



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115515980 A

(43) 申请公布日 2022. 12. 23

(21) 申请号 202180031216.2

(22) 申请日 2021.02.25

(30) 优先权数据

62/981,990 2020.02.26 US

62/990,330 2020.03.16 US

63/094,838 2020.10.21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2022.10.26

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/019685 2021.02.25

(87) PCT国际申请的公布数据
W02021/173844 EN 2021.09.02

(71) 申请人 拜格拉夫55公司
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 伦纳德·普雷斯塔 保罗·图门

尼尔斯·隆伯格

奥玛尔·杜拉玛德

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理
有限公司 11262

专利代理师 刘晓杰 武晶晶

(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)

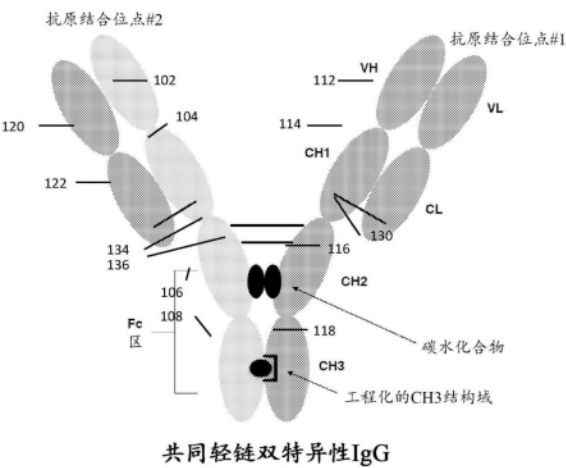
权利要求书8页 说明书74页 附图28页

(54) 发明名称

C19 C38双特异性抗体

(57) 摘要

靶向分子提供潜在途径用于治疗性干预以有效地。



1. 一种复合结合分子,其包含被配置为结合CD19的CD19结合组分和被配置为结合CD38的CD38结合组分,其中所述CD19结合组分包含抗体或其抗原结合片段,所述CD38结合组分包含抗体或其抗原结合片段。

2. 如权利要求1所述的复合结合分子,其中所述CD19结合组分和/或所述CD38结合组分包含免疫球蛋白重链和轻链对、scFv、F(ab)、F(ab')₂、单结构域抗体、来自免疫球蛋白新抗原受体的可变区片段(V_{NAR})或衍生自重链抗体的可变区(V_H)。

3. 如权利要求2所述的复合结合分子,其中所述CD19结合组分或所述CD38结合组分包含免疫球蛋白重链和轻链对。

4. 如权利要求3所述的复合结合分子,其中所述CD19结合组分和所述CD38结合组分包含免疫球蛋白重链和轻链对。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的复合结合分子,其中所述CD38结合组分包含免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链,其中所述免疫球蛋白重链包含SEQ ID NO:71-SEQ ID NO:75中任一个所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:81-SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:150-SEQ ID NO:155中任一个所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:91-SEQ ID NO:95中任一个所示的HCDR3氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链包含SEQ ID NO:101-SEQ ID NO:105中任一个所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:111-SEQ ID NO:115中任一个所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:121-SEQ ID NO:125中任一个所示的LCDR3氨基酸序列;并且其中所述CD19结合组分包含免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链,其中所述免疫球蛋白重链包含SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:15中任一个所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:25中任一个所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:31-SEQ ID NO:35中任一个所示的HCDR3氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链包含SEQ ID NO:101-SEQ ID NO:105中任一个所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:111-SEQ ID NO:115中任一个所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:121-SEQ ID NO:125中任一个所示的LCDR3氨基酸序列。

6. 如权利要求5所述的复合结合分子,其中所述CD38结合组分包含免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链,所述免疫球蛋白重链包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链与SEQ ID NO:4具有至少约90%、95%、97%、99%同一性;和/或其中所述CD19结合组分包含免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链,所述免疫球蛋白重链包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:6具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链与SEQ ID NO:4具有至少约90%、95%、97%、99%同一性。

7. 如权利要求6所述的复合结合分子,其中所述免疫球蛋白重链包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链包含与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列;和/或其中所述免疫球蛋白重链包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链包含与SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列。

8. 如权利要求1至7中任一项所述的复合结合分子,其中所述复合结合分子是共同轻链双特异性IgG。

9. 如权利要求1至3中任一项所述的复合结合分子,其中所述CD38结合组分包含免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链,所述免疫球蛋白重链包含SEQ ID NO:71-SEQ ID NO:75中任

一个所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:81-SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:150-SEQ ID NO:155中任一个所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:91-SEQ ID NO:95中任一个所示的HCDR3氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链包含SEQ ID NO:101-SEQ ID NO:105中任一个所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:111-SEQ ID NO:115中任一个所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:121-SEQ ID NO:125中任一个所示的LCDR3氨基酸序列;并且其中所述CD19结合组分包含免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链,所述免疫球蛋白重链包含SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:15中任一个所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:25中任一个所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:31-SEQ ID NO:35中任一个所示的HCDR3氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链包含SEQ ID NO:41-SEQ ID NO:45中任一个所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:55中任一个所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:61-SEQ ID NO:65中任一个所示的LCDR3氨基酸序列。

10.如权利要求9所述的复合结合分子,其中所述免疫球蛋白重链包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链与SEQ ID NO:4具有至少约90%、95%、97%、99%同一性;和/或其中所述免疫球蛋白重链包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链与SEQ ID NO:2具有至少约90%、95%、97%、99%同一性。

11.如权利要求10所述的复合结合分子,其中所述免疫球蛋白重链包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链包含与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列;并且其中所述免疫球蛋白重链包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链包含与SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列。

12.如权利要求9至11中任一项所述的复合结合分子,其中所述CD19结合组分或CD38结合组分包含scFv。

13.如权利要求12所述的复合结合分子,其中所述CD19结合组分包含scFv。

14.如权利要求12所述的复合结合分子,其中所述CD38结合组分包含scFv。

15.如权利要求9至14中任一项所述的复合结合分子,其中所述CD19结合组分或CD38结合组分包含免疫球蛋白重链/轻链对。

16.如权利要求15所述的复合结合分子,其中所述CD19结合组分包含免疫球蛋白重链/轻链对。

17.如权利要求15所述的复合结合分子,其中所述CD38结合组分包含免疫球蛋白重链/轻链对。

18.如权利要求1至17中任一项所述的复合结合分子,其中所述CD38结合组分包含HCDR2氨基酸序列,所述HCDR2氨基酸序列包含序列P-X1-LG-X2-A,其中X1和X2各自选自H、Q、T、N、S、G、A、R、K、D或E。

19.如权利要求18所述的复合结合分子,其中X1是H并且X2是T。

20.如权利要求1至19中任一项所述的复合结合分子,其中结合CD19的重链可变区包含根据Kabat编号的A84S和A108L修饰。

21.如权利要求1至20中任一项所述的复合结合分子,其中结合CD38的轻链可变区包含根据Kabat编号的W32H修饰。

22. 一种复合结合分子, 其中所述复合结合分子包含结合CD38的CD38抗原结合组分和结合CD19的CD19抗原结合组分, 所述结合CD38的CD38抗原结合组分包含与抗CD38免疫球蛋白轻链可变区配对的抗CD38免疫球蛋白重链可变区, 所述结合CD19的CD19抗原结合组分包含与抗CD38免疫球蛋白轻链可变区配对的抗CD19免疫球蛋白重链可变区, 其中所述CD38抗原结合组分包含:

a) 重链互补决定区1 (HCDR1), 其包含SEQ ID NO:71-SEQ ID NO:75中任一个所示的氨基酸序列;

b) 重链互补决定区2 (HCDR2), 其包含SEQ ID NO:81-SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:150-SEQ ID NO:155中任一个所示的氨基酸序列;

c) 重链互补决定区3 (HCDR3), 其包含SEQ ID NO:91-SEQ ID NO:95中任一个所示的氨基酸序列;

d) 轻链互补决定区1 (LCDR1), 其包含SEQ ID NO:101-SEQ ID NO:105中任一个所示的氨基酸序列;

e) 轻链互补决定区2 (LCDR2), 其包含SEQ ID NO:111-SEQ ID NO:115中任一个所示的氨基酸序列; 和/或

f) 轻链互补决定区3 (LCDR3), 其包含SEQ ID NO:121-SEQ ID NO:125中任一个所示的氨基酸序列;

其中所述CD19抗原结合组分包含:

g) 重链互补决定区1 (HCDR1), 其包含SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:15中任一个所示的氨基酸序列;

h) 重链互补决定区2 (HCDR2), 其包含SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:25中任一个所示的氨基酸序列;

i) 重链互补决定区3 (HCDR3), 其包含SEQ ID NO:31-SEQ ID NO:35中任一个所示的氨基酸序列;

j) 轻链互补决定区1 (LCDR1), 其包含SEQ ID NO:101-SEQ ID NO:105中任一个所示的氨基酸序列;

k) 轻链互补决定区2 (LCDR2), 其包含SEQ ID NO:111-SEQ ID NO:115中任一个所示的氨基酸序列; 和/或

l) 轻链互补决定区3 (LCDR3), 其包含SEQ ID NO:121-SEQ ID NO:125中任一个所示的氨基酸序列。

23. 如权利要求22所述的复合结合分子, 其中所述CD38抗原结合组分包含HCDR2氨基酸序列, 所述HCDR2氨基酸序列包含序列P-X1-L-G-X2-A, 其中X1和X2各自选自H、Q、T、N、S、G、A、R、K、D或E。

24. 如权利要求23所述的复合结合分子, 其中X1是H并且X2是T。

25. 如权利要求22至24中任一项所述的复合结合分子, 其中所述CD38抗原结合组分包含免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区, 所述免疫球蛋白重链可变区包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列, 所述免疫球蛋白轻链可变区包含与SEQ ID NO:4具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列。

26. 如权利要求25所述的复合结合分子,其中所述CD38抗原结合组分包含免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区,所述免疫球蛋白重链可变区包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5相同的氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链可变区包含与SEQ ID NO:4相同的氨基酸序列。

27. 如权利要求22至26中任一项所述的复合结合分子,其中所述CD19抗原结合组分包含抗CD19免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区,所述抗CD19免疫球蛋白重链可变区包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:6具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链可变区包含与SEQ ID NO:4具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列。

28. 如权利要求27所述的复合结合分子,其中所述抗CD19抗原结合组分包含免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区,所述免疫球蛋白重链可变区包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:6相同的氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链可变区包含与SEQ ID NO:4相同的氨基酸序列。

29. 如权利要求22至28中任一项所述的复合结合分子,其中所述抗CD38免疫球蛋白重链可变区进一步包含第一免疫球蛋白重链恒定区。

30. 如权利要求22至29中任一项所述的复合结合分子,其中所述抗CD38免疫球蛋白轻链可变区进一步包含免疫球蛋白轻链恒定区。

31. 如权利要求22至30中任一项所述的复合结合分子,其中所述抗CD19免疫球蛋白重链可变区进一步包含第二免疫球蛋白重链恒定区。

32. 如权利要求22至31中任一项所述的复合结合分子,其中所述第一免疫球蛋白重链恒定区和/或所述第二免疫球蛋白重链恒定区包含一个或多个氨基酸取代,所述氨基酸取代不利于所述抗CD38免疫球蛋白重链恒定区的同二聚化和/或促进所述第一重链恒定区和所述第二重链恒定区的异二聚化。

33. 如权利要求32所述的复合结合分子,其中所述第一免疫球蛋白重链恒定区或所述第二免疫球蛋白重链恒定区中之一包含T366W取代(EU编号),并且所述第一免疫球蛋白重链恒定区或所述第二免疫球蛋白重链恒定区中另一个包含T366S/L368A/Y407V取代(EU编号),使得与所述第一免疫球蛋白重链恒定区或所述第二免疫球蛋白重链恒定区的同二聚化相比更有利于所述第一免疫球蛋白重链恒定区和所述第二免疫球蛋白重链恒定区的异二聚化。

34. 如权利要求22至33中任一项所述的复合结合分子,其中所述CD19抗原结合组分包含SEQ ID NO:201所示的重链免疫球蛋白序列和SEQ ID NO:213所示的轻链免疫球蛋白序列,所述CD38结合组分包含SEQ ID NO:202所示的重链免疫球蛋白序列和SEQ ID NO:213所示的轻链免疫球蛋白序列。

35. 如权利要求22至34中任一项所述的复合结合分子,其中结合CD19的重链可变区包含根据Kabat编号的A84S和A108L修饰。

36. 如权利要求22至35中任一项所述的复合结合分子,其中结合CD38的轻链可变区包含根据Kabat编号的W32H修饰。

37. 如权利要求22至36中任一项所述的复合结合分子,其中由所述CD38抗原结合组分和所述CD19抗原结合组分形成单个双特异性结合分子。

38.一种复合结合分子,其包含结合至CD19的CD19结合组分和结合至CD38的CD38结合组分,其中所述CD19结合组分包含结合至CD19的scFv,并且所述CD38结合组分包含含有结合至CD38的轻链可变区和重链可变区的Fab区。

39.如权利要求38所述的复合结合分子,其中所述结合至CD19的scFv与第一免疫球蛋白重链恒定区偶联。

40.如权利要求38或39所述的复合结合分子,其中所述CD38结合组分重链可变区进一步包含第二免疫球蛋白重链恒定区。

41.如权利要求38至40中任一项所述的复合结合分子,其中所述CD38结合组分的轻链可变区进一步包含免疫球蛋白轻链恒定区。

42.如权利要求38至41中任一项所述的复合结合分子,其中所述CD19结合组分包含SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:15中任一个所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:25中任一个所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:31-SEQ ID NO:35中任一个所示的HCDR3氨基酸序列;并且所述免疫球蛋白轻链包含SEQ ID NO:41-SEQ ID NO:45中任一个所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:55中任一个所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:61-SEQ ID NO:65中任一个所示的LCDR3氨基酸序列。

43.如权利要求38至42中任一项所述的复合结合分子,其中所述CD38结合组分包含SEQ ID NO:71-SEQ ID NO:75中任一个所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:81-SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:150至SEQ ID NO:155中任一个所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:91-SEQ ID NO:95中任一个所示的HCDR3氨基酸序列;并且所述免疫球蛋白轻链包含SEQ ID NO:101-SEQ ID NO:105中任一个所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:111-SEQ ID NO:115中任一个所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:121-SEQ ID NO:125中任一个所示的LCDR3氨基酸序列。

44.如权利要求43所述的复合结合分子,其中所述CD38结合组分包含HCDR2氨基酸序列,所述HCDR2氨基酸序列包含序列P-X1-L-G-X2-A,其中X1和X2各自选自H、Q、T、N、S、G、A、R、K、D或E。

45.如权利要求44所述的复合结合分子,其中X1是H并且X2是T。

46.如权利要求38至45中任一项所述的复合结合分子,其中所述CD19结合组分包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列;和与SEQ ID NO:2具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的免疫球蛋白轻链。

47.如权利要求38至45中任一项所述的复合结合分子,其中所述CD38结合组分包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列;和与SEQ ID NO:4具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列。

48.权利要求38至47中任一项的复合结合分子,其中所述CD19结合组分包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列;和与SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列。

49.权利要求38至48中任一项的复合结合分子,其中所述CD38结合组分包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列;和与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列。

50.如权利要求38至49中任一项所述的复合结合分子,其中所述第一免疫球蛋白重链

恒定区和/或所述第二免疫球蛋白重链恒定区包含一个或多个氨基酸取代,所述氨基酸取代不利于所述抗CD38免疫球蛋白重链恒定区的同二聚化和/或促进所述第一重链恒定区和所述第二重链恒定区的异二聚化。

51.如权利要求50所述的复合结合分子,其中所述第一免疫球蛋白重链恒定区或所述第二免疫球蛋白重链恒定区中之一包含T366W取代(EU编号),并且所述第一免疫球蛋白重链恒定区或所述第二免疫球蛋白重链恒定区中另一个包含T366S/L368A/Y407V取代(EU编号),使得与所述第一免疫球蛋白重链恒定区或所述第二免疫球蛋白重链恒定区的同二聚化相比更有利于所述第一免疫球蛋白重链恒定区和所述第二免疫球蛋白重链恒定区的异二聚化。

52.如权利要求38至51中任一项所述的复合结合分子,其中所述CD19结合组分包含SEQ ID NO:213中任一个所示的序列,并且所述CD38结合组分包含分别在SEQ ID NO:213和SEQ ID NO:202中所示的轻链和重链。

53.如权利要求38至52中任一项所述的复合结合分子,其中结合CD19的重链可变区包含根据Kabat编号的A84S和A108L修饰。

54.如权利要求38至53中任一项所述的复合结合分子,其中结合CD38的轻链可变区包含根据Kabat编号的W32H修饰。

55.如权利要求38至54中任一项所述的复合结合分子,其中由所述CD38抗原结合组分和所述CD19抗原结合组分形成单个双特异性结合分子。

56.如权利要求1至55中任一项所述的复合结合分子,其中所述复合结合分子是双特异性抗体或其双抗原结合片段。

57.如权利要求1至55中任一项所述的复合结合分子,其包含含有天然碳水化合物或去岩藻糖基化碳水化合物修饰的氨基酸残基的Fc区。

58.如权利要求57所述的复合结合分子,其中所述天然碳水化合物或去岩藻糖基化碳水化合物修饰的氨基酸残基对应于根据EU编号的天冬酰胺297。

59.如权利要求1至58中任一项所述的复合结合分子,其中所述复合结合分子结合至CD19⁺、CD38⁺B细胞。

60.如权利要求1至59中任一项所述的复合结合分子,其中与包含Fc区的CD19或CD38单特异性抗体相比,所述复合结合分子结合表现出降低的血凝。

61.一条核酸或多条核酸,其包含编码如权利要求1至60中任一项所述的复合结合分子的多核苷酸序列。

62.如权利要求61所述的核酸,其中编码所述复合结合分子的所述多核苷酸序列与真核调控序列可操作地偶联。

63.一种细胞,其包含如权利要求61或62所述的核酸。

64.如权利要求63所述的细胞,其中所述细胞包括原核细胞。

65.如权利要求64所述的原核细胞,其中所述原核细胞是大肠杆菌细胞。

66.如权利要求63所述的细胞,其中所述细胞包括真核细胞。

67.如权利要求66所述的真核细胞,其中所述真核细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NS0鼠骨髓瘤细胞或人PER.C6细胞。

68.一种组合物,其包含如权利要求1至60中任一项所述的复合结合分子和药学上可接

受的稀释剂、载剂或赋形剂。

69. 如权利要求68所述的组合物,其被配制用于静脉内施用。

70. 如权利要求68所述的组合物,其被配制用于皮下施用。

71. 如权利要求1至60中任一项所述的复合结合分子或如权利要求68至70中任一项所述的组合物,用于治疗个体中的肿瘤或癌症的方法中。

72. 如权利要求71所述的用途,其中所述癌症或所述肿瘤是血液癌症。

73. 如权利要求72所述的用途,其中所述血液癌症是B细胞恶性肿瘤。

74. 如权利要求73所述的用途,其中所述B细胞恶性肿瘤是B细胞急性淋巴细胞白血病。

75. 如权利要求74所述的用途,其中所述B细胞恶性肿瘤是慢性淋巴细胞白血病、小淋巴细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤(弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡型淋巴瘤)。

76. 如权利要求72所述的用途,其中所述血液癌症是血浆恶性肿瘤。

77. 如权利要求76所述的用途,其中所述血浆恶性肿瘤是多发性骨髓瘤。

78. 如权利要求72-77中任一项所述的用途,其中所述血液癌症表达CD19和CD38。

79. 如权利要求71所述的用途,其中所述癌症或所述肿瘤是实体组织癌。

80. 如权利要求79所述的用途,其中所述实体组织癌包括乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、肺癌、肾癌、胃癌、食道癌、皮肤癌、结直肠癌、脑癌或头颈癌。

81. 如权利要求80所述的用途,其中所述乳腺癌是三阴性乳腺癌,所述肺癌是非小细胞肺癌,所述头颈癌是头颈鳞状细胞癌,所述肾癌是肾细胞癌,所述脑癌是多形性胶质母细胞瘤,或者所述皮肤癌是黑色素瘤。

82. 如权利要求1至60中任一项所述的复合结合分子或如权利要求68至70中任一项所述的组合物,用于降低和/或调节个体的肿瘤中、肿瘤附近或肿瘤周围的肿瘤浸润性B细胞和/或免疫抑制性B细胞的功能的方法。

83. 如权利要求1至60中任一项所述的复合结合分子或如权利要求68至70中任一项所述的组合物,用于降低和/或调节个体的肿瘤中、肿瘤附近或肿瘤周围的免疫抑制性B细胞的功能的方法中。

84. 如权利要求82或83所述的用途,其中免疫抑制性B细胞的所述功能包括释放IL-10、IL-35、TGF- β 或其组合。

85. 如权利要求1至60中任一项所述的复合结合分子或如权利要求68至70中任一项所述的组合物,用于降低免疫抑制性B细胞的免疫抑制的方法中。

86. 如权利要求82至85中任一项所述的用途,其中所述肿瘤浸润性B细胞或所述免疫抑制性B细胞包括CD19阳性B细胞、CD38⁺阳性B细胞、CD19、CD38双阳性B细胞或其组合。

87. 一种治疗患有癌症或肿瘤的个体的方法,所述方法包括向患有所述癌症或所述肿瘤的所述个体施用如权利要求1至60中任一项所述的复合结合分子或如权利要求68至70中任一项所述的组合物,从而治疗所述癌症或肿瘤。

88. 如权利要求87所述的方法,其中所述癌症或肿瘤是血液癌症。

89. 如权利要求88所述的方法,其中所述血液癌症是B细胞恶性肿瘤。

90. 如权利要求89所述的方法,其中所述B细胞恶性肿瘤是B细胞急性淋巴细胞白血病。

91. 如权利要求89所述的方法,其中所述B细胞恶性肿瘤是慢性淋巴细胞白血病、小淋巴细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤(弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡型淋巴瘤)。

92. 方法88的用途,其中所述血液癌症是血浆恶性肿瘤。

93. 方法92的用途,其中所述血浆恶性肿瘤是多发性骨髓瘤。

94. 如权利要求88-93中任一项所述的方法,其中所述血液癌症表达CD19和CD38。

95. 如权利要求87所述的方法,其中所述癌症或肿瘤是实体组织癌。

96. 如权利要求95所述的方法,其中所述实体组织癌包括乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、肺癌、肾癌、胃癌、食道癌、皮肤癌、结直肠癌或头颈癌。

97. 如权利要求96所述的方法,其中所述乳腺癌是三阴性乳腺癌,所述肺癌是非小细胞肺癌,所述头颈癌是头颈鳞状细胞癌,所述肾癌是肾细胞癌,所述脑癌是多形性胶质母细胞瘤,或者所述皮肤癌是黑色素瘤。

98. 一种减少患有肿瘤或癌症的个体的肿瘤中、肿瘤附近或肿瘤周围的肿瘤浸润性B细胞的方法,所述方法包括向患有所述肿瘤或所述癌症的所述个体施用如权利要求1至60中任一项所述的复合结合分子或如权利要求68至70中任一项所述的组合物,从而减少所述肿瘤中的肿瘤浸润性B细胞。

99. 一种减少患有肿瘤或癌症的个体的肿瘤中、肿瘤附近或肿瘤周围的免疫抑制性B细胞的方法,所述方法包括向患有所述肿瘤或所述癌症的所述个体施用如权利要求1至60中任一项所述的复合结合分子或如权利要求68至70中任一项所述的组合物,从而减少所述肿瘤中的免疫抑制性B细胞。

100. 一种抑制患有肿瘤或癌症的个体的肿瘤中、肿瘤附近或肿瘤周围的免疫抑制性B细胞的功能的方法,所述方法包括向患有所述肿瘤或所述癌症的所述个体施用如权利要求1至60中任一项所述的复合结合分子或如权利要求68至70中任一项所述的组合物,从而减少所述肿瘤中的免疫抑制性B细胞的免疫抑制。

101. 一种抑制肿瘤中、肿瘤附近或肿瘤周围的免疫抑制性B细胞的功能的方法,所述方法包括使所述免疫抑制性B细胞与如权利要求1至60中任一项所述的复合结合分子或如权利要求68至70中任一项所述的组合物接触,从而减少所述肿瘤中的免疫抑制性B细胞的免疫抑制。

102. 如权利要求100或101所述的方法,其中免疫抑制性B细胞的所述功能包括释放IL-10、IL-35、TGF- β 或其组合。

103. 如权利要求98至102中任一项所述的方法,其中所述肿瘤浸润性B细胞或所述免疫抑制性B细胞包括CD19阳性B细胞、CD38⁺阳性B细胞、CD19、CD38双阳性B细胞或其组合。

104. 一种制备如权利要求1至60中任一项所述的复合结合分子的方法,所述方法包括在细胞培养基中在足以允许所述复合结合分子表达、组装和分泌到所述细胞培养基中的条件下孵育如权利要求66或67所述的细胞。

105. 如权利要求104所述的方法,其包括从所述细胞培养基中分离和纯化所述分子。

106. 一种为个体准备癌症治疗的方法,所述方法包括将如权利要求1至60中任一项所述的复合结合分子与药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂混合。

C19 C38双特异性抗体

交叉引用

[0001] 本申请要求于2020年2月26日提交的美国临时申请号62/981,990、2020年3月16日提交的美国临时申请号62/990,330和2020年10月21日提交的美国临时申请号63/094,838的权益,这些申请通过引用并入本文。

背景技术

[0002] 抗体治疗剂已成功用于治疗多种疾病;然而,它们的应用在复杂疾病(如癌症)的临床功效方面可能受到限制。工程化基于抗体的治疗剂以改变靶结合亲和力和效价为提高功效和改善治疗结果提供了潜在途径。因此,双特异性或多价抗体提供了一种潜在的方法来解决与复杂疾病的多因素性质相关的挑战。通过结合两种不同的抗原分子或同一抗原的不同表位,双特异性抗体提供了更大的功能,并作为治疗多种疾病的靶向剂提供了广泛的应用。

发明内容

[0003] 癌症生物学和免疫系统之间的动态关系是与临床结果相关的因素。免疫反应在癌症发展过程中在调控肿瘤微环境中起重要作用。因此,免疫细胞如T细胞和B细胞充当癌症进展或转移的调节剂和效应剂。值得注意的是,免疫抑制性细胞在抗肿瘤免疫反应中发挥重要作用,其中免疫抑制通常与肿瘤生长和侵袭有关,并与负面结果相关。尽管已知B细胞可以正向调节免疫反应,但免疫抑制性B细胞群的功能是抑制抗肿瘤免疫反应,从而有利于肿瘤生长。

[0004] 本文提供了以双特异性或多价靶向分子靶向免疫抑制性B细胞群的某些结合分子。靶向免疫抑制性B细胞群为癌症的治疗性干预提供了途径,所述治疗性干预有效调节抗肿瘤免疫反应以改善治疗结果(例如,与选择性耗竭上皮癌细胞群相比)。本文提供的结合分子可以包含结合至B细胞谱系表面标志物(例如CD19、CD138、IgA和/或CD20)和免疫抑制性B细胞表面标志物(例如,IgD、CD1、CD5、CD21、CD24、CD38、HM13、SLAMF7、AQP3和/或潜伏TGF- β (例如,TGF-BLAP))的双特异性抗体。在某个具体实施方案中,双特异性抗体结合至CD19和CD38,因此对特定的免疫抑制性B细胞群具有选择性。

[0005] 如本文所提供和描述的,结合至CD19和CD38的双特异性抗体在选择性结合表达CD19和CD38的细胞(例如免疫抑制性B细胞群)方面具有优势。此外,本文公开的结合至CD19和CD38的双特异性抗体显示出的优势在于它们不促进溶血或血凝,尤其是与单特异性CD19或CD38抗体相比时。因此,克服了使用单特异性CD19或CD38抗体(例如SARCLISA[®](isatuximab-irfc))出现的严重副作用,例如贫血。结合至CD19和CD38的双特异性抗体显示出的优势还在于因为它们有效地促进了表达CD19和CD38的细胞的有利靶细胞凋亡,尤其是与单特异性对照相比时。此外,结合至CD19和CD38的双特异性抗体比仅使用两种独立靶向CD38和CD19的单克隆抗体更具优势,这些优势在于它们更有效地靶向特定的免疫抑制性B细胞群,从而导致更高的有效性和潜在更低的在其他B细胞靶向单克隆抗体(例如,利妥昔

单抗) 情况下所见的副作用, 例如淋巴细胞减少症。

[0006] 本文描述了一种复合结合分子, 其包含被配置为结合第一靶标的第一结合组分和被配置为结合第二靶标的第二结合组分, 其中第一靶标包括B细胞谱系表面标志物, 并且其中第二靶标包括免疫抑制性B细胞表面标志物, 其中第一靶标和第二靶标不相同。在一些实施方案中, 第一结合组分或第二结合组分包含多肽。在一些实施方案中, 第一结合组分或第二结合组分由多肽组成。在一些实施方案中, 第一结合组分和第二结合组分包含多肽。在一些实施方案中, 第一结合组分和第二结合组分由多肽组成。在一些实施方案中, 第一结合组分或第二结合组分的多肽包含长度至少为100个氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中, 第一结合组分和第二结合组分的多肽包含长度至少为100个氨基酸残基的氨基酸序列。

[0007] 在一些实施方案中, B细胞谱系表面标志物包括CD19、CD138、IgA或CD45。在一些实施方案中, B细胞谱系表面标志物包括CD19。在一些实施方案中, B细胞谱系表面标志物由CD19组成。在一些实施方案中, 免疫抑制性B细胞表面标志物包括IgD、CD1、CD5、CD21、CD24、CD38、HM13、SLAMF7、AQP3或潜伏TGF- β (例如, TGF- β LAP)。在一些实施方案中, 免疫抑制性B细胞表面标志物包括CD38。在一些实施方案中, 免疫抑制性B细胞表面标志物由CD38组成。

[0008] 在一些实施方案中, 第一结合组分或第二结合组分包含免疫球蛋白重链和轻链对、scFv、F(ab)、F(ab')₂、单结构域抗体、来自免疫球蛋白新抗原受体的可变区片段(V_{NAR})或来自重链抗体的可变区(V_H)。在一些实施方案中, 第一结合组分和第二结合组分包含免疫球蛋白重链和轻链对、scFv、F(ab)、F(ab')₂、单结构域抗体、来自免疫球蛋白新抗原受体的可变区片段(V_{NAR})或衍生自重链抗体的可变区(V_H)。

[0009] 在一些实施方案中, 第一结合组分或第二结合组分包含免疫球蛋白重链和轻链对。在一些实施方案中, 第一结合组分和第二结合组分包含免疫球蛋白重链和轻链对。在一些实施方案中, 复合结合分子包含免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链, 其中免疫球蛋白重链包含SEQ ID NO:71-SEQ ID NO:75中任一个所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:81-SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:150-SEQ ID NO:155中任一个所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:91-SEQ ID NO:95中任一个所示的HCDR3氨基酸序列; 并且免疫球蛋白轻链包含SEQ ID NO:41-SEQ ID NO:45中任一个所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:55中任一个所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:61-SEQ ID NO:65中任一个所示的LCDR3氨基酸序列。在一些实施方案中, 免疫球蛋白重链包含与SEQ ID NO:3具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列; 并且免疫球蛋白轻链与SEQ ID NO:2具有至少约90%、95%、97%、99%同一性。在一些实施方案中, 免疫球蛋白重链包含与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列; 并且免疫球蛋白轻链包含与SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列。在一些实施方案中, 复合结合分子是共同轻链双特异性IgG。

[0010] 在一些实施方案中, 第一结合组分或第二结合组分包含scFv。在一些实施方案中, 第一结合组分和第二结合组分包含scFv。在一些实施方案中, 复合结合分子是双特异性抗体或其双抗原结合片段。

[0011] 在一些实施方案中, 双特异性抗体选自以下形式之一: 共同轻链双特异性IgG、Fab-Fc:scFv-Fc双特异性IgG、Fab-Fc-Fab:Fc双特异性IgG、Fab-Fc-scFv:Fab-Fc-scFv双特异性IgG、Fab-Fc-scFv:Fc双特异性IgG、Fab-Fc-Fab:Fab-Fc双特异性IgG、scFv-Fab-Fc:

scFv-Fab-Fc双特异性IgG、Fab-Fab-Fc:Fab-Fab-Fc双特异性IgG、Fab-Fc-Fab:Fab-Fc-Fab双特异性IgG、scFv-Fab-Fc:Fc双特异性IgG和Fab-Fc-scFv:Fab-Fc双特异性IgG。在一些实施方案中,双特异性抗体是Fab-Fc:scFv-Fc双特异性IgG。在一些实施方案中,双特异性抗体是Fab-Fc-scFv:Fab-Fc-scFv双特异性IgG。在一些实施方案中,双特异性抗体是scFv-Fab-Fc:Fc双特异性IgG。在一些实施方案中,复合结合分子包含含有天然碳水化合物或去岩藻糖基化碳水化合物修饰的氨基酸残基的Fc区。在一些实施方案中,天然碳水化合物或去岩藻糖基化碳水化合物修饰的氨基酸残基对应于根据EU编号的天冬酰胺297。

[0012] 在一些实施方案中,第一结合组分包含SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:15中任一个所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:25中任一个所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:31-SEQ ID NO:35中任一个所示的HCDR3氨基酸序列、SEQ ID NO:41-SEQ ID NO:45中任一个所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:55中任一个所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:61-SEQ ID NO:65中任一个所示的LCDR3氨基酸序列。

[0013] 在一些实施方案中,第一结合组分包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2中任一个所示的氨基酸序列具有至少约90%、95%、97%、99%同一性或100%同一性。

[0014] 在一些实施方案中,第一结合组分包含与SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列。

[0015] 在一些实施方案中,第二结合组分包含SEQ ID NO:71-SEQ ID NO:75中任一个所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:81-SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:150-SEQ ID NO:155中任一个所示的HCDR2氨基酸序列,SEQ ID NO:91-SEQ ID NO:95中任一个所示的HCDR3氨基酸序列、SEQ ID NO:101-SEQ ID NO:105中任一个所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:111-SEQ ID NO:115中任一个所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:121-SEQ ID NO:125中任一个所示的LCDR3氨基酸序列。

[0016] 在一些实施方案中,第二结合组分包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4中任一个所示的氨基酸序列具有至少约90%、95%、97%、99%同一性或100%同一性。在一些实施方案中,第二结合组分包含与SEQ ID NO:SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列。

[0017] 在一些实施方案中,复合结合分子结合至CD19⁺、CD38⁺B细胞。

[0018] 公开了一种包含编码复合结合分子的核酸的细胞。在一些实施方案中,编码复合结合分子的多核苷酸序列与真核调控序列可操作地偶联。在一些实施方案中,细胞包括原核细胞。在一些实施方案中,原核细胞是大肠杆菌细胞。在一些实施方案中,细胞包括真核细胞。在一些实施方案中,真核细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NS0鼠骨髓瘤细胞或人PER.C6细胞。

[0019] 公开了一种组合物,其包含复合结合分子和药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂。在一些实施方案中,组合物被配制用于静脉内施用。在一些实施方案中,组合物被配制用于皮下施用。

[0020] 提供了复合结合分子,用于治疗个体中的肿瘤或癌症的方法中。在一些实施方案中,癌症或肿瘤是血液癌症。在一些实施方案中,血液癌症是B细胞恶性肿瘤。在某些实施方案中,B细胞恶性肿瘤是B细胞急性淋巴细胞白血病。在某些实施方案中,B细胞恶性肿瘤是

慢性淋巴细胞白血病、小淋巴细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤(弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡型淋巴瘤)。在一些实施方案中,血液癌症是血浆恶性肿瘤。在某些实施方案中,血浆恶性肿瘤是多发性骨髓瘤。在前述任一实施方案中的一些实施方案中,血液癌症表达CD19和CD38(例如癌症细胞表达CD19和CD38)。

[0021] 在一些实施方案中,癌症或肿瘤是实体组织癌。在一些实施方案中,癌症包括乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、肺癌、肾癌、胃癌、食道癌、皮肤癌、结直肠癌、脑癌或头颈癌。在一些实施方案中,乳腺癌是三阴性乳腺癌,肺癌是非小细胞肺癌,头颈癌是头颈鳞状细胞癌,肾癌是肾细胞癌,脑癌是多形性胶质母细胞瘤,或者皮肤癌是黑色素瘤。

[0022] 提供了复合结合分子,用于减少个体肿瘤中、肿瘤附近或肿瘤周围的免疫抑制性B细胞或影响个体的远离肿瘤部位的抗肿瘤免疫反应的免疫抑制性B细胞的方法中。提供了复合结合分子,用于减少个体肿瘤中、肿瘤附近或肿瘤周围的免疫抑制性B细胞的方法中。在一些实施方案中,肿瘤浸润性B细胞或免疫抑制性B细胞包含CD19+CD38+B细胞。进一步提供了复合结合分子,用于降低或抑制个体肿瘤中、肿瘤附近或肿瘤周围的免疫抑制性B细胞和/或影响个体的远离肿瘤部位的抗肿瘤免疫反应的免疫抑制性B细胞的功能中。在一些实施方案中,免疫抑制性B细胞的功能包括释放抗炎或免疫抑制细胞因子,例如IL-10、IL35、TGF- β 或其组合。

[0023] 公开了治疗患有癌症或肿瘤的个体的方法,所述方法包括向患有癌症或肿瘤的个体施用复合结合分子,从而治疗癌症或肿瘤。在一些实施方案中,癌症或肿瘤是血液癌症。在一些实施方案中,血液癌症是B细胞恶性肿瘤。在某些实施方案中,B细胞恶性肿瘤是B细胞急性淋巴细胞白血病。在某些实施方案中,B细胞恶性肿瘤是慢性淋巴细胞白血病、小淋巴细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤(弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡型淋巴瘤)。在一些实施方案中,血液癌症是血浆恶性肿瘤。在某些实施方案中,血浆恶性肿瘤是多发性骨髓瘤。在前述任一实施方案中的一些实施方案中,血液癌症表达CD19和CD38(例如癌症细胞表达CD19和CD38)。

[0024] 在一些实施方案中,癌症或肿瘤是实体组织癌。在一些实施方案中,癌症包括乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、肺癌、肾癌、胃癌、食道癌、皮肤癌、结直肠癌或头颈癌。在一些实施方案中,乳腺癌是三阴性乳腺癌,肺癌是非小细胞肺癌,头颈癌是头颈鳞状细胞癌,肾癌是肾细胞癌,脑癌是多形性胶质母细胞瘤,或者皮肤癌是黑色素瘤。

[0025] 公开了减少影响针对患有肿瘤或癌症的个体的肿瘤的抗肿瘤免疫反应的免疫抑制性B细胞的方法,所述方法包括向患有肿瘤或癌症的个体施用复合结合分子,从而减少影响抗肿瘤免疫反应的免疫抑制性B细胞。进一步公开了减少患有肿瘤或癌症的个体的肿瘤中、肿瘤附近或肿瘤周围的免疫抑制性B细胞的方法,所述方法包括向患有肿瘤或癌症的个体施用复合结合分子,从而减少肿瘤中、肿瘤附近或肿瘤周围的免疫抑制性B细胞。在一些实施方案中,肿瘤浸润性B细胞或免疫抑制性B细胞包括CD19+、CD38+B细胞。

[0026] 进一步公开了为个体准备癌症治疗的方法,所述方法包括将复合结合分子与药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂混合。

[0027] 还公开了制备复合结合分子的方法,所述方法包括在细胞培养基中在足以允许复合结合分子表达、组装和分泌到细胞培养基中的条件下孵育包含表达载体的细胞,所述表达载体包含编码复合结合分子的核酸序列。在一些实施方案中,所述方法包括从细胞培养

基中分离和纯化分子。此类分离和纯化可涉及以下步骤,所述步骤包括使细胞培养基或已经经历一个或多个纯化步骤的细胞培养基与包含蛋白、蛋白G、蛋白L、蛋白A/G或其组合的树脂或柱接触,以及任选地清洗树脂或柱以从细胞培养基或已经经历一个或多个纯化步骤的细胞培养基中除去一种或多种非复合结合分子。

[0028] 本文提供了复合结合分子,其包含被配置为结合CD19的CD19结合组分和被配置为结合CD38的CD38结合组分,其中CD19结合组分包含抗体或其抗原结合片段,CD38结合组分包含抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中CD19和/或CD38结合组分包含免疫球蛋白重链和轻链对、scFv、F(ab)、F(ab')₂、单域抗体、来自免疫球蛋白新抗原受体的可变区片段(VNAR)或衍生自重链抗体的可变区(VHH)。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中CD19结合组分或CD38结合组分包含免疫球蛋白重链和轻链对。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中CD19结合组分和CD38结合组分包含免疫球蛋白重链和轻链对。

[0029] 在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中CD38结合组分包含免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链,其中免疫球蛋白重链包含SEQ ID NO:71-SEQ ID NO:75中任一个所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:81-SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:150-SEQ ID NO:155中任一个所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:91-SEQ ID NO:95中任一个所示的HCDR3氨基酸序列,免疫球蛋白轻链包含SEQ ID NO:101-SEQ ID NO:105中任一个所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:111-SEQ ID NO:115中任一个所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:121-SEQ ID NO:125中任一个所示的LCDR3氨基酸序列;并且其中CD19结合组分包含免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链,其中免疫球蛋白重链包含SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:15中任一个所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:25中任一个所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:31-SEQ ID NO:35中任一个所示的HCDR3氨基酸序列,免疫球蛋白轻链包含SEQ ID NO:101-SEQ ID NO:105中任一个所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:111-SEQ ID NO:115中任一个所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:121-SEQ ID NO:125中任一个所示的LCDR3氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中CD38结合组分包含免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链,免疫球蛋白重链包含与SEQ ID NO:3具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列,免疫球蛋白轻链与SEQ ID NO:4具有至少约90%、95%、97%、99%同一性;和/或其中CD19结合组分包含免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链,免疫球蛋白重链包含与SEQ ID NO:1具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列,免疫球蛋白轻链与SEQ ID NO:4具有至少约90%、95%、97%、99%同一性。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中免疫球蛋白重链包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列,免疫球蛋白轻链包含与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列;和/或其中免疫球蛋白重链包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列,免疫球蛋白轻链包含与SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列。

