



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 109843325 B

(45) 授权公告日 2023.10.03

(21) 申请号 201780062822.4

(22) 申请日 2017.06.20

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109843325 A

(43) 申请公布日 2019.06.04

(30) 优先权数据

62/394,360 2016.09.14 US

62/491,908 2017.04.28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2019.04.11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/038377 2017.06.20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02018/052503 EN 2018.03.22

(73) 专利权人 特尼奥生物股份有限公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 N·特恩克雷恩 W·梵舒腾

S·F·奥德莱德 K·哈里斯

D·帕姆

(54) 发明名称

CD3结合抗体

(57) 摘要

本发明涉及新的人CD3抗原结合多肽以及其制备和在各种疾病的治疗和/或诊断中的用途，并且还涉及能够活化免疫效应细胞的双特异性抗体分子以及其在各种疾病的诊断和/或治疗中的用途。

(24) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038
专利代理人 郑天松

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

(56) 对比文件

CA 2828347 A1, 2012.09.13

CN 101627055 A, 2010.01.13

CN 105384825 A, 2016.03.09

CN 105777906 A, 2016.07.20

US 6037453 A, 2000.03.14

WO 2016128487 A1, 2016.08.18

US 2013273055 A1, 2013.10.17

CN 104114578 A, 2014.10.22

EP 2762496 A1, 2014.08.06

CN 1889979 A, 2007.01.03

US 2015337054 A1, 2015.11.26

(续)

审查员 夏向东

权利要求书4页 说明书24页

序列表13页 附图19页

内部ID	CDR1	CDR2	CDR3
312557	GFTFDYYA	ISWNNGSI	AKDSRGYGYDYLGGAY
308261	GFTFDYYA	ISWNNGSI	AKDSRGYGYDYLGGAY
308159	GFTFDYYA	ISWNNGSI	AKDSRGYGYDYSRGGAY
308160	GFTFDYYA	ISWNNGSI	AKDSRGYGYDYSLLGGAY
308256	GFTFDYYA	ISWNNGSI	AKDSRGYGYDYSLLGGAY
312585	GFTFANYA	ISWNNGSI	AKDSRGYGYDYSRGGAY
312614	GFTFDDYA	ISWNNGSI	AKDSRGYGYDYSRGGAY
312583	GFTFADYA	ISWNNGSI	AKDSRGYGYDYSRGGAY
312586	GFTFNYA	ISWNNGSI	AKDSRGYGYDYSRGGAY
312624	GFTFNYA	ISWNNGSI	AKDSRGYGYDYSRGGAY
312578	GFTFDYYA	ISWNNGSI	AKDSRGYGYDYSRGGAY
312620	GFTFDYYA	ISWNNGSI	AKDSRGYGYDYSRGGAY
312634	GFTFNYA	ISWNNGSI	AKDSRGYGYDYSLLGGAY
312579	GFTFDYYA	ISWNNGSI	AKDSRGYGYDYSRGGAY
312630	GFTFNYA	ISWNNGSI	AKDSRGYGYDYSLLGGAY
312570	GFTFDYYA	ISWNNGSI	AKDSRGYGYDYLGGAY
312567	GFTFDYYA	ISWNNGSI	AKDSRGYGYDYLGGAY
312558	GFTFDYYA	ISWNNGSI	AKDSRGYGYDYLGGAY

图 1A

312325	SEQ ID NO:19	QSVSSN	GAS	QQYNNNWPMT
308902-双价	SEQ ID NO:20	GFTVSSYG	IRGSDGST	AKQGENDGPFDH
308902	SREQ ID NO:21	GFTVSSYG	IRGSDGST	AKQGENDGPFDH

图 1B

304703	SEQ ID NO. 22	GG31SSGGHY	IHYSGST	ARWRHDIFAAFYYYYYYGMDV
--------	---------------	------------	---------	-----------------------

图 1C

[接上页]

(56) 对比文件

刘庆涛等.制备双特异性单克隆抗体的方法.中国畜牧兽医.2007,第34卷49-52.

Danielle M. Turley等.Prospects for Antigen-Specific Tolerance Based Therapies for the Treatment of Multiple Sclerosis.Results Probl Cell Differ..2010,第51卷217-235.

Minh Diem Vu等.A New Class of T-Cell Bispecific Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma, Binding to B Cell Maturation Antigen and CD3 and Showing Potent, Specific Antitumor Activity in Myeloma Cells and Long Duration of Action in Cynomolgus Monkeys.《blood》.2015,第126卷(第23期),2998.

1. 多特异性抗体,其包含:

(i) 对人CD3 δ ϵ 具有结合特异性的第一结合部分,所述第一结合部分包含:

重链可变结构域,其包含:

(A)

CDR1序列,其为GFTFDDYA,

CDR2序列,其为ISWNNGSI,和

CDR3序列,其为AKDSRGYGDYRLGGAY;或

(B)

CDR1序列,其为GFTFHNYA,

CDR2序列,其为ISWNNGSI,和

CDR3序列,其为AKDSRGYGDYSLGGAY;且

轻链可变结构域,其包含:

CDR1序列,其为QSVSSN,

CDR2序列,其为GAS,和

CDR3序列,其为QQYNNWPWT;及

(ii) 第二结合部分,其对肿瘤相关抗原(TAA)或肿瘤特异性抗原(TSA)具有结合特异性。

2. 权利要求1的多特异性抗体,其中所述第一结合部分包含重链可变结构域,所述重链可变结构域包含:

CDR1序列,其为GFTFDDYA,

CDR2序列,其为ISWNNGSI,和

CDR3序列,其为AKDSRGYGDYRLGGAY。

3. 权利要求1的多特异性抗体,其中所述第一结合部分包含重链可变结构域,所述重链可变结构域包含:

CDR1序列,其为GFTFHNYA,

CDR2序列,其为ISWNNGSI,和

CDR3序列,其为AKDSRGYGDYSLGGAY。

4. 权利要求1~3之任一项的多特异性抗体,其中:

所述第一结合部分的重链可变结构域中的CDR1、CDR2和CDR3序列存在于人VH框架中;且

所述第一结合部分的轻链可变结构域中的CDR1、CDR2和CDR3序列存在于人 κ 链可变区(V κ)框架中。

5. 权利要求4的多特异性抗体,其中:

所述第一结合部分的重链可变结构域由SEQ ID NO:1的序列构成;且

所述第一结合部分的轻链可变结构域由SEQ ID NO:19的序列构成。

6. 权利要求4的多特异性抗体,其中:

所述第一结合部分的重链可变结构域由SEQ ID NO:13的序列构成;和

所述第一结合部分的轻链可变结构域由SEQ ID NO:19的序列构成。

7. 权利要求1的多特异性抗体,其中所述第二结合部分包含单个或串联构型的单重链

可变区。

8. 权利要求1的多特异性抗体，其中所述第一结合部分包含轻链多肽亚基和重链多肽亚基，且其中所述第二结合部分包含重链多肽亚基。
9. 权利要求8的多特异性抗体，其中所述第一结合部分的轻链多肽亚基包含轻链恒定结构域。
10. 权利要求8的多特异性抗体，其中所述第一结合部分的重链多肽亚基包含至少一个重链恒定结构域。
11. 权利要求10的多特异性抗体，其中所述第一结合部分的重链多肽亚基包含CH1结构域、CH2结构域和CH3结构域。
12. 权利要求11的多特异性抗体，其中所述第一结合部分的重链多肽亚基包含位于CH1结构域和CH2结构域之间的铰链区。
13. 权利要求8的多特异性抗体，其中所述第二结合部分的重链多肽亚基包含至少一个恒定结构域。
14. 权利要求13的多特异性抗体，其中所述第二结合部分的重链多肽亚基包含CH2结构域和CH3结构域，但不包含CH1结构域。
15. 权利要求13或14的多特异性抗体，其中所述第二结合部分的重链多肽亚基包含位于第二结合部分和CH2结构域之间的铰链区。
16. 权利要求11～15之任一项的多特异性抗体，其中Fc区由下列结构域一起形成：
所述第一结合部分的重链多肽亚基的CH2和CH3结构域，和
所述第二结合部分的重链多肽亚基的CH2和CH3结构域。
17. 权利要求16的多特异性抗体，其中所述Fc区包含天然序列人IgG1 Fc区。
18. 权利要求16的多特异性抗体，其中所述Fc区包含变体人IgG1 Fc区。
19. 权利要求18的多特异性抗体，其中所述变体人IgG1 Fc区已被工程化以降低一种或多种效应子功能。
20. 权利要求16的多特异性抗体，其中所述Fc区包含天然序列人IgG4 Fc区。
21. 权利要求16的多特异性抗体，其中所述Fc区包含变体人IgG4 Fc区。
22. 权利要求21的多特异性抗体，其中所述变体人IgG4 Fc区已被工程化以降低一种或多种效应子功能。
23. 权利要求16～22之任一项的多特异性抗体，其中所述Fc区已被工程化以减少同源二聚体形成。
24. 权利要求1的多特异性抗体，其中所述第二结合部分对于下列抗原具有结合特异性：造血分化抗原、细胞表面分化抗原、生长因子信号传导抗原或细胞外基质抗原。
25. 药物组合物，其包含权利要求1～24之任一项的多特异性抗体。
26. 多核苷酸，其编码权利要求1～24之任一项的多特异性抗体。
27. 载体，其包含权利要求26的多核苷酸。
28. 细胞，其包含权利要求27的载体。
29. 产生权利要求1～24之任一项的多特异性抗体的方法，其包括：
在允许表达多特异性抗体的条件下培养权利要求28的细胞，及

从所述细胞中分离所述多特异性抗体。

30. 权利要求1~24之任一项的多特异性抗体或权利要求25的药物组合物在制备用于治疗有需要的个体的疾病的药物中的用途,其中所述疾病是自身免疫疾病或癌症。

31. 权利要求30的用途,其中所述疾病是自身免疫疾病。

32. 权利要求30的方法,其中所述疾病是癌症。

33. 用于治疗有需要的个体的疾病的试剂盒,其包含:

权利要求1~24之任一项的多特异性抗体或权利要求25的药物组合物,以及使用说明书。

34. 权利要求33的试剂盒,其还包含至少一种另外的试剂。

35. 权利要求34的试剂盒,其中所述至少一种另外的试剂包括化学治疗药物。

36. 双特异性三链抗体样分子,其包含:

第一多肽亚基,其包含:

轻链可变结构域(VL),其由SEQ ID NO:19的序列构成;和

轻链恒定结构域(CL);

第二多肽亚基,其包含:

重链可变结构域(VH),其由下列序列构成:

(i) SEQ ID NO:1的序列;或

(ii) SEQ ID NO:13的序列;和

重链恒定结构域(CH),其包含CH1结构域、铰链区、CH2结构域、CH3结构域;

其中所述轻链可变结构域和重链可变结构域一起形成对人CD3 $\delta\epsilon$ 具有结合特异性的第一结合部分;及

第三多肽亚基,其包含:

单个或串联构型的单重链可变区,其对肿瘤相关抗原(TAA)或肿瘤特异性抗原(TSA)具有结合特异性;和

在不存在CH1结构域的情况下,包含铰链区、CH2结构域和CH3结构域的重链恒定结构域(CH)。

37. 权利要求36的双特异性三链抗体样分子,其中所述第二多肽亚基的重链恒定结构域和所述第三多肽亚基的重链恒定结构域已被工程化以降低一种或多种效应子功能。

38. 权利要求36或37的双特异性三链抗体样分子,其中所述第二多肽亚基的重链恒定结构域和所述第三多肽亚基的重链恒定结构域已被工程化以减少同源二聚体形成。

39. 药物组合物,其包含权利要求36~38之任一项的双特异性三链抗体样分子。

40. 权利要求36~38之任一项的双特异性三链抗体样分子或权利要求39的药物组合物在制备用于治疗有需要的个体的疾病的药物中的用途,其中所述疾病是自身免疫疾病或癌症。

41. 权利要求40的用途,其中所述疾病是自身免疫疾病。

42. 权利要求40的用途,其中所述疾病是癌症。

43. 用于治疗有需要的个体的疾病的试剂盒,其包含:

权利要求36~38之任一项的双特异性三链抗体样分子或权利要求39的药物组合物,和使用说明书。

44. 权利要求43的试剂盒,其还包含至少一种另外的试剂。

45. 权利要求44的试剂盒,其中所述至少一种另外的试剂包括化学治疗药物。

CD3结合抗体

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2016年9月14日提交的美国临时专利申请号62/394,360以及2017年4月28日提交的美国临时专利申请号62/491,908的权益,所述申请以引用的方式整体并入本文。

背景技术

[0003] 身体的免疫系统起到防御感染、损伤和癌症的作用。两种独立但相互关联的系统,体液免疫系统和细胞免疫系统共同作用来保护身体。体液系统由可溶性因子(称为抗体)介导,所述可溶性因子中和被身体识别为外来的产物。相比之下,细胞系统涉及细胞,如T细胞和巨噬细胞,所述细胞除去并中和外来侵入物。

[0004] T细胞的活化对刺激免疫应答至关重要。T细胞表现出免疫特异性并指导大部分细胞免疫应答。尽管T细胞不分泌抗体,但它们是B淋巴细胞分泌抗体所必需的。T细胞活化需要许多细胞表面分子的参与,所述细胞表面分子例如T细胞受体复合物和CD4或CD8分子。抗原特异性T细胞受体(TcR)由具有链 α 和 β (alpha和beta)或 γ 和 δ (gamma和delta)的二硫键连接的异二聚体膜糖蛋白组成。TcR与称为CD3的不变蛋白质的复合物非共价连接。

[0005] 已知T细胞在许多实验环境中发挥有效的抗肿瘤作用。能够有效募集对抗肿瘤细胞的T细胞的抗体已经可作为例如针对肿瘤相关抗原(TAA)和激动性T细胞膜蛋白(如TCR/CD3复合物和CD28)的双特异性抗体获得。这些双特异性抗体能够活化T细胞,而不论其TCR特异性如何,从而导致携带相应TAA的细胞的特异性溶解。

[0006] 然而,虽然抗CD3双特异性抗体可使T细胞介导的溶解重定向朝向恶性细胞,但使用基于CD3的bsAb的临床试验已经显示在患者中的高毒性。来自bsAb的非特异性T细胞活化可由于Fc/Fc受体(FcR)相互作用以抗原非依赖性方式发生,或者当抗原在正常细胞和肿瘤细胞两者上表达时以抗原依赖性方式发生。这两种机制可能是先前临床研究中观察到的毒性的原因。(参见例如,Link等人(1998)Int.J.Cancer 77 (2):251-6;Durben等人Molecular Therapy (2015);23 4,648-655)。由于产生的细胞因子释放综合征,在将这些抗体开发用于治疗目的中一直存在着巨大障碍。

[0007] T细胞受体(TCR)与其肽-MHC配体的相互作用决定T细胞的活性。已经非常详细地研究了这种相互作用的结合特征并显示出控制T细胞功能。TCR-肽/MHC相互作用的强度和性质决定T细胞是发挥效应功能还是失活和缺失。针对CD3的抗体通过改变CD3 ϵ 链的构象而活化T细胞,并且取决于表位可对T细胞具有激动或拮抗作用(Yoon等人,1994Immunity 1:563-569)。鉴于许多T细胞激动剂的显著副作用,可能优选保持有效的抗肿瘤作用,同时减少促炎性细胞因子的释放。然而,部分激动性抗CD3抗体可能次优地改变CD3 ϵ 链,从而导致无效信号传导,并且大多数抗CD3抗体是两种途径的完全激动剂。尚不清楚这些效应功能是否可分开。许多现有的抗CD3抗体(例如SP-34、UCHT1、OKT3)具有在1-50nM KD范围内的亲和力,然而这对于治疗用途可能不是最佳的。

[0008] 本发明提供了CD3特异性抗体和源自所述CD3特异性抗体的双特异性抗体。

[0009] 出版物

[0010] CD3抗体公开于例如美国专利号5,585,097;5,929,212;5,968,509;6,706,265;6,750,325;7,381,803;7,728,114中。具有CD3结合特异性的双特异性抗体公开于例如美国专利号7,262,276;7,635,472;7,862,813;以及8,236,308中,所述专利各自以引用的方式明确地并入本文。

发明内容

[0011] 提供了紧密相关的抗体家族的组合物及其使用方法,所述抗体与CD3结合并活化通过CD3的信号传导,例如活化CD3⁺T细胞。所述抗体家族包含一组如本文所定义的CDR序列。所述抗体家族提供许多有助于用作一种或多种临床治疗剂的益处。所述家族内的抗体包括具有一系列结合亲和力的成员,从而允许选择具有所需亲和力的特定序列。微调亲和力的能力对于管理被治疗个体中CD3活化的水平并且由此降低毒性特别重要。

[0012] 在一些实施方案中,抗CD3抗体对CD3具有在约10⁻⁶左右至约10⁻¹¹左右范围内的亲和力(KD)。可期望具有50nM或更大、100nM或更大、500nM或更大或1μM或更大的亲和力(KD)的抗CD3抗体更接近地模拟TCR/MHC相互作用并使毒性细胞因子释放最小化,同时维持有效的肿瘤细胞溶解。在一些实施方案中,针对在与感受态T细胞结合时诱导细胞因子释放(例如针对IL-2和IFN γ的释放)的倾向降低表征或选择抗CD3抗体。可选择优化肿瘤细胞的杀伤并减少细胞因子释放的抗体用于治疗用途,例如在本文所述的抗体序列家族内的抗体,其诱导的细胞因子释放小于在比较测定中对于家族成员观察到的最大值的约一半,并且可小于例如在比较测定中对于家族成员观察到的最大值的约25%。在一些实施方案中,提供了双特异性或多特异性抗体,所述抗体至少包含来自所述抗体家族的重链可变区并且可包含本文提供的重链和轻链可变区。双特异性抗体至少包含对除CD3以外的蛋白质具有特异性的抗体的重链可变区,并且可包含重链可变区和轻链可变区。在一些此类实施方案中,第二抗体特异性地结合肿瘤相关抗原、靶向抗原(例如整联蛋白等)、病原体抗原、检查点蛋白等。各种形式的双特异性抗体属于本发明的范围,包括但不限于单链多肽、双链多肽、三链多肽、四链多肽及其倍数链多肽。

[0013] 所述CD3特异性抗体各自包含VH结构域,所述VH结构域包含人VH框架中的CDR1、CDR2和CDR3序列。作为一个实例,对于CDR1、CDR2和CDR3,所述家族2CDR序列可分别位于SEQ ID NO:1-18中列出的所提供的示例性可变区序列的约氨基酸残基26-33;51-58;和97-112的区域中。本领域技术人员将理解,如果选择不同的框架序列,则所述CDR序列可处于不同的位置中,尽管通常序列的顺序将保持不变。

