



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118414353 A

(43) 申请公布日 2024. 07. 30

(21) 申请号 202280081095.7

(22) 申请日 2022.10.06

(30) 优先权数据

21201712.3 2021.10.08 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.06.06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/077817 2022.10.06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/057571 EN 2023.04.13

(71) 申请人 根马布股份公司

地址 丹麦瓦尔比

(72) 发明人 D·萨蒂恩 P·恩格伯特斯

K·肯珀 E·C·W·布雷杰

S·奥斯坦迪 F·阿莱姆德希

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 段菊兰 彭昶

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

权利要求书6页 说明书61页

序列表(电子公布) 附图40页

(54) 发明名称

与CD30和CD3结合的抗体

(57) 摘要

本发明涉及与CD3和CD30结合的多特异性抗体。本发明进一步提供了包含本发明的抗体的药物组合物、编码该抗体的核酸、产生该抗体的宿主细胞、产生该抗体的方法和该抗体的用途,特别是用于癌症疗法的用途。

1. 一种多特异性抗体,其包含:

(i) CD30结合区,其包含第一重链可变区和第一轻链可变区,所述第一重链可变区包含分别示于SEQ ID NO:1、2和3中的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述第一轻链可变区包含分别示于SEQ ID NO:4、5和6中的CDR1、CDR2和CDR3序列,和

(ii) CD3结合区,其包含第二重链可变区和第二轻链可变区,所述第二重链可变区包含分别示于SEQ ID NO:7、8和9中的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述第二轻链可变区包含分别示于SEQ ID NO:10、11和12中的CDR1、CDR2和CDR3序列。

2. 根据权利要求1所述的多特异性抗体,其中所述第一重链可变区和/或所述第一轻链可变区是人源的。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的多特异性抗体,其中所述第二重链可变区和/或所述第二轻链可变区是人源化的。

4. 根据前述权利要求任一项所述的多特异性抗体,其中SEQ ID NO:9中的X是H。

5. 根据权利要求1至3任一项所述的多特异性抗体,其中SEQ ID NO:9中的X是G。

6. 根据前述权利要求任一项所述的多特异性抗体,其中所述第一重链可变区包含示于SEQ ID NO:13中的序列,并且所述第一轻链可变区包含示于SEQ ID NO:14中的序列。

7. 根据前述权利要求任一项所述的多特异性抗体,其中所述第二重链可变区包含示于SEQ ID NO:15中的序列,并且所述第二轻链可变区包含示于SEQ ID NO:16中的序列。

8. 根据前述权利要求任一项所述的多特异性抗体,其中所述多特异性抗体是双特异性抗体。

9. 根据前述权利要求任一项所述的多特异性抗体,其中所述多特异性抗体包含由第一和第二Fc多肽组成的Fc区。

10. 根据权利要求9所述的多特异性抗体,其中所述Fc区是IgG1 Fc区,优选人IgG1 Fc区。

11. 根据权利要求9或10所述的多特异性抗体,其中所述多特异性抗体是全长抗体。

12. 根据权利要求9至11任一项所述的多特异性抗体,其包含惰性Fc区。

13. 根据权利要求9至12任一项所述的多特异性抗体,其中所述第一和/或第二Fc多肽包含对应于人IgG1重链中位置L234和/或L235处的氨基酸的氨基酸的取代,其中所述取代优选为分别取代为F和E,其中所述氨基酸位置如通过Eu编号所定义。

14. 根据权利要求12或13所述的多特异性抗体,其中所述第一和第二Fc多肽包含对应于位置L234和L235处的氨基酸的氨基酸分别取代为F和E的取代,并且其中所述第一和/或第二Fc多肽进一步包含对应于人IgG1重链中位置G236处的氨基酸的氨基酸的取代,其中所述取代优选为取代为R,其中所述氨基酸位置如通过Eu编号所定义。

15. 根据权利要求14所述的多特异性抗体,其中所述第一和第二Fc多肽包含对应于位置L234和L235处的氨基酸的氨基酸分别取代为F和E的取代,并且其中所述第一和第二Fc多肽进一步包含对应于人IgG1重链中位置G236处的氨基酸的氨基酸的取代,其中所述取代优选为取代为R。

16. 根据权利要求12或13所述的多特异性抗体,其中所述第一和第二Fc多肽包含对应于位置L234和L235处的氨基酸的氨基酸分别取代为F和E的取代,并且其中所述第一和/或第二Fc多肽进一步包含对应于人IgG1重链中位置D265处的氨基酸的氨基酸的取代,其中所

述取代优选为取代为A,其中所述氨基酸位置如通过Eu编号所定义。

17.根据权利要求16所述的多特异性抗体,其中所述第一和第二Fc多肽包含对应于位置L234和L235处的氨基酸的氨基酸分别取代为F和E的取代,并且其中所述第一和第二Fc多肽进一步包含对应于人IgG1重链中位置D265处的氨基酸的氨基酸的取代,其中所述取代优选为取代为A。

18.根据权利要求12至14任一项所述的多特异性抗体,其中所述第一和第二Fc多肽之一包含对应于位置L234、L235和G236处的氨基酸的氨基酸分别取代为F、E和R的取代,并且另一Fc多肽包含对应于位置L234、L235E和D265处的氨基酸的氨基酸分别取代为F、E和A的取代,其中所述氨基酸位置如通过Eu编号所定义。

19.根据权利要求18所述的多特异性抗体,其中所述第一Fc多肽和所述第一重链可变区包含在同一多肽链内,并且其中所述第二Fc多肽和所述第二重链可变区包含在同一多肽链内。

20.根据权利要求19所述的多特异性抗体,其中所述第一Fc多肽包含对应于位置L234、L235和G236处的氨基酸的氨基酸分别取代为F、E和R的取代,并且所述第二Fc多肽包含对应于位置L234、L235E和D265处的氨基酸的氨基酸分别取代为F、E和A的取代,其中所述氨基酸位置如通过Eu编号所定义。

21.根据权利要求9至20任一项所述的多特异性抗体,其中在所述第一Fc多肽中,对应于人IgG1重链中选自以下的位置的位置处的氨基酸中的至少一个已被取代:T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409,并且在所述第二Fc多肽中,对应于人IgG1重链中选自以下的位置的位置处的氨基酸中的至少一个已被取代:T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409,并且其中所述第一和第二Fc多肽中的所述取代不在相同位置,其中所述氨基酸位置如通过Eu编号所定义。

22.根据权利要求21所述的多特异性抗体,其中在所述第一Fc多肽中对应于F405的位置处的氨基酸是L,并且其中在所述第二Fc多肽中对应于K409的位置处的氨基酸是R,或反之亦然。

23.根据权利要求22所述的多特异性抗体,其中在所述第一Fc多肽中对应于K409的位置处的氨基酸是R,并且其中在所述第二Fc多肽中对应于F405的位置处的氨基酸是L。

24.根据前述权利要求任一项所述的多特异性抗体,其包含:

(i)CD30结合区,其包含第一重链可变区和第一轻链可变区,所述第一重链可变区包含分别示于SEQ ID NO:1、2和3中的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述第一轻链可变区包含分别示于SEQ ID NO:4、5和6中的CDR1、CDR2和CDR3序列,和

(ii)CD3结合区,其包含第二重链可变区和第二轻链可变区,所述第二重链可变区包含分别示于SEQ ID NO:7、8和9中的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述第二轻链可变区包含分别示于SEQ ID NO:10、11和12中的CDR1、CDR2和CDR3序列;

其中所述多特异性抗体是双特异性抗体,并且包含由第一和第二Fc多肽组成的Fc区;

其中所述第一Fc多肽和所述第一重链可变区包含在同一多肽链内,并且其中所述第二Fc多肽和所述第二重链可变区包含在同一多肽链内;

其中所述第一Fc多肽包含对应于位置L234、L235和G236处的氨基酸的氨基酸分别取代为F、E和R的取代,并且所述第二Fc多肽包含对应于位置L234、L235和D265处的氨基酸的氨

基酸分别取代为F、E和A的取代,其中所述氨基酸位置如通过Eu编号所定义;以及

其中在所述第一Fc多肽中对应于K409的位置处的氨基酸是R,并且其中在所述第二Fc多肽中对应于F405的位置处的氨基酸是L。

25.根据前述权利要求任一项所述的多特异性抗体,其包含示于SEQ ID NO:17和19中的重链序列和示于SEQ ID NO:18和20中的轻链序列或由其组成。

26.根据前述权利要求任一项所述的多特异性抗体,其包含示于SEQ ID NO:17和19中的重链序列和示于SEQ ID NO:18和20中的轻链序列或由其组成,其中所述多特异性抗体是双特异性抗体。

27.根据权利要求1至8任一项所述的多特异性抗体,其中

(i) 所述CD30结合区和/或所述CD3结合区是Fab,

(ii) 所述CD30结合区和/或所述CD3结合区是scFv,

(iii) 所述CD30结合区是Fab且所述CD3结合区是scFv,或

(iv) 所述CD30结合区是scFv且所述CD3结合区是Fab。

28.一种核酸构建体或核酸构建体的组合,其编码根据前述权利要求任一项所述的多特异性抗体。

29.一种表达载体或表达载体的组合,其包含根据权利要求28所述的核酸构建体。

30.一种包含根据权利要求28所述的核酸构建体的递送媒介物。

31.根据权利要求30所述的递送媒介物,其中所述递送媒介物是颗粒。

32.根据权利要求31所述的递送媒介物,其中所述颗粒是脂质纳米颗粒。

33.根据权利要求32所述的递送媒介物,其中所述脂质纳米颗粒包含脂质、可电离的氨基脂质、PEG-脂质、胆固醇或其任意组合。

34.一种能够产生根据权利要求1至27任一项所述的多特异性抗体的重组宿主细胞,其中所述宿主细胞包含一种或多种编码根据前述权利要求任一项所述的多特异性抗体的核酸构建体。

35.根据权利要求34所述的重组宿主细胞,其中所述重组宿主细胞是CHO细胞。

36.一种药物组合物,其包含根据权利要求1至27任一项所述的多特异性抗体和可药用载体。

37.用作药物的根据权利要求1至27任一项所述的多特异性抗体、根据权利要求28所述的核酸构建体、根据权利要求30至33任一项所述的递送媒介物或根据权利要求36所述的药物组合物。

38.用于治疗癌症的根据权利要求1至27任一项所述的多特异性抗体、根据权利要求28所述的核酸构建体、根据权利要求30至33任一项所述的递送媒介物或根据权利要求36所述的药物组合物。

39.用于治疗霍奇金淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤(NHL)的根据权利要求1至27任一项所述的多特异性抗体、根据权利要求28所述的核酸构建体、根据权利要求30至33任一项所述的递送媒介物或根据权利要求36所述的药物组合物。

40.用于根据权利要求39所述使用的多特异性抗体、核酸构建体、递送媒介物或药物组合物,其中非霍奇金淋巴瘤是T细胞非霍奇金淋巴瘤(T-NHL)。

41.用于根据权利要求40所述使用的多特异性抗体、核酸构建体、递送媒介物或药物组

合物,其中T-NHL是皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)或外周T细胞淋巴瘤(PTCL)。

42. 用于根据权利要求39至41任一项所述使用的多特异性抗体、核酸构建体、递送媒介物或药物组合物,其中T细胞非霍奇金淋巴瘤(T-NHL)是间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)。

43. 用于根据权利要求39所述使用的多特异性抗体、核酸构建体、递送媒介物或药物组合物,其中非霍奇金淋巴瘤是B细胞非霍奇金淋巴瘤(B-NHL)。

44. 用于根据权利要求37至43任一项所述使用的多特异性抗体、核酸构建体、递送媒介物或药物组合物,其中所述多特异性抗体、核酸构建体、递送媒介物或药物组合物静脉内和/或皮下施用,优选皮下施用。

45. 一种用于产生根据权利要求1至27任一项所述的多特异性抗体的方法,其包括:

(i) 在产生所述抗体的条件下培养权利要求34或35所述的重组宿主细胞,和

(ii) 从培养物中分离产生的多特异性抗体。

46. 一种用于产生根据权利要求9至26任一项所述的多特异性抗体的方法,其包括:

a) 提供包含如权利要求1(i)中描述的CD30结合区的第一抗体,和包含如权利要求1(ii)中描述的CD3结合区的第二抗体,其中所述抗体任选含有权利要求2至26中描述的其他特征,其中所述第一和第二抗体包含Fc区,并且

其中所述第一和第二抗体的第一和第二CH3区的序列不同,并且使得所述第一和第二CH3区之间的异二聚相互作用强于所述第一和第二CH3区的同二聚相互作用的每一个;

b) 在足以允许铰链区中的半胱氨酸经历二硫键异构化的还原条件下将所述第一抗体与所述第二抗体一起温育;和

c) 获得所述多特异性抗体,其包含所述第一抗体的第一免疫球蛋白重链和第一免疫球蛋白轻链以及所述第二抗体的第二免疫球蛋白重链和第二免疫球蛋白轻链。

47. 一种成套试剂盒,比如用作伴随诊断剂/用于在患者群体内鉴定对用如权利要求1至27任一项所限定的抗体的治疗具有反应倾向的那些患者的试剂盒,其包含如权利要求1至27任一项所限定的抗体;和用于使用所述试剂盒的说明书。

48. 一种诊断组合物,其包含根据权利要求1至27任一项所述的多特异性抗体。

49. 一种抗体,其包含:

(i) CD30结合区,其包含第一重链可变区和第一轻链可变区,所述第一重链可变区包含分别示于SEQ ID NO:1、2和3中的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述第一轻链可变区包含分别示于SEQ ID NO:4、5和6中的CDR1、CDR2和CDR3序列,和

(ii) 由第一和第二Fc多肽组成的Fc区,其中所述第一和第二Fc多肽包含对应于位置L234和L235处的氨基酸的氨基酸分别取代为F和E的取代,并且其中所述第一和第二Fc多肽进一步包含对应于人IgG1重链中位置G236处的氨基酸的氨基酸的取代,其中所述取代优选为取代为R,其中所述氨基酸位置如通过Eu编号所定义。

50. 根据权利要求49所述的抗体,其中所述第一重链可变区包含示于SEQ ID NO:13中的序列和所述第一轻链可变区包含示于SEQ ID NO:14中的序列。

51. 根据权利要求49至50任一项所述的抗体,其中所述抗体包含示于SEQ ID NO:17中的重链序列和示于SEQ ID NO:18中的轻链序列或由其组成。

52. 一种抗体,其包含:

(i) CD3结合区,其包含第二重链可变区和第二轻链可变区,所述第二重链可变区包含

分别示于SEQ ID NO:7、8和9中的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述第二轻链可变区包含分别示于SEQ ID NO:10、11和12中的CDR1、CDR2和CDR3序列;和

(ii) 由第一和第二Fc多肽组成的Fc区,其中所述第一和第二Fc多肽包含对应于位置L234和L235处的氨基酸的氨基酸分别取代为F和E的取代,并且其中所述第一和第二Fc多肽进一步包含对应于人IgG1重链中位置G236处的氨基酸的氨基酸的取代,其中所述取代优选为取代为R,其中所述氨基酸位置如通过Eu编号所定义。

53. 根据权利要求52所述的抗体,其中SEQ ID NO:9中的X是H。

54. 根据权利要求52所述的抗体,其中SEQ ID NO:9中的X是G。

55. 根据权利要求52至54任一项所述的抗体,其中所述第二重链可变区包含示于SEQ ID NO:15中的序列和所述第二轻链可变区包含示于SEQ ID NO:16中的序列。

56. 根据权利要求49至55任一项所述的抗体,其中所述抗体是全长抗体。

57. 根据权利要求49至56任一项所述的抗体,其中对应于人IgG1重链中选自以下的位置的位置处的氨基酸中的至少一个已被取代:T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409,其中优选地,对应于F405的位置处的氨基酸是L,或对应于K409的位置处的氨基酸是R。

58. 一种用于产生多特异性抗体的方法,其包括:

a) 提供如权利要求49至51或55至57任一项所述的第一抗体和第二抗体,所述第二抗体包含:

(i) CD3结合区,其包含第二重链可变区和第二轻链可变区,所述第二重链可变区包含分别示于SEQ ID NO:7、8和9中的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述第二轻链可变区包含分别示于SEQ ID NO:10、11和12中的CDR1、CDR2和CDR3序列,和

(ii) 由第一和第二Fc多肽组成的Fc区,其中所述第一和第二Fc多肽包含对应于位置L234和L235处的氨基酸的氨基酸分别取代为F和E的取代,和对应于人IgG1重链中位置D265处的氨基酸的氨基酸取代为A的取代,

或

提供如权利要求52至57任一项所述的第二抗体和第一抗体,所述第一抗体包含:

(i) CD30结合区,其包含第二重链可变区和第二轻链可变区,所述第二重链可变区包含分别示于SEQ ID NO:1、2和3中的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述第二轻链可变区包含分别示于SEQ ID NO:4、5和6中的CDR1、CDR2和CDR3序列,和

(ii) 由第一和第二Fc多肽组成的Fc区,其中所述第一和第二Fc多肽包含对应于位置L234和L235处的氨基酸的氨基酸分别取代为F和E的取代,和对应于人IgG1重链中位置D265处的氨基酸的氨基酸取代为A的取代,

其中所述第一和第二抗体的第一和第二CH3区的序列不同,并且使得所述第一和第二CH3区之间的异二聚相互作用强于所述第一和第二CH3区的同二聚相互作用的每一个;其中优选地,在所述第一CH3区中对应于F405的位置处的氨基酸是L,且在所述第二CH3区中对应于K409的位置处的氨基酸是R,或反之亦然,

b) 在足以允许铰链区中的半胱氨酸经历二硫键异构化的还原条件下将所述第一抗体与所述第二抗体一起温育;和

c) 获得所述多特异性抗体,其包含所述第一抗体的第一免疫球蛋白重链和第一免疫球蛋白轻链以及所述第二抗体的第二免疫球蛋白重链和第二免疫球蛋白轻链。

59. 根据权利要求58所述的用于产生多特异性抗体的方法,其包括:

a) 提供如权利要求49至51或55至57任一项中描述的第一抗体和第二抗体,所述第二抗体包含

(i) CD3结合区,其包含第二重链可变区和第二轻链可变区,所述第二重链可变区包含分别示于SEQ ID NO:7、8和9中的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述第二轻链可变区包含分别示于SEQ ID NO:10、11和12中的CDR1、CDR2和CDR3序列,和

(ii) 由第一和第二Fc多肽组成的Fc区,其中所述第一和第二Fc多肽包含对应于位置L234和L235处的氨基酸的氨基酸分别取代为F和E的取代,和对应于人IgG1重链中位置D265处的氨基酸的氨基酸取代为A的取代,

其中所述第一和第二抗体的第一和第二CH3区的序列不同,并且使得所述第一和第二CH3区之间的异二聚相互作用强于所述第一和第二CH3区的同二聚相互作用的每一个;其中优选地,在所述第一CH3区中对应于K409的位置处的氨基酸是R,且在所述第二CH3区中对应于F405的位置处的氨基酸是L,

b) 在足以允许铰链区中的半胱氨酸经历二硫键异构化的还原条件下将所述第一抗体与所述第二抗体一起温育;和

c) 获得所述多特异性抗体,其包含所述第一抗体的第一免疫球蛋白重链和第一免疫球蛋白轻链以及所述第二抗体的第二免疫球蛋白重链和第二免疫球蛋白轻链。

60. 通过如权利要求58至59任一项所述的方法获得的多特异性抗体。

与CD30和CD3结合的抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及与CD30和CD3结合的多特异性抗体。本发明进一步提供了包含该抗体的药物组合物、编码该抗体的核酸、产生该抗体的宿主细胞、产生该抗体的方法和该抗体的用途,特别是用于癌症疗法的用途。

背景技术

[0002] CD30也称为Ki-1或TNFRSF8,其是一种120kD跨膜糖蛋白受体,并且是肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族的成员(Smith等人(1994)Cell 76:959-962)。CD30是在其胞外结构域中具有六个富含半胱氨酸的重复的单程I型膜蛋白(Durkop等人(1992)Cell 68:421-427)。此外,已经在患有炎症性疾病,包括溃疡性结肠炎(UC)(Giacomelli等人,Clin Exp Immunol.1998;111:532-5)和CD30-阳性血液系统恶性肿瘤(Josimovic-Alasevic等人(1989)Eur J Immunol)的患者的血清中检测到可溶形式的CD30(sCD30)。sCD30代表细胞膜锚定的金属蛋白酶,比如TACE/ADAM17和ADAM10对CD30的胞外部分的切割产物(Nagata等人,PNAS2005;Hansen等人,FASEB,2004)。

[0003] 在正常组织中,CD30表达主要限于激活的T和B淋巴细胞的亚群(Bowen等人(1996)J Immunol.156:442-9;Shanebeck等人(1995)Eur J Immunol.25:2147-53)。已经在各种淋巴瘤样肿瘤中检测到CD30表达。经典型霍奇金淋巴瘤(cHL)和间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)显示出高CD30表达水平。特别地,通常在cHL中发现的绝大多数里德-斯德伯格氏(RS)细胞对CD30呈阳性(Frizzera等人(1992)Semin.Diagn.Pathol.9:291-296)。

[0004] 例如,靶向CD30的抗体-药物缀合物维布妥昔单抗(brentuximab vedotin)(BV;SGN-35)已经用于或被建议用于治疗癌症,比如cHL、ALCL和CTCL(Younes等人,J Clin Oncol.2012年6月20日;30(18):2183-9;Pro等人,Blood.2017年12月21日;130(25):2709-2717;Shea等人,Curr Hematol Malig Rep.2020年2月;15(1):9-19)。正在开发四价双特异性CD30×CD16A抗体AFM13作为用于cHL和CD30-阳性淋巴瘤的NK细胞介导的免疫疗法(Rothe等人,Blood.2015年6月25日;125(26):4024-31)。

[0005] 此外,正在开发用于cHL和CD30-阳性淋巴瘤的靶向CD30的CAR T细胞疗法。其他CD30抗体已描述在W02003059282(Medarex)、US8257706(Seattle genetics)、US20100239571(Seattle genetics)、W02007040653(US government&Health)和W020160177846(Affimed)中。

[0006] Pohl等人(1993Int.J.Cancer,54:820-827)描述了通过将产生CD30单克隆抗体HRS-3的杂交瘤细胞与产生CD3单克隆抗体OKT-3的杂交瘤细胞融合而产生的CD3×CD30双特异性抗体OKT-3/HRS-3(杂交杂交瘤技术)。

[0007] W02008119567描述了CD30和CD3跨物种特异性双特异性单链分子的产生与表征。

[0008] US20200095330描述了由两种抗CD30克隆(命名为8D10和10C2)与抗CD3(Orthoclone OKT-3)的化学异源缀合产生的CD3×CD30双特异性抗体。

[0009] 然而,这些CD3×CD30双特异性抗体均未在临床环境中进行过测试。

[0010] 因此,需要改善的靶向CD30的癌症疗法。需要有效、安全、具有良好的可制造性和/或具有长的保质期的靶向CD30的化合物。

发明内容

[0011] 本发明涉及结合人和食蟹猴CD30和CD3的T细胞接合抗体。本发明人发现,一些CD30结合抗体以二价(单克隆)形式与表达CD30的细胞结合良好,但在具有单价CD30结合的双特异性形式中表现出强烈降低的结合和细胞毒性。鉴定了具有强单价CD30结合以及优异的肿瘤细胞杀伤的双特异性抗体。此外,鉴定了具有功能上无活性的Fc主链的双特异性抗体,其由于优异的稳定性和溶解性而适于开发成药物产品。

[0012] 在一方面,本发明涉及一种多特异性抗体,其包含:

(i)CD30结合区,其包含第一重链可变区和第一轻链可变区,所述第一重链可变区包含分别示于SEQ ID NO:1、2和3中的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述第一轻链可变区包含分别示于SEQ ID NO:4、5和6中的CDR1、CDR2和CDR3序列,和

(ii)CD3结合区,其包含第二重链可变区和第二轻链可变区,所述第二重链可变区包含分别示于SEQ ID NO:7、8和9中的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述第二轻链可变区包含分别示于SEQ ID NO:10、11和12中的CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0013] 在另一方面,本发明涉及编码根据本发明的多特异性抗体的核酸构建体或核酸构建体的组合。

[0014] 在另一些方面,本发明涉及包含根据本发明的核酸构建体的表达载体或递送媒介物。

[0015] 在另一方面,本发明涉及能够产生根据本发明的多特异性抗体的重组宿主细胞,其中宿主细胞包含编码根据本发明的多特异性抗体的一种或多种核酸构建体。

[0016] 在另一方面,本发明涉及药物组合物,其包含根据本发明的多特异性抗体和可药用载体。

[0017] 在另一些方面,本发明涉及用作药物,例如在癌症的治疗中用作药物的根据本发明的多特异性抗体、核酸构建体、递送媒介物或药物组合物。

[0018] 在又一些方面,本发明涉及产生根据本发明的多特异性抗体的方法。

附图说明

[0019] 图1:双特异性CD3×CD30抗体及其单特异性、二价CD3和CD30对应物与SU-DHL-1或HDML-2细胞的结合。(A) bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL×b12-FEAR、bsG1-b12-FEAL×CD30-MDX060-FEAR和IgG1-CD30-MDX060-FEAR,(B) bsG1-huCD3-FEAL×CD30-hAC10-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL×b12-FEAR和IgG1-CD30-hAC10-FEAR,(C) bsG1-huCD3-FEAL×CD30-HRS-3-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL×b12-FEAR和IgG1-CD30-HRS-3-FEAR,(D) BsIgG1-huCD3-FEAL×CD30-HeFi-I-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL×b12-FEAR和IgG1-CD30-HeFi-I-FEAR,(E) bsIgG1-huCD3-FEAL×CD30-T405-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL×b12-FEAR和IgG1-CD30-T405-FEAR,(F) bsIgG1-huCD3-FEAL×CD30-T105-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL×b12-FEAR和IgG1-CD30-T105-FEAR,(G) bsIgG1-huCD3-FEAL×CD30-T408-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL×b12-FEAR和IgG1-CD30-T408-FEAR,以及(H) bsIgG1-huCD3-FEAL×

CD30-T215-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL $\times$ b12-FEAR和IgG1-CD30-HRS-3-FEAR与SU-DHL-1细胞(左图)或HDLM-2细胞(右图)的剂量依赖性结合。(I) CD3 $\times$ CD30双特异性抗体和CD30单特异性抗体在1.11 μ g/mL的浓度下与SU-DHL-1细胞(左图)或HDLM-2细胞(右图)的结合。用于CD30臂的抗体克隆在x轴上表示。显示的数据是一个代表性实验的如通过流式细胞术测定的平均荧光强度(MFI)值。

[0020] 图2:bsG1-huCD3 $\times$ CD30-MDX060与HL和ALCL细胞系的结合.通过流式细胞术来评估bsG1-huCD3 $\times$ CD30-MDX060与(A)HDLM-2(HL)、(B)L-428(HL)、(C)DEL(ALCL)或(D)KI-JK(ALCL)细胞的结合。包括作为对照的双特异性抗体bsG1-huCD3 $\times$ b12和bsG1-b12 $\times$ CD30-MDX060和单特异性抗体IgG1-CD30-MDX060、IgG1-huCD3和IgG1-12。如所示那样,所有抗体在其Fc结构域中含有FEAL和/或FERR Fc沉默和DuoBody®技术突变。显示的数据是一个代表性实验的如通过流式细胞术测定的平均荧光强度(MFI)值。

[0021] 图3:在SU-DHL-1或HDLM-2细胞中通过CD3 $\times$ CD30双特异性抗体体外诱导细胞毒性.使用CD30-阳性肿瘤细胞系SU-DHL-1细胞(左图)或HDLM-2细胞(右图)作为靶细胞和使用T细胞(CD3-阳性ADCC效应细胞IV型细胞;Clean Cells, Montaigne, France)作为效应细胞,在体外细胞毒性测定中测试CD3 $\times$ CD30双特异性抗体。测试了以下抗体:(A) bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FEAR、bsG1-b12-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FEAR和IgG1-CD30-MDX060-FEAR, (B) bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-hAC10-FEAR和IgG1-CD30-hAC10-FEAR, (C) bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-HRS-3-FEAR和IgG1-CD30-HRS-3-FEAR, (D) BsIgG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-HeFi-I-FEAR和IgG1-CD30-HeFi-I-FEAR, (E) bsIgG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-T405-FEAR和IgG1-CD30-T405-FEAR, (F) bsIgG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-T105-FEAR和IgG1-CD30-T105-FEAR, (G) bsIgG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-T408-FEAR和IgG1-CD30-T408-FEAR, 或(H) bsIgG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-T215-FEAR和IgG1-CD30-HRS-3-FEAR。在所有实验中包括作为对照的抗体bsG1-huCD3-FEAL $\times$ b12-FEAR。显示的数据是活细胞百分比;每个图的数据获自一个代表性实验。

[0022] 图4:在几种ALCL和HL细胞系中通过CD3 $\times$ CD30双特异性抗体体外诱导T细胞介导的细胞毒性和T细胞增殖。(A-C)使用不同的ALCL和HL细胞系作为靶细胞和使用纯化的T细胞(A,B)或ADCC效应细胞IV型细胞(C)作为效应细胞,在体外细胞毒性测定中测试CD3 $\times$ CD30双特异性抗体。CD3 $\times$ CD30双特异性抗体含有对CD3具有较低亲和力的huCD3-FEAL Fab臂或huCD3-H101G-FEAL变体,以及CD30-特异性MDX060-FEAR Fab臂。包括作为对照的IgG1-huCD3和IgG1-b12(A,B)或bsG1-b12-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FEAR和IgG1-CD30-MDX060-FEAR(C)。显示的数据是活细胞百分比;每个图的数据获自一个代表性实验。(D)在使用HDLM-2细胞(左图)或NCEB-1细胞(右图)作为靶细胞的细胞毒性测定中,评估作为绝对T细胞计数的量度的CFSE阳性细胞的数量。

[0023] 图5:CD3 $\times$ CD30双特异性抗体与转染到Expi293F细胞中的全长人CD30和食蟹猴CD30的结合。(A-C)单价和二价CD30抗体与野生型Expi293F细胞(A)或用全长人CD30(B)或食蟹猴CD30(C)瞬时转染的Expi293F细胞的结合。细胞与递增浓度的以下抗体一起温育:IgG1-CD30-MDX060-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FEAR、bsG1-huCD3-H101G-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FEAR、bsG1-b12-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FEAR和bsG1-huCD3-FEAL $\times$ b12-FEAR。数据表示为两个技术重复的如通过流式细胞术测定的平均荧光强度(MFI)值。(D)抗

体IgG1-CD30-MDX060-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FEAR和bsG1-huCD3-FEAL $\times$ b12-FEAR与人T细胞或食蟹猴T细胞的结合。数据表示为一个代表性实验的如通过流式细胞术测定的平均荧光强度(MFI)值。

[0024] 图6:CD3 $\times$ CD30双特异性抗体与转染到Expi293F细胞中的全长人CD30和恒河猴CD30的结合。通过流式细胞术评估单价和二价CD30抗体与用全长人CD30(左图)或恒河猴CD30(右图)瞬时转染的Expi293F细胞的结合。评估了以下抗体:(A) bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-hAC10-FEAR和IgG1-CD30-hAC10-FEAR, (C) bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-HRS-3-FEAR和IgG1-CD30-HRS-3-FEAR, (D) bsIgG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-HeFi-I-FEAR和IgG1-CD30-HeFi-I-FEAR, (E) bsIgG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-T405-FEAR和IgG1-CD30-T405-FEAR, (F) bsIgG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-T105-FEAR和IgG1-CD30-T105-FEAR, (G) bsIgG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-T408-FEAR和IgG1-CD30-T408-FEAR, 或(H) bsIgG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-T215-FEAR和IgG1-CD30-HRS-3-FEAR。在所有实验中包括作为阴性对照的抗体bsG1-huCD3-FEAL $\times$ b12-FEAR。显示的数据是一个代表性实验的如通过流式细胞术测定的平均荧光强度(MFI)值。

[0025] 图7:如通过差示扫描荧光法(DSF)测定的具有不同的非激活突变的抗体的热稳定性。通过DSF一式两份评估在递增的温度下的构象蛋白稳定性。显示了以下抗体的解链曲线:(A) pH 7.4下的IgG1-CD30-MDX060-FEAR, (B) pH 7.4下的IgG1-CD30-MDX060-FERR, (C) pH 7.4下的IgG1-huCD3-FEAL, 和(D) pH 7.4下的BsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR。

[0026] 图8:bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR与HL细胞系的结合。

通过流式细胞术评估bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR与HL细胞系L-540(A)、KM-H2(B)和L-1236(C)的结合。包括作为对照的双特异性抗体bsG1-huCD3-FEAL $\times$ b12-FERR和bsG1-b12-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR以及单特异性抗体IgG1-CD30-MDX060-FERR、IgG1-huCD3-FEAL和IgG1-12-FEAL。显示的数据是一个代表性实验的如通过流式细胞术测定的平均荧光强度(MFI)值。

[0027] 图9:bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR与ALCL细胞系的结合。

通过流式细胞术评估bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR与ALCL细胞系SUP-M2(A)、DL-40(B)、KARPAS-299(C)、L-82(D)和SR-786(E)的结合。包括作为对照的双特异性抗体bsG1-huCD3-FEAL $\times$ b12-FERR和bsG1-b12-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR以及单特异性抗体IgG1-CD30-MDX060-FERR、IgG1-huCD3-FEAL和IgG1-12-FEAL。显示的数据是一个代表性实验的如通过流式细胞术测定的平均荧光强度(MFI)值。

[0028] 图10:bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR与NHL细胞系的结合。

通过流式细胞术评估bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR与(A) SUP-T1(TLL)、(B) JVM-2(MCL)、(C) HH(CTCL)和(D) NCEB-1(MCL)细胞系的结合。包括作为对照的双特异性抗体bsG1-huCD3-FEAL $\times$ b12-FERR和bsG1-b12-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR以及单特异性抗体IgG1-CD30-MDX060-FERR、IgG1-huCD3-FEAL和IgG1-12-FEAL。显示的数据是一个代表性实验的如通过流式细胞术测定的平均荧光强度(MFI)值。

[0029] 图11:bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR与转染到HEK293细胞中的全长人CD30和恒河猴CD30的结合。通过流式细胞术评估bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR与用全长人CD30(A)或恒河猴CD30(B)瞬时转染的HEK293细胞的结合。包括作为阴性对照的bsG1-huCD3-FEAL $\times$ b12-FERR。显示的数据是一个代表性实验的如通过流式细胞术测定的

平均荧光强度(MFI)值。

[0030] 图12:bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR与T细胞和肿瘤细胞的同时结合.通过流式细胞术研究bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR与荧光标记的肿瘤细胞和未致敏T细胞的同时结合。(A)在 6×10^{-5} 至 $10\mu\text{g/mL}$ bsG1huCD3FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR或对照抗体bsG1-huCD3-FEAL $\times$ b12-FEAR、bsG1b12FEAL $\times$ CD30MDX060-FERR或IgG1-b12-FEAL的存在下,双阳性事件显示为总活细胞的百分比。在没有抗体的情况下温育的样品中双阳性事件的百分比用虚线表示。(B)与 $0.12\mu\text{g/mL}$ bsG1huCD3FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR一起温育的样品中双阳性细胞的门控策略的实例。

[0031] 图13:通过CD3 $\times$ CD30双特异性抗体体外诱导T细胞介导的细胞毒性和T细胞激活。

使用CD30-阳性肿瘤细胞系Karpas-299作为靶细胞和从健康人供体血沉棕黄层纯化的T细胞作为效应细胞在体外细胞毒性测定中测试了一组CD3 $\times$ CD30双特异性抗体。在这些测定中,在CD4⁺和CD8⁺细胞中评估了作为T细胞激活的量的CD25表达。测试了以下抗体:bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR、bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-hAC10-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-HRS-3-FEAR、BsIgG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-HeFi-I-FEAR、bsIgG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-T105-FEAR、bsIgG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-T405-FEAR、bsIgG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-T408-FEAR和bsIgG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-T215-FEAR。(A)CD3 $\times$ CD30抗体的Karpas-299细胞的细胞毒性的IC₅₀值。(B)测试抗体的Karpas-299细胞的最大细胞毒性的百分比。(C-F)CD3 $\times$ CD30抗体在CD4⁺(C,E)或CD8⁺(D,F)T细胞中诱导CD25(C-D)或PD-1(E-F)表达的EC₅₀值。数据获自用从6个不同供体获得的T细胞进行的两个独立实验。统计值表示所示克隆与bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR之间的Wilcoxon配对符号秩检验的结果。NS:不显著,*: $p<0.05$ 。

[0032] 图14:bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR引起的体外T细胞介导的对细胞系的细胞毒性.使用L-428(A)、KM-H2(B)、SUP-M2(C)或KI-JK(D)肿瘤细胞系作为靶细胞和纯化的T细胞作为效应细胞在体外测试bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR引起的剂量依赖性T细胞介导的细胞毒性。包括作为对照的IgG1-huCD3-FEAL、bsG1-huCD3-FEAL $\times$ b12-FERR、IgG1-CD30-MDX060-FERR、bsG1-b12-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR和IgG1-b12-FEAL。显示的数据是活细胞百分比,每个图的数据是对一个代表性实验获得的。

[0033] 图15:L-428和KI-JK细胞系中bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR引起的体外T细胞增殖.使用L-428(A,B)或KI-JK(C,D)作为靶细胞在T细胞介导的细胞毒性测定中评估T细胞增殖。对具有稀释的Celltrace Violet染色的CD4⁺(A,C)或CD8⁺(B,D)T细胞进行门控,并使用来自FlowJo的增殖建模工具计算作为T细胞增殖的量的扩增指数。

[0034] 图16:L-428和KI-JK细胞系中bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR引起的体外T细胞激活标志物CD69表达.使用L-428(A,B)或KI-JK(C,D)作为靶细胞在T细胞介导的细胞毒性测定中评估T细胞激活。在CD4⁺(A,C)或CD8⁺(B,D)T细胞中评估T细胞激活标志物CD69的表达。

[0035] 图17:L-428和KI-JK细胞系中bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR引起的体外T细胞激活标志物CD25表达.使用L-428(A,B)或KI-JK(C,D)作为靶细胞在T细胞介导的细胞毒性测定中评估T细胞激活。在CD4⁺(A,C)或CD8⁺(B,D)T细胞中评估T细胞激活标志物CD25的表达。

[0036] 图18:L-428和KI-JK细胞系中bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR引起的体外T细胞激活标志物PD-1表达.使用L-428(A,B)或KI-JK(C,D)作为靶细胞在T细胞介导的细胞毒性测定中评估T细胞激活.在CD4⁺(A,C)或CD8⁺(B,D)T细胞中评估T细胞激活标志物PD-1的表达。

[0037] 图19:bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR引起的的体外细胞因子和颗粒酶B产生.在使用L-428作为靶细胞的体外T细胞介导的细胞毒性实验期间收集的上清液中评估14种不同细胞因子(CD40、IFN γ 、IL-10、IL-12、IL-13、IL-1b、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IP-10、MCP-1、PDL-1、TNF α)和颗粒酶B的浓度.显示了用不同浓度的bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR或对照抗体IgG1-b12-FEAL处理的样品的细胞因子和颗粒酶B浓度。

[0038] 图20:在不同的效应子与靶标比下bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR引起的体外T细胞介导的细胞毒性和T细胞增殖.(A)使用L-428肿瘤细胞作为靶细胞和纯化的T细胞作为效应细胞,在1:1、2:1、4:1或8:1的E:T比下体外测试了bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR引起的剂量依赖性T细胞介导的细胞毒性.包括作为对照抗体的bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR.显示的数据是活细胞百分比,其获自一个代表性实验。(B,C)显示了作为增殖T细胞的量度的具有稀释的Celltrace Violet染色的CD4⁺(B)或CD8⁺(C)T细胞的百分比。

[0039] 图21:bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR引起的体外T细胞介导的细胞毒性和T细胞增殖的动力学.(A)使用L-428肿瘤细胞作为靶细胞和纯化的T细胞作为效应细胞,在4:1的E:T比下体外测试了bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR引起的T细胞介导的细胞毒性的动力学.在24小时、48小时和72小时后评估细胞毒性.包括作为对照抗体的bsG1-huCD3-FEAL×b12-FERR.显示的数据是活细胞百分比,其获自一个代表性实验。(B,C)对具有稀释的Celltrace Violet染色的CD4⁺(B)或CD8⁺(C)T细胞进行门控,并使用来自FlowJo的增殖建模工具计算作为细胞毒性测定中T细胞增殖的量度的扩增指数。

[0040] 图22:bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR引起的体外T细胞介导的细胞毒性和与CD30表达水平的相关性.在八种肿瘤细胞系中评估bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR引起的最大T细胞介导的杀伤(A)或T细胞介导的细胞毒性的IC₅₀浓度(B)相对于CD30表达水平之间的相关性.使用Spearman秩相关检验(GraphPad Prism软件)来评估T细胞介导的细胞毒性(最大杀伤或IC₅₀)与CD30表达之间的相关程度的统计学显著性。

[0041] 图23:bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR引起的激活的T细胞的自相残杀.用1 μ g/mL抗CD3(OKT-3)、1 μ g/mL抗CD28和0.025 μ g/mL IL-15刺激分离的健康供体T细胞4天.在确认激活(CD25上调)后,将T细胞与递增浓度的bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR、bsIgG1-ctrl×CD30-MDX-060-FERR、bsIgG1-CD3×b12或IgG1-b12-FEAL一起温育48小时.测量作为每种条件下的活T细胞相对于在不添加任何抗体的条件下的活T细胞数量的百分比的bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR诱导的激活CD30⁺T细胞的T细胞自相残杀。(A-B)在用抗CD3、抗CD28和IL-15刺激后72小时和96小时,通过流式细胞术测定CD4⁺或CD8⁺T细胞中CD25⁺(A)或CD30⁺(B)细胞的百分比。(C)显示了作为相对于不添加任何抗体的条件的T细胞存活百分比的T细胞自相残杀.显示了一个代表性T细胞供体的数据。

[0042] 图24:CD30⁺细胞培养物上清液中的可溶性CD30及其对BsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR的抗肿瘤活性的干扰.(A)显示了如通过ELISA测量的不同血液系统肿瘤细胞

系的上清液中的可溶性CD30(sCD30)浓度。(B)如在不同的血液系统肿瘤细胞系中使用定量流式细胞术(人IgG校准试剂盒-Biocytext)测定的,sCD30浓度与细胞表面上CD30分子数量之间的相关性通过Spearman秩相关检验(GraphPad Prism软件)来评估。(C)使用CD30-阳性ALCL肿瘤细胞系DEL作为靶细胞和健康供体分离的T细胞作为效应细胞,在体外细胞毒性测定中测试BsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR。包括以下对照抗体:BsG1-b12-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR、IgG1-CD30-MDX060-FERR、BsG1-huCD3-FEAL $\times$ b12-FERR、IgG1-huCD30-FEAL和IgG1-b12-FEAL。显示的数据是活细胞百分比,其获自一个代表性实验。

[0043] 图25.在L-428肿瘤细胞中通过bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR离体诱导T细胞介导的细胞毒性和T细胞增殖。(A)使用L-428肿瘤细胞作为靶细胞和原代患者来源的T细胞作为效应细胞,在离体细胞毒性测定中测试bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR。将霍奇金淋巴瘤(HL)、急性髓系白血病(AML)和外周T细胞淋巴瘤(PTCL)患者来源的外周血单核细胞(PBMC)用作T细胞来源以评估CD3依赖性肿瘤细胞杀伤。包括作为对照的IgG1-b12-FEAL。显示的数据是活靶细胞百分比。(B-D)通过PBMC亚群内的CD4⁺/CD8⁺T细胞上CD69(B)、CD25(C)和PD-1(D)标志物的上调评估T细胞激活,其表示为阳性细胞百分比。

[0044] 图26.在SCID小鼠中静脉内注射后BsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR的血浆浓度.用10 μ g(0.5mg/kg)或100 μ g(5mg/kg)的BsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR的单一IV剂量对SCID小鼠进行注射。(A)通过ELISA测定总人IgG,并绘制随着时间推移的平均人IgG1浓度。(B)绘制0.5或5mg/kg剂量水平的平均清除率。虚线表示基于小鼠中未结合的常规人IgG1的标准分布容积的估计清除率。

[0045] 图27:C1q与膜结合的bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR的结合.使用FITC标记的兔抗C1q抗体,通过流式细胞术评估C1q与bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR-调理的、激活的人CD8⁺T细胞或CD30⁺NCEB-1细胞的结合。(A)在作为C1q来源的正常人血清的存在下,bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR、IgG1-huCD3-FEAL或阳性对照抗体IgG1-CD52-E430G与用抗CD3/CD28珠粒刺激的人CD8⁺T细胞的结合。显示的数据是来自一个代表性实验的重复孔的几何平均荧光强度(gMFI) $\pm$ SD。(B)在作为C1q来源的正常人血清的存在下,bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR、IgG1-CD30-MDX060-FERR或阳性对照抗体IgG1-7D8-E430G与CD30⁺NCEB-1细胞的结合。显示的数据是来自一个代表性实验的gMFI。

具体实施方式

定义

[0046] 如本文中使用的术语“抗体”旨在是指免疫球蛋白分子、免疫球蛋白分子的片段、或其任一种的衍生物,其具有在典型的生理和/或肿瘤特异性条件下与抗原特异性结合的能力,具有相当长的一段时间的半衰期,比如至少约30分钟、至少约45分钟、至少约1小时、至少约2小时、至少约4小时、至少约8小时、至少约12小时、至少约24小时或更多、至少约48小时或更多、至少约3、4、5、6、7天或更多天等,或任何其他相关的功能限定的时间段(比如足以诱导、促进、增强和/或调节与抗体结合至抗原相关的生理反应的时间和/或足以使抗体内化的时间)。抗体包含可与抗原相互作用的结合区(或可在本文中使用的结合结构域,二者具有相同的含义),结合区包含免疫球蛋白分子的重链和轻链二者的可变区等。抗体可包含抗体(Abs)的恒定区,其可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括免疫系统