[0030] 在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中复合结合分子是共同轻链双特异性IgG。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合

结合分子,其中CD38结合组分包含免疫球蛋白重链,免疫球蛋白重链包含SEQ ID NO:71-SEQ ID NO:75中任一个所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:81-SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:150-SEQ ID NO:155中任一个所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:91-SEQ ID NO:95中任一个所示的HCDR3氨基酸序列,免疫球蛋白轻链包含SEQ ID NO:101-SEQ ID NO:105中任一个所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:111-SEQ ID NO:115中任一个所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:121-SEQ ID NO:125中任一个所示的LCDR3氨基酸序列;并且其中CD19结合组分包含免疫球蛋白重链,免疫球蛋白重链包含SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:15中任一个所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:25中任一个所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:31-SEQ ID NO:35中任一个所示的HCDR3氨基酸序列,免疫球蛋白轻链包含SEQ ID NO:41-SEQ ID NO:45中任一个所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:55中任一个所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:61-SEQ ID NO:65中任一个所示的LCDR3氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中免疫球蛋白重链包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列,免疫球蛋白轻链与SEQ ID NO:4具有至少约90%、95%、97%、99%同一性;和/或其中免疫球蛋白重链包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列,免疫球蛋白轻链与SEQ ID NO:2具有至少约90%、95%、97%、99%同一性。

[0031] 在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中免疫球蛋白重链包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列,免疫球蛋白轻链包含与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列;并且其中免疫球蛋白重链包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列,免疫球蛋白轻链包含与SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中CD19结合组分或CD38结合组分包含scFv。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中CD19结合组分包含scFv。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中CD38结合组分包含scFv。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中CD19结合组分或CD38结合组分包含免疫球蛋白重链/轻链对。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中CD19结合组分包含免疫球蛋白重链/轻链对。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中CD38结合组分包含免疫球蛋白重链/轻链对。

[0032] 进一步提供了复合结合分子,其中复合结合分子包含结合CD38的CD38抗原结合组分和结合CD19的CD19抗原结合组分,CD38抗原结合组分包含与抗CD38免疫球蛋白轻链可变区配对的抗CD38免疫球蛋白重链可变区,CD19抗原结合组分包含与抗CD38免疫球蛋白轻链可变区配对的抗CD19免疫球蛋白重链可变区,其中CD38抗原结合组分包含:a)重链互补决定区1(HCDR1),其包含SEQ ID NO:71-SEQ ID NO:75中任一个所示的氨基酸序列;b)重链互补决定区2(HCDR2),其包含SEQ ID NO:81-SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:150-SEQ ID NO:155中任一个所示的氨基酸序列;c)重链互补决定区3(HCDR3),其包含SEQ ID NO:91-SEQ ID NO:95中任一个所示的氨基酸序列;d)轻链互补决定区1(LCDR1),其包含SEQ ID NO:101-SEQ ID NO:105中任一个所示的氨基酸序列;e)轻链互补决定区2(LCDR2),其包含SEQ ID

NO:111-SEQ ID NO:115中任一个所示的氨基酸序列;和/或f)轻链互补决定区3(LCDR3),其包含SEQ ID NO:121-SEQ ID NO:125中任一个所示的氨基酸序列。

[0033] 在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中CD19抗原结合组分包含:g)重链互补决定区1(HCDR1),其包含SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:15中任一个所示的氨基酸序列,h)重链互补决定区2(HCDR2),其包含SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:25中任一个所示的氨基酸序列,i)重链互补决定区3(HCDR3),其包含SEQ ID NO:31-SEQ ID NO:35中任一个所示的氨基酸序列;j)轻链互补决定区1(LCDR1),其包含SEQ ID NO:101-SEQ ID NO:105中任一个所示的氨基酸序列;k)轻链互补决定区2(LCDR2),其包含SEQ ID NO:111-SEQ ID NO:115中任一个所示的氨基酸序列;和/或l)轻链互补决定区3(LCDR3),其包含SEQ ID NO:121-SEQ ID NO:125中任一个所示的氨基酸序列。

[0034] 在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中CD38抗原结合组分包含免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区,免疫球蛋白重链可变区包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列,免疫球蛋白轻链可变区包含与SEQ ID NO:4具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中CD38抗原结合组分包含免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区,免疫球蛋白重链可变区包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5相同的氨基酸序列,免疫球蛋白轻链可变区包含与SEQ ID NO:4相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中CD19抗原结合组分包含抗CD19免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区,抗CD19免疫球蛋白重链可变区包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:6具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列,免疫球蛋白轻链可变区包含与SEQ ID NO:4具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列。

[0035] 在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中抗CD19抗原结合组分包含免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区,免疫球蛋白重链可变区包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:6相同的氨基酸序列,免疫球蛋白轻链可变区包含与SEQ ID NO:4相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中抗CD38免疫球蛋白重链可变区进一步包含第一免疫球蛋白重链恒定区。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中抗CD38免疫球蛋白轻链可变区进一步包含免疫球蛋白轻链恒定区。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中抗CD19免疫球蛋白重链可变区进一步包含第二免疫球蛋白重链恒定区。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中第一免疫球蛋白重链恒定区和/或第二免疫球蛋白重链恒定区包含一个或多个氨基酸取代,氨基酸取代不利于抗CD38免疫球蛋白重链恒定区的同二聚化和/或促进第一重链恒定区和第二重链恒定区的异二聚化。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中第一免疫球蛋白重链恒定区或第二免疫球蛋白重链恒定区中之一包含T366W取代(EU编号),第一免疫球蛋白重链恒定区或第二免疫球蛋白重链恒定区中另一个包含T366S/L368A/Y407V取代(EU编号),使得与第一免疫球蛋白重链恒定区或第二免疫球蛋白重链恒定区的同二聚化相比更有利于第一免疫球蛋白重链恒定区和第二免疫球蛋白重链恒定区的异二聚化。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其

中由CD38抗原结合组分和CD19抗原结合组分形成单个双特异性结合分子。

通过引用并入

[0036] 本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请都以相同的程度通过引用并入本文,就如同每个单独的出版物、专利或专利申请被明确地并单独地指出通过引用的方式并入一样。

附图说明

[0037] 本发明的新颖特征在所附的权利要求书中具体阐述。通过参考以下阐述其中利用了本发明的原理的说明性实施例以及附图的详细描述,可以更好地理解本发明的特征和优点,所述附图是:

[0038] 图1说明了共同轻链双特异性IgG的结构。

[0039] 图2说明了Fab-Fc:scFv-Fc双特异性IgG的结构。

[0040] 图3说明了Fab-Fc-Fab:Fc双特异性IgG的结构。

[0041] 图4说明了Fab-Fc-scFv:Fab-Fc-scFv双特异性IgG的结构。

[0042] 图5说明了Fab-Fc-scFv:Fc双特异性IgG的结构。

[0043] 图6说明了Fab-Fc-Fab:Fab-Fc双特异性IgG的结构。

[0044] 图7说明了scFv-Fab-Fc:scFv-Fab-Fc双特异性IgG的结构。

[0045] 图8说明了Fab-Fab-Fc:Fab-Fab-Fc双特异性IgG的结构。

[0046] 图9说明了Fab-Fc-Fab:Fab-Fc-Fab双特异性IgG的结构。

[0047] 图10说明了Fab-Fc-scFv:Fab-Fc双特异性IgG的结构。

[0048] 图11说明了scFv-Fab-Fc:Fc双特异性IgG的结构。

[0049] 图12A至图12E显示了CD19和CD38抗体的结合数据。图12A显示了CD19和CD38的细胞表面表达。图12B和图12C显示了CD19和CD38抗体的结合谱。图12D和图12E显示了CD19和CD38对照的结合。图12F显示了不表达CD19和CD38的细胞的结合谱。

[0050] 图13A至图13B显示了抗体与Daudi细胞的结合数据。

[0051] 图14A至图14B显示了抗体与REH细胞的结合数据。

[0052] 图15A至图15B显示了抗体与CD19转染的HEK293细胞的结合数据。

[0053] 图16A至图16B显示了抗体与CD38转染的HEK293细胞的结合数据。

[0054] 图17A至图17B显示了抗体与未转染的CHO细胞的结合数据。

[0055] 图18A至图18B显示了对于抗体测试品而言Daudi细胞直接凋亡的数据。

[0056] 图19A至图19B显示了对于抗体测试品而言交联诱导的Daudi细胞的细胞凋亡的数据。

[0057] 图20A至图20C显示了三个供体跨抗体测试品的ADCC数据。

[0058] 图21A至图21C显示了三个供体跨抗体测试品的ADCC数据。

[0059] 图22A到图22B显示了跨测试品的CDC谱。

[0060] 图23显示了跨抗体测试品的ADCP数据。

[0061] 图24显示了跨抗体测试品的RBC结合数据。

[0062] 图25A至图25B显示了抗体测试品的血凝谱。

[0063] 图26显示了跨抗体测试品的溶血数据。

具体实施方式

[0064] 抑制抗肿瘤免疫反应的免疫抑制性B细胞群通常可以通过存在多于一种的细胞表面生物标志物来定义。因此,有效且特异性靶向免疫抑制性B细胞的治疗剂可用于预防免疫抑制和/或消除肿瘤中、肿瘤附近或肿瘤周围或肿瘤环境内的免疫抑制。本文提供了靶向免疫抑制性B细胞的复合结合分子。此外,提供了复合结合分子,其包含被配置为结合第一靶标的第一结合组分和被配置为结合第二靶标的第二结合组分,其中第一靶标包含B细胞谱系表面标志物,并且其中第二靶标包含抑制性B细胞表面标志物。本文公开了特异性结合至跟抗肿瘤反应的负调节或免疫抑制相关的B细胞群的多价抗体。免疫抑制性B细胞可以包含细胞表面生物标志物CD19和CD38或由其定义。本文提供的双特异性抗体可以靶向CD19和CD38以抑制免疫抑制性B细胞的功能。在某些情况下,免疫抑制性B细胞的功能包括释放IL10、IL35、TGF- β 或其组合。靶向CD19和CD38的多价或双特异性抗体也可用于治疗与免疫抑制性B细胞和/或免疫功能障碍相关的致癌疾病和/或癌症。

[0065] 如本文所用,术语“免疫抑制”或“免疫阻抑”或“负免疫调节”是指免疫系统功能的降低或抑制,即免疫抑制通常表示免疫系统功能降低或缺失时的状态。在某些情况下,免疫抑制通常表示免疫系统针对肿瘤或肿瘤微环境内部、周围或附近的功能降低或缺失时的状态。整个免疫反应可能会被抑制,局部或特定区域内的免疫反应可能会降低,或者免疫活性淋巴细胞的特定群体可能会选择性地受到影响。抗原特异性免疫抑制可能是特定抗原特异性细胞群的缺失或抑制的结果,或者是抗原特异性抑制细胞对免疫反应的增强调控的结果。对免疫抑制性B细胞的提及是指对免疫反应施加负调节的B细胞或B细胞群,并且可以通过与此类群相关的特定表面标志物(例如CD38)来鉴定。在某些情况下,可以通过IL-10、IL-35、TGF- β 或其组合的存在或释放来鉴定免疫抑制。在某些情况下,可以通过B细胞存在或释放IL-10、IL-35、TGF- β 或其组合来鉴定免疫抑制。

[0066] 如本文所用,术语“癌症”可以指或描述为哺乳动物的通常以不受调控的细胞生长为特征的生理状况。癌症还可以包括但不限于血液肿瘤和/或实体肿瘤。癌症可以指血液、骨骼、器官、皮肤组织和血管系统(包括但不限于膀胱、血液、骨骼、脑、乳房、宫颈、胸部、结肠、子宫内膜、食道、眼睛、头部肾、肾、肝癌、肺癌、淋巴结、口腔、颈、卵巢、胰腺、前列腺、直肠、肾癌、皮肤、胃、睾丸、咽喉和子宫)的疾病。具体的癌症包括但不限于白血病(急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性骨髓慢性粒细胞性白血病(CML)、毛细胞白血病、成熟B细胞肿瘤(小淋巴细胞性淋巴瘤、B细胞幼淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞性淋巴瘤(如瓦尔登斯特伦巨球)蛋白血症或惰性淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞骨髓瘤、浆细胞白血病、浆细胞瘤、植体周围的免疫球蛋白沉积,重链疾病淋巴结外边缘区B细胞MALT淋巴瘤、淋巴结边缘区B细胞淋巴瘤(NMZL)、胃肠肿瘤(例如,胃肠间质细胞瘤(GIST)、滤泡型淋巴瘤、套细胞淋巴瘤/白血病、或弥漫性B细胞淋巴瘤、纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、和伯基特淋巴瘤、成熟的T细胞和自然杀伤细胞(NK)肿瘤(前淋巴细胞白血病、T细胞大淋巴细胞白血病、侵袭性NK细胞白血病、成人T细胞白血病/淋巴瘤、淋巴结外NK/T细胞淋巴瘤、肠病性T细胞淋巴瘤、肝脾T细胞淋巴瘤、母细胞NK细胞淋巴瘤、蕈状真菌病(西泽里综合征)、原发性皮肤间变性大细胞淋巴瘤、淋巴瘤样丘疹病、血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤、未指明的外周T细胞淋巴瘤和变性大细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤(结节性硬化症、混合细胞型、富于淋巴细胞型、淋巴细

胞耗尽型或未减少型、结节性淋巴细胞型)、骨髓瘤(多发性骨髓瘤、惰性骨髓瘤、阴燃性骨髓瘤)、慢性骨髓增生性疾病、脊髓发育不良/骨髓增生性疾病、骨髓增生异常综合征、与免疫缺陷相关的淋巴组织增生性障碍、组织细胞和树突细胞肿瘤、血细胞过多、软骨肉瘤、尤文肉瘤、纤维肉瘤、恶性巨细胞瘤、骨髓瘤骨病、骨肉瘤、乳腺癌(激素依赖、非激素依赖)、妇科肿瘤(儿童宫颈癌、子宫内膜、输卵管、妊娠滋养细胞疾病、卵巢、腹膜、子宫、阴道和外阴)、基底细胞癌(BCC)、鳞状细胞癌(SCC)、恶性黑色素瘤、隆突性皮肤纤维肉瘤、默克尔细胞肿瘤、卡波济氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、星形细胞瘤、毛细细胞星形细胞瘤、胚胎毛发生长神经上皮瘤变、少突胶质细胞瘤、室管膜瘤、多形性胶质母细胞瘤、混合性神经胶质瘤、少突胶质星形细胞瘤、髓母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、成神经细胞瘤、胚胎组织肿瘤、畸胎瘤、恶性间皮瘤(腹膜间皮瘤、心包间皮瘤、胸膜间皮瘤)、胃-肠-胰腺或胃肠胰腺神经内分泌肿瘤(GEP-NET)、类癌肿瘤、胰腺内分泌肿瘤(PET)、结直肠癌、结节直肠癌、侵入性神经内分泌肿瘤、平滑肌肉瘤、黏液腺癌,印戒细胞癌、肝细胞癌、肝胆肝癌、肝母细胞瘤、血管瘤、肝腺瘤、局灶性结节性增生(结节性再生性增生、错构瘤)、非小细胞肺癌(NSCLC)(鳞状细胞肺癌、腺癌、大细胞肺癌、小细胞肺癌、甲状腺癌、前列腺癌(激素难治、非雄激素依赖性、雄激素依赖、激素不敏感)、肾细胞癌和软组织肉瘤(纤维肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、皮肤纤维肉瘤、脂肪肉瘤、横纹肌肉瘤、平滑肌肉瘤、血管肉瘤、滑膜肉瘤、恶性周围神经鞘瘤/神经纤维肉瘤、骨外骨肉瘤)。

[0067] 术语“CD19”或“分化簇19”(也称为B4、T细胞表面抗原Leu-12和CVID3)是指在人由该基因CD19编码的B细胞谱系表面生物标志物或跨膜蛋白。CD19可以作为B淋巴细胞上的B细胞抗原受体复合物(BCR)的辅助受体,从而降低下游信号通路激活和触发B细胞对抗原反应的阈值。在结构上,在多肽的至少50、100、150、200、250、300、350、400、450、500个氨基酸的序列长度上或在全长上,CD19氨基酸序列与例如GenBank登录号NM_001178098.2→NP_001171569.1或NM_001770.6→NP_001761.3的氨基酸序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。在结构上,在多核苷酸的至少300、500、750、1000、1250、1500个核酸的序列长度上或在全长上,CD19核酸序列与例如GenBank登录号NG_007275.1或NCBI基因ID 930的核酸序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。序列比对可以使用本领域已知的任何比对算法进行,例如,BLAST、ALIGN,设置为默认设置。

[0068] 术语“CD38”或“分化簇38”(也称为ADPRC1)是指人中由基因CD38编码的B细胞表面生物标志物或跨膜蛋白。CD38可以在导致细胞激活和增殖的B细胞信号传导中发挥作用。在结构上,在多肽的至少50、100、150、200、250个氨基酸的序列长度上或在全长上,CD38氨基酸序列与例如GenBank登录号NM_001775.4→NP_001766.2的氨基酸序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。在结构上,在多核苷酸的至少300、500、750个核酸的序列长度上或在全长上,CD19核酸序列与例如GenBank登录号NC_000004.12或NCBI基因ID 952的核酸序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。序列比对可以使用本领域已知的任何比对算法进行,例如,BLAST、ALIGN,设置为默认设置。

[0069] 术语“抗体”在本文中以最广义使用,包括多价或双特异性抗体和单克隆抗体,包括完整抗体和其功能性(抗原结合)抗体片段,包括片段抗原结合(Fab)片段、F(ab')₂片段、

Fab' 片段、Fv片段、重组IgG (rIgG) 片段、单链抗体片段,包括单链可变片段(sFv或scFv) 和单结构域抗体(例如,sdAb、sdFv、纳米抗体) 片段。该术语涵盖基因工程化的和/或经其他形式修饰的免疫球蛋白,例如胞内抗体、肽抗体、嵌合抗体、完全人抗体、人源化抗体和异源缀合抗体、多特异性抗体,例如双特异性抗体、双抗体、三抗体和四抗体、串联di-scFv、串联tri-scFv。除非另有说明,否则术语“抗体”应理解为包括其功能性抗体片段。该术语还涵盖完整或全长抗体,包括任何类别或亚类的抗体,包括IgG及其亚类、IgM、IgE、IgA和IgD。抗体可以包含人IgG1恒定区。抗体可以包含人IgG4恒定区。

[0070] 所提供的抗体包括多特异性或多价抗体(例如,双特异性抗体和多反应性抗体) 及其抗体片段。抗体包括抗体缀合物和包含抗体的分子,例如嵌合分子。因此,抗体包括但不限于全长和天然抗体,及其保留结合特异性的片段和部分,例如其任何特异性结合部分(包括具有任何数量的免疫球蛋白类别和/或同种型(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgD、IgE和IgM) 的那些;及其生物学相关(抗原结合) 片段或其特异性结合部分,包括但不限于Fab、F(ab')₂、Fv和scFv(单链或相关实体)。单克隆抗体通常是具有基本同质抗体的组合物中的一种;因此,包含在单克隆抗体组合物中的任何单个抗体都是相同的,除了可能以少量存在的天然发生的突变。单克隆抗体可以包含人IgG1恒定区或人IgG4恒定区。

[0071] 与“高变区”或“HVR”同义的术语“互补决定区”和“CDR”是本领域已知的,是指抗体可变区内的非连续氨基酸序列,其赋予抗原特异性和/或结合亲和力。通常,每个重链可变区中存在三个CDR(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3),每个轻链可变区中存在三个CDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3)。“框架区”和“FR”在本领域中已知是指重链和轻链可变区的非CDR部分。通常,每个全长重链可变区中存在四个FR(FR-H1、FR-H2、FR-H3和FR-H4),每个全长轻链可变区中存在四个FR(FR-L1、FR-L2、FR-L3和FR-L4)。给定CDR或FR的精确氨基酸序列边界易于使用许多众所周知的方案中的任一种来确定,这些方案包括由以下文献描述的那些:Kabat等人(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(“Kabat”编号方案),Al-Lazikani等人,(1997) JMB 273,927-948(“Chothia”编号方案);MacCallum等人,J.Mol.Biol.262:732-745(1996),“Antibody-antigen interactions:Contact analysis and binding site topography,”J.Mol.Biol.262,732-745.”。(“Contact”编号方案);Lefranc MP等人,“IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains,”Dev Comp Immunol,2003一月;27(1):55-77(“IMGT”编号方案);Honegger A和Plückthun A,“Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains:an automatic modeling and analysis tool,”J Mol Biol,2001六月8;309(3):657-70, (“Aho”编号方案);和Whitelegg NR和Rees AR,“WAM:an improved algorithm for modelling antibodies on the WEB,”Protein Eng.2000Dec;13(12):819-24(“AbM”编号方案)。在某些实施方案中,本文所述的抗体的CDR可以通过选自Kabat、Chothia、IMGT、Aho、AbM或其组合的方法来定义。

[0072] 给定CDR或FR的边界可根据用于鉴定的方案而异。例如,Kabat方案基于结构比对,而Chothia方案基于结构信息。Kabat和Chothia方案的编号均基于最常见的抗体区域序列长度,插入由插入字母(例如,“30a”)表示,缺失出现在某些抗体中。这两种方案将某些插入和缺失(“indel”)放置在不同的位置,从而导致编号不同。Contact方案基于复杂晶体结构

的分析,在许多方面与Chothia编号方案相似。

[0073] 术语“可变区”或“可变结构域”是指涉及将抗体与抗原结合的抗体重链或轻链的结构域。天然抗体的重链和轻链可变结构域(分别为 V_H 和 V_L)通常具有相似的结构,其中每个结构域包含四个保守框架区(FR)和三个CDR(参见例如,Kindt等人Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007))。单个 V_H 或 V_L 结构域可能足以赋予抗原结合特异性。此外,可以使用以下来分离出结合特定抗原的抗体:来自结合抗原的抗体的 V_H 或 V_L 结构域以筛选互补 V_L 或 V_H 结构域(参见例如,Portolano等人,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等人,Nature 352:624-628(1991))。

[0074] 所提供的抗体包括抗体片段。“抗体片段”可以指除了完整抗体之外的分子,其包含完整抗体的一部分,所述部分结合完整抗体所结合的抗原。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如scFv或sFv);以及由抗体片段形成的多特异性抗体。在特定实施方案中,抗体是包含可变重链区和/或可变轻链区的单链抗体片段,例如scFv。抗体片段可以通过各种技术制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及重组宿主细胞的生产。在一些实施方案中,抗体是重组产生的片段,例如包含非天然存在的排列的片段,例如两个或更多个抗体区域或链通过合成接头(例如多肽接头)连接的片段,和/或不是通过酶消化天然存在的完整抗体产生的那些。

[0075] 在本文中,分子、肽、多肽、抗体或抗体片段可以被称为“两特异性”或“双特异性”,包括语法上的等效物。双特异性分子具有特异性结合至至少两个结构不同的靶标的能力。特异性结合可以是以下的结果:分子水平上结构不同的两个不同结合部分,包括但不限于不同的非完全相同的氨基酸序列;或能够以高亲和力(例如,KD小于约 1×10^{-6})特异性结合至两个结构不同的靶标的单个结合部分。称为“多特异性”的分子、肽、多肽、抗体或抗体片段是指一种具有特异性结合至至少三个结构不同的靶标的能力的分子。包括语法上等效物的“双特异性抗体”是指一种保留了抗体的至少一个能够特异性结合靶标的片段的双特异性分子,例如来自抗体分子的可变区、重链或轻链,或一个或多个互补决定区。包括语法上等效物的“多特异性抗体”是指一种保留了抗体的至少一个能够与靶标特异性结合的片段的多特异性分子,例如来自抗体分子可变区、重链或轻链或互补决定区。

[0076] 本文中的“接头”也称为“接头序列”、“间隔区”、“拴系序列”或其语法上等效物。如本文所指的“接头”连接两个不同的分子,这两个分子本身具有靶结合、催化活性,或者天然表达和组装为单独的多肽。例如,两个不同的结合部分或重链/轻链对。可以使用许多策略将分子共价连接在一起。这些包括但不限于蛋白质或蛋白质结构域的N末端和C末端之间的多肽连接、经由二硫键的连接和通过化学交联剂的连接。在本实施方案的一个方面,接头是通过重组技术或肽合成生成的肽键。接头肽可以主要包括以下氨基酸残基:Gly、Ser、Ala或Thr。接头肽的长度应足以连接两个分子,以使得它们彼此之间呈现正确的构象,从而保持所需的活性。在一个实施方案中,接头的长度为约1至50个氨基酸或约1至30个氨基酸。在一个实施方案中,可以使用长度为1至20个氨基酸的接头。有用的接头包括甘氨酸-丝氨酸聚合物,包括例如(GS)_n、(GSGGS)_n、(GGGGS)_n、和(GGGGS)_n(其中n是至少一个的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和其他柔性接头。用于连接抗体片段或单链可变片段的示例性接头可包括AAEPKSS、AAEPKSSDKTHTCPPCP、GGGG、或GGGGDKTHTCPPCP。可替代地,各种非蛋白质聚合物,包括但不限于聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚亚氧烷、或聚乙二醇和聚丙

二醇的共聚物,可用作接头。

[0077] “基于片段的”双特异性抗体或包含本公开的“单链可变片段”或“scFv”的双特异性抗体可以指单链抗体或其片段,其包含两个结合部分和连接这两个结合部分的接头。接头可以是多肽接头或具有合适柔性以便不抑制任一靶向部分的结合的其他接头。基于片段的双特异性抗体形式包括串联 V_{HH} 抗体、串联scFvs、scFv-Fabs、 $F(ab)_2$ 、双亲和重定位抗体(DART)。此类基于片段的抗体可以进一步操作以包含对给定靶标具有特异性的附加结合部分,例如 $A_2:B_1$ 、 $A_1:B_2$ 或 $A_2:B_2$,或具有Fc区片段以改善药代动力学或促进ADCC、ADCP或CDC。

[0078] “结合部分”是指分子、肽、多肽、抗体或抗体片段的一部分,其介导与所阐述的靶标或抗原或表位的特异性结合。例如,抗体的结合部分可以包含重链/轻链可变区对或一个或多个互补决定区(CDR)。

[0079] 如本文所指的“靶标”是指参与分子、肽、多肽、抗体或抗体片段的结合部分的分子部分。靶标可以包含氨基酸序列和/或碳水化合物、脂质或其他化学实体。“抗原”是包含能够被适应性免疫分子如抗体或抗体片段、B细胞受体或T细胞受体结合的部分的靶标。

[0080] 双特异性或多特异性分子的“效价”是指所阐述的分子、肽、多肽、抗体或抗体片段能够结合的靶标的数量。例如,单价分子能够结合至特定靶标的一个分子,二价分子能够结合至两个分子,四价分子能够结合四个靶标。例如,双特异性二价分子是能够结合至两个靶标以及两个结构上不同的靶标的分子。例如,双特异性二价分子当与包含靶A和靶B的溶液接触时可以结合 A_2 、 B_2 或 $A:B$ 。

[0081] “人源化”抗体是其中所有或基本上所有CDR氨基酸残基衍生自非人CDR且所有或基本上所有FR氨基酸残基衍生自人FR的抗体。人源化抗体任选地可以包括衍生自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。非人抗体的“人源化形式”是指已经经历人源化的非人抗体的变体,通常是为了降低对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。在一些实施方案中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,衍生CDR残基的抗体)的相应残基取代,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0082] 所提供的抗体包括人抗体。“人抗体”是具有与由人或人细胞或利用人抗体库或其他人抗体编码序列(包括人抗体文库)的非人来源产生的抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列的抗体。该术语不包括包含非人抗原结合区的非人抗体的人源化形式,例如其中所有或基本上所有CDR都是非人的那些。可以通过向转基因动物施用免疫原来制备人抗体,该转基因动物已被修饰以响应抗原激发而产生完整的人抗体或具有人可变区的完整抗体。这样的动物通常含有全部或部分的人免疫球蛋白基因座,它们取代了内源性免疫球蛋白基因座,或者存在于染色体外或随机整合到动物的染色体中。在这种转基因动物中,内源性免疫球蛋白基因座通常已被灭活。人抗体也可以来自人抗体文库,包括噬菌体展示和无细胞文库,其包含来自人库的抗体编码序列。

[0083] 如本文所用,“ADCC”或“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”是指细胞介导的反应,其中表达Fc“抗的非特异性细胞毒性细胞识别靶细胞上的结合抗体并随后引起靶细胞裂解。ADCC可以与跟Fc与跟解。胞毒的结合相关,其中跟Fc合相关,其中的结合增加导致ADCC活性增加。如本文所用,“ADCP”或“抗体依赖性细胞介导的吞噬作用”是指细胞介导的反应,其中表达Fc“抗的非特异性细胞毒性细胞识别靶细胞上的结合抗体并随后引起靶细胞的吞噬作用。

[0084] 术语“多肽”和“蛋白质”可互换使用并且是指氨基酸残基的聚合物并且不限于最小长度。多肽,包括所提供的抗体和抗体链以及其他肽,例如接头和结合肽,可以包括氨基酸残基,所述氨基酸残基包括天然和/或非天然氨基酸残基。该术语还包括多肽的表达后修饰,例如糖基化、唾液酸化、乙酰化、磷酸化等。在一些方面,多肽可以包含关于原生序列或天然序列的修饰,只要蛋白质保持所需的活性。这些修饰可以有意的,例如通过定点诱变,也可以是偶然的,例如通过产生蛋白质的宿主突变或由于PCR扩增引起的错误。

[0085] 相对于参考多肽序列的序列同一性百分比(%)是在对序列进行比对并在必要时引入缺口以获得最大序列同一性百分比并且不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分之后,候选序列中的与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比的比对可以通过各种已知的方式实现,例如,使用公开可获得的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR) 软件。能够确定用于比对的序列的适当参数,包括在被比较的序列的全长上实现最大比对所需的算法。然而,出于本文的目的,氨基酸序列同一性%值是使用序列比较计算机程序ALIGN-2生成的。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech, Inc. 编写,其源代码已在华盛顿特区的美国版权局(U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559) 以用户文档形式提交,并在那里以美国版权登记号TXU510087注册。ALIGN-2程序可从加利福尼亚州南旧金山的Genentech, Inc. 公开获得,或者可以从源代码编译。应编译ALIGN-2程序以便在UNIX操作系统(包括数字UNIX V4.0D) 上使用。所有序列比较参数均由ALIGN-2程序设置且不变。在使用ALIGN-2进行氨基酸序列比较的情况下,给定氨基酸序列A与、跟或针对给定氨基酸序列B(其可替代地被表述为具有或包含与、跟或针对给定氨基酸序列B的特定氨基酸序列同一性%的给定氨基酸序列A)的氨基酸序列同一性%计算如下:分数X/Y的100倍,其中X是序列比对程序ALIGN-2在该程序对A和B的比对中被评分为相同匹配的氨基酸残基的数目,并且其中Y是B中氨基酸残基的总数。应当理解,在氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度的情况下,A到B的氨基酸序列同一性%将不等于B到A的氨基酸序列同一性%。除非另有特别说明,本文所用的所有氨基酸序列同一性%值都是使用ALIGN-2计算机程序如前一段所述获得的。

[0086] 可以考虑和构想本文提供的抗体的氨基酸序列变体。变体通常与本文具体公开的多肽的不同之处在于一个或多个取代、缺失、添加和/或插入。此类变体可以是天然存在的或可以合成产生的,例如,通过修饰本发明的上述多肽序列中的一个或多个并评估本文所述多肽的一种或多种生物活性和/或使用多种已知技术中的任何一种。例如,可能需要提高抗体的结合亲和力和/或其他生物学特性,可以通过将适当的修饰引入编码抗体的核苷酸序列中或通过肽合成来制备抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括,例如,抗体氨基酸序列内残基的缺失和/或插入和/或取代。可以进行缺失、插入和取代的任何组合以获得最终构建体,前提是最终构建体具有所需的特征,例如抗原结合。可以提供具有一个或多个氨基酸取代的抗体变体。通过取代进行诱变的目的位点包括CDR和FR。可以将氨基酸取代引入目的抗体并筛选产物以获得所需的活性,例如保留/改善的抗原结合、降低的免疫原性或改善的ADCC或CDC。

[0087] 本公开还提供了“免疫缀合物”或“抗体缀合物”或“抗体-药物缀合物”,它们是指与一种或多种异源分子缀合的抗体。例如,免疫缀合物可包含与一种或多种细胞毒剂缀合的抗体,例如化疗剂或药物、生长抑制剂、蛋白质结构域、毒素(例如蛋白质毒素,细菌、真

菌、植物或动物来源的酶活性毒素,或其片段)或放射性同位素。在一些实施方案中,免疫缀合物可包含本文公开的复合结合分子或其片段(例如,scFv)。

[0088] 本文所述的抗体可以由核酸编码。核酸是一种包含两个或更多个核苷酸碱基的多核苷酸类型。在某些实施方案中,核酸是可用于将编码多肽的多核苷酸转移到细胞中的载体的一个组分。如本文所用,术语“载体”是指能够运送与其连接的另一核酸的核酸分子。一种类型的载体是基因组整合载体,或“整合载体”,它可以整合到宿主细胞的染色体DNA中。另一种类型的载体是“附加型”载体,例如能够进行染色体外复制的核酸。能够指导与它们可操作连接的基因的表达的载体在本文中称为“表达载体”。合适的载体包括质粒、细菌人工染色体、酵母人工染色体、病毒载体等。在表达载体中,用于控制转录的调控元件(如启动子、增强子、多聚腺苷酸化信号)可以衍生自哺乳动物、微生物、病毒或昆虫基因。也可以另外地并入通常由复制起点所赋予的能够在宿主中进行复制的能力和促进转化体识别的选择基因。可以使用来自慢病毒、逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒等病毒的载体。质粒载体可以线性化以整合到染色体位置。载体可以包含指导位点特异性整合到基因组中的指定位置或限制性位点集合的序列(例如,AttP-AttB重组)。此外,载体可包含衍生自转座元件的序列。

[0089] 如本文所用,术语“同源性的”、“同源性”或“同源性百分比”在本文中使用时用于相对于参考序列描述氨基酸序列或核酸序列,可以使用由Karlin和Altschul (Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2264-2268,1990,按Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5877,1993中修改)描述的公式确定。这样的公式被合并到Altschul等人(J.Mol.Biol.215:403-410,1990)的基本局部对齐搜索工具(BLAST)程序中。可以使用截至本申请的提交日期的最新版本的BLAST来确定序列的百分比同源性。

[0090] 编码本文所述抗体的核酸可用于感染、转染、转化或以其他方式使合适的细胞成为该核酸的转基因细胞,从而能够生产用于商业或治疗用途的抗体。用于从大规模细胞培养物生产抗体的标准细胞系和方法是本领域已知的。参见例如,Li等人,“Cell culture processes for monoclonal antibody production.”Mabs.2010九月-十月;2(5):466-477。在某些实施方案中,细胞是真核细胞。在某些实施方案中,真核细胞是哺乳动物细胞。在某些实施方案中,哺乳动物细胞是可用于产生抗体的细胞系,即中国仓鼠卵巢细胞(CHO)细胞、NS0鼠骨髓瘤细胞或PER.C6®细胞。在某些实施方案中,编码抗体的核酸被整合到可用于产生抗体的细胞的基因组基因座中。在某些实施方案中,本文描述了制备抗体的方法,所述方法包括在足以允许产生和分泌抗体的体外条件下培养包含编码所述抗体的核酸的细胞。

[0091] 如本文所用,术语“个体”、“患者”或“受试者”是指被诊断患有、疑似患有或处于患上至少一种用所述组合物和方法治疗的疾病的风险的个体。在某些实施方案中,个体是哺乳动物。在某些实施方案中,哺乳动物是小鼠、大鼠、兔、狗、猫、马、牛、绵羊、猪、山羊、美洲驼、羊驼或牦牛。在某些实施方案中,个体是人。

[0092] 如本文所用,用于修饰特定数字的术语“约”是指该数字加上或减去该数字的10%。术语“约”修饰范围是指该范围减去其最低值的10%,以及加上其最大值的10%。

[0093] 如本文所用,术语“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”是指用于在接受者中获得有益或期望结果的药物或其他干预方案。有益或期望的结果包括但不限于治疗益处

和/或预防益处。治疗益处可以指根除或改善症状或正在治疗的潜在障碍。而且,通过消除或改善与潜在障碍相关的一种或多种生理症状,获得治疗益处,从而尽管受试者仍然患有所述潜在障碍,但在受试者中观察到了改善。预防作用包括延迟、预防或消除疾病或病症的出现、延迟或消除疾病或病症的症状发作、减缓、停止或逆转疾病或病症的进展,或其任何组合。对于预防益处,可以对处于发展特定疾病的风险中的受试者或报告一种或多种疾病生理症状的受试者进行治疗,即使可能尚未做出该疾病的诊断。熟练的技术人员将会认识到,给定一组潜在的用于接受治疗的个体,并非所有人都会对治疗有反应或同样的反应。此类个体被视为已治疗。

[0094] 在此使用的小节标题仅是为了编排的目的并且不应该被解释为对所述主题进行限制。

双特异性分子

[0095] 本文提供了双特异性或多价或复合结合分子,其包含被配置为结合第一靶标的第一结合组分和被配置为结合第二靶标的第二结合组分,其中第一靶标包含B细胞谱系表面标志物,并且其中第二靶标包含抑制性B细胞表面标志物。免疫抑制性B细胞或B细胞群可包含B细胞谱系表面生物标志物和抑制性B细胞表面生物标志物。B细胞谱系表面标志物可以包括CD19、CD138、IgA或CD45。免疫抑制性B细胞表面标志物可以包括IgD、CD1、CD5、CD21、CD24、CD38、HM13、SLAMF7、AQP3或潜伏TGF- β (例如,TGF- β LAP)。在一些实施方案中,B细胞谱系表面标志物包括CD19。在某些实施方案中,B细胞谱系表面标志物由CD19组成。在一些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物包括CD38。在某些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物由CD38组成。在某些实施方案中,复合结合分子结合至CD38和CD19。

[0096] 多价或双特异性或复合结合分子具有特异性结合至至少两个结构不同的靶标的能力。特异性结合可以是以下的结果:分子水平上结构不同的两个不同结合部分,包括但不限于不同的非完全相同氨基酸序列;或能够特异性结合至两个结构不同的靶标的单个结合部分。称为“多特异性”或“多价”或“双特异性”的分子、肽、多肽、抗体或抗体片段可以指具有特异性结合至至少两个结构不同的靶标的能力的分子。在一些实施方案中,复合结合分子的第一结合组分或第二结合组分包括多肽。在某些实施方案中,第一结合组分或第二结合组分由多肽组成。在一些实施方案中,复合结合分子的第一结合组分和第二结合组分包括多肽。在某些实施方案中,第一结合组分和第二结合组分由多肽组成。在某些实施方案中,第一结合组分或第二结合组分的多肽包含长度至少为100个氨基酸残基的氨基酸序列。在某些实施方案中,第一结合组分和第二结合组分的多肽包含长度至少100个氨基酸残基的氨基酸序列。

[0097] 双特异性分子可以是双特异性抗体,其保留抗体的能够特异性结合靶标的至少一个片段,例如来自抗体分子的可变区、重链或轻链或一个或多个互补决定区。在一些实施方案中,本文所述的复合结合分子是双特异性抗体和/或其双重抗原结合片段。双特异性抗体具有结合至两种结构不同的靶标或抗原的能力。在一些实施方案中,双特异性抗体包含配置为结合第一靶标的第一结合组分和配置为结合第二靶标的第二结合组分,其中第一靶标包含B细胞谱系表面标志物(例如CD19、CD138、IgA或CD45),并且其中第二靶标包含抑制性B细胞表面标志物(例如IgD、CD1、CD5、CD21、CD24、CD38、HM13、SLAMF7、AQP3或潜伏TGF- β (例如,TGF- β LAP))。在一些实施方案中,B细胞谱系表面标志物包括CD19。在某些实施方案中,B

细胞谱系表面标志物由CD19组成。在一些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物包括CD38。在某些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物由CD38组成。

[0098] 免疫抑制性B细胞或免疫抑制性B细胞群可包含细胞表面生物标志物CD19和CD38。本文进一步公开了靶向CD19和CD38的双特异性抗体。在一些实施方案中,CD19结合组分包含含有SEQ ID NO:1的可变重链(VH)。在某些实施方案中,CD19结合组分包含含有SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15中任一个的VH CDR1区。在某些实施方案中,CD19结合组分包含含有SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25中任一个的VH CDR2区。在某些实施方案中,CD19结合组分包含含有SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:35中任一个的VH CDR3区。

[0099] 在一些实施方案中,CD19结合组分包含含有SEQ ID NO:2的可变轻链(VL)。在某些实施方案中,CD19结合组分包含含有SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:45中任一个的VL CDR1区。在某些实施方案中,CD19结合组分包含含有SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、或SEQ ID NO:55中任一个的VL CDR2区。在某些实施方案中,CD19结合组分包含含有SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64或SEQ ID NO:65中任一个的VL CDR3区。

[0100] 在一些实施方案中,双特异性抗体包含第一结合组分,其中第一结合组分包含SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:15中任一个所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:25中任一个所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:31-SEQ ID NO:35中任一个所示的HCDR3氨基酸序列、SEQ ID NO:41-SEQ ID NO:45中任一个所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:55中任一个所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:61-SEQ ID NO:65中任一个所示的LCDR3氨基酸序列。

[0101] 在一些实施方案中,双特异性抗体包含CD19结合组分,其中CD19结合组分包含SEQ ID NO:11所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:21所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:31所示的HCDR3氨基酸序列、SEQ ID NO:41所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:51所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:61所示的LCDR3氨基酸序列。

[0102] 在一些实施方案中,双特异性抗体包含CD19结合组分,其中CD19第一结合组分包含SEQ ID NO:12所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:22所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:32所示的HCDR3氨基酸序列、SEQ ID NO:42所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:52所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:62所示的LCDR3氨基酸序列。