[0014] 家族2抗体的CDR序列可具有以下序列式。X表示可变氨基酸,其可以是如下所示的特定氨基酸。

[0015] CDR1

[0016] G₁ F₂ T₃ F₄ X₅ X₆ Y₇ A₈

[0017] 其中:

[0018] X₅可以是任何氨基酸;在一些实施方案中,X₅是D、A或H;在一些实施方案中,X₅是D。

[0019] X₆可以是任何氨基酸;在一些实施方案中,X₆是D或N;在一些实施方案中,D₆是D。

[0020] 在一些实施方案中,家族2抗CD3抗体的CDR1序列包含SEQ ID NO:1-18中任一个中

列出的序列的残基26-33。

[0021] CDR2

[0022] I₁, S₂, W₃, N₄, S₅, G₆, S₇, I₈,

[0023] 在一些实施方案中,家族2抗CD3抗体的CDR2序列包含SEQ ID NO:1-18中任一个中列出的序列的残基51-58。

[0024] CDR3

[0025] A₁, K₂, D₃, S₄, R₅, G₆, Y₇, G₈, X₉, Y₁₀, X₁₁, X₁₂, G₁₃, G₁₂, A₁₅, Y₁₆

[0026] 其中:

[0027] X₉可以是任何氨基酸,在一些实施方案中,X₉是D或S;在一些实施方案中,X₉是D;

[0028] X₁₁可以是任何氨基酸,在一些实施方案中,X₁₁是R或S;

[0029] X₁₂可以是任何氨基酸,在一些实施方案中,X₁₂是L或R。

[0030] 在一些实施方案中,家族2抗CD3抗体的CD3序列具有式A K D S R G Y G D Y X₁₁, X₁₂, G G A Y,其中X₁₁和X₁₂是如上文所定义。在一些实施方案中,家族2抗CD3抗体的CDR3序列包含SEQ ID NO:1-18中任一个中列出的序列的残基97-112。在一些实施方案中,家族2抗体的CD3结合VH结构域与轻链可变区结构域配对。在一些此类实施方案中,所述轻链是固定轻链。

[0031] 在一些实施方案中,所述轻链包含具有人VL框架中的CDR1、CDR2和CDR3序列的VL结构域。所述CDR序列可以是SEQ ID NO:19的那些。在一些实施方案中,对于CDR1、CDR2、CDR3,所述CDR1序列分别包含氨基酸残基27-32;50-52;89-97。

[0032] 在一些实施方案中,本发明的抗体的CDR序列是相对于SEQ ID NO:1-18中的一个CDR序列或一组CDR序列具有至少85%同一性、至少90%同一性、至少95%同一性、至少99%同一性的序列。在一些实施方案中,本发明的CDR序列相对于SEQ ID NO:1-18中任一个中的一个CDR序列或一组CDR序列包含一个、两个、三个或更多个氨基酸取代。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代是相对于上文提供的家族2式,CDR1的位置5或10,CDR2的位置2、6或7,CDR3的位置1、8、9或10中的一个或多个。

[0033] 在一些实施方案中,本发明的双特异性抗体包含与轻链配对的本文所述的CD3结合可变区。在一些实施方案中,所述轻链包含SEQ ID NO:19中列出的可变区序列,或包含SEQ ID NO:19中的一组CDR序列和框架序列的可变区。可使用各种Fc序列,包括但不限于人IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4等。在一些实施方案中,所述双特异性抗体的第二臂包含特异性结合肿瘤相关抗原的可变区。在一些实施方案中,所述双特异性抗体的第二臂包含特异性结合BCMA的可变区。在一些实施方案中,抗BCMA臂是单链可变区,例如如图2B中所示。在一些实施方案中,所述抗BCMA臂包含SEQ ID NO:20中列出的可变区序列;或SEQ ID NO:21中列出的串联可变区序列。所述抗BCMA臂的Fc序列可以是但不限于,人IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4等。所述CDR序列可以是SEQ ID NO:20中包含的那些。在一些实施方案中,对于CDR1、CDR2、CDR3,所述CDR序列分别包含氨基酸残基26-33;51-58;97-108。

[0034] 在其它实施方案中,提供了药物组合物,所述药物组合物至少包含本发明的CD3结合VH结构域,例如至少包含本发明的CD3结合VH结构域的单特异性、双特异性等抗体或抗体样蛋白;以及药学上可接受的赋形剂。所述组合物可冻干、悬浮在溶液等中,并且可以单位剂量制剂提供。

[0035] 在一些实施方案中,提供了一种用于治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的个体施用有效剂量的本发明的单特异性、双特异性等抗体。在抗体为双特异性的情况下,第二抗原结合位点可特异性地结合肿瘤抗原、检查点蛋白等。在各种实施方案中,所述癌症选自由以下组成的组:卵巢癌、乳腺癌、胃肠癌、脑癌、头颈癌、前列腺癌、结肠癌、肺癌、白血病、淋巴瘤、肉瘤、癌、神经细胞肿瘤、鳞状细胞癌、生殖细胞肿瘤、转移、未分化肿瘤、精原细胞瘤、黑素瘤、骨髓瘤、成神经细胞瘤、混合细胞肿瘤以及由传染因子引起的瘤形成。

[0036] 在一些实施方案中,提供了一种用于治疗感染性疾病的方法,所述方法包括向有需要的个体施用有效剂量的本发明的单特异性、双特异性等抗体。在抗体为双特异性的情况下,第二抗原结合位点可特异性地结合病原体抗原,例如细菌、病毒或寄生虫。

[0037] 在其它实施方案中,提供了一种用于产生本发明的双特异性抗体的方法,所述方法包括在单个宿主细胞中表达抗体序列,例如一个或多个轻链编码序列、一个或多个重链编码序列。在各种实施方案中,所述宿主细胞可以是原核细胞或真核细胞,如哺乳动物细胞。

附图说明

[0038] 当结合附图阅读时,从以下详细描述中可最透彻地理解本发明。本专利或申请文件含有至少一幅彩色绘制的附图。在提出请求并支付必要费用后,主管局将提供具有一张或多张彩色附图的本专利或专利申请公布的副本。要强调的是,按照惯例,附图的各种特征不成比例。相反,为清楚起见,各种特征的尺寸任意地放大或缩小。附图中包括以下各图:

[0039] 图1A-1C.图1A示出特异性地结合人CD3的SEQ ID NO:1-18的抗体家族2的成员的CDR1、CDR2和CDR3区的比对,所述CDR1、CDR2和CDR3区对应于残基26-33;51-58;和97-112。图1B示出固定轻链(SEQ ID NO:19)的CDR1、CDR2和CDR3区;和示例性抗BCMA序列(SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21)。图1C提供参考抗CD3抗体(SEQ ID NO:22),ID 304704的CDR序列。

[0040] 图2A-2E.双特异性人抗体的示意性模型。图2A具有共同轻链的抗CD3:抗肿瘤抗原双特异性抗体(总计3条独特链)。图2B具有2条独特轻链的抗CD3:抗肿瘤抗原双特异性抗体(总计4条独特链)。图2C具有仅重链肿瘤抗原结合结构域的抗CD3:抗肿瘤抗原双特异性抗体(3条独特链)。图2D具有scFv肿瘤抗原结合结构域的抗CD3:抗肿瘤抗原双特异性抗体(总计3条独特链)。图2E具有scFv抗CD3结合结构域的抗CD3:抗肿瘤抗原双特异性抗体(总计3条独特链)。

[0041] 图3.抗CD3家族2数据表总结了单特异性和双特异性形式的抗CD3抗体的行为。第1列示出抗CD3VH序列的序列ID。第2列示出亲本单特异性抗CD3的Jurkat细胞结合的MFI值。第3列示出亲本单特异性抗CD3的cyno T细胞结合的MFI值。第4列示出aCD3:aBCMA双特异性抗体的名称。第5列示出由通过指示剂量的结合涂覆在塑料上的BCMA蛋白的双特异性抗体刺激的pan T细胞释放的IL-2的皮克数。第6列示出由通过指示剂量的结合涂覆在塑料上的BCMA蛋白的双特异性抗体刺激的pan T细胞释放的IL-6的皮克数。第7列示出由通过指示剂量的结合涂覆在塑料上的BCMA蛋白的双特异性抗体刺激的pan T细胞释放的IL-10的皮克数。第8列示出由通过指示剂量的结合涂覆在塑料上的BCMA蛋白的双特异性抗体刺激的pan T细胞释放的IFN- γ 的皮克数。第9列示出由通过指示剂量的结合涂覆在塑料上的BCMA蛋白的双特异性抗体刺激的pan T细胞释放的TNF α 的皮克数。第10列示出在人pan T细胞存在下

双特异性抗体介导的U266肿瘤细胞溶解的EC50。第11列示出在333ng/mL双特异性抗体的剂量下在双特异性抗体和人pan T细胞存在下U266肿瘤细胞的溶解百分比。第12列示出通过Octet测量的双特异性抗体的抗CD3臂的蛋白质结合亲和力。第13列示出双特异性抗体的Jurkat细胞结合的MFI值。

[0042] 图4. 双特异性抗体介导的肿瘤细胞溶解。测试了七种 α CD3_fam2:aBCMA双特异性抗体(各自具有独特的抗CD3臂和共同的抗BCMA臂)通过重定向活化的原代T细胞来杀死U266BCMA+肿瘤细胞的能力。在此实验中,将表达BCMA的U266细胞与活化的pan T细胞以10:1E:T比例混合,同时添加双特异性抗体。x轴示出所用抗体的浓度,并且y轴示出在添加抗体后6小时肿瘤细胞的溶解%。

[0043] 图5. 双特异性U266杀伤活性与IL-2释放相关。在散点图中示出双特异性抗体介导的肿瘤细胞溶解活性与IL-2细胞因子释放的比较。IL-2产生与U266肿瘤细胞溶解之间的相关性是 $R^2=0.37$ 。

[0044] 图6. 双特异性U266杀伤活性与IFN- γ 释放相关。在散点图中示出双特异性抗体介导的肿瘤细胞溶解活性与IFN- γ 细胞因子释放的比较。IFN- γ 产生与U266肿瘤细胞溶解之间的相关性是 $R^2=0.53$ 。

[0045] 图7. 双特异性U266杀伤活性与抗CD3结合亲和力相关。在散点图中示出双特异性抗体介导的U266肿瘤细胞溶解活性与抗CD3结合亲和力的比较。U266杀伤EC50与蛋白质结合亲和力之间的相关性是 $R^2=0.93$ 。

[0046] 图8A-8D. 双特异性抗体介导的肿瘤细胞溶解。测定了 α CD3_F1F:aBCMA双特异性抗体通过重定向活化的原代T细胞杀死三种不同的BCMA+肿瘤细胞和一种BCMA阴性细胞系的能力。在此实验中,将肿瘤细胞与活化的pan T细胞以10:1E:T比例混合,同时添加双特异性抗体。图8A示出RPMI-8226细胞的杀伤,图8B示出NCI-H929细胞的杀伤,图8C示出U-266细胞的杀伤,并且图8D示出K562细胞(阴性对照)的杀伤。x轴示出所用抗体的浓度,并且y轴示出在添加抗体后6小时肿瘤细胞的溶解%。

[0047] 图9A-9D. 双特异性抗体介导的IL-2释放。在静息人T细胞与各种肿瘤细胞系和增加剂量的 α CD3_F1F:aBCMA双特异性抗体一起培养后测量IL-2细胞因子释放的水平。图9A示出通过RPMI-8226细胞刺激的IL-2释放,图9B示出通过NCI-H929细胞刺激的IL-2释放,图9C示出通过U-266细胞刺激的IL-2释放,并且图9D示出通过K562细胞(阴性对照)刺激的IL-2释放。

[0048] 图10A-10D. 双特异性抗体介导的IFN- γ 释放。在静息人T细胞与各种肿瘤细胞系和增加剂量的 α CD3_F1F:aBCMA双特异性抗体一起培养后测量IFN- γ 细胞因子释放的水平。图10A示出通过RPMI-8226细胞刺激的IFN- γ 释放,图10B示出通过NCI-H929细胞刺激的IFN- γ 释放,图10C示出通过U-266细胞刺激的IFN- γ 释放,并且图10D示出通过K562细胞(阴性对照)刺激的IFN- γ 释放。

具体实施方式

[0049] 为了有助于理解本发明,在下文定义了许多术语。

[0050] 在描述本发明活性剂和方法之前,应理解,本发明不限于所描述的特定方法、产物、设备和因素,因为此类方法、设备和制剂当然可以变化。还应了解本文所用的术语仅出

于描述特定实施方案的目的,且不意图限制本发明的范围,本发明的范围将仅由随附权利要求限定。

[0051] 必须指出,除非上下文另外明确地规定,否则如本文和所附权利要求书中所用,单数形式“一个/种(a/an)”和“所述”包括复数指示物。因此,例如,提及“药物候选物”是指此类候选物中的一种或混合物,并且提及“方法”包括提及本领域技术人员已知的等效步骤和方法,诸如此类。

[0052] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学性术语具有与本发明所属领域的技术人员通常所理解的相同的含义。出于描述和公开描述于公布中并且可与本文所描述的发明结合使用的装置、制剂以及方法的目的,本文所提及的所有公布均以引用的方式并入本文。

[0053] 当提供值的范围时,应理解除非上下文另外清楚地规定,否则本发明内包涵所述范围的上限与下限之间的各插入值(至下限单位的十分之一)和在所陈述的范围中的任何其它陈述值或插入值。本发明内还包涵可独立地包括于这些较小范围中的所述较小范围的上限和下限,从属于所陈述的范围中的任何具体排除的限值。当所述范围包括一个或两个限值时,排除那些所包括的限值之一或两者的范围也包括在本发明中。

[0054] 在以下描述中,阐述大量具体细节以便提供本发明的更详尽的理解。然而,对于本领域技术人员将是清楚的:可以在没有一种或多种这些具体细节的情况下实施本发明。在其它情况下,并未描述本领域技术人员所熟知的熟知特征和程序,以避免混淆本发明。

[0055] 一般来说,本发明中使用本领域技术范围内的蛋白质合成、重组细胞培养和蛋白质分离的常规方法以及重组DNA技术。此类技术在文献中充分解释,参见例如,Maniatis, Fritsch和Sambrook, Molecular Cloning:A Laboratory Manual(1982);Sambrook, Russell和Sambrook, Molecular Cloning:A Laboratory Manual(2001);Harlow,Lane和Harlow,Using Antibodies:A Laboratory Manual:Portable Protocol No.I,Cold Spring Harbor Laboratory(1998);以及Harlow和Lane, Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory;(1988)。

[0056] 定义

[0057] “包含(comprising)”意指叙述的要素为组合物/方法/试剂盒中所需要的,但是可以包括其它要素以形成处于权利要求书的范围内的组合物/方法/试剂盒等。

[0058] “基本上由…组成(consisting essentially of)”意指对于未实质上影响本发明的基本特征和新特征的指定材料或步骤进行描述的组合物或方法的范围的限制。

[0059] “由…组成(consisting of)”意指从组合物、方法或试剂盒中排除权利要求书中未指定的任何要素、步骤或成分。

[0060] 本文使用术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”等一般意指获得希望的药理作用和/或生理作用。所述作用可以是就完全或部分预防疾病或其症状而言的预防性的和/或可以是就部分或完全治愈疾病和/或可归因于所述疾病的不利作用而言的治疗性的。如本文所使用的“治疗”涵盖对哺乳动物的任何疾病的治疗,并且包括:(a)预防疾病在可能易患所述疾病但尚未诊断为患有所述疾病的受试者中发生;(b)抑制疾病,即遏止所述疾病的发展;或(c)缓解疾病,即导致所述疾病消退。可在疾病或损伤发作之前、期间或之后施用治疗剂。特别感兴趣的是治疗正在进行的疾病,其中治疗使患者的不良临床症状稳定或减

轻。期望在受影响的组织中的功能完全丧失之前进行这种治疗。可在疾病的症状阶段期间，并且在一些情况下在疾病的症状阶段之后施用主题疗法。

[0061] “治疗有效量”意图是赋予受试者治疗益处所需要的活性剂的量。例如，“治疗有效量”是诱导、减轻或以其他方式引起病理症状、疾病进展或与疾病相关的生理状态的改进或者改进对病症的抗性的量。

[0062] 术语“受试者”、“个体”和“患者”在本文中可互换使用，是指正在评定治疗和/或正在治疗的哺乳动物。在一个实施方案中，哺乳动物是人。术语“受试者”、“个体”和“患者”包括但不限于患有癌症的个体、患有自身免疫性疾病的个体、患有病原体感染的个体等。受试者可以是人，而且还包括其它哺乳动物，特别是适用作人疾病的实验室模型的那些哺乳动物，例如小鼠、大鼠等。

[0063] 术语“癌症”、“赘生物”和“肿瘤”在本文中可互换使用来指表现出自主的不受调节的生长的细胞，使得其表现出以对细胞增殖的控制显著丧失为特征的异常生长表型。本申请中用于检测、分析或治疗的目标细胞包括癌前细胞（例如，良性细胞）、恶性细胞、转移前细胞、转移细胞和非转移细胞。几乎每种组织的癌症都是已知的。短语“癌症负担”是指受试者中癌细胞的量或癌症体积。因此，减轻癌症负担是指减少受试者中癌细胞的数量或癌症体积。如本文所用的术语“癌细胞”是指为癌细胞或源自癌细胞的任何细胞，例如癌细胞的克隆。许多类型的癌症是本领域技术人员已知的，包括实体瘤如癌、肉瘤、成胶质细胞瘤、黑素瘤、淋巴瘤、骨髓瘤等；以及循环癌症如白血病，具体地包括B细胞白血病、T细胞白血病等。癌症的实例包括但不限于卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、肺癌、前列腺癌、肝细胞癌、胃癌、胰腺癌、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、泌尿道癌、甲状腺癌、肾癌、癌、黑素瘤、头颈部癌和脑癌。

[0064] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”是指细胞介导的反应，其中表达Fc受体的非特异性细胞毒性细胞（如天然杀伤细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞）识别靶细胞上结合的抗体并引起靶细胞的溶解。ADCC活性可使用诸如美国专利号5,821,337中描述的那些的方法来评估。ADCP是指抗体依赖性细胞介导的吞噬作用。

[0065] “效应细胞”是表达一种或多种恒定区受体并且执行效应功能的白细胞。

[0066] “细胞因子”是由一种细胞释放以作为细胞间介质作用于另一种细胞的蛋白质。目标细胞因子包括但不限于从活化的T细胞释放的细胞因子，例如IL-2、IFN γ 等。

