



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108026177 B

(45) 授权公告日 2021. 11. 26

(21) 申请号 201680051781.4
 (22) 申请日 2016.09.28
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 108026177 A
 (43) 申请公布日 2018.05.11
 (30) 优先权数据
 15188093.7 2015.10.02 EP
 16169160.5 2016.05.11 EP
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2018.03.07
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/EP2016/073041 2016.09.28
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02017/055314 EN 2017.04.06
 (73) 专利权人 豪夫迈·罗氏有限公司
 地址 瑞士巴塞尔
 (72) 发明人 M·巴卡奇 C·克莱因 W·谢弗
 S·克洛斯特曼
 S·伊姆霍夫-荣格 M·莫尔霍
 J·T·莱古拉 P·尤马纳
 S·赫特 C·诺伊曼

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 岑晓东

(51) Int.Cl.
 C07K 16/28 (2006.01)
 C07K 16/46 (2006.01)
 A61K 39/395 (2006.01)
 A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件
 CA 2896370 A1, 2014.09.04
 CN 103748114 A, 2014.04.23
 LindseyM.HoffmanandLiaGore.Blinatumomab,abi-specificanti-CD19/CD3BiTE® antibodyforthetreatmentofacutelymphoblasticleukemia: perspectivesandcurrentpediatricapplications.《Frontiers in oncology》.2014,第4卷第1至5页.

李博华,.抗CD3人源化抗体恒定区突变体的制备及其生物学活性.《中国生物化学与分子生物学报》.2004,第20卷(第1期),第28-33页.

审查员 杨卓一

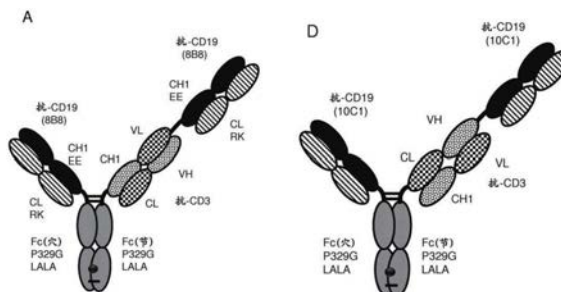
权利要求书3页 说明书72页
 序列表68页 附图42页

(54) 发明名称

双特异性抗CD19XCD3 T细胞活化性抗原结合分子

(57) 摘要

本发明一般涉及用于T细胞活化和对特定靶细胞重定向的新颖双特异性抗原结合分子。另外,本发明涉及编码此类双特异性抗原结合分子的多核苷酸,和包含此类多核苷酸的载体和宿主细胞。本发明进一步涉及用于生成本发明的双特异性抗原结合分子的方法,以及在疾病的治疗中使用这些双特异性抗原结合分子的方法。



1. 一种T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其包含

(a) 特异性结合CD19的第一抗原结合模块,其中所述第一抗原结合模块是常规Fab分子;

(b) 特异性结合CD3的第二抗原结合模块,其中所述第二抗原结合模块是交换Fab分子,其中Fab轻链和Fab重链的可变域VL和VH是彼此替换的;

(c) 特异性结合CD19的第三抗原结合模块,其中所述第三抗原结合模块是常规Fab分子;

(d) 由能够稳定联合的第一亚基和第二亚基构成的Fc域;

其中在所述第一抗原结合模块和所述第三抗原结合模块中在恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代,编号方式依照Kabat,且位置123处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代,编号方式依照Kabat,且其中在恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代,编号方式依照Kabat EU索引,且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代,编号方式依照Kabat EU索引;

其中所述第一抗原结合模块和所述第三抗原结合模块各自包含(i)重链可变区,其包含如SEQ ID NO:14所示的重链互补决定区(HCDR) 1,如SEQ ID NO:15所示的HCDR 2和如SEQ ID NO:16所示的HCDR 3,和轻链可变区,其包含如SEQ ID NO:17所示的轻链互补决定区(LCDR) 1,如SEQ ID NO:18所示的LCDR 2和如SEQ ID NO:19所示的LCDR 3,或(ii)重链可变区,其包含如SEQ ID NO:50所示的重链互补决定区(HCDR) 1,如SEQ ID NO:51所示的HCDR 2和如SEQ ID NO:52所示的HCDR 3,和轻链可变区,其包含如SEQ ID NO:53所示的轻链互补决定区(LCDR) 1,如SEQ ID NO:54所示的LCDR 2和如SEQ ID NO:55所示的LCDR 3;且

其中(i)所述第二抗原结合模块和所述第三抗原结合模块各自在Fab重链的C端融合至所述Fc域的亚基之一的N端,且所述第一抗原结合模块在Fab重链的C端融合至所述第二抗原结合模块的Fab重链的N端;或(ii)所述第一抗原结合模块和所述第三抗原结合模块各自在Fab重链的C端融合至所述Fc域的亚基之一的N端,且所述第二抗原结合模块在Fab重链的C端融合至所述第一抗原结合模块的Fab重链的N端。

2. 依照权利要求1的T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其中所述第一抗原结合模块和所述第三抗原结合模块各自包含(i)与如SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列至少95%相同的重链可变区和与如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列至少95%相同的轻链可变区,或(ii)与如SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列至少95%相同的重链可变区和与如SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列至少95%相同的轻链可变区。

3. 依照权利要求2的T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其中所述第一抗原结合模块和所述第三抗原结合模块各自包含(i)如SEQ ID NO:20所示的重链可变区和如SEQ ID NO:21所示的轻链可变区,或(ii)如SEQ ID NO:56所示的重链可变区和如SEQ ID NO:57所示的轻链可变区。

4. 依照权利要求1-3任一项的T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其中所述CD3是CD3 ϵ 。

5. 依照权利要求1-4任一项的T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其中所述第二抗原

结合模块包含如SEQ ID NO:4所示的重链互补决定区(CDR) 1,如SEQ ID NO:5所示的重链CDR 2,如SEQ ID NO:6所示的重链CDR 3,如SEQ ID NO:8所示的轻链CDR 1,如SEQ ID NO:9所示的轻链CDR 2和如SEQ ID NO:10所示的轻链CDR 3。

6. 依照权利要求5的T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其中所述第二抗原结合模块包含与如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列至少95%相同的重链可变区和与如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列至少95%相同的轻链可变区。

7. 依照权利要求6的T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其中所述第二抗原结合模块包含如SEQ ID NO:3所示的重链可变区和如SEQ ID NO:7所示的轻链可变区。

8. 依照权利要求1-7任一项的T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其中在所述第一抗原结合模块和所述第三抗原结合模块中在恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K)替代,编号方式依照Kabat,且位置123处的氨基酸用精氨酸(R)替代,编号方式依照Kabat,且其中在恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E)替代,编号方式依照Kabat EU索引,且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E)替代,编号方式依照Kabat EU索引。

9. 依照权利要求1-7任一项的T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其中在所述第一抗原结合模块和所述第三抗原结合模块中在恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K)替代,编号方式依照Kabat,且位置123处的氨基酸用赖氨酸(K)替代,编号方式依照Kabat,且其中在恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E)替代,编号方式依照Kabat EU索引,且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E)替代,编号方式依照Kabat EU索引。

10. 依照权利要求1-9任一项的T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其中所述第三抗原结合模块与所述第一抗原结合模块相同。

11. 依照权利要求1-10任一项的T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其中所述Fc域是IgG Fc域。

12. 依照权利要求11的T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其中所述Fc域是IgG1 Fc域。

13. 依照权利要求1-12任一项的T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其中所述Fc域是人Fc域。

14. 依照权利要求1-13任一项的T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其中所述Fc域包含促进所述Fc域的第一亚基和第二亚基联合的修饰。

15. 依照权利要求14的T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其中在所述Fc域的第一亚基的CH3域中位置366处的苏氨酸残基用色氨酸残基替换(T366W),且在所述Fc域的第二亚基的CH3域中位置407处的酪氨酸残基用缬氨酸残基替换(Y407V),编号方式依照Kabat EU索引。

16. 依照权利要求15的T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其中在所述Fc域的第二亚基中另外地位置366处的苏氨酸残基用丝氨酸残基替换(T366S)且位置368处的亮氨酸残基用丙氨酸残基替换(L368A),编号方式依照Kabat EU索引。

17. 依照权利要求15或16的T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其中在所述Fc域的第一亚基中另外地位置354处的丝氨酸残基用半胱氨酸残基替换(S354C)或位置356处的谷氨酸残基用半胱氨酸残基替换(E356C),且在所述Fc域的第二亚基中另外地位置349处的酪氨酸残基用半胱氨酸残基替换(Y349C),编号方式依照Kabat EU索引。

18. 依照权利要求14的T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其中所述Fc域的第一亚基包含氨基酸替代S354C和T366W,且所述Fc域的第二亚基包含氨基酸替代Y349C, T366S, L368A和Y407V,编号方式依照Kabat EU索引。

19. 依照权利要求1-18任一项的T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其中所述Fc域展现与天然IgG1 Fc域相比降低的对Fc受体的结合亲和力和/或降低的效应器功能,其中所述Fc受体是Fc γ 受体,且其中所述效应器功能是抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)。

20. 依照权利要求19的T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其中所述Fc域的每个亚基包含三处氨基酸替代,L234A,L235A和P329G,编号方式依照Kabat EU索引。

21. 一种或多种分离的多核苷酸,其编码权利要求1-20任一项的T细胞活化性双特异性抗原结合分子。

22. 一种或多种载体,其包含权利要求21的多核苷酸。

23. 一种宿主细胞,其包含权利要求21的多核苷酸或权利要求22的载体。

24. 一种生成能够特异性结合CD19和CD3的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的方法,其包括下述步骤:

a) 在适合于表达所述T细胞活化性双特异性抗原结合分子的条件下培养权利要求23的宿主细胞。

25. 权利要求24的方法,其还包括下述步骤:

b) 回收所述T细胞活化性双特异性抗原结合分子。

26. 一种T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其通过权利要求24或25的方法生成。

27. 一种药物组合物,其包含权利要求1-20或26任一项的T细胞活化性双特异性抗原结合分子和药学可接受载剂。

28. 权利要求1-20或26任一项的T细胞活化性双特异性抗原结合分子或权利要求27的药物组合物制造用于治疗癌症的药物的用途。

双特异性抗CD19XCD3 T细胞活化性抗原结合分子

发明领域

[0001] 本发明一般涉及用于活化T细胞的双特异性抗原结合分子。另外,本发明涉及编码此类双特异性抗原结合分子的多核苷酸,以及包含此类多核苷酸的载体和宿主细胞。本发明进一步涉及用于生成本发明的双特异性抗原结合分子的方法,以及在疾病的治疗中使用这些双特异性抗原结合分子的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 在多种临床背景中常常期望选择性破坏个别细胞或特定细胞类型。例如,特异性破坏肿瘤细胞而使健康细胞和组织保持完整且不受损是癌症疗法的首要目的。

[0004] 实现这点的一种有吸引力的方式是通过诱导针对肿瘤的免疫应答,使得免疫效应细胞诸如天然杀伤(NK)细胞或细胞毒性T淋巴细胞(CTL)攻击并破坏肿瘤细胞。CTL构成免疫系统最有力的效应细胞,然而它们不能通过由常规治疗性抗体的Fc域介导的效应器机制来激活。

[0005] 在此点上,最近数年对双特异性抗体变得感兴趣,其设计为用一个“臂”结合靶细胞上的表面抗原,而用第二个“臂”结合T细胞受体(TCR)复合物的活化性的,不变的组分。此类抗体对其两种靶物的同时结合会迫使靶细胞和T细胞之间的暂时相互作用,引起任何细胞毒性T细胞活化和随后的靶细胞裂解。因此,免疫应答重定向于靶细胞,而且不依赖于靶细胞的肽抗原呈递或T细胞的特异性,其对于CTL的正常MHC限制性活化会是相关的。在此背景中,至关重要的是CTL仅在靶细胞向其呈递双特异性抗体时活化,即模拟免疫突触。特别期望的是不需要淋巴细胞预条件化或共刺激来引发靶细胞有效裂解的双特异性抗体。

[0006] 已开发出数种双特异性抗体型式并研究了它们对调查中的T细胞介导的免疫疗法的适宜性。其中,所谓的BiTE(双特异性T细胞衔接物(engager))分子已得到非常好的表征,而且在临床中已显示出一些前景(综述见Nagorsen 和Bäuerle, Exp Cell Res 317,1255-1260(2011))。BiTE是串联scFv分子,其中两个scFv分子通过柔性接头融合。针对T细胞衔接评估的其它双特异性型式包括双抗体(Holliger等, Prot Eng 9,299-305(1996))及其衍生物,诸如串联双抗体(Kipriyanov等, J Mol Biol 293,41-66(1999))。一项最近的进展是所谓的 DART(双重亲和力重定向)分子,它们基于双抗体型式但特征在于实现额外稳定化的C端二硫桥(Moore等, Blood 117,4542-51(2011))。所谓的triomab(它们是完整杂合小鼠/大鼠IgG分子,而且目前亦在临床试验中进行评估)代表了尺寸更大的型式(综述见Seimetz等, Cancer Treat Rev 36,458-467(2010))。

[0007] 正在开发的多种型式显示免疫疗法中归因于T细胞重定向和活化的极大潜力。然而,生成对此合适的双特异性抗体的任务绝不是微不足道的,而是牵涉到许多必须满足的与抗体功效,毒性,适用性和生产能力有关的挑战。

[0008] 小构建体诸如例如BiTE分子(尽管能够有效交联效应器和靶细胞)具有非常短的血清半衰期,从而需要通过连续输注对患者施用它们。另一方面,IgG样型式(尽管具有长半衰期的极大益处)受制于与IgG分子固有的天然效应器功能有关的毒性。它们的免疫原性潜力构成了成功治疗性开发的IgG样双特异性抗体(尤其是非人型式)的另一个不利特征。最

后,双特异性抗体的一般开发中的一项主要挑战是以临床充足的数量和纯度生产双特异性抗体构建体,原因在于具有不同特异性的抗体重和轻链在共表达后的错配,这降低了正确装配的构建体的产量且导致许多无功能的副产物,而期望的双特异性抗体可能难以与之分开。

[0009] 已经采取了不同的办法来克服双特异性抗体中的链联合问题(参见例如 Klein等,mAbs 6,653-663(2012))。例如,‘节-入-穴’策略的目标在于通过在CH3域中引入突变以修饰接触界面来推动两条不同抗体重链的配对。在一条链上将大氨基酸用具有短侧链的氨基酸替换以创建‘穴’。相反,在另一个CH3域中引入具有大侧链的氨基酸以创建‘节’。通过共表达这两种重链(和两条相同轻链,它们必须是对于两种重链都是适宜的),观察到异二聚体(‘节-穴’)对同二聚体(‘穴-穴’或‘节-节’)的高产量(Ridgway,J.B.等,Protein Eng.9(1996)617-621;及WO 96/027011)。通过使用噬菌体展示办法重新塑造两个CH3域的相互作用表面及引入二硫桥以稳定化异二聚体能进一步提高异二聚体的百分比(Merchant,A.M.等,Nature Biotech.16(1998)677-681;Atwell,S.等,J. Mol.Biol.270(1997)26-35)。节-入-穴技术的新办法记载于例如EP 1870459 A1。

[0010] 然而,‘节-入-穴’策略没有解决包含不同轻链来结合不同靶抗原的双特异性抗体中发生的重链-轻链错配的问题。

[0011] 防止重链-轻链错配的一种策略是在双特异性抗体的结合臂之一的重和轻链之间交换域(参见WO 2009/080251,WO 2009/080252,WO 2009/080253,WO 2009/080254及Schaefer,W.等,PNAS,108(2011)11187-11191,其涉及具有域交换的双特异性IgG抗体)。

[0012] 交换双特异性抗体的结合臂之一中的重和轻链可变域VH和VL(WO2009/080252,还可参见Schaefer,W.等,PNAS,108(2011)11187-11191)明显减少由针对第一抗原的轻链与错误的针对第二抗原的重链的错配引起的副产物(与没有此类域交换的办法相比)。不过,这些抗体制备物并非完全不含副产物。主要的副产物基于Bence Jones型相互作用(Schaefer,W.et al.,PNAS,108(2011)11187-11191;附录中的图S1I)。因而想要进一步减少此类副产物以提高例如此类双特异性抗体的产量。

[0013] T细胞抗原和靶细胞抗原二者的靶抗原和适宜结合物的选项是用于治疗性应用的T细胞双特异性(TCB)抗体的生成中的又一个至关重要方面。

[0014] 人CD19是一种95kDa跨膜蛋白(B细胞共受体),唯独在B细胞上和滤泡树突细胞上表达。发现CD19与CD21和CD81联合。CD19和CD21是正常B细胞分化所需要的(Carter,R.H.,et al.,Immunol.Res.26(2002)45-54)。CD19在除干细胞和浆细胞以外的大多数B细胞上表达(泛B细胞标志物),而且频繁在大多数B细胞恶性上表达(肿瘤相关抗原),诸如淋巴瘤和白血病,多发性骨髓瘤除外,例如在非何杰金淋巴瘤和急性成淋巴细胞性白血病。针对CD19的抗体已经用于数项临床试验(参见例如Hekman,A.,et al.,Cancer Immunol.Immunother.32(191)364-372;Vlasfeld,L.T.,et al.,Cancer Immunol.Immunother.40(1995)37-47;Conry,R.M.,et al.,J.Immunother.Emphasis Tumor Immunol.18(1995)231-241;Manzke,O.,et al.,Int.J.Cancer 91(2001)516-522)。在WO 2011/147834中报告了针对CD19的抗体及其用途。在WO 99/54440和WO 2004/106381中报告了用于治疗B细胞相关病症的包含双特异性抗CD3,抗CD19抗体构建物的药物组合物。

[0015] 本发明提供设计用于T细胞活化和重定向的,靶向CD3和CD19的,新颖的,改良的双

特异性抗原结合分子,其组合了优良的功效和生产能力与较低的毒性和有利的药动学特性。

[0016] 发明概述

[0017] 发明人使用特定的抗CD19抗体开发了具有出乎意料的,改善的特性的新颖的T细胞活化性双特异性抗原结合分子。

[0018] 如此,在第一个方面,本发明提供一种T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其包含

[0019] (a) 特异性结合第一抗原的第一抗原结合模块;

[0020] (b) 特异性结合第二抗原的第二抗原结合模块;

[0021] 其中所述第一抗原是活化性T细胞抗原且所述第二抗原是CD19,或所述第一抗原

是CD19且所述第二抗原是活化性T细胞抗原;且

[0022] 其中特异性结合CD19的所述抗原结合模块包含(i)重链可变区,特别是人源化重链可变区,其包含SEQ ID NO:14的重链互补决定区(HCDR)1,SEQ ID NO:15的HCDR 2和SEQ ID NO:16的HCDR 3,和轻链可变区,特别是人源化轻链可变区,其包含SEQ ID NO:17的轻链互补决定区(LCDR)1, SEQ ID NO:18的LCDR 2和SEQ ID NO:19的LCDR 3,或(ii)重链可变区,特别是人源化重链可变区,其包含SEQ ID NO:50的重链互补决定区(HCDR)1,SEQ ID NO:51的HCDR 2和SEQ ID NO:52的HCDR 3,和轻链可变区,特别是人源化轻链可变区,其包含SEQ ID NO:53的轻链互补决定区(LCDR)1,SEQ ID NO:54的LCDR 2和SEQ ID NO:55的LCDR 3。

[0023] 在一个实施方案中,特异性结合CD19的所述抗原结合模块包含(i)包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%相同的氨基酸序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%相同的氨基酸序列的轻链可变区,或(ii)包含与SEQ ID NO:56的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%相同的氨基酸序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:57的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%相同的氨基酸序列的轻链可变区。

[0024] 在一个特定的实施方案中,所述第一抗原结合模块和/或所述第二抗原结合模块是Fab分子。在一个具体的实施方案中,所述第二抗原结合模块是特异性结合第二抗原的Fab分子,且其中Fab轻链和Fab重链的可变域VL和 VH或恒定域CL和CH1是彼此替换的(即依照此类实施方案,第二Fab分子是交换Fab分子,其中Fab轻链和Fab重链的可变或恒定域是交换的)。

[0025] 在一个特定的实施方案中,所述第一Fab分子(和所述第三Fab分子,如果有的话)是常规Fab分子。在又一个特定的实施方案中,所述T细胞活化性双特异性抗原结合分子中存在不超过一个能够特异性结合活化性T细胞抗原的Fab分子(即所述T细胞活化性双特异性抗原结合分子提供对所述活化性T细胞抗原的单价结合)。

[0026] 在一个实施方案中,所述第一抗原是CD19且所述第二抗原是活化性T细胞抗原。在一个更加具体的实施方案中,所述活化性T细胞抗原是CD3,特别是CD3 ϵ 。

[0027] 在一个特定的实施方案中,本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含

[0028] (a) 特异性结合第一抗原的第一Fab分子;

[0029] (b) 特异性结合第二抗原的第二Fab分子,且其中Fab轻链和Fab重链的可变域VL和VH或恒定域CL和CH1是彼此替换的;

[0030] 其中所述第一抗原是CD19且所述第二抗原是活化性T细胞抗原;

[0031] 其中(a)下的第一Fab分子包含(i)重链可变区,特别是人源化重链可变区,其包含SEQ ID NO:14的重链互补决定区(HCDR)1,SEQ ID NO:15的HCDR 2和SEQ ID NO:16的HCDR 3,和轻链可变区,特别是人源化轻链可变区,其包含SEQ ID NO:17的轻链互补决定区(LCDR)1,SEQ ID NO:18的LCDR 2和SEQ ID NO:19的LCDR 3,或(ii)重链可变区,特别是人源化重链可变区,其包含SEQ ID NO:50的重链互补决定区(HCDR)1,SEQ ID NO:51的HCDR 2和SEQ ID NO:52的HCDR 3,和轻链可变区,特别是人源化轻链可变区,其包含SEQ ID NO:53的轻链互补决定区(LCDR)1,SEQ ID NO:54的LCDR 2和SEQ ID NO:55的LCDR 3。

[0032] 依照本发明的又一个方面,通过在CH1和CL域中的特定氨基酸位置处引入具有相反电荷的带电荷的氨基酸(在本文中有时称作“电荷修饰”),能提高想要的双特异性抗体与不想要的副产物(特别是在它们的结合臂之一中具有VH/VL域交换的双特异性抗体中发生的Bence Jones型副产物)相比的比率。

[0033] 如此,在一些实施方案中,(a)下的第一抗原结合模块是特异性结合第一抗原的第一Fab分子,(b)下的第二抗原结合模块是特异性结合第二抗原的第二Fab分子,其中Fab轻链和Fab重链的可变域VL和VH是彼此替换的;且 i)在(a)下的第一Fab分子的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat),且其中在a)下的第一Fab分子的恒定域CH1中位置147处的氨基酸或位置213处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引);或

[0034] ii)在(b)下的第二Fab分子的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat),且其中在(b)下的第二Fab分子的恒定域CH1中位置147处的氨基酸或位置213处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0035] 在一个此类实施方案中,在(a)下的第一Fab分子的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat)(在一个优选的实施方案中,用赖氨酸(K)或精氨酸(R)独立替代),且在(a)下的第一Fab分子的恒定域CH1中位置147处的氨基酸或位置213处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0036] 在又一个实施方案中,在(a)下的第一Fab分子的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat),且在(a)下的第一Fab分子的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0037] 在还有另一个实施方案中,在(a)下的第一Fab分子的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat)(在一个优选的实施方案中,用赖氨酸(K)或精氨酸(R)独立替代)且位置123处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat)(在一个优选的实施方案中,用赖氨酸(K)或精氨酸(R)独立替代),且在(a)下的第一Fab分子的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸

用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0038] 在一个特定的实施方案中,在a)下的第一Fab分子的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K)替代(编号方式依照Kabat)且位置123处的氨基酸用赖氨酸(K)替代(编号方式依照Kabat),且在a)下的第一Fab分子的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0039] 在另一个特定的实施方案中,在a)下的第一Fab分子的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K)替代(编号方式依照Kabat)且位置123处的氨基酸用精氨酸(R)替代(编号方式依照Kabat),且在a)下的第一Fab分子的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0040] 在一个备选的实施方案中,在b)下的第二Fab分子的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat)(在一个优选的实施方案中,用赖氨酸(K)或精氨酸(R)独立替代),且在b)下的第二Fab分子的恒定域CH1中位置147处的氨基酸或位置213处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0041] 在又一个实施方案中,在b)下的第二Fab分子的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat),且在b)下的第二Fab分子的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0042] 在仍有另一个实施方案中,在b)下的第二Fab分子的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat)(在一个优选的实施方案中,用赖氨酸(K)或精氨酸(R)独立替代)且位置123处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat)(在一个优选的实施方案中,用赖氨酸(K)或精氨酸(R)独立替代),且在b)下的第二Fab分子的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0043] 在一个实施方案中,在b)下的第二Fab分子的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K)替代(编号方式依照Kabat)且位置123处的氨基酸用赖氨酸(K)替代(编号方式依照Kabat),且在b)下的第二Fab分子的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0044] 在另一个实施方案中,在b)下的第二Fab分子的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K)替代(编号方式依照Kabat)且位置123处的氨基酸用精氨酸(R)替代(编号方式依照Kabat),且在b)下的第二Fab分子的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0045] 在一个特定的实施方案中,本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含

[0046] (a) 特异性结合第一抗原的第一Fab分子;

[0047] (b) 特异性结合第二抗原的第二Fab分子,且其中Fab轻链和Fab重链的可变域VL和VH是彼此替换的;

[0048] 其中所述第一抗原是CD19且所述第二抗原是活化性T细胞抗原;

[0049] 其中(a)下的第一Fab分子包含(i)重链可变区,特别是人源化重链可变区,其包含SEQ ID NO:14的重链互补决定区(HCDR)1,SEQ ID NO:15的HCDR 2和SEQ ID NO:16的HCDR 3,和轻链可变区,特别是人源化轻链可变区,其包含SEQ ID NO:17的轻链互补决定区(LCDR)1,SEQ ID NO:18的LCDR 2和SEQ ID NO:19的LCDR 3,或(ii)重链可变区,特别是人源化重链可变区,其包含SEQ ID NO:50的重链互补决定区(HCDR)1,SEQ ID NO:51的HCDR 2和SEQ ID NO:52的HCDR 3,和轻链可变区,特别是人源化轻链可变区,其包含SEQ ID NO:53的轻链互补决定区(LCDR)1,SEQ ID NO:54的LCDR 2和SEQ ID NO:55的LCDR 3;且

[0050] 其中在a)下的第一Fab分子的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat)(在一个优选的实施方案中,用赖氨酸(K)或精氨酸(R)独立替代)且位置123处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat)(在一个优选的实施方案中,用赖氨酸(K)或精氨酸(R)独立替代),且在a)下的第一Fab分子的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0051] 在一些实施方案中,依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含特异性结合所述第一抗原的第三抗原结合模块。在特定的实施方案中,所述第三抗原结合模块与所述第一抗原结合模块相同。在一个实施方案中,所述第三抗原结合模块是Fab分子。

[0052] 在特定的实施方案中,所述第三抗原结合模块和所述第一抗原结合模块各自是Fab分子且所述第三Fab分子与所述第一Fab分子相同。在这些实施方案中,所述第三Fab分子如此包含与所述第一Fab分子相同的氨基酸替代,如果有的话。像所述第一Fab分子一样,所述第三Fab分子特别是常规Fab分子。

[0053] 如果存在第三抗原结合模块的话,在一个特定的实施方案中,所述第一抗原结合模块和所述第三抗原结合模块特异性结合CD19,且所述第二抗原结合模块特异性结合活化性T细胞抗原,特别是CD3,更加特别是CD3 ϵ 。

[0054] 在依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的一些实施方案中,a)下的第一抗原结合模块和b)下的第二抗原结合模块彼此融合,任选经由肽接头。在特定的实施方案中,所述第一抗原结合模块和所述第二抗原结合模块各自是Fab分子。在一个具体的此类实施方案中,所述第二Fab分子在Fab重链的C端融合至所述第一Fab分子的Fab重链的N端。在一个备选的此类实施方案中,所述第一Fab分子在Fab重链的C端融合至所述第二Fab分子的Fab重链的N端。在其中(i)所述第二Fab分子在Fab重链的C端融合至所述第一Fab分子的Fab重链的N端或(ii)所述第一Fab分子在Fab重链的C端融合至所述第二Fab分子的Fab重链的N端任一的实施方案中,另外地所述第一Fab分子的Fab轻链和所述第二Fab分子的Fab轻链可以彼此融合,任选经由肽接头。

[0055] 在特定的实施方案中,依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子另外地包含由能够稳定联合的第一亚基和第二亚基构成的Fc域。

[0056] 依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子可以具有不同的构造,即所述第一抗原结合模块,所述第二抗原结合模块(和任选的所述第三抗原结合模块)可以以不同方式彼此融合及融合至所述Fc域。各构件可以直接地或优选经由一个或多个合适的肽接头彼此融合。在Fab分子融合至所述Fc域的一个亚基的N端的情况中,融合典型地经由免疫球蛋白铰链区。

[0057] 在一个实施方案中,所述第一抗原结合模块和所述第二抗原结合模块各自是Fab分子且所述第二抗原结合模块在Fab重链的C端融合至所述Fc域的第一亚基或第二亚基的N端。在此类实施方案中,所述第一抗原结合模块可以在Fab重链的C端融合至所述第二抗原结合模块的Fab重链的N端或所述Fc域的亚基之另一的N端。

[0058] 在一个实施方案中,所述第一抗原结合模块和所述第二抗原结合模块各自是Fab分子且所述第一抗原结合模块和所述第二抗原结合模块各自在Fab重链的C端融合至所述Fc域的亚基之一的N端。在这个实施方案中,所述T细胞活化性双特异性抗原结合分子基本上构成免疫球蛋白分子,其中在Fab臂之一中重和轻链可变区VH和VL(或恒定区CH1和CL,在其中在CH1和CL域中不引入本文所述电荷修饰的实施方案中)是彼此交换/替换的(见图1A, D)。

[0059] 在备选的实施方案中,第三抗原结合模块,特别是第三Fab分子在Fab重链的C端融合至所述Fc域的第一亚基或第二亚基的N端。在一个特定的此类实施方案中,所述第二抗原结合模块和所述第三抗原结合模块各自在Fab重链的C端融合至所述Fc域的亚基之一的N端,且所述第一抗原结合模块在Fab重链的C端融合至所述第二Fab分子的Fab重链的N端。在这个实施方案中,所述T细胞活化性双特异性抗原结合分子基本上构成免疫球蛋白分子,其中在Fab臂之一中重和轻链可变区VH和VL(或恒定区CH1和CL,在其中在CH1和CL域中不引入本文所述电荷修饰的实施方案中)是彼此交换/替换的,且其中一个另外的(常规)Fab分子在N端融合至所述Fab臂(见图1B,E)。在另一个此类实施方案中,所述第一抗原结合模块和所述第三抗原结合模块各自在Fab重链的C端融合至所述Fc域的亚基之一的N端,且所述第二抗原结合模块在Fab重链的C端融合至所述第一抗原结合模块的Fab重链的N端。在这个实施方案中,所述T细胞活化性双特异性抗原结合分子基本上构成免疫球蛋白分子,有一个另外的Fab分子在N端融合至免疫球蛋白Fab臂之一,其中在所述另外的Fab分子中重和轻链可变区VH和VL(或恒定区CH1和CL,在其中在CH1和CL域中不引入本文所述电荷修饰的实施方案中)是彼此交换/替换的(见图1C,F)。

[0060] 在一个特定的实施方案中,依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子中包含的免疫球蛋白分子是IgG类免疫球蛋白。在一个甚至更加特定的实施方案中,所述免疫球蛋白是IgG₁亚类免疫球蛋白。在另一个实施方案中,所述免疫球蛋白是IgG₄亚类免疫球蛋白。

[0061] 在一个特定的实施方案中,本发明提供一种T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其包含

[0062] a) 特异性结合第一抗原的第一Fab分子;

[0063] b) 特异性结合第二抗原的第二Fab分子,且其中Fab轻链和Fab重链的可变域VL和VH或恒定域CL和CH1是彼此替换的;

[0064] c) 特异性结合所述第一抗原的第三Fab分子;和

[0065] d) 由能够稳定联合的第一亚基和第二亚基构成的Fc域;

[0066] 其中所述第一抗原是CD19且所述第二抗原是活化性T细胞抗原,特别是 CD3,更加特别是CD3 ϵ ;

[0067] 其中c) 下的第三Fab分子与a) 下的第一Fab分子相同;

[0068] 其中

[0069] (i) a) 下的第一Fab分子在Fab重链的C端融合至b) 下的第二Fab分子的Fab重链的N端,和b) 下的第二Fab分子和c) 下的第三Fab分子各自在Fab重链的C端融合至d) 下的Fc域的亚基之一的N端,或

[0070] (ii) b) 下的第二Fab分子在Fab重链的C端融合至a) 下的第一Fab分子的Fab重链的N端,且a) 下的第一Fab分子和c) 下的第三Fab分子各自在Fab重链的C端融合至d) 下的Fc域的亚基之一的N端;且

[0071] 其中a) 下的第一Fab分子和c) 下的第三Fab分子包含 (i) 重链可变区,特别是人源化重链可变区,其包含SEQ ID NO:14的重链互补决定区(HCDR) 1, SEQ ID NO:15的HCDR 2和SEQ ID NO:16的HCDR 3,和轻链可变区,特别是人源化轻链可变区,其包含SEQ ID NO:17的轻链互补决定区(LCDR) 1,SEQ ID NO:18的LCDR 2和SEQ ID NO:19的LCDR 3,或(ii) 重链可变区,特别是人源化重链可变区,其包含SEQ ID NO:50的重链互补决定区(HCDR) 1,SEQ ID NO:51的HCDR 2和SEQ ID NO:52的HCDR 3,和轻链可变区,特别是人源化轻链可变区,其包含SEQ ID NO:53的轻链互补决定区(LCDR) 1,SEQ ID NO:54的LCDR 2和SEQ ID NO:55的LCDR 3。

[0072] 在另一个实施方案中,本发明提供一种T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其包含

[0073] a) 特异性结合第一抗原的第一Fab分子;

[0074] b) 特异性结合第二抗原的第二Fab分子,且其中Fab轻链和Fab重链的可变域VL和VH或恒定域CL和CH1是彼此替换的;

[0075] c) 由能够稳定联合的第一亚基和第二亚基构成的Fc域;

[0076] 其中所述第一抗原是CD19且所述第二抗原是活化性T细胞抗原,特别是 CD3,更加特别是CD3 ϵ ;

[0077] 其中

[0078] (i) a) 下的第一Fab分子在Fab重链的C端融合至b) 下的第二Fab分子的Fab重链的N端,且b) 下的第二Fab分子在Fab重链的C端融合至c) 下的Fc域的亚基之一的N端,或

[0079] (ii) b) 下的第二Fab分子在Fab重链的C端融合至a) 下的第一Fab分子的Fab重链的N端,且a) 下的第一Fab分子在Fab重链的C端融合至c) 下的Fc域的亚基之一的N端;且

[0080] 其中a) 下的第一Fab分子包含 (i) 重链可变区,特别是人源化重链可变区,其包含SEQ ID NO:14的重链互补决定区(HCDR) 1,SEQ ID NO:15的HCDR 2和SEQ ID NO:16的HCDR 3,和轻链可变区,特别是人源化轻链可变区,其包含SEQ ID NO:17的轻链互补决定区(LCDR) 1,SEQ ID NO:18的LCDR 2和SEQ ID NO:19的LCDR 3,或(ii) 重链可变区,特别是人源化重链可变区,其包含SEQ ID NO:50的重链互补决定区(HCDR) 1,SEQ ID NO:51的HCDR 2和SEQ ID NO:52的HCDR 3,和轻链可变区,特别是人源化轻链可变区,其包含SEQ ID NO:53的轻链互补决定区(LCDR) 1, SEQ ID NO:54的LCDR 2和SEQ ID NO:55的LCDR 3。

[0081] 在又一个实施方案中,本发明提供一种T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其包含

[0082] a) 特异性结合第一抗原的第一Fab分子;

[0083] b) 特异性结合第二抗原的第二Fab分子,且其中Fab轻链和Fab重链的可变域VL和VH或恒定域CL和CH1是彼此替换的;和

[0084] c) 由能够稳定联合的第一亚基和第二亚基构成的Fc域;

[0085] 其中

[0086] (i) 所述第一抗原是CD19且所述第二抗原是活化性T细胞抗原,特别是 CD3,更加特别是CD3 ϵ ;或

[0087] (ii) 所述第二抗原是CD19且所述第一抗原是活化性T细胞抗原,特别是 CD3,更加特别是CD3 ϵ ;

[0088] 其中a) 下的第一Fab分子和b) 下的第二Fab分子各自在Fab重链的C端融合至c) 下的Fc域的亚基之一的N端;且

[0089] 其中特异性结合CD19的Fab分子包含(i) 重链可变区,特别是人源化重链可变区,其包含SEQ ID NO:14的重链互补决定区(HCDR)1,SEQ ID NO:15的HCDR 2和SEQ ID NO:16的HCDR 3,和轻链可变区,特别是人源化轻链可变区,其包含SEQ ID NO:17的轻链互补决定区(LCDR)1,SEQ ID NO:18的LCDR 2和SEQ ID NO:19的LCDR 3,或(ii) 重链可变区,特别是人源化重链可变区,其包含SEQ ID NO:50的重链互补决定区(HCDR)1,SEQ ID NO:51的HCDR 2和SEQ ID NO:52的HCDR 3,和轻链可变区,特别是人源化轻链可变区,其包含SEQ ID NO:53的轻链互补决定区(LCDR)1,SEQ ID NO:54的LCDR 2和SEQ ID NO:55的LCDR 3。

[0090] 在依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的所有不同构造中,如果存在的话,本文所述氨基酸替代可以在所述第一Fab分子(和所述第三Fab分子,如果存在的话)的CH1和CL域中,或者在所述第二Fab分子的CH1 和CL域中。优选地,它们在所述第一Fab分子(和所述第三Fab分子,如果存在的话)的CH1和CL域中。依照本发明的概念,如果在所述第一Fab分子(和所述第三Fab分子,如果存在的话)中进行本文所述氨基酸替代,那么在所述第二Fab分子中不进行此类氨基酸替代。反之,如果在所述第二Fab分子中进行本文所述氨基酸替代,那么在所述第一Fab分子(和所述第三Fab分子,如果存在的话)中不进行此类氨基酸替代。在包含其中的Fab轻链和Fab重链的恒定域CL和CH1彼此替换的Fab分子的T细胞活化性双特异性抗原结合分子中不进行氨基酸替代。

[0091] 在依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的特定的实施方案中,特别是其中在所述第一Fab分子(和所述第三Fab分子,如果存在的话)中进行本文所述氨基酸替代的情况,所述第一Fab分子(和所述第三Fab分子,如果存在的话)的恒定域CL是卡帕同种型的。在依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的其它实施方案中,特别是其中在所述第二Fab分子中进行本文所述氨基酸替代的情况,所述第二Fab分子的恒定域CL是卡帕同种型的。在一些实施方案中,所述第一Fab分子(和所述第三Fab分子,如果存在的话)的恒定域CL和所述第二Fab分子的恒定域CL是卡帕同种型的。

[0092] 在一个特定的实施方案中,本发明提供一种T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其包含

[0093] a) 特异性结合第一抗原的第一Fab分子;

[0094] b) 特异性结合第二抗原的第二Fab分子,且其中Fab轻链和Fab重链的可变域VL和VH是彼此替换的;

[0095] c) 特异性结合所述第一抗原的第三Fab分子;和

[0096] d) 由能够稳定联合的第一亚基和第二亚基构成的Fc域;

[0097] 其中所述第一抗原是CD19且所述第二抗原是活化性T细胞抗原,特别是 CD3,更加特别是CD3 ϵ ;

[0098] 其中c) 下的第三Fab分子与a) 下的第一Fab分子相同;

[0099] 其中在a) 下的第一Fab分子和c) 下的第三Fab分子的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K) 替代(编号方式依照Kabat) 且位置123处的氨基酸用赖氨酸(K) 或精氨酸(R) 替代(编号方式依照Kabat), 且其中在a) 下的第一Fab分子和c) 下的第三Fab分子的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E) 替代(编号方式依照Kabat EU索引) 且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E) 替代(编号方式依照Kabat EU索引);

[0100] 其中

[0101] (i) a) 下的第一Fab分子在Fab重链的C端融合至b) 下的第二Fab分子的Fab重链的N端,且b) 下的第二Fab分子和c) 下的第三Fab分子各自在Fab重链的C端融合至d) 下的Fc域的亚基之一的N端,或

[0102] (ii) b) 下的第二Fab分子在Fab重链的C端融合至a) 下的第一Fab分子的Fab重链的N端,且a) 下的第一Fab分子和c) 下的第三Fab分子各自在Fab重链的C端融合至d) 下的Fc域的亚基之一的N端;且

[0103] 其中a) 下的第一Fab分子和c) 下的第三Fab分子包含(i) 重链可变区,特别是人源化重链可变区,其包含SEQ ID NO:14的重链互补决定区(HCDR) 1, SEQ ID NO:15的HCDR 2和SEQ ID NO:16的HCDR 3,和轻链可变区,特别是人源化轻链可变区,其包含SEQ ID NO:17的轻链互补决定区(LCDR) 1,SEQ ID NO:18的LCDR 2和SEQ ID NO:19的LCDR 3,或(ii) 重链可变区,特别是人源化重链可变区,其包含SEQ ID NO:50的重链互补决定区(HCDR) 1,SEQ ID NO:51的HCDR 2和SEQ ID NO:52的HCDR 3,和轻链可变区,特别是人源化轻链可变区,其包含SEQ ID NO:53的轻链互补决定区(LCDR) 1,SEQ ID NO:54的LCDR 2和SEQ ID NO:55的LCDR 3。

[0104] 在一个甚至更加特定的实施方案中,本发明提供一种T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其包含

[0105] a) 特异性结合第一抗原的第一Fab分子;

[0106] b) 特异性结合第二抗原的第二Fab分子,且其中Fab轻链和Fab重链的可变域VL和VH是彼此替换的;

[0107] c) 特异性结合所述第一抗原的第三Fab分子;和

[0108] d) 由能够稳定联合的第一亚基和第二亚基构成的Fc域;

[0109] 其中所述第一抗原是CD19且所述第二抗原是活化性T细胞抗原,特别是 CD3,更加特别是CD3 ϵ ;

[0110] 其中c) 下的第三Fab分子与a) 下的第一Fab分子相同;

[0111] 其中在a) 下的第一Fab分子和c) 下的第三Fab分子的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K) 替代(编号方式依照Kabat) 且位置123处的氨基酸用精氨酸(R) 替代(编号方

式依照Kabat),且其中在a)下的第一Fab分子和c)下的第三 Fab分子的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照 Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引);

[0112] 其中a)下的第一Fab分子在Fab重链的C端融合至b)下的第二Fab分子的Fab重链的N端,且b)下的第二Fab分子和c)下的第三Fab分子各自在Fab重链的C端融合至d)下的Fc域的亚基之一的N端;且

[0113] 其中a)下的第一Fab分子和c)下的第三Fab分子包含(i)重链可变区,特别是人源化重链可变区,其包含SEQ ID NO:14的重链互补决定区(HCDR)1,SEQ ID NO:15的HCDR 2和SEQ ID NO:16的HCDR 3,和轻链可变区,特别是人源化轻链可变区,其包含SEQ ID NO:17的轻链互补决定区(LCDR)1,SEQ ID NO:18的LCDR 2和SEQ ID NO:19的LCDR 3,或(ii)重链可变区,特别是人源化重链可变区,其包含SEQ ID NO:50的重链互补决定区(HCDR)1,SEQ ID NO:51的HCDR 2和SEQ ID NO:52的HCDR 3,和轻链可变区,特别是人源化轻链可变区,其包含SEQ ID NO:53的轻链互补决定区(LCDR)1,SEQ ID NO:54的LCDR 2和SEQ ID NO:55的LCDR 3。

[0114] 在另一个实施方案中,本发明提供一种T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其包含

[0115] a)特异性结合第一抗原的第一Fab分子;

[0116] b)特异性结合第二抗原的第二Fab分子,且其中Fab轻链和Fab重链的可变域VL和VH是彼此替换的;

[0117] c)由能够稳定联合的第一亚基和第二亚基构成的Fc域;

[0118] 其中所述第一抗原是CD19且所述第二抗原是活化性T细胞抗原,特别是 CD3,更加特别是CD3 ϵ ;

[0119] 其中在a)下的第一Fab分子的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K)替代(编号方式依照Kabat)且位置123处的氨基酸用赖氨酸(K)或精氨酸(R)替代(编号方式依照Kabat),且其中在a)下的第一Fab分子的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引);

[0120] 其中

[0121] (i) a)下的第一Fab分子在Fab重链的C端融合至b)下的第二Fab分子的Fab重链的N端,且b)下的第二Fab分子在Fab重链的C端融合至c)下的Fc域的亚基之一的N端,或

[0122] (ii) b)下的第二Fab分子在Fab重链的C端融合至a)下的第一Fab分子的Fab重链的N端,且a)下的第一Fab分子在Fab重链的C端融合至c)下的Fc域的亚基之一的N端;且

[0123] 其中a)下的第一Fab分子包含(i)重链可变区,特别是人源化重链可变区,其包含SEQ ID NO:14的重链互补决定区(HCDR)1,SEQ ID NO:15的HCDR 2和SEQ ID NO:16的HCDR 3,和轻链可变区,特别是人源化轻链可变区,其包含SEQ ID NO:17的轻链互补决定区(LCDR)1,SEQ ID NO:18的LCDR 2和SEQ ID NO:19的LCDR 3,或(ii)重链可变区,特别是人源化重链可变区,其包含SEQ ID NO:50的重链互补决定区(HCDR)1,SEQ ID NO:51的HCDR 2和SEQ ID NO:52的HCDR 3,和轻链可变区,特别是人源化轻链可变区,其包含SEQ ID NO:53的轻链互补决定区(LCDR)1,SEQ ID NO:54的LCDR 2和SEQ ID NO:55的LCDR 3。

[0124] 在又一个实施方案中,本发明提供一种T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其包含

[0125] a) 特异性结合第一抗原的第一Fab分子;

[0126] b) 特异性结合第二抗原的第二Fab分子,且其中Fab轻链和Fab重链的可变域VL和VH是彼此替换的;和

[0127] c) 由能够稳定联合的第一亚基和第二亚基构成的Fc域;

[0128] 其中

[0129] (i) 所述第一抗原是CD19且所述第二抗原是活化性T细胞抗原,特别是CD3,更加特别是CD3 ϵ ;或

[0130] (ii) 所述第二抗原是CD19且所述第一抗原是活化性T细胞抗原,特别是 CD3,更加特别是CD3 ϵ ;

[0131] 其中在a)下的第一Fab分子的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K)替代(编号方式依照Kabat)且位置123处的氨基酸用赖氨酸(K)或精氨酸(R)替代(编号方式依照Kabat),且其中在a)下的第一Fab分子的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引);

[0132] 其中a)下的第一Fab分子和b)下的第二Fab分子各自在Fab重链的C端融合至c)下的Fc域的亚基之一的N端;且

[0133] 其中特异性结合CD19的Fab分子包含(i)重链可变区,特别是人源化重链可变区,其包含SEQ ID NO:14的重链互补决定区(HCDR)1,SEQ ID NO:15的HCDR 2和SEQ ID NO:16的HCDR 3,和轻链可变区,特别是人源化轻链可变区,其包含SEQ ID NO:17的轻链互补决定区(LCDR)1,SEQ ID NO:18的LCDR 2和SEQ ID NO:19的LCDR 3,或(ii)重链可变区,特别是人源化重链可变区,其包含SEQ ID NO:50的重链互补决定区(HCDR)1,SEQ ID NO:51的HCDR 2和SEQ ID NO:52的HCDR 3,和轻链可变区,特别是人源化轻链可变区,其包含SEQ ID NO:53的轻链互补决定区(LCDR)1,SEQ ID NO:54的LCDR 2和SEQ ID NO:55的LCDR 3。

[0134] 在T细胞活化性双特异性抗原结合分子的特定的实施方案中,所述Fc域是IgG Fc域。在一个具体的实施方案中,所述Fc域是IgG₁ Fc域。在另一个具体的实施方案中,所述Fc域是IgG₄ Fc域。在一个甚至更加具体的实施方案中,所述Fc域是包含氨基酸替代S228P的IgG₄ Fc域(Kabat编号方式)。在特定的实施方案中,所述Fc域是人Fc域。

[0135] 在一个特定的实施方案中,所述Fc域包含促进所述第一Fc域亚基和所述第二Fc域亚基联合的修饰。在一个具体的此类实施方案中,所述Fc域的第一亚基的CH3域中的氨基酸残基用具有更大侧链体积的氨基酸残基替换,由此在第一亚基的CH3域内生成隆起,所述隆起可安置于第二亚基的CH3域内的空腔中,且所述Fc域的第二亚基的CH3域中的氨基酸残基用具有更小侧链体积的氨基酸残基替换,由此在第二亚基的CH3域内生成空腔,所述空腔内可安置第一亚基的CH3域内的隆起。

[0136] 在一个特定的实施方案中,所述Fc域展现与天然IgG₁ Fc域相比降低的对Fc受体的结合亲和力和/或降低的效应器功能。在某些实施方案中,所述Fc域工程化改造成具有与非工程化改造的Fc域相比降低的对Fc受体的结合亲和力和/或降低的效应器功能。在一个实施方案中,所述Fc域包含一处或多处降低对Fc受体的结合和/或效应器功能的氨基酸

替代。在一个实施方案中,所述Fc域中一处或多处降低对Fc受体的结合和/或效应器功能的氨基酸替代处于一个或多个选自下组的位置:L234,L235和P329 (Kabat EU索引编号方式)。在特定的实施方案中,所述Fc域的每个亚基包含三处降低对Fc受体的结合和 /或效应器功能的氨基酸替代,其中所述氨基酸替代为L234A,L235A和P329G (Kabat EU索引编号方式)。在一个此类实施方案中,所述Fc域是IgG₁ Fc域,特别是人IgG₁ Fc域。在其它实施方案中,所述Fc域的每个亚基包含两处降低对Fc受体的结合和/或效应器功能的氨基酸替代,其中所述氨基酸替代为 L235E和P329G (Kabat EU索引编号方式)。在一个此类实施方案中,所述Fc域是IgG₄ Fc域,特别是人IgG₄ Fc域。在一个实施方案中,所述T细胞活化性双特异性抗原结合分子的Fc域是IgG₄ Fc域且包含氨基酸替代L235E和S228P (SPLE) (Kabat EU索引编号方式)。

[0137] 在一个实施方案中,所述Fc受体是Fc γ 受体。在一个实施方案中,所述Fc受体是人Fc受体。在一个实施方案中,所述Fc受体是活化性Fc受体。在一个具体的实施方案中,所述Fc受体是人Fc γ RIIa,Fc γ RI,和/或Fc γ RIIIa。在一个实施方案中,所述效应器功能是抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)。

[0138] 在依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的一个具体的实施方案中,所述特异性结合活化性T细胞抗原,特别是CD3,更加特别是CD3 ϵ 的抗原结合模块包含包含SEQ ID NO:4的重链互补决定区(HCDR)1,SEQ ID NO:5的HCDR 2,SEQ ID NO:6的HCDR 3的重链可变区和包含SEQ ID NO:8的轻链互补决定区(LCDR)1,SEQ ID NO:9的LCDR 2和SEQ ID NO:10的LCDR 3的轻链可变区。在一个甚至更加具体的实施方案中,所述特异性结合活化性T细胞抗原,特别是CD3,更加特别是CD3 ϵ 的抗原结合模块包含包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%相同的氨基酸序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%相同的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,所述特异性结合活化性T细胞抗原的抗原结合模块是Fab分子。在一个具体的实施方案中,依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子中包含的第二抗原结合模块,特别是Fab分子特异性结合CD3,更加特别是CD3 ϵ ,且包含SEQ ID NO:4的重链互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:5的重链CDR 2,SEQ ID NO:6的重链CDR 3,SEQ ID NO:8的轻链 CDR 1,SEQ ID NO:9的轻链CDR 2和SEQ ID NO:10的轻链CDR 3。在一个甚至更加具体的实施方案中,所述第二抗原结合模块,特别是Fab分子包含包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的轻链可变区。

[0139] 在依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的又一个具体的实施方案中,所述特异性结合CD19的抗原结合模块,特别是Fab分子包含SEQ ID NO:14的重链互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:15的重链CDR 2,SEQ ID NO:16的重链CDR 3,SEQ ID NO:17的轻链 CDR 1,SEQ ID NO:18的轻链CDR 2和SEQ ID NO:19的轻链CDR 3。在一个甚至更加具体的实施方案中,所述特异性结合CD19的抗原结合模块,特别是Fab分子包含包含与 SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%相同的氨基酸序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%相同的氨基酸序列的轻链可变区。在一个具体的实施方案中,依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子中包含的第一抗原结合模块,特别是Fab分子(和第三抗原结合模块,特别是Fab分子,如果存在的话)特异性结合CD19,且包含SEQ ID NO:14的重链互补决定区

(CDR) 1, SEQ ID NO:15的重链CDR 2, SEQ ID NO:16的重链 CDR 3, SEQ ID NO:17的轻链CDR 1, SEQ ID NO:18的轻链CDR 2和SEQ ID NO:19的轻链CDR 3。在一个甚至更加具体的实施方案中,所述第一抗原结合模块,特别是Fab分子(和所述第三抗原结合模块,特别是Fab分子,如果存在的话)包含包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的重链可变区和包含 SEQ ID NO:21的氨基酸序列的轻链可变区。

[0140] 在依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的另一个具体的实施方案中,所述特异性结合CD19的抗原结合模块,特别是Fab分子包含SEQ ID NO:50的重链互补决定区(CDR) 1, SEQ ID NO:51的重链CDR 2, SEQ ID NO:52的重链CDR 3, SEQ ID NO:53的轻链CDR 1, SEQ ID NO:54的轻链CDR 2和SEQ ID NO:55的轻链CDR 3。在一个甚至更加具体的实施方案中,所述特异性结合CD19的抗原结合模块,特别是Fab分子包含包含与 SEQ ID NO:56的氨基酸序列至少约95%, 96%, 97%, 98%, 99%或100%相同的氨基酸序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:57的氨基酸序列至少约95%, 96%, 97%, 98%, 99%或100%相同的氨基酸序列的轻链可变区。在一个具体的实施方案中,依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子中包含的第一抗原结合模块,特别是Fab分子(和第三抗原结合模块,特别是Fab分子,如果存在的话)特异性结合CD19,且包含SEQ ID NO:50的重链互补决定区(CDR) 1, SEQ ID NO:51的重链CDR 2, SEQ ID NO:52的重链 CDR 3, SEQ ID NO:53的轻链CDR 1, SEQ ID NO:54的轻链CDR 2和SEQ ID NO:55的轻链CDR 3。在一个甚至更加具体的实施方案中,所述第一抗原结合模块,特别是Fab分子(和所述第三抗原结合模块,特别是Fab分子,如果存在的话)包含包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的重链可变区和包含 SEQ ID NO:57的氨基酸序列的轻链可变区。

[0141] 在一个特定的方面,本发明提供一种T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其包含

[0142] a) 特异性结合第一抗原的第一Fab分子;

[0143] b) 特异性结合第二抗原的第二Fab分子,且其中Fab轻链和Fab重链的可变域 VL和VH或恒定域CL和CH1是彼此替换的;

[0144] c) 特异性结合所述第一抗原的第三Fab分子;和

[0145] d) 由能够稳定联合的第一亚基和第二亚基构成的Fc域;

[0146] 其中

[0147] (i) 所述第一抗原是CD19且所述第二抗原是CD3,特别是CD3 ϵ ;

[0148] (ii) a) 下的第一Fab分子和c) 下的第三Fab分子各自包含SEQ ID NO:14的重链互补决定区(CDR) 1, SEQ ID NO:15的重链CDR 2, SEQ ID NO:16的重链 CDR 3, SEQ ID NO:17的轻链CDR 1, SEQ ID NO:18的轻链CDR 2和SEQ ID NO:19的轻链CDR 3,或各自包含SEQ ID NO:50的重链互补决定区(CDR) 1, SEQ ID NO:51的重链CDR 2, SEQ ID NO:52的重链CDR 3, SEQ ID NO:53的轻链CDR 1, SEQ ID NO:54的轻链CDR 2和SEQ ID NO:55的轻链CDR 3,且 b) 下的第二Fab分子包含SEQ ID NO:4的重链CDR 1, SEQ ID NO:5的重链CDR 2, SEQ ID NO:6的重链CDR 3, SEQ ID NO:8的轻链CDR 1, SEQ ID NO:9的轻链CDR 2和SEQ ID NO:10的轻链CDR 3;且

[0149] (iii) a) 下的第一Fab分子在Fab重链的C端融合至b) 下的第二Fab分子的Fab重链的N端,且b) 下的第二Fab分子和c) 下的第三Fab分子各自在Fab重链的C端融合至d) 下的Fc域的亚基之一的N端。

[0150] 在一个实施方案中,在b)下的第二Fab分子中,可变域VL和VH是彼此替换的且进一步地(iv)在a)下的第一Fab分子和c)下的第三Fab分子的恒定域 CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K)替代(编号方式依照Kabat)且位置123处的氨基酸用赖氨酸(K)或精氨酸(R)替代,特别是用精氨酸(R)替代(编号方式依照Kabat),且在a)下的第一Fab分子和c)下的第三Fab分子的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)且位置 213处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0151] 依照本发明的另一个方面,提供一种或多种分离的多核苷酸,其编码本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子。本发明进一步提供一种或多种包含本发明的分离的多核苷酸的表达载体,以及包含本发明的分离的多核苷酸或表达载体的宿主细胞。在一些实施方案中,所述宿主细胞是真核细胞,特别是哺乳动物细胞。

[0152] 在另一个方面,提供一种生成本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的方法,其包括下述步骤:a)在适合于表达所述T细胞活化性双特异性抗原结合分子的条件培养本发明的宿主细胞,并b)回收所述T细胞活化性双特异性抗原结合分子。本发明还涵盖通过本发明的方法生成的T细胞活化性双特异性抗原结合分子。

[0153] 本发明进一步提供一种药物组合物,其包含本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子和药学可接受载剂。

[0154] 本发明还涵盖使用本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子和药物组合物的方法。在一个方面,本发明提供本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子或药物组合物,其用作药物。在一个方面,提供依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子或药物组合物,其用于治疗有所需要的个体中的疾病。在一个具体的实施方案中,所述疾病是癌症。

[0155] 还提供本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子制造用于治疗有所需要的个体中的疾病的药物的用途;以及一种治疗个体中的疾病的方法,其包括对所述个体施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含药学可接受形式的依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子。在一个具体的实施方案中,所述疾病是癌症。在任何上述实施方案中,所述个体优选是哺乳动物,特别是人。

[0156] 本发明还提供一种用于诱导靶细胞(特别是肿瘤细胞)裂解的方法,其包括在T细胞(特别是细胞毒性T细胞)存在下使靶细胞与本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子接触。

[0157] 附图简述

[0158] 图1。本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子(TCB)的例示性构造。(A,D)“1+1 CrossMab”分子的示图。(B,E)“2+1 IgG Crossfab”分子的示图,其具有Crossfab和Fab构件(“倒转的”)的备选(alternative)次序。(C,F)“2+1 IgG Crossfab”分子的示图。(G,K)“1+1 IgG Crossfab”分子的示图,其具有Crossfab 和Fab构件(“倒转的”)的备选(alternative)次序。(H,L)“1+1 IgG Crossfab”分子的示图。(I,M)“2+1 IgG Crossfab”分子的示图,其具有两个CrossFab。(J, N)“2+1 IgG Crossfab”分子的示图,其具有两个CrossFab和Crossfab和Fab构件(“倒转的”)的备选(alternative)次序。(O,S)“Fab-Crossfab”分子的示图。(P, T)“Crossfab-Fab”分子的示图。(Q,U)“(Fab)₂-Crossfab”分子的示图。(R, V)“Crossfab-(Fab)₂”分子的示图。(W,Y)“Fab-(Crossfab)₂”分子的示图。(X,

