比率。因此，等效親和力可包含不同速率常數，只要速率常數之比率保持相同。可藉由此項技術中已知之明確方法(包括本文所述之方法)量測親和力。一種用於測量親和力的特定方法為表面電漿子共振(SPR)。

「還原性結合」(例如還原性結合至Fc受體)係指對應相互作用的親和力降低，如藉由例如SPR所量測。為了清楚起見，該術語亦包括親和力降低至零(或低於分析方法之偵測極限)，亦即相互作用完全消除。反之，「增強的結合」係指對應相互作用的結合親和力增強。

如本文所用，「活化T細胞抗原」係指T淋巴細胞(特定言之，細胞毒

性T淋巴細胞)表面上所表現之抗原性決定子，其與抗原結合分子相互作用時能夠誘導T細胞活化。具體而言，抗原結合分子與活化T細胞抗原的相互作用可藉由觸發T細胞受體複合物之信號級聯來誘導T細胞活化。在一個特定實施例中，活化T細胞抗原為CD3，特定言之，CD3之 ϵ 亞單元(參見UniProt第P07766號(130版)，NCBI RefSeq第NP_000724.1號，SEQ ID NO:1 (人類序列)；或UniProt第Q95LI5號(49版)，NCBI基因庫第BAB71849.1號，SEQ ID NO:2 (食蟹獼猴[*Macaca fascicularis*]序列))。

如本文所用，「T細胞活化」係指T淋巴細胞(特定言之，細胞毒性T淋巴細胞)的一或多種細胞反應，選自：增殖、分化、細胞激素分泌、細胞毒性效應分子釋放、細胞毒性活性及活化標記表現。本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子能夠誘導T細胞活化。適於量測T細胞活化的分析在本文所述之技術中已知。

如本文所用，「靶細胞抗原」係指靶細胞(例如腫瘤細胞，諸如癌細胞或腫瘤基質細胞)表面上所呈遞的抗原性決定子。在一個特定實施例中，靶細胞抗原為STEAP-1，特定言之，人類STEAP-1。

如本文所用，當各類型部分超過一種時，為了便於區別，結合Fab分子使用術語「第一」、「第二」或「第三」。使用此等術語並非希望賦予T細胞活化雙特異性抗原結合分子以特定次序或取向，除非明確如此陳述。

「Fab分子」係指由免疫球蛋白之重鏈(「Fab重鏈」)之VH及CH1域及輕鏈(「Fab輕鏈」)之VL及CL域組成的蛋白質。

「融合」意謂各組分(例如Fab分子與Fc域亞單元)經肽鍵直接連接，經由一或多個肽連接子連接。

如本文所用，術語「單鏈」係指包含胺基酸單體經肽鍵線性連接而成的分子。在某些實施例中，抗原結合部分之一為單鏈Fab分子，亦即其中Fab輕鏈與Fab重鏈經肽鏈子連接而形成單一肽鏈的Fab分子。在一個特定的此類實施例中，在單鏈Fab分子中，Fab輕鏈C端連接至Fab重鏈N端。

「互換型」Fab分子(亦稱為互換Fab)意謂一種Fab分子，其中Fab重鏈與輕鏈可變域或恆定域發生交換(亦即彼此間置換)，亦即，互換型Fab分子包含由輕鏈可變域VL及重鏈恆定域1 CH1組成的肽鏈(VL-CH1，N端至C端方向)及由重鏈可變域VH及輕鏈恆定域CL組成的肽鏈(VH-CL，N端至C端方向)。為了清楚起見，在其中Fab輕鏈與Fab重鏈之可變域交換的互換型Fab分子中，包含重鏈恆定域1 CH1的肽鏈在本文中稱為互換型Fab分子之「重鏈」。反之，在Fab輕鏈與Fab重鏈之恆定域發生交換的互換型Fab分子中，包含重鏈可變域VH的肽鏈在本文中稱為(互換型)Fab分子的「重鏈」。

與此相反，「習知」Fab分子意謂呈天然形式的Fab分子，亦即包含由重鏈可變域及恆定域組成的重鏈(VH-CH1，N端至C端方向)及由輕鏈可變域及恆定域組成的輕鏈(VL-CL，N端至C端方向)。

術語「免疫球蛋白分子」係指具有天然存在之抗體之結構的蛋白質。舉例而言，IgG類免疫球蛋白為約150,000道爾頓(dalton)之雜四聚體醣蛋白，其由兩條輕鏈及兩條重鏈經二硫鍵鍵結而組成。自N端至C端，各重鏈具有可變域(VH)，亦稱為重鏈可變域或重鏈可變區；繼之為三個恆定域(CH1、CH2及CH3)，亦稱為重鏈恆定區。類似地，自N端至C端，各輕鏈具有可變域(VL)，亦稱為輕鏈可變域或輕鏈可變區；繼之為輕鏈

恆定域(CL)，亦稱為輕鏈恆定區。免疫球蛋白重鏈可歸為五種類型之一，稱為 α (IgA)、 δ (IgD)、 ϵ (IgE)、 γ (IgG)或 μ (IgM)，其中一些可進一步分成亞型，例如 γ_1 (IgG₁)、 γ_2 (IgG₂)、 γ_3 (IgG₃)、 γ_4 (IgG₄)、 α_1 (IgA₁)及 α_2 (IgA₂)。免疫球蛋白輕鏈基於其恆定域胺基酸序列可歸為兩種類型之一，稱為kappa (κ)及lambda (λ)。免疫球蛋白基本上由兩個Fab分子及一個Fc域經由免疫球蛋白鉸鏈區連接而組成。

術語「抗體」在本文中以最廣泛意義使用且涵蓋各種抗體結構，包括(但不限於)單株抗體、多株抗體及抗體片段，只要其展現所要抗原結合活性。

「抗體片段」係指除完整抗體之外的分子，其包含完整抗體之一部分，該部分結合由完整抗體結合的抗原。抗體片段之實例包括(但不限於)Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、雙功能抗體、線性抗體、單鏈抗體分子(例如scFv)及單域抗體。欲回顧某些抗體片段，參見Hudson等人, Nat Med 9, 129-134 (2003)。欲回顧scFv片段，參見例如Plückthun, 於The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第113卷, Rosenberg及Moore編, Springer-Verlag, New York, 第269-315頁(1994)；亦參見WO 93/16185；及美國專利第5,571,894號及第5,587,458號。關於包含救助受體結合抗原決定基殘基及具有延長之活體內半衰期之Fab及F(ab')₂片段的論述，參見美國專利第5,869,046號。雙功能抗體為可為二價或雙特異性之具有兩個抗原結合位點之抗體片段。參見例如EP 404,097；WO 1993/01161；Hudson等人, Nat Med 9, 129-134 (2003)；及Hollinger等人, Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993)。三功能抗體及四功能抗體亦描述於Hudson等人, Nat Med 9, 129-134 (2003)中。單域抗體為

包含抗體之全部或一部分重鏈可變域或全部或一部分輕鏈可變域的抗體片段。在某些實施例中，單域抗體為人類單域抗體(Domantis, Inc., Waltham, MA；參見例如美國專利第6,248,516 B1號)。抗體片段可藉由各種技術製得，包括(但不限於)蛋白分解消化完整抗體以及藉由重組宿主細胞(例如大腸桿菌或噬菌體)產生，如本文所述。

術語「抗原結合域」係指抗體之一部分，該部分包含特異性結合至抗原之一部分或全部且與之互補的區域。抗原結合域可由例如一或多個抗體可變域(亦稱為抗體可變區)提供。詳言之，抗原結合域包含抗體輕鏈可變域(VL)及抗體重鏈可變域(VH)。

術語「可變區」或「可變域」係指涉及抗體結合至抗原之抗體重鏈或輕鏈域。原生抗體之重鏈及輕鏈(分別為VH及VL)可變域一般具有類似的結構，其中各域包含四個保守性構架區(FR)及三個高變區(HVR)。參見例如Kindt等人, Kuby Immunology, 第6版, W.H. Freeman and Co., 第91頁(2007)。單一VH或VL域可足以賦予抗原結合特異性。

如本文所用，術語「高變區」或「HVR」係指抗體可變域中之在序列上具有高變性且/或形成結構上定義之環(「高變環」)的各區域。一般而言，原生四鏈抗體包含六個HVR；三個位於VH中(H1、H2、H3)，且三個位於VL中(L1、L2、L3)。HVR一般包含來自高變環及/或來自互補決定區(CDR)的胺基酸殘基，後者具有最高的序列可變性且/或涉及抗原識別。除VH中之CDR1之外，CDR一般包含形成高變環的胺基酸殘基。高變區(HVR)亦稱為「互補決定區」(CDR)，且此等術語在本文中、在提及形成抗原結合區之可變區之一部分時可互換使用。此特定區域已描述於Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, 美

國公共衛生署，國家衛生研究院(Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)(1991)及Chothia等人, J Mol Biol 196: 901-917 (1987)，其中定義包括彼此間比較時胺基酸殘基之重疊或亞群。然而，涉及抗體或其變異體之CDR之任何定義的應用意欲處於如本文中所定義及所用之術語的範疇內。包含如上述各參考文獻所定義之CDR的適當胺基酸殘基闡述於下表A中作為比較。包含特定CDR的確切殘基數目將視CDR序列及大小而變。在抗體之可變區胺基酸序列指定的情況下，熟習此項技術者可以常規方式確定哪個殘基包含特定CDR。本文中指定的CDR序列一般依據Kabat定義。

表A. CDR定義¹

CDR	Kabat	Chothia	AbM ²
V _H CDR1	31-35	26-32	26-35
V _H CDR2	50-65	52-58	50-58
V _H CDR3	95-102	95-102	95-102
V _L CDR1	24-34	26-32	24-34
V _L CDR2	50-56	50-52	50-56
V _L CDR3	89-97	91-96	89-97

¹ 表A中之所有CDR定義之編號均依據Kabat等人所闡述之編號約定(參見下文)。

² 如表A中所用之含有小寫字母「b」的「AbM」係指如藉由Oxford Molecular之「AbM」抗體模型化軟體所定義的CDR。

Kabat等人亦定義適用於任何抗體的可變區序列編號系統。一般技術者可針對任何可變區序列明確地指定此「Kabat編號」系統，而不依賴於超過序列本身的任何實驗資料。如本文中關於可變區序列所用，「Kabat編號」係指Kabat等人闡述的編號系統，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，美國公共衛生署，國家衛生研究院，Bethesda, MD (1991)。除非另外說明，否則提及抗體可變區中之特定胺

基酸殘基位置的編號係依據Kabat編號系統。

如本文所用，重鏈及輕鏈之所有恆定區及恆定域中的胺基酸位置均根據Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, 美國公共衛生署, 國家衛生研究院, Bethesda, MD (1991)中所述之Kabat編號系統編號且在本文中稱為「根據Kabat編號」或「Kabat編號」。具體而言， κ 及 λ 同型之輕鏈恆定域CL使用Kabat編號系統(參見Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版之第647-660頁, 美國公共衛生署, 國家衛生研究院, Bethesda, MD (1991))且重鏈恆定域(CH1、鉸鏈、CH2及CH3)使用Kabat EU索引編號系統(參見第661-723頁)，在此情況下，在本文中藉由參考「根據Kabat EU索引編號」來進一步澄清。

序列表之多肽序列並非根據Kabat編號系統編號。然而，將序列表之序列編號轉換為Kabat編號完全屬於熟習此項技術者之普通技能範圍內。

「構架」或「FR」係指除高變區(HVR)殘基之外的可變域殘基。可變域之FR一般由四個FR域：FR1、FR2、FR3及FR4組成。因此，在VH(或VL)中，HVR及FR序列一般依以下序列呈現：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

「人類化」抗體係指包含來自非人類HVR之胺基酸殘基及來自人類FR之胺基酸殘基之嵌合抗體。在某些實施例中，人類化抗體將包含至少一個且通常兩個可變域之實質上全部，其中所有或實質上所有HVR(例如CDR)均對應於非人類抗體之HVR，且所有或實質上所有FR均對應於人類抗體之FR。此類可變域在本文中稱為「人類化可變區」。人類化抗體視情況可包含源自人類抗體之抗體恆定區之至少一部分。抗體(例如非人類

抗體)之「人類化形式」係指已經歷人類化之抗體。本發明所涵蓋之「人類化抗體」之其他形式為其中恆定區已另外經修飾或相對於原始抗體之恆定區已發生變化以產生根據本發明之特性(尤其在C1q結合及/或Fc受體(FcR)結合方面)的彼等形式。

抗體或免疫球蛋白之「類別」係指其重鏈所具有之恆定域或恆定區的類型。抗體存在五種主要類別：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且其中若干者可進一步分成亞類(同型)，例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及IgA₂。對應於不同類別之免疫球蛋白的重鏈恆定域分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。

本文術語「Fc域」或「Fc區」用於定義含有恆定區之至少一部分的免疫球蛋白重鏈C端區域。該術語包括原生序列Fc區及變異型Fc區。雖然IgG重鏈Fc區邊界可能稍微變化，但人類IgG重鏈Fc區通常定義為自Cys226或自Pro230延伸至重鏈羧基末端。然而，宿主細胞所產生的抗體可能在重鏈C端經歷一或多個(特定言之，一個或兩個)胺基酸之轉譯後分裂。因此，宿主細胞藉由表現編碼全長重鏈之特定核酸分子而產生的抗體可包括全長重鏈，或其可包括全長重鏈的分裂型變異體(在本文中亦被稱作「分裂變異型重鏈」)。在重鏈之最末兩個C端胺基酸為甘胺酸(G446)及離胺酸(K447，根據Kabat EU索引編號)的情況下，情況可為如此。因此，Fc區之C端離胺酸(Lys447)或C端甘胺酸(Gly446)及離胺酸(K447)可能存在或可能不存在。除非另有說明，否則包括Fc域(或如本文所定義之Fc域之亞單元)之重鏈的胺基酸序列在本文中指明無C端甘胺酸-離胺酸二肽。在本發明之一個實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子中所包含的重鏈(該重鏈包括如本文說明的Fc域亞單元)包含另一個C端

甘胺酸-離胺酸二肽(G446及K447，根據Kabat EU索引編號)。在本發明之一個實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子中所包含的重鏈(該重鏈包括如本文說明的Fc域亞單元)包含另一個C端甘胺酸殘基(G446，根據Kabat EU索引編號)。本發明之組合物(諸如本文所述之醫藥組合物)包含本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子群。T細胞活化雙特異性抗原結合分子群可包含具有全長重鏈的分子及具有分裂變異型重鏈的分子。T細胞活化雙特異性抗原結合分子群可由具有全長重鏈之分子及具有分裂變異型重鏈之分子的混合物組成，其中至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%的T細胞活化雙特異性抗原結合分子具有分裂變異型重鏈。在本發明之一個實施例中，包含本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子群的組合物包含含有重鏈的T細胞活化雙特異性抗原結合分子，該重鏈包括如本文說明的Fc域亞單元及另一個C端甘胺酸-離胺酸二肽(G446及K447，根據Kabat EU索引編號)。在本發明之一個實施例中，包含本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子群的組合物包含含有重鏈的T細胞活化雙特異性抗原結合分子，該重鏈包括如本文說明的Fc域亞單元及另一個C端甘胺酸殘基(G446，根據Kabat EU索引編號)。在本發明之一個實施例中，此組合物包含由以下組成的T細胞活化雙特異性抗原結合分子群：包含包括如本文說明之Fc域亞單元之重鏈的分子；包含包括如本文說明之Fc域亞單元及另一個C端甘胺酸殘基(G446，根據Kabat EU索引編號)之重鏈的分子；及包含包括如本文說明之Fc域亞單元及另一個C端甘胺酸-離胺酸二肽(G446及K447，根據Kabat EU索引編號)之重鏈的分子。除非本文另外說明，否則Fc區或恆定區胺基酸殘基之編號係依據EU編號系統，亦稱為EU索引，如Kabat等人，Sequences of Proteins of

Immunological Interest, 第5版, 美國公共衛生署, 國家衛生研究院, Bethesda, MD (1991)中所述(亦參見上文)。如本文所用, Fc域「亞單元」係指形成二聚Fc域之兩個多肽之一, 亦即包含免疫球蛋白重鏈C端恆定區的多肽, 其能夠穩定自結合。舉例而言, IgG Fc域亞單元包含IgG CH2及IgG CH3恆定域。

「促進Fc域之第一亞單元與第二亞單元結合的修飾」為肽主鏈之操縱或Fc域亞單元之轉譯後修飾, 從而減少或阻止包含Fc域亞單元之多肽與相同多肽結合形成均二聚體。詳言之, 如本文所用之促進結合的修飾包括分別對欲結合之兩個Fc域亞單元(亦即Fc域之第一及第二亞單元)中之每一者進行的修飾, 其中該等修飾彼此間互補以便促進兩個Fc域亞單元結合。舉例而言, 促進結合的修飾可改變Fc域亞單元中之一或兩者的結構或電荷以便使其結合在空間上或在靜電上分別為有利的。因此, 包含第一Fc域亞單元之多肽與包含第二Fc域亞單元之多肽之間發生(雜)二聚, 就與亞單元(例如抗原結合部分)中之每一者融合的其他組分不相同而言, (雜)二聚可能不相同。在一些實施例中, 促進結合的修飾包含存在於Fc域中的胺基酸突變, 特定言之, 胺基酸取代。在一個特定實施例中, 促進結合的修飾包含存在於Fc域之兩個亞單元中之每一者中的各別胺基酸突變, 特定言之, 胺基酸取代。

術語「效應功能」係指可歸因於抗體之Fc區之彼等生物活性, 其因抗體同型而異。抗體效應功能之實例包括: C1q結合及補體依賴性細胞毒性(CDC)、Fc受體結合、抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)、抗體依賴性細胞吞噬(ADCP)、細胞激素分泌、免疫複合物介導抗原呈遞細胞攝入抗原、細胞表面受體(例如B細胞受體)下調及B細胞活化。

如本文所用，術語「工程化、工程改造」視為包括肽主鏈之任何操縱或天然存在或重組多肽或其片段之轉譯後修飾。工程改造包括胺基酸序列、糖基化模式或個別胺基酸之側鏈基團之修飾，以及此等方法之組合。

如本文所用，術語「胺基酸突變」意欲包含胺基酸取代、缺失、插入及修飾。取代、缺失、插入及修飾可進行任意組合以獲得最終構築體，其限制條件為最終構築體具有所要特徵，例如與Fc受體的結合減少，或與另一肽的結合增強。胺基酸序列缺失及插入包括胺基酸之胺基末端及/或羧基末端缺失及插入。特定胺基酸突變為胺基酸取代。出於改變例如Fc區之結合特徵之目的，尤其較佳為非保守性胺基酸取代，亦即一個胺基酸經具有不同結構及/或化學特性的另一胺基酸置換。胺基酸取代包括經非天然存在之胺基酸置換或經二十種標準胺基酸之天然存在之胺基酸衍生物(例如4-羥基脯胺酸、3-甲基組胺酸、鳥胺酸、高絲胺酸、5-羥基離胺酸)置換。胺基酸突變可使用此項技術中熟知之遺傳學或化學方法產生。遺傳學方法可包括定點突變誘發、PCR、基因合成及其類似方法。預期藉由除遺傳學工程改造之外的方法(諸如化學修飾)改變胺基酸側鏈基團的方法亦可為適用的。本文中可使用不同名稱表示相同的胺基酸突變。舉例而言，Fc域之位置329之脯胺酸取代為甘胺酸可以329G、G329、G₃₂₉、P329G或Pro329Gly表示。

如本文所用，術語「多肽」係指一種分子，其由單體(胺基酸)經醯胺鍵(亦稱為肽鍵)線性連接而組成。術語「多肽」係指兩個或兩個以上胺基酸之任何鏈，且並非指產物之特定長度。因此，「多肽」之定義內包括肽、二肽、三肽、寡肽、「蛋白質」、「胺基酸鏈」或用於指兩個或兩個以上胺基酸之鏈的任何其他術語且可使用術語「多肽」替代此等術語中的

任一者，或術語「多肽」可與此等術語中的任一者互換使用。術語「多肽」亦意指多肽之表現後修飾產物，包括(但不限於)糖基化、乙醯化、磷酸化、醯胺化、藉由已知保護/阻斷基團衍生化、蛋白水解分裂或藉由非天然存在之胺基酸修飾。多肽可衍生自天然生物學來源或藉由重組技術製得，但不必定自指定的核酸序列轉譯而成。其可以任何方式產生，包括化學合成。本發明多肽之大小可為約3個或超過3個、5個或超過5個、10個或超過10個、20個或超過20個、25個或超過25個、50個或超過50個、75個或超過75個、100個或超過100個、200個或超過200個、500個或超過500個、1,000個或超過1,000個，或2,000個或超過2,000個胺基酸。多肽可具有定義之三維結構，但其不必定具有此類結構。具有定義之三維結構的多肽稱為摺疊，且不具有定義之三維結構，而是可採用許多不同構形的多肽稱為展開。

「經分離」之多肽或其變異體或衍生物意指不處於天然環境下的多肽。不需要特定的純化程度。舉例而言，分離多肽可自其原生或天然環境中移除。出於本發明之目的，宿主細胞中所表現之重組產生型多肽及蛋白質視為經分離，已藉由任何適合技術分離、分級分離或部分或實質上純化的原生或重組多肽亦視為經分離。

相對於參考多肽序列之「胺基酸序列一致性百分比(%)」定義為在比對序列且引入空位(若需要)以達到最大序列一致性百分比之後，候選序列中之與參考多肽序列胺基酸殘基一致的胺基酸殘基百分比，且任何保守性取代不視為序列一致性之一部分。用於測定胺基酸序列一致性百分比之目的的比對可以此項技術之技能範圍內之多種方式達成，例如使用公開可獲得之電腦軟體，諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2或Megalign

(DNASTAR)軟體。熟習此項技術者可確定適用於比對序列之參數，包括在所比較序列之全長內達成最大比對所需的任何算法。然而，出於本文之目的，胺基酸序列一致性%值係使用序列比較電腦程式ALIGN-2產生。ALIGN-2序列比較電腦程式由Genentech, Inc.創作，且原始碼已隨使用者文件一起提交於美國版權局(U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559)，其在美國版權局以美國版權登記號TXU510087登記。ALIGN-2程序可公開獲自Genentech, Inc., South San Francisco, California，或可自原始碼編寫。ALIGN-2程序經編寫可用於UNIX操作系統，包括數位UNIX V4.0D。所有序列比較參數由ALIGN-2程序設定且不變化。在採用ALIGN-2進行胺基酸序列比較之情形下，指定胺基酸序列A相對於、與或針對指定胺基酸序列B之胺基酸序列一致性% (或者可表述為，指定胺基酸序列A具有或包含相對於、與或針對指定胺基酸序列B的胺基酸序列一致性一定%)如下計算：

$$100 \times \text{分數} X/Y$$

其中X為在A與B之程式比對中藉由序列比對程式ALIGN-2評為一致匹配之胺基酸殘基的數目，且其中Y為B中之胺基酸殘基總數目。應瞭解，在胺基酸序列A之長度與胺基酸序列B之長度不相等之情況下，A相對於B之胺基酸序列一致性%與B相對於A之胺基酸序列一致性%不相等。除非另外特定陳述，否則本文所使用之所有胺基酸序列一致性%值係使用ALIGN-2電腦程式獲得，如前一段落中剛剛所述。

術語「聚核苷酸」係指分離之核酸分子或構築體，例如信使RNA (mRNA)、病毒源RNA或質體DNA (pDNA)。聚核苷酸可包含習知磷酸二酯鍵或非習知鍵(例如醯胺鍵，諸如肽核酸(PNA)中所發現)。術語「核酸

分子」係指聚核苷酸中存在的任一個或多個核酸區段，例如DNA或RNA片段。

「分離」之核酸分子或聚核苷酸意指已自原生環境中移除的核酸分子、DNA或RNA。舉例而言，出於本發明之目的，編碼載體中所含之多肽的重組性聚核苷酸視為經分離。分離之聚核苷酸之其他實例包括異質宿主細胞中所維持的重組聚核苷酸或溶液中經純化(部分或實質上)之聚核苷酸。分離之聚核苷酸包括通常含有聚核苷酸分子之細胞中所含的聚核苷酸分子，但聚核苷酸分子存在於染色體外或不同於其天然染色體位置之染色體位置。分離之RNA分子包括本發明的活體內或活體外RNA轉錄物，以及正股及負股形式，及雙股形式。本發明之分離之聚核苷酸或核酸進一步包括合成方式產生的此類分子。另外，聚核苷酸或核酸可為或可包括調節元件，諸如啟動子、核糖體結合位點或轉錄終止子。

一種核酸或聚核苷酸的核苷酸序列與本發明之參考核苷酸序列至少例如95%「一致」意指該聚核苷酸之核苷酸序列與參考序列一致，但該聚核苷酸序列相對於參考核苷酸序列可每100個核苷酸中包括至多五個點突變。換言之，為了獲得核苷酸序列與參考核苷酸序列至少95%一致的聚核苷酸，參考序列中至多5%的核苷酸可缺失或經另一核苷酸取代，或參考序列中可插入數目佔參考序列核苷酸總數至多5%的核苷酸。參考序列之此等變化可發生於參考核苷酸序列之5'或3'末端位置或彼等末端位置之間的任何位置，此等位置個別地散佈於參考序列殘基中或參考序列內的一或多個相連基團中。實際來看，任何特定聚核苷酸序列是否與本發明之核苷酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致可習知地使用已知電腦程式確定，諸如上文針對多肽所論述的電腦程式(例如

ALIGN-2)。

術語「表現卡匣」係指重組或合成方式產生的聚核苷酸，其具有允許靶細胞中之特定核酸發生轉錄的一系列特定核酸元件。重組表現卡匣可併入質體、染色體、粒線體DNA、質體DNA、病毒或核酸片段中。典型地，表現載體之重組表現卡匣部分包括待轉錄的核酸序列及啟動子，以及其他序列。在某些實施例中本發明之表現卡匣包含編碼本發明之雙特異性抗原結合分子或其片段的聚核苷酸序列。

術語「載體」或「表現載體」與「表現構築體」同義且係指用於引入特定基因且導引該基因表現的DNA分子，該DNA分子與該基因在靶細胞中可操作地連接。該術語包括作為自複製核酸結構的載體以及併入其已引入之宿主細胞基因組中的載體。本發明之表現載體包含表現卡匣。表現載體允許大量的穩定mRNA發生轉錄。一旦表現載體進入靶細胞內，則藉由細胞轉錄及/或轉譯機構產生由該基因編碼的核糖核酸分子或蛋白質。在一個實施例中，本發明之表現載體包含表現卡匣，該表現卡匣包含編碼本發明之雙特異性抗原結合分子或其片段的聚核苷酸序列。

術語「宿主細胞」、「宿主細胞株」及「宿主細胞培養物」可互換使用且係指已引入外源核酸之細胞，包括此類細胞之後代。宿主細胞包括「轉形體」及「轉形細胞」，其包括初代轉形細胞及自其衍生之後代(不考慮繼代次數)。後代之核酸含量與親代細胞可能不完全相同，而是可能含有突變。本文包括在原始轉形細胞中篩選或選擇之具有相同功能或生物活性之突變型後代。宿主細胞為可用於產生本發明之雙特異性抗原結合分子的任何類型之細胞系統。宿主細胞包括培養細胞，例如哺乳動物培養細胞，諸如CHO細胞、BHK細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、YO骨髓瘤細胞。

胞、P3X63小鼠骨髓瘤細胞、PER細胞、PER.C6細胞或融合瘤細胞、酵母細胞、昆蟲細胞及植物細胞(僅舉數例)，而且包括轉殖基因動物、轉殖基因植物或經培養植物或動物組織內所含的細胞。

「活化Fc受體」為一種Fc受體，其與抗體Fc域接合之後，引發信號傳導事件，刺激攜帶受體之細胞執行效應功能。人類活化Fc受體包括FcγRIIIa (CD16a)、FcγRI (CD64)、FcγRIIa (CD32)及FcαRI (CD89)。

抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)為一種免疫機制，其促使免疫效應細胞溶解塗有抗體之靶細胞。靶細胞為包含Fc區之抗體或其衍生物特異性結合(一般經由Fc區N端之蛋白質部分結合)的細胞。如本文所使用，術語「降低之ADCC」定義為在圍繞靶細胞之介質中、在指定的抗體濃度下、在指定時間內、藉由上文所定義之ADCC機制溶解之靶細胞數目減少，及/或在圍繞靶細胞之介質中，在指定時間內藉由ADCC機制達成指定數目個靶細胞溶解所必需的抗體濃度增加。ADCC降低係相對於由同類型宿主細胞使用相同的標準生產、純化、調配及儲存方法(熟習此項技術者已知)所產生、但尚未經工程改造之相同抗體介導的ADCC而言。舉例而言，Fc域中包含降低ADCC之胺基酸取代的抗體所介導之ADCC降低係相對於Fc域中無此胺基酸取代之相同抗體所介導的ADCC而言。適於量測ADCC的分析在此項技術中已熟知(參見例如PCT公開案第WO 2006/082515號或PCT公開案第WO 2012/130831號)。

藥劑之「有效量」係指使其所投與之細胞或組織中產生生理學變化所必需的量。

藥劑(例如醫藥組合物)之「治療有效量」係指在必需的劑量及時間段情況下，有效達成所要治療或預防結果的量。舉例而言，治療有效量之藥

劑消除、減少、延遲、最小化或預防疾病副作用。

「個體(individual)」或「個體(subject)」為哺乳動物。哺乳動物包括(但不限於)馴養動物(例如牛、綿羊、貓、狗及馬)、靈長類動物(例如人類及非人類靈長類動物，諸如猴)、兔及嚙齒動物(例如小鼠及大鼠)。特定言之，個體為人類。

術語「醫藥組合物」係指所呈形式允許其中所含活性成分之生物活性有效發揮的製劑，且其不含對調配物將投與之個體具有不可接受毒性之其他組分。

「醫藥學上可接受之載劑」係指醫藥組合物中之除活性成分之外的對個體無毒的成分。醫藥學上可接受之載劑包括(但不限於)緩衝劑、賦形劑、穩定劑或防腐劑。

如本文所用，「治療(treatment)」(及其文法變化形式，諸如「治療(treat)」或「治療(treating)」)係指試圖改變所治療個體之疾病之自然過程的臨床介入且可出於預防的或在臨床病理學過程中進行。所需治療作用包括(但不限於)預防疾病發生或復發、緩解症狀、減輕疾病之任何直接或間接病理性後果、預防轉移、減緩疾病進展速率、改善或緩和疾病病況及緩解或改善預後。在一些實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子用於延遲疾病發展或減緩疾病進展。

術語「藥品說明書」用於指通常包括於治療性產品之商業包裝中之說明書，其含有關於與使用此類治療性產品有關之適應症、用法、劑量、投藥、組合療法、禁忌症及/或警告之資訊。

