



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107921130 A

(43)申请公布日 2018.04.17

(21)申请号 201680048182.7

(22)申请日 2016.08.12

(30)优先权数据

62/206,051 2015.08.17 US

62/280,318 2016.01.19 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.02.13

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/046680 2016.08.12

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/030926 EN 2017.02.23

(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

保罗·A·摩尔 埃兹奥·泊韦尼

黄菱 K·沙哈

拉尔夫·奥尔德森

格兰德·R·齐齐利

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所

11313

代理人 王建秀 郝名悦

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

C07K 16/30(2006.01)

权利要求书3页 说明书52页

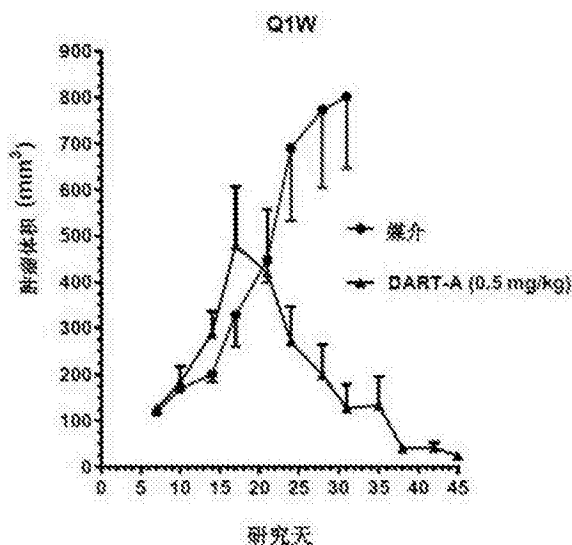
序列表38页 附图34页

(54)发明名称

能够结合B7-H3和CD3的双特异性单价双抗体及其用途

(57)摘要

本发明涉及B7-H3x CD3双特异性单价双抗体,尤其涉及B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体,其能够同时结合至B7-H3和CD3。本发明也涉及包含这类双特异性单价Fc双抗体的药物组合物。本发明另外涉及这类双抗体在治疗癌症和其他疾病和病况中的应用的方案。



1. 一种能够特异性结合B7-H3和结合CD3的B7-H3x 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,并且其中:

(A) 所述第一多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:53;

(B) 所述第二多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:55;和

(C) 所述第三多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:57。

2. 一种药物组合物,其包括权利要求1所述的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体和生理学上可接受的载体。

3. 如权利要求1所述的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体或如权利要求2所述的药物组合物在治疗与B7-H3的表达相关或特征在于B7-H3的表达的疾病或病况中的用途。

4. 如权利要求3所述的用途,其中所述与B7-H3的表达相关或特征在于B7-H3的表达的疾病或病况是癌症。

5. 如权利要求4所述的用途,其中所述癌症选自:急性髓细胞样白血病、肾上腺肿瘤、AIDS相关的癌症、软组织腺泡状肉瘤、星形细胞瘤、膀胱癌、骨癌、脑和脊髓癌症、转移性脑瘤、乳腺癌、颈动脉体瘤、宫颈癌、软骨肉瘤、脊索瘤、嫌色细胞肾细胞癌、透明细胞癌、结肠癌、结直肠癌、皮肤良性纤维组织细胞瘤、促结缔组织增生小圆细胞瘤、室管膜细胞瘤、尤文氏瘤、骨外粘液样软骨肉瘤、不完全性骨纤维生成、骨的纤维发育异常、胆囊癌或胆管癌、胃癌、妊娠滋养层疾病、生殖细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌、恶性胶质瘤、胰岛细胞肿瘤、卡波西氏肉瘤、肾癌、白血病、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/恶性的脂肪瘤、肝癌、淋巴瘤、肺癌、成神经管细胞瘤、黑色素瘤、脑膜瘤、恶性间皮瘤、多发性内分泌瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、成神经细胞瘤、神经内分泌肿瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、胰腺癌、鼻咽癌、甲状腺乳头状癌、甲状旁腺瘤、儿科癌症、周围神经鞘瘤、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、前列腺癌、眼色素层后黑色素瘤、罕见血液学疾病、肾细胞癌、肾转移性癌症、横纹肌样瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌症、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移性癌症和子宫癌。

6. 如权利要求5所述的用途,其中所述癌症选自:膀胱癌、乳腺癌、结直肠癌、胃癌、恶性胶质瘤、肾癌、肺癌、黑色素瘤、成神经细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、鼻咽癌、前列腺癌、肾细胞癌、横纹肌肉瘤和头颈的鳞状细胞癌(SCCHN)。

7. 一种能够特异性结合B7-H3和结合CD3的B7-H3x 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,并且其中:

(A) 所述第一多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:59;

(B) 所述第二多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:60;和

(C) 所述第三多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:57。

8. 一种药物组合物,其包括如权利要求7所述的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体和生理学上可接受的载体。

9. 如权利要求7所述的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体或如权利要求8所述的药物组合物在治疗与B7-H3的表达相关或特征在于B7-H3的表达的疾病或病况中的用途。

10. 如权利要求9所述的用途,其中所述与B7-H3的表达相关或特征在于B7-H3的表达的

疾病或病况是癌症。

11. 如权利要求10所述的用途,其中所述癌症选自:急性髓细胞样白血病、肾上腺肿瘤、AIDS相关的癌症、软组织腺泡状肉瘤、星形细胞瘤、膀胱癌、骨癌、脑和脊髓癌症、转移性脑瘤、乳腺癌、颈动脉体瘤、宫颈癌、软骨肉瘤、脊索瘤、嫌色细胞肾细胞癌、透明细胞癌、结肠癌、结直肠癌、皮肤良性纤维组织细胞瘤、促结缔组织增生小圆细胞瘤、室管膜细胞瘤、尤文氏瘤、骨外粘液样软骨肉瘤、不完全性骨纤维生成、骨的纤维发育异常、胆囊癌或胆管癌、胃癌、妊娠滋养层疾病、生殖细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌、恶性胶质瘤、胰岛细胞肿瘤、卡波西氏肉瘤、肾癌、白血病、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/恶性的脂肪瘤、肝癌、淋巴瘤、肺癌、成神经管细胞瘤、黑素瘤、脑膜瘤、恶性间皮瘤、多发性内分泌瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、成神经细胞瘤、神经内分泌肿瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、胰腺癌、鼻咽癌、甲状腺乳头状癌、甲状旁腺瘤、儿科癌症、周围神经鞘瘤、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、前列腺癌、眼色素层后黑素瘤、罕见血液学疾病、肾细胞癌、肾转移性癌症、横纹肌样瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌症、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移性癌症和子宫癌。

12. 如权利要求11所述的用途,其中所述癌症选自:膀胱癌、乳腺癌、结直肠癌、胃癌、恶性胶质瘤、肾癌、肺癌、黑素瘤、成神经细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、鼻咽癌、前列腺癌、肾细胞癌、横纹肌肉瘤和头颈的鳞状细胞癌(SCCHN)。

13. 一种能够特异性结合B7-H3和结合CD3的B7-H3x 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,并且其中:

- (A) 所述第一多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:61;
- (B) 所述第二多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:62;和
- (C) 所述第三多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:57。

14. 一种药物组合物,其包括如权利要求15所述的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体和生理学上可接受的载体。

15. 如权利要求13所述的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体或如权利要求14所述的药物组合物在治疗与B7-H3的表达相关或特征在于B7-H3的表达的疾病或病况中的用途。

16. 如权利要求15所述的用途,其中所述与B7-H3的表达相关或特征在于B7-H3的表达的疾病或病况是癌症。

17. 如权利要求16所述的用途,其中所述癌症选自:急性髓细胞样白血病、肾上腺肿瘤、AIDS相关的癌症、软组织腺泡状肉瘤、星形细胞瘤、膀胱癌、骨癌、脑和脊髓癌症、转移性脑瘤、乳腺癌、颈动脉体瘤、宫颈癌、软骨肉瘤、脊索瘤、嫌色细胞肾细胞癌、透明细胞癌、结肠癌、结直肠癌、皮肤良性纤维组织细胞瘤、促结缔组织增生小圆细胞瘤、室管膜细胞瘤、尤文氏瘤、骨外粘液样软骨肉瘤、不完全性骨纤维生成、骨的纤维发育异常、胆囊癌或胆管癌、胃癌、妊娠滋养层疾病、生殖细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌、恶性胶质瘤、胰岛细胞肿瘤、卡波西氏肉瘤、肾癌、白血病、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/恶性的脂肪瘤、肝癌、淋巴瘤、肺癌、成神经管细胞瘤、黑素瘤、脑膜瘤、恶性间皮瘤、多发性内分泌瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、成神经细胞瘤、神经内分泌肿瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、胰腺癌、鼻咽癌、甲状腺乳头状癌、甲状旁腺瘤、儿科癌症、周围神经鞘瘤、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、前列腺癌、眼色素层

后黑素瘤、罕见血液学疾病、肾细胞癌、肾转移性癌症、横纹肌样瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌症、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移性癌症和子宫癌。

18. 如权利要求17所述的用途,其中所述癌症选自:膀胱癌、乳腺癌、结直肠癌、胃癌、恶性胶质瘤、肾癌、肺癌、黑素瘤、成神经细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、鼻咽癌、前列腺癌、肾细胞癌、横纹肌肉瘤和头颈的鳞状细胞癌(SCCHN)。

19. 一种能够特异性结合B7-H3和结合CD3的B7-H3x 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,并且其中:

- (A) 所述第一多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:63;
- (B) 所述第二多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:64;和
- (C) 所述第三多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:57。

20. 一种药物组合物,其包括如权利要求19所述的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体和生理学上可接受的载体。

21. 如权利要求19所述的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体或如权利要求20所述的药物组合物在治疗与B7-H3的表达相关或特征在于B7-H3的表达的疾病或病况中的用途。

22. 如权利要求21所述的用途,其中所述与B7-H3的表达相关或特征在于B7-H3的表达的疾病或病况是癌症。

23. 如权利要求22所述的用途,其中所述癌症选自:急性髓细胞样白血病、肾上腺肿瘤、AIDS相关的癌症、软组织腺泡状肉瘤、星形细胞瘤、膀胱癌、骨癌、脑和脊髓癌症、转移性脑瘤、乳腺癌、颈动脉体瘤、宫颈癌、软骨肉瘤、脊索瘤、嫌色细胞肾细胞癌、透明细胞癌、结肠癌、结直肠癌、皮肤良性纤维组织细胞瘤、促结缔组织增生小圆细胞瘤、室管膜细胞瘤、尤文氏瘤、骨外粘液样软骨肉瘤、不完全性骨纤维生成、骨的纤维发育异常、胆囊癌或胆管癌、胃癌、妊娠滋养层疾病、生殖细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌、恶性胶质瘤、胰岛细胞肿瘤、卡波西氏肉瘤、肾癌、白血病、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/恶性的脂肪瘤、肝癌、淋巴瘤、肺癌、成神经管细胞瘤、黑素瘤、脑膜瘤、恶性间皮瘤、多发性内分泌瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、成神经细胞瘤、神经内分泌肿瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、胰腺癌、鼻咽癌、甲状腺乳头状癌、甲状旁腺瘤、儿科癌症、周围神经鞘瘤、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、前列腺癌、眼色素层后黑素瘤、罕见血液学疾病、肾细胞癌、肾转移性癌症、横纹肌样瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌症、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移性癌症和子宫癌。

24. 如权利要求23所述的用途,其中所述癌症选自:膀胱癌、乳腺癌、结直肠癌、胃癌、恶性胶质瘤、肾癌、肺癌、黑素瘤、成神经细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、鼻咽癌、前列腺癌、肾细胞癌、横纹肌肉瘤和头颈的鳞状细胞癌(SCCHN)。

能够结合B7-H3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] 本申请要求美国专利申请系列号62/206,051 (2015年8月17日提交;待决) 和62/280,318 (2016年1月19日提交) 的优先权, 每篇申请通过引用以其整体并入本文。

[0003] 序列表的参考

[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, 其以计算机可读的介质公开 (文件名: 1301-0123PCT_ST25.txt, 2016年8月10日创建, 大小为70,481字节), 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, 其具有对B7-H3的表位特异性的一个结合位点和对CD3的表位特异性的一个结合位点 (即, “B7-H3x CD3双特异性单价双抗体”)。最优选地, 这类B7-H3x CD3双特异性单价双抗体包括三条多肽链, 并且具有对B7-H3的表位特异性的一个结合位点和对CD3的表位特异性的一个结合位点, 并且另外包括免疫球蛋白Fc结构域 (即, “B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体”)。本发明的双特异性单价Fc双抗体能够同时结合B7-H3和CD3。本发明涉及包含这类双特异性单价Fc双抗体的药物组合物。本发明另外涉及这类双抗体在治疗癌症和其他疾病和病况中的应用的方法。

背景技术

[0006] I. B7超家族和B7-H3

[0007] 肿瘤的生长和转移很大程度上取决于它们逃避宿主免疫监视和战胜宿主防御的能力。大部分肿瘤表达可被宿主免疫系统不同程度识别的抗原, 但是在许多情况下, 由于效应T细胞的无效激活而引起不充分的免疫应答 (Khawli, L.A. 等 (2008) “Cytokine, Chemokine, and Co-Stimulatory Fusion Proteins for Immunotherapy of Solid Tumors,” *Exper. Pharmacol.* 181:291-328)。

[0008] B7-H3是免疫球蛋白分子的B7超家族的成员。B7超家族的成员具有免疫球蛋白-V样结构域和免疫球蛋白-C样结构域 (例如, 分别IgV和IgC) (Sharpe, A.H. 等 (2002) “The B7-CD28Superfamily,” *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126)。B7-超家族成员的IgV和IgC结构域各自由单外显子编码, 另外的外显子编码前导序列、跨膜和细胞质结构域。细胞质结构域是短的, 长度范围是19至62个氨基酸残基并且可由多个外显子编码 (Collins, M. 等 (2005) “The B7Family Of Immune-Regulatory Ligands,” *Genome Biol.* 6:223.1-223.7)。预测B7超家族的成员在细胞表面形成连续的 (back-to-back)、非共价的同源二聚体, 并且就B7-1 (CD80) 和B7-2 (CD86) 而言, 已经发现了这类二聚体。B7-1 (CD80) 和B7-2 (CD86) 展示具有对于刺激性CD28受体和抑制性CTLA-4 (CD152) 受体的双特异性 (Sharpe, A.H. 等 (2002) “The B7-CD28Superfamily,” *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126)。

[0009] B7-H3 (CD276) 是独特的, 因为主要的人形式包含两个细胞外串联IgV-IgC结构域 (即, IgV-IgC-IgV-IgC) (Collins, M. 等 (2005) “The B7 Family Of Immune-Regulatory

Ligands,”*Genome Biol.*6:223.1-223.7)。尽管起初认为仅仅包括2个Ig结构域(IgV-IgC)(Chapoval,A.等(2001)“B7-H3:A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN- γ Production,”*Nature Immunol.*2:269-274;Sun,M.等(2002)“Characterization of Mouse and Human B7-H3 Genes,”*J.Immunol.*168:6294-6297),但是已经发现四免疫球蛋白细胞外结构域变体(“4Ig-B7-H3”)是更常见的人形式的蛋白质(Sharpe,A.H.等(2002)“The B7-CD28Superfamily,”*Nature Rev.Immunol.*2:116-126)。但是,天然鼠科形式是2Ig,并且其和人4Ig形式展示类似的功能(Hofmeyer,K.等(2008)“The Contrasting Role Of B7-H3,”*Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.)* 105 (30):10277-10278)。4Ig-B7-H3分子抑制天然杀伤细胞介导的癌症细胞的裂解(Castriconi,R.等(2004)“Identification Of 4Ig-B7-H3 As A Neuroblastoma-Associated Molecule That Exerts A Protective Role From An NK Cell-Mediated Lysis,”*Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.)* 101 (34):12640-12645)。已经发现2Ig形式的人B7-H3,通过结合激活的T细胞上推定的受体而促进T细胞激活和IFN- γ 产生(Chapoval,A.等(2001)“B7-H3:A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN- γ Production,”*Nature Immunol.*2:269-274;Xu,H.等(2009)“MicroRNA miR-29 Modulates Expression of Immunoinhibitory Molecule B7-H3: Potential Implications for Immune Based Therapy of Human Solid Tumors,”*Cancer Res.*69 (15):5275-6281)。当在肿瘤细胞上表达时,B7-H4和B7-H3都是免疫功能的有效抑制剂(Flies,D.B.等(2007)“The New B7s:Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity,”*J.Immunother.*30 (3):251-260)。

[0010] B7-H3的作用模式是复杂的,因为蛋白质介导T细胞共刺激和共抑制二者(Hofmeyer,K.等(2008)“The Contrasting Role Of B7-H3,”*Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.)* 105 (30):10277-10278;Martin-Orozco,N.等(2007)“Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity,”*Semin.Cancer Biol.*17 (4):288-298;Subudhi,S.K.等(2005)“The Balance Of Immune Responses:Costimulation Verse Coinhibition,”*J.Mol.Med.*83:193-202)。B7-H3结合TREM样转录体2(TLT-2)并且共刺激T细胞激活,而且也结合仍未确定的受体(一种或多种),以介导T细胞的共抑制。另外,通过与未知受体(一种或多种)的相互作用,B7-H3是天然杀伤细胞和成骨细胞的抑制剂(Hofmeyer,K.等(2008)“The Contrasting Role Of B7-H3,”*Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.)* 105 (30):10277-10278)。可通过与主要信号传导途径的成员的相互作用进行抑制,通过所述传导途径,T细胞受体(TCR)调节基因转录(例如,NFAT、NF- κ B或AP-1因子)。

[0011] B7-H3共刺激CD4⁺和CD8⁺T细胞增殖。B7-H3也刺激IFN- γ 产生和CD8⁺裂解活性(Chapoval,A.等(2001)“B7-H3:A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN- γ Production,”*Nature Immunol.*2:269-274;Sharpe,A.H.等(2002)“The B7-CD28Superfamily,”*Nature Rev.Immunol.*2:116-126)。但是,蛋白质也可能通过NFAT(激活的T细胞的核因子)、NF- κ B(核因子 κ B)和AP-1(活化因子蛋白质-1)因子起作用,以抑制T细胞激活(Yi.K.H.等(2009)“Fine Tuning Immune Response Through B7-H3 And B7-H4,”*Immunol.Rev.*229:145-151)。还认为,B7-H3在体内抑制Th1、Th2或Th17(Prasad,D.V.等(2004)“Murine B7-H3 Is A Negative Regulator Of T Cells,”*J.Immunol.*173:2500-2506;Fukushima,A.等(2007)“B7-H3 Regulates The Development Of Experimental

Allergic Conjunctivitis In Mice,”*Immunol.Lett.*113:52-57;Yi.K.H.等(2009)“Fine Tuning The Immune Response Through B7-H3 And B7-H4,”*Immunol.Rev.*229:145-151)。若干独立研究已经证明,人恶性肿瘤细胞展示显著增加的B7-H3蛋白质的表达,并且该增加的表达与增加的疾病严重程度相关(Zang,X.等(2007)“The B7 Family And Cancer Therapy:Costimulation And Coinhibition,”*Clin.Cancer Res.*13:5271-5279),提示B7-H3被肿瘤用作免疫逃避途径(Hofmeyer,K.等(2008)“The Contrasting Role Of B7-H3,”*Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.)*105(30):10277-10278)。

[0012] 阻断B7分子结合T细胞受体(例如,CD28)的能力的分子抑制免疫系统,并且已经被建议作为自身免疫性疾病的疗法(Linsley,P.S.等(2009)“The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Co-Stimulation,”*Immunolog.Rev.*229:307-321)。用抗4Ig-B7-H3抗体治疗的表达4Ig-B7-H3的成神经细胞瘤细胞对NK细胞更敏感。但是,不清楚该活性是否可仅仅归因于针对4Ig-B7-H3形式的抗体,因为所有报道的针对4Ig-B7-H3而产生的抗体也结合两个Ig样形式的B7-H3(Steinberger,P.等(2004)“Molecular Characterization of Human 4Ig-B7-H3,a Member of the B7Family with Four Ig-Like Domains,”*J.Immunol.*172(4):2352-2359;和Castriconi等(2004)“Identification Of 4Ig-B7-H3 As A Neuroblastoma-Associated Molecule That Exerts A Protective Role From An NK Cell-Mediated Lysis,”*Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.)*101(34):12640-12645)。

[0013] B7-H3不在静息B或T细胞、单核细胞或树突细胞上表达,但是其在树突细胞上通过IFN- γ 被诱导和在单核细胞上通过GM-CSF被诱导(Sharpe,A.H.等(2002)“The B7-CD28Superfamily,”*Nature Rev.Immunol.*2:116-126)。还未充分表征结合B7-H3的受体(一种或多种)。早期的工作提示,一种这样的受体需要在激活之后在T细胞上被快速和瞬时上调(Loke,P.等(2004)“Emerging Mechanisms Of Immune Regulation:The Extended B7Family And Regulatory T Cells.”*Arthritis Res.Ther.*6:208-214)。最近,在髓样细胞上表达的TREM样转录体2(TLT-2或TREML2)受体(King,R.G.等(2006)“Trem-Like Transcript 2Is Expressed On Cells Of The Myeloid/Granuloid And B Lymphoid Lineage And Is Up-Regulated In Response To Inflammation,”*J.Immunol.*176:6012-6021;Klesney-Tait,J.等(2006)“The TREM Receptor Family And Signal Integration,”*Nat.Immunol.*7:1266-1273;Yi.K.H.等(2009)“Fine Tuning The Immune Response Through B7-H3 And B7-H4,”*Immunol.Rev.*229:145-151)已经被证明能够结合B7-H3,从而尤其能够共刺激CD8+T细胞的激活已经显示能够结合B7-H3,并且从而共刺激尤其CD8+T细胞的激活(Zang,X.等(2003)“B7x:A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation,”*Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.)*100:10388-10392;Hashiguchi,M.等(2008)“Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cell-Like Transcript 2(TLT-2)Is A Counter-Receptor For B7-H3 And Enhances T Cell Responses,”*Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.)*105(30):10495-10500;Hofmeyer,K.等(2008)“The Contrasting Role Of B7-H3,”*Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.)*105(30):10277-10278)。

[0014] 除了其在成神经细胞瘤细胞上的表达,也已知人B7-H3在各种其他癌症细胞(例

如,胃癌、卵巢癌和非小细胞肺癌)上表达。在肿瘤细胞系中已经免疫组织学检测到B7-H3蛋白质表达(Chapoval,A.等(2001)“B7-H3:A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN- γ Production,”*Nature Immunol.*2:269-274;Saatian,B.等(2004)“Expression Of Genes For B7-H3And Other T Cell Ligands By Nasal Epithelial Cells During Differentiation And Activation,”*Amer.J.Physiol.Lung Cell.Mol.Physiol.*287:L217-L225;Castriconi等(2004)“Identification Of 4Ig-B7-H3 As A Neuroblastoma-Associated Molecule That Exerts A Protective Role From An NK Cell-Mediated Lysis,”*Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.)* 101 (34):12640-12645);Sun,M.等(2002)“Characterization of Mouse and Human B7-H3 Genes,”*J.Immunol.*168:6294-6297)。已经在心脏、肾、睾丸、肺、肝、胰腺、前列腺、结肠和成骨细胞细胞中发现B7-H3的mRNA表达(Collins,M.等(2005)“The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands,”*Genome Biol.*6:223.1-223.7)。在蛋白质水平,在人的肝、肺、膀胱、睾丸、前列腺、乳腺、胎盘和淋巴器官中发现B7-H3(Hofmeyer,K.等(2008)“The Contrasting Role Of B7-H3,”*Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.)* 105 (30):10277-10278)。

[0015] II.CD3

[0016] CD3是由四条不同的链组成的T细胞共受体(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;1-14页;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)。

[0017] 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)的分子缔合,以便在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不能适当组装并且降解(Thomas,S.等(2010)“Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T cell Receptor Gene Transfer,”*Immunology* 129 (2):170-177)。发现CD3结合所有成熟的T细胞的膜,并且几乎不与其他细胞类型结合(见,Janeway,C.A.等(2005)在以下中:Immunobiology:The Immune System In Health And Disease,”第六版,Garland Science Publishing,NY,pp.214-216;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)。

[0018] T细胞上T细胞受体(TCR)复合物的恒定的CD3 ϵ 信号传导组分已经被用作靶,以促使在T细胞和肿瘤细胞之间形成免疫学突触。CD3和肿瘤抗原的共接合(co-engagement)激活了T细胞,引起表达肿瘤抗原的肿瘤细胞的裂解(Baeuerle等(2011)“Bispecific T Cell Engager For Cancer Therapy,”In:Bispecific Antibodies,Kontermann,R.E.(Ed.) Springer-Verlag;2011:273-287)。该方法允许双特异性抗体以对肿瘤细胞的高特异性与T

细胞小室 (compartment) 全面相互作用并且广泛适用于大量的细胞表面肿瘤抗原。

[0019] III. 抗体和其他结合分子

[0020] 抗体是免疫球蛋白分子,通过位于免疫球蛋白分子的可变区中的至少一个表位结合位点,其能够特异性结合分子,比如碳水化合物、多核苷酸、脂质,多肽等(“抗原”)的靶区域(“表位”)。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、包括具有必要的特异性的表位结合位点的抗体部分的融合蛋白、人源化抗体和嵌合抗体,以及包括具有必要特异性的表位结合位点的免疫球蛋白分子的任何其他修饰的结构。

[0021] 完整的未修饰抗体(例如,IgG抗体)结合抗原的表位的能力取决于免疫球蛋白“轻”和“重”多肽链上可变结构域的存在(即,分别为VL和VH结构域,统称为“可变区”)。每个VH和VL均包括三个互补决定区(CDR)结构域和四个FR结构域,其以下述顺序从氨基-末端至羧基-末端被布置:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。CDR的氨基酸序列决定了抗体是否能够结合特定的表位。抗体轻链与抗体重链的相互作用,尤其地,各存在于不同的多肽上的它们的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抗体的VL和VH结构域,其中结构域被足够长度的柔性连接体分开,以允许两个结构域自组装成功能性表位结合位点。在由于连接体不够长(例如,小于约12个氨基酸残基的连接体)而致使VL和VH结构域的自组装不可能的情况下,两个scFv分子可彼此相互作用而形成二价“双抗体”分子,其中一个分子的VL与另一分子的VH缔合(见Marvin等的评论(2005)“Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies,”Acta Pharmacol.Sin.26:649-658)。

[0022] 天然抗体能够仅仅结合一个表位种类(即,单特异性的),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W0 2008/003116、W0 2009/132876、W02008/003103、W0 2007/146968、W0 2009/018386、W0 2012/009544、W02013/070565),其大部分使用连接体肽,以将另外的结合结构域(例如scFv、VL、VH等)与抗体核心(IgA、IgD、IgE、IgG或IgM)融合或在抗体核心内融合,或将多个抗体结合部分彼此融合(例如两个Fab片段或scFv)。可选的形式使用连接体肽,以将结合蛋白质(例如,scFv、VL、VH等)与二聚化结构域比如CH2-CH3结构域或可选的多肽融合(W0 2005/070966、W02006/107786AW0 2006/107617A、W0 2007/046893)。典型地,这类方法涉及折中和权衡。例如,PCT公开号W0 2013/174873、W0 2011/133886和W0 2010/136172公开了使用连接体可造成治疗情形中的问题,并且教导了三特异性抗体,其中CL和CH1结构域从他们各自的天然位置被转换并且VL和VH结构域已经被多样化(W0 2008/027236、W0 2010/108127),以允许它们结合大于一种抗原。因此,这些文献中公开的分子用结合特异性换取了结合另外的抗原种类的能力。PCT公开号W0 2013/163427和W02013/119903公开了修饰CH2结构域,以包含融合蛋白加合物,其包括结合结构域。文献记载了CH2结构域在介导效应功能中可能仅仅起到最小的作用。PCT公开号W0 2010/028797、W02010028796和W0 2010/028795公开了重组抗体,其Fc区域已经用另外的VL和VH结构域取代,以便形成三价结合分子。PCT公开号W0 2003/025018和W02003012069公开了重组双抗体,其单独的链包含scFv结构域。PCT公开号W0 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,以产生异源二聚化结构。因此,在这些文献中公开的分子用所有或部分介导效应功

能的能力换取结合另外的抗原种类的能力。PCT公开号WO 2014/022540、WO2013/003652、WO 2012/162583、WO 2012/156430、WO 2011/086091、WO2008/024188、WO 2007/024715、WO 2007/075270、WO 1998/002463、WO1992/022583和WO 1991/003493公开了添加另外的结合结构域或官能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使多个Fab结构域彼此连接)。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。

[0023] 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,”*Abstract 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)。

[0024] 尤其地,已经描述了稳定、共价结合的异源二聚化非单特异性双抗体(见,例如, Chichili, G. R.等(2015)“A CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To Myelogenous Leukemia: Preclinical Activity And Safety In Nonhuman Primates,”*Sci. Transl. Med.* 7 (289):289ra82; 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. Molec. Biol.* 399 (3):436-449; 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; 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; 美国专利号8,044,180、8,133,982、8,187,593、8,193,318、8,530,627、8,669,349、8,778,339、8,784,808、8,795,667、8,802,091、8,802,093、8,946,387、8,968,730和8,993,730; 美国专利公开号2009/0060910、2010/0174053、2011/0081347、2011/0097323、2011/0117089、2012/0009186、2012/0034221、2012/0141476、2012/0294796、2013/0149236、2013/0295121、

2014/0017237和2014/0099318;欧洲专利文献号EP 1868650、EP 2158221、EP 2247304、EP2252631、EP 2282770、EP 2328934、EP 2376109、EP 2542256、EP2601216、EP 2714079、EP 2714733、EP 2786762、EP 2839842、EP2840091;和PCT公开号WO 2006/113665、WO 2008/157379、WO2010/027797、WO 2010/033279、WO 2010/080538、WO 2011/109400、WO2012/018687、WO 2012/162067、WO 2012/162068、WO 2014/159940、WO2015/021089、WO 2015/026892和WO 2015/026894)。

[0025] 尽管这样的成功,但是通过仔细考虑和放置在多肽链中使用的结构域,可进一步改进针对治疗性用途而优化的稳定的、功能性异源二聚化的、非单特异性双抗体的产生。因此,本发明涉及提供特异性多肽,所述特异性多肽尤其被设计来经共价结合形成稳定和治理有用的、能够同时结合B7-H3和CD3异源二聚化双抗体和异源二聚化Fc双抗体。

发明内容

[0026] 本发明涉及双特异性单价双抗体,其具有对B7-H3的表位特异性的一个结合位点和对CD3的表位特异性针一个结合位点(即,“B7-H3x CD3双特异性单价双抗体”)。最优选地,这类B7-H3x CD3双特异性单价双抗体包括三条多肽链,并且具有对B7-H3的表位特异性的一个结合位点和对CD3的表位特异性的一个结合位点,并且另外包括免疫球蛋白Fc结构域(即,“B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体”)。本发明的双特异性单价Fc双抗体能够同时结合B7-H3和CD3。本发明涉及包含这类双特异性单价Fc双抗体的药物组合物。本发明另外涉及这类双抗体在治疗癌症和其他疾病和病况中的用的方法。

[0027] 本发明尤其涉及B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体。本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体包括以异源二聚化方式彼此缔合的多肽链,以形成对B7-H3的表位特异性的一个结合位点和对CD3的表位特异性的一个结合位点。本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体因此是单价的,在于它们能够结合仅仅B7-H3的表位的一个拷贝和仅仅结合CD3的表位的一个拷贝,但是是双特异性的,在于单个双抗体能够同时结合B7-H3的表位和结合CD3的表位。

[0028] 本发明优选的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体包括三条多肽链(“第一”、“第二”和“第三”多肽链),其中第一和第二多肽链彼此共价结合并且第一和第三多肽链彼此共价结合。

[0029] 详细地,本发明提供了B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体,其中双特异性单价Fc双抗体能够特异性结合B7-H3的表位和结合CD3的表位,并且具有IgG Fc结构域,其中双特异性单价Fc双抗体包括第一多肽链、第二多肽链和第三多肽链,其中第一和第二多肽链彼此共价结合并且第一和第三多肽链彼此共价结合,以及其中:

[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,其包括:

[0032] (1) 亚结构域(IA1),其包括能够结合B7-H3的VL结构域(VL_{B7-H3})或能够结合CD3的VL结构域(VL_{CD3})和

[0033] (2) 亚结构域(IA2),其包括能够结合B7-H3的VH结构域(VH_{B7-H3})或能够结合CD3的VH结构域(VH_{CD3})

[0034] 其中亚结构域IA1和IA2通过具有12个或更少的氨基酸残基的多肽连接体彼此分

开,并且被协同选择,以便:

[0035] (a) 亚结构域IA1包括能够结合B7-H3的VL结构域(VL_{B7-H3})并且选择亚结构域IA2,以包括能够结合CD3的VH结构域(VH_{CD3});或

[0036] (b) 亚结构域IA1包括能够结合CD3的VL结构域(VL_{CD3})并且选择亚结构域IA2,以包括能够结合B7-H3的VH结构域(VH_{B7-H3});和

[0037] B. 任选存在的结构域IB,其包括与异源二聚体促进结构域连接的多肽连接体;

[0038] C. 结构域IC,其包括与抗体的CH2-CH3结构域连接的多肽连接体;

[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,其包括:

[0041] (1) 亚结构域(IIA1),其包括能够结合B7-H3的VL结构域(VL_{B7-H3})或能够结合CD3的VL结构域(VL_{CD3})和

[0042] (2) 亚结构域(IIA2),其包括能够结合B7-H3的VH结构域(VH_{B7-H3})或能够结合CD3的VH结构域(VH_{CD3})

[0043] 其中亚结构域IIA1和IIA2通过具有12个或更少的氨基酸残基的多肽连接体彼此分开,并且被协同选择,以便:

[0044] (a) 当亚结构域IA1包括能够结合B7-H3的VL结构域(VL_{B7-H3})时,选择亚结构域IIA1,以包括能够结合CD3的VL结构域(VL_{CD3})并且选择亚结构域IIA2,以包括能够结合B7-H3的VH结构域能(VH_{B7-H3});和

[0045] (b) 当亚结构域IA1包括能够结合CD3的VL结构域(VL_{CD3})时,选择亚结构域IIA1,以包括能够结合B7-H3的VL结构域(VL_{B7-H3})和选择亚结构域IIA2,以包括能够结合CD3的VH结构域(VH_{CD3});

[0046] B. 任选存在的结构域IIB,其包括与异源二聚体促进结构域连接的多肽连接体;

[0047] III. 第三多肽链在N-末端至C-末端方向上包括结构域IIIC,其包括与抗体的CH2-CH3结构域连接的多肽连接体;

[0048] 其中:

[0049] (A) (1) 存在任选存在的结构域IB和任选存在的结构域IIB中的至少一个,并且其中存在的结构域IB或IIB具有正或负电荷;或

[0050] (2) 存在任选存在的结构域IB和任选存在的结构域IIB两者,其中:

[0051] (i) 结构域IB和结构域IIB之一具有带正电荷的异源二聚体促进结构域,并且结构域IB和结构域IIB的另一个具有带负电荷的异源二聚体促进结构域;或

[0052] (ii) 结构域IB和结构域IIB之一具有包括氨基酸序列GVEPKSC(SEQ ID NO:6)或VEPKSC(SEQ ID NO:7)的异源二聚体促进结构域,并且结构域IB和结构域IIB的另一个具有包括氨基酸序列GFNRGEC(SEQ ID NO:8)或FNRGEC(SEQ ID NO:9)的异源二聚体促进结构域;

[0053] (B) VL_{B7-H3}和VH_{B7-H3}相互作用形成能够结合B7-H3的表位的表位结合结构域,和VL_{CD3}和VH_{CD3}形成能够结合CD3的表位的表位结合结构域;和

[0054] (C) 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。

[0055] 本发明进一步涉及这类B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体的实施方式,所述双抗体能够与人和灵长类B7-H3和CD3交叉反应。

[0056] 本发明尤其涉及这类B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体的实施方式,其中:

[0057] (A) 第一多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:53,第二多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:55,和第三多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:57;或

[0058] (B) 第一多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:59,第二多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:60和第三多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:57;或

[0059] (C) 第一多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:61,第二多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:62,和第三多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:57

[0060] (D) 第一多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:63,第二多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:64,和第三多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:57。

