



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113660952 B

(45) 授权公告日 2024.06.11

(21) 申请号 202080026225.8	A61P 1/00 (2006.01)
(22) 申请日 2020.04.03	A61P 1/16 (2006.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号	A61P 3/10 (2006.01)
申请公布号 CN 113660952 A	A61P 5/00 (2006.01)
(43) 申请公布日 2021.11.16	A61P 7/06 (2006.01)
(30) 优先权数据	A61P 9/00 (2006.01)
2019-071840 2019.04.04 JP	A61P 11/02 (2006.01)
2020-022256 2020.02.13 JP	A61P 11/06 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日	A61P 15/00 (2006.01)
2021.09.29	A61P 19/02 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据	A61P 21/00 (2006.01)
PCT/JP2020/015266 2020.04.03	A61P 25/00 (2006.01)
(87) PCT国际申请的公布数据	A61P 29/00 (2006.01)
W02020/204152 JA 2020.10.08	A61P 37/02 (2006.01)
(73) 专利权人 小野药品工业株式会社	A61P 37/06 (2006.01)
地址 日本大阪府	A61P 37/08 (2006.01)
(72) 发明人 柴山史朗 手塚智也	A61P 17/00 (2006.01)
马克·索罗斯比	A61P 17/14 (2006.01)
科尼利斯·阿德里安·迪克夫	C07K 16/28 (2006.01)
彼得·福克·凡罗 林斯·克罗斯特	C07K 16/46 (2006.01)
罗伯特斯·科内利斯·罗弗斯	C12N 15/13 (2006.01)
(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所	(56) 对比文件
11105	CN 102123582 A, 2011.07.13
专利代理师 张文辉	CN 106939050 A, 2017.07.11
(51) Int. Cl.	CN 108602888 A, 2018.09.28
A61K 39/395 (2006.01)	WO 2006105338 A2, 2006.10.05
A61K 45/00 (2006.01)	WO 2008092117 A2, 2008.07.31 (续)
	审查员 陈晨
	权利要求书7页 说明书53页
	序列表(电子公布) 附图13页

(54) 发明名称

双特异性抗体

(57) 摘要

本发明要解决的问题是提供一种用于预防自身免疫性疾病、抑制自身免疫性疾病的症状进展、抑制自身免疫性疾病复发或治疗自身免疫性疾病的新药剂。本发明的发明人潜心研究, 聚焦于PD-1/CD19双特异性抗体等作为解决该问题的

物质, 并证实该双特异性抗体可以作为一种用于预防自身免疫性疾病、抑制自身免疫性疾病的症状进展、抑制自身免疫性疾病的复发或治疗自身免疫性疾病的新药剂。他们还证实, 双特异性抗体具有允许PD-1和作为其配体的PD-L1之间的相互作用的特性。

CN 113660952 B

[接上页]

(56) 对比文件

WO 2019009726 A1, 2019.01.10

CN 101874041 A, 2010.10.27

Sebastian Kobold 等. Rationale for

Combining Bispecific T Cell Activating
Antibodies With Checkpoint Blockade for
Cancer Therapy. *Frontiers in
Oncology*. 2018, 第8卷第2页, 图1, 表1.

1. 双特异性抗体或其抗体片段,其具有特异性结合PD-1的第一臂和特异性结合CD19的第二臂,并且分别特异性结合PD-1和CD19,其中所述特异性结合PD-1的第一臂包含选自以下的任何一个VH:

(A) VH,其具有

- (a) 由序列编号18中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
- (b) 由序列编号19中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
- (c) 由序列编号20中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,

(B) VH,其具有

- (a) 由序列编号6中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
- (b) 由序列编号7中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
- (c) 由序列编号8中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,

(C) VH,其具有

- (a) 由序列编号9中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
- (b) 由序列编号10中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
- (c) 由序列编号11中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,以及

(D) VH,其具有

- (a) 由序列编号12中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
- (b) 由序列编号13中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
- (c) 由序列编号14中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,并且

所述特异性结合CD19的第二臂包含选自以下的任何一个VH:

(A) VH,其具有

- (a) 由序列编号35中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
- (b) 由序列编号36中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
- (c) 由序列编号37中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,

(B) VH,其具有

- (a) 由序列编号38中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
- (b) 由序列编号39中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
- (c) 由序列编号40中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,

(C) VH,其具有

- (a) 由序列编号41中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
- (b) 由序列编号42中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
- (c) 由序列编号43中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,

(D) VH,其具有

- (a) 由序列编号44中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
- (b) 由序列编号45中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
- (c) 由序列编号46中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,以及

(E) VH,其具有

- (a) 由序列编号47中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
- (b) 由序列编号48中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和

(c) 由序列编号49中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,且其中所述特异性结合PD-1的第一臂和所述特异性结合CD19的第二臂具有VL,所述VL分别具有

- (a) 由序列编号26中列出的氨基酸序列组成的VL-CDR1,
 - (b) 由序列编号27中列出的氨基酸序列组成的VL-CDR2,和
 - (c) 由序列编号28中列出的氨基酸序列组成的VL-CDR3,
- 其中所述抗体片段为F(ab')₂的形式。

2. 根据权利要求1所述的双特异性抗体或其抗体片段,其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有

- (a) 由序列编号18中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
 - (b) 由序列编号19中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
 - (c) 由序列编号20中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,并且
- (ii) 所述特异性结合CD19的第二臂的VH是选自以下的任何一个:

(A) VH,其具有

- (a) 由序列编号35中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
- (b) 由序列编号36中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
- (c) 由序列编号37中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,

(B) VH,其具有

- (a) 由序列编号38中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
- (b) 由序列编号39中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
- (c) 由序列编号40中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,

(C) VH,其具有

- (a) 由序列编号41中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
- (b) 由序列编号42中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
- (c) 由序列编号43中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,

(D) VH,其具有

- (a) 由序列编号44中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
- (b) 由序列编号45中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
- (c) 由序列编号46中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,以及

(E) VH,其具有

- (a) 由序列编号47中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
- (b) 由序列编号48中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
- (c) 由序列编号49中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3。

3. 根据权利要求1所述的双特异性抗体或其抗体片段,其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有

- (a) 由序列编号6中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
- (b) 由序列编号7中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
- (c) 由序列编号8中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,并且

(ii) 所述特异性结合CD19的第二臂的VH是选自以下的任何一个:

(A) VH,其具有

- (a) 由序列编号35中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
- (b) 由序列编号36中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
- (c) 由序列编号37中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,

(B) VH,其具有

- (a) 由序列编号38中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
- (b) 由序列编号39中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
- (c) 由序列编号40中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,

(C) VH,其具有

- (a) 由序列编号41中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
- (b) 由序列编号42中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
- (c) 由序列编号43中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,

(D) VH,其具有

- (a) 由序列编号44中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
- (b) 由序列编号45中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
- (c) 由序列编号46中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,以及

(E) VH,其具有

- (a) 由序列编号47中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
- (b) 由序列编号48中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
- (c) 由序列编号49中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3。

4. 根据权利要求1所述的双特异性抗体或其抗体片段,其中 (i) 所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有

- (a) 由序列编号9中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
- (b) 由序列编号10中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
- (c) 由序列编号11中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,并且

(ii) 所述特异性结合CD19的第二臂的VH是选自以下的任何一个:

(A) VH,其具有

- (a) 由序列编号35中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
- (b) 由序列编号36中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
- (c) 由序列编号37中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,

(B) VH,其具有

- (a) 由序列编号38中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
- (b) 由序列编号39中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
- (c) 由序列编号40中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,

(C) VH,其具有

- (a) 由序列编号41中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
- (b) 由序列编号42中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
- (c) 由序列编号43中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,

(D) VH,其具有

(a) 由序列编号44中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
(b) 由序列编号45中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
(c) 由序列编号46中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,以及
(E) VH,其具有

(a) 由序列编号47中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
(b) 由序列编号48中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
(c) 由序列编号49中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3。

5. 根据权利要求1所述的双特异性抗体或其抗体片段,
其中 (i) 所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有

(a) 由序列编号12中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
(b) 由序列编号13中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
(c) 由序列编号14中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,并且

(ii) 所述特异性结合CD19的第二臂的VH是选自以下的任何一个:

(A) VH,其具有

(a) 由序列编号35中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
(b) 由序列编号36中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
(c) 由序列编号37中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,

(B) VH,其具有

(a) 由序列编号38中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
(b) 由序列编号39中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
(c) 由序列编号40中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,

(C) VH,其具有

(a) 由序列编号41中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
(b) 由序列编号42中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
(c) 由序列编号43中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,

(D) VH,其具有

(a) 由序列编号44中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
(b) 由序列编号45中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
(c) 由序列编号46中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3,以及

(E) VH,其具有

(a) 由序列编号47中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR1,
(b) 由序列编号48中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR2,和
(c) 由序列编号49中列出的氨基酸序列组成的VH-CDR3。

6. 根据权利要求1所述的双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列:序列编号5、序列编号1、序列编号2、序列编号3和序列编号4,或与该VH氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列。

7. 根据权利要求1至5中任一项所述的双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列:序列编号62、序列编号30、序列编号31、序列编号32、序列编号33、序列编号34、序列编号63、序列编号64、序列编

号65和序列编号66,或与该VH氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列。

8. 根据权利要求1所述的双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列:序列编号5、序列编号1、序列编号2、序列编号3和序列编号4,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列:序列编号62、序列编号30、序列编号31、序列编号32、序列编号33、序列编号34、序列编号63、序列编号64、序列编号65和序列编号66。

9. 根据权利要求1或2所述的双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号5中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列:序列编号62、序列编号30、序列编号31、序列编号32、序列编号33、序列编号34、序列编号63、序列编号64、序列编号65和序列编号66。

10. 根据权利要求1或3所述的双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号1中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列:序列编号62、序列编号30、序列编号31、序列编号32、序列编号33、序列编号34、序列编号63、序列编号64、序列编号65和序列编号66。

11. 根据权利要求1或4所述的双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号2中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列:序列编号62、序列编号30、序列编号31、序列编号32、序列编号33、序列编号34、序列编号63、序列编号64、序列编号65和序列编号66。

12. 根据权利要求1或5所述的双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号3中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列:序列编号62、序列编号30、序列编号31、序列编号32、序列编号33、序列编号34、序列编号63、序列编号64、序列编号65和序列编号66。

13. 根据权利要求1或2所述的双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号4中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列:序列编号62、序列编号30、序列编号31、序列编号32、序列编号33、序列编号34、序列编号63、序列编号64、序列编号65和序列编号66。

14. 根据权利要求1至5、6和8中任一项所述的双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂和所述特异性结合CD19的第二臂的VL分别包含序列编号25中列出的氨基酸序列。

15. 双特异性抗体或其抗体片段,其具有特异性结合PD-1的第一臂和特异性结合CD19的第二臂,并且分别特异性结合PD-1和CD19,其中(A)所述特异性结合PD-1的第一臂具有由选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列组成的VH和由序列编号25中列出的氨基酸序列组成的VL:序列编号5、序列编号1、序列编号2、序列编号3和序列编号4,并且

(B)所述特异性结合CD19的第二臂具有由选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列组成的VH和由序列编号25中列出的氨基酸序列组成的VL:序列编号62、序列编号30、序列编号

31、序列编号32、序列编号33、序列编号34、序列编号63、序列编号64、序列编号65和序列编号66,

其中所述抗体片段为 $F(ab')_2$ 的形式。

16. 根据权利要求1至5、6、8和15中任一项所述的双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂允许PD-1和PD-L1之间的相互作用。

17. 根据权利要求1至5、6、8和15中任一项所述的双特异性抗体或其抗体片段,其中所述双特异性抗体是IgG抗体。

18. 根据权利要求17所述的双特异性抗体或其抗体片段,其中所述IgG抗体是IgG₁抗体或IgG₄抗体。

19. 根据权利要求17所述的双特异性抗体或其抗体片段,其中所述IgG抗体是IgG₁抗体。

20. 根据权利要求19所述的双特异性抗体或其抗体片段,其中与Fc受体的结合是消除或减少的。

21. 根据权利要求20所述的双特异性抗体或其抗体片段,其中在所述双特异性抗体的两个重链恒定区中,根据EU编号系统的235位处的亮氨酸被甘氨酸取代,和/或236位处的甘氨酸被精氨酸取代。

22. 根据权利要求19至21中任一项所述的双特异性抗体或其抗体片段,其中在具有所述特异性结合PD-1的第一臂的VH的重链恒定区中,根据EU编号系统的351位处的亮氨酸被赖氨酸取代并且366位处的苏氨酸被赖氨酸取代,并且在具有所述特异性结合CD19的第二臂的VH的重链恒定区中,351位处的亮氨酸被天冬氨酸取代并且368位处的亮氨酸被谷氨酸取代。

23. 根据权利要求19至21中任一项所述的双特异性抗体或其抗体片段,其中在具有所述特异性结合PD-1的第一臂的VH的重链恒定区中,根据EU编号系统的351位处的亮氨酸被天冬氨酸取代并且368位处的亮氨酸被谷氨酸取代,并且在具有所述特异性结合CD19的第二臂的VH的重链恒定区中,351位处的亮氨酸被赖氨酸取代并且366位处的苏氨酸被赖氨酸取代。

24. 根据权利要求19至21中任一项所述的双特异性抗体或其抗体片段,其中在所述双特异性抗体的两个重链恒定区中,根据EU编号系统的447位处的赖氨酸是缺失的。

25. 根据权利要求1至5、6、8和15中任一项所述的双特异性抗体或其抗体片段,其中所述具有特异性结合PD-1的第一臂的VH的重链具有包含序列编号23中列出的氨基酸序列的重链恒定区。

26. 根据权利要求1至5、6、8和15中任一项所述的双特异性抗体或其抗体片段,其中具有所述特异性结合CD19的第二臂的VH的重链具有包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列的重链恒定区:序列编号24、序列编号71、序列编号72、序列编号73、序列编号74和序列编号75。

27. 根据权利要求1至5、6、8和15中任一项所述的双特异性抗体或其抗体片段,其中具有所述特异性结合PD-1的第一臂的VL的轻链和/或具有所述特异性结合CD19的第二臂的VL的轻链具有包含序列编号29中列出的氨基酸序列的轻链恒定区。

28. 双特异性抗体或其抗体片段,其具有特异性结合PD-1的第一臂和特异性结合CD19的第二臂,并且分别特异性结合PD-1和CD19,其中

(A) 具有所述特异性结合PD-1的第一臂的VH的重链具有由选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列组成的VH和由序列编号23中列出的氨基酸序列组成的重链恒定区:序列编号5、序列编号1、序列编号2、序列编号3和序列编号4,

(B) 具有所述特异性结合PD-1的第一臂的VL的轻链具有由序列编号25中列出的氨基酸序列组成的VL和由序列编号29中列出的氨基酸序列组成的轻链恒定区,

(C) 具有所述特异性结合CD19的第二臂的VH的重链具有由选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列组成的VH和由序列编号24中列出的氨基酸序列组成的重链恒定区:序列编号62、序列编号30、序列编号31、序列编号32、序列编号33、序列编号34、序列编号63、序列编号64、序列编号65和序列编号66,和

(D) 具有所述特异性结合CD19的第二臂的VL的轻链具有由序列编号25中列出的氨基酸序列组成的VL和由序列编号29中列出的氨基酸序列组成的轻链恒定区,

其中所述抗体片段为 $F(ab')_2$ 的形式。

29. 双特异性抗体,其具有特异性结合PD-1的第一臂和特异性结合CD19的第二臂,并且分别特异性结合PD-1和CD19,其中

(A) 具有所述特异性结合PD-1的第一臂的VH的重链具有由序列编号5中列出的氨基酸序列组成的VH和由序列编号23中列出的氨基酸序列组成的重链恒定区,

(B) 具有所述特异性结合PD-1的第一臂的VL的轻链具有由序列编号25中列出的氨基酸序列组成的VL和由序列编号29中列出的氨基酸序列组成的轻链恒定区,

(C) 具有所述特异性结合CD19的第二臂的VH的重链具有由选自序列编号62的任一个中列出的氨基酸序列组成的VH和由序列编号24中列出的氨基酸序列组成的重链恒定区,和

(D) 具有所述特异性结合CD19的第二臂的VL的轻链具有由序列编号25中列出的氨基酸序列组成的VL和由序列编号29中列出的氨基酸序列组成的轻链恒定区。

30. 分离的多核苷酸,其编码权利要求1-29中任一项所述的双特异性抗体或其抗体片段。

31. 表达载体,其具有权利要求30所述的分离的多核苷酸。

32. 动物细胞,其中转染有权利要求31所述的表达载体或由该载体转化。

33. 药物组合物,其包含选自权利要求1至29中任一项所述的双特异性抗体或其抗体片段和药学上可接受的载体。

34. 权利要求1至29中任一项所述的双特异性抗体或其抗体片段用于制备药物的用途,所述药物用于预防移植物抗宿主病、抑制移植物抗宿主病的症状进展、抑制移植物抗宿主病的复发和/或治疗移植物抗宿主病(GVHD)。

双特异性抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及一种能够分别特异性结合PD-1和CD19的双特异性抗体(以下可以缩写为“PD-1/CD19双特异性抗体”)或其抗体片段(以下可以缩写为“PD-1/CD19双特异性抗体等”)和含有其作为活性成分的药物组合物以及其药物治疗用途。

背景技术

[0002] PD-1是一种属于免疫球蛋白家族的免疫抑制受体,并且是具有抑制通过抗原受体的刺激而活化的B细胞的免疫活化信号的功能的分子。从对PD-1敲除小鼠等的分析可知,PD-1信号在抑制自身免疫性疾病如自身免疫性扩张型心肌病、狼疮样综合征、自身免疫性脑脊髓炎、系统性红斑狼疮、移植物抗宿主病、I型糖尿病和类风湿性关节炎中起重要的作用。因此,指出增强PD-1信号的物质可以是自身免疫性疾病的预防剂或治疗剂。

[0003] CD19是一种在B细胞上表达的膜蛋白,并且是一种与B细胞受体复合物一起将刺激转移到B细胞中的分子。

[0004] 迄今为止,存在有用于用于治疗自身免疫性疾病的PD-1双特异性抗体的数篇报道(专利文献1-3),但是它们的一个靶标是作为T细胞受体复合体成员的CD3。

[0005] 此外,存在有靶向PD-1和CD19的双特异性抗体治疗肿瘤的报道(专利文献4),但根本没有关于PD-1/CD19双特异性抗体预防自身免疫性疾病、抑制自身免疫性疾病症状的进展或自身免疫性疾病复发,或治疗自身免疫性疾病的报道。

[0006] [引用列表]

[0007] [专利文献]

[0008] 专利文献1:国际公开号W02003/011911

[0009] 专利文献2:国际公开号W02004/072286

[0010] 专利文献3:国际公开号W02013/022091

[0011] 专利文献4:中国专利公开号106939050

发明内容

[0012] [技术问题]

[0013] 本发明的目的是提供一种用于预防自身免疫性疾病、抑制自身免疫性疾病的症状进展或自身免疫性疾病复发、或治疗自身免疫性疾病等的新药剂。

[0014] [问题的解决方案]

[0015] 本发明人潜心研究并且聚焦于本发明的PD-1/CD19双特异性抗体作为能够解决上述问题的物质,并且完成了本发明。

[0016] 此外,本发明的发明人证实了PD-1/CD19双特异性抗体具有允许PD-1和作为其配体的PD-L1之间的相互作用的特征。此外,本发明的发明人发现了PD-1/CD19双特异性抗体,其可以通过对构成该PD-1/CD19双特异性抗体的特异性结合CD19的第二臂的重链进行一个或多个氨基酸取代或添加而容易地在纯化过程中与其副产物分开。

[0017] 即,本发明涉及以下内容。

[0018] [1]一种双特异性抗体或其抗体片段,其具有特异性结合PD-1的第一臂和特异性结合CD19的第二臂,并且分别特异性结合PD-1和CD19,

[0019] 其中所述特异性结合PD-1的第一臂具有选自以下的任何一个VH

[0020] (A)重链可变区(下文中,“重链可变区”可缩写为“VH”),其具有

[0021] (a)所述重链可变区的互补决定区1(下文中,“重链可变区的互补决定区1”可缩写为“VH-CDR1”),其包含序列编号6中列出的氨基酸序列,

[0022] (b)所述重链可变区的互补决定区2(下文中,“重链可变区的互补决定区2”可缩写为“VH-CDR2”),其包含序列编号7中列出的氨基酸序列,和

[0023] (c)所述重链可变区的互补决定区3(下文中,“重链可变区的互补决定区3”可缩写为“VH-CDR3”),其包含序列编号8中列出的氨基酸序列,

[0024] (B)VH,其具有

[0025] (a)包含序列编号9中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0026] (b)包含序列编号10中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0027] (c)包含序列编号11中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,

[0028] (C)VH,其具有

[0029] (a)包含序列编号12中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0030] (b)包含序列编号13中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0031] (c)包含序列编号14中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,

[0032] (D)VH,其具有

[0033] (a)包含序列编号15中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0034] (b)包含序列编号16中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0035] (c)包含序列编号17中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,以及

[0036] (E)VH,其具有

[0037] (a)包含序列编号18中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0038] (b)包含序列编号19中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0039] (c)包含序列编号20中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,

[0040] 其中所述特异性结合CD19的第二臂具有选自以下的任何一个VH:

[0041] (A)VH,其具有

[0042] (a)包含序列编号35中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0043] (b)包含序列编号36中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0044] (c)包含序列编号37中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,

[0045] (B)VH,其具有

[0046] (a)包含序列编号38中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0047] (b)包含序列编号39中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0048] (c)包含序列编号40中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,

[0049] (C)VH,其具有

[0050] (a)包含序列编号41中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0051] (b)包含序列编号42中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

- [0052] (c) 包含序列编号43中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,
- [0053] (D)VH,其具有
- [0054] (a) 包含序列编号44中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0055] (b) 包含序列编号45中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0056] (c) 包含序列编号46中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,以及
- [0057] (E)VH,其具有
- [0058] (a) 包含序列编号47中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0059] (b) 包含序列编号48中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0060] (c) 包含序列编号49中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,且
- [0061] 其中在所述特异性结合PD-1的第一臂中的选自VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3的任何一个或多个VH-CDR中各自的1至5个任意氨基酸残基可以被其它氨基酸取代;和/或在所述特异性结合CD19的第二臂中的选自VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3的任何一个或多个VH-CDR中各自的1至5个任意氨基酸残基可以被其它氨基酸取代。
- [0062] [2]根据前述项[1]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂具有选自以下的任何一个VH:
- [0063] (A)VH,其具有
- [0064] (a) 包含序列编号6中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0065] (b) 包含序列编号7中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0066] (c) 包含序列编号8中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,
- [0067] (B)VH,其具有
- [0068] (a) 包含序列编号9中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0069] (b) 包含序列编号10中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0070] (c) 包含序列编号11中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,
- [0071] (C)VH,其具有
- [0072] (a) 包含序列编号12中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0073] (b) 包含序列编号13中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0074] (c) 包含序列编号14中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,
- [0075] (D)VH,其具有
- [0076] (a) 包含序列编号15中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0077] (b) 包含序列编号16中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0078] (c) 包含序列编号17中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,以及
- [0079] (E)VH,其具有
- [0080] (a) 包含序列编号18中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0081] (b) 包含序列编号19中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0082] (c) 包含序列编号20中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,且
- [0083] 其中所述特异性结合CD19的第二臂具有选自以下的任何一个VH:
- [0084] (A)VH,其具有
- [0085] (a) 包含序列编号35中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0086] (b) 包含序列编号36中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

- [0087] (c) 包含序列编号37中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,
[0088] (B) VH,其具有
[0089] (a) 包含序列编号38中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
[0090] (b) 包含序列编号39中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
[0091] (c) 包含序列编号40中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,
[0092] (C) VH,其具有
[0093] (a) 包含序列编号41中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
[0094] (b) 包含序列编号42中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
[0095] (c) 包含序列编号43中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,
[0096] (D) VH,其具有
[0097] (a) 包含序列编号44中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
[0098] (b) 包含序列编号45中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
[0099] (c) 包含序列编号46中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,以及
[0100] (E) VH,其具有
[0101] (a) 包含序列编号47中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
[0102] (b) 包含序列编号48中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
[0103] (c) 包含序列编号49中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。
[0104] [3]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有
[0105] (a) 包含序列编号6中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
[0106] (b) 包含序列编号7中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
[0107] (c) 包含序列编号8中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,且
[0108] (ii)所述特异性结合CD19的第二臂的VH是选自以下的任何一个:
[0109] (A) VH,其具有
[0110] (a) 包含序列编号35中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
[0111] (b) 包含序列编号36中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
[0112] (c) 包含序列编号37中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,
[0113] (B) VH,其具有
[0114] (a) 包含序列编号38中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
[0115] (b) 包含序列编号39中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
[0116] (c) 包含序列编号40中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,
[0117] (C) VH,其具有
[0118] (a) 包含序列编号41中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
[0119] (b) 包含序列编号42中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
[0120] (c) 包含序列编号43中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,
[0121] (D) VH,其具有
[0122] (a) 包含序列编号44中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
[0123] (b) 包含序列编号45中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
[0124] (c) 包含序列编号46中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,以及

- [0125] (E) VH, 其具有
- [0126] (a) 包含序列编号47中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0127] (b) 包含序列编号48中列出的氨基酸序列的VH-CDR2, 和
- [0128] (c) 包含序列编号49中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。
- [0129] [4] 根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段, 其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有
- [0130] (a) 包含序列编号9中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0131] (b) 包含序列编号10中列出的氨基酸序列的VH-CDR2, 和
- [0132] (c) 包含序列编号11中列出的氨基酸序列的VH-CDR3, 且
- [0133] (ii) 所述特异性结合CD19的第二臂的VH是选自以下的任何一个:
- [0134] (A) VH, 其具有
- [0135] (a) 包含序列编号35中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0136] (b) 包含序列编号36中列出的氨基酸序列的VH-CDR2, 和
- [0137] (c) 包含序列编号37中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,
- [0138] (B) VH, 其具有
- [0139] (a) 包含序列编号38中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0140] (b) 包含序列编号39中列出的氨基酸序列的VH-CDR2, 和
- [0141] (c) 包含序列编号40中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,
- [0142] (C) VH, 其具有
- [0143] (a) 包含序列编号41中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0144] (b) 包含序列编号42中列出的氨基酸序列的VH-CDR2, 和
- [0145] (c) 包含序列编号43中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,
- [0146] (D) VH, 其具有
- [0147] (a) 包含序列编号44中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0148] (b) 包含序列编号45中列出的氨基酸序列的VH-CDR2, 和
- [0149] (c) 包含序列编号46中列出的氨基酸序列的VH-CDR3, 以及
- [0150] (E) VH, 其具有
- [0151] (a) 包含序列编号47中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0152] (b) 包含序列编号48中列出的氨基酸序列的VH-CDR2, 和
- [0153] (c) 包含序列编号49中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。
- [0154] [5] 根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段, 其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有
- [0155] (a) 包含序列编号12中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0156] (b) 包含序列编号13中列出的氨基酸序列的VH-CDR2, 和
- [0157] (c) 包含序列编号14中列出的氨基酸序列的VH-CDR3, 且
- [0158] (ii) 所述特异性结合CD19的第二臂的VH是选自以下的任何一个:
- [0159] (A) VH, 其具有
- [0160] (a) 包含序列编号35中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0161] (b) 包含序列编号36中列出的氨基酸序列的VH-CDR2, 和

