



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107484416 A

(43)申请公布日 2017. 12. 15

(21)申请号 201580051198.9

S • 凯尼格

(22)申请日 2015.09.22

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所

11313

(30)优先权数据

62/055,695 2014.09.26 US

代理人 王建秀 郝名悦

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.03.22

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/051314 2015.09.22

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/048938 EN 2016.03.31

(71)申请人 宏观基因有限公司

地址 美国马里兰州

(72)发明人 莱斯利 • S • 约翰逊

埃兹奥 • 泊韦尼 郭家颖

保罗 • A • 摩尔 刘丽勤

权利要求书3页 说明书54页

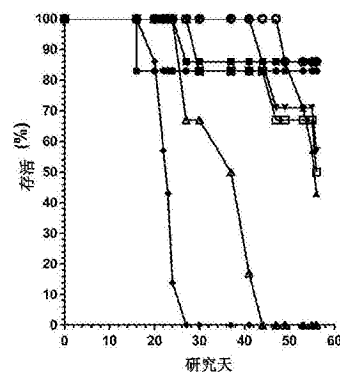
序列表25页 附图33页

(54)发明名称

能够结合CD19和CD3的双特异性单价双抗体
及其用途

(57)摘要

CD19x CD3双特异性单价双抗体,尤其是
CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体能够同时结合
CD19和CD3,并且用于治疗血液学恶性肿瘤。



◆ DART-A (500 µg/kg)
● DART-A (100 µg/kg)
○ DART-A (20 µg/kg)
▲ DART-A (4 µg/kg)
▼ DART-A (0.8 µg/kg)
□ DART-A (0.16 µg/kg)
◇ 对照 DART 1
→ 媒介

1. 能够特异性结合CD19和CD3的CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体, 其中所述双抗体包括第一多肽链、第二多肽链和第三多肽链, 其中所述多肽链形成共价结合的复合物, 和其中:

I. 所述第一多肽链在N-末端至C-末端方向上包括:

A. 结构域IA, 其包括

(1) 亚结构域(IA1), 其包括能够结合CD19 (VL_{CD19}) 或CD3 (VL_{CD3}) 的VL结构域; 和

(2) 亚结构域(IA2), 其包括能够结合CD19 (VH_{CD19}) 或CD3 (VH_{CD3}) 的VH结构域;

其中所述亚结构域IA1和IA2通过多肽连接体彼此分开, 并且是

(a) VL_{CD19}和VH_{CD3}; 或

(b) VL_{CD3}和VH_{CD19};

B. 结构域IB, 其包括带电的促进异源二聚体的结构域, 其中所述结构域IB通过多肽连接体与所述结构域IA分开;

C. 结构域IC, 其包括抗体的CH2-CH3结构域; 和

II. 所述第二多肽链在N-末端至C-末端方向上包括:

A. 结构域IIA, 其包括

(1) 亚结构域(IIA1), 其包括能够结合CD19 (VL_{CD19}) 或CD3 (VL_{CD3}) 的VL结构域; 和

(2) 亚结构域(IIA2), 其包括能够结合CD19 (VH_{CD19}) 或CD3 (VH_{CD3}) 的VH结构域;

其中所述亚结构域IIA1和IIA2通过多肽连接体彼此分开, 并且是:

(a) VL_{CD19}和VH_{CD3}, 前提是所述亚结构域IA1和IA2是VL_{CD3}和VH_{CD19}; 或

(b) VL_{CD3}和VH_{CD19}, 前提是所述亚结构域IA1和IA2是VL_{CD19}和VH_{CD3};

B. 结构域IIB, 其包括带电的促进异源二聚体的结构域, 其中所述结构域IIB通过多肽连接体与所述结构域IIA分开, 和其中所述结构域IB的所述带电的促进异源二聚体的结构域和所述结构域IIB的所述带电的促进异源二聚体的结构域具有相反的电荷; 和

III. 所述第三多肽链在N-末端至C-末端方向上包括结构域IIIC, 其包括抗体的CH2-CH3结构域;

其中所述VL_{CD19}和所述VH_{CD19}结构域形成CD19结合结构域, 和所述VL_{CD3}和VH_{CD3}结构域形成CD3结合结构域; 和所述第一多肽链和第三多肽链的所述CH2-CH3结构域形成能够结合Fc受体的Fc结构域, 从而形成所述CD19x CD3双特异性单价双抗体。

2. 权利要求1所述的CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体, 其中:

(A) 所述结构域IB和IIB各自包括半胱氨酸残基, 其经二硫键将所述第一多肽链共价结合至所述第二多肽链; 和

(B) 所述结构域IC和IIIC各自包括半胱氨酸残基, 其经二硫键将所述第一多肽链共价结合至所述第三多肽链。

3. 权利要求1-2任一项所述的CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体, 其中所述VL_{CD19}具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列和所述VH_{CD19}具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列。

4. 权利要求1-3任一项所述的CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体, 其中所述VL_{CD3}具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列和所述VH_{CD3}具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列。

5. 权利要求1-4任一项所述的CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体, 其中所述结构域IC的所述CH2-CH3结构域具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列和所述结构域IIIC的所述CH2-CH3结

构域具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

6. 权利要求1-5任一项所述的CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体,其中:

(A) 所述结构域IB的所述带电的促进异源二聚体的结构域具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列和所述结构域IIB的所述带电的促进异源二聚体的结构域具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列;或

(B) 所述结构域IB的所述带电的促进异源二聚体的结构域具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列和所述结构域IIB的所述带电的促进异源二聚体的结构域具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

7. 权利要求1-6任一项所述的CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体,其中:

(A) 所述第一多肽链具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列;

(B) 所述第二多肽链具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列;和

(C) 所述第三多肽链具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列。

8. 权利要求1-7任一项所述的CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体,其能够与人和灵长类动物CD19和CD3两者都交叉反应。

9. 权利要求1-8任一项所述的CD19 x CD3双特异性单价Fc双抗体,其用作药物。

10. 权利要求8所述的CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体,其用于治疗与CD19的表达相关或特征在于CD19的表达的疾病或病况。

11. 权利要求10所述的CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体,其中所述与CD19的表达相关或特征在于CD19的表达的疾病或病况是癌症。

12. 权利要求11所述的CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体,其中所述癌症选自:急性髓细胞样白血病(AML);慢性骨髓性白血病(CML),包括急变期CML和与CML相关的Abelson癌基因(Bcr-ABL易位);骨髓增生异常综合征(MDS);急性B成淋巴细胞性白血病(B-ALL);弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL);滤泡淋巴瘤;慢性淋巴细胞白血病(CLL),包括Richter综合症或CLL的Richter转化;毛细胞白血病(HCL);母细胞性浆细胞样树突细胞赘生物(BPDCN);非霍奇金淋巴瘤(NHL),包括套细胞白血病(MCL)和小淋巴细胞淋巴瘤(SLL);霍奇金淋巴瘤;系统性肥大细胞增生症;和伯基特淋巴瘤。

13. 共价结合的多肽复合物,其中所述多肽复合物包括第一多肽链和第二多肽链,其中:

(A) 所述第一多肽链包括具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的多肽,其连接至具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的促进异源二聚体的结构域;和

(B) 所述第二多肽链包括具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的多肽,其连接至具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的促进异源二聚体的结构域;

其中所述第一多肽链的所述促进异源二聚体的结构域和所述第二多肽链的所述促进异源二聚体的结构域经二硫键彼此共价结合。

14. 药学组合物,其包括权利要求1-12任一项所述的CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体和生理学上可接受的载体。

15. 权利要求14所述的药学组合物在治疗与CD19的表达相关或特征在于CD19的表达的疾病或病况中的用途。

16. 权利要求15所述的用途,其中所述与CD19的表达相关或特征在于CD19的表达的疾

病或病况是癌症。

17. 权利要求16所述的用途,其中所述癌症选自:急性髓细胞样白血病(AML);慢性骨髓性白血病(CML),包括急变期CML和与CML相关的Abelson癌基因(Bcr-ABL易位);骨髓增生异常综合征(MDS);急性B成淋巴细胞性白血病(B-ALL);弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL);滤泡淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL),包括Richter综合症或CLL的Richter转化;毛细胞白血病(HCL);母细胞性浆细胞样树突细胞赘生物(BPDCN);非霍奇金淋巴瘤(NHL),包括套细胞白血病(MCL)和小淋巴细胞淋巴瘤(SLL);霍奇金淋巴瘤;系统性肥大细胞增生症;和伯基特淋巴瘤。

能够结合CD19和CD3的双特异性单价双抗体及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求美国临时专利申请系列号62/055,695 (2014年9月26日提交的;待决)的优先权,该申请通过引用以其整体并入本文。

[0003] 参考序列表

[0004] 根据37 C.F.R.1.821以及下面的条款,本申请包括一个或多个序列表,其以计算机可读介质(文件名:1301_0116PCT_Sequence_Listing_ST25.txt,2015年9月18日创建,并且大小为47,329字节)的形式公开,该文件通过引用以其整体并入本文。

技术领域

[0005] 本发明涉及双特异性单价双抗体,其包括两条多肽链并且其具有对CD19的表位特异的一个结合位点和对CD3的表位特异的一个结合位点(即,“CD19x CD3双特异性单价双抗体”)。最优选地,这样的CD19x CD3双特异性单价双抗体由三条多肽链组成,并且具有对CD19的表位特异的一个结合位点和对CD3的表位特异的一个结合位点并且另外包括免疫球蛋白Fc结构域(即,“CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体”)。本发明的双特异性单价双抗体和双特异性单价Fc双抗体能够同时结合CD19和CD3。本发明涉及包含这样的双特异性单价双抗体或这样的双特异性单价Fc双抗体的药学组合物。本发明另外涉及这样的双抗体在治疗疾病,尤其是血液学恶性肿瘤中使用的方法。

背景技术

[0006] A.CD19

[0007] CD19 (B淋巴细胞表面抗原B4,Genbank登录号M28170) 是免疫球蛋白超家族的95kDa I型跨膜糖蛋白 (Stamenkovic,I.等(1988) “CD19,The Earliest Differentiation Antigen Of The B Cell Lineage,Bears Three Extracellular Immunoglobulin-Like Domains And An Epstein-Barr Virus-Related Cytoplasmic Tail,”J.Exper.Med.168 (3):1205-1210;Tedder,T.F.等(1989) “Isolation Of cDNAs Encoding The CD19 Antigen Of Human And Mouse B Lymphocytes.A New Member Of The Immunoglobulin Superfamily,”J.Immunol.143 (2):712-717;Zhou,L.J.等(1991) “Structure And Domain Organization Of The CD19 Antigen Of Human,Mouse,And Guinea Pig B Lymphocytes.Conservation Of The Extensive Cytoplasmic Domain,”J.Immunol.147 (4):1424-1432)。当CD19表达下调时,在重链重排至浆细胞阶段时,CD19在滤泡树突细胞上和来自早期前B细胞的所有B细胞上表达。在祖B细胞 (pro-B cell) 阶段之前,CD19不在造血干细胞或B细胞上表达 (Sato等(1995) “CD19Signal Transduction Molecule Is A Response Regulator Of B-Lymphocyte Differentiation,”Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.) 92:11558-62;Loken等(1987) “Flow Cytometric Analysis of Human Bone Marrow.II.Normal B Lymphocyte Development,”Blood,70:1316-1324;Wang等(2012) “CD19:A Biomarker For B Cell Development,Lymphoma Diagnosis And Therapy,”

Exp.Hematol.and Oncol.1:36)。

[0008] CD19是B细胞-受体 (BCR) 复合物的组分,并且是B细胞信号传导的正调节物,其调节B细胞激活和体液免疫的阈值。CD19通过两个细胞外C2型Ig样结构域与CD21 (CR2、C3d片段受体) 和CD81相互作用,与CD225一起形成BCR复合物。CD19的细胞内结构域涉及细胞内信号传导级联放大,主要是但不是仅仅调节BCR和CD22下游的信号 (Mei等 (2012) “Rationale of Anti-CD19 Immunotherapy:An Option To Target Autoreactive Plasma Cells In Autoimmunity,”Arthritis Res and Ther.14 (Suppl.5):S1;Wang等 (2012) “CD19:A Biomarker For B Cell Development,Lymphoma Diagnosis And Therapy,”Exp.Hematol.and Oncol.1:36);Del Nagro等 (2005) “CD19 Function in Central and Peripheral B-Cell Development,”Immunologic Res.31:119-131)。

[0009] CD19的若干特性提示其作为免疫疗法的靶标的可能的潜力。CD19是B细胞系中最广泛表达的抗原之一,并且在>95%的B细胞恶性肿瘤,包括急性成淋巴细胞白血病 (ALL)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 和非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 上表达 (Wilson,K.等 (2010) “Flow Minimal Residual Disease Monitoring Of Candidate Leukemic Stem Cells Defined By The Immunophenotype,CD34+CD38lowCD19+In B-Lineage Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia,”Haematologica 95 (4):679-683;Maloney,D.G.等 (1997) “IDEC-C2B8 (Rituximab) Anti-CD20 Monoclonal Antibody Therapy In Patients With Relapsed Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma,”Blood 90 (6):2188-2195;Vose,J.M. (1998) “Current Approaches To The Management Of Non-Hodgkin's Lymphoma,”Semin.Oncol.25 (4):483-491;Nagorsen,D.等 (2012) “Blinatumomab:A Historical Perspective,”Pharmacol.Ther.136 (3):334-342;Topp,M.S.等 (2011) “Targeted Therapy With The T-Cell-Engaging Antibody Blinatumomab Of Chemotherapy-Refractory Minimal Residual Disease In B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Results In High Response Rate And Prolonged Leukemia-Free Survival,”J.Clin Oncol.2011 Jun 20;29 (18):2493-2498;Nadler,等 (1983) “B4,A Human B Lymphocyte-Associated Antigen Expressed On Normal,Mitogen-Activated,And Malignant B Lymphocytes.”J.Immunol.;131:244-250;Ginaldi等 (1998) “Levels Of Expression Of CD19 And CD20 In Chronic B Cell Leukaemias,”J.Clin.Pathol.51:364-369;Anderson等 (1984) “Expression of Human B Cell-Associated Antigens on Leukemias and Lymphomas:A Model of Human B Cell Differentiation,”Blood 63:1424-1433)。CD19在少数其他细胞类型上表达,如果存在的话,并且也不在最终分化的浆细胞上表达,其因此通过CD19导向的治疗可以是节省的。CD19不流入循环,并且可快速内化 (Ma等 (2002) “Radioimmunotherapy For Model B Cell Malignancies Using 90Y-Labeled Anti-CD19 And Anti-CD20 Monoclonal Antibodies,”Leukemia 16:60-66;Raufi等 (2013) “Targeting CD19 in B-cell lymphoma:emerging role of SAR3419,”Cancer Management Res 3:225-233)。值得注意的是,CD19表达保持在B细胞淋巴瘤上,其对抗-CD20疗法变得有抗性 (Davis等 (1999) “Therapy of B-cell Lymphoma With Anti-CD20 Antibodies Can Result In The Loss Of CD20 Antigen Expression.”Clin Cancer Res,5:611-615,1999)。也已经建议CD19作为治疗自身免疫疾病的靶标 (Tedder (2009)

“CD19:A Promising B Cell Target For Rheumatoid Arthritis,” Nat.Rev.Rheumatol.5:572-577)。

[0010] B细胞恶性肿瘤代表各种各样的具有广泛不同特征和临床行为的疾病。历史上,具有症状疾病的大部分患者接受非交叉反应的遗传毒性剂的组合,期望实现持久的缓解和在一些情况下治愈。尽管有效,但是许多传统的方案也涉及大量的急性和长期毒性(见,例如,Stock,W.等(2013)“Dose Intensification Of Daunorubicin And Cytarabine During Treatment Of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia:Results Of Cancer And Leukemia Group B Study 19802,”Cancer.2013 Jan 1;119(1):90-98)。抗CD20单克隆抗体利妥昔单抗(rituximab)用于治疗许多B细胞病症,其中其可与“护理标准(standard of care)”剂组合使用或作为单剂使用(Fowler等(2013)“Developing Novel Strategies to Target B-Cell Malignancies,”Targeted Pathways,B-Cell Lymphoma in ASCO Educational Book,366-372页;Bargou,R.等(2008)“Tumor Regression In Cancer Patients By Very Low Doses Of A T Cell-Engaging Antibody,”Science321(5891):974-977;Thomas,D.A.等(2010)“Chemoimmunotherapy With A Modified Hyper-CVAD And Rituximab Regimen Improves Outcome In De Novo Philadelphia Chromosome-Negative Precursor B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia,”J.Clin.Oncol.28(24):3880-3889)。尽管令人鼓舞的临床结果,但是用单剂利妥昔单抗再治疗患无痛淋巴瘤的患者与仅仅40%的应答率相关,表明作为对延长暴露于利妥昔单抗的响应,在恶性B细胞中可能出现了抗性(Smith(2003)“Rituximab(Monoclonal Anti-CD20 Antibody):Mechanisms Of Action And Resistance.”Oncogene.22:7359-68;Davis等(1999)“Therapy of B-cell Lymphoma With Anti-CD20 Antibodies Can Result In The Loss Of CD20 Antigen Expression,”Clin Cancer Res,5:611-615,1999;Gabrilovich,D.等(2003)“Tumor Escape From Immune Response:Mechanisms And Targets Of Activity,”Curr.Drug Targets 4(7):525-536)。已经报道了体内产生的利妥昔单抗抗性细胞系展示针对多种化疗剂的交叉抗性(Czuczman等(2008)“Acquirement Of Rituximab Resistance In Lymphoma Cell Lines Is Associated With Both Global CD20 Gene And Protein Down-Regulation Regulated At The Pretranscriptional And Post-transcriptional Levels,”Clin Cancer Res.14:1561-1570;Olejniczak等(2008)“Acquired Resistance To Rituximab Is Associated With Chemotherapy Resistance Resulting From Decreased Bax And Bak Expression,”Clin Cancer Res.14:1550-1560)。

[0011] 由治疗性抗体靶向的其他B细胞淋巴瘤表面抗原包括CD19(Hoelzer(2013)“Targeted Therapy With Monoclonal Antibodies In Acute Lymphoblastic Leukemia,Curr.Opin.Oncol.25:701-706;Hammer(2012)“CD19 As An Attractive Target For Antibody-Based Therapy,”mAbs 4:571-577)。但是,尽管针对各种抗CD19抗体,具有抗CD19结合部分的双特异性抗体或抗体药物缀合物(ADCs)报道了与复合物内化和细胞内释放游离药物相关的有效的抗淋巴瘤活性,但是这些抗CD19抗体或ADC的抗肿瘤作用是不同的,表明抗体特异性性质,比如表位结合,诱导CD19寡聚的能力或细胞内信号传导的差异影响它们的效力(Du等(2008)“Differential Cellular Internalization Of Anti-CD19 And-CD22 Immunotoxins Results In Different Cytotoxic Activity,”Cancer Res.68:

6300-6305;Press等.(1994) “Retention Of B-Cell-Specific Monoclonal Antibodies By Human Lymphoma Cells.Blood,”83:1390-1397;Szatrowski等(2003) “Lineage Specific Treatment OfAdult Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia In First Remission With Anti-B4-Blocked Ricin Or High-Dose Cytarabine:Cancer And Leukemia Group B Study 9311,”Cancer97:1471-1480;Frankel等(2013) “Targeting T Cells To Tumor Cells Using Bispecific Antibodies,”Curr.Opin.Chem.Biol.17:385-392)。

[0012] 因此,尽管改善了许多人的生存,但遭受B细胞恶性肿瘤的大部分患者在标准化学免疫疗法之后继续复发并且在美国每年仍超过15,000名患者死于B细胞癌。因此,需要用新的非交叉抗性化合物进行治疗,以进一步改善患者生存。

[0013] B.CD3

[0014] CD3是T细胞共受体,其由四条不同的链组成(Wucherpfennig,K.W.等(2010) “Structural Biology Of The T-Cell Receptor:Insights Into Receptor Assembly, Ligand Recognition,And Initiation Of Signaling,”Cold Spring Harb.Perspect.Biol.2(4):a005140;pages 1-14;Chetty,R.等(1994) “CD3:Structure, Function,And Role Of Immunostaining In Clinical Practice,”J.Pathol.173(4):303-307;Guy,C.S.等(2009) “Organization Of Proximal Signal Initiation At the TCR:CD3 Complex,”Immunol.Rev.232(1):7-21)。

[0015] 在哺乳动物中,复合物包含CD3 γ 链、CD3 δ 链和两条CD3 ϵ 链。这些链与称为T细胞受体(TCR)的分子结合,以在T淋巴细胞中产生激活信号(Smith-Garvin,J.E.等(2009) “T Cell Activation,”Annu.Rev.Immunol.27:591-619)。在没有CD3的情况下,TCR不能适当地组装,因此被降解(Thomas,S.等(2010) “Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T-Cell Receptor Gene Transfer,”Immunology 129(2):170-177)。发现CD3结合所有成熟T细胞的膜,并且实际上不结合其他细胞类型的膜(见,Janeway,C.A.等(2005)在以下中:Immunobiology:The Immune System In Health And Disease,”第6版 Garland Science Publishing,NY,214-216页;Sun,Z.J.等(2001) “Mechanisms Contributing To T Cell Receptor Signaling And Assembly Revealed By The Solution Structure Of An Ectodomain Fragment Of The CD3 ϵ : γ Heterodimer,”Cell 105(7):913-923;Kuhns,M.S.等(2006) “Deconstructing The Form And Function Of The TCR/CD3 Complex,”Immunity.2006Feb;24(2):133-139)。

[0016] T细胞上T细胞受体(TCR)复合物的不变的CD3 ϵ 信号传导组分已经用作靶标,以促使在T细胞和肿瘤细胞之间形成免疫突触。CD3和肿瘤抗原的共衔接激活了T细胞,引发表达肿瘤抗原的肿瘤细胞裂解(Baeuerle等(2011) “Bispecific T Cell Engager For Cancer Therapy,”在以下中:Bispecific Antibodies,Kontermann,R.E.(Ed.) Springer-Verlag; 2011:273-287)。该方法允许双特异性抗体整体上与T细胞室(compartment)以对肿瘤细胞的高特异性相互作用,并且广泛适用于大量的细胞表面肿瘤抗原。

[0017] C.抗体和其他结合分子

[0018] 抗体是免疫球蛋白分子,其通过位于免疫球蛋白分子的可变区中的至少一个抗原识别位点能够特异性结合靶标,比如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等。如本文所使用,

该术语不仅仅包括完整的多克隆或单克隆抗体,而且也包括其突变体、天然存在的变体、包括具有具有必要特异性的抗原识别位点的抗体部分的融合蛋白、人源化的抗体和嵌合抗体以及包括具有必要特异性的抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他修饰结构。

[0019] 完整的、未修饰的抗体(例如,IgG)结合抗原的表位的能力取决于免疫球蛋白轻链和重链上可变结构域(即,分别为VL和VH结构域)的存在。抗体轻链和抗体重链的相互作用,尤其地,其VL和VH结构域的相互作用形成抗体的表位结合位点之一。相比之下,scFv构建体包括包含在单多肽链中的抗体的VL和VH结构域,其中结构域由足够长的灵活连接体分开,以允许两个结构域自组装成功能表位结合位点。在VL和VH结构域的自组装由于不够长(小于约12个氨基酸残基)的连接体而不可能时,两个scFv构建体彼此相互作用,以形成二价分子,其中一条链的VL与另一条链的VH结合(在以下文献中综述:Marvin等(2005)“Recombinant Approaches To IgG-like Bispecific Antibodies,”Acta Pharmacol.Sin.26:649-658中)。

[0020] 除了它们在诊断中的已知作用,已经显示抗体可用作治疗剂。最近几十年已经看到了在抗体治疗潜能中的兴趣的复兴,并且抗体已经成为一种主要类型的生物技术衍生的药物(Chan,C.E.等(2009)“The Use Of Antibodies In The Treatment of Infectious Diseases,”Singapore Med.J.50(7):663-666)。大约200种基于抗体的药物已经被批准使用或正在开发。

[0021] 天然抗体能够结合仅仅一个表位种类(即,单特异性),尽管它们可结合该种类的多个拷贝(即,展示二价或多价)。已经开发了各种重组双特异性抗体形式(见,例如,PCT公布号WO 2008/003116、WO 2009/132876、WO 2008/003103、WO 2007/146968),其大部分使用连接体肽,以将抗体核心(IgA、IgD、IgE、IgG或IgM)融合至另外的结合蛋白质(例如scFv),或者,融合例如两个Fab片段或scFv。典型地,这样的方法涉及折中和权衡。例如,PCT公布号WO 2013/174873、WO 2011/133886和WO 2010/136172公开了连接体的使用可在治疗情形中引起问题并教导三特异性抗体,其中CL和CH1结构域由其各自的天然位置被交换并且VL和VH结构域已经被多样化(WO 2008/027236;WO 2010/108127),以允许他们结合一个以上抗原。因此,这些文献中公开的分子权衡了结合特异性与结合另外的抗原种类的能力。PCT公布号WO 2013/163427和WO 2013/119903公开了修饰CH2结构域以含有融合蛋白加合物,其包括结合结构域。该文献指出,CH2结构域在介导效应子功能中可能仅发挥最小的作用。PCT公布号WO 2010/028797、WO2010028796和WO 2010/028795公开了重组抗体,其Fc区已经被取代以另外的VL和VH结构域,以便形成三价结合分子。PCT公布号WO 2003/025018和WO2003012069公开了重组双抗体,其单独的链含有scFv结构域。PCT公布号WO 2013/006544公开了多价Fab分子,其作为单多肽链被合成,然后经历蛋白酶解,以产生异源二聚结构。因此,这些文献中公开的分子用所有或一些介导效应子功能的能力换取结合另外的抗原种类的能力。PCT公布号WO 2014/022540、WO 2013/003652、WO 2012/162583、WO 2012/156430、WO 2011/086091、WO 2007/075270、WO 1998/002463、WO 1992/022583和WO 1991/003493公开了添加另外的结合结构域或功能集团至抗体或抗体部分(例如,添加双抗体至抗体的轻链或添加另外的VL和VH结构域至抗体的轻链和重链或添加异源融合蛋白或彼此链接多个Fab结构域)。因此,这些文献中公开的分子用天然抗体结构换取结合另外的抗原种类的能力。

[0022] 现有技术已经另外注意到产生在能够结合两个或多个不同表位种类(即,除了双价或多价之外显示双特异性或多特异性)方面不同于这样的天然抗体的双抗体的能力(见,例如,Holliger等(1993)“‘Diabodies’:Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments,”*Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.)* 90:6444-6448;US 2004/0058400 (Hollinger等);US 2004/0220388 (Mertens等);Alt等(1999) *FEBS Lett.* 454 (1-2):90-94;Lu,D.等(2005)“A Fully Human Recombinant IgG-like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity,”*J.Biol.Chem.* 280 (20):19665-19672;WO 02/02781 (Mertens等);Olafsen,T.等(2004)“Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications,”*Protein Eng Des Sel.* 17 (1):21-27;Wu,A.等(2001)“Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange,”*Protein Engineering* 14 (2):1025-1033;Asano等(2004)“A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain,”摘要3P-683,*J.Biochem.* 76 (8):992;Takemura,S.等(2000)“Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,”*Protein Eng.* 13 (8):583-588;Baeuerle,P.A.等(2009)“Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy,”*Cancer Res.* 69 (12):4941-4944)。

[0023] 双抗体的设计是基于单链可变区片段(scFv)。通过使用短连接肽连接轻链和/或重链可变区制备这样的分子。Bird等(1988) (“Single-Chain Antigen-Binding Proteins,”*Science* 242:423-426) 描述了连接肽的例子,其在一个可变区的羧基末端和另一可变区的氨基末端之间桥接约3.5nm。已经设计和使用了其他序列的连接体(Bird等(1988) “Single-Chain Antigen-Binding Proteins,”*Science* 242:423-426)。连接体可进而针对另外的功能被修饰,比如附接药物或连接至固体载体。可重组或合成产生单链变体。对于合成产生scFv,可使用自动合成仪。对于重组产生scFv,可将包含编码scFv的多核苷酸的合适的质粒引入适当的宿主细胞——真核细胞诸如酵母细胞、植物细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞或原核细胞诸如大肠埃希氏菌中。编码感兴趣的scFv的多核苷酸可通过常规操作诸如多核苷酸的连接而制备。产生的scFv可利用本领域中已知的标准蛋白纯化技术分离。

[0024] 美国专利号7,585,952和美国专利公开号2010-0173978涉及对ErbB2免疫特异性的scFv分子。已经描述了双特异性T细胞衔接体(engager) (“BiTEs”),一种类型的scFv分子(WO 05/061547;Baeuerle,P等(2008) “BiTE:A New Class Of Antibodies That Recruit T Cells,”*Drugs of the Future* 33:137-147;Bargou,等2008) “Tumor Regression in Cancer Patients by Very Low Doses of a T Cell-Engaging Antibody,”*Science* 321:974-977)。这样的分子由具有两个抗原结合结构域的单多肽链分子组成,其中一个抗原结合结构域免疫特异性结合CD3表位和其中第二个抗原结合结构域免疫特异性结合靶细胞的表面上存在的抗原。

[0025] 已经描述了靶向CD19和CD3二者的双特异性分子。兰妥莫单抗(Blinatumomab),一种双特异性scFv-CD19x CD3 BiTE处在临床试验中并且被报道对于CD3具有的亲和力为~

100nM,和对于CD19的亲合力为~1nM。对于靶细胞体外裂解,兰妥莫单抗展示的EC₅₀为~10-100pg/ml (Frankel等(2013)“Targeting T Cells To Tumor Cells Using Bispecific Antibodies,”Curr.Opin.Chem.Biol.17:385-392)。也已经开发了双特异性CD19x CD3双亲和性重定向(DART)(Moore等(2011)“Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma,”Blood 117(17):4542-4551)。与双特异性scFv-CD19x CD3 BiTE比较,该分子展示类似的结合亲和力,但是对于靶细胞体外裂解具有更低的EC₅₀,为~0.5至5pg/ml,并且一直显示更高水平的最大裂解。也已经描述了AFM11,一种CD19x CD3双特异性Tandab。AFM11被报道为对于靶细胞体外裂解具有的EC₅₀为~0.5至5pg/ml (Zhukovsky等(2013)“A CD19/CD3 Bispecific Tandab,AFM11,Recruits T Cells To Potently and Safely Kill CD19+ Tumor Cells,”J Clin Oncol 31,2013(补充;摘要3068))。所有这些构建体都不包括Fc结构域。

[0026] 尽管这样的成功,可通过细心考虑和将半胱氨酸残基放置在采用的一条或多条多肽链中进一步优化稳定的、功能性异源二聚化、非单特异性双抗体的产生。可以更高的产率并且以比非优化的双抗体更大的活性产生这样的优化的双抗体。因此,本发明涉及提供尤其被设计和优化以形成异源二聚双抗体的多肽的问题。本发明通过提供示例性、优化的CD19x CD3双抗体解决了该问题。

发明内容

[0027] 本发明涉及双特异性单价双抗体,其包括两条多肽链并且其具有对CD19的表位特异的一个结合位点和对CD3的表位特异的一个结合位点(即,“CD19x CD3双特异性单价双抗体”)。最优选地,这样的CD19x CD3双特异性单价双抗体由三条多肽链组成,且具有对CD19的表位特异的一个结合位点和对CD3的表位特异的一个结合位点,并且另外包括免疫球蛋白Fc结构域(即,“CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体”)。本发明的双特异性单价双抗体和双特异性单价Fc双抗体能够同时结合CD19和CD3。本发明涉及包含这样的双特异性单价双抗体或这样的双特异性单价Fc双抗体的药学组合物。本发明另外涉及这样的双抗体在治疗疾病,尤其是血液学恶性肿瘤中使用的方法。

[0028] 因此,本发明的CD19x CD3双特异性单价双抗体和双特异性单价Fc双抗体包括至少两条不同的多肽链。这样的双抗体的多肽链以异源二聚化方式彼此结合,以形成对CD19的表位有特异性的一个结合位点和对CD3的表位有特异性的一个结合位点。因此,本发明的CD19x CD3双特异性单价双抗体或双特异性单价Fc双抗体是单价的,在于其仅仅能够结合CD19的表位的一个拷贝并且仅仅结合CD3的表位的一个拷贝,但是是双特异性的,在于单一双抗体能够同时结合CD19的表位和CD3的表位。双抗体多肽链的每一条共价结合双抗体的另一多肽链,例如通过位于这样的多肽链中的半胱氨酸残基的二硫键合,以便形成共价结合的复合物。在具体的实施方式中,本发明的双抗体进一步具有免疫球蛋白Fc结构域和/或白蛋白结合结构域,以延长体内的半衰期。

[0029] 更详细地,本发明提供了CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体,其能够特异性结合CD19和CD3,其中双抗体包括第一、第二和第三多肽链,其中多肽链形成共价结合的复合物,和其中:

- [0030] I. 第一多肽链在N-末端至C-末端方向上包括:
- [0031] A. 结构域IA, 包括
- [0032] (1) 亚结构域(IA1), 其包括能够结合CD19 (VL_{CD19}) 或CD3 (VL_{CD3}) 的VL结构域; 和
- [0033] (2) 亚结构域(IA2), 其包括能够结合CD19 (VH_{CD19}) 或CD3 (VH_{CD3}) 的VH结构域;
- [0034] 其中亚结构域IA1和IA2通过多肽连接体彼此分开, 并且是
- [0035] (a) VL_{CD19}和VH_{CD3}; 或
- [0036] (b) VL_{CD3}和VH_{CD19};
- [0037] B. 结构域IB, 其包括带电的促进异源二聚体的结构域, 其中结构域IB通过多肽连接体与结构域IA分开;
- [0038] C. 结构域IC, 其包括抗体的CH2-CH3结构域; 和
- [0039] II. 第二多肽链在N-末端至C-末端方向上包括:
- [0040] A. 结构域IIA, 包括
- [0041] (1) 亚结构域(IIA1), 其包括能够结合CD19 (VL_{CD19}) 或CD3 (VL_{CD3}) 的VL结构域; 和
- [0042] (2) 亚结构域(IIA2), 其包括能够结合CD19 (VH_{CD19}) 或CD3 (VH_{CD3}) 的VH结构域;
- [0043] 其中亚结构域IIA1和IIA2通过多肽连接体彼此分开, 并且是:
- [0044] (a) VL_{CD19}和VH_{CD3}, 前提是亚结构域IA1和IA2是VL_{CD3}和VH_{CD19}; 或
- [0045] (b) VL_{CD3}和VH_{CD19}, 前提是亚结构域IA1和IA2是VL_{CD19}和VH_{CD3};
- [0046] B. 结构域IIB, 其包括带电的促进异源二聚体的结构域, 其中结构域IIB通过多肽连接体与结构域IIA分开, 和其中结构域IB的带电的促进异源二聚体的结构域和结构域IIB的带电的促进异源二聚体的结构域具有相反的电荷; 和
- [0047] III. 第三多肽链在N-末端至C-末端方向上包括结构域IIIC, 其包括抗体的CH2-CH3结构域;
- [0048] 其中VL_{CD19}和VH_{CD19}结构域形成CD19结合结构域, 和VL_{CD3}和VH_{CD3}结构域形成CD3结合结构域; 和第一和第三多肽链的CH2-CH3结构域形成能够结合Fc受体的Fc结构域, 从而形成CD19x CD3双特异性单价双抗体。
- [0049] 本发明另外提供了上述CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体的实施方式, 其中:
- [0050] (A) 结构域IB和IIB每个包括半胱氨酸残基, 其经二硫键使第一多肽链与第二多肽链共价结合; 和
- [0051] (B) 结构域IC和IIIC每个包括半胱氨酸残基, 其经二硫键使第一多肽链与第三多肽链共价结合。
- [0052] 本发明另外提供了任何上述CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体的实施方式, 其中VL_{CD19}具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列和VH_{CD19}具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列。
- [0053] 本发明另外提供了任何上述CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体的实施方式, 其中VL_{CD3}具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列和VH_{CD3}具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列。
- [0054] 本发明另外提供了任何上述CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体的实施方式, 其中结构域IC的CH2-CH3结构域具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列和结构域IIIC的CH2-CH3结构域具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列。
- [0055] 本发明另外提供了任何上述CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体的实施方式, 其中
- [0056] (A) 结构域IB的带电的促进异源二聚体的结构域具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列

