



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114945596 A

(43) 申请公布日 2022. 08. 26

(21) 申请号 202180009132.9

(22) 申请日 2021.01.28

(30) 优先权数据

2024786 2020.01.29 NL

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.07.14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/NL2021/050051 2021.01.28

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2021/154073 EN 2021.08.05

(71) 申请人 美勒斯公司

地址 荷兰乌得勒支

(72) 发明人 彼得·福科·万隆

马克·思罗斯比

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

专利代理师 张福誉 韩晓帆

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

G12N 15/13 (2006.01)

G12N 15/62 (2006.01)

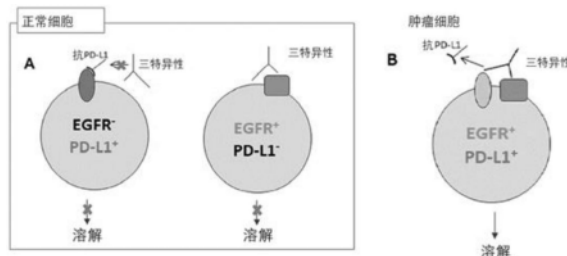
权利要求书3页 说明书40页 附图24页

(54) 发明名称

用于调节免疫细胞衔接效应的手段和方法

(57) 摘要

本发明涉及一种包含多价抗体的组合物,所述多价抗体包含结合第一肿瘤抗原(TA1)的第一可变域、结合第二肿瘤抗原(TA2)的第二可变域和结合免疫细胞衔接抗原(IEA)的第三可变域;并且其中所述组合物进一步包含结合TA1或TA2的第二结合分子。本发明还涉及一种包含所述多价抗体和第二结合分子的部件的试剂盒,并且涉及用于治疗癌症的手段和方法,包括向有需要的受试者施用所述多价抗体和第二结合分子。



1. 一种治疗性组合物,其包含多价抗体,所述多价抗体包含结合第一肿瘤抗原(TA1)的第一可变域、结合第二肿瘤抗原(TA2)的第二可变域和结合免疫细胞衔接抗原(IEA)的第三可变域;并且其中所述组合物进一步包含结合TA1或TA2的第二结合分子。

2. 根据权利要求1所述的治疗性组合物,其中所述多价抗体包含Fc区。

3. 根据权利要求1或2所述的治疗性组合物,其中所述结合免疫细胞衔接抗原(IEA)的第三可变域和所述结合第二肿瘤抗原(TA2)的第二可变域与Fc区缔合,并且所述结合第一肿瘤抗原(TA1)的第一可变域连接至所述结合免疫细胞衔接抗原(IEA)的第三可变域。

4. 根据权利要求1或2所述的治疗性组合物,其中所述结合免疫细胞衔接抗原(IEA)的第三可变域和所述结合第一肿瘤抗原(TA1)的第一可变域与Fc区缔合,并且所述结合第二肿瘤抗原(TA2)的第二可变域连接至所述结合免疫细胞衔接抗原(IEA)的第三可变域。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的治疗性组合物,其中所述第一可变域、所述第二可变域和/或所述第三可变域包含共同轻链可变区。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的治疗性组合物,其中所述结合免疫细胞衔接抗原的可变域结合至CD3、TCR- α 链、TCR- β 链、CD2、CD4、CD5、CD7、CD8、CD137、CD28、CD16、CD16A、CD64、OX40、CD27、CD40、ICOS、GITR、NKG2D、Nkp46、Nkp44或Nkp30;优选结合至CD3、TCR- α 链、TCR- β 链、CD2或CD5;更优选结合至CD3。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的治疗性组合物,其中所述结合第一肿瘤相关抗原(TA1)的可变域结合至PD-L1、PD-L2、HVEM、CD47、B7-H3、B7-H4、B7-H7或Siglec-15;优选PD-L1或PD-L2;更优选PD-L1。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的治疗性组合物,其中所述结合第二肿瘤相关抗原(TA2)的可变域结合至CLEC12A或EGFR,优选EGFR。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的治疗性组合物,其中所述第一肿瘤相关抗原(TA1)在非肿瘤细胞上表达。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的治疗性组合物,其中所述第二结合分子结合至TA1。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的治疗性组合物,其中所述第二结合分子为二价单特异性抗体。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的治疗性组合物,其中所述第二结合分子与所述多价抗体的所述第一可变域或所述第二可变域的针对TA1或TA2的结合亲和力相比具有相当、相等或较低的针对TA1或TA2的结合亲和力。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的治疗性组合物,其中所述第二结合分子具有减弱的效应功能。

14. 一种部件的试剂盒,其包含根据权利要求1至13中任一项所定义的多价抗体和第二结合分子。

15. 一种部件的试剂盒,其包含根据权利要求1至13中任一项所述的治疗性组合物,以及用于向有需要的受试者施用所述组合物的说明书。

16. 根据权利要求14或15所述的部件的试剂盒,其中所述试剂盒包含用于向有需要的受试者同时或连续施用所述多价抗体和所述第二结合分子的说明书。

17. 根据权利要求14至16中任一项所述的部件的试剂盒,其中所述试剂盒包含用于在

施用所述多价抗体之前施用所述第二结合分子的说明书。

18. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至13中任一项所定义的多价抗体和第二结合分子,以及药物学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

19. 根据权利要求1至13中任一项所定义的多价抗体和第二结合分子的组合、包含根据权利要求1至13中任一项所定义的多价抗体和第二结合分子的组合物、根据权利要求1至13中任一项所述的治疗性组合物、根据权利要求14至17中任一项所述的部件的试剂盒或根据权利要求18所述的药物组合物,其用于减少或降低所述多价抗体与非肿瘤细胞的结合和/或用于减少或降低由所述多价抗体诱导的非肿瘤细胞的细胞杀伤。

20. 根据权利要求1至13中任一项所定义的多价抗体和第二结合分子的组合、包含根据权利要求1至13中任一项所定义的多价抗体和第二结合分子的组合物、根据权利要求1至13中任一项所述的治疗性组合物、根据权利要求14至17中任一项所述的部件的试剂盒或根据权利要求18所述的药物组合物,其用作药物。

21. 根据权利要求1至13中任一项所定义的多价抗体和第二结合分子的组合、包含根据权利要求1至13中任一项所定义的多价抗体和第二结合分子的组合物、根据权利要求1至13中任一项所述的治疗性组合物、根据权利要求14至17中任一项所述的部件的试剂盒或根据权利要求18所述的药物组合物,其用于治疗有需要的受试者,特别是患有癌症的受试者。

22. 根据权利要求1至13中任一项所定义的多价抗体和第二结合分子的组合、包含根据权利要求1至13中任一项所定义的多价抗体和第二结合分子的组合物、根据权利要求1至13中任一项所述的治疗性组合物、根据权利要求14至17中任一项所述的部件的试剂盒或根据权利要求18所述的药物组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

23. 一种用于减少或降低根据权利要求1至13中任一项所定义的多价抗体与表达TA1或TA2的非肿瘤细胞的结合的方法,其中所述方法包括结合所述多价抗体使用结合至TA1或TA2的根据权利要求1至13中任一项所定义的第二结合分子。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述非肿瘤细胞表达TA1且所述第二结合分子结合至TA1。

25. 根据权利要求23或24所述的方法,其中相较于不使用所述第二结合分子的方法中所述多价抗体与表达TA1或TA2的非肿瘤细胞的结合,所述多价抗体与表达TA1或TA2的非肿瘤细胞的结合降低。

26. 一种治疗癌症的方法,其中所述方法包括:

- 向有需要的受试者施用根据权利要求1至13中任一项所定义的多价抗体并且另外向所述受试者施用根据权利要求1至13中任一项所定义的第二结合分子;

- 向有需要的受试者施用包含根据权利要求1至13中任一项所定义的多价抗体和第二结合分子的组合物;或

- 向有需要的受试者施用根据权利要求1至13中任一项所述的治疗性组合物;或

- 向有需要的受试者施用根据权利要求18所述的药物组合物。

27. 根据权利要求19至21中任一项所述的组合、组合物、治疗性组合物或部件的试剂盒或根据权利要求23至26中任一项所述的方法,其中所述多价抗体和所述第二结合分子作为单一组合物或作为两个独立组分同时施用。

28. 根据权利要求19至21中任一项所述的组合、组合物、治疗性组合物或部件的试剂盒

或根据权利要求23至26中任一项所述的方法,其中所述多价抗体在所述第二结合分子之前施用。

29. 根据权利要求19至21中任一项所述的组合、组合物、治疗性组合物或部件的试剂盒或根据权利要求23至26中任一项所述的方法,其中所述第二结合分子在所述多价抗体之前施用。

30. 一种载体,其包含编码根据权利要求1至13中任一项所定义的多价抗体的第一可变域、第二可变域和第三可变域的重链可变区的核酸,其中所述载体进一步包含不同的编码根据权利要求1至13中任一项所定义的第二结合分子的重链可变区的核酸。

31. 一种宿主细胞,其包含编码根据权利要求1至13中任一项所定义的多价抗体的第一可变域、第二可变域和第三可变域的重链可变区的核酸,其中所述宿主细胞进一步包含不同的编码根据权利要求1至13中任一项所定义的第二结合分子的重链可变区的核酸。

32. 根据权利要求31所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞进一步包含编码根据权利要求1至13中任一项所定义的多价抗体的第一可变域、第二可变域和第三可变域的轻链可变区和第二结合分子的轻链可变区的核酸。

用于调节免疫细胞衔接效应的手段和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于调节免疫细胞衔接效应的手段和方法。

背景技术

[0002] 本发明涉及活化受试者中的免疫细胞的手段和方法且涉及用免疫细胞衔接结合分子治疗受试者的癌症的方法。在一个方面,本发明涉及包含两个或更多个结合分子的组合物,其中第一结合分子为具有结合免疫细胞活化分子的可变域及结合两个肿瘤抗原(TA1和TA2)的两个可变域的多价抗体。此类结合分子中的第二结合分子为结合TA1或TA2的结合分子。本发明还涉及包含此类抗体的部件的试剂盒且涉及用此类结合分子治疗癌症的方法。

[0003] 癌症仍为主要死亡原因之一。各个方面的治疗进步已引起某些适应症及患者群体中的治疗及存活改善。有前景的趋势为研发靶向肿瘤的疗法。针对肿瘤的抗体可以多种方式干扰肿瘤的生长及持续存在。一些抗体靶向肿瘤且对其进行标记以使得宿主的免疫系统能够破坏肿瘤细胞。一些抗体靶向与癌状态相关的信号传导路径。其他抗体干扰肿瘤细胞避开或下调针对肿瘤细胞或容纳肿瘤细胞的环境的宿主免疫系统的能力。已描述各种其他作用模式。

[0004] 抗体为在功效方面及在副作用种类减少和严重程度降低方面均超过经典癌症治疗方法的重大进步。相对较新之处在于多特异性抗体的研发。此类抗体通常经设计以结合至多个目标。多特异性抗体可具有与具有多特异性抗体的分别结合特性的两个或更多个单特异性抗体的简单组合不同的活性谱。也就是说,不同作用机制及结果可从靶向两个或更多个抗原的多特异性抗体的使用、靶向那些抗原中的每个的单特异性抗体的组合的使用获得。其一个实例为T细胞衔接多特异性抗体。例如,此类抗体具有结合T细胞膜上的CD3或另一T细胞活化抗原的可变域及结合肿瘤抗原的可变域。在不受理论束缚的情况下,认为T细胞衔接抗体将T细胞带到/保持在(肿瘤)目标细胞附近且经由T细胞活化来诱导/刺激针对肿瘤的免疫反应。

[0005] 此类治疗中的许多治疗仍可经改善。例如,可经改善的方面为减少多特异性抗体对正常细胞的作用,此类作用可能会导致包括较高毒性或经降低的患者对抗体的耐受性的不合需要的副作用。许多肿瘤抗原不绝对地于肿瘤细胞上表达。实际上,此类肿瘤抗原中的许多肿瘤抗原也在本文中也称为“正常”细胞的非肿瘤细胞上表达。例如,ErbB蛋白质家族在各种癌症中经过表达和/或经突变,但也通常在受试者的各种正常细胞上表达。用剥蚀抗体靶向此类肿瘤抗原将通常影响正常非肿瘤细胞,且从而至少潜在地造成与抗体的肿瘤攻击方面不相关的效应。在严重情况下,此类目标特异性副作用可能会导致衰弱的毒性,甚至死亡,且更通常导致降低的生活质量以及特定治疗的减少、中断或中止。例如,使抗体靶向EGFR可引起在其中EGFR通常表达以调节生理功能的组织中,诸如在皮肤中最显而易见的反应。据报导,经EGFR抑制剂治疗的患者可能会罹患脓包性丘疹样疹、干性皮肤、搔痒以及毛发和甲周(指(趾)甲周围区域)变质(Lacouture 2006,nature reviews:cancer第6卷,第

803-812页:doi:10.1038/nrc1970)。

[0006] 本发明提供用于改善多价抗体治疗,特别是多特异性抗体治疗的功效和/或毒性窗的手段和方法。当相较于在不存在本发明的手段和方法的情况下类似剂量的多价抗体而言时,治疗功效可增强,毒性可降低,且耐受性可提高,或此类结果中的每个。

发明内容

[0007] 本发明提供了包含多价抗体的组合物,该多价抗体包含结合第一肿瘤抗原(TA1)的第一可变域、结合第二肿瘤抗原(TA2)的第二可变域及结合免疫细胞衔接抗原(IEA)的第三可变域;且其中组合物进一步包含结合TA1或TA2的第二结合分子。

[0008] 如本文所述的多价抗体与第二结合分子的组合提供较大治疗窗,其中相对于施用单独多价抗体而言,当与第二结合分子组合施用,多价抗体的偏离目标效应减弱。

[0009] 本发明的多价抗体可具有本领域中已知的任何抗体形式。本领域中已知的抗体形式的实例包括但不限于图12中所示和例如WO 2019/190327中所公开的抗体形式。本发明的多价抗体为多特异性抗体。

[0010] 本发明的多价抗体的实例包含有包含结合免疫细胞衔接抗原(IEA)、优选CD3、TCR- α 链或TCR- β 链的可变域及结合TA2的可变域的基础抗体。结合TA1的多价抗体可变域可为连接至结合免疫细胞衔接抗原(IEA)的可变域或连接至结合TA2的可变域的额外可变域。本发明的多价抗体的另一实例包含有包含结合免疫细胞衔接抗原(IEA)、优选CD3、TCR- α 链或TCR- β 链的可变域及结合TA1的可变域的基础抗体。结合TA2的多价抗体可变域可为连接至结合免疫细胞衔接抗原(IEA)的可变域或连接至结合TA1的可变域的额外可变域。本发明的多价抗体的另一实例包含有包含结合至TA1的可变域及结合至TA2的可变域的基础抗体。结合免疫细胞衔接抗原(IEA)、优选CD3、TCR- α 链或TCR- β 链的多价抗体可变域可为连接至结合TA1的可变域或连接至结合TA2的可变域的额外可变域。

[0011] 可变域包含重链可变区或轻链可变区中的至少一者,优选地至少重链可变区,更优选地重链可变区及轻链可变区两者。

[0012] 为了易于参考,多价或多特异性抗体上的可变域可称为域1、域2及域3。不同重链可变区可通过不同编号称为诸如VH1、VH2及VH3。因此,本发明提供包含多价抗体的组合物或部件的试剂盒,其中基础抗体可变域及额外可变域包含重链可变区VH1、VH2及VH3。在某些实施方式中,上文所描述的结合至免疫细胞衔接抗原(IEA)的基础抗体可变域包含重链可变区VH2。在某些实施方式中,结合至TA2的基础抗体可变域包含重链可变区VH3。在某些实施方式中,结合至TA1的额外可变域包含重链可变区VH1。在某些实施方式中,具有VH1的可变域适于通过接头连接至具有VH2的可变域。在某些实施方式中,结合至免疫细胞衔接抗原(IEA)的基础抗体可变域包含重链可变区VH2,结合至TA2的基础抗体可变域包含重链可变区VH3,结合至TA1的额外可变域包含重链可变区VH1,且具有VH1的可变域适于通过接头连接至具有VH2的可变域。合适多价抗体形式中的一个实例作为示意性图示提供于图1中。其他形式阐述于本文中,包括图12中,且提供于以引用方式并入的WO 2019/190327中。不同轻链可变区也可通过不同编号称为诸如VL1、VL2及VL3。用于本发明中的多价或多特异性抗体可包含具有三个不同重链可变区的共同轻链、具有三个不同轻链可变区的共同重链或三个不同可变域,该三个不同可变域诸如为各自包含彼此不同的重链和轻链可变区的域。

[0013] 本发明的第二结合分子为结合TA1或TA2的单特异性结合分子。第二结合分子可为对TA1或TA2具有特异性的任何结合分子,该任何结合分子包括但不限于维持该抗体的结合特异性的抗体或其片段或变体或包含该片段的结构。第二结合分子优选为全长抗体、Fab、经修饰Fab或scFv。

[0014] 第二结合分子结合TA1或TA2,从而防止多价抗体结合TA1或TA2或与多价抗体竞争结合TA1或TA2。这在细胞表达TA1、但不表达TA2时或在细胞表达TA2、但不表达TA1时防止或减少细胞杀伤。当细胞表达TA1和TA2两者时,多价抗体结合至TA2且从而对与TA1的结合具有超过第二结合分子的增强竞争优势,或多价抗体结合至TA1且从而对与TA2的结合具有超过第二结合分子的增强竞争优势。因此,认为相较于表达单独TA1或TA2的细胞而言,多价抗体对表达TA1和TA2两者的细胞展现增强效应。

[0015] 本发明进一步提供包含本发明的多价抗体及本发明的第二结合分子的部件的试剂盒。

[0016] 本发明进一步提供包含本发明的多价抗体及本发明的第二结合分子的治疗性组合物。

[0017] 本发明进一步提供包含本发明的多价抗体、本发明的第二结合分子及药物学上可接受的载体和/或稀释剂的药物组合物。本发明的多价抗体和第二结合分子可一起或分开经配制和/或施用。

[0018] 本发明进一步提供用于减少或降低多价抗体与非肿瘤细胞的结合和/或用于减少或降低多价抗体诱导的非肿瘤细胞的细胞杀伤的本发明的多价抗体和第二结合分子的组合。本发明进一步提供用作药物的本发明的多价抗体和第二结合分子的组合。本发明进一步提供用于治疗有需要的受试者,特别地用于治疗癌症的本发明的多价抗体和第二结合分子的组合。多价抗体和第二结合分子可同时施用,或在施用多价抗体之前或之后与第二结合分子依次施用。

[0019] 本发明进一步提供用于减少或降低多价抗体与非肿瘤细胞的结合和/或用于减少或降低多价抗体诱导的非肿瘤细胞的细胞杀伤的包含本发明的多价抗体和第二结合分子的组合物。本发明进一步提供用作药物的包含本发明的多价抗体和第二结合分子的组合物。本发明进一步提供用于治疗有需要的受试者,特别地用于治疗癌症的包含本发明的多价抗体和第二结合分子的组合物。

[0020] 如本发明的呈任何形式或组合的手段、方法、用途中所描述,包含多价抗体的组合物优选为治疗性组合物,该多价抗体包含结合第一肿瘤抗原(TA1)的第一可变域、结合第二肿瘤抗原(TA2)的第二可变域及结合免疫细胞衔接抗原(IEA)的第三可变域;且其中组合物进一步包含结合TA1或TA2的第二结合分子。

[0021] 本发明进一步提供用于减少或降低多价抗体与非肿瘤细胞的结合和/或用于减少或降低多价抗体诱导的非肿瘤细胞的细胞杀伤的包含本发明的多价抗体和第二结合分子的治疗性组合物。本发明进一步提供用作药物的包含本发明的多价抗体和第二结合分子的治疗性组合物。本发明进一步提供用于治疗有需要的受试者,特别地用于治疗癌症的包含本发明的多价抗体和第二结合分子的治疗性组合物。

[0022] 本发明进一步提供用于减少或降低多价抗体与非肿瘤细胞的结合和/或用于减少或降低多价抗体诱导的非肿瘤细胞的细胞杀伤的包含本发明的多价抗体和第二结合分子

的部件的试剂盒。本发明进一步提供用作药物的包含本发明的多价抗体和第二结合分子的部件的试剂盒。本发明进一步提供用于治疗有需要的受试者，特别地用于治疗癌症的包含本发明的多价抗体和第二结合分子的部件的试剂盒。多价抗体和第二结合分子可同时施用，或在施用多价抗体之前或之后与第二结合分子依次施用。

[0023] 本发明进一步提供用于减少或降低本发明的多价抗体与非肿瘤细胞的结合和/或用于减少或降低多价抗体诱导的非肿瘤细胞的细胞杀伤的方法，其中该方法包含使用如本文所述的第二结合分子以及多价抗体。

[0024] 本发明进一步提供治疗癌症的方法，其中该方法包含向有需要的受试者施用本发明的多价抗体且另外向受试者施用本发明的第二结合分子。

附图说明

[0025] 应注意，除下文所例示的特点及方面以外的本发明的特点及方面从实施方式以及附图显而易见，其通过示例示出了根据本发明实施方式的特点。所提供的图中的每个为示例性的且不意欲限制所提供的本发明的范围，该范围由描述且使得本文能够示出而阐述的本公开的权利要求、方面及全部程度定义。

[0026] 为了易于参考，当在本文中描述本发明的多价抗体时，使用以下形式： $TA1 = IEA \times TA2$ ，其表示肿瘤相关抗原1结合域(TA1)、接头(=)、与肿瘤相关抗原2结合域(TA2)二聚(\times)的免疫细胞衔接抗原结合域(IEA)，以使得TA1 = IEA构成“长臂”，而 \times 指代二聚化，接着TA2指示多价抗体的“短臂”。在多价抗体包含共同轻链的情况下，对应VH区如下： $TA1 (VH1) = IEA (VH2) \times TA2 (VH3)$ 。

[0027] 图1. 多价抗体的实例的示意性图示。VH为重链可变区，CH为重链恒定区，CL为轻链恒定区，VL为轻链可变区。在此特定实施方式中，共同轻链用于结合域中的每个中。轻链或VL也可对于结合域中的一个或多个而言为共同的且对于另一结合域或其他结合域而言为不同的。在此特定实施方式中，结合至TA1的具有VH1的额外结合域包含CH1和CL域。多价抗体也可例如缺乏这些域中的一个或两个，或CH1和CL域可经调换。在此特定实施方式中，多价抗体在结合至TA1的具有VH1的额外结合域的CH1域与具有VH2的IEA结合域的VH域之间包含接头。接头也可作为额外接头或作为单一接头存在于结合至TA1的具有VH1的额外结合域的CL域与具有VH2的IEA结合域的VL之间。

[0028] 图2. 具有用于PD-L1、EGFR和CD3的结合域的多价抗体的实例的示意性图示。VH为重链可变区，CH为重链恒定区，CL为轻链恒定区，VL为轻链可变区。在此特定实施方式中，共同轻链用于结合域中的每个中。轻链或VL也可对于结合域中的一个或多个而言为共同的且对于另一结合域或其他结合域而言为不同的。在此特定实施方式中，结合至PD-L1的额外结合域包含CH1和CL域。多价抗体也可例如缺乏这些域中的一个或两个，或CH1和CL域可经调换。在此特定实施方式中，多价抗体在结合至PD-L1的额外结合域的CH1域与CD3结合域的VH域之间包含接头。接头也可作为额外接头或作为单一接头存在于结合至PD-L1的额外结合域的CL域与CD3结合域的VL之间。

[0029] 图3. 以下的氨基酸序列：a) 共同轻链氨基酸序列；b) 共同轻链可变区DNA序列及转译(IGKV1-39/jk1)；c) 共同轻链恒定区DNA序列及转译；d) IGKV1-39/jk5共同轻链可变区氨基酸序列；e) V区IGKV1-39氨基酸序列；f) 共同轻链的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列。

[0030] 图4.适用于生成双特异性分子的示例性IgG重链核酸和氨基酸序列。a) CH1区。b) 铰链区。c) CH2区。d) 包含变体L351K和T366K (KK) 的CH3域。E) 包含变体L351D和L368E (DE) 的CH3域。

[0031] 图5.图A描绘呈PD-L1阳性及EGFR阴性或EGFR阳性及PD-L1阴性的正常非肿瘤细胞。在存在单特异性PD-L1结合分子的情况下,此类细胞不为三特异性PD-L1=CD3×EGFR抗体有效地溶解。经由箭头交叉(×)意指不溶解或弱溶解。

[0032] 在PD-L1阳性及EGFR阴性细胞上单特异性PD-L1结合分子胜过三特异性抗体,例如由于PD-L1结合分子的二价和/或相较于三特异性抗体针对PD-L1的亲合力而言较高的PD-L1结合分子亲合力。三特异性抗体结合EGFR阳性及PD-L1阴性细胞,不诱导活性或诱导相对弱的活性,例如由于结合的单价特征。

[0033] 然而,在表达EGFR及PD-L1两者的细胞,诸如肿瘤细胞的情况下,三特异性抗体经由EGFR对接至细胞,且PD-L1靶向臂相对于单特异性抗PD-L1结合分子而言具有增强竞争优势(图B)。相较于单特异性PD-L1结合分子而言,三特异性抗体与此类PD-L1阳性及EGFR阳性细胞具有更优选结合,该更优选结合经由亲合力达成,该亲合力经由结合至EGFR及PD-L1两者获得。此种情况可通过使用EGFR靶向臂的高亲合力得到进一步增强。

[0034] 图6.图6显示使用与人T细胞共培养的BxPC3细胞执行的细胞毒性研究的结果。测试两种不同PD-L1=CD3×EGFR三特异性抗体:一种具有包含SEQ ID NO:38的PD-L1结合域、包含SEQ ID NO:8的CD3结合域及包含SEQ ID NO:56的EGFR结合域;且另一种具有包含SEQ ID NO:42的PD-L1结合域、包含SEQ ID NO:22的CD3结合域及包含SEQ ID NO:56的EGFR结合域。在存在具有包含具有如SEQ ID NO:46中所示的氨基酸序列的重链的PD-L1结合域的单特异性二价PD-L1抗体(图6A)或具有包含具有SEQ ID NO:47中所示的氨基酸序列的重链的PD-L1结合域的单特异性二价PD-L1抗体(图6B)情况下测试三特异性抗体的细胞杀伤活性。使用以下不同浓度的单特异性PD-L1抗体:20nM、2.05nM、0.205nM、0.0205nM、0.00205nM及0nM(左至右栏)。各曲线图的y轴指示相较于不包含抗体的对照样品而言的目标细胞杀伤%。各曲线图的x轴指示样品中的分别三特异性抗体的以纳摩尔浓度(nM)为单位的量。此类图比较PD-L1=CD3×EGFR三特异性抗体与三特异性PD-L1=CD3×Mock对照抗体的活性。mock可变域具有与共同轻链一起形成破伤风类毒素结合可变域(TT)的具有SEQ ID NO:68的重链可变区。TT可变域在各种孵育中不具有结合配偶体并因此充当mock域。

[0035] 图7.图7显示使用与人T细胞共培养的BxPC3细胞(上图)或HTC116细胞(下图)执行的细胞毒性研究的结果。测试三种不同PD-L1=CD3×EGFR三特异性抗体:一种具有包含SEQ ID NO:38的PD-L1结合域、包含SEQ ID NO:8的CD3结合域及包含SEQ ID NO:56的EGFR结合域(左栏);一种具有包含SEQ ID NO:38的PD-L1结合域、包含SEQ ID NO:22的CD3结合域及包含SEQ ID NO:56的EGFR结合域(中间栏),且一种具有包含SEQ ID NO:42的PD-L1结合域、包含SEQ ID NO:22的CD3结合域及包含SEQ ID NO:56的EGFR结合域(右栏)。在存在具有包含具有如SEQ ID NO:46中所示的氨基酸序列的重链的PD-L1结合域的单特异性二价PD-L1抗体或具有包含具有如SEQ ID NO:47中所示的氨基酸序列的重链的PD-L1结合域的单特异性二价PD-L1抗体情况下测试三特异性抗体的细胞杀伤活性。单特异性PD-L1抗体的使用浓度为三特异性抗体的10倍。各曲线图的y轴指示相较于不包含三特异性抗体的对照样品而言的目标细胞杀伤%。各曲线图的x轴指示样品中的分别三特异性抗体的以ng/ml为单位的

