



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105051066 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 11

(21) 申请号 201380061615. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 09. 27

C07K 16/28(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/706, 543 2012. 09. 27 US

61/834, 915 2013. 06. 14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 05. 26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/NL2013/050693 2013. 09. 27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/051433 EN 2014. 04. 03

(71) 申请人 莫鲁斯有限公司

地址 荷兰乌得勒支

(72) 发明人 亚历山大·贝特霍尔德·亨德里

克·巴克

彼得·福科·万隆 敦·洛格滕伯格

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限

公司 11227

代理人 郑斌 彭鲲鹏

权利要求书2页 说明书28页 附图15页

(54) 发明名称

作为 T 细胞衔接器的双特异性 IgG 抗体

(57) 摘要

本发明提供了人 IgG 双特异性抗体, 其中所述抗体的一条臂与免疫效应细胞上的表位相结合, 而另一条臂靶向 CLEC12A 或其功能等同物。还提供了针对恶性疾病例如 MDS、CML 或 AML 的这些抗体的制药用途。

1. 双特异性 IgG 抗体,其中所述双特异性 IgG 抗体包含特异性识别 CLEC12A 或其功能等同物的一条臂和特异性识别免疫效应细胞上之抗原的第二臂,所述双特异性 IgG 抗体能够将这样的细胞募集到表达 CLEC12A 或所述功能等同物的异常细胞。

2. 根据权利要求 1 所述的双特异性 IgG 抗体,其中所述免疫效应细胞包含 T 细胞。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的双特异性 IgG 抗体,其中所述免疫效应细胞上的所述抗原是 CD3。

4. 根据权利要求 3 所述的双特异性 IgG 抗体,其中所述抗体特异性地识别 CD3 ϵ 。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的双特异性 IgG 抗体,其中两条臂包含共有轻链。

6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的双特异性 IgG 抗体,其中所述共有轻链是种系轻链,优选重排的种系人 κ 轻链 IgV κ 1-39 * 01/IGJ κ 1 * 01。

7. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的双特异性 IgG 抗体,其中所述双特异性抗体是人 IgG1。

8. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的双特异性 IgG 抗体,其中所述特异性识别 CLEC12A 或其功能等同物的臂包含以下序列:由与 SGYTFTSY 至少 90% 相同的序列组成的重链 CDR1 序列、由与 IINPSGGG 至少 90% 相同的序列组成的重链 CDR2 序列以及由与 GTTGDWFDY 至少 90% 相同的序列组成的重链 CDR3 序列。

9. 根据权利要求 8 所述的双特异性 IgG 抗体,其中所述特异性识别 CLEC12A 或其功能等同物的臂包含由与 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMHWRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCAKGTGDFDYWGQGLTLTVSS

至少 90% 相同的序列组成的可变重链序列。

10. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的双特异性 IgG 抗体,其中所述特异性识别 CLEC12A 或其功能等同物的臂包含以下序列:由与 SGYTFTSY 至少 90% 相同的序列组成的重链 CDR1 序列、由与 IINPSGGG 至少 90% 相同的序列组成的重链 CDR2 序列以及由与 GNYGDEFDY 至少 90% 相同的序列组成的重链 CDR3 序列。

11. 根据权利要求 10 所述的双特异性 IgG 抗体,其中所述特异性识别 CLEC12A 或其功能等同物的臂包含由与 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMHWRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCARGNYGDEFDYWGQGLTLTVSS

至少 90% 相同的序列组成的可变重链序列。

12. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的双特异性 IgG 抗体,其中所述特异性识别 CLEC12A 或其功能等同物的臂包含以下序列:由与 SGYTFTGY 至少 90% 相同的序列组成的重链 CDR1 序列、由与 WINPNSGG 至少 90% 相同的序列组成的重链 CDR2 序列以及由与 DGYFADAFDY 至少 90% 相同的序列组成的重链 CDR3 序列。

13. 根据权利要求 12 所述的双特异性 IgG 抗体,其中所述特异性识别 CLEC12A 或其功能等同物的臂包含由与 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRSDDTAVYYCARDGYFADAFDYWGQGLTLTVSS

