



(12) 发明专利申请

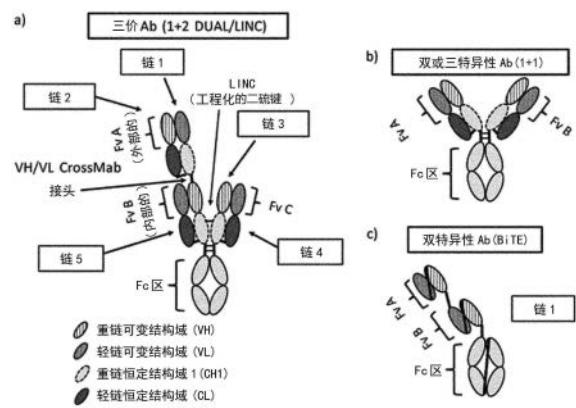
(10) 申请公布号 CN 118317786 A

(43) 申请公布日 2024. 07. 09

(21) 申请号	202280078531.5	(74) 专利代理机构	中科专利商标代理有限责任公司 11021
(22) 申请日	2022.09.28	专利代理师	周蕾 张莹
(30) 优先权数据	PCT/JP2021/035877 2021.09.29 JP	(51) Int.Cl.	A61K 39/395 (2006.01) A61K 31/4745 (2006.01) A61K 31/704 (2006.01) A61K 31/7048 (2006.01) A61K 33/245 (2006.01) A61K 45/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日	2024.05.27		
(86) PCT国际申请的申请数据	PCT/JP2022/036063 2022.09.28		
(87) PCT国际申请的公布数据	W02023/054423 EN 2023.04.06		
(71) 申请人	中外制药株式会社		
地址	日本		
(72) 发明人	直井壮太郎 冯舒 井川智之 何菽文 松田穰 三上纈史 川合由美子 恒成利明		权利要求书2页 说明书109页 序列表(电子公布) 附图9页

(54) 发明名称  
靶向DLL3的多特异性抗原结合分子的用途

(57) 摘要  
本发明提供了靶向人DLL3的多特异性抗原结合分子用于治疗癌症的用途。



1. 用于治疗癌症的包含抗体和药学上可接受的载体的药物制剂,其中所述抗体包含:

(a) 第一抗原结合部分和第二抗原结合部分,其各自包含抗体可变区,所述抗体可变区可以相同或不同并且独立地选自以下组成的组:

(a1) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:20的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:34的重链CDR 2、SEQ ID NO:48的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

(a2) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:28的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:42的重链CDR 2、SEQ ID NO:56的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

(a3) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:82的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:83的重链CDR 2、SEQ ID NO:84的重链CDR 3、SEQ ID NO:65的轻链CDR 1、SEQ ID NO:70的轻链CDR 2和SEQ ID NO:75的轻链CDR 3;和

(b) 第三抗原结合部分,其结合人δ样3(DLL3)并包含抗体可变区,所述抗体可变区包含含有SEQ ID NO:233的重链CDR1、含有SEQ ID NO:234的重链CDR2、含有SEQ ID NO:235的重链CDR3、含有SEQ ID NO:237的轻链CDR 1、含有SEQ ID NO:238的轻链CDR 2和含有SEQ ID NO:239的轻链CDR 3。

2. 权利要求1所述的药物制剂,其中所述第一和第二抗原结合部分各自包含可以相同或不同并且独立地选自以下组成的组的抗体可变区:

(a1) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区(VH),和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

(a2) 包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH,和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的VL;和

(a3) 包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的VH,和包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的VL。

3. 权利要求1或2所述的药物制剂,其中所述第一抗原结合部分和所述第二抗原结合部分中的每一个具有以下一种、两种或更多种性质:

(i) 与人CD3结合;

(ii) 与人CD137结合;或

(iii) 能够与人CD3和人CD137结合,其中第一抗原结合部分与人CD3和人CD137中的任一个结合。

4. 权利要求1或2所述的药物制剂,其中所述第三抗原结合部分包含抗体可变区,所述抗体可变区包含含有SEQ ID NO:232的VH和含有SEQ ID NO:236的VL。

5. 权利要求1或2所述的药物制剂,其中所述第一和第二抗原结合部分中的每一个是Fab,其在CH1结构域的191位置处(EU编号)具有半胱氨酸残基,并且其中存在连接两个半胱氨酸残基的二硫键。

6. 权利要求1或2所述的药物制剂,其中所述第一、第二和第三抗原结合部分各自是Fab,所述Fab包含含有VH和CH1结构域的重链和含有VL和轻链恒定(CL)结构域的轻链,并且其中所述第三抗原结合部分的重链的C末端直接或通过肽接头与所述第一抗原结合部分或第二抗原结合部分中任一项的Fab重链的N末端融合。

7. 权利要求6所述的药物制剂,其中所述第三抗原结合部分的重链的C末端通过肽接头

与所述第一抗原结合部分或第二抗原结合部分中任一项的Fab重链的N末端融合,并且其中所述肽接头具有选自SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:249和SEQ ID NO:259组成的组的氨基酸序列。

8.权利要求7所述的药物制剂,其中所述第三抗原结合部分是交叉Fab分子,其中Fab轻链和Fab重链的可变区被交换,并且其中所述第一和第二抗原结合部分各自是常规的Fab分子。

9.权利要求8所述的药物制剂,其中,在所述第一和第二抗原结合部分各自的CL结构域中,位置123和124处(Kabat编号)的氨基酸分别是精氨酸和赖氨酸;并且其中,在所述第一和第二抗原结合部分各自的CH1结构域中,在位置147和213处(EU编号)各自的氨基酸是谷氨酸。

10.权利要求1或2所述的药物制剂,其还包含Fc结构域。

11.用于治疗癌症的多特异性抗体,其中抗体包含选自以下(A)至(C)组成的组的组合中的五条多肽链:

(A) 包含SEQ ID NO:201的氨基酸序列的多肽链(链1),包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2),包含SEQ ID NO:208的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5);

(B) 包含SEQ ID NO:203的氨基酸序列的多肽链(链1),包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2),包含SEQ ID NO:209的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5);和

(C) 包含SEQ ID NO:204的氨基酸序列的多肽链(链1),包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2),包含SEQ ID NO:209的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5)。

12.权利要求1或2所述的药物制剂或权利要求11所述的多特异性抗体,其用于治疗癌症,其中所述癌症是表达DLL3的癌症或DLL3阳性的癌症,优选选自神经内分泌瘤(NEN)、神经内分泌肿瘤(NET)、神经内分泌癌(NEC)或其他非神经内分泌来源的实体瘤组成的组。

13.权利要求1或2所述的药物制剂或权利要求11所述的多特异性抗体,其用于治疗癌症,其中所述癌症选自胰腺神经内分泌肿瘤(PNET)、小细胞型NEC(SCNEC)、大细胞型NEC(LCNEC)、小细胞肺癌(SCLC)、大细胞神经内分泌肺癌、神经内分泌前列腺癌(NEPC)、默克尔细胞癌、小细胞膀胱癌、胃肠道神经内分泌癌、甲状腺髓样癌(MTC)、胃肠胰神经内分泌癌(GEP NEC)、成神经细胞瘤、神经胶质瘤或胶质母细胞瘤(GBM)、黑色素瘤和甲状腺髓样癌组成的组。

14.权利要求1或2所述的药物制剂或权利要求11所述的多特异性抗体,其用于与另外的治疗剂组合治疗癌症,优选与化疗剂或免疫检查点抑制剂组合。

15.权利要求14所述的药物制剂或多特异性抗体,其用于与免疫检查点抑制剂组合治疗癌症,其中免疫检查点抑制剂是PD-1轴结合拮抗剂,优选抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体。

16.权利要求14所述的药物制剂或多特异性抗体,其用于与化疗剂组合治疗癌症,其中化疗剂选自微管破坏剂、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、DNA嵌入剂、烷化剂、激素疗法、激酶抑制剂、受体拮抗剂、肿瘤细胞凋亡活化剂、抗血管生成剂、依托泊苷、伊立替康、芦比替定、阿霉素和铂类药剂(如顺铂和卡铂)组成的组。

## 靶向DLL3的多特异性抗原结合分子的用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及靶向DLL3的多特异性抗原结合分子,包含这种抗原结合分子的药物组合物;以及这种抗原结合分子或这种组合物在癌症疾病领域中用于治疗目的的用途。

### 背景技术

[0002] 在癌症治疗中,有效地和选择性地破坏肿瘤细胞,同时保持健康细胞和组织不受损害是一个理想的目标。与DLL3过表达相关的肿瘤性疾病,例如神经内分泌癌(NEC)、神经内分泌肿瘤(NET)和其他实体瘤的治疗需要改进。

[0003]  $\delta$ 样3(DLL3)是属于Notch配体家族成员的I型膜蛋白。DLL3是一种非经典Notch配体,以细胞自主的方式起作用以抑制Notch信号传导,顺式结合Notch,从而阻断细胞间相互作用和靶细胞中Notch的内在化,这是经典Notch信号传导的标志。DLL3的主要作用是胚胎发育过程中的体节发生。DLL3敲除的小鼠在中轴骨骼以及颅骨和神经元发育中显示出节段性缺损。在具有某些种系DLL3突变的人类中也发现了体节图式发育缺陷,导致称为脊椎肋骨发育不全(spondylocostal dysostosis)。以前的研究报道了在癌细胞系中染色体上DLL3基因的扩增,和该基因的表达增加(NPL 1),并且在一些神经胶质瘤病例中DLL3的表达增加(NPL 2)。此外,使用ADCC增强的抗体、抗体-药物偶联物(ADC)和使用BiTE-Fc形式的T细胞衔接双特异性分子(PTL1,2和3),DLL3先前已被提议用于诊断和治疗神经胶质瘤或小细胞肺癌(SCLC)的方法中。

[0004] 引文列表

[0005] 专利文献

[0006] [PTL 1]WO 2011/093097

[0007] [PTL 2]WO 2013/126746

[0008] [PTL 3]WO 2017/021349

[0009] 非专利文献

[0010] [NPL 1]Phillips,H.S.(2006)Cancer Cell 9,157-173.

[0011] [NPL 2]Mulledndore,M.E.(2009)Clin Cancer Res 15,2291-2301.

### 发明内容

[0012] 技术问题

[0013] 本发明的目的是提供通过募集靠近表达DLL3的细胞的T细胞并利用T细胞对表达DLL3的癌细胞的细胞毒性而能够治疗癌症的多特异性抗原结合分子、用于产生多特异性抗原结合分子的方法,以及包含这种多特异性抗原结合分子作为用于诱导细胞的细胞毒性的活性成分的治疗剂。本发明的另一个目的是提供用于治疗或预防各种癌症的药物组合物,其包含上述抗原结合分子之一作为活性成分,以及使用该药物组合物的治疗方法。

[0014] 问题的解决方案

[0015] 本发明涉及多特异性抗原结合分子,其包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部



分;以及第三抗原结合部分,所述第一抗原结合部分和第二抗原结合部分各自能够结合CD3和CD137,但不同时结合CD3和CD137(即能够与CD3和CD137结合,但不能同时结合);所述第三抗原结合部分能够结合DLL3,优选人DLL3,所述多特异性抗原结合分子更有效地诱导T细胞依赖性细胞毒性,同时规避其他多特异性抗原结合分子可能具有的不利毒性问题或副作用。本发明还涉及所述多特异性抗原结合分子及其药物组合物的医学用途,其通过包含抗原结合分子作为活性成分,可以治疗各种癌症,特别是与DLL3相关的癌症,例如表达DLL3的或DLL3阳性的癌症。在一个方面,所述表达DLL3的或DLL3阳性的癌症选自胰腺神经内分泌肿瘤(PNET)、小细胞型NEC(SCNEC)、大细胞型NEC(LCNEC)、小细胞肺癌(SCLC)、大细胞神经内分泌肺癌、神经内分泌前列腺癌(NEPC)、默克尔细胞癌、小细胞膀胱癌、胃肠道神经内分泌癌、甲状腺髓样癌(MTC)、胃肠胰神经内分泌癌(GEP NEC)、成神经细胞瘤、神经胶质瘤或胶质母细胞瘤(GBM)、黑色素瘤和甲状腺髓样癌组成的组。

[0016] 一方面,本发明的多特异性抗原结合分子具有非常独特的结构形式,其改善或增强了多特异性抗原结合分子的功效。具有独特结构形式的新抗原结合分子提供了数量增加的抗原结合结构域,从而对效应细胞和靶细胞上的各个抗原的效价和/或特异性提高,而不需要的不良副作用减少。

[0017] 在一个特定方面,本发明涉及多特异性抗原结合分子,其包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分;以及第三抗原结合部分,所述第一抗原结合部分和第二抗原结合部分各自能够结合CD3和CD137,但不同时结合CD3和CD137(即能够与CD3和CD137结合,但不能同时结合),所述第三抗原结合部分能够结合DLL3,优选人DLL3,所述多特异性抗原结合分子有效地诱导T细胞依赖性细胞毒性,同时规避其他多特异性抗原结合分子可能具有的不利毒性问题或副作用。在一个方面,能够结合CD3和CD137但不同时结合CD3和CD137的抗原结合部分是能够结合人CD3和人CD137的抗原结合部分,其中第一抗原结合部分结合人CD3和人CD137中的任一个。能够与CD3和CD137结合但不同时与CD3和CD137结合(即能够与CD3和CD137结合但不同时结合)的抗原结合部分可以称为“双抗原结合部分”或在某些方面称为“双Fab”,如下面更具体地定义。在一个这样的方面,第一和第二抗原结合部分各自都包含至少一个氨基酸突变,例如半胱氨酸插入/取代/突变,其在第一和第二抗原结合部分之间产生二硫键,以使所述第一和第二抗原结合部分彼此靠近,并且例如,由于两个抗原结合部分(例如双Fab)之间的空间位阻或更短的距离,促进对在相同单个效应细胞上的抗原(CD3和/或CD137)的顺式抗原结合,从而通过以不依赖DLL3的方式,防止两个抗原结合部分(能够与CD3和CD137结合但不同时结合)介导的两个表达CD3/CD137的免疫细胞的不期望的交联,提高三特异性抗原结合分子的安全性。在一个具体方面,所述第一抗原结合部分和第二抗原结合部分各自是Fab并且在CH1区包含至少一个半胱氨酸残基(通过突变、取代或插入),所述至少一个半胱氨酸残基能够在第一抗原结合部分的CH1区和第二抗原结合部分的CH1区之间形成至少一个二硫键。在另一个具体方面,所述第一抗原结合部分和第二抗原结合部分各自在CH1区中根据EU编号的位置191处包含一个半胱氨酸残基(通过突变、取代或插入),所述半胱氨酸残基能够在第一抗原结合部分的CH1区和第二抗原结合部分的CH1区之间形成一个二硫键。连接第一和第二抗原结合部分的CH1区(例如根据EU编号的位置191)中的这种二硫键在本文中可称为“LINC”。

[0018] 令人惊讶地发现,具有这种独特结构形式的抗原结合分子,即三价三特异性抗体,

与其他多特异性抗体形式(例如BiTE)相比,显示出优异的功效,同时表现出减少或最小的由不同细胞(例如效应细胞如T细胞)之间不希望的交联引起的脱靶副作用,所述三价三特异性抗体包含两个单价双Fab,每个Fab能够结合CD3和CD137但不同时结合,以及一个单价DLL3结合臂,其可以被称为“(2+1)”(或“1+2”)。

[0019] 本发明涉及:

[0020] [A-1]用作药物的抗体;

[0021] 或用于治疗癌症的抗体;

[0022] 或包含抗体和药学上可接受的载体的药物制剂;

[0023] 或用作药物的包含抗体和药学上可接受的载体的药物制剂;

[0024] 或用于治疗癌症的包含抗体和药学上可接受的载体的药物制剂。

[0025] [A-2] [A-1]的抗体或药物制剂,其中抗体包括:

[0026] (a) 第一抗原结合部分和第二抗原结合部分,其各自包含抗体可变区,所述抗体可变区可以相同或不同并且独立地选自由以下组成的组:

[0027] (a1) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:20的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:34的重链CDR 2、SEQ ID NO:48的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0028] (a2) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:28的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:42的重链CDR 2、SEQ ID NO:56的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0029] (a3) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:82的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:83的重链CDR 2、SEQ ID NO:84的重链CDR 3、SEQ ID NO:65的轻链CDR 1、SEQ ID NO:70的轻链CDR 2和SEQ ID NO:75的轻链CDR 3;和

[0030] (b) 第三抗原结合部分,其结合人 $\delta$ 样3(DLL3)并包含抗体可变区,所述抗体可变区包含含有SEQ ID NO:233的重链CDR1、含有SEQ ID NO:234的重链CDR2、含有SEQ ID NO:235的重链CDR3、含有SEQ ID NO:237的轻链CDR 1、含有SEQ ID NO:238的轻链CDR2和含有SEQ ID NO:239的轻链CDR 3。

[0031] [A-3] [A-2]的抗体或药物制剂,其中所述第一抗原结合部分和所述第二抗原结合部分中的每一个具有以下一种、两种或更多种性质:

[0032] (i) 与人CD3结合;

[0033] (ii) 与人CD137结合;

[0034] (iii) 能够与人CD3和人CD137结合,其中第一抗原结合部分和第二抗原结合部分中的每一个与人CD3和人CD137中的任一个结合;和

[0035] (iv) 能够结合人CD3和人CD137,但不同时结合人CD3和人CD137。

[0036] [A-4] [A-2]至[A-3]中任一项的抗体或药物制剂,其中所述第一和第二抗原结合部分各自包含可以相同或不同并且独立地选自由以下组成的组的抗体可变区:

[0037] (a1) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区(VH),和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

[0038] (a2) 包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH,和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的VL;

[0039] (a3) 包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的VH,和包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的VL;

[0040] (a4) 包含在(a1)至(a3)中任一项所述的VH和VL中的一个或多个氨基酸取代、缺失、添加和/或插入,并且具有与所述的VH和VL中的任一个相当的活性的VH和VL;和

[0041] (a5) 具有与(a1)至(a3)中任一项定义的VH和VL的氨基酸序列至少80%、85%、90%或95%的序列同一性的VH和VL。

[0042] [A-5][A-2]至[A-3]中任一项所述的抗体或药物制剂,其中,所述第一抗原结合部分和所述第二抗原结合部分各自包含抗体可变区,所述抗体可变区包含SEQ ID NO:20的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:34的重链CDR 2、SEQ ID NO:48的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3。

[0043] [A-6][A-4]所述的抗体或药物制剂,其中所述第一抗原结合部分和所述第二抗原结合部分各自包含抗体可变区,所述抗体可变区包含含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区,以及含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的轻链可变区。

[0044] [A-7][A-2]至[A-6]中任一项所述的抗体或药物制剂,其中第三抗原结合部分包括:

[0045] (a) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:232的VH和含有SEQ ID NO:236的VL;或

[0046] (b) 抗体可变区,其包含具有与SEQ ID NO:232的氨基酸序列至少80%、85%、90%或95%序列同一性的VH和具有与SEQ ID NO:236的氨基酸序列至少80%、85%、90%或95%序列同一性的VL。

[0047] [A-8][A-2]至[A-7]中任一项所述的抗体或药物制剂,其中,所述第一和第二抗原结合部分各自为在位置191处(EU编号)具有半胱氨酸残基的Fab,并且其中存在连接两个半胱氨酸残基的二硫键。

[0048] [A-9][A-2]至[A-8]任一项所述的抗体或药物制剂,其中所述第一、第二和第三抗原结合部分各自是Fab,所述Fab包含含有VH和CH1结构域的重链和含有VL和轻链恒定(CL)结构域的轻链,并且其中所述第三抗原结合部分的重链的C末端直接或通过肽接头与所述第一抗原结合部分或第二抗原结合部分中任一项的Fab重链的N末端融合。

[0049] [A-10-1][A-9]所述的抗体或药物制剂,其中所述第三抗原结合部分的重链的C末端通过肽接头与所述第一抗原结合部分或第二抗原结合部分两者的任一项的Fab重链的N末端融合,并且其中所述肽接头具有选自SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:249和SEQ ID NO:259组成的组的氨基酸序列。

[0050] [A-10-2][A-10-1]所述的抗体或药物制剂,其中所述第三抗原结合部分是交叉Fab分子,其中Fab轻链和Fab重链的可变区被交换,并且其中所述第一和第二抗原结合部分各自是常规的Fab分子。

[0051] [A-11][A-10-2]所述的抗体或药物制剂,其中,在所述第一和第二抗原结合部分各自的CL结构域中,位置123和124处(Kabat编号)的氨基酸分别是精氨酸和赖氨酸;并且其中,在所述第一和第二抗原结合部分各自的CH1结构域中,在位置147和213处(EU编号)各自的氨基酸是谷氨酸。

[0052] [A-12][A2]至[A-11]中任一项所述的抗体或药物制剂,还包括Fc结构域。

[0053] [A-13][A-12]所述的抗体或药物制剂,其中所述Fc结构域包含第一和第二Fc区亚

基,所述第一Fc区亚基选自包括以下的组:

[0054] 在位置234和235处各自包含丙氨酸的Fc区多肽;

[0055] 在位置234、235和297处各自包含丙氨酸的Fc区多肽;和

[0056] 在位置234、235和297处各自包含丙氨酸,在位置354处包含半胱氨酸,并且在位置366处包含色氨酸的Fc区多肽;和

[0057] 所述第二Fc区亚基选自包括以下的组:

[0058] 在位置234和235处各自包含丙氨酸的Fc区多肽;

[0059] 在位置234、235和297处各自包含丙氨酸的Fc区多肽;和

[0060] 在位置234、235和297处各自包含丙氨酸、在位置349处包含半胱氨酸、在位置366处包含丝氨酸、在位置368处包含丙氨酸和在位置407处包含缬氨酸的Fc区多肽,

[0061] 其中所有位置均按EU编号。

[0062] [A-14][A-2]的抗体或药物制剂,其中抗体包含选自由以下(A)至(C)组成的组的组合中的五条多肽链:

[0063] (A)包含SEQ ID NO:201的氨基酸序列的多肽链(链1),包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2),包含SEQ ID NO:208的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5);

[0064] (B)包含SEQ ID NO:203的氨基酸序列的多肽链(链1),包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2),包含SEQ ID NO:209的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5);和

[0065] (C)包含SEQ ID NO:204的氨基酸序列的多肽链(链1),包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2),包含SEQ ID NO:209的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5)。

[0066] [A-15][A-2]的抗体或药物制剂,其中抗体包含在下列组合中的五条多肽链:

[0067] 包含SEQ ID NO:201的氨基酸序列的多肽链(链1),包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2),包含SEQ ID NO:208的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5)。

[0068] [A-16][A-2]的抗体或药物制剂,其中抗体包含在下列组合中的五条多肽链:

[0069] 包含SEQ ID NO:203的氨基酸序列的多肽链(链1),包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2),包含SEQ ID NO:209的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5)。

[0070] [A-17][A-2]的抗体或药物制剂,其中抗体包含在下列组合中的五条多肽链:

[0071] 包含SEQ ID NO:204的氨基酸序列的多肽链(链1),包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2),包含SEQ ID NO:209的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5)。

[0072] [A-18][A-14]至[A-17]中任一项所述的抗体或药物制剂,其中抗体的五条多肽链(链1至链5)彼此连接和/或缔合,如图1(a)所示。

[0073] [A-19][A-14]至[A-17]中任一项所述的抗体或药物制剂,其中多肽链2和链5中的每一个都与多肽链1缔合;多肽链4与多肽链3缔合;多肽链1与多肽链3缔合。

[0074] [A-20][A-2]至[A-17]中任一项所述的抗体或药物制剂,其用于与另外的治疗剂,

优选化疗剂或免疫检查点抑制剂组合使用。

[0075] [A-21] [A-20]所述的抗体或药物制剂,其用于与免疫检查点抑制剂组合使用,其中免疫检查点抑制剂是PD-1轴结合拮抗剂,优选抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体,更优选阿替利珠单抗。

[0076] [A-22] [A-20]所述的抗体或药物制剂,其用于与化疗剂组合使用,其中化疗剂选自由微管破坏剂、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、DNA嵌入剂、烷化剂、激素疗法、激酶抑制剂、受体拮抗剂、肿瘤细胞凋亡活化剂、抗血管生成剂、依托泊苷、伊立替康、芦比替定(Lurbinectedin)、阿霉素和铂类制剂(如顺铂和卡铂)组成的组。

[0077] [A-23] [A-20]至[A-22]中任一项所述的抗体或药物制剂,其中免疫检查点抑制剂或化疗剂与抗体或药物制剂同时施用。

[0078] [A-24] [A-20]至[A-23]中任一项所述的抗体或药物制剂,其中免疫检查点抑制剂或化疗剂在施用抗体或药物制剂之前或之后施用。

[0079] [A-25] [A-2]至[A-24]中任一项所述的抗体或药物制剂,其用于治疗癌症,其中癌症是表达DLL3的或DLL3阳性的癌症。

[0080] [A-26] [A-25]所述的抗体或药物制剂,其中所述癌症选自由神经内分泌瘤(neuroendocrine neoplasm) (NEN)、神经内分泌肿瘤(neuroendocrine tumor) (NET)、神经内分泌癌(NEC)和其他非神经内分泌来源的实体瘤组成的组。

[0081] [A-27] [A-25]所述的抗体或药物制剂,其中所述癌症选自由胰腺神经内分泌肿瘤(PNET)、小细胞型NEC(SCNEC)、大细胞型NEC(LCNEC)、小细胞肺癌(SCLC)、大细胞神经内分泌肺癌、神经内分泌前列腺癌(NEPC)、默克尔细胞癌、小细胞膀胱癌、胃肠道神经内分泌癌、甲状腺髓样癌(MTC)、胃肠胰神经内分泌癌(GEP NEC)、成神经细胞瘤、神经胶质瘤或胶质母细胞瘤(GBM)、黑色素瘤和甲状腺髓样癌组成的组。

[0082] [A-28] [A-25]的抗体或药物制剂,其中所述癌症是肺癌,优选SCLC。

[0083] [A-29] [A-25]的抗体或药物制剂,其中癌症是神经胶质瘤或胶质母细胞瘤(GBM)。

[0084] [A-30] [A-25]的抗体或药物制剂,其中所述癌症是神经内分泌前列腺癌。

[0085] [A-31] [A-25]的抗体或药物制剂,其中癌症是成神经细胞瘤。

[0086] [A-32] [A-2]至[A-31]中任一项所述的抗体或药物制剂,其中所述抗体是多特异性抗体。

[0087] [A-33] [A-21]应用的所述的抗体或药物制剂,还与化疗剂组合,其中化疗剂选自由微管破坏剂、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、DNA嵌入剂、烷化剂、激素疗法、激酶抑制剂、受体拮抗剂、肿瘤细胞凋亡活化剂、抗血管生成剂、依托泊苷、伊立替康、芦比替定(Lurbinectedin)、阿霉素和铂类制剂(如顺铂和卡铂)组成的组。

[0088] [A-34] [A-22]所述的抗体或药物制剂,还与免疫检查点抑制剂组合,其中免疫检查点抑制剂是PD-1轴结合拮抗剂,优选抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体,更优选阿替利珠单抗。

[0089] [B-1]多特异性抗体,其包含:

[0090] (a) 第一抗原结合部分和第二抗原结合部分,其各自包含抗体可变区,所述抗体可变区可以相同或不同并且独立地选自由以下组成的组:

[0091] (a1) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:20的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:34的重链CDR 2、SEQ ID NO:48的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻

链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0092] (a2) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:28的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:42的重链CDR 2、SEQ ID NO:56的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0093] (a3) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:82的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:83的重链CDR 2、SEQ ID NO:84的重链CDR 3、SEQ ID NO:65的轻链CDR 1、SEQ ID NO:70的轻链CDR 2和SEQ ID NO:75的轻链CDR 3;和

[0094] (b) 第三抗原结合部分,其结合人 $\delta$ 样3(DLL3)并包含抗体可变区,所述抗体可变区包含含有SEQ ID NO:233的重链CDR1、含有SEQ ID NO:234的重链CDR2、含有SEQ ID NO:235的重链CDR3、含有SEQ ID NO:237的轻链CDR 1、含有SEQ ID NO:238的轻链CDR 2和含有SEQ ID NO:239的轻链CDR 3。

[0095] [B-2][B-1]所述的多特异性抗体,其中所述第一抗原结合部分和所述第二抗原结合部分中的每一个具有以下一种、两种或更多种性质:

[0096] (i) 与人CD3结合;

[0097] (ii) 与人CD137结合;

[0098] (iii) 能够与人CD3和人CD137结合,其中第一抗原结合部分和第二抗原结合部分中的每一个与人CD3和人CD137中的任一个结合;和

[0099] (iv) 能够结合人CD3和人CD137,但不同时结合人CD3和人CD137。

[0100] [B-3][B-1]至[B-2]中任一项所述的多特异性抗体,其中所述第一和第二抗原结合部分各自包含可以相同或不同并且独立地选自以下组成的组的抗体可变区:

[0101] (a1) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区(VH),和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

[0102] (a2) 包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH,和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的VL;

[0103] (a3) 包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的VH,和包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的VL;

[0104] (a4) 包含在(a1)至(a3)中任一项所述的VH和VL中的一个或多个氨基酸取代、缺失、添加和/或插入,并且具有与所述的VH和VL中的任一个相当的活性的VH和VL;和

[0105] (a5) 具有与(a1)至(a3)中任一项定义的VH和VL的氨基酸序列至少80%、85%、90%或95%的序列同一性的VH和VL。

[0106] [B-4][B-1]至[B-2]中任一项所述的多特异性抗体,其中,所述第一抗原结合部分和所述第二抗原结合部分各自包含抗体可变区,所述抗体可变区包含SEQ ID NO:20的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:34的重链CDR 2、SEQ ID NO:48的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3。

[0107] [B-5][B-3]所述的多特异性抗体,其中所述第一抗原结合部分和所述第二抗原结合部分各自包含抗体可变区,所述抗体可变区包含含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区,以及含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的轻链可变区。

[0108] [B-6][B-1]至[B-5]中任一项所述的多特异性抗体,其中第三抗原结合部分包括:

[0109] (a) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:232的VH和含有SEQ ID NO:236的VL;或

[0110] (b) 抗体可变区,其包含具有与SEQ ID NO:232的氨基酸序列至少80%、85%、90%或95%序列同一性的VH和具有与SEQ ID NO:236的氨基酸序列至少80%、85%、90%或95%序列同一性的VL。

[0111] [B-7][B-1]至[B-6]中任一项所述的多特异性抗体,其中,所述第一和第二抗原结合部分各自为在位置191处(EU编号)具有半胱氨酸残基的Fab,并且其中存在连接两个半胱氨酸残基的二硫键。

[0112] [B-8][B-1]至[B-7]任一项所述的多特异性抗体,其中所述第一、第二和第三抗原结合部分各自是Fab,所述Fab包含含有VH和CH1结构域的重链和含有VL和轻链恒定(CL)结构域的轻链,并且其中所述第三抗原结合部分的重链的C末端直接或通过肽接头与所述第一抗原结合部分或第二抗原结合部分中任一项的Fab重链的N末端融合。

[0113] [B-9-1][B-8]所述的多特异性抗体,其中所述第三抗原结合部分的重链的C末端通过肽接头与所述第一抗原结合部分或第二抗原结合部分两者的任一项的Fab重链的N末端融合,并且其中所述肽接头具有选自由SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:249和SEQ ID NO:259组成的组的氨基酸序列。

[0114] [B-9-2][B-9-1]所述的多特异性抗体,其中所述第三抗原结合部分是交叉Fab分子,其中Fab轻链和Fab重链的可变区被交换,并且其中所述第一和第二抗原结合部分各自是常规的Fab分子。

[0115] [B-10][B-9-2]所述的多特异性抗体,其中,在所述第一和第二抗原结合部分各自的CL结构域中,位置123和124处(Kabat编号)的氨基酸分别是精氨酸和赖氨酸;并且其中,在所述第一和第二抗原结合部分各自的CH1结构域中,在位置147和213处(EU编号)各自的氨基酸是谷氨酸。

[0116] [B-11][B-1]至[B-10]中任一项所述的多特异性抗体,还包括Fc结构域。

[0117] [B-12][B-11]所述的多特异性抗体,其中所述Fc结构域包含第一和第二Fc区亚基,所述第一Fc区亚基选自包括以下的组:

[0118] 在位置234和235处各自包含丙氨酸的Fc区多肽;

[0119] 在位置234、235和297处各自包含丙氨酸的Fc区多肽;和

[0120] 在位置234、235和297处各自包含丙氨酸,在位置354处包含半胱氨酸,并且在位置366处包含色氨酸的Fc区多肽;和

[0121] 所述第二Fc区亚基选自包括以下的组:

[0122] 在位置234和235处各自包含丙氨酸的Fc区多肽;

[0123] 在位置234、235和297处各自包含丙氨酸的Fc区多肽;和

[0124] 在位置234、235和297处各自包含丙氨酸、在位置349处包含半胱氨酸、在位置366处包含丝氨酸、在位置368处包含丙氨酸和在位置407处包含缬氨酸的Fc区多肽,

[0125] 其中所有位置均按EU编号。

[0126] [B-13][B-1]的多特异性抗体,其中抗体包含选自由以下(A)至(C)组成的组的组合中的五条多肽链:

[0127] (A) 包含SEQ ID NO:201的氨基酸序列的多肽链(链1),包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2),包含SEQ ID NO:208的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5);

[0128] (B) 包含SEQ ID NO:203的氨基酸序列的多肽链(链1), 包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2), 包含SEQ ID NO:209的氨基酸序列的多肽链(链3) 和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5); 和

[0129] (C) 包含SEQ ID NO:204的氨基酸序列的多肽链(链1), 包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2), 包含SEQ ID NO:209的氨基酸序列的多肽链(链3) 和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5)。

[0130] [B-14] [B-1]所述的多特异性抗体, 其中抗体包含在下列组合中的五条多肽链:

[0131] 包含SEQ ID NO:201的氨基酸序列的多肽链(链1), 包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2), 包含SEQ ID NO:208的氨基酸序列的多肽链(链3) 和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5)。

[0132] [B-15] [B-1]所述的多特异性抗体, 其中抗体包含在下列组合中的五条多肽链:

[0133] 包含SEQ ID NO:203的氨基酸序列的多肽链(链1), 包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2), 包含SEQ ID NO:209的氨基酸序列的多肽链(链3) 和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5)。

[0134] [B-16] [B-1]所述的多特异性抗体, 其中抗体包含在下列组合中的五条多肽链:

[0135] 包含SEQ ID NO:204的氨基酸序列的多肽链(链1), 包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2), 包含SEQ ID NO:209的氨基酸序列的多肽链(链3) 和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5)。

[0136] [B-17] [B-13] 至 [B-16] 中任一项所述的多特异性抗体, 其中抗体的五条多肽链(链1至链5)彼此连接和/或缔合, 如图1(a)所示。

[0137] [B-18] [B-13] 至 [B-16] 中任一项所述的多特异性抗体, 其中多肽链2和链5中的每一个都与多肽链1缔合; 多肽链4与多肽链3缔合; 多肽链1与多肽链3缔合。

[0138] [B-19] [B-1] 至 [B-18] 中任一项所述的多特异性抗体, 其用于作为药物。

[0139] [B-20] [B-1] 至 [B-18] 中任一项所述的多特异性抗体, 其用于治疗癌症。

[0140] [C-1] 药物制剂, 其包含 [B-1] 至 [B-18] 中任一项所述的多特异性抗体和药学上可接受的载体。

[0141] [C-1] 药物制剂, 其包含免疫检查点抑制剂和药学上可接受的载体, 用于与 [B-1] 至 [B-18] 中任一项所述的多特异性抗体组合使用, 用于治疗癌症。

[0142] [C-3] 包含化疗剂和药学上可接受的载体的药物制剂, 其用于与 [B-1] 至 [B-18] 中任一项所述的多特异性抗体组合使用, 用于治疗癌症。

[0143] [C-4] [C-2] 所述的药物制剂, 其中免疫检查点抑制剂是PD-1轴结合拮抗剂, 优选抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体, 更优选阿替利珠单抗。

[0144] [C-5] [C-3] 所述的药物制剂, 其中化疗剂选自微管破坏剂、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、DNA嵌入剂、烷化剂、激素疗法、激酶抑制剂、受体拮抗剂、肿瘤细胞凋亡活化剂、抗血管生成剂、依托泊苷、伊立替康、芦比替定(Lurbinectedin)、阿霉素和铂类制剂(如顺铂和卡铂)组成的组。

[0145] [C-6] [C-2] 至 [C-5] 中任一项所述的药物制剂, 其中免疫检查点抑制剂或化疗剂与多特异性抗体同时施用。

[0146] [C-7] [C-2] 至 [C-5] 中任一项所述的药物制剂, 其中免疫检查点抑制剂或化疗剂



在施用多特异性抗体之前或之后施用。

[0147] [D-1] [B-1] 至 [B-18] 中任一项所述的多特异性抗体或 [C-1] 至 [C-7] 中任一项所述的药物制剂在治疗癌症中的用途。

[0148] [E-1] 治疗患有癌症的个体的方法,其包括向所述个体施用有效量的 [B-1] 至 [B-18] 中任一项所述的多特异性抗体或 [C-1] 至 [C-7] 中任一项所述的药物制剂。

[0149] [E-2] 激活或增强对癌症的持续免疫应答的方法,其中所述方法包括向受试者施用治疗有效量的 [B-1] 至 [B-18] 中任一项所述的多特异性抗体或 [C-1] 至 [C-7] 中任一项所述的药物制剂。

[0150] [E-3] 提高免疫检查点抑制剂功效的方法,其中所述方法包括与免疫检查点抑制剂组合,向受试者施用治疗有效量的 [B-1] 至 [B-18] 中任一项所述的多特异性抗体或 [C-1] 至 [C-7] 中任一项所述的药物制剂。

[0151] [E-4] 减少或预防受试者中转移的方法,其中所述方法包括向受试者施用治疗有效量的 [B-1] 至 [B-18] 中任一种的多特异性抗体或 [C-1] 至 [C-7] 中任一项的药物制剂。

[0152] [E-5] 抑制受试者中肿瘤生长的方法,其中所述方法包括向受试者施用治疗有效量的 [B-1] 至 [B-18] 中任一项所述的多特异性抗体或 [C-1] 至 [C-7] 中任一项所述的药物制剂。

[0153] [E-6] [E-1] 至 [E-5] 中任一项所述的方法,还包含向受试者施用另外的治疗剂,优选化疗剂或免疫检查点抑制剂。

[0154] [E-7] [E-6] 所述的方法,其中免疫检查点抑制剂是PD-1轴结合拮抗剂,优选抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体,更优选阿替利珠单抗。

[0155] [E-8] [E-6] 所述的方法,其中化疗剂选自微管破坏剂、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、DNA嵌入剂、烷化剂、激素疗法、激酶抑制剂、受体拮抗剂、肿瘤细胞凋亡活化剂、抗血管生成剂、依托泊苷、伊立替康、芦比替定 (Lurbinectedin)、阿霉素和铂类制剂(如顺铂和卡铂)组成的组。

[0156] [E-9] [E-6] 至 [E-8] 中任一项所述的方法,其中另外的治疗剂、免疫检查点抑制剂或化疗剂与多特异性抗体或药物制剂同时施用。

[0157] [E-10] [E-6] 至 [E-8] 中任一项所述的方法,其中另外的治疗剂、免疫检查点抑制剂或化疗剂在施用多特异性抗体或药物制剂之前或之后施用。

[0158] [F-1] [B-1] 至 [B-18] 中任一项所述的多特异性抗体或 [C-1] 至 [C-3] 中任一项所述的药物制剂在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

[0159] [F-2] [B-1] 至 [B-18] 中任一项所述的多特异性抗体或 [C-1] 至 [C-3] 中任一项所述的药物制剂与另外的治疗剂(优选化疗剂或免疫检查点抑制剂)组合在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

[0160] [F-3] [F-2] 所述的用途,其中免疫检查点抑制剂是PD-1轴结合拮抗剂,优选抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体,更优选阿替利珠单抗。

[0161] [F-4] [F-2] 所述的用途,其中化疗剂选自微管破坏剂、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、DNA嵌入剂、烷化剂、激素疗法、激酶抑制剂、受体拮抗剂、肿瘤细胞凋亡活化剂、抗血管生成剂、依托泊苷、伊立替康、芦比替定 (Lurbinectedin)、阿霉素和铂类制剂(如顺铂和卡铂)组成的组。

[0162] [G-1][C-1]至[C-7]中任一项所述的药物制剂,[D-1]至[F-4]中任一项所述的方法或用途,其中所述癌症是表达DLL3的或DLL3阳性的癌症。

[0163] [G-2][C-1]至[C-7]中任一项所述的药物制剂,[D-1]至[F-4]中任一项所述的方法或用途,其中所述癌症选自由神经内分泌瘤(neuroendocrine neoplasm)(NEN)、神经内分泌肿瘤(neuroendocrine tumor)(NET)、神经内分泌癌(NEC)和其他非神经内分泌来源的实体瘤组成的组。

[0164] [G-3][C-1]至[C-7]中任一项所述的药物制剂,[D-1]至[F-4]中任一项所述的方法或用途,其中所述癌症选自由胰腺神经内分泌肿瘤(PNET)、小细胞型NEC(SCNEC)、大细胞型NEC(LCNEC)、小细胞肺癌(SCLC)、大细胞神经内分泌肺癌、神经内分泌前列腺癌(NEPC)、默克尔细胞癌、小细胞膀胱癌、胃肠道神经内分泌癌、甲状腺髓样癌(MTC)、胃肠胰神经内分泌癌(GEP NEC)、成神经细胞瘤、神经胶质瘤或胶质母细胞瘤(GBM)、黑色素瘤和甲状腺髓样癌组成的组。

[0165] [G-4][C-1]至[C-7]中任一项所述的药物制剂,[D-1]至[F-4]中任一项所述的方法或用途,其中所述癌症是肺癌,优选SCLC。

[0166] [G-5][C-1]至[C-7]中任一项所述的药物制剂,[D-1]至[F-4]中任一项所述的方法或用途,其中所述癌症是神经胶质瘤或胶质母细胞瘤(GBM)。

[0167] [G-6][C-1]至[C-7]中任一项所述的药物制剂,[D-1]至[F-4]中任一项所述的方法或用途,其中所述癌症是神经内分泌前列腺癌。

[0168] [G-7][C-1]至[C-7]中任一项所述的药物制剂,[D-1]至[F-4]中任一项所述的方法或用途,其中所述癌症是成神经细胞瘤。

[0169] 在另一方面,本公开提供了以下:

[0170] [1]多特异性抗原结合分子,其包含:

[0171] 第一抗原结合部分和第二抗原结合部分,所述第一抗原结合部分和第二抗原结合部分中的每一个具有以下一种、两种或更多种性质:

[0172] (i)与人CD3结合;

[0173] (ii)与人CD137结合;

[0174] (iii)能够与人CD3和人CD137结合,其中第一抗原结合部分和第二抗原结合部分中的每一个与人CD3和人CD137中的任一个结合;和

[0175] (iv)能够结合人CD3和人CD137,但不同时结合人CD3和人CD137;

[0176] 和第三抗原结合部分,其能够结合第三抗原,优选在癌细胞/组织上表达的抗原,更优选DLL3,甚至更优选人DLL3。

[0177] [2][1]所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述第一抗原结合部分和所述第二抗原结合部分各自包含抗体可变区,所述抗体可变区包含以下(a1)至(a17)中的任一项:

[0178] (a1)抗体可变区,其包含SEQ ID NO:17的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:31的重链CDR 2、SEQ ID NO:45的重链CDR 3、SEQ ID NO:64的轻链CDR 1、SEQ ID NO:69的轻链CDR 2和SEQ ID NO:74的轻链CDR 3;

[0179] (a2)抗体可变区,其包含SEQ ID NO:18的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:32的重链CDR 2、SEQ ID NO:46的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0180] (a3) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:19的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:33的重链CDR 2、SEQ ID NO:47的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0181] (a4) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:19的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:33的重链CDR 2、SEQ ID NO:47的重链CDR 3、SEQ ID NO:65的轻链CDR 1、SEQ ID NO:70的轻链CDR 2和SEQ ID NO:75的轻链CDR 3;

[0182] (a5) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:20的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:34的重链CDR 2、SEQ ID NO:48的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0183] (a6) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:22的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:36的重链CDR 2、SEQ ID NO:50的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0184] (a7) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:23的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:37的重链CDR 2、SEQ ID NO:51的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0185] (a8) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:23的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:37的重链CDR 2、SEQ ID NO:51的重链CDR 3、SEQ ID NO:66的轻链CDR 1、SEQ ID NO:71的轻链CDR 2和SEQ ID NO:76的轻链CDR 3;

[0186] (a9) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:24的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:38的重链CDR 2、SEQ ID NO:52的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0187] (a10) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:25的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:39的重链CDR 2、SEQ ID NO:53的重链CDR 3、SEQ ID NO:66的轻链CDR 1、SEQ ID NO:71的轻链CDR 2和SEQ ID NO:76的轻链CDR 3;

[0188] (a11) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:26的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:40的重链CDR 2、SEQ ID NO:54的重链CDR 3、SEQ ID NO:66的轻链CDR 1、SEQ ID NO:71的轻链CDR 2和SEQ ID NO:76的轻链CDR 3;

[0189] (a12) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:26的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:40的重链CDR 2、SEQ ID NO:54的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0190] (a13) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:27的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:41的重链CDR 2、SEQ ID NO:55的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0191] (a14) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:28的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:42的重链CDR 2、SEQ ID NO:56的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0192] (a15) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:82的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:83的重链CDR 2、SEQ ID NO:84的重链CDR 3、SEQ ID NO:65的轻链CDR 1、SEQ ID NO:70的轻链CDR 2和SEQ ID NO:75的轻链CDR 3;

[0193] (a16) 与选自 (a1) 至 (a15) 中任一项的抗体可变区的相同表位结合的抗体可变区；和

[0194] (a17) 与选自 (a1) 至 (a15) 中任一项的抗体可变片段的结合竞争的抗体可变片段；

[0195] [3][1]至[2]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述第一抗原结合部分和所述第二抗原结合部分各自包含抗体可变区,所述抗体可变区包含以下(a1)至(a18)中的任一项:

[0196] (a1) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:3的VH和含有SEQ ID NO:59的VL;

[0197] (a2) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:4的VH和含有SEQ ID NO:58的VL;

[0198] (a3) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:5的VH和含有SEQ ID NO:58的VL;

[0199] (a4) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:5的VH和含有SEQ ID NO:60的VL;

[0200] (a5) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:6的VH和含有SEQ ID NO:58的VL;

[0201] (a6) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:8的VH和含有SEQ ID NO:58的VL;

[0202] (a7) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:9的VH和含有SEQ ID NO:58的VL;

[0203] (a8) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:9的VH和含有SEQ ID NO:61的VL;

[0204] (a9) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:10的VH和含有SEQ ID NO:58的VL;

[0205] (a10) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:11的VH和含有SEQ ID NO:61的VL;

[0206] (a11) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:12的VH和含有SEQ ID NO:61的VL;

[0207] (a12) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:12的VH和含有SEQ ID NO:58的VL;

[0208] (a13) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:13的VH和含有SEQ ID NO:58的VL;

[0209] (a14) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:14的VH和含有SEQ ID NO:58的VL;和

[0210] (a15) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:81的VH和含有SEQ ID NO:60的VL;