[0061] 本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体优选地在采用选自以下的靶人类肿瘤细胞系的试验中能够使用人T细胞介导对靶肿瘤细胞的重定向杀伤:A498(肾癌),JIMT-1/Luc(乳腺癌),A375(黑素瘤)、22Rv1(前列腺癌),Detroit562(鼻咽癌),DU145(前列腺癌);BxPC3(胰腺癌),SKMES-1(肺癌),和U87(恶性胶质瘤),并且使用纯化的人原代T细胞作为效应细胞,效应细胞与T细胞之比是1:1、5:1或10:1。在这样的试验中,使用乳酸脱氢酶(LDH)释放试验或通过荧光素酶试验测量靶肿瘤细胞杀伤,在乳酸脱氢酶(LDH)释放试验中定量测量细胞死亡后从细胞释放的LDH的酶活性,在荧光素酶试验中,荧光素酶相对光单位(RLU)是指示靶细胞的相对生活力的读数,所述靶细胞已经被工程化成表达绿色荧光蛋白(GFP)和荧光素酶报告基因。观察到的这种重定向杀伤的EC₅₀是约1.5μg/mL或更少、约1.0μg/mL或更少、约500ng/mL或更少、约300ng/mL或更少、约200ng/mL或更少、约100ng/mL或更少、约50ng/mL或更少。

[0062] 本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体优选地能够在共混异种移植(co-mix xenograft)中介导对人肿瘤生长的抑制,其中在所述共混异种移植中,这类分子连同比例为5:1的22Rv1(人前列腺癌)或A498(人肾癌)肿瘤细胞和激活的人T细胞一起被引入到NOD/SCID小鼠中。另外,或可选地,本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体在雌性NSG B2m^{-/-}小鼠的异种移植模型中能够介导对人肿瘤生长的抑制和/或展示抗肿瘤活性,所述雌性NSG B2m^{-/-}小鼠:

[0063] (A) 在第-1天通过腹腔内(IP)注射植入人PBMC(1×10^7)并且在第0天经皮内(ID)植入Detroit(人鼻咽癌肿瘤细胞(5×10^6)),并且在第20、22、23、26、28、30、33、35和37天施用双抗体;或

[0064] (B) 在第0天经皮内(ID)植入A498(人肾癌肿瘤细胞(5×10^6)),并且通过腹腔内(IP)注射在第13天植入人PBMC(1×10^7)以及在第33、35、36、39、41、43、46、48和50天施用双抗体。

[0065] 优选地,本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体在以如下浓度被提供时能够在这类异种移植模型中抑制肿瘤生长:浓度大于约1.0mg/kg、浓度为约1mg/kg、浓度为约0.5mg/kg、浓度为约0.25mg/kg、浓度为约0.1mg/kg、浓度为约0.05mg/kg、浓度为约0.02mg/kg、浓度为约0.01mg/kg,或浓度为约0.005mg/kg,或浓度小于0.005mg/kg。

[0066] 本发明另外提供任何上述B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体作为药物的用途。

[0067] 本发明另外提供任何上述B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体在治疗与B7-H3的表达相关或特征在于B7-H3的表达的疾病或病况中的用途,或在治疗特征在于表达B7-H3的疾

病或病况的方法中的用途,尤其地,其中与B7-H3的表达相关或特征在于B7-H3的表达的疾病或病况是癌症,更具体地,其中所述癌症选自:急性髓细胞样白血病、肾上腺肿瘤、AIDS相关的癌症、软组织腺泡状肉瘤、星形细胞瘤、膀胱癌、骨癌、脑和脊髓癌症、转移性脑瘤、乳腺癌、颈动脉体瘤、宫颈癌、软骨肉瘤、脊索瘤、嫌色细胞肾细胞癌、透明细胞癌、结肠癌、结直肠癌、皮肤良性纤维组织细胞瘤、促结缔组织增生小圆细胞瘤、室管膜细胞瘤、尤文氏瘤、骨外粘液样软骨肉瘤、不完全性骨纤维生成、骨的纤维发育异常、胆囊癌或胆管癌、胃癌、妊娠滋养层疾病、生殖细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌、恶性胶质瘤、胰岛细胞肿瘤、卡波西氏肉瘤、肾癌、白血病、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/恶性的脂肪瘤、肝癌、淋巴瘤、肺癌、成神经管细胞瘤、黑素瘤、脑膜瘤、恶性间皮瘤、多发性内分泌瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、成神经细胞瘤、神经内分泌肿瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、胰腺癌、鼻咽癌、甲状腺乳头状癌、甲状旁腺瘤、儿科癌症、周围神经鞘瘤、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、前列腺癌、眼色素层后黑素瘤、罕见血液学疾病、肾细胞癌、肾转移性癌症、横纹肌样瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌症、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移性癌症和子宫癌。

[0068] 附图简述

[0069] 图1图解了包括两条多肽链的共价缔合的双特异性单价双抗体的结构,其不包括Fc区域。多肽链经在半胱氨酸(“C”)残基之间形成的二硫键彼此共价缔合。

[0070] 图2A和2B阐释了本发明的三链双特异性单价Fc双抗体的第一、第二和第三多肽链的两种形式的结构(形式1,图2A;形式2,图2B)。多肽链经在半胱氨酸(“C”)残基之间形成的二硫键彼此共价缔合。

[0071] 图3A-3J显示了A498(肾癌)(图3A)、JIMT-1/Luc(乳腺癌)(图3B)、A375(黑素瘤)(图3C)、22Rv1(前列腺癌)(图1D)、Detroit562(鼻咽癌)(图1E)、DU145(前列腺癌)(图3F)、BxPC-3(胰腺癌)(图3G)、SKMES-1(肺癌)(图3H)、U87(恶性胶质瘤)(图3I)和Raji(B-淋巴瘤)(图3J)细胞系的FACS柱状图。虚线表示用同种型对照PE标记的抗体染色的细胞和实线表示用抗B7-H3-PE抗体染色的细胞。

[0072] 图4A-4E显示在表达B7-H3的靶癌症细胞系(图4A-4D)或人原代T细胞(图4E)上的抗EK-螺旋抗体荧光的FACS柱状图。将浓度为10 μ g/mL的DART-A添加至表达B7-H3的癌症细胞系(A498(图4A)、JIMT-1/Luc(图4B)、Detroit562(图4C)或22Rv1(图4D))或人原代T细胞(图4E),并且孵育30分钟。在进一步用与APC-链霉抗生物素混合的缀合生物素的抗EK-螺旋抗体孵育之后,通过FACS分析细胞的DART-A细胞表面结合。实线表示细胞上的DART-A结合曲线。来自缀合生物素的抗EK-螺旋抗体的细胞上的非特异性染色通过虚线显示。

[0073] 图5A-5L显示对于表达B7-H3的细胞系(A498(图5A)、JIMT-1/Luc(图5B-5C)、A375(图5D)、U87(图5E)、DU145(图5F)、BxPC-3(图5G)、SKMES-1(图5H)、Detroit562(图5I)和22Rv1(图5J))和B7-H3阴性细胞系(CHO(图5K)和Raji(图5L)),DART-A-介导的细胞毒性的剂量响应曲线。以5:1的效应细胞:靶细胞(E:T)比,将DART-A或对照DART与不同的肿瘤细胞系和原代人T细胞体外一起孵育约24小时。使用LDH释放试验评估所有细胞系的细胞毒性百分数(图5A-5B和5D-5L)。另外,使用LUM试验测量对于JIMT-1/Luc细胞系的细胞毒性(图5C)。显示了来自使用来自多个供体的T细胞的多个实验的代表性数据。DART-A:●;对照DART:■。

[0074] 图6A-6F显示了以10:1(图6A和6B)、5:1(图6C和6D)和1:1(图6E和6F)的E:T比,DART-A-介导对A498细胞(图6A,6C和6E)和A375细胞(图6B,6D和6F)的重定向杀伤。通过LDH试验测定细胞毒性。DART-A:●;对照DART:■。

[0075] 图7A-7E显示了DART-A-介导的重定向靶细胞杀伤的剂量响应曲线(图7A)和在用纯化的T细胞作为效应细胞和A498作为靶细胞以10:1的E:T细胞比孵育24小时之后,在CD4⁺(图7B和7D)和CD8⁺(图7C和7E) T细胞上的T细胞激活标记物CD25(图7B和7C)和CD69(图7D和7E)的诱导。DART-A:●;对照DART:■。T细胞+A498细胞:▼;仅T细胞▲。

[0076] 图8A-8B显示了在存在B7-H3阳性靶细胞的情况下DART-A-介导的T细胞增殖。在CFSE标记的人原代T细胞与A498靶细胞以10:1的E:T比在存在10 μ g/mL的DART-A(粗线)或对照DART(填充的细线)的情况下共培养72小时(图8A)或96小时(图8B)之后,通过FACS分析评估人原代T细胞的增殖。

[0077] 图9A-9D显示了在用作效应细胞的纯化的人原代T细胞和表达B7-H3的CHO靶细胞以5:1的E:T细胞比孵育24小时之后,DART-A有效结合人(图9A)和食蟹猴(图9B)的表达B7-H3的CHO细胞并介导对人(图9C)和食蟹猴(图9D)的表达B7-H3的CHO细胞的重定向杀伤。使用LDH试验测量细胞毒性。DART-A:●;对照DART:■。

[0078] 图10A-10B显示了DART-A能够结合食蟹猴和人原代T细胞。将10 μ g/mL的DART-A添加至食蟹猴(图10A)或人(图10B) PBMC并且将细胞在4 $^{\circ}$ C孵育30分钟,随后用与APC-链霉抗生物素混合的缀合生物素的抗EK-螺旋抗体进行第二次孵育。通过FACS分析细胞在设门的总体组合的CD4⁺和CD8⁺细胞上的DART-A T细胞表面结合(粗线)。由细线/具有阴影的细线显示在来自缀合生物素的抗EK-螺旋二抗的细胞上的非特异性染色。

[0079] 图11A-11C显示,以30:1的E:T比使用食蟹猴PBMC,B7-H3阳性靶细胞系JIMT-1/Luc(图11A和11B)和A498(图11C)的DART-A-介导的重定向杀伤。使用LUM试验(图11A)或LDH试验(图11B和11C)测量细胞毒性。DART-A:●;对照DART:■。

[0080] 图12显示了在植入22Rv1肿瘤细胞的小鼠中在存在激活的人T细胞的情况下DART-A对肿瘤生长的抑制。雌性NOD/SCID小鼠(n=8/组)在第0天被SC植入与激活的人T细胞(1x 10⁶)共混合的22Rv1肿瘤细胞(5x 10⁶),随后在第0、1、2和3天用媒介对照(●)、对照DART(○)或DART-A以0.5mg/kg(■),0.1mg/kg(▲),0.02mg/kg(▼)或0.004mg/kg(◆)治疗总共4个IV施用的剂量。肿瘤体积显示为组平均数 $\pm$ SEM。

[0081] 图13显示了在植入A498肿瘤细胞的小鼠中在存在激活的人T细胞的情况下DART-A对肿瘤生长的抑制。雌性NOD/SCID小鼠(n=8/组)在第0天被SC植入与激活的人T细胞(1x 10⁶)共混合的A498肿瘤细胞(5x 10⁶),随后在第0、1、2和3天用媒介对照(●)、0.5mg/kg的对照DART(○)或0.5mg/kg(■)、0.1mg/kg(▲)、0.02mg/kg(▼)或0.004mg/kg(◆)的DART-A治疗总共IV施用的4个剂量。肿瘤体积显示为组平均数 $\pm$ SEM。

[0082] 图14显示了DART-A在植入A498肿瘤细胞并且用人效应细胞重构的NSG B2m^{-/-}小鼠中的抗肿瘤活性。雌性NSG B2m^{-/-}小鼠(n=7/组)在第0天被ID植入A498肿瘤细胞(5x 10⁶细胞),随后在第13天被IP植入人PBMC(1x 10⁷)。然后,用媒介对照(●)、0.5mg/kg的对照DART(○)或1mg/kg(■)、0.1mg/kg(▲)、0.01mg/kg(▼)或0.001mg/kg(◆)的DART-A在第33、35、36、39、41、43、46、48和50天治疗组。肿瘤体积显示为组平均数 $\pm$ SEM。

[0083] 图15显示了DART-A在植入Detroit562肿瘤细胞并且用人效应细胞重构的NSG

B2m^{-/-}小鼠中的抗肿瘤活性。雌性NSG B2m^{-/-}小鼠 (n=8/组) 在第0天被ID植入Detroit562肿瘤细胞 (5x 10⁶细胞), 而在第-1天被IP植入人PBMC (1x 10⁷)。随后, 用媒介对照 (●)、0.5mg/kg的对照DART (○) 或1mg/kg (■)、0.5mg/kg (▲)、0.25mg/kg (▼) 或0.1mg/kg (◆) 的DART-A在第20、22、23、26、28、30、33、35和37天治疗组, 达IV施用的总共9个剂量。肿瘤体积显示为组平均数±SEM。

[0084] 图16A-16B显示了DART-A在植入Detroit562肿瘤细胞并且用人效应细胞重构的NSG MHC11^{-/-}小鼠中的抗肿瘤活性。在第0天, MHC11^{-/-}小鼠 (n=7/媒介对照; 7/组I; 和5/组II) 被ID植入Detroit562肿瘤细胞 (5x 10⁶细胞) 并且被IP植入人PBMC (1x 10⁷细胞)。随后, 用媒介对照 (●) 或0.5mg/kg (▲) 的DART-A治疗组。组I (图16A) 接受在第15、22、29、36和43天IV施用的5个剂量。组II (图16B) 接受在第15、29和43天IV施用的3个剂量。肿瘤体积显示为组平均数±SEM。

[0085] 图17显示了DART-A和DART-B在食蟹猴中的药物代谢动力学曲线。食蟹猴组 (n=2/组; 1M/1F) 被施用0.5mg/kg的一个剂量, 然后, 被施用三个每周1.0mg/kg剂量的DART-A或DART-B, 总共IV施用的四个剂量。将研究期间四个测试动物中的每一个的DART-A (实线) 和DART-B (虚线) 的血清浓度绘图。

[0086] 发明详述

[0087] 本发明涉及双特异性单价双抗体, 其具有对B7-H3的表位特异性的一个结合位点和对CD3的表位特异性的一个结合位点 (即, “B7-H3x CD3双特异性单价双抗体”)。最优选地, 这类B7-H3x CD3双特异性单价双抗体包括三条多肽链并且具有对B7-H3的表位特异性的一个结合位点和对CD3的表位特异性的一个结合位点并且另外包括免疫球蛋白Fc结构域 (即, “B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体”)。本发明的双特异性单价Fc双抗体能够同时结合B7-H3和CD3。本发明涉及包含这类双特异性单价Fc双抗体的药物组合物。本发明另外涉及这类双抗体在治疗癌症和其他疾病和病况中的应用的方法。

[0088] I. 抗体和其他结合分子

[0089] A. 抗体

[0090] 如本文所使用, 术语“抗体”包括具有能够免疫特异性结合表位 (“表位结合位点”) 的免疫球蛋白可变结构域的任何分子。因此, 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、包括这类表位结合位点的融合蛋白、人源化抗体和嵌合抗体, 和能够免疫特异性结合表位的免疫球蛋白分子的任何其他修饰的结构。遍及本申请, 抗体的轻链和重链的恒定区的氨基酸残基的编号是根据如Kabat等 (1992) Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health Publication No. 91-3242中的EU索引。如本文所使用, “抗体的表位结合片段”旨在表示抗体的能够免疫特异性结合表位的部分。如本文所使用, 这样的术语包括片段 (比如Fab、Fab'、F(ab')₂Fv) 和单链 (scFv), 以及双抗体的表位结合结构域。

[0091] 术语“单克隆抗体”指能够免疫特异性结合表位的均质 (homogenous) 抗体群。就抗体的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、在转基因动物中产生等) 而言, 术语“单克隆抗体”不旨在是限制性的。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. 等的方法或其改良: Kohler, G. 等 (1975) “Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity,” Nature

256:495-497。典型地,在小鼠、大鼠或兔子中产生单克隆抗体。通过用免疫原性量的细胞、细胞提取物或包含期望的表位的蛋白质制品免疫动物来产生抗体。免疫原可以是但不限于原代细胞、培养的细胞系、癌细胞、蛋白质、肽、核酸或组织。用于免疫的细胞可被培养一段时间(例如,至少24小时),然后将它们用作免疫原。细胞它们本身或联合非变性佐剂,比如Ribi可用作免疫原。一般而言,在用作免疫原时,细胞应保持完整并且优选地有活性。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、人源化抗体或犬源化(caninized)抗体,以改善抗体的亲和力或其他特征。人源化抗体的一般原理涉及保留抗体的表位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。人源化单克隆抗体有四个一般步骤。这些是:(1) 确定起始抗体的轻链和重链可变结构域的核苷酸和/或预测的氨基酸序列;(2) 设计人源化抗体或犬源化抗体,即,决定在人源化或犬源化期间使用哪个抗体框架区域(一种或多种);(3) 应用实际的人源化或犬源化方法/技术;和(4) 人源化或犬源化抗体的转染和表达(见,例如,美国专利号4,816,567、5,807,715、5,866,692和6,331,415)。

[0092] 如本文所使用,如果相对于可选的表位,抗体或其表位结合片段更经常、更快速,以更长的持久性和/或更大的亲和力或亲合力与另一分子的区域(即,表位)反应或缔合,则认为抗体或其表位结合片段“免疫特异性”结合该表位。通过该定义也理解,例如,免疫特异性结合第一靶的抗体或其表位结合片段可能特异性或优先结合第二靶或可能不特异性或优先结合第二靶。

[0093] B. 双特异性抗体、多特异性双抗体和**DART®**双抗体

[0094] 非单特异性“双抗体”的供应提供了相对于抗体的显著优势:共连接(co-ligate)和共定位表达不同的表位的细胞的能力。因此,双特异性双抗体具有广泛的应用范围,包括治疗和免疫诊断。在各种应用中,双特异性在设计 and 工程化双抗体方面允许大的灵活性,提供对多聚抗原的增强的亲合力、不同抗原的交联和对特定细胞类型的导向靶向,这取决于两个靶抗原的存在。由于它们的二价、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)。尤其重要的是不同细胞的共连接,例如,细胞毒素T细胞与肿瘤细胞的交联(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),从而将T细胞共定位至肿瘤细胞的位点。

[0095] 替代将这类双抗体靶向以结合至T细胞,可以将双抗体表位结合结构域引导至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 xAnti-CEA Bispecific Fusion Proteins,”Cancer Res.59:2909-2916;WO2006/113665、WO 2008/157379、WO 2010/080538、WO 2012/018687、WO2012/162068)。通常,通过使结合抗原的抗体经Fc结构域-Fc γ R相互作用而与效应细胞结合,引发效应细胞激活;因此,在这方面,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,如本领域已知的或本文示例的任何效应功能试验(例如,ADCC试验)所验证的)。通过交联肿瘤和效应细胞,双抗体不仅仅使效应细胞接近肿瘤细胞,而且导致有效的肿瘤杀伤(见例如,Cao等(2003)“Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics,”Adv.Drug.Deliv.Rev.55:171-197)。

[0096] 但是,上述优势是以高成本为代价的。形成此类非单特异性双抗体需要成功装配两个或更多个独特且不同的多肽(即,这种形成需要通过不同多肽链种类的异源二聚化形成双抗体)。该事实与通过相同多肽链的同源二聚化形成的单特异性双抗体形成对比。因为必须提供至少两条不同的多肽(即,两个多肽种类)以便形成非单特异性双抗体,和因为这种多肽的同源二聚化导致失活的分子(Takemura,S.等(2000)“Construction Of A双抗体(Small Recombinant Bispecific Antibody)Using A Refolding System,”Protein Eng.13(8):583-588),所以这种多肽的产生必须以解决相同种类的多肽之间共价结合的方式完成(即,从而使它们的同源二聚化最小化)(Takemura,S.等(2000)“Construction Of A Diabody(Small Recombinant Bispecific Antibody)Using A Refolding System,”Protein Eng.13(8):583-588)。因此,本领域教导了这类多肽的非共价缔合(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,”Abstract 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)。

[0097] 但是,本领域已经认识到,包括非共价结合的多肽的双特异性双抗体不稳定并且容易解离成非功能单多肽链单体(见,例如,Lu,D.等(2005)“AFully 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)。

[0098] 然而,在面对该挑战时,本领域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**DART®**(双-亲和力重定向试剂(Dual-Affinity Re-Targeting Reagents))双抗体,见,例如,Chichili,G.R.等(2015)“A CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To Myelogenous Leukemia:Preclinical Activity And Safety In Nonhuman Primates,”Sci.Transl.Med.7(289):289ra82;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.Molec.Biol.399(3):436-449;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;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;美国专利号8,044,180、8,133,982、8,187,593、8,193,318、8,530,627、8,669,349、8,778,339、8,784,808、8,795,667、8,802,091、8,802,093、8,946,387、8,968,730和8,993,730;美国专利公开号2009/0060910、2010/0174053、2011/0081347、2011/0097323、2011/0117089、2012/0009186、2012/0034221、2012/0141476、2012/0294796、2013/0149236、2013/0295121、2014/0017237和2014/0099318;欧洲专利文献号EP 1868650、EP 2158221、EP 2247304、EP 2252631、EP 2282770、EP 2328934、EP 2376109、EP 2542256、EP 2601216、EP 2714079、EP 2714733、EP 2786762、EP 2839842、EP 2840091;和PCT公开号WO 2006/113665、WO 2008/157379、WO2010/027797、WO 2010/033279、WO 2010/080538、WO 2011/109400、WO2012/018687、WO 2012/162067、WO 2012/162068、WO 2014/159940、WO2015/021089、WO 2015/026892;和WO 2015/026894)。这类双抗体包括两条或更多条共价复合的多肽并且涉及将一个或多个半胱氨酸残基工程化至采用的多肽种类的每一个中。例如,将半胱氨酸残基添加至这类构建体的C-末端已经被证明允许多肽链之间的二硫键结合,使所得异源二聚体稳定,而不干扰二价分子的结合特征。

[0099] 最简单的**DART®**双抗体包括两条多肽链,其每个包括三个结构域(图1)。第一多肽链包括(i)包括第一免疫球蛋白的轻链可变结构域的结合区域的结构域(VL1), (ii)包括第二免疫球蛋白的重链可变结构域的结合区域的第二结构域(VH2),和(iii)第三结构域,其用于促进与第二多肽链的异源二聚化(“异源二聚体促进结构域”)并且共价结合双抗体的第一多肽与第二多肽链。第二多肽链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(“异源二聚体促进结构域”)和共价结合。这类分子是稳定的、有效的并且具有同时结合两个或更多个抗原的能力。它们能够促进对表达靶抗原的细胞的重定向的T细胞介导的杀伤。在一个实施方式中,第一和第二多肽链的第三结构域各自包含半胱氨酸

(“C”)残基,其用于经二硫键将多肽结合在一起。多肽链中的一条或两条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。已经描述了这类分子的许多变型(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、EP2158221;和PCT公开号WO 2012/162068、WO 2012/018687、W02010/080538)。

[0100] 本发明优选的具有Fc的**DART®**双抗体包括三条多肽链,其在图s2A-2B中描述。这类双抗体的第一多肽链包含四个结构域:(i)包含VL1的结构域,(ii)包含VH2的结构域,(iii)促进与双抗体的第二多肽链异源二聚化(“异源二聚体促进结构域”)和共价结合的结构域,和(iv)包含CH₂-CH₃序列的结构域。这类**DART®**双抗体的第二多肽包含:(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异源二聚化(“异源二聚体促进结构域”)和共价结合的结构域。这类**DART®**双抗体的第三多肽包括CH₂-CH₃序列。因此,这类**DART®**双抗体的第一和第二多肽链缔合在一起而形成能够结合第一表位(1)的VL1/VH1结合位点,以及能够结合第二表位(2)的VL2/VH2结合位点。本发明优选的具有Fc的**DART®**双抗体是B7-H3x CD3双特异性单价双抗体,其能够结合“第一表位”(可以是CD3或B7-H3)和“第二表位”(当第一表位是CD3时,其是B7-H3,和当第一表位是B7-H3时,其是CD3)。第一和第二多肽通过涉及它们各自的连接体和/或第三结构域中的半胱氨酸残基的一个或多个二硫键彼此结合。值得注意的是,第一和第三多肽链彼此复合,以形成经二硫键稳定化的Fc结构域。这类双抗体具有增强的效力。本发明优选的具有Fc的**DARTs®**双抗体可具有两个取向的任意一个(表1):

[0101]

表 1		
第一取向	第三链	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -COOH
	第一链	NH ₂ -VL1-VH2-异源二聚体促进结构域-CH ₂ -CH ₃ -COOH
	第二链	NH ₂ -VL2-VH1-异源二聚体促进结构域-COOH
第二取向	第三链	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -COOH
	第一链	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -VL1-VH2-异源二聚体促进结构域-COOH
	第二链	NH ₂ -VL2-VH1-异源二聚体促进结构域-COOH

[0102] II. 本发明优选的B7-H3x CD3双特异性单价双抗体

[0103] 本发明尤其涉及这类具有Fc的**DARTs®**双抗体,其能够同时结合B7-H3和CD3,并且因此是B7-H3x CD3双特异性单价**DART®**双抗体,并且本发明涉及这类分子在治疗癌症和其他疾病和病况中的用途。尽管非优化的B7-H3x CD3双特异性单价双抗体是完全有功能的,与通过密码子优化的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”Gene18(3):199-209),但进一步通过修饰或改善它们的序列而增强B7-H3x CD3双特异性单价双抗体的稳定性和/或功能是可能的。

[0104] 优选地,如图2A中显示,这样的三条多肽链的第一多肽链在N-末端至C-末端方向

上包含N-末端、能够结合“第一”抗原(CD3或B7-H3)的表位的轻链可变结构域(VL)(VL1)、能够结合“第二”抗原(B7-H3,如果第一抗原是CD3;CD3,如果第一抗原是B7-H3)的表位的重链可变结构域(VH)(VH2)、异源二聚体促进结构域和C-末端。间插连接体肽(连接体1)将轻链可变结构域(VL1)与重链可变结构域(VH2)分开。优选地,重链可变结构域(VL2)通过间插连接体肽(连接体2)连接至异源二聚体促进结构域。在优选的B7-H3xCD3双特异性单价Fc双抗体实施方式中,异源二聚体促进结构域的C-末端通过间插连接体肽(连接体3)或通过间插间隔体-连接体肽(间隔体-连接体3)连接至Fc区域的CH2-CH3结构域(“Fc结构域”)。最优选地,三条多肽链的第一多肽链因此在N-末端至C-末端方向上包含VL1-连接体1-VH2-连接体2-异源二聚体促进结构域-间隔体-连接体3-Fc结构域。

[0105] 可选地,如图2B中显示,这样的三条多肽链中的第一多肽链在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”)、具有例如氨基酸序列:APSSS(SEQ ID NO:51)或氨基酸序列APSSSPME(SEQ ID NO:52)的间插间隔体肽(连接体4)、能够结合“第一”抗原(CD3或B7-H3)的表位的轻链可变结构域(VL)(VL1)、能够结合“第二”抗原(B7-H3,如果第一抗原是CD3;CD3,如果第一抗原是B7-H3)的表位的重链可变结构域(VH)(VH2)、异源二聚体促进结构域和C-末端。间插连接体肽(连接体1)将轻链可变结构域(VL1)与重链可变结构域(VH2)分开。优选地,重链可变结构域(VH2)通过间插连接体肽(连接体2)连接至异源二聚体促进结构域。最优选地,在这样的可选的取向中,三条多肽链的第一多肽链因此在N-末端至C-末端方向上包含:连接体3-Fc结构域-连接体4-VL1-连接体1-VH2-连接体2-异源二聚体促进结构域。

[0106] 优选地,对于这样的两个优选的取向的任意一个,这样的三条多肽链的第二多肽链在N-末端至C-末端方向上包含N-末端、能够结合“第二”抗原的表位的轻链可变结构域(VL)(VL2)、能够结合“第一”抗原的表位的重链可变结构域(VH)(VH1)、异源二聚体促进结构域和C-末端。间插连接体肽(连接体1)将轻链可变结构域(VL2)与重链可变结构域(VH1)分开。优选地,重链可变结构域(VH1)通过间插连接体肽(连接体2)连接至异源二聚体促进结构域。最优选地,因此,三条多肽链的第二多肽链在N-末端至C-末端方向上包含:VL1-连接体1-VH2-连接体2-异源二聚体促进结构域。

[0107] 优选地,对于这样的两个优选的取向的任意一个,这样的三条多肽链的第三多肽链包含连接体肽(连接体3)和Fc区域的CH2-CH3结构域(“Fc结构域”)。因为第三链多肽链不包括VL结构域或VH结构域,因此第三多肽链在本发明的两个或更多个不同B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体之间可以是相同的。

[0108] 协同选择第一多肽链的轻链可变结构域(VL1),以便使其与第二多肽链的重链可变结构域(VH1)相互作用,从而形成有功能的表位结合位点,其能够免疫特异性结合第一抗原(即,B7-H3或CD3)的表位。同样地,协同选择第二多肽链的轻链可变结构域(VL2),以便使其与第一多肽链的重链可变结构域(VH2)相互作用,从而形成有功能的表位结合位点,其能够免疫特异性结合第二抗原(即,B7-H3或CD3)的表位。因此,协同轻链可变结构域和重链可变结构域的选择,使得两条多肽链总体包括能够结合B7-H3和CD3的表位结合位点。

[0109] A. 优选的连接体

[0110] 最优选地,分开多肽链的这类VL和VH结构域的连接体1的长度被选择,以基本上或完全防止这类VL和VH结构域彼此结合(例如,长度为12个或更少氨基酸残基)。因此,第一多

肽链的VL1和VH2结构域基本上或完全不能彼此结合,并且不形成能够基本上结合第一或第二抗原的表位结合位点。同样地,第二多肽链的VL2和VH1结构域基本上或完全不能彼此结合,并且不形成能够基本上结合第一或第二抗原的表位结合位点。优选的间插间隔体肽(连接体1)具有序列(SEQ ID NO:1):GGGSGGGG。

[0111] 连接体2的目的是将多肽链的VH结构域与该多肽链的任选存在的异源二聚体促进结构域分开。各种连接体的任何一种可用于连接体2的目的。这类连接体2的优选序列具有氨基酸序列:GGCGGG (SEQ ID NO:2),其具有可用于经二硫键共价彼此结合第一和第二多肽链的半胱氨酸残基;或ASTKG (SEQ ID NO:3),其源自IgG CH1结构域。因为连接体2,ASTKG (SEQ ID NO:3)不具有这样的半胱氨酸,这类连接体2的使用优选地与包含半胱氨酸的异源二聚体促进结构域,比如SEQ ID NO:12的E-螺旋或SEQ ID NO:13的K-螺旋,的使用结合(见下面)。

[0112] 连接体3的目的是将多肽链的异源二聚体促进结构域与该多肽链的Fc结构域分开。各种连接体的任何一种可用于连接体3的目的。这类连接体3的优选序列具有氨基酸序列:DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:4)。间隔体-连接体3的优选序列具有氨基酸序列:GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:5)。

[0113] B. 优选的异源二聚体促进结构域

[0114] 第一和第二多肽链的异源二聚体的形成可通过包括“异源二聚体促进结构域”来驱动。这类结构域包括在一条多肽链上的GVEPKSC (SEQ ID NO:6)或VEPKSC (SEQ ID NO:7)和在另一条多肽链上的GFNRGEC (SEQ ID NO:8)或FNRGEC (SEQ ID NO:9) (US2007/0004909)。

[0115] 但是,更优选地,本发明的异源二聚体促进结构域由一个、两个、三个或四个串联重复的、具有相反电荷的螺旋结构域形成,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的氨基酸残基的序列(Apostolovic,

[0116] B.等(2008)“pH-Sensitivity of the E3/K3Heterodimeric 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-Rodriquez,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* D65:1032-1041; 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 Designed Peptides For The Generation Of Adenoviral Vectors With Altered Tropism,” *J. Gene Med.* 10:355-367)。

[0117] 这样的重复的螺旋结构域可以是准确的重复或可具有取代。例如，一条多肽链的异源二聚体促进结构域可包括带负电的氨基酸残基的序列并且另一多肽链的异源二聚体促进结构域可包括带负电的氨基酸残基的序列。尤其地，实施方式螺旋结构域包括八个带负电的氨基酸残基或八个带正电的残基。哪个螺旋被提供至第一或第二多肽链是不重要的，只要带相反电荷的螺旋用于另一多肽链。但是，本发明优选的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体的第一多肽链具有带负电的螺旋。带正电的螺旋结构域的带正电的氨基酸可以是赖氨酸、精氨酸、组氨酸等并且优选地是赖氨酸。带负电的螺旋的带负电的氨基酸可以是谷氨酸、天冬氨酸等，并且优选地是谷氨酸。

[0118] 本发明的B7-H3x CD3双特异性单价DART®双抗体可仅仅具有单异源二聚体促进结构域(即，第一多肽链或第二多肽链，但不是两者，包含异源二聚体促进结构域。这类单异源二聚体促进结构域的存在通过阻碍是同源二聚体的双抗体的(这类分子缺少任何异源二聚体促进结构域，或具有两个排斥的(相同电荷的)异源二聚体促进结构域)形成而促进了异源二聚化。但是，优选地，本发明双抗体的第一和第二多肽链均包含异源二聚体促进结构域。

[0119] 在优选的实施方式中，异源二聚体促进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，而另一个异源二聚体促进结构域包括四个串联的“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。这类带电结构域的存在促进了第一和第二多肽之间的缔合，并且因此促进了异源二聚化。在另一优选的实施方式中，使用这样的异源二聚体促进结构域：其中SEQ ID NO:10的四个串联的“E-螺旋”螺旋结构域之一已经被修饰，以包含半胱氨酸残基：EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK

(SEQ ID NO:12)。类似地,在另一优选的实施方式中,使用这样的异源二聚体促进结构域:其中SEQ ID NO:11的四个串联的“K-螺旋”螺旋结构域之一已经被修饰,以包含半胱氨酸残基:KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:13)。

[0120] C. 多肽链的共价结合

[0121] 工程化本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体,从而它们的第一和第二多肽链经沿着它们的长度设置的一个或多个半胱氨酸残基而彼此共价结合。这类半胱氨酸残基可被引入到分开多肽的VL和VH结构域的间插连接体中。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,异源二聚体促进结构域的一个或多个螺旋结构域将被取代,以包含半胱氨酸残基,如在SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13中。

[0122] D. 优选的Fc结构域

[0123] 本发明优选的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体的Fc结构域可以是完整的Fc区域(例如,完整的IgG Fc区域)或仅仅是完整的Fc区域的片段。尽管本发明优选的双特异性单价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)的能力,但更优选地,这类Fc结构域被修饰,以导致与Fc γ RIA (CD64)、Fc γ RIIA (CD32A)、Fc γ RIIB (CD32B)、Fc γ RIIIA (CD16a)或Fc γ RIIIB (CD16b)降低的结合(相对于野生型Fc区域展示的结合),或被修饰,以基本上消除这类Fc结构域结合这类受体(一种或多种)的能力。因此,本发明优选的双特异性单价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(其可包括,例如,相对于完整Fc区域的CH2或CH3结构域的一个或多个插入和/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,或可包括非天然产生的完整Fc区域的部分,或可包括非天然存在的取向的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,与CH2结构域连接的CH3结构域等)。

[0124] 在优选的实施方式中,本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体的第一和第三多肽链各自包括CH2-CH3结构域,其复合在一起而形成免疫球蛋白(IgG)Fc结构域。人IgG1的示例性CH2-CH3结构域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:14):

231	240	250	260	270	280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD					
290	300	310	320	330	
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA					
[0125]	340	350	360	370	380
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE					
	390	400	410	420	430
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE					
	440	447			

[0126] ALHNHYTQKS LSLSPGK

[0127] IgG重链的恒定区中残基的编号是EU索引的编号,如在Kabat等, Sequences of

Proteins of Immunological Interest, 第5版. Public Health Service, NH1, MD (1991) 中, 其通过引用明确并入本文。“如Kabat中的EU索引”指人IgG1EU抗体的编号。在抗体恒定区内的许多不同位置处已经观察到多态性(例如, Fc位置, 包括但不限于270、272、312、315、356和358位, 如Kabat中阐释的EU索引编号), 因此呈现的序列和现有技术序列之间的可存在稍微的不同。已经良好表征了人免疫球蛋白的多态形式。目前, 已知18种Gm同种异型(allotype): G1m(1、2、3、17)或G1m(a、x、f、z)、G2m(23)或G2m(n)、G3m(5、6、10、11、13、14、15、16、21、24、26、27、28)或G3m(b1、c3、b3、b0、b3、b4、s、t、g1、c5、u、v、g5)(Lefranc, 等, “The Human IgG Subclasses: Molecular Analysis Of Structure, Function And Regulation.” Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990); Lefranc, G. 等, 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211)。具体考虑, 本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体可并入任何免疫球蛋白基因的任何同种异型、异同种异型(isoallotype)或单倍型(haplotype), 并且不限于本文提供的序列的同种异型、异同种异型或单倍型。此外, 在一些表达系统中, CH3结构域的C-末端氨基酸残基(上面加粗的)可在翻译后去除。因此, CH3结构域的C-末端残基是本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体中的任选的氨基酸残基。下面提供了包括SEQ ID NO:14的C-末端残基的示例性B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体。本发明也具体包括缺少SEQ ID NO:14的C-末端赖氨酸残基的这类构建体。