至少 90% 相同的序列组成的可变重链序列。

14. 根据权利要求 3 至 13 中任一项所述的双特异性 IgG 抗体,其中所述特异性识别 CD3 的第二臂包含以下序列:由序列 SYGMH 组成的重链 CDR1 序列、由序列 IIWYSGSKKNYADSVKG 组成的重链 CDR2 序列以及由序列 GTGYNWFDY 组成的重链 CDR3 序列。

15. 根据权利要求 14 所述的双特异性 IgG 抗体,其中所述特异性识别 CD3 的第二臂包含由序列 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYSGSKKNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTGYNWFDPWGQGLTVTVSS 组成的可变重链序列。

16. 根据权利要求 1 至 15 中任一项所述的双特异性 IgG 抗体,其中所述第一臂和所述第二臂还包含以下序列:由与 RASQSISSYLN 至少 90%相同的序列组成的轻链 CDR1 序列、由与 AASSLQS 至少 90%相同的序列组成的轻链 CDR2 序列以及由与 QQSYSTPPT 至少 90%相同的序列组成的轻链 CDR3 序列。

17. 根据权利要求 16 所述的双特异性 IgG 抗体,其中所述第一臂和所述第二臂包含由与 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK

至少 90%相同的序列组成的可变轻链序列。

18. 根据权利要求 1-17 中任一项所述的双特异性 IgG 抗体,其中所述双特异性 IgG 抗体具有突变的 CH2 和 / 或下铰链结构域,使得所述双特异性 IgG 抗体与 Fc γ 受体的相互作用显著降低。

19. 根据权利要求 18 所述的双特异性 IgG 抗体,其中所述突变的 CH2 和 / 或下铰链结构域在 235 位和 / 或 236 位氨基酸包含至少一个替换(根据 Kabat 编号)。

20. 根据权利要求 18 或 19 所述的双特异性 IgG 抗体,其中所述突变的 CH2 和 / 或下铰链结构域包含替换 L235G 和 / 或 G236R,优选 L235G 和 G236R。

21. 用于从单个细胞产生根据权利要求 1 至 20 中任一项所述的双特异性 IgG 抗体的方法,其中所述双特异性 IgG 抗体包含能够形成界面的两个 CH3 结构域,所述方法包括提供:

- 这样的细胞,所述细胞具有 a) 编码特异性识别 CLEC12A 且包含第一 CH3 结构域之 IgG 重链的第一核酸序列;和 b) 编码特异性识别免疫效应细胞上的抗原,优选 CD3,且包含第二 CH3 结构域之 IgG 重链的第二核酸序列,其中所述核酸序列具有用于使所述第一 CH3 结构域和第二 CH3 结构域优先配对的手段,所述方法还包括培养所述细胞以及允许所述两种核酸序列表达并从培养物收获所述双特异性 IgG 抗体的步骤。

22. 根据权利要求 21 所述的方法,其中所述细胞具有编码共有轻链的第三核酸序列,所述共有轻链优选重排的种系人 κ 轻链 IgV κ 139 * 01/IGJ κ 1 * 01。

23. 根据权利要求 21 或 22 所述的用于产生双特异性 IgG1 抗体的方法,其中所述第一 CH3 结构域包含氨基酸替换 L351K 和 T366K(根据 Kabat 编号)并且其中所述第二 CH3 结构域包含氨基酸替换 L351D 和 L368E,所述方法还包括培养所述细胞以及允许所述核酸序列表达并从培养物收获所述双特异性抗体的步骤。

24. 抗体,其可通过根据权利要求 21 至 23 中任一项所述的方法获得。

25. 药物组合物,其包含根据权利要求 1 至 20 或 24 中任一项所述的双特异性 IgG 抗体和可药用载体。

26. 根据权利要求 1 至 20 或 24 中任一项所述的双特异性 IgG 抗体,其在治疗骨髓增生异常综合征(MDS)、慢性髓性白血病(CML)或优选急性髓性白血病(AML)中用作药物。

27. 根据权利要求 1 至 20 中任一项或 24 所述的双特异性 IgG 抗体在制备用于治疗或预防骨髓增生异常综合征(MDS)、慢性髓性白血病(CML)或优选急性髓性白血病(AML)的药物中的用途。