量。此类图比较PD-L1=CD3×EGFR三特异性抗体与三特异性PD-L1=CD3×Mock对照抗体及三特异性Mock=CD3×EGFR对照抗体的活性。mock可变域具有与共同轻链一起形成破伤风类毒素结合可变域(TT)的具有SEQ ID NO:68的重链可变区。TT可变域在各种孵育中不具有结合配偶体并因此充当mock域。

[0036] 图8.用于使用人T细胞及BxPC3细胞测定T细胞介导的目标细胞杀伤的细胞毒性分析中的PD-L1=CD3×EGFR三特异性抗体以及单特异性二价PD-L1抗体。测试两种不同PD-L1=CD3×EGFR三特异性抗体:一种具有包含SEQ ID NO:38的PD-L1结合域、包含SEQ ID NO:8的CD3结合域及包含SEQ ID NO:56的EGFR结合域(左栏);且一种具有包含SEQ ID NO:42的PD-L1结合域、包含SEQ ID NO:22的CD3结合域及包含SEQ ID NO:56的EGFR结合域(右栏)。

[0037] x轴指示三特异性抗体的以nM为单位的量。y轴指示相对于不添加抗体时而言的细胞杀伤%。顶行显示当不存在二价单特异性抗体(媒剂)时三特异性PD-L1=CD3×EGFR抗体或mock对照的细胞杀伤活性。中间行显示当添加等量二价单特异性抗体时三特异性PD-L1=CD3×EGFR抗体或mock对照的细胞杀伤活性(三特异性:单特异性比率为1:1)。下行显示当添加十倍过量二价单特异性抗体时三特异性PD-L1=CD3×EGFR抗体或mock对照的细胞杀伤活性(三特异性:单特异性比率为1:10)。图8A显示添加包含具有SEQ ID NO:46的重链的二价单特异性抗体时的结果,且图8B显示添加包含具有SEQ ID NO:51的重链的二价单特异性抗体时的结果。

[0038] 图9.用于使用人T细胞及BxPC3细胞测定T细胞介导的目标细胞杀伤的细胞毒性分析中的PD-L1=CD3×EGFR三特异性抗体以及单特异性二价PD-L1抗体。测试三种不同PD-L1=CD3×EGFR三特异性抗体:一种具有包含SEQ ID NO:38的PD-L1结合域、包含SEQ ID NO:8的CD3结合域及包含SEQ ID NO:56的EGFR结合域(左栏);一种具有包含SEQ ID NO:38的PD-L1结合域、包含SEQ ID NO:22的CD3结合域及包含SEQ ID NO:56的EGFR结合域(中间栏);且一种具有包含SEQ ID NO:42的PD-L1结合域、包含SEQ ID NO:22的CD3结合域及包含SEQ ID NO:56的EGFR结合域(右栏)。所用二价单特异性PD-L1抗体包含具有如SEQ ID NO:46中所示的氨基酸序列的重链。

[0039] x轴指示三特异性抗体的以nM为单位的量。y轴指示相对于不添加抗体时而言的细胞杀伤%。顶行显示当不存在二价单特异性抗体(媒剂)时三特异性PD-L1=CD3×EGFR抗体或mock对照的细胞杀伤活性。中间行显示当添加等量二价单特异性抗体时三特异性PD-L1=CD3×EGFR抗体或mock对照的细胞杀伤活性(三特异性:单特异性比率为1:1)。下行显示当添加十倍过量二价单特异性抗体时三特异性PD-L1=CD3×EGFR抗体或mock对照的细胞杀伤活性(三特异性:单特异性比率为1:10)。

[0040] 图10.载体MV3032的图谱。

[0041] 图11:载体MV1625的图谱。

[0042] 图12:合适多价抗体形式的实例的示意性图示。此类多价抗体形式可包含另外的结合域。

[0043] 图12A显示包含Fc区的多价抗体形式的实例。BD1、BD2和BD3为结合域1、2和3。此类实例中的某些结合域指示为Fab域;然而,也可使用其他类型的域,诸如单域抗体、VHH、Fv、VHH2、scFv、双功能抗体、CODV等以及其组合。此类实例中的某些结合域指示为scFv域;然而,也可使用其他类型的域,诸如单域抗体、VHH、Fv、VHH2、Fab、双功能抗体、CODV等以及其

组合。结合域中的一个或多个也可连接至CH2或在CH1、CH2和/或CH3区中经工程改造。多价抗体形式可包含任何类型的重链和轻链,该任何类型的重链和轻链包括共同重链、共同轻链、正交重链及正交HC:LC。根据本领域中已知的内容,多价抗体形式中的接头的位置和/或性质可变化。

[0044] 图12B显示包括以下的多价抗体形式的额外实例:V域、以Fv及Fab为主的多特异性抗体(VHH3、三功能抗体、串联Fab3)、以Fv为主的IgG多特异性抗体(CODV-Fab TsAb、scFv-IgG TsAb)、以Fab为主的IgG多特异性抗体(orthoTsAb)和CrossMab 2:1TCB。

具体实施方式

[0045] 为了可更易于理解本说明书,首先定义某些术语。额外定义阐述于整个实施方式中。除非另外说明,否则本文所使用的所有技术及科学术语都具有与一般本领域技术人员通常所理解的含义相同的含义,且采用免疫学、蛋白质化学、生物化学、重组DNA技术及药理学的方法。

[0046] 冠词“一个”和“一种”在本文中用于指一个或超过一个(也即指一个或至少一个)该冠词的语法对象。

[0047] 在整个本说明书及随附权利要求以及方面,词语“包含”、“包括”和“具有”以及诸如“含有”、“含”、“具”和“有”的变化形式应解释为非排他性的。也就是说,在上下文允许的情况下,此类词语意欲传达可能包括未具体叙述的其他要素或整数。

[0048] 如本文所使用的术语“结合域”意指包含可变域的蛋白质分子或可包含可变域或与该可变域共享序列同源性的可变域。包含可变域的结合域的非限制性实例为Fv域、Fab域及经修饰Fab域。典型可变性系在作为互补决定区或CDR的VH和VL域中的三个浅表环形成区中找到。如本文所使用的术语“抗体”意指含有结合抗原上的表位中的一个或多个域的属于免疫球蛋白类别蛋白质的蛋白质分子,其中这些域为或来源于抗体的可变域或与其共享序列同源性。抗体通常由基础结构单元制成-各基础结构单元具有两个重链及两个轻链。用于治疗用途的抗体优选尽可能地近似待治疗的受试者的天然抗体(例如人受试者的人抗体)。本发明的抗体不限于任何特定形式或其产生方法。

[0049] “基础抗体”或“基础抗体部分”包含两个结合域。其优选由经接合以形成“Y”形分子的四个多肽-两个重链及两个轻链组成。Y的基底含有配对重链的多聚化域,此类多聚化域通常为CH3和CH2域。Y的两个分支含有连接至两个可变域的两个CH1域。CH3序列中的一个具有可兼容异二聚化域的一个部分且另一CH3序列具有异二聚化域的互补部分。

[0050] 在一个实施方式中,基础抗体包含两个结合域,各结合域包含重链可变区、CH1、轻链可变区和CL;各结合域与其CH1区缔合至铰链及Fc区。

[0051] 抗体结合具有包括特异性、亲和力及亲合力的不同品质。特异性决定何种抗原或其表位由结合域特异性结合。亲和力为与特定抗原或表位结合的强度的量度。此处宜注意,抗体的“特异性”是指抗体对特定抗原的选择性,而“亲和力”是指抗体的抗原结合位点与其所结合的表位之间的相互作用的强度。

[0052] 因此,如本文所使用的“结合特异性”是指个别抗体结合位点与抗原决定子反应的能力。通常,本发明抗体的结合位点位于Fab域的可变域中且由重链和/或轻链的高变区构建。

[0053] “亲和力”为单个抗原结合位点与其抗原之间的相互作用的强度。用于抗原的本发明抗体的单个抗原结合位点可就解离常数(kd)而言表示。

[0054] “亲合力”是指二价或多价结合分子与其一个或多个抗原之间的相互作用的累积强度。亲合力通过多个抗原结合位点的合并亲和力和来测定,且依赖于目标细胞上的各抗原的表达水平而定。二价或多价结合分子展示亲合力结合的能力依赖于同时称为交叉结合能力的二价或多价结合分子结合其抗原的能力而定。

[0055] “表位”或“抗原决定子”为抗原上与免疫球蛋白或抗体特异性结合的位点。表位可由通过蛋白质三级折叠而相邻的相连氨基酸或非相连氨基酸形成(分别为所谓的线性及构型表位)。由相连接性氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时保留,而通过三级折叠形成的构型表位通常在用变性溶剂处理时损失。表位通常可包括呈独特空间构型的3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸。

[0056] 术语“重链”或“免疫球蛋白重链”包括来自任何生物体的免疫球蛋白重链恒定区序列,且除非另外规定,否则包括重链可变域。除非另外规定,否则术语重链可变域包括三个重链CDR及四个FR区。重链的片段包括CDR、CDR与FR及其组合。典型重链在可变域之后(自N端至C端)具有CH1域、铰链、CH2域和CH3域。重链的功能片段包括能够特异性辨识抗原且包含至少一个CDR的片段。

[0057] 术语“轻链”包括免疫球蛋白轻链可变域或VL(或其功能片段);以及来自任何生物体的免疫球蛋白恒定域或CL(或其功能片段)序列。除非另外规定,否则术语轻链可包括选自人 κ 、 λ 及其组合的轻链。除非另外规定,否则轻链可变(VL)域通常包括三个轻链CDR及四个构架(FR)区。一般而言,全长轻链自N端至C端包括有包括FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的VL域及轻链恒定域。可用于本发明的轻链包括例如不选择性结合重链所选择性结合的表位的轻链。

[0058] 适用于多价抗体发明中的轻链包括共同轻链,诸如可通过筛检现有抗体库(湿式文库或计算机仿真)中最常采用的轻链识别的轻链,其中轻链实质上干扰重链的表位结合域的亲和力和/或选择性,但也适合与重链数组配对。例如,合适轻链包括来自诸如基因转殖啮齿动物的基因转殖动物的轻链,该基因转殖动物包含整合至其基因组中的共同轻链且可用于生成多组在暴露于抗原时在重链处具有多样性的共同轻链抗体(WO2009/157771)。作为多价抗体的一部分的共同轻链也可用作第二抗体的轻链。

[0059] 本发明的术语“共同轻链”是指可相同或具有一些氨基酸序列差异、同时本发明抗体的结合特异性不受影响,也即差异不显著地影响功能结合区的形成的轻链。

[0060] 例如,在如本文所使用的共同链定义的范围内,有可能例如通过引入且测试保守氨基酸变化、当与同源链配对时不促成或仅部分地促成结合特异性的区中的氨基酸变化及其类似变化来制备或发现不相同但仍在功能上等效的可变链。因此,此类变体也能够结合不同的同源链且形成功能抗原结合域。因此,如本文所使用的术语“共同轻链”是指可相同或具有一些氨基酸序列差异、同时在与重链配对之后保留所得抗体的结合特异性的轻链。特定共同轻链及此类功能等效变体的组合涵盖在术语“共同轻链”内。

[0061] 优选共同轻链指示为IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01。IgV κ 1-39为免疫球蛋白可变 κ 1-39基因的简写。该基因也称为免疫球蛋白 κ 可变1-39;IGKV139;IGKV1-39。基因外部Id为HGNC:5740;Entrez基因:28930;Ensembl:ENSG00000242371。IgV κ 1-39的优选氨基酸序列在图4中

给出。此图列举V区的序列。V区可与五个J区中的一个组合。图4描述IgVκ1-39以及J区的两个优选序列。接合序列指示为IGKV1-39/jk1及IGKV1-39/jk5；替代名称为IgVκ1-39*01/IGJκ1*01或IgVκ1-39*01/IGJκ5*01(根据imgt.org处的IMGT数据库全球网命名)。

[0062] 本领域技术人员应认识到，“共同”也指氨基酸序列不相同的轻链的功能等效物。该轻链存在许多变体，其中存在不会显著地影响功能结合区的形成的突变(删除、取代、添加)。

[0063] “Fv域”意指包含具有重链可变区(VH)及轻链可变区(VL)的可变区的结合域。

[0064] “Fab域”意指包含可变区的结合域，通常为包含经配对重链可变区及轻链可变区的结合域。Fab域可包含恒定区域，包括CH1及与恒定轻链域(CL)及VL域配对的VH域。该配对可例如经由双硫桥键以共价键联形式在CH1和CL域处发生。

[0065] “经修饰Fab域”意指包含CH1及VH域的结合域，其中VH与VL域配对且CL域不存在。可替代地，经修饰Fab域为包含CL及VL域的结合域，其中VL与VH域配对且CH1域不存在。为了使CH1或CL区可以不配对形式存在，可能有必要移除疏水性区或减小疏水性区的长度。可使用来自天然地表达单链抗体的动物物种，例如来自诸如骆马或骆驼的骆驼科动物，或来自鲨鱼的CH1区。经修饰Fab域的其他实例包括包含不与其同源区配对的恒定区CH1或CL和/或不与其同源区配对的可变区VH或VL(存在)的Fab；以及其中VH经VL调换的Fab，其中一对中的一个多肽包含VL-CH1且另一多肽包含VH-CL。

[0066] 如本文所使用的术语“免疫效应细胞”或“效应细胞”是指在哺乳动物免疫系统中的天然细胞组库内可经活化以影响目标细胞活力的细胞。免疫效应细胞包括诸如天然杀伤(NK)细胞、包括细胞毒性T细胞的T细胞或B细胞的淋巴谱系细胞，但骨髓谱系细胞也可视为诸如单核球或巨噬细胞、树突状细胞及嗜中性颗粒球的免疫效应细胞。该效应细胞优选为NK细胞、T细胞、B细胞、单核球、巨噬细胞、树突状细胞或嗜中性颗粒球。

[0067] 如本文所使用的术语“免疫细胞衔接抗原”是指在该免疫效应细胞的细胞膜上表达且当结合至其配位体或本发明的活化抗体时引起免疫细胞的活化、刺激或共刺激的分子或部分，待靶向的此类抗原的非限制性实例包括CD2、CD3、CD137、CD28、OX40、CD5、CD16、CD16A。

[0068] 当在本文中提及核酸或氨基酸序列时“一致性百分比(%)”定义为在出于最优选比较目的而比对序列之后与经选择序列中的残基具有一致性的候选序列中的残基百分比。为了使比对优化，可在两个序列之间在经比较的两个序列中的任一个中引入空隙。该比对可在所比较的全长序列上进行。可替代地，比对可在较短长度上，例如在约20个、约50个、约100个或更多个核酸/为主或氨基酸上进行。序列一致性为经报导的经比对区上的两个序列之间的一致匹配百分比。

[0069] 序列比较及两个序列之间的序列一致性百分比测定可使用数学算法实现。技术人员将了解以下事实：数个不同计算机程序可用于比对两个序列且测定两个序列之间的一致性(Kruskal, J.B. (1983) An overview of sequence comparison In D.Sankoff and J.B.Kruskal, (编), Time warps, string edits and macromolecules: the theory and practice of sequence comparison, 第1-44页 Addison Wesley)。两个氨基酸序列或核酸序列之间的序列一致性百分比可使用用于两个序列比对的尼-翁算法(Needleman and Wunsch algorithm)来测定。(Needleman, S.B. 及 Wunsch, C.D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-

453) .尼-翁算法已实施于计算机程序NEEDLE中。出于本发明的目的,使用来自EMBOSS套装的NEEDLE程序以测定氨基酸及核酸序列的一致性百分比(2.8.0版或更高级版本,EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite(2000)Rice,P.LongdenJ.及Bleasby,A.Trends in Genetics 16,(6)第276-277页,http://emboss.bioinformatics.nl/)。对于蛋白质序列,使用EBLOSUM62以用于取代矩阵。对于DNA序列,使用DNAFULL。所用参数为10的空隙开放罚分及0.5的空隙扩展罚分。

[0070] 在比对之后,通过如上文所描述的程序NEEDLE如下计算查询序列与本发明序列之间的序列一致性百分比:在两个序列中显示相同氨基酸或相同核苷酸的比对中的对应位置数目除以减除比对中的空隙总数目之后的比对总长度。

[0071] 本文中的术语“连接”或“链接”是指在一级氨基酸序列处通过肽键使域彼此接合。例如,包含VH-CH1-CH2-CH3的基础抗体部分的重链可经由接头(连接CH1处的额外结合域的重链与基础抗体部分的VH区)连接至额外结合域VH-CH1(或额外结合域与额外结合域)的重链,其一起构成一个多肽链。类似地,CH1域可连接至可变重链区且CL域可连接至可变轻链区。抗体域也可通过不需要接头的手段,诸如作为单一多肽的一部分“连接”。

[0072] “配对”是指构成本发明的多价抗体的多肽之间的相互作用,此类相互作用使得多肽可多聚化。例如,额外结合域可包含与轻链区(VL-CL)配对的重链区(VH-CH1),其中CH1和CL配对以形成该结合域。如本文所述,抗体域(例如重链和轻链)的配对因非共价相互作用且也经由双硫键发生,且可经由本文所公开的技术且通过本领域中已知的方法经工程改造。此类非共价相互作用通常在除CH1与CL之外的VH与VL之间的抗体中发生。

[0073] “双特异性抗体”为如本文所述的抗体,其中抗体的一个可变域结合至第一抗原,而抗体的第二可变域结合至第二抗原,其中该第一及第二抗原不相同。术语“双特异性抗体”也涵盖双互补位抗体,其中抗体的一个可变域结合至抗原上的第一表位,而抗体的第二可变域结合至抗原上的第二表位。该术语进一步包括其中至少一个VH能够特异性辨识第一抗原且与免疫球蛋白可变域中的至少一个VH配对的VL能够特异性辨识第二抗原的抗体。在例如WO 2008/027236、WO 2010/108127和Schaefer等人(Cancer Cell 20,472-486,2011年10月)中所描述,所得VH/VL对将结合抗原1或抗原2,且称为“二合一抗体”。本发明的双特异性抗体不限于任何特定双特异性形式或其产生方法。

[0074] 诸如本文所述的三特异性抗体的多特异性抗体为其中抗体的一个可变域结合至第一抗原、抗体的第二可变域结合至第二抗原且在三特异性抗体的情况下抗体的第三可变域结合至第三抗原的抗体,其中该第一、第二及第三抗原不相同或其所结合的表位不相同。也即,三特异性抗体可为三互补位的,这是因为其结合相同抗原上的三个不同表位或一个抗原上的两个表位及第二抗原上的一个表位。

[0075] 诸如双特异性或三特异性抗体的多价抗体具有两个或更多个结合域。结合域可包含可变域和CH1/CL区。结合域中的一些或全部可针对相同抗原,然而,通常如本发明中的情况,至少两个且优选地至少三个结合域结合不同抗原。在三特异性抗体的情况下,三个结合域通常全部结合不同抗原。因此,结合域优选全部结合不同抗原。在该情况下,结合域也全部具有不同序列。

[0076] 多价抗体可使用包括细胞融合、化学结合或重组DNA技术的各种技术生成。多价抗体形式为本领域中已知的。实例为具有两个不同结合域的抗体,诸如在双特异性抗体中,可

结合两个不同抗原或相同抗原内的两个不同表位的抗体。此类形式可允许使用经校准结合,这将允许多价抗体选择性靶向表达两个抗原或表位的细胞或目标(诸如肿瘤细胞)、同时不靶向表达一个抗原的健康细胞,或靶向以较低表达水平表达一个抗原的此类健康细胞。类似地,在诸如双特异性抗体的多价抗体上具有两个不同结合域可允许结合不同抗原,以使得可使用该多价抗体以靶向单个细胞上或两个相互作用细胞上的抑制分子及刺激分子两者,从而引起多价抗体的效力增强。也可使用多价抗体以再针对可再针对肿瘤的例如免疫调节细胞的细胞。多价抗体的非限制性实例描述于本领域中。多价抗体也描述于以引用方式并入本文中的W0 2019/190327中。

[0077] 在一个方面,本发明提供包含多价抗体的组合物,该多价抗体包含结合第一肿瘤抗原(TA1)的具有VH1的第一可变域、结合第二肿瘤抗原(TA2)的具有VH3的第二可变域及结合免疫细胞衔接抗原(IEA)的具有VH2的第三可变域;并且其中组合物进一步包含结合TA1或TA2的第二结合分子。

[0078] 结合免疫细胞衔接抗原(IEA)的具有VH2的多价抗体可变域可结合至在免疫效应细胞表面上表达的任何分子,例如CD3、TCR- α 链或TCR- β 链。其他合适免疫细胞衔接抗原为例如但不限于CD2、CD4、CD5、CD7、CD8、CD137、CD28、CD16、CD16A、CD64、OX40、CD27、CD40、ICOS、GITR、NKG2D、Nkp46、Nkp44和Nkp30。优选地,此可变域结合至CD3、TCR- α 链、TCR- β 链、CD2或CD5。此可变域优选结合至CD3。结合优选与免疫细胞衔接抗原(IEA)的胞外部分进行。优选地,多价抗体与IEA的结合活化免疫效应细胞或提供共刺激信号。优选地,多价抗体与IEA的结合活化免疫效应细胞。

[0079] 术语“CD3”(分化群3)是指由CD3 γ 链(SwissProt P09693)、CD3 δ 链(SwissProt P04234)、CD3 ϵ 链(SwissProt P07766)和CD3 ζ 链同二聚体(SwissProt P20963)构成的蛋白复合物。CD3 ϵ 以各种别名为人所知,此类别名中的一些为:“CD3 ϵ 分子 ϵ (CD3-TCR复合物)”、“CD3 ϵ 抗原 ϵ 多肽(TiT3复合物)”、T细胞表面抗原T3/Leu-4 ϵ 链;T3E;T细胞抗原受体复合物T3 ϵ 次单元;CD3 ϵ 抗原;CD3- ϵ 3;IMD18;TCRE。CD3E基因Id为HGNC:1674;Entrez基因:916;Ensembl:ENSG000001 98851;OMIM:186830及UniProtKB:P07766。此类链与T细胞受体(TCR)及 ζ 链缔合以形成在促分裂信号传导时可在T淋巴球中生成活化信号的TCR复合物。CD3在T细胞及NK T细胞上表达。除非另外具体说明,否则在本文提及CD3的情况下,提及人CD3。

[0080] CD3结合域可在亲和力、表位及其他特征范围内。可结合CD3的胞外部分的特定可变域为包含选自由以下组成的组中的至少一个重链互补决定区(CDR)的可变域:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:25。

[0081] CD3抗原结合域可包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:23的重链CDR1;SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:24的重链CDR2;和SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:25的重链CDR3。

[0082] CD3抗原结合域可包含与选自由以下组成的组中的氨基酸序列具有至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的重链CDR1、CDR2和/或CDR3序列:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ

ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:25。

[0083] CD3抗原结合域可包含与选自以下的组中的氨基酸序列具有至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的重链可变区序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:22。

[0084] CD3结合域可包含具有0-10个、优选0-5个氨基酸插入、删除、取代、添加或其组合的具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:22的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:93或SEQ ID NO:99的氨基酸序列的轻链可变区。

[0085] CD3抗原结合域可包含具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:22的重链可变区及包含SEQ ID NO:93或SEQ ID NO:99的氨基酸序列的轻链可变区。

[0086] 在某些实施方式中,具有VH1的多价抗体可变域结合至TA1。

[0087] TA1可为在肿瘤细胞上表达的任何抗原。TA1优选为PD-L1、PD-L2、HVEM、CD47、B7-H3、B7-H4、B7-H7或Siglec-15。

[0088] TA1优选为诸如PD-L1或PD-L2的免疫检查点受体/配位体对的成员。可变域抑制该对的信号传导路径且从而刺激将另外经抑制达到至少一定程度的免疫反应。

[0089] PD-L1为在诸如妊娠、组织同种异体移植、自体免疫疾病及其他疾病状态(诸如肝炎)的特定事件期间抑制免疫反应作用的1型跨膜蛋白。PD-L1与PD-1或B7.1(CD80)的结合发射减少表达PD-1的T细胞增殖的抑制信号。认为PD-1能够控制经由细胞凋亡进行之外来抗原特异性T细胞积聚。PD-L1由各种癌细胞表达且认为其表达至少部分地引起针对癌细胞的免疫反应的抑制。PD-L1为B7蛋白质家族的成员且以各种其他名称为人所知,此类其他名称诸如为CD274分子;CD274抗原;B7同源物1;PDCD1配位体1;PDCD1LG1;PDCD1L1;B7H1;PDL1;计划性细胞死亡1配位体1;计划性死亡配位体1;B7-H1;及B7-H。CD274外部Id为HGNC:17635;Entrez基因:29126;Ensembl:ENSG00000120217;OMIM:605402;UniProtKB:Q9NZQ7。

[0090] PD-L2为PD-1的第二配位体。PD-L2衔接PD-1抑制T细胞受体(TCR)介导的增殖并通过CD4+T细胞进行的细胞介素产生。在低抗原浓度下,PD-L2/PD-1结合抑制B7-CD28信号。在高抗原浓度下,PD-L2/PD-1结合减少细胞介素产生。PD-L表达在抗原呈现细胞上通过干扰素 γ 处理来上调。其在一些正常组织及各种肿瘤中表达。认为PD-L1和PD-L2具有重叠功能且调节T细胞反应。蛋白质以多个其他名称为人所知,该多个其他名称诸如为计划性细胞死亡1配位体2;B7树突状细胞分子;计划性死亡配位体2;嗜乳脂蛋白B7-DC;PDCD1配位体2;PD-1配位体2;PDCD1L2;B7-DC;CD273;B7DC;PDL2;PD-1配位体2;CD273抗原;BA574F11.2;及Btdc。PD-L2外部Id为HGNC:18731;Entrez基因:80380;Ensembl:ENSG00000197646;OMIM:605723;及UniProtKB:Q9BQ51。

[0091] HVEM也称为肿瘤坏死因子受体超家族成员14(TNFRSF14)和CD270,是TNF受体(肿瘤坏死因子)超家族的人细胞表面受体。在人中,蛋白由TNFRSF14基因编码。HVEM可以衔接至少四个相异配位体,也即TNFSF成员LIGHT(TNFSF14)及TNF β /LT α (肿瘤坏死因子 β /淋巴毒素 α)及免疫球蛋白超家族成员B及T淋巴球衰减因子(BTLA)和CD160。对于人HVEM的参考序列,我们是指Swiss-Prot编号Q92956.3;aa1-283。仅参考识别HVEM基因/蛋白质。不意欲将

如本文所述的HVEM限于数据库条目的特定序列。可结合BTLA、CD160、LIGHT及TNFB且可由如本文所述的抗体结合的HVEM天然变体在本发明的范围内。

[0092] CD47为人中由CD47基因编码的跨膜蛋白。蛋白质以多个其他名称为人所知,该多个其他名称诸如为整合素相关蛋白(IAP)、MER6、OA3和CD47分子。CD47属于免疫球蛋白超家族且可结合配位体血小板反应蛋白-1(TSP-1)及信号调节蛋白 α (SIRP α)。CD47在人细胞中经广泛地表达且已发现其在许多不同肿瘤细胞中经过表达。存在四个CD47的可替代地剪接的同功异型物。CD47外部ID为HGNC:1682、OMIM:601028、Entrez基因:961、Ensembl:ENSG00000196776及UniProtKB:Q08722。

[0093] 免疫检查点分子B7-H3为经由诸如CD28、CTLA-4及ICOS的CD28家族分子传导信号的共刺激B7分子。蛋白质以多个其他名称为人所知,该多个其他名称诸如为分化群276(CD276)、4Ig-B7-H3、B7H3、B7RP-2和CD276分子。已发现B7-H3由实体肿瘤过表达。B7-H3外部ID为HGNC:19137、OMIM:605717、Entrez基因:80381、Ensembl:ENSG00000103855及UniProtKB:Q5ZPR3。

[0094] B7-H4为免疫检查点分子且属于B7共刺激性分子家族。在人中,蛋白质由VTCN1基因编码。蛋白质以多个其他名称为人所知,该多个其他名称诸如为含V组域的T细胞活化抑制因子1(VTCN1)、B7H4、B7S1、B7X、B7h.5、PRO1291、VCTN1。B7-H4外部ID为HGNC:28873、OMIM:608162、Entrez基因:79679、Ensembl:ENSG00000134258及UniProtKB:Q7Z7D3。