- [0162] (c) 包含序列编号37中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,
[0163] (B)VH,其具有
[0164] (a) 包含序列编号38中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
[0165] (b) 包含序列编号39中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
[0166] (c) 包含序列编号40中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,
[0167] (C)VH,其具有
[0168] (a) 包含序列编号41中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
[0169] (b) 包含序列编号42中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
[0170] (c) 包含序列编号43中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,
[0171] (D)VH,其具有
[0172] (a) 包含序列编号44中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
[0173] (b) 包含序列编号45中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
[0174] (c) 包含序列编号46中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,以及
[0175] (E)VH,其具有
[0176] (a) 包含序列编号47中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
[0177] (b) 包含序列编号48中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
[0178] (c) 包含序列编号49中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。
[0179] [6]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有
[0180] (a) 包含序列编号15中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
[0181] (b) 包含序列编号16中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
[0182] (c) 包含序列编号17中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,且
[0183] (ii)所述特异性结合CD19的第二臂的VH是选自以下的任何一个:
[0184] (A)VH,其具有
[0185] (a) 包含序列编号35中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
[0186] (b) 包含序列编号36中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
[0187] (c) 包含序列编号37中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,
[0188] (B)VH,其具有
[0189] (a) 包含序列编号38中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
[0190] (b) 包含序列编号39中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
[0191] (c) 包含序列编号40中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,
[0192] (C)VH,其具有
[0193] (a) 包含序列编号41中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
[0194] (b) 包含序列编号42中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
[0195] (c) 包含序列编号43中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,
[0196] (D)VH,其具有
[0197] (a) 包含序列编号44中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
[0198] (b) 包含序列编号45中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
[0199] (c) 包含序列编号46中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,以及

- [0200] (E) VH, 其具有
- [0201] (a) 包含序列编号47中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0202] (b) 包含序列编号48中列出的氨基酸序列的VH-CDR2, 和
- [0203] (c) 包含序列编号49中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。
- [0204] [7] 根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段, 其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有
- [0205] (a) 包含序列编号18中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0206] (b) 包含序列编号19中列出的氨基酸序列的VH-CDR2, 和
- [0207] (c) 包含序列编号20中列出的氨基酸序列的VH-CDR3, 且
- [0208] (ii) 所述特异性结合CD19的第二臂的VH是选自以下的任何一个:
- [0209] (A) VH, 其具有
- [0210] (a) 包含序列编号35中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0211] (b) 包含序列编号36中列出的氨基酸序列的VH-CDR2, 和
- [0212] (c) 包含序列编号37中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,
- [0213] (B) VH, 其具有
- [0214] (a) 包含序列编号38中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0215] (b) 包含序列编号39中列出的氨基酸序列的VH-CDR2, 和
- [0216] (c) 包含序列编号40中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,
- [0217] (C) VH, 其具有
- [0218] (a) 包含序列编号41中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0219] (b) 包含序列编号42中列出的氨基酸序列的VH-CDR2, 和
- [0220] (c) 包含序列编号43中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,
- [0221] (D) VH, 其具有
- [0222] (a) 包含序列编号44中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0223] (b) 包含序列编号45中列出的氨基酸序列的VH-CDR2, 和
- [0224] (c) 包含序列编号46中列出的氨基酸序列的VH-CDR3, 以及
- [0225] (E) VH, 其具有
- [0226] (a) 包含序列编号47中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0227] (b) 包含序列编号48中列出的氨基酸序列的VH-CDR2, 和
- [0228] (c) 包含序列编号49中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。
- [0229] [8] 根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段, 其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有
- [0230] (a) 包含序列编号6中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0231] (b) 包含序列编号7中列出的氨基酸序列的VH-CDR2, 和
- [0232] (c) 包含序列编号8中列出的氨基酸序列的VH-CDR3, 和(ii)所述特异性结合CD19的第二臂的VH具有
- [0233] (a) 包含序列编号35中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0234] (b) 包含序列编号36中列出的氨基酸序列的VH-CDR2, 和
- [0235] (c) 包含序列编号37中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。

[0236] [9]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有

[0237] (a) 包含序列编号6中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0238] (b) 包含序列编号7中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0239] (c) 包含序列编号8中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和(ii)所述特异性结合CD19的第二臂的VH具有

[0240] (a) 包含序列编号38中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0241] (b) 包含序列编号39中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0242] (c) 包含序列编号40中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。

[0243] [10]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有

[0244] (a) 包含序列编号6中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0245] (b) 包含序列编号7中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0246] (c) 包含序列编号8中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和(ii)所述特异性结合CD19的第二臂的VH具有

[0247] (a) 包含序列编号41中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0248] (b) 包含序列编号42中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0249] (c) 包含序列编号43中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。

[0250] [11]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有

[0251] (a) 包含序列编号6中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0252] (b) 包含序列编号7中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0253] (c) 包含序列编号8中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和(ii)所述特异性结合CD19的第二臂的VH具有

[0254] (a) 包含序列编号44中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0255] (b) 包含序列编号45中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0256] (c) 包含序列编号46中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。

[0257] [12]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有

[0258] (a) 包含序列编号6中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0259] (b) 包含序列编号7中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0260] (c) 包含序列编号8中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和(ii)所述特异性结合CD19的第二臂的VH具有

[0261] (a) 包含序列编号47中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0262] (b) 包含序列编号48中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0263] (c) 包含序列编号49中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。

[0264] [13]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有

[0265] (a) 包含序列编号9中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

- [0266] (b) 包含序列编号10中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0267] (c) 包含序列编号11中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和(ii)所述特异性结合CD19的第二臂的VH具有
- [0268] (a) 包含序列编号35中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0269] (b) 包含序列编号36中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0270] (c) 包含序列编号37中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。
- [0271] [14]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有
- [0272] (a) 包含序列编号9中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0273] (b) 包含序列编号10中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0274] (c) 包含序列编号11中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和(ii)所述特异性结合CD19的第二臂的VH具有
- [0275] (a) 包含序列编号38中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0276] (b) 包含序列编号39中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0277] (c) 包含序列编号40中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。
- [0278] [15]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有
- [0279] (a) 包含序列编号9中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0280] (b) 包含序列编号10中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0281] (c) 包含序列编号11中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和(ii)所述特异性结合CD19的第二臂的VH具有
- [0282] (a) 包含序列编号41中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0283] (b) 包含序列编号42中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0284] (c) 包含序列编号43中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。
- [0285] [16]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有
- [0286] (a) 包含序列编号9中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0287] (b) 包含序列编号10中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0288] (c) 包含序列编号11中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和(ii)所述特异性结合CD19的第二臂的VH具有
- [0289] (a) 包含序列编号44中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0290] (b) 包含序列编号45中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0291] (c) 包含序列编号46中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。
- [0292] [17]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有
- [0293] (a) 包含序列编号9中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0294] (b) 包含序列编号10中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0295] (c) 包含序列编号11中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和(ii)所述特异性结合CD19的第二臂的VH具有

- [0296] (a) 包含序列编号47中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0297] (b) 包含序列编号48中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0298] (c) 包含在序列编号49中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。
- [0299] [18]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有
- [0300] (a) 包含序列编号12中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0301] (b) 包含序列编号13中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0302] (c) 包含序列编号14中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和(ii)所述特异性结合CD19的第二臂的VH具有
- [0303] (a) 包含序列编号35中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0304] (b) 包含序列编号36中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0305] (c) 包含序列编号37中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。
- [0306] [19]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有
- [0307] (a) 包含序列编号12中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0308] (b) 包含序列编号13中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0309] (c) 包含序列编号14中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和(ii)所述特异性结合CD19的第二臂的VH具有
- [0310] (a) 包含序列编号38中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0311] (b) 包含序列编号39中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0312] (c) 包含序列编号40中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。
- [0313] [20]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有
- [0314] (a) 包含序列编号12中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0315] (b) 包含序列编号13中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0316] (c) 包含序列编号14中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和(ii)所述特异性结合CD19的第二臂的VH具有
- [0317] (a) 包含序列编号41中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0318] (b) 包含序列编号42中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0319] (c) 包含序列编号43中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。
- [0320] [21]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有
- [0321] (a) 包含序列编号12中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0322] (b) 包含序列编号13中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0323] (c) 包含序列编号14中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和(ii)所述特异性结合CD19的第二臂的VH具有
- [0324] (a) 包含序列编号44中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0325] (b) 包含序列编号45中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0326] (c) 包含序列编号46中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。

[0327] [22]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有

[0328] (a) 包含序列编号12中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0329] (b) 包含序列编号13中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0330] (c) 包含序列编号14中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和(ii)所述特异性结合CD19的第二臂的VH具有

[0331] (a) 包含序列编号47中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0332] (b) 包含序列编号48中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0333] (c) 包含序列编号49中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。

[0334] [23]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有

[0335] (a) 包含序列编号15中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0336] (b) 包含序列编号16中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0337] (c) 包含序列编号17中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和(ii)所述特异性结合CD19的第二臂的VH具有

[0338] (a) 包含序列编号35中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0339] (b) 包含序列编号36中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0340] (c) 包含序列编号37中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。

[0341] [24]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有

[0342] (a) 包含序列编号15中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0343] (b) 包含序列编号16中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0344] (c) 包含序列编号17中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和(ii)所述特异性结合CD19的第二臂的VH具有

[0345] (a) 包含序列编号38中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0346] (b) 包含序列编号39中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0347] (c) 包含序列编号40中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。

[0348] [25]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有

[0349] (a) 包含序列编号15中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0350] (b) 包含序列编号16中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0351] (c) 包含序列编号17中列出的氨基酸序列的VH-CDR3和(ii)所述特异性结合CD19的第二臂的VH具有

[0352] (a) 包含序列编号41中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0353] (b) 包含序列编号42中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0354] (c) 包含序列编号43中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。

[0355] [26]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有

[0356] (a) 包含序列编号15中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

- [0357] (b) 包含序列编号16中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0358] (c) 包含序列编号17中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和(ii)所述特异性结合CD19的第二臂的VH具有
- [0359] (a) 包含序列编号44中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0360] (b) 包含序列编号45中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0361] (c) 包含序列编号46中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。
- [0362] [27]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有
- [0363] (a) 包含序列编号15中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0364] (b) 包含序列编号16中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0365] (c) 包含序列编号17中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和(ii)所述特异性结合CD19的第二臂的VH具有
- [0366] (a) 包含序列编号47中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0367] (b) 包含序列编号48中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0368] (c) 包含在序列编号49中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。
- [0369] [28]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有
- [0370] (a) 包含序列编号18中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0371] (b) 包含序列编号19中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0372] (c) 包含序列编号20中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和(ii)所述特异性结合CD19的第二臂的VH具有
- [0373] (a) 包含序列编号35中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0374] (b) 包含序列编号36中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0375] (c) 包含序列编号37中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。
- [0376] [29]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有
- [0377] (a) 包含序列编号18中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0378] (b) 包含序列编号19中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0379] (c) 包含序列编号20中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和(ii)所述特异性结合CD19的第二臂的VH具有
- [0380] (a) 包含序列编号38中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0381] (b) 包含序列编号39中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0382] (c) 包含序列编号40中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。
- [0383] [30]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有
- [0384] (a) 包含序列编号18中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0385] (b) 包含序列编号19中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0386] (c) 包含序列编号20中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和(ii)所述特异性结合CD19的第二臂的VH具有

- [0387] (a) 包含序列编号41中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0388] (b) 包含序列编号42中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0389] (c) 包含序列编号43中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。
- [0390] [31]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有
- [0391] (a) 包含序列编号18中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0392] (b) 包含序列编号19中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0393] (c) 包含序列编号20中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和(ii)所述特异性结合CD19的第二臂的VH具有
- [0394] (a) 包含序列编号44中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0395] (b) 包含序列编号45中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0396] (c) 包含序列编号46中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。
- [0397] [32]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中(i)所述特异性结合PD-1的第一臂的VH具有
- [0398] (a) 包含序列编号18中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0399] (b) 包含序列编号19中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0400] (c) 包含序列编号20中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和(ii)所述特异性结合CD19的第二臂的VH具有
- [0401] (a) 包含序列编号47中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0402] (b) 包含序列编号48中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0403] (c) 包含在序列编号49中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。
- [0404] [33]根据前述项[1]至[32]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中在所述特异性结合PD-1的第一臂的VH中,框架区(下文中,“框架区”可缩写为“FR”)中的框架区1(下文中,可缩写为“FR1”)、框架区2(下文中,可缩写为“FR2”)和框架区3(下文中,可缩写为“FR3”)分别对应于种系V基因IGHV7-4-1或其具有体细胞突变的基因所编码的氨基酸序列。
- [0405] [34]根据前述项[33]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中在所述特异性结合PD-1的第一臂的VH中,所述框架区4(在下文中,“框架区4”可缩写为“FR4”)包含由种系J基因JH6c或其具有体细胞突变的基因编码的氨基酸序列(排除VH-CDR3中包含的氨基酸序列)。
- [0406] [35]根据前述项[33]或[34]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH中的FR由种系V基因IGHV7-4-1中可以具有体细胞突变的该基因编码,并且包含FR1,其中在序列编号21中列出的氨基酸序列中,通过体细胞突变,13位的赖氨酸被或者可以被谷氨酰胺取代,16位的丙氨酸被或可以被缬氨酸取代,或者19位的赖氨酸被或可以被甲硫氨酸取代,或者所述FR1被或可以被其多个任意组合取代。
- [0407] [36]根据前述项[33]至[35]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH中的FR由种系V基因IGHV7-4-1中可以具有体细胞突变的该基因编码,并且包含FR2,其中在序列编号21中列出的氨基酸序列中,37位的缬氨酸被或可以被亮氨酸取代。

[0408] [37]根据前述项[33]至[36]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH中的FR由种系V基因IGHV7-4-1中可以具有体细胞突变的该基因编码,并且包含FR3,其中在序列编号21中列出的氨基酸序列中,通过体细胞突变,77位的丝氨酸被或可以被苏氨酸取代或者84位的半胱氨酸被或可以被丝氨酸或天冬酰胺取代,或者所述FR3被或可以被其多个任意组合取代。

[0409] [38]根据前述项[33]至[37]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH中的FR4由种系J基因JH6c中可以具有体细胞突变的该基因编码(排除编码VH-CDR3的基因区域),其中在FR4的氨基酸序列(Trp-Gly-Lys-Gly-Thr-Thr*-Val-Thr-Val-Ser-Ser)(序列编号61)中,赖氨酸(Lys)被或可以被谷氨酰胺或天冬酰胺取代和/或用星号标记的苏氨酸(Thr)被或可以被亮氨酸取代。

[0410] [39]根据前述项[1]至[38]中任一项所述的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合CD19的第二臂的VH中的FR中的FR1、FR2和FR3分别对应于由种系V基因IGHV5-51或其具有体细胞突变的基因编码的氨基酸序列。

[0411] [40]根据前述项[39]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合CD19的第二臂的VH中的FR由种系V基因IGHV5-51中可以具有体细胞突变的该基因所编码,并且包含FR1,其中在序列编号22中列出的氨基酸序列中,通过体细胞突变,1位的谷氨酸被或可以被谷氨酰胺取代,14位的脯氨酸被或可以被丝氨酸取代,27位的酪氨酸被或可以被苯丙氨酸取代,或30位的苏氨酸被或可以被异亮氨酸取代,或者所述FR1被或可以被其多个的任意组合取代。

[0412] [41]根据前述项[39]或[40]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合CD19的第二臂的VH中的FR包含种系V基因IGHV5-51中可以具有体细胞突变的该基因所编码的FR2。

[0413] [42]根据前述项[39]至[41]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合CD19的第二臂的VH中的FR由种系V基因IGHV5-51中可以具有体细胞突变的该基因所编码,并且包含FR3,其中在序列编号22中列出的氨基酸序列中,通过体细胞突变,76位异亮氨酸是或可以被苯丙氨酸取代,77位的丝氨酸被或可以被苏氨酸或天冬酰胺取代,78位的苏氨酸被或可以被缬氨酸取代,84位的丝氨酸被或可以被天冬酰胺取代,93位的甲硫氨酸被或可以被异亮氨酸或亮氨酸取代,或者97位的丙氨酸被或可以被缬氨酸取代,或者所述FR3被或可以被其多个的任意组合取代。

[0414] [43]根据前述项[1]至[42]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列:序列编号1、序列编号2、序列编号3、序列编号4和序列编号5或与该VH氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0415] [44]根据前述项[1]至[43]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列:序列编号1、序列编号2、序列编号3、序列编号4和序列编号5。

[0416] [45]根据前述项[1]至[44]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列:序列编号30、序列编号31、序列编号32、序列编号33和序列编号34或与该VH氨基酸序列具有至少

80%、90%、95%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0417] [46]根据前述项[1]至[45]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含以下的氨基酸序列,其中选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列中的114位的谷氨酰胺被或可以被精氨酸取代:序列编号30、序列编号31、序列编号32、序列编号33和序列编号34。

[0418] [47]根据前述项[1]至[45]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列:序列编号30、序列编号31、序列编号32、序列编号33、序列编号34、序列编号62、序列编号63、序列编号64、序列编号65和序列编号66。

[0419] [48]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列:序列编号1、序列编号2、序列编号3、序列编号4和序列编号5,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列:序列编号30、序列编号31、序列编号32、序列编号33、序列编号34、序列编号62、序列编号63、序列编号64、序列编号65和序列编号66。

[0420] [49]一种PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其具有特异性结合PD-1的第一臂和特异性结合CD19的第二臂,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列:序列编号1、序列编号2、序列编号3、序列编号4和序列编号5,或与该VH氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、98%或99%同一性的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列:序列编号30、序列编号31、序列编号32、序列编号33、序列编号34、序列编号62、序列编号63、序列编号64、序列编号65和序列编号66,或与该VH氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0421] [50]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号1中所列的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列:序列编号30、序列编号31、序列编号32、序列编号33、序列编号34、序列编号62、序列编号63、序列编号64、序列编号65和序列编号66。

[0422] [51]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号2中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列:序列编号30、序列编号31、序列编号32、序列编号33、序列编号34、序列编号62、序列编号63、序列编号64、序列编号65和序列编号66。

[0423] [52]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号3中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列:序列编号30、序列编号31、序列编号32、序列编号33、序列编号34、序列编号62、序列编号63、序列编号64、序列编号65和序列编号66。

[0424] [53]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号4中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合

CD19的第二臂的VH包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列:序列编号30、序列编号31、序列编号32、序列编号33、序列编号34、序列编号62、序列编号63、序列编号64、序列编号65和序列编号66。

[0425] [54]根据前述项[1]或[2]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号5中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列:序列编号30、序列编号31、序列编号32、序列编号33、序列编号34、序列编号62、序列编号63、序列编号64、序列编号65和序列编号66。

[0426] [55]根据前述项[1]、[2]或[8]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号1中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含序列编号30或序列编号62中列出的氨基酸序列。

[0427] [56]根据前述项[1]、[2]或[9]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号1中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含序列编号31或序列编号63中列出的氨基酸序列。

[0428] [57]根据前述项[1]、[2]或[10]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号1中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含序列编号32或序列编号64中列出的氨基酸序列。

[0429] [58]根据前述项[1]、[2]或[11]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号1中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含序列编号33或序列编号65中列出的氨基酸序列。

[0430] [59]根据前述项[1]、[2]或[12]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号1中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含序列编号34或序列编号66中列出的氨基酸序列。

[0431] [60]根据前述项[1]、[2]或[13]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号2中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含序列编号30或序列编号62中列出的氨基酸序列。

[0432] [61]根据前述项[1]、[2]或[14]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号2中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含序列编号31或序列编号63中列出的氨基酸序列。

[0433] [62]根据前述项[1]、[2]或[15]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号2中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含序列编号32或序列编号64中列出的氨基酸序列。

[0434] [63]根据前述项[1]、[2]或[16]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号2中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含序列编号33或序列编号65中列出的氨基酸序列。

[0435] [64]根据前述项[1]、[2]或[17]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号2中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含序列编号34或序列编号66中列出的氨基酸序列。

[0436] [65]根据前述项[1]、[2]或[18]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所

述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号3中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含序列编号30或序列编号62中列出的氨基酸序列。

[0437] [66]根据前述项[1]、[2]或[19]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号3中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含序列编号31或序列编号63中列出的氨基酸序列。

[0438] [67]根据前述项[1]、[2]或[20]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号3中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含序列编号32或序列编号64中列出的氨基酸序列。

[0439] [68]根据前述项[1]、[2]或[21]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号3中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含序列编号33或序列编号65中列出的氨基酸序列。

[0440] [69]根据前述项[1]、[2]或[22]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号3中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含序列编号34或序列编号66中列出的氨基酸序列。

[0441] [70]根据前述项[1]、[2]或[23]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号4中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含序列编号30或序列编号62中列出的氨基酸序列。

[0442] [71]根据前述项[1]、[2]或[24]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号4中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含序列编号31或序列编号63中列出的氨基酸序列。

[0443] [72]根据前述项[1]、[2]或[25]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号4中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含序列编号32或序列编号64中列出的氨基酸序列。

[0444] [73]根据前述项[1]、[2]或[26]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号4中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含序列编号33或序列编号65中列出的氨基酸序列。

[0445] [74]根据前述项[1]、[2]或[27]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号4中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含序列编号34或序列编号66中列出的氨基酸序列。

[0446] [75]根据前述项[1]、[2]或[28]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号5中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含序列编号30或序列编号62中列出的氨基酸序列。

[0447] [76]根据前述项[1]、[2]或[29]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号5中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含序列编号31或序列编号63中列出的氨基酸序列。

[0448] [77]根据前述项[1]、[2]或[30]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号5中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含序列编号32或序列编号64中列出的氨基酸序列。

[0449] [78]根据前述项[1]、[2]或[31]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所

述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号5中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含序列编号33或序列编号65中列出的氨基酸序列。

[0450] [79]根据前述项[1]、[2]或[32]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂的VH包含序列编号5中列出的氨基酸序列,并且所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含序列编号34或序列编号66中列出的氨基酸序列。

[0451] [80]根据前述项[1]至[79]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂和/或所述特异性结合CD19的第二臂具有轻链可变区(下文中,“轻链可变区”可缩写为“VL”),其具有

[0452] (a) 轻链可变区的互补决定区1(下文中,“轻链可变区的互补决定区1”可缩写为“VL-CDR1”),其包含序列编号26中列出的氨基酸序列,

[0453] (b) 轻链可变区的互补决定区2(下文中,“轻链可变区的互补决定区2”可缩写为“VL-CDR2”),其包含序列编号27中列出的氨基酸序列,和

[0454] (c) 轻链可变区的互补决定区3(下文中,“轻链可变区的互补决定区3”可缩写为“VL-CDR3”),其包含序列编号28中列出的氨基酸序列。

[0455] [81]根据前述项[1]至[80]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂和/或所述特异性结合CD19的第二臂分别具有包含序列编号25中列出的氨基酸序列的VL。

[0456] [82]一种双特异性抗体或其抗体片段,其具有特异性结合PD-1的第一臂和特异性结合CD19的第二臂,并且分别特异性结合PD-1和CD19,其中(A)所述特异性结合PD-1的第一臂具有包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列的VH:序列编号1、序列编号2、序列编号3、序列编号4和序列编号5,和包含序列编号25中列出的氨基酸序列的VL,和

[0457] (B)所述特异性结合CD19的第二臂具有包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列的VH:序列编号30、序列编号31、序列编号32、序列编号33、序列编号34、序列编号62、序列编号63、序列编号64、序列编号65和序列编号66,和包含序列编号25中列出的氨基酸序列的VL。

[0458] [83]一种双特异性抗体或其抗体片段,其具有特异性结合PD-1的第一臂和特异性结合CD19的第二臂,并且分别特异性结合PD-1和CD19,其中所述特异性结合PD-1的第一臂(1)与具有包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列的VH:序列编号1、序列编号2、序列编号3、序列编号4和序列编号5和包含序列编号25的氨基酸序列的VL的特异性结合PD-1的第一臂交叉竞争与PD-1的结合,或者(2)与包含相同VH和VL的特异性结合PD-1的单克隆抗体的可变区交叉竞争与PD-1的结合。

[0459] [84]一种双特异性抗体或其抗体片段,其具有特异性结合PD-1的第一臂和特异性结合CD19的第二臂,并且分别特异性结合PD-1和CD19,其中以下项与所述特异性结合PD-1的第一臂交叉竞争与PD-1的结合:(1)具有包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列的VH:序列编号1、序列编号2、序列编号3、序列编号4和序列编号5和包含序列编号25的氨基酸序列的VL的特异性结合PD-1的第一臂,或者(2)具有相同VH和VL的特异性结合PD-1的单克隆抗体的可变区。

[0460] [85]根据前述项[83]或[84]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合CD19的第二臂还(1)与具有包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列的

VH:序列编号30、序列编号31、序列编号32、序列编号33、序列编号34、序列编号62、序列编号63、序列编号64、序列编号65和序列编号66和包含序列编号25的氨基酸序列的VL的特异性结合CD19的第二臂交叉竞争与CD19的结合,或者(2)与具有相同VH和VL的特异性结合CD19的单克隆抗体的可变区交叉竞争与CD19的结合。

[0461] [86]根据前述项[83]或[84]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中以下项进一步与所述特异性结合CD19的第二臂交叉竞争与CD19的结合:(1)具有以下VH和VL的特异性结合CD19的第二臂,所述VH包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列:序列编号30、序列编号31、序列编号32、序列编号33、序列编号34、序列编号62、序列编号63、序列编号64、序列编号65和序列编号66,以及所述VH包含序列编号25的氨基酸序列,或(2)具有相同的VH和VL的特异性结合CD19的单克隆抗体的可变区。

[0462] [87]根据前述项[83]或[84]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合CD19的第二臂具有选自以下的任何一个VH:

[0463] (A) VH,其具有

[0464] (a) 包含序列编号35中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0465] (b) 包含序列编号36中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0466] (c) 包含序列编号37中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,

[0467] (B) VH,其具有

[0468] (a) 包含序列编号38中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0469] (b) 包含序列编号39中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0470] (c) 包含序列编号40中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,

[0471] (C) VH,其具有

[0472] (a) 包含序列编号41中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0473] (b) 包含序列编号42中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0474] (c) 包含序列编号43中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,

[0475] (D) VH,其具有

[0476] (a) 包含序列编号44中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0477] (b) 包含序列编号45中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0478] (c) 包含序列编号46中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和

[0479] (E) VH,其具有

[0480] (a) 包含序列编号47中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0481] (b) 包含序列编号48中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0482] (c) 包含序列编号49中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。

[0483] [88]根据前述项[83]或[84]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列:序列编号30、序列编号31、序列编号32、序列编号33、序列编号34、序列编号62、序列编号63、序列编号64、序列编号65和序列编号66,或与该VH氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0484] [89]根据前述项[83]或[84]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合CD19的第二臂的VH包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列:序列编号

30、序列编号31、序列编号32、序列编号33、序列编号34、序列编号62、序列编号63、序列编号64、序列编号65和序列编号66。

[0485] [90]根据前述项[83]至[89]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂和/或所述特异性结合CD19的第二臂具有以下的VL,其具有:

[0486] (a) 包含序列编号26中列出的氨基酸序列的VL-CDR1,

[0487] (b) 包含序列编号27中列出的氨基酸序列的VL-CDR2,和

[0488] (c) 包含序列编号28中列出的氨基酸序列的VL-CDR3。

[0489] [91]根据前述项[83]至[89]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂和/或所述特异性结合CD19的第二臂具有包含序列编号25中列出的氨基酸序列的VL。

[0490] [92]根据前述项[1]至[91]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述PD-1/CD19双特异性抗体是IgG抗体。

[0491] [93]根据前述项[92]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中前述项[92]中的IgG抗体是IgG₁或IgG₄抗体。