作为 T 细胞衔接器的双特异性 IgG 抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及抗体工程领域。特别地,其涉及用于治疗与异常细胞有关之疾病的治疗性(人)抗体的领域。更特别地,其涉及用于治疗肿瘤的双特异性抗体。

背景技术

[0002] 在实验室中,双特异性抗体已被广泛地用于将免疫效应细胞重新靶向至肿瘤细胞。在这种情况下,一个结合位点针对肿瘤相关抗原(TAA),而第二抗原针对效应细胞上的触发分子,例如 T 细胞上的 CD3(Kontermann, MABS 2012(4)182-197;Chames 和 Baty, MABS 2009(1)539-547;Moore 等, Blood 2011(117)4542-4551)。靶向 CD3 和肿瘤细胞相关抗原的第一个双特异性抗体具有啮齿类动物性质并且使用杂交的杂交瘤来产生(Liu 等 1985, PNAS 82:8648, Staerz 等 1986, PNAS83:1453, Lanzavecchia 等 1987, Eur. J. Imm 17:105)。在这些杂交的杂交瘤中, Ig 重链和轻链的重配导致在单特异性和因重链和轻链错配造成的非功能双特异性抗体之大得多的库内产生双特异性功能抗体分子。因为它们的双特异性,这些功能双特异性抗体能够将鼠和人的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)桥接(bridge)到靶细胞并触发细胞毒性作用,从而导致展示出相关抗原的肿瘤细胞裂解。然而,无法实现 CD3×TAA 双特异性 IgG 介导的多克隆静息人 T 细胞对肿瘤细胞裂解的诱导,除非通过添加外源 IL-2 或抗 CD28mAb 提供共刺激。这通过杂交大鼠 IgG2b/小鼠 IgG1CD3×CD19 双特异性分子得以例证,所述分子仅在共施用 IL-2 后才能诱导静息人 T 淋巴细胞对 CD19 阳性 REH B-ALL 肿瘤细胞系的裂解(Haagen 等, 1995Blood 85:3208)。Zeidler 等使用类似的大鼠 IgG2b/小鼠 IgG2a CD3×Epcam 分子证明,可在包含外周血单核细胞(PBMC)和肿瘤细胞两者而不添加外源 IL2 的混合的细胞培养物中实现双特异性 IgG 诱导的 Epcam 阳性肿瘤细胞的裂解(Zeidler 等 1999J. Immunol. 163:1246)。作者声称该抗体的“第三”臂(Fc 区),通过与在 PBMC 级分中存在的 Fc γ 受体阳性辅助细胞(accessory cell)相互作用而引起这种效果。特别地,强活化潜力与杂交亚类组合小鼠 IgG2a/大鼠 IgG2b 有关,与其他报道的组合(例如小鼠 IgG2a/小鼠 IgG1 或大鼠 IgG2b/小鼠 IgG1)相比,所述组合不仅与 Fc γ 受体阳性辅助细胞结合而且将其活化。这种所谓的 triomAb CD3×Epcam 双特异性抗体(也称为卡妥索单抗(catumaxomab)),已经在临床上开发并且在欧洲注册用于上皮源性腹部肿瘤的姑息治疗。虽然已经清楚地证明了这种双特异性抗体的临床功效,但是其啮齿类动物性质在重复给药后诱导抗产品免疫应答,因此阻止了这种形式的广泛应用。

[0003] 已经探究了可替代的 CD3×TAA 形式来解决与杂交啮齿类动物 triomAb 形式相关的制造问题和免疫原性问题两者。这样的形式通常是衍生自全长人 IgG 分子的免疫球蛋白样分子,并且包括以下分子,例如由在 macrogenics.com/Platforms-DART.html 的 Macrogenics 万维网开发的双亲和重新靶向(Dual-Affinity Re-Targeting, DARTTM)分子,由 Micromet(现为 Amgen)开发的双特异性 T 细胞衔接器(engager) (**BiTE[®]**)分子(SheridanC, Nat Biotechnol. 2012(30):300-1),由 Abbott 开发的双可变结构域-免疫球蛋白(DVD-IgTM)分子以及由在 affimed.com/tandab-recruit 的 Affimed 万维网开发的