[0128] 第一和第三多肽链的CH2和/或CH3结构域可都包括SEQ ID NO:14或其变体。

[0129] 尤其地, 优选地, 本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体的第一和第三多肽链的CH2-CH3结构域展示对Fc γ RIA (CD64)、Fc γ RIIA (CD32A)、Fc γ RIIB (CD32B)、Fc γ RIIIA (CD16a)或Fc γ RIIIB (CD16b)降低的(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)。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并且包括在234和235位的氨基酸取代、在265位的取代或在297位的取代, 其中所述编号是如Kabat中EU索引的编号(见, 例如, 美国专利号5,624,821, 通过引用并入本文)。在优选的实施方式中, 本发明的B7-H3x 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, 其中所述编号是如Kabat中EU索引的编号。

[0130] 第一和第三多肽链的CH2和/或CH3结构域不需要序列相同, 并且有利地被修饰, 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取代)可被引入CH2或CH3结构域中, 以便空间干扰将防止与类似的突变结构域的相互作用并将迫使突变的结构域与其中互补或适应性突变已经被工程化的结构域——即“臼(hole)”(例如, 用甘氨酸取代)——配对。这样的突变组可被工程化到构成双特异性单价Fc双抗体分子的任意多肽对中, 并且进一步地, 被工程化到所述多肽链对的任何部分中。蛋白质工程化以相对于同源二聚化利于异源二聚化的方法在本领域中是悉知的, 尤其就工程化免疫球蛋白样分子而言, 并且包括在本文中(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, and Xie等(2005)“A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell

Lysis,” J. Immunol. Methods 296:95-101; 其中每篇文献通过引用以其整体并入本文)。优选地, 杆被工程化至第一多肽链的CH2-CH3结构域中并且白被工程化至第三多肽链的CH2-CH3结构域中。因此, 杆有助于防止第一多肽链的两个分子经它们的CH2和/或CH3结构域同源二聚化。因为第三多肽链优选地包含白取代, 因此, 其具有与第一多肽链异源二聚化以及本身同源二聚化的能力(但是, 这样的同源二聚化不形成具有表位结合位点的分子)。通过修饰天然IgG Fc结构域以包含修饰T366W而产生优选的杆。通过修饰天然IgGFc结构域以包含修饰T366S、L368A和Y407V而产生优选的白。为了有助于从包括第一、第二和第三多肽链的最终的双特异性单价Fc双抗体纯化第三多肽链同源二聚体, 优选地通过在435位的氨基酸取代(H435R)来突变第三多肽链的CH2和CH3结构域的蛋白质A结合位点。因此, 第三多肽链同源二聚体不结合蛋白质A, 而双特异性单价Fc双抗体保持其经第一多肽链上的蛋白质结合位点而结合蛋白质A的能力。

[0131] 本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体的第一多肽链的CH2和CH3结构域的优选的序列具有“携带杆的”序列(SEQ ID NO:15):

[0132]

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

[0133] 本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体的第三多肽链的CH2和CH3结构域的优选的序列具有“携带白的”序列(SEQ ID NO:16):

[0134]

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

[0135] 如将注意到的, SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16的CH2-CH3结构域包括在234位用丙氨酸的取代和235位用丙氨酸的取代, 并且因此形成这样的Fc结构域: 其展示对Fc γ R1A (CD64)、Fc γ R1IA (CD32A)、Fc γ R1IB (CD32B)、Fc γ R1IIA (CD16a) 或Fc γ R1IIB (CD16b) 降低的(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。此外, 本发明具体包括缺少SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15和/或SEQ ID NO:16的C-末端赖氨酸残基的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体构建体。

[0136] 优选地第一多肽链具有“携带杆的”CH2-CH3序列, 比如SEQ ID NO:15的序列。但是, 如将认识到, “携带白的”CH2-CH3结构域(例如, SEQ ID NO:16)可用于第一多肽链中, 在该情况下“携带杆的”CH2-CH3结构域(例如, SEQ ID NO:15)将用于第三多肽链中。

[0137] E. 优选的B7-H3可变结构域

[0138] 任何抗B7-H3抗体的抗原结合结构域可根据本发明使用。下面提供了对于人B7-H7免疫特异性的示例性抗体(命名为“B7-H3mAb A”、“B7-H3mAbB”和“B7-H3mAb C”)。

[0139] 1.B7-H3mAb A

[0140] B7-H3mAb A的VL结构域的氨基酸序列(SEQ ID NO:17)显示在下方(CDR_L残基加下划线显示):

[0141] DIQLTQSPSF LSASVGDRVITCKASQNVD TNVAWYQOKP GKAPKALIYS
ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFG

[0142] QGTKLEIK

[0143] B7-H3mAb A的CDRL1:(SEQ ID NO:18)KASQNVDTNVA

[0144] B7-H3mAb A的CDRL2:(SEQ ID NO:19)SASYRYS

[0145] B7-H3mAb A的CDRL3:(SEQ ID NO:20)QQYNNYPFT

[0146] B7-H3mAb A的VH结构域的氨基酸序列(SEQ ID NO:21)显示在下方(CDR_H残基加下划线显示):

[0147] EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY
ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCGRGR
ENIYYGSRLD YWGQGTITVTVSS

[0148] B7-H3mAb A的CDRH1:(SEQ ID NO:22)SFGMH

[0149] B7-H3mAb A的CDRH2:(SEQ ID NO:23)YISSDSSAIYYADTVKG

[0150] B7-H3mAb A的CDRH3:(SEQ ID NO:24)GRENIIYGSRLDY

[0151] 2.B7-H3mAb B

[0152] B7-H3mAb B的VL结构域的氨基酸序列(SEQ ID NO:25)显示在下方(CDR_L残基加下划线显示):

[0153] DIQMTQSPSS LSASVGDRVITCRASQDIS NYLNWYQOKP GKAPKLLIYY
TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG
GTKLEIK

[0154] B7-H3mAb B的CDRL1:(SEQ ID NO:26)RASQDISNYLN

[0155] B7-H3mAb B的CDRL2:(SEQ ID NO:27)YTSRLHS

[0156] B7-H3mAb B的CDRL3:(SEQ ID NO:28)QQGNTLPPT

[0157] B7-H3mAb B的VH结构域的氨基酸序列(SEQ ID NO:29)显示在下方(CDR_H残基加下划线显示):

[0158] QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMQWVRQA PGQGLEWMGT
IYPGDGDTRY TQKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARRRG
IPLRWYFDVW GQGTITVTVSS

[0159] B7-H3mAb B的CDRH1:(SEQ ID NO:30)SYWMQ

[0160] B7-H3mAb B的CDRH2:(SEQ ID NO:31)TIYPGDGDTRYTQKFKG

[0161] B7-H3mAb B的CDRH3:(SEQ ID NO:32)RGIPRLWYFDV

[0162] 3.B7-H3mAb C

[0163] B7-H3mAb C的VL结构域的氨基酸序列(SEQ ID NO:33)显示在下方(CDR_L残基加下划线显示):

[0164]

DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQSI SYLNWYQQKP GKAPKLLIYY
TSRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG
GTKLEIK

[0165] B7-H3mAb C的CDR_{L1}: (SEQ ID NO:34) RASQSISSYLN

[0166] B7-H3mAb C的CDR_{L2}: (SEQ ID NO:35) YTSRLQS

[0167] B7-H3mAb C的CDR_{L3}: (SEQ ID NO:36) QQGNTLPPT

[0168] B7-H3mAb C的VH结构域的氨基酸序列(SEQ ID NO:37)显示在下方(CDR_H残基加下划线显示):

[0169]

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMQWVRQA PGQGLEWMGT
IYPGGDTRY TQKFQGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARRG
IPRLWYFDVW GQTTVTVSS

[0170] B7-H3mAb C的CDR_{H1}: (SEQ ID NO:38) SYWMQ

[0171] B7-H3mAb C的CDR_{H2}: (SEQ ID NO:39) TIYPGGDTRYTQKFQG

[0172] B7-H3mAb C的CDR_{H3}: (SEQ ID NO:40) RGIPRLWYFDV

[0173] F. 优选的CD3可变结构域

[0174] 任何抗CD3抗体的抗原结合结构域可根据本发明使用。下面提供了对于人CD3免疫特异性的示例性抗体(命名为“CD3mAb A”)。

[0175] CD3mAb A的VL结构域的氨基酸序列(SEQ ID NO:41)显示在下方(CDR_L残基加下划线显示):

[0176]

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG

[0177] CD3mAb A的CDR_{L1}: (SEQ ID NO:42) RSSTGAVTTSNYAN

[0178] CD3mAb A的CDR_{L2}: (SEQ ID NO:43) GTNKRAP

[0179] CD3mAb A的CDR_{L3}: (SEQ ID NO:44) ALWYSNLWV

[0180] CD3mAb A的VH结构域的氨基酸序列(SEQ ID NO:45)显示在下方(CDR_H残基加下划线显示):

[0181]

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

[0182] CD3mAb A的CDR_{H1}: (SEQ ID NO:46) TYAMN

[0183] CD3mAb A的CDR_{H2}: (SEQ ID NO:47) RIRSKYNNYATYYADSVKD

[0184] CD3mAb A的CDR_{H3}: (SEQ ID NO:48) HGNFGNSYVSWFAY

[0185] 在某些实施方式中,CD3mAb A的VH结构域包括在Kabat 65位的天冬氨酸至甘氨酸取代(D65G取代,对应于SEQ ID NO:45的残基68),以便CDR_H2的氨基酸序列是:RIRSKYNNYATYYADSVKG(SEQ ID NO:49)。具有D65G取代的CD3mAb A的VH结构域的氨基酸序列(SEQ ID NO:50)显示在下方(取代的残基加下划线显示):

[0186]

```
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR  
IRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR  
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTLL VTVSS
```

[0187] II. 示例性B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体

[0188] 本发明提供了能够同时和特异性结合B7-H3和结合CD3的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体。如上所示,本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体包括三条多肽链。下面提供了能够结合B7-H3和结合CD3的四个示例性B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体(命名为“DART-A”、“DART-B”、“DART-C”和“DART-D”)的多肽链。

[0189] A. DART-A

[0190] 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B7-H3的单克隆抗体的VL结构域(VL_{B7-H3}B7-H3mAb A)(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}CD3mAb A)(SEQ ID NO:45)、间插连接体肽(连接体2;GGCGGG(SEQ ID NO:2))、异源二聚体促进(E-螺旋)结构域(EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK(SEQ ID NO:10))、间插连接体肽(间隔体-连接体3;GGGDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:5))、“携带杵的”Fc结构域(SEQ ID NO:15)和C-末端。

[0191] 因此,DART-A的第一多肽链包括:SEQ ID NO:17—SEQ ID NO:1—SEQ ID NO:45—SEQ ID NO:2—SEQ ID NO:10—SEQ ID NO:5—SEQ ID NO:15。

[0192] DART-A的第一多肽的氨基酸序列是(SEQ ID NO:53):

[0193]

```
DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKALIYS  
ASYRYSQVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ  
GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTTFSTYAMN  
WVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKDRFTISR DSKNSLYLQM  
NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTLLVTVSS GGCGGGEVAA  
LEKEVAALEK EVAALEKEVA ALEKGGGDKT HTCPCPCAPE AAGGPSVFLE  
PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE  
EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP  
REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLWCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT  
TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL  
SPGK
```

[0194] 编码这类多肽的示例性多核苷酸是(SEQ ID NO:54):

```

gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgect ccgtgggcca
cagagtgaac atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg
cctgggtatca gcagaagcct ggcaaggccc ctaaggcgct gatctactcc
gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc aggttctccg gctccggctc
tggcaccgac ttcacctga ccatctccag cctgcagcct gaggacttcg
ccacctacta ctgccagcag tacaacaact accctttcac ctccggccag
ggcaccaagc tggaaatcaa gggaggcgga tccggcgggcg gaggcgaggt
gcagctgggtg gagtctgggg gaggtctgggt ccagcctgga gggccctga
gactctcctg tgcagcctct ggattcacct tcagcacata cgctatgaat
tgggtccgcc aggtccagc gaaggggctg gagtgggttg gaaggatcag
gtccaagtac aacaattatg caacctacta tgccgactct gtgaaggata
gattcaccat ctcaagagat gattcaaaga actcactgta tctgcaaagt
[0195] aacagcctga aaaccgagga caccgcccgtg tattactgtg tgagacacgg
taacttcggc aattcttacg tgtcttggtt tgcttatttg ggacagggga
cactggtgac tgtgtcttcc ggaggatgtg gcggtggaga agtggccgca
ctggagaaag aggttgctgc tttggagaag gaggtcgctg cacttgaaaa
ggaggctgca gccctggaga aaggcgggcg ggacaaaact cacacatgcc
caccgtgcc agcacctgaa gccgcggggg gaccgtcagt ctccctcttc
ccccaaaac ccaaggacac cctcatgac tcccggacct ctgaggtcac
atgctgtggtg gtggacgtga gccacgaaga cctgagggtc aagttcaact
ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag
gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca
ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaagggtc tccaacaaag
ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa
gaaccagggtc agcctgtggt gcctgggtcaa aggcttctat ccagcgcaca
tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc
[0196] acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct
caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg
tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg
tctccgggta aa

```

[0197] 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_{CD3CD3mAb A}) (SEQ ID NO:41)、间插连接体肽(连接体1;GGSGGGG (SEQ ID NO:1))、能够结合B7-H3的单克隆抗体的VH结构域(VH_{B7-H3B7-H3mAb A}) (SEQ ID NO:21)、间插连接体肽(连接体2;GGCGGG (SEQ ID NO:2))、异源二聚体促进(K-螺旋)结构域(KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:11))和C-末端。

[0198] 因此,DART-A的第二多肽包括:SEQ ID NO:41—SEQ ID NO:1—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:2—SEQ ID NO:11。

[0199] DART-A的第二多肽的氨基酸序列是(SEQ ID NO:55):

[0200]

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
 GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV QLVESSGGGLV QPGGSLRLSC AASGFTFSSF
 GMHWVRQAPG KGLEWVAYIS SDSSAIYYAD TVKGRFTISR DNAKNSLYLQ
 MNSLRDEDTA VYYCGRGREN IYYGSRLDYW GQGTTVTVSS GGCGGGKVAA
 LKEKVAALKE KVAALKEKVA ALKE

[0201] 编码这类多肽的示例性多核苷酸具有序列 (SEQ ID NO:56) :

caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac
 tgtgacctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact
 acgccaattg ggtgcagcag aagccaggac aggcaccaag gggcctgate
 gggggtacaa acaaaagggc tccctggacc cctgcacggt tttctggaag
 tctgctgggc ggaaaggcgc ctctgactat taccggggca caggccgagg
 acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
 gggggtggca caaaactgac tgtgctggga gggggtggat ccggcggcgg
 [0202] aggcgaggtg cagctggtcg agtctggcgg aggactggtg cagcctggcg
 gctccctgag actgtcttgc gccgcctcgc gcttcacctt ctccagcttc
 ggcattgcact gggtcgcga ggctccaggc aagggaactgg aatgggtggc
 ctacatctcc tccgactcct ccgccatcta ctacgcgcac accgtgaagg
 gcaggttcac catctcccgc gacaacgcca agaactccct gtacctgcag
 atgaactccc tgcgggacga ggacaccgcc gtgtactact gcggcagagg
 ccgggagaat atctactacg gctcccggct ggattattgg ggccagggca
 ccaccgtgac cgtgtcctcc ggaggatgtg gcggtggaaa agtggccgca
 ctgaaggaga aagttgctgc tttgaaagag aaggctcgccg cacttaagga
 [0203] aaaggctcgca gccctgaaag ag

[0204] 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; DKHTCPCP (SEQ ID NO:4))、“携带白的”Fc结构域 (SEQ ID NO:16) 和C-末端。

[0205] 因此,DART-A的第三多肽包括:SEQ ID NO:4—SEQ ID NO:16。

[0206] DART-A的第三多肽的氨基酸序列是 (SEQ ID NO:57) :

[0207]

DKHTCPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK
 GFYPDSIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSPGK

[0208] 编码这类多肽的优选的多核苷酸具有序列 (SEQ ID NO:58) :

[0209] gacaaaactc acacatgccc accgtgcccc gcacctgaag ccgcggggggg
 accgtcagtc ttctctcttc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct
 cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac
 cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc
 caagacaaaag ccgcggggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca
 gcgtccctcac cgtccctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag
 tgcaagggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc
 caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat
 cccggggagga gatgaccaag aaccagggtca gcctgagttg cgcagtcaaa
 ggcttctatc ccagcgacat cgcctggagg tgggagagca atgggcagcc
 ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct
 tcttctctgt cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg
 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accgctacac
 gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a

[0210] A.DART-B

[0211] DART-B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B7-H3的单克隆抗体的VL结构域(VL_{B7-H3}B7-H3mAb B) (SEQ ID NO:25)、间插连接体肽(连接体1; GGGSGGG (SEQ ID NO:1))、能够结合CD3的单克隆抗体的VH结构域(VH_{CD3}CD3mAb A) (SEQ ID NO:45)、间插连接体肽(连接体2; GCGGG (SEQ ID NO:2))、异源二聚体促进(E-螺旋)结构域(EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:10))、间插连接体肽(间隔体-连接体3; GGGDKHTCPPCP (SEQ ID NO:5))、“携带杵的”Fc结构域(SEQ ID NO:15)和C-末端。

[0212] 因此,DART-B的第一多肽链包括:SEQ ID NO:25—SEQ ID NO:1—SEQ ID NO:45—SEQ ID NO:2—SEQ ID NO:10—SEQ ID NO:5—SEQ ID NO:15。

[0213] DART-B的第一多肽的氨基酸序列是(SEQ ID NO:59):

[0214]

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY
 TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG
 GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN
 WVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKDRFTISR DSKNSLYLQM
 NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGT LVT VSS GCGGGGEVAA
 LEKEVAALEK EVAALEKEVA ALEKGGGDKT HTCPCPAPPE AAGGPSVFLF
 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP
 REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLWCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
 TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
 SPGK

[0215] DART-B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}CD3mAb A) (SEQ ID NO:41)、间插连接体肽(连接体1; GGGSGGG (SEQ ID NO:1))、能够结合B7-H3的单克隆抗体的VH结构域(VH_{B7-H3}B7-H3mAb B) (SEQ ID NO:29)、间插连接体肽(连接体2; GCGGG (SEQ ID NO:2))、异源二聚体促进(K-螺旋)结构域

(KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:11) 和C-末端。

[0216] 因此,DART-B的第二多肽包括:SEQ ID NO:41—SEQ ID NO:1—SEQ ID NO:29—SEQ ID NO:2—SEQ ID NO:11。

[0217] DART-B的第二多肽的氨基酸序列是 (SEQ ID NO:60) :

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLIG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV QLVQSGAEVK KPGASVKVSC KASGYTFTSY
WMQWVRQAPG QGLEWMGTIY PGDGDTRYTQ KFKGRVTITA DKSTSTAYME
LSSLRSEDTA VYYCARRGIP RLWYFDVWGQ GTTVTVSSGG CGGGKVAALK
EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE

[0219] DART-B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))、“携带白的”Fc结构域 (SEQ ID NO:16) 和C-末端。

[0220] 因此,DART-B的第三多肽包括:SEQ ID NO:4—SEQ ID NO:16并且具有与上面提供的DART-A的第三多肽相同的氨基酸序列 (SEQ ID NO:57)。

[0221] B.DART-C

[0222] DART-C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B7-H3的单克隆抗体的VL结构域 (VL_{B7-H3}B7-H3mAb C) (SEQ ID NO:33)、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}CD3mAb A,其具有D65G取代) (SEQ ID NO:50)、间插连接体肽(连接体2;GGCGGG (SEQ ID NO:2))、异源二聚体促进(E-螺旋)结构域(EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:10))、间插连接体肽(间隔体-连接体3;GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:5))、“携带杵的”Fc结构域 (SEQ ID NO:15) 和C-末端。

[0223] 因此,DART-C的第一多肽链包括:SEQ ID NO:33—SEQ ID NO:1—SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:2—SEQ ID NO:10—SEQ ID NO:5—SEQ ID NO:15。

[0224] DART-C的第一多肽的氨基酸序列是 (SEQ ID NO:61) :

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIG SYLNWYQQKP GKAPKLLIYY
TSRLQSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG
GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN
WVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKGRFTISR DSKNSLYLQM
NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTLLTVSS GGC GGGEVAA
LEKEVAALEK EVAALEKEVA ALEKGGGDKT HTCPCPCPAPE AAGGPSVFLF
PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP
REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLWCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQOGNVE SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
SPGK

[0226] DART-C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_{CD3CD3mAb C}) (SEQ ID NO:41)、间插连接体肽(连接体1;GGGSGGGG (SEQ ID NO:1))、能够结合B7-H3的单克隆抗体的VH结构域(VH_{B7-H3B7-H3mAb B}) (SEQ ID NO:37)、间插连接体肽(连接体2;GGCGGG (SEQ ID NO:2))、异源二聚体促进(K-螺旋)结构域(KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:11)和C-末端。

[0227] 因此,DART-C的第二多肽包括:SEQ ID NO:41—SEQ ID NO:1—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:2—SEQ ID NO:11。

[0228] DART-C的第二多肽的氨基酸序列是(SEQ ID NO:62):

[0229]

```
QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV QLVQSGAEVK KPGASVKVSC KASGYTFTSY
WMQWVRQAPG QGLEWMGTIY PGGGDTRYTQ KFQGRVTITA DKSTSTAYME
LSSLRSEDTA VYYCARRGIP RLWYFDVWGQ GTTVTVSSGG CGGGKVAALK
EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE
```

[0230] DART-C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))、“携带白的”Fc结构域(SEQ ID NO:16)和C-末端。

[0231] 因此,DART-C的第三多肽包括:SEQ ID NO:4—SEQ ID NO:16并且具有与上面提供的DART-A第三多肽相同的氨基酸序列(SEQ ID NO:57)。

[0232] C.DART-D

[0233] 示例性DART-D的第一和第二多肽链的一般结构与DART-A、DART-B和DART-C的相同,除了DART-D包括缺少半胱氨酸残基的可选的连接体2,并且包括包含半胱氨酸的异源二聚体促进结构域。DART-D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B7-H3的单克隆抗体的VL结构域(VL_{B7-H3B7-H3mAb C}) (SEQ ID NO:33)、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_{CD3CD3mAb A},其具有D65G取代) (SEQ ID NO:50)、间插连接体肽(连接体2;ASTKG (SEQ ID NO:3))、异源二聚体促进(E-螺旋)结构域(EVAAECEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:12))、间插连接体肽(间隔体-连接体3;GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:5))、“携带杵的”Fc结构域(SEQ ID NO:15)和C-末端。

[0234] 因此,DART-D的第一多肽链包括:SEQ ID NO:33—SEQ ID NO:1—SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:3—SEQ ID NO:12—SEQ ID NO:5—SEQ ID NO:15。

[0235] DART-D的第一多肽的氨基酸序列是(SEQ ID NO:63):

[0236]

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSSIS SYLNWYQQKP GKAPKLLIYY
TSRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG
GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN
WVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKGRFTISR DSKNSLYLQM
NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGT LVT VSS ASTKGEVAAC
EKEVA ALEKE VAALEKEVAA LEKGGGDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP
PKPKDTLMIS RTPEVTCV VV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTV DK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS
PGK

[0237] DART-D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}CD3mAb C) (SEQ ID NO:41)、间插连接体肽(连接体1;GGGSGGGG (SEQ ID NO:1))、能够结合B7-H3的单克隆抗体的VH结构域(VH_{B7-H3}B7-H3mAb B) (SEQ ID NO:37)、间插连接体肽(连接体2;ASTKG (SEQ ID NO:3))、异源二聚体促进(K-螺旋)结构域(KVAACK E-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:13)和C-末端。

[0238] 因此,DART-C的第二多肽包括:SEQ ID NO:41—SEQ ID NO:1—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:3—SEQ ID NO:13。

[0239] DART-D的第二多肽的氨基酸序列是(SEQ ID NO:64):

[0240]

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV QLVQSGAEVK KPGASVKVSC KASGYTFTSY
WMQWVRQAPG QGLEWMGTIY PGGGDTRYTQ KFQGRVTITA DKSTSTAYME

[0241]

LSSLRSED TA VYYCARRGIP RLWYFDVWGQ GTTVTVSSAS TKGKVAACK E
KVAALKEKVA ALKEKVAALK E

[0242] 尽管第一和第二多肽链并入了不同的连接体和异源二聚体促进结构域,但是DART-D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;DKHTCPPCP (SEQ ID NO:4))、“携带白的”Fc结构域(SEQ ID NO:16)和C-末端。

[0243] 因此,DART-D的第三多肽包括:SEQ ID NO:4—SEQ ID NO:16并且具有与上面提供的DART-A的第三多肽相同的氨基酸序列(SEQ ID NO:57)。

[0244] III.对照**DART®**双抗体

[0245] 为了更有意义地证明本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体的特性,构建了能够结合荧光素和CD3的对照双特异性单价Fc双抗体(命名为“对照DART”)。

[0246] 用于形成对照 **DART®** 双抗体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。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:

[0247] 抗荧光素抗体4-4-20的VL结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:65) 显示在下方 (CDRH_H 残基加下划线显示):

[0248]

DVVMTQTPFS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNGNTYLRW YLQKPGQSPK
VLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP
WTFGGGTKLE IK

[0249] 抗荧光素抗体4-4-20的VH结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:66) 显示在下方 (CDRH_H 残基加下划线显示):

[0250]

EVKLD~~ET~~GGG LVQPGRPMKL SCVASGFTFS DYWMNWVRQS PEKGLEWVAQ
IRNKPYNYET YYSDSVKGRF TISRDDSKSS VYLQMNNLRV EDMGIYYCTG
SYYGMDYWGQ GTSVTVSS

[0251] 对照DART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 (VL_{Fluor} 4-4-20) (SEQ ID NO:65)、间插连接体肽 (连接体1; GGGSGGG (SEQ ID NO:1))、能够结合CD3的单克隆抗体的VH结构域 (VH_{CD3}CD3mAb A, 其具有D65G取代) (SEQ ID NO:50)、间插连接体肽 (连接体2; GGC~~GGG~~ (SEQ ID NO:2))、异源二聚体促进 (E-螺旋) 结构域 (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:10))、间插连接体肽 (间隔体-连接体3; GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:5))、“携带杵的”Fc结构域 (SEQ ID NO:15) 和C-末端。

[0252] 因此, 对照DART的第一多肽链包括: SEQ ID NO:65—SEQ ID NO:1—SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:2—SEQ ID NO:10—SEQ ID NO:5—SEQ ID NO:15。

[0253] 对照DART的第一多肽链的氨基酸序列是 (SEQ ID NO:67):

[0254]

DVVMTQTPFS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNNGNTYLRW YLQKPGQSPK
 VLIYKVSNR F SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP
 WTFGGG TKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS
 TYAMNWRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSKNS
 LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNFGNSYVS WFAYWGQGT L VTVSSGGCGG
 GEVAALKEKVAAL EKEVAALKEG GGDKTHTCPP CPAPEAAGGP
 SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK
 TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK
 AKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLWCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
 NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ
 KSLSLSPGK

[0255] 对照DART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}CD3mAb A) (SEQ ID NO:37)、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_{f1uor4-4-20}) (SEQ ID NO:65)、间插连接体肽(连接体2;GGCGGG (SEQ ID NO:2))、异源二聚体促进(K-螺旋)结构域(KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:11)和C-末端。

[0256] 因此,对照DART的第二多肽链包括:SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:1—SEQ ID NO:65—SEQ ID NO:2—SEQ ID NO:11。

[0257] 对照DART的第二多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:68):

[0258]

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
 GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV KLDETGGGLV QPGRPMKLSC VASGFTFSDY
 WMNWVRQSPE KGLEWVAQIR NKPYNYETYY SDSVKGRFTI SRDDSKSSVY
 LQMNNLRVED MGIYYCTGSY YGMDYWGQGT SVTVSSGGCG GKGVAALKEK
 VAALKEKVAA LKEKVAALKE

[0259] 对照DART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))、“携带白的”Fc结构域(SEQ ID NO:16)和C-末端。

[0260] 因此,对照DART的第三多肽链包括:SEQ ID NO:4—SEQ ID NO:16并且具有与上面提供的DART-A的第三多肽相同的氨基酸序列(SEQ ID NO:57)。

[0261] IV. 药物组合物

[0262] 本发明的组合物包括原料药组合物(bulk drug composition),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)。这样的组合物包括本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体,或这样的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或治疗

有效量的本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体和药学上可接受的载体。

[0263] 本发明也包括这样的药物组合物:其包括本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体和有效刺激免疫应答的一种或多种另外的分子(例如,免疫检查点抑制剂)和/或联合对于至少一种特定的癌症抗原是特异性的、特异性结合癌症抗原的一种或多种另外的分子(例如,肿瘤特异性单克隆抗体或双抗体)以及药学上可接受的载体。如本文所使用,术语“癌症抗原”表示在肿瘤细胞的表面上特征性表达的抗原。癌症抗原的例子包括:A33(结直肠癌抗原;Almqvist,Y.2006,Nucl Med Biol.Nov;33(8):991-998);B1(Egloff,A.M.等2006,Cancer Res.66(1):6-9);BAGE(Bodey,B.2002 Expert Opin Biol Ther.2(6):577-84); β -联蛋白(Prange W.等2003 J Pathol.201(2):250-9);CA125(Bast,R.C.Jr.等2005 Int J Gynecol Cancer 15Suppl 3:274-81);CD5(Calin,G.A.等2006 Semin Oncol.33(2):167-73);CD19(Troussard,X.等1998Hematol Cell Ther.40(4):139-48);CD20(Thomas,D.A.等2006 Hematol Oncol Clin North Am.20(5):1125-36);CD22(Kreitman,R.J.2006 AAPS J.18;8(3):E532-51);CD23(Rosati,S.等2005 Curr Top Microbiol Immunol.5;294:91-107);CD25(Troussard,X.等1998 Hematol Cell Ther.40(4):139-48);CD27(Bataille,R.2006 Haematologica 91(9):1234-40);CD28(Bataille,R.2006 Haematologica 91(9):1234-40);CD36(Ge,Y.2005 Lab Hematol.11(1):31-7);CD40/CD154(Messmer,D.等2005 Ann N Y Acad Sci.1062:51-60);CD45(Jurcic,J.G.2005 Curr Oncol Rep.7(5):339-46);CD56(Bataille,R.2006 Haematologica 91(9):1234-40);CD79a/CD79b(Troussard,X.等1998Hematol Cell Ther.40(4):139-48);Chu,P.G.等2001 Appl Immunohistochem Mol Morphol.9(2):97-106);CD103(Troussard,X.等1998Hematol Cell Ther.40(4):139-48);CDK4(Lee,Y.M.等2006 Cell Cycle 5(18):2110-4);CEA(胚胎抗原;Mathelin,C.2006 Gynecol Obstet Fertil.34(7-8):638-46);Tellez-Avila,F.I.等2005 Rev Invest Clin.57(6):814-9);CTLA4(Peggs,K.S.等2006 Curr Opin Immunol.18(2):206-13);EGF-R(表皮生长因子受体;Adenis,A.等2003 Bull Cancer.90 Spec No:S228-32);Erb(ErbB1;ErbB3;ErbB4;Zhou,H.等2002 Oncogene 21(57):8732-40);Rimon,E.等2004 Int J Oncol.24(5):1325-38);GAGE(GAGE-1;GAGE-2;Akcakanat,A.等2006Int J Cancer.118(1):123-8);GD2/GD3/GM2(Livingston,P.O.等2005 Cancer Immunol Immunother.54(10):1018-25);gp100(Lotem,M.等2006 J Immunother.29(6):616-27);HER-2/neu(Kumar,Pal S等2006 Semin Oncol.33(4):386-91);人乳头瘤病毒-E6/人乳头瘤病毒-E7(DiMaio,D.等2006 Adv Virus Res.66:125-59);KSA(17-1A)(Ragupathi,G.2005 Cancer Treat Res.123:157-80);MAGE(MAGE-1;MAGE-3;(Bodey,B.2002 Expert Opin Biol Ther.2(6):577-84);MART(Kounalakis,N.等2005 Curr Oncol Rep.7(5):377-82);MUC-1(Mathelin,C.2006 Gynecol Obstet Fertil.34(7-8):638-46);MUM-1(Castelli,C.等2000 J Cell Physiol.182(3):323-31);N-乙酰葡萄糖氨基转移酶(Dennis,J.W.1999 Biochim Biophys Acta.6;1473(1):21-34);p15(Gil,J.等2006 Nat Rev Mol Cell Biol.7(9):667-77);PSA(前列腺特异性抗原;Cracco,C.M.等2005 Minerva Urol Nefrol.57(4):301-11);PSMA(Ragupathi,G.2005 Cancer Treat Res.123:157-80);sTn(Holmberg,L.A.2001 Expert Opin Biol Ther.1(5):881-91);TNF-受体(TNF- α 受体,TNF- β 受体;或TNF- γ 受体;van Horssen,R.等2006 Oncologist.11(4):397-408);Gardnerova,

M. 等 2000 Curr Drug Targets. 1 (4) : 327-64) ; VEGF 受体 (O'Dwyer.P.J.2006Oncologist.11 (9) :992-8) ; ADAM-9 (美国专利公开号2006/0172350;PCT公开号W0 06/084075) ; ALCAM (PCT公开号W0 03/093443) ; 羧肽酶M (美国专利公开号2006/0166291) ; CD46 (美国专利号7,148,038;PCT公开号W0 03/032814) ; 细胞角蛋白8 (PCT公开号W0 03/024191) ; 肝配蛋白受体 (尤其是EphA2 (美国专利号7,569,672;PCT公开号W0 06/084226) ; 整联蛋白 α -V- β -6 (PCT公开号W0 03/087340) ; JAM-3 (PCT公开号W0 06/084078) ; KID3 (PCT公开号W0 05/028498) ; KID31 (PCT公开号W0 06/076584) ; LUCA-2 (美国专利公开号2006/0172349;PCT公开号W0 06/083852) ; 致癌蛋白M (致癌蛋白受体 β) (美国专利号7,572,896;PCT公开号W0 06/084092) ; PIPA (美国专利号7,405,061;PCT公开号W0 04/043239) ; ROR1 (美国专利号5,843,749) ; 和运铁蛋白受体 (美国专利号7,572,895;PCT公开号W005/121179) 。

[0264] 在具体的实施方式中,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) 或其他通常获得认可的药典中,供用于动物,特别是用于人类。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,水性载体,比如盐水溶液、水性右旋糖和甘油溶液是优选的。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。

[0265] 一般而言,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。

[0266] 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、普鲁卡因等的阳离子。

[0267] 本发明也提供了药学包装或试剂盒,其包括一个或多个容器,所述一个或多个容器包含本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体,单独地或与其他剂,优选药学上可接受的载体一起。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包括在药物包装或试剂盒中。本发明也提供了这样的药物包装或试剂盒,其包括一个或多个容器,所述容器填充本发明药物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许可用于人类施用的制造、使用或销售。

[0268] 试剂盒可包括本发明的B7-H3x 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可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

可进一步包括结合一种或多种癌症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。

[0269] V. 施用方法

[0270] 通过向受试者施用有效量的本发明的分子或包括本发明的分子的药学组合物,可以提供本发明的组合物用来治疗、预防和缓解与癌症或其他疾病或病症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。

[0271] 各种递送系统是已知的,并且可以用于施用本发明的分子和组合物,例如封装于脂质体中、微粒、微胶囊、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。

[0272] 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B7-H3x 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申请号WO 92/19244、WO97/32572、WO 97/44013、WO 98/31346和WO 99/66903,其每一篇通过引用以其整体并入本文。