實施例之詳細說明

本發明提供一種用於治療應用的T細胞活化雙特異性抗原結合分子，

其具有有利特性，尤其在功效及安全以及可製造性方面(例如在純度、產量方面)。

電荷修飾

本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子可包含發生於其中所含之Fab分子中的胺基酸取代，此等取代特別有效地減少輕鏈與非匹配重鏈(瓊斯本型副產物)之錯配，錯配在產生基於Fab之雙特異性/多特異性抗原結合分子(其結合臂之一(或多個，在分子包含超過兩個抗原結合Fab分子的情況下)中存在VH/VL交換)時會發生(亦參見PCT申請案第PCT/EP2015/057165號，特別是其中的實例，該案以全文引用的方式併入本文中)。

相應地，在特定實施例中，本發明的T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含：

(a)特異性結合至第一抗原的第一Fab分子

(b)特異性結合至第二抗原的第二Fab分子，其中Fab輕鏈可變域VL與Fab重鏈可變域VH彼此間置換，

其中第一抗原為活化T細胞抗原且第二抗原為STEAP-1，或第一抗原為STEAP-1且第二抗原為活化T細胞抗原；且

其中

i)在a)項下之第一Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸經帶正電的胺基酸取代(根據Kabat編號)，且其中在a)項下之第一Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸或位置213之胺基酸經帶負電的胺基酸取代(根據Kabat EU索引編號)；或

ii)在b)項下之第二Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸經帶正

電的胺基酸取代(根據Kabat編號)，且其中在b)項下之第二Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸或位置213之胺基酸經帶負電的胺基酸取代(根據Kabat EU索引編號)。

T細胞活化雙特異性抗原結合分子不包含i)及ii)項下提及的兩種修飾。第二Fab分子之恆定域CL與CH1彼此間不置換(亦即保持不交換狀態)。

在根據本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子之一個實施例中，在a)項下之第一Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)(在一個較佳實施例中，獨立地經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代)，且在a)項下之第一Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸或位置213之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)。

在另一實施例中，在a)項下之第一Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)，且在a)項下之第一Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)。

在一個特定實施例中，在a)項下之第一Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)(在一個較佳實施例中，獨立地經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代)且位置123之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)(在一個較佳實施例中，獨立地經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代)，且在a)項下之第一Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)且位置213之胺基酸獨立

地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)。

在一個更特定的實施例中，在a)項下之第一Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)且位置123之胺基酸經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代(根據Kabat編號)，且在a)項下之第一Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)且位置213之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)。

在一個甚至更特定的實施例中，在a)項下之第一Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)且位置123之胺基酸經精胺酸(R)取代(根據Kabat編號)，且在a)項下之第一Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)且位置213之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)。

在特定實施例中，a)項下之第一Fab分子之恆定域CL為 κ 同型。

或者，根據上述實施例之胺基酸取代可發生於b)項下之第二Fab分子之恆定域CL及恆定域CH1中，而非a)項下之第一Fab分子之恆定域CL及恆定域CH1中。在特定的此類實施例中，b)項下之第二Fab分子之恆定域CL為 κ 同型。

本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子可進一步包含特異性結合至第一抗原的第三Fab分子。在特定實施例中，該第三Fab分子與a)項下的第一Fab分子相同。在此等實施例中，根據上述實施例之胺基酸取代發生於第一Fab分子及第三Fab分子中之每一者之恆定域CL及恆定域CH1中。或者，根據上述實施例之胺基酸取代可發生於b)項下之第二Fab分子之恆定域CL及恆定域CH1中，而非發生於第一Fab分子及第三Fab分子之恆定域CL及恆定域CH1中。

在特定實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含由能夠穩定結合的第一亞單元及第二亞單元組成的Fc域。

T細胞活化雙特異性抗原結合分子形式

T細胞活化雙特異性抗原結合分子之組分彼此間可以多種組態融合。例示性組態描繪於圖1中。

在特定實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子中所包含之抗原結合部分為Fab分子。在此類實施例中，第一、第二、第三等抗原結合部分在本文中可分別稱為第一、第二、第三等Fab分子。另外，在特定實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含由能夠穩定結合之第一亞單元及第二亞單元組成的Fc域。

在一些實施例中，第二Fab分子在Fab重鏈C端與Fc域之第一或第二亞單元N端融合。

在一個此類實施例中，第一Fab分子在Fab重鏈C端與第二Fab分子Fab重鏈N端融合。在一個特定的此類實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子基本上由以下組成：第一及第二Fab分子、由第一及第二亞單元組成的Fc域及視情況存在之一或多個肽連接子，其中第一Fab分子在Fab重鏈C端與第二Fab分子Fab重鏈N端融合，且第二Fab分子在Fab重鏈C端與Fc域之第一或第二亞單元N端融合。此組態示意性地描繪於圖1G及1K中。視情況，第一Fab分子之Fab輕鏈與第二Fab分子之Fab輕鏈可另外彼此間融合。

在另一此類實施例中，第一Fab分子在Fab重鏈C端與Fc域之第一或第二亞單元之N端融合。在一個特定的此類實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子基本上由以下組成：第一及第二Fab分子、由第一及第二

亞單元組成的Fc域及視情況存在之一或多個肽連接子，其中第一及第二Fab分子各自在Fab重鏈C端與Fc域之亞單元之一的N端融合。此組態示意性地描繪於圖1A圖及1D中。第一及第二Fab分子可與Fc域直接融合或經由肽連接子融合。在一個特定實施例中，第一及第二Fab分子各自經由免疫球蛋白鉸鏈區與Fc域融合。在一個特定實施例中，免疫球蛋白鉸鏈區為人類IgG₁鉸鏈區，特別是Fc域為IgG₁ Fc域的情況下。

在其他實施例中，第一Fab分子在Fab重鏈C端與Fc域之第一或第二亞單元之N端融合。

在一個此類實施例中，第二Fab分子在Fab重鏈C端與第一Fab分子Fab重鏈N端融合。在一個特定的此類實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子基本上由以下組成：第一及第二Fab分子、由第一及第二亞單元組成的Fc域及視情況存在之一或多個肽連接子，其中第二Fab分子在Fab重鏈C端與第一Fab分子Fab重鏈N端融合，且第一Fab分子在Fab重鏈C端與Fc域之第一或第二亞單元N端融合。此組態示意性地描繪於圖1H及1L中。視情況，第一Fab分子之Fab輕鏈與第二Fab分子之Fab輕鏈可另外彼此間融合。

Fab分子可直接或經由包含一或多個胺基酸(典型地，約2-20個胺基酸)的肽連接子與Fc域融合或彼此間融合。肽連接子在此項技術中已知且描述於本文中。適合的非免疫原性肽連接子包括例如(G₄S)_n、(SG₄)_n、(G₄S)_n或G₄(SG₄)_n肽連接子。「n」一般為整數1至10，典型地為2至4。在一個實施例中，該肽連接子具有至少5個胺基酸之長度；在一個實施例中，具有5至100個胺基酸之長度；在另一實施例中，具有10至50個胺基酸之長度。在一個實施例中，該肽連接子為(GxS)_n或(GxS)_nG_m，其中G=

甘胺酸，S=絲胺酸，且($x=3$ ， $n=3$ 、4、5或6，且 $m=0$ 、1、2或3)或($x=4$ ， $n=2$ 、3、4或5且 $m=0$ 、1、2或3)，在一個實施例中， $x=4$ 且 $n=2$ 或3，在另一實施例中， $x=4$ 且 $n=2$ 。在一個實施例中，該肽連接子為 $(G_4S)_2$ 。特別適用於第一Fab分子與第二Fab分子之Fab輕鏈彼此間融合的肽連接子為 $(G_4S)_2$ 。適於連接第一Fab片段與第二Fab片段Fab重鏈的例示性肽連接子包含序列(D)- $(G_4S)_2$ (SEQ ID NO 11及12)。另一種適合的此類連接子包含序列 $(G_4S)_4$ 。另外，連接子可包含免疫球蛋白鉸鏈區(之一部分)。特別是在Fab分子與Fc域亞單元N端融合的情況下，其可在另外的肽連接子存在或不存在的情況下經由免疫球蛋白鉸鏈區或其一部分融合。

使用具有能夠特異性結合至靶細胞抗原之單一抗原結合部分(諸如Fab分子)的T細胞活化雙特異性抗原結合分子(例如如圖1A、D、G、H、K、L中所示)，特別是在高親和性抗原結合部分結合之後預期靶細胞抗原發生內化的情況下。在此等情況下，存在超過一個特異性針對靶細胞抗原的抗原結合部分可增強靶細胞抗原之內化，從而降低其可利用性。

然而，在許多其他情況下，有利的是T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含兩個或超過兩個特異性針對靶細胞抗原的抗原結合部分(諸如Fab分子)(參見圖1B、1C、1E、1F、1I、1J、1M或1N中所示之實例)，以例如使靶向靶點最佳化或允許靶細胞抗原交聯。

因此，在特定實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含特異性結合至第一抗原的第三Fab分子。第一抗原較佳為靶細胞抗原，亦即STEAP-1。在一個實施例中，第三Fab分子為習知Fab分子。在一個實施例中，第三Fab分子與第一Fab分子相同(亦即，第一及第三Fab分子包含相同的重鏈及輕鏈胺基酸序列且具有相同的域排列(亦即習

知或互換型))。在一個特定實施例中，第二Fab分子特異性結合至活化T細胞抗原，特定言之，CD3，且第一及第三Fab分子特異性結合至STEAP-1。

在替代實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含特異性結合至第二抗原的第三Fab分子。在此等實施例中，第二抗原較佳為靶細胞抗原，亦即STEAP-1。在一個此類實施例中，第三Fab分子為互換型Fab分子(其中Fab重鏈可變域VH與VL或恆定域CL與CH1彼此間交換/置換)。在一個此類實施例中，第三Fab分子與第二Fab分子相同(亦即，第二及第三Fab分子包含相同的重鏈及輕鏈胺基酸序列且具有相同的域排列(亦即習知或互換型))。在一個此類實施例中，第一Fab分子特異性結合至活化T細胞抗原，特定言之，CD3，且第二及第三Fab分子特異性結合至STEAP-1。

在一個實施例中，第三Fab分子在Fab重鏈C端與Fc域之第一或第二亞單元之N端融合。

在一個特定實施例中，第二及第三Fab分子各自在Fab重鏈C端與Fc域之亞單元之一之N端融合，且第一Fab分子在Fab重鏈C端與第二Fab分子Fab重鏈N端融合。在一個特定的此類實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子基本上由以下組成：第一、第二及第三Fab分子、由第一及第二亞單元組成的Fc域及視情況存在之一或多個肽連接子，其中第一Fab分子在Fab重鏈C端與第二Fab分子Fab重鏈N端融合，且第二Fab分子在Fab重鏈C端與Fc域之第一亞單元之N端融合，且其中第三Fab分子在Fab重鏈C端與Fc域之第二亞單元之N端融合。此組態示意性地描繪於圖1B及1E(特定實施例，其中第三Fab分子為習知Fab分子且較佳與第一Fab分子相

同)，及圖1I及圖1M (替代實施例，其中第三Fab分子為互換型Fab分子且較佳與第二Fab分子相同)。第一及第三Fab分子可與Fc域直接融合或經由肽連接子融合。在一個特定實施例中，第二及第三Fab分子各自經由免疫球蛋白鉸鏈區與Fc域融合。在一個特定實施例中，免疫球蛋白鉸鏈區為人類IgG₁鉸鏈區，特別是Fc域為IgG₁ Fc域的情況下。視情況，第一Fab分子之Fab輕鏈與第二Fab分子之Fab輕鏈可另外彼此間融合。

在另一個實施例中，第一第三Fab分子各自在Fab重鏈C端與Fc域之亞單元之一之N端融合，且第二Fab分子在Fab重鏈C端與第一Fab分子Fab重鏈N端融合。在一個特定的此類實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子基本上由以下組成：第一、第二及第三Fab分子、由第一及第二亞單元組成的Fc域及視情況存在之一或多個肽連接子，其中第二Fab分子在Fab重鏈C端與第一Fab分子Fab重鏈N端融合，且第一Fab分子在Fab重鏈C端與Fc域之第一亞單元之N端融合，且其中第三Fab分子在Fab重鏈C端與Fc域之第二亞單元之N端融合。此組態示意性地描繪於圖1C及1F (特定實施例，其中第三Fab分子為習知Fab分子且較佳與第一Fab分子相同)，及圖1J及圖1N (替代實施例，其中第三Fab分子為互換型Fab分子且較佳與第二Fab分子相同)。第一及第三Fab分子可與Fc域直接融合或經由肽連接子融合。在一個特定實施例中，第一及第三Fab分子各自經由免疫球蛋白鉸鏈區與Fc域融合。在一個特定實施例中，免疫球蛋白鉸鏈區為人類IgG₁鉸鏈區，特別是Fc域為IgG₁ Fc域的情況下。視情況，第一Fab分子之Fab輕鏈與第二Fab分子之Fab輕鏈可另外彼此間融合。

在其中Fab分子於Fab重鏈C端經由免疫球蛋白鉸鏈區與Fc域之亞單元中之每一者之N端融合的T細胞活化雙特異性抗原結合分子之組態中，

兩個Fab分子、鉸鏈區及Fc域基本上形成免疫球蛋白分子。在一個特定實施例中，免疫球蛋白分子為IgG類免疫球蛋白。在一個更特定的實施例中，免疫球蛋白為IgG₁子類免疫球蛋白。在另一個實施例中，免疫球蛋白為IgG₄子類免疫球蛋白。在另一個特定實施例中，免疫球蛋白為人類免疫球蛋白。在其他實施例中，免疫球蛋白為嵌合免疫球蛋白或人類化免疫球蛋白。

在本發明之一些T細胞活化雙特異性抗原結合分子中，第一Fab分子之Fab輕鏈與第二Fab分子之Fab輕鏈彼此間融合，視情況經由肽連接子融合。視第一及第二Fab分子之組態而定，第一Fab分子之Fab輕鏈可在其C端與第二Fab分子之Fab輕鏈之N端融合，或第二Fab分子之Fab輕鏈可在其C端與第一Fab分子之Fab輕鏈之N端融合。第一與第二Fab分子之Fab輕鏈之融合進一步降低不匹配Fab重鏈與輕鏈之錯配，且亦降低為了表現本發明之一些T細胞活化雙特異性抗原結合分子所需的質體數目。

在某些實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含其中第二Fab分子之Fab輕鏈可變區與第二Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基末端肽鍵(亦即第二Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈可變區經輕鏈可變區置換)、第二Fab分子之Fab重鏈恆定區又與Fc域亞單元共用羧基末端肽鍵(VL₍₂₎-CH1₍₂₎-CH2-CH3(-CH4))的多肽；及其中第一Fab分子之Fab重鏈與Fc域亞單元共用羧基末端肽鍵(VH₍₁₎-CH1₍₁₎-CH2-CH3(-CH4))的多肽。在一些實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含其中第二Fab分子之Fab重鏈可變區與第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區(VH₍₂₎-CL₍₂₎)及第一Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)共用羧基末端肽鍵的多肽。在某些實施例中，多肽係共價連接，例如經雙硫鍵連接。

在某些實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含其中第二Fab分子之Fab重鏈可變區與第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基末端肽鍵(亦即第二Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈可變區經輕鏈可變區置換)，第二Fab分子之Fab重鏈恆定區又與Fc域亞單元共用羧基末端肽鍵($VH_{(2)}-CL_{(2)}-CH_2-CH_3(-CH_4)$)的多肽；及其中第一Fab分子之Fab重鏈與Fc域亞單元共用羧基末端肽鍵($VH_{(1)}-CH_{1(1)}-CH_2-CH_3(-CH_4)$)的多肽。在一些實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含其中第二Fab分子之Fab輕鏈可變區與第二Fab分子之Fab重鏈恆定區($VL_{(2)}-CH_{1(2)}$)及第一Fab分子之Fab輕鏈多肽($VL_{(1)}-CL_{(1)}$)共用羧基末端肽鍵的多肽。在某些實施例中，多肽係共價連接，例如經雙硫鍵連接。

在一些實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含一種多肽，其中第二Fab分子之Fab輕鏈可變區與第二Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基末端肽鍵(亦即第二Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈可變區經輕鏈可變區置換)、第二Fab分子之Fab重鏈恆定區又與第一Fab分子之Fab重鏈共用羧基末端肽鍵、第一Fab分子之Fab重鏈又與Fc域亞單元共用羧基末端肽鍵($VL_{(2)}-CH_{1(2)}-VH_{(1)}-CH_{1(1)}-CH_2-CH_3(-CH_4)$)。在其他實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含一種多肽，其中第一Fab分子之Fab重鏈與第二Fab分子之Fab輕鏈可變區共用羧基末端肽鍵、第二Fab分子之Fab輕鏈可變區又與第二Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基末端肽鍵(亦即第二Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈可變區經輕鏈可變區置換)、第二Fab分子之Fab重鏈恆定區又與Fc域亞單元共用羧基末端肽鍵($VH_{(1)}-CH_{1(1)}-VL_{(2)}-CH_{1(2)}-CH_2-CH_3(-CH_4)$)。

在一些此等實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含

第二Fab分子之互換型Fab輕鏈多肽，其中第二Fab分子之Fab重鏈可變區與第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區(VH₍₂₎-CL₍₂₎)及第一Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)共用羧基末端肽鍵。在其他此等實施例中，適當時，T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含其中第二Fab分子之Fab重鏈可變區與第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基末端肽鍵、第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區又與第一Fab分子之Fab輕鏈多肽共用羧基末端肽鍵(VH₍₂₎-CL₍₂₎-VL₍₁₎-CL₍₁₎)的多肽；或其中第一Fab分子之Fab輕鏈多肽與第二Fab分子之Fab重鏈可變區共用羧基末端肽鍵、第二Fab分子之Fab重鏈可變區又與第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基末端肽鍵(VL₍₁₎-CL₍₁₎-VH₍₂₎-CL₍₂₎)的多肽。

根據此等實施例之T細胞活化雙特異性抗原結合分子可進一步包含(i)Fc域亞單元多肽(CH₂-CH₃(-CH₄))；或(ii)其中第三Fab分子之Fab重鏈與Fc域亞單元(VH₍₃₎-CH₁(₃)-CH₂-CH₃(-CH₄))及第三Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₃₎-CL₍₃₎)共用羧基末端肽鍵的多肽。在某些實施例中，多肽係共價連接，例如經雙硫鍵連接。

在一些實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含一種多肽，其中第二Fab分子之Fab重鏈可變區與第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基末端肽鍵(亦即第二Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈恆定區經輕鏈恆定區置換)、第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區又與第一Fab分子之Fab重鏈共用羧基末端肽鍵、第一Fab分子之Fab重鏈又與Fc域亞單元共用羧基末端肽鍵(VH₍₂₎-CL₍₂₎-VH₍₁₎-CH₁(₁)-CH₂-CH₃(-CH₄))。在其他實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含一種多肽，其中第一Fab分子之Fab重鏈與第二Fab分子之Fab重鏈可變區共用羧基末端肽鍵、第二Fab

分子之Fab重鏈可變區又與第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基末端肽鍵(亦即第二Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈恆定區經輕鏈恆定區置換)、第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區又與Fc域亞單元共用羧基末端肽鍵($VH_{(1)}-CH1_{(1)}-VH_{(2)}-CL_{(2)}-CH2-CH3(-CH4)$)。

在一些此等實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含第二Fab分子之互換型Fab輕鏈多肽，其中第二Fab分子之Fab輕鏈可變區與第二Fab分子之Fab重鏈恆定區($VL_{(2)}-CH1_{(2)}$)及第一Fab分子之Fab輕鏈多肽($VL_{(1)}-CL_{(1)}$)共用羧基末端肽鍵。在其他此等實施例中，適當時，T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含其中第二Fab分子之Fab輕鏈可變區與第二Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基末端肽鍵、第二Fab分子之Fab重鏈恆定區又與第一Fab分子之Fab輕鏈多肽共用羧基末端肽鍵($VL_{(2)}-CH1_{(2)}-VL_{(1)}-CL_{(1)}$)的多肽；或其中第一Fab分子之Fab輕鏈多肽與第二Fab分子之Fab重鏈可變區共用羧基末端肽鍵、第二Fab分子之Fab重鏈可變區又與第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基末端肽鍵($VL_{(1)}-CL_{(1)}-VH_{(2)}-CL_{(2)}$)的多肽。

根據此等實施例之T細胞活化雙特異性抗原結合分子可進一步包含(i) Fc域亞單元多肽($CH2-CH3(-CH4)$)；或(ii)其中第三Fab分子之Fab重鏈與Fc域亞單元($VH_{(3)}-CH1_{(3)}-CH2-CH3(-CH4)$)及第三Fab分子之Fab輕鏈多肽($VL_{(3)}-CL_{(3)}$)共用羧基末端肽鍵的多肽。在某些實施例中，多肽係共價連接，例如經雙硫鍵連接。

在一些實施例中，第一Fab分子在Fab重鏈C端與第二Fab分子之Fab重鏈之N端融合。在某些此類實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子不包含Fc域。在某些實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子基本

上由以下組成：第一及第二Fab分子，以及視情況存在之一或多個肽連接子，其中第一Fab分子在Fab重鏈C端與第二Fab分子Fab重鏈N端融合。此組態示意性地描繪於圖1O及1S中。

在其他實施例中，第二Fab分子在Fab重鏈C端與第一Fab分子Fab重鏈N端融合。在某些此類實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子不包含Fc域。在某些實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子基本上由以下組成：第一及第二Fab分子，以及視情況存在之一或多個肽連接子，其中第二Fab分子在Fab重鏈C端與第一Fab分子Fab重鏈N端融合。此組態示意性地描繪於圖1P及1T中。

在一些實施例中，第一Fab分子在Fab重鏈C端與第二Fab分子Fab重鏈N端融合，且T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含第三Fab分子，其中該第三Fab分子在Fab重鏈C端與第一Fab分子Fab重鏈N端融合。在特定的此類實施例中，該第三Fab分子為習知Fab分子。在其他此類實施例中，該第三Fab分子為如本文所述的互換型Fab分子，亦即其中Fab重鏈與輕鏈之可變域VH與VL或恆定域CL與CH1彼此間交換/置換的Fab分子。在某些此類實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子基本上由以下組成：第一、第二及第三Fab分子，以及視情況存在之一或多個肽連接子，其中第一Fab分子在Fab重鏈C端與第二Fab分子Fab重鏈N端融合，且第三Fab分子在Fab重鏈C端與第一Fab分子Fab重鏈N端融合。此組態示意性地描繪於圖1Q及1U中(特定實施例，其中第三Fab分子為習知Fab分子且較佳與第一Fab分子相同)。

在一些實施例中，第一Fab分子在Fab重鏈C端與第二Fab分子Fab重鏈N端融合，且T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含第三Fab分

子，其中該第三Fab分子在Fab重鏈N端與第二Fab分子Fab重鏈C端融合。在特定的此類實施例中，該第三Fab分子為如本文所述的互換型Fab分子，亦即其中Fab重鏈與輕鏈之可變域VH與VL或恆定域CH1與CL彼此間交換/置換的Fab分子。在其他此類實施例中，該第三Fab分子為習知Fab分子。在某些此類實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子基本上由以下組成：第一、第二及第三Fab分子，以及視情況存在之一或多個肽連接子，其中第一Fab分子在Fab重鏈C端與第二Fab分子Fab重鏈N端融合，且第三Fab分子在Fab重鏈N端與第二Fab分子Fab重鏈C端融合。此組態示意性地描繪於圖1W及1Y中(特定實施例，其中第三Fab分子為互換型Fab分子且較佳與第二Fab分子相同)。

在一些實施例中，第二Fab分子在Fab重鏈C端與第一Fab分子Fab重鏈N端融合，且T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含第三Fab分子，其中該第三Fab分子在Fab重鏈N端與第一Fab分子Fab重鏈C端融合。在特定的此類實施例中，該第三Fab分子為習知Fab分子。在其他此類實施例中，該第三Fab分子為如本文所述的互換型Fab分子，亦即其中Fab重鏈與輕鏈之可變域VH與VL或恆定域CH1與CL彼此間交換/置換的Fab分子。在某些此類實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子基本上由以下組成：第一、第二及第三Fab分子，以及視情況存在之一或多個肽連接子，其中第二Fab分子在Fab重鏈C端與第一Fab分子Fab重鏈N端融合，且第三Fab分子在Fab重鏈N端與第一Fab分子Fab重鏈C端融合。此組態示意性地描繪於圖1R及1V中(特定實施例，其中第三Fab分子為習知Fab分子且較佳與第一Fab分子相同)。

在一些實施例中，第二Fab分子在Fab重鏈C端與第一Fab分子Fab重

鏈N端融合，且T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含第三Fab分子，其中該第三Fab分子在Fab重鏈C端與第二Fab分子Fab重鏈N端融合。在特定的此類實施例中，該第三Fab分子為如本文所述的互換型Fab分子，亦即其中Fab重鏈與輕鏈之可變域VH與VL或恆定域CH1與CL彼此間交換/置換的Fab分子。在其他此類實施例中，該第三Fab分子為習知Fab分子。在某些此類實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子基本上由以下組成：第一、第二及第三Fab分子，以及視情況存在之一或多個肽連接子，其中第二Fab分子在Fab重鏈C端與第一Fab分子Fab重鏈N端融合，且第三Fab分子在Fab重鏈C端與第二Fab分子Fab重鏈N端融合。此組態示意性地描繪於圖1X及1Z中(特定實施例，其中第三Fab分子為互換型Fab分子且較佳與第一Fab分子相同)。

在某些實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含一種多肽，其中第一Fab分子之Fab重鏈與第二Fab分子之Fab輕鏈可變區共用羧基末端肽鍵、第二Fab分子之Fab輕鏈可變區又與第二Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基末端肽鍵(亦即第二Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈可變區經輕鏈可變區置換)(VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VL₍₂₎-CH1₍₂₎)。在一些實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含其中第二Fab分子之Fab重鏈可變區與第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區(VH₍₂₎-CL₍₂₎)及第一Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)共用羧基末端肽鍵的多肽。

在某些實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含一種多肽，其中第二Fab分子之Fab輕鏈可變區與第二Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基末端肽鍵(亦即第二Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈可變區經置換)、第二Fab分子之Fab輕鏈可變區又與第二Fab分子之Fab重

鏈恆定區共用羧基末端肽鏈(亦即第二Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈可變區經輕鏈可變區置換)、第二Fab分子之Fab重鏈恆定區又與第一Fab分子之Fab重鏈共用羧基末端肽鏈(VL₍₂₎-CH1₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎)。在一些實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含其中第二Fab分子之Fab重鏈可變區與第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區(VH₍₂₎-CL₍₂₎)及第一Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)共用羧基末端肽鏈的多肽。

在某些實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含一種多肽，其中第二Fab分子之Fab重鏈可變區與第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基末端肽鏈(亦即第二Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈可變區經輕鏈恆定區置換)、第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區又與第一Fab分子之Fab重鏈共用羧基末端肽鏈(VH₍₂₎-CL₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎)。在一些實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含其中第二Fab分子之Fab輕鏈可變區與第二Fab分子之Fab重鏈恆定區(VL₍₂₎-CH1₍₂₎)及第一Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)共用羧基末端肽鏈的多肽。

在某些實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含其中第三Fab分子之Fab重鏈與第一Fab分子之Fab重鏈共用羧基末端肽鏈、第一Fab分子之Fab重鏈又與第二Fab分子之Fab輕鏈可變區共用羧基末端肽鏈、第二Fab分子之Fab輕鏈可變區又與第二Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基末端肽鏈；及其中第一Fab分子之Fab重鏈與Fc域亞單元共用羧基末端肽鏈的多肽(亦即第二Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈可變區經輕鏈可變區置換)(VH₍₃₎-CH1₍₃₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VL₍₂₎-CH1₍₂₎)。在一些實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含其中第二Fab分子之Fab重鏈可變區與第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區(VH₍₂₎-CL₍₂₎)及第一

Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)共用羧基末端肽鍵的多肽。在一些實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含第三Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₃₎-CL₍₃₎)。

在某些實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含其中第三Fab分子之Fab重鏈與第一Fab分子之Fab重鏈共用羧基末端肽鍵、第一Fab分子之Fab重鏈又與第二Fab分子之Fab重鏈可變區共用羧基末端肽鍵、第二Fab分子之Fab重鏈可變區又與第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基末端肽鍵(亦即，第二Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈恆定區經輕鏈恆定區置換)的多肽(VH₍₃₎-CH1₍₃₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VH₍₂₎-CL₍₂₎)。在一些實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含其中第二Fab分子之Fab輕鏈可變區與第二Fab分子之Fab重鏈恆定區(VL₍₂₎-CH1₍₂₎)及第一Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)共用羧基末端肽鍵的多肽。在一些實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含第三Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₃₎-CL₍₃₎)。

在某些實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含其中第二Fab分子之Fab重鏈與第二Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基末端肽鍵(亦即第二Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈可變區經輕鏈可變區置換)、第二Fab分子之Fab重鏈恆定區又與第一Fab分子之Fab重鏈共用羧基末端肽鍵、第一Fab分子之Fab重鏈又與第三Fab分子之Fab重鏈共用羧基末端肽鍵的多肽(VL₍₂₎-CH1₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VH₍₃₎-CH1₍₃₎)。在一些實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含其中第二Fab分子之Fab重鏈可變區與第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區(VH₍₂₎-CL₍₂₎)及第一Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)共用羧基末端肽鍵的多肽。在一些實

施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含第三Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₃₎-CL₍₃₎)。

在某些實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含其中第二Fab分子之Fab重鏈可變區與第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基末端肽鍵(亦即第二Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈恆定區經輕鏈恆定區置換)、第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區又與第一Fab分子之Fab重鏈共用羧基末端肽鍵、第一Fab分子之Fab重鏈又與第三Fab分子之Fab重鏈共用羧基末端肽鍵的多肽(VH₍₂₎-CL₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VH₍₃₎-CH1₍₃₎)。在一些實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含其中第二Fab分子之Fab輕鏈可變區與第二Fab分子之Fab重鏈恆定區(VL₍₂₎-CH1₍₂₎)及第一Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)共用羧基末端肽鍵的多肽。在一些實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含第三Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₃₎-CL₍₃₎)。

在某些實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含一種多肽，其中第一Fab分子之Fab重鏈與第二Fab分子之Fab輕鏈可變區共用羧基末端肽鍵、第二Fab分子之Fab輕鏈可變區又與第二Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基末端肽鍵(亦即第二Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈可變區經輕鏈可變區置換)、第二Fab分子之Fab重鏈恆定區又與第三Fab分子之Fab輕鏈可變區共用羧基末端肽鍵、第三Fab分子之Fab輕鏈可變區又與第三Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基末端肽鍵(亦即第三Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈可變區經輕鏈可變區置換)(VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VL₍₂₎-CH1₍₂₎-VL₍₃₎-CH1₍₃₎)。在一些實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含其中第二Fab分子之Fab重鏈可變區與第二Fab