TandAb® RECRUIT 分子。现在使用抗 CD3 抗体加人 IL-2 已经证明,对于这些形式中的一种,使用 CD3×CD19 双抗体将外周血淋巴细胞成功地重新靶向以裂解 CD19 阳性肿瘤细胞需要预活化外周血 T 淋巴细胞 (Kipriyanov 等,1998Int. J. Can. 77 :763)。另一些形式(例如二价单链 Fv CD3×TAA **BiTE®**形式 (Loffler 等,2000Blood 95 :2098))不需要预活化静息 T 细胞并且能够以非常有效的方式诱导抗原阳性肿瘤细胞体外裂解 (Dreier 等,2002Int. J. Canc. 100 :690)。使用 **BiTE®**靶向不同的 TAA 的另一些研究显示, **BiTE®**形式的有效效力与抗原的尺寸,特别是 TAA 上的表位与肿瘤细胞膜的距离有关 (Bluemel 等,2010Cancer Immunol. Immunother. 59 :1197)。对于 **BiTE®**分子已证明溶细胞性 T 细胞突触的有效形成,这可解释为形成其效力的结构基础 (Offner 等, Molecular Immunology 2006 (43) 763-771),也认为这与所述 **BiTE®**形式的小尺寸相关。如果尺寸重要,这将暗示较大的分子(例如完整的 IgG)将会过大以致于不能形成有效的溶细胞突触。已经证明 CD3×CD19 **BiTE®** (blinatumomab) 在难治的非霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkin lymphoma) 和急性淋巴性白血病患者中具有显著的临床功效 (Bargou 等,2008 Science 321 :974)。虽然 CD3×CD19 **BiTE®**在体外于低水平时显示非常有效的肿瘤细胞裂解,但是向患者施用这种双特异性的形式也伴随有重大的挑战。由于它们的小尺寸, **BiTE®**被迅速从循环中清除,因此患者的给药需要持续输注。因为给药方案具有超过 2 个月的总持续时间,这种治疗对患者的生活质量具有显著影响。

[0004] 因此,在根除异常细胞中,仍然需要有效的全长双特异性 T 细胞衔接 IgG 分子,其组合了在静脉内施用后具有长的循环半衰期,不需要持续输注,不具有免疫原性以及只有有限的副作用。

[0005] 附图简述

[0006] 图 1 :CLEC12A 及相关序列。

[0007] 图 2 :由多种抗体活化 T 细胞 :单克隆二价 CD3 IgG,双特异性 CD3×CLEC12 IgG,双特异性 CD3×同种型对照 IgG,单克隆二价 CLEC12A IgG,单克隆二价同种型对照 IgG。

[0008] 图 3 :由 CD3×CLEC12A 双特异性 IgG 和对照抗体特异性裂解 HL60 细胞。

[0009] 图 4 :由 CD3×CLEC12A 双特异性 IgG 和对照抗体特异性裂解 HL60 细胞 (E : T 比)。

[0010] 图 5 :用由多种 CLEC12A 臂和固定的 CD3 臂组成的数个 CD3×CLEC12A 双特异性 IgG 分子和对照抗体特异性裂解 HL60 细胞。

[0011] 图 6 :用 CD3×CLEC12A 双特异性 IgG 与 Fc 沉默组合特异性裂解 HL60 细胞 (DM = 双突变体 ;TM = 三突变体 ;WT = 野生型,无 Fc 沉默)。