[0492] [94]根据前述项[92]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中前述项[92]中的IgG抗体是IgG₁抗体。

[0493] [95]根据前述项[92]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中前述项[92]中的IgG抗体是IgG₄抗体。

[0494] [96]根据前述项[94]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中在前述项[94]的IgG₁抗体的两个重链恒定区中,各自的根据EU编号系统的235位亮氨酸被甘氨酸取代,和/或各自的根据EU编号系统的236位甘氨酸被精氨酸取代。

[0495] [97]根据前述项[94]或[96]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中在具有所述特异性结合PD-1的第一臂的VH的重链的恒定区中,根据EU编号系统的351位的亮氨酸和366位的苏氨酸均被赖氨酸取代,并且在具有所述特异性结合CD19的第二臂的VH的重链的恒定区中,351位的亮氨酸被天冬氨酸取代,并且368位的亮氨酸被谷氨酸取代。

[0496] [98]根据前述项[94]或[96]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中在具有所述特异性结合PD-1的第一臂的VH的重链的恒定区中,根据EU编号系统的351位的亮氨酸被天冬氨酸取代,并且368位的亮氨酸被谷氨酸取代,并且在具有所述特异性结合CD19的第二臂的VH的重链的恒定区中,351位的亮氨酸和366位的苏氨酸均被赖氨酸取代。

[0497] [99]根据前述项[94]和[96]至[98]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中在前述项[94]和[96]至[98]的任一项中IgG₁抗体的两个重链恒定区中,各自的根据EU编号系统的447位的赖氨酸是缺失的。

[0498] [100]根据前述项[95]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中在前述项[95]中的IgG₄抗体的两个重链恒定区中,各自的根据EU编号系统的228位的丝氨酸被脯氨酸取代。

[0499] [101]根据前述项[94]和[96]至[99]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中具有所述特异性结合CD19的第二臂的VH的重链在其C端进一步具有Gly(甘氨酸)、Gly-Lys-Lys-Ala(序列编号67)、Gly-Lys-Ala-Lys-Ala(序列编号68)、Gly-Arg-Arg-

Ala(序列编号69)或Gly-Arg-Ala-Arg-Ala(序列编号70)。

[0500] [102]根据前述项[1]至[94]、[96]、[98]、[99]和[101]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中具有所述特异性结合PD-1的第一臂的VH的重链具有包含序列编号23中列出的氨基酸序列的重链恒定区。

[0501] [103]根据前述项[1]至[94]、[96]、[98]、[99]、[101]和[102]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中具有所述特异性结合CD19的第二臂的VH的重链具有包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列的重链恒定区:序列编号24、序列编号71、序列编号72、序列编号73、序列编号74和序列编号75。

[0502] [104]根据前述项[1]至[103]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中具有所述特异性结合PD-1的第一臂的VL的轻链和/或具有所述特异性结合CD19的第二臂的VL的轻链含有以下的轻链恒定区,其包含序列编号29中列出的氨基酸序列。

[0503] [105]一种双特异性抗体或其抗体片段,其具有特异性结合PD-1的第一臂和特异性结合CD19的第二臂,并且分别特异性结合PD-1和CD19,其中

[0504] (A)具有所述特异性结合PD-1的第一臂的VH的重链具有包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列的VH:序列编号1、序列编号2、序列编号3、序列编号4和序列编号5,以及包含序列编号23中列出的氨基酸序列的重链恒定区,

[0505] (B)具有所述特异性结合PD-1的第一臂的VL的轻链具有包含序列编号25中列出的氨基酸序列的VL,以及包含序列编号29中列出的氨基酸序列的轻链恒定区,

[0506] (C)具有所述特异性结合CD19的第二臂的VH的重链具有包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列的VH:序列编号30、序列编号31、序列编号32、序列编号33、序列编号34、序列编号62、序列编号63、序列编号64、序列编号65和序列编号66,以及包含序列编号24中列出的氨基酸序列的重链恒定区,和

[0507] (D)具有所述特异性结合CD19的第二臂的VL的轻链具有包含序列编号25中列出的氨基酸序列的VL,以及包含序列编号29中列出的氨基酸序列的轻链恒定区。

[0508] [106]根据前述项[1]至[105]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂允许PD-1和PD-L1之间的相互作用。

[0509] [107]根据前述项[1]至[106]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中由所述特异性结合PD-1的第一臂的重链和轻链组成的复合物具有在约7.4至约7.7之间(优选地,在约7.5至约7.6之间)的等电点。

[0510] [108]根据前述项[1]至[107]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中由所述特异性结合CD19的第二臂的重链和轻链组成的复合物具有在约8.3至约8.8之间(优选地,在约8.4至约8.6之间)的等电点。

[0511] [109]根据前述项[1]至[108]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中在施用期间或施用后24小时内血液或组织中细胞因子的产生充分减少。

[0512] [110]根据前述项[1]至[108]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述特异性结合PD-1的第一臂允许PD-1和PD-L1之间的相互作用,并且其中细胞因子的产生充分减少。

[0513] [111]根据前述项[109]或[110]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述细胞因子至少为IL-2、IFN- γ 或TNF- α 。

[0514] [112]根据前述项[1]至[111]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其分别通过结合B细胞上表达的PD-1和CD19来抑制B细胞的活化。

[0515] [113]根据前述项[1]至[111]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其抑制T细胞(优选记忆T细胞)的活化。

[0516] [114]根据前述项[113]的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其分别通过结合B细胞上表达的CD19和T细胞上表达的PD-1来抑制T细胞活化。

[0517] [115]根据前述项[1]至[114]中任一项所述的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中PD-1为人PD-1,且CD19为人CD19。

[0518] [116]根据前述项[1]至[115]中任一项所述的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述PD-1/CD19双特异性抗体为单克隆抗体。

[0519] [117]根据前述项[1]至[116]中任一项所述的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其中所述PD-1/CD19双特异性抗体是分离的抗体。

[0520] [1-1]一种药物组合物,其含有选自前述项[1]至[117]的任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段作为活性成分。

[0521] [1-2]根据前述项[1-1]的药物组合物,其进一步至少含有药学上可接受的载体。

[0522] [2-1]一种用于预防自身免疫性疾病、抑制自身免疫性疾病的症状进展、抑制自身免疫性疾病的复发和/或治疗自身免疫性疾病的药剂,其含有选自前述项[1]至[117]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段作为活性成分。

[0523] [2-2]根据前述项[2-1]的药剂,其中自身免疫性疾病是贝切特氏病、系统性红斑狼疮、慢性盘状红斑狼疮、多发性硬化(系统性硬皮病和进行性系统性硬化症)、硬皮病、多肌炎、皮炎、结节性动脉周围炎(结节性多动脉炎和显微镜下多血管炎)、主动脉炎综合征(高安氏动脉炎)、恶性类风湿性关节炎、类风湿性关节炎、幼年特发性关节炎、脊椎关节炎、混合性结缔组织病、舍格伦综合征、成人斯蒂尔病、血管炎、变应性肉芽肿性血管炎、超敏感性血管炎、类风湿性血管炎、大血管血管炎、ANCA相关血管炎(如肉芽肿伴多血管炎和嗜酸性肉芽肿伴多血管炎)、寇甘综合征、RS3PE综合征、颞动脉炎、风湿性多肌痛、纤维肌痛、抗磷脂抗体综合征、嗜酸性筋膜炎、IgG₄相关疾病(如原发性硬化性胆管炎和自身免疫性胰岛炎等)、格-巴二氏综合征、重症肌无力、慢性萎缩性胃炎、自身免疫性肝炎、非酒精性脂肪性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、肺出血肾炎综合征、急进性肾小球肾炎、巨幼红细胞贫血、自身免疫性溶血性贫血、恶性贫血、自身免疫性中性粒细胞减少、特发性血小板减少性紫癜、巴塞多病(格雷夫斯病(甲亢))、桥本病、自身免疫性肾上腺皮质功能不全、原发性甲状腺功能减退症、阿狄森氏病(慢性肾上腺皮质功能减退)、特发型阿狄森氏病、I型糖尿病、缓慢进展的I型糖尿病、局灶性硬皮病、银屑病、银屑病关节炎、大疱性类天疱疮、天疱疮、类天疱疮、妊娠疱疹、线性IgA大疱性皮肤病、获得性大疱性表皮松解症、斑秃、白癜风、寻常型白癜风、视神经脊髓炎、慢性炎性脱髓鞘性多神经病、多灶性运动神经病、结节病、巨细胞动脉炎、肌萎缩侧索硬化、原田病、自身免疫性视神经病变、特发性无精子症、习惯性流产、炎症性肠病(如溃疡性结肠炎和克罗恩病)、乳糜泻、强直性脊柱炎、严重哮喘、慢性荨麻疹、移植免疫、家族性地中海热、嗜酸性粒细胞慢性鼻及鼻窦炎、扩张型心肌病、系统性肥大细胞增多或包涵体肌炎。

[0524] [2-3]一种用于预防移植物抗宿主病(GVHD)、抑制移植物抗宿主病(GVHD)的症状

进展、抑制移植物抗宿主病 (GVHD) 的复发和/或治疗移植物抗宿主病 (GVHD) 的药剂,其含有根据前述项[1]至[117]中任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段作为活性成分。

[0525] [2-4]一种用于预防I型糖尿病、抑制I型糖尿病的症状进展、抑制I型糖尿病复发和/或治疗I型糖尿病的药剂,其含有选自前述项[1]至[117]的任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段作为活性成分,并且与选自以下的任何一种或多种药物一起施用:胰岛素制剂(例如人胰岛素、甘精胰岛素、赖脯胰岛素、地特胰岛素和门冬胰岛素等)、磺脲类药剂(如格列本脲、格列齐特、格列美脲等)、速效胰岛素分泌促进剂(如那格列奈等)、双胍制剂(如二甲双胍等)、胰岛素抗性改善剂(如吡格列酮等)、 α -葡萄糖苷酶抑制剂(如阿卡波糖、伏格列波糖等)、糖尿病神经病治疗剂(如依帕司他、美西律、咪达普利等)、GLP-1类似物制剂(如利拉鲁肽(liraglutide)、艾塞那肽(exenatide)、利西拉肽(lixisenatide)等)和DPP-4抑制剂(例如,西格列汀(sitagliptin)、维格列汀(vildagliptin)和阿格列汀(alogliptin)等)。

[0526] [2-5]一种用于预防多发性硬化、抑制多发性硬化的症状进展、抑制多发性硬化的复发和/或治疗多发性硬化的药剂,其含有选自前述项[1]至[117]的任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段作为活性成分,并且与选自以下的任何一种或多种药物一起施用:类固醇剂(例如醋酸可的松、氢化可的松、氢化可的松磷酸钠、氢化可的松琥珀酸钠、醋酸氟氢可的松、泼尼松龙、醋酸泼尼松龙、泼尼松龙琥珀酸钠、泼尼松龙醋酸丁酯、泼尼松龙磷酸钠、醋酸卤泼尼松、甲泼尼龙、醋酸甲泼尼龙、甲泼尼龙琥珀酸钠、曲安西龙(triamsinolone)、醋酸曲安西龙、曲安奈德(triamsinolone acetonide)、地塞米松、醋酸地塞米松、地塞米松磷酸钠、地塞米松棕榈酸酯、醋酸对氟米松、和倍他米松等)、干扰素 β -1a、干扰素 β -1b、醋酸格拉替雷(glatiramer acetate)、米托蒽醌、硫唑嘌呤、环磷酰胺、环孢菌素、甲氨蝶呤、克拉屈滨、促肾上腺皮质激素(ACTH)、促皮质素、咪唑立滨、他克莫司、芬戈莫德(fingolimod)和阿仑单抗(alemtuzumab)。

[0527] [2-6]一种用于预防系统性红斑狼疮、抑制系统性红斑狼疮的症状进展、抑制系统性红斑狼疮的复发和/或治疗系统性红斑狼疮的药剂,其含有选自前述项[1]至[117]的任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段作为活性成分,并且与选自以下的任何一种或多种药物一起施用:类固醇剂(例如,前述项[2-5]中提到的类固醇剂)、免疫抑制剂(例如,环孢菌素、他克莫司和芬戈莫德等)和贝利木单抗。

[0528] [2-7]一种用于预防类风湿性关节炎、抑制类风湿性关节炎的症状进展、抑制类风湿性关节炎的复发和/或治疗类风湿性关节炎的药剂,其含有选自前述项[1]至[117]的任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段作为活性成分,并且与选自以下的任何一种或多种药物一起施用:类固醇剂(例如,前述项[2-5]中提到的类固醇剂)、抗风湿剂(甲氨蝶呤、柳氮磺吡啶、布西拉明、来氟米特、咪唑立滨和他克莫司等)、抗细胞因子药物(如英夫利昔单抗、阿达木单抗、托珠单抗(tocilizumab)、依那西普、戈利木单抗(golimumab)和赛妥珠单抗(certolizumab)等)和阿巴西普(abatacept)。

[0529] [2-8]一种用于预防自身免疫性疾病、抑制自身免疫性疾病的症状进展、抑制自身免疫性疾病的复发和/或治疗自身免疫性疾病的药剂,其含有选自前述项[1]至[117]的任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段作为活性成分,并与前述项[2-4]至[2-7]中列出的任何一种或多种药剂一起施用。

[0530] [2-9]根据前述项[2-4]至[2-8]的用于预防疾病、抑制疾病症状进展、抑制疾病复发和/或治疗疾病的药剂,其施用于接受前述项[2-4]至[2-7]中列出的任何一种或多种药物的施用的患者。

[0531] [2-10]根据前述项[2-4]至[2-8]的用于预防疾病、抑制疾病症状进展、抑制疾病复发和/或治疗疾病的药剂,其在施用前述项[2-4]至[2-7]中列出的任何一种或多种药物后施用。

[0532] [2-11]根据前述项[2-4]至[2-8]的用于预防疾病、抑制疾病症状进展、抑制疾病复发和/或治疗疾病的药剂,其在施用前述项[2-4]至[2-7]中列出的任何一种或多种药物前施用。

[0533] [3-1]一种静脉内注射制剂,其含有前述项[1]至[117]中任一项所述的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段和至少一种药学上可接受的载体。

[0534] [3-2]根据前述项[3-1]的静脉内注射制剂,其用于预防自身免疫性疾病、抑制自身免疫性疾病的症状进展、抑制自身免疫性疾病的复发和/或治疗自身免疫性疾病。

[0535] [3-3]根据前述项[3-1]或[3-2]的静脉内注射制剂,其用于滴注。

[0536] [4-1]一种分离的多核苷酸或其片段,其编码具有特异性结合CD19的第二臂的VH的重链,所述第二臂构成选自前述项[1]至[117]的任一项的PD-1/CD19双特异性抗体。

[0537] [4-2]一种分离的多核苷酸或其片段,其编码特异性结合CD19的第二臂的VH,所述第二臂构成选自前述项[1]至[117]的任一项的PD-1/CD19双特异性抗体。

[0538] [4-3]根据前述项[4-1]或[4-2]的分离的多核苷酸或其片段,其中所述特异性结合CD19的第二臂的VH由以下的多核苷酸编码,所述多核苷酸包含选自以下的任何一个中列出的碱基序列:序列编号56至60和序列编号76至80。

[0539] [4-4]一种分离的多核苷酸或其片段,其含有以下的多核苷酸,所述多核苷酸包含选自序列编号56至60和序列编号76至80的任何一个中列出的碱基序列。

[0540] [5-1]一种表达载体,其具有前述项[4-1]至[4-4]中任一项的多核苷酸。

[0541] [6-1]一种动物细胞,其中转染了前述项[5-1]的表达载体,或者转化了该载体。

[0542] [7-1]一种用于预防自身免疫性疾病、抑制自身免疫性疾病的症状进展、抑制自身免疫性疾病复发和/或治疗自身免疫性疾病的方法,其包括向患者施用有效量的选自前述项[1]至[117]的任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段。

[0543] [8-1]选自前述项[1]至[117]的任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其用于预防自身免疫性疾病、抑制自身免疫性疾病的症状进展、抑制自身免疫性疾病的复发,和/或治疗自身免疫性疾病。

[0544] [9-1]选自前述项[1]至[117]的任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段用于制备药物的用途,所述药物用于预防自身免疫性疾病、抑制自身免疫性疾病的症状进展、抑制自身免疫性疾病复发和/或治疗自身免疫性疾病。

[0545] [10-1]一种分离的抗CD19单克隆抗体或其抗体片段,其与特异性结合CD19的抗体交叉竞争与CD19的结合,所述特异性结合CD19的抗体具有包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列的VH:序列编号30、序列编号31、序列编号32、序列编号33、序列编号34、序列编号62、序列编号63、序列编号64、序列编号65和序列编号66,以及包含序列编号25中列出的氨基酸序列的VL。

[0546] [10-2]一种分离的抗CD19单克隆抗体或其抗体片段,其中特异性结合CD19的抗体与所述抗体或其抗体片段交叉竞争与CD19的结合,所述特异性结合CD19的抗体具有包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列的VH:序列编号30、序列编号31、序列编号32、序列编号33、序列编号34、序列编号62、序列编号63、序列编号64、序列编号65和序列编号66,以及包含序列编号25中列出的氨基酸序列的VL。

[0547] [10-3]一种分离的抗CD19单克隆抗体或其抗体片段,其具有选自以下的任何一个VH:

[0548] (A) VH,其具有

[0549] (a) 包含序列编号35中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0550] (b) 包含序列编号36中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0551] (c) 包含序列编号37中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,

[0552] (B) VH,其具有

[0553] (a) 包含序列编号38中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0554] (b) 包含序列编号39中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0555] (c) 包含序列编号40中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,

[0556] (C) VH,其具有

[0557] (a) 包含序列编号41中所列氨基酸序列的aVH-CDR1,

[0558] (b) 包含序列编号42中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0559] (c) 包含序列编号43中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,

[0560] (D) VH,其具有

[0561] (a) 包含序列编号44中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0562] (b) 包含序列编号45中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0563] (c) 包含列编号46中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和

[0564] (E) VH,其具有

[0565] (a) 包含序列编号47中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0566] (b) 包含序列编号48中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0567] (c) 包含序列编号49中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和

[0568] VL,其具有

[0569] (a) 包含序列编号26中列出的氨基酸序列的VL-CDR1,

[0570] (b) 包含序列编号27中列出的氨基酸序列的VL-CDR2,和

[0571] (c) 包含序列编号28中列出的氨基酸序列的VL-CDR3。

[0572] [10-4]一种分离的抗CD19单克隆抗体或其抗体片段,其具有选自以下的任何一种VH:

[0573] (A) VH,其具有

[0574] (a) 包含序列编号35中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

[0575] (b) 包含序列编号36中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和

[0576] (c) 包含序列编号37中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,

[0577] (B) VH,其具有

[0578] (a) 包含序列编号38中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,

- [0579] (b) 包含序列编号39中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0580] (c) 包含序列编号40中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,
- [0581] (C) VH,其具有
- [0582] (a) 包含序列编号41中所列氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0583] (b) 包含序列编号42中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0584] (c) 包含序列编号43中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,
- [0585] (D) VH,其具有
- [0586] (a) 包含序列编号44中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0587] (b) 包含序列编号45中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0588] (c) 包含序列编号46中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和
- [0589] (E) VH,其具有
- [0590] (a) 包含序列编号47中列出的氨基酸序列的VH-CDR1,
- [0591] (b) 包含序列编号48中列出的氨基酸序列的VH-CDR2,和
- [0592] (c) 包含序列编号49中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和
- [0593] VL,其具有
- [0594] (a) 包含序列编号26中列出的氨基酸序列的VL-CDR1,
- [0595] (b) 包含序列编号27中列出的氨基酸序列的VL-CDR2,和
- [0596] (c) 包含序列编号28中所列氨基酸序列的VL-CDR3,
- [0597] 其中VH中选自VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3的任何一个或多个CDR中的1至5个任意氨基酸残基可以被其他氨基酸取代。
- [0598] [10-5]根据前述项[10-1]至[10-4]中任一项的分离的抗CD19单克隆抗体或其抗体片段,其具有包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列的VH:序列编号30、序列编号31、序列编号32、序列编号33和序列编号34,或包含与该VH氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、98%或99%同一性的氨基酸序列的VH,和包含序列编号25中列出的氨基酸序列的VL。
- [0599] [10-6]根据前述项[10-1]至[10-4]中任一项的分离的抗CD19单克隆抗体或其抗体片段,其具有包含以下氨基酸序列的VH:其中选自序列编号30、序列编号31、序列编号32、序列编号33和序列编号34的任何一个中列出的氨基酸序列中114位的谷氨酰胺被或可以被精氨酸取代,和包含序列编号25中列出的氨基酸序列的VL。
- [0600] [10-7]根据前述项[10-1]至[10-4]中任一项所述的分离的抗CD19单克隆抗体或其抗体片段,其具有包含选自序列编号30、序列编号31、序列编号32、序列编号33、序列编号34、序列编号62、序列编号63、序列编号64、序列编号65和序列编号66的任何一个中列出的氨基酸序列的VH和包含序列编号25中列出的氨基酸序列的VL。
- [0601] [10-8]根据前述项[10-1]至[10-7]中任一项的分离的抗CD19单克隆抗体或其抗体片段,其中CD19是人CD19。
- [0602] [10-9]根据前述项[10-1]至[10-8]中任一项的分离的抗CD19单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗CD19抗体为IgG抗体。
- [0603] [10-10]根据前述项[10-9]的分离的抗CD19单克隆抗体或其抗体片段,其中在前述项[10-9]中描述的IgG抗体是IgG₁抗体或IgG₄抗体。
- [0604] [10-11]根据前述项[10-9]的分离的抗CD19单克隆抗体或其抗体片段,其中在前

述项[10-9]中描述的IgG抗体是IgG₁抗体。

[0605] [10-12]根据前述项[10-9]的分离的抗CD19单克隆抗体或其抗体片段,其中在前述项[10-9]中描述的IgG抗体是IgG₄抗体。

[0606] [10-13]根据前述项[10-1]至[10-11]中任一项的分离的抗CD19单克隆抗体或其抗体片段,其中在重链恒定区中,(1)351位的亮氨酸被天冬氨酸取代,并且368位亮氨酸被谷氨酸取代,或者(2)在重链恒定区中,351位亮氨酸和366位苏氨酸都被赖氨酸取代。

[0607] [10-14]根据前述项[10-1]至[10-13]中任一项的分离的抗CD19单克隆抗体或其抗体片段,其在重链的C端进一步具有Gly(甘氨酸)、Gly-Lys-Lys-Ala(序列编号67)、Gly-Lys-Ala-Lys-Ala(序列编号68)、Gly-Arg-Arg-Ala(序列编号69)或Gly-Arg-Ala-Arg-Ala(序列编号70)。

[0608] [10-15]根据前述项[10-1]至[10-14]中任一项的分离的抗CD19单克隆抗体或其抗体片段,其中所述重链具有包含选自以下的任何一个中列出的氨基酸序列的重链恒定区:序列编号24、序列编号71、序列编号72、序列编号73、序列编号74和序列编号75。

[0609] [11-1]一种用于预防自身反应性B细胞介导的疾病、抑制自身反应性B细胞介导的疾病的症状进展、抑制自身反应性B细胞介导的疾病的复发和/或治疗自身反应性B细胞介导的疾病的药剂,其含有选自前述项[1]至[117]的任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段作为活性成分。

[0610] [11-2]根据前述项[11-1]的用于预防自身反应性B细胞介导的疾病、抑制自身反应性B细胞介导的疾病的症状进展、抑制自身反应性B细胞介导的疾病的复发和/或治疗自身反应性B细胞介导的疾病的药剂,其中所述自身反应性B细胞介导的疾病是系统性红斑狼疮、格雷夫斯病、重症肌无力、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性血小板减少、哮喘、冷球蛋白血症、原发性硬化性胆管炎或恶性贫血。

[0611] [12-1]一种用于抑制自身反应性B细胞的药剂,其含有选自前述项[1]至[117]的任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段作为活性成分。

[0612] [12-2]根据前述项[12-1]的用于抑制自身反应性B细胞的药剂,其中自身反应性B细胞的抑制是对免疫球蛋白产生的抑制。

[0613] [12-3]根据前述项[12-2]的用于抑制自身反应性B细胞的药剂,其中所述免疫球蛋白是IgG或IgM。

[0614] [13-1]一种用于抑制T细胞活化的药剂,其含有选自前述项[1]至[117]的任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段作为活性成分。

[0615] [13-2]根据前述项[13-1]的用于抑制T细胞活化的药剂,其中T细胞活化的抑制是对细胞因子产生的抑制。

[0616] [13-3]根据前述项[13-1]或[13-2]的用于抑制T细胞活化的药剂,其中T细胞活化的抑制是记忆T细胞活化的抑制。

[0617] [14-1]一种抑制自身反应性B细胞或T细胞活化的方法,其包括向患者施用有效量的选自前述项[1]至[117]的任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段。

[0618] [15-1]选自前述项[1]至[117]的任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段,其用于抑制自身反应性B细胞或T细胞活化。

[0619] [16-1]选自前述项[1]至[117]的任一项的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段

用于制备药物的用途,所述药物用于抑制自身反应性B细胞或T细胞活化。

[0620] 【发明的有益效果】

[0621] 本发明的PD-1/CD19双特异性抗体允许PD-1和PD-L1之间的相互作用,并有望增强或维持对预防自身免疫性疾病、抑制自身免疫性疾病症状进展、抑制自身免疫性疾病复发和/或自身免疫性疾病的疗法的效果。

附图说明

[0622] [图1]它显示了共同轻链的VL和恒定区的氨基酸序列。

[0623] [图2]它显示了共同轻链VL中各个CDR的氨基酸序列。

[0624] [图3]它显示了种系V基因:IGHV7-4-1和IGHV5-51各自编码的氨基酸序列。

[0625] [图4]它显示了特异性结合PD-1的抗体(以下可以缩写为“抗PD-1抗体”)的各个克隆的VH,种系基因IGHV7-4-1和JH6c之间的序列比对。本图中,克隆的氨基酸序列中的“-”代表与相应种系基因IGHV7-4-1或JH6c的氨基酸相同的氨基酸,并且氨基酸的缩写代表与该种系基因的氨基酸不同的氨基酸。

[0626] [图5]它显示了特异性结合CD19的抗体(以下可以缩写为“抗CD19抗体”)的各个克隆的VH与种系基因IGHV5-51编码的氨基酸序列之间的序列比对。本图中的每个符号代表与图4中的含义相同的含义。