和结构域IIB的带电的促进异源二聚体的结构域具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列;或

[0057] (B) 结构域IB的带电的促进异源二聚体的结构域具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列和结构域IIB的带电的促进异源二聚体的结构域具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

[0058] 本发明另外提供了任何上述CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体的实施方式,其中:

[0059] (A) 第一多肽链具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列;

[0060] (B) 第二多肽链具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列;和

[0061] (C) 第三多肽链具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列。

[0062] 本发明另外提供了任何上述CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体的实施方式,其能够与人和灵长类CD19和CD3都进行交叉反应。

[0063] 本发明另外提供了任何上述CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体,以用作药物。

[0064] 本发明另外提供了任何上述CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体,以用于治疗与CD19的表达相关或特征在于CD19的表达的疾病或病况,或用于治疗特征在于CD19的表达的疾病或病况的方法中,尤其是其中与CD19的表达相关或特征在于CD19的表达的疾病或病况是癌症的情况,更具体地,其中癌症选自:急性髓细胞样白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML),包括急变期CML和与CML相关的Abelson癌基因(Bcr-ABL易位)、骨髓增生异常综合征(MDS)、急性B成淋巴细胞性白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL),包括Richter综合症或CLL的Richter转化、毛细胞白血病(HCL)、母细胞性(blastic)浆细胞样树突细胞赘生物(BPDCN)、非霍奇金淋巴瘤(NHL),包括套细胞白血病(MCL)和小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、霍奇金淋巴瘤、系统性肥大细胞增生症和伯基特淋巴瘤。

[0065] 本发明另外提供了共价结合的多肽复合物,其中多肽复合物包括第一多肽链和第二多肽链,其中:

[0066] (A) 第一多肽链包括具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的多肽,其连接至具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的促进异源二聚体的结构域;和

[0067] (B) 第二多肽链包括具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的多肽,其连接至具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的促进异源二聚体的结构域;

[0068] 其中第一多肽链的促进异源二聚体的结构域和第二多肽链的促进异源二聚体的结构域经二硫键彼此共价结合。

[0069] 本发明另外提供了包括任何上述CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体和生理学上可接受的载体的药学组合物。本发明另外涉及这样的药学组合物在治疗与CD19的表达相关或特征在于CD19的表达的疾病或病况中的用途,尤其是其中与CD19的表达相关或特征在于CD19的表达的疾病或病况是癌症的情况,更具体地,其中癌症选自:急性髓细胞样白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML),包括急变期CML和与CML相关的Abelson癌基因(Bcr-ABL易位)、骨髓增生异常综合征(MDS)、急性B成淋巴细胞性白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL),包括Richter综合症或CLL的Richter转化、毛细胞白血病(HCL)、母细胞性浆细胞样树突细胞赘生物(BPDCN)、非霍奇金淋巴瘤(NHL),包括套细胞白血病(MCL)和小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、霍奇金淋巴瘤、系统性肥大细胞增生症和伯基特淋巴瘤。

[0070] 本发明的CD19x CD3双特异性单价双抗体和CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体优

选地能够展示对可溶性人和食蟹猴 (*cynomolgus monkey*) CD3类似的结合亲和力和在结合CD19方面的10倍差异,如通过表面等离子共振 (SPR) 技术 (BIAcore) 所分析的,或如通过流式细胞术使用CD4⁺和CD8⁺设门的T细胞群体和CD20⁺设门的B细胞群体所分析的。

[0071] 本发明的CD19x CD3双特异性单价双抗体和CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体使用人T细胞在采用3个靶B淋巴瘤细胞系:Raji/GF (伯基特淋巴瘤), HBL-2 (套细胞淋巴瘤), 或Jeko-1 (套细胞淋巴瘤) 中的任何一个的试验中,并使用纯化的人初级T细胞作为效应细胞,优选能够介导重定向杀伤靶肿瘤细胞。在这样的试验中,使用乳酸脱氢酶 (LDH) 释放试验测量靶肿瘤细胞杀伤,其中定量测量细胞死亡时从细胞释放的LDH的酶活性,或通过荧光素酶试验测量靶肿瘤细胞杀伤,其中荧光素酶相对光单位 (RLU) 是指示Raji/GF靶细胞的相对生活力的读数,所述靶细胞已经被工程化以表达绿色荧光蛋白 (GFP) 和荧光素酶报告基因。观察到的这样的重定向杀伤的EC50是约5pM或更少、约3pM或更少、约1pM或更少、约0.5pM或更少、约0.3pM或更少、约0.2pM或更少、约0.1pM或更少、约0.05pM或更少、约0.04pM或更少、约0.03pM或更少、约0.02pM或更少或约0.01pM或更少。

[0072] 本发明的CD19x CD3双特异性单价双抗体和CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体优选地能够介导人和食蟹猴外周血单核细胞 (PBMC) 中的细胞毒性,以便以下效应细胞与T细胞比例引起两种这样的细胞系统中的剂量依赖性CD20+B细胞消耗:2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1或9:1。观察到的人CD20+B细胞消耗的EC50是约7pM或更少、约5pM或更少、约3pM或更少、约1pM或更少、约0.5pM或更少、约0.3pM或更少、约0.2pM或更少、约0.1pM或更少、约0.05pM或更少、约0.04pM或更少、约0.03pM或更少、约0.02pM或更少或约0.01pM或更少。观察到的食蟹猴CD20+B细胞消耗的EC50是约1000pM或更少、约900pM或更少、约800pM或更少、约500pM或更少、约300pM或更少、约100pM或更少、约50pM或更少、约20pM或更少、约10pM或更少、约5pM或更少、约2pM或更少或约1pM或更少,使得自体人B细胞消耗与食蟹猴B细胞消耗的比例是约500:1或更少、约300:1或更少、约100:1或更少、约50:1或更少、约20:1或更少或约10:1或更少。

[0073] 本发明的CD19x CD3双特异性单价双抗体和CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体优选地能够通过人和食蟹猴PBMC介导细胞因子 (例如, IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-4、IL-6和IL-10,尤其是IFN- γ 和TNF- α) 的释放。这样的释放是约5000pg/mL或更少、约4000pg/mL或更少、约3000pg/mL或更少、约2000pg/mL或更少、约1000pg/mL或更少、约500pg/mL或更少、约2000pg/mL或更少,或约100pg/mL或更少。从人PBMC的这样的细胞因子释放的平均EC50是约100pM或更少、约90pM或更少、约80pM或更少、约50pM或更少、约30pM或更少、约20pM或更少、约10pM或更少,或约5pM或更少。从食蟹猴PBMC的这样的细胞因子释放的平均EC50是约3000pM或更少、约2000pM或更少、约1000pM或更少、约500pM或更少、约300pM或更少、约200pM或更少、约100pM或更少,或约50pM或更少。

[0074] 本发明的CD19x CD3双特异性单价双抗体和CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体优选地能够介导对共混合 (co-mix) 异种移植物中人B细胞淋巴瘤肿瘤生长的抑制,在所述共混合异种移植物中,这样的分子与比例为1:5的HBL-2 (人套细胞淋巴瘤) 或Raji (伯基特淋巴瘤) 肿瘤细胞和激活的人T细胞一起被引入到NOD/SCID小鼠中。优选地,当以下述浓度提供时,这样的双抗体能够抑制肿瘤生长:大于100 μ g/ml的浓度、约100 μ g/kg的浓度、约80 μ g/kg的浓度、约50 μ g/kg的浓度、约20 μ g/kg的浓度、约10 μ g/kg的浓度、约5 μ g/kg的浓度、约2 μ

g/kg的浓度、约1 μ g/kg的浓度、约0.5 μ g/kg、约0.2 μ g/kg的浓度、约0.1 μ g/kg的浓度、约0.05 μ g/kg的浓度、约0.02 μ g/kg的浓度、约0.01 μ g/kg的浓度或约0.005 μ g/kg的浓度或小于0.005 μ g/kg的浓度。

[0075] 本发明的CD19x CD3双特异性单价双抗体和CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体优选地能够在雌性NSG B2m^{-/-}小鼠的HBL-2(人套细胞淋巴瘤)异种移植模型中展示抗肿瘤活性,所述异种移植模型在第0天被真皮内(ID)植入HBL-2肿瘤细胞,然后在第4天被腹膜内(IP)注射PBMC和在第17天施用双抗体,以便使肿瘤体积减少约10%、约20%、约40%、约60%、约80%、约90%或大于90%。

[0076] 本发明的CD19x CD3双特异性单价双抗体和CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体在引入到接受者人或非人动物中时优选地能够展示延长的半衰期。可通过将双抗体引入到人FcRn转基因小鼠中测量这样的半衰期(美国专利号6,992,234和7,358,416;Haraya,K.(2014)“Application Of Human FcRn Transgenic Mice As A Pharmacokinetic Screening Tool Of Monoclonal Antibody,”Xenobiotica 2014 Jul17:1-8;Proetzel,G.等(2014)“Humanized FcRn mouse models for evaluating pharmacokinetics of human IgG antibodies,”Methods 65(1):148-153;Stein,C.等(2012)“Clinical Chemistry Of Human FcRn Transgenic Mice,”Mamm.Genome23(3-4):259-269;Roopenian,D.C.等(2010)“Human FcRn Transgenic Mice For Pharmacokinetic Evaluation Of Therapeutic Antibodies,”Methods Molec.Biol.602:93-104)。使用可获得自Jackson Laboratories, Bar Harbor,Maine,US的B6.Cg-Fcgrt^{tm1Dcr}(CAG-FCGRT)276Dcr/DcrJ小鼠(库存号(Stock Number)004919)进行测量。

[0077] 为了避免任何怀疑,本发明的双抗体可展示本文所述的功能特性中的一种、两种、三种、大于三种或所有功能特性。因此,本发明的双抗体可展示本文所述的功能特性的任何组合。

[0078] 本发明的双抗体可用作药物。优选地,双抗体用于治疗与CD19的表达相关或特征在于CD19的表达的疾病或病况。本发明也涉及本发明的双抗体在制造优选地用于治疗与CD19的表达相关或特征在于CD19的表达的疾病或病况的药学组合物中的用途,如本文进一步限定的。

[0079] 与CD19的表达相关或特征在于CD19的表达的疾病或病况可以是B细胞恶性肿瘤(Campo,E.等(2011)“The 2008 WHO Classification Of Lymphoid Neoplasms And Beyond:Evolving Concepts And Practical Applications,”Blood117(19):5019-5032)。例如,癌症可选自:急性髓细胞样白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML),包括急变期CML和与CML相关的Abelson癌基因(Bcr-ABL易位)、骨髓增生异常综合征(MDS)、急性B成淋巴细胞性白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL),包括Richter综合症或CLL的Richter转化、毛细胞白血病(HCL)、母细胞性浆细胞样树突细胞赘生物(BPDCN)、非霍奇金淋巴瘤(NHL),包括套细胞白血病(MCL),和小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、霍奇金淋巴瘤、系统性肥大细胞增生症和伯基特淋巴瘤。

[0080] 本发明另外提供包括任何上述双抗体和生理学上可接受的载体的药学组合物。本发明尤其涉及这样的药学组合物,其中被治疗的疾病或病况是用利妥昔单抗难以治疗的。

[0081] 本发明另外提供了上述药学组合物在治疗与CD19的表达相关或特征在于CD19的

表达的疾病或病况中的用途。

[0082] 本发明尤其涉及这样的用途的实施方式,其中与CD19的表达相关或特征在于CD19的表达的疾病或病况是B细胞恶性肿瘤(尤其选自下述的癌症:急性髓细胞样白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML),包括急变期CML和与CML相关的Abelson癌基因(Bcr-ABL易位)、骨髓增生异常综合征(MDS)、急性B成淋巴细胞性白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL),包括Richter综合症或CLL的Richter转化、毛细胞白血病(HCL)、母细胞性浆细胞样树突细胞赘生物(BPDCN)、非霍奇金淋巴瘤(NHL),包括套细胞白血病(MCL)和小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、霍奇金淋巴瘤、系统性肥大细胞增生症和伯基特淋巴瘤)。

[0083] 术语比如“约”应解释为指定值的10%,更优选地5%以内,除非上下文另外指出。

附图说明

[0084] 图1图解了由两条多肽链组成的共价结合的双特异性单价双抗体的结构。

[0085] 图2A和2B阐释了本发明的三链CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体的两种形式的第一、第二和第三多肽链的结构(形式1,图2A;形式2,图2B)。

[0086] 图3显示了CD19和CD3二者通过DART-A(●)的同时衔接。对照DART 1(■)或对照DART 2(▲)都不能同时结合两个靶。

[0087] 图4A-4B显示了CD19x CD3双特异性分子(DART-A)与人(图4A)和食蟹猴(图4B)CD20+B细胞的结合。

[0088] 图5A-5B显示CD19x CD3双特异性分子(DART-A)与人(图5A)和食蟹猴(图5B)CD4+和CD8+T细胞的结合。

[0089] 图6A-6F显示了CD19x CD3双特异性分子(DART-A)相对于对照DART 1介导的对靶细胞的重定向杀伤。DART-A-介导的细胞毒性的剂量响应曲线使用初级人T细胞作为针对下述靶细胞系的效应细胞:HBL-2(图6A)、Raji/GF(绿色荧光的)(图6B)、Jeko-1(图6C)、Molm-13(图6D)和Colo205/Luc(图6F),其中使用LDH试验测量靶细胞杀伤。图6E显示了Raji/GF细胞的杀伤,如使用荧光素酶试验(RLU)测定的,以测量相对存活的细胞。对于1个代表性实验,DART-A的EC50值显示在每张图上。DART-A:▲;对照DART 1:▼。

[0090] 图7A-7D显示了以不同的E:T细胞比例CD19x CD3双特异性分子(DART-A)-介导的对靶Raji/GF细胞的重定向杀伤(10:1(●)、5:1(■)和2.5:1(▲))。在24小时孵育(图7A)和48小时孵育(图7B)之后测定DART-A-介导细胞毒性的剂量响应曲线(细胞毒性百分数),其中初级人T细胞作为针对CD19+靶Raji/GF细胞的效应细胞。在24小时孵育(图7C)之后和48小时孵育(图7D)之后测定的DART-A-介导细胞毒性的剂量响应曲线(细胞毒性百分数)被包括,作为对照,其中初级人T细胞作为针对CD19-阴性JIMT-1细胞的效应细胞。显示的是每个均使用来自独立供体的T细胞的3个代表性实验的1个。

[0091] 图8A-8D显示了以2.5:1(●)或1:1(■)的更低的E:T细胞比例,CD19x CD3双特异性分子(DART-A)-介导的对靶Raji/GF细胞的重定向杀伤。在72小时孵育(图8A)之后和96小时孵育(图8B)之后测定DART-A-介导细胞毒性的剂量响应曲线(细胞毒性百分数),其中初级人T细胞作为针对CD19+靶Raji/GF细胞的效应细胞。在72小时孵育(图8C)之后和96小时孵育(图8D)之后测定的CD19x CD3双特异性DART-A-介导细胞毒的剂量响应曲线(细胞毒

性百分数)作为对照被包括,作为对照,其中初级人T细胞作为针对CD19-阴性JIMT-1细胞的效应细胞。显示的是每个均使用来自独立供体的T细胞的3个代表性实验的1个。

[0092] 图9A-9B显示了CD19x CD3双特异性分子(DART-A)-介导的在人或食蟹猴PBMC中的自体B细胞消耗。呈现了DART(DART-A或对照DART 1)-介导的自体B细胞消耗的剂量响应曲线。图9A:用各种剂量的DART-A或对照DART 1进行PBMC处理之后的人CD20+细胞的百分数。图9B:用各种剂量的DART-A或对照DART 1进行PBMC处理之后的食蟹猴CD20+细胞的百分数。DART-A的EC50值显示在每张图上。平行分析CD3+细胞的百分数并且用作内参考对照——在任何测试的浓度没有观察到改变。DART-A:▲;对照DART 1:▼。

[0093] 图10显示了以E:T=30:1,通过食蟹猴PBMC,CD19x CD3双特异性分子(DART-A)-介导的对靶细胞的重定向杀伤。DART-A:▲;对照DART 1:▼。

[0094] 图11A-11C显示了在存在靶细胞的情况下CD19x CD3双特异性分子(DART-A)-介导的从人T细胞的细胞因子释放。用DART-A或对照DART 1在存在Raji/GF靶细胞的情况下处理人T细胞约24小时。收集培养物上清液并且进行基于ELISA的细胞因子测量。显示的是使用不同供体的2个中的一个代表性实验。图11A:γ-干扰素(IFN γ)释放;图11B:肿瘤坏死因子-α(TNF-α)释放;图11C:白介素2(IL-2)释放。DART-A:▲;对照DART 1:▼。

[0095] 图12A-12D显示了在重定向细胞杀伤期间通过CD19x CD3双特异性分子(DART-A)相对于对照DART 1的人T细胞激活。使用Raji/GF靶细胞,DART-A-介导的T细胞激活标记物CD25(图12A-12B)和CD69(图12C-12D)对CD8+(图12A和12C)和CD4+(图12B和12D)人T细胞的诱导的剂量响应。显示的是每个均使用来自不同供体的T细胞的2个中的一个代表性实验。DART-A:▲;对照DART1:▼。

[0096] 图13A-13D显示了在重定向细胞杀伤期间通过CD19x CD3双特异性分子(DART-A)相对于对照DART 1的食蟹猴T细胞激活。使用Raji/GF靶细胞,DART-A-介导T细胞激活标记物CD25(图13A和13B)和CD69(图13C和13D)对CD8+(图13A和13C)和CD4+(图13B和13D)食蟹猴T细胞或PBMC的诱导的量响应。显示的是使用T细胞的一个代表性实验。DART-A:▲;对照DART 1:▼。

[0097] 图14A-14D显示了CD19x CD3双特异性分子(DART-A)和对照DART 1不能在存在CD19-阴性JIMT1细胞的情况下介导人T细胞激活。呈现了DART-A-介导的T细胞激活标记物CD25(图14A和14B)和CD69(图14C和14D)对来自如图12A-12D的相同供体的CD8+(图14A和14C)和CD4+(图14B和14D)的诱导的剂量响应。DART-A:▲;对照DART 1:▼。

[0098] 图15A-15B显示了在用不同浓度的Raji/GF靶细胞和DART-A或对照DART 1以10:1的E:T比例孵育24小时之后,在CD4+和CD8+人T细胞中染色的粒酶B(图15A)和穿孔蛋白(图15B)的细胞内水平。

[0099] 图16A和16B显示了在以10:1的E:T比例在存在200ng/mL的DART-A或对照DART 1的情况下与HBL-2靶细胞共培养24小时(图16A)或72小时(图16B)之后,通过FACS分析的CFSE标记的人T细胞的增殖。显示了在存在DART-A的情况(黑线)或在存在下对照DART 1的情况下(灰色填充)与HBL-2细胞共培养之后的染色曲线(profile)。

[0100] 图17显示了在移植以HBL-2肿瘤细胞的小鼠中在存在激活的人T细胞的情况下通过CD19x CD3双特异性分子(DART-A)对肿瘤生长的抑制。在第0天,雌性非肥胖糖尿病/严重联合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠(n=8/组)被皮下移植(SC)以HBL-2肿瘤细胞+激活的人T细

胞,随后在第0-3天用媒介对照、对照DART 1或DART-A处理总共4个剂量,IV施用。以1:5的比例(分别 1×10^6 和 5×10^6 个细胞)孵育人T细胞和HBL-2细胞。肿瘤体积显示为组平均数 $\pm$ SEM。

[0101] 图18显示了在存在激活的人T细胞的情况下,CD19x CD3双特异性分子(DART-A)在移植Raji肿瘤细胞的小鼠中对肿瘤生长的抑制。在第0天,雌性NOD/SCID小鼠($n=8$ /组)被SC植入Raji肿瘤细胞+激活的人T细胞,随后在第0-3天用媒介对照、对照DART 1或DART-A处理总共4个剂量,IV施用。以1:5的比例(分别 1×10^6 和 5×10^6 个细胞)孵育人T细胞和Raji细胞。肿瘤体积显示为组平均数 $\pm$ SEM。

[0102] 图19A-19B显示在移植以HBL-2肿瘤细胞的小鼠中肿瘤体积随着时间的变化。图19A:在第0天,雌性NSG B2m-/-小鼠($n=8$ /组)被真皮内(ID)移植以HBL-2肿瘤细胞(5×10^6)。在第4天,小鼠被腹膜内(IP)移植以PBMC(5×10^7)。然后,用媒介、对照DART 1或CD19x CD3双特异性DART-A如指示地(见Rx箭头)经静脉内(IV)处理小鼠。肿瘤体积显示为组平均数 $\pm$ SEM。图19B:在第0天,雌性NSG B2m-/-小鼠($n=8$ /组)被真皮内(ID)移植以HBL-2肿瘤细胞(5×10^6)。在第4天,小鼠被腹膜内(IP)移植以PBMC(5×10^7)。然后,用媒介、对照DART 1或CD19xCD3双特异性DART-A如指示地(见Rx箭头)经静脉内(IV)处理小鼠。肿瘤体积显示为组平均数 $\pm$ SEM。

[0103] 图20A-20B显示在IV施用多达4个循环的每周一次的递增剂量的CD19x CD3双特异性DART-A之后,食蟹猴中随着时间推移的循环B细胞水平。组1中的食蟹猴($n=4$)在第1、8、15、22和29天(由垂直虚线指示)用IV施用的媒介 $\rightarrow 0.5 \rightarrow 5 \rightarrow 50 \rightarrow 50 \mu\text{g/kg}$ DART-A处理(图20A)。在第1、8、15、22和29天(由垂直虚线指示)用IV施用的媒介 $\rightarrow 2 \rightarrow 10 \rightarrow 100 \rightarrow 100 \mu\text{g/kg}$ DART-A处理组2中的食蟹猴($n=4$) (图20B)。显示了每个食蟹猴的数据。

[0104] 图21A-21D显示了在IV施用多达3个循环的每周一次的固定剂量或多达5个循环每3天一次的固定剂量的DART-A之后,食蟹猴中随着时间推移的循环B细胞水平。用CD19x CD3双特异性DART-A处理组3-5中的食蟹猴($n=2$ /组)。组3(图21A)接受 5 ng/kg DART-A;组4(图21B)接受 50 ng/kg DART-A;和组5(图21C)接受 500 ng/kg DART-A。在第1、8和15天(由垂直虚线指示)IV施用DART-A。在第1、4、8、11和15天(由垂直虚线指示)用IV施用的 500 ng/kg DART-A处理组6中的食蟹猴($n=2$) (图21D)。显示了每个食蟹猴的数据。

[0105] 图22显示了DART-A人FcRn转基因小鼠药物代谢动力学(PK)分析。mAb 1、mAb 2和mAb 3是不相关的人源化的IgG1抗体,其用作对照,以允许测定转基因动物中典型的抗体半衰期。

[0106] 图23显示了用 $500 \mu\text{g/kg}$ DART-A(■)、 $500 \mu\text{g/kg}$ 对照DART 1(▲)或媒介对照(●)处理之后,在人PBMC-重构的小鼠中散布(disseminated)的Raji-luc细胞白血病模型中的生存曲线。

[0107] 图24显示了用 $500 \mu\text{g/kg}$ (●)、 $100 \mu\text{g/kg}$ (■)、 $20 \mu\text{g/kg}$ (○)、 $4 \mu\text{g/kg}$ (▲)、 $0.8 \mu\text{g/kg}$ (▼)或 $0.16 \mu\text{g/kg}$ (□)的DART-A、 500 mg/kg (△)对照DART 1或媒介对照(◆)处理之后,在人PBMC-重构的小鼠中散布的Raji-luc细胞白血病模型中的生存曲线。

[0108] 图25显示了用 0.5 mg/kg 的DART-A(▲)、 0.1 mg/kg DART-A(■)或媒介对照(●)处理之后,人PBMC-重构的小鼠中Raji.luc细胞淋巴瘤模型中的生存曲线。

[0109] 图26显示了在用 $500 \mu\text{g/kg}$ (■)、 $100 \mu\text{g/kg}$ (▲)、 $20 \mu\text{g/kg}$ (▼)、 $4 \mu\text{g/kg}$ (◆)、 $0.8 \mu\text{g/kg}$

kg (□) 或 0.16 μg/kg (△) 的 DART-A、0.1 mg/kg 的对照 DART 1 (○) 或媒介对照 (●) 处理之后, 人 PBMC-重构的小鼠中 Raji.luc 细胞淋巴瘤模型中的生存曲线。

[0110] 图 27 显示了被投以 10 μg/kg DART-A 的食蟹猴中 DART-A 的血清浓度-时间曲线。

[0111] 图 28 显示了对于研究天数和组, 通过流式细胞术测定的 CD45+/CD20+ 细胞/uL 的平均 ± SEM 数量。在第 8、15、22 和 29 天的垂直虚线指示组 2-5 的动物通过 2-小时 IV 输注的每个剂量 (D) 的 DART-A; 而组 1 的动物继续接受媒介对照。x 轴指示研究天数, 其分成 3 段, 覆盖第 -7 天至 -1 天、第 0 天至第 63 天和第 64-121 天。

[0112] 图 29A-29I 显示了 CLL PBMC (E:T=1:23) 中恶性 B 细胞 (CD20+/CD5+) (图 29A-29C)、T 细胞 (CD4+ 或 CD8+) (图 29D-29E) 和 T 细胞激活 (CD4+ (图 29F-29G) 或 CD8+ (图 29H-29I) T 细胞中的 CD25) 在没有处理 (图 29A)、DART-A (图 29C、29E、29G 和 29I) 或对照 DART 1 (图 29B、29D、29F 和 29H) 处理 6 天后的代表性 FACS 分析。

[0113] 发明详述

[0114] 本发明涉及双特异性单价双抗体, 其包括两条多肽链并且其具有对 CD19 的表位特异的一个结合位点和对 CD3 的表位特异的一个结合位点 (即, “CD19x CD3 双特异性单价双抗体”)。最优选地, 这样的 CD19x CD3 双特异性单价双抗体由三条多肽链组成并且具有对 CD19 的表位特异的一个结合位点和对 CD3 的表位特异的一个结合位点, 并且另外包括免疫球蛋白 Fc 结构域 (即, “CD19x CD3 双特异性单价 Fc 双抗体”)。本发明的双特异性单价双抗体和双特异性单价 Fc 双抗体能够同时结合 CD19 和 CD3。本发明涉及包含这样的双特异性单价双抗体或这样的双特异性单价 Fc 双抗体的药学组合物。本发明另外涉及这样的双抗体用于治疗疾病, 尤其是血液学恶性肿瘤的方法。

[0115] A. 抗体和其他结合分子

[0116] 1. 抗体

[0117] 如本文所使用, 术语“抗体”不仅仅包括完整的多克隆或单克隆抗体, 而且也包括其突变体、天然存在的变体、包括具有必要的特异性的抗原识别位点的抗体部分的融合蛋白、人源化的抗体和嵌合抗体以及包括具有必要的特异性的抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他修饰的结构。遍及本申请, 抗体轻链和重链的氨基酸残基的编号是根据如在以下文献中的 EU 索引: Kabat 等 (1992) Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health Publication No. 91-3242 中。如本文所使用, “抗体的抗原结合片段”是抗体具有至少一个抗原识别位点的一部分。如本文所使用, 该术语包括片段 (比如 Fab、Fab'、F(ab')₂Fv) 和单链 (scFv)。

[0118] 术语“单克隆抗体”指同质性 (homogenous) 抗体群体, 其中单克隆抗体由参与抗原的选择性结合的氨基酸 (天然存在的和非天然存在的) 组成。单克隆抗体是高度特异性的, 针对单抗原位点。术语“单克隆抗体”不仅仅包括完整的单克隆抗体和全长单克隆抗体, 而且也包括其片段 (比如 Fab、Fab'、F(ab')₂Fv)、单链 (scFv), 其突变体、包括抗体部分的融合蛋白、人源化的单克隆抗体、嵌合单克隆抗体和包括具有必要特异性和结合抗原能力的抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他修饰结构。就抗体来源或制备其的方式 (例如, 通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达、转基因动物等) 而言不期望受到限制。该术语包括完整的免疫球蛋白以及上面根据定义“抗体”描述的片段等。制备单克隆抗体的方法是本领域已知的。可采用的一种方法是 Kohler, G. 等的方法 (1975) “Continuous Cultures Of Fused

Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity,”Nature 256:495-497或其改良方法。典型地,单克隆抗体在小鼠、大鼠或兔子中开发。通过用包含期望的表位的免疫原量的细胞、细胞提取物或蛋白制品免疫动物而产生抗体。免疫原可以是,但不限于初始细胞、培养的细胞系、癌细胞、蛋白质、肽、核酸或组织。用于免疫的细胞可培养一段时间(例如,至少24小时),然后它们用作免疫原。细胞可通过它们本身或组合非变性佐剂比如Ribi用作免疫原。一般而言,当用作免疫原时,细胞应保持完整和优选地能存活。相比于破裂的细胞,完整的细胞可允许抗原被免疫的动物更好地检测。变性或烈性佐剂,例如,弗氏佐剂的使用,可使细胞破裂,因此,其应用受阻。免疫原可以周期性间隔被多次施用,诸如两周一次或一周一次,或者可以维持在动物(例如,在组织重组体中)中的生存力这样的方式被施用。可选地,对于期望的致病表位是免疫特异性的现有单克隆抗体和任意其他等价抗体可被测序并通过本领域中已知的任意手段重组产生。在一个实施方式中,对这样的抗体测序,然后将多核苷酸序列克隆至载体用于表达或增殖。编码感兴趣的抗体的序列可在宿主细胞中保持在载体中,并且,可然后扩展和冷冻宿主细胞用于将来的使用。这样的抗体的多核苷酸序列可用于基因操作,以产生本发明的双特异性分子以及嵌合抗体、人源化的抗体或犬源化(caninized)的抗体,改善抗体的亲和性,或其他特征。人源化抗体的一般原理涉及保留抗体的抗原结合部分的基本序列,同时用人抗体序列交换抗体的非人剩余部分。使单克隆抗体人源化大体上有四个步骤。这些是:(1)测定起始抗体轻链和重链可变结构域的核苷酸和预测的氨基酸序列(2)设计人源化的抗体或犬源化的抗体,即,确定在人源化或犬源化过程期间使用哪个抗体框架区(3)实际人源化或犬源化方法/技术和(4)转染和表达人源化的抗体。见,例如,美国专利号4,816,567、5,807,715、5,866,692和6,331,415。

[0119] 2. 双特异性抗体、多特异性双抗体和DART™双抗体

[0120] 非单特异性“双抗体”的供应提供了相对于抗体的明显优势:共连接和共定位表达不同表位的细胞的能力。因此,二价双抗体具有宽范围的应用,包括治疗和免疫诊断。二价允许在各个应用中在设计和工程化双抗体时更大的灵活性,提供对多聚抗原的增强的抗体亲抗原性、不同抗原的交联和对特定细胞类型的直接靶向,这取决于两个靶标抗原的存在。由于其增加的价、低离解速率和从循环中快速清除(对于小尺寸的双抗体,为~50kDa或以下),本领域中已知的双抗体分子在肿瘤成像领域还显示特别的用途(Fitzgerald等(1997) “Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In *Pichia pastoris*,”Protein Eng.10:1221)。尤其重要的是共连接不同的细胞,例如,交联细胞毒性T细胞与肿瘤细胞(Staerz等(1985) “Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells,”Nature 314:628-631和Holliger等(1996) “Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody,”Protein Eng.9:299-305)。

[0121] 双抗体表位结合结构域也可针对B细胞,比如CD19、CD20、CD22、CD30、CD37、CD40和CD74的表面决定子(Moore,P.A.等(2011) “Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma,”Blood 117(17):4542-4551;Cheson,B.D.等(2008) “Monoclonal Antibody Therapy For B-Cell Non-Hodgkin’s Lymphoma,”N.Engl.J.Med.359(6):613-626;Castillo,J.等(2008) “Newer monoclonal antibodies for hematological malignancies,”

Exp.Hematol.36 (7):755-768。在许多研究中,也发现结合效应细胞决定子,例如Fc γ 受体(Fc γ R),的双抗体激活效应细胞(Holliger等(1996)“Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody,”Protein Eng.9:299-305;Holliger等(1999)“Carcinoembryonic Antigen(CEA)-Specific T-Cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-CD3 x Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7 x Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins,”Cancer Res.59:2909-2916、WO 2006/113665、WO 2008/157379、WO 2010/080538、WO 2012/018687、WO 2012/162068)。通常,效应细胞激活由结合抗原的抗体经Fc-Fc γ R相互作用与效应细胞的结合而触发;因此,就此而言,双抗体分子可展示Ig样功能,不依赖于它们是否包括Fc结构域(例如,如在本领域中已知的任何效应功能测定中所分析的或在本文示例的效应功能测定(例如,ADCC测定)中所分析的)。通过交联肿瘤和效应细胞,双抗体不仅能使效应细胞在肿瘤细胞附近,而且导致有效肿瘤杀伤(见例如Cao等(2003)“Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics,”Adv.Drug.Deliv.Rev.55:171-197)。

[0122] 然而,上述优势是以显著的成本获得的。这样的非单特异性双抗体的形成要求成功组装两个或多个有区别而不同的多肽(即,这样的形成要求双抗体通过不同多肽链种类的异源二聚化而形成)。该事实与单特异性双抗体不同,其通过一致的多肽链的同源二聚化而形成。由于至少两个不同的多肽(即,两个多肽种类)必须被提供以形成非单特异性双抗体并且由于这样的多肽的同源二聚化导致失活分子(Takemura,S.等(2000)“Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,”Protein Eng.13 (8):583-588),这样的多肽的产生必须以防止相同种类的多肽之间的共价结合的方式完成(即,以便防止同源二聚化)(Takemura,S.等(2000)“Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,”Protein Eng.13 (8):583-588)。因此,本领域已经教导了这样的多肽的非共价结合(见,例如Olafsen等(2004)“Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications,”Prot.Engr.Des.Sel.17:21-27;Asano等(2004)“A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain,”摘要3P-683,J.Biochem.76 (8):992;Takemura,S.等(2000)“Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,”Protein Eng.13 (8):583-588;Lu,D.等(2005)“A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity,”J.Biol.Chem.280 (20):19665-19672)。

[0123] 但是,现有技术已经认识到由非共价结合的多肽组成的双特异性双抗体是不稳定的并且容易解离成无功能的单体(见,例如,Lu,D.等(2005)“A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity,”J.Biol.Chem.280 (20):19665-19672)。

[0124] 面对该挑战时,现有技术已经成功开发了稳定的、共价结合的异源二聚化非单特

异性双抗体,称为DARTsTM(见,例如,美国专利公开号2013-0295121、2010-0174053和2009-0060910;欧洲专利公开号EP 2714079、EP 2601216、EP 2376109、EP 2158221和PCT公开号WO 2012/162068、WO 2012/018687、WO 2010/080538;和Moore,P.A.等(2011)“Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma,”Blood 117(17):4542-4551;Veri,M.C.等(2010)“Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ Receptor IIb(CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold,”Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943;Johnson,S.等(2010)“Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion,”J.Mol.Biol. 399(3):436-449)。这样的双抗体包括两个或多个共价复合的多肽并涉及将一个或多个半胱氨酸残基工程化到每个应用的多肽种类中。例如,将半胱氨酸残基添加至这样的构建体的c-末端已经被证明允许多肽链之间的二硫键合,稳定了产生的异源二聚体,而不干扰二价分子的结合特性。

[0125] 最简单DARTTM的两个多肽中的每一个包括三个结构域(图1)。第一多肽包括:(i) 结构域,其包括第一免疫球蛋白的轻链可变结构域的结合区域(VL1), (ii) 第二结构域,其包括第二免疫球蛋白的重链可变结构域的结合区域(VH2),和(iii) 第三结构域,其用于促进与第二多肽的异源二聚化并且使第一多肽共价结合双抗体的第二多肽。第二多肽包含互补的第一结构域(VL2结构域),互补的第二结构域(VH1结构域)和与第一多肽链的第三结构域复合的第三结构域,以便促进与第一多肽链的异源二聚化和共价键合。这样的分子是稳定的、有效的并且能够同时结合两个或更多个抗原。它们能够促进重定向的T细胞介导对表达靶抗原的细胞的杀伤。