Z)“(Crossfab)₂-Fab”分子的示图。黑点：任选的Fc域中促进异二聚化的修饰。++，--：CH1和CL域中任选引入的相反电荷的氨基酸。Crossfab分子描绘为包含VH和VL区交换，但是在其中CH1和CL域中没有引入电荷修饰的实施方案中可以备选地包含CH1和CL域的交换。

[0159] 图2。实施例中制备的TCB的图示。(A)分子A：有电荷修饰的“2+1 IgG CrossFab,倒转的”(CD3结合物中的VH/VL交换,CD19结合物(亲本CD19结合物8E8)中的电荷修饰,EE=147E,213E;RK=123R,124K), (B)分子B：无电荷修饰的“2+1 IgG CrossFab,倒转的”(CD3结合物中的CH1/CL交换,亲本CD19结合物8B8), (C)分子C：有电荷修饰的“2+1 IgG CrossFab”(CD3结合物中的VH/VL交换,CD19结合物(人源化CD19结合物变体5)中的电荷修饰), (D)分子D：无电荷修饰的“2+1 IgG CrossFab,倒转的”(CD3结合物中的CH1/CL交换,CD19结合物10C1), (E)分子E：无电荷修饰的“1+1 IgG CrossFab,倒转的”(CD3结合物中的CH1/CL交换,亲本CD19结合物8B8), (F)分子F：有电荷修饰的“1+1 IgG CrossMab”(CD3结合物中的VH/VL交换,CD19结合物(亲本CD19结合物8B8)中的电荷修饰), (G)分子G：有电荷修饰的“2+1 IgG CrossFab,倒转的”(CD19结合物(亲本CD19结合物8B8)中的VH/VL交换,CD3结合物中的电荷修饰), (H)分子H：有电荷修饰的“2+1 IgG CrossFab”(CD3结合物中的VH/VL交换,CD19结合物(人源化CD19结合物2B11)中的电荷修饰,EE=147E,213E;RK=123R,124K)。

[0160] 图3。实施例中制备的TCB的CE-SDS分析(最终的经过纯化的制备物)。(A)图2A中所示分子“A”的电泳图, (B)图2B中所示分子“B”的电泳图, (C)图2C中所示分子“C”的电泳图, (D)图2D中所示分子“D”的电泳图, (E)图2E中所示分子“E”的电泳图, (F)图2F中所示分子“F”的电泳图, (G)图2G中所示分子“G”的电泳图,道A=非还原的,道B=还原的, (H)图2H中所示分子“H”的电泳图,道A=非还原的,道B=还原的。

[0161] 图4。第一个纯化步骤(蛋白A亲和层析)之后实施例中制备的TCB的SDS-PAGE分析(4-12%Bis-Tris,考马斯染色,非还原的)。(A)道1=标志物(Mark 12,未染色的标准品,Invitrogen);道2-11=来自分子A的蛋白A亲和层析的级分, (B)道1=标志物(Mark 12,未染色的标准品,Invitrogen);道2-14=来自分子B的蛋白A亲和层析的级分, (C)道1=标志物(Mark 12,未染色的标准品,Invitrogen);道2-8=来自分子C的蛋白A亲和层析的级分, (D)道1=标志物(Mark 12,未染色的标准品,Invitrogen);道2-14=来自分子D的蛋白A亲和层析的级分, (E)道1=标志物(Mark 12,未染色的标准品,Invitrogen);道2-11=来自分子E的蛋白A亲和层析的级分, (F)道1=标志物(Mark 12,未染色的标准品,Invitrogen);道2-11=来自分子F的蛋白A亲和层析的级分, (G)道1=标志物(Mark 12,未染色的标准品,Invitrogen);道4-10=来自分子G的蛋白A亲和层析的级分, (H)道1=标志物(HiMark HMW,Invitrogen);道2-14=来自分子H的蛋白A亲和层析的级分。

[0162] 图5。(A)CD19 IgG和CD19 TCB对Raji细胞的结合。(B)CD19 TCB(使用8B8和10C1克隆生成的)对表达CD3的Jurkat细胞的结合。

[0163] 图6。(A-B)由CD19 TCB抗体介导的表达CD19的肿瘤细胞((A)Na1m-6,(B)SUDHL-4)的裂解。(C-F)由CD19 TCB抗体介导的Na1m-6靶细胞杀伤后CD8(C,E)和CD4(D,F)T细胞上的CD69(C,D)和CD25(D,E)表达。(G-J)由CD19 TCB抗体介导的SUDHL-4靶细胞杀伤后CD8(G,I)和CD4(H,J)T细胞上的CD69(G,H)和CD25(I,J)表达。(K)由CD19 TCB抗体(具有8B8和10C1克隆)和博纳吐单抗介导的Z-138细胞的裂解。(L-M)由CD19 TCB抗体介导的Z-138肿瘤细胞杀伤后CD8 T细胞上的CD69(L)和CD25(M)表达。(N-O)由CD19 TCB抗体介导的Z-

138肿瘤细胞杀伤后CD4⁺ T细胞上的CD69 (N) 和CD25 (O) 表达。

[0164] 图7。(A) 由基于8B8和10C1克隆的CD19 TCB抗体介导的B细胞消减。(B) 由基于8B8和10C1克隆的CD19 TCB抗体介导的B细胞消减后的T细胞活化 (CD69标志物)。

[0165] 图8。CD19 TCB抗体 (基于8B8和10C1克隆) 对食蟹猴 (A) 和人 (B) B细胞, 对食蟹猴 (C) 和人 (D) CD4⁺ T细胞, 和对食蟹猴 (E) 和人 (F) CD8⁺ T细胞的结合。

[0166] 图9。(A-D) 由CD19 TCB抗体 (8B8克隆) 和博纳吐单抗介导的食蟹猴 (A,C) 和人 (B, D) 全血中的B细胞消减: (A,B) 通过将B细胞值针对CD4⁺ T细胞标准化获得的%B细胞消减, (C,D) 通过将B细胞值针对CD8⁺ T细胞标准化获得的%B细胞消减。(E-L) 食蟹猴 (E,G,I,K) 和人 (F,H,J,L) 全血中CD19 TCB (8B8克隆) 和博纳吐单抗B细胞消减后发生的T细胞活化: (E-F) 食蟹猴 (E) 和人 (F) CD8⁺ T细胞上的%CD69, (G-H) 食蟹猴 (G) 和人 (H) CD8⁺ T细胞上的%CD25, (I-J) 食蟹猴 (I) 和人 (J) CD4⁺ T细胞上的%CD69, (K-L) 食蟹猴 (K) 和人 (L) CD4⁺ T细胞上的%CD25。

[0167] 图10。由不同CD19 TCB抗体型式介导的肿瘤细胞裂解和随后T细胞活化的比较。(A) Na1m-6肿瘤细胞的裂解。(B) Z-138肿瘤细胞的裂解。(C-E) Na1m-6靶物杀伤后CD8⁺ T细胞上的CD107a (C), CD25 (D) 和CD69 (E) 表达。(F-H) Na1m-6靶物杀伤后CD4⁺ T细胞上的CD107a (F), CD25 (G) 和CD69 (H) 表达。(I-K) Z-138靶物杀伤后CD8⁺ T细胞上的CD107a (I), CD25 (J) 和CD69 (K) 表达。(L-N) Z-138靶物杀伤后CD4⁺ T细胞上的CD107a (L), CD25 (M) 和CD69 (N) 表达。

[0168] 图11。不同CD19 TCB抗体型式 (基于8B8克隆) 对表达人CD19和CD3的靶细胞的结合。(A) Na1m-6细胞, (B) 正常人B细胞, (C) 正常人CD4⁺ T细胞, (D) 正常人CD8⁺ T细胞, (E) Jurkat细胞。

[0169] 图12。由不同CD19 TCB抗体型式介导的肿瘤细胞裂解和随后T细胞活化的比较。(A) Na1m-6肿瘤细胞的裂解。(B) Z-138肿瘤细胞的裂解。(C-E) Na1m-6靶物杀伤后CD8⁺ T细胞上的CD107a (C), CD25 (D) 和CD69 (E) 表达。(F-H) Na1m-6靶物杀伤后CD4⁺ T细胞上的CD107a (F), CD25 (G) 和CD69 (H) 表达。(I-K) Z-138靶物杀伤后CD8⁺ T细胞上的CD107a (I), CD25 (J) 和CD69 (K) 表达。(L-N) Z-138靶物杀伤后CD4⁺ T细胞上的CD107a (L), CD25 (M) 和CD69 (N) 表达。

[0170] 图13。由含有亲本和人源化CD19结合物的CD19 TCB抗体介导的表达CD19的肿瘤细胞的裂解和随后T细胞活化。(A) Z-138肿瘤细胞的裂解。(B-D) Z-138靶物杀伤后CD8⁺ T细胞上的CD107a (B), CD25 (C) 和CD69 (D) 表达。(E-G) Z-138靶物杀伤后CD4⁺ T细胞上的CD107a (E), CD25 (F) 和CD69 (G) 表达。

[0171] 发明详述

[0172] 定义

[0173] 除非在下文另外定义, 术语在本文中如本领域中一般使用的那样使用。

[0174] 如本文中使用的, 术语“抗原结合分子”在其最广义上指特异性结合抗原性决定簇的分子。抗原结合分子的例子是免疫球蛋白及其衍生物, 例如片段。

[0175] 术语“双特异性”意指抗原结合分子能够特异性结合至少两种不同的抗原性决定簇。通常, 双特异性抗原结合分子包含两种抗原结合位点, 其中每种特异于不同的抗原性决定簇。在某些实施方案中, 所述双特异性抗原结合分子能够同时结合两种抗原性决定簇, 特

别是在两种不同的细胞上表达的两种抗原性决定簇。

[0176] 如本文中使用的,术语“价”指抗原结合分子中规定数目的抗原结合位点的存在。因而,术语“对抗原的单价结合”指抗原结合分子中一个(且不超过一个)特异于抗原的抗原结合位点的存在。

[0177] “抗原结合位点”指抗原结合分子上提供与抗原相互作用的位点,即一个或多个氨基酸残基。例如,抗体的抗原结合位点包含来自互补性决定区(CDR)的氨基酸残基。天然的免疫球蛋白分子通常具有两个抗原结合位点,Fab分子通常具有单个抗原结合位点。

[0178] 如本文中使用的,术语“抗原结合模块”指特异性结合抗原性决定簇的多肽分子。在一个实施方案中,抗原结合模块能够将其附接的实体(例如第二抗原结合模块)引导至靶部位,例如至特定类型的肿瘤细胞或携有抗原性决定簇的肿瘤基质。在另一个实施方案中,抗原结合模块能够经由其靶抗原例如T细胞受体复合物抗原来激活信号传导。抗原结合模块包括如本文中另外定义的抗体及其片段。具体的抗原结合模块包括抗体的抗原结合域,其包含抗体重链可变区和抗体轻链可变区。在某些实施方案中,抗原结合模块可以包含抗体恒定区,如本文中另外定义和本领域中已知的。可用的重链恒定区包括以下5种同种型中的任何一种: α , δ , ϵ , γ 或 μ 。可用的轻链恒定区包括以下2种同种型中的任何一种: κ 和 λ 。

[0179] 如本文中使用的,术语“抗原性决定簇”与“抗原”和“表位”同义,并且指多肽大分子上与抗原结合模块结合,从而形成抗原结合模块-抗原复合物的位点(例如氨基酸的连续区段或由不连续氨基酸的不同区构成的构象性构造)。可用的抗原性决定簇可以在例如肿瘤细胞表面上,病毒感染的细胞的表面上,其它患病细胞的表面上,免疫细胞的表面上,游离在血液血清中和/或在胞外基质(ECM)中找到。除非另外指示,本文中称作抗原的蛋白质(例如CD3)可以是来自任何脊椎动物来源,包括哺乳动物如灵长类(例如人)和啮齿类(例如小鼠和大鼠)的任何天然形式蛋白质。在一个具体的实施方案中,抗原是人蛋白。在对本文中的特定蛋白质进行提述的情况下,该术语涵盖“全长”,未加工的蛋白质以及起因于细胞中加工的蛋白质的任何形式。该术语还涵盖蛋白质的天然存在变体,例如剪接变体或等位变体。可用作抗原的一种例示性人蛋白是CD3,特别是CD3的 ϵ 亚基(对于人序列,参见UniProt no.P07766(版本130),NCBI RefSeq no.NP_000724.1,SEQ ID NO:1;或对于食蟹猴[*Macaca fascicularis*]序列,参见UniProt no.Q95LI5(版本49),NCBI GenBank no.BAB71849.1,SEQ ID NO:2),或CD19,也称作B淋巴细胞抗原CD19或B淋巴细胞表面抗原B4(对于人蛋白质,参见UniProt no.P15391,NCBI RefSeq no.NP_001761.3)。在某些实施方案中,本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子结合在来自不同物种的CD3或CD19抗原间保守的CD3或CD19的表位。

[0180] “特异性结合”意指结合对于抗原是选择性的,并且能与不想要的或非特异性的相互作用区别开来。抗原结合模块结合特定抗原性决定簇的能力能经由酶联免疫吸附测定法(ELISA)或本领域技术人员熟知的其它技术,例如表面等离子共振(SPR)技术(在BIAcore仪上分析)(Liljeblad等,Glyco J 17, 323-329(2000)),以及传统的结合测定法(Heeley, Endocr Res 28,217-229(2002))来测量。在一个实施方案中,抗原结合模块对无关蛋白质的结合程度是该抗原结合模块对抗原结合的小于约10%,如例如通过SPR测量的。在某些实施方案中,结合抗原的抗原结合模块,或包含该抗原结合模块的抗原结合分子具有 $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{nM}$, $\leq 10\text{nM}$, $\leq 1\text{nM}$, $\leq 0.1\text{nM}$, $\leq 0.01\text{nM}$,或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更少,例如 10^{-8}M 至

10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M 的解离常数(K_D)。

[0181] “亲和力”指分子(例如受体)的单一结合位点与其结合配偶体(例如配体)之间非共价相互作用总和的强度。除非另外指示,如本文中使用的,“结合亲和力”指反映结合对的成员(例如抗原结合模块和抗原,或受体及其配体)之间1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可以以解离常数(K_D)来表述,其为解离与结合速率常数(分别为 $K_{\text{解离}}$ 和 $K_{\text{结合}}$)的比率。如此,相等的亲和力可能包含不同的速率常数,只要速率常数的比率保持相同。亲和力可以通过本领域知道的确立方法来测量,包括本文中描述的那些方法。用于测量亲和力的一种具体方法是表面等离子共振(SPR)。

[0182] “降低的结合”,例如降低的对Fc受体的结合,指相应相互作用的亲和力降低,例如通过SPR测量的。为了清楚,该术语还包括亲和力降低至0(或低于分析方法的检测限),即完全消除相互作用。相反,“升高的结合”指相应相互作用的结合亲和力升高。

[0183] 如本文中使用的,“活化性T细胞抗原”指在T淋巴细胞,特别是细胞毒性T淋巴细胞的表面上表达的抗原性决定簇,其在与抗原结合分子相互作用后能诱导T细胞活化。特定地,抗原结合分子与活化性T细胞抗原的相互作用可诱导T细胞活化,其通过触发T细胞受体复合物的信号传导级联进行。在一个具体的实施方案中,所述活化性T细胞抗原是CD3,特别是CD3的 ϵ 亚基(对于人序列,参见UniProt no.P07766(版本130),NCBI RefSeq no. NP_000724.1,SEQ ID NO:1;或对于食蟹猴[*Macaca fascicularis*]序列,参见UniProt no.Q95LI5(版本49),NCBI GenBank no.BAB71849.1,SEQ ID NO:2)。

[0184] 如本文中使用的,“T细胞活化”指T淋巴细胞,特别是细胞毒性T淋巴细胞的一种或多种细胞应答,其选自:增殖,分化,细胞因子分泌,细胞毒性效应分子释放,细胞毒性活性和活化标志物的表达。本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子能够诱导T细胞活化。合适的测量T细胞活化的测定法是本文中所述技术领域已知。

[0185] 如本文中使用的,“靶细胞抗原”指靶细胞表面上呈现的抗原性决定簇,所述靶细胞例如肿瘤中的细胞如癌细胞或肿瘤基质的细胞。在一个特别的实施方案中,所述靶细胞抗原是CD19,特别是人CD19。

[0186] 如本文中使用的,术语“第一”,“第二”或“第三”就Fab分子等而言为了在有超过一个每类模块时便于区分而使用。除非明确如此陈述,这些术语的使用不意图赋予T细胞活化性双特异性抗原结合分子的特定次序或取向。

[0187] “Fab分子”指由免疫球蛋白的重链(“Fab重链”)的VH和CH1域以及轻链(“Fab轻链”)的VL和CL域组成的蛋白质。

[0188] “融合”意指组分(例如Fab分子和Fc域亚基)直接地或经由一种或多种肽接头通过肽键连接。

[0189] 如本文中使用的,术语“单链”指包含通过肽键线性连接的氨基酸单体的分子。在某些实施方案中,抗原结合模块之一是单链Fab分子,即其中通过肽接头连接Fab轻链和Fab重链以形成单一肽链的Fab分子。在一个具体的此类实施方案中,在单链Fab分子中Fab轻链的C端连接于Fab重链的N端。

[0190] “交换”Fab分子(也称作“Crossfab”)意指其中Fab重链和轻链的可变域或恒定域交换(即彼此替换)的Fab分子,即交换Fab分子包含由轻链可变域VL和重链恒定域1CH1构成的肽链(VL-CH1,N至C端方向),和由重链可变域VH和轻链恒定域CL构成的肽链(VH-CL,N

至C端方向)。为了清楚,在其中Fab轻链和Fab重链的可变域交换的交换Fab分子中,包含重链恒定域1 CH1的肽链在本文中称作(交换)Fab分子的“重链”。相反,在其中Fab轻链和 Fab重链的恒定域交换的交换Fab分子中,包含重链可变域VH的肽链在本文中称作(交换)Fab分子的“重链”。

[0191] 与之相反,“常规”Fab分子意指处于它的天然型式的Fab分子,即包含由重链可变和恒定域构成的重链(VH-CH1,N至C端方向),和由轻链可变和恒定域构成的轻链(VL-CL,N至C端方向)。

[0192] 术语“免疫球蛋白分子”指具有天然存在的抗体结构的蛋白质。例如,IgG类的免疫球蛋白是约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,其由二硫键连接的两条轻链和两条重链构成。从N端至C端,每条重链具有可变域(VH),也称作可变重域或重链可变区,接着是3个恒定域(CH1,CH2和CH3),也称作重链恒定区。类似地,从N端至C端,每条轻链具有可变域(VL),也称作可变轻域或轻链可变区,接着是恒定轻(CL)域(也称作轻链恒定区)。免疫球蛋白的重链可以归入称作 α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG)或 μ (IgM)的5类之一,其中一些可以进一步分成亚类,例如 γ_1 (IgG₁), γ_2 (IgG₂), γ_3 (IgG₃), γ_4 (IgG₄), α_1 (IgA₁)和 α_2 (IgA₂)。基于其恒定域的氨基酸序列,免疫球蛋白的轻链可以归入称作卡帕(κ)和拉姆达(λ)的两类之一。免疫球蛋白基本由经由免疫球蛋白铰链区连接的两个Fab分子和Fc域组成。

[0193] 术语“抗体”在本文中以最广义使用且涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体,多克隆抗体和抗体片段,只要它们展现出期望的抗原结合活性。

[0194] “抗体片段”指完整抗体外的分子,其包含完整抗体中结合与完整抗体结合的抗原的一部分。抗体片段的例子包括但不限于Fv,Fab,Fab', Fab'-SH,F(ab')₂,双抗体,线性抗体,单链抗体分子(例如scFv),和单域抗体。对于某些抗体片段的综述,参见Hudson等,Nat Med 9,129-134(2003)。对于scFv片段的综述,参见例如Plückthun,于The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,vol.113,Rosenburg和Moore编,Springer-Verlag,New York, pp.269-315(1994);亦参见W0 93/16185;和美国专利No.5,571,894和 5,587,458。关于包含补救受体结合表位残基且具有延长的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段的论述,参见美国专利No.5,869,046。双抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段,其可以是二价或双特异性的。参见例如EP 404,097; W0 1993/01161;Hudson等,Nat Med 9,129-134(2003);和Hollinger等,Proc Natl Acad Sci USA 90,6444-6448(1993)。三抗体和四抗体也记载于Hudson等,Nat Med 9,129-134(2003)。单域抗体是包含抗体的整个或部分重链可变域,或整个或部分轻链可变域的抗体片段。在某些实施方案中,单域抗体是人单域抗体(Domantis,Inc.,Waltham,MA;参见例如美国专利No. 6,248,516B1)。可以通过各种技术来制备抗体片段,包括但不限于对完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞(例如大肠杆菌或噬菌体)产生,如本文中描述的。

[0195] 术语“抗原结合域”指包含特异性结合部分或整个抗原且与其互补的区域的抗体部分。抗原结合域可由例如一个或多个抗体可变域(也称作抗体可变区)提供。具体地,抗原结合域包含抗体轻链可变域(VL)和抗体重链可变域(VH)。

[0196] 术语“可变区”或“可变域”指抗体重链或轻链中牵涉使抗体结合抗原的域。天然抗体的重链和轻链的可变域(分别为VH和VL)一般具有类似的结构,每个域包含4个保守的框架区(FR)和3个高变区(HVR)。参见例如Kindt等,Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman

and Co.,第91页(2007)。单个 VH或VL域可能足以赋予抗原结合特异性。

[0197] 如本文中使用的,术语“高变区”或“HVR”指抗体可变域中序列中高度可变和/或形成结构上定义的环(“高变环”)的每个区域。通常,天然的四链抗体包含六个HVR;三个在VH中(H1,H2,H3),三个在VL中(L1,L2,L3)。HVR一般包含来自高变环和/或来自互补性决定区(CDR)的氨基酸残基,后者具有最高序列变异性和/或涉及抗原识别。除了VH中CDR1外,CDR一般包含形成高变环的氨基酸残基。高变区(HVR)也称作“互补性决定区”(CDR),并且在谈及形成抗原结合区的可变区部分时,这些术语在本文中可交换使用。此特定区域已由Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)及Chothia et al.,J Mol Biol 196:901-917(1987)描述,其中定义包括在彼此比较时氨基酸残基的重叠或子集。然而,应用任一种定义来指抗体或其变体的CDR意图在如本文中定义和使用的术语的范围内。涵盖如由上文引用的每篇参考文献定义的CDR的适宜的氨基酸残基在下表A中列出作为比较。涵盖特定CDR的确切残基数将随着CDR的序列和大小而变化。鉴于抗体的可变区氨基酸序列,本领域技术人员可以常规确定哪些残基构成特定CDR。本文中给出的CDR序列一般是依照Kabat定义的。

[0198] 表A:CDR定义¹

	CDR	Kabat	Chothia	AbM²
[0199]	V _H CDR1	31-35	26-32	26-35
	V _H CDR2	50-65	52-58	50-58
	V _H CDR3	95-102	95-102	95-102
[0200]	V _L CDR1	24-34	26-32	24-34
	V _L CDR2	50-56	50-52	50-56
	V _L CDR3	89-97	91-96	89-97

[0201] ¹表A中所有CDR定义的编号方式依照由Kabat等提出的编号惯例(见下文)。

[0202] ²如表A中使用的具有小写字母“b”的“AbM”指由Oxford Molecular的“AbM”抗体建模软件定义的CDR。

[0203] Kabat等还定义针对可变区序列的编号系统,其可应用于任何抗体。本领域的普通技术人员可以明确地将此“Kabat编号”系统归入任何可变区序列,不依赖于序列本身外的任何实验数据。如本文中结合可变区序列使用的,“Kabat编号方式”指由Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda, MD(1991)提出的编号系统。除非另外说明,提及抗体可变区中特定氨基酸残基位置的编号方式依照Kabat编号系统。

[0204] 如本文中使用的,所有重和轻链的恒定区和域的氨基酸位置是依照Kabat,et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th ed.,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)中描述的Kabat编号系统编号的且在本文中称作“依照Kabat的编号方式”或“Kabat编号方式”。具体而言,将Kabat编号系统(参见Kabat,et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th

ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) 的第 647-660 页) 用于卡帕和拉姆达同种型的轻链恒定域 CL 并将 Kabat EU 索引编号系统 (参见第 661-723 页) 用于重链恒定域 (CH1, 铰链, CH2 和 CH3), 在这种情况下在本文中通过提到“依照 Kabat EU 索引的编号方式”来进一步澄清。

[0205] 序列列表的多肽序列并不依照 Kabat 编号系统编号。然而, 本领域中普通技术人员完全能将序列列表的序列编号方式转变成 Kabat 编号方式。

[0206] “框架”或“FR”指除高变区 (HVR) 残基外的可变域残基。可变域的 FR 一般由 4 个 FR 域组成: FR1, FR2, FR3 和 FR4。因而, HVR 和 FR 序列一般以下列顺序出现在 VH (或 VL) 中: FR1-H1 (L1) -FR2-H2 (L2) -FR3-H3 (L3) -FR4。

[0207] “人源化”抗体指包含来自非人 HVR 的氨基酸残基和来自人 FR 的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中, 人源化抗体会包含至少一个, 通常两个基本上整个可变域, 其中所有或基本上所有 HVR (例如, CDR) 对应于非人抗体的那些, 且所有或基本上所有 FR 对应于人抗体的那些。此类可变域在本文中称作“人源化可变区”。任选地, 人源化抗体可以至少包含自人抗体衍生的抗体恒定区的一部分。抗体 (例如非人抗体) 的“人源化形式”指已经经历人源化的抗体。本发明涵盖的“人源化抗体”的其它形式是那些其中的恒定区已经另外自初始抗体的恒定区进行过修饰或改变以生成依照本发明的特性 (特别地关于 C1q 结合和/或 Fc 受体 (FcR) 结合) 的。

[0208] 抗体或免疫球蛋白的“类”指其重链拥有的恒定域或恒定区的类型。抗体有 5 种主要的类: IgA, IgD, IgE, IgG 和 IgM, 并且这些中数种可以进一步分成亚类 (同种型), 例如 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 和 IgA₂。对应于不同免疫球蛋白类的重链恒定域分别称作 α , δ , ϵ , γ 和 μ 。

[0209] 本文中术语“Fc 域”或“Fc 区”用于定义免疫球蛋白重链中至少含有恒定区的一部分的 C 端区域。该术语包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。虽然 IgG 重链的 Fc 区的边界可以略微变化, 但是人 IgG 重链 Fc 区通常定义为自 Cys226 或 Pro230 延伸至重链的羧基端。然而, 由宿主细胞生成的抗体可能经历翻译后切割, 自重链的 C 端切除一个或多个, 特别是一个或两个氨基酸。因此, 通过表达编码全长重链的特定核酸分子由宿主细胞生成的抗体可包括全长重链, 或者它可包括全长重链的切割变体 (在本文中称作“切割变体重链”)。当重链的最终两个 C 端氨基酸是甘氨酸 (G446) 和赖氨酸 (K447, 编号方式依照 Kabat EU 索引) 时可能就是这种情况。因此, Fc 区的 C 端赖氨酸 (Lys447), 或 C 端甘氨酸 (Gly446) 和赖氨酸 (K447) 可以存在或不存在。如果没有另外指明的话, 包括 Fc 域 (或本文中定义的 Fc 域的亚基) 的重链的氨基酸序列在本文中表示无 C 端甘氨酸-赖氨酸二肽的。在本发明的一个实施方案中, 依照本发明的 T 细胞活化性双特异性抗原结合分子中包含的包括本文中规定的 Fc 域的一个亚基的重链包含另外的 C 端甘氨酸-赖氨酸二肽 (G446 和 K447, 编号方式依照 Kabat 的 EU 索引)。在本发明的一个实施方案中, 依照本发明的 T 细胞活化性双特异性抗原结合分子中包含的包括本文中规定的 Fc 域的一个亚基的重链包含另外的 C 端甘氨酸残基 (G446, 编号方式依照 Kabat 的 EU 索引)。本发明的组合物, 诸如本文所述药物组合物, 包含本发明的 T 细胞活化性双特异性抗原结合分子的群体。T 细胞活化性双特异性抗原结合分子的群体可包含具有全长重链的分子和具有切割变体重链的分子。T 细胞活化性双特异性抗原结合分子的群体可以由具有全长重链的分子和具有切割变体重链的分子的混合物组成, 其中至少 50%,

至少60%，至少70%，至少80%或至少90%的T细胞活化性双特异性抗原结合分子具有切割变体重链。在本发明的一个实施方案中，包含本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的群体的组合物包含如下的T细胞活化性双特异性抗原结合分子，其包含包括本文中规定的Fc域的一个亚基及另外的C端甘氨酸-赖氨酸二肽(G446和K447，编号方式依照Kabat的EU索引)的重链。在本发明的一个实施方案中，包含本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的群体的组合物包含如下的T细胞活化性双特异性抗原结合分子，其包含包括本文中规定的Fc域的一个亚基及另外的C端甘氨酸残基(G446，编号方式依照Kabat的EU索引)的重链。在本发明的一个实施方案中，此类组合物包含由如下分子构成的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的群体：包含包括本文中规定的Fc域的一个亚基的重链的分子；包含包括本文中规定的Fc域的一个亚基及另外的C端甘氨酸残基(G446，编号方式依照Kabat的EU索引)的重链的分子，和包含包括本文中规定的Fc域的一个亚基及另外的C端甘氨酸-赖氨酸二肽(G446和K447，编号方式依照Kabat的EU索引)的重链的分子。除非本文中另外指定，Fc区或恒定区中氨基酸残基的编号方式依照EU编号系统，也称作EU索引，如记载于Kabat等，Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991(也参见上文)。如本文中使用的，Fc域的“亚基”指形成二聚体Fc域的两个多肽之一，即包含免疫球蛋白重链中能够稳定自身联合的C端恒定区的多肽。例如，IgG Fc域的亚基包含IgG CH2和IgG CH3恒定域。

[0210] “促进Fc域的第一亚基和第二亚基联合的修饰”是降低或防止包含Fc域亚基的多肽与相同多肽联合以形成同二聚体的肽主链操作或Fc域亚基的翻译后修饰。如本文中使用的，具体地，促进联合的修饰包括对期望联合的两个Fc域亚基(即Fc域的第一亚基和第二亚基)中的每一个进行的分开的修饰，其中所述修饰彼此互补，从而促进两个Fc域亚基的联合。例如，促进联合的修饰可以改变一种或两种Fc域亚基的结构或电荷，从而在立体或静电上分别促进它们的联合。如此，(异)二聚化在包含第一Fc域亚基的多肽和包含第二Fc域亚基的多肽之间发生，其在融合至每个亚基的别的组分(例如抗原结合模块)不同这一意义上讲可能是不相同的。在一些实施方案中，促进联合的修饰包含在Fc域中的氨基酸突变，具体为氨基酸替代。在一个具体的实施方案中，促进联合的修饰包含Fc域的两个亚基的每一个中分开的氨基酸突变，具体为氨基酸替代。

[0211] 术语“效应器功能”指那些可归于抗体Fc区且随抗体同种型而变化的生物学活性。抗体效应器功能的例子包括：C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC)，Fc受体结合，抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)，抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)，细胞因子分泌，免疫复合物介导的抗原呈递细胞的抗原摄取，细胞表面受体(例如B细胞受体)下调和B细胞活化。

[0212] 如本文中使用的，术语“工程化”视为包括对肽主链的任何操作或对天然存在或重组的多肽或其片段的翻译后修饰。工程化包括对氨基酸序列，糖基化模式或各氨基酸侧链基团的修饰，以及这些办法的组合。

[0213] 如本文中使用的，术语“氨基酸突变”意为涵盖氨基酸替代，缺失，插入和修饰。可以进行替代，缺失，插入和修饰的任意组合来实现最终构建体，只要最终构建体拥有期望的特性，例如降低的对Fc受体的结合，或与另一种肽的增加的联合。氨基酸序列缺失和插入包括氨基和/或羧基端缺失和氨基酸插入。具体的氨基酸突变是氨基酸替代。为了改变例如Fc区的结合特征，特别优选非保守性的氨基酸替代，即将一个氨基酸用具有不同结构和/或化

学特性的另一种氨基酸替换。氨基酸替代包括由非天然存在的氨基酸或由20种标准氨基酸的天然存在的氨基酸衍生物(例如4-羟脯氨酸,3-甲基组氨酸,鸟氨酸,高丝氨酸,5-羟赖氨酸)替换。可以使用本领域中公知的遗传或化学方法生成氨基酸突变。遗传方法可以包括定点诱变,PCR,基因合成等。通过与遗传工程化不同的方法如化学修饰来改变氨基酸侧链基团的方法也可能可用。本文中可使用各种名称来指示同一氨基酸突变。例如,从Fc域第329位脯氨酸到甘氨酸的替代可指示为329G, G329, G₃₂₉, P329G或Pro329Gly。

[0214] 如本文中使用的,术语“多肽”指由通过酰胺键(也称作肽键)线性连接的单体(氨基酸)构成的分子。术语“多肽”指具有两个或更多个氨基酸的任何链,并且不指特定长度的产物。如此,肽,二肽,三肽,寡肽,“蛋白质”,“氨基酸链”或任何其它用于指具有两个或更多个氨基酸的链的术语均包括在“多肽”的定义中,而且术语“多肽”可以代替这些术语中任何一个或与其交换使用。术语“多肽”还意图指多肽的表达后修饰的产物,包括但不限于糖基化,乙酰化,磷酸化,酰化,通过已知的保护性/封闭性基团衍生化,蛋白水解切割,或通过非天然存在的氨基酸的修饰。多肽可以自天然的生物学来源衍生或通过重组技术生成,但不必从指定的核酸序列翻译。它可以以任何方式来生成,包括通过化学合成。本发明的多肽大小可以是约3个或更多,5个或更多,10个或更多,20个或更多,25个或更多,50个或更多,75个或更多,100个或更多,200个或更多,500个或更多,1,000个或更多,或2,000个或更多的氨基酸。多肽可以具有限定的三维结构,尽管它们不必具有此类结构。具有限定的三维结构的多肽被称作折叠的,而不具有限定的三维结构而可以采用大量不同构象的多肽被称作未折叠的。

[0215] “分离的”多肽或其变体或衍生物意图为不处于其天然环境中的多肽。不需要特定水平的纯化。例如,分离的多肽可以是从其天然或自然环境中取出。就本发明的目的而言,在宿主细胞中表达的重组生成的多肽和蛋白质被视为分离的,已通过任何合适的技术分开,分级,或部分或基本上纯化的天然的或重组的多肽也是如此。

[0216] 关于参照多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为在比对序列并在必要时引入缺口以获取最大百分比序列同一性后,且不将任何保守性替代视为序列同一性的一部分时,候选序列中与参照多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。为测定百分比氨基酸序列同一性目的比对可以以本领域技术范围内的多种方式进行,例如使用公众可得到的计算机软件,如BLAST, BLAST-2, ALIGN或Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可决定用于比对序列的适宜参数,包括在比较序列的全长里获得最大比对需要的任何算法。然而,就本文中目的而言,使用序列比较计算机程序ALIGN-2来生成%氨基酸序列同一性值。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech, Inc. 创作,并且源代码已与用户文档一起提交到美国版权局(U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559, 其在美国版权注册No. TXU510087下注册。ALIGN-2程序可从Genentech, Inc., South San Francisco, California公开获得,或可从源代码汇编。ALIGN-2程序应当汇编用于UNIX操作系统,包括数字UNIX V4.0D。所有序列比较参数均由ALIGN-2程序设定且不改变。在采用ALIGN-2进行氨基酸序列比较的情况下,给定的氨基酸序列A对,与,或相对给定的氨基酸序列B的%氨基酸序列同一性(或其可以用短语表示为对,与,或相对给定的氨基酸序列B具有或包含特定%氨基酸序列同一性的给定氨基酸序列A)如下计算:

[0217] 分数X/Y的100倍

[0218] 其中X是由序列比对程序ALIGN-2在所述程序对A和B的比对中评分为相同匹配的氨基酸残基数,而其中Y是B中氨基酸残基的总数。会领会的是,当氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度时,A对B的%氨基酸序列同一性将不等于B对A的%氨基酸序列同一性。除非另外明确说明,本文中使用的所有%氨基酸序列同一性值如在上一段中描述的那样使用ALIGN-2计算机程序获得。

[0219] 术语“多核苷酸”指分离的核酸分子或构建体,例如信使RNA (mRNA),病毒衍生的RNA或质粒DNA (pDNA)。多核苷酸可以包含常规的磷酸二酯键或非常规的键(例如酰胺键,如在肽核酸(PNA)中发现的)。术语“核酸分子”指任何一种或多种存在于多核苷酸中的核酸区段,例如DNA或RNA片段。

[0220] “分离的”核酸分子或多核苷酸意指已从其天然环境取出的核酸分子, DNA或RNA。例如,就本发明的目的而言,包含在载体中的编码多肽的重组多核苷酸被视为分离的。分离的多核苷酸的别的例子包括在异源宿主细胞中保持的重组多核苷酸或溶液中的(部分或基本上)纯化的多核苷酸。分离的多核苷酸包括在普遍含有该多核苷酸分子的细胞中含有的多核苷酸分子,但该多核苷酸分子存在于染色体外或在不同于其天然染色体位置的染色体位置处。分离的RNA分子包括本发明的体内或体外RNA转录本,以及正链和负链形式,和双链形式。依照本发明的分离的多核苷酸或核酸还包括合成生成的此类分子。另外,多核苷酸或核酸可以为或可以包括调节元件如启动子,核糖体结合位点或转录终止子。

[0221] 与本发明的参照核苷酸序列具有至少例如95%“相同的”核苷酸序列的核酸或多核苷酸意指该多核苷酸的核苷酸序列与参照序列相同,只不过按照参照核苷酸序列的每100个核苷酸,该多核苷酸序列可以包含多达5处点突变。换言之,为了获得与参照核苷酸序列具有至少95%相同的核苷酸序列的多核苷酸,可以删除或用另一种核苷酸替代参照序列中高达5%的核苷酸,或者可以将参照序列中占总核苷酸的高达5%的数目的核苷酸插入到参照序列中。参照序列的这些变更可以发生在参照核苷酸序列的5' 或3' 端位置或那些末端位置之间的任何地方,个别分散在参照序列中的残基中或分散在参照序列内的一或多个连续组中。作为一个实际问题,可以使用已知的计算机程序,如上文针对多肽论述的程序(例如ALIGN-2)来常规确定任何特定的多核苷酸序列是否与本发明的核苷酸序列为至少80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%或99%相同。

[0222] 术语“表达盒”指重组或合成生成的,具有一系列允许特定核酸在靶细胞中转录的指定核酸元件的多核苷酸。可以将重组表达盒掺入质粒,染色体,线粒体DNA,质体DNA,病毒或核酸片段中。通常,表达载体的重组表达盒部分包含要转录的核酸序列和启动子等。在某些实施方案中,本发明的表达盒包含编码本发明的双特异性抗原结合分子或其片段的多核苷酸序列。

[0223] 术语“载体”或“表达载体”与“表达构建体”同义,并指用于在靶细胞中导入与其可操作联合的特定基因及指导其表达的DNA分子。该术语包括作为自主复制核酸结构的载体以及掺入到已经接受其导入的宿主细胞的基因组中的载体。本发明的表达载体包含表达盒。表达载体允许转录大量稳定的 mRNA。一旦表达载体在靶细胞内,就通过细胞转录和/或翻译装置生成基因编码的核糖核酸分子或蛋白质。在一个实施方案中,本发明的表达载体包含表达盒,其包含编码本发明的双特异性抗原结合分子或其片段的多核苷酸序列。

[0224] 术语“宿主细胞”,“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可交换使用并指已引入外源

核酸的细胞,包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“经转化的细胞”,其包括初始转化的细胞和自其衍生的后代(不考虑传代数)。后代在核酸内含物上可能与亲本细胞不完全相同,但可以含有突变。本文中包括具有如原始转化细胞中筛选或选择的相同的功能或生物学活性的突变体后代。宿主细胞是能用于生成本发明的双特异性抗原结合分子的任何类型的细胞系统。宿主细胞包括培养的细胞,例如哺乳动物培养细胞如 CHO细胞, BHK细胞, NS0细胞, SP2/0细胞, Y0骨髓瘤细胞, P3X63小鼠骨髓瘤细胞, PER细胞, PER.C6细胞或杂交瘤细胞, 酵母细胞, 昆虫细胞和植物细胞等,而且还包括在转基因动物, 转基因植物或培养的植物或动物组织中包含的细胞。

[0225] “激活Fc受体”是一种在抗体的Fc域衔接后,引发刺激携带该受体的细胞实施效应器功能的信号传导事件的Fc受体。人激活Fc受体包括Fc γ RIIIIa (CD16a), Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIa (CD32) 和Fc α RI (CD89)。

[0226] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 是一种导致通过免疫效应器细胞对抗体包被的靶细胞裂解的免疫机制。靶细胞是包含Fc区的抗体或其衍生物一般经由Fc区的N端的蛋白质部分特异性结合的细胞。如本文中使用的,术语“降低的ADCC”定义为通过上文定义的ADCC机制,以靶细胞周围介质中给定浓度的抗体,在给定的时间内裂解的靶细胞数目的降低,和/或通过ADCC机制,实现给定时间内给定数目的靶细胞裂解需要的靶细胞周围介质中抗体浓度的增加。ADCC的降低相对于使用相同的标准生产,纯化,配制和贮存方法(其是本领域技术人员已知的),由同一类型的宿主细胞生成但尚未工程化改造的相同抗体介导的ADCC。例如,由在其Fc域包含降低 ADCC的氨基酸替代的抗体所介导的ADCC中的降低,是相对于由在Fc域中无此氨基酸替代的相同抗体介导的ADCC而言。测量ADCC的合适测定法是本领域中公知的(参见例如PCT公开文本no.WO 2006/082515或PCT公开文本 no.WO 2012/130831)。

[0227] 药剂的“有效量”指引起接受其施用的细胞或组织中的生理学变化必需的量。

[0228] 药剂例如药物组合物的“治疗有效量”指有效实现期望的治疗或预防结果的量(以必要的剂量且持续必要的时间)。治疗有效量的药剂例如消除,降低,延迟,最小化或预防疾病的不良作用。

[0229] “个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯养的动物(例如牛,绵羊,猫,犬和马),灵长类(例如人和非人灵长类如猴),家兔和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)。优选地,所述个体或受试者是人。

[0230] 术语“药物组合物”指其形式使得容许其中含有的活性成分的生物学活性有效,且不含对会接受配制剂施用的受试者有不可接受的毒性的别的成分的制剂。

[0231] “药学可接受载体”指药物组合物中活性成分以外对受试者无毒的成分。药学可接受载体包括但不限于缓冲剂,赋形剂,稳定剂或防腐剂。

[0232] 如本文中使用的,“治疗/处理”(及其语法变体)指试图改变治疗个体中疾病的自然进程,并且可以是为了预防或在临床病理学的过程期间实施的临床干预。治疗的期望效果包括但不限于预防疾病的发生或复发,缓解症状,降低疾病的任何直接或间接病理学后果,预防转移,减缓疾病进展率,改善或减轻疾病状态,及消退或改善的预后。在一些实施方案中,本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子用于延迟疾病的形成或延缓疾病的进展。

[0233] 术语“包装插页”用于指治疗产品的商业化包装中通常含有的说明书,其含有关于适应症,使用,剂量,施用,组合法,禁忌症的信息和/或关于使用此类治疗产品的警告。

[0234] 实施方案的详细描述

[0235] 本发明提供一种T细胞活化性双特异性抗原结合分子,其具有对于治疗性应用有利的特性,特别是就功效和安全性以及生产力而言(例如就纯度,产量,稳定性而言)。

[0236] 发明人发现包含具有抗CD19抗体8B8(WO 2011/147834)的结合特异性的抗原结合模块的T细胞活化性双特异性抗原结合分子在介导T细胞杀伤表达CD19的细胞中提供较高的效力。此外,发现包含特定人源化型式的抗体 8B8的T细胞活化性双特异性抗原结合分子展现较高的效力和较好的生产力。电荷修饰

[0237] 本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子可以在其中包含的Fab分子中包含如下的氨基酸替代,其特别有效地减少轻链与非匹配重链的错配(Bence-Jones型副产物),在它们的一个(或多个,在分子包含超过两个抗原结合Fab分子的情况中)结合臂具有VH/VL交换的基于Fab的双/多特异性抗原结合分子的生产中可发生所述错配(还可参见PCT申请No. PCT/EP2015/057165,特别是其中的实施例,通过援引完整收入本文)。

[0238] 因而,在具体的实施方案中,本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含

[0239] (a) 特异性结合第一抗原的第一Fab分子,

[0240] (b) 特异性结合第二抗原的第二Fab分子,且其中Fab轻链和Fab重链的可变域 VL和VH是彼此替换的,

[0241] 其中第一抗原是活化性T细胞抗原且第二抗原是CD19,或第一抗原是CD19 且第二抗原是活化性T细胞抗原;且

[0242] 其中

[0243] i) 在a)下的第一Fab分子的恒定域CL中位置124处的氨基酸用带正电荷的氨基酸替代(编号方式依照Kabat),且其中在a)下的第一Fab分子的恒定域CH1 中位置147处的氨基酸或位置213处的氨基酸用带负电荷的氨基酸替代(编号方式依照Kabat EU索引);或

[0244] ii) 在b)下的第二Fab分子的恒定域CL中位置124处的氨基酸用带正电荷的氨基酸替代(编号方式依照Kabat),且其中在b)下的第二Fab分子的恒定域CH1 中位置147处的氨基酸或位置213处的氨基酸用带负电荷的氨基酸替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0245] T细胞活化性双特异性抗原结合分子没有同时包含i)和ii)下提到的修饰。第二Fab分子的恒定域CL和CH1没有彼此替换(即保持不交换)。

[0246] 在依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的一个实施方案中,在a)下的第一Fab分子的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat)(在一个优选的实施方案中,用赖氨酸(K)或精氨酸(R)独立替代),且在a)下的第一Fab分子的恒定域CH1中位置147处的氨基酸或位置213处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0247] 在又一个实施方案中,在a)下的第一Fab分子的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat),且在a)下的第一Fab分子的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0248] 在一个具体的实施方案中,在a)下的第一Fab分子的恒定域CL中位置 124处的氨

氨酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat)(在一个优选的实施方案中,用赖氨酸(K)或精氨酸(R)独立替代)且位置123处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat)(在一个优选的实施方案中,用赖氨酸(K)或精氨酸(R)独立替代),且在a)下的第一Fab分子的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0249] 在一个更加具体的实施方案中,在a)下的第一Fab分子的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K)替代(编号方式依照Kabat)且位置123处的氨基酸用赖氨酸(K)或精氨酸(R)替代(编号方式依照Kabat),且在a)下的第一Fab分子的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0250] 在一个甚至更加具体的实施方案中,在a)下的第一Fab分子的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K)替代(编号方式依照Kabat)且位置123处的氨基酸用精氨酸(R)替代(编号方式依照Kabat),且在a)下的第一Fab分子的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0251] 在具体的实施方案中,a)下的第一Fab分子的恒定域CL是卡帕同种型的。

[0252] 或者,依照上文实施方案的氨基酸替代可以在b)下的第二Fab分子的恒定域CL和恒定域CH1中进行,代替在a)下的第一Fab分子的恒定域CL和恒定域CH1中进行。在特定的此类实施方案中,b)下的第二Fab分子的恒定域CL是卡帕同种型的。

[0253] 依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子可以进一步包含特异性结合所述第一抗原的第三Fab分子。在具体的实施方案中,所述第三Fab分子与a)下的第一Fab分子相同。在这些实施方案中,依照上文实施方案的氨基酸替代会在第一Fab分子和第三Fab分子每一个的恒定域CL和恒定域CH1中进行。或者,依照上文实施方案的氨基酸替代可以在b)下的第二Fab分子的恒定域CL和恒定域CH1中进行,但是不在第一Fab分子和第三Fab分子的恒定域CL和恒定域CH1中进行。

[0254] 在具体的实施方案中,依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含由能够稳定联合的第一亚基和第二亚基构成的Fc域。

[0255] T细胞活化性双特异性抗原结合分子型式

[0256] T细胞活化性双特异性抗原结合分子各组份可以以多种构造彼此融合。例示性的构造绘于图1中。

[0257] 在具体的实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子中包含的抗原结合模块是Fab分子。在此类实施方案中,第一,第二,第三等抗原结合模块在本文中分别可以称作第一,第二,第三等Fab分子。而且,在具体的实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含由能够稳定联合的第一亚基和第二亚基构成的Fc域。

[0258] 在一些实施方案中,第二Fab分子在Fab重链的C端融合至Fc域的第一或第二亚基的N端。

[0259] 在一个此类实施方案中,第一Fab分子在Fab重链的C端融合至第二Fab分子的Fab重链的N端。在一个特定的此类实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子基本由

以下组成：第一和第二Fab分子，由第一亚基和第二亚基构成的Fc域，和任选的一个或多个肽接头，其中第一Fab分子在 Fab重链的C端融合至第二Fab分子的Fab重链的N端，且第二Fab分子在Fab重链的C端融合至Fc域的第一或第二亚基的N端。此类构造示意性描绘于图1G和1K。任选地，第一Fab分子的Fab轻链和第二Fab分子的Fab轻链可以另外彼此融合。

[0260] 在另一个此类实施方案中，第一Fab分子在Fab重链的C端融合至Fc域的第一或第二亚基的N端。在一个特定的此类实施方案中，T细胞活化性双特异性抗原结合分子基本由以下组成：第一和第二Fab分子，由第一和第二亚基构成的Fc域和任选地一个或多个肽接头，其中第一和第二Fab分子各自在 Fab重链的C端融合至Fc域的亚基之一的N端。此类构造示意性描绘于图1A 和1D。第一和第二Fab分子可以直接或经由肽接头融合至Fc域。在一个具体的实施方案中，第一和第二Fab分子各自经由免疫球蛋白铰链区融合至Fc 域。在一个具体的实施方案中，所述免疫球蛋白铰链区是人IgG₁铰链区，特别是在Fc域是IgG₁ Fc域的情况下。

[0261] 在其它实施方案中，第一Fab分子在Fab重链的C端融合至Fc域的第一或第二亚基的N端。

[0262] 在一个此类实施方案中，第二Fab分子在Fab重链的C端融合至第一Fab分子的Fab重链的N端。在一个具体的此类实施方案中，T细胞活化性双特异性抗原结合分子基本由以下组成：第一和第二Fab分子，由第一和第二亚基构成的Fc域和任选地一个或多个肽接头，其中第二Fab分子在Fab重链的C端融合至第一Fab分子的Fab重链的N端，且第一Fab分子在Fab重链的C端融合至Fc域的第一或第二亚基的N端。此类构造示意性描绘于图1H和1L。任选地，第一Fab分子的Fab轻链和第二Fab分子的Fab轻链可以另外彼此融合。

[0263] Fab分子可以直接或经由肽接头融合至Fc域或彼此融合，所述肽接头包含一个或多个氨基酸，通常约2-20个氨基酸。肽接头是本领域中已知且本文中记载的。合适的，非免疫原性的肽接头包括例如(G₄S)_n，(SG₄)_n，(G₄S)_n或G₄(SG₄)_n肽接头。“n”一般是1至10，通常是2至4的整数。在一个实施方案中，所述肽接头具有至少5个氨基酸的长度，在一个实施方案中5至100个氨基酸的长度，在又一个实施方案中10至50个氨基酸的长度。在一个实施方案中，所述肽接头是(GxS)_n或(GxS)_nG_m，其中G=甘氨酸，S=丝氨酸，且(x=3，n=3，4，5或6，和m=0，1，2或3)或(x=4，n=2，3，4或5和m=0，1，2或3)，在一个实施方案中，x=4和n=2或3，在又一个实施方案中，x=4和n=2。在一个实施方案中，所述肽接头是(G₄S)₂。一种特别适合于将第一和第二Fab分子的Fab轻链彼此融合的肽接头是(G₄S)₂。一种适合于连接第一和第二Fab片段的Fab重链的例示性肽接头包含序列(D)-(G₄S)₂(SEQ ID NO 11和12)。另一种合适的此类接头包含序列(G₄S)₄。另外，接头可包含免疫球蛋白铰链区(的一部分)。特别地，当Fab分子融合至Fc域亚基的N端时，其可以在有或无另外的肽接头的情况下经由免疫球蛋白铰链区或其部分融合。

[0264] 具有单个能够特异性结合靶细胞抗原的抗原结合模块(诸如Fab分子)的T细胞活化性双特异性抗原结合分子(例如如图1A，D，G，H，K，L中显示的)是有用的，特别是在高亲和力抗原结合模块结合后预期靶细胞抗原内在化的情况中。在此类情况中，存在超过一个特异于靶细胞抗原的抗原结合模块可能增强靶细胞抗原的内在化，由此降低其利用度。

[0265] 然而，在许多其它情况中，会有利的是具有包含两个或更多个特异于靶细胞抗原的抗原结合模块(诸如Fab分子)的T细胞活化性双特异性抗原结合分子(见图1B，1C，1E，1F，

1I, 1J, 1M或1N中所示例子), 从而例如优化对靶部位的靶向或允许靶细胞抗原的交联。

[0266] 因而, 在特定的实施方案中, 本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含特异性结合第一抗原的第三Fab分子。第一抗原优选是靶细胞抗原, 即CD19。在一个实施方案中, 第三Fab分子是常规Fab分子。在一个实施方案中, 第三Fab分子与第一Fab分子相同(即第一和第三Fab分子包含相同的重和轻链氨基酸序列且具有相同的域布局(即常规或交换))。在一个特定的实施方案中, 第二Fab分子特异性结合活化性T细胞抗原, 特别是CD3, 且第一和第三Fab分子特异性结合CD19。

[0267] 在备选实施方案中, 本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含特异性结合第二抗原的第三Fab分子。在这些实施方案中, 第二抗原优选是靶细胞抗原, 即CD19。在一个此类实施方案中, 第三Fab分子是交换Fab分子(其中Fab重和轻链的可变域VH和VL或恒定域CL和CH1彼此交换/替换的Fab分子)。在一个此类实施方案中, 第三Fab分子与第二Fab分子相同(即第二和第三Fab分子包含相同的重和轻链氨基酸序列且具有相同的域布局(即常规或交换))。在一个此类实施方案中, 第一Fab分子特异性结合活化性T细胞抗原, 特别是CD3, 且第二和第三Fab分子特异性结合CD19。

[0268] 在一个实施方案中, 第三Fab分子在Fab重链的C端融合至Fc域的第一或第二亚基的N端。

[0269] 在一个具体的实施方案中, 第二和第三Fab分子各自在Fab重链的C端融合至Fc域的亚基之一的N端, 且第一Fab分子在Fab重链的C端融合至第二Fab分子的Fab重链的N端。在一个具体的此类实施方案中, T细胞活化性双特异性抗原结合分子基本上由以下组成: 第一, 第二和第三Fab分子, 由第一亚基和第二亚基构成的Fc域, 和任选的一个或多个肽接头, 其中第一Fab分子在Fab重链的C端融合至第二Fab分子的Fab重链的N端, 且第二Fab分子在Fab重链的C端融合至Fc域的第一亚基的N端, 且其中第三Fab分子在Fab重链的C端融合至Fc域的第二亚基的N端。此类构造示意性描绘于图1B和1E(特定的实施方案, 其中第三Fab分子是常规Fab分子且优选与第一Fab分子相同), 和图1I和1M(备选的实施方案, 其中第三Fab分子是交换Fab分子且优选与第二Fab分子相同)。第二和第三Fab分子可以直接或经由肽接头融合至Fc域。在一个具体的实施方案中, 第二和第三Fab分子各自经由免疫球蛋白铰链区融合至Fc域。在一个特定的实施方案中, 免疫球蛋白铰链区是人IgG₁铰链区, 特别是Fc域是人IgG₁Fc域的情况。任选地, 第一Fab分子的Fab轻链和第二Fab分子的Fab轻链可以另外彼此融合。

[0270] 在另一个实施方案中, 第一和第三Fab分子各自在Fab重链的C端融合至Fc域的亚基之一的N端, 且第二Fab分子在Fab重链的C端融合至第一Fab分子的Fab重链的N端。在一个具体的此类实施方案中, T细胞活化性双特异性抗原结合分子基本上由以下组成: 第一, 第二和第三Fab分子, 由第一亚基和第二亚基构成的Fc域, 和任选的一个或多个肽接头, 其中第二Fab分子在Fab重链的C端融合至第一Fab分子的Fab重链的N端, 且第一Fab分子在Fab重链的C端融合至Fc域的第一亚基的N端, 且其中第三Fab分子在Fab重链的C端融合至Fc域的第二亚基的N端。此类构造示意性描绘于图1C和1F(特定的实施方案, 其中第三Fab分子是常规Fab分子且优选与第一Fab分子相同)和图1J和1N(备选的实施方案, 其中第三Fab分子是交换Fab分子且优选与第二Fab分子相同)。第一和第三Fab分子可以直接或经由肽接头融合至Fc域。在一个特定的实施方案中, 第一和第三Fab分子各自经由免疫球蛋白铰链区融合

至Fc 域。在一个具体的实施方案中,免疫球蛋白铰链区是人IgG₁铰链区,特别是 Fc域是IgG₁ Fc域的情况。任选地,第一Fab分子的Fab轻链和第二Fab分子的 Fab轻链可以另外彼此融合。

[0271] 在其中一个Fab分子在Fab重链的C端经由免疫球蛋白铰链区融合至Fc域的每个亚基的N端的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的构造中,所述两个Fab分子,所述铰链区和所述Fc域基本上形成免疫球蛋白分子。在一个具体的实施方案中,免疫球蛋白分子是IgG类免疫球蛋白。在一个甚至更具体的实施方案中,免疫球蛋白是IgG₁亚类免疫球蛋白。在另一个实施方案中,免疫球蛋白是IgG₄亚类免疫球蛋白。在又一个具体的实施方案中,免疫球蛋白是人免疫球蛋白。在其它实施方案中,免疫球蛋白是嵌合免疫球蛋白或人源化免疫球蛋白。

[0272] 在本发明的一些T细胞活化性双特异性抗原结合分子中,第一Fab分子的Fab轻链和第二Fab分子的Fab轻链彼此融合,任选地经由肽接头。根据第一和第二Fab分子的构造,第一Fab分子的Fab轻链可在其C端融合至第二Fab 分子的Fab轻链的N端,或者第二Fab分子的Fab轻链可在其C端融合至第一 Fab分子的Fab轻链的N端。第一和第二Fab分子的Fab轻链的融合进一步降低不匹配的Fab重链和轻链的错配,并且还降低表达本发明的一些T细胞活化性双特异性抗原结合分子需要的质粒数。

[0273] 在某些实施方案中,依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含其中的第二Fab分子的Fab轻链可变区与第二Fab分子的Fab重链恒定区共享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含交换Fab重链,其中重链可变区用轻链可变区替换),第二Fab分子的Fab重链恒定区继而与Fc域亚基共享羧基末端肽键的多肽(VL₍₂₎-CH1₍₂₎-CH2-CH3(-CH4)),和其中的第一Fab分子的Fab 重链与Fc域亚基共享羧基末端肽键的多肽(VH₍₁₎-CH1₍₁₎-CH2-CH3(-CH4))。在一些实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含其中的第二Fab分子的Fab重链可变区与第二Fab分子的Fab轻链恒定区共享羧基末端肽键的多肽(VH₍₂₎-CL₍₂₎)和第一Fab分子的Fab轻链多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)。在某些实施方案中,所述多肽共价连接,例如通过二硫键。

[0274] 在某些实施方案中,依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含其中的第二Fab分子的Fab重链可变区与第二Fab分子的Fab轻链恒定区共享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含交换Fab重链,其中重链恒定区用轻链恒定区替换),第二Fab分子的Fab轻链恒定区继而与Fc域亚基共享羧基末端肽键的多肽(VH₍₂₎-CL₍₂₎-CH2-CH3(-CH4)),和其中的第一Fab分子的Fab重链与Fc域亚基共享羧基末端肽键的多肽(VH₍₁₎-CH1₍₁₎-CH2-CH3(-CH4))。在一些实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含其中的第二Fab分子的Fab轻链可变区与第二Fab分子的Fab重链恒定区共享羧基末端肽键的多肽(VL₍₂₎-CH1₍₂₎)和第一Fab分子的Fab轻链多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)。在某些实施方案中,所述多肽共价连接,例如通过二硫键。