分子之Fab輕鏈恆定區($VH_{(2)}-CL_{(2)}$)及第一Fab分子之Fab輕鏈多肽($VL_{(1)}-CL_{(1)}$)共用羧基末端肽鍵的多肽。在一些實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含其中第三Fab分子之Fab重鏈可變區與第三Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基末端肽鍵($VH_{(3)}-CL_{(3)}$)的多肽。

在某些實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含其中第一Fab分子之Fab重鏈與第二Fab分子之Fab重鏈可變區共用羧基末端肽鍵、第二Fab分子之Fab重鏈可變區又與第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基末端肽鍵(亦即第二Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈恆定區經輕鏈恆定區置換)、第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區又與第三Fab分子之Fab重鏈可變區共用羧基末端肽鍵、第三Fab分子之Fab重鏈可變區又與第三Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基末端肽鍵(亦即第三Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈恆定區經輕鏈恆定區置換)的多肽($VH_{(1)}-CH1_{(1)}-VH_{(2)}-CL_{(2)}-VH_{(3)}-CL_{(3)}$)。在一些實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含其中第二Fab分子之Fab輕鏈可變區與第二Fab分子之Fab重鏈恆定區($VL_{(2)}-CH1_{(2)}$)及第一Fab分子之Fab輕鏈多肽($VL_{(1)}-CL_{(1)}$)共用羧基末端肽鍵的多肽。在一些實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含其中第三Fab分子之Fab輕鏈可變區與第三Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基末端肽鍵($VL_{(3)}-CH1_{(3)}$)的多肽。

在某些實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含一種多肽，其中第三Fab分子之Fab輕鏈可變區與第三Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基末端肽鍵(亦即第三Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈可變區經輕鏈可變區置換)、第三Fab分子之Fab重鏈恆定區又與第二Fab分子之Fab輕鏈可變區共用羧基末端肽鍵、第二Fab分子之Fab輕鏈可變區

又與第二Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基末端肽鍵(亦即第二Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈可變區經輕鏈可變區置換)、第二Fab分子之Fab重鏈恆定區又與第一Fab分子之Fab重鏈共用羧基末端肽鍵(VL₍₃₎-CH1₍₃₎-VL₍₂₎-CH1₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎)。在一些實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含其中第二Fab分子之Fab重鏈可變區與第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區(VH₍₂₎-CL₍₂₎)及第一Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)共用羧基末端肽鍵的多肽。在一些實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含其中第三Fab分子之Fab重鏈可變區與第三Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基末端肽鍵(VH₍₃₎-CL₍₃₎)的多肽。

在某些實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含其中第三Fab分子之Fab重鏈可變區與第三Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基末端肽鍵(亦即第三Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈恆定區經輕鏈恆定區置換)、第三Fab分子之Fab輕鏈恆定區又與第二Fab分子之Fab重鏈可變區共用羧基末端肽鍵、第二Fab分子之Fab重鏈可變區又與第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基末端肽鍵(亦即第二Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈恆定區經輕鏈恆定區置換)、第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區又與第一Fab分子之Fab重鏈共用羧基末端肽鍵的多肽(VH₍₃₎-CL₍₃₎-VH₍₂₎-CL₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎)。在一些實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含其中第二Fab分子之Fab輕鏈可變區與第二Fab分子之Fab重鏈恆定區(VL₍₂₎-CH1₍₂₎)及第一Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)共用羧基末端肽鍵的多肽。在一些實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子進一步包含其中第三Fab分子之Fab輕鏈可變區與第三Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基末端肽鍵(VL₍₃₎-CH1₍₃₎)的多肽。

根據任一上述實施例，T細胞活化雙特異性抗原結合分子中之組分(例如Fab分子、Fc域)可直接或經由各種連接子(特定言之，本文所述或此項技術中已知之包含一或多個胺基酸、典型地約2-20個胺基酸的肽連接子)融合。適合的非免疫原性肽連接子包括例如 $(G_4S)_n$ 、 $(SG_4)_n$ 、 $(G_4S)_n$ 或 $G_4(SG_4)_n$ 肽連接子，其中n一般為整數1至10，典型地為2至4。

Fc域

T細胞活化雙特異性抗原結合分子中之Fc域係由一對包含免疫球蛋白分子重鏈域的多肽鏈組成。舉例而言，免疫球蛋白G (IgG)分子中之Fc域為二聚體，其中各亞單元包含CH2及CH3 IgG重鏈恆定域。Fc域之兩個亞單元彼此間能夠穩定結合。在一個實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含不超過一個Fc域。

在根據本發明之一個實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子中之Fc域為IgG Fc域。在一個特定實施例中，Fc域為IgG₁ Fc域。在另一實施例中，Fc域為IgG₄ Fc域。在一個更特定實施例中，Fc域為包含位置S228 (Kabat編號)之胺基酸取代(特定言之，胺基酸取代S228P)的IgG₄ Fc域。此胺基酸取代減少活體內IgG₄抗體之Fab臂交換(參見Stubenrauch等人, Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010))。在另一個特定實施例中，Fc域為人類Fc域。人類IgG₁ Fc區之例示性序列明示於SEQ ID NO:13中。

促進雜二聚化之Fc域修飾

本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含與Fc域之兩個亞單元中之一者或另一者融合的不同Fab分子，因此Fc域之該兩個亞單元典型地包含於兩個非一致多肽鏈中。此等多肽之重組共表現及隨後二聚化引起兩

種多肽出現若干種可能的組合。因此有利的是，將促進所要多肽結合的修飾引入T細胞活化雙特異性抗原結合分子之Fc域中以改良T細胞活化雙特異性抗原結合分子在重組製造時的產量及純度。

因此，在特定實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子之Fc域包含促進Fc域之第一亞單元與第二亞單元結合的修飾。人類IgG Fc域中之兩個亞單元之間最廣泛蛋白質-蛋白質相互作用的位點存在於Fc域之CH3域中。因此，在一個實施例中，該修飾存在於Fc域之CH3域中。

Fc域之CH3域中的修飾存在若干種方法以便進行雜二聚化，此等方法充分描述於例如WO 96/27011、WO 98/050431、EP 1870459、WO 2007/110205、WO 2007/147901、WO 2009/089004、WO 2010/129304、WO 2011/90754、WO 2011/143545、WO 2012058768、WO 2013157954、WO 2013096291中。典型地，在所有此類方法中，Fc域之第一亞單元之CH3域與Fc域之第二亞單元之CH3域均以互補方式經工程改造，使得各CH3域(或包含其的重鏈)本身不再發生均二聚，而是被迫與以互補方式經工程改造之另一CH3域雜二聚(使得第一CH3域與第二CH3域發生雜二聚且兩個第一CH3域或兩個第二CH3域之間不形成均二聚體)。涵蓋用於改良重鏈雜二聚化的此等不同方法作為不同替代方案與本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子中的重鏈-輕鏈修飾(一個結合臂中存在VH與VL交換/置換且帶電胺基酸經相反電荷取代引入CH1/CL界面)的組合，從而減少輕鏈錯配及瓊斯本型副產物。

在一個特定實施例中，促進Fc域之第一亞單元與第二亞單元結合的該修飾為所謂的「臼包杵」型修飾，包含位於Fc域之兩個亞單元之一中的「杵」型修飾及位於Fc域之兩個亞單元之另一者中的「臼」型修飾。

臼包杵型技術描述於例如US 5,731,168; US 7,695,936 ; Ridgway等人, Prot Eng 9, 617-621 (1996)及Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)。一般而言,方法包括在第一多肽之界面處引入隆凸(「杵」)及在第二多肽之界面處引入相應空腔(「臼」),使得隆凸可定位於空腔中以便促進雜二聚體形成且阻礙均二聚體形成。藉由用較大側鏈(例如酪胺酸或色胺酸)置換第一多肽界面中之小胺基酸側鏈來構建隆凸。藉由用較小胺基酸側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)置換大胺基酸側鏈而在第二多肽界面中產生大小與隆凸相同或相似的補償性空腔。

因此,在一個特定實施例中,在T細胞活化雙特異性抗原結合分子之Fc域之第一亞單元之CH3域中,胺基酸殘基經具有較大側鏈體積的胺基酸殘基置換,從而在第一亞單元之CH3域內產生可定位於第二亞單元之CH3域內之空腔中的隆凸,且在Fc域之第二亞單元之CH3域中,胺基酸殘基經具有較小側鏈體積的胺基酸殘基置換,從而在第二亞單元之CH3域內產生供第一亞單元之CH3域內之隆凸可定位於其中的空腔。

較佳地,具有較大側鏈體積之該胺基酸殘基選自由精胺酸(R)、苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)及色胺酸(W)組成之群。

較佳地,具有較小側鏈體積的胺基酸殘基選自由丙胺酸(A)、絲胺酸(S)、蘇胺酸(T)及纈胺酸(V)組成之群。

隆凸及空腔可藉由改變編碼多肽之核酸(例如藉由定點突變誘發或藉由肽合成來改變)來產生。

在一特定實施例中,在Fc域之第一亞單元(「杵」亞單元)之CH3域中,位置366之蘇胺酸殘基經色胺酸殘基置換(T366W),且在Fc域之第二亞單元(「臼」亞單元)之CH3域中,位置407之酪胺酸殘基經纈胺酸殘基

置換(Y407V)。在一個實施例中，在Fc域之第二亞單元中，另外，位置366之蘇胺酸殘基經絲胺酸殘基置換(T366S)且位置368之白胺酸殘基經丙胺酸殘基置換(L368A)(根據Kabat EU索引編號)。

在另一實施例中，在Fc域之第一亞單元中，另外，位置354之絲胺酸殘基經半胱胺酸殘基(S354C)置換或位置356之麩胺酸殘基經半胱胺酸殘基置換(E356C)，且在Fc域之第二亞單元中，另外，位置349之酪胺酸殘基經半胱胺酸殘基置換(Y349C)(根據Kabat EU索引編號)。引入此等兩個半胱胺酸殘基使得Fc域之兩個亞單元之間形成二硫橋鍵，進一步穩定二聚體(Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001))。

在一個特定實施例中，Fc域之第一亞單元包含胺基酸取代S354C及T366W，且Fc域之第二亞單元包含胺基酸取代Y349C、T366S、L368A及Y407V (根據Kabat EU索引編號)。

在一個特定實施例中，特異性結合活化T細胞抗原的Fab分子與Fc域之第一亞單元(包含「杵」型修飾)融合(視情況經由特異性結合至靶細胞抗原的Fab分子融合)。不希望受理論束縛，特異性結合活化T細胞抗原之Fab分子與Fc域之含杵亞單元融合(進一步)使包含兩個結合至活化T細胞抗原之Fab分子之抗原結合分子的產生最小化(兩個含杵多肽在空間上有抵觸)。

涵蓋用於增強雜二聚化之CH3修飾的其他技術作為本發明之替代方案且此等技術描述於例如WO 96/27011、WO 98/050431、EP 1870459、WO 2007/110205、WO 2007/147901、WO 2009/089004、WO 2010/129304、WO 2011/90754、WO 2011/143545、WO 2012/058768、WO 2013/157954、WO 2013/096291中。

在一個實施例中，替代地使用EP 1870459 A1中所述之雜二聚化方法。此方法係基於在Fc域之兩個亞單元之間的CH3/CH3域界面中的特定胺基酸位置引入具有相反電荷的帶電胺基酸。本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子之一個較佳實施例為存在於(Fc域之)兩個CH3域之一中的胺基酸突變R409D、K370E及存在於Fc域之另一個CH3域中的胺基酸突變D399K、E357K (根據Kabat EU索引編號)。

在另一個實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含存在於Fc域之第一亞單元之CH3域中的胺基酸突變T366W及存在於Fc域之第二亞單元之CH3域中的胺基酸突變T366S、L368A、Y407V；以及另外存在於Fc域之第一亞單元之CH3域中的胺基酸突變R409D、K370E及存在於Fc域之第二亞單元之CH3域中的胺基酸突變D399K、E357K (根據Kabat EU索引編號)。

在另一個實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含存在於Fc域之第一亞單元之CH3域中的胺基酸突變S354C、T366W及存在於Fc域之第二亞單元之CH3域中的胺基酸突變Y349C、T366S、L368A、Y407V，或該T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含存在於Fc域之第一亞單元之CH3域中的胺基酸突變Y349C、T366W及存在於Fc域之第二亞單元之CH3域中的胺基酸突變S354C、T366S、L368A、Y407V以及另外存在於Fc域之第一亞單元之CH3域中的胺基酸突變R409D、K370E及存在於Fc域之第二亞單元之CH3域中的胺基酸突變D399K、E357K (所有編號均根據Kabat EU索引)。

在一個實施例中，替代地使用WO 2013/157953中所述之雜二聚化方法。在一個實施例中，第一CH3域包含胺基酸突變T366K且第二CH3域包

含胺基酸突變L351D (根據Kabat EU索引編號)。在另一實施例中，第一CH3域進一步包含胺基酸突變L351K。在另一實施例中，第二CH3域進一步包含選自Y349E、Y349D及L368E之胺基酸突變(較佳為L368E)(根據Kabat EU索引編號)。

在一個實施例中，替代地使用WO 2012/058768中所述之雜二聚化方法。在一個實施例中，第一CH3域包含胺基酸突變L351Y、Y407A且第二CH3域包含胺基酸突變T366A、K409F。在另一實施例中，第二CH3域包含位置T411、D399、S400、F405、N390或K392之另一胺基酸突變，例如選自以下之胺基酸突變：a) T411N、T411R、T411Q、T411K、T411D、T411E或T411W；b) D399R、D399W、D399Y或D399K；c) S400E、S400D、S400R或S400K；d) F405I、F405M、F405T、F405S、F405V或F405W；e) N390R、N390K或N390D；f) K392V、K392M、K392R、K392L、K392F或K392E (根據Kabat EU索引編號)。在另一實施例中，第一CH3域包含胺基酸突變L351Y、Y407A且第二CH3域包含胺基酸突變T366V、K409F。在另一實施例中，第一CH3域包含胺基酸突變Y407A且第二CH3域包含胺基酸突變T366A、K409F。在另一實施例中，第二CH3域進一步包含胺基酸突變K392E、T411E、D399R及S400R (根據Kabat EU索引編號)。

在一個實施例中，替代地使用WO 2011/143545中所述之雜二聚化方法，例如發生於選自由368及409組成之群之位置的胺基酸修飾(根據Kabat EU索引編號)。

在一個實施例中，替代地使用WO 2011/090762中所述之雜二聚化方法，其亦使用上述白包杓技術。在一個實施例中，第一CH3域包含胺基酸

突變T366W且第二CH3域包含胺基酸突變Y407A。在一個實施例中，第一CH3域包含胺基酸突變T366Y且第二CH3域包含胺基酸突變Y407T (根據Kabat EU索引編號)。

在一個實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子或其Fc域屬於IgG₂子類且替代地使用WO 2010/129304中所述之雜二聚化方法。

在一個替代實施例中，促進Fc域之第一亞單元與第二亞單元結合的修飾包含介導靜電導引作用的修飾，例如如PCT公開案第WO 2009/089004號中所述。一般而言，此方法包括兩個Fc域亞單元界面處的一或多個胺基酸殘基經帶電胺基酸殘基置換，以致均二聚體形成在靜電上變得不利，但雜二聚化在靜電上變得有利。在一個此類實施例中，第一CH3域包含帶負電胺基酸(例如麩胺酸(E)或天冬胺酸(D))對K392或N392發生的胺基酸取代(較佳為K392D或N392D)且第二CH3域包含帶正電胺基酸(例如離胺酸(K)或精胺酸(R))對D399、E356、D356或E357發生的胺基酸取代(較佳為D399K、E356K、D356K或E357K，且更佳為D399K及E356K)。在另一實施例中，第一CH3域進一步包含帶負電胺基酸(例如麩胺酸(E)或天冬胺酸(D))對K409或R409發生的胺基酸取代(較佳為K409D或R409D)。在另一實施例中，第一CH3域進一步或替代地包含帶負電胺基酸(例如麩胺酸(E)或天冬胺酸(D))對K439及/或K370發生的胺基酸取代(所有編號均根據Kabat EU索引)。

在又另一個實施例中，替代地使用WO 2007/147901中所述之雜二聚化方法。在一個實施例中，第一CH3域包含胺基酸突變K253E、D282K及K322D且第二CH3域包含胺基酸突變D239K、E240K及K292D (根據Kabat EU索引編號)。

在再另一個實施例中，可替代地使用WO 2007/110205中所述之雜二聚化方法。

在一個實施例中，Fc域之第一亞單元包含胺基酸取代K392D及K409D，且Fc域之第二亞單元包含胺基酸取代D356K及D399K（根據Kabat EU索引編號）。

Fc域修飾降低Fc受體結合及/或效應功能

Fc域賦予T細胞活化雙特異性抗原結合分子有利的藥物動力學特性，包括較長血清半衰期，其有助於良好聚積於靶組織中及有利的組織-血液分佈比率。然而，其同時引起T細胞活化雙特異性抗原結合分子非所需地靶向表現Fc受體之細胞，而非優先靶向攜帶抗原之細胞。此外，Fc受體信號傳導路徑之共活化可引起細胞激素釋放，細胞激素釋放與抗原結合分子之T細胞活化特性及長半衰期組合，導致全身性投藥後的細胞激素受體過度活化及重度副作用。由於T細胞存在被摧毀(例如被NK細胞摧毀)的可能性，因此除T細胞之外之免疫細胞(攜帶Fc受體)之活化甚至會降低T細胞活化雙特異性抗原結合分子之功效。

因此，在特定實施例中，相較於原生IgG₁ Fc域，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子中之Fc域展現降低之針對Fc受體的結合親和力及/或降低之效應功能。在一個此類實施例中，Fc域(或包含該Fc域的T細胞活化雙特異性抗原結合分子)對Fc受體展現的結合親和力小於原生IgG₁ Fc域(或包含原生IgG₁ Fc域的T細胞活化雙特異性抗原結合分子)對Fc受體之結合親和力的50%，較佳小於20%，更佳小於10%且最佳小於5%，且/或Fc域(或包含該Fc域的T細胞活化雙特異性抗原結合分子)現的效應功能小於原生IgG₁ Fc域(或包含原生IgG₁ Fc域的T細胞活化雙特異性抗原結合

分子)所展現之效應功能的50%，較佳小於20%，更佳小於10%且最佳小於5%。在一個實施例中，Fc域(或包含該Fc域的T細胞活化雙特異性抗原結合分子)實質上不結合至Fc受體且/或誘導效應功能。在一個特定實施例中，Fc受體為Fc γ 受體。在一個實施例中，Fc受體為人類Fc受體。在一個實施例中，Fc受體為活化Fc受體。在一個特定實施例中，Fc受體為活化人類Fc γ 受體，更特定言之，人類Fc γ RIIIa、Fc γ RI或Fc γ RIIa，最特定言之，人類Fc γ RIIIa。在一個實施例中，效應功能為選自CDC、ADCC、ADCP及細胞激素分泌之群的一或多者。在一個特定實施例中，效應功能為ADCC。在一個實施例中，Fc域對新生兒Fc受體(FcRn)展現的結合親和力實質上類似於原生IgG₁ Fc域。當Fc域(或包含該Fc域的T細胞活化雙特異性抗原結合分子)對FcRn展現的結合親和力大於原生IgG₁ Fc域(或包含原生IgG₁ Fc域的T細胞活化雙特異性抗原結合分子)對FcRn之結合親和力的約70%、特定言之大於約80%、更特定言之大於約90%時，對FcRn達成實質上相似的結合。

在某些實施例中，相較於未經工程改造的Fc域，經工程改造的Fc域對Fc受體的結合親和力減小且/或效應功能減少。在特定實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子之Fc域包含一或多個使Fc域對Fc受體之結合親和力及/或效應功能減少的胺基酸突變。典型地，Fc域之兩個亞單元中之每一者中存在該一或多個胺基酸突變。在一個實施例中，胺基酸突變使Fc域對Fc受體的結合親和力減小。在一個實施例中，胺基酸突變使Fc域對Fc受體的結合親和力減小至少2倍、至少5倍或至少10倍。在其中存在超過一個使Fc域對Fc受體之結合親和力減小之胺基酸突變的實施例中，此等胺基酸突變之組合可使Fc域對Fc受體的結合親和力減小至少10倍、

至少20倍或甚至至少50倍。在一個實施例中，包含經工程改造之Fc域的T細胞活化雙特異性抗原結合分子對Fc受體展現的結合親和力小於包含未經工程改造之Fc域之T細胞活化雙特異性抗原結合分子之結合親和力的20%，特定言之小於10%，更特定言之小於5%。在一個特定實施例中，Fc受體為Fc γ 受體。在一些實施例中，Fc受體為人類Fc受體。在一些實施例中，Fc受體為活化Fc受體。在一個特定實施例中，Fc受體為活化人類Fc γ 受體，更特定言之，人類Fc γ RIIIa、Fc γ RI或Fc γ RIIa，最特定言之，人類Fc γ RIIIa。較佳地，與此等受體中之每一者的結合減少。在一些實施例中，相對於補體組分的結合親和力，特定言之，相對於C1q的結合親和力，亦減小。在一個實施例中，相對於新生兒Fc受體(FcRn)的結合親和力未減小。當Fc域(或包含該Fc域的T細胞活化雙特異性抗原結合分子)對FcRn展現的結合親和力大於未經工程改造之Fc域形式(或包含該未經工程改造之Fc域形式的T細胞活化雙特異性抗原結合分子)之結合親和力的約70%時，對FcRn達成實質上相似的結合，亦即，保持Fc域對該受體的結合親和力。Fc域或本發明之包含該Fc域的T細胞活化雙特異性抗原結合分子可展現大於此親和力的約80%且甚至大於約90%。在某些實施例中，相較於未經工程改造之Fc域，T細胞活化雙特異性抗原結合分子中之Fc域經工程改造可具有減少之效應功能。減少之效應功能可包括(但不限於)以下一或多者：補體依賴性細胞毒性(CDC)降低、抗體依賴性細胞介導性細胞毒性(ADCC)降低、抗體依賴性細胞吞噬(ADCP)減少、細胞激素分泌減少、免疫複合物介導抗原呈遞細胞攝入抗原減少、相對於NK細胞的結合減少、相對於巨噬細胞的結合減少、相對於單核細胞的結合減少、相對於多形核細胞的結合減少、誘導細胞凋亡之直接信號傳導減少、標靶所結合

抗體之交聯減少、樹突狀細胞成熟減少，或T細胞激活減少。在一個實施例中，減少之效應功能為選自以下之群的一或多者：CDC降低、ADCC降低、ADCP降低及細胞激素分泌減少。在一個特定實施例中，減少之效應功能為ADCC降低。在一個實施例中，降低之ADCC小於未經工程改造之Fc域(或包含未經工程改造之Fc域的T細胞活化雙特異性抗原結合分子)所誘導之ADCC的20%。

在一個實施例中，使Fc域對Fc受體之結合親和力及/或效應功能減少的胺基酸突變為胺基酸取代。在一個實施例中，Fc域包含位於選自以下之群之位置的胺基酸取代：E233、L234、L235、N297、P331及P329 (根據Kabat EU索引編號)。在一個更特定實施例中，Fc域包含位於選自以下之群之位置的胺基酸取代：L234、L235及P329 (根據Kabat EU索引編號)。在一些實施例中，Fc域包含胺基酸取代L234A及L235A (根據Kabat EU索引編號)。在一個此類實施例中，Fc域為IgG₁ Fc域，特定言之，人類IgG₁ Fc域。在一個實施例中，Fc域包含位置P329之胺基酸取代。在一個更特定的實施例中，胺基酸取代為P329A或P329G，特定言之，P329G (根據Kabat EU索引編號)。在一個實施例中，Fc域包含位置P329之胺基酸取代及選自E233、L234、L235、N297及P331之位置的另一胺基酸取代(根據Kabat EU索引編號)。在一個更特定的實施例中，另一胺基酸取代為E233P、L234A、L235A、L235E、N297A、N297D或P331S。在特定實施例中，Fc域包含位置P329、L234及L235之胺基酸取代(根據Kabat EU索引編號)。在更特定的實施例中，Fc域包含胺基酸突變L234A、L235A及P329G (「P329G LALA」)。在一個此類實施例中，Fc域為IgG₁ Fc域，特定言之，人類IgG₁ Fc域。「P329G LALA」胺基酸取代組合幾乎

澈底地消除人類IgG₁ Fc域與Fc γ 受體(以及補體)之結合，如PCT公開案第WO 2012/130831號中所述，該文獻以全文引用的方式併入本文中。WO 2012/130831亦描述製備此類突變型Fc域的方法及測定其特性(諸如Fc受體結合或效應功能)的方法。

相較於IgG₁抗體，IgG₄抗體展現減小之針對Fc受體的結合親和力及減少之效應功能。因此，在一些實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子中的Fc域為IgG₄ Fc域，特定言之，人類IgG₄ Fc域。在一個實施例中，IgG₄ Fc域包含位置S228之胺基酸取代，特定言之，胺基酸取代S228P (根據Kabat EU索引編號)。為了進一步減小其對Fc受體的結合親和力及/或其效應功能，在一個實施例中，IgG₄ Fc域包含位置L235之胺基酸取代，特定言之，胺基酸取代L235E (根據Kabat EU索引編號)。在另一個實施例中，IgG₄ Fc域包含位置P329之胺基酸取代，特定言之，胺基酸取代P329G (根據Kabat EU索引編號)。在一個特定實施例中，IgG₄ Fc域包含位置S228、L235及P329之胺基酸取代，特定言之，胺基酸取代S228P、L235E及P329G (根據Kabat EU索引編號)。此類IgG₄ Fc域突變體及其Fc γ 受體結合特性描述於PCT公開案第WO 2012/130831號中，該案以全文引用的方式併入本文中。

在一個特定實施例中，相較於原生IgG₁ Fc域展現減小之針對Fc受體之結合親和力及/或減少之效應功能的Fc域為包含胺基酸取代L234A、L235A及視情況存在之P329G的人類IgG₁ Fc域，或包含胺基酸取代S228P、L235E及視情況存在之P329G的人類IgG₄ Fc域(根據Kabat EU索引編號)。

在某些實施例中，Fc域之N糖基化已消除。在一個此類實施例中，

Fc域包含位置N297之胺基酸突變，特定言之，丙胺酸置換天冬醯胺的胺基酸取代(N297A)或天冬胺酸置換天冬醯胺的胺基酸取代(N297D)(根據Kabat EU索引編號)。

除上文及PCT公開案第WO 2012/130831號中所述之Fc域之外，Fc受體結合及/或效應功能減少之Fc域亦包括具有Fc域殘基238、265、269、270、297、327及329中之一或多者之取代的Fc域(美國專利第6,737,056號)(根據Kabat EU索引編號)。此類Fc突變體包括具有胺基酸位置265、269、270、297及327中之兩者或兩者以上之取代的Fc突變體，包括殘基265及297取代為丙胺酸的所謂「DANA」Fc突變體(美國專利第7,332,581號)。

突變型Fc域可使用此項技術中熟知之遺傳學或化學方法、藉由胺基酸缺失、取代、插入或修飾來製備。遺傳學方法可包括編碼DNA序列之定點突變誘發、PCR、基因合成及類似方法。恰當的核苷酸變化可藉由例如測序來檢驗。

與Fc受體的結合可容易測定，例如藉由ELISA，或藉由表面電漿子共振(SPR)、使用標準儀器，諸如BIAcore儀器(GE Healthcare)，且可藉由重組表現來獲得諸如Fc受體。適合的此類結合分析描述於本文中。或者，Fc域或包含Fc域之細胞活化雙特異性抗原結合分子對Fc受體的結合親和力可使用已知表現特定Fc受體的細胞株(諸如表現FcγIIIa受體的人類NK細胞)評價。

Fc域或包含Fc域之T細胞活化雙特異性抗原結合分子的效應功能可藉由此項技術中已知之方法量測。適用於量測ADCC的分析描述於本文中。評估所關注分子之ADCC活性之活體外分析的其他實例描述於美國專利第

5,500,362號；Hellstrom等人, Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) 及 Hellstrom 等人, Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985)；美國專利第5,821,337號；Bruggemann等人, J Exp Med 166, 1351-1361 (1987)。或者，可採用非放射性分析方法(參見例如流式細胞術用的ACTITM非放射性細胞毒性分析(CellTechnology, Inc. Mountain View, CA)；及CytoTox 96®非放射性細胞毒性分析(Promega, Madison, WI))。適用於此類分析之效應細胞包括周邊血液單核細胞(PBMC)及天然殺手(NK)細胞。或者或另外，可評估所關注分子之活體內ADCC活性，例如在動物模型(諸如Clynes等人, Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998)中所揭示)中。

在一些實施例中，Fc域相對於補體組分(特定言之，C1q)的結合減少。因此，在其中Fc域經工程改造而具有減少之效應功能的一些實施例中，該減少之效應功能包括降低之CDC。可進行C1q結合分析以確定T細胞活化雙特異性抗原結合分子是否能夠結合C1q且因此具有CDC活性。參見例如WO 2006/029879及WO 2005/100402中之C1q及C3c結合ELISA。為了評估補體活化，可執行CDC分析(參見例如Gazzano-Santoro等人, J Immunol Methods 202, 163 (1996)；Cragg等人, Blood 101, 1045-1052 (2003)；及Cragg及Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004))。

抗原結合部分

本發明之抗原結合分子具有雙特異性，亦即其包含至少兩個能夠特異性結合至兩個不同抗原性決定子的抗原結合部分。根據本發明的特定實施例，抗原結合部分為Fab分子(亦即由各包含可變域及恆定域之重鏈及輕鏈組成的抗原結合域)。在一個實施例中，該等Fab分子為人類Fab分子。

在另一個實施例中，該等Fab分子為人類化Fab分子。在又另一個實施例中，該等Fab分子包含人類重鏈及輕鏈恆定域。

較佳地，抗原結合部分中的至少一者為互換型Fab分子。此類修飾減少來自不同Fab分子之重鏈與輕鏈之錯配，從而改良本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子在重組製造時之產量及純度。在適用於本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子的特定互換型Fab分子中，Fab輕鏈與Fab重鏈之可變域(分別為VL及VH)發生交換。然而，即使存在此域交換，T細胞活化雙特異性抗原結合分子製劑亦可包含由於誤配之重鏈與輕鏈之間之所謂瓊斯本型相互作用而產生的某些副產物(參見Schaefer等人, PNAS, 108 (2011) 11187-11191)。為了進一步減少來自不同Fab分子之重鏈與輕鏈之錯配且從而提高本發明之所要T細胞活化雙特異性抗原結合分子的純度及產量，可在特異性結合至靶細胞抗原之Fab分子或特異性結合至活化T細胞抗原之Fab分子之CH1及CL域中的特定胺基酸位置引入具有相反電荷的帶電胺基酸。電荷修飾發生於T細胞活化雙特異性抗原結合分子所含之習知Fab分子(諸如圖1 A-C、G-J中所示)中，或發生於T細胞活化雙特異性抗原結合分子所含之VH/VL互換型Fab分子(諸如圖1 D-F、K-N中所示)中(但並非發生於兩者中)。在特定實施例中，電荷修飾發生於T細胞活化雙特異性抗原結合分子所含之習知Fab分子(在特定實施例中，其特異性結合至靶細胞抗原)中。