[0273] 本发明也使得本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体包装在密封容器中,比如指示分子的数量的安瓿或小袋中。在一个实施方式中,本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc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B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体作为冻干无菌粉提供于密封容器中。

[0274] 本发明的冻干的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体应在它们的初始容器中储存在2℃和8℃之间,并且分子应该在重构之后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B7-H3x CD3双特异性单价Fc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B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体提供在密封容器中。

[0275] 可通过标准临床技术确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路径和病况的严重性,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推断。

[0276] 如本文所使用,在一个实施方式中,药物组合物的“有效量”是足以实现有益或期望的结果的量,所述结果包括但不限于临床结果,比如减少源自疾病的症状、减弱疾病的症

状(例如,癌细胞的增殖、肿瘤存在、肿瘤转移等),从而提高遭受疾的患者的生命质量,降低治疗疾病需要的其他药物治疗的剂量、比如经靶向和/或内化增强另一药物的作用、延迟疾病的进展,和/或延长个体的生存。

[0277] 可在一次或多次施用中施加这样的有效量。为了本发明的目的,有效量的药物、化合物或药物组合物是足够减少病毒存在的增殖(或影响)和直接或间接减少和/或延迟疾病(例如癌症)的发展的量。在一些实施方式中,药物、化合物或药物组合物的有效量可联合或不联合另一药物、化合物或药物组合物实现。因此,“有效量”可在施用一种或多种化疗剂的背景下考虑,并且如联合一种或多种其他剂,可实现或实现期望的结果,则单剂可视为以有效量施用。尽管个体的需要不同,但是测定每种组分的有效量的最佳范围是本领域技术人员已知的。

[0278] 对于本发明包括的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体,向患者施用的剂量优选地基于接受受试者的体重(kg)来确定。施用的剂量通常是至少约0.01 μ g/kg、至少约0.05 μ g/kg、至少约0.1 μ g/kg、至少约0.2 μ g/kg、至少约0.5 μ g/kg、至少约1 μ g/kg、至少约2 μ g/kg、至少约3 μ g/kg、至少约5 μ g/kg、至少约10 μ g/kg、至少约20 μ g/kg、至少约30 μ g/kg、至少约50 μ g/kg、至少约0.1mg/kg、至少约0.15mg/kg、至少约0.2mg/kg、至少约0.5mg/kg、至少约1.0mg/kg受试者的体重或更多。

[0279] 用本发明的治疗或预防有效量的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体治疗受试者可包括单治疗,或优选地,可包括涉及相同或不同剂量的一系列治疗。例如,受试者可用本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体治疗,每周一次或每两周一次,持续约2至约120周,或大于120周。应该认识到,用于治疗的本7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体的有效剂量在特定的治疗期间可增加或减少。

[0280] 优选地,使用治疗方案的疗程施用B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体,所述治疗方案包括一个或多个剂量(其可保持不变,或可响应受试者对治疗的应答而增加或减少,其中治疗方案是在2周、3周、4周、6周、8周或大于8周内施用。典型地,有1、2、3、4、5或大于5个治疗疗程。每个治疗疗程可以与任何之前的方案相同或不同。

[0281] 在某些实施方式中,剂量方案包括第一个6周循环,其中B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体每两周一次施用至受试者(即,每隔一周一次),随后是一个或多个8周循环,其中B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体每两周一次施用至受试者。在某些实施方式中,第一个6周循环之后是一、二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四或大于十四个8周循环。

[0282] 在具体的实施方式中,施用至受试者的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体的剂量是至少约0.1 μ g/kg、0.3 μ g/kg、1.3 μ g/kg、3 μ g/kg、10 μ g/kg、30 μ g/kg或100 μ g/kg受试者的体重。基于患者在基线时的体重施用计算的剂量。但是,体重由基线或确定的稳定状态(plateau)重量的显著($\geq 10\%$)改变将提示重新计算施用的剂量。

[0283] 通过修饰比如,例如,脂质化来增强B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体的吸收和组织渗透,可降低或改变本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体的施用的剂量和频率。

[0284] 对于用作单剂疗法,可计算向患者施用的本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体的剂量。可选地,本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体可与其他治疗组合物联

合使用,以便向患者施用的剂量小于当所述分子用作单剂疗法时的剂量。

[0285] 本发明的药物组合物可被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:局部注入、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。

[0286] 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Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer,Lopez-Berestein和Fidler(编辑),Liss,New York,pp.353-365(1989)中;Lopez-Berestein,同上,pp.3 17-327)。

[0287] 本发明的组合物可以在控释或缓释系统中递送。本领域技术人员已知的任何技术均可用于产生包括本发明的一种或多种B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体的缓释制剂。见,例如,美国专利号4,526,938;PCT公开W091/05548;PCT公开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,其每一篇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;Sefton,(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 and Wise(eds.),CRC Pres.,Boca Raton,Florida(1974);*Controlled Drug Bioavailability,Drug Product Design and Performance*,Smolen and 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公开号W0 99/15154和PCT公开号W0 99/20253)。缓释制剂中所用的聚合物的实例包括但不限于聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸)、乙烯-乙基乙酸酯共聚物(poly(ethylene-co-vinyl acetate))、聚(甲

基丙烯酸)、聚乙醇酸交酯 (PLG)、聚酞、聚 (N-乙基吡咯烷酮)、聚 (乙醇醇)、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 (例如, 肺) 布置, 因此仅仅需要全身剂量的一部分 (见, 例如, Goodson, 在以下中: Medical Applications of Controlled Release, 上文, vol. 2, pp. 115-138 (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流中, 并且非聚合物材料会逐渐凝结或沉淀, 形成固体微孔基质 (见美国5,888,533)。

[0288] Langer的综述中讨论了控释系统 (1990, “New Methods Of Drug Delivery,” Science 249:1527-1533)。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; 国际公开号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, 其每一篇文献通过引用以其整体并入本文。

[0289] 在本发明的组合物是编码本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体的核酸的情况下, 核酸可被体内施用, 以通过如下方式促进其编码的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体的表达: 将其构建为适当的核酸表达载体的一部分并且施用其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包被, 或通过已知进入核的同源框样肽联合施用 (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, 可以将核酸引入细胞内并通过同源重组整合到宿主细胞DNA中, 以进行表达。

[0290] 用治疗或预防有效量的本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体治疗受试者可包括单治疗, 或优选地, 可包括一系列治疗。在优选的实施例中, 用这类双抗体治疗受试者每周一次、每两周一次 (即, 每隔一周一次) 或每三周一次, 持续约1至52周。本发明的药物组合物可每天施用一次、每天施用两次或每天施用三次。可选地, 药物组合物可每周施用一次、每周两次、每两周一次、每月一次、每六周一次、每两个月一次、每年两次或每年一次。也将认识到, 用于治疗的分子的有效剂量可随着具体治疗的疗程而增加或降低。

[0291] VI. 本发明组合物的用途

[0292] 本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体具有共定位T细胞至表达B7-H3的细

胞的能力,并且因此可用于治疗任何与B7-H3的表达相关或特征在于B7-H3的表达的疾病或病况。因此,不受限制,包括这类分子的药物组合物可用于诊断或治疗癌症,包括特征在于存在癌症细胞的癌症,所述癌症细胞包括但不限于下述的癌症的细胞:急性髓细胞样白血病、肾上腺肿瘤、AIDS相关的癌症、软组织腺泡状肉瘤、星形细胞瘤、膀胱癌、骨癌、脑和脊髓癌症、转移性脑瘤、乳腺癌、颈动脉体瘤、宫颈癌、软骨肉瘤、脊索瘤、嫌色细胞肾细胞癌、透明细胞癌、结肠癌、结直肠癌、皮肤良性纤维组织细胞瘤、促结缔组织增生小圆细胞瘤、室管膜细胞瘤、尤文氏瘤、骨外粘液样软骨肉瘤、不完全性骨纤维生成、骨的纤维发育异常、胆囊癌或胆管癌、胃癌、妊娠滋养层疾病、生殖细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌、恶性胶质瘤、胰岛细胞肿瘤、卡波西氏肉瘤、肾癌、白血病、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/恶性的脂肪瘤、肝癌、淋巴瘤、肺癌、成神经管细胞瘤、黑素瘤、脑膜瘤、恶性间皮瘤、多发性内分泌瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、成神经细胞瘤、神经内分泌肿瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、胰腺癌、鼻咽癌、甲状腺乳头状癌、甲状旁腺瘤、儿科癌症、周围神经鞘瘤、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、前列腺癌、眼色素层后黑素瘤、罕见血液学疾病、肾细胞癌、肾转移性癌症、横纹肌样瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌症、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移性癌症或子宫癌。

[0293] 尤其地,本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体可用于治疗头颈的磷状细胞癌(SCCHN)、膀胱癌、乳腺癌、结直肠癌、胃癌、恶性胶质瘤、肾癌、肺癌,包括非小细胞肺癌(NSCLC)、黑素瘤、卵巢癌、胰腺癌、鼻咽癌、前列腺癌、肾细胞癌和儿童的小圆蓝细胞肿瘤(small round blue cell tumor),包括成神经细胞瘤和横纹肌肉瘤,其每种高度表达B7-H3。

[0294] 本发明的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体可另外用于制造用于治疗上述病况的药物。

[0295] 现已大体上描述了本发明,通过参考下述实施方式,其将更容易理解,所述实施方式通过示例的方式提供,不旨在限制本发明,除非指出。

[0296] 本发明的实施方式

[0297] 下面提供本发明某些实施方式的非限制性例子。

[0298] 实施方式1:

[0299] 一种B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体,其中所述双特异性单价Fc双抗体能够特异性结合B7-H3的表位和结合CD3的表位,并且具有IgG Fc结构域,其中所述双特异性单价Fc双抗体包括第一多肽链、第二多肽链和第三多肽链,其中第一和第二多肽链彼此共价结合并且第一和第三多肽链彼此共价结合,和其中:

[0300] I. 第一多肽链在N-末端至C-末端方向上包括:

[0301] A. 结构域IA,其包括:

[0302] (1) 亚结构域(IA1),其包括能够结合B7-H3的VL结构域(VL_{B7-H3})或结合CD3的VL结构域(VL_{CD3});和

[0303] (2) 亚结构域(IA2),其包括能够结合B7-H3的VH结构域(VH_{B7-H3})或结合CD3的VH结构域(VH_{CD3});

[0304] 其中亚结构域IA1和IA2通过具有12个或更少的氨基酸残基的多肽连接体彼此分开,并且被协同选择,以便:

[0305] (a) 亚结构域IA1包括能够结合B7-H3的VL结构域(VL_{B7-H3})和选择亚结构域IA2,以包括能够结合CD3的VH结构域(VH_{CD3});或

[0306] (b) 亚结构域IA1包括能够结合CD3的VL结构域(VL_{CD3})和选择亚结构域IA2,以包括能够结合B7-H3的VH结构域(VH_{B7-H3});和

[0307] B. 任选存在的结构域IB,其包括与异源二聚体促进结构域连接的多肽连接体;

[0308] C. 结构域IC,其包括与抗体的CH2-CH3结构域连接的多肽连接体;

[0309] II. 第二多肽链在N-末端至C-末端方向上包括:

[0310] A. 结构域IIA,其包括:

[0311] (1) 亚结构域(IIA1),其包括能够结合B7-H3的VL结构域(VL_{B7-H3})或结合CD3的VL结构域(VL_{CD3})和

[0312] (2) 亚结构域(IIA2),其包括能够结合B7-H3的VH结构域(VH_{B7-H3})或结合CD3的VH结构域(VH_{CD3})

[0313] 其中亚结构域IIA1和IIA2通过具有12个或更少的氨基酸残基的多肽连接体彼此分开,并且被协同选择,以便:

[0314] (a) 当亚结构域IA1包括能够结合B7-H3的VL结构域(VL_{B7-H3})时,选择亚结构域IIA1,以包括能够结合CD3的VL结构域(VL_{CD3})和选择亚结构域IIA2,以包括能够结合B7-H3的VH结构域(VH_{B7-H3});和

[0315] (b) 当亚结构域IA1包括能够结合CD3的VL结构域(VL_{CD3})时,则选择亚结构域IIA1,以包括能够结合B7-H3的VL结构域(VL_{B7-H3})和选择亚结构域IIA2,以包括能够结合CD3的VH结构域(VH_{CD3});

[0316] B. 任选存在的结构域IIB,其包括与异源二聚体促进结构域连接的多肽连接体;

[0317] III. 第三多肽链在N-末端至C-末端方向上包括结构域IIIC,其包括与抗体的CH2-CH3结构域连接的多肽连接体;

[0318] 其中:

[0319] (A) (1) 存在任选存在的结构域IB和任选存在的结构域IIB的至少一个,和其中存在的结构域IB或IIB具有正或负电荷;或

[0320] (2) 存在任选存在的结构域IB和任选存在的结构域IIB两者,其中:

[0321] (i) 结构域IB和结构域IIB之一具有带正电荷的异源二聚体促进结构域,并且结构域IB和结构域IIB的另一个具有带负电荷的异源二聚体促进结构域;或

[0322] (ii) 结构域IB和结构域IIB之一具有包括氨基酸序列GVEPKSC(SEQ ID NO:6)或VEPKSC(SEQ ID NO:7)的异源二聚体促进结构域,并且结构域IB和结构域IIB的另一个具有包括氨基酸序列GFNRGEC(SEQ ID NO:8)或FNRGEC(SEQ ID NO:9)的异源二聚体促进结构域;

[0323] (B) VL_{B7-H3}和VH_{B7-H3}相互作用形成能够结合B7-H3的表位的表位结合结构域,和VL_{CD3}和VH_{CD3}形成能够结合CD3的表位的表位结合结构域;和

[0324] (C) 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。

[0325] 实施方式2:

[0326] 实施方式1所述的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体,其能够与人和灵长类B7-H3和CD3交叉反应。

[0327] 实施方式3:

[0328] 实施方式1或2所述的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体,其中:

[0329] (A) (1) 结构域IB和IIB各自包括半胱氨酸残基,其经二硫键将第一多肽链与第二多肽链共价结合;和

[0330] (2) 结构域IC和IIIC各自包括半胱氨酸残基,其经二硫键将第一多肽链与第三多肽链共价结合;或

[0331] (B) (1) 多肽连接体,其将结构域IA2和IB分开,并且结构域IIA2和IIB各自包括半胱氨酸残基,其经二硫键将第一多肽链与第二多肽链共价结合;和

[0332] (2) 结构域IC和IIIC各自包括半胱氨酸残基,其经二硫键将第一多肽链与第三多肽链共价结合。

[0333] 实施方式4:

[0334] 实施方式1-3任一项所述的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体,其中:

[0335] (A) VL_{B7-H3}具有氨基酸序列SEQ ID NO:17和VH_{B7-H3}具有氨基酸序列SEQ ID NO:21;或

[0336] (B) VL_{B7-H3}具有氨基酸序列SEQ ID NO:25和VH_{B7-H3}具有氨基酸序列SEQ ID NO:29;或

[0337] (C) VL_{B7-H3}具有氨基酸序列SEQ ID NO:33和VH_{B7-H3}具有氨基酸序列SEQ ID NO:37。

[0338] 实施方式5:

[0339] 实施方式1-4任一项所述的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体,其中VL_{CD3}具有氨基酸序列SEQ ID NO:41和VH_{CD3}具有氨基酸序列SEQ ID NO:45或50。

[0340] 实施方式6:

[0341] 实施方式1-5任一项所述的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体,其中:

[0342] (A) 结构域IC的CH2-CH3结构域具有氨基酸序列SEQ ID NO:15和结构域IIIC的CH2-CH3结构域具有氨基酸序列SEQ ID NO:16;或

[0343] (B) 结构域IC的CH2-CH3结构域具有氨基酸序列SEQ ID NO:16和结构域IIIC的CH2-CH3结构域具有氨基酸序列SEQ ID NO:15。

[0344] 实施方式7:

[0345] 实施方式1-6任一项所述的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体,其中:

[0346] (A) 将亚结构域IA1和IA2分开的多肽连接体具有氨基酸序列SEQ ID NO:1;和/或

[0347] (B) 将亚结构域IIA1和IIA2分开的多肽连接体具有氨基酸序列SEQ ID NO:1。

[0348] 实施方式8:

[0349] 实施方式1-7任一项所述的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体,其中:

[0350] (A) 结构域IB的异源二聚体促进结构域具有氨基酸序列SEQ ID NO:10和结构域IIB的异源二聚体促进结构域具有氨基酸序列SEQ ID NO:11;或(B) 结构域IB的异源二聚体促进结构域具有氨基酸序列SEQ ID NO:11和结构域IIB的异源二聚体促进结构域具有氨基酸序列SEQ ID NO:10;或(C) 结构域IB的异源二聚体促进结构域具有氨基酸序列SEQ ID NO:12和结构域IIB的异源二聚体促进结构域具有氨基酸序列SEQ ID NO:13;或(D) 结构域IB的异源二聚体促进结构域具有氨基酸序列SEQ ID NO:13和结构域IIB的异源二聚体促进结构域具有氨基酸序列SEQ ID NO:12。

[0351] 实施方式9:

[0352] 实施方式1-8任一项所述的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体,其中:

[0353] (A) 将结构域IB和IA分开的多肽连接体具有氨基酸序列SEQ ID NO:2或3;和/或

[0354] (B) 将亚结构域IIB和IIA分开的多肽连接体具有氨基酸序列SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3。

[0355] 实施方式10:

[0356] 实施方式1-9任一项所述的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体,其中结构域IC进一步包括多肽连接体,其将CH2-CH3结构域与结构域IB分开,并且其中结构域IIIC进一步包括在CH2-CH3结构域的N-末端的多肽连接体。

[0357] 实施方式11:

[0358] 实施方式10所述的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体,其中结构域IC和IIC的多肽连接体具有氨基酸序列SEQ ID NO:4或5。

[0359] 实施方式12:

[0360] 实施方式1-11任一项所述的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体,其中:

[0361] (A) 第一多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:53,第二多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:55,并且第三多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:57;或(B) 第一多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:59,第二多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:60并且第三多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:57;或

[0362] (C) 第一多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:61,第二多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:62,并且第三多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:57;或(D) 第一多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:63,第二多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:64,并且第三多肽链具有氨基酸序列SEQ ID NO:57。

[0363] 实施方式13:

[0364] 实施方式1-12任一项所述的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体,其能够在采用选自下述的靶人类肿瘤细胞系的试验中使用人T细胞介导对靶肿瘤细胞的重定向杀伤:A498(肾癌)、JIMT-1/Luc(乳腺癌)、A375(黑素瘤)、22Rv1(前列腺癌)、Detroit562(鼻咽癌)、DU145(前列腺癌)、BxPC3(胰腺癌)、SKMES-1(肺癌)和U87(恶性胶质瘤),并且使用纯化的人原代T细胞作为效应细胞,效应细胞与T细胞之比是1:1、5:1或10:1,其中观察到的这种重定向杀伤的EC50是约1.5 μ g/mL或更少、约1.0 μ g/mL或更少、约500ng/mL或更少、约300ng/mL或更少、约200ng/mL或更少、约100ng/mL或更少、约50ng/mL或更少。

[0365] 实施方式14:

[0366] 实施方式13所述的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体,其中使用乳酸脱氢酶(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后从细胞释放的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。

[0367] 实施方式15:

[0368] 实施方式1-14任一项所述的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体,其能够在共混异种移植物中介导对人肿瘤生长的抑制,其中这类分子连同22Rv1(人前列腺癌)或A498(人肾

癌)肿瘤细胞和激活的人T细胞以5:1的比例被引入到NOD/SCID小鼠中。

[0369] 实施方式16:

[0370] 实施方式1-15任一项所述的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体,其能够在雌性NSG B2m^{-/-}小鼠中的异种移植模型中介导对人肿瘤生长的抑制和/或展示抗肿瘤活性,所述雌性NSG B2m^{-/-}小鼠:

[0371] (A)在第-1天通过腹腔内(IP)注射而植入人PBMC(1×10^7)和在第0天皮内(ID)植入Detroit(人鼻咽癌肿瘤细胞(5×10^6)),并且在第20、22、23、26、28、30、33、35和37天施用双抗体;或

[0372] (B)在第0天皮内(ID)植入A498(人肾癌肿瘤细胞(5×10^6)),和在第13天通过腹腔内(IP)注射而植入人PBMC(1×10^7),并且在第33、35、36、39、41、43、46、48和50天施用双抗体。

[0373] 实施方式17:

[0374] 实施方式15或16所述的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体,其中当以大于约0.5mg/kg的浓度、以约0.5mg/kg的浓度,以约0.2mg/kg的浓度、以约0.1mg/kg的浓度、以约0.05mg/kg的浓度、以约0.02mg/kg的浓度、以约0.01mg/kg的浓度,或以约0.005mg/kg的浓度,或以小于0.005mg/kg的浓度提供时,所述B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体抑制肿瘤生长和/或展示抗肿瘤活性。

[0375] 实施方式18:

[0376] 实施方式1-17任一项所述的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体,其用作药物。

[0377] 实施方式19:

[0378] 一种药物组合物,其包含实施方式1-17任一项所述的B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体和生理学上可接受的载体。

[0379] 实施方式20:

[0380] 实施方式19所述的药物组合物在治疗与B7-H3的表达相关或特征在于B7-H3的表达的疾病或病况中的用途。

[0381] 实施方式21:

[0382] 实施方式20所述的用途,其中所述与B7-H3的表达相关或特征在于B7-H3的表达的疾病或病况是癌症。

[0383] 实施方式22:

[0384] 实施方式21所述的用途,其中所述癌症的特征在于存在选自下述的细胞的癌症细胞:急性髓细胞样白血病、肾上腺肿瘤、AIDS相关的癌症、软组织腺泡状肉瘤、星形细胞瘤、膀胱癌、骨癌、脑和脊髓癌症、转移性脑瘤、乳腺癌、颈动脉体瘤、宫颈癌、软骨肉瘤、脊索瘤、嫌色细胞肾细胞癌、透明细胞癌、结肠癌、结直肠癌、皮肤良性纤维组织细胞瘤、促结缔组织增生小圆细胞瘤、室管膜细胞瘤、尤文氏瘤、骨外粘液样软骨肉瘤、不完全性骨纤维生成、骨的纤维发育异常、胆囊癌或胆管癌、胃癌、妊娠滋养层疾病、生殖细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌、恶性胶质瘤、胰岛细胞肿瘤、卡波西氏肉瘤、肾癌、白血病、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/恶性的脂肪瘤、肝癌、淋巴瘤、肺癌、成神经管细胞瘤、黑素瘤、脑膜瘤、恶性间皮瘤、多发性内分泌瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、成神经细胞瘤、神经内分泌肿瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、胰腺癌、鼻咽癌、甲状腺乳头状癌、甲状旁腺瘤、儿科癌症、周围神经鞘瘤、嗜

铬细胞瘤、垂体瘤、前列腺癌、眼色素层后黑素瘤、罕见血液学疾病、肾细胞癌、肾转移性癌症、横纹肌样瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌症、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移性癌症和子宫癌。

[0385] 实施方式23:

[0386] 实施方式22所述的用途,其中所述癌症选自:膀胱癌、乳腺癌、结直肠癌、胃癌、恶性胶质瘤、肾癌、肺癌、黑素瘤、成神经细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、鼻咽癌、前列腺癌、肾细胞癌、横纹肌肉瘤和头颈的鳞状细胞癌(SCCHN)。

[0387] 实施方式24:

[0388] 实施方式21-23任一项所述的用途,其中B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体每两周一次施用至受试者(即,每隔一周一次)。

[0389] 实施方式25:

[0390] 实施方式24所述的用途,其中B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体以0.1 μ g/kg、0.3 μ g/kg、1.3 μ g/kg、3 μ g/kg、10 μ g/kg、30 μ g/kg、或100 μ g/kg受试者的基线体重的剂量被施用。

[0391] 现已大体上描述了本发明,通过参考下述实施例,其将更容易被理解,所述实施例通过示例方式提供,而不旨在限制本发明,除非具体指出。

实施例

[0392] 下述实施例阐释了组合物在本发明的诊断或治疗方法中的各种方法。实施例旨在是阐释性的,而决不限本发明的范围。

[0393] 实施例1

[0394] 结合亲和力

[0395] 通过BIAcore™分析来评估若干示例性B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体(DART-A、DART-B和DART-C)与人或食蟹猴B7-H3的结合亲和力。BIAcore™分析测量解离速率(dissociation off-rate)kd。抗体和其靶之间的结合亲和力(KD)是根据式:KD=[kd]/[ka]的对于缔合(结合速率,ka)和解离(解离速率,kd)的动力学常数的函数。BIAcore™分析使用表面等离子体共振,以直接测量这些动力学参数。

[0396] 通过表面等离子体共振(SPR)技术(BIAcore)分析的DART-A、DART-B和DART-C与人和食蟹猴B7-H3的结合的结果显示在表2中。

[0397]

表 2				
DART	抗原	ka ($\pm$ SD) (M-1s-1)	kd ($\pm$ SD) (s-1)	KD ($\pm$ SD) (nM)
DART-A	人 B7-H3	2.3 x 10 ⁵	5.6 x 10 ⁻³	24.6
DART-A	短尾猴 B7-H3	1.7 x 10 ⁵	5.1 x 10 ⁻³	30.2
DART-B	人 B7-H3	2.4 x 10 ⁶	7.6 x 10 ⁻³	3.2
DART-B	短尾猴 B7-H3	21.5 x 10 ⁶	13.3 x 10 ⁻³	8.9
DART-C	人 B7-H3	4.6 x 10 ⁶	7.2x 10 ⁻³	1.6
DART-C	短尾猴 B7-H3	n.d.	n.d.	n.d.

[0398] n.d.——未进行-BIAcore分析

[0399] DART-A的结合亲和力对于人和食蟹猴B7-H3是类似的(分别为 $KD=24.6\text{ nM}$ 和 30.2 nM)。DART-B对于人B7-H3的结合亲和力是对于食蟹猴B7-H3的亲力的三倍以内(分别为 $KD=3.2\text{ nM}$ 和 8.9 nM)。但是,相比DART-A,DART-B对于人B7-H3具有约8倍的亲和力(分别为 $KD=3.2\text{ nM}$ 和 24.6 nM)。类似地,相比DART-A,DART-C对于人B7-H3具有约15倍的亲和力。DART-D包括与DART-C相同B7-H3结合结构域,并且预期对于B7-H3具有相同的结合亲和力。在其他研究中,显示DART-C和DART-D的B7-H3结合结构域结合食蟹猴B7-H3。对于人和食蟹猴CD3的结合亲和力(KD)几乎相同($\sim 14\text{ nM}$)。鉴于对于人和食蟹猴B7-H3类似的结合亲和力,食蟹猴是用于毒理学评估的相关物种。

[0400] 实施例2

[0401] 肿瘤细胞系上B7-H3表达的FACS分析

[0402] 评估源自不同人组织肿瘤类型的一组肿瘤细胞系的B7-H3表达,以便鉴定适当的靶细胞系,用于评估示例性B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体的生物学活性。图3显示了在各种癌症细胞系上检测的抗B7-H3-PE抗体结合的FACS柱状图。基于抗B7-H3-PE抗体结合的荧光强度,确认了九个细胞系对于B7-H3表达是阳性的,并且显示一定范围的B7-H3表达水平。具有最高B7-H3表达的细胞系是:A498(肾癌)(图3A)、JIMT-1/Luc(乳腺癌)(图3B)和A375(黑素瘤)(图3C);中等B7-H3表达:22Rv1(前列腺癌)(图3D)、Detroit562(鼻咽癌)(图3E)和DU145(前列腺癌)(图3F);和低B7-H3表达:BxPC3(胰腺癌)(图1G)、SKMES-1(肺癌)(图3H)和U87(恶性胶质瘤)(图3I)。利用使用的抗B7-H3-PE抗体,Raji细胞(已知对于B7-H3表达是阴性的B-淋巴瘤细胞系)未显示任何荧光(图3J)。在评估的细胞系组上的B7-H3表达的范围提供了表征B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体(例如,DART-A)对于以各种水平的靶密度和源自不同人组织的肿瘤细胞系的生物学活性的基础。

[0403] 实施例3

[0404] 与B7-H3阳性癌症细胞系和表达CD3的T细胞的结合

[0405] 检测示例性B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体它们的双特异性结合能力。通过FACS分析评估四种表达B7-H3的肿瘤细胞系(A948、JIMT-1/Luc、Detroit562和22Rv1)和人原代T细胞的DART-A细胞表面结合。因为DART-A结合CD3,不使用CD3作为T细胞的标记物,取而代之地,使用CD4和CD8的组合作为T细胞标记物。因此,在该研究中,当使用原代人白细胞时,组合的CD4+加CD8+设门的(gated)事件表示T细胞群体。

[0406] 在用 $10\mu\text{g/mL}$ 的DART-A孵育之后,使用识别DART-A蛋白质的E-螺旋/K-螺旋(EK)异源二聚体促进结构域的抗EK-螺旋抗体检测靶癌症细胞系和T细胞上结合细胞的DART-A。DART-A显示对表达人B7-H3的肿瘤细胞(图4A-4D)和表达CD3的T细胞(图4E)的结合。在类似的研究中,发现DART-B、DART-C和DART-D也具有双特异性结合能力。

[0407] 实施例4

[0408] 以纯化的人T细胞作为效应细胞对多种靶癌症细胞系的CTL活性

[0409] 在确认与表达CD3的T细胞和表达B7-H3的肿瘤细胞二者的结合之后(见实施例3),使用9种人肿瘤细胞系(A498、JIMT-1/Luc、A375、U87、DU145、BxPC-3、SKMES-1、Detroit562和22Rv1)作为靶细胞和正常人T细胞作为效应细胞,体外评估B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体-介导的对表达B7-H3的靶细胞的重定向T细胞杀伤。使用定量测量LDH的酶活性的LDH释放试验测定细胞毒性,LDH是在细胞死亡后从细胞释放的一种稳定的细胞溶质酶。因

为LDH试验测量来自包含靶细胞和效应细胞的孔的上清液中的LDH活性,因此存在来自效应细胞死亡的干扰的可能性。因此,为了确认在LDH释放试验中测量的细胞毒性对B7-H3xCD3双特异性单价Fc双抗体-介导的对靶细胞的重定向杀伤是特异性的,还利用发光(LUM)试验评估细胞毒性。在该试验形式中,测量被转染和选择来稳定表达荧光素酶基因的靶细胞(JIMT-1/Luc细胞)的荧光素酶活性,并且用于计算在试验结束时残留的有生活力的靶细胞。FITC x CD3双特异性单价Fc双抗体(命名为“对照DART”)在这些研究中用作对照蛋白质。FITC x CD3双特异性单价Fc双抗体是一种抗荧光素(FITC) x抗CD3双抗体蛋白,其中抗CD3结合组分与B7-H3xCD3双特异性单价Fc双抗体中的相同,但是抗FITC组分代表不相干的结合靶。因此,FITC xCD3双特异性单价Fc双抗体将接合(engage)T细胞上的CD3,但是预期不将它们与靶细胞共接合。使用GraphPad Prism 6软件,通过将数据拟合至3-参数sigmoidal剂量响应函数的曲线测定EC50值。

[0410] 使用纯化的人T细胞作为效应细胞(E:T细胞比=5:1),DART-A介导对表达B7-H3的靶细胞有效的、特异性的、重定向杀伤。利用代表性供体T细胞,对靶细胞的DART-A剂量依赖性杀伤显示在图5A-5J中,并且EC50值和最大细胞毒性百分数(E_{max})呈现在表3中。在评估的9种靶细胞系中观察到范围从47至1275ng/mL的DART-A EC50浓度,其中JIMT-1/Luc是最敏感的细胞系(EC50=47ng/mL)。使用特异性测量存活的JIMT-1/Luc靶细胞的LUM试验观察到几乎全部的肿瘤细胞杀伤(见图5C)。DART-A活性一般与B7-H3表达相关,因为对于具有更高B7-H3表达的靶细胞系观察到更低的EC50值。在评估的最高浓度(10,000ng/mL),用对照DART观察到最小活性或没有观察到活性。B7-H3阴性CHO细胞(图5K)或Raji细胞(图5L)中在存在DART-A的情况下没有观察到细胞毒性,确认了DART-A活性对于表达B7-H3的靶细胞的特异性。

[0411]

表 3 在 5:1 的 E:T 细胞之比, 对于重定向杀伤靶细胞系, DART-A 的代表性 E _{max} 和 EC ₅₀ 浓度				
靶细胞系	肿瘤类型	E _{max} (%)	EC ₅₀ (ng/mL)	B7-H3 表达
JIMT-1/Luc	乳腺癌	78	47	高
A498	肾癌	80	64	高
DU145	前列腺癌	57	84	中等
A375	黑素瘤	49	97	高
U87	恶性胶质瘤	79	99	低
BxPC-3	胰腺癌	54	196	低
22Rv1	前列腺癌	34	212	中等
SKMES-1	肺癌	73	319	低
Detroit562	鼻咽癌	31	1275	中等
Raji	B-淋巴瘤	无活性		阴性
CHO	正常的中国仓鼠卵巢	无活性		阴性

[0412] 使用许多不同靶细胞系,包括A498和JIMT-1,用DART-C和DART-D进行类似的研究,

表明这两种分子具有类似的最大裂解水平 ($E_{\max}$)，但是在介导重定向细胞杀伤方面，其效力平均是DART-A的20倍。也使用许多不同的靶细胞系包括A498、THP-1和DU145测试了DART-B，其效力平均是DART-A的6倍。

[0413] 实施例5

[0414] DART-A在不同效应细胞:靶细胞 (E:T) 比的CTL活性

[0415] 为了证明E:T细胞比与B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体-介导的重定向杀伤的关系，以10:1 (图6A和6B)、5:1 (图6C和6D) 和1:1 (图6E和6F) 的E:T细胞比，在使用A498 (图6A, 6C和6E) 和A375 (图6B, 6D和6F) 靶细胞和纯化的人T细胞作为效应细胞的LDH试验中，进一步评估DART-A的CTL活性。DART-A在10:1 (图6A和6B) 的E:T细胞比显示最高的效力 (EC_{50}) 和最大的细胞毒性百分数 ($E_{\max}$)，并且效力和最大细胞毒性随着E:T细胞比的下降而降低 (图6A-6F和表4)。但是，甚至在评估的最低E:T细胞比 (1:1) 观察到了特异性活性，尽管程度较低 (图6E和6F和表4)。

[0416]

表 4 在不同的 E:T 细胞比，DART-A 重定向杀伤靶细胞系的 $E_{\max}$ 和 EC_{50} 浓度						
靶细胞系	E:T = 10:1		E:T = 5:1		E:T = 1:1	
	$E_{\max}$ (%)	EC_{50} (ng/mL)	$E_{\max}$ (%)	EC_{50} (ng/mL)	$E_{\max}$ (%)	EC_{50} (ng/mL)
A498	83.91	27.2	73.56	42.51	36.3	128.5
A375	41.5	165.6	38.1	242.7	11.01	352.5

[0417] 实施例6

[0418] B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体-介导的T细胞激活取决于靶细胞接合 (engagement)

[0419] 在人T细胞中 (单独地或在存在表达B7-H3的靶细胞 (A498) 的情况下) 以10:1的E:T细胞比，评估B7-H3xCD3双特异性单价Fc双抗体诱导的T细胞激活的水平。使用DART-A的这些研究的结果显示在图7中。流式细胞术分析揭示，在存在表达B7-H3的靶细胞 (图7B-7D) 的情况下，CD4⁺ (图7B和7D) 和CD8⁺ (图7C和7E) T细胞亚组上CD25 (图7B和7C) 和CD69 (图7D和7E) T细胞激活标记物通过DART-A以剂量依赖性方式上调。DART-A-介导的T细胞激活与靶细胞的细胞毒性相关 (图7A)。

[0420] 在使用DART-A或对照DART的所有评估的浓度，在不存在表达B7-H3的靶细胞 (图7B-7E) 的情况下，仅仅用T细胞没有观察到T细胞激活。这些数据提示，B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体比如DART-A介导的T细胞激活依赖于效应细胞—靶细胞共接合。此外，在CTL试验中，当单独的T细胞与DART-A (图7B-7E) 或对照DART孵育时，没有观察到细胞毒性。相反，在存在靶细胞的情况下观察到显著的DART-A-介导的细胞毒性 (图7A)。在使用DART-B、DART-C或DART-D进行的类似的研究中发现了相当的结果。

[0421] 实施例7

[0422] 当靶细胞共接合时，B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体-介导的T细胞增殖

[0423] 先前已经报道了与双特异性抗体诱导的CTL活性相关的T细胞扩展 (expansion) (Klinger M等 (2012) “Immunopharmacologic Response Of Patients With B-Lineage

