(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118510803 A
(43)申请公布日 2024.08.16

(21)申请号 202280082275.7
(22)申请日 2022.10.12
(66)本国优先权数据
PCT/CN2021/123371 2021.10.12 CN
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.06.12
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2022/124968 2022.10.12
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/061419 EN 2023.04.20
(71)申请人 乐普创一生物科技(上海)有限公司
地址 201203 上海市浦东新区张衡路1077号大得创同B207室
(72)发明人 甄威 杨柳 方磊
(74)专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283
专利代理师 高晓莉 王卫彬
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
C12N 15/09(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

权利要求书4页 说明书49页
序列表（电子公布） 附图14页

(54)发明名称

对人和食蟹猴蛋白具有交叉反应性的抗CD3抗体

(57)摘要

本公开提供了新的抗CD3抗体,这些抗CD3抗体包括人源化抗体和它们的抗原结合片段。这些抗体可以高亲和力结合人和食蟹猴CD3,并且它们的单链片段(scFv)可以容易地掺入多特异性抗体中以在存在肿瘤细胞的情况下有效激活T细胞。此外,尽管数量相对较少,但这些抗体具有广泛的抗CD3活性,因此被分为九个不同的等级。如进一步所证明的,这些抗CD3抗体和片段可适用于双特异性或三特异性抗体以实现优化的活性和安全裕度。

CN 118510803 A

1.一种对人和食蟹猴CD3蛋白均具有结合特异性的抗CD3抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述VH包含VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,并且所述VL包含VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,其中:

所述VH CDR1包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,所述VH CDR2包含SEQ ID NO:8、64、65或66的氨基酸序列,所述VH CDR3包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,所述VL CDR1包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,所述VL CDR2包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,并且所述VL CDR3包含SEQ ID NO:12或67的氨基酸序列;

所述VH CDR1包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,所述VH CDR2包含SEQ ID NO:14、68、69或70的氨基酸序列,所述VH CDR3包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,所述VL CDR1包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,所述VL CDR2包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,并且所述VL CDR3包含SEQ ID NO:17或71的氨基酸序列;或者

所述VH CDR1包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,所述VH CDR2包含SEQ ID NO:18、72、73或74的氨基酸序列,所述VH CDR3包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列,所述VL CDR1包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,所述VL CDR2包含SEQ ID NO:21或75的氨基酸序列,并且所述VL CDR3包含SEQ ID NO:22或76的氨基酸序列。

2.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

所述VH CDR1包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,所述VH CDR2包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,所述VH CDR3包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,所述VL CDR1包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,所述VL CDR2包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,并且所述VL CDR3包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;

所述VH CDR1包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,所述VH CDR2包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,所述VH CDR3包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,所述VL CDR1包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,所述VL CDR2包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,并且所述VL CDR3包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列;或者

所述VH CDR1包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,所述VH CDR2包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列,所述VH CDR3包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列,所述VL CDR1包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,所述VL CDR2包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,并且所述VL CDR3包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

3.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述VH CDR1包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,所述VH CDR2包含SEQ ID NO:8、64、65或66的氨基酸序列,所述VH CDR3包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,所述VL CDR1包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,所述VL CDR2包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,并且所述VL CDR3包含SEQ ID NO:12或67的氨基酸序列。

4.根据权利要求3所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述VH包含选自SEQ ID NO:1和23-28的氨基酸序列,所述氨基酸序列任选地具有G55A取代、S61A取代或它们的组合,并且所述VL包含选自SEQ ID NO:2和30-32的氨基酸序列,所述氨基酸序列任选地具有S93A取代,所有氨基酸位置根据Kabat编号。

5.根据权利要求4所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

所述VH包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:30的氨基酸序

列;

所述VH包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列;或者

所述VH包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

6.根据权利要求4所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

所述VH包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列;或者

所述VH包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

7.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述VH CDR1包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,所述VH CDR2包含SEQ ID NO:14、68、69或70的氨基酸序列,所述VH CDR3包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,所述VL CDR1包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,所述VL CDR2包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,并且所述VL CDR3包含SEQ ID NO:17或71的氨基酸序列。

8.根据权利要求7所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述VH包含选自SEQ ID NO:3和36-41的氨基酸序列,所述氨基酸序列任选地具有G55A取代、S61A取代或它们的组合,并且所述VL包含选自SEQ ID NO:4和44-46的氨基酸序列,所述氨基酸序列任选地具有S93A取代,所有氨基酸位置根据Kabat编号。

9.根据权利要求8所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

所述VH包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;

所述VH包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;

所述VH包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;

所述VH包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列;

所述VH包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列;或者

所述VH包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列。

10.根据权利要求8所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述VH包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列,所述氨基酸序列任选地具有G55A取代、S61A取代或它们的组合,并且所述VL包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列,所述氨基酸序列任选地具有S93A取代,所有氨基酸位置根据Kabat编号。

11.根据权利要求8所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

所述VH包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列;

所述VH包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列;或者

所述VH包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列。

12.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述VH CDR1包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,所述VH CDR2包含SEQ ID NO:18、72、73或74的氨基酸序列,所述VH CDR3包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列,所述VL CDR1包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,所述VL CDR2包含SEQ ID NO:21或75的氨基酸序列,并且所述VL CDR3包含SEQ ID NO:22或76的氨基酸序列。

13.根据权利要求12所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述VH包含选自SEQ ID NO:5和50-55的氨基酸序列,所述氨基酸序列任选地具有G55A取代、S61A取代或它们的组合,并且所述VL包含选自SEQ ID NO:6和59-62的氨基酸序列,所述氨基酸序列任选地具有S53A取代、S93A取代或它们的组合,所有氨基酸位置根据Kabat编号。

14.根据权利要求12所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

所述VH包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列;或者

所述VH包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列。

15.根据权利要求12所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述VH包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列。

16.根据权利要求1-15中任一项所述的多特异性抗体,其特征在于,所述抗CD3单元包含对所述CD3复合物具有特异性的单链片段(scFv)。

17.一种多特异性抗体,所述多特异性抗体包含根据权利要求1-16中任一项所述的抗CD3抗原结合片段和抗肿瘤相关抗原(TAA)单元。

18.根据权利要求17所述的多特异性抗体,其特征在于,所述抗TAA单元包含Fab片段,所述Fab片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)对,并且所述抗CD3抗原结合片段为单链片段(scFv)。

19.根据权利要求17所述的多特异性抗体,其特征在于,所述抗CD3抗原结合片段和所述抗TAA单元均设置在Fc片段的N末端处。

20.根据权利要求17-19中任一项所述的多特异性抗体,其特征在于,所述TAA选自Claudin 18.2、GPC3、5T4、EGFR、Her2、EpCAM、CD20、CD30、CD33、CD47、CD52、CD133、CD73、CEA、gpA33、粘蛋白、TAG-72、CIX、PSMA、叶酸结合蛋白、GD2、GD3、GM2、VEGF、VEGFR、整联蛋白、α、Vβ3、α5β1、ERBB2、ERBB3、MET、IGF1R、EPHA3、TRAILR1、TRAILR2、RANKL、FAP和腱生蛋白。

21.一种或多种多核苷酸,所述多核苷酸编码根据权利要求1-20中任一项所述的抗体或片段。

22.一种细胞,所述细胞包含根据权利要求21所述的一种或多种多核苷酸。

23.一种组合物,所述组合物包含根据权利要求1-20中任一项所述的抗体或片段、根据权利要求21所述的一种或多种多核苷酸、或根据权利要求22所述的细胞。

24.一种治疗癌症的方法,所述方法包括向癌症患者施用有效量的根据权利要求1-20中任一项所述的抗体或片段。

25.根据权利要求1-20中任一项所述的抗体或片段用于制备治疗癌症的药物的用途。

26.根据权利要求24所述的方法或根据权利要求25所述的用途,其特征在于,所述癌症为前列腺癌、胰腺癌、白血病、乳腺癌、结肠直肠癌、胃癌、头颈癌、肝癌、食管癌、宫颈癌、甲状腺癌、肺癌、膀胱癌、肾癌、子宫癌或黑素瘤。

对人和食蟹猴蛋白具有交叉反应性的抗CD3抗体

背景技术

[0001] CD3(分化簇3)是蛋白复合物和T细胞共受体,其参与激活细胞毒性T细胞(CD8+初始T细胞)和T辅助细胞(CD4+初始T细胞)。CD3由四条不同的链构成。在哺乳动物中,该复合物包含一条CD3γ链、一条CD3δ链和两条CD3ε链。这些链与T细胞受体(TCR)和CD3-zeta(ζ链)结合以在T淋巴细胞中产生激活信号。TCR、CD3-zeta和其他CD3分子一起构成TCR复合物。

[0002] 由于其复杂的胞外结构,抗CD3激动剂抗体难以开发。自最初尝试产生靶向CD3的治疗性抗体以来的几十年里,成功得到的抗体寥寥无几。SP34是第一个广泛使用的抗CD3激动剂抗体,并且可与食蟹猴CD3交叉反应。此外,已基于原始SP34抗体开发了许多衍生物。然而,已证明使SP34抗体或其衍生物采用scFv形式是一项巨大的挑战。鉴于scFv是用于加入双特异性或三特异性抗体中的最常用的片段,该缺陷严重限制了SP34的应用。另一种广泛使用的抗CD3抗体为OKT3,不幸的是,其不具有对食蟹猴CD3的交叉反应性,因此其临床应用因缺乏合适的临床前测试模型而受到阻碍。

[0003] 具有抗CD3单元的双特异性抗体提供了将患者自身的T细胞与恶性细胞连接的靶向免疫肿瘤学平台。此类双特异性抗体确保T细胞与癌细胞直接连接,因此能够激活T细胞,从而产生针对癌细胞的细胞毒性活性。由于缺乏具有平衡效力、对食蟹猴的交叉反应性和对合适片段形式的适应性的抗CD3抗体,开发对CD3具有特异性的双特异性抗体的工作一直受阻。

发明内容

[0004] 本公开提供新的抗CD3抗体,这些抗CD3抗体包括人源化抗体和它们的抗原结合片段。这些抗体可以高亲和力结合人和食蟹猴CD3,并且它们的单链片段(scFv)具有合理的可开发性,因此这些CD3抗体可以容易地加入多特异性抗体中以在存在肿瘤细胞的情况下有效激活T细胞。此外,这些抗体数量相对较少,但却表现出了广泛的抗CD3活性。基于这些活性,这些抗体被分类为很好的不同等级(等级1-9)。

[0005] 因此,在一个实施方案中,提供了抗CD3抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,该抗CD3抗体或其抗原结合片段对人和食蟹猴CD3均具有结合亲和力。在一些实施方案中,该抗CD3抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),该VH包含VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,并且该VL包含VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,其中:该VH CDR1包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,该VH CDR2包含SEQ ID NO:8、64、65或66的氨基酸序列,该VH CDR3包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,该VL CDR1包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,该VL CDR2包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,并且该VL CDR3包含SEQ ID NO:12或67的氨基酸序列;该VH CDR1包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,该VH CDR2包含SEQ ID NO:14、68、69或70的氨基酸序列,该VH CDR3包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,该VL CDR1包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,该VL CDR2包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,并且该VL CDR3包含SEQ ID NO:17或71的氨基酸序列;或者该VH CDR1包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,该VH CDR2包含

SEQ ID NO:18、72、73或74的氨基酸序列,该VH CDR3包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列,该VL CDR1包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,该VL CDR2包含SEQ ID NO:21或75的氨基酸序列,并且该VL CDR3包含SEQ ID NO:22或76的氨基酸序列。

[0006] 在一些实施方案中,该VH CDR1包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,该VH CDR2包含SEQ ID NO:8、64、65或66的氨基酸序列,该VH CDR3包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,该VL CDR1包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,该VL CDR2包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,并且该VL CDR3包含SEQ ID NO:12或67的氨基酸序列。

[0007] 在一些实施方案中,该VH包含选自SEQ ID NO:1和23-28的氨基酸序列,该氨基酸序列任选地具有G55A取代、S61A取代或它们的组合,并且该VL包含选自SEQ ID NO:2和30-32的氨基酸序列,该氨基酸序列任选具有S93A取代,所有氨基酸位置根据Kabat编号。

[0008] 在一些实施方案中,该VH包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列,并且该VL包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列;该VH包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,并且该VL包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列;或者该VH包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列,并且该VL包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

[0009] 在一些实施方案中,该VH CDR1包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,该VH CDR2包含SEQ ID NO:14、68、69或70的氨基酸序列,该VH CDR3包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,该VL CDR1包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,该VL CDR2包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,并且该VL CDR3包含SEQ ID NO:17或71的氨基酸序列。

[0010] 在一些实施方案中,该VH包含选自SEQ ID NO:3和36-41的氨基酸序列,该氨基酸序列任选地具有G55A取代、S61A取代或它们的组合,并且该VL包含选自SEQ ID NO:4和44-46的氨基酸序列,该氨基酸序列任选具有S93A取代,所有氨基酸位置根据Kabat编号。

[0011] 在一些实施方案中,该VH包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列,并且该VL包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;该VH包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列,并且该VL包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;该VH包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列,并且该VL包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;该VH包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列,并且该VL包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列;该VH包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列,并且该VL包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列;或者该VH包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列,并且该VL包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列。

[0012] 在一些实施方案中,该VH包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列,该氨基酸序列任选地具有G55A取代、S61A取代或它们的组合,并且该VL包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列,该氨基酸序列任选地具有S93A取代,所有氨基酸位置根据Kabat编号。

[0013] 在一些实施方案中,该VH CDR1包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,该VH CDR2包含SEQ ID NO:18、72、73或74的氨基酸序列,该VH CDR3包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列,该VL CDR1包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,该VL CDR2包含SEQ ID NO:21或75的氨基酸序列,并且该VL CDR3包含SEQ ID NO:22或76的氨基酸序列。

[0014] 在一些实施方案中,该VH包含选自SEQ ID NO:5和50-55的氨基酸序列,该氨基酸序列任选地具有G55A取代、S61A取代或它们的组合,并且该VL包含选自SEQ ID NO:6和59-62的氨基酸序列,该氨基酸序列任选地具有S53A取代、S93A取代或它们的组合,所有氨基酸位置根据Kabat编号。

[0015] 在一些实施方案中,该VH包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列,并且该VL包含SEQ ID

NO:60的氨基酸序列;或者该VH包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列,并且该VL包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列。

[0016] 还提供了使用所公开的抗体或片段治疗疾病诸如癌症的方法和用途。

附图说明

[0017] 图1显示抗CD3嵌合抗体以不同效力结合人PBMC和食蟹猴PBMC。

[0018] 图2显示被测嵌合抗体的CD3活性与基准抗体OKT3相比表现出更弱的应答。

[0019] 图3显示被测抗CD3嵌合抗体诱导的4-1BB表达。

[0020] 图4显示被测人源化CD3抗体基于细胞的结合。

[0021] 图5显示被测人源化CD3抗体表现出多种CD3活性。

[0022] 图6显示人源化CD3抗体诱导的4-1BB表达。

[0023] 图7显示通过TCR/CD3细胞检测的CD3 NFAT活性。

[0024] 图8显示与SP34相比,CD3 BsAb的TAA依赖性激动活性。

[0025] 图9显示1+1格式的双特异性抗体比2+Lc2格式的双特异性抗体诱导更强的应答。

[0026] 图10显示4-1BB诱导的IL-2分泌依赖于CD3。

[0027] 图11显示三特异性抗体刺激的IL-2分泌与CD3 NFAT活性具有正相关。

[0028] 图12显示三特异性抗体刺激的4-1BB诱导与CD3 NFAT活性呈正相关。

[0029] 图13显示基准双特异性抗体诱导的IL-2分泌和细胞裂解活性。

[0030] 图14显示基准三特异性抗体诱导的IL-2分泌和细胞裂解活性。

[0031] 图15显示用三特异性抗体治疗B16F10-h5T4诱导肿瘤的体内实验的设计和结果。

具体实施方式

定义

[0032] 应当注意的是,术语“一”或“一个”实体是指该实体中的一个或多个实体;例如,“抗体”应理解为代表一个或多个抗体。因此,术语“一”(或“一个”)、“一个或多个”和“至少一个”在本文中可互换使用。

[0033] 如本文所用,术语“多肽”旨在包括单数的“多肽”以及复数的“多肽”,并且是指由通过酰胺键(也称为肽键)线性连接的单体(氨基酸)构成的分子。术语“多肽”是指两个或更多个氨基酸的任意一条或多条链,并且不是指产物的特定长度。因此,肽、二肽、三肽、寡肽、“蛋白质”、“氨基酸链”或用于指两个或更多个氨基酸的一条或多条链的任何其他术语包括在“多肽”的定义内,并且术语“多肽”可代替这些术语中的任一术语使用或可与这些术语中的任一术语互换使用。术语“多肽”还指多肽表达后修饰的产物,表达后修饰包括但不限于糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/阻断基团衍生化、溶蛋白性裂解或通过非天然存在的氨基酸修饰。多肽可源自天然生物来源或通过重组技术产生,但不一定由指定的核酸序列翻译而成。它可以任何方式产生,包括通过化学合成。

[0034] 如本文所用,关于细胞、核酸(诸如DNA或RNA)的术语“分离的”是指分别从存在于大分子的天然来源中的其他DNA或RNA分离的分子。如本文所用,术语“分离的”还指当通过重组DNA技术产生时基本上不含细胞物质、病毒物质或培养基,或当化学合成时基本上不含化学前体或其他化学品的核酸或肽。此外,“分离的核酸”意指包括不作为片段天然存在并

且在天然状态下不存在的核酸片段。术语“分离的”在本文中也用于指从其他细胞蛋白质或组织分离的细胞或多肽。分离的多肽意指包括纯化的和重组的多肽两者。

[0035] 如本文所用,“抗体”或“抗原结合多肽”是指特异性识别并结合抗原的多肽或多肽复合物。抗体可以是完整抗体和其任何抗原结合片段或单链。因此,术语“抗体”包括任何包含蛋白质或肽的分子,该分子包括具有结合抗原的生物活性的免疫球蛋白分子的至少一部分。该抗体的示例包括但不限于重链或轻链的互补决定区(CDR)或它们的配体结合部分、重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、框架(FR)区、或他们的任何部分、或结合蛋白的至少一部分。

[0036] 如本文所用,术语“抗体片段”或“抗原结合片段”是抗体的一部分,诸如$F(ab')_2$、$F(ab)_2$、Fab'、Fab、Fv、scFv等。无论结构如何,抗体片段与完整抗体识别的相同抗原结合。术语“抗体片段”包括适体、镜像异构体和双抗体。术语“抗体片段”还包括通过与特定抗原结合形成复合物而起类似于抗体的作用的任何合成的或基因工程化的蛋白质。

[0037] “单链可变片段”或“scFv”是指免疫球蛋白的重链(V_H)和轻链(V_L)的可变区的融合蛋白。在一些方面,这些区域与10至约25个氨基酸的短连接肽连接。该接头可以富含甘氨酸以提高柔性,也可富含丝氨酸或苏氨酸以提高溶解度,并且可以将V_H的N末端与V_L的C末端连接,反之亦然。尽管去除了恒定区并引入了接头,但该蛋白质仍保留了原始免疫球蛋白的特异性。ScFv分子是本领域已知的,并且描述于例如美国专利5,892,019中。

[0038] 术语“抗体”包括可以通过生物化学方法加以区分的各种广泛种类的多肽。本领域技术人员应当理解,重链被分类为gamma、mu、alpha、delta或epsilon(γ、μ、α、δ、ε),其中具有一些亚类(例如,γ1-γ4)。该链的性质决定了抗体的“类别”,分别为IgG、IgM、IgA、IgG或IgE。免疫球蛋白亚类(同种型),例如,IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgG_5等已被充分表征,并已知具有功能特化。鉴于本公开,这些类别和同种型中的每一种的修饰形式对于本领域普通技术人员来说容易辨别,因此在本公开的保护范围内。所有免疫球蛋白的类别显然都在本公开的保护范围内,以下讨论一般针对免疫球蛋白分子的IgG类别。对于IgG,标准免疫球蛋白分子包含两个分子量为约23,000道尔顿的相同轻链多肽和两个分子量为53,000-70,000的相同重链多肽。这四条链通常通过二硫键连接成“Y”构型,其中轻链将重链括在中间,从“Y”的开口处开始并一直延伸到可变区。

[0039] 本公开的抗体、抗原结合多肽、它们的变体或衍生物包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、多特异性抗体、人抗体、人源化抗体、灵长类动物化抗体或嵌合抗体、单链抗体、表位结合片段,例如,Fab、Fab'和$F(ab')_2$、Fd、Fv、单链Fv(scFv)、单链抗体、二硫键连接的Fv(sdFv)、包含VK或VH结构域的片段、由Fab表达文库产生的片段和抗独特型(抗Id)抗体(包括例如,本文公开的抗CD3抗体)。本公开的免疫球蛋白或抗体分子可以是任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类的免疫球蛋白分子。

[0040] 轻链分类为kappa或lambda(K,λ)。每个重链类别可与kappa或lambda轻链结合。通常,轻链和重链彼此共价结合,并且当免疫球蛋白由杂交瘤、B细胞或基因工程宿主细胞产生时,两条重链的“尾”部分通过共价二硫键或非共价键彼此结合。在重链中,氨基酸序列从Y构型的叉状末端处的N末端延伸至每条链底部的C末端。

[0041] 轻链和重链均被分成结构性和功能性同源区。术语“恒定”和“可变”是根据功能使

用。在这方面,应当理解,轻链(VK)和重链(VH)部分的可变结构域决定抗原识别和特异性。相反,轻链(CK)和重链(CH1、CH2或CH3)的恒定结构域赋予重要的生物学特性,诸如分泌、经胎盘迁移、Fc受体结合、补体结合等。按照惯例,恒定区结构域的编号随着它们距抗体的抗原结合位点或氨基末端越来越远而增加。N末端部分是可变区,并且C末端部分是恒定区;CH3和CK结构域实际上分别包括重链和轻链的羧基末端。

[0042] 如上所述,可变区允许抗体选择性地识别并特异性地结合抗原上的表位。即,抗体的VK结构域和VH结构域,或互补决定区(CDR)的子集组合以形成定义三维抗原结合位点的可变区。该抗体四级结构形成存在于Y的每条臂末端的抗原结合位点。更具体地,该抗原结合位点由VH和VK链中的每条链上的三个CDR(即,CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3)定义。在一些情况下,例如,某些源自骆驼科物种的免疫球蛋白分子或基于骆驼科免疫球蛋白工程化的免疫球蛋白分子,完整的免疫球蛋白分子可以仅由重链组成,而没有轻链。参见,例如,Hammers-Casterman等人,Nature,第363卷,第446-448页,1993年。

[0043] 在天然存在的抗体中,当抗体在水性环境中呈现三维构型时,存在于每个抗原结合域中的六个“互补决定区”或“CDR”是被特异性定位以形成抗原结合域的短的、非连续的氨基酸序列。抗原结合域中被称为“框架”区的其余氨基酸显示较少的分子间可变性。框架区主要采取β折叠构象,并且CDR形成与β折叠结构连接,并且在一些情况下形成其一部分的环状结构。因此,框架区的作用是形成骨架,该骨架通过链间非共价相互作用将CDR定位在正确的方向上。由被定位的CDR形成的抗原结合域定义了与免疫反应性抗原上的表位互补的表面。该互补表面促进抗体与其同源表位的非共价结合。对于任何给定的重链或轻链可变区,本领域普通技术人员可以容易地鉴定分别包含CDR和框架区的氨基酸,因为它们已经被精确地定义(参见“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,Kabat,E.等人,U.S.Department of Health and Human Services,1983年;以及Chothia和Lesk,J.MoI.Biol.,第196卷,第901-917页,1987年)。

[0044] 在本领域中使用和/或接受的术语存在两个或更多个定义的情况下,除非明确地相反说明,否则如本文所用的术语的定义旨在包括所有这样的含义。一个具体的示例是使用术语“互补决定区”(“CDR”)来描述在重链和轻链多肽的可变区内发现的非连续抗原结合位点。这一特定区域已描述于:Kabat等人,U.S.Dept.of Health and Human Services,“Sequences of Proteins of Immunological Interest”1983年,和Chothia等人,J.MoI.Biol.第196卷,第901-917页,1987年,其全文以引用方式并入本文。根据Kabat和Chothia的CDR定义包括相互比较时重叠的氨基酸残基或氨基酸残基的子集。然而,涉及抗体CDR或其变体时,任一定义的应用都在如本文所定义和使用的术语的范围内。涵盖上文引用的参考文献中的每一篇定义的CDR的合适的氨基酸残基列于下表中作为对比。涵盖特定CDR的精确残基数目将根据CDR的序列和大小而变化。本领域技术人员可根据抗体的可变区氨基酸序列例行性地确定特定的CDR包含哪些残基。

	Kabat	Chothia
CDR-H1	31-35	26-32
CDR-H2	50-65	52-58
CDR-H3	95-102	95-102
CDR-L1	24-34	26-32

CDR-L2	50-56	50-52
CDR-L3	89-97	91-96

[0045] Kabat等人还定义了可应用于任何抗体的可变结构域序列的编号系统。本领域普通技术人员可以明确地将这种“Kabat编号”系统分配到任何可变结构域序列,而无需依赖该序列本身之外的任何实验数据。如本文所用,“Kabat编号”是指Kabat等人,U.S.Dept.of Health and Human Services,“Sequence of Proteins of Immunological Interest”1983年中提出的编号系统。

[0046] 除了上表之外,Kabat编号系统对CDR区域的描述如下:CDR-H1起始于约第31个氨基酸(即,第一个半胱氨酸残基后约9个残基),包括约5-7个氨基酸,并结束于下一个色氨酸残基。CDR-H2起始于CDR-H1末端后的第15个残基,包括约16-19个氨基酸,并结束于下一个精氨酸或赖氨酸残基。CDR-H3起始于CDR-H2末端后约第33个氨基酸残基;包括3-25个氨基酸;并结束于序列W-G-X-G,其中X是任何氨基酸。CDR-L1起始于约第24个残基(即,在半胱氨酸残基之后);包括约10-17个残基;并结束于下一个色氨酸残基。CDR-L2起始于CDR-L1末端后约第16个残基,并包括约7个残基。CDR-L3起始于CDR-L2末端后约第33个残基(即,在半胱氨酸残基之后);包括约7-11个残基,并结束于序列F或W-G-X-G,其中X是任何氨基酸。

[0047] 本文公开的抗体可以来自任何动物来源,包括鸟类和哺乳动物。优选地,这些抗体为人、鼠、驴、兔、山羊、豚鼠、骆驼、美洲驼、马或鸡抗体。在另一个实施方案中,可变区可以是软骨鱼纲来源的(例如,来自鲨鱼)。

[0048] 如本文所用,术语“重链恒定区”包括源自免疫球蛋白重链的氨基酸序列。包含重链恒定区的多肽包含以下项中的至少一者:CH1结构域、铰链(例如,上、中和/或下铰链区)结构域、CH2结构域、CH3结构域或它们的变体或片段。例如,用于本公开的抗原结合多肽可以含有包含CH1结构域的多肽链;包含CH1结构域、铰链结构域的至少一部分和CH2结构域的多肽链;包含CH1结构域和CH3结构域的多肽链;包含CH1结构域、铰链结构域的至少一部分和CH3结构域的多肽链;或包含CH1结构域、铰链结构域的至少一部分、CH2结构域和CH3结构域的多肽链。在另一个实施方案中,本公开的多肽含有包含CH3结构域的多肽链。此外,用于本公开的抗体可以缺少CH2结构域的至少一部分(例如,CH2结构域的全部或部分)。如上所述,本领域普通技术人员应当理解,可以修饰重链恒定区,使得它们在氨基酸序列上与天然存在的免疫球蛋白分子不同。

[0049] 本文公开的抗体的重链恒定区可以源自不同的免疫球蛋白分子。例如,多肽的重链恒定区可包含源自IgG_1分子的CH1结构域和源自IgG_3分子的铰链区。在另一个示例中,重链恒定区可包含部分源自IgG_1分子和部分源自IgG_3分子的铰链区。在另一个示例中,重链部分可包括部分源自IgG_1分子和部分源自IgG_4分子的嵌合铰链。

[0050] 如本文所用,术语“轻链恒定区”包含源自抗体轻链的氨基酸序列。优选地,该轻链恒定区包含恒定kappa结构域或恒定lambda结构域中的至少一者。

[0051] “特异性结合……”或“具有对……的特异性”通常是指抗体通过其抗原结合域结合表位,并且该结合需要该抗原结合域和该表位之间具有一定互补性。根据该定义,当抗体通过其抗原结合域结合表位比其结合随机的无关表位更容易时,该抗体被称为“特异性结合”该表位。术语“特异性”在本文中用于限定某种抗体与某种表位结合的相对亲和力。例如,抗体“A”可被认为对给定表位具有比抗体“B”更高的特异性,或抗体“A”可被认为与表位

“C”结合的特异性高于其对相关表位“D”的特异性。

[0052] 如本文所用,术语“治疗”是指治疗性治疗和预防性或防止性措施,其中目标是预防或减缓(减轻)不期望的生理变化或病症,诸如癌症的进展。有益的或期望的临床结果包括但不限于可检测或不可检测的症状的缓解、疾病程度的减弱、疾病状态的稳定(即,不恶化)、疾病进展的延迟或减慢、疾病状态的改善或缓和、以及(部分或完全)缓解。“治疗”也可指与未接受治疗时的预期生存期相比延长的生存期。需要治疗的个体包括已患有该病况或病症的个体以及易患有该病况或病症的个体或要预防该病况或病症的个体。