[0275] 在一些实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含其中的第二Fab分子的Fab轻链可变区与第二Fab分子的Fab重链恒定区共享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含交换Fab重链,其中重链可变区用轻链可变区替换),第二Fab分子的Fab重链恒定区继而与第一Fab分子的Fab重链共享羧基末端肽键,第一Fab分子的Fab重链继而与Fc域亚基共享羧基末端肽键的多肽(VL₍₂₎-CH1₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎-CH2-CH3(-CH4))。在其它实施方案中,T细胞

活化性双特异性抗原结合分子包含其中的第一Fab分子的Fab重链与第二Fab分子的Fab轻链可变区共享羧基末端肽键,第二Fab分子的Fab轻链可变区继而与第二Fab分子的Fab重链恒定区共享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含交换 Fab重链,其中重链可变区用轻链可变区替换),第二Fab分子的Fab重链恒定区继而与Fc域亚基共享羧基末端肽键的多肽 (VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VL₍₂₎-CH1₍₂₎-CH2-CH3(-CH4))。

[0276] 在这些中的一些实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含第二Fab分子的交换Fab轻链多肽,其中第二Fab分子的Fab重链可变区与第二Fab分子的Fab轻链恒定区共享羧基末端肽键(VH₍₂₎-CL₍₂₎),和第一Fab 分子的Fab轻链多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)。在这些中的其它实施方案中,在适当时,T 细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含其中的第二Fab分子的Fab重链可变区与第二Fab分子的Fab轻链恒定区共享羧基末端肽键,第二Fab分子的Fab轻链恒定区继而与第一Fab分子的Fab轻链多肽共享羧基末端肽键的多肽 (VH₍₂₎-CL₍₂₎-VL₍₁₎-CL₍₁₎),或其中的第一Fab分子的Fab轻链多肽与第二Fab 分子的Fab重链可变区共享羧基末端肽键,第二Fab分子的Fab重链可变区继而与第二Fab分子的Fab轻链恒定区共享羧基末端肽键的多肽 (VL₍₁₎-CL₍₁₎-VH₍₂₎-CL₍₂₎)。

[0277] 依照这些实施方案的T细胞活化性双特异性抗原结合分子可以进一步包含(i) Fc域亚基多肽(CH2-CH3(-CH4)),或(ii)其中的第三Fab分子的Fab重链与Fc域亚基共享羧基末端肽键的多肽(VH₍₃₎-CH1₍₃₎-CH2-CH3(-CH4))和第三 Fab分子的Fab轻链多肽(VL₍₃₎-CL₍₃₎)。在某些实施方案中,所述多肽共价连接,例如通过二硫键。

[0278] 在某些实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含其中的第二Fab分子的Fab重链可变区与第二Fab分子的Fab轻链恒定区共享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含交换Fab重链,其中重链恒定区用轻链恒定区替换),第二Fab分子的Fab轻链恒定区继而与第一Fab分子的Fab重链共享羧基末端肽键,第一Fab分子的Fab重链继而与Fc域亚基共享羧基末端肽键的多肽 (VH₍₂₎-CL₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎-CH2-CH3(-CH4))。在其它实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含其中的第一Fab分子的Fab重链与第二Fab分子的Fab重链可变区共享羧基末端肽键,第二Fab分子的Fab重链可变区继而与第二Fab分子的Fab轻链恒定区共享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含交换 Fab重链,其中重链恒定区用轻链恒定区替换),第二Fab分子的Fab轻链恒定区继而与Fc域亚基共享羧基末端肽键的多肽 (VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VH₍₂₎-CL₍₂₎-CH2-CH3(-CH4))。

[0279] 在这些中的一些实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含第二Fab分子的交换Fab轻链多肽,其中第二Fab分子的Fab轻链可变区与第二Fab分子的Fab重链恒定区共享羧基末端肽键(VL₍₂₎-CH1₍₂₎),和第一Fab 分子的Fab轻链多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)。在这些中的其它实施方案中,在适当时,T 细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含其中的第二Fab分子的Fab轻链可变区与第二Fab分子的Fab重链恒定区共享羧基末端肽键,第二Fab分子的Fab重链恒定区继而与第一Fab分子的Fab轻链多肽共享羧基末端肽键的多肽 (VL₍₂₎-CH1₍₂₎-VL₍₁₎-CL₍₁₎),或其中的第一Fab分子的Fab轻链多肽与第二Fab 分子的Fab重链可变区共享羧基末端肽键,第二Fab分子的Fab重链可变区继而与第二Fab分子的Fab轻链恒定区共享羧基末端肽键的多肽 (VL₍₁₎-CL₍₁₎-VH₍₂₎-CL₍₂₎)。依照这些实施方案的T细胞活化性双特异性抗原结合分子可以进一步包含(i) Fc域亚基多肽(CH2-CH3(-CH4)),或(ii)其中的第三Fab分子的Fab重链与Fc域亚基共享羧基末端肽键的多肽 (VH₍₃₎-CH1₍₃₎-CH2-

CH3 (-CH4)) 和第三Fab分子的Fab轻链多肽(VL₍₃₎-CL₍₃₎)。在某些实施方案中,所述多肽共价连接,例如通过二硫键。

[0280] 在一些实施方案中,第一Fab分子在Fab重链的C端融合至第二Fab分子的 Fab重链的N端。在某些此类实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子不包含Fc域。在某些实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子基本上由以下组成:第一和第二Fab分子,和任选的一个或多个肽接头,其中第一Fab分子在Fab重链的C端融合至第二Fab分子的Fab重链的N端。此类构造示意性描绘于图10和1S。

[0281] 在其它实施方案中,第二Fab分子在Fab重链的C端融合至第一Fab分子的 Fab重链的N端。在某些此类实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子不包含Fc域。在某些实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子基本上由以下组成:第一和第二Fab分子,和任选的一个或多个肽接头,其中第二Fab分子在Fab重链的C端融合至第一Fab分子的Fab重链的N端。此类构造示意性描绘于图1P和1T。

[0282] 在一些实施方案中,第一Fab分子在Fab重链的C端融合至第二Fab分子的 Fab重链的N端,且T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含第三Fab 分子,其中所述第三Fab分子在Fab重链的C端融合至第一Fab分子的Fab重链的N端。在特定的此类实施方案中,所述第三Fab分子是常规Fab分子。在其它此类实施方案中,所述第三Fab分子是本文所述交换Fab分子,即其中Fab 重和轻链的可变域VH和VL或恒定域CL和CH1彼此交换/替换的Fab分子。在某些此类实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子基本上由以下组成:第一,第二和第三Fab分子,和任选的一个或多个肽接头,其中第一Fab 分子在Fab重链的C端融合至第二Fab分子的Fab重链的N端,且第三Fab分子在Fab重链的C端融合至第一Fab分子的Fab重链的N端。此类构造示意性描绘于图1Q和1U(具体的实施方案,其中第三Fab分子是常规Fab分子且优选与第一Fab分子相同)。

[0283] 在一些实施方案中,第一Fab分子在Fab重链的C端融合至第二Fab分子的 Fab重链的N端,且T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含第三Fab 分子,其中所述第三Fab分子在Fab重链的N端融合至第二Fab分子的Fab重链的C端。在特定的此类实施方案中,所述第三Fab分子是本文所述交换Fab分子,即其中Fab重和轻链的可变域VH和VL或恒定域CH1和CL彼此交换/替换的Fab分子。在其它此类实施方案中,所述第三Fab分子是常规Fab分子。在某些此类实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子基本上由以下组成:第一,第二和第三Fab分子,和任选的一个或多个肽接头,其中第一Fab 分子在Fab重链的C端融合至第二Fab分子的Fab重链的N端,且第三Fab分子在Fab重链的N端融合至第二Fab分子的Fab重链的C端。此类构造示意性描绘于图1W和1Y(具体的实施方案,其中第三Fab分子是交换Fab分子且优选与第二Fab分子相同)。

[0284] 在一些实施方案中,第二Fab分子在Fab重链的C端融合至第一Fab分子的 Fab重链的N端,且T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含第三Fab 分子,其中所述第三Fab分子在Fab重链的N端融合至第一Fab分子的Fab重链的C端。在特定的此类实施方案中,所述第三Fab分子是常规Fab分子。在其它此类实施方案中,所述第三Fab分子是本文所述交换Fab分子,即其中Fab 重和轻链的可变域VH和VL或恒定域CH1和CL彼此交换/替换的Fab分子。在某些此类实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子基本上由以下组成:第一,第二和第三Fab分子,和任选的一个或多个肽接头,其中第二Fab 分子在Fab重链的C端融合

至第一Fab分子的Fab重链的N端,且第三Fab分子在Fab重链的N端融合至第一Fab分子的Fab重链的C端。此类构造示意性描绘于图1R和1V(具体的实施方案,其中第三Fab分子是常规Fab分子且优选与第一Fab分子相同)。

[0285] 在一些实施方案中,第二Fab分子在Fab重链的C端融合至第一Fab分子的 Fab重链的N端,且T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含第三Fab 分子,其中所述第三Fab分子在Fab重链的C端融合至第二Fab分子的Fab重链的N端。在特定的此类实施方案中,所述第三Fab分子是本文所述交换Fab分子,即其中Fab重和轻链的可变域VH和VL或恒定域CH1和CL彼此交换/替换的Fab分子。在其它此类实施方案中,所述第三Fab分子是常规Fab分子。在某些此类实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子基本上由以下组成:第一,第二和第三Fab分子,和任选的一个或多个肽接头,其中第二Fab 分子在Fab重链的C端融合至第一Fab分子的Fab重链的N端,且第三Fab分子在Fab重链的C端融合至第二Fab分子的Fab重链的N端。此类构造示意性描绘于图1X和1Z(具体的实施方案,其中第三Fab分子是交换Fab分子且优选与第一Fab分子相同)。

[0286] 在某些实施方案中,依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含其中的第一Fab分子的Fab重链与第二Fab分子的Fab轻链可变区共享羧基末端肽键,第二Fab分子的Fab轻链可变区继而与第二Fab分子的Fab重链恒定区共享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含交换Fab重链,其中重链可变区用轻链可变区替换)的多肽(VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VL₍₂₎-CH1₍₂₎)。在一些实施方案中,T 细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含其中的第二Fab分子的Fab重链可变区与第二Fab分子的Fab轻链恒定区共享羧基末端肽键的多肽(VH₍₂₎-CL₍₂₎)和第一Fab分子的Fab轻链多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)。

[0287] 在某些实施方案中,依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含其中的第二Fab分子的Fab轻链可变区与第二Fab分子的Fab重链恒定区共享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含交换Fab重链,其中重链可变区用轻链可变区替换),第二Fab分子的Fab重链恒定区继而与第一Fab分子的Fab重链共享羧基末端肽键的多肽(VL₍₂₎-CH1₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎)。在一些实施方案中, T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含其中的第二Fab分子的Fab重链可变区与第二Fab分子的Fab轻链恒定区共享羧基末端肽键的多肽(VH₍₂₎-CL₍₂₎)和第一Fab分子的Fab轻链多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)。

[0288] 在某些实施方案中,依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含其中的第二Fab分子的Fab重链可变区与第二Fab分子的Fab轻链恒定区共享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含交换Fab重链,其中重链恒定区用轻链恒定区替换),第二Fab分子的Fab轻链恒定区继而与第一Fab分子的Fab重链共享羧基末端肽键的多肽(VH₍₂₎-CL₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎)。在一些实施方案中, T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含其中的第二Fab分子的Fab轻链可变区与第二Fab分子的Fab重链恒定区共享羧基末端肽键的多肽(VL₍₂₎-CH1₍₂₎)和第一Fab分子的Fab轻链多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)。

[0289] 在某些实施方案中,依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含其中的第三Fab分子的Fab重链与第一Fab分子的Fab重链共享羧基末端肽键,第一Fab分子的Fab重链继而与第二Fab分子的Fab轻链可变区共享羧基末端肽键,第二Fab分子的Fab轻链可变区继而与第二Fab分子的Fab重链恒定区共享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含交换Fab重链,其中重链可变区用轻链可变区替换)的多肽(VH₍₃₎-CH1₍₃₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VL₍₂₎-CH1₍₂₎)。在

一些实施方案中, T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含其中的第二Fab分子的Fab重链可变区与第二Fab分子的Fab轻链恒定区共享羧基末端肽键的多肽 (VH₍₂₎-CL₍₂₎) 和第一Fab分子的Fab轻链多肽 (VL₍₁₎-CL₍₁₎)。在一些实施方案中, T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含第三Fab分子的Fab轻链多肽 (VL₍₃₎-CL₍₃₎)。

[0290] 在某些实施方案中, 依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含其中的第三Fab分子的Fab重链与第一Fab分子的Fab重链共享羧基末端肽键, 第一Fab分子的Fab重链继而与第二Fab分子的Fab重链可变区共享羧基末端肽键, 第二Fab分子的Fab重链可变区继而与第二Fab分子的Fab轻链恒定区共享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含交换Fab重链, 其中重链恒定区用轻链恒定区替换)的多肽 (VH₍₃₎-CH1₍₃₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VH₍₂₎-CL₍₂₎)。在一些实施方案中, T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含其中的第二Fab分子的Fab轻链可变区与第二Fab分子的Fab重链恒定区共享羧基末端肽键的多肽 (VL₍₂₎-CH1₍₂₎) 和第一Fab分子的Fab轻链多肽 (VL₍₁₎-CL₍₁₎)。在一些实施方案中, T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含第三Fab分子的Fab轻链多肽 (VL₍₃₎-CL₍₃₎)。

[0291] 在某些实施方案中, 依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含其中的第二Fab分子的Fab轻链可变区与第二Fab分子的Fab重链恒定区共享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含交换Fab重链, 其中重链可变区用轻链可变区替换), 第二Fab分子的Fab重链恒定区继而与第一Fab分子的Fab重链共享羧基末端肽键, 第一Fab分子的Fab重链继而与第三Fab分子的Fab重链共享羧基末端肽键的多肽 (VL₍₂₎-CH1₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VH₍₃₎-CH1₍₃₎)。在一些实施方案中, T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含其中的第二Fab分子的Fab重链可变区与第二Fab分子的Fab轻链恒定区共享羧基末端肽键的多肽 (VH₍₂₎-CL₍₂₎) 和第一Fab分子的Fab轻链多肽 (VL₍₁₎-CL₍₁₎)。在一些实施方案中, T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含第三Fab分子的Fab轻链多肽 (VL₍₃₎-CL₍₃₎)。

[0292] 在某些实施方案中, 依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含其中的第二Fab分子的Fab重链可变区与第二Fab分子的Fab轻链恒定区共享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含交换Fab重链, 其中重链恒定区用轻链恒定区替换), 第二Fab分子的Fab轻链恒定区继而与第一Fab分子的Fab重链共享羧基末端肽键, 第一Fab分子的Fab重链继而与第三Fab分子的Fab重链共享羧基末端肽键的多肽 (VH₍₂₎-CL₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VH₍₃₎-CH1₍₃₎)。在一些实施方案中, T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含其中的第二Fab分子的Fab轻链可变区与第二Fab分子的Fab重链恒定区共享羧基末端肽键的多肽 (VL₍₂₎-CH1₍₂₎) 和第一Fab分子的Fab轻链多肽 (VL₍₁₎-CL₍₁₎)。在一些实施方案中, T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含第三Fab分子的Fab轻链多肽 (VL₍₃₎-CL₍₃₎)。

[0293] 在某些实施方案中, 依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含其中的第一Fab分子的Fab重链与第二Fab分子的Fab轻链可变区共享羧基末端肽键, 第二Fab分子的Fab轻链可变区继而与第二Fab分子的Fab重链恒定区共享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含交换Fab重链, 其中重链可变区用轻链可变区替换), 第二Fab分子的Fab重链恒定区继而与第三Fab分子的Fab轻链可变区共享羧基末端肽键, 第三Fab分子的Fab轻链可变区继而与第三Fab分子的Fab重链恒定区共享羧基末端肽键(即第三Fab分子包含交换Fab重链, 其中重链可变区用轻链可变区替换)的多肽 (VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VL₍₂₎-CH1₍₂₎-VL₍₃₎-CH1₍₃₎)。在一些实施方案中, T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含其中的第二Fab分子的

Fab重链可变区与第二Fab分子的Fab轻链恒定区共享羧基末端肽键的多肽(VH₍₂₎-CL₍₂₎)和第一Fab分子的Fab轻链多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)。在一些实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含其中的第三Fab分子的Fab重链可变区与第三Fab分子的Fab轻链恒定区共享羧基末端肽键的多肽(VH₍₃₎-CL₍₃₎)。

[0294] 在某些实施方案中,依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含其中的第一Fab分子的Fab重链与第二Fab分子的Fab重链可变区共享羧基末端肽键,第二Fab分子的Fab重链可变区继而与第二Fab分子的Fab轻链恒定区共享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含交换Fab重链,其中重链恒定区用轻链恒定区替换),第二Fab分子的Fab轻链恒定区继而与第三Fab分子的Fab重链可变区共享羧基末端肽键,第三Fab分子的Fab重链可变区继而与第三Fab分子的Fab轻链恒定区共享羧基末端肽键(即第三Fab分子包含交换Fab重链,其中重链恒定区用轻链恒定区替换)的多肽(VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VH₍₂₎-CL₍₂₎-VH₍₃₎-CL₍₃₎)。在一些实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含其中的第二Fab分子的Fab轻链可变区与第二Fab分子的Fab重链恒定区共享羧基末端肽键的多肽(VL₍₂₎-CH1₍₂₎)和第一Fab分子的Fab轻链多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)。在一些实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含其中的第三Fab分子的Fab轻链可变区与第三Fab分子的Fab重链恒定区共享羧基末端肽键的多肽(VL₍₃₎-CH1₍₃₎)。

[0295] 在某些实施方案中,依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含其中的第三Fab分子的Fab轻链可变区与第三Fab分子的Fab重链恒定区共享羧基末端肽键(即第三Fab分子包含交换Fab重链,其中重链可变区用轻链可变区替换),第三Fab分子的Fab重链恒定区继而与第二Fab分子的Fab轻链可变区共享羧基末端肽键,第二Fab分子的Fab轻链可变区继而与第二Fab分子的Fab重链恒定区共享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含交换Fab重链,其中重链可变区用轻链可变区替换),第二Fab分子的Fab重链恒定区继而与第一Fab分子的Fab重链共享羧基末端肽键的多肽(VL₍₃₎-CH1₍₃₎-VL₍₂₎-CH1₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎)。在一些实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含其中的第二Fab分子的Fab重链可变区与第二Fab分子的Fab轻链恒定区共享羧基末端肽键的多肽(VH₍₂₎-CL₍₂₎)和第一Fab分子的Fab轻链多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)。在一些实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含其中的第三Fab分子的Fab重链可变区与第三Fab分子的Fab轻链恒定区共享羧基末端肽键的多肽(VH₍₃₎-CL₍₃₎)。

[0296] 在某些实施方案中,依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含其中的第三Fab分子的Fab重链可变区与第三Fab分子的Fab轻链恒定区共享羧基末端肽键(即第三Fab分子包含交换Fab重链,其中重链恒定区用轻链恒定区替换),第三Fab分子的Fab轻链恒定区继而与第二Fab分子的Fab重链可变区共享羧基末端肽键,第二Fab分子的Fab重链可变区继而与第二Fab分子的Fab轻链恒定区共享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含交换Fab重链,其中重链恒定区用轻链恒定区替换),第二Fab分子的Fab轻链恒定区继而与第一Fab分子的Fab重链共享羧基末端肽键的多肽(VH₍₃₎-CL₍₃₎-VH₍₂₎-CL₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎)。在一些实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含其中的第二Fab分子的Fab轻链可变区与第二Fab分子的Fab重链恒定区共享羧基末端肽键的多肽(VL₍₂₎-CH1₍₂₎)和第一Fab分子的Fab轻链多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)。在一些实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子进一步包含其中的第三Fab分子的Fab轻链可变区与第三Fab分子的Fab重链恒定区

共享羧基末端肽键的多肽(VL₍₃₎-CH1₍₃₎)。

[0297] 依照任何上述实施方案,T细胞活化性双特异性抗原结合分子的各组分(例如Fab分子,Fc域)可直接地或经由本文中描述或本领域已知的各种接头(特别是包含一个或多个氨基酸,通常约2-20个氨基酸的肽接头)融合。合适的,非免疫原性的肽接头包括例如(G₄S)_n, (SG₄)_n, (G₄S)_n或G₄(SG₄)_n肽接头,其中n一般是1至10,通常是2至4的整数。

[0298] Fc域

[0299] T细胞活化性双特异性抗原结合分子的Fc域由一对包含免疫球蛋白分子重链域的多肽链组成。例如,免疫球蛋白G(IgG)分子的Fc域是二聚体,其每个亚基包含CH2和CH3 IgG重链恒定域。Fc域的两个亚基能够彼此稳定联合。在一个实施方案中,本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含不超过一个Fc域。

[0300] 在依照本发明的一个实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子的Fc域是IgG Fc域。在一个具体的实施方案中,Fc域是IgG₁ Fc域。在另一个实施方案中,Fc域是IgG₄ Fc域。在一个更加具体的实施方案中,Fc域是包含位置S228(Kabat编号方式)处的氨基酸替代,特别是氨基酸替代S228P的IgG₄ Fc域。此氨基酸替代降低IgG₄抗体的体内Fab臂交换(参见 Stubenrauch等,Drug Metabolism and Disposition 38,84-91(2010))。在又一个具体的实施方案中,Fc域是人的。人IgG₁ Fc区的一种例示性序列在SEQ ID NO:13中给出。

[0301] 促进异二聚化的Fc域修饰

[0302] 依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含不同的Fab分子,其融合至Fc域的两个亚基之一或另一个,如此Fc域的两个亚基通常包含在两条不相同的多肽链中。这些多肽的重组共表达和随后二聚化导致两种多肽的数种可能组合。为了改进重组生产中T细胞活化性双特异性抗原结合分子的产量和纯度,如此在T细胞活化性双特异性抗原结合分子的Fc域中引入促进期望多肽联合的修饰会是有利的。

[0303] 因而,在具体的实施方案中,依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的Fc域包含促进Fc域的第一和第二亚基联合的修饰。人IgG Fc域的两个亚基之间最广泛的蛋白质-蛋白质相互作用的位点在Fc域的CH3域中。如此,在一个实施方案中,所述修饰在Fc域的CH3域中。

[0304] 有数种办法来修饰Fc域的CH3域以加强异二聚化,它们详细记载于例如 WO 96/27011,WO 98/050431,EP 1870459,WO 2007/110205,WO 2007/147901,WO 2009/089004,WO 2010/129304,WO 2011/90754,WO 2011/143545,WO 2012058768,WO 2013157954,WO 2013096291。典型地,在所有此类办法中,Fc域的第一亚基的CH3域和Fc域的第二亚基的CH3域二者以互补方式进行工程化改造使得每个CH3域(或包含它的重链)不再能与其自身同二聚化但被迫与互补工程化改造的其它CH3域异二聚化(使得第一和第二CH3域异二聚化且两个第一CH3域或两个第二CH3域之间不形成同二聚体)。涵盖这些用于改善重链异二聚化的不同办法作为不同备选,与依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子中的减少轻链错配和Bence Jones 型副产物的重-轻链修饰(一个结合臂中的VH和VL交换/替换及在CH1/CL界面中引入具有相反电荷的带电荷的氨基酸的替代)组合。

[0305] 在一个特定的实施方案中,所述促进Fc域的第一亚基和第二亚基联合的修饰是所谓的“节-入-穴”修饰,其包含在Fc域的两个亚基之一中的“节”修饰和在Fc域的两个亚基之另一中的“穴”修饰。

[0306] 节-入-穴技术记载于例如US 5,731,168;US 7,695,936;Ridgway等,Prot Eng 9, 617-621 (1996)和Carter, J Immunol Meth 248,7-15 (2001)。一般地,该方法牵涉在第一多肽的界面处引入隆起(“节”)并在第二多肽的界面中引入相应的空腔(“穴”),使得隆起可以置于空腔中从而促进异二聚体形成并阻碍同二聚体形成。通过将来自第一多肽界面的小氨基酸侧链用更大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸)替换来构建隆起。在第二多肽的界面中创建具有与隆起相同或相似大小的互补性空腔,其通过将大氨基酸侧链用更小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替换进行。

[0307] 因而,在一个具体的实施方案中,在T细胞活化性双特异性抗原结合分子的Fc域的第一亚基的CH3域中,一个氨基酸残基用具有更大侧链体积的氨基酸残基替换,由此在第一亚基的CH3域内生成隆起,其可安置于第二亚基的CH3域内的空腔中,而且在Fc域的第二亚基的CH3域中,一个氨基酸残基用具有更小侧链体积的氨基酸残基替换,由此在第二亚基的CH3域内生成空腔,其中可安置第一亚基的CH3域内的隆起。

[0308] 优选地,所述具有更大侧链体积的氨基酸残基选自下组:精氨酸(R),苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),和色氨酸(W)。

[0309] 优选地,所述具有更小侧链体积的氨基酸残基选自下组:丙氨酸(A),丝氨酸(S),苏氨酸(T),和缬氨酸(V)。

[0310] 可以通过改变编码多肽的核酸,例如通过位点特异性诱变或通过肽合成来生成隆起和空腔。

[0311] 在一个特定的实施方案中,在Fc域第一亚基的CH3域(“节”亚基)中,第366位的苏氨酸残基用色氨酸残基替换(T366W),而在Fc域第二亚基的CH3域(“穴”亚基)中,第407位的酪氨酸残基用缬氨酸残基替换(Y407V)。在一个实施方案中,在Fc域第二亚基中,另外,第366位的苏氨酸残基用丝氨酸残基替换(T366S)且第368位的亮氨酸残基用丙氨酸残基替换(L368A)(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0312] 在还有又一个实施方案中,在Fc域的第一亚基中,另外,第354位的丝氨酸残基用半胱氨酸残基替换(S354C)或第356位的谷氨酸残基用半胱氨酸残基替换(E356C),而在Fc域的第二亚基中,另外,第349位的酪氨酸残基用半胱氨酸残基替换(Y349C)(编号方式依照Kabat EU索引)。这两个半胱氨酸残基的引入导致在Fc域的两个亚基之间形成二硫桥,进一步稳定了二聚体(Carter, J Immunol Methods 248,7-15 (2001))。

[0313] 在一个具体的实施方案中,Fc域的第一亚基包含氨基酸替代S354C和 T366W,且Fc域的第二亚基包含氨基酸替代Y349C, T366S, L368A和 Y407V(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0314] 在一个具体的实施方案中,将特异性结合活化性T细胞抗原的Fab分子融合(任选地经由特异性结合靶细胞抗原的Fab分子)至Fc域的第一亚基(其包含“节”修饰)。不希望受理论束缚,特异性结合活化性T细胞抗原的Fab分子与Fc域的含节的亚基的融合会(进一步)使包含两个结合活化性T细胞抗原的 Fab分子的抗原结合分子的生成最小化(两条含节的多肽的空间碰撞)。

[0315] 涵盖修饰CH3以增强异二聚化的其它技术作为依照本发明的备选,它们记载于例如WO 96/27011,WO 98/050431,EP 1870459,WO 2007/110205, WO 2007/147901,WO 2009/089004,WO 2010/129304,WO 2011/90754, WO 2011/143545,WO 2012/058768,WO 2013/

157954,WO 2013/096291。

[0316] 在一个实施方案中,备选地使用EP 1870459A1中记载的异二聚化办法。这种办法基于在Fc域的两个亚基之间的CH3/CH3域界面中的特定氨基酸位置引入具有相反电荷的带电氨基酸。本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的一个优选的实施方案是(Fc域的)两个CH3域之一中的氨基酸突变R409D;K370E和Fc域的CH3域之另一中的氨基酸突变D399K;E357K(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0317] 在另一个实施方案中,本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含Fc域的第一亚基的CH3域中的氨基酸突变T366W和Fc域的第二亚基的CH3域中的氨基酸突变T366S,L368A,Y407V,和另外的Fc域的第一亚基的CH3域中的氨基酸突变R409D;K370E和Fc域的第二亚基的CH3域中的氨基酸突变D399K;E357K(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0318] 在另一个实施方案中,本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含Fc域的第一亚基的CH3域中的氨基酸突变S354C,T366W和Fc域的第二亚基的CH3域中的氨基酸突变Y349C,T366S,L368A,Y407V,或所述T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含Fc域的第一亚基的CH3域中的氨基酸突变Y349C,T366W和Fc域的第二亚基的CH3域中的氨基酸突变S354C,T366S,L368A,Y407V和另外的Fc域的第一亚基的CH3域中的氨基酸突变R409D;K370E和Fc域的第二亚基的CH3域中的氨基酸突变D399K;E357K(所有编号方式依照Kabat EU索引)。

[0319] 在一个实施方案中,备选地使用WO 2013/157953中记载的异二聚化办法。在一个实施方案中,第一CH3域包含氨基酸突变T366K且第二CH3域包含氨基酸突变L351D(编号方式依照Kabat EU索引)。在又一个实施方案中,第一CH3域进一步包含氨基酸突变L351K。在又一个实施方案中,第二CH3域进一步包含选自Y349E,Y349D和L368E的氨基酸突变(优选L368E)(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0320] 在一个实施方案中,备选地使用WO 2012/058768中记载的异二聚化办法。在一个实施方案中,第一CH3域包含氨基酸突变L351Y,Y407A且第二CH3域包含氨基酸突变T366A,K409F。在又一个实施方案中,第二CH3域进一步包含位置T411,D399,S400,F405,N390,或K392处的氨基酸突变,例如选自a) T411N,T411R,T411Q,T411K,T411D,T411E或T411W,b) D399R,D399W,D399Y或D399K,c) S400E,S400D,S400R,或S400K,d) F405I,F405M,F405T,F405S,F405V或F405W,e) N390R,N390K或N390D,f) K392V,K392M,K392R,K392L,K392F或K392E(编号方式依照Kabat EU索引)。在又一个实施方案中,第一CH3域包含氨基酸突变L351Y,Y407A且第二CH3域包含氨基酸突变T366V,K409F。在又一个实施方案中,第一CH3域包含氨基酸突变Y407A且第二CH3域包含氨基酸突变T366A,K409F。在又一个实施方案中,第二CH3域进一步包含氨基酸突变K392E,T411E,D399R和S400R(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0321] 在一个实施方案中,备选地使用WO 2011/143545中记载的异二聚化办法,例如进行选自下组的位置处的氨基酸修饰:368和409(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0322] 在一个实施方案中,备选地使用WO2011/090762中记载的异二聚化办法,它也使用上文所述节-入-穴技术。在一个实施方案中,第一CH3域包含氨基酸突变T366W且第二CH3域包含氨基酸突变Y407A。在一个实施方案中,第一CH3域包含氨基酸突变T366Y且第二CH3域包含氨基酸突变Y407T(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0323] 在一个实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子或它的Fc域是IgG₂亚类

的且备选地使用WO 2010/129304记载的异二聚化办法。

[0324] 在一个备选的实施方案中,促进Fc域的第一和第二亚基联合的修饰包含介导静电操纵效应(electrostatic steering effect)的修饰,例如如记载于PCT公开文本No.WO 2009/089004的。一般地,此方法涉及将在两个Fc域亚基界面处的一个或多个氨基酸残基替换为带电荷的氨基酸残基,从而在静电上不利于同二聚体形成而在静电上有利于异二聚化。在一个此类实施方案中,第一 CH3域包含带负电荷的氨基酸(例如谷氨酸(E),或天冬氨酸(D))对K392或 N392的氨基酸替代(优选K392D或N392D)且第二CH3域包含带正电荷的氨基酸(例如赖氨酸(K)或精氨酸(R))对D399,E356,D356,或E357的氨基酸替代(优选D399K,E356K,D356K,或E357K,更优选D399K和E356K)。在又一个实施方案中,第一CH3域进一步包含带负电荷的氨基酸(例如谷氨酸(E),或天冬氨酸(D))对K409或R409的氨基酸替代,优选K409D或R409D。在又一个实施方案中,第一CH3域进一步或二选一地包含带负电荷的氨基酸(例如谷氨酸(E),或天冬氨酸(D))对K439和/或K370的氨基酸替代(所有编号方式依照Kabat EU索引)。

[0325] 在还有又一个实施方案中,备选地使用WO 2007/147901中记载的异二聚化办法。在一个实施方案中,第一CH3域包含氨基酸突变K253E,D282K,和K322D且第二CH3域包含氨基酸突变D239K,E240K,和K292D(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0326] 在仍有另一个实施方案中,可以备选地使用WO 2007/110205中记载的异二聚化办法。

[0327] 在一个实施方案中,Fc域的第一亚基包含氨基酸替代K392D和K409D,且Fc域的第二亚基包含氨基酸替代D356K和D399K(编号方式依照Kabat EU 索引)。

[0328] 降低Fc受体结合和/或效应器功能的Fc域修饰

[0329] Fc域赋予T细胞活化性双特异性抗原结合分子以有利的药动学特性,包括长血清半衰期,其有助于在靶组织中的较好积累和有利的组织-血液分配比。然而,同时它可能导致不想要的T细胞活化性双特异性抗原结合分子对表达Fc受体的细胞而非优选的携带抗原的细胞的靶向。此外,Fc受体信号传导途径的共激活可能导致细胞因子释放,其与抗原结合分子的T细胞活化特性和长半衰期组合,在系统性施用后引起细胞因子受体的过度活化和严重的副作用。(携带Fc受体的)免疫细胞而非T细胞的活化甚至可能降低T细胞活化性双特异性抗原结合分子的功效,原因是例如通过NK细胞对T细胞的潜在破坏。

[0330] 因而,在具体的实施方案中,依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的Fc域展现出与天然IgG₁ Fc域相比降低的对Fc受体的结合亲和力和/或降低的效应器功能。在一个此类实施方案中,Fc域(或包含所述Fc域的 T细胞活化性双特异性抗原结合分子)展现出与天然IgG₁ Fc域(或包含天然 IgG₁ Fc域的T细胞活化性双特异性抗原结合分子)相比少于50%,优选少于 20%,更优选少于10%且最优选少于5%的对Fc受体的结合亲和力,和/或与天然IgG₁ Fc域(或包含天然IgG₁ Fc域的T细胞活化性双特异性抗原结合分子)相比少于50%,优选少于20%,更优选少于10%且最优选少于5%的效应器功能。在一个实施方案中,Fc域(或包含所述Fc域的T细胞活化性双特异性抗原结合分子)没有实质性结合Fc受体和/或诱导效应器功能。在一个具体的实施方案中,所述Fc受体是Fc γ 受体。在一个实施方案中,所述Fc受体是人 Fc受体。在一个实施方案中,所述Fc受体是活化性Fc受体。在一个特定的实施方案中,所述Fc受体是活化性人Fc γ 受体,更具体地是人Fc γ RIIIa, Fc γ RI

或Fc γ RIIa,最具体地是人Fc γ RIIIa。在一个实施方案中,效应器功能是选自下组的一项或多项: CDC, ADCC, ADCP, 和细胞因子分泌。在一个具体的实施方案中,所述效应器功能是ADCC。在一个实施方案中,所述Fc域展现出与天然IgG₁ Fc域相比基本相似的对新生儿Fc受体(FcRn)的结合亲和力。当Fc域(或包含所述Fc域的T细胞活化性双特异性抗原结合分子)展现出超过约70%,特别是超过约80%,更特别是超过约90%的天然IgG₁ Fc域(或包含天然IgG₁ Fc域的T细胞活化性双特异性抗原结合分子)对FcRn的结合亲和力时,实现基本相似的对FcRn的结合。

[0331] 在某些实施方案中,Fc域工程化改造为具有与非工程化Fc域相比降低的对Fc受体的结合亲和力和/或降低的效应器功能。在具体的实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子的Fc域包含一处或多处降低Fc域对Fc受体的结合亲和力和/或效应器功能的氨基酸突变。通常,Fc域的两个亚基的每一个中存在相同的一处或多处氨基酸突变。在一个实施方案中,所述氨基酸突变降低Fc域对Fc受体的结合亲和力。在一个实施方案中,所述氨基酸突变将Fc域对Fc受体的结合亲和力降低至少2倍,至少5倍,或至少10倍。在有超过一处降低Fc域对Fc受体的结合亲和力的氨基酸突变的实施方案中,这些氨基酸突变的组合可以将Fc域对Fc受体的结合亲和力降低至少10倍,至少20倍,或甚至至少50倍。在一个实施方案中,包含工程化Fc域的T细胞活化性双特异性抗原结合分子展现出与包含非工程化Fc域的T细胞活化性双特异性抗原结合分子相比少于20%,特别是少于10%,更特别是少于5%的对Fc受体的结合亲和力。在一个具体的实施方案中,Fc受体是Fc γ 受体。在一些实施方案中,所述Fc受体是人Fc受体。在一些实施方案中,Fc受体是活化性Fc受体。在一个特定的实施方案中,Fc受体是活化性人Fc γ 受体,更特别是人Fc γ RIIIa,Fc γ RI或Fc γ RIIa,最特别是人Fc γ RIIIa。优选地,对这些受体的每一种的结合是降低的。在一些实施方案中,对补体成分的结合亲和力,特别是对C1q的结合亲和力也是降低的。在一个实施方案中,对新生儿Fc受体(FcRn)的结合亲和力没有降低。当Fc域(或包含所述Fc域的T细胞活化性双特异性抗原结合分子)展现出非工程化形式的Fc域(或包含所述非工程化形式的Fc域的T细胞活化性双特异性抗原结合分子)对FcRn的结合亲和力的超过约70%时,实现基本相似的对FcRn的结合,即保留该Fc域对所述受体的结合亲和力。Fc域或包含所述Fc域的本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子可以展现出超过约80%和甚至超过约90%的此类亲和力。在某些实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子的Fc域工程化改造为具有与非工程化Fc域相比降低的效应器功能。所述降低的效应器功能可包括但不限于下列一项或多项:降低的补体依赖性细胞毒性(CDC),降低的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),降低的抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP),降低的细胞因子分泌,降低的免疫复合物介导的抗原呈递细胞的抗原摄取,降低的对NK细胞的结合,降低的对巨噬细胞的结合,降低的对单核细胞的结合,降低的对多形核细胞的结合,降低的诱导凋亡的直接信号传导,降低的靶物结合的抗体的交联,降低的树突细胞成熟,或降低的T细胞引发。在一个实施方案中,所述降低的效应器功能是选自下组的一项或多项:降低的CDC,降低的ADCC,降低的ADCP,和降低的细胞因子分泌。在一个具体的实施方案中,所述降低的效应器功能是降低的ADCC。在一个实施方案中,所述降低的ADCC是小于20%的由非工程化Fc域(或包含非工程化Fc域的T细胞活化性双特异性抗原结合分子)诱导的ADCC。

[0332] 在一个实施方案中,所述降低Fc域对Fc受体的结合亲和力和/或效应器功能的氨

氨基酸突变是氨基酸替代。在一个实施方案中,Fc域包含在选自下组的位置处的氨基酸替代:E233,L234,L235,N297,P331和P329(编号方式依照Kabat EU索引)。在一个更特定的实施方案中,Fc域包含在选自下组的位置处的氨基酸替代:L234,L235和P329(编号方式依照Kabat EU索引)。在一些实施方案中,Fc域包含氨基酸替代L234A和L235A(编号方式依照Kabat EU索引)。在一个此类实施方案中,Fc域是IgG₁ Fc域,特别是人 IgG₁ Fc域。在一个实施方案中,Fc域包含在位置P329处的氨基酸替代。在一个更加特定的实施方案中,氨基酸替代是P329A或P329G,特别是P329G(编号方式依照Kabat EU索引)。在一个实施方案中,Fc域包含在位置P329处的氨基酸替代和又一处在选自以下位置处的氨基酸替代:E233,L234, L235, N297和P331(编号方式依照Kabat EU索引)。在一个更加特定的实施方案中,所述又一处氨基酸替代是E233P,L234A,L235A,L235E, N297A,N297D或P331S。在具体的实施方案中,所述Fc域包含在位置 P329,L234和L235处的氨基酸替代(编号方式依照Kabat EU索引)。在更具体的实施方案中,所述Fc域包含氨基酸突变L234A,L235A和P329G(“P329G LALA”)。在一个此类实施方案中,Fc域是IgG₁ Fc域,特别是人 IgG₁ Fc域。氨基酸替代组合“P329G LALA”几乎完全消除了人IgG₁ Fc域的 Fc γ 受体(以及补体)结合,如记载于PCT公开文本no.WO 2012/130831,其通过提述完整并入本文。WO 2012/130831还描述了制备此类突变体Fc域的方法和用于测定其特性(诸如Fc受体结合或效应器功能)的方法。

[0333] IgG₄抗体展现出与IgG₁抗体相比降低的对Fc受体的结合亲和力和降低的效应器功能。因此,在一些实施方案中,本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的Fc域是IgG₄ Fc域,特别是人IgG₄ Fc域。在一个实施方案中,所述IgG₄ Fc域包含在位置S228处的氨基酸替代,具体是氨基酸替代S228P(编号方式依照Kabat EU索引)。为了进一步降低其对Fc受体的结合亲和力和/或其效应器功能,在一个实施方案中,所述IgG₄ Fc域包含在位置L235处的氨基酸替代,具体是氨基酸替代L235E(编号方式依照Kabat EU索引)。在另一个实施方案中,所述IgG₄ Fc域包含在位置P329处的氨基酸替代,具体是氨基酸替代P329G(编号方式依照Kabat EU索引)。在一个具体的实施方案中,所述IgG₄ Fc域包含在位置S228,L235和P329处的氨基酸替代,具体是氨基酸替代S228P,L235E和P329G(编号方式依照Kabat EU索引)。此类 IgG₄ Fc域突变体及其Fc γ 受体结合特性记载于PCT公开文本No.WO 2012/130831,其通过提述完整并入本文。

[0334] 在一个具体的实施方案中,展现出与天然IgG₁ Fc域相比降低的对Fc受体的结合亲和力和/或降低的效应器功能的Fc域是包含氨基酸替代L234A, L235A和任选地P329G的人IgG₁ Fc域,或包含氨基酸替代S228P,L235E和任选地P329G的人IgG₄ Fc域(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0335] 在某些实施方案中,已消除Fc域的N-糖基化。在一个此类实施方案中,所述Fc域包含在位置N297处的氨基酸突变,特别是用丙氨酸(N297A)或天冬氨酸(N297D)替换天冬酰胺的氨基酸替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0336] 在上文和PCT公开文本no.WO 2012/130831中描述的Fc域以外,具有降低的Fc受体结合和/或效应器功能的Fc域还包括那些具有Fc域残基238, 265,269,270,297,327和329中一个或多个的替代的(美国专利No. 6,737,056)(编号方式依照Kabat EU索引)。此类Fc突变体包括具有在氨基酸位置265,269,270,297和327的两个或更多个处的替代的Fc突变体,包括所谓的“DANA”Fc突变体,其具有残基265和297到丙氨酸的替代(美国专利 No.7,

332,581)。

[0337] 可以使用本领域中公知的遗传或化学方法通过氨基酸删除,替代,插入或修饰来制备突变体Fc域。遗传方法可以包括编码DNA序列的位点特异性诱变,PCR,基因合成等。正确的核苷酸变化可以通过例如测序来验证。

[0338] 可以容易地测定对Fc受体的结合,例如通过ELISA或通过使用标准仪器诸如BIAcore仪(GE Healthcare)的表面等离子共振(SPR)进行,并且Fc受体诸如可通过重组表达获得。本文中描述了一种合适的此类结合测定法。或者,可使用已知表达特定Fc受体的细胞系,如表达Fc γ IIIa受体的人NK细胞来估测Fc域或包含Fc域的细胞活化性双特异性抗原结合分子对Fc受体的结合亲和力。

[0339] 可通过本领域中已知的方法来测量Fc域或包含Fc域的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的效应器功能。本文中描述了用于测量ADCC的一种合适的测定法。评估感兴趣分子的ADCC活性的体外测定法的其它例子记载于美国专利No.5,500,362;Hellstrom等,Proc Natl Acad Sci USA 83,7059-7063 (1986)和Hellstrom等,Proc Natl Acad Sci USA 82,1499-1502 (1985);美国专利 No.5,821,337;Bruggemann等,J Exp Med 166,1351-1361 (1987)。或者,可采用非放射性测定方法(参见例如用于流式细胞术的ACTI™非放射性细胞毒性测定法(CellTechnology,Inc.Mountain View,CA);和CytoTox 96®非放射性细胞毒性测定法(Promega, Madison, WI))。对于此类测定法有用的效应细胞包括外周血单个核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。或者/另外,可体内评估感兴趣分子的ADCC活性,例如在动物模型中,诸如披露于Clynes等, Proc Natl Acad Sci USA 95,652-656 (1998)的。

[0340] 在一些实施方案中,Fc域对补体成分(特别是对C1q)的结合是降低的。因而,在其中Fc域工程化为具有降低的效应器功能的一些实施方案中,所述降低的效应器功能包括降低的CDC。可实施C1q结合测定法来测定T细胞活化性双特异性抗原结合分子是否能够结合C1q并因此具有CDC活性。参见例如WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体激活,可实施CDC测定法(参见例如Gazzano-Santoro等,J Immunol Methods 202,163 (1996);Cragg等,Blood 101,1045-1052 (2003);以及Cragg 和Glennie, Blood 103,2738-2743 (2004))。

[0341] 抗原结合模块

[0342] 本发明的抗原结合分子是双特异性的,即它包含至少两种能够特异性结合两种不同抗原性决定簇的抗原结合模块。依照本发明的具体实施方案,所述抗原结合模块是Fab分子(即由各自包含可变域和恒定域的重链和轻链构成的抗原结合域)。在一个实施方案中,所述Fab分子是人的。在另一个实施方案中,所述Fab分子是人源化的。在再一个实施方案中,所述 Fab分子包含人重链和轻链恒定域。

[0343] 优选地,抗原结合模块中至少一个是交换Fab分子。此类修饰减少来自不同Fab分子的重链和轻链的错误配对,由此改进了重组生产中本发明的T 细胞活化性双特异性抗原结合分子的产量和纯度。在可用于本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的一种具体的交换Fab分子中,Fab轻链和Fab 重链的可变域(分别是VL和VH)是交换的。然而,甚至在有这种域交换的情况下,由于错配的重和轻链之间所谓的Bence Jones型相互作用,T细胞活化性双特异性抗原结合分子的制备物仍然可能包含某些副产物(参见Schaefer et al, PNAS,108 (2011) 11187-11191)。为了进一步减少来自不同Fab分子的重和轻链的错配及如

此提高想要的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的纯度和产量,依照本发明,可以在特异性结合靶细胞抗原的Fab分子或特异性结合活化性T细胞抗原的Fab分子任一的CH1和CL域中的特定氨基酸位置引入具有相反电荷的带电荷的氨基酸。在T细胞活化性双特异性抗原结合分子中包含的常规Fab分子中(诸如例如图1A-C,G-J中所示)或在T细胞活化性双特异性抗原结合分子中包含的VH/VL交换Fab分子中(诸如例如图1D-F, K-N中所示)(但并不在二者中都)进行电荷修饰。在具体的实施方案中,在T 细胞活化性双特异性抗原结合分子中包含的常规Fab分子(它在具体的实施方案中特异性结合靶细胞抗原)中进行电荷修饰。

[0344] 在依照本发明的一个具体的实施方案中,所述T细胞活化性双特异性抗原结合分子能够同时结合靶细胞抗原(特别是肿瘤细胞抗原)和活化性T细胞抗原,特别是CD3。在一个实施方案中,所述T细胞活化性双特异性抗原结合分子能够通过同时结合靶细胞抗原和活化性T细胞抗原来交联T细胞和靶细胞。在一个甚至更具体的实施方案中,此类同时结合导致靶细胞(特别是肿瘤细胞)的裂解。在一个实施方案中,此类同时结合导致T细胞的活化。在其它实施方案中,此类同时结合导致T淋巴细胞(特别是细胞毒性T淋巴细胞)的细胞应答,其选自下组:增殖,分化,细胞因子分泌,细胞毒性效应分子释放,细胞毒性活性,和活化标志物的表达。在一个实施方案中,在没有同时结合靶细胞抗原的情况下T细胞活化性双特异性抗原结合分子对活化性T细胞抗原,特别是CD3的结合不导致T细胞活化。

[0345] 在一个实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子能够将T细胞的细胞毒性活性重定向于靶细胞。在一个具体的实施方案中,所述重定向不依赖于靶细胞的MHC介导的肽抗原呈递和/或T细胞的特异性。

[0346] 具体地,依照本发明任何实施方案的T细胞是细胞毒性T细胞。在一些实施方案中,所述T细胞是CD4⁺或CD8⁺ T细胞,特别是CD8⁺ T细胞。

[0347] 活化性T细胞抗原结合模块

[0348] 本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含至少一个特异性结合活化性T细胞抗原的抗原结合模块,特别是Fab分子(本文中称作“活化性T 细胞抗原结合模块,或活化性T细胞抗原结合Fab分子”)。在一个具体的实施方案中,所述T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含不超过一个能够特异性结合活化性T细胞抗原的抗原结合模块。在一个实施方案中,所述T细胞活化性双特异性抗原结合分子提供对活化性T细胞抗原的单价结合。

[0349] 在具体的实施方案中,特异性结合活化性T细胞抗原的抗原结合模块是本文所述交换Fab分子,即其中Fab重和轻链的可变域VH和VL或恒定域CH1 和CL彼此交换/替换的Fab分子。在此类实施方案中,特异性结合靶细胞抗原的抗原结合模块优选是常规Fab分子。在T细胞活化性双特异性抗原结合分子中包含超过一个特异性结合靶细胞抗原的抗原结合模块,特别是Fab分子的实施方案中,特异性结合活化性T细胞抗原的抗原结合模块优选是交换Fab 分子且特异性结合靶细胞抗原的抗原结合模块是常规Fab分子。

[0350] 在备选实施方案中,特异性结合活化性T细胞抗原的抗原结合模块是常规Fab分子。在此类实施方案中,特异性结合靶细胞抗原的抗原结合模块是本文所述交换Fab分子,即其中Fab重和轻链的可变域VH和VL或恒定域CH1 和CL彼此交换/替换的Fab分子。

[0351] 在一个具体的实施方案中,所述活化性T细胞抗原是CD3,特别是人 CD3 (SEQ ID NO:1)或食蟹猴CD3 (SEQ ID NO:2),最特别是人CD3。在一个具体的实施方案中,活化性T细胞抗原结合模块对于人和食蟹猴CD3是交叉反应性的(即特异性结合)。在一些实施方案中,

所述活化性T细胞抗原是 CD3的 ϵ 亚基(CD3 ϵ)。

[0352] 在一些实施方案中,活化性T细胞抗原结合模块特异性结合CD3,特别是CD3 ϵ ,且包含至少一个选自下组的重链互补决定区(CDR):SEQ ID NO: 4,SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6和至少一个选自下组的轻链CDR:SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10。

[0353] 在一个实施方案中,所述CD3结合抗原结合模块,特别是Fab分子包含包含SEQ ID NO:4的重链CDR1,SEQ ID NO:5的重链CDR2,SEQ ID NO:6的重链CDR3的重链可变区,和包含SEQ ID NO:8的轻链CDR1, SEQ ID NO:9的轻链CDR2,和SEQ ID NO:10的轻链CDR3的轻链可变区。

[0354] 在另一个实施方案中,所述CD3结合抗原结合模块,特别是Fab分子包含包含SEQ ID NO:4的重链CDR1,SEQ ID NO:37的重链CDR2,SEQ ID NO:6的重链CDR3的重链可变区,和包含SEQ ID NO:38的轻链CDR1, SEQ ID NO:9的轻链CDR2,和SEQ ID NO:10的轻链CDR3的轻链可变区。

[0355] 在一个实施方案中,所述CD3结合抗原结合模块,特别是Fab分子包含与SEQ ID NO:3至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%相同的重链可变区序列和与SEQ ID NO:7至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%相同的轻链可变区序列。

[0356] 在一个实施方案中,所述CD3结合抗原结合模块,特别是Fab分子包含包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的轻链可变区。

[0357] 在一个实施方案中,所述CD3结合抗原结合模块,特别是Fab分子包含 SEQ ID NO:3的重链可变区序列和SEQ ID NO:7的轻链可变区序列。

[0358] 在一个实施方案中,所述CD3结合抗原结合模块,特别是Fab分子包含与SEQ ID NO:39至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%相同的重链可变区序列和与SEQ ID NO:40至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%相同的轻链可变区序列。

[0359] 在一个实施方案中,所述CD3结合抗原结合模块,特别是Fab分子包含包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的轻链可变区。

[0360] 在一个实施方案中,所述CD3结合抗原结合模块,特别是Fab分子包含 SEQ ID NO:39的重链可变区序列和SEQ ID NO:40的轻链可变区序列。

[0361] 靶细胞抗原结合模块

[0362] 本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含至少一个特异性结合 CD19(靶细胞抗原)的抗原结合模块,特别是Fab分子。在某些实施方案中,所述T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含两个特异性结合CD19的抗原结合模块,特别是Fab分子。在一个具体的此类实施方案中,这些抗原结合模块中的每一个特异性结合相同抗原性决定簇。在一个甚至更加具体的实施方案中,这些抗原结合模块都是相同的,即它们包含相同的氨基酸序列,包括相同的本文所述CH1和CL域中的氨基酸替代(如果有的话)。在一个实施方案中,所述T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含特异性结合 CD19的免疫球蛋白分子。在一个实施方案中,所述T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含不超过两个特异性结合CD19的抗原结合模块,特别是 Fab分子。

[0363] 在具体的实施方案中,特异性结合CD19的抗原结合模块是常规Fab分子。在此类实施方案中,特异性结合活化性T细胞抗原的抗原结合模块是本文所述交换Fab分子,即其中Fab重和轻链的可变域VH和VL或恒定域CH1和 CL彼此交换/替换的Fab分子。

[0364] 在备选实施方案中,特异性结合CD19的抗原结合模块是本文所述交换 Fab分子,即其中Fab重和轻链的可变域VH和VL或恒定域CH1和CL彼此交换 /替换的Fab分子。在此类实施方案中,特异性结合活化性T细胞抗原的抗原结合模块是常规Fab分子。

[0365] 所述CD19结合模块能够将T细胞活化性双特异性抗原结合分子引导至靶部位(例如表达CD19的特定类型肿瘤细胞)。

[0366] 在一个特定的实施方案中,特异性结合CD19的抗原结合模块,特别是 Fab分子包含包含SEQ ID NO:14的重链互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:15的重链CDR 2,和SEQ ID NO:16的重链CDR 3的重链可变区,和包含SEQ ID NO:17的轻链CDR 1,SEQ ID NO:18的轻链CDR 2和SEQ ID NO:19的轻链CDR 3的轻链可变区。在又一个实施方案中,特异性结合CD19的抗原结合模块,特别是Fab分子包含与SEQ ID NO:20的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%相同的重链可变区,和与SEQ ID NO:21的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%相同的轻链可变区。在仍有又一个实施方案中,特异性结合CD19的抗原结合模块,特别是Fab分子包含SEQ ID NO:20的重链可变区序列,和SEQ ID NO:21的轻链可变区序列。在一个具体的实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含与SEQ ID NO:24的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%相同的多肽,与SEQ ID NO:30的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%相同的多肽,与SEQ ID NO:31的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%相同的多肽,和与SEQ ID NO:32的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%相同的多肽。在又一个具体的实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含SEQ ID NO:24的多肽序列,SEQ ID NO:30的多肽序列,SEQ ID NO:31的多肽序列和SEQ ID NO:32的多肽序列。

[0367] 别的特异性结合CD19的抗体在欧洲专利申请EP 15188262(通过援引完整收入本文)中有描述。

[0368] 在一个实施方案中,特异性结合CD19的抗原结合模块,特别是Fab分子包含包含SEQ ID NO:50的重链互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:51的重链 CDR 2,和SEQ ID NO:52的重链CDR 3的重链可变区,和包含SEQ ID NO:53的轻链CDR 1,SEQ ID NO:54的轻链CDR 2和SEQ ID NO:55的轻链CDR 3的轻链可变区。在又一个实施方案中,特异性结合CD19的抗原结合模块,特别是Fab分子包含与SEQ ID NO:56的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%相同的重链可变区,和与SEQ ID NO:57的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%相同的轻链可变区。在仍有又一个实施方案中,特异性结合CD19的抗原结合模块,特别是Fab分子包含SEQ ID NO:56的重链可变区序列,和SEQ ID NO:57的轻链可变区序列。

[0369] 在一个实施方案中,特异性结合CD19的抗原结合模块,特别是Fab分子包含

[0370] (i) 包含SEQ ID NO:58的重链互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:59的重链 CDR 2,和SEQ ID NO:60的重链CDR 3的重链可变区,和包含SEQ ID NO:61的轻链CDR 1,SEQ ID NO:62的轻链CDR 2和SEQ ID NO:63的轻链CDR 3的轻链可变区;

[0371] (ii) 包含SEQ ID NO:66的重链互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:67的重链 CDR 2,和SEQ ID NO:68的重链CDR 3的重链可变区,和包含SEQ ID NO:69的轻链CDR 1,SEQ ID NO:70的轻链CDR 2和SEQ ID NO:71的轻链CDR 3的轻链可变区;

[0372] (iii) 包含SEQ ID NO:74的重链互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:75的重链CDR 2,和SEQ ID NO:76的重链CDR 3的重链可变区,和包含SEQ ID NO:77的轻链CDR 1,SEQ ID

NO:78的轻链CDR 2和SEQ ID NO:79的轻链CDR 3的轻链可变区;

[0373] (iv) 包含SEQ ID NO:82的重链互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:83的重链 CDR 2,和SEQ ID NO:84的重链CDR 3的重链可变区,和包含SEQ ID NO: 85的轻链CDR 1,SEQ ID NO:86的轻链CDR 2和SEQ ID NO:87的轻链CDR 3的轻链可变区;

[0374] (v) 包含SEQ ID NO:90的重链互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:91的重链 CDR 2,和SEQ ID NO:92的重链CDR 3的重链可变区,和包含SEQ ID NO: 93的轻链CDR 1,SEQ ID NO: 94的轻链CDR 2和SEQ ID NO:95的轻链CDR 3的轻链可变区;或

[0375] (vi) 包含SEQ ID NO:98的重链互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:99的重链 CDR 2,和SEQ ID NO:100的重链CDR 3的重链可变区,和包含SEQ ID NO: 101的轻链CDR 1,SEQ ID NO:102的轻链CDR 2和SEQ ID NO:103的轻链 CDR 3的轻链可变区。

[0376] 在又一个实施方案中,特异性结合CD19的抗原结合模块,特别是Fab分子包含

[0377] (i) 与SEQ ID NO:64的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%相同的重链可变区,和与SEQ ID NO:65的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%相同的轻链可变区;

[0378] (ii) 与SEQ ID NO:72的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%相同的重链可变区,和与SEQ ID NO:73的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%相同的轻链可变区;

[0379] (iii) 与SEQ ID NO:80的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%相同的重链可变区,和与SEQ ID NO:81的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%相同的轻链可变区;

[0380] (iv) 与SEQ ID NO:88的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%相同的重链可变区,和与SEQ ID NO:89的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%相同的轻链可变区;

[0381] (v) 与SEQ ID NO:96的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%相同的重链可变区,和与SEQ ID NO:97的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%相同的轻链可变区;或

[0382] (vi) 与SEQ ID NO:104的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%相同的重链可变区,和与SEQ ID NO:105的序列至少95%,96%,97%,98%,或 99%相同的轻链可变区。

[0383] 在仍有又一个实施方案中,特异性结合CD19的抗原结合模块,特别是 Fab分子包含

[0384] (i) SEQ ID NO:64的重链可变区序列,和SEQ ID NO:65的轻链可变区序列;

[0385] (ii) SEQ ID NO:72的重链可变区序列,和SEQ ID NO:73的轻链可变区序列;

[0386] (iii) SEQ ID NO:80的重链可变区序列,和SEQ ID NO:81的轻链可变区序列;

[0387] (iv) SEQ ID NO:88的重链可变区序列,和SEQ ID NO:89的轻链可变区序列;

[0388] (v) SEQ ID NO:96的重链可变区序列,和SEQ ID NO:97的轻链可变区序列;或

[0389] (vi) SEQ ID NO:104的重链可变区序列,和SEQ ID NO:105的轻链可变区序列。

[0390] 在一个特定的实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含与 SEQ ID NO:24的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%相同的多肽,与SEQ ID NO:114的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%相同的多肽,与SEQ ID NO:115的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%相同的多肽,和与SEQ ID NO:116的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%相同的多肽。在又一个特定的实施方案中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子包含 SEQ ID NO:24的多肽序列,SEQ ID NO:114的多肽序列,SEQ ID NO:115 的多肽序列和SEQ ID NO:116的多肽序列。