[0012] 图 7 :Fc 沉默不影响 FcRn 结合。

[0013] 图 8 :CD3×CLEC12A bsAb 靶向特异性诱导 T 细胞增殖。

[0014] 图 9 :与健康供体相比,AML 患者的 CD8+T 细胞区室。

[0015] 图 10 :特异的 CD3×CLEC12A DM-Fc 诱导的 T 细胞活化和通过 AML 患者 T 细胞裂解 HL60 肿瘤细胞。

[0016] 图 11 :通过自体 AML 患者 T 细胞特异性裂解 AML 母细胞。

- [0017] 图 12 :通过患者 T 细胞的特异性单核细胞裂解。
- [0018] 图 13 :Fc 沉默显著地消除了旁观者 (bystander) 细胞细胞因子的释放。
- [0019] 图 14A :HPB-ALL 细胞上 FACS 染色的抗 CD3 抗体。
- [0020] 图 14B :板结合的 IgG,用 CFSE 标记的 T 细胞,在第 5 天通过 FACS 读出。
- [0021] 图 15 :HL60 细胞毒性测定。
- [0022] 图 16 :HL60 细胞上 FACS 染色的抗 CLEC12A 抗体。
- [0023] 图 17 :HL60 细胞毒性测定。
- [0024] 图 18 :FACS 分析。
- [0025] 图 19 :HL60 细胞毒性测定。
- [0026] 图 20 :CD3 特异性 Fab 臂和 CLEC12A 特异性 Fab 臂的 VII 序列。012 共有轻链的 VL 序列。CDR 序列以粗体和下划线表示。

发明内容

[0027] 本发明描述了用于治疗 AML 的完全人 IgG 双特异性全长抗体。抗体的一条臂与免疫效应细胞上的表位 (优选 CD3) 结合,而另一条臂靶向 CLEC12A (在 90-95% 新生和复发的 AML 患者中表达的一种骨髓细胞特异性表面靶标)。CLEC12A 在 AML 白血病干细胞上表达,但不在正常的造血细胞上表达。不同于 CD33, CLEC12A 不在红细胞前体或巨核细胞上表达,因此本发明的 CD3×CLEC12A 双特异性 IgG1 抗体不应诱导血小板或红细胞的损耗。用骨髓细胞集落进行的实验已经表明,正常骨髓中 CLEC12A+ 细胞的损耗不影响产生血小板和红细胞的髓系。在一个优选的实施方案中,根据本发明的 CD3×CLEC12A 双特异性 IgG 抗体包含经修饰的 Fc 区,以减少 PBMC 内 T 细胞和表达 Fc γ R 的细胞的衔接而导致的非特异性免疫活化。根据现有技术中描述 triomAb 双特异性抗体的数据,高度怀疑完全人 IgG1 形式的 CD3×TAA 双特异性抗体将能够在静息外周血淋巴细胞中诱导裂解性抗肿瘤活性,而不需要 T 细胞的预活化。此外,**BiTE[®]**形式的可用数据表明全长 IgG 分子太大以致于无法在肿瘤细胞和效应细胞之间产生有效的溶细胞突触。出乎意料地,我们证明了完全人 CD3×CLEC12A 双特异性全长 IgG1 能够体外诱导非常有效的 T 细胞介导的 CLEC12A 阳性 HL60 AML 肿瘤细胞的裂解。事实上,有效的裂解是由从 PBMC 纯化的静息 T 淋巴细胞介导的,而不需要预先活化所述 T 细胞。此外,我们证明了当在含有人血清的培养基中进行测定时,这种裂解活性不一定依赖于与 HL60 细胞上存在的 Fc γ R 的相互作用,因为这种裂解活性并未受到过量的人 IgG 存在的影响。这是首次全长人 IgG1 双特异性 T 细胞衔接器抗体发挥有效的肿瘤细胞裂解作用而不需要 T 细胞的预活化或不需要活性 Fc γ R 的相互作用。当与 **BiTE[®]** 分子相比较时,尽管 IgG1 的尺寸相对较大,但仍可实现有效的裂解。显然,当将 CH2/ 下铰链突变引入 CD3×CLEC12A 双特异性 IgG1 分子中以进一步减少 Fc 受体相互作用时,这仍然导致了通过免疫效应细胞的有效肿瘤细胞裂解。双特异性人 IgG1T 细胞衔接器抗体相比于使用杂交亚类组合小鼠 IgG2a/ 大鼠 IgG2b 的当前 IgG 具有优点,因为人 IgG1 有较小的免疫原性,因此可以应用于重复治疗。此外,全长双特异性人 IgG1T 细胞衔接器抗体相比于免疫球蛋白 / 样分子 (例如 DART[™]、**TandAb[®]** 或 **BiTE[®]**) 具有优点,因为全长人 IgG1 不会被从循环迅速清除,因此患者给药不需要持续输注,这对患者更加有益。