[0095] 先前称为人内源性逆转录病毒-H长端重复序列相关2(HHLA2)的B7-H7属于B7共刺激性分子家族。B7-H7已识别为人CD28H的特定配位体,其一起促进CD4+T细胞增殖及细胞介素产生。B7-H7外部ID为HGNC:4905、Entrez基因:11148、Ensembl:ENSG00000114455、OMIM:604371及UniProtKB:Q9UM44。

[0096] 唾液酸结合免疫球蛋白型凝集素Siglec-15为结合唾液酸且主要在免疫细胞表面上找到的细胞表面蛋白。蛋白质以多个其他名称为人所知,该多个其他名称诸如为CD33抗原样3、CD33分子样3、CD33L3及唾液酸结合Ig样凝集素15。Siglec-15外部ID为HGNC:27596、OMIM:618105、Entrez基因:284266、Ensembl:ENSG00000197046及UniProtKB:Q6ZMC9。

[0097] 在某些实施方式中,多价抗体的TA1结合域特异性结合人PD-L1。多价抗体的PD-L1结合域或可变域可在亲和力、表位及其他特征范围内。可结合PD-L1的胞外部分的特定可变域为包含选自以下组成的组中的至少一个重链CDR的可变域:SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36和SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44和SEQ ID NO:45。

[0098] PD-L1抗原结合域可包含SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:39或SEQ ID NO:43的重链CDR1;SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:40或SEQ ID NO:44的重链CDR2;和SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:45的重链CDR3。

[0099] PD-L1抗原结合域可包含与选自以下组成的组中的氨基酸序列具有至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的重链CDR1、CDR2和/或CDR3序列:SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID

NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44和SEQ ID NO:45。

[0100] PD-L1抗原结合域可包含与选自以下的组中的氨基酸序列具有至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的重链可变区序列:SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:42。

[0101] PD-L1抗原结合域可包含具有0-10个、优选0-5个氨基酸插入、删除、取代、添加或其组合的具有SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:42的氨基酸序列的重链可变区。

[0102] PD-L1抗原结合域可包含具有SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:42的重链可变区及包含SEQ ID NO:93或SEQ ID NO:99的氨基酸序列的轻链可变区。

[0103] 在某些实施方式中,PD-L1抗原结合域包含有包含具有SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:51的氨基酸序列或针对以下公开的氨基酸序列的重链的PD-L1抗体的重链和/或轻链可变区,详细重链可变区:MSB-0010718C参见WO 2013/079174;STI-1014参见WO2013/181634;CX-072参见WO2016/149201;KN035,参见Zhang等人,Cell Discov.7:3 (2017年3月);LY3300054,参见例如WO 2017/034916;和CK-301,参见Gorelik等人,AACR:Abstract 4606 (2016年4月));以及12A4或MDX-1105,参见例如WO 2013/173223。

[0104] 在某些实施方式中,PD-L1抗原结合域结合与包含具有SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:51或具有以下重链的PD-L1抗体的重链和轻链可变区相同的表位:MSB-0010718C,参见WO 2013/079174;STI-1014,参见WO2013/181634;CX-072,参见WO2016/149201;KN035,参见Zhang等人,Cell Discov.7:3 (2017年3月);LY3300054,参见例如WO 2017/034916;和CK-301,参见Gorelik等人,AACR:Abstract 4606 (2016年4月));以及12A4或MDX-1105,参见例如WO 2013/173223。

[0105] 在某些实施方式中,PD-L1抗原结合域与以下PD-L1抗体的重链和轻链可变区竞争结合至PD-L1:MPDL3280A、RG7446,参见US 2010/0203056 A1;MEDI-4736,参见WO 2011/066389;MSB-0010718C,参见WO 2013/079174;STI-1014,参见WO2013/181634;CX-072,参见WO2016/149201;KN035,参见Zhang等人,Cell Discov.7:3 (2017年3月);LY3300054,参见例如WO 2017/034916;和CK-301,参见Gorelik等人,AACR:Abstract 4606 (2016年4月));以及12A4或MDX-1105,参见例如WO 2013/173223。

[0106] 在某些实施方式中,具有VH3的多价抗体可变域结合至TA2。

[0107] TA2可为任何肿瘤相关抗原,但优选为CLEC12A或ErbB蛋白质家族成员,优选EGFR。

[0108] CLEC12A也称为C型凝集素域家族12成员A;C型凝集素蛋白CLL-1;MICL;树突状细胞相关凝集素2;C型凝集素超家族;骨髓抑制性C型凝集素样受体;C型凝集素样分子-1;CLL-1;DCAL2;CLL1;C型凝集素样分子1;DCAL-2;杀伤细胞凝集素样受体亚家族L成员1(KLRL1);CD371 (Bakker A.等人Cancer Res.2004,64,p8843-50;GenBankTM寄存编号:AY547296;Zhang W.等人GenBankTM寄存编号:AF247788;A.S.Marshall,等人J Biol Chem 2004,279,p14792-802;GenBankTM寄存编号:AY498550;Y.Han等人Blood 2004,104,p2858-66;H.Floyd,等人GenBankTM寄存编号:AY426759;C.H.Chen,等人Blood 2006,107,p1459-67)。Id:HGNC:31713;Entrez基因:160364;Ensembl:ENSG00000172322;OMIM:612088;UniProtKB:Q5QGZ9。CLEC12A为在白血病母细胞上及在急性骨髓性白血病(AML)中的白血病

干细胞(包括CD34阴性或CD34低表达白血病干细胞(侧群))上表达的抗原(A.B.Bakker等人 Cancer Res 2004,64,p8443-50;Van Rhenen等人2007 Blood 110:2659;Moshaver等人2008 Stem Cells 26:3059)。另外认为CLEC12A表达限于造血性谱系,特别地限于周边血液及骨髓中的骨髓细胞,也即颗粒球、单核球及树突状细胞前驱体。更重要地,CLEC12A不存在于造血干细胞上。此表达图谱使CLEC12A成为AML中的特别有利的目标。全长形式的CLEC12A包含275个氨基酸残基,包括不存在于大部分其他同功异型物中的具有10个氨基酸的额外胞内延伸段,且显示严格骨髓表达图谱(表面表达及mRNA水平)。如Bakker等人 Cancer Res 2004,64,p8443-50及Marshall 2004-J Biol Chem 279(15),p14792-802中所描述,术语“CLEC12A或其功能等效物”意指保留严格骨髓表达图谱的上文提及的全部(诸如剪接及突变)变体及其同功异型物(两者处于表面表达水平及mRNA水平下)。本发明的CLEC12A结合抗体结合人CLEC12A。除非另外具体说明,否则在本文提及CLEC12A的情况下,提及人CLEC12A。

[0109] “ErbB1”或“EGFR”为命名为Her-1、Her-2、Her-3及Her-4或cErbB-1、cErbB-2、cErbB-3和CErbB-4的四个受体酪氨酸激酶(RTK)家族的成员。EGFR具有由四个亚域构成的胞外域(ECD),该四个亚域中的两个参与配位体结合且该四个亚域中的一个参与同二聚化及异二聚化。此部分中使用的参考号码是指以“本说明书中引用的参考文献”为表头的清单中的参考文献编号。EGFR整合来自各种配位体的胞外信号以产生多样胞内反应。由EGFR活化的主信号转导路径由Ras-促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)促分裂信号级联构成。此路径的活化通过将Grb2募集至酪氨酸磷酸化EGFR来引发。这引起经由Grb2结合Ras-鸟嘌呤核苷酸交换因子无七之子(Son of Sevenless,SOS)进行的Ras活化。另外,PI3-激酶-Akt信号转导路径也由EGFR活化,但此活化在存在Her3共表达的情况下强得多。EGFR牵涉到数种人上皮恶性疾病,尤其乳癌、膀胱癌、非小细胞肺癌、结肠癌、卵巢癌、头颈癌及脑癌。已在基因中发现活化突变以及受体及其配位体的过表达,此类情况产生自分泌活化环。因此,此RTK已广泛地用作癌症疗法的目标。靶向RTK的小分子抑制剂及针对胞外配位体结合域的单株抗体(mAb)两者均已得到研发且迄今已显示数项临床成功,即使大部分精选患者组的临床成功。人EGFR蛋白及其编码基因的数据库寄存编号为(GenBanknM_005228.3)。寄存编号主要为了提供识别作为目标的EGFR蛋白的另一方法而给出,抗体所结合的EGFR蛋白的实际序列可变化,例如由于编码基因突变,诸如在一些癌症或其类似疾病中出现的编码基因突变。除非另外说明,否则在本文提及EGFR的情况下,提及是指人EGFR。结合EGFR的抗原结合位点结合EGFR及其各种变体,诸如在一些EGFR阳性肿瘤上表达的EGFR及其各种变体。

[0110] 如本文所使用的“ErbB-2”或“HER2”是指人中由ERBB-2基因编码的蛋白质。基因或蛋白质的替代名称包括CD340;HER-2;HER-2/neu;MLN 19;NEU;NGL;TKR1。ERBB-2基因通常称为HER2(来自人表皮生长因子受体2)。在本文提及ErbB-2的情况下,提及是指人ErbB-2。包含结合ErbB-2的抗原结合位点的抗体结合人ErbB-2。ErbB-2抗原结合位点也可由于人与其他哺乳动物异种同源物之间的序列及三级结构类似性而结合此类异种同源物,但并非必须如此。人ErbB-2蛋白及其编码基因的数据库寄存编号为(NP_001005862.1,NP_004439.2NC_000017.10NT_010783.15NC_018928.2)。寄存编号主要为了提供识别作为目标的ErbB-2的另一方法而给出,抗体所结合的ErbB-2蛋白的实际序列可变化,例如由于编码基因突变,诸如在一些癌症或其类似疾病中出现的编码基因突变。ErbB-2抗原结合位点结

合ErbB-2及其各种变体,诸如由一些ErbB-2阳性肿瘤细胞表达的ErbB-2及其各种变体。

[0111] 如本文所使用的“ErbB-2”或“HER2”是指人中由ERBB-3基因编码的蛋白质。基因或蛋白质的替代名称为HER3;LCCS2;MDA-BF-1;c-ErbB-3;c-erbb-3;erbb-3-S;p180-ErbB-3;p45-sErbB-3;及p85-sErbB-3。在本文提及ErbB-3的情况下,提及是指人ErbB-3。包含结合ErbB-3的抗原结合位点的抗体结合人ErbB-3。ErbB-3抗原结合位点也可由于人与其他哺乳动物异种同源物之间的序列及三级结构类似性而结合此类异种同源物,但非必须如此。人ErbB-3蛋白及其编码基因的数据库寄存编号为(NP_001005915.1NP_001973.2,NC_000012.11NC_018923.2NT_029419.12)。寄存编号主要为了提供识别作为目标的ErbB-3的另一方法而给出,抗体所结合的ErbB-3蛋白的实际序列可变化,例如由于编码基因突变,诸如在一些癌症或其类似疾病中出现的编码基因突变。ErbB-3抗原结合位点结合ErbB-3及其各种变体,诸如由一些ErbB-2阳性肿瘤细胞表达的ErbB-3及其各种变体。

[0112] 在某些实施方式中,目标细胞抗原结合特异性结合人表皮生长因子受体(EGFR)。EGFR结合域可在亲和力、表位及其他特征范围内。可结合EGFR的胞外部分的特定可变域为包含选自由以下组成的组中的至少一个重链CDR的可变域:SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:61和SEQ ID NO:63。

[0113] EGFR抗原结合域可包含具有SEQ ID NO:53的重链CDR1、具有SEQ ID NO:54的重链CDR2及具有SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:61或SEQ ID NO:63的重链CDR3。

[0114] EGFR抗原结合域可包含与选自由以下组成的组中的氨基酸序列具有至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的重链CDR1、CDR2和/或CDR3序列:SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:61和SEQ ID NO:63。

[0115] EGFR抗原结合域可包含与选自以下的组中的氨基酸序列具有至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的重链可变区序列:SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:60和SEQ ID NO:62。

[0116] EGFR结合域可包含具有0-10个、优选0-5个氨基酸插入、删除、取代、添加或其组合的具有SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:60和SEQ ID NO:62的氨基酸序列的重链可变区。

[0117] EGFR抗原结合域可包含具有SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:60或SEQ ID NO:62的重链可变区及包含SEQ ID NO:93或SEQ ID NO:99的氨基酸序列的轻链可变区。

[0118] 在某些实施方式中,EGFR抗原结合域包含EGFR抗体西妥昔单抗(cetuximab)或帕尼单抗(panitumumab)的重链和/或轻链可变区。

[0119] 在某些实施方式中,EGFR抗原结合域结合与EGFR抗体西妥昔单抗或帕尼单抗的重链和轻链可变区相同的表位。

[0120] 在某些实施方式中,EGFR抗原结合域与EGFR抗体西妥昔单抗或帕尼单抗的重链和轻链可变区竞争结合至EGFR。

[0121] 在某些实施方式中,目标细胞抗原结合特异性结合人CLEC12A。CLEC12A结合域可在亲和力、表位及其他特征范围内。可结合CLEC12A的胞外部分的特定可变域为包含选自由

以下组成的组中的至少一个重链CDR的可变域:SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67。

[0122] CLEC12A抗原结合域可包含分别具有SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67的重链CDR1、CDR2和CDR3。

[0123] CLEC12A抗原结合域可包含与SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66或SEQ ID NO:67的氨基酸序列具有至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的重链CDR1、CDR2和/或CDR3序列。

[0124] CLEC12A抗原结合域可包含与SEQ ID NO:64的氨基酸序列具有至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的重链可变区序列。

[0125] CLEC12A结合域可包含具有0-10个、优选0-5个氨基酸插入、删除、取代、添加或其组合的具有SEQ ID NO:64的氨基酸序列的重链可变区。

[0126] CLEC12A抗原结合域可包含具有SEQ ID NO:64的重链可变区及包含SEQ ID NO:93或SEQ ID NO:99的氨基酸序列的轻链可变区。

[0127] 在一个实施方式中,本发明的多价抗体包含结合PD-L1的具有VH1的第一可变域、结合CD3的具有VH2的第二可变域及结合EGFR的具有VH3的第三可变域,其中可变域如本文所定义。第二结合分子可为对TA1或TA2、优选TA1具有特异性的任何结合分子。TA1优选为PD-L1。该结合分子包括但不限于维持该抗体的结合特异性的抗体或其片段或变体或包含该片段的结构。

[0128] 组合多价抗体与第二结合分子允许多价抗体仅或主要诱导表达抗原TA1和TA2(例如PD-L1及EGFR)两者的细胞,诸如肿瘤细胞的细胞杀伤。多价抗体不应诱导仅表达TA1或TA2(例如PD-L1而非EGFR;或EGFR而非PD-L1)的细胞,诸如非肿瘤细胞的细胞杀伤,或诱导程度至少低于不存在第二结合分子情况下的诱导程度。

[0129] 多价抗体与第二结合分子的组合特别适用于以下情形:存在表达TA1而非TA2的非肿瘤细胞及表达TA2而非TA1的非肿瘤细胞,且多价抗体的亲合力不足以仅或主要诱导表达TA1和TA2两者的细胞的细胞杀伤。若多价抗体仍结合至表达TA1而非TA2的非肿瘤细胞和/或诱导其的细胞杀伤,则如本文所述的第二结合分子结合至TA1。这防止或减少如本文所述的多价抗体与表达TA1而非TA2的非肿瘤细胞的结合,和/或减少多价抗体诱导的非肿瘤细胞的细胞杀伤。同样,若多价抗体仍结合至表达TA2而非TA1的非肿瘤细胞和/或诱导其的细胞杀伤,则如本文所述的第二结合分子结合至TA2。这防止或减少如本文所述的多价抗体与表达TA2而非TA1的非肿瘤细胞的结合,和/或减少多价抗体诱导的非肿瘤细胞的细胞杀伤。

[0130] 结合至TA1或TA2的本发明的第二结合分子与多价抗体竞争结合至TA1或TA2。针对双阳性表达TA1、TA2的细胞的选择性活性可由归因于以下的多价抗体与此类细胞的优良结合引起:多价抗体和第二结合分子的TA1或TA2结合域的亲合力、第二结合分子的化合价、多价抗体和第二结合分子的表位特异性、因第二结合分子所致的目标抗原内化或排出、或此类方面的组合。因此,第二结合分子减少多价抗体与TA1或TA2的结合,或引起多价抗体与缺乏或具有减少TA2表达的TA1细胞或缺乏或具有减少TA1表达的TA2细胞的结合减少。

[0131] 多价抗体的TA1和TA2结合域的亲合力可基于TA1和TA2在肿瘤细胞及非肿瘤细胞上的表达水平选择。例如,若TA2在肿瘤细胞上的表达水平高于TA1在肿瘤细胞上的表达水平,则多价抗体的TA2结合域的亲合力可为低或低-中等亲合力,诸如双数位或三位数nM,且

多价抗体的TA1结合域的亲和力可为中等或中等-高亲和力,诸如单数位或双数位nM。同样,若TA1在肿瘤细胞上的表达水平高于TA2在肿瘤细胞上的表达水平,则多价抗体的TA1结合域的亲和力可为低或低-中等亲和力,诸如双数位或三位数nM,且多价抗体的TA2结合域的亲和力可为中等或中等-高亲和力,诸如单数位或双数位nM。若TA2在肿瘤细胞上的表达水平与TA1在肿瘤细胞上的表达水平相当,则多价抗体的TA2结合域的亲和力及TA1结合域的亲和力优选在相同范围内,诸如在高、中等-高、中等、低-中等或低亲和力范围内。若TA2在肿瘤细胞上的表达水平低于TA1在肿瘤细胞上的表达水平,则多价抗体的TA2结合域的亲和力可为中等-高或高亲和力,且多价抗体的TA1结合域的亲和力可为低、低-中等或中等亲和力。同样,若TA1在肿瘤细胞上的表达水平低于TA2在肿瘤细胞上的表达水平。则多价抗体的TA1结合域的亲和力可为中等-高或高亲和力,且多价抗体的TA2结合域的亲和力可为低、低-中等或中等亲和力。

[0132] 第二结合分子优选为全长抗体、Fab、经修饰Fab或scFv。第二结合分子优选不包含TA2结合可变域。其优选不包含结合免疫细胞衔接抗原(IEA)的结合域。多价抗体的TA1或TA2结合可变域可与第二结合分子的TA1或TA2结合可变域相同。第二结合分子包含至少一个TA1或TA2结合可变域,但也可包含多个TA1或TA2结合可变域。第二结合分子优选包含两个TA1或TA2结合可变域。第二结合分子的TA1或TA2结合可变域宜相同,但并非必须相同。第二结合分子优选为包含两个相同TA1或TA2结合可变域的二价单特异性抗体。在某些实施方式中,如在同一分析中所量测,第二结合分子的亲和力低于多价抗体的亲和力。合适分析的实例为FACS结合分析。

[0133] 第二结合分子可为诸如阿特珠单抗(atenzolizumab)或德瓦鲁单抗(durvalumab)的市售抗体或其类似物或变体。另一可使用的抗PD-L1抗体为包含具有SEQ ID NO:47的重链的抗PD-L1抗体或其功能等效物。另外实例包括但不限于MSB-0010718C,参见WO 2013/079174;STI-1014,参见WO2013/181634;CX-072,参见WO2016/149201;KN035,参见Zhang等人,Cell Discov.7:3(2017年3月);LY3300054,参见例如WO 2017/034916;和CK-301,参见Gorelik等人,AACR:Abstract 4606(2016年4月);以及12A4(也称为MDX-1105),参见例如WO 2013/173223。

[0134] 在一个实施方式中,第二结合分子包含两个具有SEQ ID NO:46、47或51的重链。

[0135] 多价抗体应与第二结合分子竞争结合至TA1或TA2。多价抗体应能够胜过第二结合分子结合至表达TA1和TA2两者的细胞,且第二结合分子能够胜过多价分子结合第二结合分子所靶向的仅表达抗原(TA1或TA2)中的一个的细胞。

[0136] 获得正确靶向—例如,第二结合分子以较大比率结合表达单一抗原的细胞且多价抗体以较大比率结合双抗原细胞可通过本文所示的本发明来达成。

[0137] 此可通过调节多价抗体的TA1或TA2结合域和/或第二结合分子的TA1或TA2结合域的亲和力来达成。多价抗体的TA1或TA2结合域和/或第二结合分子的TA1或TA2结合域的亲和力调节可基于TA1和TA2在肿瘤细胞及非肿瘤细胞上的表达水平。优选地,结合TA1或TA2的第二结合分子的kd与多价抗体的TA1或TA2结合域的kd相比相当、相等或较低。kd系由kon率及koff率确定。可优选地,结合TA1或TA2的第二结合分子的kon率与多价抗体的TA1或TA2结合域的kon率相比相当、相等或较高。也可优选地,结合TA1的第二结合分子的koff率与多价抗体的TA1或TA2结合域的koff率相比相当、相等或较低。也可优选地,结合TA1或TA2的第

二结合分子的 k_{on} 率与多价抗体的TA1或TA2结合域的 k_{on} 率相比相当、相等或较高,且结合TA1的第二结合分子的 k_{off} 率与多价抗体的TA1或TA2结合域的 k_{off} 率相比相当、相等或较低。此种情况允许第二结合分子比多价抗体更强地结合至TA1或TA2和/或占据更多TA1或TA2,从而防止多价抗体结合至TA1或TA2。当细胞表达TA1和TA2两者时,多价抗体将结合不由第二结合分子结合的肿瘤相关抗原(TA1或TA2)且由于较大亲合力胜过第二结合分子结合至第二结合分子所结合的肿瘤相关抗原。

[0138] 此可通过以使得不由第二结合分子结合的肿瘤相关抗原过量存在于第二结合分子所靶向的肿瘤相关抗原上的方式选择TA1和TA2、和/或通过选择对不由第二结合分子靶向的肿瘤相关抗原具有高亲和力的多价抗体的结合臂、或两者的组合得到增强。本文例示但不限于其等的此类作用模式减少多价抗体与仅表达TA1或TA2的非肿瘤细胞的结合,或执行达到低于表达TA1和TA2两者的目标肿瘤细胞的程度。

[0139] 除驱动表达双抗原的细胞的多价靶向选择性的亲和力及亲合力之外,也可采用其他机械手段。可优选地,第二结合分子引起经靶向抗原(TA1或TA2)的内化或排出。具有在结合时进行内化或排出能力的肿瘤相关抗原数组为本领域中已知的。第二结合分子的此特点移除用于单一表达细胞的多价分子的抗原目标,而对于双重表达细胞,多价将对接于不由结合分子靶向的第二抗原上,且随后锁定至随时间推移再现的由第二结合分子靶向的抗原上。

[0140] 类似地,多价分子可经设计以具有靶向域,该靶向域在结合时更改抗原,使得第二结合分子不能靶向抗原。在任何情况下,一个分子(多价分子或第二结合分子)的靶向应破坏第二分子靶向已由第一分子结合的同一天原的潜能。

[0141] 在一个方面,第二结合分子的TA1或TA2结合可变域的亲和力与多价抗体的TA1或TA2结合可变域的亲和力相当。此种情况允许多价抗体胜过第二结合分子或在表达TA1和TA2两者的细胞上与TA1或TA2具有增强结合。为了增强仅表达TA1和TA2中的一个的细胞上第二结合分子与TA1或TA2的结合,可提高第二结合分子的化合价和/或亲和力。

[0142] 在一个方面,第二结合分子的TA1或TA2结合可变域的亲和力与多价抗体的TA1或TA2结合可变域的亲和力相等。此种情况允许多价抗体胜过第二结合分子或在表达TA1和TA2两者的细胞上与TA1或TA2具有增强结合。为了增强仅表达TA1和TA2中的一个的细胞上第二结合分子与TA1或TA2的结合,可提高第二结合分子的化合价和/或亲和力。

[0143] 在一个方面,第二结合分子的TA1或TA2结合可变域的亲和力高于多价抗体的TA1或TA2结合可变域的亲和力。此种情况允许第二结合分子胜过多价抗体结合至TA1或TA2。为了增强表达TA1和TA2两者的细胞上多价抗体与TA1的结合并因此胜过第二结合分子结合至TA1,可提高多价抗体的TA2结合可变域的亲和力。

[0144] 如本文所述的可变域的 k_d 或 k_{on} 或 k_{off} 优选在biacore中且优选在双特异性单价形式中,也即使用具有一个 k_d 或 k_{on} 或 k_{off} 待测定的可变域及一个结合无关目标的可变域的双特异性抗体量测。在本申请中,此无关目标适于为优选具有相同共同轻链及具有SEQ ID NO:68的VH链的破伤风类毒素结合域。

[0145] 结合TA1的多价抗体的额外可变域优选作为scFv域、Fab域或经修饰Fab域的一部分存在。优选地,额外可变与CH1区在其C端处缔合且其优选通过接头连接至结合免疫细胞衔接抗原(IEA)的可变域的N端。优选地,额外结合域为包含重链可变区(VH)及轻链可变区

(VL)的Fab域,该Fab域的该重链可变区包含CH1区(VH-CH1)且该Fab的该轻链可变区包含CL区(VL-CL)。额外结合域也可为由VH-CH1及VL组成的经修饰Fab域。可替代地,额外结合域为由VL-CL及VH组成的经修饰Fab域。在此类经修饰Fab域中,存在恒定区CH1或CL,该恒定区不与其同源区配对,和/或存在可变区VH或VL,该可变区不与其同源区配对。

[0146] 结合免疫细胞衔接抗原(IEA)的多价抗体的可变域和/或结合TA2的多价抗体的可变域也优选与CH1区缔合。优选地,结合免疫细胞衔接抗原(IEA)的结合域和/或结合TA2的结合域为包含重链可变区(VH)及轻链可变区(VL)的Fab域,该Fab域的该重链可变区包含CH1区(VH-CH1)且该Fab的该轻链可变区包含CL区(VL-CL)。结合免疫细胞衔接抗原(IEA)的结合域和/或结合TA2的结合域也可为由VH-CH1及VL组成的经修饰Fab域。可替代地,额外结合域为由VL-CL及VH组成的经修饰Fab域。在此类经修饰Fab域中,存在恒定区CH1或CL,该恒定区不与其同源区配对,和/或存在可变区VH或VL,该可变区不与其同源区配对。

[0147] 接头可用于连接额外结合域与基础抗体。接头可为本领域中已知的任何合适接头,且优选包含例如一个或多个铰链区和/或一个或多个来源于铰链区的区的肽区。接头及其所连接的恒定区(例如CH1)的组合可决定多价抗体的特性。接头可允许校正抗体的功能性和/或一个或多个额外结合域向基础抗体的定向。结合域中的CH1区的组合可改善抗体的功能性和/或结合域向基础抗体的定向。基于给出亚型的铰链的接头序列优选与额外结合域中相同亚型的恒定区组合。

[0148] 优选地,接头为天然存在的序列或基于天然存在的序列。更具体地,该接头优选为铰链序列或包含基于铰链序列的序列。更具体地,该接头可包含基于IgG1铰链区、IgG2铰链区、IgG3铰链区或IgG4铰链区的铰链区。接头优选为具有7-30个氨基酸残基的肽。接头优选包含如本文所述的抗体的铰链序列。

[0149] 可替代地,该接头包含具有7-30个氨基酸残基的肽,该肽包含以下序列中的一个或多个:

- [0150] 1:ESKYGPP (SEQ ID NO:69);
- [0151] 2:EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:70);
- [0152] 3:GGGSGGGGS (SEQ ID NO:71);
- [0153] 4:ERKSSVESPPSP (SEQ ID NO:72);
- [0154] 5:ERKCSVESPPSP (SEQ ID NO:73);
- [0155] 6:ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO:74);
- [0156] 7:ESKYGPPSPSSP (SEQ ID NO:75);
- [0157] 8:ERKSSVEAPPVAG (SEQ ID NO:76);
- [0158] 9:ERKCSVEAPPVAG (SEQ ID NO:77);
- [0159] 10:ESKYGPPAPEFLGG (SEQ ID NO:78);
- [0160] 11:EPKSCDKTHTSPPSP (SEQ ID NO:79);
- [0161] 12:EPKSCDGGGSGGGGS (SEQ ID NO:80);
- [0162] 13:GGGSGGGGSAPPVAG (SEQ ID NO:81);
- [0163] 14:EPKSCDKTHTAPELLGG (SEQ ID NO:82);
- [0164] 15:ERKSSVESPPSPAPPVAG (SEQ ID NO:83);
- [0165] 16:ERKCSVESPPSPAPPVAG (SEQ ID NO:84);