[0211] (a16) 抗体可变区,其包含含有选自由SEQ ID NO:3-6、8-14和81组成的组的氨基酸序列的VH和/或包含选自由SEQ ID NO:58-61组成的组的氨基酸序列的VL。

[0212] (a17) 与选自 (a1) 至 (a15) 中任一项的抗体可变区的相同表位结合的抗体可变区；和

[0213] (a18) 与选自 (a1) 至 (a15) 中任一项的抗体可变片段的结合竞争的抗体可变片段。

[0214] [4][1]至[3]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述第一抗原结合部分和所述第二抗原结合部分各自是Fab分子,并且包括在所述第一抗原结合部分的CH1区和所述第二抗原结合部分的CH1区之间形成的至少一个二硫键。

[0215] [4A][4]所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述第一抗原结合部分和所述第二抗原结合部分各自是Fab分子,并且包含在所述第一抗原结合部分和所述第二抗原结合部分各自的CH1区中根据EU编号在位置191处的氨基酸残基之间形成的一个二硫键。

[0216] [5][1]至[4A]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述第三抗原结合部分与所述第一抗原结合部分或所述第二抗原结合部分中的任一个融合。

[0217] [5A][5]所述的多特异性抗原结合分子,其中所述第三抗原结合部分是Fab或scFv。

[0218] [6][5]至[5A]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中所述第一、第二和第三抗原结合部分各自是Fab分子,其中所述第三抗原结合部分在Fab重链的C末端(CH1)与所述第一抗原结合部分或第二抗原结合部分之一的Fab重链的N末端,任选地通过肽接头融

合。

[0219] [6A][5]至[6]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述肽接头选自由SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:249或SEQ ID NO:259的氨基酸序列组成的组。

[0220] [6B][1]至[6A]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述第一抗原结合部分与所述第二抗原结合部分相同。

[0221] [7][1]至[6B]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中所述第三抗原结合部分是交叉Fab分子,其中Fab轻链和Fab重链的可变区被交换,并且其中所述第一和第二抗原结合部分各自是常规的Fab分子。

[0222] [8][7]所述的多特异性抗原结合分子,其中在所述第一和第二抗原结合部分各自的轻链的恒定结构域CL中,位置123和/或124处的氨基酸独立地被赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)(根据Kabat编号)所取代,并且其中在所述第一和第二抗原结合部分各自的重链的恒定结构域CH1中,位置147处的氨基酸和/或位置213处的氨基酸独立地被谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)(根据Kabat EU索引编号)所取代。

[0223] [9][8]所述的多特异性抗原结合分子,其中,在所述第一和第二抗原结合部分各自的轻链的恒定结构域CL中,位置123和124处的氨基酸分别是精氨酸(R)和赖氨酸(K)(根据Kabat编号),并且其中在所述第一和第二抗原结合部分各自的重链的恒定结构域CH1中,位置147和213处的氨基酸是谷氨酸(E)(根据Kabat EU索引编号)。

[0224] [10][1]至[9]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中,能够与DLL3结合的第三抗原结合部分包含抗体可变区,所述抗体可变区包含如下(a1)至(a5)中任一项:

[0225] (a1) SEQ ID NO:233的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:234的重链CDR 2、SEQ ID NO:235的重链CDR 3、SEQ ID NO:237的轻链CDR 1、SEQ ID NO:238的轻链CDR 2和SEQ ID NO:239的轻链CDR 3;

[0226] (a2) SEQ ID NO:276的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:277的重链CDR 2、SEQ ID NO:278的重链CDR 3、SEQ ID NO:279的轻链CDR 1、SEQ ID NO:280的轻链CDR 2和SEQ ID NO:281的轻链CDR 3;

[0227] (a3) SEQ ID NO:285的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:286的重链CDR 2、SEQ ID NO:287的重链CDR 3、SEQ ID NO:288的轻链CDR 1、SEQ ID NO:289的轻链CDR 2和SEQ ID NO:290的轻链CDR 3;

[0228] (a4) 与选自(a1)至(a3)中任一项的抗体可变区的相同表位结合的抗体可变区;和

[0229] (a5) 与选自(a1)至(a3)中任一项的抗体可变片段的结合竞争的抗体可变片段。

[0230] [11][1]至[10]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中,能够与DLL3结合的第三抗原结合部分包含抗体可变区,所述抗体可变区包含如下(a1)至(a6)中任一项:

[0231] (a1) 包含SEQ ID NO:232的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:236的氨基酸序列的轻链可变区;

[0232] (a2) 包含SEQ ID NO:264的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:265的氨基酸序列的轻链可变区;

[0233] (a3) 包含SEQ ID NO:266的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:267的氨基酸序列的轻链可变区;

[0234] (a4) 包含SEQ ID NO:268的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:269的氨

氨基酸序列的轻链可变区；

[0235] (a5) 与选自(a1)至(a4)中任一项的抗体可变区的相同表位结合的抗体可变区；和

[0236] (a6) 与选自(a1)至(a4)中任一项的抗体可变片段的结合竞争的抗体可变片段。

[0237] [12][1]至[11]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其进一步包含Fc结构域。

[0238] [12A][12]所述的多特异性抗原结合分子,其中所述Fc结构域由能够稳定缔合的第一和第二Fc区亚基组成,并且其中所述Fc结构域与天然人IgG1 Fc结构域相比,表现出对人Fc $\gamma$ 受体的结合亲和力降低。

[0239] [12B][12A]所述的多特异性抗原结合分子,其中所述第一Fc区亚基选自由以下组成的组:

[0240] (a1) 包含位置234处的Ala和位置235处的Ala的Fc区多肽;

[0241] (a2) 包含位置234处的Ala、位置235处的Ala和位置297处的Ala的Fc区多肽;

[0242] (a3) 包含位置234处的Ala、位置235处的Ala、位置297处的Ala、位置354处的Cys和位置366处的Trp的Fc区多肽;和

[0243] 其中所述第二Fc区亚基选自由以下组成的组:

[0244] (a4) 包含位置234处的Ala和位置235处的Ala的Fc区多肽;

[0245] (a5) 包含位置234处的Ala、位置235处的Ala和位置297处的Ala的Fc区多肽;

[0246] (a6) 包含位置234处的Ala、位置235处的Ala、位置297处的Ala、位置349处的Cys、位置366处的Ser、位置368处的Ala和位置407处的Val的Fc区多肽;和

[0247] 其中氨基酸位置使用EU索引编号进行编号。

[0248] [12C][12]至[12B]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中,与天然IgG的Fc区相比,所述Fc结构域在酸性pH条件(例如pH 5.8)下表现出增强的FcRn结合活性。

[0249] [12D][12C]所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述Fc结构域包含根据EU编号位置434处的Ala;位置438处的Glu、Arg、Ser或Lys;和位置440处的Glu、Asp或Gln。

[0250] [12E][12D]所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述Fc结构域包含根据EU编号位置434处的Ala;位置438处的Arg或Lys;和位置440处的Glu或Asp。

[0251] [12F][12E]所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述Fc结构域还包含根据EU编号位置428处的Ile或Leu;和/或位置436处的Ile、Leu、Val、Thr或Phe。

[0252] [12G][12C]至[12F]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述Fc结构域包含选自由以下组成的组的氨基酸取代的组合:

[0253] 根据EU编号(a)N434A/Q438R/S440E;

[0254] (b)N434A/Q438R/S440D;

[0255] (c)N434A/Q438K/S440E;

[0256] (d)N434A/Q438K/S440D;

[0257] (e)N434A/Y436T/Q438R/S440E;

[0258] (f)N434A/Y436T/Q438R/S440D;

[0259] (g)N434A/Y436T/Q438K/S440E;

[0260] (h)N434A/Y436T/Q438K/S440D;

[0261] (i)N434A/Y436V/Q438R/S440E;

[0262] (j)N434A/Y436V/Q438R/S440D;

- [0263] (k) N434A/Y436V/Q438K/S440E;
- [0264] (l) N434A/Y436V/Q438K/S440D;
- [0265] (m) N434A/R435H/F436T/Q438R/S440E;
- [0266] (n) N434A/R435H/F436T/Q438R/S440D;
- [0267] (o) N434A/R435H/F436T/Q438K/S440E;
- [0268] (p) N434A/R435H/F436T/Q438K/S440D;
- [0269] (q) N434A/R435H/F436V/Q438R/S440E;
- [0270] (r) N434A/R435H/F436V/Q438R/S440D;
- [0271] (s) N434A/R435H/F436V/Q438K/S440E;
- [0272] (t) N434A/R435H/F436V/Q438K/S440D;
- [0273] (u) M428L/N434A/Q438R/S440E;
- [0274] (v) M428L/N434A/Q438R/S440D;
- [0275] (w) M428L/N434A/Q438K/S440E;
- [0276] (x) M428L/N434A/Q438K/S440D;
- [0277] (y) M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E;
- [0278] (z) M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440D;
- [0279] (aa) M428L/N434A/Y436T/Q438K/S440E;
- [0280] (ab) M428L/N434A/Y436T/Q438K/S440D;
- [0281] (ac) M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440E;
- [0282] (ad) M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440D;
- [0283] (ae) M428L/N434A/Y436V/Q438K/S440E;
- [0284] (af) M428L/N434A/Y436V/Q438K/S440D;
- [0285] (ag) L235R/G236R/S239K/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E;和
- [0286] (ah) L235R/G236R/A327G/A330S/P331S/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E。
- [0287] [12H] [12C]至[12G]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述Fc结构域包含M428L/N434A/Q438R/S440E的氨基酸取代的组合。
- [0288] [12I] [12]至[12H]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述Fc结构域为IgG Fc结构域,优选为人IgG Fc结构域,更优选为人IgG1 Fc结构域。
- [0289] [12J] [12]至[12I]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述Fc结构域包含以下任一项:
- [0290] (a) 包含SEQ ID NO:100所示氨基酸序列的第一Fc亚基和包含SEQ ID NO:111所示氨基酸序列的第二Fc亚基;和
- [0291] (b) 包含SEQ ID NO:99所示氨基酸序列的第一Fc亚基和包含SEQ ID NO:109所示氨基酸序列的第二Fc亚基。
- [0292] [12K] [12]至[12J]中任一项的多特异性抗原结合分子,其中所述第一和第二抗原结合部分各自为Fab,其中所述第一抗原结合部分在Fab重链的C末端与Fc结构域的第一或第二亚基的N末端融合,并且所述第二抗原结合部分在Fab重链的C末端与Fc结构域的剩余亚基的N末端融合。
- [0293] [12L] [12K]所述的多特异性抗原结合分子,其中所述第三抗原结合部分在C末端

与所述第一抗原结合部分或第二抗原结合部分之一的Fab重链的N末端,任选地通过肽接头融合。

[0294] [13]多特异性抗原结合分子,其包含选自以下(a1)至(a15)的任一组合中的五条多肽链:

[0295] (a1)包含SEQ ID NO:201的氨基酸序列的多肽链(链1),包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2),包含SEQ ID NO:208的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5);

[0296] (a2)包含SEQ ID NO:203的氨基酸序列的多肽链(链1),包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2),包含SEQ ID NO:209的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5);

[0297] (a3)包含SEQ ID NO:204的氨基酸序列的多肽链(链1),包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2),包含SEQ ID NO:209的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5);

[0298] (a4)包含SEQ ID NO:205的氨基酸序列的多肽链(链1),包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2),包含SEQ ID NO:209的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5);

[0299] (a5)包含SEQ ID NO:216的氨基酸序列的多肽链(链1),包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2),包含SEQ ID NO:229的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5);

[0300] (a6)包含SEQ ID NO:217的氨基酸序列的多肽链(链1),包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2),包含SEQ ID NO:210的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5);

[0301] (a7)包含SEQ ID NO:219的氨基酸序列的多肽链(链1),包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2),包含SEQ ID NO:211的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5);

[0302] (a8)包含SEQ ID NO:220的氨基酸序列的多肽链(链1),包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2),包含SEQ ID NO:211的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5);

[0303] (a9)包含SEQ ID NO:221的氨基酸序列的多肽链(链1),包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2),包含SEQ ID NO:211的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5);

[0304] (a10)包含SEQ ID NO:222的氨基酸序列的多肽链(链1),包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2),包含SEQ ID NO:230的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5);

[0305] (a11)包含SEQ ID NO:223的氨基酸序列的多肽链(链1),包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2),包含SEQ ID NO:212的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:215的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5);

[0306] (a12)包含SEQ ID NO:225的氨基酸序列的多肽链(链1),包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2),包含SEQ ID NO:213的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ



ID NO:215的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5)；

[0307] (a13) 包含SEQ ID NO:226的氨基酸序列的多肽链(链1), 包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2), 包含SEQ ID NO:213的氨基酸序列的多肽链(链3) 和各自包含SEQ ID NO:215的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5)；

[0308] (a14) 包含SEQ ID NO:227的氨基酸序列的多肽链(链1), 包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2), 包含SEQ ID NO:213的氨基酸序列的多肽链(链3) 和各自包含SEQ ID NO:215的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5)；和

[0309] (a15) 包含SEQ ID NO:228的氨基酸序列的多肽链(链1), 包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2), 包含SEQ ID NO:231的氨基酸序列的多肽链(链3) 和各自包含SEQ ID NO:215的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5)；

[0310] 其中, 优选地, 五条多肽链(链1至链5) 按照图1 (a) 所示的方向相互连接和/或缔合(更具体地, 多肽链2和链5中的每一个都与多肽链1缔合; 多肽链4与多肽链3缔合; 多肽链1与多肽链3缔合)。

[0311] [14]分离的多核苷酸或多个多核苷酸, 其编码[1]至[13]中任一项所述的多特异性抗原结合分子。

[0312] [15]载体, 其编码[14]所述的多核苷酸或多个多核苷酸。

[0313] [16]宿主细胞, 其包含[14]所述的多核苷酸或多个多核苷酸, 或[15]所述的载体。

[0314] [17][1]至[13]中任一项所述的多特异性抗原结合分子的制备方法, 其包括以下步骤: a) 在适于抗原结合分子的表达的条件下培养[16]所述的宿主细胞和b) 回收所述抗原结合分子。

[0315] [17A]多特异性抗原结合分子, 其通过[17]所述的方法制备。

[0316] [18]药物组合物, 其包含[1]至[13]中任一项所述的多特异性抗原结合分子和药学上可接受的载体。

[0317] [19][1]至[13]中任一项所述的多特异性抗原结合分子或[18]所述的药物组合物, 其诱导细胞毒性, 优选T细胞依赖性细胞毒性。

[0318] [20][1]至[13]中任一项所述的多特异性抗原结合分子或[18]所述的药物组合物, 其用作药物。

[0319] [21][1]至[13]中任一项所述的多特异性抗原结合分子或[18]所述的药物组合物, 其用于在有需要的个体中治疗或预防疾病。

[0320] [22][21]所述的用于治疗/预防疾病的多特异性抗原结合分子或药物组合物, 其中所述疾病是癌症。

[0321] [22A][22]所述的用于治疗/预防疾病的多特异性抗原结合分子或药物组合物, 其中所述癌症是表达DLL3的癌症或DLL3阳性的癌症, 优选神经内分泌瘤(NEN)、神经内分泌肿瘤(NET)、神经内分泌癌(NEC)或其他非神经内分泌来源的实体瘤。

[0322] [22B][22]或[22A]所述的用于治疗/预防疾病的多特异性抗原结合分子或药物组合物, 其中所述癌症选自胰腺神经内分泌肿瘤(PNET)、小细胞型NEC(SCNEC)、大细胞型NEC(LCNEC)、小细胞肺癌(SCLC)、大细胞神经内分泌肺癌、神经内分泌前列腺癌(NEPC)、默克尔细胞癌、小细胞膀胱癌、胃肠道神经内分泌癌、甲状腺髓样癌(MTC)、胃肠胰神经内分泌癌(GEP NEC)、成神经细胞瘤、神经胶质瘤或胶质母细胞瘤(GBM)、黑色素瘤和甲状腺髓样癌

组成的组。

[0323] [23][1]至[13]中任一项所述的多特异性抗原结合分子或[18]所述的药物组合物在制备用于在有需要的个体中治疗或预防的疾病的药物中的用途。

[0324] [24]治疗个体中疾病的方法,其包括向所述个体施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含[1]至[13]中任一项所述的多特异性抗原结合分子或[18]所述的药物组合物。

[0325] [25][23]所述的用途或[24]所述的方法,其中所述疾病是癌症,优选DLL3阳性的癌症或表达DLL3的癌症。

[0326] [25A][25]所述的用途和方法,其中所述癌症是表达DLL3的癌症或DLL3阳性的癌症,优选神经内分泌瘤(neuroendocrine neoplasm)(NEN)、神经内分泌肿瘤(neuroendocrine tumor)(NET)、神经内分泌癌(NEC)和其他非神经内分泌来源的实体瘤。

[0327] [25B][25A]所述的用途或方法,其中所述癌症选自胰腺神经内分泌肿瘤(PNET)、小细胞型NEC(SCNEC)、大细胞型NEC(LCNEC)、小细胞肺癌(SCLC)、大细胞神经内分泌肺癌、神经内分泌前列腺癌(NEPC)、默克尔细胞癌、小细胞膀胱癌、胃肠道神经内分泌癌、甲状腺髓样癌(MTC)、胃肠胰神经内分泌癌(GEP NEC)、成神经细胞瘤、神经胶质瘤或胶质母细胞瘤(GBM)、黑色素瘤和甲状腺髓样癌组成的组。

[0328] [26]用于诱导靶细胞裂解的方法,其包括在T细胞存在下使靶细胞与[1]至[13]中任一项所述的多特异性抗原结合分子或[18]所述的药物组合物接触。

[0329] [27]试剂盒,其包含[18]所述的组合物;和包装插页,所述包装插页包含用于向受试者施用以治疗或延缓癌症的进展的说明,所述癌症优选DLL3阳性的癌症或表达DLL3的癌症,优选神经内分泌瘤(NEN)、神经内分泌肿瘤(NET)、神经内分泌癌(NEC)或其他非神经内分泌来源的实体瘤。

[0330] [27A][27]所述的试剂盒,其中所述癌症选自胰腺神经内分泌肿瘤(PNET)、小细胞型NEC(SCNEC)、大细胞型NEC(LCNEC)、小细胞肺癌(SCLC)、大细胞神经内分泌肺癌、神经内分泌前列腺癌(NEPC)、默克尔细胞癌、小细胞膀胱癌、胃肠道神经内分泌癌、甲状腺髓样癌(MTC)、胃肠胰神经内分泌癌(GEP NEC)、成神经细胞瘤、神经胶质瘤或胶质母细胞瘤(GBM)、黑色素瘤和甲状腺髓样癌组成的组。

[0331] 本发明的另一方面涉及:

[0332] [28]多特异性抗原结合分子,其包含:

[0333] 第一抗原结合部分,其具有以下一种、两种或更多种性质:

[0334] (i) 与人CD3结合;

[0335] (ii) 与人CD137结合;

[0336] (iii) 能够与人CD3和人CD137结合,其中第一抗原结合部分与人CD3或人CD137中的任一个结合;和

[0337] (iv) 能够结合人CD3和人CD137,但不同时结合人CD3和人CD137;和

[0338] 第二抗原结合部分,其能够结合DLL3,优选人DLL3。

[0339] [29][28]所述的多特异性抗原结合分子,其中所述第一抗原结合部分包含含有以下(a1)至(a17)中的任一项的抗体可变区:

[0340] (a1)SEQ ID NO:17的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:31的重链CDR 2、SEQ ID NO:45的重链CDR 3、SEQ ID NO:64的轻链CDR 1、SEQ ID NO:69的轻链CDR 2和SEQ ID NO:

74的轻链CDR 3;

[0341] (a2) SEQ ID NO:18的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:32的重链CDR 2、SEQ ID NO:46的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0342] (a3) SEQ ID NO:19的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:33的重链CDR 2、SEQ ID NO:47的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0343] (a4) SEQ ID NO:19的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:33的重链CDR 2、SEQ ID NO:47的重链CDR 3、SEQ ID NO:65的轻链CDR 1、SEQ ID NO:70的轻链CDR 2和SEQ ID NO:75的轻链CDR 3;

[0344] (a5) SEQ ID NO:20的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:34的重链CDR 2、SEQ ID NO:48的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0345] (a6) SEQ ID NO:22的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:36的重链CDR 2、SEQ ID NO:50的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0346] (a7) SEQ ID NO:23的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:37的重链CDR 2、SEQ ID NO:51的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0347] (a8) SEQ ID NO:23的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:37的重链CDR 2、SEQ ID NO:51的重链CDR 3、SEQ ID NO:66的轻链CDR 1、SEQ ID NO:71的轻链CDR 2和SEQ ID NO:76的轻链CDR 3;

[0348] (a9) SEQ ID NO:24的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:38的重链CDR 2、SEQ ID NO:52的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0349] (a10) SEQ ID NO:25的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:39的重链CDR 2、SEQ ID NO:53的重链CDR 3、SEQ ID NO:66的轻链CDR 1、SEQ ID NO:71的轻链CDR 2和SEQ ID NO:76的轻链CDR 3;

[0350] (a11) SEQ ID NO:26的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:40的重链CDR 2、SEQ ID NO:54的重链CDR 3、SEQ ID NO:66的轻链CDR 1、SEQ ID NO:71的轻链CDR 2和SEQ ID NO:76的轻链CDR 3;

[0351] (a12) SEQ ID NO:26的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:40的重链CDR 2、SEQ ID NO:54的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0352] (a13) SEQ ID NO:27的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:41的重链CDR 2、SEQ ID NO:55的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0353] (a14) SEQ ID NO:28的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:42的重链CDR 2、SEQ ID NO:56的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID

NO:73的轻链CDR 3;

[0354] (a15) SEQ ID NO:82的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:83的重链CDR 2、SEQ ID NO:84的重链CDR 3、SEQ ID NO:65的轻链CDR 1、SEQ ID NO:70的轻链CDR 2和SEQ ID NO:75的轻链CDR 3;

[0355] (a16) 与选自(a1)至(a15)中任一项的抗体可变区的相同表位结合的抗体可变区;和

[0356] (a17) 与选自(a1)至(a15)中任一项的抗体可变片段的结合竞争的抗体可变片段。

[0357] [30][28]至[29]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中第一抗原结合部分包含抗体可变区,所述抗体可变区包含如下(a1)至(a18)中任一项:

[0358] (a1) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的轻链可变区;

[0359] (a2) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的轻链可变区;

[0360] (a3) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的轻链可变区;

[0361] (a4) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的轻链可变区;

[0362] (a5) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的轻链可变区;

[0363] (a6) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的轻链可变区;

[0364] (a7) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的轻链可变区;

[0365] (a8) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的轻链可变区;

[0366] (a9) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的轻链可变区;

[0367] (a10) 包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的轻链可变区;

[0368] (a11) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的轻链可变区;

[0369] (a12) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的轻链可变区;

[0370] (a13) 包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的轻链可变区;

[0371] (a14) 包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的轻链可变区;

[0372] (a15) 包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的轻链可变区;

- [0373] (a16) 包含选自由SEQ ID NO:3-6、8-14和81组成的组的氨基酸序列的重链可变区，
- [0374] 和/或包含选自由SEQ ID NO:58-61组成的组的氨基酸序列的轻链可变区。
- [0375] (a17) 与选自(a1)至(a15)中任一项的抗体可变区的相同表位结合的抗体可变区；和
- [0376] (a18) 与选自(a1)至(a15)中任一项的抗体可变片段的结合竞争的抗体可变片段。
- [0377] 本发明的又一方面涉及：
- [0378] [31]多特异性抗原结合分子，其包含选自以下(a1)至(a15)中任一项的组组合的五条多肽链：
- [0379] (a1) 包含SEQ ID NO:201的氨基酸序列的多肽链(链1)，包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2)，包含SEQ ID NO:208的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5)；
- [0380] (a2) 包含SEQ ID NO:203的氨基酸序列的多肽链(链1)，包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2)，包含SEQ ID NO:209的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5)；
- [0381] (a3) 包含SEQ ID NO:204的氨基酸序列的多肽链(链1)，包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2)，包含SEQ ID NO:209的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5)；
- [0382] (a4) 包含SEQ ID NO:205的氨基酸序列的多肽链(链1)，包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2)，包含SEQ ID NO:209的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5)；
- [0383] (a5) 包含SEQ ID NO:216的氨基酸序列的多肽链(链1)，包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2)，包含SEQ ID NO:229的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5)；
- [0384] (a6) 包含SEQ ID NO:217的氨基酸序列的多肽链(链1)，包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2)，包含SEQ ID NO:210的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5)；
- [0385] (a7) 包含SEQ ID NO:219的氨基酸序列的多肽链(链1)，包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2)，包含SEQ ID NO:211的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5)；
- [0386] (a8) 包含SEQ ID NO:220的氨基酸序列的多肽链(链1)，包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2)，包含SEQ ID NO:211的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5)；
- [0387] (a9) 包含SEQ ID NO:221的氨基酸序列的多肽链(链1)，包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2)，包含SEQ ID NO:211的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5)；
- [0388] (a10) 包含SEQ ID NO:222的氨基酸序列的多肽链(链1)，包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2)，包含SEQ ID NO:230的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5)；

[0389] (a11) 包含SEQ ID NO:223的氨基酸序列的多肽链(链1), 包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2), 包含SEQ ID NO:212的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:215的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5);

[0390] (a12) 包含SEQ ID NO:225的氨基酸序列的多肽链(链1), 包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2), 包含SEQ ID NO:213的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:215的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5);

[0391] (a13) 包含SEQ ID NO:226的氨基酸序列的多肽链(链1), 包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2), 包含SEQ ID NO:213的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:215的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5);

[0392] (a14) 包含SEQ ID NO:227的氨基酸序列的多肽链(链1), 包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2), 包含SEQ ID NO:213的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:215的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5);和

[0393] (a15) 包含SEQ ID NO:228的氨基酸序列的多肽链(链1), 包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的多肽链(链2), 包含SEQ ID NO:231的氨基酸序列的多肽链(链3)和各自包含SEQ ID NO:215的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5);

[0394] 其中, 优选地, 五条多肽链(链1至链5)根据图1(a)所示的方向彼此连接和/或缔合。

[0395] [31A]多特异性抗原结合分子, 其包含以下组合中的五条多肽链:

[0396] 包含选自SEQ ID NO:201-205和216-228组成的组的氨基酸序列的多肽链(链1); 包含选自SEQ ID NO:206-207组成的组的氨基酸序列的多肽链(链2); 包含选自SEQ ID NO:208-213和229-231组成的组的氨基酸序列的多肽链(链3); 和各自包含由选自SEQ ID NO:214和215组成的组的氨基酸序列的两条多肽链(链4和链5)。

[0397] [31B] [31]或[31A]所述的多特异性抗原结合分子, 其中多肽链2和链5中的每一个与多肽链1缔合; 多肽链4与多肽链3缔合; 多肽链1与多肽链3缔合。

[0398] 本发明的又一方面涉及:

[0399] [32]能够结合DLL3的抗原结合分子, 其包含抗体可变区, 所述抗体可变区包含如下(a1)至(a5)中任一项:

[0400] (a1) SEQ ID NO:233的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:234的重链CDR 2、SEQ ID NO:235的重链CDR 3、SEQ ID NO:237的轻链CDR 1、SEQ ID NO:238的轻链CDR 2和SEQ ID NO:239的轻链CDR 3;

[0401] (a2) SEQ ID NO:276的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:277的重链CDR 2、SEQ ID NO:278的重链CDR 3、SEQ ID NO:279的轻链CDR 1、SEQ ID NO:280的轻链CDR 2和SEQ ID NO:281的轻链CDR 3;

[0402] (a3) SEQ ID NO:285的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:286的重链CDR 2、SEQ ID NO:287的重链CDR 3、SEQ ID NO:288的轻链CDR 1、SEQ ID NO:289的轻链CDR 2和SEQ ID NO:290的轻链CDR 3;

[0403] (a4) 与选自(a1)至(a3)中任一项的抗体可变区的相同表位结合的抗体可变区; 和

[0404] (a5) 与选自(a1)至(a3)中任一项的抗体可变片段的结合竞争的抗体可变片段。

[0405] [33]能够结合DLL3的抗原结合分子, 其包含抗体可变区, 所述抗体可变区包含如

下(a1)至(a6)中任一项:

[0406] (a1) 包含SEQ ID NO:232的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:236的氨基酸序列的轻链可变区;

[0407] (a2) 包含SEQ ID NO:264的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:265的氨基酸序列的轻链可变区;

[0408] (a3) 包含SEQ ID NO:266的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:267的氨基酸序列的轻链可变区;

[0409] (a4) 包含SEQ ID NO:268的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:269的氨基酸序列的轻链可变区;

[0410] (a5) 与选自(a1)至(a4)中任一项的抗体可变区的相同表位结合的抗体可变区;和

[0411] (a6) 与选自(a1)至(a4)中任一项的抗体可变片段的结合竞争的抗体可变片段。

[0412] 本发明的又一方面涉及:

[0413] [33-1]多特异性抗原结合分子,其包含:

[0414] (a) 第一抗原结合部分和第二抗原结合部分,其各自结合人CD137并且包含可以相同或不同并且独立地选自由以下组成的组的抗体可变区:

[0415] (a1) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:17的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:31的重链CDR 2、SEQ ID NO:45的重链CDR 3、SEQ ID NO:64的轻链CDR 1、SEQ ID NO:69的轻链CDR 2和SEQ ID NO:74的轻链CDR 3;

[0416] (a2) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:18的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:32的重链CDR 2、SEQ ID NO:46的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0417] (a3) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:19的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:33的重链CDR 2、SEQ ID NO:47的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0418] (a4) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:19的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:33的重链CDR 2、SEQ ID NO:47的重链CDR 3、SEQ ID NO:65的轻链CDR 1、SEQ ID NO:70的轻链CDR 2和SEQ ID NO:75的轻链CDR 3;

[0419] (a5) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:20的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:34的重链CDR 2、SEQ ID NO:48的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0420] (a6) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:22的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:36的重链CDR 2、SEQ ID NO:50的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0421] (a7) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:23的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:37的重链CDR 2、SEQ ID NO:51的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0422] (a8) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:23的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:37的重链CDR 2、SEQ ID NO:51的重链CDR 3、SEQ ID NO:66的轻链CDR 1、SEQ ID NO:71的轻链CDR 2和SEQ ID NO:76的轻链CDR 3;

[0423] (a9) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:24的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:38的重链CDR 2、SEQ ID NO:52的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0424] (a10) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:25的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:39的重链CDR 2、SEQ ID NO:53的重链CDR 3、SEQ ID NO:66的轻链CDR 1、SEQ ID NO:71的轻链CDR 2和SEQ ID NO:76的轻链CDR 3;

[0425] (a11) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:26的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:40的重链CDR 2、SEQ ID NO:54的重链CDR 3、SEQ ID NO:66的轻链CDR 1、SEQ ID NO:71的轻链CDR 2和SEQ ID NO:76的轻链CDR 3;

[0426] (a12) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:26的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:40的重链CDR 2、SEQ ID NO:54的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0427] (a13) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:27的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:41的重链CDR 2、SEQ ID NO:55的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0428] (a14) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:28的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:42的重链CDR 2、SEQ ID NO:56的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;和

[0429] (a15) 抗体可变区,其包含SEQ ID NO:82的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:83的重链CDR 2、SEQ ID NO:84的重链CDR 3、SEQ ID NO:65的轻链CDR 1、SEQ ID NO:70的轻链CDR 2和SEQ ID NO:75的轻链CDR 3;

[0430] 和

[0431] (b) 第三抗原结合部分,其结合人δ样3(DLL3)并包含抗体可变区,所述抗体可变区包含含有SEQ ID NO:233的重链CDR1、含有SEQ ID NO:234的重链CDR2、含有SEQ ID NO:235的重链CDR3、含有SEQ ID NO:237的轻链CDR 1、含有SEQ ID NO:238的轻链CDR 2和含有SEQ ID NO:239的轻链CDR 3。

[0432] [33-2][33-1]所述的多特异性抗原结合分子,其中所述第一和第二抗原结合部分各自包含可以相同或不同并且独立地选自以下组成的组的抗体可变区:

[0433] (a1) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的轻链可变区;

[0434] (a2) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的轻链可变区;

[0435] (a3) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的轻链可变区;

[0436] (a4) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的轻链可变区;

[0437] (a5) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的轻链可变区;

[0438] (a6) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:58的氨基



酸序列的轻链可变区；

[0439] (a7) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的轻链可变区；

[0440] (a8) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的轻链可变区；

[0441] (a9) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的轻链可变区；

[0442] (a10) 包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的轻链可变区；

[0443] (a11) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的轻链可变区；

[0444] (a12) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的轻链可变区；

[0445] (a13) 包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的轻链可变区；

[0446] (a14) 包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的轻链可变区；

[0447] (a15) 包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的轻链可变区；和

[0448] (a16) 包含选自由SEQ ID NO:3-6、8-14和81组成的组的氨基酸序列的重链可变区,和/或包含选自由SEQ ID NO:58-61组成的组的氨基酸序列的轻链可变区。

[0449] [33-2A][33-1]至[33-2]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述第一抗原结合部分和所述第二抗原结合部分各自包含抗体可变区,所述抗体可变区包含SEQ ID NO:20的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:34的重链CDR 2、SEQ ID NO:48的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3。

[0450] [33-2B][33-2A]所述的多特异性抗原结合分子,其中所述第一抗原结合部分和所述第二抗原结合部分各自包含抗体可变区,所述抗体可变区包含含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区,以及含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的轻链可变区。

[0451] [33-2C][33-1]至[33-2B]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中所述第三抗原结合部分包含抗体可变区,所述抗体可变区包含含有SEQ ID NO:232的VH和含有SEQ ID NO:236的VL。

[0452] [33-3][33-1]至[33-2C]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述第一和第二抗原结合部分各自为在位置191处(EU编号)具有半胱氨酸残基的Fab,并且其中存在连接两个半胱氨酸残基的二硫键。

[0453] [33-4][33-3]所述的多特异性抗原结合分子,其中所述第一、第二和第三抗原结合部分各自是Fab,所述Fab包含含有VH和CH1结构域的重链和含有VL和轻链恒定(CL)结构域的轻链,并且其中所述第三抗原结合部分的重链的C末端直接或通过肽接头与所述第一抗原结合部分或第二抗原结合部分中任一项的Fab重链的N末端融合。

[0454] [33-5A][33-4]所述的多特异性抗原结合分子,其中所述第三抗原结合部分的重

链的C末端通过肽接头与所述第一抗原结合部分或第二抗原结合部分中任一项的Fab重链的N末端融合,并且其中所述肽接头具有选自SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:249和SEQ ID NO:259组成的组的氨基酸序列。

[0455] [33-5B][33-5A]所述的多特异性抗原结合分子,其中所述第三抗原结合部分是交叉Fab分子,其中Fab轻链和Fab重链的可变区被交换,并且其中所述第一和第二抗原结合部分各自是常规的Fab分子。

[0456] [33-6][33-5B]所述的多特异性抗原结合分子,其中,在所述第一和第二抗原结合部分各自的CL结构域中,位置123和124处(Kabat编号)的氨基酸分别是精氨酸和赖氨酸;并且其中,在所述第一和第二抗原结合部分各自的CH1结构域中,位置147和213处(EU编号)各自的氨基酸是谷氨酸。

[0457] [33-7][33-6]所述的多特异性抗原结合分子,其还包含Fc结构域。

[0458] [33-8][33-7]所述的多特异性抗原结合分子,其中所述Fc结构域包含第一和第二Fc区亚基,所述第一Fc区亚基选自包括以下的组:

[0459] 在位置234和235处各自包含丙氨酸的Fc区多肽;

[0460] 在位置234、235和297处各自包含丙氨酸的Fc区多肽;和

[0461] 在位置234、235和297处各自包含丙氨酸,在位置354处包含半胱氨酸,并且在位置366处包含色氨酸的Fc区多肽;和

[0462] 所述第二Fc区亚基选自包括以下的组:

[0463] 在位置234和235处各自包含丙氨酸的Fc区多肽;

[0464] 在位置234、235和297处各自包含丙氨酸的Fc区多肽;和

[0465] 在位置234、235和297处各自包含丙氨酸、在位置349处包含半胱氨酸、在位置366处包含丝氨酸、在位置368处包含丙氨酸和在位置407处包含缬氨酸的Fc区多肽,

[0466] 其中所有位置均按EU编号。

[0467] 本发明的又一方面涉及:

[0468] [34-1]多特异性抗原结合分子,其包含:

[0469] (a) 第一抗原结合部分和第二抗原结合部分,其各自结合人CD3并且包含可以相同或不同并且独立地选自(a1)至(a15)组成的组的抗体可变区:

[0470] (a1) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:17的重链互补决定区(CDR)1、含有SEQ ID NO:31的重链CDR 2、含有SEQ ID NO:45的重链CDR 3、含有SEQ ID NO:64的轻链CDR 1、含有SEQ ID NO:69的轻链CDR 2和含有SEQ ID NO:74的轻链CDR 3;

[0471] (a2) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:18的重链互补决定区(CDR)1、含有SEQ ID NO:32的重链CDR 2、含有SEQ ID NO:46的重链CDR 3、含有SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、含有SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和含有SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0472] (a3) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:19的重链互补决定区(CDR)1、含有SEQ ID NO:33的重链CDR 2、含有SEQ ID NO:47的重链CDR 3、含有SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、含有SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和含有SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0473] (a4) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:19的重链互补决定区(CDR)1、含有SEQ ID NO:33的重链CDR 2、含有SEQ ID NO:47的重链CDR 3、含有SEQ ID NO:65的轻链CDR 1、含有SEQ ID NO:70的轻链CDR 2和含有SEQ ID NO:75的轻链CDR 3;

[0474] (a5) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:20的重链互补决定区(CDR)1、含有SEQ ID NO:34的重链CDR 2、含有SEQ ID NO:48的重链CDR 3、含有SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、含有SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和含有SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0475] (a6) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:22的重链互补决定区(CDR)1、含有SEQ ID NO:36的重链CDR 2、含有SEQ ID NO:50的重链CDR 3、含有SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、含有SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和含有SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0476] (a7) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:23的重链互补决定区(CDR)1、含有SEQ ID NO:37的重链CDR 2、含有SEQ ID NO:51的重链CDR 3、含有SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、含有SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和含有SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0477] (a8) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:23的重链互补决定区(CDR)1、含有SEQ ID NO:37的重链CDR 2、含有SEQ ID NO:51的重链CDR 3、含有SEQ ID NO:66的轻链CDR 1、含有SEQ ID NO:71的轻链CDR 2和含有SEQ ID NO:76的轻链CDR 3;

[0478] (a9) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:24的重链互补决定区(CDR)1、含有SEQ ID NO:38的重链CDR 2、含有SEQ ID NO:52的重链CDR 3、含有SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、含有SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和含有SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0479] (a10) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:25的重链互补决定区(CDR)1、含有SEQ ID NO:39的重链CDR 2、含有SEQ ID NO:53的重链CDR 3、含有SEQ ID NO:66的轻链CDR 1、含有SEQ ID NO:71的轻链CDR 2和含有SEQ ID NO:76的轻链CDR 3;

[0480] (a11) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:26的重链互补决定区(CDR)1、含有SEQ ID NO:40的重链CDR 2、含有SEQ ID NO:54的重链CDR 3、含有SEQ ID NO:66的轻链CDR 1、含有SEQ ID NO:71的轻链CDR 2和含有SEQ ID NO:76的轻链CDR 3;

[0481] (a12) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:26的重链互补决定区(CDR)1、含有SEQ ID NO:40的重链CDR 2、含有SEQ ID NO:54的重链CDR 3、含有SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、含有SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和含有SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0482] (a13) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:27的重链互补决定区(CDR)1、含有SEQ ID NO:41的重链CDR 2、含有SEQ ID NO:55的重链CDR 3、含有SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、含有SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和含有SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0483] (a14) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:28的重链互补决定区(CDR)1、含有SEQ ID NO:42的重链CDR 2、含有SEQ ID NO:56的重链CDR 3、含有SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、含有SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和含有SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;和

[0484] (a15) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:82的重链互补决定区(CDR)1、含有SEQ ID NO:83的重链CDR 2、含有SEQ ID NO:84的重链CDR 3、含有SEQ ID NO:65的轻链CDR 1、含有SEQ ID NO:70的轻链CDR 2和含有SEQ ID NO:75的轻链CDR 3;

[0485] 和

[0486] (b) 第三抗原结合部分,其结合人δ样3(DLL3)并包含抗体可变区,所述抗体可变区包含含有SEQ ID NO:233的重链CDR1、含有SEQ ID NO:234的重链CDR2、含有SEQ ID NO:235的重链CDR3、含有SEQ ID NO:237的轻链CDR 1、含有SEQ ID NO:238的轻链CDR 2和含有SEQ ID NO:239的轻链CDR 3。

[0487] [34-2] 多特异性抗原结合分子,其包含:

[0488] (a) 第一抗原结合部分和第二抗原结合部分,其各自包含抗体可变区,所述抗体可变区可以相同或不同并且独立地选自以下组成的组:

[0489] (a1) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:3的重链可变区(VH)和含有SEQ ID NO:59的轻链可变区(VL);

[0490] (a2) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:4的VH和含有SEQ ID NO:58的VL;

[0491] (a3) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:5的VH和含有SEQ ID NO:58的VL;

[0492] (a4) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:5的VH和含有SEQ ID NO:60的VL;

[0493] (a5) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:6的VH和含有SEQ ID NO:58的VL;

[0494] (a6) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:8的VH和含有SEQ ID NO:58的VL;

[0495] (a7) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:9的VH和含有SEQ ID NO:58的VL;

[0496] (a8) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:9的VH和含有SEQ ID NO:61的VL;

[0497] (a9) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:10的VH和含有SEQ ID NO:58的VL;

[0498] (a10) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:11的VH和含有SEQ ID NO:61的VL;

[0499] (a11) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:12的VH和含有SEQ ID NO:61的VL;

[0500] (a12) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:12的VH和含有SEQ ID NO:58的VL;

[0501] (a13) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:13的VH和含有SEQ ID NO:58的VL;

[0502] (a14) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:14的VH和含有SEQ ID NO:58的VL;

[0503] (a15) 抗体可变区,其包含含有SEQ ID NO:81的VH和含有SEQ ID NO:60的VL;和

[0504] (a16) 包含选自SEQ ID No:3-6、8-14和81组成的组的氨基酸序列的重链可变区,

[0505] 和/或包含选自SEQ ID NO:58-61组成的组的氨基酸序列的轻链可变区;

[0506] 和

[0507] (b) 第三抗原结合部分,其包含抗体可变区,所述抗体可变区包含含有SEQ ID NO:232的VH和含有SEQ ID NO:236的VL。

[0508] [34-3][34-1]所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述第一和第二抗原结合部分的抗体可变区是相同的。

[0509] [34-4][34-2]所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述第一和第二抗原结合部分的抗体可变区是相同的。

[0510] [34-5][34-3]所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述第一和第二抗原结合部分各自是在位置191处(EU编号)具有半胱氨酸残基的Fab,并且其中二硫键连接这两个半胱氨酸残基。

[0511] [34-6][34-4]所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述第一和第二抗原结合部分各自是在位置191处(EU编号)具有半胱氨酸残基的Fab,并且其中二硫键连接这两个半胱氨酸残基。

[0512] [34-7][34-5]所述的多特异性抗原结合分子,其中所述第一、第二和第三抗原结合部分各自为Fab的形式,所述Fab包含VH、VL、CH1结构域和轻链恒定(CL)结构域,并且其中第三抗原结合部分的CH1结构域的C末端直接或通过肽接头与所述第一抗原结合部分或第二抗原结合部分中任一项的VH的N末端融合。

[0513] [34-8][34-6]所述的多特异性抗原结合分子,其中所述第一、第二和第三抗原结

合部分各自为Fab的形式,所述Fab包含VH、VL、CH1结构域和轻链恒定(CL)结构域,并且其中第三抗原结合部分的CH1结构域的C末端直接或通过肽接头与所述第一抗原结合部分或第二抗原结合部分中任一项的VH的N末端融合。

[0514] [34-9][34-7]所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述融合是通过肽接头进行的,所述肽接头包含选自由SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:249和SEQ ID NO:259组成的组的氨基酸序列。

[0515] [34-10][34-8]所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述融合是通过肽接头进行的,所述肽接头包含选自由SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:249和SEQ ID NO:259组成的组的氨基酸序列。

[0516] [34-11][34-9]所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述第三抗原结合部分是其中VH与CL结构域连接并且VL与CH1结构域连接的交叉Fab,并且其中第一和第二抗原结合部分各自都是其中VH连接到CH1结构域并且VL连接到CL结构域的常规Fab。

[0517] [34-12][34-10]所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述第三抗原结合部分是其中VH与CL结构域连接并且VL与CH1结构域连接的交叉Fab,并且其中第一和第二抗原结合部分各自都是其中VH连接到CH1结构域并且VL连接到CL结构域的常规Fab。

[0518] [34-13][34-11]所述的多特异性抗原结合分子,其中,在所述第一和第二抗原结合部分各自的CL结构域中,位置123和124处(Kabat编号)的氨基酸分别是精氨酸和赖氨酸;并且其中,在所述第一和第二抗原结合部分各自的CH1结构域中,位置147和213处(EU编号)各自的氨基酸是谷氨酸。

[0519] [34-14][34-12]所述的多特异性抗原结合分子,其中,在所述第一和第二抗原结合部分各自的CL结构域中,位置123和124处(Kabat编号)的氨基酸分别是精氨酸和赖氨酸;并且其中,在所述第一和第二抗原结合部分各自的CH1结构域中,位置147和213处(EU编号)各自的氨基酸是谷氨酸。

[0520] [34-15][34-13]所述的多特异性抗原结合分子,其还包含Fc结构域。

[0521] [34-16][34-14]所述的多特异性抗原结合分子,其还包含Fc结构域。

[0522] [34-17][34-15]所述的多特异性抗原结合分子,

[0523] 其中所述Fc结构域包含第一和第二Fc区亚基,

[0524] 其中所述第一Fc区亚基选自包括以下的组:

[0525] 在位置234和235处各自包含丙氨酸的Fc区多肽;

[0526] 在位置234、235和297处各自包含丙氨酸的Fc区多肽;和

[0527] 在位置234、235和297处各自包含丙氨酸,在位置354处包含半胱氨酸,并且在位置366处包含色氨酸的Fc区多肽;

[0528] 其中所述第二Fc区亚基选自包括以下的组:

[0529] 在位置234和235处各自包含丙氨酸的Fc区多肽;

[0530] 在位置234、235和297处各自包含丙氨酸的Fc区多肽;和

[0531] 在位置234、235和297处各自包含丙氨酸、在位置349处包含半胱氨酸、在位置366处包含丝氨酸、在位置368处包含丙氨酸和在位置407处包含缬氨酸的Fc区多肽;和

[0532] 其中所有位置均按EU编号。

[0533] [34-18][34-16]所述的多特异性抗原结合分子,

- [0534] 其中所述Fc结构域包含第一和第二Fc区亚基,
- [0535] 其中所述第一Fc区亚基选自包括以下的组:
- [0536] 在位置234和235处各自包含丙氨酸的Fc区多肽;
- [0537] 在位置234、235和297处各自包含丙氨酸的Fc区多肽;和
- [0538] 在位置234、235和297处各自包含丙氨酸,在位置354处包含半胱氨酸,并且在位置366处包含色氨酸的Fc区多肽;
- [0539] 其中所述第二Fc区亚基选自包括以下的组:
- [0540] 在位置234和235处各自包含丙氨酸的Fc区多肽;
- [0541] 在位置234、235和297处各自包含丙氨酸的Fc区多肽;和
- [0542] 在位置234、235和297处各自包含丙氨酸、在位置349处包含半胱氨酸、在位置366处包含丝氨酸、在位置368处包含丙氨酸和在位置407处包含缬氨酸的Fc区多肽;和
- [0543] 其中所有位置均按EU编号。