[0028] 实施方案

[0029] 本发明提供了双特异性 IgG 抗体,其中所述双特异性 IgG 抗体包含特异性识别 CLEC12A 或其功能等同物的一条臂和特异性识别免疫效应细胞上之抗原的第二臂,所述双特异性 IgG 抗体能够将这样的细胞募集到表达 CLEC12A 或所述功能等同物的异常细胞。

[0030] 如本文所使用的术语“特异性识别 CLEC12A 或其功能等同物”意指在 CLEC12A 或所述功能等同物存在于所述抗体附近的情况下,所述臂具有特异性识别 CLEC12A 或所述功能等同物的能力。同样地,术语“特异性识别免疫效应细胞上的抗原”意指当所述抗原存在于所述抗体附近时,所述臂具有特异性识别所述抗原的能力。这种抗体对抗原的识别通常是通过抗体的互补区以及抗原和抗体臂二者的特定三维结构来介导的,不同于抗体随机的非特异性连接,其允许这两个结构精确结合在一起(类似于锁和钥匙的相互作用)。因为抗体通常识别抗原的表位,并且因为表位同样也可存在于其他化合物中,所以根据本发明“特异性识别 CLEC12A 或其功能等同物”并且“特异性识别免疫效应细胞上的抗原”的抗体也可识别其他化合物,如果这些其他化合物包含相同种类的表位的话。因此,术语“特异性识别 CLEC12A 或其功能等同物”,“特异性识别免疫效应细胞上的抗原”和“特异性识别 CD3”不排除抗体与包含相同(种类)表位的其他化合物相结合。替代地,允许交叉反应性。根据本发明的抗体通常能够以至少 $1 \times 10^{-5} \text{M}$ 的结合亲和力与 CLEC12A(或其功能等同物)和免疫效应细胞上的抗原(优选 CD3)相结合,如下进行了更详细的概述。

[0031] 如本文所使用的术语“抗体”意指属于免疫球蛋白类蛋白质的蛋白质分子,其含有与抗原上的表位结合的一个或更多个结构域,其中这些结构域衍生自抗体的可变区或与抗体的可变区共享序列同源性。用于治疗用途的抗体优选尽可能接近待治疗对象的天然抗体(例如用于人对象的人抗体)。可以以特异性和亲和力来表示抗体结合。特异性决定哪些抗原或其表位被结合结构域特异性地结合。亲和力是与特定抗原或表位结合的强度的量度。特异性结合或“特异性识别”被定义为具有至少 $1 \times 10^{-5} \text{M}$,更优选 $1 \times 10^{-7} \text{M}$,更优选高于 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 的亲和力(KD)的结合。通常,用于治疗应用的抗体具有高达 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 或甚至更高的亲和力。本发明的抗体通常是人 IgG 亚类的双特异性全长抗体。优选地,本发明的抗体是人 IgG1 亚类抗体。

[0032] 根据本发明的术语“全长 IgG”被定义为包括基本上完全的 IgG,然而其并不一定要具有完整 IgG 的所有功能。为了避免疑义,全长 IgG 包含两条重链和两条轻链。每条链包含恒定区(C)和可变区(V),其可以被分成指定的 CH1、CH2、CH3、VH 和 CL、VL 结构域。IgG 抗体通过包含在 Fab 部分的可变区结构域与抗原相结合,并且在结合后,可通过恒定结构域(主要是通过 Fc 部分)与免疫系统的分子和细胞相互作用。术语“可变区结构域”、“可变区”、“可变结构域”、“VH/VL 对”、“VH/VL”、“Fab 部分”、“Fab 臂”、“Fab”或“臂”在本文中可互换使用。根据本发明的全长抗体涵盖 IgG 分子,其中可能存在提供所需特性的突变。这些突变不应该是任何区域实质部分的缺失。然而,其中一个或多个氨基酸残基缺失但是基本上没有改变所得 IgG 分子的结合特性的 IgG 分子也包含在术语“全长 IgG”之内。例如,这类 IgG 分子可具有 1 至 10 氨基酸残基之间的一个或更多个缺失,优选在非 CDR 区,其中缺失的氨基酸对于 IgG 的结合特异性不是必需的。