[0067] “非免疫原性”是指不会引发、激发或增强免疫应答的物质，其中免疫应答包括适应性免疫应答和/或先天性免疫应答。

[0068] 术语“分离的”是指材料从其原始环境（例如，如果它是天然存在的，则为天然环境）中移出。例如，存在于活动物中的天然存在的多核苷酸或多肽是未分离的，但与天然系统中的一些或全部共存物质分离的相同的多核苷酸或多肽是分离的。此类多核苷酸可以是载体的一部分和/或此类多核苷酸或多肽可以是组合物的一部分，且它们仍然是分离的，因为这种载体或组合物不是其自然环境的一部分。

[0069] “药学上可接受的赋形剂”是指适用于制备药物组合物的通常安全、无毒且合乎需要的赋形剂，并且包括可为兽医学用途以及人医药用途所接受的赋形剂。此类赋形剂可以是固体、液体、半固体，或在气雾剂组合物的情况下可为气体。

[0070] “药学上可接受的盐和酯”是指药学上可接受的并具有所需药理学特性的盐和酯。

此类盐包括在存在于化合物中的酸性质子能够与无机碱或有机碱反应的情况下可以形成的盐。适合的无机盐包括用碱金属形成的那些,所述碱金属例如钠和钾、镁、钙以及铝。适合的有机盐包括用有机碱形成的那些,所述有机碱诸如胺碱,例如乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、氨基丁三醇、N甲基葡萄糖胺等。此类盐还包括用无机酸(例如,盐酸和氢溴酸)和有机酸(例如,乙酸、柠檬酸、马来酸、以及烷烃-和芳烃-磺酸诸如甲烷磺酸和苯磺酸)形成的酸加成盐。药学上可接受的酯包括由存在于化合物中的羧基、磺酰基和膦酰基形成的酯,例如, C_{1-6} 烷基酯。当存在两个酸性基团时,药学上可接受的盐或酯可以是单酸单盐或酯或二盐或酯;并且类似地在存在超过两个酸性基团时,一些或所有此类基团可以被盐化或酸化。本发明中命名的化合物可以未盐化或未酯化形式、或以盐化和/或酯化形式存在,并且此类化合物的命名意图包括原始(未盐化和未酯化)化合物及其药学上可接受的盐和酯。此外,本发明中命名的某些化合物可以超过一种立体异构形式存在,并且此类化合物的命名意图包括所有单一立体异构体和此类立体异构体的所有混合物(外消旋的或其它的)。

[0071] 术语“药学上可接受的”、“生理上可耐受的”以及其语法变型在指示组合物、载体、稀释剂和试剂时可互换使用并且表示材料能够施用至或施用于人而不会产生将禁止施用该组合物的程度的不期望的生理作用。

[0072] 两个序列之间的“同源性”通过序列同一性来确定。如果有待比较的两个序列彼此的长度不同,则序列同一性优选涉及较短序列的与较长序列的核苷酸残基相同的核苷酸残基的百分比。可以常规地利用计算机程序如Bestfit程序(Wisconsin Sequence Analysis Package, Unix版本8, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711)来确定序列同一性。Bestfit利用局部同源性算法(Smith和Waterman, Advances in Applied Mathematics 2(1981), 482-489)来寻找两个序列之间具有最高序列同一性的区段。当使用Bestfit或另一序列比对程序来确定特定序列与本发明的参考序列是否具有例如95%同一性时,优选调整参数以使得在参考序列的全长上计算同一性百分比并容许参考序列中核苷酸总数的至多5%的同源性空位。当使用Bestfit时,优选保留所谓的任选参数于其预先设定(“默认”)值下。给定序列与本发明上述序列之间的比较中出现的偏差可能例如由添加、缺失、取代、插入或重组引起。优选地,还可利用程序“fasta20u66”(版本2.0u66,1998年9月,William R. Pearson和University of Virginia;还参见W.R. Pearson(1990), Methods in Enzymology 183, 63-98随附实施例和<http://workbench.sdsc.edu/>)实施这种序列比较。出于此目的,可使用“默认”参数设定。

[0073] “变体”是指具有与天然序列多肽在一定程度上不同的氨基酸序列的多肽。通常,氨基酸序列变体与序列具有至少约80%的序列同一性,更优选地,至少约90%同源。氨基酸序列变体可具有在参考氨基酸序列内的某些位置处的取代、缺失和/或插入。

[0074] 如本文所用的术语“载体”意图指能够转运其已连接的另一核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,所述质粒是指可将额外的DNA区段连接到其中的环状双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体,其中额外的DNA区段可连接到病毒基因组中。某些载体能够在它们被导入的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其它载体(例如,非附加型哺乳动物载体)可在引入到宿主细胞中后整合到宿主细胞的基因组中,并且由此与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导它们所可操作地连接的基因的表达。此类载体在本文中称为“重组表达载体”(或简称为“重组载体”)。一般

来说,在重组DNA技术中使用的表达载体经常呈质粒的形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可互换地使用,因为质粒是载体的最通常使用形式。

[0075] 如本文所用,术语“宿主细胞”(或“重组宿主细胞”)意图指已经遗传改变或能够通过引入外源多核苷酸(如重组质粒或载体)进行遗传改变的细胞。应了解的是此类术语意图不仅指代特定受试细胞,而且指这种细胞的子代。因为某些修饰可由于突变或环境影响而在下一代中出现,所以此类后代可能实际上与亲代细胞不相同,但仍然包括在如本文中所用的术语“宿主细胞”的范围内。

[0076] “结合亲和力”通常是指分子(例如,抗体或其它结合分子)的单一结合位点与它的结合配偶体(例如,抗原或受体)之间的非共价相互作用的总和的强度。分子X对其配偶体Y的亲和力可通常由解离常数(K_d)表示。亲和力可通过本领域中已知的常用方法(包括本文所述的那些)进行测量。低亲和力抗体较弱地结合抗原(或受体)并且易于解离,而高亲和力抗体更紧密地结合抗原(或受体)并且保持更长时间的结合。

[0077] 除非具体相反地指出,否则如本文所述和要求保护的术语“缀合物”被定义为通过将一个或多个抗体片段共价连接至一个或多个聚合物分子而形成的异质分子,其中所述异质分子是水溶性的,即可溶于生理流体如血液中,并且其中所述异质分子不含任何结构化聚集体。目标缀合物是PEG。在前述定义的上下文中,术语“结构化聚集体”是指(1)水溶液中具有球状体或球状体壳结构的任何分子聚集体,以使得异质分子不呈胶束或其它乳液结构形式,并且不锚定至脂质双层、囊泡或脂质体;以及(2)在与水相接触时不会将异质分子释放到溶液中的呈固体或不溶性形式的任何分子聚集体,如色谱珠粒基质。因此,如本文所定义的术语“缀合物”涵盖呈沉淀物、沉降物、生物可蚀解基质或能够在固体水合时将异质分子释放到水溶液中的其它固体形式的上述异质分子。

[0078] 词语“标记”当在本文使用时是指直接地或间接地与抗体缀合的可检测化合物或组合物。标记本身可以是可检测的(例如,放射性同位素标记或荧光标记)或在酶促标记的情况下可催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。

[0079] “固相”是指本发明的抗体可粘附至其的非水性基质。本文涵盖的固相的实例包括部分或全部由玻璃(例如可控多孔玻璃)、多糖(例如琼脂糖)、聚丙烯酰胺、聚苯乙烯、聚乙二醇和硅通形成的那些。在某些实施方案中,取决于上下文,固相可包括测定板的孔;在其它情况下,它是纯化柱(例如亲和色谱柱)。此术语还包括离散颗粒的不连续固相,如美国专利号4,275,149中所描述的那些。

[0080] 抗体也称为免疫球蛋白,常规地包含至少一条重链和一条轻链,其中所述重链和轻链的氨基端结构域的序列为可变的,因此通常称为可变区结构域或者可变重链(VH)或可变轻链(VL)结构域。两个结构域常规地缔合以形成特异性结合区,尽管如本文论述的,特异性结合也可使用仅重链可变序列来获得,并且抗体的各种非天然构型为本领域中已知并使用的。

[0081] “官能化”或“生物活性”抗体或抗原结合分子(包括本文中的仅重链抗体和双特异性三链抗体样分子(TCA))是能够在结构性、调节性、生物化学或生物物理事件中发挥其天然活性中的一种或多种的抗体或抗原结合分子。例如,功能性抗体或其它结合分子(例如TCA)可具有特异性结合抗原的能力并且所述结合可进而引起或改变细胞或分子事件,诸如信号传导转导或酶活性。功能性抗体或其它结合分子(例如TCA)也可阻断受体的配体活化

或用作激动剂或拮抗剂。抗体或其它结合分子(例如TCA)发挥其天然活性中的一种或多种地能力取决于若干因素,包括多肽链的正确折叠和组装。

[0082] 本文的术语“抗体”以最广泛的意义使用并且具体地涵盖单克隆抗体、多克隆抗体、单体、二聚体、多聚体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、仅重链抗体、三链抗体、单链Fv、纳米抗体等,并且还包括抗体片段,只要它们表现出所需的生物活性(Miller等人(2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861)。抗体可以是鼠、人、人源化、嵌合的或源于其它物种。

[0083] 术语抗体可提及全长重链、全长轻链、完整免疫球蛋白分子;或这些多肽中任一种的免疫活性部分,即包含免疫特异性地结合所感兴趣的靶标抗原或其部分的抗原结合位点的多肽,这些靶标包括但不限于癌细胞或产生与自身免疫疾病相关的自身免疫抗体的细胞。本文所公开的免疫球蛋白可具有任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或免疫球蛋白分子的亚类,包括具有改变的Fc部分的工程改造的亚类,其提供减小的或增强的效应细胞活性。免疫球蛋白可来源于任何物种。在一方面,免疫球蛋白大部分为人来源。

[0084] 术语“可变”是指这样的事实,在抗体之间可变结构域的某些部分在序列上广泛不同,并且用于各特定抗体对它的特定抗原的结合和特异性。然而,可变性并非在抗体的整个可变结构域中均匀分布。在轻链与重链可变结构域中,所述可变性集中在三个称为高变区的区段中。可变结构域的更高度保守的部分被称为框架区(FR)。天然重链和轻链的可变结构域各包含四个FR,主要采用由形成环连接的三个高变区连接的 β -折叠构型,并且在一些情况下,形成 β -折叠结构的一部分。各链的高变区由FR紧密靠近地结合在一起,并且与来自其它链的高变区一起有助于形成抗体的抗原结合位点(参见Kabat等人(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*,第5版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.)。虽然恒定结构域并不直接参与抗体与抗原结合,但表现各种效应功能,诸如抗体参与抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。

[0085] 术语“高变区”当在本文使用时是指抗体的负责抗原结合的氨基酸残基。高变区可包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基,和/或来自“高变环”的那些残基。“框架区”或“FR”残基是除如本文定义的高变区残基外的那些可变结构域残基。

[0086] 目标可变区包含来自本文提供的家族2可变区的至少一个CDR序列,通常至少2个CDR序列、且更通常3个CDR序列。示例性CDR名称在本文中示出,然而本领域技术人员将理解,通常使用CDR的许多定义,包括Kabat定义(参见“Zhao等人A germline knowledge based computational approach for determining antibody complementarity determining regions.” *Mol Immunol.* 2010;47:694-700),其是基于序列变异性并且是最常用的。Chothia定义是基于结构环区域的位置(Chothia等人“Conformations of immunoglobulin hypervariable regions.” *Nature.* 1989;342:877-883)。目标替代CDR定义包括但不限于以下所公开的那些:Honegger,“Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains:an automatic modeling and analysis tool.” *J Mol Biol.* 2001;309:657-670;Ofran等人“Automated identification of complementarity determining regions (CDRs) reveals peculiar characteristics of CDRs and B cell epitopes.” *J Immunol.* 2008;181:6230-6235;Almagro“Identification

of differences in the specificity-determining residues of antibodies that recognize antigens of different size: implications for the rational design of antibody repertoires." *J Mol Recognit.* 2004; 17: 132-143; 以及Padlan等人 "Identification of specificity-determining residues in antibodies." *Faseb J.* 1995; 9: 133-139., 其各自以引用的方式明确地并入本文。

[0087] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指自大致上均质抗体的群体获得的抗体, 即除可以少量存在的可能天然存在的突变之外, 构成所述群体的个体抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异性的, 是针对单一的抗原位点。此外, 与包括针对不同决定子(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂不同, 各单克隆抗体针对抗原上的单一决定子。除它们的特异性之外, 单克隆抗体也是有利的, 因为它们可以在不被其他抗体污染的情况下合成。修饰语“单克隆”指示抗体是从实质上均质的抗体群体获得的特性, 且不应解释为需要通过任何特定方法来产生所述抗体。

[0088] 本文中的抗体明确包括“嵌合”抗体, 其中重链和/或轻链的一部分与源于特定物种或属于特定抗体类别或子类的抗体中的相应序列相同或同源, 而所述链的剩余部分与源于另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源; 以及所述抗体的片段, 只要其展现所需生物活性即可(美国专利号4,816,567; 以及Morrison等人(1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855)。本文的目标嵌合抗体包括包含源于非人灵长类动物(例如旧大陆猴、猿等)的可变结构域抗原结合序列和人恒定区序列的“灵长类化”抗体。

[0089] 如本文所用的“完整抗体链”是包含全长可变区和全长恒定区(Fc)的抗体链。完整“常规”抗体包含所分泌IgG的完整轻链和完整重链以及轻链恒定结构域(CL)和重链恒定结构域CH1、铰链CH2和CH3。其它同种型诸如IgM或IgA可具有不同的CH结构域。恒定结构域可为天然序列恒定结构域(例如人天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。完整抗体可具有一种或多种“效应功能”, 其指可归因于抗体Fc恒定区(天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区)的那些生物活性。抗体效应功能的实例包括:C1q结合; 补体依赖性细胞毒性; Fc受体结合; 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC); 吞噬; 以及下调细胞表面受体。恒定区变体包括改变效应物分布、与Fc受体的结合等的那些变体。

[0090] 取决于它们的重链的Fc(恒定区)的氨基酸序列, 抗体和各种抗原结合蛋白可以被提供为不同的类别。存在五种主要类别的重链Fc区: IgA、IgD、IgE、IgG以及IgM, 并且这些类别中的几种可进一步划分成“亚类”(同种型), 例如, IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA以及IgA2。对应于不同类别的抗体的Fc恒定结构域分别可被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、和 μ 。不同类别的免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是熟知的。Ig形式包括铰链修饰或无铰链形式(Roux等人(1998) *J. Immunol.* 161: 4083-4090; Lund等人(2000) *Eur. J. Biochem.* 267: 7246-7256; US2005/0048572; US 2004/0229310)。来自任何脊椎动物物种的抗体的轻链可基于其恒定结构域的氨基酸序列指定为两种类型(称为 κ 和 λ)中的一者。

[0091] “功能性Fc区”具有天然序列Fc区的“效应功能”。示例性效应功能包括C1q结合; CDC; Fc受体结合; ADCC; ADCP; 下调细胞表面受体(例如, B细胞受体)等。此类效应功能总体上需要Fc区与受体相互作用, 所述受体例如Fc γ RI; Fc γ RIIA; Fc γ RIIB1; Fc γ RIIB2; Fc γ RIIIA; Fc γ RIIIB受体, 以及低亲和力FcRn受体; 并且可使用如例如本文中的定义所公开的

各种测定来评定。“死亡”Fc为已被诱变处理以保持关于例如延长血清半衰期的活性但不会活化高亲和力Fc受体的Fc。

[0092] “天然序列Fc区”包含与天然存在的Fc区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。天然序列人Fc区包括例如,天然序列人IgG1Fc区(非-A和A同种异型);天然序列人IgG2Fc区;天然序列人IgG3Fc区;以及天然序列人IgG4Fc区,以及其天然存在的变体。

[0093] “变体Fc区”所包含的氨基酸序列与天然序列Fc区的氨基酸序列的不同之处在于至少一个氨基酸修饰,优选地为一个或多个氨基酸取代。优选地,与天然序列Fc区或与亲本多肽的Fc区相比,变体Fc区具有至少一个氨基酸取代,例如天然序列Fc区中或亲本多肽的Fc区中的约一个至约十个氨基酸取代,并且优选地约一个至约五个氨基酸取代。本文中的变体Fc区将优选地与天然序列Fc区和/或与亲本多肽的Fc区具有至少约80%同源性,以及最优选地与其具有至少约90%同源性,更优选地至少约95%同源性。

[0094] 变体Fc序列可包含CH2区中的三个氨基酸取代以减少在EU索引位置234、235和237处的Fc γ RI结合(参见Duncan等人, (1988) *Nature* 332:563)。在EU索引位置330和331处的补体C1q结合位点中的两个氨基酸取代减少了补体结合(参见Tao等人, *J. Exp. Med.* 178:661 (1993) 以及Canfield和Morrison, *J. Exp. Med.* 173:1483 (1991))。在233-236处的IgG2残基和在位置327、330和331处的IgG4残基取代到人IgG1中极大地减少了ADCC和CDC(参见例如, Armour KL.等人, 1999 *Eur J Immunol.* 29 (8) :2613-24;以及Shields RL.等人, 2001 *J Biol Chem.* 276 (9) :6591-604)。其它Fc变体是可能的,包括但不限于其中缺失能够形成二硫键的区域的变体或其中在天然Fc形式的N-末端处消除某些氨基酸残基或将甲硫氨酸残基添加到其中的变体。因此,在本发明的一个实施方案中,scFc分子的一个或多个Fc部分可包含铰链区中的一个或多个突变以消除二硫键合。在另一个实施方案中,Fc的铰链区可整体除去。在仍然另一个实施方案中,分子可包含Fc变体。

[0095] 另外,Fc变体可被构造为通过取代、缺失或添加氨基酸残基来除去或基本上减少效应功能,以实现补体结合或Fc受体结合。例如但不限于,缺失可出现在补体结合位点,诸如C1q结合位点中。制备免疫球蛋白Fc片段的此类序列衍生物的技术公开于国际专利公布号WO 97/34631和WO 96/32478中。另外,Fc结构域可以通过磷酸化、硫酸盐化、酰化、糖基化、甲基化、法尼基化、乙酰化、酰胺化等来修饰。