[0126] 在一种实施方式中,第一和第二多肽的第三结构域每个包含半胱氨酸残基,其用于经二硫键将多肽结合在一起。多肽中的一个或两个的第三结构域可另外具有CH2-CH3结构域的序列,以便双抗体多肽的复合形成能够结合细胞(比如B淋巴细胞、树突细胞、天然杀伤细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜伊红粒细胞、嗜碱性细胞和肥大细胞)的Fc受体的Fc结构域(图2A-2B)。已经描述了这样的分子的许多变型(见,例如,美国专利公开号2013-0295121、2010-0174053和2009-0060910;欧洲专利公开号EP 2714079、EP 2601216、EP 2376109、EP 2158221;和PCT公开号WO 2012/162068、WO 2012/018687、WO 2010/080538)。这些包含Fc的DART可包括三条多肽链。这样的双抗体的第一多肽包含三个结构域:(i) 包含VL1的结构域, (ii) 包含VH2的结构域, (iii) 促进与双抗体的第一多肽链的异源二聚化和共价键合的结构域和(iv) 包含CH2-CH3序列的结构域。这样的DARTTM的第二多肽包含:(i) 包含VL2的结构域, (ii) 包含VH1的结构域和(iii) 促进与双抗体的第一多肽链的异源二聚化和共价键合的结构域。这样的DARTTM的第三多肽包括CH2-CH3序列。因此,这样的DARTTM的第一和第二多肽链结合在一起,以形成能够结合表位的VL1/VH1结合位点,以及能够结合第二表位的VL2/VH2结合位点。第一和第二多肽经其各自的第三结构域中包括半胱氨酸残基的二硫键彼此结合。值得注意的是,第一和第三多肽链彼此复合以形成Fc区,其经二硫键被稳定。这样的双抗体具有增强的效力。这样的包含Fc的DARTsTM可具有两个定向(表1)中的任意之一:

[0127]

表 1		
第一 定向	第三条链	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -COOH
	第一条链	NH ₂ -VL1-VH2- 促进异源二聚体的结构域 -CH ₂ -CH ₃ -COOH
	第二条链	NH ₂ -VL2-VH1-促进异源二聚体的结构域-COOH

[0128]

第二 定向	第三条链	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -COOH
	第一条链	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -VL1-VH2-促进异源二聚体的结构域 -COOH
	第二条链	NH ₂ -VL2-VH1-促进异源二聚体的结构域-COOH

[0129] B. 本发明优选的CD19x CD3双特异性单价双抗体

[0130] 本发明尤其涉及能够同时结合CD19和CD3的CD19x CD3双特异性单价双抗体,并且涉及这样的分子在治疗血液学恶性肿瘤中的用途。尽管非优化的CD19x CD3双特异性单价双抗体是充分起作用的,与通过密码子优化在基因表达中获得的改善类似(见,例如, Grosjean, H.等(1982)“Preferential Codon Usage In Prokaryotic Genes: The Optimal Codon-Anticodon Interaction Energy And The Selective Codon Usage In Efficiently Expressed Genes” Gene 18 (3): 199-209),还可能通过修饰或改进它们的序列而进一步提高CD19x CD3双特异性单价双抗体的稳定性和/或功能。

[0131] 本发明优选的CD19x CD3双特异性单价双抗体是由三条多肽链组成的CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体,所述三条多肽链彼此结合以形成对CD19的表位具有特异性的一个结合位点和对CD3的表位具有特异性的一个结合位点(见,图2A-2B),以便能够同时结合CD19和CD3的。因此,这样的双抗体结合“第一抗原”,其可以是CD3或CD19,和结合“第二抗原”,其在第一表位是CD3时是CD19并且在第一表位是CD19时是CD3。

[0132] 优选地,如在图2A中所显示,这样的三条多肽链的第一条在N-末端至C-末端方向上包含N-末端、“第一”抗原(CD3或CD19)的轻链可变结构域的抗原结合结构域(VL)、第二抗原(CD19,如果第一抗原是CD3;CD3,如果第一抗原是CD19)的重链可变结构域的抗原结合结构域(VH)、促进异源二聚体的结构域和C-末端。间插连接体肽(连接体1)将轻链可变结构域的抗原结合结构域与重链可变结构域的抗原结合结构域分开。优选地,重链可变结构域的抗原结合结构域通过间插连接体肽(连接体2)连接至促进异源二聚体的结构域。在CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体的情况下,促进异源二聚体的结构域的C-末端通过间插连接体肽(连接体3)或通过间插间隔连接体肽(间隔连接体3)连接至Fc区域的CH₂-CH₃结构域(“Fc结构域”)。最优选地,三条多肽链的第一条在N-末端至C-末端方向上因此包含: VL_{第一抗原}-连接体1-VH_{第二抗原}-连接体2-促进异源二聚体的结构域-间隔连接体3-Fc结构域。

[0133] 可选地,如在图2B中所显示,这样的三条多肽链的第一条在N-末端至C-末端方向

上包含N-末端、连接体3、Fc区域的CH2-CH3结构域(“Fc结构域”)、间插间隔肽(连接体4),其具有例如氨基酸序列:APSSS(SEQ ID NO:47)或氨基酸序列APSSSPME(SEQ ID NO:48)、第一抗原(CD3或CD19)的轻链可变结构域(VL)的抗原结合结构域、第二抗原(CD19,如果第一抗原是CD3;CD3,如果第一抗原是CD19)的重链可变结构域(VH)的抗原结合结构域、促进异源二聚体的结构域和C-末端。间插连接体肽(连接体1)使轻链可变结构域的抗原结合结构域与重链可变结构域的抗原结合结构域分开。优选地,重链可变结构域的抗原结合结构域通过间插连接体肽(连接体2)连接至促进异源二聚体的结构域。最优选地,三条多肽链的第一条因此在N-末端至C-末端方向上包含:连接体3-Fc结构域-连接体4-VL_{第一抗原}-连接体1-VH_{第二抗原}-连接体2-促进异源二聚体的结构域。

[0134] 优选地,这样的三条多肽链的第二条在N-末端至C-末端方向上包含N-末端、第二抗原的轻链可变结构域(VL)的抗原结合结构域、第一抗原的重链可变结构域(VH)的抗原结合结构域、促进异源二聚体的结构域和C-末端。间插连接体肽(连接体1)将轻链可变结构域的抗原结合结构域与重链可变结构域的抗原结合结构域分开。优选地,重链可变结构域的抗原结合结构域通过间插连接体肽(连接体2)连接至促进异源二聚体的结构域。最优选地,三条多肽链的第二条因此在N-末端至C-末端方向上包含:VL_{第二抗原}-连接体1-VH_{第一抗原}-连接体2-促进异源二聚体的结构域。

[0135] 优选地,这样的三条多肽链的第三条包含连接体肽(连接体3)和Fc区域的CH2-CH3结构域(“Fc结构域”)。

[0136] 第一多肽链的轻链可变结构域的抗原结合结构域与第二多肽链的重链可变结构域的抗原结合结构域相互作用,以便形成对第一抗原(即,CD19或CD3)具有特异性的功能性抗原结合位点。同样地,第二多肽链的轻链可变结构域的抗原结合结构域与第一多肽链的重链可变结构域的抗原结合结构域相互作用,以便形成对第二抗原(即,CD3或CD19,这取决于第一抗原的身份)具有特异性的第二功能性抗原结合位点。因此,第一和第二多肽链的轻链可变结构域的抗原结合结构域和重链可变结构域的抗原结合结构域的选择是协调的,以便两条多肽链总共包括能够结合CD19和CD3的轻链和重链可变结构域的抗原结合结构域。

[0137] I. 优选的连接体

[0138] 最优选地,选择将多肽链这样的VL和VH结构域分开的连接体1的长度,以基本上或完全防止这样的VL和VH结构域彼此结合。因此第一多肽链的VL和VH结构域基本上或完全不能彼此结合。同样地,第二多肽链的VL和VH结构域基本上或完全不能彼此结合。优选的间插间隔肽(连接体1)具有序列(SEQ ID NO:1):GGGSGGGG。

[0139] 连接体2的目的是将多肽链的VH结构域与该多肽链的促进异源二聚体的结构域分开。各种连接体中的任意一种均可用于连接体2的目的。用于这样的连接体2的优选的序列具有氨基酸序列:ASTKG(SEQ ID NO:2),其源自IgG CH1结构域,或GGCGGG(SEQ ID NO:3),其具有可用于使第一和第二多肽链经二硫键彼此共价结合的半胱氨酸残基。因为连接体2,ASTKG(SEQ ID NO:2),不具有这样的半胱氨酸,这样的连接体2的使用优选地与包含半胱氨酸的促进异源二聚体的结构域的使用相结合,比如SEQ ID NO:12的E-螺旋或SEQ ID NO:13的K-螺旋(见下文)。

[0140] 连接体3的目的是将多肽链的促进异源二聚体的结构域与该多肽链的Fc结构域分开。各种连接体中的任意一种均可用于连接体3的目的。这样的连接体3的优选的序列具有

氨基酸序列:DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:4)。间隔连接体3的优选的序列具有氨基酸序列:GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:5)。

[0141] 2. 优选的促进异源二聚体的结构域

[0142] 第一和第二多肽链的异源二聚体的形成可通过包括促进异源二聚体的结构域而被驱动。这样的结构域在一条多肽链上包括GVEPKSC (SEQ ID NO:6) 或VEPKSC (SEQ ID NO:7) 和在另一条多肽链上包括GFNRGEC (SEQ ID NO:8) 或FNRGEC (SEQ ID NO:9) (US2007/0004909)。

[0143] 但是,更优选地,本发明的促进异源二聚体的结构域由具有相反电荷的一个、两个、三个或四个串联重复的螺旋结构域形成,所述螺旋结构域包括具有至少六个、至少七个或至少八个带电氨基酸残基的序列 (Apostolovic, B. 等 (2008) “pH-Sensitivity of the E3/K3 Heterodimeric Coiled Coil,” *Biomacromolecules* 9:3173-3180; Arndt, K.M. 等 (2001) “Helix-stabilized Fv (hsFv) Antibody Fragments: Substituting the Constant Domains of a Fab Fragment for a Heterodimeric Coiled-coil Domain,” *J. Molec. Biol.* 312:221-228; Arndt, K.M. 等 (2002) “Comparison of In Vivo Selection and Rational Design of Heterodimeric Coiled Coils,” *Structure* 10:1235-1248; Boucher, C. 等 (2010) “Protein Detection By Western Blot Via Coiled-Coil Interactions,” *Analytical Biochemistry* 399:138-140; Cachia, P.J. 等 (2004) “Synthetic Peptide Vaccine Development: Measurement Of Polyclonal Antibody Affinity And Cross-Reactivity Using A New Peptide Capture And Release System For Surface Plasmon Resonance Spectroscopy,” *J. Mol. Recognit.* 17:540-557; De Crescenzo, G.D. 等 (2003) “Real-Time Monitoring of the Interactions of Two-Stranded de novo Designed Coiled-Coils: Effect of Chain Length on the Kinetic and Thermodynamic Constants of Binding,” *Biochemistry* 42:1754-1763; Fernandez-Rodriguez, J. 等 (2012) “Induced Heterodimerization And Purification Of Two Target Proteins By A Synthetic Coiled-Coil Tag,” *Protein Science* 21:511-519; Ghosh, T.S. 等 (2009) “End-To-End And End-To-Middle Interhelical Interactions: New Classes Of Interacting Helix Pairs In Protein Structures,” *Acta Crystallographica D* 65:1032-1041; Grigoryan, G. 等 (2008) “Structural Specificity In Coiled-Coil Interactions,” *Curr. Opin. Struc. Biol.* 18:477-483; Litowski, J.R. 等 (2002) “Designing Heterodimeric Two-Stranded α -Helical Coiled-Coils: The Effects Of Hydrophobicity And α -Helical Propensity On Protein Folding, Stability, And Specificity,” *J. Biol. Chem.* 277:37272-37279; Steinkruger, J.D. 等 (2012) “The d'-d-d' Vertical Triad is Less Discriminating Than the a'-a-a' Vertical Triad in the Antiparallel Coiled-coil Dimer Motif,” *J. Amer. Chem. Soc.* 134 (5):2626-2633; Straussman, R. 等 (2007) “Kinking the Coiled Coil-Negatively Charged Residues at the Coiled-coil Interface,” *J. Molec. Biol.* 366:1232-1242; Tripet, B. 等 (2002) “Kinetic Analysis of the Interactions between Troponin C and the C-terminal Troponin I Regulatory Region and Validation of a New Peptide Delivery/Capture System used for

Surface Plasmon Resonance,” J. Molec. Biol. 323:345-362; Woolfson, D.N. (2005) “The Design Of Coiled-Coil Structures And Assemblies,” Adv. Prot. Chem. 70:79-112; Zeng, Y. 等 (2008) “A Ligand-Pseudoreceptor System Based On de novo Desiggned Peptides For The Generation Of Adenoviral Vectors With Altered Tropism,” J. Gene Med. 10:355-367)。

[0144] 这样的重复螺旋结构域可以是精确的重复序列 (repeat) 或可具有取代。例如, 第一多肽链的促进异源二聚体的结构域可包括具有八个带负电的氨基酸残基的序列和第二多肽链的促进异源二聚体的结构域可包括具有八个带正电的氨基酸残基的序列 (或反之亦然)。哪个螺旋提供给第一或第二多肽链不重要, 只要具有相反电荷的螺旋用于另一多肽链。但是, 本发明优选的 CD19x CD3 双特异性单价双抗体具有的第一多肽链具有带负电的螺旋。带正电的氨基酸可以是赖氨酸、精氨酸、组氨酸等和/或带负电的氨基酸可以是谷氨酸、天冬氨酸等。带正电的氨基酸优选地是赖氨酸和/或带负电的氨基酸优选地是谷氨酸。采用仅仅单个促进异源二聚体的结构域是可能的 (因为这样的结构域抑制同源二聚化, 从而促进异源二聚化), 但是, 优选本发明的双抗体的第一和第二多肽链二者均包含促进异源二聚体的结构域。

[0145] 在优选的实施方式中, 促进异源二聚体的结构域之一包括四个串联的“E-螺旋”螺旋结构域 (SEQ ID NO:10: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK), 其谷氨酸残基在 pH 7 形成负电荷, 而另一促进异源二聚体的结构域包括四个串联“K-螺旋”结构域 (SEQ ID NO:11: KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK), 其赖氨酸残基在 pH 7 形成正电荷。这样的带电结构域的存在促进了第一和第二多肽之间的结合, 因此促进异源二聚化。尤其优选的是这样的促进异源二聚体的结构域: 其中 SEQ ID NO:10 的四个串联“E-螺旋”螺旋结构域之一已经被修饰成包含半胱氨酸残基: EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:12)。同样地, 尤其优选的是这样的促进异源二聚体的结构域, 其中 SEQ ID NO:11 的四个串联“K-螺旋”螺旋结构域之一已经被修饰成包含半胱氨酸残基: KVAACEK-KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK (SEQ ID NO:13)。

[0146] 3. 多肽链的共价键合

[0147] 本发明的 CD19x CD3 双特异性单价双抗体被工程化, 以便它们的第一和第二多肽链经沿着它们的长度布置的一个或多个半胱氨酸残基彼此共价键合。这样的半胱氨酸残基可被引入到将多肽的 VL 和 VH 结构域分开的间插连接体中。可选地, 连接体 2 可包含半胱氨酸残基。另外或可选地, 连接体 3 可包含半胱氨酸残基, 如在 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5 中。最优选地, 促进异源二聚体的结构域的一个或多个螺旋结构域被取代, 以包含半胱氨酸残基, 如在 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:13 中。

[0148] 在具体的实施方式中, 本发明的 CD19x CD3 双特异性单价双抗体可进一步具有白蛋白结合结构域, 以延长体内的半衰期。

[0149] 4. 优选的 Fc 结构域

[0150] 本发明的 CD19x CD3 双特异性单价 Fc 双抗体的 Fc 结构域可是完整的 Fc 区域 (例如, 完整的 IgG Fc 区域) 或仅仅是完整 Fc 区域的片段。尽管本发明的双特异性单价 Fc 双抗体的 Fc 结构域可具有结合一个或多个 Fc 受体 (例如, Fc γ R (一种或多种)) 的能力, 但是更优选地这样的 Fc 结构域将造成与 Fc γ R1A (CD64)、Fc γ R1A (CD32A)、Fc γ R1B (CD32B)、Fc γ R1IA

(CD16a) 或Fc γ RIIIB (CD16b) 减少的结合 (相对于野生型Fc区域展示的结合) 或基本上消除这样的Fc结构域结合这样的受体 (一种或多种) 的能力。本发明的双特异性单价Fc双抗体的Fc结构域可包括完整Fc区域的一些或所有的CH2结构域和/或一些或所有的CH3结构域, 或可包括变异的CH2和/或变异的CH3序列 (其相对于完整Fc区域的CH2或CH3结构域可包括, 例如, 一个或多个插入和/或一个或多个缺失)。本发明的双特异性单价Fc双抗体的Fc结构域可包括非Fc多肽部分, 或可包括非天然的完整Fc区域的部分, 或可包括非天然取向的CH2和/或CH3结构域 (比如, 例如, 两个CH2结构域或两个CH3结构域, 或在N-末端至C-末端方向上, 连接至CH2结构域的CH3结构域等)。

[0151] 在优选的实施方式中, 本发明的CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体的第一和第三多肽链每个包括复合在一起的CH2-CH3结构域, 以形成免疫球蛋白 (IgG) Fc结构域。人IgG1的CH2-CH3结构域的氨基酸序列是 (SEQ ID NO:14) :

[0152]

APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD

[0153]

GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPGK

[0154] 因此第一和第三多肽链的CH2和/或CH3结构域二者可都由SEQ ID NO:14或其变体组成。

[0155] 尤其地, 优选本发明的CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体的第一和第三多肽链的CH2-CH3结构域展示与Fc γ RIA (CD64)、Fc γ RIIA (CD32A)、Fc γ RIIIB (CD32B)、Fc γ RIIIA (CD16a) 或Fc γ RIIIB (CD16b) 降低的 (或基本上没有) 结合 (相对于野生型Fc区域 (SEQ ID NO:14) 展示的结合。能够介导这样的改变的结合的Fc变体和突变体形式是本领域熟知的, 其包括在234和235位的氨基酸取代、在265位的取代或在297位的取代 (见, 例如, US专利号 5,624,821, 其通过引用并入本文)。在优选的实施方式中, 本发明的CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体的第一和/或第三多肽链的CH2-CH3结构域包括在234位用丙氨酸的取代和235位用丙氨酸的取代。

[0156] 第一和第三多肽链的CH2和/或CH3结构域的序列不需要一致, 并且, 其有利地被修饰以促进两条多肽链之间的复合。例如, 氨基酸取代 (优选以包括形成“杵 (knob)”的大侧基的氨基酸例如色氨酸进行取代) 可被引入CH2或CH3结构域, 以便空间干扰将防止与类似突变的结构域的相互作用并将迫使突变的结构域与这样的结构域配对: 已经向所述结构域中工程化了互补或适应性突变“臼 (hole)” (例如, 用甘氨酸取代)。这样的突变组可被工程化到包含双特异性单价Fc双抗体分子的任意多肽对中, 并且进一步被工程化到所述多肽对的多肽链的任何部分中。相对于同源二聚化利于异源二聚化的蛋白质工程的方法在本领域中是悉知的, 尤其是关于工程化免疫球蛋白样分子, 这些都包括在本文中 (见例如, Ridgway等 (1996) ‘Knobs-Into-Holes’ Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization” Protein Engr.9:617-621, Atwell等 (1997) “Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display

Library” J.Mol.Biol.270:26-35和Xie等(2005) “A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis” J.Immunol.Methods 296:95-101;其每一篇通过参考以其整体并入本文)。优选“杵”被工程化到第一多肽链的CH2-CH3结构域中和“臼”被工程化到第三多肽链的CH2-CH3结构域中。因此,“杵”将有助于防止第一多肽链经其CH2和/或CH3结构域而同源二聚化。由于第三多肽链优选包含“臼”取代,其将与第一多肽链异源二聚化以及自身同源二聚化。通过将天然IgG Fc结构域修饰为含有修饰T366W,产生优选的杵。通过将天然IgG Fc结构域修饰为含有修饰T366S、L368A以及Y407V,产生优选的臼。为了帮助从包括第一、第二和第三多肽链的最终双特异性单价Fc双抗体纯化第三多肽链同二聚物,第三多肽链的CH2和CH3结构域的蛋白A结合位点优选地经在435位的氨基酸取代(H435R)被突变。因此,第三多肽链同二聚物不会结合蛋白A,而双特异性单价Fc双抗体会保留其通过第一多肽链上的蛋白A结合位点结合蛋白A的能力。

[0157] 本发明的CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体的第一多肽链的CH2和CH3结构域的优选序列具有“包含杵的”序列(SEQ ID NO:15):

[0158]

```
APEAAGGPSV  FLFPPKPKDT  LMISRTPEVT  CVVVDVSHED  PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK  PREEQYNSTY  RVVSVLTVLH  QDWLNGKEYK  CKVSNKALPA
PIEKTISKAK  GQPREPQVYT  LPPSREEMTK  NQVSLWCLVK  GFYPSDIAVE
WESNGQPENN  YKTTTPVLDS  DGSFFLYSKL  TVDKSRWQQG  NVFSCSV MHE
ALHNHYTQKS  LSLSPGK
```

[0159] 本发明的CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体的第三多肽链的CH2和CH3结构域的优选序列具有“包含臼的”序列(SEQ ID NO:16):

[0160]

```
APEAAGGPSV  FLFPPKPKDT  LMISRTPEVT  CVVVDVSHED  PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK  PREEQYNSTY  RVVSVLTVLH  QDWLNGKEYK  CKVSNKALPA
PIEKTISKAK  GQPREPQVYT  LPPSREEMTK  NQVSLSCAVK  GFYPSDIAVE
WESNGQPENN  YKTTTPVLDS  DGSFFLVSKL  TVDKSRWQQG  NVFSCSV MHE
ALHNRYTQKS  LSLSPGK
```

[0161] 如将叙述的,SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16的CH2-CH3结构域包括在234位用丙氨酸进行的取代和235位用丙氨酸进行的取代,并且因此形成的Fc结构域展示与Fc γ RIA (CD64)、Fc γ RIIA (CD32A)、Fc γ RIIB (CD32B)、Fc γ RIIIA (CD16a) 或Fc γ RIIB (CD16b) 下降的(或基本上不)结合(相对于野生型Fc区域(SEQ ID NO:14)展示的结合)。

[0162] 优选地,第一多肽链具有“包含杵的”CH2-CH3序列,比如SEQ ID NO:15的CH2-CH3序列。但是,如将认识到,“包含臼的”CH2-CH3结构域(例如,SEQ ID NO:16)可在第一多肽链中采用,在该情况下,“包含杵的”CH2-CH3结构域(例如,SEQ ID NO:15)将用于第三多肽链。

[0163] 5. 优选的CD19可变区

[0164] 可根据本发明使用任何抗CD19抗体的轻链可变结构域的抗原结合结构域。但是,优选地,这样的VL_{CD19}结构域具有氨基酸序列(SEQ ID NO:17):

[0165] ENVLTQSPAT LSVTPGEKAT ITCRASQSVS YMHWYQQKPG QAPRLLIYDA SNRASGVPSR

FSGSGSGTDH TLTSSLEAE DAATYYCFQG SVYPFTFGQG TKLEIK

[0166] 其中加下划线的序列分别是其CDR1、CDR2和CDR3:

[0167] VL_{CD19}CDR1:RASQSVSYMH (SEQ ID NO:18)

[0168] VL_{CD19}CDR2:DASNRAS (SEQ ID NO:19)

[0169] VL_{CD19}CDR3:FQGSVYPFT (SEQ ID NO:20)

[0170] 同样地,可根据本发明使用任何抗CD19抗体的重链可变结构域的抗原结合结构域。但是,优选地,这样的VH_{CD19}结构域具有氨基酸序列 (SEQ ID NO:21):

[0171]

QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSL TSGMGVGWIR QPPGKALEWL
 AHIWDDDKR YNPALKSRLT ISKDTSKNQV FLTMTNMDPV DTATYYCARM
ELWSYYFDYW GQGT TVTVSS

[0172] 其中加下划线的序列分别是其CDR1、CDR2和CDR3:

[0173] VH_{CD19}CDR1:TSGMGV (SEQ ID NO:22)

[0174] VH_{CD19}CDR2:HIWDDDKRYNPALKS (SEQ ID NO:23)

[0175] VH_{CD19}CDR3:MELWSYYFDY (SEQ ID NO:24)

[0176] 6. 优选的CD3可变结构域

[0177] 可根据本发明使用任何抗CD3抗体的轻链可变结构域的抗原结合结构域。但是,优选地,这样的VL_{CD3}结构域具有氨基酸序列 (SEQ ID NO:25):

[0178]

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
 GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG

[0179] 其中加下划线的序列分别是其CDR1、CDR2和CDR3:

[0180] VL_{CD3}CDR1:RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:26)

[0181] VL_{CD3}CDR2:GTNKRAP (SEQ ID NO:27)

[0182] VL_{CD3}CDR3:ALWYSNLWV (SEQ ID NO:28)

[0183] 同样地,可根据本发明使用任何抗CD3抗体的重链可变结构域的抗原结合结构域。但是,优选地,这样的VH_{CD3}结构域具有氨基酸序列 (SEQ ID NO:29):

[0184]

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
IRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGT TVTVSS

[0185] 其中加下划线的序列分别是其CDR1、CDR2和CDR3:

[0186] VH_{CD3}CDR1:TYAMN (SEQ ID NO:30)

[0187] VH_{CD3}CDR2:RIRSKYNNYATYYADSVKG (SEQ ID NO:31)

[0188] VH_{CD3}CDR3:HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO:32)

[0189] 7. 任选的白蛋白结合结构域

[0190] 如在WO 2012/018687中公开的,为了进一步改善本发明的CD19x CD3双特异性单价双抗体和CD19x CD3双特异性单价双抗体Fc双抗体的体内药物代谢动力学特性,可修饰这样的双抗体,以在双抗体的一个或多个末端包含血清结合蛋白的多肽部分。最优选地,血

清结合蛋白的这样的多肽部分安置在双抗体的C-末端。用于该目的的尤其优选的血清结合蛋白的多肽部分是来自链球菌蛋白质G的白蛋白结合结构域(ABD)。链球菌属菌株G148的蛋白质G的白蛋白结合结构域3(ABD3)是尤其优选的。

[0191] 链球菌属菌株G148的蛋白质G的白蛋白结合结构域3(ABD3)由形成稳定的三-螺旋束的46个氨基酸残基组成,并且具有广泛的白蛋白结合特异性(Johansson,M.U.等(2002)“Structure,Specificity,And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules,”J.Biol.Chem.277(10):8114-8120)。白蛋白是血浆中最丰富的蛋白质并且在人中的半衰期为19天。白蛋白具有若干小分子结合位点,其允许它非共价结合其他蛋白质,从而延长它们的血清半衰期。

[0192] 因此,具有白蛋白结合结构域的这样的CD19x CD3双特异性单价双抗体或双特异性单价Fc双抗体的第二多肽链包含连接体(连接体4),其将这样的多肽链的E-螺旋(或K-螺旋)与白蛋白结合结构域分开。这样的连接体4的优选的序列是SEQ ID NO:33:GGGS。优选的白蛋白结合结构域(ABD)具有序列(SEQ ID NO:34): LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLIDNAKSAEGVKALIDEILAALP。

[0193] C.示意性CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体,“DART-A”

[0194] 本发明提供了示意性CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体,其能够同时并特异性结合CD19和CD3。该示意性双抗体表示为“DART-A”。发现本发明的双抗体相对于其他CD19x CD3双抗体展示增强的功能活性。

[0195] 如上面所示,本发明的CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体包括三条多肽链。DART-A的第一多肽链在N-末端至C-末端方向上包括N-末端、能够结合CD19的单克隆抗体的VL结构域(VL_{CD19})(SEQ ID NO:17)、间插连接体肽(连接体1;GGGSGGGG(SEQ ID NO:1))、能够结合CD3的单克隆抗体的VH结构域(VH_{CD3})(SEQ ID NO:29)、间插连接体肽(连接体2;ASTKG(SEQ ID NO:2))、促进异源二聚体的(E-螺旋)结构域(EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK(SEQ ID NO:12))、间插连接体肽(间隔连接体3;GGGDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:5))、包含“包含杵的”CH2和CH3结构域的多肽(Fc结构域序列,SEQ ID NO:15)和C-末端。

[0196] 因此,DART-A的第一多肽链由以下组成:SEQ ID NO:17-SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:29-SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:12-SEQ ID NO:5-SEQ ID NO:15。

[0197] DART-A的第一多肽的氨基酸序列是(SEQ ID NO:35):

[0198] ENVLTQSPATLSVTPGEKATITCRASQSVSYMHYQQKPGQAPRLLIYDASNRRASGVPSRFSGSGSGTDHTLTISSELAEDAATYYCFQGSVYPFTFGQGTKLEIKGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSSASTKGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKGGGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0199] 编码这样的多肽的优选的多核苷酸是(SEQ ID NO:36):

[0200]

gagaatgtgtgtcacacagtcctcctgcaactctgagcgttaactccaggggagaaggccaccatcacgtgtagagcctccagagtgtagctacatgcactggtatcagcagaaacctggacaagctcccaggttgctgatctatgacgcgagca

accgggctagtggcgttccatcccggttttctggctcaggatctggcactgaccacaccctcaccatattcagcctt
gaagccgaagatgcccgaacctactactgctttcaggggagtggtatcccttcacattcggtcagggtacaaagct
ggagattaagggtggaggatccggcggcggaggcgaggtgcagctgggtggagtctgggggaggcttggtccagcctg
gagggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagcacatacgctatgaattgggtccgccaggt
ccagggaaggggctggagtgggttggaaaggatcagggtccaagtacaacaattatgcaacctactatgccgactctgt
gaagggtagattcaccatctcaagagatgattcaaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgaaaaccgagg
acacggccgtgtattactgtgtgagacacggtaacttcggcaattcttacgtgtcttggtttgcttattggggacag
gggacactgggtgactgtgtcttccgcctccaccaaggcggaagtggccgcattgtgagaaagaggttgctgctttgga
gaaggaggtcgctgcacttgaaaaggaggtcgagccctggagaaaggcggcggggacaaaactcacacatgccac
cgtgccccagcacctgaagccgcggggggaccgtcagttcttcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgac
tcccggaacctgaggtcacatgcgtgggtgggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgt
ggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcg
tctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcc
cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggcgagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatcccgga
ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgtggtgcttggtcaaaggttctatcccagcgacatcgccgtggagtggg
agagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccggtgctggactccgacggctccttcttctctac
agcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctctatgctccgtgatgcatgaggctctgca
caaccactacacgcagaagagcctctcctgtctcgggtaaa

[0201] DART-A的第二多肽链在N-末端至C-末端方向上包括N-末端、能够结合CD3的单克隆抗体的VL结构域(VL_{CD3}) (SEQ ID NO:25)、间插连接体肽(连接体1;GGGSGGG (SEQ ID NO:1))、能够结合CD19的单克隆抗体的VH结构域(VH_{CD19}) (SEQ ID NO:21)、间插连接体肽(连接体2;ASTKG (SEQ ID NO:2))、促进异源二聚体的(K-螺旋)结构域(KVAACKK-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:13)和C-末端。

[0202] 因此,DART-A的第二多肽由以下组成:SEQ ID NO:25-SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:13。

[0203] DART-A的第二多肽的氨基酸序列是(SEQ ID NO:37):

[0204] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLL
GGKAALTITGAQAEDADYYCALWYSNLWVFGGKTLTVLGGGSGGGQVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFS
LSTSGMGVGWIRQPPGKALEWLAHIWWDDDKRYNPALKSRLTISKDTSKNQVFLTMTNMDPVDATYYCARMELWSY
YFDYWGGTTTVTVSSASTKGKVAACKKVAALKEKVAALKEKVAALKE

[0205] 编码这样的多肽的优选的多核苷酸具有序列(SEQ ID NO:38):

[0206]

caggctgtggtgactcaggagccttactgaccgtgtccccaggcggaaactgtgacctgacatgcagatccagcac
aggcgcagtgaccacatctaactacgccaattgggtgcagcagaagccaggacaggcaccaaggggctgatcgggg
gtacaaacaaaagggtccctggaccctgcacggtttctggaagtctgctggcggaaggccgctctgactatt
accggggcacaggccgaggacgaagccgattactattgtgctctgtggtatagcaatctgtgggtgttcgggggtgg
cacaaaactgactgtgctgggaggggtggatccggcggaggtggacaggtgacactgagggaatctgggtccagctc
tggtgaaaccactcagacgtcactctcacttgcaccttagtggttctcactgtccacatctggcatgggagta
ggctggattcgacagccacctgggaaagccttgaggtggcttgccacatctggtgggatgacgacaagcgtataa

tcccgactgaagagcagactgaccatcagcaaggatacatccaagaaccaggtgtttctgaccatgaccaacatgg
accctgtcgatacagccacctactattgtgctcgcatggagttgtggctcctactacttcgactattggggacaaggc
acaaccgtgactgtctcatccgcctccaccaagggcaaagtggccgcatgtaaggagaaagttgctgctttgaaaga
gaaggtcgccgcacttaaggaaaaggtcgagccctgaaagag

[0207] DART-A的第三多肽链在N-末端至C-末端方向上包括N-末端、肽(连接体3;
DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:4))、包含“包含白的”CH2和CH3结构域的多肽(Fc结构域序列,SEQ
ID NO:16)和C-末端。

[0208] 因此,DART-A的第三多肽由以下组成:SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:16。

[0209] DART-A的第三多肽的氨基酸序列是(SEQ ID NO:39):

[0210] DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVSCFVMSHHEALHNRYTQKSLSL
SPGK

[0211] 编码这样的多肽的优选的多核苷酸具有序列(SEQ ID NO:40):

[0212]

gacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaagccgcggggggaccgtcagtcttctcttccccccaaa
accaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctg
aggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaac
agcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggt
ctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgt
acaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgagttgcgagtcacaaaggttctatccc
agcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactc
cgacggctccttcttctctcgctcagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgct
ccgtgatgcatgaggtctctgcacaaccgctacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

[0213] D. 对照DARTS

[0214] 为了更有意义地表明本发明的CD19x CD3双特异性单价双抗体的特性,构建了两个对照DARTS。第一对照DART(“对照DART 1”)能够结合荧光素和CD3。第二对照DART(“对照DART 2”)能够结合荧光素和CD19。

[0215] 用于形成对照DART 1和2的抗荧光素抗体是抗体4-4-20(Gruber,M.等(1994)
“Efficient Tumor Cell Lysis Mediated By A Bispecific Single Chain Antibody
Expressed In Escherichia coli,”J.Immunol.152(11):5368-5374;Bedzyk,W.D.等
(1989)“Comparison Of Variable Region Primary Structures Within An Anti-
Fluorescein Idiotypic Family,”J.Biol.Chem.264(3):1565-1569),用于对照双抗体中。
抗荧光素抗体4-4-20的轻链可变结构域和重链可变结构域的氨基酸序列如下:

[0216] 抗荧光素抗体4-4-20的轻链可变结构域的氨基酸序列(SEQ ID NO:41):

[0217] DVVMTQTPFS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNNGNTYLRW YLQKPGQSPK
VLIYKVSNRFS SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCQSSTHVP

[0218] WTFGGGKLE IK

[0219] 抗荧光素抗体4-4-20的重链可变结构域的氨基酸序列(SEQ ID NO:42):

EVKLDETGGG LVQPGRPMKL SCVASGFTFS DYWMNWVRQS PEKGLEWVAQ
 [0220] IRNKPNYET YYSDSVKGRF TISRDDSKSS VYLQMNLRV EDMGIYYCTG
SYYGMDYWGQ GTSVTVSS

[0221] 1.对照DART 1(荧光素x CD3)

[0222] 对照DART 1的第一多肽链在N-末端至C-末端方向上包括N-末端、能够结合荧光素的单克隆抗体的VL结构域(VL₄₋₄₋₂₀)(SEQ ID NO:41)、间插连接体肽(连接体1;GGSGGGG(SEQ ID NO:1))、能够结合CD3的单克隆抗体的VH结构域(VH_{CD3})(SEQ ID NO:29)、间插连接体肽(连接体2;GGCGGG(SEQ ID NO:3))、促进异源二聚体的(E-螺旋)结构域(EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK(SEQ ID NO:10))、间插连接体肽(间隔连接体3;GGDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:5))、包含“包含杵的”CH2和CH3结构域的多肽(Fc结构域序列,SEQ ID NO:15)和C-末端。