的各种细胞(比如效应细胞)和补体系统的组分,比如C1q,其为补体激活的经典途径中的第一组分。

[0047] 在本发明的上下文中,术语“抗体”包括单克隆抗体(mAb)、抗体样多肽、嵌合抗体、人源抗体、人源化抗体、以及通过任何已知技术(比如酶促切割、肽合成和重组DNA技术)提供的保留与抗原特异性结合的能力的“抗体片段”或“其片段”(抗原结合片段)。术语“抗体”包括双特异性、三特异性或多特异性抗体和/或具有进一步修饰的抗体,例如抗体-药物缀合物和/或在IgG Fc结构域中具有修饰的抗体。除非本文中的公开内容另行限制,如根据本发明定义的抗体可具有任何同种型或不具有同种型(例如scFv抗体)。

[0048] 已经显示抗体的抗原结合功能可由全长抗体的片段来执行。涵盖在术语“抗体”内的结合片段的实例包括(i) Fab' 或Fab片段,其为由轻链可变结构域(VL)、重链可变结构域(VH)、轻链恒定区(CL)和重链恒定区结构域1(CH1)结构域组成的单价片段,或如WO 2007/059782中描述的单价抗体;(ii) F(ab')₂片段,其为由包含在铰链区处通过二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)基本上由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv)基本上由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;(v) dAb片段,Ward等人,Nature 341,544546(1989),其基本上由VH结构域组成并且也称为结构域抗体,Holt等人;Trends Biotechnol-.2003年11月;21(11):484-90;(vi)骆驼抗体或纳米抗体,Revetts等人;Expert Opin Biol Ther.2005年1月;5(1):111-24和(vii)分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个结构域(VL和VH)由单独的基因编码,但是它们可使用重组方法通过合成接头来连接,所述合成接头使得它们能够制成单个蛋白链,其中VL和VH区配对以形成单价分子(称为单链抗体或单链Fv(scFv),参见例如Revetts等人;Expert Opin Biol Ther.2005年1月;5(1):111-24和Bird等人,Science 242,423426(1988)。除非上下文另行说明或明确指出,此类单链抗体涵盖在术语抗体中。尽管此类片段通常包括在抗体的含义内,但它们共同地且各自独立地是本发明的独特特征,表现出不同的生物学性质和效用。在本文中进一步讨论了在本发明的上下文中的这些和其他有用的抗体片段。

[0049] 作为最终产物或作为通过受控的Fab臂交换(cFEA)产生例如双特异性抗体的中间体的抗体可以在不同的体外或离体表达或生产系统(例如重组修饰的宿主细胞、杂交瘤或使用支持编码该抗体的核酸序列的体外转录和/或翻译的细胞提取物的系统)中产生和收集。

[0050] 如本文中使用的术语“免疫球蛋白重链”或“免疫球蛋白的重链”旨在是指免疫球蛋白的重链之一。重链通常包含重链可变区(在本文中缩写为VH)和重链恒定区(在本文中缩写为CH),重链恒定区限定免疫球蛋白的同种型。IgG的重链恒定区通常包含三个结构域(CH1、CH2和CH3)。如本文中使用的术语“免疫球蛋白”旨在是指一类结构上相关的糖蛋白,其通常由两对多肽链组成,一对轻(L)低分子量链和一对重(H)链,所有四条链潜在地通过二硫键相互连接。免疫球蛋白的结构已经被充分表征(参见例如Fundamental Immunology第7章,Paul,W.编辑,第2版,Raven Press,N.Y.(1989))。在免疫球蛋白的结构内,两条重链经由所谓的“铰链区”中的二硫键相互连接。与重链相同,每条轻链通常包含若干个区;轻链可变区(在本文中缩写为VL)和轻链恒定区。轻链恒定区通常包含一个结构域CL。此外,VH和VL区可以进一步细分为高可变性区(或高变区,其在结构限定环的序列和/或形式方面可以是高变的),也称为互补决定区(CDR),其间散布有称为框架区(FR)的更保守的区域。每个VH

和VL通常由三个CDR和四个FR构成,从氨基末端到羧基末端以下列顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0051] 当在本文中使用时,术语“半分子(half molecule)”、“Fab臂”和“臂”是指一个重链-轻链对。当双特异性抗体被描述为包含“来源于”第一抗体的半分子抗体和“来源于”第二抗体的半分子抗体时,术语“来源于”表示该双特异性抗体通过经由任何已知方法将来自所述第一和第二抗体中的每一种的所述半分子重组成所得双特异性抗体来产生。在这种上下文中,“重组”并非旨在受任何特定的重组方法的限制,并由此包括用于产生本文中描述的双特异性抗体的所有方法,包括例如通过半分子交换进行的重组,以及在核酸水平和/或通过相同细胞中共表达两个半分子的重组。

[0052] 当在本文中的抗体或其结构域或区域的上下文中使用时,术语“第一”和“第二”仅旨在便于参考,并且并非旨在表示特定的相对位置等。

[0053] 如本文中使用的术语“抗原结合区”或“结合区”是指能够与抗原结合的抗体区域。抗原可以是任何分子,比如多肽、蛋白、多糖或其组合。抗原可以例如呈递在细胞、细菌或病毒粒子上。除非与上下文矛盾,术语“抗原”和“靶标”可以在本发明的上下文中互换使用。除非与上下文矛盾,术语“抗原结合区”和“抗原结合位点”可以在本发明的上下文中互换使用。

[0054] 如本文中使用的术语“ K_D ”(M)是指特定抗体-抗原相互作用的平衡解离常数,并且通过 k_d 除以 k_a 来获得。 K_D 也可以称为“结合亲和力”。

[0055] 如本文中使用的术语“ k_d ”(秒⁻¹)是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率常数。所述值也称为 k_{off} 值或解离速率。

[0056] 如本文中使用的术语“ k_a ”(M⁻¹×秒⁻¹)是指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率常数。所述值也称为 k_{on} 值或缔合速率。

[0057] 如本文中使用的术语“结合”是指抗体与预先确定的抗原或靶标的结合,当使用抗体作为配体和使用抗原作为分析物通过生物层干涉法测定时,通常具有对应于1E⁻⁶M或更小,例如5E⁻⁷M或更小、1E⁻⁷M或更小,比如5E⁻⁸M或更小、比如1E⁻⁸M或更小、比如5E⁻⁹M或更小、比如1E⁻⁹M或更小、比如1E⁻¹⁰M或更小或比如1E⁻¹¹M或更小的 K_D 的结合亲和力,并且以对应于为其与除预先确定的抗原或密切相关的抗原之外的非特异性抗原(例如BSA、酪蛋白)结合的亲和力的至多1/10,比如至多1/100,例如至多1/1,000,比如至多1/10,000,例如至多1/100,000的 K_D 的亲和力与预先确定的抗原结合。

[0058] 如本文中使用的术语“CD30”是指人分化簇30蛋白,其也称为TNFRSF8(肿瘤坏死因子受体超家族成员8)。CD30存在于各种物种中,并且由此术语“CD30”可以不限于人CD30,除非与上下文矛盾。人CD30的序列示于SEQ ID NO:39中。

[0059] 如本文中使用的术语“CD3”是指人分化簇3蛋白,其是T细胞辅助受体蛋白复合物的部分,并由四条不同的链构成。CD3存在于各种物种中,并且由此术语“CD3”可以不限于人CD3,除非与上下文矛盾。在哺乳动物中,复合物含有CD3 γ (gamma)链(人CD3 γ 链UniProtKB/Swiss-Prot No P09693或食蟹猴CD3 γ UniProtKB/Swiss-Prot No Q95LI7)、CD3 δ (delta)链(人CD3 δ UniProtKB/Swiss-Prot No P04234或食蟹猴CD3 δ UniProtKB/Swiss-Prot No Q95LI8)、两个CD3 ϵ (epsilon)链(人CD3 ϵ :UniProtKB/Swiss-Prot No P07766,其序列在本文中作为SEQ ID NO:42并入;食蟹猴CD3 ϵ UniProtKB/Swiss-Prot No

Q95LI5;或恒河猴CD3 ϵ UniProtKB/Swiss-Prot No G7NCB9)和CD3 ζ 链(zeta)链(人CD3 ζ UniProtKB/Swiss-Prot No P20963,食蟹猴CD3 ζ UniProtKB/Swiss-Prot No Q09TK0)。这些链与称为T细胞受体(TCR)的分子缔合并在T淋巴细胞中产生激活信号。TCR和CD3分子一起构成TCR复合物。

[0060] 术语“抗体结合区”是指抗原的区域,其包含抗体与之结合的表位。抗体结合区可以通过使用生物层干涉法的表位鉴定(epitope binning)、通过丙氨酸扫描或通过结构域混编测定(使用抗原构建体,其中抗原的区域与另一物种的区域交换,并确定抗体是否仍与抗原结合)来确定。参与与抗体的相互作用的抗体结合区内的氨基酸可以通过氢/氘交换质谱法和/或通过与其抗原结合的抗体的晶体学来确定。

[0061] 术语“表位”意指被抗体特异性结合的抗原决定簇。表位通常由分子,比如氨基酸、糖侧链或其组合的表面组群(surface groupings)组成,并通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。构象表位和非构象表位的区别在于在变性溶剂或破坏蛋白或其多聚体的三维结构的其他试剂的存在下与前者的结合丧失而与后者的结合不丧失。表位可包含直接参与结合的氨基酸残基和不直接参与结合的其他氨基酸残基,比如抗体与抗原结合时被抗体有效阻断或覆盖的氨基酸残基。

[0062] 如本文中使用的术语“单克隆抗体”、“单克隆Ab”、“单克隆抗体组合物”、“mAb”等是指单一分子组成的抗体分子的制剂,并且其通常对特定表位表现出单一结合特异性和亲和力。单克隆抗体通常可由相同细胞(其为独特的亲本细胞的所有克隆)来制备,所述相同细胞比如杂交瘤、稳定细胞系等。因此,术语“人单克隆抗体”是指表现出单一结合特异性的抗体,其具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。人单克隆抗体可由杂交瘤产生,所述杂交瘤包括与无限增殖化细胞融合的获自转基因或转染色体非人动物(比如转基因小鼠)的B细胞,所述动物具有包含人重链转基因和轻链转基因的基因组。人单克隆抗体可来源于人B细胞或浆细胞。单克隆抗体也可以由重组修饰的宿主细胞或使用支持编码该抗体的核酸序列的体外转录和/或翻译的细胞提取物的系统产生。

[0063] 如本文中使用的术语“同种型”是指免疫球蛋白类别(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE或IgM)或其任何同种异型,比如由重链恒定区基因编码的IgG1m(za)和IgG1m(f)。此外,每个重链同种型可以与kappa(κ)或lambda(λ)轻链组合。

[0064] 当在本文中使用时,术语“全长抗体”是指包含一对重链和轻链或两对重链和轻链的抗体(例如亲本或变体抗体),每对含有重链和轻链恒定结构域和可变结构域,比如通常在该同种型的野生型抗体的重链-轻链对中发现的。由此,例如,全长IgG1抗体含有VH、CH1、CH2、CH3、铰链、VL和CL结构域。在全长变体抗体中,当与全长亲本或野生型抗体相比时,重链和轻链恒定结构域和可变结构域可以特别含有修饰和/或改善抗体的功能性质的氨基酸取代。根据本发明的全长抗体可以通过包括以下步骤的方法产生:(i)将CDR序列克隆到一种或多种包含完整重链和轻链序列的合适载体中,和(ii)在合适的表达系统中表达获得的具有重链和轻链序列的合适载体。当从CDR序列或全可变区序列开始时,产生全长抗体在本领域技术人员知识范围内。由此,技术人员知道如何产生根据本发明的全长抗体。

[0065] 如本文中使用的术语“人源化抗体”是指遗传工程化的非人源抗体,其含有人源抗体恒定结构域和经修饰以含有与人可变结构域的高水平序列同源性的非人可变结构域。这可以通过将一起形成抗原结合位点的非人源抗体互补决定区(CDR)移植到同源人受体框架

区 (FR) 上来实现 (参见例如W092/22653和EP0629240)。为了完全重构亲本抗体的结合亲和力和特异性,可能需要用来自亲本抗体 (即非人源抗体) 的一些框架残基取代一些人框架残基 (回复突变)。结构同源性建模可有助于鉴定框架区中对抗体的结合性质而言重要的氨基酸残基。由此,人源化抗体可包含非人CDR序列,任选包含对非人氨基酸序列的一个或多个氨基酸回复突变的主要人框架区,以及完全人恒定区。任选地,可以应用另外的氨基酸修饰 (其不一定是回复突变) 以获得具有优选特征 (比如特别有用的亲和力和生物化学性质) 的人源化抗体,例如包括避免脱酰胺和/或改善制造的修饰。此外,可以修饰CDR和/或框架区以改善对抗原的亲和力,例如经由亲和力成熟程序。

[0066] 如本文中使用的术语“人源抗体”是指具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。人源抗体可包括并非由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基 (例如通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。然而,如本文中使用的术语“人源抗体”并不旨在包括其中衍生自另一哺乳动物物种 (比如小鼠) 的种系的CDR序列已被移植到人框架序列上的抗体。本发明的人单克隆抗体可以通过各种技术产生,包括常规单克隆抗体方法,例如Kohler和Milstein, *Nature* 256:495 (1975) 的标准体细胞杂交技术。尽管体细胞杂交程序是优选的,但原则上,可以采用用于产生单克隆抗体的其他技术,例如B淋巴细胞的病毒转化或致瘤性转化或使用人源抗体基因文库的噬菌体展示技术。人单克隆抗体可以使用携带人免疫系统的部分而不是小鼠系统的转基因或转染色体小鼠,比如Hco12小鼠 (参见例如W0 03/059282) 等来产生。

[0067] 如本文中使用的术语“Fc区”是指在从抗体的两个重链多肽的N末端至C末端的方向上包含至少一个铰链区、一个CH2区和一个CH3区的区域。Fc多肽通常是糖基化的。抗体的Fc区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的各种细胞 (比如效应细胞) 和补体系统的组分。Fc区通常还结合FcRn和蛋白A。

[0068] 如本文中使用的短语“对应于在……位处的氨基酸的氨基酸”是指人IgG1重链中的氨基酸位置编号。其他免疫球蛋白中的相应氨基酸位置可以通过与人IgG1比对应来找到。除非另行说明或与上下文矛盾,恒定区序列的氨基酸在本文中根据EU编号索引 (描述在Kabat, E.A. 等人, 1991, *Sequences of proteins of immunological interest*. 第5版-US Department of Health and Human Services, NIH出版号91-3242, 第662、680、689页中) 来编号。由此,一个序列中“对应于”另一序列中的氨基酸或区段的氨基酸或区段是使用标准序列比对程序 (比如ALIGN、ClustalW或类似的), 通常在默认设置下与其他氨基酸或区段比对并与人IgG1重链具有至少50%、至少80%、至少90%、或至少95%的同一性的氨基酸或区段。本领域中公知如何比对序列或序列中的区段,并由此确定序列中对应于根据本发明的氨基酸位置的位置。

[0069] 如本文中使用的术语“铰链区”是指免疫球蛋白重链的铰链区。由此,例如人IgG1抗体的铰链区对应于根据如Kabat, E.A. 等人, *Sequences of proteins of immunological interest*. 第5版-US Department of Health and Human Services, NIH出版号91-3242, 第662、680、689页 (1991) 中所示的Eu编号的氨基酸216-230。然而,铰链区也可以是如本文中描述的任何其他亚型。

[0070] 如本文中使用的术语“CH1区”或“CH1结构域”是指免疫球蛋白重链的CH1区。由此,例如人IgG1抗体的CH1区对应于根据如Kabat (同上) 中所示的Eu编号的氨基酸118-215。然

而,CH1区也可以是如本文中描述的任何其他亚型。

[0071] 如本文中使用的术语“CH2区”或“CH2结构域”是指免疫球蛋白重链的CH2区。由此,例如人IgG1抗体的CH2区对应于根据如Kabat(同上)中所示的Eu编号的氨基酸231-340。然而,CH2区也可以是如本文中描述的任何其他亚型。

[0072] 如本文中使用的术语“CH3区”或“CH3结构域”是指免疫球蛋白重链的CH3区。由此,例如人IgG1抗体的CH3区对应于根据如Kabat(同上)中所示的Eu编号的氨基酸341-447。然而,CH3区也可以是如本文中描述的任何其他亚型。

[0073] 如本文中使用的术语“Fc介导的效应功能”旨在是指作为多肽或抗体与其细胞膜上的靶标或抗原结合的结果的功能,其中Fc介导的效应功能归因于多肽或抗体的Fc区。Fc介导的效应功能的实例包括(i) C1q结合, (ii) 补体激活, (iii) 补体依赖性细胞毒性(CDC), (iv) 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC), (v) Fc γ 受体(Fc γ R)结合, (vi) 抗体依赖性Fc γ R介导的抗原交联, (vii) 抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP), (viii) 补体依赖性细胞毒性(CDCC), (ix) 补体增强的细胞毒性, (x) 由抗体介导的与调理抗体的补体受体的结合, (xi) 调理作用和(xii) (i)至(xi)中任意的组合。

[0074] 如本文中使用的术语“惰性”、“惰性的”或“非激活的”是指不能经由单个抗体的两个Fc区结合任何Fc γ R、诱导Fc介导的Fc γ R的交联、诱导Fc γ R介导的效应功能,比如ADCC和ADCP、诱导Fc γ R介导的靶抗原的交联或具有其最低能力,和/或不能结合C1q并诱导补体介导的效应功能,比如CDC和CDCC的Fc区。可以使用单特异性或双特异性形式的抗体测试抗体的Fc区的惰性。

[0075] 在本发明的上下文中,术语“单价抗体”是指仅具有一个抗原结合结构域(例如一个Fab臂)的可与抗原相互作用的抗体分子。在多特异性(比如双特异性)抗体的上下文中,“单价抗体结合”是指多特异性抗体仅用一个抗原结合结构域(例如一个Fab臂)与一种抗原结合。

[0076] 在本发明的上下文中,术语“单特异性抗体”是指仅具有对一种抗原、一种表位的结合特异性的抗体。该抗体可以是单特异性单价抗体(即仅携带一个抗原结合区)、单特异性二价抗体(例如具有两个相同的抗原结合区的抗体)或单特异性多价抗体(例如具有多于两个相同的抗原结合区的抗体)。

[0077] 术语“多特异性抗体”是指具有结合两个或更多个不同表位的两个或更多个抗原结合结构域的抗体。术语“双特异性抗体”是指具有结合不同表位的两个抗原结合结构域(例如两个不相同的VH和VL区的对、两个不相同的Fab臂或两个具有不相同的CDR区的Fab臂)的抗体。在本发明的上下文中,双特异性和多特异性抗体分别对两个或更多个不同表位具有特异性。此类表位可以在相同或不同的抗原或靶标上。如果表位在不同的抗原上,此类抗原可以在相同的细胞或不同的细胞、细胞类型或结构(比如胞外基质或囊泡和可溶性蛋白)上。多特异性和双特异性抗体可由此能够交联多种抗原,例如两种不同的细胞。

[0078] 术语“二价抗体”是指具有两个抗原结合区的抗体,其中所述抗原结合区可以是相同的并且与相同的表位结合,或者它们可以是不相同的并且与不同表位结合,所述不同表位可以在相同或不同抗原上。因此,二价抗体可以是单特异性抗体或双特异性抗体。

[0079] 术语“氨基酸”和“氨基酸残基”在本文中可互换使用,并且不应理解为限制性的。氨基酸是含有氨基(-NH₂)和羧基(-COOH)官能团以及各氨基酸特有的侧链(R基团)的有机

化合物。在本发明的上下文中,氨基酸可以基于结构和化学特性进行分类。由此,氨基酸的类别可以反映在下表的一个或两个中:

表1

基于R基团的结构和一般化学特性的主要分类

类别	氨基酸
酸性残基	D和E
碱性残基	K、R和H
亲水性不带电荷的残基	S、T、N和Q
脂族不带电荷的残基	G、A、V、L和I
非极性不带电荷的残基	C、M和P
芳族残基	F、Y和W

表2氨基酸残基的替代物理和功能分类

类别	氨基酸
含有羟基基团的残基	S 和 T
脂族残基	I、L、V 和 M
环烯基相关残基	F、H、W 和 Y
疏水性残基	A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、W 和 Y
带负电荷的残基	D 和 E
极性残基	C、D、E、H、K、N、Q、R、S 和 T
带正电荷的残基	H、K 和 R
小残基	A、C、D、G、N、P、S、T 和 V
非常小的残基	A、G 和 S
涉及转角形成的残基	A、C、D、E、G、H、K、N、Q、R、S、P 和 T
柔性残基	Q、T、K、S、G、P、D、E 和 R

一种氨基酸取代为另一种氨基酸可被分类为保守取代或非保守取代。在本发明的上下文中,“保守取代”是一种氨基酸被具有相似结构和/或化学特性的另一种氨基酸取代,比如一种氨基酸残基取代为如上文两个表中任一个所定义的同类别的另一种氨基酸残基:例如,保守取代可以是亮氨酸被异亮氨酸取代,因为它们都是脂族支链疏水物。类似地,保守取代的实例是天冬氨酸被谷氨酸取代,因为它们都是小的带负电荷的残基。

[0080] 在本发明的上下文中,抗体中的取代表示为:原始氨基酸-位置编号-取代的氨基酸;参考公认的氨基酸命名法,使用三字母代码或单字母代码,包括代码“Xaa”或“X”来表示任何氨基酸残基。由此,Xaa或X通常可以代表20种天然存在的氨基酸中的任一种。如本文中使用的术语“天然存在的”是指以下氨基酸残基中的任一种:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、谷氨酰胺、脯氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸和半胱氨酸。

[0081] 因此,符号“K409R”或“Lys409Arg”意指抗体在氨基酸位置409处包含赖氨酸被精氨酸的取代。将给定位置处的氨基酸取代为任何其他氨基酸称为:原始氨基酸-位置;或例如“K409”。对于其中原始氨基酸和/或取代的氨基酸可包含多于一种但并非所有氨基酸的修饰,多于一种氨基酸可以用“,”或“/”分开。例如在位置409处赖氨酸被精氨酸、丙氨酸或

苯丙氨酸取代为:“Lys409Arg,Ala,Phe”或“Lys409Arg/Ala/Phe”或“K409R,A,F”或“K409R/A/F”或“K409至R,A,或F”。此类名称在本发明的上下文可以互换使用,但具有相同的含义和目的。

[0082] 此外,术语“取代”包括取代为任一种或其他十九种天然氨基酸,或取代为其他氨基酸,比如非天然氨基酸。例如,在位置409处的氨基酸K的取代包括以下取代的每一种:409A、409C、409D、409E、409F、409G、409H、409I、409L、409M、409N、409Q、409R、409S、409T、409V、409W、409P和409Y。这些取代也可以表示为K409A、K409C等,或K409A,C,等或K409A/C/等。其以类似方式应用于本文中提及的每一及每个位置,以在本文中具体包括任一种此类取代。

[0083] 如本文中使用的术语“宿主细胞”旨在是指其中已引入核酸,比如表达载体的细胞。应当理解的是,此类术语不仅旨在指特定的受试细胞,而且还可包括此类细胞的后代。因为某些修饰可能由于突变或环境影响而在后续世代中发生,所以此类后代实际上可能与亲本细胞不同,但仍包括如在本文中使用的术语“宿主细胞”的范围内。重组宿主细胞(即用于产生重组蛋白的宿主细胞)包括例如转染瘤(比如CHO细胞、HEK-293细胞、Expi293F细胞、PER.C6细胞、NS0细胞和淋巴细胞)以及原核细胞(比如大肠杆菌(E.coli))和其他真核宿主(比如植物细胞和真菌)。

[0084] 如本文中使用的术语“转染瘤”包括表达抗体或靶抗原的重组真核宿主细胞,比如CHO细胞、PER.C6细胞、NS0细胞、HEK-293细胞、Expi293F细胞、植物细胞或真菌,包括酵母细胞。

[0085] 为了本发明的目的,使用如在EMBOSS包(EMBOSS:The European Molecular Biology Open Software Suite,Rice等人,2000,Trends Genet.16:276-277)(优选5.0.0版或更新版本)的Needle程序中实施的Needleman-Wunsch算法(Needleman和Wunsch,1970,J.Mol.Biol.48:443-453),在参考序列的长度上确定两个氨基酸序列之间的序列同一性。所用参数是空位开放罚分10、空位延伸罚分0.5和EBLOSUM62(BLOSUM62的EMBOSS版本)取代矩阵。Needle标记的“最长同一性”的输出(使用-nobrief选项获得)以同一性百分比形式使用,并如下计算:

$$(\text{相同残基} \times 100) / (\text{比对长度} - \text{比对中的空位总数})。$$

[0086] 类似残基的保留也可以或可替代地通过相似性得分来测量,如通过使用BLAST程序(例如使用标准设置BLOSUM62,开放空位=11和延伸空位=1,通过NCBI可获得的BLAST 2.2.8)所确定的那样。合适的变体通常表现出与亲本或参考序列至少约45%,比如至少约55%、至少约65%、至少约75%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或更多(例如约99%)的相似性。

[0087] 表3氨基酸序列

SEQ ID NO:	参考	结构域	序列
1	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VH_CDR1	GGSFSAYY
2	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VH_CDR2	INHGGGT
3	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VH_CDR3	ASLTAY
4	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VL_CDR1	QGISSW
5	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VL_CDR2	AAS
6	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VL_CDR3	QQYDSYPIT
7	IgG1-huCD3-FEAL	VH_CDR1	GFTFNTYA
8	IgG1-huCD3-FEAL	VH_CDR2	IRSKYNNYAT
9	IgG1-huCD3-FEAL	VH_CDR3	VRXGNFNGNSYVSWFAY, 其中 X 是 H 或 G
10	IgG1-huCD3-FEAL	VL_CDR1	TGAVTTSNY
11	IgG1-huCD3-FEAL	VL_CDR2	GTN
12	IgG1-huCD3-FEAL	VL_CDR3	ALWYSNLWV
13	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSAYYWSWIR QPPGKGLEWIGDINHGGGTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLNSVTAADTAVYYCASLTAYWGQGS�TVTVSS
14	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VL	DIQMTQSPTSLASVGDRTITCRASQGISSWLTWYQQK PEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQYDSYPITFGQGRLEIK
15	IgG1-huCD3-FEAL	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWV RQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYADSVKDRFTISR DSKSSLYLQMNKLKTEDTAMYYCVRXGNFNGNSYVSWF AYWGQGTLLTVTVSS, wherein X is H or G
16	IgG1-huCD3-FEAL	VL	QAVVTQEPFSFVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWV QQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTI TGAQADDESIFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
17	IgG1-CD30-MDX060-FERR	完整重链	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSAYYWSWIR QPPGKGLEWIGDINHGGGTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLNSVTAADTAVYYCASLTAYWGQGS�TVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFERG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPDSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG

18	IgG1-CD30-MDX060-FERR	完整轻链	DIQMTQSPTSLASVGDRTITCRASQGISSWLTWYQQK PEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ EDFATYYCQQYDSYPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
19	IgG1-huCD3-FEAL	完整重链	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYVCVRHGNFGNSYVSWF AYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVAVVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
20	IgG1-huCD3-FEAL	完整轻链	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWV QQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTI TGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
21	IgG1-CD30-hAC10-FEAR	完整重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYIITWV RQAPGQGLEWMGWYIPGSGNTKYNEKFKGRVTMTRD TSISTAYMELSRLSDDTAVYYCANYGNYWFAYWGQG TLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC PCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
22	IgG1-CD30-hAC10-FEAR	完整轻链	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDFDGD SYMNYWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTL TISSLQAEDVAVYYCQQSNEDPWTFGQGTKEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
23	IgG1-CD30-HRS-3-FEAR	完整重链	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTTYTIHWV RQRPGLDLEWIGYINPSSGYSDYNQNFKGKTLTADKS SNTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARRADYGNIEYTWFA YWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

24	IgG1-CD30-HRS-3-FEAR	完整轻链	DIVMTQSPKFMSTSVGDRVTVTCKASQNVGTNVAWFQ QKPGQSPKVLIIYSASYRYSYGVDPDRFTGSGSGTDFLTISN VQSEDLAEYFCQQYHTYPLTFGGGKTLEINRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
25	IgG1-CD30-HeFi-I-FEAR	完整重链	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDYYMNWVR QPPGKALEWLGFIKANKGYTTEFSAVSMGRFTISRDD SQSILYLQMNTLRADTSATYYCARDPPYGNPHYYAMDY WGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDK THTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVHLQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
26	IgG1-CD30-HeFi-I-FEAR	完整轻链	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSASGYNYMHW YQQKAGQPPKLLIHLASNLSEGVPARFSGSGSGTDFLTN IHPVEEEDASTYYCQHSGLPFTFGSGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
27	IgG1-CD30-T405-FEAR	完整重链	QVQLQQIGAEIVRPGASVKLSCKASGYTFNMYWINWV KQRPGQGLEWIGNIYPSDSRSNYNQKFKDKATLTVDKP SSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCTLSYWGQGLTVTVSAA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPEFE GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQ DNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
28	IgG1-CD30-T405-FEAR	完整轻链	DVVMVTQTPPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLSDSDGKTYLN WLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVDPDRFTGSGSGTDFLT KISRVEAEDLGVIYCWQGAHFPRTFGGGTKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
29	IgG1-CD30-T105-FEAR	完整重链	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIR QPSGKDLLEWLAHIYWDGDKRYNPGLKSLRTISKDTSSN QVFLKITSVDATATYYCARRADGLYFYLDVWGAGTT VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPP CPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQLDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

30	IgG1-CD30-T105-FEAR	完整轻链	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVNTNVAWYQ QKPGQSPEALIYSASYRYSYGVDPDRFTGSGSGTDFLTISN VQSEDLAEYFCQQYNSYPLTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
31	IgG1-CD30-T408-FEAR	完整重链	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWV KQRPQGQLEWIGNIYPSDSYSNYNQKFKDKATLTVDKS SSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCTLGSYWGQGLVTVSAA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFE GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
32	IgG1-CD30-T408-FEAR	完整轻链	DVVMQTPTLTLSTVIGQPASISCKSSQSLSDSDGKTYLN WLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTL KISRVEAEDLGYYCWQGAHFPRTFGGGTKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
33	IgG1-CD30-T215-FEAR	完整重链	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFGSFLSVSGMGVSWIR QPSGKGLEWLAHIHWDDRRSNPSLRSLTISKDTSNN QVFLKITSVDATATYYCARRPDLYGNYFFDFWGGQ TTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV VLTVHLQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
34	IgG1-CD30-T215-FEAR	完整轻链	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVFTNVAWYQ QKLQSPKPLIYSASYRYSYGVDPDRFTGSGSGTDFLTISD VQSEDLAEYFCQQYNSYPTVTFGAGTKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
35	IgG1-huCD3H101G-FEAL	完整重链	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKSSLYLQMNLLKTEDTAMYYCVRGGNFGNSYVSWF AYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVHLQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

36	IgG1-b12-FEAL	完整重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFIHWV RQAPGQRFWMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVFTADT SANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDN YYMDVWGKGTTVIVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV PKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G
37	IgG1-b12-FEAL	完整轻链	EIVLTQSPGTLSPGERATFSCRSSHISIRSRVAVYQHK PGQAPRLVIHGVSNRASGISDRFSGSGSGTDFTLTITRVE PEDFALYYCQVYGASSYTFGQGTKLERKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALY SGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
38	IgG1-b12-FERR	完整重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFIHWV RQAPGQRFWMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVFTADT SANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDN YYMDVWGKGTTVIVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV PKSCDKTHTCPPCPAPEFERGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLLYS RLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G
39	人 CD30		FPQDRPFEDTCHGNPSHYDCAVRRCCYRCMPGLFPTQ QCPQRPTDCRKQCEPDYYLDEADRCTACVTCRDDLVE KTPCAWNSSRVCECRPGMFCSTSAVNSCARCFHFSVCPA GMIVKFPGTAQKNTVCEPASPGVSPACASPENCKEPSSG TIPQAKPTVPSPATSSASTMPVRGGTRLAQEAASKLTRA PDSPSSVGRPSDPGLSPTQPCPEGSGDCRKQCEPDYYL DEAGRCTACVSCSRDDLVEKTPCAWNSSRTCECRPGMI CATSATNSCARCVYPICAAETVTKPQDMAEKDTTFEAP PLGTQPDNPTPENGEAPASTSPTQSLLDVDSQASKTLPI TSAPVALSSTGKPVLDAGPVLFVWVILVVLVVVGSSAFLL CHRRACRKIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRRSST QLRSGASVTEPVAEERGLMSQPLMETCHSVGAAYLESL PLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIMKAD TVIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPE QETEPPLGSCSDVMLSVEEEGKEDPLPTAASGK

40	食蟹猴 CD30		FPQDRPFEDTCRGNPGHYDYDKAVRRCYRCPTGTAQK NTVCEPASPGVSPACASPENCKEPSSGTIPQAKPTPVSPA TSNASTMPLRGGTRLAQEAASKLTRAPGSPSSVGRPSSD PGLSPTQPCPQSGDCRKQCEPDYYLDEAGRCTACVSC SRDDLVEKTPCAWNSSRICERPGMICATSATNSCARCV PYPICAAETGTPQDMAEKDITFEAPPVGTQPDCSPTPE NGEAPASTSPTLSSLVDSQASKTLPIPTSAPIALSSTGKPV LDAGPVLFWVILVLAVVVGSSSTFLLCHRRACRKIRQKL HLCYPVQTSRPKLELVDSRPRRSSTQFESGTFVTKPSAE ELGLMSLPPKETCRNVGAACPESLPLWDASPAGGPSSPR DLPEPRVSTEHTNNRIEKIYIMKADTVIVGTVKAELPEG QGLAGPAEPELEEELEADHAPHYPEQETEPPLGSCSDV MLSVEEEGKEDPLPTAASGK
41	恒河猴 CD30		FPQDRPFEDTCRGNPGHYDYDKAVRRCYRCPMGLFPTQ QCPQRPADCRKQCEPDYYLDEAGRCTACVSCSRDDLVE KMPCAWNSSRVCECQPGMFCAVSVVNSCARCFFHSVCP AGMIVKFPGTAQKNTVCEPASPGVSPACASPENCKEPSS GTIPQAKPTPVSPATSNASTMPLRGGTRLAQEAASKLTR APGSPSSVGRPSSDPGLSPTQPCPQSGDCRKQCEPDYY LDEAGRCTACVSCSRDDLVEKTPCAWNSSRICERPGMI CATSATNSCARCVPYPICAAETGTPQDMAEKDITFEAP PVGTQPDCSPTPENGEAPASTSPTLSSLVDSQASKTLPIPT SAPIALSSTGKPVLDAGPVLFWVILVLAVVVGSSSTFLLC HRRACRKIRQKLHLCYPVQTSRPKLELVDSRPRRSSTQ FESGTFVTKPSAEELGLMSLPPKETCRNVGAACPESLPL WDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNRIEKIYIMKADT VIVGTVKAELPEGQGLAGPAEPELEEELEADHAPHYPEQ ETEPPLGSCSDVMLSVEEEGKEDPLPTAASGK
42	人 CD3 (ε)		QDGNEEMGGITQTPYKVISIGTTVILTCQYPGSEILWQ HNDKNIGGDEDDKNIGSDEHLSLKEFSELEQSGYYVC YPRGSKPEDANFYLYLRARCENCMEMDVM SVATIVIV DITGGLLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQR GQNKERPPVPNPDIPIRKQORDLYSGLNQRR
43	食蟹猴 CD3		QDGNEEMGSITQTPYQVISIGTTVILTCQHLGSEAQWQ HNGKNKEDSGDRLFLPEFSEMEQSGYYVCYPRGSNPED ASHHLYLKARVCENCMEMDVM AVATIVIVDITLGLLL LVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPP VPNPDIPIRKQGDLYSGLNQRR
44	IgG1 恒定区		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
45	IgG1 恒定区	具有 FER 取代 (黑体)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE F ER GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

46	IgG1 恒定区	具有 FEA 取代 (黑体)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPEF E GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
47	IgG1 恒定区	具有 F405L 取 代(黑体)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
48	IgG1 恒定区	具有 K409R 取 代(黑体)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
49	IgG1 恒定区	具有 FER 取代 和具有 F405L 取代(黑体)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPEF E RGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
50	IgG1 恒定区	具有 FER 取代 和具有 K409R 取代(黑体)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPEF E RGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
51	IgG1 恒定区	具有 FEA 取代 和具有 F405L 取代(黑体)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPEF E GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

52	IgG1 恒定区	具有 FEA 取代和具有 K409R 取代(黑体)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
53	恒定区	人 κ 轻链的恒定区	RTVAAPSFIAPPDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
54	恒定区	人 λ 轻链的恒定区	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
55	IgG1-CD30-MDX060- FEAR	完整重链	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVAVYGGSFSAAYWWSWIRQPPGKGLEWIGDINHGGGTNYPNPSLKSRTVTSVDTSKNQFSLKLNSTAAADTAVYYCASLTAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

本发明的其他方面和实施方案

如上所述,在第一方面,本发明涉及多特异性抗体,其包含:

(i) CD30结合区,其包含第一重链可变区和第一轻链可变区,所述第一重链可变区包含分别示于SEQ ID NO:1、2和3中的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述第一轻链可变区包含分别示于SEQ ID NO:4、5和6中的CDR1、CDR2和CDR3序列,和

(ii) CD3结合区,其包含第二重链可变区和第二轻链可变区,所述第二重链可变区包含分别示于SEQ ID NO:7、8和9中的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述第二轻链可变区包含分别示于SEQ ID NO:10、11和12中的CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0088] 在一个实施方案中,SEQ ID NO:9中的X为H。在另一实施方案中,SEQ ID NO:9中的X为G。

[0089] 在一个实施方案中,第一重链可变区是人源的或人源化的。在另一实施方案中,第一轻链可变区是人源的或人源化的。在一个实施方案中,第二重链可变区是人源的或人源化的。在另一实施方案中,第二轻链可变区是人源的或人源化的。在另一实施方案中,第一重链可变区和第一轻链可变区是人源的。在另一实施方案中,第一重链可变区和第一轻链可变区是人源化的。在另一实施方案中,第二重链可变区和第二轻链可变区是人源的。在另一实施方案中,第二重链可变区和第二轻链可变区是人源化的。在另一实施方案中,第一重链可变区和第一轻链可变区是人源的,且第二重链可变区和第二轻链可变区是人源的。在另一实施方案中,第一重链可变区和第一轻链可变区是人源的,且第二重链可变区和第二轻链可变区是人源化的。

[0090] 如本领域技术人员公知的,抗体的每个抗原结合区通常包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),并且每个可变区分别包含三个CDR序列CDR1、CDR2和CDR3,并且可以分别包含四个框架序列FR1、FR2、FR3和FR4。该结构优选也存在于根据本发明的抗体中。在一个实

施方案中,所述四个框架序列中的一个、两个、三个或全部是人框架序列。

[0091] 如上所述,根据本发明的多特异性抗体包含能够与人CD30结合的抗原结合区,其序列示于SEQ ID NO:39中。特别地,根据本发明的抗体是其中能够与人CD30结合的所述抗原结合区能够与人CD30(比如在细胞,更优选肿瘤细胞上表达的CD30分子)的胞外结构域结合的抗体。

[0092] 如所述,抗体包含CD30结合区,所述CD30结合区包含第一重链可变区和第一轻链可变区,所述第一重链可变区包含分别示于SEQ ID NO:1、2和3中的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述第一轻链可变区包含分别示于SEQ ID NO:4、5和6中的CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0093] 可以使用本领域已知的方法从可变重链和轻链区鉴定CDR1、CDR2和CDR3区。来自所述可变重链和轻链区的CDR区根据IMGT进行注释(参见Lefranc, M.-P., *The Immunologist*, 7, 132-136 (1999); Lefranc, *Developmental and Comparative Immunology*, 27(1), 55-77 (2003))。

[0094] 在一个实施方案中,与CD30结合的抗原结合区包含:

- 包含SEQ ID NO:13的序列或与SEQ ID NO:13的序列具有至少90%、至少95%、至少97%或至少99%氨基酸序列同一性的序列的(第一)重链可变区(VH);和
- 包含SEQ ID NO:14的序列或与SEQ ID NO:14的序列具有至少90%、至少95%、至少97%或至少99%氨基酸序列同一性的序列的(第一)轻链可变区(VL)。

[0095] 在另一实施方案中,根据本发明的抗体包含如本文定义的与CD30结合的抗原结合区的重链可变(VH)区,其中当与SEQ ID NO:13相比时,序列总计包含最多1、2、3、4或5个氨基酸取代。

[0096] 在另一实施方案中,根据本发明的抗体包含如本文定义的与CD30结合的抗原结合区的轻链可变(VL)区,其中当与SEQ ID NO:14相比时,序列总计包含最多1、2、3、4或5个氨基酸取代。

[0097] 在另一实施方案中,第一重链可变区包含示于SEQ ID NO:13中的序列,并且第一轻链可变区包含示于SEQ ID NO:14中的序列。

[0098] 能够结合人CD30的此类抗原结合区已经例如在W003059282 (Medarex) 中描述,其通过引用并入本文。

[0099] 根据本发明的所述抗体可以在与人CD30结合的抗原结合区和人CD30之间以平衡解离常数KD结合,所述平衡解离常数KD在0.1至20nM范围内,例如在0.5-5nM范围内,比如在1.5-2nM范围内(单价结合)。所述结合亲和力可以通过生物层干涉法测定。

[0100] 在一个实施方案中,本发明的抗体还可以结合食蟹猴CD30 (SEQ ID NO:40)。

[0101] 如上所述,根据本发明的多特异性抗体包含能够与人CD3结合的抗原结合区。此外,本发明提供了能够结合人CD3 ϵ (epsilon) (比如如SEQ ID NO:22中指定的人CD3 ϵ (epsilon))的根据本发明的抗体。此类抗原结合区能够结合如呈递在T细胞(比如原代人T细胞)上的人CD3 ϵ (epsilon)。

[0102] 如所述,抗体包含CD3结合区,所述CD3结合区包含第二重链可变区和第二轻链可变区,所述第二重链可变区包含分别示于SEQ ID NO:7、8和9中的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述第二轻链可变区包含分别示于SEQ ID NO:10、11和12中的CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0103] 在一个实施方案中,与CD3结合的抗原结合区包含:

- 包含SEQ ID NO:15的序列或与SEQ ID NO:15的序列具有至少90%、至少95%、至少97%或至少99%氨基酸序列同一性的序列的(第二)重链可变区(VH);和

- 包含SEQ ID NO:16的序列或与SEQ ID NO:16的序列具有至少90%、至少95%、至少97%或至少99%氨基酸序列同一性的序列的(第二)轻链可变区(VL)。

[0104] 在另一实施方案中,根据本发明的抗体包含如本文中定义的与CD3结合的抗原结合区的重链可变(VH)区,其中当与SEQ ID NO:15相比时,序列总计包含最多1、2、3、4或5个氨基酸取代。

[0105] 在另一个实施方案中,根据本发明的抗体包含如本文中定义的与CD3结合的抗原结合区的轻链可变(VL)区,其中当与SEQ ID NO:16相比时,序列总计包含最多1、2、3、4或5个氨基酸取代。

[0106] 在另一实施方案中,第二重链可变区包含示于SEQ ID NO:15中的序列,且第二轻链可变区包含示于SEQ ID NO:16中的序列。在一个实施方案中,SEQ ID NO:15中的X是H。在另一个实施方案中,SEQ ID NO:15中的X是G。

[0107] 能够结合人CD3的此类抗原结合区已经例如在W02015/001085 (Genmab) 中描述,其通过引用并入本文。其变体,比如包含示于SEQ ID NO:9(其中X为G) 中的VH CDR3区(其对人CD3结合的亲和力低于其中X为H的亲本抗体) 的变体已经在W02017/009442 (Genmab) 的实施例2中描述,其通过引用并入本文。

[0108] 根据本发明的所述抗体可以在与人CD3结合的抗原结合区和人CD3之间以平衡解离常数KD结合,所述平衡解离常数KD在5至30nM范围内,比如在10至20nM之间(对于单价结合)。

[0109] 在一个实施方案中,本发明的抗体还可以结合食蟹猴CD3(SEQ ID NO:43)。

[0110] 在另一实施方案中,多特异性抗体包含:

- (i) CD30结合区,其包含含有示于SEQ ID NO:13中的序列的第一重链可变区和含有示于SEQ ID NO:14中的序列的第一轻链可变区,和

- (ii) CD3结合区,其包含含有示于SEQ ID NO:15中的序列的第二重链可变区和含有示于SEQ ID NO:16中的序列的第二轻链可变区。

抗体形式

[0111] 本发明的多特异性抗体可以具有两种或更多种特异性,比如两种或三种或更多种特异性。此外,多特异性抗体可以具有CD3和/或CD30的抗原结合区的超过一个拷贝。例如,在一个实施方案中,抗体具有两个能够结合CD3的抗原结合区,比如两个相同的结合CD3的结合区。例如,在另一实施方案中,抗体具有两个结合CD30的抗原结合区,比如两个相同的结合CD30的结合区。另外的抗原结合区可以例如以与恒定区共价连接的scFv的形式存在。

[0112] 在一个优选实施方案中,本发明的多特异性抗体是双特异性抗体。双特异性抗体的许多不同形式和用途是本领域已知的,并且由Kontermann, Drug Discov Today, 2015年7月;20(7):838-47和MAbs, 2012年3月-4月;4(2):182-97以及由Labrijn等人, 2019 Nat Rev Drug Discov 18(8)585-608综述。根据本发明的双特异性抗体可以不限于任何特定的双特异性形式或产生其的方法。

[0113] 可用于本发明中的双特异性抗体分子的实例包括(i) 具有包含不同抗原结合区的两个臂的单抗体;(ii) 对两种不同靶标具有特异性的单链抗体,例如经由通过额外的肽接

头串联连接的两个scFv; (iii) 双可变结构域抗体 (DVD-Ig), 其中每条轻链和重链含有通过短肽键串联的两个可变结构域 (Wu等人, Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-IgTM) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (iv) 化学连接的双特异性 (Fab')₂ 片段; (v) Tandab, 其是产生对每个靶抗原具有两个结合位点的四价双特异性抗体的两个单链双抗体 (diabody) 的融合体; (vi) flexibody, 其是产生多价分子的scFv与双抗体的组合; (vii) 基于蛋白激酶A的“二聚化和对接结构域”的所谓的“Dock-and-Lock”分子, 当蛋白激酶A的“二聚化和对接结构域”应用于Fab时可产生由与不同Fab片段连接的两个相同Fab片段组成的三价双特异性结合蛋白; (viii) 所谓的Scorpion分子, 其包含例如与人Fab臂的两个末端融合的两个scFv; 和 (ix) 双抗体。