[0103] 在一些实施方案中,双特异性抗体包含CD19结合组分,其中CD19结合组分包含SEQ ID NO:15所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:25所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:35所示的HCDR3氨基酸序列、SEQ ID NO:45所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:55所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:65所示的LCDR3氨基酸序列。

[0104] 在一些实施方案中,CD19结合包含可变重链和轻链或CDR,其对应于或来源于英比利珠单抗(Inebilizumab)、Tafasitamab、帕他莫单抗(Taplitumomab)、奥贝利单抗(Obexelimab)、博纳吐单抗(Blinatumomab)、考妥昔单抗(Coltuximab)、地宁妥珠单抗(Denintuzumab)、或朗妥昔单抗(Loncastuximab)、MOR208、MEDI-551、XmAb 5871、MDX-1342或AFM11。

[0105] 在一些实施方案中,CD38结合组分包含含有SEQ ID NO:3的可变重链(VH)。在某些实施方案中,CD19结合组分包含含有SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:75、或SEQ ID NO:75中的任一个的VH CDR1区。在某些实施方案中,CD19结合组分包含含有SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84或SEQ ID NO:85中任一个的VH CDR2区。在某些实施方案中,CD19结合组分包含含有SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:94或SEQ ID NO:95中任一个的VH CDR3区。

[0106] 在一些实施方案中,CD38结合组分包含含有SEQ ID NO:4的可变轻链(VL)。在某些实施方案中,CD19结合组分包含含有SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:105或SEQ ID NO:105中任一个的VL CDR1区。在某些实施方案中,CD19结合组分包含含有SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:114或SEQ ID NO:115中任一个的VL CDR2区。在某些实施方案中,CD19结合组分包含含有SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:123、SEQ ID NO:124或SEQ ID NO:125中任一个的VL CDR3区。

[0107] 在一些实施方案中,双特异性抗体包含CD38结合组分,其中CD38结合组分包含SEQ ID NO:71所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:81所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:91所示的HCDR3氨基酸序列、SEQ ID NO:101所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:111所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:121所示的LCDR3氨基酸序列。

[0108] 在一些实施方案中,双特异性抗体包含CD38结合组分,其中CD38结合组分包含SEQ ID NO:72所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:82所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:92所示的HCDR3氨基酸序列、SEQ ID NO:102所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:112所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:122所示的LCDR3氨基酸序列。

[0109] 在一些实施方案中,双特异性抗体包含CD38结合组分,其中CD38结合组分包含SEQ ID NO:75所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:85所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:95所示的HCDR3氨基酸序列、SEQ ID NO:105所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:115所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:125所示的LCDR3氨基酸序列。

[0110] 在一些实施方案(例如,任何前述实施方案)中,CD38结合组分的CDR-H2包含氨基酸残基P(X1)LG(X2)A,其中X1和X2耐受氨基酸取代同时保持与CD38结合。在某些实施方案中,X1和X2选自降低CDRH2氨基酸序列的疏水性的氨基酸。在某些实施方案中,降低疏水性的氨基酸包括H、Q、T、N、S、G、A、R、K、D或E。在某些实施方案中,X1是H,X2是T。

[0111] 在一些实施方案中,双特异性抗体包含CD38结合组分和CD19结合组分,其中CD38结合组分包含VH氨基酸序列和VL氨基酸序列,并且其中VH氨基酸序列包含与SEQ ID NO:3具有至少约90%、95%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,VL包含与SEQ ID NO:4具有至少约90%、95%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列;并且CD19结合组分包含VH氨基酸序列和VL氨基酸序列,其中VH氨基酸序列包含与SEQ ID NO:1具有至少约90%、95%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,VL包含与SEQ ID NO:2具有至少约90%、95%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0112] 在一些实施方案中,双特异性抗体包含CD38结合组分和CD19结合组分,其中CD38结合组分包含VH氨基酸序列和VL氨基酸序列,并且其中VH氨基酸序列包含与SEQ ID NO:3相同的氨基酸序列,并且所述VL包含与SEQ ID NO:4相同的氨基酸序列;并且CD19结合组分包含VH氨基酸序列和VL氨基酸序列,其中VH氨基酸序列包含与SEQ ID NO:1相同的氨基酸

序列,VL包含与SEQ ID NO:2相同的氨基酸序列。

[0113] 在一些实施方案中,双特异性抗体包含CD38结合组分和CD19结合组分,其中CD38结合组分包含VH氨基酸序列和VL氨基酸序列,并且其中VH氨基酸序列包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:215或SEQ ID NO:218-SEQ ID NO:223具有至少约90%、95%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,VL包含与SEQ ID NO:4或223具有至少约90%、95%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列;并且CD19结合组分包含VH氨基酸序列和VL氨基酸序列,其中VH氨基酸序列包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:201或SEQ ID NO:216-SEQ ID NO:217具有至少约90%、95%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,VL包含与SEQ ID NO:2具有至少约90%、95%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,CD19结合组分包含在A84和A108处含有取代的VH氨基酸序列。在一些实施方案中,取代包含A84S和A108L。

[0114] 在一些实施方案中,双特异性抗体包含CD38结合组分和CD19结合组分,其中CD38结合组分包含VH氨基酸序列和VL氨基酸序列,并且其中VH氨基酸序列包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:215或SEQ ID NO:218-SEQ ID NO:223相同的氨基酸序列,VL包含与SEQ ID NO:4或223相同的氨基酸序列;并且CD19结合组分包含VH氨基酸序列和VL氨基酸序列,其中VH氨基酸序列包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:201、SEQ ID NO:216-SEQ ID NO:217相同的氨基酸序列,VL包含与SEQ ID NO:2相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,CD19结合组分包含在A84和A108处含有取代的VH氨基酸序列。在一些实施方案中,取代包含A84S和A108L。

[0115] 在一些实施方案中,双特异性抗体包含CD38结合组分和CD19结合组分,其中CD38结合组分包含SEQ ID NO:71所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:81所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:91所示的HCDR3氨基酸序列、SEQ ID NO:101所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:111所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:121所示的LCDR3氨基酸序列;并且CD19结合组分包含SEQ ID NO:11所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:21所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:31所示的HCDR3氨基酸序列、SEQ ID NO:41所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:51所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:61所示的LCDR3氨基酸序列。

[0116] 在一些实施方案中,双特异性抗体包含CD38结合组分和CD19结合组分,其中CD38结合组分包含SEQ ID NO:72所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:82所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:92所示的HCDR3氨基酸序列、SEQ ID NO:102所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:112所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:122所示的LCDR3氨基酸序列;并且CD19结合组分包含SEQ ID NO:12所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:22所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:32所示的HCDR3氨基酸序列、SEQ ID NO:42所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:52所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:62所示的LCDR3氨基酸序列。

[0117] 在一些实施方案中,当双特异性包含Fab或需要双特异性形式的轻链恒定区的其他结构时,VL包含与SEQ ID NO:210和/或211中的任一个具有至少约90%、95%、97%、98%、99%同一性或相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,当双特异性包含Fab或需要对于双特异性形式的轻链恒定区的其他结构时,VL包含与SEQ ID NO:210和/或211中的任一个相同的氨基酸序列。

[0118] 在一些实施方案中,双特异性抗体包含CD38结合组分和CD19结合组分,其中CD38结合组分包含SEQ ID NO:75所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:85所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:95所示的HCDR3氨基酸序列、SEQ ID NO:105所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ

ID NO:115所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:125所示的LCDR3氨基酸序列;并且CD19结合组分包含SEQ ID NO:15所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:25所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:35所示的HCDR3氨基酸序列、SEQ ID NO:45所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:55所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:65所示的LCDR3氨基酸序列。

[0119] 在一些实施方案中,CD38结合包含对应于或衍生自达雷木单抗或艾萨妥昔单抗的可变重链和轻链或CDR。

[0120] 取代、插入或缺失可发生在一个或多个CDR内,其中取代、插入或缺失基本上不降低抗体与抗原的结合。例如,可以在CDR中进行不显著降低结合亲和力的保守取代。此类改变可能不在CDR“热点”范围内。在变体 V_H 和 V_L 序列的一些实施方案中,每个CDR是不变的。氨基酸序列插入和缺失包括长度范围从一个残基到含有一百个或更多残基的多肽的氨基和/或羧基末端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入和缺失。末端插入的示例包括具有N末端甲硫氨酰残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括与抗体的N-或C末端与增加抗体的血清半衰期的酶(例如,对于ADEPT)或多肽融合。抗体分子的序列内插入变体的示例包括在轻链中插入3个氨基酸。末端缺失的例子包括在轻链末端缺失7个或更少氨基酸的抗体。

[0121] 可以在CDR中进行改变(例如取代)例如以提高抗体亲和力。可以在体细胞成熟期间在具有高突变率的CDR编码密码子中进行此类改变(Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207: 179-196 (2008)),并且可以测试所得变体的结合亲和力。亲和力成熟(例如,使用易错PCR、链改组、CDR随机化或寡核苷酸定向诱变)可用于提高抗体亲和力(参见例如, Hoogenboom等人Methods in Molecular Biology 178:1-37 (2001))。可以特异性鉴定参与抗原结合的CDR残基,例如,使用丙氨酸扫描诱变或建模(参见例如Cunningham和Wells Science, 244: 1081-1085 (1989))。特别是CDR-H3和CDR-L3经常成为目标。可替代地或另外地,抗原-抗体复合物的晶体结构以鉴定抗体和抗原之间的接触点。此类接触残基和相邻残基可以作为取代的候选物被靶向或消除。可以筛选变体以确定它们是否包含所需的属性。

[0122] 可以改变抗体以增加或减少它们的糖基化(例如,通过改变氨基酸序列以产生或去除一个或多个糖基化位点)。可以改变与抗体的Fc区连接的碳水化合物。来自哺乳动物细胞的天然抗体通常包含通过N键连接到Fc区CH2结构域的Asn₂₉₇的分支双触角寡糖(参见例如,Wright等人TIBTECH 15:26-32 (1997))。寡糖可以是各种碳水化合物,例如甘露糖、N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)、半乳糖、唾液酸、与双触角寡糖结构的茎中的GlcNAc连接的岩藻糖。可以对抗体中的寡糖进行修饰,例如,以产生具有某些改进特性的抗体变体。抗体糖基化变体可以具有改善的ADCC和/或CDC功能。在一些实施方案中,提供了具有碳水化合物结构的抗体变体,该碳水化合物结构缺乏(直接或间接)连接至Fc区的岩藻糖。例如,此类抗体中岩藻糖的量可为1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。岩藻糖的量是通过相对于与Asn₂₉₇连接的所有糖结构的总和计算Asn₂₉₇处糖链内岩藻糖的平均量来确定的(参见例如,WO 08/077546)。Asn₂₉₇是指位于Fc区中约位置297处的天冬酰胺残基(Fc区残基的EU编号;参见例如,Edelman等人Proc Natl Acad Sci U S A. 1969年5月;63(1):78-85)。然而,由于抗体中的微小序列变化,Asn₂₉₇也可位于位置297上游或下游约±3个氨基酸,即在位置294和300之间。这种岩藻糖基化变体可以具有改进的ADCC功能(参见例如,Okazaki等人J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004);和Yamane-Ohnuki等人Biotech. Bioeng. 87:614

(2004))。细胞系,例如敲除细胞系及其使用方法可用于产生去岩藻糖基化抗体,例如蛋白质岩藻糖基化缺陷的Lec13 CHO细胞和 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因(FUT8)敲除CHO细胞(参见例如,Ripka等人Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);Yamane-Ohnuki等人Biotech.Bioeng.87:614(2004);Kanda,Y.等人,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006))。还包括其他抗体糖基化变体(参见例如美国专利号6,602,684)。

[0123] 在一些实施方案中,本文提供的复合结合分子对于抗体靶标具有如下解离常数(K_D):10 μ M、1 μ M、100nM、50nM、40nM、30nM、20nM、10nM、5nM、2nM、1nM、0.5nM、0.1nM、0.05nM、0.01nM或0.001nM或更少(例如,10 $^{-8}$ M或更低,例如,10 $^{-8}$ M至10 $^{-13}$ M,例如,10 $^{-9}$ M至10 $^{-13}$ M)。抗体靶标可以是CD19靶标、CD38靶标或包含CD19和CD38两者的靶标。 K_D 可以通过任何合适的测定来测量。在某些实施方案中, K_D 可以使用表面等离子共振测定法测量(例如,使用BIACORE[®]-2000或BIACORE[®]-3000或Octet)。

[0124] 在一些实施方案中,可以将一个或多个氨基酸修饰引入本文提供的抗体的Fc区,从而产生Fc区变体。本文中的Fc区是免疫球蛋白重链的C末端区,其包含至少一部分恒定区。Fc区包括天然序列Fc区和变体Fc区。Fc区变体可包含一个人Fc区序列(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区),该人Fc区序列在一个或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如,取代)。

[0125] 在某些情况下,免疫球蛋白的Fc区对于许多重要的抗体功能(例如效应子功能)(例如抗原依赖性细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP))来说都是很重要的,导致靶细胞的杀伤,尽管这些是通过不同的机制产生的。因此,在一些实施方案中,本文所述的抗体包含本发明的可变结构域和基于用于预期用途的抗体的生物活性选择的包含不同Fc区的恒定结构域。在某些情况下,例如,人IgG可以分为四个亚类,IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,这些亚类中的每一个都包含Fc区,该Fc区具有针对与一种或多种Fc γ 受体(激活性受体Fc γ RI(CD64)、Fc γ RIIA、Fc γ RIIC(CD32);Fc γ RIIIA和Fc γ RIIIB(CD16)和抑制性受体Fc γ RIIB)结合以及针对补体的第一组分(C1q)具有独特谱。人IgG1和IgG3结合至所有Fc γ 受体;IgG2结合至Fc γ RIIA_{H131},并且对Fc γ RIIA_{R131} Fc γ RIIIA_{V158}具有较低的亲和力;IgG4结合至Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、Fc γ RIIC和Fc γ RIII_{V158};并且抑制性受体Fc γ RIIB对IgG1、IgG2和IgG3的亲和力低于所有其他Fc γ 受体。研究表明,Fc γ RI不与IgG2结合,Fc γ RIIIB不与IgG2或IgG4结合。同前。一般来说,就ADCC活性而言,人IgG1 $\geq$ IgG3 $\gg$ IgG4 $\geq$ IgG2。

[0126] 在某些实施方案中,本文所述的抗CD19或抗CD38可变区与结合至一种或多种激活性Fc受体(Fc γ RI/CD64、Fc γ RIIa/CD32或Fc γ RIIIa/CD16)的Fc连接,从而刺激ADCC,并且在一些情况下,会导致靶标耗竭。在某些实施方案中,本文所述的抗CD19或抗CD38可变区与人IgG1或IgG3 Fc连接,即,抗体是IgG1或IgG3同种型抗体。在一些情况下,Fc区的修饰产生具有(a)增加的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、(b)增加的补体介导的细胞毒性(CDC)、(c)增加的对C1q的亲和力和/或(d)相对于亲本Fc增加的对Fc受体的亲和力的Fc变体。在一些实施方案中,Fc区变体在Fc区中包含至少一个氨基酸修饰。组合氨基酸修饰也是有用的。例如,变体Fc区可以在其中(例如此处确定的特定Fc区位置)包括两个、三个、四个、五个等取代。

[0127] 在一些实施方案中,可以通过修饰Fc区来增加ADCC活性。关于ADCC活性,在某些情

况下,人IgG1和IgG3与IgG4和IgG2相比显示出增加的ADCC活性,因此选择IgG1或IgG3恒定结构域而不是IgG2或IgG4以用于其中需要ADCC的抗体。在一些实施方案中,选择IgG3以用于激活表达Fc γ RIIIA的NK细胞、巨噬细胞的单核细胞。在某些情况下,不同的IgG同种型也表现出不同的CDC活性,其中IgG3和IgG1与IgG2或IgG4相比表现出更大的CDC活性。可替代地,在一些实施方案中,通过修饰第234、235、236、238、239、240、241、243、244、245、247、248、249、252、254、255、256、258、262、263、264、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、299、301、303、305、307、309、312、313、315、320、322、324、325、326、327、329、330、331、332、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、433、434、435、436、437、438或439 (Kabat编号) 位处的一个或多个氨基酸来修饰Fc区以增加抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用 (ADCP)、补体介导的细胞毒性 (CDC)、C1q的亲合力和/或增加Fc γ 受体的亲和力。美国专利号5,500,362和5,821,337描述了用于评估目的分子的ADCC活性的体外测定的非限制性例子。可替代地,可以采用非放射性测定方法 (例如ACTITM和CytoTox96[®]非放射性细胞毒性测定)。用于此类测定的有用效应细胞包括外周血单核细胞 (PBMC)、单核细胞、巨噬细胞和自然杀伤 (NK) 细胞。

[0128] 抗体可以具有增加的半衰期和改善的与新生儿Fc受体 (FcRn) 的结合 (参见例如US2005/0014934)。此类抗体可包含其中具有一个或多个取代的Fc区,所述取代改善Fc区与FcRn的结合,并且包括在以下一个或多个Fc区残基处具有取代的那些:238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434 (根据EU编号系统) (参见例如美国专利7,371,826)。也考虑了Fc区变体的其他示例 (参见例如Duncan&Winter, Nature 322:738-40 (1988); 美国专利号5,648,260和5,624,821; 和W094/29351)。

[0129] 在一些实施方案中,可能需要产生半胱氨酸工程化的抗体,例如“thioMAb”,其中抗体的一个或多个残基被半胱氨酸残基取代。在一些实施方案中,取代的残基出现在抗体的可及位点处。反应性硫醇基团可以位于用于与其他部分 (例如药物部分或接头药物部分) 缀合的位点,以产生免疫缀合物。在一些实施方案中,任何一个或多个以下残基可以被半胱氨酸取代:轻链的V205 (Kabat编号); 重链的A118 (EU编号); 重链Fc区的S400 (EU编号)。

[0130] 在一些实施方案中,本文提供的抗体可以进一步被修饰以包含已知和可用的额外非蛋白质部分。适用于抗体衍生化的部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性示例包括但不限于聚乙二醇 (PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸 (均聚物或无规共聚物) 和葡聚糖或聚 (N-乙烯基吡咯烷酮) 聚乙二醇、聚丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇 (例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛由于在水中具有稳定性,所以在制造中具有优势。聚合物可以具有任何分子量,并且可以是支链或非支链的。连接到抗体的聚合物的数量可以不同,如果连接了两个或更多个聚合物,它们可以是相同或不同的分子。

[0131] 复合结合分子或双特异性抗体可以基于与这些分子相关的结合部分而不同,其中也有几种不同的可以在本文中部署和设想的形式。复合结合分子或双特异性抗体可包含抗体片段、基本上完整的抗体或其组合。在一些实施方案中,第一结合组分或第二结合组分包

含免疫球蛋白重链和轻链对、scFv、F(ab)、F(ab')₂、单结构域抗体、来自免疫球蛋白新抗原受体的可变区片段(VNAR)或源自重链抗体的可变区(VHH)。在某些实施方案中,第一结合组分和第二结合组分包含免疫球蛋白重链和轻链对、scFv、F(ab)、F(ab')₂、单结构域抗体、来自免疫球蛋白新抗原受体的可变区片段(VNAR)或来自重链抗体的可变区(VHH)。在一些实施方案中,第一结合组分或第二结合组分包含免疫球蛋白重链和轻链对。在某些实施方案中,第一结合组分和第二结合组分包含免疫球蛋白重链和轻链对。在一些实施方案中,第一结合组分或第二结合组分包含scFv。在某些实施方案中,第一结合组分和第二结合组分包含scFv。

[0132] 根据本公开的双特异性抗体包括完整的抗体分子或基本上完全完整的抗体分子,并且可以是不对称的或对称的。

[0133] 不对称双特异性抗体通常包含来自对靶标A特异的抗体的重链/轻链(HC/LC)对和来自对靶标B特异的抗体的HC/LC对,从而产生异双功能抗体。诸如此类的异双功能抗体面临分子在产生时形成效果不佳的问题。期望得到HC/LC-A:HC/LC-B,但从所有可能的组合来看,通常在热力学或统计上都是不利的。已经引入了多种方案来规避这个问题。在一些情况下,来自对A具有特异性的抗体的HC/LC对和来自对B具有特异性的抗体的HC/LC对进一步包含对FC区的突变以增加形成具有HC/LC-A:HC/LC-B的抗体的可能性。这可以通过工程化结构特征来实现,例如在HC-A的FC区域中设计“杵”,在HC-B中设计“臼”,反之亦然,从而促进HC-A和HC-B之间异二聚体的形成。促进HC-A:HC-B异二聚体的另一种方案是工程化HC-A和HC-B的FC部分中的氨基酸残基以包含有利于HC-B和HC-A之间的静电相互作用的电荷对。解决链结合问题的另一种方案是用单链结合分子(例如,V_{HH}或scFv)替换HC/LC对中之之一的可变区。这样分子的一半包含经典的HC/LC对,而另一半包含与单链结合分子融合或以其他方式连接的HC恒定区。可以进行进一步的修饰以促进正确的HC/LC配对,包括对A或B的HC和LC进行工程化突变,以利于形成正确的HC/LC对;CrossMab技术,其需要交换HC/LC对的相应恒定区域。对称双特异性抗体通过不依赖异双功能分子的形成来规避链结合问题。这样的示例包括:双可变结构域分子,其包含不同特异性的堆叠可变区;IgG-scFv分子,其包含与经典抗体分子的重链c末端融合的具有不同特异性的scFv;(scFv)₄-Fc,其包含通过Ig的Fc区连接的两个scFv(Fc二聚化产生双特异性四价分子);DART-Fc和二合一,等等。

[0134] 可以构思和设计复合结合分子或双特异性抗体的结构,以改变复合结合分子或双特异性抗体的功能或结合特性(参见例如“Bispecific antibodies:a mechanistic review of the pipeline.”Nat Rev Drug Discovery.2019年八月;18(8):585-608)(参见例如“The making of bispecific antibodies”MAbs.2017年二月-三月;9(2):182-212)。例如,双特异性抗体可以选自以下形式之一:共同轻链双特异性IgG、Fab-Fc:scFv-Fc双特异性IgG、Fab-Fc-Fab:Fc双特异性IgG、Fab-Fc-scFv:Fab-Fc-scFv双特异性IgG、Fab-Fc-scFv:Fc双特异性IgG、Fab-Fc-Fab:Fab-Fc双特异性IgG、scFv-Fab-Fc:scFv-Fab-Fc双特异性IgG、Fab-Fab-Fc:Fab-Fab-Fc双特异性IgG、Fab-Fc-Fab:Fab-Fc-Fab双特异性IgG、和Fab-Fc-scFv:Fab-Fc双特异性IgG。

共同轻链双特异性IgG

[0135] 本文可以使用具有共同轻链双特异性IgG结构的双特异性抗体。图1说明了具有共同轻链双特异性IgG结构的双特异性抗体。该结构包含第一重链和第二IgG重链。每条重链

包含VH、CH1、CH2和CH3结构域。第一重链包含VH 102、CH1 104、CH2 106和CH3 108。第二重链包含VH 112、CH1 114、CH2 116和CH3 118。共同轻链双特异性IgG结构还包含轻链,该轻链包含VL结构域120和CL结构域122。通常,第一重链将包含源自具有第一特异性的抗体的重链的序列;以及第二重链将包含源自具有第二特异性的抗体的重链。与第一重链和第二重链配对的轻链将是相同的,并且可以源自具有特异性或单独特异性的抗体的轻链。重链可以通过共价键(例如二硫键130)与轻链分子共价偶联。重链可以通过一个或多个共价键(例如二硫键134和/或136)与另一条重链偶联。共同轻链双特异性IgG结构可以包含第一重链和第二重链分子,其进一步包含在CH3结构域内的突变,所述突变促进第一重链和第二重链偶联和/或阻止第一重链与另一条第一重链或第二条重链与另一条第二重链的偶联。突变可以在物理上(例如空间位阻,“杵”进入“臼”)或生物化学上(例如静电相互作用)阻止两个第一重链分子或两个第二重链分子的偶联。示例性杵入臼突变可包含一条重链中的T366W(EU编号)和第二重链中的T366S/L368A/Y407V(EU编号)。促进第一重链和第二重链分子偶联的示例性突变公开于例如W02009089004、US 8,642,745、US PG-PUB:US20140322756和“The making of bispecific antibodies”MAbs.2017年二月-三月;9(2):182-212。共同轻链双特异性IgG结构还可以包含与其偶联的碳水化合物分子140或其额外修饰。

[0136] 具有共同轻链双特异性IgG结构的双特异性抗体可以靶向B细胞谱系表面标志物(例如CD19、CD138、IgA或CD45)和抑制性B细胞表面标志物(例如IgD、CD1、CD5、CD21、CD24、CD38、HM13、SLAMF7、AQP3或潜伏TGF- β (例如,TGF- β LAP))。在一些实施方案中,第一重链被配置为结合B细胞谱系表面标志物并且第二重链被配置为结合抑制性B细胞表面标志物。在一些实施方案中,B细胞谱系表面标志物包含CD19。在某些实施方案中,B细胞谱系表面标志物由CD19组成。在一些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物包含CD38。在某些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物由CD38组成。

[0137] 在一些实施方案中,第一重链包含含有CD19结合组分的VH序列,第二重链包含含有CD38结合组分的VH序列。在某些实施方案中,重链CD19结合组分包含SEQ ID NO:201、SEQ ID NO:1或在SEQ ID NO:201的A84和A108之一或两者处包含突变的变体,重链CD38结合组分包含SEQ ID NO:202、SEQ ID NO:215、SEQ ID NO:218-SEQ ID NO:221。在某些实施方案中,变体包含突变A84S和A108L。在一些实施方案中,双特异性抗体包含共同轻链。在某些实施方案中,共同轻链序列包含CD19结合组分(例如SEQ ID NO:2)。在某些实施方案中,共同轻链序列包含CD38结合组分(例如SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:222)。

[0138] 本文所述的BS1包含具有被配置为结合CD19的CD19结合组分和被配置为结合CD38的CD38结合组分的共同轻链形式,其中所述CD19结合组分包含抗体或其抗原结合片段并且所述CD38结合组分包含抗体或其抗原结合片段,其中所述CD38抗体或抗原结合片段包含与抗CD38免疫球蛋白轻链可变区配对的抗CD38免疫球蛋白重链可变区并且所述CD19抗体或抗原结合片段包含与抗CD38免疫球蛋白轻链可变区配对的抗CD19免疫球蛋白重链可变区,其中所述CD38抗体或抗原结合组分包含:a)重链互补决定区1(HCDR1),其包含SEQ ID NO:71-SEQ ID NO:75中任一个所示的氨基酸序列;b)重链互补决定区2(HCDR2),其包含SEQ ID NO:81-SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:150-SEQ ID NO:155中任一个所示的氨基酸序列;c)重链互补决定区3(HCDR3),其包含SEQ ID NO:91-SEQ ID NO:95中任一个所示的氨基酸序列;d)轻链互补决定区1(LCDR1),其包含SEQ ID NO:101-SEQ ID NO:105中任一个所示的氨基

酸序列;e)轻链互补决定区2(LCDR2),其包含SEQ ID NO:111-SEQ ID NO:115中任一个所示的氨基酸序列;和/或)轻链互补决定区3(LCDR3),其包含SEQ ID NO:121-SEQ ID NO:125中任一个所示的氨基酸序列;并且其中所述CD19抗原结合组分包含:g)重链互补决定区1(HCDR1),其包含SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:15中任一个所示的氨基酸序列;h)重链互补决定区2(HCDR2),其包含SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:25中任一个所示的氨基酸序列;i)重链互补决定区3(HCDR3),其包含SEQ ID NO:31-SEQ ID NO:35中任一个所示的氨基酸序列;j)轻链互补决定区1(LCDR1),其包含SEQ ID NO:101-SEQ ID NO:105中任一个所示的氨基酸序列;k)轻链互补决定区2(LCDR2),其包含SEQ ID NO:111-SEQ ID NO:115中任一个所示的氨基酸序列;和/或l)轻链互补决定区3(LCDR3),其包含SEQ ID NO:121-SEQ ID NO:125中任一个所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,CD38抗原结合组分包含含有序列P-X1-L-G-X2-A的HCDR2氨基酸序列,其中X1和X2各自选自H、Q、T、N、S、G、A、R、K、D、或E。在某些实施方案中,X1是H并且X2是T。在一些实施方案中,CD19重链序列包含A84S和/或A108L取代。在一些实施方案中,CD38轻链包含W32H取代。

Fab-Fc:scFv-Fc双特异性IgG

[0139] 本文可以使用具有Fab-Fc:scFv-Fc双特异性IgG结构的双特异性抗体。图2说明了具有Fab-Fc:scFv-Fc双特异性IgG结构的双特异性抗体。该结构包含第一重链分子和经修饰的包含单链可变片段的第二IgG重链分子。第一重链从N末端至C末端分别包含VH 202、CH1 204、CH2 206和CH3 208。经修饰的第二重链从N末端至C末端分别包含单链可变片段(scFv) 210、CH2 216和CH3 218。单链可变片段(scFv)可以包含对应于可变轻链结构域或其片段的第一结构域212、对应于可变重链或其片段的第二结构域214,和接头多肽215。Fab-Fc:scFv-Fc双特异性IgG结构还包含轻链,该轻链包含VL结构域220和CL结构域222。第一重链可以通过共价键(例如二硫键230)与轻链分子共价偶联。第一重链可以通过一个或多个共价键(例如二硫键234和/或236)与经修饰的第二重链偶联。Fab-Fc:scFv-Fc双特异性IgG结构可以包含第一和经修饰的第二重链分子,其进一步包含在CH3结构域内的突变,所述突变促进第一重链和第二重链偶联和/或阻止第一重链与另一条第一重链或第二条重链与另一条第二重链的偶联。突变可以在物理上(例如空间位阻)或生物化学上(例如静电相互作用)阻止两个第一重链分子或两个第二重链分子的偶联。促进第一重链和第二重链分子偶联的示例性突变公开于例如US PG-PUB:US20140322756和“The making of bispecific antibodies”MAbs.2017二月-三月;9(2):182-212。ab-Fc:scFv-Fc双特异性IgG结构还可以包含与其偶联的碳水化合物分子240或其额外修饰。

[0140] 具有Fab-Fc:scFv-Fc双特异性IgG结构的双特异性抗体可以靶向B细胞谱系表面标志物(例如CD19、CD138、IgA或CD45)和抑制性B细胞表面标志物(例如IgD、CD1、CD5、CD21、CD24、CD38、HM13、SLAMF7、AQP3或潜伏TGF- β (例如TGF- β LAP))。在一些实施方案中,B细胞谱系表面标志物包含CD19。在某些实施方案中,B细胞谱系表面标志物由CD19组成。在一些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物包含CD38。在某些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物由CD38组成。

[0141] 可以对Fab-Fc:scFv-Fc双特异性IgG结构进行工程化,以使第一抗原结合位点靶向CD19,第二抗原结合位点靶向CD38。在一些实施方案中,第一重链包含含有CD19结合组分的VH序列,第二重链包含含有CD38结合组分的单链可变片段(scFv)序列。在某些实施方案

中,含有CD38单链可变片段的重链包含SEQ ID NO:205或SEQ ID NO:206。在某些实施方案中,VL序列包含CD19结合组分。在某些实施方案中,包含CD38结合组分的单链可变片段(scFv)序列包含对应于抗体重链和轻链可变序列或其CD38结合片段的CD38结合组分。在一些实施方案中,第一重链包含含有CD38结合组分的VH序列,第二重链包含含有CD19结合组分的单链可变片段(scFv)序列。在某些实施方案中,含有CD19单链可变片段的重链包含SEQ ID NO:203或SEQ ID NO:204或SEQ ID NO:217。在某些实施方案中,包含CD19结合组分的单链可变片段(scFv)序列包含对应于抗体重链和轻链可变序列或其CD19结合片段的CD19结合组分。

[0142] 可以对Fab-Fc:scFv-Fc双特异性IgG结构进行工程化,以使第一抗原结合位点靶向CD38,第二抗原结合位点靶向CD19。在一些实施方案中,第一重链包含含有CD38结合组分的VH序列,第二重链包含含有CD19结合组分的单链可变片段(scFv)序列。在某些实施方案中,VL序列包含CD38结合组分。在某些实施方案中,包含CD19结合组分的单链可变片段(scFv)序列包含对应于抗体重链和轻链可变序列或其CD19结合片段的CD19结合组分。

[0143] 本文所述的BS2包含被配置为结合CD19的CD19结合组分和被配置为结合CD38的CD38结合组分,其中所述CD19结合组分包含抗体或其抗原结合片段,所述CD38结合组分包含抗体或其抗原结合片段,其中所述CD38抗原结合组分包含结合CD38的Fab,其包含与抗CD38免疫球蛋白轻链可变区配对的抗CD38免疫球蛋白重链可变区,CD19抗原结合组分包含结合CD19的scFv,其包含与抗CD38免疫球蛋白轻链可变区配对的抗CD19免疫球蛋白重链可变区,其中所述CD38结合组分包括免疫球蛋白重链,所述免疫球蛋白重链包含SEQ ID NO:71-SEQ ID NO:75中任一个所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:81-SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:150-SEQ ID NO:155中任一个所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:91-SEQ ID NO:95中任一个所示的HCDR3氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链包含SEQ ID NO:101-SEQ ID NO:105中任一个所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:111-SEQ ID NO:115中任一个所示的LCDR2氨基酸序列、和/或SEQ ID NO:121-SEQ ID NO:125中任一个所示的LCDR3氨基酸序列;并且其中所述CD19结合组分包括免疫球蛋白重链,所述免疫球蛋白重链包含SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:15中任一个所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:25中任一个所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:31-SEQ ID NO:35中任一个所示的HCDR3氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链包含SEQ ID NO:41-SEQ ID NO:45中任一个所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:55中任一个所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:61-SEQ ID NO:65中任一个所示的LCDR3氨基酸序列。在一些实施方案中,CD38抗原结合组分包含含有序列P-X1-L-G-X2-A的HCDR2氨基酸序列,其中X1和X2选自H、Q、T、N、S、G、A、R、K、D或E。在某些实施方案中,X1是H并且X2是T。在一些实施方案中,CD19重链序列包含A84S和/或A108L取代。在一些实施方案中,CD38轻链包含W32H取代。

Fab-Fc-Fab:Fc双特异性IgG

[0144] 本文可以使用具有Fab-Fc-Fab:Fc双特异性IgG结构的工程化的双特异性抗体。图3说明了具有Fab-Fc-Fab:Fc双特异性IgG结构的双特异性抗体。该结构包含第一重链分子和经修饰的IgG重链分子。第一重链从N末端至C末端分别包含VH结构域302、CH1结构域304、CH2结构域306、CH3结构域308、接头310、第二VH结构域312和第二CH1结构域314。经修饰的重链从N末端至C末端分别包含CH2结构域316和CH3结构域318。Fab-Fc-Fab:Fc双特异性IgG

结构还包含第一轻链,其包含VL结构域320和CL结构域322。Fab-Fc-Fab:Fc双特异性IgG结构还包含第二轻链,其包含VL结构域324和CL结构域326。重链可以通过共价键(例如二硫键330)与轻链分子共价偶联。第一重链也可以通过共价键(例如二硫键332)与第一第二链分子共价偶联。重链和轻链可以以第一重链的VH结构域和CH1结构域与第一轻链的VL结构域和CL结构域配对的方式偶联。第一重链和第二轻链可以以第一重链的第二VH结构域和第二CH1结构域与第二轻链的VL结构域和CL结构域配对的方式偶联。第一重链可以通过一个或多个共价键(例如二硫键334和/或336)与经修饰的第二重链偶联。Fab-Fc-Fab:Fc双特异性IgG结构可以包含第一和经修饰的第二重链分子,其进一步包含在CH3结构域内的突变,所述突变促进第一重链和第二重链偶联和/或阻止第一重链与另一条第一重链或第二条重链与另一条第二重链的偶联。突变可以在物理上(例如空间位阻)或生物化学上(例如静电相互作用)阻止两个第一重链分子或两个第二重链分子的偶联。促进第一重链和第二重链分子偶联的示例性突变公开于例如US PG-PUB:US20140322756和“The making of bispecific antibodies”MAbs.2017二月-三月;9(2):182-212。Fab-Fc-Fab:Fc双特异性IgG结构还可以包含与其偶联的碳水化合物分子340或其额外修饰。

[0145] 具有Fab-Fc-Fab:Fc双特异性IgG结构的双特异性抗体可以靶向B细胞谱系表面标志物(例如CD19、CD138、IgA或CD45)和抑制性B细胞表面标志物(例如IgD、CD1、CD5、CD21、CD24、CD38、HM13、SLAMF7、AQP3或潜伏TGF- β (例如TGF- β LAP))。在一些实施方案中,B细胞谱系表面标志物包含CD19。在某些实施方案中,B细胞谱系表面标志物由CD19组成。在一些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物包含CD38。在某些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物由CD38组成。

[0146] 可以对Fab-Fc-Fab:Fc双特异性IgG结构进行工程化,以使第一抗原结合位点靶向CD19,第二抗原结合位点靶向CD38。在一些实施方案中,第一重链VH结构域(例如302)和VL结构域(例如320)包含CD19结合组分,其中第二VH结构域(例如312)和VL结构域(例如324)包含CD38结合组分。在一些实施方案中,Fab-Fc-Fab重链包含SEQ ID NO:207并且Fc重链包含SEQ ID NO:208。

[0147] 也可以对Fab-Fc-Fab:Fc双特异性IgG结构进行工程化,以使第一抗原结合位点靶向CD38,第二抗原结合位点靶向CD19。在一些实施方案中,第一重链VH结构域(例如302)和VL结构域(例如320)包含CD38结合组分,其中第二VH结构域(例如312)和VL结构域(例如324)包含CD19结合组分。

Fab-Fc-scFv:Fab-Fc-scFv双特异性IgG

[0148] 本文可以使用具有Fab-Fc-scFv:Fab-Fc-scFv双特异性IgG结构的工程化的双特异性抗体。图4说明了具有Fab-Fc-scFv:Fab-Fc-scFv双特异性IgG结构的双特异性抗体。该结构包含两个第一重链分子。第一重链从N末端至C末端分别包含VH结构域402、CH1结构域404、CH2结构域406、CH3结构域408、接头410和单链可变片段(scFv)412。单链可变片段(scFv)可以包含对应于可变轻链结构域的第一结构域414或其片段、对应于可变重链的第二结构域416或其片段和第二接头多肽415。Fab-Fc-scFv:Fab-Fc-scFv双特异性IgG结构还包含第一轻链,其包含VL结构域420和CL结构域422。重链可以通过共价键(例如二硫键430)与轻链分子共价偶联。重链可以通过一个或多个共价键(例如二硫键434和/或436)与另一条重链偶联。Fab-Fc-scFv:Fab-Fc-scFv双特异性IgG结构还可以包含与其偶联的碳水化合

物分子440或其额外修饰。

[0149] 具有Fab-Fc-scFv:Fab-Fc-scFv双特异性IgG结构的双特异性抗体可以靶向B细胞谱系表面标志物(例如CD19、CD138、IgA或CD45)和抑制性B细胞表面标志物(例如IgD、CD1、CD5、CD21、CD24、CD38、HM13、SLAMF7、AQP3或潜伏TGF- β (例如TGF- β LAP))。在一些实施方案中,B细胞谱系表面标志物包含CD19。在某些实施方案中,B细胞谱系表面标志物由CD19组成。在一些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物包含CD38。在某些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物由CD38组成。

[0150] 可以对Fab-Fc-scFv:Fab-Fc-scFv双特异性IgG结构进行工程化,以使第一抗原结合位点靶向CD19,第二抗原结合位点靶向CD38。在一些实施方案中,第一重链VH结构域(例如402)和VL结构域(例如420)包含CD19结合组分,其中单链可变片段(scFv)(例如412)序列包含CD38结合组分。在某些实施方案中,包含CD38结合组分的单链可变片段(scFv)序列包含对应于抗体重链和轻链可变序列或其CD38结合片段的CD38结合组分。

[0151] 也可以对Fab-Fc-scFv:Fab-Fc-scFv双特异性IgG结构进行工程化,以使第一抗原结合位点靶向CD38,第二抗原结合位点靶向CD19。在一些实施方案中,第一重链VH结构域(例如402)和VL结构域(例如420)包含CD38结合组分,其中单链可变片段(scFv)(例如412)序列包含CD19结合组分。在某些实施方案中,包含CD19结合组分的单链可变片段(scFv)序列包含对应于抗体重链和轻链可变序列或其CD19结合片段的CD19结合组分。在一些实施方案中,Fab-Fc-scFv重链包含SEQ ID NO:209。

Fab-Fc-scFv:Fc双特异性IgG

[0152] 本文可以使用具有Fab-Fc-scFv:Fc双特异性IgG结构的工程化的双特异性抗体。图5说明了具有Fab-Fc-scFv:Fc双特异性IgG结构的双特异性抗体。该结构包含第一重链分子和第二IgG重链分子。第一重链从N末端至C末端分别包含VH结构域502、CH1结构域504、CH2结构域506、CH3结构域508、接头510和单链可变片段(scFv)512。单链可变片段(scFv)可以包含对应于可变轻链结构域的第一结构域514或其片段、对应于可变重链的第二结构域516或其片段和第二接头多肽515。Fab-Fc-scFv:Fc双特异性IgG结构还包含第一轻链,其包含VL结构域520和CL结构域522。Fab-Fc-scFv:Fc双特异性IgG结构还包含第二轻链,其包含VL结构域524和CL结构域526。重链可以通过共价键(例如二硫键530)与轻链分子共价偶联。重链可以通过一个或多个共价键(例如二硫键534和/或536)与另一条重链偶联。Fab-Fc-scFv:Fc双特异性IgG结构可以包含第一和经修饰的第二重链分子,其进一步包含在CH3结构域内的突变,所述突变促进第一重链和第二重链偶联和/或阻止第一重链与另一条第一重链或第二条重链与另一条第二重链的偶联。突变可以在物理上(例如空间位阻)或生物化学上(例如静电相互作用)阻止两个重链分子或两个第二重链分子的偶联。促进第一重链和第二重链分子偶联的示例性突变公开于例如US PG-PUB:US20140322756和“The making of bispecific antibodies”MAbs.2017二月-三月;9(2):182-212。Fab-Fc-scFv:Fc双特异性IgG结构还可以包含与其偶联的碳水化合物分子540或其另外的修饰。