[0391] 多核苷酸

[0392] 本发明还提供分离的多核苷酸,其编码如本文中描述的T细胞活化性双特异性抗原结合分子或其片段。在一些实施方案中,所述片段是抗原结合片段。

[0393] 可以将编码本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的多核苷酸以编码完整T细胞活化性双特异性抗原结合分子的单一多核苷酸表达,或以共表达的多种(例如两种或更多种)多核苷酸表达。由共表达的多核苷酸编码的多肽可以经由例如二硫键或其它手段联合以形成功能性T细胞活化性双特异性抗原结合分子。例如,Fab分子的轻链部分可以与T细胞活化性双特异性抗原结合分子中包含Fab分子重链部分,Fc域亚基和任选地(部分的)另一个 Fab分子的部分由分开多核苷酸编码。当共表达时,重链多肽会与轻链多肽联合以形成Fab分子。在另一个例子中,T细胞活化性双特异性抗原结合分子中包含两个Fc域亚基之一和任选地(部分的)一个或多个Fab分子的部分可以与T细胞活化性双特异性抗原结合分子中包含两个Fc域亚基中另一个和任选地(部分的)Fab分子的部分由分开多核苷酸编码。当共表达时,Fc域亚基会联合以形成Fc域。

[0394] 在一些实施方案中,所述分离的多核苷酸编码整个依照本文所述发明的 T细胞活化性双特异性抗原结合分子。在其它实施方案中,所述分离的多核苷酸编码依照本文所述发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子中包含的多肽。

[0395] 在某些实施方案中,所述多核苷酸或核酸是DNA。在其它实施方案中,本发明的多核苷酸是RNA,例如以信使RNA (mRNA) 的形式。本发明的RNA可以是单链或双链的。

[0396] 重组方法

[0397] 可以获得本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子,例如通过固相肽合成(例如Merrifield固相合成)或重组生成进行。对于重组生成,分离一种或多种编码所述T细胞活化性双特异性抗原结合分子(片段)的多核苷酸(例如如上文描述的),并将其插入一种或多种载体中用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。可以使用常规规程容易分离并测序此类多核苷酸。在一个实施方案中,提供包含一种或多种本发明的多核苷酸的载体(优选为表达载体)。可以使用本领域技术人员公知的方法来构建含有T细胞活化性双特异性抗原结合分子(片段)的编码序列以及适宜的转录/翻译控制信号的表达载体。这些方法包括体外重组DNA技术,合成技术和体内重组/遗传重组。参见例如记载于Maniatis等,MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory,N.Y.(1989);和Ausubel等,CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY,Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y(1989)的技术。表达载体可以是质粒,病毒的一部分或可以是核酸片段。表达载体包含表达盒,其中在与启动子和/或其它转录或翻译控制元件的可操作联合中克隆编码T细胞活化性双特异性抗原结合分子(片段)的多核苷酸(即编码区)。如本文中使用的,“编码区”是核酸中由翻译成氨基酸的密码子组成的一部分。尽管“终止密码子”(TAG,TGA或TAA)不翻译成氨基酸,但可将其视为编码区的一部分(若存在的话),但任何侧翼序列例如启动子,核糖体结合位点,转录终止子,内含子,5' 和3' 非翻译区等,不是编码区的一部分。两个或更多个编码区可以存在于单一多核苷酸构建体中(例如单一载体上),或存在于分开多核苷酸构建体中,例如在分开的(不同的)载体上。此外,任何载体可含有单个编码区,或可包含两个或更多个编码区,例如本发明的载体可以编码一种或多种多肽,其经由蛋白水解切割在翻译后或共翻译分开成最终蛋白质。另外,本发明的载体,多核苷酸或核酸可以编码异源编码区,其与编码本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子

(片段)或其变体或衍生物的多核苷酸融合或未融合。异源编码区包括但不限于特殊化的元件或基序,如分泌信号肽或异源功能域。当基因产物例如多肽的编码区与一种或多种调节序列以某种方式联合从而使得该基因产物的表达置于该调节序列的影响或控制下时,即为可操作联合。若诱导启动子功能导致编码期望的基因产物的mRNA的转录并且如果两个DNA片段之间的连接的性质不干扰表达调节序列指导该基因产物表达的能力或不干扰DNA模板被转录的能力,则两个DNA片段(如多肽编码区和与其联合的启动子)为“可操作联合的”。如此,如果启动子能够实现编码多肽的核酸的转录,那么该启动子区将是与该核酸可操作联合。所述启动子可以是细胞特异性启动子,其仅在预先确定的细胞中指导DNA的实质性转录。除启动子以外,其它转录控制元件例如增强子,操纵基因,阻遏物和转录终止信号能与多核苷酸可操作联合以指导细胞特异性转录。在本文中公开了合适的启动子和其它转录控制区。多种转录控制区是本领域技术人员已知的。这些包括但不限于在脊椎动物细胞中发挥功能的转录控制区,如但不限于来自巨细胞病毒的启动子和增强子区段(例如立即早期启动子,以及内含子 -A),猿病毒40(例如早期启动子)和逆转录病毒(例如如劳斯(Rous)肉瘤病毒)。其它转录控制区包括那些自脊椎动物基因如肌动蛋白,热休克蛋白,牛生长激素和家兔 α 球蛋白衍生的,以及能够控制真核细胞中基因表达的其它序列。另外的合适的转录控制区包括组织特异性启动子和增强子以及诱导型启动子(例如四环素诱导型启动子)。类似地,多种翻译控制元件是本领域普通技术人员已知的。这些包括但不限于核糖体结合位点,翻译起始和终止密码子以及自病毒系统衍生的元件(具体地,内部核糖体进入位点或IRES,也称作CITE序列)。表达盒还可以包含其它特征,如复制起点和/或染色体整合元件,如逆转录病毒长末端重复(LTR)或腺伴随病毒(AAV)反向末端重复(ITR)。

[0398] 本发明的多核苷酸和核酸编码区可以与编码分泌或信号肽的另外的编码区联合,所述分泌或信号肽指导由本发明的多核苷酸编码的多肽的分泌。例如,如果期望分泌所述T细胞活化性双特异性抗原结合分子,那么可以将编码信号序列的DNA置于编码本发明T细胞活化性双特异性抗原结合分子或其片段的核酸上游。依照信号假说,由哺乳动物细胞分泌的蛋白质具有信号肽或分泌前导序列,一旦启动将生长的蛋白质链跨越粗面内质网输出,就将该信号肽或分泌前导序列从成熟的蛋白质切去。本领域中普通技术人员知晓由脊椎动物细胞分泌的多肽一般具有融合至多肽N端的信号肽,其从所翻译的多肽切去以生成分泌性或“成熟”形式的多肽。在某些实施方案中,使用天然的信号肽,例如免疫球蛋白重链或轻链信号肽,或该序列的保留指导与其可操作联合的多肽分泌的能力的功能性衍生物。或者,可以使用异源哺乳动物信号肽或其功能性衍生物。例如,可以将野生型前导序列用人组织血纤维蛋白溶酶原激活剂(TPA)或小鼠 β -葡糖醛酸糖苷酶的前导序列替代。

[0399] 可以将编码能用于促进后期纯化(例如组氨酸标签)或辅助标记T细胞活化性双特异性抗原结合分子的短蛋白序列的DNA纳入T细胞活化性双特异性抗原结合分子(片段)编码多核苷酸内或其末端。

[0400] 在一个别的实施方案中,提供包含本发明的一种或多种多核苷酸的宿主细胞。在某些实施方案中,提供包含本发明的一种或多种载体的宿主细胞。多核苷酸和载体可以单独地或组合地掺入本文中分别关于多核苷酸和载体所描述的任何特征。在一个此类实施方案中,宿主细胞包含载体(例如已用该载体转化或转染),所述载体包含编码本发明T细胞活化性双特异性抗原结合分子(的部分)的多核苷酸。如本文中使用的,术语“宿主细胞”指任

何能工程化以生成本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子或其片段的细胞系统种类。适用于复制并支持T细胞活化性双特异性抗原结合分子表达的宿主细胞是本领域中公知的。在适当时,可用特定的表达载体转染或转导此类细胞,并且可以培养大量的含载体细胞以用于接种大规模发酵罐,从而获得充足量的T细胞活化性双特异性抗原结合分子用于临床应用。合适的宿主细胞包括原核微生物如大肠杆菌,或各种真核细胞,如中国仓鼠卵巢细胞(CHO),昆虫细胞等。例如,可以在细菌中生成多肽,尤其在不需要糖基化时。在表达后,可以将多肽在可溶性级分中从细菌细胞糊分离并可以进一步纯化。除了原核生物外,真核微生物如丝状真菌或酵母也是适合编码多肽的载体的克隆或表达宿主,包括其糖基化途径已被“人源化”,导致生成具有部分或完全人的糖基化样式的多肽的真菌和酵母菌株。参见Gerngross, *Nat Biotech* 22, 1409-1414 (2004), 和Li等, *Nat Biotech* 24, 210-215 (2006)。适用于表达(糖基化)多肽的宿主细胞还自多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动物)衍生。无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞。已鉴定出可与昆虫细胞一起使用的大量杆状病毒株,特别是用于转染草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞。也可以将植物细胞培养物用作宿主。参见例如美国专利No. 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978和6,417,429(描述用于在转基因植物中生成抗体的PLANTIBODIES™技术)。脊椎动物细胞也可以用作宿主。例如,适应于在悬液中生长的哺乳动物细胞系可以是有用的。可用的哺乳动物宿主细胞系的其它例子是由SV40转化的猴肾CV1系(COS-7);人胚肾系(293或293T细胞,如例如记载于Graham等, *J Gen Virol* 36, 59 (1977)), 幼仓鼠肾细胞(BHK), 小鼠塞托利(sertoli)细胞(TM4细胞,如例如记载于Mather, *Biol Reprod* 23, 243-251 (1980)的), 猴肾细胞(CV1), 非洲绿猴肾细胞(VERO-76), 人宫颈癌细胞(HELA), 犬肾细胞(MDCK), 牛鼠(buffalo rat)肝细胞(BRL 3A), 人肺细胞(W138), 人肝细胞(Hep G2), 小鼠乳房肿瘤细胞(MMT 060562), TRI细胞(如例如记载于Mather等, *Annals N.Y. Acad Sci* 383, 44-68 (1982)的), MRC 5细胞和FS4细胞。其它可用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括dhfr⁻CHO细胞(Urlaub等, *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 4216 (1980));和骨髓瘤细胞系如 Y0, NS0, P3X63和Sp2/0。对于某些适用于蛋白质生产的哺乳动物宿主细胞系的综述,参见例如Yazaki和Wu, *Methods in Molecular Biology*, 第248卷(B.K.C.Lo编, Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)。宿主细胞包括培养的细胞,例如哺乳动物培养细胞,酵母细胞,昆虫细胞,细菌细胞和植物细胞等,但还包括在转基因动物,转基因植物或培养的植物或动物组织中包含的细胞。在一个实施方案中,宿主细胞是真核细胞,优选为哺乳动物细胞如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,人胚肾(HEK)细胞或淋巴样细胞(例如Y0, NS0, Sp20细胞)。

[0401] 本领域中已知在这些系统中表达外来基因的标准技术。可以将表达包含抗原结合域如抗体的重链或轻链的多肽的细胞工程化改造为使得还表达另一抗体链,从而使得表达的产物是具有重链和轻链两者的抗体。

[0402] 在一个实施方案中,提供了生成依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的方法,其中所述方法包括在适合于所述T细胞活化性双特异性抗原结合分子表达的条件下培养包含编码T细胞活化性双特异性抗原结合分子的多核苷酸的宿主细胞(如本文中提供的),并从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述T细胞活化性双特异性抗原结合分子。

[0403] 所述T细胞活化性双特异性抗原结合分子的组分彼此遗传融合。T细胞活化性双特异性抗原结合分子可设计为使其组分直接彼此融合或经由接头序列间接融合。可依照本领域中公知的方法测定接头的组成和长度,并可以测试功效。T细胞活化性双特异性抗原结合分子不同组分之间的接头序列的例子见于本文中提供的序列。还包含另外的序列以纳入切割位点来分开融合的各个组分(若期望的话),例如内肽酶识别序列。

[0404] 在某些实施方案中,所述T细胞活化性双特异性抗原结合分子的一个或多个抗原结合模块至少包含能结合抗原性决定簇的抗体可变区。可变区可形成天然或非天然存在的抗体及其片段的一部分和自其衍生。生成多克隆抗体和单克隆抗体的方法是本领域中公知的(参见例如Harlow和Lane,“Antibodies,a laboratory manual”,Cold Spring Harbor Laboratory,1988)。非天然存在的抗体可以使用固相肽合成构建生成,可以重组生成(例如如记载于美国专利No.4,186,567的)或可通过例如筛选包含可变重链和可变轻链的组合库获得(参见例如McCafferty的美国专利No.5,969,108)。

[0405] 可以将抗体,抗体片段,抗原结合域或可变区的任何动物种类用于本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子。可用于本发明的非限制性抗体,抗体片段,抗原结合域或可变区可以是鼠,灵长类或人起源的。如果T细胞活化性双特异性抗原结合分子意图供人使用,那么可以使用嵌合形式的抗体,其中抗体的恒定区来自人。也可以依照本领域中公知的方法制备人源化或全人形式的抗体(参见例如Winter的美国专利No.5,565,332)。人源化可以通过各种方法实现,包括但不限于(a)将非人(例如供体抗体)CDR嫁接到人(例如受体抗体)框架和恒定区上,保留或不保留关键的框架残基(例如那些对于保留较好的抗原结合亲和力或抗体功能重要的残基),(b)仅将非人特异性决定区(SDR或a-CDR;对于抗体-抗原相互作用关键的残基)嫁接到人框架和恒定区上,或(c)移植完整的非人可变域,但通过替换表面残基用人样部分来“掩饰(cloak)”它们。人源化的抗体及其制备方法综述于例如Almagro和Fransson,Front Biosci 13,1619-1633(2008),并且还记载于例如Riechmann等,Nature 332,323-329(1988);Queen等,Proc Natl Acad Sci USA 86,10029-10033(1989);美国专利No.5,821,337,7,527,791,6,982,321和7,087,409;Jones等,Nature 321,522-525(1986);Morrison等,Proc Natl Acad Sci 81,6851-6855(1984);Morrison和Oi,Adv Immunol 44,65-92(1988);Verhoeyen等,Science 239,1534-1536(1988);Padlan,Molec Immun 31(3),169-217(1994);Kashmiri等,Methods 36,25-34(2005)(描述SDR(a-CDR)嫁接);Padlan,Mol Immunol 28,489-498(1991)(描述“表面重建”);Dall’Acqua等,Methods 36,43-60(2005)(描述“FR改组”);和Osborn等,Methods 36,61-68(2005)以及Klimka等,Br J Cancer 83,252-260(2000)(描述了FR改组的“引导选择”办法)。可以使用本领域中已知的各种技术来生成人抗体和人可变区。人抗体一般记载于van Dijk和van de Winkel,Curr Opin Pharmacol 5,368-74(2001)以及Lonberg,Curr Opin Immunol 20,450-459(2008)。人可变区能形成通过杂交瘤方法制备的人单克隆抗体的一部分和自其衍生(参见例如Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,pp.51-63(Marcel Dekker,Inc.,New York,1987))。还可以通过对转基因动物施用免疫原来制备人抗体和人可变区,所述转基因动物已经过修饰以应答抗原攻击而生成完整的人抗体或具有人可变区的完整抗体(参见例如Lonberg,Nat Biotech 23,1117-1125(2005))。还可以通过分离选自人衍生的噬菌体展示库的Fv克隆可变区序列来生成人抗

体和可变区(参见例如Hoogenboom等,于Methods in Molecular Biology 178,1-37(O'Brien等编,Human Press,Totowa, NJ,2001);和McCafferty等,Nature 348,552-554;Clackson等,Nature 352, 624-628(1991))。噬菌体通常展示抗体片段,作为单链Fv(scFv)片段或作为Fab片段。

[0406] 在某些实施方案中,将可用于本发明的抗原结合模块工程化改造为具有增强的结合亲和力,其依照例如公开于美国专利申请公开文本No. 2004/0132066的方法进行,其完整内容通过提述据此并入。可以经由酶联免疫吸附测定法(ELISA)或本领域技术人员熟知的其它技术来测量本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子结合特定抗原性决定簇的能力,所述其它技术例如表面等离子共振技术(在BIAcore T100系统上分析)(Liljebblad等,Glyco J 17,323-329(2000))和传统的结合测定法(Heeley,Endocr Res 28, 217-229(2002))。可以使用竞争测定法来鉴定与参照抗体竞争对特定抗原的结合的抗体,抗体片段,抗原结合域或可变域,例如与V9抗体竞争对CD3的结合的抗体。在某些实施方案中,此类竞争性抗体结合由参照抗体结合的相同表位(例如线性或构象性表位)。用于定位抗体结合的表位的详细的例示性方法在Morris(1996)“Epitope Mapping Protocols,”于Methods in Molecular Biology vol.66(Humana Press,Totowa,NJ)中提供。在一种例示性竞争测定法中,将固定化的抗原(例如CD3)在溶液中温育,所述溶液包含结合该抗原的第一标记抗体(例如V9抗体,记载于US 6,054,297)和测试其与第一抗体竞争对抗原的结合的能力的第二未标记抗体。第二抗体可以存在于杂交瘤上清液中。作为对照,将固定化的抗原在溶液中温育,所述溶液包含第一标记抗体但没有第二未标记抗体。在允许第一抗体结合抗原的条件下温育后,除去过量的未结合的抗体,并测量与固定化抗原联合的标记物的量。如果与固定化抗原联合的标记物的量在测试样品中相对于对照样品实质性降低,那么这指示第二抗体在与第一抗体竞争对抗原的结合。参见Harlow和Lane(1988)Antibodies:A Laboratory Manual ch.14(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY)。

[0407] 可以通过本领域已知的技术来纯化如本文中描述的那样制备的T细胞活化性双特异性抗原结合分子,所述技术如高效液相层析,离子交换层析,凝胶电泳,亲和层析,大小排阻层析等。用于纯化具体蛋白质的实际条件将部分取决于因素,如净电荷,疏水性,亲水性等,而且对于本领域中的技术人员将是明显的。对于亲和层析纯化,能使用T细胞活化性双特异性抗原结合分子的亲和层析纯化,可以使用具有蛋白A或蛋白G的基质。可以使用连续的蛋白A或G亲和层析和大小排阻层析来分离T细胞活化性双特异性抗原结合分子,基本如实施例中描述的。可以通过多种公知的分析方法中的任一种来测定T细胞活化性双特异性抗原结合分子的纯度,包括凝胶电泳,高压液相层析等。例如,如实施例中所描述的那样表达的重链融合蛋白显示为完整且正确装配的,如通过还原性SDS-PAGE证明的(见例如图3)。在约Mr 25,000,Mr 50,000和Mr 75,000处解析出三条条带,其对应于预测的T细胞活化性双特异性抗原结合分子轻链,重链和重链/轻链融合蛋白的分子量。

[0408] 测定法

[0409] 通过本领域中已知的各种测定法,可以鉴定,筛选或表征本文中提供的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的物理/化学特性和/或生物学活性。

[0410] 亲和力测定法

[0411] 可以依照实施例中提出的方法使用标准的仪器如BIAcore仪 (GE Healthcare) 通过表面等离子共振 (SPR) 测定T细胞活化性双特异性抗原结合分子对Fc受体或靶抗原的亲和力,而且可以诸如通过重组表达获得受体或靶蛋白。或者,可以例如通过流式细胞术 (FACS), 使用表达特定受体或靶抗原的细胞系来评估T细胞活化性双特异性抗原结合分子对不同受体或靶抗原的结合。一个用于测量结合亲和力的特定的说明性和例示性实施方案记载于下文和下文实施例。

[0412] 依照一个实施方案,通过表面等离子共振使用BIACORE® T100仪 (GE Healthcare) 于25°C测量 K_D 。

[0413] 为了分析Fc部分与Fc受体之间的相互作用,通过固定化于CM5芯片上的抗五His抗体 (Qiagen) 来捕捉带His标签的重组Fc受体并将双特异性构建体用作分析物。简言之,将羧甲基化的葡聚糖生物传感器芯片 (CM5, GE Healthcare) 依照供应商说明书用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺氢氯化物 (EDC) 和N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 活化。将抗五His抗体用10mM醋酸钠 pH 5.0稀释至40 μ g/ml,接着以5 μ l/分钟的流速注射以实现约6500响应单位 (RU) 的偶联蛋白。在注射配体后,注射1M乙醇胺以封闭未反应的基团。然后,在4或10nM捕捉Fc受体60秒。对于动力学测量,将双特异性构建体的4倍连续稀释液 (范围为约500nM至4000nM) 在HBS-EP (GE Healthcare, 10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05%表面活性剂P20, pH 7.4) 中于25°C以约30 μ l/分钟的流速注射120秒。

[0414] 为了测定对靶抗原的亲和力,通过固定化于活化CM5传感器芯片表面上的抗人Fab特异性抗体 (GE Healthcare) 来捕捉双特异性构建体,如对于抗五-His抗体所描述的。偶联蛋白质的最终量为约12000RU。双特异性构建体在300nM捕捉90秒。使靶抗原在从250至1000nM的浓度范围以30 μ l/min 的流速通过流动池达180秒。监测解离达180秒。

[0415] 通过扣除在参照流动池上获得的响应来校正批量折射率 (bulk refractive index) 差异。使用稳态响应通过Langmuir结合等温线的非线性曲线拟合来导出解离常数 K_D 。使用简单的1对1Langmuir结合模型 (BIACORE® T100评估软件版本1.1.1) 通过同时拟合结合和解离传感图来计算结合速率 ($k_{\text{结合}}$) 和解离速率 ($k_{\text{解离}}$)。平衡解离常数 (K_D) 计算为比率 $k_{\text{解离}}/k_{\text{结合}}$ 。参见例如Chen等, J Mol Biol 293, 865-881 (1999)。

[0416] 活性测定法

[0417] 可以通过各种测定法来测量本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的生物学活性,如实施例中描述的。生物学活性可例如包括诱导T细胞的增殖,诱导T细胞中的信号传导,诱导T细胞中活化标志物的表达,诱导通过T细胞的细胞因子分泌,诱导靶细胞如肿瘤细胞的裂解,和诱导肿瘤消退和/或改善存活。

[0418] 组合物,配制剂和施用路径

[0419] 在一个别的方面,本发明提供包含本文中提供的任一种T细胞活化性双特异性抗原结合分子的药物组合物,例如用于以下任一种治疗方法。在一个实施方案中,药物组合物包含本文中提供的任一种T细胞活化性双特异性抗原结合分子以及药学可接受载体。在另一个实施方案中,药物组合物包含本文中提供的任一种T细胞活化性双特异性抗原结合分子以及至少一种另外的治疗剂,例如如下文描述的。

[0420] 还提供以适于体内施用的形式生成本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子

的方法,所述方法包括(a)获得依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子,并(b)将所述T细胞活化性双特异性抗原结合分子与至少一种药学可接受载体配制在一起,由此配制成用于体内施用的T细胞活化性双特异性抗原结合分子制剂。

[0421] 本发明的药物组合物包含治疗有效量的在药学可接受载体中溶解或分散的一种或多种T细胞活化性双特异性抗原结合分子。短语“药学或药理学可接受的”指在所采用的剂量和浓度一般对接受者无毒性,即在适当时对动物如例如人施用时不产生不利,变应性或其它不当反应的分子实体和组合物。根据本公开,制备含有至少一种T细胞活化性双特异性抗原结合分子以及任选地另外的活性成分的药物组合物将是本领域技术人员已知的,如由 Remington's Pharmaceutical Sciences,18th Ed.Mack Printing Company,1990例示的,其通过提述并入本文。此外,对于动物(例如人)施用,会理解制剂应当满足FDA生物标准部门(FDA Office of Biological Standards)或其它国家的相应机构要求的无菌性,热原性(pyrogenicity),一般安全性和纯度标准。优选的组合物是冻干配制剂或水性溶液。如本文中使用的,“药学可接受载体”包括任何和所有的溶剂,缓冲剂,分散介质,涂料材料,表面活性剂,抗氧化剂,防腐剂(例如抗细菌剂,抗真菌剂),等张剂,吸收延缓剂,盐,防腐剂,抗氧化剂,蛋白质,药物,药物稳定剂,聚合物,凝胶,粘合剂,赋形剂,崩解剂(disintegration agent),润滑剂,甜味剂,芳香剂,染料,此类类似的材料及其组合,如本领域普通技术人员将已知的(参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences,18th Ed.Mack Printing Company,1990, pp.1289-1329,通过提述并入本文)。除非任何常规载体与活性成分不相容,涵盖其治疗或药物组合物中的使用。

[0422] 所述组合物可以包含不同类型的载体,这取决于其要以固体,液体还是气雾剂形式施用,以及其对于此类施用路径如注射是否需要是无菌的。可以静脉内,皮内,动脉内,腹膜内,损伤内,颅内,关节内,前列腺内,脾内,肾内,胸膜内,气管内,鼻内,玻璃体内,阴道内,直肠内,肿瘤内,肌内,腹膜内,皮下,结膜下,囊泡内,粘膜,心包内,脐内,眼内,口服,表面(topically),局部(locally),通过吸入(例如气雾剂吸入),注射,输注,连续输注,直接浸洗靶细胞的局部灌注,经由导管,经由灌注,以乳剂,以液体组合物(例如脂质体),或通过其它方法或前述项的任意组合施用本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子(以及任何另外的治疗剂),如本领域中普通技术人员会知晓的(参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences,18th Ed.Mack Printing Company,1990,通过提述并入本文)。胃肠外施用,特别是静脉内注射,最常用于施用多肽分子如本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子。

[0423] 胃肠外组合物包括那些设计用于通过注射施用,例如皮下,皮内,损伤内,静脉内,动脉内,肌内,鞘内或腹膜内注射施用的组合物。对于注射,可以将本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子在水性溶液,优选地在生理学相容的缓冲液中配制,所述生理学相容的缓冲液如汉克(Hanks)氏溶液,林格(Ringer)氏溶液或生理学盐水缓冲液。溶液可以含有配制剂如悬浮剂,稳定剂和/或分散剂。或者,T细胞活化性双特异性抗原结合分子可以为粉末形式,用于在使用前用合适的媒介物例如无菌无热原水构成。根据需要,通过将本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子以需要的量掺入到具有下文列举的各种其它成分的合适溶剂中来制备无菌可注射溶液。可以容易地实现无菌,例如通过过滤流过无菌过滤膜进行。一般地,通过将各种无菌活性成分掺入到无菌媒介物中来制备分散剂,所述无菌媒介

物含有基础分散介质和/或其它成分。在制备无菌可注射溶液,悬液或乳剂的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥或冷冻干燥技术,其将活性成分以及任何另外的期望成分的粉末从其先前无菌过滤的液体介质产生。液体介质在必要时应当是适当缓冲的,并且在用充足的盐水或葡萄糖注射前首先使液体稀释液等张。组合物在制备和贮存条件下必须是稳定的,并且针对微生物如细菌和真菌的污染作用提供保护。会领会的是,应当将内毒素污染最少保持于安全水平,例如低于0.5ng/mg蛋白质。合适的药学可接受载体包括但不限于:缓冲剂如磷酸,柠檬酸和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵(hexamethonium chloride);氯化苯甲烃铵(benzalkonium chloride);氯化苄乙铵(benzethonium chloride);酚,丁醇或苯甲醇;烷基对羟基苯甲酸酯如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(低于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清清蛋白,明胶,或免疫球蛋白;亲水性聚合物如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸如甘氨酸,谷氨酰胺,天冬酰胺,组氨酸,精氨酸或赖氨酸;单糖,二糖,和其它碳水化合物,包括葡萄糖,甘露糖或糊精;螯合剂如EDTA;糖如蔗糖,甘露醇,海藻糖或山梨糖醇;形成盐的反荷离子如钠;金属复合物(例如Zn-蛋白复合物);和/或非离子型表面活性剂如聚乙二醇(PEG)。水性注射悬液可以含有提高悬液粘度的化合物,如羧甲基纤维素钠,山梨糖醇,葡聚糖等。任选地,悬液还可以含有合适的稳定剂或增加化合物溶解度以允许制备高度浓缩的溶液的试剂。另外,可以将活性化合物的悬液制备为合适的油性注射悬液。合适的亲脂溶剂或媒介物包括脂肪油如芝麻油或合成的脂肪酸酯,如乙基cleats或甘油三酯或脂质体。

[0424] 可以将活性成分在例如分别通过凝聚技术或通过界面聚合作用制备的微囊剂,例如羟甲基纤维素或明胶微囊剂和聚-(甲基丙烯酸酯)微囊剂中,在胶体药物投递系统(例如脂质体,清蛋白微球,微乳剂,纳米颗粒和纳米胶囊)或在粗乳液(macroemulsion)中包载。此类技术披露于Remington's Pharmaceutical Sciences(18th Ed.Mack Printing Company,1990)。可以制备持续释放的制剂。合适的持续释放制剂的例子包括含多肽的固体疏水性聚合物的半透性基质,该基质为成形制品例如膜或微囊剂的形式。在具体的实施方案中,可以通过在组合物中使用吸收延迟剂如例如单硬脂酸铝,明胶或其组合,来产生可注射组合物的延长吸收。

[0425] 在先前描述的组合物外,T细胞活化性双特异性抗原结合分子还可以配制为贮存(depot)制剂。可以通过植入(例如皮下或肌内)或通过肌内注射来施用此类长效配制剂。如此,例如所述T细胞活化性双特异性抗原结合分子可以用合适的聚合或疏水性材料(例如作为可接受油中的乳剂)或离子交换树脂配制,或配制为微溶性衍生物,例如微溶性盐。

[0426] 可以通过常规的混合,溶解,乳化,包囊,包载或冻干过程来制备包含本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的药物组合物。可以以常规方式配制药物组合物,其使用一种或多种有助于将蛋白质加工成可药学使用的制剂的生理学可接受载体,稀释剂,赋形剂或辅助剂。合适的配制剂依赖于选择的施用路径。

[0427] 可以将T细胞活化性双特异性抗原结合分子以游离酸或碱,中性或盐形式配制成组合物。药学可接受盐是基本保留游离酸或碱的生物学活性的盐。这些包括酸加成盐(acid addition salt),例如与蛋白质性组合物的游离氨基基团形成的那些,或与无机酸(例如如氢氯酸或磷酸)或与有机酸如乙酸,草酸,酒石酸或扁桃酸形成的。与游离羧基基团形成的

盐还可以自无机碱如例如氢氧化钠,钾,铵,钙或铁;或有机碱如异丙胺,三甲胺,组氨酸或普鲁卡因(procaine)衍生。药用盐倾向于比相应的游离碱形式更可溶于水性溶剂和其它质子溶剂中。

[0428] 治疗方法和组合物

[0429] 可以将本文中提供的任一种T细胞活化性双特异性抗原结合分子用在治疗方法中。本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子可用作免疫治疗剂,例如在癌症的治疗中。

[0430] 对于在治疗方法中的使用,将以与优良医学实践一致的方式配制,给药和施用本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子。在此背景中考虑的因素包括治疗的特定病症,治疗的特定哺乳动物,个体患者的临床状况,病症的起因,药剂的投递部位,施用方法,施用时间安排以及医学从业人员已知的其它因素。

[0431] 在一个方面,提供用作药物的本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子。在别的方面,提供用于治疗疾病的本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子。在某些实施方案中,提供用于治疗方法的本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子。在一个实施方案中,本发明提供如本文中描述的T细胞活化性双特异性抗原结合分子,用于治疗有此需要的个体中的疾病。在某些实施方案中,本发明提供T细胞活化性双特异性抗原结合分子,用于治疗患有疾病的个体的方法,所述方法包括对所述个体施用治疗有效量的T细胞活化性双特异性抗原结合分子。在某些实施方案中,待治疗的疾病是增殖性病症。在一个具体的实施方案中,所述疾病是癌症,特别是B细胞癌症。在某些实施方案中,所述方法进一步包括对个体施用治疗有效量的至少一种另外的治疗剂,例如抗癌剂(如果待治疗的疾病是癌症的话)。在别的实施方案中,本发明提供如本文中描述的T细胞活化性双特异性抗原结合分子,用于诱导靶细胞,特别是B细胞的裂解。在某些实施方案中,本发明提供T细胞活化性双特异性抗原结合分子,用于在个体中诱导靶细胞,特别是B细胞裂解的方法,该方法包括对该个体施用有效量的T细胞活化性双特异性抗原结合分子以诱导靶细胞的裂解。依照上文任何实施方案的“个体”是哺乳动物,优选是人。

[0432] 在一个别的方面,本发明提供本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子在制造或制备药物中的用途。在一个实施方案中,所述药物用于治疗有此需要的个体中的疾病。在一个别的实施方案中,所述药物用于治疗疾病的方法,该方法包括对患疾病的个体施用治疗有效量的药物。在某些实施方案中,待治疗的疾病是增殖性病症。在一个具体的实施方案中,所述疾病是癌症,特别是B细胞癌症。在一个实施方案中,所述方法进一步包括对个体施用治疗有效量的至少一种另外的治疗剂,例如抗癌剂(如果待治疗的疾病是癌症的话)。在一个别的实施方案中,所述药物用于诱导靶细胞,特别是B细胞的裂解。仍在别的实施方案中,所述药物用于在个体中诱导靶细胞,特别是B细胞裂解的方法,所述方法包括对该个体施用有效量的药物以诱导靶细胞的裂解。依照上文任何实施方案的“个体”可以是哺乳动物,优选是人。

[0433] 在一个别的方面,本发明提供用于治疗疾病的方法。在一个实施方案中,所述方法包括对患有此类疾病的个体施用治疗有效量的本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子。在一个实施方案中,对所述个体施用组合物,其包含药学可接受的形式本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子。在某些实施方案中,待治疗的疾病是增殖性病症。在一个

具体的实施方案中,所述疾病是癌症,特别是B细胞癌症。在某些实施方案中,所述方法进一步包括对个体施用治疗有效量的至少一种另外的治疗剂,例如抗癌剂(如果待治疗的疾病是癌症的话)。依照上文任何实施方案的“个体”可以是哺乳动物,优选是人。

[0434] 在一个别的方面,本发明提供一种用于诱导靶细胞,特别是B细胞裂解的方法。在一个实施方案中,所述方法包括在存在T细胞,特别是细胞毒性 T细胞的情况下使靶细胞与本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子接触。在一个别的方面,提供一种用于在个体中诱导靶细胞,特别是B细胞裂解的方法。在一个此类实施方案中,所述方法包括对个体施用有效量的T细胞活化性双特异性抗原结合分子以诱导靶细胞裂解。在一个实施方案中,“个体”是人。

[0435] 在某些实施方案中,所述待治疗的疾病是增殖性病征,特别是癌症。癌症的非限制性例子包括膀胱癌,脑癌,头和颈癌,胰腺癌,肺癌,乳腺癌,卵巢癌,子宫癌,宫颈癌,子宫内膜癌,食道癌,结肠癌,结肠直肠癌,直肠癌,胃癌,前列腺癌,血液癌,皮肤癌,鳞状细胞癌,骨癌和肾癌。其它可使用本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子治疗的细胞增殖病征包括但不限于位于下列各项中的新生物:腹部,骨,乳房,消化系统,肝,胰,腹膜,内分泌腺(肾上腺,副甲状腺,垂体,睾丸,卵巢,胸腺,甲状腺),眼,头和颈,神经系统(中枢和外周),淋巴系统,骨盆,皮肤,软组织,脾,胸区,和泌尿生殖系统。还包括癌症前期状况或损伤以及癌症转移。在某些实施方案中,癌症是B细胞癌症。在一个实施方案中, B细胞癌症是B细胞淋巴瘤或B细胞白血病。在一个实施方案中,B细胞癌症是非何杰金氏淋巴瘤或急性成淋巴细胞性白血病或慢性淋巴细胞性白血病。熟练技术人员容易地认可在许多情况下,T细胞活化性双特异性抗原结合分子可能不提供治愈而仅可以提供部分益处。在一些实施方案中,具有一些益处的生理学变化也被视为治疗有益的。如此,在一些实施方案中,提供生理学变化的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的量被视为“有效量”或“治疗有效量”。需要治疗的受试者,患者或个体通常为哺乳动物,更特定地为人类。

[0436] 在一些实施方案中,对细胞施用有效量的本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子。在其它实施方案中,对个体施用治疗有效量的本发明的T 细胞活化性双特异性抗原结合分子以治疗疾病。

[0437] 为了预防或治疗疾病,本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的合适剂量(当单独或与一种或多种其它另外的治疗剂组合使用时)将取决于待治疗的疾病的类型,施用路径,患者的体重,T细胞活化性双特异性抗原结合分子的类型,疾病的严重程度和进程,施用T细胞活化性双特异性抗原结合分子是为了预防还是治疗目的,先前或同时的治疗干预,患者的临床史和对T细胞活化性双特异性抗原结合分子的响应,以及主治医师的判断。负责施用的从业人员将在任何事件中确定组合中活性成分的浓度和用于个体受试者的合适剂量。本文中涵盖各种给药方案,包括但不限于在各个时间点的单次或多次施用,推注施用,和脉冲输注。

[0438] 所述T细胞活化性双特异性抗原结合分子适宜地在一次或一系列治疗里对患者施用。根据疾病的类型和严重程度,约1 μ g/kg至15mg/kg(例如0.1 mg/kg-10mg/kg)的T细胞活化性双特异性抗原结合分子可以是用于对患者施用的起始候选剂量,不管是例如通过一次或多次分开的施用,还是通过连续输注进行。根据上文提及的因素,一种典型的每日剂量的范围可以从约1 μ g/kg至100mg/kg或更多。对于在数天或更长时间里的重复施用,根据状况,

治疗一般将持续直至发生对疾病症状的期望的抑制。T细胞活化性双特异性抗原结合分子的一种例示性剂量将在约0.005mg/kg至约10mg/kg的范围内。在其它非限制性例子中,剂量还可包括每次施用从约1微克/kg体重,约5微克/kg体重,约10微克/kg体重,约50微克/kg体重,约100微克/kg 体重,约200微克/kg体重,约350微克/kg体重,约500微克/kg体重,约1毫克/kg体重,约5毫克/kg体重,约10毫克/kg体重,约50毫克/kg体重,约100 毫克/kg体重,约200毫克/kg体重,约350毫克/kg体重,约500毫克/kg体重,至约1000mg/kg体重或更多,以及其中可导出的任何范围。在从本文列出的数量可导出的范围的非限制性例子中,基于上文描述的数目,可以施用约5mg/kg体重至约100mg/kg体重的范围,约5微克/kg体重至约500毫克/kg 体重的范围等。如此,可以对患者施用一剂或多剂的约0.5mg/kg,2.0 mg/kg,5.0mg/kg或10mg/kg (或其任意组合)。可以间歇地施用此类剂量,例如每周或每3周(例如使得患者接受约2至约20,或例如约6剂的T细胞活化性双特异性抗原结合分子)。可以施用起始较高的加载剂量,继之以一剂或多剂较低剂量。然而,可以使用其它剂量方案。通过常规技术和测定法容易监测该疗法的进行。

[0439] 本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子一般将以对于实现意图的目的有效的量使用。对于治疗或预防疾病状况的用途,以治疗有效量施用或应用本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子,或其药物组合物。治疗有效量的确定完全在本领域技术人员的能力以内,尤其根据本文中提供的详细公开内容。

[0440] 对于系统性施用,能从体外测定法如细胞培养测定法初步估算出治疗有效剂量。然后可以在动物模型中配制剂量以达到包含如在细胞培养中测定的 IC_{50} 的循环浓度范围。可以将此类信息用于更准确地确定人中的可用剂量。

[0441] 使用本领域中公知的技术,还能从体内数据例如动物模型估算出初始剂量。本领域中的普通技术人员能容易地基于动物数据优化对人的施用。

[0442] 可以分别调整剂量量和时间间隔以提供足以维持治疗效果的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的血浆水平。通过注射施用的可用患者剂量的范围为从约0.1至50mg/kg/天,通常约0.5至1mg/kg/天。可以通过每日施用多剂实现治疗有效的血浆水平。可以例如通过HPLC测量血浆中的水平。

[0443] 在局部施用或选择性摄取的情况下,T细胞活化性双特异性抗原结合分子的有效局部浓度可能与血浆浓度无关。本领域技术人员会能够在无需过度实验的情况下优化治疗有效的局部剂量。

[0444] 本文中描述的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的治疗有效剂量一般将提供治疗益处,而不导致实质性毒性。可以通过在细胞培养物或实验动物中的标准药理学规程来测定T细胞活化性双特异性抗原结合分子的毒性和治疗功效。可以使用细胞培养测定法和动物研究来测定 LD_{50} (对50%的群体致命的剂量)和 ED_{50} (在50%的群体中治疗有效的剂量)。毒性和治疗效果之间的剂量比率为治疗指数,其可以表述为 LD_{50}/ED_{50} 比。优选展现出较大治疗指数的T细胞活化性双特异性抗原结合分子。在一个实施方案中,依照本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子展现出高治疗指数。可以将从细胞培养测定法和动物研究获得的数据用来制定适用于人的剂量范围。优选地,剂量处于具有很小或无毒性的循环浓度(包含 ED_{50})的范围内。剂量在此范围内可以随多种因素,例如采用的剂量形式,利用的施用路径,受试者的状况等而变化。鉴于患者的状况,各个内科医生可以选择确切的配制剂,施

用路径和剂量(参见例如Fingl等,1975,于:The Pharmacological Basis of Therapeutics,Ch.1,p.1,通过提述完整并入本文)。

[0445] 用本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子治疗的患者的主治内科医生将知晓如何及何时终止,中断或调整施用(由于毒性,器官功能障碍等)。相反,如果临床应答不适当(排除毒性),主治内科医生还将知晓如何将治疗调整至更高水平。在感兴趣的病症的管理中的施用剂量的量级将随待治疗的状况的严重程度,施用路径等而变化。可以例如部分地通过标准的预后评估方法来评估状况的严重程度。另外,剂量以及可能的给药频率也将随个体患者的年龄,体重和应答而变化。

[0446] 其它药剂和治疗

[0447] 本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子可以与一种或多种其它药剂在疗法中组合施用。例如,本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子可以与至少一种另外的治疗剂共施用。术语“治疗剂”涵盖施用以治疗需要此类治疗的个体中的症状或疾病的任何药剂。此类另外的治疗剂可以包含任何适用于所治疗的特定适应征的活性成分,优选地具有不会彼此不利影响的互补活性的那些活性成分。在某些实施方案中,另外的治疗剂是免疫调控剂,细胞抑制剂,细胞粘着的抑制剂,细胞毒剂,细胞凋亡的激活剂,或提高细胞对凋亡诱导剂的敏感性的药剂。在一个具体的实施方案中,另外的治疗剂是抗癌剂,例如微管破坏物,抗代谢物,拓扑异构酶抑制剂,DNA嵌入剂,烷化剂,激素疗法,激酶抑制剂,受体拮抗剂,肿瘤细胞凋亡的激活剂,或抗血管生成剂。

[0448] 此类其它药剂以对意图目的有效的量适宜地组合存在。此类其它药剂的有效量取决于使用的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的量,病症或治疗的类型以及上文所述其它因素。所述T细胞活化性双特异性抗原结合分子一般以与本文中描述的相同的剂量和施用路径,或以本文中描述的剂量的约1至99%,或通过凭经验/临床上确定为合适的任何剂量和任何路径使用。

[0449] 上文记载的此类组合疗法涵盖组合施用(其中在同一组合物或分别的组合物中包含两种或更多种治疗剂)和分开施用,在该情况中,本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子的施用可以在施用另外的治疗剂和/或辅助剂之前,同时和/或之后发生。本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子还可以与放射疗法组合使用。

[0450] 制品

[0451] 在本发明的另一个方面,提供含有可用于治疗,预防和/或诊断上文描述的病症的材料的制品。所述制品包含容器和容器上或与容器联合的标签或包装插页。合适的容器包括例如瓶,管形瓶,注射器,IV溶液袋等。所述容器可从多种材料如玻璃或塑料形成。所述容器容纳组合物,其自身或其它组合物组合对于治疗,预防和/或诊断状况是有效的,并且可以具有无菌的存取口(例如,容器可以是具有由皮下注射针可穿过的塞子的静脉内溶液袋或管形瓶)。组合物中至少一种活性成分是本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子。标签或包装插页指示该组合物用于治疗选择的状况。此外,所述制品可以包含(a)其中含有组合物的第一容器,其中所述组合物包含本发明的T细胞活化性双特异性抗原结合分子;和(b)其中含有组合物的第二容器,其中所述组合物包含另外的细胞毒性或其它方面治疗剂。本发明的这一实施方案中的制品还可以包含包装插页,其指示该组合物可用于治疗特定状况。或者/另外,所述制品还可以包含第二(或第三)容器,其包含药学可接受缓冲液,

如抑菌性注射用水 (BWF1), 磷酸盐缓冲盐水, 林格 (Ringer) 氏溶液和右旋糖溶液。它可以进一步包含从商业和用户观点看期望的其它材料, 包括其它缓冲液, 稀释剂, 滤器, 针, 和注射器。

实施例

[0452] 下面是本发明的方法和组合物的实施例。应当理解, 鉴于上文提供的一般性描述, 可以实践各种其他实施方案。

[0453] 通用方法

[0454] 重组DNA技术

[0455] 使用标准方法操作DNA, 如Sambrook et al., *Molecular cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989中描述的。依照制造商的说明书使用分子生物学试剂。关于人免疫球蛋白轻和重链的核苷酸序列的一般信息参见: Kabat, E. A. et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., NIH Publication No 91-3242。

[0456] DNA测序

[0457] 通过双链测序来测定DNA序列。

[0458] 基因合成

[0459] 在需要的情况下, 期望的基因区段使用适宜的模板通过PCR来生成或由Genart AG (Regensburg, Germany) 通过自动化基因合成从合成的寡核苷酸和PCR产物合成。在确切基因序列不可得的情况下, 基于来自最近的同源物的序列设计寡核苷酸引物, 并通过RT-PCR从源自适宜组织的RNA分离基因。将侧翼为单一限制性内切核酸酶切割位点的基因区段克隆入标准的克隆/测序载体。从经转化的细菌纯化质粒DNA, 并通过UV分光术测定浓度。通过DNA测序确认亚克隆的基因片段的DNA序列。基因区段设计为具有合适的限制性位点以允许亚克隆入相应的表达载体。所有构建体均设计为具有编码前导肽的5'端DNA序列, 该前导肽在真核细胞中将蛋白质靶向分泌。

[0460] 人源化CD19抗体的制备

[0461] 如欧洲专利申请No. EP 15187820.4 (通过援引完整收入本文) 中所述制备人源化CD19结合物 (变体5)。如其中所示, 通过引入重链可变区第64位处N (Asn) 变成Q (Gln) 的点突变 (编号方式依照Kabat) 和轻链可变区的第26e位处S (Ser) 变成P (Pro) 的点突变 (编号方式依照Kabat), 这种抗体具有与其它人源化变体相比改善的稳定性, 特别是脱酰胺稳定性。在这种改进的人源化抗人CD19抗体中, 亲本鼠抗体 (8B8, WO 2011/147834) 的人/食蟹猴交叉反应性得到保留。

[0462] 有和无电荷修饰的抗CD19/抗CD3 T细胞双特异性 (TCB) 分子的制备

[0463] 在这个实施例中制备了下述分子, 它们的示意图显示于图2:

[0464] A. 有电荷修饰的“2+1 IgG CrossFab, 倒转的” (CD3结合物中的VH/VL交换, CD19结合物中的电荷修饰, 亲本鼠CD19结合物 (8B8)) (图2A, SEQ ID NO 22-25)

[0465] B. 无电荷修饰的“2+1 IgG CrossFab, 倒转的” (CD3结合物中的CH1/CL交换, 亲本鼠CD19结合物 (8B8)) (图2B, SEQ ID NO 26-29)

[0466] C. 有电荷修饰的“2+1 IgG CrossFab, 倒转的” (CD3结合物中的VH/VL交换, CD19结

合物中的电荷修饰,人源化CD19结合物(变体5))(图2C,SEQ ID NO 24,30-32)

[0467] D.无电荷修饰的“2+1 IgG CrossFab,倒转的”(CD3结合物中的CH1/CL交换,鼠CD19结合物10C1)(图2D,SEQ ID NO 28,41-43)

[0468] E.无电荷修饰的“1+1 IgG CrossFab,倒转的”(CD3结合物中的CH1/CL交换,亲本鼠CD19结合物(8B8))(图2E,SEQ ID NO 27-29,44)

[0469] F.有电荷修饰的“1+1 IgG CrossMab”(CD3结合物中的VH/VL交换,CD19结合物中的电荷修饰,亲本鼠CD19结合物(8B8))(图2F,SEQ ID NO 22,24, 25,45)

[0470] G.有电荷修饰的“2+1 IgG CrossFab,倒转的”(CD19结合物中的VH/VL交换,CD3结合物中的电荷修饰,亲本鼠CD19结合物(8B8))(图2G,SEQ ID NO 46-49)

[0471] H.有电荷修饰的“2+1 IgG CrossFab,倒转的”(CD3结合物中的VH/VL交换,CD19结合物中的电荷修饰,人源化CD19结合物2B11)(图2H,SEQ ID NO 24,114-116)。

[0472] 将重和轻链可变区DNA序列与预先插入相应接受哺乳动物表达载体中的恒定重链或恒定轻链同框亚克隆。蛋白质表达受MPSV启动子驱动且合成的polyA信号序列位于CDS的3'端。另外,每种载体含有EBV OriP序列。

[0473] 该分子是如下生成的,即使用聚乙烯亚胺(PEI)用哺乳动物表达载体共转染悬浮生长的HEK293-EBNA细胞。用相应的表达载体以1:2:1:1比率(A,C和H:“载体重链(VH-CH1-VL-CH1-CH2-CH3)”：“载体轻链(VL-CL)”：“载体重链(VH-CH1-CH2-CH3)”：“载体轻链(VH-CL)”；B和D:“载体重链(VH-CH1-VH-CL-CH2-CH3)”：“载体轻链(VL-CL)”：“载体重链(VH-CH1-CH2-CH3)”：“载体轻链(VL-CH1)”；G:“载体重链(VL-CH1-VH-CH1-CH2-CH3)”：“载体轻链(VL-CL)”：“载体重链(VL-CH1-CH2-CH3)”：“载体轻链(VH-CL)”)或1:1:1:1比率(E:“载体重链(VH-CH1-VH-CL-CH2-CH3)”：“载体轻链(VL-CL)”：“载体重链(CH2-CH3)”：“载体轻链(VL-CH1)”；F:“载体重链(VL-CH1-CH2-CH3)”：“载体轻链(VH-CL)”：“载体重链(VH-CH1-CH2-CH3)”：“载体轻链(VL-CL)”)转染细胞。

[0474] 对于转染,在含有6mM L-谷氨酰胺和250mg/l G418的无血清Excell培养基中悬浮培养HEK293EBNA细胞。对于在600ml Tubespun烧瓶(最大工作体积400ml)中的生产,在转染前24小时接种 600×10^6 个HEK293EBNA细胞。对于转染,将细胞以 $210 \times g$ 离心5分钟,并用20ml预热的CD CHO培养基替换上清液。在20ml CD CHO培养基中混合表达载体至最终量为400 μ g DNA。在添加1080 μ l PEI溶液(2.7 μ g/ml)后,将混合物涡旋振荡15秒,随后于室温温育10分钟。之后,将细胞与DNA/PEI溶液混合,转移至600ml Tubespun烧瓶,并于37 $^{\circ}$ C在具有5%CO₂气氛的温箱中温育3小时。温育后,添加360ml Excell+6mM L-谷氨酰胺+5g/L Pepsoy+1.0mM VPA培养基并将细胞培养24小时。在转染后一天,添加7%补料1。在7天后,收集培养上清液进行纯化,即以 $3600 \times g$ (Sigma 8K离心机)离心20-30分钟,将溶液无菌过滤(0.22 μ m滤器),并以0.01%w/v的终浓度添加叠氮化钠。将溶液保持于4 $^{\circ}$ C。

[0475] 通过蛋白A-HPLC测定培养液中该分子的浓度。分离的基础是pH 8.0时含Fc分子对蛋白A的结合和自pH 2.5起的阶梯洗脱。有两种流动相。这些是 Tris(10mM)-甘氨酸(50mM)-NaCl(100mM)缓冲液,除了将它们调节至不同pH(8和2.5)以外是相同的。柱体是Upchurch 2x20mm前置柱,内部体积 $\sim 63 \mu$ l,填充POROS 20A。以流速0.5ml/min在经过平衡的材料上注射100 μ l每种样品。0.67分钟后,用达到pH 2.5的pH梯级洗脱样品。通过测定280nm吸光度及使用人IgG1自16至166mg/l的浓度范围的标准曲线的计算进行量化。

[0476] 自细胞培养物上清纯化分泌的蛋白质,其通过蛋白A亲和层析,继之以大小排阻层析步骤进行。

[0477] 对于亲和层析,将上清液加载到用25ml 20mM磷酸钠,20mM柠檬酸钠,pH 7.5平衡的HiTrap蛋白A HP柱(CV=5ml,GE Healthcare)上。通过用至少10个柱体积的20mM磷酸钠,20mM柠檬酸钠,pH 7.5清洗来去除未结合的蛋白质,并在6个柱体积的20mM柠檬酸钠,100mM氯化钠,100mM甘氨酸,pH 3.0中洗脱靶蛋白。通过添加1/10的0.5M磷酸钠pH 8.0来中和蛋白质溶液。将靶蛋白浓缩并过滤,之后加载到用20mM组氨酸,140mM氯化钠,0.01%Tween20,pH 6.0平衡的HiLoad Superdex 200柱(GE Healthcare)上。

[0478] 对于蛋白A层析后的联机分析,通过还原剂缺失下的SDS-PAGE和考马斯(InstantBlue™,Expedeon)染色来分析单一级分中分子的纯度和分子量。依照制造商的说明书使用NuPAGE®预制凝胶系统(4-12%Bis-Tris, Invitrogen)。

[0479] 通过测量280nm处的光密度(OD)来测定经过纯化的蛋白质样品的蛋白质浓度,其使用基于氨基酸序列计算的摩尔消光系数进行。

[0480] 通过在还原剂存在和缺失下的CE-SDS分析来分析分子的最终纯度和分子量。依照制造商的说明书使用Caliper LabChip GXII系统(Caliper Lifescience)。

[0481] 使用TSKgel G3000SW XL分析性大小排阻柱(Tosoh)在25mM K₂HPO₄,125mM NaCl,200mM L-精氨酸单氢氯化物,0.02%(w/v) NaN₃,pH 6.7运行缓冲液中于25°C分析分子的聚集体含量。

[0482] 遵循相同的方法生成并纯化所有分子。

[0483] 对于分子A-C和H,三种有电荷修饰的“2+1 IgG CrossFab,倒转的”分子(分子A,C和H)的最终回收率是最高的且最终质量很好,具有超过99%的单体含量(分子C和H拖尾(tailing))及CE-SDS上超过96%的纯度(表1和2,图3A, 3C和3H)。分子B并不含有CD19 Fab中的电荷修饰。这对通过CE-SDS和分析性SEC显示的最终质量有影响(表1和2,图3B)。质量的差异在第一个纯化步骤之后在SDS-PAGE上多半是可见的(图4A,4B,4C,4H)。分子B含有比分子A,C和H更多的150kDa和70kDa(半分子和大概缺失轻链的构建物)处的副产物。对于分子A,C和H,这份制备物内主要的级分是靶分子且低分子量杂质可以通过最终的纯化步骤去除(表1和2,图3A,3C,3H)。

[0484] 分子E,F和G能以较好的质量(>98%单体含量)和CE-SDS上>93%的纯度制备(表1和2,图3E,3F和3G)。分子D具有略微不太好的质量,具有96%左右的单体含量和CE-SDS上70%的纯度(表1和2,图3D)。

[0485] 表1:有和无电荷修饰的抗CD19/抗CD3 TCB分子的生成和纯化的汇总。

[0486]

分子	滴度	回收率	产量	分析性SEC(HMW/单体/LMW)
----	----	-----	----	--------------------

	(mg/l)	[%]	(mg/l)	[%]
A	13.8	28	3.93	0/100/0
B	30.4	9	2.77	1/97.3/1.7
C	123	21	25.8	0.5/99.5/拖尾
D	23	17	4	0/95.6/拖尾
E	33	10	3	1.4/98.6/0
F	39	18	7	0/100/0
G	25	25	6	0/100/0
H	64	38	24	0/100/拖尾

[0488] 表2:有和无电荷修饰的抗CD19/抗CD3 TCB分子的CE-SDS分析(非还原性)。

分子	峰编号	大小[kDa]	纯度[%]
A	1	220.9	100
B	1	94.6	2
	2	183.2	4.2
	3	205	5.2
	4	212.2	6.7
	5	221	81.9
C	1	172	3.2
	2	206	96.8
D	1	183	3
	2	207	27
	3	219	70
E	1	66	4
	2	152	2
	3	176	94
F	1	68	3
	2	177	97
G	1	171	3
	2	197	4
	3	216	93
H	1	167	2
[0490]	2	196	98

[0491] 在下面五个实施例中,分子B称作“CD19 TCB_8B8”。还测试了结构相同但基于CD19结合物10C1 (SEQ ID NO:33的VH,SEQ ID NO:34的VL) 的TCB(分子D,在下面五个实施例中称作“CD19 TCB_10C1”)。“DP47 TCB”指与分子B具有相同结构但具有不结合任何已知蛋白质的DP47结合物 (SEQ ID NO:35的VH,SEQ ID NO:36的VL) 代替CD19结合物的非靶向性TCB(用作阴性对照)。

[0492] CD19 IgG和CD19 TCB对表达人CD19和CD3的靶细胞的结合

[0493] 使用表达CD19的伯基特氏淋巴瘤细胞 (Raji) 和表达CD3的永生T淋巴细胞系 (Jurkat) 测试CD19 IgG和CD19 TCB对表达人CD19和CD3的靶细胞的结合。简言之,收获细胞,计数,检查存活力并在FACS缓冲液 (100 μ l PBS 0.1%BSA) 中以 2×10^6 个细胞/ml重悬浮。将100 μ l细胞悬浮液 (含有 0.2×10^6 个细胞) 与递增浓度的CD19 IgG和CD19 TCB (10pM-200nM) 一起在圆底96孔板中于4 $^{\circ}$ C温育30分钟,用冷PBS 0.1%BSA清洗两次,与PE缀合的AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗人IgG,Fc γ 片段特异性二抗 (Jackson Immuno Research Lab PE#109-116-170) 一起于4 $^{\circ}$ C再温育另外30分钟,用冷PBS 0.1%BSA清洗两次并立即使用FACS CantoII (Software FACS Diva) 通过对活的DAPI阴性细胞设门通过FACS分析。

[0494] 结果在图5中显示。图5A显示CD19 IgG和CD19 TCB对Raji细胞的结合。CD19克隆 (作为IgG和TCB的8B8和10C1) 展示相当的对表达CD19的细胞的结合 (对表达CD19的细胞的结合的EC50值在3-8nM范围中)。与结合有关的结合曲线和EC50值使用GraphPadPrism5计算并在表3中给出。图5B显示 CD19 TCB (基于8B8和10C1克隆) 对表达CD3的Jurkat细胞的结合。两种克隆展示相当的对Jurkat细胞的结合。由于结合曲线未达到饱和,因此无法计算EC50值。

[0495] 表3:CD19 IgG和CD19 TCB对表达人CD19的靶Raji细胞的结合的EC50值 (nM)

	抗体	EC50 [nM]	EC50 [ng/ml]
[0496]	CD19_IgG_8B8	3.1	455
	CD19_TCB_8B8	4.1	795
	CD19_IgG_10C1	5.2	763
[0497]	CD19_TCB_10C1	7.7	1493