[0114] 双特异性抗体的不同类别的其他实例包括但不限于 (i) 具有互补CH3结构域以强制异二聚化的IgG样分子; (ii) 重组IgG样双靶向分子, 其中分子的两侧各自含有至少两种不同抗体的Fab片段或Fab片段的部分; (iii) IgG融合分子, 其中全长IgG抗体与额外的Fab片段或Fab片段的部分融合; (iv) Fc融合分子, 其中单链Fv分子或稳定的双抗体与重链恒定结构域、Fc区或其部分融合; (v) Fab融合分子, 其中不同的Fab片段融合在一起、与重链恒定结构域、Fc区或其部分融合; 和 (vi) 基于scFv的抗体和基于双抗体的抗体和重链抗体 (例如结构域抗体、纳米抗体), 其中不同的单链Fv分子或不同的双抗体或不同的重链抗体 (例如结构域抗体、纳米抗体) 彼此融合或与另一蛋白或载体分子融合, 所述另一蛋白或载体分子与重链恒定结构域、Fc区或其部分融合。

[0115] 具有互补CH3结构域分子的IgG样分子的实例包括但不限于 Triomab/Quadroma 分子 (Trion Pharma/Fresenius Biotech; Roche, W02011069104)、所谓的杵臼 (Knobs-into-Holes) 分子 (Genentech, W09850431)、CrossMAbs (Roche, W02011117329) 和静电配对分子 (electrostatically-matched molecule) (Amgen, EP1870459和W02009089004; Chugai, US201000155133; Oncomed, W02010129304)、LUZ-Y分子 (Genentech, Wranik等人 J. Biol. Chem. 2012, 287 (52): 43331-9, doi:10.1074/jbc.M112.397869. Epub 2012年11月1日)、DIG-body和PIG-body分子 (Pharmabcine, W02010134666, W02014081202)、链交换工程化结构域体 (SEEDbody) 分子 (EMD Serono, W02007110205)、Biclonics分子 (Merus, W02013157953)、Fc Δ Adp分子 (Regeneron, W0201015792)、双特异性IgG1和IgG2分子 (Pfizer/Rinat, W011143545)、Azymetric骨架分子 (Zymeworks/Merck, W02012058768)、mAb-Fv分子 (Xencor, W02011028952)、二价双特异性抗体 (W02009080254) 和 DuoBody® 分子 (Genmab A/S, W02011131746)。

[0116] 重组IgG样双靶向分子的实例包括但不限于双靶向 (DT)-Ig分子 (W02009058383)、二合一抗体 (Two-in-one Antibody) (Genentech; Bostrom等人, 2009. Science 323, 1610-1614)、交联MAbs (Karmanos Cancer Center)、mAb2 (F-Star, W02008003116)、Zybody分子 (Zyngenia; LaFleur等人 MAbs. 2013 Mar-Apr; 5 (2): 208-18)、利用共同轻链的方法 (Crucell/Merus, US7, 262, 028)、kappa/lambda bodyTM分子 (NovImmune, W02012023053) 和 CovX-body (CovX/Pfizer; Doppalapudi, V.R. 等人, 2007. Bioorg. Med. Chem. Lett. 17, 501-506)。

[0117] IgG融合分子的实例包括但不限于双可变结构域 (DVD)-Ig分子 (Abbott, US7, 612,

181)、双结构域双头抗体(Unilever;Sanofi Aventis,W020100226923)、IgG样双特异性分子(ImClone/Eli Lilly,Lewis等人,Nat Biotechnol.2014Feb;32(2):191-8)、Ts2Ab(MedImmune/AZ;Dimasi等人,J Mol Biol.2009年10月30日;393(3):672-92)和BsAb分子(Zymogenetics,W02010111625)、HERCULES分子(Biogen Idec,US007951918)、scFv融合分子(Novartis)、scFv融合分子(Changzhou Adam Biotech Inc,CN 102250246)和TvAb分子(Roche,W02012025525,W02012025530)。

[0118] Fc融合分子的实例包括但不限于scFv/Fc融合体(Pearce等人,Biochem Mol Biol Int.1997年9月;42(6):1179-88)、SCORPION分子(Emergent BioSolutions/Trubion, Blankenship JW,等人AACR 100th Annual meeting 2009(Abstract#5465); Zymogenetics/BMS,W02010111625)、双亲和重靶向技术(基于Fc的DART)分子(MacroGenics,W02008157379,W02010080538)和双(scFv)2-Fab分子(National Research Center for Antibody Medicine-China)。

[0119] Fab融合双特异性抗体的实例包括但不限于F(ab)2分子(Medarex/AMGEN;Deo等人,J Immunol.1998Feb 15;160(4):1677-86.)、双功能(Dual-Action)或双Fab分子(Genentech,Bostrom等人,2009.Science 323,1610-1614.)、Dock-and-Lock(DNL)分子(ImmunoMedics,W02003074569,W02005004809)、二价双特异性分子(Biotecnol, Schoonjans,J Immunol.2000年12月15日;165(12):7050-7.)和Fab-Fv分子(UCB-Celltech,W0 2009040562A1)。

[0120] 基于scFv的抗体、基于双抗体的抗体和结构域抗体的实例包括但不限于双特异性T细胞衔接器(BiTE)分子(Micromet,W02005061547)、串联双抗体分子(TandAb)(Affimed)(Le Gall等人,Protein Eng Des Sel.2004年4月;17(4):357-66.)、DART分子(MacroGenics,W02008157379,W02010080538)、单链双抗体分子(Lawrence,FEBS Lett.1998年4月3日;425(3):479-84)、TCR样抗体(AIT,ReceptorLogics)、人血清白蛋白scFv融合体(Merrimack,W02010059315)和COMBODY分子(Epigen Biotech,Zhu等人,Immunol Cell Biol.2010年8月;88(6):667-75.)、双靶向纳米抗体(Ablynx,Hmila等人,FASEB J.2010)和双靶向仅重链结构域抗体。

[0121] 在一个实施方案中,本发明的双特异性抗体是双抗体、cross-body或经由受控的Fab臂交换获得的双特异性抗体(比如W02011131746(Genmab)中所述的)。

[0122] 在一个实施方案中,本发明的抗体是双特异性DuoBody®分子(Genmab A/S,W02011131746)。

[0123] 本发明的多特异性(比如双特异性)抗体可以是任何同种型。示例性同种型包括但不限于人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4同种型中的任一种。优选地,抗体可以选择为人IgG1同种型,如实施例中所示。可以使用人轻链恒定区 κ 或 λ 中的任一种或两种,例如示于SEQ ID NO: 53和54中的序列。例如,在一个实施方案中,参与CD30结合的轻链包含 κ 恒定区,且参与CD3结合的轻链包含 λ 恒定区。在一个实施方案中,本发明的抗体的两条重链都是IgG1同种型。在一个实施方案中,双特异性抗体的两条重链分别是IgG1和IgG4同种型。优选地,双特异性抗体可以选择为人IgG1同种型,如实施例中所示。任选且优选地,可以对所选同种型的重链及其Fc区序列进行修饰,优选在铰链区、CH2区和/或CH3区中进行修饰,以使得能够产生双特异性抗体和/或引入惰性。

[0124] 在一个实施方案中,本发明的多特异性抗体包含由第一和第二Fc多肽组成的Fc区。

[0125] 在一个实施方案中,第一Fc多肽和第一重链可变区包含在同一多肽链内,并且其中第二Fc多肽和第二重链可变区包含在同一多肽链内。

[0126] 第一和第二Fc多肽可各自为任何同种型,包括任何人同种型,比如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgE、IgD、IgM或IgA同种型或混合同种型。优选地,Fc区是人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4同种型或混合同种型。在一个实施方案中,所述Fc区是人IgG1Fc区。

[0127] 在另一实施方案中,多特异性抗体是如本文中定义的全长抗体。

[0128] 根据本发明的抗体可在Fc区中包含修饰,以使抗体成为惰性或非激活的抗体。因此,在本文中公开的抗体中,可对一条或两条重链进行修饰,使得抗体相对于除不包含所述修饰外相同的抗体在较小程度上诱导Fc介导的效应功能。Fc介导的效应功能可以通过测定T细胞上Fc介导的CD69表达(即由于CD3抗体介导的Fc γ 受体依赖性CD3交联所致的CD69表达,例如如W02015001085中所述)、通过与Fc γ 受体的结合、通过与C1q的结合、或通过诱导Fc介导的Fc γ R的交联来测量。特别地,可对重链恒定序列进行修饰,使得与野生型(未修饰)抗体相比时,Fc介导的CD69表达降低至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少99%或100%,其中所述Fc介导的CD69表达在基于PBMC的功能测定中,例如通过如W02015001085的实施例3中所述的流式细胞术来确定。重链和轻链恒定序列的修饰还可导致降低的C1q与所述抗体的结合。与未修饰抗体相比,可降低至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、或100%,并且C1q结合可以通过ELISA来确定。此外,Fc区可进行修饰,使得与未修饰抗体相比,所述抗体介导减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少99%或100%的Fc介导的T细胞增殖,例如在曲线的线性部分中,其中所述T细胞增殖在基于PBMC的功能测定中测量。

[0129] 已经开发了多种不同的非激活抗体形式,其中在IgG1同种型抗体的恒定重链区中引入氨基酸取代及其组合来消除Fc介导的效应功能(例如Chiu等人,Antibodies 2019年12月;8(4):55;Liu等人,Antibodies,2020年11月.17;9(4):64;29(10):457-66;Shields等人,J Biol Chem.2001Mar.2;276(9):6591-604)。

[0130] 例如在IgG1同种型抗体中可以修饰的氨基酸位置的实例包括位置L234和L235。在一个实施方案中,第一和/或第二Fc多肽包含对应于人IgG1重链中位置L234和/或L235处的氨基酸的氨基酸的取代,其中取代优选分别为取代为F和E,其中氨基酸位置如通过Eu编号所定义。

[0131] 应当理解的是,除了氨基酸位置L234和L235的修饰外,还可以修饰其他位置。由此,在另一实施方案中,第一和第二Fc多肽包含对应于位置L234和L235处的氨基酸的氨基酸分别取代为F和E的取代,并且第一和/或第二Fc多肽进一步包含对应于人IgG1重链中位置G236处的氨基酸的氨基酸的取代,其中取代优选为取代为R。

[0132] 在另一实施方案中,第一和第二Fc多肽包含对应于位置L234和L235处的氨基酸的氨基酸分别取代为F和E的取代,并且第一和第二Fc多肽进一步包含对应于人IgG1重链中位置G236处的氨基酸的氨基酸的取代,其中取代优选为取代为R。

[0133] 在另一实施方案中,第一和第二Fc多肽包含对应于位置L234和L235处的氨基酸的氨基酸分别取代为F和E的取代,并且第一和/或第二Fc多肽进一步包含对应于人IgG1重链

中位置D265处的氨基酸的氨基酸的取代,其中取代优选为取代为A。

[0134] 在另一实施方案中,第一和第二Fc多肽包含对应于位置L234和L235处的氨基酸的氨基酸分别取代为F和E的取代,并且第一和第二Fc多肽进一步包含对应于人IgG1重链中位置D265处的氨基酸的氨基酸的取代,其中取代优选为取代为A。

[0135] 在另一实施方案中,第一和第二Fc多肽之一包含对应于位置L234、L235和G236处的氨基酸的氨基酸分别取代为F、E和R的取代,并且另一Fc多肽包含对应于位置L234、L235E和D265处的氨基酸的氨基酸分别取代为F、E和A的取代。

[0136] 在另一实施方案中,第一Fc多肽包含对应于位置L234、L235和G236处的氨基酸的氨基酸分别取代为F、E和R的取代,并且第二Fc多肽包含对应于位置L234、L235E和D265处的氨基酸的氨基酸分别取代为F、E和A的取代,其中氨基酸位置如通过Eu编号所定义。

[0137] 例如,具有此类Fc区取代的恒定区例如在SEQ ID NO. 45、46、49、50、51和52中提供,其可以与不具有此类取代的SEQ ID NO. 44进行比较。在一个实施方案中,本发明的抗体包含选自SEQ ID NO: 45、46、49、50、51和52的序列。

[0138] 在一个实施方案中,本发明的多特异性或双特异性抗体包含含有第一和第二CH3区的Fc区,所述第一和第二CH3区是不同的,并且使得所述第一和第二CH3区之间的异二聚相互作用强于所述第一和第二CH3区的同二聚相互作用的每一个。关于这些相互作用以及可如何实现它们的更多细节在W02011131746和W02013060867 (Genmab) 中提供,其通过引用并入本文。稳定的异二聚体抗体可以基于在CH3区中仅含有少量不对称突变的两个同二聚体起始抗体,例如通过W0 2008/119353和W0 2011/131746中提供的所谓的Fab臂交换以高产率获得。

[0139] 在特定实施方案中,本发明提供了一种抗体,其中在所述第一Fc多肽中对应于人IgG1重链中的K409的位置处的氨基酸是R,并且在所述第二Fc多肽中对应于人IgG1重链中的F405的位置处的氨基酸是L,或反之亦然。

[0140] 在另一实施方案中,第一Fc多肽中对应于K409的位置处的氨基酸是R,并且其中第二Fc多肽中对应于F405的位置处的氨基酸是L。

[0141] 因此,在一个实施方案中,在第一Fc多肽中,对应于人IgG1重链中选自以下的位置的位置处的氨基酸中的至少一个已被取代:T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409,并且在第二Fc多肽中,对应于人IgG1重链中选自以下的位置的位置处的氨基酸中的至少一个已被取代:T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409,并且其中第一和第二Fc多肽中的所述取代不在相同位置,其中氨基酸位置如通过Eu编号所定义。例如,具有此类Fc区取代的恒定区例如在SEQ ID NO. 47、48、49、50、51和52中提供,其可以与不具有此类取代的SEQ ID NO. 44进行比较。在一个实施方案中,本发明的抗体包含选自SEQ ID NO: 47、48、49、50、51和52的序列。

[0142] 优选地,在第一Fc多肽中对应于F405的位置处的氨基酸是L,并且在第二Fc多肽中对应于K409的位置处的氨基酸是R,或反之亦然。

[0143] 由此,在一个实施方案中,第一和第二Fc多肽之一包含对应于位置L234、L235、G236和F405处的氨基酸的氨基酸分别取代为F、E、R和L的取代,并且另一Fc多肽包含对应于位置L234、L235E、D265和K409处的氨基酸的氨基酸分别取代为F、E、A和R的取代。

[0144] 在另一实施方案中,第一和第二Fc多肽之一包含对应于位置L234、L235、G236和

K409处的氨基酸的氨基酸分别取代为F、E、R和R的取代,并且另一Fc多肽包含对应于位置L234、L235E、D265和F405处的氨基酸的氨基酸分别取代为F、E、A和L的取代。

[0145] 在另一实施方案中,本发明涉及多特异性抗体,其包含:

(i)CD30结合区,其包含第一重链可变区和第一轻链可变区,所述第一重链可变区包含分别示于SEQ ID NO:1、2和3中的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述第一轻链可变区包含分别示于SEQ ID NO:4、5和6中的CDR1、CDR2和CDR3序列,和

(ii)CD3结合区,其包含第二重链可变区和第二轻链可变区,所述第二重链可变区包含分别示于SEQ ID NO:7、8和9中的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述第二轻链可变区包含分别示于SEQ ID NO:10、11和12中的CDR1、CDR2和CDR3序列;

其中该多特异性抗体是双特异性抗体,并且包含由第一和第二Fc多肽组成的Fc区;

其中第一Fc多肽和第一重链可变区包含在同一多肽链内,并且其中第二Fc多肽和第二重链可变区包含在同一多肽链内;

其中第一Fc多肽包含对应于位置L234、L235和G236处的氨基酸的氨基酸分别取代为F、E和R的取代,并且第二Fc多肽包含对应于位置L234、L235和D265处的氨基酸的氨基酸分别取代为F、E和A的取代,其中氨基酸位置如通过Eu编号所定义;以及

其中在第一Fc多肽中对应于K409的位置处的氨基酸是R,并且其中在第二Fc多肽中对应于F405的位置处的氨基酸是L。

[0146] 在另一实施方案中,本发明涉及多特异性抗体,其包含:

(i)CD30结合区,其包含第一重链可变区和第一轻链可变区,所述第一重链可变区包含分别示于SEQ ID NO:1、2和3中的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述第一轻链可变区包含分别示于SEQ ID NO:4、5和6中的CDR1、CDR2和CDR3序列,和

(ii)CD3结合区,其包含第二重链可变区和第二轻链可变区,所述第二重链可变区包含分别示于SEQ ID NO:7、8和9中的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述第二轻链可变区包含分别示于SEQ ID NO:10、11和12中的CDR1、CDR2和CDR3序列;

其中该多特异性抗体是双特异性抗体,并且包含由第一和第二Fc多肽组成的Fc区;

其中第一Fc多肽和第一重链可变区包含在同一多肽链内,并且其中第二Fc多肽和第二重链可变区包含在同一多肽链内;

其中第一Fc多肽包含对应于位置L234、L235和D265处的氨基酸的氨基酸分别取代为F、E和A的取代,并且第二Fc多肽包含对应于位置L234、L235和D265处的氨基酸的氨基酸分别取代为F、E和A的取代,其中氨基酸位置如通过Eu编号所定义;以及

其中在第一Fc多肽中对应于K409的位置处的氨基酸是R,并且其中在第二Fc多肽中对应于F405的位置处的氨基酸是L。

[0147] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含示于SEQ ID NO:17和19中的重链序列和示于SEQ ID NO:18和20中的轻链序列或由其组成。

[0148] 在另一个实施方案中,本发明的抗体包含示于SEQ ID NO:17和19中的重链序列和示于SEQ ID NO:18和20中的轻链序列或由其组成,并且所述抗体是双特异性抗体。

[0149] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含示于SEQ ID NO:17和35中的重链序列和示

于SEQ ID NO:18和20中的轻链序列或由其组成。

[0150] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含示于SEQ ID NO:55和19中的重链序列和示于SEQ ID NO:18和20中的轻链序列或由其组成。

[0151] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含示于SEQ ID NO:55和35中的重链序列和示于SEQ ID NO:18和20中的轻链序列或由其组成。

[0152] 在又一实施方案中,本发明的抗体是bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FEAR或bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR。在再一实施方案中,本发明的抗体是bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR。

[0153] SEQ ID NO:44-52和55中列举的恒定区序列不包括C末端赖氨酸(K)。然而,在人中发现的衍生这些Fc区的天然存在的序列中,此类C末端赖氨酸可以作为开放阅读框的部分存在。在重组抗体的细胞培养生产期间,该末端赖氨酸可以通过内源性羧肽酶的蛋白水解而被切割掉,产生具有相同序列但缺少C末端赖氨酸的恒定区。出于制造抗体的目的,可以从序列中省略编码该末端赖氨酸的DNA,使得在没有赖氨酸的情况下产生抗体。从编码抗体的序列中省略C末端赖氨酸可相对于存在C末端赖氨酸提高抗体的同质性。由编码或不编码末端赖氨酸的核酸序列产生的抗体在序列和功能上基本相同,因为当例如使用在基于CHO的生产系统中产生的抗体时,C末端赖氨酸的加工程度通常较高(Dick, L.W. 等人 Biotechnol. Bioeng. 2008;100:1132-1143)。因此,应当理解的是,可以在不编码或不具有C末端赖氨酸的情况下生成根据本发明的抗体,比如本文中列举的。出于制造目的,可以由此生成不具有C末端赖氨酸的抗体。

[0154] 在备选实施方案中,根据本发明的多特异性抗体不是包含Fc区的经典全长抗体。例如,在一个实施方案中,

(i) CD30结合区和/或CD3结合区是Fab,

(ii) CD30结合区和/或CD3结合区是scFv,

(iii) CD30结合区是Fab且CD3结合区是scFv, 或 (iv) CD30结合区是scFv且CD3结合区是Fab。

结合、细胞毒性和T细胞激活

[0155] 可与人CD3和人CD30结合的如本文中描述的抗体(比如双特异性抗体)可有利地将T细胞靶向至表达人CD30的癌细胞,由此诱导T细胞介导的对所述癌细胞的杀伤。

[0156] 如所述,优选地,根据本发明的抗体是惰性的,并且此外,抗体包含以下特性中的一种或多种:

a) 当使用流式细胞术测试时,例如如本文的实施例中所述,能够与表达CD30的人肿瘤细胞,比如SU-DHL-1细胞、SUP-M2细胞、DL-40细胞、KARPAS-299细胞、L-82细胞、SR-786细胞、L-540细胞、KM-H2细胞、L-1236细胞、JVM-2细胞、HH细胞、NCEB-1细胞和/或HDLM-2细胞结合,

b) 当如本文的实施例中所述进行测定时,当使用例如纯化的PBMC、ADCC效应细胞或T细胞作为效应细胞时,能够介导对表达CD30的人肿瘤细胞的浓度依赖性细胞毒性,

c) 当如本文的实施例中所述进行测定时,当使用例如纯化的PBMC或T细胞作为效应细胞时,能够介导对一种或多种表达人CD30的肿瘤细胞系的浓度依赖性细胞毒性,所述肿瘤细胞系选自:SU-DHL-1细胞、L-428细胞、KM-H2细胞、SUP-M2细胞、KI-JK细胞和HDLM-2

细胞,

d) 例如当如本文的实施例中所述进行测定时,能够在表达CD30的人肿瘤细胞的存在下体外诱导T细胞的增殖,

e) 当如本文的实施例中所述进行测定时,能够在一种或多种表达CD30的人肿瘤细胞系的存在下体外激活T细胞,所述人肿瘤细胞系选自:SU-DHL-1细胞、L-428细胞、KI-JK细胞和HDLM-2细胞,

f) 当如本文的实施例中所述进行测定时,能够体外诱导T细胞剂量依赖性产生细胞因子和颗粒酶B,

g) 当如本文的实施例中所述进行测定时,即使CD30在激活的T细胞亚群上表达,也能够不导致T细胞的自相残杀,和/或

h) 当如本文的实施例中所述进行测定时,即使在sCD30的存在下,也能够诱导T细胞介导的细胞毒性。

[0157] 在一个实施方案中,当如本文的实施例中所述进行测定,比如使用L-428肿瘤细胞并通过流式细胞术测量时,如本文中描述的抗体以低于0.050 $\mu\text{g}/\text{ml}$,比如低于0.045 $\mu\text{g}/\text{ml}$,如低于0.040 $\mu\text{g}/\text{ml}$,比如低于0.035 $\mu\text{g}/\text{ml}$,如低于0.030 $\mu\text{g}/\text{ml}$,比如低于0.025 $\mu\text{g}/\text{ml}$,如低于0.020 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 EC_{50} 浓度诱导T细胞介导的细胞毒性。

[0158] 在另一实施方案中,当如本文的实施例中所述进行测定,比如使用L-428肿瘤细胞并通过流式细胞术测量时,如本文中描述的抗体在诱导T细胞介导的细胞毒性时具有高于80%,比如高于85%,如高于90%的最大裂解。

[0159] 在一个实施方案中,当如本文的实施例中所述进行测定,比如使用L-428肿瘤细胞并通过流式细胞术测量时,如本文中描述的抗体诱导 CD4^+ T细胞激活,其具有低于0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$,比如低于0.045 $\mu\text{g}/\text{ml}$,如低于0.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$,比如低于0.035 $\mu\text{g}/\text{ml}$,如低于0.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的CD25表达的 EC_{50} 浓度。在另一实施方案中,当如本文的实施例中所述进行测定,比如使用L-428肿瘤细胞并通过流式细胞术测量时,如本文中描述的抗体诱导 CD8^+ T细胞激活,其具有低于0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$,比如低于0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$,如低于0.0009 $\mu\text{g}/\text{ml}$,比如低于0.0008 $\mu\text{g}/\text{ml}$,如低于0.0007 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的CD25表达的 EC_{50} 浓度。

[0160] 在一个实施方案中,当如本文的实施例中所述进行测定,比如使用L-428肿瘤细胞并通过流式细胞术测量时,如本文中描述的抗体诱导 CD4^+ T细胞激活,其具有低于0.004 $\mu\text{g}/\text{ml}$,比如低于0.003 $\mu\text{g}/\text{ml}$,如低于0.002 $\mu\text{g}/\text{ml}$,比如低于0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$,如低于0.0009 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的CD69表达的 EC_{50} 浓度。在另一实施方案中,当如本文的实施例中所述进行测定,比如使用L-428肿瘤细胞并通过流式细胞术测量时,如本文中描述的抗体诱导 CD8^+ T细胞激活,其具有低于0.0035 $\mu\text{g}/\text{ml}$,比如低于0.0030 $\mu\text{g}/\text{ml}$,如低于0.0025 $\mu\text{g}/\text{ml}$,比如低于0.0020 $\mu\text{g}/\text{ml}$,如低于0.0015 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的CD69表达的 EC_{50} 浓度。

[0161] 在一个实施方案中,当如本文的实施例中所述进行测定,比如使用L-428肿瘤细胞并通过流式细胞术测量时,如本文中描述的抗体诱导 CD4^+ T细胞激活,其具有低于0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$,比如低于0.008 $\mu\text{g}/\text{ml}$,如低于0.007 $\mu\text{g}/\text{ml}$,比如低于0.006 $\mu\text{g}/\text{ml}$,如低于0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的PD-1表达的 EC_{50} 浓度。在另一实施方案中,当如本文的实施例中所述进行测定,比如使用L-428肿瘤细胞并通过流式细胞术测量时,如本文中描述的抗体诱导 CD8^+ T细胞激活,其具有低于0.007 $\mu\text{g}/\text{ml}$,比如低于0.006 $\mu\text{g}/\text{ml}$,如低于0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$,比如低于0.004 $\mu\text{g}/\text{ml}$,如低于

0.003 μ g/ml的PD-1表达的EC₅₀浓度。

[0162] 测定可以如本领域技术人员通常已知的那样进行,并且可以任选包含4:1的效应细胞与靶细胞的比(E:T)和/或任选的72小时的温育期。例如,测定可以通过以下来进行:提供肿瘤细胞,优选标记的肿瘤细胞,比如L-428肿瘤细胞;添加如本文中描述的抗体,优选在连续稀释物中添加;以E:T为4:1的效应物与靶标的比提供T细胞,优选标记的T细胞,并温育72小时;任选地,对相关参数,比如CD4、CD8、CD25、CD69和/或PD-1进行染色,并最后使用流式细胞术,如FACS分析细胞。活细胞%和/或T细胞增殖/激活可以从通过本领域技术人员通常已知的分析获得的数据来计算。

本发明的抗体的产生

[0163] 传统方法,比如杂交瘤和化学缀合法(Marvin和Zhu (2005) *Acta Pharmacol Sin* 26:649)可用于制备本发明的多特异性(比如双特异性)抗体中。在宿主细胞中共表达由不同的重链和轻链组成的两种抗体产生除了期望的双特异性抗体之外的可能抗体产物的混合物,其随后可以通过例如亲和色谱法或类似方法来分离。

[0164] 如所提及的,也可以使用在共表达不同抗体构建体时有利于形成功能性双特异性产物的策略,例如Lindhofer等人(1995 *J Immunol* 155:219)描述的方法。由于优先物种限制的重链/轻链配对,因此产生不同抗体的大鼠和小鼠杂交瘤的融合产生有限数量的异二聚体蛋白。相对于同二聚体促进异二聚体形成的另一种策略是“杵臼”策略,其中在第一重链多肽上引入突起并在第二重链多肽中引入相应的空腔,使得在这两条重链的界面处突起可以位于空腔中,从而促进异二聚体形成并阻碍同二聚体形成。通过用较大的侧链替换来自第一多肽的界面的小氨基酸侧链来构建“突起”。通过用较小的氨基酸侧链替换大的氨基酸侧链,在第二多肽的界面中产生尺寸与突起相同或相似的补偿性“空腔”(美国专利5,731,168)。EP1870459 (Chugai) 和W02009089004 (Amgen) 描述了在宿主细胞中共表达不同抗体结构域时有利于异二聚体形成的其他策略。在这些方法中,在两个CH3结构域中构成CH3-CH3界面的一个或多个残基用带电荷的氨基酸替换,使得同二聚体形成在静电方面不利,而异二聚化在静电方面有利。W02007110205 (Merck) 描述了另一种策略,其中利用IgA和IgG CH3结构域之间的差异来促进异二聚化。

[0165] 用于产生双特异性抗体的另一种体外方法已描述在W02008119353 (Genmab) 中,其中双特异性抗体通过在还原条件下温育后,两个单特异性IgG4抗体或IgG4样抗体之间的“Fab臂”或“半分子”交换(重链与附接的轻链交换)形成。所得产物是具有可包含不同序列的两个Fab臂的双特异性抗体。

[0166] 用于制备本发明的双特异性CD3 $\times$ CD30抗体的优选方法包括W02011131746和W013060867 (Genmab) 中描述的方法,其包括以下步骤:

- a) 提供包含Fc区的第一抗体,所述Fc区包含第一CH3区;
 - b) 提供包含第二Fc区的第二抗体,所述Fc区包含第二CH3区,
- 其中第一抗体是CD30抗体,且第二抗体是CD3抗体,或反之亦然;

其中所述第一和第二CH3区的序列不同,并且使得所述第一和第二CH3区之间的异二聚相互作用强于所述第一和第二CH3区的同二聚相互作用的每一个;

- c) 在还原条件下将所述第一抗体与所述第二抗体一起温育;和
- d) 获得所述双特异性CD3 $\times$ CD30抗体。

[0167] 类似地,本发明涉及一种用于产生根据本发明的多特异性(比如双特异性)抗体的方法,其包括

a) 提供包含如本文中描述的CD30结合区的第一同二聚体抗体和包含如本文中描述的CD3结合区的第二同二聚体抗体,其中所述抗体包含Fc区且任选含有本文中描述的其他特征,其中第一和第二抗体的第一和第二CH3区的序列不同,并且使得第一和第二CH3区之间的异二聚相互作用强于第一和第二CH3区的同二聚相互作用的每一个;

b) 在足以允许铰链区中的半胱氨酸经历二硫键异构化的还原条件下将第一抗体与第二抗体一起温育;和

c) 获得如本文中描述的本发明的异二聚体多特异性抗体,其包含第一抗体的第一免疫球蛋白重链和第一免疫球蛋白轻链以及第二抗体的第二免疫球蛋白重链和第二免疫球蛋白轻链。

[0168] 在一个实施方案中,在足以允许铰链区中的半胱氨酸经历二硫键异构化的还原条件下将所述第一抗体与所述第二抗体一起温育,其中所得异二聚体抗体中所述第一和第二抗体之间的异二聚相互作用使得在37°C下24小时后,在0.5mM GSH下不发生Fab臂交换。

[0169] 不受理论限制,在步骤c)中,亲本抗体铰链区中的重链二硫键被还原,并且所得半胱氨酸随后能够与另一亲本抗体分子(初始具有不同的特异性)的半胱氨酸残基形成重链间二硫键。在该方法的一个实施方案中,步骤c)中的还原条件包括添加还原剂,例如选自以下的还原剂:2-巯基乙胺(2-MEA)、二硫代苏糖醇(DTT)、二硫代赤藓糖醇(DTE)、谷胱甘肽、三(2-羧基乙基)膦(TCEP)、L-半胱氨酸和 β -巯基乙醇,优选选自以下的还原剂:2-巯基乙胺、二硫代苏糖醇和三(2-羧基乙基)膦。在一个优选实施方案中,还原剂是2-巯基乙胺。在另一实施方案中,步骤c)包括例如通过除去还原剂(例如通过脱盐)将条件恢复为非还原性或较低还原性。

[0170] 在另一方面,本发明涉及一种单特异性抗体,其包含:

(i) CD30结合区,其包含第一重链可变区和第一轻链可变区,所述第一重链可变区包含分别示于SEQ ID NO:1、2和3中的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述第一轻链可变区包含分别示于SEQ ID NO:4、5和6中的CDR1、CDR2和CDR3序列,和

(ii) 由第一和第二Fc多肽组成的Fc区,其中第一和第二Fc多肽包含对应于位置L234和L235处的氨基酸的氨基酸分别取代为F和E的取代,并且其中第一和第二Fc多肽进一步包含对应于人IgG1重链中位置G236处的氨基酸的氨基酸的取代,其中取代优选为取代为R,其中氨基酸位置如通过Eu编号所定义。

[0171] 在一个实施方案中,第一重链可变区包含示于SEQ ID NO:13中的序列,并且第一轻链可变区包含示于SEQ ID NO:14中的序列。

[0172] 在另一方面,本发明涉及单特异性抗体,其包含:

(i) CD3结合区,其包含第二重链可变区和第二轻链可变区,所述第二重链可变区包含分别示于SEQ ID NO:7、8和9中的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述第二轻链可变区包含分别示于SEQ ID NO:10、11和12中的CDR1、CDR2和CDR3序列,和

(ii) 由第一和第二Fc多肽组成的Fc区,其中第一和第二Fc多肽包含对应于位置L234和L235处的氨基酸的氨基酸分别取代为F和E的取代,并且其中第一和第二Fc多肽进一步包含对应于人IgG1重链中位置G236处的氨基酸的氨基酸的取代,其中取代优选为取代为

R,其中氨基酸位置如通过Eu编号所定义。

[0173] 在一个实施方案中,SEQ ID NO:9中的X是H。在另一实施方案中,SEQ ID NO:9中的X是G。在一个实施方案中,第二重链可变区包含示于SEQ ID NO:15中的序列,且第二轻链可变区包含示于SEQ ID NO:16中的序列。

[0174] 在一个实施方案中,上述提及的单特异性抗体是全长抗体。优选地,对应于人IgG1重链中选自以下的位置的位置处的氨基酸中的至少一个已被取代:T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409,其中优选地,对应于F405的位置处的氨基酸是L,或对应于K409的位置处的氨基酸是R。

[0175] 在另一方面,本发明涉及用于产生多特异性抗体的方法,其包括:

a) 提供如上文所述的第一单特异性CD30抗体和第二抗体,所述第二抗体包含(i) CD3结合区,其包含第二重链可变区和第二轻链可变区,所述第二重链可变区包含分别示于SEQ ID NO:7、8和9中的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述第二轻链可变区包含分别示于SEQ ID NO:10、11和12中的CDR1、CDR2和CDR3序列,和(ii) 由第一和第二Fc多肽组成的Fc区,其中第一和第二Fc多肽包含对应于位置L234和L235处的氨基酸的氨基酸分别取代为F和E的取代,和对应于人IgG1重链中位置D265处的氨基酸的氨基酸取代为A的取代,

或

提供如上文所述的第二单特异性CD3抗体和第一抗体,所述第一抗体包含(i) CD30结合区,其包含第二重链可变区和第二轻链可变区,所述第二重链可变区包含分别示于SEQ ID NO:1、2和3中的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述第二轻链可变区包含分别示于SEQ ID NO:4、5和6中的CDR1、CDR2和CDR3序列,和(ii) 由第一和第二Fc多肽组成的Fc区,其中第一和第二Fc多肽包含对应于位置L234和L235处的氨基酸的氨基酸分别取代为F和E的取代,和对应于人IgG1重链中位置D265处的氨基酸的氨基酸取代为A的取代,

其中第一和第二抗体的第一和第二CH3区的序列不同,并且使得第一和第二CH3区之间的异二聚相互作用强于第一和第二CH3区的同二聚相互作用的每一个;其中优选地,在第一CH3区中对应于F405的位置处的氨基酸是L,且在第二CH3区中对应于K409的位置处的氨基酸是R,或反之亦然,

b) 在足以允许铰链区中的半胱氨酸经历二硫键异构化的还原条件下将第一抗体与第二抗体一起温育;和

c) 获得包含第一抗体的第一免疫球蛋白重链和第一免疫球蛋白轻链以及第二抗体的第二免疫球蛋白重链和第二免疫球蛋白轻链的多特异性抗体。

[0176] 在一个实施方案中,本发明涉及用于产生如本文中描述的多特异性抗体的方法,其包括:

a) 提供如本文中描述的第一单特异性CD30抗体和第二抗体,所述第二抗体包含(i) CD3结合区,其包含第二重链可变区和第二轻链可变区,所述第二重链可变区包含分别示于SEQ ID NO:7、8和9中的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述第二轻链可变区包含分别示于SEQ ID NO:10、11和12中的CDR1、CDR2和CDR3序列,和(ii) 由第一和第二Fc多肽组成的Fc区,其中第一和第二Fc多肽包含对应于位置L234和L235处的氨基酸的氨基酸分别取代为F和E的取代,和对应于人IgG1重链中位置D265处的氨基酸的氨基酸取代为A的取代,

其中第一和第二抗体的第一和第二CH3区的序列不同,并且使得第一和第二CH3区

之间的异二聚相互作用强于第一和第二CH3区的同二聚相互作用的每一个;其中优选地,在第一CH3区中对应于K409的位置处的氨基酸是R,且在第二CH3区中对应于F405的位置处的氨基酸是L,

b) 在足以允许铰链区中的半胱氨酸经历二硫键异构化的还原条件下将第一抗体与第二抗体一起温育;和

c) 获得包含第一抗体的第一免疫球蛋白重链和第一免疫球蛋白轻链以及第二抗体的第二免疫球蛋白重链和第二免疫球蛋白轻链的多特异性抗体。

[0177] 本发明进一步涉及通过如本文中描述的方法获得的多特异性抗体。

[0178] 在上述方法中,提供能够与CD30和/或CD3结合的第一或第二同二聚体抗体的步骤可包括以下步骤:

- 提供含有用于产生所述一种或多种抗体的表达载体的细胞;和
- 允许该细胞产生所述一种或多种抗体,并随后,
- 获得所述一种或多种抗体,由此提供所述一种或多种抗体。

[0179] 在该方法的一个实施方案中,所述第一和/或第二同二聚体抗体是全长抗体。

[0180] 第一和第二同二聚体抗体的Fc区可以是任何同种型,包括但不限于IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在该方法的一个实施方案中,所述第一和所述第二同二聚体抗体的Fc区均为IgG1同种型。在另一实施方案中,所述同二聚体抗体的Fc区之一是IgG1同种型,并且另一个是IgG4同种型。在后一实施方案中,所得双特异性抗体包含IgG1的Fc区和IgG4的Fc区,并由此可在效应功能的激活方面具有引人关注的中间性质。

[0181] 在另一实施方案中,同二聚体起始抗体之一已经工程化为不结合蛋白A,由此允许通过使产物通过蛋白A柱,除去流穿物并从蛋白A柱洗脱异二聚体抗体来分离异二聚体抗体与同二聚体起始抗体,以获得纯化的异二聚体抗体组合物。

[0182] 如上所述,同二聚体起始抗体的第一和第二CH3区的序列可以不同,并且使得所述第一和第二CH3区之间的异二聚相互作用强于所述第一和第二CH3区的同二聚相互作用的每一个。关于这些相互作用及可实现它们的更多细节在W02011131746和W02013060867 (Genmab) 中提供,其通过引用全文并入本文。

[0183] 特别地,基于分别结合CD30和CD3并在CH3区中仅含有少量相当保守的不对称突变的两种同二聚体起始抗体,使用本发明的上述方法可以以高产率获得稳定的双特异性CD3×CD30抗体。不对称突变意指所述第一和第二CH3区的序列在不相同的位置处含有氨基酸取代。

[0184] 本发明的多特异性(比如双特异性)抗体也可以通过在单个细胞中共表达编码第一和第二多肽的构建体来获得。

[0185] 由此,在另一方面,本发明涉及编码根据本发明的多特异性抗体的核酸构建体或核酸构建体的组合,并涉及包含此类核酸构建体的表达载体或表达载体的组合。

[0186] 此外,本发明涉及能够产生根据本发明的多特异性抗体的重组宿主细胞,其中宿主细胞包含编码根据本发明的多特异性抗体的一种或多种核酸构建体。

[0187] 因此,本发明还涉及用于产生根据本发明的多特异性抗体的方法,其包括:

- (i) 在产生抗体的条件下培养本发明的重组宿主细胞,和
- (ii) 从培养物中分离产生的多特异性抗体。

[0188] 在一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:

a) 提供编码包含第一抗体重链的第一Fc区和第一抗原结合区的第一多肽的第一核酸构建体,所述第一Fc区包含第一CH3区,

b) 提供编码包含第二抗体重链的第二Fc区和第二抗原结合区的第二多肽的第二核酸构建体,所述第二Fc区包含第二CH3区,

其中所述第一和第二CH3区的序列不同,并且使得所述第一和第二CH3区之间的异二聚相互作用强于所述第一和第二CH3区的同二聚相互作用的每一个,任选其中所述第一和第二核酸构建体编码所述第一和第二抗体的轻链序列,

c) 在宿主细胞中共表达所述第一和第二核酸构建体,和

d) 从细胞培养物获得所述异二聚体蛋白。

[0189] 优选地,在第一CH3区中对应于F405的位置处的编码的氨基酸是L,并且在第二CH3区中对应于K409的位置处的编码的氨基酸是R,或反之亦然。

[0190] 用于产生抗体的合适表达载体(包括启动子、增强子等)和合适宿主细胞是本领域公知的。宿主细胞的实例包括酵母、细菌和哺乳动物细胞,比如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或人细胞,比如人胚肾(HEK)细胞。

[0191] 如本文中定义的核酸或一种或多种核酸可以是RNA或DNA。如本文中定义的核酸或一种或多种核酸可用于在哺乳动物细胞中表达。因此,本发明进一步提供了一种或多种细胞,其包含如本文中定义的核酸或包含如本文中定义的一种或多种核酸。

[0192] 本发明的上下文中的核酸可以是表达载体,其可以是任何合适的载体,包括染色体、非染色体和合成核酸载体(包含一组合适的表达控制元件的核酸序列)。此类载体的实例包括SV40的衍生物、细菌质粒、噬菌体DNA、杆状病毒、酵母质粒、衍生自质粒和噬菌体DNA的組合的载体和病毒核酸(RNA或DNA)载体。在一个实施方案中,编码CD30或CD3抗体的核酸包含在包括例如线性表达元件的裸DNA或RNA载体(如例如在Sykes和Johnston, Nat Biotech 17,355-59(1997)中描述的)、紧凑型核酸载体(如例如在US 6,077,835和/或WO 00/70087中描述的)、质粒载体,比如pBR322、pUC 19/18或pUC 118/119、“蚊式(midge)”最小尺寸的核酸载体(如例如在Schakowski等人, Mol Ther 3,793-800(2001)中描述的)中,或作为沉淀的核酸载体构建体,比如CaPO₄沉淀的构建体(如例如在W0200046147, Benvenisty和Reshef, PNAS USA 83,9551-55(1986), Wigler等人, Cell 14,725(1978), 以及Coraro和Pearson, Somatic Cell Genetics 7,603(1981)中描述的)。此类核酸载体及其用途是本领域公知的(参见例如美国专利号US 5,589,466和US 5,973,972)。

[0193] 在一个实施方案中,载体适于在细菌细胞中表达CD30抗体和/或CD3抗体。此类载体的实例包括表达载体,比如BlueScript(Stratagene)、pIN载体(Van Heeke&Schuster, J Biol Chem 264,5503-5509(1989)、pET载体(Novagen, Madison WI)等。

[0194] 表达载体也可以或备选地是适于在酵母系统中表达的载体。可以使用适于在酵母系统中表达的任何载体。合适的载体包括例如包含组成型或诱导型启动子,比如 α 因子、醇氧化酶和PGH的载体(综述于:F.Ausubel等人编辑, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience New York(1987), 和Grant等人, Methods in Enzymol 153,516-544(1987)中)。

[0195] 核酸和/或表达载体还可以包含编码分泌/定位序列的核酸序列,所述分泌/定位

序列可以将多肽(比如新生多肽链)靶向至周质空间或细胞培养基中。此类序列是本领域已知的,并包括分泌前导肽或信号肽。核酸和/或表达载体可以包含促进表达(即核酸的转录和/或翻译)的任何合适的元件,使得表达(双特异性)抗体的组分。核酸和/或载体与任何合适的启动子、增强子和其他表达促进元件缔合。此类元件的实例包括强表达启动子(例如人CMV IE启动子/增强子以及RSV、SV40、SL3 3、MMTV和HIV LTR启动子)、有效的多聚(A)终止序列、大肠杆菌中质粒产物的复制起点、作为可选标志物的抗生素抗性基因和/或方便的克隆位点(例如多聚接头)。核酸还可以包含与组成型启动子(比如CMV IE)相反的诱导型启动子。

组合物和(医疗)用途

[0196] 此外,本发明提供了包含如本文中定义的抗体的组合物。优选地,此类组合物是药物组合物,即抗体包含在可药用载体中。

[0197] 药物组合物可以根据常规技术配制,所述常规技术比如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第19版,Gennaro编辑,Mack Publishing Co.,Easton,PA,1995中公开的那些。本发明的药物组合物可以例如包括稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、洗涤剂(例如非离子洗涤剂,比如吐温-20或吐温-80)、稳定剂(例如糖或非蛋白氨基酸(protein-free amino acid))、防腐剂、组织固定剂、增溶剂和/或适于包含在药物组合物中的其他材料。

[0198] 药物组合物可以通过任何合适的途径和模式施用。在一个实施方案中,药物组合物通过静脉内或皮下注射或输注施用。

[0199] 根据本发明的抗体、组合物或药物组合物优选用作药物。

[0200] 根据本发明的抗体、组合物或药物组合物优选用于治疗疾病。

[0201] 特别地,本发明的双特异性抗体可用于治疗各种形式的癌症。

[0202] 在一方面,本发明提供了用于治疗受试者的癌症的方法,该方法包括施用治疗有效量的本发明的多特异性抗体。在另一实施方案中,本发明提供了用于治疗受试者中涉及表达CD30的细胞的病症的方法,该方法包括施用治疗有效量的本发明的多特异性抗体。