[0153] 具有Fab-Fc-scFv:Fc双特异性IgG结构的双特异性抗体可以靶向B细胞谱系表面标志物(例如CD19、CD138、IgA或CD45,例如CD19、CD138、IgA或CD45)和抑制性B细胞表面标志物(例如IgD、CD1、CD5、CD21、CD24、CD38、HM13、SLAMF7、AQP3或潜伏TGF- β (例如TGF- β LAP))。在一些实施方案中,B细胞谱系表面标志物包含CD19。在某些实施方案中,B细胞谱系

表面标志物由CD19组成。在一些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物包含CD38。在某些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物由CD38组成。

[0154] 可以对Fab-Fc-scFv:Fc双特异性IgG结构进行工程化,以使第一抗原结合位点靶向CD19,第二抗原结合位点靶向CD38。在一些实施方案中,第一重链VH结构域(例如502)和VL结构域(例如520)包含CD19结合组分,其中单链可变片段(scFv)(例如512)序列包含CD38结合组分。在某些实施方案中,包含CD38结合组分的单链可变片段(scFv)序列包含对应于抗体重链和轻链可变序列或其CD38结合片段的CD38结合组分。

[0155] 也可以对Fab-Fc-scFv:Fc双特异性IgG结构进行工程化,以使第一抗原结合位点靶向CD38,第二抗原结合位点靶向CD19。在一些实施方案中,第一重链VH结构域(例如502)和VL结构域(例如520)包含CD38结合组分,其中单链可变片段(scFv)(例如512)序列包含CD19结合组分。在某些实施方案中,包含CD19结合组分的单链可变片段(scFv)序列包含对应于抗体重链和轻链可变序列或其CD19结合片段的CD19结合组分。

Fab-Fc-Fab:Fab-Fc双特异性IgG

[0156] 本文可以使用具有Fab-Fc-Fab:Fab-Fc双特异性IgG结构的工程化的双特异性抗体。图6说明了具有Fab-Fc-Fab:Fab-Fc双特异性IgG结构的双特异性抗体。该结构包含第一重链分子和第二IgG重链分子。第一重链从N末端至C末端分别包含VH结构域602、CH1结构域604、CH2结构域606、CH3结构域608、接头610、第二VH结构域612和第二CH1结构域614。与在第一条重链中那样,第二重链从N末端至C末端分别包含VH结构域652、CH1结构域654、CH2结构域656和CH3结构域658。Fab-Fc-Fab:Fab-Fc双特异性IgG结构还包含第一轻链,其包含VL结构域620和CL结构域622。Fab-Fc-Fab:Fab-Fc双特异性IgG结构还包含第二轻链,其包含VL结构域624和CL结构域626。重链可以通过共价键(例如二硫键630)与轻链分子共价偶联。第一重链和第一轻链可以以第一重链的VH结构域和CH1结构域与第一轻链的VL结构域和CL结构域配对的方式偶联。第一重链和第二轻链可以以第一重链的第二VH结构域和第二CH1结构域与第二轻链的VL结构域和CL结构域配对的方式偶联。重链可以通过一个或多个共价键(例如二硫键634和/或636)与另一条重链偶联。Fab-Fc-Fab:Fab-Fc双特异性IgG结构可以包含第一重链和第二重链分子,其进一步包含在CH3结构域内的突变,所述突变促进第一重链和第二重链偶联和/或阻止第一重链与另一条第一重链或第二条重链与另一条第二重链的偶联。突变可以在物理上(例如空间位阻)或生物化学上(例如静电相互作用)阻止两个第一重链分子或两个第二重链分子的偶联。促进第一重链和第二重链分子偶联的示例性突变公开于例如US PG-PUB:US20140322756和“The making of bispecific antibodies” MAbs. 2017二月-三月;9(2):182-212。Fab-Fc-Fab:Fab-Fc双特异性IgG结构还可包含与其偶联的碳水化合物分子或其额外修饰。

[0157] 具有Fab-Fc-Fab:Fab-Fc双特异性IgG结构的双特异性抗体可以靶向B细胞谱系表面标志物(例如CD19、CD138、IgA或CD45)和抑制性B细胞表面标志物(例如IgD、CD1、CD5、CD21、CD24、CD38、HM13、SLAMF7、AQP3或潜伏TGF- β (例如,TGF- β LAP))。在一些实施方案中,B细胞谱系表面标志物包含CD19。在某些实施方案中,B细胞谱系表面标志物由CD19组成。在一些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物包含CD38。在某些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物由CD38组成。

[0158] 可以对Fab-Fc-Fab:Fab-Fc双特异性IgG结构进行工程化,以使第一抗原结合位点

靶向CD19,第二抗原结合位点靶向CD38。在一些实施方案中,第一重链VH结构域(例如602)和VL结构域(例如620)包含CD19结合组分,其中第二VH结构域(例如612)和VL结构域(例如624)包含CD38结合组分。

[0159] 也可以对Fab-Fc-Fab:Fab-Fc双特异性IgG结构进行工程化,以使第一抗原结合位点靶向CD38,第二抗原结合位点靶向CD19。在一些实施方案中,第一重链VH结构域(例如602)和VL结构域(例如620)包含CD38结合组分,其中第二VH结构域(例如612)和VL结构域(例如624)包含CD19结合组分。

scFv-Fab-Fc:scFv-Fab-Fc双特异性IgG

[0160] 本文可以使用具有scFv-Fab-Fc:scFv-Fab-Fc双特异性IgG结构的工程化的双特异性抗体。图7说明了具有scFv-Fab-Fc:scFv-Fab-Fc双特异性IgG结构的双特异性抗体。该结构包含两个第一重链分子。第一重链从N末端到C末端分别包含单链可变片段(scFv) 712、接头710、VH结构域702、CH1结构域704、CH2结构域706和CH3结构域708。单链可变片段(scFv)可以包含对应于可变轻链结构域第一结构域714或其片段、对应于可变重链的第二结构域716或其片段和第二接头多肽715。ScFv-Fab-Fc:scFv-Fab-Fc双特异性IgG结构还包含第一轻链,其包含VL结构域720和CL结构域722。重链可以通过共价键(例如二硫键730)与轻链分子共价偶联。重链可以通过一个或多个共价键(例如二硫键734和/或736)与另一条重链偶联。ScFv-Fab-Fc:scFv-Fab-Fc双特异性IgG结构还可以包含与其偶联的碳水化合物分子740或其另外的修饰。

[0161] 具有scFv-Fab-Fc:scFv-Fab-Fc双特异性IgG结构的双特异性抗体可以靶向B细胞谱系表面标志物(例如CD19、CD138、IgA或CD45)和抑制性B细胞表面标志物(例如IgD、CD1、CD5、CD21、CD24、CD38、HM13、SLAMF7、AQP3或潜伏TGF- β (例如,TGF- β LAP))。在一些实施方案中,B细胞谱系表面标志物包含CD19。在某些实施方案中,B细胞谱系表面标志物由CD19组成。在一些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物包含CD38。在某些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物由CD38组成。

[0162] 可以对scFv-Fab-Fc:scFv-Fab-Fc双特异性IgG结构进行工程化,以使第一抗原结合位点靶向CD19,第二抗原结合位点靶向CD38。在一些实施方案中,第一重链VH结构域(例如702)和VL结构域(例如720)包含CD19结合组分,其中单链可变片段(scFv)(例如712)序列包含CD38结合组分。在某些实施方案中,包含CD38结合组分的单链可变片段(scFv)序列包含对应于抗体重链和轻链可变序列或其CD38结合片段的CD38结合组分。

[0163] 也可以对scFv-Fab-Fc:scFv-Fab-Fc双特异性IgG结构进行工程化,以使第一抗原结合位点靶向CD38,第二抗原结合位点靶向CD19。在一些实施方案中,第一重链VH结构域(例如702)和VL结构域(例如720)包含CD38结合组分,其中单链可变片段(scFv)(例如712)序列包含CD19结合组分。在某些实施方案中,包含CD19结合组分的单链可变片段(scFv)序列包含对应于抗体重链和轻链可变序列或其CD19结合片段的CD19结合组分。

Fab-Fab-Fc:Fab-Fab-Fc双特异性IgG

[0164] 本文可以使用具有Fab-Fab-Fc:Fab-Fab-Fc双特异性IgG结构的工程化的双特异性抗体。图8说明了具有Fab-Fab-Fc:Fab-Fab-Fc双特异性IgG结构的双特异性抗体。该结构包含两个重链分子。重链从N末端到C末端分别包含额外的VH结构域812和额外的CH1结构域814、接头810、VH结构域802、CH1结构域804、CH2结构域806和CH3结构域808。Fab-Fab-Fc:

Fab-Fab-Fc双特异性IgG结构还包含第一轻链,其包含VL结构域820和CL结构域822。Fab-Fab-Fc:Fab-Fab-Fc双特异性IgG结构还包含第二轻链,其包含VL结构域824和CL结构域826。重链分子可以通过共价键(例如二硫键830)与轻链分子共价偶联。重链和第一轻链可以以重链的VH结构域和CH1结构域与第一轻链的VL结构域和CL结构域配对的方式偶联。重链和第二轻链可以以重链的额外VH结构域和额外CH1结构域与第二轻链的VL结构域和CL结构域配对的方式偶联。重链可以通过一个或多个共价键(例如二硫键834和/或836)与经修饰的第二重链偶联。Fab-Fab-Fc:Fab-Fab-Fc双特异性IgG结构还可包含与其偶联的碳水化合物分子840或其额外修饰。

[0165] 具有Fab-Fab-Fc:Fab-Fab-Fc双特异性IgG结构的双特异性抗体可以靶向B细胞谱系表面标志物(例如CD19、CD138、IgA或CD45)和抑制性B细胞表面标志物(例如IgD、CD1、CD5、CD21、CD24、CD38、HM13、SLAMF7、AQP3或潜伏TGF- β (例如,TGF- β LAP))。在一些实施方案中,B细胞谱系表面标志物包含CD19。在某些实施方案中,B细胞谱系表面标志物由CD19组成。在一些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物包含CD38。在某些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物由CD38组成。

[0166] 可以对Fab-Fab-Fc:Fab-Fab-Fc双特异性IgG结构进行工程化,以使第一抗原结合位点靶向CD19,第二抗原结合位点靶向CD38。在一些实施方案中,第一VH结构域(例如802)和VL结构域(例如820)包含CD19结合组分,其中第二VH结构域(例如812)和VL结构域(例如824)包含CD38结合组分。

[0167] 也可以对Fab-Fab-Fc:Fab-Fab-Fc双特异性IgG结构进行工程化,以使第一抗原结合位点靶向CD38,第二抗原结合位点靶向CD19。在一些实施方案中,VH结构域(例如802)和VL结构域(例如820)包含CD38结合组分,其中第二VH结构域(例如812)和VL结构域(例如824)包含CD19结合组分。

Fab-Fc-Fab:Fab-Fc-Fab双特异性IgG

[0168] 本文可以使用具有Fab-Fc-Fab:Fab-Fc-Fab双特异性IgG结构的工程化的双特异性抗体。图9说明了具有Fab-Fc-Fab:Fab-Fc-Fab双特异性IgG结构的双特异性抗体。该结构包含两个重链分子和两个轻链分子。重链从N末端至C末端分别包含VH结构域902、CH1结构域904、CH2结构域906、CH3结构域908、接头910、第二VH结构域912和第二CH1结构域914。Fab-Fc-Fab:Fab-Fc-Fab双特异性IgG结构还包含第一轻链,其包含VL结构域920和CL结构域922。Fab-Fc-Fab:Fab-Fc-Fab双特异性IgG结构还包含第二轻链,其包含VL结构域924和CL结构域926。重链可以通过共价键(例如二硫键930)与轻链分子共价偶联。重链和第一轻链可以以重链的VH结构域和CH1结构域与第一轻链的VL结构域和CL结构域配对的方式偶联。重链和第二轻链可以以重链的第二VH结构域和第二CH1结构域与第二轻链的VL结构域和CL结构域配对的方式偶联。重链也可以通过共价键(例如二硫键934和936)与另一个重链分子共价偶联。Fab-Fc-Fab双特异性IgG结构还可以包含与其偶联的碳水化合物分子940或其额外修饰。

[0169] 具有Fab-Fc-Fab:Fab-Fc-Fab双特异性IgG结构的双特异性抗体可以靶向B细胞谱系表面标志物(例如CD19、CD138、IgA或CD45)和抑制性B细胞表面标志物(例如IgD、CD1、CD5、CD21、CD24、CD38、HM13、SLAMF7、AQP3或潜伏TGF- β (例如,TGF- β LAP))。在一些实施方案中,B细胞谱系表面标志物包含CD19。在某些实施方案中,B细胞谱系表面标志物由CD19组

成。在一些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物包含CD38。在某些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物由CD38组成。

[0170] 可以对Fab-Fc-Fab:Fab-Fc-Fab双特异性IgG结构进行工程化,以使第一抗原结合位点靶向CD19,第二抗原结合位点靶向CD38。在一些实施方案中,第一VH结构域(例如902)和VL结构域(例如920)包含CD19结合组分,其中第二VH结构域(例如912)和VL结构域(例如924)包含CD38结合组分。

[0171] 也可以对Fab-Fc-Fab:Fab-Fc-Fab双特异性IgG结构进行工程化,以使第一抗原结合位点靶向CD38,第二抗原结合位点靶向CD19。在一些实施方案中,VH结构域(例如902)和VL结构域(例如920)包含CD38结合组分,其中第二VH结构域(例如912)和VL结构域(例如924)包含CD19结合组分。

Fab-Fc-scFv:Fab-Fc双特异性IgG

[0172] 本文可以使用具有Fab-Fc-scFv:Fab-Fc双特异性IgG结构的工程化的双特异性抗体。图10展示了具有Fab-Fc-scFv:Fab-Fc双特异性IgG结构的双特异性抗体。该结构包含第一重链分子和第二IgG重链分子。第一重链从N末端至C末端分别包含VH结构域1002、CH1结构域1004、CH2结构域1006、CH3结构域1008、接头1010和单链可变片段(scFv) 1012。单链可变片段(scFv)可以包含对应于可变轻链结构域的第一结构域1014或其片段、对应于可变重链的第二结构域1016或其片段,和第二接头多肽1015。与在第一条重链中那样,第二重链从N末端至C末端分别包含VH结构域1002、CH1结构域1004、CH2结构域1004和CH3结构域1008。Fab-Fc-scFv:Fab-Fc双特异性IgG结构还包含第一轻链,其包含VL结构域1020和CL结构域1022。重链可以通过共价键(例如二硫键1030)与轻链分子共价偶联。重链可以通过一个或多个共价键(例如二硫键1034和/或1036)与另一条重链偶联。Fab-Fc-scFv:Fab-Fc双特异性IgG结构可以包含第一重链和第二重链分子,其进一步包含在CH3结构域内的突变,所述突变促进第一重链和第二重链偶联和/或阻止第一重链与另一条第一重链或第二条重链与另一条第二重链的偶联。突变可以在物理上(例如空间位阻)或生物化学上(例如静电相互作用)阻止两个第一重链分子或两个第二重链分子的偶联。促进第一重链和第二重链分子偶联的示例性突变公开于例如US PG-PUB:US20140322756和“The making of bispecific antibodies”MAbs.2017二月-三月;9(2):182-212。Fab-Fc-scFv:Fab-Fc双特异性IgG结构还可以包含与其偶联的碳水化合物分子1040或其额外修饰。

[0173] 具有Fab-Fc-scFv:Fab-Fc双特异性IgG结构的双特异性抗体可以靶向B细胞谱系表面标志物(例如CD19、CD138、IgA或CD45)和抑制性B细胞表面标志物(例如IgD、CD1、CD5、CD21、CD24、CD38、HM13、SLAMF7、AQP3或潜伏TGF- β (例如,TGF- β LAP))。在一些实施方案中,B细胞谱系表面标志物包含CD19。在某些实施方案中,B细胞谱系表面标志物由CD19组成。在一些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物包含CD38。在某些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物由CD38组成。

[0174] 可以对Fab-Fc-scFv:Fab-Fc双特异性IgG结构进行工程化,以使第一抗原结合位点靶向CD19,第二抗原结合位点靶向CD38。在一些实施方案中,第一重链VH结构域(例如1002)和VL结构域(例如1020)包含CD19结合组分,其中单链可变片段(scFv)(例如1012)序列包含CD38结合组分。在某些实施方案中,包含CD38结合组分的单链可变片段(scFv)序列包含对应于抗体重链和轻链可变序列或其CD38结合片段的CD38结合组分。

[0175] 也可以对Fab-Fc-scFv:Fab-Fc双特异性IgG结构进行工程化,以使第一抗原结合位点靶向CD38,第二抗原结合位点靶向CD19。在一些实施方案中,第一重链VH结构域(例如1002)和VL结构域(例如1020)包含CD38结合组分,其中单链可变片段(scFv)(例如1012)序列包含CD19结合组分。在某些实施方案中,包含CD19结合组分的单链可变片段(scFv)序列包含对应于抗体重链和轻链可变序列或其CD19结合片段的CD19结合组分。

scFv-Fab-Fc:Fc双特异性IgG

[0176] 本文可以使用具有scFv-Fab-Fc:Fc双特异性IgG结构的工程化的双特异性抗体。图11展示了具有scFv-Fab-Fc:Fc双特异性IgG结构的双特异性抗体。该结构包含含有scFv、VH和Fc区的第一重链分子和含有Fc的第二重链分子。scFv-Fab-Fc:Fc双特异性IgG结构可以包含第一重链和第二重链分子,其进一步包含在CH3结构域内的突变,所述突变促进第一重链和第二重链偶联和/或阻止第一重链与另一条第一重链或第二条重链与另一条第二重链的偶联。突变可以在物理上(例如杵臼结构)或生物化学上(例如静电相互作用)促进第一重链分子与第二重链分子的结合。scFv-Fab-Fc:Fc双特异性IgG结构包含与产生第一抗原结合位点的第一重链分子缔合的轻链分子。第二抗原结合位点由与第一重链的N末端偶联的scFv片段提供。促进第一重链和第二重链分子偶联的示例性突变公开于例如US PG-PUB:US20140322756和“The making of bispecific antibodies”MAbs.2017二月-三月;9(2):182-212。scFv-Fab-Fc:Fc双特异性IgG结构还可以包含与其偶联的碳水化合物分子1140或其额外修饰。

[0177] 具有scFv-Fab-Fc:Fc双特异性IgG结构的双特异性抗体可以靶向B细胞谱系表面标志物(例如CD19、CD138、IgA或CD45)和抑制性B细胞表面标志物(例如IgD、CD1、CD5、CD21、CD24、CD38、HM13、SLAMF7、AQP3或潜伏TGF- β (例如,TGF- β LAP))。在一些实施方案中,B细胞谱系表面标志物包含CD19。在某些实施方案中,B细胞谱系表面标志物由CD19组成。在一些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物包含CD38。在某些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物由CD38组成。

[0178] 可以对scFv-Fab-Fc:Fc双特异性IgG结构进行工程化,以使第一抗原结合位点靶向CD19,第二抗原结合位点靶向CD38。在一些实施方案中,第一重链VH结构域和VL结构域包含CD19结合组分,其中单链可变片段(scFv)序列包含CD38结合组分。在某些实施方案中,单链可变片段(scFv)序列包含对应于抗体重链和轻链可变序列或其CD38结合片段的CD38结合组分。

[0179] 也可以对scFv-Fab-Fc:Fc双特异性IgG结构进行工程化,以使第一抗原结合位点靶向CD38,第二抗原结合位点靶向CD19。在一些实施方案中,重链VH结构域和VL结构域包含CD38结合组分,其中单链可变片段(scFv)序列包含CD19结合组分。在某些实施方案中,包含CD19结合组分的单链可变片段(scFv)序列包含对应于抗体重链和轻链可变序列或其CD19结合片段的CD19结合组分。

[0180] 在某些实施方案中,第一重链分子包含与SEQ ID NO:212所示的氨基酸序列具有至少约90%、95%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,第一重链分子包含与SEQ ID NO:212所示氨基酸序列相同的氨基酸序列。

[0181] 在某些实施方案中,轻链分子包含与SEQ ID NO:213所示的氨基酸序列具有至少约90%、95%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,轻链分子包含与

SEQ ID NO:213所示氨基酸序列相同的氨基酸序列。

[0182] 在某些实施方案中,第二重链分子包含与SEQ ID NO:214所示的氨基酸序列具有至少约90%、95%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,第一重链分子包含与SEQ ID NO:214所示氨基酸序列相同的氨基酸序列。

框架区

[0183] 在重链和轻链的框架区内对种系序列进行突变或回复可有利于改善本文所述的CD19和CD38结合分子的药代动力学和药效学性质。在某些情况下,在重链和/或轻链中产生的种系序列的突变或回复提高了CD19和CD38结合分子(例如本文所述的双特异性抗体)的稳定性。在某些情况下,在重链和/或轻链中产生的种系序列的突变或回复降低了CD19和CD38结合分子(例如本文所述的双特异性抗体)的免疫原性。因此,在一些实施方案中,重链和/或轻链的框架区包含1、2、3、4、5、8或10个突变或回复至种系序列。在一些实施方案中,重链和/或轻链的框架区包含1个突变或回复至种系序列至10个突变或回复至种系序列。在一些实施方案中,重链和/或轻链的框架区包含至少1个突变或回复至种系序列。在一些实施方案中,重链和/或轻链的框架区包含至多10个突变或回复至种系序列。在一些实施方案中,重链和/或轻链的框架区包含1个突变或回复到种系序列至2个突变或回复到种系序列、1个突变或回复到种系序列至3个突变或回复到种系序列、1个突变或回复到种系序列至4个突变或回复到种系序列、1个突变或回复到种系序列至5个突变或回复到种系序列、1个突变或回复到种系序列至8个突变或回复到种系序列、1个突变或回复到种系序列至10个突变或回复到种系序列、2个突变或回复到种系序列至3个突变或回复到种系序列、2个突变或回复到种系序列至4个突变或回复到种系序列、2个突变或回复到种系序列至5个突变或回复到种系序列、2个突变或回复到种系序列至8个突变或回复到种系序列、2个突变或回复到种系序列至10个突变或回复到种系序列、3个突变或回复到种系序列至4个突变或回复到种系序列、3个突变或回复到种系序列至5个突变或回复到种系序列、3个突变或回复到种系序列至8个突变或回复到种系序列、3个突变或回复到种系序列至10个突变或回复到种系序列、4个突变或回复到种系序列至5个突变或回复到种系序列、4个突变或回复到种系序列至8个突变或回复到种系序列、4个突变或回复到种系序列至10个突变或回复到种系序列、5个突变或回复到种系序列至8个突变或回复到种系序列、5个突变或回复到种系序列至10个突变或回复到种系序列、或8个突变或回复到种系序列至10个突变或回复到种系序列。在一些实施方案中,重链和/或轻链的框架区包含1个突变或回复到种系序列、2个突变或回复到种系序列、3个突变或回复到种系序列、4个突变或回复到种系序列、5个突变或回复到种系序列、8个突变或回复到种系序列、或10个突变或回复到种系序列。在一些实施方案中,CD38结合部分包含如SEQ ID NO:5所示的重链框架区。在一些实施方案中,CD结合部分包含如SEQ ID NO:6或7所示的重链框架区。

药学上可接受的赋形剂、载剂和稀释剂

[0184] 包含本公开的复合结合分子的组合物包括在包含一种或多种药学上可接受的赋形剂、载剂和稀释剂的药物组合物中。在某些实施方案中,本公开的抗体悬浮在无菌和/或等渗溶液中而施用。在某些实施方案中,溶液包含约0.9% NaCl。在某些实施方案中,溶液包含约5.0%右旋糖。在某些实施方案中,溶液进一步包含以下中的一种或多种:缓冲液,例如乙酸盐、柠檬酸盐、组氨酸、琥珀酸盐、磷酸盐、碳酸氢盐和羟甲基氨基甲烷(Tris);表面

活性剂,例如聚山梨醇酯80(吐温80)、聚山梨醇酯20(吐温20)和泊洛沙姆188;多元醇/二糖/多糖,例如葡萄糖、右旋糖、甘露糖、甘露醇、山梨糖醇、蔗糖、海藻糖和葡聚糖40;氨基酸,例如甘氨酸或精氨酸;抗氧化剂,例如抗坏血酸、蛋氨酸;或螯合剂,例如EDTA或EGTA。

[0185] 用于施用抗体的皮下制剂可以包含以下中的一种或多种:缓冲液,例如乙酸盐、柠檬酸盐、组氨酸、琥珀酸盐、磷酸盐、碳酸氢盐和羟甲基氨基甲烷(Tris);表面活性剂,例如聚山梨醇酯80(吐温80)、聚山梨醇酯20(吐温20)和泊洛沙姆188;多元醇/二糖/多糖,例如葡萄糖、右旋糖、甘露糖、甘露醇、山梨糖醇、蔗糖、海藻糖和葡聚糖40;氨基酸,例如甘氨酸或精氨酸;抗氧化剂,例如抗坏血酸、蛋氨酸;或螯合剂,例如EDTA或EGTA。此外,可以包含减轻注射部位疼痛的化合物或分子,例如透明质酸酶,例如浓度为约2,000U/ml至约12,000U/ml。

[0186] 在某些实施方案中,本公开的复合结合分子在施用前冷冻干燥和重构运输/储存。在某些实施方案中,冻干抗体制剂包含填充剂,例如甘露糖醇、山梨糖醇、蔗糖、海藻糖、葡聚糖40或其组合。冻干制剂可以包含在由玻璃或其他合适的非反应性材料构成的小瓶中。配制时的抗体,无论是否重构,都可以在一定的pH(通常小于7.0)下缓冲。在某些实施方案中,pH可以为4.5至6.5、4.5至6.0、4.5至5.5、4.5至5.0或5.0至6.0。

[0187] 本文还描述了试剂盒,所述试剂盒在合适的容器中包含一种或多种本文所述的复合结合分子,和一种或多种选自以下的另外组分:使用说明;稀释剂、赋形剂、载剂和施用装置。

[0188] 在某些实施方案中,本文描述的是准备癌症治疗的方法,所述方法包括将一种或多种药学上可接受的赋形剂、载剂或稀释剂与本公开的复合结合分子混合。在某些实施方案中,本文描述的是准备癌症治疗用于储存或运输的方法,所述方法包括冻干本公开的一种或多种抗体。

生产和制造

[0189] 编码本文所述的复合结合分子(例如双特异性抗体)的核酸可用于感染、转染、转化或以其他方式使合适的细胞成为该核酸的转基因细胞,从而能够生产用于商业或治疗用途的复合结合分子。用于从大规模细胞培养物生产抗体的标准细胞系和方法是本领域已知的。参见例如,Li等人,“Cell culture processes for monoclonal antibody production.”Mabs.2010年9月至10月;2(5):466-477。

[0190] 在某些实施方案中,核酸序列编码本文公开的复合结合分子或双特异性抗体。在某些实施方案中,编码复合结合分子的多核苷酸序列与真核调控序列可操作地偶联。在一些实施方案中,细胞包含核酸序列。

[0191] 在一些实施方案中,细胞包含编码本文公开的复合结合分子的核酸。在某些实施方案中,细胞包括原核细胞。在某些实施方案中,原核细胞是大肠杆菌细胞。在某些实施方案中,细胞包括真核细胞。在某些实施方案中,真核细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NS0鼠骨髓瘤细胞或人PER.C6细胞

[0192] 在某些实施方案中,本文描述了制备复合结合分子的方法,所述包括在足以允许复合结合分子产生和分泌的体外条件下培养包含编码复合结合分子的核酸的细胞。

[0193] 在本文所述的某些实施方案中,主细胞库包含:(a)哺乳动物细胞系,其包含编码本文所述抗体的整合在基因组位置处的核酸;(b)冷冻保护剂。在某些实施方案中,冷冻保

护剂包括甘油。在某些实施方案中,主细胞库包含:(a) CHO细胞系,其包含编码复合结合分子的整合在基因组位置的核酸;(b) 冷冻保护剂。在某些实施方案中,冷冻保护剂包括甘油。在某些实施方案中,主细胞库包含在能够经受液氮冷冻的合适的小瓶或容器中。

[0194] 本文还描述了制备本文所述的复合结合分子的方法。此类方法包括在足以允许复合结合分子表达和分泌的条件下在细胞培养基中孵育包含编码复合结合分子的核酸的细胞或细胞系,并进一步从细胞培养基中收获复合结合分子。收获可以进一步包括一个或多个纯化步骤以去除活细胞、细胞碎片、非复合结合分子蛋白质或多肽、不需要的盐、缓冲液和培养基组分。在某些实施方案中,额外的一个或多个纯化步骤包括离心、超速离心、蛋白A、蛋白G、蛋白A/G或蛋白L纯化和/或离子交换层析。

使用方法

[0195] 通过免疫调节细胞抑制免疫反应可以促进肿瘤的生长、迁移和转移。免疫抑制或负免疫调节可包括导致免疫反应完全或部分降低的过程或途径。免疫抑制可以是全身性的或局部于特定位点(例如肿瘤微环境)、组织或受试者或患者身体的区域。尽管B细胞主要通过产生有助于中和病原体的抗体而被称为正免疫调节剂,但某些B细胞群可以发挥抑制或负调节免疫反应的功能。这种B细胞群可以通过多于一种细胞表面生物标志物的表达来定义。免疫抑制性B细胞或B细胞群可包含B细胞谱系表面生物标志物和抑制性B细胞表面生物标志物。B细胞谱系表面标志物可以包括CD19、CD138、IgA或CD45。B细胞表面标志物可以包括IgD、CD1、CD5、CD21、CD24、CD38、HM13、SLAMF7、AQP3或潜伏TGF- β (例如,TGF- β LAP)。免疫抑制性B细胞或免疫抑制性B细胞群可通过分泌抗炎介质(如细胞因子)抑制多种细胞亚型(包括T细胞)来发挥抑制免疫反应的功能。免疫抑制性B细胞还可以通过负调节淋巴结构和/或促进T细胞转化为调节性T细胞来减弱免疫反应。因此,本文公开了用于靶向免疫抑制性B细胞群以有效调节反应的方法。

[0196] 靶向免疫抑制性B细胞或B细胞群可导致针对肿瘤或致瘤细胞的免疫反应的免疫激活或正调节。本文提供了治疗患有癌症或肿瘤的个体的方法,所述方法包括向患有癌症或肿瘤的个体施用本文公开的复合结合分子。本文还提供了减少患有肿瘤或癌症的个体的肿瘤中、肿瘤附近或肿瘤周围的免疫抑制性B细胞的方法,所述方法包括向患有肿瘤或癌症的个体施用本文公开的复合结合分子,从而减少肿瘤内、邻近或周围的免疫抑制性B细胞。进一步公开了使受试者中的免疫抑制性B细胞与复合结合分子接触的方法,其中所述方法包括向受试者施用复合结合分子。在某些实施方案中,受试者患有肿瘤或癌症。

[0197] 肿瘤或癌症的类型、亚型或形式可能是治疗策略和方法中的重要因素。在一些实施方案中,癌症或肿瘤是血液癌症。在一些实施方案中,癌症或肿瘤是实体组织癌。在一些实施方案中,癌症包括乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、肺癌、肾癌、胃癌、食道癌、皮肤癌、结直肠癌或头颈癌。

[0198] 免疫抑制性B细胞可以抑制抗肿瘤免疫反应。在一些实施方案中,肿瘤或癌症包含B细胞,所述B细胞包含B细胞系表面生物标志物和抑制性B细胞表面生物标志物。B细胞谱系表面标志物可以包括CD19、CD138、IgA或CD45。B细胞表面标志物可以包括IgD、CD1、CD5、CD21、CD24、CD38、HM13、SLAMF7、AQP3或TGFB。在一些实施方案中,B细胞表面标志物包括CD19(例如CD19+)和CD38(例如CD38+)。在一些实施方案中,肿瘤浸润性B细胞或免疫抑制性B细胞包括CD19+、CD38+B细胞。

[0199] 在某些实施方案中,本文公开了用于治疗癌症或肿瘤的双特异性抗体。治疗是指寻求改善或缓解正在治疗的病症的方法。对于癌症,治疗包括但不限于减少肿瘤体积、减少肿瘤体积生长、增加无进展生存期或总体预期寿命。在某些实施方案中,治疗将实现正在治疗的癌症的缓解。在某些实施方案中,治疗包括用作旨在防止先前治疗的癌症或肿瘤复发或进展的预防或维持剂量。本领域技术人员应当理解,并非所有个体会对所施用的治疗都产生相同的反应或根本没有反应,但是这些个体被认为已得到治疗。

[0200] 在某些实施方案中,癌症或肿瘤是实体癌或肿瘤。在某些实施方案中,癌症或肿瘤是血液癌症或肿瘤。在某些实施方案中,癌症或肿瘤包括乳房、心脏、肺、小肠、结肠、脾、肾、膀胱、头、颈、卵巢、前列腺、脑、胰腺、皮肤、骨、骨髓、血液、胸腺、子宫、睾丸和肝脏肿瘤。在某些实施方案中,可以用本发明抗体治疗的肿瘤包括腺瘤、腺癌、血管肉瘤、星形细胞瘤、上皮细胞癌、生殖细胞瘤、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、血管内皮瘤、血管肉瘤、血肿、肝母细胞瘤、白血病、淋巴瘤、髓母细胞瘤、黑色素瘤、成神经细胞瘤、骨肉瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤和/或畸胎瘤。在某些实施例中,肿瘤/癌症选自下组:肢端雀斑样黑色素瘤、光化性角化病、腺癌、腺样囊性癌、腺瘤、腺肉瘤、腺鳞状细胞癌、星形细胞肿瘤、巴氏腺癌、基底细胞癌、支气管腺癌、毛细血管类癌、上皮癌、癌肉瘤、胆管癌、软骨肉瘤、囊腺瘤、内胚窦瘤、子宫内膜增生、子宫内膜间质肉瘤、子宫内膜样腺癌、室管膜瘤、尤因氏肉瘤 (Swing's sarcoma)、局灶性结节增生、胃癌、生殖系肿瘤、胶质母细胞瘤、胰高血糖素瘤、血管母细胞瘤、血管内皮瘤、血管瘤、肝腺瘤、肝腺瘤病、肝细胞癌、insulinite、上皮内肿瘤、上皮内鳞状细胞癌、侵入性鳞状细胞癌、大细胞癌、脂肪肉瘤、肺癌、淋巴母细胞性白血病、淋巴细胞性白血病、平滑肌肉瘤、黑色素瘤、恶性黑色素瘤、恶性间皮肿瘤、神经鞘瘤、髓母细胞瘤、髓上皮瘤、间皮瘤、粘液表皮样癌、髓性白血病、成神经细胞瘤、神经上皮腺癌、结节性黑色素瘤、骨肉瘤、卵巢癌、乳头状浆液性癌、垂体瘤、浆细胞瘤、假肉瘤、前列腺癌、肺胚细胞瘤、肾细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、浆液性癌、鳞状细胞癌、小细胞癌、软组织癌、生长抑素分泌肿瘤、鳞状细胞癌、鳞状细胞癌、未分化癌、葡萄膜黑色素瘤、疣状癌、阴道/外阴癌、VIPpoma、和威尔姆氏瘤 (Wilm's tumor)。在某些实施例中,要用本发明的一种或多种抗体治疗的肿瘤/癌症包括脑癌、头颈癌、大肠癌、急性髓性白血病、前B细胞急性淋巴细胞白血病、膀胱癌、星形细胞瘤 (优选II级、III或IV星形细胞瘤)、胶质母细胞瘤、多形性胶质母细胞瘤、小细胞肺癌、以及非小细胞癌 (优选非小细胞肺癌、肺腺癌)、转移性黑色素瘤、不依赖雄激素的转移性前列腺癌、雄激素依赖的转移性前列腺癌、前列腺癌、和乳腺癌 (优选地乳腺导管癌)、和/或乳腺上皮癌。在某些实施方案中,用本公开的抗体治疗的癌症包括胶质母细胞瘤。在某些实施方案中,用本公开的一种或多种抗体治疗的癌症包括胰腺癌。在某些实施方案中,用本公开的一种或多种抗体治疗的癌症包括卵巢癌。在某些实施方案中,用本公开的一种或多种抗体治疗的癌症包括肺癌。在某些实施方案中,用本公开的一种或多种抗体治疗的癌症包括前列腺癌。在某些实施方案中,用本公开的一种或多种抗体治疗的癌症包括结肠癌。在某些实施方案中,所治疗的癌症包括胶质母细胞瘤、胰腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌或肺癌。在某个实施方案中,其他治疗对癌症无效。在某个实施方案中,所治疗的癌症复发。在某个实施方案中,癌症是复发性/难治性胶质母细胞瘤、胰腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌或肺癌。

[0201] 在某些实施方案中,要用本文的复合结合分子治疗的癌症和/或肿瘤是成熟B细胞

肿瘤：慢性淋巴细胞白血病、小淋巴细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤（弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡型淋巴瘤）、粘膜相关淋巴组织淋巴瘤（MALT）、纵隔（胸腺）大B细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞性淋巴瘤和华氏巨球蛋白血症（Waldenstrom macroglobulinemia）、淋巴结边缘区B细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、淋巴结外边缘区B细胞MALT淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、伯基特淋巴瘤（Burkitt lymphoma）或原发性中枢神经系统淋巴瘤。

[0202] 在某些实施方案中，要用本文的复合结合分子治疗的癌症和/或肿瘤是T细胞淋巴瘤，例如T细胞非霍奇金淋巴瘤、T细胞ALL、蕈状真菌病、间变性大细胞淋巴瘤、外周T细胞淋巴瘤、T淋巴细胞白血病（T-ALL）、急性髓细胞白血病、急性单核细胞白血病和其他。

[0203] 在某些实施方案中，可以通过适合于施用含抗体的药物组合物的任何途径，例如皮下、腹膜内、静脉内、肌内、瘤内或脑内等，将抗体施用至有需要的受试者。在某些实施方案中，静脉内施用抗体。在某些实施方案中，皮下施用抗体。在某些实施方案中，瘤内施用抗体。在某些实施方案中，以合适的剂量方案施用抗体，例如每周、每周两次、每月、每月两次、每两周一次、每三周一次或每月一次等。在某些实施方案中，抗体是每三周施用一次。抗体可以任何治疗有效量施用。在某些实施方案中，治疗上可接受的量为约0.1mg/kg至约50mg/kg。在某些实施方案中，治疗上可接受的量为约1mg/kg至约40mg/kg。在某些实施方案中，治疗上可接受的量为约5mg/kg至约30mg/kg。治疗有效量包括足以改善与待治疗的疾病或痛苦相关的一种或多种症状的量。

示例性实施方案

[0204] 本文提供了复合结合分子，其包含被配置为结合CD19的CD19结合组分和被配置为结合CD38的CD38结合组分，其中所述CD19结合组分包含抗体或其抗原结合片段并且所述CD38结合组分包含抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中，提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子，其中所述CD19和/或CD38结合组分包含免疫球蛋白重链和轻链对、scFv、F(ab)、F(ab')₂、单结构域抗体、来自免疫球蛋白新抗原受体的可变区片段（VNAR）或来自重链抗体的可变区（VHH）。在一些实施方案中，提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子，其中所述CD19或CD38结合组分包含免疫球蛋白重链和轻链对。在一些实施方案中，提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子，其中所述CD19和CD38结合组分包含免疫球蛋白重链和轻链对。

[0205] 在一些实施方案中，提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子，其中所述CD38结合组分包含免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链，其中所述免疫球蛋白重链包含SEQ ID NO:71-SEQ ID NO:75中任一个所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:81-SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:150-SEQ ID NO:155中任一个所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:91-SEQ ID NO:95中任一个所示的HCDR3氨基酸序列，所述免疫球蛋白轻链包含SEQ ID NO:101-SEQ ID NO:105中任一个所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:111-SEQ ID NO:115中任一个所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:121-SEQ ID NO:125中任一个所示的LCDR3氨基酸序列；并且其中所述CD19结合组分包含免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链，其中所述免疫球蛋白重链包含SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:15中任一个所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:25中任一个所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:31-SEQ ID NO:35中任一个所示的HCDR3氨基酸序列，所述免疫球蛋白轻链包含SEQ ID NO:101-SEQ ID NO:105

中任一个所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:111-SEQ ID NO:115中任一个所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:121-SEQ ID NO:125中任一个所示的LCDR3氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述CD38结合组分包含免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链,所述免疫球蛋白重链包含与SEQ ID NO:3具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链与SEQ ID NO:4具有至少约90%、95%、97%、99%同一性;和/或其中所述CD19结合组分包含免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链,所述免疫球蛋白重链包含与SEQ ID NO:1具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链与SEQ ID NO:4具有至少约90%、95%、97%、99%同一性。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述免疫球蛋白重链包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链包含与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列;和/或其中所述免疫球蛋白重链包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链包含与SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列。

[0206] 在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述复合结合分子是共同轻链双特异性IgG。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述CD38结合组分包含免疫球蛋白重链,所述免疫球蛋白重链包含SEQ ID NO:71-SEQ ID NO:75中任一个所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:81-SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:150-SEQ ID NO:155中任一个所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:91-SEQ ID NO:95中任一个所示的HCDR3氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链包含SEQ ID NO:101-SEQ ID NO:105中任一个所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:111-SEQ ID NO:115中任一个所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:121-SEQ ID NO:125中任一个所示的LCDR3氨基酸序列;并且其中所述CD19结合组分包含免疫球蛋白重链,所述免疫球蛋白重链包含SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:15中任一个所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:25中任一个所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:31-SEQ ID NO:35中任一个所示的HCDR3氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链包含SEQ ID NO:41-SEQ ID NO:45中任一个所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:55中任一个所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:61-SEQ ID NO:65中任一个所示的LCDR3氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述免疫球蛋白重链包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链与SEQ ID NO:4具有至少约90%、95%、97%、99%同一性;和/或其中所述免疫球蛋白重链包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链与SEQ ID NO:2具有至少约90%、95%、97%、99%同一性。