## 附图说明

- [0544] 图1显示了a) DUAL/LINC (1+2) 格式的三价抗体,b) 常规Ab格式的双特异性抗体和c) BiTE格式的双特异性抗体的设计和命名规则。
- [0545] 图2显示了抗体针对SK-MEL30细胞系的TDCC活性。a) DUAL/LINC和CD3双特异性格式之间的TDCC比较。b) 接头长度对细胞毒性的影响。
- [0546] 图3显示了在huNOG小鼠模型中,抗体针对NCI-H1436异种移植物的体内功效。Y轴表示肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ),X轴表示肿瘤植入后的天数。
- [0547] 图4显示了分析CD8<sup>+</sup> T细胞浸润的结果。在抗体注射后的指定时间点收获肿瘤,并使用流式细胞仪分析T细胞浸润。
- [0548] 图5显示了分析CD8<sup>+</sup> T细胞上的耗竭标志物(exhaustion markers)的结果。在抗体注射后第7天收获肿瘤,并使用流式细胞仪分析耗竭标志物的表达。
- [0549] 图6是显示全长人DLL3和人DLL3 ECD片段蛋白的结构示意图。还显示了每个抗DLL3抗体识别的表位。从N末端侧到C末端侧,EGF结构域有6个区域,EGF1到EGF6。
- [0550] 图7显示了抗DLL3-双-抗体(DLL3-DualAE05/DualAE05-FF110)对NB-1细胞系(成神经细胞瘤)和QGP-1细胞系(胰岛细胞癌)的T细胞依赖性细胞毒性(TDCC)活性。
- [0551] 图8显示了在DMS53小细胞肺癌模型中,抗DLL3-双-LINC抗体(DLL3-DualAE05/DualAE05-FF114)作为单一疗法或与顺铂(CDDP)或卡铂(CBDCA)作为联合疗法(Combo)的肿瘤体积减少的体内功效。CBDCA意味着CBDCA的单一疗法,CDDP意味着CDDP的单一疗法。Y轴表示肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ),X轴表示肿瘤植入后的天数。 $*P<0.05$ , $**P<0.01$ 。
- [0552] 图9显示了抗DLL3-双-抗体(DLL3-DualAE05/DualAE05-FF114)或DLL3CD3BiTE的肿瘤体积减少的体内功效,抗DLL3-双-抗体(DLL3-DualAE05/DualAE05-FF114)或DLL3CD3BiTE在人源化NOG小鼠模型中的NCI-H1436异种移植物中以单剂量一次或每周一次(QW)多次施用。Y轴表示肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ),X轴表示肿瘤植入后的天数。
- [0553] 图10显示了抗DLL3-双-LINC抗体(DLL3-DualAE05/DualAE05-FF114)与类固醇或托珠单抗组合的体内功效。a)在用类固醇进行的用药前实验中,在向表达DLL3的携带PC-10的huNOG小鼠在1小时和24小时或注射抗体之前1小时在腹膜内施用地塞米松。a)中的上图

显示了有或没有类固醇的抗体对肿瘤的抑制作用。a) 中的中间图显示类固醇介导的抗体诱导的IFN- $\gamma$  释放(左图)或TNF- $\alpha$ 释放(右图)的抑制。a) 中的下图显示类固醇介导的抗体诱导的IL-6释放的抑制。b) 在使用托珠单抗的实验中,托珠单抗在向表达DLL3的携带PC-10的huNOG小鼠注射抗DLL3-双-LINC抗体之前一天或之后6小时施用。该图显示了在有或没有托珠单抗之前或之后施用的情况下,抗体对肿瘤的抑制作用。

### 具体实施方式

[0554] 本文描述或引用的技术和程序通常被本领域技术人员很好地理解,并通常使用常规方法实施,例如,广泛使用的方法在以下中描述: Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第三版(2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 纽约; Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel等人编辑, (2003)); the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames和G.R. Taylor编辑 (1995)), Harlow和Lane编辑. (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture (R.I. Freshney编辑 (1987)); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait编辑, 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis编辑, 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney), 编辑, 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather和P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, 和D.G. Newell编辑, 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir和C.C. Blackwell编辑); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller和M.P. Calos编辑, 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis等人, 编辑, 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan等人, 编辑, 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley和Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway和P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., 编辑, IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd和C. Dean, 编辑, Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow和D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti和J.D. Capra编辑, Harwood Academic Publishers, 1995); 和Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita等人, 编辑, J.B. Lippincott Company, 1993)。

[0555] 提供以下定义和详细描述以有助于理解本文所说明的本公开。

[0556] 定义

[0557] 氨基酸

[0558] 在本文中,氨基酸由单字母代码或三字母代码或两者描述,例如Ala/A、Leu/L、Arg/R、Lys/K、Asn/N、Met/M、Asp/D、Phe/F、Cys/C、Pro/P、Gln/Q、Ser/S、Glu/E、Thr/T、Gly/G、Trp/W、His/H、Tyr/Y、Ile/I或Val/V。

[0559] 氨基酸的改变

[0560] 对于抗原结合分子的氨基酸序列中的氨基酸改变(在本描述中也称为“氨基酸取

代”或“氨基酸突变”),可以适当地使用已知方法,例如定点诱变方法(Kunkel等人(Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1985) 82,488-492))和重叠延伸PCR。此外,几种已知的方法也可以用作氨基酸改变方法以取代非天然氨基酸(Annu Rev.Biophys.Biomol.Struct.(2006) 35,225-249;和Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.(2003) 100(11),6353-6357)。例如,适合使用含有tRNA的无细胞翻译系统(Clover Direct(Protein Express)),该tRNA具有与终止密码子之一的UAG密码子(琥珀密码子)的互补琥珀抑制子tRNA结合的非天然氨基酸。

[0561] 在本说明书中,当描述氨基酸改变的位点时,术语“和/或”的含义包括“和”和“或”适当组合的每一个组合。具体而言,例如,“位置33、55和/或96处的氨基酸被取代”包括以下氨基酸改变的变化:(a)位置33、(b)位置55、(c)位置96、(d)位置33和55、(e)位置33和96、(f)位置55和96、和(g)位置33、55和96的氨基酸。

[0562] 此外,在本文中,作为表示氨基酸改变的表述,可以适当地使用在表示特定位置的数字的前后分别显示改变前后的氨基酸的1个字母或3个字母的代码的表述。例如,当取代包含在抗体可变区中的氨基酸时,使用的改变N100bL或Asn100bLeu,表示在100b位置(根据Kabat编号)用Leu取代Asn。也就是说,数字表示根据Kabat编号的氨基酸位置,数字前写的1个字母或3个字母的氨基酸代码表示取代前的氨基酸,数字后写的1个字母或3个字母的氨基酸代码表示取代后的氨基酸。类似地,当取代抗体恒定区中包含的Fc区的氨基酸时,使用的改变P238D或Pro238Asp表明在238位置(根据EU编号)用Asp取代Pro。也就是说,数字表示根据EU编号的氨基酸位置,数字前写的1个字母或3个字母的氨基酸代码表示取代前的氨基酸,数字后写的1个字母或3个字母的氨基酸代码表示取代后的氨基酸。

#### [0563] 多肽

[0564] 如本文所用,术语“多肽”是指由通过酰胺键(也称为肽键)线性连接的单体(氨基酸)组成的分子。术语“多肽”是指两个或多个氨基酸的任何链,而不是指特定长度的产物。因此,肽、二肽、三肽、寡肽、“蛋白质”、“氨基酸链”或用于指代两个或多个氨基酸的链的任何其他术语都包括在“多肽”的定义中,并且术语“多肽”可以用来代替这些术语中的任何一个,或与这些术语中的任何一个互换使用。术语“多肽”还意指多肽的表达后修饰的产物,包括但不限于糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/封闭基团衍生、蛋白水解切割或通过非天然发生的氨基酸修饰。多肽可以源自天然生物来源或通过重组技术产生,但不一定翻译自指定的核酸序列。它可以以任何方式产生,包括通过化学合成产生。如本文所述的多肽的大小可以是约3个或更多、5个或更多、10个或更多、20个或更多、25个或更多、50个或更多、75个或更多、100个或更多、200个或更多、500个或更多、1000个或更多或2000个或更多氨基酸。多肽可以具有确定的三维结构,尽管它们不一定需要具有这样的结构。具有确定的三维结构的多肽被称为折叠的,不具有确定的三维结构但可以采用大量不同构象的多肽被称为未折叠的。

#### [0565] 百分比(%)氨基酸序列同一性

[0566] 相对于参考多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为在将所述序列进行比对并在必要时引入空位以获取最大百分比序列同一性,且不将任何保守取代视为序列同一性的一部分之后,候选序列中的氨基酸残基与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的百分比。用于确定百分比氨基酸序列同一性的目的的比对可以以本领域技术范围内的各种方式实现,例如,使用公开可用的计算机软件,例如BLAST、BLAST-2、ALIGN、Megalign



(DNASTAR) 软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适当参数,包括在被比较序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。然而,出于本文的目的,使用序列比较计算机程序 ALIGN-2 产生 % 氨基酸序列同一性值。ALIGN-2 序列比较计算机程序由 Genentech, Inc. 编写,源代码已与用户文档一起提交给华盛顿特区美国版权局,20559,在美国版权注册号为 TXU510087。ALIGN-2 程序可从加利福尼亚州南圣弗朗西斯科的 Genentech, Inc. 公开获得,或者可以从源代码编译。应编译 ALIGN-2 程序以在 UNIX 操作系统上使用,包括数字 UNIX V4.0D。所有序列比较参数均由 ALIGN-2 程序设置,不会发生变化。在使用 ALIGN-2 进行氨基酸序列比较的情况下,给定氨基酸序列 A 相对于、和或针对给定氨基酸序列 B (可以备选地表述为给定氨基酸 A 相对于、和或针对给定氨基酸序列 B 具有或包括特定 % 氨基酸序列同一性) 的 % 氨基酸序列同一性计算如下:

[0567] 分数 X/Y 的 100 倍

[0568] 其中 X 是序列比对程序 ALIGN-2 在该程序的 A 和 B 比对中评分为相同匹配的氨基酸残基数,其中 Y 是 B 中氨基酸残基的总数。将理解,氨基酸序列 A 的长度与氨基酸序列 B 的长度不相等,则 A 相对于 B 的 % 氨基酸序列同一性将不等于 B 相对于 A 的 % 氨基酸序列同一性。除非另有特别说明,本文使用的所有 % 氨基酸序列同一性值都是如上一段所述使用 ALIGN-2 计算机程序获得的。

[0569] 重组方法和组合物

[0570] 可以使用重组方法和组合物产生抗体和抗原结合分子,例如,如美国专利号 4,816,567 中所述。在一个实施方案中,提供了编码本文所述抗体的分离的核酸。此类核酸可编码包含抗体的 VL 的氨基酸序列和/或包含 VH 的氨基酸序列 (例如,抗体的轻链和/或重链)。在另一个实施方案中,提供了一种或多种包含此类核酸的载体 (例如,表达载体)。在另一个实施方案中,提供了包含这种核酸的宿主细胞。在一个这样的实施方案中,宿主细胞包括 (例如,已用以下转化): (1) 包含核酸的载体,所述核酸编码包括抗体的 VL 的氨基酸序列和包含抗体的 VH 的氨基酸序列,或 (2) 包含编码包含抗体的 VL 的氨基酸序列的核酸的第一载体,和包含编码包含抗体的 VH 的氨基酸序列的核酸的第二载体。在一个实施方案中,宿主细胞是真核细胞,例如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或淋巴样细胞 (例如 Y0、NS0、Sp2/0 细胞)。在一个实施方案中,提供了制备本发明的多特异性抗原结合分子的方法,其中所述方法包括在适合表达抗体的条件下培养如上文所提供的包含编码抗体的核酸的宿主细胞,并且任选地从所述宿主细胞 (或宿主细胞培养基) 回收所述抗体。

[0571] 对于本文所述抗体的重组生产,分离例如如上所述编码抗体的核酸,将其插入一个或多个载体中以在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。可以使用常规程序 (例如,通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针) 容易地分离和测序此类核酸。

[0572] 用于克隆或表达编码抗体的载体的合适宿主细胞包括本文所述的原核或真核细胞。例如,抗体可以在细菌中产生,特别是当不需要糖基化和 Fc 效应子功能时。对于抗体片段和多肽在细菌中的表达,参见例如美国专利号 5,648,237、5,789,199 和 5,840,523。(还参见 Charlton, Methods in Molecular Biology, 卷 248 (B.K.C.Lo, 编著, Humana Press, Totowa, NJ, 2003), 第 245-254 页,描述了抗体片段在大肠杆菌中的表达。) 表达后,抗体可以以可溶级分从细菌细胞糊状物中分离,并可以进一步纯化。

[0573] 除原核生物外,真核微生物如丝状真菌或酵母是编码抗体的载体的合适克隆或表达宿主,包括糖基化途径已被“人源化”的真菌和酵母菌株,从而产生具有部分或完全的人糖基化模式的抗体。参见Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004) 和Li等人, Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)。

[0574] 用于表达糖基化抗体的合适宿主细胞也来源于多细胞生物(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞。已经鉴定了许多杆状病毒株,它们可以与昆虫细胞结合使用,特别是用于草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞的转染。

[0575] 植物细胞培养物也可以用作宿主。参见,例如,美国专利号5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978和6,417,429(其描述了用于在转基因植物中生产抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0576] 脊椎动物细胞也可用作宿主。例如,适应于在悬浮液中生长的哺乳动物细胞系可能是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其他例子是由SV40(COS-7)转化的猴肾CV1细胞系;人胚胎肾细胞系(如Graham等人, J. Gen. Virol. 36:59 (1977)所述的293或293细胞);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠支持细胞(如Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)中所述的TM4细胞);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK);buffalo大鼠肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562);TRI细胞,如Mather等人, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)中所述;MRC 5细胞;和FS4细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,其包括DHFR-CHO细胞(Urlaub等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980));和骨髓瘤细胞系,如Y0、NS0和Sp2/0。有关适用于抗体产生的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,请参见例如Yazaki和Wu, Methods in Molecular Biology, 第248卷(B.K.C.Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), 第255-268页(2003)。

[0577] 本文所述的抗原结合分子的重组生产可以用类似于上述那些的方法通过使用宿主细胞进行,所述宿主细胞包含(例如,已经转化有)一个或多个载体,所述载体包含编码氨基酸序列的核酸,所述氨基酸序列包含整个抗原结合分子或抗原结合分子的一部分。

#### [0578] 抗原结合分子和多特异性抗原结合分子

[0579] 如本文所用,术语“抗原结合分子”是指包含抗原结合位点的任何分子或对抗原具有结合活性的任何分子,并且可以进一步指这样的分子,例如具有大约五个氨基酸或更多氨基酸长度的肽或蛋白质。肽和蛋白质不限于来源于生物体的那些,例如,它们可以是由人工设计的序列产生的多肽。它们也可以是任何天然存在的多肽、合成多肽、重组多肽等。包含已知稳定构象结构如 $\alpha/\beta$ 桶作为支架,并且其中部分分子被制成抗原结合位点的支架分子,也是本文所述的抗原结合分子的一个实施方案。

[0580] “多特异性抗原结合分子”是指特异性结合多于一个抗原的抗原结合分子。术语“双特异性”是指抗原结合分子能够特异性结合至少两个不同的抗原决定簇。术语“三特异性”是指抗原结合分子能够特异性结合至少三个不同的抗原决定簇。在某些实施方案中,本申请的多特异性抗原结合分子是三特异性抗原结合分子,即它能够特异性结合三种不同的抗原——能够结合CD3或CD137中的任一种但不同时结合二者,并且能够特异性结合DLL3。

[0581] 在第一方面,本公开提供了多特异性抗原结合分子,其包含:第一抗原结合部分和第二抗原结合部分,其各自能够结合CD3和CD137,但不同时结合CD3和CD137;和第三抗原结

合部分,其能够结合第三抗原,优选在癌细胞/组织上表达的抗原。在某些实施方案中,由第三抗原结合部分所结合的第三抗原是DLL3,优选是人DLL3。

[0582] 第一抗原结合部分和第二抗原结合部分可以是能够结合CD3和CD137但不能同时结合的“双抗原结合部分”,这将在下文更详细地描述。第三抗原结合部分可以是“DLL3抗原结合部分”,其也将在下文更详细地描述。第三抗原结合部分可以是“DLL3抗原结合部分”,其也将在下文更详细地描述。

[0583] 在一些实施方案中,第一抗原结合部分和第二抗原结合部分各自是Fab分子并且包含在第一抗原结合部分的CH1区和第二抗原结合部分的CH1区之间形成的至少一个二硫键。可以在第一抗原结合部分和第二抗原结合部分各自的CH1区中根据EU编号在位置191处的氨基酸残基之间形成二硫键。

[0584] 在一些实施方案中,可以是Fab或scFv的第三抗原结合部分与第一抗原结合部分或第二抗原结合部分中的任一项融合。在第一、第二和第三抗原结合部分各自是Fab分子的情况下,第三抗原结合部分可以在Fab重链的C末端(CH1)与第一抗原结合部分或第二抗原结合部分中任一项的Fab重链的N末端,任选地通过肽接头融合。代表性的肽接头包括由SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:249或SEQ ID NO:259的氨基酸序列组成的那些。在某些实施方案中,第一抗原结合部分与第二抗原结合部分相同。

[0585] 在一些实施方案中,第三抗原结合部分是交叉Fab分子,其中Fab轻链和Fab重链的可变区被交换,并且其中第一和第二抗原结合部分各自是常规Fab分子。

[0586] 在一些实施方案中,在第一和第二抗原结合部分各自的轻链的恒定结构域CL中,位置123和/或124处的氨基酸独立地被赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)取代(根据Kabat编号),并且其中在所述第一和第二抗原结合部分各自的重链的恒定结构域CH1中,位置147处的氨基酸和/或位置213处的氨基酸独立地被谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)取代(根据Kabat EU索引编号)。在其他实施方案中,在第一和第二抗原结合部分各自的轻链的恒定结构域CL中,位置123和124处的氨基酸分别是精氨酸(R)和赖氨酸(K)(根据Kabat编号),并且其中在第一和第二抗原结合部分各自的重链的恒定结构域CH1中,位置147和213处的氨基酸是谷氨酸(E)(根据Kabat EU索引编号)。

[0587] 多特异性抗原结合分子可以进一步包含Fc结构域,这将在下文详细描述。在第一和第二抗原结合部分各自是Fab的情况下,第一抗原结合部分可以在Fab重链的C末端与Fc结构域的第一或第二亚基的N末端融合,和第二抗原结合部分可以在Fab重链的C末端与Fc结构域的剩余亚基的N末端融合。在一些实施方案中,第三抗原结合部分在C末端与第一抗原结合部分或第二抗原结合部分中任一项的Fab重链的N末端,任选地通过肽接头融合。

[0588] 在本发明的另一个方面,本公开提供了一种多特异性抗原结合分子,其包含:能够结合CD3和CD137但不同时结合CD3和CD137的抗原结合部分;和能够结合DLL3,优选人DLL3的抗原结合部分。在某些实施方案中,能够结合CD3和CD137但不同时结合CD3和CD137的抗原结合部分是能够结合CD3和CD137但不同时结合CD3和CD137的“双抗原结合部分”,下面进行详细介绍。

[0589] 本发明的多特异性抗原结合分子的组分可以多种构型相互融合。图1a)中描绘了示例性构型,并与表10-1至10-3一起阅读。

[0590] 根据上述实施方案中任一项,多特异性抗原结合分子的组分(例如抗原结合部分、

Fc结构域)可以直接或通过各种接头,特别是包含一个或多个氨基酸,通常约2-20个氨基酸的肽接头融合,接头在本文中进行描述或在本领域中是已知的。合适的非免疫原性肽接头包括,例如,(G4S)<sub>n</sub>、(SG4)<sub>n</sub>、(G4S)<sub>n</sub>或G4(SG4)<sub>n</sub>肽接头,其中n通常为1至10之间的数字,通常为2至4。

#### [0591] 焦谷氨酰化

[0592] 已知当抗体在细胞中表达时,抗体在翻译后被修饰。翻译后修饰的例子包括重链C末端的赖氨酸被羧肽酶切割;通过焦谷氨酰化将重链和轻链N末端的谷氨酰胺或谷氨酸修饰为焦谷氨酸;糖基化;氧化;脱酰胺;和糖化,并且已知这种翻译后修饰发生在各种抗体中(Journal of Pharmaceutical Sciences,2008,第97卷,p.2426-2447)。

[0593] 在一些实施方案中,本发明的多特异性抗原结合分子还包括翻译后修饰。翻译后修饰的实例包括在重链可变区的N末端发生焦谷氨酰化和/或在重链的C末端缺失赖氨酸。本领域已知,由于N末端焦谷氨酰化和C末端赖氨酸缺失而导致的这种翻译后修饰对抗体的活性没有任何影响(Analytical Biochemistry,2006,第348卷,p.24-39)。

#### [0594] 抗原结合部分

[0595] 如本文所用,术语“抗原结合部分”是指特异性结合抗原的多肽分子。在一个实施方案中,抗原结合部分能够将其所附接的实体引导至靶位点,例如引导至表达癌抗原(DLL3)的特定类型的肿瘤细胞。在另一个实施方案中,抗原结合部分能够通过其靶抗原,例如T细胞受体复合物抗原(特别是CD3)和/或共刺激受体(CD137)激活信号传导。抗原结合部分包括如本文进一步定义的抗体及其片段。具体的抗原结合部分包括抗体的抗原结合结构域或抗体可变区,包括抗体重链可变区和抗体轻链可变区。在某些实施方案中,抗原结合部分可包含如本文进一步定义和本领域已知的抗体恒定区。有用的重链恒定区包括五种同种型中的任何一种: $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$  或 $\mu$ 。有用的轻链恒定区包括两种同种型中的任何一种: $\kappa$ 和 $\lambda$ 。

[0596] 如本文所用,关于抗原结合部分等的术语“第一”、“第二”和“第三”是为了当每种类型的部分有多于一个时便于区分。除非明确说明,否则这些术语的使用不旨在赋予多特异性抗原结合分子特定顺序或方向。

[0597] 在另一方面,本文公开的本发明的抗原结合部分可用于包含一个或多个本文公开的抗原结合部分的新型嵌合抗原受体(CAR)中。在某些实施方案中,本发明的CAR将包含scFv构建体,并且在优选的实施方案中,将包含或包含如本文所公开的重链和轻链可变区。在优选的实施方案中,所公开的嵌合抗原受体可用于治疗或预防增殖性病症及其任何复发或转移。

#### [0598] 能够结合CD3和CD137但不能同时结合的抗原结合部分

[0599] 本文所述的多特异性抗原结合分子包含至少一个能够结合CD3和CD137但不同时结合CD3和CD137的抗原结合部分(本文也称为“双抗原结合部分”或“第一抗原结合部分”或“双Fab”或双Ig”)。在一个实施方案中,能够与CD3和CD137结合但不同时与CD3和CD137结合的抗原结合部分是与人CD3结合的抗原结合部分。在另一个实施方案中,能够与CD3和CD137结合但不同时与CD3和CD137结合的抗原结合部分是与人CD137结合的抗原结合部分。在另一个方面,能够结合CD3和CD137但不同时结合CD3和CD137的抗原结合部分是能够结合人CD3和人CD137的抗原结合部分,其中抗原结合部分结合人CD3和人CD137中的任一个。在特定实施方案中,多特异性抗原结合分子包含两个双抗原结合部分(“第一抗原结合部分”和

“第二抗原结合部分”,各自都可以称为“双Fab”)。在一些实施方案中,两个双抗原结合部分(“第一抗原结合部分”或“第二抗原结合部分”或“双Fab”)各自提供与CD3或CD137的单价结合,但不同时结合CD3和CD137。在特定实施方案中,多特异性抗原结合分子包含不超过两个双抗原结合部分(“第一抗原结合部分”或“第二抗原结合部分”或“双Fab”)。

[0600] 在某些实施方案中,双抗原结合部分(“第一抗原结合部分”或“第二抗原结合部分”或“双Fab”)通常是Fab分子,特别是常规Fab分子。在某些实施方案中,双抗原结合部分(“第一抗原结合部分”或“第二抗原结合部分”或“双Fab”)是包含抗体轻链和重链可变区(VL和VH)的结构域。包含抗体轻链和重链可变区的此类结构域的合适实例包括“单链Fv(scFv)”、“单链抗体”、“Fv”、“单链Fv 2(scFv2)”、“Fab”、“F(ab')<sub>2</sub>”等。

[0601] 在某些实施方案中,双抗原结合部分(“第一抗原结合部分”或“第二抗原结合部分”或“双Fab”)特异性结合CD3的部分肽的全部或部分。在特定实施方案中,CD3是人CD3或食蟹猴CD3,最特别是人CD3。在特定实施方案中,第一抗原结合部分对人和食蟹猴CD3具有交叉反应性(即特异性结合)。在一些实施方案中,第一抗原结合部分能够特异性结合CD3的 $\epsilon$ 亚基,特别是SEQ ID NO:7(NP\_000724.1)(RefSeq注册号显示在括号中)中所示的CD3的人CD3 $\epsilon$ 亚基。在一些实施方案中,双抗原结合部分(“第一抗原结合部分”或“第二抗原结合部分”或“双Fab”)能够特异性结合真核细胞表面上表达的CD3 $\epsilon$ 链。在一些实施方案中,双抗原结合部分(“第一抗原结合部分”或“第二抗原结合部分”或“双Fab”)与T细胞的表面上表达的CD3 $\epsilon$ 链结合。

[0602] 在某些实施方案中,CD137是人CD137。在一些实施方案中,本发明的抗原结合分子的有利实例包含与选自由以下组成的组的抗体所结合的人CD137表位相同的表位结合的双抗原结合部分(“第一抗原结合部分”或“第二抗原结合部分”或“双Fab”):

[0603] 识别包含SPCPPNSFSSAGGQRTCD

[0604] ICRQCKGVFTRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC序列(SEQ ID NO:21)的区域的抗体,

[0605] 识别包含DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC序列(SEQ ID NO:35)的区域的抗体,

[0606] 识别包含LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFTRTRKECSSTSNAEC序列(SEQ ID NO:49)的区域的抗体,和

[0607] 识别在人CD137蛋白中包含LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQIC序列(SEQ ID NO:105)的区域的抗体。

[0608] 在具体实施方案中,双抗原结合部分(“第一抗原结合部分”或“第二抗原结合部分”或“双Fab”)包含下表1中所示的任何一种抗体可变区序列。在具体实施方案中,双抗原结合部分(“第一抗原结合部分”或“第二抗原结合部分”或“双Fab”)包含表1中所示的重链可变区和轻链可变区的组合中的任何一种。

[0609] (表1)

[0610] 双抗原结合部分(“第一抗原结合部分”或“第二抗原结合部分”或“双Fab”)的可变区的SEQ ID NO

[0611]

名称	SEQ ID NO	
	重链可变区 (VH)	轻链可变区 (VL)
DualAE08	3	59
DualAE06	4	58
DualAE17	5	58
DualAE10	5	60
DualAE05	6	58
DualAE19	8	58
DualAE20	9	58
DualAE21	9	61
DualAE22	10	58
DualAE23	11	61
DualAE09	12	61
DualAE18	12	58
DualAE14	13	58
DualAE15	14	58
DualAE16	81	60

[0612] 在一个实施方案中,双抗原结合部分(“第一抗原结合部分”或“第二抗原结合部分”或“双Fab”)包含重链可变区序列和轻链可变区序列,所述重链可变区序列与SEQ ID NO:6具有至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性,所述轻链可变区序列与SEQ ID NO:58具有至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性。在一个实施方案中,双抗原结合部分(“第一抗原结合部分”或“第二抗原结合部分”或“双Fab”)包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列。

[0613] 在一个实施方案中,双抗原结合部分(“第一抗原结合部分”或“第二抗原结合部分”或“双Fab”)包含重链可变区序列和轻链可变区序列,所述重链可变区序列与SEQ ID NO:14具有至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性,所述轻链可变区序列与SEQ ID NO:58具有至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性。在一个实施方案中,双抗原结合部分(“第一抗原结合部分”或“第二抗原结合部分”或“双Fab”)包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列。

[0614] 在一个实施方案中,双抗原结合部分(“第一抗原结合部分”或“第二抗原结合部分”或“双Fab”)包含重链可变区序列和轻链可变区序列,所述重链可变区序列与SEQ ID NO:81具有至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性,所述轻链可变区序列与SEQ ID NO:58具有至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性。在一个实施方案中,双抗原结合部分(“第一抗原结合部分”或“第二抗原结合部分”或“双Fab”)包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列。

[0615] 在具体实施方案中,双抗原结合部分(“第一抗原结合部分”或“第二抗原结合部分”或“双Fab”)包含下表2中所示的HVR序列的组合中的任何一种。

[0616] (表2)

[0617] 双抗原结合部分(“第一抗原结合部分”或“第二抗原结合部分”或“双-Fab”)的HVR(CDR)序列的SEQ ID NO

名称	SEQ ID NO					
	HVR-H1	HVR-H2	HVR-H3	HVR-L1	HVR-L2	HVR-L3
DualAE08	17	31	45	64	69	74
DualAE06	18	32	46	63	68	73
DualAE17	19	33	47	63	68	73
DualAE10	19	33	47	65	70	75
DualAE05	20	34	48	63	68	73
DualAE19	22	36	50	63	68	73
DualAE20	23	37	51	63	68	73
DualAE21	23	37	51	66	71	76
DualAE22	24	38	52	63	68	73
DualAE23	25	39	53	66	71	76
DualAE09	26	40	54	66	71	76
DualAE18	26	40	54	63	68	73
DualAE14	27	41	55	63	68	73
DualAE15	28	42	56	63	68	73
DualAE16	82	83	84	65	70	75

[0620] 在一些实施方案中,双抗原结合部分(“第一抗原结合部分”或“第二抗原结合部分”或“双Fab”)各自包含抗体可变区,所述抗体可变区包含以下(a1)至(a17)中的任一项:

[0621] (a1)SEQ ID NO:17的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:31的重链CDR 2、SEQ ID NO:45的重链CDR 3、SEQ ID NO:64的轻链CDR 1、SEQ ID NO:69的轻链CDR 2和SEQ ID NO:74的轻链CDR 3;

[0622] (a2)SEQ ID NO:18的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:32的重链CDR 2、SEQ ID NO:46的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0623] (a3)SEQ ID NO:19的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:33的重链CDR 2、SEQ ID NO:47的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0624] (a4)SEQ ID NO:19的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:33的重链CDR 2、SEQ ID NO:47的重链CDR 3、SEQ ID NO:65的轻链CDR 1、SEQ ID NO:70的轻链CDR 2和SEQ ID NO:75的轻链CDR 3;

[0625] (a5)SEQ ID NO:20的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:34的重链CDR 2、SEQ ID NO:48的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0626] (a6)SEQ ID NO:22的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:36的重链CDR 2、SEQ ID NO:50的重链CDR 3、SEQ ID NO:63的轻链CDR 1、SEQ ID NO:68的轻链CDR 2和SEQ ID NO:73的轻链CDR 3;

[0627] (a7)SEQ ID NO:23的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:37的重链CDR 2、SEQ ID

N0:51的重链CDR 3、SEQ ID N0:63的轻链CDR 1、SEQ ID N0:68的轻链CDR 2和SEQ ID N0:73的轻链CDR 3;

[0628] (a8) SEQ ID N0:23的重链互补决定区 (CDR) 1、SEQ ID N0:37的重链CDR 2、SEQ ID N0:51的重链CDR 3、SEQ ID N0:66的轻链CDR 1、SEQ ID N0:71的轻链CDR 2和SEQ ID N0:76的轻链CDR 3;

[0629] (a9) SEQ ID N0:24的重链互补决定区 (CDR) 1、SEQ ID N0:38的重链CDR 2、SEQ ID N0:52的重链CDR 3、SEQ ID N0:63的轻链CDR 1、SEQ ID N0:68的轻链CDR 2和SEQ ID N0:73的轻链CDR 3;

[0630] (a10) SEQ ID N0:25的重链互补决定区 (CDR) 1、SEQ ID N0:39的重链CDR 2、SEQ ID N0:53的重链CDR 3、SEQ ID N0:66的轻链CDR 1、SEQ ID N0:71的轻链CDR 2和SEQ ID N0:76的轻链CDR 3;

[0631] (a11) SEQ ID N0:26的重链互补决定区 (CDR) 1、SEQ ID N0:40的重链CDR 2、SEQ ID N0:54的重链CDR 3、SEQ ID N0:66的轻链CDR 1、SEQ ID N0:71的轻链CDR 2和SEQ ID N0:76的轻链CDR 3;

[0632] (a12) SEQ ID N0:26的重链互补决定区 (CDR) 1、SEQ ID N0:40的重链CDR 2、SEQ ID N0:54的重链CDR 3、SEQ ID N0:63的轻链CDR 1、SEQ ID N0:68的轻链CDR 2和SEQ ID N0:73的轻链CDR 3;

[0633] (a13) SEQ ID N0:27的重链互补决定区 (CDR) 1、SEQ ID N0:41的重链CDR 2、SEQ ID N0:55的重链CDR 3、SEQ ID N0:63的轻链CDR 1、SEQ ID N0:68的轻链CDR 2和SEQ ID N0:73的轻链CDR 3;

[0634] (a14) SEQ ID N0:28的重链互补决定区 (CDR) 1、SEQ ID N0:42的重链CDR 2、SEQ ID N0:56的重链CDR 3、SEQ ID N0:63的轻链CDR 1、SEQ ID N0:68的轻链CDR 2和SEQ ID N0:73的轻链CDR 3;

[0635] (a15) SEQ ID N0:82的重链互补决定区 (CDR) 1、SEQ ID N0:83的重链CDR 2、SEQ ID N0:84的重链CDR 3、SEQ ID N0:65的轻链CDR 1、SEQ ID N0:70的轻链CDR 2和SEQ ID N0:75的轻链CDR 3;

[0636] (a16) 与选自 (a1) 至 (a15) 中任一项的抗体可变区的相同表位结合的抗体可变区; 和

[0637] (a17) 与选自 (a1) 至 (a15) 中任一项的抗体可变片段的结合竞争的抗体可变片段。

[0638] 在一些实施方案中,本发明的多特异性抗原结合分子或双抗原结合部分(“第一抗原结合部分”或“第二抗原结合部分”或“双Fab”)还包含翻译后修饰。翻译后修饰的实例包括在重链可变区的N末端发生焦谷氨酰化和/或在重链的C末端缺失赖氨酸。本领域已知,由于N末端焦谷氨酰化和C末端赖氨酸缺失而导致的这种翻译后修饰对抗体的活性没有任何影响(*Analytical Biochemistry*, 2006, 第348卷, p.24-39)。

[0639] 能够结合DLL3的抗原结合部分

[0640] 本文所述的多特异性抗原结合分子包含至少一个能够结合 $\delta$ 样3 (DLL3) 的抗原结合部分(本文也称为“DLL3抗原结合部分”或“第三抗原结合部分”或“结合DLL3的抗原结合部分”)。

[0641] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合分子包含一个能够结合DLL3的抗原结合部



分。在某些实施方案中,多特异性抗原结合分子包含两个能够结合DLL3的抗原结合部分(“DLL3抗原结合部分”)。在特定的此类实施方案中,这些抗原结合部分各自特异性结合DLL3的相同表位。在甚至更特定的实施方案中,所有这些“DLL3抗原结合部分”都是相同的。在一个实施方案中,多特异性抗原结合分子包含能够特异性结合DLL3的免疫球蛋白分子(“DLL3抗原结合部分”)。在一个实施方案中,多特异性抗原结合分子包含不超过两个能够结合DLL3的抗原结合部分(“DLL3抗原结合部分”)。

[0642] 在某些实施方案中,DLL3抗原结合部分是交叉Fab分子,即其中Fab重链和轻链的可变区或恒定区被交换的DLL3分子。在某些实施方案中,DLL3抗原结合部分是交叉Fab分子,其中Fab轻链和Fab重链的可变区被交换。

[0643] 在一些实施方案中,DLL3抗原结合部分特异性结合DLL3的细胞外结构域。在一些实施方案中,DLL3抗原结合部分特异性结合DLL3细胞外结构域内的表位。在一些实施方案中,DLL3抗原结合部分与真核细胞的表面上表达的DLL3蛋白结合。在一些实施方案中,DLL3抗原结合部分与癌细胞的表面上表达的DLL3蛋白结合。

[0644] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子或DLL3抗原结合部分结合细胞外结构域(ECD)内的表位,即从N末端到紧接TM区之前的结构域,但不结合TM区或C末端细胞内结构域。多特异性抗原结合分子或DLL3抗原结合部分可以结合ECD内任何上述结构域/区域内的表位。在优选的实施方案中,多特异性抗原结合分子或DLL3抗原结合部分与从EGF6到紧接TM区之前的区域内的表位结合。更具体地,多特异性抗原结合分子或DLL3抗原结合部分可以结合人DLL3中SEQ ID NO:89中定义的区域内的表位。在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子或DLL3抗原结合部分结合EGF1、EGF2、EGF3、EGF4、EGF5或EGF6区或从EGF6到紧接在人DLL3的TM区之前的区域,或在EGF1、EGF2、EGF3、EGF4、EGF5或EGF6区或从EGF6到紧接在人DLL3的TM区域之前的区域内的表位。在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子或DLL3抗原结合部分可源自先前报道的抗DLL3抗体,其中结合的DLL3表位已被表征(例如W02019131988和W02011093097)。

[0645] 在具体实施方案中,多特异性抗原结合分子或DLL3抗原结合部分包含下表3中所示的任何一种抗体可变区序列。在具体实施方案中,多特异性抗原结合分子或DLL3抗原结合部分包含表3所示的重链可变区和轻链可变区的组合中的任一种。在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子或DLL3抗原结合部分包含结构域,所述结构域包含与表3中所示抗体可变区中的任一项竞争结合DLL3的抗体可变片段。

[0646] (表3)

[0647] 示例性DLL3抗原结合部分的可变区的SEQ ID NO

名称	SEQ ID NO	
	重链可变区 (VH)	轻链可变区 (VL)
DL301	305	313
DL306	306	314
DL309	307	315
DL312	308	316
DLL3-14	309	317
DLL3-22	310	318
DLL3-4	311	319
DLL3-6	312	320
DLA0106	260	261
DLA0126	262	263
DLA0316	264	265
DLA0379	266	267
DLA0580	268	269
DLA0641	270	271
DLA0769	272	273
DLA0841	274	275
D30841AE05	297	236
D30841AE08	298	236
D30841AE11	298	302
D30841AE12	299	236
D30841AE13	232	236
D30841AE14	300	236
D30841AE15	301	236

[0650] 在一个实施方案中,DLL3抗原结合部分包含重链可变区序列和轻链可变区序列,所述重链可变区序列与SEQ ID NO:232具有至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性,所述轻链可变区序列与SEQ ID NO:236具有至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性。在一个实施方案中,DLL3抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:232的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:236的氨基酸序列。

[0651] 在一个实施方案中,DLL3抗原结合部分包含重链可变区序列和轻链可变区序列,所述重链可变区序列与SEQ ID NO:300具有至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性,所述轻链可变区序列与SEQ ID NO:236具有至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性。在一个实施方案中,DLL3抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:300的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:236的氨基酸序列。

[0652] 在一个实施方案中,DLL3抗原结合部分包含重链可变区序列和轻链可变区序列,所述重链可变区序列与SEQ ID NO:301具有至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性,所述轻链可变区序列与SEQ ID NO:236具有至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性。在一个实施方案中,DLL3抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,所

述重链可变区包含SEQ ID NO:301的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:236的氨基酸序列。

[0653] 在一个实施方案中,DLL3抗原结合部分包含重链可变区序列和轻链可变区序列,所述重链可变区序列与SEQ ID NO:274具有至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性,所述轻链可变区序列与SEQ ID NO:275具有至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性。在一个实施方案中,DLL3抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:274的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:275的氨基酸序列。

[0654] 在一个实施方案中,DLL3抗原结合部分包含重链可变区序列和轻链可变区序列,所述重链可变区序列与SEQ ID NO:264具有至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性,所述轻链可变区序列与SEQ ID NO:265具有至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性。在一个实施方案中,DLL3抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:264的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:265的氨基酸序列。

[0655] 在具体实施方案中,DLL3抗原结合部分包含下表4中所示的HVR序列的组合中的任一种。在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子或DLL3抗原结合部分包含结构域,所述结构域包含抗体可变片段,所述抗体可变片段与表4中所示的任一抗体可变区竞争结合DLL3,或与包含与表4中所示抗体可变区的HVR区相同的HVR序列的任何抗体可变片段竞争结合DLL3。

[0656] (表4)

[0657] 示例性DLL3抗原结合部分的HVR(CDR)序列的SEQ ID NO

名称	SEQ ID NO					
	HVR-H1	HVR-H2	HVR-H3	HVR-L1	HVR-L2	HVR-L3
DLA0316	276	277	278	279	280	281
DLA0580	285	286	287	288	289	290
DLA0769	291	292	293	294	295	296
DLA0841	282	283	284	237	238	239
[0658] D30841AE05	233	234	303	237	238	239
D30841AE08	233	234	235	237	238	239
D30841AE11	233	234	235	237	238	304
D30841AE12	233	234	235	237	238	239
D30841AE13	233	234	235	237	238	239
D30841AE14	233	234	235	237	238	239
D30841AE15	233	234	235	237	238	239

[0659] 在一些实施方案中,本发明的多特异性抗原结合分子或DLL3抗原结合部分包含抗体可变区,所述抗体可变区包含以下(a1)至(a5)中任一项:

[0660] (a1) SEQ ID NO:233的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:234的重链CDR 2、SEQ ID NO:235的重链CDR 3、SEQ ID NO:237的轻链CDR 1、SEQ ID NO:238的轻链CDR 2和SEQ ID NO:239的轻链CDR 3;

[0661] (a2) SEQ ID NO:276的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:277的重链CDR 2、SEQ ID NO:278的重链CDR 3、SEQ ID NO:279的轻链CDR 1、SEQ ID NO:280的轻链CDR 2和SEQ

ID NO:281的轻链CDR 3;

[0662] (a3) SEQ ID NO:285的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:286的重链CDR 2、SEQ ID NO:287的重链CDR 3、SEQ ID NO:288的轻链CDR 1、SEQ ID NO:289的轻链CDR 2和SEQ ID NO:290的轻链CDR 3;

[0663] (a4) 与选自(a1)至(a3)中任一项的抗体可变区的相同表位结合的抗体可变区;和

[0664] (a5) 与选自(a1)至(a3)中任一项的抗体可变片段的结合竞争的抗体可变片段。

[0665] 在一些实施方案中,本发明的多特异性抗原结合分子或DLL3抗原结合部分还包含翻译后修饰。翻译后修饰的实例包括在重链可变区的N末端发生焦谷氨酰化和/或在重链的C末端缺失赖氨酸。本领域已知,由于N末端焦谷氨酰化和C末端赖氨酸缺失而导致的这种翻译后修饰对抗体的活性没有任何影响(*Analytical Biochemistry*, 2006, 第348卷, p.24-39)。

[0666] 在另一个方面,本发明的DLL3抗原结合部分可用于掺入DLL3结合结构域的新型嵌合抗原受体(CAR) (DLL3 CAR) 中。在某些实施方案中,本发明的DLL3结合结构域(和DLL3 CAR) 将包含scFv构建体,并且在优选的实施方案中,将包含如本文所公开的重链和轻链可变区。在其他优选实施方案中,本发明的DLL3结合结构域(和DLL3 CAR) 将包含scFv构建体或其片段,所述scFv构建体或其片段包含本文公开的重链和轻链可变区。在优选的实施方案中,所公开的嵌合抗原受体可用于治疗或预防增殖性病症及其任何复发或转移。

[0667] 在某些实施方案中,DLL3蛋白在肿瘤起始细胞上表达。DLL3 CAR通过基因修饰(例如转导)在细胞毒性淋巴细胞(优选自体细胞毒性淋巴细胞)上表达,产生可用于靶向和杀死DLL3阳性的肿瘤细胞的DLL3敏感性淋巴细胞。如本文将广泛讨论的,本发明的CAR通常包含细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,所述细胞内信号传导结构域包含激活某些淋巴细胞并产生DLL3阳性的肿瘤细胞的免疫应答的DLL3结合结构域。本发明的选定实施方案包括展示所公开的CAR的免疫活性宿主细胞,和编码本发明的DLL3 CAR的各种多核苷酸序列和载体。其他方面包括通过将表达DLL3 CAR分子的宿主细胞引入患有癌症的个体来增强个体中T淋巴细胞或自然杀伤(NK)细胞的活性并治疗个体的方法。这些方面尤其包括肺癌(例如,小细胞肺癌)和黑色素瘤。

[0668] 抗原

[0669] 如本文所用,术语“抗原”是指多肽大分子上与抗原结合部分结合、形成抗原结合部分-抗原复合物的位点(例如连续的氨基酸段或由不连续氨基酸的不同区域组成的构象构型)。有用的抗原决定簇可存在于例如肿瘤细胞的表面、病毒感染细胞的表面、其他患病细胞的表面、免疫细胞的表面、游离于血清中和/或细胞外基质(ECM)。除非另有说明,本文称为抗原的蛋白质(例如CD3、CD137、DLL3)可以是来自任何脊椎动物来源的任何天然形式的蛋白质,包括哺乳动物例如灵长类动物(例如人)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)。在特定实施方案中,抗原是人CD3、人CD137或人DLL 3。在本文中提及特定蛋白质时,该术语包括“全长”、未加工的蛋白质以及由细胞中加工产生的任何形式的蛋白质。该术语还包括天然存在的蛋白质变体,例如剪接变体或等位基因变体。

[0670] 在某些实施方案中,本文所述的多特异性抗原结合分子结合在来自不同物种的在CD3、CD137或DLL 3中保守的CD3、CD137或DLL 3的表位。在某些实施方案中,本申请的多特异性抗原结合分子是三特异性抗原结合分子,即它能够特异性结合三种不同的抗原——能

够结合CD3或CD137中的任一种但不同时结合两种抗原,并且能够特异性结合DLL 3。

[0671] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合分子特异性结合CD3的部分肽的全部或部分。在特定实施方案中,CD3是人CD3或食蟹猴CD3,最特别是人CD3。在特定实施方案中,多特异性抗原结合分子对人和食蟹猴CD3具有交叉反应性(即特异性结合)。在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子能够特异性结合CD3的 $\epsilon$ 亚基,特别是SEQ ID NO:7(NP\_000724.1)(RefSeq注册号显示在括号内)中所示的CD3的人CD3 $\epsilon$ 亚基。在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子能够与在真核细胞的表面上表达的CD3 $\epsilon$ 链特异性结合。在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子结合在T细胞的表面上表达的CD3 $\epsilon$ 链。

[0672] 在某些实施方案中,CD137是人CD137。在一些实施方案中,本发明的抗原结合分子的有利实例包括与选自由以下组成的组的抗体所结合的人CD137表位相同的表位结合的抗原结合分子:

[0673] 识别包含SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC序列(SEQ ID NO:21)的区域的抗体,

[0674] 识别包含DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC序列(SEQ ID NO:35)的区域的抗体,

[0675] 识别包含LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSN AEC序列(SEQ ID NO:49)的区域的抗体,和