[0203] 如所述,可以在根据本发明的方法和用途中考虑的合适的疾病是癌症。所述癌症最优选以CD30的表达为特征。癌症中CD30的表达可使用本领域已知的方法(比如PCR、免疫染色或FACS分析),即检测CD30转录物和/或蛋白的表达容易地确定。能够与人CD30结合的如本文中描述的抗体可用于例如免疫染色和/或FACS分析等。

[0204] 在一方面,本发明涉及用于治疗霍奇金淋巴瘤或间变性大细胞淋巴瘤的根据本发明的多特异性抗体、组合物或药物组合物。

[0205] 在另一方面,本发明涉及用于治疗霍奇金淋巴瘤(HL)或非霍奇金淋巴瘤(NHL)的根据本发明的多特异性抗体、组合物或药物组合物。

[0206] 在一个实施方案中,霍奇金淋巴瘤是经典型霍奇金淋巴瘤(cHL)。

[0207] 在一个实施方案中,非霍奇金淋巴瘤是T细胞非霍奇金淋巴瘤(T-NHL)或B细胞非霍奇金淋巴瘤(B-NHL)。在另一实施方案中,非霍奇金淋巴瘤是T细胞非霍奇金淋巴瘤(T-NHL)。

[0208] 在另一实施方案中,T细胞非霍奇金淋巴瘤是外周T细胞淋巴瘤(PTCL)或皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)。在又一实施方案中,T细胞非霍奇金淋巴瘤(T-NHL)是间变性大细胞淋巴

瘤 (ALCL)。在又一实施方案中,外周T细胞淋巴瘤 (PTCL) 是间变性大细胞淋巴瘤 (ALCL)。

[0209] 在一个实施方案中,B细胞非霍奇金淋巴瘤 (B-NHL) 是套细胞淋巴瘤 (MCL)。

[0210] 在再一实施方案中,霍奇金淋巴瘤 (HL) 是复发性和难治性霍奇金淋巴瘤。在另一实施方案中,霍奇金淋巴瘤 (HL) 是CD30+霍奇金淋巴瘤。在又一实施方案中,霍奇金淋巴瘤 (HL) 是复发性和难治性CD30+霍奇金淋巴瘤。在再一实施方案中,霍奇金淋巴瘤 (HL) 是复发性和难治性CD30+经典型霍奇金淋巴瘤。

[0211] 在再一实施方案中,非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 是复发性和难治性非霍奇金淋巴瘤。在另一实施方案中,非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 是CD30+非霍奇金淋巴瘤。在又一实施方案中,非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 是复发性和难治性CD30+非霍奇金淋巴瘤。

[0212] 在另一实施方案中,用于治疗霍奇金淋巴瘤 (HL) 或非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 的根据本发明的多特异性抗体、组合物或药物组合物静脉内和/或皮下施用,优选皮下施用。

[0213] 在另一实施方案中,可对被诊断患有癌症的患者进行癌细胞中CD30表达的评估,并在检测到CD30 (其可以在低至高的范围内) 时,可以选择此类患者用根据本发明的抗体治疗。然而,在选择患者进行治疗时可能不一定需要包括此类评估。

[0214] 本发明的多特异性抗体具有许多体外和体内诊断和治疗效用,包括诊断和治疗涉及表达CD30的细胞的病症。例如,可以将抗体施用于培养物中的细胞 (例如体外或离体) 或施用于受试者 (例如体内),以治疗、预防和/或诊断各种病症。如本文中使用的术语“受试者”旨在包括人和非人个体。

[0215] 在一方面,本发明涉及诊断组合物,其包含根据如本文中公开的任一实施方案的多特异性抗体。

[0216] 在一个实施方案中,诊断组合物是伴随诊断剂,其用于筛选和选择将受益于用多特异性抗体治疗的那些患者。

试剂盒

[0217] 本发明进一步提供了包含如上文公开的抗体的成套试剂盒,比如用作伴随诊断剂/用于在患者群体内鉴定对用如上定义的抗体治疗具有响应倾向的那些患者,或用于预测所述抗体在用于治疗患者时的效力或抗肿瘤活性的试剂盒,该试剂盒包含如上定义的抗体;以及所述试剂盒的使用说明书。

[0220] 在一个实施方案中,本发明提供了用于诊断癌症的试剂盒,其包含容器,所述容器包含多特异性CD3×CD30抗体和一种或多种用于检测表达CD30的细胞和表达CD3的细胞的交联的试剂。试剂可包括例如荧光标签、酶标签或其他可检测标签。试剂还可包括用于酶促反应的二抗或三抗或试剂,其中酶促反应产生可以可视化的产物。

[0221] 在另一方面,本发明涉及用于在施用根据如本文中公开的任一实施方案的多特异性抗体后,检测来源于患者的样品中是否发生表达CD30的细胞与表达CD3的细胞之间的交联的方法,其包括以下步骤:

(i) 使样品与根据如本文中公开的任一实施方案的多特异性抗体在允许在所述双特异性抗体和表达CD30的细胞和表达CD3的细胞之间形成复合物的条件下接触;以及

(ii) 分析是否已形成复合物。

核酸构建体的递送和递送媒介物

[0222] 在另一方面,本发明涉及施用用于体内表达的编码本发明的抗体的核酸构建体。

对于编码抗体的核酸的体内表达,所述核酸通常以适于核酸进入受试者的细胞的形式施用。存在用于递送用于体内表达的核酸的不同方法,并且包括涉及机械和化学手段的两种方法。例如,此类方法可涉及电穿孔或将核酸刺(tattoo)到皮肤上(Patel等人,2018,Cell Reports 25,1982-1993)。适于向受试者施用核酸的其他方法包括在合适的制剂中施用核酸。

[0223] 由此,本发明还涉及包含根据本发明的核酸或核酸的組合的递送媒介物。在一些实施方案中,所述递送媒介物可以是脂质制剂。该制剂的脂质可以是颗粒,比如脂质纳米颗粒(LNP)。本发明的核酸或核酸的組合可以包封在所述颗粒内,例如包封在所述LNP内。适于向受试者施用用于体内表达的核酸的不同脂质制剂是本领域技术人员公知的。例如,所述脂质制剂通常可包含脂质、可电离的氨基脂质、PEG-脂质、胆固醇或其任意組合。

[0224] 用于制备适于向受试者施用用于表达治疗性抗体的核酸的脂质制剂的各种形式和方法是本领域公知的。此类脂质制剂的实例包括但不限于US20180170866(Arcturus)、EP2391343(Arbutus)、WO 2018/006052(Protiva)、WO2014152774(Shire Human Genetics)、EP 2972 360(Translate Bio)、US10195156(Moderna)和US20190022247(Acuitas)中描述的那些。

[0225] 因此,在另一方面,本发明涉及用作药物,优选用于治疗癌症,比如用于治疗霍奇金淋巴瘤或间变性大细胞淋巴瘤的根据本发明的核酸构建体或根据本发明的递送媒介物。

[0226] 通过以下实施例进一步说明本发明,这些实施例不应解释为限制本发明的范围。
实施例

[0227] 实施例1——通过2-MEA诱导的Fab臂交换产生CD3×CD30双特异性抗体
在实施例中使用以下抗体:
人源化CD3抗体

[0228] 如WO2015/001085(Genmab)的实施例1中所述的IgG1-huCD3-H1L1。IgG1-huCD3-H1L1在本文中称为“IgG1-huCD3”。

[0229] 如WO2017/009442(Genmab)的实施例2中所述的IgG1-huCD3-H1L1-H101G。IgG1-huCD3-H1L1-H101G在本文中称为“IgG1-huCD3-H101G”。

CD30抗体

[0230] MDX-060(也称为HuMab 5F11)已经公开在WO2003/059282(Medarex)中。hAC10(或SGN-30)已经公开在US 8257706和US20100239571(Seattle genetics)中。HRS-3已经公开在WO2016/0177846(Affimed)中。HeFi-1、T405、T105、T408和T215已经公开在WO2007/040653(US government&Health)中。

抗体表达

[0231] 将抗体序列克隆到pcDNA3.3表达载体(Invitrogen,US)中并表达为IgG1, κ 或IgG1, λ ,在Fc结构域中具有或不具有Fc沉默和/或DuoBody®技术氨基酸取代(参见下文)。基本如制造商所述,通过使用ExpiFectamine™ 293(Thermo Fisher Scientific;目录号A14525)在Expi293F™细胞(Thermo Fisher Scientific,US;目录号A14527)中共转染相关重链和轻链表达载体,在无血清条件下产生所有抗体。

产生双特异性抗体

[0232] 使用DuoBody®平台技术,即如WO2011147986、WO2011131746和WO2013060867

(Genmab) 以及 Labrijn 等人 (Labrijn 等人, PNAS 2013, 110:5145-50; Gramer 等人, MAbs 2013, 5:962-973) 中所述的 2-MEA 诱导的受控的 Fab 臂交换 (cFAE) 在体外产生双特异性抗体。为了使得能够通过该方法产生双特异性抗体, 产生在 CH3 结构域中携带单个突变的 IgG1 分子: 在一个亲本 IgG1 抗体中, 为 F405L 突变 (即 CD3 抗体或对照, HIV-1gp120 特异性抗体), 在另一亲本 IgG1 抗体中, 为 K409R 突变 (即 CD30 或对照抗体)。除了这些突变之外, 亲本 IgG1 抗体包括导致 Fc 结构域不能与 IgG Fc 受体 (Fc γ 受体) 和/或补体因子, 比如 C1q 相互作用的取代: L234F、L235E、D265A (FEA; US2015/0337049) 或 L234F、L235E、G236R (FER)。

[0233] Fc 沉默和 DuoBody® 技术突变的组合指定如下:

L234F、L235E、D265A 和 F405L: FEAL

L234F、L235E、D265A 和 K409R: FEAR

L234F、L235E、G236R 和 K409R: FERR

亲本抗体的重链 (HC) 和轻链 (LC) 序列示于以下 SEQ ID NO 中:

IgG1-huCD3-FEAL: SEQ ID NO:19 (HC) 和 SEQ ID NO:20 (LC)。

IgG1-huCD3-H101G-FEAL: SEQ ID NO:35 (HC) 和 SEQ ID NO:20 (LC)。

IgG1-CD30-MDX060-FERR: SEQ ID NO:17 (HC) 和 SEQ ID NO:18 (LC)。

IgG1-CD30-MDX060-FAER: SEQ ID NO:55 (HC) 和 SEQ ID NO:18 (LC)。

IgG1-CD30-hAC10-FAER: SEQ ID NO:21 (HC) 和 SEQ ID NO:22 (LC)。

IgG1-CD30-HRS-3-FAER: SEQ ID NO:23 (HC) 和 SEQ ID NO:24 (LC)。

IgG1-CD30-HeFi-I-FAER: SEQ ID NO:25 (HC) 和 SEQ ID NO:26 (LC)。

IgG1-CD30-T405-FAER: SEQ ID NO:27 (HC) 和 SEQ ID NO:28 (LC)。

IgG1-CD30-T105-FAER: SEQ ID NO:29 (HC) 和 SEQ ID NO:30 (LC)。

IgG1-CD30-T408-FAER: SEQ ID NO:31 (HC) 和 SEQ ID NO:32 (LC)。

IgG1-CD30-T215-FAER: SEQ ID NO:33 (HC) 和 SEQ ID NO:34 (LC)。

[0234] 为了产生双特异性抗体, 将两种亲本抗体以等摩尔比在 PBS 缓冲液 (磷酸盐缓冲盐水; 8.7mM HPO_4^{2-} , 1.8mM H_2PO_4^- , 163.9mM Na^+ , 140.3mM Cl^- , pH 7.4) 中混合。加入 2-巯基乙醇-HCl (2-MEA) 至终浓度为 75mM, 并且将反应混合物在 31°C 下温育 5 小时。根据制造商的方案, 使用 10kDa 分子量截止的 Slide-A-Lyzer 架 (Thermo Fisher Scientific) 通过透析到 PBS 缓冲液中来除去 2-MEA。将样品在 4°C 下储存过夜以允许二硫键的再氧化和完整双特异性抗体的形成。如 Gramer 等人 (MAbs. 2013 年 11 月 1 日; 5(6):962-973.) 所述, 如通过电喷雾电离质谱 (ESI-MS) 评估的 cFAE 的效力 >95%。

非结合对照抗体 b12

[0235] IgG1-b12 是 HIV-1gp120 特异性抗体 (Barbas, CF. J Mol Biol. 1993 年 4 月 5 日; 230(3):812-23), 其在一些实施例中用作阴性、非结合对照抗体。重链的序列和轻链的序列分别作为 SEQ ID NO:36 和 37 (FEAL) 或分别作为 SEQ ID NO:38 和 37 (FERR) 包括在本文中。

[0236] 实施例 2——人霍奇金淋巴瘤 (HL)、间变性大细胞淋巴瘤 (ALCL) 和 TLL 细胞系中的 CD30 表达

使用定量流式细胞术 (人 IgG 校准试剂盒, Biocytex, 目录号 CP010) 在一组 HL、ALCL 和 TLL 细胞系中评估 CD30 表面表达水平 (表 4)。将细胞 (5×10^4 个细胞/孔) 在聚苯乙烯 96 孔圆底板 (Greiner bio-one, 目录号 650180) 中与 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IgG1-CD30-MDX060-FERR 一起在 50

μL染色缓冲液(补充有0.1%牛血清白蛋白[BSA,fraction V,Roche,目录号10735086001]和0.02%NaN₃[Sigma Aldrich,目录号13412]的PBS[Lonza,目录号BE17-517Q])中在4℃下温育30分钟。平行地,基本上根据制造商的说明书,使用人IgG校准试剂盒(Biocytext,目录号CP010)生成标准曲线。将每个珠粒含有明确数量的人IgG单克隆抗体的校准珠粒与相同的R-PE缀合的二抗(Jackson ImmunoResearch,UK;目录号109-116-098;1:500稀释)一起在4℃下避光温育30分钟。将细胞和珠粒在FACS缓冲液中洗涤,并在FACSCelesta流式细胞仪(BDBiosciences,USA)上通过流式细胞术进行分析。使用GraphPad Prism软件,将使用人IgG校准试剂盒获得的标准曲线用于内插每个细胞的结合的IgG1-CD30-MDX060-FERR抗体的数量(ABC),其表示在细胞表面上表达的CD30分子数量的估计。

[0237] 表4和5显示,在除SUP-T1之外的所有细胞系中观察到高于定量下限(LL0Q)的CD30表达。

[0238] 表4:细胞系和CD30表达的概述

细胞系	肿瘤类型	目录	供应商	CD30 表达(ABC)		
				中值	范围	n
L-540	HL	ACC 72	DSMZ	145,723	61,779-271,304	3
L-428	HL	ACC 197	DSMZ	120,725	102,787-133,437	3
HDLM-2	HL	CRL-2965	ATCC	56,578	51,737-87,841	3
KM-H2	HL	ACC 8	DSMZ	19,720	17,283-29,129	3
NCEB-1	MCL	CRL-3005	ATCC	15,406	11,102-18,333	3
L-1236	HL	ACC 530	DSMZ	4,548	4,054-4,838	3
L-82	ALCL	ACC 597	DSMZ	127,616	70,495-172,019	3
SR-786	ALCL	ACC 369	DSMZ	104,947	69,630-133,464	3
KI-JK	ALCL	ACC 695	DSMZ	124,669	77,610-139,598	3
DEL	ALCL	ACC 338	DSMZ	122,003	55,416-153,484	3
SUP-M2	ALCL	ACC 509	DSMZ	6,129	37,047-93,777	3
SU-DHL-1	ALCL	ACC 356	DSMZ	75,238	72,529-80,697	2
HuT 78	ALCL	TIB-161	ATCC	19,399	20,608-18,189	2
SUP-T1	TLL	CRL-1942	ATCC	<LLOQ ^a	-	3

表5:细胞系和平均CD30表达的概述

细胞系	肿瘤类型	目录	供应商	CD30 表达(ABC)		
				平均	范围	n
DEL	ALCL	ACC 338	DSMZ	110,301	55,416-153,484	3
DL-40	ALCL	JCRB1337	JCRB	98,174	60,392-156,229	3
HDLM-2	HL	CRL-2965	ATCC	64,510	51,737-87,841	3
HH	CTCL	ACC 707	DSMZ	161,740	122,598-206,774	3
HuT 78	ALCL	TIB-161	ATCC	19,399	20,608-18,189	2
JVM-2	MCL	ACC 12	DSMZ	25,842	12,644-43,081	3
KARPAS-299	ALCL	06072604	PHE	91,426	77,730-106,058	3
KI-JK	ALCL	ACC 695	DSMZ	118,794	77,610-139,598	3
KM-H2	HL	ACC 8	DSMZ	22,044	17,283-29,129	3
L-1236	HL	ACC 530	DSMZ	4,480	4,054-4,838	3
L-428	HL	ACC 197	DSMZ	117,743	102,787-133,437	3
L-540	HL	ACC 72	DSMZ	159,602	61,779-271,304	3
L-82	ALCL	ACC 597	DSMZ	127,616	70,495-172,019	3
NCEB-1	MCL	CRL-3005	ATCC	14,947	11,102-18,333	3
SR-786	ALCL	ACC 369	DSMZ	104,497	69,630-133,464	3
SU-DHL-1	ALCL	ACC 356	DSMZ	76,613	72,529-80,697	2
SUP-M2	ALCL	ACC 509	DSMZ	66,129	37,047-93,777	3
SUP-T1	TLL	CRL-1942	ATCC	<LLOQ ^a	-	3

^a<LLOQ, 低于定量下限 (3300ABC)

[0239] 实施例3——CD3×CD30双特异性抗体与人霍奇金淋巴瘤 (HL) 和非霍奇金淋巴瘤 (NHL), 比如间变性大细胞淋巴瘤 (ALCL) 细胞的结合

通过流式细胞术分析CD3×CD30双特异性抗体与两种表达CD30的人肿瘤细胞系SU-DHL-1 (ALCL; ATCC, 目录号ACC 356) 和HDLM-2 (HL; ATCC, 目录号CRL-2965) 的结合。

[0240] 将细胞 (3×10^4 个细胞/孔) 在聚苯乙烯96孔圆底板 (Greiner bio-one, 目录号650180) 中与抗体的连续稀释物 (以3倍稀释级范围0.0046至10 μ g/mL) 一起在50 μ L染色缓冲液中在4℃下温育30分钟。在染色缓冲液中洗涤两次后, 将细胞与50 μ L二抗一起在4℃下温育30分钟。作为二抗, 使用在染色缓冲液中1:400稀释的R-PE缀合的山羊抗人IgG (Jackson ImmunoResearch, UK; 目录号109-116-098)。接下来, 将细胞在染色缓冲液中洗涤两次, 重悬在补充有T0-PRO-3碘化物 (Thermo Fisher Scientific; 目录号T3605; 1:8000稀释) 的100 μ L染色缓冲液中, 并在FACSCelesta流式细胞仪 (BD Biosciences, USA) 上进行分析。基于FSC/SSC和不存在T0PRO-3染色对活细胞进行门控。使用GraphPad Prism V7.02软件 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), 通过对数转换数据的非线性回归 (具有可变斜率的S形剂量反应, 四个参数) 分析结合曲线。

结果

[0241] 图1显示了CD3×CD30双特异性抗体bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FEAR (A)、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-hAC10-FEAR (B)、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-HRS-3-FEAR (C)、BsG1-huCD3-FEAL×CD30-HeFi-I-FEAR (D)、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-T405-FEAR (E)、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-T105-FEAR (F)、BisIgG1-huCD3-FEAL×CD30-T408-FEAR (G) 和bsG1-huCD3-FEAL×CD30-T215-FEAR (H) 与SU-DHL-1 (左图) 和HDLM-2 (右图) 肿瘤细胞的剂量反应结合曲线。

[0242] 在1.11 μ g/mL的浓度下, 当与单特异性二价CD30亲本抗体IgG1-CD30-MDX060-

FEAR、IgG1-CD30-hAC10-FEAR、IgG1-CD30-HRS-3-FEAR和IgG1-CD30-T105-FEAR的结合相比时,bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-hAC10-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-HRS-3-FEAR和bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-T105-FEAR表现出相似的结合(图1I)。

[0243] 相比之下,在1.11 μ g/mL的浓度下,bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-T405-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-T408-FEAR和bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-T215-FEAR的结合低于单特异性二价CD30亲本抗体IgG1-CD30-T405-FEAR、IgG1-CD30-T408-FEAR和IgG1-CD30-T215-FEAR与SU-DHL-1和HDLM-2细胞的结合(图1I)。

[0244] 总体上,在1.11 μ g/mL的浓度下的bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-hAC10-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-HRS-3-FEAR、BsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-HeFi-I-FEAR和bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-T105-FEAR的结合高于相同浓度下的bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-T405-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-T408-FEAR和bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-T215-FEAR的结合(图1I)。

[0245] 包括在这些实验中的阴性对照抗体BsG1-huCD3-FEAL $\times$ b12-FEAR未显示与SU-DHL-1和HDLM-2细胞的结合,这表示SU-DHL-1和HDLM-2细胞均不表达CD3。

[0246] 总之,与二价形式相比,CD30抗体克隆T405、T408和T215在单价形式中显示出降低的结合,而克隆MDX060、hAC10、HRS-3和T105在单价和二价形式二者中均显示出与表达CD30的肿瘤细胞的有效结合。

[0247] 图2显示了bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR与(A) HDLM-2 (HL)、(B) L-428 (HL)、(C) DEL (ALCL) 和(D) KI-JK (ALCL) 细胞的剂量反应结合曲线。当与单特异性二价CD30亲本抗体IgG1-CD30-MDX060-FERR相比时,BsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR表现出类似的最大结合。阴性对照抗体bsG1-huCD3-FEAL $\times$ b12-FEAR、IgG1-huCD3-FEAL和IgG1-b12-FEAL未显示与这些细胞系中任一种的结合,这表示这些细胞在细胞表面上不表达CD3。这些数据证实了bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR与HL和ALCL细胞系的有效结合。

[0248] 表6显示了如在两个独立实验中评估的bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FEAR与HDLM-2、L-428、DEL和KI-JK细胞的结合的EC₅₀值。EC₅₀值的范围在0.05至0.30 μ g/mL之间。

[0249] 表6:bsG1-huCD3 $\times$ CD30-MDX060的结合的EC₅₀值

细胞系	EC ₅₀ (μ g/mL)	
	N=1	N=2
HDLM-2	0.1450	0.1197
L-428	0.1539	0.0705
DEL	0.3018	0.0568
KI-JK	0.1602	0.0735

[0250] 图8、9和10显示了bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR与表达CD30的HL细胞系(图8)、ALCL细胞系(图9)和NHL细胞系(图10)的剂量反应结合曲线。在所有细胞系中,与单价对照抗体BsG1-b12-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR相比,BsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR表现出类似的最大结合。单特异性二价CD30亲本抗体IgG1-CD30-MDX060-FERR显示出与所有细胞系的剂量依赖性结合,但与BsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR相比显示出较低的最大结合。阴性对照抗体bsG1-huCD3-FEAL $\times$ b12-FEAR、IgG1-huCD3-FEAL和IgG1-b12-FEAL未显示与这些细胞系中任一种的结合,这表示这些细胞在细胞表面上不表达CD3。

这些数据证实了bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR与HL细胞系、T-NHL,比如ALCL和CTCL细胞系、以及B-NHL,比如MCL细胞系的有效结合。

[0251] 表7显示了如在2个或3个独立实验中评估的bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR与HL、T-NHL和B-NHL细胞系的结合的EC₅₀值。EC₅₀值的范围在0.12至0.35 μ g/mL之间。

[0252] 表7:bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR的结合的EC₅₀值

细胞系		CD30 结合		
名称	癌症类型	平均结合 EC ₅₀	结合 EC ₅₀ (μ g/mL)范围	n 次测试
L-540	HL	0.3229	0.2020 - 0.4694	3
L-428	HL	0.1743	0.1742 - 0.1744	2
KM-H2	HL	0.1587	0.1405 - 0.1824	3
L-1236	HL	0.2019	0.1628 - 0.2247	3
HDLM-2	HL	0.1674	0.1253 - 0.2206	3
L-82	ALCL	0.1999	0.1845 - 0.2153	2
SR-786	ALCL	0.3279	0.1735 - 0.5499	3
KI-JK	ALCL	0.1914	0.1431 - 0.2582	3
SUP-M2	ALCL	0.1667	0.1336 - 0.2225	3
DL-40	ALCL	0.2364	0.1698 - 0.3472	3
DEL	ALCL	0.2011	0.1430 - 0.2674	3
KARPAS-299	ALCL	0.2015	0.1343 - 0.2686	2
SUP-T1	TLL	0.3458	0.2572 - 0.4344	2
JVM-2	MCL	0.1257	0.1068 - 0.1411	3
NCEB-1	MCL	0.1564	0.1180 - 0.2000	3
HH	CTCL	0.1951	0.1559 - 0.2425	3

[0253] 实施例4——通过CD3 $\times$ CD30双特异性抗体体外诱导T细胞介导的细胞毒性和T细胞增殖

使用CD30阳性肿瘤细胞系作为靶细胞和T细胞作为效应细胞,在体外细胞毒性测定中测试CD3 $\times$ CD30双特异性抗体。作为T细胞的来源,使用CD3阳性ADCC效应细胞IV型(Clean Cells, Montaigne, France)或纯化的T细胞(如实施例5中所述)来评估CD3依赖性肿瘤细胞杀伤。

[0254] 将SU-DHL-1 (ALCL)、HuT78 (ALCL)、HDLM-2 (HL)、NCEB-1 (MCL) 或L540 (HL) 细胞以10,000个细胞/孔的密度接种到聚苯乙烯96孔圆底板(Greiner bio-one, 目录号650180)中。效应细胞用0.5 μ M CFSE(羧基荧光素琥珀酰亚胺酯;Cell Signalling Technology, Danvers, MA; 目录号C34554)在37 $^{\circ}$ C下标记20分钟,并以E:T比=10:1 (ADCC效应细胞)或7:1 (纯化的T细胞)添加到肿瘤细胞中。加入双特异性CD3 $\times$ CD30、b12 $\times$ CD30或CD3 $\times$ b12抗体或单特异性二价CD30抗体的连续稀释物(最终浓度范围从10至0.041 μ g/mL;3倍稀释),并将细胞在37 $^{\circ}$ C下温育72小时。在一些实验中,使用具有含H101G突变的CD3结合臂的bsG1-huCD3-

FEAL×CD30-MDX060-FEAR的变体,所述CD3结合臂对CD3具有降低的亲合力(WO2017/009442, Genmab)。在100 μ L染色缓冲液中洗涤两次后,将细胞重悬在含有T0-PRO-3碘化物(Thermo Fisher Scientific;目录号T3605;1:4000稀释)的染色缓冲液中,并在FACSCelesta流式细胞仪(BD Biosciences, USA)上进行分析。

[0255] 将用5 μ M十字孢碱(Sigma-Aldrich, US, 目录号S6942)处理的肿瘤细胞样品的活力设定为0%,并且将未处理的肿瘤细胞样品的活力设定为100%。

[0256] “活细胞百分比”如下计算:

$$\% \text{活细胞} = ([\text{样品的细胞数} - \text{十字孢碱处理的靶细胞的细胞数}] / [\text{未处理的靶细胞的细胞数} - \text{十字孢碱处理的靶细胞的细胞数}]) \times 100。$$

[0257] 计数作为T细胞绝对数量的量度的CFSE阳性细胞以评估T细胞增殖。

[0258] 使用GraphPad Prism V8软件(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)通过非线性回归(具有可变斜率的S形剂量反应)分析剂量反应曲线。

结果

[0259] 使用CD30阳性肿瘤细胞系SU-DHL-1细胞或HDLM-2细胞作为靶细胞和ADCC效应细胞IV型细胞(Clean Cells, Montaigu, France)作为效应细胞,在体外细胞毒性测定中测试CD3×CD30双特异性抗体。

[0260] 图3显示了bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FEAR(A)、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-hAC10-FEAR(B)、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-HRS-3-FEAR(C)、BsG1-huCD3-FEAL×CD30-HeFi-I-FEAR(D)、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-T405-FEAR(E)、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-T105-FEAR(F)、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-T408-FEAR(G)和bsG1-huCD3-FEAL×CD30-T215-FEAR(H)诱导的对SU-DHL-1(左图)或HDLM-2(右图)细胞的剂量依赖性T细胞介导的细胞毒性(显示为活细胞%的降低)。

[0261] 单特异性二价CD30抗体IgG1-MDX060-FEAR(A)、IgG1-CD30-hAC10-FEAR(B)、IgG1-CD30-HRS-3-FEAR(C)、IgG1-CD30-HeFi-I-FEAR(D)、IgG1-CD30-T405-FEAR(E)、IgG1-CD30-T105-FEAR(F)、IgG1-CD30-T408-FEAR(G)和IgG1-CD30-T215-FEAR(H)不诱导T细胞介导的细胞毒性。对照抗体bsG1-huCD3-FEAL×b12-FEAR也不诱导对SU-DHL-1或HDLM-2细胞的T细胞介导的细胞毒性。

[0262] 此外,使用不同的MCL、ALCL和HL细胞系作为靶细胞并使用纯化的T细胞或ADCC效应细胞IV型细胞作为效应细胞,在体外细胞毒性测定中测试了CD3×CD30双特异性抗体。图4A-B显示,与带有具有降低亲和力的CD3结合臂的bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FEAR的变体(bsG1-huCD3-H101G-FEAL×CD30-MDX060-FEAR)相比,通过bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FEAR诱导的对SU-DHL-1、HuT78或NCEB-1细胞的T细胞介导的细胞毒性更有效。通过bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FEAR和bsG1-huCD3-H101G-FEAL×CD30-MDX060-FEAR诱导了类似的对HDLM-2细胞的最大T细胞介导的细胞毒性(图4B)。与作为对照包括的二价单特异性抗体IgG1-huCD3-FEAL或IgG1-b12-FEAR一起温育未在这些细胞系中诱导细胞毒性。在测试的最低浓度(0.014 μ g/mL;图4C)下,bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FEAR和bsG1-huCD3-H101G-FEAL×CD30-MDX060-FEAR诱导了有效和类似的对L540细胞的T细胞介导的细胞毒性。对照抗体bsG1-b12-FEAL×CD30-MDX060-FEAR或IgG1-MDX060-FEAR不诱导对L540细胞的T细胞介导的细胞毒性。

[0263] 总之,bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FEAR诱导对各种表达CD30的MCL、ALCL和HL肿瘤细胞系的有效杀伤。与具有在位置101处含有G的较低亲和力CD3臂的变体相比,在CD3臂的VH CDR3的位置101处含有H的bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FEAR在杀伤表达CD30的MCL和ALCL肿瘤细胞方面更有效。

[0264] 在使用HDLM-2细胞(左图)或NCEB-1细胞(右图)作为靶细胞的细胞毒性测定中,评估作为绝对T细胞计数的量度的CFSE阳性细胞的数量。图4D显示了通过bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FEAR或bsG1-huCD3-H101G-FEAL×CD30-MDX060-FEAR诱导的对HDLM-2和NCEB-1细胞的T细胞介导的细胞毒性(参见图4B)与T细胞计数的剂量依赖性增加相关。通常,在该测定中,在与bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FEAR或bsG1-huCD3-H101G-FEAL×CD30-MDX060-FEAR一起温育后,计数相似的T细胞数量。在具有与浓度高于1μg/mL的bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FEAR一起温育的NCEB-1细胞的共培养物中注意到T细胞数量减少。在这些实验中,对照抗体IgG1-b12-FEAL不影响T细胞计数。

[0265] 总之,BsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FEAR在各种表达CD30的ALCL、HL和MCL肿瘤细胞系的存在下诱导T细胞增殖。

[0266] 实施例5——CD3×CD30双特异性抗体与Expi293F细胞中表达的人、食蟹猴或恒河猴CD30的结合

通过流式细胞术分析双特异性CD3×CD30抗体和单特异性二价CD30抗体与用人CD30或食蟹猴CD30瞬时转染的Expi293细胞的质膜的结合。

人、食蟹猴或恒河猴CD30在HEK-293F或HEK-293细胞中的瞬时表达

[0267] 产生用于表达各种全长CD30变体的以下密码子优化的构建体:人(智人)CD30(huCD30;Uniprot登记号P28908)、食蟹猴(*cynomolgus monkey*) (食蟹猴(*Macaca fascicularis*))CD30(mfCD30;Uniprot登记号A0A2K5VW07)(SEQ ID NO:40)和恒河猴(*rhesus monkey*) (恒河猴(*Macaca mulatta*))CD30(mmCD30;Uniprot登记号A0A1D5RK03)(SEQ ID NO:41)。构建体含有用于克隆的合适限制性位点和最佳Kozak(GCCGCCACC)序列(Kozak,M.,Gene1999;234(2):187-208)。将全长人CD30、食蟹猴和恒河猴CD30密码子优化的构建体克隆到哺乳动物表达载体pcDNA3.3(Invitrogen)中,并基本如制造商所述使用Expi293F表达平台(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,USA,目录号A14527)进行表达。在另一组实验中,在HEK-293细胞中表达全长人CD30或食蟹猴CD30构建体。

CD3×CD30双特异性抗体与Expi293细胞中表达的人、食蟹猴或恒河猴CD30的结合

[0268] 将细胞(3×10^4 个细胞/孔)在聚苯乙烯96孔圆底板(Greiner bio-one,目录号650180)中与抗体的连续稀释物(以3倍稀释级范围从0.005至10μg/mL)一起在100μL染色缓冲液中在4℃下温育30分钟。实验在一式两份技术重复中进行。在染色缓冲液中洗涤两次后,将细胞在50μL二抗中在4℃下温育30分钟。作为二抗,使用在染色缓冲液中1:400稀释的R-PE缀合的山羊抗人IgG(Jackson ImmunoResearch,UK;目录号109-116-098)。将细胞在染色缓冲液中洗涤两次,重悬在30μL含有0.4% EDTA的染色缓冲液中,并在iQue Screener(Intellicyt Corporation,USA)上进行分析。使用GraphPad Prism V9.0.0软件(GraphPad Software, San Diego, CA, USA),使用非线性回归(具有可变斜率的S形剂量反应)分析结合曲线。

CD3×CD30双特异性抗体与HEK293细胞中表达的人、食蟹猴或恒河猴CD30的结合

[0269] 将细胞 (3×10^4 个细胞/孔) 在聚苯乙烯96孔圆底板 (Thermo Scientific, 目录号 163320) 中与抗体的连续稀释物 (以4倍稀释级范围从0.0002至50 $\mu\text{g/mL}$) 一起在50 μL 染色缓冲液中在4 $^{\circ}\text{C}$ 下温育30分钟。实验在一式两份技术重复中进行。在染色缓冲液中洗涤两次后, 将细胞在50 μL 二抗中在4 $^{\circ}\text{C}$ 下温育30分钟。作为二抗, 使用在染色缓冲液中1:200稀释的R-PE缀合的山羊抗人IgG (Jackson ImmunoResearch, UK; 目录号109-116-098)。将细胞在染色缓冲液中洗涤两次, 重悬在30 μL 含有0.4% EDTA和1:10,000稀释的ToPro-3活力标志物 (Invitrogen, 目录号T3605) 的染色缓冲液中。在iQue Screener (Intellicyt Corporation, USA) 上分析细胞。使用GraphPad Prism V9.0.0软件 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), 使用非线性回归 (具有可变斜率的S形剂量反应) 分析结合曲线。

CD3 $\times$ CD30双特异性抗体与人T细胞或食蟹猴PBMC的结合

[0270] 将食蟹猴PBMC (Tebu-Bio, The Netherlands; 目录号PBMCMA-10) 或纯化的人T细胞铺板在聚苯乙烯96孔圆底板中。T细胞来源于人供体血沉棕黄层 (Sanquin, Amsterdam, The Netherlands), 并根据制造商的说明书使用RosetteSep人T细胞富集混合液 (Stemcell Technologies, France, 目录号15061) 分离。将细胞 (3×10^4 个细胞/孔) 与抗体IgG1-CD30-MDX060-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FEAR和bsG1-huCD3-FEAL $\times$ b12-FEAR的连续稀释物 (以3倍稀释级范围从0.0001至10 $\mu\text{g/mL}$) 一起在50 μL 染色缓冲液中在4 $^{\circ}\text{C}$ 下温育30分钟。在染色缓冲液中洗涤两次后, 将细胞在50 μL R-PE缀合的山羊抗人IgG二抗中在4 $^{\circ}\text{C}$ 下温育30分钟 (1:400稀释)。在染色缓冲液中洗涤两次后, 针对T细胞标志物CD3 (1:100; Miltenyi biotec, 克隆10D12, 与APC缀合)、CD4 (1:50; eBioscience, 克隆OKT4, 与APC-Cy7缀合)、CD8 (1:100; Biolegend, 克隆RPA-T8, 与AF700缀合) 和T细胞激活标志物CD69 (1:50; BD Biosciences, 克隆AB2439, 与FITC缀合)、CD25 (1:50; eBioscience, 克隆BC96, 与PE-Cy7缀合) 和CD279/PD1 (1:50; BD Biosciences, 克隆AEH12.2H7, 与BV605缀合) 对T细胞进行染色。将含有Ultracomp珠粒 (5 μL ; Invitrogen, 目录号01-2222-42) 的单一染色的样品用于流式细胞仪的补偿调节。在4 $^{\circ}\text{C}$ 下温育30分钟后, 将细胞用染色缓冲液洗涤两次, 重悬在100 μL 染色缓冲液中并使用FACS Fortessa (BD Biosciences) 进行分析。使用FlowJo (BD Biosciences) 处理数据。

结果

[0271] 靶向CD30的双特异性抗体bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FEAR、bsG1-huCD3-H101G-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FEAR和bsG1-b12-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FEAR未显示与野生型Expi293F细胞的结合 (图5A), 但表现出与用huCD30 (图5B) 或mfCD30 (图5C) 转染的Expi293F细胞的剂量依赖性结合。这些双特异性抗体的结合与单特异性二价CD30抗体IgG1-CD30-MDX060-FEAR的结合相当。如预期的那样, 阴性对照抗体bsG1-huCD3-FEAL $\times$ b12-FEAR未显示与野生型或huCD30或mfCD30转染的Expi293F细胞的结合。类似地, bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR显示出与用huCD30 (图11A) 或mfCD30 (图11B) 转染的HEK293细胞的剂量依赖性结合, 阴性对照抗体bsG1-huCD3-FEAL $\times$ b12-FERR未显示与huCD30或mfCD30转染的HEK293细胞的结合。这表示靶向CD30的抗体MDX060以二价以及单价形式与在HEK细胞中表达的人和食蟹猴CD30二者有效地结合。

[0272] 图5D显示CD3 $\times$ CD30双特异性抗体bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FEAR和对照双特异性抗体bsG1-huCD3-FEAL $\times$ b12-FEAR有效结合原代人T细胞和食蟹猴T细胞。这显示

了这些靶向CD3的双特异性抗体与在T细胞上内源性表达的人CD3和食蟹猴CD3二者有效地结合。IgG1-CD30-MDX060二价亲本抗体不与人T细胞或食蟹猴T细胞结合,这表示CD30不在这些细胞上表达。

[0273] 通过流式细胞术评估CD3×CD30双特异性抗体组和单特异性亲本CD30抗体与用huCD30或mmCD30转染的Expi293F细胞的结合。CD3×CD30双特异性抗体bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FEAR(图6A)、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-hAC10-FEAR(图6B)、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-HRS-3-FEAR(图6C)、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-T405-FEAR(图6E)、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-T105-FEAR(图6F)、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-T408-FEAR(图6G)和bsG1-huCD3-FEAL×CD30-T215-FEAR(图6H)显示出与表达huCD30或mmCD30的细胞的相等结合。类似地,亲本单特异性CD30抗体克隆显示出与表达huCD30或mmCD30的细胞的相等结合。相比之下,bsG1-huCD3-FEAL×CD30-HeFi-I-FEAR和亲本单特异性CD30抗体IgG1-CD30-heFi-I-FEAR显示出与huCD30,但不与mmCD30的结合(图6D)。

[0274] 实施例6——通过DSF分析评估单特异性和双特异性非激活抗体变体的构象稳定性使用差示扫描荧光法(DSF)评估在恒定重链区中携带非激活突变的二价单特异性CD30、CD3和双特异性CD3×CD30IgG1抗体变体的蛋白稳定性特性。

[0275] 将IgG1-CD30-MDX060-FEAR、IgG1-CD30-MDX060-FERR、IgG1-huCD3-FEAL和BsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR的样品在PBS pH 7.4中以约1mg/mL的浓度配制。

[0276] 为了评估构象稳定性,在iQ5多色实时PCR检测系统(Bio-Rad)中进行DSF,该检测系统能够检测由外来染料Sypro-Orange(在DMSO中的5000×浓缩液,目录号S5692,Sigma-Aldrich)与IgG去折叠后暴露的疏水性区域的结合引起的荧光强度的变化。将Sypro-Orange在PBS pH 7.4(Hyclone GE Healthcare)中稀释320倍。热解链曲线可以来源于测量分析的IgG的受控逐步热变性期间渐增的荧光。因此,将5μL抗体溶液(1mg/mL,在PBS中)的一式两份样品添加到iQ 96孔PCR板中的20μL在PBS pH 7.4中的稀释的Sypro-Orange中。在范围从25℃至95℃的渐增温度下,以每次递增0.5℃的逐步增量和15秒持续时间加上记录所有孔的荧光所需的时间记录荧光。使用Bio-Rad CFX Manager软件3.0分析数据,并通过软件从荧光相对于温度图确定解链点。

结果

[0277] 图7和表8显示,IgG1-CD30-MDX060-FERR的解链温度(T_m)为69.0℃,高于pH 7.4下IgG1-CD30-MDX060-FEAR的 T_m (64.5℃)。这表示IgG1-CD30-MDX060-FERR具有高于IgG1-CD30-MDX060-FEAR的构象稳定性,表明含有FER主链的IgG1-CD30-MDX060具有高于含有FEA主链的IgG1-CD30-MDX060的构象稳定性。BsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR的解链温度测定为64.5℃,其在对两种亲本抗体IgG1-huCD3-FEAL(62.5℃)和IgG1-CD30-MDX060-FERR(69.0℃)测定的 T_m 之间。

[0278] 表8:如通过差示扫描荧光法(DSF)测定的所示抗体的解链温度(T_m)

抗体	T_m (°C)
IgG1-CD30-MDX060-FEAR	64.5
IgG1-CD30-MDX060-FERR	69.0
IgG1-huCD3-FEAL	62.5
BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR	64.5

[0279] 实施例7——bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR与T细胞和肿瘤细胞的同时结合

研究了bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR与肿瘤细胞和未致敏T细胞的同时结合。

[0280] 将从健康供体分离的冷冻的T细胞解冻并用0.25mM Celltrace Violet (Pacific Blue; Invitrogen, 目录号C34557A) 在37℃下标记15分钟。L-428肿瘤细胞用Celltrace FarRed (APC; Invitrogen, 目录号C34564A) 在37℃下标记15分钟, 并以1:1的E:T比添加到T细胞中。加入bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR或对照抗体bsG1-huCD3-FEAL×b12-FEAR、bsG1b12FEAL×CD30MDX060-FERR或IgG1-b12-FEAL的连续稀释物(最终浓度范围从 6×10^{-5} 至10 $\mu\text{g/mL}$; 3倍稀释), 并将细胞在4℃下温育2小时。在温育后, 添加活力标志物7-AAD (BD Bioscience, 目录号559925) (100×最终稀释), 并在FACS Celesta流式细胞仪 (BD Biosciences) 上分析细胞。

结果

[0281] 图12显示, bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR诱导作为bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR介导的肿瘤细胞与T细胞的交联(同时结合)的量的CD3⁺CD30⁺双阳性事件(在流式细胞术染色中表达CellTrace Far Red和CellTrace Violet二者的细胞)的形成。双阳性事件的增加是抗体浓度依赖性的, 并且显示钟形曲线。在与对照抗体bsG1-huCD3-FEAL×b12-FEAR、bsG1b12FEAL×CD30-MDX060-FERR或IgG1-b12-FEAL一起温育的样品中或在没有抗体的情况下温育的样品中没有观察到肿瘤细胞与T细胞的交联的增加(A)。图12B显示了如通过表达CellTrace Far Red和CellTrace Violet二者的细胞的百分比所检测的, bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR与肿瘤细胞和未致敏T细胞的同时结合(B)。

[0282] 这些数据表示bsG1huCD3FEAL×CD30-MDX060-FERR可以同时结合和交联CD30⁺肿瘤细胞和CD3⁺T细胞。

[0283] 实施例8——通过CD3×CD30双特异性抗体体外诱导T细胞介导的细胞毒性和T细胞激活

评估了一组CD3×CD30双特异性抗体引起的T细胞介导的对Karpas-299肿瘤细胞的细胞毒性和相关T细胞激活。评估了以下抗体: bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-hAC10-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-HRS-3-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-HeFi-I-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-T105-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-T405-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-T408-FEAR和bsG1-huCD3-FEAL×CD30-T215-FEAR。

[0284] T细胞获自健康人供体血沉棕黄层 (Sanquin, Amsterdam, The Netherlands), 并根据制造商的说明书使用RosetteSep™人T细胞富集混合液 (Stemcell Technologies, France, 目录号15061) 分离。T细胞用Celltrace Violet (Invitrogen, 目录号C34557A; 最终浓度5 μM) 在37℃下标记15分钟。平行地, Karpas-299肿瘤细胞用Celltrace FarRed (Invitrogen, 目录号C34564A; 最终浓度2 μM) 在37℃下标记15分钟。标记后, 加入5×体积的冰冷DBSI并在室温下温育5分钟。将细胞沉淀, 重悬在培养基中, 并将肿瘤细胞以50,000个细胞/孔的密度接种到96孔板 (Greiner-bio-one, The Netherlands, 目录号655180) 中。添加双特异性CD3×CD30抗体的连续稀释物(最终浓度范围从1,000至0.051ng/mL; 3倍稀释)