[0207] 在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述免疫球蛋白重链包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链包含与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列;并且其中所述免疫球蛋白重链包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链包含与SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述CD19结合组

分或CD38结合组分包含scFv。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述CD19结合组分包含scFv。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述CD38结合组分包含scFv。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述CD19结合组分或CD38结合组分包含免疫球蛋白重链/轻链对。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述CD19结合组分包含免疫球蛋白重链/轻链对。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述CD38结合组分包含免疫球蛋白重链/轻链对。

[0208] 进一步提供了复合结合分子,其中所述复合结合分子包含结合CD38的CD38抗原结合组分和结合CD19的CD19抗原结合组分,所述CD38抗原结合组分包含与抗CD38免疫球蛋白轻链可变区配对的抗CD38免疫球蛋白重链可变区,所述CD19抗原结合组分包含与抗CD38免疫球蛋白轻链可变区配对的抗CD19免疫球蛋白重链可变区,其中所述CD38抗原结合组分包含:a)重链互补决定区1(HCDR1),其包含SEQ ID NO:71-SEQ ID NO:75中任一个所示的氨基酸序列;b)重链互补决定区2(HCDR2),其包含SEQ ID NO:81-SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:150-SEQ ID NO:155中任一个所示的氨基酸序列;c)重链互补决定区3(HCDR3),其包含SEQ ID NO:91-SEQ ID NO:95中任一个所示的氨基酸序列;d)轻链互补决定区1(LCDR1),其包含SEQ ID NO:101-SEQ ID NO:105中任一个所示的氨基酸序列;e)轻链互补决定区2(LCDR2),其包含SEQ ID NO:111-SEQ ID NO:115中任一个所示的氨基酸序列;和/或f)轻链互补决定区3(LCDR3),其包含SEQ ID NO:121-SEQ ID NO:125中任一个所示的氨基酸序列。

[0209] 在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述CD19抗原结合组分包含:g)重链互补决定区1(HCDR1),其包含SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:15中任一个所示的氨基酸序列;h)重链互补决定区2(HCDR2),其包含SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:25中任一个所示的氨基酸序列;i)重链互补决定区3(HCDR3),其包含SEQ ID NO:31-SEQ ID NO:35中任一个所示的氨基酸序列;j)轻链互补决定区1(LCDR1),其包含SEQ ID NO:101-SEQ ID NO:105中任一个所示的氨基酸序列;k)轻链互补决定区2(LCDR2),其包含SEQ ID NO:111-SEQ ID NO:115中任一个所示的氨基酸序列;和/或l)轻链互补决定区3(LCDR3),其包含SEQ ID NO:121-SEQ ID NO:125中任一个所示的氨基酸序列。

[0210] 在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述CD38抗原结合组分包含免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区,所述免疫球蛋白重链可变区包含与SEQ ID NO:3或5具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链可变区包含与SEQ ID NO:4具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述CD38抗原结合组分包含免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区,所述免疫球蛋白重链可变区包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5相同的氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链可变区包含与SEQ ID NO:4相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述CD19抗原结合组分包含抗CD19免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区,所述抗CD19免疫球蛋白重链可变区包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:6具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链可变区包含与SEQ ID NO:4具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列。

[0211] 在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述抗

CD19抗原结合组分包含免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区,所述免疫球蛋白重链可变区包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:6相同的氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链可变区包含与SEQ ID NO:4相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述抗CD38免疫球蛋白重链可变区进一步包含第一免疫球蛋白重链恒定区。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述抗CD38免疫球蛋白轻链可变区进一步包含免疫球蛋白轻链恒定区。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述抗CD19免疫球蛋白重链可变区进一步包含第二免疫球蛋白重链恒定区。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中第一免疫球蛋白重链恒定区和/或所述第二免疫球蛋白重链恒定区包含一个或多个氨基酸取代,所述氨基酸取代不利于所述抗CD38免疫球蛋白重链恒定区的同二聚化和/或促进第一重链恒定区和所述第二重链恒定区的异二聚化。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中第一免疫球蛋白重链恒定区或第二免疫球蛋白重链恒定区中之一包含T366W取代(EU编号),并且第一免疫球蛋白重链恒定区或第二免疫球蛋白重链恒定区中另一个包含T366S/L368A/Y407V取代(EU编号),使得与第一免疫球蛋白重链恒定区或第二免疫球蛋白重链恒定区的同二聚化相比更有利于第一免疫球蛋白重链恒定区和第二免疫球蛋白重链恒定区的异二聚化。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中由所述CD38抗原结合组分和所述CD19抗原结合组分形成单个双特异性结合分子。

[0212] 还提供了复合结合分子,其包含结合至CD19的CD19结合组分和结合至CD38的CD38结合组分,其中所述CD19结合组分包含结合至CD19的scFv,所述CD38结合组分包含含有结合至CD38的轻链可变区和重链可变区的免疫球蛋白可变区。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中与CD19结合的scFv与第一免疫球蛋白重链恒定区偶联。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中CD38结合组分的重链可变区进一步包含第二免疫球蛋白重链恒定区。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中CD38结合组分的轻链可变区进一步包含免疫球蛋白轻链恒定区。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述CD19结合组分包含SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:15中任一个所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:25中任一个所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:31-SEQ ID NO:35中任一个所示的HCDR3氨基酸序列;并且所述免疫球蛋白轻链包含SEQ ID NO:41-SEQ ID NO:45中任一个所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:55中任一个所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:61-SEQ ID NO:65中任一个所示的LCDR3氨基酸序列。

[0213] 在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述CD38结合组分包含SEQ ID NO:71-SEQ ID NO:75中任一个所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:81-SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:150-SEQ ID NO:155中任一个所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:91-SEQ ID NO:95中任一个所示的HCDR3氨基酸序列;并且所述免疫球蛋白轻链包含SEQ ID NO:101-SEQ ID NO:105中任一个所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:111-SEQ ID NO:115中任一个所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:121-SEQ ID NO:125中任一个所示的LCDR3氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述CD19结合组分包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7具有至少约90%、

95%、97%、99%同一性的氨基酸序列;和与SEQ ID NO:2具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的免疫球蛋白轻链。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述CD38结合组分包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列;和与SEQ ID NO:4具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述CD19结合组分包含与SEQ ID NO:1或7中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列;和与SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述CD38结合组分包含与SEQ ID NO:3或5中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列;和与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列。

[0214] 在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中第一免疫球蛋白重链恒定区和/或所述第二免疫球蛋白重链恒定区包含一个或多个氨基酸取代,所述氨基酸取代不利于所述抗CD38免疫球蛋白重链恒定区的同二聚化和/或促进第一重链恒定区和所述第二重链恒定区的异二聚化。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中第一免疫球蛋白重链恒定区或第二免疫球蛋白重链恒定区之一一包含T366W取代(EU编号),并且第一免疫球蛋白重链恒定区或第二免疫球蛋白重链恒定区中另一个包含T366S/L368A/Y407V取代(EU编号),使得与第一免疫球蛋白重链恒定区或第二免疫球蛋白重链恒定区的同二聚化相比更有利于第一免疫球蛋白重链恒定区和第二免疫球蛋白重链恒定区的异二聚化。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中由所述CD38抗原结合组分和所述CD19抗原结合组分形成单个双特异性结合分子。

[0215] 在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述复合结合分子是双特异性抗体或其双抗原结合片段。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其包含含有天然碳水化合物或去岩藻糖基化碳水化合物修饰的氨基酸残基的Fc区。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述天然碳水化合物或去岩藻糖基化碳水化合物修饰的氨基酸残基对应于根据EU编号的天冬酰胺297。

[0216] 在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述复合结合分子结合至CD19⁺、CD38⁺B细胞。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中与包含Fc区的CD19或CD38单特异性抗体相比,所述复合结合分子结合表现出降低的血凝。

[0217] 提供了包含编码前述任一实施方案所述的复合结合分子的复合结合分子的多核苷酸序列的核酸。实施方案49:实施方案47的核酸,其中编码所述复合结合分子的所述多核苷酸序列与真核调控序列可操作地偶联。在一些实施方案中,提供了包含前述任一实施方案所述的实施方案的核酸的细胞。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的细胞,其中所述细胞包括原核细胞。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的细胞,其中所述原核细胞是大肠杆菌细胞。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的细胞,其中所述细胞包括真核细胞。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的细胞,其中所述真核细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NS0鼠骨髓瘤细胞或人PER.C6细胞。

[0218] 还提供了药物组合物,例如,包含前述任一实施方案所述的复合结合分子和药学

上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂的组合物。在一些实施方案中,组合物被配制用于静脉内施用。在一些实施方案中,组合物被配制用于皮下施用。

[0219] 提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子或前述任一实施方案所述的药物组合物,其用于治疗个体的肿瘤或癌症的方法中。在一些实施方案中,肿瘤是血液癌症。在一些实施方案中,血液癌症是B细胞恶性肿瘤。在某些实施方案中,B细胞恶性肿瘤是B细胞急性淋巴细胞白血病。在某些实施方案中,B细胞恶性肿瘤是慢性淋巴细胞白血病、小淋巴细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤(弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡型淋巴瘤)。在一些实施方案中,血液癌症是血浆恶性肿瘤。在某些实施方案中,血浆恶性肿瘤是多发性骨髓瘤。在前述任一实施方案中的一些实施方案中,血液癌症表达CD19和CD38(例如癌症细胞表达CD19和CD38)。

[0220] 在一些实施方案中,癌症或肿瘤是实体组织癌。在一些实施方案中,实体组织癌包括乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、肺癌、肾癌、胃癌、食道癌、皮肤癌、结直肠癌、脑癌或头颈癌。在一些实施方案中,乳腺癌是三阴性乳腺癌,肺癌是非小细胞肺癌,头颈癌是头颈鳞状细胞癌,肾癌是肾细胞癌,脑癌是多形性胶质母细胞瘤,或者皮肤癌是黑色素瘤。

[0221] 还提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子或前述任一实施方案所述的药物组合物,其用于在减少个体肿瘤中、肿瘤附近或肿瘤周围的免疫抑制性B细胞的方法中使用。在一些实施方案中,进一步提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子或前述任一实施方案所述的药物组合物,其用于在减少个体肿瘤中、肿瘤附近或肿瘤周围的免疫抑制性B细胞的方法中使用。在一些实施方案中,肿瘤浸润性B细胞或免疫抑制性B细胞包括CD19⁺、CD38⁺B细胞。

[0222] 在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述CD38结合组分包含含有序列P-X1-LG-X2-A的HCDR2氨基酸序列,其中X1和X2各自选自H、Q、T、N、S、G、A、R、K、D或E。在某些实施方案中,X1是H,X2是T。在一些实施方案中,提供了在任何前述实施方案中的复合结合分子,X1是H,X2是T。在一些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述CD19结合组分包含A84S和/或A108L修饰。在某些实施方案中,提供了前述任一实施方案所述的复合结合分子,其中所述CD38结合组分包含含有W32H取代的轻链序列。

[0223] 进一步提供了治疗患有癌症或肿瘤的个体的方法,所述方法包括向患有所述癌症或所述肿瘤的所述个体施用前述任一实施方案所述的复合结合分子或前述任一实施方案所述的药物组合物,从而治疗所述癌症或所述肿瘤。在一些实施方案中,癌症或肿瘤是血液癌症。在一些实施方案中,血液癌症是B细胞恶性肿瘤。在某些实施方案中,B细胞恶性肿瘤是B细胞急性淋巴细胞白血病。在某些实施方案中,B细胞恶性肿瘤是慢性淋巴细胞白血病、小淋巴细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤(弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡型淋巴瘤)。在一些实施方案中,血液癌症是血浆恶性肿瘤。在某些实施方案中,血浆恶性肿瘤是多发性骨髓瘤。在前述任一实施方案中的一些实施方案中,血液癌症表达CD19和CD38(例如癌症细胞表达CD19和CD38)。

[0224] 在一些实施方案中,癌症或肿瘤是实体组织癌。在一些实施方案中,实体组织癌包括乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、肺癌、肾癌、胃癌、食道癌、皮肤癌、结直肠癌或头颈癌。在一些实施方案中,乳腺癌是三阴性乳腺癌,肺癌是非小细胞肺癌,头颈癌是头颈鳞状细胞癌,肾

癌是肾细胞癌,脑癌是多形性胶质母细胞瘤,或者皮肤癌是黑色素瘤。

[0225] 提供了减少患有肿瘤或癌症的个体的肿瘤中、肿瘤附近或肿瘤周围的免疫抑制性B细胞的方法,所述方法包括向患有所述肿瘤或所述癌症的所述个体施用前述任一实施方案所述的复合结合分子或前述任一实施方案所述的药物组合物,从而减少所述肿瘤中的免疫抑制性B细胞。

[0226] 还提供了减少患有肿瘤或癌症的个体的肿瘤中、肿瘤附近或肿瘤周围的免疫抑制性B细胞的方法,所述方法包括向患有所述肿瘤或所述癌症的所述个体施用前述任一实施方案所述的复合结合分子或前述任一实施方案所述的药物组合物,从而减少所述肿瘤中的免疫抑制性B细胞。在一些实施方案中,肿瘤浸润性B细胞或免疫抑制性B细胞包括CD19+、CD38+B细胞。

[0227] 本文还提供了制备前述任一实施方案所述的复合结合分子的方法,所述方法包括在细胞培养基中在足以允许所述复合结合分子表达、组装和分泌到所述细胞培养基中的条件下孵育前述实施方案所述的细胞。在一些实施方案中,所述方法包括从所述细胞培养基中分离和纯化所述分子。还提供了为个体准备癌症治疗的方法,所述方法包括将前述任一实施方案所述的复合结合分子与药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂混合。

[0228] 因此,本文提供了复合结合分子,其包含被配置为结合第一靶标的第一结合组分和被配置为结合第二靶标的第二结合组分,其中第一靶标包含B细胞谱系表面标志物,所述第二靶标包含抑制性B细胞表面标志物,其中第一靶标和所述第二靶标不相同。在一些实施方案中,第一结合组分或第二结合组分包含多肽。在某些实施方案中,第一结合组分或第二结合组分由多肽组成。在一些实施方案中,第一结合组分和第二结合组分包含多肽。在某些实施方案中,第一结合组分和第二结合组分由多肽组成。在一些实施方案中,第一结合组分或第二结合组分的多肽包含长度至少为100个氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一结合组分和第二结合组分的多肽包含长度至少100个氨基酸残基的氨基酸序列。

[0229] B细胞谱系表面标志物可以包括CD19、CD138、IgA或CD45。在一些实施方案中,B细胞谱系表面标志物包含CD19。在某些实施方案中,B细胞谱系表面标志物是CD19。在一些实施方案中,B细胞谱系表面标志物是IgA。在某些实施方案中,B细胞谱系表面标志物是IgA。在一些实施方案中,B细胞谱系表面标志物是CD138。在某些实施方案中,B细胞谱系表面标志物是CD138。在一些实施方案中,B细胞谱系表面标志物是CD45。在某些实施方案中,B细胞谱系表面标志物是CD45。在一些实施方案中,B细胞谱系表面标志物选自IgA、CD19、CD138、CD45及其任何组合。

[0230] 抑制性B细胞表面标志物可包括IgD、CD1、CD5、CD21、CD24、CD38、HM13、SLAMF7、AQP3、或潜伏TGF- β (例如,TGF- β LAP)。在一些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物包括IgD。在某些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物是IgD。在一些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物包括CD1。在某些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物是CD1。在一些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物包括CD5。在某些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物是CD5。在一些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物包括CD21。在某些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物是CD21。在一些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物包括CD24。在某些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物是CD24。在一些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物包括CD38。在某些实施方案中,抑制性B细胞表面标志物是CD38。在一些实施方案中,B细胞表面

标志物选自IgD、CD1、CD5、CD21、CD24、CD38、HM13、SLAMF7、AQP3、潜伏TGF- β (例如, TGF- β LAP) 及其任何组合。

[0231] 复合结合分子可包含抗体或其靶结合片段。在一些实施方案中, 第一结合组分或第二结合组分包含免疫球蛋白重链和轻链对、scFv、F(ab)、F(ab')₂、单结构域抗体、来自免疫球蛋白新抗原受体的可变区片段(VNAR)或源自重链抗体的可变区(VHH)。在一些实施方案中, 第一结合组分和第二结合组分包含免疫球蛋白重链和轻链对、scFv、F(ab)、F(ab')₂、单结构域抗体、来自免疫球蛋白新抗原受体的可变区片段(VNAR)或源自重链抗体的可变区(VHH)。在某些实施方案中, 第一结合组分或第二结合组分包含免疫球蛋白重链和轻链对。在某些实施方案中, 第一结合组分和第二结合组分包含免疫球蛋白重链和轻链对。在某些实施方案中, 第一结合组分或第二结合组分包含scFv。在某些实施方案中, 第一结合组分和第二结合组分包含scFv。

[0232] 本文所述的复合结合分子, 其中复合结合分子是双特异性抗体或其双抗原结合片段。

[0233] 在一些实施方案中, 复合结合分子包含免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链, 其中所述免疫球蛋白重链包含SEQ ID NO:71-SEQ ID NO:75中任一个所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:81-SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:150-SEQ ID NO:155中任一个所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:91-SEQ ID NO:95中任一个所示的HCDR3氨基酸序列, 所述免疫球蛋白轻链包含SEQ ID NO:41-SEQ ID NO:45中任一个所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:55中任一个所示的LCDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO:61-SEQ ID NO:65中任一个所示的LCDR3氨基酸序列。在某些实施方案中, 免疫球蛋白重链包含与SEQ ID NO:3具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的氨基酸序列; 和与SEQ ID NO:2具有至少约90%、95%、97%、99%同一性的免疫球蛋白轻链。在某些实施方案中, 免疫球蛋白重链包含与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列, 免疫球蛋白轻链包含与SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列。在一些实施方案中, 复合结合分子是共同轻链双特异性IgG。

[0234] 复合结合分子可以是双特异性抗体。在一些实施方案中, 双特异性抗体选自以下形式之一: 共同轻链双特异性IgG、Fab-Fc:scFv-Fc双特异性IgG、Fab-Fc-Fab:Fc双特异性IgG、Fab-Fc-scFv:Fab-Fc-scFv双特异性IgG、Fab-Fc-scFv:Fc双特异性IgG、Fab-Fc-Fab:Fab-Fc双特异性IgG、scFv-Fab-Fc:scFv-Fab-Fc双特异性IgG、Fab-Fab-Fc:Fab-Fab-Fc双特异性IgG、Fab-Fc-Fab:Fab-Fc-Fab双特异性IgG和Fab-Fc-scFv:Fab-Fc双特异性IgG。在某些实施方案中, 双特异性抗体是共同轻链双特异性IgG。在某些实施方案中, 双特异性抗体是Fab-Fc:scFv-Fc双特异性IgG。在某些实施方案中, 双特异性抗体是Fab-Fc-Fab:Fc双特异性IgG。在某些实施方案中, 双特异性抗体是Fab-Fc-scFv:Fab-Fc-scFv双特异性IgG。在某些实施方案中, 双特异性抗体是Fab-Fc-scFv:Fc双特异性IgG。在某些实施方案中, 双特异性抗体是Fab-Fc-Fab:Fab-Fc双特异性IgG。在某些实施方案中, 双特异性抗体是scFv-Fab-Fc:scFv-Fab-Fc双特异性IgG。在某些实施方案中, 双特异性抗体是Fab-Fab-Fc:Fab-Fab-Fc双特异性IgG。在某些实施方案中, 双特异性抗体是Fab-Fc-Fab:Fab-Fc-Fab双特异性IgG。在某些实施方案中, 双特异性抗体是IgG-scFv

[0235] 复合结合分子可以包含翻译后修饰。在一些实施方案中, 复合结合分子包含含有

天然碳水化合物或去岩藻糖基化碳水化合物修饰的氨基酸残基的Fc区。在某些实施方案中,天然碳水化合物或去岩藻糖基化碳水化合物修饰的氨基酸残基对应于根据EU编号的天冬酰胺297。

[0236] 在一些实施方案中,第一结合组分包含SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:15中任一个所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:25中任一个所示的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:31-SEQ ID NO:35中任一个所示的HCDR3氨基酸序列、SEQ ID NO:41-SEQ ID NO:45中任一个所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:55中任一个所示的LCDR2氨基酸序列,和/或SEQ ID NO:61-SEQ ID NO:65中任一个所示的LCDR3氨基酸序列。在某些实施方案中,第一结合组分包含与SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2中任一个所示的氨基酸序列具有至少约90%、95%、97%、99%同一性或100%相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,第一结合组分包含与SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2中任一个所示的氨基酸序列具有至少约90%、95%、97%、99%同一性或100%相同的氨基酸序列。

[0237] 在一些实施方案中,第二结合组分包含SEQ ID NO:71-SEQ ID NO:75中任一个所示的HCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:81-SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:150-SEQ ID NO:155任一个所示的HCDR2氨基酸序列,SEQ ID NO:91-SEQ ID NO:95中任一个所示的HCDR3氨基酸序列、SEQ ID NO:101-SEQ ID NO:105中任一个所示的LCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:111-SEQ ID NO:115中任一个所示的LCDR2氨基酸序列、和/或SEQ ID NO:121-SEQ ID NO:125中任一个所示的LCDR3氨基酸序列。在某些实施方案中,第二结合组分包含与SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4中任一个所示的氨基酸序列具有至少约90%、95%、97%、99%同一性或100%相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,第二结合组分包含与SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4任一个所示的氨基酸序列具有至少约90%、95%、97%、99%同一性或100%相同的氨基酸序列。

[0238] 复合结合分子可以结合第一靶标和第二靶标,其中第一靶标包含B细胞谱系表面标志物,并且其中所述第二靶标包含抑制性B细胞表面标志物。在一些实施方案中,复合结合分子结合至CD19阳性(CD19⁺或CD19^高)和CD38阳性(CD38⁺或CD19^高)B细胞。

[0239] 复合结合分子可以由核酸分子编码。本文公开了包含编码本文公开的复合结合分子的多核苷酸序列的核酸。在一些实施方案中,编码复合结合分子的多核苷酸序列与真核调控序列可操作地偶联。

[0240] 细胞可以包含编码复合结合分子的核酸。在一些实施方案中,细胞包括原核细胞。在某些实施方案中,原核细胞是大肠杆菌细胞。在一些实施方案中,细胞包括真核细胞。在某些实施方案中,所述真核细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NS0鼠骨髓瘤细胞或人PER.C6细胞。

[0241] 本文还公开了包含复合结合分子和药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂的组合物。在一些实施方案中,组合物被配制用于静脉内施用。在一些实施方案中,组合物被配制用于皮下施用。

[0242] 本文公开的复合结合分子可以抑制和/或减少抑制抗肿瘤免疫反应的免疫抑制性B细胞的数量。因此,本文的复合结合分子可用于治疗个体的肿瘤或癌症的方法中。在某些实施方案中,癌症或肿瘤是血液癌症。在某些实施方案中,血液癌症是B细胞恶性肿瘤。在某些实施方案中,B细胞恶性肿瘤是B细胞急性淋巴细胞白血病。在某些实施方案中,B细胞恶

性肿瘤是慢性淋巴细胞白血病、小淋巴细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤(弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡型淋巴瘤)。在一些实施方案中,血液癌症是血浆恶性肿瘤。在某些实施方案中,血浆恶性肿瘤是多发性骨髓瘤。在前述任一实施方案中的一些实施方案中,血液癌症表达CD19和CD38(例如癌症细胞表达CD19和CD38)。

[0243] 在一些实施方案中,癌症或肿瘤是实体组织癌。在一些实施方案中,癌症包括乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、肺癌、肾癌、胃癌、食道癌、皮肤癌、结直肠癌或头颈癌。在一些实施方案中,癌症是乳腺癌。在一些特定实施方案中,乳腺癌是三阴性乳腺癌。在一些实施方案中,癌症是肺癌。在某些实施方案中,肺癌是非小细胞肺癌。在一些实施方案中,癌症是头颈癌。在某些实施方案中,头颈癌是头颈鳞状细胞癌。在一些实施方案中,癌症是肾癌。在某些实施方案中,肾癌是肾细胞癌。在一些实施方案中,癌症是脑癌。在一些实施方案中,脑癌是多形性成胶质细胞瘤。在一些实施方案中,癌症是皮肤癌。在某些实施方案中,皮肤癌是黑色素瘤。

[0244] 本文的复合结合分子可用于减少抑制针对个体肿瘤的抗肿瘤免疫反应的肿瘤浸润性B细胞和/或免疫抑制性B细胞的方法中。本文的复合结合分子可用于抑制针对个体肿瘤的抗肿瘤免疫反应的肿瘤浸润性B细胞和/或免疫抑制性B细胞的功能的方法中。复合结合分子可用于减少个体肿瘤中、肿瘤附近或肿瘤周围的抑制性B细胞的方法中。在一些实施方案中,肿瘤浸润性B细胞或免疫抑制性B细胞包括CD19⁺、CD38⁺B细胞。

[0245] 本文进一步公开了治疗患有癌症或肿瘤的个体的方法,所述方法包括向患有癌症或肿瘤的个体施用本文公开的复合结合分子,从而治疗所述癌症或所述肿瘤。在一些实施方案中,癌症或肿瘤是血液癌症。在一些实施方案中,血液癌症是B细胞恶性肿瘤。在某些实施方案中,B细胞恶性肿瘤是B细胞急性淋巴细胞白血病。在某些实施方案中,B细胞恶性肿瘤是慢性淋巴细胞白血病、小淋巴细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤(弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡型淋巴瘤)。在一些实施方案中,血液癌症是血浆恶性肿瘤。在某些实施方案中,血浆恶性肿瘤是多发性骨髓瘤。在前述任一实施方案中的一些实施方案中,血液癌症表达CD19和CD38(例如癌症细胞表达CD19和CD38)。

[0246] 在一些实施方案中,癌症或肿瘤是实体组织癌。在一些实施方案中,癌症包括乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、肺癌、肾癌、胃癌、食道癌、皮肤癌、结直肠癌或头颈癌。在一些实施方案中,癌症是乳腺癌。在一些特定实施方案中,乳腺癌是三阴性乳腺癌。在一些实施方案中,癌症是肺癌。在某些实施方案中,肺癌是非小细胞肺癌。在一些实施方案中,癌症是头颈癌。在某些实施方案中,头颈癌是头颈鳞状细胞癌。在一些实施方案中,癌症是肾癌。在某些实施方案中,肾癌是肾细胞癌。在一些实施方案中,癌症是脑癌。在一些实施方案中,脑癌是多形性成胶质细胞瘤。在一些实施方案中,癌症是皮肤癌。在某些实施方案中,皮肤癌是黑色素瘤。

[0247] 还公开了一种减少患有肿瘤或癌症的个体的肿瘤中、肿瘤附近或肿瘤周围的肿瘤浸润性B细胞的方法,所述方法包括向患有所述肿瘤或所述癌症的所述个体施用本文公开的复合结合分子,从而减少所述肿瘤中的肿瘤浸润性B细胞。还公开了减少患有肿瘤或癌症的个体的肿瘤中、肿瘤附近或肿瘤周围的免疫抑制性B细胞的方法,所述方法包括向患有所述肿瘤或所述癌症的所述个体施用本文公开的复合结合分子,从而减少所述肿瘤中的免疫抑制性B细胞。在一些实施方案中,肿瘤浸润性B细胞或免疫抑制性B细胞包括CD19⁺、CD38⁺B

细胞。在一些实施方案中,减少肿瘤浸润性B细胞包括减少和/或阻断和/或预防和/或抑制免疫抑制性B细胞募集到肿瘤环境或微环境中。在一些实施方案中,减少肿瘤浸润性B细胞包括减少和/或阻断和/或预防和/或抑制由免疫抑制性B细胞介导的细胞间接触诱导的免疫抑制。在一些实施方案中,减少肿瘤浸润性B细胞包括减少和/或阻断和/或预防和/或抑制免疫抑制性B细胞分化。

[0248] 本文公开了制备本文公开的复合结合分子的方法,该方法包括在细胞培养基中在足以允许复合结合分子表达、组装和分泌到所述细胞培养基中的条件下孵育本文公开的细胞。在一些实施方案中,该方法包括从细胞培养基中分离和纯化分子。

[0249] 本文公开的复合结合分子可用于治疗癌症或肿瘤。因此,公开了一种为个体准备癌症治疗的方法,该方法包括将本公开的复合结合分子与药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂混合。

实施例

[0250] 包括以下实施例仅用于说明目的,并不旨在限制本发明的范围。

实施例1:CD19和CD38抗体的细胞结合特性

[0251] 举例说明本文的公开内容,测试了复合结合分子与表达CD19和CD38的细胞的结合,所述复合结合分子包含被配置为结合第一靶标的第一结合组分和被配置为结合第二靶标的第二结合组分,其中第一靶标包含B细胞谱系表面标志物,并且其中第二靶标包含抑制性B细胞表面标志物。包含CD19和CD38轻链和重链的抗体与表达CD19和CD38的Raji细胞的结合特性。图12A显示了Raji细胞中CD19和CD38的细胞表面表达数据。将表达CD19和CD38的Raji细胞与包含CD19和CD38轻链和重链的抗体一起孵育。将细胞以11种不同的浓度与30ug/mL抗体一起孵育,以生成每个样品的结合谱。使用市售抗体验证CD19和CD38的表达。测试的样品包括:(A)匹配的CD19重链和轻链,其中CD19重链包含SEQ ID NO:1,CD19轻链包含SEQ ID NO:2;(B)交换的CD19重链和CD38轻链,CD19重链包含SEQ ID NO:1,CD38轻链包含SEQ ID NO:4;(C)交换的CD38重链和CD19轻链,CD38重链包含SEQ ID NO:3,CD19轻链包含SEQ ID NO:2;(D)匹配的CD38重链和轻链,CD38重链包含SEQ ID NO:3,CD38轻链包含SEQ ID NO:4;(E)包含SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:2的CD19单链可变片段(scFv);(F)包含SEQ ID NO:3-SEQ ID NO:4的CD38单链可变片段(scFv);兆珂(Darzalex)(CD38对照);抗CD19 PE(CD19对照);抗CD38 PE(CD38对照);和IgG1同种型对照。

[0252] 图12B和12C显示了样品A-F、兆珂和IgG1同种型对照的结合谱。表1和表2显示了样品A-F、兆珂和IgG1同种型对照的 EC_{50} 值和最大平均荧光强度(MFI)。样品A-F中的每一个都证明了与表达CD19和CD38的Raji细胞的结合,其中样品A-F的结合谱在样品之间变化。图12D和12E显示了对照抗CD19(图11D)和抗CD38抗体(图11E)的结合。图12F显示了测试的抗体不结合至不表达CD19和CD38的CHO细胞。

表1

样品	细胞结合	
	EC50 (ng/mL)	Max MFI
A	~ 6E+21	1878626
B	~ 38394212	1842964
C	ND	ND
D	2260	3827997
E	~ 1E+16	3957921
F	37889	4416606
兆珂	195	4016941
IgG1 同种型对照	~4622880	38691

表2

样品	细胞结合		
	EC50 (nM)	Max MFI	调整的* EC50 (nM)
A	NA	1878626	78.79
B	NA	1842964	113.11
C	ND	ND	ND
D	17.39	3827997	17.39
E	NA	3957921	66.85
F	NA	4416606	67.40
兆珂	1.27	4016941	1.27
IgG1 同种型对照	-	38691	-

NA-治疗没有产生达到稳定的信号。EC50不能以常规方式定义

*顶部渐近线固定在兆珂的最大响应附近。

实施例2:Octet结合数据

[0253] 使用生物层干涉法测定亲本和双特异性抗体的结合亲和力。在25℃使用由0.1% BSA、1XPBS、0.02%吐温-20、0.05% NaN₃组成的测定缓冲液在Octet Red96上进行结合实验。将抗体装载到抗hIgG Fc Capture生物传感器上300秒。将载有配体的传感器浸入抗原的系列稀释液(从300nM开始:对于CD19为两倍系列稀释并且对于CD38为三倍系列稀释)以进行结合(对于CD19为200秒,对于CD38为150秒),然后解离(对于CD19为600秒,对于CD38为400秒)。使用单价(1:1)结合模型计算动力学常数。

[0254] 亲本测试品包括:

[0255] 851A=抗CD19 3C10

[0256] 851B=抗CD19 3C10重链和抗CD38 003轻链

[0257] 851C=抗CD38 003重链和抗CD19 3C10轻链

[0258] 851D=抗CD38 003

[0259] 851E=抗CD19 3C10(scFv-Fc) 2

[0260] 851F=抗CD38 003 (scFv-Fc) 2

[0261] 具有抗CD19 3C10 VH和VL的两种亲本抗体 (851A/851E) 以相似的KD结合CD19。用抗CD38 VL替代抗CD19 3C10 VL (851B) 导致与CD19的结合减少至约五分之一。正如预期的那样,具有抗CD38 003VH和VL的亲本抗体 (851D/851F) 不结合至CD19。

[0262] 表3显示了结合数据。具有抗CD38 003VH和VL的两种亲本抗体 (851D/851F) 以相似的KD结合CD38。用抗CD19 VL替代抗CD38 003VL (851C) 导致与CD38的结合大大减少。正如预期的那样,具有抗CD19 VH和VL的亲本抗体 (851A/851E) 不结合至CD38;851B也不结合至CD38。该数据表明,只有抗CD38 003VL可以作为抗CD19 3C10 VH的共同轻链。

表3

样品	KD (nM)	
	CD19	CD38
851A	1.53	NB
851B	7.07	NB
851C	NB	285
851D	NB	0.98
851E	1.21	NB
851F	NB	2.22

NB=无结合

[0263] 双特异性抗体 (形式) 测试品包括:

[0264] BS1=1:1:2比例003HC:3C10HC:003LC (共同轻链)

[0265] BS1b=2:1:2比例003HC:3C10HC:003LC (共同轻链)

[0266] BS2=1:1:1比例003杵:3C10scFv臼:003LC (Fab-Fc:scFv-Fc双特异性IgG1)

[0267] BS2b=4:1:4比例003杵:3C10scFv臼:003LC (Fab-Fc:scFv-Fc双特异性IgG1)

[0268] BS3=1:1:1比例3C10scFv-003Fab-Fc杵:Fc臼:003LC) (scFv-Fab-Fc:Fc双特异性IgG1)

[0269] BS4=1:1:1比例003Fab-Fc杵-3C10scFv:Fc臼 (Fab-Fc-scFv:Fc双特异性IgG1)

[0270] BS4b=4:1:4比例003Fab-Fc杵-3C10scFv:Fc臼 (Fab-Fc-scFv:Fc双特异性IgG1)

[0271] CM1=1:1:2比例3C10臼:VZV杵:003LC抗CD19对照抗体

[0272] CM1b=1:3:3比例3C10臼:VZV杵:003LC

[0273] CM2=1:1:2比例003杵:VZV臼:003LC抗CD38对照抗体

[0274] CM2b=3:1:3比例003杵:VZV臼:003LC

[0275] 表4显示了呈单一抗原形式的双特异性测试品的结合数据。双特异性抗体BS1/BS2/BS4与两种靶抗原结合,其中KD在亲本抗体 (以灰色阴影显示) 的4倍以内。BS3仅结合至CD19,但不结合CD38,这表明抗CD38 Fab结合位点被抗CD19 scFv N末端融合物阻断,或者抗CD38需要游离的VH N末端进行结合。单臂对照抗体 (CM1、CM2) 仅与其预期的靶抗原结合。

表4

样品	KD (nM)	
	CD19	CD38
BS1	13.8	1.32
BS1b	13.0	1.23
BS2	1.53	1.33
BS2b	1.58	1.12
BS3	3.32	NB
BS4	1.31	1.20
BS4b	4.78	1.21
CM1	18.2	NB
CM1b	15.9	2210
CM2	NB	1.67
CM2b	21300	0.59

NB=无结合

[0276] 对于两抗原形式,将抗体加载到抗hIgG Fc Capture生物传感器上300秒。载有配体的传感器用500nM的第一抗原饱和500秒,然后用300nM的第二抗原饱和240秒。使用单价(1:1)结合模型计算动力学常数。表5显示了双特异性抗体BS1/BS2/BS4可以同时结合至两种靶抗原,其 k_a (1/Ms) 在亲本抗体(851B、851D和851E)的2倍以内。与单抗原形式一样,BS3仅结合至CD19,而不结合CD38。

表5

样品	KD (nM)		第二抗原 Ka (1/Ms)E+04
	抗原 1	抗原 2	
851B	-	CD19	4.24
851D	-	CD38	43.1
851E	-	CD19	4.89
BS1	CD19	CD38	27.0
BS1	缓冲液	CD38	40.9
BS1b	CD19	CD38	26.3
BS1b	缓冲液	CD38	31.6
BS2	CD19	CD38	25.4
BS2	缓冲液	CD38	44.7
BS2b	CD19	CD38	22
BS2b	缓冲液	CD38	32.8
BS3	CD19	CD38	NB
BS3	缓冲液	CD38	NB
BS4	CD19	CD38	37.2
BS4	缓冲液	CD38	44.5
BS4b	CD19	CD38	26.7
BS4b	缓冲液	CD38	39.0

CM1	CD19	CD38	NB
CM1	缓冲液	CD38	NB
CM2	CD19	CD38	30.0
CM2	缓冲液	CD38	29.4
BS1	CD38	CD19	4.44
BS1	缓冲液	CD19	5.34
BS1b	CD38	CD19	6.87
BS1b	缓冲液	CD19	8.98
BS2	CD38	CD19	5.74
BS2	缓冲液	CD19	5.31
BS2b	CD38	CD19	6.66
BS2b	缓冲液	CD19	8.20
BS3	CD38	CD19	8.84
BS3	缓冲液	CD19	8.93
BS4	CD38	CD19	2.65
BS4	缓冲液	CD19	4.55
BS4b	CD38	CD19	3.29
BS4b	缓冲液	CD19	4.64
CM1	CD38	CD19	5.07
CM1	缓冲液	CD19	4.73
CM2	CD38	CD19	NB
CM2	缓冲液	CD19	NB

NB=无结合

[0277] 进一步测试了变体结合CD19和/或CD38的能力。在25℃对Octet Red进行结合实验。将抗体装载到抗hIgG Fc Capture (AHC) 生物传感器上300秒。将载有配体的传感器浸入抗原 (CD19和CD38) 的两倍系列稀释液 (从300nM开始) (对于CD19为240秒, 对于CD38为150秒) 以结合, 然后解离 (对于CD19为600秒, 对于CD38为130秒)。使用单价 (1:1) 结合模型计算动力学常数。表6显示了抗CD38 CDRH2变体的结合。表7显示了CD38轻链W32H变体的结合。表8显示了CD19重链框架突变体A84S A108L的结合。

表6: 双特异性BS1抗CD38臂CDR-H2变体

	序列										CD38 结合 KD (nM)
BS1	R	V	I	P	F	L	G	I	A	N	1.2
BS1M-1	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	13.2
BS1M-3	.	.	.	.	H	.	.	.	.	.	6.9
BS1M-4	.	.	.	.	H	.	.	T	.	.	94.4
BS1M-6	.	.	.	.	Q	.	.	.	.	.	4.4
BS1M-7	.	.	.	.	Q	.	.	T	.	.	60.5
BS1M-2	.	.	T	.	.	.	.	T	.	.	无结合
BS1M-5	.	.	T	.	H	.	.	T	.	.	无结合
BS1M-8	.	.	.	.	H	Q	.	T	.	.	无结合
BS1M-9	.	.	.	.	Q	Q	.	T	.	.	无结合

表7: 双特异性BS1共同轻链变体

	CD38 结合 KD (nM)	CD19 结合 KD (nM)
BSM-10 (W32H)	77.3	39.4
BS1	1.2	13

表8: 双特异性BS1抗CD19臂框架变体

	CD19 结合 KD (nM)
BSM-14 (A84S A108L)	9.5
BS1	13

实施例3: 细胞结合研究

[0278] 细胞结合研究方案: 将五种细胞系 (HEK293-CD19、HEK293-CD38、HEK293-CD19/CD38、Daudi 和 REH) 与测试品以 133nM 孵育, 然后进行 3 倍稀释系列 (总共 7 个点), 另有无处理对照, 一式三份。瞬时转染 HEK293 细胞系。

[0279] 进行了一项研究以评估 CD19 和 CD38 在 Daudi、Raji 和 REH 细胞系上的细胞表面表达。用与 PE 缀合的市售抗体对细胞进行一式三份染色、洗涤并通过流式细胞术采集。为了量化细胞表面的分子表达, 使用 Bangs Laboratories 的 Quantum Simply Cellular 抗小鼠 IgG 试剂盒 (目录 #815-A) 生成标准曲线以用于将 MFI 内插到分子数/细胞值 (表 9)。

表9

细胞系	分子数目	
	CD19	CD38
Daudi	200,000	1,000,000
Raji	200,000	1,000,000
REH	50,000	300,000

[0280] 图13A显示了亲本抗体(851A、851B、851D)和两种对照双特异性抗体(每一种具有一个针对CD19或CD38的臂和针对水痘带状疱疹病毒的另一臂)与Daudi细胞的结合。鉴于Daudi细胞在其表面具有约100万个CD38拷贝,但只有约200,000个CD19拷贝,图13A显示了抗CD38 851D和38K-VZVH的有效结合,但仅适度结合抗CD19 851A、851B、19H-VZVK。注意到具有两个CD38结合性Fab的851D是38K-VZVH的结合的约5倍,38K-VZVH只有一个结合CD38的Fab。

[0281] 图13B显示了双特异性抗体BS1、BS2和BS4与Daudi细胞的结合。通过将它们的结合与仅结合CD38的38K-VZVH比较,双特异性抗体与CD38和CD19两者结合的亲合力是显而易见的。

[0282] 图14A显示了亲本抗体(851A、851B、851D)和两种对照双特异性抗体(每一种具有一个针对CD19或CD38的臂和针对水痘带状疱疹病毒的另一臂)与REH细胞的结合。鉴于REH细胞在其表面具有约300,000个CD38拷贝,但只有约50,000个CD19拷贝,图14A显示了抗CD38 851D和38K-VZVH的有效结合,但仅适度结合抗CD19 851A、851B、19H-VZVK。由于REH细胞上CD38和CD19两者的表达水平较低,与Daudi细胞(图2A、2B)相比,MFI的幅度明显更小。注意到具有两个CD38结合性Fab的851D是38K-VZVH的结合的约5倍,38K-VZVH只有一个结合CD38的Fab。