[0676] 识别在人CD137蛋白中包含LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQIC序列(SEQ ID NO:105)的区域的抗体。

[0677] 除非另有说明,本文使用的术语“DLL3”是指来自任何脊椎动物来源的任何天然DLL3(8样3),包括哺乳动物如灵长类动物(例如人)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)。该术语包括“全长”未加工的DLL3以及由细胞中加工产生的任何形式的DLL3。该术语还包括天然存在的DLL3变体,例如剪接变体或等位基因变体。示例性人DLL3的氨基酸序列已知为NCBI参考序列(RefSeq) NM\_016941.3,示例性食蟹猴DLL3的氨基酸序列已知为NCBI参考序列XP\_005589253.1,和示例性小鼠DLL3的氨基酸序列已知为NCBI参考序列NM\_007866.2。

[0678] 人DLL3蛋白在C末端侧包含跨膜(TM)区和细胞内结构域,在N末端侧包含DSL(Notch)结构域(参见例如图6)。另外,DLL3具有EGF结构域,所述EGF结构域包含从N末端侧到C末端侧的6个区域,EGF1至EGF6。在一些实施方案中,本发明的多特异性抗原结合分子或DLL3抗原结合部分结合细胞外结构域(ECD)即从N末端到紧接TM区之前的结构域内的表位,但不结合TM区或C端细胞内结构域。本发明的多特异性抗原结合分子或DLL3抗原结合部分可以结合ECD内的任何上述结构域/区域内的表位。在优选的实施方案中,本发明的多特异性抗原结合分子或DLL3抗原结合部分与从EGF6到紧接TM区之前的区域内的表位结合。更具体地,本发明的多特异性抗原结合分子或DLL3抗原结合部分可以结合人DLL3中SEQ ID NO:89中定义的区域内的表位。在一些实施方案中,本发明的分子/抗体结合EGF1、EGF2、EGF3、EGF4、EGF5或EGF6区或从EGF6到紧接在人DLL3的TM区之前的区域,或EGF1、EGF2、EGF3、EGF4、EGF5或EGF6区或从EGF6到紧接在人DLL3的TM区之前的区域内的表位。

[0679] 在人DLL3中,上述结构域/区域具有以下氨基酸残基(参见例如<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9NYJ7>或W02013/126746):

[0680] 细胞外结构域(ECD):位置1至492处的氨基酸残基;

[0681] DSL结构域:位置176至215处的氨基酸残基;  
[0682] EGF结构域:位置216至465处的氨基酸残基;  
[0683] EGF1区:位置216至249处的氨基酸残基;  
[0684] EGF2区:位置274至310处的氨基酸残基;  
[0685] EGF3区:位置312至351处的氨基酸残基;  
[0686] EGF4区:位置353至389处的氨基酸残基;  
[0687] EGF5区:位置391至427处的氨基酸残基;  
[0688] EGF6区:位置429至465处的氨基酸残基;  
[0689] 从EGF6到紧接TM区之前的区域:位置429至492处的氨基酸残基;  
[0690] TM区:位置493至513处的氨基酸残基;和  
[0691] C末端细胞内结构域:位置516至618处的氨基酸残基(或在某些同工型中为516至587处)。上述氨基酸位置也指在SEQ ID NO:90所示氨基酸序列中的氨基酸位置。

[0692] 因此,本发明的多特异性抗原结合分子或DLL3抗原结合部分可以与具有在人DLL3的上述位置处的氨基酸残基的上述区域/结构域结合。即,本发明的多特异性抗原结合分子或DLL3抗原结合部分可以与具有在人DLL3中上述位置处的氨基酸残基的上述区域/结构域内的表位结合。

[0693] 本发明中使用的DLL3蛋白质可以是具有上述序列的DLL3蛋白质,也可以是通过一个或多个氨基酸的修饰具有来自上述序列的序列的修饰蛋白质。通过一个或多个氨基酸的修饰具有来自上述序列的序列的修饰蛋白质的实例可以包括与上述氨基酸序列具有70%或更多、优选80%或更多、更优选90%或更多、甚至更优选95%或更多同一性的多肽。或者,可以使用这些DLL3蛋白质的部分肽。

[0694] 本发明中使用的DLL3蛋白质不受其来源的限制,优选人或食蟹猴DLL3蛋白质。

[0695] 在一些实施方案中,对于DLL3蛋白,可以使用DLL3 ECD片段蛋白质(或ECD变体)。取决于截短位点,片段/变体可以从N末端侧到C末端侧包含DSL结构域至EGF6、EGF1至EGF6、EGF2至EGF6、EGF3至EGF6、EGF4至EGF6、EGF5和EGF6,或EGF6。片段/变体还可以包含跨越从紧接在EGF6区之后到紧接在TM区之前的区域。可以使用本领域公知的技术将Flag标签连接到片段/变体的C末端。

[0696] 抗原结合结构域

[0697] 术语“抗原结合结构域”是指抗体的一部分,其包含与抗原的部分或全部特异性结合并互补的区域。抗原结合结构域可以由例如一个或多个抗体可变结构域(也称为抗体可变区)提供。优选地,抗原结合结构域包含抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH)两者。这种优选的抗原结合结构域包括例如“单链Fv(scFv)”、“单域抗体或VHH”、“单链抗体”、“Fv”、“单链Fv2(scFv2)”、“Fab”和“F(ab')<sub>2</sub>”。

[0698] 可变区

[0699] 术语“可变区”或“可变结构域”是指参与抗体与抗原结合的抗体重链或轻链的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为VH和VL)通常具有相似的结构,每个结构域包含四个保守的框架区(FR)和三个高变区(HVR)。(参见,例如Kindt等,Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007))。单个VH或VL结构域可能足以赋予抗原结合特异性。此外,可以使用来自结合抗原的抗体的VH或VL结构域来分别筛选互补

VL或VH结构域的文库,从而分离结合特定抗原的抗体。参见例如Portolano等人, J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等人,Nature 352:624-628(1991)。

[0700] HVR或CDR

[0701] 如本文所用,术语“高变区”或“HVR”是指在序列上高变(“互补决定区”或“CDR”)和/或形成结构上定义的环(“高变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触”)的抗体可变结构域的每个区域。高变区(HVR)也称为“互补决定区”(CDR),这些术语在本文中可互换使用,指的是形成抗原结合区的可变区部分。通常,抗体包含六个HVR:VH中的三个(H1,H2,H3)和VL中的三个(L1,L2,L3)。本文的示例性HVR包括:

[0702] (a) 出现在氨基酸残基26-32(L1),50-52(L2),91-96(L3),26-32(H1),53-55(H2)和96-101(H3)处的高变环(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987));

[0703] (b) 出现在氨基酸残基24-34(L1),50-56(L2),89-97(L3),31-35b(H1),50-65(H2)和95-102(H3)处的CDR(Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991));

[0704] (c) 出现在氨基酸残基27c-36(L1),46-55(L2),89-96(L3),30-35b(H1),47-58(H2)和93-101(H3)处的抗原接触(MacCallum等人,J.Mol.Biol.262:732-745(1996));和

[0705] (d) (a)、(b)和/或(c)的组合,包括HVR氨基酸残基46-56(L2),47-56(L2),48-56(L2),49-56(L2),26-35(H1),26-35b(H1),49-65(H2),93-102(H3)和94-102(H3)。

[0706] 除非另有说明,否则可变结构域中的HVR残基和其他残基(例如FR残基)在本文中根据Kabat等编号,见上文。

[0707] HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3也分别被称为“H-CDR1”、“H-CDR2”、“H-CDR3”、“L-CDR1”、“L-CDR2”和“L-CDR3”。

[0708] 能够与CD3和CD137结合,但不同时与CD3和CD137结合

[0709] 可以通过本领域中已知的方法来确定本发明的抗体可变区是否“能够与CD3和CD137结合”。

[0710] 例如,这可以通过电化学发光法(ECL法)来确定(BMC Research Notes 2011,4:281)。

[0711] 具体而言,例如,由经生物素标记的待测抗原结合分子的能够与CD3和CD137结合的区域(例如Fab区)构成的低分子抗体或者其单价抗体(缺少通常抗体所携带的两个Fab区之一的抗体)与用碘基标签(Ru络合物)标记的CD3或CD137混合,并将混合物添加到链霉亲和素固定的板上。在该操作中,待测试的生物素标记的抗原结合分子与平板上的链霉亲和素结合。从碘基标签发光,利用Sector Imager 600或2400(MSD K.K.)等检测发光信号,从而确认待测抗原结合分子的上述区域与CD3或CD137的结合。

[0712] 或者,可以通过ELISA或FACS(荧光活化细胞分选术)、ALPHAScreen(amplified luminescent proximity homogeneous assay screen,放大发光邻近均质测定筛选)或基于表面等离子共振(SPR)现象的BIAcore法等来进行该测定(Proc.Natl.Acad.Sci.USA (2006) 103(11),4005-4010)。

[0713] 具体而言,例如,可以使用基于表面等离子共振(SPR)现象的相互作用分析仪Biacore(GE Healthcare Japan Corp.)来进行该测定。Biacore分析仪包括任意型号,例如Biacore T100、T200、X100、A100、4000、3000、2000、1000或C。可将Biacore的任意传感器芯

片,例如,CM7、CM5、CM4、CM3、C1、SA、NTA、L1、HPA或Au芯片用作传感器芯片。通过例如胺偶联、二硫化物偶联(disulfide coupling)、醛偶联的偶联方法将捕获本发明的抗原结合分子的蛋白(例如蛋白A、蛋白G、蛋白L、抗人IgG抗体、抗人IgG-Fab、抗人L链抗体、抗人Fc抗体、抗原蛋白或抗原肽)固定在传感器芯片上。将CD3或CD137作为分析物注射在芯片上,测量相互作用以获得传感图。在该操作中,CD3或CD137的浓度可以根据测定样品的相互作用强度(例如KD等)在数 $\mu\text{M}$ 至数pM的范围内选择。

[0714] 或者,可以将CD3或CD137代替抗原结合分子固定在传感器芯片上,使得待评价的抗体样品与CD3或CD137相互作用。根据由相互作用的传感图算出的解离常数(KD)值、或根据抗原结合分子样品作用后相对于作用前水平的传感图的增加程度,可以确认本发明的抗原结合分子的抗体可变区是否具有对CD3或CD137的结合活性。

[0715] 在一些实施方案中,使用例如Biacore T200仪器(GE Healthcare)或Biacore 8K仪器(GE Healthcare)在37°C(对于CD137)或25°C(对于CD3)下评估本发明的抗体可变区与目的抗原(即CD3或CD137)的结合活性或亲和力。使用胺偶联试剂盒(例如GE Healthcare),将抗人Fc(例如GE Healthcare)固定在CM4传感器芯片的所有流通池上。将抗原结合分子或抗体可变区捕获到抗Fc传感器表面上,然后将抗原(CD3或CD137)注射到流通池上。抗原结合分子或抗体可变区的捕获水平的目标可以为200个共振单位(RU)。重组人CD3或CD137可以以2000到125nM的剂量注射,其通过两倍连续稀释,然后进行解离来制备。在包含20mMACES,150mM NaCl,0.05%吐温20、0.005%NaN<sub>3</sub>的ACES pH 7.4中制备所有抗原结合分子或抗体可变区和分析物。每个循环用3M MgCl<sub>2</sub>再生传感器表面。通过使用例如Biacore透视评估软件2.0版(Biacore Insight Evaluation software)(GE Healthcare)或Biacore 8K评估软件(GE Healthcare)将数据处理并将其拟合为1:1结合模型来确定结合亲和力。计算KD值以评估本发明的抗原结合结构域的特异性结合活性或亲和力。

[0716] ALPHAScreen是通过使用两种类型的珠子(供体和受体)的ALPHA技术,基于下述原理来实施的:通过结合于供体珠子的分子和结合于受体珠子的分子之间的生物学相互作用,仅在这两个珠子靠近时检测到发光信号。供体珠子内的激光激发的光敏剂将周围的氧转换为具有激发状态的单线态氧。单线态氧扩散至供体珠子周围,到达靠近供体珠子的受体珠子,从而引起珠子内的化学发光反应,最终发出光。在结合于供体珠子的分子和结合于受体珠子的分子不发生相互作用时,供体珠子产生的单线态氧不会到达受体珠子。因此,不会发生化学发光反应。

[0717] 将观察相互作用的物质的一个(配体)固定在传感器芯片的金薄膜上。从传感器芯片的背面照射光使得在金薄膜和玻璃之间的界面发生全反射。结果,在一部分反射光中形成了反射强度(SPR信号)下降的位点。将观察相互作用的物质的另一个(分析物)注射到传感器芯片的表面。分析物与配体结合时,固定化配体分子的质量会增加,从而改变传感器芯片表面的溶剂的折射率。折射率的变化使SPR信号的位置发生移位(相反,结合分子的解离会使信号返回到原始位置)。Biacore系统在纵坐标上绘制位移量,即传感器芯片表面上的质量变化,并显示依赖于时间的质量变化作为测定数据(传感图)。由传感图可确定与被捕获到传感器芯片表面上的配体结合的分析物的量(在分析物相互作用前后的传感图上的响应的变化量)。但是,由于结合量也取决于配体的量,必须在使用基本上相同的配体量的条件下进行比较。由传感图的曲线可确定动力学即缔合速率常数( $k_a$ )和解离速率常数( $k_d$ ),



而由这些常数之间的比值可确定亲和力(KD)。BIACORE法中还优选使用抑制测定法。抑制测定法的实例描述在Proc.Natl.Acad.Sci.USA(2006)103(11),4005-4010中。

[0718] 术语“不同时结合CD3和CD137(4-1BB)”或“不与CD3和CD137(4-1BB)同时结合”是指本发明的抗原结合部分或抗体可变区不能在与CD3结合的状态下与CD137结合,反之抗原结合部分或抗体可变区不能在与CD137结合的状态下与CD3结合。在本文中,短语“不同时与CD3和CD137结合”也包括表达CD3的细胞和表达CD137的细胞不交联、或者不同时结合各自在不同细胞上表达的CD3和CD137。该短语进一步包括下述的情形:当CD3和CD137如可溶性蛋白那样不在细胞膜上表达、或者二者均存在于同一细胞上时,可变区能够同时结合CD3和CD137,但不同时结合各自在不同细胞上表达的CD3和CD137。这样的抗体可变区没有特别限定,只要抗体可变区具有这些功能即可。其实例可包括:通过将IgG型抗体可变区的一部分氨基酸改变以与所期望的抗原结合而获得的可变区。待改变的氨基酸选自,例如在与CD3或CD137结合的抗体可变区中,其改变不消除与抗原的结合的氨基酸。

[0719] 在本文中,短语“在不同细胞上表达”仅是指抗原在分开的细胞上表达。这样的细胞组合可以是,例如,同一类型的细胞例如T细胞与另一个T细胞,或者可以是不同类型的细胞例如T细胞和NK细胞。

[0720] 本发明的抗原结合分子是否“不同时与CD3和CD137结合”可如下进行确认:确认抗原结合分子对CD3和CD137都具有结合活性,然后使CD3或CD137预先结合到包含具有结合活性的可变区的抗原结合分子上,然后通过上述方法确定其对另一个是否具有结合活性。或者,这也可以通过确定抗原结合分子与固定在ELISA板或传感器芯片上的CD3或CD137的结合是否被加入到溶液中的另一个抑制来确认。在一些实施方案中,本发明的抗原结合分子与CD3或CD137的结合被抗原结合分子与另一个的结合抑制了至少50%,优选60%或以上,更优选70%或以上,更优选80%或以上,进一步优选90%或以上,或甚至更优选95%或以上。

[0721] 在一方面,当一种抗原(例如CD3)被固定时,可以通过现有技术中已知的方法(即ELISA,BIACORE等)在存在另一种抗原(例如CD137)的情况下确定对抗原结合分子与CD3的结合的抑制。在另一方面,当CD137被固定时,也可以在CD3存在下确定对抗原结合分子与CD137的结合的抑制。当进行上述两个方面中的任何一个时,如果结合被抑制至少50%,优选60%或以上,优选70%或以上,进一步优选80%或以上,进一步优选90%或以上,甚至更优选95%或以上,则确定本发明的抗原结合分子不同时与CD3和CD137结合。

[0722] 在一些实施方案中,作为分析物注射的抗原的浓度比待固定的其他抗原的浓度高至少1倍、2倍、5倍、10倍、30倍、50倍或100倍。

[0723] 以优选的方式,作为分析物注射的抗原的浓度比待固定的其他抗原的浓度高100倍,并且结合被抑制至少80%。

[0724] 在一个实施方案中,计算了抗原结合分子的CD3(分析物)结合活性的KD值与抗原结合分子的CD137(固定化)结合活性的KD值之比( $KD(CD3)/KD(CD137)$ ),并且比CD137(固定化)浓度高10倍、50倍、100倍或200倍的KD值之比( $KD(CD3)/KD(CD137)$ )的CD3(分析物)浓度,可用于上面的竞争性测量。(例如,当KD值之比为0.1时,可以选择高1倍、5倍、10倍或20倍的浓度。另外,当KD值之比为10时,可以选择高100倍、500倍、1000倍或2000倍的浓度。)

[0725] 在一方面,当一种抗原(例如CD3)被固定时,可以通过现有技术中已知的方法(即

ELISA, ECL等) 在存在另一种抗原 (例如CD137) 的情况下确定抗原结合分子与CD3的结合信号的衰减。在另一方面, 当CD137被固定时, 也可以在CD3存在下确定抗原结合分子与CD137的结合信号的衰减。当进行上述两个方面中的任何一个时, 如果结合信号衰减至少50%, 优选60%或以上, 优选70%或以上, 进一步优选80%或以上, 进一步优选90%或以上, 甚至更优选95%或以上, 则确定本发明的抗原结合分子不同时与CD3和CD137结合。

[0726] 在一些实施方案中, 作为分析物注射的抗原的浓度比待固定的其他抗原的浓度高至少1倍、2倍、5倍、10倍、30倍、50倍或100倍。

[0727] 以优选的方式, 作为分析物注射的抗原的浓度比待固定的其他抗原的浓度高100倍, 并且结合被抑制至少80%。

[0728] 在一个实施方案中, 计算了抗原结合分子的CD3 (分析物) 结合活性的KD值与抗原结合分子的CD137 (固定化) 结合活性的KD值之比 ( $KD(CD3)/KD(CD137)$ ), 比CD137 (固定化) 浓度高10倍、50倍、100倍或200倍的KD值之比 ( $KD(CD3)/KD(CD137)$ ) 的CD3 (分析物) 的浓度, 可用于上面的测量。(例如, 当KD值之比为0.1时, 可以选择高1倍、5倍、10倍或20倍的浓度。另外, 当KD值之比为10时, 可以选择高100倍、500倍、1000倍或2000倍的浓度。)

[0729] 具体地, 在使用例如ECL方法的情况下, 制备了待测的生物素标记的抗原结合分子、用碘基标签标记的CD3 (Ru复合物) 和未标记的CD137。当待测抗原结合分子能够与CD3和CD137结合, 但不同时与CD3和CD137结合时, 通过将待测抗原结合分子和标记的CD3的混合物添加到固定有链霉亲和素的板上, 然后进行光显影, 在不存在未标记的CD137的情况下检测到碘基标签的发光信号。相反, 在未标记的CD137存在下发光信号降低。发光信号的这种降低可以被量化以确定相对结合活性。可以通过使用标记的CD137和未标记的CD3类似地进行该分析。

[0730] 在ALPHA Screen的情况下, 待测抗原结合分子在不存在竞争CD137的情况下与CD3相互作用, 从而产生520至620nm的信号。未标记的CD137与CD3竞争与待测抗原结合分子的相互作用。可以定量由于竞争而导致的荧光减少, 从而确定相对结合活性。使用碘基-NHS-生物素等的多肽生物素化是本领域已知的。使用碘基-NHS-生物素等的多肽生物素化是本领域已知的。可以通过适当采用的方法用GST标记CD3, 该方法包括例如将编码CD3的多核苷酸与编码GST的多核苷酸在框内融合; 使得到的融合基因通过具有能够表达其的载体的细胞等表达, 然后使用谷胱甘肽柱进行纯化。优选地, 使用例如基于非线性回归分析的适于单位点竞争 (one-site competition) 模型的软件GRAPH PAD PRISM (GraphPad Software, Inc., San Diego) 来分析所获得的信号。可以使用标记的CD137和未标记的CD3类似地进行该分析。

[0731] 或者, 可以采用使用荧光共振能量转移 (FRET) 的方法。FRET是一种激发能量通过电子共振直接在彼此相邻的两个荧光分子之间转移的现象。当发生FRET时, 供体 (具有激发态的荧光分子) 的激发能被转移到受体 (位于供体附近的另一个荧光分子), 从而从供体发出的荧光消失 (准确地说, 荧光的寿命缩短), 反之从受体发出荧光。通过使用这种现象, 可以分析是否同时结合CD3和CD137。例如, 当带有荧光供体的CD3和带有荧光受体的CD137同时与待测抗原结合分子结合时, 供体的荧光消失, 而从受体发出荧光。因此, 观察到荧光波长的变化。确认这样的抗体同时结合CD3和CD137。另一方面, 如果CD3、CD137和待测抗原结合分子的混合不改变与CD3结合的荧光供体的荧光波长, 则该待测抗原结合分子可被认为

是能够结合CD3和CD137但不同时结合CD3和CD137的抗原结合结构域。

[0732] 例如,使待测的生物素标记的抗原结合分子与供体珠子上的链霉亲和素结合,而使标记有谷胱甘肽S转移酶(GST)的CD3与受体珠子结合。在不存在竞争性第二抗原的情况下,待测抗原结合分子与CD3相互作用,以产生520至620nm的信号。未标记的第二抗原与CD3竞争与待测抗原结合分子的相互作用。可以定量由于竞争而导致的荧光减少,从而确定相对结合活性。使用碘基-NHS-生物素等的多肽生物素化是本领域已知的。使用碘基-NHS-生物素等的多肽生物素化是本领域已知的。可以通过适当采用的方法用GST标记CD3,该方法包括例如将编码CD3的多核苷酸与编码GST的多核苷酸在框内融合;使得到的融合基因通过具有能够表达其的载体的细胞等表达,然后使用谷胱甘肽柱进行纯化。优选地,使用例如基于非线性回归分析的适于单位点竞争(one-site competition)模型的软件GRAPHPAD PRISM(GraphPad Software, Inc., San Diego)来分析所获得的信号。

[0733] 标签不限于GST标签,并且可以利用任何标签来进行,例如但不限于,组氨酸标签、MBP、CBP、Flag标签、HA标签、V5标签或c-myc标签。待测抗原结合分子与供体珠子的结合不限于使用生物素-链霉亲和素反应的结合。特别地,当待测抗原结合分子包含Fc时,可能的方法涉及使待测抗原结合分子通过Fc识别蛋白例如蛋白A或蛋白G结合到供体珠子上。

[0734] 同样,当CD3和CD137如可溶性蛋白那样不在细胞膜上表达、或者二者均存在于同一细胞上时,可变区能够同时结合CD3和CD137,但不同时结合各自在不同细胞上表达的CD3和CD137,这种情况也可以通过本领域已知的方法进行测定。

[0735] 具体而言,在检测与CD3和CD137同时结合的ECL-ELISA中,已确认为阳性的待测抗原结合分子,还与表达CD3的细胞和表达CD137的细胞混合。除非抗原结合分子和这些细胞彼此同时结合,否则可以显示待测抗原结合分子不能同时结合在不同细胞上表达的CD3和CD137。该测定可以通过例如基于细胞的ECL-ELISA进行。将表达CD3的细胞预先固定在板上。在将待测抗原结合分子结合到板上之后,将表达CD137的细胞添加到板上。使用针对该抗原的碘基标签标记的抗体检测到仅在表达CD137的细胞上表达的不同抗原。当抗原结合分子同时与分别在两个细胞上表达的两个抗原结合时,观察到信号。当抗原结合分子不同时与这些抗原结合时,没有观察到信号。

[0736] 或者,该测定可以通过ALPHA Screen方法进行。将待测抗原结合分子与结合于供体珠子的表达CD3的细胞和结合于受体珠子的表达CD137的细胞混合。当抗原结合分子同时与分别在两个细胞上表达的两个抗原结合时,观察到信号。当抗原结合分子不同时与这些抗原结合时,没有观察到信号。

[0737] 或者,该测定也可以通过Octet相互作用分析方法进行。首先,使用肽标签标记的表达CD3的细胞与识别该肽标签的生物传感器结合。将表达CD137的细胞和待测抗原结合分子置于孔中,并分析其相互作用。当抗原结合分子同时结合分别在两个细胞上表达的两个抗原时,观察到由待测抗原结合分子和表达CD137的细胞与生物传感器的结合而引起的较大波长偏移。当抗原结合分子不同时与这些抗原结合时,观察到仅由待测抗原结合分子与生物传感器的结合而引起的较小波长偏移。

[0738] 代替这些基于结合活性的方法,可以进行基于生物学活性的测定。例如,将表达CD3的细胞和表达CD137的细胞与待测抗原结合分子混合,并进行培养。当抗原结合分子同时与这两个抗原结合时,分别在两个细胞上表达的两个抗原通过待测抗原结合分子相互活

化。因此,可以检测到活化信号的改变,例如抗原的相应下游磷酸化水平的增加。或者,由于活化而诱导了细胞因子的产生。因此,可以测量产生的细胞因子的量,从而确认是否同时与两个细胞结合。或者,由于活化而诱导了针对表达CD137的细胞的细胞毒性。或者,报告基因的表达由启动子诱导,该启动子由于活化而在CD137或CD3的信号转导途径的下游被活化。因此,可以测量产生的细胞毒性或报告蛋白的量,从而确认是否同时与两个细胞结合。

**[0739] 至少一个二硫键**

**[0740]** 在本发明的一个方面,第一抗原结合部分和第二抗原结合部分各自包含至少一个半胱氨酸残基(通过突变、取代或插入),优选在CH1区中,并且所述至少一个半胱氨酸残基能够在所述第一抗原结合部分和所述第二抗原结合部分之间形成至少一个二硫键。在某些实施方案中,半胱氨酸残基存在于抗体重链恒定区的CH1区内,例如,它存在于CH1区中选自根据EU编号的位置119、122、123、131、132、133、134、135、136、137、139、140、148、150、155、156、157、159、160、161、162、163、165、167、174、176、177、178、190、191、192、194、195、197、213和214组成的组中的位置处。在一个实施方案中,第一抗原结合部分和第二抗原结合部分各自在CH1区中根据EU编号的位置191处包含一个半胱氨酸残基(通过突变、取代或插入),其能够在所述第一抗原结合部分的CH1区和所述第二抗原结合部分的CH1区之间形成一个二硫键。

**[0741]** 在上述方面的实施方案中,如上所述形成的连接第一抗原结合部分和第二抗原结合部分的“至少一个键”可以保持两个抗原结合部分(即,如上所述的第一抗原结合部分和第二抗原结合部分)在空间上接近的位置。借助于第一抗原结合部分和第二抗原结合部分之间通过一个或多个二硫键的连接,本发明的抗原结合分子能够将两个抗原结合部分保持在比对照抗原结合分子更近的位置,对照抗原结合分子与本发明的抗原结合分子的不同之处仅在于对照抗原结合分子不具有在两个抗原结合部分之间引入的另外的一个或多个键。在一些实施方案中,术语“空间上接近的位置”或“更接近的位置”包括这样的含义,即如上所述的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域保持在缩短的距离和/或降低的柔韧性。

**[0742]** 结果,本发明的抗原结合分子的两个抗原结合部分(即,如上所述的第一抗原结合部分和第二抗原结合部分)与在相同单个细胞上表达的抗原结合。换句话说,本发明的抗原结合分子的各自的两个抗原结合部分(即,如上所述的第一抗原结合部分和第二抗原结合部分)不与在不同细胞上表达从而导致不同细胞交联的抗原结合。在本申请中,本发明的抗原结合分子的这种抗原结合方式可以称为“顺式结合”,而抗原结合分子的两个抗原结合部分各自与在不同细胞上表达的抗原结合从而引起不同细胞交联的抗原结合分子的抗原结合方式可以被称为“反式结合”。在一些实施方案中,本发明的抗原结合分子主要以“顺式-结合”方式与在相同单个细胞上表达的抗原结合。

**[0743]** 在上述方面的实施方案中,借助于如上所述的第一抗原结合部分和第二抗原结合部分之间通过一个或多个二硫键的二硫化物连接(disulfide linkage),本发明的抗原结合分子能够减少和/或防止免疫细胞(例如T细胞,NK细胞,DC细胞等)的不期望的交联和活化。也就是说,在本发明的一些实施方案中,本发明的抗原结合分子的第一抗原结合部分与在免疫细胞例如T细胞上表达的任何信号传导分子(例如,第一抗原)结合,本发明的抗原结合分子的第二抗原结合结构域还与在免疫细胞例如T细胞上表达的任何信号传导分子(例

如,第一抗原或不同于第一抗原的第二抗原)结合。因此,本发明的抗原结合分子的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域可以与在相同单个免疫细胞例如T细胞(即,顺式结合方式)或在不同的免疫细胞(例如T细胞)上(即反式结合方式)表达的第一或第二信号传导分子中的任意一个结合。当第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域以反式结合方式与在不同的免疫细胞例如T细胞上表达的信号传导分子结合时,那些不同的免疫细胞例如T细胞被交联,并且在某些情况下,诸如T细胞的免疫细胞的这种交联可能导致诸如T细胞的免疫细胞的不希望的活化。

[0744] 另一方面,在本发明的抗原结合分子的另一个实施方案的情况下,即,包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分的抗原结合分子,所述第一抗原结合部分和第二抗原结合部分通过CH1区(根据EU编号的位置191处)中的至少一个二硫键彼此连接,第一抗原结合部分和第二抗原结合部分都可以与在相同单个免疫细胞如T细胞上表达的信号传导分子以“顺式-结合”的方式结合,从而可以减少不同的免疫细胞例如T细胞通过抗原结合分子的交联,以避免免疫细胞的不希望的活化。

[0745] 在本申请中,上述特征,在CH1区(例如,根据EU编号的位置191处)中连接第一抗原结合部分和第二抗原结合部分的至少一个二硫键可以用缩写术语“LINC”来描述。使用该缩写,在一些实施方案中,具有所述至少一个二硫键的本发明的上述抗原结合分子可以表示为例如“LINC格式”、“双/LINC”或“DLL3-双/LINC”等。同样地,其第一抗原结合部分和第二抗原结合部分未通过CH1区(例如根据EU编号的位置191处)中的至少一个二硫键彼此连接/尚未连接的抗原结合分子可以用缩写术语“UnLINC”来描述。

#### [0746] Fab分子

[0747] “Fab分子”是指由免疫球蛋白的重链(“Fab重链”)的VH和CH1结构域以及轻链(“Fab轻链”)的VL和CL结构域组成的蛋白质。

#### [0748] 融合的

[0749] “融合的”是指组分(例如Fab分子和Fc结构域亚基)通过肽键直接或通过一个或多个肽接头连接。

#### [0750] “交叉”Fab

[0751] “交叉”Fab分子(也称为“交叉fab”)是指Fab分子,其中Fab重链和轻链的可变区或恒定区被交换,即交叉Fab分子包含由轻链可变区和重链恒定区组成的肽链,以及由重链可变区和轻链恒定区组成的肽链。为清楚起见,在其中Fab轻链和Fab重链的可变区被交换的交叉Fab分子中,包含重链恒定区的肽链在本文中称为交叉Fab分子的“重链”。相反,在其中Fab轻链和Fab重链的恒定区被交换的交叉Fab分子中,包含重链可变区的肽链在本文中被称为交叉Fab分子的“重链”。

#### [0752] “常规”Fab

[0753] 与此相反,“常规”Fab分子是指天然形式的Fab分子,即包含由重链可变区和恒定区(VH-CH1)组成的重链和由轻链可变区和恒定区(VL-CL)组成的轻链。术语“免疫球蛋白分子”是指具有天然存在的抗体结构的蛋白质。例如,IgG类的免疫球蛋白是约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,由二硫键键合的两条轻链和两条重链组成。从N末端到C末端,每条重链都有可变区(VH),也称为可变重结构域或重链可变结构域,其后是三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3),也称为重链恒定区。类似地,从N末端到C末端,每条轻链都有可变区(VL),也称

为可变轻结构域或轻链可变结构域,其后是恒定轻链(CL)结构域,也称为轻链恒定区。免疫球蛋白的重链可分配到五种类型之一,称为 $\alpha$  (IgA)、 $\delta$  (IgD)、 $\epsilon$  (IgE)、 $\gamma$  (IgG)或 $\mu$  (IgM),其中一些可进一步分为亚型,例如 $\gamma$  1 (IgG1)、 $\gamma$  2 (IgG2)、 $\gamma$  3 (IgG3)、 $\gamma$  4 (IgG4)、 $\alpha$ 1 (IgA1)和 $\alpha$ 2 (IgA2)。基于其恒定结构域的氨基酸序列,免疫球蛋白的轻链可以被分配到称为 $\kappa$ 和 $\lambda$ 的两种类型中的一种。免疫球蛋白基本上由通过免疫球蛋白铰链区连接的两个Fab分子和Fc结构域组成。

#### [0754] 亲和力

[0755] “亲和力”是指分子(例如,抗原结合分子或抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如,抗原)之间的非共价相互作用总和的强度。除非另有说明,如本文所用,“结合亲和力”是指反映结合对的成员(例如,抗原结合分子和抗原,或抗体和抗原)之间的1:1相互作用的内在结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可以用解离常数(KD)表示,它是解离速率常数和缔合速率常数(分别为 $k_{off}$ 和 $k_{on}$ )的比值。因此,等效亲和力可以包括不同的速率常数,只要速率常数的比率保持相同。亲和力可以通过本领域已知的公认方法测量,包括本文所述的那些。测量亲和力的一种特定方法是表面等离子共振(SPR)。

#### [0756] 确定亲和力的方法

[0757] 在某些实施方案中,本文提供的抗原结合分子或抗体对于其抗原的解离常数(KD)为1 $\mu$ M或更低、120nM或更低、100nM或更低、80nM或更低、70nM或更低、50nM或更低、40nM或更低、30nM或更低、20nM或更低、10nM或更低、2nM或更低、1nM或更低、0.1nM或更低、0.01nM或更低、或0.001nM或更低(例如,10<sup>-8</sup>M或更低、10<sup>-8</sup>M至10<sup>-13</sup>M、10<sup>-9</sup>M至10<sup>-13</sup>M)。在某些实施方案中,抗体/抗原结合分子对CD3、CD137或DLL3的KD值在1-40、1-50、1-70、1-80、30-50、30-70、30-80、40-70、40-80或60-80nM的范围内。

[0758] 在一个实施方案中,KD通过放射性标记的抗原结合测定法(RIA)测量。在一个实施方案中,使用目的抗体的Fab版本及其抗原进行RIA。例如,Fab对抗原的溶液结合亲和力是通过在存在一系列滴定未标记抗原的情况下用最小浓度的(<sup>125</sup>I)标记的抗原平衡Fab,然后用抗Fab抗体包被的板捕获结合的抗原来测量的(参见,例如,Chen等人., J. Mol. Biol. 293: 865-881 (1999))。为了建立测定条件,将MICROTITER(注册商标)多孔板(Thermo Scientific)在50mM碳酸钠(pH 9.6)中用5微克/毫升捕获抗Fab抗体(Cappel Labs)包被过夜,随后在室温(约23摄氏度)下用PBS中的2% (w/v)牛血清白蛋白封闭2-5小时。在非吸附板(Nunc#269620)中,将100pM或26pM [<sup>125</sup>I]-抗原与目的Fab的系列稀释液混合(例如,与在Presta等人., Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997)中,抗VEGF抗体Fab-12的评估一致)。然后将目标Fab孵育过夜;然而,孵育可能会持续更长的时间(例如,约65小时)以确保达到平衡。此后,将混合物转移至捕获板以在室温下孵育(例如,一小时)。然后除去溶液并用PBS中的0.1%聚山梨醇酯20(TWEEN-20(注册商标))洗涤板八次。当板干燥后,加入150微升/孔闪烁剂(MICROSCINT-20<sup>TM</sup>; Packard),并在TOPCOUNT<sup>TM</sup>伽马计数器(Packard)上对板计数10分钟。选择产生小于或等于最大结合的20%的每个Fab的浓度用于竞争性结合测定。

[0759] 根据另一个实施方案,使用BIAcore(注册商标)表面等离子体共振测定法测量Kd。例如,使用BIAcore(注册商标)-2000或BIAcore(注册商标)-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)在25℃下用固定化抗原CM5芯片以约10个响应单位(RU)进行测定。在一个实施方案中,羧甲基化葡聚糖生物传感器芯片(CM5, BIAcore, Inc.)根据供应商的说明用N-

乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化。抗原用10mM乙酸钠,pH 4.8稀释至5微克/毫升( $\sim 0.2\mu\text{M}$ ),然后以5微升/分钟的流速注射,以实现约10个响应单位(RU)的偶联蛋白。注射抗原后,注射1M乙醇胺以阻断未反应的基团。对于动力学测量,将Fab的两倍系列稀释液(0.78nM至500nM)在含0.05%聚山梨醇酯20(TWEEN-20<sup>TM</sup>)表面活性剂(PBST)的PBS中在25℃下以约25微升/分钟的流速注射。通过同时拟合缔合和解离传感图,使用简单的一对一朗格缪尔结合模型(BIACORE(注册商标)评估软件版本3.2)计算缔合速率( $k_{\text{on}}$ )和解离速率( $k_{\text{off}}$ )。平衡离解常数(Kd)计算为比值 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 。参见,例如,Chen等人.,J.Mol.Biol.293:865-881(1999)。如果上述表面等离子共振测定的缔合速率超过 $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,则可以通过使用在25℃下在PBS,pH 7.2中20nM抗-抗原抗体(Fab形式),在存在增加的抗原浓度的情况下,如在光谱仪中测量的,例如配备有停止流的分光光度计(Aviv Instruments)或带有搅拌比色皿的8000系列SLM-AMINCO<sup>TM</sup>分光光度计(ThermoSpectronic)中,测量荧光发射强度(激发=295nm;发射=340nm,16nm带通)中的增加或减少的荧光猝灭技术来确定缔合速率。

[0760] 根据上述测定抗原结合分子或抗体的亲和力的方法,本领域技术人员可以对其他抗原结合分子或抗体对各种抗原的亲和力进行测定。

#### [0761] 抗体

[0762] 术语“抗体”在本文中以最广泛的含义使用并且包括各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)和抗体片段,只要它们表现出期望的抗原-结合活性。

#### [0763] 抗体片段

[0764] “抗体片段”是指除完整抗体之外的分子,其包含完整抗体的一部分,与完整抗体结合的抗原结合。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、双抗体、线性抗体、单链抗体分子(例如scFv)和单域抗体。对于某些抗体片段的综述,参见Hudson等人.,Nat Med 9,129-134(2003)。对于scFv片段的综述,请参见例如Pluckthun,在The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,vol.113,Rosenburg and Moore eds.,Springer-Verlag,New York,pp.269-315(1994)中;另参见W0 93/16185;以及美国专利号5,571,894和5,587,458。关于包含补救受体结合表位残基并具有增加的体内半衰期的Fab和F(ab')<sub>2</sub>片段的讨论,参见美国专利号5,869,046。双链抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段,可以是二价或双特异性的。参见,例如,EP 404,097;W0 1993/01161;Hudson等人.,Nat Med 9,129-134(2003);和Hollinger等人.,Proc Natl Acad Sci USA 90,6444-6448(1993)。Hudson等人.,Nat Med 9,129-134(2003)中也描述了三链抗体和四链抗体。单域抗体是包含抗体的全部或部分重链可变结构域或全部或部分轻链可变结构域的抗体片段。在某些实施方案中,单域抗体是人单域抗体(Domantis,Inc.,Waltham,MA;参见,例如,美国专利号6,248,516B1)。如本文所述,抗体片段可通过各种技术制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及由重组宿主细胞(例如大肠杆菌或噬菌体)产生。

#### [0765] 抗体类别

[0766] 抗体的“类别”是指其重链所具有的恒定结构域或恒定区的类型。抗体主要分为五类:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其中一些可以进一步分为亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、

$\gamma$  和  $\mu$ 。

[0767] 除非另有说明,否则本文中轻链恒定区的氨基酸残基按照Kabat等人编号,重链恒定区的氨基酸残基编号按照EU编号系统,也称为EU索引编号,如Kabat等人., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991中所述。

#### [0768] 框架

[0769] “框架”或“FR”是指高变区 (HVR) 残基以外的可变结构域残基。可变结构域的FR通常由四个FR结构域组成: FR1、FR2、FR3和FR4。相应地, HVR和FR序列在VH (或VL) 中一般按以下顺序出现: FR1-H1 (L1) -FR2-H2 (L2) -FR3-H3 (L3) -FR4。

#### [0770] 人共有框架

[0771] “人共有框架”是代表人免疫球蛋白VL或VH框架序列选择中最常见的氨基酸残基的框架。通常,人免疫球蛋白VL或VH序列的选择来自可变结构域序列的亚组。通常,序列亚组是Kabat等人., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), 卷1-3中的亚组。在一个实施方案中,对于VL,该亚组是上述Kabat等人的亚组 $\kappa$ I。在一个实施方案中,对于VH,亚组是上述Kabat等人的亚组III。

#### [0772] 嵌合抗体

[0773] 术语“嵌合”抗体是指其中重链和/或轻链的一部分源自特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分源自不同来源或物种的抗体。类似地,术语“嵌合抗体可变结构域”是指这样的抗体可变区,其中重链和/或轻链可变区的一部分源自特定来源或物种,而重链和/或轻链可变区的其余部分源自不同的来源或物种。

#### [0774] 人源化抗体

[0775] “人源化”抗体是指包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中,人源化抗体将包括基本上所有的、至少一个且通常为两个可变结构域,其中所有或基本上所有的HVR (例如CDR) 对应于非人抗体的那些HVR,并且所有或基本上所有的FR对应于人抗体的那些FR。人源化抗体任选地包括源自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。抗体例如,非人抗体的“人源化形式”是指已经过人源化的抗体。“人源化抗体可变区”是指人源化抗体的可变区。

#### [0776] 人抗体

[0777] “人抗体”指具有这样的氨基酸序列的抗体,所述氨基酸序列对应于由人或人细胞生成或来源于利用人抗体库或其它人抗体编码序列的非人来源的抗体的氨基酸序列。人抗体的这一定义明确排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。“人抗体可变区”是指人抗体的可变区。

#### [0778] 多核苷酸 (核酸)

[0779] 如本文可互换使用的“多核苷酸”或“核酸”是指任何长度的核苷酸的聚合物,并且包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基和/或它们的类似物,或可以通过DNA或RNA聚合酶或通过合成反应掺入聚合物的任何底物。多核苷酸可包含修饰的核苷酸,例如甲基化的核苷酸及其类似物。核苷酸序列可能被非核苷酸成分中断。多核苷酸可包含合成后进行的修饰,例如与标记缀合。其他类型的修饰包括例如



“帽”、用类似物取代一个或多个天然存在的核苷酸、核苷酸间修饰例如具有不带电荷的键(例如,甲基磷酸酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯等)和带电荷的键(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)的那些,含有悬垂部分的那些,例如蛋白质(例如核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚-L-赖氨酸等),带有嵌入剂(例如,吡啶,补骨脂素等)的那些,含有螯合剂(例如,金属,放射性金属,硼,氧化金属等)的那些,含有烷基化剂的那些,带有修饰的键的那些(例如, $\alpha$ -异头核酸等),以及未修饰形式的多核苷酸。此外,糖中通常存在的任何羟基可以被例如磷酸酯基团、磷酸酯基团替代,被标准保护基团保护,或被激活以制备额外核苷酸的额外键,或可以缀合到固体或半固体支撑物。5'和3'末端OH可以被磷酸化或被胺或1至20个碳原子的有机帽化基团部分取代。其他羟基也可以衍生为标准保护基团。多核苷酸还可以包含本领域公知的核糖或脱氧核糖的类似形式,包括例如2'-O-甲基-、2'-O-烯丙基-、2'-氟-或2'-叠氮基-核糖、碳环糖类似物、 $\alpha$ -异头糖、差向异构糖如阿拉伯糖、木糖或来苏糖、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖、无环类似物和碱性核苷类似物如甲基核苷。一个或多个磷酸二酯键可以被备选的连接基团替代。这些备选的连接基团包括但不限于其中磷酸酯被P(O)S(“硫代酸酯”)、P(S)S(“二硫代酸酯”)、(O)NR<sub>2</sub>(“酰胺酸酯”)、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH<sub>2</sub>(“甲缩醛(formacetal)”)替代的实施方案,其中每个R或R'独立地为H或取代或未取代的烷基(1-20C),任选地包含醚(-O-)键、芳基、烯基、环烷基、环烯基或芳烷基(araldyl)。并非多核苷酸中的所有键都需要相同。前述描述适用于本文提及的所有多核苷酸,包括RNA和DNA。

#### [0780] 分离的(核酸)

[0781] “分离的”核酸分子是已经从其自然环境的组分中分离出来的核酸分子。分离的核酸分子还包括在下述细胞中含有的核酸分子,所述细胞通常含有该核酸分子,但该核酸分子存在于染色体外或存在于不同于其天然染色体位置的染色体位置处。

#### [0782] 载体

[0783] 如本文所用,术语“载体”是指能够使与其连接的另一个核酸增殖的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体,以及掺入到已引入该载体的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与它们可操作地连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。可以使用病毒或电穿孔将载体引入宿主细胞。然而,载体的引入不限于体外方法。例如,也可以直接使用体内方法将载体引入受试者。

[0784] 在本发明的另一个方面,包含编码本公开的能够结合CD3和CD137但不能同时结合的抗原结合部分,能够结合DLL3的抗原结合部分,抗原结合分子或抗体的核酸分子的载体可以被引入受试者,以在受试者体内直接表达本公开的抗原结合部分、抗原结合分子或抗体。可以使用的载体的实例是腺病毒,但不限于腺病毒。也可以将编码本公开的抗原结合部分、抗原结合分子或抗体的核酸分子直接施用至受试者,或将编码本公开的抗原结合部分、抗原结合分子或抗体的核酸分子通过电穿孔转移到受试者中,或将包含编码待表达和分泌到受试者中的本公开的抗原结合部分、抗原结合分子或抗体的核酸分子的细胞施用到受试者中,以在受试者中持续表达和分泌本公开的抗原结合部分、抗原结合分子或抗体。

#### [0785] 宿主细胞

[0786] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,是指其中已引入外源核酸的细胞,包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”,其包括原代转化的细胞和由其衍生的后代,而不考虑传代次数。后代在核酸含量上可能与亲本细

胞不完全相同,但可能包含突变。本文中包括具有与在最初转化的细胞中筛选或选择的相同功能或生物学活性的突变体后代。

#### [0787] 特异性

[0788] “特异性”是指特异性结合一个或多个结合配偶体,不显示与配偶体以外的分子的任何显著结合的分子。此外,当抗原结合位点对抗原中包含的多个表位中的特定表位具有特异性时,也使用“特异性”。如果抗原结合分子与抗原特异性结合,则它也被描述为“抗原结合分子具有/显示出对/针对抗原的特异性”。当由抗原结合位点结合的表位包含在多个不同的抗原中时,包含该抗原结合位点的抗原结合分子可以与具有该表位的各种抗原结合。