并将板在室温下温育15分钟。将T细胞以4:1的效应物与靶标(E:T)比添加到肿瘤细胞中,并将板在37℃下温育72小时。用PBS/0.1% BSA/0.02%叠氮化物(染色缓冲液)洗涤2次后,将细胞针对T细胞标志物CD4(1:50;Biolegend,目录号300521,与Pacific Blue缀合)、CD8(1:100;BD Biosciences,与FITC缀合)和T细胞激活标志物CD69(1:50;Biolegend,目录号310934,与BV650偶联)、CD 25(1:100;Invitrogen,目录号25-0259-42,与PE-Cy7缀合)和CD279/PD-1(1:50;Biolegend,目录号329930,与BV605缀合)进行染色。包括含有Ultracomp珠粒(5 μ L;Invitrogen,目录号01-2222-42)的单一染色的样品并将其用于流式细胞仪的补偿调节。在4℃下温育30分钟后,将板用染色缓冲液洗涤两次,并将细胞用7-AAD(在染色缓冲液中1:100稀释)在4℃下染色10分钟。使用FACS Celesta(BD Biosciences)分析细胞。使用FlowJo(BD Biosciences)处理数据。

[0285] 使用GraphPad Prism V7.02软件(GraphPad Software, San Diego, CA, USA),使用非线性回归分析(具有可变斜率的S形剂量反应)生成剂量反应曲线。

结果

[0286] 图13A和B显示所有CD3 $\times$ CD30抗体诱导T细胞介导的对Karpas-299细胞的细胞毒性。与测试的所有其他克隆相比,使用CD30克隆MDX060(bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR和bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FEAR)产生的CD3 $\times$ CD30双特异性抗体在杀伤Karpas-299细胞方面更有效。事实上,与使用CD30克隆HRS-3、HeFi-1、T105、T405、T408或T215产生的CD3 $\times$ CD30双特异性抗体(bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-HRS-3-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-HeFi-1-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-T105-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-T405-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-T408-FEAR和bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-T215-FEAR;图13A)相比,基于MDX060的CD3 $\times$ CD30双特异性抗体显示出显著更低的IC₅₀值。此外,与使用CD30克隆hAC10、HeFi-1、T405、T408或T215产生的CD3 $\times$ CD30双特异性抗体(bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-hAC10-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-HeFi-1-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-T405-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-T408-FEAR和bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-T215-FEAR;图13B)相比,bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR和bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FEAR诱导更高的最大杀伤。图13C和D显示,bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR和bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FEAR在诱导作为CD4⁺T细胞(图13C)或CD8⁺T细胞(图13D)中T细胞激活的量的CD25表达方面比任何其他CD3 $\times$ CD30双特异性抗体更有效(较低的EC₅₀值)。对PD-1(图13E和F)和CD69(数据未显示)的表达观察到类似的结果。在含有FEAR或FERR突变的两种基于MDX060的CD3 $\times$ CD30双特异性抗体之间未观察到T细胞介导的杀伤或T细胞激活的差异。

[0287] 与测试的其他CD3 $\times$ CD30双特异性抗体组相比,双特异性抗体bsG1-huCD3 $\times$ CD30-MX060在诱导T细胞介导的对L-428细胞的细胞毒性方面也更有效(数据未显示)。

[0288] 由这些实验中使用的CD3 $\times$ CD30双特异性抗体组诱导的T细胞介导的细胞毒性的平均IC₅₀浓度和最大裂解百分比以及T细胞激活(CD25表达)的EC₅₀浓度概括在表9中。

[0289] 总之,这些数据表明,bsG1huCD3 $\times$ CD30-MDX060在诱导T细胞介导的细胞毒性方面比评估的任何其他CD3 $\times$ CD30双特异性抗体更有效。

[0290] 表9:由CD3 $\times$ CD30双特异性抗体组诱导的T细胞介导的对Karpas-299细胞的细胞毒性的IC₅₀浓度和最大裂解百分比以及T细胞激活(CD25表达)的EC₅₀浓度

抗体	细胞毒性		T 细胞激活(CD25 表达)		T 细胞激活(PD-1 表达)	
			CD4+T 细胞	CD8+T 细胞	CD4+T 细胞	CD8+T 细胞
	IC ₅₀ (μg/mL)	最大裂解 (%)	EC ₅₀ (μg/mL)	EC ₅₀ (μg/mL)	EC ₅₀ (μg/mL)	EC ₅₀ (μg/mL)
	平均 (SD)	平均 (SD)	平均 (SD)	平均 (SD)	平均 (SD)	平均 (SD)
bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR	0.029 (0.004)	52.328 (3.929)	0.023 (0.004)	0.020 (0.005)	0.025 (0.006)	0.023 (0.009)
bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR	0.033 (0.004)	53.703 (5.949)	0.024 (0.004)	0.020 (0.005)	0.024 (0.006)	0.027 (0.009)
bsG1-huCD3-FEALxCD30-hAC10-FEAR	0.032 (0.006)	37.765 (5.340)	0.046 (0.011)	0.054 (0.021)	0.056 (0.021)	0.057 (0.031)
bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR	0.068 (0.011)	47.472 (6.539)	0.089 (0.031)	0.079 (0.031)	0.123 (0.046)	0.112 (0.047)
bsG1-huCD3-FEALxCD30-HeFi-I-FEAR	0.052 (0.011)	42.987 (6.603)	0.069 (0.013)	0.076 (0.016)	0.075 (0.024)	0.083 (0.023)
bsG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR	0.042 (0.007)	52.582 (5.344)	0.056 (0.010)	0.060 (0.017)	0.064 (0.021)	0.065 (0.024)
bsG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR	0.078 (0.023)	41.667 (4.560)	0.093 (0.027)	0.080 (0.056)	0.138 (0.054)	0.140 (0.126)
bsG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR	0.226 (0.112)	41.295 (5.482)	0.172 (0.046)	0.134 (0.077)	0.286 (0.104)	0.220 (0.126)
bsG1-huCD3-FEALxCD30-T215-FEAR	0.077 (0.032)	42.840 (6.464)	0.092 (0.036)	0.105 (0.063)	0.355 (0.476)	0.281 (0.308)

[0291] 实施例9——通过bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR体外诱导T细胞介导的细胞毒性、T细胞增殖和T细胞激活

在HL和ALCL细胞系中评估bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR引起的T细胞介导对肿瘤细胞的细胞毒性和相关的T细胞增殖和激活。

[0292] T细胞获自健康人供体血沉棕黄层(Sanquin, Amsterdam, The Netherlands), 并根据制造商的说明书使用RosetteSep™人T细胞富集混合液(Stemcell Technologies, France, 目录号15061)分离。T细胞用Celltrace Violet(Invitrogen, 目录号C34557A; 最终浓度5μM)在37℃下标记15分钟。平行地, 肿瘤细胞L-428、KI-JK、KM-H2或SUP-M2用Celltrace FarRed(Invitrogen, 目录号C34564A; 最终浓度2μM)在37℃下标记15分钟。标记后, 加入5×体积的冰冷DBSI并在室温下温育5分钟。将细胞沉淀, 重悬在培养基中, 并将肿瘤细胞以50,000个细胞/孔的密度接种到96孔板(Greiner-bio-one, The Netherlands, 目录号655180)中。添加bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR或对照抗体IgG1-huCD3-FEAL、bsG1-huCD3-FEAL×b12-FERR、IgG1-CD30-MDX060-FERR、bsG1-b12-FEAL×CD30-MDX060-FERR、IgG1-b12-FEAL的连续稀释物(最终浓度范围从1,000至0.051ng/mL; 3倍稀释)并将板在室温下温育15分钟。将T细胞以4:1的效应物与靶标(E:T)比添加到肿瘤细胞中, 并将板在37℃下温育72小时。用PBS/0.1% BSA/0.02%叠氮化物(染色缓冲液)洗涤2次后, 将细胞针对T细胞标志物CD4(1:50; Biolegend, 目录号300521, 与Pacific Blue缀合)、CD8(1:100; BD Biosciences, 与FITC缀合)和T细胞激活标志物CD69(1:50; Biolegend, 目录号310934, 与BV650缀合)、CD 25(1:100; Invitrogen, 目录号25-0259-42, 与PE-Cy7缀合)和CD279/PD-1(1:50; Biolegend, 目录号329930, 与BV605缀合)进行染色。包括含有Ultracomp珠粒(5μL;

Invitrogen, 目录号01-2222-42) 的单一染色的样品并将其用于流式细胞仪的补偿调节。在4℃下温育30分钟后, 将板用染色缓冲液洗涤两次, 并将细胞用7-AAD (在染色缓冲液中1:100稀释) 在4℃下染色10分钟。使用FACS Celesta (BD Biosciences) 分析细胞, 并使用FlowJo (BD Biosciences) 处理数据。

[0293] 使用以下方程计算活靶细胞的百分比:

活靶细胞% = (每种条件下活的单一Celltrace FarRed标记细胞的绝对数量/在仅含有靶细胞和T细胞而不添加任何抗体的条件下活的单一Celltrace FarRed标记细胞的绝对数量) × 100。

[0294] 通过门控具有稀释的Celltrace Violet染色的CD4⁺或CD8⁺T细胞来评估T细胞增殖。使用来自FlowJo的增殖建模工具计算扩增指数。自动拟合生成峰 (generation peak), 并根据以下方程计算扩增指数值:

扩增指数 = 细胞总量/培养开始时的细胞量 = (G0+G1+G2+G3+G4+G5+G6) / (G0+G1:2+G2:4+G3:8+G4:16+G5:32+G6:64)。

Gn = 第n个生成峰的细胞数量 (n=0至6)。

[0295] 使用GraphPad Prism V7.02软件 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), 使用非线性回归分析 (具有可变斜率的S形剂量反应) 生成剂量反应曲线。

结果

[0296] 图14显示bsG1-huCD3-FEAL × CD30-MDX060-FERR在L-428 (HL)、KM-H2 (HL)、SUP-M2 (ALC1) 和KI-JK (ALCL) 细胞系中体外诱导剂量依赖性T细胞介导的细胞毒性。L-428和KI-JK细胞中通过bsG1-huCD3-FEAL × CD30-MDX060-FERR诱导的T细胞介导的细胞毒性的平均IC₅₀浓度概括在表10中。在与对照抗体IgG1-huCD3-FEAL、bsG1-huCD3-FEAL × b12-FERR、IgG1-CD30-MDX060-FERR、bsG1-b12-FEAL × CD30-MDX060-FERR、IgG1-b12-FEAL一起温育的细胞中或在没有抗体的情况下温育的样品中未观察到细胞毒性。

[0297] 图15、16、17和18显示通过bsG1-huCD3-FEAL × CD30-MDX060-FERR诱导的T细胞介导的对L-428和KI-JK细胞的细胞毒性与CD4⁺和CD8⁺T细胞增殖 (图15) 和T细胞激活标志物CD69 (图16)、CD25 (图17) 和PD-1 (图18) 的表达相关。在这些实验中通过bsG1-huCD3-FEAL × CD30-MDX060-FERR诱导的T细胞增殖和激活的平均EC₅₀浓度概括在表10中。

[0298] 因此, bsG1-huCD3-FEAL × CD30-MDX060-FERR在HL和ALCL细胞系中体外诱导剂量依赖性T细胞介导的细胞毒性, 其与T细胞增殖和激活相关。

[0299] 表10: L-428和KI-JK细胞中通过bsG1-huCD3-FEAL × CD30-MDX060-FERR诱导的T细胞介导的细胞毒性的EC₅₀浓度和相关的CD4⁺和CD8⁺细胞的T细胞增殖和激活

肿瘤细胞系		L-428		KI-JK	
细胞毒性					
	平均 IC ₅₀ (μg/mL)	0.002		0.0015	
	IC ₅₀ (μg/mL)范围	0.001216 - 0.003439		0.0008858 - 0.001904	
T 细胞类型		CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
T 细胞增殖					
PI	平均 EC ₅₀ (μg/mL)	0.0051	0.00096	0.00606	0.00213
	EC ₅₀ (μg/mL)范围	0.003727 0.006534	0.0002052 0.002255	0.00338 0.007501	0.001103 0.002715
T 细胞激活					
CD69	平 均 CD69 EC ₅₀ (μg/mL)	0.00083	0.00121	0.00146	0.00171
	CD69 EC ₅₀ (μg/mL)范 围	0.0001221 0.001647	-3.252E-14 0.002421	-0.0004487 0.002086	-4.694E-11 0.005097
CD25	平 均 CD25 EC ₅₀ (μg/mL)	0.00261	0.00061	0.00599	0.00656
	CD25 EC ₅₀ (μg/mL)范 围	0.002164 0.002898	-0.000298 0.001006	-0.004483 0.007791	-0.001901 0.01562
PD-1	平 均 PD-1 EC ₅₀ (μg/mL)	0.00491	0.00257	0.0112	0.00696
	PD-1 EC ₅₀ (μg/mL)范 围	0.004387 0.005433	-0.001302 0.003412	-0.009616 0.01222	-0.005845 0.009151
n 次测试		3		3	

[0300] 实施例10——通过bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR体外诱导细胞因子产生如实施例9中所述,在使用L-428靶细胞和健康供体T细胞的体外T细胞介导的细胞毒性实验期间收集的上清液中评估通过bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR诱导的细胞因子和颗粒酶B产生。上清液储存在-20℃下并解冻用于分析。使用由R&D systems定制的基于珠粒的多重免疫测定(luminex)测量14种不同细胞因子(CD40、IFN γ、IL-10、IL-12、IL-13、IL-1b、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IP-10、MCP-1、PDL-1、TNFα)和颗粒酶B的浓度。

结果

[0301] 在来自bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR存在下的L-428细胞和T细胞的共培养物的上清液中主要观察到提高的颗粒酶B和细胞因子IFN γ、IL-13和TNFα浓度(>2000μg/mL)。当与对照抗体IgG1-b12-FEAL相比时,观察到CD40、IL-10、IL-12、IL-1β、IL-2、IL-4、IL6和IP-10细胞因子浓度的中等提高。与对照抗体IgG1-b12-FEAL相比,IL-8、MCP-1和PDL1的水平未被调节(图19)。

[0302] 由此,bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR引起的T细胞介导的细胞毒性和T细胞激活与细胞因子和颗粒酶B的剂量依赖性产生相关。

[0303] 实施例11——使用纯化的T细胞作为效应细胞,在不同的效应物与靶标比下通过bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR体外诱导T细胞介导的细胞毒性

为了确定在双特异性抗体bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR存在下T细胞介导的肿瘤细胞杀伤的最佳效应物与靶细胞比,使用CD30阳性肿瘤细胞系L-428作为靶细胞和纯化的T细胞作为效应细胞,在不同的效应物与靶细胞(E:T)比下进行体外细胞毒性测定。

[0304] 基本如实施例9中所述评估T细胞介导的细胞毒性,不同之处在于以1:1、2:1、4:1或8:1的不同效应物与靶标(E:T)细胞比将T细胞添加到肿瘤细胞中。

结果

[0305] 图20A显示了在所有E:T比下通过bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR诱导的剂量依赖性T细胞介导的细胞毒性,其中在4:1和8:1的E:T比下观察到最大肿瘤细胞杀伤(小于20%活肿瘤细胞)。与此一致,在所有E:T细胞比下观察到CD4⁺和CD8⁺T细胞增殖,最显著在4:1和8:1的E:T比下(图20B-C)。在任何测试的E:T比下,对照抗体bsG1-huCD3-FEAL×b12-FERR均未诱导特异性T细胞介导的细胞毒性或T细胞增殖。

[0306] 总之,这些数据表示体外bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR诱导的T细胞介导的对L-428肿瘤细胞的细胞毒性在4:1和8:1的E:T比下最有效。

[0307] 实施例12——bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR引起的体外T细胞介导的细胞毒性和T细胞增殖的动力学

为了评估在bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR的存在下T细胞介导的肿瘤细胞杀伤的动力学,使用CD30阳性肿瘤细胞系L-428作为靶细胞和纯化的T细胞作为效应细胞,在不同的温育期下进行体外细胞毒性测定。

[0308] 基本如实施例9中所述评估T细胞介导的细胞毒性,不同之处在于在24小时、48小时和72小时后评估肿瘤细胞细胞毒性和T细胞增殖。

结果

[0309] 图21显示了bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR在48小时和72小时后诱导剂量依赖性T细胞介导的细胞毒性,而在24小时后未观察到显著的T细胞介导的细胞毒性。在72小时后通过bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR诱导剂量依赖性CD4⁺和CD8⁺T细胞增殖,而在24小时或48小时后未观察到T细胞增殖(图21B和C)。

[0310] 总之,这些数据显示bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR以时间依赖性方式诱导T细胞介导的对肿瘤细胞的细胞毒性和T细胞增殖。

[0311] 实施例13——CD30表达水平与体外bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR诱导的T细胞介导的细胞毒性的相关性

使用4:1的E:T比,如实施例9中所述在体外细胞毒性测定中测定bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR对8种表达CD30的肿瘤细胞系的T细胞介导的杀伤。使用以下细胞系:L-428、KM-H2、DEL-KI-JK、KARPAS-299、SUP-M2、NCEB-1和JVM-2。对于这些肿瘤细胞系,通过如实施例2中详述的定量流式细胞术评估CD30表达水平。

结果

[0312] 图22显示了bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR在所有细胞系中体外诱导T细胞介导的细胞毒性,其中最大靶细胞杀伤在68%至98%之间。bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR引起的最大T细胞介导的肿瘤细胞杀伤与CD30表达水平显著相关(图22A)。

[0313] 在图22B中,将每种细胞系在bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR存在下的T细胞介导的杀伤的EC₅₀相对于CD30表达水平作图,显示出阴性但不显著的趋势。

[0314] 由此,这些数据显示了CD30表达水平和体外bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR诱导的最大T细胞介导的细胞毒性之间的正相关。

[0315] 实施例14——bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR引起的激活T细胞的自相残杀

在体外评估bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR诱导的激活的CD30⁺T细胞的T

细胞自相残杀。

[0316] 用100 μ L的1 μ g/mL抗人CD3(克隆OKT3, Invitrogen, 目录号16-0037-85)在PBS中的溶液涂覆96孔板(Greiner-bio-one, The Netherlands, 目录号655180)。将板在37 $^{\circ}$ C下温育4小时。除去抗体溶液后,用100 μ L PBS洗涤孔。T细胞获自健康人供体血沉棕黄层(Sanquin, Amsterdam, The Netherlands),并根据制造商的说明书使用RosetteSepTM人T细胞富集混合液(Stemcell Technologies, France, 目录号15061)分离。以 2×10^6 个细胞/mL的浓度将纯化的T细胞重悬在T细胞培养基(含有25mM HEPES和L-谷氨酰胺的Roswell Park Memorial Institute[RPMI]-1640培养基(Lonza, 目录号BE12-115F),其补充有10%热灭活的含铁供体牛血清(DBSI; Gibco, 目录号20731-030)和青霉素/链霉素(pen/strep; Lonza, 目录号DE17-603E))中。将100 μ L T细胞悬浮液(含有200,000个T细胞)添加到抗CD3涂覆的板的每个孔中。此外,向每个孔中添加100 μ L补充有2 μ g/mL抗CD28(克隆CD28.2, Invitrogen, 目录号16-0289-85)和0.05 μ g/mL IL-15(ThermoFisher, 目录号PHC9151)的T细胞培养基。然后将T细胞在37 $^{\circ}$ C下温育96小时。

[0317] 96小时后,收集T细胞并以 2×10^6 个细胞/mL的浓度重悬在T细胞培养基中。进行流式细胞术分析以测量CD30和T细胞激活标志物的表达。简而言之,将细胞的等分试样用PBS/0.1% BSA/0.02%叠氮化物(染色缓冲液)洗涤,用50 μ L的1000 $\times$ 稀释的FVS510活力染料(BD Biosciences, 目录号564406)染色,并在室温下温育15分钟。随后用染色缓冲液洗涤细胞,并对CD30(1:50; Biolegend, 目录号333906,与PE缀合)、T细胞标志物CD4(1:50; Biolegend, 目录号300506,与FITC缀合)、CD8(1:100; Biolegend, 目录号301028,与AF700缀合)和T细胞激活标志物CD69(1:50; Biolegend, 目录号310910,与APC缀合)、CD25(1:100; Invitrogen, 目录号25-0259-42,与PE-Cy7缀合)和CD279/PD1(1:50; Biolegend, 目录号329924,与BV605缀合)进行染色。包括含有Ultracomp珠粒(5 μ L; Invitrogen, 目录号01-2222-42)的单一染色的样品并将其用于流式细胞仪的补偿调节。在4 $^{\circ}$ C下温育30分钟后,将板用染色缓冲液洗涤两次。使用FACS Celesta(BD Biosciences)分析细胞,并使用FlowJo(BD Biosciences)处理数据。

[0318] 为了评估bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR是否可诱导激活的T细胞的自相残杀,将受刺激的T细胞以200,000个细胞/孔的密度接种在96孔板中。随后,将50 μ L的bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR或对照抗体,即bsG1-b12-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR、bsG1-huCD3-FEAL $\times$ b12-MDX060-FERR或IgG1-b12添加到每个孔中(在T细胞培养基中以3倍稀释级至最终浓度范围从0.003至3.3 μ g/mL)。将板在37 $^{\circ}$ C下温育48小时。

[0319] 用染色缓冲液洗涤2次后,将细胞用FVS510活力染料染色,并因此对T细胞标志物CD4和CD8以及T细胞激活标志物CD69、CD25和CD279/PD1染色。使用FACS Celesta(BD Biosciences)进行流式细胞术分析,并使用FlowJo(BD Biosciences)处理数据。

[0320] 使用GraphPad Prism V7.02软件(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)生成剂量反应曲线。

结果

[0321] 图23显示了在温育72小时后,细胞标志物CD25(T细胞激活)(A)和CD30(B)分别在54-63%和21-27%的T细胞中表达。温育96小时后进一步诱导CD25和CD30的表达(CD25:80-83%,和CD30:27-33%)。图23C显示了递增剂量的bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR、

bsG1-b12-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR、bsG1-huCD3-FEAL $\times$ b12-MDX060-FERR或IgG1-b12与激活的T细胞降低的活力无关。

[0322] 因此,激活的T细胞亚群上的CD30表达在与bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR一起温育时不会导致T细胞的自相残杀。

[0323] 实施例15——sCD30对bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR的抗肿瘤活性的干扰

在17种不同的血液CD30⁺肿瘤细胞系中评估了细胞表面CD30的脱落和可溶性CD30(sCD30)的产生。

[0324] 按照制造商的说明书,使用“人sCD30ELISA试剂盒”(Invitrogen,目录号BMS240)通过用于定量检测人CD30的ELISA测定测量在新鲜培养基中接种细胞后3天从细胞培养物收集的25 μ L未稀释上清液中sCD30的浓度。

结果

[0325] 图24A显示了细胞培养上清液中sCD30的浓度。如所示,在来自不同细胞系的细胞培养上清液中检测到不同浓度的sCD30。图24B显示了如先前在实施例2中所述通过定量流式细胞术测量的(人IgG校准试剂盒,Biocyte,目录号CP010),细胞培养上清液中sCD30的浓度与CD30膜表达水平显著相关。

[0326] 为了评估sCD30是否可阻断有效的bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR诱导的T细胞介导的细胞毒性,在DEL肿瘤细胞(ALCL)(其在上清液中显示出高水平的sCD30(129ng/mL))中评估bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR引起的T细胞介导细胞毒性。如前所述(实施例8)进行T细胞介导的细胞毒性测定。图24C显示bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR在该细胞系中诱导有效的T细胞介导的细胞毒性,其中最大肿瘤细胞杀伤为86%,这表示bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR在sCD30存在下仍然能够体外诱导有效的T细胞介导的细胞毒性。

[0327] 由此,sCD30浓度在细胞类型之间不等,并与细胞表面上的CD30表达水平相关。此外,bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR在sCD30的存在下仍然能够体外诱导有效的T细胞介导的细胞毒性。

[0328] 实施例16——使用患者来源的外周血单核T细胞作为效应细胞的bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR的离体细胞毒性使用CD30阳性肿瘤细胞系作为靶细胞和原代患者来源的T细胞作为效应细胞,在离体细胞毒性测定中测试CD3 $\times$ CD30双特异性抗体。作为T细胞的来源,霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)和急性髓系白血病(AML)患者来源的外周血单核细胞(PBMC,Discovery Life Sciences,表11)用于评估CD3依赖性肿瘤细胞杀伤。

[0329] L-428肿瘤细胞用Celltrace FarRed(Invitrogen,目录号C34564A,最终浓度2 μ M)在37 $^{\circ}$ C下标记15分钟。在标记后,添加5 $\times$ 体积的冰冷DBSI并在室温下温育5分钟。将细胞沉淀,重悬在培养基中,并将肿瘤细胞以50,000个细胞/孔的密度接种到96孔板(Greiner-bio-one,The Netherlands,目录号655180)中。添加bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR和对照抗体IgG1-b12-FEAL的连续稀释物(最终浓度范围从1,000至0.051ng/mL;3倍稀释),并将板在室温下温育15分钟。将PBMC解冻,计数并重悬在培养基(RPMI 1640/10%FBS/1%青霉素-链霉素/1%谷氨酸)中,随后以8:1的效应物与靶标(E:T)比添加到肿瘤细胞中,并

将板在37℃下温育72小时。用PBS/0.1% BSA/0.02%叠氮化物(染色缓冲液)洗涤2次后,将细胞染色以使用CD3(T细胞;Invitrogen,目录号48-0037)、CD14(单核细胞/巨噬细胞;Biolegend;目录号301834)、CD19(B细胞;Biolegend;目录号302246)、CD16(单核细胞/巨噬细胞;BD Biosciences;目录号556618)、CD56(NK细胞;BD Biosciences;目录号564849)和CD66b(粒细胞;Biolegend;目录号305116)区分不同的细胞群体。此外,针对T细胞标志物CD4(1:50;Biolegend,目录号300521,与Pacific Blue缀合)、CD8(1:100;BD Biosciences,目录号345772,与FITC缀合)和T细胞激活标志物CD69(1:50;Biolegend,目录号310934,与BV650缀合)、CD25(1:100;Invitrogen,目录号25-0259-42,与PE-Cy7缀合)和CD279/PD1(1:50;Biolegend,目录号329930,与BV605缀合)对细胞进行染色。包括含有Ultracomp珠粒(5μL;Invitrogen,目录号01-2222-42)的单一染色的样品,并将其用于流式细胞仪的补偿调节。在4℃下温育30分钟后,将板用染色缓冲液洗涤两次,并将细胞用7-AAD(在染色缓冲液中1:100稀释)在4℃下染色10分钟。使用FACS Celesta(BD Biosciences)分析细胞,并使用FlowJo(BD Biosciences)处理数据。使用GraphPad Prism V7.02软件(GraphPad Software, San Diego, CA, USA),使用非线性回归分析(具有可变斜率的S形剂量反应)生成剂量反应曲线。

[0330] 使用以下方程计算活靶细胞的百分比:

活靶细胞% = (每种条件下活的单一Celltrace FarRed标记的细胞的绝对数量/在仅含有靶细胞和T细胞而不添加任何抗体的条件下活的单一Celltrace FarRed标记的细胞的绝对数量) × 100。

结果

[0331] 图25A显示了bsG1-huCD3-FEAL × CD30-MDX060-FERR在72小时后诱导对L-428肿瘤细胞的剂量依赖性细胞毒性,其由来源于健康对照供体和不同的HL和NHL患者供体的T细胞介导。细胞毒性与T细胞激活和增殖相关,其由CD69、CD25和PD-1的上调所示(图25B-D)。对于对照抗体IgG1-b12-FEAL,未观察到T细胞介导的细胞毒性。对于供体E(AML)未观察到T细胞介导的对L-428肿瘤细胞的细胞毒性,这可能归因于PBMC样品中T细胞的低频率(表11)。

[0332] 总之,这些数据说明,来自HL和NHL患者的外周血T细胞能够在bsG1-huCD3-FEAL × CD30-MDX060-FERR的存在下诱导T细胞介导的对肿瘤细胞系的细胞毒性。

[0333] 表11.原代患者PBMC样品特性

样品#	代码	来源	治疗(Tx)状态	公司	细胞活力 (%)	T 细胞的频 率(%)
A	100000537	霍奇金, 结节 性硬化型霍奇 金淋巴瘤	IV 期, Tx 前	Discovery Life Sciences	63.5	71.1
B	120328910	霍奇金淋巴瘤	Tx 前		81.7	56.1
C	17A0D69A3	霍奇金, 混合 细胞型霍奇金 淋巴瘤	Tx 前		87.5	35.6
D	D4931CBAB	霍奇金, 结节 性淋巴细胞为 主型霍奇金淋 巴瘤	II-A 期, Tx 前, CD20+		63.95	59.9
E	200003963	急性髓系白血 病(AML)	主动-Tx, 测试 EBV		65.55	17.4
F	121426858	NHL, 外周 T 细胞淋巴瘤 (PTCL) - 未指 定	III 期, Tx 后, 治疗 CHP+Adcetris/阿霉素		66.2	68
HC		健康对照 PBMC	N.A.	Sanquin	86.55	48.4

实施例17——评估SCID小鼠中bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR的药代动力学性质

对11-12周龄的雌性无肿瘤SCID小鼠(C.B-17/IcrHan®Hsd-Prkdcscid mice, Envigo) (每组3只小鼠) 静脉内(IV) 注射单剂量的1μg (0.05mg/kg)、10μg (0.5mg/kg) 或100μg (5mg/kg) 的bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR。建立实验以研究在不存在靶标介导的清除(因为bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR不与小鼠蛋白交叉反应) 的情况下的抗体清除。

[0339] 在抗体施用后10分钟、4-6小时、24小时、2天、7天、14天和21天, 经由面颊静脉穿刺或隐静脉穿刺收集40μL血液样品。将血液收集到含有K2-EDTA的小瓶(Sarstedt, Microvette CB300, 目录号16.444.100) 中, 并在10,000g下离心10分钟。将血浆上清液转移到标记的Eppendorf小瓶中并储存在-80℃下直至血浆IgG浓度测定。

[0340] 使用总人IgG酶联免疫吸附测定(ELISA) 确定人IgG浓度。将100μL PBS (BioTrading, 目录号K654F500PP) 中在4℃下以2μg/mL的浓度过夜涂覆至96孔Microton ELISA板(Greiner, Germany) 的小鼠抗人IgG-κ克隆MH 16(CLB Sanquin, The Netherlands; 目录号M1268) 用作捕获抗体。在室温(RT) 下用PBSA (具有0.2%牛血清白蛋白[BSA]的PBS) 封闭板1小时后, 加入样品, 在PBSA中连续稀释, 并在室温下在板振荡器上温育1小时。将板用300μL PBST (补充有0.05% Tween 20的PBS) 洗涤三次并随后在室温下与山羊抗人IgG免疫球蛋白(Jackson, West Grace, PA; 目录号109-035-098; 1:10,000, 在补充有0.2% BSA的PBST中) 一起温育1小时。将板用300μL PBST洗涤三次, 随后与2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS; Roche, 目录号11112422001和11112597001) 一起避光温育。通过添加100μL 2%草酸(Sigma-Aldrich, 目录号33506) 终止反应, 在室温下温育10分钟。在ELx808吸光度酶标仪(Biotek, Winooski, VT) 上在405nm处测量吸光度。

[0341] 从参考抗体人IgG1λ(纯蛋白30C, 目录号BP078), 在PBSTA中以3倍稀释进一步稀释来生成标准曲线(浓度范围: 1mg/mL [3μL])。注射的材料用于生成第二标准曲线, 并且由

5mg/kg剂量制备,其中1mg/mL (3.6 μ L抗体)的浓度在PBSTA中以3倍稀释进一步稀释。

结果

[0342] 通过在Microsoft Excel中使用4参数逻辑拟合曲线内插未知数,从参考标准品计算校准曲线。从绘制的校准曲线的方程计算血浆样品中的人IgG1浓度(图26A),并使用GraphPad Prism软件计算曲线下面积(AUC)。通过公式 $D \times 1.000 / AUC$ 确定直到血液取样最后一天(第21天)的IgG清除,其中D是注射剂量(1mg/kg)(图26B)。

[0343] bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR不与小鼠蛋白交叉反应,并且由此预期药代动力学性质将与其他非结合野生型人IgG1分子相当。所有剂量组的预期人IgG血浆浓度计算为约100 μ g/mL($\sim$ 5mg/kg)、10 μ g/mL($\sim$ 0.5mg/kg)或1 μ g/mL($\sim$ 0.05mg/kg)。对于所有时间点,来自用0.05mg/kg处理的动物的样品是不可测量的。

[0344] bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR的血浆清除率与常规人IgG1的预测血浆清除率相当。平均最大人IgG血浆浓度(C_{max})与常规人IgG1的预测 C_{max} 相当。

[0345] 由此,bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR的药代动力学概况与不存在靶标结合的情况下未携带肿瘤的SCID小鼠中常规人IgG1预测的药代动力学概况相当。

[0346] 实施例18——评估C1q与bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR的结合使用表达CD3或CD30的细胞评估补体蛋白C1q与膜结合的bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR或产生bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR的亲本抗体(即IgG1-huCD3-FEAL和IgG1-CD30-MDX060-FERR)的结合。

[0347] A. C1q与结合至表达CD3的细胞的bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR的结合

使用受刺激的人CD8⁺T细胞测试补体蛋白C1q与CD3结合的bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR和IgG1-huCD3-FEAL的结合。包括作为阳性对照的IgG1-CD52-E430G,其具有基于CD52抗体CAMPATH-1H的VH和VL结构域,并且具有已知在结合至细胞表面时有效结合C1q的Fc增强主链。作为非结合阴性对照抗体,包括IgG1-b12-FERR和IgG1-b12。

[0348] 根据制造商的说明书使用RosetteSepTM人CD8⁺T细胞富集混合液(Stemcell Technologies,目录号15023C.2)通过阴性选择从获自健康志愿者(Sanquin)的血沉棕黄层中纯化(富集)人CD8⁺T细胞。将纯化的T细胞重悬在T细胞培养基(含有25mM HEPES和L-谷氨酰胺的Roswell Park Memorial Institute[RPMI]-1640培养基(Lonza,目录号BE12-115F),其补充有10%热灭活的含铁供体牛血清(DBSI;Gibco,目录号20731-030)和青霉素/链霉素(pen/strep;Lonza,目录号DE17-603E))中。

[0349] 用PBS洗涤抗CD3/CD28珠粒(DynabeadsTM人T活化剂CD3/CD28;ThermoFisher Scientific,目录号11132D)并将其重悬在T细胞培养基中。以1:1的比将珠粒添加到富集的人CD8⁺T细胞中并在37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂下温育48小时。接下来,使用磁体除去珠粒,并将细胞在PBS中洗涤两次并再次计数。

[0350] 使用bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR和IgG1-huCD3-FEAL(30 μ g/mL)和R-藻红蛋白(PE)缀合的山羊抗人IgG F(ab')₂(在GMB FACS缓冲液中1:200稀释;Jackson ImmunoResearch,目录号109-116-098),通过流式细胞术证实bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR和IgG1-huCD3-FEAL与激活的CD8⁺T细胞的结合。

[0351] 将激活的CD8⁺T细胞接种在圆底96孔板(30,000个细胞/孔)中,沉淀,并重悬在30 μ L测定培养基(含有25mM HEPES和L-谷氨酰胺的RPMI-1640,其补充有0.1% [w/v]牛血清白

蛋白组分V (BSA; Roche, 目录号10735086001) 和青霉素/链霉素) 中。随后, 将50 μ L的bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR、IgG1-huCD3-FEAL、IgG1-b12-FERR、IgG1-CD52-E430G或IgG1-b12 (在测定培养基中以2倍稀释级至最终浓度为 1.7×10^{-4} -30 μ g/mL) 添加到每个孔中, 并在37 $^{\circ}$ C下温育15分钟以允许抗体与细胞结合。

[0352] 添加作为C1q来源的人血清 (20 μ L/孔; Sanquin, 批号20L15-02) 至20%的最终浓度。细胞在冰上温育45分钟, 接着用冷的GMB FACS缓冲液洗涤两次, 并在存在或不存在别藻蓝蛋白缀合的小鼠抗CD8 (BD Biosciences, 目录号555369; 在GMB FACS缓冲液中1:50稀释) 的情况下, 与50 μ L异硫氰酸荧光素 (FITC) 缀合的兔抗人C1q (最终浓度为20 μ g/mL (DAKO, 目录号F0254); 在GMB FACS缓冲液中1:75稀释) 一起在黑暗中以4 $^{\circ}$ C下温育30分钟。将细胞用冷的GMB FACS缓冲液洗涤两次, 重悬在20 μ L补充有2mM乙二胺四乙酸 (EDTA; Sigma-Aldrich, 目录号03690) 和4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 活力染料 (1:5,000; BD Pharmingen, 目录号564907) 的GMB FACS缓冲液中。在iQue3Screener (Intellicyt Corporation) 上通过流式细胞术分析C1q与活细胞的结合 (如通过DAPI排除鉴定的)。使用iQue软件 (Intellicyt Corporation, **ForeCyt**[®] Enterprise Client Edition 6.2[R3], 版本6.2.652) 分析数据。使用GraphPad Prism软件, 使用非线性回归分析 (具有可变斜率的S形剂量反应) 分析结合曲线。

结果

[0353] 图27A显示, 尽管观察到C1q与膜结合的IgG1-CD52-E430G的剂量依赖性结合, 但未观察到C1q与膜结合的bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR或IgG1-huCD3-FEAL, 或与非结合对照抗体的结合。

[0354] B. C1q与结合至表达CD30的细胞的bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR的结合
使用NCEB-1套细胞淋巴瘤细胞测试补体蛋白C1q与CD30结合的bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR和IgG1-huCD30-MDX060-FERR的结合。作为阳性对照, 包括IgG1-7D8-E430G (抗CD20), 其不含有惰性突变并保留与C1q结合的能力。作为非结合阴性对照抗体, 包括IgG1-b12-FERR。

[0355] 将NCEB-1细胞以 2×10^6 个细胞/mL的浓度悬浮在测定培养基 (含有0.1%牛血清白蛋白 (BSA, 组分V, Roche, 目录号10735086001) 和1%青霉素/链霉素 (Gibco, 目录号15140-122) 的RPMI-1640 (Lonza, Switzerland, 目录号BE12-115F)) 中。将肿瘤细胞 (50 μ L中100,000个细胞) 添加到96孔圆底板 (Greiner Bio, 目录号650180) 中。接下来, 将30 μ L的bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR、IgG1-CD30-MDX060-FERR或对照抗体 (在测定培养基中以3倍稀释级稀释至最终浓度为 5.6×10^{-5} -10 μ g/mL) 添加到每个孔中, 并在37 $^{\circ}$ C下温育15分钟以允许抗体与细胞结合。

[0356] 将一半细胞 (40 μ L细胞悬浮液, 含有抗体) 铺板在不同的板中以检查抗体结合。使用R-藻红蛋白 (PE) 缀合的山羊抗人IgG F(ab')₂ (在FACS缓冲液中1:500稀释; Jackson ImmunoResearch, 目录号109-116-098), 通过流式细胞术证实bsG1-huCD3-FEAL $\times$ CD30-MDX060-FERR和IgG1-CD30-MDX060-FERR与NCEB-1细胞的结合。

[0357] 将人血清 (10 μ L/孔; Sanquin, 批号21K04-01) 添加到剩余的40 μ L细胞悬浮液 (最终浓度的20%) 中并在冰上温育45分钟, 接着用FACS缓冲液洗涤并与25 μ L FITC-缀合的兔抗C1q抗体 (最终浓度为20 μ g/mL (DAKO, 目录号F0254); 在FACS缓冲液中稀释) 一起在黑暗中以

4℃下温育30分钟。将细胞用冷的FACS缓冲液洗涤,重悬在30μL补充有T0-PRO™-3活力染色剂(1:5000;ThermoFisher,目录号T3605)的FACS缓冲液中,并在iQue3Screener(Intellicyt Corporation)上测量。使用iQue软件(Intellicyt Corporation,ForeCyt® Enterprise Client Edition 6.2[R3],版本6.2.652)分析数据。使用GraphPad Prism软件,使用非线性回归分析(具有可变斜率的S形剂量反应)分析结合曲线。

结果

[0358] 图27B显示,虽然观察到C1q与膜结合的IgG1-CD20-E430G的剂量依赖性结合,但未观察到C1q与膜结合的bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR或IgG1-CD30-MDX060-FERR或与非结合对照抗体的结合。

[0359] 由此,这些结果表明bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR不结合C1q,证实了功能上惰性的主链。

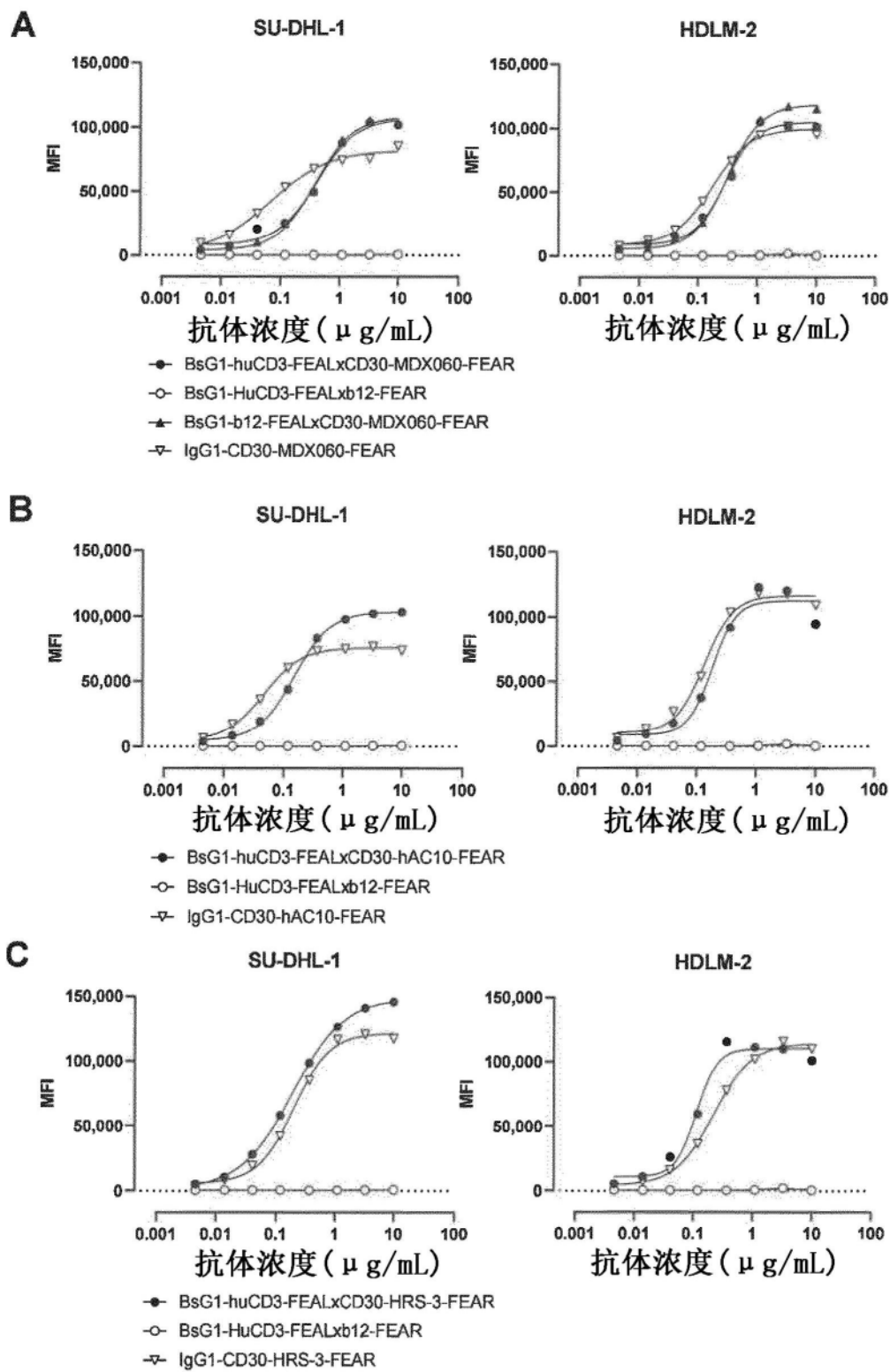


图1

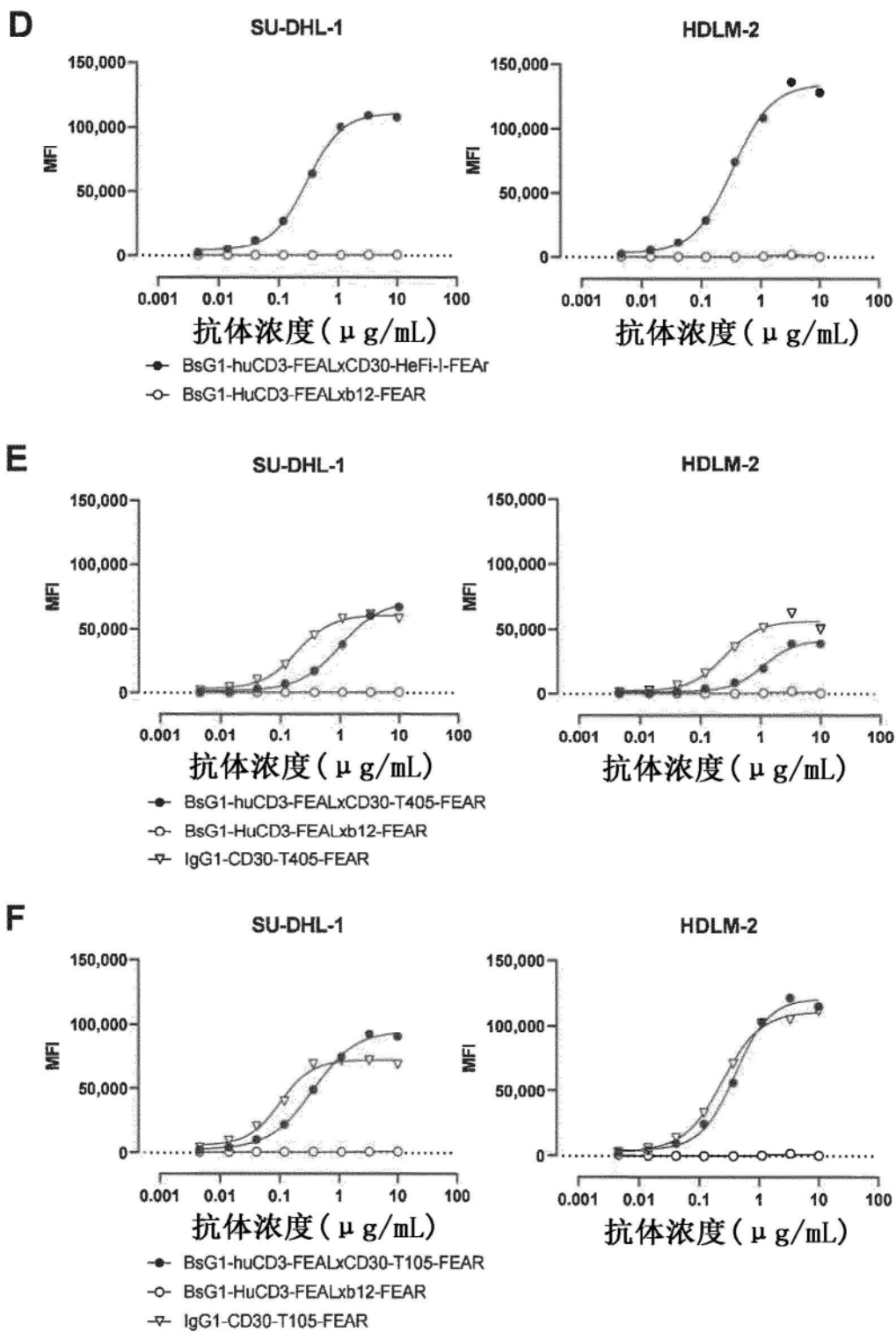


图1(续)