[0498] 由CD19 TCB抗体介导的表达CD19的肿瘤细胞裂解和随后T细胞活化

[0499] 在NaIm-6 (B细胞前体白血病ALL,70000个CD19结合位点),Z-138细胞 (套细胞淋巴瘤,10000个CD19结合位点) 和SUDHL-4 (B-NHL,40000个CD19结合位点) 上评估由CD19 TCB抗体介导的表达CD19的肿瘤细胞裂解和随后 T细胞活化。在用Z-138细胞进行的测定法中,作为另外的CD19 TCB抗体添加博纳吐单抗进行比较。使用人PBMC作为效应物并在与不同双特异性抗体一起温育18-21小时后检测肿瘤裂解。简言之,收获靶细胞,清洗,并使用圆底96孔板以30,000个细胞/孔的密度分配。通过自健康人供体获得的新鲜血液的Histopaque密度离心制备外周血单个核细胞 (PBMC)。用无菌PBS稀释新鲜血液并在Histopaque梯度 (Sigma,#10771) 上分层。离心 (450x g,30分钟,室温,无中断) 后,丢弃含有PBMC的界面上方的血浆并将PBMC转移至一个新的Falcon管,随后装填50ml PBS。将混合物离心 (350x g,10分钟,室温),丢弃上清液并将PBMC团粒用无菌PBS清洗两次 (离心步骤350x

g, 10分钟)。对所得PBMC群体自动计数 (ViCell) 并以 6×10^6 个细胞/ml在含有2%FCS和1% L-丙氨酰基-L-谷氨酰胺 (Biochrom, K0302) 的RPMI1640培养基中重悬浮。对于肿瘤裂解测定法, 以所示浓度 (范围为0.005pM-250pM, 一式三份) 添加抗体。以最终的效应对靶 (E:T) 比10:1将PBMC添加至靶细胞。于37°C, 5%CO₂温育20-24小时后通过量化由凋亡/坏死细胞释放放入细胞上清液的LDH (LDH 检测试剂盒, Roche Applied Science, #11 644 793 001) 来评估肿瘤细胞裂解。通过将靶细胞与1% Triton X-100一起温育来实现最大靶细胞裂解 (=100%)。最小裂解 (=0%) 指在没有双特异性构建物的情况下与效应细胞共温育的靶细胞。对于肿瘤细胞裂解后发生的T细胞活化的评估, 将细胞以400x g离心4分钟并用含有0.1% BSA的PBS清洗两次。依照供应商的说明书实施针对CD8 (FITC抗人CD8, Biolegend#344704或APCCy7, 抗人CD8, Biolegend#301016), CD4 (BV421抗人CD4, Biolegend#300532或APC抗人CD4, BD#555349), CD25 (APC抗人CD25, Biolegend#356110或PECy7抗人CD25, Biolegend#302612) 和CD69 (PE抗人CD69, Biolegend#310906或BV421抗人CD69, Biolegend#310930) 的表面染色。将细胞用150μl/孔含有0.1% BSA的PBS清洗两次并使用100μl/孔固定缓冲液 (BD#554655) 于4°C固定20分钟。离心后, 在100μl/孔PBS 0.1% BSA中重悬浮样品。在BD FACS CantoII上分析样品。

[0500] 结果在图6中显示。图6A-B显示CD19 TCB抗体 (基于8B8和10C1克隆) 诱导强且靶物特异性的CD19+靶细胞杀伤。CD19 TCB克隆8B8和10C1在诱导表达CD19的肿瘤细胞裂解方面总体相当, 克隆8B8略微优于克隆10C1, 如通过与用CD19 TCB 8B8克隆获得的肿瘤杀伤有关的EC50值 (使用 GraphPadPrism5计算) 略微更低描绘的 (表4)。图6C-F和6G-J显示两种CD19 TCB抗体在肿瘤杀伤后诱导T细胞活化方面也相当 (图6C-F, NaIm-6靶细胞杀伤后CD8和CD4 T细胞上的CD69和CD25表达; 图6G-J, SUDHL-4靶细胞杀伤后CD8和CD4 T细胞上的CD69和CD25表达), 克隆8B8略微优于克隆10C1, 如通过与T细胞活化有关的EC50值 (使用 GraphPadPrism5计算) 略微更低描绘的 (表5)。图6K显示由两种CD19 TCB抗体 (基于8B8和10C1克隆) 和博纳吐单抗介导的Z-138细胞裂解。CD19 TCB克隆8B8略微优于克隆10C1但与博纳吐单抗相当, 如通过与用CD19 TCB 8B8克隆获得的肿瘤杀伤有关的EC50值 (使用 GraphPadPrism5计算) 描绘的 (表6)。图6L-M和6N-O显示两种CD19 TCB抗体在肿瘤杀伤后诱导T细胞活化方面也相当 (图6L-M, CD8 T细胞上的CD69和CD25表达, 图6N-O, CD4 T细胞上的CD69和CD25表达), 克隆8B8略微优于克隆10C1但与博纳吐单抗相当的, 如通过与T细胞活化有关的EC50值 (使用GraphPadPrism5计算) 描绘的 (表7)。

[0501] 表4: 在表达CD19的肿瘤靶细胞上评估的由基于8B8和10C1克隆的CD19 TCB 抗体介导的肿瘤细胞裂解的EC50值 (pM)

[0502]

靶细胞	肿瘤裂解EC50 (pM) 克隆8B8	肿瘤裂解EC50 (pM) 克隆10C1
NaIm-6	1.7	2.1
SUDHL-4	0.8	3.4

[0503] 表5: 由CD19 TCB (克隆8B8和10C1) 介导的肿瘤细胞裂解后T细胞活化的 EC50值 (pM), 使用表达CD19的肿瘤靶细胞 (NaIm-6和SUDHL-4)

	活化标志物, 靶细胞	EC50 (pM)克隆8B8	EC50 (pM)克隆10C1
[0504]	CD25/CD4, Nalm-6	3.3	11.8
	CD25/CD8, Nalm-6	0.7	3.0
	CD69/CD4, Nalm-6	0.9	5.6
	CD69/CD8, Nalm-6	0.8	3.8
	CD25/CD4, SUDHL-4	3.9	9.7
[0505]	CD25/CD8, SUDHL-4	2.1	7.2
	CD69/CD4, SUDHL-4	2.0	5.2
	CD69/CD8, SUDHL-4	2.7	10.5

[0506] 表6:在表达CD19的Z-138肿瘤靶细胞上评估的由CD19 TCB抗体(基于8B8和 10C1克隆)和博纳吐单抗介导的肿瘤细胞裂解的EC50值(pM)

[0507]	肿瘤细胞裂解Z-138细胞(21h)	EC50 (pM)	EC50 (ng/ml)
	CD19 TCB_克隆8B8	4.1	0.8
	CD19 TCB_克隆10C1	11.1	2.2
	博纳吐单抗	4.8	0.26

[0508] 表7:由CD19 TCB(克隆8B8和10C1)和博纳吐单抗介导的Z-138肿瘤细胞裂解后T细胞活化的EC50值(pM)

	活化标志物	EC50 (pM)克隆8B8	EC50 (pM)克隆10C1	EC50 (pM)博纳吐单抗
[0509]	CD69/CD8	2.7	5.7	2.4
	CD25/CD8	2.4	5.9	4.5
	CD69/CD4	1.8	4.5	2.3
	CD25/CD4	2.4	6.7	3.7

[0510] 由CD19 TCB抗体(基于8B8和10C1克隆)介导的人全血中的B细胞消减和随后T细胞活化

[0511] 还使用来自健康志愿者的新鲜肝素化人血液评估由两种CD19 TCB抗体(基于8B8和10C1克隆)介导的正常B细胞消减和随后T细胞活化。简言之,在含有肝素的注射器中收集新鲜血液。在补充有TCB稀释液(10 μ L/孔)的96孔深板中分配血液等分试样(190 μ L/孔)并在增湿细胞温箱中在5%CO₂中于37 $^{\circ}$ C温育20-24小时。温育后,通过吸上吹下来混合血液,之后将35 μ L/孔血液等分试样转移至96孔圆底板并与荧光抗CD45(抗人CD45 PerCPCy5.5, Biologend#300506),抗CD4(抗人CD4 FITC, Biologend#300506),抗CD8(抗人CD8 APCCy7, Biologend#301016),抗CD22(抗人CD22 APC, Biologend#302510),抗CD25(抗人CD25 PECy7, Biologend#302612),抗CD14(抗人CD14 PE, Biologend#325606)和抗CD69(抗人CD69 BV421, Biologend#310930)一起在55 μ L总体积中温育进行流式细胞术。于室温(在黑暗中)温育15分钟后,添加180 μ L/孔FACS裂解溶液(BD Biosciences)以在流式细胞术之前

消减红细胞及固定细胞。图7A显示基于8B8克隆的CD19 TCB抗体在介导B细胞消减方面略微优于基于10C1克隆的CD19 TCB抗体。图7B突显了同一点,其显示B细胞消减后的T细胞活化(CD69标志物)。

[0512] CD19 TCB抗体(基于8B8和10C1克隆)对人和食蟹猴B和T细胞的结合

[0513] 通过评估对人和食蟹猴表达CD19的B细胞和表达CD3的CD4和CD8 T细胞的结合来评估CD19 TCB抗体(基于8B8和10C1克隆)的交叉反应性。简言之,自新鲜血液分离来自健康食蟹猴以及健康人供体的PBMC。用无菌PBS (2:1) 稀释新鲜人血液并在Histopaque梯度(Sigma,#H8889)上分层。离心(450 x g,30分钟,室温,无中断)后,丢弃含有PBMC的界面上方的血浆并将 PBMC转移至一个新的Falcon管,随后装填50ml PBS。将混合物离心(350x g,10分钟,室温)。使用5ml ACK裂解缓冲液(0.155M NH_4Cl +10mM KHCO_3 +0.1mM EDTA pH 7.3,在ddH₂O中,温育:5分钟,室温)裂解红细胞。添加10ml细胞培养基,之后离心,并将PBMC团粒用无菌PBS清洗两次(离心步骤300x g,10分钟)。用无菌PBS(1:1)稀释新鲜食蟹猴血液并在Histopaque梯度(Sigma,#10771)上分层。离心(520x g,30分钟,室温,无中断)后,将PBMC的宽条带转移至一个新的Falcon管,随后装填50ml PBS。将混合物离心(400x g,10分钟,4℃),丢弃上清液并用无菌PBS清洗 PBMC团粒(离心150x g,15分钟)。使用1ml ACK裂解缓冲液(0.155M NH_4Cl +10mM KHCO_3 +0.1mM EDTA pH 7.3,在ddH₂O中,温育:5分钟,室温)裂解红细胞。添加10ml细胞培养基,之后离心(300x g,10分钟,RT)。对所得人和食蟹猴PBMC群体自动计数(ViCell)。以 4×10^6 个细胞/ml在FACS缓冲液(PBS+0.1%BSA)中重悬浮PBMC。将100 μ l细胞悬浮液(含有 0.4×10^6 个细胞)接种入圆底96孔板并离心(420x g,4分钟)。丢弃上清液并将细胞与渐增浓度的CD19 TCB(0.05pM-200nM)一起于4℃温育30分钟,用冷PBS 0.1%BSA清洗两次,与PE缀合的AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗人IgG Fc γ 片段特异性二抗(Jackson Immuno Research Lab PE#109-116-170)和抗hu/cyno CD4 PerCPCy5.5(BD#552838),抗hu/cyno CD8 APCCy7(Biolegend #328824),抗hu/cyno CD20 PECy7(BD#560735)一起于4℃再温育另外30分钟,用冷PBS 0.1%BSA清洗两次并用BD FACS裂解溶液(BD#349202)固定,之后使用FACS CantoII(Software FACS Diva)通过FACS分析细胞。使用GraphPadPrism5获得结合曲线。

[0514] 图8A和8B显示CD19 TCB抗体(基于8B8和10C1克隆)对食蟹猴和人B细胞的结合,图8C和8D显示对食蟹猴和人CD4 T细胞的结合,而图8E和8F显示对食蟹猴和人CD8 T细胞的结合。

[0515] 由CD19 TCB抗体(基于8B8克隆)介导的人和食蟹猴全血中的B细胞消减和随后T细胞活化,与博纳吐单抗比较

[0516] 通过检测自健康志愿者新鲜分离的人和食蟹猴全血中的正常B细胞消减和随后T细胞活化来进一步评估CD19 TCB抗体(8B8克隆)的功能活性和交叉反应性。另外,将CD19 TCB(8B8克隆)的活性与相同测定法中的博纳吐单抗比较。简言之,在含有肝素的注射器中收集新鲜人血液并在Li-肝素真空管中收集食蟹猴血液。在补充有TCB稀释液(20 μ L/孔)的96孔深板中分配血液等分试样(180 μ L/孔)并在增湿细胞温箱中在5%CO₂中于37℃温育20小时。温育后,通过吸上吹下来混合血液,之后将35 μ L血液等分试样转移至96孔U底板并与荧光抗hu CD45 APC(BD#561290)或抗cyno CD45 APC(Biolegend#304037),抗hu/cyno CD4 PerCPCy5.5(BD#552838),抗hu/cyno CD8 APCCy7(BD#557760),抗hu/cyno CD20

PECy7 (BD#560735), 抗 hu/cyno CD25 PE (BD#557138) 和抗 hu/cyno CD69 BV421 (BD#562883) 一起在55 μ L总体积中温育进行流式细胞术。于室温 (在黑暗中) 温育15分钟后, 添加200 μ L/孔FACS裂解溶液 (BD#349202) 以在流式细胞术之前消滅红细胞及固定细胞。

[0517] 图9A-B和9C-D显示由CD19 TCB抗体 (8B8克隆) 和博纳吐单抗介导的食蟹猴 (左边小图) 和人 (右边小图) 全血中的B细胞消滅。图9A-B显示通过将B 细胞值针对CD4 T细胞标准化来获得%B细胞消滅的结果, 图9C-D显示将B 细胞值针对CD8 T细胞标准化来获得%B细胞消滅的结果。图9A-B和9C-D 显示CD19 TCB抗体 (8B8克隆) 具有人/食蟹猴交叉反应性且展示人和食蟹猴血液中相当的B细胞消滅。另外, CD19 TCB抗体 (8B8克隆) 展示人全血中与博纳吐单抗相当的活性。博纳吐单抗没有食蟹猴交叉反应性, 因而它并不介导食蟹猴中的B细胞消滅。图9E-L显示食蟹猴 (图9A, C, E, G, I, K) 和人 (图9B, D, F, H, J, L) 全血中CD19 TCB (8B8克隆) 和博纳吐单抗B 细胞消滅后发生的T细胞活化。

[0518] 由不同CD19 TCB抗体型式介导的肿瘤细胞裂解和随后T细胞活化的比较

[0519] 在Nalm-6 (B细胞前体白血病ALL, 70000个CD19结合位点) 和Z-138细胞 (套细胞淋巴瘤, 10000个CD19结合位点) 上评估由不同CD19 TCB抗体型式介导的肿瘤细胞裂解和随后T细胞活化的比较。测试下述CD19 TCB抗体型式 (均基于8B8克隆): 如图2B中所示分子B (在这个实施例中命名为“CD19 TCB_2+1_无电荷_倒转的”), 如图2E中所示分子E (在这个实施例中命名为“CD19 TCB_1+1_头至尾_无电荷_倒转的”) 和如图2F中所示分子F (在这个实施例中命名为“CD19 TCB_1+1_电荷”)。使用相应的非靶向性TCB型式 (即含有不靶向任何已知蛋白质的DP47结合物的TCB) 作为阴性对照。使用分离的人泛T细胞作为效应物并在与不同双特异性抗体型式一起温育21小时后检测肿瘤裂解。简言之, 收获靶细胞, 清洗, 并使用圆底96孔板以30,000个细胞/孔的密度分配。通过自健康人供体获得的新鲜肝素化血液的Histopaque密度离心制备外周血单个核细胞 (PBMC)。用无菌PBS (2:1) 稀释新鲜血液并在Histopaque梯度 (Sigma, #10771) 上分层。离心 (450x g, 30分钟, 室温, 无中断) 后, 丢弃含有PBMC的界面上方的血浆并将PBMC转移至一个新的 Falcon管, 随后装填50ml PBS。将混合物离心 (350x g, 10分钟, 室温), 丢弃上清液并将PBMC团粒用无菌PBS清洗两次 (离心步骤300x g, 10分钟)。对所得PBMC群体自动计数 (ViCell)。使用来自Miltenyi Biotec的泛T细胞分离试剂盒II (#130-091-156) 遵循试剂盒手册的说明书分离T细胞。

[0520] 对于肿瘤裂解测定法, 以所示浓度 (范围为0.1pM-1nM, 一式三份) 将抗体添加至接种的靶细胞。而且, 将抗人CD107a PE (Biolegend#328608) 添加入细胞培养物。以最终E:T比5:1将泛T细胞添加至靶细胞。于37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂温育21小时后通过量化由凋亡/坏死细胞释放入细胞上清液的LDH (LDH 检测试剂盒, Roche Applied Science, #11 644 793 001) 来评估肿瘤细胞裂解。通过将靶细胞与1% Triton X-100一起温育来实现最大靶细胞裂解 (=100%)。最小裂解 (=0%) 指在没有双特异性构建物的情况下与效应细胞共温育的靶细胞。对于肿瘤细胞裂解后发生的T细胞活化的评估, 收集上清液用于LDH释放之后将细胞以350x g离心5分钟并用含有0.1% BSA的PBS清洗两次。实施针对CD8 (APCCy7抗人CD8, Biolegend#301016), CD4 (FITC抗人 CD4, Biolegend#300506), CD69 (BV421抗人CD69, Biolegend#310930), 和CD25 (PECy7抗人CD25, Biolegend#302612) 的表面染色。将细胞用150 μ l/孔含有0.1% BSA的PBS清洗两次并使用含2% PFA的PBS 0.1% BSA固定。在BD FACS CantoII上分析样品。

[0521] 图10A和10B显示“CD19 TCB_2+1_无电荷_倒转的”展示与“CD19 TCB_1+1_头至尾_无电荷_倒转的”相当(Z-138细胞,图10B)或略微更优(Nalm-6,图10A)的肿瘤细胞裂解。这两种型式对这两种肿瘤靶细胞系均显著优于“CD19 TCB_1+1_电荷”。正如预期的,用非靶向性TCB对照没有观察到肿瘤细胞裂解。图10C-N显示两种CD19 TCB抗体型式(“CD19 TCB_2+1_无电荷_倒转的”和“CD19 TCB_1+1_头至尾_无电荷_倒转的”)在肿瘤杀伤后诱导T细胞活化方面也相当。更为重要的是,这两种型式均比“CD19 TCB_1+1_电荷”显著要好。

[0522] 表8:由不同CD19 TCB抗体型式介导的Z-138肿瘤细胞裂解的EC50值(pM)

肿瘤细胞裂解Z-138细胞(21h)	EC50(pM)	EC50(ng/ml)
“CD19 TCB_2+1_无电荷_倒转的”	3.2	0.62
“CD19 TCB_1+1_头至尾_无电荷_倒转的”	4.2	0.62
“CD19 TCB_1+1_电荷”	53.7	7.85

[0524] 表9:Z-138细胞裂解后由不同CD19 TCB抗体型式介导的肿瘤细胞裂解后T细胞活化的EC50值(pM)

活化标志物, Z-138细胞	“CD19 TCB_ 2+1_无电荷_ 倒转的”	“CD19 TCB_ 1+1_头至尾_ 无电荷_倒转的”	“CD19 TCB_ 1+1_电荷”
CD107/CD8	1.32	2.76	4.02
CD25/CD8	1.86	3.31	6.50
CD69/CD8	0.83	1.71	2.59
CD107/CD4	1.68	2.09	7.54
CD25/CD4	3.22	3.55	10.02
CD69/CD4	1.01	1.04	3.97

[0526] 不同CD19 TCB抗体型式(基于8B8克隆)对表达人CD19和CD3的靶细胞的结合

[0527] 在表达人CD19的靶细胞(Nalm-6和正常人B细胞)和表达人CD3的靶细胞(CD4,CD8 T细胞和Jurkat细胞)上评估不同CD19 TCB抗体型式(基于8B8克隆)的结合。测试下述CD19 TCB抗体型式:如图2B中所示分子B(在这个实施例中命名为“CD19 TCB_2+1_无电荷_倒转的”)和如图2A中所示分子A(在这个实施例中命名为“CD19 TCB_2+1_电荷CD19_倒转的”)。使用非靶向性TCB(即具有与分子B相同的型式但含有不靶向任何已知蛋白质的DP47结合物的TCB)作为阴性对照。简言之,收获细胞,清洗,检查存活力,并以 1.5×10^6 个细胞/ml在FACS缓冲液(100 μ l PBS 0.1%BSA)中重悬浮。将100 μ l 细胞悬浮液(含有 0.15×10^6 个细胞)与递增浓度的CD19 TCB(50pM-200nM)一起在圆底96孔板中于4 $^{\circ}$ C温育30分钟,用冷PBS 0.1%BSA清洗两次,与PE缀合的AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗人IgG Fc γ 片段特异性二抗(Jackson Immuno Research Lab PE#109-116-170)一起于4 $^{\circ}$ C再温育另外30分钟,用冷PBS 0.1%BSA清洗两次,并立即使用FACS CantoII(Software FACS Diva)通过FACS分析。

[0528] 图11显示不同CD19 TCB抗体型式“CD19 TCB_2+1_无电荷_倒转的”和“CD19 TCB_2+1_电荷CD19_倒转的”对(A) Nalm-6细胞,(B) 正常人B细胞,(C) 正常人CD4 T细胞,(D) 正常

人CD8 T细胞,和(E) Jurkat细胞的结合。两种CD19 TCB抗体型式展示相当的对表达CD19和CD3的靶细胞二者的结合。由于结合曲线未达到饱和,因此无法计算结合的EC50值。使用非靶向性TCB作为阴性对照(它不结合表达CD19的靶细胞,但是它确实结合表达 CD3的靶细胞,因为它含有CD19 TCB抗体型式中包含的相同结合物,图11 A-E)。

[0529] 由不同CD19 TCB抗体型式介导的肿瘤细胞裂解和随后T细胞活化的比较

[0530] 在Nalm-6 (B细胞前体白血病ALL,70000个CD19结合位点)和Z-138细胞(套细胞淋巴瘤,10000个CD19结合位点)上评估由不同CD19 TCB抗体型式介导的肿瘤细胞裂解和随后T细胞活化的比较。测试下述CD19 TCB抗体型式(均基于8B8克隆):分子B(在这个实施例中命名为“CD19 TCB_2+1_无电荷_倒转的”),分子A(在这个实施例中命名为“CD19 TCB_2+1_电荷 CD19_倒转的”)和分子G(在这个实施例中命名为“CD19 TCB_2+1_电荷 CD3_倒转的”)。使用非靶向性TCB(即具有与分子B相同的型式但含有不靶向任何已知蛋白质的DP47结合物的TCB)作为阴性对照。使用分离的人泛T 细胞作为效应物并在与不同双特异性抗体型式一起温育21小时后检测肿瘤裂解。简言之,收获靶细胞,清洗,并使用圆底96孔板以50,000个细胞/孔的密度分配。通过自健康人供体获得的新鲜肝素化血液的Histopaque密度离心制备外周血单个核细胞(PBMC)。用无菌PBS稀释新鲜血液并在Histopaque梯度(Sigma,#10771)上分层。离心(450x g,30分钟,室温,无中断)后,丢弃含有PBMC的界面上方的血浆并将PBMC转移至一个新的Falcon管,随后装填50ml PBS。将混合物离心(350x g,10分钟,室温),丢弃上清液并将 PBMC团粒用无菌PBS清洗两次(离心步骤300x g和350x g,10分钟)。对所得PBMC群体自动计数(ViCell)。使用来自Miltenyi Biotec的泛T细胞分离试剂盒(#130-091-156)遵循试剂盒手册的说明书分离T细胞。对于肿瘤裂解测定法,以所示浓度(范围为0.1pM-1nM,一式三份)添加抗体。而且,将抗人CD107a PE (Biolegend#328608)添加入细胞培养物。以最终E:T比3:1将泛 T细胞添加至靶细胞。于37°C,5%CO₂温育21小时后通过量化由凋亡/坏死细胞释放入细胞上清液的LDH(LDH检测试剂盒,Roche Applied Science,#11 644 793 001)来评估肿瘤细胞裂解。通过将靶细胞与1%Triton X-100一起温育来实现最大靶细胞裂解(=100%)。最小裂解(=0%)指在没有双特异性构建物的情况下与效应细胞共温育的靶细胞。对于肿瘤细胞裂解后发生的T 细胞活化的评估,将PBMC以400x g离心4分钟并用含有0.1%BSA的PBS清洗。依照供应商的说明书实施针对CD8(APCCy7抗人CD8,Biolegend #301016),CD4(FITC抗人CD4,Biolegend#300506),CD69(BV421抗人 CD69,Biolegend#310930)和CD25(PECy7抗人CD25,Biolegend#302612)的表面染色。将细胞用150μl/孔含有0.1%BSA的PBS清洗两次并使用在PBS 0.1%BSA中稀释的2%PFA固定。在BD FACS CantoII上分析样品。

[0531] 图12A和12B显示“CD19 TCB_2+1_无电荷_倒转的”,“CD19 TCB_2+1_电荷CD19_倒转的”和“CD19 TCB_2+1_电荷CD3_倒转的”展示相当的Z-138 肿瘤细胞(B)和Nalm-6肿瘤细胞(A)二者裂解。正如预期的,用非靶向性TCB 对照没有观察到肿瘤细胞裂解。图12C-N显示“CD19 TCB_2+1_无电荷_倒转的”,“CD19 TCB_2+1_电荷CD19_倒转的”和“CD19 TCB_2+1_电荷CD3_倒转的”在肿瘤杀伤后诱导T细胞活化方面也相当。

[0532] 表10:由不同CD19 TCB抗体型式介导的Z-138肿瘤细胞裂解的EC50值(pM)

肿瘤细胞裂解Z-138细胞(21h)	EC50 (pM)	EC50 (ng/ml)
“CD19 TCB_2+1_无电荷_倒转的”	3.16	0.62

“CD19 TCB_2+1_电荷CD19_倒转的”	~4.70	0.92
“CD19 TCB_2+1_电荷CD3_倒转的”	2.93	0.57

[0534] 表11:Z-138细胞裂解后由不同CD19 TCB抗体型式介导的肿瘤细胞裂解后T 细胞活化的EC50值 (pM)

活化标志物, Z-138细胞	“CD19 TCB_ 2+1_无电荷_ 倒转的”	“CD19 TCB_ 2+1_电荷 CD19_倒转的”	“CD19 TCB_ 2+1_电荷 CD3_倒转的”
CD107/CD8	1.22	2.00	1.13
CD25/CD8	1.70	2.87	1.53
CD69/CD8	0.82	1.37	0.70
CD107/CD4	1.37	2.34	1.14
CD25/CD4	2.77	~4.58	1.85
CD69/CD4	~0.81	1.41	~0.75

[0536] 由含有人源化CD19结合物的CD19 TCB抗体介导的表达CD19的肿瘤细胞裂解和随后T细胞活化

[0537] 在Z-138细胞(套细胞淋巴瘤,10000个CD19结合位点)上评估由CD19 TCB抗体介导的表达CD19的肿瘤细胞裂解和随后T细胞活化。在这种测定法中,比较含有亲本鼠CD19结合物8B8的分子A(在这个实施例中命名为“CD19 TCB_8B8_电荷CD19_倒转的”)与含有人源化CD19结合物变体5的分子C(在这个实施例中命名为“CD19 TCB_人源化8B8_电荷CD19_倒转的”)和含有人源化CD19结合物2B11的分子H(在这个实施例中命名为“CD19 TCB_8B8-2B11_电荷CD19_倒转的”)。使用人PBMC作为效应物并在与不同双特异性抗体一起温育21小时后检测肿瘤裂解。简言之,收获靶细胞,清洗,并使用圆底96孔板以50,000个细胞/孔的密度分配。通过自健康人供体获得的新鲜血液的Histopaque密度离心制备外周血单个核细胞(PBMC)。用无菌PBS稀释新鲜血液并在Histopaque梯度(Sigma,#10771)上分层。离心(450x g,30分钟,室温,无中断)后,丢弃含有PBMC的界面上方的血浆并将PBMC转移至一个新的Falcon管,随后装填50ml PBS。将混合物离心(350 x g,10分钟,室温),丢弃上清液并将PBMC团粒用无菌PBS清洗两次(离心步骤300x g,10分钟)。对所得PBMC群体自动计数(ViCell)并以 5×10^6 个细胞/ml在含有10%FCS和1%L-丙氨酸-L-谷氨酰胺(Biochrom, K0302)的RPMI1640培养基中重悬浮。对于肿瘤裂解测定法,以所示浓度(范围为0.1 pM-1000pM,一式三份)添加抗体。而且,将抗人CD107a PE(Biolegend #328608)添加入细胞培养物。以最终E:T比5:1将PBMC添加至靶细胞。于37°C,5%CO₂温育20-24小时后通过量化由凋亡/坏死细胞释放入细胞上清液的LDH(LDH检测试剂盒,Roche Applied Science,#11644 793 001)来评估肿瘤细胞裂解。通过将靶细胞与2.67%Triton X-100一起温育来实现最大靶细胞裂解(=100%)。最小裂解(=0%)指在没有双特异性构建物的情况下与效应细胞共温育的靶细胞。对于肿瘤细胞裂解后发生的T细胞活化的评估,将细胞以400x g离心4分钟并用含有2%FCS,5mM EDTA和0.25%叠氮化钠(sodium azide)的PBS(FACS缓冲液)清洗两次。依照供应商的说明书实施针对CD8(APCCy7抗人CD8,Biolegend#301016),CD4

(PerCPy5.5抗人 CD4, BD#552838), CD25 (PECy7抗人CD25, BD#557741) 和CD69 (BV421抗人CD69, Biolegend#310930) 的表面染色。将细胞用150 μ l/孔 FACS缓冲液清洗两次并使用120 μ l/孔固定缓冲液 (BD#554655) 于4 $^{\circ}$ C固定 20分钟。在BD FACS CantoII上分析样品。

[0538] 图13A显示所有三种CD19 TCB抗体均诱导同等的CD19+靶细胞杀伤。含有亲本CD19结合物8B8的CD19 TCB和含有人源化CD19结合物变体5或 2B11的CD19 TCB之间没有显著差异。图13B-D和E-G显示三种CD19 TCB 抗体在肿瘤杀伤后诱导T细胞活化方面也相当。

[0539] ***

[0540] 尽管为了理解清楚的目的已经通过例示和实施例较为详细地描述了前述发明, 但是该描述和实施例不应解释为限制本发明的范围。通过提述明确完整收录本文中引用的所有专利和科学文献的公开内容。

[0001] 序列表

[0002] <110> 豪夫迈·罗氏有限公司(F. Hoffmann-La Roche AG)

[0003] <120> 双特异性抗CD19XCD3 T细胞活化性抗原结合分子

[0004] <130> P33121

[0005] <150> EP 15188093.7

[0006] <151> 2015-10-02

[0007] <150> EP 16169160.5

[0008] <151> 2015-05-11

[0009] <150> EP 16169160.5

[0010] <151> 2016-05-11

[0011] <160> 116

[0012] <170> PatentIn version 3.5

[0013] <210> 1

[0014] <211> 207

[0015] <212> PRT

[0016] <213> 人(Homo sapiens)

[0017] <400> 1

[0018] Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser

[0019] 1 5 10 15

[0020] Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr

[0021] 20 25 30

[0022] Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr

[0023] 35 40 45

[0024] Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys

[0025] 50 55 60

[0026] Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp

[0027] 65 70 75 80

[0028] His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr

[0029] 85 90 95

[0030] Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu

[0031] 100 105 110

[0032] Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met

[0033] 115 120 125

[0034] Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu

[0035] 130 135 140

[0036] Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys

[0037] 145 150 155 160

[0038] Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn

[0039]		165		170		175
[0040]	Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg					
[0041]		180		185		190
[0042]	Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile					
[0043]		195		200		205
[0044]	<210> 2					
[0045]	<211> 198					
[0046]	<212> PRT					
[0047]	<213> 食蟹猴(Macaca fascicularis)					
[0048]	<400> 2					
[0049]	Met Gln Ser Gly Thr Arg Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser					
[0050]	1	5		10		15
[0051]	Ile Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr					
[0052]		20		25		30
[0053]	Gln Thr Pro Tyr Gln Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr					
[0054]		35		40		45
[0055]	Cys Ser Gln His Leu Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys					
[0056]		50		55		60
[0057]	Asn Lys Glu Asp Ser Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu					
[0058]	65	70		75		80
[0059]	Met Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro					
[0060]		85		90		95
[0061]	Glu Asp Ala Ser His His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Cys Glu Asn					
[0062]		100		105		110
[0063]	Cys Met Glu Met Asp Val Met Ala Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp					
[0064]		115		120		125
[0065]	Ile Cys Ile Thr Leu Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys					
[0066]		130		135		140
[0067]	Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly					
[0068]	145	150		155		160
[0069]	Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn					
[0070]		165		170		175
[0071]	Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Gln Asp Leu Tyr Ser Gly					
[0072]		180		185		190
[0073]	Leu Asn Gln Arg Arg Ile					
[0074]		195				
[0075]	<210> 3					
[0076]	<211> 125					
[0077]	<212> PRT					

[0078] <213> 人工序列
 [0079] <220>
 [0080] <223> CD3 VH
 [0081] <400> 3
 [0082] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0083] 1 5 10 15
 [0084] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 [0085] 20 25 30
 [0086] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0087] 35 40 45
 [0088] Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 [0089] 50 55 60
 [0090] Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 [0091] 65 70 75 80
 [0092] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 [0093] 85 90 95
 [0094] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 [0095] 100 105 110
 [0096] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0097] 115 120 125
 [0098] <210> 4
 [0099] <211> 5
 [0100] <212> PRT
 [0101] <213> 人工序列
 [0102] <220>
 [0103] <223> CD3 HCDR1
 [0104] <400> 4
 [0105] Thr Tyr Ala Met Asn
 [0106] 1 5
 [0107] <210> 5
 [0108] <211> 19
 [0109] <212> PRT
 [0110] <213> 人工序列
 [0111] <220>
 [0112] <223> CD3 HCDR2
 [0113] <400> 5
 [0114] Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 [0115] 1 5 10 15
 [0116] Val Lys Gly

[0117] <210> 6
 [0118] <211> 14
 [0119] <212> PRT
 [0120] <213> 人工序列
 [0121] <220>
 [0122] <223> CD3 HCDR3
 [0123] <400> 6
 [0124] His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
 [0125] 1 5 10
 [0126] <210> 7
 [0127] <211> 109
 [0128] <212> PRT
 [0129] <213> 人工序列
 [0130] <220>
 [0131] <223> CD3 VL
 [0132] <400> 7
 [0133] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 [0134] 1 5 10 15
 [0135] Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 [0136] 20 25 30
 [0137] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
 [0138] 35 40 45
 [0139] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
 [0140] 50 55 60
 [0141] Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 [0142] 65 70 75 80
 [0143] Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 [0144] 85 90 95
 [0145] Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 [0146] 100 105
 [0147] <210> 8
 [0148] <211> 14
 [0149] <212> PRT
 [0150] <213> 人工序列
 [0151] <220>
 [0152] <223> CD3 LCDR1
 [0153] <400> 8
 [0154] Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
 [0155] 1 5 10

[0156] <210> 9
[0157] <211> 7
[0158] <212> PRT
[0159] <213> 人工序列
[0160] <220>
[0161] <223> CD3 LCDR2
[0162] <400> 9
[0163] Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
[0164] 1 5
[0165] <210> 10
[0166] <211> 9
[0167] <212> PRT
[0168] <213> 人工序列
[0169] <220>
[0170] <223> CD3 LCDR3
[0171] <400> 10
[0172] Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
[0173] 1 5
[0174] <210> 11
[0175] <211> 10
[0176] <212> PRT
[0177] <213> 人工序列
[0178] <220>
[0179] <223> 接头
[0180] <400> 11
[0181] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[0182] 1 5 10
[0183] <210> 12
[0184] <211> 11
[0185] <212> PRT
[0186] <213> 人工序列
[0187] <220>
[0188] <223> 接头
[0189] <400> 12
[0190] Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[0191] 1 5 10
[0192] <210> 13
[0193] <211> 225
[0194] <212> PRT

[0195] <213> 人(Homo sapiens)
 [0196] <400> 13
 [0197] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 [0198] 1 5 10 15
 [0199] Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 [0200] 20 25 30
 [0201] Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 [0202] 35 40 45
 [0203] Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 [0204] 50 55 60
 [0205] His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 [0206] 65 70 75 80
 [0207] Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 [0208] 85 90 95
 [0209] Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 [0210] 100 105 110
 [0211] Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 [0212] 115 120 125
 [0213] Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 [0214] 130 135 140
 [0215] Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 [0216] 145 150 155 160
 [0217] Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 [0218] 165 170 175
 [0219] Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 [0220] 180 185 190
 [0221] Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 [0222] 195 200 205
 [0223] His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 [0224] 210 215 220
 [0225] Pro
 [0226] 225
 [0227] <210> 14
 [0228] <211> 5
 [0229] <212> PRT
 [0230] <213> 人工序列
 [0231] <220>
 [0232] <223> CD19 HCDR1 (变体5)
 [0233] <400> 14

[0234]	Asp Tyr Ile Met His
[0235]	1 5
[0236]	<210> 15
[0237]	<211> 17
[0238]	<212> PRT
[0239]	<213> 人工序列
[0240]	<220>
[0241]	<223> CD19 HCDR2 (变体5)
[0242]	<400> 15
[0243]	Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe Gln
[0244]	1 5 10 15
[0245]	Gly
[0246]	<210> 16
[0247]	<211> 12
[0248]	<212> PRT
[0249]	<213> 人工序列
[0250]	<220>
[0251]	<223> CD19 HCDR3 (变体5)
[0252]	<400> 16
[0253]	Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr
[0254]	1 5 10
[0255]	<210> 17
[0256]	<211> 16
[0257]	<212> PRT
[0258]	<213> 人工序列
[0259]	<220>
[0260]	<223> CD19 LCDR1 (变体5)
[0261]	<400> 17
[0262]	Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Pro Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
[0263]	1 5 10 15
[0264]	<210> 18
[0265]	<211> 7
[0266]	<212> PRT
[0267]	<213> 人工序列
[0268]	<220>
[0269]	<223> CD19 LCDR1 (变体5)
[0270]	<400> 18
[0271]	Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
[0272]	1 5

[0273] <210> 19
 [0274] <211> 9
 [0275] <212> PRT
 [0276] <213> 人工序列
 [0277] <220>
 [0278] <223> CD19 LCDR3 (变体5)
 [0279] <400> 19
 [0280] Leu Gln Leu Thr His Val Pro Tyr Thr
 [0281] 1 5
 [0282] <210> 20
 [0283] <211> 121
 [0284] <212> PRT
 [0285] <213> 人工序列
 [0286] <220>
 [0287] <223> CD19 VH (变体5)
 [0288] <400> 20
 [0289] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 [0290] 1 5 10 15
 [0291] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 [0292] 20 25 30
 [0293] Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 [0294] 35 40 45
 [0295] Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
 [0296] 50 55 60
 [0297] Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 [0298] 65 70 75 80
 [0299] Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0300] 85 90 95
 [0301] Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
 [0302] 100 105 110
 [0303] Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 [0304] 115 120
 [0305] <210> 21
 [0306] <211> 112
 [0307] <212> PRT
 [0308] <213> 人工序列
 [0309] <220>
 [0310] <223> CD19 VL (变体5)
 [0311] <400> 21

[0351]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
[0352]	145 150 155 160
[0353]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
[0354]	165 170 175
[0355]	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
[0356]	180 185 190
[0357]	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
[0358]	195 200 205
[0359]	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
[0360]	210 215 220
[0361]	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
[0362]	225 230 235 240
[0363]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
[0364]	245 250 255
[0365]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
[0366]	260 265 270
[0367]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
[0368]	275 280 285
[0369]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
[0370]	290 295 300
[0371]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
[0372]	305 310 315 320
[0373]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
[0374]	325 330 335
[0375]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[0376]	340 345 350
[0377]	Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
[0378]	355 360 365
[0379]	Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[0380]	370 375 380
[0381]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
[0382]	385 390 395 400
[0383]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
[0384]	405 410 415
[0385]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
[0386]	420 425 430
[0387]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
[0388]	435 440 445
[0389]	Pro

[0390] <210> 23
 [0391] <211> 674
 [0392] <212> PRT
 [0393] <213> 人工序列
 [0394] <220>
 [0395] <223> CD19 (8B8) VH-CH1 (EE) -CD3 VL-CH1-Fc (节, P329G LALA)
 [0396] <400> 23
 [0397] Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 [0398] 1 5 10 15
 [0399] Ser Val Lys Met Ala Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 [0400] 20 25 30
 [0401] Ile Met His Trp Val Lys Gln Lys Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 [0402] 35 40 45
 [0403] Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
 [0404] 50 55 60
 [0405] Asn Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ile Thr Ala Tyr
 [0406] 65 70 75 80
 [0407] Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0408] 85 90 95
 [0409] Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
 [0410] 100 105 110
 [0411] Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 [0412] 115 120 125
 [0413] Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 [0414] 130 135 140
 [0415] Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 [0416] 145 150 155 160
 [0417] Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 [0418] 165 170 175
 [0419] Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 [0420] 180 185 190
 [0421] Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 [0422] 195 200 205
 [0423] Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 [0424] 210 215 220
 [0425] Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr
 [0426] 225 230 235 240
 [0427] Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr
 [0428] 245 250 255

[0429]	Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp
[0430]	260 265 270
[0431]	Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr
[0432]	275 280 285
[0433]	Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu
[0434]	290 295 300
[0435]	Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu
[0436]	305 310 315 320
[0437]	Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly
[0438]	325 330 335
[0439]	Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
[0440]	340 345 350
[0441]	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
[0442]	355 360 365
[0443]	Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
[0444]	370 375 380
[0445]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
[0446]	385 390 395 400
[0447]	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
[0448]	405 410 415
[0449]	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
[0450]	420 425 430
[0451]	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
[0452]	435 440 445
[0453]	Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
[0454]	450 455 460
[0455]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
[0456]	465 470 475 480
[0457]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
[0458]	485 490 495
[0459]	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
[0460]	500 505 510
[0461]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
[0462]	515 520 525
[0463]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
[0464]	530 535 540
[0465]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro
[0466]	545 550 555 560
[0467]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

[0507]	Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
[0508]	145 150 155 160
[0509]	Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
[0510]	165 170 175
[0511]	Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
[0512]	180 185 190
[0513]	Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
[0514]	195 200 205
[0515]	Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
[0516]	210 215 220
[0517]	Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0518]	225 230
[0519]	<210> 25
[0520]	<211> 219
[0521]	<212> PRT
[0522]	<213> 人工序列
[0523]	<220>
[0524]	<223> CD19 (8B8) VL-CL (RK)
[0525]	<400> 25
[0526]	Asp Ala Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
[0527]	1 5 10 15
[0528]	Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
[0529]	20 25 30
[0530]	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[0531]	35 40 45
[0532]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Leu
[0533]	50 55 60
[0534]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0535]	65 70 75 80
[0536]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Leu
[0537]	85 90 95
[0538]	Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0539]	100 105 110
[0540]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg
[0541]	115 120 125
[0542]	Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
[0543]	130 135 140
[0544]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
[0545]	145 150 155 160

[0546]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
[0547]	165 170 175
[0548]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
[0549]	180 185 190
[0550]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
[0551]	195 200 205
[0552]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0553]	210 215
[0554]	<210> 26
[0555]	<211> 449
[0556]	<212> PRT
[0557]	<213> 人工序列
[0558]	<220>
[0559]	<223> CD19 (8B8) VH-CH1-Fc (穴, P329G LALA)
[0560]	<400> 26
[0561]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[0562]	1 5 10 15
[0563]	Ser Val Lys Met Ala Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
[0564]	20 25 30
[0565]	Ile Met His Trp Val Lys Gln Lys Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0566]	35 40 45
[0567]	Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
[0568]	50 55 60
[0569]	Asn Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ile Thr Ala Tyr
[0570]	65 70 75 80
[0571]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[0572]	85 90 95
[0573]	Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
[0574]	100 105 110
[0575]	Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[0576]	115 120 125
[0577]	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
[0578]	130 135 140
[0579]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
[0580]	145 150 155 160
[0581]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
[0582]	165 170 175
[0583]	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
[0584]	180 185 190

[0585]	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His		
[0586]	195	200	205
[0587]	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys		
[0588]	210	215	220
[0589]	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly		
[0590]	225	230	235 240
[0591]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
[0592]	245	250	255
[0593]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
[0594]	260	265	270
[0595]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
[0596]	275	280	285
[0597]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
[0598]	290	295	300
[0599]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
[0600]	305	310	315 320
[0601]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile		
[0602]	325	330	335
[0603]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
[0604]	340	345	350
[0605]	Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
[0606]	355	360	365
[0607]	Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
[0608]	370	375	380
[0609]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
[0610]	385	390	395 400
[0611]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val		
[0612]	405	410	415
[0613]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
[0614]	420	425	430
[0615]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
[0616]	435	440	445
[0617]	Pro		
[0618]	<210> 27		
[0619]	<211> 692		
[0620]	<212> PRT		
[0621]	<213> 人工序列		
[0622]	<220>		
[0623]	<223> CD19 (8B8) VH-CH1-CD3 VH-CL-Fc (节, P329G LALA)		

[0663]	Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
[0664]	305 310 315 320
[0665]	Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His
[0666]	325 330 335
[0667]	Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
[0668]	340 345 350
[0669]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val
[0670]	355 360 365
[0671]	Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
[0672]	370 375 380
[0673]	Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
[0674]	385 390 395 400
[0675]	Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
[0676]	405 410 415
[0677]	Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
[0678]	420 425 430
[0679]	Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
[0680]	435 440 445
[0681]	Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
[0682]	450 455 460
[0683]	Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
[0684]	465 470 475 480
[0685]	Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
[0686]	485 490 495
[0687]	Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
[0688]	500 505 510
[0689]	Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
[0690]	515 520 525
[0691]	Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
[0692]	530 535 540
[0693]	Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
[0694]	545 550 555 560
[0695]	Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly
[0696]	565 570 575
[0697]	Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
[0698]	580 585 590
[0699]	Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
[0700]	595 600 605
[0701]	Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

[0702]	610	615	620
[0703]	Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
[0704]	625	630	635
[0705]	Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys		
[0706]	645	650	655
[0707]	Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
[0708]	660	665	670
[0709]	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
[0710]	675	680	685
[0711]	Ser Leu Ser Pro		
[0712]	690		
[0713]	<210> 28		
[0714]	<211> 214		
[0715]	<212> PRT		
[0716]	<213> 人工序列		
[0717]	<220>		
[0718]	<223> CD3 VL-CH1		
[0719]	<400> 28		
[0720]	Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly		
[0721]	1	5	10
[0722]	Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser		
[0723]	20	25	30
[0724]	Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly		
[0725]	35	40	45
[0726]	Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe		
[0727]	50	55	60
[0728]	Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala		
[0729]	65	70	75
[0730]	Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn		
[0731]	85	90	95
[0732]	Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala		
[0733]	100	105	110
[0734]	Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser		
[0735]	115	120	125
[0736]	Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe		
[0737]	130	135	140
[0738]	Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly		
[0739]	145	150	155
[0740]	Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu		

[0741]		165		170		175													
[0742]	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr			
[0743]			180						185					190					
[0744]	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys			
[0745]			195						200					205					
[0746]	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys													
[0747]		210																	
[0748]	<210>	29																	
[0749]	<211>	219																	
[0750]	<212>	PRT																	
[0751]	<213>	人工序列																	
[0752]	<220>																		
[0753]	<223>	CD19 (8B8)	VL-CL																
[0754]	<400>	29																	
[0755]	Asp	Ala	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Gly			
[0756]	1			5						10					15				
[0757]	Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Glu	Asn	Ser			
[0758]			20						25					30					
[0759]	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser			
[0760]			35					40					45						
[0761]	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Val	Ser	Lys	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Leu			
[0762]		50					55					60							
[0763]	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile			
[0764]	65				70						75				80				
[0765]	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Leu	Gln	Leu			
[0766]			85							90				95					
[0767]	Thr	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys			
[0768]			100							105				110					
[0769]	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu			
[0770]			115						120					125					
[0771]	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe			
[0772]		130							135					140					
[0773]	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln			
[0774]	145					150					155				160				
[0775]	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser			
[0776]			165							170				175					
[0777]	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu			
[0778]			180							185				190					
[0779]	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser			

[0780]	195	200	205
[0781]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0782]	210	215	
[0783]	<210> 30		
[0784]	<211> 449		
[0785]	<212> PRT		
[0786]	<213> 人工序列		
[0787]	<220>		
[0788]	<223> CD19 (变体5) VH-CH1 (EE) -Fc (穴, P329G LALA)		
[0789]	<400> 30		
[0790]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
[0791]	1	5	10 15
[0792]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr		
[0793]	20	25	30
[0794]	Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
[0795]	35	40	45
[0796]	Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe		
[0797]	50	55	60
[0798]	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr		
[0799]	65	70	75 80
[0800]	Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0801]	85	90	95
[0802]	Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly		
[0803]	100	105	110
[0804]	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
[0805]	115	120	125
[0806]	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
[0807]	130	135	140
[0808]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
[0809]	145	150	155 160
[0810]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
[0811]	165	170	175
[0812]	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
[0813]	180	185	190
[0814]	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His		
[0815]	195	200	205
[0816]	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys		
[0817]	210	215	220
[0818]	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly		

[0819]	225	230	235	240
[0820]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met			
[0821]		245	250	255
[0822]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His			
[0823]		260	265	270
[0824]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val			
[0825]		275	280	285
[0826]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr			
[0827]		290	295	300
[0828]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly			
[0829]		305	310	315
[0830]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile			
[0831]		325	330	335
[0832]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val			
[0833]		340	345	350
[0834]	Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser			
[0835]		355	360	365
[0836]	Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
[0837]		370	375	380
[0838]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
[0839]		385	390	395
[0840]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val			
[0841]		405	410	415
[0842]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
[0843]		420	425	430
[0844]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
[0845]		435	440	445
[0846]	Pro			
[0847]	<210> 31			
[0848]	<211> 674			
[0849]	<212> PRT			
[0850]	<213> 人工序列			
[0851]	<220>			
[0852]	<223> CD19 (变体5) VH-CH1 (EE) -CD3 VL-CH1-Fc (节, P329G LALA)			
[0853]	<400> 31			
[0854]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
[0855]	1	5	10	15
[0856]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr			
[0857]		20	25	30

[0858]	Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0859]	35 40 45
[0860]	Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
[0861]	50 55 60
[0862]	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
[0863]	65 70 75 80
[0864]	Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0865]	85 90 95
[0866]	Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
[0867]	100 105 110
[0868]	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[0869]	115 120 125
[0870]	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
[0871]	130 135 140
[0872]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
[0873]	145 150 155 160
[0874]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
[0875]	165 170 175
[0876]	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
[0877]	180 185 190
[0878]	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
[0879]	195 200 205
[0880]	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
[0881]	210 215 220
[0882]	Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr
[0883]	225 230 235 240
[0884]	Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr
[0885]	245 250 255
[0886]	Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp
[0887]	260 265 270
[0888]	Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr
[0889]	275 280 285
[0890]	Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu
[0891]	290 295 300
[0892]	Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu
[0893]	305 310 315 320
[0894]	Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly
[0895]	325 330 335
[0896]	Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

[0897]		340		345		350											
[0898]	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	
[0899]		355		360		365											
[0900]	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	
[0901]		370		375		380											
[0902]	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	
[0903]	385			390		395											400
[0904]	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	
[0905]				405		410											415
[0906]	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	
[0907]				420		425											430
[0908]	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	
[0909]				435		440											445
[0910]	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	
[0911]				450		455											460
[0912]	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	
[0913]	465					470											480
[0914]	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	
[0915]						485											495
[0916]	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	
[0917]				500		505											510
[0918]	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	
[0919]				515		520											525
[0920]	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	
[0921]				530		535											540
[0922]	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	
[0923]	545					550											560
[0924]	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	
[0925]						565											575
[0926]	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	
[0927]						580											590
[0928]	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	
[0929]						595											605
[0930]	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	
[0931]						610											620
[0932]	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	
[0933]	625					630											640
[0934]	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	
[0935]						645											655

[0936]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
[0937]	660 665 670
[0938]	Ser Pro
[0939]	<210> 32
[0940]	<211> 219
[0941]	<212> PRT
[0942]	<213> 人工序列
[0943]	<220>
[0944]	<223> CD19 (变体5) VL-CL(RK)
[0945]	<400> 32
[0946]	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
[0947]	1 5 10 15
[0948]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Pro
[0949]	20 25 30
[0950]	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[0951]	35 40 45
[0952]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
[0953]	50 55 60
[0954]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0955]	65 70 75 80
[0956]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu
[0957]	85 90 95
[0958]	Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0959]	100 105 110
[0960]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg
[0961]	115 120 125
[0962]	Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
[0963]	130 135 140
[0964]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
[0965]	145 150 155 160
[0966]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
[0967]	165 170 175
[0968]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
[0969]	180 185 190
[0970]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
[0971]	195 200 205
[0972]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0973]	210 215
[0974]	<210> 33

[0975] <211> 121
 [0976] <212> PRT
 [0977] <213> 人工序列
 [0978] <220>
 [0979] <223> CD19 (10C1) VH
 [0980] <400> 33
 [0981] Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 [0982] 1 5 10 15
 [0983] Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 [0984] 20 25 30
 [0985] Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 [0986] 35 40 45
 [0987] Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Phe Asn Glu Lys Phe
 [0988] 50 55 60
 [0989] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 [0990] 65 70 75 80
 [0991] Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0992] 85 90 95
 [0993] Thr Arg Gly Val Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gln Gly Asp Tyr Trp Gly
 [0994] 100 105 110
 [0995] Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 [0996] 115 120
 [0997] <210> 34
 [0998] <211> 112
 [0999] <212> PRT
 [1000] <213> 人工序列
 [1001] <220>
 [1002] <223> CD19 (10C1) VL
 [1003] <400> 34
 [1004] Asp Ala Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 [1005] 1 5 10 15
 [1006] Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
 [1007] 20 25 30
 [1008] Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 [1009] 35 40 45
 [1010] Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 [1011] 50 55 60
 [1012] Asp Arg Phe Asn Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 [1013] 65 70 75 80

[1014]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Val
[1015]	85 90 95
[1016]	Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[1017]	100 105 110
[1018]	<210> 35
[1019]	<211> 115
[1020]	<212> PRT
[1021]	<213> 人工序列
[1022]	<220>
[1023]	<223> DP47 VH
[1024]	<400> 35
[1025]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1026]	1 5 10 15
[1027]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[1028]	20 25 30
[1029]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1030]	35 40 45
[1031]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[1032]	50 55 60
[1033]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[1034]	65 70 75 80
[1035]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1036]	85 90 95
[1037]	Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
[1038]	100 105 110
[1039]	Val Ser Ser
[1040]	115
[1041]	<210> 36
[1042]	<211> 108
[1043]	<212> PRT
[1044]	<213> 人工序列
[1045]	<220>
[1046]	<223> DP47 VL
[1047]	<400> 36
[1048]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[1049]	1 5 10 15
[1050]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
[1051]	20 25 30
[1052]	Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

[1053]	35	40	45
[1054]	Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser		
[1055]	50	55	60
[1056]	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu		
[1057]	65	70	75
[1058]	Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro		
[1059]	85	90	95
[1060]	Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[1061]	100	105	
[1062]	<210> 37		
[1063]	<211> 19		
[1064]	<212> PRT		
[1065]	<213> 人工序列		
[1066]	<220>		
[1067]	<223> CD3 HCDR2		
[1068]	<400> 37		
[1069]	Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser		
[1070]	1	5	10
[1071]	Val Lys Asp		
[1072]	<210> 38		
[1073]	<211> 14		
[1074]	<212> PRT		
[1075]	<213> 人工序列		
[1076]	<220>		
[1077]	<223> CD3 LCDR1		
[1078]	<400> 38		
[1079]	Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn		
[1080]	1	5	10
[1081]	<210> 39		
[1082]	<211> 125		
[1083]	<212> PRT		
[1084]	<213> 人工序列		
[1085]	<220>		
[1086]	<223> CD3 VH		
[1087]	<400> 39		
[1088]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[1089]	1	5	10
[1090]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr		
[1091]	20	25	30

[1092]	Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1093]	35 40 45
[1094]	Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
[1095]	50 55 60
[1096]	Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
[1097]	65 70 75 80
[1098]	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
[1099]	85 90 95
[1100]	Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
[1101]	100 105 110
[1102]	Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1103]	115 120 125
[1104]	<210> 40
[1105]	<211> 109
[1106]	<212> PRT
[1107]	<213> 人工序列
[1108]	<220>
[1109]	<223> CD3 VL
[1110]	<400> 40
[1111]	Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
[1112]	1 5 10 15
[1113]	Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
[1114]	20 25 30
[1115]	Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
[1116]	35 40 45
[1117]	Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
[1118]	50 55 60
[1119]	Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
[1120]	65 70 75 80
[1121]	Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
[1122]	85 90 95
[1123]	Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[1124]	100 105
[1125]	<210> 41
[1126]	<211> 449
[1127]	<212> PRT
[1128]	<213> 人工序列
[1129]	<220>
[1130]	<223> CD19 (10C1) VH-CH1-Fc (穴, P329G LALA)

[1131] <400> 41
[1132] Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[1133] 1 5 10 15
[1134] Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[1135] 20 25 30
[1136] Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[1137] 35 40 45
[1138] Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Phe Asn Glu Lys Phe
[1139] 50 55 60
[1140] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[1141] 65 70 75 80
[1142] Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[1143] 85 90 95
[1144] Thr Arg Gly Val Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gln Gly Asp Tyr Trp Gly
[1145] 100 105 110
[1146] Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[1147] 115 120 125
[1148] Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
[1149] 130 135 140
[1150] Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
[1151] 145 150 155 160
[1152] Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
[1153] 165 170 175
[1154] Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
[1155] 180 185 190
[1156] Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
[1157] 195 200 205
[1158] Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
[1159] 210 215 220
[1160] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
[1161] 225 230 235 240
[1162] Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
[1163] 245 250 255
[1164] Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
[1165] 260 265 270
[1166] Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
[1167] 275 280 285
[1168] His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
[1169] 290 295 300

[1170]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
[1171]	305 310 315 320
[1172]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
[1173]	325 330 335
[1174]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[1175]	340 345 350
[1176]	Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
[1177]	355 360 365
[1178]	Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[1179]	370 375 380
[1180]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
[1181]	385 390 395 400
[1182]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
[1183]	405 410 415
[1184]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
[1185]	420 425 430
[1186]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
[1187]	435 440 445
[1188]	Pro
[1189]	<210> 42
[1190]	<211> 692
[1191]	<212> PRT
[1192]	<213> 人工序列
[1193]	<220>
[1194]	<223> CD19 (10C1) VH-CH1-CD3 VL-CH1-Fc(节, P329G LALA)
[1195]	<400> 42
[1196]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[1197]	1 5 10 15
[1198]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[1199]	20 25 30
[1200]	Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[1201]	35 40 45
[1202]	Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Phe Asn Glu Lys Phe
[1203]	50 55 60
[1204]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[1205]	65 70 75 80
[1206]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[1207]	85 90 95
[1208]	Thr Arg Gly Val Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gln Gly Asp Tyr Trp Gly

[1209]		100		105		110										
[1210]	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
[1211]		115		120		125										
[1212]	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
[1213]		130		135		140										
[1214]	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
[1215]	145			150		155										160
[1216]	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
[1217]				165		170										175
[1218]	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
[1219]				180		185										190
[1220]	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
[1221]				195		200										205
[1222]	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
[1223]				210		215										220
[1224]	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Leu
[1225]	225					230										240
[1226]	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser
[1227]						245										255
[1228]	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr	Ala	Met	Asn	Trp	Val
[1229]						260										270
[1230]	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Arg	Ile	Arg	Ser
[1231]						275										285
[1232]	Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg
[1233]						290										300
[1234]	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met
[1235]	305															320
[1236]	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Arg	His
[1237]																335
[1238]	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn	Ser	Tyr	Val	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln
[1239]																350
[1240]	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val
[1241]																365
[1242]	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser
[1243]																380
[1244]	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln
[1245]	385															400
[1246]	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val
[1247]																415

[1248]	Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
[1249]	420 425 430
[1250]	Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
[1251]	435 440 445
[1252]	Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
[1253]	450 455 460
[1254]	Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
[1255]	465 470 475 480
[1256]	Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
[1257]	485 490 495
[1258]	Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
[1259]	500 505 510
[1260]	Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
[1261]	515 520 525
[1262]	Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
[1263]	530 535 540
[1264]	Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
[1265]	545 550 555 560
[1266]	Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly
[1267]	565 570 575
[1268]	Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
[1269]	580 585 590
[1270]	Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
[1271]	595 600 605
[1272]	Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
[1273]	610 615 620
[1274]	Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
[1275]	625 630 635 640
[1276]	Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
[1277]	645 650 655
[1278]	Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
[1279]	660 665 670
[1280]	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
[1281]	675 680 685
[1282]	Ser Leu Ser Pro
[1283]	690
[1284]	<210> 43
[1285]	<211> 219
[1286]	<212> PRT