[0053] “受试者”或“个体”或“动物”或“患者”或“哺乳动物”是指需要诊断、预后或治疗的任何受试者,特别是哺乳动物受试者。哺乳动物受试者包括人、家畜、农场动物,以及动物园动物、体育动物或宠物动物,诸如狗、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、牛、奶牛等。

[0054] 如本文所用,短语诸如“需要治疗的患者”或“需要治疗的受试者”包括将受益于施用本公开的抗体或组合物的受试者,诸如哺乳动物受试者,该抗体或组合物用于例如,检测、诊断程序和/或治疗。

提高治疗指数的T细胞衔接器

[0055] CD3(分化簇3)是蛋白复合物和T细胞共受体,其参与激活细胞毒性T细胞($CD8^+$初始T细胞)和T辅助细胞($CD4^+$初始T细胞)。CD3由四条不同的链构成。在哺乳动物中,该复合物包含一条CD3γ链、一条CD3δ链和两条CD3ε链。这些链与T细胞受体(TCR)和CD3-zeta(ζ链)结合以在T淋巴细胞中产生激活信号。TCR、CD3-zeta和其他CD3分子一起构成TCR复合物。

[0056] 由于其复杂的胞外结构,抗CD3激动剂抗体难以开发。自最初尝试产生靶向CD3的治疗性抗体以来的几十年里,成功得到的抗体寥寥无几。SP34是第一个广泛使用的抗CD3激动剂抗体,并且可与食蟹猴CD3交叉反应。此外,已基于原始SP34抗体开发了许多衍生物。然而,已证明使SP34抗体或其衍生物采用scFv形式是一项巨大的挑战。鉴于scFv是用于加入双特异性或三特异性抗体中的最常用的片段,该缺陷严重限制了SP34的临床应用。另一种广泛使用的抗CD3抗体为OKT3,不幸的是,其与食蟹猴CD3没有交叉反应性,因此其临床应用因缺乏合适的临床前测试模型而受到阻碍。

[0057] 目前抗CD3抗体的治疗用途通常与在没有靶向肿瘤细胞的情况下CD3激活引起的脱靶毒性有关。具有不同活性/物理和化学性质/安全性特征的抗CD3抗体的有限可用性使该挑战进一步复杂化。

[0058] 在此背景下,在一个实施方案中,本公开提供新的抗CD3抗体,这些抗CD3抗体包括人源化抗体和它们的抗原结合片段。产生了三个小鼠杂交瘤克隆153A6B1、155A9B1和192A7B9(表1)。在人源化后,VH/VL中的每一者都产生2-6个人源化版本(表4-6)。这些VH/VL序列的组合产生不到70个抗体(表4A-6A)。

[0059] 出乎意料的是,这大约70个抗体表现出非常不同的体外功能活性,如通过激活T细胞核因子(NFAT)荧光素酶报告基因测定法或4-1BB诱导测定法所测量的。根据NFAT活性或4-1BB诱导活性,将这些抗体分为九个不同的等级(表10,1-9级)。

[0060] 这些抗CD3抗体中的若干抗CD3抗体用于构建双特异性和三特异性抗体(双特异性或三特异性T细胞衔接器)。T细胞需要两种信号来完全激活。第一种信号是抗原特异性信号,其通过与抗原呈递细胞(APC)膜上的肽-MHC分子相互作用的T细胞受体(TCR)提供。第二

种信号,即共刺激信号,是抗原非特异性信号,其通过在APC膜上表达的共刺激分子与T细胞之间的相互作用提供。4-1BB(CD137,肿瘤坏死因子受体超家族9)是TNF受体超家族(TNFRSF)的成员,并且是重要的共刺激分子,其在免疫细胞(先天性和适应性免疫细胞)激活后表达。

[0061] 预期对CD3、肿瘤相关抗原(TAA)和4-1BB具有特异性的三特异性T细胞衔接器可具有至少以下优点。首先,这种三特异性抗体可同时提供第一(TCR信号)和第二(共刺激)激活信号传导以完全、持续且有效地激活T细胞并进一步形成记忆T细胞应答,从而对抗恶性细胞。第二,4-1BB是在激活的或肿瘤浸润的T细胞和NK细胞上表达的可诱导的共刺激分子。CD3信号可通过诱导T细胞上4-1BB表达而进一步与4-1BB信号协同作用。第三,如果使用TAA依赖性抗4-1BB抗体(即,在不存在相应TAA的情况下不具有激动活性的抗4-1BB抗体),则三特异性T细胞衔接器在非肿瘤环境中将甚至更安全。最后,可以调节三特异性抗体中的CD3活性(例如,通过使用适当等级的抗CD3部分,例如,表9)来微调4-1BB激活。同样,不同效力的抗CD3抗体也可最佳地用于进一步靶向肿瘤相关抗原(TAA)的双特异性T细胞衔接器。

[0062] 因此,对于此类三特异性T细胞衔接器,重要的是鉴定具有平衡效力的抗CD3单元,这些抗CD3单元可更好地与4-1BB信号协同作用。合适的抗CD3单元可在存在肿瘤抗原的情况下有效激活T细胞,并且在不存在肿瘤抗原的情况下不能激活T细胞,例如,如通过IL2激活和4-1BB诱导以及TAA阳性靶细胞杀伤所证明的。利用这种合适的抗CD3单元,三特异性T细胞衔接器可在存在相应TAA的情况下具有强4-1BB激活效力,并且在不存在相应TAA的情况下具有低4-1BB激活效力(例如,<10%4-1BB阳性细胞)或不具有4-1BB激活效力。

[0063] 结果表明,抗CD3/抗4-1BB/抗Claudin 18.2三特异性抗体与4级抗体(具有微弱体外激动活性的抗CD3抗体,诸如Hu153A6B1-2、-3和-4,Hu155A9B1-8、-9、-10、-14、-15和-16,以及Hu192A7B9-7和-13)在Claudin 18.2阳性细胞中诱导足够的细胞因子释放和4-1BB诱导,而在对照细胞中不产生非特异性激活。同时,3级抗体(例如,Hu153A6B1-7和13,Hu155A9B1-2、-3和-4,以及Hu192A7B9-4)也在Claudin 18.2阳性细胞中诱导可接受的细胞因子释放和4-1BB诱导,而在TAA阴性对照细胞中不产生非特异性激活。

[0064] 因此,这些平衡良好的抗CD3抗体经过了额外的检测,并且当加入双特异性和三特异性形式时,表现出最佳的疗效和治疗指数。因此,这些数据证明相对弱的抗CD3抗体可为加入双特异性和三特异性T细胞衔接器中的绝佳候选物。同样重要的是,不同效力的抗CD3抗体可适用于不同情况。因此,目前获得的抗体可以广泛用于临床,实现现成的免疫肿瘤治疗应用。

[0065] 此外,已经检测了双特异性和三特异性抗体的不同结构。其中之一为1+1格式,包括在单链片段(scFv)中的抗CD3单元和在常规Fab(VH/VL)结构域中的抗TAA单元。另一结构,即2+Lc2格式,是对称的,并且包括分别与对TAA具有特异性的Fab对的两条轻链的C末端融合的两个抗CD3 scFv。对于还对4-1BB具有特异性的三特异性抗体,抗4-1BB单元可包括分别与抗TAA/CD3双特异性单元的Fc结构域的C末端融合的两个纳米抗体(见图6和图10的A中的图解说明)。本文发现,1+1格式具有更好的安全裕度,因此是优选的形式;而格式2+Lc2仍然也是可接受的。

[0066] 因此,根据本公开的一个实施方案,提供了包含抗CD3单元和抗肿瘤相关抗原(TAA)单元的多特异性抗体。多特异性抗体可以是双特异性的(抗CD3和抗TAA)、三特异性的

(抗CD3、抗TAA和抗4-1BB或另一种共刺激因子)或四特异性的,不作限制。

具有平衡的T细胞激活活性的抗CD3单元

[0067] 在一个优选实施方案中,本公开的T细胞衔接器包括具有“平衡良好的T细胞激活活性”(或简称为“平衡效力”)的抗CD3单元。平衡良好的T细胞激活活性的一个示例表示为3级或4级,如在所附实验实施例中所证实的以及如下文进一步描述的。

[0068] 抗CD3单位(例如,抗体或片段)的效力可以用本领域已知的各种不同测定法和不同格式进行测量。在一些实施方案中,该测定法是4-1BB诱导测定法。在一些实施方案中,该测定法是T细胞增殖测定法。在一些实施方案中,该测定法是NFAT(激活T细胞核因子)信号传导测定法。

A.T细胞激活NFAT测定法

[0069] 在一个示例中,用NFAT(激活T细胞核因子)测定法测定T细胞激活活性。在这种测定法中,T细胞激活活性可以表示为最大效应(Emax,其为该测定法中最高的发光读数)。NFAT测定法的一个示例如下进行。将抗CD3抗体或抗原结合片段(浓度范围:1nM至100nM)与2.5×10^4个包含由NFAT应答元件(NFAT-RE)调控的报告基因的Jurkat T细胞(例如,来自Promega,CAT#J1601)一起温育6小时。报告基因的表达以发光读数测量,其最大值记录为Emax,其用于表示抗CD3抗体或片段的T细胞激活活性。

[0070] 对于每个抗CD3抗体或片段,可获得两个Emax值。当被测抗体还包含靶向肿瘤相关抗原(TAA)的抗体单元,并且Jurkat T细胞与TAA表达细胞(例如,CHO细胞或其他肿瘤细胞)混合时,测定其中之一,称为“TAA依赖性Emax”或“$Emax_{(TAA+)}$”。在一些实施方案中,T细胞与TAA表达细胞之间的细胞数目比为1:1,或可选地1:2、2:1、1:3、3:1、1:4或4:1。在一些实施方案中,这种抗体为双特异性(CD3+TAA)抗体。在一些实施方案中,诸如抗体为三特异性(例如,CD3+TAA+4-1BB)抗体。肿瘤抗原的非限制性示例包括Claudin 18.2、5T4、GPC3、EGFR、Her2、EpCAM、CD20、CD30、CD33、CD47、CD52、CD133、CD73、CEA、gpA33、粘蛋白、TAG-72、CIX、PSMA、叶酸结合蛋白、GD2、GD3、GM2、VEGF、VEGFR、整联蛋白、αVβ3、α5β1、ERBB2、ERBB3、MET、IGF1R、EPHA3、TRAILR1、TRAILR2、RANKL、FAP和腱生蛋白。在一些实施方案中,TAA是Claudin 18.2。在一些实施方案中,TAA是5T4。

[0071] 当被测抗体不包含附加的抗TAA单元时,当温育不包括TAA表达细胞时,或两种TAA不同时,测量第二个Emax值,称为“无TAA Emax”或“$Emax_{(TAA-)}$”。

[0072] 为了增强跨平台可重复性,可以使用参照抗CD3抗体,并且活性可以表示为相对于参照抗体的活性的百分比。示例性参照抗CD3抗体为常规全长单特异性Fab格式的SP34(参见表2B中的序列,SEQ ID NO:78和79)。因此,NFAT测定法条件(例如,Jurkat T细胞数)可以变化而不影响最终结果(相对于SP34活性%)。在一个优选实施方案中,为了测量无TAA的Emax,被测抗CD3抗体是二价的,参照抗体(例如,SP34)也是二价的。例如,两者都是常规全长Fab抗体格式。在一些实施方案中,为了测量无TAA的Emax,被测抗CD3抗体和参照抗体(例如,SP34)为相同格式,诸如全长Fab抗体、scFv或多特异性抗体。然而,在一些实施方案中,此类偏好选不适用于TAA依赖性Emax的测量。

[0073] 在一些实施方案中,本公开的抗CD3抗体或抗原结合片段具有平衡的T细胞激活活性,当用NFAT测定法测量时,其满足以下标准:(A)$Emax_{(TAA-)}$<SP34的$Emax_{(TAA-)}$的50%,和(B)$Emax_{(TAA+)}$>SP34的$Emax_{(TAA-)}$。在一些实施方案中,对于标准(A),$Emax_{(TAA-)}$小于SP34的

$Emax_{(TAA-)}$的10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％或70％，而在标准(B)中，$Emax_{(TAA+)}$＞SP34的$Emax_{(TAA-)}$。在一些实施方案中，对于标准(A)，$Emax_{(TAA-)}$大于SP34的$Emax_{(TAA-)}$的1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％或20％，但小于SP34的$Emax_{(TAA-)}$的10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％或70％，而在标准(B)中，$Emax_{(TAA+)}$＞SP34的$Emax_{(TAA-)}$。

B.替代性T细胞激活测定法

[0074] 在一些实施方案中，抗CD3单元的T细胞激活活性可在NFAT测定法(诸如实施例中所述的测定法)中用单元或整个多特异性抗体测量。在一些实施方案中，活性表示为来自NFAT测定法的EC50。

[0075] 在一些实施方案中，当在不存在表达TAA的细胞($EC50_{TAA-}$)的情况下进行测量时，大于10μg/mL的EC50被认为是平衡的T细胞激活活性。在一些实施方案中，对于具有平衡的T细胞激活活性的抗CD3抗体或片段，EC50或$EC50_{TAA-}$大于5μg/mL、10μg/mL、20μg/mL、30μg/mL、40μg/mL、50μg/mL、100μg/mL、200μg/mL或300μg/mL。在一些实施方案中，对于具有平衡T细胞激活活性的抗CD3抗体或片段，$EC50_{TAA-}$小于50μg/mL、100μg/mL、200μg/mL、300μg/mL、400μg/mL、500μg/mL、1000μg/mL或5000μg/mL。

[0076] 在一些实施方案中，抗CD3单元(或完整多特异性抗体)具有T细胞激活活性，其EC50大于10nM。在一些实施方案中，在不存在表达TAA的细胞($EC50_{TAA-}$)的情况下进行测量。在一些实施方案中，对于具有平衡的T细胞激活活性的抗CD3抗体或片段，EC50或$EC50_{TAA-}$大于5nM、10nM、20nM、30nM、40nM、50nM、100nM、200nM或300nM。在一些实施方案中，对于具有平衡的T细胞激活活性的抗CD3抗体或片段，$EC50_{TAA-}$小于50nM、100nM、200nM、300nM、400nM、500nM、1000nM或5000nM。

[0077] 在一些实施方案中，当抗CD3单元具有为$EC50_{TAA-}$的至少5倍低的TAA依赖性T细胞激活活性$EC50_{TAA+}$时，其被认为具有平衡的T细胞激活。在一些实施方案中，$EC50_{TAA+}$至少比$EC50_{TAA-}$低6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、20倍、25倍、30倍、40倍、50倍、100倍、200倍、500倍或1000倍。

[0078] 在一些实施方案中，当测量$EC50_{TAA+}$时，T细胞与TAA表达细胞之间的细胞数量比为1:1，或可选地1:2、2:1、1:3、3:1、1:4或4:1。

[0079] 在一些实施方案中，$EC50_{TAA-}$低于100μg/mL、90μg/mL、80μg/mL、70μg/mL、60μg/mL、50μg/mL、40μg/mL、30μg/mL、20μg/mL、15μg/mL、10μg/mL、9μg/mL、8μg/mL、7μg/mL、6μg/mL、5μg/mL、4μg/mL、3μg/mL、2μg/mL、1μg/mL、0.5μg/mL或0.1μg/mL。在一些实施方案中，$EC50_{TAA-}$低于100nM、90nM、80nM、70nM、60nM、50nM、40nM、30nM、20nM、15nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.5nM或0.1nM。

C.4-1BB诱导测定法

[0080] 在一些实施方案中，抗CD3单元的T细胞激活活性用4-1BB诱导测定法测量。在一个实施方案中，4-1BB诱导测定法用常规格式的单克隆/单特异性抗CD3抗体进行。

[0081] 常规格式的单克隆/单特异性抗CD3抗体的4-1BB诱导活性可如下测定。原代人PBMC可以1×10^5个/孔的密度在96孔板中培养。人PBMC细胞通常包括约30％与该测定法最相关的$CD8^+$细胞。可将被测抗体连续稀释并加入96孔板中，起始终浓度为例如20nM。于37℃培养48小时后，可收集细胞。用PBS洗涤后，可使用标准程序将样品与下列抗体一起于室温

避光温育30分钟进行染色:抗人CD4-APC(Ebiosciene,17-0048-42)、抗人CD8-BV510(BD Bioscience,563919)、抗人4-1BB-PE(BD Pharmingen,555956)。然后可将样品用FACS缓冲液洗涤两次。离心后,弃去上清液,将细胞重悬于0.2mL FACS缓冲液中。可通过MACSQuant分析仪16评价$CD8^+$T细胞中的4-1BB^+CD8^+T细胞亚群。使用4-1BB^+CD8^+T细胞占总$CD8^+$T细胞的百分比(%)表示4-1BB诱导率:

$$\text{4-1BB诱导率（%）} = \frac{\text{4-1}BB^+CD8^+\text{细胞的数量}}{\text{总}CD8^+\text{的数量}}\%。$$

[0082] 更简单地说,通过将人外周血CD8+细胞与终浓度为例如20nM的包括抗CD3单元的单特异性抗体一起于37℃温育48小时,并测量4-1BB+CD8+细胞占CD8+细胞总数的百分比作为4-1BB诱导率,来测量单特异性抗CD3抗体的4-1BB诱导活性。在一些实施方案中,单特异性抗CD3抗体为二价的。在一些实施方案中,单特异性抗CD3抗体具有常规Fab+Fc格式。

[0083] 抗体的最终浓度可如上所述为20nM,或可选地1nM、5nM、10nM、15nM、20nM、30nM、40nM、50nM或100nM,不作限制。在一个优选的实施方案中,该浓度为10nM或20nM。

[0084] 在上述示例中,4-1BB诱导活性测量程序使用来自供体个体的原代人外周血细胞。在一些实施方案中,可使用替代性细胞,诸如来自建立的细胞系的$CD8^+$细胞。

[0085] 虽然上述4-1BB诱导测定法被说明用于测量单特异性抗CD3抗体的T细胞激活活性,但它也可用于双特异性或三特异性/多特异性抗体。对于还包含抗TAA单元的双特异性或三特异性/多特异性抗体,4-1BB诱导活性可为TAA依赖性4-1BB诱导活性(例如,与表达TAA的细胞共温育),或无TAA的4-1BB诱导活性(例如,不与表达TAA的细胞共温育)。

[0086] 在一些实施方案中,当多特异性抗体不具有抗4-1BB单元时,测量这些无TAA或TAA依赖性的4-1BB诱导率。在一些实施方案中,当多特异性抗体还包含抗4-1BB单元时,测量这些无TAA或TAA依赖性的4-1BB诱导率。

[0087] 在一些实施方案中,用1+1格式的多特异性抗体进行测量。在一些实施方案中,用2+2Lc格式的多特异性抗体进行测量。在一些实施方案中,用本公开的三特异性抗体进行测量。在一些实施方案中,该三特异性抗体包含抗CD3单元、抗TAA单元和抗4-1BB单元。在一些实施方案中,抗4-1BB单元包含一种或两种TAA依赖性激动剂抗体或片段。

[0088] 多特异性抗体的无TAA和TAA依赖性的4-1BB诱导率可用与单特异性抗体相似的方法测量。例如,人PBMC可以1×10^5个/孔的密度在96孔板中培养。可将表达TAA的靶细胞系(TAA表达细胞)或对照细胞(CHO-K1)以2.5×10^4的密度接种(因此E:T比为4:1,或$CD8^+$:T比为1:1)。可将被测抗体连续稀释并加入96孔板中,起始终浓度为100nM。于37℃培养48小时后,可收集细胞。用PBS洗涤后,可使用标准程序将样品与下列抗体一起于室温避光温育30分钟进行染色:抗人CD4-APC(Ebiosciene,17-0048-42)、抗人CD8-BV510(BD Bioscience,563919)、抗人4-1BB-PE(BD Pharmingen,555956)。可将样品用FACS缓冲液洗涤两次。离心后,可弃去上清液,可将人PBMC重悬于0.2mL FACS缓冲液中。可通过MACSQuant分析仪16评价$CD8^+$T细胞中的4-1BB^+CD8^+T细胞亚群。4-1BB诱导率可如下计算:

$$\text{无TAA的4-1BB诱导率（%）}=\frac{\text{4-1}BB^+CD8^+\text{细胞的数量}}{\text{总 }CD8^+\text{的数量}}\%\text{（当使用对照细胞时）;以及}$$

$$\text{TAA依赖性的4-1BB诱导率（%）}=\frac{\text{4-1}BB^+CD8^+\text{细胞的数量}}{\text{总 }CD8^+\text{的数量}}\%\text{（当使用表达TAA的细胞时）。}$$

[0089] 更简单地说,在一些实施方案中,通过在不存在表达TAA的细胞的情况下,将人外

周血CD8+细胞与终浓度为100nM的多特异性抗体一起于37℃温育48小时,并测量4-1BB$^+$CD8$^+$细胞占CD8+细胞总数的百分比作为无TAA的4-1BB诱导率,来测量无TAA的4-1BB诱导率。在一些实施方案中,多特异性抗体在100nM的浓度下具有至少20%的TAA依赖性的4-1BB诱导率,其中该TAA依赖性的4-1BB诱导率通过以下测量:以1:1的比例将人外周血CD8$^+$细胞和TAA表达细胞与终浓度为100nM的多特异性抗体一起于37℃温育48小时,并测量4-1BB$^+$CD8$^+$细胞占CD8+细胞总数的百分比作为TAA依赖性的4-1BB诱导率。

[0090] 在一些实施方案中,多特异性抗体在表达TAA的细胞存在的情况下具有比在表达TAA的细胞不存在的情况下高得多的4-1BB诱导活性。例如,在一些实施方案中,多特异性抗体具有与无TAA的4-1BB诱导率相比为其至少2倍的4-1BB诱导率。在一些实施方案中,多特异性抗体具有与无TAA的4-1BB诱导率相比为其至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍或20倍的4-1BB诱导率。

[0091] 在一些实施方案中,多特异性抗体是双特异性的。在一些实施方案中,多特异性抗体是三特异性的。在一些实施方案中,多特异性抗体具有如格式1+1(图9)所示的三特异性形式。在这种格式中,抗TAA单元是Fab片段,抗CD3单元是scFv,并且抗4-1BB单元包含与Fc片段C末端融合的两个纳米抗体。

[0092] 在一些实施方案中,多特异性抗体中的抗CD3单元包含至少单链片段(scFv)。在一些实施方案中,多特异性抗体中的抗CD3单元仅包含一个scFv。在一些实施方案中,scFv任选地通过接头或铰链片段融合与Fc的N末端融合。

[0093] 在一些实施方案中,多特异性抗体中的抗TAA单元包含由VH/VL对组成的Fab片段。在一些实施方案中,抗TAA单元任选地通过接头或铰链片段与Fc的N末端融合。

[0094] 与野生型人Fc片段相比,多特异性抗体的Fc片段任选地被修饰以包括杵臼或修饰的盐桥以减少不对称抗体的错配。

[0095] 在一些实施方案中,多特异性抗体还包含抗原结合单元。在一些实施方案中,附加的抗原结合单元对人4-1BB蛋白质具有特异性。在一些实施方案中,抗4-1BB单元与两条Fc链中的一者或二者的N末端融合。在一些实施方案中,抗4-1BB单元包含一个或一对scFv。在一些实施方案中,抗4-1BB单元包含一个或一对纳米抗体。在一些实施方案中,抗4-1BB单元为非激动抗4-1BB抗体或其片段。非激动抗4-1BB抗体或片段结合4-1BB,但在不与肿瘤相关抗原结合的情况下不激活4-1BB。

[0096] 在一些实施方案中,被认为具有平衡的T细胞激活活性的抗CD3抗体或片段具有1%-25%的无TAA的4-1BB诱导率。在一些实施方案中,4-1BB诱导率不大于25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%或2%。在一些实施方案中,4-1BB诱导率为至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%或25%。

[0097] 在一些实施方案中,被认为具有平衡的T细胞激活活性的抗CD3抗体或片段具有1%-25%、1%-24%、1%-23%、1%-22%、1%-21%、1%-20%、1%-19%、1%-18%、1%-17%、1%-16%、1%-15%、1%-14%、1%-13%、1%-12%、1%-11%、1%-10%、2%-25%、2%-24%、2%-23%、2%-22%、2%-21%、2%-20%、2%-19%、2%-18%、2%-17%、2%-16%、2%-15%、2%-14%、2%-13%、2%-12%、2%-11%、2%-10%、3%-25%、3%-24%、3%-23%、3%-22%、3%-21%、3%-20%、3%-19%、3%-18%、3%-17%、3%-16%、3%-

15%、3%-14%、3%-13%、3%-12%、3%-11%、3%-10%、4%-25%、4%-24%、4%-23%、4%-22%、4%-21%、4%-20%、4%-19%、4%-18%、4%-17%、4%-16%、4%-15%、4%-14%、4%-13%、4%-12%、4%-11%、4%-10%、5%-25%、5%-24%、5%-23%、5%-22%、5%-21%、5%-20%、5%-19%、5%-18%、5%-17%、5%-16%、5%-15%、5%-14%、5%-13%、5%-12%、5%-11%、5%-10%、6%-25%、6%-24%、6%-23%、6%-22%、6%-21%、6%-20%、6%-19%、6%-18%、6%-17%、6%-16%、6%-15%、6%-14%、6%-13%、6%-12%、6%-11%、6%-10%、7%-25%、7%-24%、7%-23%、7%-22%、7%-21%、7%-20%、7%-19%、7%-18%、7%-17%、7%-16%、7%-15%、7%-14%、7%-13%、7%-12%、7%-11%、7%-10%、8%-25%、8%-24%、8%-23%、8%-22%、8%-21%、8%-20%、8%-19%、8%-18%、8%-17%、8%-16%、8%-15%、8%-14%、8%-13%、8%-12%、8%-11%、8%-10%、9%-25%、9%-24%、9%-23%、9%-22%、9%-21%、9%-20%、9%-19%、9%-18%、9%-17%、9%-16%、9%-15%、9%-14%、9%-13%、9%-12%、9%-11%、9%-10%、10%-25%、10%-24%、10%-23%、10%-22%、10%-21%、10%-20%、10%-19%、10%-18%、10%-17%、10%-16%、10%-15%、10%-14%、10%-13%、10%-12%或10%-11%的无TAA的4-1BB诱导率。

[0098] 在一些实施方案中,为了测量无TAA的4-1BB诱导率,抗体的最终浓度可为100nM,如本文所检测的,或可选地1nM、5nM、10nM、15nM、20nM、30nM、40nM或50nM,不作限制。

[0099] 在一些实施方案中,被认为具有平衡的T细胞激活活性的抗CD3抗体或片段具有1%-80%的TAA依赖性的4-1BB诱导率。在一些实施方案中,TAA依赖性的4-1BB诱导率不大于80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、29%、28%、27%、26%或25%。在一些实施方案中,TAA依赖性4-1BB诱导率为至少15%、20%、25%、30%、35%、40%或50%。

[0100] 在一些实施方案中,被认为具有平衡的T细胞激活活性的抗CD3抗体或片段具有15%-80%、15%-70%、15%-60%、15%-50%、15%-40%、15%-35%、20%-80%、20%-70%、20%-60%、20%-50%、20%-40%、20%-35%、20%-30%、25%-80%、25%-70%、25%-60%、25%-50%、25%-40%、25%-35%、25%-30%、30%-80%、30%-70%、30%-60%、30%-50%、30%-40%或30%-35%的TAA依赖性的4-1BB诱导率。

[0101] 在一些实施方案中,为了测量TAA依赖性的4-1BB诱导率,抗体的最终浓度可为1nM,如上文所述,或可选地0.5nM、2nM、5nM、10nM、15nM、20nM、30nM、40nM、50nM或100nM,不作限制。在一个实施方案中,浓度为5nM。在一个实施方案中,浓度为10nM。在一个实施方案中,浓度为20nM。

[0102] 在一些实施方案中,多特异性抗体在100nM的抗体浓度下具有不大于5%、10%、15%、20%或25%的无TAA的4-1BB诱导率。在一些实施方案中,多特异性抗体在100nM的抗体浓度下具有不大于15%、14%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的无TAA的4-1BB诱导率。在一些实施方案中,测量是在1nM、2nM、3nM、4nM、5nM、10nM、20nM、30nM、40nM、50nM、60nM、70nM、80nM、90nM、100nM、150nM或200nM的替代抗体浓度下进行的。

[0103] 在一些实施方案中,多特异性抗体在1nM的浓度下具有至少10%的TAA依赖性的4-1BB诱导率。在一些实施方案中,多特异性抗体在1nM的抗体浓度下具有至少5%、6%、7%、

8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％、16％、17％、18％、19％、20％、21％、22％、23％、24％、25％、26％、27％、28％、29％、30％、31％、32％、33％、34％、35％、36％、37％、38％、39％或40％的TAA依赖性的4-1BB诱导率。在一些实施例中，测量是在1nM、2nM、3nM、4nM、5nM、10nM、20nM、30nM、40nM或50nM的替代抗体浓度下进行的。