[0283] 图14B显示了双特异性抗体BS1、BS2和BS4与REH细胞的结合。通过将它们的结合与仅结合CD38的38K-VZVH比较,双特异性抗体与CD38和CD19两者结合的亲合力是显而易见的。

[0284] 图15A显示了亲本抗体(851A、851B、851D)和两种对照双特异性抗体(38K-VZVH、19H-VZVK)与CD19转染的HEK293细胞的结合。正如所料,两种抗CD38抗体不结合至这些细胞。注意到851A和851B各自有两个CD19结合性Fab,结合显著好于19H-VZVK,19H-VZVK只有一个CD19结合性Fab。

[0285] 图15B显示了双特异性抗体BS1、BS2和BS4与CD19转染的HEK293细胞的结合。BS2和BS4的结合略好于BS1;BS2和BS4与CD19的结合是BS1的约10倍,因为BS1具有抗CD38轻链(参见表Octet数据)。

[0286] 图16A显示了亲本抗体(851A、851B、851D)和两种对照双特异性抗体(38K-VZVH、19H-VZVK)与CD38转染的HEK293细胞的结合。正如所料,三种抗CD19抗体不结合至这些细胞。注意到具有两个CD38结合性Fab的851D的结合比38K-VZVH更好,38K-VZVH只有一个结合CD38的Fab。

[0287] 图16B显示了双特异性抗体BS1、BS2和BS4与CD38转染的HEK293细胞的结合。

[0288] 细胞结合研究方案-非特异性背景结合:进行了一项研究以评估三种亲本单克隆抗体(抗CD19克隆851A和851B以及抗CD38克隆851D)、人IgG1同种型对照和达雷木单抗与

CHO-S和Expi293T细胞系的结合。将两种细胞系用活性染料染色,然后与最高浓度为1,250nM的测试品一起孵育,然后进行5倍稀释系列(总共4个点),另有无处理对照和无处理、无二级对照,一式三份。

[0289] 图17A显示了亲本抗体(851A、851B、851D)与未转染的CHO-S细胞的结合。对于所有三种亲本抗体,在250nM开始出现非特异性结合,并且对于抗CD38 851D更为明显。

[0290] 图17B显示了亲本抗体(851A、851B、851D)与未转染的Expi293T细胞的结合。对于所有三种亲本抗体,在250nM开始出现非特异性结合,并且对于抗CD38 851D更为明显。

实施例4:直接和交联的细胞凋亡

[0291] 为了评估直接细胞凋亡,用测试品处理细胞并在37℃/5% CO₂下孵育48小时。为了评估交联诱导的细胞凋亡,在加入5μg/mL的兔抗人Fcγ特异性F(ab')₂之前,将细胞与测试品在冰上孵育30分钟。然后将细胞在37℃/5% CO₂下孵育48小时。孵育后,洗涤细胞并用膜联蛋白V染色,然后在流式细胞仪采集之前重新悬浮在含有活性染料(碘化丙啶;PI)的膜联蛋白V缓冲液中。早期凋亡细胞定义为膜联蛋白V+/PI-单细胞,晚期凋亡/坏死细胞定义为膜联蛋白V+/PI+单细胞。膜联蛋白V+/PI-和膜联蛋白V+/PI+的总和定义为总凋亡/坏死细胞。绘制膜联蛋白V+/PI-细胞或膜联蛋白V+/PI+的百分比以比较各种凋亡条件。

[0292] 对于直接细胞凋亡评估,每个测试品均在33nM的最终最高浓度然后是7点五倍稀释系列下进行测试,连同未处理的对照,一式三份。对于交联诱导的细胞凋亡,单独的试验品(BS1、BS2、BS4、851A、851B和851D)和试验品的组合(851A和851D;851B和851D;以及38K-VZVH和19H-VZVK),连同达雷木单抗和IgG1同种型对照,分别在33nM的最终最高浓度然后是7点五倍稀释系列下进行测试,连同未处理的对照,一式三份。对于膜联蛋白V染色的阳性对照,将细胞用5mM星形孢菌素处理。

[0293] 图18A显示了对于亲本抗体(851A、851B、851D)、两种对照双特异性抗体(38K-VZVH、19H-VZVK)、达雷木单抗和IgG1同种型对照,Daudi细胞的直接凋亡。达雷木单抗表现出最高水平的细胞凋亡。与达雷木单抗相比,两个抗CD19亲本(851A、851B)都表现出较低水平的细胞凋亡。两个双特异性对照和抗CD38亲本抗体851D未显示出明显的直接细胞凋亡。

[0294] 图18B显示了对于双特异性抗体BS1、BS2、BS4、达雷木单抗和IgG1同种型对照,Daudi细胞的直接凋亡。与达雷木单抗相比,BS1和BS2形式显示出显著更高水平的直接细胞凋亡。双特异性形式BS4显示出与亲本抗CD19 851A/851B抗体相当的直接细胞凋亡水平(比较图12A);这可能是由于BS4形式无法使CD19和CD38靠近以启动细胞凋亡。

[0295] 图19A显示对于亲本抗体(851A、851B、851D)、两种亲本抗体组合(851A+851D;851B+851D)、达雷木单抗和IgG1同种型对照,交联诱导的Daudi细胞凋亡。交联增加了达雷木单抗驱动细胞凋亡水平(比较图12A和图7A)。交联显著增加了抗CD38 851D的细胞凋亡水平,抗CD38 851D显示没有直接的细胞凋亡(比较图12A和图7A)。当交联抗CD19亲本抗体851A和851B时,细胞凋亡水平的增加低于CD38抗体,这可能是由于与CD38相比,Daudi细胞上的CD19水平较低(见表9)。与单独的851D相比,抗CD19 851A或851B与抗CD38 851D的交联组合不会增加细胞凋亡水平。

[0296] 图19B显示了对于双特异性抗体BS1、BS2、BS4、(38K-VZVH+19H-VZVK)、达雷木单抗和IgG1同种型对照,交联诱导的Daudi细胞凋亡。当交联时,BS1和BS2形式显示出与达雷木单抗相当的细胞凋亡水平。值得注意的是,双特异性形式BS4显示出与BS1、BS2和达雷木单

抗相当的交联诱导细胞凋亡水平;在没有交联的情况下,BS4没有显示出细胞凋亡(见图6B)。两种对照抗体38K-VZVH和19H-VZVK的组合表现出显著的细胞凋亡,但少于任何双特异性形式,表明在单一抗体中包含抗CD19和抗CD38结合位点比在独立的抗体中更有利。

实施例5:细胞毒性

[0297] 用测试品的剂量反应处理Daudi靶细胞并在37℃/5% CO₂下孵育15分钟。测试品在133nM的最终最高浓度下然后是7点五倍稀释系列下进行测试,此外还有0nM对照。达雷木单抗和IgG1同种型对照用作阳性和阴性对照。

[0298] 预处理的靶细胞与来自n=3个供体的人PBMC共培养(E:T25:1)。PBMC已用100U/mL的IL-2过夜“引发”。用ViaFluor 405标记PBMC。在流式细胞术分析细胞毒性之前,将样品在37℃/5% CO₂下孵育4小时。对于细胞毒性分析,将细胞用碘化丙啶(P.I.)染色并通过高通量流式细胞术进行分析。分析VF405-群中P.I.+细胞的百分比作为靶细胞细胞毒性的量度。

[0299] 图20A、图20B和图20C显示了三个供体的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。对于所有三个供体,结果是相似的。三种双特异性形式—BS1、BS2、BS4—和达雷木单抗表现出相似的ADCC水平。抗CD19双特异性对照19H-VZVK不诱导ADCC并且与IgG1对照抗体等效,可能是由于靶Daudi细胞上的CD19水平低(参见表9)。相比之下,抗CD38双特异性对照38K-VZVH表现出与双特异性者和达雷木单抗相当的ADCC,这可能是由于与CD19相比,Daudi细胞上的CD38水平要高得多。

[0300] 图21A-C显示了三个供体的ADCC。对于所有三个供体,结果是相似的。三种双特异性形式—BS1、BS2、BS4—表现出相似的ADCC水平。与岩藻糖基化版本相比,BS1、BS2、BS4的去岩藻糖基化版本显示出增加约10倍的ADCC。

[0301] 还进行了补体依赖性细胞毒性(CDC)测定。将靶细胞用以下测试品的剂量反应进行处理:BS1、BS2、38K-VZVH、19H-VZVH、38K-VZVH/19H-VZVH组合,以及兆珂、抗CD20、WT IgG1 Tafasitimab的对照和人IgG1同种型对照。所有样品都在133nM的最高浓度然后是5倍稀释系列(总共7个点)下进行测试,连同无处理对照。在37℃、5% CO₂下孵育15分钟后,将补体以25%的终浓度添加到处理过的细胞中。然后将细胞与补体在37℃、5% CO₂下再孵育2小时。补体孵育后,用5μg/mL的活性染料碘化丙啶(P.I.)洗涤和重悬浮细胞,并通过高通量流式细胞术采集。

[0302] 图22A和22B显示了补体依赖性细胞毒性(CDC)测定的结果。阳性技术对照抗CD20诱导了稳健的剂量依赖性CDC活性。38K-VZVH和19H-VZVH(单独或组合使用)、抗CD19 tafasitimab(wt IgG1)和人IgG1同种型对照不诱导任何CDC活性。兆珂、BS1和BS2都显示出CDC活性(尽管与文献中预期的抗CD20的幅度不同)。兆珂的最大细胞毒性高于BS1和BS2。

[0303] 抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)进一步通过pHrodo Green AM(pHG)标记的Raji细胞进行测定,这些细胞用受试品的剂量反应处理并在37℃、5% CO₂下孵育15分钟。pHG是pH敏感性染料,仅在中性pH时发出微弱的荧光,但在巨噬细胞的成熟吞噬体中在低pH时发出高荧光。抗CD20抗体和IgG1同种型对照情况下的pHG标记的Raji靶细胞作为阳性对照和阴性对照,最高浓度为133nM,7点五倍稀释系列,和0nM对照。预处理的靶细胞与来自n=3个供体的人巨噬细胞(从单核细胞体外分化)共培养(E:T 1:2)。用Cell Trace Violet(CTV)标记巨噬细胞。在流式细胞术分析吞噬作用之前,将样品在37℃、5% CO₂下孵育4小时。分析pHGhi/CTV+细胞的百分比作为靶细胞吞噬作用的量度。百分比相对于测试品浓度的对数

绘制在XY图表上,数据拟合到计算EC50的四参数非线性回归曲线。

[0304] 图23显示了使用Raji细胞作为靶标和供体巨噬细胞的抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)测定的结果。阳性对照抗CD20在4小时后对所有三个供体表现出剂量依赖性吞噬作用(最大吞噬作用在5-10%之间)。阴性对照——IgG1同种型对照,在4小时后对所有三个供体都没有显示出剂量依赖性吞噬作用。兆珂在4小时后对所有三个供体表现出剂量依赖性吞噬作用(最大吞噬作用在4-10%之间)。BS-1、BS-2、去岩藻糖基化BS-1和去岩藻糖基化BS-2显示出轻微的剂量依赖性吞噬作用,去岩藻糖基化形式导致ADCP增加。

实施例6:与RBC的相互作用

[0305] 进行了基于流式细胞术的红血细胞(RBC)结合研究,以评估测试品与来自n=3食蟹猴和n=3人供体的红血细胞的结合。将全血用1X PBS洗涤,然后用PBS稀释20倍,然后用测试品处理。将双特异性(BS1、BS2)、亲本单克隆(851A、851D)和对照(抗CD38兆珂、重组抗CD19 tafasitamab、IgG1同种型对照、与Alexa Fluor 647偶联的抗CD47)在最高终浓度133nM然后是总共7个点的五倍连续稀释下测试,连同0nM对照,一式三份。以组合测试了单组列对照(38K-VZVH、19H-VZVK),两者都以最高浓度133nM并且剂量反应相同。

[0306] 在冰上与一抗孵育30分钟后,洗涤细胞并用5 μ g/mL的二抗(用Alexa Fluor 647标记的山羊抗人Fc γ F(ab')₂)染色,以检测测试品在红血细胞上的结合。对于抗CD47-A647染色的细胞不使用二抗。在冰上与二抗再孵育30分钟后,洗涤、稀释染色细胞,并通过高通量流式细胞术采集。计算了单细胞群的AlexaFluor 647GeoMean荧光强度(MFI)。在XY图表上绘制AF647的MFI,绘制MFI与浓度对数的关系图,并将数据拟合到计算EC50的非线性回归曲线。

[0307] 图24显示了AF647缀合的抗CD47与所有三个人红血细胞供体均显示出剂量反应结合曲线。兆珂还显示出与所有三个供体结合的剂量依赖性增加,尽管最大MFI比抗CD47小一个数量级。在兆珂之后,抗CD38 851D显示出次最大MFI,其次是BS1、BS2、38K-VZVH和19H-VZVK,以及抗CD19 tafasitamab。最后,仅在最高浓度下,抗CD19 851A和IgG1同种型仅显示MFI略有增加。

[0308] 对来自总共三只健康(n=3)食蟹猴(Cyno)供体和三名健康(n=3)人供体的红血细胞进行体外血凝测定。在研究当天采集全血并检查凝血。然后用PBS清洗血液并按1:50稀释以获得“全血底物”。将全血底物铺在96孔圆底板中,并用测试品(BS1、BS2、38K-VZVH+19H-VZVK、851A和851D)、对照(具有野生型IgG1的tafasitimab)、兆珂和人IgG1同种型对照)或阳性技术对照(IGM-55.5)在PBS中在最高终浓度133nM然后是六个点的五倍连续稀释进行处理,连同0nM对照,一式三份。在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂下孵育1小时后,对一个或多个板拍照以确定血凝水平。使用照片作为参考,以0-5的特定血凝量表对每个孔进行评分。每个得分的具体表现在某种程度上与个体供体有关。

[0309] 图25A显示了人供体3的血凝测定结果。阳性对照抗CD47从0.04nM开始到1.1nM诱导所有三个人供体的血凝。BS1、BS2、38K-VZVH+19H-VZVK、兆珂、tafasitimab和人IgG1同种型对照在所有三个供体中在任何浓度均未显示诱导血凝。对于所有三个供体,单克隆抗体851A(抗CD19)和851D(抗CD38)对于每者从0.2或1.1nM开始均诱导血凝,反应幅度与技术对照(抗CD47)相似。与亲本单克隆抗体相比,BS1和BS2在任何浓度下均未显示任何血凝诱导。

[0310] 图25B显示了食蟹猴供体3的血凝测定结果。对于所有三个食蟹猴供体,阳性对照

IGM-55.5 (抗小i抗原IgM抗体) 从0.04或0.2nM开始诱导血凝。BS1、BS2、38K-VZVH+19H-VZVK、兆珂、tafasitimab和人IgG1同种型对照在所有三个供体中在任何浓度均未显示诱导血凝。对于所有三个供体,单克隆抗体851A (抗CD19) 和851D (抗CD38) 对于每者从1.1nM开始均诱导血凝。与亲本单克隆抗体相比,BS1和BS2在任何浓度下均未显示任何无血凝诱导。

[0311] 还对来自三只 (n=3) 健康食蟹猴 (cyno) 和三名 (n=3) 健康人供体的红血细胞进行了体外溶血测定。在研究当天采集全血并检查凝血。用PBS清洗血液并按1:10稀释以获得“全血底物”。将全血底物用PBS中的测试品和对照处理。将双特异性 (BS1、BS2)、亲本单克隆 (851A、851D) 和对照 (抗CD38 Darzalex、重组抗CD19Tafasitamab、IgG1同种型对照) 在最高终浓度133nM然后是总共7个点的五倍连续稀释下测试,连同0nM对照,一式三份。以组合测试了单组列对照 (38K-VZVH、19H-VZVK), 两者都以最高浓度133nM并且剂量反应相同。将皂苷在0.1%的最高浓度连带总共七个点的三倍连续稀释下进行了测试。在37℃、5% CO₂下孵育1小时后,将板离心,收集上清液。通过酶标仪分析上清液在540nm处的光密度 (OD)。对于所有种类和供体,阳性对照皂苷从0.001%开始到0.10%诱导剂量依赖性溶血。在任何测试浓度下,没有测试品诱导任何溶血。

[0312] 图26显示了在任何测试浓度下,没有测试品诱导任何溶血。对于所有种类和供体,阳性对照皂苷从0.001%开始到0.10%诱导剂量依赖性溶血。

[0313] 虽然已经示出和在本文所述了本发明的优选实施方案,对本领域技术人员将是显而易见的是,仅通过举例的方式来提供这样的实施方案。在不脱离本发明的情况下,本领域技术人员现在将清楚许多变型、改变和替代。应当理解,在实践本发明时可以采用本文所述的本发明实施方案的各种替代方案。所附权利要求旨在限定本发明的范围,并且由此覆盖这些权利要求及其等同物的范围内的方法和结构。

序列

#	序列	注解
1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFSSYTINWVRQAPGQGLE WMGGIPIFGIPNYAQKFQGRVTIT ADESTNTAYMELSSLRAEDTAVY YCARASGGSADYSYGMDVWGQG TAVTVSS	抗 CD19_VH
2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLI YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYKRYPY TFGQGTKLEIK	抗 CD19_VL
3	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFSSYAFSWVRQAPGQGLE WMGRVIPFLGIANSAQKFQGRVTI TADKSTSTAYMDLSSLRSED TAV YYCARD DIAALGPFDYWGQGT LV TVSS	抗 CD38_VH
4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLI YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPR TFGQGTKVEIK	抗 CD38_VL
5	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFSSYAFSWVRQAPGQGLE WMGRVIPFLGIANSAQKFQGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSED TAVY YCARD DIAALGPFDYWGQGT LV TVSS	抗 CD38_VH ver 2
6	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFSSYTINWVRQAPGQGLE WMGGIPIFGIPNYAQKFQGRVTIT ADESTNTAYMELSSLRSED TAVY YCARASGGSADYSYGMDVWGQG TLVTVSS	抗 CD19_Ver2
7	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFSSYTINWVRQAPGQGLE WMGGIPIFGIPNYAQKFQGRVTIT ADESTNTAYMELSSLRSED TAVY	抗 CD19_Ver 3

	YCARASGGSADYSYGMDVWGGG TLVTVSS	
11	GGTFSSYT	抗 CD19_VH_CDR1_IM GT
12	SYTIN	抗 CD19_VH_CDR1_Kab at
13	GGTFSSY	抗 CD19_VH_CDR1_Cho thia
14	SSYTIN	抗 CD19_VH_CDR1_Con tact
15	GGTFSSYTIN	抗 CD19_VH_CDR1_Ab M
21	IIPIFGIP	抗 CD19_VH_CDR2_IM GT
22	GIPIFGIPNYAQKFQG	抗 CD19_VH_CDR2_Kab at
23	PIFG	抗 CD19_VH_CDR2_Cho thia
24	WMGGIIPIFGIPN	抗 CD19_VH_CDR2_Con tact
25	GIPIFGIPN	抗 CD19_VH_CDR2_Ab M
31	ARASGGSADYSYGMDV	抗 CD19_VH_CDR3_IM GT
32	ASGGSADYSYGMDV	抗 CD19_VH_CDR3_Kab at

33	SGGSADYSYGMD	抗 CD19_VH_CDR3_Cho thia
34	ARASGGSADYSYGMD	抗 CD19_VH_CDR3_Con tact
35	ASGGSADYSYGMDV	抗 CD19_VH_CDR3_Ab M
41	QGISSWLA	抗 CD19_VL_CDR1_IM GT
42	RASQGISSWLA	抗 CD19_VL_CDR1_Kab at
43	SQGISSW	抗 CD19_VL_CDR1_Cho thia
44	SSWLAWY	抗 CD19_VL_CDR1_Con tact
45	RASQGISSWLA	抗 CD19_VL_CDR1_Ab M
51	AAS	抗 CD19_VL_CDR2_IM GT
51	AASSLQS	抗 CD19_VL_CDR2_Kab at
53	AAS	抗 CD19_VL_CDR2_Cho thia
54	SLIYAASSLQ	抗 CD19_VL_CDR2_Con tact
55	AASSLQS	抗 CD19_VL_CDR2_Ab M

61	QQYKRYPYT	抗 CD19_VL_CDR3_IM GT
62	QQYKRYPYT	抗 CD19_VL_CDR3_Kab at
63	YKRYPY	抗 CD19_VL_CDR3_Cho thia
64	QQYKRYPY	抗 CD19_VL_CDR3_Con tact
65	QQYKRYPYT	抗 CD19_VL_CDR3_Ab M
71	GGTFSSYA	抗 CD38_VH_CDR1_IM GT
72	SYAFS	抗 CD38_VH_CDR1_Kab at
73	GGTFSSY	抗 CD38_VH_CDR1_Cho thia
74	SSYAFS	抗 CD38_VH_CDR1_Con tact
75	GGTFSSYAFS	抗 CD38_VH_CDR1_Ab M
81	VIPFLGIA	抗 CD38_VH_CDR2_IM GT
82	RVIPFLGIANSAQKFQG	抗 CD38_VH_CDR2_Kab at
83	PFLG	抗 CD38_VH_CDR2_Cho thia

84	WMGRVIPFLGIAN	抗 CD38_VH_CDR2_Con tact
85	RVIPFLGIAN	抗 CD38_VH_CDR2_Ab M
91	ARDDIAALGPFDY	抗 CD38_VH_CDR3_IM GT
92	DDIAALGPFDY	抗 CD38_VH_CDR3_Kab at
93	DIAALGPFD	抗 CD38_VH_CDR3_Cho thia
94	ARDDIAALGPFD	抗 CD38_VH_CDR3_Con tact
95	DDIAALGPFDY	抗 CD38_VH_CDR3_Ab M
101	QGISSWLA	抗 CD38_VL_CDR1_IM GT
102	RASQGISSWLA	抗 CD38_VL_CDR1_Kab at
103	SQGISSW	抗 CD38_VL_CDR1_Cho thia
104	SSWLAWY	抗 CD38_VL_CDR1_Con tact
105	RASQGISSWLA	抗 CD38_VL_CDR1_Ab M
111	AAS	抗 CD38_VL_CDR2_IM GT

112	AASSLQS	抗 CD38_VL_CDR2_Kab at
113	AAS	抗 CD38_VL_CDR2_Cho thia
114	SLIYAASSLQ	抗 CD38_VL_CDR2_Con tact
115	AASSLQS	抗 CD38_VL_CDR2_Ab M
121	QQYNSYPRT	抗 CD38_VL_CDR3_IM GT
122	QQYNSYPRT	抗 CD38_VL_CDR3_Kab at
123	YNSYPR	抗 CD38_VH_CDR3_Cho thia
124	QQYNSYPR	抗 CD38_VH_CDR3_Con tact
125	QQYNSYPRT	抗 CD38_VH_CDR3_Ab M
150	P-X1-L-G-X2-A; 其中 X1 和 X2 是 任何氨基酸	抗 CD38_VH_CDR2
151	PFLGTA	抗 CD38_VH_CDR2
152	PHLGIA	抗 CD38_VH_CDR2
153	PHLGTA	抗 CD38_VH_CDR2
154	PQLGIA	抗 CD38_VH_CDR2
155	PQLGTA	抗 CD38_VH_CDR2
201	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFSSYTINWVRQAPGQGLE WMGGIPIFGIPNYAQKFQGRVTIT ADESTNTAYMELSSLRAEDTAVY	BS1-19H

	YCARASGGSADYSYGMDVWGQG TAVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK	
202	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFSSYAFSWVRQAPGQGLE WMGRVIPFLGIANSAQKFQGRVTI TADKSTSTAYMDLSSLRSED TAV YYCARD DIAALGPFDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSLSSLTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	BS1-38K
203	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFSSYTINWVRQAPGQGLE WMGGIPIFGIPNYAQKFQGRVTIT ADESTNTAYMELSSLRAEDTAVY YCARASGGSADYSYGMDVWGQG	BS2-19H1

	TAVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSD IQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRAS QGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQYKRYPYT FGQGTKLEIKAAEPKSSDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	
204	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFSSYTINWVRQAPGQGLE WMGGIPIFGIPNYAQKFQGRVTIT ADESTNTAYMELSSLRAEDTAVY YCARASGGSADYSYGMDVWGQG TAVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSD IQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRAS QGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQYKRYPYT FGQGTKLEIK GGGG DKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK	BS2-19H2
205	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFSSYAFSWVRQAPGQGLE WMGRVIPFLGIANSAQKFQGRVTI TADKSTSTAYMDLSSLRSEDVAV	BS2X-19H1

	YYCARDDDIAALGPFDYWGQGLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM TQSPSSLASVGDRVTITCRASQGI SSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQYNSYPRTFGQ GTKVEIK AAEPKSSDK THTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK	
206	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFSSYAFSWVRQAPGQGLE WMGRVIPFLGIANSAQKFQGRVTI TADKSTSTAYMDLSSLRSEDTAV YYCARDDDIAALGPFDYWGQGLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM TQSPSSLASVGDRVTITCRASQGI SSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQYNSYPRTFGQ GTKVEIK GGGGDK THTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK	BS2X-19H2
207	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFSSYTINWVRQAPGQGLE WMGGIPIFGIPNYAQKFQGRVTIT	BS3-19H38

	ADESTNTAYMELSSLRAEDTAVY YCARASGGSADYSYGMDVWGQG TAVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGSGGGSQVQLVQSGAE VKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAF SWVRQAPGQGLEWMGRVIPFLGI ANSAQKFQGRVTITADKSTSTAY MDLSSLRSEDNAVYYCARDIAA LGPFDYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTH	
208	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVELTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK	BS3-Fc
209	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFSSYAFSWVRQAPGQGLE WMGRVIPFLGIANSQKFQGRVTI TADKSTSTAYMDLSSLRSEDNAV	BS4-38K19

	YYCARDDDIAALGPFDYWGQGT TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGGGGSGGGSQVQLVQSGAEV KKPGSSVKVSCKASGGTFSSYTIN WVRQAPGQGLEWMGGIPIFGIPN YAQKFQGRVTITADESTNTAYME LSSLRAEDTAVYYCARASGGGSAD YSYGMDVWGQGTAVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSA SVGDRVITICRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPS RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQQYKRYPTYTFGQGTKLEIK	
210	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICR ASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLI YAASSLQSGVPSRFGSGSGTDFT LTISLQPEDFATYYCQQYKRYPY TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	19VL-CL
211	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICR ASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLI YAASSLQSGVPSRFGSGSGTDFT LTISLQPEDFATYYCQQYNSYPR TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA	38VL-CL

	KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC	
212	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFSSYTINWVRQAPGQGLE WMGGIPIFGIPNYAQKFQGRVTIT ADESTNTAYMELSSLRAEDTAVY YCARASGGSADYSYGMDVWGQG TAVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQYKRYPYT FGQGTKLEIKGGGGGQVQLVQSG AEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSY TINWVRQAPGQGLEWMGGIPIFG IPNYAQKFQGRVTITADESTNTAY MELSSLRAEDTAVYYCARASGGS ADYSYGMDVWGQGTAVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	3C10 scFv-003Fab-Fc 杵(BS3-19F38)
213	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLI YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPR TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ	003VL (38VL-CL)

	DSKDSTYSLSSTLTLSKADYKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
214	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK	Fc 白(BS3-Fc)
215	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFSSYAFSWVRQAPGQGLE WMGRVIPFLGIANSAQKFQGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVY YCARDIAALGPFDYWGQGTLLV VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	BS1-38K ver2
216	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFSSYTINWVRQAPGQGLE WMGGIPIFGIPNYAQKFQGRVTIT ADESTNTAYMELSSLRSEDNAVY YCARASGGSADYSYGMDVWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW	BS1-19H ver2

	NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDSFLLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK	
217	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFSSYTINWVRQAPGQGLE WMGGIPIFGIPNYAQKFQGRVTIT ADESTNTAYMELSSLRSEDNAVY YCARASGGSADYSYGMDVWGGG TLVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQYKRYPYT FGQGTKLEIKAAEPKSSDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSGDSFLLVSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	BS2-19H ver2
218	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFSSYAFSWVRQAPGQGLE WMGRVIPFLGTANSAQKFQGRVT ITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAV YYCARDIAALGPFDYWGQGTLV TVSS	BS1M-1

219	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFSSYAFSWVRQAPGQGLE WMGRVIPHLGIANSAQKFQGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVY YCARDLIAALGPFDYWGQGTLV VSS	BS1M-3
220	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFSSYAFSWVRQAPGQGLE WMGRVIPHLGTANSAQKFQGRVT ITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAV YYCARDLIAALGPFDYWGQGTLV TVSS	BS1M-4
221	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFSSYAFSWVRQAPGQGLE WMGRVIPQLGIANSAQKFQGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVY YCARDLIAALGPFDYWGQGTLV VSS	BS1M-6
222	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFSSYAFSWVRQAPGQGLE WMGRVIPQLGTANSAQKFQGRVT ITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAV YYCARDLIAALGPFDYWGQGTLV TVSS	BS1M-7
223	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQGISHLAWYQQKPEKAPKSLI YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYNSTPR TFGQGTKVEIK	BSM-10

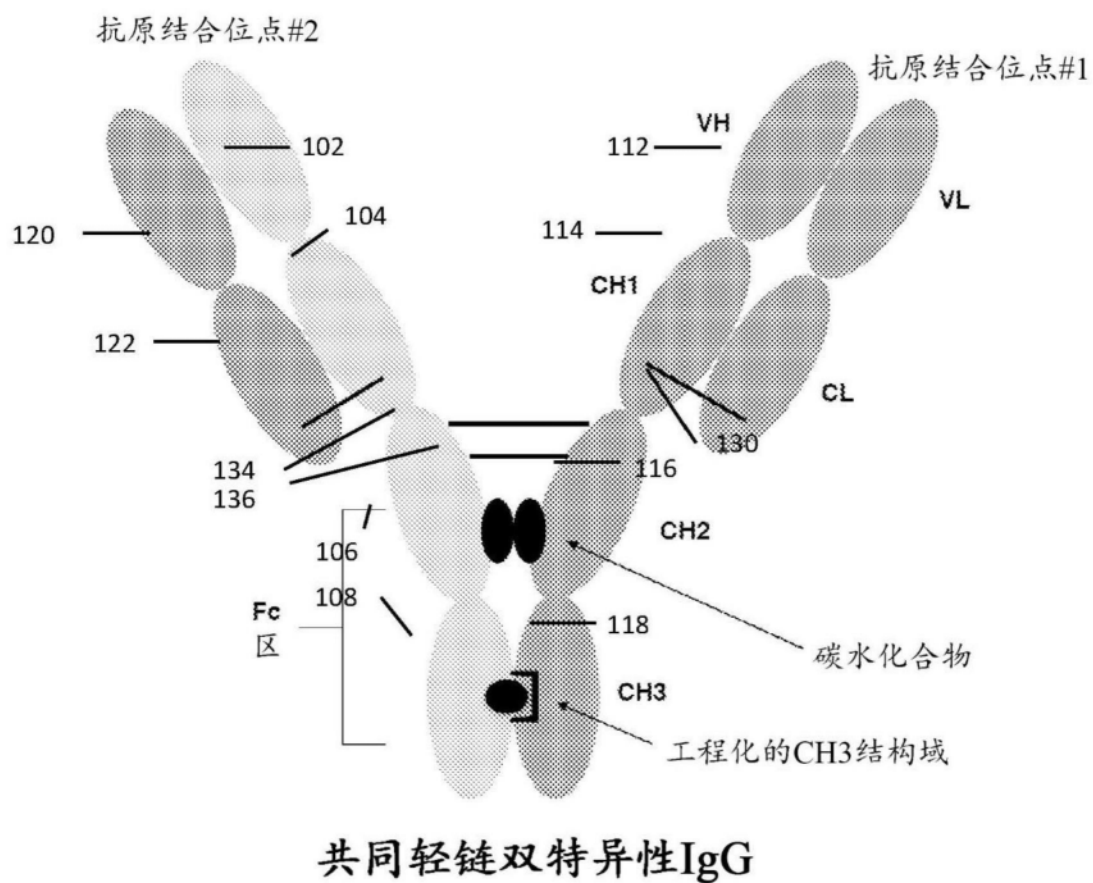
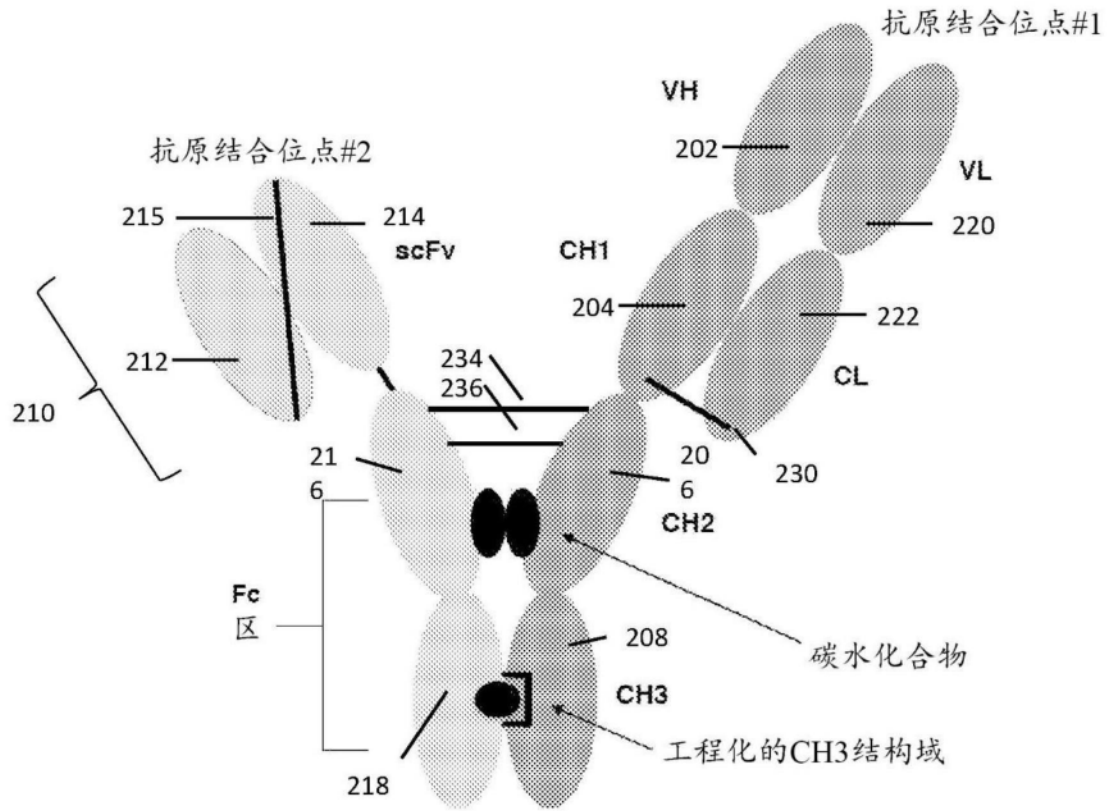
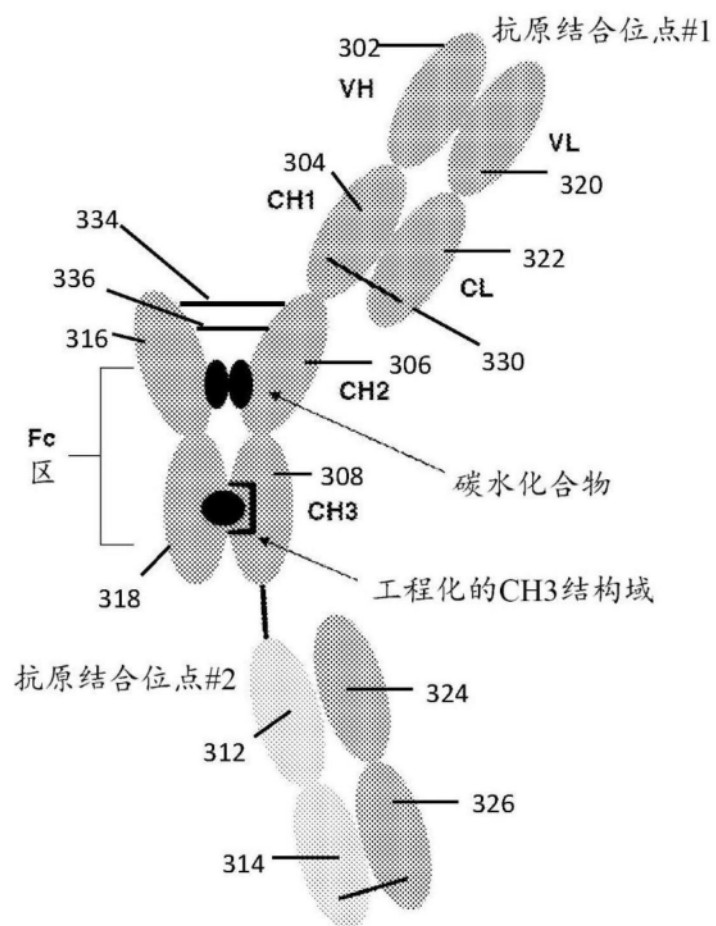