- [0166] 17:ELKTPLGDTTHTAPEFLGG (SEQ ID NO:85);
- [0167] 18:ESKYGPPSPSSPAPEFLGG (SEQ ID NO:86);
- [0168] 19:EPKSCDKTHTSPSPAPPELLGG (SEQ ID NO:87);
- [0169] 20:ERKSSVEEAAAKEAAAKAPPVAG (SEQ ID NO:88);
- [0170] 21:ERKCSVEEAAAKEAAAKAPPVAG (SEQ ID NO:89);
- [0171] 22:ESKYGPPEAAAKEAAAKAPEFLGG (SEQ ID NO:90);
- [0172] 23:EPKSCDKTHTTEAAAKEAAAKAPPELLGG (SEQ ID NO:91);
- [0173] 24:ELKTPLGDTTHTTEAAAKEAAAKAPEFLGG (SEQ ID NO:92);
- [0174] 或与其任一个具有至少约85%序列一致性的序列。
- [0175] 连接基础抗体与一个或多个额外结合域的接头优选为包含肽序列1至24中的任一者的氨基酸序列的肽或包含与肽序列1至24具有至少约85%序列一致性的氨基酸序列的多肽。
- [0176] 多价抗体的结合域可具有任何合适轻链。其可各自具有不同轻链,或两个或更多个结合域可具有相同或类似轻链。该轻链在本文中称为共同轻链,该共同轻链为包含共同轻链可变区的轻链。该共同轻链中的轻链恒定区(CL)不必相同或类似。优选地,多价抗体的全部结合域都包含共同轻链。第二结合分子也可包含共同轻链。通常,此共同轻链为与多价抗体中所使用的共同轻链相同的共同轻链。
- [0177] 具有共同轻链或轻链可变区促进多价抗体的产生,这是因为其限制可在免疫球蛋白链缔合时形成的不同分子的数目。产生细胞现仅需要产生两个重链及一个轻链或一个轻链可变区。在该轻链系在包括编码具有三个或更多个重链可变区的两个重链的DNA的宿主细胞内表达的情况下,该轻链能够与各可用重链可变区或CH1-VH1区配对,从而形成至少三个功能抗原结合域。
- [0178] 共同轻链或共同轻链可变区能够与诸如具有VH1、VH2和/或VH3的重链的不同重链或重链可变区配对。该共同轻链或共同轻链可变区的实例描述于WO2004/009618及WO2009/157771中。共同轻链或共同轻链可变区优选具有生殖系序列。优选生殖系序列为常用于人组库中的轻链可变区且具有良好热力学稳定性、产量及溶解度。优选生殖系轻链包含IgV κ 1-39可变区V区段。共同轻链优选包含经重排生殖系人 κ 轻链可变区IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01(图3B)。其可包含0-5个氨基酸插入、删除、取代、添加或其组合。共同轻链优选进一步包含轻链恒定区。此轻链恒定区可为 κ 或 λ 轻链恒定区,优选 κ 轻链恒定区(图3C)。
- [0179] 优选地,本发明的多价抗体包含 κ 轻链可变区IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01或IgV κ 1-39*01/IGJ κ 5*01。优选地,多价抗体中的共同轻链可变区为IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01(SEQ ID NO:93)。
- [0180] 优选地,本发明的第二结合分子也包含 κ 轻链可变区IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01或IgV κ 1-39*01/IGJ κ 5*01。优选地,第二结合分子中的共同轻链可变区为IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01(SEQ ID NO:93)。
- [0181] 包括例如IgV κ 3-20/IgJ κ 1、IgV κ 3-15/IgJ κ 1及IgV λ 3-21/IgJ λ 3的其他共同轻链可变区为本领域中已知的且可用。
- [0182] IgV κ 1-39为免疫球蛋白可变 κ 1-39基因的简写。该基因也称为免疫球蛋白 κ 可变1-39;IGKV139;IGKV1-39。基因外部Id为HGNC:5740;Entrez基因:28930;Ensembl:

ENSG00000242371。IgV κ 1-39的优选氨基酸序列作为SEQ ID NO:107给出。此序列为V区的序列。V区可与五个J区中的一个组合。两个优选接合序列指示为IGKV1-39/jk1及IGKV1-39/jk5;替代名称为IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01或IgV κ 1-39*01/IGJ κ 5*01(根据imgt.org处的IMGT数据库全球网命名)。此类名称为示例性的且涵盖基因区段的等位基因变体。

[0183] IgV κ 3-20为免疫球蛋白可变 κ 3-20基因的简写。该基因也称为免疫球蛋白 κ 可变3-20;IGKV320;IGKV3-20。基因外部Id为HGNC:5817;Entrez基因:28912;Ensembl:ENSG00000239951。IgV κ 3-20的优选氨基酸序列如SEQ ID NO:108。此序列为V区的序列。V区可与五个J区中的一个组合。优选接合序列指示为IGKV3-20/jk1;替代名称为IgV κ 3-20*01/IGJ κ 1*01(根据imgt.org处的IMGT数据库全球网命名)。此名称为示例性的且涵盖基因区段的等位基因变体。

[0184] IgV κ 3-15为免疫球蛋白可变 κ 3-15基因的简写。该基因也称为免疫球蛋白 κ 可变3-15;IGKV315;IGKV3-15。基因外部Id为HGNC:5816;Entrez基因:28913;Ensembl:ENSG00000244437。IgV κ 3-15的优选氨基酸序列作为SEQ ID NO:109给出。此序列为V区的序列。V区可与五个J区中的一个组合。优选接合序列指示为IGKV3-15/jk1;替代名称为IgV κ 3-15*01/IGJ κ 1*01(根据imgt.org处的IMGT数据库全球网命名)。此名称为示例性的且涵盖基因区段的等位基因变体。

[0185] IgV λ 3-21为免疫球蛋白可变 λ 3-21基因的简写。该基因也称为免疫球蛋白 λ 可变3-21;IGLV320;IGLV3-21。基因外部Id为HGNC:5905;Entrez基因:28796;Ensembl:ENSG00000211662.2。IgV λ 3-21的优选氨基酸序列作为SEQ ID NO:110给出。此序列为V区的序列。V区可与五个J区中的一个组合。优选接合序列指示为IGAV3-21/jk3;替代名称为IgV λ 3-21/IGJ κ 3(根据imgt.org处的IMGT数据库全球网命名)。此名称为示例性的且涵盖基因区段的等位基因变体。

[0186] 多价抗体优选为包含恒定区的全长抗体。优选地,多价抗体为包含经重链异二聚化优化的恒定区的全长抗体。用于优化重链异二聚化的技术为本领域中已知的且包括但不限于杵-臼突变的使用及DEKK突变的使用(WO2013/157954及De Nardis等人,J.Biol.Chem.(2017) 292 (35) 14706-14717,其等以引用方式并入本文中)。

[0187] 多价抗体可为诱导效应功能的抗体。多价抗体也可可为不诱导效应功能或诱导减弱的效应功能的抗体。多价抗体优选不可经由Fc受体诱导效应功能。第二结合分子优选不诱导效应功能或诱导减弱的效应功能。

[0188] 本领域中已知的一种类型的效应功能常称为抗体依赖性细胞毒性(ADCC),且也称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性。ADCC为细胞介导的免疫防御机制,由此免疫系统的效应细胞主动溶解膜表面抗原已由特异性抗体结合的目标细胞。ADCC效应功能通常由Fc受体(FcR)介导。受体为使抗体介导的(体液)免疫反应与细胞效应功能相联的关键免疫调节受体。已识别用于全部类别的免疫球蛋白的受体,包括Fc γ R(IgG)、Fc ϵ RI(IgE)、Fc α RI(IgA)、Fc μ R(IgM)及Fc δ R(IgD)。在白血球上发现三类用于人IgG的受体:CD64(Fc γ RI)、CD32(Fc γ R IIa、Fc γ R IIb及Fc γ R IIc)和CD16(Fc γ R IIIa及Fc γ R IIIb)。Fc γ RI分类为高亲和力受体(纳摩尔浓度范围KD),而Fc γ R II及Fc γ R III为低至中度亲和力(微莫耳浓度范围KD)。在抗体依赖性细胞毒性(ADCC)中,效应细胞(天然杀伤细胞、巨噬细胞、单核球及嗜酸性球)的表面上的Fc γ R结合至自身与目标细胞结合的IgG的Fc区。在结合时,触发信号传导路径,这引

起诸如溶解酶、穿孔蛋白、颗粒酶及肿瘤坏死因子的各种物质的分泌,此类物质介导目标细胞破坏。人IgG亚型的ADCC效应功能水平变化。尽管此水平依赖于同种型及特定Fc γ R而定,但简言之,人IgG1及IgG3的ADCC效应功能高,且IgG2及IgG4的ADCC效应功能低。了解抗体上的Fc γ R的结合位点已产生不具有ADCC效应功能的经工程改造的抗体。

[0189] 另一类型的效应功能不依赖效应细胞且常称为补体依赖性细胞毒性(CDC)。此效应功能为IgG及IgM抗体的效应功能。其为可使治疗性抗体或抗体片段达成抗肿瘤效应的另一作用机制。当作为经典补体路径的引发组分的C1q固定至目标结合抗体的Fc部分时,CDC经引发。此为可最终引起抗体标记细胞溶解的复合物补体活化级联的第一步。

[0190] 第二结合分子优选为包含经工程改造以降低抗体的ADCC和/或CDC活性的恒定区的单特异性抗体。用于降低抗体的ADCC和/或CDC活性的技术为本领域中已知的且可适用于本发明中。在第二结合分子为IgG1抗体的情况下,优选地,其包含经修饰CH2区,修饰优选使得抗体的ADCC和/或CDC活性减弱或丧失。CH2/低级铰链区中的一些抗体经修饰以例如减弱Fc受体相互作用或减少C1q结合。本发明的第二结合分子可为具有突变CH2和/或低级铰链域以使得第二结合分子与Fc受体,优选Fc- γ 受体的相互作用减弱的IgG抗体。

[0191] 多价抗体可具有经工程改造以降低抗体的ADCC和/或CDC活性的恒定区。在多价抗体为IgG1抗体的情况下,优选地,其包含经修饰CH2区,修饰优选使得抗体的ADCC和/或CDC活性减弱或丧失。CH2/低级铰链区中的一些抗体经修饰以例如减弱Fc受体相互作用或减少C1q结合。本发明的多价抗体可为具有突变CH2和/或低级铰链域以使得多价抗体与Fc受体,优选Fc- γ 受体的相互作用减弱的IgG抗体。展现减弱的效应功能的多价抗体将经由其与免疫细胞衔接抗原的结合保持能够结合效应细胞且当经由TA1和/或TA2结合可变域结合时在诸如癌细胞的异常细胞附近活化此类效应细胞。

[0192] 因此,本发明提供如本文所定义的包含多价抗体和第二结合分子的组合物。组合物优选为包含多价抗体和第二结合分子的治疗性组合物或包含多价抗体、第二结合分子及药物学上可接受的载体和/或稀释剂的药物组合物。待施用至患者的本发明组合物中的多价抗体和第二结合分子的量通常处于治疗窗中,此意指使用足够数量以获得治疗作用,同时该量不超过导致不可接受程度的副作用的阈值。

[0193] 也提供如本文所定义的本发明的包含多价抗体和第二结合分子的部件的试剂盒。部件的试剂盒可包含本发明的多价抗体和第二结合分子作为单一组合物或作为独立组分,也即一种包含多价抗体的组合物及另一种包含第二结合分子的组合物。在某些实施方式中,试剂盒包含用于向有需要的受试者同时或连续施用多价抗体和第二结合分子的说明书。在某些实施方式中,试剂盒包含用于在施用多价抗体之前施用第二结合分子的说明书。

[0194] 如本文所述的多价抗体和第二结合分子的组合、组合物或部件的试剂盒可用于减少或降低多价抗体与非肿瘤细胞的结合和/或用于减少或降低多价抗体诱导的非肿瘤细胞的细胞杀伤。

[0195] 特别地,在本发明的上下文中,诸如表达TA1而非TA2的细胞及表达TA2而非TA1的细胞的非肿瘤细胞仅表达与多价抗体结合的肿瘤相关抗原中的一者。表达TA1而非TA2的非肿瘤细胞及表达TA2而非TA1的非肿瘤细胞可同时存在。减少的结合及减少的细胞杀伤是指当与在不存在第二结合分子的情况下多价抗体的结合或细胞杀伤活性相比较时经降低的结合及细胞杀伤活性。

[0196] 在某些实施方式中,本发明涉及用于减少或降低如本文所述的多价抗体与非肿瘤细胞的结合和/或用于减少或降低如本文所述的多价抗体诱导的非肿瘤细胞的细胞杀伤的方法,该方法包含使用结合至TA1或TA2的如本文所述的第二结合分子以及多价抗体。

[0197] 在某些实施方式中,本发明涉及用于减少或降低如本文所述的多价抗体与非肿瘤细胞的结合和/或用于减少或降低如本文所述的多价抗体诱导的非肿瘤细胞的细胞杀伤的如本文所述的第二结合分子的用途。

[0198] 在某些实施方式中,本发明涉及用于减少或降低多价抗体与非肿瘤细胞的结合和/或用于减少或降低多价抗体诱导的非肿瘤细胞的细胞杀伤的如本文所述的多价抗体和第二结合分子的组合的用途。

[0199] 在某些实施方式中,本发明涉及用于减少或降低多价抗体与非肿瘤细胞的结合和/或用于减少或降低多价抗体诱导的非肿瘤细胞的细胞杀伤的如本文所述的包含多价抗体和第二结合分子的组合物的用途。在某些实施方式中,组合物为如本文所述的治疗性组合物。在某些实施方式中,组合物为如本文所述的药物组合物。

[0200] 在某些实施方式中,本发明涉及用于减少或降低多价抗体与非肿瘤细胞的结合和/或用于减少或降低多价抗体诱导的非肿瘤细胞的细胞杀伤的如本文所述的多价抗体和第二结合分子的组合。

[0201] 在某些实施方式中,本发明涉及用于减少或降低多价抗体与非肿瘤细胞的结合和/或用于减少或降低多价抗体诱导的非肿瘤细胞的细胞杀伤的如本文所述的第二结合分子。在某些实施方式中,多价抗体为如本文所述的多价抗体。

[0202] 在某些实施方式中,本发明涉及用于减少或降低多价抗体与非肿瘤细胞的结合和/或用于减少或降低多价抗体诱导的非肿瘤细胞的细胞杀伤的如本文所述的包含多价抗体和第二结合分子的组合物。在某些实施方式中,组合物为如本文所述的治疗性组合物。在某些实施方式中,组合物为如本文所述的药物组合物。

[0203] 除其临床用途之外,如本文所述的包含多价抗体和第二结合分子的组合物、如本文所述的多价抗体和第二结合分子的组合、如本文所述的方法及如本文所述的用途也可用于研究且研发治疗性抗体及包含此类抗体的组合物。此用途包括但不限于包括临床前表征中的活体外分析及活体内实验的活体外分析、活体内实验中的用途。

[0204] 如本文所述的多价抗体和第二结合分子的组合、组合物或部件的试剂盒可用于用以治疗患有医学适应症,特别是癌症的人或动物的方法中,该方法包括向有需要的人或动物施用治疗有效量的如本文所定义的本发明的多价抗体和第二结合分子的组合。

[0205] 提供治疗癌症的方法,其中该方法包括:

[0206] -向有需要的受试者施用如本文所述的多价抗体且另外向受试者施用如本文所述的第二结合分子;

[0207] -向有需要的受试者施用如本文所述的组合物;

[0208] -向有需要的受试者施用如本文所述的治疗性组合物;或

[0209] -向有需要的受试者施用如本文所述的药物组合物。

[0210] 进一步提供用于治疗癌症的如本文所定义的包含多价抗体和第二结合分子的组合物或如本文所定义的包含多价抗体和第二结合分子的部件的试剂盒。

[0211] 在某些实施方式中,本发明涉及如本文所述的多价抗体和第二结合分子的组合用

于治疗癌症的用途。

[0212] 在某些实施方式中,本发明涉及如本文所述的包含多价抗体和第二结合分子的组合物用于治疗癌症的用途。在某些实施方式中,组合物为如本文所述的治疗性组合物。在某些实施方式中,组合物为如本文所述的药物组合物。

[0213] 在某些实施方式中,本发明涉及用于治疗癌症的如本文所述的多价抗体和第二结合分子的组合。

[0214] 在某些实施方式中,本发明涉及用于治疗癌症的如本文所述的包含多价抗体和第二结合分子的组合物。在某些实施方式中,组合物为如本文所述的治疗性组合物。在某些实施方式中,组合物为如本文所述的药物组合物。

[0215] 进一步提供如本文所定义的本发明的多价抗体和第二结合分子的组合、如本文所定义的本发明的包含多价抗体和第二结合分子的组合物或如本文所定义的包含多价抗体和第二结合分子的部件的试剂盒用于制造用以治疗患有癌症的受试者的药物的用途。在某些实施方式中,组合物为如本文所述的治疗性组合物。在某些实施方式中,组合物为如本文所述的药物组合物。

[0216] 进一步提供治疗癌症的方法,该方法包含向有需要的受试者施用如本文所定义的本发明的多价抗体且另外向受试者施用如本文所定义的本发明的第二结合分子。

[0217] 本发明的多价抗体和第二结合分子可作为一种组合物或作为独立组分同时施用。本发明的多价抗体和第二结合分子也可依次施用,其中首先施用第二结合分子,接着为多价抗体,或反之亦然。优选地,第二结合分子在多价抗体之前施用。

[0218] 癌症可为任何实体癌或血液癌。实体癌的实例包括上皮起源的实体癌;诸如卵巢癌及子宫内膜癌的妇科癌症;乳癌;前列腺癌;及脑癌。

[0219] 血液癌可为优选骨髓起源的白血病或白血病前期疾病,但也可B细胞淋巴瘤。可根据本发明治疗的疾病包括诸如急性骨髓性白血病(AML)、骨髓发育不良症候群(MDS)及慢性骨髓性白血病(CML)的骨髓性白血病或白血病前期疾病;及霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's Lymphoma)及大部分非霍奇金氏淋巴瘤。此外,B-ALL、T-ALL、套细胞淋巴瘤也为用本发明的组合物或部件的试剂盒进行的治疗的优选目标。

[0220] 因此,本发明提供在骨髓发育不良症候群(MDS)、慢性骨髓性白血病(CML)、多发性骨髓瘤(MM)或优选急性骨髓性白血病(AML)治疗中用作药物的所附权利要求的组合物或部件的试剂盒。也提供权利要求的组合物或部件的试剂盒用于制备用以治疗或预防MDS、CML、MM或优选AML的药物的用途。优选地,肿瘤抗原为CLEC12A。

[0221] 本发明进一步提供包含编码如本文所述的多价抗体的重链和轻链的核酸的表达载体以及包含编码如本文所述的第二结合分子的重链和轻链的核酸的表达载体。也设想用于多价抗体和第二结合分子两者的单一表达载体的用途。

[0222] 因此,本发明还涉及包含编码如本文所定义的多价抗体的第一、第二及第三可变域的重链可变区的核酸的表达载体,其中载体进一步包含编码如本文所定义的第二结合分子的重链可变区的核酸。编码第二结合分子的重链可变区的核酸为与编码多价抗体的第一、第二及第三可变域的重链可变区的核酸不同的核酸。例如,示例性多价抗体包含有包含结合至免疫细胞衔接抗原(IEA)的结合域及结合至TA1的结合域的多肽及包含结合至TA2的结合域的多肽。因此,编码第二结合分子的重链可变区的核酸不编码对TA2具有特异性的重

链可变区,但编码对TA1具有特异性的重链可变区。

[0223] 因此,在其中在多价抗体中结合免疫细胞衔接抗原(IEA)的第三可变域及结合第二肿瘤抗原(TA2)的第二可变域与Fc区缔合且结合第一肿瘤抗原(TA1)的第一可变域连接至结合免疫细胞衔接抗原(IEA)的第三可变域的实施方式中,编码第二结合分子的重链可变区的核酸编码对TA1具有特异性的重链可变区。在其中在多价抗体中其中结合免疫细胞衔接抗原(IEA)的第三可变域及结合第一肿瘤抗原(TA1)的第一可变域与Fc区缔合且结合第二肿瘤抗原(TA2)的第二可变域连接至结合免疫细胞衔接抗原(IEA)的第三可变域的实施方式中,编码第二结合分子的重链可变区的核酸编码对TA2具有特异性的重链可变区。

[0224] 编码如本文所定义的多价抗体的第一、第二及第三可变域的重链可变区的核酸及编码如本文所定义的第二结合分子的重链可变区的核酸可进一步编码优选包含CH1、CH2和CH3的重链恒定区。

[0225] 表达载体可进一步包含编码如本文所定义的多价抗体的第一、第二及第三可变域的轻链可变区的核酸及编码如本文所定义的第二结合分子的轻链可变区的核酸。此类核酸可进一步编码轻链恒定区(CL)。

[0226] 本发明进一步涉及包含编码如本文所定义的多价抗体的第一、第二及第三可变域的重链可变区的核酸的宿主细胞,其中宿主细胞进一步包含编码如本文所定义的第二结合分子的重链可变区的核酸。如上文针对表达载体所解释,编码第二结合分子的重链可变区的核酸为与编码多价抗体的第一、第二及第三可变域的重链可变区的核酸不同的核酸。

[0227] 编码如本文所定义的多价抗体的第一、第二及第三可变域的重链可变区的核酸及编码如本文所定义的第二结合分子的重链可变区的核酸可进一步编码优选包含CH1、CH2和CH3的重链恒定区。

[0228] 宿主细胞可进一步包含编码如本文所定义的多价抗体的第一、第二及第三可变域的轻链可变区的核酸及编码如本文所定义的第二结合分子的轻链可变区的核酸。此类核酸可进一步编码轻链恒定区(CL)。

[0229] 宿主细胞允许由单个细胞表达多价抗体和第二结合分子两者。

[0230] 合适载体的实例包括能够在例如哺乳动物细胞的原核或真核宿主细胞中复制的质体、噬质体、黏质体、病毒及噬菌体核酸或其他核酸分子。载体可为其中编码重链和轻链的核酸可操作地连接至表达控制组件的表达载体。典型表达载体含有可用于调节多核苷酸表达的转录及转译终止子、起始序列及启动子。

[0231] 优选地,编码多价抗体的重链的核酸包含一个或多个促进重链异二聚化的修饰。此类修饰为本领域中已知的且包括但不限于如本文所提供的修饰的实例。编码第二结合分子的一个或多个重链的核酸优选不具有促进异二聚化的修饰。替代地,其可包含一个或多个促进同二聚化的修饰。

[0232] 本领域中存在用以产生抗体及其他类型的结合分子的各种方法。抗体及结合分子通常由表达编码抗体或结合分子的核酸的细胞产生。因此,本发明也提供产生和/或包含本发明的抗体和/或第二结合分子的经分离细胞或于组织培养物中的细胞。通常,此细胞为活体外、经分离或重组细胞。该细胞包含编码本发明的抗体和/或第二结合分子的核酸。细胞优选为动物细胞,更优选哺乳动物细胞,更优选灵长类动物细胞,最优选人细胞。出于本发明的目的,合适细胞为能够包含且优选能够产生本发明的抗体和/或包含本发明的核酸的

任何细胞。优选地,细胞为融合瘤细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NS0细胞或PER.C6细胞。特别优选地,细胞为CHO细胞。

[0233] 进一步提供包含本发明的细胞的细胞培养物或细胞株。经研发以用于蛋白质及抗体的工业规模生产的细胞株在本文中进一步称为工业细胞株。

[0234] 本发明进一步提供用于产生本发明的多价抗体和/或第二结合分子的方法,该方法包含培养本发明的细胞且自该培养物收取多价抗体和/或第二结合分子。该细胞可在无血清培养基中培养。优选地,该细胞适于悬浮生长。多价抗体和/或第二结合分子可自培养基纯化。优选地,该多价抗体和/或第二结合分子经亲和力纯化。

[0235] 本发明进一步提供包含如本文所述的多价抗体和第二结合分子及药物学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂的药物组合物。

[0236] 当本发明的多价抗体和/或第二结合分子经配制以用作用于点滴的注射或输注溶液时,注射或输注溶液可呈水溶液、悬浮液或乳液的任何形式,或可与药物学上可接受的载体一起配制为固体药物以使得该药物将在使用时溶解、悬浮或乳化于溶剂中。在用于点滴的注射或输注溶液中使用的溶剂的实例包括注射用蒸馏水、生理盐水、葡萄糖溶液和等张溶液(例如于其中氯化钠、氯化钾、甘油、甘露醇、山梨醇、硼酸、硼砂、丙二醇或其类似物可溶)。

[0237] 药物学上可接受的载体的实例包括稳定剂、增溶剂、悬浮剂、乳化剂、缓解剂、缓冲剂、防腐剂、消毒剂、pH调节剂和抗氧化剂。可使用各种氨基酸、白蛋白、球蛋白、明胶、甘露醇、葡萄糖、聚葡萄糖、乙二醇、丙二醇、聚乙二醇、抗坏血酸、亚硫酸氢钠、硫代硫酸钠、依地酸钠、柠檬酸钠、二丁基羟基甲苯或其类似物作为稳定剂。可使用醇(例如乙醇)、多元醇(例如丙二醇及聚乙二醇)、非离子表面活性剂(例如聚山梨醇酯20(注册商标)、聚山梨醇酯80(注册商标)及HCO-50)或其类似物作为增溶剂。可使用单硬脂酸甘油酯、单硬脂酸铝、甲基纤维素、羧甲基纤维素、羟甲基纤维素、月桂基硫酸钠或其类似物作为悬浮剂。可使用阿拉伯胶、海藻酸钠、黄蓍或其类似物作为乳化剂。可使用苯甲醇、氯丁醇、山梨醇或其类似物作为缓解剂。可使用磷酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、Tris缓冲液、赖氨酸缓冲液、 ϵ -氨基己酸缓冲液或其类似物作为缓冲剂。可使用对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯、氯丁醇、苯甲醇、氯化苄烷铵、去水醋酸钠、乙二胺四乙酸钠、硼酸、硼砂或其类似物作为防腐剂。可使用氯化苄烷铵、对羟基苯甲酸、氯丁醇或其类似物作为消毒剂。可使用盐酸、氢氧化钠、磷酸、乙酸或其类似物作为pH调节剂。可使用(1)诸如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠及亚硫酸钠的水性抗氧化剂、(2)诸如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基苯甲醚、丁基化羟基甲苯、卵磷脂、五倍子酸丙酯及 α -生育酚的油溶性抗氧化剂或(3)诸如柠檬酸、乙二胺四乙酸、山梨醇、酒石酸及磷酸的金属螯合剂作为抗氧化剂。

[0238] 用于点滴的注射或输注溶液可通过执行最终过程中的灭菌或无菌操纵,例如通过用过滤器过滤进行的灭菌,且随后填充无菌容器来产生。用于点滴的注射或输注溶液可通过在使用时将经真空干燥或冻干的无菌粉末(其可包括药物学上可接受的载体粉末)溶解于适当溶剂中来使用。

[0239] 本发明进一步提供治疗受试者的癌症的方法,该方法包含向有需要的受试者施用有效量的如本文所述的多价抗体和第二结合分子或药物组合物。因此,本发明提供用于治

疗受试者的癌症的如本文所述的多价抗体和第二结合分子的组合。本发明进一步提供用于预防癌症、抑制癌症症状发展或复发和/或治疗癌症的药物剂,其中药物剂包含作为活性成分的如本文所述的多价抗体和第二结合分子。

[0240] 本文引用专利文献或作为背景给出的其他主题不视为承认该文件或主题为人所知或其所含信息为权利要求中的任一者的优先权日的公共常识的一部分。

[0241] 本文所示的各参考文献的公开内容以全文引用方式并入本文中。

[0242] 出于清楚且简洁描述的目的,特点在本文中描述为相同或独立实施方式的一部分,然而,应了解,本发明的范围可包括具有所描述特点中的全部或一些的组合的实施方式。