[0033] 优选全长 IgG 抗体,这是因为其有利的半衰期以及由于免疫原性的缘故,需要保持与完全自体(人)分子接近。根据本发明,使用双特异性 IgG 抗体。在一个优选的实施

方案中,使用双特异性全长 IgG1 抗体。基于其在人中的长循环半衰期,IgG1 是有利的。为了避免人类中的任何免疫原性,根据本发明的双特异性 IgG 抗体优选的是人 IgG1。术语“双特异性”(bs) 意指抗体的一条臂与第一抗原相结合,而第二臂与第二抗原相结合,其中所述第一抗原和第二抗原不相同。根据本发明,所述第一抗原和第二抗原实际上是位于两个不同细胞类型上的两个不同分子。术语“[抗体的] 一条臂”优选意指全长 IgG 抗体的一个 Fab 部分。通过募集和活化内源免疫细胞而介导细胞毒性的双特异性抗体是下一代抗体治疗的新兴种类。这可通过在一个分子中组合对靶细胞(即肿瘤细胞)和效应细胞(即 T 细胞、NK 细胞和巨噬细胞)特异性的抗原结合来实现(Cui 等, JBC 2012(287) 28206-28214; Kontermann, MABS 2012(4) 182-197; Chames 和 Baty, MABS 2009(1) 539-547; Moore 等, Blood 2011(117) 4542-4551; Loffler 等. 2000 Blood 95:2098; Zeidler 等, 1999 J. Immunol. 163:1246)。根据本发明,提供双特异性抗体,其中一条臂与异常(肿瘤)细胞上的 CLEC12A 抗原结合,而第二臂与免疫效应细胞上的抗原结合。

[0034] 还考虑这样的抗体,其中 VH 能够特异性识别第一抗原且与免疫球蛋白可变区中的 VH 配对的 VL 能够特异性识别第二抗原。所得的 VH/VL 对将与抗原 1 或抗原 2 相结合。例如在 WO 2008/027236、WO 2010/108127 和 Schaefer 等 (Cancer Cell 20, 472-486, 2011 年 10 月) 中描述的这些所谓的“二合一抗体 (two-in-one antibody)”也包含在术语“双特异性抗体”中,因为它们也具有结合两种不同抗原的能力。在一个实施方案中,VH 用于特异性识别 CLEC12A 或其功能等同物,而 VL 用于特异性识别免疫效应细胞上的抗原。或者,根据本发明的抗体包含特异性识别免疫效应细胞上之抗原的 VH 和特异性识别 CLEC12A 或其功能等同物的 VL。无论哪种方式,所得到的抗体通常包含两个 VH/VL 对,其中每个 VH/VL 对将与 CLEC12A(或其功能等同物)或者免疫效应细胞上的抗原相结合。二合一抗体通常与两种相似的抗原(AA 或 BB;单特异性二价)或两种不同的抗原(AB;双特异性)相结合。因此,如果二合一抗体用于根据本发明的治疗应用,这些抗体的一部分将不能发挥所期望的效果,这是由于其与两种 CLEC12A 分子(或其功能等同物)或者免疫效应细胞上的两种抗原(例如 CD3)相结合。由于用所施用抗体的一部分仍可以实现治疗目标,因此二合一抗体仍然合适。

[0035] 如本文所使用的术语“CLEC12A”指的是 C 型凝集素结构域家族 12 成员 A,也称为 C 型凝集素样分子 -1 (CLL-1) (在急性髓性白血病 (AML) 的白血病母细胞和白血病干细胞上表达的抗原),其包括 CD34 阴性或 CD34 低表达的白血病干细胞(侧群)(A. B. Bakker 等, Cancer Res 2004, 64, 8443-50 页; Van Rhenen 等, 2007 Blood 110:2659; Moshaver 等, 2008 Stem Cells 26:3059)。CLEC12A 的表达另外受限于造血系,特别受限于在外周血和骨髓中的骨髓细胞,即粒细胞、单核细胞和树突细胞前体。更重要的是, CLEC12A 不存在于造血干细胞上。这种表达谱使得 CLEC12A 特别有利于在 AML 中靶向。CLEC12A 的替代名称包括树突细胞相关的 C 型凝集素 2 (DCAL-2)、髓性抑制 C 型凝集素样受体 (MICL) 和杀伤细胞凝集素样受体亚家族 L 成员 1 (KLRL1) (Zhang W 等, GenBank™ 登录号: AF247788; A. S. Marshall 等, J Biol Chem 2004, 279, 14792-802 页; GenBank™ 登录号: AY498550; Y. Han 等, Blood 2004, 104, 2858-66 页; H. Floyd 等, GenBank™ 登录号: AY426759; C. H. Chen 等, Blood 2006, 107, 1459-67 页)。在图 1 中示出了这些序列的比对。CLEC12A 的全长形式包含 275 个氨基酸残基,其包括在大多数其他同工型中不存在的并显示出严格的髓表达谱(表面表