图1



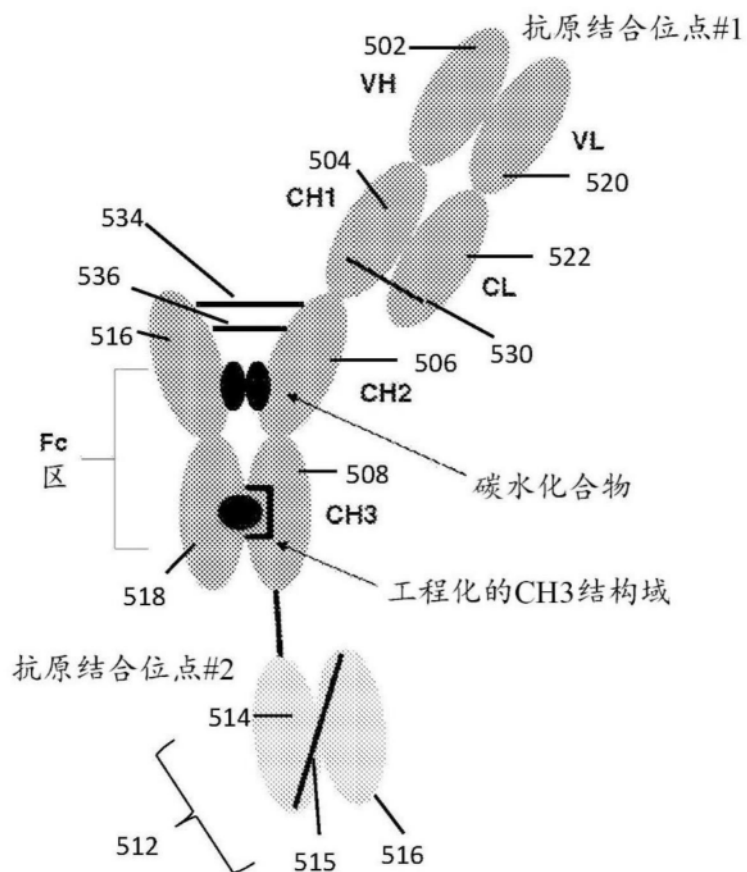
Fab-Fc:scFv-Fc双特异性IgG

图2



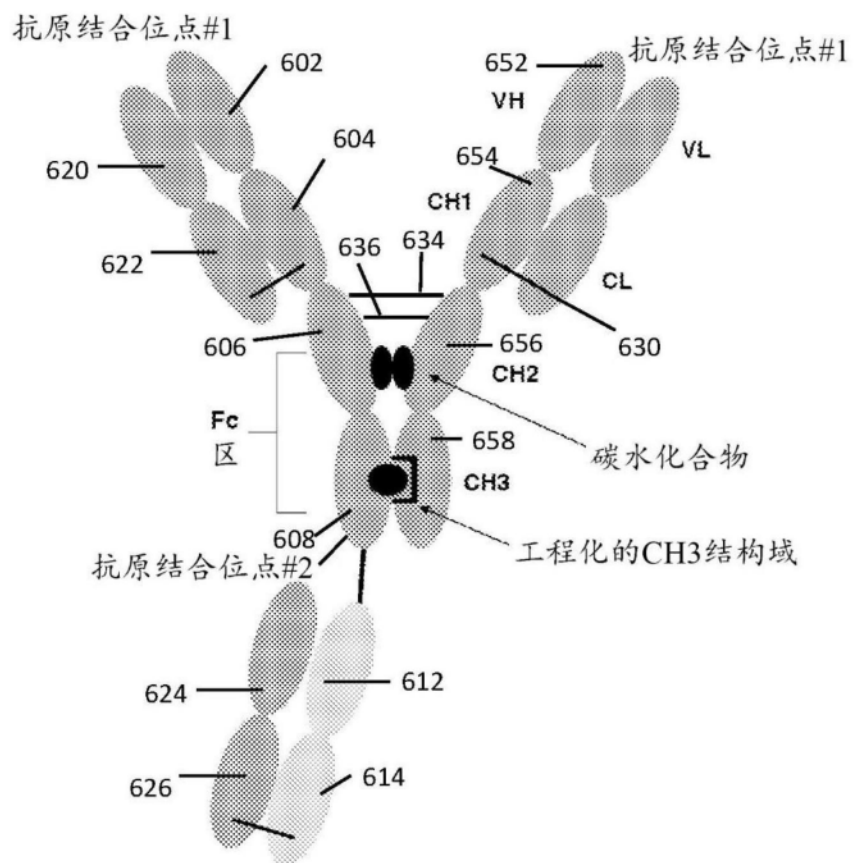
Fab-Fc-Fab:Fc双特异性IgG

图3



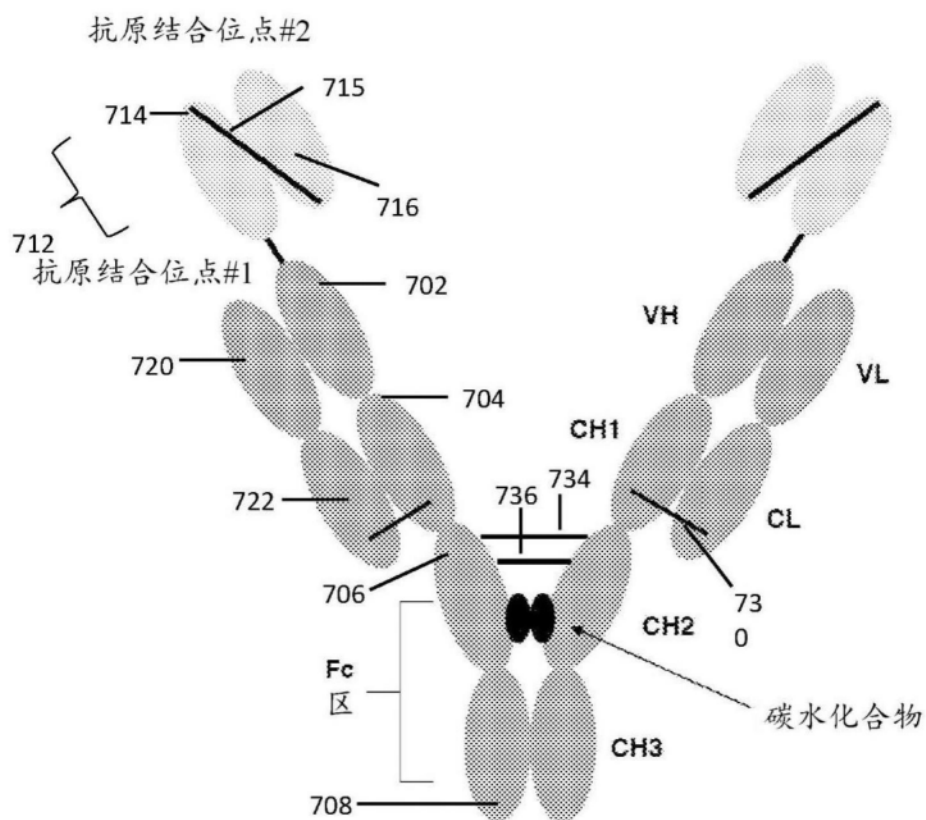
Fab-Fc-scFv:Fc双特异性IgG

图5



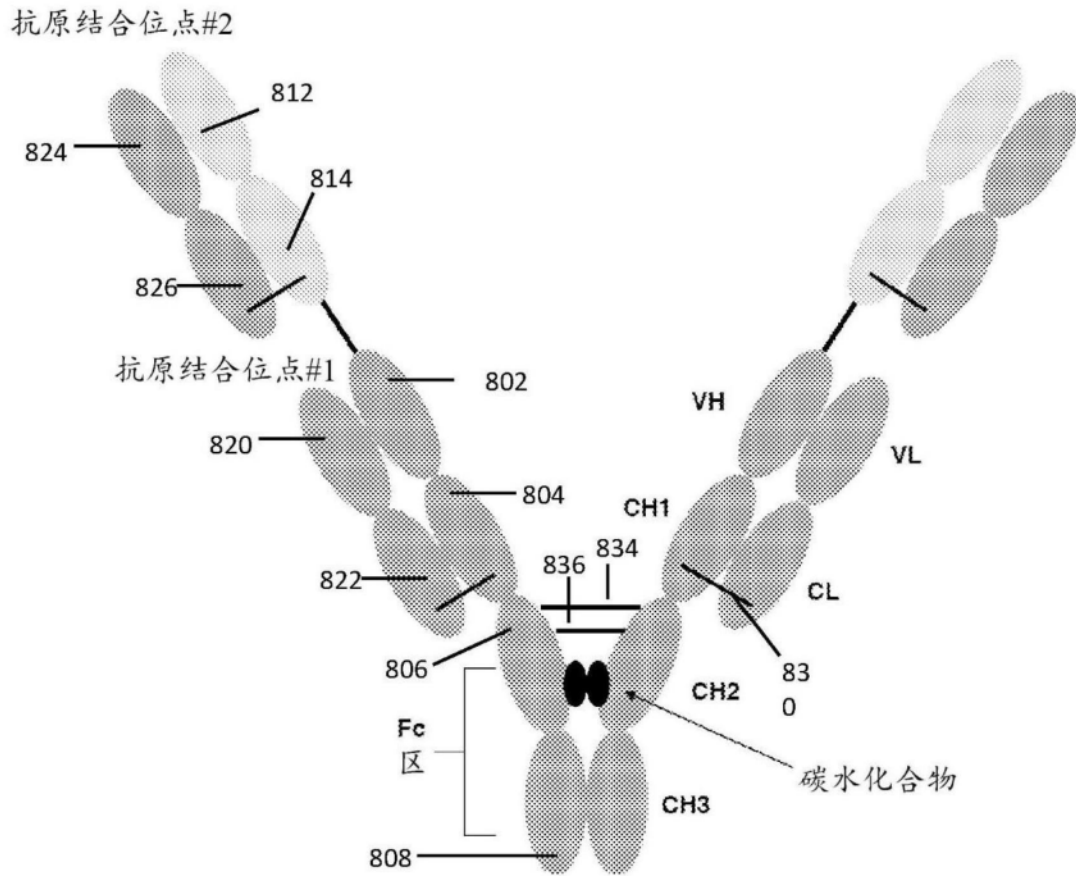
Fab-Fc-Fab:Fab-Fc双特异性IgG

图6



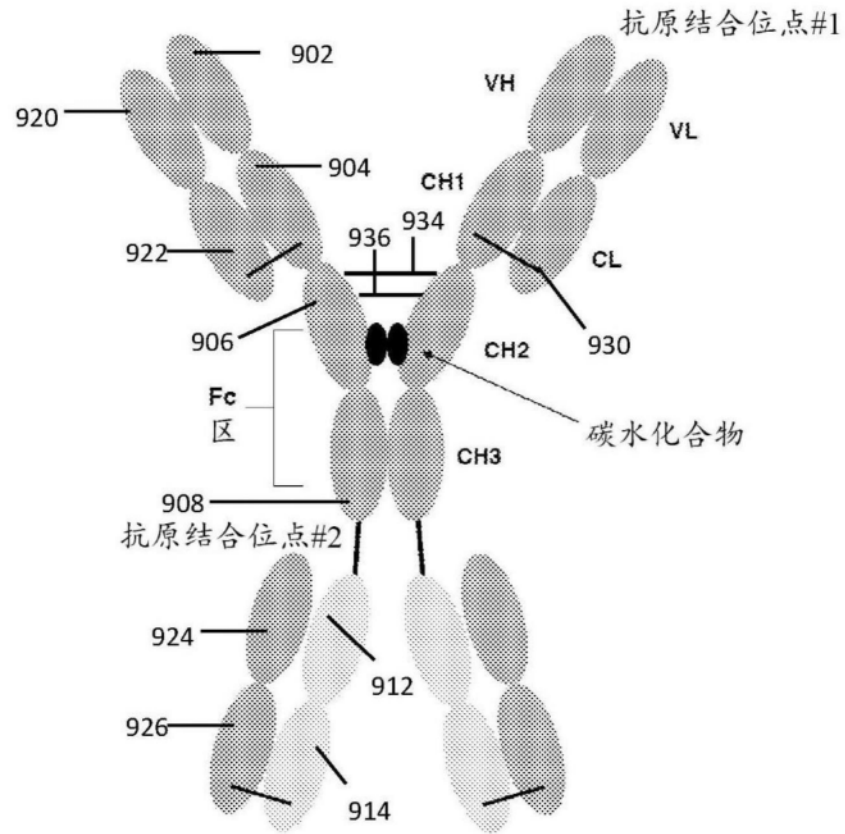
scFv-Fab-Fc:scFv-Fab-Fc双特异性IgG

图7



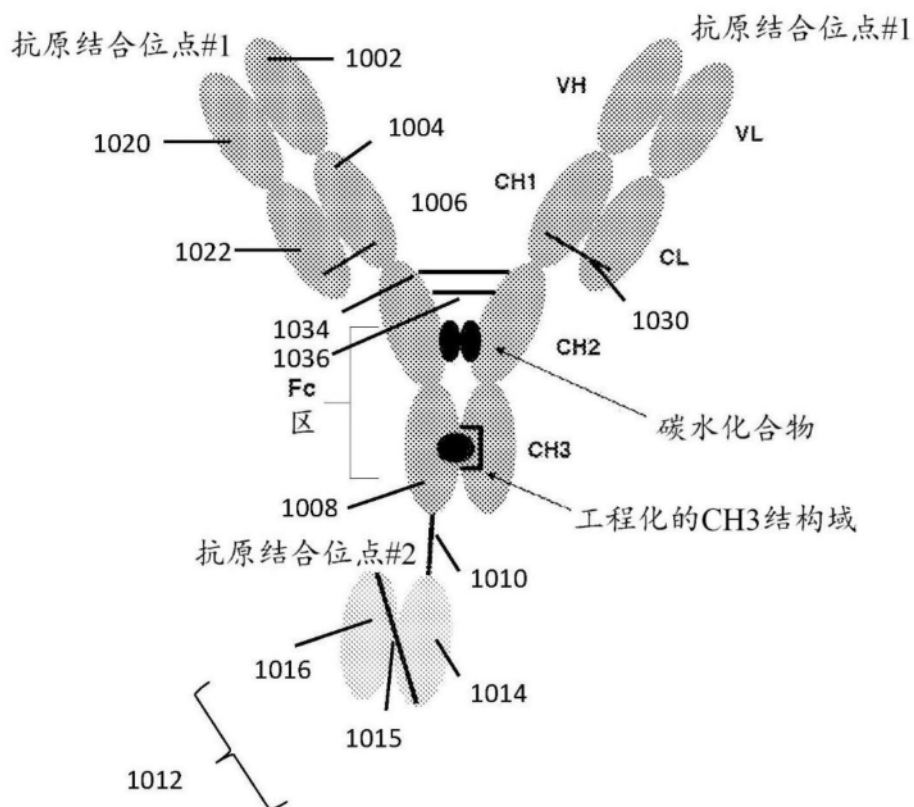
Fab-Fab-Fc:Fab-Fab-Fc双特异性IgG

图8



Fab-Fc-Fab:Fab-Fc-Fab双特异性IgG

图9



Fab-Fc-scFv:Fab-Fc双特异性IgG

图10

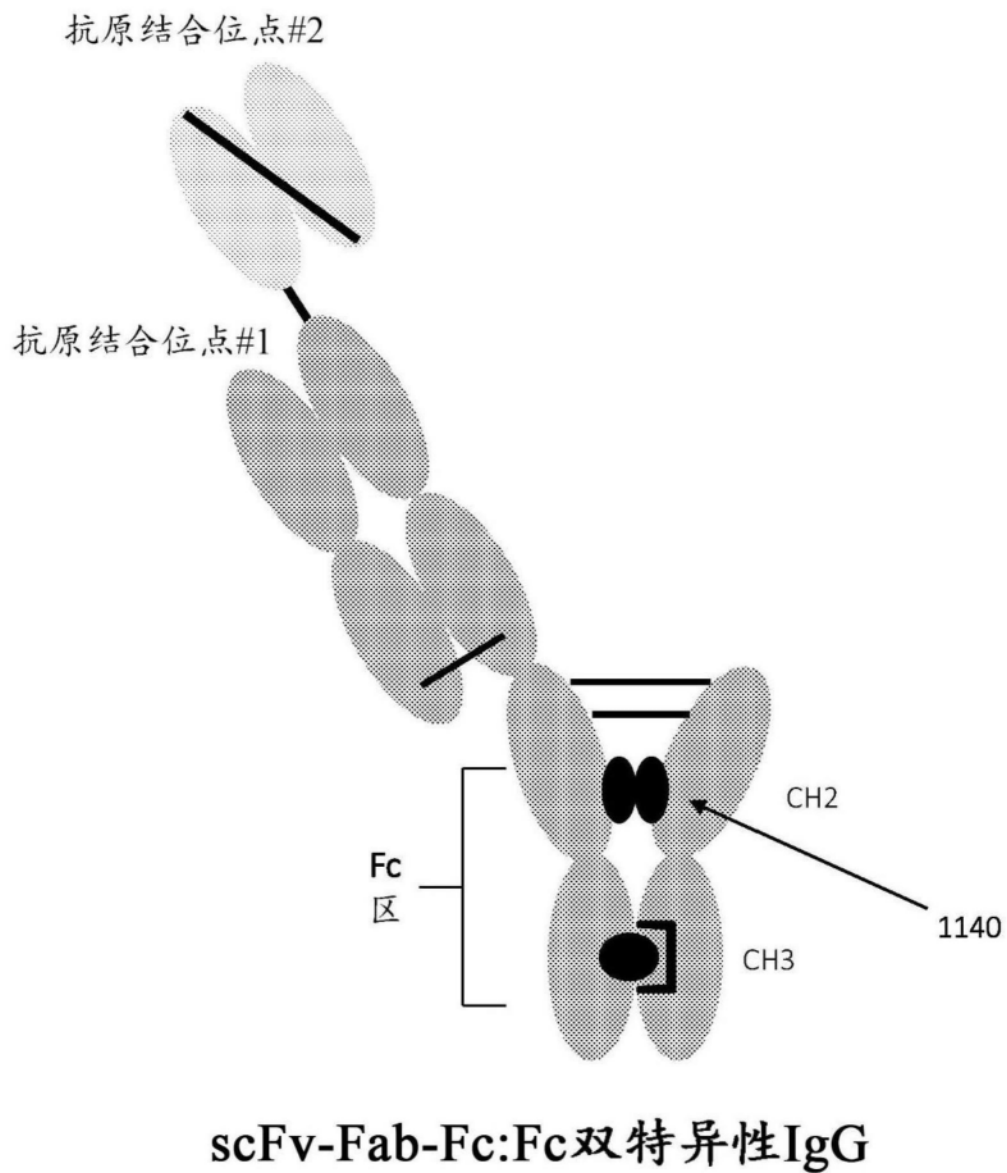


图11

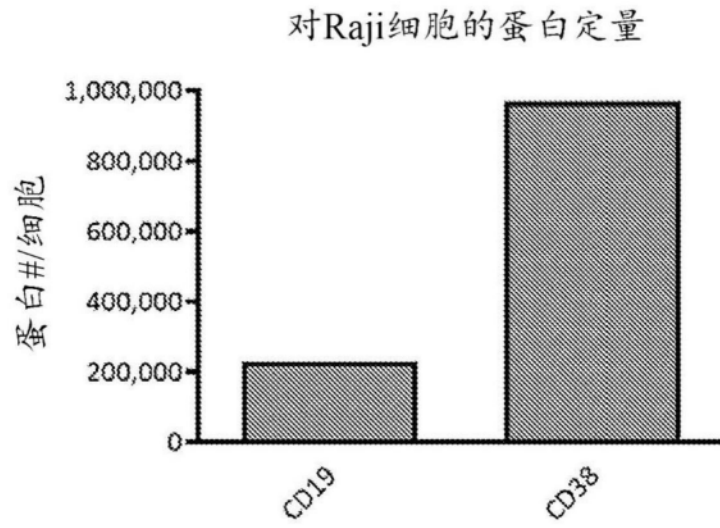


图12A

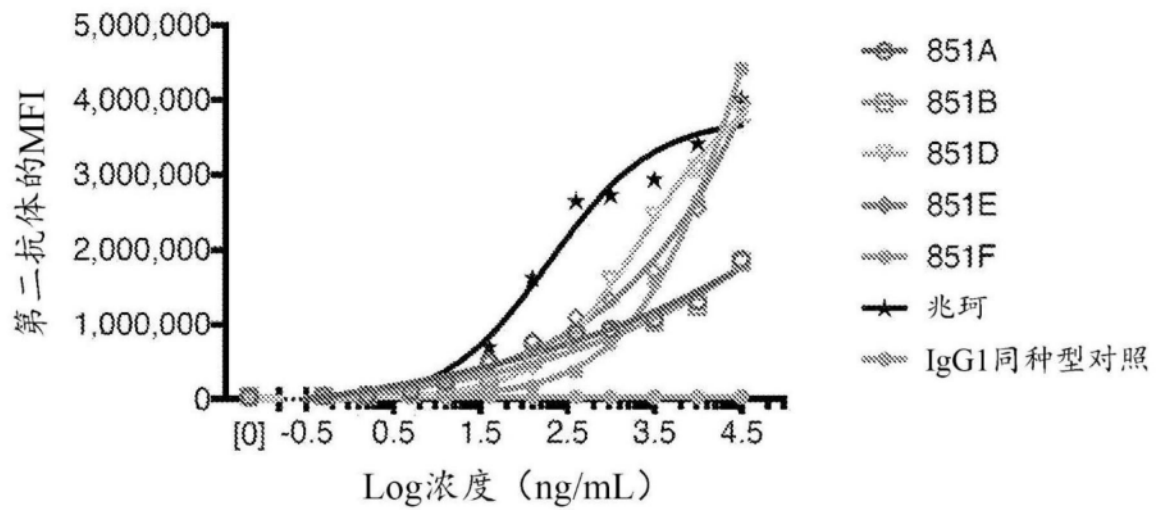


图12B

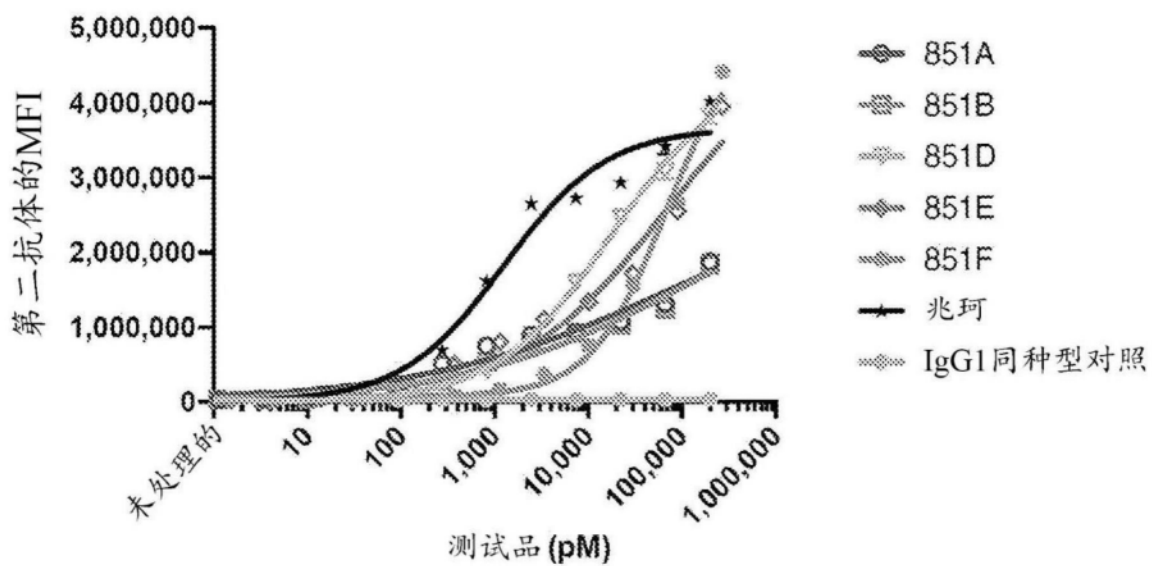


图12C

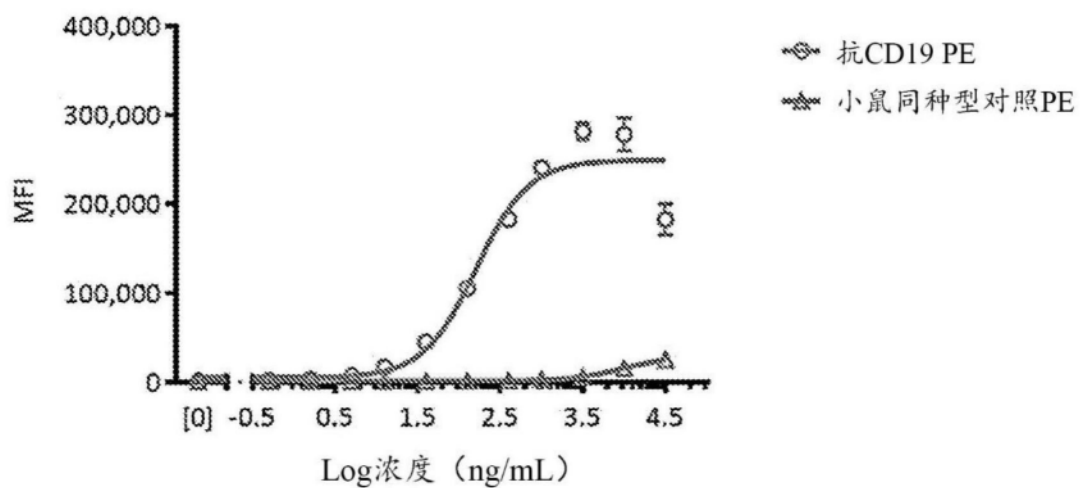


图12D

B55-01细胞结合: Raji

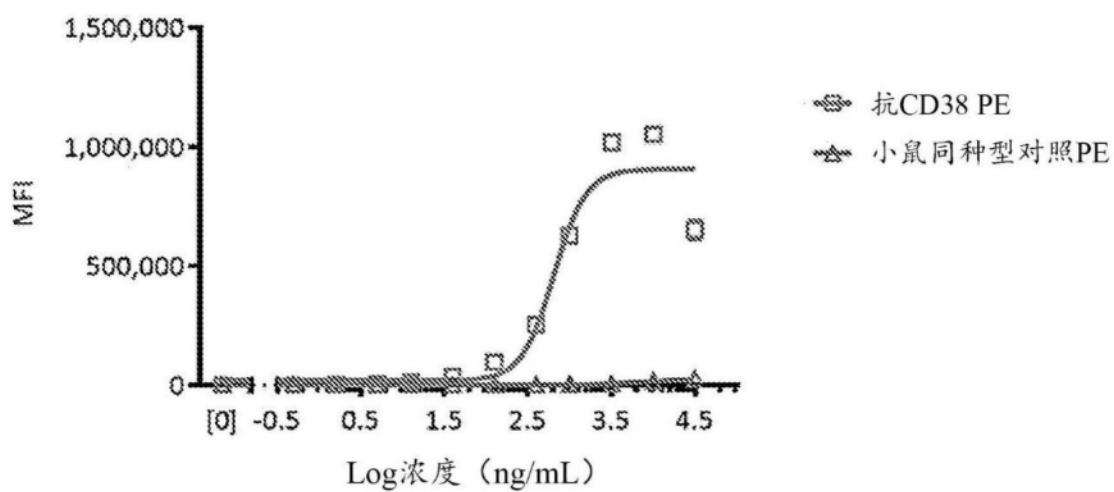


图12E

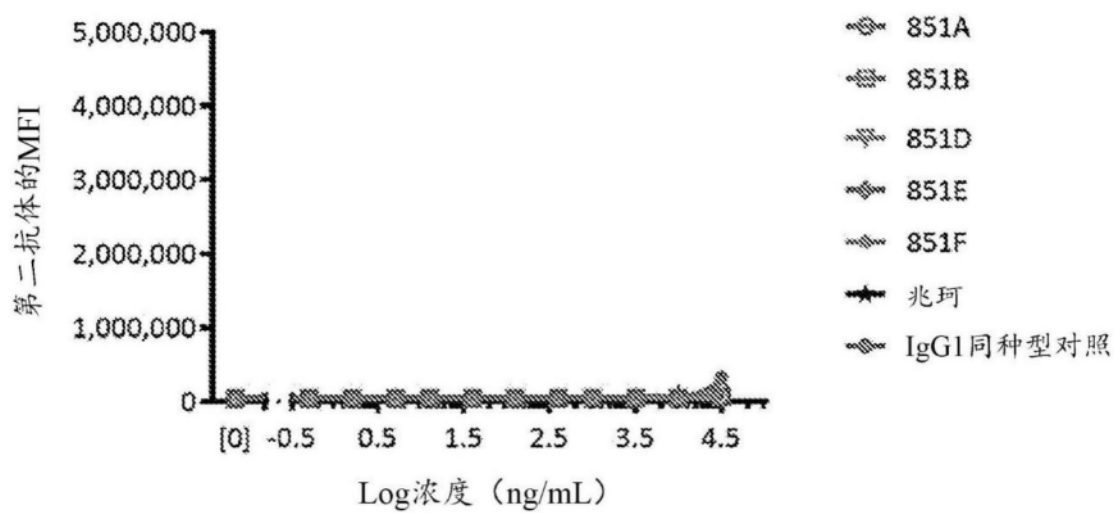


图12F

细胞结合: Daudi细胞

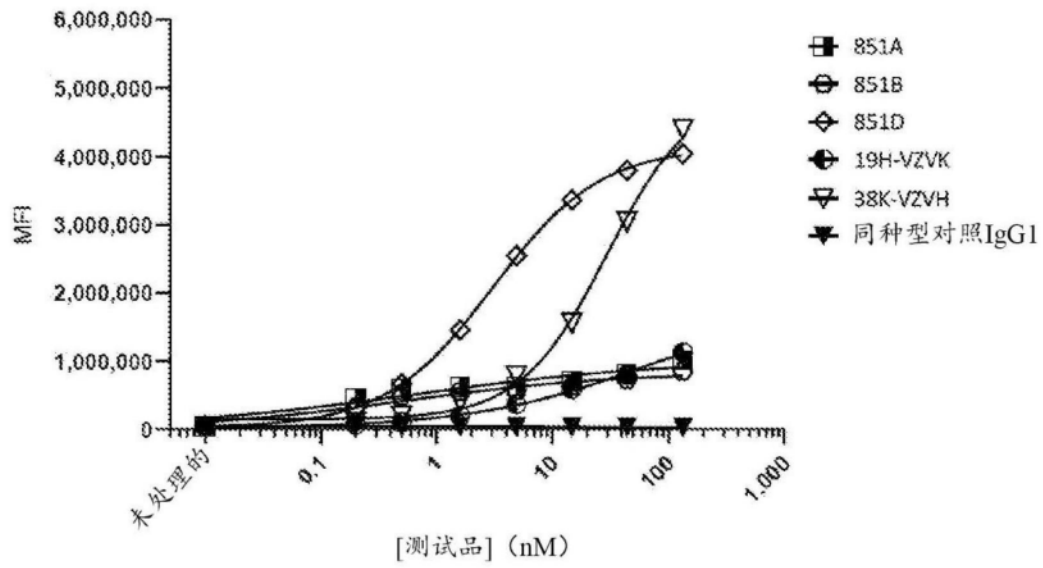


图13A

细胞结合: Daudi细胞

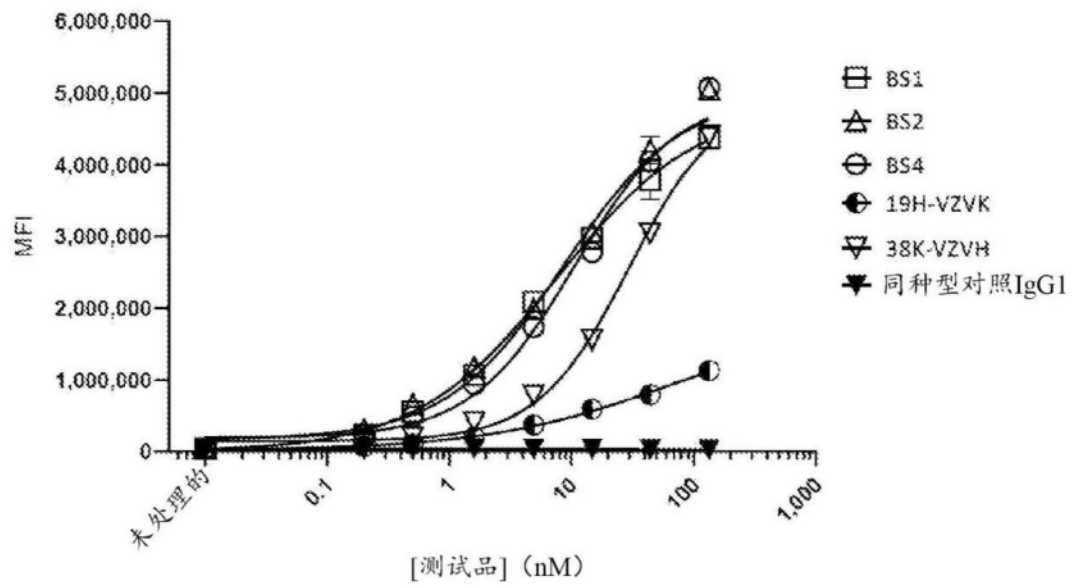


图13B

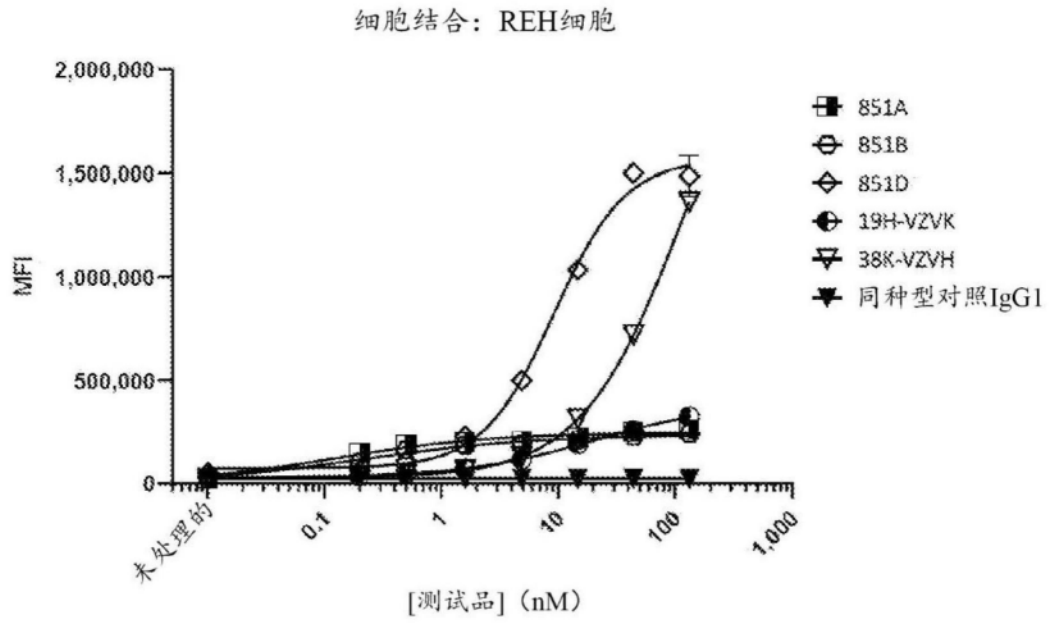


图14A

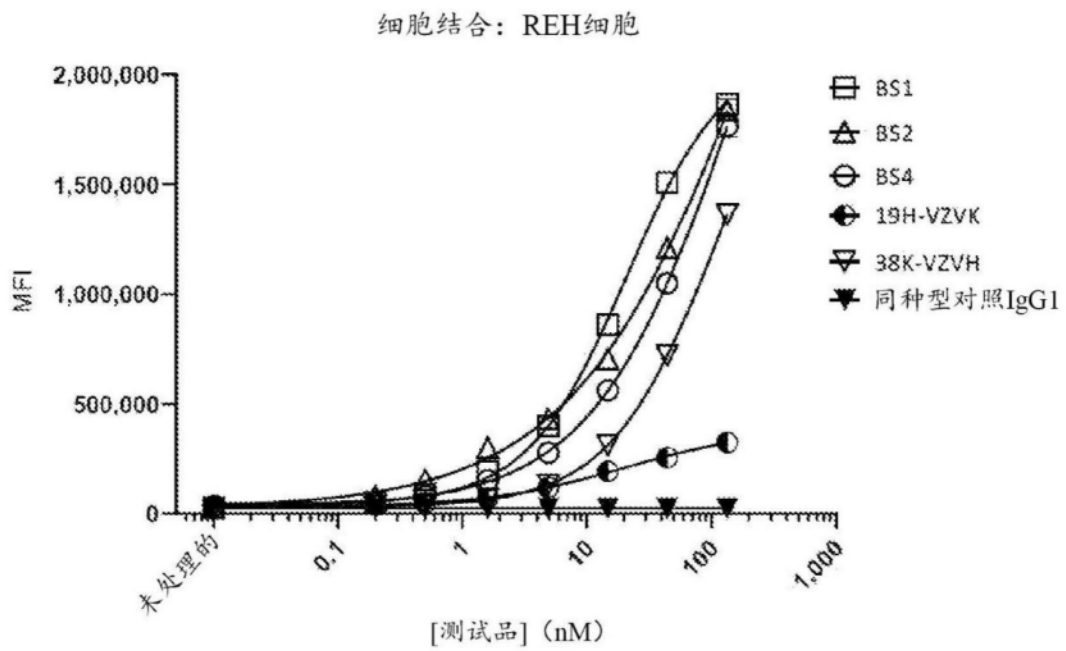


图14B

细胞结合: HEK293-CD19

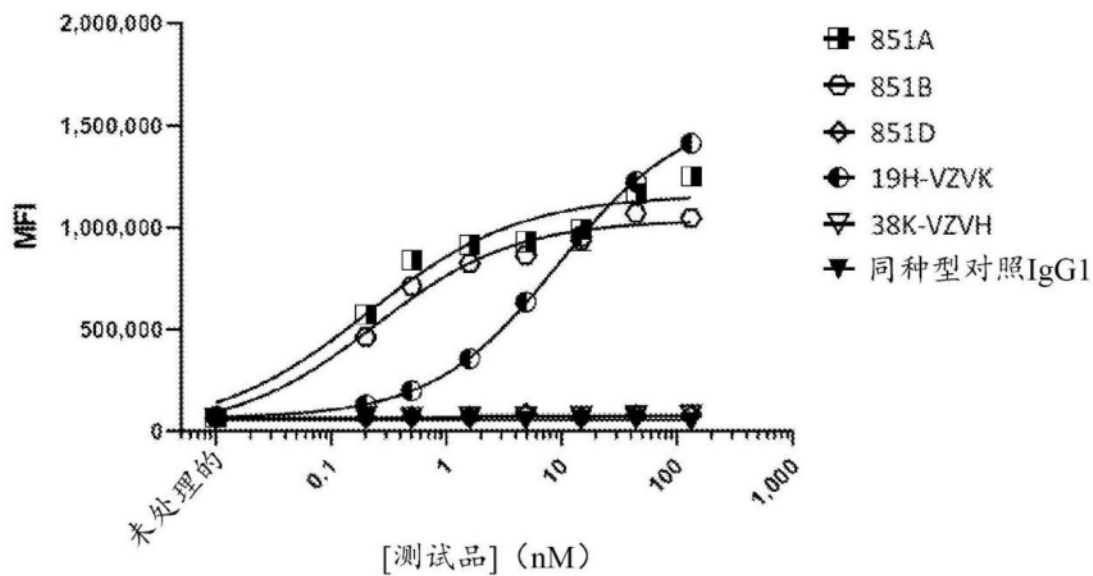


图15A