[0243] 实施例

[0244] 实施例1

[0245] 细胞和细胞株

[0246] HCT116 (ECACC 91091005) 为人结肠癌细胞株。BxPC3 (BxPC-3 ATCC[®] CRL-1687) 为人胰腺癌细胞。BxPC3细胞表达相对高含量的EGFR及PD-L1,而HCT116表达较低含量的EGFR及PD-L1。

[0247] 抗体

[0248] 本文所制备的多价抗体为具有两个具备如图1中所描绘的一般结构的重链的三特异性抗体。

[0249] 产生包含不同VH1及VH2区及相同VH3区的不同三特异性抗体。单个VH3区选自对EGFR具有特异性的Fab (SEQ ID NO:56);两个VH2区选自对CD3具有特异性的Fab (SEQ ID No:8及22),且两个VH1区选自对PD-L1具有特异性的Fab (SEQ ID No:38及42)。两个经选择PD-L1 Fab具有高于用于单特异性PD-L1抗体(包含SEQ ID NO:47)中的一个的PD-L1 Fab且低于用于包含具有SEQ ID NO:46的重链的单特异性PD-L1抗体的PD-L1 Fab的相对亲和力。

[0250] 重链具有如W02013/157954及W02013/157953中所描述的异二聚化域。具有VH3的重链具备具有DE残基351D及368E的CH3域。根据EU编号,具有VH2和VH1的重链在CH3区中具备具有KK残基(351K、366K)的互补CH3域。可经由使用不同技术或在VH3侧上具有KK残基且在VH2和VH1侧上具有DE残基来应用异二聚化CH3区的替代性包括。在细胞中产生两个重链引起具有两个重链的IgG重链异二聚体的生成(W02013/157954和W02013/157953)。

[0251] KK重链具有以下N端至C端结构VH1-CH1-接头-VH2-CH1-铰链-CH2-CH3。用于在细胞中表达重链和轻链的表达载体基于MV3032制成(图10)。此处所用的轻链为包含IGKV1-39/jk1可变区(图3中所示的序列)的共同轻链。

[0252] DE重链具有以下N端至C端结构VH3-CH1-铰链-CH2-CH3。用于在细胞中表达重链和轻链的表达载体基于MV1625制成(图11)。由此载体编码的轻链为包含IGKV1-39/jk1可变区(图3中所示的序列)的共同轻链。

[0253] 产生三种二价单特异性PD-L1抗体:1)包含两个具有如SEQ ID NO:46中所示的氨基酸的重链和包含如SEQ ID NO:105中所示的氨基酸序列的轻链的抗体;2)包含两个具有如SEQ ID NO:47中所示的氨基酸的重链和包含如SEQ ID NO:98中所示的氨基酸序列的轻链的抗体;及3)包含两个具有如SEQ ID NO:51中所示的氨基酸的重链和包含如SEQ ID NO:106中所示的氨基酸序列的轻链的抗体。

[0254] 抗体产生

[0255] Hek293细胞用于表达包含具有SEQ ID NO:47的重链和具有SEQ ID NO:98的轻链的三特异性抗体及单特异性PD-L1抗体。在转染前两天,使Hek293细胞存放在293培养基中以1:1比率裂解且在37℃及8%CO₂下以155rpm回转振荡速度孵育隔夜。在转染前一天将细胞稀释至5×10⁵个细胞/毫升的密度。将悬浮细胞接种至盘中,用可透气密封件覆盖且在37℃及8%CO₂下以285rpm回转振荡速度孵育隔夜。在转染日,使293-F培养基与线性聚乙烯亚胺(PEI)(MW 25000)混合。对于待产生的各IgG,将293F培养基-PEI混合物添加至分别表达载体DNA(用于编码各重链的IgG异二聚体DNA)中。将混合物在室温下孵育20分钟,之后轻轻地添加至细胞中。在转染后之日,将稀释于293-F培养基中的青霉素-链霉素(Pen Strep)添加至各培养物中。在转染后七天,将培养物在37℃及8%CO₂下以285rpm回转振荡速度孵育直至收取为止。将培养物以500g离心5min,将含有IgG的上清液使用10-12μm熔喷聚丙烯过滤盘过滤且储存于-20℃下,之后进行纯化。

[0256] 将上清液与1M Trizma pH 8及Protein A Sepharose CL-4B珠粒(50%v/v,G.E Healthcare Life Sciences)混合且在25℃下以600rpm回转振荡孵育2h。将珠粒真空过滤且用PBS pH 7.4洗涤2次。抗体洗脱通过添加0.1M柠檬酸盐缓冲液pH 3,接着用1M Trizma pH 8中和来执行。将经纯化IgG级份立即缓冲交换至PBS pH 7.4中。将IgG样品转移至30kDa过滤器聚醚砜膜中且以1500g在4℃下离心,将PBS添加至保留物中,将样品以500rpm混合3min,之后在4℃下收集IgG进行储存。IgG浓度通过Octet及Protein A生物传感器(Pall ForteBio)来测定。在七次2倍稀释中使用人IgG作为标准品。IgG样品浓度经二次重复测定。

[0257] 在CHO细胞中产生包含两个具有如SEQ ID NO:46中所示的氨基酸的重链和包含如SEQ ID NO:105中所示的氨基酸序列的轻链的单特异性PD-L1抗体及包含两个具有如SEQ ID NO:51中所示的氨基酸的重链和包含如SEQ ID NO:106中所示的氨基酸序列的轻链的单特异性PD-L1抗体。

[0258] 细胞毒性分析

[0259] 使用BxPC3及HCT116细胞株以量测T细胞介导的细胞杀伤活性。

[0260] 根据标准技术使用Ficoll及EasySep人T细胞分离试剂盒自来自健康供体的全血分离休眠T细胞,使用流动式细胞量测分析通过抗CD3抗体检查>95%T细胞纯度且随后冷冻保存。将经冷冻保存的T细胞解冻,且若在解冻时,通过标准锥虫蓝染色所测定,其活力为>90%,则使用它。

[0261] 简而言之,细胞毒性分析,将经解冻休眠T细胞及BxPC3或HCT116目标细胞以5:1的E:T比共培养48小时。目标细胞溶解通过利用量测由CellTiter-Glo(Promega)评估的ATP含量量测活细胞分数来测定。通过于Envision微量盘式读取器上的发光量测的ATP含量产生相对光单位(RLU)值,此类RLU值使用GraphPad Prism来分析。

[0262] 各样品的目标细胞溶解如下计算:

[0263] 杀伤% = (100 - (样品RLU/无IgG RLU) × 100)。

[0264] 在第一实验中,使用BxPC3细胞毒性分析以展现单特异性抗PD-L1抗体添加对三特异性抗体诱导目标细胞杀伤的能力的影响。对于三特异性抗体及对照,使用以20.5nM浓度开始的20倍4步稀释系列。

[0265] 将人T细胞与BxPC3目标细胞一起共培养且与两种不同PD-L1 = CD3 × EGFR三特异

性抗体一起孵育。第一种三特异性抗体包含有包含具有SEQ ID NO:38的重链可变区的PD-L1结合域;包含具有SEQ ID NO:8的重链可变区的CD3结合域;及包含具有SEQ ID NO:56的重链可变区的EGFR结合域。第二种三特异性抗体包含有包含具有SEQ ID NO:42的重链可变区的PD-L1结合域;包含具有SEQ ID NO:22的重链可变区的CD3结合域;及包含具有SEQ ID NO:56的重链可变区的EGFR结合域。细胞杀伤百分比相对于阴性对照破伤风毒素(TT)=CD3×TT三特异性抗体而言突出,TT结合臂包含具有SEQ ID NO 68的重链可变区且CD3结合域包含具有SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:22的重链可变区。将第一及第二种三特异性抗体的细胞杀伤活性与三特异性PD-L1=CD3×mock抗体的细胞杀伤活性进行比较,其中mock臂对TT具有特异性。

[0266] 图6显示在不存在单特异性PD-L1抗体的情况下第一种三特异性抗体及三特异性PD-L1=CD3×mock抗体两者均以类似水平诱导T细胞介导的细胞杀伤(图6A;右栏)。上述情况也适用于第二种三特异性抗体(图6B;右栏)。因此,在不存在单特异性PD-L1抗体的情况下包含PD-L1结合域及EGFR结合域之三特异性抗体及包含PD-L1结合域、但缺乏EGFR结合域之三特异性抗体两者均诱导T细胞介导的细胞杀伤。此种情况表明,抗体的T细胞介导的细胞杀伤活性独立于与EGFR的结合存在,此意指表达PD-L1、但不表达EGFR或表达低含量EGFR的细胞(其应包括非肿瘤细胞)将经此类抗体杀伤,此类抗体包括包含PD-L1及EGFR结合域之三特异性抗体。

[0267] 增加单特异性PD-L1抗体的量影响三特异性PD-L1=CD3×mock抗体而非包含PD-L1及EGFR结合域之三特异性抗体的活性。在存在单特异性PD-L1抗体的情况下包含PD-L1结合域及EGFR结合域之三特异性抗体仍诱导T细胞介导的细胞杀伤,但包含PD-L1结合域、但缺乏EGFR结合域之三特异性抗体不诱导或不太有效地诱导T细胞介导的细胞杀伤。此种情况表明,在存在单特异性PD-L1抗体的情况下抗体的细胞杀伤活性依赖于EGFR的结合而定。此意指当存在单特异性PD-L1抗体时,表达PD-L1、但不表达EGFR或表达低量EGFR的细胞(例如非肿瘤细胞)将不经包含PD-L1及EGFR结合域之三特异性抗体杀伤或经其不太有效地杀伤。

[0268] 结果显示,在此分析中,当EGFR不由三特异性抗体结合或由三特异性抗体结合达到较低程度时,二价单特异性PD-L1抗体能够防止由三特异性抗体进行的T细胞介导的目标细胞杀伤。换言之,二价单特异性PD-L1抗体能够降低表达PD-L1、但不表达EGFR或仅表达低量EGFR的细胞的T细胞介导的细胞杀伤。通过组合三特异性抗体与二价单特异性抗体使三特异性抗体更高特异性靶向期望的TA1、TA2阳性目标细胞。

[0269] 在第二实验中,使用细胞毒性分析以测定单特异性抗体对三特异性抗体诱导T细胞介导的HCT116细胞及BxPC3细胞杀伤的能力的影响。对于三特异性抗体及对照,使用以20.5nM浓度开始的8倍8步稀释。

[0270] 在存在三种不同PD-L1=CD3×EGFR三特异性抗体的情况下将人T细胞与BxPC3或HCT116目标细胞一起共培养。第一种三特异性抗体包含有包含具有SEQ ID NO:38的重链可变区的PD-L1结合域;包含具有SEQ ID NO:8的重链可变区的CD3结合域;及包含具有SEQ ID NO:56的重链可变区的EGFR结合域。第二种三特异性抗体包含有包含具有SEQ ID NO:38的重链可变区的PD-L1结合域;包含具有SEQ ID NO:22的重链可变区的CD3结合域;及包含具有SEQ ID NO:56的重链可变区的EGFR结合域。第三种三特异性抗体包含有包含具有SEQ ID

NO:42的重链可变区的PD-L1结合域;包含具有SEQ ID NO:22的重链可变区的CD3结合域;及包含具有SEQ ID NO:56的重链可变区的EGFR结合域。除PD-L1=CD3×TT阴性对照之外,也包括TT=CD3×EGFR对照。细胞杀伤百分比再次相对于阴性对照TT=CD3×TT三特异性抗体而言突出,TT结合臂包含SEQ ID NO:68且CD3结合域包含SEQ ID NO:8或22。

[0271] 图7显示在不存在单特异性PD-L1抗体的情况下三特异性PD-L1=CD3×mock抗体诱导T细胞介导的细胞杀伤。此T细胞介导的目标细胞杀伤仅归因于可在表达PD-L1、但不表达EGFR或表达低量EGFR的正常非肿瘤细胞上以及在表达PD-L1及EGFR两者的肿瘤细胞上的抗体与PD-L1的结合。在存在单特异性PD-L1抗体的情况下此T细胞介导的目标细胞杀伤很大程度上经降低或减少。认为此种情况归因于较少PD-L1可用于三特异性PD-L1=CD3×mock抗体,因为该抗体必须与单特异性PD-L1抗体竞争。

[0272] 在不存在单特异性PD-L1抗体的情况下PD-L1=CD3×EGFR三特异性抗体也诱导T细胞介导的细胞杀伤。在存在单特异性PD-L1抗体的情况下,与三特异性PDL1=CD3×mock抗体相比,此T细胞介导的细胞杀伤不经降低或经较低程度地降低。此外,在此处,较少PD-L1将可用于三特异性PD-L1=CD3×EGFR抗体的结合,这是归因于单特异性PD-L1抗体。然而,因为PD-L1=CD3×EGFR三特异性抗体也结合EGFR,故PD-L1=CD3×EGFR三特异性抗体可展现其对表达EGFR及PD-L1两者的细胞、而非或较低程度地对不表达EGFR或仅表达低量EGFR的细胞的细胞杀伤影响。

[0273] 将三特异性抗体与包含具有如SEQ ID NO:46中所示的序列的重链的二价单特异性抗PD-L1抗体的组合仅与三特异性抗体的用途进行比较。以固定1:10的三特异性抗体与单特异性抗体比添加二价单特异性抗PD-L1抗体以使得单特异性抗体相对于三特异性抗体而言始终大大过剩存在。缺乏功能PD-L1可变域的TT=CD3×EGFR对照抗体诱导T细胞介导的目标细胞杀伤达到一定程度,但与具有功能PD-L1可变域三特异性抗体相比有效程度低得多(参见图7;PD-L1=CD3×EGFR;或PD-L1=CD3×TT)。在存在二价单特异性PD-L1抗体的情况下PD-L1=CD3×EGFR抗体仍诱导T细胞介导的目标细胞杀伤,即使其不结合至或较低程度地结合至EGFR阴性PD-L1阳性细胞。此种情况与在存在二价单特异性抗体的情况下的损失大部分其T细胞介导的目标细胞杀伤活性的PD-L1=CD3×mock抗体相反。其损失活性的事实显示,二价单特异性PD-L1抗体对三特异性PD-L1=CD3×EGFR抗体作用增添大量特异性。单特异性PD-L1抗体改进三特异性抗体的治疗窗。

[0274] 在平均HCT116细胞上具有含量低于BxPC3细胞的EGFR及PD-L1。此种情况不改变单特异性PD-L1抗体对三特异性抗体的更高特异性细胞靶向的影响,即使在存在单特异性PD-L1抗体的情况下三特异性抗体的T细胞介导的细胞杀伤活性的量在某种程度上较低(图7下图)。

[0275] 在第三实验中,使用BxPC3细胞毒性分析以测定不同比率的三特异性抗体与单特异性抗体对其杀伤BxPC3细胞的能力的影响。对于三特异性抗体及对照,使用以20.5nM浓度开始的3倍8步稀释。

[0276] 在存在两种不同PD-L1=CD3×EGFR三特异性抗体的情况下将人T细胞与BxPC3目标细胞一起共培养。第一种三特异性抗体包含有包含具有SEQ ID NO:38的重链可变区的PD-L1结合域;包含具有SEQ ID NO:8的重链可变区的CD3结合域;及包含具有SEQ ID NO:56的重链可变区的EGFR结合域。第二种三特异性抗体包含有包含具有SEQ ID NO:42的重链可

变区的PD-L1结合域;包含具有SEQ ID NO:22的重链可变区的CD3结合域;及包含具有SEQ ID NO:56的重链可变区的EGFR结合域。测试两种不同二价单特异性PD-L1抗体:一种抗体包含具有如SEQ ID NO:46中所示的氨基酸序列的重链(图8A)且一种抗体包含具有如SEQ ID NO:51中所示的氨基酸序列的重链(图8B)。

[0277] 图8显示二价单特异性抗体的存在降低缺乏EGFR结合臂的三特异性抗体而非包含EGFR结合臂的三特异性抗体的T细胞介导的目标细胞杀伤。此种情况表明,在存在二价单特异性PD-L1抗体的情况下,与当三特异性抗体仅结合至PD-L1时相比,当三特异性抗体在表达PD-L1及EGFR两者的细胞上结合至PD-L1及EGFR时T细胞介导的细胞杀伤较高。自此可得出结论:单特异性PD-L1抗体确保T细胞介导的目标细胞杀伤主要或较高程度地由抗体与PD-L1及EGFR阳性细胞的结合诱导且不由抗体与PD-L1阳性及EGFR阴性细胞的结合诱导。所测试的两种不同二价单特异性抗体的结果类似。

[0278] 第四实验为重复第三实验,但随后包括包含有包含具有SEQ ID NO:38的重链可变区的PD-L1结合域、包含具有SEQ ID NO:22的重链可变区的CD3结合域及包含具有SEQ ID NO:56的重链可变区的EGFR结合域的另一三特异性抗体;且仅使用包含具有如SEQ ID NO:46中所示的氨基酸序列的重链的二价单特异性抗体。对于三特异性抗体及对照,使用以20.5nM浓度开始的8倍8步稀释。

[0279] 图9显示此三特异性抗体产生与其他两种三特异性抗体类似的结果。因此,可得出结论:具有不同PD-L1和/或CD3结合域的二价单特异性抗体达成相同结果。

[0280] 本发明的方面

[0281] 1.一种组合物,其包含多价抗体,所述多价抗体包含结合第一肿瘤抗原(TA1)的第一可变域、结合第二肿瘤抗原(TA2)的第二可变域和结合免疫细胞衔接抗原(IEA)的第三可变域;并且其中所述组合物进一步包含结合TA1或TA2的第二结合分子。

[0282] 2.如方面1的组合物,其中所述结合免疫细胞衔接抗原(IEA)的第三可变域和所述结合第二肿瘤抗原(TA2)的第二可变域与Fc区缔合,并且所述结合第一肿瘤抗原(TA1)的第一可变域连接至所述结合免疫细胞衔接抗原(IEA)的第三可变域。

[0283] 3.如方面1的组合物,其中所述结合免疫细胞衔接抗原(IEA)的第三可变域和所述结合第一肿瘤抗原(TA1)的第一可变域与Fc区缔合,且所述结合第二肿瘤抗原(TA2)的第二可变域连接至所述结合免疫细胞衔接抗原(IEA)的第三可变域。

[0284] 4.如方面1至3中任一项的组合物,其中所述第一、第二和/或第三可变域包含共同轻链可变区。

[0285] 5.如方面1至4中任一项的组合物,其中所述结合免疫细胞衔接抗原的可变域结合至CD3、TCR- α 链、TCR- β 链、CD2、CD4、CD5、CD7、CD8、CD137、CD28、CD16、CD16A、CD64、OX40、CD27、CD40、ICOS、GITR、NKG2D、Nkp46、Nkp44或Nkp30;优选结合至CD3、TCR- α 链、TCR- β 链、CD2或CD5;更优选结合至CD3。

[0286] 6.如方面1至5中任一项的组合物,其中所述结合第一肿瘤相关抗原(TA1)的可变域结合至PD-L1、PD-L2、HVEM、CD47、B7-H3、B7-H4、B7-H7或Siglec-15;优选PD-L1或PD-L2;更优选PD-L1。

[0287] 7.如方面1至6中任一项的组合物,其中所述结合第二肿瘤相关抗原(TA2)的可变域结合至CLEC12A或EGFR,优选EGFR。

- [0288] 8. 如方面1至7中任一项的组合物,其中所述第二结合分子结合至TA1。
- [0289] 9. 如方面1至8中任一项的组合物,其中所述第二结合分子为二价单特异性抗体。
- [0290] 10. 如方面9的组合物,其中所述第二结合分子具有减弱的效应功能。
- [0291] 11. 一种部件的试剂盒,其包含如方面1至10中任一项所定义的多价抗体和第二结合分子。
- [0292] 12. 一种药物组合物,其包含如方面1至10中任一项所定义的多价抗体和第二结合分子。
- [0293] 13. 一种如方面1至10中任一项所定义的多价抗体和第二结合分子的组合、如方面1至10中任一项所定义的组合物、如方面11所定义的部件的试剂盒或如方面12所定义的药物组合物,其用于治疗有需要的受试者,特别是患有癌症的受试者。
- [0294] 14. 一种治疗癌症的方法,其包括:
- [0295] -向有需要的受试者施用如方面1至10中任一项所定义的多价抗体且另外向所述受试者施用如方面1至10中任一项所定义的第二结合分子;或
- [0296] -向有需要的受试者施用如方面1至10中任一项所定义的组合物;或
- [0297] -向有需要的受试者施用如方面12所定义的药物组合物。
- [0298] 15. 一种包含如方面1至10中任一项所定义的多价抗体和第二结合分子的组合物或包含如方面1至10中任一项所定义的多价抗体和第二结合分子的部件的试剂盒的用途,其用于制备用于治疗患有癌症的个体的药物。
- [0299] 16. 如方面13所定义的用于治疗的组合、如方面14所定义的治疗方法或如方面15中定义的用途,其中所述多价抗体和第二结合分子作为单一组合物或作为两个独立组分同时施用。
- [0300] 17. 如方面13所定义的用于治疗的组合、如方面14所定义的治疗方法或如方面15中定义的用途,其中所述多价抗体在所述第二结合分子之前施用。
- [0301] 18. 如方面13所定义的用于治疗的组合、如方面14所定义的治疗方法或如方面15中定义的用途,其中所述第二结合分子在所述多价抗体之前施用。
- [0302] 19. 一种载体,其包含编码如方面1至10中任一项所定义的多价抗体的第一、第二及第三可变域的重链可变区的核酸,其中所述载体进一步包含不同的编码如方面1至10中任一项所定义的第二结合分子的重链可变区的核酸。
- [0303] 20. 一种宿主细胞,其包含编码如方面1至10中任一项所定义的多价抗体的第一、第二及第三可变域的重链可变区的核酸,其中所述宿主细胞进一步包含不同的编码如方面1至10中任一项所定义的第二结合分子的重链可变区的核酸。
- [0304] 序列
- [0305] SEQ ID NO:1:重链可变区
- [0306] EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFRSFGISWVRQAPGQGLEWMGGFIPVLGTANYAQKFQGRVT
IIADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGNWNPFDPPWGQGLVTVSS
- [0307] SEQ ID NO:2:根据Kabat的HCDR1
- [0308] SFGIS
- [0309] SEQ ID NO:3:根据Kabat的HCDR2
- [0310] GFIPVLGTANYAQKFQ

- [0311] SEQ ID NO:4:根据Kabat的HCDR3
[0312] RGNWNPFD
[0313] SEQ ID NO:5:重链可变区
[0314] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGDAFKSKTFTISWVRQAPGQGLEWLGIIPLFGTITYAQKFQGR
VTITADKSTNTAFMELSSLRSEDAMYYCTRRGNWNPFDPWGQGLVTVSS
[0315] SEQ ID NO:6:根据Kabat的HCDR1
[0316] SKTFTIS
[0317] SEQ ID NO:7:根据Kabat的HCDR2
[0318] GIIPFGTITYAQKFQ
[0319] SEQ ID NO:8:重链可变区
[0320] EVQLVQSGSELKPKGSSVKVSKASGVTFNSRTFTISWVRQAPGQGLEWLSIIPIFGTITYAQKFQGR
VTITADKSTSTAFMELTSLRSEDTAIYYCTRRGNWNPFDPWGQGLVTVSS
[0321] SEQ ID NO:9:根据Kabat的HCDR1
[0322] SRTFTIS
[0323] SEQ ID NO:10:根据Kabat的HCDR2
[0324] SIIPIFGTITYAQKFQ
[0325] SEQ ID NO:11:重链可变区
[0326] QVQLVQSGGGLVQPGSLRLSCATSGFKFSSYALSWVRQAPGKGLEWVSGISGSGRTTWYADSVKGRFT
ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSYGPYWFYDLWGRGTLVTVSS
[0327] SEQ ID NO:12:根据Kabat的HCDR1
[0328] SYALS
[0329] SEQ ID NO:13:根据Kabat的HCDR2
[0330] GISGSGRTTWYADSVK
[0331] SEQ ID NO:14:根据Kabat的HCDR3
[0332] DGGYSYGPYWFYDL
[0333] SEQ ID NO:15:重链可变区
[0334] EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTRFWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGSDTRYSPSFQGV
ISADKSTSTAYLQWSSLKASDTGMYCVRHIRYFDWSEYHYLDVWVGKGTTVTVSS
[0335] SEQ ID NO:16:根据Kabat的HCDR1
[0336] RFWIG
[0337] SEQ ID NO:17:根据Kabat的HCDR2
[0338] IIPGSDTRYSPSFQ
[0339] SEQ ID NO:18:根据Kabat的HCDR3
[0340] HIRYFDWSEYHYLDV
[0341] SEQ ID NO:19:重链可变区
[0342] EVQLVESGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTRYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGSDTRYSPSFQGV
ISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCVRNIRYFVWSEYHYMDVWVGKGTTVTVSS
[0343] SEQ ID NO:20:根据Kabat的HCDR1
[0344] RYWIG

- [0345] SEQ ID NO:21:根据Kabat的HCDR3
[0346] NIRYFVWSEYHYMDV
[0347] SEQ ID NO:22:重链可变区
[0348] EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCATSGFNFDYTMHWVRQAPGKGLEWVSDISWSSGSIGYADSVKGRFT
ISRDNKNSLWLMNSLRTEDTALYFCAKDHRYG DYEGGGFDYWGQGLVTVSS
[0349] SEQ ID NO:23:根据Kabat的HCDR1
[0350] DYTMH
[0351] SEQ ID NO:24:根据Kabat的HCDR2
[0352] DISWSSGSIGYADSVKG
[0353] SEQ ID NO:25:根据Kabat的HCDR3
[0354] DHRGYGDYEGGGFDY
[0355] SEQ ID NO:26:重链可变区
[0356] EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGIFSTYAI SWVRQAPGQGLEWMGGI IPIFDTPNYAQKFQGRVT
ITADKSTSTAYMDLSSLRSED TAVYYCAKNVRGYSAYDL DYWGQGLVTVSS
[0357] SEQ ID NO:27:根据Kabat的HCDR1
[0358] TYAIS
[0359] SEQ ID NO:28:根据Kabat的HCDR2
[0360] GIIPFDTPNYAQKFQG
[0361] SEQ ID NO:29:根据Kabat的HCDR3
[0362] NVRGYSAYDL DY
[0363] SEQ ID NO:30:重链可变区
[0364] QVQLVQSGSELKPKGASVKVSKASGYTFTSY SMNWVRQAPGQGLEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDHDFRTGRAFDI IWGQGT TVTVSS
[0365] SEQ ID NO:31:根据Kabat的HCDR1
[0366] SYSMN
[0367] SEQ ID NO:32:根据Kabat的HCDR2
[0368] WINTNTGNPTYAQGFTG
[0369] SEQ ID NO:33:根据Kabat的HCDR3
[0370] DHDFRTGRAFDI
[0371] SEQ ID NO:34:重链可变区
[0372] EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFT
ISRDNKSTLFLQMNSLRAEDTAVYFCVRGLPITMVRGAYSFDYWGQGLVTVSS
[0373] SEQ ID NO:35:根据Kabat的HCDR1
[0374] SYGMH
[0375] SEQ ID NO:36:根据Kabat的HCDR2
[0376] VISYDGSNKYYADSVKG
[0377] SEQ ID NO:37:根据Kabat的HCDR3
[0378] GLPITMVRGAYSFDY
[0379] SEQ ID NO:38:重链可变区