[0096] Fc可以呈具有天然糖链、与天然形式相比增加的糖链或与天然形式相比减少的糖链的形式,或者可以呈糖基化(aglycosylated)或去糖基化的形式。糖链的增加、减少、去除或其它修饰可以通过本领域常见方法,诸如化学方法、酶方法或通过在遗传工程改造的生产细胞系中表达所述糖链来实现。此类细胞系可包括天然表达糖基化酶的微生物,例如巴斯德毕赤酵母,以及哺乳动物细胞系,例如CHO细胞。另外,微生物或细胞可被工程改造以表达糖基化酶,或者可使得不能表达糖基化酶(参见例如Hamilton等人, *Science*, 313:1441 (2006); Kanda等人, *J. Biotechnology*, 130:300 (2007); Kitagawa等人, *J. Biol. Chem.*, 269 (27) :17872 (1994); Ujita-Lee等人, *J. Biol. Chem.*, 264 (23) :13848 (1989); Imai-Nishiya等人, *BMC Biotechnology* 7:84 (2007);以及WO 07/055916)。作为工程改造为具有改变的唾液酸化活性的细胞的一个实例, α -2,6-唾液酸转移酶1基因已工程改造到中国仓鼠卵巢细胞和sf9细胞中。由这些工程改造的细胞表达的抗体因此被外源基因产物唾液酸化。另一种用于获得具有与多种天然分子相比改变量的糖残基的Fc分子的方法包括例如使用凝集

素亲和色谱法将所述多种分子分离成糖基化和非糖基化级分(参见例如W007/117505)。特定糖基化部分的存在已显示改变免疫球蛋白的功能。例如,将糖链从Fc分子中去除导致与第一补体组分C1的C1q部分的结合亲和力显著减小以及抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC)的减小或损失,从而不会在体内诱导不需要的免疫应答。另外的重要修饰包括唾液酸化和岩藻糖基化:唾液酸在IgG中的存在已与抗炎活性相关(参见例如Kaneko等人,Science313:760(2006)),而从IgG中去除岩藻糖导致ADCC活性增强(参见例如Shoj-Hosaka等人,J.Biochem.,140:777(2006))。

[0097] 在替代实施方案中,本发明的抗体可具有效应功能增强的Fc序列,例如通过增加其与Fc γ RIIIA的结合能力以及增加ADCC活性。例如,在Fc的Asn-297处连接至N-连接的聚糖的岩藻糖在空间上阻碍Fc与Fc γ RIIIA的相互作用,并且通过糖基工程改造除去岩藻糖可增加与Fc γ RIIIA的结合,这转换成与野生型IgG1对照相比高>50倍的ADCC活性。通过IgG1的Fc部分中的氨基酸突变进行的蛋白质工程改造已生成增加Fc与Fc γ RIIIA的结合亲和力的多种变体。值得注意的是,三丙氨酸突变体S298A/E333A/K334A展现出与Fc γ RIIIA的结合的2倍增加和ADCC功能。S239D/I332E(2X)和S239D/I332E/A330L(3X)变体具有与Fc γ RIIIA的结合亲和力的显著增加以及体外和体内ADCC能力的增强。由酵母展示鉴别的其它Fc变体也在小鼠异种移植模型中显示改进的与Fc γ RIIIA的结合和增强的肿瘤细胞杀伤。参见,例如Liu等人(2014)JBC 289(6):3571-90,其以引用的方式具体地并入本文中。

[0098] 术语“含Fc区的抗体”是指包含Fc区的抗体。Fc区的C-端赖氨酸(残基447,根据EU编号系统)可例如在抗体纯化期间去除或通过编码抗体的核酸的重组工程改造去除。因此,具有根据本发明的Fc区的抗体可包括具有或不具有K447的抗体。

[0099] “Fv”是含有完全抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。本发明的CD3结合抗体包含紧密、非共价结合的一条重链和一条轻链可变结构域的二聚体;然而另外的抗体,例如为了在多特异性构型中使用,可在不存在VL序列的情况下包含VH。甚至单一可变结构域(或仅包含对抗原具有特异性的三个高变区的一半Fv)具有识别和结合抗原的能力,尽管与双结构域结合位点相比亲和力可能较低。

[0100] Fab片段也含有轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。Fab'片段因在重链CH1结构域的羧基末端添加少量残基(包括一个或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸)而不同于Fab片段。Fab'-SH在本文中表示恒定域的半胱氨酸残基携带至少一个游离巯基的Fab'。F(ab')₂抗体片段最初以之间具有铰链半胱氨酸的Fab'片段对形式产生。抗体片段的其它化学偶联也是已知的。

[0101] “人源化”形式的非人(例如啮齿动物)抗体(包括单链抗体)是含有源于非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体(包括单链抗体)。参见例如Jones等人,(1986)Nature 321:522-525;Chothia等人(1989)Nature342:877;Riechmann等人(1992)J.Mol.Biol.224,487-499;Foote和Winter,(1992)J.Mol.Biol.224:487-499;Presta等人(1993)J.Immunol.151,2623-2632;Werther等人(1996)J.Immunol.Methods157:4986-4995;以及Presta等人(2001)Thromb.Haemost.85:379-389。关于其它细节,参见美国专利号5,225,539;6,548,640;6,982,321;5,585,089;5,693,761;6,407,213;Jones等人(1986)Nature,321:522-525;以及Riechmann等人(1988)Nature 332:323-329。

[0102] 如本文所用的术语“单链抗体”是指含有一个或多个结合抗原的表位的抗原结合

结构域的单一多肽链,其中此类结构域源自抗体重链或轻链的可变区或与所述可变区具有序列同一性。此类可变区的部分可由V_H或V_L基因区段、D和J_H基因区段或J_L基因区段编码。所述可变区可通过重排的V_HDJ_H、V_LDJ_H、V_HJ_L或V_LJ_L基因区段编码。V-、D-和J-基因区段可源自人和各种动物,包括鸟类、鱼类、鲨鱼、哺乳动物、啮齿动物、非人灵长类动物、骆驼、大羊驼、兔等。

[0103] 本发明的CD3结合抗体在多特异性构型中特别有用,所述多特异性构型包括但不限于双特异性抗体、三功能抗体等。多种方法和蛋白质构型是已知的并且可用于双特异性单克隆抗体(BsMAB)、三特异性抗体等。

[0104] 第一代BsMAB由两条重链和两条轻链组成,每条链来自两种不同的抗体。两个Fab区是针对两种抗原。Fc区由两条重链组成,并且与免疫细胞上的Fc受体形成第三结合位点(参见例如Lindhofer等人,The Journal of Immunology,第155卷,第219-225页,1995)。所述抗体可来自相同或不同物种。例如,表达大鼠和小鼠抗体的细胞系由于优先的物种限制性重链和轻链配对而分泌功能性双特异性Ab。在其它实施方案中,所述Fc区被设计为仅以特定方式配合在一起。

[0105] 其它类型的双特异性抗体包括仅由Fab区组成的化学连接的Fab。两个化学连接的Fab或Fab2片段形成结合至两种不同抗原的人工抗体,从而使其成为一种类型的双特异性抗体。两种不同单克隆抗体的抗原结合片段(Fab或Fab2)产生并通过化学方式如硫醚连接(参见Glennie, M J等人,Journal of immunology 139,第2367-75页,1987; Peter Borchmann等人,Blood,第100卷,第9期,第3101-3107页,2002)。

[0106] 已经通过重组融合两种抗体的可变结构域开发了用于产生多价人工抗体的各种其它方法。单链可变片段(scFv)是免疫球蛋白的重链(VH)和轻链(VL)的可变区的融合蛋白,其与10至约25个氨基酸的短接头肽连接。所述接头通常富含甘氨酸以获得柔性,以及丝氨酸或苏氨酸以获得溶解性,并且可连接VH的N-末端与VL的C-末端,反之亦然。可通过连接具有不同特异性的两种scFv来工程改造双特异性单链可变片段(di-scFv、bi-scFv)。产生具有两个VH和两个VL区的单一肽链,从而产生二价scFv。

[0107] 双特异性串联scFv也称为双特异性T细胞衔接器(BiTE)。可用接头肽产生双特异性scFv,所述接头肽对于两个可变区而言太短而不能折叠在一起(约5个氨基酸),从而迫使scFv二聚化。这种类型被称为双抗体(Adams等人,British journal of cancer 77,第1405-12页,1998)。双亲和力重靶向(DART)平台技术(Macrogenics, Rockville, Md.)。这种融合蛋白技术在约55千道尔顿的单一肽链上使用不同抗体的两个单链可变片段(scFv)。SCORPION Therapeutics(Emergent Biosolutions, Inc., Seattle, Wash.)在单链蛋白中组合了两个抗原结合结构域。基于免疫球蛋白Fc区,一个结合结构域位于C-末端上,并且第二结合结构域位于效应结构域的N-末端上。

[0108] 四价和双特异性抗体样蛋白还包括DVD-Ig,所述DVD-Ig由两种单克隆抗体工程改造(Wu, C.等人,Nature Biotechnology, 25, 第1290-1297页,2007)。为了构建DVD-Ig分子,两种mAb的V结构域通过短接头(TVAAP)串联融合,其中第一抗体轻链(VL)的可变结构域在N末端处的,随后是其它抗体VL和C_h,以形成DVD-Ig蛋白质轻链。类似地,两种mAb的重(VH)链的可变区通过短接头(ASTKGP)串联融合,其中第一抗体在N末端处,随后是另一抗体和重链恒定结构域,以形成DVD-Ig蛋白质重链(VH1/VL1)。所有轻链和重链恒定结构域都保留在

DVD-Ig设计中,因为它们对于形成二硫键连接的完整IgG样分子是至关重要的。用编码DVD-Ig轻链和重链的表达载体共转染哺乳动物细胞导致分子量为大约200kDa的单一种类的IgG样分子的分泌。这种分子现在具有四个结合位点,每个mAb 2个。

[0109] 术语“双特异性三链抗体样分子”或“TCA”在本文中用于指包含三个多肽亚基、基本上由其组成或由其组成的抗体样分子,所述多肽亚基中的两个包含单克隆抗体的一条重链和一条轻链或包含抗原结合区和至少一个CH结构域的此类抗体链的功能性抗原结合片段、基本上由其组成或由其组成。此重链/轻链对对第一抗原具有结合特异性。第三多肽亚基包含仅重链抗体、基本上由仅重链抗体组成或由仅重链抗体组成,所述抗体包含在不存在CH1结构域的情况下包含CH2和/或CH3和/或CH4结构域的Fc部分以及结合第二抗原的表位或第一抗原的不同表位的抗原结合结构域,其中此类结合结构域源自抗体重链或轻链的可变区或与抗体重链或轻链的可变区具有序列同一性。此类可变区的部分可由V_H和/或V_L基因区段、D和J_H基因区段或J_L基因区段编码。所述可变区可通过重排的V_HDJ_H、V_LDJ_H、V_HJ_L或V_LJ_L基因区段编码。

[0110] TCA蛋白质利用如本文所用的“仅重链抗体”或“重链抗体”或“重链多肽”,是指包含重链恒定区CH2和/或CH3和/或CH4但不含CH1结构域的单链抗体。在一个实施方案中,所述重链抗体由抗原结合结构域、铰链区的至少一部分以及CH2和CH3结构域组成。在另一个实施方案中,所述重链抗体由抗原结合结构域、铰链区的至少一部分和CH2结构域组成。在另一实施方案中,所述重链抗体由抗原结合结构域、铰链区的至少一部分和CH3结构域组成。其中CH2和/或CH3结构域被截短的重链抗体也包括在本文中。在另一实施方案中,所述重链由抗原结合结构域和至少一个CH(CH1、CH2、CH3或CH4)结构域组成,但不含铰链区。仅重链抗体可呈二聚体形式,其中两条重链彼此二硫键连接、彼此共价或非共价连接。所述重链抗体可属于IgG亚类,但是属于其它亚类(如IgM、IgA、IgD和IgE亚类)的抗体也包括在本文中。在一个具体实施方案中,所述重链抗体具有IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型,特别是IgG1亚型。

[0111] 重链抗体构成由骆驼科动物(例如骆驼和美洲驼)产生的IgG抗体的约四分之一(Hamers-Casterman C.,等人Nature.363,446-448(1993))。这些抗体由两条重链形成,但没有轻链。因此,可变抗原结合部分被称为VHH结构域并且它代表长度仅约120个氨基酸的最小天然存在的完整抗原结合位点(Desmyter,A.,等人J.Biol.Chem.276,26285-26290(2001))。可通过免疫产生针对多种抗原的具有高特异性和亲和力的重链抗体(van der Linden,R.H.,等人Biochim.Biophys.Acta.1431,37-46(1999)),并且VHH部分可容易地克隆并在酵母中表达(Frenken,L.G.J.,等人J.Biotechnol.78,11-21(2000))。它们的表达水平、溶解度和稳定性显著高于经典F(ab)或Fv片段的那些(Ghahroudi,M.A.等人FEBS Lett.414,521-526(1997))。鲨鱼也被证明在其抗体中具有单个VH样结构域(其被称为VNAR)(Nuttall等人Eur.J.Biochem.270,3543-3554(2003);Nuttall等人Function and Bioinformatics 55,187-197(2004);Dooley等人,Molecular Immunology40,25-33(2003))。

[0112] “结合”目标抗原的抗体或抗原结合分子(包括本文中的仅重链抗体和双特异性三链抗体样分子(TCA))是以足够的亲和力结合抗原以使得所述抗体或结合分子可用作靶向所述抗原的诊断和/或治疗剂并且不与其它蛋白质显著交叉反应的抗体或抗原结合分

子。在此类实施方案中,如通过荧光活化细胞分选(FACS)分析或放射免疫沉淀(RIA)所测定,所述抗体或其它结合分子与非靶向抗原的结合的程度将不超过10%。

[0113] 蛋白质

[0114] 本发明提供了密切相关的抗体的家族,所述抗体结合至CD3并活化通过CD3的信号传导,例如活化CD3⁺T细胞。所述家族内的抗体包含一组如本文所定义的CDR序列,并且通过SEQ ID NO:1-18所提供的VH序列例示。所述抗体家族提供许多有助于用作一种或多种临床治疗剂的益处。所述家族内的抗体包括具有一系列结合亲和力的成员,从而允许选择具有所需亲和力的特定序列。微调亲和力的能力对于管理被治疗个体中CD3活化的水平并且由此降低毒性特别重要。例如,如果靶向低丰度肿瘤抗原(每个细胞少于10,000个分子),则预期优选高亲和力CD3结合剂(<30nM)。如果靶向高丰度肿瘤抗原(每个细胞超过50,000个分子),则优选具有低亲和力(>50nM)的CD3结合剂。从亲和力单独评价可以是抗体在与T细胞结合时诱导细胞因子释放(例如,释放IL-2、IFN γ 等)的倾向,其中细胞因子释放减少可能是合乎需要的。

[0115] 可从本文提供的那些中选择合适的抗体用于开发和使用,包括但不限于用作双特异性抗体。候选蛋白质的亲和力的测定可使用本领域中已知的方法(例如,Biacore测量等)进行。抗体家族的成员可对CD3具有亲和力,其中Kd为约10⁻⁶至约10⁻¹¹左右,包括但不限于:约10⁻⁶至约10⁻¹⁰左右;约10⁻⁶至约10⁻⁹左右;约10⁻⁶至约10⁻⁸左右;约10⁻⁸至约10⁻¹¹左右;约10⁻⁸至约10⁻¹⁰左右;约10⁻⁸至约10⁻⁹左右;约10⁻⁹至约10⁻¹¹左右;约10⁻⁹至约10⁻¹⁰左右;或这些范围内的任何值。亲和力选择可通过在例如和体外或临床前模型中T细胞活化的生物学评估和潜在毒性的评估来确认。细胞因子释放的确定可使用任何方便的方法进行评价,所述方法包括但不限于实施例中描述的测定。

[0116] 通过结合MH-肽复合物或抗TCR/CD3抗体以接合T细胞受体(TCR)来起始T细胞活化。活化T细胞的抗TCR/CD3抗体的实例是OKT3和UCHT1。这些抗CD3抗体交叉竞争结合至T细胞上的CD3,并且常规地用于T细胞活化测定中。本发明的抗CD3抗体与OKT3交叉竞争结合至人CD3。取决于对CD3和CD3上的表位的结合亲和力,抗CD3抗体活化T细胞,具有不同的功能结果。人T细胞与低亲和力抗CD3抗体的体外孵育导致T细胞的不完全活化、低IL-2和IL-10产生。相比之下,高亲和力CD3结合剂活化T细胞以产生显著更多的IL-2和其它细胞因子。低亲和力抗CD3抗体被认为是部分激动剂,其选择性地诱导一些效应功能、有效的肿瘤杀伤和CD69上调而不能诱导其它如IL-2和IL-10产生。本发明的高亲和力结合剂是活化T细胞的许多免疫效应功能的完全激动剂。与CD3和识别的表位的相互作用的强度定性地导致T细胞的不同活化。由低亲和力抗CD3抗体活化的T细胞的最大细胞因子产生低于高亲和力抗CD3抗体的最大活化。在一些实施方案中,当与相同测定中的参考抗CD3抗体相比时,当在活化测定中与T细胞组合时,本发明的抗体导致IL-2和IL-10中的一者或两者的较低释放,其中所述参考抗体可以是ID304703(SEQ ID NO:22)或具有等效亲和力的抗体。IL-2和/或IL-10的最大释放可小于通过参考抗体的释放的约75%、小于通过参考抗体的释放的约50%、小于通过参考抗体的释放的约25%并且可小于通过参考抗体的释放的约10%。

[0117] 在本发明的一些实施方案中,提供了双特异性或多特异性抗体,所述抗体可具有本文所论述的任何构型,包括但不限于三链双特异性。双特异性抗体至少包含对除CD3以外的蛋白质具有特异性的抗体的重链可变区,并且可包含重链可变区和轻链可变区。在一些

此类实施方案中,第二抗体特异性结合肿瘤相关抗原、靶向抗原(例如整联蛋白等)、病原体抗原、检查点蛋白等。各种形式的双特异性抗体属于本发明的范围,包括但不限于单链多肽、双链多肽、三链多肽、四链多肽及其倍数链多肽。

[0118] CD3特异性抗体家族包含VH结构域,所述VH结构域包含人VH框架中的CDR1、CDR2和CDR3序列。作为一个实例,对于CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR序列可分别位于SEQ ID NO:1-18中列出的所提供的示例性可变区序列的约氨基酸残基26-33;51-58;和97-112的区域中。本领域技术人员将理解,如果选择不同的框架序列,则所述CDR序列可处于不同的位置中,尽管通常序列的顺序将保持不变。

[0119] 家族2抗体的CDR序列可具有以下序列式。X表示可变氨基酸,其可以是如下所示的特定氨基酸。

[0120] CDR1

[0121] G₁ F₂ T₃ F₄ X₅ X₆ Y₇ A₈

[0122] 其中:

[0123] X₅可以是任何氨基酸;在一些实施方案中,X₅是D、A或H;在一些实施方案中,X₅是D。

[0124] X₆可以是任何氨基酸;在一些实施方案中,X₆是D或N;在一些实施方案中,D₆是D。

[0125] 在一些实施方案中,家族2抗CD3抗体的CDR1序列包含SEQ ID NO:1-18中任一个中列出的序列的残基26-33。

[0126] CDR2

[0127] I₁ S₂ W₃ N₄ S₅ G₆ S₇ I₈

[0128] 在一些实施方案中,家族2抗CD3抗体的CDR2序列包含SEQ ID NO:1-18中任一个中列出的序列的残基51-58。

[0129] CDR3

[0130] A₁ K₂ D₃ S₄ R₅ G₆ Y₇ G₈ X₉ Y₁₀ X₁₁ X₁₂ G₁₃ G₁₂ A₁₅ Y₁₆

[0131] 其中:

[0132] X₉可以是任何氨基酸,在一些实施方案中,X₉是D或S;在一些实施方案中,X₉是D;

[0133] X₁₁可以是任何氨基酸,在一些实施方案中,X₁₁是R或S;

[0134] X₁₂可以是任何氨基酸,在一些实施方案中,X₁₂是L或R。

[0135] 在一些实施方案中,家族2抗CD3抗体的CD3序列具有式A K D S R G Y G D Y X₁₁ X₁₂ G G A Y,其中X₁₁和X₁₂是如上文所定义。在一些实施方案中,家族2抗CD3抗体的CDR3序列包含SEQ ID NO:1-18中任一个中列出的序列的残基97-112。

[0136] 在一些实施方案中,CD3结合VH结构域与轻链可变区结构域配对。在一些此类实施方案中,所述轻链是固定轻链。在一些实施方案中,所述轻链包含具有人VL框架中的CDR1、CDR2和CDR3序列的VL结构域。所述CDR序列可以是SEQ ID NO:19的那些。在一些实施方案中,对于CDR1、CDR2、CDR3,所述CDR1序列分别包含氨基酸残基27-32;50-52;89-97。

[0137] 在一些实施方案中,家族2抗体的CDR序列具有相对于SEQ ID NO:1-18中任一个中的一个CDR序列或一组CDR序列具有至少85%同一性、至少90%同一性、至少95%同一性、至少99%同一性的序列。在一些实施方案中,本发明的CDR序列相对于SEQ ID NO:1-18中任一个中的一个CDR序列或一组CDR序列包含一个、两个、三个或更多个氨基酸取代。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代是相对于上文提供的式,CDR1的位置5或10,CDR2的位

置2,6或7,CDR3的位置1、8、9或10中的一个或多个。

[0138] 当本发明的蛋白质为双特异性抗体时,一个结合部分(即VH/VL组合或仅VH)对人CD3具有特异性,而另一个臂可对靶细胞具有特异性,所述靶细胞包括癌细胞,如卵巢癌、乳腺癌、胃肠癌、脑癌、头颈癌、前列腺癌、结肠癌和肺癌等以及血液肿瘤如B细胞肿瘤(包括白血病)、淋巴瘤、肉瘤、癌、神经细胞肿瘤、鳞状细胞癌、生殖细胞肿瘤、转移、未分化肿瘤、精原细胞瘤、黑素瘤、骨髓瘤、成神经细胞瘤、混合细胞肿瘤、由感染因子引起的瘤形成和其它恶性肿瘤的细胞;感染病原体的细胞,引起炎症和/或自身免疫性的自身反应性细胞。非CD3部分也可对免疫调节蛋白具有特异性,如将在本文中所描述。

[0139] 肿瘤相关抗原(TAA)相对局限于肿瘤细胞,而肿瘤特异性抗原(TSA)是肿瘤细胞所特有的。TSA和TAA通常是细胞表面上作为主要组织相容性复合物的一部分表达的细胞内分子的一部分。

[0140] 组织特异性分化抗原是存在于肿瘤细胞及其正常细胞对应物上的分子。已知被治疗性mAb识别的肿瘤相关抗原分为若干不同的类别。造血分化抗原是通常与分化簇(CD)组群相关的糖蛋白并且包括CD20、CD30、CD33和CD52。细胞表面分化抗原是在正常细胞和肿瘤细胞表面上发现的一组不同的糖蛋白和碳水化合物。参与生长和分化信号传导的抗原通常是生长因子和生长因子受体。为用于癌症患者中的抗体的靶标的生长因子包括CEA、表皮生长因子受体(EGFR;也称为ERBB1)、ERBB2(也称为HER2)、ERBB3、MET(也称为HGFR)、胰岛素样生长因子1受体(IGF1R)、肝配蛋白受体A3(EPHA3)、肿瘤坏死因子(TNF)相关的凋亡诱导配体受体1(TRAILR1;也称为TNFRSF10A)、TRAILR2(也称为TNFRSF10B)以及核因子-κB配体的受体活化剂(RANKL;也称为TNFSF11)。参与血管生成的抗原通常是支持新微血管系统的形成的蛋白质或生长因子,包括血管内皮生长因子(VEGF)、VEGF受体(VEGFR)、整联蛋白αVβ3和整联蛋白α5β1。肿瘤间质和细胞外基质是肿瘤必不可少的支撑结构。为治疗靶标的间质和细胞外基质抗原包括成纤维细胞活化蛋白(FAP)和腱生蛋白。

[0141] 可用于双特异性构型中的治疗性抗体的实例包括但不限于利妥昔单抗;替伊莫单抗;tiuxetan;托西莫单抗;本妥昔单抗;维多汀;吉妥珠单抗;奥佐米星;阿仑单抗;IGN101;阿德木单抗;拉贝珠单抗;huA33;培妥莫单抗;奥戈伏单抗;CC49(明瑞莫单抗);cG250;J591;M0v18;MORAb-003(法利珠单抗);3F8, ch14.18; KW-2871; hu3S193; IgN311; 贝伐单抗; IM-2C6; CDP791; 埃达珠单抗; 伏洛昔单抗; 西妥昔单抗, 帕尼单抗, 尼妥珠单抗; 806; 曲妥珠单抗; 帕妥珠单抗; MM-121; AMG 102, METMAB; SCH 900105; AVE1642, IMC-A12, MK-0646, R1507; CP 751871; KB004; IIIA4; 马帕木单抗(HGS-ETR1); HGS-ETR2; CS-1008; 地诺单抗; 西罗珠单抗; F19; 以及81C6。

[0142] 在临床癌症免疫疗法的背景下最积极研究的免疫检查点受体细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4;也称为CD152)和程序性细胞死亡蛋白1(PD1;也称为CD279)均是抑制性受体。阻断这些受体中的任一者的抗体的临床活性意味着可在多个水平下增强抗肿瘤免疫性,并且组合策略可智能地设计,通过机械考虑和临床前模型来引导。

[0143] PD1的两种配体是PD1配体1(PDL1;也称为B7-H1和CD274)和PDL2(也称为B7-DC和CD273)。PDL1在癌细胞上表达,并且通过与T细胞上的其受体PD1结合,它抑制T细胞活化/功能。

[0144] 淋巴细胞活化基因3(LAG3;也称为CD223)、2B4(也称为CD244)、B和T淋巴细胞衰减

子(BTLA;也称为CD272)、T细胞膜蛋白3(TIM3;也称为HAVcr2)、腺昔A2a受体(A2aR)和杀伤抑制性受体家族各自与淋巴细胞活性的抑制相关,并且在一些情况下与淋巴细胞无反应性的诱导相关。这些受体的抗体靶向可用于本发明方法中。

[0145] 激动免疫共刺激分子的剂也可用于本发明的方法中。此类剂包括激动剂或CD40和OX40。CD40是在抗原呈递细胞(APC)上发现的共刺激蛋白,并且是其活化所必需的。这些APC包括吞噬细胞(巨噬细胞和树突状细胞)和B细胞。CD40是TNF受体家族的一部分。CD40的主要活化信号传导分子是IFN γ 和CD40配体(CD40L)。通过CD40刺激活化巨噬细胞。

[0146] 目标抗CCR4(CD194)抗体包括针对C-C趋化因子受体4(CCR4)的人源化单克隆抗体,其具有潜在抗炎和抗肿瘤活性。CCR2在炎性巨噬细胞上表达,其可在各种炎性病状中发现,例如类风湿性关节炎;并且还被鉴别为在促进肿瘤的巨噬细胞上表达。CCR2还在调节性T细胞上表达,并且CCR2配体CCL2介导调节性T细胞募集到肿瘤中。调节性T细胞抑制对抗肿瘤T细胞的反应并且因此需要它们的抑制或消减。

[0147] 产生本发明的蛋白质

[0148] 尽管可通过化学合成制备抗体,但所述抗体通常通过重组DNA技术的方法产生,所述方法例如在单个重组宿主细胞中共表达构成蛋白质的所有链,或共表达重链多肽和抗体如人抗体。此外,还可使用单个多顺反子表达载体表达抗体重链和轻链。使用标准蛋白质纯化技术,如亲和(蛋白A)色谱法、尺寸排阻色谱法和/或疏水相互作用色谱法来实现单独多肽的纯化。双特异性抗体的大小和疏水性足够不同以使得可使用标准方法进行纯化。

[0149] 在单个宿主细胞中产生的抗体和重链多肽的量可通过工程改造抗体和重链的恒定区以使得同二聚化优于异二聚化,例如,通过引入自身互补的相互作用来最小化(参见例如WO 98/50431获得可能性,如“突出到腔中”策略(参见WO 96/27011))。因此,本发明的另一方面是提供一种用于在重组宿主中产生双特异性抗体的方法,所述方法包括以下步骤:在重组宿主细胞中表达编码至少两种重链多肽的核酸序列,其中所述重链链多肽在其恒定区中的差异足以减少或阻止同二聚体形成但增加双特异性形成。

[0150] 当蛋白质包含三条链时,例如FlicAb,它们可通过在单个重组宿主细胞中共表达构成分子的三条链(2条重链和一条轻链)来产生。

[0151] 为了重组产生本文的蛋白质,分离编码所有链的一种或多种核酸(例如2、3、4种等)并将所述核酸插入可复制载体中以用于进一步克隆(扩增DNA)或用于表达。许多载体是可用的。载体组分通常包括但不限于以下中的一者或多者:信号序列、复制起点、一种或多种标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。

[0152] 在一个优选地实施方案中,根据本发明的方法的宿主细胞能够高水平表达人免疫球蛋白,即至少1pg/细胞/天、优选至少10pg/细胞/天且甚至更优选至少20pg/细胞/天或更多,而无需扩增编码所述宿主细胞中的单链的核酸分子。

[0153] 药物组合物

[0154] 本发明的另一方面是提供药物组合物,所述药物组合物包含与合适的药学上可接受的载体混合的一种或多种本发明的蛋白质。如本文使用的药学上可接受的载体是示例性但不限于佐剂、固体载体、水、缓冲剂或本领域中用于保持治疗组分的其它载体或其组合。

[0155] 根据本发明使用的蛋白质的治疗性制剂通过将具有所需纯度的蛋白质与任选的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences

第16版,0sol,A.编辑(1980))混合来制备以供储存,如呈冻干制剂或水性溶液的形式。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒性,并且包括缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵、氯化六烃季铵(hexamethonium chloride)、苯扎氯铵、苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟苯甲酸烷酯,如对羟苯甲酸甲酯或丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇和间-甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、凝胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯基吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷酰氨酸、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、双糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,如钠;金属络合物(例如,Zn-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,如TWEENTM、PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。

[0156] 抗CD3抗体制剂公开于例如美国专利公布号20070065437中,整个公开内容明确地以引用的方式并入本文。类似的制剂可用于本发明的蛋白质。此类制剂的主要组分是有效范围在3.0至6.2的范围内有效的pH缓冲剂、盐、表面活性剂和有效量的具有抗CD3特异性的双特异性抗体。

[0157] 使用方法

[0158] 提供了用于在方案中治疗或减轻疾病的方法,所述疾病包括但不限于感染、自身免疫性疾病、原发性或转移性癌症等,所述方法包括使靶细胞与本发明的抗原结合组合物接触,特别是其中所述抗原结合组合物是适用于所治疗病状的多特异性抗体,例如其中一个结合部分特异性结合肿瘤相关抗原以治疗相关癌细胞;对目标病原体具有特异性的结合部分以用于治疗相关感染等。此类方法包括向需要治疗的受试者施用治疗有效量或有效剂量的本发明的剂,包括但不限于试剂与化学治疗药物、放射疗法或手术的组合。

[0159] 用于治疗疾病的本发明的组合物的有效剂量根据许多不同因素而变化,包括施用方式、靶位点、患者的生理状态、患者为人还是动物、所施用的其它药物和治疗为预防性还是治疗性。通常,患者是人,但也可治疗非人哺乳动物,例如伴侣动物如狗、猫、马等,实验室哺乳动物如兔、小鼠、大鼠等。可滴定治疗剂量以使安全性和功效最优化。

[0160] 剂量水平可由普通熟练的临床医生容易地确定,并且可根据需要进行修改,例如根据需要以改变受试者对治疗的反应。可与载体物质组合以产生单一剂型的活性成分的量取决于所治疗宿主和特定施用模式而变化。剂量单位形式通常含有约1mg至约500mg之间的活性成分。

[0161] 在一些实施方案中,所述剂的治疗剂量可在宿主体重的约0.0001至100mg/kg、并且更通常0.01至5mg/kg的范围内。例如,剂量可以是1mg/kg体重或10mg/kg体重或在1-10mg/kg的范围内。示例性治疗方案需要每两周施用一次或每月施用一次或每3至6个月施用一次。通常多次施用本发明的治疗性实体。单个剂量之间的间隔可为每周、每月或每年。间隔也可以是无规律的,如通过在患者中测量治疗性实体的血液水平所指示。或者,本发明的治疗性实体可作为缓释制剂施用,在此情况下要求不太频繁的施用。剂量和频率取决于患者中多肽的半衰期而变化。

[0162] 在预防性应用中,可在长时间段内以相对不频繁的间隔施用相对低的剂量。一些患者在其余生继续接受治疗。在其它治疗性应用中,有时要求相对较短间隔下的相对较高剂量直到疾病进展减少或终止为止,并且优选地直到患者显示疾病症状的部分或完全改善

为止。此后,可以预防性的方式施用本专利品。

[0163] 在仍然其它实施方案中,本发明的方法包括治疗、减少或预防癌症的肿瘤生长、肿瘤转移或肿瘤侵袭,所述癌症包括癌、血液癌症如白血病和淋巴瘤、黑素瘤、肉瘤、神经胶质瘤等。用于预防性应用,将药物组合物或药物以足以消除或降低风险、减轻疾病的严重程度或延迟疾病的发作(包括所述疾病的生物化学、组织学和/或行为症状、其并发症和在所述疾病的发展期间存在的中间病理学表型)的量施用于易患或否则处于疾病风险中的患者。

[0164] 用于治疗疾病的组合物可通过肠胃外、局部、静脉内、肿瘤内、口服、皮下、动脉内、颅内、腹膜内、鼻内或肌内方式施用。典型施用途径是静脉内或肿瘤内,但其它途径可同样有效。

[0165] 通常,组合物被制备成呈液体溶液或悬浮液形式的可注射物;也可制备适于在注射之前溶解或悬浮于液体媒介物中的固体形式。制剂也可乳化或包封在脂质体或微粒如聚丙交酯、聚乙交酯或共聚物中以增强佐剂作用,如上文所论述。Langer, *Science* 249:1527, 1990和Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28:97-119, 1997。本发明的剂可呈可以允许活性成分持续或脉动释放的方式配制的储库注射液或植入制剂的形式施用。药物组合物通常被配制为无菌、大致上等渗并且完全遵循美国食品药品管理局的所有药品生产质量管理规范(GMP)条例。

[0166] 可通过标准药物程序在细胞培养物或实验动物中,例如通过确定LD₅₀(对50%群体致死的剂量)和LD₁₀₀(对100%群体致死的剂量)来确定本文所述的蛋白质的毒性。毒性与治疗作用之间的剂量比是治疗指数。从这些细胞培养物测定和动物研究中获得的数据可用于配制对于在人种使用无毒的剂量范围。本文所述的蛋白质的剂量优选处于包括具有极小或无毒性的有效剂量的循环浓度的范围内。所述剂量可根据所采用的剂型和利用的施用途径而在此范围内变化。可由个体医师鉴于患者的病状来选择确切制剂、施用途径以及剂量。

[0167] 所述药物组合物可取决于施用方法以多种单位剂型施用。例如,适用于口服施用的固体剂型包括但不限于粉末、片剂、丸剂、胶囊和锭剂。应认识到,当口服施用时,应保护本发明的组合物免于消化。这通常通过将分子与组合物络合以使所述分子对酸性和酶水解具有抗性,或通过将分子包装在适当的抗性载体(如脂质体或保护屏障)中来实现。保护蛋白质免于消化的方法在本领域中是熟知的。

[0168] 用于施用的组合物通常将包含溶解于药学上可接受的载体,优选水性载体中的抗体或其它清除剂。可使用多种水性载体,例如,缓冲盐水等。这些溶液是无菌的并且通常不含不合需要的物质。这些组合物可通过常规的、众所周知的灭菌技术进行灭菌。所述组合物可含有接近生理条件所需要的药学上可接受的辅助物质,如pH调节剂和缓冲剂、毒性调节剂等,例如,乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。这些制剂中的活性剂的浓度可广泛地变化,并且将根据所选的特定施用模式和患者的需求主要基于流体体积、粘度、患者体重等来选择(例如,Remington's *Pharmaceutical Science* (第15版,1980)和Goodman&Gillman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Hardman等人,编辑,1996))。

[0169] 包含本发明的活性剂及其制剂和使用说明书的药盒也在本发明的范围内。所述药盒还可含有至少一种另外的试剂,例如,化学治疗药物等。药盒通常包括指示所述药盒的内容物的预期用途的标签。术语标签包括在药盒上或与药盒一起或另外伴随药盒提供的任何书面或记录材料。

[0170] 可施用所述组合物用于治疗性治疗。如上所述,组合物以足以基本上消除靶向细胞的量施用于患者。足以实现此目的的量被定义为“治疗有效剂量”,所述量可提供总体存活率的改善。可根据患者所需药和耐受的剂量和频率施用组合物的单次或多次给药。治疗所需的特定剂量将取决于哺乳动物的医学病状和病史以及其它因素,如年龄、体重、性别、施用途径、效率等。