[0627] [图6]它显示了各个抗PD-1抗体克隆的VH氨基酸序列。

[0628] [图7]它显示了各个抗PD-1抗体克隆的VH中各个CDR氨基酸序列。

[0629] [图8]它显示了各个抗CD19抗体克隆的VH氨基酸序列。

[0630] [图9]它显示了各个抗CD19抗体克隆的VH中的各个CDR氨基酸序列。

[0631] [图10]它显示了PD-1/CD19双特异性单克隆抗体的各个重链恒定区的氨基酸序列。

[0632] [图11]它显示了来自Biacore测量的结果,证明了各个PD-1/CD19双特异性抗体克隆对PD-1和CD19的结合活性。

[0633] [图12]它显示了分别证明各个PD-1/CD19双特异性抗体克隆CD19-1(Bi)至CD19-3(Bi)对CD19的结合特性的流式细胞术。

[0634] [图13]它显示了分别证明各个PD-1/CD19双特异性抗体克隆CD19-4(Bi)和CD19-5(Bi)对CD19的结合特性的流式细胞术。

[0635] [图14]它显示了分别证明各个PD-1/CD19双特异性抗体克隆CD19-1(Bi)至CD19-3(Bi)对PD-1的结合特性的流式细胞术。

[0636] [图15]它显示了分别证明了各个PD-1/CD19双特异性抗体克隆CD19-4(Bi)和CD19-5(Bi)对PD-1的结合特性的流式细胞术。

[0637] [图16]它显示了分别证明了PD-1/CD19双特异性抗体克隆CD19-6(Bi)对PD-1和CD19的结合特性的流式细胞术。

[0638] [图17]它显示了分别证明了各个PD-1/CD19双特异性抗体克隆对PD-1和CD19的同时结合特性的流式细胞术。

[0639] [图18]它显示了分别证明了对各个PD-1/CD19双特异性抗体克隆的PD-1/PD-L1相互作用的影响的流式细胞术。

[0640] [图19]它显示了各个PD-1/CD19双特异性抗体克隆分别对活化的人B细胞的IgM产生的体外影响。这里注意在此图中,“Ctrl”代表对照组。

[0641] [图20]它显示了各个PD-1/CD19双特异性抗体克隆CD19-1(Bi)至CD19-4(Bi)分别对活化的人B细胞的IgG₂产生的体内影响。这里注意,在此图中,“Ctrl”代表对照组。

[0642] [图21]它显示了PD-1/CD19双特异性抗体克隆CD19-5(Bi)和CD19-6(Bi)分别对活化的人B细胞的IgG₂产生的体内影响。这里注意,在此图中,“Ctrl”代表对照组。

[0643] [图22]它显示PD-1/CD19双特异性抗体克隆CD19-6(Bi)对人外周血单核细胞的细胞因子产生的影响。这里注意,在此图中,“培养基”代表对照组。

具体实施方式

[0644] PD-1(程序性细胞死亡-1)是一种人类中的膜型蛋白,其由GenBank登录号NP_005009代表的氨基酸序列构成。在本说明书中,除非另有明确定义,否则术语“PD-1”可用作包括保留了本发明的“特异性结合PD-1的第一臂”的表位的其所有同种型及其进一步变体的含义。在本发明中,PD-1优选为人PD-1。

[0645] CD19是人类中的B细胞上的一种膜蛋白,由GenBank登录号NP_001171569或NP_001761代表的氨基酸序列构成,并且是与B细胞受体复合物一起将刺激转移到B细胞的分子。在本说明书中,除非另有明确定义,否则术语“CD19”可用作包括保留了本发明的“特异性结合CD19的第二臂”的表位的变体的含义。在本发明中,CD19优选为人CD19。

[0646] 在本说明书中,术语“分离”是指通过从包含从宿主细胞中提取的多种或无数种组分的杂质中鉴定、分离和/或纯化而变成单一的基本上纯的组分。

[0647] 在本说明书中,术语“单克隆抗体”是指从结合相同特异性抗原的基本上同质的抗体组获得的抗体。

[0648] 在本说明书中,术语“双特异性抗体”是指对两个不同的抗原分子或一个分子上的多个表位具有结合特异性的抗体。此外,术语“双特异性单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体组中获得的双特异性抗体。

[0649] 本发明涉及一种能够分别特异性结合PD-1和CD19的双特异性抗体(在本说明书中,可缩写为“PD-1/CD19双特异性抗体”)。在本发明中,PD-1/CD19双特异性抗体优选为PD-1/CD19双特异性单克隆抗体,更优选为分离的PD-1/CD19双特异性单克隆抗体,进一步优选为分离的人PD-1/人CD19双特异性单克隆抗体。在此,“分离的人PD-1/人CD19双特异性单克隆抗体”是指分离的针对人PD-1和人CD19的双特异性单克隆抗体。

[0650] 在本文中,双特异性抗体的形式的实例包括双抗体、双特异性sc(Fv)₂、双特异性微型抗体、双特异性F(ab')₂、双特异性杂交抗体、共价双抗体(双特异性DART)、双特异性(FvCys)₂、双特异性F(ab'-拉链)₂、双特异性(Fv-拉链)₂、双特异性三链抗体和双特异性mAb²等。

[0651] 双抗体是单链肽的二聚体,其中识别不同抗原的VH和VL通过肽接头相互连接(参见Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1993),Vol.90,No.14,pp.6444-6448)。

[0652] 双特异性sc(Fv)₂是一种低分子抗体,其经过修饰而使识别不同抗原的两种抗体的两对VH/VL与肽接头连接以形成连续的单链形式(参见J.Biological Chemistry(1994),269:pp.199-206)。

[0653] 双特异性F(ab')₂是一种低分子抗体,其中识别两种不同抗原的抗体的Fab'片段通过二硫键等共价键合。

[0654] 双特异性微型抗体是一种低分子抗体,其中以使抗体的恒定区CH3结构域与识别不同抗原的scFv连接的方式修饰的低分子抗体片段分别通过CH3结构域上的二硫键等共价结合(参见Biochemistry(1992),Vo.31,No.6,pp.1579-1584)。

[0655] 双特异性杂交抗体是一种完整抗体,其中识别两种不同抗原的抗体的重链/轻链复合物通过二硫键等彼此共价结合。

[0656] 在本发明中,双特异性抗体的形式优选为双特异性杂交抗体。

[0657] 双特异性杂交抗体可以从杂交瘤产生,所述杂交瘤通过例如杂合杂交瘤方法(参见US4474893)产生。或者,双特异性杂交抗体可以通过使哺乳动物动物细胞共表达分别编码识别不同抗原的抗体的重链和轻链的四种cDNA并分泌它来产生。

[0658] 本发明中使用的单克隆抗体可以通过杂交瘤方法(参见,例如Kohler和Milstein等人,Nature(1975),Vol.256,p.495-97,Hongo等人,Hybridoma(1995),Vol.14,No.3,pp.253-260,Harlow等人,Antibodies:A Laboratory Manual,(Cold Spring Harbor Laboratory Press(1988),Vol.2)和Hammerling等人,Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas,pp.563-681(Elsevier,N.Y.,1981))、重组DNA方法(参见例如US4816567)、噬菌体展示方法(参见例如Ladner等人的US5223409、US5403484和US5571698、Dower等人的US5427908和US5580717、McCafferty等人的US5969108和US6172197和Griffiths等人US5885793、US6521404、US6544731、US6555313、US6582915和US6593081)产生。

[0659] 抗体或单克隆抗体在施用于人时可以有以嵌合抗体、人源化抗体或完全人抗体的形式产生,以降低或消除其抗原性。

[0660] 术语“嵌合抗体”意指其可变区序列和恒定区序列衍生自不同哺乳动物的抗体。嵌合抗体的实例包括其可变区序列衍生自小鼠抗体而恒定区序列衍生自人抗体的抗体。嵌合抗体可以通过使用熟知的方法将编码抗体可变区的基因与编码人衍生的抗体的恒定区的基因连接来产生(参见例如Cabilly等人的US4816567),所述编码抗体可变区的基因从产生抗体的杂交瘤分离,所述产生抗体的杂交瘤通过上述杂交瘤方法、重组DNA方法或噬菌体展示方法,使用熟知的技术分离。

[0661] 术语“人源化抗体”意指衍生自其它哺乳动物(如小鼠)的种系的互补决定区(CDR)序列嫁接至人框架区序列的抗体。人源化抗体也可以通过使用熟知的方法将编码从产生抗体的杂交瘤(其根据上述方法通过熟知的技术分离)分离的抗体的CDR的基因与编码人衍生的抗体的框架区的基因连接来产生(参见例如,Winter,US5225539和US5530101;Queen等,US5585089和US6180370)。

[0662] 术语“人抗体”或“完整的人抗体”意指其中由框架区和CDR区组成的可变区和恒定区两者均衍生自人种系免疫球蛋白序列的抗体。要在本发明中使用的人抗体可以通过使用被转化以产生人抗体的小鼠的方法产生,所述小鼠是例如Humab小鼠(参见,例如,Lonberg和Kay等人的US5545806,US5569825,US5625126,US5633425,US5789650,US5877397,US5661016,US5814318,US5874299和US5770429),KM小鼠(参见,例如,Ishida等人的W02002/43478),Xeno小鼠(参见,例如,US5939598,US6075181,US6114598,US6150584和

US6162963) 或Tc小鼠(参见,例如, Tomizuka等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000), pp. 722-727)。人抗体也可以使用SCID小鼠制备,所述SCID小鼠中已经重建有人免疫细胞,使得在免疫后产生人抗体应答(参见,例如, Wilson等人的US5476996和US5698767)。此外,要在本发明中使用的人抗体也可以根据上述噬菌体展示方法来产生。

[0663] 在本说明书中,PD-1/CD19双特异性抗体的术语“抗体片段”是全长抗体的一部分,并且是具有与PD-1的抗原结合部分和与CD19的抗原结合部分的抗体。其实例包括F(ab')₂等。本文中,抗原结合部分意指可以与其抗原结合的抗体的最小单位,例如,其由VH和VL各自中的三个CDR和用于排列CDR使得可以通过那些CDR的组合识别靶抗原的框架区组成。

[0664] 在本说明书中,术语“共同轻链”意指可以与两条或更多条不同的重链缔合并可以表现出与每种抗原的结合能力的轻链(De Wildt RM, J. Mol. Biol. (1999), Vol. 285, pp. 895-901, De Kruijff等, J. Mol. Biol. (2009), Vol. 387, pp. 548-58, W02004/009618, W02009/157771和W02014/051433)。此类共同轻链的优选实例包括由人κ轻链IgVκ1-39*01/IGJκ1*01(IMGT数据库的命名法)种系基因(以下,可以缩写为“IGVK1-39/JK1共同轻链”)编码的轻链。更优选的共同轻链实例包括具有VL的轻链,所述VL具有包含序列编号26中列出的氨基酸序列的CDR1,包含序列编号27中列出的氨基酸序列的CDR2和包含氨基酸序列编号28中列出的氨基酸序列的CDR3,并且进一步优选的共同轻链实例包括具有VL的轻链,所述VL包含序列编号25中列出的氨基酸序列。此外,共同轻链的恒定区的优选实例包括包含序列编号29中列出的氨基酸序列的轻链恒定区。本发明中使用的共同轻链的VL和恒定区各自的氨基酸序列均显示于图1中,并且可变区的CDR各自的氨基酸序列显示于图2中。

[0665] 在本说明书中,术语“同种型”意指由重链恒定区基因编码的抗体类别(例如, IgM或IgG)。本发明的PD-1/CD19双特异性抗体的同种型优选是IgG,更优选IgG₁或IgG₄。本文中, IgG₁优选是消除或减少了其与Fc受体的结合的IgG₁。具体地,可以通过取代、缺失或插入其重链恒定区的任意氨基酸来获得消除或减少与Fc受体的结合的IgG₁抗体。其实例包括以下抗体,其中在两个重链恒定区或其铰链区上各自的根据EU编号系统的235位亮氨酸被甘氨酸取代,和/或236位的甘氨酸被精氨酸取代。此外,为了降低抗体的异质性,优选其中已缺失了C端处的氨基酸,例如根据EU编号系统的447位的赖氨酸的抗体。此外,当双特异性抗体是IgG₄时,为了抑制抗体分子中的交换,更优选其中其重链恒定区中的任意氨基酸被取代、缺失或插入的变体。例如,优选其中位于铰链区中的根据EU编号系统的228位的丝氨酸被脯氨酸取代的抗体。本文中注意,在本说明书中,可以根据Kabat编号系统指定分配给抗体可变区中CDR和框架区的氨基酸位置(参见Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institute of Health, Bethesda, Md., 1987和1991))。此外,恒定区中的氨基酸是依照根据Kabat氨基酸位置的EU编号系统指示的(参见Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No. 91-3242)。

[0666] 在本发明的PD-1/CD19双特异性抗体的Fc区中,其中的任意氨基酸可以被取代,使得两条不同的重链容易相互缔合。其优选实施方案的实例包括PD-1/CD19双特异性抗体,其中在具有特异性结合PD-1的第一臂的VH的重链的恒定区中,根据EU编号系统的351位的亮氨酸被赖氨酸取代,并且366位的苏氨酸被赖氨酸取代,并且其中在具有特异性结合CD19的第二臂的VH的重链的恒定区中,351位的亮氨酸被天冬氨酸取代,并且368位的亮氨酸被谷氨酸取代。此外,其实例还包括PD-1/CD19双特异性抗体,其中在具有特异性结合PD-1的第

一臂的VH的重链的恒定区中,根据EU编号系统的351位的亮氨酸被天冬氨酸取代,并且368位的亮氨酸被谷氨酸取代,并且其中在具有特异性结合CD19的第二臂的VH的重链的恒定区中,351位的亮氨酸被赖氨酸取代并且366位的苏氨酸取代被赖氨酸取代。

[0667] 特异性结合PD-1的第一臂

[0668] 在本说明书中,“特异性结合PD-1的第一臂”(下文中可缩写为“第一臂”)是指至少具有特异性结合PD-1的抗体的VH并能够特异性结合PD-1的抗体部分,无论其是否包含在抗体或其抗体片段的一部分中,或者不作为部分而是作为单一物质存在。例如,像这样的第一臂由抗PD-1抗体的VH和可以构成该抗PD-1抗体的共同轻链的VL构成,并且其进一步的实例还包括具有相同VH和VL的抗体Fab。在本文中,术语“特异性结合PD-1”用作直接结合PD-1的特征,其结合活性高于至少 1×10^{-5} M,优选 1×10^{-7} M,更优选 1×10^{-9} M亲和力(解离常数(Kd值)),并且基本上不结合属于所谓的CD28家族受体的任何受体成员,例如至少CD28、CTLA-4和ICOS。此外,“特异性结合PD-1的抗体”或“抗PD-1抗体”中的“抗体”是指全长抗体,即由用二硫键连接的两条重链和两条轻链组成的全长抗体,优选其单克隆抗体。

[0669] 在本文中,“特异性结合PD-1的第一臂”的实例包括具有VH的那些,所述VH具有

[0670] (a) VH-CDR1,其包含由HYJ¹LH表示的氨基酸序列[其中J¹表示G(甘氨酸)或A(丙氨酸),并且其他字母分别表示单字母氨基酸缩写],

[0671] (b) VH-CDR2,其包含由WJ²NTNTU²NPTX²AQGFTG表示的氨基酸序列[其中J²代表L(亮氨酸)或I(异亮氨酸),U²代表E(谷氨酸)或G(甘氨酸),X²代表F(苯丙氨酸)或Y(酪氨酸),并且其他字母分别与上文代表相同],

[0672] (c) VH-CDR3,其包含由GDJ³VVPTTIWNYU³X³MZ³V表示的氨基酸序列[其中J³代表M(甲硫氨酸)或L(亮氨酸),U³代表H(组氨酸)或Y(酪氨酸),X³代表F(苯丙氨酸)或Y(酪氨酸),Z³代表D(天冬氨酸)或E(谷氨酸),并且其他字母分别与上文代表相同]。

[0673] 此外,“特异性结合PD-1的第一臂”的其他实施方案的实例包括具有选自以下的任何一个VH的那些:

[0674] (1b) VH,其具有包含序列编号6中列出的氨基酸序列的VH-CDR1、包含序列编号7中列出的氨基酸序列的VH-CDR2和包含序列编号8中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,

[0675] (2b) VH,其具有包含序列编号9中列出的氨基酸序列的VH-CDR1、包含序列编号10中列出的氨基酸序列的VH-CDR2和包含序列编号11中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,

[0676] (3b) VH,其具有包含序列编号12中列出的氨基酸序列的VH-CDR1、包含序列编号13中列出的氨基酸序列的VH-CDR2和包含序列编号14中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,

[0677] (4b) VH,其具有包含序列编号15中列出的氨基酸序列的VH-CDR1、包含序列编号16中列出的氨基酸序列的VH-CDR2和包含序列编号17中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和

[0678] (5b) VH,其具有包含序列编号18中列出的氨基酸序列的VH-CDR1、包含序列编号19中列出的氨基酸序列的VH-CDR2和包含序列编号20中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。

[0679] 此外,本发明的“特异性结合PD-1的第一臂”的实例包括如下的那些:其中选自上述(1b)至(5b)的任何一个VH各自的VH-CDR中,1至5个任意氨基酸残基被其他氨基酸(优选地,其保守氨基酸)取代,并且其对PD-1的结合活性与没有任何用相同氨基酸的取代的原始第一臂的结合活性基本相同。其实例包括如下那些:其中VH-CDR1中的一个氨基酸残基被其他氨基酸(优选地,其保守氨基酸)取代,以及VH-CDR2或VH-CDR3中的1至5个氨基酸残基分

别被其他氨基酸(优选地,其保守氨基酸)取代。进一步地,如图4所示,在与特异性结合PD-1的第一臂对应的抗PD-1抗体克隆各自的CDR中,克隆间不同的氨基酸或其多个的任意组合可以在克隆之间可互相交换。在本文中,用保守氨基酸取代是指与具有相似侧链的残基的可交换性。例如,具有脂肪族侧链的氨基酸组包括甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;具有脂肪族羟基侧链的氨基酸组包括丝氨酸和苏氨酸;具有含酰胺侧链的氨基酸组包括天冬酰胺和谷氨酰胺;具有芳香族侧链的氨基酸组包括苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;具有碱性侧链的氨基酸组包括赖氨酸、精氨酸和组氨酸;具有含硫侧链的氨基酸组包括半胱氨酸和甲硫氨酸。用保守氨基酸的优选取代的实例包括缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸之间的取代,苯丙氨酸和酪氨酸之间的取代,赖氨酸和精氨酸之间的取代,丙氨酸和缬氨酸之间的取代,以及天冬酰胺和谷氨酰胺之间的取代。此外,在本文中,上述“对PD-1的结合活性与没有任何用氨基酸的取代的原始第一臂的结合活性基本相同”的句子是指用相同氨基酸取代的第一臂对PD-1的结合活性是没有任何用相同氨基酸的取代的原始第一臂对PD-1的结合活性的95%或更多,优选98%或更多,更优选99%或更多。

[0680] 此外,本发明的“特异性结合PD-1的第一臂”的实例包括如下那些,其具有的VH含有其中具有上述特定氨基酸序列的各个VH-CDR,并且其中的框架区的氨基酸序列由特定种系基因或其具有体细胞突变的基因编码。例如,选自上述(1b)至(5b)的任何一个所代表的VH可由VDJ重组基因或其具有体细胞突变的基因编码,其中种系V基因是IGHV7-4-1并且种系J基因是JH6c。在本文中,由种系V基因IGHV7-4-1编码的氨基酸序列对应于序列编号21(图3)中列出的序列。

[0681] 本发明的特异性结合PD-1的第一臂的VH中的框架区可由具有体细胞突变的种系VDJ重组基因编码。例如,由于选自种系V基因为IGHV7-4-1的上述(1b)至(5b)的任何一个所代表的VH中的FR1、FR2和FR3不同于图4中显示的氨基酸位置处由IGHV7-4-1基因编码的氨基酸序列,它们在各自相同的位置处发生了体细胞突变。例如,对于FR1,在序列编号21中列出的氨基酸序列中,13位的赖氨酸可以被谷氨酰胺取代,16位的丙氨酸可以被缬氨酸取代,或者19位的赖氨酸可以被甲硫氨酸取代,或者可以以其多个的任意组合取代。对于FR2,序列编号21中列出的氨基酸序列中,37位的缬氨酸可以被亮氨酸取代。对于FR3,在序列编号21中列出的氨基酸序列中,77位的丝氨酸可以被苏氨酸取代,或者84位的半胱氨酸可以被丝氨酸或天冬酰胺取代,或者可以以其多个的任意组合取代。此外,对于选自上述(1b)至(5b)的任何一个表示的VH的FR4,在自J基因JH6c衍生的FR4的氨基酸序列(Trp-Gly-Lys-Gly-Thr-Thr*-Val-Thr-Val-Ser-Ser)(序列编号41)中,赖氨酸(Lys)可以被谷氨酰胺或天冬酰胺取代,和/或用星号标记的苏氨酸(Thr)可以被亮氨酸取代。分别具有上述任意氨基酸取代的FR1、FR2、FR3和FR4对特异性结合PD-1的第一臂的功能没有实质影响,并且可以作为框架区。

[0682] 此外,本发明的“特异性结合PD-1的第一臂”的实例还包括如下那些:其具有含有如上指定的氨基酸序列的各个CDR并且其中VH中的FR氨基酸序列由特定种系基因或其具有体细胞突变的基因编码。此类第一臂的实例包括具有包含选自序列编号1至5中的任一者的氨基酸序列的VH的那些。

[0683] 此外,此类“特异性结合PD-1的第一臂”的实例还包括如下那些,其具有的VH包含与选自序列编号1至5的任何一个中列出的氨基酸序列具有至少80%同一性,优选至少90%

同一性,更优选至少95%同一性,进一步更优选至少98%的同一性,进一步更优选至少99%的同一性的氨基酸序列,并且其中与原始第一臂的VH氨基酸序列的差异对与PD-1的结合活性没有实质性影响(以下可缩写为“同源第一臂”)。本文中,用于比较氨基酸序列同一性的术语“%同一性”定义为当比对两个序列时与参考氨基酸序列相同的氨基酸序列的百分比(本文中,当为了使序列同一性最大化而需要时,参考氨基酸序列中已引入缺口)。此外,本文中“与原始第一臂的VH氨基酸序列的差异对与PD-1的结合活性没有实质性影响”是指同源第一臂对PD-1的结合活性为原始第一臂的结合活性的95%或更多,优选为98%或更多,更优选为99%或更多。

[0684] 在又一个实施方案中,本发明的“特异性结合PD-1的第一臂”还包括如下那些,其具有抗PD-1抗体的可变区(本文中,可变区包含构成它的VH和VL),所述抗PD-1抗体(1)与具有选自上述(1b)至(5b)的任何一个所表示的VH或包含选自序列编号1至5的任何一个中列出的氨基酸序列的VH和本说明书共同轻链的VL(优选地,包含序列编号25中列出的氨基酸序列的VL)的第一臂交叉竞争与PD-1的结合,或(2)与具有相同VH和VL的特异性结合PD-1的单克隆抗体可变区交叉竞争与PD-1的结合,并且还包括具有抗PD-1抗体可变区的那些,所述抗PD-1抗体与PD-1的结合由以下项交叉竞争:(3)具有选自上述(1b)至(5b)的任何一个所表示的VH或包含选自序列编号1至5的任何一个中列出的氨基酸序列的VH和相同共同轻链的VL的第一臂,或(4)具有相同的VH和VL的特异性结合PD-1的单克隆抗体的可变区。在本文中,句子“交叉竞争与PD-1的结合”是指通过结合与本说明书中例示的第一臂的表位相同或部分重叠的表位抑制第一臂与PD-1的结合,无论其程度如何,或者结合与例示的第一臂的表位相同或部分重叠的表位的抗体对PD-1的结合受到该例示的第一臂抑制,无论其程度如何。它是否交叉竞争可以通过竞争性结合测定来评估。例如,它可以使用Biacore分析、ELISA测定、流式细胞术、酶联免疫吸附测定(ELISA)、荧光能量转移法(FRET)和荧光微量测定技术(FMAT(注册商标))来测定。

[0685] 具有由上述(5b)表示的VH和共同轻链的VL的第一臂交叉竞争与PD-1的结合的第一臂的实例包括具有由选自上述(1b)至(4b)的任何一个表示的VH和共同轻链的VL(优选地,具有包含序列编号26中列出的氨基酸序列的VL-CDR1,包含序列编号27中列出的氨基酸序列的VL-CDR2和包含序列编号28中列出的氨基酸序列的VL-CDR3的VL)的第一臂,并且进一步包括具有包含选自序列编号1至4的任何一个中列出的氨基酸序列的VH和共同轻链的VL(优选地,VL包含序列编号25中列出的氨基酸序列)的第一臂。

[0686] 此外,与具有由选自上述(1b)至(4b)的任何一个表示的VH或包含选自序列编号1至4的任何一个中列出的氨基酸序列的VH和共同轻链的VL的第一臂交叉竞争与PD-1的结合的第一臂的实例包括具有上述(5b)表示的VH和共同轻链的VL(优选地,具有包含序列编号26中列出的氨基酸序列的VL-CDR1、包含序列编号27中列出的氨基酸序列的VL-CDR2和包含序列编号28中列出的氨基酸序列的VL-CDR3的VL)的第一臂,并且进一步包括具有包含序列编号5中列出的氨基酸序列的VH和共同轻链的VL(优选地,包含序列编号25中列出的氨基酸序列的VL)的第一臂。

[0687] 在本文中,本发明的“特异性结合PD-1的第一臂”的优选实例包括具有由选自上述(1b)至(5b)的任何一个表示的VH的第一臂。此外,如上所述,第一臂的优选实例还包括具有VH的那些,其中在各个CDR中的1至5个任意氨基酸残基被其他氨基酸(优选地,其保守氨基

酸)取代并且相同取代对与PD-1的结合活性没有实质性影响。此外,如上所述,它们还包括具有VH的那些,其中框架区的氨基酸序列由种系V基因IGHV7-4-1或J基因JH6c或其具有体细胞突变的基因编码。然后,第一臂的更优选实例包括具有包含选自序列编号1至5的任何一个中列出的氨基酸序列的VH的那些。

[0688] 此外,本发明的“特异性结合PD-1的第一臂”优选为具有本说明书的共同轻链的VL的那些,并且此类共同轻链优选为IGVK1-39/JK1共同轻链。其更优选的实例是具有VL的轻链,所述VL具有包含序列编号26中列出的氨基酸序列的CDR1、包含序列编号27中列出的氨基酸序列的CDR2和包含序列编号28中列出的氨基酸序列的CDR3,并且其更优选的实例是含有VL的轻链,所述VL包含序列编号25中列出的氨基酸序列。此外,共同轻链的恒定区的优选实例包括包含序列编号29中列出的氨基酸序列的轻链恒定区。

[0689] 此外,“特异性结合PD-1的第一臂”优选是允许PD-1和PD-L1之间的相互作用、PD-1和PD-L2之间的相互作用、或它们两者的相互作用的臂。在本文中,句子“允许PD-1和PD-L1之间的相互作用、PD-1和PD-L2之间的相互作用、或它们两者的相互作用”是指即使在相对于可溶形式PD-L1或PD-L2的浓度存在20倍过量的本发明的PD-1/CD19双特异性抗体时,与不存在本发明的PD-1/CD19双特异性抗体时的情况相比,将PD-L1和PD-1之间的相互作用、PD-L2和PD-1之间的相互作用或它们两者的相互作用维持50%或更多,优选70%或更多,更优选80%或更多。此外,“允许PD-1和PD-L1之间的相互作用、PD-1和PD-L2之间的相互作用、或它们两者的相互作用”的定义可以具有与“实质上抑制PD-1和PD-L1之间的相互作用、PD-1和PD-L2之间的相互作用、或它们两者的相互作用”的含义相同的含义。

[0690] 图6中显示了构建本发明PD-1/CD19双特异性抗体所获得的各个抗PD-1单克隆抗体克隆与其VH氨基酸序列以及其序列编号之间的对应关系。图7中显示了各个抗PD-1单克隆抗体克隆的VH中CDR氨基酸序列与其序列编号之间的对应关系。