- [0380] EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGDTFNTYSITWVRQAPGQGLEWMGSIVPIFGTINNAQKFQGRVT
ITADKSANTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDNTMVRGVDYVYMDVWVGKGMTVTVSS
- [0381] SEQ ID NO:39:根据Kabat的HCDR1
- [0382] TYSIT
- [0383] SEQ ID NO:40:根据Kabat的HCDR2
- [0384] SIVPIFGTINNAQKFQG
- [0385] SEQ ID NO:41:根据Kabat的HCDR3
- [0386] DNTMVRGVDYVYMDV
- [0387] SEQ ID NO:42:重链可变区
- [0388] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGDTFRSYGITWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTTNYAQKFQGRVT
ITADKSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARRRGYSNPHWLDPWGQGLTVTVSS
- [0389] SEQ ID NO:43:根据Kabat的HCDR1
- [0390] SYGIT
- [0391] SEQ ID NO:44:根据Kabat的HCDR2
- [0392] GIIPFGTTNYAQKFQG
- [0393] SEQ ID NO:45:根据Kabat的HCDR3
- [0394] RRGYSNPHWLDP
- [0395] SEQ ID NO:46:重链序列
- [0396] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFT
ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDK
THTCPPCPAPELGRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
- [0397] VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGN
- [0398] SEQ ID NO:47:重链
- [0399] QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSKASGDTFNTYAINWVRQAPGQGLEWVGRIIPFGTANYAQKFQGRVT
ISADKSTTTAYMELSSLRSEDVAVFYCAKDETYSSSNFQHWGRGLTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKS
CDKTHCPPCPAPELGRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
- [0400] SEQ ID NO:48:根据Kabat的HCDR1
- [0401] TYAIN
- [0402] SEQ ID NO:49:根据Kabat的HCDR2
- [0403] RIIPFGTANYAQKFQG
- [0404] SEQ ID NO:50:根据Kabat的HCDR3
- [0405] DETGYSSSNFQH
- [0406] SEQ ID NO:51:重链序列

[0407] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFT
ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKS
CDKTHCTCPPAPEFEGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV

[0408] FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0409] SEQ ID NO:52:重链可变区

[0410] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNANTNYAQKLQGRVT
MTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAKDRHWHHWLDAFDYWGQGTLVTVSS

[0411] SEQ ID NO:53:根据Kabat的HCDR1

[0412] SYGIS

[0413] SEQ ID NO:54:根据Kabat的HCDR2

[0414] WISAYNANTNYAQKLQ

[0415] SEQ ID NO:55:根据Kabat的HCDR3

[0416] DRHWHHWLDAFDY

[0417] SEQ ID NO:56:重链可变区

[0418] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNANTNYAQKLQGRVT
MTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAKDLYGHWLDAFDYWGQGTLVTVSS

[0419] SEQ ID NO:57:根据Kabat的HCDR3

[0420] DLYGHWLDAFDY

[0421] SEQ ID NO:58:重链可变区

[0422] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNANTNYAQKLQGRVT
MTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAKGPESHWWLDAFDYWGQGTLVTVSS

[0423] SEQ ID NO:59:根据Kabat的HCDR3

[0424] GPGSHWWLDAFDY

[0425] SEQ ID NO:60:重链可变区

[0426] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNANTNYAQKLQGRVT
MTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAKDRGWHHWLDAFDYWGQGTLVTVSS

[0427] SEQ ID NO:61:根据Kabat的HCDR3

[0428] DRGWHHWLDAFDY

[0429] SEQ ID NO:62:重链可变区

[0430] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNANTNYAQKLQGRVT
MTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAKDRHWHHWLDGFDYWGQGTLVTVSS

[0431] SEQ ID NO:63:根据Kabat的HCDR3

[0432] DRHWHHWLDGFDY

[0433] SEQ ID NO:64:重链可变区

[0434] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVT
MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAKGTGDFDYWGQGTLVTVSS

- [0435] SEQ ID NO:65:根据Kabat的HCDR1
[0436] SYVMH
[0437] SEQ ID NO:66:根据Kabat的HCDR2
[0438] IINPSGGSTSYAQKFQG
[0439] SEQ ID NO:67:根据Kabat的HCDR3
[0440] GTTGDWFDY
[0441] SEQ ID NO:68:重链可变区
[0442] EVQLVETGAEVKKPGASVKVSKASDYIFTKYDINWVRQAPGQGLEWMGWMSANTGNTGYAQKFQGRVT
MTRDTSINTAYMELSSLTSGDTAVYFCARSSLFKTETAPYYHFALDVWGQGTITVTVSS
[0443] SEQ ID NO:69:接头1
[0444] ESKYGPP
[0445] SEQ ID NO:70:接头2
[0446] EPKSCDKTHT
[0447] SEQ ID NO:71:接头3
[0448] GGGSGGGGS
[0449] SEQ ID NO:72:接头4
[0450] ERKSSVESPPSP
[0451] SEQ ID NO:73:接头5
[0452] ERKCSVESPPSP
[0453] SEQ ID NO:74:接头6
[0454] ELKTPLGDTTHT
[0455] SEQ ID NO:75:接头7
[0456] ESKYGPPSPSSP
[0457] SEQ ID NO:76:接头8
[0458] ERKSSVEAPPVAG
[0459] SEQ ID NO:77:接头9
[0460] ERKCSVEAPPVAG
[0461] SEQ ID NO:78:接头10
[0462] ESKYGPPAPEFLGG
[0463] SEQ ID NO:79:接头11
[0464] EPKSCDKTHTSPPSP
[0465] SEQ ID NO:80:接头12
[0466] EPKSCDGGGSGGGGS
[0467] SEQ ID NO:81:接头13
[0468] GGGSGGGGSAPPVAG
[0469] SEQ ID NO:82:接头14
[0470] EPKSCDKHTAPELLGG
[0471] SEQ ID NO:83:接头15
[0472] ERKSSVESPPSPAPPVAG

- [0473] SEQ ID NO:84:接头16
[0474] ERKCSVESPPSPAPPVAG
[0475] SEQ ID NO:85:接头17
[0476] ELKTPLGDTTHTAPEFLGG
[0477] SEQ ID NO:86:接头18
[0478] ESKYGPPSPSSPAPEFLGG
[0479] SEQ ID NO:87:接头19
[0480] EPKSCDKTHTSPPSPAPPELLGG
[0481] SEQ ID NO:88:接头20
[0482] ERKSSVEEAAAKEAAAKAPPVAG
[0483] SEQ ID NO:89:接头21
[0484] ERKCSVEEAAAKEAAAKAPPVAG
[0485] SEQ ID NO:90:接头22
[0486] ESKYGPPEAAAKEAAAKAPEFLGG
[0487] SEQ ID NO:91:接头23
[0488] EPKSCDKTHTTEAAAKEAAAKAPELLGG
[0489] SEQ ID NO:92:接头24
[0490] ELKTPLGDTTHTTEAAAKEAAAKAPEFLGG
[0491] SEQ ID NO:93:轻链可变区
[0492] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK
[0493] SEQ ID NO:94:根据IMGT的LCDR1
[0494] QSISSY
[0495] SEQ ID NO:95:根据IMGT的LCDR2
[0496] AAS
[0497] SEQ ID NO:96:根据IMGT的LCDR3
[0498] QQSYSTPPT
[0499] SEQ ID NO:97:轻链恒定区
[0500] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
[0501] SEQ ID NO:98:轻链序列
[0502] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
[0503] SEQ ID NO:99:IGKV1-39/jk5轻链可变区
[0504] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQTRLEIK
[0505] SEQ ID NO:100:CH1序列
[0506] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV

TVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRV

[0507] SEQ ID NO:101:铰链

[0508] EPKSCDKTHTCPPCP

[0509] SEQ ID NO:102:CH2序列

[0510] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

[0511] SEQ ID NO:103:经修饰CH3序列

[0512] GQPREPQVYTKPPSREEMTKNQVSLKCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0513] SEQ ID NO:104:经修饰CH3序列

[0514] GQPREPQVYTDPPSREEMTKNQVSLTCEVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0515] SEQ ID NO:105:轻链序列

[0516] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0517] SEQ ID NO:106:轻链序列

[0518] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGT TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0519] SEQ ID NO:107:IgV_k1-39 V_H

[0520] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTP

[0521] SEQ ID NO:108:IgV_k 3-20V_H

[0522] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGT TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP

[0523] SEQ ID NO:109:IgV_k3-15 V_H

[0524] EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGT EFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNWP

[0525] SEQ ID NO:110:IgVL3-21 V_H

[0526] SYVLTQPPSVSVAPGETARITCGGDNIGRKSIVYVYQQKSGQAPVLVIYYDSRPSGIPERFSGSNSGNT ATLISRVEAGDEADYYCQVWDGSSDH

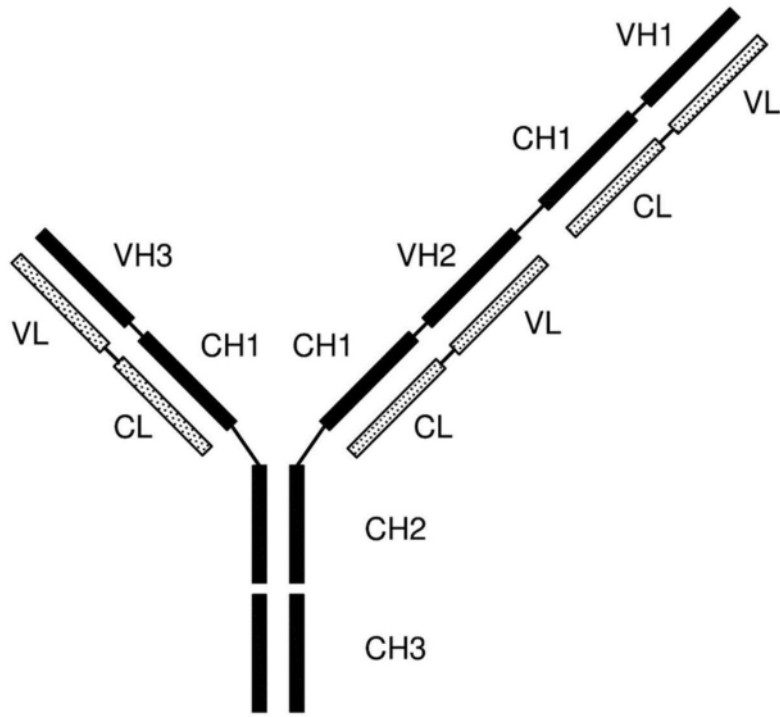


图1

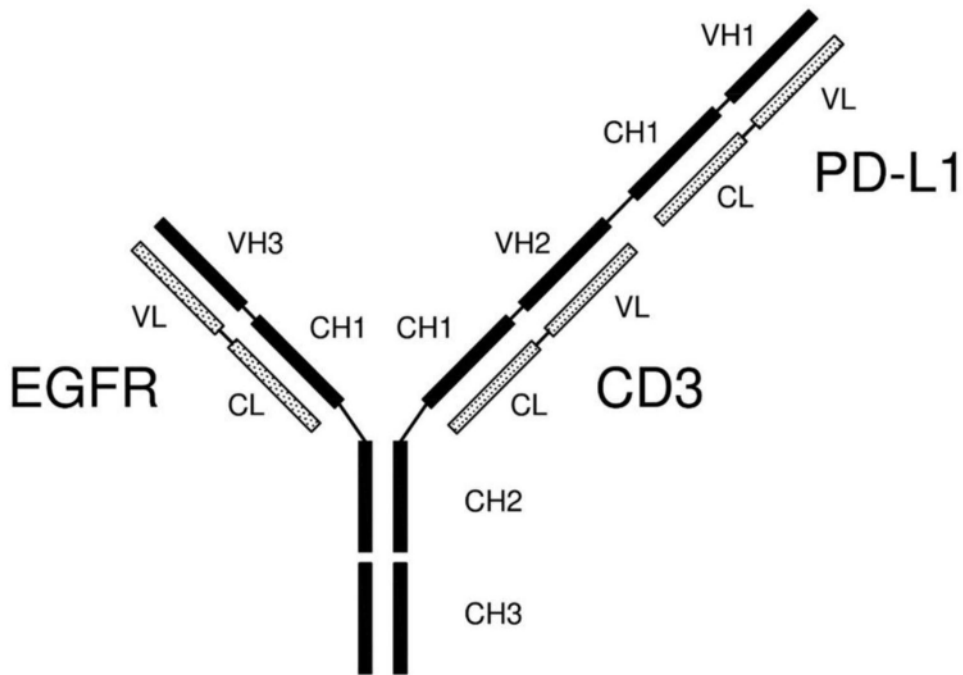


图2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 YLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图3A

gacatccagatgaccagtcctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcacc
 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
 atcacttgccgggcaagtcagagcattagcagctacttaaattggtatcagcagaaacca
 I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P
 gggaaagcccctaagctcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatca
 G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S
 aggttcagtgccagtgatctgggacagatttcactctcaccatcagcagtcctgcaacct
 R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
 gaagattttgcaacttactactgtcaacagagttacagtaccctccaacgttcggccaa
 E D F A T Y Y C Q Q S Y S T P P T F G Q
 gggaccaaggtggagatcaaa
 G T K V E I K

图3B

cgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatct
 R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S
 ggaactgcctctgttgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacag
 G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q
 tggaaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggac
 W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D
 agcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgag
 S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E
 aaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaag
 K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K
 agcttcaacaggggagagtgtag
 S F N R G E C -

图3C

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA
 SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK

图3D

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA
SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTP

图3E

CDR1 - QSISSY,
CDR2 - AAS,
CDR3 - QQSYSTPPT,
根据 IMGT.

CDR1 - RASQSISSYLN,
CDR2 - AASSLQS,
CDR3 - QQSYSTPPT,
根据 Kabat.

图3F

CH1:

gctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggg
A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G
ggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcg
G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
tggaaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctca
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
ggactctactccctcagcagcgtcgtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacc
G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
tacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagtt
Y I C N V N H K P S N T K V D K R V

图4A

铰链:

gagcccaaactcttgtagacaaaactcacacatgccaccgtgccca
E P K S C D K T H T C P P C P

图4B

CH2:

```

gcacctgaactcctggggggaccgtcagttcttcttcccccaaaacccaaggacacc
A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T
ctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctgggtggacgtgagccacgaagac
L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D
cctgagggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaag
P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K
ccgcgaggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtgggtcagcgtcctcaccgtcctgcac
P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H
caggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaagccctcccagcc
Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A
cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaa
P I E K T I S K A K

```

图4C

CH3: L351K 和 T366K

```

gggcagccccgagaaccacaggtgtacaccaagccccatcccgggaggagatgaccaag
G Q P R E P Q V Y T K P P S R E E M T K
aaccaggtcagcctgaagtgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgcacatcgccgtggag
N Q V S L K C L V K G F Y P S D I A V E
tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactcc
W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S
gacggctccttcttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg
D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G
aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc
N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S
ctctccctgtctccgggttga
L S L S P G -

```

图4D

CH3: L351D 和 L368E
gggcagccccgagaaccacaggtgtacaccgaccccccatcccgggaggagatgaccaag
G Q P R E P Q V Y T D P P S R E E M T K
aaccaggtcagcctgacctgcgagggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
N Q V S L T C E V K G F Y P S D I A V E
tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactcc
W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S
gacggctccttcttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg
D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G
aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc
N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S
ctctccctgtctccgggttga
L S L S P G -

图4E

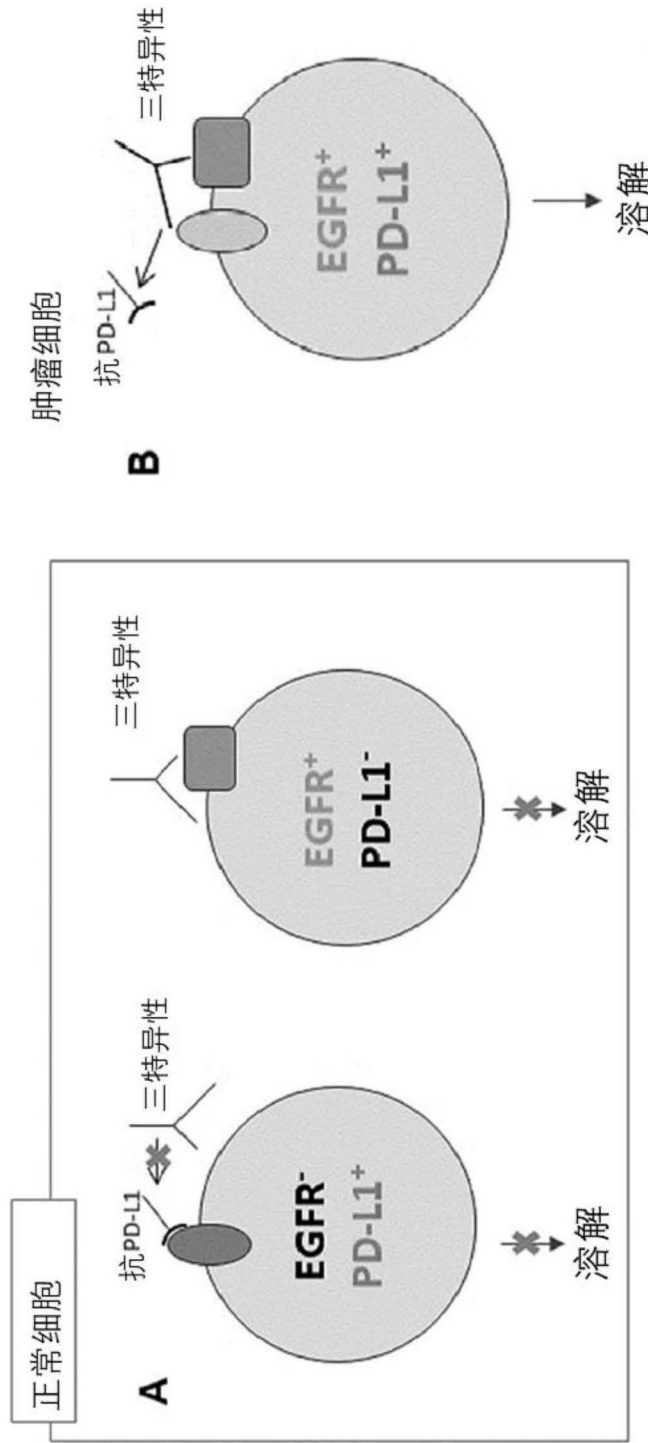


图5

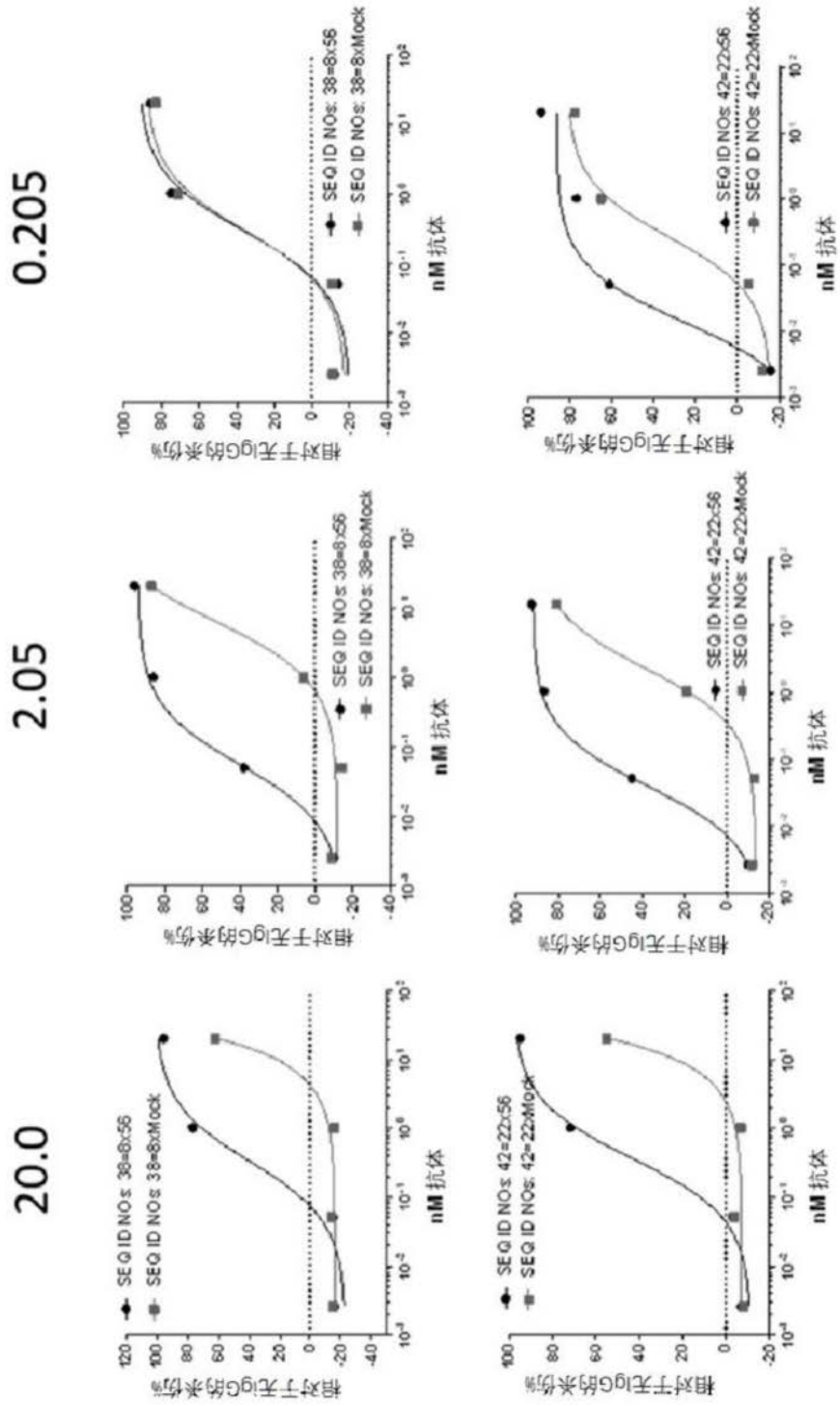


图6A

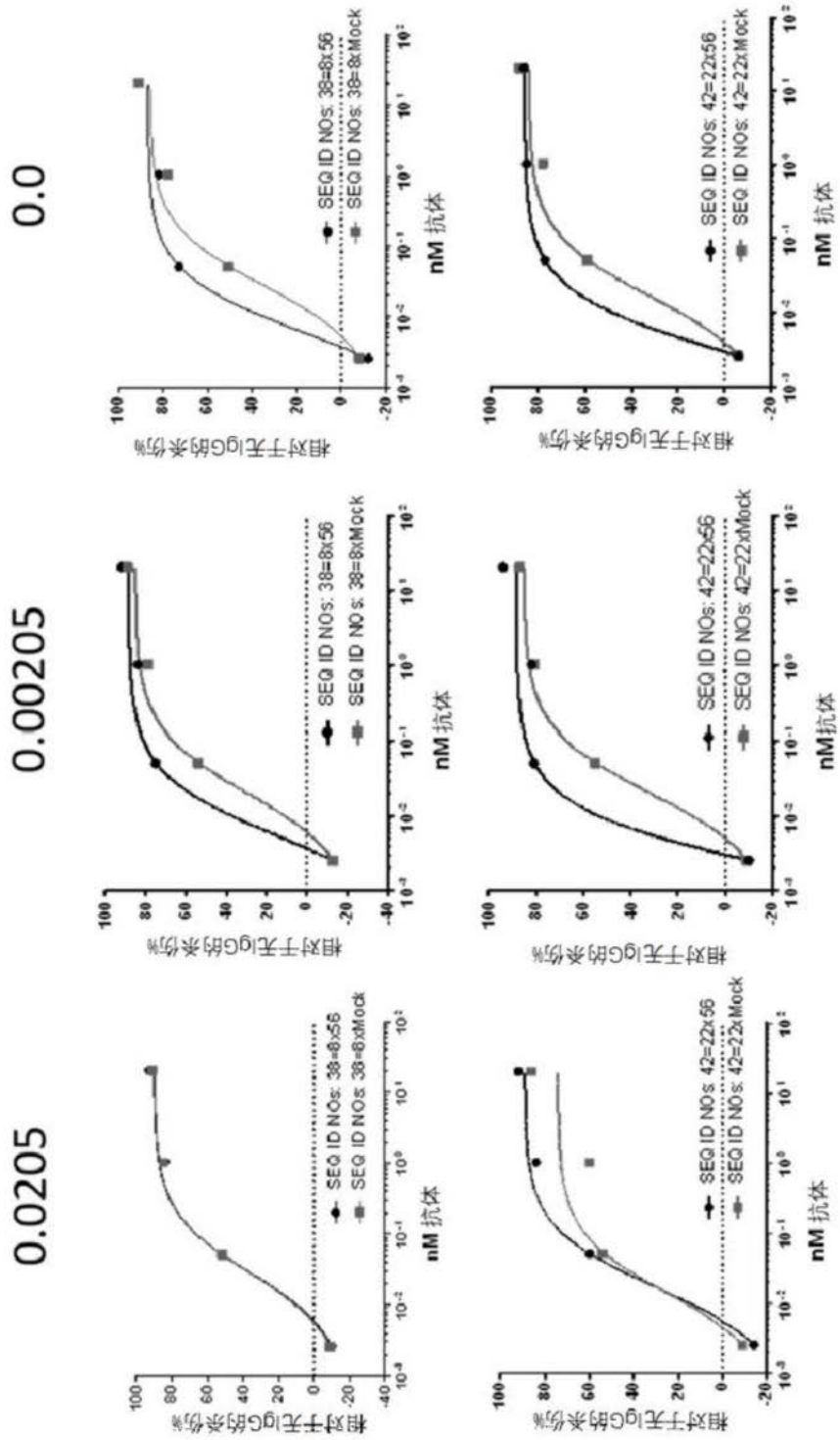


图6A(续)