[0223] 因此,对照DART 1的第一多肽链由以下组成:SEQ ID NO:41-SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:29-SEQ ID NO:3-SEQ ID NO:10-SEQ ID NO:5-SEQ ID NO:15。

[0224] 对照DART 1的第一多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:43):

[0225] DVVMTQTPFSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLRLWYLQKPGQSPKVLIIKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIKGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHNGFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASTKGEVAACEKEVAALKEVAALKEVAALKEKGGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0226] 对照DART 1的第二多肽链在N-末端至C-末端方向上包括N-末端、能够结合CD3的单克隆抗体的VL结构域(VL_{CD3})(SEQ ID NO:25)、间插连接体肽(连接体1;GGSGGGG(SEQ ID NO:1))、能够结合荧光素的单克隆抗体的VH结构域(VH_{F1uor})(SEQ ID NO:42)、间插连接体肽(连接体2;GGCGGG(SEQ ID NO:3))、促进异源二聚体的(K-螺旋)结构域(KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK(SEQ ID NO:11)和C-末端。

[0227] 因此,对照DART 1的第二多肽链由以下组成:SEQ ID NO:25-SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:42-SEQ ID NO:3-SEQ ID NO:11。

[0228] 对照DART 1的第二多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:44):

[0229] QAVVTQEPLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLGGAALTITGAQAEDADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGEVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPNYETYYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSTVTVSSASTKGVAAACEKEVAALKEKVAALKEKVAALKE

[0230] 对照DART 1的第三多肽链在N-末端至C-末端方向上包括N-末端、肽(连接体3;DKTHTCPPCP(SEQ ID NO:4))、包含“包含杵的”CH2和CH3结构域的多肽(Fc结构域序列,SEQ ID NO:16)和C-末端。

[0231] 因此,对照DART 1的第三多肽链由以下组成:SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:16。

[0232] 对照DART 1的第三多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:39):

[0233] DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNRYTQKSLSLSPGK

[0234] 2.对照DART 2(荧光素x CD19)

[0235] 对照DART 2的第一多肽链在N-末端至C-末端方向上包括N-末端、能够结合CD19的单克隆抗体的VL结构域(VL_{CD19})(SEQ ID NO:17)、间插连接体肽(连接体1;GGGSGGGG(SEQ ID NO:1))、能够结合荧光素的单克隆抗体的VH结构域(VH_{Fluor})(SEQ ID NO:42)、间插连接体肽(连接体2;GGCGGG(SEQ ID NO:3))、促进异源二聚体的(E-螺旋)结构域(EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK(SEQ ID NO:10))、间插连接体肽(间隔连接体3;GGDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:5))、包含“包含杵的”CH2和CH3结构域的多肽(Fc结构域序列,SEQ ID NO:15)和C-末端。

[0236] 因此,对照DART 2的第一多肽链由以下组成:SEQ ID NO:17-SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:42-SEQ ID NO:3-SEQ ID NO:10-SEQ ID NO:5-SEQ ID NO:15。

[0237] 对照DART 2的第一多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:45):

[0238] ENVLTQSPATLSVTPGEKATITCRASQSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDASNRASGVPSRFSGSGSGTDHTLTISSELEAEDAATYYCFQGSVYPFTFGQGTKLEIKGGGSGGGGEVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSTVTVSSASTKGEVAACEKEVAALKEVAALKEVAALKEGGGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0239] 对照DART 2的第二多肽链在N-末端至C-末端方向上包括N-末端、能够结合荧光素的单克隆抗体的VL结构域(VL_{Fluor})(SEQ ID NO:41)、间插连接体肽(连接体1;GGGSGGGG(SEQ ID NO:1))、能够结合CD3的单克隆抗体的VH结构域(VH_{CD3})(SEQ ID NO:29)、间插连接体肽(连接体2;GGCGGG(SEQ ID NO:3))、促进异源二聚体的(K-螺旋)结构域(KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE(SEQ ID NO:11)和C-末端。

[0240] 因此,对照DART 2的第二多肽链由以下组成:SEQ ID NO:41-SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:29-SEQ ID NO:3-SEQ ID NO:11。

[0241] 对照DART 2的第二多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:46):

[0242] QAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLGGAALTITGAQAEDADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGSGGGGEVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSTVTVSSASTKGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

[0243] 对照DART 2的第三多肽链在N-末端至C-末端方向上包括N-末端、肽(连接体3;DKTHTCPPCP(SEQ ID NO:4))、包含“包含臼的”CH2和CH3结构域的多肽(Fc结构域序列,SEQ ID NO:16)和C-末端。

[0244] 因此,对照DART 2的第三多肽链由以下组成:SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:16。

[0245] 对照DART 2的第三多肽的氨基酸序列是SEQ ID NO:39):

[0246] DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK

[0247] E. 药学组合物

[0248] 本发明的组合物包括原料药 (bulk drug) 组合物, 其可用于制备药学组合物 (例如, 不纯或非无菌组合物) 和可用于制备单位剂型的药学组合物 (即, 适于施用给受试者或患者的组合物)。这样的组合物包括预防有效量的或治疗有效量的本发明的CD19x CD3双特异性单价双抗体或这样的药剂和药学上可接受的载体的组合。优选地, 本发明的组合物包括预防有效量的或治疗有效量的本发明的CD19x CD3双特异性单价双抗体和药学上可接受的载体。

[0249] 本发明也包括这样的药学组合物, 其包括本发明的CD19x CD3双特异性单价双抗体 (尤其地, CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体), 和对特定的癌症抗原具有特异性的第二治疗抗体 (例如, 肿瘤特异性单克隆抗体), 以及药学上可接受的载体。

[0250] 在具体实施方式中, 术语“药学上可接受的”表示获得联邦政府或州政府管理机构的许可或列于美国药典 (U.S. Pharmacopeia) 或其他供用于动物, 特别是用于人类的通常获得认可的药典中。术语“载体”指与治疗剂一起施用的稀释剂、佐剂 (例如弗氏佐剂 (完全和不完全)、赋形剂或媒介。这类药学载体可以是无菌液体, 如水和油, 包括石油、动物油、植物油或合成来源的油, 如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内施用药学组合物时, 水是优选的载体。盐水溶液和含水右旋糖以及甘油溶液也可以用作液体载体, 特别是对于可注射溶液而言。合适的药用赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂乳粉 (dried skim milk)、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。若需要, 组合物也可以含有小量湿润剂或乳化剂或pH缓冲剂。这些组合物可以采用溶液、悬液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、粉剂、缓释制剂等形式。

[0251] 通常, 本发明组合物的成分被单独提供或以单位剂型混合在一起, 例如作为标明活性剂的量的密封容器中的冻干粉或无水浓缩物, 所述密封容器如安瓿或小袋 (sachette)。当通过输注施用组合物时, 其可以用含有无菌的药学级水或盐水的输注瓶分配。如果通过注射施用所述组合物, 则可以提供一安瓿注射用无菌水或盐水, 以便可以在施用前混合所述成分。

[0252] 可以将本发明的组合物配制为中性或盐形式。药学上可接受的盐包括但不限于用阴离子形成的盐以及用阳离子形成的盐, 所述阴离子例如来源于盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的阴离子, 并且所述阳离子例如来自氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙基氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等。

[0253] 本发明也提供药学包装或试剂盒, 其包括一个或多个容器, 所述容器填充本发明的CD19x CD3双特异性单价双抗体 (尤其地, CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体), 单独地或组合这样的药学上可接受的载体。另外, 用于治疗疾病的一种或多种其他预防剂或治疗剂也可以包括于所述药学包装或试剂盒中。本发明还提供了药学包装或试剂盒, 其包含一个或多个容器, 所述容器填充以本发明药学组合物的一种或多种成分。任选地与这类容器 (一个或多个) 关联的可以是管理药物或生物产品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式的布告 (notice), 所述布告反映了管理机构对用于人类施用的制造、使用或销售的批准。

[0254] 本发明提供了可用于上述方法的试剂盒。试剂盒可包括本发明的CD19x CD3双特异性单价双抗体,更优选地,包括CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体。试剂盒可在一个或多个容器中进一步包括用于治疗癌症的一种或多种其他预防剂和/或治疗剂;和/或试剂盒可进一步包括结合与癌症相关的一个或多个癌抗原的一种或多种细胞毒性抗体。在某些实施方式中,其他预防剂或治疗剂是化疗剂。在其他实施方式中,预防剂或治疗剂是生物或激素治疗剂。

[0255] F. 施用方法

[0256] 通过向受试者施用有效量的本发明的融合蛋白或缀合分子或包括本发明的融合蛋白或缀合分子的药学组合物,可以提供本发明的组合物用来治疗、预防和改善与疾病、病症或感染相关的一种或多种症状。在优选的方面,这类组合物基本上是纯的(即,基本上不含限制其效果或产生不期望的副作用的物质)。在具体实施方式中,受试者是动物,优选哺乳动物,如非灵长类(例如牛、马、猫科动物、犬科动物、啮齿动物等)或灵长类(例如,猴子,如食蟹猴、人等)。在优选的实施方式中,受试者是人。

[0257] 各种递送系统是已知的,并且可以用于施用本发明的组合物,例如封装于脂质体、微粒、微胶囊、重组细胞中,能表达抗体或融合蛋白的重组细胞、受体介导的内吞作用(见,例如,Wu等(1987)“Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System”J.Biol.Chem.262:4429-4432),构建核酸作为逆转录病毒或其他载体的一部分等。施用本发明的分子的方法包括、但不限于肠胃外施用(例如皮内、肌肉、腹腔内、静脉内以及皮下)、硬膜外以及粘膜(例如鼻内和口腔途径)。在具体实施方式中,本发明的CD19x CD3双特异性单价双抗体或CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体经肌肉、静脉内或皮下施用。组合物可以通过任何方便途径施用,例如通过输注或弹丸注射、通过上皮或黏膜皮肤被覆(lining)(例如口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收,并且可以与其他生物活性剂一起施用。给药可以是全身的或局部的。另外,也可以应用肺部给药,例如通过使用吸入器或喷雾器,并且与雾化剂一起配制。见例如美国专利号6,019,968;5,985,320;5,985,309;5,934,272;5,874,064;5,855,913;5,290,540;和4,880,078;和PCT公布号WO 92/19244;WO 97/32572;WO 97/44013;WO 98/31346;和WO 99/66903,其各自通过引用以其整体并入本文。

[0258] 本发明也使得本发明的CD19x CD3双特异性单价双抗体(尤其地,CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体)被包装在密封容器中,比如指示分子的量的安瓿或小袋中。在一个实施方式中,本发明的CD19x CD3双特异性单价双抗体作为冻干无菌粉或无水浓缩物提供于密封容器中,并且可以用例如水或盐水重构至适当浓度用于施用于受试者。优选地,本发明的CD19x CD3双特异性单价双抗体作为冻干无菌粉提供于密封容器中,其单位剂量为至少5 μ g、更优选地至少10 μ g、至少15 μ g、至少25 μ g、至少50 μ g、至少100 μ g、或至少200 μ g。

[0259] 本发明冻干的CD19x CD3双特异性单价双抗体或CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体应在它们的原容器中在2和8 $^{\circ}$ C之间储存,并且分子应在重构之后的12小时内,优选地6小时内,5小时内,3小时内,或1小时内施用。在可选的实施方式中,本发明的CD19x CD3双特异性单价双抗体以液体形式提供在指示分子、融合蛋白或缀合分子的量和浓度的密封容器中。优选地,本发明液体形式的CD19x CD3双特异性单价双抗体提供在密封容器中,其中分子存在的浓度为至少1 μ g/ml,更优选地至少2.5 μ g/ml、至少5 μ g/ml、至少10 μ g/ml、至少50 μ

g/ml或至少100 μ g/ml。

[0260] 可通过标准临床技术测定本发明的组合物有效治疗、预防或改善与病症相关的一个或多个症状的量。制剂中采用的精确剂量还将取决于施用的途径和病况的严重性,并且应根据从业者的判断和每个患者的情况决定。有效的剂量可从源自体外或动物模型测试系统的剂量响应曲线来推断。

[0261] 对于本发明包括的CD19x CD3双特异性单价双抗体或CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体,优选地基于接受受试者的体重(kg)确定施用至患者的剂量。施用的剂量通常是至少约0.3ng/kg/天至约0.9ng/kg/天、至少约1ng/kg/天至约3ng/kg/天、至少约3ng/kg/天至约9ng/kg/天、至少约10ng/kg/天至约30ng/kg/天、至少约30ng/kg/天至约90ng/kg/天、至少约100ng/kg/天至约300ng/kg/天、至少约200ng/kg/天至约600ng/kg/天、至少约300ng/kg/天至约900ng/kg/天、至少约400ng/kg/天至约800ng/kg/天、至少约500ng/kg/天至约1000ng/kg/天、至少约600ng/kg/天至约1000ng/kg/天、至少约700ng/kg/天至约1000ng/kg/天、至少约800ng/kg/天至约1000ng/kg/天、至少约900ng/kg/天至约1000ng/kg/天或至少约1,000ng/kg/天。

[0262] 在另一实施方式中,患者被施用这样的治疗方案:其包括一个或多个剂量的本发明包括的这类预防有效量或治疗有效量的CD19x CD3双特异性单价双抗体(尤其地,CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体),其中治疗方案在2天、3天、4天、5天、6天或7天内施用。在某些实施方式中,治疗方案包括间歇地施用本发明包括的预防有效量或治疗有效量的CD19x CD3双特异性单价双抗体的剂量(例如,在给定周的第1天、第2天、第3天和第4天施用剂量,并且在该周的第5天、第6天和第7天不施用本发明包括的预防有效量或治疗有效量的CD19x CD3双特异性单价双抗体(尤其地,CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体)的剂量)。典型地,有1、2、3、4、5或更多个治疗疗程。每个疗程可以是相同的方案或不同的方案。

[0263] 在另一个实施方式中,施用的剂量在方案(一个或多个)的前四分之一、前一半、或前三分之二或四分之三内上升(例如,在四疗程的第一、第二或第三方案内),直到达到日预防有效量或治疗有效量的本发明包括的CD19x CD3双特异性单价双抗体(尤其地,CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体)。

[0264] 表2提供针对典型治疗疗程的上述不同给药方案的5个实例。

[0265]

表 2						
方案	天	双抗体剂量(ng 双抗体/kg 受试者体重/天)				
1	1、2、3、4	100	100	100	100	100
	5、6、7	无	无	无	无	无
2	1、2、3、4	300	500	700	900	1,000
	5、6、7	无	无	无	无	无
3	1、2、3、4	300	500	700	900	1,000
	5、6、7	无	无	无	无	无
4	1、2、3、4	300	500	700	900	1,000
	5、6、7	无	无	无	无	无

[0266] 可通过修饰比如,例如,脂质化来增强CD19x CD3双特异性单价双抗体的吸收和组织渗透而降低或改变本发明的CD19x CD3双特异性单价双抗体或CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体的施用剂量和频率。

[0267] 可计算施用至患者的本发明的CD19x CD3双特异性单价双抗体或CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体的剂量,以用作单剂疗法。可选地,本发明的CD19x CD3双特异性单价双抗体或CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体结合其他治疗性组合物使用,并且施用至患者的剂量小于当所述分子用作单剂疗法时施用的剂量。

[0268] 本发明的药学组合物可局部施用至需要治疗的区域;这可通过例如,但不限于下述方式实现:局部输注、通过注射、或通过植入物的手段,所述植入物是多孔的、非多孔的或胶状材料,包括膜,比如硅橡胶膜或纤维。优选地,当施用本发明的分子时,必须注意使用不吸收该分子的材料。

[0269] 本发明的组合物可在泡状体(vesicle),尤其是脂质体中递送(见Langer(1990)“New Methods Of Drug Delivery,”Science 249:1527-1533);Treat等,在以下中:LIPOSOMES IN THE THERAPY OF INFECTIOUS DISEASE AND CANCER,Lopez-Berestein和Fidler(eds.),Liss,New York,353-365页(1989);Lopez-Berestein,同上,317-327页)。

[0270] 可以在控释或缓释系统中递送本发明的组合物。可以使用本领域技术人员已知的任何技术产生包括一个或多个本发明的一个或多个CD19x CD3双特异性单价双抗体的缓释制剂。见例如美国专利号4,526,938;PCT公开物WO 91/05548;PCT公开物WO 96/20698;Ning等(1996)“Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel,”Radiotherapy&Oncology 39:179-189,Song等(1995)“Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions,”PDA Journal of Pharmaceutical Science&Technology50:372-397;Cleek等(1997)“Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application,”Pro.Int’l.Symp.Control.Rel.Bioact.Mater.24:853-854;和Lam等(1997)“Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery,”Proc.Int’l.Symp.Control Rel.Bioact.Mater.24:759-760,其各通过引用以

其整体并入本文。在一个实施方式中,泵可用于控释系统(见Langer,上文;Seffon,(1987)“Implantable Pumps,”CRC Crit.Rev.Biomed.Eng.14:201-240;Buchwald等(1980)“Long-Term,Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis,”Surgery 88:507-516;和Saudek等(1989)“A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery,”N.Engl.J.Med.321:574-579)。在另一个实施方式中,聚合材料可用于实现分子的控释(见例如MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE,Langer和Wise(eds.),CRC Pres.,Boca Raton,Florida(1974);CONTROLLED DRUG BIOAVAILABILITY,DRUG PRODUCT DESIGN AND PERFORMANCE,Smolen和Ball(eds.),Wiley,New York(1984);Levy等(1985)“Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate,”Science 228:190-192;During等(1989)“Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant:In Vivo Characterization,”Ann.Neurol.25:351-356;Howard等(1989)“Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits,”J.Neurosurg.7(1):105-112);美国专利号5,679,377;美国专利号5,916,597;美国专利号5,912,015;美国专利号5,989,463;美国专利号5,128,326;PCT公布号W0 99/15154;和PCT公布号W0 99/20253)。缓释制剂所用的聚合物的实例包括但不限于聚(2-甲基丙烯酸羟乙酯)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸)、乙烯-乙烯基乙酸酯共聚物(poly(ethylene-co-vinyl acetate))、聚(甲基丙烯酸)、聚乙醇酸交酯(PLG)、聚酐、聚(N-乙烯基吡咯烷酮)、聚(乙烯醇)、聚丙烯酰胺、聚(乙二醇)、聚交酯(PLA)、丙交酯-乙交酯共聚物(PLGA)以及聚原酸酯(polyorthoester)。控释系统可接近治疗靶标(例如,肺)布置,因此仅仅需要全身剂量的一部分(见例如Goodson,在MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE中,上文,卷2,115-138页(1984))。根据Dunn等(见U.S.5,945,155),使用可用作控释移植物的聚合物组合物。该特定方法基于聚合物系统中生物活性材料原位控释的治疗效果。移植可通常发生于患者身体内需要治疗的任何地方。可使用非聚合物持续递送系统,由此受试者身体内的非聚合物移植物被用作药物递送系统。一旦移植到身体中,移植物的有机溶剂会从组合物中消散、分散或渗漏到周围组织液中,并且非聚合物材料会逐渐凝结或沉淀,形成固体微孔基质(见U.S.5,888,533)。

[0271] 控释系统在Langer(1990,“New Methods Of Drug Delivery,”Science249:1527-1533)的综述中有论述。可以使用本领域技术人员已知的任何技术来生产包含本发明的一种或多种治疗剂的缓释制剂。见例如美国专利号4,526,938;国际公布号W0 91/05548和W0 96/20698;Ning等(1996)“Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel,”Radiotherapy&Oncology 39:179-189;Song等(1995)“Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions,”PDA Journal of Pharmaceutical Science&Technology 50:372-397;Cleek等(1997)“Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application,”Pro.Int’l.Symp.Control.Rel.Bioact.Mater.24:853-854;和Lam等(1997)“Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery,”Proc.Int’l.Symp.Control Rel.Bioact.Mater.24:759-

760,其各通过引用以其整体并入本文。

[0272] 在本发明的组合物是编码本发明的CD19x CD3双特异性单价双抗体的核酸的情况下,核酸可体内施用,以通过如下方式促进其编码的CD19x CD3双特异性单价双抗体或CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体的表达:通过将其构建为适当的核酸表达载体的一部分并且施用它从而其成为细胞内的,例如,通过使用逆转录病毒载体(见美国专利号4,980,286),或通过直接注射,或通过使用微粒轰击(例如,基因枪;生物弹道技术(Biolistic), Dupont),或用脂质或细胞表面受体或转染试剂涂覆,或通过已知进入核的同源框样肽一起施用(见例如Joliot等(1991)“Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis,”Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.) 88:1864-1868)等。可选地,可以将核酸经细胞内引入并通过同源重组整合到宿主细胞DNA中,以进行表达

[0273] 用治疗或预防有效量的本发明的CD19x CD3双特异性单价双抗体(尤其地,CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体)治疗受试者可包括单一治疗或,优选地,可包括一系列治疗。在优选的实施例中,用这样的双抗体每周治疗受试者一次持续约1至10周,优选地2至8周,更优选地约3至7周,和甚至更优选地约4、5或6周。本发明的药学组合物可一天施用一次、一天两次或一天三次。可选地,药学组合物可一周施用一次、一周两次、每两周一次、一个月一次、每六周一次、每两个月一次、一年两次或每年一次。应当认识到,用于治疗的有效剂量可以随着具体疗程增加或降低

[0274] G. 本发明的组合物的用途

[0275] 本发明的CD19x CD3双特异性单价双抗体(尤其地,本发明的CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体)具有治疗任何与CD19的表达相关或特征在于CD19的表达的疾病或病况的能力。因此,这样的分子可用于诊断或治疗(但不限于)下述疾病或病况:急性髓细胞样白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML),包括急变期CML和与CML相关的Abelson癌基因(Bcr-ABL易位)、骨髓增生异常综合征(MDS)、急性B成淋巴细胞性白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL),包括Richter综合症或CLL的Richter转化、毛细胞白血病(HCL)、母细胞性浆细胞样树突细胞赘生物(BPDCN)、非霍奇金淋巴瘤(NHL),包括套细胞白血病(MCL)和小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、霍奇金淋巴瘤、系统性肥大细胞增生症和伯基特淋巴瘤;自身免疫狼疮(SLE)、过敏症、哮喘和类风湿性关节炎。本发明的双特异性单价双抗体可另外用于制造治疗上述病况的药物。

实施例

[0276] 已经一般性描述了本发明,通过参考下述实施例将更容易理解本发明,所述实施例通过示例的方式被提供而不旨在限制本发明,除非明确指出。

[0277] 实施例1

[0278] CD19细胞表面表达的定量

[0279] 为了鉴定用于评估CD19x CD3双特异性双抗体的生物学活性的合适的靶细胞系,首先使用定量FACS(QFACS)在一系列人B-细胞淋巴瘤/白血病细胞系上确定CD19细胞表面表达水平,所述细胞系包括Na1m-6(急性成淋巴细胞白血病)、Raji(伯基特淋巴瘤)、Daudi(伯基特淋巴瘤)、HBL-2(套细胞淋巴瘤)、MEC-1(慢性淋巴细胞白血病)和Jeko-1(套细胞淋巴瘤)、MOLM-13(急性髓细胞样白血病细胞系)、JIMT1(乳腺癌)和Colo205(结肠癌)。使用

QFACS试剂盒计算表面上CD19抗体结合位点的绝对数。如表3中显示,细胞系上CD19结合位点的绝对数顺序如下:Raji (高) > Nalm-6 (中) > Daudi (中) > HBL2 (中) > MEC-1 (低) > Jeko-1 (低)。

[0280] 如预期的,MOLM-3、JIMT-1和Colo205没有CD19表达,这与CD19是B-细胞特异性抗原一致。

表 3	
靶细胞系	CD19 表面表达 (抗体结合位点)
Raji	670,322
Nalm-6	442,730
Daudi	369,860
HBL-2	334,725
MEC-1	177,025
Jeko-1	124,396

[0282] 实施例2

[0283] 结合亲和力

[0284] 为了量化CD19x CD3双特异性单价双抗体和人或食蟹猴CD3之间的结合程度,使用示例性CD19x CD3双特异性单价Fc双抗体,DART-A进行BIAcore™分析。BIAcore™分析测量解离速率(dissociation off-rate), k_d 。根据公式: $KD = [k_d]/[k_a]$,抗体和其靶标之间的结合亲和力(KD)是结合(结合速率(on reate), k_a)和解离(速率(off-rate), k_d)的动力学常数的函数。BIAcore™分析使用表面等离子共振,以直接测量这些动力学参数。

[0285] 通过表面等离子共振(SPR)技术(BIAcore)分析的DART-A (0-100nM) 与可溶性人和食蟹猴CD3和CD19的结合的结果显示在表4中。

[0286] DART-A对人和食蟹猴CD3的结合亲和力类似(KD分别=21.2nM和21.9nM)。但是,DART-A对食蟹猴CD19是对人CD19的亲和力低约1/10(KD分别=20.3nM和2.0),原因是食蟹猴CD19增加的解离速率常数(k_d)。食蟹猴仍是用于毒理学评估的相关物种,尽管应考虑CD19结合亲和力方面的差异。

[0287]

表 4			
抗原	$k_a (\pm SD)$ (M-1s-1)	$k_d (\pm SD)$ (s-1)	KD ($\pm SD$) (nM)
人 CD3 ϵ/δ	2.2×10^5	$4.5 (\pm 0.1) \times 10^{-3}$	$21.2 (\pm 1.7)$
食蟹猴 CD3 ϵ/δ	$2.0 (\pm 0.1) \times 10^5$	$4.3 (\pm 0.2) \times 10^{-3}$	$21.9 (\pm 1.2)$
人 CD19-His	$2.8 (\pm 0.3) \times 10^5$	$5.6 (\pm 0.6) \times 10^{-4}$	$2.0 (\pm 0.2)$
食蟹猴 CD19-His	$2.4 (\pm 0.1) \times 10^5$	$4.7 (\pm 1.1) \times 10^{-3}$	$20.3 (\pm 1.3)$

[0288] 实施例3

[0289] 细胞结合特征

[0290] 通过流式细胞术体外评估DART-A与小鼠、大鼠、兔子、食蟹猴和人血液白细胞(由全血纯化)的结合。用浓度为25或100nM的DART-A以及对照DART 1和对照DART 2将白细胞染色约1小时。对照DART 2包含与DART-A相同的CD19结合组分,而对照DART 1包含与DART-A相同的CD3结合组分。孵育之后,用识别DART蛋白质的EK螺旋异源二聚化区域的抗E-螺旋/K-螺旋(EK) mAb检测结合白细胞的DART蛋白质。在小鼠、大鼠或兔子血液白细胞上没有观察到DART-A结合。同样地,对照DART双抗体也不显示与小鼠、大鼠或兔子白细胞的任何结合。如预期地,测试的两种浓度的DART-A都显示与人和食蟹猴血液白细胞的特异性结合。

[0291] 双功能ELISA试验用于显示由DART-A同时衔接两个靶抗原。ELISA板被包被以可溶性人CD3 ϵ / δ 异源二聚体,并且在4℃孵育过夜,然后用BSA封闭。添加各种浓度的DART-A,随后添加可溶性人CD19-生物素。冲洗平板,并且用缀合链霉抗生物素的化学发光底物检测免疫复合物。如图3中显示,DART-A能够同时结合CD19和CD3二者。

[0292] 通过流式细胞术在食蟹猴和人血液白细胞(从全血纯化)中进一步评估DART-A的双特异性结合。用浓度范围是0.005至80nM的DART-A、对照DART 1或对照DART2将白细胞染色约1小时。孵育之后,使用识别DART蛋白质的EK螺旋异源二聚化区域和链霉抗生物素-PE的生物素化的抗E-螺旋/K-螺旋(EK) mAb检测与白细胞的结合。因为DART-A结合CD3,CD4和CD8的组合用于明确T细胞群体。类似地,CD20而不是CD19用作B细胞标记物。所以,在该研究中,CD4+和CD8+设门事件表示T细胞群体和CD20+设门事件表示B细胞群体。DART-A显示与人和食蟹猴B细胞和T细胞的双特异性结合。相反,对照DART双抗体仅仅显示与B细胞(对照DART 2)或T细胞(对照DART 1)的单特异性结合,这与它们相应的结合特异性一致。人和食蟹猴B和T细胞的DART-A和对照DART双抗体结合滴定曲线提供在图4A-4B和图5A-5B中。

[0293] 实施例4

[0294] 使用人T细胞,DART-A介导的对靶肿瘤细胞的重定向杀伤

[0295] 使用纯化的人初级T细胞作为效应细胞,在展示一定范围CD19表达的3个靶B淋巴瘤细胞系:Raji/GF(伯基特淋巴瘤)、HBL-2(套细胞淋巴瘤)和Jeko-1(套细胞淋巴瘤)上评估DART-A介导重定向靶细胞杀伤的能力。Raji/GF细胞显示最高水平的CD19表达,随后是HBL-2细胞中中等水平的CD19表达和Jeko-1细胞中更低的CD19表达水平。使用乳酸脱氢酶(LDH)释放试验测量靶肿瘤细胞杀伤,在所述试验中,定量测量细胞死亡时从细胞释放的LDH的酶活性,或通过荧光素酶试验测量靶肿瘤细胞杀伤,其中荧光素酶相对光单位(RLU)是指示Raji/GF靶细胞相对活力的读数,所述靶细胞已经被工程化以表达绿色荧光蛋白(GFP)和荧光素酶报告基因二者。

[0296] 当来自多个独立人供体的纯化的T细胞以10:1的效应子与靶(E:T)细胞比例使用时,DART-A在所有3个细胞系中展示有效的重定向细胞杀伤(图6A-6C)。在50%最大活性(EC50)值的平均有效浓度是:对于HBL-2细胞, 1.05×10^{-1} pM;对于Raji/GF细胞, 3.07×10^{-1} pM;和对于Jeko-1细胞, 1.46×10^{-1} pM(表5)。对照DART1不介导T细胞重定向杀伤靶细胞。最重要地,在不表达CD19的细胞系(Molm-13和Colo205)中没有观察到细胞杀伤活性(图6D-6F)。

[0297]

表 5 在不同 E:T 细胞比例下代表性 DART-A-介导的重定向杀伤靶 Raji/GF 细胞的 EC50 值的总结						
	E:T = 10:1		E:T = 5:1		E:T = 2.5:1	
细胞毒性	EC50 (pM)	E _{max} (%)	EC50 (pM)	E _{max} (%)	EC50 (pM)	E _{max} (%)
24 小时	0.14	63	0.67	24	N/A	4
48 小时	0.0441	73	0.38	48	1.08	11

[0298] 为了评估DART-A在存在较少数量效应细胞的情况下的活性,在用DART-A孵育24至96小时之后,在Raji/GF细胞中以5:1、2.5:1和1:1的较低E:T细胞比例测试重定向细胞杀伤。在5:1比例下观察到的细胞毒素活性是在10:1比例下观察到的最大活性的约一半;以2.5:1的E:T细胞比例在24和48小时两个时间点也都观察到更低的比活性(图7A-7D和表5)。在孵育72或96小时之后,在2.5:1和1:1的比例下Raji/GF细胞的细胞毒性明显增加(见图8A-8D和表6)。值得注意的是,在更低的E:T细胞比例下,有效的细胞裂解在Raji/GF细胞中随着时间的推移而增加,表明通过DART-A-激活的T细胞的连续靶细胞杀伤。动力学表明时间是有效消除较大数量靶细胞的低T细胞数量的限制因素。总之,来自使用来自不同供体的人T细胞的多个实验的数据指示DART-A重定向细胞杀伤活性取决于E:T细胞比例和时间,尤其在较低的E:T细胞比例下。

[0299]

表 6 在较低的 E:T 细胞比例下代表性 DART-A-介导的重定向杀伤靶 Raji/GF 细胞 的 EC50 值的总结				
	E:T = 2.5:1		E:T = 1:1	
细胞毒性	EC50 (pM)	E _{max} (%)	EC50 (pM)	E _{max} (%)
72 小时	1.54	64	2.79	33
96 小时	0.422	87	0.440	56

[0300]

[0301] 实施例5

[0302] 人和食蟹猴PBMC中DART-A-介导的自体B细胞消耗

[0303] 因为正常的B细胞表达CD19并且因为DART-A显示与食蟹猴CD19和CD3交叉反应(实施例2,图4A-4B和图5A-5B),所以在人和食蟹猴外周血液单核细胞(PBMC)中都观察到DART-A-介导的细胞毒性。在用DART-A处理之后,在人和食蟹猴PBMC二者中都观察到剂量依赖性CD20+B细胞消耗(图9A-9B)。如预期地,在用对照DART 1处理之后,没有观察到B细胞消耗。

[0304] 为了进一步确认PBMC中的DART-A活性,具有不同的T细胞(效应子)与B细胞(靶)E:T细胞比例的多个独立的人或食蟹猴PBMC供体被用于评估效力。在总结中(表7),人B细胞消耗的EC50值的范围是1.84至6.27pM;而食蟹猴B细胞消耗的EC50值在106.8至859.1pM之间。自体人B细胞消耗的DART-A的效力好像大于食蟹猴B细胞消耗的(平均为约100倍;范围:19

至312倍)。但是,值得注意的是,食蟹猴PBMC中的E:T细胞比例(平均约4:1)小于人PBMC中的E:T细胞比例(平均约8:1),考虑到DART-A重定向杀伤活性取决于E:T细胞比例,这可能归因于EC50值的较大差异。人和食蟹猴B细胞之间CD19表达水平的潜在差异可能是造成效力的明显差异的另一可变因素。

表 7 用 DART-A 处理人或食蟹猴 PBMC 之后, 自体 B 细胞消耗的 EC50 值的总结						
	EC50 值(pM)			EC50 值(pM)		
	DART-A	对照 DART		DART-A	对照 DART	
[0305] 人 5 (E:T= 8:1)	6.27	无活性	食蟹猴 5 (E:T= 3:1)	166.2	无活性	
人 6 (E:T= 8:1)	2.75	无活性	食蟹猴 6 (E:T= 2:1)	859.1	无活性	
人 7 (E:T= 5:1)	5.52	无活性	食蟹猴 7 (E:T= 3:1)	106.8	无活性	
人 8 (E:T= 9:1)	1.84	无活性	食蟹猴 8 (E:T= 7:1)	239.1	无活性	
平均值	4.20	不适用	平均值	342.8	不适用	

[0306] 重要地是,应注意当食蟹猴PBMC用作效应细胞时DART-A介导的针对Raji/GF靶细胞的有效细胞毒性,其中EC50为 1.30×10^{-2} pM(图10),类似于当人T细胞用作效应细胞时观察到的(平均EC50= 3.07×10^{-1} pM),表明人和食蟹猴T细胞针对相同靶细胞系具有相当的活性。这些数据进一步支持食蟹猴在非临床毒理学研究中作为评估DART-A的相关物种的用途。

[0307] 实施例6

[0308] 使用人或食蟹猴效应细胞评估DART-A介导的细胞因子释放

[0309] 人和食蟹猴PBMC中DART-A介导的B细胞群体的消耗与人和食蟹猴PBMC中的细胞因子释放相关。如在下面表8中总结,细胞因子释放的EC50值等于或大于人或食蟹猴自体B细胞消耗,表明DART-A在介导B细胞消耗方面比体外诱导细胞因子释放更有效。体外人和食蟹猴之间的细胞因子释放曲线具有一些相似性和差异。IFN- γ 和TNF- α 是在用DART-A处理之后在两种物种中释放的主要的细胞因子。但是,基于Emax值,IL-6是人中产生的第三种最主要的细胞因子,而IL-2仅仅在食蟹猴PBMC中大量产生。比较用DART-A孵育之后PBMC中产生的最灵敏细胞因子(人中IFN- γ 、TNF- α 和IL-6)的平均EC50值与自体B细胞消耗的平均EC50值,揭示了存在至少6倍表观安全边际(apparent safety margin),如在中B细胞消耗和细胞因子产生之间的差异所反映的(表9)。

[0310]

表 8 用 DART-A 处理人或食蟹猴 PBMC 之后，自体 B 细胞消耗和细胞因子产生的 EC50 值的总结	
人 PBMC	
试验(测试的供体的数量)	平均 EC50 (pM)
人 B 细胞消耗(n = 4)	4.20
人细胞因子释放(n = 2)	
IFN- γ	25.21
TNF- α	31.83
IL-10	70.11
IL-6	23.55
IL-4	不适用*
IL-2	56.77
食蟹猴 PBMC	
食蟹猴 B 细胞消耗(n = 4)	342.8
食蟹猴细胞因子释放(n = 2)	
IFN- γ	925.24
TNF- α	262.22
IL-6	306.68
IL-5	486.22
IL-4	1718.63
IL-2	2930.19
*低于检测的界限	