[0691] 特异性结合CD19的第二臂

[0692] 在本说明书中,“特异性结合CD19的第二臂”(下文中可缩写为“第二臂”)是指至少具有特异性结合CD19的抗体的VH并能够特异性结合CD19的抗体部分,无论其是否包含在抗体或其抗体片段的一部分中,或者不作为部分而是作为单一物质存在。例如,此类第二臂由抗CD19抗体的VH和可以构成该抗CD19抗体的共同轻链的VL构成,并且其进一步的实例还包括包含相同VH和VL的抗体Fab部分。在本文中,句子“特异性结合CD19”用作直接结合CD19的特征,其结合活性高于至少 $1 \times 10^{-5} \text{M}$,优选 $1 \times 10^{-7} \text{M}$,更优选超过 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 亲和力(解离常数(Kd值)),并且基本上不结合任何其它蛋白。此外,“特异性结合CD19的抗体”或“抗CD19抗体”中的“抗体”是指由用二硫键连接的两条重链和两条轻链组成的全长抗体,优选其单克隆抗体。

[0693] 在本文中,“特异性结合CD19的第二臂”的实例包括具有VH的那些,所述VH具有

[0694] (a) VH-CDR1,其包含由SYWIJ⁴表示的氨基酸序列的VH-CDR1[其中J⁴表示G(甘氨酸)或A(丙氨酸),并且其他字母分别代表一字母的氨基酸缩写],(b) VH-CDR2,包含IIU⁴PGDSDFRYSPFQ⁴代表的氨基酸序列[其中U⁴代表W(色氨酸)或Y(酪氨酸),或其他字母分别与上文代表相同],和(c) VH-CDR3,其包含由X⁴TIVZ⁴J⁵U⁵X⁵Z⁵AJ⁶DU⁶表示的氨基酸序列[其中X⁴代表K(赖氨酸)、Q(谷氨酰胺)、H(组氨酸)或R(精氨酸),Z⁴代表G(甘氨酸)或A(丙氨酸),J⁵代表T(苏氨酸)或V(缬氨酸),U⁵代表V(缬氨酸),I(异亮氨酸)或T(苏氨酸),X⁵代表M(甲硫

氨酸),Y(酪氨酸),G(甘氨酸)或H(组氨酸),Z⁵代表T(苏氨酸)、N(天冬酰胺)、L(亮氨酸)或W(色氨酸),J⁶代表F(苯丙氨酸)或S(丝氨酸),并且U⁶代表I(异亮氨酸)、F(苯丙氨酸)或Y(酪氨酸),并且其他字母分别与上文代表相同]。

[0695] 此外,“特异性结合CD19的第二臂”的其他实施方案的实例包括具有选自以下的任何一个VH的那些:

[0696] (1d)VH,其具有包含序列编号35中列出的氨基酸序列的VH-CDR1、包含序列编号36中列出的氨基酸序列的VH-CDR2和包含序列编号37中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,

[0697] (2d)VH,其具有包含序列编号38中列出的氨基酸序列的VH-CDR1、包含序列编号39中列出的氨基酸序列的VH-CDR2和包含序列编号40中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,

[0698] (3d)VH,其具有包含序列编号41中列出的氨基酸序列的VH-CDR1、包含序列编号42中列出的氨基酸序列的VH-CDR2和包含序列编号43中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,

[0699] (4d)VH,其具有包含序列编号44中列出的氨基酸序列的VH-CDR1、包含序列编号45中列出的氨基酸序列的VH-CDR2和包含序列编号46中列出的氨基酸序列的VH-CDR3,和

[0700] (5d)VH,其具有包含序列编号47中列出的氨基酸序列的VH-CDR1、包含序列编号48中列出的氨基酸序列的VH-CDR2和包含序列编号49中列出的氨基酸序列的VH-CDR3。

[0701] 此外,本发明的“特异性结合CD19的第二臂”的实例还包括如下的那些:其中选自上述(1d)至(5d)的任何一个VH各自的VH-CDR中,1至5个任意氨基酸残基被其他氨基酸(优选地,其保守氨基酸)取代,并且其对CD19的结合活性与没有任何用相同氨基酸的取代的原始第二臂的结合活性基本相同。其实例包括如下那些,其中VH-CDR1中的一个氨基酸残基被其他氨基酸(优选地,其保守氨基酸)取代,以及VH-CDR2或VH-CDR3中的1至5个氨基酸残基分别被其他氨基酸(优选地,其保守氨基酸)取代。进一步地,如图5所示,在与特异性结合CD19的第一臂对应的抗CD19抗体克隆各自的CDR中,克隆间不同的氨基酸或其多个的任意组合可以在克隆之间可互相交换。在本文中,上述“对CD19的结合活性与没有任何用相同氨基酸的取代的原始第二臂的结合活性基本相同”的句子是指用相同氨基酸取代的第二臂对CD19的结合活性是没有任何用相同氨基酸的取代的原始第一臂对CD19的结合活性的95%或更多,优选98%或更多,更优选99%或更多。在此注意,第二臂的各个VH-CDR中的“用保守氨基酸取代”的实例包括上述第一臂中的氨基酸取代的实例。

[0702] 此外,本发明中的“特异性结合CD19的第二臂”还包括具有VH的那些,该VH含有包含上述特定氨基酸序列的各个CDR,并且其中FR氨基酸序列由特定种系基因或其具有体细胞突变的基因编码。例如,选自上述(1d)至(5d)的任何一个VH可由VDJ重组基因或其具有体细胞突变的基因编码,其中种系V基因为IGHV5-51。在本文中,由种系的V基因IGHV5-51编码的氨基酸序列对应于序列编号22中列出的氨基酸序列(图3)。

[0703] 本发明的特异性结合CD19的第二臂VH中的框架区可由具有体细胞突变的种系VDJ重组基因编码。例如,由于由种系V基因为IGHV5-51的上述(1d)-(5d)的任何一个所代表的VH中的FR1和FR3在图5所示的氨基酸位置处不同于IGHV5-51基因,它们在各个相同的位置发生了体细胞突变。例如,对于FR1,在序列编号22中列出的氨基酸序列中,1位的谷氨酸可以被谷氨酰胺取代,14位的脯氨酸可以被丝氨酸取代,27位的酪氨酸可以被苯丙氨酸取代,或者30位的苏氨酸可以被异亮氨酸取代,或者可以以其多个任意组合被取代。对于FR3,在序列编号22中列出的氨基酸序列中,76位的异亮氨酸可以被苯丙氨酸取代,或者77位的丝

氨酸可以被苏氨酸或天冬酰胺取代,78位的苏氨酸可以被缬氨酸取代、84位的丝氨酸可以被天冬酰胺取代,93位的甲硫氨酸可以被异亮氨酸或亮氨酸取代,或者97位的丙氨酸可以被缬氨酸取代,或者可以以其多个任意组合被取代。具有上述任何氨基酸取代的组合的相应FR1和FR3对特异性结合CD19的第二臂的功能没有实质性影响,并且可以用作框架区。

[0704] 此外,本发明的“特异性结合CD19的第二臂”的实例还包括具有VH的那些,所述VH含有包含上述特定氨基酸序列的各个CDR,并且其中FR氨基酸序列由特定种系基因或其具有体细胞突变的基因编码。此类第二臂的实例包括具有VH的那些,所述VH包含选自序列编号30至34的任何一个中列出的氨基酸序列。

[0705] 此外,此类“特异性结合CD19的第二臂”的实例还包括具有VH的那些,所述VH包含与选自序列编号30至34的任何一个中列出的氨基酸序列具有至少80%,优选至少90%,更优选至少95%,进一步更优选至少98%,进一步更优选至少99%同一性的氨基酸序列,并且其中与原始第二臂的VH氨基酸序列的差异对与CD19的结合活性没有实质性影响(以下可以缩写为“同源第二臂”)。在本文中,“与原始第二臂的VH氨基酸序列的差异对与CD19的结合活性没有实质性影响”是指同源第二臂与CD19的结合活性是原始第二臂的结合活性的95%或更多,优选为98%或更多,更优选为99%或更多。

[0706] 在又一个实施方案中,本发明的“特异性结合CD19的第二臂”的实例还包括如下那些,其具有抗CD19抗体的可变区(本文中,可变区包含构成它的VH和VL),所述抗CD19抗体(1)与具有选自上述(1d)至(5d)的任何一个所表示的VH或包含选自序列编号30至34的任何一个中列出的氨基酸序列的VH和本说明书共同轻链的VL(优选地,包含序列编号25中列出的氨基酸序列的VL)的第二臂交叉竞争与CD19的结合,或(2)与具有相同VH和VL的特异性结合CD19的单克隆抗体可变区交叉竞争与CD19的结合,并且还包含具有抗CD19抗体可变区的那些,所述抗CD19抗体与CD19的结合由以下项交叉竞争:(3)具有选自上述(1d)至(5d)的任何一个所表示的VH或包含选自序列编号30至34的任何一个中列出的氨基酸序列的VH和共同轻链的相同VL的第二臂,或(4)具有相同的VH和VL的特异性结合CD19的单克隆抗体的可变区。在本文中,句子“交叉竞争与CD19的结合”是指通过与本说明书中例示的第二臂结合相同或部分重叠的表位抑制第二臂与CD19的结合,无论其程度如何,或者结合与例示的第二臂的表位相同或部分重叠的表位的抗体对CD19的结合受到该例示的第二臂抑制,无论其程度如何。在本文中,它是否交叉竞争可以根据关于“特异性结合PD-1的第一臂”的描述中描述的方法类似地评估。

[0707] 在本文中,本发明的“特异性结合CD19的第二臂”的优选实例包括具有由选自上述(1d)至(5d)的任何一个表示的VH的第二臂。此外,如上所述,第二臂的优选实例还包括具有VH的那些,其中各个CDR中的1至5个任意氨基酸残基被其他氨基酸(优选地,其保守氨基酸)取代并且相同取代基本上不影响与CD19的结合活性。此外,如上所述,第二臂的实例包括具有VH的那些,其中框架区的氨基酸序列由种系V基因IGHV5-51或其具有体细胞突变的基因编码。然后,第二臂的更优选实例包括具有包含选自序列编号30至34的任何一个中列出的氨基酸序列的VH的那些。

[0708] 此外,本发明的“特异性结合CD19的第二臂”的其他优选实施方案的实例包括具有VH的第二臂,所述VH包含选自序列编号30至34的任何一个氨基酸序列,其中114位的谷氨酰胺被或可以被精氨酸取代,更优选地,具有VH的第二臂,所述VH包含选自序列编号30至34的

任何一个氨基酸序列,其中114位的谷氨酰胺被精氨酸取代,它们对应于具有包含选自序列编号62至66的任何一个氨基酸序列的VH的第二臂。这些氨基酸取代可以增加具有第二臂的由重链和轻链组成的复合物(以下称为第二臂-重链/轻链复合物)的等电点(pI值),从而在本发明的PD-1/CD19双特异性抗体的纯化过程中,容易将双特异性抗体与特别地由第二臂-重链/轻链复合物组成的同源二聚体分离。第二臂-重链/轻链复合物的等电点优选在约8.3和约8.9之间,更优选在约8.4和约8.8之间。并且,具有第一臂的由重链和轻链组成的复合物(以下称为第一臂-重链/轻链复合物)的等电点优选在约7.4和约7.7之间,更优选在约7.5和约7.6之间。

[0709] 本发明的“特异性结合CD19的第二臂”优选为具有本说明书的共同轻链的那些,并且此类共同轻链优选为IGVK1-39/JK1共同轻链。其更优选的实例是具有VL的轻链,所述VL具有包含序列编号26中列出的氨基酸序列的CDR1、包含序列编号27中列出的氨基酸序列的CDR2和包含序列编号28中列出的氨基酸序列的CDR3,并且其更优选的实例是具有包含序列编号25中列出的氨基酸序列的VL的轻链。此外,共同轻链的恒定区的优选实例包括包含序列编号29中列出的氨基酸序列的轻链恒定区。

[0710] 下文中,图8中显示了构建本发明PD-1/CD19双特异性抗体的各个抗CD19抗体克隆与其VH氨基酸序列及其序列编号之间的对应关系。图9中显示了各个抗CD19抗体克隆的VH中各个CDR氨基酸序列与其序列编号之间的对应关系。

[0711] 另一方面,本发明的PD-1/CD19双特异性抗体的优选实施方案的实例包括如下那些,其中特异性结合PD-1的第一臂具有

[0712] (A) VH,其中在选自上述(1b)至(5b)的任何一个表示的VH的VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3的任何一个或多个CDR中的1至5个任意氨基酸残基可以被其他氨基酸(优选其保守氨基酸)取代,和

[0713] (B) VL,其具有包含序列编号26中列出的氨基酸序列的CDR1、包含序列编号27中列出的氨基酸序列的CDR2和包含序列编号28中列出的氨基酸序列的CDR3,和

[0714] 特异性结合CD19的第二臂具有

[0715] (C) VH,其中在选自上述(1d)至(5d)的任何一个表示的VH的VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3的任何一个或多个CDR中的1至5个任意氨基酸残基可以被其他氨基酸(优选其保守氨基酸)取代,和

[0716] (D) VL,其具有包含序列编号26中列出的氨基酸序列的CDR1、包含序列编号27中列出的氨基酸序列的CDR2和包含序列编号28中列出的氨基酸序列的CDR3。

[0717] 本发明的PD-1/CD19双特异性抗体的更优选实例包括如下那些,其中特异性结合PD-1的第一臂具有

[0718] (A) 由选自上述(1b)至(5b)的任何一个表示的VH,和

[0719] (B) VL,其具有包含序列编号26中列出的氨基酸序列的CDR1、包含序列编号27中列出的氨基酸序列的CDR2和包含序列编号28中列出的氨基酸序列的CDR3,和

[0720] 特异性结合CD19的第二臂具有

[0721] (C) 由选自上述(1d)至(5d)的任何一个表示的VH,和

[0722] (D) VL,其具有包含序列编号26中列出的氨基酸序列的CDR1、包含序列编号27中列出的氨基酸序列的CDR2和包含序列编号28中列出的氨基酸序列的CDR3。

[0723] 此外,本发明的PD-1/CD19双特异性抗体的其他优选实施方案的实例包括如下那些,其中特异性结合PD-1的第一臂具有

[0724] (A) 包含选自序列编号1至5的任何一个中列出的氨基酸序列的VH,或包含与相同VH氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH,和

[0725] (B) 包含序列编号25中列出的氨基酸序列的VL,和

[0726] 特异性结合CD19的第二臂具有

[0727] (C) 包含选自序列编号30至34和62至66的任何一个中列出的氨基酸序列的VH,或包含与相同VH氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH,和

[0728] (D) 包含序列编号25中列出的氨基酸序列的VL。

[0729] 其他更优选的其实例包括PD-1/CD19双特异性抗体,其中特异性结合PD-1的第一臂具有

[0730] (A) 包含选自序列编号1至5的任何一个中列出的氨基酸序列的VH,和

[0731] (B) 包含序列编号25中列出的氨基酸序列的VL,和

[0732] 特异性结合CD19的第二臂具有

[0733] (C) 包含选自序列编号30至34和62至66的任何一个中列出的氨基酸序列的VH,和

[0734] (D) 包含序列编号25中列出的氨基酸序列的VL。

[0735] 此外,其他更优选的其实例包括PD-1/CD19双特异性抗体,其中特异性结合PD-1的第一臂具有

[0736] (A) 包含选自序列编号1至5的任何一个中列出的氨基酸序列的VH,和

[0737] (B) 包含序列编号25中列出的氨基酸序列的VL,和

[0738] 其中特异性结合CD19的第二臂具有

[0739] (C) 包含选自序列编号62至66的任何一个中列出的氨基酸序列的VH,和

[0740] (D) 包含序列编号25中列出的氨基酸序列的VL。

[0741] 本发明的PD-1/CD19双特异性抗体的同种型优选为IgG抗体,进一步优选为IgG₁抗体或IgG₄抗体,进一步优选为IgG₁抗体。当抗体为IgG₁抗体时,如下的IgG₁抗体是优选的,其中在两个重链恒定区或其铰链区上,根据EU编号系统的235位的亮氨酸被甘氨酸取代,和/或236位的甘氨酸被精氨酸取代。此外,如下的双特异性抗体是优选的,其中重链的C端氨基酸,例如根据EU编号系统的447位的赖氨酸已被缺失。此外,当PD-1/CD19双特异性抗体是IgG₄抗体时,如下的抗体是优选的,其中位于铰链区中的根据EU编号系统的228位的丝氨酸被脯氨酸取代。

[0742] 此外,当PD-1/CD19双特异性抗体是IgG₁抗体时,其优选实施方案的实例包括如下那些,其中在具有特异性结合PD-1的第一臂的VH的重链的恒定区中,根据EU编号系统的351位的亮氨酸被赖氨酸取代,366位的苏氨酸被赖氨酸取代,并且在具有特异性结合CD19的第二臂的VH的重链恒定区中,351位亮氨酸被天冬氨酸取代,并且368位的亮氨酸被谷氨酸取代。此外,如下的IgG₁抗体也是优选的,其中在具有特异性结合PD-1的第一臂的VH的重链恒定区中,根据EU编号系统的351位的亮氨酸被天冬氨酸取代并且368位的亮氨酸被谷氨酸取代,并且在具有特异性结合CD19的第二臂的VH的重链恒定区中,351位的亮氨酸被赖氨酸取代,并且366位的苏氨酸被赖氨酸取代。

[0743] 采用重链恒定区中的所有上述氨基酸取代的PD-1/CD19双特异性IgG₁抗体的优选

实施方案的实例包括如下那些,其中具有特异性结合PD-1的第一臂的VH的重链具有包含序列编号23中列出的氨基酸序列的重链恒定区,并且具有特异性结合CD19的第二臂的VH的重链具有包含选自序列编号24和序列编号71至75的任何一个中列出的氨基酸序列的重链恒定区。在图10中例示了那些氨基酸序列。

[0744] 在本文中,具有特异性结合CD19的第二臂的VH的重链还可通过在其C端与其C端氨基酸的酰胺结合而具有Gly(甘氨酸)、Gly-Lys-Lys-Ala(序列编号67)、Gly-Lys-Ala-Lys-Ala(序列编号68)、Gly-Arg-Arg-Ala(序列编号69)或Gly-Arg-Ala-Arg-Ala(序列编号70)。氨基酸或肽的添加可以提高第二臂-重链/轻链复合物的等电点(pI值),从而容易将本发明的PD-1/CD19双特异性抗体与特别地由第二臂-重链/轻链复合物组成的同二聚体分离,如与上述第二臂的VH中的氨基酸取代的情况一样。这里注意,关于对其C端添加氨基酸或肽的第二臂-重链/轻链复合物的等电点优选在约8.3和约8.9之间,更优选在约8.4和约8.8之间。

[0745] 本发明的PD-1/CD19双特异性抗体的最优选实施方案的实例包括通过本说明书实施例12中所述的方式产生的克隆CD19-1(Bi)、CD19-2(Bi)、CD19-3(Bi)、CD19-4(Bi)和CD19-5(Bi),以及通过实施例13中所述的方式产生的克隆CD19-6(Bi)。

[0746] 本发明的PD-1/CD19双特异性抗体的优选特征的实例包括允许PD-1和PD-L1之间的相互作用、PD-1和PD-L2之间的相互作用或它们两者的相互作用。本文中,句子“允许PD-1和PD-L1之间的相互作用、PD-1和PD-L2之间的相互作用或它们两者的相互作用”意指与关于“特异性结合PD-1的第一臂”的描述中描述相同。

[0747] 此外,本发明的PD-1/CD19双特异性抗体的优选特征的实例包括充分减少细胞因子产生。在本文中,句子“充分减少细胞因子产生”是指例如在静脉内施用期间或到该施用后24小时,通过滴注本发明的PD-1/CD19双特异性抗体,例如,在血液或组织中包括IL-2、IFN- γ 和/或TNF- α 的细胞因子的浓度不增加,或者即使它增加,其程度使得其可以通过类固醇施用加以抑制。

[0748] 此外,本发明的PD-1/CD19双特异性抗体的优选特征的实例包括对T细胞(例如记忆T细胞)活化的抑制效果。抑制效果可以以针对细胞因子(例如,IL-2)产生的抑制效果评估。

[0749] PD-1/CD19双特异性抗体的制备和纯化方法

[0750] 本发明的PD-1/CD19双特异性抗体及其抗体片段也可以通过W02014/051433、W02013/157953或W02013/157954公开的方法制备。

[0751] 具体地,可以通过将已经分别插入以下项的表达载体基因转移到哺乳动物动物细胞中以对其进行转化,并且然后通过让它们表达和分泌重链和共同轻链两者来制备本发明的PD-1/CD19双特异性抗体及其抗体片段:(1) 编码具有特异性结合PD的第一臂的VH的重链的多核苷酸,(2) 编码具有特异性结合CD19的第二臂的VH的重链的多核苷酸和(3) 编码共同轻链的多核苷酸。

[0752] 在本文中,可以使用表达本发明的PD-1/CD19双特异性抗体的任何宿主细胞,只要它们可以通过表达载体进行基因转移以表达它们。宿主细胞的优选实例包括昆虫细胞,如SF-9和SF-21,更优选地哺乳动物细胞,如小鼠细胞,包括CHO细胞、BHK细胞、SP2/0细胞和NS-0骨髓瘤细胞,灵长类细胞,如COS和Vero细胞,和MDCK细胞,BRL 3A细胞,杂交瘤,肿瘤细

胞,永生化原代细胞,W138,HepG2,HeLa,HEK293,HT1080和胚胎视网膜细胞如PER.C6等。这里注意,在选择表达系统时,可以使用用于哺乳动物细胞的表达载体和用于该表达载体的宿主细胞,从而将抗体进行适当糖基化。有利地,使用人细胞系(优选PER.C6)来获得对应于人糖基化模式的抗体。

[0753] 可以参考例如Current Protocols in Protein Science(1995),Coligan JE, Dunn BM,Ploegh HL,Speicher DW,Wingfield PT,ISBN 0-471-11184-8,Bendig,1988进行通过表达载体的基因转移转化的宿主细胞中的蛋白质生成。此外,可以参考Mammalian Cell Biotechnology:a Practical Approach(M.Butler编,IRL Press,1991)进行使宿主细胞培养的生产力最大化的一般指南、规程和实用方法。抗体在宿主细胞中的表达描述于例如公开文本,如EP0120694、EP0314161、EP0481790、EP0523949、US4816567、W02000/63403等。

[0754] 本文中,可以通过熟知的方法优化宿主细胞的培养条件,并且可以优化其中的蛋白质生成的量。可以通过在培养皿、滚瓶或反应室中的分批培养、进料培养、连续培养或中空纤维培养进行培养。为了通过细胞培养大规模且连续地产生重组蛋白,优选在悬浮液中让细胞增殖。此外,优选在无任何动物或人源性血清或动物或人源性血清组分的条件下培养细胞。

[0755] 可以使用熟知的方法对在宿主细胞中表达,然后通过熟知的方法从它们或培养物中回收的抗体进行纯化。纯化方法的实例包括免疫沉淀法、离心法、过滤、尺寸排阻色谱、亲和色谱、阳离子和/或阴离子交换色谱、疏水相互作用色谱等。此外,可以优选使用蛋白A或蛋白G亲和色谱(参见例如US4801687和US5151504)。

[0756] 抗CD19单克隆抗体

[0757] 本发明包括“特异性结合CD19的单克隆抗体”(以下可以缩写为“抗CD19单克隆抗体”)及其抗体片段,以构建本发明的PD-1/CD19双特异性抗体。

[0758] 本发明的抗CD19单克隆抗体的一个实施方案是一种能够通过其VH与本发明的共同轻链的VL缔合而特异性结合CD19的单克隆抗体。在本文中,句子“特异性结合CD19”用作如下的特征:以高于至少 $1 \times 10^{-5} \text{M}$,优选 $1 \times 10^{-7} \text{M}$,且更优选 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 亲和力的结合活性(解离常数(Kd值))直接结合CD19,并且基本上不结合任何其他蛋白质。在本文中,“特异性结合CD19的单克隆抗体”中的“抗体”是指由用二硫键连接的两条重链和两条轻链组成的全长抗体。此外,“特异性结合CD19的单克隆抗体的片段”是全长抗体中至少包括抗原结合部分的部分,并且其实例包括Fab、Fab'、Fv、scFv、F(ab')₂等。

[0759] 本发明的抗CD19单克隆抗体的实例包括如下那些,其具有选自上述(1d)至(5d)的任何一个VH,构成“特异性结合CD19的第二臂”的VH或包含选自序列编号30至34的任何一个中列出的氨基酸序列的VH,和VL作为本说明书的共同轻链(优选地,包含序列编号25中列出的氨基酸序列的VL)。

[0760] 此外,本发明的抗CD19单克隆抗体的实例还包括如下那些,其中在选自上述(1d)至(5d)的任何一个VH的各个CDR中的1至5个任意氨基酸残基被其他氨基酸(优选其保守氨基酸)取代,并且其对CD19的结合活性与具有不含任何用相同氨基酸的取代的原始VH的抗CD19单克隆抗体的结合活性基本相同。其实例包括如下那些,其中CDR1中的一个氨基酸残基被其他氨基酸(优选地,其保守氨基酸)取代并且CDR2或CDR3中的1至5个氨基酸残基被其

他氨基酸(优选地,其保守氨基酸)取代。此外,如图5所示,在抗CD19单克隆抗体克隆的各个CDR中,克隆间不同的氨基酸或其多个的任意组合在克隆间可以相互交换。在本文中,句子“对CD19的结合活性与具有不含任何用相同氨基酸的取代的原始VH的抗CD19单克隆抗体的结合活性基本相同”是指用相同氨基酸取代的抗CD19单克隆抗体对CD19的结合活性是具有不含任何用相同氨基酸的取代的原始VH的抗CD19单克隆抗体的结合活性的95%或更多,优选98%或更多,更优选99%或更多。

[0761] 此外,本发明的抗CD19单克隆抗体的实例包括如下那些,其含有包含上述特定氨基酸序列的各个CDR,并且其中框架区的氨基酸序列由特定种系基因或其具有体细胞突变的基因编码。其实例包括由特定种系基因或其具有体细胞突变的基因编码的特定VH,其在关于上述“特异性结合CD19的第二臂”的描述中描述。

[0762] 此外,在本发明的抗CD19单克隆抗体中,在选自上述(1d)至(5d)的任何一个VH中含有各个CDR并且其中其FR氨基酸序列由特定种系基因或其具有体细胞突变的基因编码的那些抗体的实例包括具有包含选自序列编号30至34的任何一个中列出的氨基酸序列的VH的那些。此外,此类抗CD19单克隆抗体的实例包括如下那些,其具有与选自序列编号30-34的任何一个中列出的氨基酸序列具有至少80%,优选至少90%,更优选至少95%,进一步优选至少98%,进一步优选至少99%同一性的VH氨基酸序列,并且对CD19的结合活性与具有原始VH的抗CD19单克隆抗体的结合活性基本相同。在本文中,“对CD19的结合活性与具有原始VH的抗CD19单克隆抗体的结合活性基本相同”是指相对于具有原始VH的抗CD19单克隆抗体的结合活性,它具有95%或更多,优选98%或更多,更优选99%或更多的对CD19的结合活性。

[0763] 此外,本发明的抗CD19单克隆抗体的其他实例还包括(1)抗CD19单克隆抗体,其与具有选自上述(1d)至(5d)的任何一个VH或包含选自序列编号30至34的任何一个中列出的氨基酸序列的VH以及本说明书的共同轻链的VL(优选地,包含序列编号25中列出的氨基酸序列的VL)的抗CD19单克隆抗体交叉竞争与CD19的结合,和(2)抗CD19单克隆抗体,其与CD19的结合被具有选自上述(1d)至(5d)的任何一个VH或包含选自序列编号30至34的任何一个中列出的氨基酸序列的VH和共同轻链的相同VL的抗CD19单克隆抗体交叉竞争。