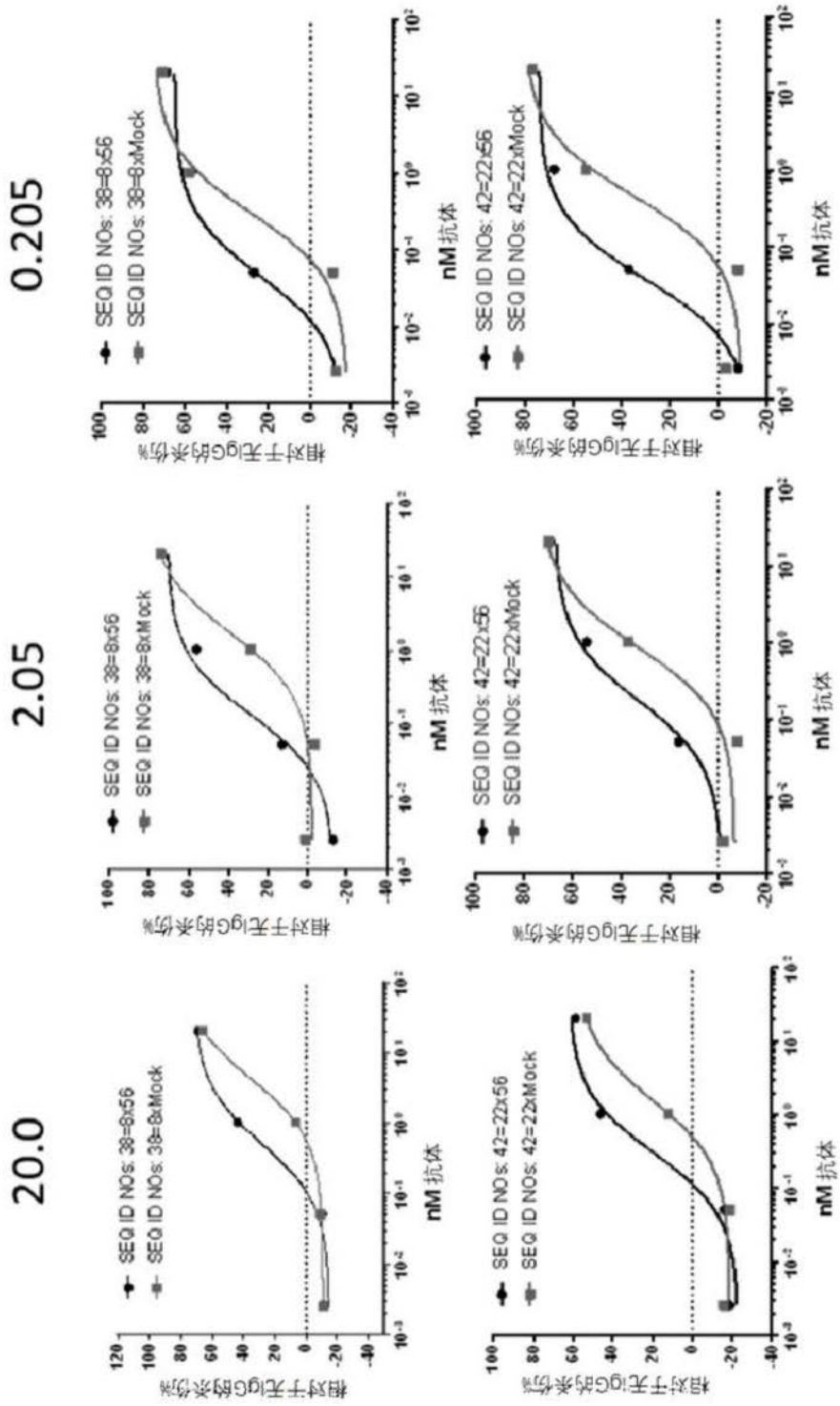


图6B

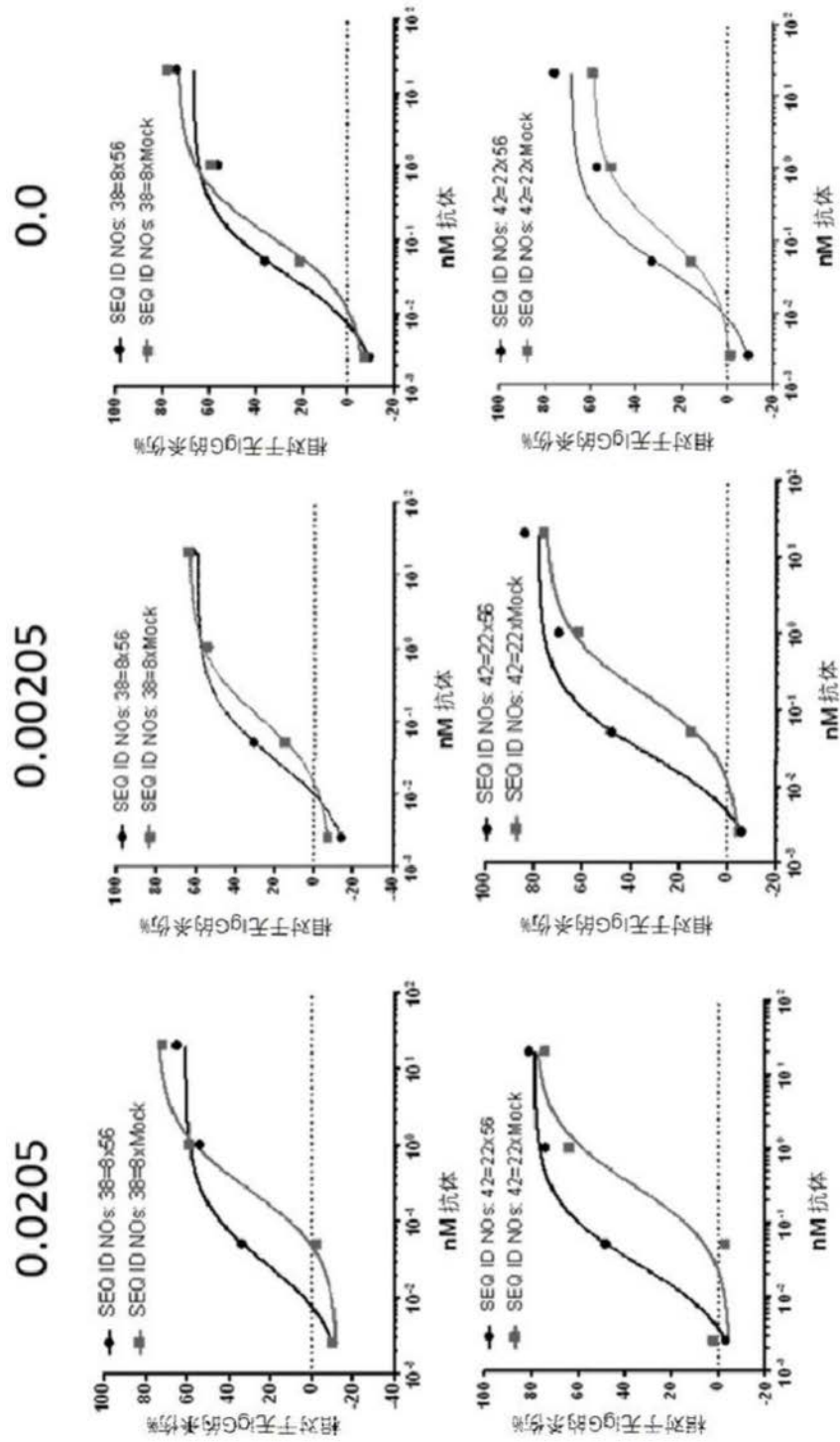


图6B(续)

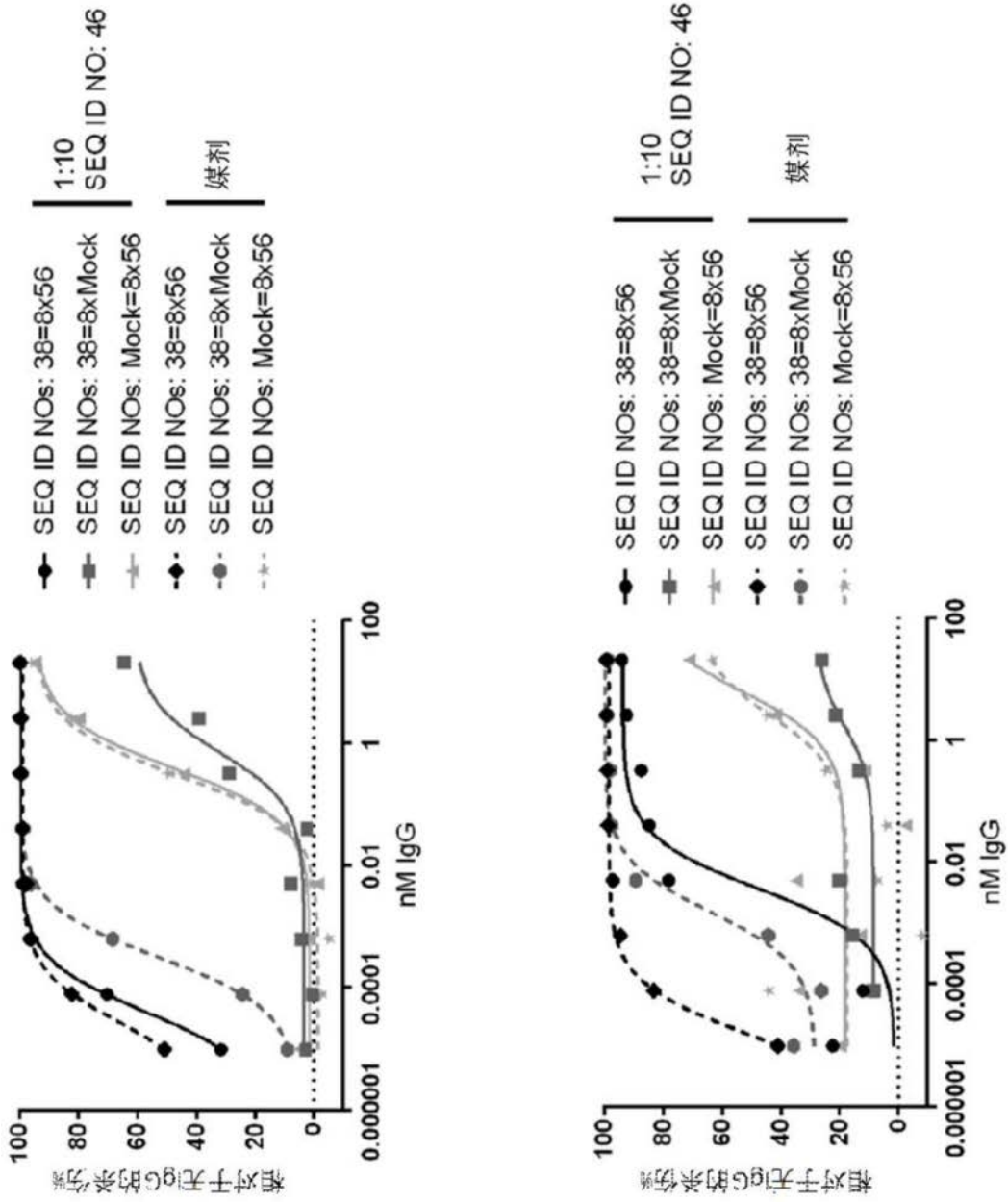


图7

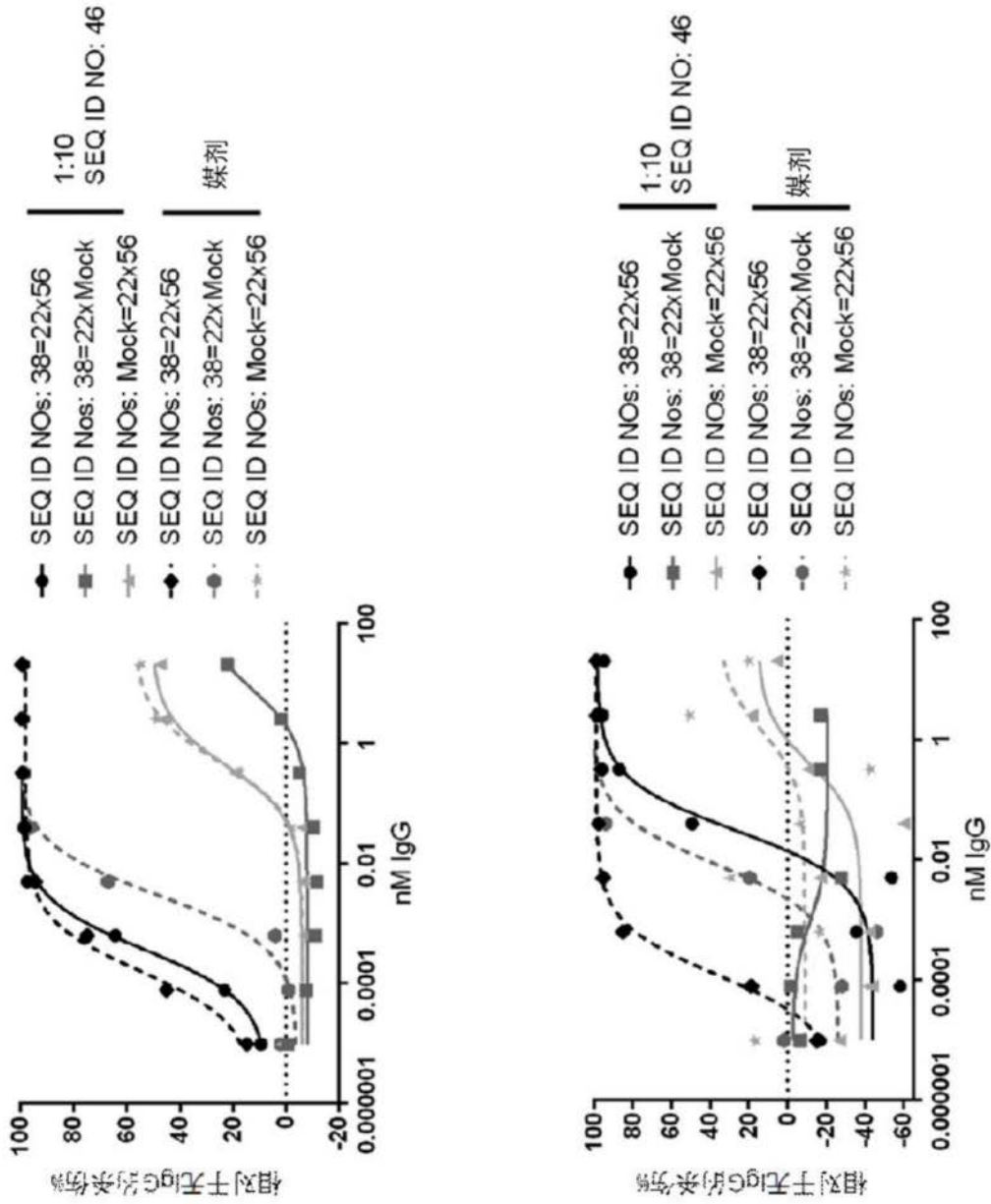


图7(续)

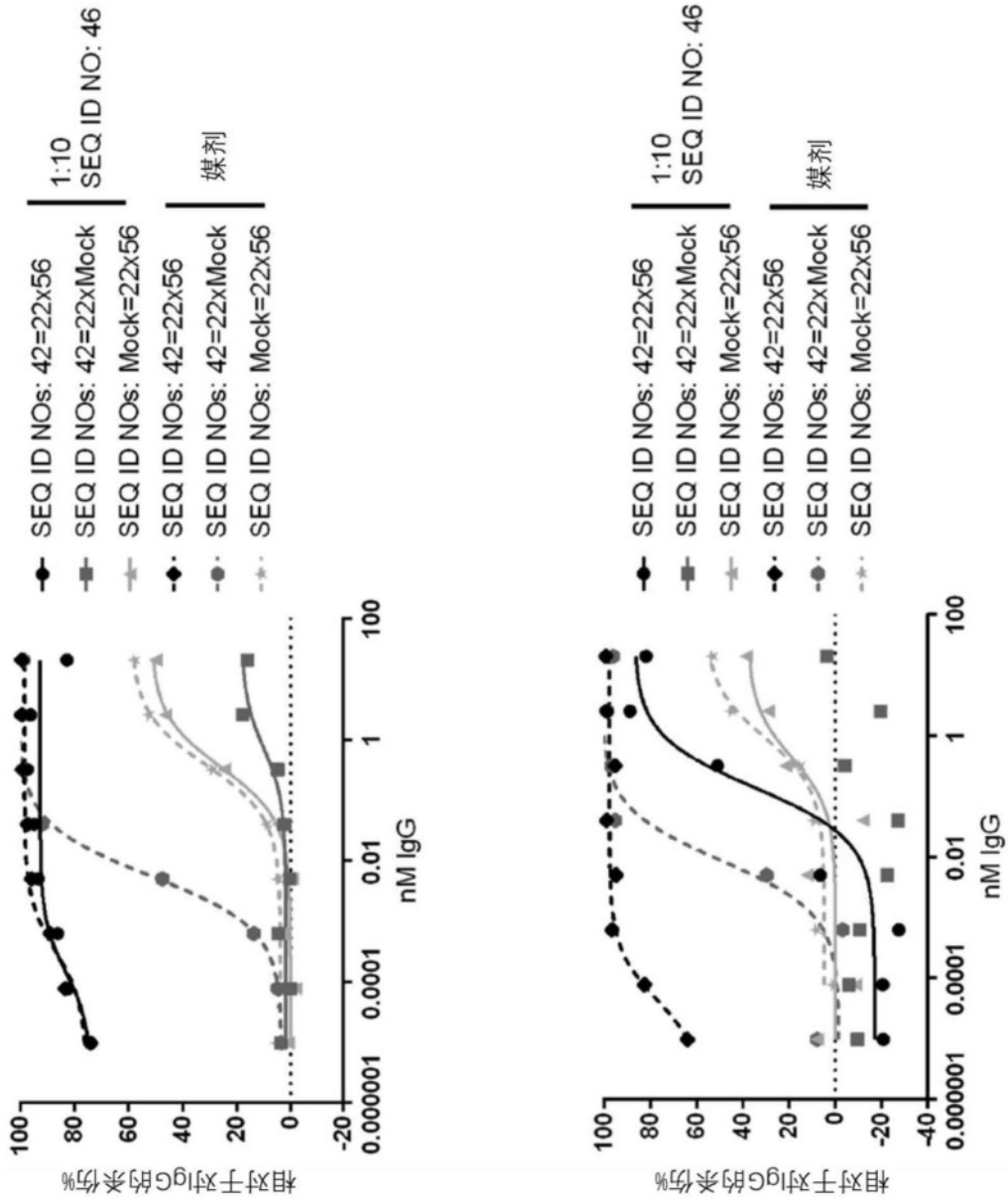


图7 (续)

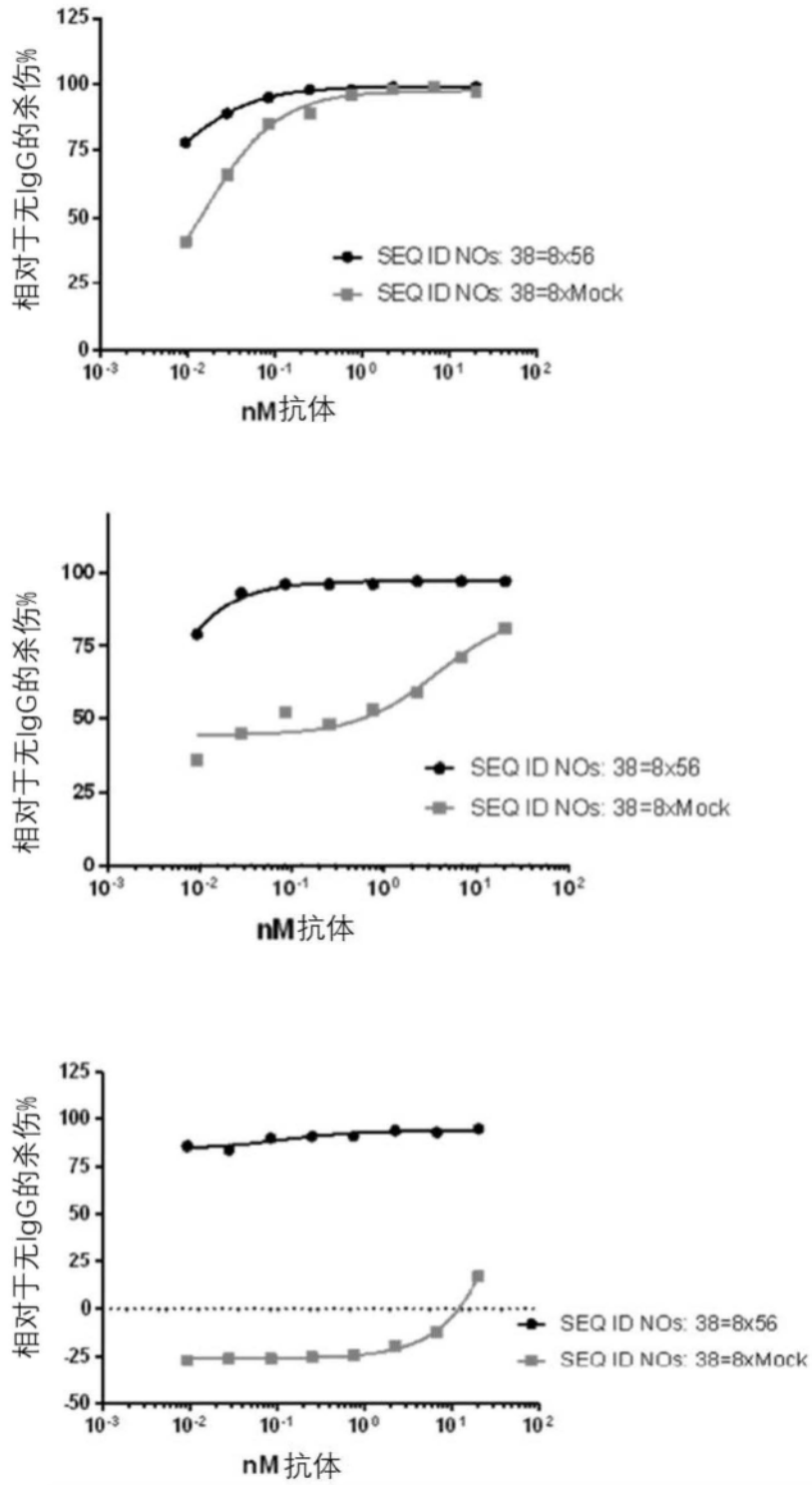


图8A

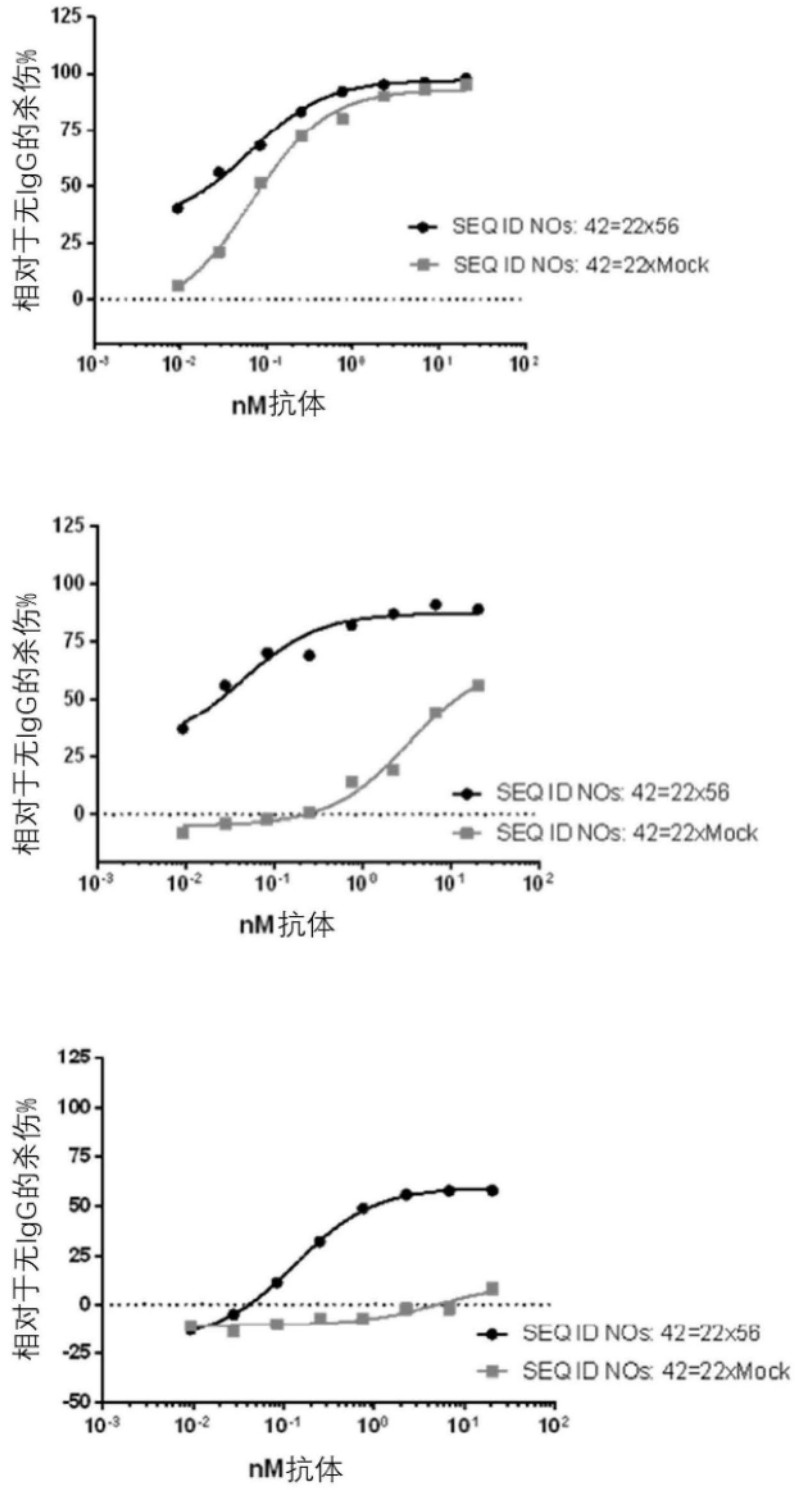


图8A(续)

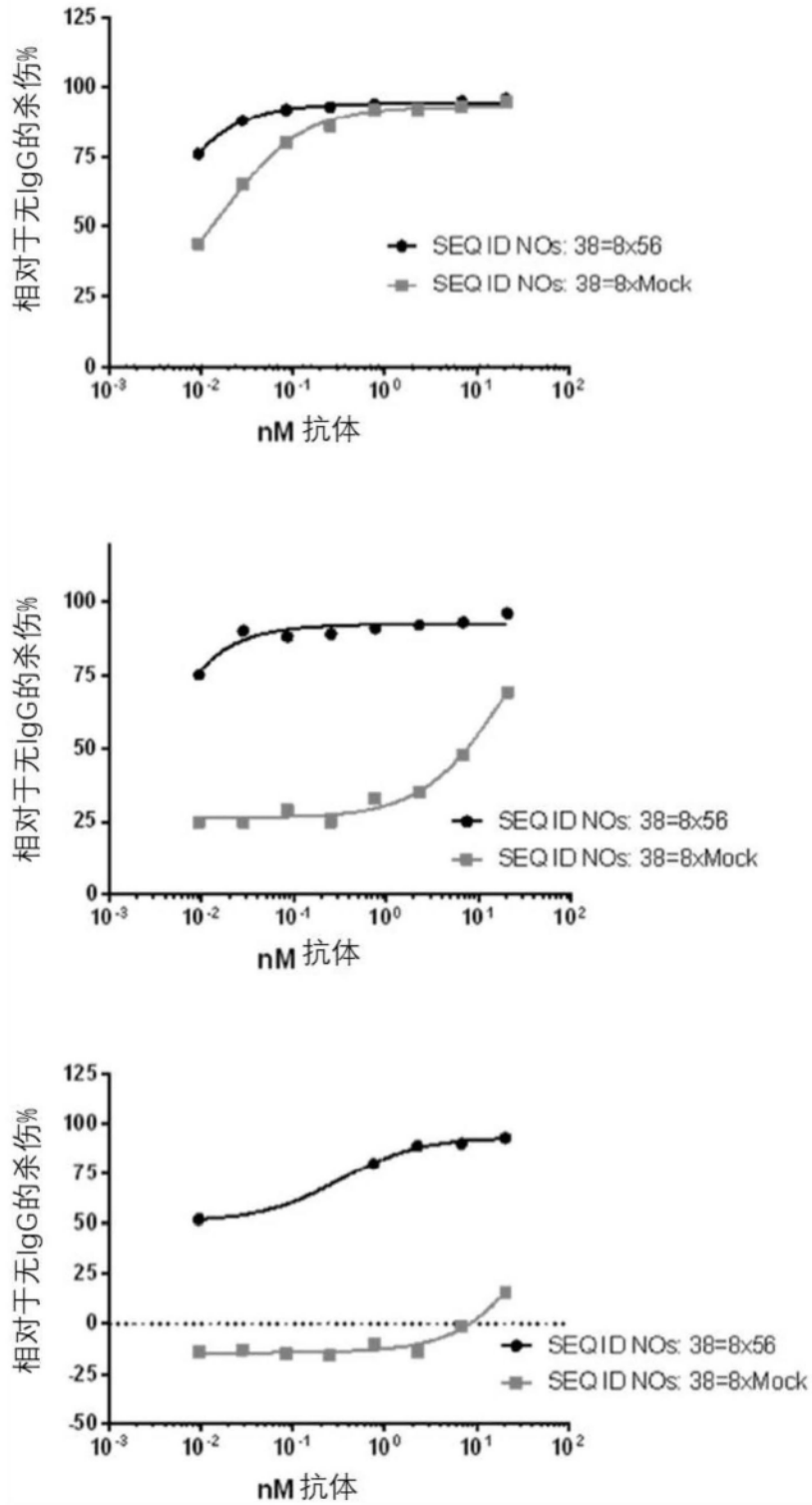


图8B

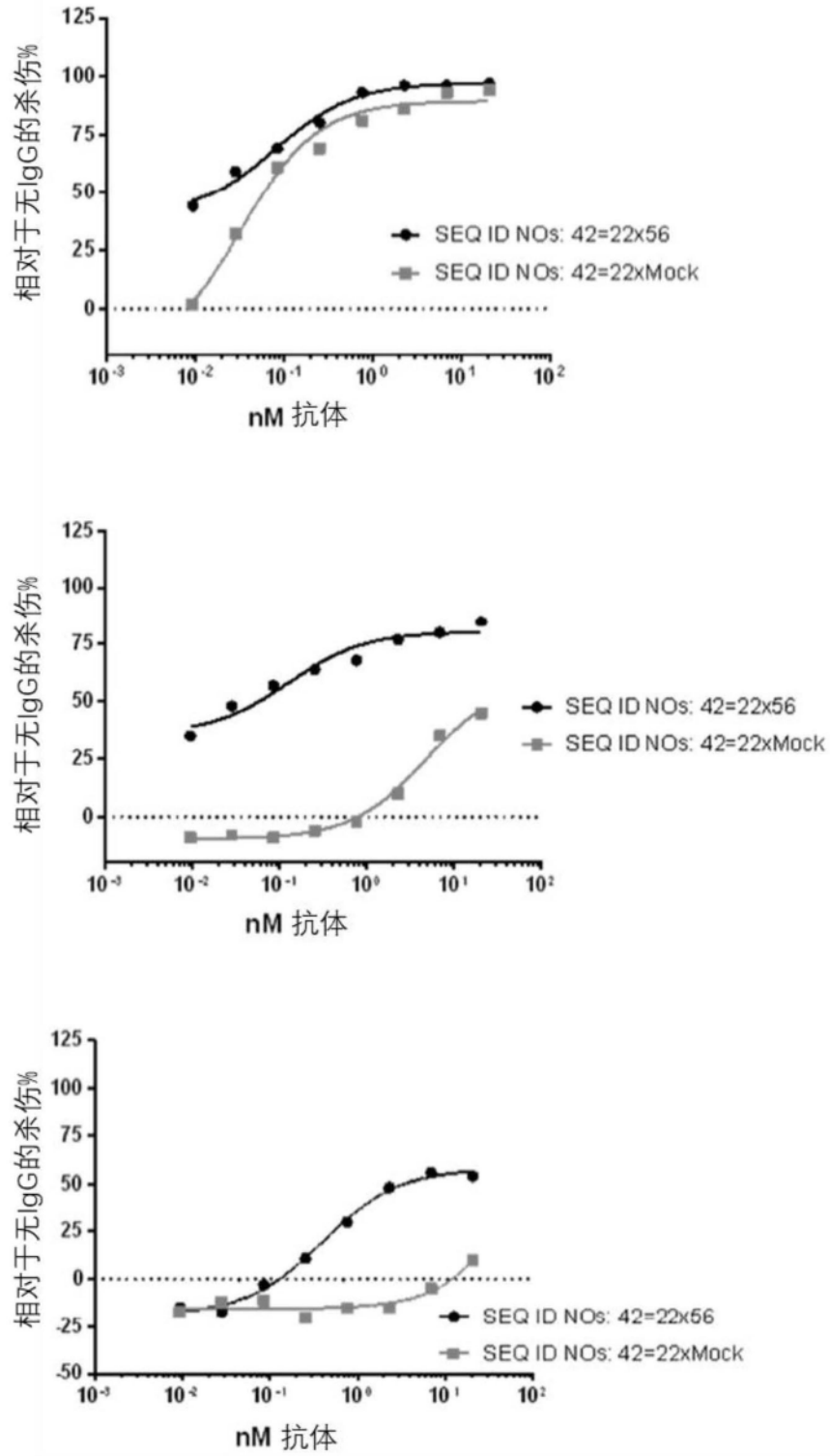


图8B (续)