[0311]

表 9			
在人细胞中体外评估 DART-A 之后，细胞毒性对细胞因子产生的 EC50 值的总结			
CTL 试验 ¹		人 PBMC ²	
试验 (供体的数量)	平均 EC50 (pM)	试验 (供体的数量)	平均 EC50 (pM)
细胞毒性		自体 B 细胞消耗	
HBL-2 (n = 5)	0.11	PBMC (n = 7)	4.20
Raji/GF (n = 5)	0.31		
Jeko-1 (n = 3)	0.15		
细胞因子释放(n = 2)		细胞因子释放(n = 2)	
IFN-γ	5.51	IFN-γ	25.21
TNF-α	3.71	TNF-α	31.83
IL-2	6.32	IL-6	23.55
EC50 倍数差异 (指示安全边际)	12-58	EC50 倍数差异 (指示安全边际)	6-8
1 使用 CTL 试验用表达 CD19 的肿瘤细胞(HBL-2、Raji/GF 或 Jeko-1)在存在纯化的人 T 细胞(E:T = 10:1)的情况下评估的活性。使用 Raji/GF 肿瘤细胞评估细胞因子释放。			
2 在正常人 PBMC 中评估的活性。			

[0312] 也研究了在存在靶细胞的情况下通过T细胞的DART-A-介导的细胞因子释放。在与 Raji/GF靶细胞共孵育之后，观察到来自人T细胞的TNF-α、IFN-γ 和IL-2的DART-A剂量依赖性细胞因子产生，其中针对IL-2 (>7000pg/mL) 观察到最高水平 (Emax) (图11A-11C;表10)。也产生大量水平的TNF-α和IFN-γ (~2000-4000pg/mL)。如预期地，用对照DART双抗体孵育不导致任何可检测的细胞因子产生(图11A-11C)。相比在灵敏度最小的靶细胞系(Raji/GF)中的靶细胞细胞毒性的平均EC50值，考虑到在用DART-A在存在表达CD19的靶细胞(Raji/GF)的情况下孵育之后通过纯化的人T细胞产生的最灵敏细胞因子(TNF-α)的平均EC50值，在靶细胞杀伤和细胞因子产生之间存在至少12倍表观安全边际(见上面表9)。

[0313]

表 10				
在存在来自两个独立供体的 Raji/GF 靶细胞的情况下，以 E:T = 10:1，通过人 T 细胞的 DART-A-介导的细胞因子产生的 EC50 值				
	D47067		D44284	
细胞因子	EC50 (pM)	Emax (pg/mL)	EC50 (pM)	Emax (pg/mL)
IFN-γ	8.58	3885	2.44	2219

[0314]

TNF- α	6.79	3722	0.626	2361
IL-2	11.31	8496	1.33	7492

[0315] 实施例7

[0316] DART-A-介导的人和食蟹猴T细胞激活的评估

[0317] 通过评估T细胞激活标记物CD69和CD25的表达表征DART-A-介导的重定向靶细胞(Raji/GF细胞)裂解期间对T细胞的作用。在人和食蟹猴CD4⁺和CD8⁺T细胞中CD25和CD69都以剂量依赖性方式被上调(图12A-12D和图13A-13D),指示DART-A-介导的重定向细胞杀伤与T细胞伴随的激活相关。在存在CD19⁻阴性JIMT-1细胞的情况下没有观察到T细胞激活(图14A-14D)。这些数据表明T细胞激活依赖于靶细胞共衔接。进一步支持该结论,对照DART 1不介导T细胞激活标记物的诱导(图12A-12D和图13A-13D)。

[0318] 实施例8

[0319] CD19x CD3作用机制的评估

[0320] 为了确认通过T细胞的CD19x CD3-介导的重定向细胞杀伤的预期的机制是由粒酶B和穿孔蛋白介导,在CTL试验中测量暴露于DART-A或对照DART 1之后T细胞中的细胞内粒酶B和穿孔蛋白的水平。在用DART-A在存在Raji/GF靶细胞的情况下以10:1的E:T细胞比例孵育人T细胞24小时之后,观察到CD8⁺和CD4⁺T细胞中的粒酶B和穿孔蛋白水平的剂量依赖性上调(图15A-15B)。相比之下,当人T细胞用Raji/GF靶细胞和对照DART 1孵育时,没有观察到粒酶B或穿孔蛋白的上调。这些数据支持了DART-A-介导的靶细胞杀伤可由粒酶B和穿孔蛋白途径介导。重要地,粒酶B(图15A)和穿孔蛋白(图15B)的上调在CD8⁺T细胞中比CD4⁺T细胞中更高,这与预期的CD8⁺T细胞更高的CTL效力一致。

[0321] 考虑到先前已经报道了伴随T细胞激活的增殖,也评估了在由CD9x CD3共衔接效应子:靶细胞期间T细胞的扩展。将CFSE标记的人T细胞与HBL-2靶细胞以10:1的E:T细胞比例在存在浓度为200ng/mL的DART-A或对照DART 1的情况下共培养。通过FACS分析经由CFSE稀释的水平监测CFSE标记的T细胞随着时间的推移的增殖(图16A-16B)。图16A显示在存在DART-A或对照DART1和靶细胞的情况下CFSE-染色曲线。DART-A的添加导致增殖(CFSE稀释),其中在72小时孵育之后约75%的细胞增殖(图16B)。相反,在存在对照DART 1的情况下没有观察到CFSE标记的T细胞的增殖。

[0322] 实施例9

[0323] 共混合(Co-Mix)异种移植物的功效

[0324] 评估被注射与激活的人T细胞共混的HBL-2(人套细胞淋巴瘤)或Raji(伯基特淋巴瘤)肿瘤细胞的雌性NOD/SCID小鼠(n=8/组)中DART-A对人B细胞淋巴瘤肿瘤生长的抑制。在两个研究中,人T细胞和肿瘤细胞(HBL-2或Raji)以1:5的比例(分别为 1×10^6 和 5×10^6 个细胞)组合,并且在第0天SC注射至小鼠。随后在第0、1、2和3天IV施用媒介对照(仅肿瘤细胞)、DART-A或对照DART 1。

[0325] 如在图17中显示,在用剂量水平 $\geq 0.2 \mu\text{g/kg}$ 的DART-A进行IV处理之后HBL-2肿瘤细胞的生长被完全抑制。尽管用 $0.02 \mu\text{g/kg}$ DART-A处理好像延迟了HBL-2肿瘤的生长,但是应答不是统计上显著的。到第13天,媒介和对照DART组中的HBL-2肿瘤达到的平均肿瘤体积

是约1000mm³。

[0326] 如图18中,直到研究结束(第28天),在所有评估的剂量(0.8至100μg/kg)下,在用DART-A处理的小鼠中没有观察到明显Raji肿瘤细胞的生长。用0.8μg/kg DART-A处理导致8只小鼠的7只小鼠中的完全应答。媒介和对照DART 1组中的Raji肿瘤表现体内肿瘤生长,其中到研究结束时(第28天)平均肿瘤体积分别达到2449.4±421.1mm³和2968.2±200.0mm³。

[0327] 实施例10

[0328] 建立的肿瘤模型中的功效

[0329] 在雌性NSG B2m^{-/-}小鼠(n=8/组)中,评估DART-A在HBL-2(人套细胞淋巴瘤)异种移植模型中的抗肿瘤活性。小鼠在第0天被真皮内(ID)移植以HBL-2肿瘤细胞(5×10⁶个细胞),随后在第4天被腹膜内(IP)注射PBMCs(5×10⁷个细胞)。在第17天开始用IV施用的媒介、对照DART 1或DART-A进行处理,此时接收媒介、对照DART 1或DART-A的组的平均肿瘤体积分别是438.4±80.2、433.7±63.8和531.7±122.5mm³。在第21天(第二剂量施用),用媒介、对照DART 1和DART-A处理的组中,平均肿瘤体积已经分别增加至1306.1±240.4、1185.6±138.7和958.5±216.1mm³。在第24天(第三剂量施用),媒介和对照DART 1组中的平均肿瘤体积已经分别增加至2401.3±397.4和2623.7±351.5mm³。相反,接受DART-A的组中的体积已经减小45%,达到527.3±148.3mm³。在DART-A处理的组中,肿瘤的尺寸继续减小,最终在第42天达到终体积111.4±38.9mm³,从记录的最大肿瘤体积减小了88.3%(图19A)。总之,用0.5mg/kg的DART-A处理导致建立的大的HBL-2套细胞淋巴瘤肿瘤缩小。在研究结束时的第42天没有复发被记录。

[0330] 在研究的第14天,平均肿瘤尺寸为541mm³的另一组荷瘤小鼠(n=4小鼠)按计划用500μg/kg DART-A处理。在第一剂量(研究的第17天)时,肿瘤已经达到的平均体积是2279±61mm³(图19B)。但是,在第三(研究的第24天)和第四(研究的第28天)剂量时,肿瘤体积分别达到1469±162和848±74mm³,代表肿瘤体积相对于在研究的第21天记录的峰体积分别减小36%和63%(图19B)。肿瘤的尺寸继续减小至在第42天达到的程度,平均肿瘤体积是248±52mm³,肿瘤体积减小89%(图19B)。

[0331] 实施例11

[0332] 食蟹猴中DART-A的毒代动力学研究

[0333] 在食蟹猴中进行非GLP(良好实验室规范(Good Laboratory Practice))毒理学研究,以评估DART-A的不同剂量和方案(regime)。首先进行A阶段,以评估每个连续周,达4周,的动物内递增剂量的DART-A的2-小时IV输注,如在表11中总结(A阶段)的。在第36天或第64天处死每组中一半的A阶段食蟹猴(1M/1F)。随后进行B阶段的研究,以评估每个组中作为固定剂量施用的DART-A的2-小时IV输注(表11,B阶段)。对于第3、4和5组,每个连续周施用相同剂量(分别为5、50或500ng/kg),每个动物总共3个剂量。对于组6,在研究的第1、4、8、11和15天施用500ng/kg,作为2-小时IV输注,每个动物总共5个剂量。在第18天处死所有B阶段动物。

[0334]

表 11								
实验设计(A 阶段)								
组号	雄性	雌性	测试材料	剂量	研究给药天	剂量水平 (ng/kg)	剂量体积 (mL/kg)	剂量浓度 (ng/mL)
1	2	2	媒介	1	1	0	0.3	0
			DART-A	2	8	500	0.3	1700
				3	15	5000	0.3	16,700
				4	22	50,000	0.3	166,700
				5	29	50,000	0.3	166,700
2	2	2	DART-A	1	1	0	0.3	0
				2	8	2000	0.3	7000
				3	15	10,000	0.3	33,300
				4	22	100,000	0.3	333,300
				5	29	100,000	0.3	333,300
实验设计(B 阶段)								
组号	雄性	雌性	测试材料	剂量	研究给药天	实际剂量水平* (ng/kg)	剂量体积 (mL/kg)	实际剂量浓度(ng/mL)
3	1	1	DART-A	1	1	5	0.3	15.0
				2	8	5	0.3	15.0
				3	15	5	0.3	15.0
4	1	1	DART-A	1	1	50	0.3	150.0
				2	8	50	0.3	150.0

[0335]

表 11								
				3	15	50	0.3	150.0
5	1	1	DART-A	1	1	500	0.3	1500.0
				2	8	500	0.3	1500.0
				3	15	500	0.3	1500.0
6	1	1	DART-A	1	1	500	0.3	1500.0
				2	4	500	0.3	1500.0
				3	8	500	0.3	1500.0
				4	11	500	0.3	1500.0
				5	15	500	0.3	1500.0

*显示了基于给药制剂浓度的分析施用的实际剂量水平。注意，实际剂量是 B 阶段方案指定的剂量水平的 1/10。

[0336] 1. 食蟹猴中DART-A的毒代动力学研究 (A阶段)

[0337] 在食蟹猴中进行非GLP、实验性、探索性剂量递增的DART-A研究。在研究的A阶段，第1、8、15、22和29天，向两组食蟹猴 (n=4/组；2M/2F) 施用内部递增剂量的媒介(第1天) 或

DART-A, 作为2-小时IV输注。组1中的食蟹猴接受媒介对照→500→5000→50,000→50,000ng/kg DART-A。组2中的食蟹猴接受媒介对照→2000→10,000→100,000→100,000ng/kg DART-A。在第36天或第64天处死每组中A阶段中一半的食蟹猴(1M/1F)。

[0338] 在研究的A阶段没有DART-A相关的死亡率,并且没有DART-A相关的肉眼可见的改变或器官重量改变。但是,在 ≥ 500 ng/kg的剂量水平存在DART-A相关的作用,如下面详述。这些作用与测试物品的药理学一致,并且不认为是细胞毒性显著的。

[0339] 在A阶段的第36天,对于所有组1和2动物,DART-A相关的显微镜发现限于淋巴结(腹股沟、下颌和肠系膜)、脾和肠相关的淋巴组织(GALT),其中到第64天没有恢复显微镜发现。在第36天,淋巴结和脾中的显微镜发现是类似的,其包括鉴定的淋巴样滤泡生发中心数量和尺寸的中等(moderate)至显著(marked)的减少;在GALT中,淋巴样滤泡生发中心的数量和尺寸减小最少。到第64天,测试物品相关的发现仍存在于淋巴结、脾和GALT中;在淋巴结和脾中,显微镜发现包括淋巴样滤泡生发中心轻微(mild)至显著的数量和尺寸的减小,并且在GALT中,淋巴样滤泡生发中心的数量和尺寸减小最少。

[0340] 通过免疫组织化学(IHC)评估骨髓(胸骨)、淋巴结(腹股沟、下颌和肠系膜)和脾,揭示在第36天在A阶段动物中CD20阳性细胞数目的大大减少,到第64天仅仅部分恢复CD20染色。在第36天,在A阶段动物的骨髓或淋巴结中大体上没有注意到CD20阳性染色,除了来自组1的一个动物,其中仅仅分别在腹股沟淋巴结的生发中心和淋巴细胞冠(corona)存在非常稀少(very rare)的、轻微至中等的CD20阳性染色。在脾中,仅仅在3个动物的红髓中鉴定了CD20阳性细胞(1个动物来自组1;2个动物来自组2),CD20阳性细胞的频率是非常稀少至稀少(rare)和最低(minimal)或轻微至中等强度。

[0341] 在恢复的动物中(第64天),仅仅在组1动物的骨髓中注意到非常稀少至偶尔、中等染色的CD20阳性细胞。在淋巴结(腹股沟、下颌和肠系膜)中,仅仅在来自组1的一个动物中鉴定了CD20阳性染色;CD20阳性细胞的频率通常在所有淋巴结中大大降低,而阳性细胞的染色强度是中等至显著。在所有组1和2动物的脾中鉴定了CD20阳性细胞。在组1动物中,在一个动物的淋巴样滤泡、微动脉周围淋巴鞘(PALS)和红髓中和另一动物的PALS和红髓中鉴定了CD20阳性细胞。在组2动物中,仅仅在红髓中鉴定了非常稀少至稀少的CD20阳性细胞,其具有轻微染色强度。

[0342] 下面总结了在该研究的A阶段部分中对基于FACS的B细胞消耗、细胞因子和ADA的评估。

[0343] a. 对于B、T、NK细胞以及单核细胞的FACS评估

[0344] 为了各种淋巴细胞亚组和单核细胞细胞群的流式细胞术评估,收集全血样品。在-1周;在第1、8、15、22和29天给药之前;在第2、9、16、23和30天开始输注(SOI)后24小时;在第4、11、18、25和32天SOI后72小时;在第35天;和在43、50、57和63天,评估A阶段动物(仅仅应用于来自每组的一半A阶段食蟹猴,在第64天执行恢复处死(recovery sacrifice))。

[0345] 对于两个组(组1和2),在第9天(SOI后24小时)开始出现B淋巴细胞(CD20+)的绝对计数的剂量依赖性减少。在第11和15天,对于500ng/kg/剂量动物(组1),B淋巴细胞群趋向于研究前水平,而对于2000ng/kg/剂量动物,该值(组2)保持减少。对于两个剂量组,在第二DART-A剂量施用之后的第16天(SOI后24小时)B淋巴细胞实质上被消耗,并且对于所有随后的时间点仍被消耗(图20A-20B)。B淋巴细胞消耗是DART-A预期的药理学作用。

[0346] 通过流式细胞术也评估了其他免疫细胞群,包括单核细胞、天然杀伤细胞(NK)和T细胞。

[0347] 对于以2000ng/kg被投药的大部分动物(组2),在S0I后24小时的第9天开始出现CD14+单核细胞数量的瞬时、剂量依赖性减少。对于分别以5000ng/kg和50,000ng/kg被投药的大部分动物(组1)和对于分别以10,000ng/kg和100,000ng/kg被投药的所有动物(组2),在第16天和第23天,S0I后24小时,也出现CD14+单核细胞数量的减少。CD14+单核细胞群在每次输注结束时快速恢复,并且在随后剂量之后24小时再次减少之前到下一给药时间点前,一般达到或超过研究前基线值。在给药阶段结束时,CD14+单核细胞值波动,其趋于朝着研究前水平并且保持处于或高于研究前基线水平的值。

[0348] 也观察到了总T淋巴细胞、CD4+T淋巴细胞、CD8+T淋巴细胞、T调节性淋巴细胞(CD4+/CD25+/FoxP3+)、CD159a+NK细胞、CD16+NK细胞和CD16+/CD159a+NK细胞的瞬时、剂量依赖性减少,其中在第9天(S0I后24小时)对2000ng/kg/剂量动物(组2)观察到最大减少,随后在第16天(S0I后24小时)在组1动物中5000ng/kg/剂量观察到最大减少。T淋巴细胞和NK细胞亚组在每次输注结束时快速恢复,并且,在每次给药后24小时再次减少之前,在第15和22天下一次给药之前,通常达到或超过研究前基线水平,然后。对于组1或2,在第29天施用剂量后的第30天(S0I后24小时),没有出现进一步减少。

[0349] 针对激活标记物PD-1、TIM-3、CD25和CD69的上调,评估CD4+和CD8+T淋巴细胞群,以确定DART-A剂量施用之后的细胞的激活状态。在给药之后,在CD4+T淋巴细胞中PD-1+、CD69+和CD25+存在不同的增加频率和在CD8+T淋巴细胞中PD-1+和CD69+存在不同的增加频率,表明给药之后在全血中激活的CD4+和CD8+T淋巴细胞的频率的增加。在第9天(S0I后24小时)开始,CD4+T淋巴细胞中的CD69+、PD-1+和CD25+的频率(在较小程度上,在一些但不是所有的动物中发生)和CD8+T淋巴细胞中的PD-1+和CD69+的频率在500ng/kg(组1)和2000ng/kg(组2)剂量之后增加。这些值一般保持高于基线水平并且对于所有的随后时间点高度可变。CD25+/CD69+、TIM-3+和PD-1+/TIM3+淋巴细胞群的相对百分数一般<1%的总CD4+和CD8+T淋巴细胞群,使得难以评估任何DART-A相关的改变。总体上,这些数据表明DART-A施用导致在CD4+和CD8+T淋巴细胞上PD-1和CD69表达的向上趋势以及在一些但不是所有动物中的CD4+T淋巴细胞中的CD25+的更适度的增加。

[0350] b. 细胞因子评估

[0351] 在给药前和在每次输注开始后4和24小时,测定血清IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、TNF- α 和IFN- γ 水平(EMD Millipore试验)。当食蟹猴在2-小时时间内通过IV输注被施用递增剂量范围是中500至50,000ng/kg(组1)和2000至100,000ng/kg(组2)的前3个剂量时,在输注开始之后4小时观察到IL-10水平的瞬时DART-A剂量相关的增加(多达1918pg/mL);在输注开始之后24小时之内水平通常返回到基线。在任一组中,在最后DART-A输注(组1中50,000ng/kg或组2中100,000ng/kg)开始之后4小时通常没有检测到IL-10,有一个例外(动物2502)。动物2502在最后一次给药(在第29天,100,000ng/kg)之后经历了瞬时IL-10增加至332pg/mL,但是该增加的量级低于在第22天第一次100 μ g/kg剂量(570pg/mL)之后的IL-10增加。经历最高IL-10水平(在第22天,1918pg/mL)的一只食蟹猴(动物1001)以50,000ng/kg剂量水平也经历了IL-2(32pg/mL)、IL-5(45pg/mL)和IL-6(357pg/mL)的同时瞬时增加。在输注DART-A之后的4小时,在大部分食蟹猴中观察到了IL-6水平的瞬时增加;但是,

与在没有明显剂量响应的第1天输注媒介对照(多达190pg/mL)之后观察的水平比较,该增加一般是类似的,或量级更低(上述动物1001例外)。没有明显的与增加的细胞因子水平相关的临床观察。

[0352] 在输注DART-A之后,IL-5、IL-4、IL-2、IFN- γ 或TNF- α 的水平没有一致的变化。在第15天或22天DART-A输注之后,在经历小的瞬时增加(~ 10 -20pg/mL;上面讨论的动物1001除外)的各组约一半的动物的IL-5水平是变化的。IFN- γ 的水平在整个研究中也是变化的,在一些动物中在输注之后有小的($< \sim 10$ pg/mL)瞬时增加。

[0353] 2. 食蟹猴中DART-A的毒代动力学研究(B阶段)

[0354] 在研究的B阶段,4组食蟹猴($n=2$ /组;1M/1F)被施用固定剂量的DART-A,作为2-小时IV输注,其中在第1、8和15天为组3(5ng/kg)、组4(50ng/kg)和组5(500ng/kg)施用3个剂量;和在第1、4、8、11和15天为组6(500ng/kg)施用5个剂量。所有B阶段动物在第18天被实施安乐死。

[0355] 在研究的B阶段期间没有DART-A相关的死亡率,并且没有DART-A相关的肉眼可见的或器官重量改变。在第18天,DART-A相关的显微镜发现限于组4、5和6动物的淋巴结(腹股沟、下颌和肠系膜),其包括由包括脾中PALS的淋巴样组织的尺寸和/或细胞密度没有明显改变而鉴定的淋巴样滤泡生发中心的数量和尺寸的最小至轻微减少。没有报道在组3(5ng/kg)中注意到了显微镜发现。

[0356] 通过IHC,针对表达CD20的细胞群评估骨髓(胸骨)、淋巴结(腹股沟、下颌和肠系膜)和脾的另外的福尔马林固定的石蜡包埋的切片(Mordenti, J.等(1991)“Interspecies Scaling Of Clearance And Volume Of Distribution Data For Five Therapeutic Proteins,”Pharm.Res.8(11):1351-1359)。组3、4、5或6的骨髓(胸骨)、淋巴结(腹股沟、下颌和肠系膜)或脾中的CD20阳性细胞的分布和/或染色强度没有可感知的(appreciable)差异。在所有组织中,阳性染色与细胞膜相关。一般而言,在骨髓中,偶尔的CD20阳性细胞遍布骨髓基质分布,并且阳性细胞的染色强度是中等至显著。在淋巴结中,CD20阳性细胞主要与生发中心和滤泡的淋巴细胞冠相关,其中较少数的CD20阳性细胞位于副皮质、髓索和髓窦和被膜下窦中。生发中心、淋巴细胞冠、髓索和髓窦以及被膜下窦的染色强度是中等至显著。副皮质中的染色强度是轻微至显著。在脾中,CD20阳性细胞主要与生发中心、滤泡套(follicular mantle)和淋巴样滤泡的边缘区相关,其中较少的CD20阳性细胞在PALS和红髓内并且染色是中等至显著强度。

[0357] 下面总结了该研究B阶段部分的基于FACS的B细胞消耗、细胞因子和ADA的评估。

[0358] a. 对B细胞、T细胞、NK细胞和单核细胞的FACS评估

[0359] 收集全血样品用于对各种淋巴细胞亚组和单核细胞细胞群进行流式细胞术评估。在-1周;在第1、4(仅仅组6)、8、11(仅仅组6),和15天投药之前;在第2、9和16天S0I后24小时;和在第4天和第11天S0I后72小时(仅仅组3-5),评估B阶段动物。

[0360] 在第1、8和15天在开始输注施用的剂量之后的24小时,B淋巴细胞(CD20+)的总数存在明显的剂量依赖性减少。对于5ng/kg(组3)、50ng/kg(组4)和500ng/kg(组5和6)处理组的最大减少出现在第2天(S0I后24小时)。在组3和4中B淋巴细胞群在每次输注后快速恢复,并且在所有其他时间点呈现研究前基线水平附近的波动值。组5和6在给药之间呈现最小的恢复并且通常在第2天之后的所有时间点保持减小的值(图21A-21D)。持续的B淋巴细胞消

耗是预期的较高剂量的DART-A的药理学作用。

[0361] 也通过流式细胞术评估了其他免疫细胞群,包括单核细胞、NK细胞和T细胞。

[0362] 对于所有剂量组(组3-6)中的大部分动物,总的CD14+单核细胞在第2天(SOI后24小时)开始出现瞬时剂量依赖性减少。在第9和16天,所有剂量组中的大部分动物也出现CD14+单核细胞的另外的改变,并且值是高度可变的。

[0363] 总T淋巴细胞、T调节性淋巴细胞(CD4+/CD25+/FoxP3+)、CD4+T淋巴细胞、CD8+T淋巴细胞和NK细胞亚组的数目存在瞬时剂量依赖性减少,其中所有组(组3-6)最大的减少一般出现在第2天(SOI后24小时)。T淋巴细胞亚组在每次输注之后快速恢复,并且在所有组中在下次输注之前,所有的剂量通常达到或超过研究前水平。对于50ng/kg(组4)、500ng/kg(组5)和多剂量的500ng/kg(组6)给药的动物,CD4+、CD8+和T调节性淋巴细胞的另外的减少也出现在第9和16天(SOI后24小时);但是,相比在第一次DART-A给药后第2天出现的那些减少,在这些时间点出现的减少具有较低的量级。NK细胞亚组通常在输注的第一天后趋于恢复,并且在所有剩余的时间点呈现可变的值。评估CD4+和CD8+T淋巴细胞群的激活标记物PD-1、TIM-3、CD25和CD69的上调,以确定在DART-A剂量施用之后的细胞的激活状态。CD4+和CD8+T淋巴细胞群中CD25+/CD69+ (仅仅对于CD4+T淋巴细胞)、TIM-3+和PD-1+/TIM3+的相对百分数通常<总CD4+和CD8+T淋巴细胞群的1%,使得难以评估任何DART-A相关的改变。在组5和6中,对于500ng/kg/剂量动物,在第2天(SOI后24小时)开始,在多个时间点存在CD4+和CD8+T淋巴细胞中PD-1+和CD69+频率的增加。另外,对于500ng/kg/剂量动物(组5和6),在第2天(SOI后24小时)开始,出现CD4+和CD8+T淋巴细胞中CD25+的频率更适度的增加,以及对于多剂量500ng/kg/剂量动物(组6),CD8+T淋巴细胞中CD25+/CD69+相对百分数的增加。与在第2天出现的那些增加的量级相当的增加通常也在随后剂量后出现第9和16天(SOI后24小时)。共同地,这些数据指示DART-A施用导致CD4+和CD8+T淋巴细胞上PD-1、CD69和CD25表达的上升趋势。

[0364] b. 细胞因子评估

[0365] 在第-7、8和15天给药之前;和在第1、8和15天开始输注后4和24小时,测定血清IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、TNF- α 和IFN- γ 水平(EMD Millipore试验)。当食蟹猴被施用5、50或500ng/kg的DART-A剂量时(组3-6),在第一次DART-A输注开始后4小时后观察到IL-10水平的瞬时和剂量相关的增加(多达173pg/mL);该水平通常在输注开始的24小时内返回到基线。相比第二和第三剂量之后的IL-10增加(所有动物中<22pg/mL,下述动物5001除外),在第一剂量的DART-A之后,在所有组中IL-10的增加好像更明显,表明在第一次给药之后,细胞因子释放的“脱敏”和/或负责T细胞激活的靶细胞群体的快速减少/消除。在所有剂量组的一些动物中,每次DART-A输注开始后4小时不定地观察到IL-6水平的瞬时增加(多达162pg/mL),其中该水平通常在24小时内返回到基线水平或其附近。但是,基于从A阶段中媒介施用产生的数据,其中观察到IL-6水平增加多达190pg/mL,B阶段中IL-6波动的水平($\leq$ 162pg/mL)可能未必反映药物相关的响应。贯穿该研究,没有观察到IL-5、IL-4、IL-2、IFN- γ 或TNF- α 水平的一致改变。

[0366] 一只食蟹猴(动物5001)在第二次DART-A输注之前的第8天经历升高水平的IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-4、IL-5和IL-10。在第8天第二次输注后4小时,细胞因子(IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IFN- γ 和TNF- α)水平进一步增加或保持稳定(IL-2)。到第二次给药第24小时,

细胞因子水平开始下降,其中在第15天第三次DART-A输注之后一些细胞因子的增加不同。尽管所有的细胞因子水平从它们的峰值下降,但是在该食蟹猴中细胞因子水平在评估的最后时间点(第16天)仍高于基线水平。没有与增加的细胞因子水平相关的明显的临床观察。

[0367] 实施例12

[0368] 人FcRn转基因小鼠中的1g样半衰期

[0369] 使用可获得自Jackson Laboratories,Bar Harbor,Maine,US的人FcRn转基因小鼠株B6.Cg-Fcgrt^{tm1Dcr}(CAG-FCGRT) 276Dcr/DcrJ小鼠(库存号(Stock Number) 004919)进行人FcRn转基因小鼠药物代谢动力学(PK)研究,以评估DART-A和对照DART 1(图22)。终期半衰期分别是85.6和92.1小时。在相同的测试系统中,也评估了三个人mAb用于比较,其终期半衰期范围是58.7至102.7小时。

[0370] 实施例13

[0371] 人PBMC-重构的小鼠中散布的Raji细胞白血病/淋巴瘤模型中的功效

[0372] 使用荧光素酶-转导的Raji淋巴瘤细胞(Raji.luc)在用人PBMC重构的雌性NSGB2m^{-/-}小鼠中建立散布的肿瘤模型,其中小鼠在肿瘤细胞注射后一天(“早期处理”或白血病范例)或在体内生长至少两周后(“建立的肿瘤”或淋巴瘤模型)用媒介、对照DART 1或DART-A处理。

[0373] 早期处理模型

[0374] 在第-14研究天人PBMC重构之后,在第0研究天注射Raji.luc淋巴瘤细胞并且在第二天(第1研究天)开始处理。每3-4天IV注射媒介对照、0.5mg/kg对照DART1或0.5mg/kg DART-A一次,总共12个剂量(即,第1、4、6、8、11、13、15、18、20、22、25和27研究天)。从第54研究天或第56研究天跟踪小鼠的生存。

[0375] 在接收媒介或对照DART 1的组中,弥漫性散布的肿瘤细胞剖面(profile)快速联合,并且到第2和3周在大部分小鼠中扩张。最早在肿瘤细胞移植后两周注意到在这两个对照组中的动物死亡。媒介或对照DART 1组中的所有的小鼠到第40或53研究天分别死亡或人道地处死(即,如果动物垂死或失去大于它们15%的体重)。图23描绘了生存曲线。相反,用DART-A处理的组在任何时间点都显示没有肿瘤细胞生长并且到研究结束时没有观察到动物死亡。图23描绘了生存曲线。

[0376] 在随后实验中在上述相同实验条件下进行剂量范围发现研究,除了每3-4天IV注射0.16μg/kg、0.8μg/kg、4μg/kg、20μg/kg、0.1mg/kg或0.5mg/kg DART-A一次,共12个剂量(即,第1、4、6、8、11、13、15、18、20、22、25和27研究天)。在相同研究天如上述施用媒介和对照DART 1。在用媒介或对照DART 1处理的小鼠中观察到Raji.luc肿瘤生长的快速进展。在所有测试剂量下DART-A均显示功效,其中在低至20μg/kg的剂量下,大部分小鼠是活的(>8%)并且在研究结束时(第56天)无肿瘤(图24)。

[0377] 建立的肿瘤模型

[0378] 在不同的实验组中测试了当延迟处理时CD19x CD3控制Raji.luc细胞肿瘤负荷的能力。在建立的肿瘤模型中,以第0研究天(约PBMC注射后一周)的Raji.luc细胞IV接种人-PBMC-重构的小鼠并且允许生长14天,然后开始处理。

[0379] 在第12研究天基于肿瘤负荷将小鼠随机分成3组,并且随后在第14研究天(Raji.luc细胞接种后2周)开始用媒介、0.1mg/kg DART-A或0.5mg/kg DART-A处理,共10个

剂量(即,第14、15、16、19、21、23、30、33、35和37研究天)。在媒介对照组中,到处理的第一周结束时,初始病灶的尺寸明显增加,并且在处理开始的2周内5/7小鼠死亡(图25)。相反,在处理的第一周期间,在两个DART-A处理组中大部分动物的肿瘤负荷显著减小或清除。每个DART-A处理组中的仅仅一只动物,每个在随机化时具有相对高的肿瘤负荷,在处理的第一周死亡(图25)。到第50研究天,0.1mg/kg DART-A处理组中的仅仅2只小鼠仍有外周肿瘤。

[0380] 在上述一般的实验条件下在延迟处理模型中进行剂量范围发现研究。在该实验中,在第0研究天(PBMC注射后5天),给人PBMC-重构的小鼠IV接种Raji.luc细胞,并且允许生长至第14研究天,然后随机化。在第15研究天,用媒介、0.1mg/kg对照DART 1或0.16μg/kg、0.8μg/kg、4μg/kg、20μg/kg、0.1mg/kg或0.5mg/kgDART-A开始处理,共9个剂量(即,第15、17、21、23、25、28、30、32和35研究天)。

[0381] 在媒介对照组中,肿瘤负荷逐渐增加并且在处理的第二周结束时所有的小鼠死亡或被处死(图26)。用0.1mg/kg对照DART 1处理的小鼠与媒介处理的小鼠相比显示肿瘤进展的稍微延迟(图26)。相反,用DART-A处理的动物中的肿瘤负荷显示随着时间的推移大体上剂量依赖性减小(图26)。

[0382] 实施例14

[0383] 食蟹猴中DART-A的药代动力学

[0384] 基于与基于用前体mAbs进行的免疫组织化学的人相比在该物种两个靶抗原的同样分布,将食蟹猴选择为用于DART-A分析的适当的药理学模型。

[0385] 根据本发明进行的研究包括5个处理组,由10只食蟹猴/组(5只雄性、5只雌性)组成。对于在第1天第一次输注,在2小时内用媒介对照通过IV输注处理组,随后用媒介对照(组1)或DART-A(组2-5)处理,每周一次,持续四周。当组1动物对于所有的4次随后输注继续接收媒介对照时,组2-5的动物对于所有随后输注在第8、15、22和29天接受0.2μg/kg、2μg/kg、5μg/kg或10μg/kg的DART-A(表12)。三只雄性和3只雌性在第37天被实施安乐死并且进行尸体剖检,而剩余的恢复组猴子(2只雄性和2只雌性)在12-周恢复时间后的第121天被实施安乐死并且进行尸体剖检。

[0386]

表 12							
研究输注号	DART-A 输注号(仅组 2-5)	研究天	DART-A (μg/kg)				
			施用作为 2-小时 IV 输注				
			组 1	组 2	组 3	组 4	组 5
1	NA	1	0	0	0	0	0
2	1	8	0	0.2	2	5	10

[0387]

3	2	15	0	0.2	2	5	10
4	3	22	0	0.2	2	5	10
5	4	29	0	0.2	2	5	10

[0388] 用ELISA进行在各个时间点收集的血清中的DART-A的浓度分析。来自组5的代表性动物的DART-A血清浓度-时间曲线显示在图27中。在0.2、2、5和10μg/kg剂量之后评估PK参