在根據本發明之一個特定實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子能夠同時結合至靶細胞抗原(特定言之，腫瘤細胞抗原)及活化T細胞抗原(特定言之，CD3)。在一個實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子藉由同時結合至靶細胞抗原及活化T細胞抗原而能夠使T細胞與靶細胞

交聯。在一個甚至更特定的實施例中，此同時結合引起靶細胞(特定言之，腫瘤細胞)溶解。在一個實施例中，此同時結合引起T細胞活化。在其他實施例中，此同時結合引起T淋巴細胞(特定言之，細胞毒性T淋巴細胞)之細胞反應，細胞反應選自以下之群：增殖、分化、細胞激素分泌、細胞毒性效應分子釋放、細胞毒活性及活化標記表現。在一個實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子結合至活化T細胞抗原(特定言之，CD3)而不同時結合至靶細胞抗原，未引起T細胞活化。

在一個實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子能夠使T細胞之細胞毒性活性再定向靶細胞。在一個特定實施例中，該再定向不依賴於MHC介導靶細胞呈遞肽抗原及T細胞之特異性。

特定言之，根據本發明之任一實施例的T細胞為細胞毒性T細胞。在一些實施例中，T細胞為CD4⁺或CD8⁺ T細胞，特定言之，CD8⁺ T細胞。

活化T細胞抗原結合部分

本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含至少一個特異性結合至活化T細胞抗原的抗原結合部分，特定言之，Fab分子(在本文中亦被稱作「活化T細胞抗原結合部分，或活化T細胞抗原結合Fab分子」)。在一個特定實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含不超過一個能夠特異性結合至活化T細胞抗原的抗原結合部分。在一個實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子向活化T細胞抗原提供單價結合。

在特定實施例中，特異性結合活化T細胞抗原的抗原結合部分為如本文所述之互換型Fab分子，亦即其中Fab重鏈與Fab輕鏈之可變域VH與VL或恆定域CH1與CL彼此間交換/置換的Fab分子。在此等實施例中，特異性結合靶細胞抗原的抗原結合部分較佳為習知Fab分子。在存在超過一個

抗原結合部分(特定言之，Fab分子)特異性結合至T細胞活化雙特異性抗原結合分子中所包含之靶細胞抗原的實施例中，特異性結合至活化T細胞抗原的抗原結合部分較佳為互換型Fab分子且特異性結合至靶細胞抗原的抗原結合部分為習知Fab分子。

在替代實施例中，特異性結合活化T細胞抗原的抗原結合部分為習知Fab分子。在此類實施例中，特異性結合靶細胞抗原的抗原結合部分為如本文所述之互換型Fab分子，亦即其中Fab重鏈與輕鏈之可變域VH與VL或恆定域CH1與CL彼此間交換/置換的Fab分子。

在一個特定實施例中，活化T細胞抗原為CD3，特定言之，人類CD3 (SEQ ID NO:1)或食蟹獼猴CD3 (SEQ ID NO:2)，最特定言之，人類CD3。在一個特定實施例中，活化T細胞抗原結合部分對於人類及食蟹獼猴CD3具有交叉反應(亦即特異性結合至人類及食蟹獼猴CD3)。在一些實施例中，活化T細胞抗原為CD3之 ϵ 亞單元(CD3 ϵ)。

在一些實施例中，活化T細胞抗原結合部分特異性結合至CD3 (特定言之，CD3 ϵ)，且包含至少一個選自由SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5及SEQ ID NO:6組成之群的重鏈互補決定區(CDR)及至少一個選自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10之群的輕鏈CDR。

在一個特定實施例中，CD3結合抗原結合部分(特定言之，Fab分子)包含含有SEQ ID NO:4之重鏈CDR1、SEQ ID NO:5之重鏈CDR2、SEQ ID NO:6之重鏈CDR3的重鏈可變區，及含有SEQ ID NO:8之輕鏈CDR1、SEQ ID NO:9之輕鏈CDR2及SEQ ID NO:10之輕鏈CDR3的輕鏈可變區。

在另一個實施例中，CD3結合抗原結合部分(特定言之，Fab分子)包含含有SEQ ID NO:4之重鏈CDR1、SEQ ID NO:28之重鏈CDR2、SEQ

ID NO:6之重鏈CDR3的重鏈可變區，及含有SEQ ID NO:29之輕鏈CDR1、SEQ ID NO:9之輕鏈CDR2及SEQ ID NO:10之輕鏈CDR3的輕鏈可變區。

在特定實施例中，CD3結合抗原結合部分(特定言之，Fab分子)包含與SEQ ID NO:3至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的重鏈可變區序列及與SEQ ID NO:7至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的輕鏈可變區序列。

在一個實施例中，CD3結合抗原結合部分(特定言之，Fab分子)包括包含胺基酸序列SEQ ID NO:3的重鏈可變區及包含胺基酸序列SEQ ID NO:7的輕鏈可變區。

在一個實施例中，CD3結合抗原結合部分(特定言之，Fab分子)包含重鏈可變區序列SEQ ID NO:3及輕鏈可變區胺基酸序列SEQ ID NO:7。

在其他實施例中，CD3結合抗原結合部分(特定言之，Fab分子)包含與SEQ ID NO:30至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的重鏈可變區序列，及與SEQ ID NO:31至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的輕鏈可變區序列。

在一個實施例中，CD3結合抗原結合部分(特定言之，Fab分子)包括包含胺基酸序列SEQ ID NO:30的重鏈可變區及包含胺基酸序列SEQ ID NO:31的輕鏈可變區。

在一個實施例中，CD3結合抗原結合部分(特定言之，Fab分子)包含SEQ ID NO:30之重鏈可變區序列及SEQ ID NO:31之輕鏈可變區序列。

靶細胞抗原結合部分

本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含至少一個特異性結合

至STEAP-1(靶細胞抗原)的抗原結合部分，特定言之，Fab分子。在某些實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含兩個特異性結合至STEAP-1的抗原結合部分，特定言之，Fab分子。在一個特定的此類實施例中，此等抗原結合部分中之每一者特異性結合至相同抗原性決定子。在一個甚至更特定的實施例中，所有此等抗原結合部分均相同，亦即其包括如本文所述之CH1及CL域中之相同胺基酸取代的相同胺基酸序列(若存在)。在一個實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含特異性結合至STEAP-1的免疫球蛋白分子。在一個實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含不超過兩個特異性結合至STEAP-1的抗原結合部分，特定言之，Fab分子。

在特定實施例中，特異性結合至STEAP-1的抗原結合部分為習知Fab分子。在此類實施例中，特異性結合活化T細胞抗原的抗原結合部分為如本文所述之互換型Fab分子，亦即其中Fab重鏈與輕鏈之可變域VH與VL或恆定域CH1與CL彼此間交換/置換的Fab分子。

在替代實施例中，特異性結合至STEAP-1的抗原結合部分為如本文所述之互換型Fab分子，亦即其中Fab重鏈與輕鏈之可變域VH與VL或恆定域CH1與CL彼此間交換/置換的Fab分子。在此類實施例中，特異性結合活化T細胞抗原的抗原結合部分為習知Fab分子。

STEAP-1結合部分能夠將T細胞活化雙特異性抗原結合分子定向至靶點，例如定向至表現STEAP-1的特定類型的腫瘤細胞。

在一個實施例中，特異性結合至STEAP-1的抗原結合部分(特定言之，Fab分子)包含重鏈可變區，其包含SEQ ID NO:14之重鏈互補決定區(CDR)1、SEQ ID NO:15之重鏈CDR 2及SEQ ID NO:16之重鏈CDR 3；

以及輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO:17之輕鏈CDR 1、SEQ ID NO:18之輕鏈CDR 2及SEQ ID NO:19之輕鏈CDR 3。在另一實施例中，特異性結合至STEAP-1的抗原結合部分(特定言之，Fab分子)包含與序列SEQ ID NO:20至少95%、96%、97%、98%或99%一致的重鏈可變區，及與序列SEQ ID NO:21至少95%、96%、97%、98%或99%一致的輕鏈可變區。

在特定實施例中，特異性結合至STEAP-1的抗原結合部分(特定言之，Fab分子)包含重鏈可變區序列SEQ ID NO:32及輕鏈可變區序列SEQ ID NO:21。在一個特定實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含與序列SEQ ID NO:24至少95%、96%、97%、98%或99%一致的多肽、與序列SEQ ID NO:25至少95%、96%、97%、98%或99%一致的多肽、與序列SEQ ID NO:33至少95%、96%、97%、98%或99%一致的多肽及與序列SEQ ID NO:34至少95%、96%、97%、98%或99%一致的多肽。在另一個特定實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含多肽序列SEQ ID NO:24、多肽序列SEQ ID NO:25、多肽序列SEQ ID NO:33及多肽序列SEQ ID NO:34。在另一個實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含與序列SEQ ID NO:24至少95%、96%、97%、98%或99%一致的多肽、與序列SEQ ID NO:35至少95%、96%、97%、98%或99%一致的多肽、與序列SEQ ID NO:36至少95%、96%、97%、98%或99%一致的多肽，及與序列SEQ ID NO:37至少95%、96%、97%、98%或99%一致的多肽。在另一個特定實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含SEQ ID NO:24之多肽序列、SEQ ID NO:35之多肽序列、SEQ ID NO:36之多肽序列及SEQ ID NO:37之多肽序列。在再另一個實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含與序列SEQ ID NO:25至少95%、96%、

97%、98%或99%一致的多肽、與序列SEQ ID NO:33至少95%、96%、97%、98%或99%一致的多肽、與序列SEQ ID NO:38至少95%、96%、97%、98%或99%一致的多肽，及與序列SEQ ID NO:39至少95%、96%、97%、98%或99%一致的多肽。在另一個實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含SEQ ID NO:25之多肽序列、SEQ ID NO:33之多肽序列、SEQ ID NO:38之多肽序列及SEQ ID NO:39之多肽序列。在再另一個實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含與序列SEQ ID NO:24至少95%、96%、97%、98%或99%一致的多肽、與序列SEQ ID NO:25至少95%、96%、97%、98%或99%一致的多肽、與序列SEQ ID NO:33至少95%、96%、97%、98%或99%一致的多肽，及與序列SEQ ID NO:41至少95%、96%、97%、98%或99%一致的多肽。在另一個實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含SEQ ID NO:24之多肽序列、SEQ ID NO:25之多肽序列、SEQ ID NO:33之多肽序列及SEQ ID NO:41之多肽序列。

在其他實施例中，特異性結合至STEAP-1的抗原結合部分(特定言之，Fab分子)包含重鏈可變區序列SEQ ID NO:20及輕鏈可變區序列SEQ ID NO:21。在一個實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含與序列SEQ ID NO:22至少95%、96%、97%、98%或99%一致的多肽、與序列SEQ ID NO:23至少95%、96%、97%、98%或99%一致的多肽、與序列SEQ ID NO:24至少95%、96%、97%、98%或99%一致的多肽，及與序列SEQ ID NO:25至少95%、96%、97%、98%或99%一致的多肽。在另一個特定實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子包含SEQ ID NO:22之多肽序列、SEQ ID NO:23之多肽序列、SEQ ID NO:24之多肽序列及SEQ

ID NO:25之多肽序列。

聚核苷酸

本發明進一步提供編碼如本文所述之T細胞活化雙特異性抗原結合分子或其片段的經分離之聚核苷酸。在一些實施例中，該片段為抗原結合片段。

編碼本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子的聚核苷酸可以編碼整個T細胞活化雙特異性抗原結合分子之單一聚核苷酸形式或以共表現之多種(例如兩種或超過兩種)聚核苷酸形式表現。由共表現之聚核苷酸編碼的多肽可經由例如二硫鍵或形成功能性T細胞活化雙特異性抗原結合分子的其他方式結合。舉例而言，Fab分子之輕鏈部分可由與包含Fab分子之重鏈部分、Fc域亞單元及視情況存在之另一Fab分子(之一部分)的T細胞活化雙特異性抗原結合分子之一部分分離的聚核苷酸編碼。共表現時，重鏈多肽與輕鏈多肽結合而形成Fab分子。在另一實例中，包含兩個Fc域亞單元之一及視情況存在之一或多個Fab分子(一部分)的T細胞活化雙特異性抗原結合分子之一部分可由與包含兩個Fc域亞單元中之另一者及視情況存在之Fab分子(之一部分)的T細胞活化雙特異性抗原結合分子之一部分分離的聚核苷酸編碼。共表現時，Fc域亞單元結合而形成Fc域。

在一些實施例中，經分離之聚核苷酸編碼如本文所述之本發明之整個T細胞活化雙特異性抗原結合分子。在其他實施例中，經分離之聚核苷酸編碼如本文所述之本發明T細胞活化雙特異性抗原結合分子中所包含之多肽。

在某些實施例中，聚核苷酸或核酸為DNA。在其他實施例中，本發明之聚核苷酸為RNA，例如呈信使RNA (mRNA)形式。本發明之RNA可

為單股或雙股RNA。

重組方法

本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子可藉由例如固態肽合成(例如梅里菲爾德固相合成(Merrifield solid phase synthesis))或重組製造法獲得。重組製造時，分離一或多種編碼T細胞活化雙特異性抗原結合分子(片段)的聚核苷酸(例如如上文所述)且插入一或多個載體中用於在宿主細胞中進一步選殖及/或表現。此類聚核苷酸可容易使用習知程序分離及測序。在一個實施例中，提供包含本發明之聚核苷酸中之一或多者的載體，較佳為表現載體。可利用熟習此項技術者已熟知的方法建構含有T細胞活化雙特異性抗原結合分子(片段)之編碼序列與適當轉錄/轉譯控制信號的表現載體。此等方法包括活體外重組DNA技術、合成技術以及活體內重組/基因重組。參見例如以下文獻中所述之技術：Maniatis等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989)；Ausubel等人，Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)。表現載體可為質體、病毒之一部分，或可為核酸片段。表現載體包括編碼T細胞活化雙特異性抗原結合分子(片段)之聚核苷酸(亦即編碼區)於其中選殖而與啟動子及/或其他轉錄或轉譯控制元件可操作關聯的表現卡匣。如本文所用，「編碼區」為由轉譯成胺基酸之密碼子組成的核酸之一部分。雖然「終止密碼子」(TAG、TGA或TAA)未轉譯成胺基酸，但其可視為編碼區(若存在)之一部分，但任何側接序列(例如啟動子、核糖體結合位點、轉錄終止子、內含子、5'及3'未轉譯區及類似序列)不為編碼區之一部分。兩個或超過兩個編碼區可存在於單一聚核苷酸構築體中，例

如單一載體上，或存在於各別聚核苷酸構築體中，例如各別(不同)載體上。此外，任何載體可含有單一編碼區，或可包含兩個或超過兩個編碼區，例如本發明之載體可編碼一或多種多肽，其經由蛋白水解分裂而轉譯後或共轉譯分離成最終蛋白質。另外，本發明之載體、聚核苷酸或核酸可編碼與本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子(片段)的聚核苷酸或其變異體或衍生物融合或不融合的異質編碼區。異質編碼區包括(不限於)專門化元件或基元，諸如分泌性信號肽或異質功能域。當基因產物(例如多肽)之編碼區與一或多個調節序列以使得基因產物之表現置於調節序列之影響或控制下的方式關聯時，為可操作關聯。若誘導啟動子功能引起編碼所要基因產物之mRNA轉錄且若兩個DNA片段之間連接的性質不干擾表現調節序列導引基因產物表現的能力或不干擾DNA模板轉錄的能力，則兩個DNA片段(諸如多肽編碼區及與其相關的啟動子)為「可操作關聯」。因此，若啟動子能夠實現核酸轉錄，則啟動子區域與編碼多肽之核酸可操作地關聯。啟動子可為僅導引預定細胞中之DNA實質性轉錄的細胞特異性啟動子。除啟動子之外的其他轉錄控制元件(例如增強子、操縱子、抑制子及轉錄終止信號)可操作地與導引細胞特異性轉錄的聚核苷酸關聯。適合啟動子及其他轉錄控制區揭示於本文中。多種轉錄控制區已為熟習此項技術者所知。此等區域包括(但不限於)在脊椎動物細胞中起作用的轉錄控制區，諸如(但不限於)啟動子及增強子區段，其來自巨細胞病毒(例如即刻早期啟動子，連同內含子-A)、猴病毒40 (例如早期啟動子)及逆轉錄病毒(諸如勞斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus))。其他轉錄控制區包括來源於脊椎動物基因(諸如肌動蛋白、熱休克蛋白、牛生長激素及兔 α -血球蛋白)的彼等區域，以及能夠控制真核生物細胞中之基因表現的其他序列。

其他適合轉錄控制區域包括組織特異性啟動子及增強子以及誘導性啟動子(例如啟動子誘導性四環素(tetracyclins))。類似地，多種轉譯控制元件已為一般技術者所知。此等元件包括(但不限於)核糖體結合位點、轉譯起始及終止密碼子，以及來源於病毒系統的元件(特定言之，內部核糖體入口位點或IRES，亦稱為CITE序列)。表現卡匣亦可包括其他特徵，諸如複製起點，及/或染色體整合元件，諸如逆轉錄病毒長末端重複序列(LTR)，或腺相關聯病毒(AAV)反向末端重複序列(ITR)。

本發明之聚核苷酸及核酸編碼區可與編碼分泌肽或信號肽的其他編碼區關聯，從而導引由本發明之聚核苷酸編碼的多肽分泌。舉例而言，若需要分泌T細胞活化雙特異性抗原結合分子，則編碼信號序列的DNA可置於編碼本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子或其片段之核酸上游。根據信號假設，哺乳動物細胞所分泌的蛋白質具有自成熟蛋白質裂解(一旦生長蛋白質鏈跨越粗糙內質網輸出已起始)的信號肽或分泌性前導序列。一般技術者意識到，脊椎動物細胞分泌的多肽一般具有與多肽N端融合的信號肽，該信號肽自所轉譯多肽裂解而產生呈分泌或「成熟」形式的多肽。在某些實施例中，使用原生信號肽(例如免疫球蛋白重鏈或輕鏈信號肽)，或保持導引與其可操作地關聯之多肽分泌之能力的該序列之功能衍生物。或者，可使用異質哺乳動物信號肽，或其功能衍生物。舉例而言，野生型前導序列可經人類組織纖維蛋白溶酶原活化因子(TPA)或小鼠 β -葡糖醛酸酶之前導序列取代。

編碼可用於促進隨後純化(例如組胺酸標記)或有助於標記T細胞活化雙特異性抗原結合分子之短蛋白質序列的DNA可包括於編碼聚核苷酸之T細胞活化雙特異性抗原結合分子(片段)內部或末端。

在另一實施例中，提供包含本發明之一或多種聚核苷酸。在某些實施例中，提供包含本發明之一或多種載體的宿主細胞。聚核苷酸及載體可合併本文分別關於聚核苷酸及載體所述之任一特徵(單個或組合)。在一個此類實施例中，宿主細胞包含含有編碼本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子(一部分)之聚核苷酸的載體(例如已經該載體轉形或轉染)。如本文所用，術語「宿主細胞」係指可經工程改造而產生本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子或其片段的任何種類之細胞系統。適於複製及支持T細胞活化雙特異性抗原結合分子表現的宿主細胞在此項技術中已熟知。此類細胞適當時可經特定表現載體轉染或轉導且可使大量含有載體的細胞生長用於接種大型發酵器，以獲得足量的T細胞活化雙特異性抗原結合分子用於臨床應用。適合的宿主細胞包括原核微生物，諸如大腸桿菌，或各種真核生物細胞，諸如中國倉鼠卵巢細胞(CHO)、昆蟲細胞或其類似物。舉例而言，可利用細菌產生多肽，特別是不需要糖基化時。表現之後，可自可溶性部分之細菌細胞糊狀物中分離出多肽且可對該多肽進一步純化。除原核生物外，諸如絲狀真菌或酵母之真核微生物為適用於編碼抗體之載體的選殖或表現宿主，包括糖基化路徑已經「人類化」、從而產生具有部分或完全人類糖基化型態之多肽的真菌及酵母株。參見Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004)；及Li等人, Nat Biotech 24, 210-215 (2006)。適用於表現(糖基化)多肽的宿主細胞亦來源於多細胞生物體(無脊椎動物及脊椎動物)。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已鑑別出多種桿狀病毒株，其可聯合昆蟲細胞使用，尤其用於轉染草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*)細胞。植物細胞培養物亦可用作宿主。參見例如美國專利第5,959,177號、第6,040,498號、第6,420,548號、第7,125,978

號及第 6,417,429 號(描述利用轉殖基因植物產生抗體的 PLANTIBODIESTM技術)。脊椎動物細胞亦可用作宿主。舉例而言，適於在懸浮液中生長之哺乳動物細胞株可為適用的。適用哺乳動物宿主細胞株之其他實例為經SV40轉形的猴腎CV1株(COS-7)；人類胚腎細胞株(293或293T細胞，如例如Graham等人, J Gen Virol 36, 59 (1977)中所述)；幼倉鼠腎細胞(BHK)；小鼠塞特利氏細胞(mouse sertoli cells)(TM4細胞，如例如Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980)中所述)；猴腎細胞(CV1)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76)；人類子宮頸癌細胞(海拉細胞(HELA))；犬腎細胞(MDCK)；水牛鼠肝細胞(buffalo rat liver cells)(BRL 3A)；人類肺細胞(W138)；人類肝細胞(Hep G2)；小鼠乳腺腫瘤細胞(MMT 060562)；TRI細胞(如例如Mather等人, Annals N. Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982)中所述)；MRC 5細胞及FS4細胞。其他適用的哺乳動物宿主細胞株包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，包括dhfr⁻ CHO細胞(Urlaub等人, Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980))；及骨髓瘤細胞株，諸如YO、NS0、P3X63及Sp2/0。欲回顧適於產生蛋白質的某些哺乳動物宿主細胞株，參見例如Yazaki及Wu, Methods in Molecular Biology, 第248卷(B. K. C. Lo編, Humana Press, Totowa, NJ), 第255-268 (2003)頁。宿主細胞包括經培養細胞，例如經培養之哺乳動物細胞、酵母細胞、昆蟲細胞、細菌細胞及植物細胞(僅舉數例)，而且包括轉殖基因動物、轉殖基因植物或經培養之植物或動物組織中所包含的細胞。在一個實施例中，宿主細胞為真核生物細胞，較佳為哺乳動物細胞，諸如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、人類胚腎(HEK)細胞或淋巴細胞(例如Y0、NS0、Sp20細胞)。

此項技術中已知用此等系統表現外源基因的標準技術。表現包含抗

原結合域之重鏈或輕鏈之多肽(諸如抗體)的細胞可經工程改造以便亦表現抗體鏈中之另一者，使得所表現產物為具有重鏈與輕鏈的抗體。

在一個實施例中，提供一種製造本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子的方法，其中該方法包含在適於表現T細胞活化雙特異性抗原結合分子的條件下培養如本文所提供之包含編碼T細胞活化雙特異性抗原結合分子之聚核苷酸的宿主細胞，以及自宿主細胞(或宿主細胞培養基)回收T細胞活化雙特異性抗原結合分子。

T細胞活化雙特異性抗原結合分子中之組分以遺傳學方式彼此間融合。T細胞活化雙特異性抗原結合分子可設計成其組分彼此間直接融合或經由連接子序列間接融合。連接子之組成及長度可根據此項技術中熟知之方法確定且可測試其功效。T細胞活化雙特異性抗原結合分子中之不同組分之間之連接子序列之實例發現於本文所提供之序列中。亦可包括合併裂解位點的其他序列以在必要時將融合體中之個別組分分隔，例如肽鏈內切酶識別序列。

在某些實施例中，T細胞活化雙特異性抗原結合分子中之一或多個抗原結合部分包含至少一個能夠結合抗原性決定子的抗體可變區。可變區可形成天然或非天然存在之抗體及其片段之一部分且來源於天然或非天然存在之抗體及其片段。產生多株抗體及單株抗體的方法在此項技術中已熟知(參見例如Harlow及Lane, 「Antibodies, a laboratory manual」, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。非天然存在之抗體可使用固相肽合成法構建，可以重組方式產生(例如如美國專利第4,186,567號中所述)或可藉由例如篩選包含可變重鏈及可變輕鏈的組合文庫來獲得(參見例如McCafferty之美國專利第5,969,108號)。

任何動物物種之抗體、抗體片段、抗原結合域或可變區可用於本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子中。適用於本發明的非限制性抗體、抗體片段、抗原結合域或可變區可具有鼠類、靈長類動物或人類來源。若T細胞活化雙特異性抗原結合分子意欲用於人類用途，則可使用呈嵌合形式的抗體，其中抗體恆定區來自人類。呈人類化或完全人類形式的抗體亦可根據此項技術中熟知之方法製備(參見例如Winter之美國專利第5,565,332號)。人類化可藉由各種方法達成，包括(但不限於)(a)將非人類(例如供者抗體)CDR移植至人類(例如受者抗體)構架及恆定區上，保留或不保留關鍵構架殘基(例如對於保持良好抗原結合親和力或抗體功能而言具有重要作用的彼等殘基)；(b)僅將非人類特異性決定區(SDR或a-CDR；對於抗體-抗原相互作用而言具有關鍵作用的殘基)移植至人類構架及恆定區上，或(c)移植整個非人類可變域，但藉由表面殘基置換而用人類類似區段「遮掩」其。人類化抗體及其製備方法評述於例如Almagro及Fransson, *Front Biosci* 13, 1619-1633 (2008)，且進一步描述於例如Riechmann等人, *Nature* 332, 323-329 (1988)；Queen等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 10029-10033 (1989)；美國專利第5,821,337號、第7,527,791號、第6,982,321號及第7,087,409號；Jones等人, *Nature* 321, 522-525 (1986)；Morrison等人, *Proc Natl Acad Sci* 81, 6851-6855 (1984)；Morrison及Oi, *Adv Immunol* 44, 65-92 (1988)；Verhoeyen等人, *Science* 239, 1534-1536 (1988)；Padlan, *Molec Immun* 31(3), 169-217 (1994)；Kashmiri等人, *Methods* 36, 25-34 (2005) (描述SDR (a-CDR)移植)；Padlan, *Mol Immunol* 28, 489-498 (1991) (描述「表面重塑」)；Dall'Acqua等人, *Methods* 36, 43-60 (2005) (描述「FR改組」)；

及Osbourn等人, *Methods* 36, 61-68 (2005)及Klimka等人, *Br J Cancer* 83, 252-260 (2000) (描述FR改組的「指導性選擇」方法)。人類抗體及人類可變區可使用此項技術中已知的各種技術產生。人類抗體一般性描述於van Dijk及van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5, 368-74 (2001)及Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20, 450-459 (2008)。人類可變區可形成藉由融合瘤方法製得之人類單株抗體的一部分且可來源於藉由融合瘤方法製得之人類單株抗體(參見例如 *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 第51-63頁 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。人類抗體及人類可變區亦可藉由將免疫原投與轉殖基因動物來製備, 該轉殖基因動物已經改造以產生完整人類抗體或具有人類可變區之完整抗體作為對抗原性攻毒的反應(參見例如Lonberg, *Nat Biotech* 23, 1117-1125 (2005)。人類抗體及人類可變區亦可藉由分離選自人類源噬菌體呈現文庫之Fv純系可變區序列來產生(參見例如Hoogenboom等人, 於 *Methods in Molecular Biology* 178, 1-37 (O'Brien等人編, Human Press, Totowa, NJ, 2001); 及McCafferty等人, *Nature* 348, 552-554; Clackson等人, *Nature* 352, 624-628 (1991))。噬菌體典型地使抗體片段以單鏈Fv (scFv)片段形式或以Fab片段形式呈現。

在某些實施例中, 適用於本發明的抗原結合部分根據例如美國專利申請公開案第2004/0132066號中所揭示之方法經工程改造可具有增強的結合親和力, 該案之整個內容以引用的方式併入本文中。本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子結合至特定抗原性決定子的能力可經由酶聯免疫吸附分析(ELISA)或熟習此項技術者熟悉的其他技術量測, 例如表面電漿子共振技術(在BIACORE T100系統上分析)(Liljeblad等人, *Glyco J* 17,

323-329 (2000)) 及傳統結合分析(Heeley, *Endocr Res* 28, 217-229 (2002))。競爭分析可用於鑑別與參考抗體競爭結合至特定抗原的抗體、抗體片段、抗原結合域或可變域，例如與V9抗體競爭結合至CD3的抗體。在某些實施例中，此競爭抗體結合至與參考抗體所結合相同的抗原決定基(例如線性或構形抗原決定基)。抗體所結合之抗原決定基之定位的例示性詳細方法提供於Morris (1996) 「Epitope Mapping Protocols」，於Methods in Molecular Biology第66卷(Humana Press, Totowa, NJ)中。在例示性競爭分析中，所固著之抗原(例如CD3)在溶液中培育，該溶液包含結合至抗原的第一經標記抗體(例如US 6,054,297中所述之V9抗體)及待測試與第一抗體競爭結合至抗原之能力的第二未標記抗體。第二抗體可存在於融合瘤上清液中。作為對照，所固著之抗原在包含第一經標記抗體、但不包含第二未標記抗體之溶液中培育。在允許第一抗體結合至抗原之條件下培育之後，移除過量的未結合抗體，且量測與所固著抗原相關之標記之量。若測試樣品中與所固著抗原相關之標記之量相對於對照樣品發生實質上降低，則表明第二抗體與第一抗體競爭結合至抗原。參見Harlow及Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* 第14章(Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。

如本文所述製備之T細胞活化雙特異性抗原結合分子可藉由此項技術中已知之技術純化，諸如高效液相層析、離子交換層析、凝膠電泳、親和層析、尺寸排阻層析及類似技術。用於純化特定蛋白質的實際條件部分地視諸如淨電荷、疏水性、親水性等因素而定，且對於熟習此項技術者而言為顯而易見的。親和層析純化時，可使用T細胞活化雙特異性抗原結合分子所結合的抗體、配位體、受體或抗原。舉例而言，親和層析純化本發明