[0764] 此外,本发明的抗CD19单克隆抗体的其他实例还包括如下那些,其具有包含选自序列编号30至34的任何一个中列出的氨基酸序列中的114位谷氨酰胺被或可以被精氨酸取代的氨基酸序列的VH,以及本说明书的共同轻链的VL(优选地,包含序列编号25中列出的氨基酸序列的VL),并且它们更优选地是如下那些,其具有包含选自序列编号30至34的任何一个中列出的氨基酸序列中114位谷氨酰胺被精氨酸取代的氨基酸序列的VH和相同共同轻链的VL,它们对应于具有选自序列编号62至66的任何一个氨基酸序列的VH和共同轻链的该VL的抗CD19单克隆抗体。

[0765] 编码PD-1/CD19双特异性抗体的多核苷酸

[0766] 编码PD-1/CD19双特异性抗体的多核苷酸包含:(1)编码具有特异性结合PD-1的第一臂的VH的重链的多核苷酸,(2)编码具有特异性结合CD19的第二臂的VH的重链的多核苷酸,以及(3)编码共同轻链的多核苷酸。在本文中,编码具有特异性结合PD-1的第一臂的VH的重链的多核苷酸包含编码特异性结合PD-1的第一臂的VH的多核苷酸和编码具有该VH的重链的恒定区的多核苷酸。类似地,编码具有特异性结合CD19的第二臂的VH的重链的多核

苷酸包含编码特异性结合CD19的第二臂的VH的多核苷酸和编码具有该VH的重链的恒定区的多核苷酸。

[0767] 编码PD-1/CD19双特异性抗体的多核苷酸可以是任何多核苷酸,只要它们分别编码构成PD-1/CD19双特异性抗体的各部分,并且可以是基因组DNA、cDNA、合成DNA、RNA和DNA-RNA杂交体中的任何一种。作为编码一种氨基酸的密码子,已知一种至六种类型。例如,分别地,Phe对应于TTT或TTC,Leu对应于TTA、TTG、CTT、CTC、CTA或CTG,Ile对应于ATT、ATC或ATA,Met对应于ATG,Val对应于GTT、GTC、GTA或GTG,Ser对应于TCT、TCC、TCA或TCG,Pro对应于CCT、CCC、CCA或CCG,Thr对应于ACT、ACC、ACA或ACG,Ala对应于GCT、GCC、GCA或GCG,Tyr对应于TAT或TAC,His对应于CAT或CAC,Gln对应于CAA或CAG,Asn对应于AAT或AAC,Lys对应于AAA或AAG,Asp对应于GAT或GAC,Glu对应于GAA或GAG,Cys对应于TGT或TGC,Trp对应于TGG,Arg对应于CGT、CGC、CGA或CGG,Ser对应于AGT或AGC,Arg对应于AGA或AGG并且Gly对应于GGT、GGC、GGA或GGG。因此,编码PD-1/CD19双特异性抗体的多核苷酸的实例包括通过将对应于每个氨基酸的每个密码子任意组合构成的多核苷酸。编码特异性结合PD-1的第一臂的VH的多核苷酸的优选实例包括包含选自分别编码克隆PD1-1至PD1-5的VH的序列编码50至54的任何一个中列出的碱基序列的多核苷酸。编码特异性结合CD19的第二臂的VH的多核苷酸的优选实例包括包含选自分别编码克隆CD19-5、CD19-1、CD19-4、CD19-2和CD19-3的VH的序列编号56至60和序列编号76至80的任何一个中列出的碱基序列的多核苷酸。此外,编码共同轻链的可变区的多核苷酸的实例包括包含序列编号55中列出的碱基序列的多肽。

[0768] 药物用途

[0769] 本发明的PD-1/CD19双特异性抗体等可用于预防自身免疫性疾病或移植物抗宿主病(GVHD)、抑制自身免疫性疾病或移植物抗宿主病(GVHD)的症状进展、抑制自身免疫性疾病或移植物抗宿主病(GVHD)复发和/或治疗自身免疫性疾病或移植物抗宿主病(GVHD)。

[0770] 通过本发明的PD-1/CD19双特异性抗体等可以预防、可以抑制其症状进展和/或可以治疗的自身免疫性疾病的实例包括贝赫切特氏病、系统性红斑狼疮、慢性盘状红斑狼疮、多发性硬化(系统性硬皮病和进行性系统性硬化)、硬皮病、多肌炎、皮肌炎、结节性动脉周围炎(结节性多动脉炎和显微镜下多血管炎)、主动脉炎综合征(高安动脉炎)、恶性类风湿关节炎、类风湿关节炎、幼年型特发性关节炎、脊柱关节炎、混合性结缔组织病、舍格伦氏综合征、成人斯蒂尔氏病、血管炎、变应性肉芽肿性血管炎、超敏感性血管炎、类风湿性血管炎、大血管血管炎、ANCA相关血管炎(例如,肉芽肿病伴多血管炎和嗜酸性肉芽肿病伴多血管炎)、寇甘氏综合征、RS3PE综合征、颞动脉炎、风湿性多肌痛、纤维肌痛、抗磷脂抗体综合征、嗜酸性筋膜炎、IgG4相关疾病(例如,原发性硬化性胆管炎和自身免疫性胰岛炎等)、格-巴二氏综合征、重症肌无力、慢性萎缩性胃炎、自身免疫性肝炎、非酒精性脂肪性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、肺出血肾炎综合征、快速进行性肾小球肾炎、巨幼细胞贫血、自身免疫性溶血性贫血、恶性贫血、自身免疫性中性粒细胞减少、特发性血小板减少性紫癜、巴塞多病(格雷夫斯病(甲状腺功能亢进))、桥本病、自身免疫性肾上腺皮质功能不全、原发性甲状腺功能减退症、艾迪生氏病(慢性肾上腺皮质功能减退)、特发性艾迪生氏病、I型糖尿病、缓慢进行性I型糖尿病(成人潜伏性自身免疫性糖尿病)、局灶性硬皮病、银屑病、银屑病关节炎、大疱性类天疱疮、天疱疮、类天疱疮、妊娠疱疹、线性IgA大疱性皮肤病、获得性大疱性表皮松解、斑秃、白癜风、寻常性白癜风、视神经脊髓炎、慢性炎性脱髓鞘多神经病、多灶性运行

神经病、结节病、巨细胞性动脉炎、肌萎缩侧索硬化、原田病、自身免疫性视神经病变、特发性无精子症、习惯性流产、炎症肠病(例如,溃疡性结肠炎和克罗恩氏病)、乳糜泻、强直性脊柱炎、严重哮喘、慢性荨麻疹、移植免疫、家族性地中海热、嗜酸性慢性鼻鼻窦炎、扩张型心肌病、系统性肥大细胞增多症或包涵体肌炎等。

[0771] 在本发明中,术语“治疗”意指治愈或改善某种疾病或其症状。术语“预防”意指在一定时间段内防止或延迟某种疾病或其症状的发作。术语“抑制症状进展”意指抑制症状的进展或恶化以停止疾病状况的进展。“预防”的含义还包括抑制复发。术语“抑制复发”意指防止某些疾病或其综合征的复发或者减少复发的可能性。

[0772] 此外,本发明的PD-1/CD19双特异性抗体等的另一个实施方案可用于预防自身反应性B细胞介导的疾病、抑制自身反应性B细胞介导的疾病的症状进展、抑制自身反应性B细胞介导的疾病的复发和/或治疗自身反应性B细胞介导的疾病。自身反应性B细胞介导的疾病的实例包括系统性红斑狼疮、格雷夫斯病、重症肌无力、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性血小板减少、哮喘、冷球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、恶性贫血等。在该药物用途中,本发明的PD-1/CD19双特异性抗体等通过对自身反应性B细胞的抑制效果起作用。在本文中,对自身反应性B细胞的抑制效果的实例包括对免疫球蛋白如IgG和IgM的产生的抑制效果。此外,本发明的PD-1/CD19双特异性抗体等具有对记忆T细胞活化的抑制效果。在本文中,对记忆T细胞活化的抑制效果的实例包括对细胞因子产生的抑制效果。

[0773] 本发明的PD-1/CD19双特异性抗体等通常通过肠胃外施用系统地或局部地施用。此类施用方法的具体实例包括注射施用、鼻内施用、经肺施用、经皮施用等。注射施用的实例包括静脉内注射、肌肉内注射、腹膜内注射等。对于静脉内注射,优选静脉内滴注。其剂量根据年龄、体重、症状、治疗效果、施用方法、治疗时段等而变化。对于一名成年患者,其单剂量通常为通过肠胃外施用每天一次至几次,在0.1 μ g/kg至300mg/kg的范围内且特别优选在0.1mg/kg至10mg/kg的范围内,或者通过静脉内维持施用每天30分钟至24小时的范围内。不用说,如上所述,由于剂量根据各种条件而变化,因此它可以低于上述剂量,或者可能需要超出上述进行施用。

[0774] 配制剂

[0775] 当将本发明的PD-1/CD19双特异性抗体等配制成用作滴注的注射或输注溶液时,该注射或输注溶液可以为水溶液、悬浮液或乳液的任何形式,或者可以与药学上可接受的载体一起配制为固体药剂,使得它在使用时在添加溶剂中溶解、悬浮或乳化。可以用于滴注的注射或输注溶液中的溶剂的实例包括注射用蒸馏水、生理盐水、葡萄糖溶液和等渗溶液等(例如,其中溶解氯化钠、氯化钾、甘油、甘露醇、山梨糖醇、硼酸、硼砂、丙二醇等的溶液)。

[0776] 本文中,药学上可接受的载体的实例包括稳定剂、增溶剂、悬浮剂、乳化剂、舒缓剂、缓冲剂、保存剂、防腐剂、pH调节剂、抗氧化剂等。作为稳定剂,例如,可以使用各种氨基酸、白蛋白、球蛋白、明胶、甘露醇、葡萄糖、右旋糖酐、乙二醇、丙二醇、聚乙二醇、抗坏血酸、亚硫酸氢钠、硫代硫酸钠、依地酸钠、柠檬酸钠、二丁基羟基甲苯等。作为增溶剂,例如,可以使用醇(例如乙醇等)、多元醇(例如丙二醇和聚乙二醇等)、非离子表面活性剂(例如Polysorbate 20(注册商标)、Polysorbate 80(注册商标)、HCO-50等)等。作为悬浮剂,例如,可以使用单硬脂酸甘油酯、单硬脂酸铝、甲基纤维素、羧甲基纤维素、羟甲基纤维素、月桂基硫酸钠等。作为乳化剂,例如,可以使用阿拉伯胶、海藻酸钠、黄蓍胶等。作为舒缓剂,例

如,可以使用苯甲醇、氯丁醇、山梨糖醇等。作为缓冲剂,例如,可以使用磷酸盐缓冲剂、乙酸盐缓冲剂、硼酸盐缓冲剂、碳酸盐缓冲剂、柠檬酸盐缓冲剂、Tris缓冲剂、谷氨酸缓冲剂、epsilon-氨基己酸缓冲剂等。作为保存剂,例如,可以使用对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯、氯丁醇、苯甲醇、苯扎氯铵、脱氢乙酸钠、依地酸钠、硼酸、硼砂等。作为防腐剂,例如,可以使用苯扎氯铵、对羟基苯甲酸、氯丁醇等。作为pH调节剂,例如,可以使用盐酸、氢氧化钠、磷酸、乙酸等。作为抗氧化剂,例如,可以使用(1)水性抗氧化剂,如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠和亚硫酸钠,(2)油性抗氧化剂,如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基茴香醚、丁基化羟基甲苯、卵磷脂,没食子酸丙酯和 α -生育酚,以及(3)金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸、山梨糖醇、酒石酸和磷酸。

[0777] 用于滴注的注射或输注溶液可以通过在最终过程中进行灭菌或通过无菌操作灭菌,例如通过用过滤器等进行过滤进行灭菌,随后将其填充到无菌容器来生产。用于滴注的注射或输注溶液可以通过在使用时将真空干燥或冻干的无菌粉末(其可以包括药学上可接受的载体粉末)溶解在适当的溶剂中来使用。

[0778] 组合使用或组合配制剂

[0779] 此外,本发明的PD-1/CD19双特异性抗体等可以与用于预防自身免疫性疾病、抑制自身免疫性疾病的症状进展、抑制自身免疫性疾病复发和/或治疗自身免疫性疾病的其它药剂组合使用。在本发明中,与其它药剂组合使用的施用形式的实例(组合使用)可以包括在一种配制剂中含有这两种成分的组合配制剂的形式,以及在单独的配制剂中施用的形式。此类组合使用可以补充其它药剂的预防、症状进展抑制、复发抑制和/或治疗的效果,或者可以维持或减少其它药剂的施用剂量或频率。在分开施用本发明的PD-1/CD19双特异性抗体等和其它药剂的情况下,它们可以在一定时间段内同时施用,然后可以仅施用PD-1/CD19双特异性抗体等或其它药剂。或者,可以最初施用本发明的PD-1/CD19双特异性抗体等,并且在完成其施用之后,可以施用其它药剂。可以最初施用其它药剂,并且在完成其施用后,可以施用本发明的PD-1/CD19双特异性抗体等。各种施用方法可以彼此相同或不同。还可以提供一种试剂盒,其包含含有本发明的PD-1/CD19双特异性抗体等的配制剂和含有其它药剂的配制剂。在本文中,其它药剂的剂量可以基于临床使用的剂量适当选择。此外,其它药剂可以以适当比率与两种或更多种任意药剂组合施用。此外,其它药剂的实例不仅包括已知的药剂,而且还包括将来新发现的药剂。

[0780] 例如,当本发明的PD-1/CD19双特异性抗体等应用于预防I型糖尿病、抑制I型糖尿病的症状进展或复发和/或治疗I型糖尿病时,其可以与选自以下的任一种或多种药剂组合使用:胰岛素制剂(例如,人胰岛素、甘精胰岛素、赖脯胰岛素、地特胰岛素和门冬胰岛素等)、磺酰脲剂(例如,格列本脲(glibenclamide)、格列齐特(gliclazide)和格列美脲(glimepiride)等)、速效胰岛素分泌促进剂(例如,那格列奈(nateglinide)等)、双胍制剂(例如,二甲双胍等)、胰岛素抵抗改善剂(例如,吡格列酮(pioglitazone)等)、 α -葡萄糖苷酶抑制剂(例如,阿卡波糖(acarbose)和伏格列波糖(voglibose)等)、糖尿病神经病变治疗剂(例如,依帕司他(epalrestat)、美西律(mexiletine)和咪达普利(imidapril)等)、GLP-1类似物制剂(例如,利拉鲁肽(liraglutide)、艾塞那肽(exenatide)和利西那肽(lixisenatide)等)和DPP-4抑制剂(西格列汀(sitagliptin)、维格列汀(vildagliptin)和阿格列汀(alogliptin)等)。

[0781] 此外,例如,当本发明的PD-1/CD19双特异性抗体等应用于预防多发性硬化、抑制多发性硬化的症状进展或复发和/或治疗多发性硬化时,其可以与选自以下的任一种或多种试剂组合使用:类固醇剂(例如,醋酸可的松、氢化可的松、氢化可的松磷酸钠、氢化可的松琥珀酸钠、醋酸氟可的松、泼尼松龙、醋酸泼尼松龙、泼尼松龙琥珀酸钠、泼尼松龙乙酸丁酯、泼尼松龙磷酸钠、醋酸卤泼尼松、甲泼尼龙、醋酸甲泼尼龙、甲泼尼龙琥珀酸钠、曲安西龙、醋酸曲安西龙、曲安奈德、地塞米松、醋酸地塞米松、地塞米松磷酸钠、地塞米松棕榈酸酯、醋酸帕拉米松和倍他米松等)、干扰素 β -1a、干扰素 β -1b、醋酸格拉替雷、米托蒽醌、硫唑嘌呤、环磷酰胺、环孢菌素、甲氨蝶呤、克拉屈滨、促肾上腺皮质激素(ACTH)、促皮质素、咪唑立宾、他克莫司、芬戈莫德、阿仑珠单抗等。

[0782] 此外,例如,当本发明的PD-1/CD19双特异性抗体等应用于预防系统性红斑狼疮、抑制系统性红斑狼疮的症状进展或复发和/或治疗系统性红斑狼疮时,其可以与选自以下的任一种或多种药剂组合使用:类固醇剂(例如,上述类固醇剂)、免疫抑制剂(例如,环孢菌素、他克莫司和芬戈莫德等)和贝利木单抗(belimumab)。

[0783] 例如,当本发明的PD-1/CD19双特异性抗体应用于预防类风湿关节炎、抑制类风湿关节炎的症状进展或复发和/或治疗类风湿关节炎时,其可以与选自以下的任一种或多种药剂组合使用:类固醇剂(例如,上述类固醇剂)、抗风湿剂(例如,甲氨蝶呤、柳氮磺胺吡啶、布西拉明(bucillamine)、来氟米特(leflunomide)、咪唑立宾和他克莫司等)、抗细胞因子剂(例如,英夫利昔单抗(infliximab)、阿达木单抗(adalimumab)、托珠单抗(tocilizumab)、依那西普(etanercept)、戈利木单抗(golimimumab)和赛妥珠单抗(certolizumab)等)和阿巴西普(abatacept)等。

[0784] 本发明的PD-1/CD19双特异性抗体等在得到应用以预防其他自身免疫性疾病、抑制其他自身免疫性疾病的症状进展或复发和/或治疗其他自身免疫性疾病时可以与任何一种或多种上述其它药剂组合使用。

[0785] 现在将通过以下实施例更详细地描述本发明,但本发明的范围不限于此。本领域技术人员可以根据本发明的描述进行各种变化和修改,并且此类变化和修改也包括在本发明的范围内。

[0786] 实施例

[0787] 实施例1:使用重组人PD-1-Fc融合蛋白免疫MeMo(注册商标)小鼠

[0788] 作为获得本发明的特异性结合PD-1的第一臂的方法,选择用重组人PD-1蛋白免疫MeMo(注册商标)小鼠的方法(参见W02009/157771)。MeMo(注册商标)小鼠是那些经过遗传修饰而使含有非重组人重链V基因区、D基因区和J基因区的基因片段,以及重组人 κ 轻链IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01种系基因已与小鼠恒定区基因连接的小鼠。通过用抗体的靶蛋白直接免疫它们,可以产生具有多样性的由重链和共同轻链组成的抗体。

[0789] 用使用Gerbu佐剂MM(Gerbu Biotechnik,系列号#3001)乳化的重组人PD-1-Fc融合蛋白(R&D Systems,系列号1086-PD)以14天间隔免疫12只12-16周龄的MeMo(注册商标)小鼠。免疫后第0、14、28天,皮下施用重组人PD-1-Fc融合蛋白,此后皮下施用溶解于PBS中的重组人PD-1-Fc融合蛋白。在免疫后第21、35、56、77和98天,使用强制表达人PD-1的HEK293 T细胞系通过流式细胞术评估血清中的抗体滴度。当在稀释1000倍的血清中染色强制表达人PD-1的HEK293 T细胞系时,使用与不表达人PD-1的HEK293 T细胞系作为对照相比

MFI值增加超过三倍的小鼠淋巴组织来构建噬菌体展示文库。自抗体滴度评估日起,对符合构建文库的标准的小鼠用重组PD-1-Fc融合蛋白再免疫3天,并且采集小鼠的脾和腹股沟淋巴结。还从小鼠中收集脾脏和中心区域淋巴结,在所述小鼠血清中对人PD-1和食蟹猴PD-1的抗体滴度为1/100或更多,并且抗体滴度不因额外免疫而增加。从那些淋巴样组织中提取RNA,然后进行cDNA合成。

[0790] 实施例2:构建噬菌体展示文库以获得抗PD-1抗体(蛋白免疫)

[0791] 使用实施例1中制备的DNA和对免疫球蛋白重链可变区家族特异性的引物进行PCR反应。用限制酶SfiI和XhoI消化得到的PCR产物,并且插入用相同的限制酶消化的噬菌粒载体[具有编码共同轻链的基因(人 κ 轻链IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01种系基因)]中以构建文库。

[0792] 实施例3:筛选抗PD-1抗体

[0793] 使用用人PD-1-Fc融合蛋白、人PD-1-His标签融合蛋白、食蟹猴PD-1-His标签融合蛋白或小鼠PD-1-His标签融合蛋白包被的板,基于对PD-1的结合特性进行噬菌体选择。当使用人PD-1-Fc融合蛋白时,在与噬菌体温育期间,向其中添加人IgG(SIGMA,系列号I4506)以吸收Fc反应性克隆。富集能够与人PD-1、食蟹猴PD-1和小鼠PD-1结合的结合噬菌体。使用对强制表达食蟹猴PD-1的HEK293 T细胞系的选择,富集能够与食蟹猴PD-1结合的结合噬菌体。获得通过选择获得的用噬菌体转化的大肠杆菌菌株TG1克隆以生成主板。

[0794] 进而,根据吸附了人PD-1-Fc融合蛋白的平板上与PD-1的结合特性,对通过上述选择得到的克隆的周质空间提取物进行噬菌体选择。在此注意,作为选择标准,具有比阴性对照孔(PBS)中的信号(OD_{450} 值)多三倍的信号的克隆被定义为阳性克隆。

[0795] 实施例4:抗PD-1抗体的DNA测序候选克隆

[0796] 对通过实施例3中筛选得到的阳性克隆的重链可变区基因进行DNA测序。将分析的DNA序列分类为超级簇(具有相同长度的重链CDR3的组,其中相同CDR3的氨基酸序列彼此具有70%或更多的同源性)和簇(其中重链CDR3的氨基酸序列相同的组)。获得了数百个克隆,将它们分类为超级簇和簇。

[0797] 实施例5:基于对表达PD-1的细胞的结合特性的评估的筛选

[0798] 从各个分类的超级簇中,筛选并分离出满足以下条件的抗PD-1单克隆抗体克隆:

[0799] (1) 在CDR中具有高频率的体细胞突变,

[0800] (2) 具有高度频繁使用的VH的种系基因,和

[0801] (3) 在基于与人PD-1-Fc融合蛋白的结合特性的筛选中具有高信号。

[0802] 使用那些周质间隙提取物中所含的Fab片段,通过用抗小鼠IgG多克隆抗体检测来评估对强制表达人PD-1的CHO-S细胞系和强制表达食蟹猴PD-1的CHO-S细胞系的结合特性。在评估的117个克隆(105类簇)中,在包括抗PD-1单克隆抗体克隆PD1-1、PD1-2、PD1-3和PD1-4在内的22个克隆中,对表达人PD-1的CHO-S细胞系的结合得到确认。

[0803] 实施例6:抗PD-1单克隆抗体的氨基酸取代产物的制备

[0804] 克隆PD1-1和PD1-4在其重链可变区的框架区4中分别含有脱酰胺基序(Asn-Gly)。为了获得具有降低的脱酰胺风险的PD-1臂,生成了其中脱酰胺基序已转化的变体。通过熟知的位点特异性突变方法将克隆PD1-4的根据EU编号系统的119位天冬酰胺(Asn)改变为谷氨酰胺,以制备和分离克隆PD1-5。该克隆与强制表达人PD-1的CHO-S细胞的结合特性与克隆PD1-4的结合特性相同。

[0805] 实施例7:使用CD19表达质粒载体免疫MeMo(注册商标)

[0806] 作为获得本发明的特异性结合CD19的第二臂的方法,选择用人CD19表达质粒载体和食蟹猴CD19表达质粒载体免疫MeMo(注册商标)小鼠的方法(参见W02009/157771)。

[0807] MeMo(注册商标)小鼠是那些经过遗传修饰而使含有非重组人重链V基因区、D基因区和J基因区的基因片段,以及重组人 κ 轻链IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01种系基因已与小鼠恒定区基因连接的小鼠。通过用表达抗体的靶蛋白的质粒载体直接免疫它们,可以生成具有多样性的由重链和共同轻链组成的抗体。

[0808] 用人CD19表达质粒载体和/或食蟹猴CD19表达质粒载体分别或交替免疫12至16周龄的MeMo(注册商标)小鼠。在免疫后第0、3、6、14、17、28、31、42、49、63和/或70天,施用表达质粒载体。使用表达人CD19的细胞系通过流式细胞术评估血清中的抗体滴度。当在100倍稀释的血清中染色表达人CD19的细胞系时,使用与不表达人CD19的细胞系作为对照相比MFI值增加超过三倍的小鼠淋巴组织来构建噬菌体展示文库。对符合构建文库构建体标准的小鼠再进行免疫,并收集其中的脾脏和腹股沟淋巴结。从那些淋巴样组织中提取RNA,然后使用对IgG恒定区特异性的引物通过逆转录反应进行cDNA合成。

[0809] 实施例8:构建噬菌体展示文库以获得抗CD19抗体

[0810] 使用实施例7中制备的DNA和对免疫球蛋白重链可变区家族特异性的引物进行PCR反应。将得到的PCR产物用限制酶消化,并且插入用相同限制酶消化的噬菌粒载体[具有编码共同轻链的基因(人 κ 轻链IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01种系基因)]中以构建文库。

[0811] 实施例9:筛选抗CD19抗体

[0812] 使用人CD19-Fc融合蛋白(R&D systems,系列号9269-CD),食蟹猴CD19-Fc融合蛋白(NovoPro Bioscience,系列号504385),人B细胞系Raji或强制表达食蟹猴CD19的HEK293T细胞系,基于与CD19的结合特性进行噬菌体选择。获得用通过选择得到的噬菌体转化的大肠杆菌菌株TG1克隆以生成主板。在此注意,作为选择标准,将信号比由阴性对照获得的信号(OD_{450} 值或MFI)多3倍的克隆定义为阳性克隆。

[0813] 实施例10:抗CD19抗体的候选克隆的DNA测序

[0814] 对通过实施例9中的筛选得到的阳性克隆的重链可变区基因进行DNA测序。将分析的DNA序列分类为超簇(重链CDR3长度相同并且重链可变区的氨基酸序列彼此具有70%或更多同源性的组)和簇(其中重链可变区和重链CDR3的氨基酸序列分别彼此相同的组)。

[0815] 在第一次筛选时获得数百个克隆,它们分类为超级簇、簇和4类种系。在第二次筛选时获得数百个克隆,它们分类为超级簇、簇和8类种系。19类超级簇与第一次筛选时的超级簇不同。

[0816] 实施例11:基于对CD19的结合特性的评估的筛选

[0817] 从各个分类的超级簇中,筛选并分离出满足以下条件的抗CD19单克隆抗体克隆:

[0818] (1) 在CDR中具有高频率的体细胞突变,

[0819] (2) 具有高度频繁使用的VH的种系基因,和

[0820] (3) 在基于与CD19的结合特性的筛选中具有高信号。

[0821] 使用包含在这些周质空间提取物中的Fab片段,评估了与CD19的结合特性。

[0822] 证实在评估的克隆中,包括抗CD19单克隆抗体克隆CD19-1、CD19-2、CD19-3、CD19-4和CD19-5在内的许多克隆可以结合人CD19表达细胞系。