[0171] 现已充分描述了本发明,对本领域的普通技术人员而言将清楚的是,可在不背离本发明的精神和范围的情况下作出各种变化和修改。

[0172] 实施例

[0173] 实施例1表达仅重链抗体的遗传工程改造的大鼠

[0174] 构建并以若干部分组装人IgH基因座,其涉及修饰和连接大鼠C区基因,然后将所述基因座连接到人V_H6-D-J_H区的下游。然后将具有单独的人V_H基因簇的两个BAC与编码组装的(人V_H6-D-J_H-大鼠C)片段的BAC共注射。

[0175] 产生了携带呈未重排构型的人工重链免疫球蛋白基因座的转基因大鼠。包含的恒定区基因编码IgM、IgD、IgG2b、IgE、IgA和3'增强子。转基因大鼠的RT-PCR和血清分析(ELISA)揭示了转基因免疫球蛋白基因座的生产性重排和血清中各种同种型的仅重链抗体的表达。将转基因大鼠与先前在美国专利公布2009/0098134A1中描述的具有突变的内源性重链和轻链基因座的大鼠杂交。对此类动物的分析证明了大鼠免疫球蛋白重链和轻链表达的失活以及具有由人V、D和J基因编码的可变区的重链抗体的高水平表达。转基因大鼠的免疫使得产生抗原特异性重链抗体的高滴度血清反应。表达具有人VDJ区的重链抗体的这些转基因大鼠被称为UniRat。

[0176] 实施例2表达固定轻链抗体的遗传工程改造的大鼠

[0177] 从具有不同(V_H-D-J_H)_n重排的H链与独特L链的组合产生转基因人抗体谱系。为此,通过DNA显微注射将重排的L链(人V_k-J_k1-C_k)整合在大鼠种系中,并将获得的转基因动物与先前描述的天然表达人H链谱系的大鼠品系配种(Osborn等人,2013)。这种新的大鼠品系被命名为OmniFlic。

[0178] 使用许多不同抗原对OmniFlic大鼠的免疫产生高水平的抗原特异性IgG,类似于携带相同IgH基因座的其它转基因大鼠。通过RT-PCR进行的谱系分析鉴别了高转录物和蛋白水平下的高度可变的V_H-基因重排。此外,仅鉴别了一种也以高水平表达的L-链产物。

[0179] 来自OmniFlic的抗原特异性结合剂通过NGS获得并从cDNA文库(酵母、大肠杆菌、噬菌体)中选择,其在测序后鉴别不同的H-链转录物。为了在哺乳动物细胞中表达,将超突变的H-链构建体与原始转基因Igk序列组合转染。在这种重排的V_k-J_k1-C_k中,不允许突变变化,并且总是用各种H-链产物表达相同的L-链以产生单克隆人IgG。

[0180] 实施例3在转基因大鼠中产生抗原特异性抗体,

[0181] 为了在大鼠中产生抗原特异性重链抗体,将表达的遗传工程改造大鼠以两种方式进行免疫。

[0182] 用PD-L1和BCMA的重组细胞外结构域免疫。PD-L1和BCMA的重组细胞外结构域购自R&D Systems并用无菌盐水稀释且与佐剂组合。将免疫原与完全弗氏佐剂(CFA)和不完全弗氏佐剂(IF)或Titermax和Ribi佐剂组合。在左腿和右腿中施用CFA或Titermax中的免疫原的第一次免疫(引发)。在用CFA中的免疫原第一次免疫后,在每条腿中施用IF中的另外两

次免疫(加强)或Ribi中的另外4次免疫以及Titermax中的另外一次免疫。这种免疫顺序导致产生高亲和力抗体的B细胞的发育。免疫原浓度是每条腿10微克。在最终放血时从大鼠收集血清以确定血清滴度。

[0183] 为了产生抗人CD3 δ ϵ 抗体,使用基于DNA的免疫方案对遗传工程改造大鼠进行免疫。

[0184] 使用GENOVAC抗体技术在Aldevron, Inc. (Fargo, ND) 用人和食蟹猕猴CD3- ϵ /8构建体免疫Omniflic大鼠。在最终加强后收获引流淋巴结并分离RNA。在cDNA合成后,通过下一代测序和我们专有的内部软件表征IgH重链抗体谱系。选择显示抗原特异性阳性选择的证据的候选抗原特异性VH序列。选择编码FlicAb的数百个VH序列用于基因组装并克隆到表达载体中。随后,在HEK细胞中表达完全人FlicAb IgG1抗体以用于通过Flow和ELISA进行分析。通过流式测试人FlicAb与原代人T细胞和Jurkat细胞的结合。此外,在ELISA中使用重组CD3 δ ϵ 蛋白测试人FlicAb。所有对人T细胞具有阳性结合的FlicAb列于图1和2中。在T细胞活化测定中进一步表征选择的序列。

[0185] 实施例4抗体的表征

[0186] 图3的数据表总结了单特异性和双特异性形式的家族2的抗CD3抗体的行为。第1列示出抗CD3VH序列的序列ID。第2列示出亲本单特异性抗CD3的Jurkat细胞结合的MFI值。第3列示出亲本单特异性抗CD3的cyno T细胞结合的MFI值。第4列示出aCD3:aBCMA双特异性抗体的名称。第5列示出由通过指示剂量的结合涂覆在塑料上的BCMA蛋白的双特异性抗体刺激的pan T细胞释放的IL-2的皮克数。第6列示出由通过指示剂量的结合涂覆在塑料上的BCMA蛋白的双特异性抗体刺激的pan T细胞释放的IL-6的皮克数。第7列示出由通过指示剂量的结合涂覆在塑料上的BCMA蛋白的双特异性抗体刺激的pan T细胞释放的IL-10的皮克数。第8列示出由通过指示剂量的结合涂覆在塑料上的BCMA蛋白的双特异性抗体刺激的pan T细胞释放的IFN- γ 的皮克数。第9列示出由通过指示剂量的结合涂覆在塑料上的BCMA蛋白的双特异性抗体刺激的pan T细胞释放的TNF α 的皮克数。第10列示出在人pan T细胞存在下双特异性抗体介导的U266肿瘤细胞溶解的EC50。第11列示出在333ng/mL双特异性抗体的剂量下在双特异性抗体和人pan T细胞存在下U266肿瘤细胞的溶解百分比。第12列示出通过Octet测量的双特异性抗体的抗CD3臂的蛋白质结合亲和力。第13列示出双特异性抗体的Jurkat细胞结合的MFI值。

[0187] 实施例5双特异性抗体表征

[0188] 测试了七种aCD3_fam2:aBCMA双特异性抗体(各自具有独特的抗CD3臂和共同的抗BCMA臂)通过重定向活化的原代T细胞来杀死U266BCMA+肿瘤细胞的能力。在此实验中,将表达BCMA的U266细胞与活化的pan T细胞以10:1E:T比例混合,同时添加双特异性抗体。图4中示出,x轴示出所用抗体的浓度,并且y轴示出在添加抗体后6小时肿瘤细胞的溶解%。

[0189] 双特异性抗体介导的肿瘤细胞溶解活性与IL-2细胞因子释放的比较在图5的散点图中示出。IL-2产生与U266肿瘤细胞溶解之间的相关性是R²=0.37。双特异性抗体介导的肿瘤细胞溶解活性与IFN- γ 细胞因子释放的比较在图6的散点图中示出。IFN- γ 产生与U266肿瘤细胞溶解之间的相关性是R²=0.53。双特异性抗体介导的U266肿瘤细胞溶解活性与抗CD3结合亲和力的比较在图7的散点图中示出。U266杀死EC50与蛋白结合亲和力之间的相关性是R²=0.93。

[0190] 实施例6肿瘤细胞的溶解

[0191] 测定了 α CD3_F1F: α BCMA双特异性抗体通过重定向活化的原代T细胞杀死三种不同的BCMA+肿瘤细胞和一种BCMA阴性细胞系的能力。在此实验中,将肿瘤细胞与活化的pan T细胞以10:1E:T比例混合,同时添加双特异性抗体。结果在图8A-8D中示出。图A示出RPMI-8226细胞的杀伤,图B示出NCI-H929细胞的杀伤,图C示出U-266细胞的杀伤,并且图D示出K562细胞(阴性对照)的杀伤。x轴示出所用抗体的浓度,并且y轴示出在添加抗体后6小时肿瘤细胞的溶解%。

[0192] 在静息人T细胞与各种肿瘤细胞系和增加剂量的 α CD3_F1F: α BCMA双特异性抗体一起培养后测量IL-2细胞因子释放的水平。图9A示出通过RPMI-8226细胞刺激的IL-2释放,图9B示出通过NCI-H929细胞刺激的IL-2释放,图9C示出通过U-266细胞刺激的IL-2释放,并且图9D示出通过K562细胞(阴性对照)刺激的IL-2释放。

[0193] 在静息人T细胞与各种肿瘤细胞系和增加剂量的 α CD3_F1F: α BCMA双特异性抗体一起培养后测量IFN- γ 细胞因子释放的水平。图10A示出通过RPMI-8226细胞刺激的IFN- γ 释放,图10B示出通过NCI-H929细胞刺激的IFN- γ 释放,图10C示出通过U-266细胞刺激的IFN- γ 释放,并且图10D示出通过K562细胞(阴性对照)刺激的IFN- γ 释放。

[0194] 提出实施例以便向本领域的普通技术人员提供如何制备和使用本发明的完全公开和说明,并且不意图限制本发明人看待其发明的范围,也不意图表示以下实验是进行的全部或仅有的实验。虽然已尽力确保就所用数字(例如量、温度等)来说的准确性,但仍应考量一些实验误差和偏差。除非另外指出,否则份数是重量份,分子量是重均分子量,温度是摄氏度并且压力是大气压或接近大气压。

[0195] 虽然本发明已经参考其特定实施方案进行了描述,但是本领域技术人员应理解,可在不脱离本发明的真实精神和范围下进行各种变化且可取代等效物。此外,为了使特定的情况、材料、物质的组合物、方法、方法步骤或步骤适应本发明的目的、精神和范围,可进行许多改进。所有此类修改均意图处于所附权利要求的范围内。

- [0001] 序列表
[0002] <110> Trinklein, Nathan
[0003] vanSchooten, Wim
[0004] Aldred, Shelley Force
[0005] Harris, Katherine
[0006] Pham, Duy
[0007] <120> CD3结合抗体
[0008] <130> TEBO-001W02
[0009] <150> 62/394,360
[0010] <151> 2016-09-14
[0011] <150> 62/491,908
[0012] <151> 2017-04-28
[0013] <160> 22
[0014] <170> 用于Windows 4.0版的FastSEQ
[0015] <210> 1
[0016] <211> 123
[0017] <212> PRT
[0018] <213> 智人
[0019] <400> 1
[0020] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
[0021] 1 5 10 15
[0022] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
[0023] 20 25 30
[0024] Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0025] 35 40 45
[0026] Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
[0027] 50 55 60
[0028] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[0029] 65 70 75 80
[0030] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
[0031] 85 90 95
[0032] Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Arg Leu Gly Gly Ala Tyr
[0033] 100 105 110
[0034] Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0035] 115 120
[0036] <210> 2
[0037] <211> 123
[0038] <212> PRT

[0039]	<213> 智人			
[0040]	<400> 2			
[0041]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly			
[0042]	1	5	10	15
[0043]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr			
[0044]	20	25	30	
[0045]	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[0046]	35	40	45	
[0047]	Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val			
[0048]	50	55	60	
[0049]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr			
[0050]	65	70	75	80
[0051]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys			
[0052]	85	90	95	
[0053]	Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Arg Leu Gly Gly Ala Tyr			
[0054]	100	105	110	
[0055]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0056]	115	120		
[0057]	<210> 3			
[0058]	<211> 123			
[0059]	<212> PRT			
[0060]	<213> 智人			
[0061]	<400> 3			
[0062]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg			
[0063]	1	5	10	15
[0064]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr			
[0065]	20	25	30	
[0066]	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[0067]	35	40	45	
[0068]	Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val			
[0069]	50	55	60	
[0070]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr			
[0071]	65	70	75	80
[0072]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys			
[0073]	85	90	95	
[0074]	Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr			
[0075]	100	105	110	
[0076]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0077]	115	120		

[0078] <210> 4
 [0079] <211> 123
 [0080] <212> PRT
 [0081] <213> 智人
 [0082] <400> 4
 [0083] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 [0084] 1 5 10 15
 [0085] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 [0086] 20 25 30
 [0087] Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0088] 35 40 45
 [0089] Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 [0090] 50 55 60
 [0091] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 [0092] 65 70 75 80
 [0093] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 [0094] 85 90 95
 [0095] Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Leu Gly Gly Ala Tyr
 [0096] 100 105 110
 [0097] Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0098] 115 120
 [0099] <210> 5
 [0100] <211> 123
 [0101] <212> PRT
 [0102] <213> 智人
 [0103] <400> 5
 [0104] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 [0105] 1 5 10 15
 [0106] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 [0107] 20 25 30
 [0108] Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0109] 35 40 45
 [0110] Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 [0111] 50 55 60
 [0112] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 [0113] 65 70 75 80
 [0114] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 [0115] 85 90 95
 [0116] Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Leu Gly Gly Ala Tyr

[0117]	100	105	110
[0118]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0119]	115	120	
[0120]	<210> 6		
[0121]	<211> 123		
[0122]	<212> PRT		
[0123]	<213> 智人		
[0124]	<400> 6		
[0125]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg		
[0126]	1 5 10 15		
[0127]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala Asn Tyr		
[0128]	20 25 30		
[0129]	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[0130]	35 40 45		
[0131]	Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val		
[0132]	50 55 60		
[0133]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
[0134]	65 70 75 80		
[0135]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys		
[0136]	85 90 95		
[0137]	Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr		
[0138]	100 105 110		
[0139]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0140]	115 120		
[0141]	<210> 7		
[0142]	<211> 123		
[0143]	<212> PRT		
[0144]	<213> 智人		
[0145]	<400> 7		
[0146]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg		
[0147]	1 5 10 15		
[0148]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr		
[0149]	20 25 30		
[0150]	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[0151]	35 40 45		
[0152]	Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val		
[0153]	50 55 60		
[0154]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
[0155]	65 70 75 80		

[0156] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Gly Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
[0157] 85 90 95
[0158] Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr
[0159] 100 105 110
[0160] Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0161] 115 120
[0162] <210> 8
[0163] <211> 123
[0164] <212> PRT
[0165] <213> 智人
[0166] <400> 8
[0167] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0168] 1 5 10 15
[0169] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala Asp Tyr
[0170] 20 25 30
[0171] Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0172] 35 40 45
[0173] Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
[0174] 50 55 60
[0175] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[0176] 65 70 75 80
[0177] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
[0178] 85 90 95
[0179] Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr
[0180] 100 105 110
[0181] Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0182] 115 120
[0183] <210> 9
[0184] <211> 123
[0185] <212> PRT
[0186] <213> 智人
[0187] <400> 9
[0188] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
[0189] 1 5 10 15
[0190] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asn Tyr
[0191] 20 25 30
[0192] Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0193] 35 40 45
[0194] Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val

[0195]	50	55	60
[0196]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr		
[0197]	65	70	75
[0198]	80		
[0199]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys		
[0200]	85	90	95
[0201]	Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr		
[0202]	100	105	110
[0203]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0204]	115	120	
[0205]	<210> 10		
[0206]	<211> 123		
[0207]	<212> PRT		
[0208]	<213> 智人		
[0209]	<400> 10		
[0210]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg		
[0211]	1	5	10
[0212]	15		
[0213]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asn Tyr		
[0214]	20	25	30
[0215]	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[0216]	35	40	45
[0217]	Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val		
[0218]	50	55	60
[0219]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
[0220]	65	70	75
[0221]	80		
[0222]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys		
[0223]	85	90	95
[0224]	Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr		
[0225]	100	105	110
[0226]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0227]	115	120	
[0228]	<210> 11		
[0229]	<211> 123		
[0230]	<212> PRT		
[0231]	<213> 智人		
[0232]	<400> 11		
[0233]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg		
[0234]	1	5	10
[0235]	15		
[0236]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr		
[0237]	20	25	30

[0234] Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0235] 35 40 45
 [0236] Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 [0237] 50 55 60
 [0238] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 [0239] 65 70 75 80
 [0240] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 [0241] 85 90 95
 [0242] Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr
 [0243] 100 105 110
 [0244] Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0245] 115 120
 [0246] <210> 12
 [0247] <211> 123
 [0248] <212> PRT
 [0249] <213> 智人
 [0250] <400> 12
 [0251] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 [0252] 1 5 10 15
 [0253] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 [0254] 20 25 30
 [0255] Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0256] 35 40 45
 [0257] Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 [0258] 50 55 60
 [0259] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 [0260] 65 70 75 80
 [0261] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 [0262] 85 90 95
 [0263] Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Ser Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr
 [0264] 100 105 110
 [0265] Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0266] 115 120
 [0267] <210> 13
 [0268] <211> 123
 [0269] <212> PRT
 [0270] <213> 智人
 [0271] <400> 13
 [0272] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

[0273]	1	5	10	15
[0274]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe His Asn Tyr			
[0275]	20	25	30	
[0276]	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[0277]	35	40	45	
[0278]	Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val			
[0279]	50	55	60	
[0280]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr			
[0281]	65	70	75	80
[0282]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys			
[0283]	85	90	95	
[0284]	Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Leu Gly Gly Ala Tyr			
[0285]	100	105	110	
[0286]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0287]	115	120		
[0288]	<210> 14			
[0289]	<211> 123			
[0290]	<212> PRT			
[0291]	<213> 智人			
[0292]	<400> 14			
[0293]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
[0294]	1	5	10	15
[0295]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr			
[0296]	20	25	30	
[0297]	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[0298]	35	40	45	
[0299]	Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val			
[0300]	50	55	60	
[0301]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr			
[0302]	65	70	75	80
[0303]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys			
[0304]	85	90	95	
[0305]	Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr			
[0306]	100	105	110	
[0307]	Cys Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0308]	115	120		
[0309]	<210> 15			
[0310]	<211> 123			
[0311]	<212> PRT			

[0312]	<213> 智人			
[0313]	<400> 15			
[0314]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg			
[0315]	1	5	10	15
[0316]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asn Tyr			
[0317]	20	25	30	
[0318]	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[0319]	35	40	45	
[0320]	Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val			
[0321]	50	55	60	
[0322]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr			
[0323]	65	70	75	80
[0324]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys			
[0325]	85	90	95	
[0326]	Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Leu Gly Gly Ala Tyr			
[0327]	100	105	110	
[0328]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0329]	115	120		
[0330]	<210> 16			
[0331]	<211> 123			
[0332]	<212> PRT			
[0333]	<213> 智人			
[0334]	<400> 16			
[0335]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg			
[0336]	1	5	10	15
[0337]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr			
[0338]	20	25	30	
[0339]	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[0340]	35	40	45	
[0341]	Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val			
[0342]	50	55	60	
[0343]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr			
[0344]	65	70	75	80
[0345]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys			
[0346]	85	90	95	
[0347]	Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Arg Leu Gly Gly Ala Tyr			
[0348]	100	105	110	
[0349]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0350]	115	120		