之T細胞活化雙特異性抗原結合分子時，可使用具有蛋白質A或蛋白質G之基質。可依序使用蛋白質A或G親和層析及尺寸排阻層析來基本上分離T細胞活化雙特異性抗原結合分子，如實例中所述。T細胞活化雙特異性抗原結合分子之純度可藉由多種熟知分析方法中的任一者測定，包括凝膠電泳、高壓液相層析及類似方法。舉例而言，如實例中所述表現的重鏈融合蛋白顯示為完整的且經正確組裝，如還原性SDS-PAGE所證明(參見例如圖3)。三條色帶在約Mr 25,000、Mr 50,000及Mr 75,000 (對應於T細胞活化雙特異性抗原結合分子輕鏈、重鏈及重鏈/輕鏈融合蛋白之分子量預測值)解析。

分析

本文所提供之T細胞活化雙特異性抗原結合分子可藉由此項技術中已知的各種分析、根據其物理/化學特性及/或生物學活性加以鑑別、篩選或表徵。

親和力分析

T細胞活化雙特異性抗原結合分子對於Fc受體或靶抗原的親和力可根據實例中所闡述之方法、藉由表面電漿子共振(SPR)、使用標準儀器(諸如BIAcore儀器(GE Healthcare))加以測定，且諸如受體或標靶蛋白質可藉由重組表現來獲得。或者，T細胞活化雙特異性抗原結合分子對於不同受體或標靶抗原的結合可使用表現特定受體或靶抗原的細胞株、藉由例如流式細胞術(FACS)來評價。量測結合親和力的特定說明性及例示性實施例描述於下文及以下實例中。

根據一個實施例，藉由表面電漿子共振、使用BIACORE® T100機器(GE Healthcare)、在25°C量測 K_D 。

為了分析Fc部分與Fc受體之間的相互作用，藉由CM5晶片上所固著的抗Penta His抗體(Qiagen)捕捉經His標記之重組Fc受體且使用雙特異性構築體作為分析物。簡言之，根據供應商說明書，用N-乙基-N'-(3-二甲胺基丙基)-碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)及N-羥基丁二醯亞胺(NHS)活化羧基甲基化聚葡萄糖生物感測晶片(CM5, GE Healthcare)。抗Penta-His抗體用10 mM乙酸鈉(pH 5.0)稀釋至40 $\mu\text{g/ml}$ ，隨後以5 $\mu\text{l/min}$ 流速注射以使所偶聯蛋白質達成約6500個反應單位(RU)。注射配位體之後，注射1 M乙醇胺以將未反應之基團封端。隨後，Fc受體在4 nM或10 nM下捕捉60秒。動力學量測時，雙特異性構築體(500 nM與4000 nM之間的範圍)於HBS-EP (GE Healthcare, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05%界面活性劑P20, pH 7.4)中之四倍連續稀釋液在25°C、以30 $\mu\text{l/min}$ 流速注射120秒。

為了測定針對靶抗原的親和力，藉由活化CM5感測晶片表面上所固著之抗人類Fab特異性抗體(GE Healthcare)捕捉雙特異性構築體，如針對抗Penta-His抗體所述。偶聯蛋白質之最終量為約12000 RU。雙特異性構築體在300 nM捕捉90秒。使靶抗原以250 nM至1000 nM範圍內之濃度、以30 $\mu\text{l/min}$ 流速通過流動池180秒。監視解離180秒。

藉由減去參考流動池上所得之反應來校正整體折射率差異。藉由朗格繆爾結合等溫線(Langmuir binding isotherm)之非線性曲線擬合，利用穩態反應來推導解離常數 K_D 。使用簡單的一比一朗格繆爾結合模型(BIACORE®評價軟體1.1.1版)、藉由同時擬合結合及解離感測圖譜來計算結合速率(k_{on})及解離速率(k_{off})。平衡解離常數(K_D)係依比率 k_{off}/k_{on} 計算。參見例如Chen等人, J Mol Biol 293, 865-881 (1999)。

活性分析

本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子的生物活性可藉由如實例中所述的各種分析來量測。生物學活性可例如包括誘導T細胞增殖、誘導T細胞中之信號傳導、誘導T細胞表現活化標記、誘導T細胞分泌細胞激素、誘導靶細胞(諸如腫瘤細胞)溶解，及誘導腫瘤消退及/或改善存活率。

組合物、調配物及投藥途徑

在另一態樣中，本發明提供包含本文所提供之T細胞活化雙特異性抗原結合分子中之任一者的醫藥組合物，例如用於任一以下治療性方法。在一個實施例中，醫藥組合物包含本文所提供之T細胞活化雙特異性抗原結合分子中的任一者及醫藥學上可接受之載劑。在另一個實施例中，醫藥組合物包含本文所提供之T細胞活化雙特異性抗原結合分子中的任一者及至少一種其他治療劑，例如如下文所述。

另外提供一種製造呈適於活體內投與之形式的本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子的方法，該方法包含(a)獲得本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，及(b)用至少一種醫藥學上可接受之載劑調配T細胞活化雙特異性抗原結合分子，藉此調配成用於活體內投與的T細胞活化雙特異性抗原結合分子製劑。

本發明之醫藥組合物包含治療有效量之一或多種溶解於或分散於醫藥學上可接受之載劑中的T細胞活化雙特異性抗原結合分子。片語「醫藥學上或藥理學上可接受」係指在所用劑量及濃度下對於接受者而言一般無毒性的分子實體及組合物，亦即當投與動物(適當時諸如人類)時，不產生有害、過敏或其他不良反應。熟習此項技術者根據本發明將獲知含有至少一種T細胞活化雙特異性抗原結合分子及視情況存在之另一種活性成分之

醫藥組合物的製備，如Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, Mack Printing Company, 1990中舉例說明，該文獻以引用的方式併入本文中。此外，投與動物(例如人類)時，應瞭解，製劑應滿足FDA生物學標準局(FDA Office of Biological Standards)或其他國家之相應機關所要求的無菌性、發熱性、總體安全及純度標準。較佳組合物為凍乾調配物或水溶液。如本文所用，「醫藥學上可接受之載劑」包括任何及所有溶劑、緩衝劑、分散介質、塗料、界面活性劑、抗氧化劑、防腐劑(例如抗細菌劑、抗真菌劑)、等張劑、吸收延遲劑、鹽、防腐劑、抗氧化劑、蛋白質、藥物、藥物穩定劑、聚合物、凝膠、黏合劑、賦形劑、崩解劑、潤滑劑、甜味劑、調味劑、染料及類似材料及其組合，如一般技術者所知(參見例如Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, Mack Printing Company, 1990, 第1289-1329頁，該文獻以引用的方式併入本文中)。除非任何習知載劑與活性成分不相容，否則涵蓋將其用於治療或醫藥組合物之用途。

組合物可包含不同類型的載劑，此視其是否以固體、液體或氣溶膠形式投與及投藥途徑(諸如注射)是否需要其為無菌而定。本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子(及任何其他治療劑)可如下投與：靜脈內、皮內、動脈內、腹膜內、病灶內、顱內、關節內、前列腺內、脾內、腎內、胸膜內、氣管內、鼻內、玻璃體內、陰道內、直腸內、瘤內、肌內、腹膜內、皮下、結膜下、囊泡內、黏膜、心包內、臍內、眼內、經口、表面、局部、吸入(例如氣溶膠吸入)、注射、輸注、連續輸注、局部灌注沐浴靶細胞(直接、經由導管、經由灌洗法)、於乳膏中、於脂質組合物(例如脂質體)中、或藉由一般技術者已知的其他方法或前述者之任何組合(參見例

如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, Mack Printing Company, 1990, 該文獻以引用的方式併入本文中)。非經腸投藥, 特定言之, 靜脈內注射, 最常用於投與多肽分子, 諸如本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子。

非經腸組合物包括為藉由注射(例如皮下、皮內、病灶內、靜脈內、動脈內、肌肉內、鞘內或腹膜內注射)投藥所設計的彼等物。注射時, 本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子可於水溶液中調配, 較佳於生理上相容的緩衝液(諸如漢克氏溶液(Hanks' solution)、林格氏溶液(Ringer's solution)或生理鹽水緩衝液)中調配。溶液可含有調配劑, 諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑。或者, T細胞活化雙特異性抗原結合分子可呈粉末形式以便在使用之前用適合媒劑(例如無菌無熱原質水)復原。無菌可注射溶液係藉由必要時將含有所需量之本發明T細胞活化雙特異性抗原結合分子的適當溶劑與下文所列之各種其他成分合併來製備。無菌性可容易藉由例如無菌過濾膜過濾來實現。一般而言, 分散液係藉由將各種經滅菌之活性成分併入含有基本分散介質及/或其他成分的無菌媒劑中來製備。在用於製備無菌可注射溶液之無菌粉末情況下, 較佳製備方法為真空乾燥及冷凍乾燥技術, 其利用預先無菌過濾之液體介質產生活性成分與任何其他所需成分之粉末。必要時, 液體介質宜經緩衝, 且在用足量鹽水或葡萄糖注射之前, 首先使液體稀釋劑呈等張性。組合物在製造及儲存條件下必須穩定, 且針對微生物(諸如細菌及真菌)之污染作用加以保存。應瞭解, 內毒素污染應最低限度地保持在安全水準, 例如低於0.5 ng/mg蛋白質。醫藥學上可接受之適合載劑包括(但不限於)緩衝劑, 諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸; 抗氧化劑, 包括抗壞血酸及甲硫胺酸; 防腐劑(諸如氯化十

八烷基二甲基苯甲基銨；氯化六羥季銨；苯紮氯銨；苜索氯銨；苯酚、丁基或苯甲醇；對羥苯甲酸烷基酯，諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(小於約10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啉酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖，諸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇；成鹽相對離子，諸如鈉；金屬錯合物(例如Zn蛋白錯合物)；及/或非離子界面活性劑，諸如聚乙二醇(PEG)。水性注射懸浮液可含有增加懸浮液黏度之化合物，諸如羧甲基纖維素鈉、山梨糖醇、聚葡萄糖或其類似物。視情況，懸浮液亦可含有適合穩定劑或增加化合物溶解度之藥劑以允許製備高度濃縮之溶液。另外，活性化合物懸浮液可製備成適當的油性注射懸浮液。適合親脂性溶劑或媒劑包括脂肪油，諸如芝麻油；或合成脂肪酸酯，諸如油酸乙酯或甘油三酯；或脂質體。

活性成分可截留於微膠囊中，例如藉由凝聚技術或藉由界面聚合法所製備之微膠囊，例如分別為羥基甲基纖維素或明膠微膠囊及聚(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊；截留於膠態藥物遞送系統(例如脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米顆粒及奈米膠囊)中或巨乳液中。此類技術揭示於Remington's Pharmaceutical Sciences (第18版, Mack Printing Company, 1990)中。可製備持續釋放型製劑。持續釋放型製劑之適合實例包括含有多肽之固體疏水性聚合物之半滲透基質，該等基質呈成形物品形式，例如薄膜或微膠囊。在特定實施例中，可注射組合物之延長吸收可藉由在組合物中使用延遲吸收劑(諸如單硬脂酸鋁、明膠或其組合)來達成。

除先前描述的組合物之外，T細胞活化雙特異性抗原結合分子亦可調配為儲槽式製劑。此類長效調配物可藉由植入(例如皮下或肌肉內植入)或藉由肌肉內注射來投與。因此，舉例而言，T細胞活化雙特異性抗原結合分子可用適合聚合物或疏水性材料(例如可接受油中之乳液)或離子交換樹脂調配，或調配為微溶性衍生物，例如調配為微溶性鹽。

包含本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子的醫藥組合物可藉助於習知混合、溶解、乳化、囊封、截留或凍乾方法製造。醫藥組合物可使用一或多種有利於將蛋白質處理成可在醫藥學上使用之製劑的生理學上可接受之載劑、稀釋劑、賦形劑或助劑、以習知方式調配。適當調配物視所選投藥途徑而定。

T細胞活化雙特異性抗原結合分子可調配成呈游離酸或鹼、中性或鹽形式的組合物。醫藥學上可接受之鹽為實質上保持游離酸或鹼之生物活性的鹽。此等鹽包括酸加成鹽，例如與蛋白質組合物之自由胺基形成的鹽，或與無機酸(諸如鹽酸或磷酸)或有機酸(諸如乙酸、草酸、酒石酸或杏仁酸)形成的鹽。與自由羧基形成的鹽亦可衍生自無機鹼，諸如氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫氧化銨、氫氧化鈣或氫氧化鐵；或有機鹼，諸如異丙胺、三甲胺、組胺酸或普魯卡因(procaine)。相較於對應游離鹼形式，醫藥鹽傾向於更溶於水性及其他質子溶劑中。

治療方法及組合物

本文所提供之任一種T細胞活化雙特異性抗原結合分子可用於治療方法中。本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子可用作免疫治療劑，例如治療癌症。

用於治療方法時，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子係以符

合良好醫學實務之方式調配、給予及投與。在此情形下，考慮因素包括所治療之特定病症、所治療之特定哺乳動物、個別患者之臨床病狀、病症之病因、藥劑遞送部位、投藥方法、投藥時程及從醫者已知之其他因素。

在一個態樣中，提供用作藥物的本發明T細胞活化雙特異性抗原結合分子。在其他態樣中，提供用於治療疾病的本發明T細胞活化雙特異性抗原結合分子。在某些實施例中，提供用於治療方法中的本發明T細胞活化雙特異性抗原結合分子。在一個實施例中，本發明提供用於治療有需要之個體之疾病的如本文所述之T細胞活化雙特異性抗原結合分子。在某些實施例中，本發明提供用於治療患有疾病之個體之方法中的T細胞活化雙特異性抗原結合分子，該方法包含向該個體投與治療有效量之T細胞活化雙特異性抗原結合分子。在某些實施例中，所治療之疾病為增生性病變。在一個特定實施例中，該疾病為癌症。在某些實施例中，方法進一步包含向個體投與治療有效量之至少一種其他治療劑，例如抗癌劑(若所治療之疾病為癌症)。在其他實施例中，本發明提供如本文所述之用於誘導靶細胞(特定言之，細胞)溶解的T細胞活化雙特異性抗原結合分子。在某些實施例中，本發明提供用於誘導個體中之靶細胞(特定言之，腫瘤細胞)溶解之方法中的T細胞活化雙特異性抗原結合分子，該方法包含向該個體投與有效量之T細胞活化雙特異性抗原結合分子以誘導靶細胞溶解。根據任一上述實施例之「個體」為哺乳動物，較佳為人類。

在另一態樣中，本發明提供本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子用於製造或製備藥物的用途。在一個實施例中，藥物用於治療有需要之個體之疾病。在另一實施例中，藥物係用於治療疾病之方法中，該方法包含向患有疾病之個體投與治療有效量之藥物。在某些實施例中，所治療之

疾病為增生性病徵。在一個特定實施例中，該疾病為癌症。在一個實施例中，方法進一步包含向個體投與治療有效量之至少一種其他治療劑，例如抗癌劑(若所治療之疾病為癌症)。在另一實施例中，藥物係用於誘導靶細胞(特定言之，腫瘤細胞)溶解。在再另一個實施例中，藥物係用於誘導個體之靶細胞(特定言之，腫瘤細胞)溶解的方法中，該方法包含向個體投與有效量之誘導靶細胞溶解的藥物。根據任一上述實施例之「個體」可為哺乳動物，較佳為人類。

在另一態樣中，本發明提供一種治療疾病之方法。在一個實施例中，該方法包含向患有此類疾病之個體投與治療有效量之本發明T細胞活化雙特異性抗原結合分子。在一個實施例中，向該個體投與包含本發明T細胞活化雙特異性抗原結合分子、呈醫藥學上可接受之形式的組合物。在某些實施例中，所治療之疾病為增生性病徵。在一個特定實施例中，該疾病為癌症。在某些實施例中，方法進一步包含向個體投與治療有效量之至少一種其他治療劑，例如抗癌劑(若所治療之疾病為癌症)。根據任一上述實施例之「個體」可為哺乳動物，較佳為人類。

在另一態樣中，本發明提供一種誘導靶細胞(特定言之，腫瘤細胞)溶解的方法。在一個實施例中，方法包含使靶細胞與本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子在T細胞(特定言之，細胞毒性T細胞)存在下接觸。在另一態樣中，提供一種誘導個體之靶細胞(特定言之，腫瘤細胞)溶解的方法。在一個此類實施例中，方法包含向個體投與有效量之T細胞活化雙特異性抗原結合分子以誘導靶細胞溶解。在一個實施例中，「個體」為人類。

在某些實施例中，所治療之疾病為增生性病徵，特定言之，癌症。

癌症之非限制性實例包括膀胱癌、腦癌、頭頸癌、胰臟癌、肺癌、乳癌、卵巢癌、子宮癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、食道癌、結腸癌、結腸直腸癌、直腸癌、胃癌、前列腺癌、血液癌、皮膚癌、鱗狀細胞癌、骨癌及腎臟癌。可使用本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子治療的其他細胞增殖病症包括(但不限於)位於以下中之贅瘤：腹部、骨、乳房、消化系統、肝臟、胰臟、腹膜、內分泌腺體(腎上腺、副甲狀腺、腦垂體、睪丸、卵巢、胸腺、甲狀腺)、眼、頭頸部、神經系統(中樞及周邊)、淋巴系統、骨盆、皮膚、軟組織、脾臟、胸區域及泌尿生殖系統。亦包括癌前病狀或病變及癌症轉移。在某些實施例中，癌症係選自由以下組成之群：腎細胞癌、膀胱癌、皮膚癌、肺癌、結腸直腸癌、乳癌、腦癌、頭頸癌及前列腺癌。在一個實施例中，癌症為前列腺癌。熟習此項技術者容易認識到，在許多情況下，T細胞活化雙特異性抗原結合分子可能不提供治癒，而是僅可提供部分益處。在一些實施例中，具有一些益處之生理學變化亦視為治療上有益的。因此，在一些實施例中，提供生理學變化之T細胞活化雙特異性抗原結合分子的量視為「有效量」或「治療有效量」。個體、患者或需要治療之個體典型地為哺乳動物，更特定言之，人類。

在一些實施例中，將有效量之本發明T細胞活化雙特異性抗原結合分子投與細胞。在其他實施例中，將治療有效量之本發明T細胞活化雙特異性抗原結合分子投與個體以便治療疾病。

預防或治療疾病時，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子(單獨或與一或多種其他額外治療劑組合使用時)的適當劑量將視以下而定：所治療之疾病類型、投藥途徑、患者體重、T細胞活化雙特異性抗原結合分子類型、疾病之嚴重程度及病程、投與T細胞活化雙特異性抗原結合分

子是否用於預防或治療目的、先前或並行治療介入、患者臨床病史及對T細胞活化雙特異性抗原結合分子的反應，以及主治醫師判斷。負責投藥的從業者將在任何情況下確定組合物中活性成分之濃度及適用於單獨個體的劑量。本文中涵蓋各種給藥時程，包括(但不限於)單次投藥或在不同時間點的多次投藥、快速投藥及脈衝式輸注。

T細胞活化雙特異性抗原結合分子宜一次性或在一系列治療期間投與患者。視疾病類型及嚴重程度而定，約1 $\mu\text{g/kg}$ 至15 mg/kg (例如0.1 mg/kg -10 mg/kg)之T細胞活化雙特異性抗原結合分子可為投與患者的初始候選劑量(不論例如藉由一或多次各別投藥，或藉由連續輸注)。一種典型的日劑量可在約1 $\mu\text{g/kg}$ 至100 mg/kg 或100 mg/kg 以上之範圍內，此視上文所提及之因素而定。經歷數日或更長時間重複投藥時，視病狀而定，治療一般持續至疾病症狀發生所需抑制為止。T細胞活化雙特異性抗原結合分子之一種例示性劑量在約0.005 mg/kg 至約10 mg/kg 範圍內。在其他非限制性實例中，每次投藥時的劑量亦可包含每公斤體重約1微克、每公斤體重約5微克、每公斤體重約10微克、每公斤體重約50微克、每公斤體重約100微克、每公斤體重約200微克、每公斤體重約350微克、每公斤體重約500微克、每公斤體重約1毫克、每公斤體重約5毫克、每公斤體重約10毫克、每公斤體重約50毫克、每公斤體重約100毫克、每公斤體重約200毫克、每公斤體重約350毫克、每公斤體重約500毫克至每公斤體重約1000毫克或1000毫克以上，及可推導出的其中任何範圍。在本文所列數字之可推導範圍之非限制性實例中，基於上述數字，可投與的範圍為每公斤體重約5 mg 至約每公斤體重約100 mg 、每公斤體重約5微克至約每公斤體重約500毫克等。因此，可向患者投與約0.5 mg/kg 、2.0 mg/kg 、5.0

mg/kg或10 mg/kg(或其任何組合)之一或多種劑量。此類劑量可間歇地投與，例如每週或每三週投與(例如使得患者接受約2至約20次，或例如約6次劑量之T細胞活化雙特異性抗原結合分子)。初始可投與較高起始劑量，隨後可投與一或多次較低劑量。然而，其他給藥方案可為適用的。此療法之進程容易藉由習知技術及分析來監視。

本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子一般以有效達成預定目的的量使用。用於治療或預防疾病病狀時，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子或其醫藥組合物係以治療有效量投與或施用。治療有效量之確定完全屬於熟習此項技術者之能力範圍內，尤其根據本文所提供之詳細揭示內容。

全身性投藥時，可首先利用活體外分析(諸如細胞培養分析)估算治療有效劑量。接著可利用動物模型配製劑量以達成循環濃度範圍，包括如在細胞培養物中測定的IC₅₀。此類資訊可用於更準確地判定適用於人類之劑量。

初始劑量亦可利用活體內資料(例如動物模型)、使用此項技術中熟知的技術估算。一般熟習此項技術者根據動物資料容易最佳化人類投藥。

劑量及時間間隔可個別地調整以提供足以維持治療作用的T細胞活化雙特異性抗原結合分子之血漿含量。常見的患者注射投藥劑量範圍為每天約0.1 mg/kg至50 mg/kg，典型地為每天約0.5 mg/kg至1 mg/kg。治療有效的血漿含量可藉由每日投與多次劑量來達成。血漿含量可藉由例如HPLC量測。

在局部投藥或選擇性吸收之情況下，T細胞活化雙特異性抗原結合分子之有效局部濃度可與血漿濃度無關。熟習此項技術者能夠最佳化治療有

效局部劑量而無需不當實驗。

治療有效劑量之本文所述T細胞活化雙特異性抗原結合分子通常提供治療益處而不會導致實質性毒性。T細胞活化雙特異性抗原結合分子之毒性及治療功效可藉由細胞培養物或實驗動物之標準醫藥程序測定。可利用細胞培養分析及動物研究來確定LD₅₀ (50%群體致死劑量)及ED₅₀ (50%群體治療有效劑量)。毒性作用與治療作用之間的劑量比率為治療指數，其可以比率LD₅₀/ED₅₀表示。較佳為展現大治療指數的T細胞活化雙特異性抗原結合分子。在一個實施例中，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子展現高治療指數。自細胞培養分析及動物研究獲得之資料可用於調配適用於人類的劑量範圍。劑量較佳在循環濃度範圍內，包括毒性極小或無毒性的ED₅₀。視多種因素(例如所用劑型、所用投藥途徑、個體病狀及類似因素)而定，劑量可在此範圍內變化。準確的配方、投藥途徑及劑量可由個別醫師根據患者病狀來選擇(參見例如Fingl等人，1975，於：The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第1章, 第1頁, 該文獻以全文引用的方式併入本文中)。

經本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子治療之患者的主治醫師瞭解由於毒性、器官功能障礙及類似因素而如何及何時終止、中斷或調整投藥。反之，主治醫師亦已知若臨床反應不夠(排除毒性)則調整療法至更高水準。管理所關注病症時所投與劑量之量值將因所治療之病狀之嚴重強度及投藥途徑及類似因素而不同。病狀之嚴重程度可例如部分地依據標準預後評價方法來評價。另外，劑量及可能的給藥頻率亦將根據個別患者之年齡、體重及反應而變。

其他藥劑及療法

治療時，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子可與一或多種其他藥劑組合投與。舉例而言，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子可與至少一種其他治療劑共投與。術語「治療劑」涵蓋為治療需要此類治療之個體之症狀或疾病而投與的任何藥劑。此類其他治療劑可包含適於治療特定適應症的任何活性成分，較佳為具有互補活性、彼此間無不利影響的彼等活性成分。在某些實施例中，其他治療劑為免疫調節劑、細胞抑制劑、細胞黏附抑制劑、細胞毒性劑、細胞凋亡活化劑，或增強細胞對細胞凋亡誘導劑之敏感性的藥劑。在一個特定實施例中，其他治療劑為抗癌劑，例如微管中斷劑、抗代謝物、拓撲異構酶抑制劑、DNA嵌入劑、烷化劑、激素療法、激酶抑制劑、受體拮抗劑、腫瘤細胞凋亡活化劑，或抗血管生成劑。

此類其他藥劑宜以有效達成預定目的之量組合存在。此類其他藥劑之有效量視T細胞活化雙特異性抗原結合分子之用量、病症類型或療法及上文所論述的其他因素而定。T細胞活化雙特異性抗原結合分子通常以相同劑量且使用如本文所述的投藥途徑使用，或以本文所述劑量之約1至99%，或以憑經驗/臨床上確定為適當的任何劑量及任何途徑使用。

上文指出的此類組合療法包含組合投藥(其中相同或各別組合物中包括兩種或兩種以上治療劑)及各別投藥，在此情況下，本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子之投與可發生於其他治療劑及/或佐劑之投與之前、同時及/或之後。本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子亦可與輻射療法組合使用。

製品

在本發明之另一態樣中，提供含有適用於治療、預防及/或診斷上述

病症之物質的製品。製品包含容器及附於或系連於容器之標籤或藥品說明書。適合容器包括例如瓶子、小瓶、注射器、IV溶液袋等。容器可由多種材料(諸如玻璃或塑膠)形成。容器裝有單獨或與有效治療、預防及/或診斷病狀之另一組合物組合之組合物，且可具有無菌接取口(例如容器可為具有可由皮下注射針刺穿之塞子的靜脈內溶液袋或小瓶)。組合物中之至少一種活性劑為本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子。標籤或藥品說明書指示組合物用於治療所選病狀。此外，製品可包含(a)其中含有組合物的第一容器，其中組合物包含本發明之T細胞活化雙特異性抗原結合分子；及(b)其中含有組合物的第二容器，其中組合物包含另一種細胞毒性劑或其他治療劑。本發明之此實施例中之製品可進一步包含指示組合物可用於治療特定病狀之藥品說明書。或者或另外，製品可進一步包含第二(或第三)容器，其包含醫藥學上可接受之緩衝液，諸如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸鹽緩衝鹽水、林格氏溶液及右旋糖溶液。其可進一步包括就商業及使用者觀點而言所需之其他物質，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

實例

以下為本發明之方法及組合物之實例。應瞭解，考慮到上文提供之一般說明，可實施各種其他實施例。

通用方法

重組DNA技術

使用標準方法操縱DNA，如Sambrook等人，Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989中所述。根據製造商說明書，使用分子生物學試

劑。關於人類免疫球蛋白輕鏈及重鏈之核苷酸序列的一般資訊明示於 Kabat, E. A. 等人, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, NIH公告第91-3242號。

DNA測序

藉由雙股測序法測定DNA序列。

基因合成

必要時，所要基因區段係藉由PCR、使用適當模板產生，或藉由 Geneart AG (Regensburg, Germany)、藉由自動化基因合成法、自合成寡核苷酸及PCR產物合成。在確切基因序列無法獲得的情況下，根據來自最近同源物的序列來設計寡核苷酸引子且藉由RT-PCR自來源於適當組織之RNA分離基因。將側接有單數個限制性核酸內切酶裂解位點的基因區段選殖入標準選殖/測序載體中。自經轉形之細菌純化質體DNA且藉由UV光譜學來測定濃度。經次選殖之基因片段之DNA序列藉由DNA測序來證實。基因區段經設計具有允許次選殖入相應表現載體中的適合限制位點。所有構築體經設計具有5'端DNA序列，該序列編碼靶向真核生物細胞中分泌之蛋白質的前導肽。

實例1

抗STEAP-1/抗CD3 T細胞雙特異性(TCB)分子的製備

此實例中製備以下分子，其示意性說明顯示於圖2中：

A.具有電荷修飾的「2+1 IgG互換Fab，倒置式」(CD3結合子中之VH/VL交換，STEAP-1結合子中之電荷修飾)(圖2A，SEQ ID NO 24、25、33及34)。

B.不具有電荷修飾的「2+1 IgG互換Fab，倒置式」(CD3結合子中之

VH/VL交換)(圖2B，SEQ ID NO 24、35、36及37)。

C.具有電荷修飾的「2+1 IgG互換Fab，倒置式」(CD3結合子中之CH1/CL交換，STEAP-1結合子中之電荷修飾)(圖2C，SEQ ID NO 25、33、38及39)。

D.「STEAP-1/CD3 (scFv)₂」(圖2D，SEQ ID NO 40；亦參見WO 2014/165818)。

E.具有電荷修飾的“1+1 IgG互換Fab”(CD3結合子中之VH/VL交換，STEAP-1結合子中之電荷修飾)(圖2E，SEQ ID NO 24、25、33及41)。

F.具有電荷修飾的「2+1 IgG互換Fab，倒置式」(CD3結合子中之VH/VL交換，STEAP-1結合子中之電荷修飾)(圖2F，SEQ ID NO 22-25)。

將編碼CD3及STEAP1結合子之重鏈及輕鏈可變區的DNA序列與預插入相應受者哺乳動物表現載體中之相應恆定區同框次選殖。抗體表現係由嵌合MPSV啟動子或CMV啟動子驅動。聚腺苷酸化係由位於CDS之3'端的合成聚腺苷酸信號序列驅動。另外，各種載體含有用於常染色體複製的EBV OriP序列。

為了產生分子A、B、C、E及F，使用聚乙烯亞胺(PEI)作為轉染試劑，將生長於懸浮液中的HEK293-EBNA細胞用相應表現載體共轉染。為了產生分子A、B、C及F，相應表現載體係以1:2:1:1比率共轉染(「載體重鏈(VH-CH1-VL-CH1-CH2-CH3)」：「載體輕鏈(VL-CL)」：「載體重鏈(VH-CH1-CH2-CH3)」：「載體輕鏈(VH-CL)」或「載體重鏈(VH-CH1-VH-CL-CH2-CH3)」：「載體輕鏈(VL-CL)」：「載體重鏈(VH-CH1-CH2-CH3)」：「載體輕鏈(VL-CH1)」)。為了產生分子E，相應表現載體係以