[0823] 实施例12:PD-1/CD19双特异性抗体的制备

[0824] 通过分别将编码在实施例5和6中选择的抗PD-1单克隆抗体克隆PD1-1至PD1-5的各个重链可变区的DNA与编码IgG₁重链恒定区的DNA连接来制备表达特异性结合PD-1的第一臂的各个重链的表达载体。另一方面,通过分别将编码实施例11中选择的抗CD19单克隆抗体克隆CD19-1至CD19-5的各个重链可变区的DNA与编码IgG₁重链恒定区的DNA连接来制备表达特异性结合CD19的第二臂的各个重链的表达载体。在本文中,作为表达那些重链恒定区的基因,对于特异性结合PD-1的第一臂,使用表达具有L351D/L368E变异(DE变异)的Fc区的基因,并且对于特异性结合CD19的第二臂,使用表达具有L351K/T366K变异(KK变异)的Fc区的基因。构建这些表达载体以进一步含有编码IGVK1-39/JK1共同轻链的基因,从而将其一起表达。此外,为了消除Fc效应子活性,对表达这些重链恒定区的基因进行修饰,从而被表达为其中重链恒定区中235位的亮氨酸被甘氨酸取代并且另外236位的甘氨酸被精氨酸取代的那些,此外为了避免翻译后的加工,它们进行修饰以被表达为其中重链恒定区C端447位的赖氨酸缺失的那些。将这两种表达载体基因转移到Free Style 293F细胞中,使它们在培养上清液中产生抗体。收集培养上清液,并且通过蛋白A亲和色谱处理以分别纯化克隆CD19-1 (Bi)、CD19-2 (Bi)、CD19-3 (Bi)、CD19-4 (Bi)和CD19-5 (Bi)作为本发明的PD-1/CD19双特异性抗体。

[0825] 在此注意,由于将源自抗CD19单克隆抗体克隆CD19-1、CD19-2、CD19-3、CD19-4和CD19-5的特异性结合CD19的第二臂用于其制备,这些PD-1/CD19双特异性单克隆抗体克隆分别对应于那些抗PD-1单克隆抗体克隆。所有这些PD-1/CD19双特异性抗体克隆都具有源自克隆PD1-5的特异性结合PD-1的第一臂。

[0826] 实施例13:抗CD19单克隆抗体变体及其PD-1/CD19双特异性抗体的制备

[0827] 存在着如下的可能性,即实施例12中制备的PD-1/CD19双特异性抗体克隆不能从作为副产物的第一臂-重链/轻链复合物、第二臂-重链/轻链复合物和/或由它们组成的相应同二聚体充分分离或纯化。因此,为了改善通过阳离子交换色谱的纯化中双特异性抗体与那些副产物的分离,制备等电点升高的抗CD19单克隆抗体的氨基酸变体。

[0828] 产生变体,其中通过已知的定点诱变方法将代表克隆CD19-5的VH氨基酸序列的序列编号30中的114位谷氨酰胺用精氨酸取代。在本发明中,该变体命名为“CD19-6”。使用用于分析基因和氨基酸序列的软件Genetyx (Genetics Inc.)计算抗体的等电点。

[0829] 此外,通过已知的遗传修饰技术制备具有如下形式的各个变体,其中将甘氨酸和由序列编号67至70表示的肽添加到具有CD19-6的VH的重链的C端(以下统称为“CD19-6/C端肽加合物”)。在本发明中,具有将序列编号67表示的肽添加到CD19-6的C端的形式变体命名为“CD19-7”。

[0830] 按照与实施例12中相同的方法将该实施例中描述的各个表达载体基因转移到Free Style 293F细胞中以使其在培养上清液中产生抗体,所述表达载体中已经插入了编码这些抗CD19单克隆抗体的变体的相应DNA和编码克隆PD1-5的DNA。收集培养上清液并通过蛋白A亲和色谱处理以纯化分别源自本实施例中制备的各个变体的本发明的双特异性抗体。在这些双特异性抗体中,源自CD19-6的双特异性抗体克隆命名为“CD19-6(Bi)”,并且源自CD19-7的双特异性抗体克隆命名为“CD19-7(Bi)”。

[0831] 实施例14:PD-1/CD19双特异性抗体及其副产物的纯化和分离

[0832] 验证了从副产物中纯化和分离的成功和失败,所述副产物可以分别在实施例12和13中制备的PD-1/CD19双特异性抗体生产期间产生。

[0833] 将实施例12和13中分别收集的含有该双特异性抗体的培养上清液分别通过蛋白A亲和色谱和尺寸排阻色谱处理以纯化该双特异性抗体、分别对应于副产物的抗PD-1抗体和抗CD19抗体。

[0834] 通过超滤对含有这些相应纯化抗体的溶剂进行缓冲液交换,以达到pH 6.0。将缓冲液交换后的相应纯化抗体施加到用缓冲液A (pH 7.0) 平衡的阳离子交换柱TSKge1 SP-STAT柱(Tosoh,型号0021964)。使用含有1mol/L氯化钠的缓冲液B(pH 7.0)通过盐梯度洗脱与柱结合的相应纯化抗体。流动相流速为0.5mL/min,并且洗脱采用从缓冲液A到缓冲液B的线性梯度进行。缓冲液B的比率在开始施加相应的纯化抗体后从0至10分钟设置为0%,然后从10至40分钟从0线性增加至100%,并且从40至50分钟设置为100%。

[0835] 克隆CD19-2(等电点:8.32)、CD19-6(I_p:8.49)和CD19-7(I_p:8.75)在阳离子交换色谱中的保留时间(分钟)分别为15.167、15.749和17.521,并且克隆CD19-6和CD19-7的保留时间分别是延长的。另一方面,克隆PD1-3(I_p:7.67)和PD1-5(I_p:7.52)未与阳离子交换柱结合,并从其洗脱。

[0836] 另一方面,PD-1/CD19双特异性抗体克隆CD19-2(Bi)和CD19-2(Bi)未与阳离子交换柱结合,并从其中洗脱,但克隆CD19-6(Bi)和CD19-7(Bi)的保留时间(分钟)分别为13.715和14.955。

[0837] 如上文讨论,通过经由第二臂中的氨基酸取代或在其重链的C端添加特定肽来增加等电点,在通过阳离子交换色谱的纯化中作为靶标的本发明双特异性抗体与作为副产物的抗PD-1抗体和抗CD19抗体的分离得到改进,从而使得可以提供本发明的双特异性抗体,其中其副产物的污染极大地减少。

[0838] 实施例15:PD-1/CD19双特异性抗体结合特性的评估

[0839] 通过使用融合有人IgG1-Fc的人PD-1细胞外重组蛋白(R&D systems,系列号1086-PD)的Biacore测定,分别评估实施例12和13中获得的PD-1/CD19双特异性单克隆抗体的第一臂对PD-1重组蛋白的结合亲和力。这里注意,为了固定重组蛋白,使用S系列传感器芯片CM5传感器芯片(GE Health Care,系列号29-1049-88)。

[0840] 类似地,通过使用融合有人IgG1-Fc的CD19胞外重组蛋白(R&D systems,系列号9269-CD)的Biacore测定,分别评估了相同抗体的第二臂对CD19的结合亲和力。图11显示了关于各个克隆的第一臂对PD-1的结合亲和力(K_d值)和第二臂对CD19的结合亲和力。证实了与实施例13中没有氨基酸取代的CD19-5(Bi)的结合亲和力相比,CD19-6(Bi)对PD-1和CD19的结合亲和力分别得到改善。

[0841] 实施例16:PD-1/CD19双特异性抗体结合特性的验证

[0842] 验证了实施例12和13中获得的PD-1/CD19双特异性抗体分别特异性结合人PD-1、食蟹猴PD-1、人CD19和食蟹猴CD19。将克隆CD19-1(Bi)至CD19-6(Bi)添加到强制表达人PD-1的CHO-S细胞系、强制表达食蟹猴PD-1的CHO-S细胞系、CHO-S细胞系、强制表达人CD19的CHO-K1细胞系、强制表达食蟹猴CD19的CHO-K1细胞系和CHO-K1细胞系,并在冰上温育20分钟。洗涤那些细胞后,向其中添加100μL PE标记的山羊抗人IgG-Fc F(ab')₂片段抗体(ThermoFisher,系列号H10104),并在冰上温育20分钟。洗涤那些细胞后,分别通过流式细

胞术评估那些抗体的第一臂对PD-1的结合特性和第二臂对CD19的结合特性。图12至16显示了其在该测定中的结果。

[0843] 所有克隆都结合人PD-1、食蟹猴PD-1、人CD19和食蟹猴CD19。这里注意,未检测到此结合系统中的非特异性结合。

[0844] 验证了实施例12中获得的PD-1/CD19双特异性单克隆抗体分别同时特异性结合PD-1和CD19。最初,将克隆CD19-1 (Bi) 至CD19-5 (Bi) 分别添加到强制表达人CD19的CHO-K1细胞系和CHO-K1细胞系中,并在冰上温育20分钟。洗涤那些细胞后,向其添加100 μ L融合有6xHis标签的人PD-1胞外区重组蛋白 (R&D systems, 系列号8986-PD), 并且在冰上温育20分钟。洗涤那些细胞后,向其添加100 μ L经Alexa Fluor 488标记的小鼠抗His标签抗体 (MBL, 系列号D291-A48), 并在冰上温育20分钟。洗涤那些细胞后,通过流式细胞术评估PD-1胞外区重组蛋白的结合量。图17显示了其在此测定中的结果。

[0845] 所有克隆同时结合PD-1和CD19。这里注意,未检测到此结合系统中的非特异性结合。

[0846] 实施例17:PD-1/CD19双特异性抗体的第一臂的结合特性的评估

[0847] 为了评估实施例12中获得的PD-1/CD19双特异性抗体的第一臂对PD-1/PD-L1相互作用的影响,对该双特异性抗体克隆和可溶性PD-L1重组蛋白对PD-1的结合进行了竞争性结合测定。最初,分别将克隆CD19-1 (Bi) 至CD19-5 (Bi)、纳武单抗 (Nivolumab) 和抗人PD-1抗体J105 (Immunology Letters, 2002, Vol. 83, Issue 3, p. 215-220) 添加到冰上的强制表达人PD-1的CHO-S细胞系。此外,在冰上向其添加使用生物素标记试剂盒 (Dojin, 系列号LK03) 用生物素标记的可溶性PD-L1重组蛋白 (R&D systems, 系列号156-B7)。洗涤那些细胞后,在冰上向其添加经APC标记的链霉亲和素 (BioLegend, 系列号405207)。洗涤那些细胞后,通过流式细胞术评估可溶性PD-L1重组蛋白的结合量。图18显示了其在该测定中的结果。

[0848] 克隆CD19-1 (Bi) 至CD19-5 (Bi) 允许可溶性PD-L1重组蛋白与PD-1的结合。另一方面,纳武单抗和J105在相同条件下完全抑制可溶性PD-L1重组蛋白与PD-1的结合。

[0849] 通过相同的评估证明,分别具有实施例5中获得的抗PD-1单克隆抗体克隆PD1-1至PD1-4作为第一臂的双特异性抗体也允许可溶性PD-L1重组蛋白与PD-1的结合。

[0850] 实施例18:PD-1/CD19双特异性抗体对活化的B细胞的体外抑制效果

[0851] 使用通过人B细胞分离试剂盒II (Miltenyi Biotec, 系列号130-091-151) 从健康人外周血单个核细胞 (LONZA, 型号CC-2702) 中分离的B细胞来评估针对人IgM产生的抑制效果。将人B细胞接种在细胞培养板中,并且向其添加抗人CD79B抗体 (LifeSpan Biosciences, 系列号LS-C134648)、人CD40L重组蛋白 (Enzo Life Sciences, 系列号ALX-522-110) 和人IL-21重组蛋白 (R&Dsystems, 系列号8879-IL) 以进行活化处理。向其中添加克隆CD19-1 (Bi) 至CD19-5 (Bi) 或对照抗体,并通过ELISA (ThermoFisher, 系列号BMS2098) 对活化处理后的培养物上清液中所含有的IgM进行定量。图19显示了其结果。CD19-1 (Bi) 至CD19-5 (Bi) 的所有克隆抑制了IgM的产生。这里注意,图中的IgM产率 (pg/mL) 量表示为平均值 \pm 标准差 (N=4)。

[0852] 实施例19:PD-1/CD19双特异性抗体对活化的B细胞的体内抑制效果

[0853] 使用移植了源自健康个体的外周血单个核细胞 (LONZA, 系列号CC-2702) 的

NOD.Cg-PrkdcscidIl2 rgtm1Wj1/SzJ小鼠(以下缩写为NSG小鼠)评估对人IgG₂的产生的抑制效果。每只NSG小鼠移植 1×10^7 个源自健康个体的外周血单个核细胞。在移植后的第3、7、10、14和17天,每天一次腹膜内施用3mg/kg/天的克隆CD19-1(Bi)至CD19-4(Bi)或对照抗体。移植后第21天从尾静脉收集血液以制备血清。另一方面,在移植后第3、7和10天分别以相同剂量腹膜内施用克隆CD19-5(Bi)和CD19-6(Bi)。此时,也平行地腹腔内施用对照抗体。移植后第14天从尾静脉收集血液以制备血清。通过ELISA(ThermoFisher,系列号BMS2093)定量血清中所含的人IgG₂。图20和21显示了其结果。CD19-1(Bi)至CD19-4(Bi)的所有克隆都抑制IgG₂的产生。这里注意,图中的IgG₂产率($\mu\text{g}/\text{mL}$)量表示为平均值 \pm 标准差(N=4-8)。

[0854] 实施例20:PD-1/CD19双特异性抗体的与PD-1的结合的交叉竞争特性的评估

[0855] 进行交叉竞争测定以评估具有相应的克隆PD1-1至PD1-5作为第一臂的双特异性抗体的与PD-1结合的交叉竞争特性,这些克隆是用于生成PD-1/CD19双特异性抗体的PD-1抗体。

[0856] 最初,将具有克隆PD1-5作为第一臂的双特异性抗体添加到冰上的表达人PD-1的CHO-S系细胞中。此外,分别向其添加分别具有克隆PD1-1至PD1-5作为第一臂的生物素标记的双特异性单克隆抗体,然后在冰上温育。洗涤那些细胞后,向其中添加PE标记的链霉亲和素(BD Pharmingen,系列号554061),并在冰上温育。洗涤那些细胞后,使用流式细胞术测量那些生物素标记的抗体的结合量。

[0857] 证明了具有克隆PD1-5作为第一臂的双特异性抗体可以分别抑制具有克隆PD1-1至PD1-4作为第一臂的相同抗体与PD-1的结合,因此它可以与那些结合PD-1的抗体进行交叉竞争。

[0858] 实施例21:PD-1/CD19双特异性抗体对从人外周血单个核细胞释放细胞因子的体外效果的评估

[0859] 为了分析PD-1/CD19双特异性抗体的细胞因子释放活性,进行实验,其中分别将本发明的双特异性抗体或小鼠抗人CD3抗体OKT3(BioLegend,系列号317304)添加到人外周血单个核细胞(以下缩写为“人PBMC”)。

[0860] 将克隆CD19-6(Bi)和OKT3添加到人PBMC(LONZA,系列号CC-2702)中,然后进行培养。通过流式细胞术使用细胞计数珠阵列(BD Biosciences,系列号551809)对培养上清液中含有的IL-2进行定量。图22显示了其结果。这里注意,图中的IL-2产率(pg/mL)量由平均值 \pm 标准差(N=3)表示。

[0861] OKT3显著诱导IL-2产生,但未检测到与CD19-6(Bi)相关的IL-2产生。

[0862] 实施例22:PD-1/CD19双特异性抗体的物理化学稳定性评估

[0863] 证实了本发明的PD-1/CD19双特异性抗体在任何物理化学稳定性评估中具有良好性能,所述物理化学稳定性评估包括差示扫描量热法(DSC)测量中的结构稳定性、扩散系数变化(DLS)测量中的胶体稳定性和在应激条件(例如,在pH 3至4和5°C或pH 7、5°C和五个冻融循环)下的化学稳定性(例如,蛋白质浓度的变化、分子结构的变化、结合/聚集的存在或不存在、电荷变体生成的存在或不存在、结构变化、对CD19的结合活性)。

[0864] **【工业适用性】**

[0865] 本发明的PD-1/CD19双特异性抗体或其抗体片段可用于预防自身免疫性疾病或移

植物抗宿主病 (GVHD)、抑制自身免疫性疾病或移植物抗宿主病 (GVHD) 的症状进展、抑制自身免疫性疾病或移植物抗宿主病 (GVHD) 复发和/或治疗自身免疫性疾病或移植物抗宿主病 (GVHD)。

共同轻链	SEQ ID No.	氨基酸序列
可变区	25	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQS YSTPPTFGQGTKVEIK
恒定区	29	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图1

共同轻链	SEQ ID No.	CDR1	SEQ ID No.	CDR2	SEQ ID No.	CDR3
CDRs	26	RASQSISSYLN	27	AASSLQS	28	QQSYSTPPT

图2

种系V基因	SEQ ID No.	氨基酸序列
IGHV7-4-1	21	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTSYAMNWVRQ APGQGLEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFLDTSVST AYLQICSLKAEDTAVYYCAR
IGHV5-51	22	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQM PGKGLEWMGIHPGSDTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQ WSSLKASDTAMYYCAR

图3

PD1-1至PD1-5的各个VH和IGHV7-4-1/JH6c之间的比对

	-----FR1-----	-CDR1-	----FR2-----	-----CDR2-----
IGHV7-4-1 (SEQ ID No. 21)	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT	SYAMN	WVRQAPGQGLEWMG	WINTNTGNPTYAQGFTG
PD1-1 VH (SEQ ID No. 1)	-----Q-----	H-GLH	-----	-L-E-F-
PD1-2 VH (SEQ ID No. 2)	-----Q-V-----	H-GLH	-----	-----
PD1-3 VH (SEQ ID No. 3)	-----M-----	H-LH	-----	-L-E-
PD1-4 VH (SEQ ID No. 4)	-----Q-----	H-LH	-L-	-L-E-F-
PD1-5 VH (SEQ ID No. 5)	-----Q-----	H-LH	-L-	-L-E-F-
	-----FR3-----	-----CDR3-----	----FR4----	
IGHV7-4-1 (SEQ ID No. 21)	RFVFLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCAR			
D 基因 (未知)				
JH6c			HYYYYYMDV	WKGITVTVSS
PD1-1 VH (SEQ ID No. 1)	-----T-S-----	GDMVVPTTIWN-HF-	-N-L-	
PD1-2 VH (SEQ ID No. 2)	-----S-----	GDLVVPTTIWN-H-E-	-L-	
PD1-3 VH (SEQ ID No. 3)	-----T-N-----	GDMVVPTTIWN-	-----	
PD1-4 VH (SEQ ID No. 4)	-----T-S-----	GDMVVPTTIWN-HF-	-N-	
PD1-5 VH (SEQ ID No. 5)	-----T-S-----	GDMVVPTTIWN-HF-	-Q-	

图4

CD19-1至CD19-6的每个VH和IGHV5-51之间的比对

	FR1	CDR1-	FR2	CDR2
IGHV5-51 (SEQ ID No. 22)	EVQLVQSGAEVKKPKGESLKISCKGSGYSFT	SYWIG	WVRQMPGKGLEWMG	IIYPGDSDRYSPSFQG
CD19-5 VH (SEQ ID No. 30)	Q-----	---	-----	-----
CD19-1 VH (SEQ ID No. 31)	-----	---	-----	-----
CD19-4 VH (SEQ ID No. 32)	Q-----S-----F---	---A	-----	-----
CD19-2 VH (SEQ ID No. 33)	Q-----I---	---	-----	---W-----
CD19-3 VH (SEQ ID No. 34)	-----	---	-----	-----
CD19-6 VH (SEQ ID No. 30)	Q-----	---	-----	-----

	FR3	CDR3	FR4
IGHV5-51 (SEQ ID No. 22)	QVTISADKSISTAYLQWSSSLKASDTAMYCAR		
CD19-5 VH (SEQ ID No. 30)	-----I---	KTIVGVMTAFDI	WGQGTMTVSS
CD19-1 VH (SEQ ID No. 31)	-----V-	QTIVATVMNAFDI	WGQGTMTVSS
CD19-4 VH (SEQ ID No. 32)	-----FT---N---I---	HTIVATIYNADF	WGQGTMTVSS
CD19-2 VH (SEQ ID No. 33)	-----NV-----L-V-	QTIVATTGLAFDI	WGQGTMTVSS
CD19-3 VH (SEQ ID No. 34)	-----N-----	RTIVATIHWASDY	WGQGTMTVSS
CD19-6 VH (SEQ ID No. 30)	-----I---	KTIVGVMTAFDI	WGRGTMTVSS

图5

克隆No.	SEQ ID No.	氨基酸序列
PD1-1	1	QVQLVQSGSELKQPGASVKVSKASGYTFTHYGLHWVRQAPGQGLEWMGW LNTNTENPTFAQGFTGRFVFLDTSVTTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGDMV VPTTIWNYHYFMDVWGNGLTVTVSS
PD1-2	2	QVQLVQSGSELKQPGVSVKVSCKASGYTFTHYGLHWVRQAPGQGLEWMGWI NTNTGNPTYAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGDLVV PTTIWNYHYHMEVWVGKGLTVTVSS
PD1-3	3	QVQLVQSGSELKQPGASVMVSKASGYTFTHYALHWVRQAPGQGLEWMGW LNTNTENPTYAQGFTGRFVFLDTSVTTAYLQINSLKAEDTAVYYCARGDMV VPTTIWNYHYMDVWVGKGTTVTVSS
PD1-4	4	QVQLVQSGSELKQPGASVKVSKASGYTFTHYALHWLRQAPGQGLEWMGWL LNTNTENPTFAQGFTGRFVFLDTSVTTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGDMVV PTTIWNYHYFMDVWGNGLTVTVSS
PD1-5	5	QVQLVQSGSELKQPGASVKVSKASGYTFTHYALHWLRQAPGQGLEWMGWL LNTNTENPTFAQGFTGRFVFLDTSVTTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGDMVV PTTIWNYHYFMDVWVWQGTTVTVSS

图6

克隆No.	SEQ ID No.	CDR1	SEQ ID No.	CDR2	SEQ ID No.	CDR3
PD1-1	6	HYGLH	7	WLNTNTENPTFAQGFTG	8	GDMVVPTTIWNYHFMDV
PD1-2	9	HYGLH	10	WINTNTGNPTYAQGFTG	11	GDLVVPTTIWNYHYMEV
PD1-3	12	HYALH	13	WLNTNTENPTYAQGFTG	14	GDMVVPTTIWNYYYMDV
PD1-4	15	HYALH	16	WLNTNTENPTFAQGFTG	17	GDMVVPTTIWNYHFMDV
PD1-5	18	HYALH	19	WLNTNTENPTFAQGFTG	20	GDMVVPTTIWNYHFMDV

图7

克隆No.	SEQ ID No.	氨基酸序列
CD19-5	30	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMG IIYPGDS DTRYSPSFQGV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTAIYYCARKTI VGVVMTAFDIWGQGTMTVSS
CD19-1	31	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMG IIYPGDS DTRYSPSFQGV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCVRQT IVATVMNAFDIWGQGTITVSS
CD19-4	32	QVQLVQSGAEVKKSGESLKISCKGSGFSFTSYWIAWVRQMPGKGLEWMG IIYPGDS DTRYSPSFQGV TISADKSFTTAYLQWNSLKASDTAIYYCARHT IVATIYNADFDFWGQGTMTVSS
CD19-2	33	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFISYWIGWVRQMPGKGLEWMGI IWP GDS DTRYSPSFQGV TISADKSINVA YLQWSSLKASDTALYYCVRQTI VATTGLAFDIWGQGTILVTVSS
CD19-3	34	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMG IIYPGDS DTRYSPSFQGV TISADKSINTAYLQWSSLKASDTAMYYCARRT IVATIH WASDYWGQGTMTVSS
CD19-6	62	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMG IIYPGDS DTRYSPSFQGV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTAIYYCARKTI VGVVMTAFDIWGRGTMVTVSS

图8

克隆No.	SEQ ID No.	CDR1	SEQ ID No.	CDR2	SEQ ID No.	CDR3
CD19-5	35	SYWIG	36	IIYPGDS DTRYSPSFQG	37	KTI VGVVMTAFDI
CD19-1	38	SYWIG	39	IIYPGDS DTRYSPSFQG	40	QTI VATVMNAFDI
CD19-4	41	SYWIA	42	IIYPGDS DTRYSPSFQG	43	HTI VATIYNADFDF
CD19-2	44	SYWIG	45	I IWP GDS DTRYSPSFQG	46	QTI VATTGLAFDI
CD19-3	47	SYWIG	48	IIYPGDS DTRYSPSFQG	49	RTI VATIHWASDY

图9

	SEQ ID No.	氨基酸序列
具有特异性结合PD-1的第一臂的VH的重链恒定区	23	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPP CPAPELGRGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTPPSREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
具有特异性结合CD19的第一臂的VH的重链恒定区	24	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPP CPAPELGRGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTKPPSREEMTKNQVSLKCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
具有特异性结合PD-1的第一臂的VH的重链恒定区	71	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPP CPAPELGRGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTKPPSREEMTKNQVSLKCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG GKKA

图10

克隆No.	人CD19	人PD-1
	Kd (nmol/L)	Kd (nmol/L)
CD19-1(Bi)	11.3	7.6
CD19-2(Bi)	13.6	6.7
CD19-3(Bi)	5.7	6.8
CD19-4(Bi)	12.5	6.7
CD19-5(Bi)	6.6	7.6
CD19-6(Bi)	3.1	1.4