[1287] <213> 人工序列
 [1288] <220>
 [1289] <223> CD19 (10C1) VL-CL
 [1290] <400> 43
 [1291] Asp Ala Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 [1292] 1 5 10 15
 [1293] Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
 [1294] 20 25 30
 [1295] Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 [1296] 35 40 45
 [1297] Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 [1298] 50 55 60
 [1299] Asp Arg Phe Asn Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 [1300] 65 70 75 80
 [1301] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Val
 [1302] 85 90 95
 [1303] Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [1304] 100 105 110
 [1305] Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 [1306] 115 120 125
 [1307] Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 [1308] 130 135 140
 [1309] Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 [1310] 145 150 155 160
 [1311] Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 [1312] 165 170 175
 [1313] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 [1314] 180 185 190
 [1315] Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 [1316] 195 200 205
 [1317] Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 [1318] 210 215
 [1319] <210> 44
 [1320] <211> 225
 [1321] <212> PRT
 [1322] <213> 人工序列
 [1323] <220>
 [1324] <223> Fc(节, P329G LALA)
 [1325] <400> 44

[1365]	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Gly	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser
[1366]				20					25					30		
[1367]	Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Val	Gln	Glu	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Phe	Arg	Gly
[1368]			35					40					45			
[1369]	Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro	Gly	Thr	Pro	Ala	Arg	Phe
[1370]		50					55					60				
[1371]	Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Ala
[1372]	65					70						75				80
[1373]	Gln	Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn
[1374]					85					90					95	
[1375]	Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala
[1376]				100					105					110		
[1377]	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser
[1378]			115						120					125		
[1379]	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe
[1380]		130					135						140			
[1381]	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly
[1382]	145					150						155				160
[1383]	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu
[1384]					165					170					175	
[1385]	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr
[1386]			180							185				190		
[1387]	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys
[1388]			195							200				205		
[1389]	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
[1390]		210						215					220			
[1391]	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys
[1392]	225					230						235				240
[1393]	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
[1394]					245					250					255	
[1395]	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr
[1396]				260						265				270		
[1397]	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
[1398]			275						280					285		
[1399]	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
[1400]		290						295					300			
[1401]	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
[1402]	305					310						315				320
[1403]	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln

[1404]		325		330		335										
[1405]	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu
[1406]			340						345					350		
[1407]	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro
[1408]			355						360					365		
[1409]	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn
[1410]			370						375					380		
[1411]	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu
[1412]			385						390					395		400
[1413]	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val
[1414]				405						410					415	
[1415]	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln
[1416]				420						425				430		
[1417]	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro									
[1418]				435												
[1419]	<210>	46														
[1420]	<211>	442														
[1421]	<212>	PRT														
[1422]	<213>	人工序列														
[1423]	<220>															
[1424]	<223>	CD19 (8B8) VL-CH1-Fc (穴, P329G LALA)														
[1425]	<400>	46														
[1426]	Asp	Ala	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Gly
[1427]	1			5						10					15	
[1428]	Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Glu	Asn	Ser
[1429]				20						25				30		
[1430]	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
[1431]				35						40				45		
[1432]	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Val	Ser	Lys	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Leu
[1433]				50						55				60		
[1434]	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
[1435]	65				70						75				80	
[1436]	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Leu	Gln	Leu
[1437]					85						90				95	
[1438]	Thr	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
[1439]					100						105				110	
[1440]	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser
[1441]					115						120				125	
[1442]	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys

[1443]	130	135	140
[1444]	Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu		
[1445]	145	150	155
[1446]	Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu		
[1447]	165	170	175
[1448]	Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr		
[1449]	180	185	190
[1450]	Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val		
[1451]	195	200	205
[1452]	Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro		
[1453]	210	215	220
[1454]	Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe		
[1455]	225	230	235
[1456]	Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
[1457]	245	250	255
[1458]	Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe		
[1459]	260	265	270
[1460]	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
[1461]	275	280	285
[1462]	Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
[1463]	290	295	300
[1464]	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val		
[1465]	305	310	315
[1466]	Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala		
[1467]	325	330	335
[1468]	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg		
[1469]	340	345	350
[1470]	Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly		
[1471]	355	360	365
[1472]	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		
[1473]	370	375	380
[1474]	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser		
[1475]	385	390	395
[1476]	Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln		
[1477]	405	410	415
[1478]	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His		
[1479]	420	425	430
[1480]	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
[1481]	435	440	

[1521]	Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
[1522]	260 265 270
[1523]	Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr
[1524]	275 280 285
[1525]	Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp
[1526]	290 295 300
[1527]	Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
[1528]	305 310 315 320
[1529]	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr
[1530]	325 330 335
[1531]	Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
[1532]	340 345 350
[1533]	Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
[1534]	355 360 365
[1535]	Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp
[1536]	370 375 380
[1537]	Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
[1538]	385 390 395 400
[1539]	Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
[1540]	405 410 415
[1541]	Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
[1542]	420 425 430
[1543]	Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
[1544]	435 440 445
[1545]	Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
[1546]	450 455 460
[1547]	Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
[1548]	465 470 475 480
[1549]	Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
[1550]	485 490 495
[1551]	Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
[1552]	500 505 510
[1553]	Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
[1554]	515 520 525
[1555]	Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
[1556]	530 535 540
[1557]	Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
[1558]	545 550 555 560
[1559]	Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys

[1560]		565		570		575													
[1561]	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp			
[1562]			580						585					590					
[1563]	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe			
[1564]			595						600					605					
[1565]	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu			
[1566]			610						615					620					
[1567]	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe			
[1568]			625						630					635					
[1569]	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly			
[1570]					645					650						655			
[1571]	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr			
[1572]					660					665						670			
[1573]	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro										
[1574]					675					680									
[1575]	<210>	48																	
[1576]	<211>	228																	
[1577]	<212>	PRT																	
[1578]	<213>	人工序列																	
[1579]	<220>																		
[1580]	<223>	CD19 (8B8) VH-CL																	
[1581]	<400>	48																	
[1582]	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala			
[1583]	1				5					10					15				
[1584]	Ser	Val	Lys	Met	Ala	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr			
[1585]					20					25					30				
[1586]	Ile	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Lys	Thr	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile			
[1587]					35					40					45				
[1588]	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Asp	Gly	Ser	Lys	Tyr	Thr	Glu	Lys	Phe			
[1589]					50					55					60				
[1590]	Asn	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ser	Asp	Lys	Ser	Ser	Ile	Thr	Ala	Tyr			
[1591]					65					70					75				80
[1592]	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys			
[1593]					85					90					95				
[1594]	Ala	Arg	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ala	Leu	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly			
[1595]					100					105					110				
[1596]	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Ser			
[1597]					115					120					125				
[1598]	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala			

[1599]	130	135	140
[1600]	Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val		
[1601]	145	150	155 160
[1602]	Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser		
[1603]		165	170 175
[1604]	Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr		
[1605]		180	185 190
[1606]	Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys		
[1607]		195	200 205
[1608]	Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn		
[1609]		210	215 220
[1610]	Arg Gly Glu Cys		
[1611]	225		
[1612]	<210> 49		
[1613]	<211> 215		
[1614]	<212> PRT		
[1615]	<213> 人工序列		
[1616]	<220>		
[1617]	<223> CD3 VL-CL (RK)		
[1618]	<400> 49		
[1619]	Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly		
[1620]	1	5	10 15
[1621]	Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser		
[1622]		20	25 30
[1623]	Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly		
[1624]		35	40 45
[1625]	Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe		
[1626]		50	55 60
[1627]	Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala		
[1628]		65	70 75 80
[1629]	Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn		
[1630]		85	90 95
[1631]	Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro		
[1632]		100	105 110
[1633]	Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Lys Lys Leu		
[1634]		115	120 125
[1635]	Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro		
[1636]		130	135 140
[1637]	Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala		

[1638]	145	150	155	160
[1639]	Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala			
[1640]		165	170	175
[1641]	Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg			
[1642]		180	185	190
[1643]	Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr			
[1644]		195	200	205
[1645]	Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser			
[1646]		210	215	
[1647]	<210>	50		
[1648]	<211>	5		
[1649]	<212>	PRT		
[1650]	<213>	人工序列		
[1651]	<220>			
[1652]	<223>	CD19 HCDR1 (2B11)		
[1653]	<400>	50		
[1654]	Asp Tyr Ile Met His			
[1655]	1	5		
[1656]	<210>	51		
[1657]	<211>	17		
[1658]	<212>	PRT		
[1659]	<213>	人工序列		
[1660]	<220>			
[1661]	<223>	CD19 HCDR2 (2B11)		
[1662]	<400>	51		
[1663]	Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe Gln			
[1664]	1	5	10	15
[1665]	Gly			
[1666]	<210>	52		
[1667]	<211>	12		
[1668]	<212>	PRT		
[1669]	<213>	人工序列		
[1670]	<220>			
[1671]	<223>	CD19 HCDR3 (2B11)		
[1672]	<400>	52		
[1673]	Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Gln Leu Phe Asp Tyr			
[1674]	1	5	10	
[1675]	<210>	53		
[1676]	<211>	16		

[1677] <212> PRT
 [1678] <213> 人工序列
 [1679] <220>
 [1680] <223> CD19 LCDR1 (2B11)
 [1681] <400> 53
 [1682] Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser Thr Gly Thr Thr Tyr Leu Asn
 [1683] 1 5 10 15
 [1684] <210> 54
 [1685] <211> 7
 [1686] <212> PRT
 [1687] <213> 人工序列
 [1688] <220>
 [1689] <223> CD19 LCDR2 (2B11)
 [1690] <400> 54
 [1691] Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
 [1692] 1 5
 [1693] <210> 55
 [1694] <211> 9
 [1695] <212> PRT
 [1696] <213> 人工序列
 [1697] <220>
 [1698] <223> CD19 LCDR3 (2B11)
 [1699] <400> 55
 [1700] Leu Gln Leu Leu Glu Asp Pro Tyr Thr
 [1701] 1 5
 [1702] <210> 56
 [1703] <211> 121
 [1704] <212> PRT
 [1705] <213> 人工序列
 [1706] <220>
 [1707] <223> CD19 VH (2B11)
 [1708] <400> 56
 [1709] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 [1710] 1 5 10 15
 [1711] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 [1712] 20 25 30
 [1713] Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 [1714] 35 40 45
 [1715] Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe

[1716]	50	55	60
[1717]	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr		
[1718]	65	70	75 80
[1719]	Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[1720]	85	90	95
[1721]	Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Gln Leu Phe Asp Tyr Trp Gly		
[1722]	100	105	110
[1723]	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
[1724]	115	120	
[1725]	<210> 57		
[1726]	<211> 112		
[1727]	<212> PRT		
[1728]	<213> 人工序列		
[1729]	<220>		
[1730]	<223> CD19 VL (2B11)		
[1731]	<400> 57		
[1732]	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly		
[1733]	1	5	10 15
[1734]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser		
[1735]	20	25	30
[1736]	Thr Gly Thr Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser		
[1737]	35	40	45
[1738]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro		
[1739]	50	55	60
[1740]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
[1741]	65	70	75 80
[1742]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu		
[1743]	85	90	95
[1744]	Leu Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[1745]	100	105	110
[1746]	<210> 58		
[1747]	<211> 5		
[1748]	<212> PRT		
[1749]	<213> 人工序列		
[1750]	<220>		
[1751]	<223> CD19 HCDR1 (5H09)		
[1752]	<400> 58		
[1753]	Asp Tyr Ile Met His		
[1754]	1	5	

[1794] <212> PRT
 [1795] <213> 人工序列
 [1796] <220>
 [1797] <223> CD19 LCDR3 (5H09)
 [1798] <400> 63
 [1799] Leu Gln Leu Ile Asp Tyr Pro Val Thr
 [1800] 1 5
 [1801] <210> 64
 [1802] <211> 121
 [1803] <212> PRT
 [1804] <213> 人工序列
 [1805] <220>
 [1806] <223> CD19 VH (5H09)
 [1807] <400> 64
 [1808] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 [1809] 1 5 10 15
 [1810] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 [1811] 20 25 30
 [1812] Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 [1813] 35 40 45
 [1814] Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
 [1815] 50 55 60
 [1816] Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 [1817] 65 70 75 80
 [1818] Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1819] 85 90 95
 [1820] Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
 [1821] 100 105 110
 [1822] Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 [1823] 115 120
 [1824] <210> 65
 [1825] <211> 112
 [1826] <212> PRT
 [1827] <213> 人工序列
 [1828] <220>
 [1829] <223> CD19 VL (5H09)
 [1830] <400> 65
 [1831] Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 [1832] 1 5 10 15

[1833] Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Ser Ser
 [1834] 20 25 30
 [1835] Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 [1836] 35 40 45
 [1837] Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
 [1838] 50 55 60
 [1839] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 [1840] 65 70 75 80
 [1841] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu
 [1842] 85 90 95
 [1843] Ile Asp Tyr Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [1844] 100 105 110
 [1845] <210> 66
 [1846] <211> 5
 [1847] <212> PRT
 [1848] <213> 人工序列
 [1849] <220>
 [1850] <223> CD19 HCDR1 (7H07)
 [1851] <400> 66
 [1852] Asp Tyr Ile Met His
 [1853] 1 5
 [1854] <210> 67
 [1855] <211> 17
 [1856] <212> PRT
 [1857] <213> 人工序列
 [1858] <220>
 [1859] <223> CD19 HCDR2 (7H07)
 [1860] <400> 67
 [1861] Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe Gln
 [1862] 1 5 10 15
 [1863] Gly
 [1864] <210> 68
 [1865] <211> 12
 [1866] <212> PRT
 [1867] <213> 人工序列
 [1868] <220>
 [1869] <223> CD19 HCDR3 (7H07)
 [1870] <400> 68
 [1871] Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu Phe Asp Tyr

[1872]	1	5	10
[1873]	<210>	69	
[1874]	<211>	16	
[1875]	<212>	PRT	
[1876]	<213>	人工序列	
[1877]	<220>		
[1878]	<223>	CD19 LCDR1 (7H07)	
[1879]	<400>	69	
[1880]	Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn		
[1881]	1	5	10 15
[1882]	<210>	70	
[1883]	<211>	7	
[1884]	<212>	PRT	
[1885]	<213>	人工序列	
[1886]	<220>		
[1887]	<223>	CD19 LCDR2 (7H07)	
[1888]	<400>	70	
[1889]	Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser		
[1890]	1	5	
[1891]	<210>	71	
[1892]	<211>	9	
[1893]	<212>	PRT	
[1894]	<213>	人工序列	
[1895]	<220>		
[1896]	<223>	CD19 LCDR3 (7H07)	
[1897]	<400>	71	
[1898]	Leu Gln Ala Thr His Ile Pro Tyr Thr		
[1899]	1	5	
[1900]	<210>	72	
[1901]	<211>	121	
[1902]	<212>	PRT	
[1903]	<213>	人工序列	
[1904]	<220>		
[1905]	<223>	CD19 VH (7H07)	
[1906]	<400>	72	
[1907]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
[1908]	1	5	10 15
[1909]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr		
[1910]		20	25 30

[1911]	Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[1912]	35 40 45
[1913]	Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
[1914]	50 55 60
[1915]	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
[1916]	65 70 75 80
[1917]	Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1918]	85 90 95
[1919]	Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
[1920]	100 105 110
[1921]	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
[1922]	115 120
[1923]	<210> 73
[1924]	<211> 112
[1925]	<212> PRT
[1926]	<213> 人工序列
[1927]	<220>
[1928]	<223> CD19 VL (7H07)
[1929]	<400> 73
[1930]	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
[1931]	1 5 10 15
[1932]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
[1933]	20 25 30
[1934]	Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[1935]	35 40 45
[1936]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
[1937]	50 55 60
[1938]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[1939]	65 70 75 80
[1940]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ala
[1941]	85 90 95
[1942]	Thr His Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[1943]	100 105 110
[1944]	<210> 74
[1945]	<211> 5
[1946]	<212> PRT
[1947]	<213> 人工序列
[1948]	<220>
[1949]	<223> CD19 HCDR1 (2B03)

[1950] <400> 74
 [1951] Asp Tyr Ile Thr His
 [1952] 1 5
 [1953] <210> 75
 [1954] <211> 17
 [1955] <212> PRT
 [1956] <213> 人工序列
 [1957] <220>
 [1958] <223> CD19 HCDR2 (2B03)
 [1959] <400> 75
 [1960] Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe Gln
 [1961] 1 5 10 15
 [1962] Gly
 [1963] <210> 76
 [1964] <211> 12
 [1965] <212> PRT
 [1966] <213> 人工序列
 [1967] <220>
 [1968] <223> CD19 HCDR3 (2B03)
 [1969] <400> 76
 [1970] Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Asp Leu Phe Asp Tyr
 [1971] 1 5 10
 [1972] <210> 77
 [1973] <211> 16
 [1974] <212> PRT
 [1975] <213> 人工序列
 [1976] <220>
 [1977] <223> CD19 LCDR1 (2B03)
 [1978] <400> 77
 [1979] Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
 [1980] 1 5 10 15
 [1981] <210> 78
 [1982] <211> 7
 [1983] <212> PRT
 [1984] <213> 人工序列
 [1985] <220>
 [1986] <223> CD19 LCDR2 (2B03)
 [1987] <400> 78
 [1988] Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser

- [2028] <220>
- [2029] <221> 混杂特征
- [2030] <222> (107) .. (107)
- [2031] <223> Xaa可以是任何天然发生氨基酸
- [2032] <400> 81
- [2033] Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
- [2034] 1 5 10 15
- [2035] Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
- [2036] 20 25 30
- [2037] Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
- [2038] 35 40 45
- [2039] Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
- [2040] 50 55 60
- [2041] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
- [2042] 65 70 75 80
- [2043] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu
- [2044] 85 90 95
- [2045] Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Xaa Lys Leu Glu Ile Lys
- [2046] 100 105 110
- [2047] <210> 82
- [2048] <211> 5
- [2049] <212> PRT
- [2050] <213> 人工序列
- [2051] <220>
- [2052] <223> CD19 HCDR1 (5A07)
- [2053] <400> 82
- [2054] Asp Tyr Ile Met His
- [2055] 1 5
- [2056] <210> 83
- [2057] <211> 17
- [2058] <212> PRT
- [2059] <213> 人工序列
- [2060] <220>
- [2061] <223> CD19 HCDR2 (5A07)
- [2062] <400> 83
- [2063] Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe Gln
- [2064] 1 5 10 15
- [2065] Gly
- [2066] <210> 84

- [2067] <211> 12
- [2068] <212> PRT
- [2069] <213> 人工序列
- [2070] <220>
- [2071] <223> CD19 HCDR3 (5A07)
- [2072] <400> 84
- [2073] Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr
- [2074] 1 5 10
- [2075] <210> 85
- [2076] <211> 16
- [2077] <212> PRT
- [2078] <213> 人工序列
- [2079] <220>
- [2080] <223> CD19 LCDR1 (5A07)
- [2081] <400> 85
- [2082] Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
- [2083] 1 5 10 15
- [2084] <210> 86
- [2085] <211> 7
- [2086] <212> PRT
- [2087] <213> 人工序列
- [2088] <220>
- [2089] <223> CD19 LCDR2 (5A07)
- [2090] <400> 86
- [2091] Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
- [2092] 1 5
- [2093] <210> 87
- [2094] <211> 9
- [2095] <212> PRT
- [2096] <213> 人工序列
- [2097] <220>
- [2098] <223> CD19 LCDR3 (5A07)
- [2099] <400> 87
- [2100] Leu Gln Pro Gly His Tyr Pro Gly Thr
- [2101] 1 5
- [2102] <210> 88
- [2103] <211> 121
- [2104] <212> PRT
- [2105] <213> 人工序列

[2106] <220>
 [2107] <223> CD19 VH (5A07)
 [2108] <400> 88
 [2109] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 [2110] 1 5 10 15
 [2111] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 [2112] 20 25 30
 [2113] Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 [2114] 35 40 45
 [2115] Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
 [2116] 50 55 60
 [2117] Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 [2118] 65 70 75 80
 [2119] Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [2120] 85 90 95
 [2121] Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
 [2122] 100 105 110
 [2123] Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 [2124] 115 120
 [2125] <210> 89
 [2126] <211> 112
 [2127] <212> PRT
 [2128] <213> 人工序列
 [2129] <220>
 [2130] <223> CD19 VL (5A07)
 [2131] <400> 89
 [2132] Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 [2133] 1 5 10 15
 [2134] Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
 [2135] 20 25 30
 [2136] Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 [2137] 35 40 45
 [2138] Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
 [2139] 50 55 60
 [2140] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 [2141] 65 70 75 80
 [2142] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Pro
 [2143] 85 90 95
 [2144] Gly His Tyr Pro Gly Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

[2145]		100	105	110
[2146]	<210>	90		
[2147]	<211>	5		
[2148]	<212>	PRT		
[2149]	<213>	人工序列		
[2150]	<220>			
[2151]	<223>	CD19 HCDR1 (5B08)		
[2152]	<400>	90		
[2153]		Asp Tyr Ile Met His		
[2154]	1		5	
[2155]	<210>	91		
[2156]	<211>	17		
[2157]	<212>	PRT		
[2158]	<213>	人工序列		
[2159]	<220>			
[2160]	<223>	CD19 HCDR2 (5B08)		
[2161]	<400>	91		
[2162]		Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe Gln		
[2163]	1		5	10 15
[2164]		Gly		
[2165]	<210>	92		
[2166]	<211>	12		
[2167]	<212>	PRT		
[2168]	<213>	人工序列		
[2169]	<220>			
[2170]	<223>	CD19 HCDR3 (5B08)		
[2171]	<400>	92		
[2172]		Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Gln Leu Phe Asp Tyr		
[2173]	1		5	10
[2174]	<210>	93		
[2175]	<211>	16		
[2176]	<212>	PRT		
[2177]	<213>	人工序列		
[2178]	<220>			
[2179]	<223>	CD19 LCDR1 (5B08)		
[2180]	<400>	93		
[2181]		Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn		
[2182]	1		5	10 15
[2183]	<210>	94		

[2184] <211> 7
 [2185] <212> PRT
 [2186] <213> 人工序列
 [2187] <220>
 [2188] <223> CD19 LCDR2 (5B08)
 [2189] <400> 94
 [2190] Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
 [2191] 1 5
 [2192] <210> 95
 [2193] <211> 9
 [2194] <212> PRT
 [2195] <213> 人工序列
 [2196] <220>
 [2197] <223> CD19 LCDR3 (5B08)
 [2198] <400> 95
 [2199] Leu Gln Leu Asp Ser Tyr Pro Asn Thr
 [2200] 1 5
 [2201] <210> 96
 [2202] <211> 121
 [2203] <212> PRT
 [2204] <213> 人工序列
 [2205] <220>
 [2206] <223> CD19 VH (5B08)
 [2207] <400> 96
 [2208] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 [2209] 1 5 10 15
 [2210] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 [2211] 20 25 30
 [2212] Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 [2213] 35 40 45
 [2214] Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
 [2215] 50 55 60
 [2216] Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 [2217] 65 70 75 80
 [2218] Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [2219] 85 90 95
 [2220] Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Gln Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
 [2221] 100 105 110
 [2222] Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

[2223]	115	120
[2224]	<210> 97	
[2225]	<211> 112	
[2226]	<212> PRT	
[2227]	<213> 人工序列	
[2228]	<220>	
[2229]	<223> CD19 VL (5B08)	
[2230]	<400> 97	
[2231]	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly	
[2232]	1 5 10 15	
[2233]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser	
[2234]	20 25 30	
[2235]	Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	
[2236]	35 40 45	
[2237]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro	
[2238]	50 55 60	
[2239]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
[2240]	65 70 75 80	
[2241]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu	
[2242]	85 90 95	
[2243]	Asp Ser Tyr Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
[2244]	100 105 110	
[2245]	<210> 98	
[2246]	<211> 5	
[2247]	<212> PRT	
[2248]	<213> 人工序列	
[2249]	<220>	
[2250]	<223> CD19 HCDR1 (5D08)	
[2251]	<400> 98	
[2252]	Asp Tyr Ile Met His	
[2253]	1 5	
[2254]	<210> 99	
[2255]	<211> 17	
[2256]	<212> PRT	
[2257]	<213> 人工序列	
[2258]	<220>	
[2259]	<223> CD19 HCDR2 (5D08)	
[2260]	<400> 99	
[2261]	Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe Gln	

[2262]	1	5	10	15
[2263]	Gly			
[2264]	<210> 100			
[2265]	<211> 12			
[2266]	<212> PRT			
[2267]	<213> 人工序列			
[2268]	<220>			
[2269]	<223> CD19 HCDR3 (5D08)			
[2270]	<400> 100			
[2271]	Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu Phe Asp Tyr			
[2272]	1	5	10	
[2273]	<210> 101			
[2274]	<211> 16			
[2275]	<212> PRT			
[2276]	<213> 人工序列			
[2277]	<220>			
[2278]	<223> CD19 LCDR1 (5D08)			
[2279]	<400> 101			
[2280]	Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn			
[2281]	1	5	10	15
[2282]	<210> 102			
[2283]	<211> 7			
[2284]	<212> PRT			
[2285]	<213> 人工序列			
[2286]	<220>			
[2287]	<223> CD19 LCDR2 (5D08)			
[2288]	<400> 102			
[2289]	Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser			
[2290]	1	5		
[2291]	<210> 103			
[2292]	<211> 9			
[2293]	<212> PRT			
[2294]	<213> 人工序列			
[2295]	<220>			
[2296]	<223> CD19 LCDR3 (5D08)			
[2297]	<400> 103			
[2298]	Leu Gln Leu Thr His Glu Pro Tyr Thr			
[2299]	1	5		
[2300]	<210> 104			

[2301]	<211>	121
[2302]	<212>	PRT
[2303]	<213>	人工序列
[2304]	<220>	
[2305]	<223>	CD19 VH (5D08)
[2306]	<400>	104
[2307]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
[2308]	1	5 10 15
[2309]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr	
[2310]		20 25 30
[2311]	Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
[2312]		35 40 45
[2313]	Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe	
[2314]		50 55 60
[2315]	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr	
[2316]		65 70 75 80
[2317]	Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[2318]		85 90 95
[2319]	Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu Phe Asp Tyr Trp Gly	
[2320]		100 105 110
[2321]	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
[2322]		115 120
[2323]	<210>	105
[2324]	<211>	112
[2325]	<212>	PRT
[2326]	<213>	人工序列
[2327]	<220>	
[2328]	<223>	CD19 VL (5D08)
[2329]	<400>	105
[2330]	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly	
[2331]	1	5 10 15
[2332]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser	
[2333]		20 25 30
[2334]	Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	
[2335]		35 40 45
[2336]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro	
[2337]		50 55 60
[2338]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
[2339]		65 70 75 80

[2340]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu
[2341]	85 90 95
[2342]	Thr His Glu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[2343]	100 105 110
[2344]	<210> 106
[2345]	<211> 5
[2346]	<212> PRT
[2347]	<213> 小鼠 (Mus musculus)
[2348]	<400> 106
[2349]	Asp Tyr Ile Met His
[2350]	1 5
[2351]	<210> 107
[2352]	<211> 17
[2353]	<212> PRT
[2354]	<213> 小鼠 (Mus musculus)
[2355]	<400> 107
[2356]	Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe Asn
[2357]	1 5 10 15
[2358]	Gly
[2359]	<210> 108
[2360]	<211> 12
[2361]	<212> PRT
[2362]	<213> 小鼠 (Mus musculus)
[2363]	<400> 108
[2364]	Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr
[2365]	1 5 10
[2366]	<210> 109
[2367]	<211> 16
[2368]	<212> PRT
[2369]	<213> 小鼠 (Mus musculus)
[2370]	<400> 109
[2371]	Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
[2372]	1 5 10 15
[2373]	<210> 110
[2374]	<211> 7
[2375]	<212> PRT
[2376]	<213> 小鼠 (Mus musculus)
[2377]	<400> 110
[2378]	Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser

[2379] 1 5
 [2380] <210> 111
 [2381] <211> 9
 [2382] <212> PRT
 [2383] <213> 小鼠 (Mus musculus)
 [2384] <400> 111
 [2385] Leu Gln Leu Thr His Val Pro Tyr Thr
 [2386] 1 5
 [2387] <210> 112
 [2388] <211> 121
 [2389] <212> PRT
 [2390] <213> 小鼠 (Mus musculus)
 [2391] <400> 112
 [2392] Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 [2393] 1 5 10 15
 [2394] Ser Val Lys Met Ala Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 [2395] 20 25 30
 [2396] Ile Met His Trp Val Lys Gln Lys Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 [2397] 35 40 45
 [2398] Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
 [2399] 50 55 60
 [2400] Asn Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ile Thr Ala Tyr
 [2401] 65 70 75 80
 [2402] Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 [2403] 85 90 95
 [2404] Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
 [2405] 100 105 110
 [2406] Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 [2407] 115 120
 [2408] <210> 113
 [2409] <211> 112
 [2410] <212> PRT
 [2411] <213> 小鼠 (Mus musculus)
 [2412] <400> 113
 [2413] Asp Ala Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 [2414] 1 5 10 15
 [2415] Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
 [2416] 20 25 30
 [2417] Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

[2418]	35	40	45
[2419]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Leu		
[2420]	50	55	60
[2421]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
[2422]	65	70	75
[2423]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Leu		
[2424]	85	90	95
[2425]	Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[2426]	100	105	110
[2427]	<210> 114		
[2428]	<211> 449		
[2429]	<212> PRT		
[2430]	<213> 人工序列		
[2431]	<220>		
[2432]	<223> CD19 (2B11) VH-CH1 (EE) -Fc (穴, P329G LALA)		
[2433]	<400> 114		
[2434]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
[2435]	1	5	10
[2436]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr		
[2437]	20	25	30
[2438]	Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
[2439]	35	40	45
[2440]	Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe		
[2441]	50	55	60
[2442]	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr		
[2443]	65	70	75
[2444]	Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[2445]	85	90	95
[2446]	Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Gln Leu Phe Asp Tyr Trp Gly		
[2447]	100	105	110
[2448]	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
[2449]	115	120	125
[2450]	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
[2451]	130	135	140
[2452]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
[2453]	145	150	155
[2454]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
[2455]	165	170	175
[2456]	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		

[2457]		180		185		190												
[2458]	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His		
[2459]			195					200					205					
[2460]	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys		
[2461]		210					215					220						
[2462]	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly		
[2463]	225					230					235					240		
[2464]	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met		
[2465]				245						250					255			
[2466]	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His		
[2467]				260						265					270			
[2468]	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val		
[2469]			275						280				285					
[2470]	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr		
[2471]		290						295					300					
[2472]	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly		
[2473]	305					310					315					320		
[2474]	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile		
[2475]				325						330					335			
[2476]	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val		
[2477]				340						345					350			
[2478]	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser		
[2479]			355						360					365				
[2480]	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu		
[2481]		370						375					380					
[2482]	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro		
[2483]	385					390						395				400		
[2484]	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val		
[2485]				405						410					415			
[2486]	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met		
[2487]				420						425					430			
[2488]	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser		
[2489]			435						440						445			
[2490]	Pro																	
[2491]	<210>	115																
[2492]	<211>	674																
[2493]	<212>	PRT																
[2494]	<213>	人工序列																
[2495]	<220>																	

[2496] <223> CD19 (2B11) VH-CH1 (EE) -CD3 VL-CH1-Fc (节, P329G LALA)
 [2497] <400> 115
 [2498] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 [2499] 1 5 10 15
 [2500] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 [2501] 20 25 30
 [2502] Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 [2503] 35 40 45
 [2504] Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
 [2505] 50 55 60
 [2506] Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 [2507] 65 70 75 80
 [2508] Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [2509] 85 90 95
 [2510] Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Gln Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
 [2511] 100 105 110
 [2512] Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 [2513] 115 120 125
 [2514] Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 [2515] 130 135 140
 [2516] Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 [2517] 145 150 155 160
 [2518] Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 [2519] 165 170 175
 [2520] Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 [2521] 180 185 190
 [2522] Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 [2523] 195 200 205
 [2524] Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 [2525] 210 215 220
 [2526] Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr
 [2527] 225 230 235 240
 [2528] Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr
 [2529] 245 250 255
 [2530] Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp
 [2531] 260 265 270
 [2532] Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr
 [2533] 275 280 285
 [2534] Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu

[2535]	290	295	300
[2536]	Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu		
[2537]	305	310	315 320
[2538]	Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly		
[2539]	325	330	335
[2540]	Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro		
[2541]	340	345	350
[2542]	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr		
[2543]	355	360	365
[2544]	Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
[2545]	370	375	380
[2546]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro		
[2547]	385	390	395 400
[2548]	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr		
[2549]	405	410	415
[2550]	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn		
[2551]	420	425	430
[2552]	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser		
[2553]	435	440	445
[2554]	Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala		
[2555]	450	455	460
[2556]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
[2557]	465	470	475 480
[2558]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
[2559]	485	490	495
[2560]	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
[2561]	500	505	510
[2562]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr		
[2563]	515	520	525
[2564]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
[2565]	530	535	540
[2566]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro		
[2567]	545	550	555 560
[2568]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
[2569]	565	570	575
[2570]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val		
[2571]	580	585	590
[2572]	Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
[2573]	595	600	605

[2574]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
[2575]	610 615 620
[2576]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
[2577]	625 630 635 640
[2578]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
[2579]	645 650 655
[2580]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
[2581]	660 665 670
[2582]	Ser Pro
[2583]	<210> 116
[2584]	<211> 219
[2585]	<212> PRT
[2586]	<213> 人工序列
[2587]	<220>
[2588]	<223> CD19 (2B11) VL-CL (RK)
[2589]	<400> 116
[2590]	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
[2591]	1 5 10 15
[2592]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
[2593]	20 25 30
[2594]	Thr Gly Thr Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[2595]	35 40 45
[2596]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
[2597]	50 55 60
[2598]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[2599]	65 70 75 80
[2600]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu
[2601]	85 90 95
[2602]	Leu Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[2603]	100 105 110
[2604]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg
[2605]	115 120 125
[2606]	Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
[2607]	130 135 140
[2608]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
[2609]	145 150 155 160
[2610]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
[2611]	165 170 175
[2612]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

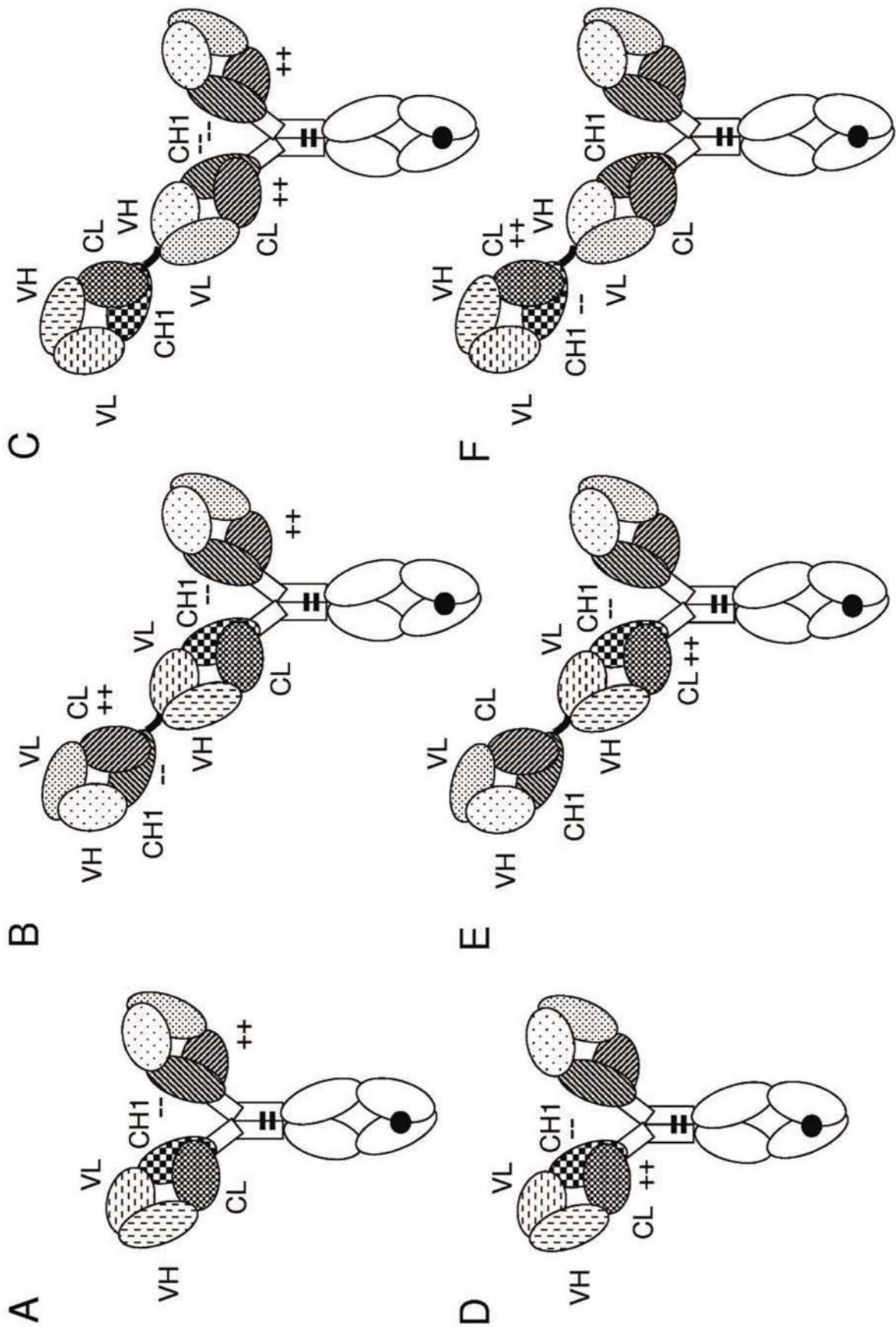


图1

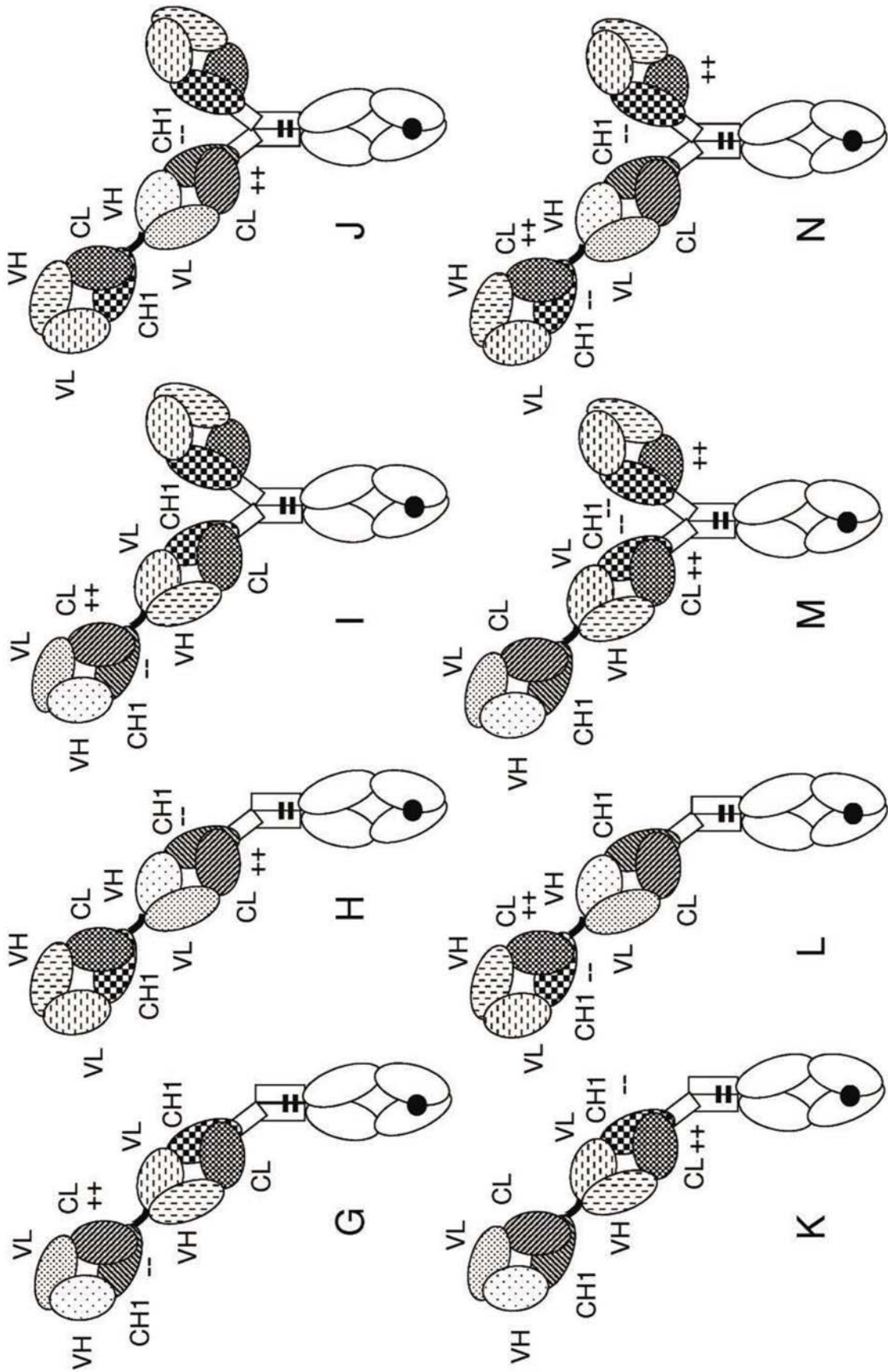


图1(续)

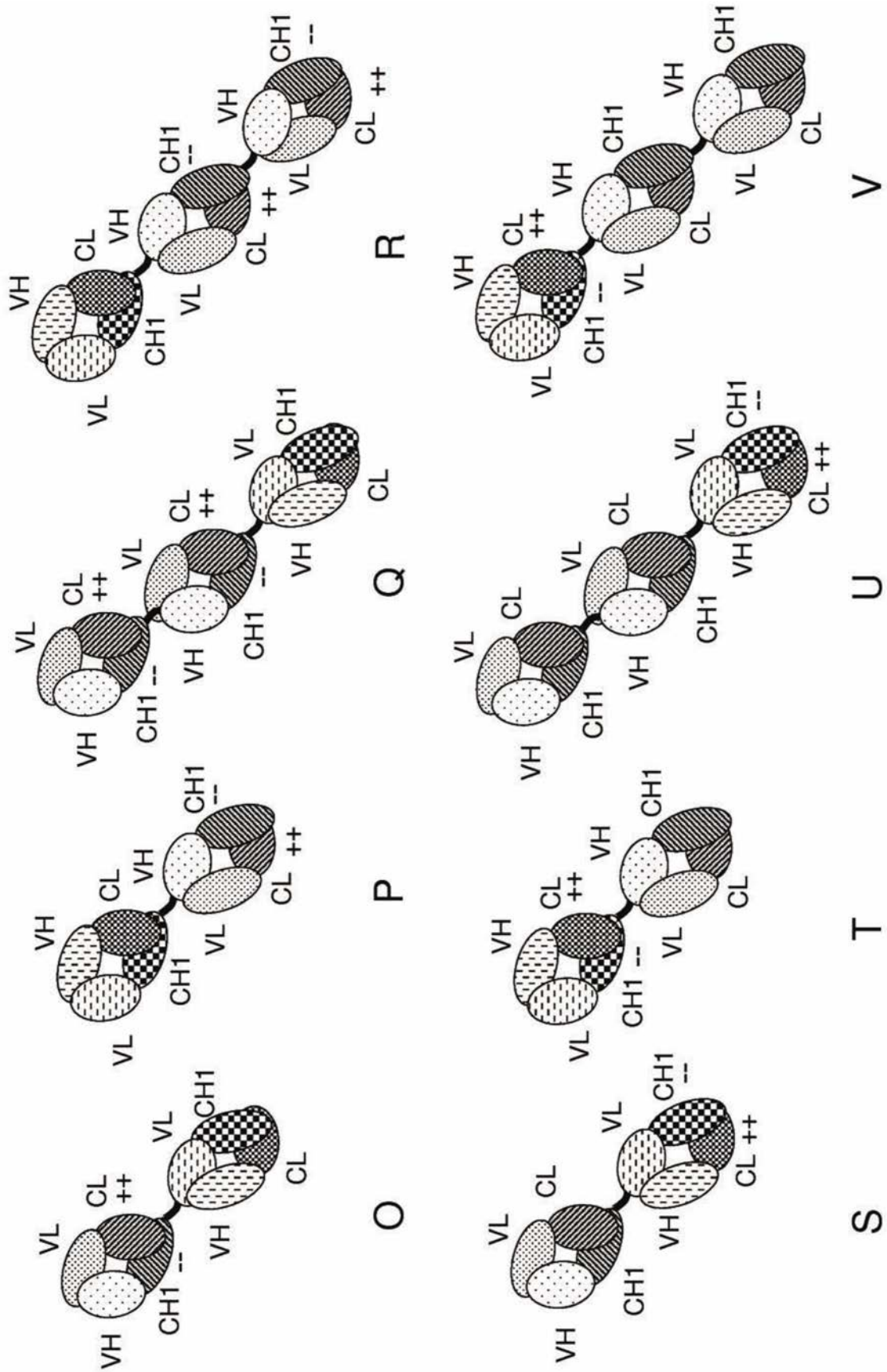


图1(续)

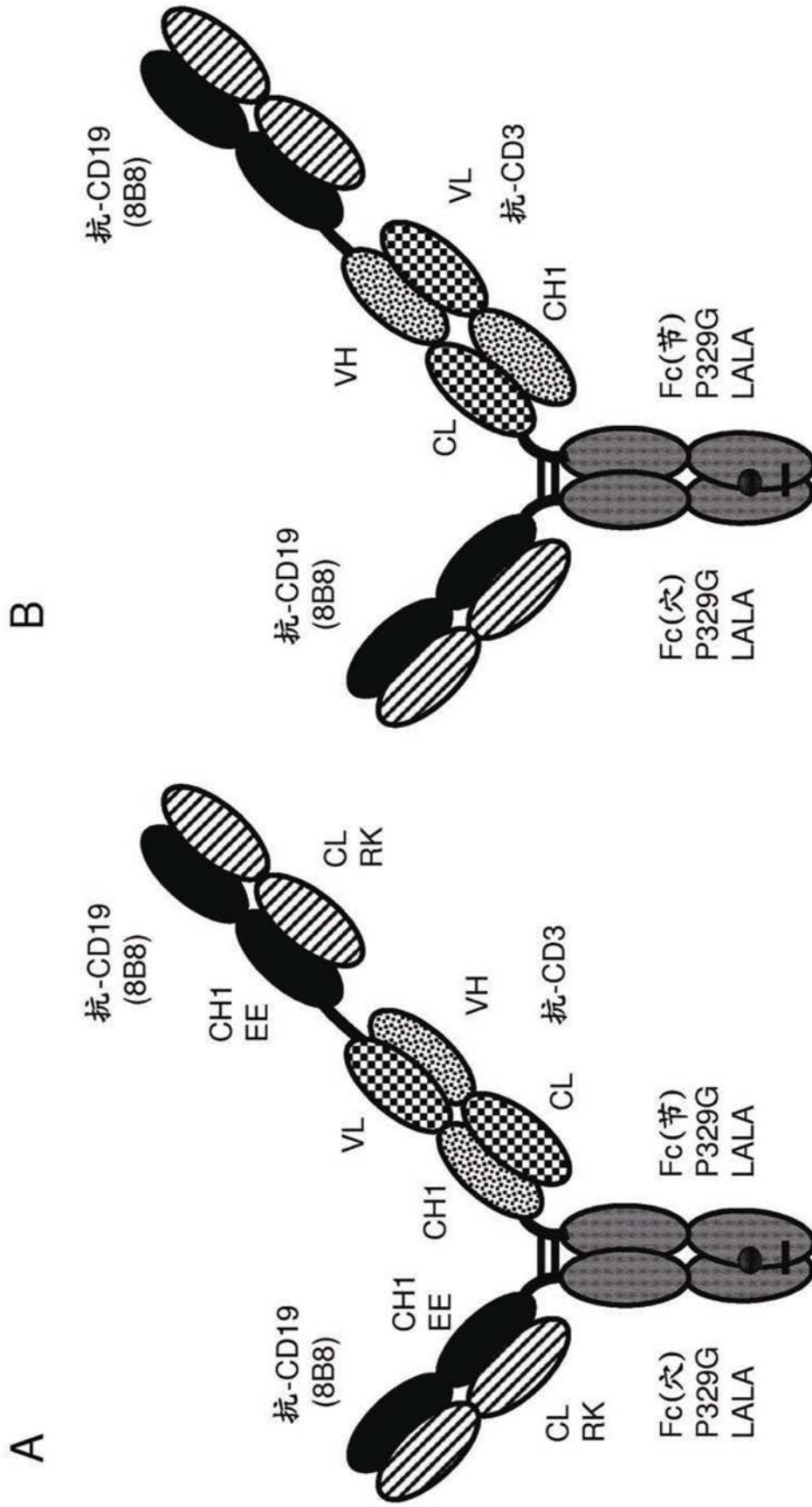


图2

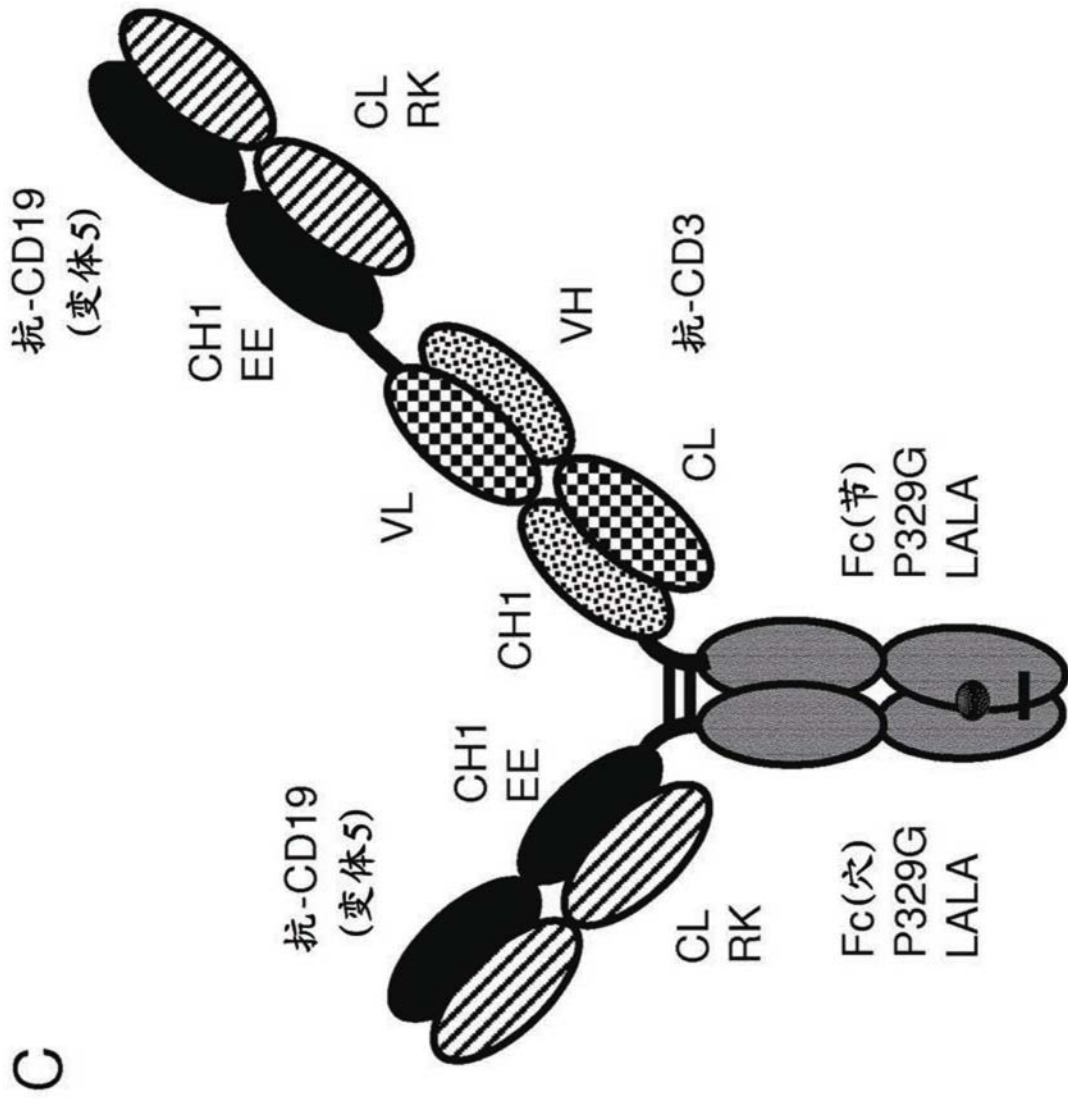


图2(续)

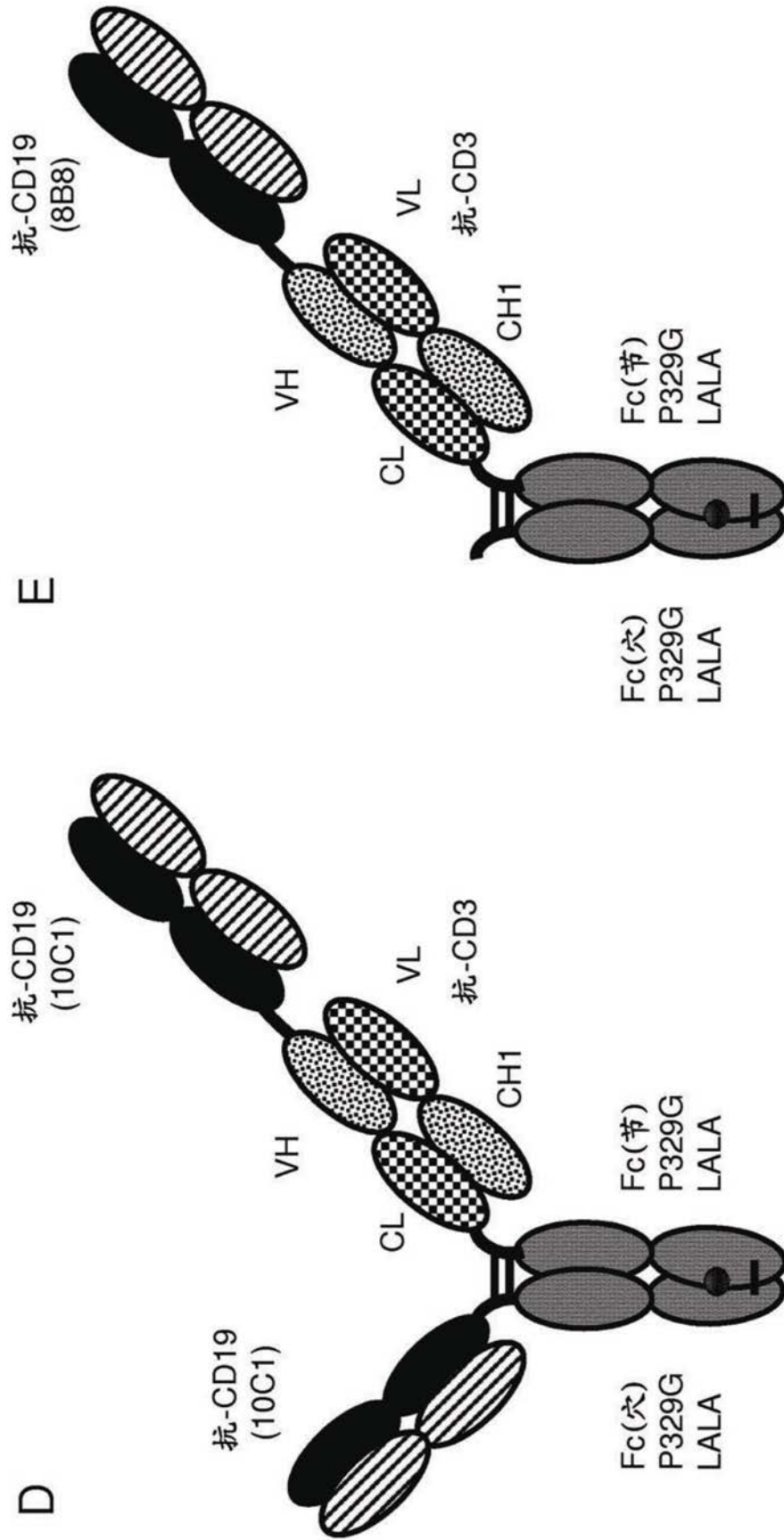


图2(续)

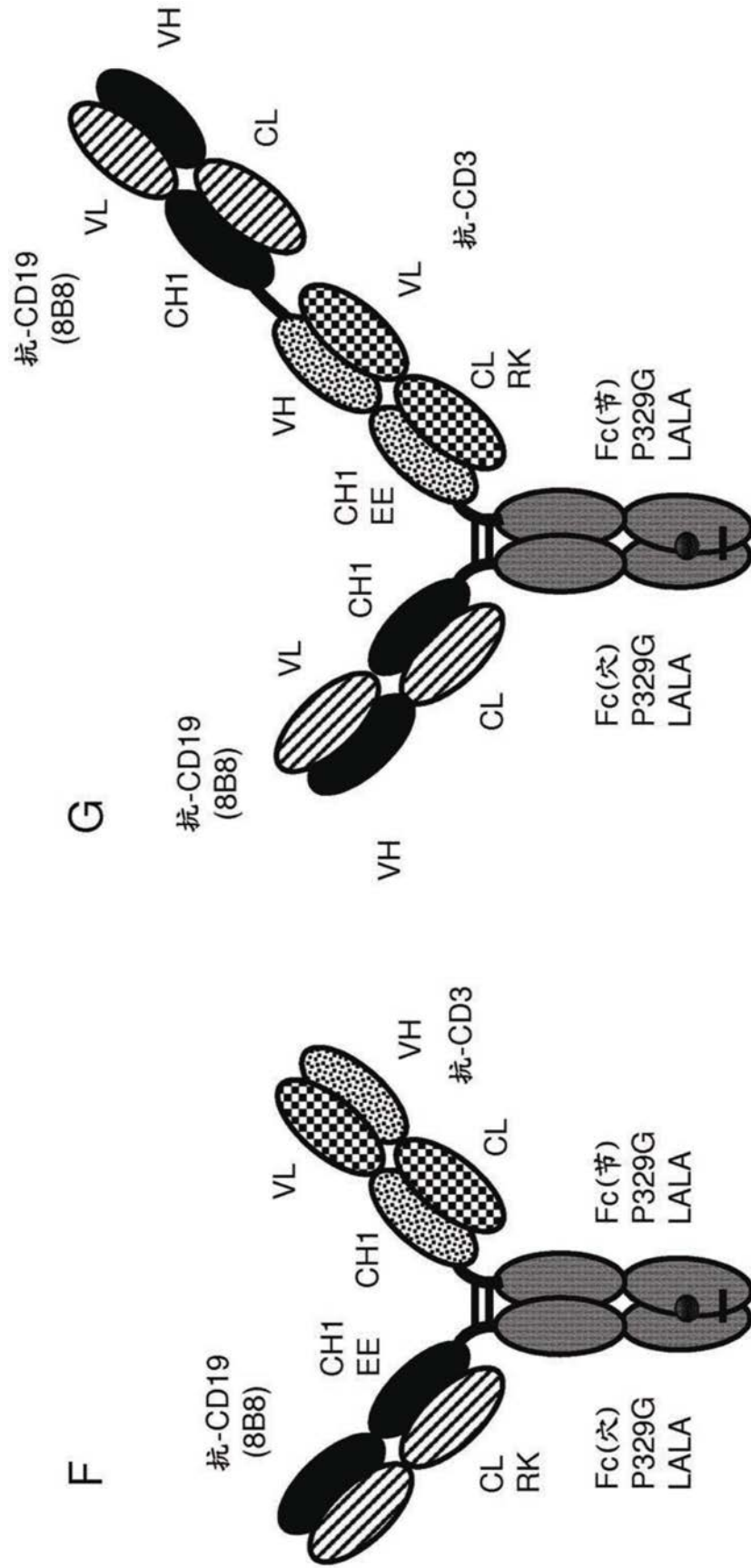


图2(续)