1:1:1:1比率共轉染。

為了分子A、B、C、E及F的轉染，將HEK293 EBNA細胞在無血清懸浮液中、在含有6 mM L-麩醯胺酸及250 mg/l G418的Excell培養基中培養。在600 ml旋轉管燒瓶(最大工作體積400 ml)中產生時，轉染之前24小時接種600百萬個HEK293 EBNA細胞。為了轉染，以 $210\times g$ 將細胞離心5分鐘，且用20 ml預溫熱CD CHO培養基置換上清液。表現載體於20 ml CD CHO培養基中混合至400 μg DNA之最終量。添加1080 μl PEI溶液(2.7 $\mu g/ml$)之後，將混合物渦旋15秒且隨後在室溫下培育10分鐘。隨後，將細胞與DNA/PEI溶液混合，轉移至600 ml旋轉管燒瓶中且在具有5% CO₂加濕氛圍的保溫箱中、在37°C培育3小時。培育之後，添加360 ml含有6 mM L-麩醯胺酸、5 g/L Pepsoy及1.0 mM VPA的Excell培養基且培育細胞24小時。轉染後第一天添加7%饋料。7天之後，藉由以 $3600\times g$ 離心20-30分鐘(Sigma 8K離心機)來收集培養上清液用於純化，溶液無菌過濾(0.22 μm 過濾器)且添加最終濃度為0.01% w/v的疊氮化鈉。溶液在4°C保存。

培養基中之分子效價係藉由蛋白質A-HPLC測定(表1)。效價的計算係基於兩步方法且包括在pH 8.0使含Fc分子結合至蛋白質A及在pH 2.5利用步驟溶離進行釋放。分析所用的兩種緩衝液含有Tris (10 mM)、甘胺酸(50 mM)及NaCl (100 mM)且調整至相應pH (8及2.5)。管柱主體為具有約63 μl 內部體積、裝填有POROS 20A的Upchurch 2 $\times$ 20 mm預裝填管柱。初始校準之後，以0.5 ml/min之流速注射100 μl 各種樣品。0.67分鐘之後，利用pH步驟溶離樣品至pH 2.5。藉由測定280 nm吸光度及使用人類IgG₁濃度範圍為16 mg/l至166 mg/l之標準曲線計算來進行定量。

轉染之後第七天，藉由使用蛋白質A親和層析的親和層析、隨後藉由尺寸排阻層析步驟而自細胞培養上清液中純化分子A、B、C、E及F。

親和層析時，將上清液裝載於經25 ml 20 mM磷酸鈉、20 mM檸檬酸鈉(pH 7.5)平衡的HiTrap蛋白質A HP管柱(CV=5 mL, GE Healthcare)上。未結合的蛋白質藉由至少10個管柱體積的20 mM磷酸鈉、20 mM檸檬酸鈉(pH 7.5)洗滌加以移除且靶蛋白用6個管柱體積的20 mM檸檬酸鈉、100 mM氯化鈉、100 mM甘胺酸(pH 3.0)溶離。藉由添加1/10之0.5 M磷酸鈉(pH 8.0)來中和蛋白質溶液。蛋白質A層析之後進行中間分析時，藉由在還原劑不存在下進行SDS-PAGE且利用庫馬斯(InstantBlue™, 得自Expedeon)染色來分析單一溶離份中之分子純度及分子量(圖3)。根據製造商說明書使用NuPAGE® Pre-Cast凝膠系統(4-12% Bis-Tris, Invitrogen)。將所選靶蛋白溶離份濃縮且過濾，隨後裝載於經20 mM組胺酸、140 mM氯化鈉(pH 6.0)、0.01% Tween20平衡的HiLoad Superdex 200管柱(GE Healthcare)上。

為了純化分子D，在藉由親和層析(使用固定金屬離子親和層析(IMAC)，隨後進行尺寸排阻層析步驟)進行轉染之後的第7天，自細胞培養上清液中純化所分泌的蛋白質。將經過濾的上清液裝載於經25 ml 50 mM磷酸鈉、300 mM氯化鈉(pH 8)平衡的Roche cOmplete His Tag管柱(CV=5 mL, Roche)。藉由用至少10個管柱體積之相同緩衝液洗滌來移除未結合之蛋白質。靶蛋白用5個管柱體積的50 mM磷酸鈉、300 mM氯化鈉、250 mM咪唑(pH 8)溶離。濃縮靶蛋白，隨後裝載於經20 mM組胺酸、140 mM NaCl溶液、0.01% Tween20 (pH 6)平衡的HiLoad Superdex 200管柱(GE Healthcare)上。

所純化蛋白質樣品之蛋白質濃度係藉由量測280 nm光學密度(OD)、使用基於胺基酸序列所計算之莫耳消光係數來測定。

在25°C下，使用25 mM K_2HPO_4 、125 mM NaCl、200 mM L-精胺酸單鹽酸鹽、0.02% (w/v) NaN_3 、pH 6.7操作緩衝液，使用TSKgel G3000 SW XL分析型尺寸排阻管柱(Tosoh)分析分子聚集物含量。所有分子之純化參數的概述明示於表1中。

藉由CE-SDS分析、在還原劑存在及不存在下分析分子的最終純度及分子量。根據製造商說明書使用Caliper LabChip GXII系統(Caliper lifescience)(圖4及表2)。

在Agilent LC-MS系統(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)上對分子A、B及C進行質譜分析。層析系統(Agilent 1260 Infinity)與Agilent 6224 TOF LC/MS ESI裝置耦聯。在40°C，以1 ml/min的流速將約5 μ g樣品注射至NUCLEOGEL RP1000-8, 250 mm×4.6 mm管柱(MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germany)上。流動相如下：A：5%乙腈、0.05%甲酸，及B：95%乙腈、0.05%甲酸。為了施加溶離梯度，在10分鐘內使15% B升高至60% B，接著在2.5分鐘內升高100% B。

質譜儀係以高解析度4 GHz正模式量測，且在500至3200 m/z範圍內記錄。使用得自Roche的MassAnalyzer 2.4.1 (Hoffman-La Roche, Ltd)，以人工方式將m/z譜去卷積。

雖然分子A、B及C係根據相同方案產生且純化，但最終品質為不同的，此視分子形式而定。就單體含量、高及低分子量(HMW及LMW)污染及純度而言，獲得分子A的最佳品質。移除電荷修飾(分子B)或電荷修飾

與CH1-CL互換(分子C)的組合均導致分子品質降低。LC-MS分析揭露分子A無錯配，而分子B含有約40%的分子有輕鏈錯配。

表1. 具有及不具有電荷修飾之抗STEAP-1/抗CD3 TCB分子之產生及純化概述

分子	效價[mg/l]	回收率[%]	產量[mg/l]	分析型SEC (HMW/單體/LMW) [%]
A	60	19	11	0.4 / 99.6 / 0
B	43	6.7	3	0.9 / 95 / 4.1
C	51	9.6	5	0.9 / 99.1 / 0
D	858	0.13	1.13	3.51 / 96.49 / 0
E	136.6	33	45.1	2.78 / 95.69 / 1.25
F	207	33	68	1.1 / 93.9 / 5

表2. 具有及不具有電荷修飾之抗STEAP-1/抗CD3 TCB分子的CE-SDS分析(非還原)

分子	峰#	尺寸[kDa]	純度[%]
A	1	315	100
B	1	168	3.5
	2	190	2
	3	202	94.5
C	1	172	0.9
	2	177	1.5
	3	184	1.6
	4	192	33
	5	206	63
D	1	73.9	100
E	1	99	2.2
	2	125	1
	3	162	1.3
	4	172	93.11
	5	183	1.7
F	1	217	100

實例2

STEAP-1 TCB分子F對表現STEAP-1及CD3之細胞的結合

測試實例1中所製備之STEAP-1 TCB分子F對表現STEAP-1之LnCAP細胞及表現CD3之永生化T淋巴細胞株(Jurkat)的結合。簡言之，收集細胞，計數，檢查存活率且以 2×10^6 個細胞/毫升再懸浮於FACS緩衝液(100

μ l PBS 0.1% BSA)中。100 μ l細胞懸浮液(含有 0.2×10^6 個細胞)在圓底96孔盤中，在4℃，與濃度遞增的STEAP-1 TCB (20 pM-250 nM)一起培育30分鐘，用冷PBS 0.1% BSA洗滌兩次，在4℃與PE結合之AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗人類IgG Fcg片段特異性二級抗體(Jackson Immuno Research Lab PE #109-116-170)一起再培育另外30分鐘，用冷PBS 0.1% BSA洗滌兩次且立即使用FACS Canto II (Software FACS Diva)藉由FACS進行分析。包括相應的非靶向TCB分子(結合至CD3，但不結合至靶細胞抗原SEQ ID NO 26、27)作為對照物。使用GraphPadPrism6獲得結合曲線(圖5A，對LnCAP細胞的結合；圖5B，對傑卡特細胞的結合)。

實例3

STEAP-1 TCB分子誘導T細胞發揮殺死作用

評估STEAP-1 TCB分子介導T細胞殺死表現STEAP-1之LnCAP及MKN45細胞。人類PBMC用作效應子且在與雙特異性抗體一起培育24小時及48小時時偵測殺死。在黏附性靶細胞的情況下，用胰蛋白酶/EDTA收集細胞，洗滌且使用平底96孔盤以25000個細胞/孔之密度塗鋪。使細胞黏附隔夜。分析當天收集懸浮的靶細胞且使用圓底96孔盤、以30000個細胞/孔之密度塗鋪。藉由對獲自健康人類供者之肝素化血液的淋巴細胞富集製劑進行Histopaque密度離心來製備周邊血液單核細胞(PBMC)。新鮮血液用無菌PBS稀釋且依Histopaque梯度(Sigma, #H8889)分層。離心(450×g，30分鐘，室溫)之後，丟棄含PBMC之相界面上方的血漿且將PBMC轉移至新的法爾康管中，隨後填充50 ml PBS。對混合物進行離心(400×g，10分鐘，室溫)，丟棄上清液且PBMC集結粒用無菌PBS洗滌兩

次(離心步驟 $350\times g$ ，10分鐘)。所得PBMC群自動計數(ViCell)且於含有10% FCS及1% L-丙胺醯基-L-麩醯胺酸(Biochrom, K0302)之RPMI1640培養基中、在細胞保溫箱中、在 37°C 、5% CO_2 下儲存直至進一步使用(不長於24小時)。在殺死分析中，以指定濃度(範圍為0.1 pM-10 nM，一式三份)添加抗體。包括相應的非靶向TCB分子(結合至CD3，但不結合至靶細胞抗原SEQ ID NO 26、27)作為對照物。將PBMC添加至靶細胞中，效應子相對於靶細胞的最終比率(E:T)為10:1。在 37°C 、5% CO_2 下培育24小時及48小時之後，藉由對藉由細胞凋亡/壞死細胞釋放至細胞上清液中之LDH進行定量(LDH偵測套組，Roche Applied Science，#11 644 793 001)來評估靶細胞殺死。藉由將靶細胞與1% Triton X-100一起培育來實現靶細胞的最大溶解(=100%)。最小溶解(=0%)是指在雙特異性構築體不存在下與效應細胞一起共培育的靶細胞。結果顯示STEAP-1 TCB分子誘導LnCAP及MKN45細胞發生標靶特異性殺死(圖6)。使用GraphPadPrism6計算的與殺死分析相關之EC50值明示於表3中。

表3. STEAP-1 TCB分子F誘導T細胞介導殺死表現STEAP-1之LnCAP及MKN45細胞的EC50值(pM).

細胞株	EC50 [pM] 24 h
LnCAP	100.2
MKN45	1505

實例4

STEAP-1 TCB分子誘導T細胞介導腫瘤溶解

評估不同STEAP-1 TCB分子介導T細胞殺死表現STEAP-1之LnCaP細胞。人類PBMC用作效應子且在與雙特異性抗體一起培育24小時及48小時時偵測殺死。用胰蛋白酶/EDTA收集黏附的靶細胞，洗滌且使用平底96孔盤以30000個細胞/孔之密度塗鋪。使細胞黏附隔夜。藉由對獲自健康

人類供者之肝素化血液的淋巴細胞富集製劑進行Histopaque密度離心來製備周邊血液單核細胞(PBMC)。新鮮血液用無菌PBS稀釋且依Histopaque梯度(Sigma, #H8889)分層。離心($450\times g$, 30分鐘, 室溫)之後, 丟棄含PBMC之相界面上方的血漿且將PBMC轉移至新的法爾康管中, 隨後填充50 ml PBS。對混合物進行離心($400\times g$, 10分鐘, 室溫), 丟棄上清液且PBMC集結粒用無菌PBS洗滌兩次(離心步驟 $350\times g$, 10分鐘)。所得PBMC群自動計數(ViCell)且於含有10% FCS及1% L-丙胺鹽基-L-麩醯胺酸(Biochrom, K0302)之RPMI1640培養基中、在細胞保溫箱中、在 37°C 、5% CO_2 下儲存直至進一步使用(不長於24小時)。

在殺死分析中, 以指定濃度(範圍為6 pM-100 nM)一式三份添加抗體。添加PBMC至靶細胞中, 以獲得10:1之最終E:T比率。在 37°C 、5% CO_2 下培育24小時及48小時之後, 藉由對藉由細胞凋亡/壞死細胞釋放至細胞上清液中之LDH進行定量(LDH偵測套組, Roche Applied Science, #11 644 793 001)來評估靶細胞殺死。藉由將靶細胞與1% Triton X-100一起培育來實現靶細胞的最大溶解(=100%)。最小溶解(=0%)是指在雙特異性構築體不存在下與效應細胞一起共培育的靶細胞。24小時之後的結果(圖7A)顯示分子A為最強的分, 繼之為分子B、分子C, 且最後為分子D。腫瘤細胞溶解48小時之後(圖7B), 排序如下: 分子C、分子B、分子A及最後為分子D。

腫瘤細胞溶解的相應EC50值係使用GraphPadPrism6計算且明示於表4中。

24小時相對於48小時時的不同分子排序可指示各種TCB分子之腫瘤細胞溶解的多樣性動力學。

表4. 指定STEAP-1 TCB抗體誘導T細胞介導表現STEAP-1之LnCaP細胞溶解的EC50值(pM).

TCB分子	EC50 [pM] 24 h	EC50 [pM] 48 h
分子A	36.8	31.4
分子B	95.7	22.9
分子C	151.6	12.8
分子D	308.6	78.5

在另一個實驗中(圖12)，使用如上文所述的相同分析配置及STEAP-1陽性LnCaP腫瘤細胞來比較分子A與分子E的效力。在此，在LnCap存在下，分子A的抗體濃度範圍為0.08 pM-6.25 nM且分子E的抗體濃度範圍為12.2 pM-200 nM。

如圖12中所示，相較於分子E，分子A誘導LnCaP腫瘤細胞在24小時(A)及48小時(B)之後出現較好的溶解。

表5. STEAP-1 TCB介導表現STEAP-1之LnCaP細胞溶解的EC50值(pM)

TCB分子	EC50 [pM] 24 h	EC50 [pM] 48 h
分子A	13.7	6.35
分子E	1855	1556

實例5

Jurkat-NFAT活化分析

使用腫瘤抗原陽性靶細胞(LnCaP)與Jurkat-NFAT報導細胞(具有NFAT啟動子的表現CD3之人類急性淋巴白血報導細胞株，GloResponse Jurkat NFAT-RE-luc2P，Promega #CS176501)的共培養物，評估STEAP-1 TCB分子A及B同時結合至細胞上之CD3及人類STEAP-1後誘導CD3介導效應細胞活化的能力。TCB分子同時結合至STEAP-1抗原(LNCap腫瘤細胞上所表現)及CD3抗原(Jurkat-NFAT報導細胞上所表現)時，NFAT啟動子被活化且引起活性螢火蟲螢光素酶表現。發光信號強度(添加螢光素酶受質後獲得)與CD3活化及信號傳導之強度成比

例。

在分析中，收集人類腫瘤細胞且使用ViCell測定存活率。將每孔20000個細胞塗鋪於平底白壁96孔盤(#655098，Greiner bio-one)中且添加稀釋的抗體或培養基(用作對照)(12.2 pM-200 nM範圍)。

隨後收集Jurkat-NFAT報導細胞且使用ViCell評估存活率。將細胞再懸浮於細胞培養基中且添加至腫瘤細胞中以獲得如所指示之5:1之最終E:T比率及每孔100 μ l之最終體積。細胞在加濕保溫箱中在37°C培育6小時。在培育時間結束時，向孔中添加每孔100 μ l ONE-Glo溶液(1:1 ONE-Glo及分析培養基體積/孔)且在室溫下、在黑暗中培育10分鐘。使用WALLAC Victor3 ELISA讀取器(PerkinElmer2030)，使用5秒/孔作為偵測時間來偵測發光。

如圖8中所示，所有經評價的STEAP-1 TCB分子均經由CD3誘導T細胞交聯及隨後的T細胞活化。STEAP-1 TCB分子的排序如下：分子A、分子B、分子D及最後為分子C。

Jurkat活化的相應EC50值係使用GraphPadPrism6計算且明示於表6中。

表6. STEAP-1 TCB介導Jurkat-NFAT報導細胞活化的EC50值(nM)，如根據6小時之後的發光所量測。

TCB分子	EC50 [nM]
分子A	3.58
分子B	5.73
分子C	39.46
分子D	11.77

在另一個實驗中(圖10)，使用如上文所述的相同分析配置來比較分子A與分子E的效力。在此，分別地，在LnCaP存在下，分子A的抗體濃度範圍為12.2 pM-200 nM且分子E的抗體濃度範圍為48.8 pM-800 nM；在

CHO-hSTEAP-1純系2細胞存在下，分子A的抗體濃度範圍為0.76 pM-12.5 nM且分子E的抗體濃度範圍為3.05 pM-50 nM。

如圖10中所示，分子A在同時結合至Jurkat上之人類CD3及LnCaP或CHO-hSTEAP1細胞上之人類STEAP-1後誘導的Jurkat-NFAT活化強於分子E。

表7. STEAP-1 TCB介導Jurkat-NFAT報導細胞活化的EC50值(nM)，如根據6小時之後的發光所量測。

TCB分子	EC50 [nM] LnCaP細胞的存在	EC50 [nM] CHO-hSTEAP1的存在
分子A	1.36	7.19
分子E	0.054	0.51

在另一個實驗中(圖11)，使用表現STEAP-1的CHO轉染物相對於STEAP-1陰性親代CHO-k1細胞，比較分子A與分子E，以檢查Jurkat NFAT報導細胞的抗原依賴性活化相對於抗原非依賴性活化。在此，兩種分子的抗體濃度範圍為10.2 pM-800 nM。

如圖11A中所示，分子A誘導的抗原依賴性Jurkat-NFAT活化強於分子E。此外，如圖11B中所描繪，分子E亦在高於1 nM的濃度下、在STEAP-1陰性CHO-k1細胞存在下誘導抗原非依賴性Jurkat-NFAT活化。相比之下，分子A僅在約80 nM及高於80 nM的高濃度下誘導抗原非依賴性Jurkat-NFAT活化。

表8. STEAP-1 TCB介導Jurkat-NFAT報導細胞活化的EC50值(nM)，如根據6小時之後的發光所量測。

TCB分子	EC50 [nM] CHO-hSTEAP1的存在	EC50 [nM] STEAP-1陰性CHO-K1的存在
分子A	0.1	-
分子E	0.79	18.8

實例6

STEAP-1 TCB對表現STEAP-1及CD3之細胞的結合

使用表現STEAP-1之CHO-hSTEAP1純系2細胞(來源於倉鼠卵巢的上皮細胞株，其經轉染而穩定地過度表現人類STEAP-1)及表現CD3之永生化T淋巴細胞(Jurkat，DSMZ #ACC 282)測試STEAP-1 TCB分子的結合。

簡言之，使用細胞解離緩衝液(Gibco, #13151014)收集黏附的CHO-hSTEAP1細胞，計數，檢查存活率，且以 2×10^6 個細胞/毫升再懸浮於FACS緩衝液(100 μ l PBS 0.1% BSA)中。亦收集傑卡特懸浮細胞，計數且檢查存活率。將100 μ l細胞懸浮液(含有 0.2×10^6 個細胞)與濃度遞增的STEAP-1 TCB (31 pM-500 nM)一起在圓底96孔盤中、在4°C培育30分鐘，用含有0.1% BSA的冷PBS (FACS緩衝液)洗滌兩次，在4°C與1:50預稀釋之FITC結合或Alexa Fluor 647結合AffiniPure F(ab')₂片段山羊-人類IgG Fc γ 片段特異性二級抗體(Jackson Immuno Research Lab，FITC #109-096-098，結合至Jurkats；或Jackson Immuno Research Lab，Alexa Fluor 647 #109-606-008，結合至CHO-hSTEAP1，在FACS緩衝液中稀釋)再培育另外30分鐘且用冷PBS 0.1% BSA洗滌兩次。

將染色細胞再懸浮於100 μ l含有2%多聚甲醛的FACS緩衝液中且在室溫下培育30分鐘以固定染色。最後將細胞在350 $\times$ g及4°C下離心4分鐘，丟棄上清液且將細胞集結粒再懸浮於200 μ l FACS緩衝液中。使用FACS Canto II (軟體FACS Diva)，藉由FACS分析染色。使用GraphPadPrism6獲得結合曲線(圖9A，對CHO-hSTEAP1純系2細胞的結合；圖9B，對傑卡特細胞的結合)。

如圖9中所示，分子A對細胞上所表現的人類STEAP-1以及人類CD3

顯示強烈的濃度依賴性結合。相較於分子A，分子E對表現人類STEAP-1之細胞僅顯示微弱(單價)的結合且對細胞上之CD3顯示稍微更好的結合。此可能歸因於不同的構形且因此歸因於相應結合部分之不同可及性水準。

實例7

STEAP-1 TCB分子同時結合至靶細胞及效應細胞後，T細胞上的活化標記物上調

使用識別T細胞活化標記物CD69 (早期活化標記物)及CD25 (晚期活化標記物)的抗體，藉由FACS分析來對STEAP-1 TCB分子同時結合至表現STEAP-1之靶細胞及表現人類CD3之效應細胞後的CD8⁺及CD4⁺ T細胞活化進行評估。抗體及腫瘤溶解分析條件基本上如上文所述(實例4，圖12)。培育之後，將PBMC轉移至圓底96孔盤中，以350×g離心5分鐘且用含有0.1% BSA的PBS (FACS緩衝液)洗滌兩次。根據供應商指示，在4℃，在黑暗中，對CD8 (FITC抗人類CD8，BioLegend # 344704)、CD4 (APC抗人類CD4，BD Biosciences #555349)、CD69 (PE-Cy7抗人類CD69，BioLegend #310912)及CD25 (PE抗人類CD25，BD Biosciences #555432)進行表面染色30分鐘。細胞用每孔150 µl含有0.1% BSA的PBS洗滌兩次且在4℃使用每孔150 µl含有1%多聚甲醛的FACS緩衝液固定30分鐘。離心之後，將樣品再懸浮於每孔150 µl FACS緩衝液中且使用BD FACS CantoII加以分析。

如圖13中所描繪，分子A在同時結合至T細胞上之CD3及靶細胞上之STEAP-1後誘導的T細胞活化強於分子E。48小時之後，分別以表現CD69 (圖13A)或CD25 (圖13C)之CD8 T細胞的百分比、表現CD69(圖13B)及CD25(圖13D)之CD4 T細胞的百分比來測定T細胞活化。圖示為一式三

份，具有SD。

表9. STEAP-1 TCB介導初代CD4或CD8 T細胞活化的EC50值(pM)，如根據CD69或CD25上調(FACS)所測定。

TCB分子	% CD8+CD69+	% CD4+CD69+	% CD8+CD25+	% CD4+CD25+
分子A	123.5	299.9	270.6	446.6
分子E	588.1	4307	5056	7960

在另一個實驗中，使用類似的分析配置來檢查初代T細胞在不同STEAP-1 TCB分子及STEAP-1陰性親代CHO-k1細胞株存在下的抗原非依賴性活化(圖14)。在此，STEAP-1 TCB分子係在0.71 pM-200 nM的濃度範圍內使用。如圖14中所示，分子E在約1 nM及高於1 nM的濃度下誘導抗原非依賴性T細胞活化，而分子A在約80 nM及高於80 nM的濃度下誘導抗原非依賴性T細胞活化。

* * *

雖然已藉助於說明及實例較詳細地描述前述本發明以用於清楚理解之目的，但描述及實例不應解釋為限制本發明之範疇。本文中所引用之所有專利及科學文獻之揭示內容均以全文引用之方式明確併入本文中。

【序列表】

<110> 瑞士商赫孚孟拉羅股份公司
 <120> 雙特異性T細胞活化抗原結合分子
 <130> P33125
 <150> EP 15188037.4
 <151> 2015-10-02
 <160> 41
 <170> Patent In version 3.5
 <210> 1
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 1

Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1 5 10 15

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
35 40 45

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
50 55 60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
85 90 95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
100 105 110

Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
115 120 125

Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
130 135 140

Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
145 150 155 160

Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn
165 170 175

Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg

180

185

190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
 195 200 205

<210> 2
 <211> 198
 <212> PRT
 <213> 食蟹獼猴

<400> 2

Met Gln Ser Gly Thr Arg Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
 1 5 10 15

Ile Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr
 20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Gln Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
 35 40 45

Cys Ser Gln His Leu Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys
 50 55 60

Asn Lys Glu Asp Ser Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu
 65 70 75 80

Met Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro
 85 90 95

Glu Asp Ala Ser His His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Cys Glu Asn
 100 105 110

Cys Met Glu Met Asp Val Met Ala Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp
 115 120 125

Ile Cys Ile Thr Leu Gly Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys
 130 135 140

Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly
 145 150 155 160

Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn
 165 170 175

Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Gln Asp Leu Tyr Ser Gly
 180 185 190

Leu Asn Gln Arg Arg Ile
 195

<210> 3

<211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CD3 VH

<400> 3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CD3 HCDR1

<400> 4

Thr Tyr Ala Met Asn
 1 5

<210> 5
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CD3 HCDR2

<400> 5

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 6
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CD3 HCDR3

<400> 6

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 7
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CD3 VL

<400> 7

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
 35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 8
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CD3 LCDR1

<400> 8

Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
1 5 10

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD3 LCDR2

<400> 9

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD3 LCDR3

<400> 10

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
1 5

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 11

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 12

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 13
<211> 225
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro
225

<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> STEAP-1 HCDR1

<400> 14

Asp Tyr Ala Trp Asn
1 5

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> STEAP-1 HCDR2

<400> 15

Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> STEAP-1 HCDR3

<400> 16

Glu Arg Asn Tyr Asp Tyr Asp Asp Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> STEAP-1 LCDR1

<400> 17

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> STEAP-1 LCDR2

<400> 18

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> STEAP-1 LCDR3

<400> 19

Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr
 1 5

<210> 20
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> STEAP-1 VH

<400> 20

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Val Gly Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Arg Asn Tyr Asp Tyr Asp Asp Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 21
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> STEAP-1 VL

<400> 21

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

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

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 22
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> STEAP-1 VH-CH1(EE)-Fc(白・P329G LALA)

<400> 22

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Gly Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Arg Asn Tyr Asp Tyr Asp Asp Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp

Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys
405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Pro
450

<210> 23
<211> 677
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> STEAP-1 VH-CH1(EF)-CD3 VL-CH1-Fc(杆, P329G LALA)

<400> 23

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Gly Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Arg Asn Tyr Asp Tyr Asp Asp Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly

130	135	140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro 145 150 155 160		
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr 165 170 175		
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val 180 185 190		
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn 195 200 205		
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro 210 215 220		
Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala 225 230 235 240		
Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val 245 250 255		
Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr 260 265 270		
Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile 275 280 285		
Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly 290 295 300		
Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro 305 310 315 320		
Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp 325 330 335		
Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr 340 345 350		
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser 355 360 365		
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu 370 375 380		
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His 385 390 395 400		

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 405 410 415
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 420 425 430
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 435 440 445
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 450 455 460
 Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 465 470 475 480
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 485 490 495
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 500 505 510
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 515 520 525
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 530 535 540
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 545 550 555 560
 Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 565 570 575
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 580 585 590
 Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 595 600 605
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 610 615 620
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 625 630 635 640
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 645 650 655
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 660 665 670

Leu Ser Leu Ser Pro
675

<210> 24
<211> 232
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD3 VH-CL

<400> 24

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val
115 120 125

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
130 135 140

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
145 150 155 160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
165 170 175

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
180 185 190

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
195 200 205

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
210 215 220

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 25
<211> 220
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> STEAP-1 VL-CL(RK)

<400> 25

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

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

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Arg Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser

195

200

205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 26
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> DP47 VH

<400> 26

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 27
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> DP47 VL

<400> 27

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 28
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CD3 HCDR2

<400> 28

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Asp

<210> 29
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CD3 LCDR1

<400> 29

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
 1 5 10

<210> 30
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CD3 VH

<400> 30

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr

20

25

30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 31
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CD3 VL

<400> 31

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
 35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 32
 <211> 124

<212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> STEAP-1 VH

<400> 32

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Val Gly Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Arg Asn Tyr Asp Tyr Asp Asp Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 33
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> STEAP-1 VH-CH1(EE)-Fc(白・P329G LALA)

<400> 33

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Val Gly Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85	90	95
Ala Arg Glu Arg Asn Tyr Asp Tyr Asp Asp Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp	100	105	110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys	115	120	125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly	130	135	140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro	145	150	155
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr	165	170	175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val	180	185	190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn	195	200	205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro	210	215	220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu	225	230	235
Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp	245	250	255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp	260	265	270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly	275	280	285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn	290	295	300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp	305	310	315
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly	325	330	335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350

Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
355 360 365

Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys
405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Pro
450

<210> 34
<211> 677
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> STEAP-1 VH-CH1(EE)-CD3 VL-CH1-Fc(杵, P329G LALA)

<400> 34

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Gly Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Arg Asn Tyr Asp Tyr Asp Asp Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp

100	105	110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys		
115	120	125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly		
130	135	140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro		
145	150	155
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr		
165	170	175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val		
180	185	190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn		
195	200	205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro		
210	215	220
Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala		
225	230	235
Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val		
245	250	255
Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr		
260	265	270
Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile		
275	280	285
Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly		
290	295	300
Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro		
305	310	315
Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp		
325	330	335
Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr		
340	345	350
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser		
355	360	365

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 370 375 380
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 385 390 395 400
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 405 410 415
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 420 425 430
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 435 440 445
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 450 455 460
 Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 465 470 475 480
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 485 490 495
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 500 505 510
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 515 520 525
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 530 535 540
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 545 550 555 560
 Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 565 570 575
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 580 585 590
 Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 595 600 605
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 610 615 620
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 625 630 635 640

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
645 650 655

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
660 665 670

Leu Ser Leu Ser Pro
675

<210> 35
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> STEAP-1 VH-CH1-Fc(白, P329G LALA)

<400> 35

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Gly Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Arg Asn Tyr Asp Tyr Asp Asp Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys
 405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445

Ser Leu Ser Pro
450

<210> 36
<211> 677
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> STEAP-1 VH-CH1-CD3 VL-CH1-Fc(杆, P329G LALA)