图11

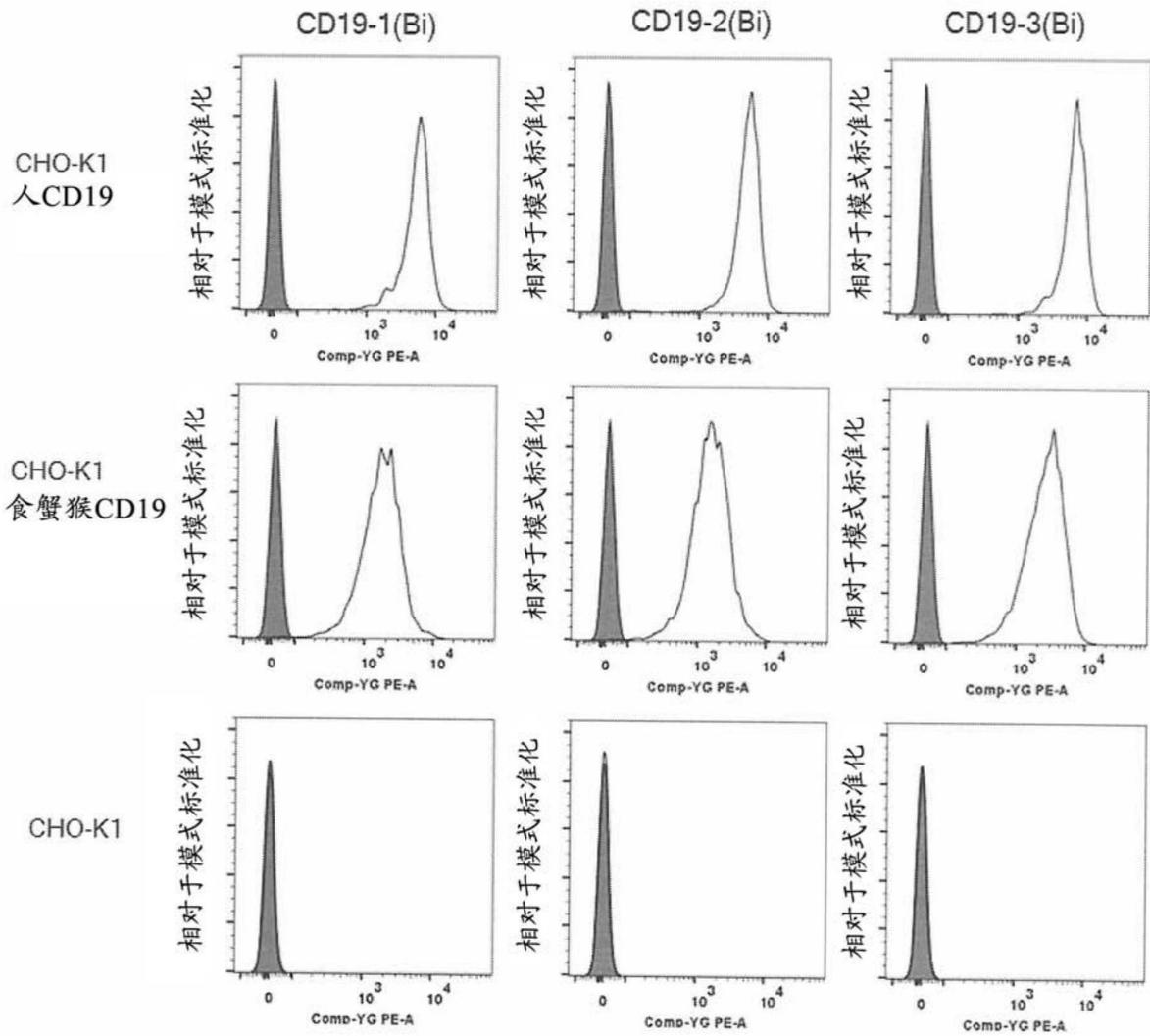


图12

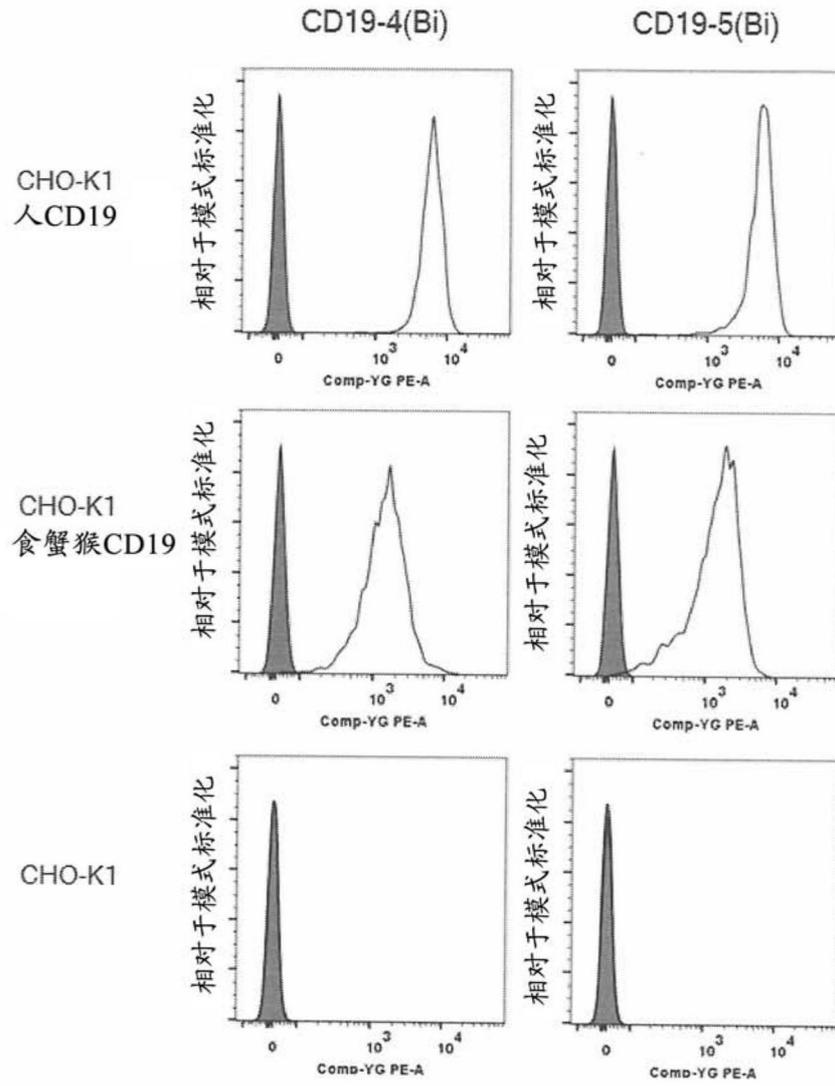


图13

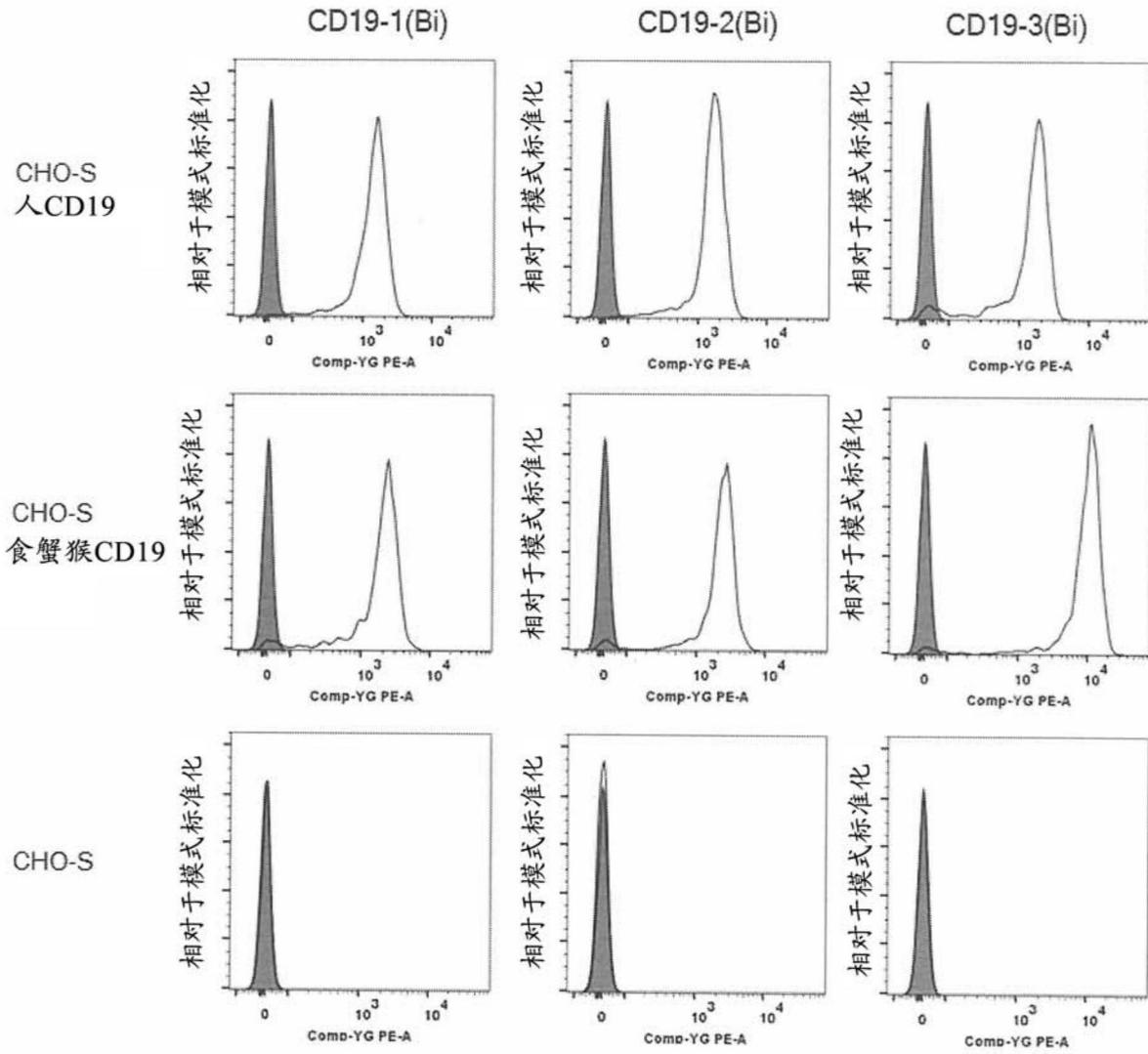


图14

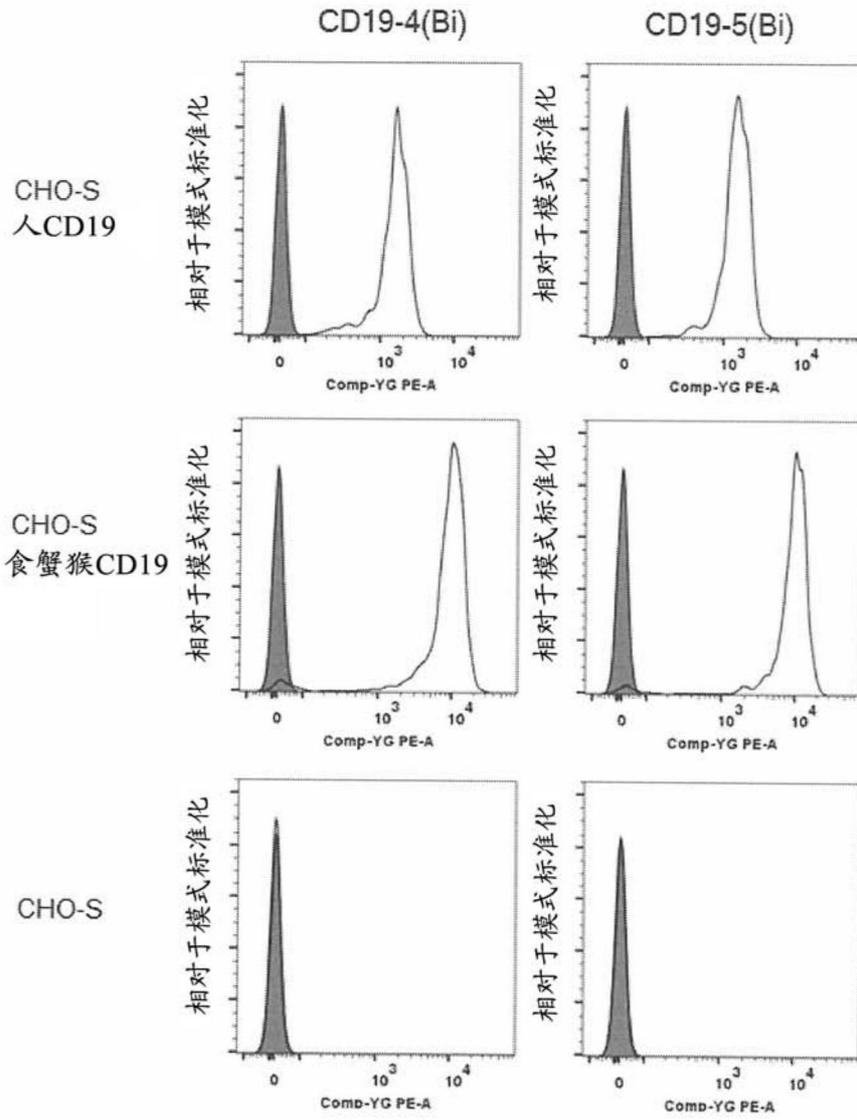


图15

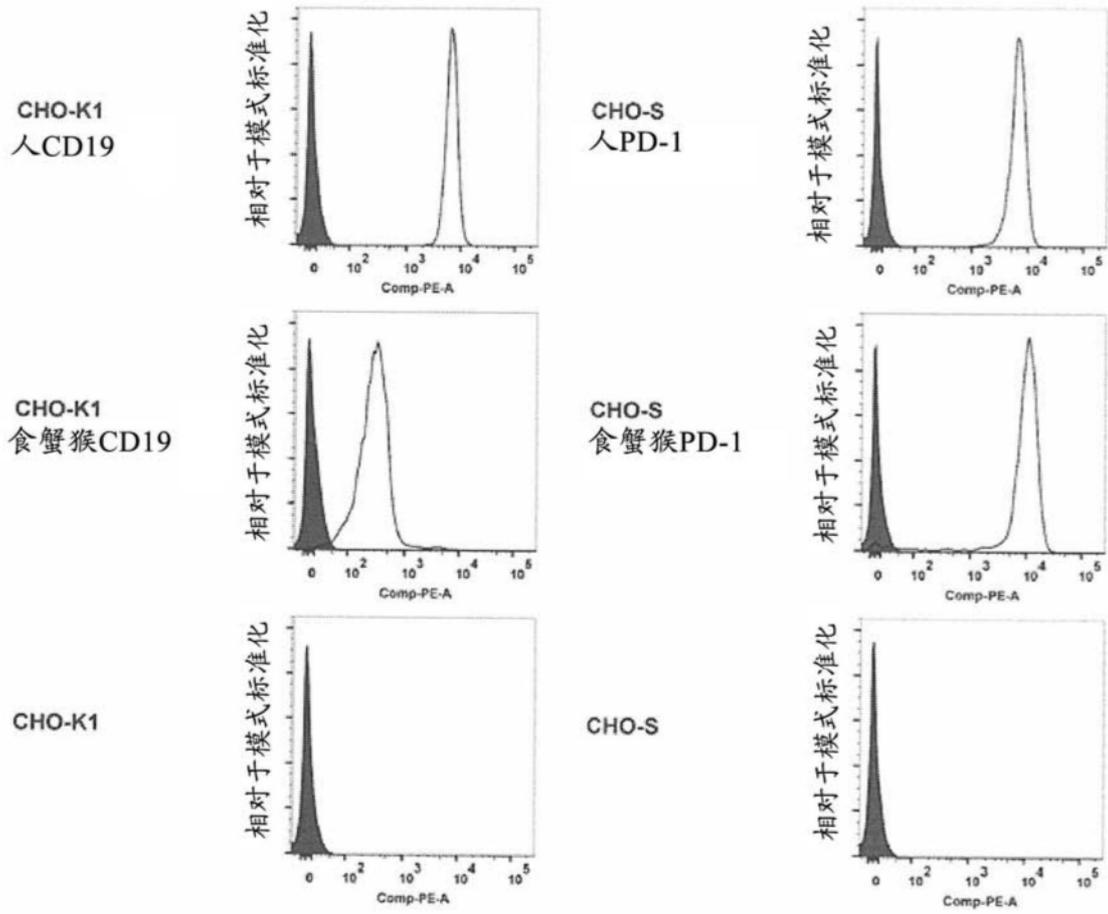


图16

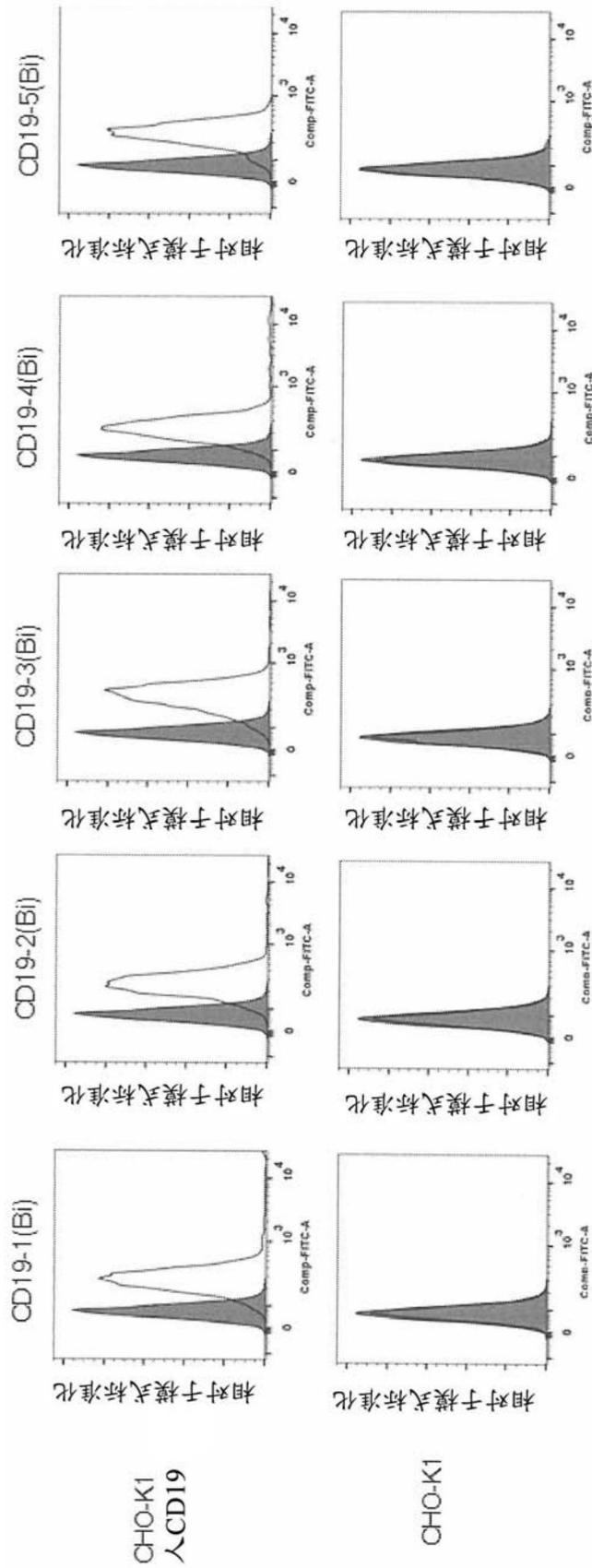


图17

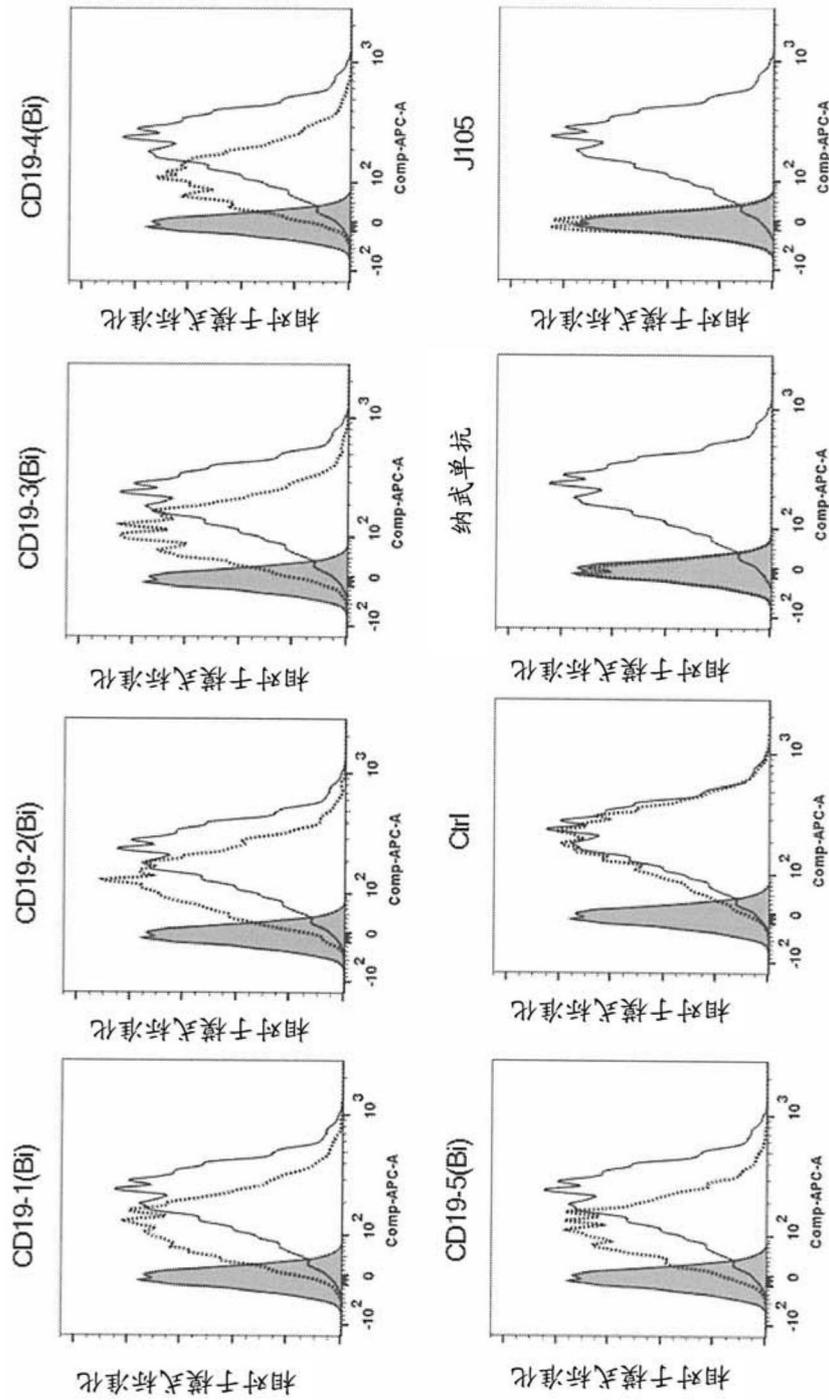


图18

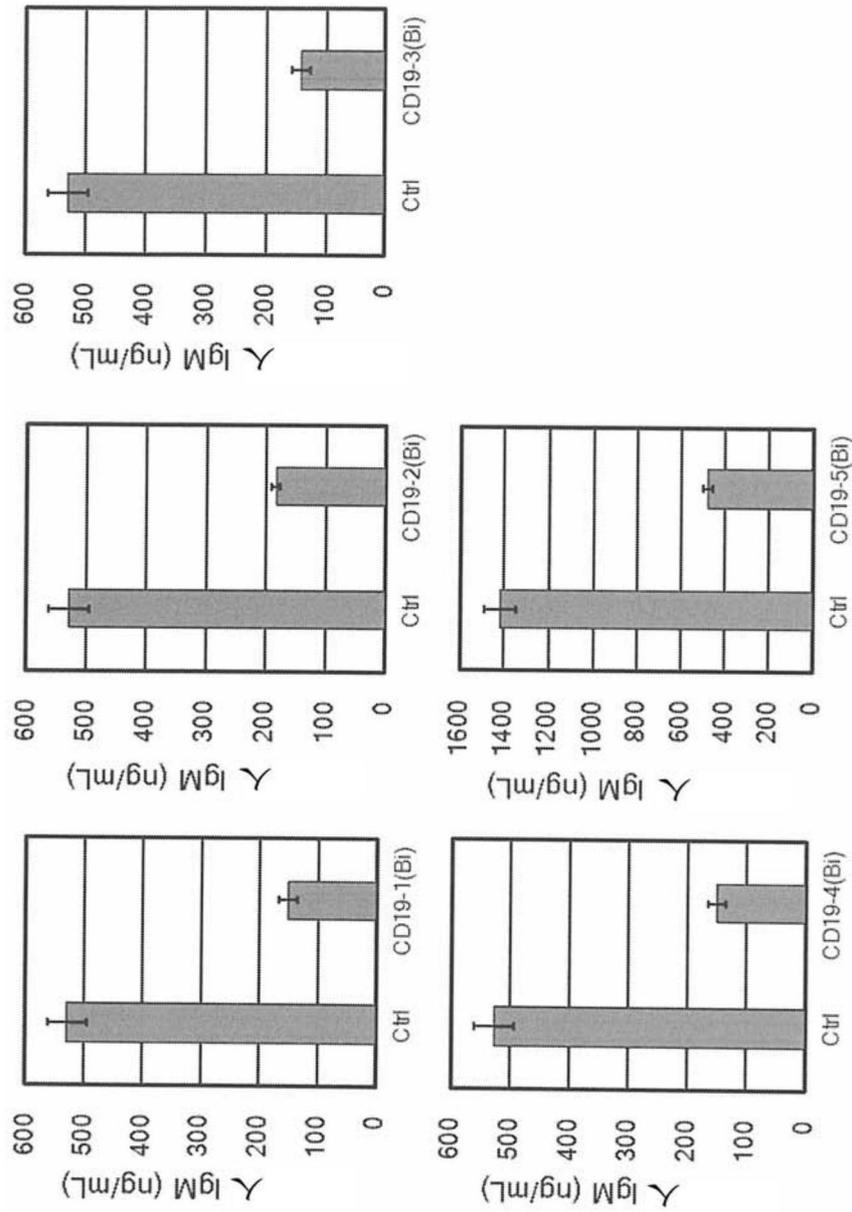


图19

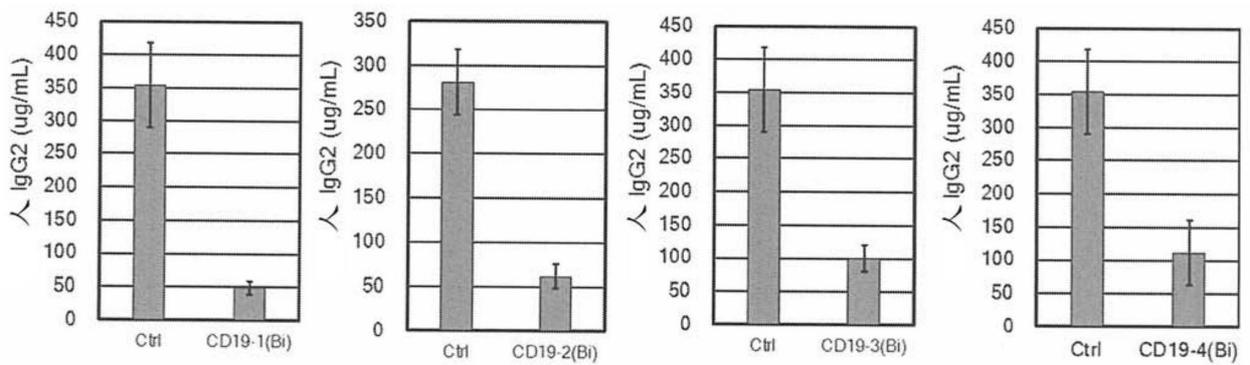


图20

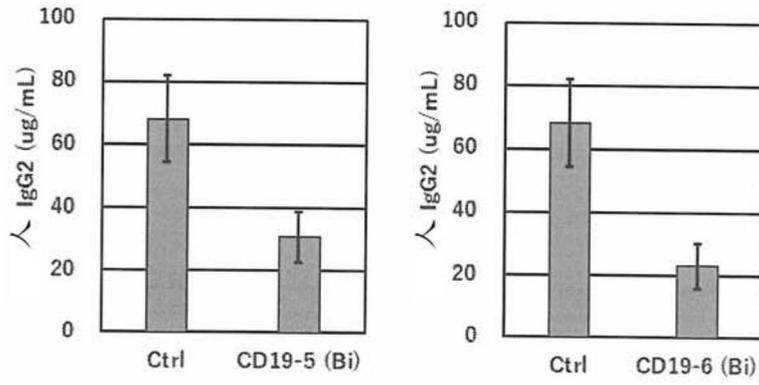


图21

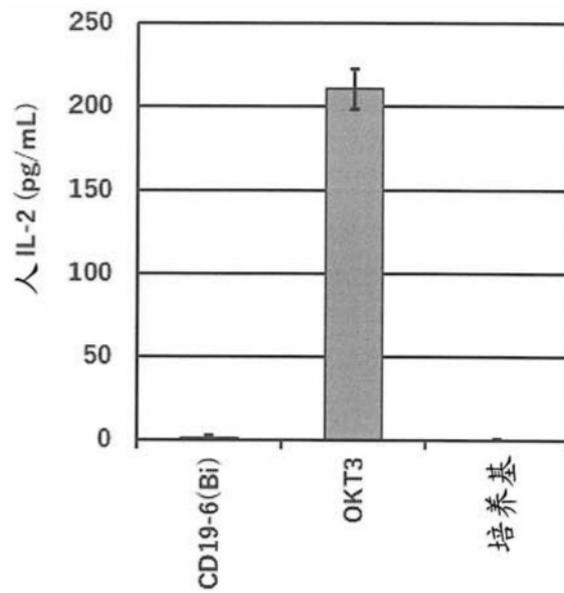


图22