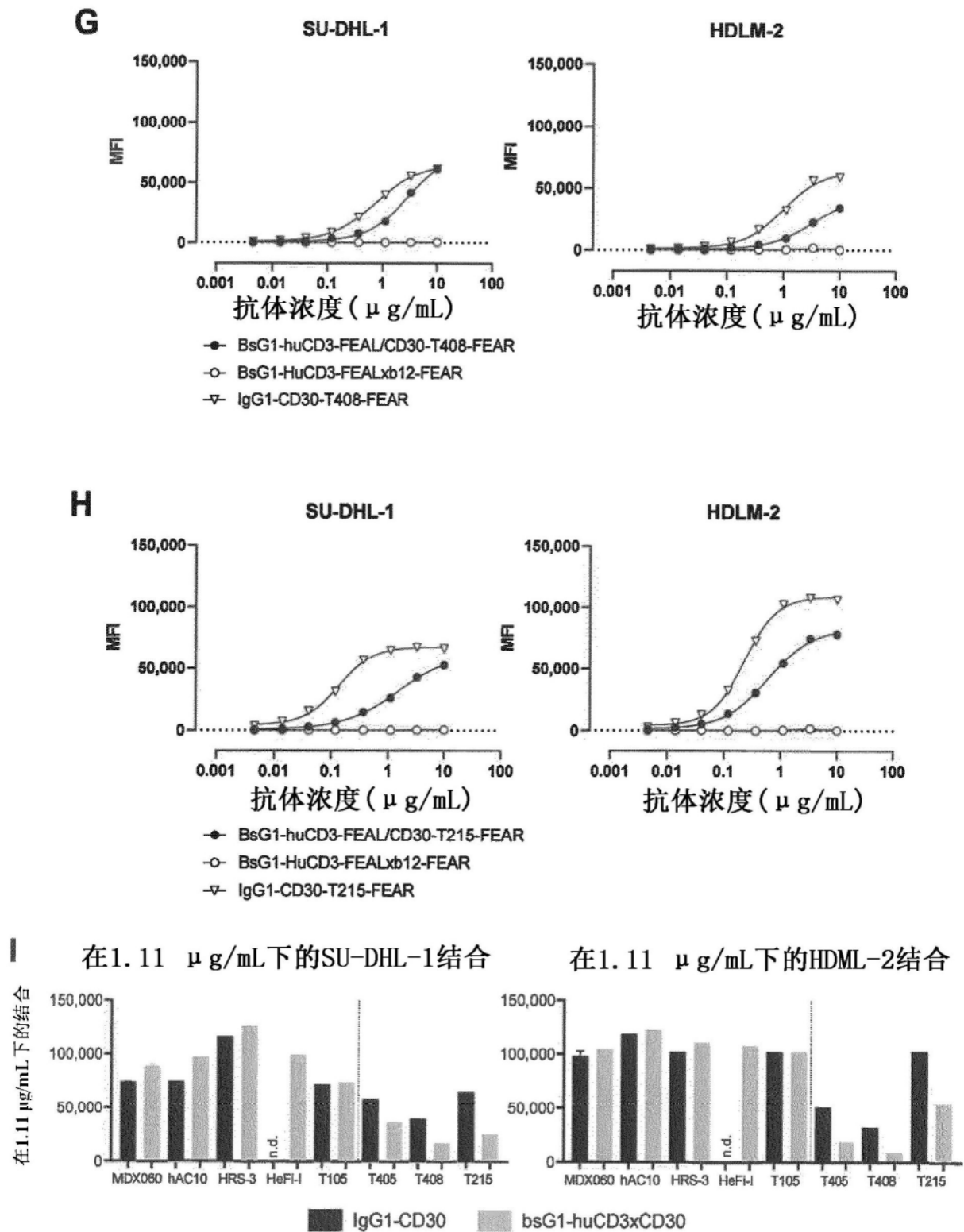


图1 (续)

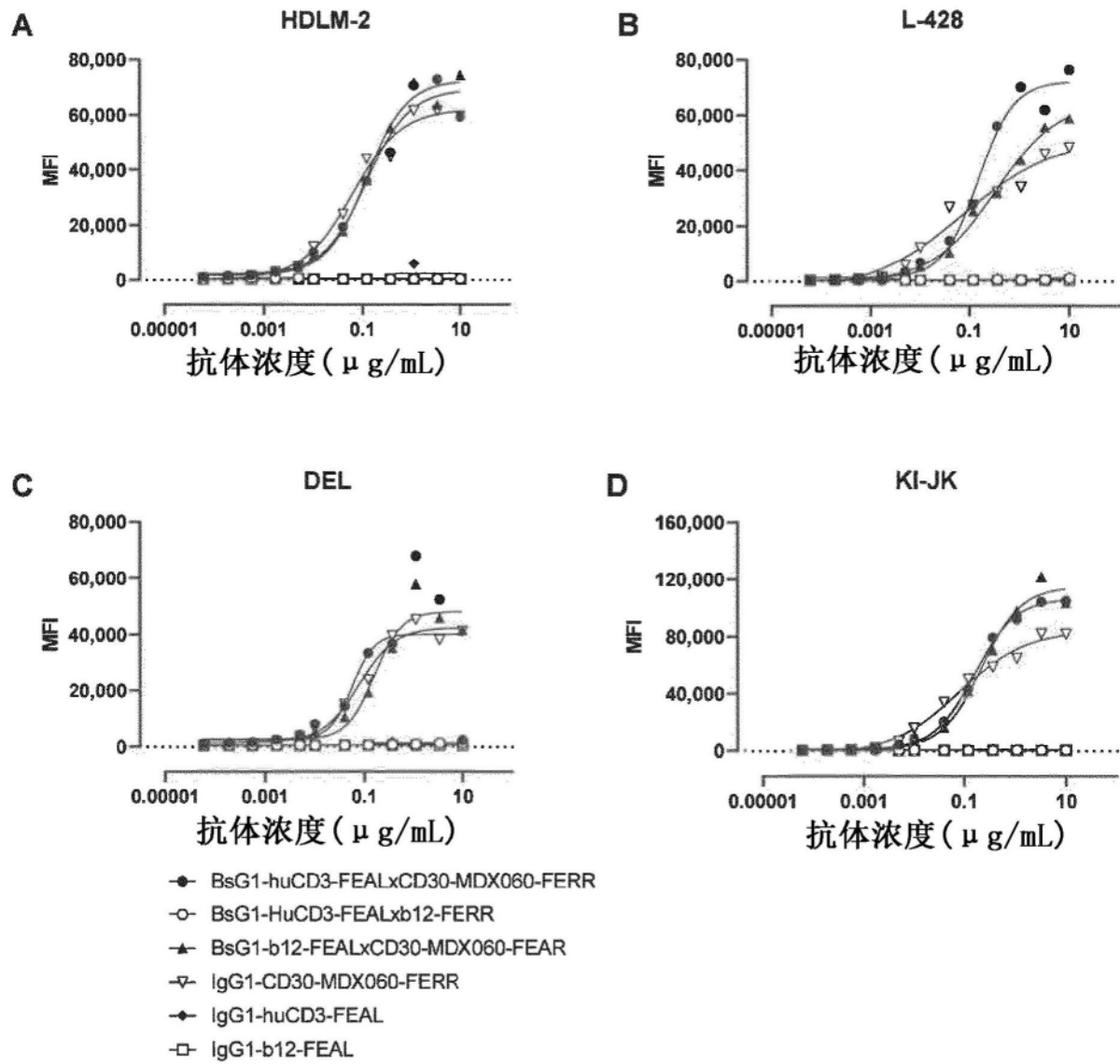


图2

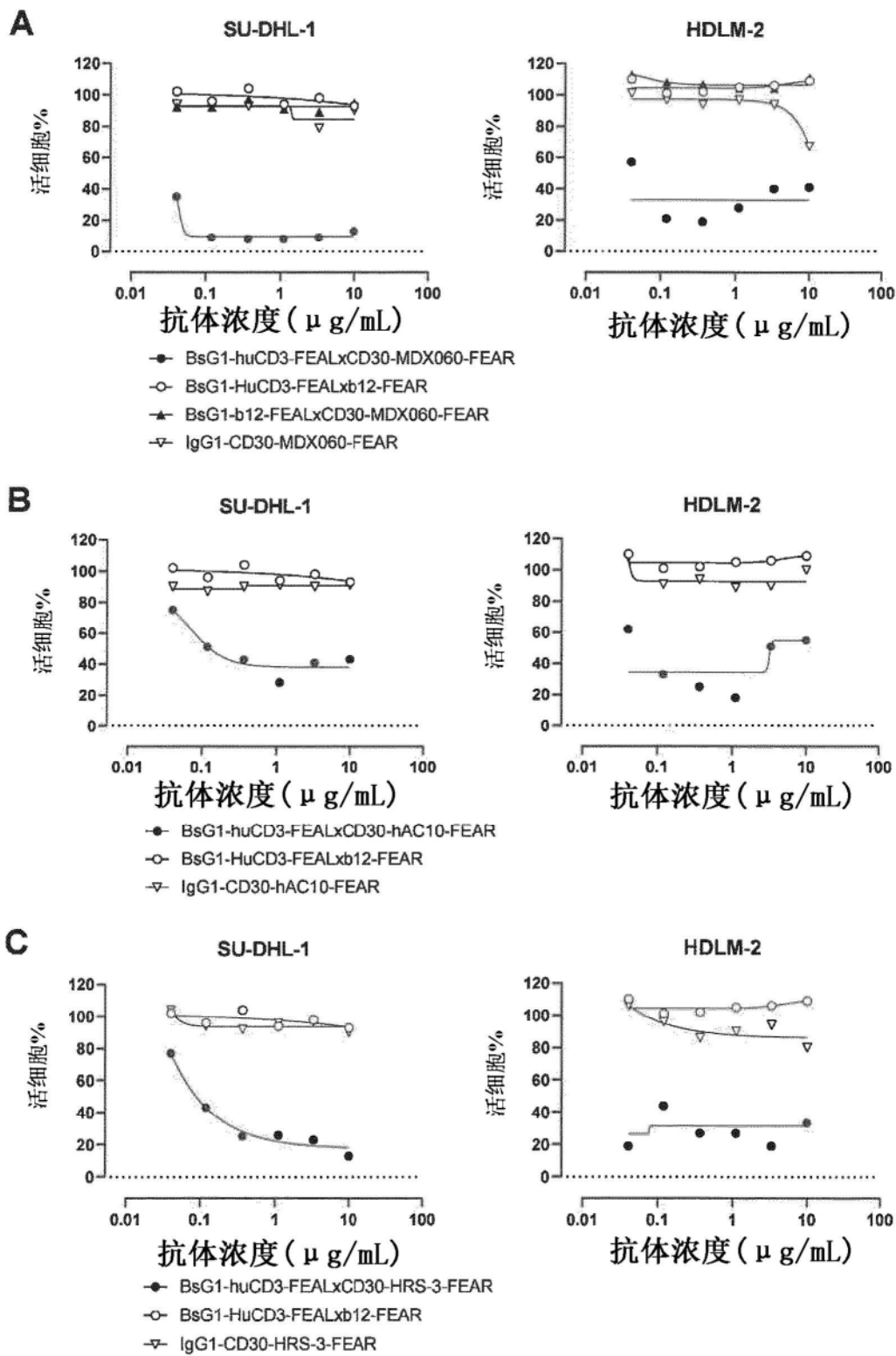


图3

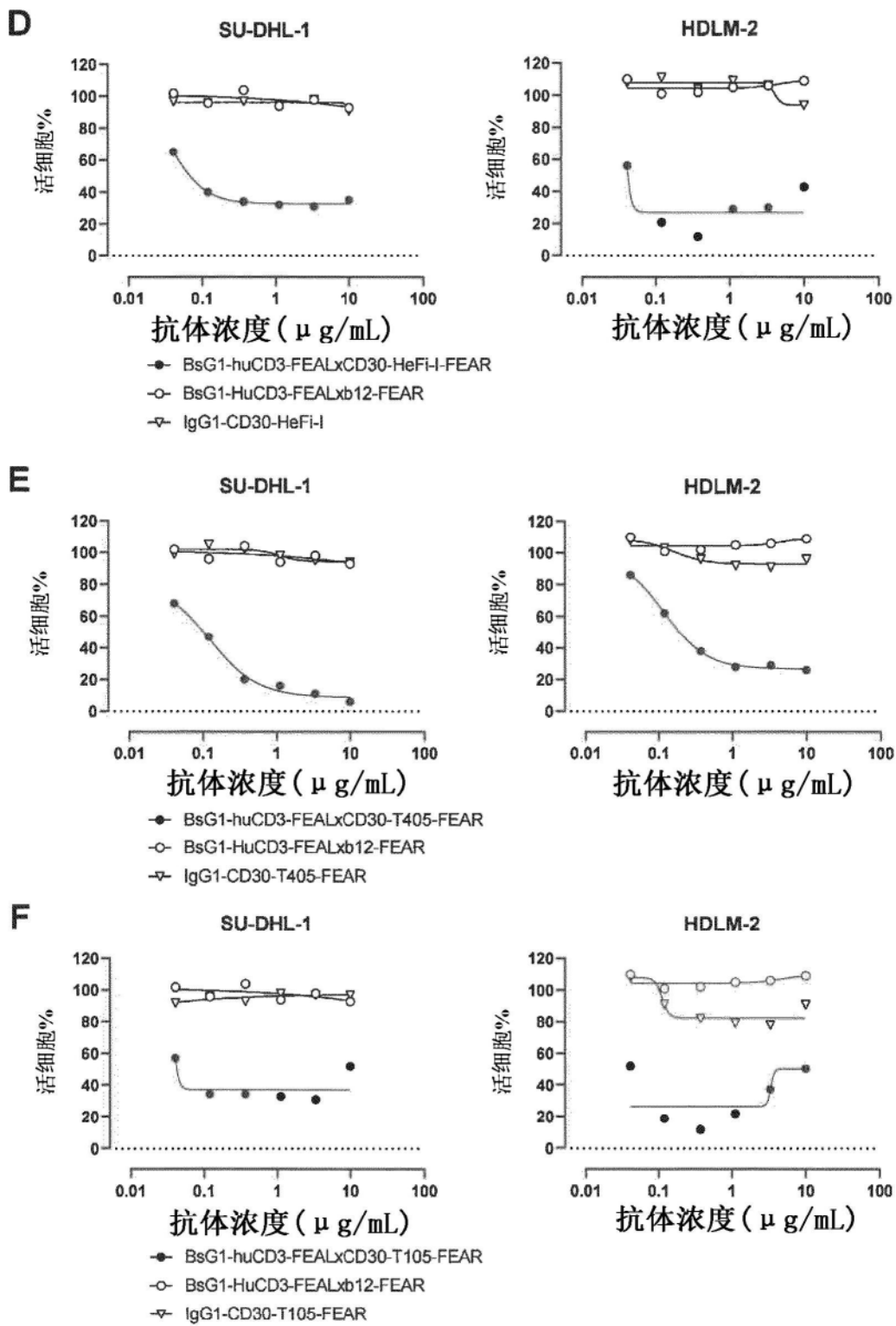


图3(续)

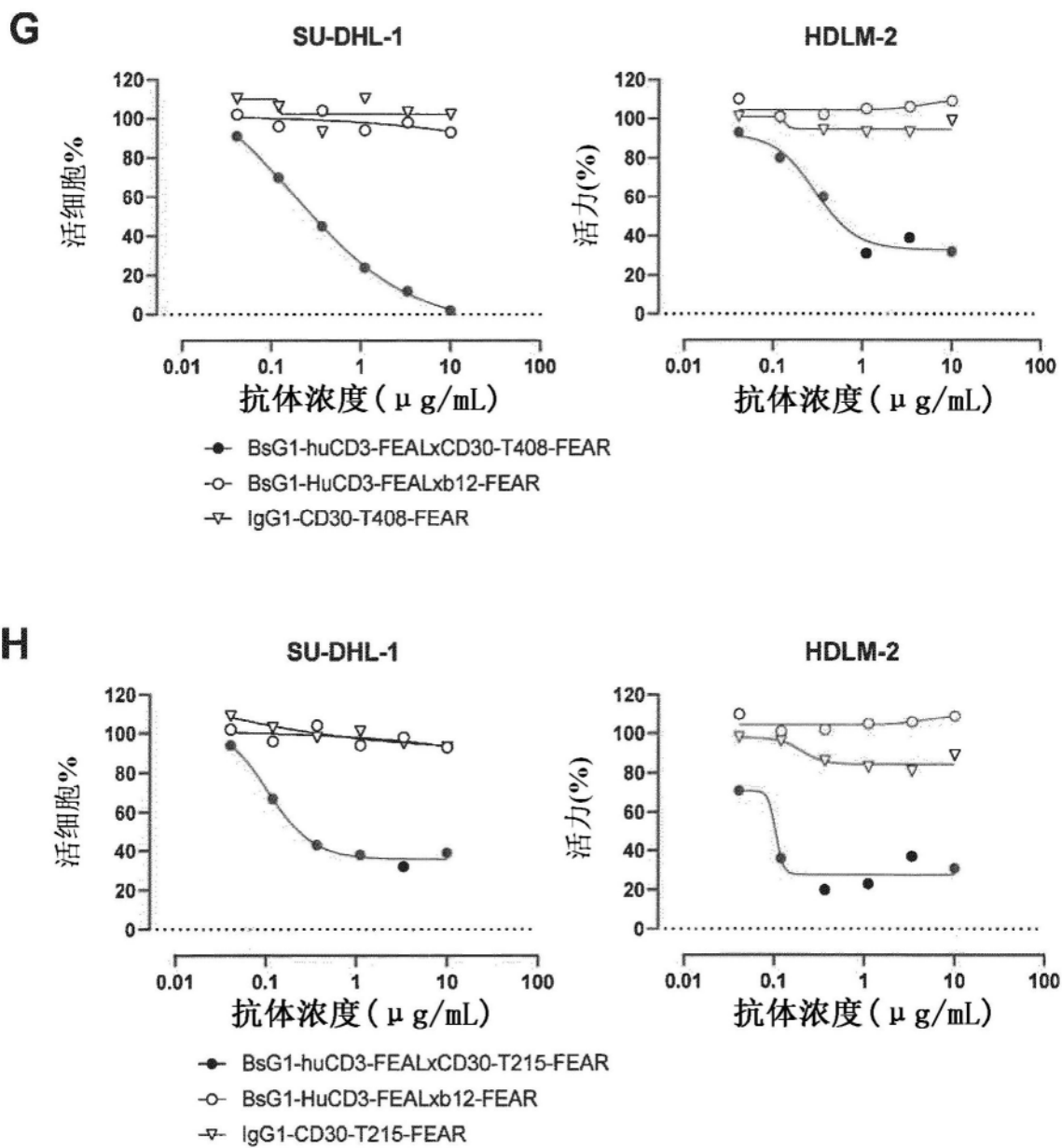


图3 (续)

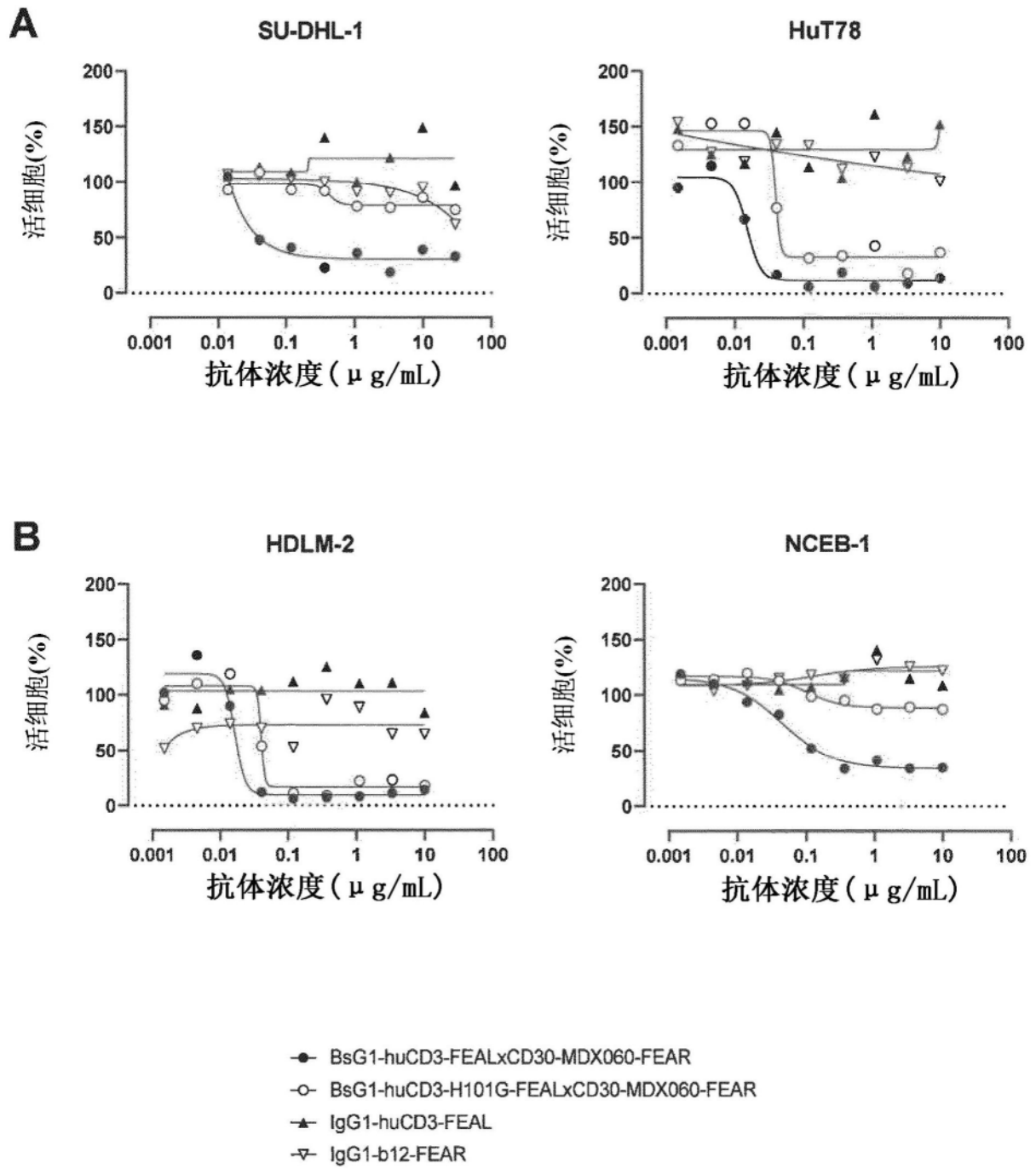


图4

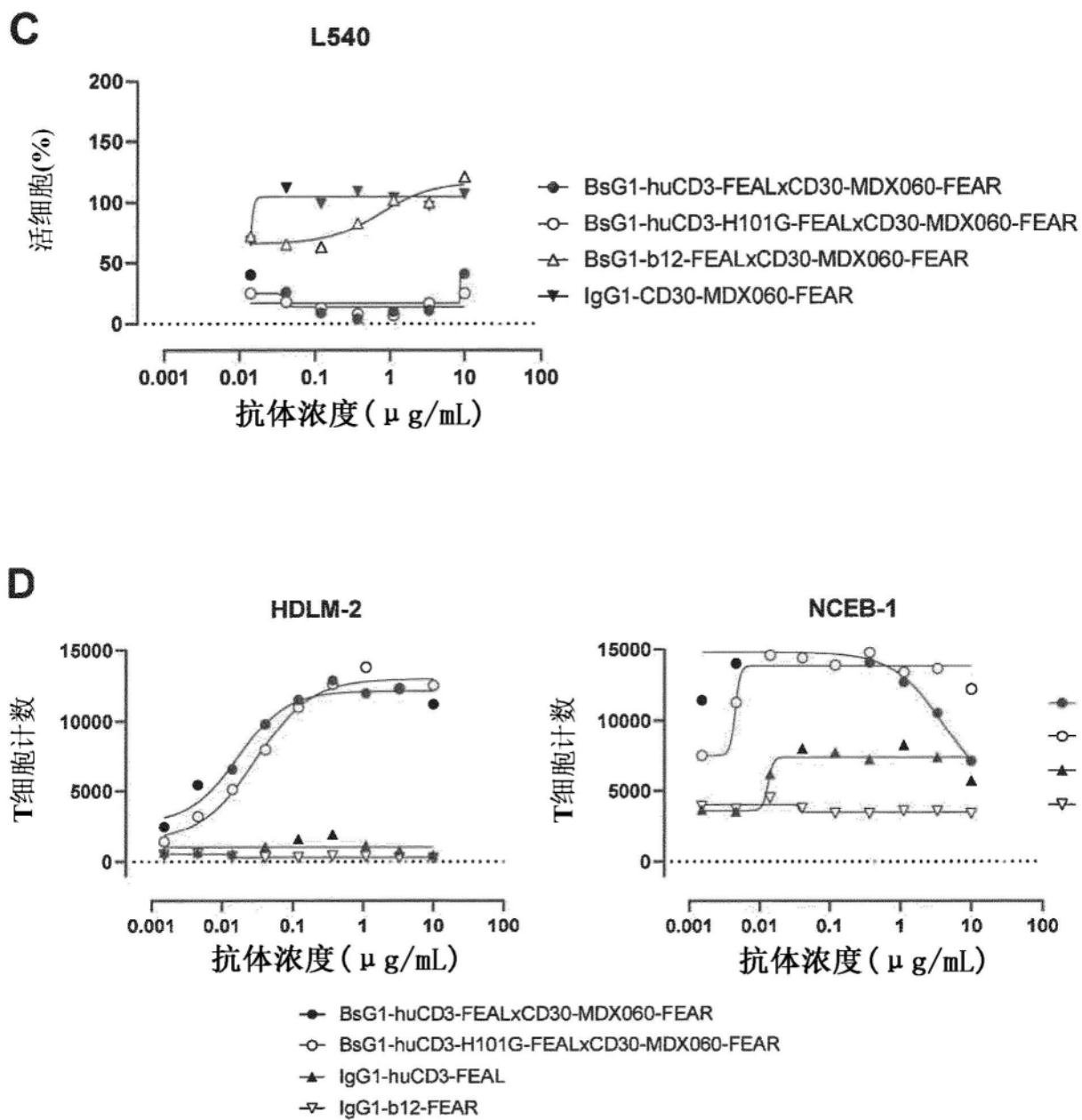


图4(续)

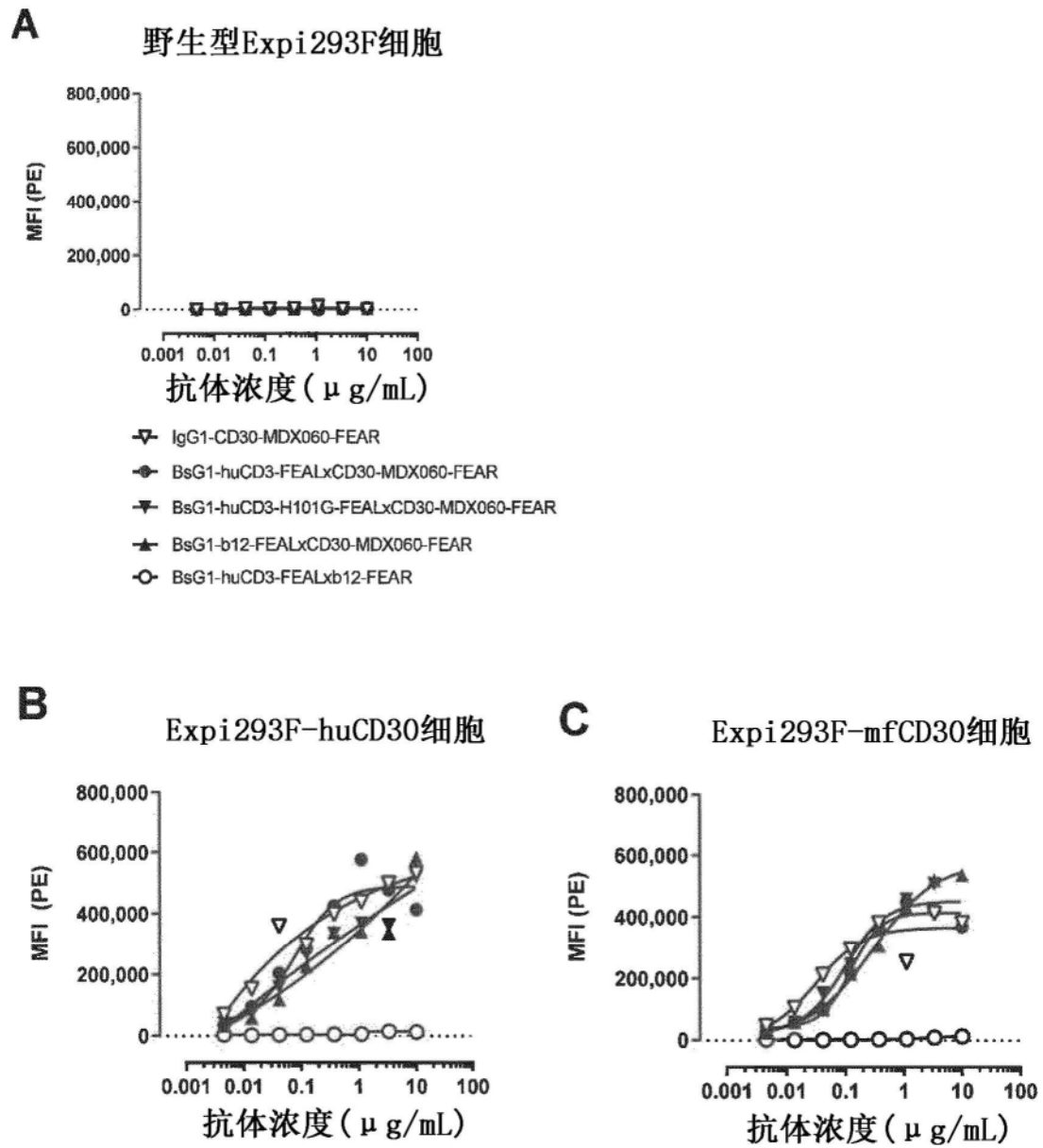


图5

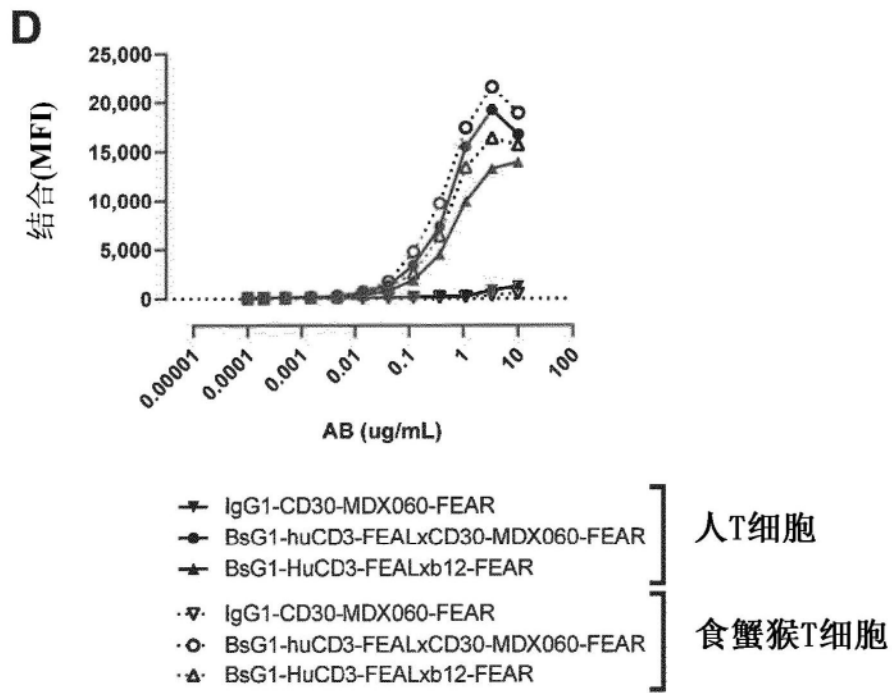


图5 (续)

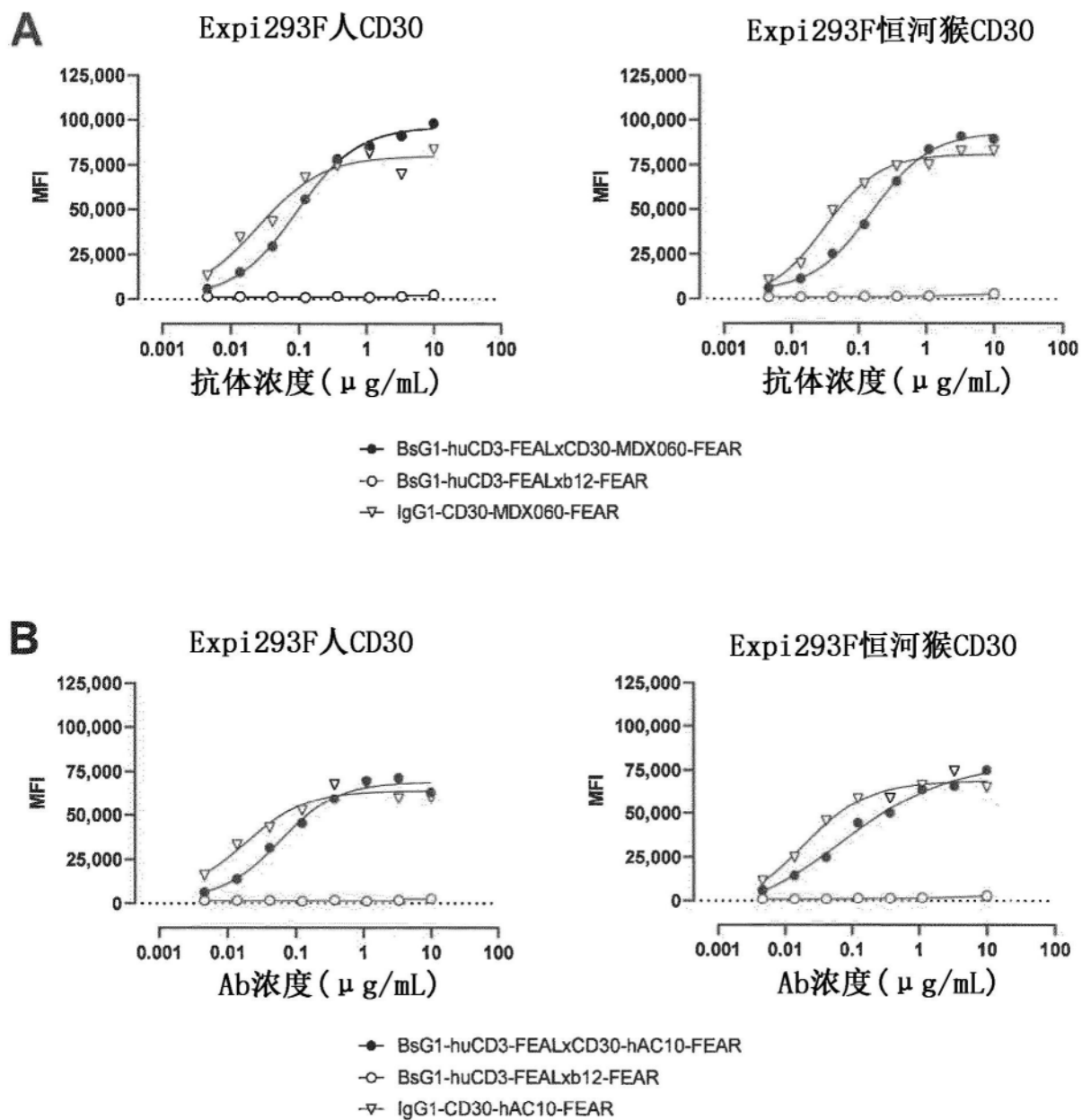


图6

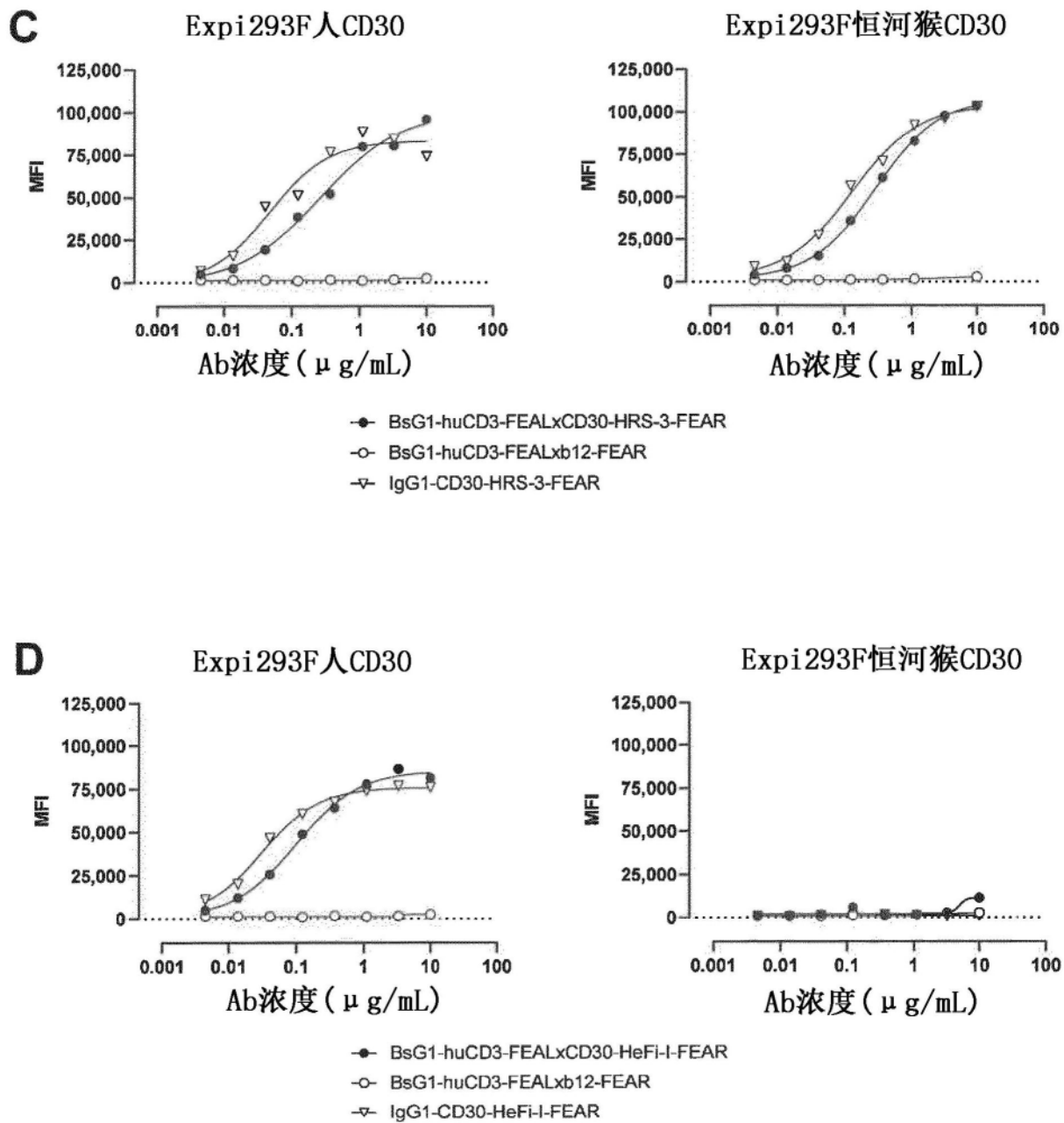


图6(续)

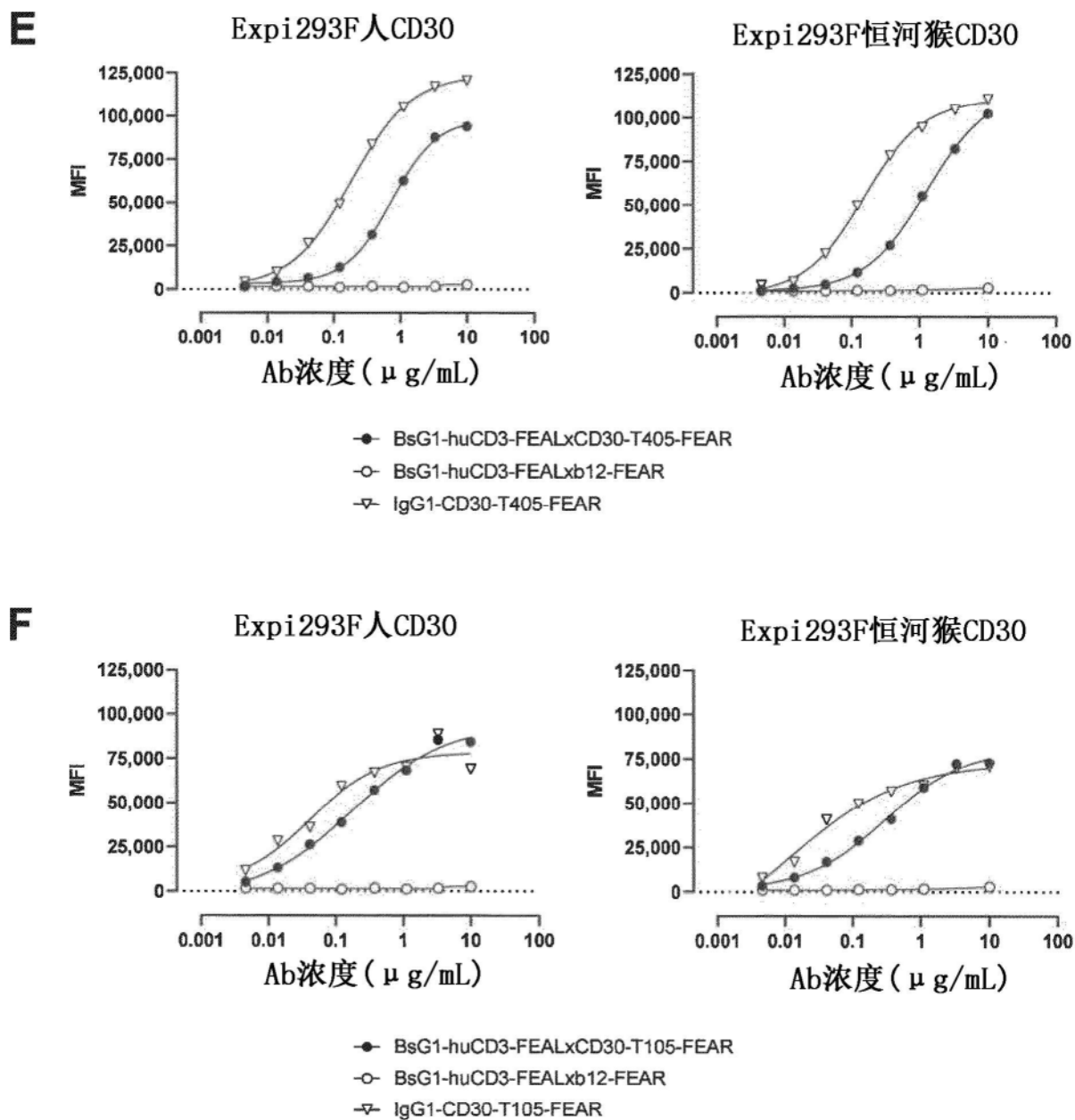


图6 (续)