#### [0789] 抗体片段

[0790] “抗体片段”是指除完整抗体之外的分子,其包含完整抗体的一部分,与完整抗体结合的抗原结合。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>;双链抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如scFv);以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0791] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用,是指具有与天然抗体结构基本相似的结构或具有包含本文定义的Fc区的重链的抗体。

#### [0792] 可变片段(Fv)

[0793] 在本文中,术语“可变片段(Fv)”是指由抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH)对组成的来自抗体的抗原结合位点的最小单位。1988年,Skerra和Pluckthun发现可以通过在细菌信号序列的下游插入抗体基因并在大肠杆菌中诱导该基因的表达来从大肠杆菌周质级分制备均一且具有活性的抗体(Science(1988)240(4855),1038-1041)。在由周质级分制备的Fv中,VH以与抗原结合的方式与VL缔合。

#### [0794] scFv、单链抗体和sc(Fv)<sub>2</sub>

[0795] 本文中,术语“scFv”、“单链抗体”和“sc(Fv)<sub>2</sub>”均指包含衍生自重链和轻链的可变区而非恒定区的单个多肽链的抗体片段。一般而言,单链抗体还在VH和VL结构域之间包含多肽接头,这使得能够形成被认为允许抗原结合的所需结构。Pluckthun在“The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg and Moore,编辑,Springer-Verlag,New York,269-315(1994)”中详细讨论了单链抗体。还参见国际专利公开W0 1988/001649;美国专利号4,946,778和5,260,203。在特定的实施方案中,单链抗体可以是双特异性的和/或人源化的。

[0796] scFv是单链低分子量抗体,其中形成Fv的VH和VL通过肽接头连接在一起(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.(1988)85(16),5879-5883)。VH和VL可以通过肽接头保留在非常接近的位置。

[0797] sc(Fv)<sub>2</sub>是单链抗体,其中两个VL和两个VH的四个可变区通过接头如肽接头连接以形成单链(J Immunol.Methods(1999)231(1-2),177-189)。两个VH和两个VL可以源自不同的单克隆抗体。此类sc(Fv)<sub>2</sub>优选包括例如识别单个抗原中存在的两个表位的双特异性sc(Fv)<sub>2</sub>,如Journal of Immunology(1994)152(11),5368-5374中所公开的。例如,sc(Fv)<sub>2</sub>可以通过经例如肽接头的接头连接scFv来制备。

[0798] 在本文中,sc(Fv)<sub>2</sub>包括两个VH单元和两个VL单元,其从单链多肽的N末端开始,以VH、VL、VH和VL([VH]-接头-[VL]-接头-[VH]-接头-[VL])的顺序排列。两个VH单元和两个VL

单元的顺序不限于上述形式,并且它们可以以任何顺序布置。形式的示例如下所示。

[0799] [VL]-接头-[VH]-接头-[VH]-接头-[VL],

[0800] [VH]-接头-[VL]-接头-[VL]-接头-[VH],

[0801] [VH]-接头-[VH]-接头-[VL]-接头-[VL],

[0802] [VL]-接头-[VL]-接头-[VH]-接头-[VH],

[0803] [VL]-接头-[VH]-接头-[VL]-接头-[VH]。

[0804]  $sc(Fv)_2$ 的分子形式也在W02006/132352中详细描述。根据这些描述,本领域技术人员可以适当地制备所需的 $sc(Fv)_2$ 以产生本文公开的多肽复合物。

[0805] 此外,本公开的抗原结合分子或抗体可以与载体聚合物例如PEG或有机化合物例如抗癌剂缀合。或者,优选将糖链添加序列插入到抗原结合分子或抗体中,使得糖链产生期望的效果。

[0806] 用于连接抗体可变区的接头包括可通过基因工程引入的任意肽接头、合成接头和例如Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996中公开的接头。然而,肽接头在本公开中是优选的。肽接头的长度没有特别限制,并且可以根据目的由本领域技术人员适当地选择。长度优选为5个氨基酸或更多(没有特别限制,上限通常为30个氨基酸或更少,优选20个氨基酸或更少),特别优选15个氨基酸。当 $sc(Fv)_2$ 包含三个肽接头时,它们的长度可以相同或不同。

[0807] 例如,所述肽接头包括:

[0808] Ser,

[0809] Gly-Ser,

[0810] Gly-Gly-Ser,

[0811] Ser-Gly-Gly,

[0812] Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:91),

[0813] Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:92),

[0814] Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:93),

[0815] Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:94),

[0816] Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:95),

[0817] Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:96),

[0818] Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:97),

[0819] Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:98),

[0820] (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:93))<sub>n</sub>, 和

[0821] (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:94))<sub>n</sub>,

[0822] 其中n是1或更大的整数。本领域技术人员可以根据目的相应地选择肽接头的长度或序列。

[0823] 合成接头(化学交联剂)通常用于交联肽,示例包括:

[0824] N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),

[0825] 辛二酸二琥珀酰亚胺酯(DSS),

[0826] 双(磺基琥珀酰亚胺)辛二酸酯(BS3),

[0827] 二硫代双(琥珀酰亚胺丙酸酯)(DSP),

[0828] 二硫代双(磺基琥珀酰亚胺丙酸酯) (DTSP),  
[0829] 乙二醇双(琥珀酰亚胺基琥珀酸酯) (EGS),  
[0830] 乙二醇双(磺基琥珀酰亚胺基琥珀酸酯) (磺基-EGS),  
[0831] 酒石酸二琥珀酰亚胺酯 (DST)、酒石酸二磺基琥珀酰亚胺酯 (磺基-DST),  
[0832] 双[2-(琥珀酰亚胺氧基羰基氧基) 乙基] 砒 (BSOCOES), 和  
[0833] 双[2-(磺基琥珀酰亚胺氧基羰基氧基) 乙基] 砒 (磺基-BSOCOES)。这些交联剂是可商购的。

[0834] 通常, 需要三个接头将四个抗体可变区连接在一起。要使用的接头可以是相同类型或不同类型的。

[0835] Fab、F(ab')<sub>2</sub>和Fab'

[0836] “Fab”由单条轻链和来自单条重链的CH1结构域和可变区组成。Fab分子的重链不能与另一个重链分子形成二硫键。

[0837] “F(ab')<sub>2</sub>”或“Fab”是通过用诸如胃蛋白酶和木瓜蛋白酶的蛋白酶处理免疫球蛋白(单克隆抗体)而产生的, 并且是指通过在存在于两条H链各自的铰链区之间的二硫键附近消化免疫球蛋白(单克隆抗体)而产生的抗体片段。例如, 木瓜蛋白酶剪切在两条H链各自的铰链区之间存在的二硫键上游的IgG, 以产生两个同源抗体片段, 其中包含VL(L链可变区)和CL(L链恒定区)的L链通过在其C末端区域的二硫键与包含VH(H链可变区)和CH<sub>γ</sub>1(H链恒定区的<sub>γ</sub>1区)的H链片段连接。这两个同源抗体片段各自都称为Fab'。

[0838] “F(ab')<sub>2</sub>”由两条轻链和两条重链组成, 所述两条轻链和两条重链包含CH1结构域的恒定区和CH2结构域的一部分, 从而在两条重链之间形成二硫键。在本文公开的F(ab')<sub>2</sub>可以优选如下制备。用诸如胃蛋白酶的蛋白酶部分消化完整单克隆抗体或包含所需抗原结合位点的单克隆抗体; Fc片段通过吸附到蛋白A柱上而去除。蛋白酶没有特别限制, 只要其可以在合适的设定酶反应条件例如pH下以选择性方式切割整个抗体以产生F(ab')<sub>2</sub>即可。这样的蛋白酶包括例如胃蛋白酶和无花果蛋白酶。

[0839] 单域抗体

[0840] 在本说明书中, 术语“单域抗体”不受其结构的限制, 只要该结构域本身可以发挥抗原结合活性即可。已知一般抗体, 例如IgG抗体, 在可变区由VH和VL配对形成的状态下表现出抗原结合活性, 而单域抗体自身的结构域结构可以通过自身发挥抗原结合活性而不与另一个结构域配对。通常, 单域抗体的分子量相对较低, 以单体形式存在。

[0841] 单域抗体的实例包括但不限于先天性缺乏轻链的抗原结合分子, 例如骆驼科动物的VHH和鲨鱼VNAR, 以及包含抗体VH结构域的全部或部分或抗体VL结构域的全部或部分的抗体片段。作为包含抗体VH或VL结构域的全部或部分的抗体片段的单域抗体的实例包括但不限于源自人抗体VH或人抗体VL的人工制备的单域抗体, 如在美国专利号6,248,516B1等中所描述的。在本发明的一些实施方案中, 一个单域抗体具有三个CDR(CDR1、CDR2和CDR3)。

[0842] 单域抗体可以从能够产生单域抗体的动物或通过免疫能够产生单域抗体的动物获得。能够产生单域抗体的动物的实例包括但不限于骆驼科动物和携带能够产生单域抗体的基因的转基因动物。骆驼科动物包括骆驼、驼马(lamas)、羊驼、单峰骆驼和大羊驼(guanacos)等。携带能够产生单域抗体的基因的转基因动物的实例包括但不限于: 国际公开号W02015/143414和美国专利公开号US2011/0123527A1中描述的转基因动物。可以将从

动物获得的单域抗体的框架序列转化为人种系序列或与其相似的序列,以获得人源化单域抗体。人源化单域抗体(例如,人源化VHH)也是本发明的单域抗体的一个实施方案。

[0843] 或者,可以通过ELISA、淘选等从包含单域抗体的多肽文库中获得单域抗体。包含单域抗体的多肽文库的实例包括但不限于从各种动物或人类获得的幼稚抗体文库(例如,Methods in Molecular Biology 2012 911(65-78)和Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics 2006 1764:8(1307-1319)),通过免疫各种动物获得的抗体文库(例如,Journal of Applied Microbiology 2014 117:2(528-536)),以及从各种动物或人类的抗体基因制备的合成抗体文库(例如,Journal of Biomolecular Screening 2016 21:1(35-43),Journal of Biological Chemistry 2016 291:24(12641-12657)和AIDS2016 30:11(1691-1701))。

#### [0844] Fc区

[0845] 术语“Fc区”或“Fc结构域”是指包含由抗体分子中的铰链或其部分和CH2和CH3结构域组成的片段的区域。IgG类的Fc区是指但不限于从例如半胱氨酸226(EU编号(在本文中也称为EU索引))到C末端或从脯氨酸230(EU编号)到C末端的区域。Fc区可以优选通过以下方式获得:例如,用蛋白水解酶例如胃蛋白酶部分消化IgG1、IgG2、IgG3或IgG4单克隆抗体,然后重新洗脱吸附在蛋白A柱或蛋白G柱上的级分。这种蛋白水解酶没有特别限制,只要该酶在适当设定的酶反应条件(例如pH)下能够消化全长抗体以限制性地形成Fab或F(ab')<sub>2</sub>即可。其实例可以包括胃蛋白酶和木瓜蛋白酶。

[0846] 源自例如天然存在的IgG的Fc区可以用作本发明的“Fc区”。在本文中,天然存在的IgG是指含有与天然存在的IgG相同的氨基酸序列的多肽,并且属于基本上由免疫球蛋白 $\gamma$ 基因编码的一类抗体。天然存在的人IgG是指例如天然存在的人IgG1,天然存在的人IgG2,天然存在的人IgG3或天然存在的人IgG4。天然存在的IgG还包括由其自发衍生的变体等。NIH出版号91-3242的Sequences of proteins of immunological interest中,将基于基因多态性的多个同种异型序列描述为人IgG1、人IgG2、人IgG3和人IgG4抗体的恒定区,其中任何一个都可以用于本发明中。特别地,人IgG1的序列可以具有作为EU编号位置356至358的氨基酸序列的DEL或EEM。

[0847] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子的Fc结构域由一对多肽链组成,所述多肽链包含免疫球蛋白分子的重链结构域。例如,免疫球蛋白G(IgG)分子的Fc结构域是二聚体,其每个亚基都包含CH2和CH3 IgG重链恒定结构域。Fc结构域的两个亚基能够相互稳定缔合。在一个实施方案中,本文所述的多特异性抗原结合分子包含不超过一个Fc结构域。

[0848] 在本文所述的一个实施方案中,多特异性抗原结合分子的Fc结构域是IgG Fc结构域。在特定实施方案中,Fc结构域是IgG1 Fc结构域。在进一步的特定实施方案中,Fc结构域是人IgG1 Fc区。

[0849] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合分子的Fc结构域由能够稳定缔合的第一和第二Fc区亚基组成,并且与天然人IgG1 Fc结构域相比,Fc结构域对人Fc $\gamma$ 受体的结合亲和力降低。

[0850] 在某些实施方案中,本文所述的多特异性抗原结合分子的Fc结构域包含促进Fc结构域的第一和第二亚基缔合的修饰。在具体的实施方案中,所述修饰是所谓的“杵臼”修饰,包括在Fc结构域的两个亚基之一中的“杵”修饰和在Fc结构域的两个亚基的另一个中的

“臼”修饰,这将在下面更详细地描述。

[0851] 在具体实施方案中,与天然人IgG1 Fc结构域相比,在由能够稳定缔合的第一和第二Fc区亚基组成并表现出与人Fc  $\gamma$  受体结合亲和力降低的Fc结构域中,第一Fc区亚基选自以下组成的组:

[0852] (a1) 包含突变L234A、L235A的Fc区多肽;

[0853] (a2) 包含突变L234A、L235A、N297A的Fc区多肽;

[0854] (a3) 包含突变L234A、L235A、N297A、S354C、T366W的Fc区多肽;和

[0855] 第二Fc区亚基选自以下组成的组:

[0856] (a4) 包含突变L234A、L235A的Fc区多肽;

[0857] (a5) 包含突变L234A、L235A、N297A的Fc区多肽;和

[0858] (a6) 包含突变L234A、L235A、N297A、Y349C、T366S、L368A、Y407V的Fc区多肽(氨基酸位置使用EU索引编号进行编号)。

[0859] 在某些实施方案中,与天然IgG的Fc区相比,本文所述的多特异性抗原结合分子的Fc结构域在酸性pH条件(例如,pH 5.8)下表现出增强的FcRn结合活性。此类Fc结构域包含例如根据EU编号位置434处的Ala;位置438处的Glu、Arg、Ser或Lys;和位置440处的Glu、Asp或Gln。在一些实施方案中,Fc结构域包含根据EU编号位置434处的Ala;位置438处的Arg或Lys;和位置440处的Glu或Asp。在一些实施方案中,Fc结构域还包含根据EU编号位置428处的Ile或Leu;和/或位置436处的Ile、Leu、Val、Thr或Phe。在一些实施方案中,Fc结构域包含选自以下组成的组的氨基酸取代的组合:

[0860] 根据EU编号(a) N434A/Q438R/S440E;

[0861] (b) N434A/Q438R/S440D;

[0862] (c) N434A/Q438K/S440E;

[0863] (d) N434A/Q438K/S440D;

[0864] (e) N434A/Y436T/Q438R/S440E;

[0865] (f) N434A/Y436T/Q438R/S440D;

[0866] (g) N434A/Y436T/Q438K/S440E;

[0867] (h) N434A/Y436T/Q438K/S440D;

[0868] (i) N434A/Y436V/Q438R/S440E;

[0869] (j) N434A/Y436V/Q438R/S440D;

[0870] (k) N434A/Y436V/Q438K/S440E;

[0871] (l) N434A/Y436V/Q438K/S440D;

[0872] (m) N434A/R435H/F436T/Q438R/S440E;

[0873] (n) N434A/R435H/F436T/Q438R/S440D;

[0874] (o) N434A/R435H/F436T/Q438K/S440E;

[0875] (p) N434A/R435H/F436T/Q438K/S440D;

[0876] (q) N434A/R435H/F436V/Q438R/S440E;

[0877] (r) N434A/R435H/F436V/Q438R/S440D;

[0878] (s) N434A/R435H/F436V/Q438K/S440E;

[0879] (t) N434A/R435H/F436V/Q438K/S440D;

- [0880] (u) M428L/N434A/Q438R/S440E;  
[0881] (v) M428L/N434A/Q438R/S440D;  
[0882] (w) M428L/N434A/Q438K/S440E;  
[0883] (x) M428L/N434A/Q438K/S440D;  
[0884] (y) M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E;  
[0885] (z) M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440D;  
[0886] (aa) M428L/N434A/Y436T/Q438K/S440E;  
[0887] (ab) M428L/N434A/Y436T/Q438K/S440D;  
[0888] (ac) M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440E;  
[0889] (ad) M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440D;  
[0890] (ae) M428L/N434A/Y436V/Q438K/S440E;  
[0891] (af) M428L/N434A/Y436V/Q438K/S440D;  
[0892] (ag) L235R/G236R/S239K/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E; 和  
[0893] (ah) L235R/G236R/A327G/A330S/P331S/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E。

[0894] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子的Fc结构域包含氨基酸取代M428L/N434A/Q438R/S440E的组合。在一些实施方案中,Fc结构域是IgG Fc结构域,优选人IgG Fc结构域,更优选人IgG1 Fc结构域。在某些实施方案中,多特异性抗原结合分子的Fc结构域包含以下中的任一种:(a) 包含SEQ ID NO:100所示氨基酸序列的第一Fc亚基和包含SEQ ID NO:111所示氨基酸序列的第二Fc亚基;和(b) 包含SEQ ID NO:99所示氨基酸序列的第一Fc亚基和包含SEQ ID NO:109所示氨基酸序列的第二Fc亚基。

[0895] Fc  $\gamma$  受体结合活性降低的Fc区

[0896] 在本文中,“Fc  $\gamma$  受体结合活性降低”是指,例如,基于上述分析方法,被测抗原结合分子或抗体的竞争活性比对照抗原结合分子或抗体的竞争活性低50%以下,优选为45%以下,40%以下,35%以下,30%以下,20%以下,15%以下,特别优选10%以下,9%以下,8%以下,7%以下,6%以下,5%以下,4%以下,3%以下,2%以下,或1%以下。

[0897] 包含单克隆IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体的Fc结构域的抗原结合分子或抗体可以适当地用作对照抗原结合分子或抗体。Fc结构域结构显示在SEQ ID NO:85(A添加到RefSeq登录号AAC82527.1的N末端)、86(A添加到RefSeq登录号AAB59393.1的N末端)、87(A被添加到RefSeq登录号CAA27268.1的N末端)和88(A被添加到RefSeq登录号AAB59394.1的N末端)中。此外,当将包含特定同种型抗体的Fc结构域突变体的抗原结合分子或抗体用作待测物质时,突变体的突变对Fc  $\gamma$  受体结合活性的影响使用包含相同同种型的Fc结构域的抗原结合分子或抗体作为对照进行评估。如上所述,适当地制备包含其Fc  $\gamma$  受体结合活性已被判断为降低的Fc结构域突变体的抗原结合分子或抗体。

[0898] 此类已知突变体包括,例如,具有氨基酸231A-238S(EU编号)缺失的突变体(WO 2009/011941),以及突变体C226S、C229S、P238S、(C220S)(J.Rheumatol(2007)34,11); C226S和C229S(Hum.Antibod.Hybridomas(1990)1(1),47-54);C226S、C229S、E233P、L234V和L235A(Blood(2007)109,1185-1192)。

[0899] 具体地,优选的抗原结合分子或抗体包括包含具有在选自以下氨基酸位置的至少一个氨基酸突变(例如取代)的Fc结构域的那些:在形成特定同种型抗体的Fc结构域的氨基

酸中,位置220,226,229,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,264,265,266,267,269,270,295,296,297,298,299,300,325,327,328,329,330,331或332(EU编号)。对Fc结构域所起源的抗体的同种型没有特别限制,可以使用来源于单克隆IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体的适当的Fc结构域。优选使用源自IgG1抗体的Fc结构域。

[0900] 优选的抗原结合分子或抗体包括,例如,在形成IgG1抗体Fc结构域的氨基酸中,包含具有以下所示任一取代的Fc结构域的那些,其位置根据EU编号指定(每个编号表示氨基酸残基在EU编号中的位置;并且数字前的单字母的氨基酸符号代表取代前的氨基酸残基,而数字后的单字母的氨基酸符号代表取代后的氨基酸残基):

[0901] (a) L234F、L235E、P331S;

[0902] (b) C226S、C229S、P238S;

[0903] (c) C226S、C229S;或

[0904] (d) C226S、C229S、E233P、L234V、L235A;

[0905] 以及具有在位置231至238处具有氨基酸序列缺失的Fc结构域的那些。

[0906] 此外,优选的抗原结合分子或抗体还包括包含在形成IgG2抗体的Fc结构域的氨基酸中具有如下所示任一取代的Fc结构域的那些,其位置根据EU编号来指定:

[0907] (e) H268Q、V309L、A330S和P331S;

[0908] (f) V234A;

[0909] (g) G237A;

[0910] (h) V234A和G237A;

[0911] (i) A235E和G237A;或

[0912] (j) V234A、A235E和G237A。每个数字代表氨基酸残基在EU编号中的位置;数字前的单字母氨基酸符号表示取代前的氨基酸残基,数字后的单字母氨基酸符号表示取代后的氨基酸残基。

[0913] 此外,优选的抗原结合分子或抗体还包括包含在形成IgG3抗体的Fc结构域的氨基酸中具有如下所示任一取代的Fc结构域的那些,其位置根据EU编号来指定:

[0914] (k) F241A;

[0915] (l) D265A;或

[0916] (m) V264A。每个数字代表氨基酸残基在EU编号中的位置;数字前的单字母氨基酸符号表示取代前的氨基酸残基,数字后的单字母氨基酸符号表示取代后的氨基酸残基。

[0917] 此外,优选的抗原结合分子或抗体还包括包含在形成IgG4抗体的Fc结构域的氨基酸中具有如下所示任一取代的Fc结构域的那些,其位置根据EU编号来指定:

[0918] (n) L235A、G237A和E318A;

[0919] (o) L235E;或

[0920] (p) F234A和L235A。每个数字代表氨基酸残基在EU编号中的位置;数字前的单字母氨基酸符号表示取代前的氨基酸残基,数字后的单字母氨基酸符号表示取代后的氨基酸残基。

[0921] 其他优选的抗原结合分子或抗体包括,例如,包含Fc结构域的那些,其中在形成IgG1抗体的Fc结构域的氨基酸中,位置233、234、235、236、237、327、330或331处(EU编号)的任何氨基酸被相应IgG2或IgG4中EU编号中相应位置处的氨基酸取代。



[0922] 优选的抗原结合分子或抗体还包括,例如,包含Fc结构域的那些,其中在形成IgG1抗体的Fc结构域的氨基酸中,位置234、235和297(EU编号)的任何一个或多个氨基酸被其他氨基酸取代。取代后的氨基酸类型没有特别限制;但是,特别优选含有其中位置234、235、297处的氨基酸中的任意一个或多个氨基酸被置换为丙氨酸的Fc结构域的抗原结合分子或抗体。

[0923] 优选的抗原结合分子或抗体还包括例如包含Fc结构域的那些,其中在形成IgG1抗体的Fc结构域的氨基酸中,位置265处(EU编号)的氨基酸被另一个氨基酸取代。取代后的氨基酸类型没有特别限制;但是,特别优选包含其中位置265处的氨基酸被丙氨酸取代的Fc结构域的抗原结合分子或抗体。

#### [0924] Fc受体

[0925] 术语“Fc受体”或“FcR”是指结合抗体Fc区的受体。在一些实施方案中,FcR是天然人FcR。在一些实施方案中,FcR是结合IgG抗体( $\gamma$ 受体)并且包括Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII和Fc $\gamma$ RIII亚类的受体,包括这些受体的等位基因变体和备选的剪接形式。Fc $\gamma$ RII受体包括Fc $\gamma$ RIIA(“活化受体”)和Fc $\gamma$ RIIB(“抑制受体”),它们具有相似的氨基酸序列,其主要区别在于其细胞质结构域。活化受体Fc $\gamma$ RIIA在其细胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制受体Fc $\gamma$ RIIB在其细胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)。(参见例如Daeron,Annu.Rev.Immunol.15:203-234(1997))。例如,Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-92(1991);Capel等人.,Immunomethods 4:25-34(1994);和de Haas等人.,J.Lab.Clin.Med.126:330-41(1995)中综述了FcR。本文中的术语“FcR”涵盖了其他FcR,包括将来要鉴定的那些。

[0926] 术语“Fc受体”或“FcR”还包括新生儿受体FcRn,其负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer等人.,J.Immunol.117:587(1976)和Kim等人.,J.Immunol.24:249(1994))和免疫球蛋白稳态的调节。测量与FcRn的结合的方法是已知的(参见,例如,Ghetie和Ward.,Immunol.Today18(12):592-598(1997);Ghetie等人.,Nature Biotechnology,15(7):637-640(1997);Hinton等人.,J.Biol.Chem.279(8):6213-6216(2004);WO 2004/92219(Hinton等人.)。

[0927] 可以例如在转基因小鼠或表达人FcRn的转染的人细胞系中,或在施用具有变体Fc区的多肽的灵长类动物中测定与人FcRn的体内结合和人FcRn高亲和力结合多肽的血浆半衰期。WO 2000/42072(Presta)描述了与FcR结合增加或减少的抗体变体。另见,例如,Shields等人J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001)。

#### [0928] Fc $\gamma$ 受体

[0929] Fc $\gamma$ 受体是指能够与单克隆IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体的Fc结构域结合的受体,包括属于基本上由Fc $\gamma$ 受体基因编码的蛋白质家族的所有成员。在人类中,该家族包括Fc $\gamma$ RI(CD64),其包括同工型Fc $\gamma$ RIa、Fc $\gamma$ RIb和Fc $\gamma$ RIc;Fc $\gamma$ RII(CD32),其包括同工型Fc $\gamma$ RIIa(包括同种异型H131和R131)、Fc $\gamma$ RIIb(包括Fc $\gamma$ RIIb-1和Fc $\gamma$ RIIb-2)和Fc $\gamma$ RIIc;和Fc $\gamma$ RIII(CD16),其包括同工型Fc $\gamma$ RIIIa(包括同种异型V158和F158)和Fc $\gamma$ RIIIb(包括同种异型Fc $\gamma$ RIIIb-NA1和Fc $\gamma$ RIIIb-NA2);以及所有未鉴定的人Fc $\gamma$ 受体、Fc $\gamma$ 受体同工型及其同种异型。然而,Fc $\gamma$ 受体不限于这些实例。不限于此,Fc $\gamma$ 受体包括来源于人、小鼠、大鼠、兔和猴的那些。Fc $\gamma$ 受体可以来源于任何生物体。小鼠Fc $\gamma$ 受体包括但

不限于Fc  $\gamma$  RI (CD64)、Fc  $\gamma$  RII (CD32)、Fc  $\gamma$  RIII (CD16)和Fc  $\gamma$  RIII-2 (CD16-2),以及所有未鉴定的小鼠Fc  $\gamma$  受体、Fc  $\gamma$  受体同工型及其同种异体。此类优选的Fc  $\gamma$  受体包括例如人Fc  $\gamma$  RI (CD64)、Fc  $\gamma$  RIIA (CD32)、Fc  $\gamma$  RIIB (CD32)、Fc  $\gamma$  RIIIA (CD16)和/或Fc  $\gamma$  RIIB (CD16)。Fc  $\gamma$  RI的多核苷酸序列和氨基酸序列分别如RefSeq登录号NM\_000566.3和RefSeq登录号NP\_000557.1所示;Fc  $\gamma$  RIIA的多核苷酸序列和氨基酸序列分别如RefSeq登录号BC020823.1和RefSeq登录号AAH20823.1所示;Fc  $\gamma$  RIIB的多核苷酸序列和氨基酸序列分别如RefSeq登录号BC146678.1和RefSeq登录号AAI46679.1所示;Fc  $\gamma$  RIIIA的多核苷酸序列和氨基酸序列分别如RefSeq登录号BC033678.1和RefSeq登录号AAH33678.1所示;和Fc  $\gamma$  RIIB的多核苷酸序列和氨基酸序列分别如RefSeq登录号BC128562.1和RefSeq登录号AAI28563.1所示。Fc  $\gamma$  受体是否具有与单克隆IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体的Fc结构域的结合活性可以通过ALPHA筛选(放大发光邻近均相测定)、基于表面等离子共振 (SPR) 的BIAcore方法和除上述FACS和ELISA形式外的其他方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103(11), 4005-4010) 测定。

[0930] 同时,“Fc配体”或“效应配体”是指与抗体Fc结构域结合形成Fc/Fc配体复合物的分子,优选多肽。该分子可能来源于任何生物体。Fc配体与Fc的结合优选诱导一种或多种效应子功能。此类Fc配体包括但不限于Fc受体、Fc  $\gamma$  受体、Fc $\alpha$ 受体、Fc $\beta$ 受体、FcRn、Clq和C3、甘露聚糖结合凝集素、甘露糖受体、葡萄球菌蛋白A、葡萄球菌蛋白G和病毒Fc  $\gamma$  受体。Fc配体还包括Fc受体同源物 (FcRH) (Davis等人., (2002) Immunological Reviews 190, 123-136), 它们是与Fc  $\gamma$  受体同源的Fc受体家族。Fc配体还包括与Fc结合的未鉴定分子。

#### [0931] Fc $\gamma$ 受体结合活性

[0932] Fc结构域与Fc  $\gamma$  受体Fc  $\gamma$  RI、Fc  $\gamma$  RIIA、Fc  $\gamma$  RIIB、Fc  $\gamma$  RIIIA和/或Fc  $\gamma$  RIIB中任一种的结合活性受损可以通过使用上述FACS和ELISA形式,以及ALPHA筛选(放大发光邻近均相测定)和基于表面等离子共振 (SPR) 的BIAcore方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103(11), 4005-4010) 来评估。

[0933] ALPHA筛选是通过ALPHA技术基于下述原理使用两种类型的珠子进行的:供体珠子和受体珠子。仅当与供体珠子连接的分子与与受体珠子连接的分子发生生物学相互作用并且两个珠子位置非常接近时,才会检测到发光信号。在激光束的激发下,供体珠子中的光敏剂将珠子周围的氧转化为激发的单线态氧。当单线态氧在供体珠子周围扩散并到达附近的受体珠子时,引发在受体珠子内的化学发光反应。该反应最终导致发光。如果连接到供体珠子的分子不与连接到受体珠子的分子相互作用,则供体珠子产生的单线态氧不会到达受体珠子,并且不会发生化学发光反应。

[0934] 例如,生物素标记的抗原结合分子或抗体固定在供体珠子上,而谷胱甘肽S-转移酶 (GST) 标记的Fc  $\gamma$  受体固定在受体珠子上。在不存在包含竞争性突变Fc结构域的抗原结合分子或抗体的情况下,Fc  $\gamma$  受体与包含野生型Fc结构域的抗原结合分子或抗体相互作用,结果诱导520至620nm的信号。具有未标记的突变Fc结构域的抗原结合分子或抗体与包含野生型Fc结构域的抗原结合分子或抗体竞争与Fc  $\gamma$  受体的相互作用。可以通过量化竞争导致的荧光减少来确定相对结合亲和力。使用碘基-NHS-生物素等对抗原结合分子或抗体如抗体进行生物素化的方法是已知的。将GST标签添加到Fc  $\gamma$  受体的适当方法包括以下方法:将编码Fc  $\gamma$  受体的多肽和GST框内融合,使用引入了携带基因的载体的细胞表达融合基

因,然后使用谷胱甘肽柱纯化。可以优选地分析诱导的信号,例如,通过使用诸如GRAPHPAD PRISM(GraphPad;San Diego)之类的软件基于非线性回归分析拟合至单点竞争模型。

[0935] 用于观察它们相互作用的物质之一作为配体固定在传感器芯片的金薄层上。当光线照射到传感器芯片的背面,使金薄层和玻璃之间的界面发生全反射时,反射光的强度会在某个位置部分降低 (SPR信号)。将用于观察它们相互作用的另一种物质作为分析物注入传感器芯片的表面。当分析物与配体结合时,固定化配体分子的质量会增加。这会改变传感器芯片表面上溶剂的折射率。折射率的变化导致SPR信号的位置偏移(相反,解离将信号移回原始位置)。在Biacore系统中,将上述位移量(即传感器芯片表面的质量变化)绘制在垂直轴上,因此质量随时间的变化显示为测量数据(传感图)。动力学参数(缔合速率常数( $k_a$ )和解离速率常数( $k_d$ ))由传感图曲线确定,亲和力(KD)由这两个常数之间的比值确定。BIACORE方法中优选使用抑制测定。该抑制测定法的实例描述在Proc.Natl.Acad.Sci.USA (2006) 103(11),4005-4010中。

#### [0936] 多特异性抗体的生产和纯化

[0937] 本文所述的多特异性抗原结合分子包含具有不同结合特异性的两种类型的抗原结合部分(例如,均能够结合CD3和CD137的“第一抗原结合部分”和“第二抗原结合部分”,以及能够结合不同的抗原的“第三抗原结合部分”),每个抗原结合部分最终融合到Fc结构域的两个亚基中的一个或另一个,因此Fc结构域的两个亚基通常包含在两条不同的多肽链中。这些多肽的重组共表达和随后的二聚化导致两个多肽的几种可能组合。为了提高重组生产中多特异性抗原结合分子的产率和纯度,因此在多特异性抗原结合分子的Fc结构域中引入促进所需多肽缔合的修饰将是有利的。

[0938] 因此,在特定实施方案中,本文所述的多特异性抗原结合分子的Fc结构域包含促进Fc结构域的第一和第二亚基缔合的修饰。人IgG Fc结构域的两个亚基之间最广泛的蛋白质-蛋白质相互作用的位点是在Fc结构域的CH3结构域中。因此,在一个实施方案中,所述修饰在Fc结构域的CH3结构域中。

[0939] 在具体的实施方案中,所述修饰是所谓的“杵臼”修饰,包括在Fc结构域的两个亚基之一中的“杵”修饰和在Fc结构域的两个亚基的另一个中的“臼”修饰。

[0940] 例如在US 5,731,168;US7,695,936;Ridgway等人.,Prot Eng 9,617-621(1996)和Carter,J Immunol Meth 248,7-15(2001)中描述了杵臼技术。通常,该方法包括在第一多肽的界面处引入突起(“杵”)和在第二多肽的界面中引入相应的腔(“臼”),使得突起可以定位在腔中以便促进异二聚体形成并阻碍同二聚体形成。通过用较大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸)替换来自第一多肽界面的小氨基酸侧链来构建突起。通过用较小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替换大的氨基酸侧链,在第二个多肽的界面中产生与突起大小相同或相似的补偿腔。

[0941] 因此,在特定实施方案中,在多特异性抗原结合分子的Fc结构域的第一亚基的CH3结构域中,氨基酸残基被具有更大侧链体积的氨基酸残基取代,从而在第一亚基的CH3结构域内产生突起,所述突起可定位在第二亚基的CH3结构域内的腔中,并且在Fc结构域的第二亚基的CH3结构域中,氨基酸残基被具有较小侧链体积的氨基酸残基取代,从而在第二亚基的CH3结构域内产生腔,第一亚基的CH3结构域内的突起可定位在该腔内。

[0942] 可以通过改变编码多肽的核酸来形成突起和腔,例如通过位点特异性诱变或肽合

成。

[0943] 在具体实施方案中,在Fc结构域的第一亚基的CH3结构域中,位置366处的苏氨酸残基被色氨酸残基(T366W)替换,并且在Fc结构域的第二亚基的CH3结构域中,位置407处的酪氨酸残基被缬氨酸残基取代(Y407V)。在一个实施方案中,在Fc结构域的第二亚基中,位置366处的苏氨酸残基另外被丝氨酸残基取代(T366S)并且位置368处的亮氨酸残基被丙氨酸残基取代(L368A)。

[0944] 在又一个实施方案中,在Fc结构域的第一亚基中,位置354处的丝氨酸残基另外被半胱氨酸残基取代(S354C),并且在Fc结构域的第二亚基中,位置349的酪氨酸残基另外被半胱氨酸残基取代(Y349C)。这两个半胱氨酸残基的引入导致在Fc结构域的两个亚基之间形成二硫键,进一步稳定二聚体(Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001))。

[0945] 在其他实施方案中,用于促进具有期望组合的H链之间以及L和H链之间缔合的其他技术可以应用于本发明的多特异性抗原结合分子。

[0946] 例如,通过在抗体H链的第二恒定区或第三恒定区(CH2或CH3)的界面处引入静电排斥来抑制不希望的H链缔合的技术可应用于多特异性抗体缔合(WO2006/106905)。

[0947] 在通过在CH2或CH3的界面引入静电排斥来抑制非预期的H链缔合的技术中,在H链的另一个恒定区的界面接触的氨基酸残基的实例包括对应于CH3区中EU编号的位置356、439、357、370、399和409处的残基。

[0948] 更具体地,实例包括包含两种类型的H链CH3区的抗体,其中第一H链CH3区中的1至3对氨基酸残基选自如下(1)至(3)中所示的氨基酸残基对,携带相同类型的电荷:(1)包含在H链CH3区中EU编号位置356和439处的氨基酸残基;(2)包含在H链CH3区中EU编号位置357和370处的氨基酸残基;和(3)包含在H链CH3区中EU编号位置399和409处的氨基酸残基。

[0949] 此外,该抗体可以是这样的抗体,其中与上述第一H链CH3区不同的第二H链CH3区中的氨基酸残基对选自上述(1)至(3)的氨基酸残基对,其中对应于上述在所述第一H链CH3区中携带相同类型的电荷的(1)至(3)的氨基酸残基对的1至3对氨基酸残基,携带与上面提到的第一H链CH3区的相应氨基酸残基相反的电荷。

[0950] 上述(1)至(3)中所示的每个氨基酸残基在缔合期间彼此接近。本领域技术人员可以使用市售软件通过同源性建模等找出与所需H链CH3区或H链恒定区中的上述(1)至(3)的氨基酸残基相对应的位置,并且这些位置的氨基酸残基可以适当地进行修饰。

[0951] 在上述抗体中,“带电荷的氨基酸残基”优选地选自例如包括在以下任一组中的氨基酸残基:

[0952] (a) 谷氨酸(E)和天冬氨酸(D);和

[0953] (b) 赖氨酸(K)、精氨酸(R)和组氨酸(H)。

[0954] 在上述抗体中,短语“携带相同电荷”是指,例如,2个或以上的氨基酸残基全部选自上述组(a)和(b)的任一个中包含的氨基酸残基。短语“携带相反电荷”是指,例如,当两个或更多个氨基酸残基中的至少一个氨基酸残基选自上述组(a)和(b)的任一个中所包含的氨基酸残基时,剩余的氨基酸残基选自包含在另一组中的氨基酸残基。

[0955] 在优选的实施方案中,上述抗体可以具有通过二硫键交联的它们的第一H链CH3区和第二H链CH3区。

[0956] 在本发明中,进行修饰的氨基酸残基不限于上述抗体可变区或抗体恒定区的氨基

酸残基。本领域技术人员可以使用市售软件通过同源建模等方法鉴定在突变多肽或异源多聚体中形成界面的氨基酸残基;然后可以对这些位置的氨基酸残基进行修饰以调节缔合。

[0957] 此外,其他已知技术也可用于形成本发明的多特异性抗体。具有不同序列的多肽的缔合可以使用链交换工程化的结构域CH3通过CH3的互补缔合来有效诱导,所述链交换工程化的结构域CH3是通过将抗体的H链CH3的一部分改变为相应的IgA衍生序列并将相应的IgA衍生序列引入另一个H链CH3的互补部分而产生的(Protein Engineering Design& Selection,23;195-202,2010)。这种已知的技术也可用于有效地形成目标多特异性抗体。

[0958] 此外,如W0 2011/028952、W02014/018572和Nat Biotechnol.2014Feb;32(2):191-8中描述的使用抗体CH1和CL的缔合以及VH和VL的缔合的抗体生产技术;如W02008/119353和W02011/131746中描述的联合使用单独制备的单克隆抗体生产双特异性抗体的技术(Fab臂交换);如W02012/058768和W02013/063702中所描述的用于调节抗体重链CH3之间的缔合的技术;如W02012/023053中所描述的用于生产由两种类型的轻链和一种类型的重链组成的多特异性抗体的技术;如Christoph等人.(Nature Biotechnology第31卷,p 753-758(2013))所描述的使用两种细菌细胞株(其分别表达包含单个H链和单个L链的抗体链之一)生产多特异性抗体的技术;等均可用于形成多特异性抗体。

[0959] 或者,即使在不能有效地形成目标多特异性抗体的情况下,也可以通过从产生的抗体中分离纯化目标多特异性抗体来获得本发明的多特异性抗体。例如,已经报道了通过将氨基酸取代引入两种H链的可变区而赋予等电点差异,从而能够通过离子交换色谱法纯化两种类型的同源形式和目标异聚抗体的方法(W02007114325)。迄今为止,作为纯化异聚抗体的方法,已经报道了使用蛋白A纯化包含与蛋白A结合的小鼠IgG2a H链和不与蛋白A结合的大鼠IgG2b H链的异二聚体抗体的方法(W098050431和W095033844)。此外,可以通过使用包含将作为IgG蛋白A结合位点的EU编号位置435和436的氨基酸残基用产生不同蛋白A亲和力的氨基酸Tyr、His等氨基酸替换的H链,或使用具有不同蛋白A亲和力的H链来改变每个H链与蛋白A的相互作用,然后使用蛋白A柱而有效地单独纯化异二聚体抗体。

[0960] 此外,Fc区C末端异质性得到改善的Fc区可以适当地用作本发明的Fc区。更具体地,本发明提供通过从构成源自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的Fc区的两个多肽的氨基酸序列中缺失如EU编号指定的位置446处的甘氨酸和位置447处的赖氨酸而产生的Fc区。

[0961] 如本文所述制备的多特异性抗原结合分子可以通过本领域已知的技术例如高效液相色谱、离子交换色谱、凝胶电泳、亲和色谱、尺寸排阻色谱等来纯化。用于纯化特定蛋白质的实际条件将部分取决于诸如净电荷、疏水性、亲水性等因素,并且对于本领域技术人员来说是显而易见的。对于亲和色谱纯化,可以使用与多特异性抗原结合分子结合的抗体、配体、受体或抗原。例如,对于本发明的多特异性抗原结合分子的亲和色谱纯化,可以使用具有蛋白A或蛋白G的基质。顺序蛋白A或G亲和色谱和尺寸排阻色谱可用于分离多特异性抗原结合分子。多特异性抗原结合分子的纯度可以通过多种众所周知的分析方法中的任一种来确定,包括凝胶电泳、高效液相色谱等。

[0962] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性

[0963] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是指一种细胞毒性形式,其中分泌的Ig与某些细胞毒性细胞(例如NK细胞、中性粒细胞和巨噬细胞)上存在的Fc受体(FcR)结合,使这些细胞毒性效应细胞与带有抗原的靶细胞特异性结合,随后用细胞毒素杀死靶细胞。

介导ADCC的主要细胞NK细胞仅表达Fc  $\gamma$  RIII,而单核细胞表达Fc  $\gamma$  RI、Fc  $\gamma$  RII和Fc  $\gamma$  RIII。Ravetch和Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991) 第464页的表3总结了造血细胞上的FcR表达。为了评估目标分子的ADCC活性,可以进行体外ADCC测定,例如美国专利号5,500,362或5,821,337或美国专利号6,737,056 (Presta) 中描述的那些。用于此类测定的有用的效应细胞包括PBMC和NK细胞。或者或另外地,可在体内评估目的分子的ADCC活性,例如在诸如Clynes等人. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998) 中公开的动物模型中。

**[0964] 补体依赖性细胞毒性**

**[0965]** “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”是指在补体存在下靶细胞的裂解。经典补体途径的激活是通过补体系统的第一组分(C1q)与抗体(适当的亚类)结合而启动的,这些抗体与它们的同源抗原结合。为了评估补体激活,可以进行CDC测定,例如,如Gazzano-Santoro等人., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996) 中所描述的。例如,在美国专利号6,194,551B1和W0 1999/51642中描述了具有改变的Fc区氨基酸序列的多肽变体(具有变体Fc区的多肽)和增加或减少的C1q结合能力。另见,例如,Idusogie等人. *J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000)。

**[0966] T细胞依赖性细胞毒性**

**[0967]** “T细胞依赖性细胞毒性”或“TDCC”是指一种细胞毒性形式,其中抗原结合分子与靶细胞上表达的抗原和在T细胞上表达的另一种抗原两者结合,从而将T细胞重新定向到靠近靶细胞的位置,因为由于T细胞诱导针对靶细胞的细胞毒性。评估T细胞依赖性细胞毒性的方法体外TDCC测定法,也在本说明书的“T细胞依赖性细胞毒性测量”部分中进行了描述。

**[0968] T细胞依赖性细胞毒性的测量**

**[0969]** 在抗原结合分子与DLL3和CD3/CD137两者结合的实施方案中,优选使用下述方法作为评估或确定由本公开的抗原结合分子与表达DLL3的细胞接触引起的T细胞依赖性细胞毒性(TDCC)的方法,其中本公开的抗原结合分子中的抗原结合位点结合所述表达DLL3的细胞。用于评估或确定体外细胞毒活性的方法包括用于确定细胞毒T细胞等的活性的方法。本公开的抗原结合分子是否具有诱导T细胞介导的细胞毒性的活性可以通过已知方法确定(参见例如Current protocols in Immunology,第7章.Immunologic studies in humans, Editor, John E, Coligan等人., John Wiley&Sons, Inc., (1993))。在细胞毒性测定中,将能够与DLL3不同且在细胞中不表达的抗原CD3/CD137结合的抗原结合分子作为对照抗原结合分子。以相同的方式测定对照抗原结合分子。然后,通过测试本公开的抗原结合分子是否表现出比对照抗原结合分子更强的细胞毒活性来评估活性。

**[0970]** 同时,例如通过以下程序评估或确定体内抗肿瘤功效。将表达本公开的抗原结合分子中的抗原结合位点所结合的抗原的细胞皮内或皮下移植至非人动物受试者。然后,从移植当天或之后,每天或每隔几天将测试抗原结合分子施用于静脉或腹腔。随着时间的推移测量肿瘤大小。肿瘤大小变化的差异可以定义为细胞毒活性。如在体外测定中,施用对照抗原结合分子。当施用本公开的抗原结合分子的组中的肿瘤大小小于施用对照抗原结合分子的组时,可以判断本公开的抗原结合分子具有细胞毒活性。

**[0971]** MTT方法和同位素标记的摄取到细胞中的胸苷的测量优选用于评估或确定与本公开的抗原结合分子接触以抑制表达抗原的细胞的生长的效果,所述抗原与抗原结合分子中的抗原结合位点结合。同时,可以优选使用与上述用于评估或确定体内细胞毒活性的相同方法来评估或确定抑制细胞体内生长的活性。

[0972] 本公开的抗体或抗原结合分子的TDCC可以通过本领域已知的任何合适的方法来评估。例如,TDCC可以通过乳酸脱氢酶(LDH)释放测定来测量。在该测定中,靶细胞(例如表达DLL3的细胞)与T细胞(例如PBMC)在存在测试抗体或抗原结合分子的情况下孵育,使用合适的试剂测量已从被T细胞杀死的靶细胞释放的LDH的活性。通常,细胞毒活性计算为与抗体或抗原结合分子孵育产生的LDH活性相对于100%杀死靶细胞(例如通过用Triton-X处理裂解)产生的LDH活性的百分比。如果如上所述计算出的细胞毒活性较高,则确定测试抗体或抗原结合分子具有较高的TDCC。