<400> 36

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Gly Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Arg Asn Tyr Asp Tyr Asp Asp Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220
 Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala
 225 230 235 240
 Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val
 245 250 255
 Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr
 260 265 270
 Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile
 275 280 285
 Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 290 295 300
 Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro
 305 310 315 320
 Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp
 325 330 335
 Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr
 340 345 350
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 355 360 365
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 370 375 380
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 385 390 395 400
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 405 410 415
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 420 425 430
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 435 440 445
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 450 455 460
 Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 465 470 475 480

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 485 490 495

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 500 505 510

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 515 520 525

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 530 535 540

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 545 550 555 560

Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 565 570 575

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 580 585 590

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 595 600 605

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 610 615 620

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 625 630 635 640

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 645 650 655

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 660 665 670

Leu Ser Leu Ser Pro
 675

<210> 37
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> STEAP-1 VL-CL

<400> 37

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

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

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 38
<211> 695
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> STEAP-1 VH-CH1(EF)-CD3 VH-CL-Fc(杆 · P329G LALA)

<400> 38

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp

20	25	30
Tyr Ala Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp		
35	40	45
Val Gly Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu		
50	55	60
Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Glu Arg Asn Tyr Asp Tyr Asp Asp Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp		
100	105	110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys		
115	120	125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly		
130	135	140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro		
145	150	155
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr		
165	170	175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val		
180	185	190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn		
195	200	205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro		
210	215	220
Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val		
225	230	235
Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu		
245	250	255
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met		
260	265	270
Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg		
275	280	285

Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 290 295 300
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 305 310 315 320
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 325 330 335
 Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
 340 345 350
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala
 355 360 365
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 370 375 380
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 385 390 395 400
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 405 410 415
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 420 425 430
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 435 440 445
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 450 455 460
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 465 470 475 480
 Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 485 490 495
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 500 505 510
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 515 520 525
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 530 535 540
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 545 550 555 560

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
565 570 575

Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
580 585 590

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu
595 600 605

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
610 615 620

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
625 630 635 640

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
645 650 655

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
660 665 670

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
675 680 685

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
690 695

<210> 39
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD3 VL-CH1

<400> 39

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala
100 105 110

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
115 120 125

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
130 135 140

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
145 150 155 160

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
180 185 190

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
195 200 205

Val Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 40
<211> 507
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> STEAP-1/CD3 (scFv)2 (VL-VH-VH-VL-His標識)

<400> 40

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

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

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

85	90	95
Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile 100 105 110		
Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly 115 120 125		
Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly 130 135 140		
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser 145 150 155 160		
Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu 165 170 175		
Trp Val Gly Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser 180 185 190		
Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu 195 200 205		
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr 210 215 220		
Cys Ala Arg Glu Arg Asn Tyr Asp Tyr Asp Asp Tyr Tyr Tyr Ala Met 225 230 235 240		
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly 245 250 255		
Gly Ser Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro 260 265 270		
Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr 275 280 285		
Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu 290 295 300		
Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln 305 310 315 320		
Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr 325 330 335		
Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr 340 345 350		

Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly
 355 360 365
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly
 370 375 380
 Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val Asp Asp Ile Gln Leu Thr
 385 390 395 400
 Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met
 405 410 415
 Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln
 420 425 430
 Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val
 435 440 445
 Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser
 450 455 460
 Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
 465 470 475 480
 Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
 485 490 495
 Lys Leu Glu Leu Lys His His His His His His
 500 505

<210> 41
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CD3 VH-CL-Fc(杆, P329G LALA)

<400> 41

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
 35 40 45
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala

65	70	75	80
Gln Pro Glu Asp	Glu Ala Glu Tyr Tyr	Cys Ala Leu Trp Tyr	Ser Asn
	85	90	95
Leu Trp Val Phe	Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	Ser Ser Ala	
	100	105	110
Ser Thr Lys Gly	Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro	Ser Ser Lys Ser	
	115	120	125
Thr Ser Gly Gly	Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe		
	130	135	140
Pro Glu Pro Val Thr	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly		
	145	150	155
Val His Thr Phe	Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu		
	165	170	175
Ser Ser Val Val	Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr		
	180	185	190
Ile Cys Asn Val	Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys		
	195	200	205
Val Glu Pro Lys Ser	Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro		
	210	215	220
Ala Pro Glu Ala Ala	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys		
	225	230	235
Pro Lys Asp Thr	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val		
	245	250	255
Val Val Asp Val	Ser His Gln Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr		
	260	265	270
Val Asp Gly Val	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu		
	275	280	285
Gln Tyr Asn Ser	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His		
	290	295	300
Gln Asp Trp Leu	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys		
	305	310	315
Ala Leu Gly Ala	Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln		
	325	330	335

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu
 340 345 350

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 355 360 365

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 370 375 380

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 385 390 395 400

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 405 410 415

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 420 425 430

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435

201726735

IPC 分類：
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

【發明摘要】

【中文發明名稱】

雙特異性T細胞活化抗原結合分子

【英文發明名稱】

BISPECIFIC T CELL ACTIVATING ANTIGEN BINDING
MOLECULES

【中文】

本發明大體上係關於用於T細胞活化及使其再定向至特定靶細胞的新穎雙特異性抗原結合分子。另外，本發明係關於編碼此類雙特異性抗原結合分子的聚核苷酸，以及包含此類聚核苷酸的載體及宿主細胞。本發明進一步關於製造本發明之雙特異性抗原結合分子的方法，及使用此等雙特異性抗原結合分子治療疾病的方法。

【英文】

The present invention generally relates to novel bispecific antigen binding molecules for T cell activation and re-direction to specific target cells. In addition, the present invention relates to polynucleotides encoding such bispecific antigen binding molecules, and vectors and host cells comprising such polynucleotides. The invention further relates to methods for producing the bispecific antigen binding molecules of the invention, and to methods of using these bispecific antigen binding molecules in the treatment of disease.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其包含

(a)特異性結合至第一抗原的第一抗原結合部分；

(b)特異性結合至第二抗原的第二抗原結合部分；

其中該第一抗原為活化T細胞抗原且該第二抗原為STEAP-1，或該第一抗原為STEAP-1且該第二抗原為活化T細胞抗原；及

其中特異性結合至STEAP-1的該抗原結合部分包含重鏈可變區，特定言之，人類化重鏈可變區，其包含SEQ ID NO:14之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO:15之HCDR 2及SEQ ID NO:16之HCDR 3；及輕鏈可變區，特定言之，人類化輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO:17之輕鏈互補決定區(LCDR) 1、SEQ ID NO:18之LCDR 2及SEQ ID NO:19之LCDR 3。

【第2項】

如請求項1之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中特異性結合至STEAP-1的該抗原結合部分包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含與胺基酸序列SEQ ID NO:20至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列；及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含與胺基酸序列SEQ ID NO:21至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列。

【第3項】

如請求項1之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中特異性結合至STEAP-1的該抗原結合部分包括包含胺基酸序列SEQ ID NO:32的重鏈可變區及包含胺基酸序列SEQ ID NO:21的輕鏈可變區。

【第4項】

如請求項1至3中任一項之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中該第一及/或第二抗原結合部分為Fab分子。

【第5項】

如請求項1至3中任一項之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中該第二抗原結合部分為特異性結合至第二抗原的Fab分子，且其中該Fab輕鏈及該Fab重鏈的可變域VL與VH或恆定域CL與CH1彼此間置換。

【第6項】

如請求項1至3中任一項之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中該第一抗原為STEAP-1且該第二抗原為活化T細胞抗原。

【第7項】

如請求項1至3中任一項之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中該活化T細胞抗原為CD3，特定言之，CD3 ϵ 。

【第8項】

如請求項1至3中任一項之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中特異性結合至該活化T細胞抗原的該抗原結合部分包含SEQ ID NO:4之重鏈互補決定區(CDR) 1、SEQ ID NO:5之重鏈CDR 2、SEQ ID NO:6之重鏈CDR 3、SEQ ID NO:8之輕鏈CDR 1、SEQ ID NO:9之輕鏈CDR 2及SEQ ID NO:10之輕鏈CDR 3。

【第9項】

如請求項1至3中任一項之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中特異性結合至該活化T細胞抗原的該抗原結合部分包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含與胺基酸序列SEQ ID NO:3至少約95%、96%、97%、98%、

99%或100%一致的胺基酸序列；及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含與胺基酸序列SEQ ID NO:7至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列。

【第10項】

如請求項1至3中任一項之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中
(a)項下之該第一抗原結合部分為特異性結合至第一抗原的第一Fab分子，
(b)項下之該第二抗原結合部分為特異性結合至第二抗原的第二Fab分子，
其中該Fab輕鏈及該Fab重鏈之可變域VL及VH彼此間置換；

及

i)在a)項下之該第一Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)，且其中在a)項下之該第一Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸或位置213之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)；
或

ii)在b)項下之該第二Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)，且其中在b)項下之該第二Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸或位置213之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)。

【第11項】

如請求項10之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中在a)項下之該第一Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)，且其中在a)項下之該第一Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸或位置213之胺基酸獨立地經麩胺

酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)。

【第12項】

如請求項10之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中在a)項下之該第一Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)，且其中在a)項下之該第一Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)。

【第13項】

如請求項10之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中在a)項下的該第一Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)且位置123之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)，且其中在a)項下之該第一Fab分子的恆定域CH1中，位置147之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)且位置213之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)。

【第14項】

如請求項10之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中在a)項下之該第一Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)且位置123之胺基酸經精胺酸(R)取代(根據Kabat編號)，且其中在a)項下之該第一Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)且位置213之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)。

【第15項】

如請求項10之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中在a)項下之該第一Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)且位置123之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)，且其中在a)項下之該第一Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)且位置213之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)。

【第16項】

如請求項10之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中在b)項下之該第二Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)，且其中在b)項下之該第二Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸或位置213之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)。

【第17項】

如請求項10之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中在b)項下之該第二Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)，且其中在b)項下之該第二Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)。

【第18項】

如請求項10之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中在b)項下之該第二Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)且位置123之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)，且其中在b)項下之

該第二Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)且位置213之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)。

【第19項】

如請求項10之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中在b)項下之該第二Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)且位置123之胺基酸經精胺酸(R)取代(根據Kabat編號)，且其中在b)項下之該第二Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)且位置213之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)。

【第20項】

如請求項10之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中在b)項下之該第二Fab分子之恆定域CL中，位置124之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)且位置123之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)，且其中在b)項下之該第二Fab分子之恆定域CH1中，位置147之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)且位置213之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)。

【第21項】

如請求項1之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其進一步包含
c)特異性結合至該第一抗原的第三抗原結合部分。

【第22項】

如請求項21之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中該第三抗原結合部分為Fab分子。

【第23項】

如請求項21或22之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中該第三抗原結合部分與該第一抗原結合部分相同。

【第24項】

如請求項21或22之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中該第一及第三抗原結合部分特異性結合至靶細胞抗原，且該第二抗原結合部分特異性結合至活化T細胞抗原，特定言之，CD3，更特定言之，CD3 ϵ 。

【第25項】

如請求項1至3、21及22中任一項之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，另外包含

d)由能夠穩定結合之第一亞單元及第二亞單元組成的Fc域。

【第26項】

如請求項1至3、21及22中任一項之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中該第一及第二抗原結合部分彼此間融合，視情況經由肽連接子融合。

【第27項】

如請求項1至3、21及22中任一項之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中該第一及第二抗原結合部分為Fab分子且該第二抗原結合部分在該Fab重鏈之C端與該第一抗原結合部分之該Fab重鏈的N端融合。

【第28項】

如請求項1至3、21及22中任一項之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中該第一及第二抗原結合部分為Fab分子且該第一抗原結合部分在該Fab重鏈之C端與該第二抗原結合部分之該Fab重鏈之N端融合。

【第29項】

如請求項27之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中該第一及第二抗原結合部分為Fab分子且該第一抗原結合部分之該Fab輕鏈及該第二抗原結合部分之該Fab輕鏈彼此間融合，視情況經由肽連接子融合。

【第30項】

如請求項25之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中該第一及第二抗原結合部分為Fab分子且該第二抗原結合部分在該Fab重鏈之C端與該Fc域之該第一或第二亞單元之N端融合。

【第31項】

如請求項25之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中該第一及第二抗原結合部分為Fab分子且該第一抗原結合部分在該Fab重鏈之C端與該Fc域之該第一或第二亞單元之N端融合。

【第32項】

如請求項25之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中該第一及第二抗原結合部分為Fab分子且該第一及第二抗原結合部分各自在該Fab重鏈之C端與該Fc域之該等亞單元之一的N端融合。

【第33項】

如請求項25之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中該第三抗原結合部分為Fab分子且在該Fab重鏈之C端與該Fc域之該第一或第二亞單元的N端融合。

【第34項】

如請求項25之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中該第一、第二及第三抗原結合部分為Fab分子且該第二及第三抗原結合部分各自在該

Fab重鏈之C端與該Fc域之該等亞單元之一的N端融合，且該第一抗原結合部分在該Fab重鏈之C端與該第二抗原結合部分之該Fab重鏈的N端融合。

【第35項】

如請求項25之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中該第一、第二及第三抗原結合部分為Fab分子且該第一及第三抗原結合部分各自在該Fab重鏈之C端與該Fc域之該等亞單元之一的N端融合，且該第二抗原結合部分在該Fab重鏈之C端與該第一抗原結合部分之該Fab重鏈的N端融合。

【第36項】

如請求項35之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中該第一及第三抗原結合部分及該Fc域為免疫球蛋白分子，特定言之，IgG類別免疫球蛋白的一部分。

【第37項】

如請求項25之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中該Fc域為IgG，特定言之，IgG₁或IgG₄，Fc域。

【第38項】

如請求項25之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中該Fc域為人類Fc域。

【第39項】

如請求項25之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中該Fc域包含促進該Fc域之該第一與第二亞單元結合的修飾。

【第40項】

如請求項39之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中在該Fc域之該第一亞單元之CH3域中，胺基酸殘基經具有較大側鏈體積之胺基酸殘基置

換，藉此在該第一亞單元之CH₃域內產生可定位於該第二亞單元之CH₃域內之空腔中的隆凸，且在該Fc域之該第二亞單元之CH₃域中，胺基酸殘基經具有較小側鏈體積之胺基酸殘基置換，藉此在該第二亞單元之CH₃域內產生可供該第一亞單元之CH₃域內之該隆凸定位於其中的空腔。

【第41項】

如請求項40之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中具有較大側鏈體積的該胺基酸殘基選自由精胺酸(R)、苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)及色胺酸(W)組成之群，且具有較小側鏈體積的該胺基酸殘基選自由丙胺酸(A)、絲胺酸(S)、蘇胺酸(T)及纈胺酸(V)組成之群。

【第42項】

如請求項40之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中在該Fc域之該第一亞單元之CH₃域中，位置366之該蘇胺酸殘基經色胺酸殘基置換(T366W)，且在該Fc域之該第二亞單元之CH₃域中，位置407之該酪胺酸殘基經纈胺酸殘基置換(Y407V)，且視情況另外在該Fc域之該第二亞單元中，位置366之該蘇胺酸殘基經絲胺酸殘基置換(T366S)且位置368之該白胺酸殘基經丙胺酸殘基置換(L368A)(根據Kabat EU索引編號)。

【第43項】

如請求項40之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中另外在該Fc域之該第一亞單元中，位置354之該絲胺酸殘基經半胱胺酸殘基置換(S354C)或位置356之該麩胺酸殘基經半胱胺酸殘基置換(E356C)，且另外在該Fc域之該第二亞單元中，位置349之該酪胺酸殘基經半胱胺酸殘基置換(Y349C)(根據Kabat EU索引編號)。

【第44項】

如請求項40之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中該Fc域之該第一亞單元包含胺基酸取代S354C及T366W，且該Fc域之該第二亞單元包含胺基酸取代Y349C、T366S、L368A及Y407V（根據Kabat EU索引編號）。

【第45項】

如請求項25之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中該Fc域相較於原生IgG₁ Fc域而言展現減小的針對Fc受體之結合親和力及/或降低的效應功能。

【第46項】

如請求項25之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中該Fc域包含可降低與Fc受體之結合及/或效應功能的一或多個胺基酸取代。

【第47項】

如請求項46之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中該一或多個胺基酸取代位於一或多個選自L234、L235及P329之群的位置(Kabat EU索引編號)。

【第48項】

如請求項25之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中該Fc域之各亞單元包含可降低與活化Fc受體之結合及/或效應功能的三個胺基酸取代，其中該等胺基酸取代為L234A、L235A及P329G (Kabat EU索引編號)。

【第49項】

如請求項45之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中該Fc受體為Fc γ 受體。

【第50項】

如請求項45之T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其中該效應功能為抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)。

【第51項】

一種經分離之聚核苷酸，其編碼如請求項1至50中任一項之T細胞活化雙特異性抗原結合分子。

【第52項】

一種載體，特定言之，表現載體，其包含如請求項51之聚核苷酸。

【第53項】

一種宿主細胞，其包含如請求項50之聚核苷酸或如請求項52之載體。

【第54項】

一種製造能夠特異性結合至STEAP-1及活化T細胞抗原之T細胞活化雙特異性抗原結合分子的方法，該方法包含以下步驟：a)在適於表現該T細胞活化雙特異性抗原結合分子的條件下培養如請求項53之宿主細胞及b)視情況回收該T細胞活化雙特異性抗原結合分子。

【第55項】

一種T細胞活化雙特異性抗原結合分子，其藉由如請求項54之方法製造。

【第56項】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至50或55中任一項之T細胞活化雙特異性抗原結合分子及醫藥學上可接受之載劑。