协同CD3和4-1BB激动的T细胞衔接器

[0104] 抗CD3激动剂抗体可激活4-1BB诱导。如上所述，抗CD3抗体的4-1BB诱导活性可“依赖”于肿瘤抗原表达细胞的存在。也就是说，在不存在肿瘤抗原的情况下，4-1BB的诱导率低，而在存在肿瘤抗原的情况下，4-1BB的诱导率高出数倍。这种肿瘤抗原依赖性对患者是有益的，因为它降低了脱靶毒性。

[0105] 在此背景下，本文进一步发现当T细胞衔接器包含抗CD3单元和抗4-1BB单元时，肿瘤抗原依赖性以及肿瘤抗原依赖性的4-1BB诱导可得到协同增强。特别地，当抗4-1BB单元本身是肿瘤抗原依赖性激动剂抗体时，协同作用进一步增加。肿瘤抗原依赖性激动剂抗4-1BB抗体在不存在肿瘤抗原的情况下不激活(或具有低的激活能力)4-1BB信号传导，但在存在肿瘤抗原的情况下激活4-1BB信号传导。这种抗4-1BB抗体被称为“肿瘤抗原依赖性激动剂抗4-1BB抗体”或“非激动剂抗4-1BB抗体”。

[0106] 有趣的是，在抗CD3抗体与靶向其他T细胞共刺激因子(诸如CD28)的抗体之间，未观察到抗CD3抗体与抗4-1BB抗体之间的这种协同作用。因此，这种协同作用是相当出乎意料的。

[0107] 另一个令人惊讶的发现是，当抗CD3单元和抗4-1BB单元均包含在多特异性抗体中时，它们优选“远离”彼此。例如，在如图6中所示的1+1格式或2+Lc2格式中，抗CD3单元和抗4-1BB单元优选被Fc片段分开，而不是位于Fc片段的同一末端。相比之下，当还包含抗TAA单元时，抗CD3单元和抗TAA单元优选位于Fc片段的同一侧(例如，N末端)。

[0108] 在实施例18中用B16F10的体内动物模型证实了这种多特异性抗体的显著疗效。B16F10是公知的PD1非应答性和抗性模型，通常称为“冷肿瘤”。根据定义，冷肿瘤特别难以治疗。正如所料，如图14所示，抗PD1治疗表现为无效。仅靶向TAA和CD3或4-1BB的双特异性抗体(不靶向4-1BB的CTM01-01A和不靶向CD3的CTM01-01B)疗效欠佳。同时靶向TAA、CD3和4-1BB的三特异性抗体(CTM01-01)具有非常优异的疗效。因此，本示例证实了以本文公开的方式同时靶向CD3和4-1BB在治疗冷激性肿瘤中具有出乎意料的巨大疗效。

[0109] 因此，本公开的一个实施方案提供了多特异性抗体，该多特异性抗体包含抗CD3单元，该抗CD3单元包含对人CD3复合体具有结合特异性的抗CD3抗体或抗原结合片段；和抗4-1BB单元，该抗4-1BB单元包含对人4-1BB蛋白质具有结合特异性的抗4-1BB抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，多特异性抗体还包含抗肿瘤相关抗原(TAA)单元，该抗TAA单元包含对人TAA具有结合特异性的抗TAA抗体或抗原结合片段。

[0110] 在一些实施方案中，多特异性抗体还包含Fc片段。具有Fc片段的多特异性抗体的示例性格式示于图6。在一些实施方案中，抗CD3单元和抗TAA单元均位于Fc片段的N末端。

[0111] 在1+1格式中，抗CD3抗体或抗原结合片段是与Fc片段的链的N末端融合的单链片段(scFv)，并且抗TAA抗体或抗原结合片段是与Fc片段的另一条链融合的Fab片段。

[0112] 在2+Lc2格式中，抗TAA单元包含通过各自重链与Fc片段的N末端融合的两个抗TAA Fab，并且抗CD3单元包含分别与抗TAA单元的Fab的轻链的C末端融合的两个scFv。

[0113] 在两种举例说明的形式中,抗4-1BB单元可与Fc片段的C末端融合。在一些实施方案中,抗4-1BB单元包含两个抗4-1BB纳米抗体或scFv。

[0114] 在一些实施方案中,抗4-1BB抗体或抗原结合片段为肿瘤相关的抗原依赖性激动剂抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,抗4-1BB抗体或抗原结合片段不在细胞表面聚集4-1BB蛋白质。此类抗体是本领域已知的,诸如来自Abl Bio的1A10。

[0115] 人4-1BB,作为肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族(TNFRSF)成员,在与C末端胞质区连接的N末端胞外区中含有四个半胱氨酸富集结构域(CRD)以启动随后的信号传导,该C末端胞质区包含TNF受体相关因子(TRAF)结合基序。这四个CRD,CRD1、CRD2、CRD3和CRD4的位置示于表A中。

[0116] 4-1BB信号传导活化是激动剂抗体诸如乌托鲁单抗(PF-05082566)和乌瑞芦单抗(urelumab)(BMS-663513)的预期机制。乌瑞芦单抗与CRD1结合,而乌托鲁单抗与CRD3结合。用于加入本公开的多特异性抗体的优选抗4-1BB抗体或片段不结合CRD1。相反,它结合CRD2、CRD3或CRD4或它们的组合。在一些实施方案中,这种抗4-1BB抗体或抗原结合片段不具有激动活性。

表A.人4-1BB(SEQ ID NO:77)的氨基酸序列

```
  1 MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR
                                 CRD1

 61 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC
          CRD2                                 CRD3

121 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE
                     CRD4

181 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG

241 CSCRFPEEEE GGCEL
```

[0117] “肿瘤相关抗原”或“肿瘤抗原”是在肿瘤细胞中产生的抗原性物质,即,它在宿主中触发免疫应答。肿瘤抗原可用于鉴定肿瘤细胞,并且是用于癌症治疗的潜在候选物。体内正常蛋白质不是抗原性的。然而,某些蛋白质在肿瘤发生期间产生或过表达,因此对身体而言似乎是“外来的”。这可包括与免疫系统隔离良好的正常蛋白质、通常以极小量产生的蛋白质、通常仅在发育的某些阶段产生的蛋白质、或由于突变而改变结构的蛋白质。

[0118] 大量的肿瘤抗原是本领域已知的,并且新的肿瘤抗原可通过筛选容易地鉴定。肿瘤抗原的非限制性示例包括Claudin 18.2、5T4、GPC3、EGFR、Her2、EpCAM、CD20、CD30、CD33、CD47、CD52、CD133、CD73、CEA、gpA33、粘蛋白、TAG-72、CIX、PSMA、叶酸结合蛋白、GD2、GD3、GM2、VEGF、VEGFR、整联蛋白、αVβ3、α5β1、ERBB2、ERBB3、MET、IGF1R、EPHA3、TRAILR1、TRAILR2、RANKL、FAP和腱生蛋白。在一个具体的实施方案中,TAA是Claudin 18.2。靶向Claudin 18.2的示例性抗体是本领域已知的,包括公开于例如PCT公开WO/2020/200196、WO/2021/058000、WO/2020/147321和WO/2019/219089中的抗体。

[0119] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段结合在免疫细胞表面上表达的抗原。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段结合选自以下的分化簇分子:CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD7、CDS、CD9、CD10、CD11A、CD11B、CD11C、CDw12、CD13、CD14、

CD15、CD15s、CD16、CDw17、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD3Q、CD31、CD32、CD33、CD34、CD35、CD36、CD37、CD38、CD39、CD40、CD41、CD42a、CD42b、CD42c、CD42d、CD43、CD44、CD45、CD45RO、CD45RA、CD45RB、CD46、CD47、CD48、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD50、CD51、CD52、CD53、CD54、CD55、CD56、CD57、CD58、CD59、CDw60、CD6I、CD62E、CD62L、CD62P、CD63、CD64、CD65、CD66a、CD66b、CD66c、CD66d、CD66e、CD66E、CD68、CD69、CD70、CD71、CD72、CD73、CD74、CD75、CD76、CD79o、0079b、CD80、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85、CD86、CD87、CD88、CD89、CD90、CD91、CDw92、CD93、CD94、CD95、CD96、CD97、CD98、CD99、CD100、CDIGI、CD102、CD103、CD104、CD105、CD106、CD107a、CD107b、CDw’108、CD109、CD114、CD115、CD116、CD117、CD118、CD119、CD120a、CD120b、CD121a、CDwl21b、CD122、CD123、CD124、CD125、CD126、CD127、CDwl28、CD129、CD130、CDwl31、CD132、CD134、CD135、CDw136、CDwl37、CD138、CD139、CD140a、CD140b、CD141、CD142、CD143、CD144、CD145、CD146、CD147、CD148、CD15G、CD151、CD152、CD153、CD154、CD155、CD156、CD157、CD158a、CD158b、CD161、CD162、CD163、CD164、CD165、CD166和CD182。

示例性抗CD3抗体

[0120] 在一些实施方案中,本公开还提供了可单独使用或选择加入本技术的T细胞衔接器中的示例性抗CD3抗体和片段。

[0121] 根据本公开的一个实施方案,是对人CD3复合物具有结合特异性的抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),该VH包含VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,并且该VL包含VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。

[0122] 在一个实施方案中,该抗体为153A6B1或其衍生物,或其人源化版本。在一些实施方案中,VH CDR1包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,VH CDR2包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,VH CDR3包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,VL CDR1包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,VL CDR2包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,并且VL CDR3包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

[0123] 已经观察到VH CDR2(RIRYNGDTSYNSALKS,SEQ ID NO:8)包含G55残基和S61残基(Kabat编号),它们存在翻译后修饰(PTM)的风险。因此,在一些实施方案中,对于153A6B1或人源化或衍生化版本,可将G55A取代和/或S61A取代引入VH以防止PTM。在这些变化下,替代性VH CDR2可为RIRYNADTSYNSALKS(SEQ ID NO:64)、RIRYNGDTSYNAALKS(SEQ ID NO:65)或RIRYNADTSYNAALKS(SEQ ID NO:66)。

[0124] 同样,VL CDR3(LQHGSGYT,SEQ ID NO:12)包含存在PTM风险的S93A残基。因此,在一些实施方案中,对于153A6B1或人源化或衍生化版本,可将S93A取代引入VL以防止PTM。在这种变化下,替代性VL CDR3可为LQHGAGYT(SEQ ID NO:67)。

[0125] 在一些实施方案中,VH包含选自SEQ ID NO:1和23-28,特别是SEQ ID NO:23-28的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH包含G55A取代、S61A取代或它们的组合。在一些实施方案中,VL包含选自SEQ ID NO:2和30-32,特别是SEQ ID NO:30-32的氨基酸序列。在一些实施方案中,VL包含S93A取代。

[0126] 在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:23,并且VL包含SEQ ID NO:30。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:23,并且VL包含SEQ ID NO:31。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:23,并且VL包含SEQ ID NO:32。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:24,并且VL包含SEQ ID NO:30。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:24,并且VL包含SEQ ID NO:31。在

一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:24,并且VL包含SEQ ID NO:32。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:25,并且VL包含SEQ ID NO:30。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:25,并且VL包含SEQ ID NO:31。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:25,并且VL包含SEQ ID NO:32。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:26,并且VL包含SEQ ID NO:30。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:26,并且VL包含SEQ ID NO:31。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:26,并且VL包含SEQ ID NO:32。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:27,并且VL包含SEQ ID NO:30。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:27,并且VL包含SEQ ID NO:31。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:27,并且VL包含SEQ ID NO:32。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:28,并且VL包含SEQ ID NO:30。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:28,并且VL包含SEQ ID NO:31。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:28,并且VL包含SEQ ID NO:32。在一些实施方案中,VH包含G55A取代、S61A取代或它们的组合。在一些实施方案中,VL包含S93A取代。

[0127] 通过序列分析和与活性数据的比较,本文观察到某些回复突变在确定抗体的活性方面起重要作用。预期VH中的回复突变27F、78V、29L和30T强烈促进抗体的T细胞激活活性,而VH中的回复突变37V、71R、48M、67L和93T有助于维持活性的平衡(3级或4级)。

[0128] 因此,在一个实施方案中,本公开的抗CD3抗体或片段包含抗体153A6B1或它们的风险降低版本的CDR(如上所述),并且还在VH中包含回复突变37V、71R、48M、67L和93T中的至少一者。在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中包含至少37V。在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中包含至少71R。在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中包含至少48M。在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中包含至少67L。在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中包含至少93T。

[0129] 在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中包含至少37V和71R、37V和48M、37V和67L、或37V和93T。在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中包含至少71R和48M、71R和67L或71R和93T。在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中包含至少48M和67L、或48M和93T。在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中包含至少67L和93T。在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中包含37V、71R、48M、67L和93T中的至少3者。在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中包含37V、71R、48M、67L和93T中的至少4者。在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中包含37V、71R、48M、67L和93T的全部。

[0130] 在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中不包含27F、78V、29L和30T中的至少一者。在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中不包含至少27F和78V、27F和29L或27F和30T。在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中不包含78V、29L和30T、或27F、29L和30T、或27F、78V和30T、或27F、78V和29L。在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中不包含27F、78V、29L和30T中的任一者。

[0131] 在一些实施方案中,本公开的抗CD3抗体或片段在VH中包含抗体153A6B1或它们的风险降低版本的CDR(如上所述),并且还包含回复突变37V、71R、48M、67L和93T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者、4者或更多者),并且不包含27F、78V、29L和30T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者或更多者)。

[0132] 在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段具有如表10中所定义的4级效力(例如153-2、3、4)。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:24,并且VL包含SEQ ID NO:30。在一些实施

方案中,VH包含SEQ ID NO:25,并且VL包含SEQ ID NO:30。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:26,并且VL包含SEQ ID NO:30。在一些实施方案中,VH包含G55A取代、S61A取代或它们的组合。在一些实施方案中,VL包含S93A取代。

[0133] 在一些实施方案中,VH与SEQ ID NO:24具有至少85%、90%或95%的序列同一性,包含SEQ ID NO:24的CDR,并且包含回复突变37V、71R、48M、67L和93T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者、4者或更多者),并且不包含27F、78V、29L和30T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者或更多者),并且VL与SEQ ID NO:30具有至少85%、90%或95%的序列同一性,并且包含SEQ ID NO:30的CDR。

[0134] 在一些实施方案中,VH与SEQ ID NO:25具有至少85%、90%或95%的序列同一性,包含SEQ ID NO:25的CDR,并且包含回复突变37V、71R、48M、67L和93T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者、4者或更多者),并且不包含27F、78V、29L和30T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者或更多者),并且VL与SEQ ID NO:30具有至少85%、90%或95%的序列同一性,并且包含SEQ ID NO:30的CDR。

[0135] 在一些实施方案中,VH与SEQ ID NO:26具有至少85%、90%或95%的序列同一性,包含SEQ ID NO:26的CDR,并且包含回复突变37V、71R、48M、67L和93T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者、4者或更多者),并且不包含27F、78V、29L和30T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者或更多者),并且VL与SEQ ID NO:30具有至少85%、90%或95%的序列同一性,并且包含SEQ ID NO:30的CDR。

[0136] 在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段具有如表10中所定义的3级效力(例如153-7、13)。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:23,并且VL包含SEQ ID NO:31。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:23,并且VL包含SEQ ID NO:32。在一些实施方案中,VH包含G55A取代、S61A取代或它们的组合。在一些实施方案中,VL包含S93A取代。

[0137] 在一些实施方案中,VH与SEQ ID NO:23具有至少85%、90%或95%的序列同一性,包含SEQ ID NO:23的CDR,并且包含回复突变37V、71R、48M、67L和93T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者、4者或更多者),并且不包含27F、78V、29L和30T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者或更多者),并且VL与SEQ ID NO:31具有至少85%、90%或95%的序列同一性,并且包含SEQ ID NO:31的CDR。

[0138] 在一些实施方案中,VH与SEQ ID NO:23具有至少85%、90%或95%的序列同一性,包含SEQ ID NO:23的CDR,并且包含回复突变37V、71R、48M、67L和93T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者、4者或更多者),并且不包含27F、78V、29L和30T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者或更多者),并且VL与SEQ ID NO:32具有至少85%、90%或95%的序列同一性,并且包含SEQ ID NO:32的CDR。

[0139] 在一个实施方案中,该抗体为155A9B1或其衍生物,或其人源化版本。在一些实施方案中,VH CDR1包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,VH CDR2包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,VH CDR3包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,VL CDR1包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,VL CDR2包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,并且VL CDR3包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0140] 已经观察到VH CDR2(RVRYNGDTSYNSALKS,SEQ ID NO:14)包含G55残基和S61残基(Kabat编号),它们存在翻译后修饰(PTM)的风险。因此,在一些实施方案中,对于155A9B1或人源化或衍生化版本,可将G55A取代和/或S61A取代引入VH以防止PTM。在这些变化下,替代

性VH CDR2可为RVRYNADTSYNSALKS(SEQ ID NO:68)、RVRYNGDTSYNAALKS(SEQ ID NO:69)或RVRYNADTSYNAALKS(SEQ ID NO:70)。

[0141] 同样,VL CDR3(LQHNSGYT,SEQ ID NO:17)包含存在PTM风险的S93A残基。因此,在一些实施方案中,对于155A9B1或人源化或衍生化版本,可将S93A取代引入VL以防止PTM。在这种变化下,替代性VL CDR3可为LQHNAGYT(SEQ ID NO:71)。

[0142] 在一些实施方案中,VH包含选自SEQ ID NO:3和34-41,特别是SEQ ID NO:3和36-41,或仅是SEQ ID NO:36-41的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH包含G55A取代、S61A取代或它们的组合。在一些实施方案中,VL包含选自SEQ ID NO:4和43-46,特别是SEQ ID NO:44-46的氨基酸序列。在一些实施方案中,VL包含S93A取代。

[0143] 在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:36,并且VL包含SEQ ID NO:44。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:36,并且VL包含SEQ ID NO:45。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:36,并且VL包含SEQ ID NO:46。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:37,并且VL包含SEQ ID NO:44。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:37,并且VL包含SEQ ID NO:45。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:37,并且VL包含SEQ ID NO:46。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:38,并且VL包含SEQ ID NO:44。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:38,并且VL包含SEQ ID NO:45。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:38,并且VL包含SEQ ID NO:46。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:39,并且VL包含SEQ ID NO:44。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:39,并且VL包含SEQ ID NO:45。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:39,并且VL包含SEQ ID NO:46。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:40,并且VL包含SEQ ID NO:44。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:40,并且VL包含SEQ ID NO:45。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:40,并且VL包含SEQ ID NO:46。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:41,并且VL包含SEQ ID NO:44。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:41,并且VL包含SEQ ID NO:45。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:41,并且VL包含SEQ ID NO:46。在一些实施方案中,VH包含G55A取代、S61A取代或它们的组合。在一些实施方案中,VL包含S93A取代。

[0144] 通过序列分析和与活性数据的比较,本文观察到某些回复突变在确定抗体的活性方面起重要作用。预期VH中的回复突变27F、78A、29L和30T强烈促进抗体的T细胞激活活性,而VH中的回复突变37V、71R、48M、67L和93T有助于维持活性的平衡(3级或4级)。此外,VL中的回复突变36F和58I有助于维持活性的平衡(3级或4级)。

[0145] 因此,在一个实施方案中,本公开的抗CD3抗体或片段包含抗体155A9B1或它们的风险降低版本的CDR(如上所述),并且还在VH中包含回复突变37V、71R、48M、67L和93T中的至少一者。在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中包含至少37V。在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中包含至少71R。在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中包含至少48M。在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中包含至少67L。在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中包含至少93T。

[0146] 在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中包含至少37V和71R、37V和48M、37V和67L、或37V和93T。在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中包含至少71R和48M、71R和67L或71R和93T。在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中包含至少48M和67L、或48M和93T。在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中包含至少67L和93T。在一些实施方案中,

抗CD3抗体或片段在VH中包含37V、71R、48M、67L和93T中的至少3者。在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中包含37V、71R、48M、67L和93T中的至少4者。在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中包含37V、71R、48M、67L和93T的全部。

[0147] 在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中不包含27F、78A、29L和30T中的至少一者。在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中不包含至少27F和78A、27F和29L、或27F和30T。在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中不包含78A、29L和30T、或27F、29L和30T、或27F、78A和30T、或27F、78A和29L。在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段在VH中不包含27F、78A、29L和30T中的任一者。

[0148] 因此,在一个实施方案中,本公开的抗CD3抗体或片段包含抗体155A9B1或其风险降低版本的CDR(如上所述),并且还在VL中包含回复突变36F和/或58I中的至少一者。

[0149] 在一些实施方案中,本公开的抗CD3抗体或片段在VH中包含抗体155A9B1或它们的风险降低版本的CDR(如上所述),并且还包含回复突变37V、71R、48M、67L和93T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者、4者或更多者),并且不包含27F、78A、29L和30T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者或更多者)。在一些实施方案中,VL包含回复突变36F和/或58I中的至少一者。

[0150] 在一个具体的实施方案中,VH包含SEQ ID NO:37,并且VL包含SEQ ID NO:45。在一些实施方案中,VH包含具有G55A取代、S61A取代或它们的组合的SEQ ID NO:37,并且VL包含SEQ ID NO:45。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:37,并且VL包含具有S93A取代的SEQ ID NO:45。在一些实施方案中,VH包含具有G55A取代、S61A取代或它们的组合的SEQ ID NO:37,并且VL包含具有S93A取代的SEQ ID NO:45。

[0151] 在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段具有如表10中所定义的4级效力(例如155-8、9、10、14、15、16)。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:37,并且VL包含SEQ ID NO:45。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:38,并且VL包含SEQ ID NO:45。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:39,并且VL包含SEQ ID NO:45。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:37,并且VL包含SEQ ID NO:46。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:38,并且VL包含SEQ ID NO:46。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:39,并且VL包含SEQ ID NO:46。在一些实施方案中,VH包含G55A取代、S61A取代或它们的组合。在一些实施方案中,VL包含S93A取代。

[0152] 在一些实施方案中,VH与SEQ ID NO:37具有至少85%、90%或95%的序列同一性,包含SEQ ID NO:37的CDR,并且包含回复突变37V、71R、48M、67L和93T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者、4者或更多者),并且不包含27F、78A、29L和30T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者或更多者),并且VL与SEQ ID NO:45具有至少85%、90%或95%的序列同一性,包含SEQ ID NO:45的CDR,并且包含至少回复突变36F和/或58I。

[0153] 在一些实施方案中,VH与SEQ ID NO:38具有至少85%、90%或95%的序列同一性,包含SEQ ID NO:38的CDR,并且包含回复突变37V、71R、48M、67L和93T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者、4者或更多者),并且不包含27F、78A、29L和30T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者或更多者),并且VL与SEQ ID NO:45具有至少85%、90%或95%的序列同一性,包含SEQ ID NO:45的CDR,并且包含至少回复突变36F和/或58I。

[0154] 在一些实施方案中,VH与SEQ ID NO:39具有至少85%、90%或95%的序列同一性,包含SEQ ID NO:39的CDR,并且包含回复突变37V、71R、48M、67L和93T中的至少一者(或如上

所述的其中2者、3者、4者或更多者),并且不包含27F、78A、29L和30T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者或更多者),并且VL与SEQ ID NO:45具有至少85%、90%或95%的序列同一性,包含SEQ ID NO:45的CDR,并且包含至少回复突变36F和/或58I。

[0155] 在一些实施方案中,VH与SEQ ID NO:37具有至少85%、90%或95%的序列同一性,包含SEQ ID NO:37的CDR,并且包含回复突变37V、71R、48M、67L和93T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者、4者或更多者),并且不包含27F、78A、29L和30T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者或更多者),并且VL与SEQ ID NO:46具有至少85%、90%或95%的序列同一性,包含SEQ ID NO:46的CDR,并且包含至少回复突变36F和/或58I。

[0156] 在一些实施方案中,VH与SEQ ID NO:38具有至少85%、90%或95%的序列同一性,包含SEQ ID NO:38的CDR,并且包含回复突变37V、71R、48M、67L和93T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者、4者或更多者),并且不包含27F、78A、29L和30T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者或更多者),并且VL与SEQ ID NO:46具有至少85%、90%或95%的序列同一性,包含SEQ ID NO:46的CDR,并且包含至少回复突变36F和/或58I。

[0157] 在一些实施方案中,VH与SEQ ID NO:39具有至少85%、90%或95%的序列同一性,包含SEQ ID NO:39的CDR,并且包含回复突变37V、71R、48M、67L和93T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者、4者或更多者),并且不包含27F、78A、29L和30T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者或更多者),并且VL与SEQ ID NO:46具有至少85%、90%或95%的序列同一性,包含SEQ ID NO:46的CDR,并且包含至少回复突变36F和/或58I。

[0158] 在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段具有如表10中所定义的3级效力(例如155-2、3、4)。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:37,并且VL包含SEQ ID NO:44。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:38,并且VL包含SEQ ID NO:44。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:39,并且VL包含SEQ ID NO:44。在一些实施方案中,VH包含G55A取代、S61A取代或它们的组合。在一些实施方案中,VL包含S93A取代。

[0159] 在一些实施方案中,VH与SEQ ID NO:37具有至少85%、90%或95%的序列同一性,包含SEQ ID NO:37的CDR,并且包含回复突变37V、71R、48M、67L和93T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者、4者或更多者),并且不包含27F、78A、29L和30T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者或更多者),并且VL与SEQ ID NO:44具有至少85%、90%或95%的序列同一性,包含SEQ ID NO:44的CDR,并且包含至少回复突变36F和/或58I。

[0160] 在一些实施方案中,VH与SEQ ID NO:38具有至少85%、90%或95%的序列同一性,包含SEQ ID NO:38的CDR,并且包含回复突变37V、71R、48M、67L和93T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者、4者或更多者),并且不包含27F、78A、29L和30T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者或更多者),并且VL与SEQ ID NO:44具有至少85%、90%或95%的序列同一性,包含SEQ ID NO:44的CDR,并且包含至少回复突变36F和/或58I。

[0161] 在一些实施方案中,VH与SEQ ID NO:39具有至少85%、90%或95%的序列同一性,包含SEQ ID NO:39的CDR,并且包含回复突变37V、71R、48M、67L和93T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者、4者或更多者),并且不包含27F、78A、29L和30T中的至少一者(或如上所述的其中2者、3者或更多者),并且VL与SEQ ID NO:44具有至少85%、90%或95%的序列同一性,包含SEQ ID NO:44的CDR,并且包含至少回复突变36F和/或58I。

[0162] 在一个实施方案中,该抗体为192A7B9或其衍生物,或其人源化版本。在一些实施

方案中,VH CDR1包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,VH CDR2包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列,VH CDR3包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列,VL CDR1包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,VL CDR2包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,并且VL CDR3包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

[0163] 已经观察到VH CDR2(RMRYNGDTSYNSALKS,SEQ ID NO:18)包含G55残基和S61残基(Kabat编号),它们存在翻译后修饰(PTM)的风险。因此,在一些实施方案中,对于192A7B9或人源化或衍生化版本,可将G55A取代和/或S61A取代引入VH以防止PTM。在这些变化下,替代性VH CDR2可为RMRYNADTSYNSALKS(SEQ ID NO:72)、RMRYNGDTSYNAALKS(SEQ ID NO:73)或RMRYNADTSYNAALKS(SEQ ID NO:74)。

[0164] 同样,VL CDR2(IANSLQT,SEQ ID NO:21)包含存在PTM风险的S53残基。因此,在一些实施方案中,对于192A7B9或人源化或衍生化版本,可将S53A取代引入VL以防止PTM。在这种变化下,替代性VL CDR2可为IANALQT(SEQ ID NO:75)。

[0165] 此外,VL CDR3(LQHNSWYT,SEQ ID NO:22)包含存在PTM风险的S93A残基。因此,在一些实施方案中,对于192A7B9或人源化或衍生化版本,可将S93A取代引入VL以防止PTM。在这种变化下,替代性VL CDR3可为LQHNAWYT(SEQ ID NO:76)。

[0166] 在一些实施方案中,VH包含选自SEQ ID NO:5和48-55,特别是SEQ ID NO:5和50-55,或仅是SEQ ID NO:50-55的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH包含G55A取代、S61A取代或它们的组合。在一些实施方案中,VL包含选自SEQ ID NO:6和57-62,特别是SEQ ID NO:59-62的氨基酸序列。在一些实施方案中,VL包含S53A取代。在一些实施方案中,VL包含S93A取代。

[0167] 在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:50,并且VL包含SEQ ID NO:59。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:50,并且VL包含SEQ ID NO:60。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:50,并且VL包含SEQ ID NO:61。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:50,并且VL包含SEQ ID NO:62。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:51,并且VL包含SEQ ID NO:59。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:51,并且VL包含SEQ ID NO:60。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:51,并且VL包含SEQ ID NO:61。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:51,并且VL包含SEQ ID NO:62。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:52,并且VL包含SEQ ID NO:59。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:52,并且VL包含SEQ ID NO:60。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:52,并且VL包含SEQ ID NO:61。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:52,并且VL包含SEQ ID NO:62。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:53,并且VL包含SEQ ID NO:59。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:53,并且VL包含SEQ ID NO:60。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:53,并且VL包含SEQ ID NO:61。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:53,并且VL包含SEQ ID NO:62。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:54,并且VL包含SEQ ID NO:59。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:54,并且VL包含SEQ ID NO:60。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:54,并且VL包含SEQ ID NO:61。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:54,并且VL包含SEQ ID NO:62。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:55,并且VL包含SEQ ID NO:59。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:55,并且VL包含SEQ ID NO:60。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:55,并且VL包含SEQ ID NO:61。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:55,并且VL包含SEQ ID NO:62。在一些实施方案中,VH包含G55A取代、S61A取代或它们的组合。在一些实施方案中,VL包含S53A取代。在一些实施方