数(二室模型(two-compartment model))(表13)。一般而言,在评估的剂量范围中,观察到了最大血清浓度($C_{\max}$)和 AUC_{inf} 的剂量比例增加。尽管主要PK参数的若干成对剂量比较存在差异,但是总体上,在表明线性PK的可评估的剂量中,DART-A的清除(CL)、室间清除(CLD_2)和分布的体积(V_1 和 V_2)的变化没有一致的趋势。组2-5的动物中的CL值小于食蟹猴的肾小球滤过率(GFR)($\sim 125\text{mL/h/kg}$),这表明实际上没有通过肾过滤发生消除,如对于该分子量的蛋白质(109.3kDa)所预期的。组2、3、4和5动物的平均初始分布体积(V_1)与食蟹猴中的血浆体积($\sim 45\text{mL/kg}$)类似或比其稍大,表明通过结合于靶细胞DART-A在中心室中的少许消耗。平均 β -阶段半衰期和MRT显示随着增加剂量而增加的趋势,其中平均 β 半衰期($t_{1/2,\beta}$)是161小时(6.7天)和平均滞留时间(MRT)是191小时(8天)。值得注意的是,仅来自GLP研究的三只动物($2\mu\text{g/kg}$ 剂量组中, $n=1$; $5\mu\text{g/kg}$ 剂量组中, $n=2$)在第二次和随后的DART-A输注($n=2$)之后或在第四次DART-A输注($n=1$)之后具有异常的PK曲线,并且随后被确认对于ADA是积极的。因此,对于这3只动物,从PK建模中排除了在受影响的输注循环之后的血清浓度数据。

[0389]

表 13 食蟹猴中 DART-A 的 PK 参数的二室分析				
属性	0.2 $\mu\text{g/kg/d}$ (平均值 $\pm$ SD)	2 $\mu\text{g/kg/d}$ (平均值 $\pm$ SD)	5 $\mu\text{g/kg/d}$ (平均值 $\pm$ SD)	10 $\mu\text{g/kg/d}$ (平均值 $\pm$ SD)
$C_{\max}$ (ng/mL)	3.18 ± 0.46	31.9 ± 3.0	82.9 ± 5.6	166.6 ± 11.0
AUC_{inf} (h*ng/mL)	155 ± 37	2258 ± 634	6714 ± 1846	13756 ± 2534
CL (mL/h/kg)	0.95 ± 0.17	0.80 ± 0.22	0.73 ± 0.24	0.70 ± 0.13
CLD_2 (mL/h/kg)	0.87 ± 0.15	1.65 ± 0.36	1.70 ± 0.74	1.40 ± 0.40
V_1 (mL/kg)	43.4 ± 5.8	50.9 ± 5.1	52.3 ± 3.5	54.5 ± 4.5
V_2 (mL/kg)	65.3 ± 17.5	77.9 ± 17.9	93.4 ± 33.3	105.3 ± 33.0
V_{ss} (mL/kg)	108.7 ± 16.6	128.8 ± 17.2	145.8 ± 34.6	159.8 ± 36.0
$t_{1/2}$ (h)	14.0 ± 1.5	11.0 ± 2.2	12.3 ± 3.8	15.0 ± 4.4
$t_{1/2,\beta}$ (h)	119.1 ± 27.6	143.4 ± 43.4	184.9 ± 72.0	205.6 ± 66.9
MRT (h)	116.3 ± 20.3	173.0 ± 54.5	221.2 ± 86.5	235.9 ± 72.0

[0390] DART-A处理的食蟹猴中的细胞因子释放

[0391] 在第1、8、15、22和29天,在输注之前和在输注结束后2和22小时收集血清样品,以评估细胞因子水平。评估的细胞因子是TNF- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6和IL-10。

[0392] 相对于在输注结束后2小时发生的细胞因子水平的最大增加,在第一次DART-A输注(第8天)之后观察到IL-6、IL-10、IFN- γ 和TNF- α 水平的增加,在 $>2\mu\text{g/kg}$ 的剂量水平观察到IL-10和IFN- γ 的DART-A剂量依赖性增加,而在 $\geq 5\mu\text{g/kg}$ 的剂量水平观察到IL-6的增加。TNF- α 水平的改变小并且仅仅在最高剂量水平($10\mu\text{g/kg}$)被观察到。细胞因子水平的改变是瞬时的,并且在输注开始的24小时内返回到基线或其附近,并且没有与这些增加的细胞因子水平相关的临床观察。在第15、22和29天的DART-A的随后输注导致较小的细胞因子水平增加,通常与对照制品输注之后观察到的那些水平增加相当。在个体动物中IL-2、IL-4

和IL-5的平均水平显示不同的和孤立的改变,但是在整个研究期间在所有组中保持<20pg/mL,并且不被认为是毒理学上显著的。

[0393] 接收0.2μg/kg DART-A的动物中的细胞因子水平与在对照制品输注之后的观察的变化相当(组1)。

[0394] 食蟹猴中DART-A-介导的循环B细胞的消耗

[0395] 在整个研究期间测量B细胞、T细胞,包括T细胞亚组(CD4 vs CD8)和激活标记物(CD25、CD69、PD-1和TIM-3)、和NK细胞的循环绝对水平,作为药效终点(pharmacodynamic endpoint)。在输注之前和在第1、8、22和29天输注结束后2、22和70小时,收集样品,然后在第37天进行末期尸体剖检,然后在第36、43、50、57、64、78、92、106和119天的恢复期间的每周一次或每两一次周收集样品。

[0396] 图28显示DART-A处理导致期望的靶群体CD20+B细胞的剂量依赖性消耗。到以剂量水平 $\geq 2\mu\text{g/kg}$ 第一次输注DART-A开始之后的24小时,观察到CD20+细胞的完全或几乎完全消耗。在整个处理期间CD20+B细胞的消耗是持久的,并且在最后剂量之后持续3-5周。在12周恢复期间的最后数周,存在CD20+B细胞剂量依赖性返回到剂量前水平。

[0397] 实施例15

[0398] CLL原发性患者样品中恶性B细胞的自体消耗

[0399] 为了评估CLL原发性患者样品中DART-A-介导的溶细胞活性,用DART-A或对照DART 1孵育患者PBMC。由于受限的患者样品可用性,仅仅测试了2个浓度(50ng/mL和200ng/mL)。在处理之前和处理3天和6天之后,通过流式细胞术测量CLL恶性B细胞(CD19+/CD5+或CD20+/CD5+)和T细胞(CD19-/CD5+或CD4+和CD8+)的百分数。在测试浓度下的DART-A部分阻碍了抗CD19抗体的染色,所以,在用DART-A处理之后不适合使用CD19+/CD5+对恶性B细胞设门。因此,通过在DART-A处理之后对CD20+/CD5+细胞设门测定恶性B细胞消耗。

[0400] 从CLL恶性B细胞和T细胞频率测定的E:T比例一般 $\leq 1:10$ 。在显示的代表性CLL供体实验中,基于仅仅占总PBMC的4%的CD19-/CD5+T细胞和约90%的PBMC被鉴定为CD19+/CD5+恶性B细胞。在处理之前E:T细胞比例是约1:23。图29A-29I和表14显示与CLL患者样品相比DART-A处理的效果。用CLL PBMC孵育DART-A导致在两个评估的DART-A浓度下恶性B细胞的时间依赖性消耗,伴随着在第6天观察的T细胞(CD4和CD8)的同时增加。另外,在DART-A处理6天后,T细胞激活标记物CD25被上调,表明在重定向杀伤恶性B细胞期间,DART-A诱导T细胞激活。相反,到第6天,用对照DART 1没有观察到CD25的B细胞杀伤或上调。

[0401] 值得注意的是,在两个评估的浓度下,DART-A介导相同水平的杀伤,但是杀伤的水平随着时间的推移增加,其中在第3天和第6天分别约40%和85%的恶性B细胞被杀伤,表明当存在足够的DART-A时,该时间在低T细胞与靶比例下是有效消耗靶细胞的关键因素。

[0402]

表 14					
在 DART-A 或对照 DART 1 处理 3 天和 6 天之后, CLL PBMC (E:T = 1:23)中恶性 B 细胞(CD20+/CD5+)、T 细胞(CD4, CD8+)和激活的 T 细胞(CD25+/CD4+和 CD25+/CD8+)的百分数					
时间点	百分数(%)				
	CD20+/CD5+	CD4+	CD8+	CD25+/CD4+	CD25+/CD8+
第 0 天					
预处理	70.7	n.d. ¹		在第 0 天没有测量 CD4+和 CD8+ T 细胞亚组。CD19-/CD5+用于在第 0 天限定 T 细胞群体(4%), 如上述。	
第 3 天					
DART-A (50ng/mL)	40.5	1.01	1.78	总体 T 细胞百分数过低 (<5%), 而不能在第 0 天或第 3 天评估 T 细胞激活标记物 CD25。	
对照 DART 1 (50 ng/mL)	73.5	3.08	1.81		
DART-A (200 ng/mL)	42.3	1.61	1.68		
对照 DART 1 (200 ng/mL)	72.9	3.23	1.62		
第 6 天					
DART-A (50ng/mL)	11.3	57.4	22.2	87.7	82.8

[0403]

对照 DART 1 (50 ng/mL)	74.9	3.54	2.26	1.4	20.6
DART-A (200 ng/mL)	12.3	65.2	20.9	91.6	90.7
对照 DART 1 (200 ng/mL)	73.4	2.79	1.82	1.4	14.3

[0404] 本说明书提到的所有出版物和专利通过参考并入本文,如同好像具体和单独指出每个单个出版物或专利申请通过参考以其整体并入的程度。尽管已经结合其具体实施方式描述了本发明,但是应当理解,其能够被进一步更改并且本申请旨在覆盖大体上根据本发明原理的本发明的任何变型、用途或改变,并且包括与本公开的偏离,只要在本发明所属领域的已知或习惯实践内并且可应用至本文之前所阐释的本质特征。

序列表

<110> 宏观基因股份有限公司

莱斯利·S·约翰逊

埃兹奥·泊韦尼

郭家颖

保罗·A·摩尔

刘丽琴

S·凯尼格

<120> 能够结合CD19和CD3的双特异性单价双抗体及其用途

<130> 1301.0116PCT

<150> US 62/0255,695

<151> 2014-09-26

<160> 48

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 间插间隔肽(连接体1)

<400> 1

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 连接体2

<400> 2

Ala Ser Thr Lys Gly

1 5

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 包含半胱氨酸的连接体

<400> 3

Gly Gly Cys Gly Gly Gly

1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (10)

<223> IgG1铰链结构域

<400> 4

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 间隔连接体3

<400> 5

Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 促进异源二聚体的结构域

<400> 6

Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys

1 5

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 促进异源二聚体的结构域

<400> 7

Val Glu Pro Lys Ser Cys

1 5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 促进异源二聚体的结构域

<400> 8

Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys

1 5

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 促进异源二聚体的结构域

<400> 9

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

1 5

<210> 10

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> E-螺旋促进异源二聚体的结构域

<400> 10

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val

1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys

20 25

<210> 11

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> K-螺旋促进异源二聚体的结构域

<400> 11

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val

1	5	10	15
Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu			
	20	25	
<210> 12			
<211> 28			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 包含半胱氨酸的E-螺旋促进异源二聚体的结构域			
<400> 12			
Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val			
1	5	10	15
Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys			
	20	25	
<210> 13			
<211> 28			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 包含半胱氨酸的K-螺旋促进异源二聚体的结构域			
<400> 13			
Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val			
1	5	10	15
Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu			
	20	25	
<210> 14			
<211> 217			
<212> PRT			
<213> 智人			
<220>			
<221> MISC_FEATURE			
<222> (1) .. (217)			
<223> 人IgG1的CH2-CH3结构域			
<400> 14			
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys			
1	5	10	15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val			
	20	25	30
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr			

35			40			45									
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
50			55			60									
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
65			70			75			80						
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
85			90			95									
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
100			105			110									
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met
115			120			125									
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro
130			135			140									
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn
145			150			155			160						
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu
165			170			175									
Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val
180			185			190									
Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln
195			200			205									
Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
210			215												

<210> 15

<211> 217

<212> PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉“包含杵的”CH₂-CH₃结构域

<400> 15

Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys
1				5					10					15	
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
			20					25					30		
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr
		35					40					45			
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
	50					55					60				
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His

65	70	75	80
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys			
	85	90	95
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln			
	100	105	110
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met			
	115	120	125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro			
	130	135	140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn			
145	150	155	160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu			
	165	170	175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val			
	180	185	190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln			
	195	200	205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	210	215	

<210> 16

<211> 217

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> "包含白的" CH2-CH3结构域

<400> 16

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys			
1	5	10	15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val			
	20	25	30
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr			
	35	40	45
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu			
	50	55	60
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His			
65	70	75	80
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys			
	85	90	95
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln			

100	105	110
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr	Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met	
115	120	125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser	Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro	
130	135	140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn	
145	150	155
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu	
165	170	175
Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val	
180	185	190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala	Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln	
195	200	205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
210	215	

<210> 17

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD19抗体的可变轻链

<400> 17

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr	Leu Ser Val Thr Pro Gly
1	5 10 15
Glu Lys Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser	Gln Ser Val Ser Tyr Met
20	25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala	Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35	40 45
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro	Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50	55 60
Gly Ser Gly Thr Asp His Thr Leu Thr Ile	Ser Ser Leu Glu Ala Glu
65	70 75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly	Ser Val Tyr Pro Phe Thr
85	90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
100	105

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD19抗体的可变轻链的CDR1

<400> 18

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met His

1 5 10

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD19抗体的可变轻链的CDR2

<400> 19

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Ser

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD19抗体的可变轻链的CDR3

<400> 20

Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 21

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD19抗体的可变重链

<400> 21

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu

35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala

50 55 60

〈213〉 人工序列

<220>

<223> 抗-CD3抗体的可变轻链

<400> 25

Gln	Ala	Val	Val	Thr	Gln	Glu	Pro	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Arg	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser
			20					25					30		
Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Val	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Gly
		35					40					45			
Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro	Trp	Thr	Pro	Ala	Arg	Phe
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ala
65				70						75				80	
Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn
			85						90					95	
Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly		
			100					105					110		

<210> 26

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD3抗体的可变轻链的CDR1

<400> 26

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

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD3抗体的可变轻链的CDR2

<400> 27

Gly	Thr	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro
1				5		

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD3抗体的可变轻链的CDR3

<400> 28

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val

1 5

<210> 29

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD3抗体的可变重链

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD3抗体的可变重链的CDR1

<400> 30

Thr Tyr Ala Met Asn

1 5

<210> 31

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD3抗体的可变重链的CDR2

<400> 31

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser

1

5

10

15

Val Lys Gly

<210> 32

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD3抗体的可变重链的CDR3

<400> 32

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr

1

5

10

<210> 33

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 连接体4

<400> 33

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 34

<211> 46

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 白蛋白结合结构域 (ABD)

<400> 34

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly

1

5

10

15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu

20

25

30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro

35

40

45

<210> 35

<211> 502

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DART-A的第一多肽链

<400> 35

Glu	Asn	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Lys	Ala	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Tyr	Met
			20					25						30	
His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr
			35				40						45		
Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
			50				55					60			
Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	His	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Ala	Glu
65					70				75					80	
Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	Val	Tyr	Pro	Phe	Thr
				85				90						95	
Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
			100					105					110		
Gly	Gly	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro
			115					120					125		
Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser
			130				135					140			
Thr	Tyr	Ala	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
145					150					155				160	
Trp	Val	Gly	Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr
				165					170					175	
Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys
			180					185					190		
Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala
			195					200					205		
Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Arg	His	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn	Ser	Tyr	Val	Ser
			210				215					220			
Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala
225					230					235				240	
Ser	Thr	Lys	Gly	Glu	Val	Ala	Ala	Cys	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu
				245					250					255	

Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
 260 265 270
 Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 275 280 285
 Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 290 295 300
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 305 310 315 320
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 325 330 335
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 340 345 350
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 355 360 365
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 370 375 380
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 385 390 395 400
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 405 410 415
 Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 420 425 430
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 435 440 445
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 450 455 460
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 465 470 475 480
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 485 490 495
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 500

<210> 36

<211> 1506

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码DART-A的多核苷酸 (SEQ ID NO:35)

<400> 36

gagaatgtgc tcacacagtc ccctgcaact ctgagcgtaa ctccagggga gaaggccacc 60
 atcacgtgta gagcctccca gagtgtgagc tacatgcact ggtatcagca gaaacctgga 120
 caagctccca gggtgtgat ctatgacgcg agcaaccggg ctagtggcgt tccatcccgg 180
 ttttctggct caggatctgg cactgaccac accctcacca tatccagcct tgaagccgaa 240
 gatgccgcaa cctactactg ctttcagggg agtgtgtatc cttcacatt cggtcagggt 300
 acaaagctgg agattaaggg tggaggatcc ggcgggcgag gcgaggtgca gctggtggag 360
 tctgggggag gcttgggtcca gcctggaggg tccctgagac tctcctgtgc agcctctgga 420
 ttcaccttca gcacatacgc tatgaattgg gtccgccagg ctccagggaa ggggctggag 480
 tgggttggaa ggatcaggtc caagtacaac aattatgcaa cctactatgc cgactctgtg 540
 aagggtagat tcaccatctc aagagatgat tcaaagaact cactgtatct gcaaatgaac 600
 agcctgaaaa ccgaggacac ggccgtgtat tactgtgtga gacacggtaa cttcggcaat 660
 tcttacgtgt cttggtttgc ttattgggga caggggacac tggtgactgt gtcttccgcc 720
 tccaccaagg gcgaagtggc cgcatgtgag aaagaggttg ctgctttgga gaaggaggtc 780
 gctgcacttg aaaaggaggt cgagccctg gagaaaggcg gcggggacaa aactcacaca 840
 tgcccaccgt gccagcacc tgaagccgcg gggggaccgt cagtcttctt ctcccccca 900
 aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac 960
 gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 1020
 aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 1080
 ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1140
 aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 1200
 ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg 1260
 tggtgccctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1320
 cagccggaga acaactacaa gaccagcct cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttct 1380
 ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1440
 tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1500
 ggtaaa 1506

<210> 37

<211> 271

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DART-A的第二多肽链

<400> 37

Gln	Ala	Val	Val	Thr	Gln	Glu	Pro	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Arg	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser
				20					25					30	
Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Val	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Gly
				35					40					45	

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe		
50	55	60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala		
65	70	75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn		
	85	90 95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly		
	100	105 110
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala		
	115	120 125
Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly		
	130	135 140
Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro		
145	150	155 160
Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp		
	165	170 175
Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp		
	180	185 190
Thr Ser Lys Asn Gln Val Phe Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val		
	195	200 205
Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr		
	210	215 220
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser		
225	230	235 240
Thr Lys Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys		
	245	250 255
Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu		
	260	265 270

<210> 38

<211> 813

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码DART-A的第二多肽链的多核苷酸(SEQ ID NO:37)

<400> 38

caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60
 acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag 120
 aagccaggac aggcaccaag gggcctgata gggggtacaa acaaaagggc tccctggacc 180
 cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240

caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300
 gggggtggca caaaactgac tgtgctggga gggggtggat ccggcggagg tggacaggtg 360
 aactgaggg aatctgggtcc agctctggtg aaaccactc agacgtcac tctcacttgc 420
 accttagtg ggttctcact gtccacatct ggcatgggag taggctggat tcgacagcca 480
 cctgggaaag ccttggagtg gcttgccac atctggtggg atgacgacaa gcggtataat 540
 cccgcactga agagcagact gaccatcagc aaggatacat ccaagaacca ggtgtttctg 600
 accatgacca acatggaccc tgtcgataca gccacctact attgtgctcg catggagttg 660
 tggtcctact acttcgacta ttggggacaa ggcacaaccg tgactgtctc atccgcctcc 720
 accaagggca aagtggccgc atgtaaggag aaagttgctg ctttgaaaga gaaggtcgcc 780
 gcacttaagg aaaaggtcgc agccctgaaa gag 813

<210> 39

<211> 227

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DART-A的第三多肽链

<400> 39

Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly
1				5					10					15	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
			20						25					30	
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
			35					40					45		
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
			50				55						60		
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
65						70				75					80
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
				85						90					95
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
						100				105					110
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
						115				120					125
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
						130				135					140
Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
145							150				155				160
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
							165								175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys

225

<210> 40

<211> 681

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码DART-A的第三多肽链的多核苷酸

<400> 40

gacaaaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaag ccgcgggggg accgtcagtc 60
 ttctcttccc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180
 ggctgtggagg tgcataatgc caagacaaaag ccgcggggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag 420
 aaccagggtca gcctgagttg cgagtcacaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctctccgt gctggactcc 540
 gacggctcct tcttctcgt cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600
 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accgctacac gcagaagagc 660
 ctctccctgt ctccgggtaa a 681

<210> 41

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗荧光素抗体4-4-20的可变轻链结构域

<400> 41

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Phe Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Phe Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly			
1	5	10	15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser			
	20	25	30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
	35	40	45
Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro			
	50	55	60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
65	70	75	80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser			
	85	90	95
Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105	110
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly			
	115	120	125
Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala			
	130	135	140
Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala			
145	150	155	160
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn			
	165	170	175
Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile			
	180	185	190
Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu			
	195	200	205
Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe			
	210	215	220
Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu			
225	230	235	240
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Glu Val Ala Ala Cys Glu			
	245	250	255
Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu			
	260	265	270
Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro			
	275	280	285
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe			
	290	295	300
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val			

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

<210> 44

<211> 269

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 对照DART 1的第二多肽链

<400> 44

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser			
	20	25	30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly			
	35	40	45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe			

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

<210> 45

<211> 495

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 对照DART 2的第一多肽链

<400> 45

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly		
1	5	10
Glu Lys Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met		
20	25	30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr		

35					40					45						
Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	
50					55					60						
Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	His	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Ala	Glu	
65					70					75					80	
Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	Val	Tyr	Pro	Phe	Thr	
85					90					95						
Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
100					105					110						
Gly	Gly	Glu	Val	Lys	Leu	Asp	Glu	Thr	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	
115					120					125						
Gly	Arg	Pro	Met	Lys	Leu	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	
130					135					140						
Asp	Tyr	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Glu	Lys	Gly	Leu	Glu	
145					150					155					160	
Trp	Val	Ala	Gln	Ile	Arg	Asn	Lys	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Glu	Thr	Tyr	Tyr	
165					170					175						
Ser	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	
180					185					190						
Ser	Ser	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Asn	Leu	Arg	Val	Glu	Asp	Met	Gly	
195					200					205						
Ile	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
210					215					220						
Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Glu	Val	Ala	
225					230					235					240	
Ala	Cys	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	
245					250					255						
Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly	Gly	Asp	Lys	Thr	His	
260					265					270						
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	
275					280					285						
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	
290					295					300						
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	
305					310					315					320	
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	
325					330					335						
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	
340					345					350						

Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
355							360					365			
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
370							375					380			
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
385						390				395					400
Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu
					405				410					415	
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
			420					425					430		
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
			435				440					445			
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
			450				455					460			
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
465						470				475					480
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	
					485				490					495	

<210> 46

<211> 269

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 对照DART 2的第二多肽链

<400> 46

Gln	Ala	Val	Val	Thr	Gln	Glu	Pro	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Arg	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser
			20					25					30		
Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Val	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Gly
		35					40					45			
Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro	Trp	Thr	Pro	Ala	Arg	Phe
		50				55					60				
Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ala
65					70					75					80
Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn
					85				90					95	
Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gly	Gly
					100				105					110	

Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Glu	Val	Lys	Leu	Asp	Glu	Thr	Gly	Gly	Gly
115						120			125						
Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	Pro	Met	Lys	Leu	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Gly
130				135				140							
Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Glu
145			150				155				160				
Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Gln	Ile	Arg	Asn	Lys	Pro	Tyr	Asn	Tyr
165						170				175					
Glu	Thr	Tyr	Tyr	Ser	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg
180						185				190					
Asp	Asp	Ser	Lys	Ser	Ser	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Asn	Leu	Arg	Val
195				200				205							
Glu	Asp	Met	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp
210				215				220							
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys
225			230				235				240				
Gly	Lys	Val	Ala	Ala	Cys	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys
245						250				255					
Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu			
260						265									

<210> 47

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 间插间隔肽(连接体4)

<400> 47

Ala Pro Ser Ser Ser

1

5

<210> 48

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 间插间隔肽(连接体4)