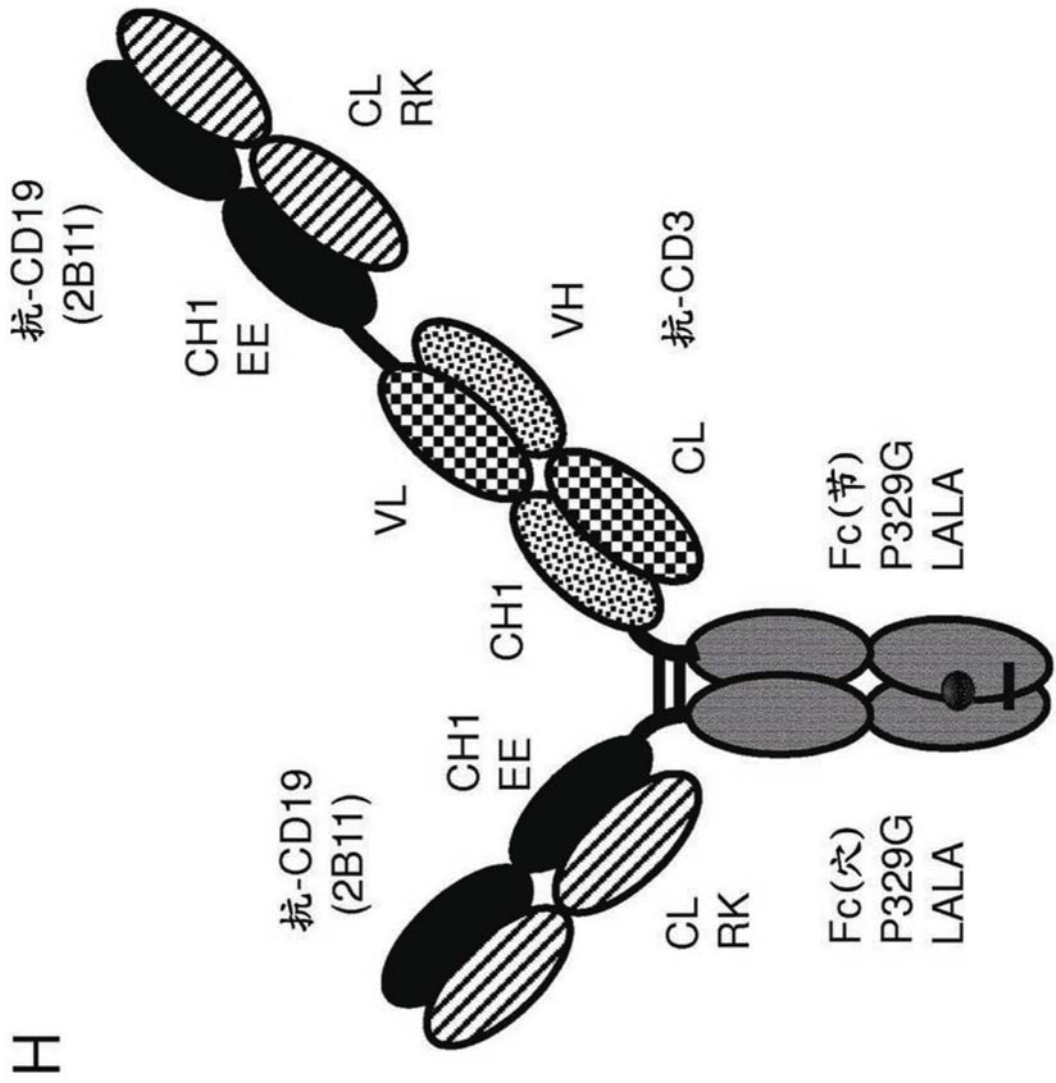


图2(续)

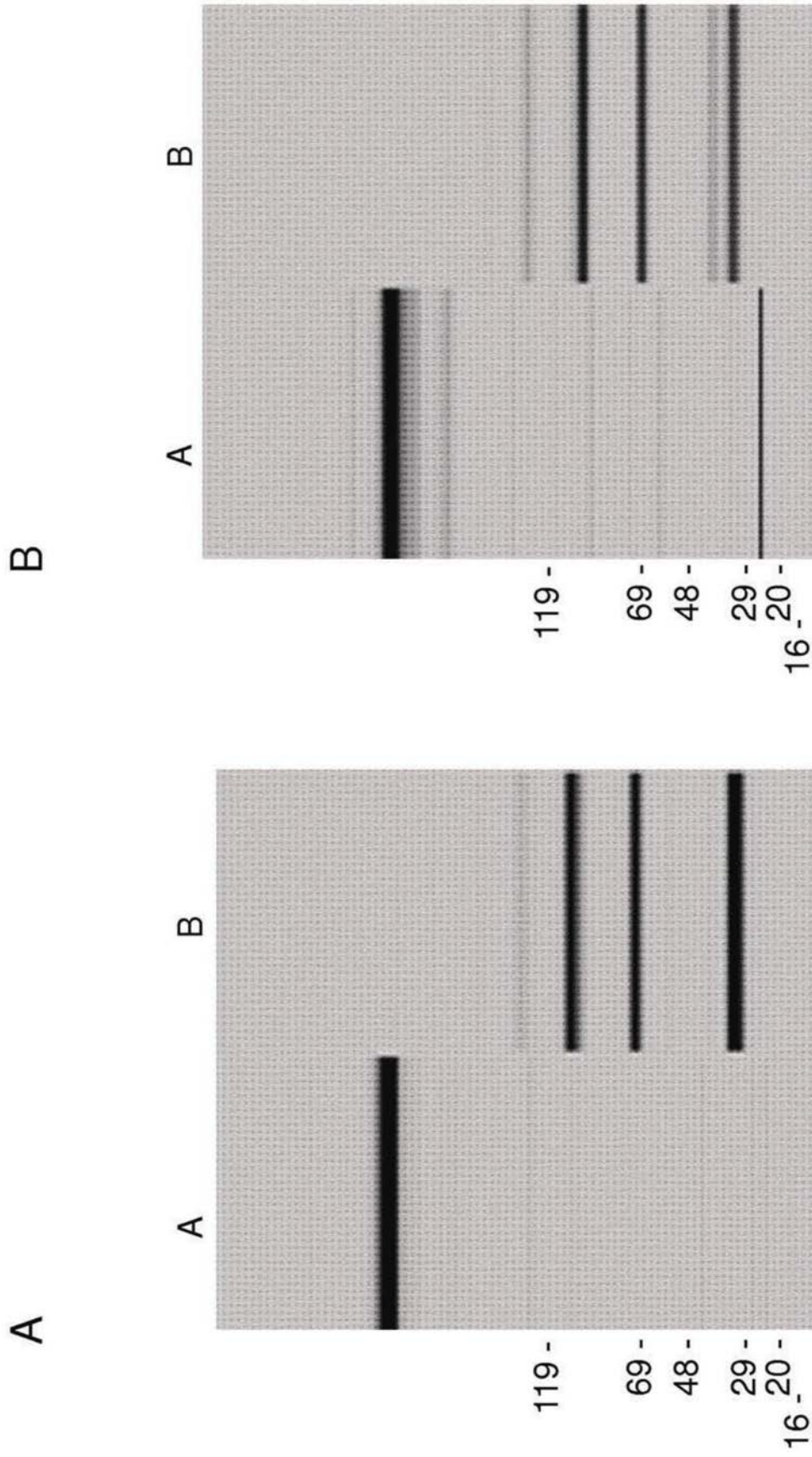


图3

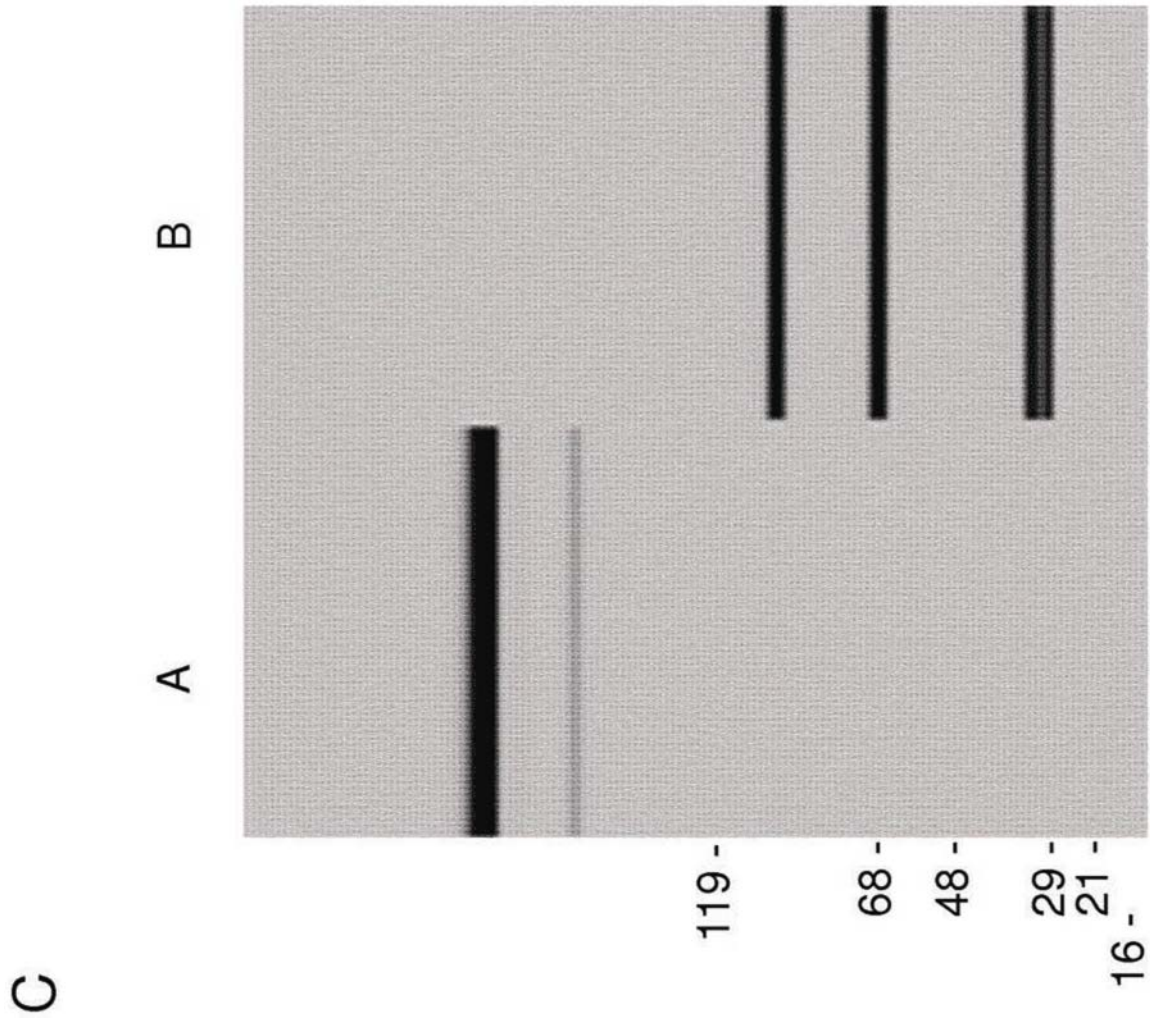


图3(续)

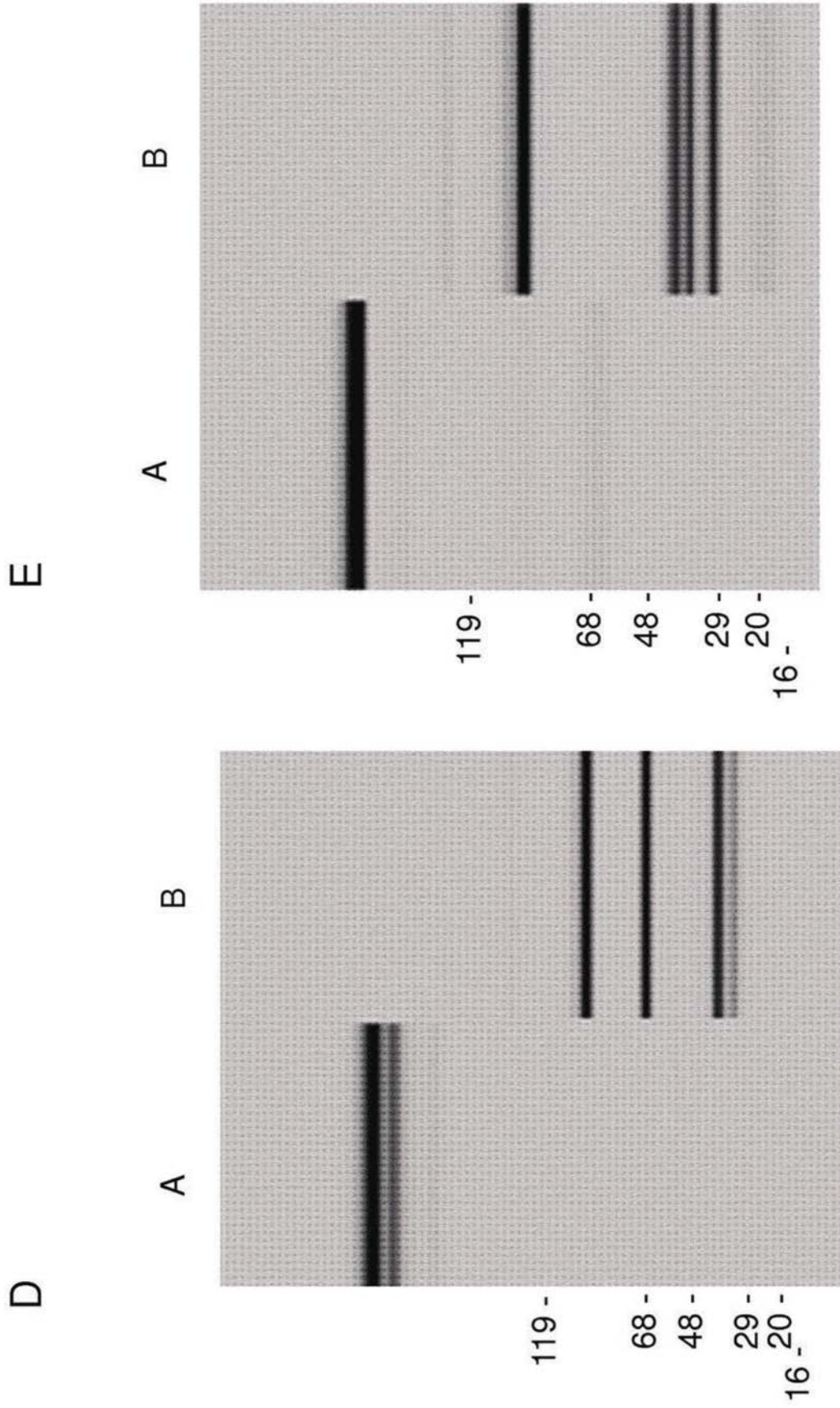


图3(续)

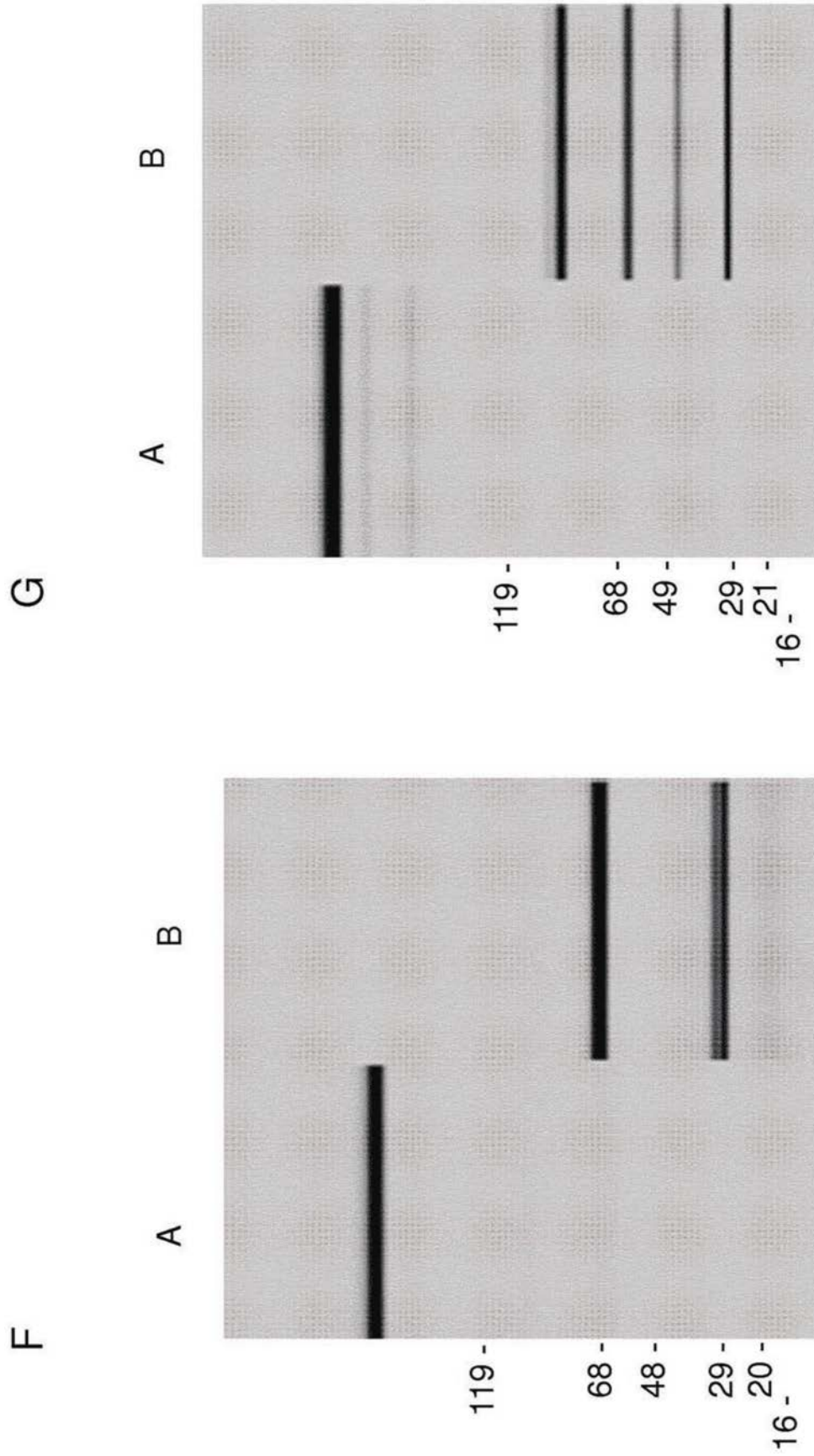


图3(续)

H

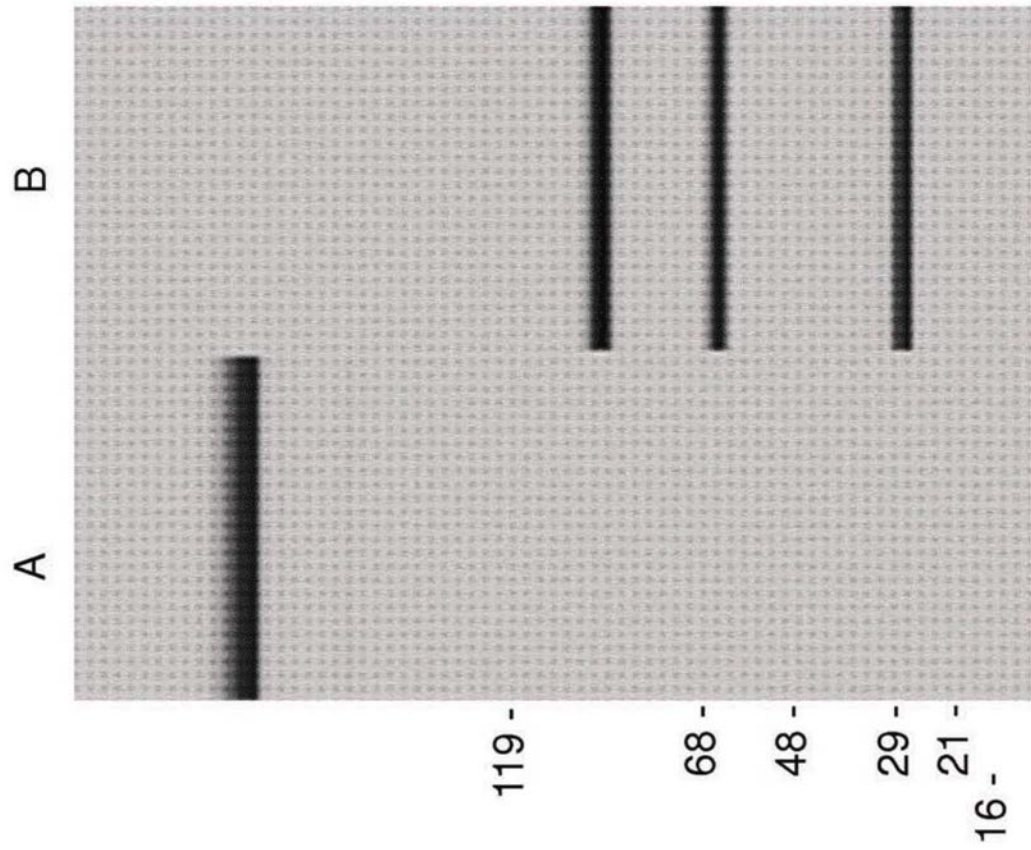


图3(续)

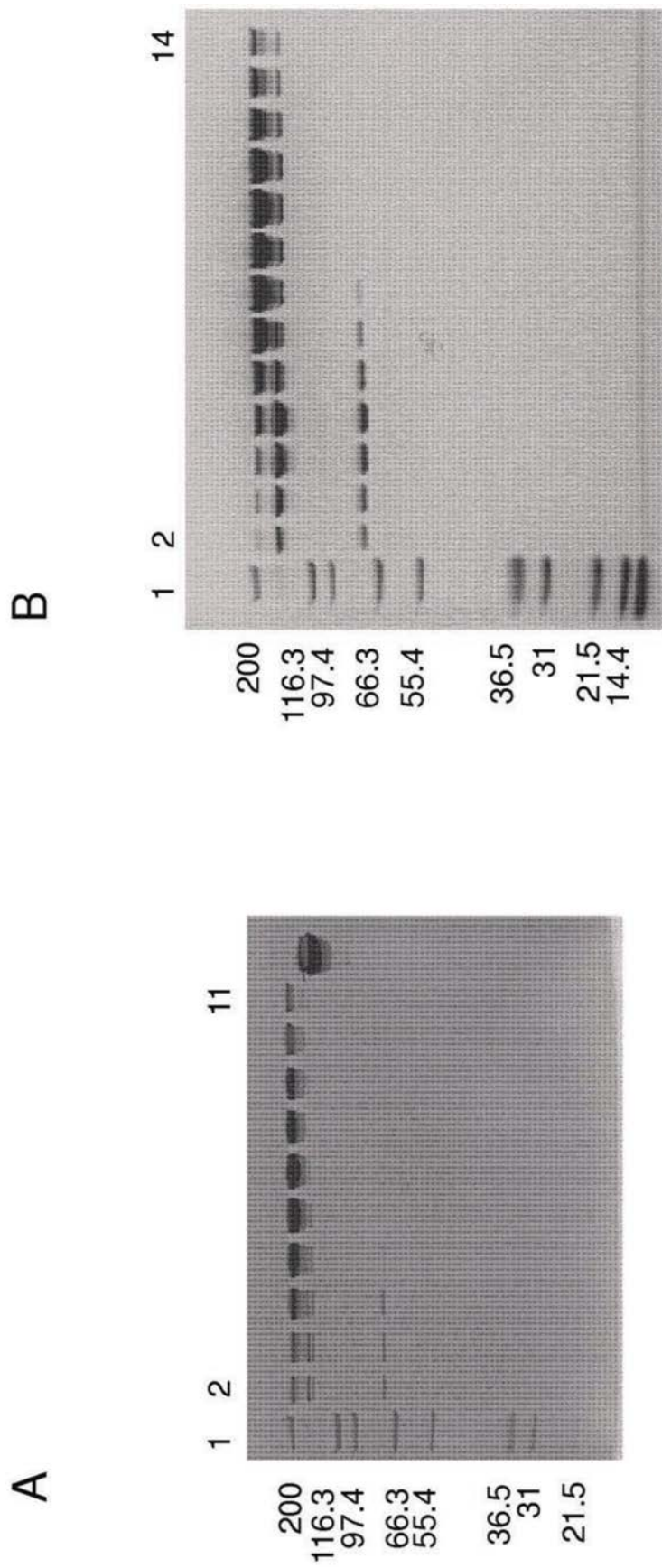


图4

C

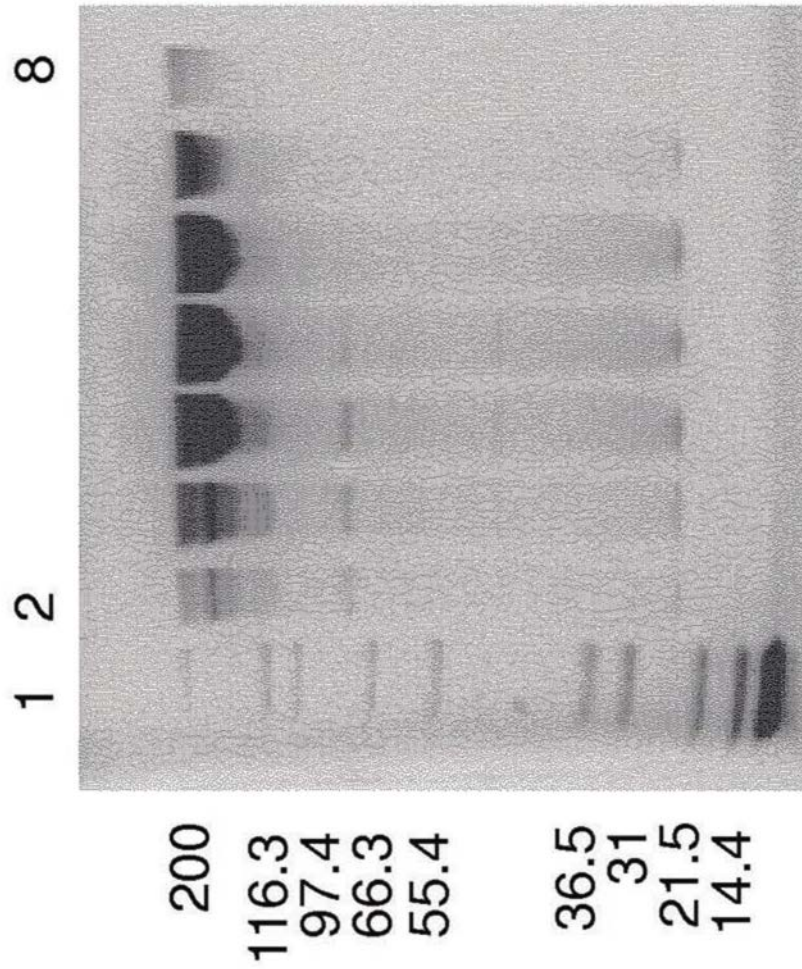
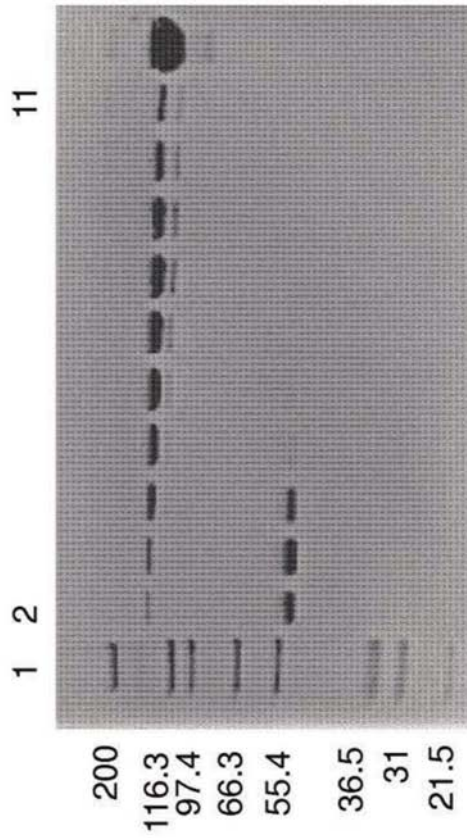


图4(续)

E



D

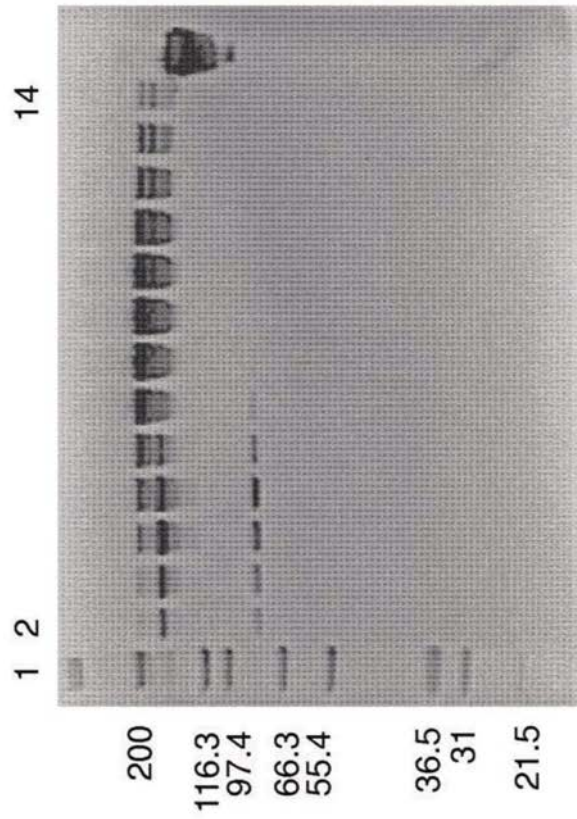
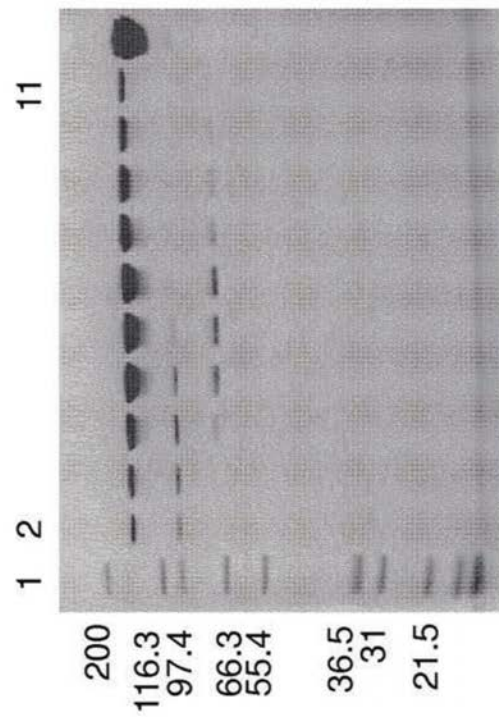


图4(续)

F



G

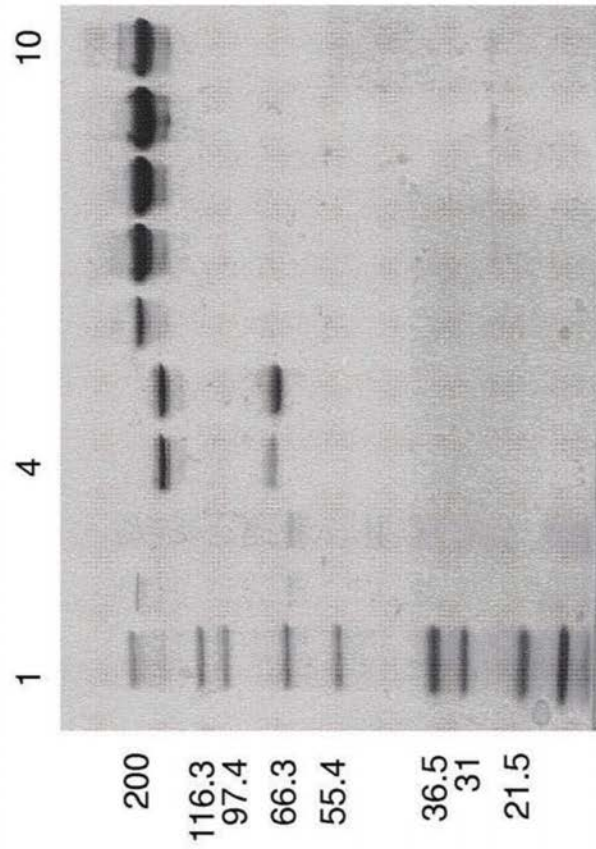


图4(续)

H

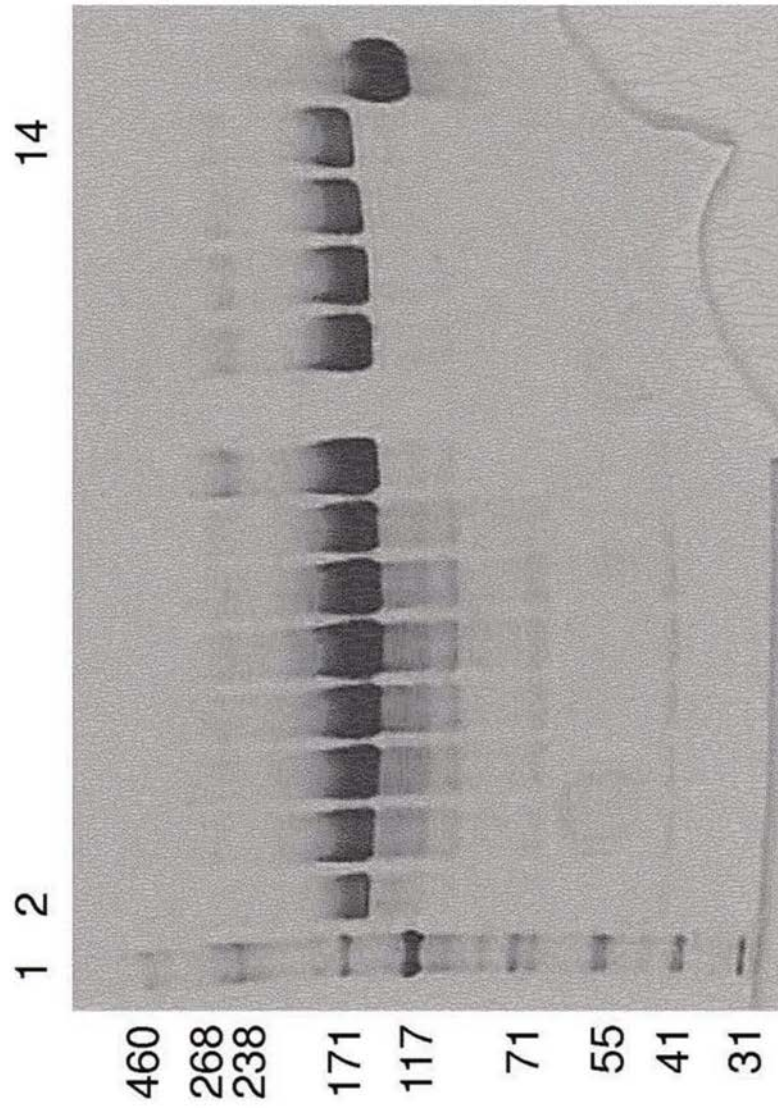


图4(续)

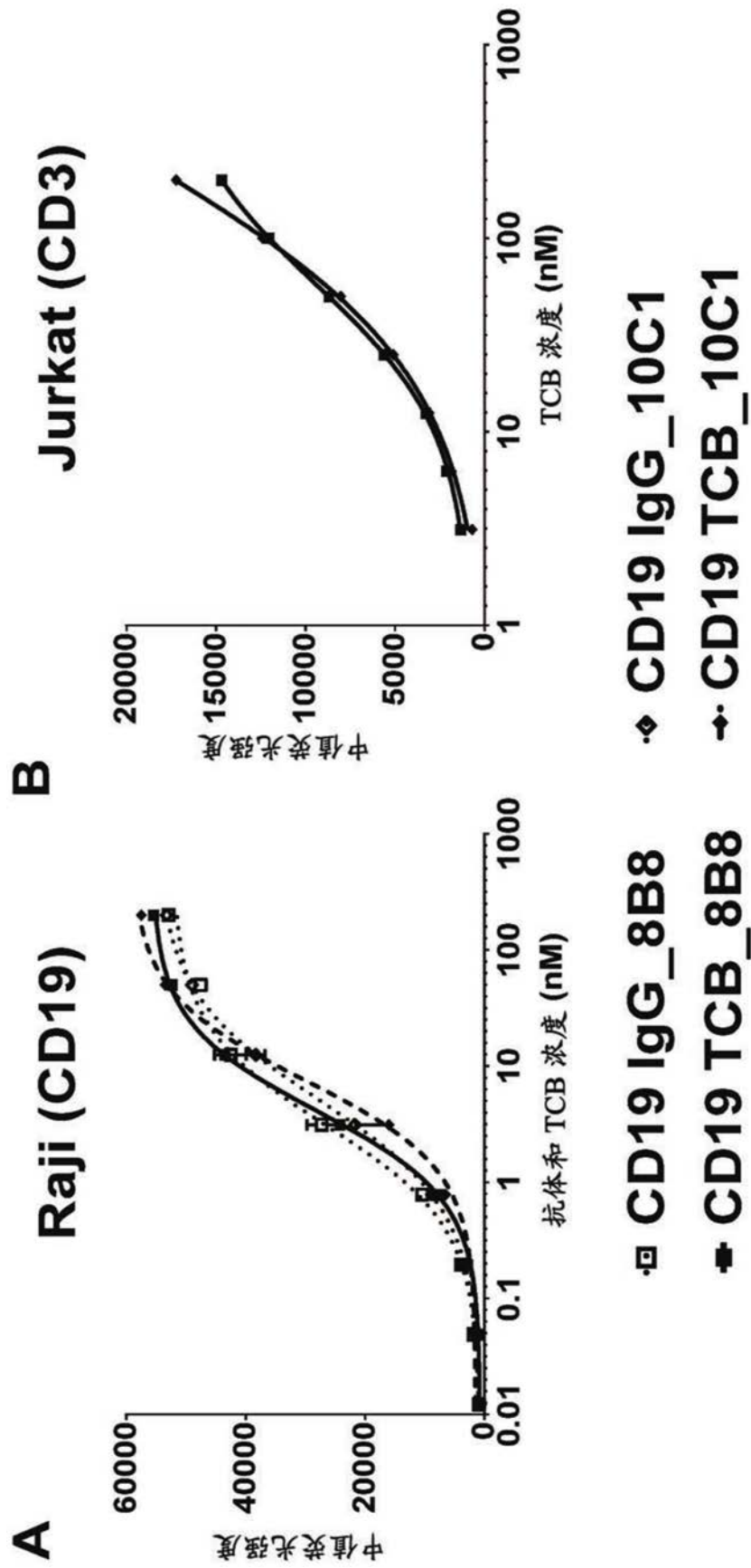


图5

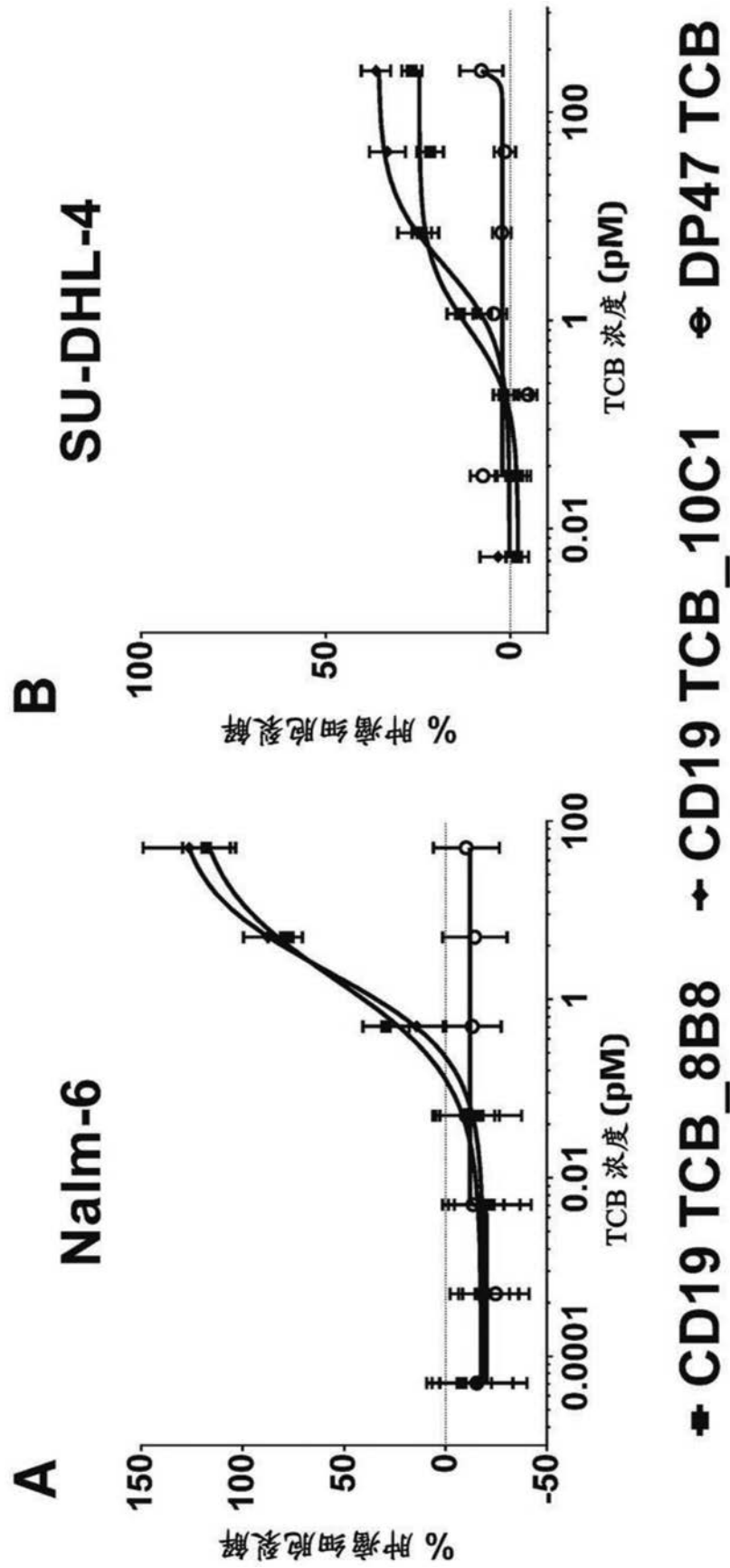


图6

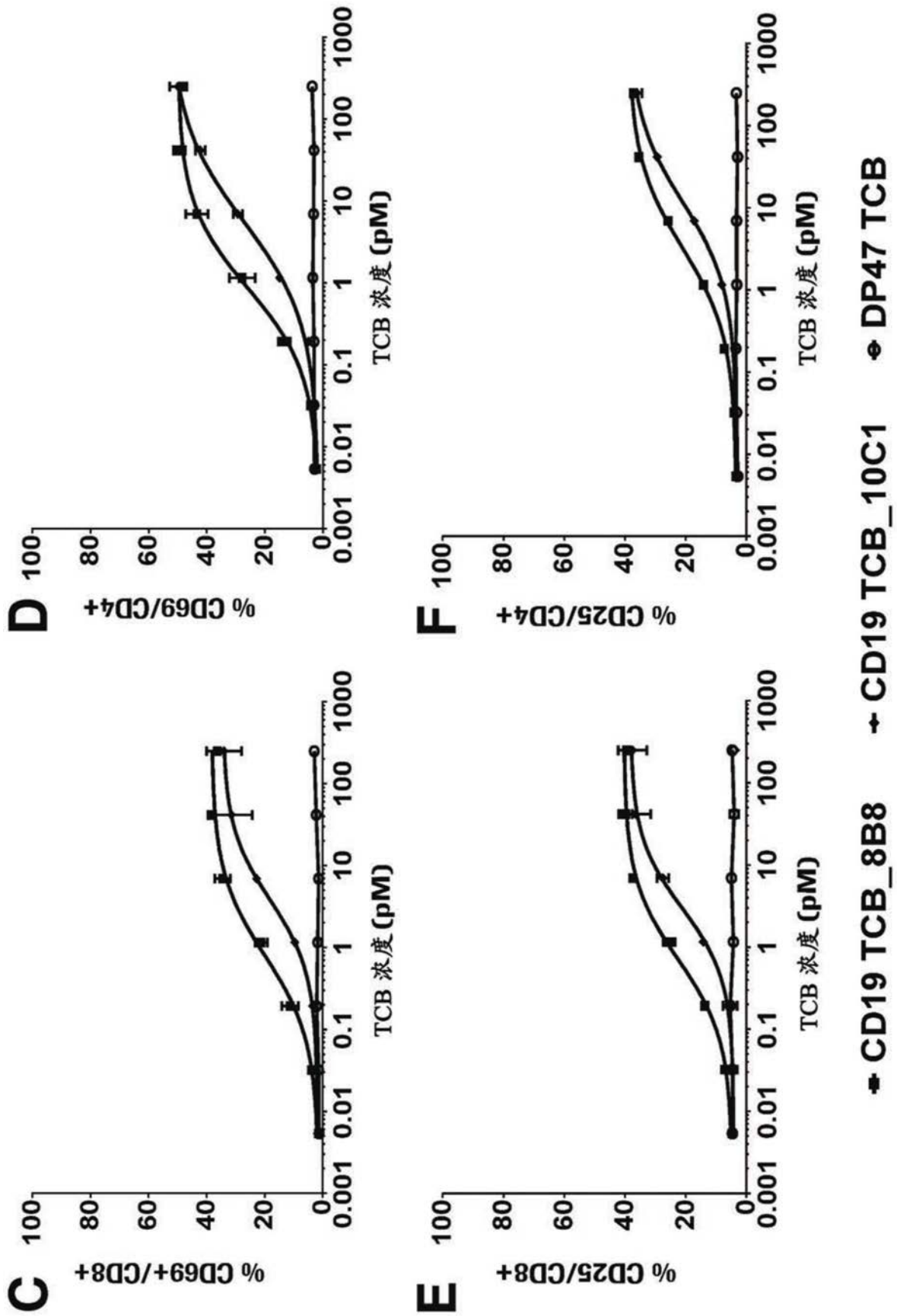


图6 (续)

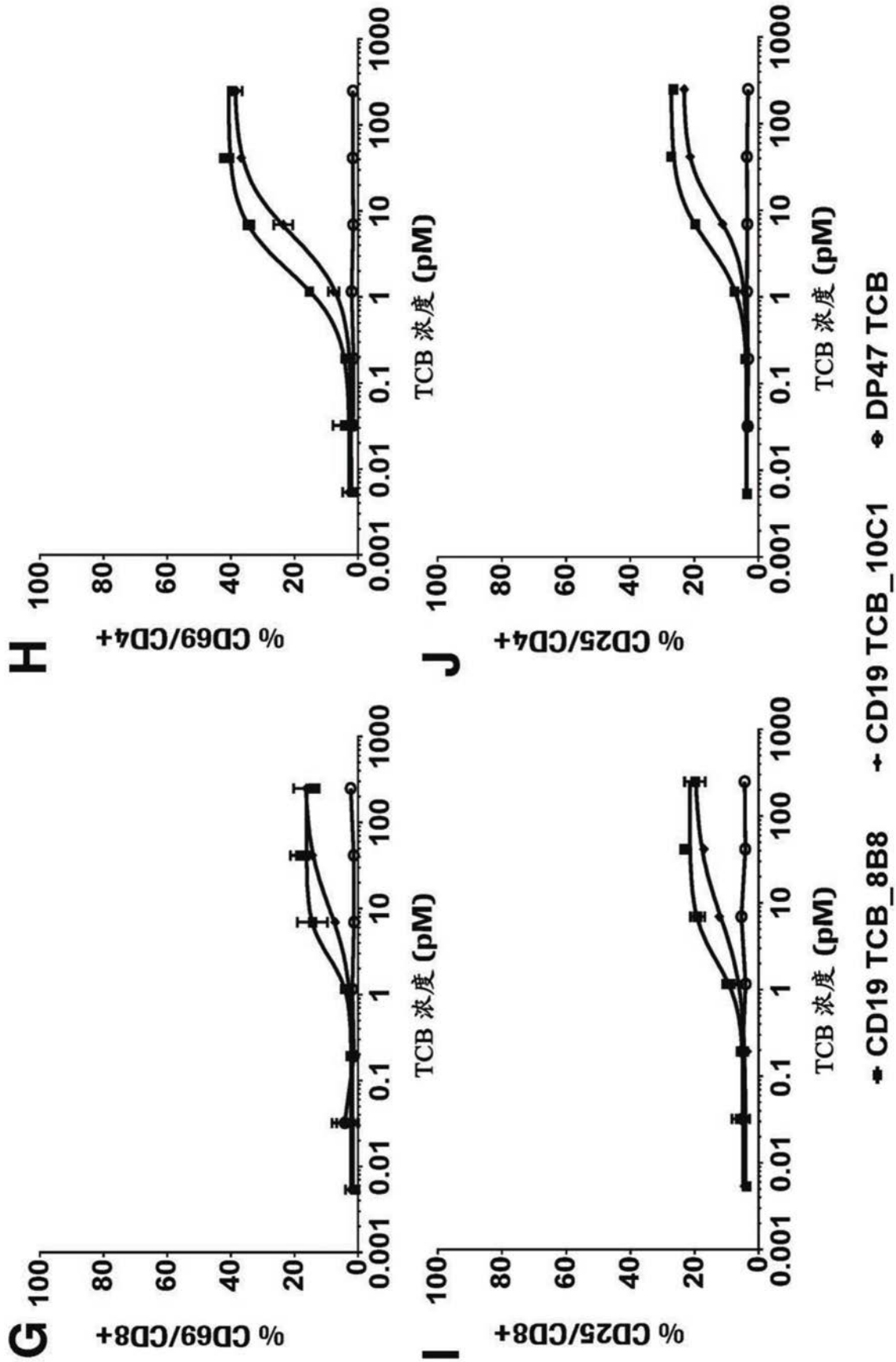


图6 (续)

K

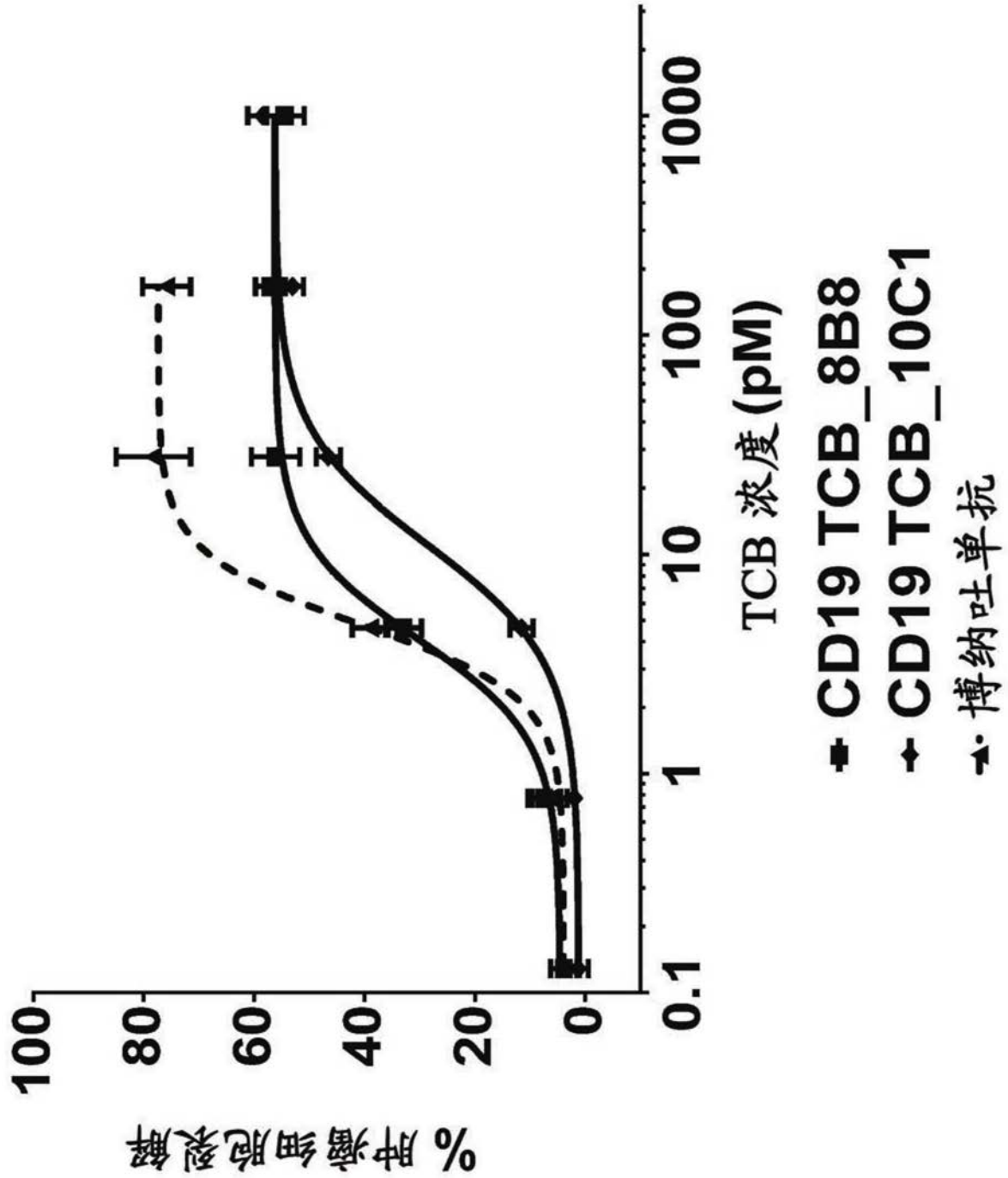


图6 (续)

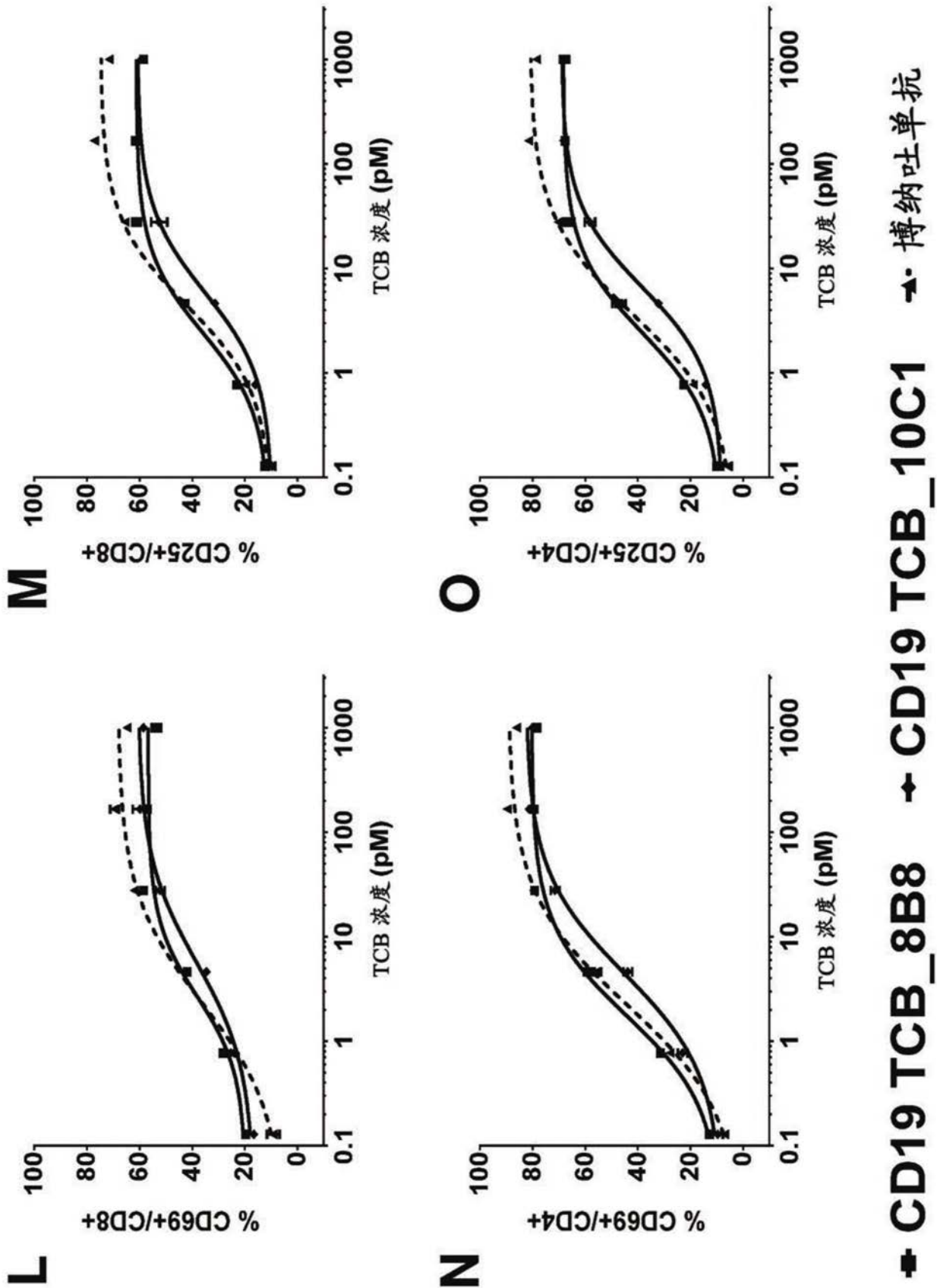


图6(续)