Acute Lymphoblastic Leukemia To Continuous Infusion Of T Cell-Engaging CD19/CD3-Bispecific BiTE Antibody Blinatumomab,”Blood 119 (26):6226-6233)。因此,在观察到用B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体的治疗导致伴随T细胞激活标记物增加的靶细胞的剂量依赖性消耗之后,评估用靶细胞和B7-H3x CD3双特异性单价Fc双抗体培养的T细胞的扩展。为了这样做,用CFSE标记人PBMC并且与A498靶细胞以10:1的E:T细胞比在存在浓度为10 μ g/mL的DART-A或对照DART的情况下共培养72或96小时。由于每次细胞分裂使后代细胞中包含的染料水平减半,因此通过经FACS分析测量CFSE随着时间推移的水平而监测CFSE标记的T细胞的增殖。图8A (72小时) 和图8B (96小时) 显示,在存在DART-A或对照DART和靶细胞的情况下开始共培养之后孵育之后的CFSE-染色曲线。DART-A的存在导致CFSE标记的T细胞的增殖,其中在孵育72小时之后增殖的百分数是约45% (图8A) 和96小时之后是约73% (图8B)。相反,在存在对照DART的情况下没有观察到CFSE标记的T细胞的增殖 (图8A和8B)。

[0424] 实施例8

[0425] 与人和食蟹猴表达B7-H3的CHO细胞的结合和重定向杀伤的表征

[0426] 为了确认DART-A与食蟹猴B7-H3的交叉反应能力,通过流式细胞术评估用人B7-H3 (huB7-H3-CHO) (图9A) 或食蟹猴B7-H3 (cyno-B7-H3-CHO) (图9B) 转染的CHO细胞的DART-A结合。从10 μ g/mL开始,用5倍降低浓度的DART-A或对照DART蛋白质处理细胞,并且使用抗Eκ-螺旋抗体检测结合细胞的DART-A。图9A和9B分别显示了DART-A与表达人B7-H3的和表达食蟹猴B7-H3的CHO细胞的浓度依赖性结合。

[0427] 为了使用表达人B7-H3或食蟹猴B7-H3的CHO细胞评估B7-H3xCD3双特异性单价Fc双抗体-介导的重定向杀伤,用不同浓度的DART-A在存在人T细胞的情况下以5:1的E:T细胞比孵育细胞。如图9C和9D中显示,对于表达食蟹猴 (图9C) 和人 (图9D) B7-H3的CHO细胞,都观察到了有效的DART-A-介导的杀伤。

[0428] 实施例9

[0429] 以食蟹猴PBMC作为效应细胞,B7-H3X CD3双特异性单价Fc双抗体-介导的对靶细胞的重定向杀伤

[0430] 通过流式细胞术评估与食蟹猴T细胞的DART-A结合,其中DART-A的结合描绘在设门的CD4⁺和CD8⁺T细胞群体中。与食蟹猴T细胞 (图10A) 的DART-A结合和与人T细胞 (图10B) 的结合类似。

[0431] 在确认了DART-A与食蟹猴T细胞的交叉反应性之后,使用食蟹猴PBMC评估DART-A-介导的离体CTL活性。将DART-A或对照DART添加至与表达B7-H3的靶细胞 (JIMT-1/Luc (图11A和11B) 或A498 (图11C)) 混合的食蟹猴PBMC中,E:T细胞比是30:1,并且孵育24小时。如图11A-11C中显示,使用食蟹猴PBMC作为针对表达人B7-H3的靶细胞系的效应细胞观察到剂量依赖性DART-A-介导的离体细胞毒性。

[0432] 实施例10

[0433] 22Rv1人前列腺癌的共混异种移植模型

[0434] 根据RosetteSep T细胞分离试剂盒 (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) 中提供的制造商的方案,从肝素化全血分离人T细胞。随后通过将细胞暴露于抗CD3 (OKT-3; 1 μ g/mL) 和抗CD28 (66 μ g/mL) 抗体或暴露于抗CD3/CD28 Dynabeads (1:1比例) 达48小

时的时间而激活纯化的T细胞。刺激之后,使细胞在具有10%FBS和1%青霉素/链霉素的RPMI 1640培养基中在存在IL2(7.6ng/mL)的情况下生长长达3周。

[0435] 将人T细胞(1×10^6)和22Rv1肿瘤细胞(5×10^6)组合,并且在再悬浮在200 μ L的Ham's F12培养基中之后,在第0天皮下(SC)注射。在22Rv1肿瘤细胞和T细胞植入之后,用媒介对照(●)、对照DART(0.5mg/kg)(○)或DART-A以4种不同的剂量水平(0.004(◆)、0.02(▼)、0.1(▲)或0.5(■)mg/kg)IV处理小鼠,每天一次,持续4天,从肿瘤细胞植入的当天开始(第0、1、2和3天)。

[0436] 如图12中所显示,在第0天至3天以0.1(▲)或0.5(■)mg/kg的剂量水平每天一次用DART-A经IV治疗之后,22Rv1肿瘤细胞的生长被延迟和抑制。尽管在0.02mg/kg(▼)DART-A剂量水平,肿瘤生长被部分抑制,但是未达到显著水平。在0.004mg/kg(◆)DART-A剂量水平没有记录到肿瘤生长的抑制。

[0437] 实施例11

[0438] A498人肾癌的共混异种移植模型

[0439] 如上分离和制备人T细胞。将人T细胞(1×10^6)和A498肿瘤细胞(5×10^6)组合,并且在再悬浮在200 μ L的Ham's F12培养基中之后,在第0天SC注入。在A498肿瘤细胞和T细胞植入之后,用媒介对照(●)、对照DART(0.5mg/kg)(○)或DART-A以4种不同的剂量水平(0.004(◆)、0.02(▼)、0.1(▲)或0.5(■)mg/kg)每天一次IV处理小鼠,持续4天,从肿瘤细胞植入当天开始(第0、1、2和3天)。

[0440] 如图13中所显示,在存在激活的人T细胞的情况下,甚至在对照动物中,在第0天注入的A498肿瘤细胞显示一些初始肿瘤收缩(是肿瘤适应体内环境的结果。但是,在稍后的时间点,在接收媒介对照(●)和对照DART(○)以及在第0、1、2和3天用0.004(◆)或0.02(▼)mg/kg DART-A每天治疗一次的动物中,记录到了活跃的肿瘤生长,与对照动物相比没有肿瘤生长的抑制。在以0.1(▲)或0.5(■)mg/kg剂量水平的DART-A进行IV治疗之后,肿瘤生长被延迟和抑制。

[0441] 实施例12

[0442] 人PBMC-重构小鼠中建立的A498人肾癌模型

[0443] 为了评估DART-A对NSG B2m^{-/-}小鼠中建立的肿瘤异种移植物的活性,采用人效应细胞-重构的模型。该模型也提供这样的环境:其中抗肿瘤活性取决于通过DART-A向建立的肿瘤募集植入的人T细胞。

[0444] 雌性NSG B2m^{-/-}小鼠(Jackson Laboratory)用于建立的肿瘤研究(n=7-8/组)。采用I类MHC表达受损的 β -2微球蛋白(B2m)敲除小鼠,以便延迟和最小化与移植人外周血液单核细胞(PBMC)相关的移植物抗宿主疾病(GVHD)的发生和严重程度。但是,应注意,这些小鼠中B2m表达的缺失也与FcRn的受损表达相关(Israel, E. J. 等(1996) "Increased clearance of IgG in mice that lack beta 2-microglobulin: possible protective role of FcRn," Immunology 89:573-578)。因此,预期DART-A在这些小鼠中的半衰期比在野生型小鼠或灵长类中的半衰期更短。基于之前在该小鼠品系中用包括人Fc区域的分子的研究,采用每2至4天一次的给药频率,以确保在这些研究中的充分暴露。

[0445] 根据制造商的方案,使用Ficoll-Paque从肝素化全血中分离人PBMC。将A498肿瘤细胞(5×10^6 活力细胞)再悬浮在100 μ L的Ham's F12中,并且在第0天皮内(ID)注入,随后在

第13天腹腔内 (IP) 注射 (200 μ L, 盐水) 人PBMC (1×10^7 活力细胞)。关于肿瘤细胞植入, PBMC 接种的时机与肿瘤细胞的生长速度相关, 并且凭经验确定, 以便获得最佳的人效应细胞重构以及在随机化和治疗启动时约150–300mm³的肿瘤尺寸。治疗周期是在第33、35、36、39、41、43、46、48和50天, 总共9个IV施用的剂量, 包括媒介对照、对照DART (1mg/kg), 或4种不同剂量水平的DART-A (0.001、0.01、0.1或1mg/kg)。

[0446] 在治疗启动前的第32天, A498肿瘤已经达到平均约250mm³的体积 (图14)。在接受1mg/kg (■) DART-A的组中, 肿瘤体积从在第32天的242 $\pm$ 19mm³退化至第39天的106 $\pm$ 35mm³。在接受0.1mg/kg (▲) DART-A的组中, 肿瘤体积减少较小 (249 $\pm$ 25至181 $\pm$ 87mm³), 而在0.01mg/kg (▼) 组中, 在相同的间隔 (第32天至第39天) 内存在白细胞淤积的阶段。在1mg/kg (■) DART-A组中, 5/7的动物中肿瘤生长继续退化, 但是在研究结束时 (第53天), 在剩余的2个动物中复发。研究结束时, 在0.1 (▲) 和0.01 (▼) mg/kg组中, 肿瘤生长分别在5/7和4/7动物中保持退化。肿瘤生长的发展对于所有用0.001 (◆) mg/kg DART-A治疗的动物是明显的。用媒介对照 (●) 或对照DART (○) 没有记录到对肿瘤生长的作用。

[0447] 人PBMC-重构的小鼠中的A498人肾癌模型也用于评估以0.02、0.1或0.5mg/kg给与的DART-B、对照DART (0.5mg/kg) 或媒介对照的活性。用DART-B治疗的动物在所有剂量均显示实质性的肿瘤生长的抑制, 而用媒介对照或对照DART没有记录到对肿瘤生长的作用。

[0448] 实施例13

[0449] 人PBMC-重构的小鼠中建立的Detroit562人鼻咽癌模型

[0450] 如上述制备人PBMC。将Detroit562肿瘤细胞 (5×10^6 活力细胞) 再悬浮在100 μ L的Ham's F12中, 并且在第0天ID注入。在NSG B2m^{-/-}小鼠中, 在肿瘤细胞植入前一天, 第-1天, 通过IP注射 (200 μ L, 盐水) 植入人PBMC (1×10^7 活力细胞)。治疗周期是在第20、22、23、26、28、30、33、35和37天, 总共9个IV施用的剂量, 并且包括媒介对照、对照DART (0.5mg/kg), 或4种不同剂量水平 (0.1、0.25、0.5或1mg/kg) 的DART-A。

[0451] 在治疗启动之前第19天, Detroit562肿瘤已经达到约150mm³的肿瘤体积 (图15)。以1 (■)、0.5 (▲) 和0.25 (▼) mg/kg剂量水平接受DART-A的组中的肿瘤的尺寸在治疗期间下降, 其中对于0.25 (▼) mg/kg组, 在第27天达到最低点 (106 $\pm$ 21mm³) (图15)。对于1 (■) 和0.5 (▲) mg/kg组, 在研究的最后一天, 第37天, 观察到最大的肿瘤减小, 其中平均肿瘤体积分别是32 $\pm$ 6和47 $\pm$ 7mm³ (图15)。在0.1 (◆) mg/kg DART-A组中, 对于最大肿瘤体积 (258 $\pm$ 37mm³) 观察到降低的肿瘤生长, 其与研究结束时 (第37天) 对照DART (○) (347 $\pm$ 36mm³) 和媒介 (390 $\pm$ 42mm³) 组的相比降低 (图15)。

[0452] 实施例14

[0453] 人PBMC-重构的小鼠给药研究中建立的Detroit562人鼻咽癌模型

[0454] 为了评估DART-A对MHC11^{-/-}小鼠中建立的肿瘤异种移植物的活性, 采用人效应细胞-重构的模型。该模型也提供这样的环境: 其中抗肿瘤活性取决于通过DART-A向建立的肿瘤募集植入的人T细胞。在这些研究中, 检验每周一次和每两周一次 (即, 每隔一周一次) 给药方案。

[0455] 如上述制备人PBMC。将Detroit562肿瘤细胞 (5×10^6 活力细胞) 再悬浮在50 μ L的Ham's F12培养基中, 并且与50 μ L的基质胶组合, 并且然后在第0天皮内 (ID) 注入。在第0天, 在MHC11^{-/-}小鼠中, 通过IP注射 (200 μ L, Ham's F12培养基) 植入人PBMC (1×10^7 活力细胞)。

治疗周期在第15天启动。在第15、22、29、36和43天,组I小鼠被施用DART-A (0.5mg/kg),每周一次(Q1W),总共5个IV施用的剂量。在第15、29和43天,组II小鼠被施用DART-A (0.5mg/kg),每两周一次(Q2W),总共3个IV施用的剂量。媒介对照动物每周一次给药。

[0456] 在治疗启动之前的第14天,Detroit562肿瘤的范围是 $200.49 \pm 15.58 \text{mm}^3$ 至 $287.5 \pm 48.79 \text{mm}^3$ 。与媒介处理的动物(●)(图16A和16B)相比,组I和II(▲)中的DART-A处理的动物中肿瘤的尺寸在治疗期间下降。在组I中,DART-A处理的动物,在第45天,对于[最大]肿瘤体积($24.3 \pm 9.5 \text{mm}^3$)观察到降低的肿瘤生长,其与用媒介处理的动物在第31天($801.9 \pm 155.5 \text{mm}^3$)的相比降低(图16A)。在组II中,DART-A处理的动物,对于[最大]肿瘤体积($47.6 \pm 28.5 \text{mm}^3$)观察到降低的肿瘤生长,其与用媒介处理的动物在第31天($801.9 \pm 155.5 \text{mm}^3$)的相比降低(图16B)。

[0457] 实施例15

[0458] 食蟹猴中的毒代动力学研究

[0459] 在食蟹猴中进行DART-A、DART-B、DART-C或DART-D的三个非GLP的初步探索性给药研究。在一个剂量递增研究中,两组食蟹猴($n=2/\text{组}; 1\text{M}/1\text{F}$)被施用0.5mg/kg的一个剂量,然后被施用三个每周一次剂量的1.0mg/kg的DART-A或DART-B。对于任一组均没有明显的发现,尽管在输注之后观察到了IL-6水平瞬时增加。没有与增加的细胞因子水平相关的明显临床观察。在研究过程期间检验DART-A和DART-B的血清浓度(图17)。如图17中显示,两种分子都展示可接受的药代动力学曲线。DART-A的血清水平在研究期间显示较少的变化。

[0460] 在单剂量研究中,两组食蟹猴($n=2/\text{组}; 1\text{M}/1\text{F}$)被施用一个剂量的0.5mg/kg的DART-D,或一个剂量的0.5mg/kg,然后三个每周一次剂量的1.0mg/kg的对照DART。用0.5mg/kg的DART-D处理的两组动物展示异常的临床信号。在进一步的研究中,四组食蟹猴($n=2/\text{组}; 1\text{M}/1\text{F}$)被施用四个每周一次剂量的0.075、0.15或0.3mg/kg的DART-D,或被施用四个每周一次剂量的0.5mg/kg的DART-C。在这些研究中,所有剂量均是耐受的。但是,在0.15和0.3mg/kg的DART-D,和0.5mg/kg的DART-C,对于血小板水平存在明显的瞬时作用。

[0461] 本说明书提到的所有出版物和专利通过参考并入本文,达到如同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相同程度。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,其能够被进一步修改,并且本申请旨在覆盖大体上根据本发明原理并且包括与本公开的偏离的本发明的任何变型、用途或改变,只要在本发明所属领域的已知或习惯实践内并且如可应用至本文之前所阐释的本质特征。

序列表

- <110> 宏观基因有限公司
莱斯利·S·约翰逊
保罗·A·摩尔
埃兹奥·泊韦尼
黄菱
K·沙哈
格兰德·R·齐齐利
- <120> 能够结合B7-H3和CD3的双特异性单价双抗体及其用途
- <130> 1301.0123PCT
- <150> US 62/206,051
- <151> 2015-08-17
- <160> 68
- <170> PatentIn 3.5版本
- <210> 1
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 连接体1
- <400> 1
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5
- <210> 2
- <211> 6
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 连接体2
- <400> 2
Gly Gly Cys Gly Gly Gly
1 5
- <210> 3
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 可选的连接体2

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly

1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 连接体3

<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> 异源二聚体促进结构域

<400> 6

Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys

1 5

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 异源二聚体促进结构域

<400> 7

Val Glu Pro Lys Ser Cys

1 5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 异源二聚体促进结构域

<400> 8

Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys

1 5

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 异源二聚体促进结构域

<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" 异源二聚体促进结构域

<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" 异源二聚体促进结构域

<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" 异源二聚体促进结构域		
<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" 异源二聚体促进结构域		
<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 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
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
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		
<220>		
<223> “携带杵的”人IgG1 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
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
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> “携带白的”人IgG1 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			

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

63

<213> 小家鼠
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (11)
<223> B7-H3 mAb A的轻链CDR1
<400> 18
Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn Val Ala
1 5 10
<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (7)
<223> B7-H3 mAb A的轻链CDR2
<400> 19
Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5
<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (9)
<223> B7-H3 mAb A的轻链CDR3
<400> 20
Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe Thr
1 5
<210> 21
<211> 122
<212> PRT
<213> 小家鼠
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (122)
<223> B7-H3 mAb A的重链可变结构域
<400> 21

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 Ser Phe
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Gly Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (5)

<223> B7-H3 mAb A的重链 CDR1

<400> 22

Ser Phe Gly Met His

1 5

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (17)

<223> B7-H3 mAb A的重链 CDR2

<400> 23

Tyr Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (13)

<223> B7-H3 mAb A的重链 CDR3

<400> 24

Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (107)

<223> B7-H3 mAb B的轻链可变结构域

<400> 25

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (11)

<223> B7-H3 mAb B的轻链CDR1

<400> 26

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (7)

<223> B7-H3 mAb B的轻链CDR2

<400> 27

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (9)

<223> B7-H3 mAb B的轻链CDR3

<400> 28

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro Thr

1 5

<210> 29

<211> 120

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (120)

<223> B7-H3 mAb B的重链可变结构域

<400> 29

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Ile Pro Arg Leu Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (5)

<223> B7-H3 mAb B的重链 CDR1

<400> 30

Ser Tyr Trp Met Gln

1 5

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (17)

<223> B7-H3 mAb B的重链 CDR2

<400> 31

Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (11)

<223> B7-H3 mAb B的重链 CDR3

<400> 32

Arg Gly Ile Pro Arg Leu Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (107)

<223> B7-H3 mAb C的轻链可变结构域

<400> 33

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (11)

<223> B7-H3 mAb C的轻链CDR1

<400> 34

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (7)

<223> B7-H3 mAb C的轻链CDR2

<400> 35

Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (9)

<223> B7-H3 mAb C的轻链CDR3

<400> 36

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro Thr

1 5

<210> 37

<211> 120

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (120)

<223> B7-H3 mAb C的重链可变结构域

<400> 37

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Ile Pro Arg Leu Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 38

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (5)

<223> B7-H3 mAb C的重链 CDR1

<400> 38

Ser Tyr Trp Met Gln

1 5

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (17)

<223> B7-H3 mAb C的重链 CDR2

<400> 39

Thr Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (11)

<223> B7-H3 mAb C的重链 CDR3

<400> 40

Arg Gly Ile Pro Arg Leu Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 41

<211> 110

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (110)

<223> CD3 mAb A的轻链可变结构域

<400> 41

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

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys 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> 42

<211> 14

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (14)

<223> CD3 mAb A的轻链CDR1

<400> 42

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn

1 5 10

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (7)

<223> CD3 mAb A的轻链CDR2

<400> 43

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (9)

<223> CD3 mAb A的轻链CDR3

<400> 44

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val

1 5

<210> 45

<211> 125

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (125)

<223> CD3 mAb A的重链可变结构域

<400> 45

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 Asp 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> 46

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (5)

<223> CD3 mAb A的重链 CDR1

<400> 46

Thr Tyr Ala Met Asn

1 5

<210> 47

<211> 19

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (19)

<223> CD3 mAb A的重链CDR2

<400> 47

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

1 5 10 15

Val Lys Asp

<210> 48

<211> 14

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (14)

<223> CD3 mAb A的重链CDR3

<400> 48

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

1 5 10

<210> 49

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 在Kabat位置65含有天冬氨酸至甘氨酸取代的CD3 mAb A的重链 CDR3

<400> 49

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

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 50

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 在Kabat位置65含有天冬氨酸至甘氨酸取代的CD3 mAb A的重链可变结构域

<400> 50

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> 51

<211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 连接体4
 <400> 51
 Ala Pro Ser Ser Ser
 1 5
 <210> 52
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 可选的连接体4
 <400> 52
 Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu
 1 5
 <210> 53
 <211> 504
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> B7-H3 x CD3 双特异性DART-A双抗体的第一多肽链
 <400> 53
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

115	120	125
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe		
130	135	140
Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
145	150	155
Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr		
165	170	175
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser		
180	185	190
Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr		
195	200	205
Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val		
210	215	220
Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
225	230	235
Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala		
245	250	255
Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu		
260	265	270
Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
275	280	285
Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		
290	295	300
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
305	310	315
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val		
325	330	335
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
340	345	350
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		
355	360	365
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
370	375	380
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
385	390	395
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr		
405	410	415
Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
420	425	430

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 435 440 445
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 450 455 460
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 465 470 475 480
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 485 490 495
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 500

<210> 54

<211> 1512

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码B7-H3 x CD3 双特异性DART-A双抗体的第一多肽链的多核苷酸

<400> 54

gacatccagc	tgacccagtc	cccctccttc	ctgtctgcct	ccgtgggcga	cagagtgacc	60
atcacatgca	aggcctccca	gaacgtggac	accaacgtgg	cctggtatca	gcagaagcct	120
ggcaaggccc	ctaaggcgct	gatctactcc	gcctcctacc	ggtactccgg	cgtgcettcc	180
aggttctccg	gctccggctc	tggcaccgac	ttcacctga	ccatctccag	cctgcagcct	240
gaggacttcg	ccacctacta	ctgccagcag	tacaacaact	accctttcac	cttcggccag	300
ggcaccaagc	tggaaatcaa	gggaggcgga	tccggcgggc	gaggcgaggt	gcagctgggtg	360
gagtctgggg	gaggcttggg	ccagcctgga	gggtccctga	gactctcctg	tgcagcctct	420
ggattcacct	tcagcacata	cgctatgaat	tgggtccgcc	aggctccagg	gaaggggctg	480
gagtgggttg	gaaggatcag	gtccaagtac	aacaattatg	caacctacta	tgccgactct	540
gtgaaggata	gattcaccat	ctcaagagat	gattcaaaga	actcactgta	tctgcaaatg	600
aacagcctga	aaaccgagga	cacggccgtg	tattactgtg	tgagacacgg	taacttcggc	660
aattcttacg	tgtcttggtt	tgtttattgg	ggacagggga	cactggtgac	tgtgtcttcc	720
ggaggatgtg	gcggtggaga	agtggccgca	ctggagaaag	aggttgctgc	tttggagaag	780
gaggtcgctg	cacttgaaaa	ggaggtcgca	gccttgagga	aaggcggcgg	ggacaaaact	840
cacacatgcc	caccgtgccc	agcacctgaa	gccgcggggg	gaccgtcagt	cttctcttcc	900
ccccaaaac	ccaaggacac	cctcatgate	tcccggacce	ctgaggtcac	atgcgtgggtg	960
gtggacgtga	gccacgaaga	ccctgaggtc	aagttcaact	ggtacgtgga	cggcgtggag	1020
gtgcataatg	ccaagacaaa	gccgcgggag	gagcagtaca	acagcacgta	ccgtgtggtc	1080
agcgtcctca	ccgtcctgca	ccaggactgg	ctgaatggca	aggagtacaa	gtgcaaggtc	1140
tccaacaaag	ccctcccagc	ccccatcgag	aaaaccatct	ccaaagccaa	agggcagccc	1200
cgagaaccac	aggtgtacac	cctgccccca	tcccgggagg	agatgaccaa	gaaccaggtc	1260
agcctgtggg	gcctgggtcaa	aggtttctat	cccagcgaca	tcgccgtgga	gtgggagagc	1320

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1380
 ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1440
 tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1500
 tctccgggta aa 1512

<210> 55

<211> 274

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> B7-H3 x CD3 双特异性DART-A双抗体的第二多肽链

<400> 55

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 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 130 135 140

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ala Ile
 165 170 175

Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 180 185 190

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp
 195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly
 210 215 220

Ser Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235 240
 Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala
 245 250 255
 Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
 260 265 270

Lys Glu

<210> 56

<211> 822

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码B7-H3 x CD3 双特异性DART-A双抗体的第二多肽链的多核苷酸

<400> 56

caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60
 acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag 120
 aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc gggggtacaa acaaaagggc tccctggacc 180
 cctgcacggg tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240
 caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300
 ggggggtggc caaaactgac tgtgctggga gggggtggat ccggcggcgg aggcgaggtg 360
 cagctggtcg agtctggcgg aggactggtg cagcctggcg gctccctgag actgtcttgc 420
 gccgcctccg gcttcacctt ctccagcttc ggcatgcaact gggtcgcga ggctccaggc 480
 aagggactgg aatgggtggc ctacatctcc tccgactcct ccgccatcta ctacgccgac 540
 accgtgaagg gcaggttcac catctcccgg gacaacgcca agaactccct gtacctgcag 600
 atgaactccc tgcgggacga ggacaccgcc gtgtactact gcggcagagg ccgggagaat 660
 atctactacg gctcccggct ggattattgg ggccagggca ccaccgtgac cgtgtcctcc 720
 ggaggatgtg gcggtggaaa agtggccgca ctgaaggaga aagttgctgc tttgaaagag 780
 aaggtcgccg cacttaagga aaaggtcgca gccctgaaag ag 822

<210> 57

<211> 227

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> B7-H3 x CD3 双特异性DART-A双抗体的第三多肽链

<400> 57

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
 165 170 175
 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> 58

<211> 681

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码B7-H3 x CD3 双特异性DART-A双抗体的第三多肽链的多核苷酸

<400> 58

gacaaaactc acacatgccc accgtgccc	gcacctgaag ccgcgggggg accgtcagtc	60
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc	ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca	120
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac	cctgaggtea agttcaactg gtacgtggac	180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaaag	ccgcgggagg 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 cgcagtcaaa ggctttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctccctgt gctggactcc 540
gacggctcct tcttcctcgt cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accgctacac gcagaagagc 660
ctctccctgt ctccgggtaa a 681

<210> 59

<211> 504

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> B7-H3 x CD3 双特异性DART-B双抗体的第一多肽链

<400> 59

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val		
210	215	220
Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
225	230	235 240
Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala		
245	250	255
Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu		
260	265	270
Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
275	280	285
Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		
290	295	300
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
305	310	315 320
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val		
325	330	335
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
340	345	350
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		
355	360	365
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
370	375	380
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
385	390	395 400
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr		
405	410	415
Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
420	425	430
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
435	440	445
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
450	455	460
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe		
465	470	475 480
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
485	490	495
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
500		

<210> 60

<211> 272
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> B7-H3 x CD3 双特异性DART-B双抗体的第二多肽链
 <400> 60
 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 Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
 115 120 125
 Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 130 135 140
 Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 145 150 155 160
 Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr
 165 170 175
 Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys
 180 185 190
 Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 195 200 205
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Ile Pro Arg Leu Trp Tyr
 210 215 220
 Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 225 230 235 240
 Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
 245 250 255
 Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu

260	265	270
<210> 61		
<211> 504		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> B7-H3 x CD3 双特异性DART-C双抗体的第一多肽链		
<400> 61		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1 5 10 15		
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr		
20 25 30		
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
35 40 45		
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50 55 60		
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65 70 75 80		
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro		
85 90 95		
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly		
100 105 110		
Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln		
115 120 125		
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe		
130 135 140		
Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
145 150 155 160		
Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr		
165 170 175		
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser		
180 185 190		
Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr		
195 200 205		
Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val		
210 215 220		
Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
225 230 235 240		
Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala		

245	250	255
Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu		
260	265	270
Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
275	280	285
Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		
290	295	300
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
305	310	315
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val		
325	330	335
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
340	345	350
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		
355	360	365
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
370	375	380
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
385	390	395
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr		
405	410	415
Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
420	425	430
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
435	440	445
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
450	455	460
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe		
465	470	475
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
485	490	495
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
500		

<210> 62

<211> 272

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> B7-H3 x CD3 双特异性DART-C双抗体的第二多肽链

<400> 62

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 Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
 115 120 125
 Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 130 135 140
 Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 145 150 155 160
 Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Asp Thr
 165 170 175
 Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys
 180 185 190
 Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 195 200 205
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Ile Pro Arg Leu Trp Tyr
 210 215 220
 Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 225 230 235 240
 Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
 245 250 255
 Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
 260 265 270

<210> 63

<211> 503

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> B7-H3 x CD3 双特异性DART-D双抗体的第一多肽链

<400> 63

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

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

<210> 64

<211> 271

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> B7-H3 x CD3 双特异性DART-D双抗体的第二多肽链

<400> 64

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
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly		
	100	105
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu		
	115	120
Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly		
	130	135
Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly		
145	150	155
Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Asp Thr		
	165	170
Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys		
	180	185
Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp		
	195	200
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Ile Pro Arg Leu Trp Tyr		
	210	215
Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser		
225	230	235
Thr Lys Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys		
	245	250
Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu		
	260	265
		270

<210> 65

<211> 112

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (112)

<223> 抗-荧光素抗体4-4-20的轻链可变结构域

<400> 65

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

<210> 66

<211> 118

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (118)

<223> 抗-荧光素抗体4-4-20的重链可变结构域

<400> 66

Glu Val Lys Leu Asp Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Pro Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Met Gly Ile Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Gly Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

- <210> 67
 <211> 509
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗-荧光素双抗体 (对照DART) 的第一多肽
 <400> 67

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	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Gly	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
Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys		
275	280	285
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu		
290	295	300
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
305	310	315
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys		
325	330	335
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
340	345	350
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
355	360	365
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
370	375	380
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
385	390	395
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
405	410	415
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys		
420	425	430
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
435	440	445
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		
450	455	460
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
465	470	475
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
485	490	495
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
500	505	
<210>	68	
<211>	270	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	抗-荧光素双抗体 (对照DART) 的第二多肽	
<400>	68	

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	Gly	Gly	Cys	Gly
225					230					235				240	
Gly	Gly	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu
			245					250					255		
Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu		
		260						265					270		