[0973] 另外地或备选地,例如,TDCC也可以通过实时细胞生长抑制测定来测量。在该测定中,靶细胞(例如表达DLL3的细胞)与T细胞(例如PBMC)在存在测试抗体或抗原结合分子的情况下在96孔板上孵育,并通过本领域已知的方法监测靶细胞的生长,例如通过使用合适的分析仪器(例如xCELLigence实时细胞分析仪)。根据 $CGI(\%) = 100 - (CIAb \times 100 / CINoAb)$ 给出的公式,由细胞指数值确定细胞生长抑制率(CGI:%)。“CIAb”表示在特定实验时间内含有抗体或抗原结合分子的孔的细胞指数值,“CINoAb”表示没有抗体或抗原结合分子的孔的平均细胞指数值。如果抗体或抗原结合分子的CGI率高,即具有显著的阳性值,则可以说该抗体或抗原结合分子具有TDCC活性。

[0974] 在一个方面,本公开的抗体或抗原结合分子具有T细胞活化活性。T细胞活化可以通过本领域已知的方法来测定,例如使用工程化T细胞系的方法,该工程化T细胞系响应于其活化而表达报告基因(例如荧光素酶)(例如Jurkat/NFAT-RE报告细胞系(T细胞活化生物测定法,Promega))。在该方法中,靶细胞(例如表达DLL3的细胞)与T细胞在测试抗体或抗原结合分子的存在下培养,然后通过适当的方法测量报告基因表达产物的水平或活性作为T细胞活化的指标。当报告基因是荧光素酶基因时,可以测量由荧光素酶与其底物之间的反应引起的发光作为T细胞活化的指数。如果如上所述测量的T细胞活化较高,则确定测试抗体或抗原结合分子具有较高的T细胞活化活性。

#### [0975] 药物组合物

[0976] 在一个方面,本公开提供了药物组合物或药物制剂,其包含本公开的抗原结合分子或抗体。在某些实施方案中,本公开的药物组合物或药物制剂诱导T细胞依赖性细胞毒性,换言之,本公开的药物组合物或药物制剂是用于诱导细胞的细胞毒性的治疗剂。在某些实施方案中,本公开的药物组合物或药物制剂是用于治疗和/或预防癌症的药物组合物或药物制剂。在某些实施方案中,本发明的药物组合物或药物制剂是用于治疗和/或预防DLL3阳性的或表达DLL3的癌症,包括肺癌(包括小细胞癌肺)和黑素瘤,或包括表达DLL3的神经内分泌瘤(neuroendocrine Neoplasm)(NEN)、神经内分泌肿瘤(neuroendocrine tumor)(NET)或神经内分泌癌(NEC),或表达DLL3的其他非神经内分泌来源的实体瘤的药物组合物或药物制剂。在一些优选的实施方案中,癌症的实例包括胰腺神经内分泌肿瘤(PNET)、小细胞型NEC(SCNEC)、大细胞型NEC(LCNEC)、小细胞肺癌(SCLC)、大细胞神经内分泌肺癌、神经内分泌前列腺癌(NEPC)、默克尔细胞癌、小细胞膀胱癌、胃肠道神经内分泌癌、甲状腺髓样癌(MTC)、胃肠胰神经内分泌癌(GEP NEC)或其他实体瘤例如成神经细胞瘤、神经胶质瘤或胶质母细胞瘤(GBM)、黑色素瘤、甲状腺髓样癌。在优选实施方案中,肿瘤或癌症疾病是肺癌,优选SCLC。在另一优选实施方案中,肿瘤或癌症疾病是神经胶质瘤或胶质母细胞瘤(GBM)。在另一优选实施方案中,肿瘤或癌症疾病是神经内分泌前列腺癌。在某些实施方案

中,本公开的药物组合物或药物制剂是细胞生长抑制剂。在某些实施方案中,本公开的药物组合物或药物制剂是抗癌剂。

[0977] 如果需要,本公开的药物组合物或药物制剂、用于诱导细胞的细胞毒性的治疗剂、细胞生长抑制剂或抗癌剂可以与不同类型的抗原结合分子或抗体一起配制。例如,针对表达抗原的细胞的细胞毒作用可以通过本公开的多种抗原结合分子或抗体的混合物来增强。

[0978] 本文所述的抗原结合分子或抗体的药物组合物或药物制剂通过以下制备的:将有所需纯度的这种抗原结合分子或抗体与一种或多种任选的药学上可接受的载体混合(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.Ed.(1980)),所述药物组合物为冻干制剂或水溶液的形式。药学上可接受的载体在所采用的剂量和浓度下通常对接受者无毒,并且包括但不限于:缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,其包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲铵氯化物;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,例如EDTA;糖,例如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;形成盐的反离子,例如钠;金属络合物(例如锌-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,例如聚乙二醇(PEG)。本文的示例性的药学上可接受的载体进一步包括间质药物分散剂,例如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,例如rHuPH20(HYLENEX(注册商标),Baxter International,Inc.)。某些示例性sHASEGP和使用方法,包括rHuPH20,描述于美国专利公开号2005/0260186和2006/0104968中。在一方面,sHASEGP与一个或多个另外的糖胺聚糖酶例如软骨素酶组合。

[0979] 示例性冻干抗体制剂描述于美国专利号6,267,958中。水性抗体制剂包括美国专利号6,171,586和W02006/044908中描述的那些,后者的制剂包括组氨酸-乙酸盐缓冲液。

[0980] 本文的制剂还可以含有超过一种的活性成分,所述活性成分是被治疗的特定适应症所需的,优选具有不会不利地影响彼此的互补活性的那些活性成分。此类活性成分以对预期目的有效的量适当地组合存在。

[0981] 如有必要,本发明的抗原结合分子或抗体可包封在微胶囊(由羟甲基纤维素、明胶、聚[甲基丙烯酸甲酯]等制成的微胶囊)中,制备到胶体药物递送系统的组分中(脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)(例如,参见"Remington's Pharmaceutical Science 16th edition",Oslo Ed.(1980))。此外,将试剂制备为缓释剂的方法是已知的,并且这些方法可以应用于本公开的抗原结合分子(J.Biomed.Mater.Res.(1981)15,267-277;Chemtech.(1982)12,98-105;美国专利号3773719;欧洲专利申请号EP58481和EP133988;Biopolymers(1983)22,547-556)。

[0982] 本公开的药物组合物、细胞生长抑制剂或抗癌剂可以口服或肠胃外施用至患者。肠胃外施用是优选的。具体而言,这种施用方法包括注射、经鼻施用、经肺施用和经皮施用。注射包括例如静脉内注射、肌肉内注射、腹膜内注射和皮下注射。例如,本公开的药物组合物、用于诱导细胞的细胞毒性的治疗剂、细胞生长抑制剂或抗癌剂可以通过注射局部或全身施用。此外,可以根据患者的年龄和症状选择合适的施用方法。对于每次施用,施用剂量



可以选自例如0.0001mg至1,000mg/kg体重的范围。或者,剂量可选自例如0.001mg/身体至100,000mg/身体每名患者。然而,本公开的药物组合物的剂量不限于这些剂量。

[0983] 优选地,本公开的药物组合物或药物制剂包含如本文所述的抗原结合分子或抗体。一方面,该组合物是用于诱导细胞的细胞毒性的药物组合物。在另一个方面,该组合物是用于治疗或预防癌症的药物组合物。优选地,所述癌症是肺癌(包括小细胞肺癌)和黑素瘤或包括表达DLL3的神经内分泌瘤(neuroendocrine Neoplasm) (NEN)、神经内分泌肿瘤(neuroendocrine tumor) (NET) 或神经内分泌癌(NEC),或表达DLL3的其他非神经内分泌来源的实体瘤。在一些优选的实施方案中,癌症的实例包括胰腺神经内分泌肿瘤(PNET)、小细胞型NEC(SCNEC)、大细胞型NEC(LCNEC)、小细胞肺癌(SCLC)、大细胞神经内分泌肺癌、神经内分泌前列腺癌(NEPC)、默克尔细胞癌、小细胞膀胱癌、胃肠道神经内分泌癌、甲状腺髓样癌(MTC)、胃肠胰神经内分泌癌(GEP NEC)或其他实体瘤例如成神经细胞瘤、神经胶质瘤或胶质母细胞瘤(GBM)、黑色素瘤、甲状腺髓样癌。在优选实施方案中,肿瘤或癌症疾病是肺癌,优选SCLC。在另一优选实施方案中,肿瘤或癌症疾病是神经胶质瘤或胶质母细胞瘤(GBM)。在另一优选实施方案中,肿瘤或癌症疾病是神经内分泌前列腺癌。本公开的药物组合物可用于治疗或预防癌症。因此,本公开提供了治疗或预防癌症的方法,其中将本文所述的抗原结合分子或抗体施用于有需要的患者。

[0984] 本公开还提供了通过使表达DLL3的细胞与结合DLL3的本公开的抗原结合分子接触来损害表达DLL3的细胞或抑制细胞生长的方法。本公开的抗原结合分子结合的细胞不受特别限制,只要它们表达DLL3。具体地,在本公开中,优选的表达DLL3的细胞包括肺癌(包括小细胞肺癌)和黑素瘤或包括表达DLL3的神经内分泌瘤(neuroendocrine Neoplasm) (NEN)、神经内分泌肿瘤(neuroendocrine tumor) (NET) 或神经内分泌癌(NEC),或表达DLL3的其他非神经内分泌来源的实体瘤。在一些优选的实施方案中,癌症的实例包括胰腺神经内分泌肿瘤(PNET)、小细胞型NEC(SCNEC)、大细胞型NEC(LCNEC)、小细胞肺癌(SCLC)、大细胞神经内分泌肺癌、神经内分泌前列腺癌(NEPC)、默克尔细胞癌、小细胞膀胱癌、胃肠道神经内分泌癌、甲状腺髓样癌(MTC)、胃肠胰神经内分泌癌(GEP NEC)或其他实体瘤例如成神经细胞瘤、神经胶质瘤或胶质母细胞瘤(GBM)、黑色素瘤、甲状腺髓样癌。在优选实施方案中,肿瘤或癌症疾病是肺癌,优选SCLC。在另一优选实施方案中,肿瘤或癌症疾病是神经胶质瘤或胶质母细胞瘤(GBM)。在另一优选实施方案中,肿瘤或癌症疾病是神经内分泌前列腺癌。

[0985] 在本公开中,“接触”可以例如通过将本公开的抗原结合分子添加到体外培养的表达DLL3的细胞的培养基中进行。在这种情况下,添加的抗原结合分子可以以适当的形式使用,例如通过冻干等制备的溶液或固体。当本公开的抗原结合分子作为水溶液添加时,该溶液可以是仅含有抗原结合分子的纯水溶液,也可以是含有例如上述表面活性剂、赋形剂、着色剂、调味剂、防腐剂、稳定剂、缓冲剂、悬浮剂、等渗剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂、流动性促进剂和矫味剂的溶液。加入浓度没有特别限制;然而,培养基中的最终浓度优选在1pg/ml至1g/ml的范围内,更优选1ng/ml至1mg/ml,还更优选1μg/ml至1mg/ml。

[0986] 在本公开的另一个实施方案中,“接触”也可以通过向体内移植了表达DLL3的细胞的非人动物或具有内源性表达DLL3的癌细胞的动物施用来进行。施用方法可以是口服或肠胃外。施用方法可以是口服或肠胃外。特别优选肠胃外施用。具体而言,肠胃外施用方法包

括注射、经鼻施用、经肺施用和经皮施用。注射包括例如静脉内注射、肌肉内注射、腹膜内注射和皮下注射。例如,本公开的药物组合物、用于诱导细胞的细胞毒性的治疗剂、细胞生长抑制剂或抗癌剂可以通过注射局部或全身施用。此外,可以根据动物受试者的年龄和症状适当地选择施用方法。当抗原结合分子作为水溶液施用时,该溶液可以是仅含有抗原结合分子的纯水溶液,也可以是含有例如上述表面活性剂、赋形剂、着色剂、调味剂、防腐剂、稳定剂、缓冲剂、悬浮剂、等渗剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂、流动性促进剂和矫味剂的溶液。对于每次施用,施用剂量可以选自例如0.0001mg至1,000mg/kg体重的范围。或者,对于每名患者,剂量可选自例如0.001mg/身体至100,000mg/身体。然而,本公开的抗原结合分子的剂量不限于这些实例。

[0987] 本公开还提供了用于本公开的方法中的试剂盒,其包含本公开的抗原结合分子或通过本公开的方法产生的抗原结合分子。试剂盒可以与额外的药学上可接受的载体或介质,或描述如何使用试剂盒的说明书等一起包装。

[0988] 在本发明的另一个方面,提供了含有用于治疗、预防和/或诊断上述病症的材料的制品。制品包括容器和容器上的标签或与容器相关的包装插页。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器、IV溶液袋等。容器可以由多种材料例如玻璃或塑料制成。容器容纳组合物,该组合物本身或与有效治疗、预防和/或诊断病症的另一种组合物组合,并且可以具有无菌入口(例如,容器可以是静脉注射溶液袋或具有可通过皮下注射针刺穿塞子的小瓶)。组合物中的至少一种活性成分是本发明的抗体。标签或包装插页表明该组合物用于治疗所选择的病症。此外,该制品可以包括(a)其中含有组合物的第一容器,其中所述组合物包含本发明的抗体;和(b)其中含有组合物的第二容器,其中所述组合物含有进一步的细胞毒性剂或其他治疗剂。本发明的该实施方案中的制品可进一步包括包装插页,所述包装插页说明该组合物可用于治疗特定病症。或者或另外地,制品可进一步包括第二(或第三)容器,所述容器包含药学上可接受的缓冲剂,例如抑菌注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和葡萄糖溶液。它可以进一步包括从商业和用户角度看需要的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

#### [0989] 包装插页

[0990] 术语“包装插页”用于指通常包含在治疗产品商业包装中的说明,其中包含有关使用此类治疗产品的适应症、用法、剂量、施用、联合治疗、禁忌症和/或警告的信息。

#### [0991] 药物制剂

[0992] 术语“药物制剂”或“药物组合物”是指这样一种制剂,其形式允许包含在其中的活性成分的生物活性是有效的,并且不包含对将要施用该制剂的受试者具有不可接受的毒性的额外成分。

#### [0993] 药学上可接受的载体

[0994] “药学上可接受的载体”是指药物制剂中除活性成分外的对受试者无毒的成分。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲剂、辅料、稳定剂或防腐剂。

#### [0995] 治疗

[0996] 如本文所用,“治疗(treatment)”(及其语法变体,例如“治疗(treat)”或“治疗(treating)”)是指临床干预以试图改变被治疗个体的自然过程,并且可以用于预防或在临床病理学过程期间进行。治疗的理想效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、减轻症状、

减轻疾病的任何直接或间接病理后果、预防转移、降低疾病进展速度、改善或缓解疾病状态、缓解或改善预后。在一些实施方案中,本公开的抗原结合分子或抗体用于延迟疾病的发展或减缓疾病的进展。

#### [0997] 癌症

[0998] 术语“癌症”和“癌性”是指或描述哺乳动物的生理状况,其通常以不受调节的细胞生长/增殖为特征。

[0999] 在某些实施方案中,所述癌症为表达DLL3的或DLL3阳性的癌症,其包括表达DLL3的神经内分泌瘤(neuroendocrine Neoplasm) (NEN)、神经内分泌肿瘤(neuroendocrine tumor) (NET) 或神经内分泌癌(NEC),或表达DLL3的其他非神经内分泌来源的实体瘤。在一些实施方案中,癌症的实例包括胰腺神经内分泌肿瘤(PNET)、小细胞型NEC(SCNEC)、大细胞型NEC(LCNEC)、小细胞肺癌(SCLC)、大细胞神经内分泌肺癌、神经内分泌前列腺癌(NEPC)、默克尔细胞癌、小细胞膀胱癌、胃肠道神经内分泌癌、甲状腺髓样癌(MTC)、胃肠胰神经内分泌癌(GEP NEC)或其他实体瘤例如成神经细胞瘤、神经胶质瘤或胶质母细胞瘤(GBM)、黑色素瘤、甲状腺髓样癌。在本发明的优选实施方案中,肿瘤或癌症疾病是肺癌,优选SCLC。在本发明的另一优选实施方案中,肿瘤或癌症疾病是神经胶质瘤或胶质母细胞瘤(GBM)。在本发明的另一优选实施方案中,肿瘤或癌症疾病是神经内分泌前列腺癌。

#### [1000] 肿瘤

[1001] 术语“肿瘤”是指所有肿瘤细胞生长和增殖,无论是恶性的还是良性的,以及所有癌前和癌细胞和组织。术语“癌症”、“癌性”、“细胞增殖性病症”、“增殖性病症”和“肿瘤”在本文中并不相互排斥。

#### [1002] 其他试剂和治疗

[1003] 本文所述的多特异性抗原结合分子可以与治疗中的一种或多种其他试剂组合施用。例如,本文所述的多特异性抗原结合分子可以与至少一种另外的治疗剂共同施用。术语“治疗剂”包括为治疗需要这种治疗的个体的症状或疾病而施用的任何试剂。这种额外的治疗剂可以包含任何适用于被治疗的特定适应症的活性成分,优选具有不会不利地影响彼此的互补活性的那些活性成分。在某些实施方案中,另外的治疗剂是免疫治疗剂、细胞生长抑制剂、细胞粘附抑制剂、细胞毒剂、细胞凋亡激活剂或增加细胞对凋亡诱导剂敏感性的试剂。

[1004] 在上述实施方案的某些实施方案中,另外的治疗剂是免疫治疗剂。在一些实施方案中,免疫治疗剂是调节免疫应答的试剂。在一些实施方案中,免疫治疗剂是增强抗肿瘤免疫应答的试剂。在一些实施方案中,免疫治疗剂是增加细胞介导的免疫性的试剂。在一些实施方案中,免疫治疗剂是增加T细胞活性的试剂。在一些实施方案中,免疫治疗剂是增加细胞溶解性T细胞(CTL)活性的试剂。在一些实施方案中,免疫治疗剂是增加NK细胞活性的试剂。在一些实施方案中,免疫治疗剂是抑制免疫应答抑制的试剂。在一些实施方案中,免疫治疗剂是抑制抑制子细胞或抑制细胞活性的试剂。在一些实施方案中,免疫治疗剂是抑制Treg活性的试剂。在一些实施方案中,免疫治疗剂是抑制MDSC活性的试剂。在一些实施方案中,免疫治疗剂是抑制抑制性免疫检查点受体活性的试剂。在一些实施方案中,免疫治疗剂是抑制PD-1活性的试剂。在一些实施方案中,免疫治疗剂是抑制PD-L1和/或PD-L2活性的试剂。在一些实施方案中,免疫治疗剂是抑制CTLA-4活性的试剂。在一些实施方案中,免疫治

疗剂是抑制CD80和/或CD86活性的试剂。在一些实施方案中,免疫治疗剂是抑制TIGIT活性的试剂。在一些实施方案中,免疫治疗剂是抑制KIR活性的试剂。在一些实施方案中,免疫治疗剂是抑制IDO 1活性的试剂。在一些实施方案中,免疫治疗剂是增强或刺激激活免疫检查点受体活性的试剂。在一些实施方案中,免疫治疗剂是增强或刺激GITR活性的试剂。在一些实施方案中,免疫治疗剂是增强或刺激OX 40活性的试剂。在一些实施方案中,免疫治疗剂是增强或刺激CD 40活性的试剂。

[1005] 在本文所述的一些实施方案中,免疫治疗剂是PD-1拮抗剂、PD-L1拮抗剂、PD-L2拮抗剂、CTLA-4拮抗剂、CD80拮抗剂、CD86拮抗剂、TIGIT拮抗剂、KIR拮抗剂、Tim-3拮抗剂、LAG3拮抗剂、CD96拮抗剂、CD20拮抗剂或IDO1拮抗剂。在一些实施方案中,PD-1拮抗剂是特异性结合PD-1的抗体。在一些实施方案中,结合PD-1的抗体是帕博利珠单抗,匹地利珠单抗(pidilizumab) (CT-011) 或尼妥珠单抗(nivolumab))。在一些实施方案中,PD-L1拮抗剂是特异性结合PD-L1的抗体。在一些实施方案中,结合PD-L1的抗体是阿替利珠单抗、度伐鲁单抗(MEDI4736) 或BMS-936559。在一些实施方案中,CTLA-4拮抗剂是特异性结合CTLA-4的抗体。在一些实施方案中,与CTLA-4结合的抗体是伊匹单抗或替西木单抗(tremelimumab) (CP-675206)。在一些实施方案中,KIR拮抗剂是特异性结合KIR的抗体。在一些实施方案中,结合KIR的抗体是利妥昔单抗(lirilumab)。在本文所述方法的一些实施方案中,免疫治疗剂是CD28激动剂、4-1BB激动剂、OX40激动剂、CD27激动剂、CD80激动剂、CD86激动剂、CD40激动剂或GITR激动剂。

[1006] 在适当或必要的情况下,本文所述的多特异性抗原结合分子可以与类固醇或其他抗体药物(例如托珠单抗)组合施用,以控制细胞因子释放综合征(CRS),这是T细胞相关治疗剂(例如T细胞衔接物和CAR-T细胞)的常见不良事件。

[1007] 化疗剂

[1008] 在上述实施方案中的某些的实施方案中,另外的治疗剂是化疗剂,例如微管破坏剂、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、DNA嵌入剂、烷化剂、激素疗法、激酶抑制剂、受体拮抗剂、肿瘤细胞凋亡的激活剂,或抗血管生成剂。“化疗剂”是指用于治疗癌症的化合物。化疗剂的实例包括烷基化剂,例如噻替哌和环磷酰胺(CYTOXAN(注册商标));烷基磺酸盐,如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶,如苯并多巴(benzodopa)、卡波醌、美妥替派(meturedopa)和乌瑞替派(uredopa);乙烯亚胺和羟甲基三聚氰胺,包括六甲蜜胺、三亚乙基三聚氰胺、三亚乙基磷酰胺、三乙烯基硫代磷酰胺和trimethylomelamine;乙酰精宁(acetogenins)(尤其是布拉他辛和布拉它辛酮); $\delta$ -9-四氢大麻酚(屈大麻酚,MARINOL(注册商标)); $\beta$ -拉帕醌;拉帕醇;秋水仙碱;桦木酸;喜树碱(包括合成类似物拓扑替康(HYCANTIN(注册商标)),CPT-11(伊立替康,CAMPTOSAR(注册商标)),乙酰喜树碱,东莨菪素和9-氨基喜树碱);苔藓抑素;callistatin;CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin),卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物);鬼臼毒素;鬼臼酸;替尼泊苷;隐藻毒素(特别是隐藻毒素1和隐藻毒素8);海兔毒素;多卡霉素(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);五加素;水鬼蕉碱(pancratistatin);sarcodictyin;海绵抑素(spongistatin);氮芥,如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯磷酰胺、雌氮芥、异环磷酰胺、甲氯乙胺、氧氮芥盐酸盐、美法仑、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺、尿嘧啶芥;亚硝基脲,如卡莫司汀、氯脲菌素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀和雷莫司汀;抗生

素,如烯二炔类抗生素(例如,卡利霉素,特别是卡利霉素  $\gamma$  1I和卡利霉素  $\omega$  1I(参见,例如, Nicolaou等人, Angew.Chem Intl.Ed.Engl., 33:183-186(1994)); CDP323,口服 $\alpha$ -4整合素抑制剂;达诺霉素(dynemicin),包括达诺霉素A;埃斯培拉霉素(esperamicin);以及新制癌菌素生色团和相关的发色蛋白烯二炔类抗生素发色团),阿克拉霉素(aclacinomysins),放线菌素,蒽霉素,重氮丝氨酸,博莱霉素类,放线菌素C,卡柔比星,洋红霉素,嗜癌菌素,色霉素类,放线菌素D,柔红霉素,地托比星,6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸,多柔比星(包括 ADRIAMYCIN(注册商标),吗啉多柔比星,氰基吗啉多柔比星,2-吡咯啉多柔比星,多柔比星盐酸脂质体注射液(DOXIL(注册商标)),脂质体多柔比星TLC D-99(MYOCET(注册商标)),聚乙二醇化脂质体多柔比星(CAELYX(注册商标)) 和脱氧多柔比星),表柔比星,依索比星,伊达比星,马塞霉素,丝裂霉素如丝裂霉素C,霉酚酸,诺加霉素,奥利霉素(olivomycins),派来霉素(peplomycin),甲基丝裂霉素(porfiromycin),嘌呤霉素,喹霉素,罗红霉素,链黑霉素,链脲佐菌素,结核菌素,乌苯美司,净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin);抗代谢物如甲氨蝶呤,吉西他滨(GEMZAR(注册商标)),替加氟(UFTORAL(注册商标)),卡培他滨(XELODA(注册商标)),埃坡霉素和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,如二甲叶酸(denopterin),甲氨蝶呤,蝶罗呤,曲美蝶呤;嘌呤类似物,如氟达拉滨,6-巯基嘌呤,硫胺嘧啶,硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,如安西他滨,阿扎胞苷,6-氮杂尿苷,卡莫氟,阿糖胞苷,双脱氧尿苷,去氧氟尿苷,依诺西他滨,氟尿苷;雄激素如卡普睾酮,丙酸屈他雄酮,表硫雄醇(epitio stanol),美雄烷,睾内酯;抗肾上腺药物,如氨基谷氨酰胺(aminoglutethimide),米托坦,曲洛司坦;叶酸补充剂,如亚叶酸;乙酰丙酮;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;恩尿嘧啶;安吡啶(amsacrine);bestrabucil;比生群(bisantrene);依达曲沙(edatraxate);地磷酰胺(defosfamide);地美可辛(demecolcine);地吡醌(diaziquone);依氟鸟氨酸(eflornithine);依利醋铵(elliptinium acetate);埃博霉素;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;洛尼达明;美登素类化合物,如美登素和安萨米霉素;米托瓜蒎;米托蒽醌;莫匹达莫;硝苯丙胺;喷司他丁;菲纳美特;吡柔比星;洛索蒽醌;2-乙基肼;丙卡巴嗪;PSK(注册商标)多糖复合物(JHS Natural Products,Eugene,OR);雷佐生(razoxane);根瘤菌素;西佐糖(sizofiran);螺旋锗;替诺酸;三嗪醌;2,2',2'-三氯三乙胺;单端孢霉烯族化合物(特别是T-2毒素,verracurin A,杆孢菌素A和anguidine);乌拉坦;长春地辛(ELDISINE(注册商标)、FILDESIN(注册商标));达卡巴嗪;甘露霉素;米托溴醇;米托内酯;哌泊溴烷(pipobroman);胞嘧啶;阿糖胞苷(arabinoside)("Ara-C");噻替哌;紫杉烷,例如紫杉醇(TAXOL(注册商标)),紫杉醇的白蛋白工程纳米颗粒制剂(ABRAXANE<sup>TM</sup>)和多西紫杉醇(TAXOTERE(注册商标));苯丁酸氮芥;6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲氨蝶呤;铂类药物,如顺铂,奥沙利铂(例如ELOXATIN(注册商标)) 和卡铂;蔓长春花属(vincas),其阻止微管蛋白聚合成微管,包括长春碱(VELBAN(注册商标)),长春新碱(ONCOVIN(注册商标)),长春地辛(ELDISINE(注册商标),FILDESIN(注册商标)) 和长春瑞滨(NAVELBINE(注册商标));依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;亚叶酸;诺凡特龙;依达曲沙;道诺霉素;氨基蝶呤;伊班膦酸盐;拓扑异构酶抑制剂RFS2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);类维生素A,例如视黄酸,包括贝沙罗汀(TARGRETIN(注册商标));双膦酸盐,如氯膦酸盐(例如BONEFOS(注册商标)或OSTAC(注册商标)),依替膦酸盐(DIDROCAL(注册商标)),NE-58095,唑来膦酸/唑来膦酸盐(ZOMETA(注册商标)),阿仑膦酸盐(FOSAMAX(注册商标)),帕米膦酸盐(AREDIA(注册商

标)),替鲁膦酸盐(SKELID(注册商标)),或利塞膦酸盐(ACTONEL(注册商标));曲沙他滨(1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物);反义寡核苷酸,特别是那些抑制与异常细胞增殖有关的信号传导途径中基因表达的寡核苷酸,例如PKC- $\alpha$ ,Raf,H-Ras和表皮生长因子受体(EGF-R);疫苗,如THERATOPE(注册商标)疫苗和基因治疗疫苗,例如ALLOVETIN(注册商标)疫苗,LEUVETIN(注册商标)疫苗和VAXID(注册商标)疫苗;拓扑异构酶1抑制剂(例如LURTOTECAN(注册商标));rmRH(例如ABARELIX(注册商标));BAY439006(索拉非尼;拜耳);SU-11248(舒尼替尼,SUTENT(注册商标),辉瑞);哌立福新(perifosine),COX-2抑制剂(例如塞来昔布或依托考昔),蛋白体抑制剂(例如PS341);硼替佐米(VELCADE(注册商标));CCI-779;替比法尼(R11577);索拉非尼,ABT510;Bcl-2抑制剂如奥利默森钠(oblimersen sodium)(GENASENSE(注册商标));吡咯烷酮(pixantrone);EGFR抑制剂(见下文定义);酪氨酸激酶抑制剂(见下文定义);丝氨酸-苏氨酸激酶抑制剂,如雷帕霉素(西罗莫司,RAPAMUNE(注册商标));法尼基转移酶抑制剂,如洛那法尼(SCH 6636,SARASAR<sup>TM</sup>);鲁比卡丁(Lurbinectedin)或阿霉素(Amrubicin);和上述任何物质的药学上可接受的盐、酸或衍生物;以及上述两种或两种以上的组合,例如CHOP,环磷酰胺,多柔比星,长春新碱和泼尼松龙联合疗法的缩写;FOLFOX是奥沙利铂(ELOXATIN<sup>TM</sup>)联合5-FU和亚叶酸治疗方案的缩写。

[1009] 本文定义的化疗剂还可以包括“抗激素剂”或“内分泌治疗剂”,其作用是调节、减少、阻断或抑制可促进癌症生长的激素的作用。它们可能是激素本身,包括但不限于:具有混合激动剂/拮抗剂特征的抗雌激素,包括他莫昔芬(NOLVADEX(注册商标))、4-羟基他莫昔芬、托瑞米芬(FARESTON(注册商标))、艾多昔芬、屈洛昔芬、雷洛昔芬(raloxifene)(EVISTA(注册商标)),三氧昔芬(trioxifene),酮昔芬(keoxifene)和选择性雌激素受体调节剂(SERM),如SERM3;没有激动剂特性的纯抗雌激素,如氟维司群(FASLODEX(注册商标)) and EM800(此类药物可阻断雌激素受体(ER)二聚化,抑制DNA结合,增加ER转换和/或抑制ER水平);芳香化酶抑制剂,包括甾体芳香化酶抑制剂,如福美斯坦(formestane)和依西美坦(AROMASIN(注册商标)),以及非甾体芳香化酶抑制剂,如阿那曲唑(ARIMIDEX(注册商标))、来曲唑(FEMARA(注册商标))和氨鲁米特(aminoglutethimide),其他芳香化酶抑制剂包括伏罗唑(vorozole)(RIVISOR(注册商标))、醋酸甲地孕酮(MEGASE(注册商标))、法曲唑和4(5)-咪唑;促黄体激素释放激素激动剂,包括亮丙瑞林(LUPRON(注册商标))和ELIGARD(注册商标)、戈舍瑞林、布舍瑞林和曲普瑞林;性类固醇,包括孕激素,如醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮,雌激素,如己烯雌酚和倍美力(premarin),以及雄激素/类维生素A,如氟甲睾酮,全反式维甲酸和芬维A胺;奥那司酮;抗孕酮;雌激素受体下调因子(ERD);抗雄激素如氟他胺,尼鲁胺和比卡鲁胺;和上述任何物质的药学上可接受的种盐、酸或衍生物;以及上述两种或两种以上的组合。

[1010] 此类其他试剂适当地以对预期目的有效的量组合存在。此类其他试剂的有效量取决于所使用的多特异性抗原结合分子的量、病症或治疗的类型以及上面讨论的其他因素。通常以与本文所述相同的剂量和施用途径使用多特异性抗原结合分子,或以本文所述剂量的约1%至99%,或以通过经验/临床确定为合适的任何剂量和任何途径使用。

[1011] 上述的此类联合疗法包括联合施用(其中两种或更多种治疗剂包含在相同或单独的组合物中)和单独施用,在这种情况下,本发明的多特异性抗原结合分子的施用可以在另外治疗剂和/佐剂的施用之前、同时和/或随后发生。如本文所述的多特异性抗原结合分子

也可以与放射疗法组合使用。

[1012] 本文引用的所有文献通过引用纳入本文。

[1013] 以下是本公开的方法和组合物的实施例。应当理解,鉴于上面提供的一般性描述,可以实施各种其他实施方案。

[1014] 实施例

[1015] 实施例1

[1016] 用于改善对肿瘤细胞的体外细胞毒性的亲本Fab H183L072的亲合力成熟变体筛选

[1017] 1.1亲合力成熟变体的序列

[1018] 在W02019111871(通过引用并入本文)中公开了提供结合CD3和CD137但不同时结合CD3和CD137的免疫球蛋白可变(Fab)区的概念(双Fab)。为了增加W02019111871中公开的亲本双Fab H183L072(重链:SEQ ID NO:1;轻链:SEQ ID NO:57)的结合亲合力,使用H183L072作为模板以在可变区上引入单个或多个突变来生成1,000多种双Fab变体。使用Expi293(Invitrogen)表达抗体,并通过蛋白质A纯化和随后的凝胶过滤(如果需要进行凝胶过滤的话)进行纯化。具有多个突变的22种代表性双Fab变体的序列列于表6和表8-1至表8-6中,并使用Biacore T200仪器(GE Healthcare)在25摄氏度和/或37摄氏度评估了对CD3和CD137的结合亲合力和动力学,如以下实施例1.2.2(表9)中所述。

[1019] 1.2.亲合力成熟变体的结合动力学信息

[1020] 1.2.1人CD3和CD137的表达和纯化

[1021] 人CD3复合物的 $\gamma$ 和 $\epsilon$ 亚基(人CD3 $\epsilon$ g接头)通过29聚体接头连接,并将Flag标签融合到 $\gamma$ 亚基的C末端(SEQ ID NO:102,表5和7)。使用FreeStyle293F细胞系(Thermo Fisher)瞬时表达该构建体。使用装有QHP树脂(GE Healthcare)的柱子浓缩表达人CD3 $\epsilon$ g接头的条件培养基,然后将其施加到FLAG标签亲和色谱。收集含有人CD3 $\epsilon$ g接头的级分,然后将其置于用1x D-PBS平衡的Superdex 200凝胶过滤柱(GE Healthcare)上。然后合并含有人CD3 $\epsilon$ g接头的级分。使用FreeStyle293F细胞系(Thermo Fisher)瞬时表达在其C末端带有六组氨酸(His标签)和生物素受体肽(BAP)的人CD137细胞外结构域(ECD)(SEQ ID NO:103,表5和7)。将表达人CD137 ECD的条件培养基施加到HisTrap HP柱(GE Healthcare),并用含咪唑(Nacalai)的缓冲液洗脱。收集含有人CD137 ECD的级分,然后将其置于用1x D-PBS平衡的Superdex 200凝胶过滤柱(GE Healthcare)上。然后合并含有人CD137 ECD的级分,并储存在-80℃下。

[1022] 1.2.2对人CD3和CD137的亲合力测量

[1023] 使用Biacore 8K仪器(GE Healthcare)在25摄氏度下评估双Fab抗体(双-Ig)对人CD3的结合亲合力。使用胺偶联试剂盒(GE Healthcare),将抗人Fc(GE Healthcare)固定在CM4传感器芯片的所有流通池上。将抗体捕获到抗Fc传感器表面上,然后将重组人CD3或CD137注射到流通池上。在包含20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05%吐温20、0.005%NaN<sub>3</sub>的ACES pH 7.4中制备所有抗体和分析物。每个周期用3M MgCl<sub>2</sub>再生传感器表面。通过使用Biacore透视评估软件2.0版(GE Healthcare)处理数据并将其拟合到1:1结合模型来确定结合亲合力。CD137结合亲合力测定在相同条件下进行,除了测定温度设置为37℃。双Fab抗体对重组人CD3和CD137的结合亲合力在表9-1和9-2中示出(在表格中,用于表达K<sub>on</sub>、K<sub>off</sub>和



KD值的表述E表示“10次方”，例如，3.54E+04=3.54\*10<sup>4</sup>）。如表9-1和9-2所示，与H183/L072相比，双Fab变体对CD3和CD137显示出不同的结合动力学。

[1024] (表5)

[1025] 表7的SEQ ID NO注释(用于表9中亲和力测量的人CD3和CD137抗原的SEQ ID NO)

[1026]	抗原名称	SEQ列表
	人CD3eg接头	102
	人CD137 ECD	103

[1027] (表6)

[1028]

表8-1-8-6的SEQ ID NO注释(包括CDR1、2和3的可变区的抗体命名和SEQ ID NO)

Dual/AE编号	Ab 名称	VHR 名称	VLR 名称	VHR	VHR_ CDR1	VHR_ CDR2	VHR_ CDR3	VLR	VLR_ CDR1	VLR_ CDR2	VLR_ CDR3
Parent	H183/L072	dBBDu183H	dBBDu072L	1	15	29	43	57	62	67	72
Dual/AE01	H0868L0581	dBBDu183H0868	dBBDu072L0581	2	16	30	44	58	63	68	73
Dual/AE08	H1550L0918	dBBDu183H1550	dBBDu072L0918	3	17	31	45	59	64	69	74
Dual/AE06	H1571L0581	dBBDu183H1571	dBBDu072L0581	4	18	32	46	58	63	68	73
Dual/AE17	H1610L0581	dBBDu183H1610	dBBDu072L0581	5	19	33	47	58	63	68	73
Dual/AE10	H1610L0939	dBBDu183H1610	dBBDu072L0939	5	19	33	47	60	65	70	75
Dual/AE05	H1643L0581	dBBDu183H1643	dBBDu072L0581	6	20	34	48	58	63	68	73
Dual/AE19	H1647L0581	dBBDu183H1647	dBBDu072L0581	8	22	36	50	58	63	68	73
Dual/AE20	H1649L0581	dBBDu183H1649	dBBDu072L0581	9	23	37	51	58	63	68	73
Dual/AE21	H1649L0943	dBBDu183H1649	dBBDu072L0943	9	23	37	51	61	66	71	76
Dual/AE22	H1651L0581	dBBDu183H1651	dBBDu072L0581	10	24	38	52	58	63	68	73
Dual/AE23	H1652L0943	dBBDu183H1652	dBBDu072L0943	11	25	39	53	61	66	71	76
Dual/AE09	H1673L0943	dBBDu183H1673	dBBDu072L0943	12	26	40	54	61	66	71	76
Dual/AE18	H1673L0581	dBBDu183H1673	dBBDu072L0581	12	26	40	54	58	63	68	73
Dual/AE14	H2591L0581	dBBDu183H2591	dBBDu072L0581	13	27	41	55	58	63	68	73
Dual/AE15	H2594L0581	dBBDu183H2594	dBBDu072L0581	14	28	42	56	58	63	68	73
Dual/AE16	H1644L0939	dBBDu183H1644	dBBDu072L0939	81	82	83	84	60	65	70	75
Dual/AE02	H0888L0581	dBBDu183H0888	dBBDu072L0581	101	114	127	140	58	63	68	73
Dual/AE24	H1595L0581	dBBDu183H1595	dBBDu072L0581	104	117	130	143	58	63	68	73
Dual/AE07	H1573L0581	dBBDu183H1573	dBBDu072L0581	106	119	132	145	58	63	68	73
Dual/AE25	H1579L0581	dBBDu183H1579	dBBDu072L0581	107	120	133	146	58	63	68	73
Dual/AE26	H1572L0581	dBBDu183H1572	dBBDu072L0581	110	123	136	149	58	63	68	73
Dual/AE27	H0883	dBBDu183H0883	dBBDu072L	113	126	139	152	57	62	67	72
	CD3ε	CD3εVH	CD3εVL	77				78			
	CD137	CD137VH	CD137VL	79				80			

[1029] (表7)



[1030]

抗原的全长氨基酸序列		
抗原名称	SEQ列表	氨基酸序列
人 CD3εg 接头	102	QDGNEEMGGITQTPYKVVISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDEHLSLKEFSELEQSG YVVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVGSADDAKDAKDDAKKDDAKKDGSGSIKGNHLLVKVYDYQEDGSVLL TCDAEAKNITWFKDGMIGFLTEDKKWNLGNAKDPGRMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMDYKDDDDK
人 CD137 ECD	103	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFTRKECSSTSNAECDCTPGFHCL GAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFCGTFNDQKRIGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLS PGASSVTPAPAREPGHSPQHSHHHHHGGGGGLNDIFEAQKIEWHE

[1031] (表8-1)

[1032]

抗体可变区的全长氨基酸序列，随后是如表6注释的CDR1、2和3区的氨基酸序列

SEQ 列表	SEQ 编号	氨基酸序列
dBBDu183H	1	QVQLVESGGGLVQPGRSRLRSCAASGFTFSNAWMHWRQAPGKGLEWVAQIKDKGNAYAAYYA PSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYCHYHYASTVLPAFGVDWVGQGTITVSS
dBBDu183H0868	2	QVQLVESGGGLVQPGRSRLRSCAASGFKFSNVMMHWRQAPGKGLEWVAQIKDKYNAYAAYYA PSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYCHYHYASTLLPAFGVDWVGQGTITVSS
dBBDu183H1550	3	QVQLVESGGGLVQPGRSRLRSCAASGFKFSNVMMHWRQAPGKGLEWVAQIKDKYNAYAAYYA PSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYCHYHYASTLLPAFGVDWVGQGTITVSS
dBBDu183H1571	4	QVQLVESGGGLVQPGRSRLRSCAASGFKFSNVFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDKYNAYATYYAP SVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYCHYHYASTLLPAFGVDWVGQGTITVSS
dBBDu183H1610	5	QVQLVESGGGLVQPGRSRLRSCAASGFKFSNVMMHWRQAPGKGLEWVAQIKDKWNAYAAYYA PSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYCHYHYASTLLPAEGIDWVGQGTITVSS
dBBDu183H1643	6	QVQLVESGGGLVQPGRSRLRSCAASGFKFSNVFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAAYYAP SVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYCHYHYASTLLPAEGVDWVGQGTITVSS
dBBDu183H1647	8	QVQLVESGGGLVQPGRSRLRSCAASGFKFSNTWFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDYNDYAAYYAP SVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYCHYHYASTLLPAEGVDWVGQGTITVSS
dBBDu183H1649	9	QVQLVESGGGLVQPGRSRLRSCAASGFKFSNVFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDKYNAYADYYAP SVKERFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYCHYHYASTLLPAEGVDWVGQGTITVSS
dBBDu183H1651	10	QVQLVESGGGLVQPGRSRLRSCAASGFKFSNVFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDKYNAYADYYAP SVEGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYCHYHYASTLLPAEGVDWVGQGTITVSS
dBBDu183H1652	11	QVQLVESGGGLVQPGRSRLRSCAASGFKFSNVFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYADYYAP SVEGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYCHYHYASTLLPAEGVDWVGQGTITVSS
dBBDu183H1673	12	QVQLVESGGGLVQPGRSRLRSCAASGFKFSNVFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDKWNAYADYYA PSVKERFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYCHYHYASTLLPAEGIDWVGQGTITVSS

[1033] (表8-2)

[1034]

表8-1续

SEQ 列表	SEQ 编号	氨基酸序列
dBBDu183H2591	13	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGKFNSVWFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAGYYHP SVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYCHYVHYAAASTLLPAEGVDWGGQTTVTVSS
dBBDu183H2594	14	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGKFNSVWFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAGYYHP SVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYCHYVHYAAASQLLPAEGVDWGGQTTVTVSS
dBBDu183H_VHR_CDR1	15	NAWMH
dBBDu183H0868_VHR_CDR1	16	NVWMH
dBBDu183H1550_VHR_CDR1	17	NVWMH
dBBDu183H1571_VHR_CDR1	18	NVWFH
dBBDu183H1610_VHR_CDR1	19	NVWMH
dBBDu183H1643_VHR_CDR1	20	NVWFH
dBBDu183H1647_VHR_CDR1	22	NTWFH
dBBDu183H1649_VHR_CDR1	23	NVWFH
dBBDu183H1651_VHR_CDR1	24	NVWFH
dBBDu183H1652_VHR_CDR1	25	NVWFH
dBBDu183H1673_VHR_CDR1	26	NVWFH
dBBDu183H2591_VHR_CDR1	27	NVWFH
dBBDu183H2594_VHR_CDR1	28	NVWFH
dBBDu183H_VHR_CDR2	29	QIKDKGNAYAAAYAPSVKG
dBBDu183H0868_VHR_CDR2	30	QIKDKYNAYAAAYAPSVKG
dBBDu183H1550_VHR_CDR2	31	QIKDKYNAYAAAYAPSVKG
dBBDu183H1571_VHR_CDR2	32	QIKDKYNAYATYYAPSVKG

[1035] (表8-3)

[1036]

表8-2续

SEQ列表	SEQ 编号	氨基酸序列
dBBDu183H1610_VHR_CDR2	33	QIKDKWNAYAAAYAPSVKG
dBBDu183H1643_VHR_CDR2	34	QIKDYNNAYAAAYAPSVKG
dBBDu183H1647_VHR_CDR2	36	QIKDYNDYAAAYAPSVKG
dBBDu183H1649_VHR_CDR2	37	QIKDKYNAYADYAPSVKE
dBBDu183H1651_VHR_CDR2	38	QIKDKYNAYADYAPSVEG
dBBDu183H1652_VHR_CDR2	39	QIKDYNNAYADYAPSVEG
dBBDu183H1673_VHR_CDR2	40	QIKDKWNAYADYAPSVKE
dBBDu183H2591_VHR_CDR2	41	QIKDYNNAYAGYHPSVKG
dBBDu183H2594_VHR_CDR2	42	QIKDYNNAYAGYHPSVKG
dBBDu183H_VHR_CDR3	43	VHYASASTVLPAFGVDA
dBBDu183H0868_VHR_CDR3	44	VHYASASTLLPAFGVDA
dBBDu183H1550_VHR_CDR3	45	IHYASASTLLPAFGVDA
dBBDu183H1571_VHR_CDR3	46	VHYASASTLLPAFGVDA
dBBDu183H1610_VHR_CDR3	47	IHYASASTLLPAEGIDA
dBBDu183H1643_VHR_CDR3	48	VHYASASTLLPAEGVDA
dBBDu183H1647_VHR_CDR3	50	VHYASASTLLPAEGVDA
dBBDu183H1649_VHR_CDR3	51	VHYASASTLLPAEGVDA
dBBDu183H1651_VHR_CDR3	52	VHYASASTLLPAEGVDA
dBBDu183H1652_VHR_CDR3	53	VHYASASTLLPAEGVDA
dBBDu183H1673_VHR_CDR3	54	IHYASASTLLPAEGIDA
dBBDu183H2591_VHR_CDR3	55	VHYAAASTLLPAEGVDA
dBBDu183H2594_VHR_CDR3	56	VHYAAASQLLPAEGVDA

[1037] (表8-4)

[1038]