案中,VL包含S93A取代。

[0168] 在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段具有如表10中所定义的4级效力(例如192-7、13)。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:50,并且VL包含SEQ ID NO:60。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:50,并且VL包含SEQ ID NO:61。

[0169] 在一些实施方案中,抗CD3抗体或片段具有如表10中所定义的3级效力(例如192-4)。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:53,并且VL包含SEQ ID NO:59。

[0170] 在一些实施方案中,抗体或片段为IgG1类、IgG2类、IgG3类或IgG4类。在一些实施方案中,抗体或片段具有抗体依赖性细胞毒性(ADCC)能力。在一些实施方案中,抗体或片段不具有ADCC能力。

[0171] 本领域普通技术人员还将理解,可以修饰本文公开的抗体,使得它们在氨基酸序列上与它们所源自的天然存在的结合多肽不同。例如,源自指定蛋白质的多肽或氨基酸序列可以是相似的,例如,与起始序列具有一定百分比的同一性,例如,它可以与起始序列具有60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%的同一性。

[0172] 在某些实施方案中,抗体包含通常不与抗体结合的氨基酸序列或一个或多个部分。示例性修饰在下文中更详细地描述。例如,本公开的抗体可包含柔性接头序列,或可被修饰以添加功能性部分(例如PEG、药物、毒素或标记)。

[0173] 本公开的抗体、它们的变体或衍生物包括修饰的衍生物,即通过任何类型的分子与抗体的共价连接,使得共价连接不阻止抗体与表位结合的衍生物。例如,但不作为限制,抗体可例如通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/封闭基团的衍生化、溶蛋白性裂解、与细胞配体或其他蛋白质连接等被修饰。许多化学修饰中的任何一种都可以通过已知技术进行,包括但不限于特定的化学裂解、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。另外,抗体可以含有一个或多个非经典氨基酸。

[0174] 在一些实施方案中,抗体可以与治疗剂、前药、肽、蛋白质、酶、病毒、脂质、生物反应调节剂、药剂或PEG缀合。

[0175] 抗体可以与治疗剂缀合或融合,该治疗剂可以包括可检测标记物,诸如放射性标记物、免疫调节剂、激素、酶、寡核苷酸、光敏治疗剂或诊断剂、细胞毒性剂(其可以是药物或毒素)、超声增强剂、非放射性标记物、它们的组合以及本领域已知的其他此类试剂。

[0176] 抗体可以通过与化学发光化合物偶联而可检测地标记。然后通过检测在化学反应过程中产生的发光的存在来确定化学发光标签化的抗原结合多肽的存在。特别有用的化学发光标记化合物的示例是鲁米诺(luminol)、异鲁米诺(isoluminol)、热性吖啶鎓酯(theromatic acridinium ester)、咪唑、吖啶鎓盐和草酸酯。

[0177] 抗体也可以用荧光发射金属(诸如^{152}Eu)或其他镧系金属可检测地标记。这些金属可以使用金属螯合基团诸如二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)与抗体连接。将各种部分与抗体缀合的技术是公知的,参见例如Arnon等人,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”,引自Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy,Reisfeld等人(编著),第243-256页(Alan R.Liss,Inc.(1985年);Hellstrom等人,“Antibodies For Drug Delivery”,引自Controlled Drug Delivery(第2版),Robinson等人(编著),Marcel Dekker,Inc.,第623-653页(1987年);Thorpe,“Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review”,引

自Monoclonal Antibodies'84:Biological And Clinical Applications,Pinchera等人(编著),第475-506页(1985);"Analysis,Results,And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy",引自Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy,Baldwin等人(编著),Academic Press,第303-316页(1985年);以及Thorpe等人"The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates",Immunol.Rev.(第52卷:第119-158页(1982年))。

示例性T细胞衔接器格式和序列

[0178] 本公开的某些实施方案提供了多特异性抗体,该多特异性抗体包含:抗CD3单元,该抗CD3单元包含对人CD3复合物具有结合特异性的抗CD3抗体或抗原结合片段;和抗4-1BB单元,该抗4-1BB单元包含对人4-1BB蛋白具有结合特异性的抗4-1BB抗体或抗原结合片段。

[0179] 在一些实施方案中,多特异性抗体还包含抗肿瘤相关抗原(TAA)单元,该抗TAA单元包含对人TAA具有结合特异性的抗TAA抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,多特异性抗体还包含Fc片段。

[0180] 在一些实施方案中,抗CD3单元位于Fc片段的N末端侧。在一些实施方案中,抗CD3单元是单价的。在一些实施方案中,抗CD3单元具有scFv、Fab或纳米抗体的格式。

[0181] 在一些实施方案中,抗4-1BB单元与Fc片段的N末端或C末端或轻链的C末端融合。在一些实施方案中,抗4-1BB单元包含一个或两个抗4-1BB纳米抗体或scFv。

[0182] 在一些实施方案中,抗TAA单元位于Fc片段的N末端侧。在一些实施方案中,抗TAA单元位于Fc片段的C末端侧。在一些实施方案中,抗TAA单元是单价的或二价的。在一些实施方案中,抗TAA单元具有scFv、Fab或纳米抗体的格式。

[0183] 在一些实施方案中,多特异性抗体还包含Fc片段,其中抗CD3和抗TAA单元位于Fc片段的N末端。在一些实施方案中,抗4-1BB单元与Fc片段的C末端融合。在一些实施方案中,抗CD3和抗TAA单元是单价的;抗4-1BB单元包含两个抗4-1BB纳米抗体或scFv。

[0184] 在一些实施方案中,抗CD3抗体或抗原结合片段是单链片段(scFv)或Fab片段或纳米抗体,并与Fc片段的链的N末端融合。在一些实施方案中,抗TAA抗体或抗原结合片段是Fab片段或scFv或纳米抗体,并与Fc片段的另一条链融合。抗4-1BB抗体或抗原结合片段是与Fc片段的C末端融合的Fab片段或纳米抗体或scFv。

[0185] 在一些实施方案中,抗CD3抗体为是与Fc片段的链的N末端融合的单价格式的单链片段(scFv),抗TAA抗体或抗原结合片段是与Fc片段的另一条链融合的单价格式的Fab片段,并且抗4-1BB单元是与Fc的C末端融合的二价格式的纳米抗体。

编码抗体的多核苷酸和制备抗体的方法

[0186] 本公开还提供了编码本公开的抗体、它们的变体或衍生物的分离的多核苷酸或核酸分子。本公开的多核苷酸可以在同一多核苷酸分子上或在不同的多核苷酸分子上编码抗原结合多肽、它们的变体或衍生物的整个重链和轻链可变区。另外,本公开的多核苷酸可以在同一多核苷酸分子上或在不同的多核苷酸分子上编码抗原结合多肽、它们的变体或衍生物的重链和轻链可变区的部分。

[0187] 制备抗体的方法是本领域熟知的,并且描述于本文中。在某些实施方案中,本公开的抗原结合多肽的可变区和恒定区均为全人的。全人抗体可以使用本领域所述的和如本文所述的技术来制备。例如,通过将抗原施用于转基因动物,可以制备针对特定抗原的全人抗

体,该转基因动物已被修饰以响应于抗原攻击产生此类抗体,但是其内源性基因座已被禁用。可用于制备此类抗体的示例性技术描述于美国专利:6,150,584;6,458,592;6,420,140,这些文献全文以引用方式并入本文。

[0188] 在某些实施方案中,所制备的抗体不会在待治疗的动物中,例如在人中引发有害的免疫应答。在一个实施方案中,使用本领域公认的技术修饰本公开的抗原结合多肽、它们的变体或衍生物以降低它们的免疫原性。例如,抗体可以是人源化的、灵长类动物化的、去免疫化的,或者可以制备嵌合抗体。这些类型的抗体源自非人抗体,通常是鼠抗体或灵长类动物抗体,其保留或基本上保留亲本抗体的抗原结合特性,但在人中免疫原性较低。这可以通过各种方法实现,包括(a)将整个非人可变结构域移植到人恒定区上以产生嵌合抗体;(b)将非人互补决定区(CDR)中的一个或多个CDR的至少一部分移植到保留或不保留关键框架残基的人框架和恒定区中;或(c)移植整个非人可变结构域,但通过替换表面残基用类人部分“伪装”它们。此类方法公开于Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,第57卷:第6851-6855页(1984年);Morrison等人,Adv.Immunol.第44卷:第65-92页(1988年);Verhoeyen等人,Science,第239卷:第1534-1536页(1988年);Padlan,Molec.Immun.,第25卷:第489-498页(1991年);Padlan,Molec.Immun.,第31卷:第169-217页(1994年)和美国专利号:5,585,089、5,693,761、5,693,762和6,190,370,所有这些文献全文据此以引用方式并入。

[0189] 也可使用去免疫降低抗体的免疫原性。如本文所用,术语“去免疫”包括改变抗体以修饰T细胞表位(参见例如,国际申请公开号:WO/9852976A1和WO/0034317A2)。例如,分析来自起始抗体的可变重链和可变轻链序列,并从每个V区产生人T细胞表位“地图”,该地图显示了与互补决定区(CDR)和序列内其他关键残基相关的表位的位置。分析来自T细胞表位地图的单个T细胞表位,以鉴定改变最终抗体活性的低风险替代性氨基酸取代。设计一系列包含氨基酸取代的组合的替代性可变重链和可变轻链序列,随后将这些序列加入一系列结合多肽中。通常,产生12至24种变体抗体并检测其结合和/或功能。然后将包含经修饰的可变区和人恒定区的完整重链和轻链基因克隆到表达载体中,随后将质粒引入细胞系中以产生全抗体。然后在适当的生物化学和生物学测定中比较抗体,并鉴定最佳变体。

[0190] 本公开的抗原结合多肽的结合特异性可以通过体外测定来确定,诸如免疫沉淀、放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)。

肿瘤,特别是冷肿瘤的治疗

[0191] 如本文所述,本公开的抗体、变体或衍生物可用于某些治疗和诊断方法。

[0192] 本公开进一步涉及基于抗体的疗法,其包括向患者(诸如动物、哺乳动物和人)施用本公开的抗体,以于治疗本文所述的一种或多种病症或病况。本公开的治疗性化合物包括但不限于本公开的抗体(包括如本文所述的它们的变体和衍生物)和编码本公开的抗体(包括如本文所述的它们的变体和衍生物)的核酸或多核苷酸。

[0193] 本公开的抗体还可用于治疗或抑制癌症。在一些实施方案中,肿瘤抗原(例如,Claudin 18.2)在肿瘤细胞中过表达。因此,在一些实施方案中,提供了用于治疗有需要的患者中的癌症的方法。在一个实施方案中,该方法需要向患者施用有效量的本公开的抗体。在一些实施方案中,患者中的癌细胞中的至少一种(例如,基质细胞)表达、过表达或被诱导表达肿瘤抗原。例如,基因表达的诱导可以通过施用肿瘤疫苗或放射疗法来进行。

[0194] 可以适当治疗的肿瘤包括膀胱癌、非小细胞肺癌、肾癌、乳腺癌、尿道癌、结肠直肠癌、头颈癌、鳞状细胞癌、梅克尔细胞癌、胃肠道癌、胃癌、食道癌、卵巢癌、肾癌和小细胞肺癌的肿瘤。因此,本公开的抗体可用于治疗任何一种或多种此类癌症。

[0195] 在一些实施方案中,被治疗的肿瘤是特别难以用常规免疫肿瘤疗法,诸如用靶向免疫检查点(ICP)的抗体治疗的肿瘤。有时,此类肿瘤被称为"冷肿瘤"或"非免疫原性肿瘤"。如上所述,本公开的多特异性抗体在B16F10(一种"冷肿瘤")的体内动物模型中表现出显著的疗效(参见例如,实施例18)。因此,在一些实施方案中,本公开提供了用本文公开的多特异性抗体治疗冷肿瘤的方法和用途。

[0196] 在一些实施方案中,非免疫原性肿瘤是未被T细胞浸润的肿瘤,或者是在T细胞过滤、抗原呈递细胞(APC)或T细胞激活方面有缺陷的肿瘤,或者是在T细胞归巢进入肿瘤床方面有缺陷的肿瘤。所有前列腺癌、胰腺癌和白血病都是非免疫原性的。绝大多数乳腺癌(95%)、结肠直肠癌(95%)、胃癌(87%)、头颈癌(84%)、肝癌(83%)、食管癌(86%)、宫颈癌(87%)和甲状腺癌(87%)也是非免疫原性的。此外,83%的肺癌、79%的膀胱癌、77%的肾癌、70%的子宫癌和66%的黑素瘤也是非免疫原性的。

[0197] 非免疫原性肿瘤或冷肿瘤的鉴定也可通过测量肿瘤内免疫细胞的类型、密度和位置来进行。例如,Galon和Bruni(Nature Reviews Drug Discovery,第18卷,第197-218页(2019年))描述了一种标准化评分系统,即免疫评分,该系统基于例如在切除组织中的两种淋巴细胞群(CD3和CD8)的定量,用于指导热肿瘤和冷肿瘤的分层。免疫评分的范围为免疫评分0(I0,代表低密度,诸如这两个区域均不存在这两种细胞类型)至I4(在两个位置均存在高免疫细胞密度)。通过根据癌症的免疫浸润对癌症进行分类,评分系统提供了基于免疫的肿瘤分类,包括"热"(高度浸润,免疫评分I4)和"冷"(非浸润,免疫评分I0)肿瘤的定义。

[0198] 在一些实施方案中,肿瘤对用免疫检查点抑制剂,诸如PD-L1抑制剂、PD-1抑制剂、CTLA-4抑制剂或它们的组合的治疗有抗性。在一些实施方案中,癌症是前列腺癌、胰腺癌或白血病。在一些实施方案中,癌症是乳腺癌、结肠直肠癌、胃癌、头颈癌、肝癌、食管癌、宫颈癌或甲状腺癌。在一些实施方案中,癌症是肺癌、膀胱癌、肾癌、子宫癌或黑素瘤。

[0199] 可用本公开的抗体或其变体或衍生物治疗、预防、诊断和/或预后的与增加的细胞存活相关联的其他疾病或病况包括但不限于恶性肿瘤和相关病症的进展和/或转移,这些恶性肿瘤和相关病症是例如白血病(包括急性白血病(例如,急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞性白血病(包括成髓细胞性、早幼粒细胞性、粒单核细胞性、单核细胞性和红白血病))和慢性白血病(例如慢性髓细胞性(粒细胞性)白血病和慢性淋巴细胞性白血病))、真性红细胞增多症、淋巴瘤(例如,霍奇金病和非霍奇金病)、多发性骨髓瘤、华氏巨球蛋白血症、重链病和实体瘤,实体瘤包括但不限于肉瘤和癌,诸如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、甲状腺癌、子宫内膜癌、黑素瘤、前列腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、肾母细胞瘤、宫颈癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑素瘤、神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤。

[0200] 用于任何特定患者的具体剂量和治疗方案将取决于多种因素,包括所用的特定抗体、它们的变体或衍生物;患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;以及给药时间、排泄速率、药物组合和所治疗的特定疾病的严重程度。医疗护理人员对这些因素的判断在本领域的普通技术范围内。用量还将取决于待治疗的个体患者、施用途径、制剂类型、所用化合物的特征、疾病的严重程度和期望效果。用量可以通过本领域熟知的药理学和药代动力学原理来确定。

[0201] 抗体、变体或的施用方法包括但不限于皮内、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。抗原结合多肽或组合物可以通过任何方便的途径施用,例如通过输注或推注,通过上皮或粘膜皮肤内层(例如口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收施用,并且可以与其他生物活性剂一起施用。因此,含有本公开的抗原结合多肽的药物组合物可通过口服、直肠、肠胃外、脑池内、阴道内、腹膜内、局部(如通过粉末、软膏、滴剂或透皮贴剂)、口腔含服或作为口腔喷雾剂或鼻喷雾剂施用。

[0202] 如本文所用,术语“肠胃外”是指包括静脉内、肌内、腹膜内、胸骨内、皮下和关节内注射和输注的施用方式。

[0203] 施用可以是全身性的或局部的。此外,可能需要通过任何合适的途径将本公开的抗体引入中枢神经系统,包括心室内和鞘内注射;脑室内注射可以通过脑室内导管,例如连接到储液器(诸如Ommaya储液器)的导管来促进。也可采用肺部施用,例如使用吸入器或雾化器,以及含雾化剂的制剂。

[0204] 可能需要将本公开的抗体、多肽或组合物局部施用于需要治疗的区域;可能需要将本公开的抗体、多肽或组合物局部施用于需要治疗的区域;这可通过例如但不限于手术期间的局部输注、局部施用(例如,与手术后的伤口敷料结合)、通过注射、通过导管、通过栓剂或通过植入物来实现,所述植入物是多孔、无孔或凝胶状材料,包括膜(诸如唾液酸膜)或纤维。

组合物

[0205] 本公开还提供药物组合物。此类组合物包含有效量的抗体和可接受的载体。

[0206] 在一个具体的实施方案中,术语“药学上可接受的”意指由联邦或州政府的管理机构批准的或在美国药典或其他公认的药典中列出的用于动物,更尤其是用于人的。此外,“药学上可接受的载体”通常是无毒的固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、包封材料或任何类型的制剂助剂。

[0207] 术语“载体”是指与治疗剂一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或溶媒。此类药物载体可以是无菌液体,诸如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的液体,诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内施用药物组合物时,水是优选的载体。还可以将盐水溶液和水性右旋糖以及甘油溶液用作液体载体,特别是用于可注射溶液。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果需要,组合物还可以含有少量的润湿剂或乳化剂,或pH缓冲剂,诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐。还可以考虑抗菌剂,诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,诸如乙二胺四乙酸;和调节张力的试剂,诸如氯化钠或葡萄糖。这些组合物可以采用溶液、悬浮液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、粉末、缓释制剂等形式。组合物可用传统的粘合剂和载体(诸如甘油三

酯)制成栓剂。口服制剂可以包括标准载体,诸如药用物级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。合适的药物载体的示例描述于E.W.Martin的Remington's Pharmaceutical Sciences中,其以引入方式并入本文。此类组合物将含有治疗有效量的抗原结合多肽(优选为纯化的形式)以及合适量的载体,以便提供用于适当施用给患者的形式。制剂应适合施用方式。肠胃外制剂可以封装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0208] 在一个实施方案中,根据常规方法将组合物配制成适于静脉内施用于人的药物组合物。通常,用于静脉内施用的组合物是无菌等渗水性缓冲液中的溶液。必要时,组合物还可以包含增溶剂和局部麻醉剂(诸如利多卡因)以减轻注射部位的疼痛。通常,这些成分以单位剂型单独提供或混合在一起提供,例如,以在指示活性剂的量的密封容器(诸如安瓿或小袋)中的冻干粉末或无水浓缩物的形式提供。在通过输注施用组合物的情况下,可以用含有无菌药用级水或盐水的输液瓶分配组合物。在通过注射施用组合物的情况下,可以提供一安瓿的无菌注射用水或盐水,以便在施用前将各成分混合。

[0209] 本公开的化合物可以配制成中性或盐形式。药学上可接受的盐包括与阴离子,诸如源自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的阴离子形成的盐,以及与阳离子,诸如源自钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等阳离子形成的盐。

实施例

实施例1:抗人CD3抗体的产生和检测

[0210] 本实施例描述了使用杂交瘤技术产生抗人CD3单克隆抗体。

[0211] 抗原:人CD3D&CD3E异二聚体蛋白(义翘神州,CT026-H0323H)。

[0212] 免疫:为了产生针对人CD3的单克隆抗体,用CD3D&CD3E异二聚体蛋白免疫Wistar大鼠和SD大鼠。4轮免疫后,将免疫大鼠的血清通过ELISA进行抗体滴度评价。简单地说,将微量滴定板用0.5或1μg/ml的人CD3蛋白的ELISA包被缓冲液包被,100μl/孔,于4℃包被过夜,然后用200μl/孔的5%脱脂牛奶封闭。将来自免疫小鼠的血清稀释液加入各孔中,并于37℃温育1-2小时。将平板用PBS/吐温洗涤,然后与过氧化物酶AffiniPure山羊抗大鼠IgG于37℃温育30分钟。洗涤后,将平板用TMB底物显色,并通过分光光度计在OD 450nm下分析。用人CD3D&CD3E异二聚体蛋白对具有足够抗CD3 IgG滴度的大鼠进行增强免疫。

[0213] 细胞融合:通过电融合进行细胞融合。将融合的细胞接种到50块96孔板中进行各次融合。

[0214] 亚克隆和筛选:通过有限稀释对来自各次融合的阳性原代克隆进行亚克隆,以确保亚克隆源自单个亲代细胞。亚克隆以与原代克隆相同的方法进行筛选,阳性克隆的培养上清液通过亲和力分级进行附加的确认性筛选。

[0215] 选择杂交瘤克隆153A6B1、155A9B1和192A7B9进行进一步分析。153A6B1、155A9B1和192A7B9的可变区的氨基酸序列提供于下表1中,CDR序列总结于表1A中。

表1.抗体可变区序列

名称	序列	SEQ ID NO:
153A6B1 VH	QVQLKESGPGLVQPSQTLSLTCTVSGFSLT**SYNIH**WVRQPPGKG LEWMG**RIRYNGDTSYNSALKS**RLSISRDTSKNQVFLKMSSLQT DDTGTYYCTR**GPYGGSREPLFDY**WGQGVMVTVSS	1
153A6B1 VL	DIKMTQSPSFLSAAVGDRVTINC**KTSQNINKYLN**WFQQKLGAA PKLLIY**TTNNLQT**GIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYFC**L QHGSGYT**FGAGTKLELK	2
155A9B1 VH	QVQLKESGPGLVQPSQTLSLTCTVSGFSLT**SYNVH**WVRQPPGKG LEWMG**RVRYNGDTSYNSALKS**RLSISRDTSKNQAFLKMNSLQI DDTGTYYCTR**GPYGGSSEPLFDY**WGQGVMVTVSS	3
155A9B1 VL	DIKMTQSPSFLSASVGDRVTINC**KASQNINKYLN**WFQQKLGEA PRLLIY**TTNNLQT**GIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYFC**L QHNSGYT**FGAGTKLELK	4
192A7B9 VH	QVQLKESGPGLVQPSQTLSLNCTVSGFSLT**SYNVH**WVRQPPGK GLEWMG**RMRYNGDTSYNSALKS**RLSISRDTSKNQVFLKMNSL QTDDTGTYYCTR**GPRGGYYSALFDY**WGQGVMVTVSS	5
192A7B9 VL	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTINC**KASQNINRYLN**WYQQKLGDA PKVLIS**IANSLQT**GIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYFC**LQ HNSWYT**FGAGTKLELK	6

表1ACDR序列(具有任选突变以避免PTM,Kabat编号)

名称	CDR	序列	SEQ ID NO:
153A6B1 VH	CDR1 CDR2 （具有G55A） （具有S61A） （具有G55A/S61A） CDR3	SYNIH RIRYNGDTSYNSALKS RIRYN**A**DTSYNSALKS RIRYNGDTSYN**A**ALKS RIRYN**A**DTSYN**A**ALKS GPYGGSREPLFDY	7 8 64 65 66 9
153A6B1 VL	CDR1 CDR2 CDR3 （具有S93A）	KTSQNINKYLN TTNNLQT LQHGSGYT LQHG**A**GYT	10 11 12 67
155A9B1 VH	CDR1 CDR2 （具有G55A） （具有S61A） （具有G55A/S61A） CDR3	SYNVH RVRYNGDTSYNSALKS RVRYN**A**DTSYNSALKS RVRYNGDTSYN**A**ALKS RVRYN**A**DTSYN**A**ALKS GPYGGSSEPLFDY	13 14 68 69 70 15
155A9B1 VL	CDR1 CDR2 CDR3 （具有S93A）	KASQNINKYLN TTNNLQT LQHNSGYT LQHN**A**GYT	16 11 17 71
192A7B9 VH	CDR1 CDR2 （具有G55A） （具有S61A） （具有G55A/S61A） CDR3	SYNVH RMRYNGDTSYNSALKS RMRYN**A**DTSYNSALKS RMRYNGDTSYN**A**ALKS RMRYN**A**DTSYN**A**ALKS GPRGGYYSALFDY	13 18 72 73 74 19
192A7B9 VL	CDR1 CDR2 （具有S53A） CDR3 （具有S93A）	KASQNINRYLN IANSLQT IAN**A**LQT LQHNSWYT LQHN**A**WYT	20 21 75 22 76

实施例2:嵌合抗体对CD3抗原的结合活性

ELISA检测

[0216] 为了评价杂交瘤克隆153A6B1、155A9B1和192A7B9的结合活性,对来自这些克隆的嵌合mAb进行ELISA检测。

[0217] 简单地说,将微量滴定板用1μg/ml人、食蟹猴和小鼠CD3蛋白的PBS溶液包被,100μL/孔,于4℃包被过夜,然后用150μL/孔的1% BSA封闭。将153A6B1、155A9B1和192A7B9抗体的三倍稀释液(起始浓度15μg/mL)加入各孔中,并于37℃温育1小时。将平板用PBS/吐温洗涤,然后与抗人IgG(H&L)(山羊)抗体过氧化物酶偶联物于37℃温育30分钟。洗涤后,将平板用TMB底物显色,并通过分光光度计在OD 450nm下分析。如表2所示,153A6B1、155A9B1和192A7B9均与人和食蟹猴CD3结合。被测抗体均不与小鼠CD3结合。SP34(Biointron,B6762)用作基准对照。SP34的序列提供于表2B中。

表2A.153A6B1、155A9B1和192A7B9的跨物种活性

	人(ng/mL)	食蟹猴(ng/mL)	小鼠(ng/mL)
EC50 of 155A9B1	2.148	2.331	NA
EC50of 192A7B9	1.905	2.164	NA
EC50of 153A6B1	2.794	2.880	NA
EC50of SP34	6.484	6.177	NA

[0218] NA:不适用

表2B.SP34单克隆抗体的序列

结构域	序列	SEQ ID NO:
VH	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMY YCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSA ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	78
VL	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGL IGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLW VFGGGTKLTVL GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPV KAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS	79

基于细胞的结合

[0219] 采用FACS评价153A6B1、155A9B1和192A7B9嵌合mAb对人或食蟹猴PBMC的结合活性。SP34(Biointron,B6762)和OKT3(Biointron,B6928)用作基准对照。

[0220] 简单地说,首先将cynoPBMC与3倍连续稀释(起始浓度为10nM)的153A6B1、155A9B1和192A7B9嵌合mAb一起于4℃温育30分钟。而将huPBMC与4倍连续稀释(起始浓度为10nM)的153A6B1、155A9B1和192A7B9嵌合mAb一起于4℃温育30分钟。用PBS洗涤后,将PE山羊抗人IgG Fc二抗(eBioscience™,Invitrogen)加入各孔中,并于4℃温育30分钟。将样品用FACS缓冲液洗涤两次。通过MACSQuant分析仪16评价PE的平均荧光强度(MFI)。如图1的A和图1的B所示,153A6B1、155A9B1和192A7B9与人PBMC和食蟹猴PBMC均结合。

实施例3:CD3嵌合抗体的结合亲和力

[0221] 利用Biacore通过捕获法检测153A6B1、155A9B1和192A7B9抗体与重组CD3D&E蛋白(人CD3-his标签)的结合。使用蛋白A芯片捕获153A6B1、155A9B1和192A7B9 mAb。以30μL/min的流速在捕获的抗体上注射连续稀释的人CD3-His标签蛋白3分钟。使抗原解离120-360秒。所有实验均在Biacore T200上进行。采用Biacore T200评价软件进行数据分析。结果示于表3中。

表3.通过Biacore测量的亲和力

Ab	CD3D&E-His		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
155A9B1	5.719E+4	2.068E-3	3.615E-8
192A7B9	6.967E+4	4.416E-4	6.338E-9
153A6B1	7.986E+4	6.939E-4	8.690E-9
SP34	4.237E+5	2.918E-3	6.888E-9
OKT3	7.347E+5	2.719E-3	3.702E-9

实施例4:CD3嵌合抗体的功能活性

[0222] 本实施例检测了嵌合CD3抗体的功能活性。

CD3嵌合抗体的基于细胞系的功能表征

[0223] 为了评价CD3嵌合抗体激活CD3信号传导途径的能力,使用了商业化的CD3NFAT荧光素酶报告系统。在该测定中,Jurkat-CD3-NFAT用作报告细胞系。Jurkat-CD3-NFAT细胞系经遗传修饰以稳定表达应答元件(Genomeditech#C17940)下游的CD3和荧光素酶。抗体与CD3受体结合后诱导荧光素酶表达。简单地说,将报告细胞以2.5×10^4个/孔的密度在白色96孔板中培养。将抗体连续稀释3倍,并加入白色96孔测定板中,终浓度范围为10nM至0.0005nM。于37℃温育6小时后,通过加入荧光素酶底物获得发光,并用酶标仪测量。用GraphPad软件进行四参数logistic曲线分析。

[0224] 如图2所示,153A6B1、155A9B1和192A7B9抗体与OKT3相比均表现出较弱的CD3NFAT活性,并且192A7B9显示出与SP34相当的CD3 NFAT活性。