细胞结合: HEK293-CD19

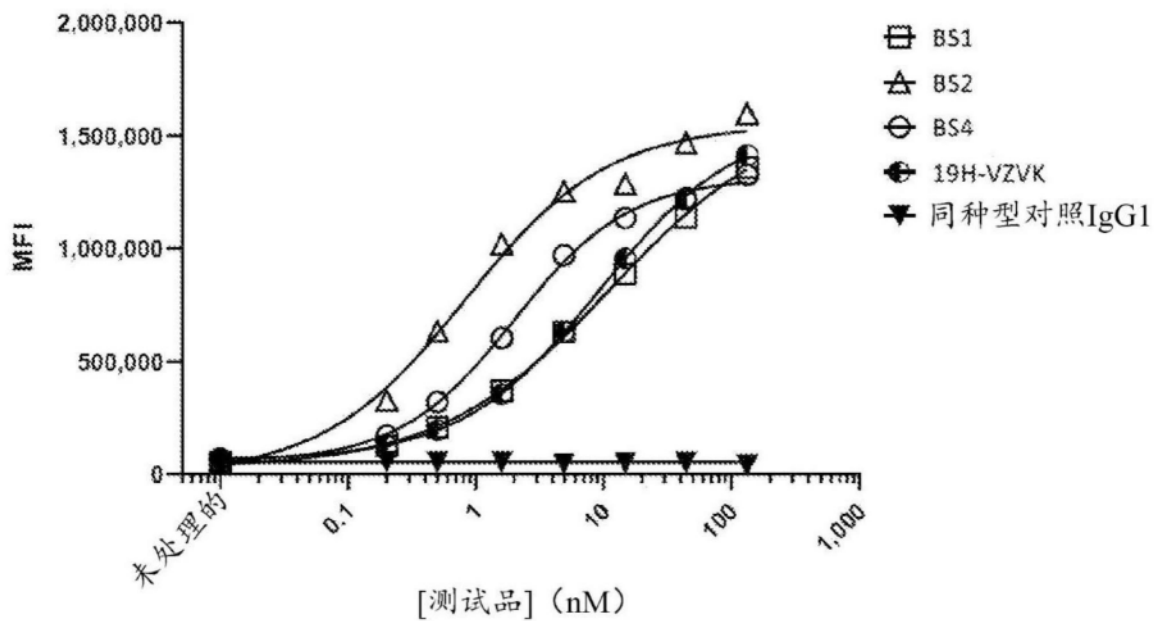


图15B

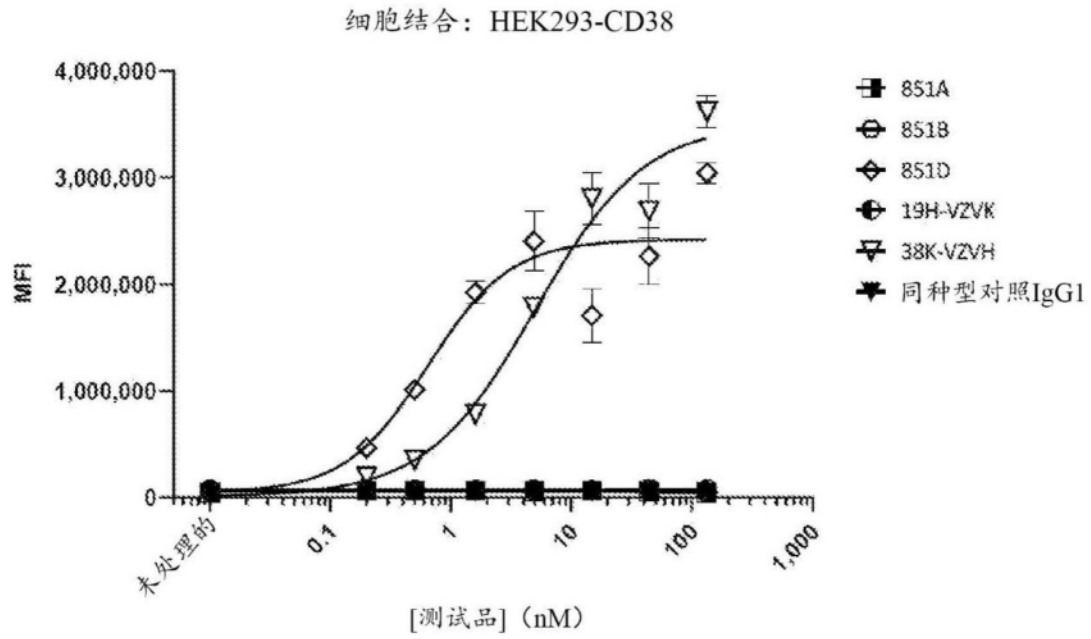


图16A

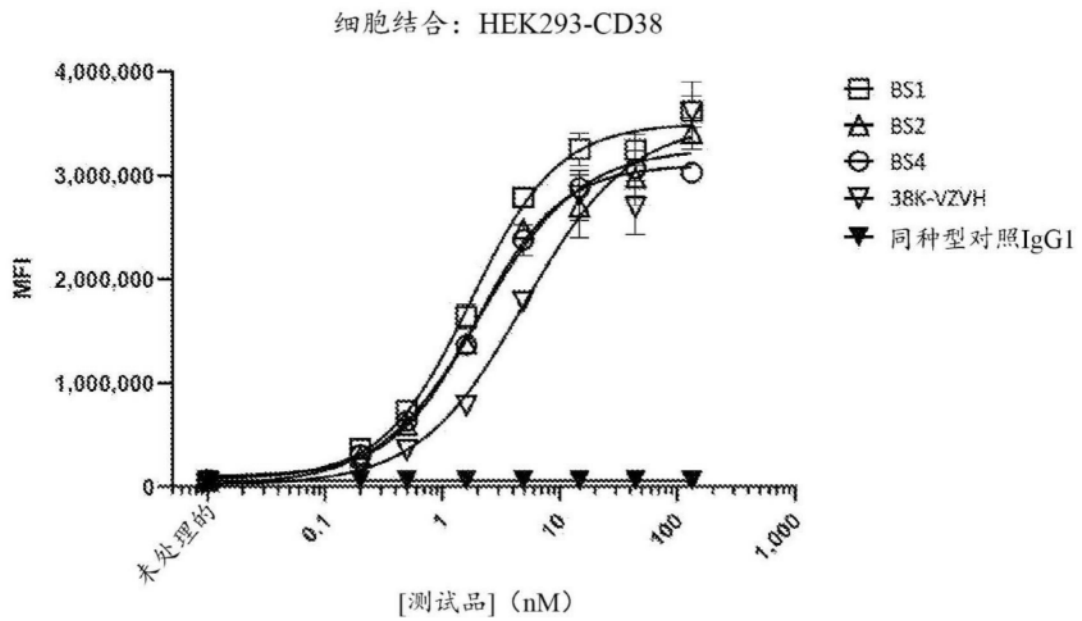


图16B

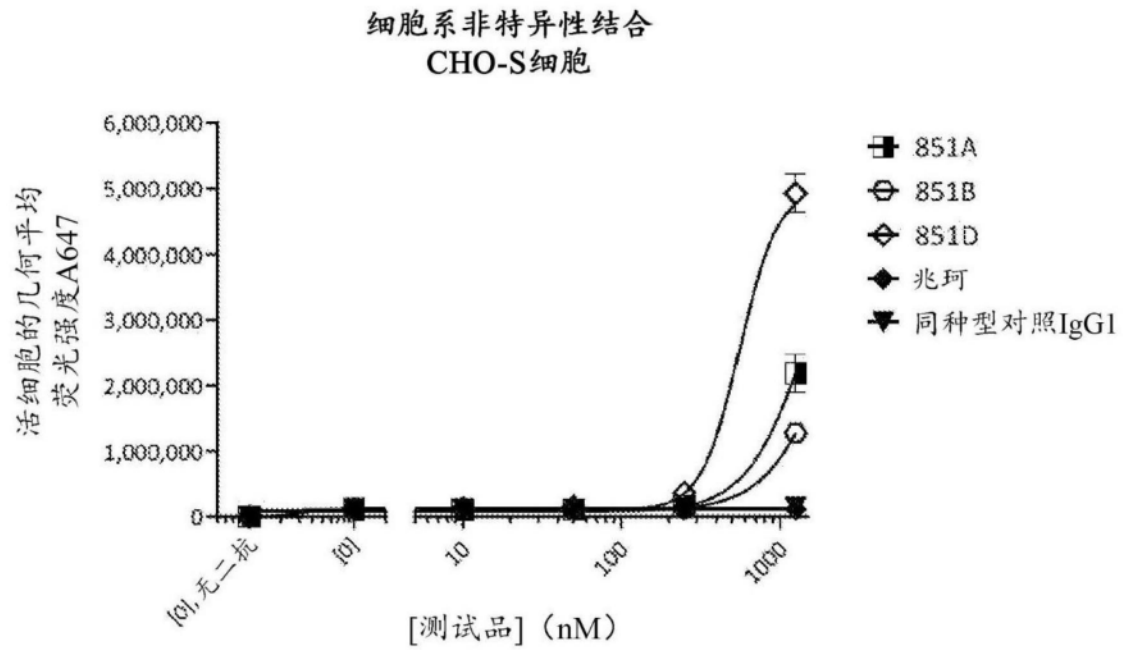


图17A

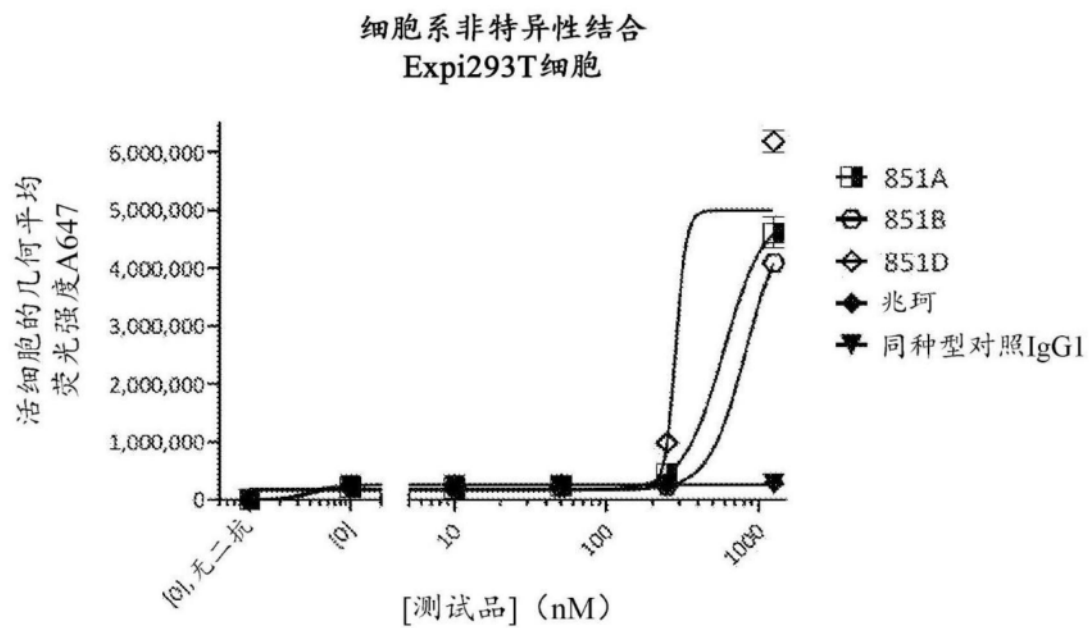


图17B

直接凋亡
Daudi细胞, 48小时

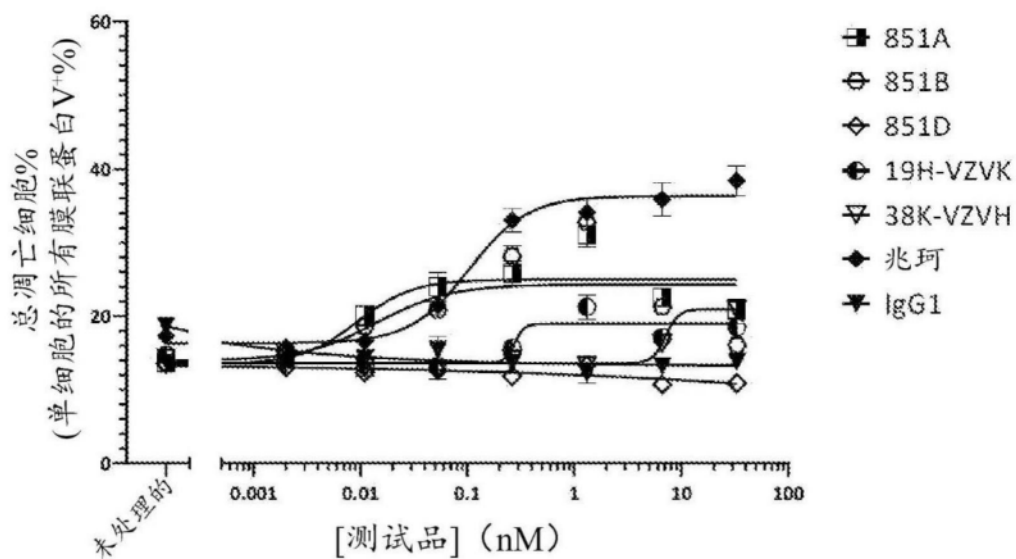


图18A

直接凋亡
Daudi细胞, 48小时

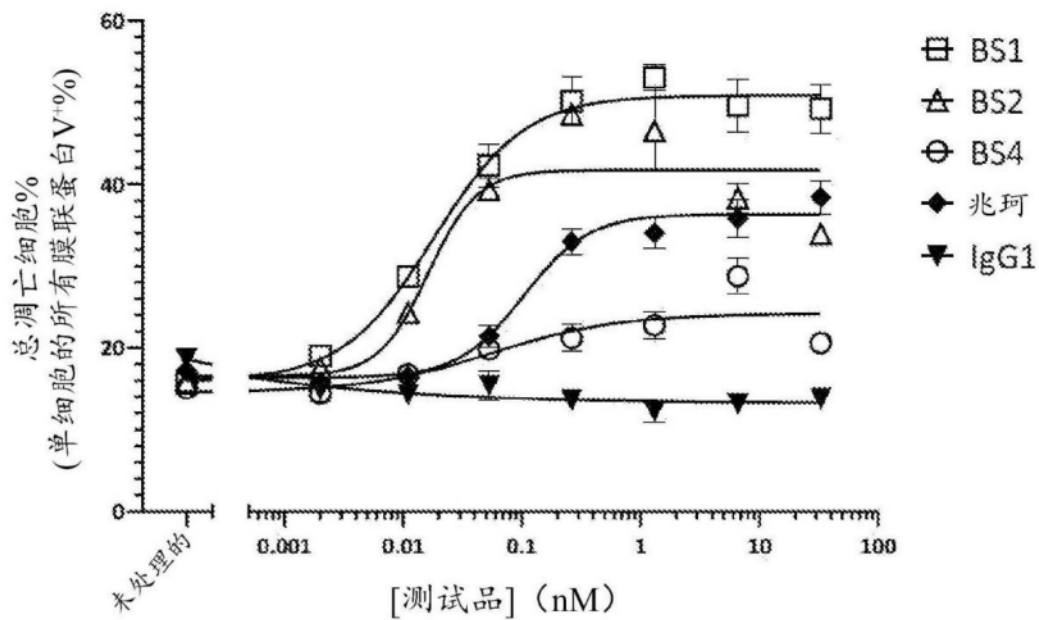


图18B

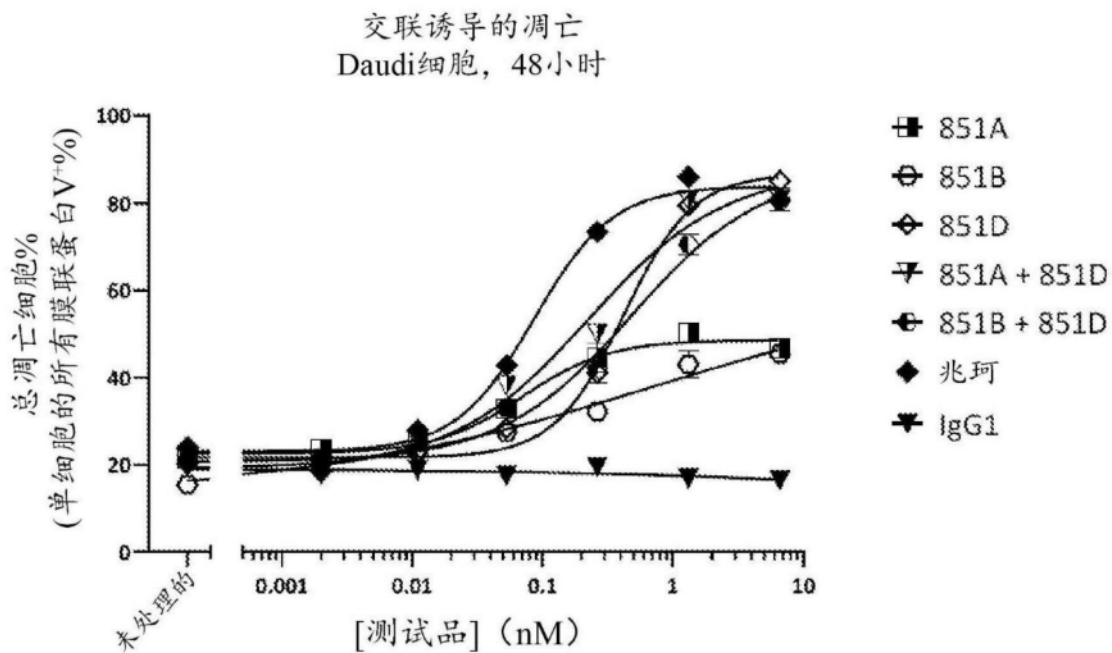


图19A

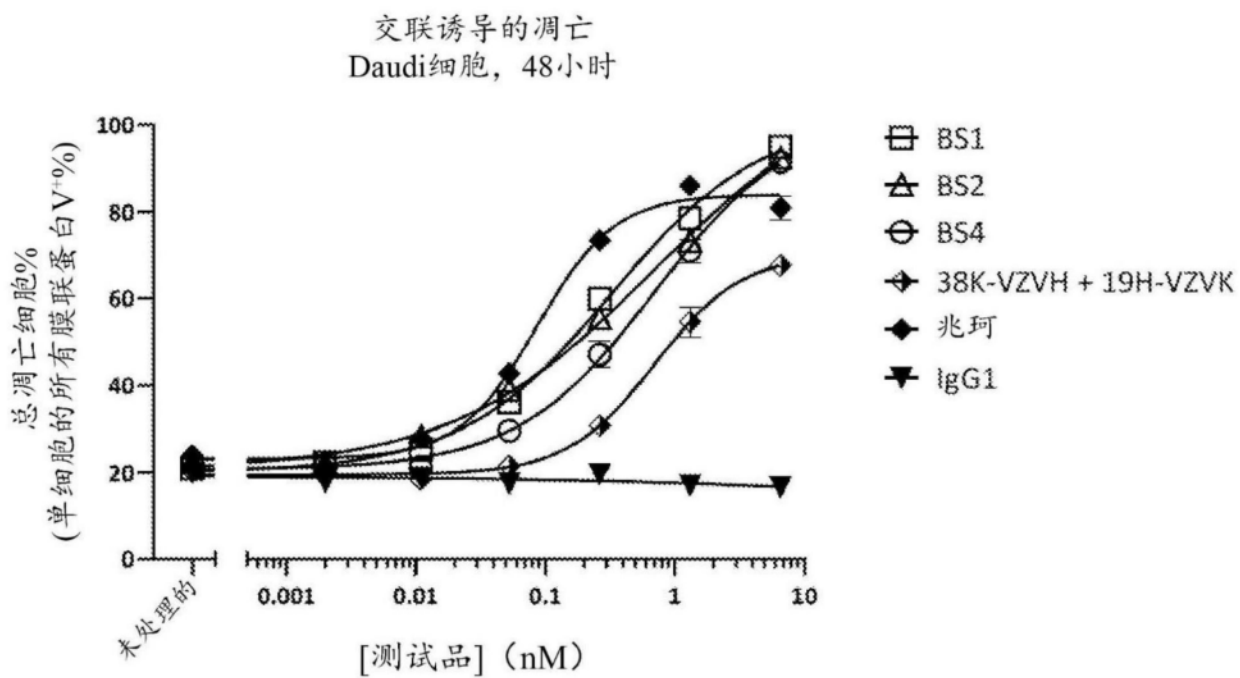


图19B

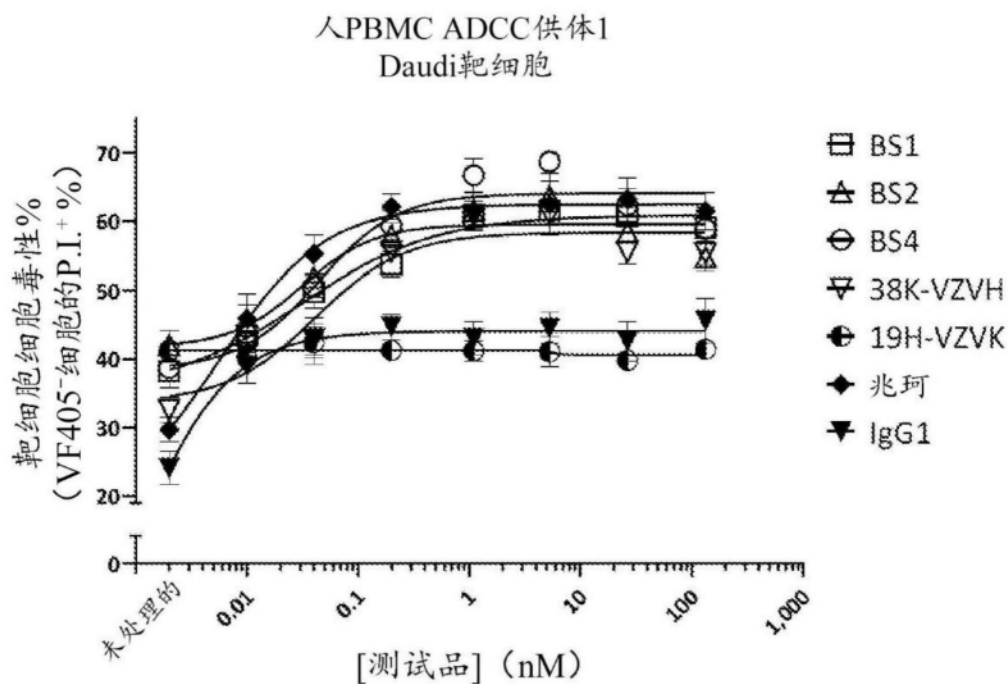


图20A

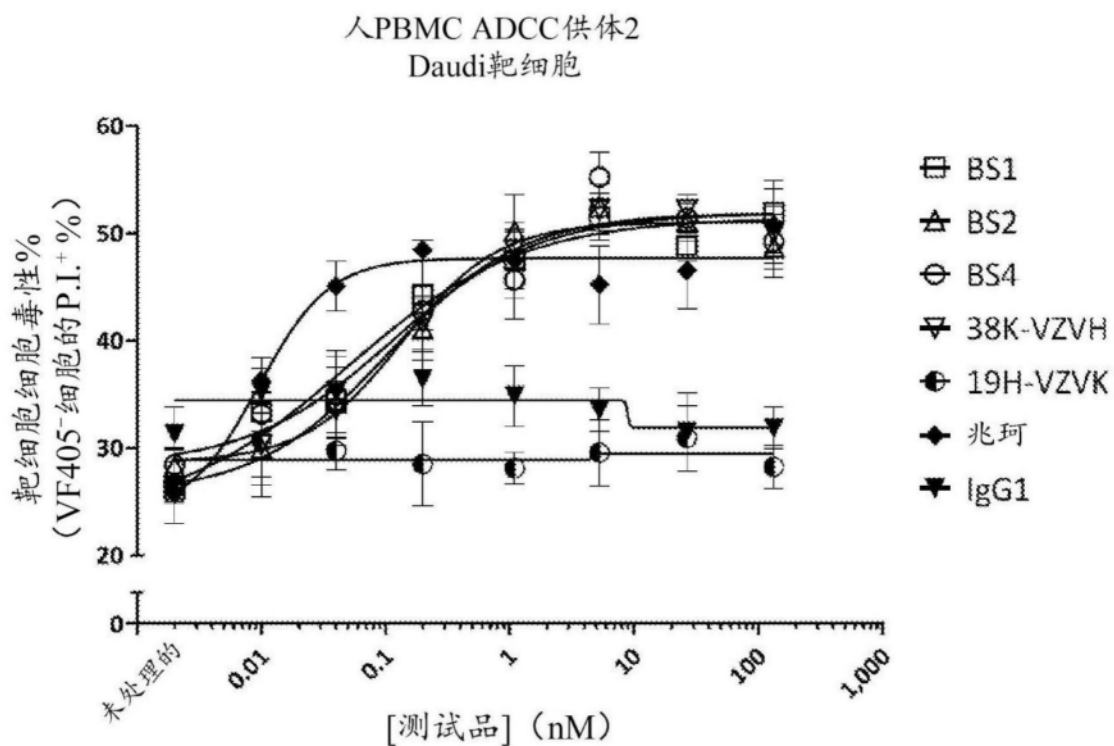


图20B

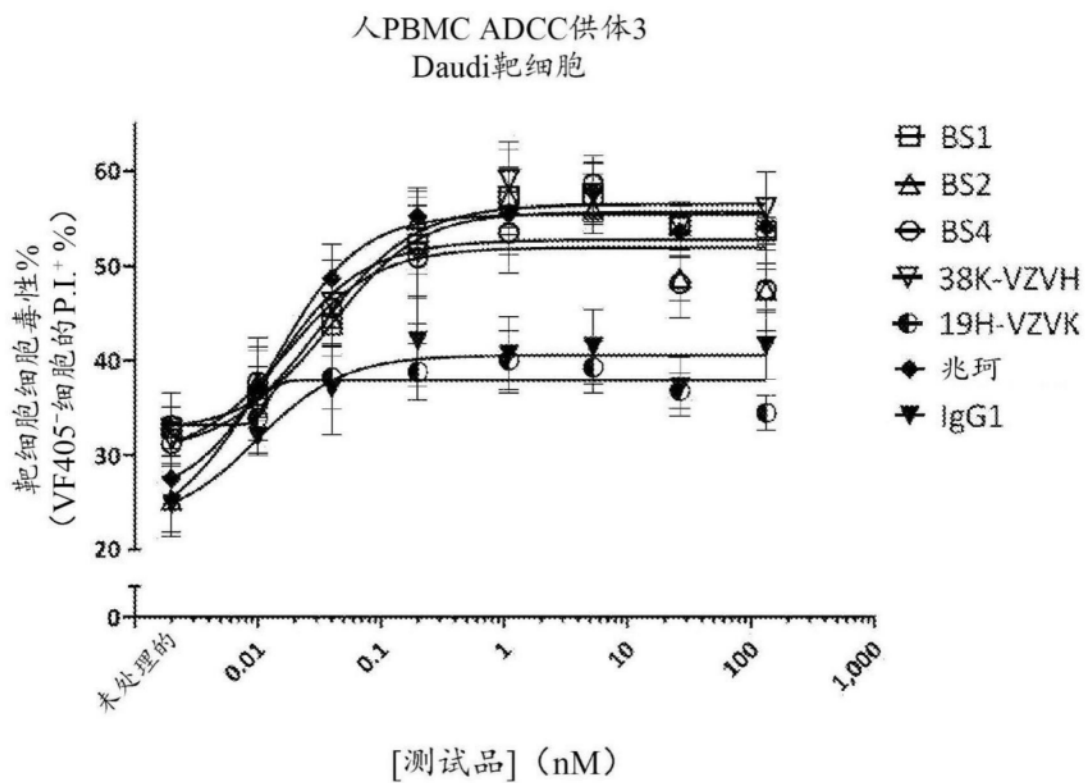


图20C

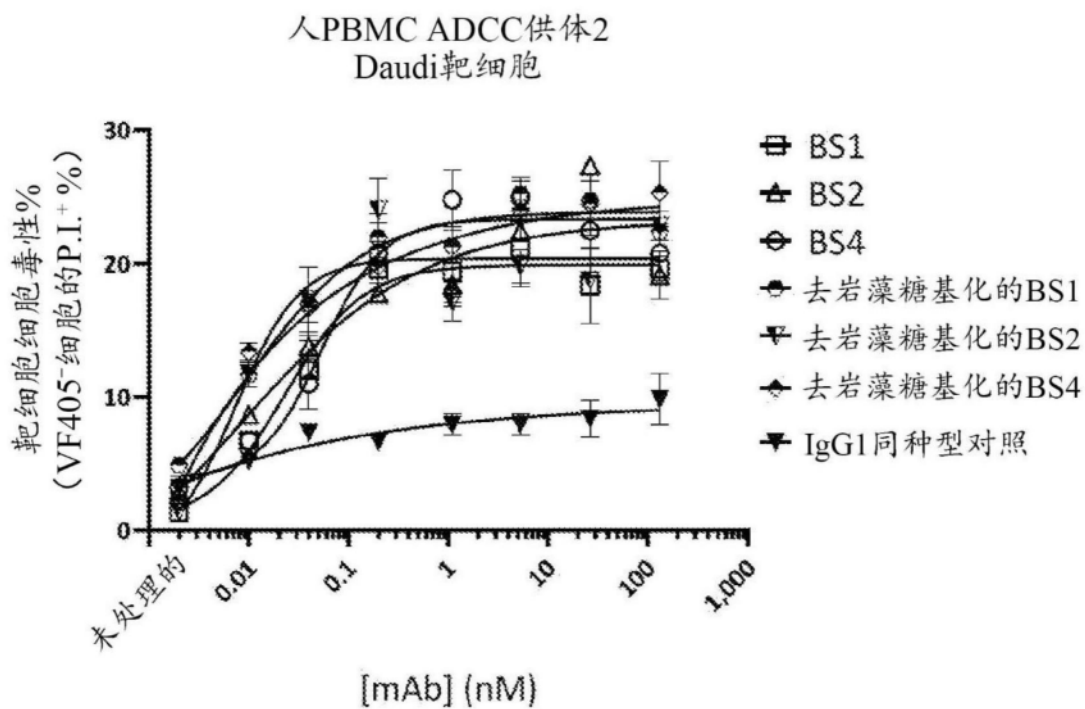


图21A

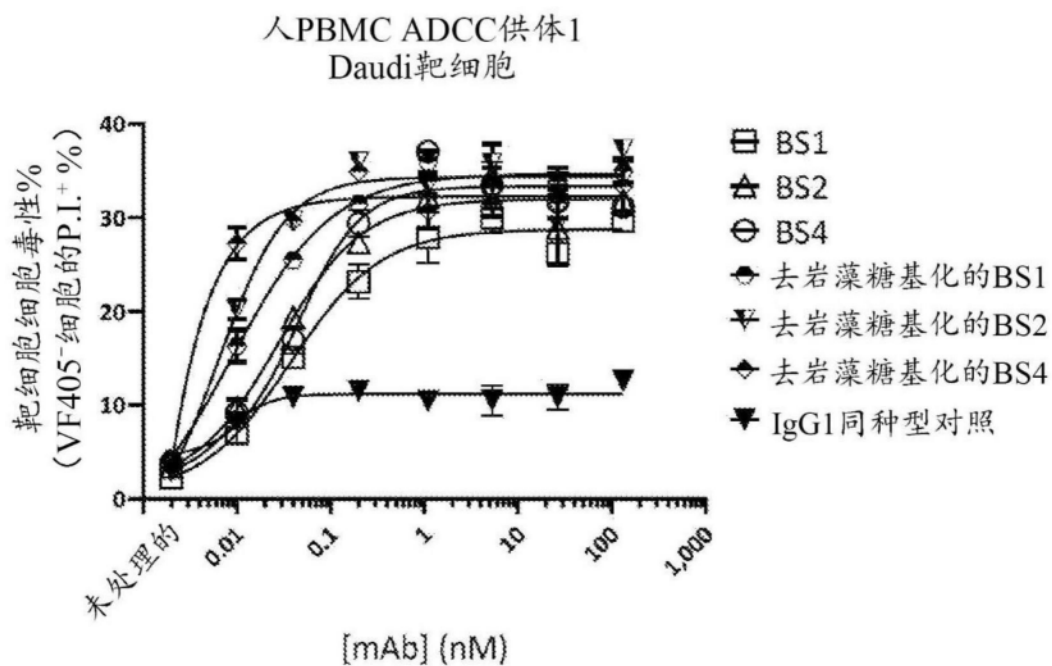


图21B

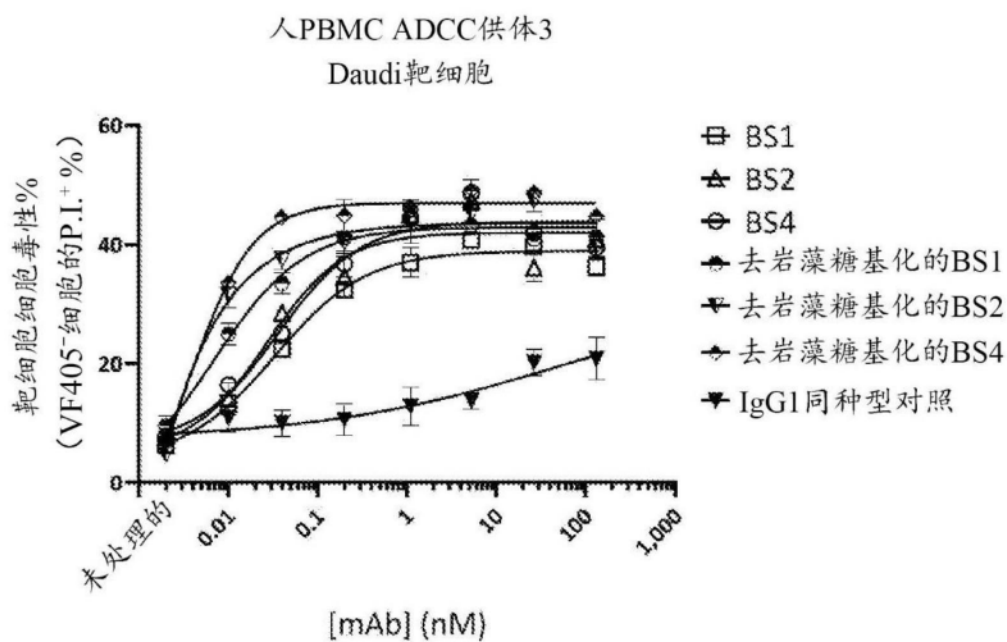


图21C

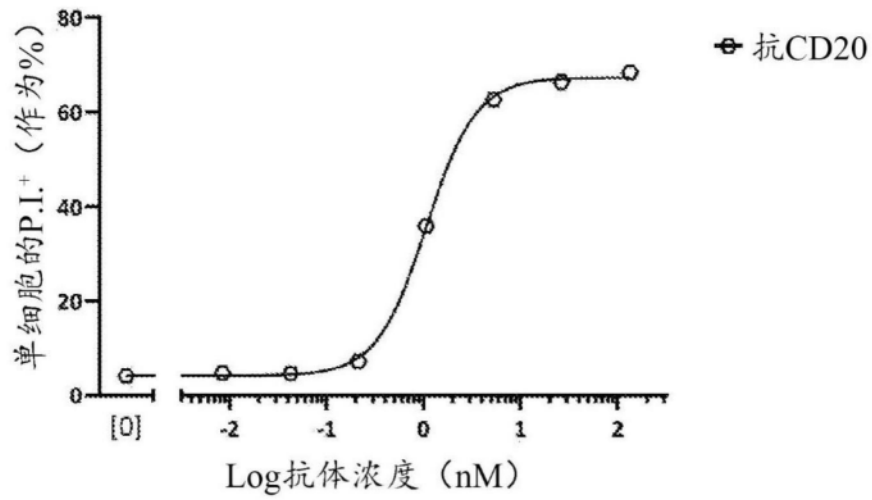
CDC人补体Raji细胞
(2小时)

图22A

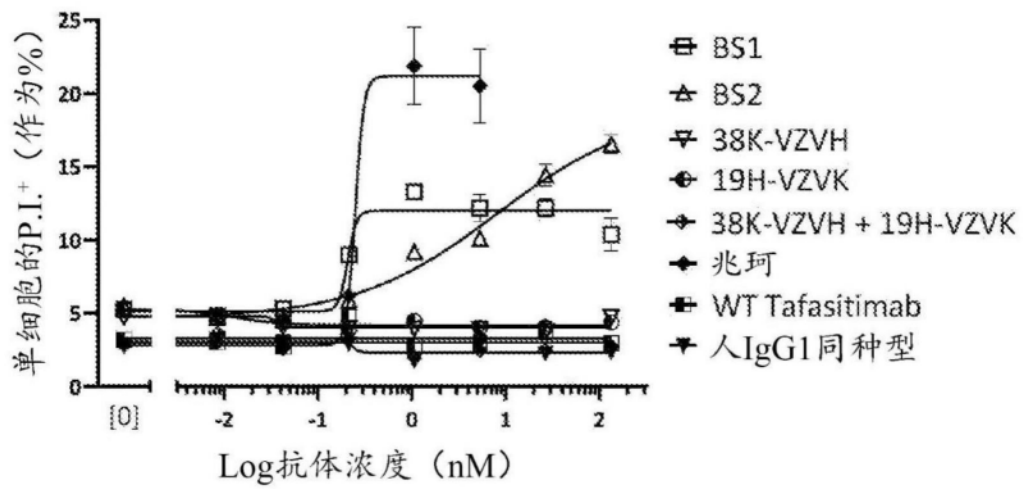
CDC人补体Raji细胞
(2小时)

图22B

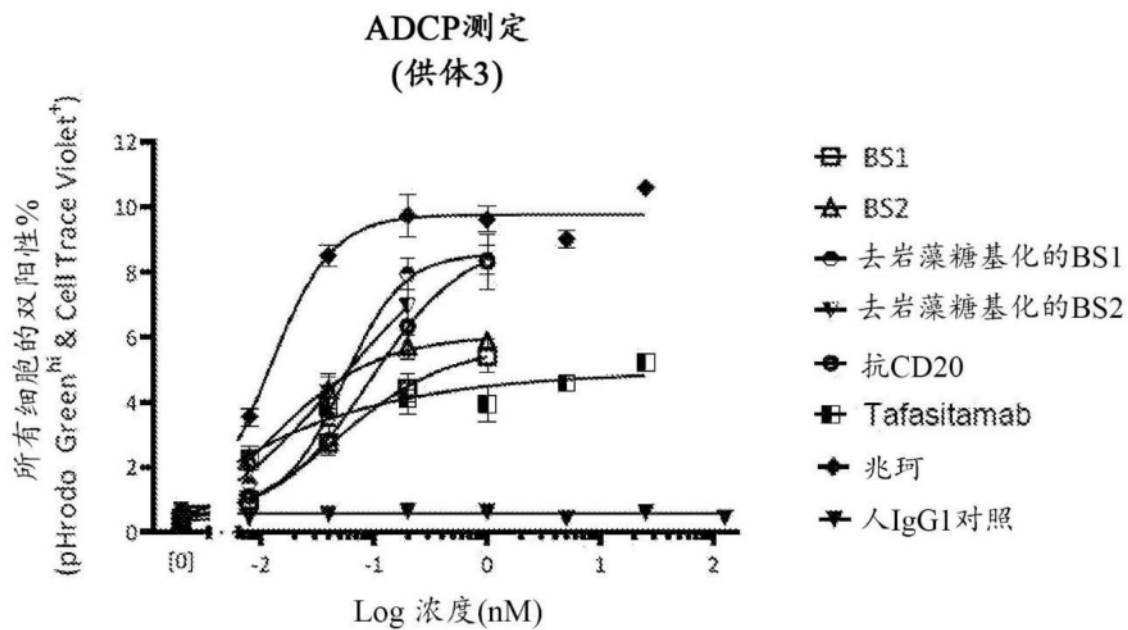


图23

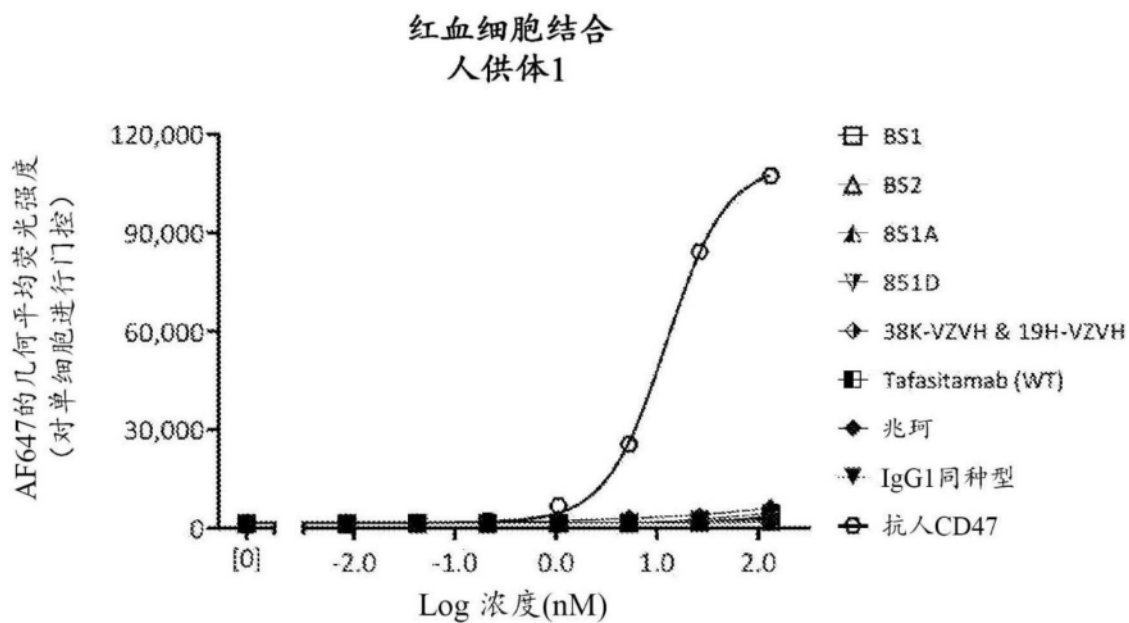


图24

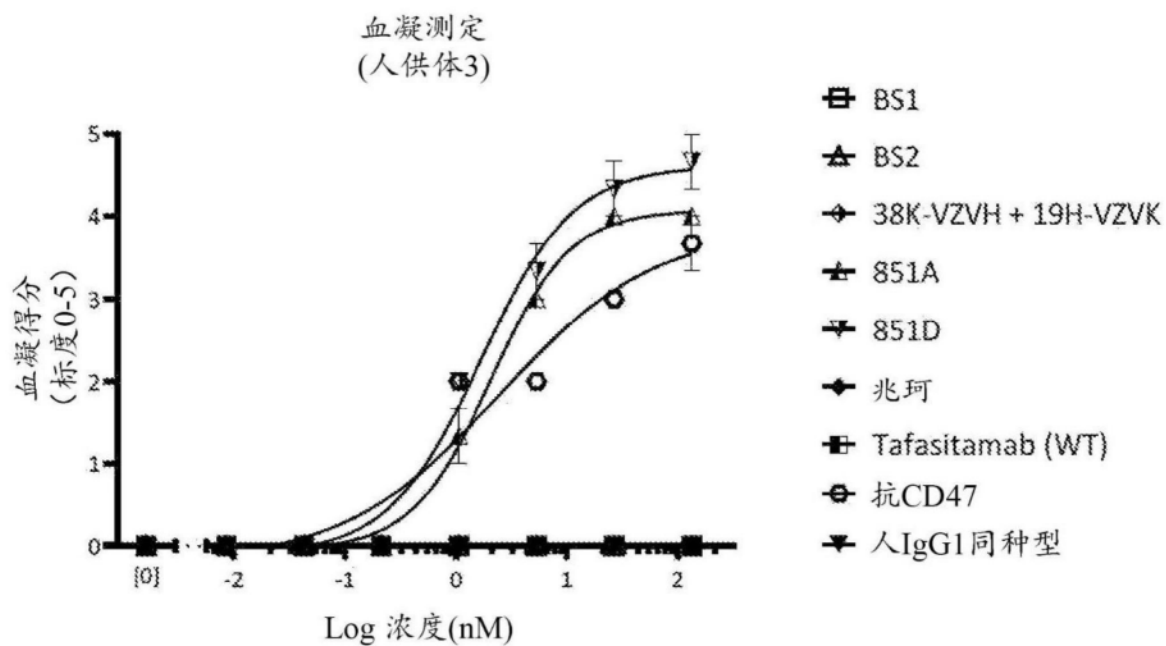


图25A

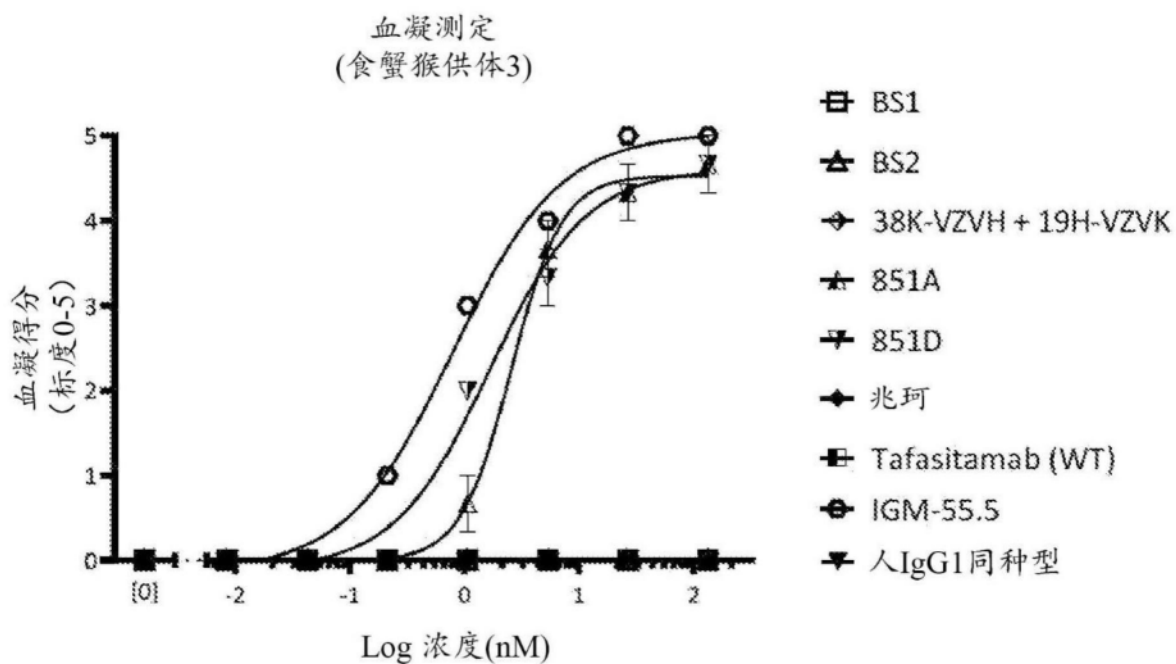


图25B

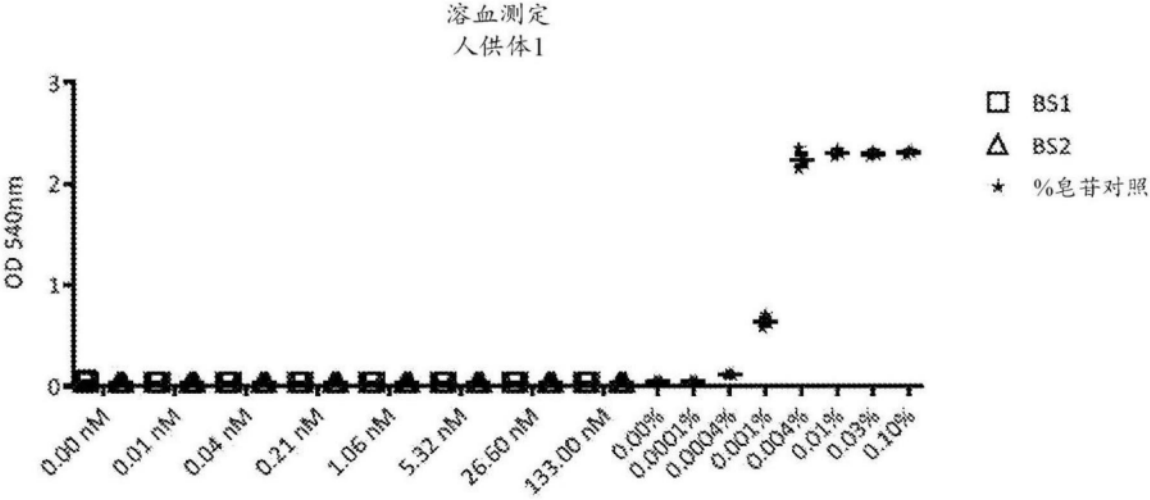


图26