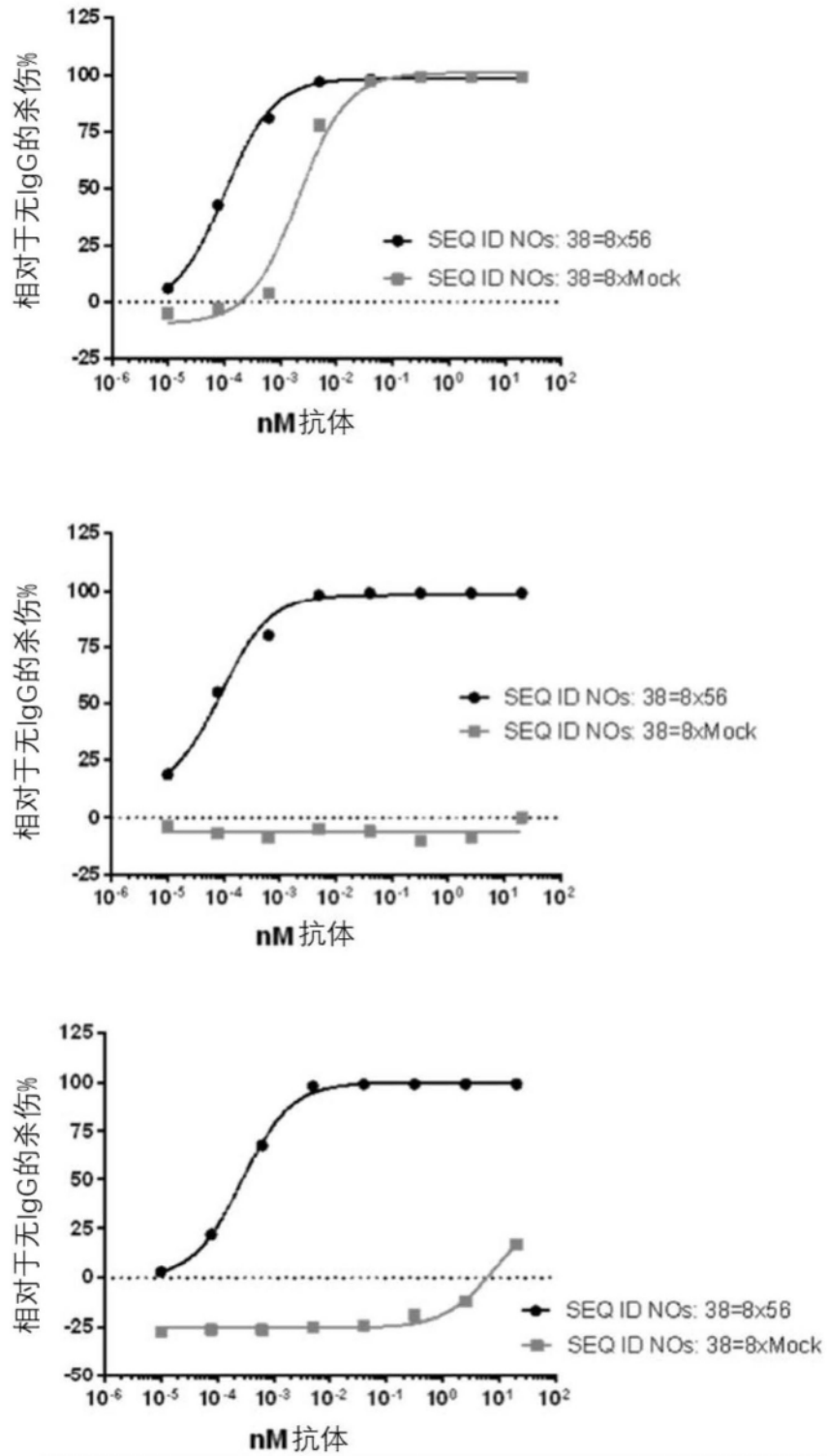


图9

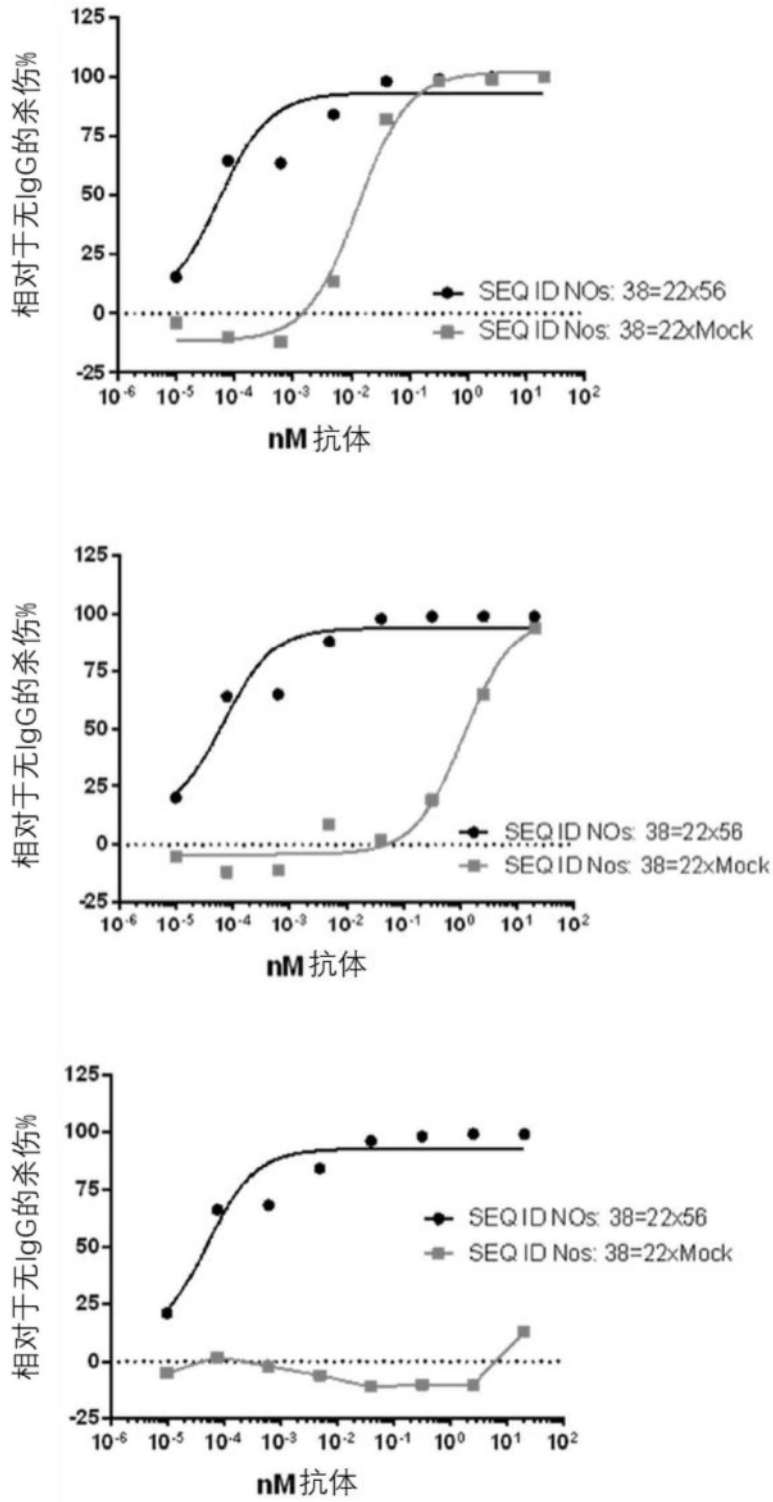


图9(续)

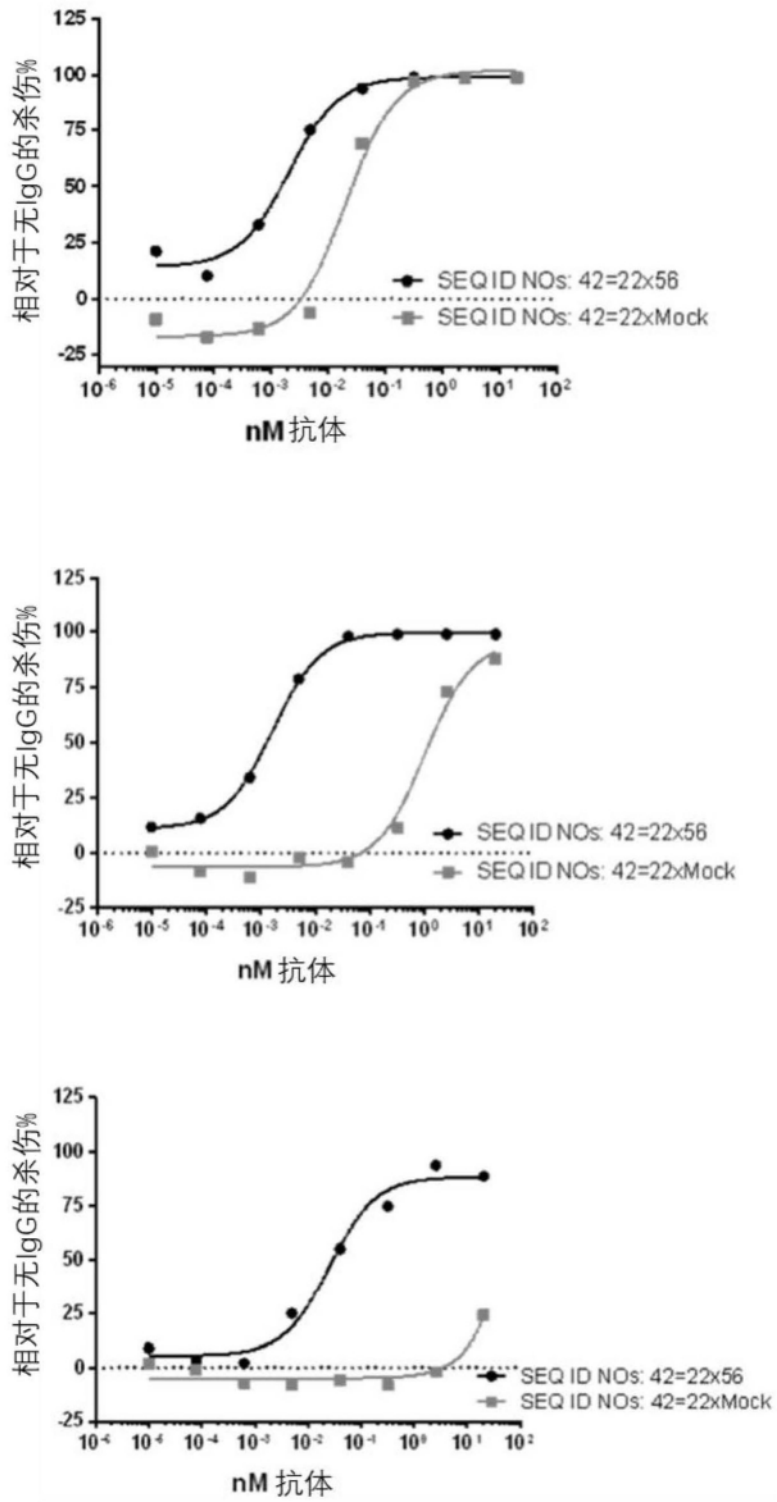


图9(续)

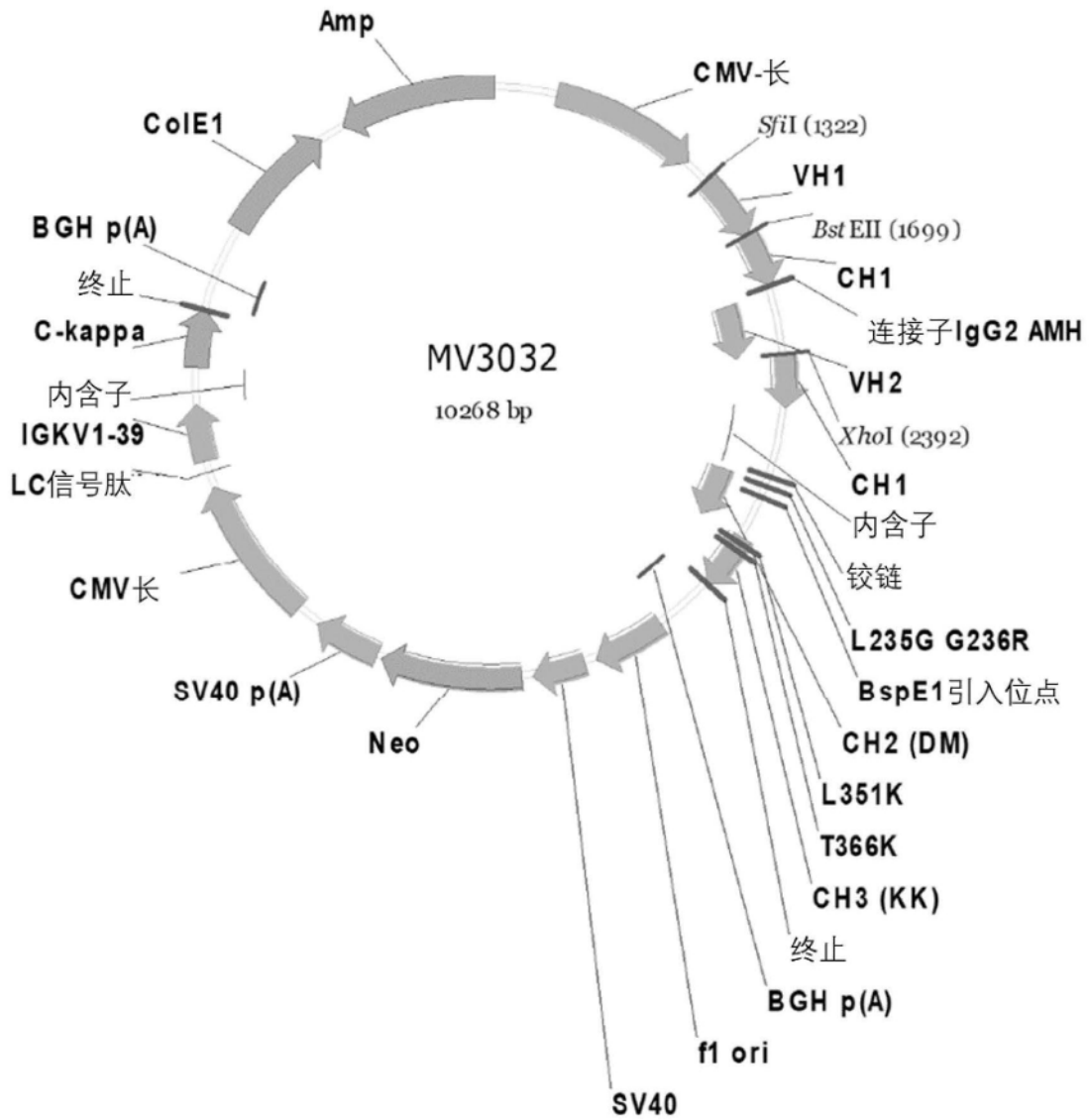


图10

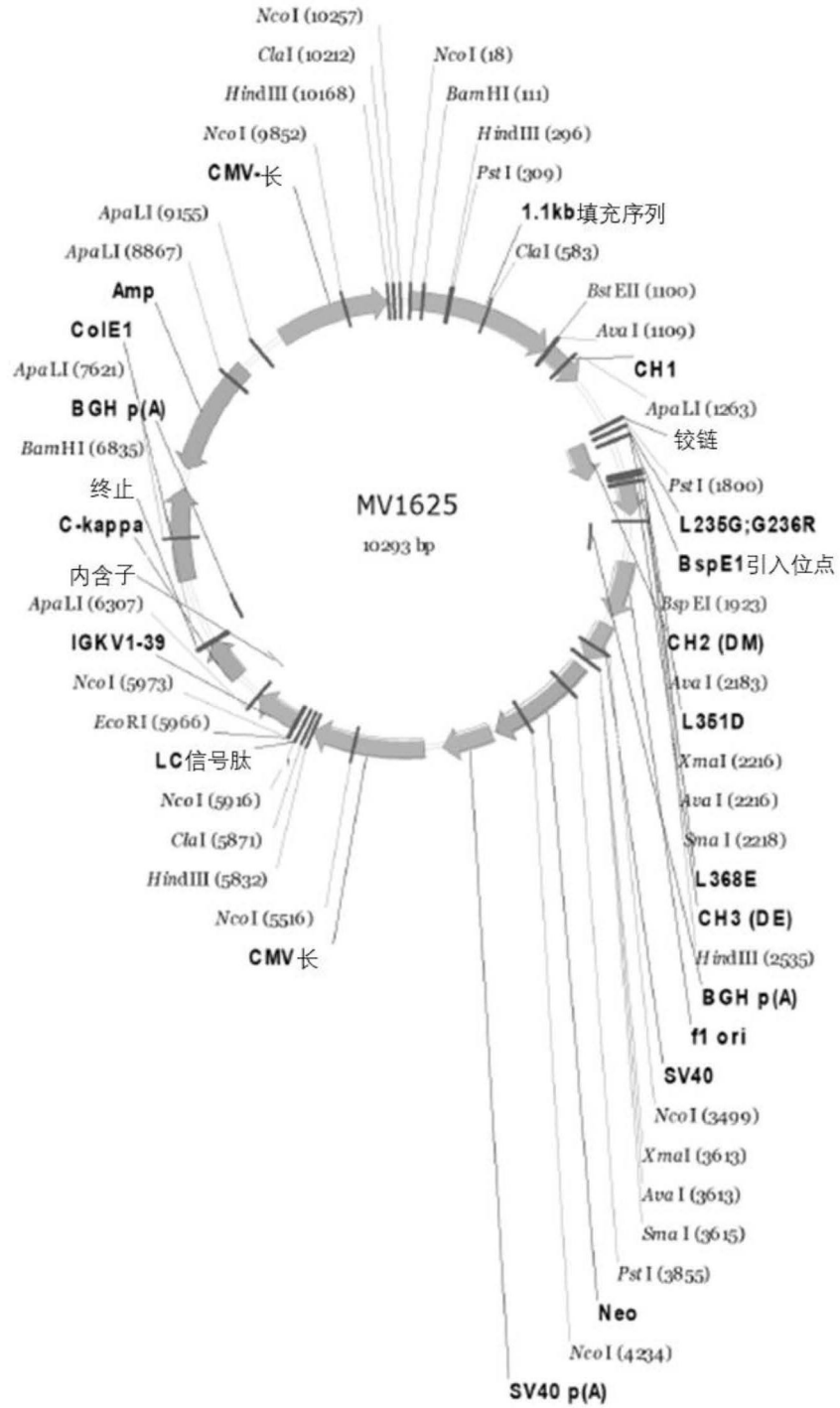


图11

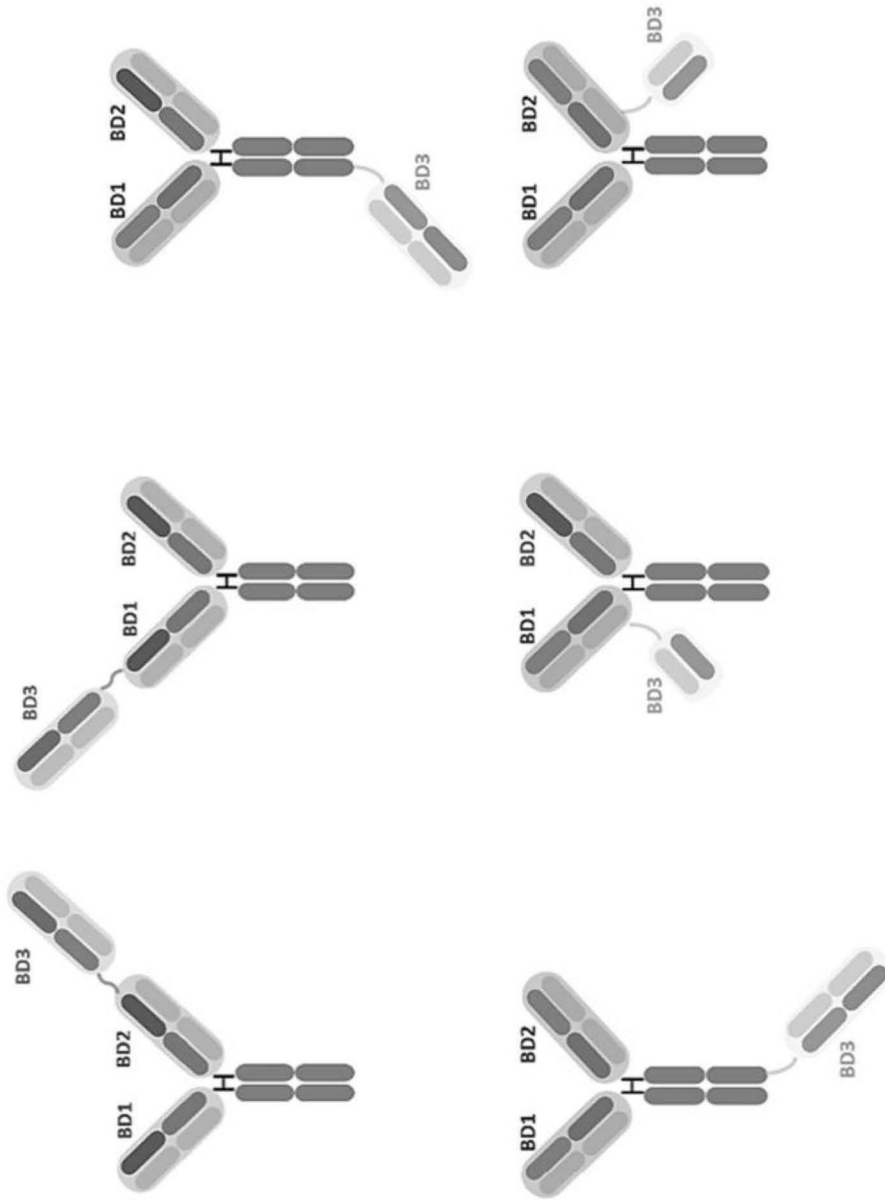


图12A

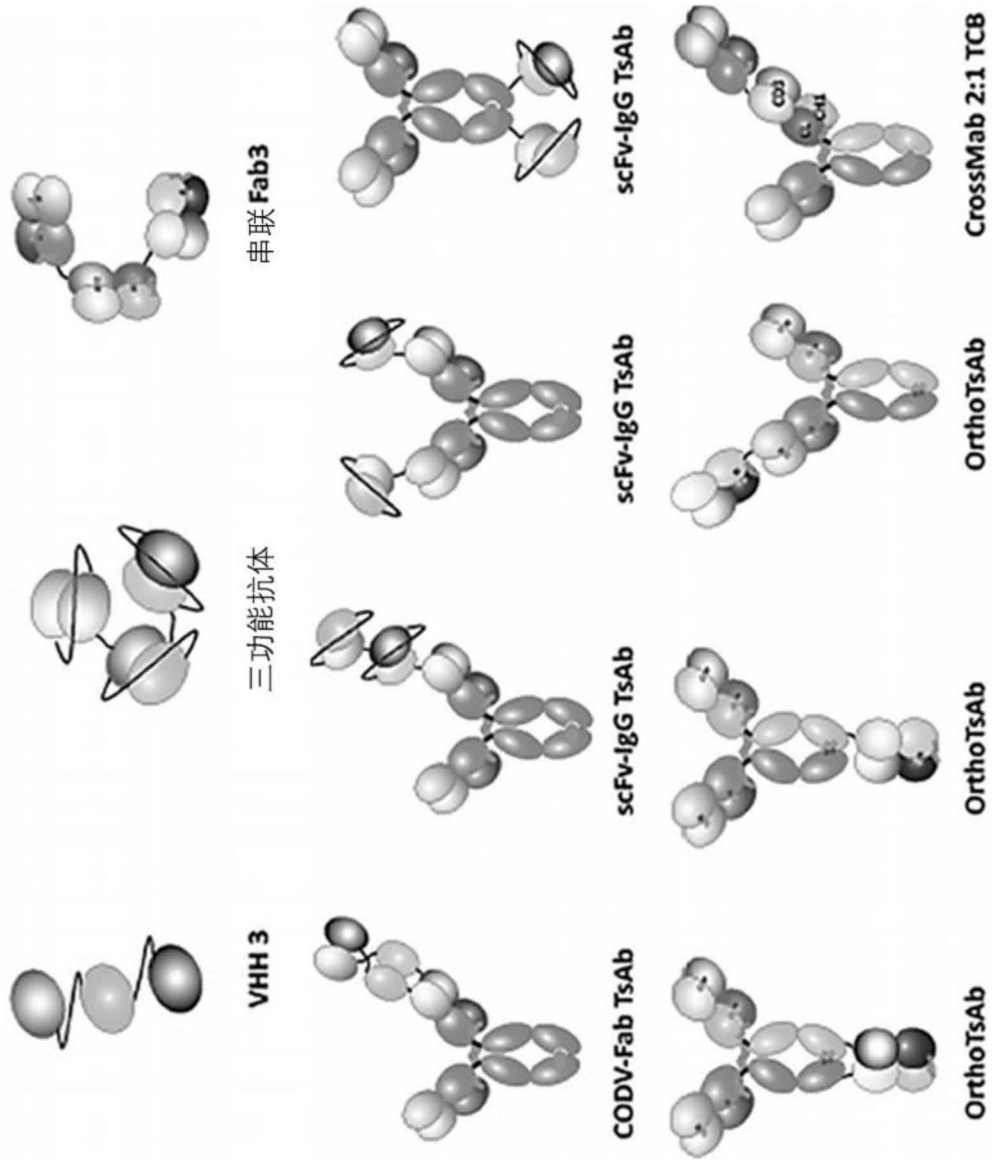


图12B