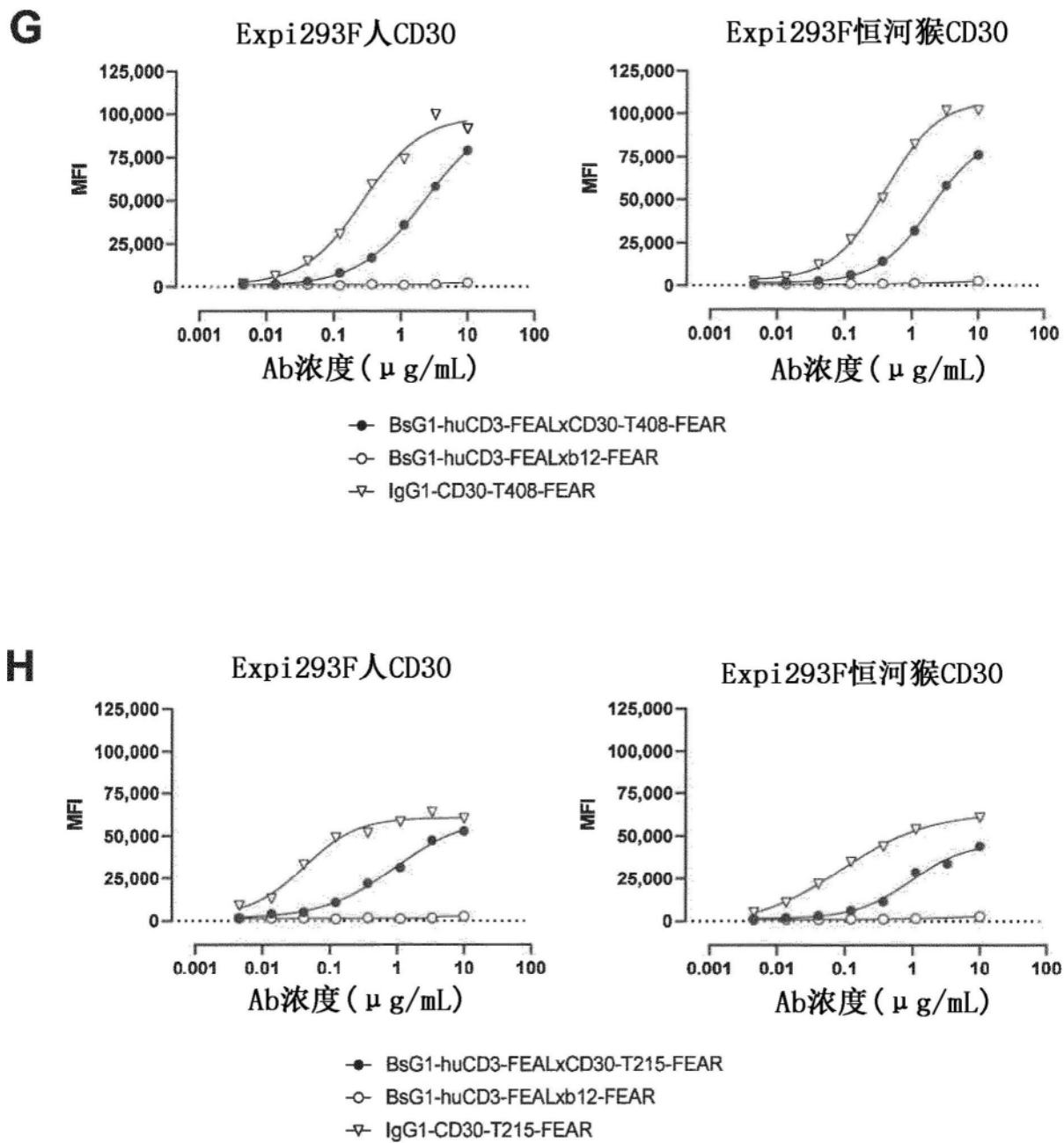


图6(续)

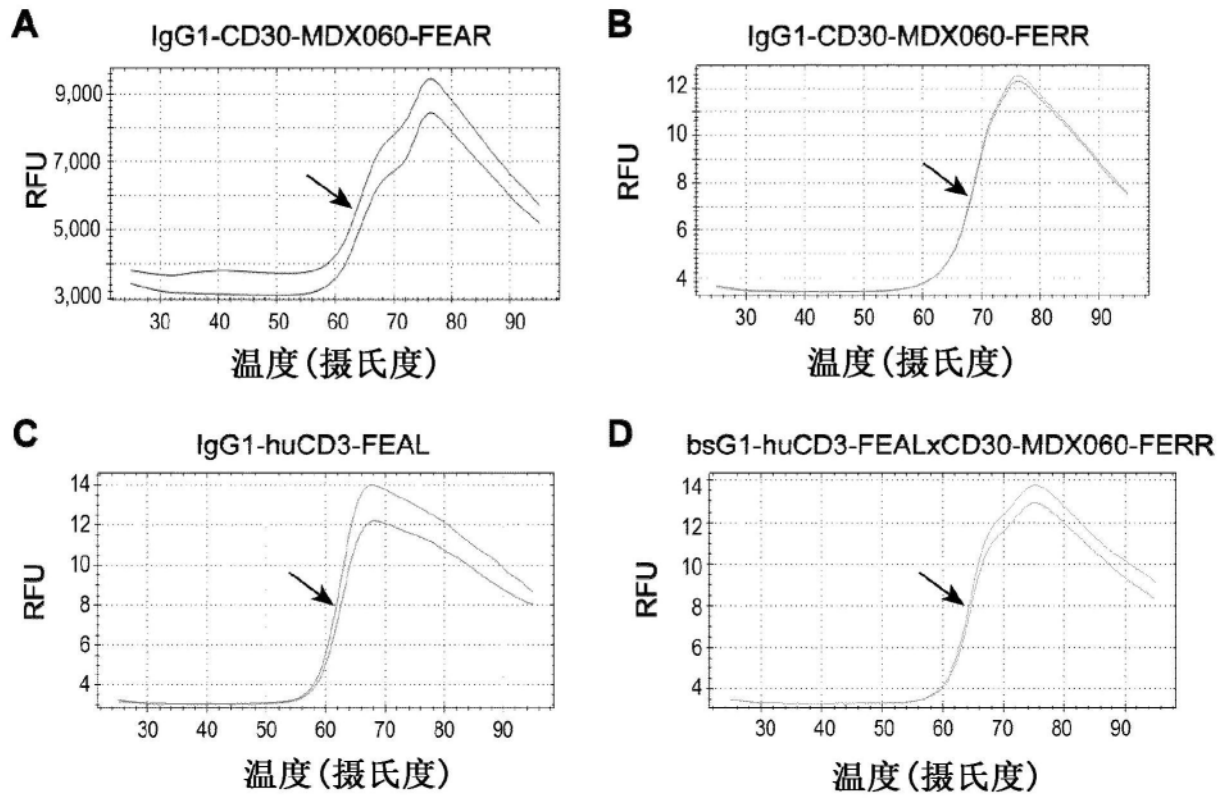


图7

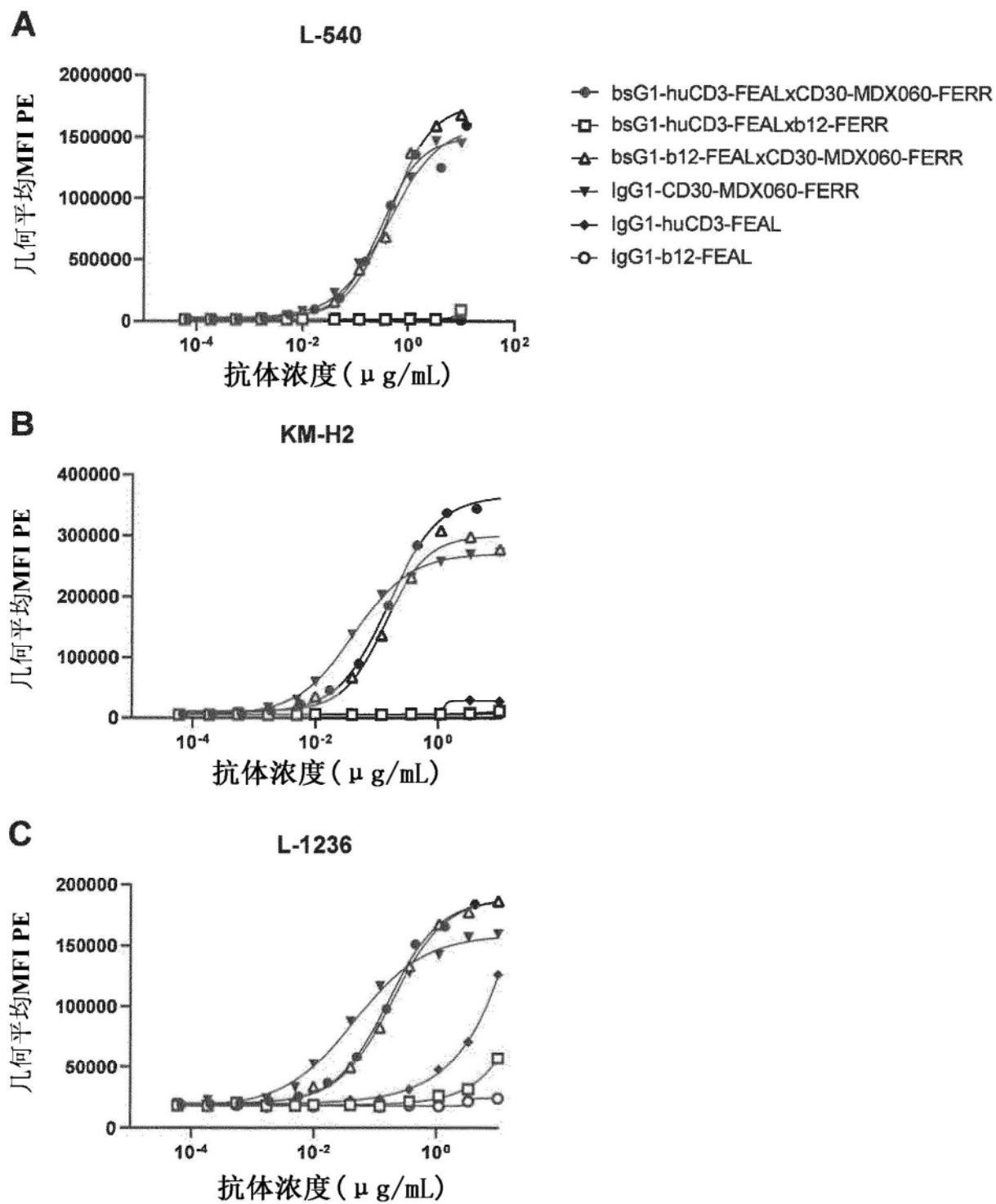


图8

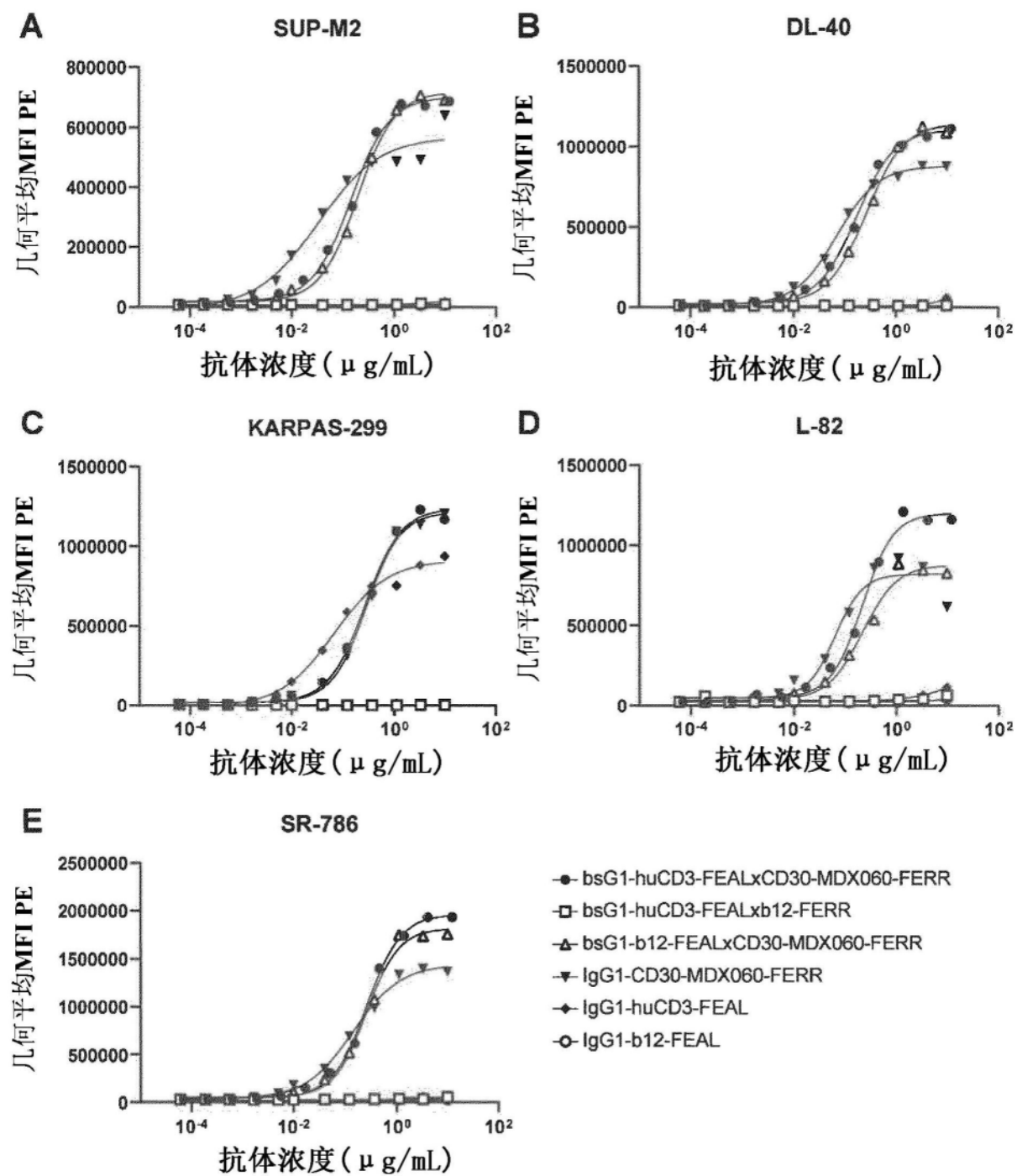


图9

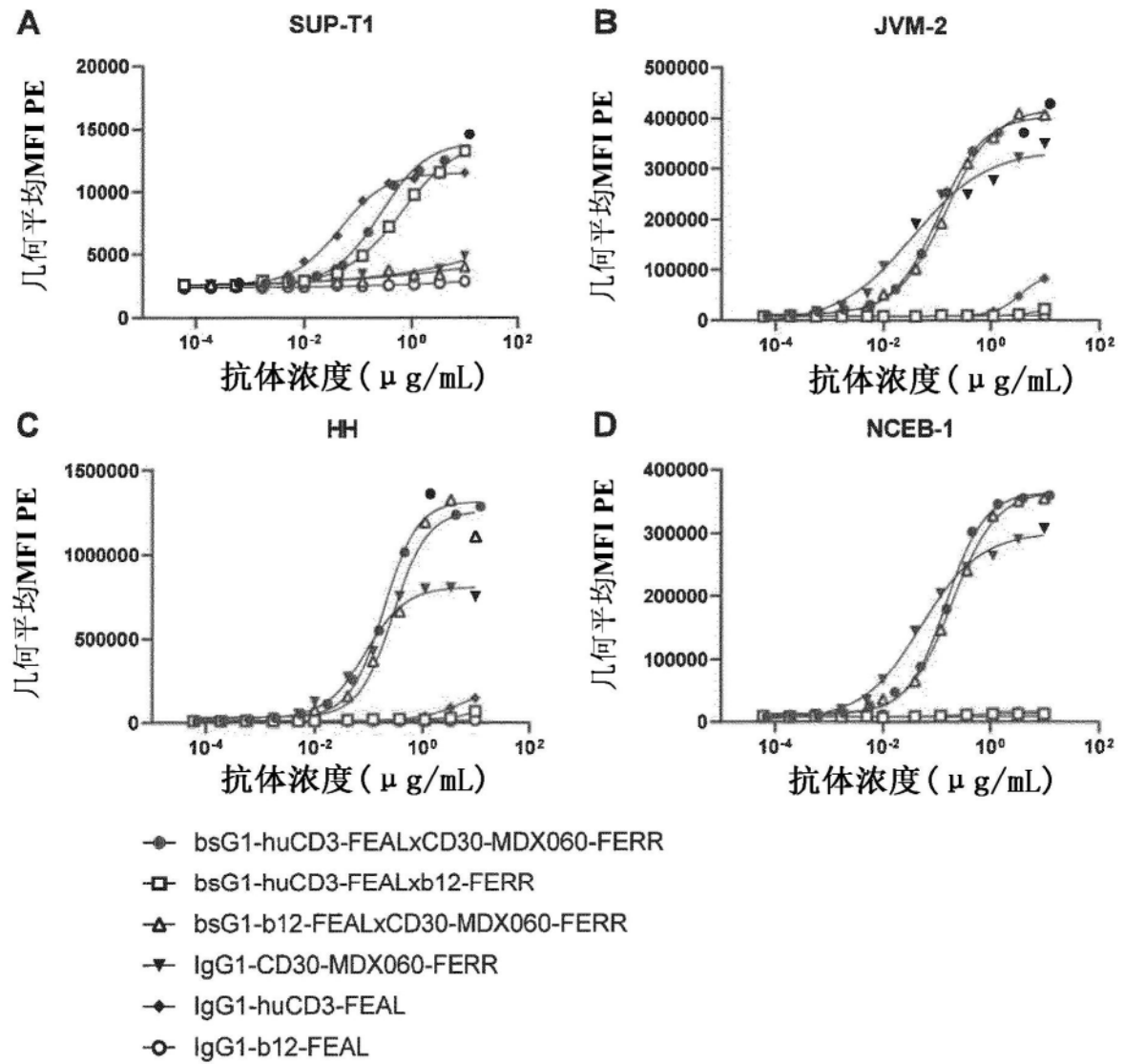


图10

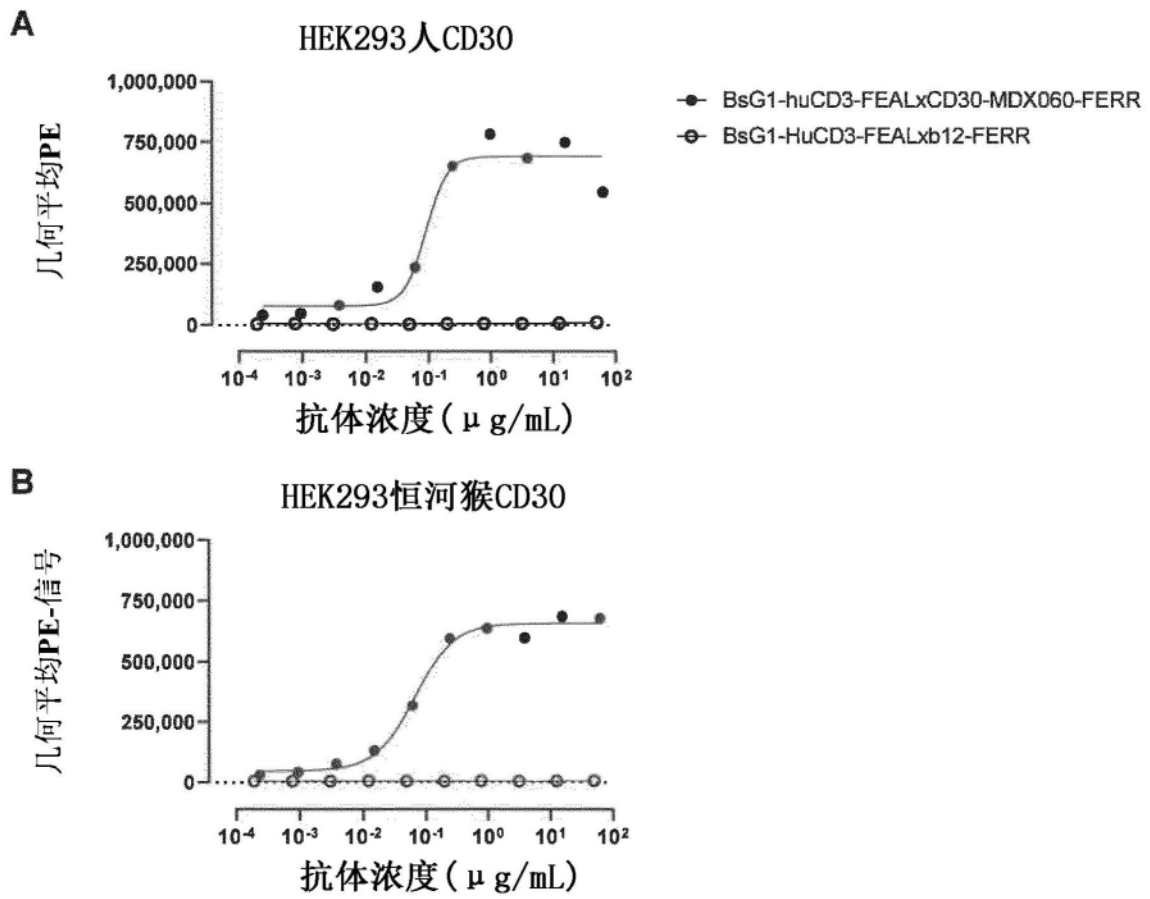


图11

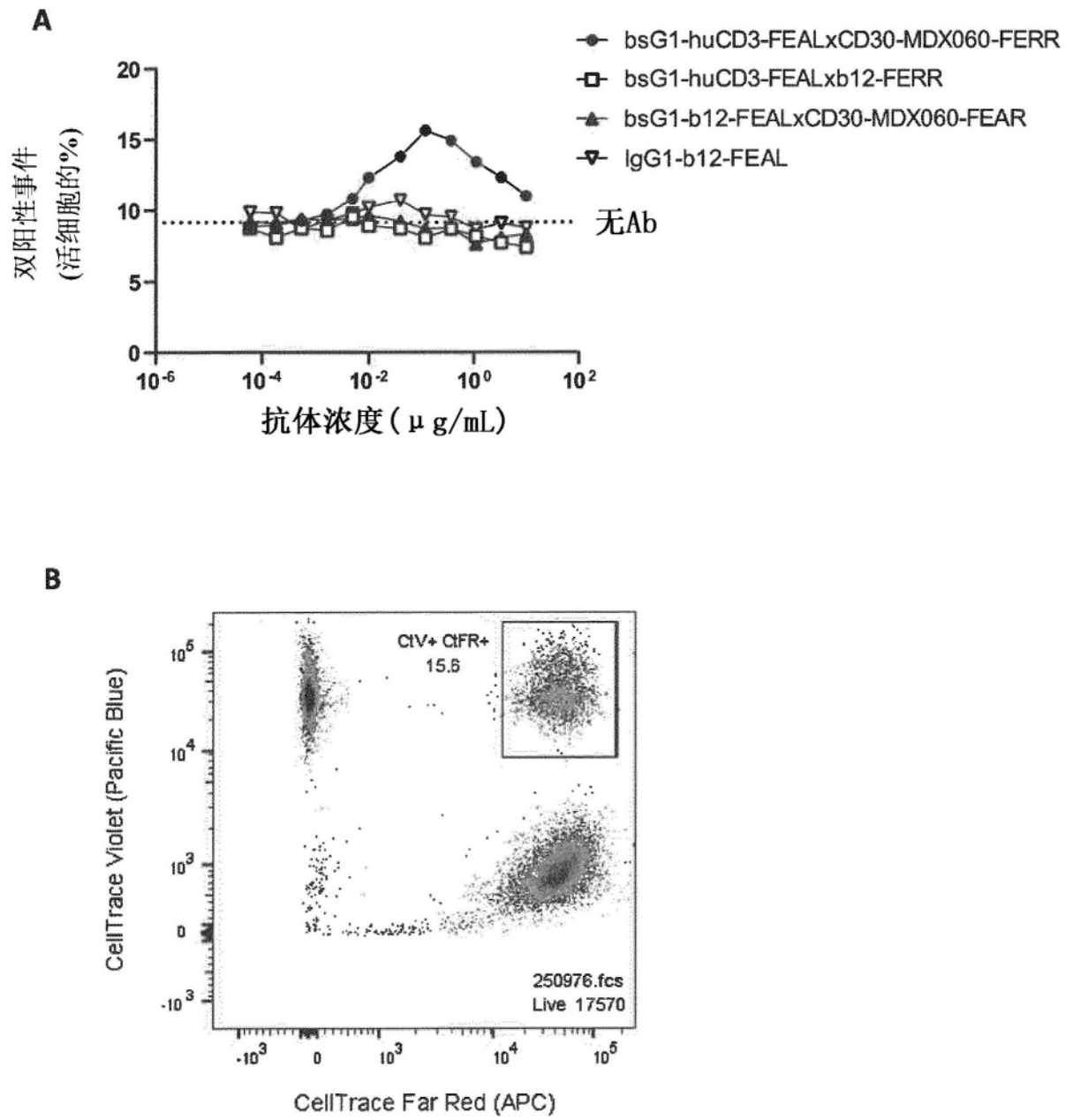


图12

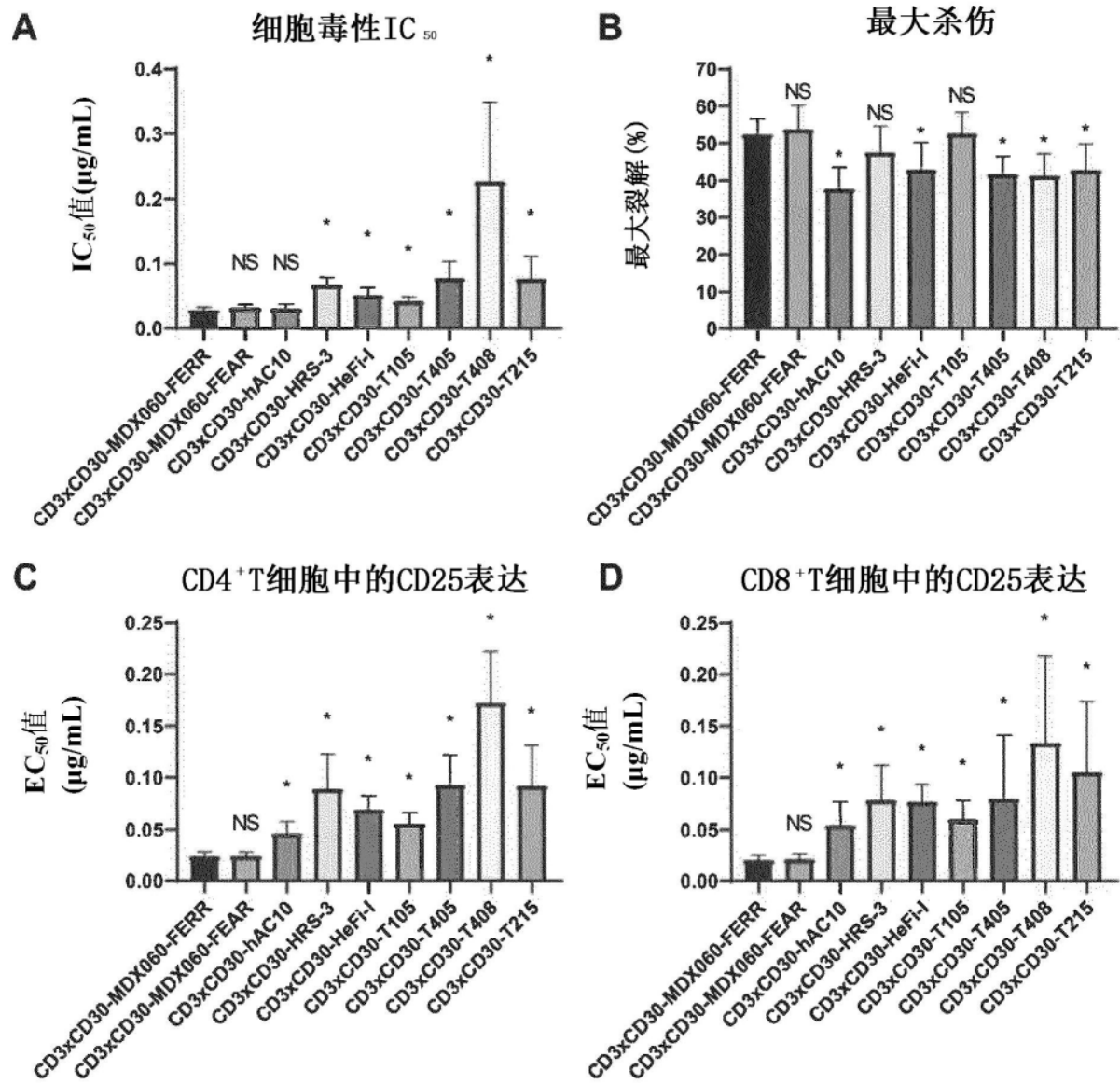


图13

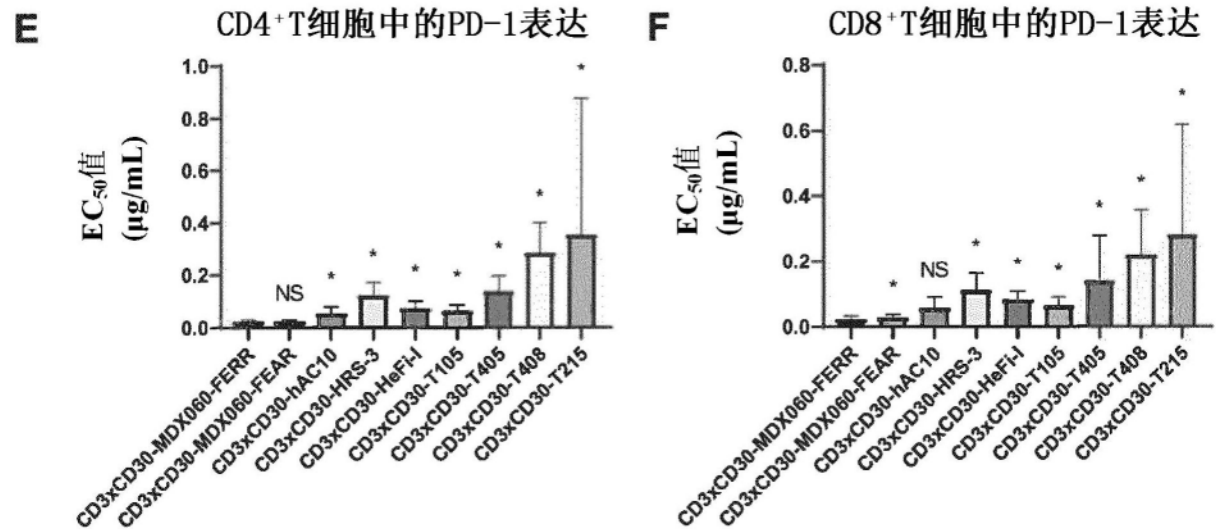


图13(续)