表8-3续

SEQ列表	SEQ 编号	氨基酸序列
dBBDu072L	57	DIVMTQSPISLPVTPGEPASISCSQASQELVHMMNRNTYLHWYQQKPGQAPRLLIKVSNRFP
		RVSGSGGTDFTLKISRVEAEDGVVYCAQGTSPFTFGQGTKLEIK
dBBDu072L0581	58	DIVMTQSPISLPVTPGEPASISCSQSEVHMMNRNTYLHWYQQKPGQAPRLLIKVSNRFP
		RVSGSGGTDFTLKISRVEAEDGVVYCAQGTSPFTFGQGTKLEIK
dBBDu072L0918	59	DIVMTQSPISLPVTPGEPASISCSQSEVHMMNVVYLHWYQQKPGQAPRLLIKVSNRFP
		RVSGSGGTDFTLKISRVEAEDGVVYCAQGTSPFTFGQGTKLEIK
dBBDu072L0939	60	DIVMTQSPISLPVTPGEPASISCSQSEVHMMNRNTYLHWYQQKPGQAPRLLIKVSNRFP
		RVSGSGGTDFTLKISRVEAEDGVVYCAQGTSPFTFGQGTKLEIK
dBBDu072L0943	61	DIVMTQSPISLPVTPGEPASISCSQSEVHMMNRNTYLHWYQQKPGQAPRLLIKVSNRFP
		RVSGSGGTDFTLKISRVEAEDGVVYCAQGTSPFTFGQGTKLEIK
dBBDu072L_VLR_CDR1	62	QASQELVHMMNRNTYLH
dBBDu072L0581_VLR_CDR1	63	QPSQEVHMMNRNTYLH
dBBDu072L0918_VLR_CDR1	64	QPSQEVHMMNVVYLH
dBBDu072L0939_VLR_CDR1	65	QPSQEVHMMNRNTYLH
dBBDu072L0943_VLR_CDR1	66	QPSEEVHMMNRNTYLH
dBBDu072L_VLR_CDR2	67	KVSNRFP
dBBDu072L0581_VLR_CDR2	68	KVSNRFP
dBBDu072L0918_VLR_CDR2	69	KVSNRFP
dBBDu072L0939_VLR_CDR2	70	KVSNVFP
dBBDu072L0943_VLR_CDR2	71	KVSNLFP
dBBDu072L_VLR_CDR3	72	AQGTSPFT
dBBDu072L0581_VLR_CDR3	73	AQGTSPFT
dBBDu072L0918_VLR_CDR3	74	AQGTSPFT
dBBDu072L0939_VLR_CDR3	75	AQGTSPFT
dBBDu072L0943_VLR_CDR3	76	AQGTSPFT

[1039] (表8-5)

[1040]

表8-4续

SEQ列表	SEQ 编号	氨基酸序列
CD3 $\epsilon$ VH	77	QVQLVESGGGWQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMHWVRQAPGKGLEWVAQIKDKSQNYATYV AESVKGRFTISRADSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYCRYVHYAAGYGVDIWGQGTITVTVSS
CD3 $\epsilon$ VL	78	DIVMTQSPPLSLPTGEPASISCRSSQPLVHSNRNTYLHWYQQKPGQAPRLIYKVSNRFGVDPDRF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYCGGQTQVPTFGGQTKLEIK
CD137VH	79	QVQLQQWAGALLKPSETSLTCAVYGGSGFYWSWIRQSPEKGLEWIGEINHGGYVVTYNPSLESR VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYCARDYGPNGYDWFYDLWGRGTLVTVSS
CD137VL	80	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASNRATGIPARFSGSGSGT DFTLTISLEPEDFAVYVCCQQRSNWPPALTFGGGTKVEIK
dBBDu183H1644	81	QVQLVESGGGLVQPGRLSLRSCAASGFVFSNVWFHVVVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAAAYAP SVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYCHYVHYASASTLLPAEGVDWVGQGTITVTVSS
dBBDu183H1644_VHR_CDR1	82	NVWFH
dBBDu183H1644_VHR_CDR2	83	QIKDYNNAYAAAYAPSVKG
dBBDu183H1644_VHR_CDR3	84	VHYASASTLLPAEGVDA
dBBDu183H0888	101	QVQLVESGGGLVQPGRLSLRSCAASGFKFSNVWMHWVRQAPGKGLEWVAQIKDKWNAYAAAYA PSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYCHYIHYASASTLLPAFGIDAWGQGTITVTVSS
dBBDu183H1595	104	QVQLVESGGGLVQPGRLSLRSCAASGFKFSNTWMHWVRQAPGKGLEWVAQIKDKYNAYAAAYA PSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYCHYIHYASASTLLPAFGVDWVGQGTITVTVSS
dBBDu183H1573	106	QVQLVESGGGLVQPGRLSLRSCAASGFKFSNVWFHVVVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAAAYAP SVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYCHYVHYASASTLLPAFGVDWVGQGTITVTVSS
dBBDu183H1579	107	QVQLVESGGGLVQPGRLSLRSCAASGFKFSNVWFHVVVRQAPGKGLEWVAQIKDKYNAYAAAYAP SVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYCHYVHYASASTLLPAFGVDWVGQGTITVTVSS
dBBDu183H1572	110	QVQLVESGGGLVQPGRLSLRSCAASGFKFSNVWFHVVVRQAPGKGLEWVAQIKDKYNAYAAAYAP SVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYCHYVHYASASTLLPAEGVDWVGQGTITVTVSS
dBBDu183H0883	113	QVQLVESGGGLVQPGRLSLRSCAASGFTFSNAWMHWVRQAPGKGLEWVAQIKDKGNAYAAAYA PSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYCRYVHYASASTLLPAFGVDWVGQGTITVTVSS

[1041]

(表8-6)

[1042]

表8-5续

SEQ列表	SEQ 编号	氨基酸序列
dBBDu183H0888_VHR_CDR1	114	NVWMH
dBBDu183H1595_VHR_CDR1	117	NTWMH
dBBDu183H1573_VHR_CDR1	119	NVWFH
dBBDu183H1579_VHR_CDR1	120	HVWFH
dBBDu183H1572_VHR_CDR1	123	NVWFH
dBBDu183H0883_VHR_CDR1	126	NAWMH
dBBDu183H0888_VHR_CDR2	127	QIKDKWNAYAAYYAPSVKG
dBBDu183H1595_VHR_CDR2	130	QIKDKYNAYAAYYAPSVKG
dBBDu183H1573_VHR_CDR2	132	QIKDYNNAYAAYYAPSVKG
dBBDu183H1579_VHR_CDR2	133	QIKDKYNAYAAYYAPSVKG
dBBDu183H1572_VHR_CDR2	136	QIKDKYNAYAAYYAPSVKG
dBBDu183H0883_VHR_CDR2	139	QIKDKGNAYAAYYAPSVKG
dBBDu183H0888_VHR_CDR3	140	IHYASASTLLPAFGIDA
dBBDu183H1595_VHR_CDR3	143	IHYASASTLLPAFGVDA
dBBDu183H1573_VHR_CDR3	145	VHYASASTLLPAFGVDA
dBBDu183H1579_VHR_CDR3	146	VHYASASTLLPAFGVDA
dBBDu183H1572_VHR_CDR3	149	VHYASASTLLPAEGVDA
dBBDu183H0883_VHR_CDR3	152	VHYASASTLLPAFGVDA

[1043] (表9-1)

[1044]

双变体对人CD3和人CD137的结合动力学

抗体名称	CD3 (25°C)			CD137 (37°C)		
	ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	kd (s <sup>-1</sup> )	KD (M)	ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	kd (s <sup>-1</sup> )	KD (M)
H183L072	3.54E+04	1.20E-02	3.40E-07	3.47E+03	1.96E-02	5.66E-06
H0868L0581	1.23E+05	1.94E-02	1.57E-07	1.22E+04	1.36E-03	1.11E-07
H1550L0918	7.20E+04	3.16E-03	4.38E-08	1.09E+04	5.79E-03	5.30E-07
H1571L0581	1.42E+05	1.56E-02	1.10E-07	1.21E+04	1.05E-03	8.68E-08
H1610L0581	6.80E+04	1.42E-03	2.09E-08	1.07E+04	1.10E-03	1.03E-07
H1610L0939	5.00E+04	2.53E-03	5.07E-08	1.30E+04	8.01E-04	6.18E-08
H1643L0581	9.46E+04	2.51E-02	2.65E-07	1.23E+04	6.06E-04	4.94E-08
H1644L0939	5.58E+04	8.08E-02	1.45E-06	1.21E+04	4.44E-04	3.68E-08
H1647L0581	4.43E+04	1.01E-01	2.28E-06	9.98E+03	6.47E-04	6.48E-08
H1649L0581	7.50E+04	3.36E-02	4.49E-07	1.29E+04	5.53E-04	4.28E-08
H1649L0943	6.10E+04	4.81E-02	7.89E-07	1.43E+04	4.68E-04	3.28E-08
H1651L0581	7.18E+04	3.71E-02	5.17E-07	1.40E+04	6.03E-04	4.32E-08
H1652L0943	6.23E+04	6.36E-02	1.02E-06	1.29E+04	4.70E-04	3.64E-08
H1673L0581	7.96E+04	1.06E-03	1.33E-08	1.19E+04	9.60E-04	8.04E-08
H1673L0943	5.50E+04	1.16E-03	2.10E-08	1.22E+04	7.22E-04	5.91E-08
H2591L0581	1.02E+05	5.35E-02	5.25E-07	2.04E+04	7.42E-04	3.63E-08
H2594L0581	9.83E+04	5.84E-02	5.93E-07	2.09E+04	1.63E-03	7.81E-08

[1045] (表9-2)



[1046]

抗体名称	CD3 (25°C)			CD137 (37°C)		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
H0888L0581	9.50E+04	1.92E-03	2.02E-08	1.50E+04	3.11E-03	2.08E-07
H1595L0581	1.16E+05	6.58E-03	5.70E-08	1.38E+04	2.69E-03	1.95E-07
H1573L0581	1.21E+05	1.88E-02	1.56E-07	1.46E+04	1.03E-03	7.06E-08
H1579L0581	1.24E+05	3.40E-02	2.73E-07	1.48E+04	4.06E-03	2.75E-07
H1572L0581	9.77E+04	2.80E-02	2.86E-07	1.39E+04	7.22E-04	5.21E-08
H0883	9.07E+04	9.99E-03	1.10E-07	n.d.		

[1047] 实施例2

[1048] 双特异性和三特异性抗体序列和制备

[1049] 2.1. 双特异性或三特异性抗体 (1+1) 格式的设计和制备

[1050] 为了评估实施例1中制备的双Ig变体 (DualAE05等) 的功效,用识别肿瘤抗原DLL3的一个臂 (来自抗DLL3抗体D30841AE13) 和识别效应细胞主要是T细胞的另一个臂产生双特异性和三特异性抗体。根据Proc Natl Acad Sci U S A.2013Mar 26;110(13):5145-5150中描述的方法,使用Fab臂交换 (FAE) 生成DLL3/CD3ε (1+1) 和DLL3/DualAE05 (1+1) 抗体。(1+1) 格式如图1 (b) 所示。(1+1) 格式的双特异性和三特异性抗体中各Fv区的靶抗原及各结合结构域的命名规则见表10-2,并且SEQ ID NO见表12。

[1051] 2.2. 包含一个单价DLL3结合臂和两个双Fab的三价Ab (1+2) 格式的设计和制备

[1052] 实体瘤中的靶抗原表达可能高度异质, 抗原表达低的肿瘤区域可能无法提供CD3或CD137的充分交联。特别地, CD137受体簇对于有效的激动活性至关重要 (Trends Biochem Sci. 2002 Jan; 27 (1) 19-26)。为了改善由CD3结合和激活介导的细胞毒性, 设计了一种新的三价三特异性抗体格式, 即DLL3-DUAL/LINC, 1+2), 以增加对CD137分子的结合结构域的数量。具体而言, 新抗体格式是具有“1+2”格式的三价三特异性抗体, 其包含两个单价双Fab, 每个都能够与一个CD3或CD137结合但不能同时结合 (图1a的FvB和FvC), 以及一个单价DLL3结合臂 (图1a的FvA), 其中通过例如在两个双Fab各自的CH1结构域的191位引入半胱氨酸取代 (S191C, Kabat编号) (图1 (a) 和表10-1), 在两个双Fab之间引入/改造一个二硫键 (“LINC”)。不希望受理论束缚, 我们设想由于两个双Fab之间的空间位阻或更短距离, 这种工程化二硫键 (“LINC”) 将限制两个双Fab的抗原 (CD3或CD137) 结合方向为顺式抗原结合 (即结合相同细胞上的两个抗原), 从而以不依赖DLL3的方式通过防止两个双Fab介导的两个表达CD3/CD137的免疫细胞发生不良交联, 从而提高三特异性抗体的安全性。具体而言, 制备了DLL3-双/双抗体变体 (DLL3-双/LINC, 1+2), 其具有对DLL3的单价肿瘤抗原结合能力, 归因于两个双Fab的二价CD3和二价CD137结合特性 (图1 (a) 和表10-1)。还使用了CrossMab技术 (W02017055539)。Fc区是Fc  $\gamma$  R沉默和去糖基化的。三特异性抗体中各Fv区的靶抗原及各结合结构域的命名规则见表10-1, SEQ ID NO见表11-1和表12。至于阴性对照, 使用不与DLL3结合的Ctrl (VHR IC17HdK和VLR IC17L) 代替单价DLL3结合臂 (表12)。所有抗体通过在Expi293细胞 (Invitrogen) 中的瞬时表达而表达为三价形式并根据实施例1.1纯化。为了提高纯度, 通过穿过亲和柱进一步纯化抗体, 所述亲和柱特异性结合UnLINC形式 (即, 没有工程化二硫键的三价1+2抗体) 而不是LINC形式 (即, 具有工程化二硫键的三价1+2抗体) 的亲和柱而进一步纯化抗体。

[1053] 2.3. 双特异性抗体 (BiTE) 的产生

[1054] 为了比较三价Ab (DLL3-DUAL/LINC, 2+1) 与其他DLL3/CD3双特异性格式抗体的功效, 生成了一种半衰期延长的BiTE格式的抗体, 命名为DLL3CD3BiTE。DLL3CD3BiTE由两个单链可变片段 (ScFv) 组成, 其中一个单链可变片段针对肿瘤相关抗原DLL3并与针对CD3的一个单链可变片段融合 (图1 (c))。BiTE格式的双特异性抗体中各Fv区的靶抗原在表10-3示出, 并且SEQ ID NO在表11-2和表14示出。

[1055] (表10-1)

[1056]

抗体名称、靶向臂和Fc信息	格式	Fv A	接头	Fv B	Fv C	FC	Fc (株)	Fc (白)
三价抗体 (1+2 LINC) 抗体名称								
DLL3-DualAE05/ DualAE05-FF091	(1+2) Dual/LINC	Anti-DLL3	长	DualAE05	DualAE05	LALA, N297A, Act5 (M428L, N434A, Q438R, S440E)	SG1321kV11Fc	SG1321hV11Fc
Ctrl-DualAE05/ DualAE05-FF091	(1+2) Dual/LINC	Ctrl	长	DualAE05	DualAE05	LALA, N297A, Act5 (M428L, N434A, Q438R, S440E)	SG1321kV11Fc	SG1321hV11Fc
DLL3-DualAE05/ DualAE05-FF102	(1+2) Dual/LINC	Anti-DLL3	长	DualAE05	DualAE05	LALA, N297A, Act5 (M428L, N434A, Q438R, S440E)	SG1372kV11Fc	SG1372hV11Fc
DLL3-DualAE05/ DualAE05-FF110	(1+2) Dual/LINC	Anti-DLL3	中	DualAE05	DualAE05	LALA, N297A, Act5 (M428L, N434A, Q438R, S440E)	SG1372kV11Fc	SG1372hV11Fc
DLL3-DualAE05/ DualAE05-FF111	(1+2) Dual/LINC	Anti-DLL3	短	DualAE05	DualAE05	LALA, N297A, Act5 (M428L, N434A, Q438R, S440E)	SG1372kV11Fc	SG1372hV11Fc
DLL3-DualAE05/ DualAE05-FF056	(1+2) Dual/LINC	Anti-DLL3	长	DualAE05	DualAE05	L235R, S239K, N297A (M428L, N434A, Q438R, S440E)	SG1176kV11Fc	SG1176hV11Fc
DLL3-DualAE15/ DualAE15-FF119	(1+2) Dual/LINC	Anti-DLL3	长	DualAE15	DualAE15	LALA, N297A, Act5 (M428L, N434A, Q438R, S440E)	SG1321kV11Fc	SG1321hV11Fc
Ctrl-DualAE15/ DualAE15-FF119	(1+2) Dual/LINC	Ctrl	长	DualAE15	DualAE15	LALA, N297A, Act5 (M428L, N434A, Q438R, S440E)	SG1321kV11Fc	SG1321hV11Fc
DLL3-DualAE15/ DualAE15-FF120	(1+2) Dual/LINC	Anti-DLL3	长	DualAE15	DualAE15	LALA, N297A, Act5 (M428L, N434A, Q438R, S440E)	SG1372kV11Fc	SG1372hV11Fc
DLL3-DualAE15/ DualAE15-FF121	(1+2) Dual/LINC	Anti-DLL3	中	DualAE15	DualAE15	LALA, N297A, Act5 (M428L, N434A, Q438R, S440E)	SG1372kV11Fc	SG1372hV11Fc
DLL3-DualAE15/ DualAE15-FF122	(1+2) Dual/LINC	Anti-DLL3	短	DualAE15	DualAE15	LALA, N297A, Act5 (M428L, N434A, Q438R, S440E)	SG1372kV11Fc	SG1372hV11Fc
DLL3-DualAE15/ DualAE15-FF123	(1+2) Dual/LINC	Anti-DLL3	长	DualAE15	DualAE15	L235R, S239K, N297A (M428L, N434A, Q438R, S440E)	SG1176kV11Fc	SG1176hV11Fc
DLL3-DualAE16/ DualAE16-FF124	(1+2) Dual/LINC	Anti-DLL3	长	DualAE16	DualAE16	LALA, N297A, Act5 (M428L, N434A, Q438R, S440E)	SG1321kV11Fc	SG1321hV11Fc
Ctrl-DualAE16/ DualAE16-FF124	(1+2) Dual/LINC	Ctrl	长	DualAE16	DualAE16	LALA, N297A, Act5 (M428L, N434A, Q438R, S440E)	SG1321kV11Fc	SG1321hV11Fc
DLL3-DualAE16/ DualAE16-FF125	(1+2) Dual/LINC	Anti-DLL3	长	DualAE16	DualAE16	LALA, N297A, Act5 (M428L, N434A, Q438R, S440E)	SG1372kV11Fc	SG1372hV11Fc
DLL3-DualAE16/ DualAE16-FF126	(1+2) Dual/LINC	Anti-DLL3	中	DualAE16	DualAE16	LALA, N297A, Act5 (M428L, N434A, Q438R, S440E)	SG1372kV11Fc	SG1372hV11Fc
DLL3-DualAE16/ DualAE16-FF127	(1+2) Dual/LINC	Anti-DLL3	短	DualAE16	DualAE16	LALA, N297A, Act5 (M428L, N434A, Q438R, S440E)	SG1372kV11Fc	SG1372hV11Fc
DLL3-DualAE16/ DualAE16-FF128	(1+2) Dual/LINC	Anti-DLL3	长	DualAE16	DualAE16	L235R, S239K, N297A (M428L, N434A, Q438R, S440E)	SG1176kV11Fc	SG1176hV11Fc

[1057] (表10-2)

[1058] 双和三特异性抗体 (1+1)

[1059]

抗体名称	Fv A	Fv B
------	------	------

DLL3/CD3 $\epsilon$	DLL3	CD3 $\epsilon$
DLL3/DualAE05	DLL3	DualAE05

[1060] (表10-3)

[1061] 双特异性抗体 (BiTE)

抗体名称	Fv A	Fv B
DLL3CD3BiTE	Anti-DLL3	抗-CD3

[1063] (表11-1)

[1064] 抗体链编号和序列ID

变体名称	接头	链1	链2	链3	链4或链5
DLL3-DualAE05/DualAE05-FF091	249	201	206	208	214
Ctrl-DualAE05/DualAE05-FF091	249	202	207	208	214
DLL3-DualAE05/DualAE05-FF102	249	203	206	209	214
DLL3-DualAE05/DualAE05-FF110	248	204	206	209	214
DLL3-DualAE05/DualAE05-FF111	259	205	206	209	214
DLL3-DualAE05/DualAE05-FF056	249	216	206	229	214
DLL3-DualAE15/DualAE15-FF119	249	217	206	210	214
Ctrl-DualAE15/DualAE15-FF119	249	218	207	210	214
DLL3-DualAE15/DualAE15-FF120	249	219	206	211	214
DLL3-DualAE15/DualAE15-FF121	248	220	206	211	214
DLL3-DualAE15/DualAE15-FF122	259	221	206	211	214
DLL3-DualAE15/DualAE15-FF123	249	222	206	230	214
DLL3-DualAE16/DualAE16-FF124	249	223	206	212	215
Ctrl-DualAE16/DualAE16-FF124	249	224	207	212	215
DLL3-DualAE16/DualAE16-FF125	249	225	206	213	215
DLL3-DualAE16/DualAE16-FF126	248	226	206	213	215
DLL3-DualAE16/DualAE16-FF127	259	227	206	213	215
DLL3-DualAE16/DualAE16-FF128	249	228	206	231	215

[1066] (表11-2)

[1067] 抗体链编号和序列ID

抗体名称	链1
DLL3CD3BiTE	250

[1069] (表12)

[1070]

可变区及其CDR1-3序列ID

VR 名称	VHR 名称	VLR 名称	VHR	VHR_ CDR1	VHR_ CDR2	VHR_ CDR3	VLR	VLR_ CDR1	VLR_ CDR2	VLR_ CDR3
DLL3 (D30841AE13)	D08410053H0118	D084101L0000	232	233	234	235	236	237	238	239
DualAE05	dBBDu183H1643	dBBDu072L0581	6	20	34	48	58	63	68	73
DualAE15	dBBDu183H2594	dBBDu072L0581	14	28	42	56	58	63	68	73
DualAE16	dBBDu183H1644	dBBDu072L0939	81	82	83	84	60	65	70	75
CD3ε	CD3εVH	CD3εVL	251	252	253	254	255	256	257	258
对照	IC17HdK	IC17L	240	241	242	243	244	245	246	247

[1071] (表13)

[1072] 表14中的Fc区的序列ID N0

[1073]

Fc名称	SED ID NO
SG1321kV11Fc	99
SG1372kV11Fc	100
SG1176kV11Fc	108
SG1321hV11Fc	109
SG1372hV11Fc	111
SG1176hV11Fc	112

[1074] (表14-1)

序列名称	SEQ ID NO	氨基酸序列
		DIQLTQSPFSLASVGDRVTITCQSTESVYGSDWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGGSDFTLTINSLEAEDAATY YCQGYSGYIYAFGGGKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGKTITCNDVHKPSNTKVDKRVPEKSCGGGGGSGGQQLVESGGGLVQPGRSRLSCAASGFKFSNVWFH WVRQAPGKGLEWVAQIKDYNYAYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYYCHVHYASASTLLPAEGVDWAG QGTTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSCSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKHTHTCPPCPAEEAGGSPVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQEGNVFSCSVLHEALHAHYTRKELSLSLSP 201
		DIQMTQSSSFSLGDRVTITCKASEDIYNRLAWYQQKPGNAPRLISGATSLETGVPSPRFSGSGGKDYTLTSITQTEDVATYYC QQYWTPTFTGGGKLEVKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS SVVTVPSSSLGKTITCNDVHKPSNTKVDKRVPEKSCGGGGGSGGQQLVESGGGLVQPGRSRLSCAASGFKFSNVWFH VRQAPGKLEWVAQIKDYNYAYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYYCHVHYASASTLLPAEGVDWAGQ GTTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSCSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKHTHTCPPCPAEEAGGSPVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQEGNVFSCSVLHEALHAHYTRKELSLSLSP 202
		DIQLTQSPFSLASVGDRVTITCQSTESVYGSDWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGGSDFTLTINSLEAEDAATY YCQGYSGYIYAFGGGKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGKTITCNDVHKPSNTKVDKRVPEKSCGGGGGSGGQQLVESGGGLVQPGRSRLSCAASGFKFSNVWFH WVRQAPGKGLEWVAQIKDYNYAYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYYCHVHYASASTLLPAEGVDWAG QGTTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSCSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKHTHTCPPCPAEEAGGSPVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQEGNVFSCSVLHEALHAHYTRKELSLSLSP 203

[1075]



[1079]

序列名称	SEQ ID NO	氨基酸序列
		QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFHWRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAAAYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQ MNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDWGGQTTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVEDYFPEPVTVS NSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSCSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDEKVEPKSCDKHTHTCPAPAEEAAGGSPVFLFPP KPKDTLMISRTPETVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALP APIETISKAKGQPREPQVCTLPISRDELTKNQVSLSCAVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR 209WQEGNVFSCSVLHEALHAHYTRKELSLS
		QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFHWRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAAAYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQ MNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDWGGQTTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVEDYFPEPVTVS NSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSCSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDEKVEPKSCDKHTHTCPAPAEEAAGGSPVFLFPP KPKDTLMISRTPETVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALP APIETISKAKGQPREPQVCTLPISRDELTKNQVSLSCAVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR 210WQEGNVFSCSVLHEALHAHYTRKELSLS
		QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFHWRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAAAYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQ MNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDWGGQTTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVEDYFPEPVTVS NSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSCSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDEKVEPKSCDKHTHTCPAPAEEAAGGSPVFLFPP KPKDTLMISRTPETVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALP APIETISKAKGQPREPQVCTLPISRDELTKNQVSLSCAVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR 211WQEGNVFSCSVLHEALHAHYTRKELSLS
		QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFHWRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAAAYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQ MNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDWGGQTTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVEDYFPEPVTVS NSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSCSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDEKVEPKSCDKHTHTCPAPAEEAAGGSPVFLFPP KPKDTLMISRTPETVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALP APIETISKAKGQPREPQVCTLPISRDELTKNQVSLSCAVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR 212WQEGNVFSCSVLHEALHAHYTRKELSLS
		QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFHWRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAAAYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQ MNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDWGGQTTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVEDYFPEPVTVS NSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSCSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDEKVEPKSCDKHTHTCPAPAEEAAGGSPVFLFPP KPKDTLMISRTPETVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALP APIETISKAKGQPREPQVCTLPISRDELTKNQVSLSCAVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR 213WQEGNVFSCSVLHEALHAHYTRKELSLS

[1080] (表14-4)



[1081]

序列名称	SEQ ID NO	氨基酸序列
		DIVMTQSPFLSLPVTGEPASISQPSQEVVHMNRNTYLHWYQQKPGQAPRLIYKVSNRFPQVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQGTSHPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSK
	214	ADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
		DIVMTQSPFLSLPVTGEPASISQPSQEVVHMNRNTYLHWYQQKPGQAPRLIYKVSNVFPGVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQGTSHPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSK
	215	ADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
		DIQLTQSPSFLSASVGDRTVITCQSTESVYGSDWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEADAATYYCQGYYSGYIAFGGGGTKEIKSSASTKGPVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTTKTYTCNVVDHHPKPSNTKVDKREPKSCGGGGGGGGGQVQLVESGGGLVQPGRLSLRSCAASGKFNSVWFHVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAAAYYAPSVKGRFTISRDDSKNISIYQMNSLKTEDTAVYCHYVHYAASQLLPAEGVDAGWGQGTITVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVEDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSCSLGTQTYICNVNHPKSNKTVDEKVEPKSCDKTHTCTPPCPAPELGGPKVFLPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQE
	216	GNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSP
		DIQLTQSPSFLSASVGDRTVITCQSTESVYGSDWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEADAATYYCQGYYSGYIAFGGGGTKEIKSSASTKGPVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTTKTYTCNVVDHHPKPSNTKVDKREPKSCGGGGGGGGGQVQLVESGGGLVQPGRLSLRSCAASGKFNSVWFHVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAGYYHPYKGRFTISRDDSKNISIYQMNSLKTEDTAVYCHYVHYAASQLLPAEGVDAGWGQGTITVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVEDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSCSLGTQTYICNVNHPKSNKTVDEKVEPKSCDKTHTCTPPCPAPEAAGGPSVFLPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQE
	217	GNVFSCSVLHEALHAHYTRKELSLSLSP
		DIQMTQSSSFVSILGDRVTITCKASEDIYNRLAWYQQKPGNAPRLIISGATSLETGVPSRFSGSGSGKDYTLTSITSLQTEDVATYYCQYQYWSTPYTFGGGTKELVKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTTKTYTCNVVDHHPKPSNTKVDKREPKSCGGGGGGGGGQVQLVESGGGLVQPGRLSLRSCAASGKFNSVWFHVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAGYYHPYKGRFTISRDDSKNISIYQMNSLKTEDTAVYCHYVHYAASQLLPAEGVDAGWGQGTITVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVEDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSCSLGTQTYICNVNHPKSNKTVDEKVEPKSCDKTHTCTPPCPAPEAAGGPSVFLPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQE
	218	GNVFSCSVLHEALHAHYTRKELSLSLSP

[1082] (表14-5)

[1083]

序列名称	SEQ ID NO	氨基酸序列
		DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQSTESVYGSDWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGGTDFTLTINSLEAEDAATY YCOGYYSGYIAFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGKTITTCNVDPKPSNTKVDKRVPEKSCGGGSGGQVQLVESGGGLVQPGRSRLRSCAASGKFSNVWFH WVRQAPGKLEWVAQIKDYNNAYAGYYHPSVKGRFTISRDDSKNSIYQMNSLKTEDTAVYCHYVHYAAASQLLPAEGVD GQGTITVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSCSLG TQTYICNVNHHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWVYV DGEVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVLHEALHAHYTRKELSLSLSP
	219	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQSTESVYGSDWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGGTDFTLTINSLEAEDAATY YCOGYYSGYIAFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGKTITTCNVDPKPSNTKVDKRVPEKSCGGGSGGQVQLVESGGGLVQPGRSRLRSCAASGKFSNVWFHWRQA PGKLEWVAQIKDYNNAYAGYYHPSVKGRFTISRDDSKNSIYQMNSLKTEDTAVYCHYVHYAAASQLLPAEGVDAGGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSCSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWVVDGVEVH NAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVLHEALHAHYTRKELSLSLSP
	220	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQSTESVYGSDWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGGTDFTLTINSLEAEDAATY YCOGYYSGYIAFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGKTITTCNVDPKPSNTKVDKRVPEKSCQVQLVESGGGLVQPGRSRLRSCAASGKFSNVWFHWRQAPGKGL EWVAQIKDYNNAYAGYYHPSVKGRFTISRDDSKNSIYQMNSLKTEDTAVYCHYVHYAAASQLLPAEGVDAGGQGTITVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSCSLGTQTYICNVNHHK PSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWVVDGVEVHNAKTK PREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFPSPDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVLHEALHAHYTRKELSLSLSP
	221	

[1084] (表14-6)

[1085]

序列名称	SEQ ID NO	氨基酸序列
		DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQSTESVYGSDWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGGTDFLTINSLEAEDAATY YCQGYSGYIYAFGGGKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVKPKSCGGGGGSGGQVQLVESGGGLVQPGRLSLRSCAASGFKFSNVWFH WVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAGYYPSVKGRFTISRDDSKNSIYQMNSLKTEDTAVYCHYVHYAASQLLPAEGVD GQGTITVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVEDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSVTVPSCSLG TQYICNVNHHKPSNTKVDKRVKPKSCGGGGGSGGQVQLVESGGGLVQPGRLSLRSCAASGFKFSNVWFH DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGRVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
	222	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQSTESVYGSDWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGGTDFLTINSLEAEDAATY YCQGYSGYIYAFGGGKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVKPKSCGGGGGSGGQVQLVESGGGLVQPGRLSLRSCAASGFKFSNVWFH WVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAGYYPSVKGRFTISRDDSKNSIYQMNSLKTEDTAVYCHYVHYAASQLLPAEGVD GQGTITVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVEDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSVTVPSCSLG TQYICNVNHHKPSNTKVDKRVKPKSCGGGGGSGGQVQLVESGGGLVQPGRLSLRSCAASGFKFSNVWFH DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGRVFCSSVLHEALHAHYTRKELSLSLSP
	223	DIQMTQSSSFVSGLGDRVTITCKASEDIYNRLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLVETGVPSPRFSGSGGKDYTLTSLQTEDVATYYC QQYWSPTPTFGGGTKLEVKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVKPKSCGGGGGSGGQVQLVESGGGLVQPGRLSLRSCAASGFKFSNVWFH WVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAGYYPSVKGRFTISRDDSKNSIYQMNSLKTEDTAVYCHYVHYAASQLLPAEGVD GQGTITVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVEDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSVTVPSCSLG TQYICNVNHHKPSNTKVDKRVKPKSCGGGGGSGGQVQLVESGGGLVQPGRLSLRSCAASGFKFSNVWFH DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGRVFCSSVLHEALHAHYTRKELSLSLSP
	224	DIQMTQSSSFVSGLGDRVTITCKASEDIYNRLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLVETGVPSPRFSGSGGKDYTLTSLQTEDVATYYC QQYWSPTPTFGGGTKLEVKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVKPKSCGGGGGSGGQVQLVESGGGLVQPGRLSLRSCAASGFKFSNVWFH WVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAGYYPSVKGRFTISRDDSKNSIYQMNSLKTEDTAVYCHYVHYAASQLLPAEGVD GQGTITVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVEDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSVTVPSCSLG TQYICNVNHHKPSNTKVDKRVKPKSCGGGGGSGGQVQLVESGGGLVQPGRLSLRSCAASGFKFSNVWFH DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGRVFCSSVLHEALHAHYTRKELSLSLSP

[1086] (表14-7)

[1087]

序列名称	SEQ ID NO	氨基酸序列
		DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQSTESVYGSDWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGGTDFTLTINSLEAEDAATY YCOGYYSGYIAFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGKTITTCNVDPKPSNTKVDKRVKPKSCGGGSGGQVQLVESGGGLVQPGSRSLRSCAASGFVSNVWFH WVRQAPGKGLWVAQIKDYNNAYAYAPSVKGRFTISRDDSKNIIYQMNSLKTEDTAVYCHYVHYASASTLLPAEGVDWVG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVTPSCSLGT QTYICNVNHHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWVVD GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVLHEALHAHYTRKELSLSLSP
	225	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQSTESVYGSDWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGGTDFTLTINSLEAEDAATY YCOGYYSGYIAFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGKTITTCNVDPKPSNTKVDKRVKPKSCGGGSGGQVQLVESGGGLVQPGSRSLRSCAASGFVSNVWFHWRQA PGKGLWVAQIKDYNNAYAYAPSVKGRFTISRDDSKNIIYQMNSLKTEDTAVYCHYVHYASASTLLPAEGVDWVGQGTITVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVTPSCSLGTQTYICNV NHHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWVVDGVEVHN AKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVLHEALHAHYTRKELSLSLSP
	226	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQSTESVYGSDWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGGTDFTLTINSLEAEDAATY YCOGYYSGYIAFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGKTITTCNVDPKPSNTKVDKRVKPKSCGGGSGGQVQLVESGGGLVQPGSRSLRSCAASGFVSNVWFHWRQAPGKGL EWVAQIKDYNNAYAYAPSVKGRFTISRDDSKNIIYQMNSLKTEDTAVYCHYVHYASASTLLPAEGVDWVGQGTITTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVTPSCSLGTQTYICNVNHHK SNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWVVDGVEVHNAKTKP REEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI 227AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVLHEALHAHYTRKELSLSLSP

[1088] (表14-8)

[1089]

序列名称	SEQ ID NO	氨基酸序列
		DIQLTQSPSFLSASVGRVTITCQSTESVYGSVDWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGGTDFTLTINSLEAEDAATY YCQGYSGYIYAFGGGKVEIKSSASTKGPSVFLPAPSSRSTSESTAAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVWTVPSSSLGKTYTCNVDRHDKPSNTKVDKRVKPKSCGGGGGSGGQVQLVESGGGLVQPGSRSLRSCAASGFVFSNVWFH WVRQAPGKGLEWVAQIKDYNYAYAAAPSVKGRFTISRDDSKNLSYLTQVQVQLVSGDGLVQPGSRSLRSCAASGFVFSNVWFH QGTWTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVWTVPSCSLGT QTYICNVNHHKPSNTKVDEKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLRGPKVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSL WCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFLYSLKLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP
	228	QVQLVESGGGLVQPGSRSLRSCAASGFVFSNVWFHWRQAPGKGLEWVAQIKDYNYAYAAAPSVKGRFTISRDDSKNLSYLTQ MNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDWAGQGTTTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVWTVPSCSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDEKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLRGPKVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFLYSLKLTVDKSR WQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP
	229	QVQLVESGGGLVQPGSRSLRSCAASGFVFSNVWFHWRQAPGKGLEWVAQIKDYNYAYAGYYHPSVKGRFTISRDDSKNLSYLTQ MNSLKTEDTAVYYCHYVHYAAASQLLPAEGVDWAGQGTTTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVWTVPSCSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDEKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLRGPKVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFLYSLKLTVDKSR WQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP
	230	QVQLVESGGGLVQPGSRSLRSCAASGFVFSNVWFHWRQAPGKGLEWVAQIKDYNYAYAAAPSVKGRFTISRDDSKNLSYLTQ MNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDWAGQGTTTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVWTVPSCSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDEKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLRGPKVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFLYSLKLTVDKSR WQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP
	231	QVQLVESGGGLVQPGSRSLRSCAASGFVFSNVWFHWRQAPGKGLEWVAQIKDYNYAYAAAPSVKGRFTISRDDSKNLSYLTQ MNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDWAGQGTTTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVWTVPSCSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDEKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLRGPKVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFLYSLKLTVDKSR WQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP

[1090] (表14-9)

[1091]

序列名称	SEQ ID NO	氨基酸序列
D08410053H0118	232	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSSSYDMGWVRQAPGQGLEWMGTIYTGDYSTDYASWAKGRVTI
D08410053H0118_VHR_CDR1	233	SVDRSKNQFSKLSSVTAADTAVYCARHTGYGYFGLWGQGLTVTVSS
D08410053H0118_VHR_CDR2	234	SSYDMG
D08410053H0118_VHR_CDR3	235	TIYTGDYSTDYASWAKG
D084101L0000	236	HTGYGYFGL
D084101L0000_VLR_CDR1	237	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQSTESVYGSDWLSWYQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGSGTDFT
D084101L0000_VLR_CDR2	238	LTINSLEAEDAATYQCQGYSGYIYAFGGGTKVEIK
D084101L0000_VLR_CDR3	239	QSTESVYGSDWLS
IC17HdK	240	QASNLEI
IC17HdK_VHR_CDR1	241	QGYSGYIYA
IC17HdK_VHR_CDR2	242	QVQLQQSGPQLVRPGASVKISKASGYSTSYWMHWVNRQPGQGLEWIGMIDPSYSETRLNQKFKDKATL
IC17HdK_VHR_CDR3	243	TVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYCYALYGNFYFDYWGGQTTLTVSS
IC17L	244	SYWMH
IC17L_VLR_CDR1	245	MIDPSYSETRLNQKFKD
IC17L_VLR_CDR2	246	YGNFYDY
IC17L_VLR_CDR3	247	DIQMTQSSSFVSLGDRVTITCKASEDIYNRLAWYQQKPGNAPRLISGATSLETGVPSPRFSGSGSGKDYTL
	248	TSLQTEDVATYCYCQYVWSTPYTFGGGTKLEVK
	249	KASEDIYNRLA
		GATSLET
		QQYVWSTPYT
		VEPKSCGGGGS
		VEPKSCGGGGGGGS

[1092] (表14-10)





[1095]

序列名称	SEQ ID NO	氨基酸序列
SG1321kV11Fc	99	CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVLHEALHAHYTRKELSLS
SG1372kV11Fc	100	CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVLHEALHAHYTRKELSLS
SG1176kV11Fc	108P	CPPCPAPELRGGPKVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
SG1321hV11Fc	109	CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVLHEALHAHYTRKELSLS
SG1372hV11Fc	111P	CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVLHEALHAHYTRKELSLS
SG1176hV11Fc	112	CPPCPAPELRGGPKVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPREEMTKNQVSLSCAVKGF FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMHEALHNHYTQKSLSLS

- [1096] 实施例3
- [1097] DLL3双LINC抗体对DLL3表达细胞系的体外功效
- [1098] 3.1.使用抗DLL3/双-Linc (1+2) 抗体、双 (1+1) 抗体、DLL3CD3BiTE和DLL3/CD3ε (1+
- 108



### 1) 抗体测量TDCC活性

[1099] 通过在PBMC存在下使用xCELLigence实时细胞分析仪(Roche Diagnostics)观察肿瘤细胞生长抑制率来评估细胞毒活性。图2显示了根据表10-13制备的抗DLL3/双Linc抗体(DLL3-DualAE05/DualAE05, 1+2)、双(1+1)抗体(DLL3/双AE05)、DLL3CD3BiTE和DLL3/CD3 $\epsilon$ (1+1)抗体的TDCC活性。SK-MEL30细胞系用作靶细胞。将靶细胞从培养皿中脱落,通过将细胞调整为 $5 \times 10^3$ 个细胞/孔,将细胞以100 $\mu$ L/孔的等分试样接种到E-plate 96(Roche Diagnostics)中,并使用xCELLigence实时细胞分析仪启动细胞生长的测量。24小时后,移出板,并将以每种浓度(从10nM开始的系列稀释液,即0.25、1.25、2.5、5和10nM)制备的50 $\mu$ L相应抗体添加到板中。在室温下反应15分钟后,以效应:靶标比例为2(即 $1 \times 10^4$ 个细胞/孔)加入50 $\mu$ L新鲜人PBMC溶液,并使用xCELLigence实时细胞分析仪重新测量细胞生长。该反应在37 $^{\circ}$ C下在5%二氧化碳气体的条件下进行。由于CD137信号传导增强了T细胞存活并防止了活化诱导的细胞死亡,所以以低E:T比进行TDCC测定。可能需要延长的时间以便观察CD137活化产生的优异细胞毒性。这样,在添加PBMC后约68小时,使用以下等式确定细胞生长抑制(CGI)率(%)。在计算中使用的由xCELLigence实时细胞分析仪获得的细胞指数值是归一化的值,其中将抗体添加前即时时间点的细胞指数值定义为1。

[1100] 细胞生长抑制率(%) =  $(A-B) \times 100 / (A-1)$

[1101] A表示未添加抗体(仅包含靶细胞和人PBMC)的孔中的细胞指数值的平均值,B表示靶标孔的细胞指数值的平均值。以一式两份进行检查。

[1102] 如图2a)所示,抗DLL3/双Linc抗体(DLL3-DualAE05/DualAE05, 1+2)显示出比双(1+1)抗体(DLL3/DualAE05)和DLL3/CD3 $\epsilon$ (1+1)抗体更强的TDCC活性。这表明双Linc分子格式有助于改善细胞毒性。此外,在这些抗体浓度下,抗DLL3/双Linc抗体的TDCC活性与DLL3/CD3BiTE是可比的。

### [1103] 3.2. 评估接头长度对细胞毒性的影响

[1104] 为了提高对肿瘤细胞的细胞毒性,肿瘤细胞和效应细胞之间更紧密的接近和更严格的结合将是至关重要的。这意味着较短的距离可能有助于使T细胞和肿瘤细胞靠近,这可能有助于TDCC。因此,我们生成了具有不同长度接头的三种抗DLL3/双Linc抗体变体。DLL3-DualAE05/DualAE05-FF110(中间接头)和DLL3-DualAE05/DualAE05-FF111(短接头)的接头长度比DLL3-DualAE05/DualAE05-FF091(长接头)的接头长度短(以下这些变体分别缩写为DLL3-AE05/AE05-FF110、DLL3-AE05/AE05-FF111和DLL3-AE05/AE05-FF091)。为了评估接头长度对细胞毒性的影响,如实施例3.1中所述,使用0.2、1和5nM的抗体进行TDCC测量。

[1105] 如图2b)所示,DLL3-AE05/AE05-FF110(中间接头)和DLL3-AE05/AE05-FF111(短接头)在0.2nM表现出比DLL3-AE05/AE05-FF091(长接头)更强的TDCC活性。DLL3-AE05/AE05-FF110(中间接头)显示出最强的TDCC活性。这些结果表明接头长度对TDCC活性很重要,并且中等长度接头最适合体外TDCC活性。

### [1106] 实施例4

[1107] 评估与DLL3CD3BiTE相比,DLL3-DualAE05/DualAE05-FF091三特异性抗体的体内功效。

[1108] 在人小细胞肺癌NCI-H1436癌症模型中测试实施例2中制备的DLL3-DualAE05/DualAE05-FF091抗体和DLL3CD3BiTE的抗肿瘤活性。NCI-H1436细胞被皮下移植到NOG人源

化小鼠中。NOG雌性小鼠购自In-Vivo Science。对于人源化,对小鼠进行亚致死性辐射,然后在1天后注射100,000个人脐带血细胞(ALLCELLS)。人源化后,将NCI-H1436 ( $5 \times 10^6$  细胞)与Matrigel基础膜基质(Corning)混合并移植到人源化NOG小鼠的右侧。将移植的当天定义为第0天。在第11天,根据肿瘤体积和体重对小鼠进行随机分组。第二天,对小鼠静脉注射运载体(含有0.05%吐温的PBS)、6.5mg/kg DLL3-DualAE05/DualAE05-FF091和3.5mg/kg DLL3CD3BiTE中的任一种。

[1109] 对于T细胞浸润分析,在抗体施用后的指定时间点收获小鼠负荷的异种移植肿瘤。将肿瘤称重,根据制造商的方案使用人肿瘤溶解试剂盒(Miltenyi)将其切碎,并在解离后添加CountBright绝对计数珠(ThermoFisher Scientific)。使用LSRFortessa X-20(BD)评估肿瘤内CD8+T细胞数量。

[1110] 对于T细胞耗竭分析,在抗体施用后第7天收获小鼠上负荷的异种移植肿瘤。根据制造商的方案,用人肿瘤溶解试剂盒(Miltenyi)切碎肿瘤,并评估肿瘤内T细胞的T细胞耗竭标志物Tim-3、PD-1和Lag-3的表达。

[1111] 结果,DLL3-DualAE05/DualAE05-FF091显示出比DLL3CD3BiTE更强的功效和更高的T细胞浸润(图3和图4)。此外,DLL3-DualAE05/DualAE05-FF091处理组的T细胞具有更低的PD-1、Tim-3和LAG3表达(图5),表明DLL3-DualAE05/DualAE05-FF091诱导较少的T细胞耗竭。

[1112] 实施例5

[1113] 抗-DLL3-双-LINC抗体对非SCLC细胞系的体外功效

[1114] 通过LDH细胞毒性检测试剂盒(Takara Bio)评估抗DLL3-双-抗体(DLL3-DualAE05/DualAE05-FF110)和非靶向对照双-LINC抗体(Ctrl-DualAE05/DualAE05-FF110)对非SCLC细胞系的体外细胞毒性。使用NB-1细胞系(成神经细胞瘤,JCRB细胞库IF050295)和QGP-1细胞系(胰岛细胞癌,JCRB细胞库JCRB0183)作为靶细胞。将靶细胞以 $1 \times 10^4$  细胞/孔接种在96孔培养板中,并加入以每种浓度制备的抗体(从10nM到0.00064nM的5倍连续稀释液)。此后,加入 $2 \times 10^5$  个人PBMC细胞并在37℃下孵育。24小时后,用Triton-X 100裂解高对照样品,并从所有孔中收集50微升上清液。根据制造商的方案计算细胞毒性(%)。如图7所示,抗-DLL3-双-LINC抗体(DLL3-DualAE05/DualAE05-FF110)显示出对非SCLC细胞系(包括NB-1细胞系和QGP-1细胞系)的体外细胞杀伤活性。