实施例5:CD3嵌合抗体诱导的CD8+细胞中的4-1BB表达

[0225] 本实施例检测了嵌合CD3抗体引发的$CD8^+$细胞中的4-1BB诱导。

[0226] 为了评价CD3嵌合抗体诱导4-1BB表达的能力,将人PBMC以1×10^5个/孔的密度在96孔板中培养。将嵌合抗体连续稀释3倍,并加入96孔板中,终浓度范围为10nM至0.0015nM。于37℃温育48小时后,收集人PBMC进行进一步分析。用PBS洗涤后,使用标准程序将样品与下列抗体一起于室温避光温育30分钟进行染色:抗人CD4-APC(Ebiosciene,17-0048-42)、抗人CD8-BV510(BD bioscience,563919)、抗人CD137-PE(BD Pharmingen,555956)。将样品用FACS缓冲液洗涤两次。离心后,弃去上清液,将人PBMC重悬于0.2mL FACS缓冲液中。通过MACSQuant分析仪16评价$CD8^+$T细胞中的$CD137^+CD8^+$T细胞亚群。

[0227] 如图3所示,与SP34和OKT3一样,三种嵌合抗体均表现出强4-1BB诱导活性。

实施例6:CD3抗体的人源化

[0228] 采用153A6B1/155A9B1/192A7B9可变区基因构建人源化mAb。在该方法的第一步,将153A6B1/155A9B1/192A7B9的VH和VK的氨基酸序列与可获得的人Ig基因序列数据库进行比较,以得到总体上最佳匹配的人种系Ig基因序列。

[0229] 对于153A6B1的轻链,VK1-39(012)-JK2是最适合的种系,而对于153A6B1的重链,

选择VH4-59-JH3作为人源化主链。然后设计人源化153A6B1 CDR移植抗体,其中将CDRL1、L2和L3移植到VK1-39(O12)-JK2的框架序列上,并将CDRH1、H2和H3移植到VH4-59-JH3的框架序列上。然后产生3D模型以确定原始小鼠FR区序列中抗体结合和构象必需的氨基酸。基于153A6B1 CDR移植抗体序列,构建了6条附加的人源化重链和3条附加的轻链。

[0230] 对于155A9B1的轻链,VK1-39(O12)-JK2是最适合的种系,而对于155A9B1的重链,选择VH4-59-JH3作为人源化主链。然后设计人源化155A9B1 CDR移植抗体,其中将CDRL1、L2和L3移植到VK1-39(O12)-JK2的框架序列上,并将CDRH1、H2和H3移植到VH4-59-JH3的框架序列上。然后产生3D模型以确定原始小鼠FR区序列中抗体结合和构象必需的氨基酸。基于155A9B1 CDR移植抗体序列,构建了6条附加的人源化重链和3条附加的轻链。

[0231] 对于192A7B9的轻链,VK1-39(O12)-JK2是最适合的种系,而对于192A7B9的重链,选择VH4-59-JH3作为人源化主链。然后设计人源化192A7B9 CDR移植抗体,其中将CDRL1、L2和L3移植到VK1-39(O12)-JK2的框架序列上,并将CDRH1、H2和H3移植到VH4-59-JH3的框架序列上。然后产生3D模型以确定原始小鼠FR区序列中抗体结合和构象必需的氨基酸。基于192A7B9 CDR移植抗体序列,构建了6条附加的人源化重链和4条附加的轻链。

[0232] 用于CDR移植的人种系的序列以及所得人源化序列列于表4-表6中。

表4.153A6B1的人源化

名称	序列	SEQ ID NO:
153A6B1 VH	QVQLKESGPGLVQPSQTLSLTCTVSGFSLTSYNIHWVRQPPGK GLEWMGRIRYNGDTSYNSALKSRLSISRDTSKNQVFLKMSSL QTDDTGTYYCTRGPYGGSREPLFDYWGQGVMVTVSS	1
153A6B1 VH.V0（移植）	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYNIHWIRQPPGKG LEWIGRIRYNGDTSYNSALKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARGPYGGSREPLFDYWGQGTMVTVSS	23
153A6B1 VH.V1	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYNIHW**V**RQPPGKG LEWIGRIRYNGDTSYNSALKSRVTIS**R**DTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARGPYGGSREPLFDYWGQGTMVTVSS	24
153A6B1 VH.V2	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYNIHW**V**RQPPGKG LEW**M**GRIRYNGDTSYNSALKSR**L**TIS**R**DTSKNQFSLKLSSVTA	25

	ADTAVYYCARGPYGGSREPLFDYWGQGTMVTVSS	
153A6B1 VH.V3	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYNIHW**V**RQPPGKG LEW**M**GRIRYNGDTSYNSALKSR**L**TIS**R**DTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYC**T**RGPYGGSREPLFDYWGQGTMVTVSS	26
153A6B1 VH.V4	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG**F**SISSYNIHW**V**RQPPGKG LEW**M**GRIRYNGDTSYNSALKSR**L**TIS**R**DTSKNQ**V**SLKLSSVTA ADTAVYYC**T**RGPYGGSREPLFDYWGQGTMVTVSS	27
153A6B1 VH.V5	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG**F**S**L**TSYNIHW**V**RQPPGK GLEW**M**GRIRYNGDTSYNSALKSR**L**TIS**R**DTSKNQ**V**SLKLSSVT AADTAVYYC**T**RGPYGGSREPLFDYWGQGTMVTVSS	28
VH4-59-JH3 （人种系）	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGK GLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCAR----------WGQGTMVTVSS	29
153A6B1 VK	DIKMTQSPSFLSAAVGDRVTINCKTSQNINKYLNWFQQKLGAA PKLLIYTTNNLQTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYFCL QHGSGYTFGAGTKLELK	2
153A6B1 VK.V0 （移植）	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKTSQNINKYLNWYQQKPGKA PKLLIYTTNNLQTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC LQHGSGYTFGQGTKLEIK	30
153A6B1 VK.V1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKTSQNINKYLNW**F**QQKPGKA PKLLIYTTNNLQTG**I**PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC LQHGSGYTFGQGTKLEIK	31
153A6B1 VK.V2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKTSQNINKYLNW**F**QQKPGKA PKLLIYTTNNLQTG**I**PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY**F**CL QHGSGYTFGQGTKLEIK	32
VK1-39(O12)-JK2 （人种系）	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC-------FGQG TKLEIK	33

表4A.来自153A6B1的人源化抗体

VK / VH	153A6B1 VK.V0	153A6B1 VK.V1	153A6B1 VK.V2
153A6B1 VH.V0	Hu153A6B1-1	Hu153A6B1-7	Hu153A6B1-13
153A6B1 VH.V1	Hu153A6B1-2	Hu153A6B1-8	Hu153A6B1-14
153A6B1 VH.V2	Hu153A6B1-3	Hu153A6B1-9	Hu153A6B1-15
153A6B1 VH.V3	Hu153A6B1-4	Hu153A6B1-10	Hu153A6B1-16
153A6B1 VH.V4	Hu153A6B1-5	Hu153A6B1-11	Hu153A6B1-17
153A6B1 VH.V5	Hu153A6B1-6	Hu153A6B1-12	Hu153A6B1-18

表5.155A9B1的人源化

名称	序列	SEQ ID NO:
155A9B1 VH	QVQLKESGPGLVQPSQTLSLTCTVSGFSLTSYNVHWVRQPP GKGLEWMGRVRYNGDTSYNSALKSRLSISRDTSKNQAFLK MNSLQIDDTGTYYCTRGPYGGSSEPLFDYWGQGVMVTVS S	3
155A9B1 VH-G55A	QVQLKESGPGLVQPSQTLSLTCTVSGFSLTSYNVHWVRQPP	34

（CDR2突变）	GKGLEWMGRVRYNADTSYNSALKSRLSISRDTSKNQAFLK MNSLQIDDTGTYYCTRGPYGGSSEPLFDYWGQGVMVTVS S	
155A9B1 VH-S61A （CDR2突变）	QVQLKESGPGLVQPSQTLSLTCTVSGFSLTSYNVHWVRQPP GKGLEWMGRVRYNGDTSYNAALKSRLSISRDTSKNQAFL KMNSLQIDDTGTYYCTRGPYGGSSEPLFDYWGQGVMVTV SS	35
155A9B1 VH.V0 （移植）	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYNVHWIRQPPG KGLEWIGRVRYNGDTSYNSALKSRVTISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCARGPYGGSSEPLFDYWGQGTMVTVSS	36
155A9B1 VH.V1	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYNVHW**V**RQPP GKGLEWIGRVRYNGDTSYNSALKSRVTIS**R**DTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARGPYGGSSEPLFDYWGQGTMVTVSS	37
155A9B1 VH.V2	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYNVHW**V**RQPP GKGLEW**M**GRVRYNGDTSYNSALKSR**L**TIS**R**DTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCARGPYGGSSEPLFDYWGQGTMVTVSS	38
155A9B1 VH.V3	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYNVHW**V**RQPP GKGLEW**M**GRVRYNGDTSYNSALKSR**L**TIS**R**DTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYC**T**RGPYGGSSEPLFDYWGQGTMVTVSS	39
155A9B1 VH.V4	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG**F**SISSYNVHW**V**RQPP GKGLEW**M**GRVRYNGDTSYNSALKSR**L**TIS**R**DTSKNQ**A**SL KLSSVTAADTAVYYC**T**RGPYGGSSEPLFDYWGQGTMVTVS S	40
155A9B1 VH.V5	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG**F**S**LT**SYNVHW**V**RQPP GKGLEW**M**GRVRYNGDTSYNSALKSR**L**TIS**R**DTSKNQ**A**SL KLSSVTAADTAVYYC**T**RGPYGGSSEPLFDYWGQGTMVTVS S	41
VH4-59-JH3 （人种系）	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPG KGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCAR----------WGQGTMVTVSS	42
155A9B1 VK	DIKMTQSPSFLSASVGDRVTINCKASQNINKYLNWFQQKL GEAPRLLIYTTNNLQTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDV ATYFCLQHNSGYTFGAGTKLELK	4
155A9B1 VK-S93A （CDR3突变）	DIKMTQSPSFLSASVGDRVTINCKASQNINKYLNWFQQKL GEAPRLLIYTTNNLQTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDV ATYFCLQHNAGYTFGAGTKLELK	43
155A9B1 VK.V0 （移植）	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNINKYLNWYQQKP GKAPRLLIYTTNNLQTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCLQHNSGYTFGQGTKLEIK	44
155A9B1 VK.V1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNINKYLNW**F**QQKPG KAPRLLIYTTNNLQTG**I**PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCLQHNSGYTFGQGTKLEIK	45
155A9B1 VK.V2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNINKYLNW**F**QQKPG KAPRLLIYTTNNLQTG**I**PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TY**F**CLQHNSGYTFGQGTKLEIK	46
VK1-39(O12)-JK2 （人种系）	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYC--------FGQG TKLEIK	47

表5A.来自155A9B1的人源化抗体

VK	155A9B1	155A9B1	155A9B1	155A9B1 VK-	155A9B1

VH	VK.V0	VK.V1	VK.V2	s93a	VK
155A9B1 VH.V0	Hu155A9B1-1	Hu155A9B1-7	Hu155A9B1-13		
155A9B1 VH.V1	Hu155A9B1-2	Hu155A9B1-8	Hu155A9B1-14		
155A9B1 VH.V2	Hu155A9B1-3	Hu155A9B1-9	Hu155A9B1-15		
155A9B1 VH.V3	Hu155A9B1-4	Hu155A9B1-10	Hu155A9B1-16		
155A9B1 VH.V4	Hu155A9B1-5	Hu155A9B1-11	Hu155A9B1-17		
155A9B1 VH.V5	Hu155A9B1-6	Hu155A9B1-12	Hu155A9B1-18		
155A9B1 VH-G55A					155A9B1-C1
155A9B1 VH-S61A					155A9B1-C2
155A9B1 VH				155A9B1-C3	155A9B1-C

表6.192A7B9的人源化

名称	序列	SEQ ID NO:
192A7B9 VH	QVQLKESGPGLVQPSQTLSLNCTVSGFSLTSYNVHWVRQPPG KGLEWMGRMRYNGDTSYNSALKSRLSISRDTSKNQVFLKMN SLQTDDTGTYYCTRGPRGGYYSALFDYWGQGVMVTVSS	5
192A7B9 VH-G55A（CDR2 突变）	QVQLKESGPGLVQPSQTLSLNCTVSGFSLTSYNVHWVRQPPG KGLEWMGRMRYNADTSYNSALKSRLSISRDTSKNQVFLKMN SLQTDDTGTYYCTRGPRGGYYSALFDYWGQGVMVTVSS	48
192A7B9 VH-S61A（CDR2 突变）	QVQLKESGPGLVQPSQTLSLNCTVSGFSLTSYNVHWVRQPPG KGLEWMGRMRYNGDTSYNAALKSRLSISRDTSKNQVFLKMN SLQTDDTGTYYCTRGPRGGYYSALFDYWGQGVMVTVSS	49
192A7B9 VH.V0（移植）	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYNVHWIRQPPGKG LEWIGRMRYNGDTSYNSALKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARGPRGGYYSALFDYWGQGTMVTVSS	50
192A7B9 VH.V1	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYNVHW**V**RQPPGK GLEWIGRMRYNGDTSYNSALKSRVTIS**R**DTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARGPRGGYYSALFDYWGQGTMVTVSS	51
192A7B9 VH.V2	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYNVHW**V**RQPPGK GLEW**M**GRMRYNGDTSYNSALKSR**L**TIS**R**DTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCARGPRGGYYSALFDYWGQGTMVTVSS	52
192A7B9 VH.V3	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYNVHW**V**RQPPGK GLEW**M**GRMRYNGDTSYNSALKSR**L**TIS**R**DTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYC**T**RGPRGGYYSALFDYWGQGTMVTVSS	53
192A7B9 VH.V4	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG**F**SISSYNVHW**V**RQPPGK GLEW**M**GRMRYNGDTSYNSALKSR**L**TIS**R**DTSKNQ**V**SLKLSSV TAADTAVYYC**T**RGPRGGYYSALFDYWGQGTMVTVSS	54
192A7B9 VH.V5	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG**F**S**LT**SYNVHW**V**RQPPGK GLEW**M**GRMRYNGDTSYNSALKSR**L**TIS**R**DTSKNQ**V**SLKLSSV TAADTAVYYC**T**RGPRGGYYSALFDYWGQGTMVTVSS	55
VH4-59-JH3（人种系）	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGK GLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCAR----------WGQGTMVTVSS	56
192A7B9 VK	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTINCKASQNINRYLNWYQQKLGD APKVLISIANSLQTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYFC	6

	LQHNSWYTFGAGTKLELK	
192A7B9 VK-S53A（CDR2 突变）	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTINCKASQNINRYLNWYQQKLGD APKVLISIANALQTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYFC LQHNSWYTFGAGTKLELK	57
192A7B9 VK-S93A（CDR3 突变）	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTINCKASQNINRYLNWYQQKLGD APKVLISIANSLQTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYFC LQHNAWYTFGAGTKLELK	58
192A7B9 VK.V0（移植）	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNINRYLNWYQQKPGKA PKLLIYIANSLQTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC LQHNSWYTFGQGTKLEIK	59
192A7B9 VK.V1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNINRYLNWYQQKPGKA PKLLISIANSLQTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCL QHNSWYTFGQGTKLEIK	60
192A7B9 VK.V2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNINRYLNWYQQKPGKA PKLLISIANSLQTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCL QHNSWYTFGQGTKLEIK	61
192A7B9 VK.V3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNINRYLNWYQQKPGKA PKVLISIANSLQTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCL QHNSWYTFGQGTKLEIK	62
VK1-39(O12)-JK2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC-------FGQG TKLEIK	63

表6A.来自192A7B9的人源化抗体

VK VH	192A7B9 VK.V0	192A7B9 VK.V1	192A7B9 VK.V2	192A7B9 VK.V3	192A7B9 VK-s53a	192A7B9 VK-s93a	192A7B9 VK
192A7B9 VH.V0	Hu192A7B9-1	Hu192A7B9-7	Hu192A7B9-13	Hu192A7B9-19			
192A7B9 VH.V1	Hu192A7B9-2	Hu192A7B9-8	Hu192A7B9-14	Hu192A7B9-20			
192A7B9 VH.V2	Hu192A7B9-3	Hu192A7B9-9	Hu192A7B9-15	Hu192A7B9-21			
192A7B9 VH.V3	Hu192A7B9-4	Hu192A7B9-10	Hu192A7B9-16	Hu192A7B9-22			
192A7B9 VH.V4	Hu192A7B9-5	Hu192A7B9-11	Hu192A7B9-17	Hu192A7B9-23			
192A7B9 VH.V5	Hu192A7B9-6	Hu192A7B9-12	Hu192A7B9-18	Hu192A7B9-24			
192A7B9 VH-G55A							192A7B9-C1
192A7B9 VH-S61A							192A7B9-C2
192A7B9 VH					192A7B9-C3	192A7B9-C4	192A7B9-C

[0233] 为了比较CD3人源化抗体与基准SP34的物理和化学性质,通过蛋白A亲和柱从HEK293细胞的瞬时转染上清液纯化所示单克隆抗体的scFv形式。通过SEC-HPLC检测纯度。表6B显示155A9B1-8-scFv hFc单克隆抗体与SP34相比具有更高的纯度和产率。在相同的实验条件下无法表达SP34-scFv hFc抗体。

表6B.比较155A9B1-8和SP34的scFv形式的纯度和产率

	纯度	产率(mg/L)
155A9B1-8-scFv hFc	100%	221
SP34-scFv hFc	不适用	不适用

实施例7:人源化抗体对CD3抗原的结合活性

ELISA检测

[0234] 为了评价人源化抗体的结合活性,对人源化CD3抗体进行ELISA检测。

[0235] 简单地说,将微量滴定板用1μg/ml人CD3蛋白的PBS溶液包被,100μL/孔,于4℃包被过夜,然后用150μL/孔的1％ BSA封闭。将人源化抗体的三倍稀释液(起始浓度:15μg/mL)加入各孔中,并于37℃温育1小时。将平板用PBS/吐温洗涤,然后与抗人IgG(H&L)(山羊)抗体过氧化物酶偶联物于37℃温育30分钟。洗涤后,将平板用TMB底物显色,并通过分光光度计在OD 450nm下分析。如表7所示,人源化CD3抗体以不同的结合效力结合人CD3。

表7.人源化抗体的结合活性

表7A.Hu153A6B1-1-Hu153A6B1-5

Abs	EC50(ng/mL)
153A6B1C8	3.418
Hu153A6B1-1	16.320
Hu153A6B1-2	3.393
Hu153A6B1-3	3.871
Hu153A6B1-4	3.719
Hu153A6B1-5	3.233
人IgG1	NA

表7B.Hu153A6B1-6-Hu153A6B1-11

Abs	EC50(ng/mL)
153A6B1C8	2.910
Hu153A6B1-6	2.992
Hu153A6B1-7	6.782
Hu153A6B1-8	2.953
Hu153A6B1-9	3.351
Hu153A6B1-10	3.436
Hu153A6B1-11	3.048
人IgG1	NA

表7C.Hu153A6B1-12-Hu153A6B1-18

Abs	**EC50（ng/mL）**
153A6B1C8	2.737
Hu153A6B1-12	2.692
Hu153A6B1-13	6.382
Hu153A6B1-14	3.056
Hu153A6B1-15	3.034
Hu153A6B1-16	3.438
Hu153A6B1-17	2.893
Hu153A6B1-18	2.816

表7D.Hu155A9B1-1-Hu155A9B1-5

Abs	EC50(ng/mL)
155A9B1-C	2.699

Hu155A9B1-1	428.400
Hu155A9B1-2	26.420
Hu155A9B1-3	32.170
Hu155A9B1-4	16.410
Hu155A9B1-5	3.265
人IgG1	NA

表7E.Hu155A9B1-6-Hu155A9B1-11

Abs	EC50(ng/mL)
155A9B1-C	2.544
Hu155A9B1-6	4.159
Hu155A9B1-7	136.200
Hu155A9B1-8	5.837
Hu155A9B1-9	6.283
Hu155A9B1-10	6.035
Hu155A9B1-11	3.197
人IgG1	NA

表7F.Hu155A9B1-12-Hu155A9B1-18

Abs	EC50(ng/mL)
155A9B1-C	2.344
Hu155A9B1-12	3.353
Hu155A9B1-13	123.700
Hu155A9B1-14	5.655
Hu155A9B1-15	6.505
Hu155A9B1-16	7.283
Hu155A9B1-17	3.072
Hu155A9B1-18	1.950

表7G.Hu192A7B9-1-Hu192A7B9-5

Abs	EC50(ng/mL)
192A7B9-C	2.853
Hu192A7B9-1	148.400
Hu192A7B9-2	194.000
Hu192A7B9-3	86.200
Hu192A7B9-4	22.820
Hu192A7B9-5	5.517
人IgG1	NA

表7H.Hu192A7B9-6-Hu192A7B9-11

Abs	EC50(ng/mL)
192A7B9-C	2.161
Hu192A7B9-6	8.585

Hu192A7B9-7	22.560
Hu192A7B9-8	6.425
Hu192A7B9-9	5.584
Hu192A7B9-10	5.077
Hu192A7B9-11	7.945
人IgG1	NA

表7I.Hu192A7B9-12-Hu192A7B9-17

Abs	EC50(ng/mL)
192A7B9-C	2.301
Hu192A7B9-12	9.739
Hu192A7B9-13	14.500
Hu192A7B9-14	5.017
Hu192A7B9-15	28.750
Hu192A7B9-16	7.461
Hu192A7B9-17	4.456
人IgG1	NA

表7J.Hu192A7B9-18-Hu192A7B9-24

Abs	EC50(ng/mL)
192A7B9-C	2.534
Hu192A7B9-18	8.831
Hu192A7B9-19	4.981
Hu192A7B9-20	5.153
Hu192A7B9-21	5.461
Hu192A7B9-22	7.116
Hu192A7B9-23	15.77
Hu192A7B9-24	20.15

基于细胞的结合

[0236] 采用FACS评价人源化抗体对人PBMC的结合活性。

[0237] 简单地说,首先将huPBMC细胞与3倍连续稀释的人源化CD3抗体一起于4℃温育30分钟。将PE山羊抗人IgG Fc二抗(eBioscience™,Invitrogen)加入各孔中,并于4℃温育30分钟。将样品用FACS缓冲液洗涤两次。通过MACSQuant分析仪16评价PE的平均荧光强度(MFI)。如图4所示,人源化CD3抗体以多种结合亲和力结合人PBMC。

实施例8:人源化抗体的结合亲和力

[0238] 利用Biacore通过捕获法检测人源化抗体与重组CD3D&E蛋白(人CD3-his标签)的结合。使用蛋白A芯片捕获人源化抗体。以30μL/min的流速在捕获的抗体上注射连续稀释的人CD3-His标签蛋白3分钟。使抗原解离120-360秒。所有实验均在Biacore T200上进行。采用Biacore T200评价软件进行数据分析。结果示于表8中。

表8.通过Biacore测量的亲和力

表8A:153A6B1系列

Abs	CD3d&ε-His		
	ka（1/Ms）	kd（1/s）	KD（M）
153A6B1	7.986E+4	6.939E-4	8.690E-9
Hu153A6B1-1	4.442E+5	3.912E-3	8.808E-9
Hu153A6B1-2	4.020E+5	2.011E-2	5.001E-8
Hu153A6B1-3	4.060E+5	2.414E-2	5.945E-8
Hu153A6B1-4	3.337E+5	1.953E-2	5.850E-8
Hu153A6B1-5	9.132E+4	1.767E-3	1.935E-8
Hu153A6B1-6	8.578E+4	1.810E-3	2.110E-8
Hu153A6B1-7	3.137E+5	1.418E-2	4.519E-8
Hu153A6B1-8	8.084E+5	3.957E-2	4.895E-8
Hu153A6B1-9	5.576E+5	3.440E-2	6.169E-8
Hu153A6B1-10	8.060E+5	5.678E-2	7.045E-8
Hu153A6B1-11	9.303E+4	1.064E-3	1.143E-8
Hu153A6B1-12	7.945E+4	1.072E-3	1.350E-8
Hu153A6B1-13	3.488E+5	1.032E-2	2.959E-8
Hu153A6B1-14	1.024E+6	5.300E-2	5.174E-8
Hu153A6B1-15	1.978E+5	1.508E-2	7.621E-8
Hu153A6B1-16	1.797E+6	1.113E-1	6.190E-8
Hu153A6B1-17	9.545E+4	1.063E-3	1.114E-8
Hu153A6B1-18	8.544E+4	1.069E-3	1.252E-8

表8B:155A9B1系列

Abs	CD3d&ε-His		
	ka（1/Ms）	kd（1/s）	KD（M）
155A9B1	5.719E+4	2.068E-3	3.615E-8
Hu155A9B1-1	1.093E+5	4.413E-3	4.038E-8
Hu155A9B1-2	4.446E+5	7.037E-3	1.583E-8
Hu155A9B1-3	3.700E+5	6.667E-3	1.802E-8
Hu155A9B1-4	4.091E+5	6.477E-3	1.583E-8
Hu155A9B1-5	1.036E+5	6.367E-3	6.144E-8
Hu155A9B1-6	9.543E+4	5.926E-3	6.210E-8
Hu155A9B1-7	4.065E+5	5.474E-3	1.347E-8
Hu155A9B1-8	2.261E+5	1.588E-2	7.024E-8
Hu155A9B1-9	2.822E+5	1.553E-2	5.505E-8
Hu155A9B1-10	1.869E+5	1.505E-2	8.054E-8
Hu155A9B1-11	6.929E+4	3.056E-3	4.410E-8
Hu155A9B1-12	5.591E+4	2.863E-3	5.121E-8
Hu155A9B1-13	2.804E+5	3.545E-3	1.264E-8
Hu155A9B1-14	2.362E+5	1.872E-2	7.925E-8
Hu155A9B1-15	2.851E+5	1.524E-2	5.345E-8
Hu155A9B1-16	1.726E+5	1.650E-2	9.559E-8
Hu155A9B1-17	7.040E+4	3.071E-3	4.363E-8
Hu155A9B1-18	5.665E+4	2.910E-3	5.136E-8

表8C:192A7B9系列

Abs	CD3d&ε-His		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
192A7B9	6.967E+4	4.416E-4	6.338E-9
Hu192A7B9-1	/	/	/
Hu192A7B9-2	/	/	/
Hu192A7B9-3	/	/	/
Hu192A7B9-4	/	/	/
Hu192A7B9-5	1.159E+5	1.189E-2	1.026E-7
Hu192A7B9-6	8.490E+4	2.400E-2	2.827E-7
Hu192A7B9-7	1.897E+5	1.510E-2	7.963E-8
Hu192A7B9-8	8.053E+5	4.747E-2	5.894E-8
Hu192A7B9-9	2.199E+5	2.038E-2	9.265E-8
Hu192A7B9-10	1.184E+5	1.445E-2	1.221E-7
Hu192A7B9-11	5.784E+4	4.495E-3	7.772E-8
Hu192A7B9-12	5.455E+4	3.171E-3	5.812E-8
Hu192A7B9-13	2.864E+5	6.307E-3	2.202E-8
Hu192A7B9-14	2.059E+5	1.786E-2	8.671E-8
Hu192A7B9-15	1.812E+5	7.407E-3	4.089E-8
Hu192A7B9-16	9.765E+4	1.429E-2	1.464E-7
Hu192A7B9-17	8.221E+4	5.325E-3	6.478E-8
Hu192A7B9-18	5.651E+4	3.168E-3	5.605E-8
Hu192A7B9-19	1.573E+5	5.433E-3	3.453E-8
Hu192A7B9-20	9.310E+4	5.610E-3	6.026E-8
Hu192A7B9-21	9.060E+4	4.990E-3	5.507E-8
Hu192A7B9-22	8.388E+4	4.617E-3	5.504E-8
Hu192A7B9-23	7.025E+4	8.620E-4	1.227E-8
Hu192A7B9-24	6.447E+4	5.940E-4	9.214E-9

实施例9:人源化抗体诱导的CD3 NFAT活性

[0239] 本实施例检测了人源化CD3抗体的功能活性。

CD3人源化抗体的基于细胞系的功能表征

[0240] 为了评价CD3人源化抗体激活CD3信号传导途径的能力,使用了商业化的CD3NFAT荧光素酶报告系统。在该测定中,Jurkat-CD3-NFAT用作报告细胞系。用CD3下游NFAT应答元件遗传修饰Jurkat-CD3-NFAT细胞系。抗体与CD3受体结合后诱导荧光素酶表达。简单地说,将报告细胞以2.5×10^4个/孔的密度在白色96孔板中培养。将被测抗体连续稀释5倍,并加入白色96孔测定板中,起始终浓度为3μg/mL。于37℃温育6小时后,通过加入荧光素酶底物获得发光,并用酶标仪测量。用GraphPad软件进行四参数logistic曲线分析。

[0241] 如图5所示,人源化CD3抗体显示出多种不同的CD3活性。

实施例10:人源化抗体诱导的4-1BB表达

[0242] 本实施例评价了CD3人源化抗体激活4-1BB表达的能力。

[0243] 简单地说,将人PBMC以1×10^5细胞/孔的密度在96孔板中培养。将被测抗体连续稀释10倍,并加入96孔板中,终浓度范围为20nM至0.0002nM。于37℃温育48小时后,收集人PBMC进行进一步分析。用PBS洗涤后,使用标准程序将样品与下列抗体一起于室温避光温育30分钟进行染色:抗人CD4-APC(Ebiosciene,17-0048-42)、抗人CD8-BV510(BD bioscience,563919)、抗人CD137(4-1BB)-PE(BD Pharmingen,555956)。将样品用FACS缓冲液洗涤两次。离心后,弃去上清液,将人PBMC重悬于0.2mL FACS缓冲液中。通过MACSQuant分