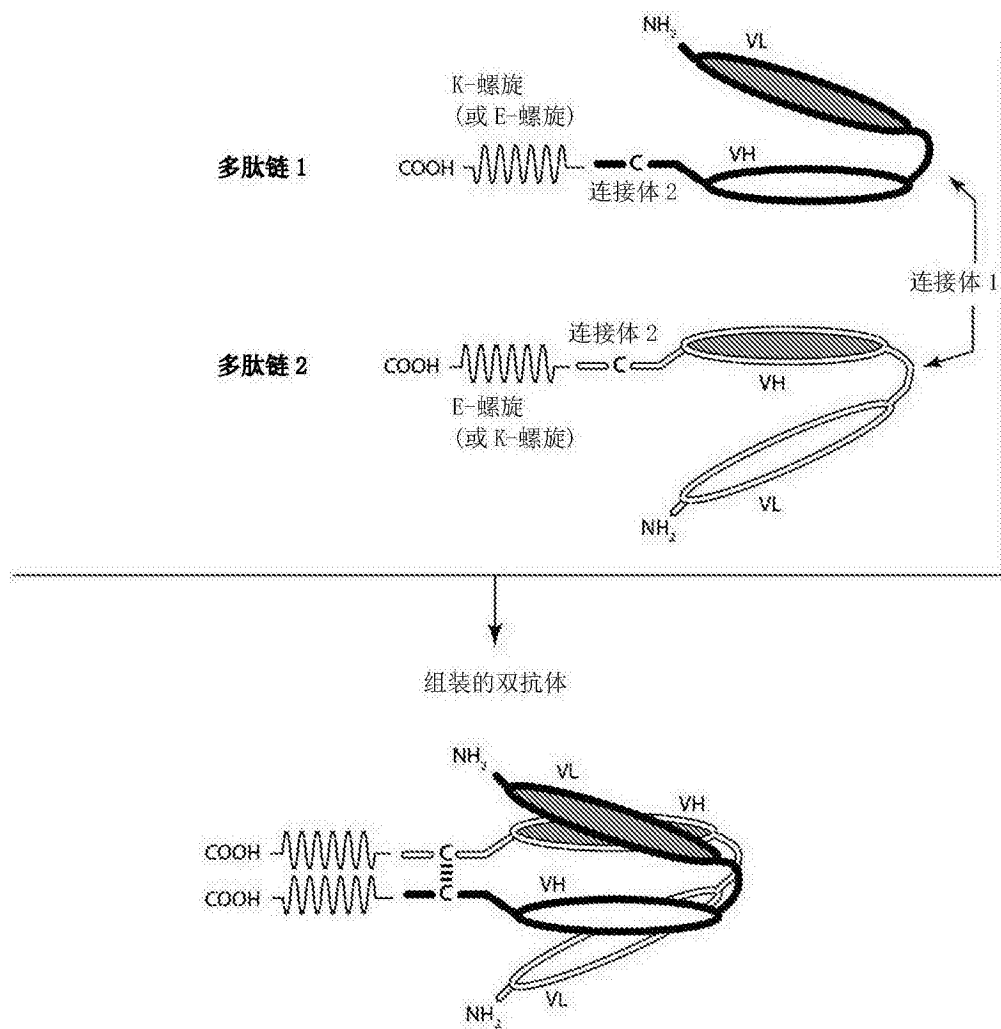


图1

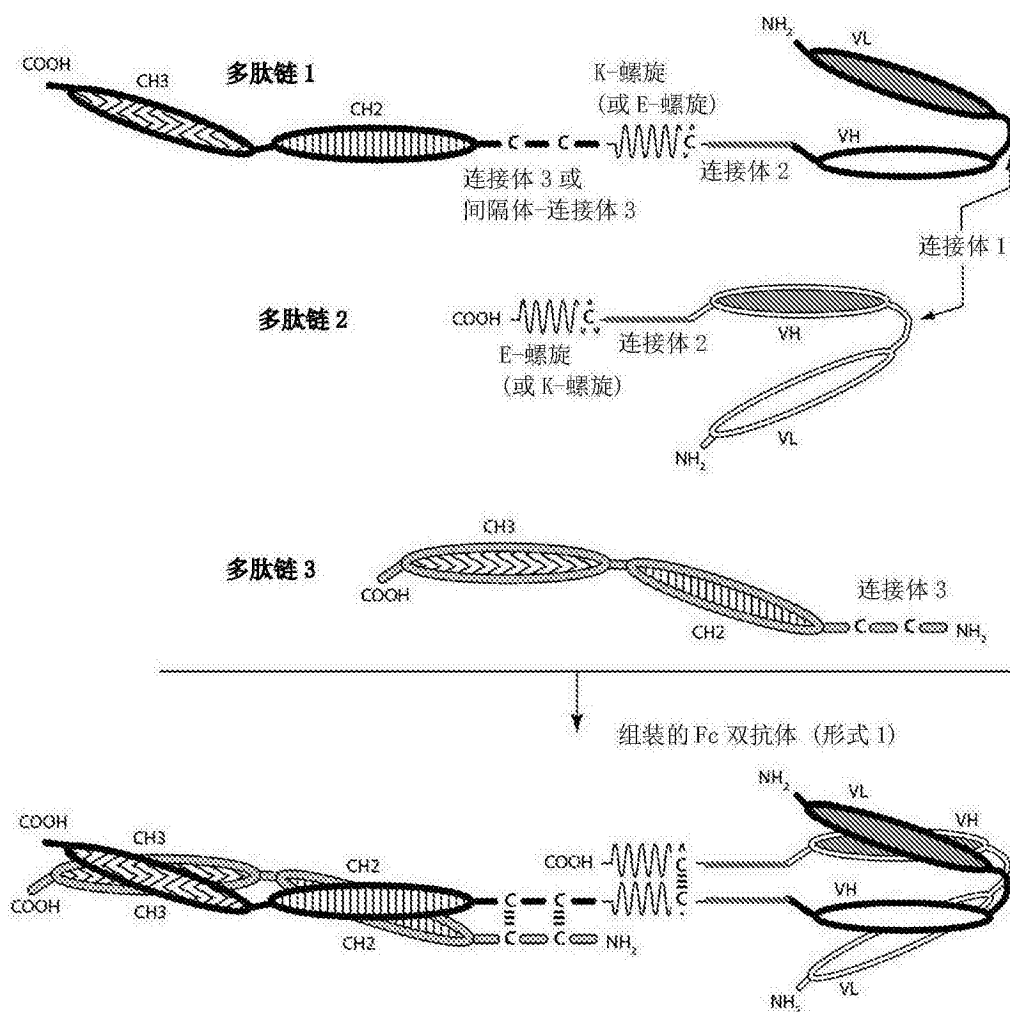


图2A

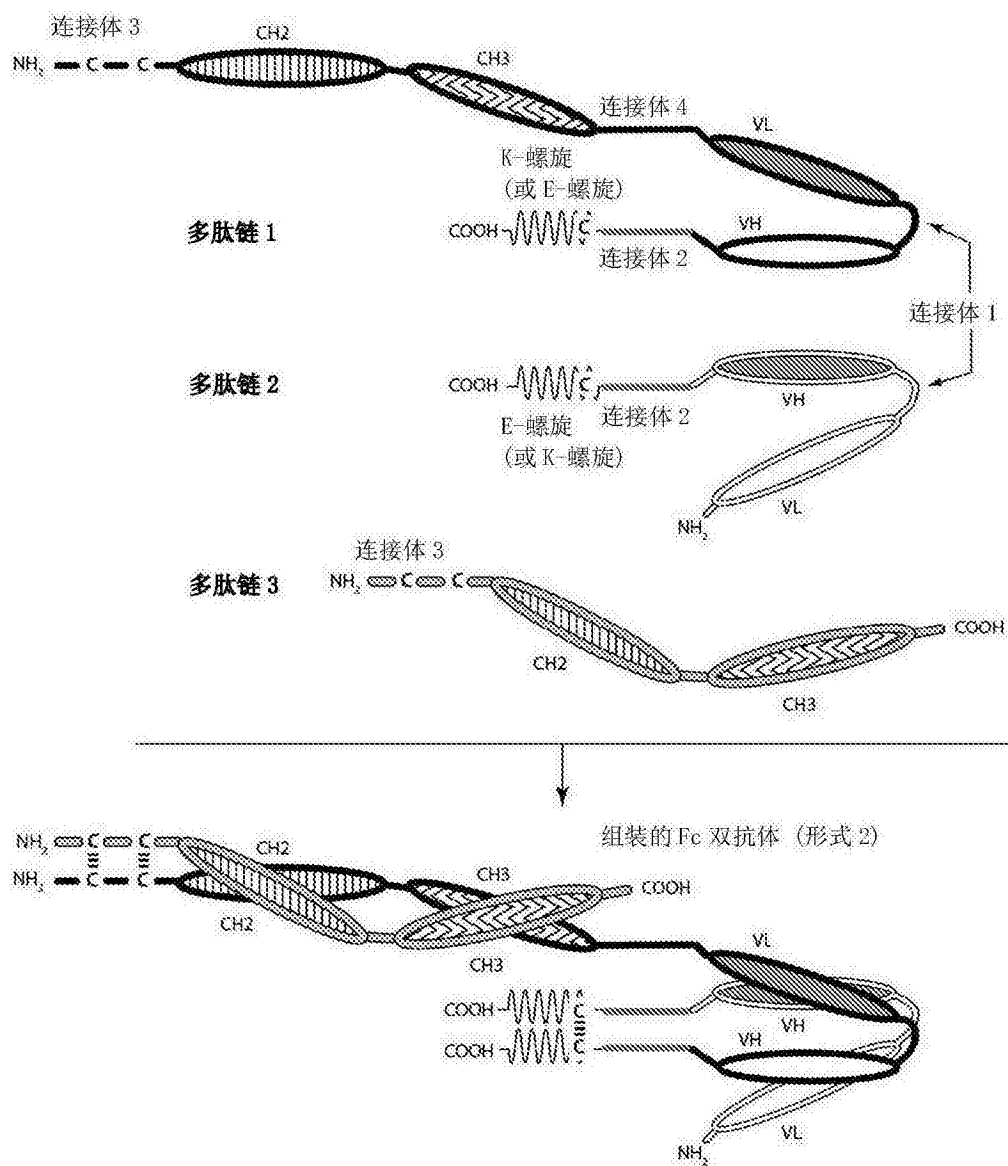


图2B

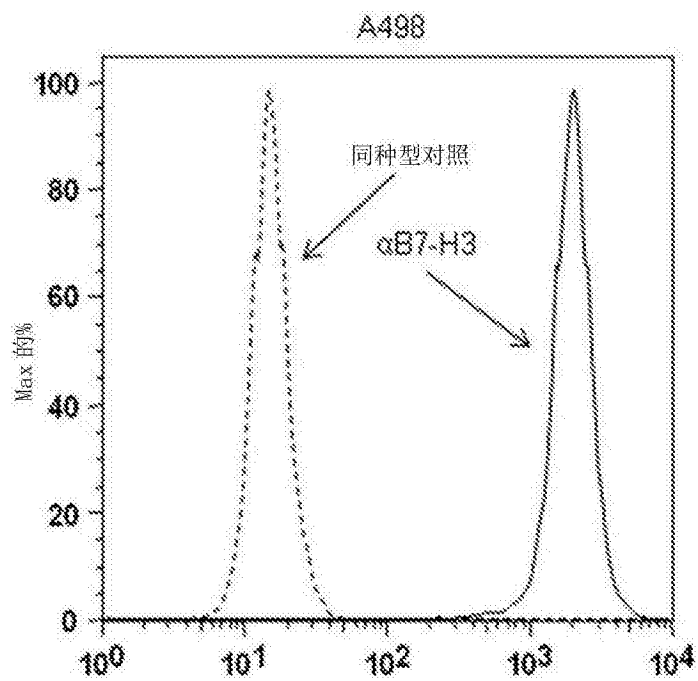


图3A

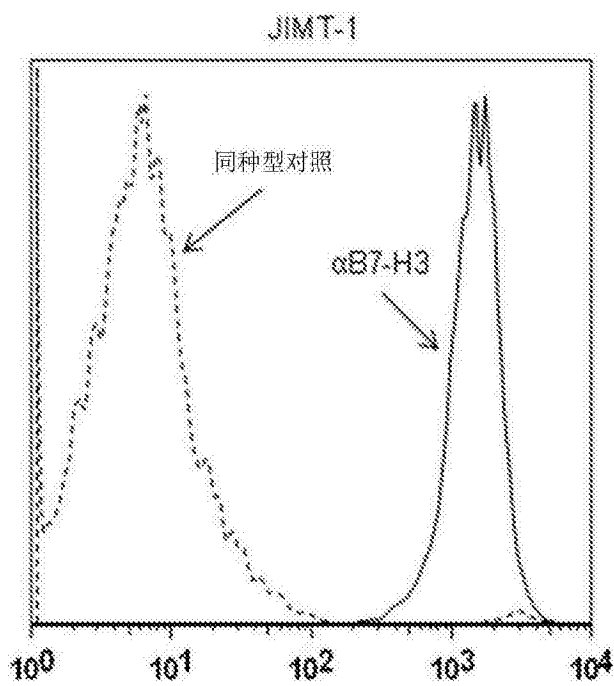


图3B

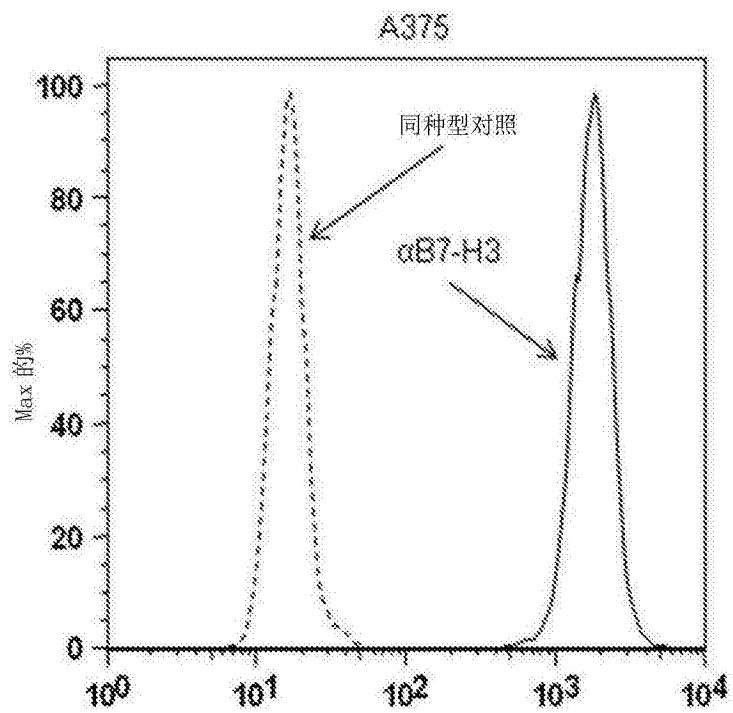


图3C

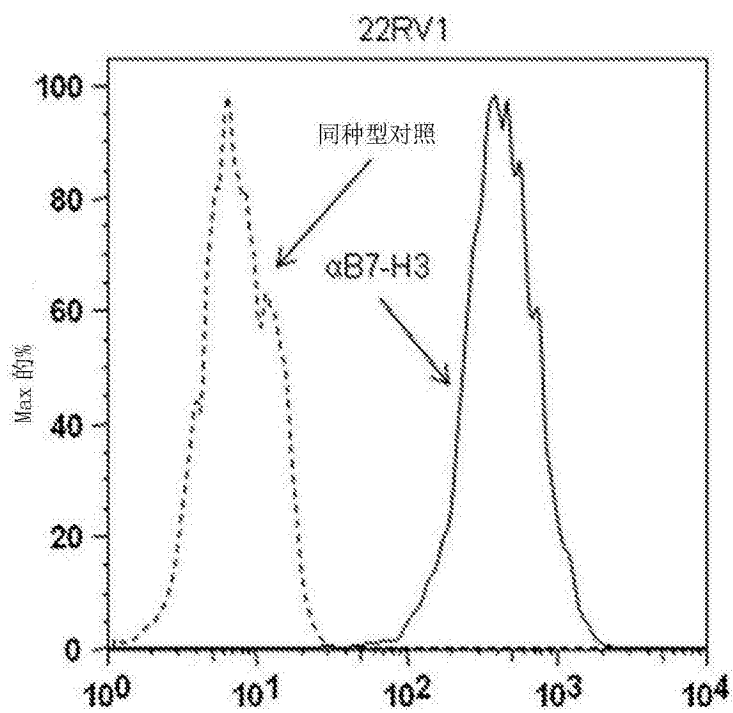


图3D

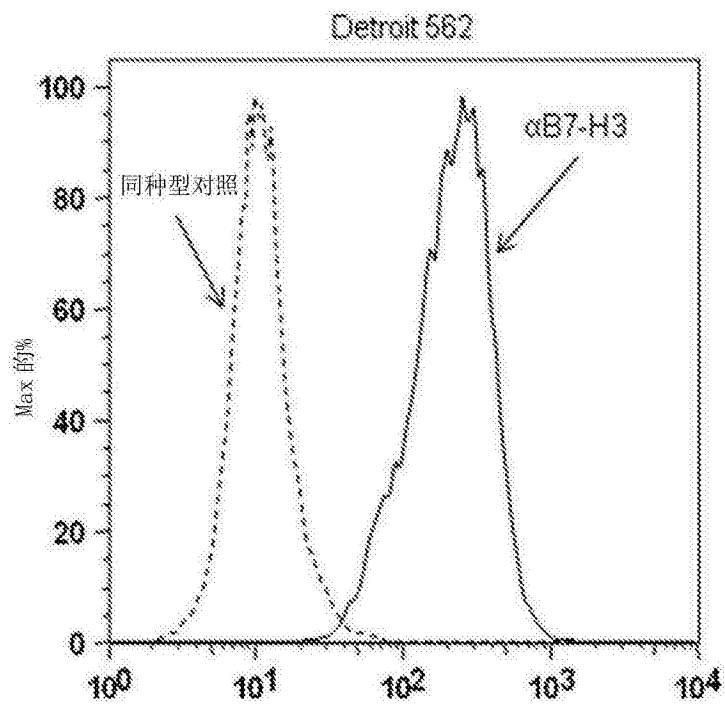


图3E

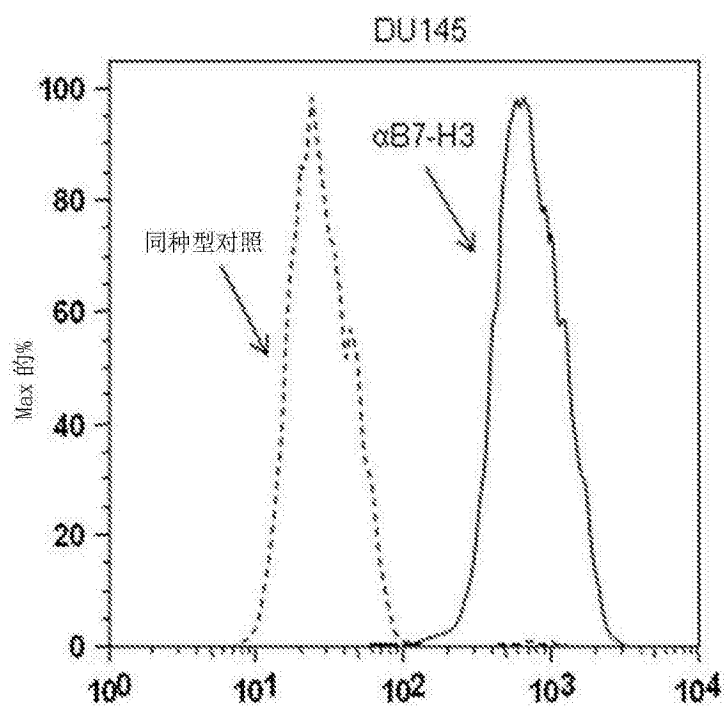


图3F

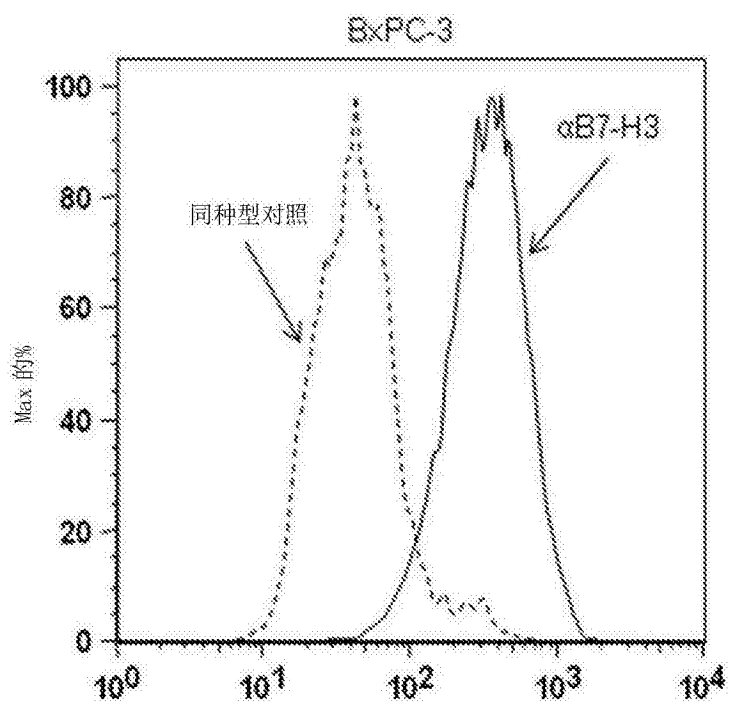


图3G

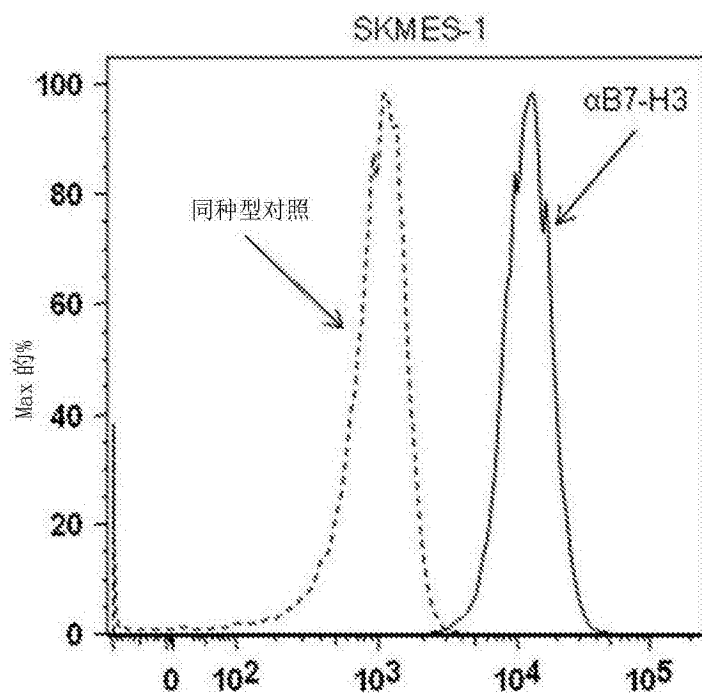


图3H

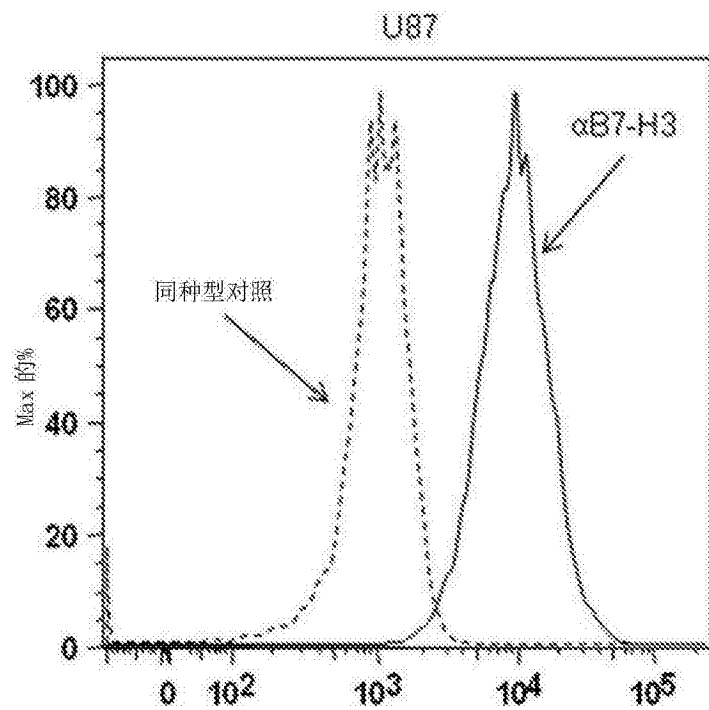


图3I

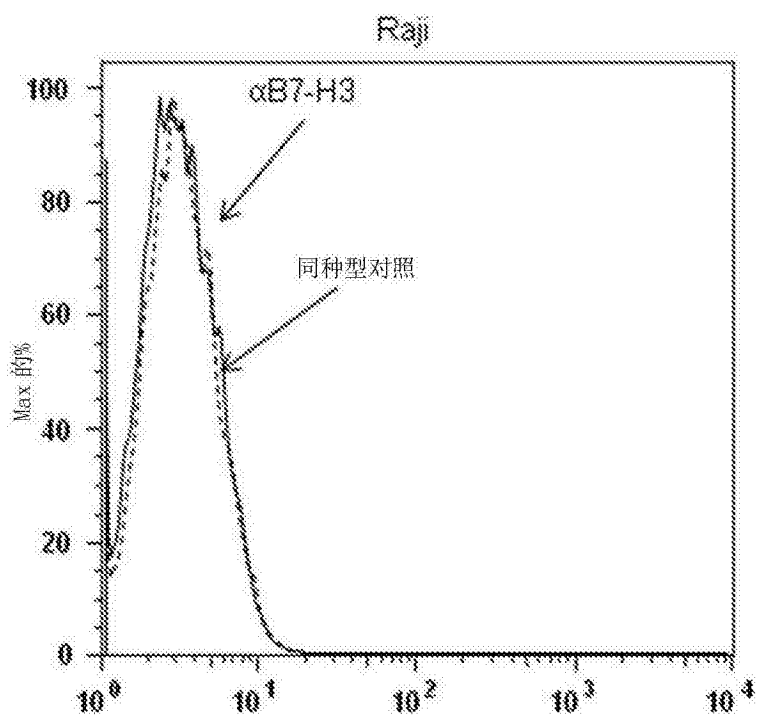


图3J

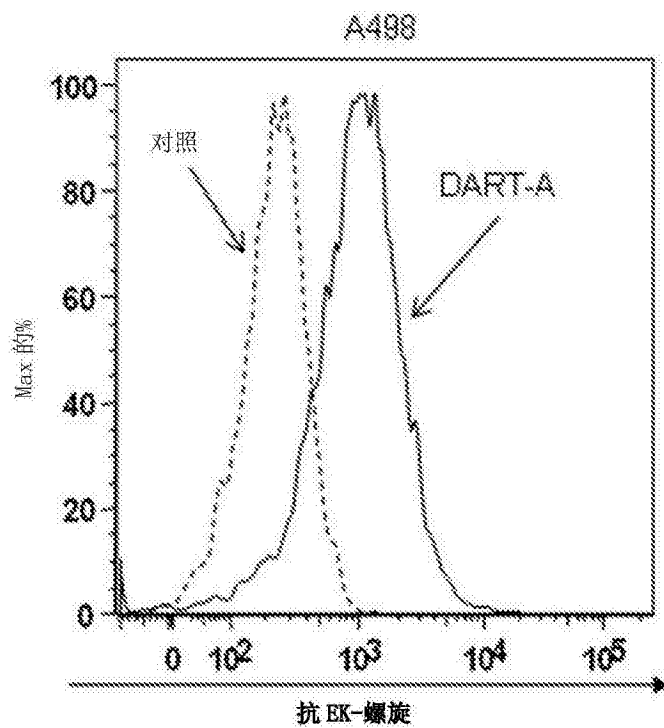


图4A

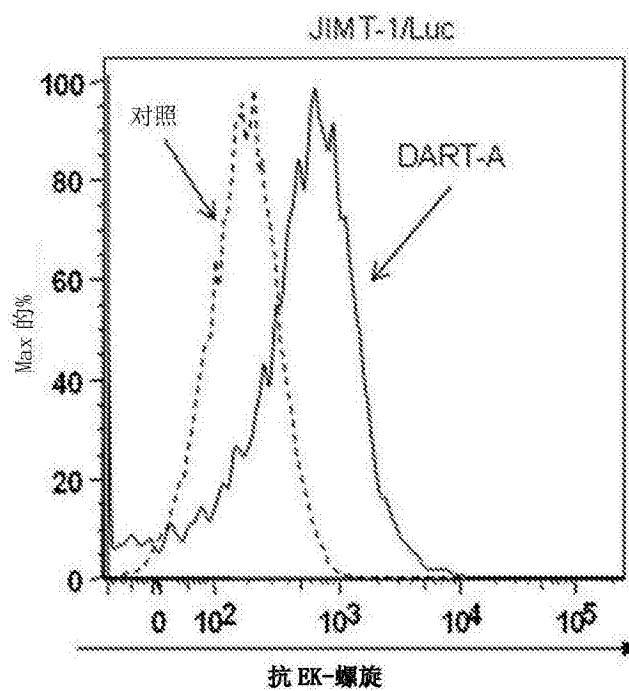


图4B

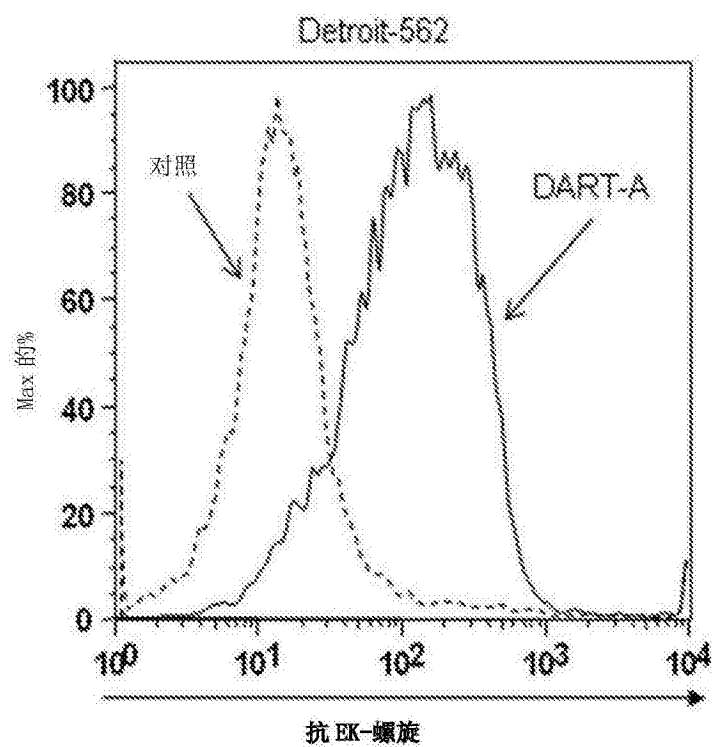


图4C

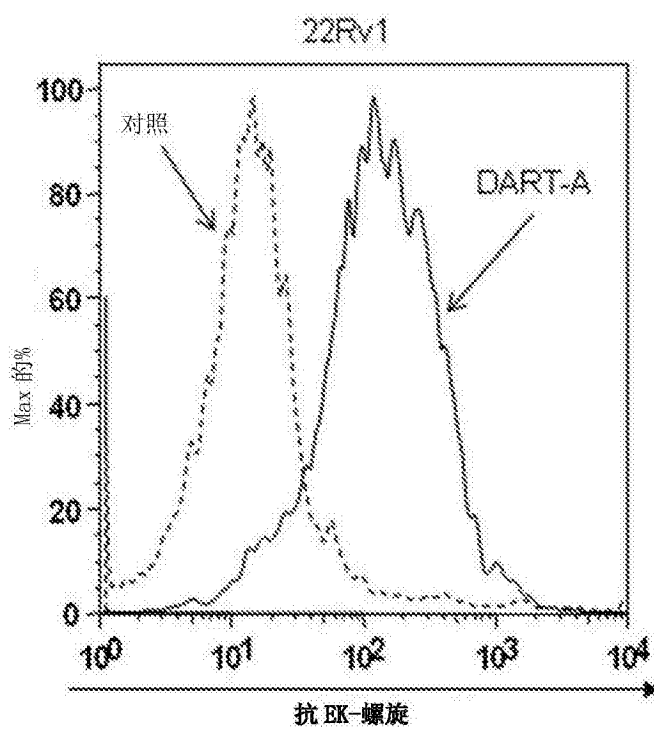


图4D

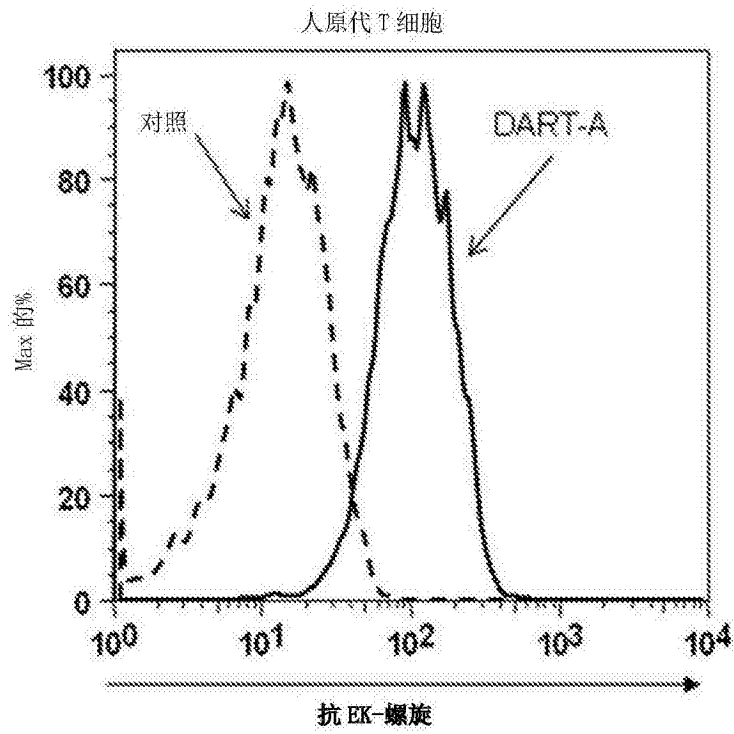


图4E

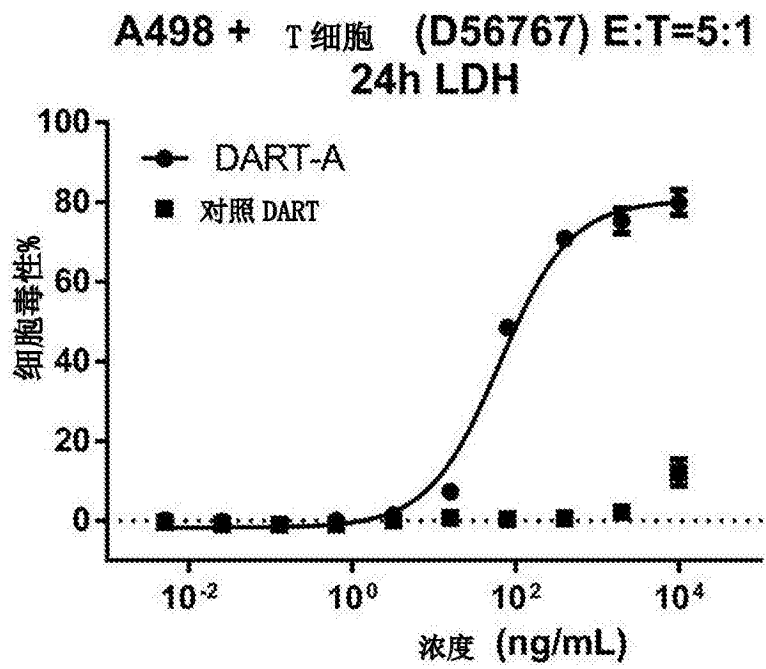


图5A

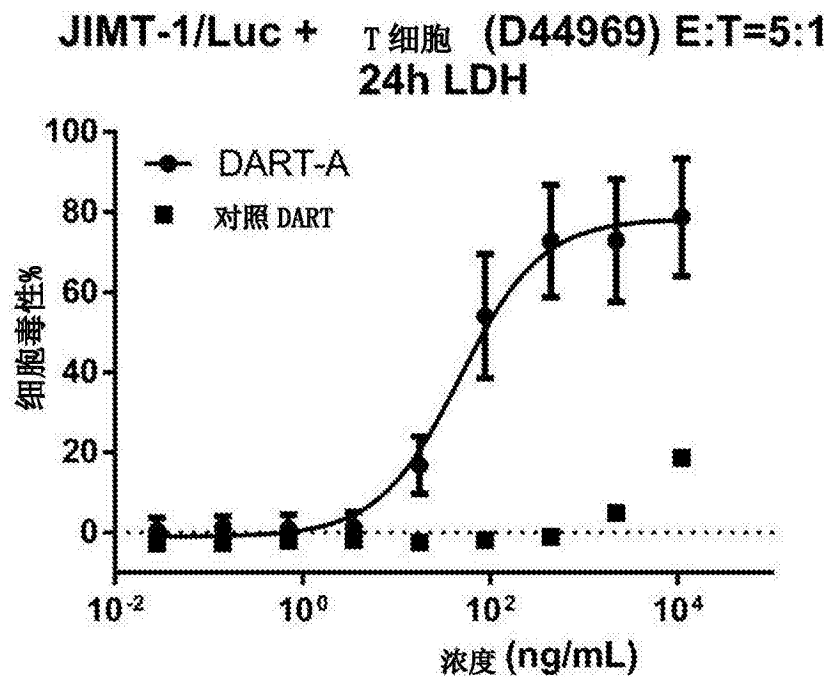


图5B

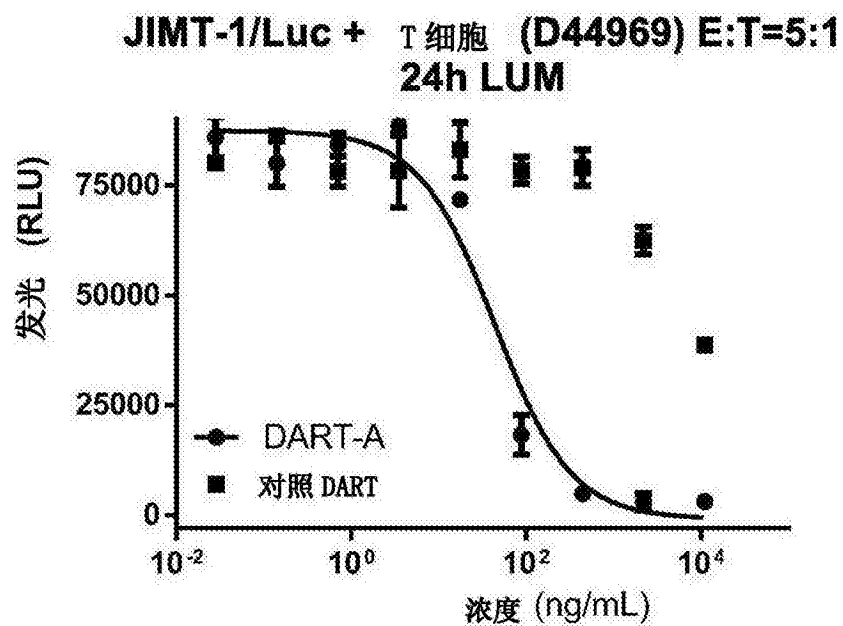


图5C

**A375 + T细胞 (D39162) E:T=5:1
24h LDH**