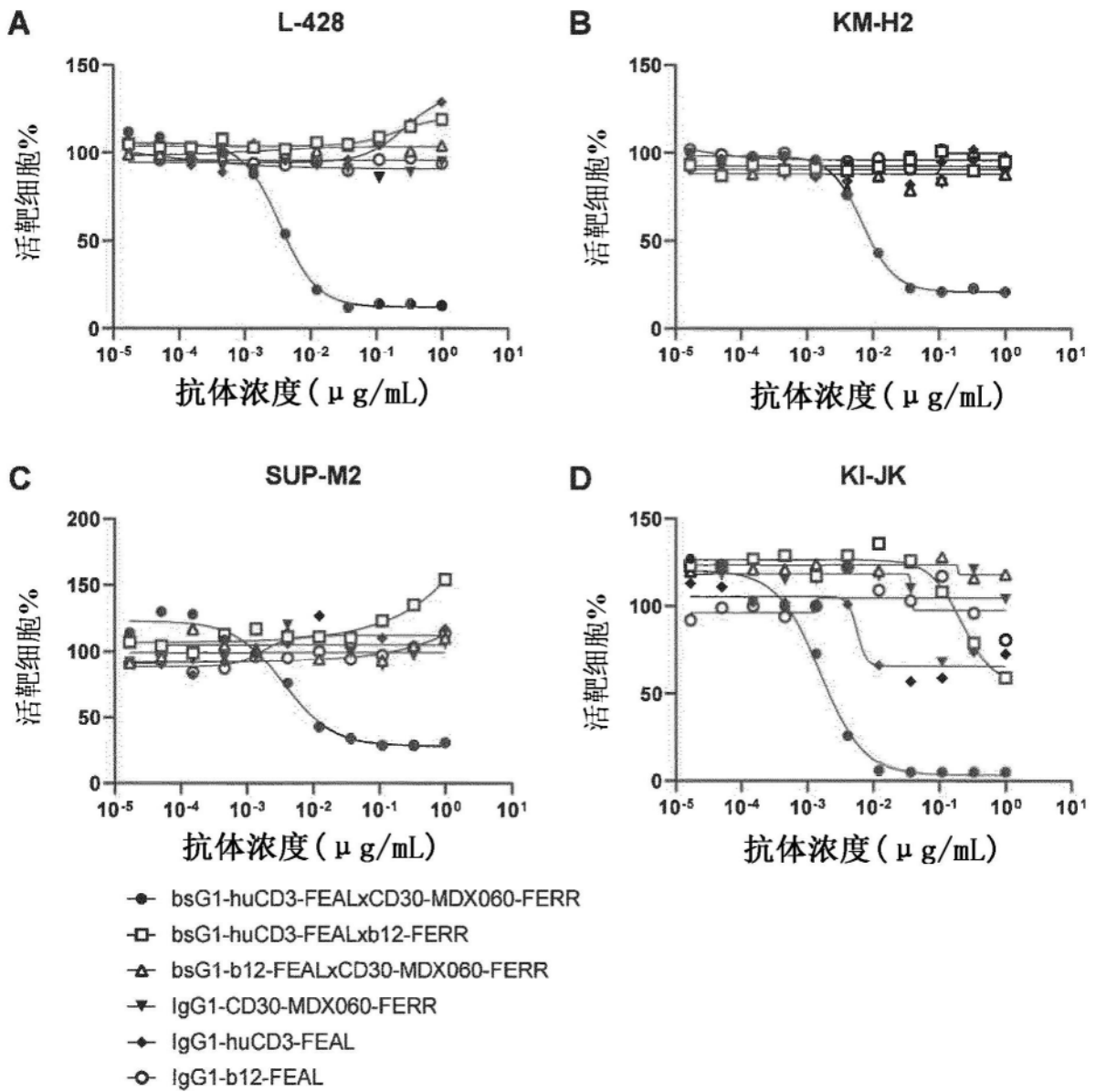


图14

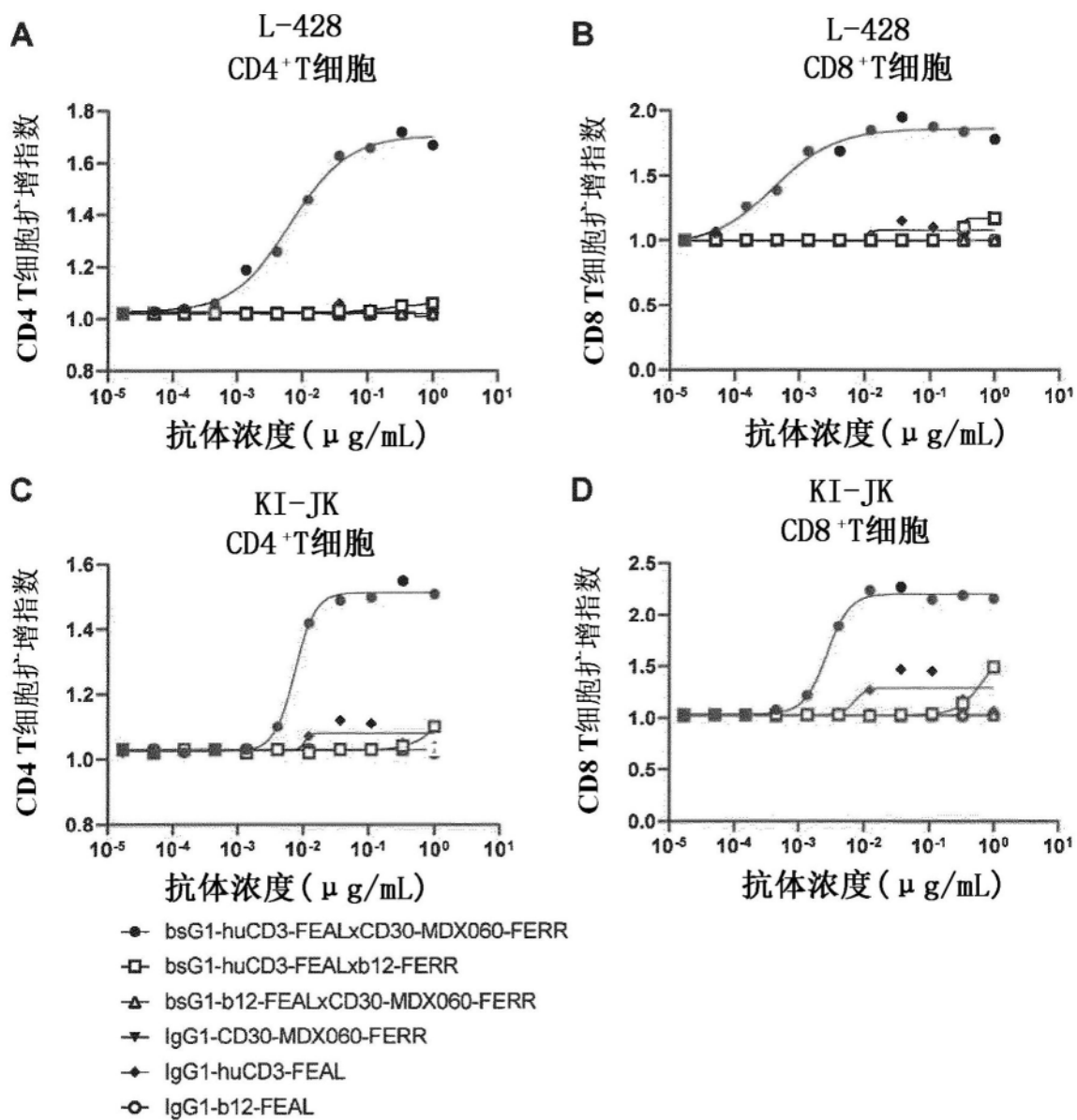


图15

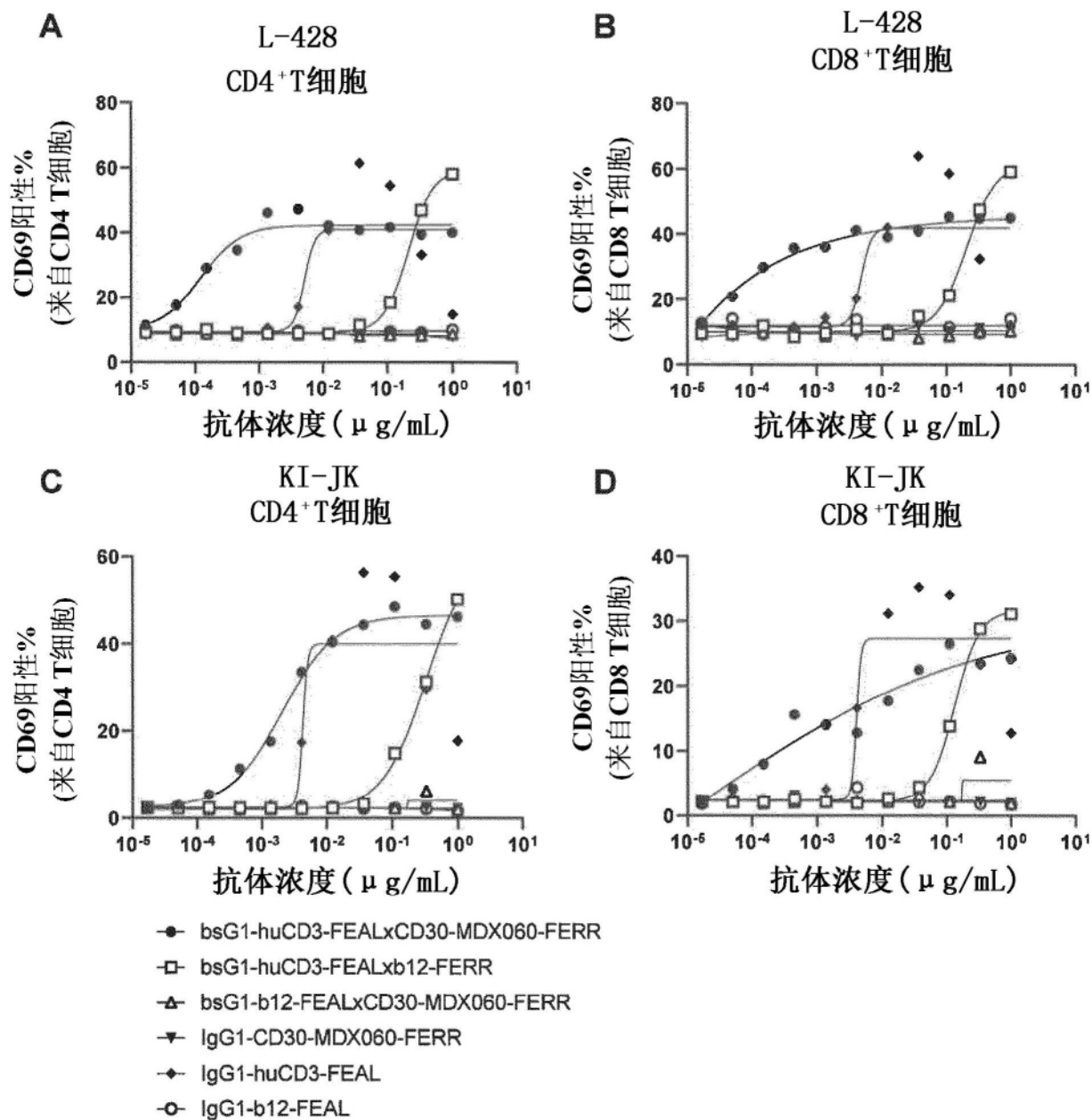


图16

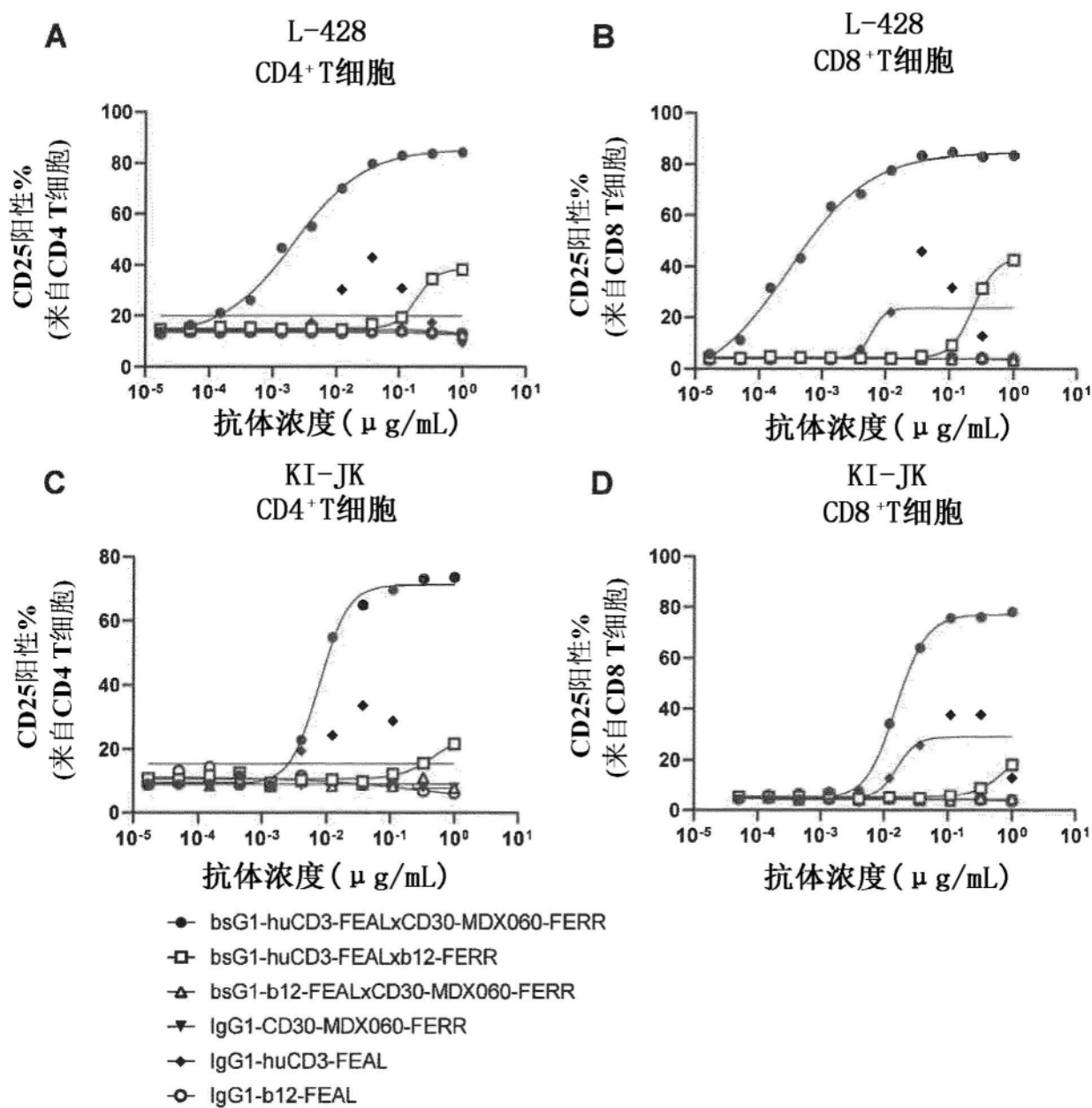


图17

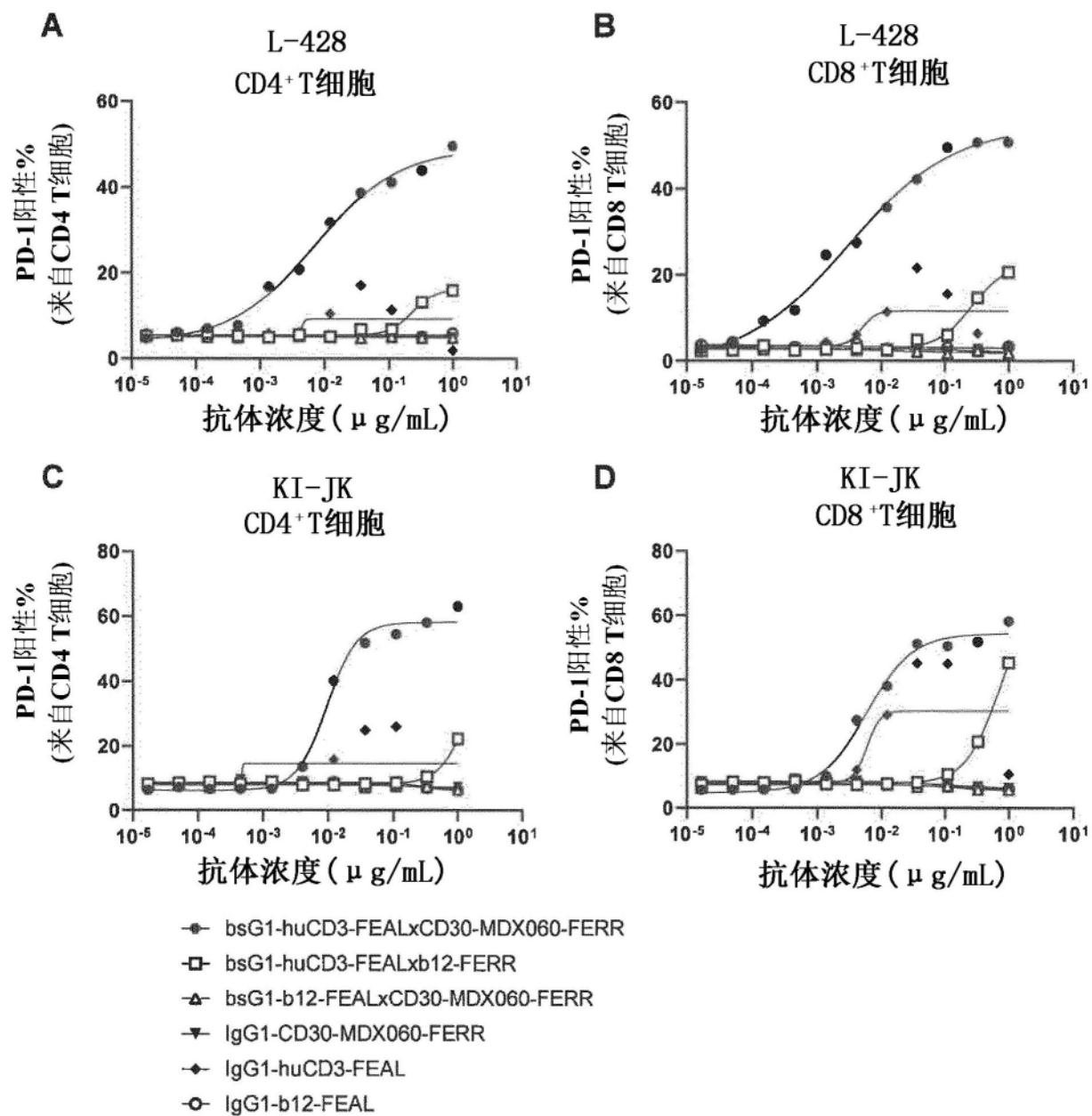


图18

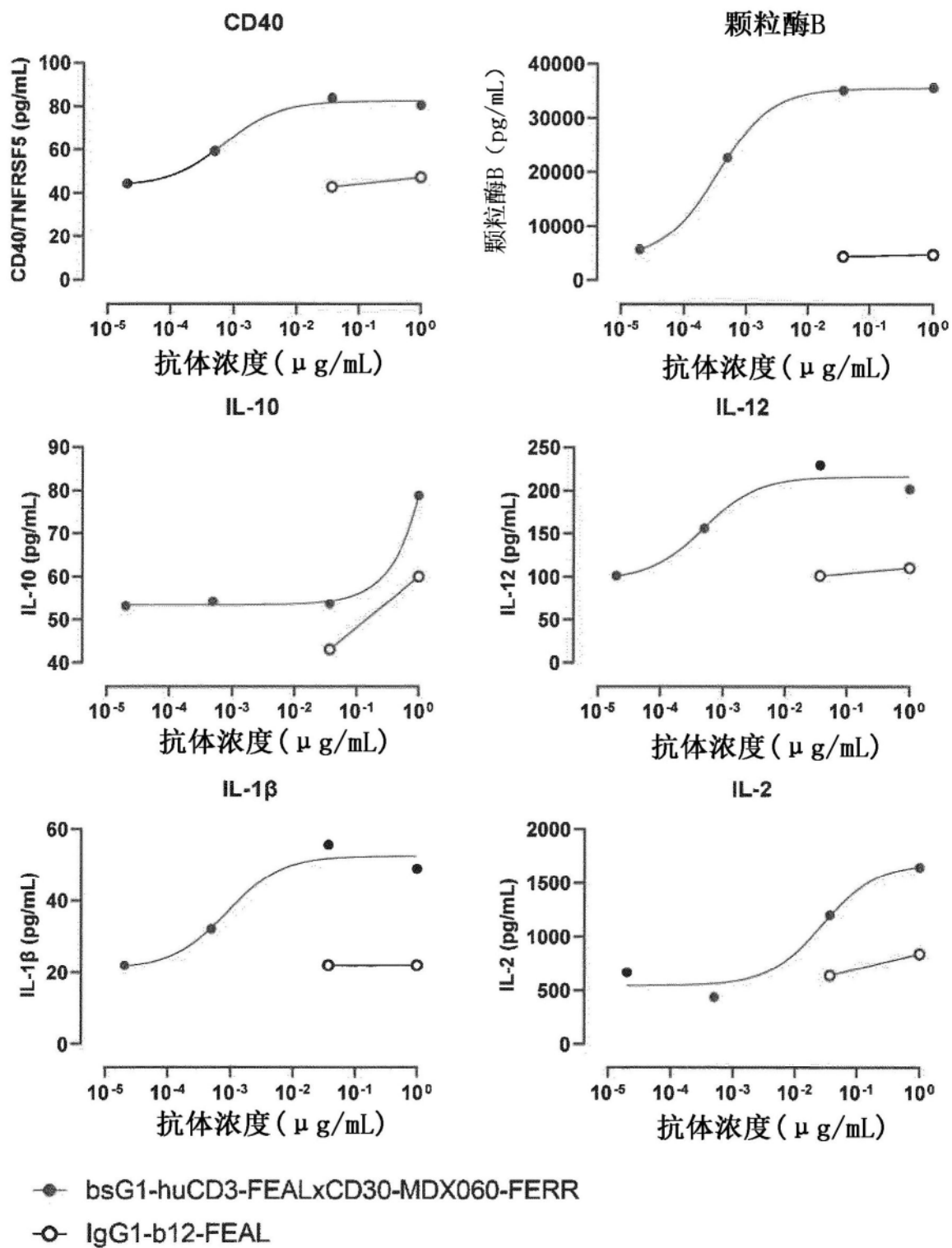


图19

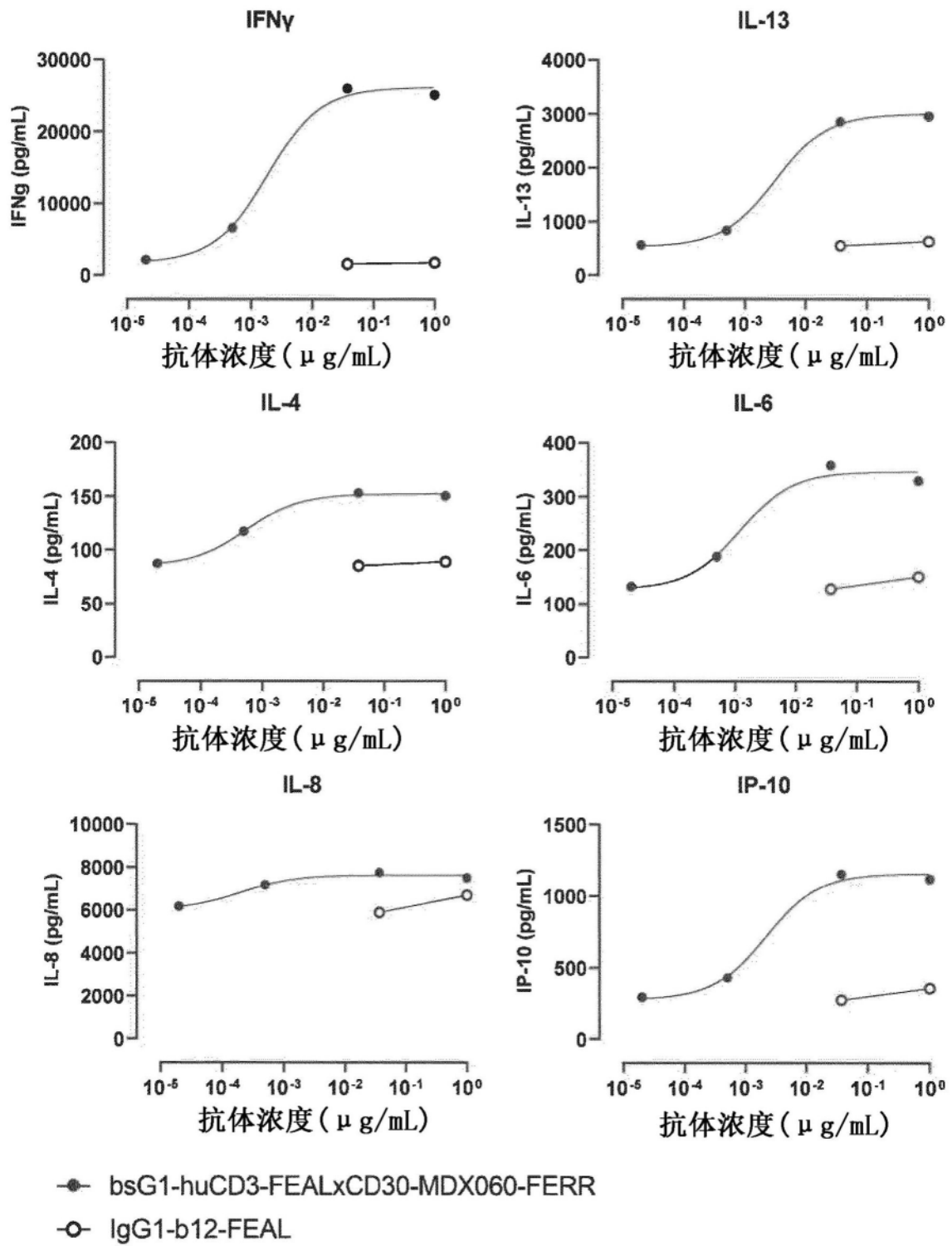


图19(续)

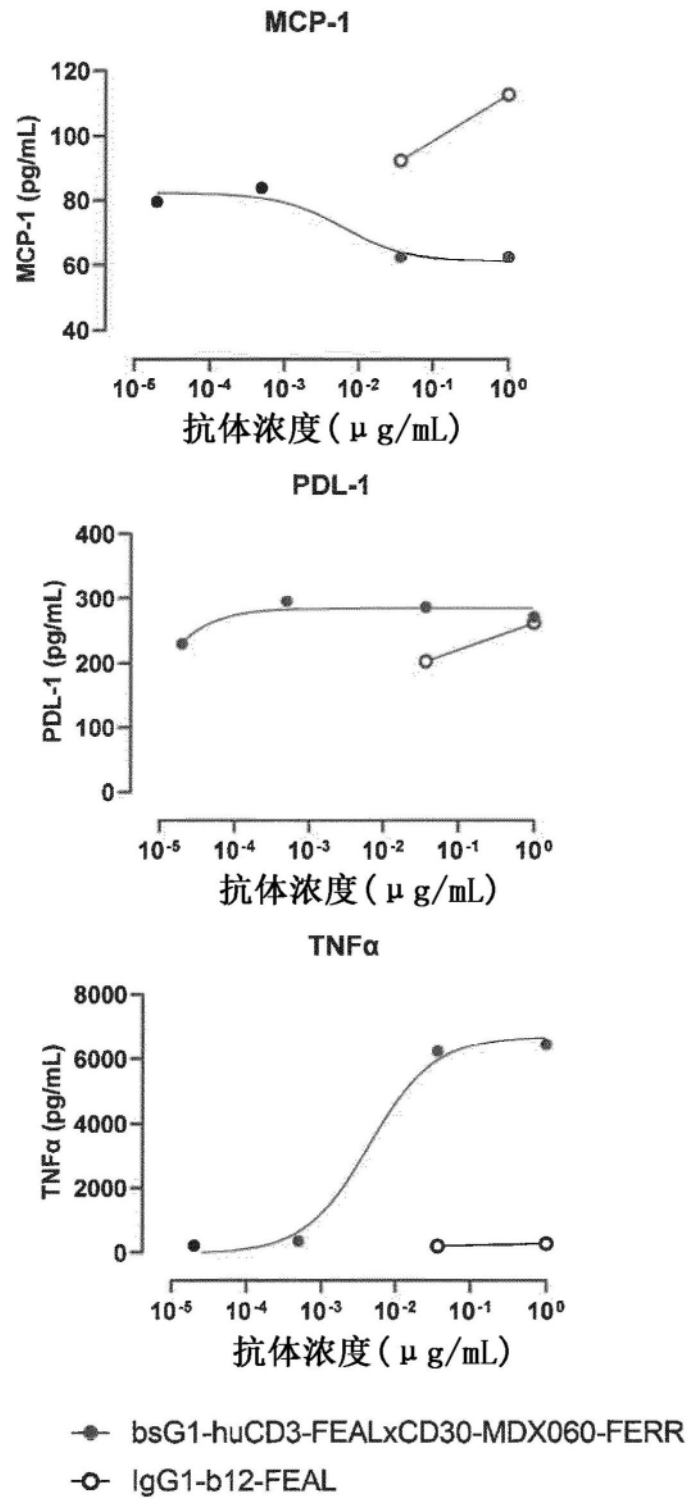


图19(续)

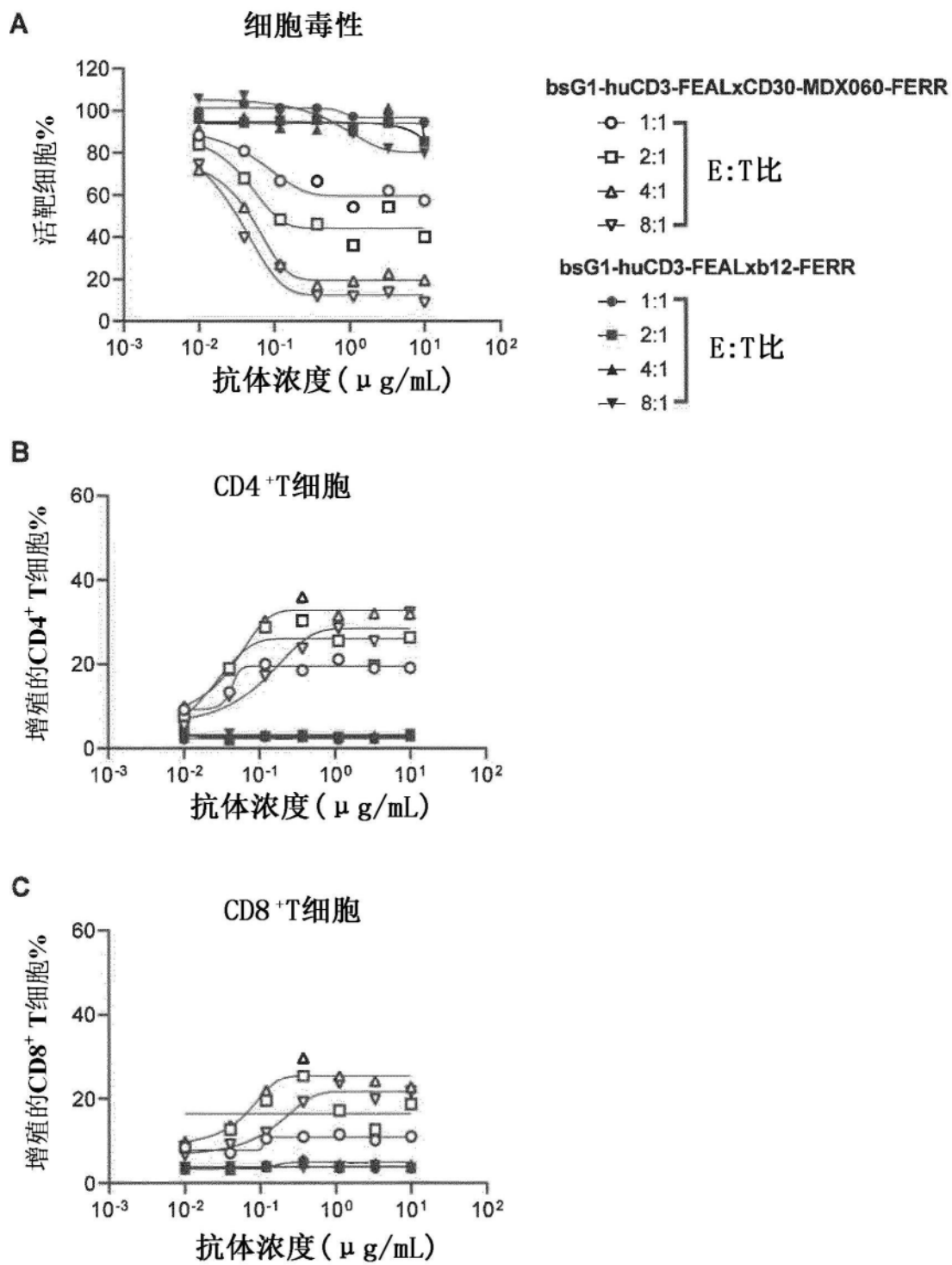


图20

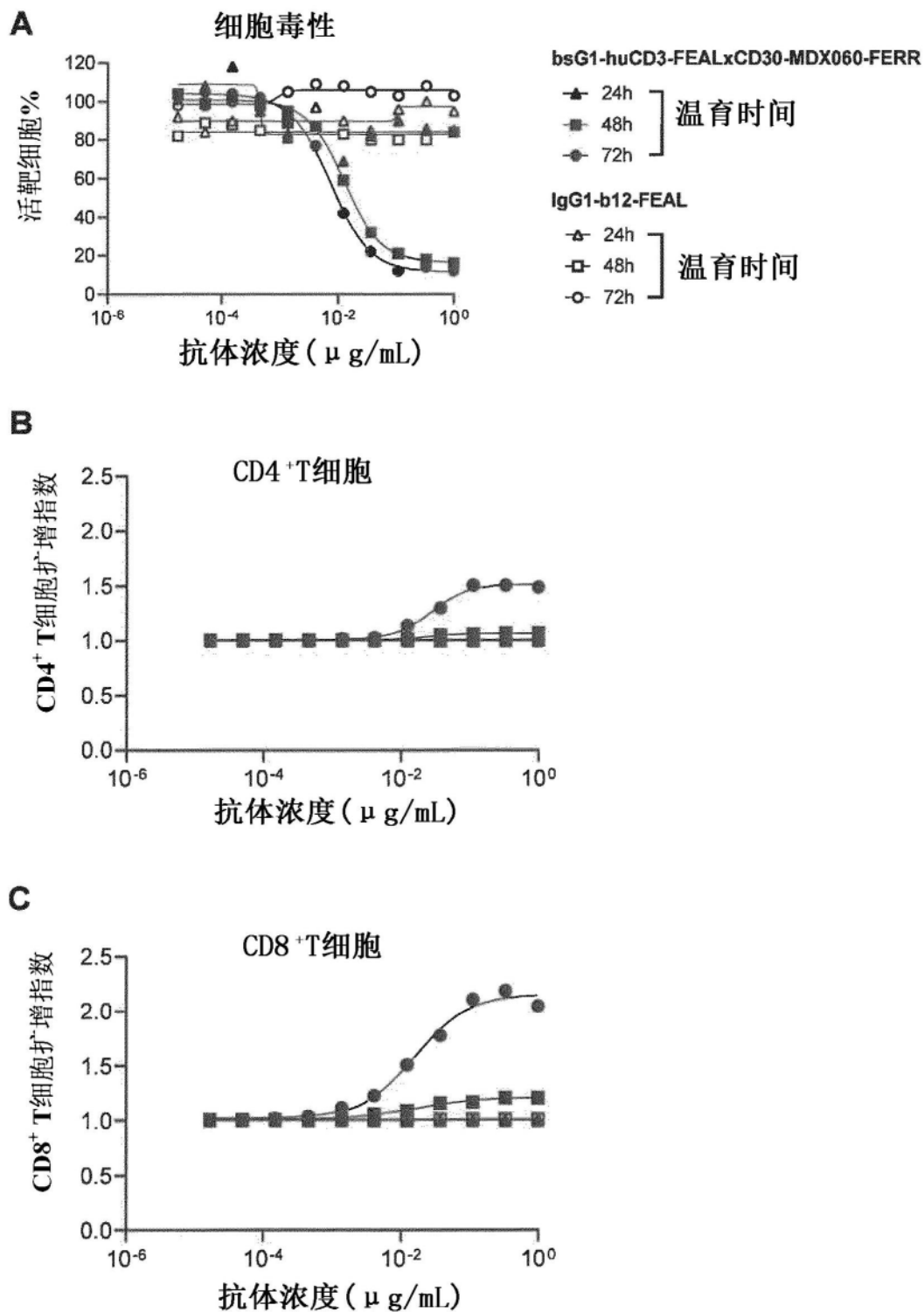


图21

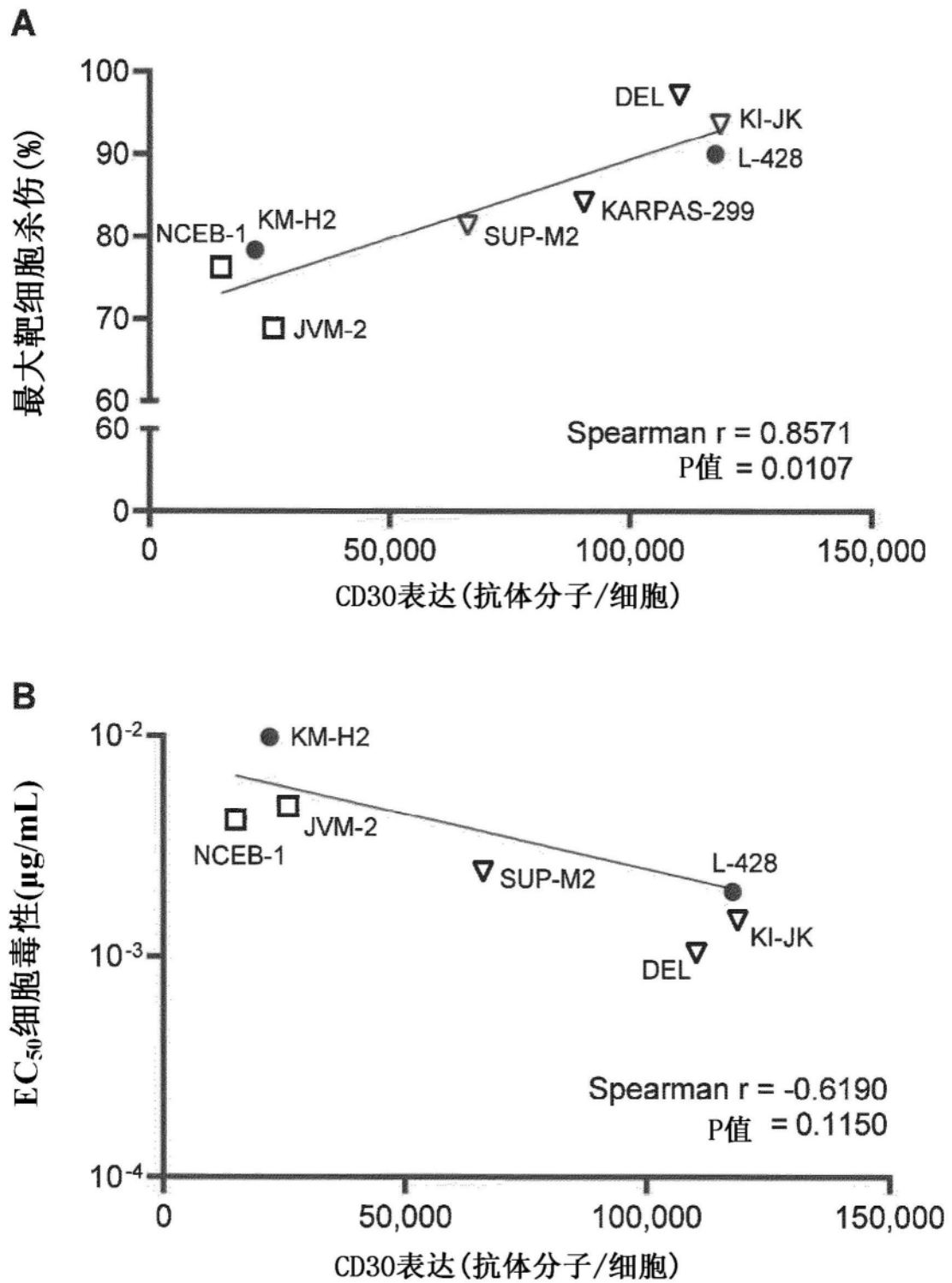


图22

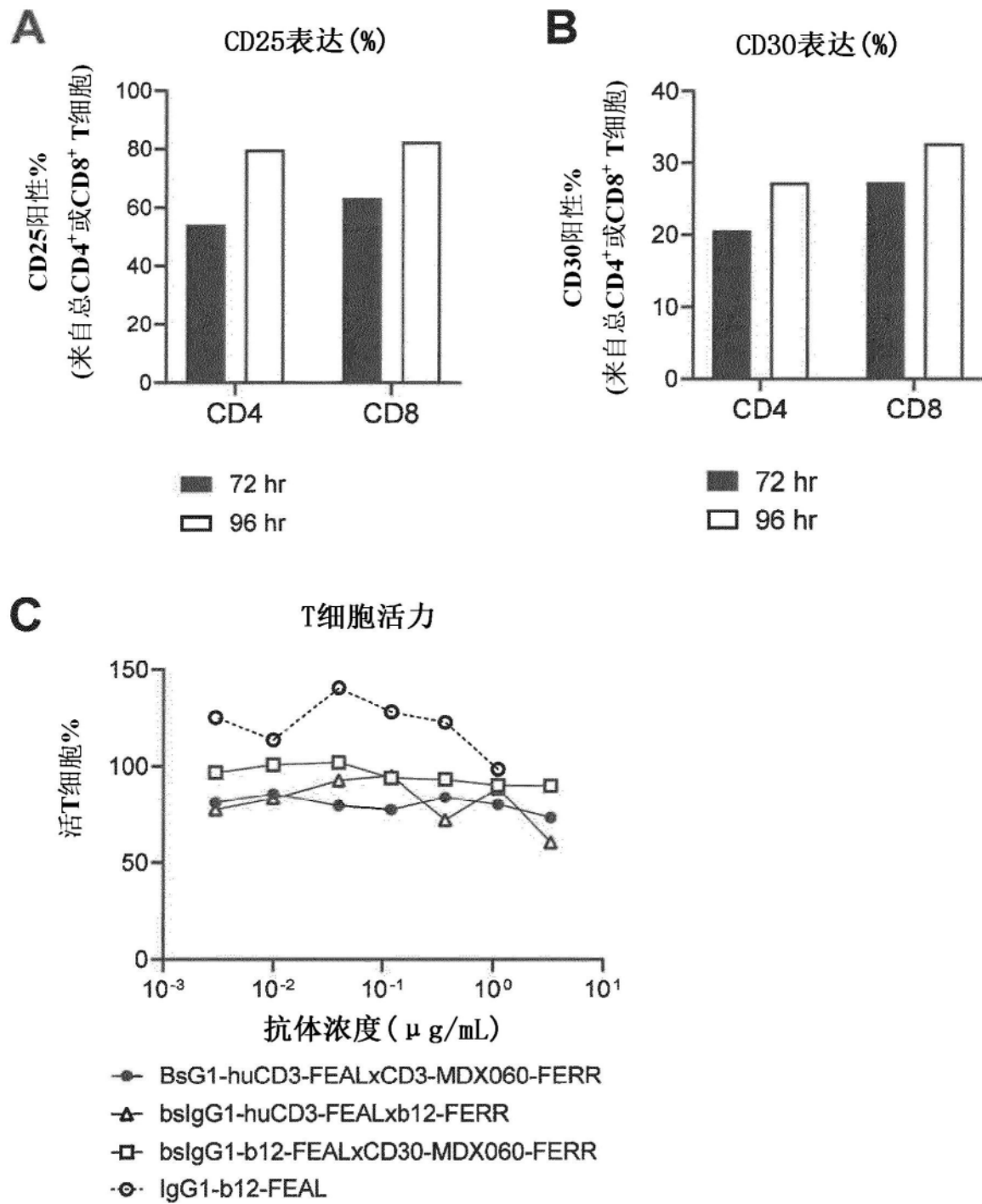


图23

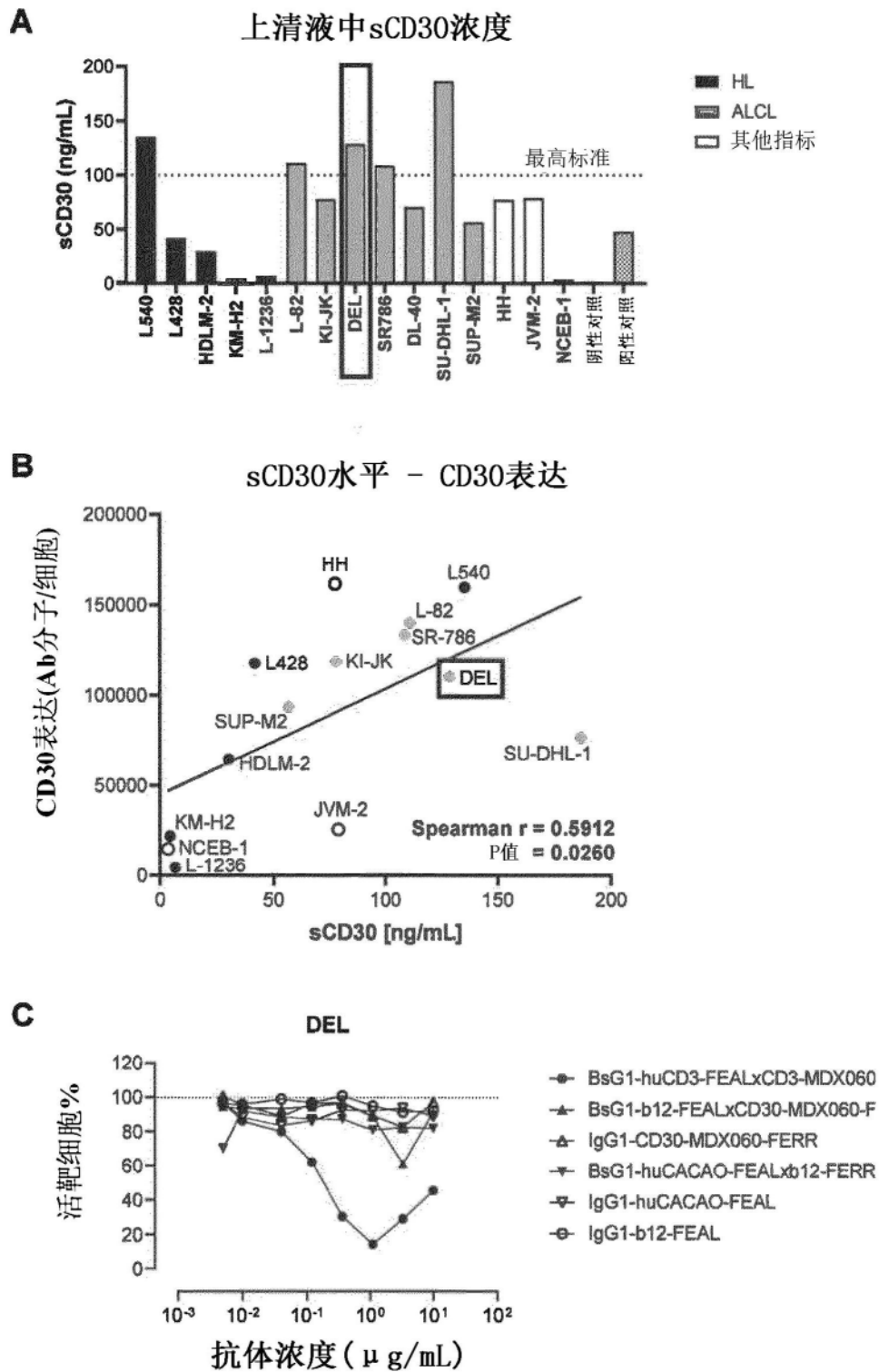


图24

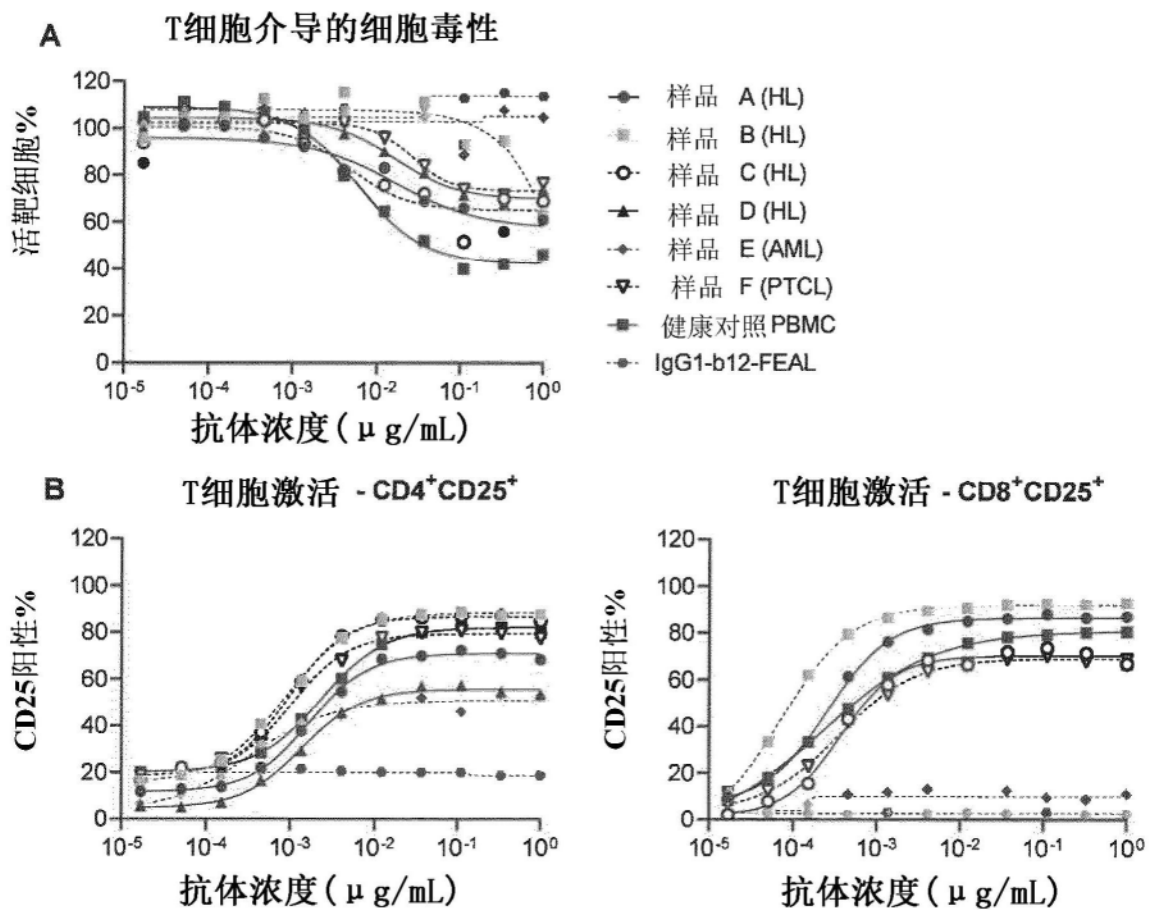


图25

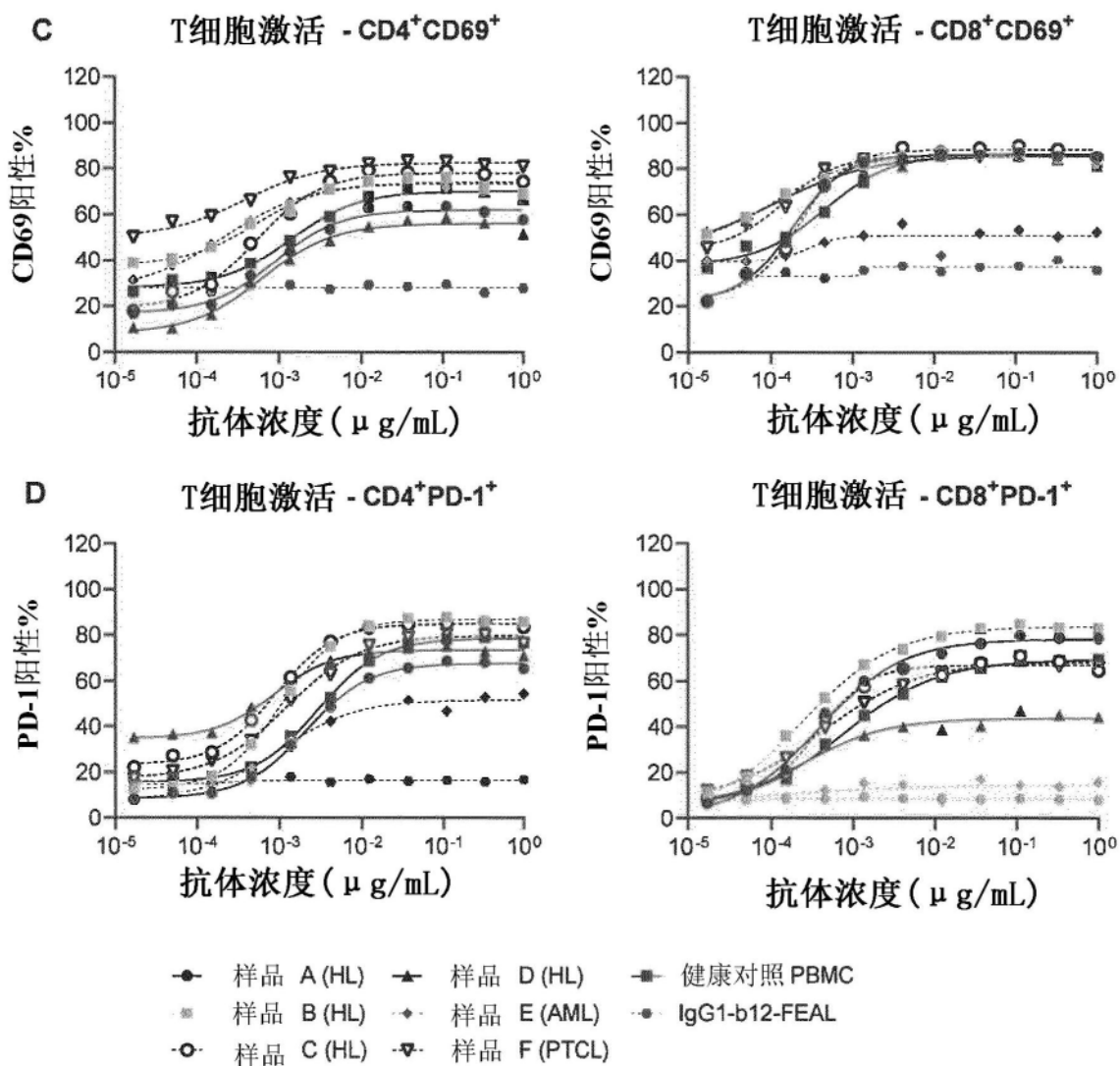


图25(续)

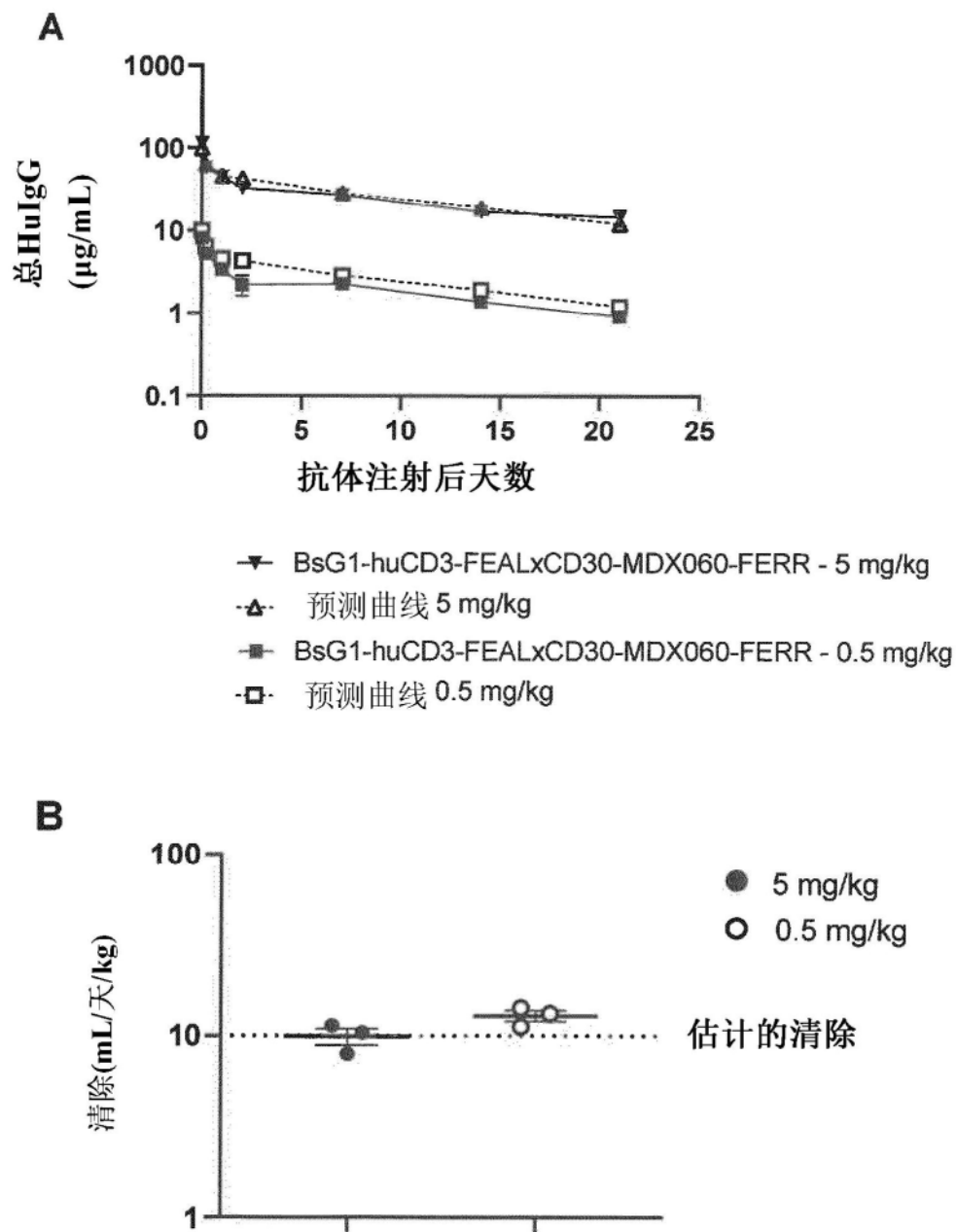


图26

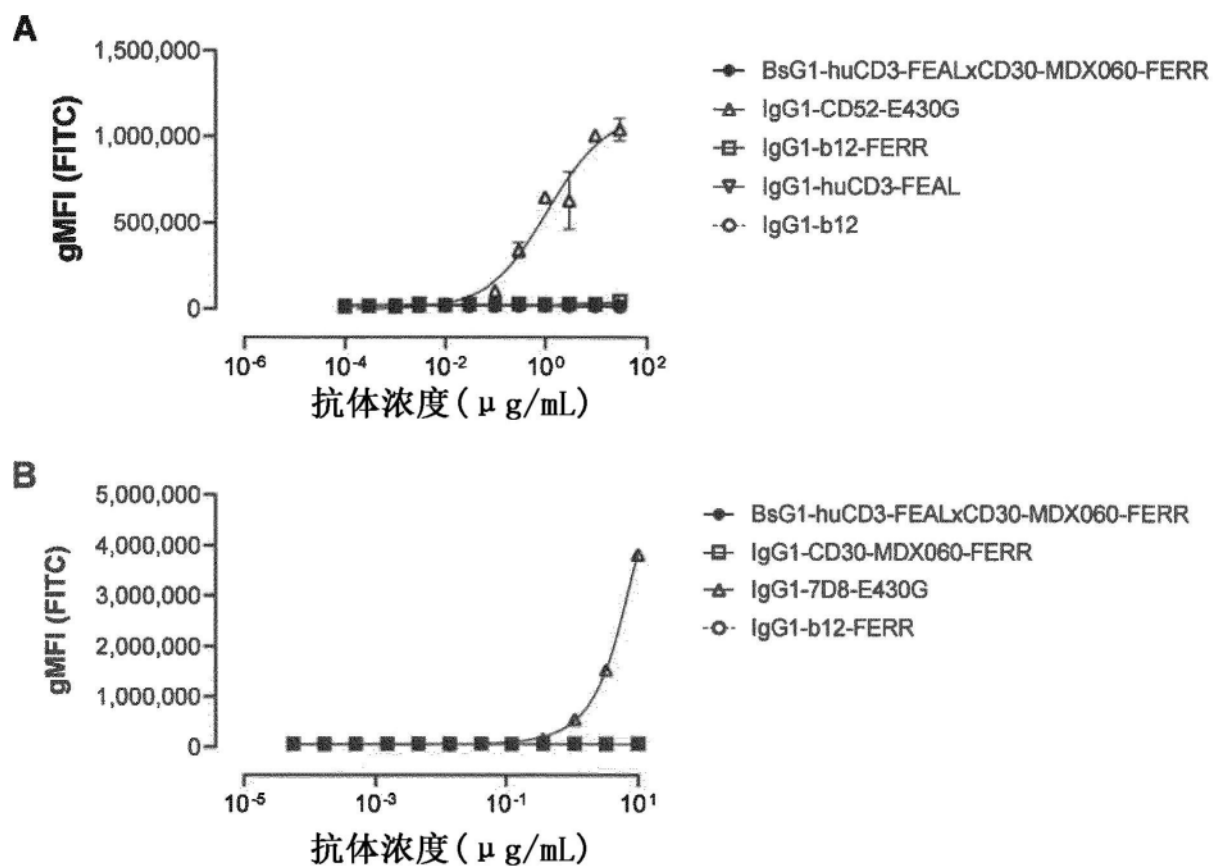


图27