析仪16评价$CD8^+$T细胞中的$CD137^+$(4-1BB$^+$)$CD8^+$T细胞亚群。使用$CD137^+$(4-1BB$^+$)$CD8^+$T细胞占总$CD8^+$T细胞的百分比(%)表示4-1BB诱导率:

$$4\text{-}1BB\text{诱导率}(\%)=\frac{4\text{-}1BB^+CD8^+\text{细胞的数量}}{\text{总 }CD8^+\text{的数量}}\%。$$

[0244] 有趣的是,在NFAT检测中检测为具有微弱应答或无应答的那些人源化抗体(1-4级)可以基于4-1BB诱导活性更明确地分类,并且4-1BB诱导率与CD3 NFAT活性密切相关(图6)。

实施例11:CD3单克隆抗体和多特异性抗体诱导的CD3 NFAT活性

[0245] 为了进一步确定CD3效力,通过在TCR/CD3效应细胞中使用SP34作为参照来测量CD3介导的NFAT活性。使用TCR/CD3效应细胞(NFAT,Promega Cat#J1601)。当受到抗TCR/CD3刺激时,受体介导的信号传导诱导发光(通过NFAT的激活),发光可通过加入Bio-Glo™试剂并使用发光计定量来检测。

CD3单克隆抗体诱导的CD3 NFAT活性

[0246] 简单地说,将TCR/CD3效应细胞以2.5×10^4个/孔的密度在白色96孔板中培养。将CD3人源化抗体连续稀释4倍,并加入白色96孔测定板中,起始终浓度为100nM。于37℃温育6小时后,通过加入荧光素酶底物获得发光,并用酶标仪测量。用GraphPad软件进行四参数logistic曲线分析。

[0247] 如图7和表10所示,人源化CD3抗体显示出多种不同的CD3活性。其中,NFAT应答中最大效应(最高发光读数,Emax)显示不超过SP34的50%的定义为1-4级。NFAT应答中最大效应(最高发光读数,Emax)显示超过SP34的50%的定义为5-9级。表9显示了CD3-NFAT测定中的最高值(Emax)和SP34诱导的相对百分比。

表9.CD3-NFAT测定中指定抗体的Emax及SP34诱导的相对百分比。

	等级	最高值(Emax)	SP34的相对百分比(%)
SP34	-	5856	100.00
IgG	-	208	3.55
Hu153A6B1-1	1-4	1160	19.81
Hu153A6B1-2	1-	2496	42.62
Hu153A6B1-3	1-	2664	45.49
Hu153A6B1-4	1-	2584	44.13
Hu153A6B1-5	5-9	4600	78.55
Hu153A6B1-6	5-9	4208	71.86
Hu153A6B1-7	1-4	1576	26.91
Hu153A6B1-8	5-9	4128	70.49
Hu153A6B1-9	5-9	4312	73.63

	等级	最高值	SP34的相对百分比（%）
SP34	-	5520	100.00
IgG	-	232	4.20
Hu153A6B1-10	5-9	4080	73.91
Hu153A6B1-11	5-9	4472	81.01
Hu153A6B1-12	5-9	4832	87.54
Hu153A6B1-13	1-4	1280	23.19
Hu153A6B1-14	5-9	4136	74.93
Hu153A6B1-15	5-9	4152	75.22
Hu153A6B1-16	5-9	3968	71.88
Hu153A6B1-17	5-9	4264	77.25
Hu153A6B1-18	5-9	4904	88.84

	等级	最高值	SP34的相对百分比（%）
SP34	-	5064	100.00
IgG	-	216	4.27
Hu155A9B1-1	1-4	720	14.22
Hu155A9B1-2	1-4	656	12.95
Hu155A9B1-3	1-4	648	12.80
Hu155A9B1-4	1-4	752	14.85
Hu155A9B1-5	5-9	4048	79.94
Hu155A9B1-6	5-9	4296	84.83
Hu155A9B1-7	1-4	1144	22.59
Hu155A9B1-8	1-4	1328	26.22
Hu155A9B1-9	1-4	1768	34.91

	等级	最高值	SP34的相对百分比（%）
SP34	-	5744	100.00
IgG	-	240	4.18
Hu155A9B1-10	1-4	1376	23.96
Hu155A9B1-11	5-9	4504	78.41
Hu155A9B1-12	5-9	4160	72.42
Hu155A9B1-13	1-4	1056	18.38
Hu155A9B1-14	1-4	1096	19.08
Hu155A9B1-15	1-4	1152	20.06
Hu155A9B1-16	1-4	1240	21.59
Hu155A9B1-17	5-9	4368	76.04
Hu155A9B1-18	5-9	4248	73.96

[0248] 每次测定SP34组的最高值设为100％。使用指定抗体的最高值占SP34的最高值的百分比表示CD3 T细胞激活活性：

$$\text{百分比（%）} = \frac{\text{指定抗体的最高值}}{\text{SP34的最高值}}\%。$$

CD3多特异性抗体诱导的CD3 NFAT活性

[0249] 为了进一步定义CD3活性,产生了CD3多特异性抗体,并且在存在TAA阳性细胞的情况下,在多特异性格式的背景下进一步确定了CD3活性。对于双特异性抗体,将与Fc的N末端融合的scFv形式的抗CD3和与Fc的另一N末端融合的Fab形式的抗Claudin 18.2或GPC3构建成1+1格式的双特异性抗体(图9的A)。对于三特异性抗体,将与重链的N末端融合的scFv形式的抗CD3和与Fc的另一N末端融合的Fab形式的5T4以及与各重链的C末端融合的抗4-1BB构建成三特异性抗体1+1格式(图11的A)。SP34用作参考对照。

[0250] 简单地说,将TCR/CD3效应细胞以2.5×10^4个/孔的密度在白色96孔板中培养。将表达Claudin 18.2(CHO-K1-hCLDN18.2)、5T4(CHO-K1-h5T4和MCF7)或GPC3(HepG2)的靶细胞系以2.5×10^4的密度接种(因此E:T比为1:1)。将被测CD3双特异性或三特异性抗体连续稀释,并加入白色96孔测定板中,起始终浓度为100nM。SP34(Biointron,B6762)用作基准对照。于37℃温育6小时后,通过加入荧光素酶底物获得发光,并用酶标仪测量。用GraphPad软件进行四参数logistic曲线分析。

[0251] 令人惊讶的是,属于1-4级活性的CD3抗体均可基于在上述测定中测量的它们的TAA依赖性T细胞激活活性进一步定义和分类。基于它们的TAA依赖性活性与基准SP34单克隆抗体的比较,将具有强于SP34单克隆抗体的活性的抗CD3抗体定义为3级和4级;而具有不可检测活性的那些抗CD3抗体定义为1级和2级。

[0252] 如图8的A-B所示,具有1级或2级活性的CD3抗体,诸如155-7和155-1,在存在Claudin 18.2的情况下均具有不可检测的CD3激活,而具有2级水平以上的活性的其他抗体与SP34单克隆抗体相比均显示出更强的CD3活性。类似地,如图8的C所示,具有2级以上活性(例如,155-5属于“5-9级活性”,155-14和155-16属于“4级活性”)的被测CD3抗体在存在GPC3表达HepG2细胞的情况下均表现出比SP34单克隆抗体诱导的活性更强的活性,其中这些CD3抗体用GPC3-CD3双特异性抗体构建。同样,当将这些抗CD3抗体构建为5T4×CD3双特异性抗体时,具有2级活性以上(例如,155-8和155-16属于“4级活性”,153-7属于“3级活性”)的被测CD3抗体在5T4高表达细胞系中也均诱导与SP34单克隆抗体相比更显著的CD3激活(图8的D-E)。

[0253] 因此,2级以上的抗体在TAA-CD3双特异性抗体格式中均表现出极好的TAA依赖性CD3活性。3级和4级序列脱颖而出,因为这些序列在CD3单克隆抗体形式的背景下在NFAT应答方面具有微弱的CD3激动活性或没有CD3激动活性,而在TAA-CD3双特异性形式的背景下,当与表达TAA的细胞结合时,具有强效的NFAT应答。同时,3-4级序列诱导的最大效应(测量为Emax)至少大于SP34抗体诱导的最大效应。

实施例12:CD3/claudin 18.2抗人CD3双特异性抗体对人PBMC的结合活性

[0254] 在本实施例中制备以下双特异性分子。将来自155A9B1-8的与N末端融合的scFv形式的抗CD3抗体片段和与重链的另一N末端融合的Fab形式的Claudin 18.2构建为两种不同的双特异性抗体格式A和B(图9的A)。以双特异性抗体155-8A为代表的格式A(也称为“1+1形式”)在N末端包含抗CD3 scFv(右侧),在另一末端包含抗Claudin 18.2Fab(左侧)。在Fc区中使用杵臼取代以减少错配。以双特异性抗体155-8B为代表的格式B(也称为“2+Lc2格式”)包含两个与抗Claudin 18.2Fab的每个轻链可变区的C末端融合的抗CD3scFv。

[0255] 除了包含人源化抗体155-8的scFv的两种双特异性抗体155-8A和155-8B之外,还

制备了第三种双特异性抗体。该参考双特异性抗体Xmab采用1+1格式,并包含来自帕拉莫妥单抗(Plamotamab)(Xencor)的CD3 scFv。

[0256] 使用FACS评价Claudin 18.2/CD3双特异性抗体的不同格式和参考单特异性抗体SP34和155-8对人PBMC的结合活性。

[0257] 简单地说,首先将huPBMC与4倍连续稀释的claudin 18.2/CD3双特异性抗体一起于4℃温育30分钟,起始浓度为100nM。将PE山羊抗人IgG Fc二抗(eBioscience™,Invitrogen)加入各孔中,并于4℃温育30分钟。将样品用FACS缓冲液洗涤两次。通过MACSQuant分析仪16评价PE的平均荧光强度(MFI)。

[0258] 结果示于图9的B中。双特异性抗体155-8A和155-8B对huPBMC的结合活性比参照单特异性抗体以及Xmab弱。

实施例13:CD3/claudin 18.2双特异性抗体诱导的4-1BB表达

[0259] 本实施例测量CD3/claudin 18.2双特异性抗体的不同格式激活4-1BB表达的能力。

[0260] 简单地说,将人PBMC以1×10^5细胞/孔的密度在96孔板中培养。将表达Claudin18.2(CHO-K1-hCLDN18.2)或对照细胞(CHO-K1)的靶细胞系以2.5×10^4的密度接种(因此E:T比为4:1)。FACS分析显示,Claudin 18.2在CHO-K1-hCLDN18.2细胞中的过表达为在CHO-K1细胞中的约九十倍。FACS测定抗体为Ganymed Pharmaceuticals AG研发的IMAB362。然后将被测双特异性抗体连续稀释4倍,并加入96孔板中,终浓度范围为100nM至0.0004nM。于37℃温育48小时后,收集人PBMC进行进一步分析。用PBS洗涤后,使用标准程序将样品与下列抗体一起于室温避光温育30分钟进行染色:抗人CD4-APC(Ebiosciene,17-0048-42)、抗人CD8-BV510(BD Bioscience,563919)、抗人CD137-PE(BD Pharmingen,555956)。将样品用FACS缓冲液洗涤两次。离心后,弃去上清液,将人PBMC重悬于0.2mL FACS缓冲液中。通过MACSQuant分析仪16评价$CD8^+$T细胞中的$CD137^+$(4-1BB$^+$)$CD8^+$T细胞亚群。

[0261] 使用$CD137^+$(4-1BB$^+$)$CD8^+$T细胞占总$CD8^+$T细胞的百分比(%)表示4-1BB诱导率。当使用肿瘤相关抗原(Claudin 18.2)表达细胞时,获得的是TAA依赖性的4-1BB诱导率;在不存在这些TAA表达细胞(而存在CHO-K1细胞)的情况下,获得的是无TAA的4-1BB诱导率。

[0262] 图9的C显示155-8A(1+1格式)比155-8B(2+Lc2格式)诱导更强的应答。同样重要的是,虽然SP34和XmAb在Claudin 18.2$^-$细胞(CHO-K1)和Claudin 18.2$^+$细胞中均表现出强4-1BB激活活性,但155-8A和155-8B在Claudin 18.2$^+$细胞中的活性显然更明显,表明了它们对Claudin 18.2表达的依赖性。

实施例14:Claudin 18.2/4-1BB双特异性抗体诱导的IL-2分泌依赖于CD3

[0263] 本实施例检测了Claudin 18.2/4-1BB双特异性抗体诱导的IL-2分泌是否依赖于CD3。

[0264] 简单地说,将实验分成两组。在第一组中,将平板用CD3抗体(克隆HIT3a)预包被;在第二组中,不使用CD3抗体。然后将人PBMC以1×10^5细胞/孔的密度在96孔板中培养。将表达Claudin 18.2(CHO-K1-hCLDN18.2)或对照细胞(CHO-K1)的靶细胞系以2.5×10^4的密度接种(因此E:T比为4:1)。然后将Claudin 18.2/4-1BB双特异性抗体连续稀释4倍,并加入96孔测定板中,终浓度范围为100nM至0.0061nM。于37℃温育48小时后,收集上清液进行进一步分析。按照制造商的方案,通过TR-FRET测定(Perkin Elmer)测量IL-2。使用Envision检

测Lance信号。获得了来自615nM(通道1)和665nM(通道2)的双发射。通过对LANCE计数作图产生标准曲线(Ch1/Ch2比相对于标准浓度)。数据采用非线性回归以4参数logistic方程进行分析。

[0265] 如图10所示,4-1BB诱导的IL-2分泌确实依赖于CD3激活。

实施例15:三特异性抗体刺激的IL-2分泌

[0266] 本实施例描述了与claudin 18.2、CD3和4-1BB相互作用以增强T细胞激活和肿瘤靶向的三特异性抗体。这种三特异性抗体结合三个靶标:肿瘤细胞上的蛋白claudin 18.2,和T细胞上的蛋白CD3和4-1BB。抗体的靶结合域示于图11的A中。其包括抗TAA/CD3部分的1+1格式,其中两个抗4-1BB纳米抗体与Fc片段的C末端融合。

[0267] 为了评价CD3三特异性抗体激活T细胞的能力,通过LANCE(Perkin Elmer)检测IL-2分泌。简单地说,将人PBMC细胞以1×10^5细胞/孔的密度在96孔板中培养。将表达Claudin 18.2(CHO-K1-hCLDN18.2)或对照细胞(CHO-K1)的靶细胞系以2.5×10^4的密度接种(E:T比为4:1)。将被测三特异性抗体连续稀释4倍,并加入96孔板中,终浓度范围为100nM至0.098nM。于37℃温育48小时后,收集上清液进行进一步分析。按照制造商的方案,通过TR-FRET测定测量IL2。使用Envision检测Lance信号。获得了来自615nM(通道1)和665nM(通道2)的双发射。通过对LANCE计数作图产生标准曲线(Ch1/Ch2比相对于标准浓度)。数据采用非线性回归以4参数logistic方程进行分析。

[0268] 在存在CHO-K1-hCLDN18.2细胞的情况下,人PBMC中的IL-2分泌(图11的B)与CD3 NFAT活性呈正相关。4B级抗体,包括具有微弱CD3激动活性的155-8、155-9和155-14,在CHO-K1对照细胞中诱导有效的细胞因子释放,而不产生非特异性激活。3级抗体(155-2)在不存在Claudin 18.2的情况下具有不可检测的非特异性IL-2激活,尽管在存在Claudin 18.2的情况下IL-2激活不那么明显。因此,4级和3级抗体均表现出优异的安全裕度。

实施例16:三特异性抗体诱导的4-1BB表达

[0269] 本实施例评价了三特异性抗体激活4-1BB表达的能力。

[0270] 简单地说,将人PBMC以1×10^5细胞/孔的密度在96孔板中培养。将表达Claudin18.2(CHO-K1-hCLDN18.2)或对照细胞(CHO-K1)的靶细胞系以2.5×10^4的密度接种(因此E:T比为4:1)。将被测抗体连续稀释4倍,并加入96孔板中,终浓度范围为100nM至0.098nM。于37℃温育48小时后,收集人PBMC进行进一步分析。用PBS洗涤后,使用标准程序将样品与下列抗体一起于室温避光温育30分钟进行染色:抗人CD4-APC(Ebiosciene,17-0048-42)、抗人CD8-BV510(BD Bioscience,563919)、抗人CD137-PE(BD Pharmingen,555956)。将样品用FACS缓冲液洗涤两次。离心后,弃去上清液,将人PBMC重悬于0.2mL FACS缓冲液中。通过MACSQuant分析仪16评价$CD8^+$T细胞中的$CD137^+$($4\text{-}1BB^+$)$CD8^+$T细胞亚群。

[0271] 使用$CD137^+$($4\text{-}1BB^+$)$CD8^+$T细胞占总$CD8^+$T细胞的百分比(%)表示4-1BB诱导率。当使用肿瘤相关抗原(Claudin 18.2)表达细胞时,获得了TAA依赖性的4-1BB诱导率;在不存在这些TAA表达细胞(而存在CHO-K1细胞)的情况下,获得了无TAA的4-1BB诱导率。

[0272] 在存在CHO-K1-hCLDN18.2细胞的情况下,人PBMC $CD8^+$细胞中的4-1BB诱导(图12)与CD3 NFAT活性呈正相关。与图10的B中类似,4B级抗体155-8、155-9和155-14在CHO-K1对照细胞中诱导有效的4-1BB诱导,而不产生非特异性激活。此外,3级抗体(155-2)在不存在Claudin 18.2的情况下具有不可检测的非特异性4-1BB激活,尽管在存在Claudin 18.2的

情况下4-1BB激活不那么明显。同样,4级和3级抗体均表现出优异的安全裕度。

[0273] 基于在无TAA的情况下CD3单位诱导的CD3-NFAT活性(图7的A-D)、TAA-CD3双特异性抗体诱导的TAA依赖性T细胞激活(图8的A-E)和CD3-4-1BB-TAA三特异性抗体导致的TAA依赖性4-1BB诱导(图12)的数据,CD3活性可分为九个类别,如表10所示。

表10.效力分类

类别	测定			153系列	155系列	192系列
	CD3 mAb诱导的CD3-NFAT活性	TAA×CD3 BsAb诱导的TAA依赖性CD3-NFAT活性	TAA×CD3×4-1BB TriAb导致的4-1BB诱导			
5-9级	>50% SP34	>SP34	++++	153-5, 6, 17, 11, 18, 12, 9,8,14, 10, 15, 16	155-11, 17, 18, 12, 5,6	192-22, 21, 17, 23, 18, 12, 11, 20, 19, 24, 6, 5, 16, 10, 15, 9, 14, 8
4级	<=50% SP34	>SP34	+++	153-2, 3, 4	155-8, 9, 10, 14, 15, 16	192-7, 13
3级	<=50% SP34	>SP34	++	153-7, 13, 1	155-2, 3, 4	192-4
2级	<=50% SP34	无应答	+		155-7, 13	
1级	<=50% SP34	无应答	-		155-1	192-1, 2, 3

实施例17:基准双特异性抗体诱导的IL-2分泌和细胞裂解活性

[0274] 为了比较候选抗体与商业化的基准CD3抗体的CD3活性,本实施例将我们的CD3和商业化的基准CD3序列构建为双特异性1+1格式,如图9的A所示。Xencor-BiAb代表从帕拉莫妥单抗(Xencor)获得的CD3序列;Roche-BiAb代表从莫妥珠单抗(Mosunetuzumab)(Roche)获得的CD3序列;Amt-BiAb代表从塔拉妥单抗(Tarlatamab)(Amgen)获得的CD3序列;Amb-BiAb代表从贝林妥欧单抗(Amgen)获得的CD3序列;SP34-BiAb代表从SP34获得的CD3序列。

[0275] 本实施例使用IL-2分泌和细胞裂解活性作为CD3活性的读出,然后评价双特异性CD3抗体对与CHO-K1-hCLDN18.2细胞共培养的人PBMC的IL-2产生和细胞裂解活性的影响。

CD3双特异性抗体诱导的IL-2分泌

[0276] 为了评价CD3双特异性抗体激活T细胞的能力,通过LANCE(Perkin Elmer)检测IL-2分泌。

[0277] 简单地说,将人PBMC以1×10^5细胞/孔的密度在96孔板中培养。将表达Claudin18.2(CHO-K1-hCLDN18.2)或对照细胞(CHO-K1)的靶细胞系以2.5×10^4的密度接种。因此E:T比为4:1。将抗体连续稀释5倍,并加入96孔板中,终浓度范围为100nM至0.032nM。于37℃温育48小时后,收集上清液进行进一步分析。按照制造商的方案,通过TR-FRET测定测量IL2。使用Envision检测Lance信号。获得了来自615nM(通道1)和665nM(通道2)的双发射。通过对LANCE计数作图产生标准曲线(Ch1/Ch2比相对于标准浓度)。数据采用非线性回归以4参数logistic方程进行分析。

CD3双特异性抗体诱导的细胞裂解活性

[0278] 为了评价CD3双特异性抗体激活T细胞的能力,通过细胞毒性检测试剂盒^{PLUS}(Roche)检测从受损细胞的胞液释放的乳酸脱氢酶(LDH)活性。

[0279] 简单的说,通过CD8分离试剂盒(Miltenyi Biotec公司)从人PBMC分离$CD8^+$细胞。$CD8^+$细胞以2×10^5个/孔的密度在96孔板中培养。将表达Claudin 18.2(CHO-K1-hCLDN18.2)或对照细胞(CHO-K1)的靶细胞系以1×10^4的密度接种。因此E:T比为20:1。将抗体连续稀释4倍,并加入96孔测定板中,终浓度范围为10nM至3.81E-05nM。于37℃温育24小时后,收集上清液进行进一步分析。按照制造商的方案检测LDH。使用酶标仪测量样品在492nm处的吸光度。

[0280] 如图13的A所示,在存在CHO-K1-hCLDN18.2细胞的情况下,供试品155-8双特异性抗体显示出比基准双特异性抗体更低的细胞裂解活性,而在存在CHO-K1细胞的情况下,155-8双特异性抗体相比于基准双特异性抗体也引发更少的非特异性细胞裂解活性。

[0281] 而对于IL-2分泌(图13的B),在存在CHO-K1-hCLDN18.2细胞的情况下,被测双特异性抗体均引发与同种型对照相当的IL-2分泌。

实施例18:基准三特异性抗体诱导的IL-2分泌和细胞裂解活性

[0282] 为了比较我们的候选物与商业化的基准CD3抗体的CD3活性,本实施例将我们的CD3和商业化的基准CD3序列构建为三特异性1+1格式,如图11的A所示。Xencor-TriAb代表从帕拉莫妥单抗(Xencor)获得的CD3序列;Roche-TriAb代表从莫妥珠单抗(Roche)获得的CD3序列;Amt-TriAb代表从塔拉妥单抗(Amgen)获得的CD3序列;Amt-TriAb代表从贝林妥欧单抗(Amgen)获得的CD3序列。我们使用IL-2分泌和细胞裂解活性作为CD3活性的读出,然后评价三特异性CD3抗体对与CHO-K1-hCLDN18.2细胞共培养的人外周血单核细胞(PBMC)的IL-2产生和细胞裂解活性的影响。

CD3三特异性抗体诱导的IL-2分泌

[0283] 为了评价CD3三特异性抗体激活T细胞的能力,通过LANCE(Perkin Elmer)检测IL-2分泌。

[0284] 简单地说,将人PBMC以1×10^5细胞/孔的密度在96孔板中培养。将表达Claudin18.2(CHO-K1-hCLDN18.2)或对照细胞(CHO-K1)的靶细胞系以2.5×10^4的密度接种。因此E:T比为4:1。将抗体连续稀释5倍,并加入96孔板中,终浓度范围为100nM至0.032nM。于37℃温育48小时后,收集上清液进行进一步分析。按照制造商的方案,通过TR-FRET测定测量IL2。使用Envision检测Lance信号。获得了来自615nM(通道1)和665nM(通道2)的双发射。通过对LANCE计数作图产生标准曲线(Ch1/Ch2比相对于标准浓度)。数据采用非线性回归以4参数logistic方程进行分析。

CD3三特异性抗体诱导的细胞裂解活性

[0285] 为了评价CD3三特异性抗体激活T细胞的能力,通过细胞毒性检测试剂盒PLUS(Roche)检测从受损细胞的胞液释放的乳酸脱氢酶(LDH)活性。

[0286] 简单地说,将人PBMC以4×10^5细胞/孔的密度在96孔板中培养。将表达Claudin18.2(CHO-K1-hCLDN18.2)的靶细胞系以2×10^4的密度接种。因此E:T比为10:1。将抗体连续稀释5倍,并加入96孔板中,终浓度范围为100nM至0.032nM。于37℃温育48小时后,收集上清液进行进一步分析。按照制造商的方案检测LDH。使用酶标仪测量样品在492nm处的吸光度。

[0287] 如图14的A所示,在存在CHO-K1-hCLDN18.2细胞的情况下,供试品155-8三特异性抗体显示出与使用其他基准CD3序列的三特异性抗体相当的细胞裂解活性,而在存在CHO-

K1细胞的情况下,155-8三特异性抗体引发微弱的脱靶细胞裂解活性,其显著低于其他对照。

[0288] 而对于IL-2分泌(图14的B),在存在CHO-K1-hCLDN18.2细胞的情况下,供试品155-8三特异性抗体与基准三特异性抗体相比诱导更强的人PBMC的IL-2释放。同时,在存在CHO-K1细胞的情况下,155-8三特异性抗体与基准三特异性抗体相比诱导更少的非特异性IL-2分泌。

[0289] 这些结果表明在三特异性抗体的1+1格式中,155-8的CD3活性足以准确启动TAA依赖性T细胞激活。

实施例19:通过三特异性抗体的体内肿瘤治疗

[0290] 本实施例检测了采用155-8以及抗5T4(那普妥莫单抗,Active Biotech)和抗4-1BB元件的三特异性抗体在治疗B16F10-h5T4肿瘤中的功效。

[0291] B16F10是源自肺黑素瘤结节的小鼠黑素瘤细胞系。将B16F10-h5T4细胞注射到CD3/4-1BB人源化小鼠中。当肿瘤大小达到100mm^3时开始治疗。

[0292] 除了基于155-8的三特异性抗体(CTM01-01)外,对照处理包括CTM01-01的两个突变体。突变体之一CTM01-01A在抗4-1BB抗体中包括失活突变,另一突变体CTM01-01B在抗CD3抗体中包括失活突变。

[0293] B16F10肿瘤是公知的PD-1无应答和抗性模型,被广泛认为是最难治疗的肿瘤之一。结果示于图15中。小鼠抗PD-1治疗对该模型无效。使用CTM01-01(靶向CD3、4-1BB和作为TAA的人5T4的野生型三特异性抗体)进行治疗使得肿瘤显著减少。相比之下,使用CTM01-01B进行治疗(其中抗CD3部分失活)的效果并不显著,而使用CTM01-01A进行治疗(其中抗4-1BB部分失活)的仅具有次优的疗效。因此,这些结果证明了抗CD3/4-1BB/h5T4三特异性抗体优越的体内疗效。

***

[0294] 本公开不受所述具体实施方案的范围限制,所述具体实施方案旨在作为本公开的各个方面的单一说明,并且功能上等同的任何组合物或方法都在本公开的范围内。对于本领域技术人员显而易见的是,在不背离本公开的实质或范围的情况下,可对本公开的方法和组合物进行各种修改和变化。因此,本公开旨在覆盖本公开的修改和变化,前提是这些修改和变化在所附权利要求及其等同物的范围内。

[0295] 本说明书中提及的所有出版物和专利申请均通过引用并入本文,其程度如同每个单独的出版物或专利申请被具体且单独地指明通过引用并入本文。

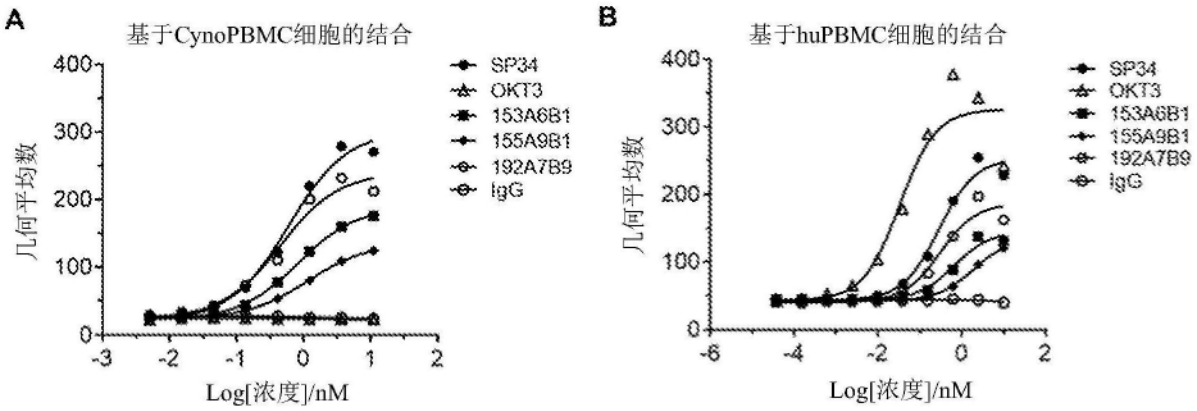
A
基于CynoPBMC细胞的结合
几何平均数
Log[浓度]/nM
SP34
OKT3
153A6B1
155A9B1
192A7B9
IgG
B
基于huPBMC细胞的结合
几何平均数
Log[浓度]/nM
SP34
OKT3
153A6B1
155A9B1
192A7B9
IgG