[0351]	<210> 17			
[0352]	<211> 123			
[0353]	<212> PRT			
[0354]	<213> 智人			
[0355]	<400> 17			
[0356]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg			
[0357]	1	5	10	15
[0358]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr			
[0359]	20	25	30	
[0360]	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[0361]	35	40	45	
[0362]	Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val			
[0363]	50	55	60	
[0364]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr			
[0365]	65	70	75	80
[0366]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys			
[0367]	85	90	95	
[0368]	Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Arg Leu Gly Gly Ala Tyr			
[0369]	100	105	110	
[0370]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0371]	115	120		
[0372]	<210> 18			
[0373]	<211> 123			
[0374]	<212> PRT			
[0375]	<213> 智人			
[0376]	<400> 18			
[0377]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg			
[0378]	1	5	10	15
[0379]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr			
[0380]	20	25	30	
[0381]	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[0382]	35	40	45	
[0383]	Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val			
[0384]	50	55	60	
[0385]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr			
[0386]	65	70	75	80
[0387]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys			
[0388]	85	90	95	
[0389]	Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Arg Leu Gly Gly Ala Tyr			

[0390]	100	105	110
[0391]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0392]	115	120	
[0393]	<210> 19		
[0394]	<211> 107		
[0395]	<212> PRT		
[0396]	<213> 智人		
[0397]	<400> 19		
[0398]	Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly		
[0399]	1 5 10 15		
[0400]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn		
[0401]	20 25 30		
[0402]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile		
[0403]	35 40 45		
[0404]	Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly		
[0405]	50 55 60		
[0406]	Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser		
[0407]	65 70 75 80		
[0408]	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Trp		
[0409]	85 90 95		
[0410]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[0411]	100 105		
[0412]	<210> 20		
[0413]	<211> 243		
[0414]	<212> PRT		
[0415]	<213> 智人		
[0416]	<400> 20		
[0417]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0418]	1 5 10 15		
[0419]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr		
[0420]	20 25 30		
[0421]	Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val		
[0422]	35 40 45		
[0423]	Ser Gly Ile Arg Gly Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
[0424]	50 55 60		
[0425]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0426]	65 70 75 80		
[0427]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0428]	85 90 95		

[0429]	Ala Lys Gln Gly Glu Asn Asp Gly Pro Phe Asp His Arg Gly Gln Gly			
[0430]	100	105	110	
[0431]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu			
[0432]	115	120	125	
[0433]	Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu			
[0434]	130	135	140	
[0435]	Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp			
[0436]	145	150	155	160
[0437]	Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val Ser Gly Ile Arg			
[0438]	165	170	175	
[0439]	Gly Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe			
[0440]	180	185	190	
[0441]	Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn			
[0442]	195	200	205	
[0443]	Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gln Gly			
[0444]	210	215	220	
[0445]	Glu Asn Asp Gly Pro Phe Asp His Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr			
[0446]	225	230	235	240
[0447]	Val Ser Ser			
[0448]	<210> 21			
[0449]	<211> 119			
[0450]	<212> PRT			
[0451]	<213> 智人			
[0452]	<400> 21			
[0453]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
[0454]	1	5	10	15
[0455]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr			
[0456]	20	25	30	
[0457]	Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val			
[0458]	35	40	45	
[0459]	Ser Gly Ile Arg Gly Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
[0460]	50	55	60	
[0461]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
[0462]	65	70	75	80
[0463]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0464]	85	90	95	
[0465]	Ala Lys Gln Gly Glu Asn Asp Gly Pro Phe Asp His Arg Gly Gln Gly			
[0466]	100	105	110	
[0467]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			

[0468]	115
[0469]	<210> 22
[0470]	<211> 128
[0471]	<212> PRT
[0472]	<213> 智人
[0473]	<400> 22
[0474]	Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
[0475]	1 5 10 15
[0476]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
[0477]	20 25 30
[0478]	Gly His Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
[0479]	35 40 45
[0480]	Trp Ile Gly Tyr Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
[0481]	50 55 60
[0482]	Leu Lys Ser Arg Val Ile Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
[0483]	65 70 75 80
[0484]	Ser Leu Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
[0485]	85 90 95
[0486]	Cys Ala Arg Trp Arg His Asp Ile Phe Ala Ala Tyr Pro Tyr Tyr Tyr
[0487]	100 105 110
[0488]	Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0489]	115 120 125

内部ID		CDR1	CDR2	CDR3
312557	SEQ ID NO:1	GFTFDDYA	ISWNNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
308261	SEQ ID NO:2	GFTFDDYA	ISWNNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
308159	SEQ ID NO:3	GFTFDDYA	ISWNNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
308160	SEQ ID NO:4	GFTFDDYA	ISWNNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
308256	SEQ ID NO:5	GFTFDDYA	ISWNNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
312585	SEQ ID NO:6	GFTFANYA	ISWNNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
312614	SEQ ID NO:7	GFTFNNYA	ISWNNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
312583	SEQ ID NO:8	GFTFADYA	ISWNNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
312586	SEQ ID NO:9	GFTFDNYA	ISWNNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
312624	SEQ ID NO:10	GFTFDNYA	ISWNNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
312578	SEQ ID NO:11	GFTFDDYA	ISWNNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
312620	SEQ ID NO:12	GFTFDDYA	ISWNNSGSI	AKDSRGYGSYSRGGAY
312634	SEQ ID NO:13	GFTFHNYA	ISWNNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
312579	SEQ ID NO:14	GFTFDDYA	ISWNNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
312630	SEQ ID NO:15	GFTFDNYA	ISWNNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
312570	SEQ ID NO:16	GFTFDDYA	ISWNNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
312567	SEQ ID NO:17	GFTFDDYA	ISWNNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
312558	SEQ ID NO:18	GFTFDDYA	ISWNNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY

图1A

312325	SEQ ID NO:19	QSVSSN	GAS	QQYNNWPWT
308902- 双价	SEQ ID NO:20	GFTVSSYG	IRGSDGST	AKQGENDGPFDH
308902	SREQ ID NO:21	GFTVSSYG	IRGSDGST	AKQGENDGPFDH

图1B

304703	SEQ ID NO. 22	GGSISGGHY	IHYSGST	ARWRHDIFAAYPYYYYGMDV
--------	---------------	-----------	---------	----------------------

图1C

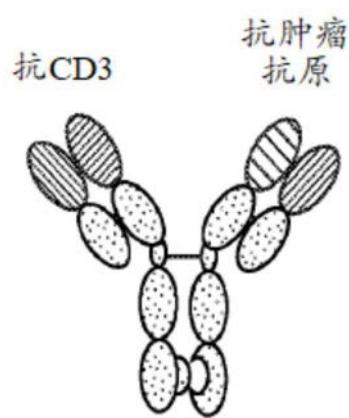


图2A

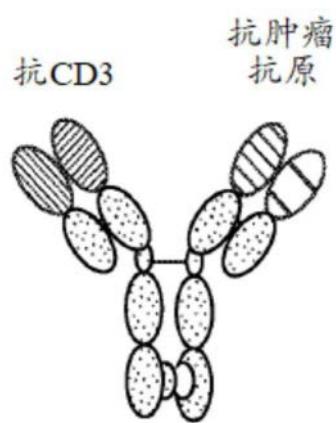


图2B

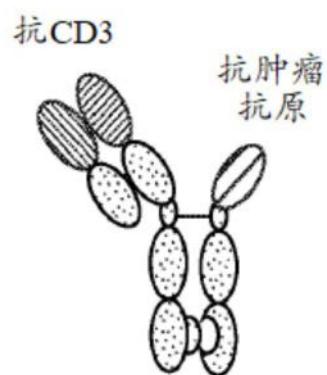


图2C

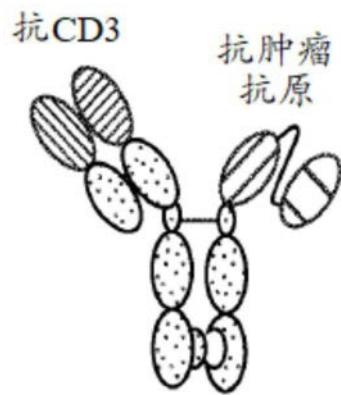


图2D

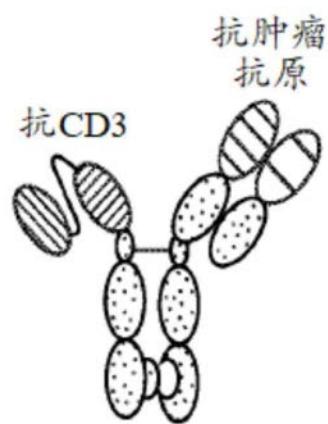


图2E

序 列 号	亲本抗CD3抗体			抗CD3抗BCMA双特异性抗体										
	抗CD3 ID	Cyto T 细胞结合 (MF)	在BsAb剂 量 ng/mL下	IL-2	IL-6	IL-10	IFNg	TNF α	杀 伤 EC50 (ng/mL)	杀 伤 (333ng/mL)	KD (nM)	Jurkat 细胞结合 (MF)		
312624	30.5	1.4	CD3_F2E-BCMA	37	111	111	12	12	705	1787	2.0	63	227	296
312585	32.7	0.9	CD3_F2C-BCMA	130	1.0	24.1	0.5	19.2	751	1821	2.1	68	44	513
312614	32.4	0.9	CD3_F2D-BCMA	93	0.5	1.5	89.9	1185	2387	6.1	63	86	357	357
312634	21.4	1.1	CD3_F2F-BCMA	294	1.5	89.9	1185	2387	6.1	63	86	67	67	
312608	25.9	1.0	CD3_F2A-BCMA	44	0.5	2.4	333	485	9.8	51	714	199	110	
312557	6.1	1.0	CD3_F2B-BCMA	96	0.5	3.3	505	1161	22.2	59	199	1000	31	
312568	4.1	1.2	CD3_F2G-BCMA	8	0.5	0.6	154	553	150.1	38	1000	ND	9	
304703	15.9	26.2	CD3_F1A-BCMA	212	0.8	48.5	746	1844	64	71	98	149	149	