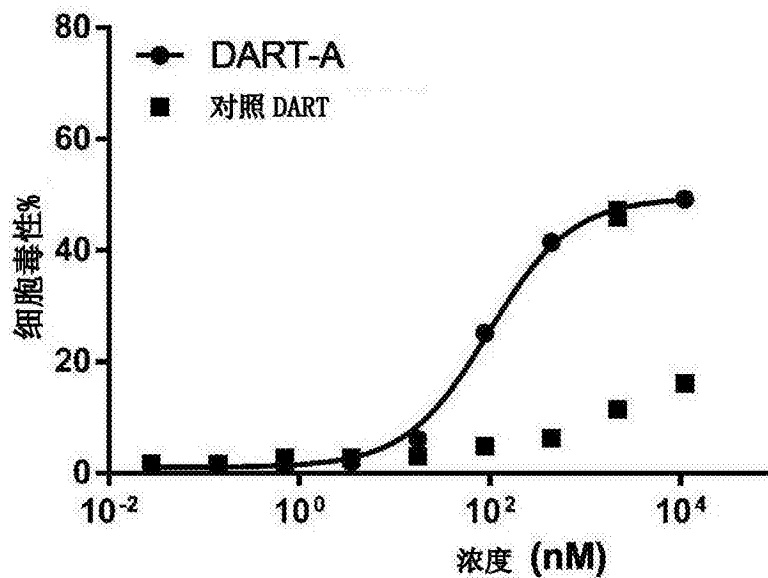


图5D

**U87 + T细胞 (D45421) E:T=5:1
24h LDH**

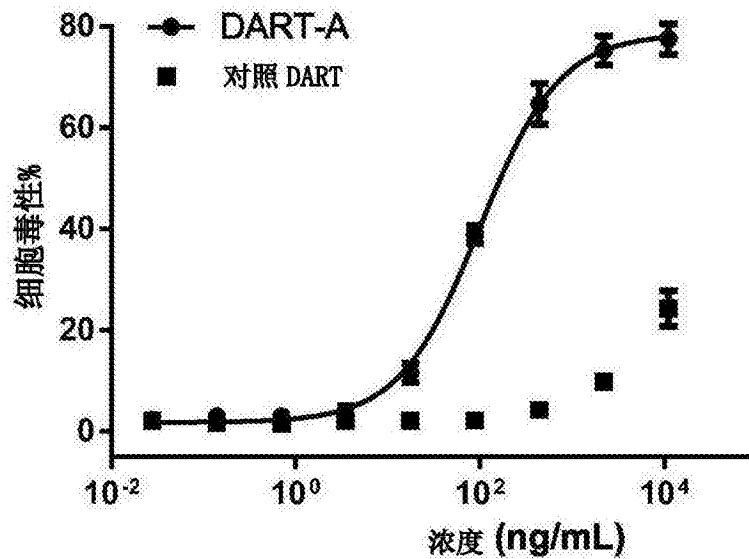


图5E

DU145 + T细胞 (D39162) E:T=5:1
24h LDH

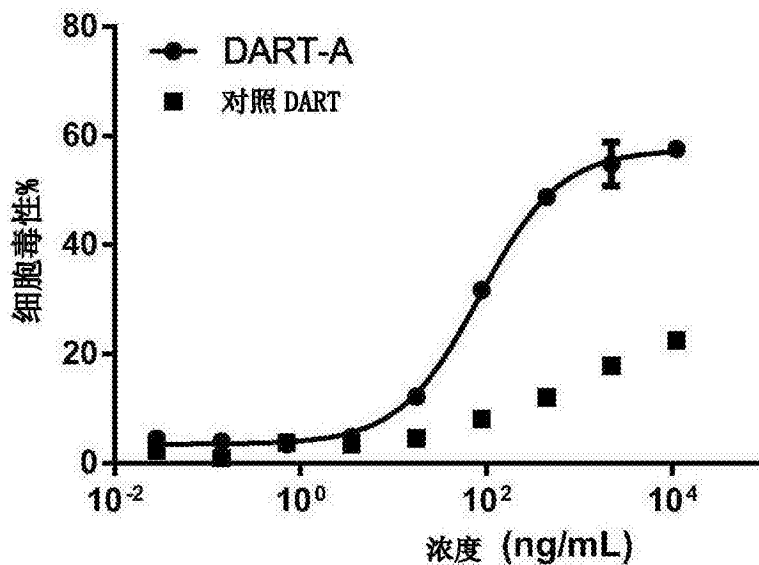


图5F

BxPC-3 + T细胞 (D40717) E:T=5:1
24h LDH

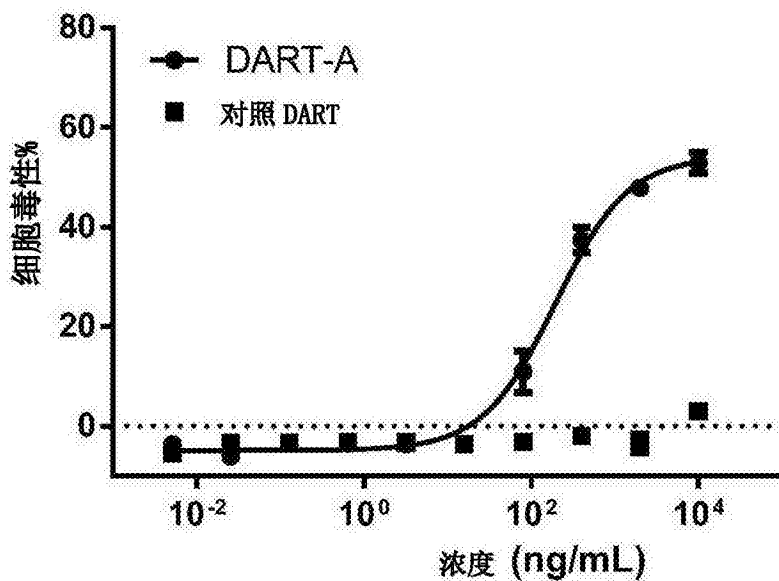


图5G

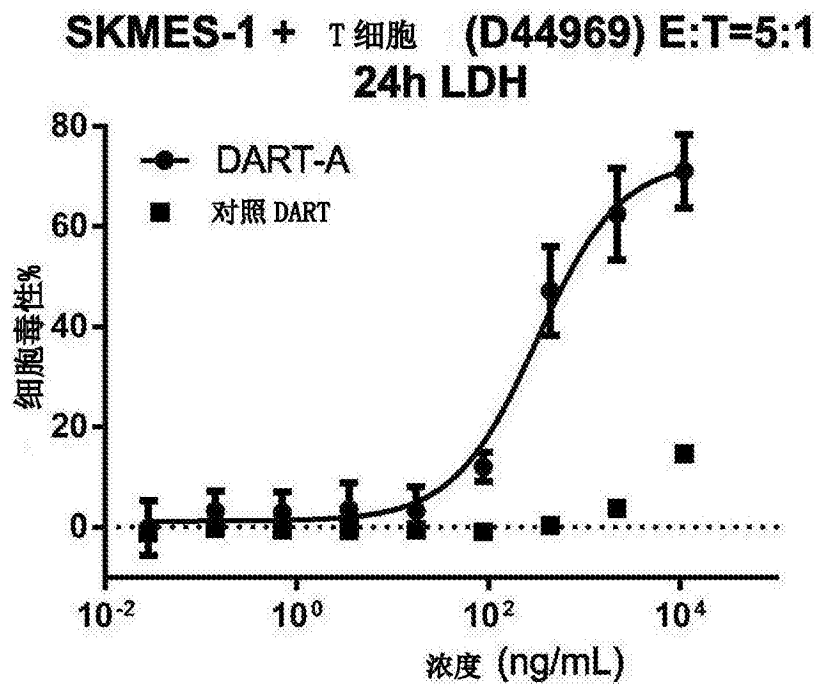


图5H

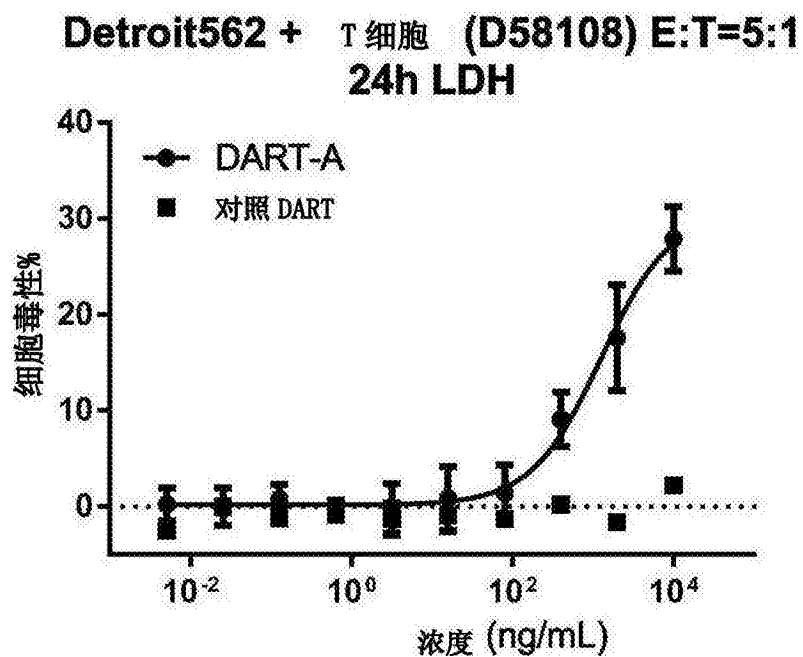


图5I

22Rv1 + T细胞 (D58108) E:T=5:1
24h LDH

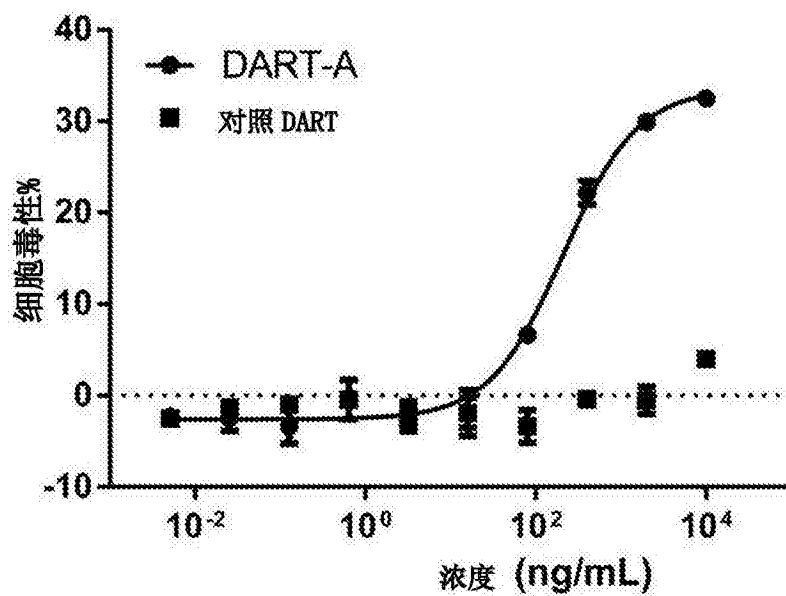


图5J

CHO + T细胞 (D55778) E:T=5:1
24h LDH

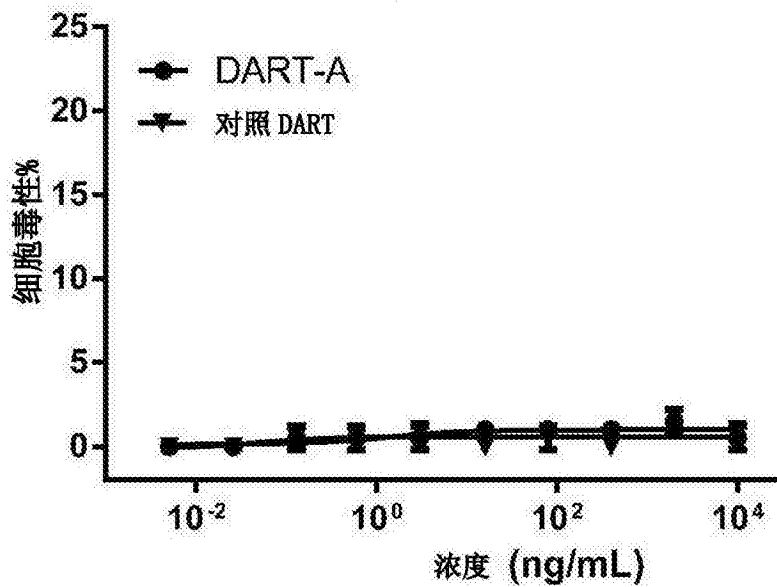


图5K

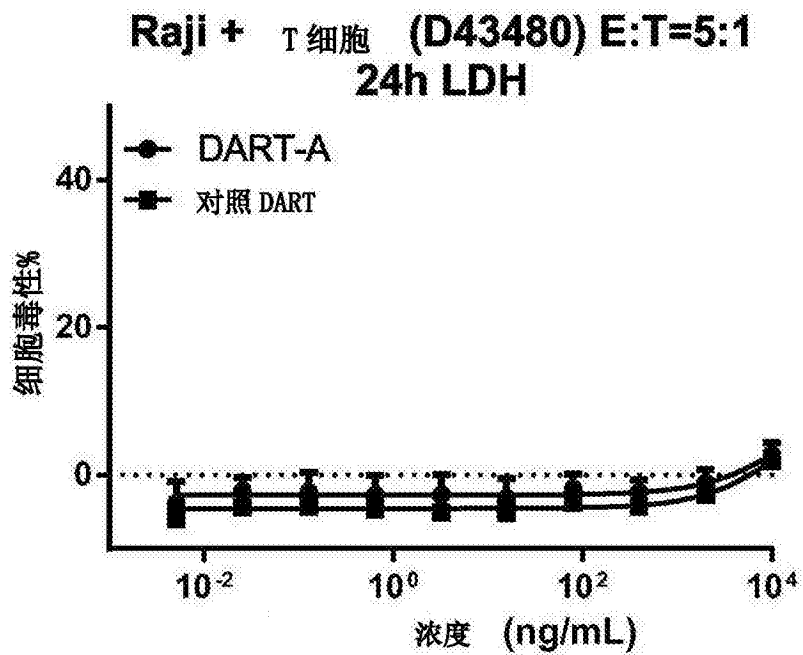


图5L

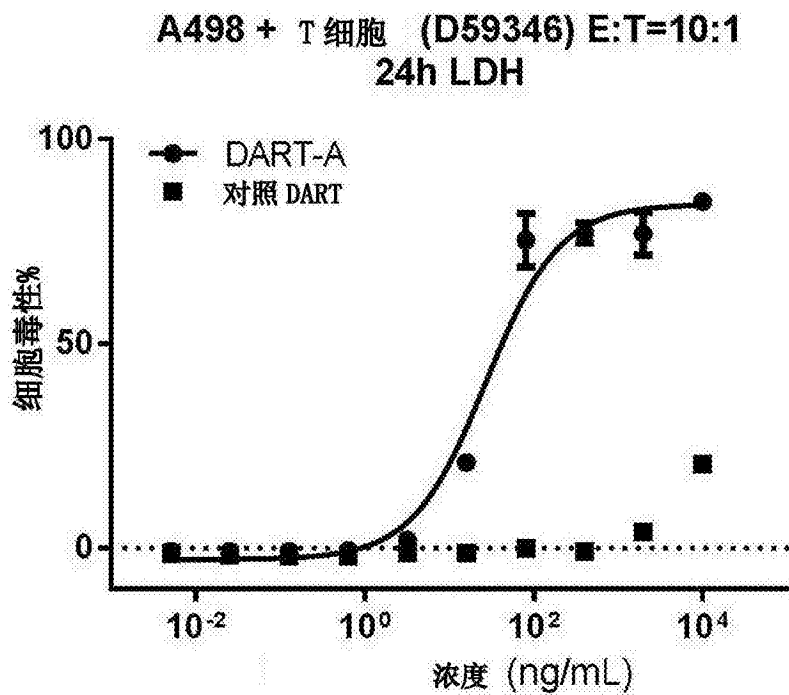


图6A

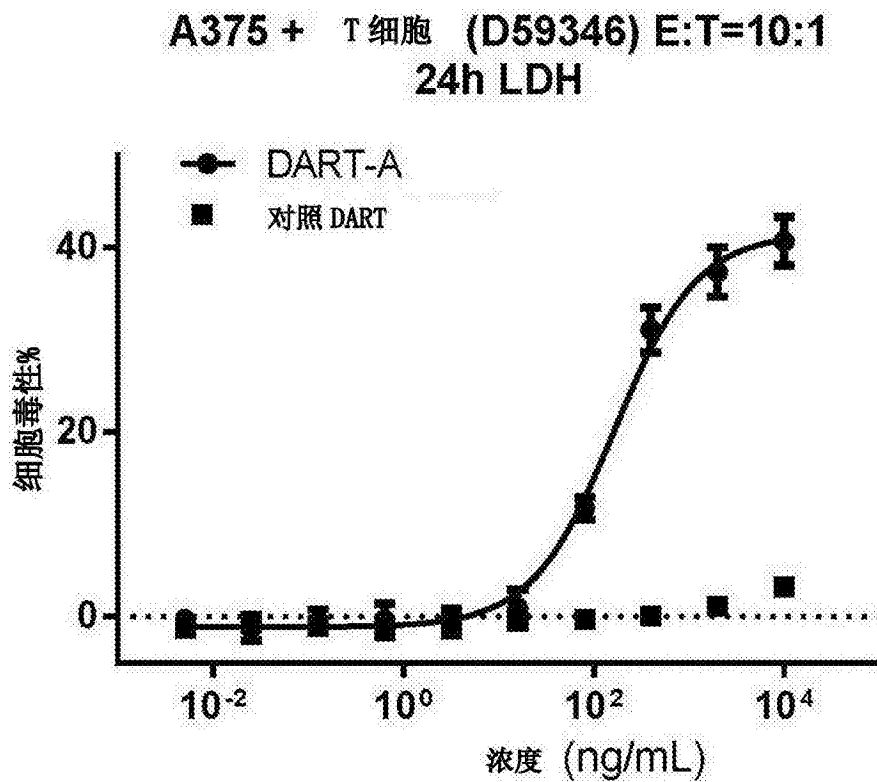


图6B

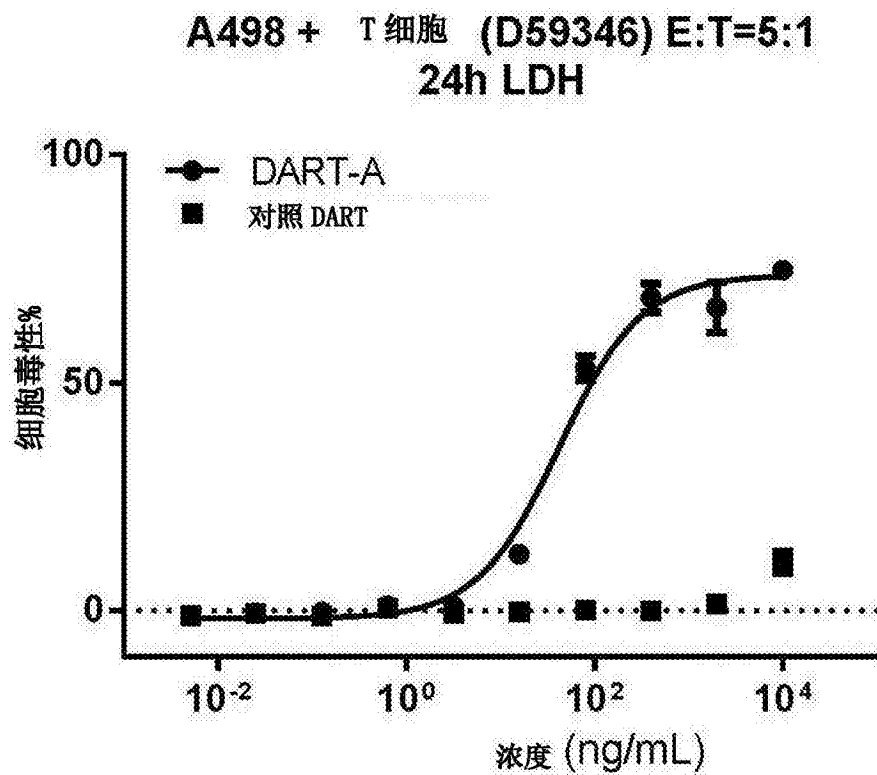


图6C

**A375 + T细胞 (D59346) E:T=5:1
24h LDH**

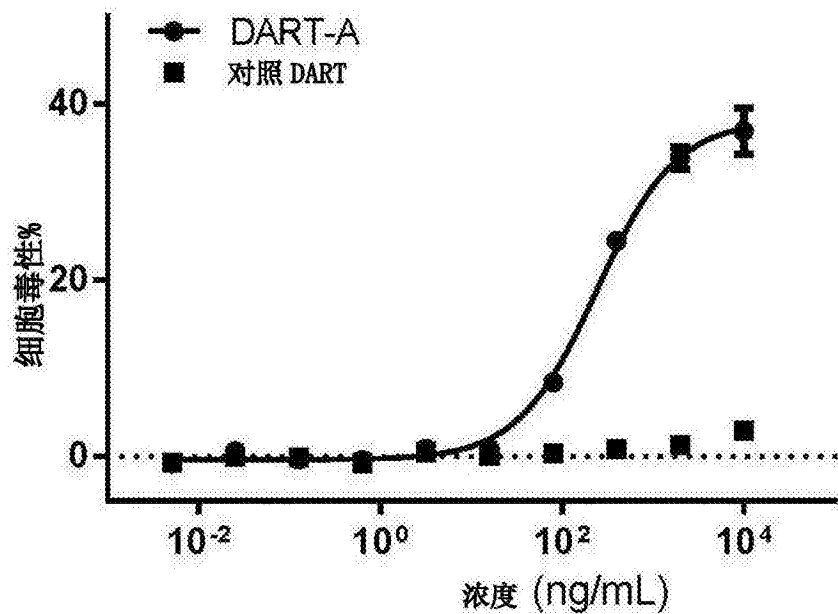


图6D

**A498 + T细胞 (D59346) E:T=1:1
24h LDH**

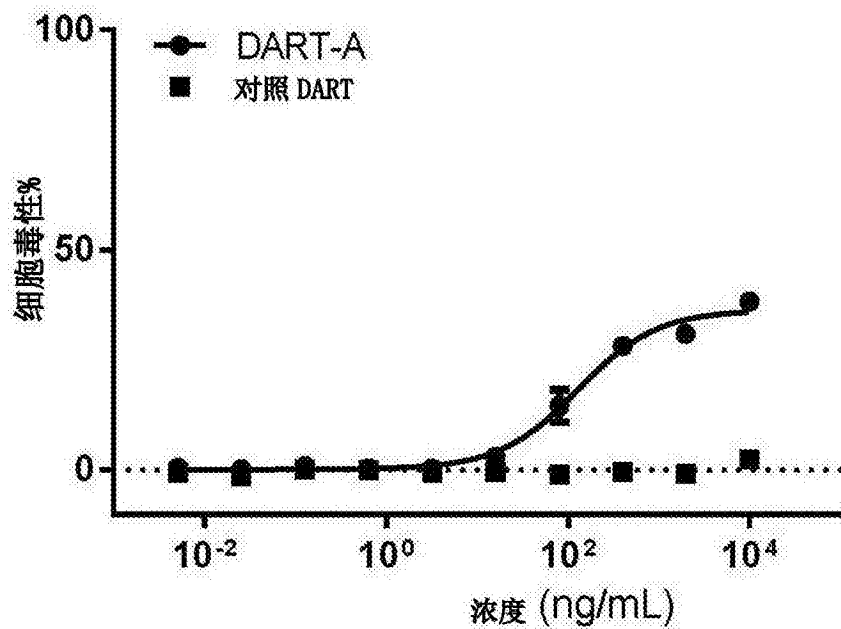


图6E

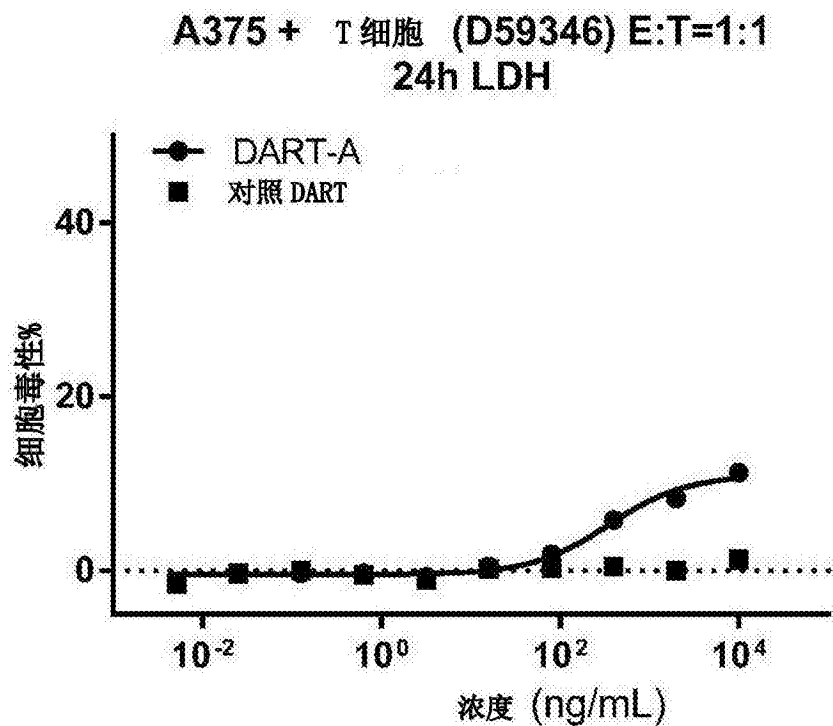


图6F

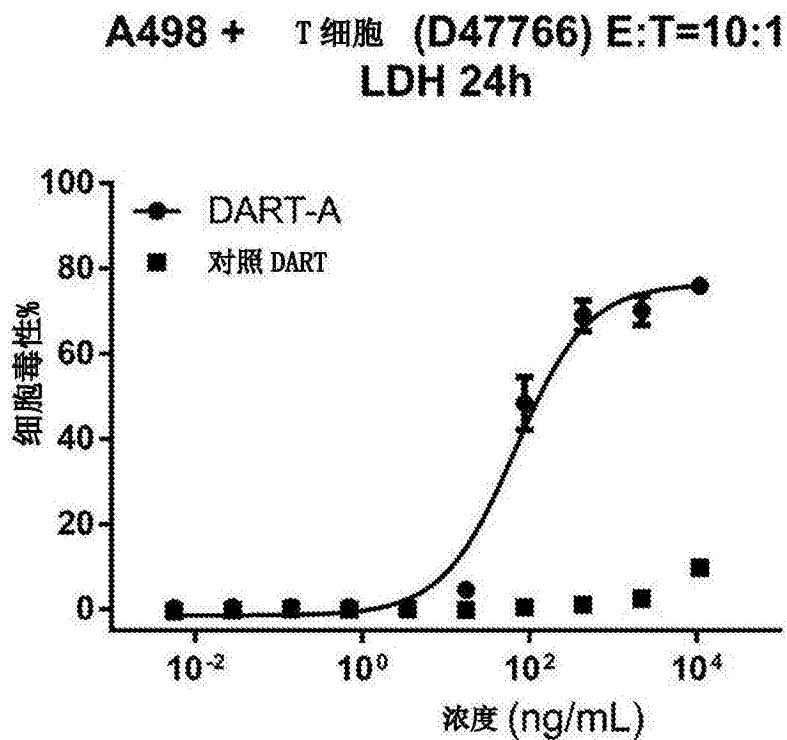


图7A