图1

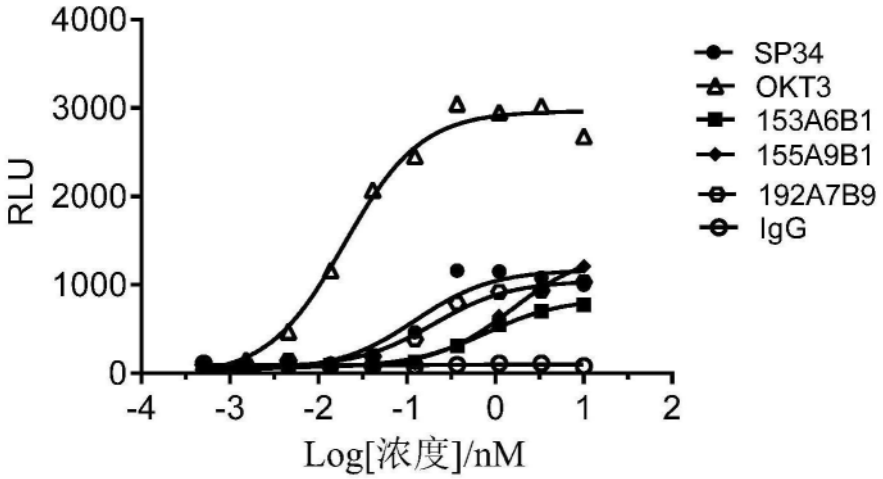
RLU
Log[浓度]/nM
SP34
OKT3
153A6B1
155A9B1
192A7B9
IgG

图2

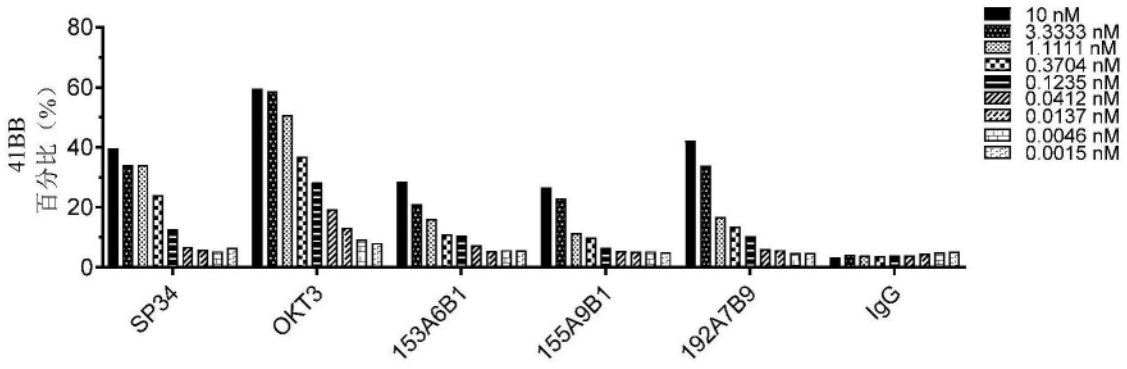
41BB
百分比（%）
SP34
OKT3
153A6B1
155A9B1
192A7B9
IgG
10 nM
3.3333 nM
1.1111 nM
0.3704 nM
0.1235 nM
0.0412 nM
0.0137 nM
0.0046 nM
0.0015 nM

图3

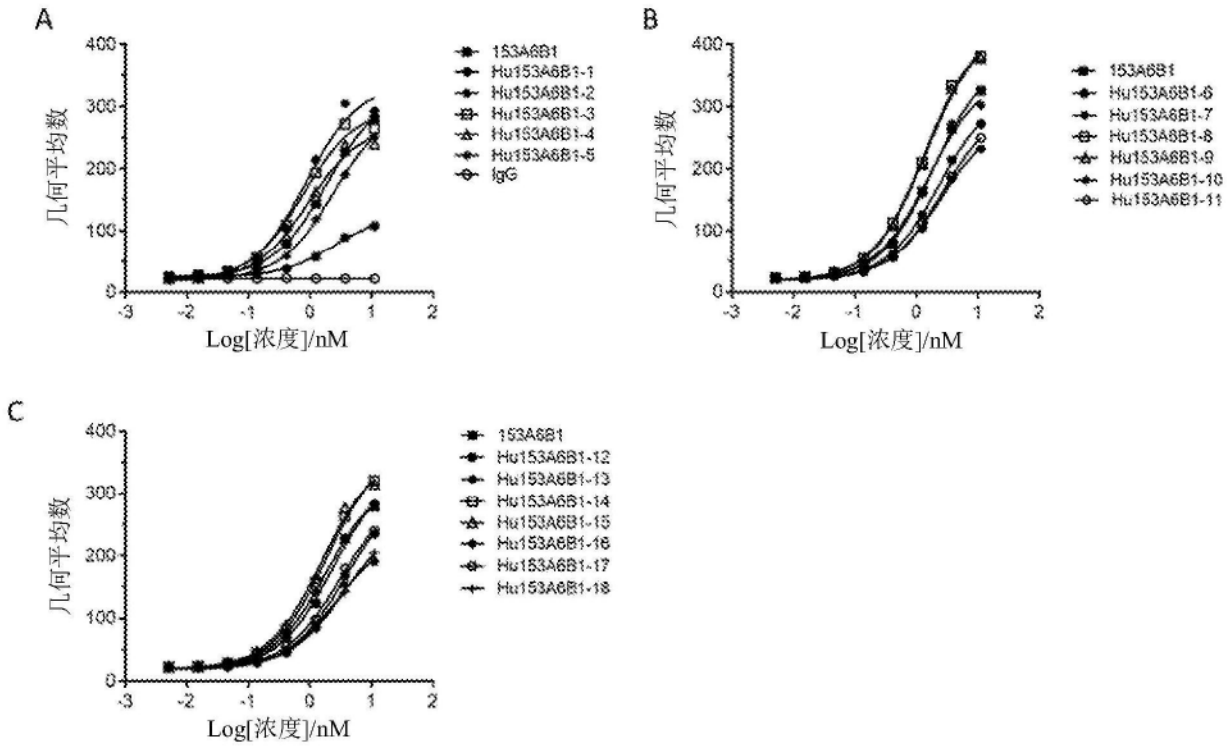
A
几何平均数
Log[浓度]/nM
153A6B1
Hu153A6B1-1
Hu153A6B1-2
Hu153A6B1-3
Hu153A6B1-4
Hu153A6B1-5
IgG
B
几何平均数
Log[浓度]/nM
153A6B1
Hu153A6B1-6
Hu153A6B1-7
Hu153A6B1-8
Hu153A6B1-9
Hu153A6B1-10
Hu153A6B1-11
C
几何平均数
Log[浓度]/nM
153A6B1
Hu153A6B1-12
Hu153A6B1-13
Hu153A6B1-14
Hu153A6B1-15
Hu153A6B1-16
Hu153A6B1-17
Hu153A6B1-18

图4

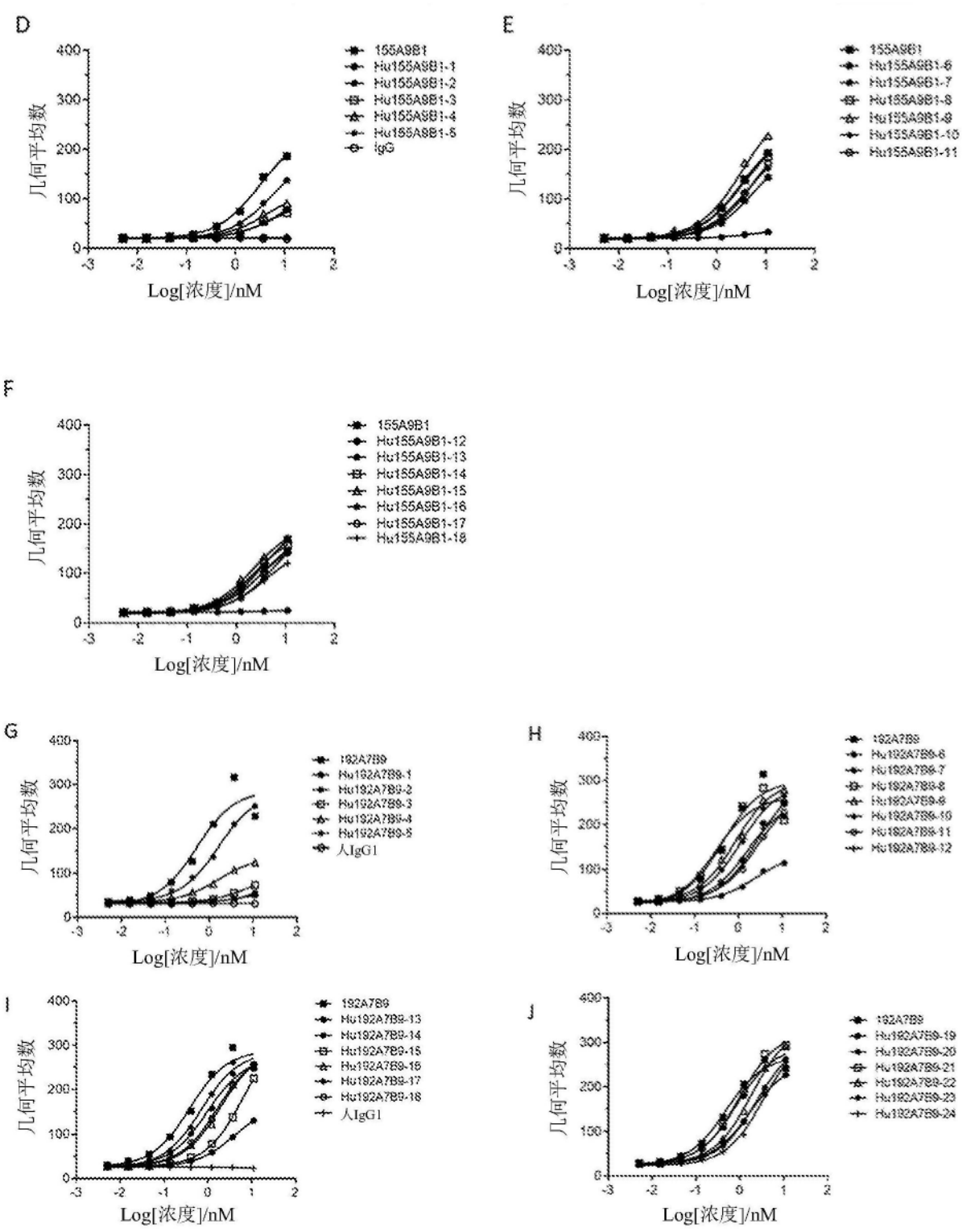
D
几何平均数
Log[浓度]/nM
155A9B1
Hu155A9B1-1
Hu155A9B1-2
Hu155A9B1-3
Hu155A9B1-4
Hu155A9B1-5
IgG
E
几何平均数
Log[浓度]/nM
155A9B1
Hu155A9B1-6
Hu155A9B1-7
Hu155A9B1-8
Hu155A9B1-9
Hu155A9B1-10
Hu155A9B1-11
F
几何平均数
Log[浓度]/nM
155A9B1
Hu155A9B1-12
Hu155A9B1-13
Hu155A9B1-14
Hu155A9B1-15
Hu155A9B1-16
Hu155A9B1-17
Hu155A9B1-18
G
几何平均数
Log[浓度]/nM
192A7B9
Hu192A7B9-1
Hu192A7B9-2
Hu192A7B9-3
Hu192A7B9-4
Hu192A7B9-5
人IgG1
H
几何平均数
Log[浓度]/nM
192A7B9
Hu192A7B9-6
Hu192A7B9-7
Hu192A7B9-8
Hu192A7B9-9
Hu192A7B9-10
Hu192A7B9-11
Hu192A7B9-12
I
几何平均数
Log[浓度]/nM
192A7B9
Hu192A7B9-13
Hu192A7B9-14
Hu192A7B9-15
Hu192A7B9-16
Hu192A7B9-17
Hu192A7B9-18
人IgG1
J
几何平均数
Log[浓度]/nM
192A7B9
Hu192A7B9-19
Hu192A7B9-20
Hu192A7B9-21
Hu192A7B9-22
Hu192A7B9-23
Hu192A7B9-24

图4(续)

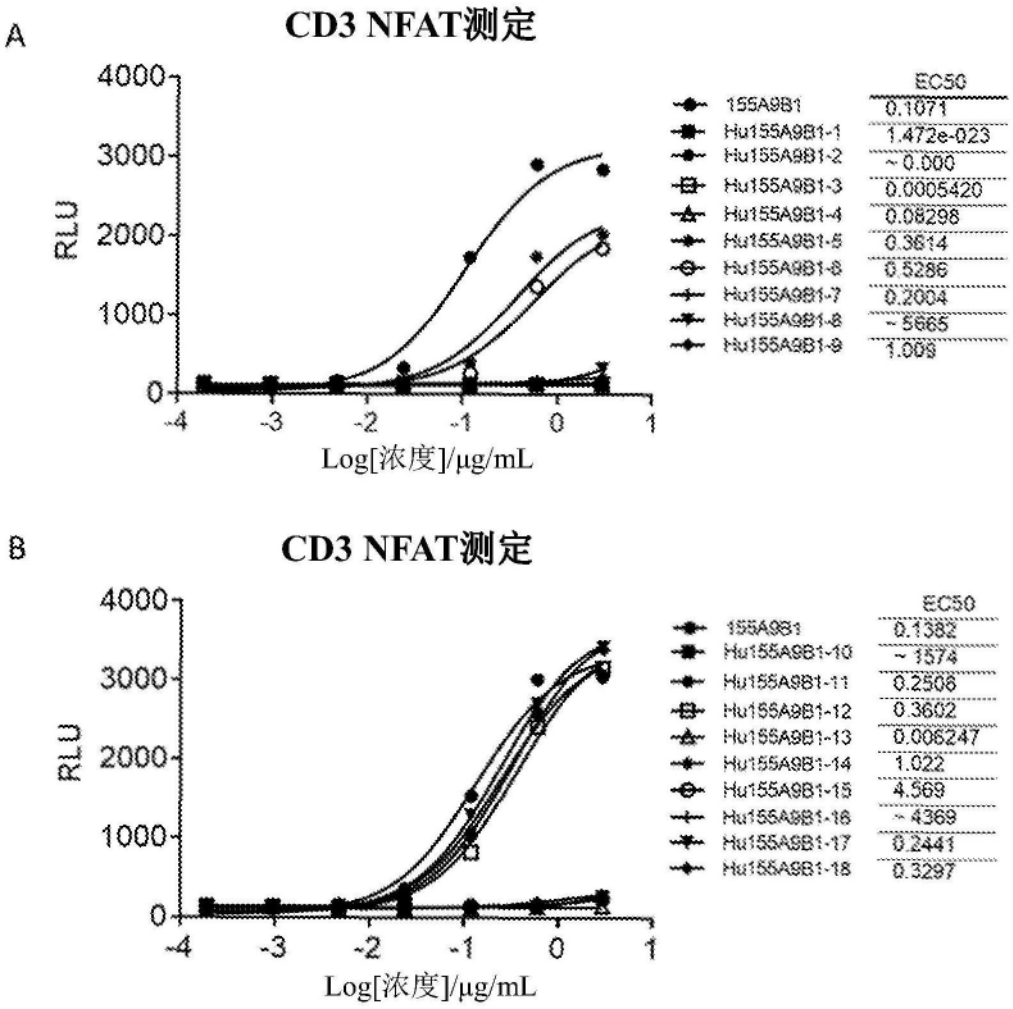
A
CD3 NFAT测定
RLU
Log[浓度]/μg/mL
EC50
155A9B1 0.1071
Hu155A9B1-1 1.472e-023
Hu155A9B1-2 ~0.000
Hu155A9B1-3 0.0005420
Hu155A9B1-4 0.08298
Hu155A9B1-5 0.3614
Hu155A9B1-6 0.5286
Hu155A9B1-7 0.2004
Hu155A9B1-8 ~5665
Hu155A9B1-9 1.009
B
CD3 NFAT测定
RLU
Log[浓度]/μg/mL
EC50
155A9B1 0.1382
Hu155A9B1-10 ~1574
Hu155A9B1-11 0.2506
Hu155A9B1-12 0.3602
Hu155A9B1-13 0.006247
Hu155A9B1-14 1.022
Hu155A9B1-15 4.569
Hu155A9B1-16 ~4369
Hu155A9B1-17 0.2441
Hu155A9B1-18 0.3297

图5

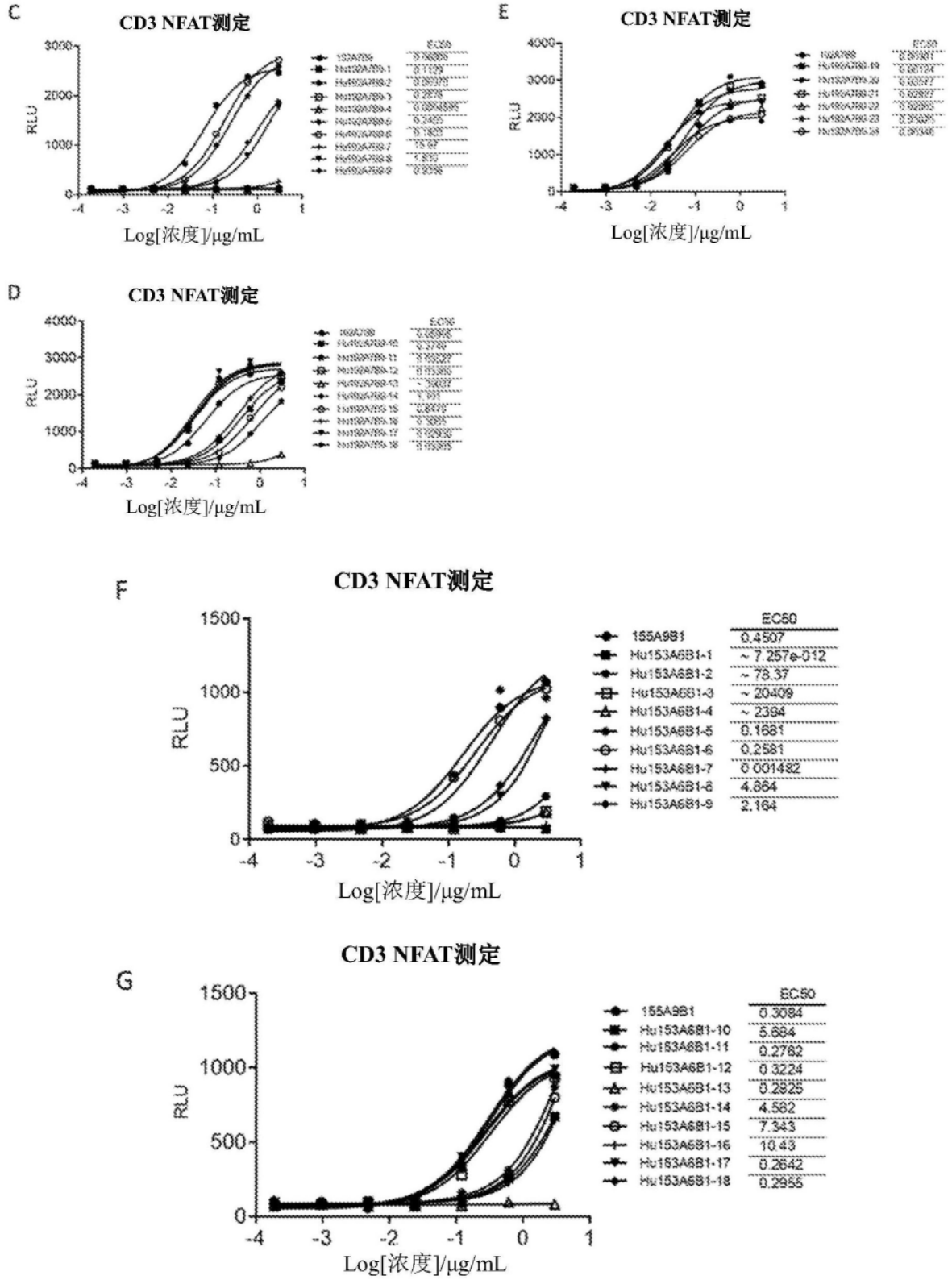
C
CD3 NFAT测定
RLU
Log[浓度]/μg/mL
E
CD3 NFAT测定
RLU
Log[浓度]/μg/mL
D
CD3 NFAT测定
RLU
Log[浓度]/μg/mL
F
CD3 NFAT测定
RLU
Log[浓度]/μg/mL
EC50
155A9B1 0.4507
Hu153A6B1-1 ~ 7.257e-012
Hu153A6B1-2 ~ 78.37
Hu153A6B1-3 ~ 20409
Hu153A6B1-4 ~ 2394
Hu153A6B1-5 0.1681
Hu153A6B1-6 0.2581
Hu153A6B1-7 0.001482
Hu153A6B1-8 4.864
Hu153A6B1-9 2.164
G
CD3 NFAT测定
RLU
Log[浓度]/μg/mL
EC50
155A9B1 0.3084
Hu153A6B1-10 5.684
Hu153A6B1-11 0.2762
Hu153A6B1-12 0.3224
Hu153A6B1-13 0.2825
Hu153A6B1-14 4.582
Hu153A6B1-15 7.343
Hu153A6B1-16 10.43
Hu153A6B1-17 0.2642
Hu153A6B1-18 0.2955

图5(续)

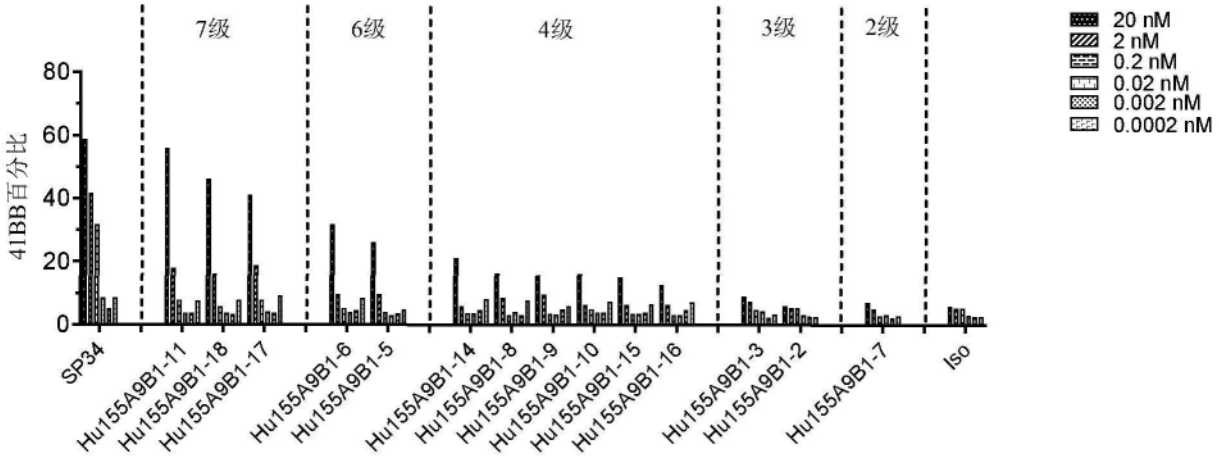
7级
6级
4级
3级
2级
20 nM
2 nM
0.2 nM
0.02 nM
0.002 nM
0.0002 nM
41BB百分比
80
60
40
20
0
SP34
Hu155A9B1-11
Hu155A9B1-18
Hu155A9B1-17
Hu155A9B1-6
Hu155A9B1-5
Hu155A9B1-14
Hu155A9B1-8
Hu155A9B1-9
Hu155A9B1-10
Hu155A9B1-15
Hu155A9B1-16
Hu155A9B1-3
Hu155A9B1-2
Hu155A9B1-7
Iso

图6

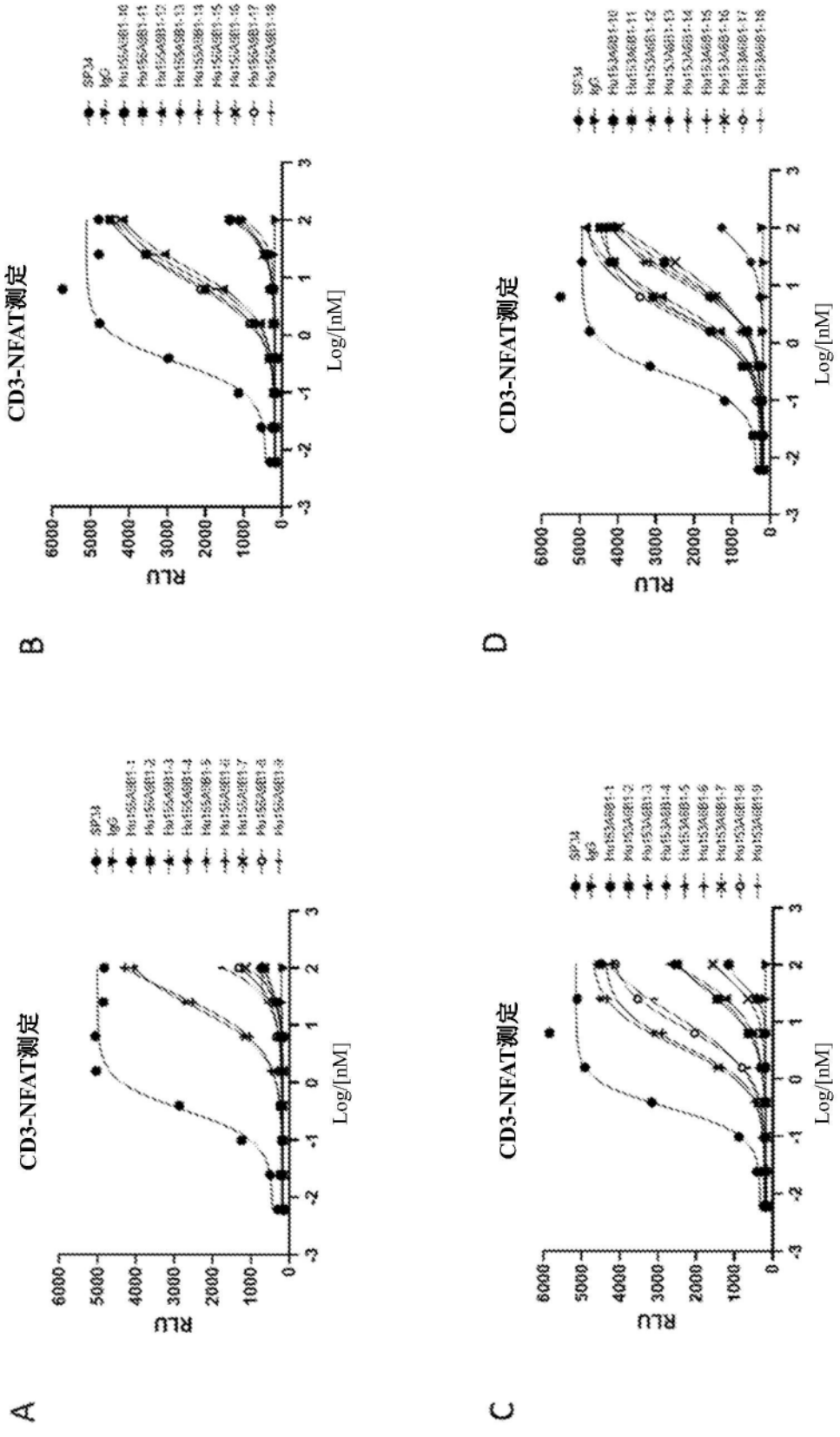
A
CD3-NFAT测定
RLU
Log/[nM]
B
CD3-NFAT测定
RLU
Log/[nM]
C
CD3-NFAT测定
RLU
Log/[nM]
D
CD3-NFAT测定
RLU
Log/[nM]