<400> 48

Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu

1

5

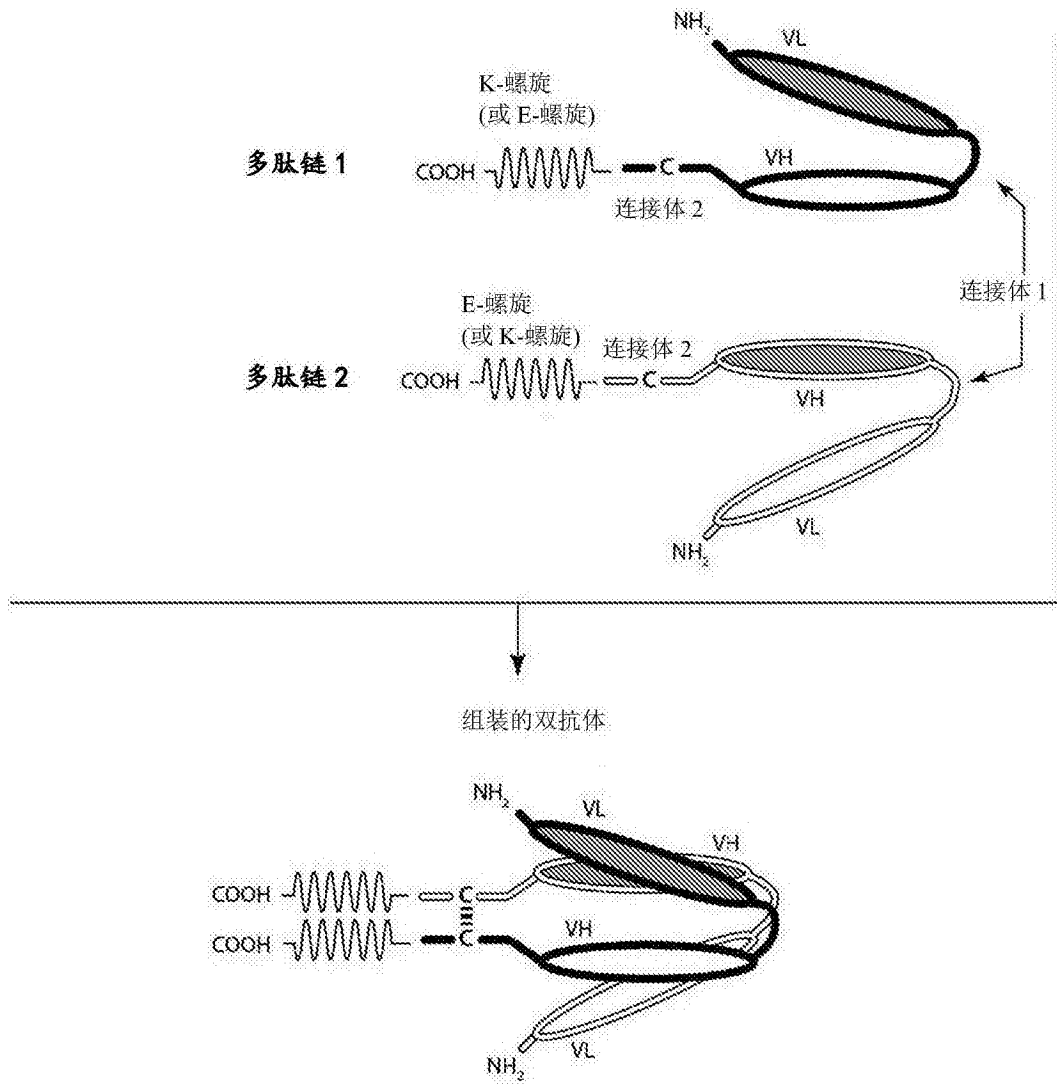


图1

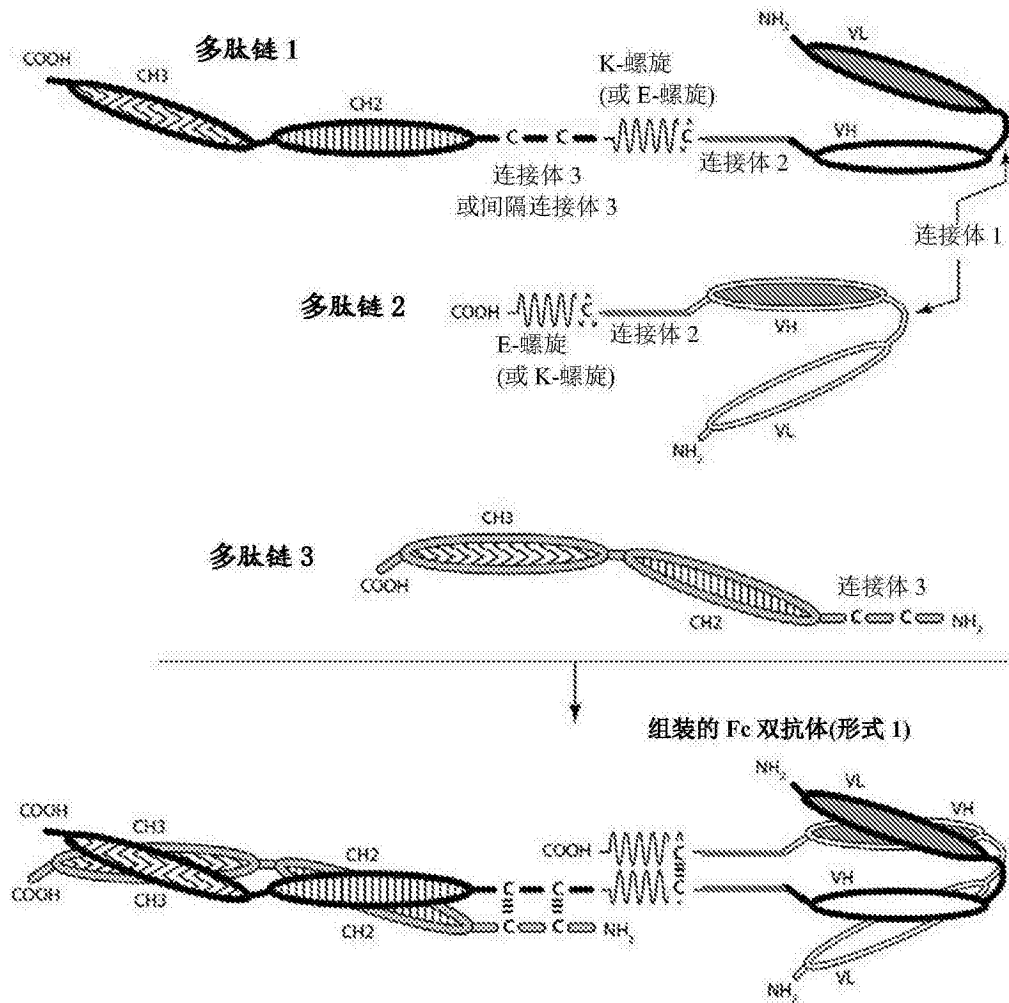


图2A

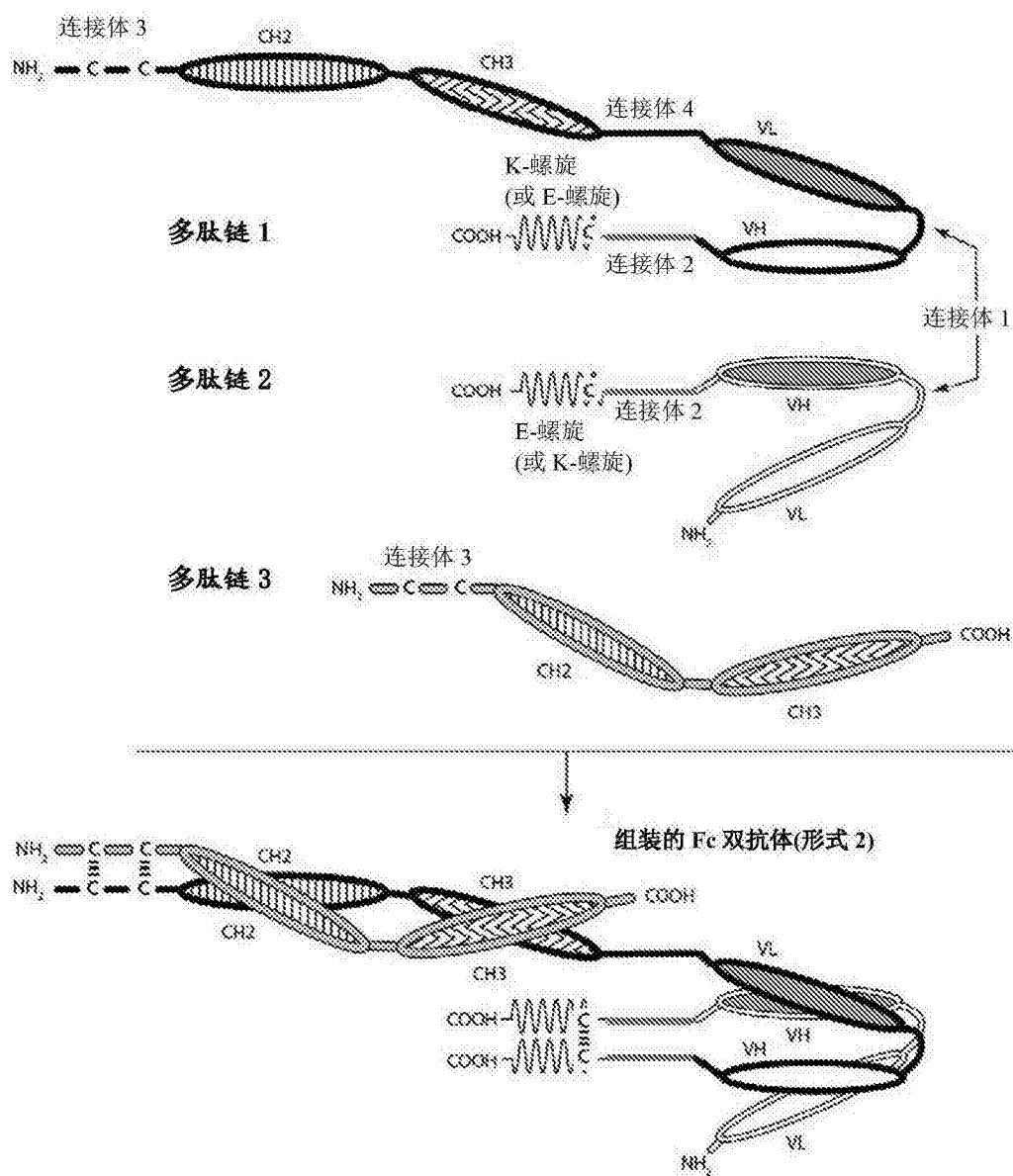


图2B

双特异性 ELISA

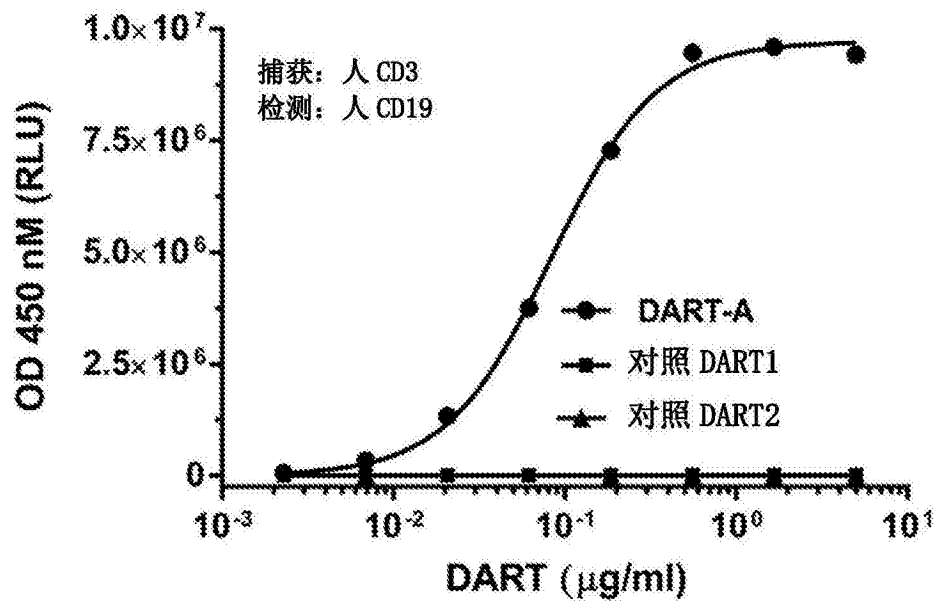


图3

人白细胞结合 CD20+设门

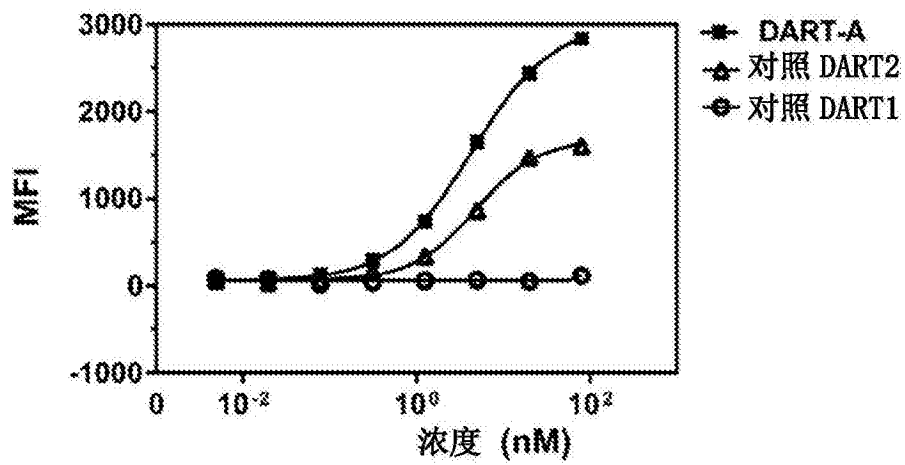


图4A

食蟹猴白细胞结合 CD20+设门的

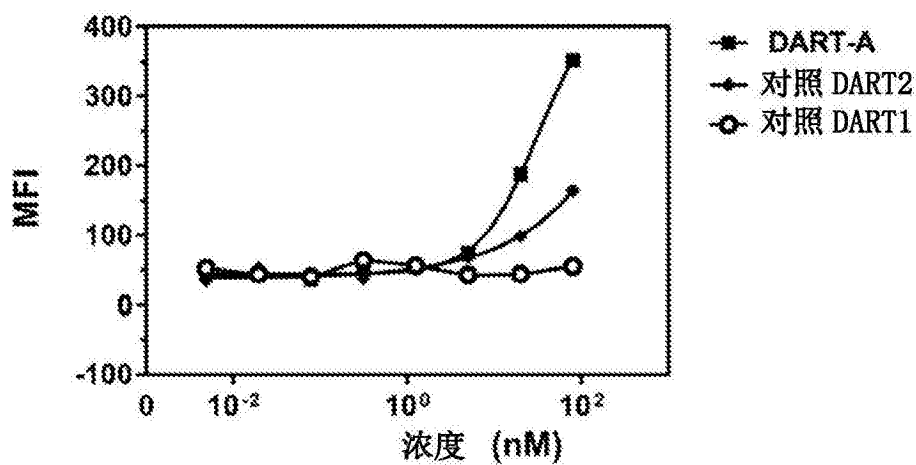


图4B

人白细胞结合 CD4+CD8+设门

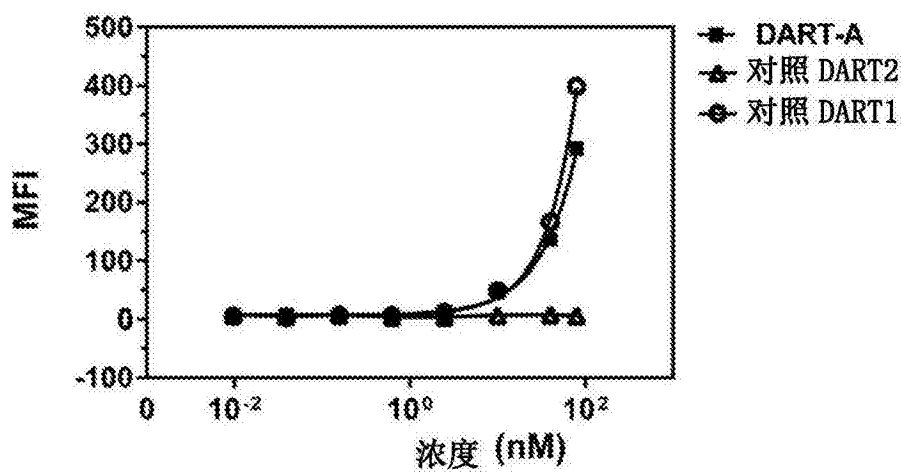


图5A

食蟹猴白细胞结合 CD4+CD8+设门

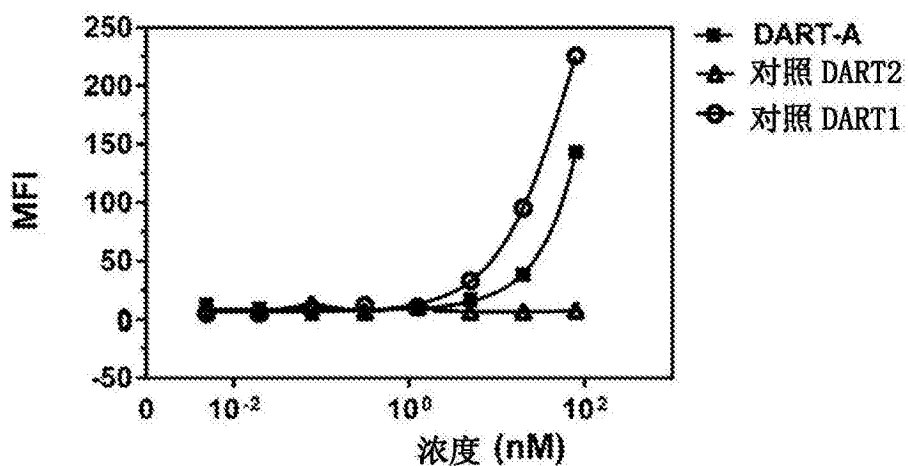


图5B

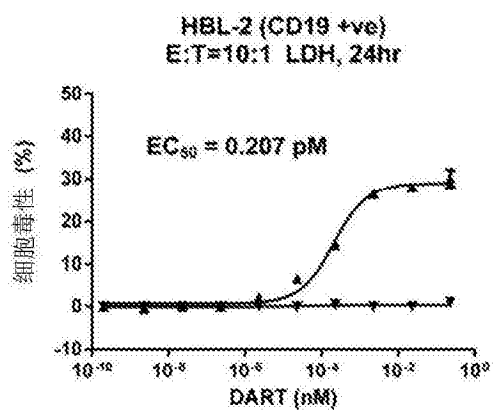


图6A

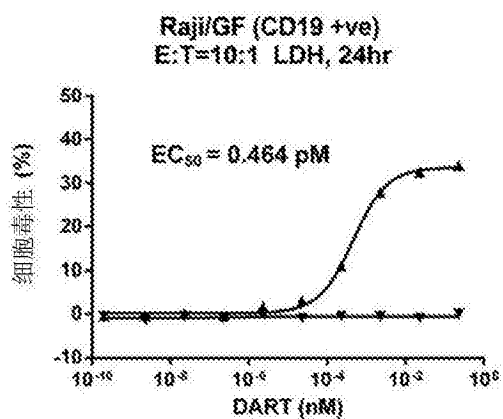


图6B

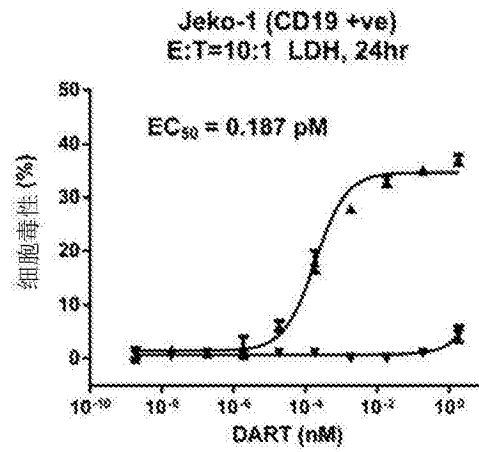


图6C

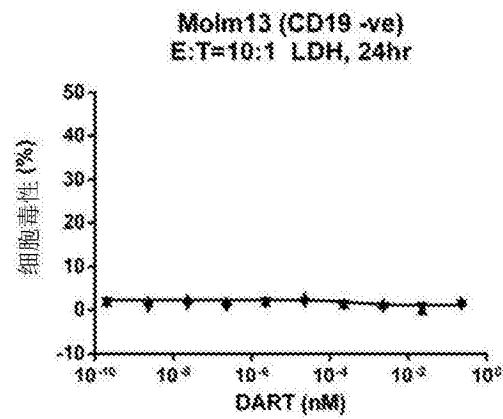


图6D

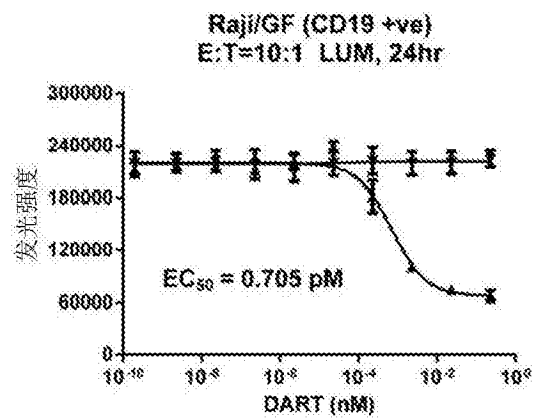


图6E

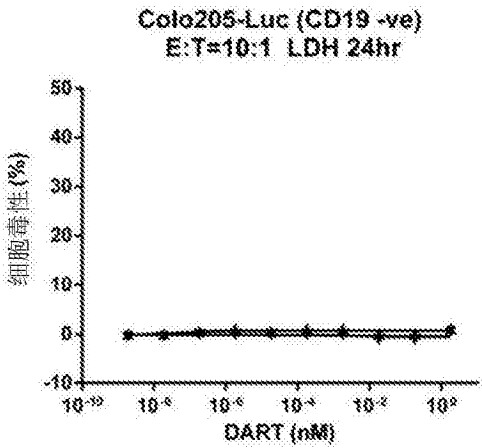


图6F

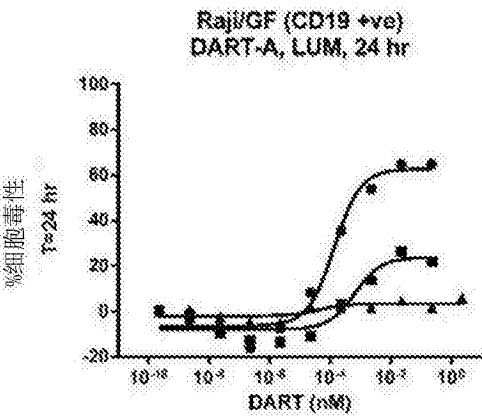


图7A

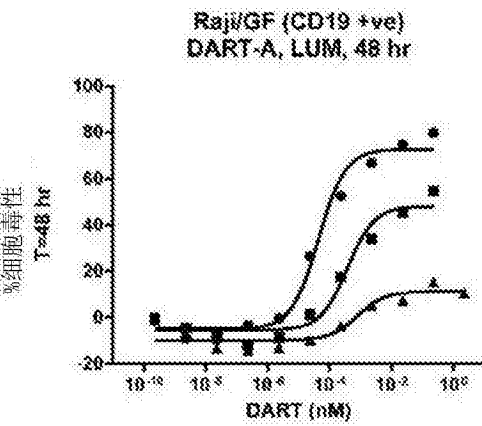


图7B

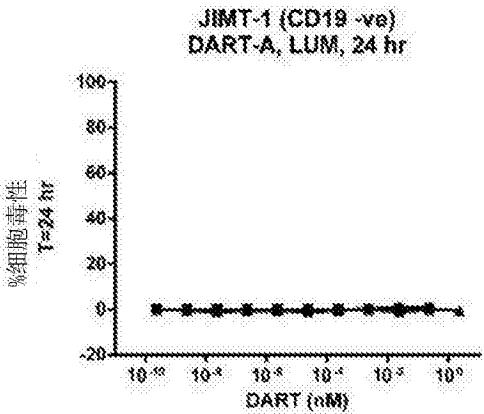


图7C

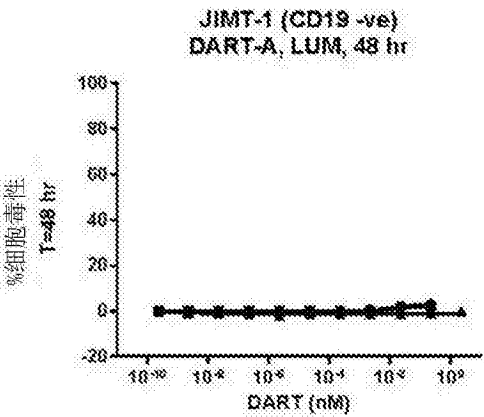


图7D

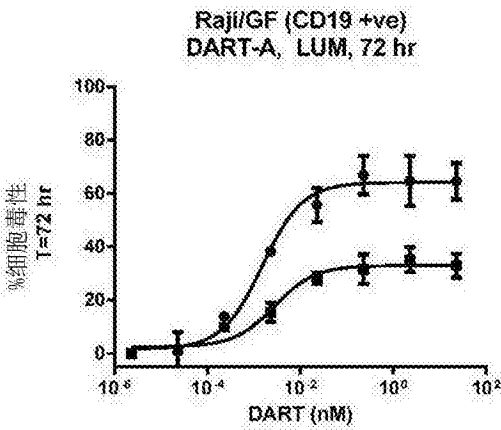


图8A

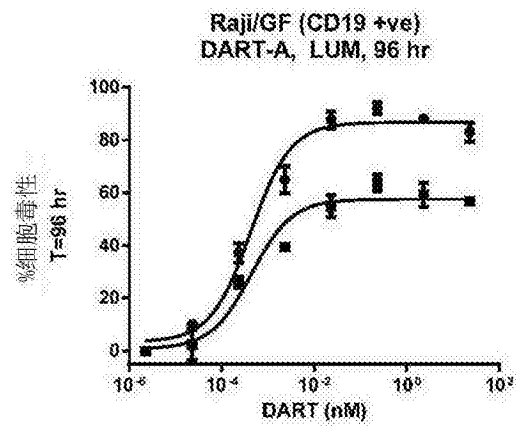


图8B

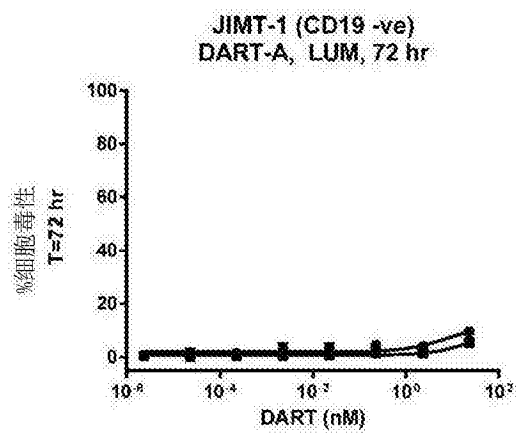


图8C

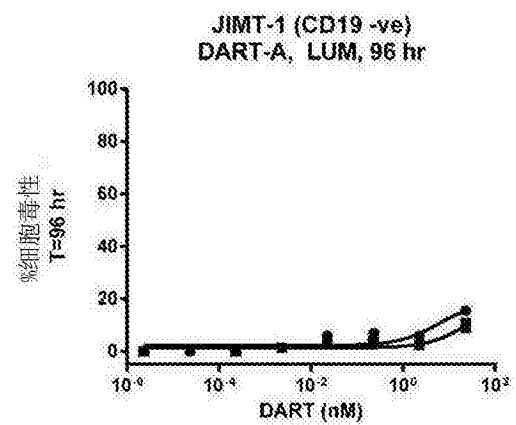


图8D

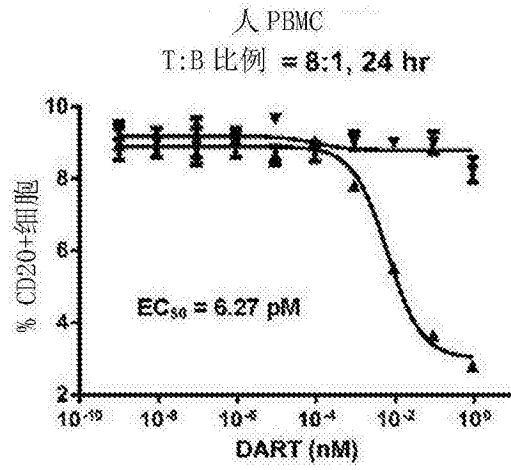


图9A

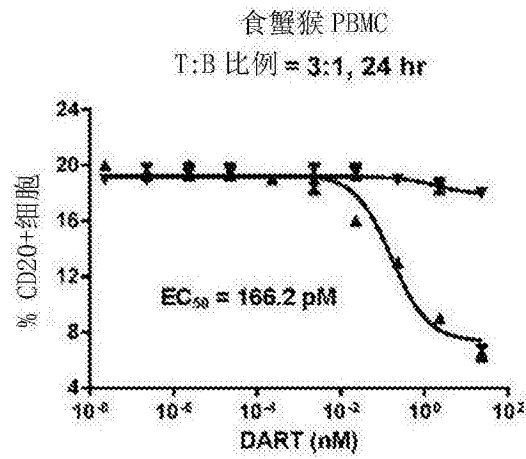


图9B

Raji/GF (CD19 +ve) + 食蟹猴 PBMC C20142
E:T=30:1 LDH, 24hr

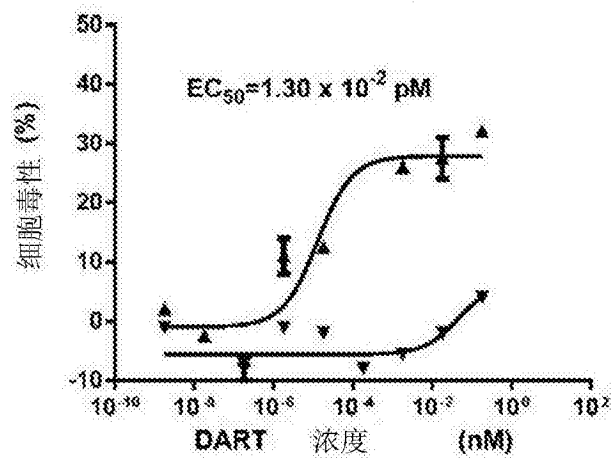


图10

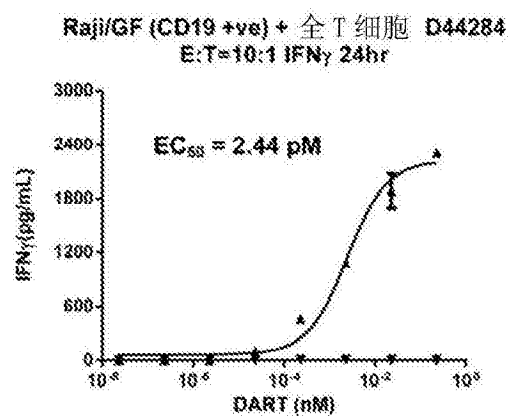


图11A

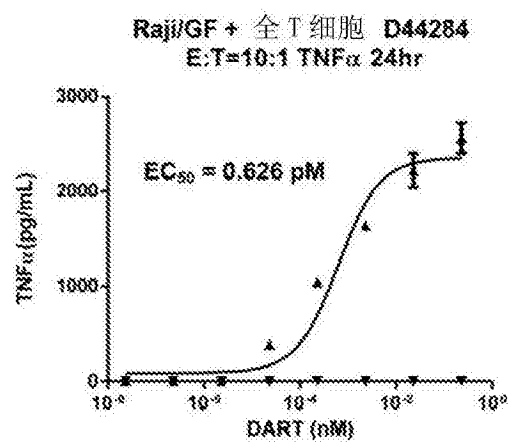


图11B

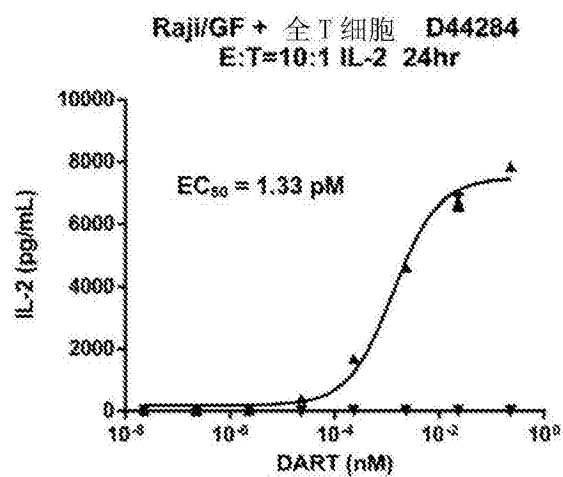


图11C

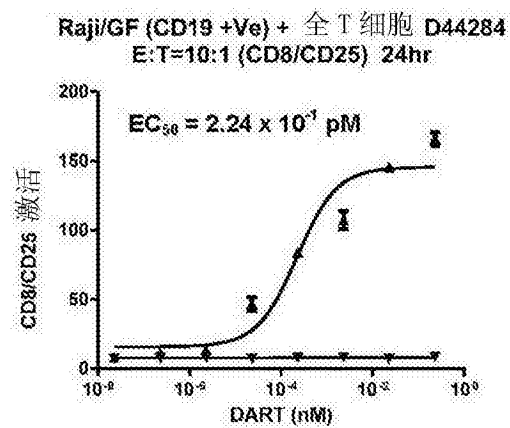


图12A

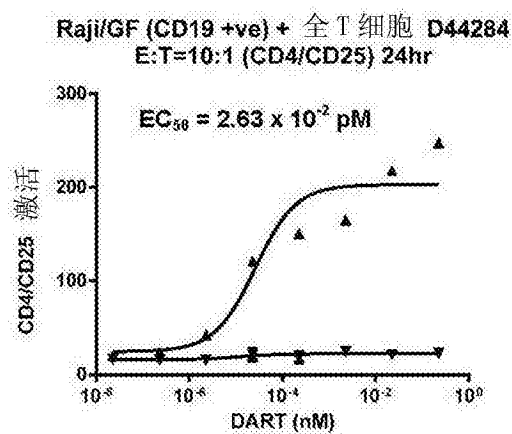


图12B

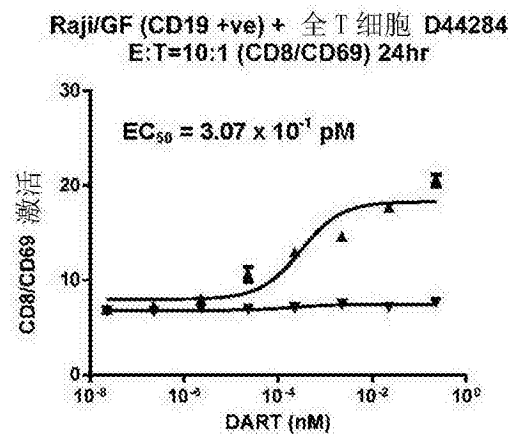


图12C

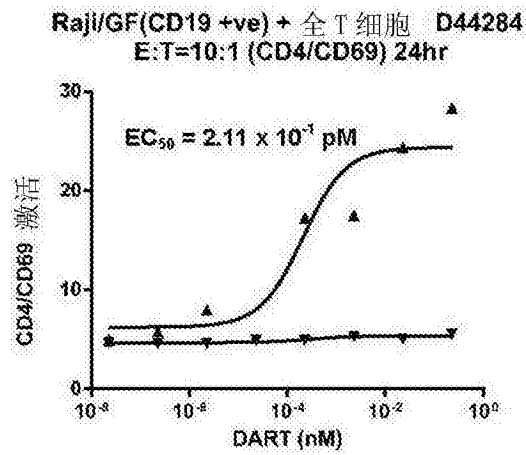


图12D

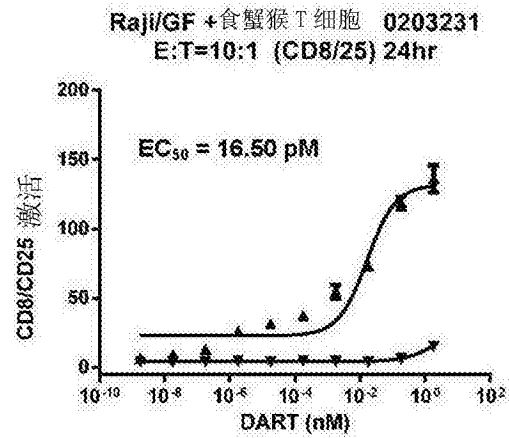


图13A

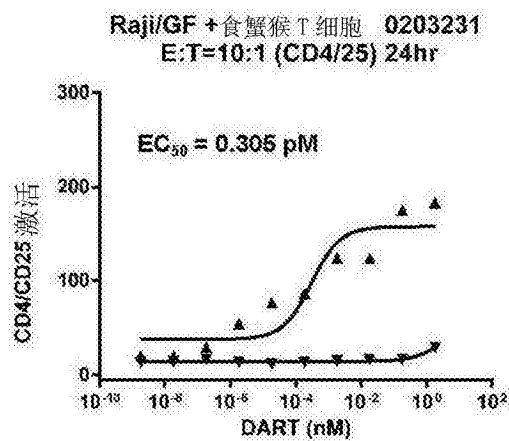