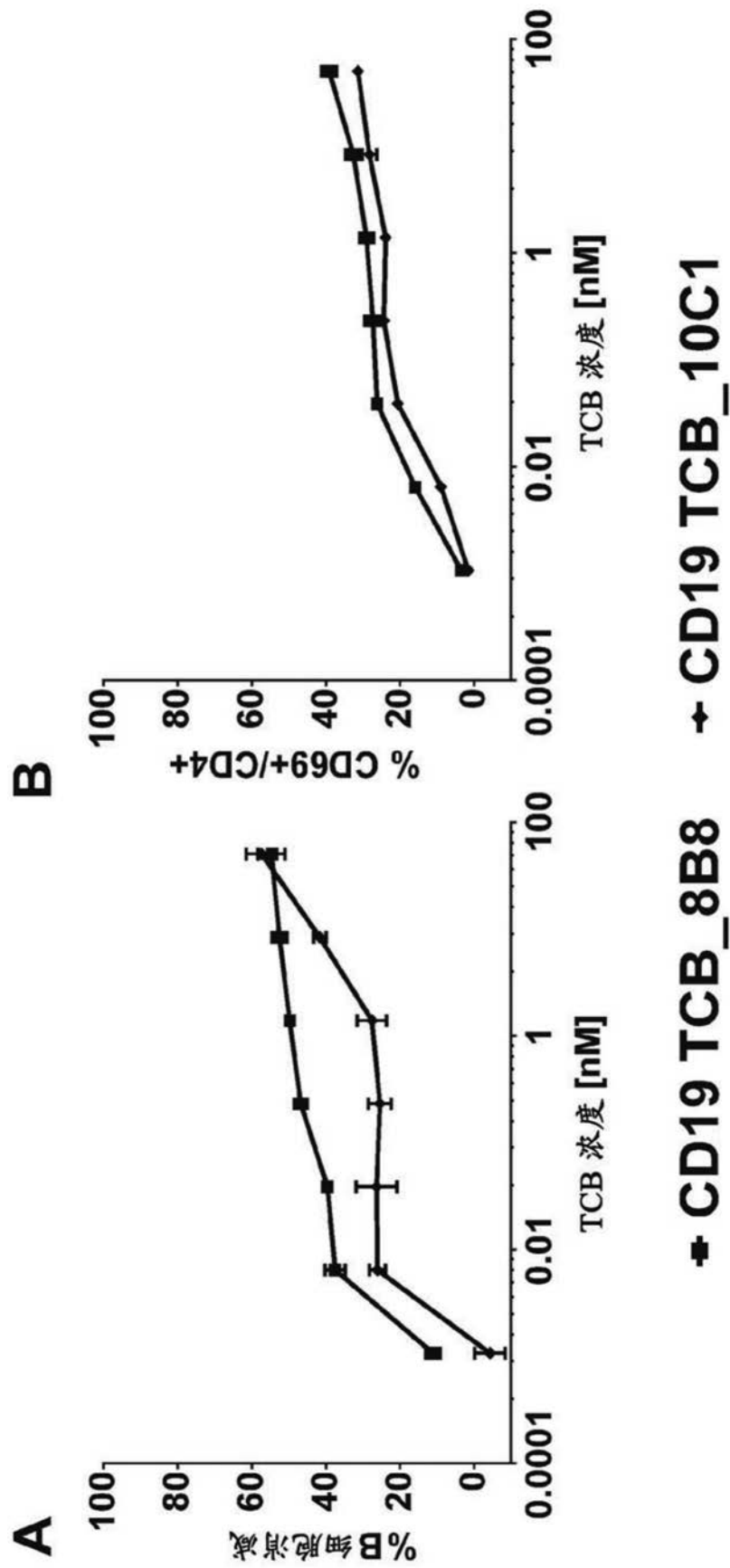


图7

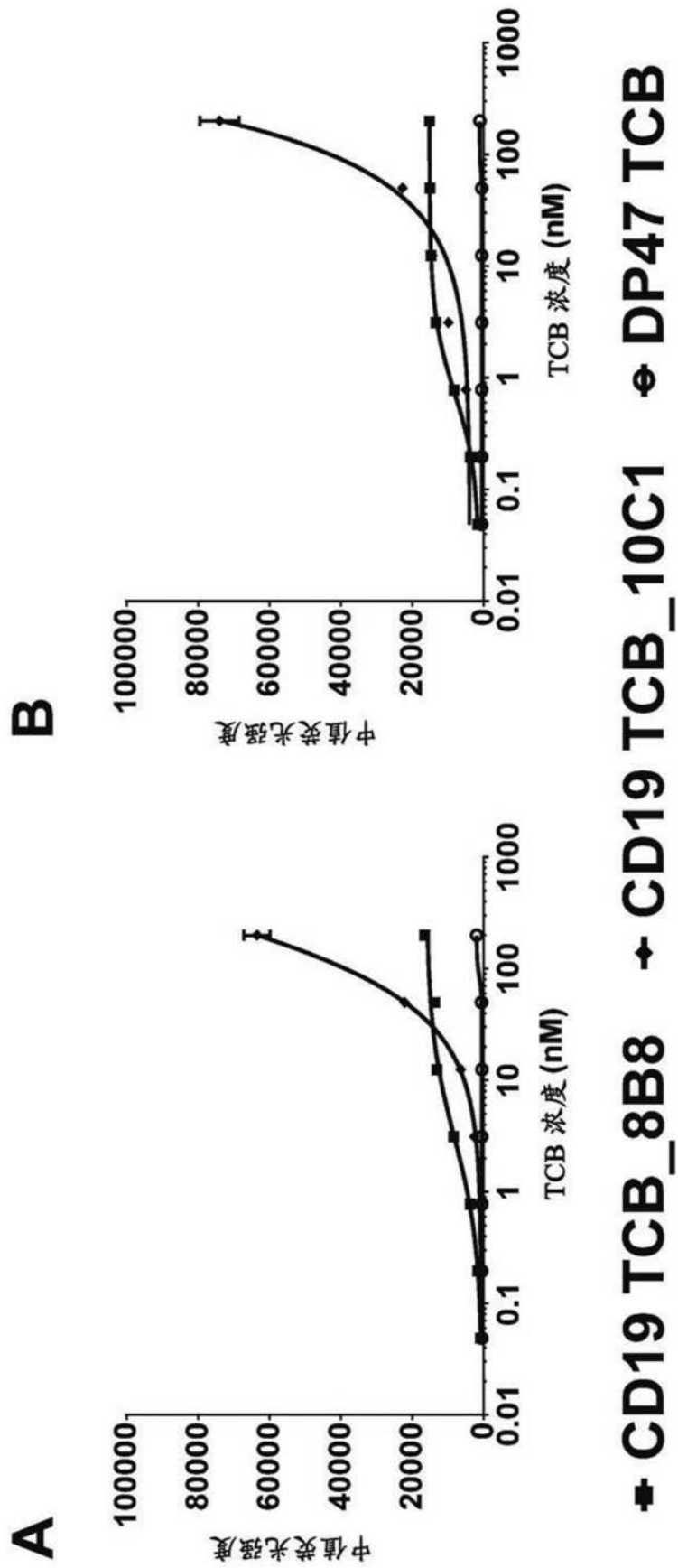


图8

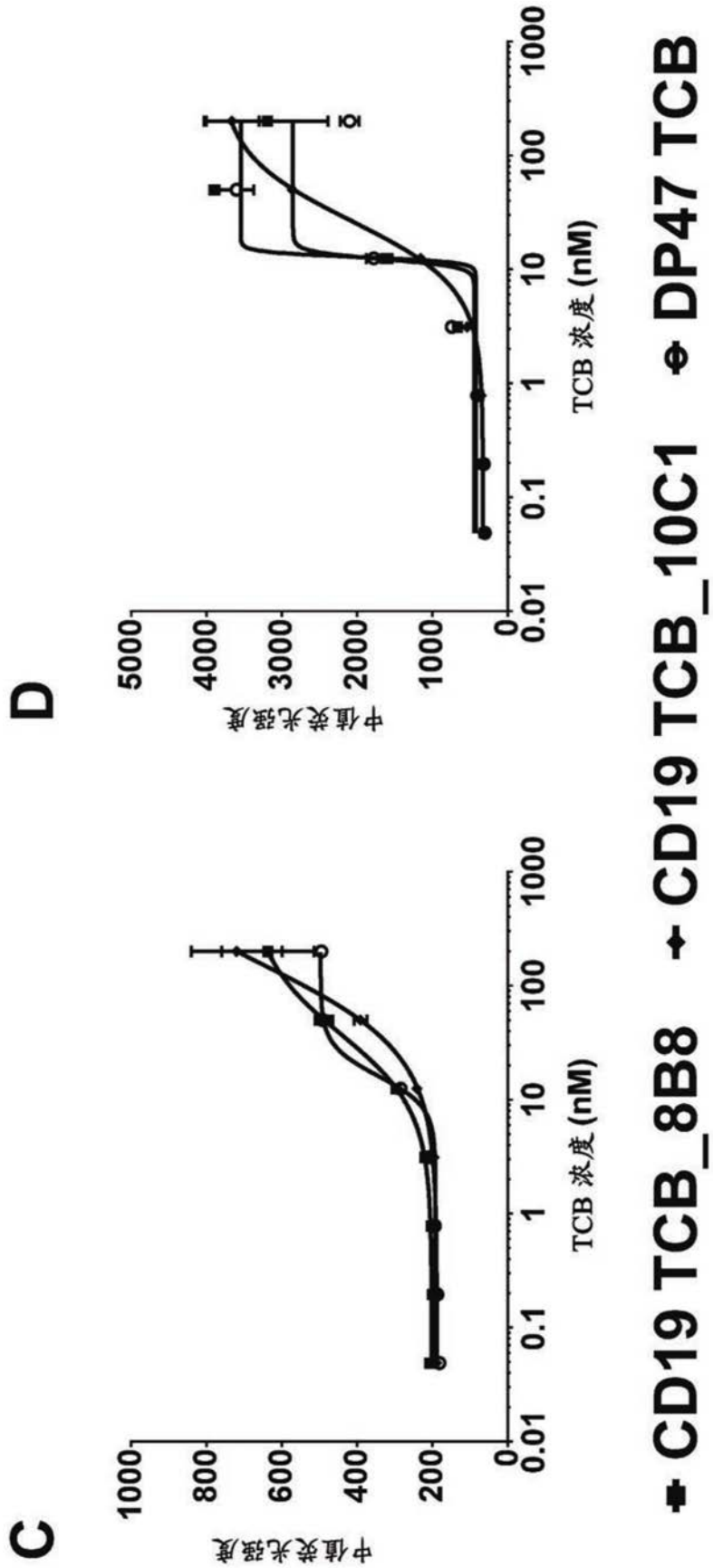


图8(续)

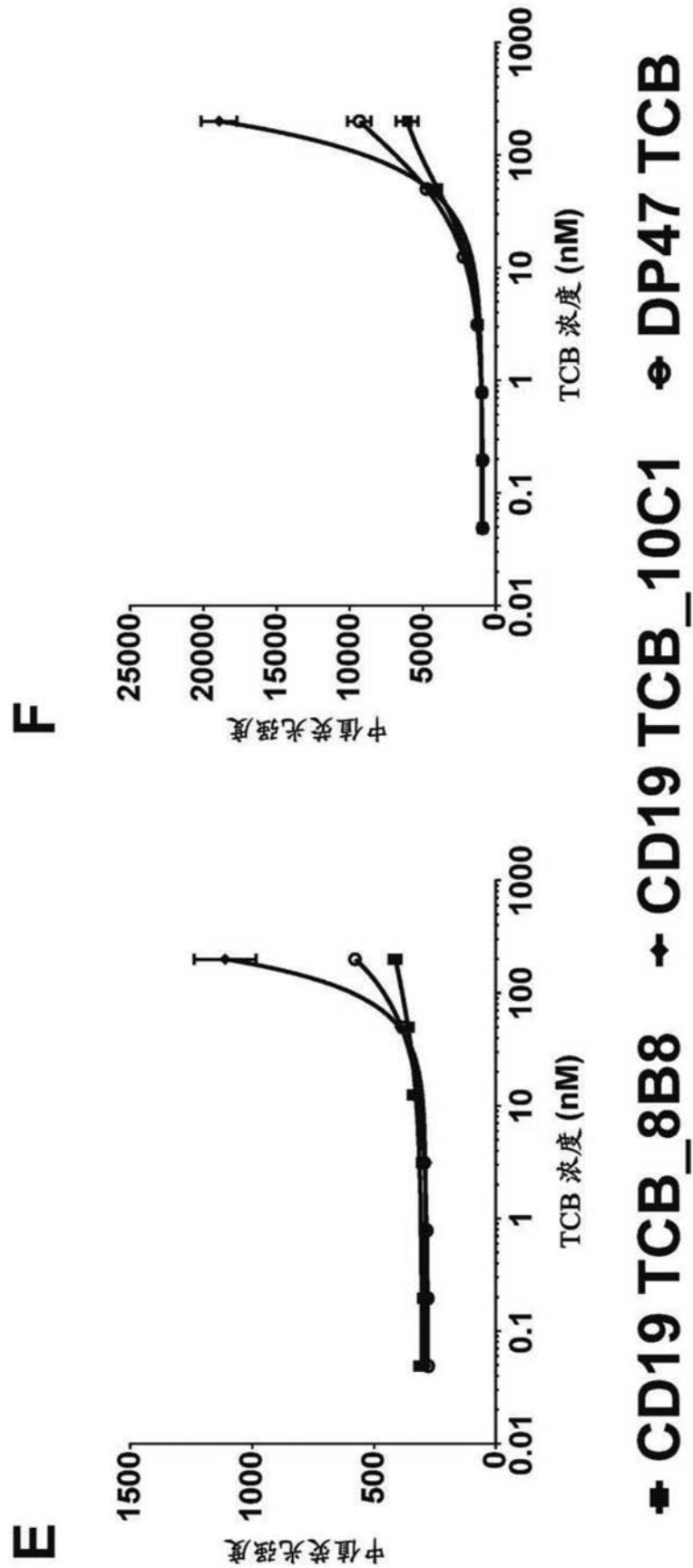
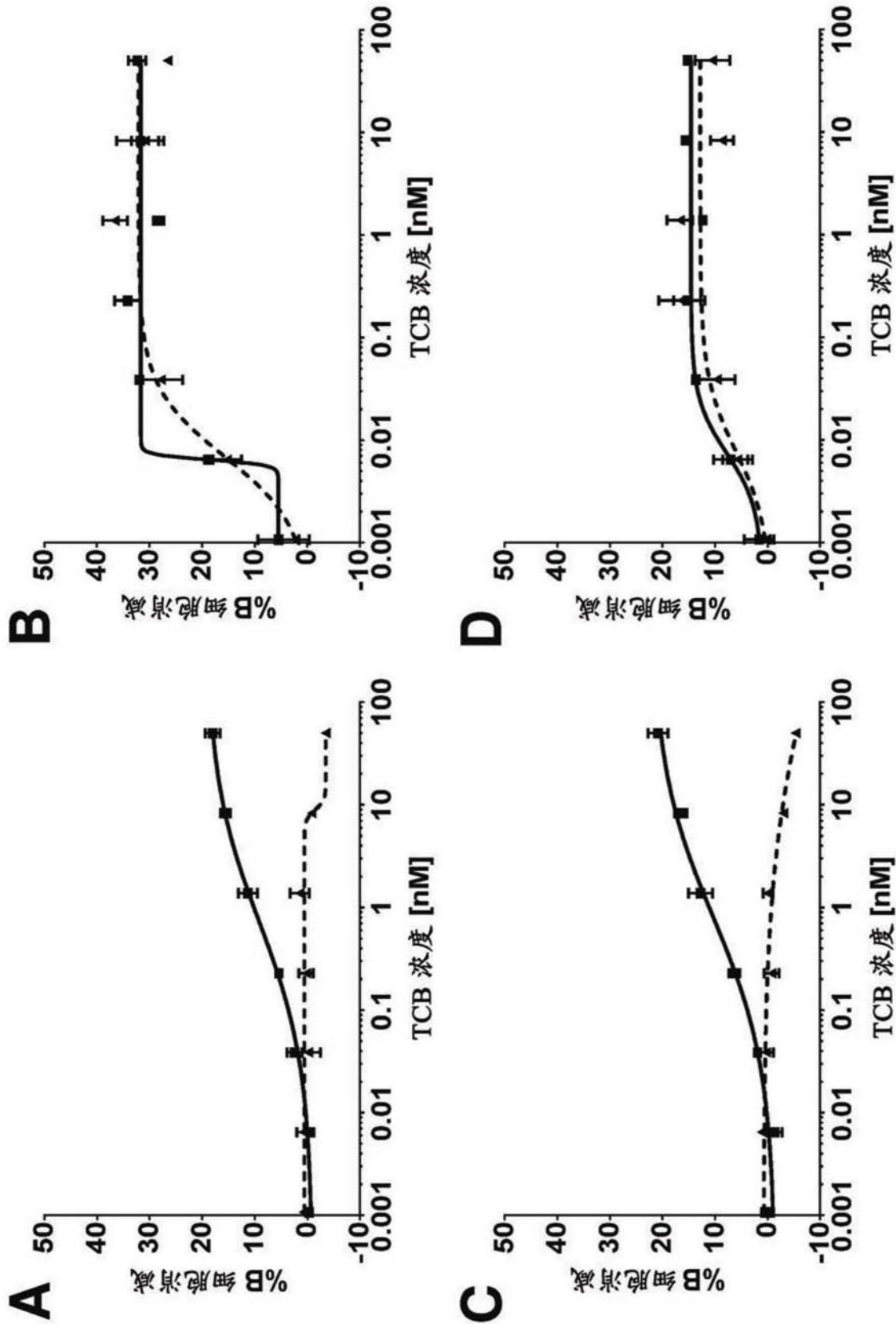


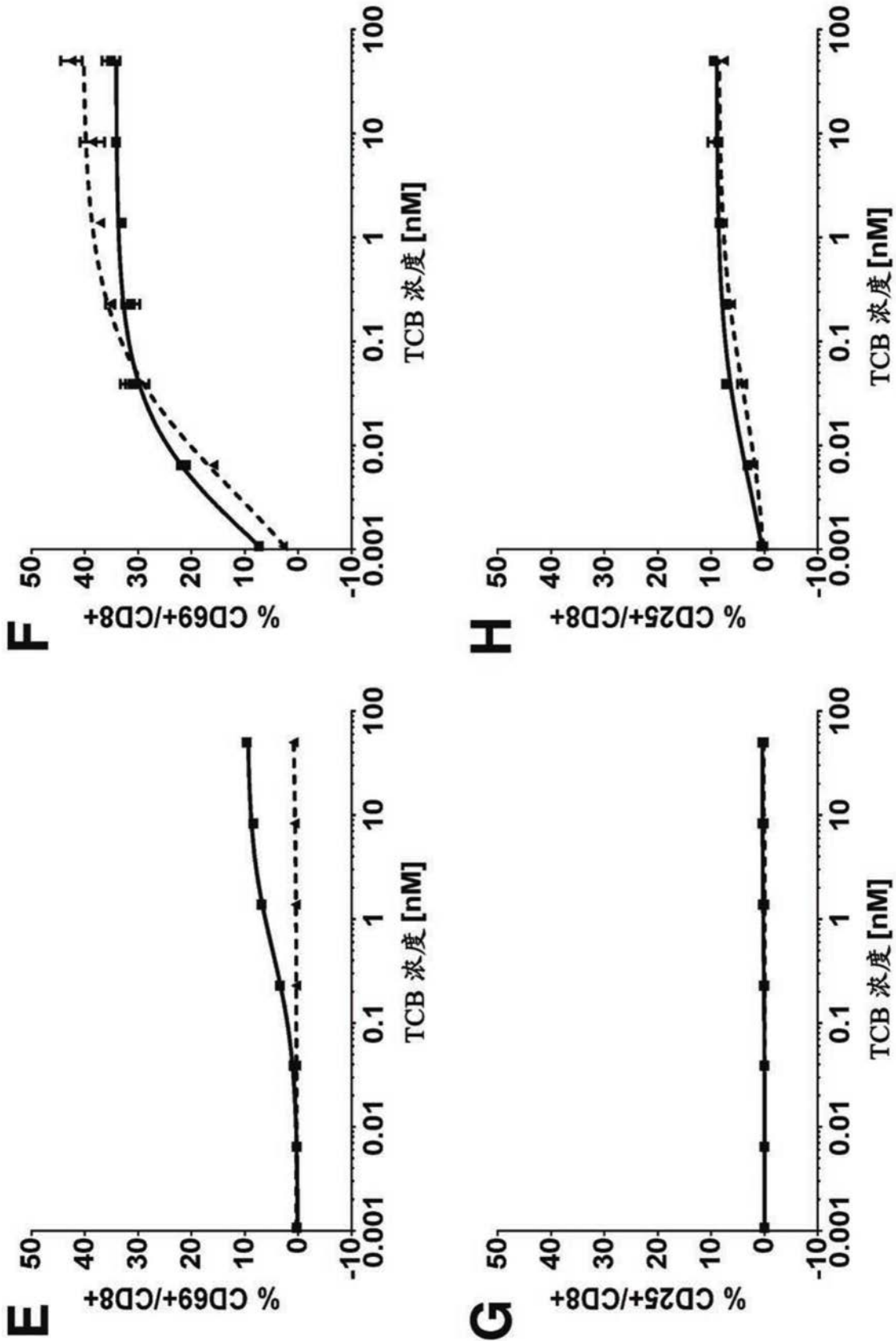
图8(续)



▲ 博纳吐单抗

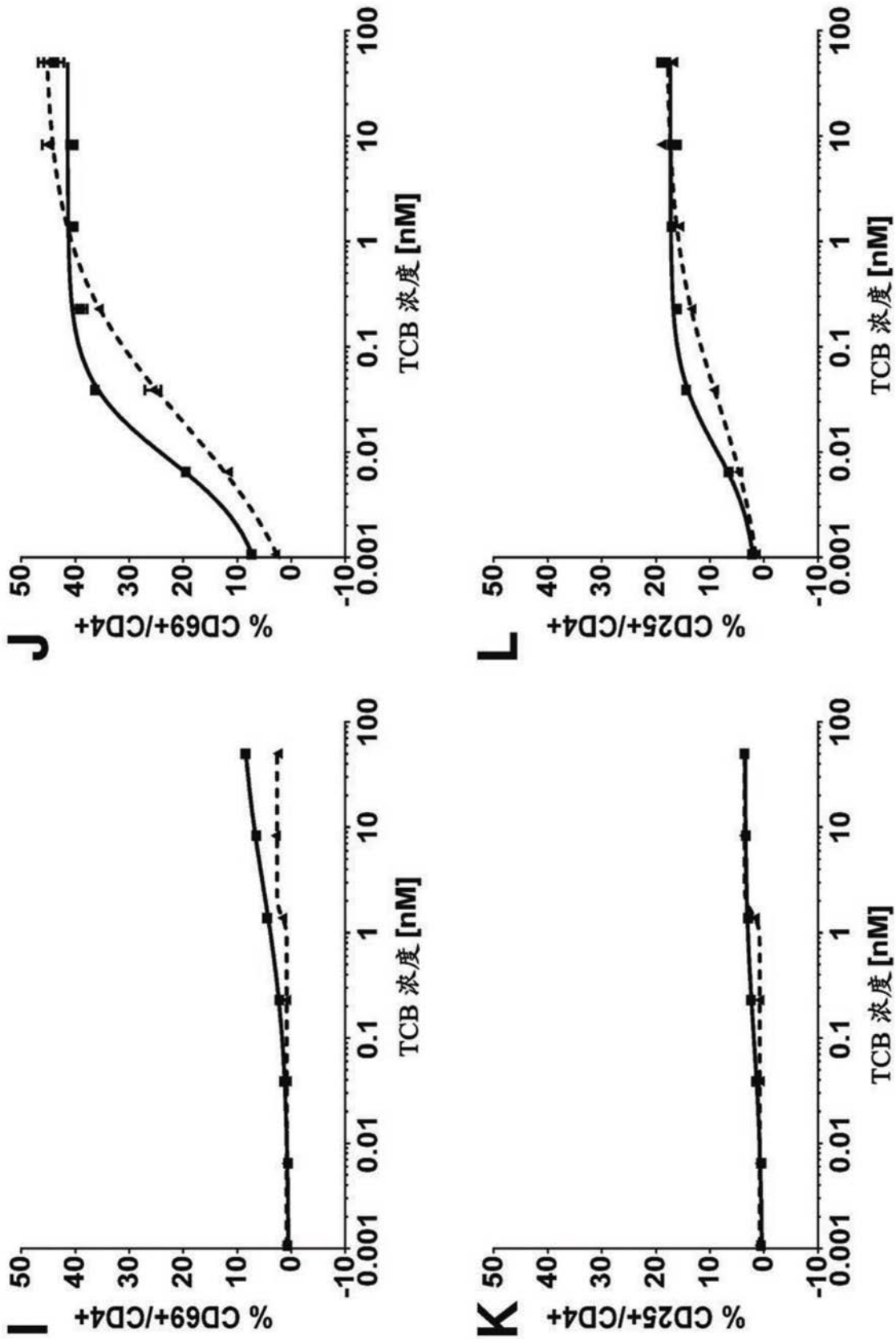
■ CD19 TCB_8B8

图9



■ CD19 TCB_8B8 ▲ 博纳吐单抗

图9(续)



■ CD19 TCB_8B8 ▲ 博纳吐单抗

图9(续)

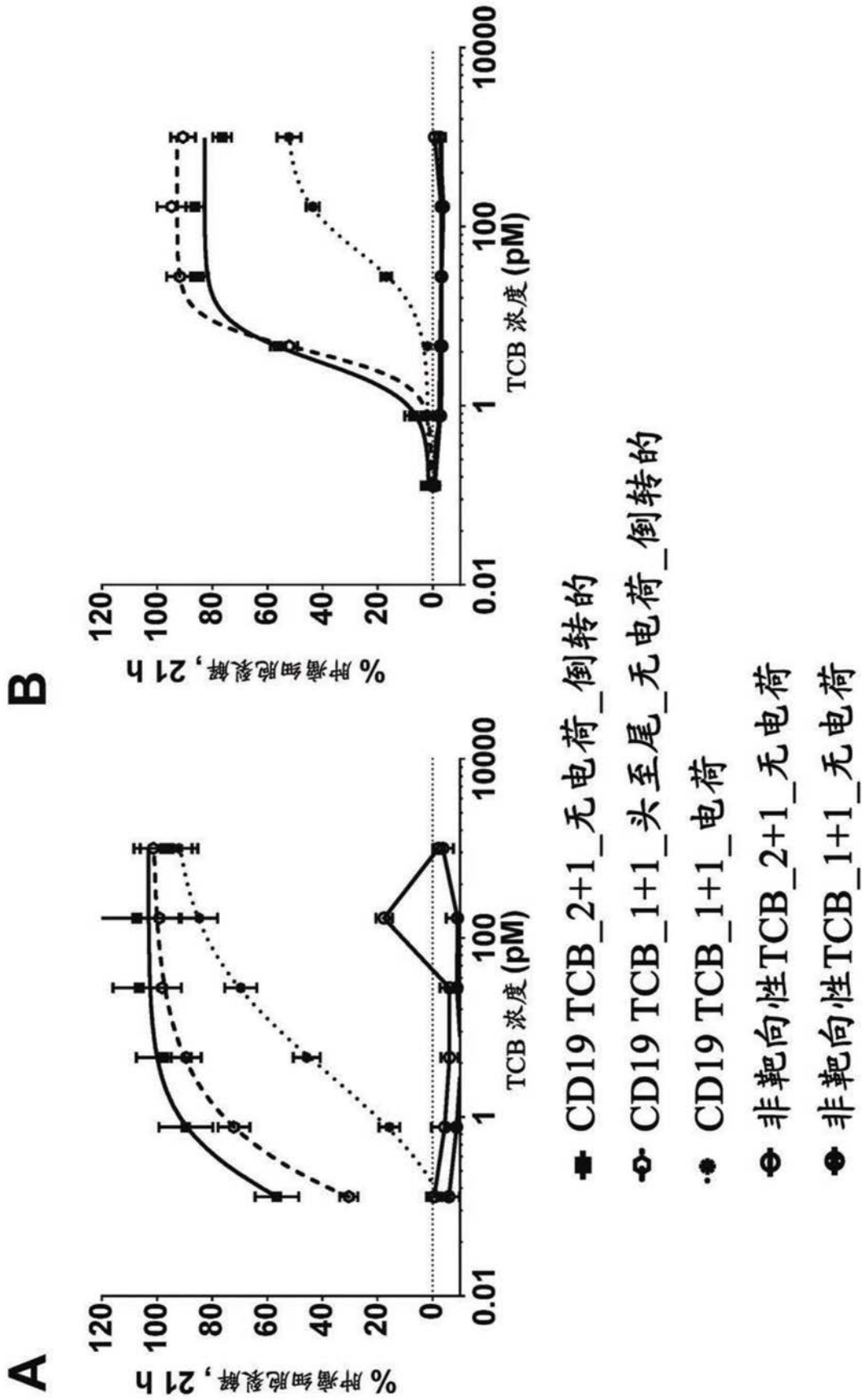
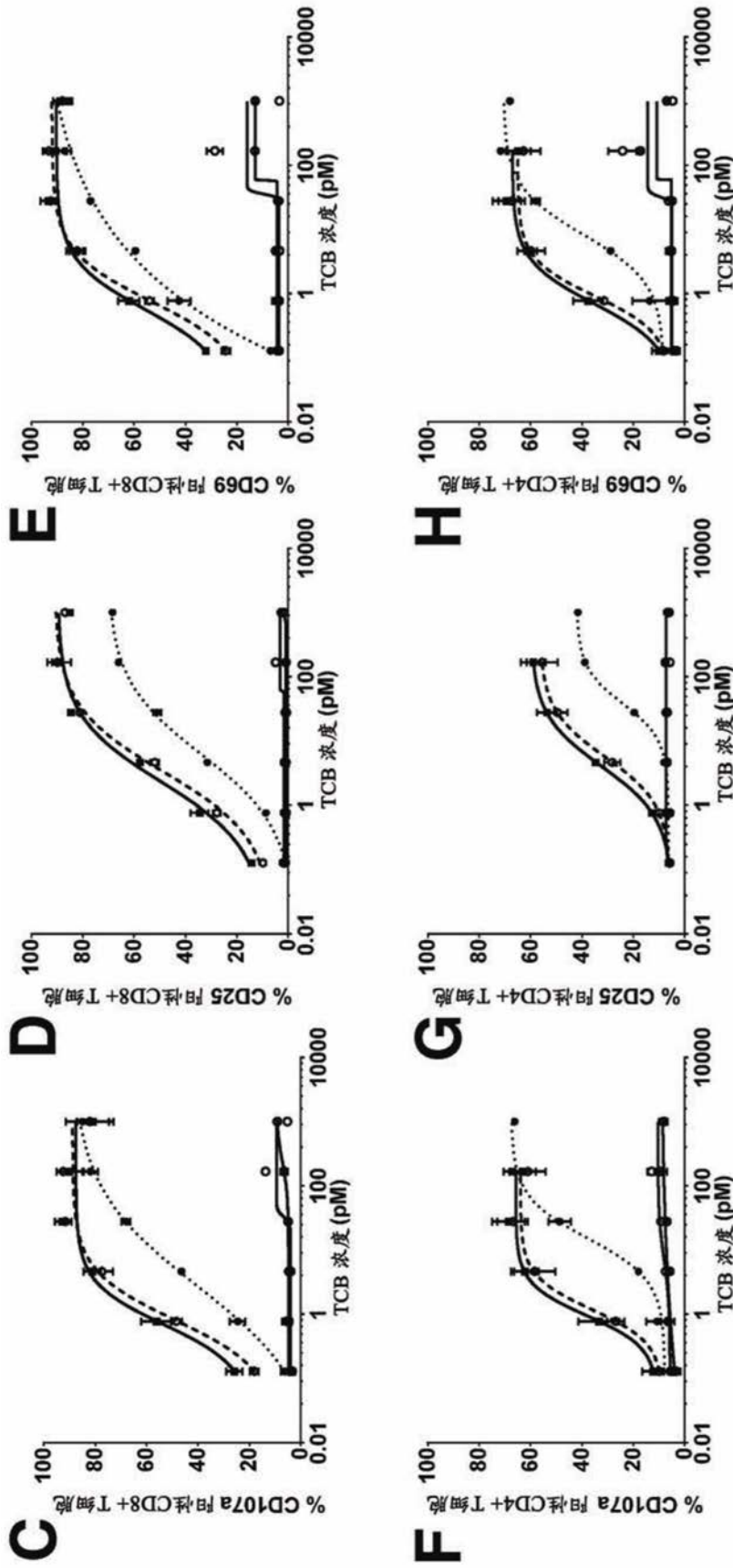


图10



- CD19 TCB_2+1_无电荷_倒转的
- CD19 TCB_1+1_头至尾_无电荷_倒转的
- CD19 TCB_1+1_电荷
- 非靶向性TCB_2+1_无电荷
- 非靶向性TCB_1+1_无电荷

图10(续)

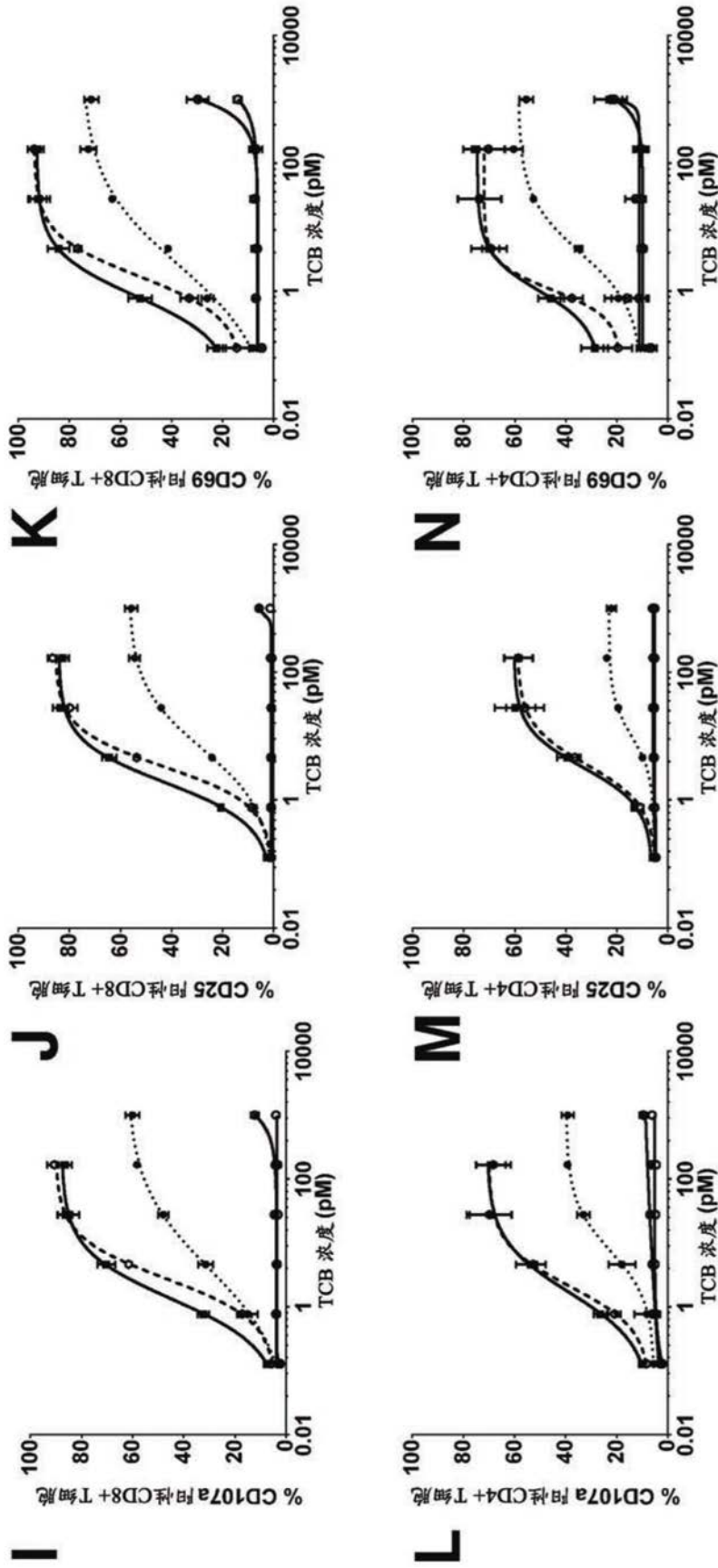


图10(续)

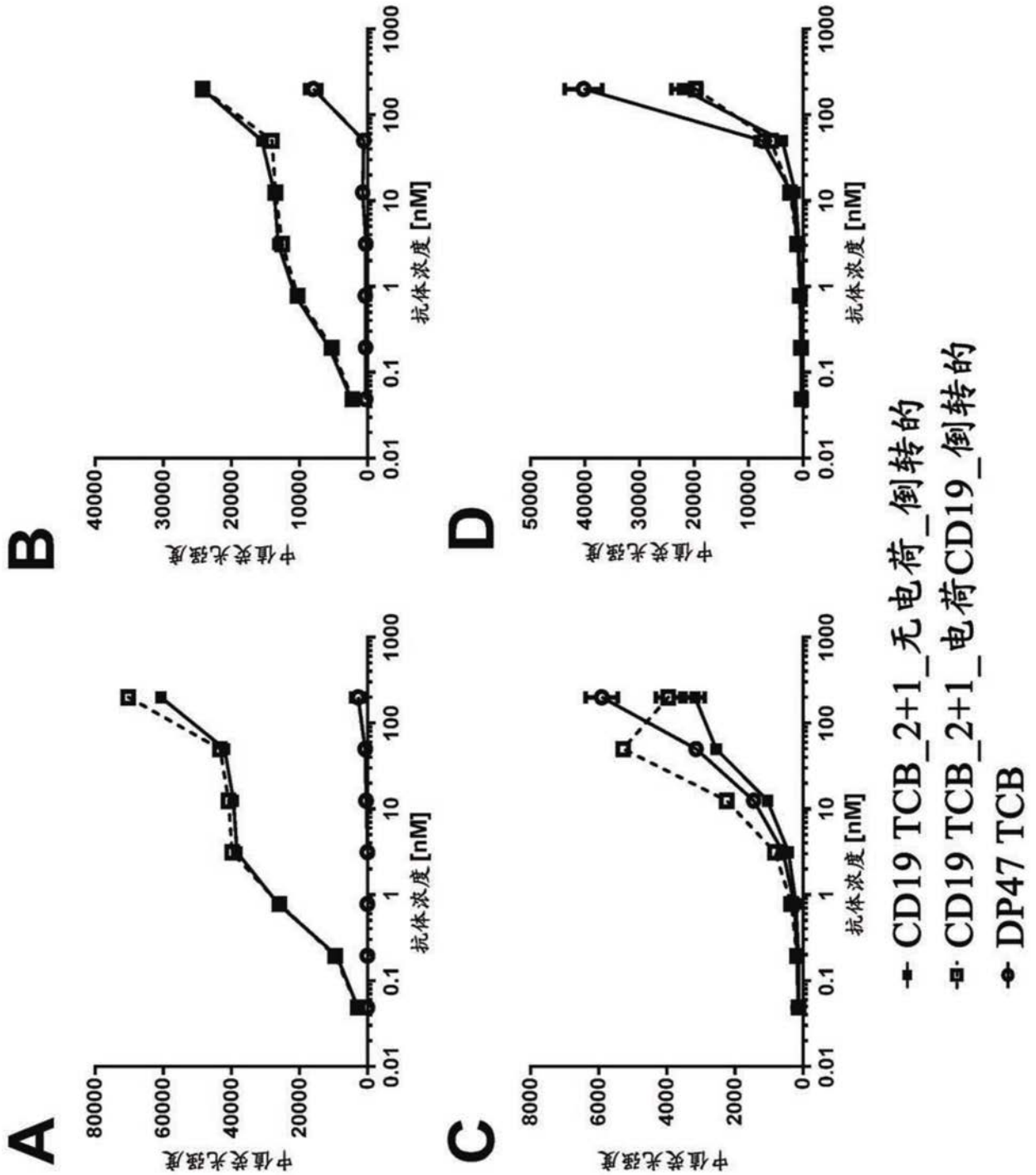


图11

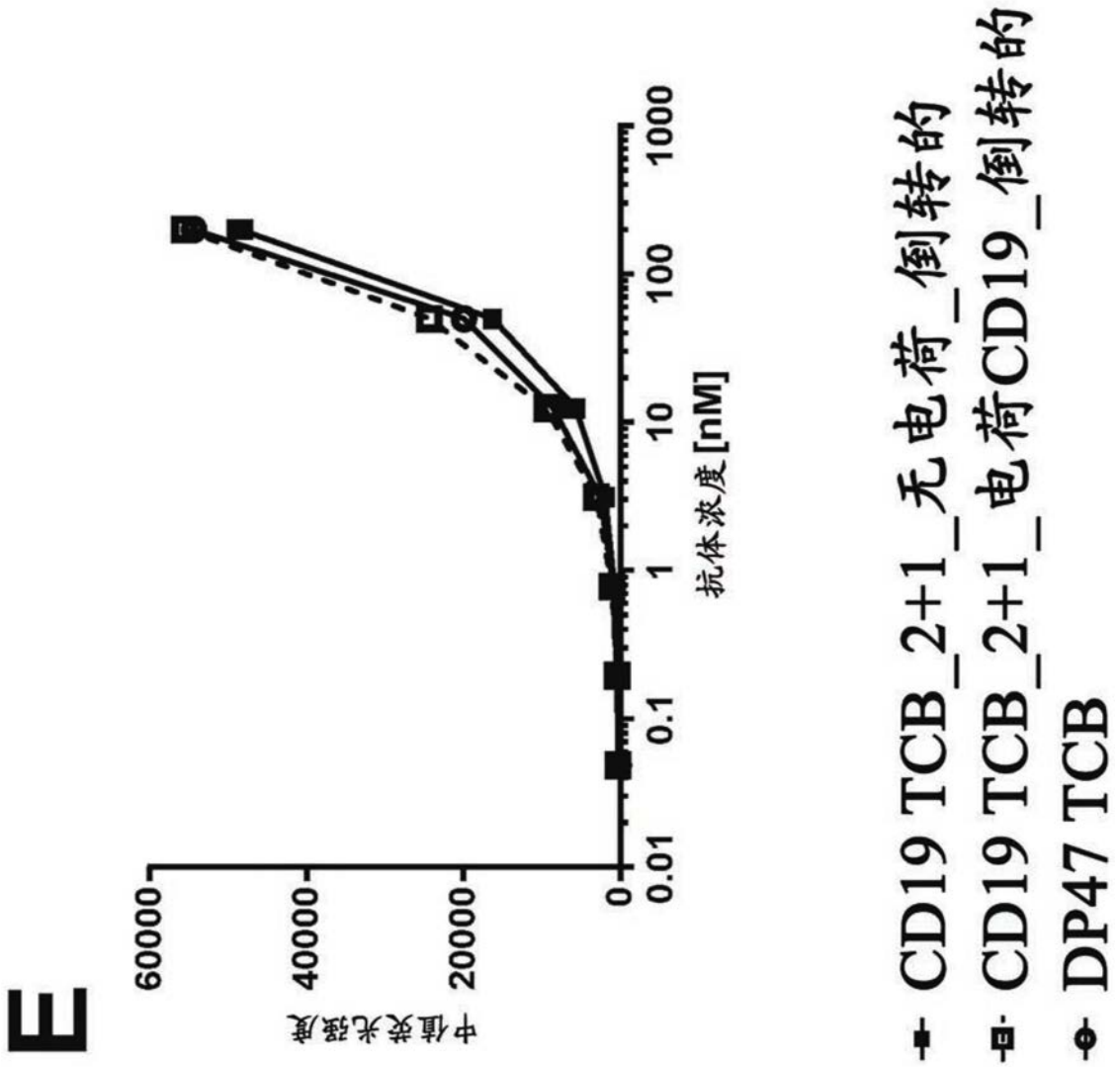


图11 (续)

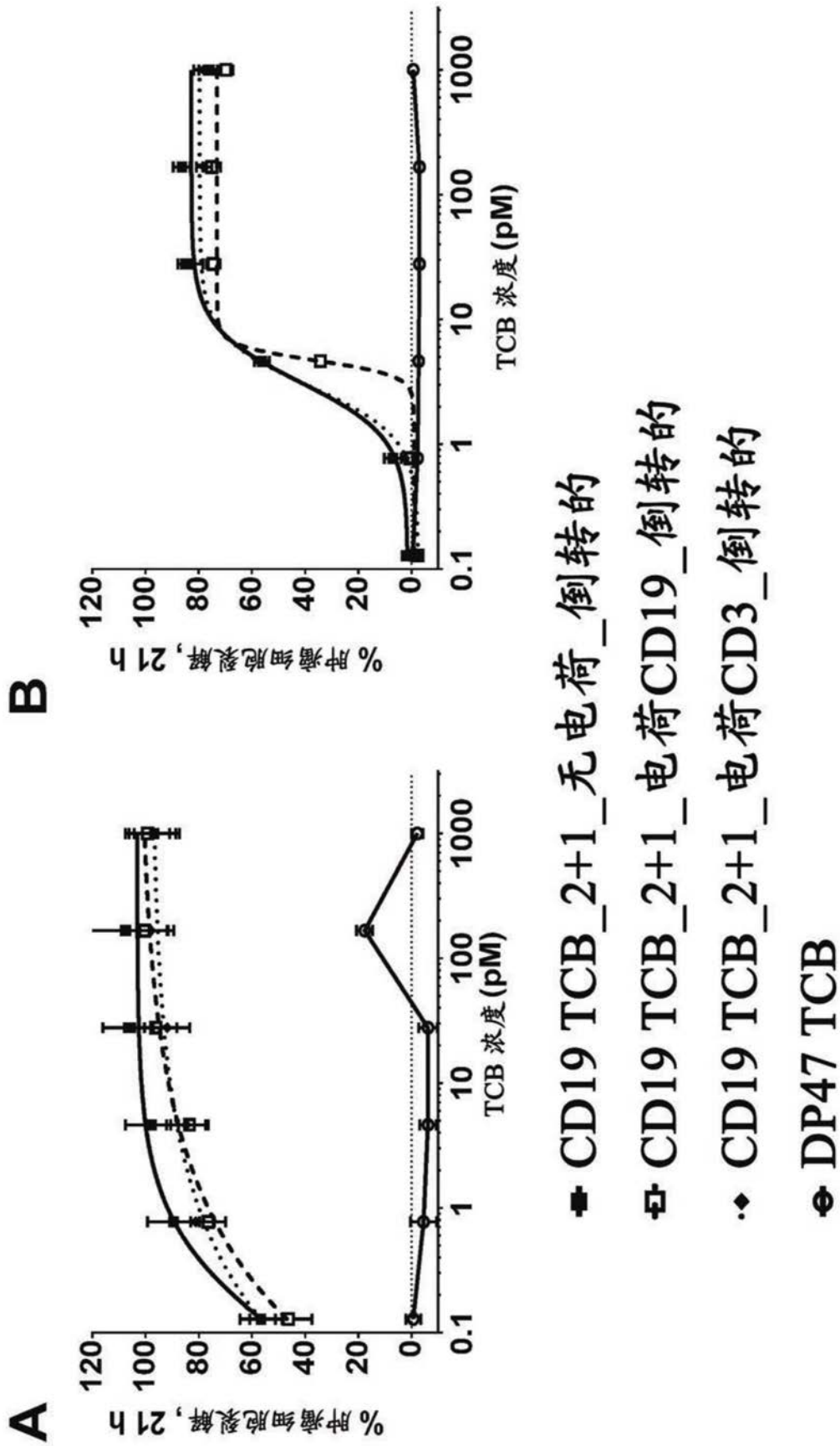


图12

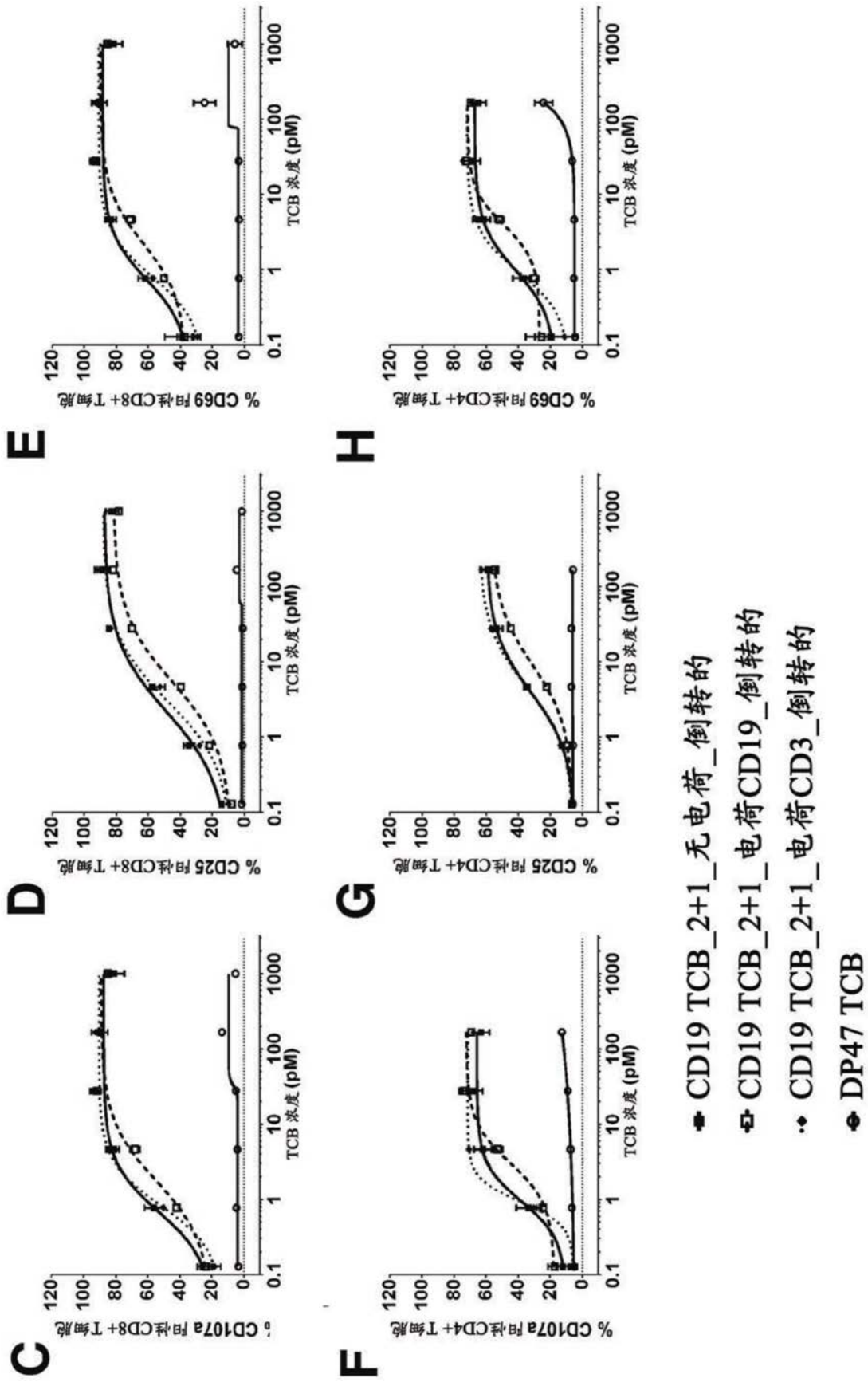


图12(续)

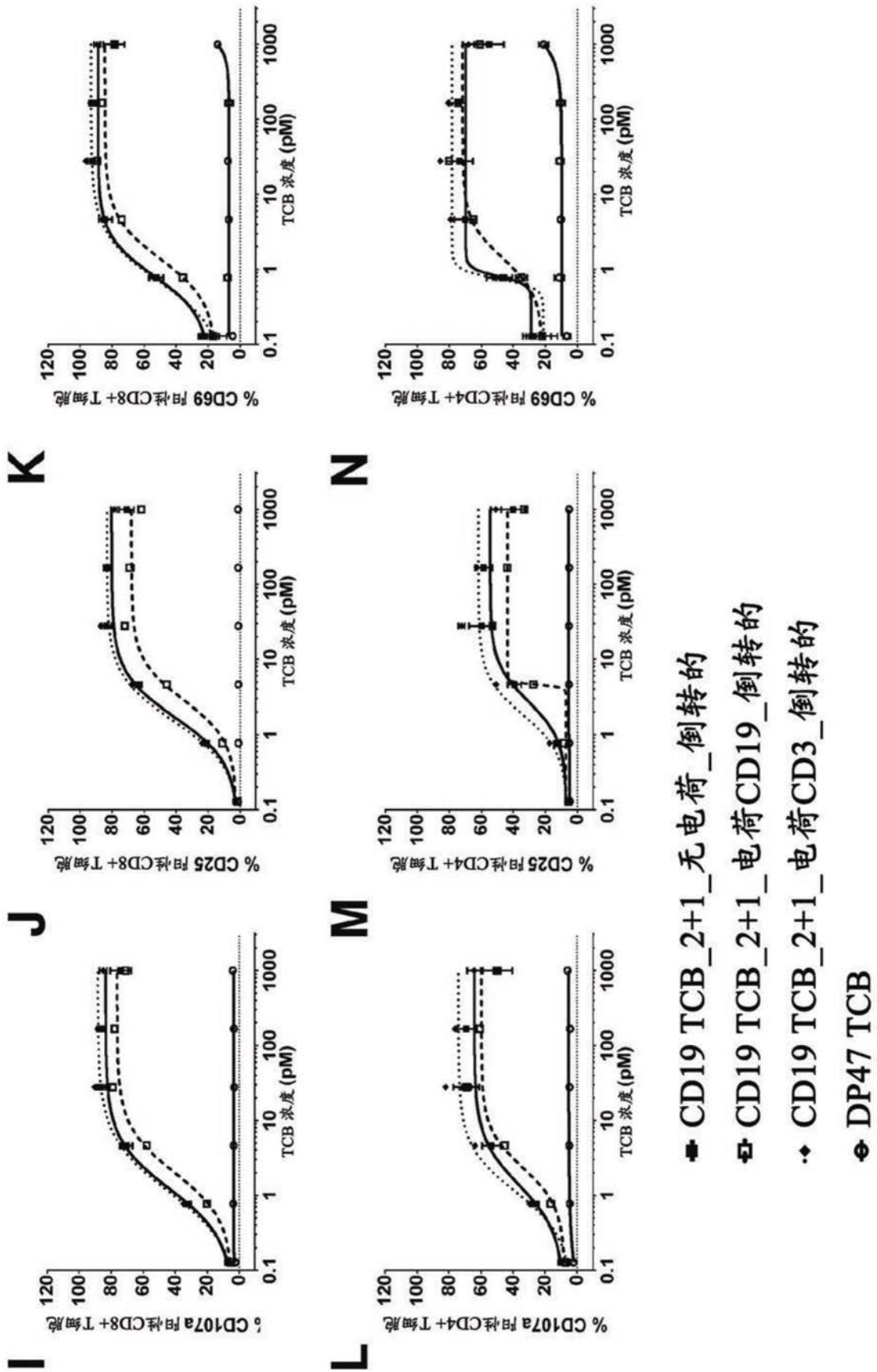


图12(续)

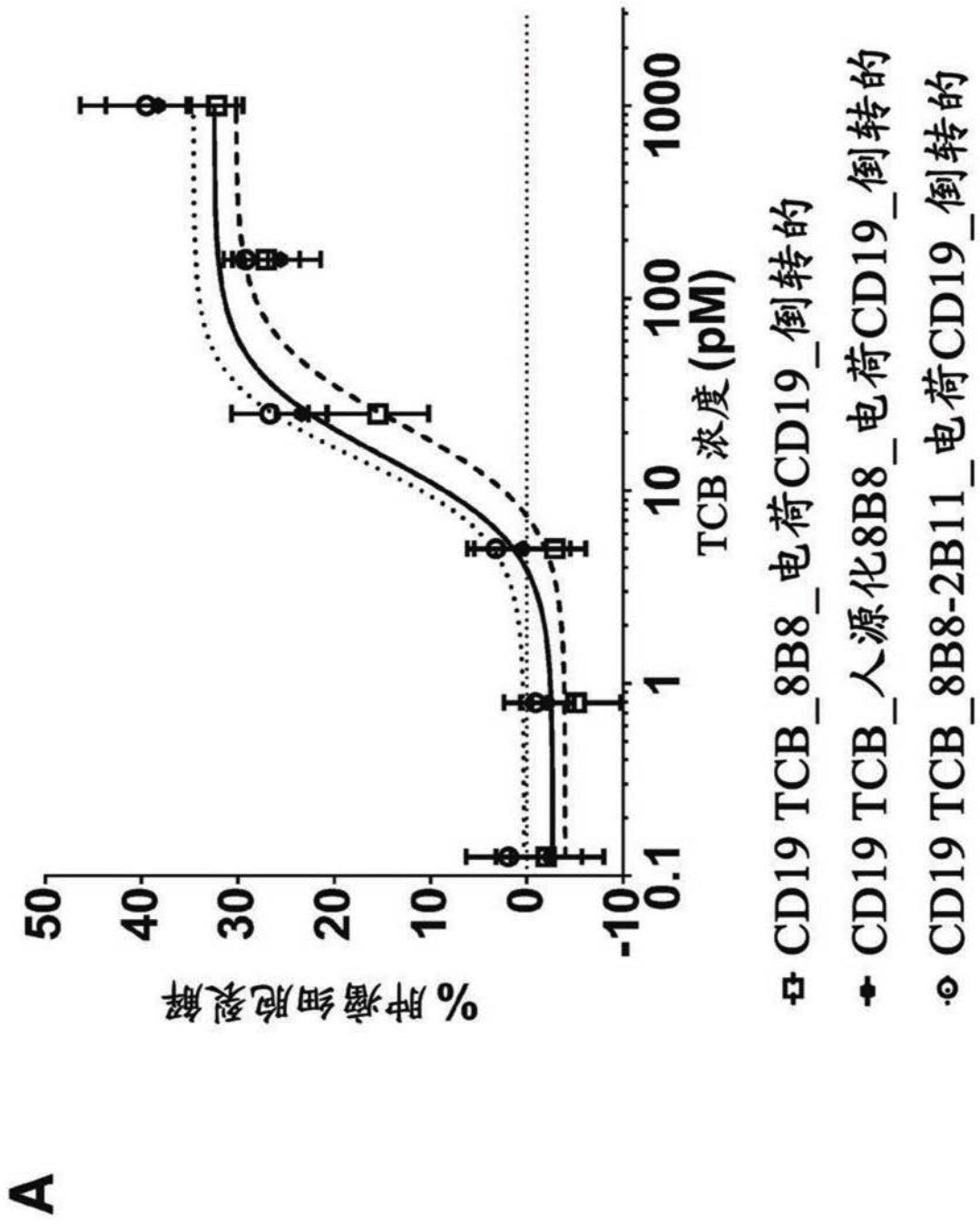


图13

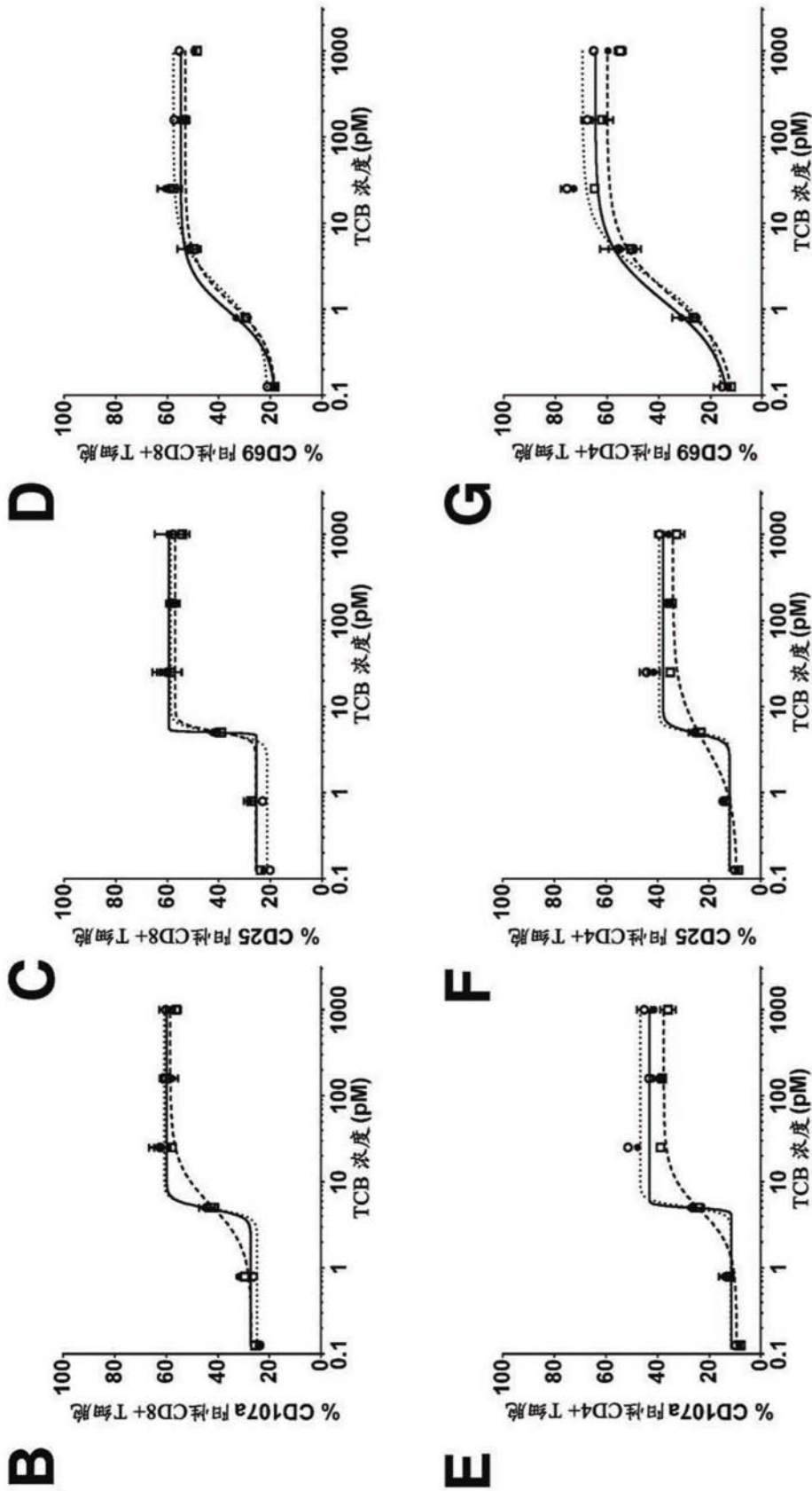


图13(续)