[1115] 实施例6

[1116] 抗-DLL3-双-LINC抗体与化疗试剂组合的体内功效

[1117] 在DMS3小鼠肺癌模型中评估了使用抗-DLL3-双-LINC抗体(DLL3-DualAE05/DualAE05-FF114)和铂试剂的组合治疗的抗肿瘤功效。NOG雌性小鼠购自In-Vivo Science。为了人源化,对小鼠进行亚致死照射,然后在1天后注射100000个人脐带血细胞(LONZA)。将DMS53细胞(ATCC CRL-2062)与Matrigel基底膜基质(Corning)混合,并接种在人源化NOG小鼠的右侧。在肿瘤体积约为 $150 \text{ mm}^3$ 的第9天,根据肿瘤体积和体重将小鼠随机分组,并静脉内(i.v.)注射运载体(含0.05%吐温的PBS)、1.3mg/kg抗DLL3-双-LINC抗体(DLL3-DualAE05/DualAE05-FF114)、7.5mg/kg顺铂(CDDP)和40mg/kg卡铂(CBDCA)作为单一疗法或组合使用。因此,抗DLL3-双-LINC抗体DLL3-DualAE05/DualAE05-FF114和铂试剂的组合显示出比单独使用CDDP、CBDCA或抗DLL3-双-LINC抗体的单一疗法显著更高的功效(图8)。

[1118] 实施例7

[1119] 抗DLL3-双-LINC抗体对携带NCI-H1436的人源化模型的体内功效

[1120] 在NCI-H1436小细胞肺癌模型中评估了抗DLL3-双-LINC抗体DLL3-DualAE05/DualAE05-FF114的抗肿瘤功效。NOG雌性小鼠购自In-Vivo Science。为了人源化,对小鼠进行亚致死照射,然后在1天后注射100000个人脐带血细胞(LONZA)。将NCI-H1436细胞(ATCC CRL-5871)与Matrigel基底膜基质(Corning)混合,并接种在人源化NOG小鼠的右侧。在肿瘤体积约为150mm<sup>3</sup>的第16天,根据肿瘤体积和体重将小鼠随机分组,并静脉注射运载体(含有0.05%吐温的PBS)、6.5mg/kg抗DLL3-双-LINC抗体(DLL3-DualAE05/DualAE05-FF114)和3.5mg/kg DLL3CD3BiTE。抗DLL3-双-LINC抗体DLL3-DualAE05/DualAE05-FF114和DLL3CD3BiTE以单剂量或每周(QW)施用。结果,在两种治疗方案中,抗DLL3-双-LINC抗体DLL3-DualAE05/DualAE05-FF114显示出比DLL3CD3BiTE更强的功效(图9)。

[1121] 实施例8

[1122] 抗DLL3-双-LINC抗体对其他非SCLC细胞系的体外疗效

[1123] 如实施例5所述评估抗DLL3-双-LINC抗体(DLL3-DualAE05/DualAE05-FF110或DLL3-DualAE05/DualAE05-FF114)和非靶向对照双LINC抗体对其他非SCLC细胞系的体外细胞毒性。要评估的非SCLC细胞系的例子是胰腺神经内分泌肿瘤(PNET)、小细胞型NEC(SCNEC)、大细胞型NEC(LCNEC)、小细胞肺癌(SCLC)、大细胞神经内分泌肺癌、神经内分泌前列腺癌(NEPC)、默克尔细胞癌、小细胞膀胱癌、胃肠道神经内分泌癌、甲状腺髓样癌(MTC)、胃肠胰神经内分泌癌(GEP NEC)、成神经细胞瘤、神经胶质瘤或胶质母细胞瘤(GBM)、黑色素瘤和甲状腺髓样癌。

[1124] 实施例9

[1125] 抗DLL3-双-LINC抗体与其他化疗试剂或检查点抑制剂组合的体内和体外功效

[1126] 使用实施例5中所述的方法评估抗DLL3-双-LINC抗体(DLL3-DualAE05/DualAE05-FF110或DLL3-DualAE05/DualAE05-FF114)与其他化学治疗试剂或检查点抑制剂(抗PD-L1抗体或抗PD1抗体)组合对SCLC细胞系或其他非SCLC细胞系的体外细胞毒性。

[1127] 如实施例6所述,在DMS53小细胞肺癌模型和其他非SCLC癌症模型中评估抗DLL3-双-LINC抗体(DLL3-DualAE05/DualAE05-FF110或DLL3-DualAE05/DualAE05-FF114)与其他化疗试剂或检查点抑制剂(抗PD-L1抗体或抗PD1抗体)组合的体内抗肿瘤功效。

[1128] 在这个例子中,要评估的非SCLC细胞系(或非SCLC癌症模型)是癌症的细胞系(或癌症模型),所述癌症选自由胰腺神经内分泌肿瘤(PNET)、小细胞型NEC(SCNEC)、大细胞型NEC(LCNEC)、大细胞神经内分泌肺癌、神经内分泌前列腺癌(NEPC)、默克尔细胞癌、小细胞膀胱癌、胃肠道神经内分泌癌、甲状腺髓样癌(MTC)、胃肠胰神经内分泌癌(GEP NEC)、成神经细胞瘤、神经胶质瘤或胶质母细胞瘤(GBM)、黑色素瘤和甲状腺髓样癌组成的组。

[1129] 在这个例子中,要评估与抗DLL3-双-LINC抗体(DLL3-DualAE05/DualAE05-FF110或DLL3-DualAE05/DualAE05-FF114)联合治疗的检查点抑制剂选自由帕博利珠单抗,匹地利珠单抗(pidilizumab)、尼妥珠单抗(nivolumab)、阿替利珠单抗和度伐鲁单抗组成的组,特别是阿替利珠单抗。

[1130] 实施例10

[1131] 抗DLL3-双-LINC抗体与类固醇或托珠单抗组合的体内功效

[1132] 细胞因子释放综合征 (CRS) 是T细胞相关疗法 (如T细胞衔接物和CAR-T细胞) 的常见不良事件。在临床上,类固醇和/或托珠单抗治疗广泛用于控制CRS。因此,评估了抗DLL3-双-LINC抗体 (DLL3-DualAE05/DualAE05-FF114) 与类固醇或托珠单抗组合的体内功效。如实施例7所述产生免疫人源化NOG小鼠。将表达人DLL3的PC-10细胞 (Immuno-Biological Laboratories) 移植到人源化NOG小鼠的右侧。当肿瘤体积约为200mm<sup>3</sup>时,根据肿瘤体积和体重将小鼠随机分组。在使用类固醇的预施用实验中,在抗体注射前1小时和24小时或1小时腹膜内施用33mg/kg地塞米松。在使用托珠单抗的实验中,在注射抗DLL3-双-LINC抗体之前一天或之后6小时施用10mg/kg托珠单抗。在注射抗DLL3-双-LINC抗体之前和之后6、24和96小时收集血浆样品,并根据制造商的说明使用人细胞因子/趋化因子磁珠板 (HCYT MAG-60K-PX38, Millipore) 测量细胞因子的血浆浓度。结果,用地塞米松预施用诱导细胞因子产生的显著减少而不影响肿瘤生长抑制 (图10a)。同样,托珠单抗的施用前后对抗DLL3-双-LINC抗体的抗肿瘤功效没有任何影响 (图10b)。

[1133] 工业适用性

[1134] 本发明提供了通过与CD3/CD37和DLL3结合而表现出以DLL3依赖性方式增强的T细胞依赖性细胞毒活性的多特异性抗原结合分子。该抗原结合分子及其药物组合物可用于靶向表达DLL3的细胞,用于治疗各种癌症的免疫疗法,尤其是与DLL3相关的癌症,例如DLL3阳性的癌症。

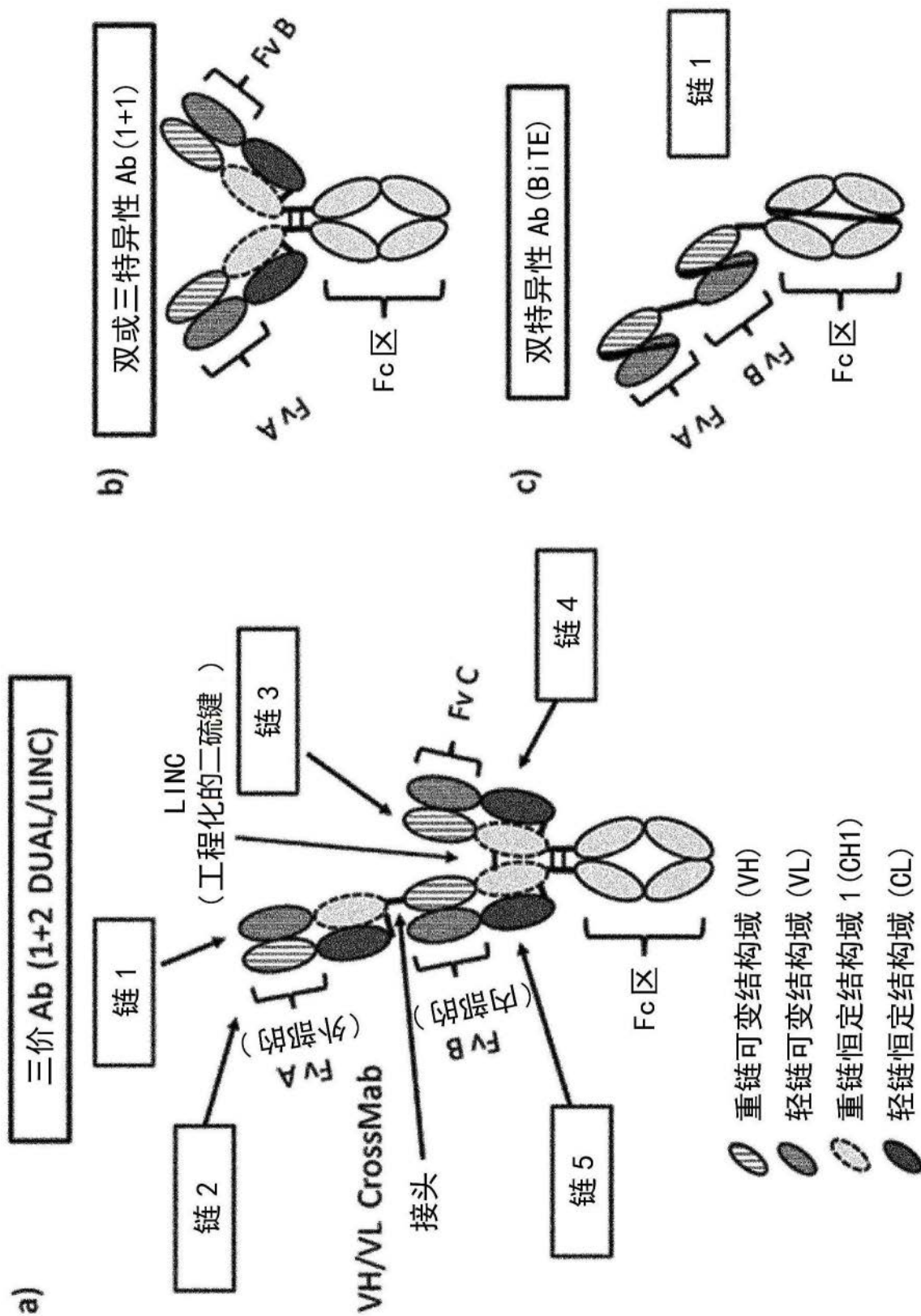


图1

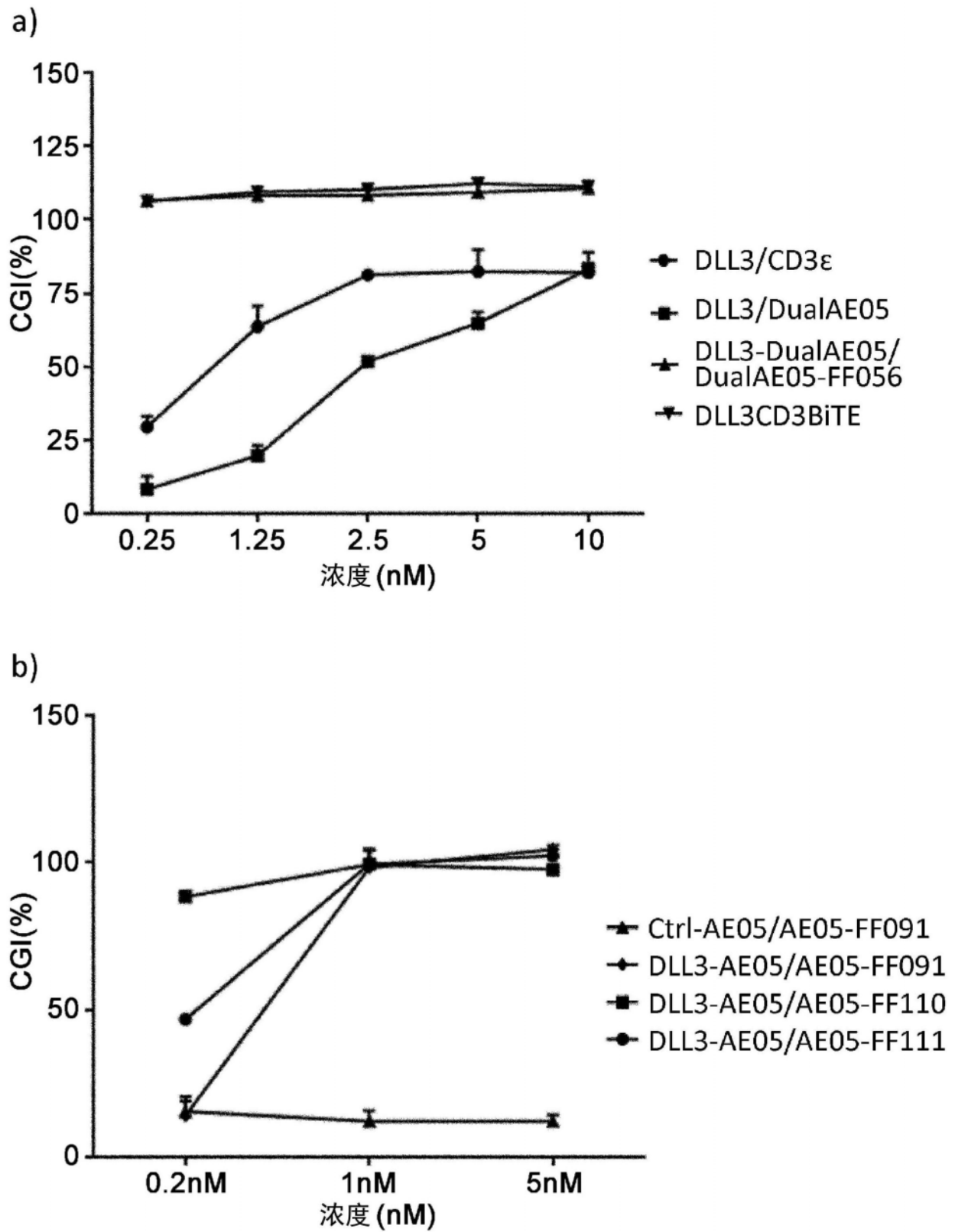


图2

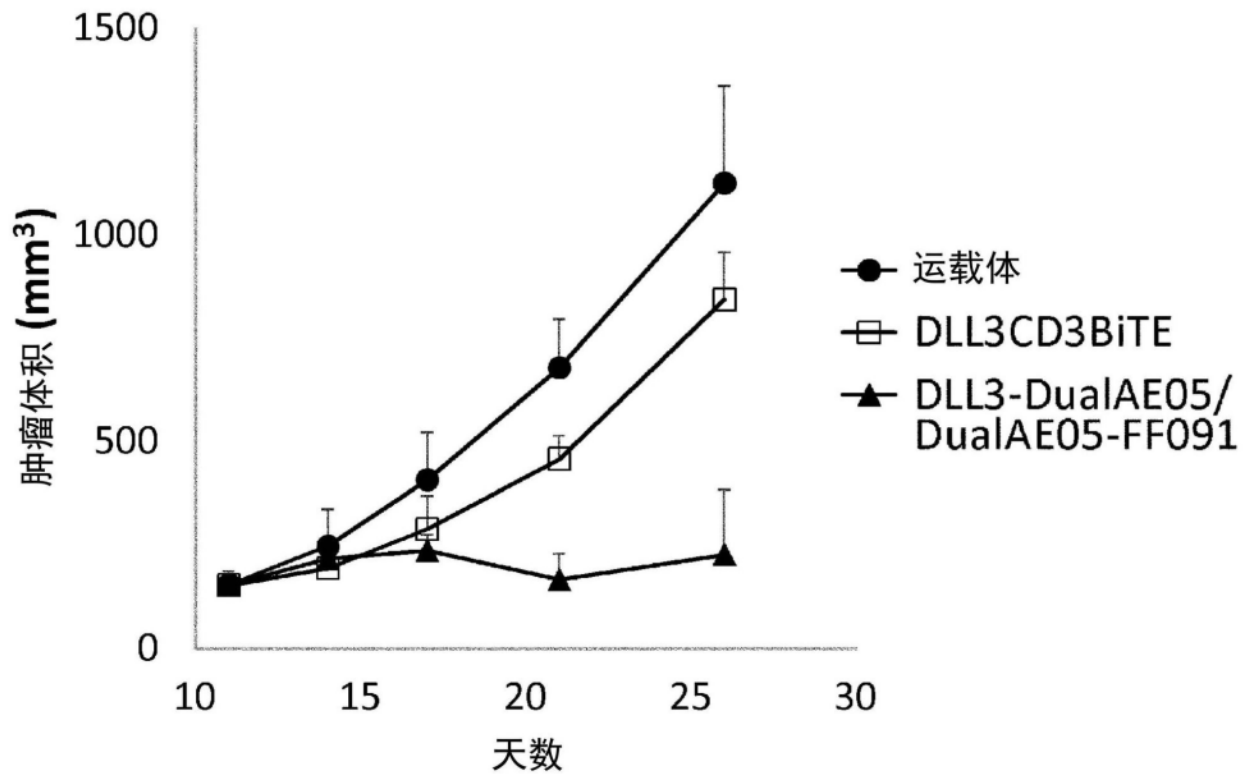


图3

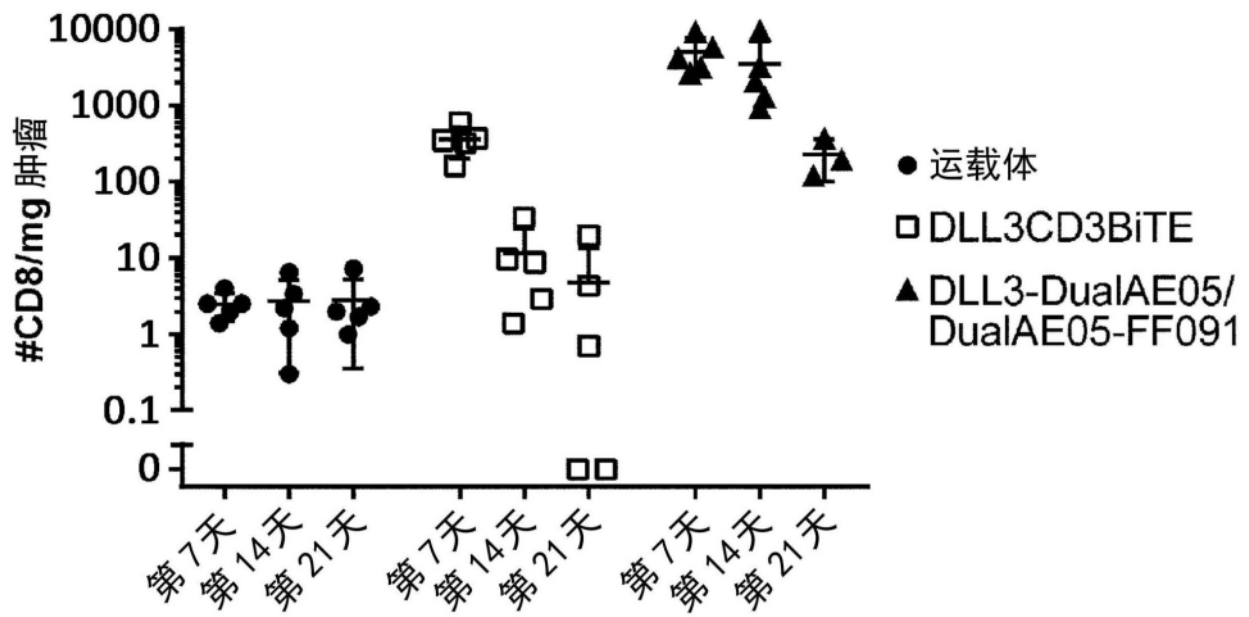


图4

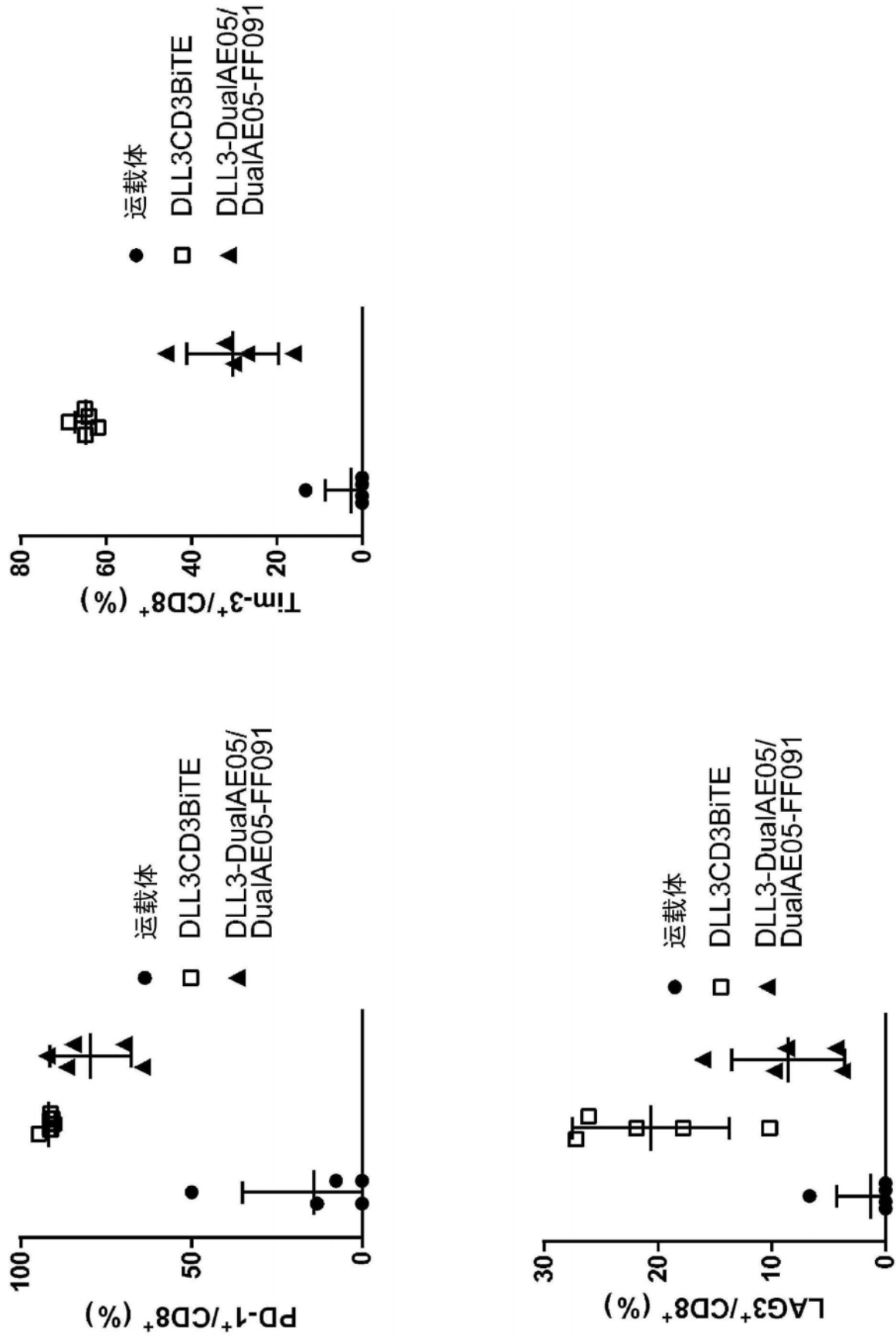


图5



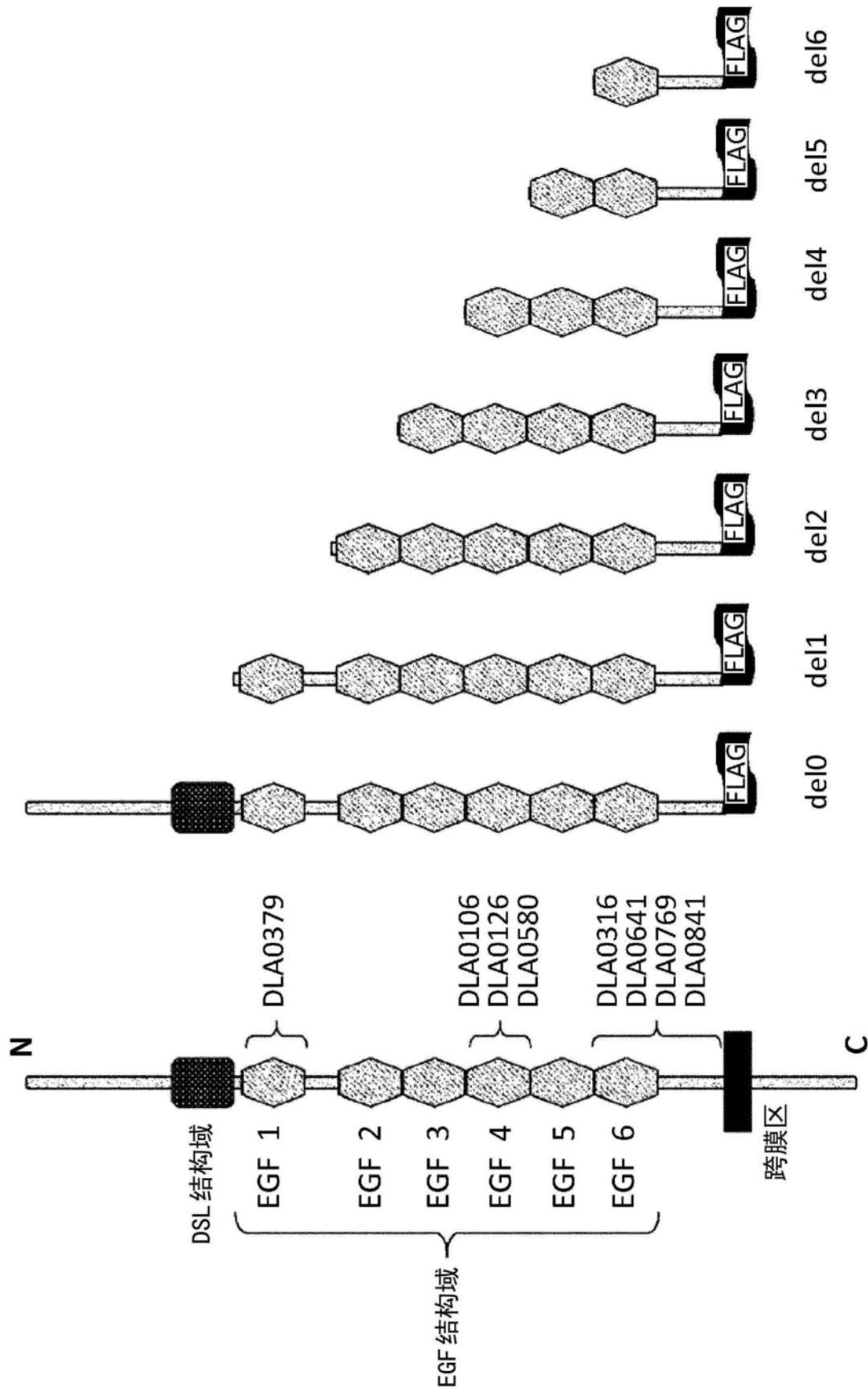


图6

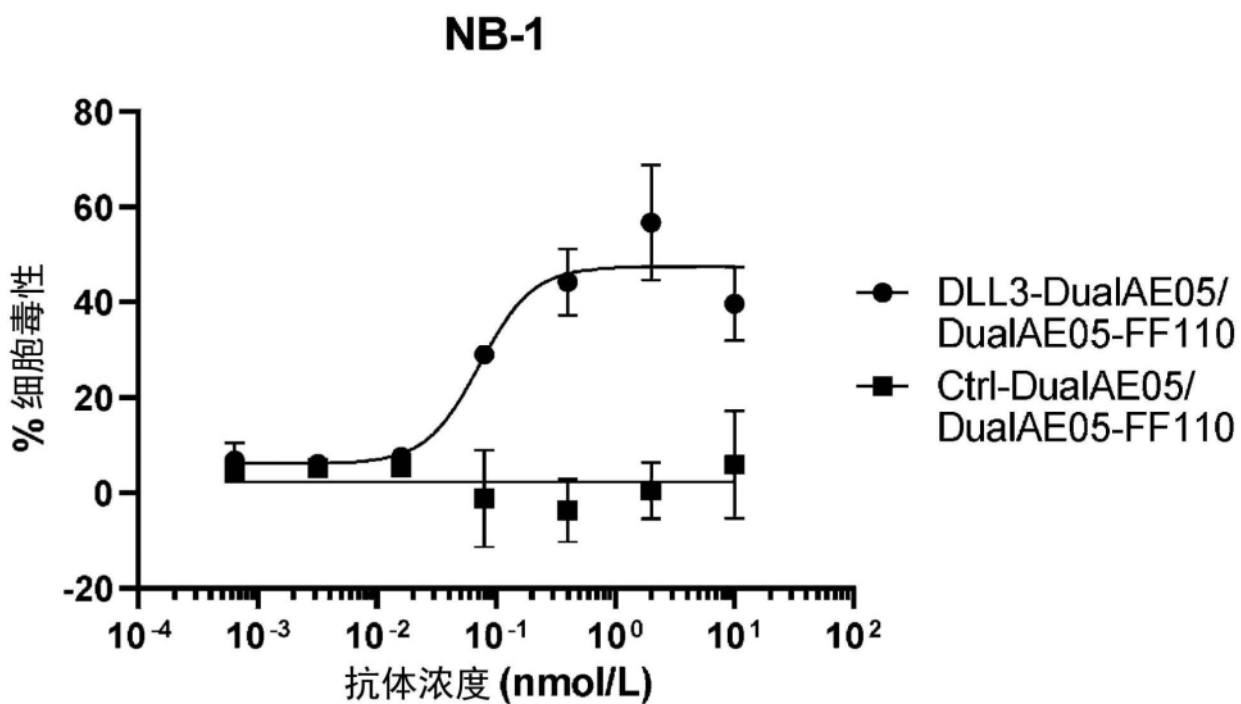
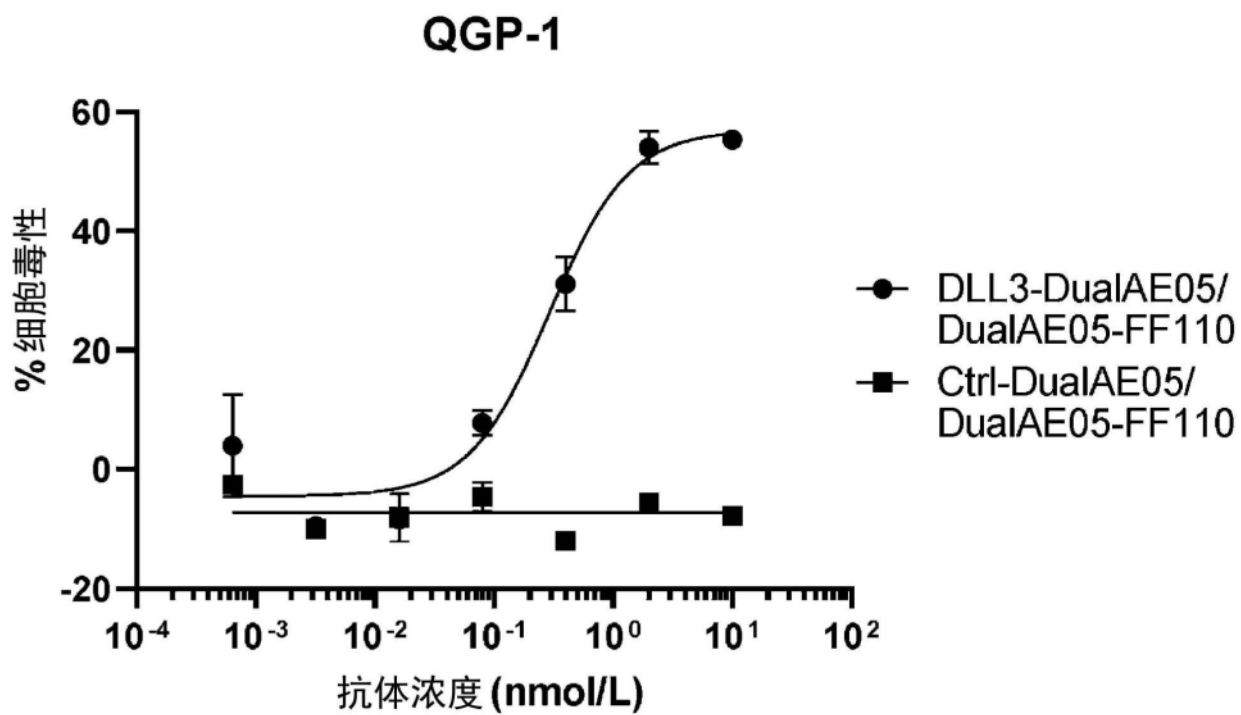


图7

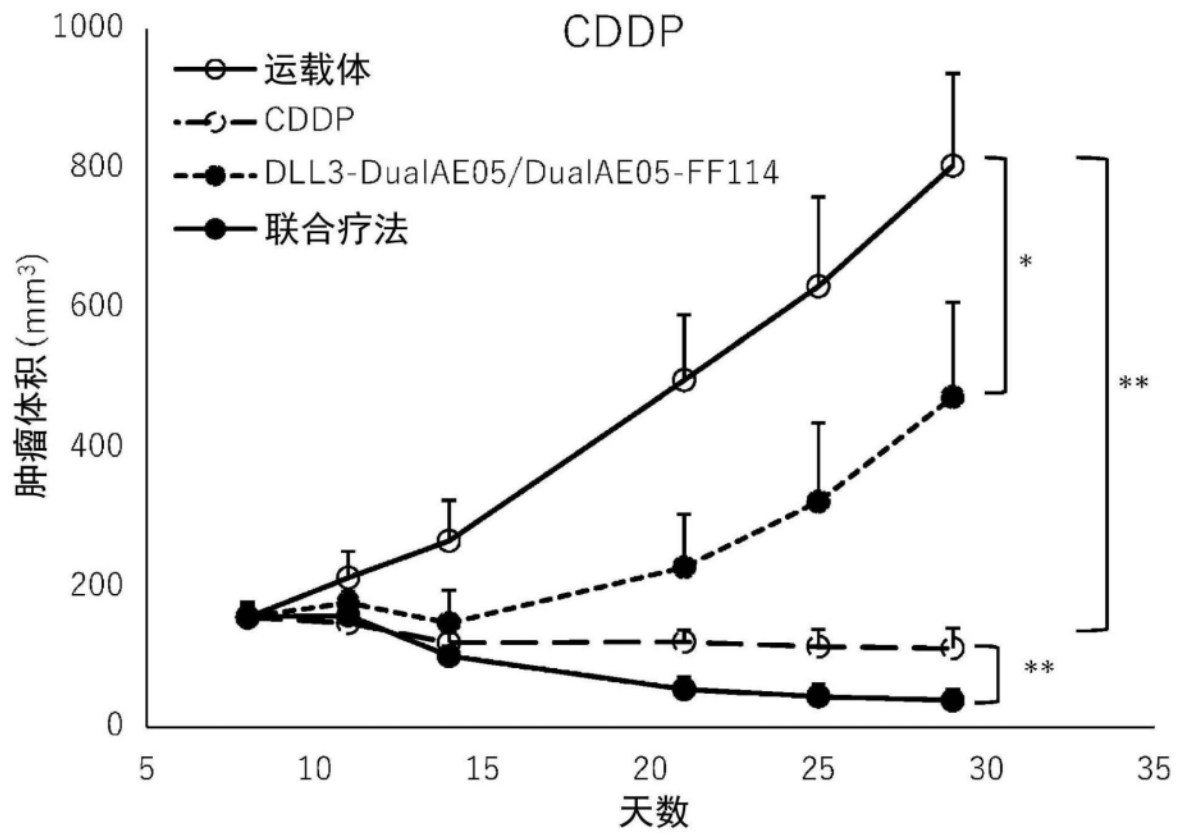
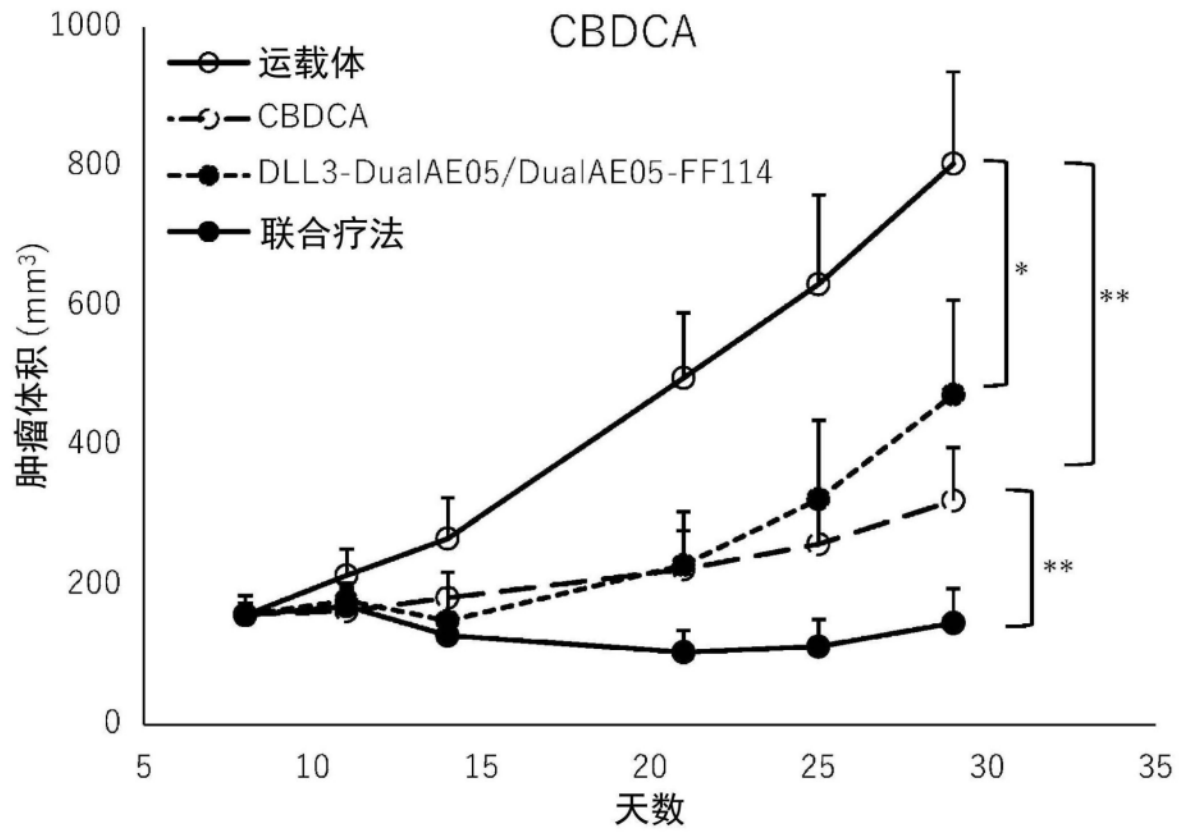


图8

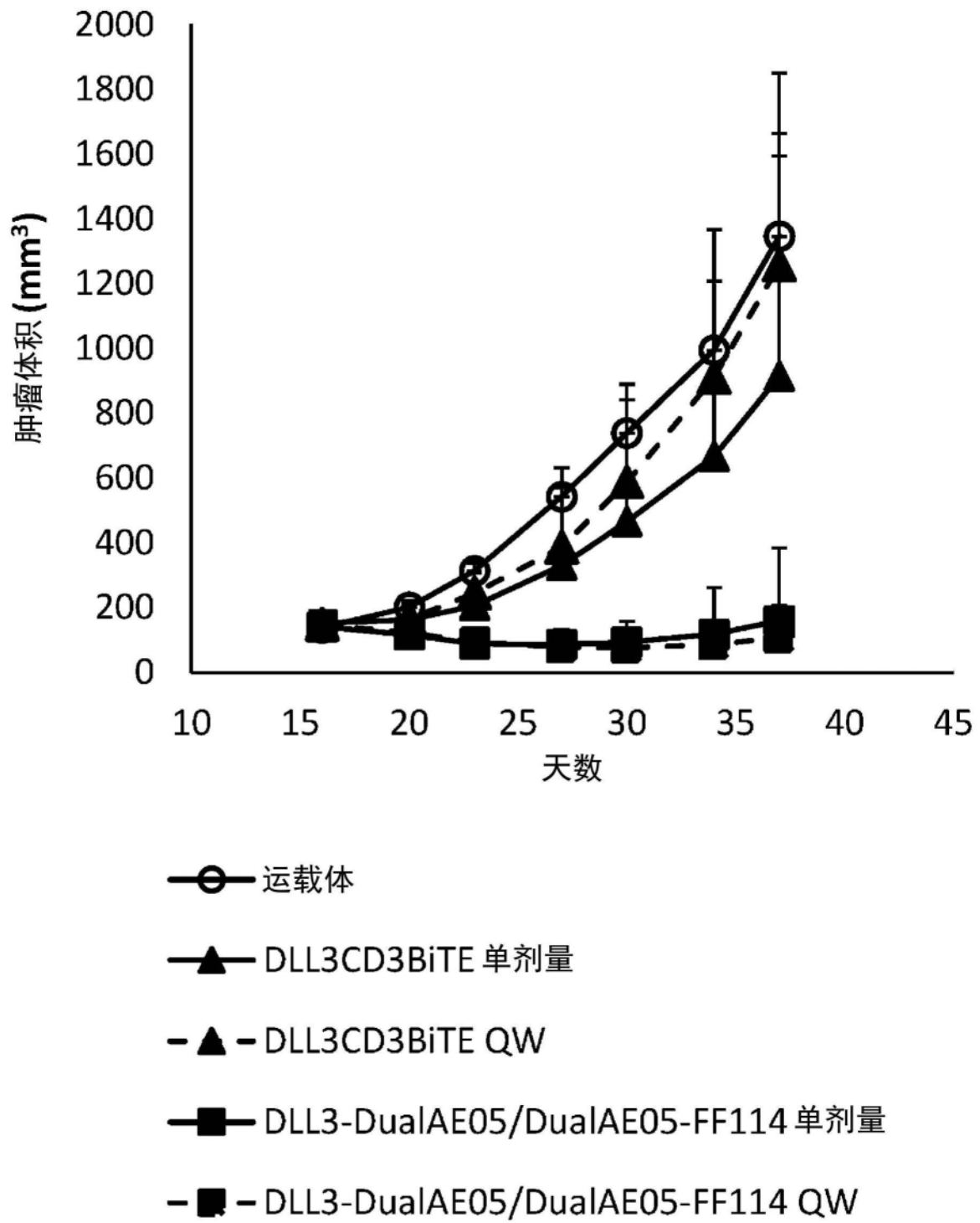


图9

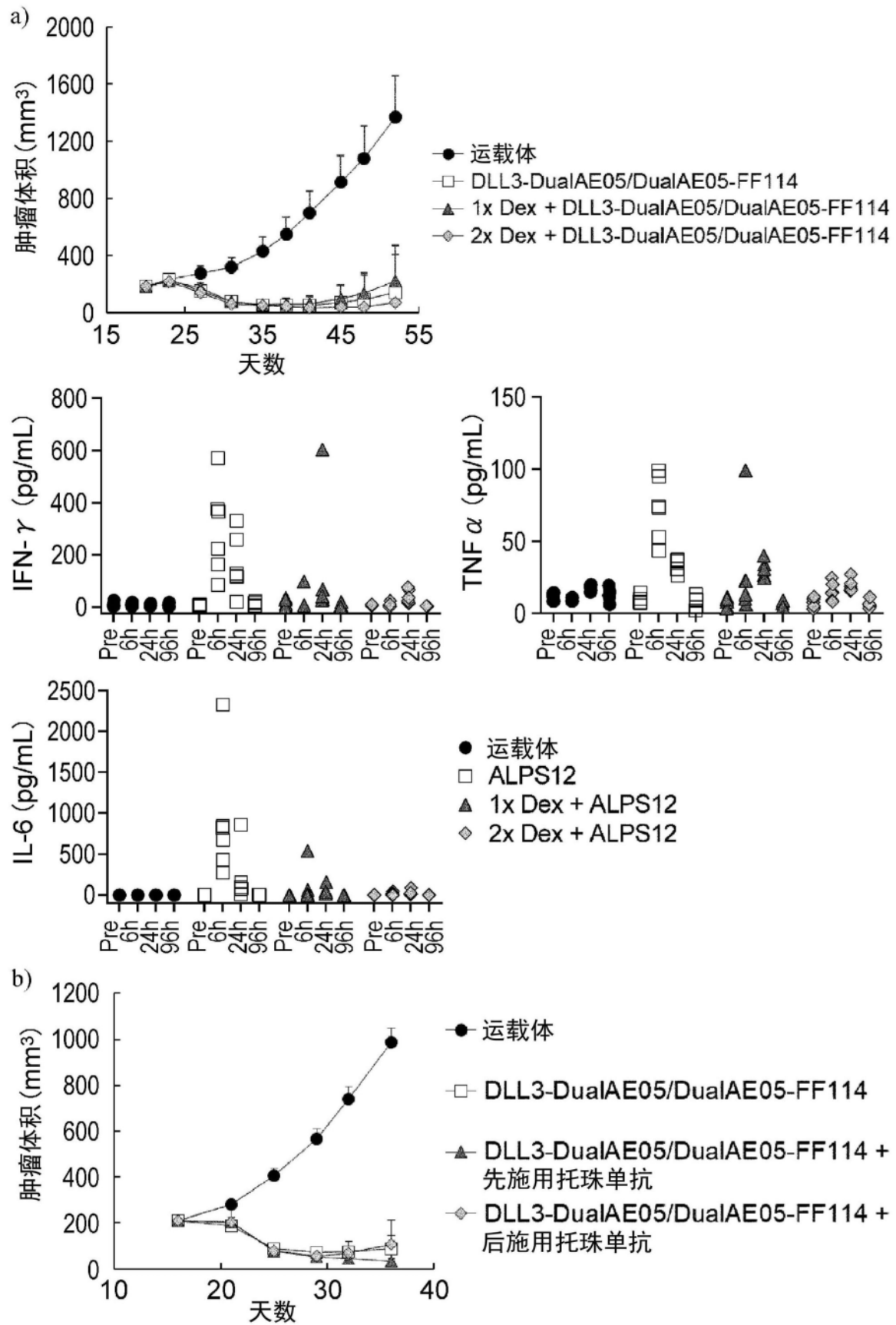


图10