图13B

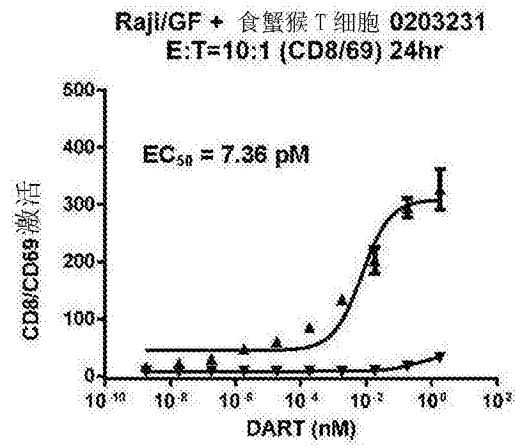


图13C

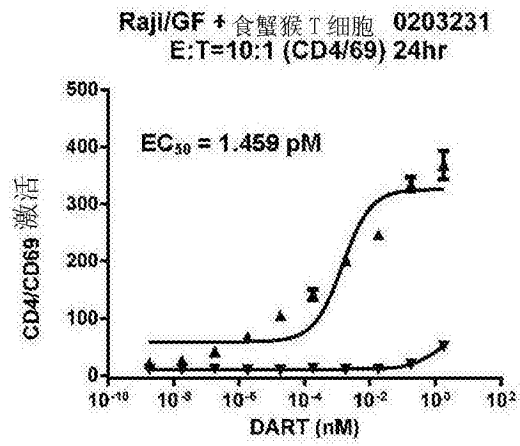


图13D

全 T 细胞

全 T 细胞

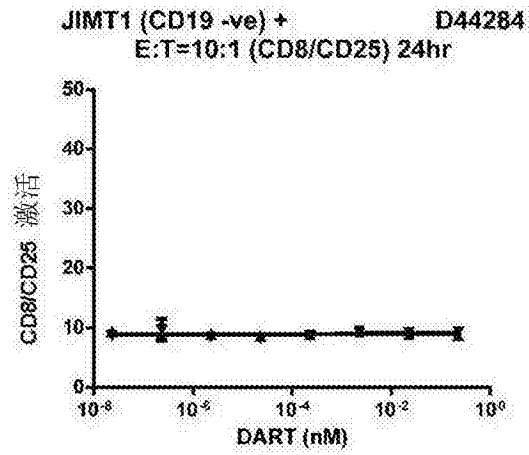


图14A

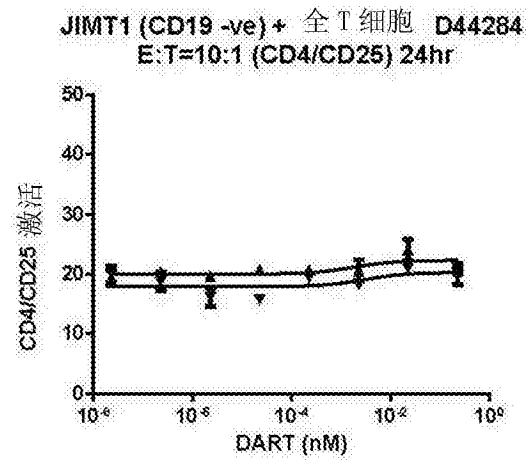


图14B

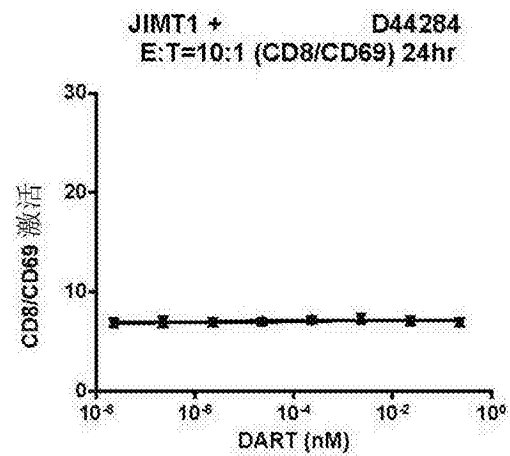


图14C

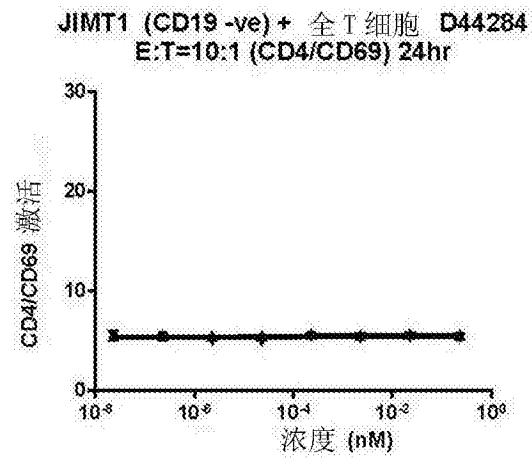


图14D

粒酶 B

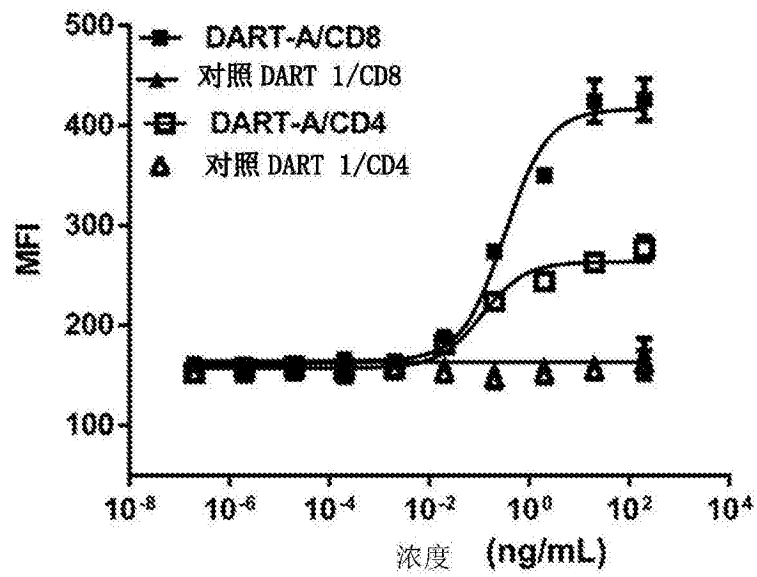


图15A

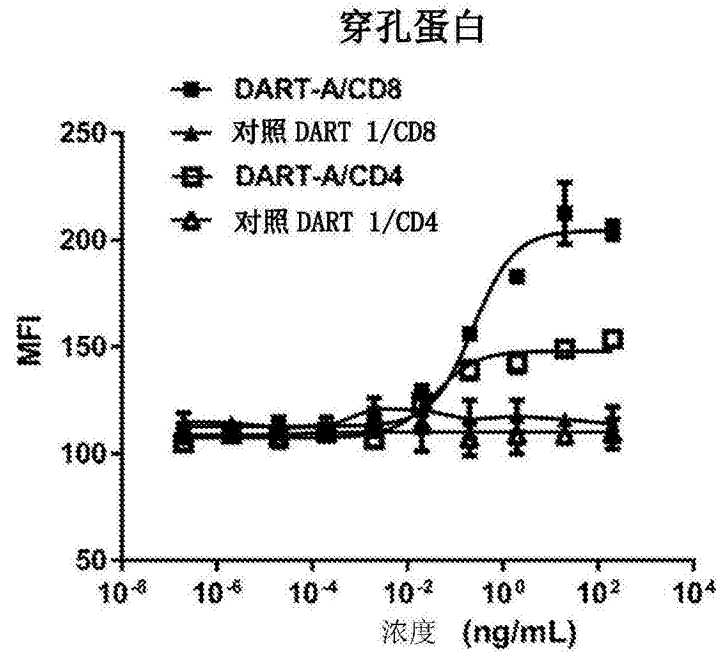


图15B

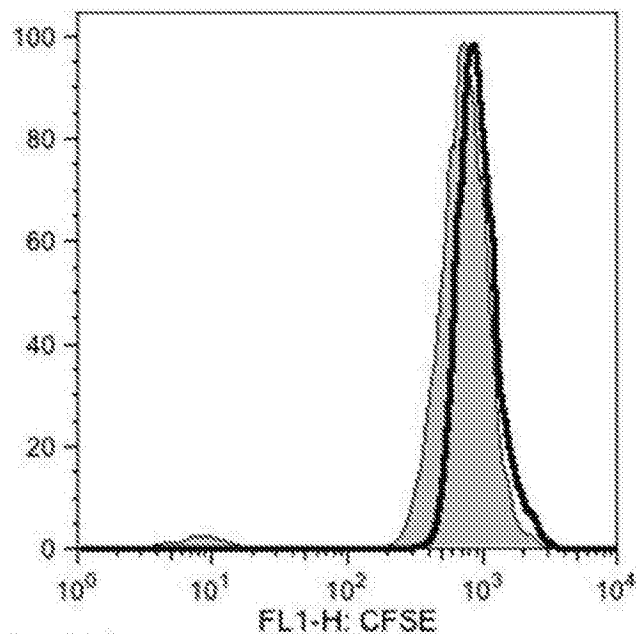


图16A

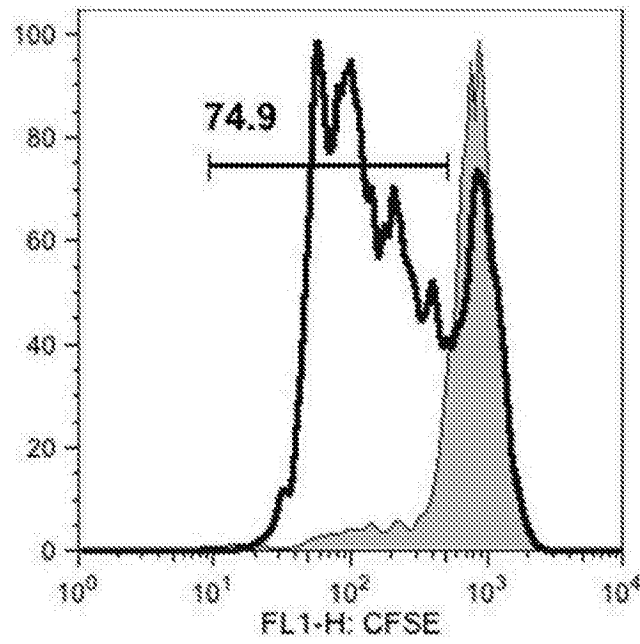


图16B

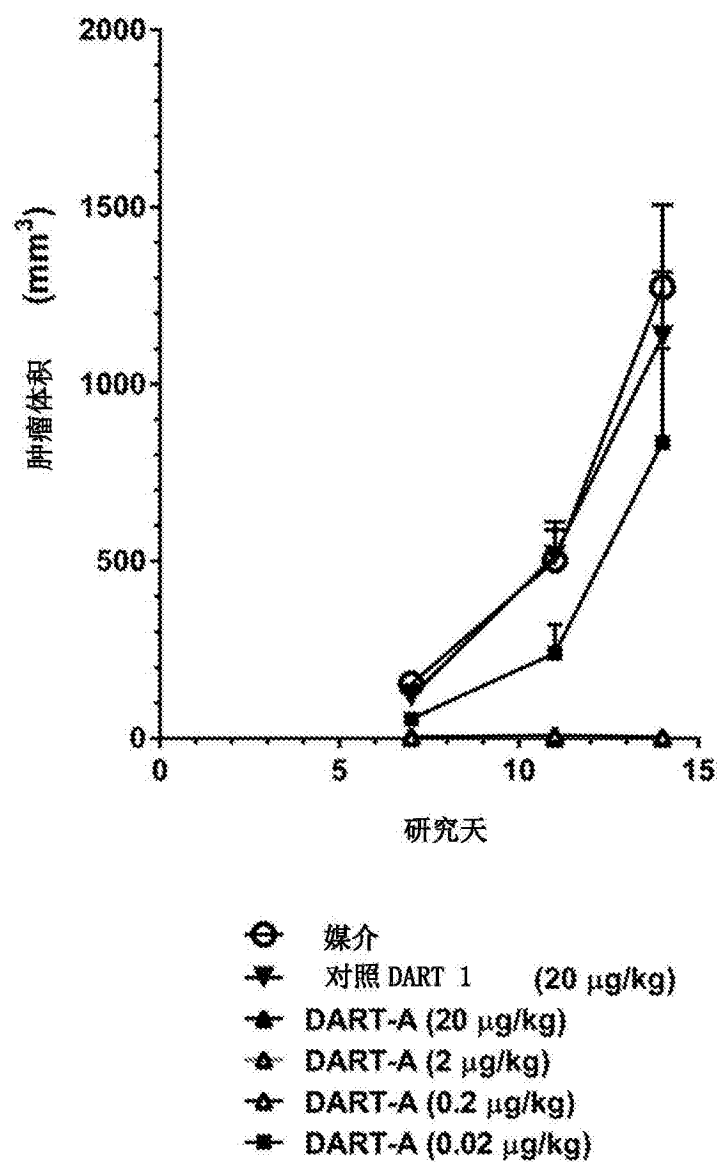


图17

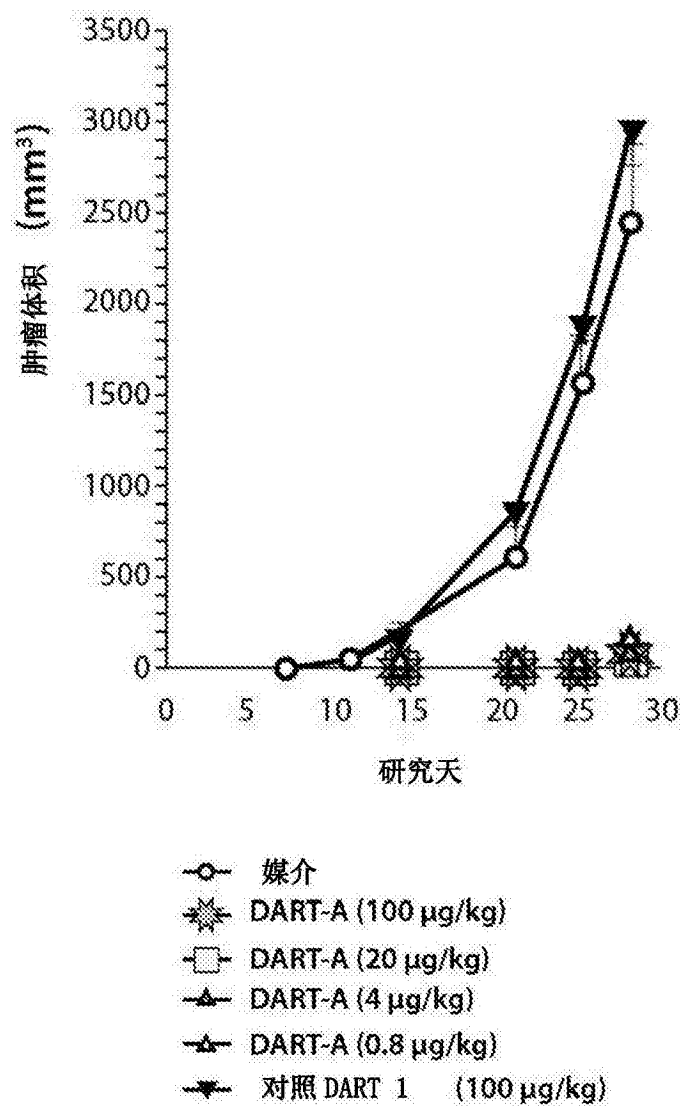


图18

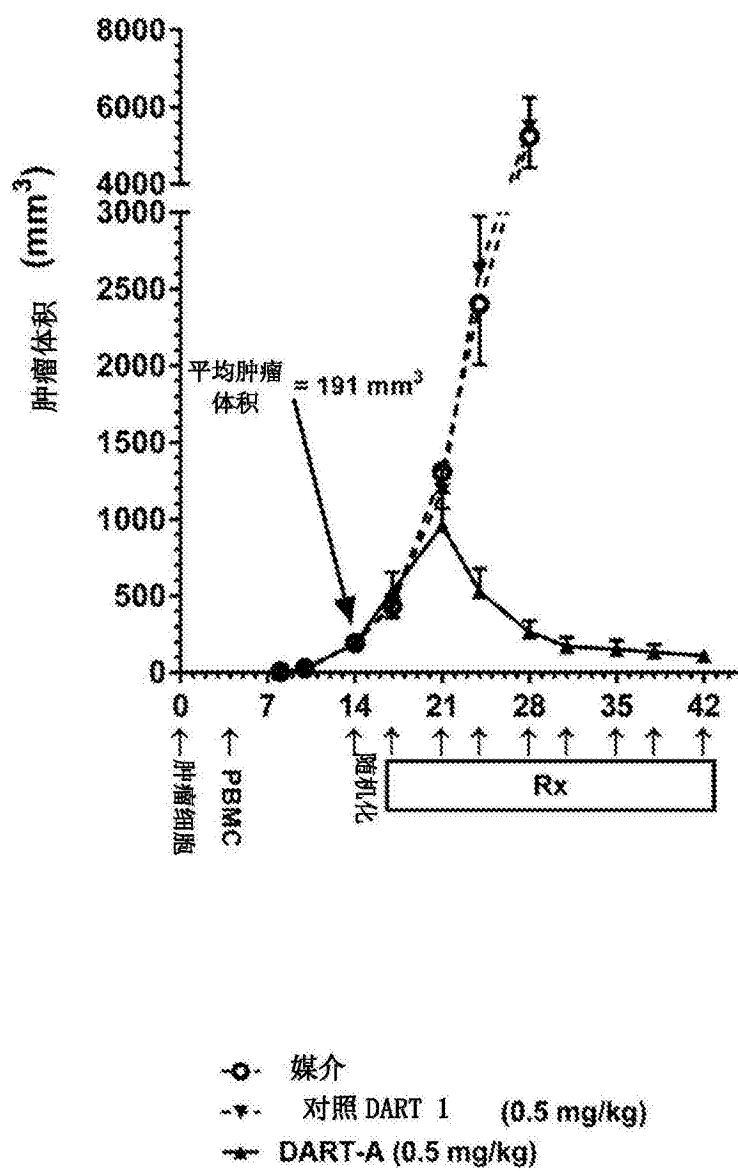


图19A

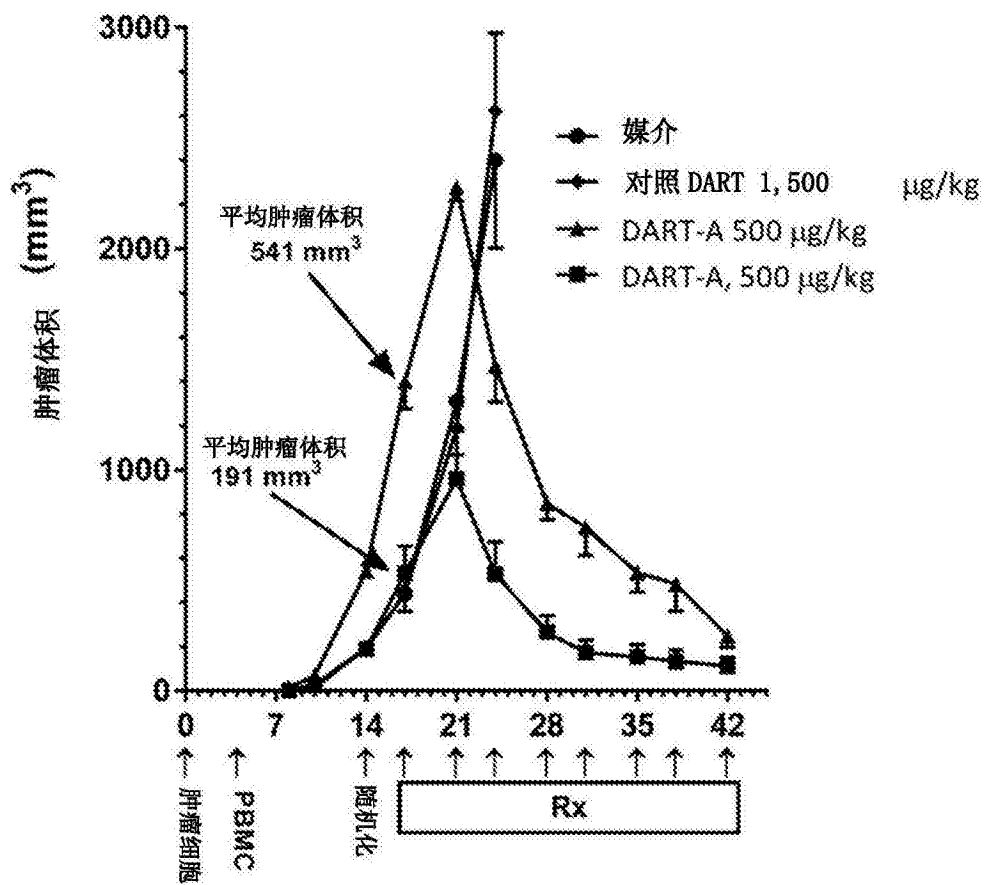


图19B

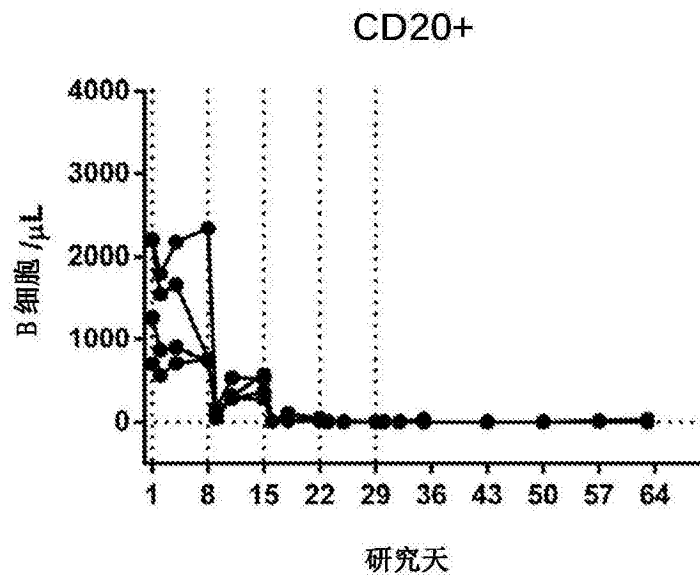


图20A

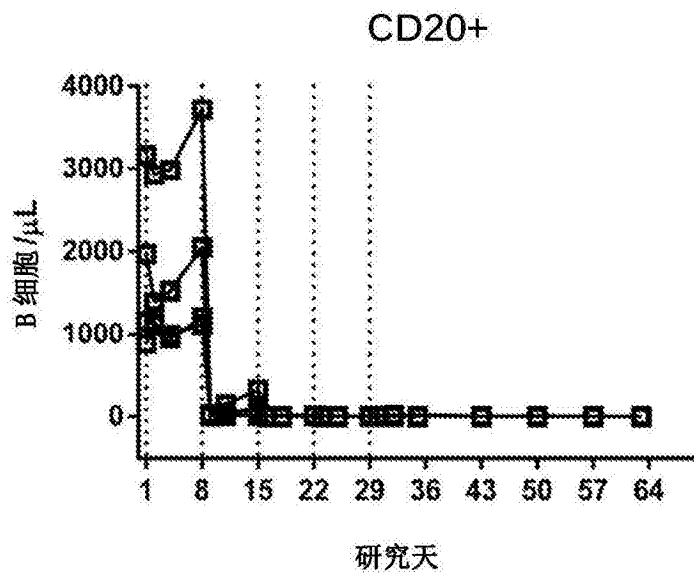


图20B

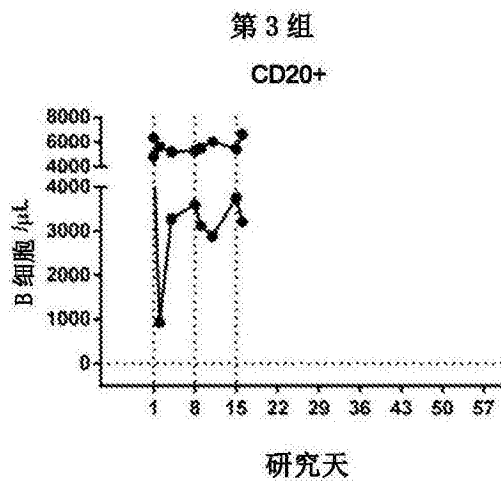


图21A

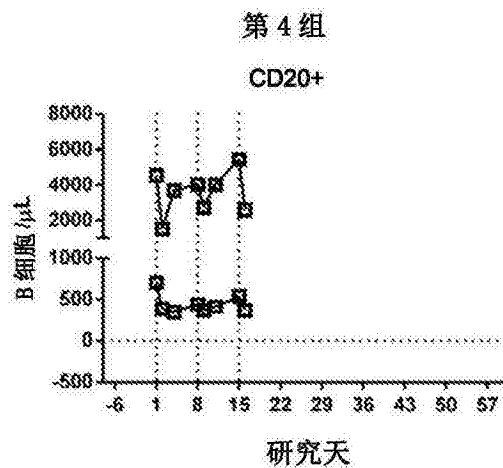


图21B

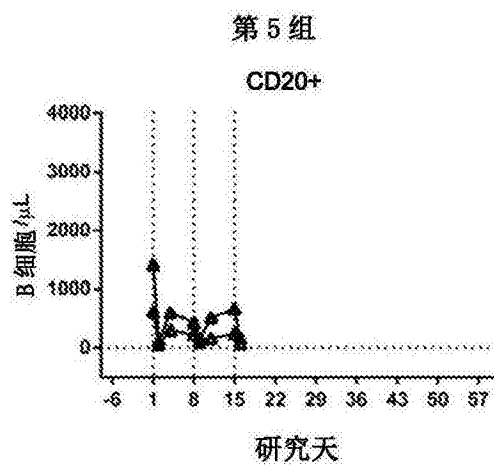


图21C

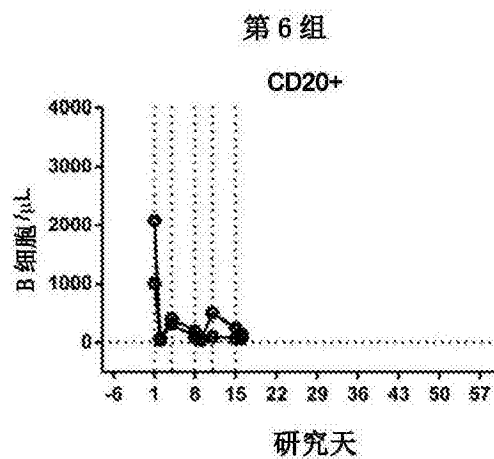


图21D

人 FcRn 转基因小鼠 PK 分析

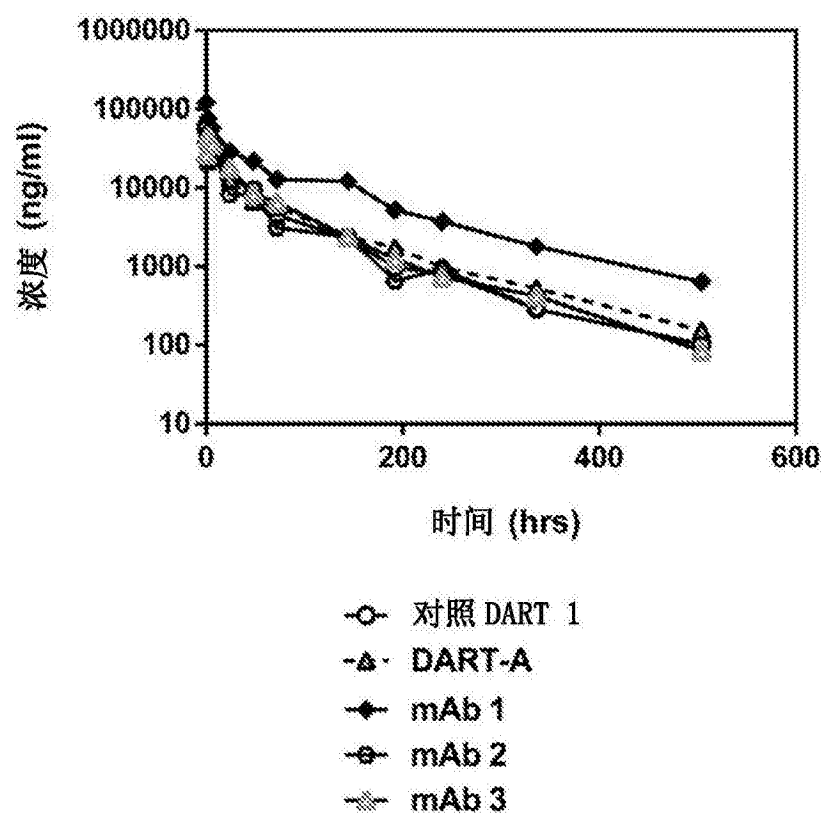


图22

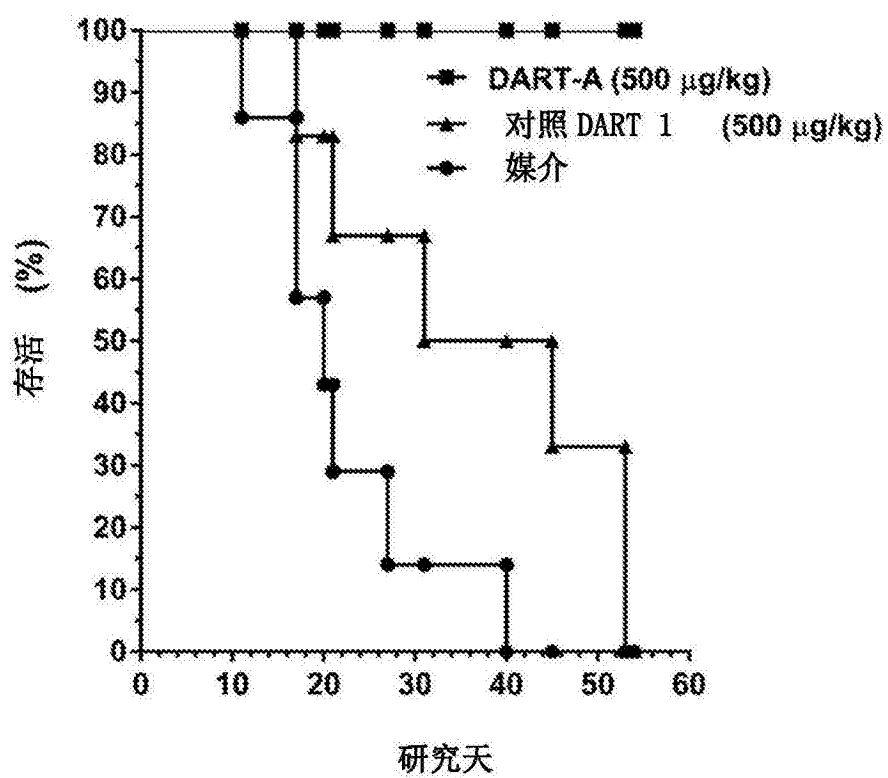


图23

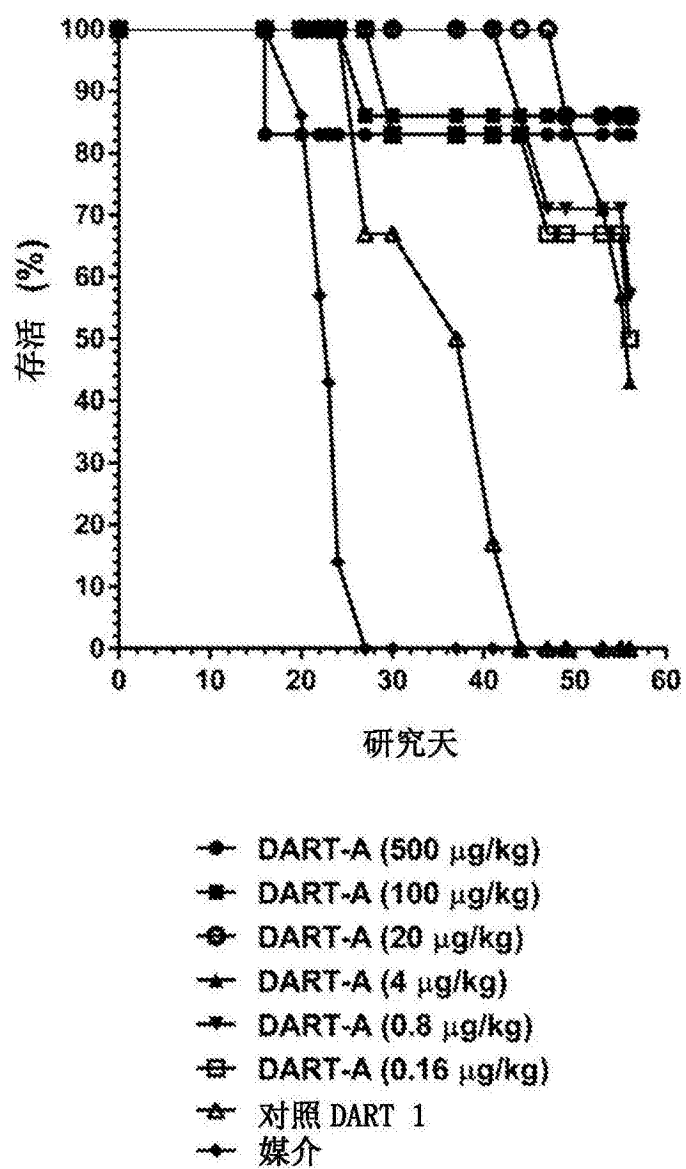


图24

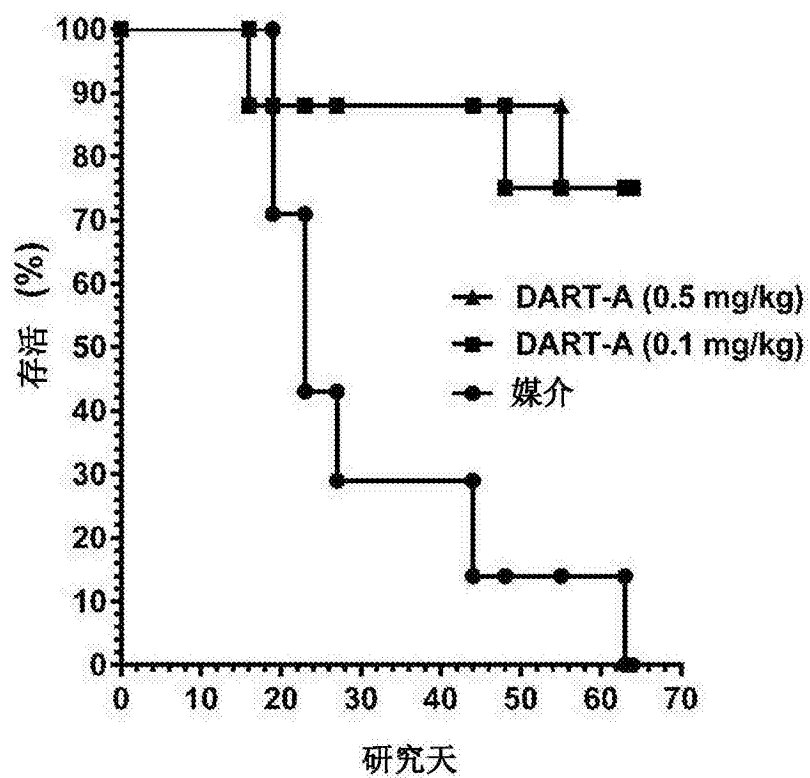
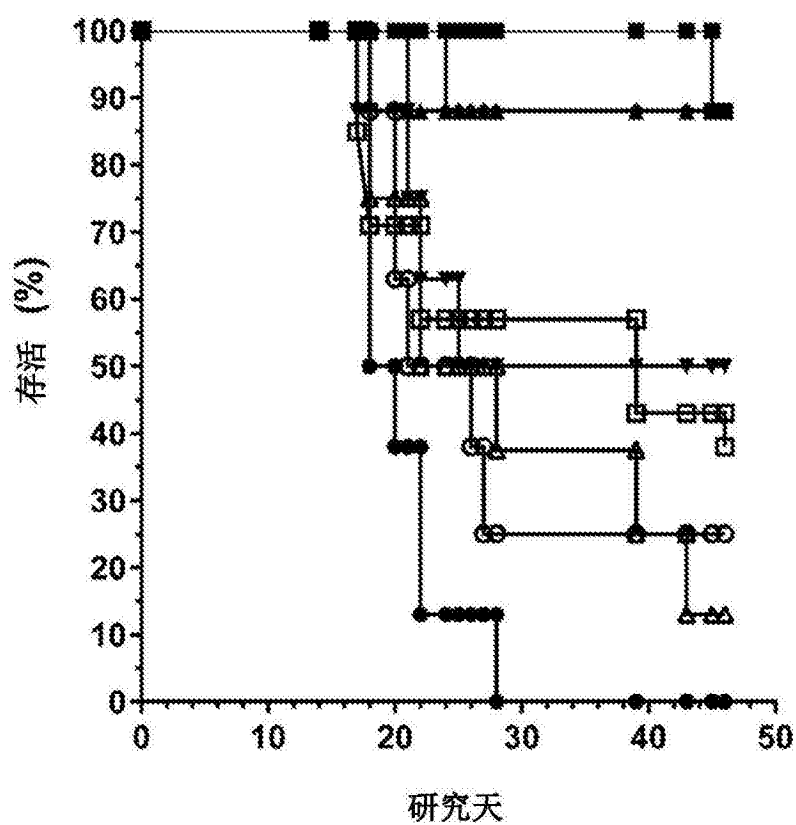


图25



- ◆ 媒介
- ⊖ 对照 DART 1 (100 $\mu\text{g/kg}$)
- DART-A (500 $\mu\text{g/kg}$)
- ★ DART-A (100 $\mu\text{g/kg}$)
- ✱ DART-A (20 $\mu\text{g/kg}$)
- ✦ DART-A (4 $\mu\text{g/kg}$)
- ⊞ DART-A (0.8 $\mu\text{g/kg}$)
- △ DART-A (0.16 $\mu\text{g/kg}$)

图26

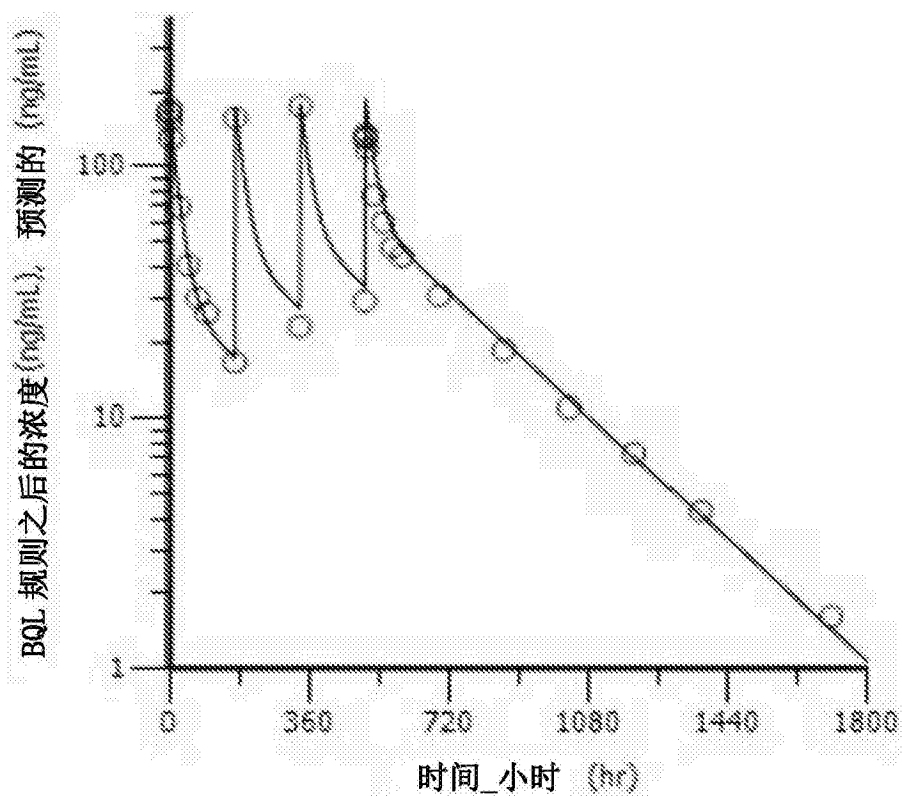


图27

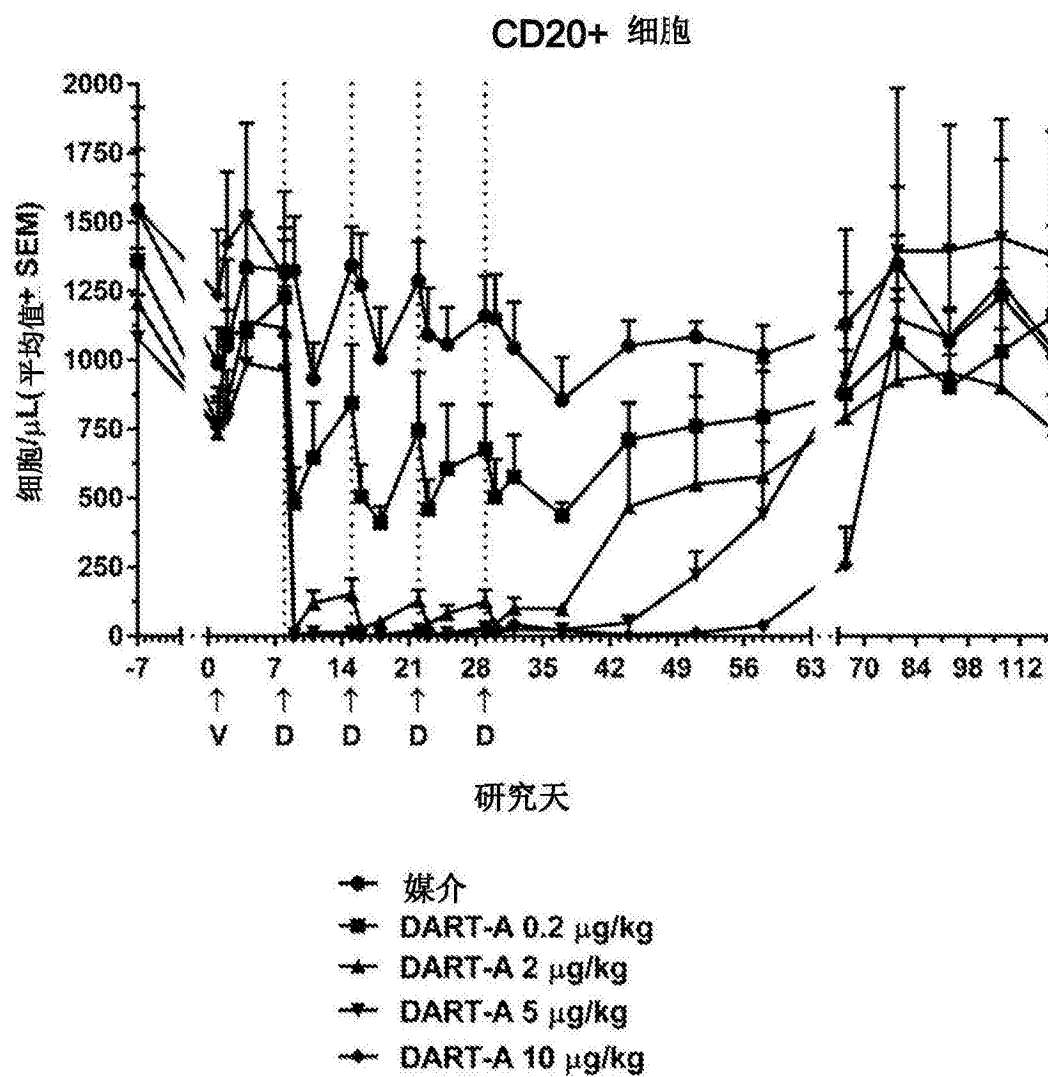


图28

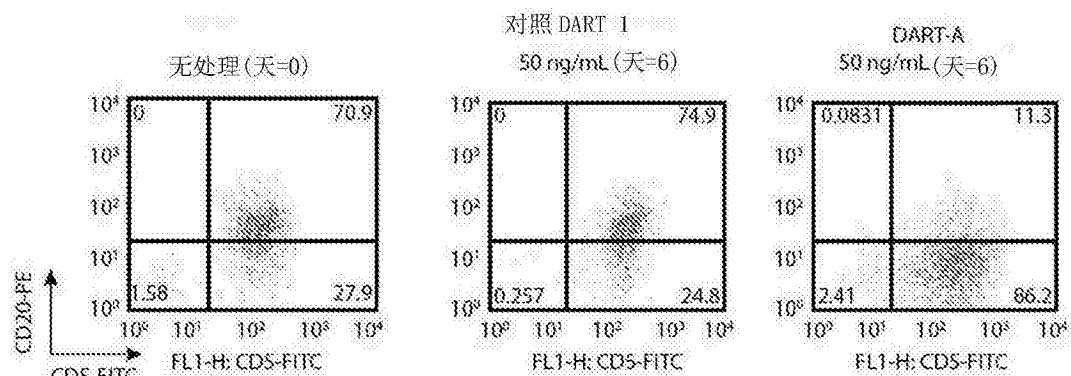


图 29A

图 29B

图 29C

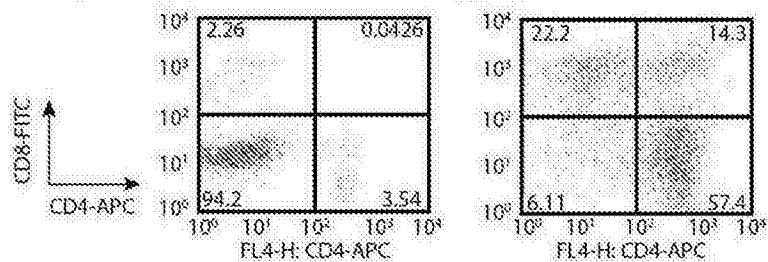


图 29D

图 29E

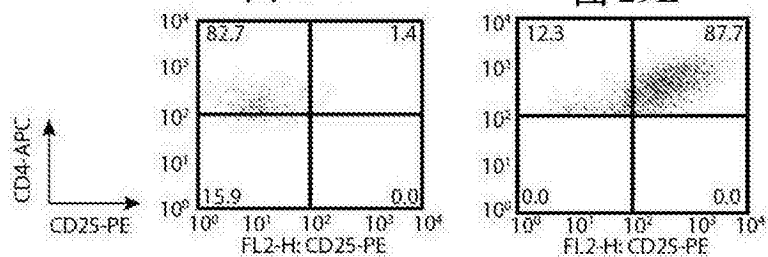


图 29F

图 29G

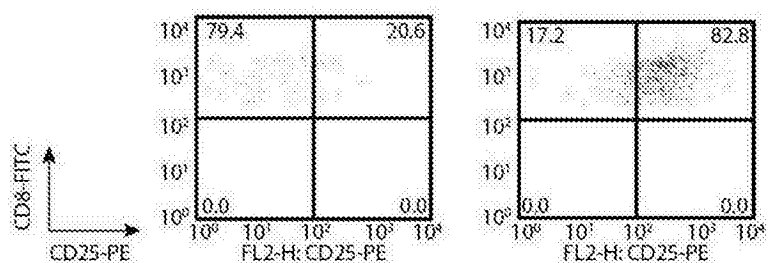


图 29H

图 29I