【第57項】

如請求項56之醫藥組合物，其係用作藥劑。

【第58項】

如請求項56之醫藥組合物，其用於治療有需要之個體的疾病。

【第59項】

如請求項58之醫藥組合物，其中該疾病為癌症。

【第60項】

一種如請求項1至50或55中任一項之T細胞活化雙特異性抗原結合分子的用途，其係用於製造供治療有需要之個體之疾病用的藥劑。

【第61項】

如請求項60之用途，其中該疾病為癌症。

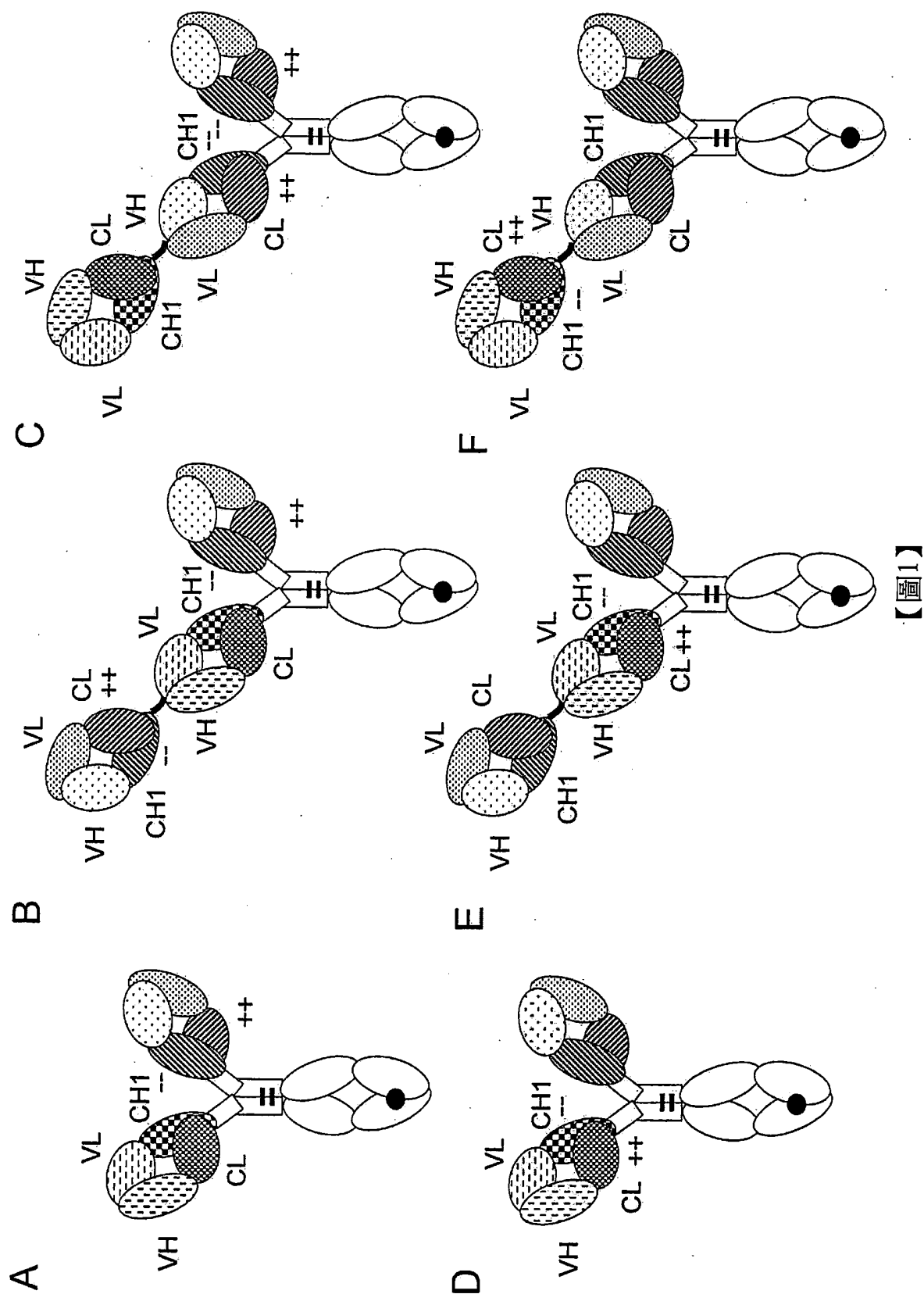
【第62項】

一種用於誘導靶細胞溶解的活體外方法，該方法包含在T細胞存在下使靶細胞與如請求項1至50或55中任一項之T細胞活化雙特異性抗原結合分子接觸。

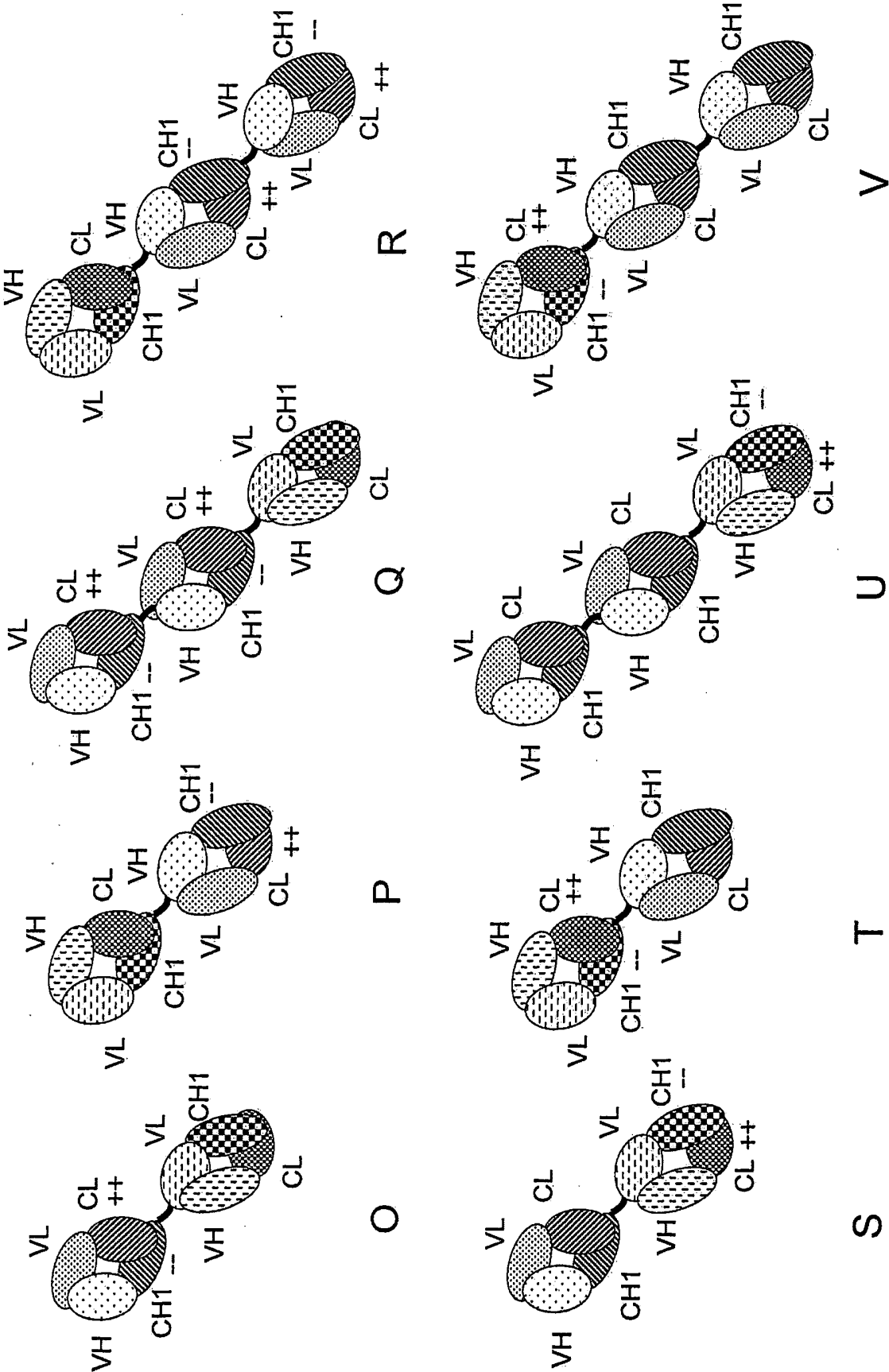
【第63項】

一種如請求項1至50或55中任一項之T細胞活化雙特異性抗原結合分子的用途，其係用於製造供誘導靶細胞溶解用的藥劑。

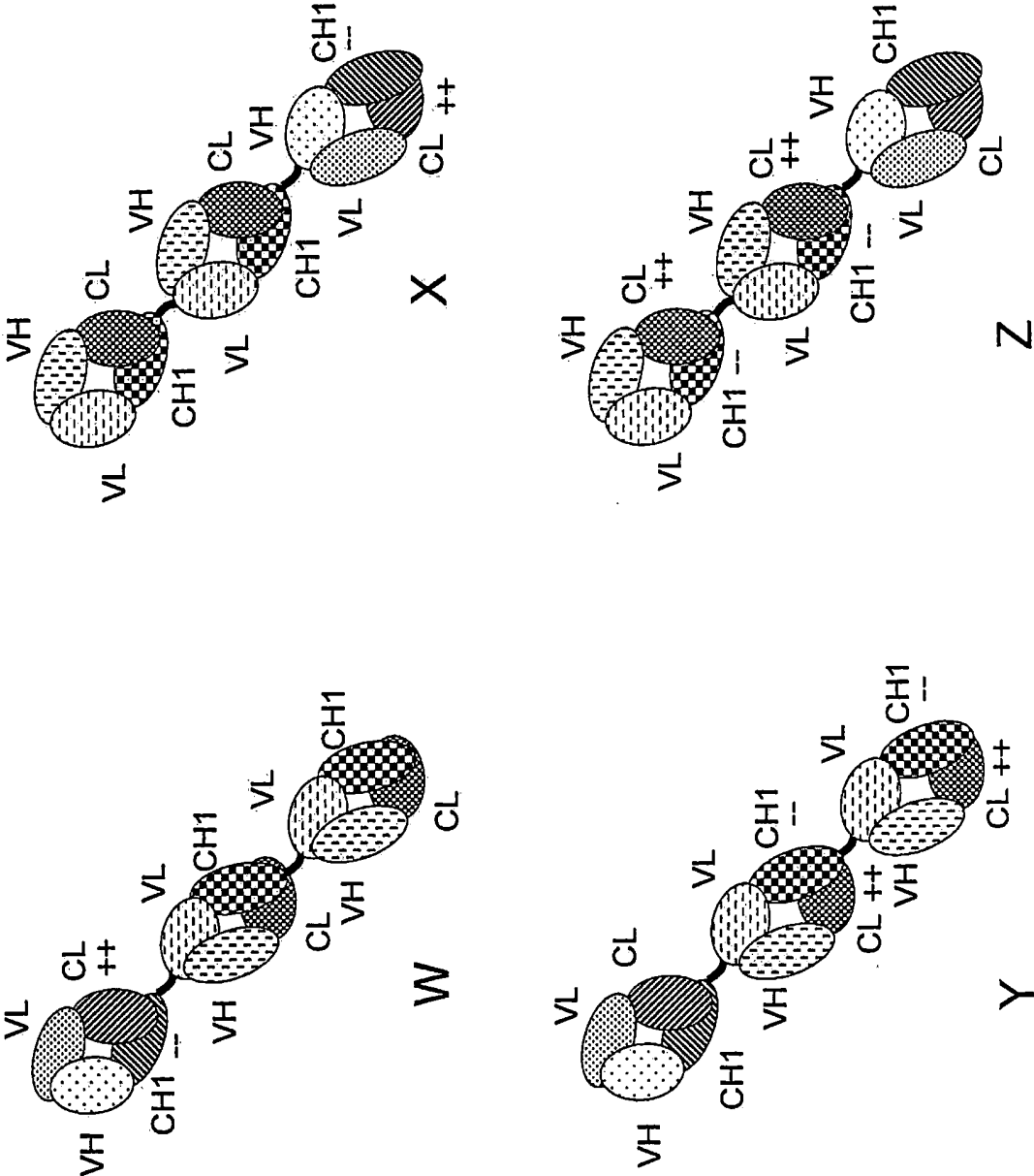
【發明圖式】



【圖1】

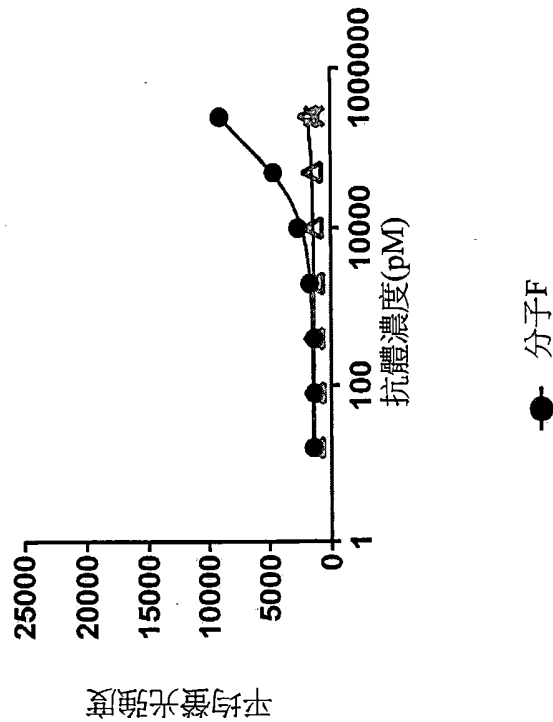


【圖1(續)】

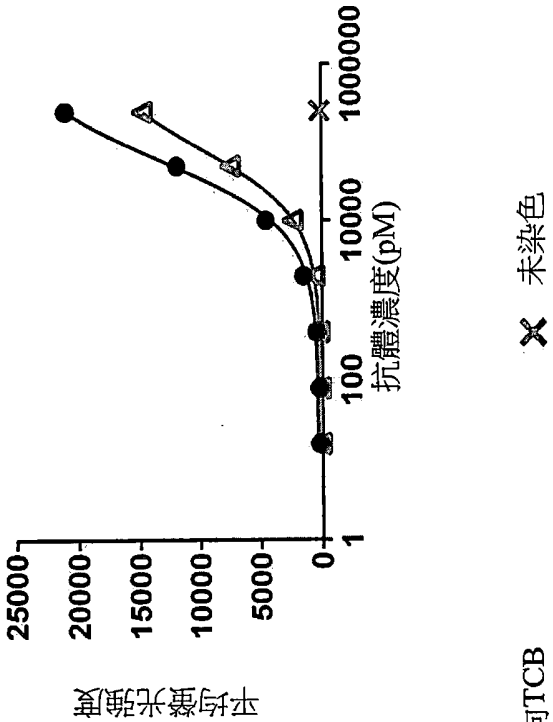


【圖1(續)】

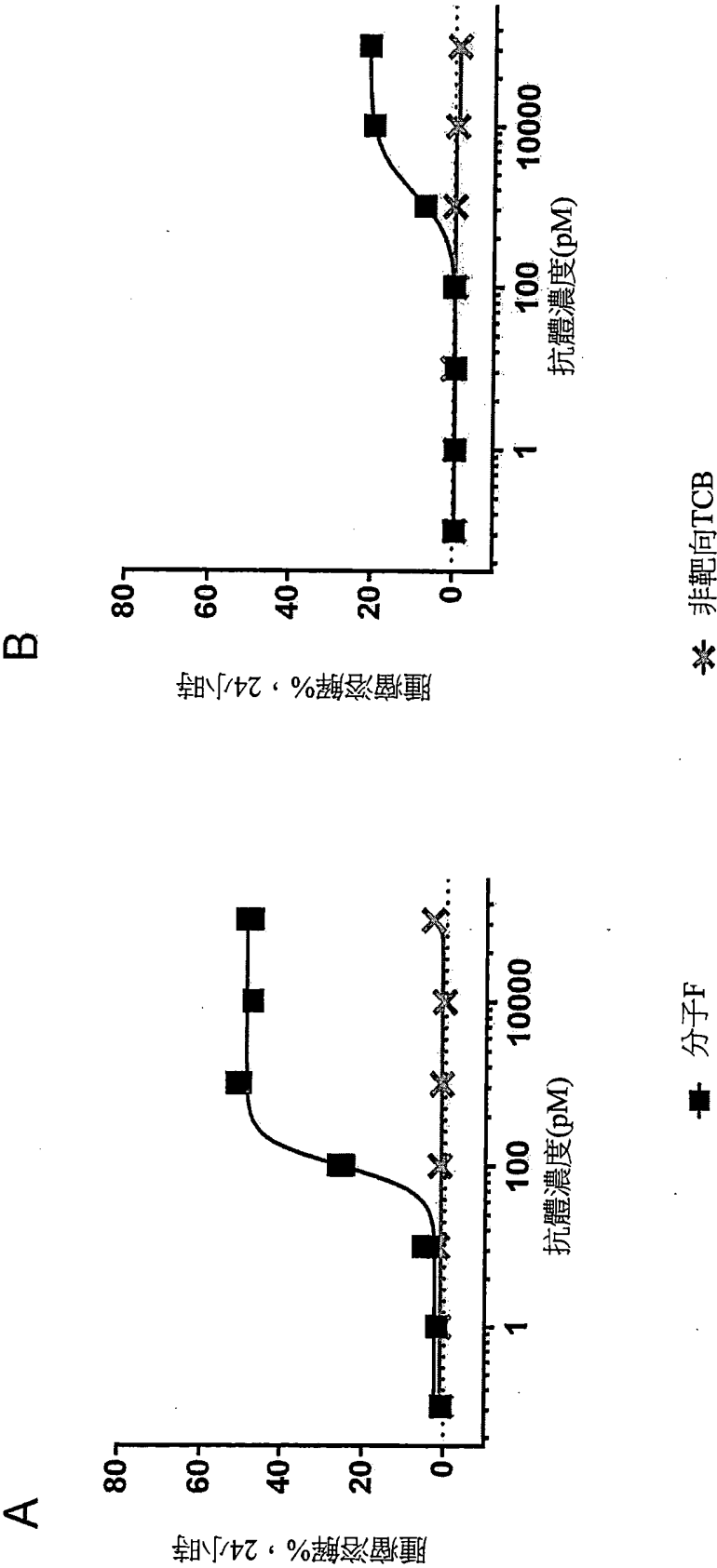
A



B

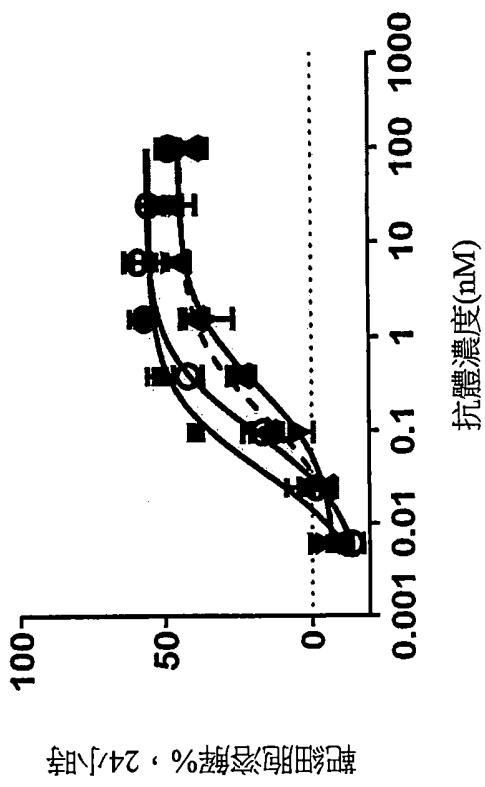


【圖5】

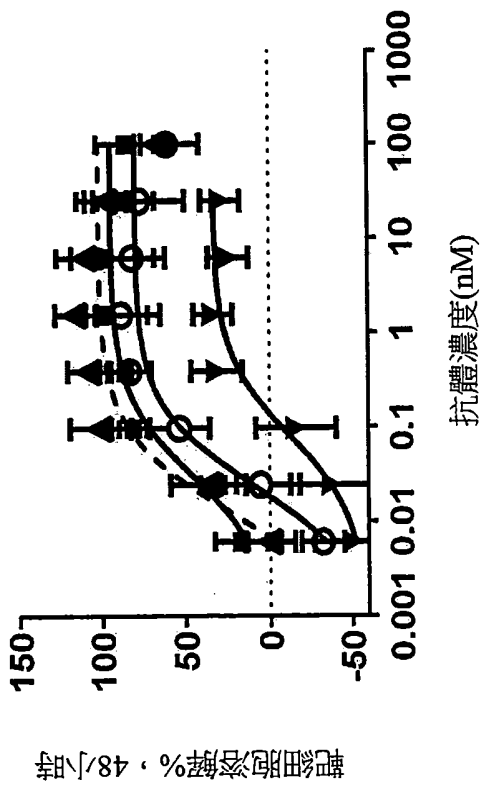


【圖6】

A



B



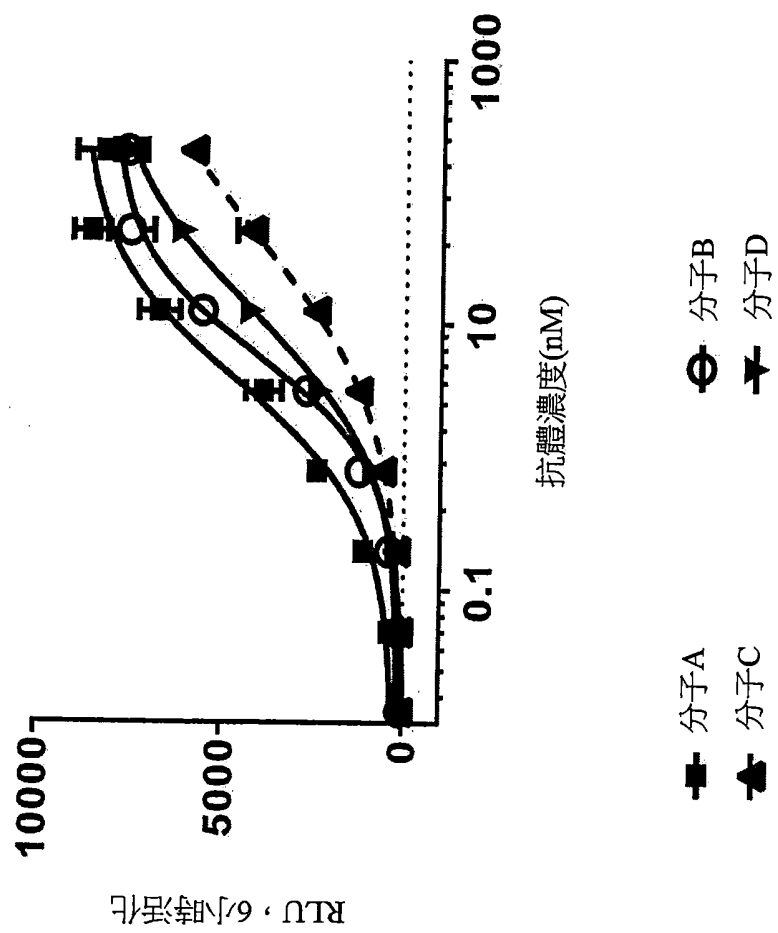
分子D

分子C

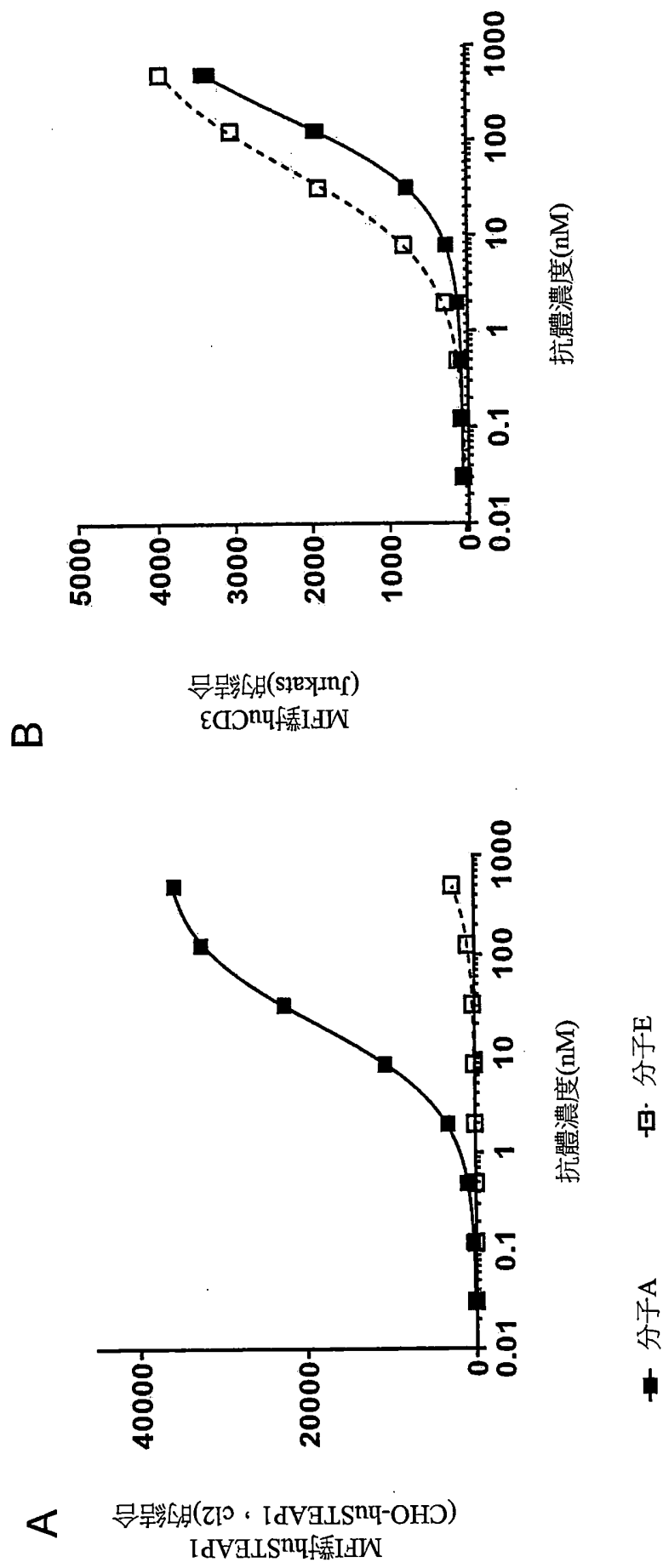
分子B

分子A

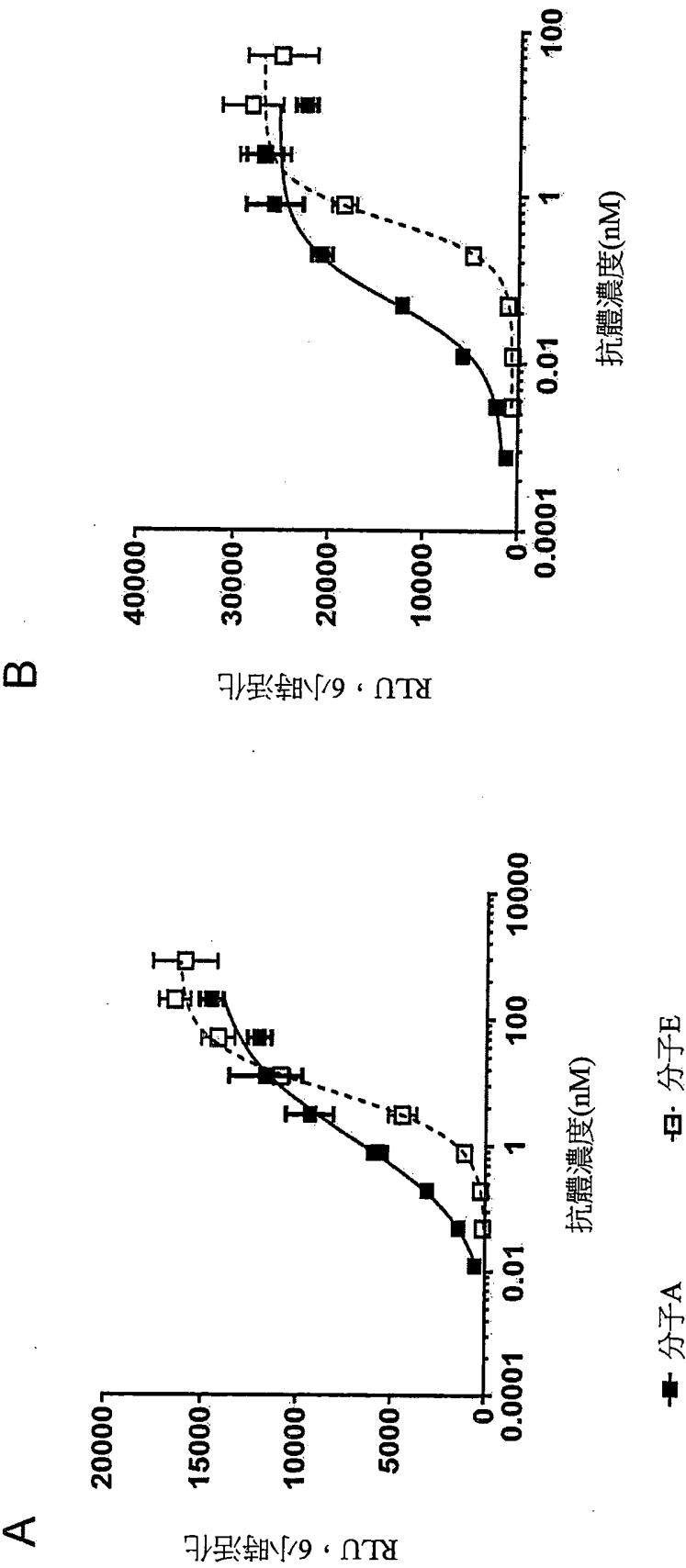
【圖7】



【圖8】

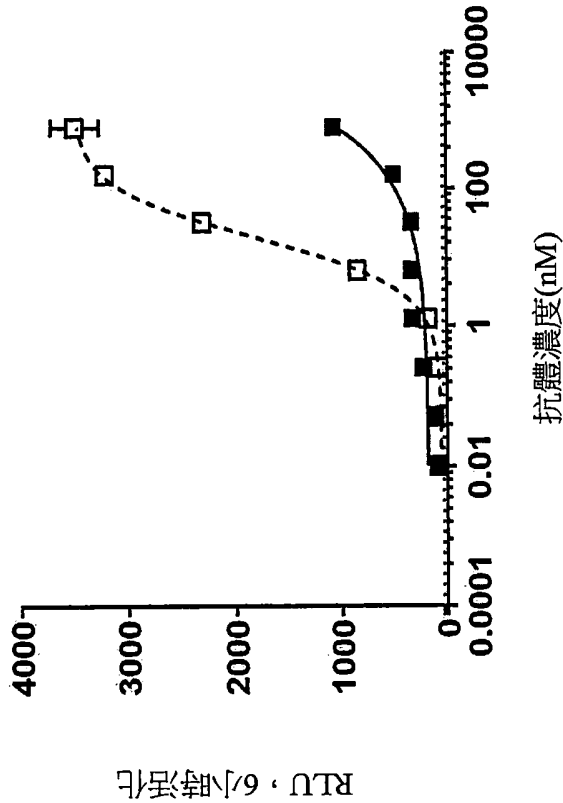


【圖9】

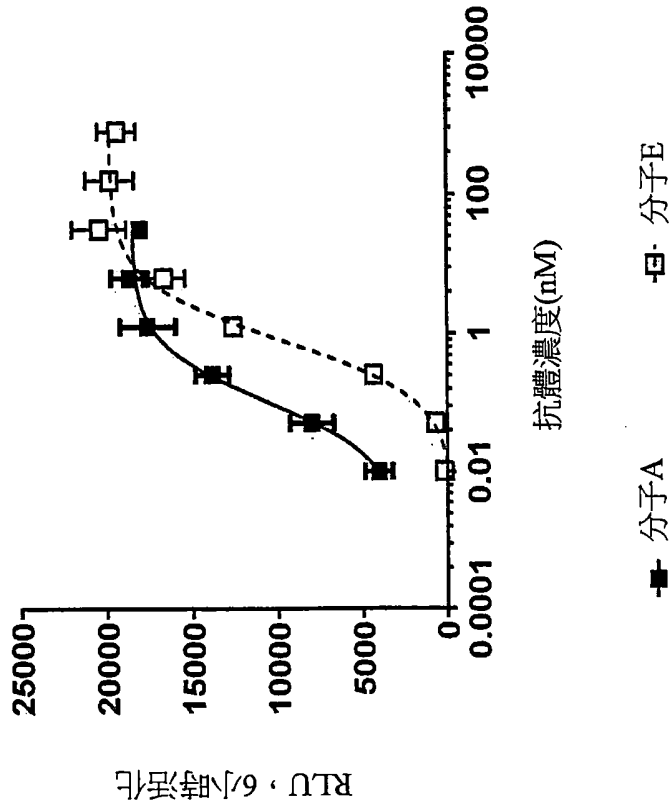


【圖10】

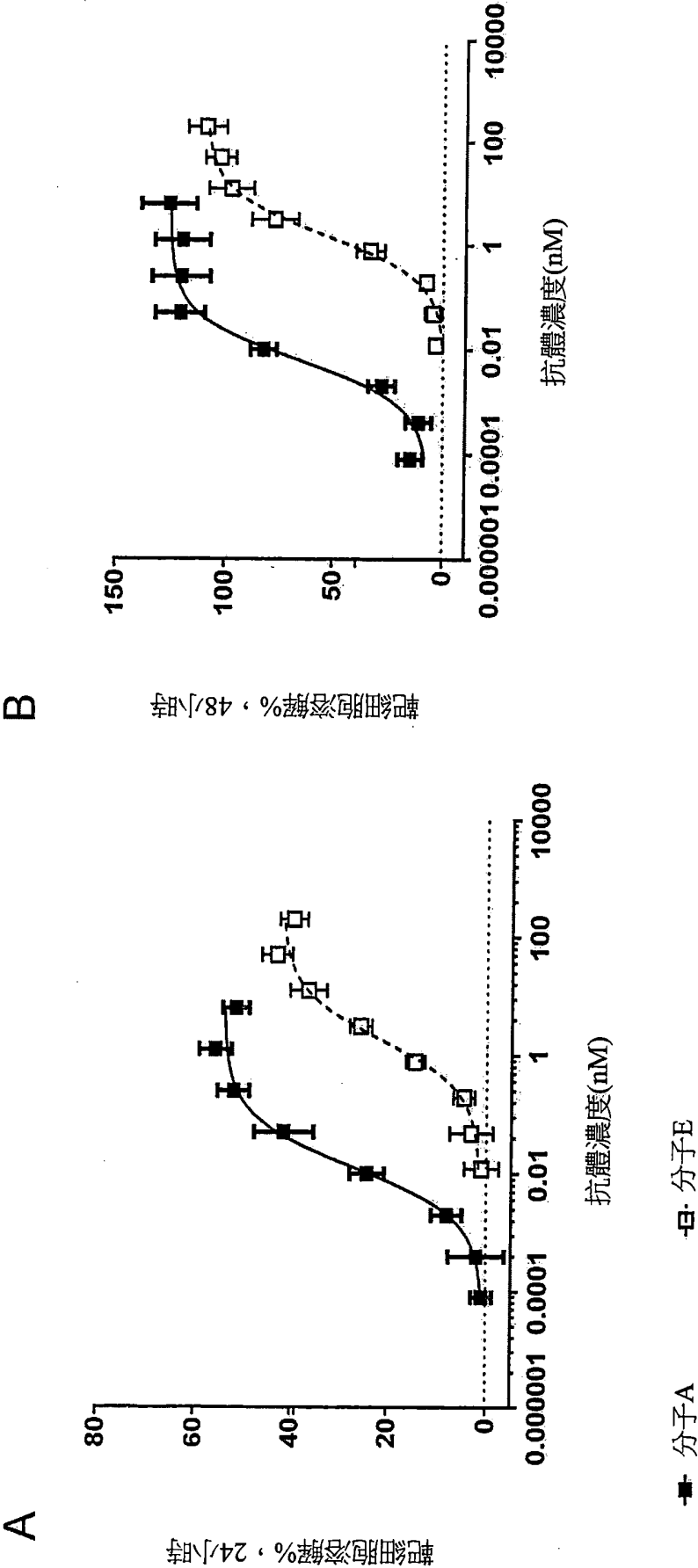
B



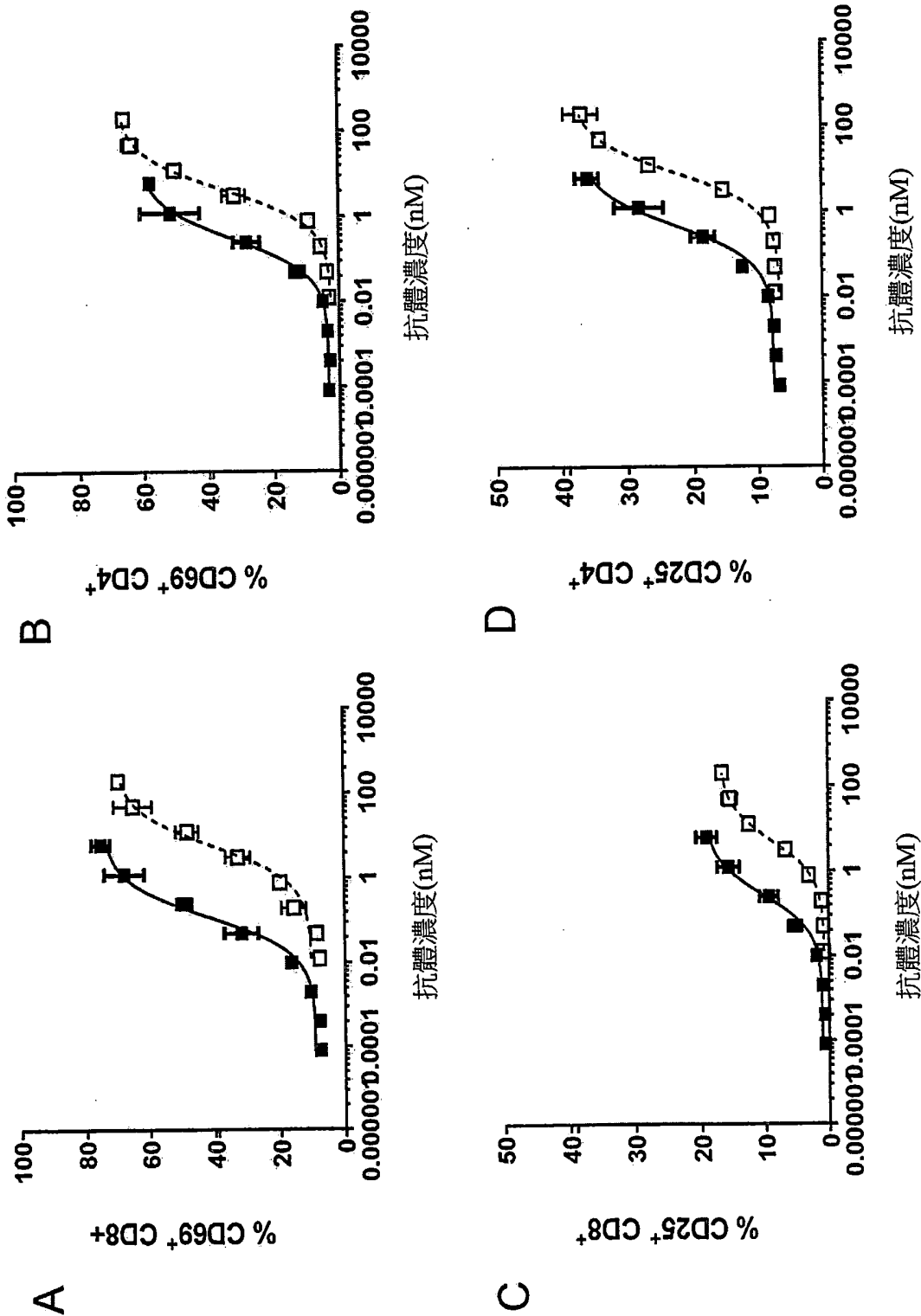
A



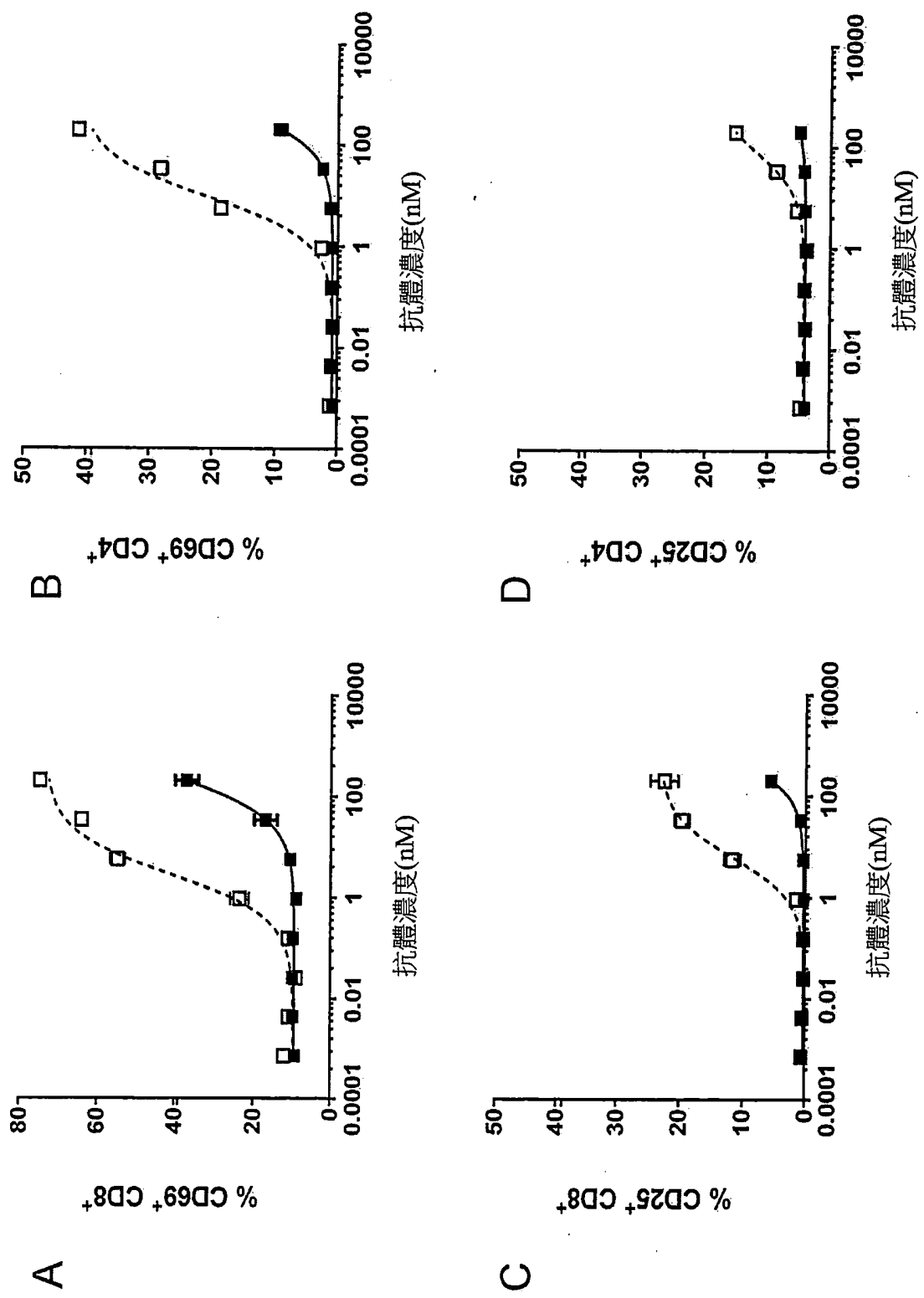
【圖11】



【圖12】



【圖13】



【圖14】

分子A 分子E