图3

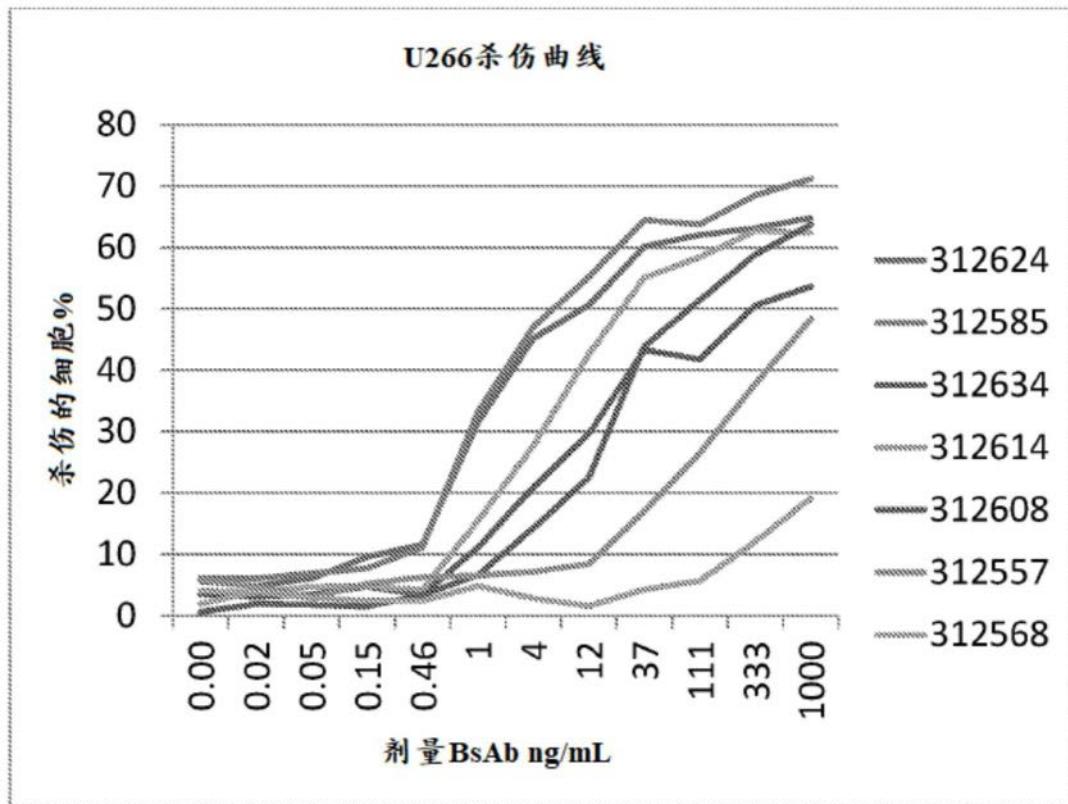


图4

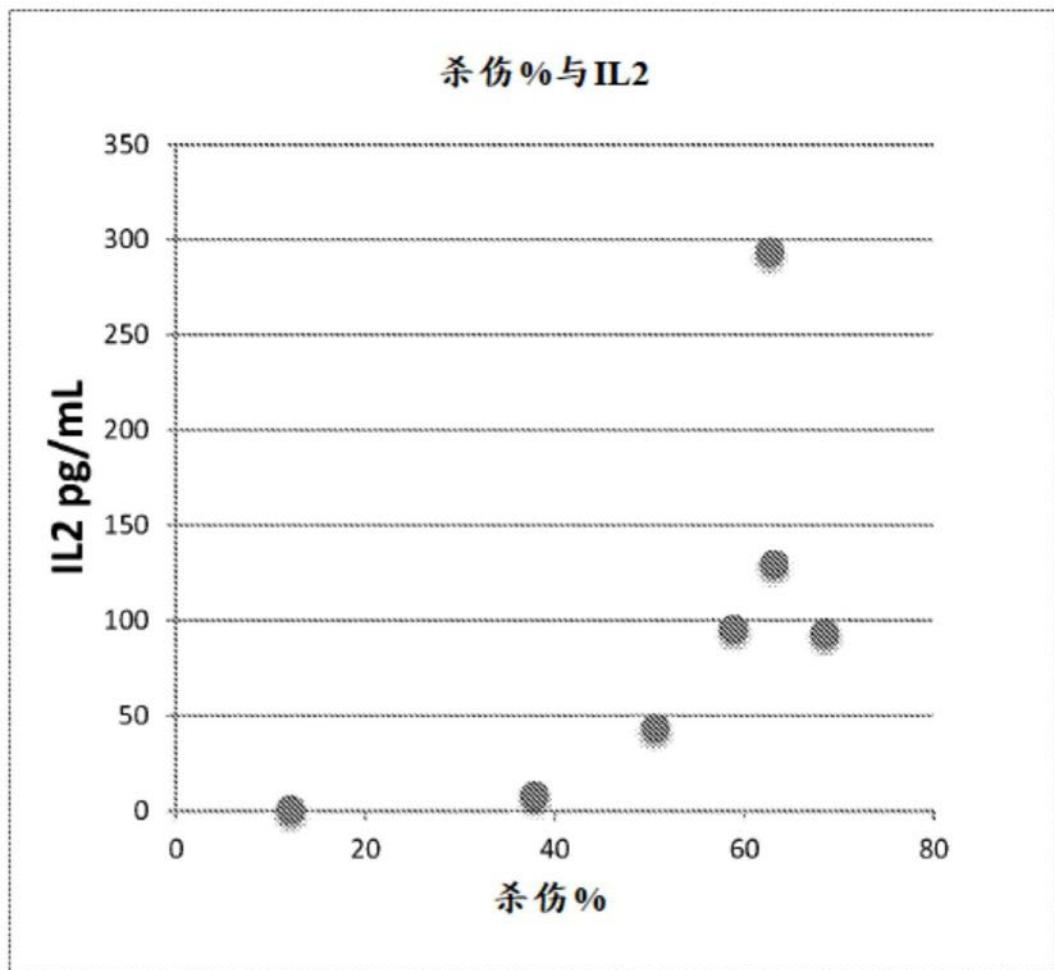


图5

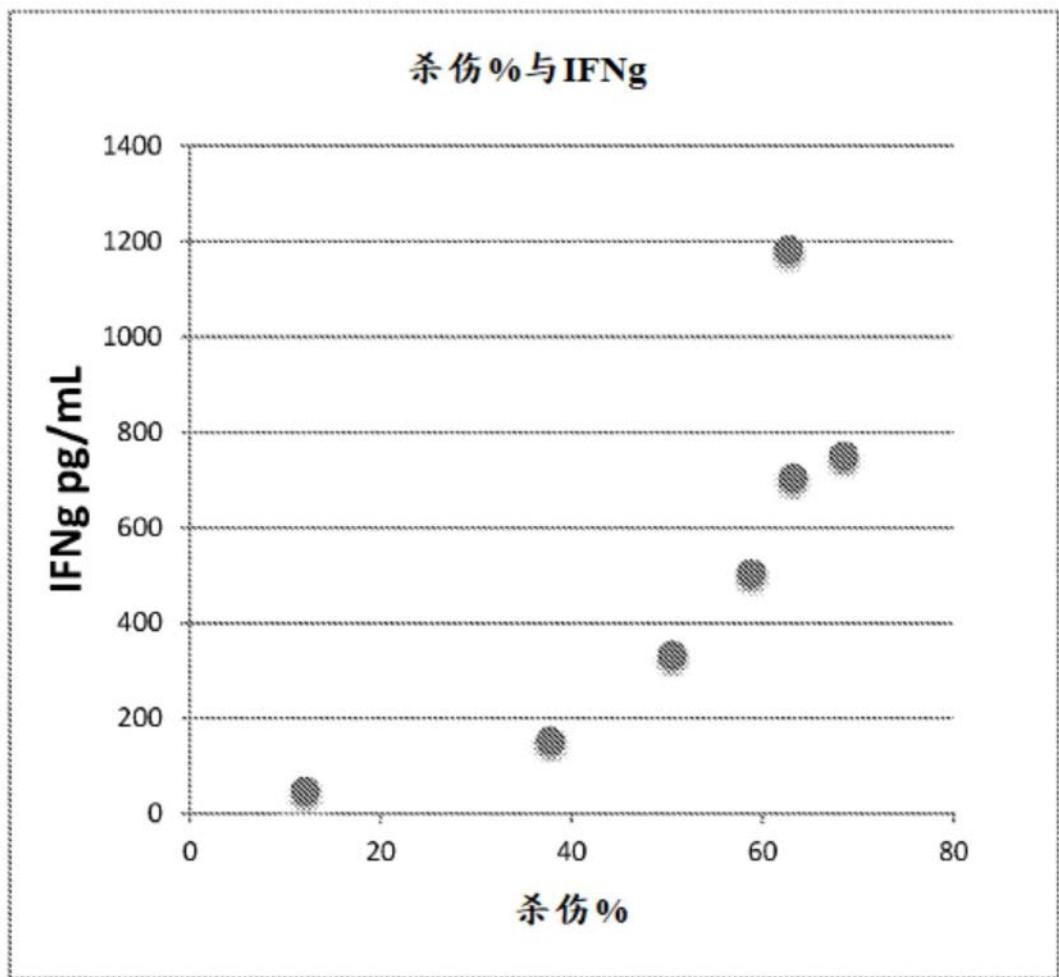


图6

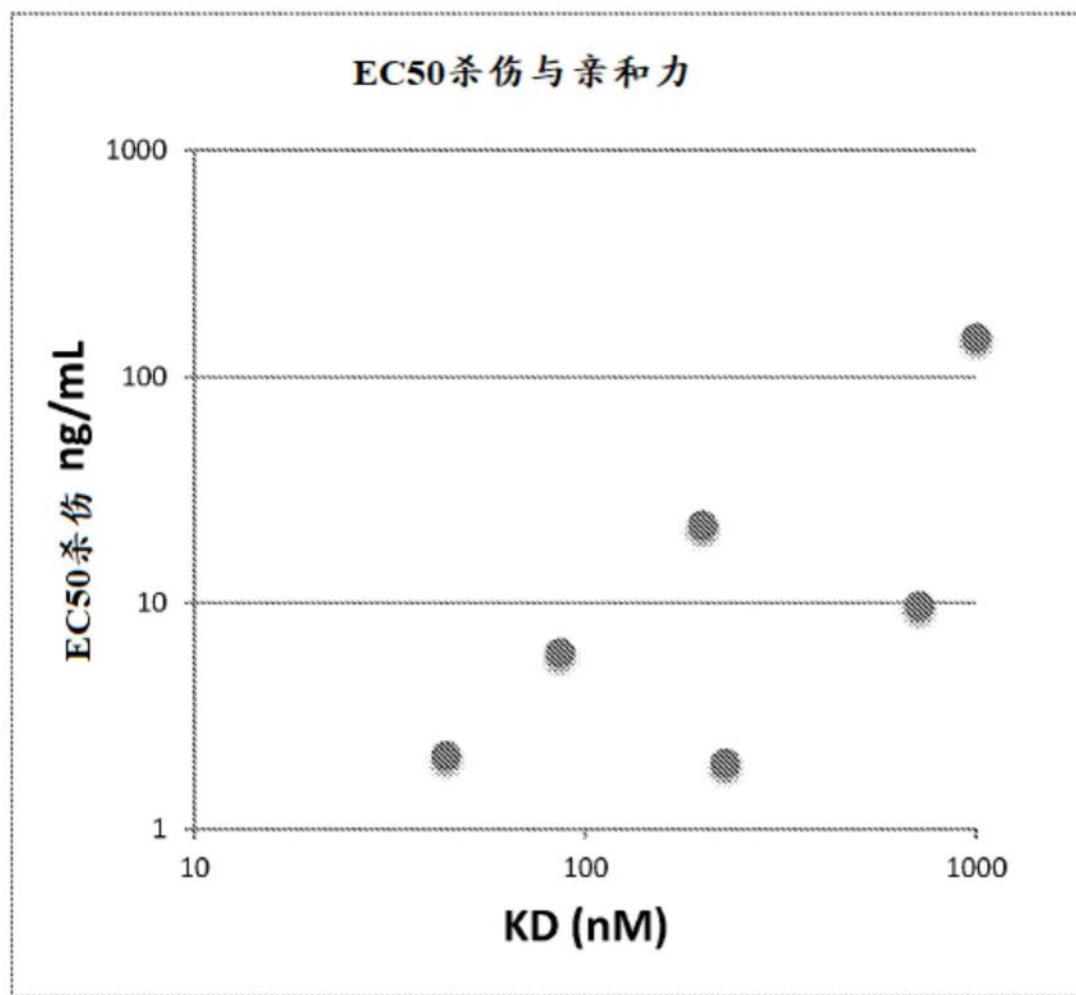


图7

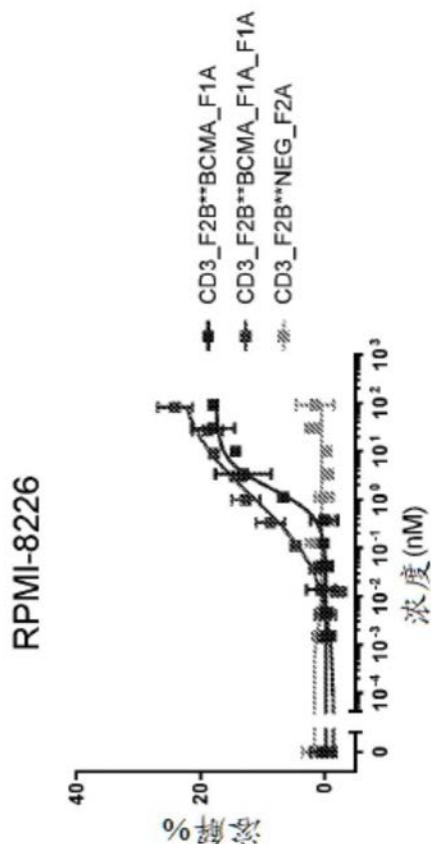


图8A

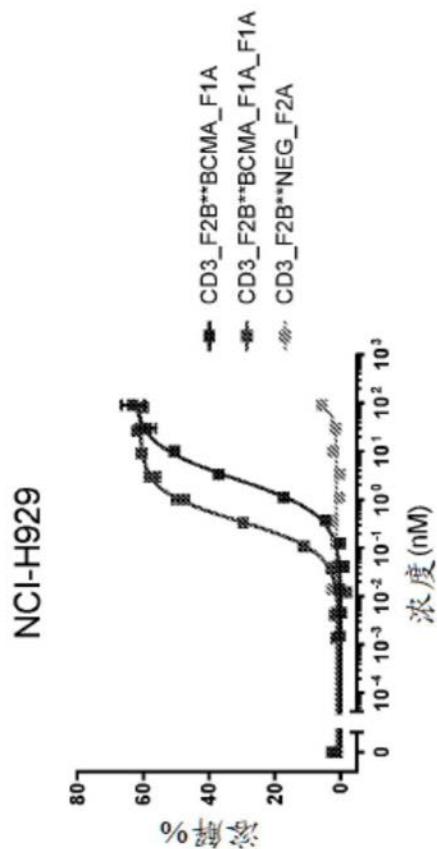


图8B

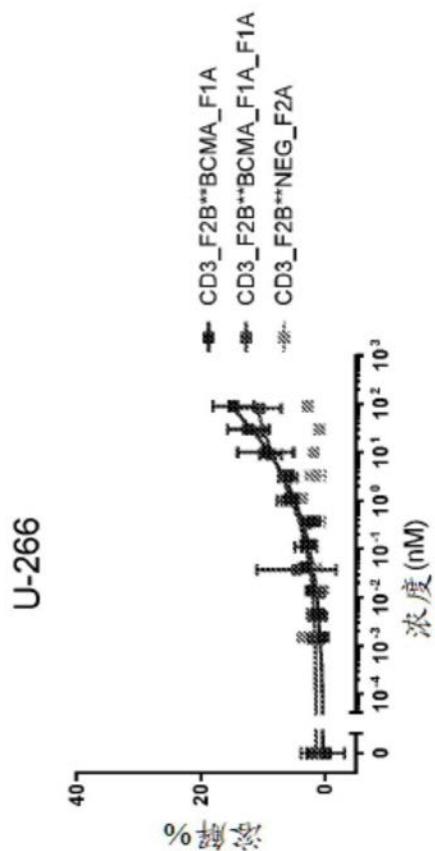


图8C

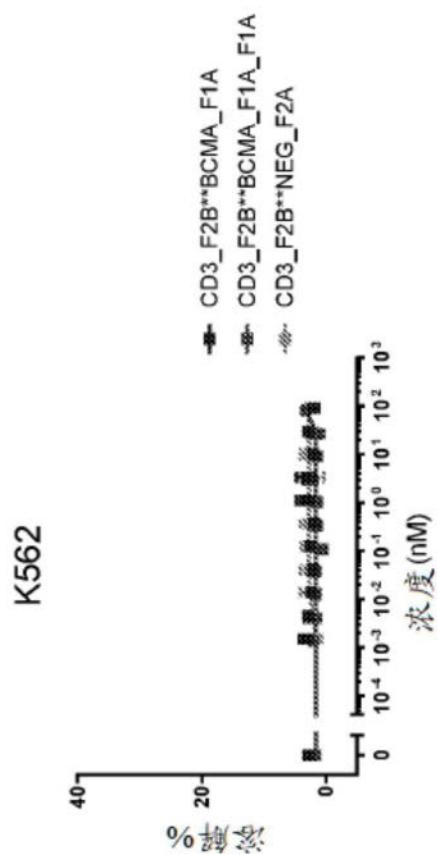


图8D

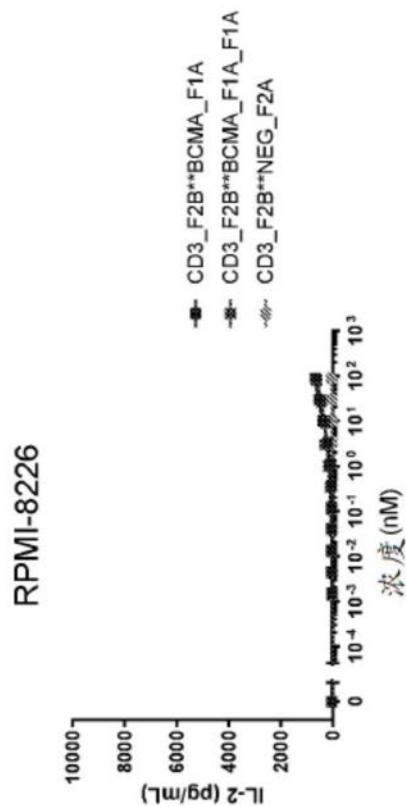


图9A

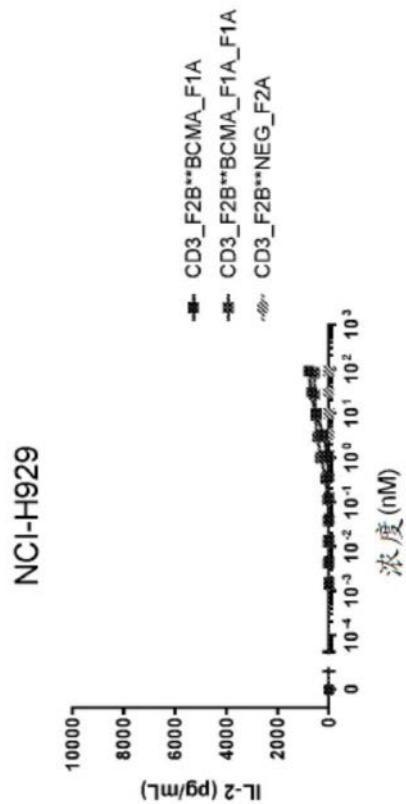


图9B

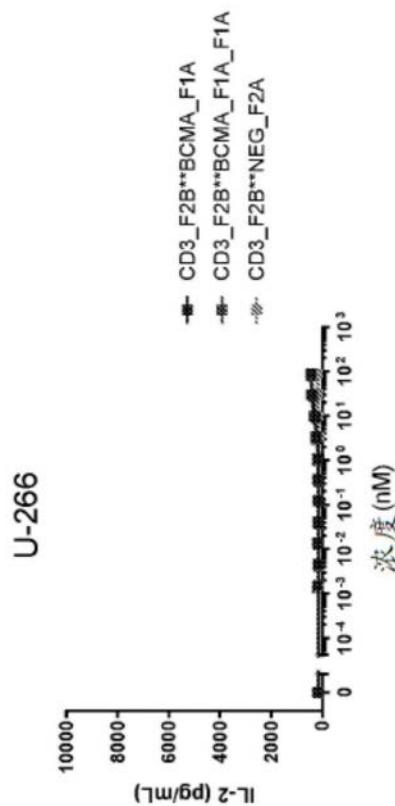


图9C

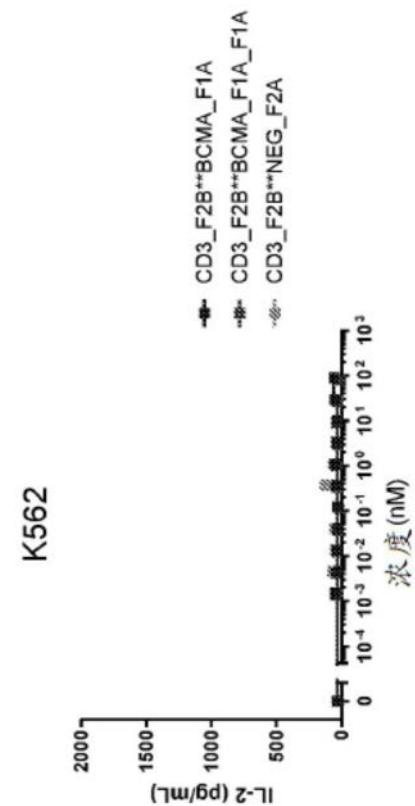


图9D

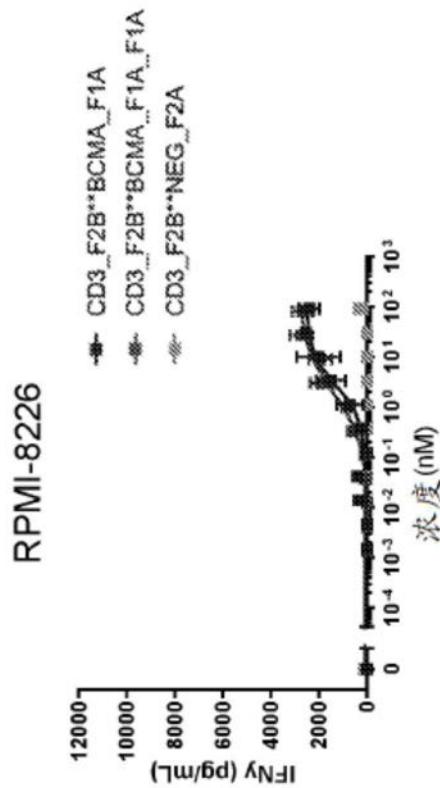


图10A

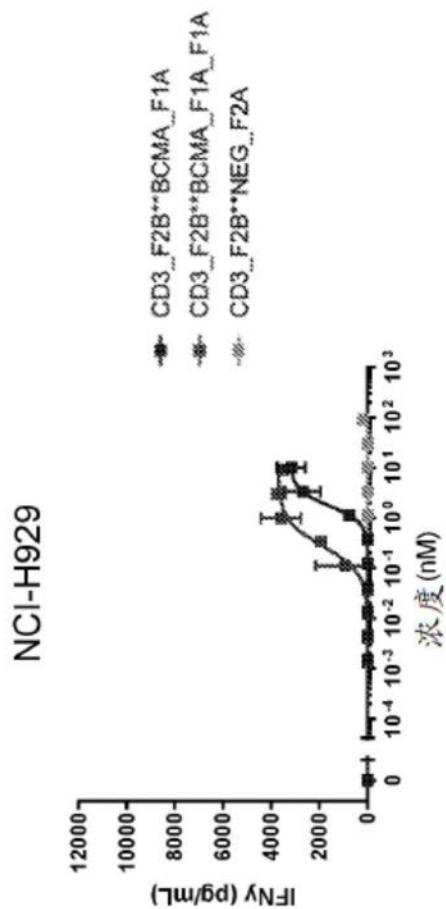


图10B

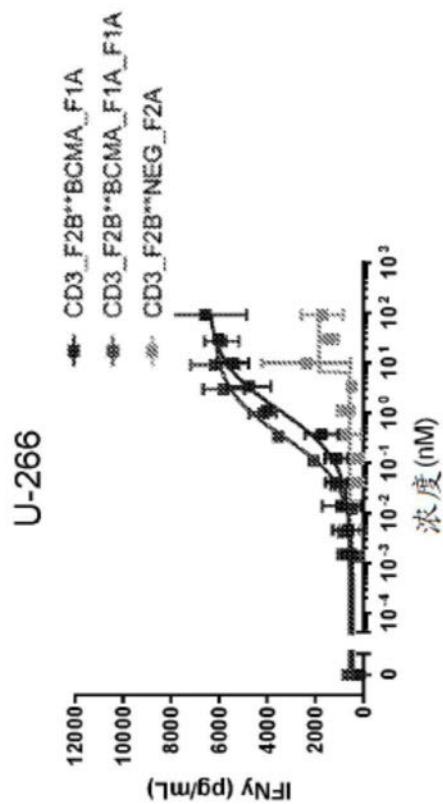


图10C

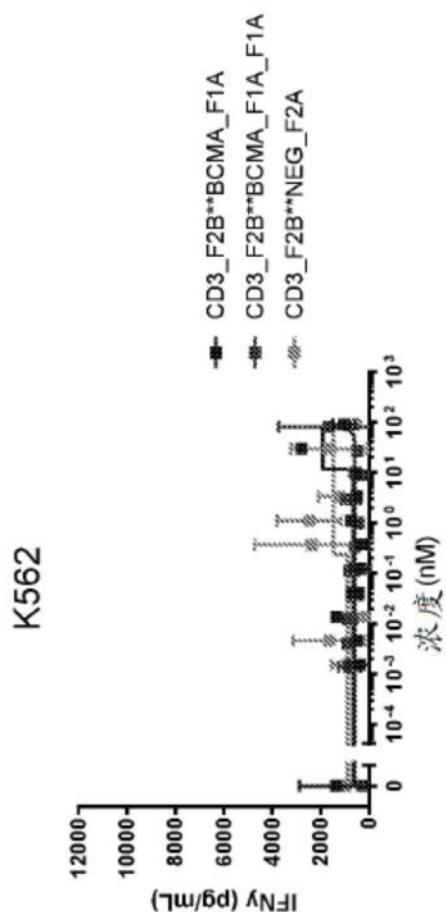


图10D