图7

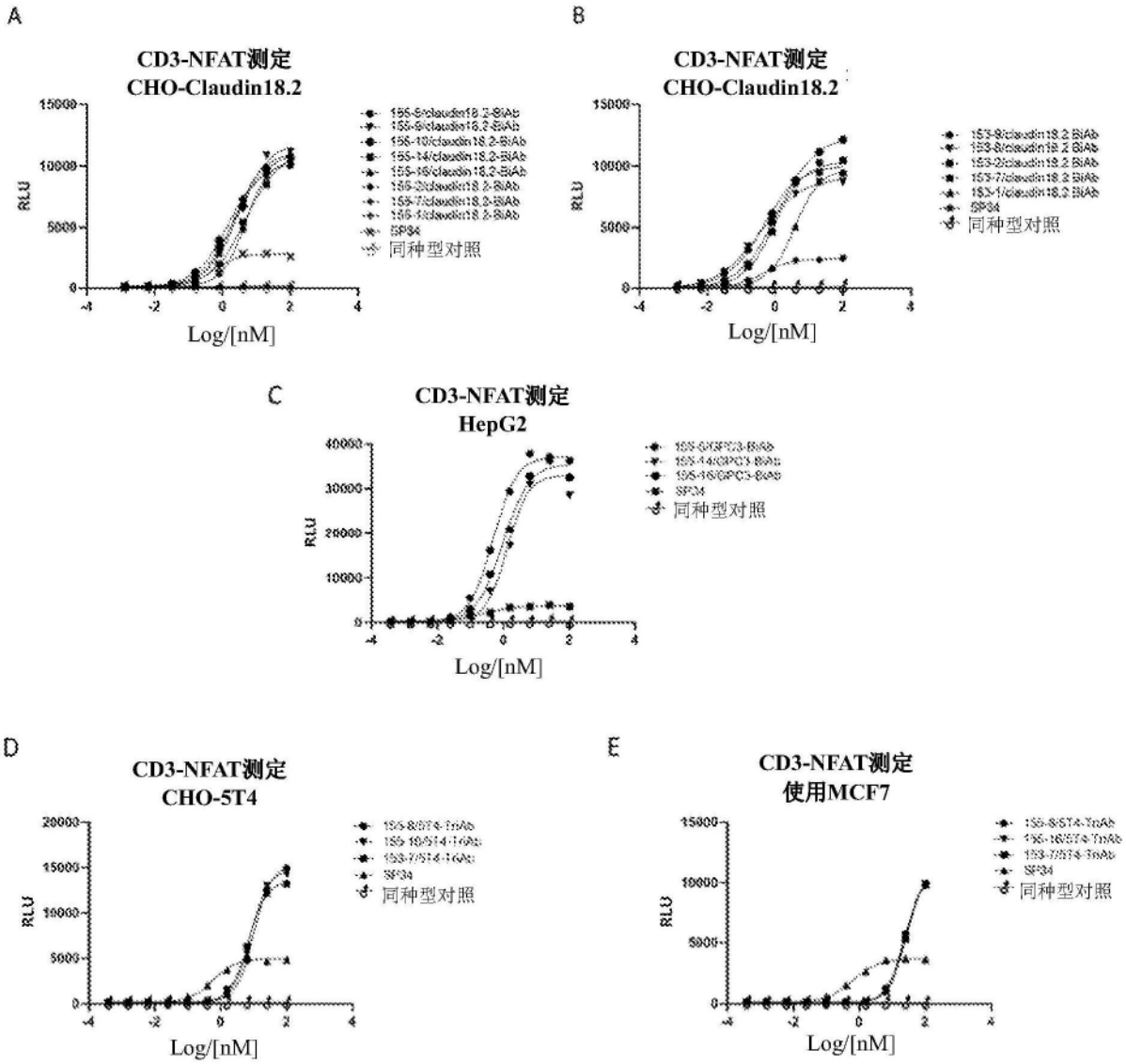
A
CD3-NFAT测定
CHO-Claudin18.2
RLU
Log/[nM]
同种型对照
B
CD3-NFAT测定
CHO-Claudin18.2
RLU
Log/[nM]
同种型对照
C
CD3-NFAT测定
HepG2
RLU
Log/[nM]
同种型对照
D
CD3-NFAT测定
CHO-5T4
RLU
Log/[nM]
同种型对照
E
CD3-NFAT测定
使用MCF7
RLU
Log/[nM]
同种型对照

图8

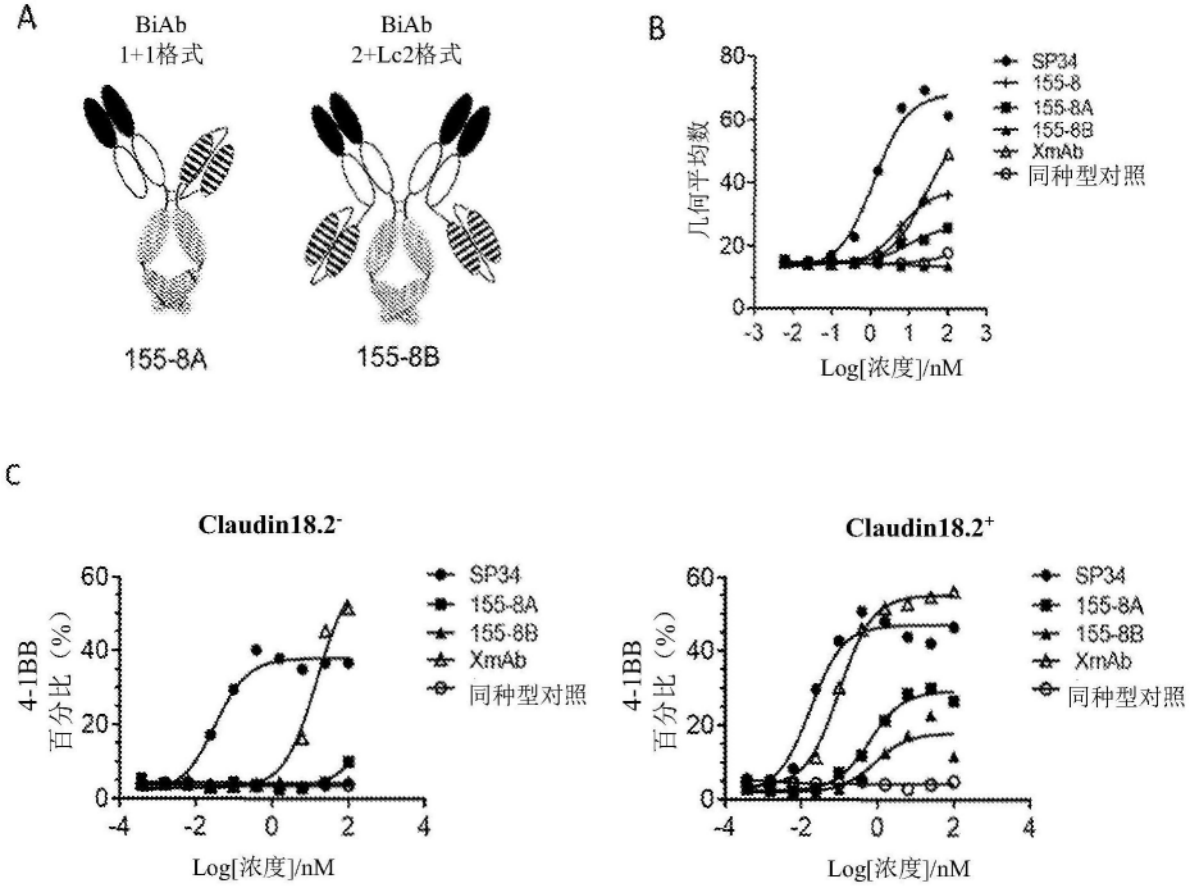
A
BiAb
1+1格式
BiAb
2+Lc2格式
155-8A
155-8B
B
几何平均数
Log[浓度]/nM
SP34
155-8
155-8A
155-8B
XmAb
同种型对照
C
Claudin18.2-
Claudin18.2+
4-1BB
百分比（%）
Log[浓度]/nM
SP34
155-8A
155-8B
XmAb
同种型对照

图9

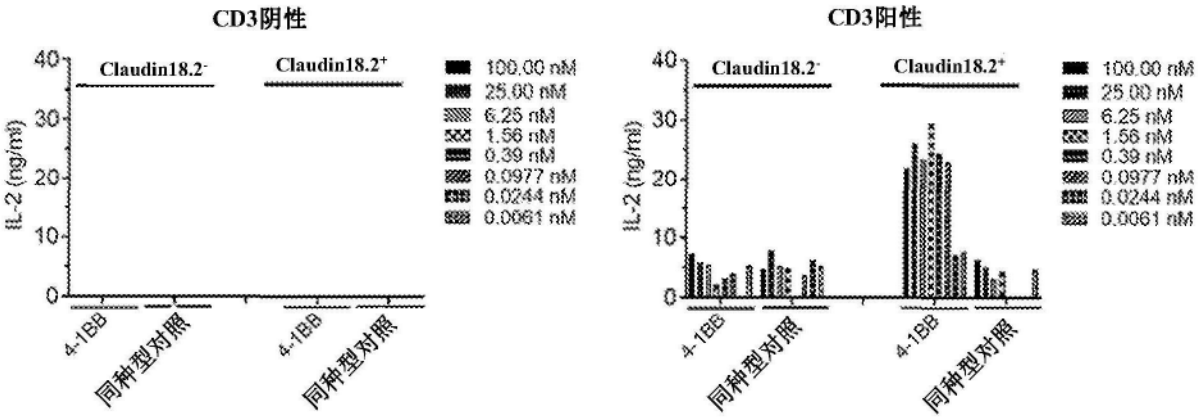
CD3阴性
CD3阳性
Claudin18.2-
Claudin18.2+
IL-2 (ng/ml)
100.00 nM
25.00 nM
6.25 nM
1.56 nM
0.39 nM
0.0977 nM
0.0244 nM
0.0061 nM
4-1BB
同种型对照

图10

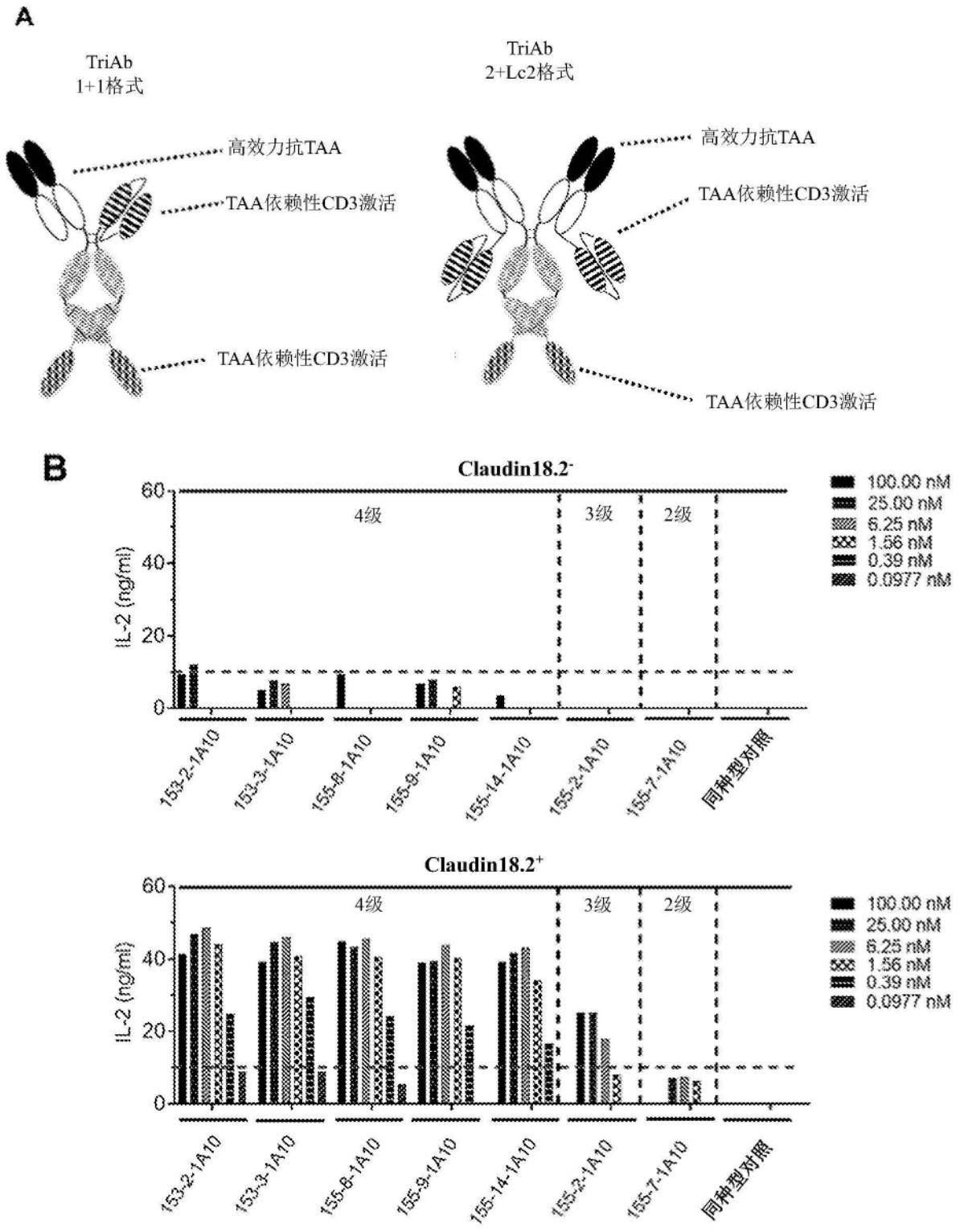
A
TriAb
1+1格式
高效力抗TAA
TAA依赖性CD3激活
TAA依赖性CD3激活
TriAb
2+Lc2格式
高效力抗TAA
TAA依赖性CD3激活
TAA依赖性CD3激活
B
Claudin18.2-
IL-2 (ng/ml)
60
40
20
0
4级
3级
2级
100.00 nM
25.00 nM
6.25 nM
1.56 nM
0.39 nM
0.0977 nM
153-2-1A10
153-3-1A10
155-8-1A10
155-9-1A10
155-14-1A10
155-2-1A10
155-7-1A10
同种型对照
Claudin18.2+
IL-2 (ng/ml)
60
40
20
0
4级
3级
2级
100.00 nM
25.00 nM
6.25 nM
1.56 nM
0.39 nM
0.0977 nM
153-2-1A10
153-3-1A10
155-8-1A10
155-9-1A10
155-14-1A10
155-2-1A10
155-7-1A10
同种型对照

图11

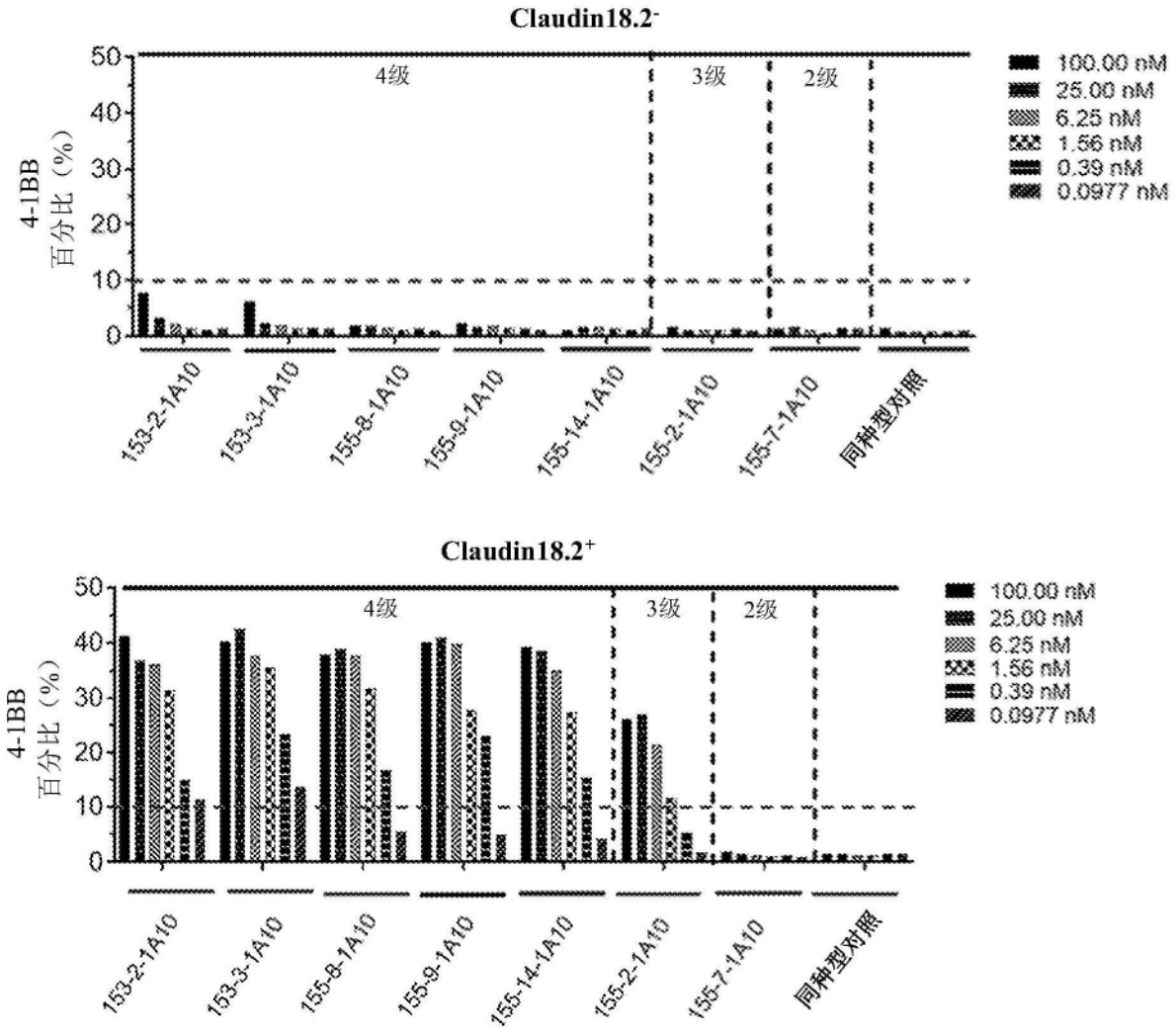
Claudin18.2-
4-1BB 百分比（%）
4级
3级
2级
100.00 nM
25.00 nM
6.25 nM
1.56 nM
0.39 nM
0.0977 nM
153-2-1A10
153-3-1A10
155-8-1A10
155-9-1A10
155-14-1A10
155-2-1A10
155-7-1A10
同种型对照
Claudin18.2+
4-1BB 百分比（%）
4级
3级
2级
100.00 nM
25.00 nM
6.25 nM
1.56 nM
0.39 nM
0.0977 nM
153-2-1A10
153-3-1A10
155-8-1A10
155-9-1A10
155-14-1A10
155-2-1A10
155-7-1A10
同种型对照

图12

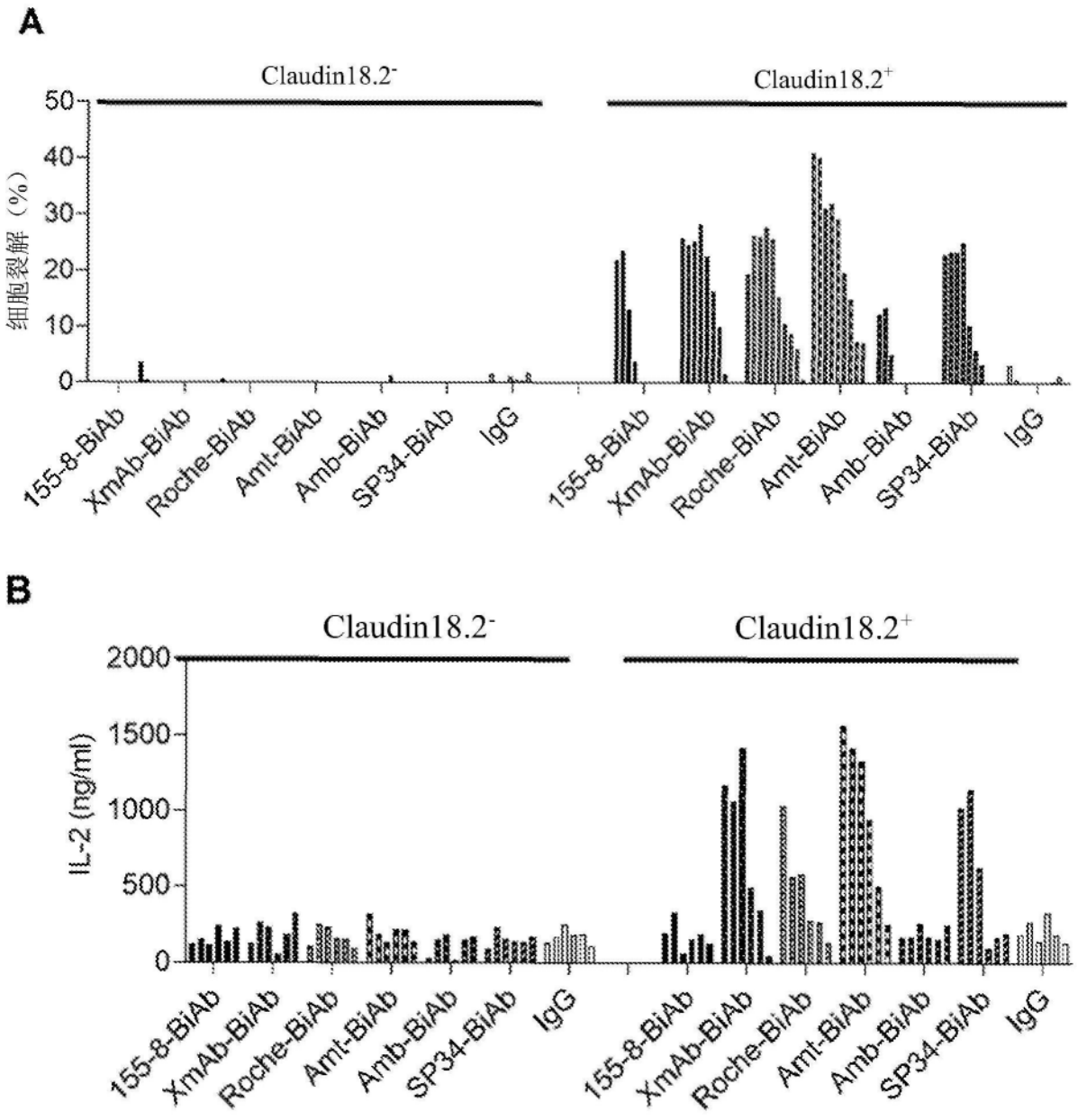
A
Claudin18.2-
Claudin18.2+
细胞裂解（%）
50
40
30
20
10
0
155-8-BiAb
XmAb-BiAb
Roche-BiAb
Amt-BiAb
Amb-BiAb
SP34-BiAb
IgG
B
Claudin18.2-
Claudin18.2+
IL-2 (ng/ml)
2000
1500
1000
500
0

图13

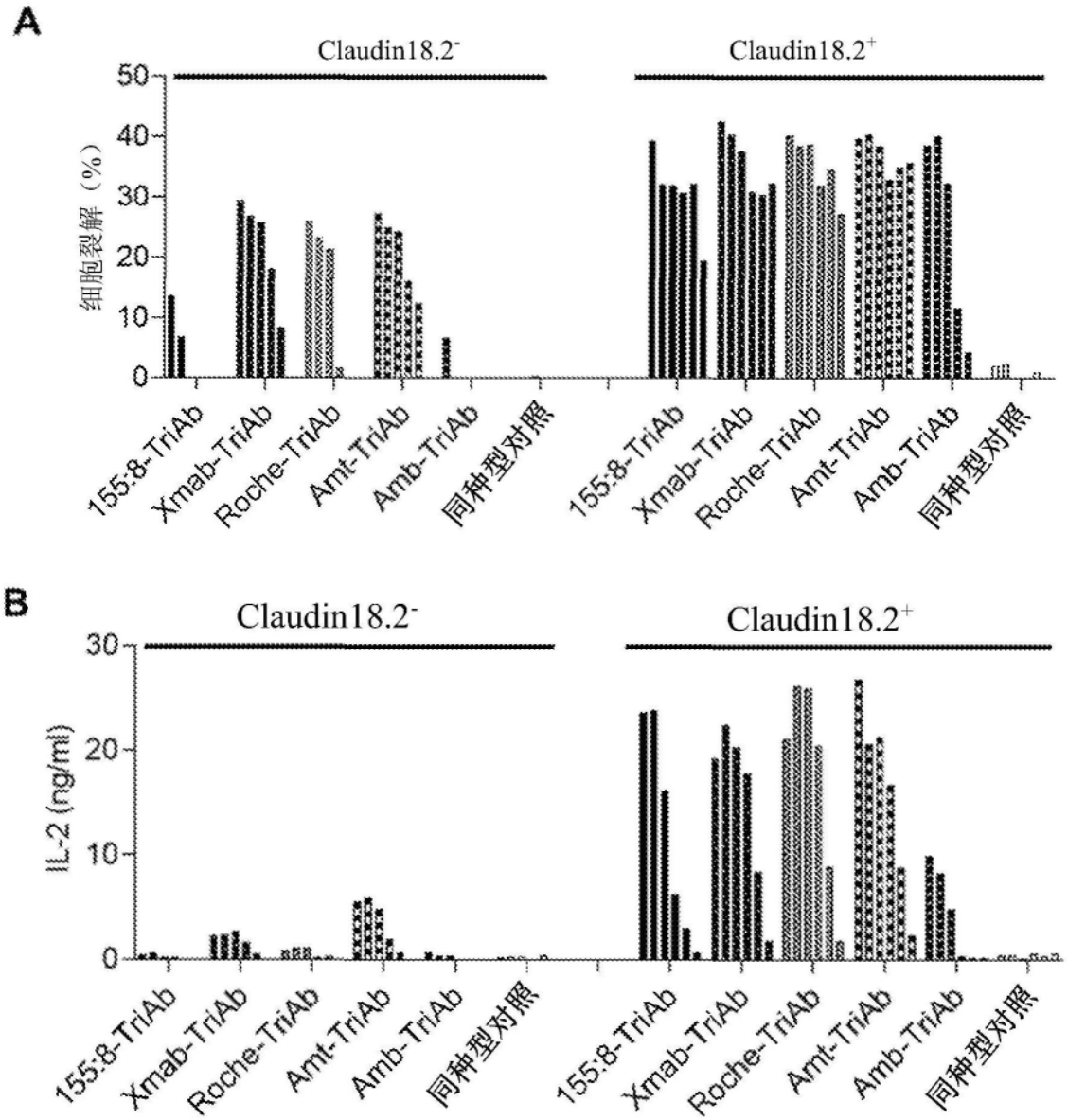
A
Claudin18.2-
Claudin18.2+
细胞裂解（%）
50
40
30
20
10
0
155:8-TriAb
Xmab-TriAb
Roche-TriAb
Amt-TriAb
Amb-TriAb
同种型对照
B
Claudin18.2-
Claudin18.2+
IL-2 (ng/ml)
30
20
10
0
155:8-TriAb
Xmab-TriAb
Roche-TriAb
Amt-TriAb
Amb-TriAb
同种型对照

图14

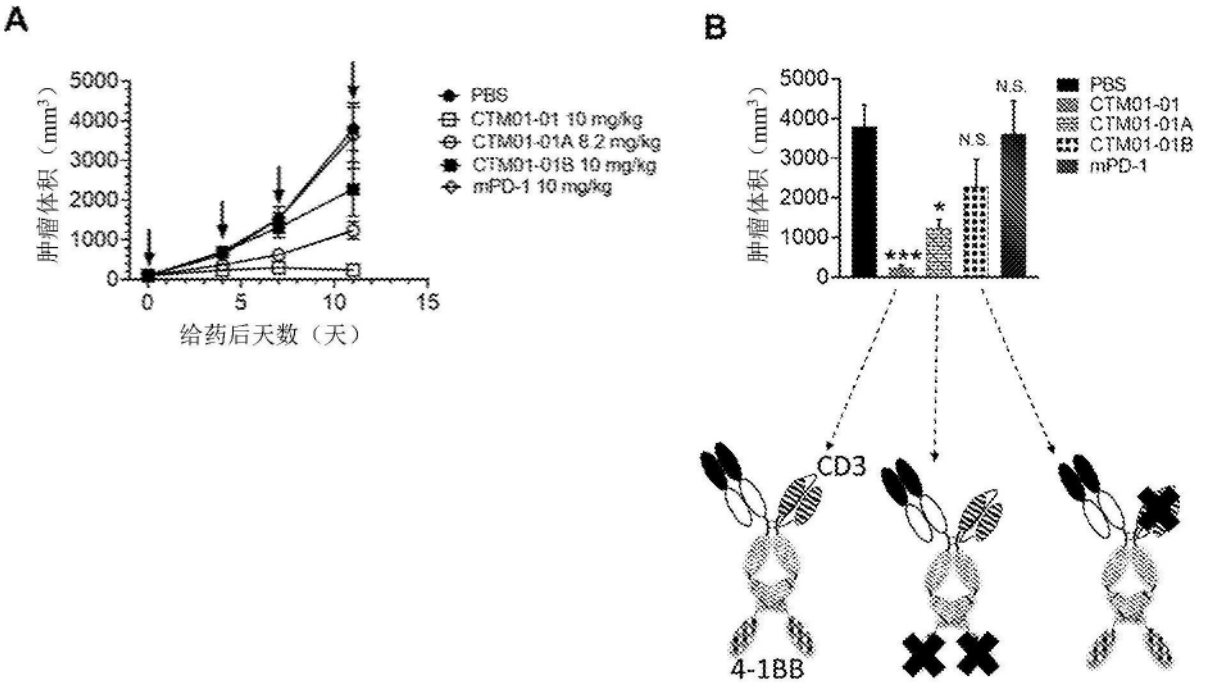
A
肿瘤体积（mm³）
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
给药后天数（天）
PBS
CTM01-01 10 mg/kg
CTM01-01A 6.2 mg/kg
CTM01-01B 10 mg/kg
mPD-1 10 mg/kg
B
肿瘤体积（mm³）
5000
4000
3000
2000
1000
0
***
*
N.S.
N.S.
PBS
CTM01-01
CTM01-01A
CTM01-01B
mPD-1
CD3
4-1BB

图15