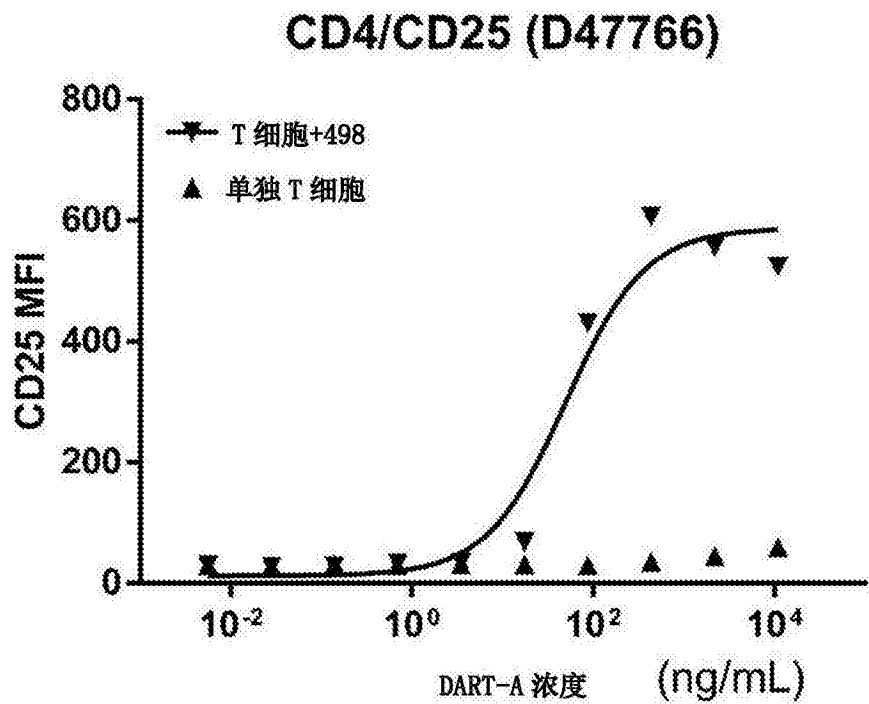


图7B

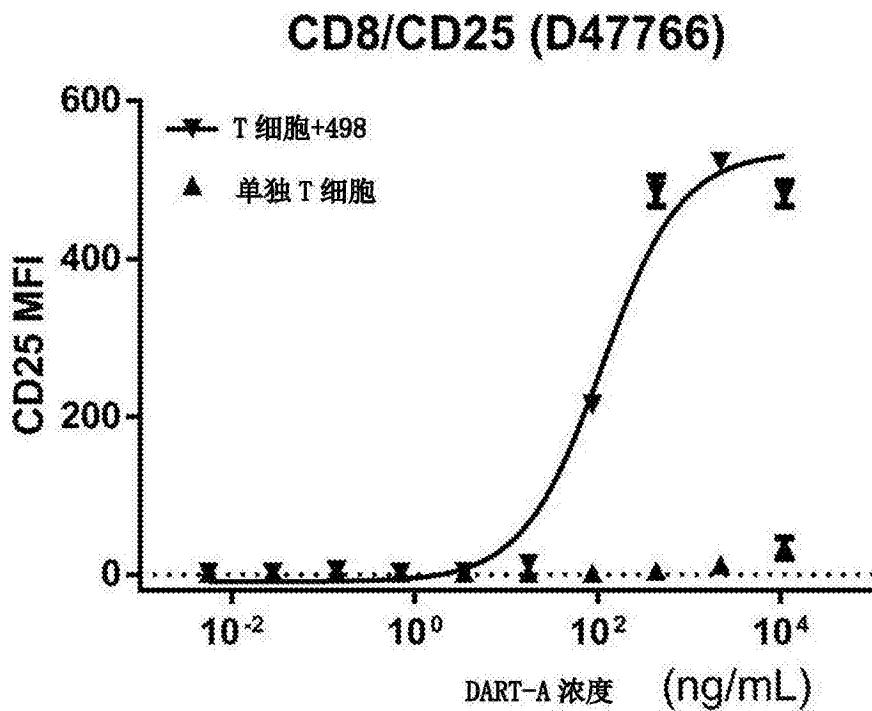


图7C

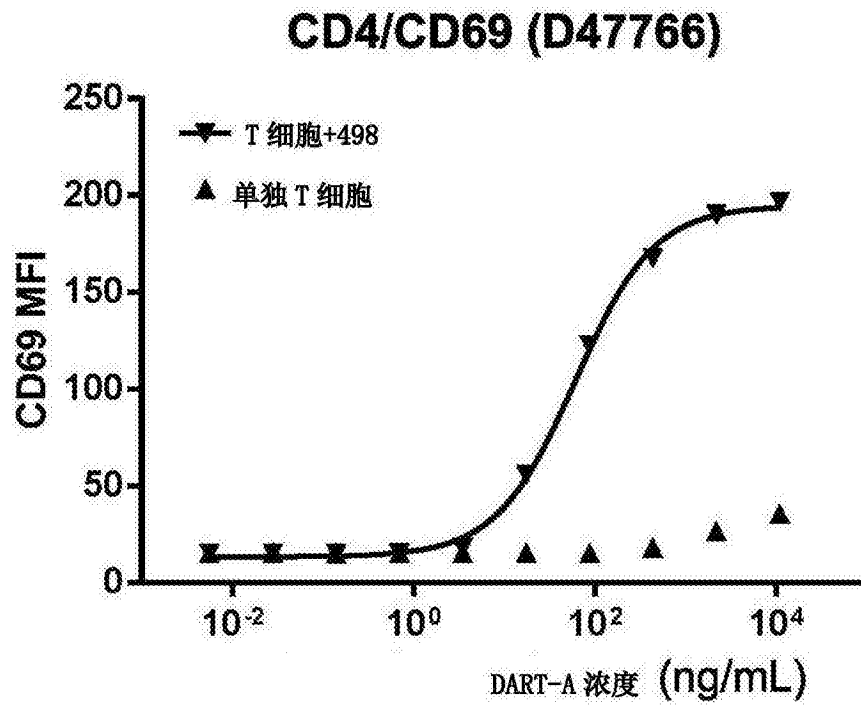


图7D

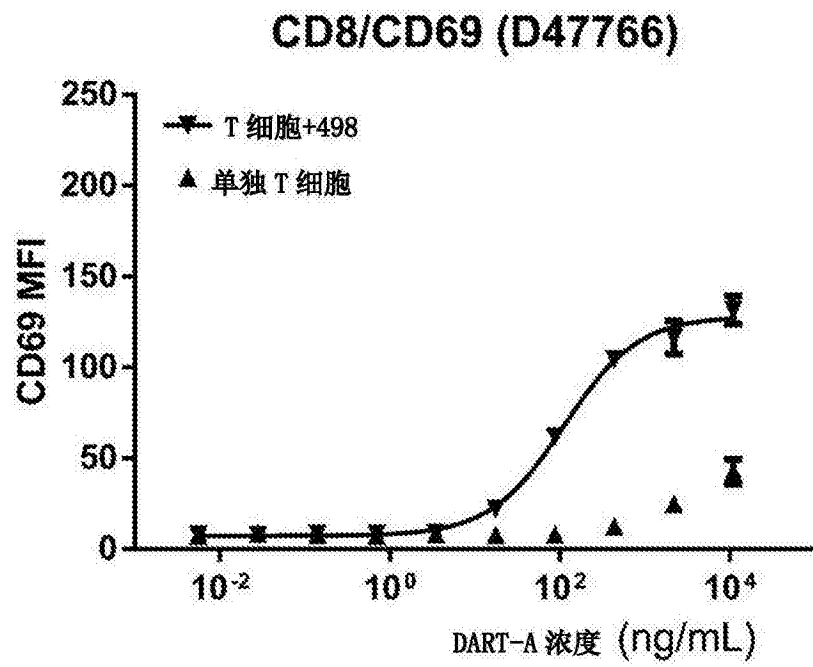


图7E

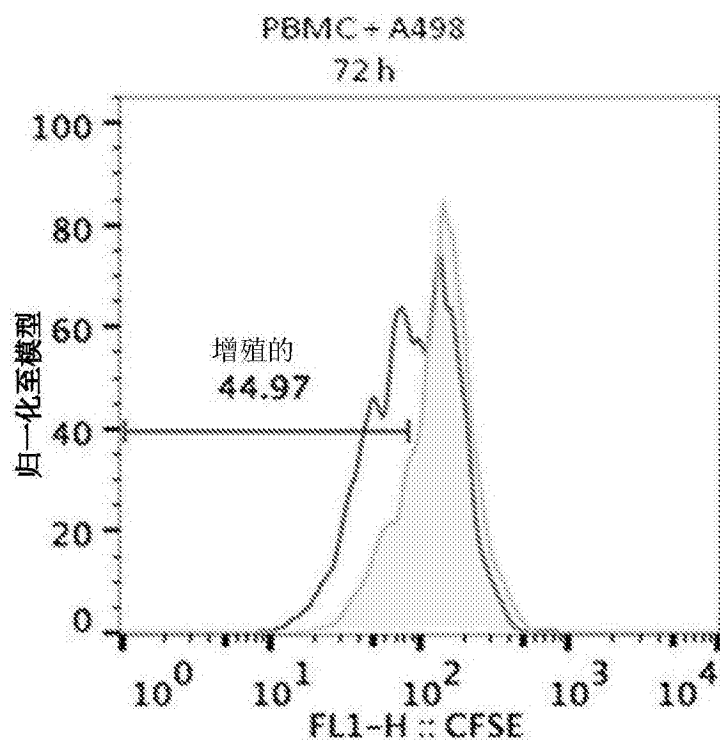


图8A

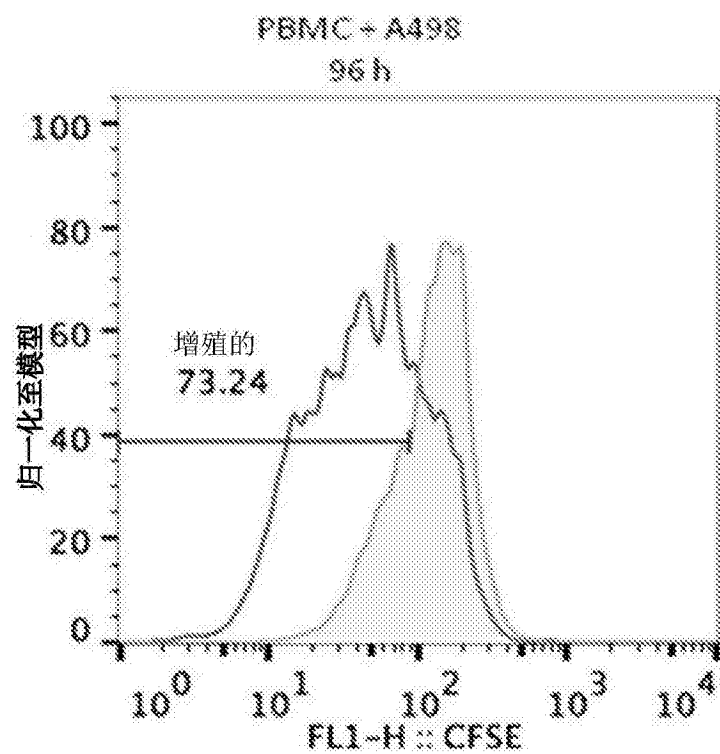


图8B

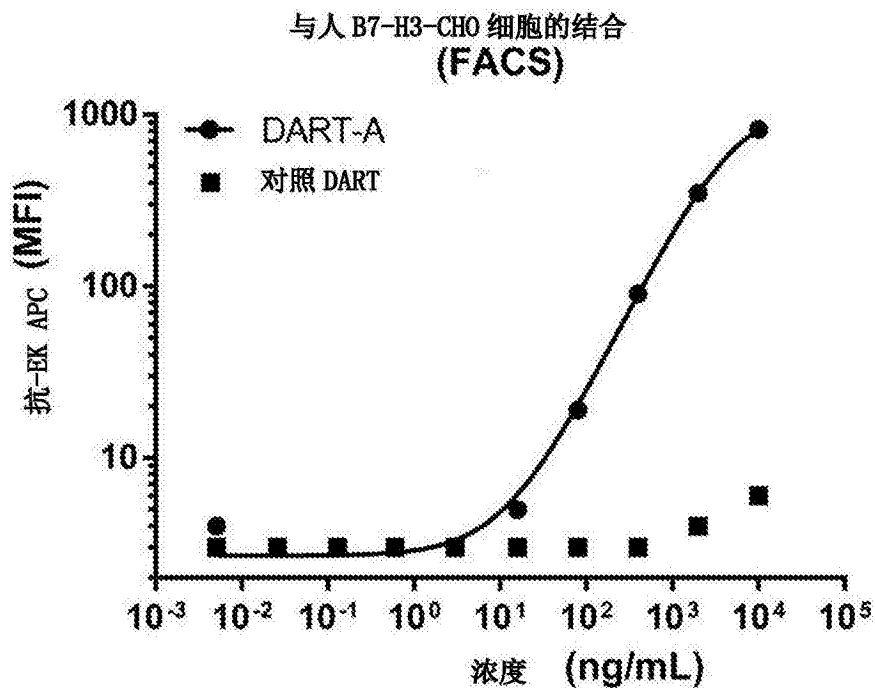


图9A

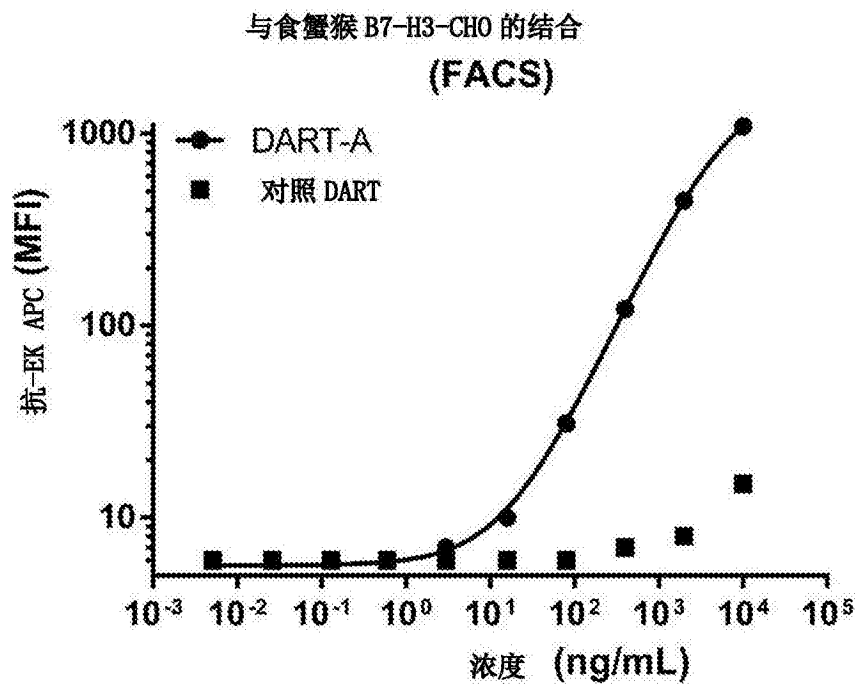


图9B

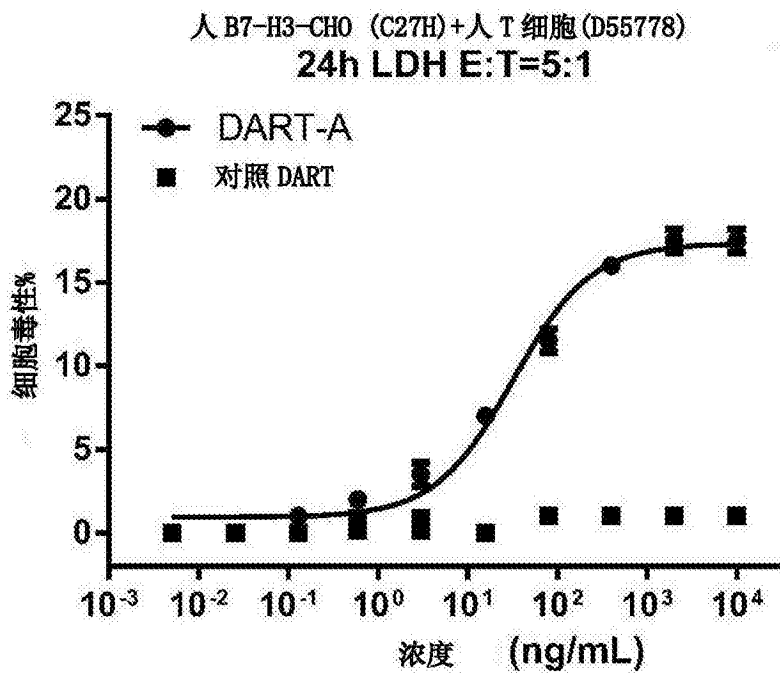


图9C

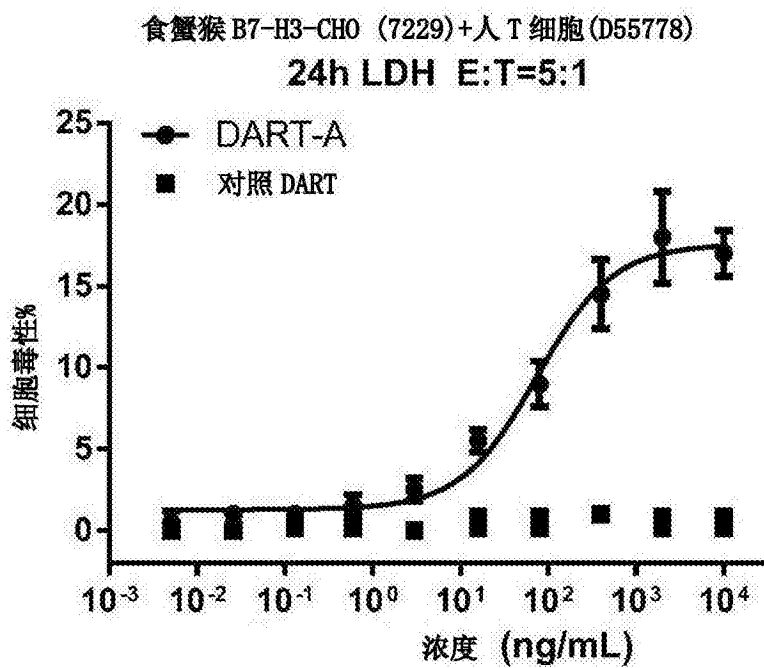


图9D

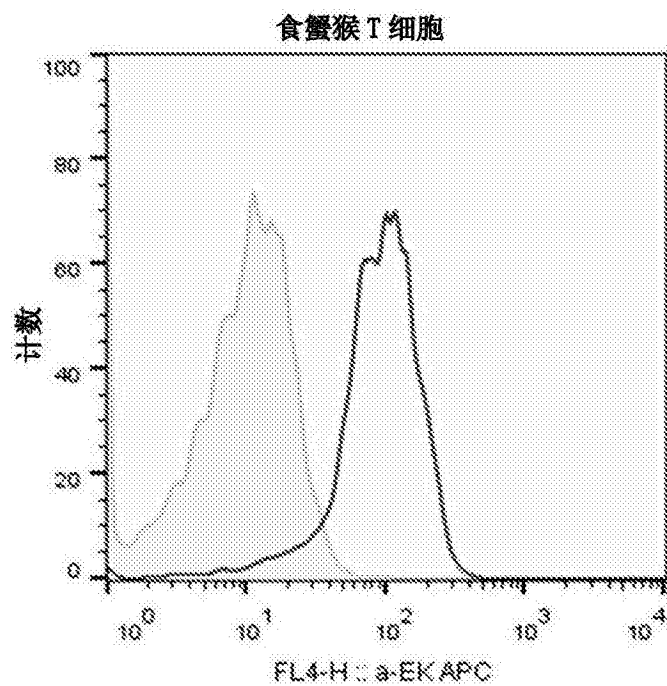


图10A

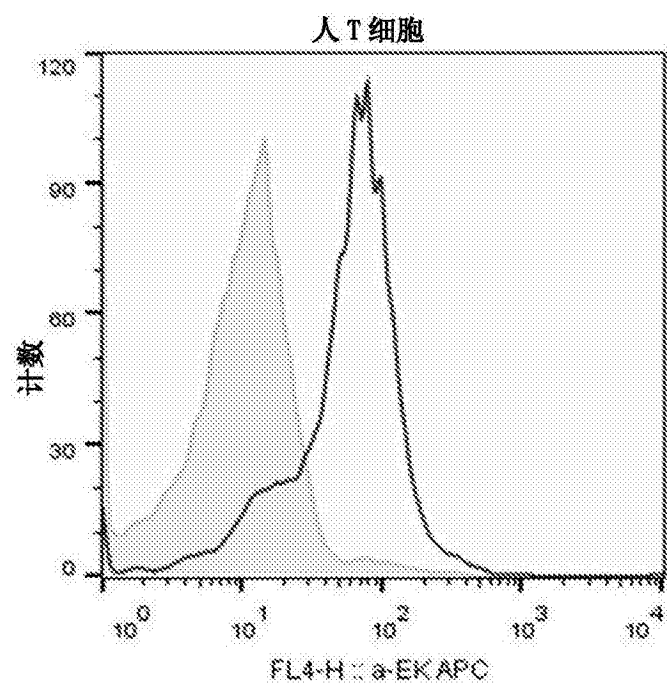


图10B

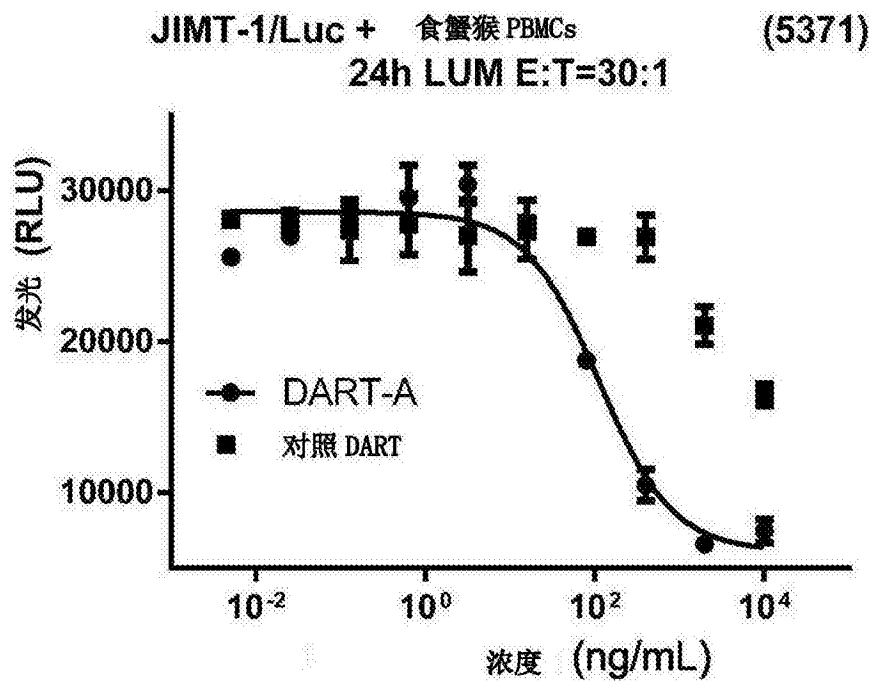


图11A

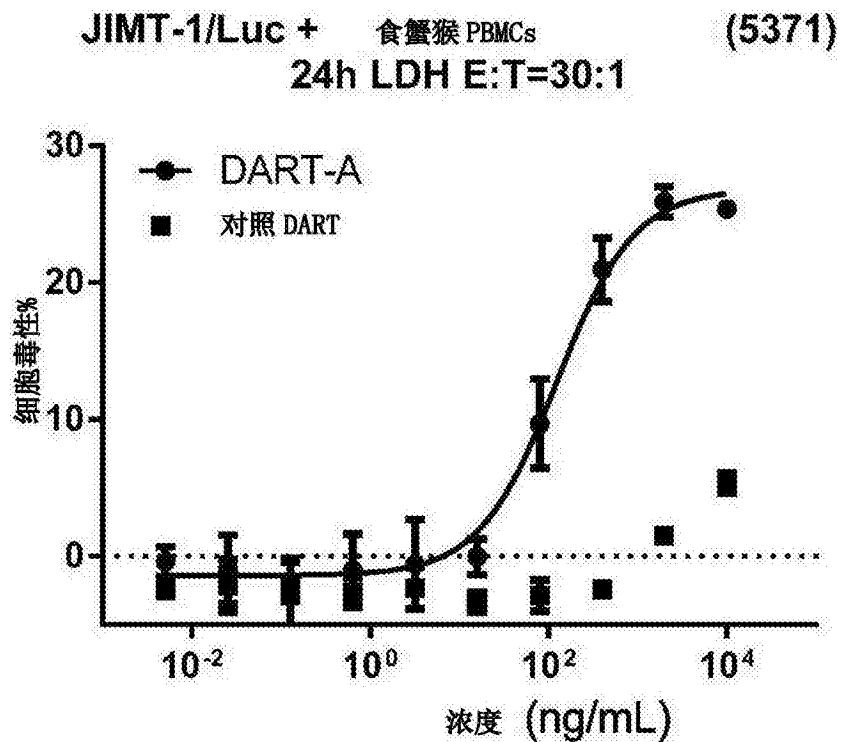


图11B

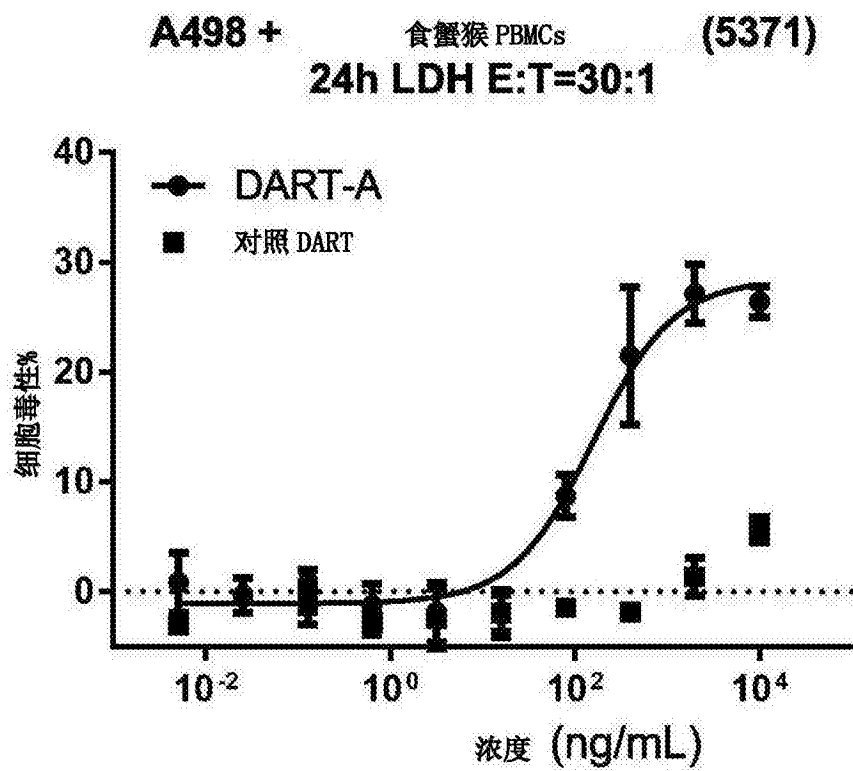


图11C

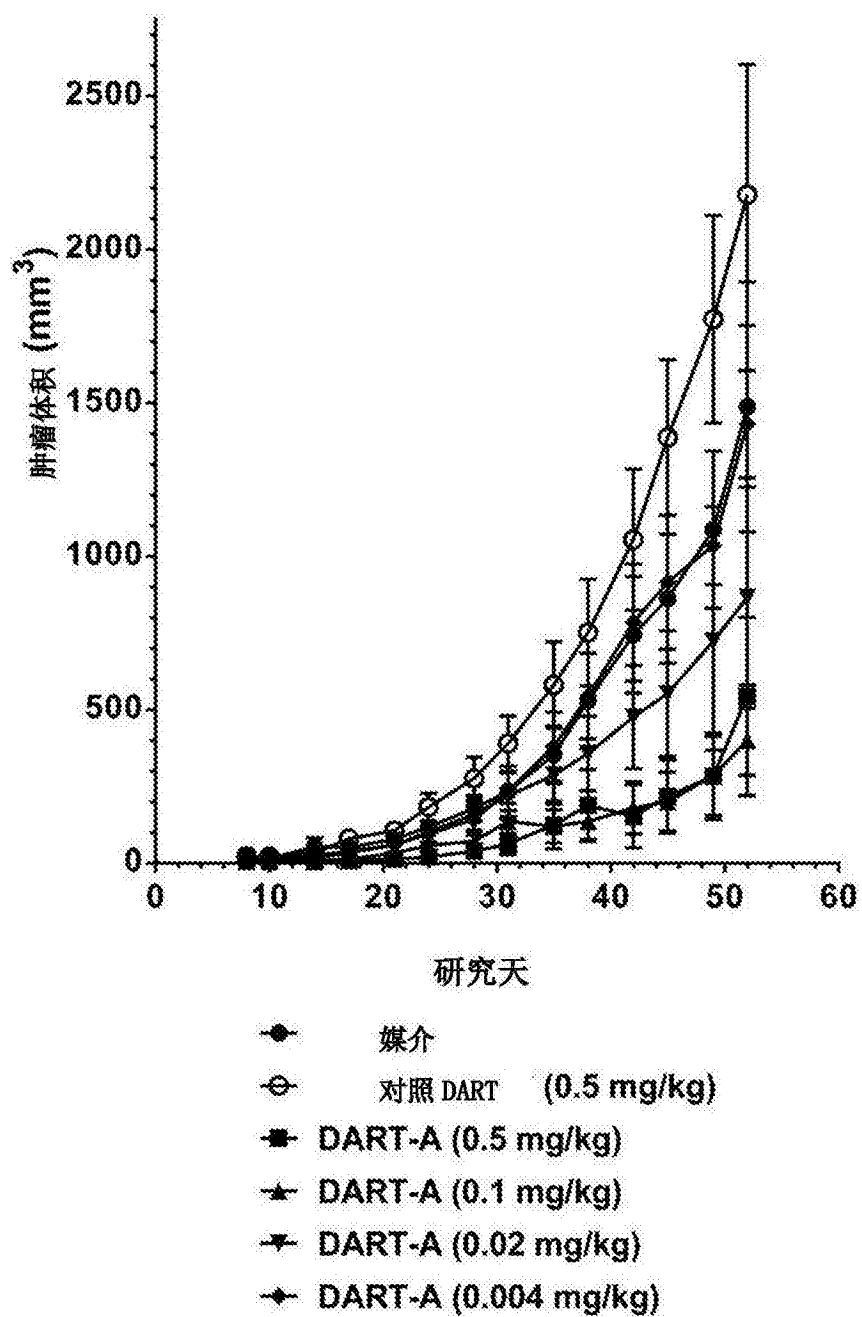


图12

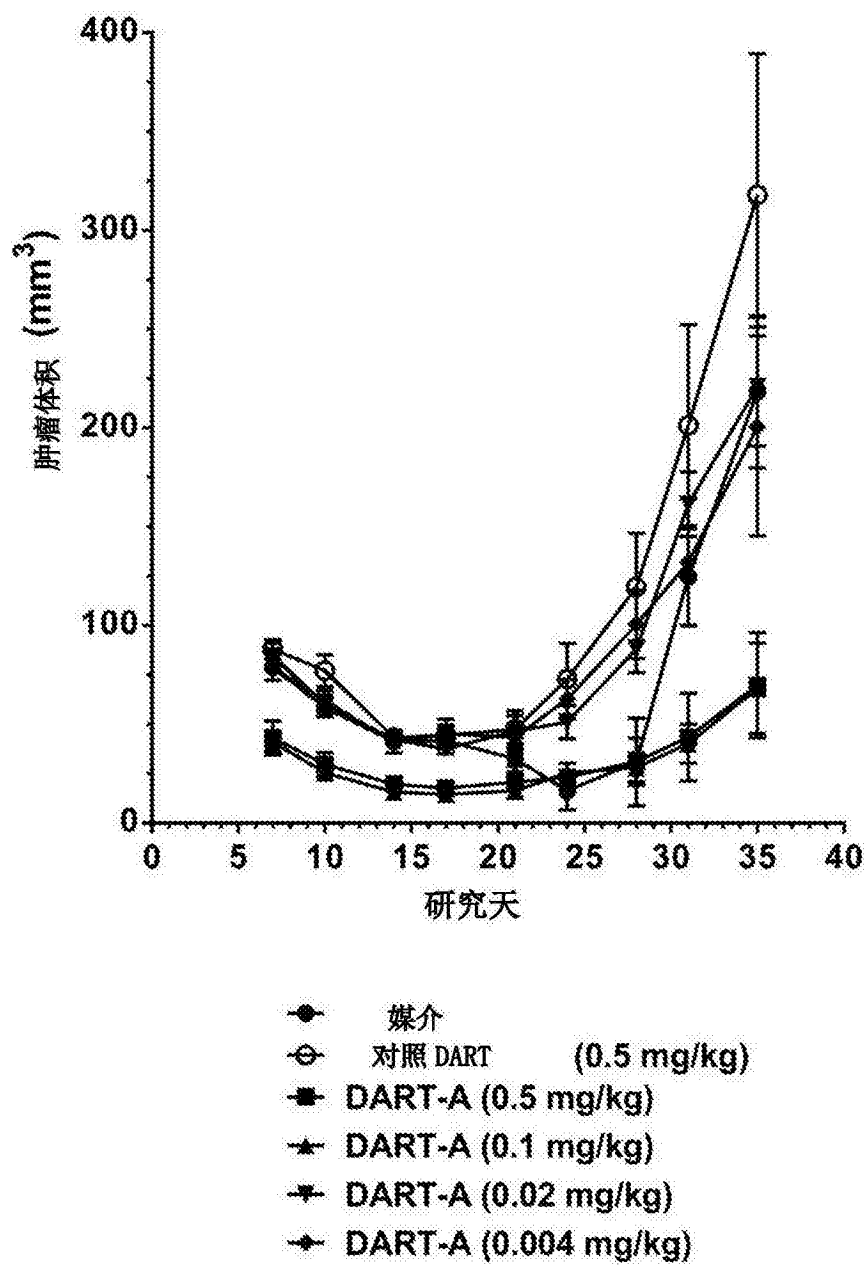


图13

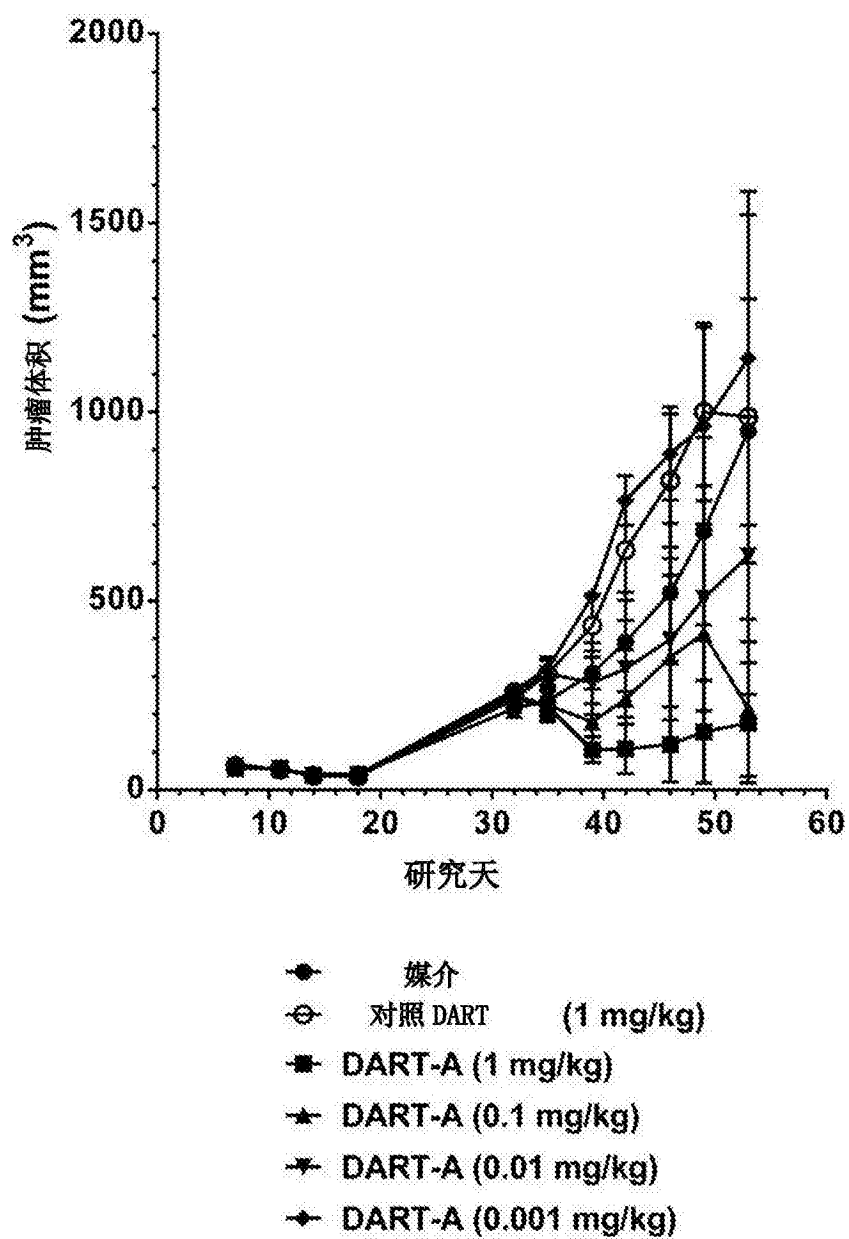


图14

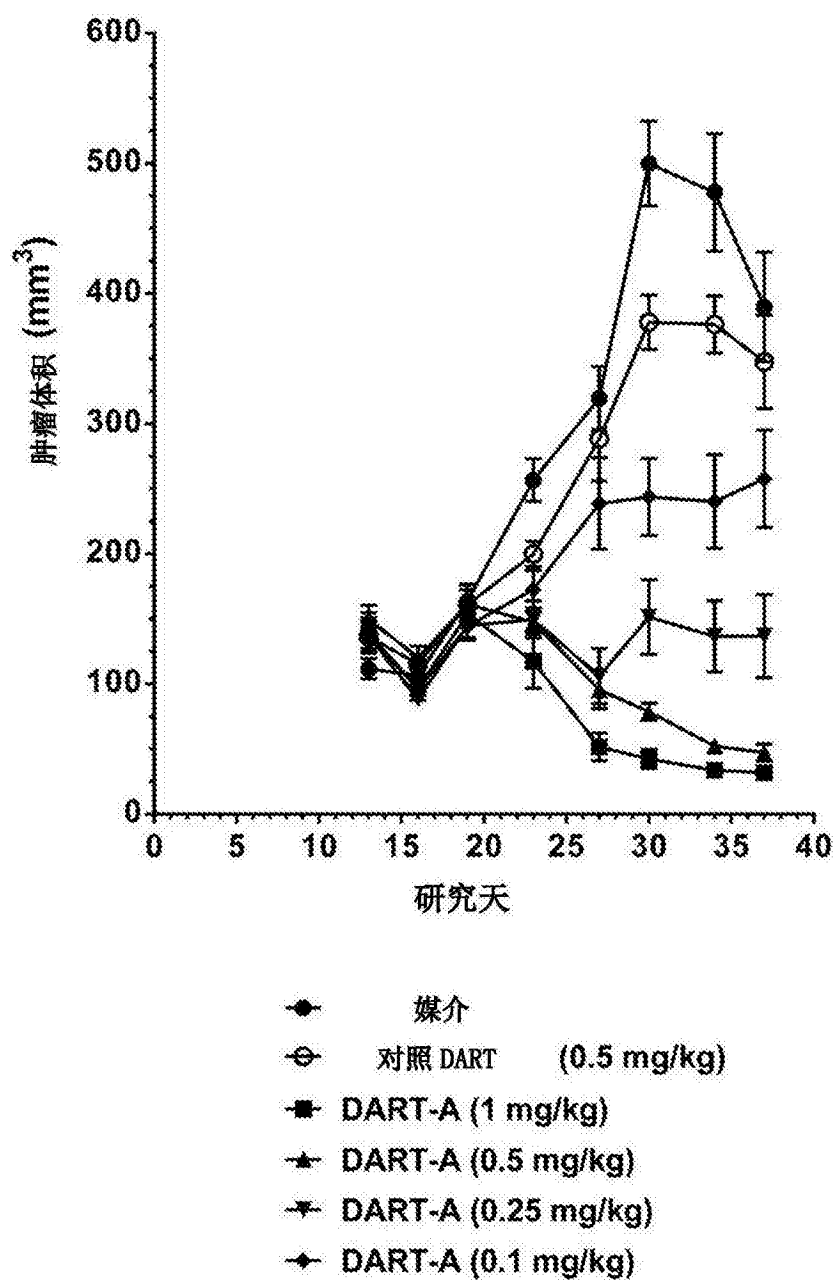


图15

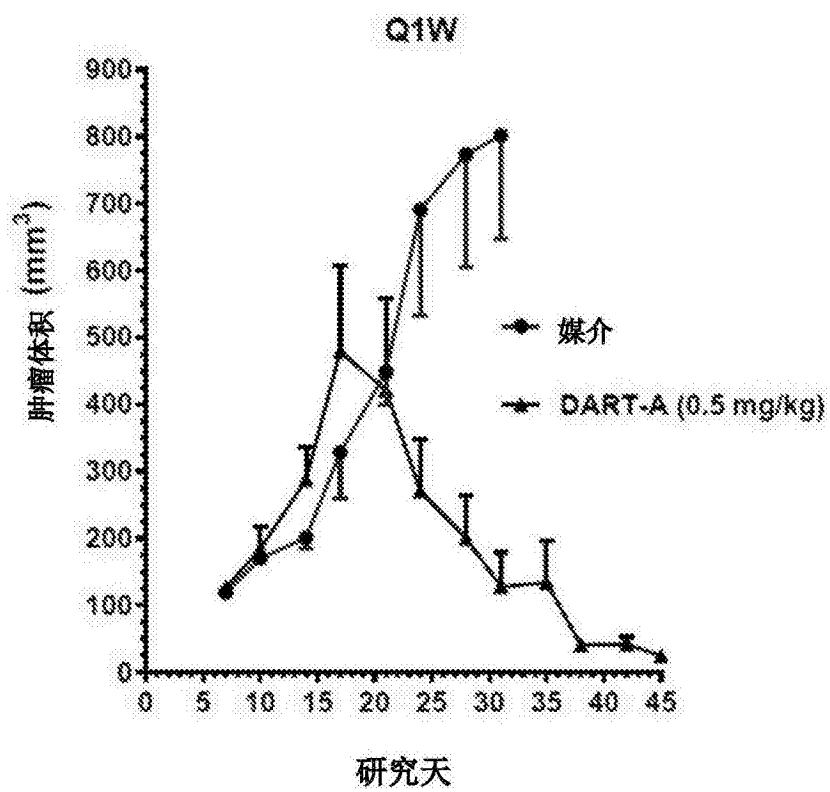


图16A

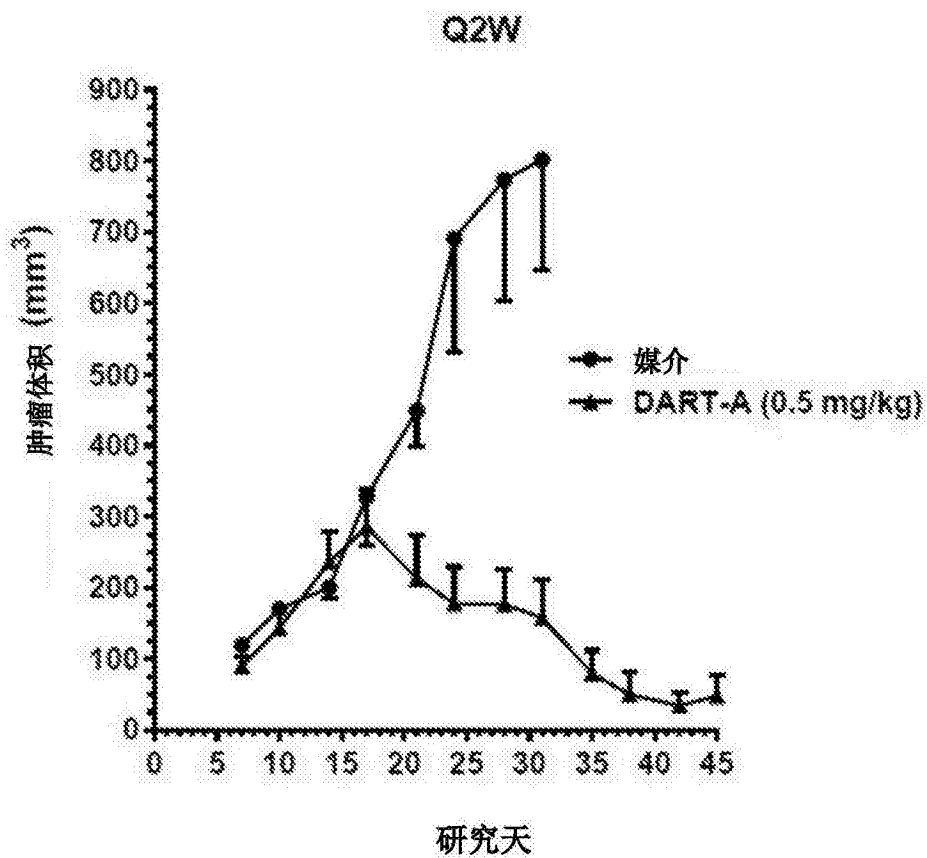


图16B

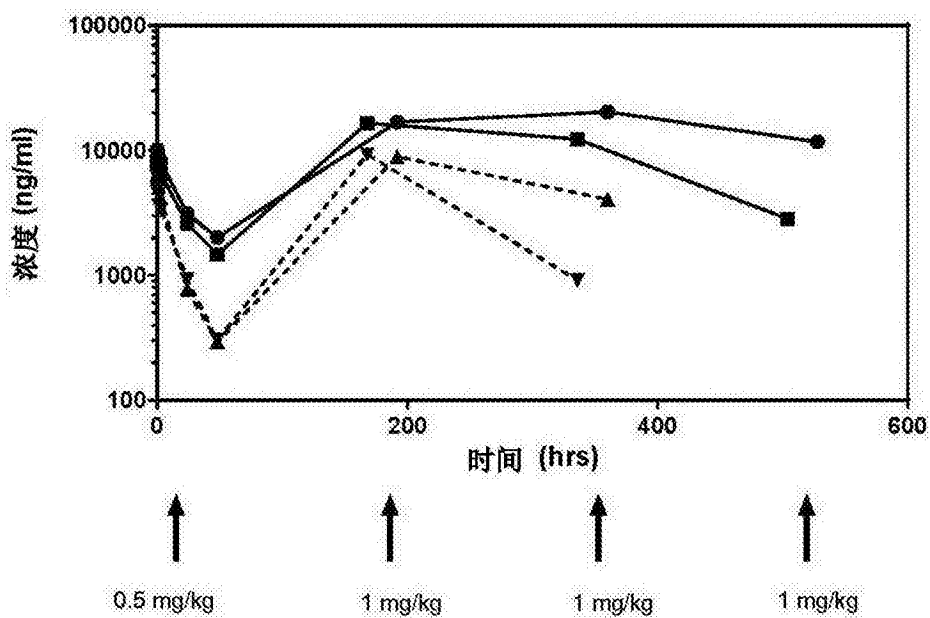


图17