达和 mRNA 水平) 之额外的 10 个氨基酸胞内段 (intracellular stretch)。术语“CLEC12A 或其功能等同物”意指上述提到的所有变体以及其保留了严格的髓表达谱 (在表面表达水平和 mRNA 水平两者) 的同工型, 如在 Bakker 等, *Cancer Res* 2004, 64, 8443-50 页中所描述。因此, 本发明包括其中一条臂特异性识别 CLEC12A 的功能等同物的双特异性 IgG 抗体, 其包括那些缺乏上述额外的 10 个氨基酸胞内段的功能等同物。然而, 优选的是根据本发明的双特异性 IgG 抗体, 其中一条臂特异性识别全长形式的 CLEC12A。

[0036] 如本文所用的术语“异常细胞”包括肿瘤细胞, 更具体的是血液学来源的肿瘤细胞, 其还包括白血病前期细胞 (例如导致骨髓增生异常综合征 (MDS) 的细胞) 和白血病细胞 (例如急性髓性白血病 (AML) 肿瘤细胞或慢性髓性白血病 (CML) 细胞)。

[0037] 如本文所使用的术语“免疫效应细胞”或“效应细胞”指的是在哺乳动物免疫系统中细胞的天然库 (repertoire) 内的细胞, 其可被活化以影响靶细胞的生存力。免疫效应细胞包括淋巴系的细胞例如天然杀伤 (NK) 细胞, T 细胞包括细胞毒性 T 细胞或 B 细胞, 而且骨髓系的细胞也可被视为免疫效应细胞, 例如单核细胞或巨噬细胞、树突细胞和嗜中性粒细胞。因此, 所述效应细胞优选 NK 细胞、T 细胞、B 细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞或嗜中性粒细胞。根据本发明, 将效应细胞募集至异常细胞意指免疫效应细胞被带到靠近异常靶细胞的附近, 使得效应细胞可以直接杀伤它们被募集至的异常细胞或间接地启动异常细胞的杀伤。为了避免非特异性相互作用, 优选地本发明的双特异性抗体特异性识别免疫效应细胞上的抗原, 其与体内的其他细胞相比被这些免疫效应细胞至少过表达。存在于免疫效应细胞上的靶抗原可包括 CD3、CD16、CD25、CD28、CD64、CD89、NKG2D 和 NKp46。优选地, 在免疫效应细胞上的抗原是在 T 细胞上表达的 CD3 或其功能等同物 (功能等同物是在 T 细胞上具有类似分布和类似功能 (在性质上, 未必在数量上) 的 CD3 样分子)。如本文所使用的术语“CD3”也涵盖 CD3 的功能等同物。在免疫效应细胞上最优选的抗原是 CD3 ϵ 链。已证明该抗原在募集 T 细胞至异常细胞中非常有效。因此, 根据本发明的双特异性 IgG 抗体优选地包含特异性识别 CD3 ϵ 的一条臂。

[0038] 因此, 本发明提供了双特异性全长 IgG 抗体, 其中所述双特异性抗体包含特异性识别 CLEC12A 或其功能等同物的一条臂和特异性识别免疫效应细胞上之抗原的第二臂, 所述双特异性 IgG 抗体能够将这样的细胞募集到表达 CLEC12A 或所述功能等同物的异常细胞, 其中所述免疫效应细胞包含 T 细胞。在另一个优选的实施方案中, 本发明提供了根据本发明的双特异性 IgG 抗体, 其中在所述免疫效应细胞上的所述抗原是 CD3 或其功能等同物, 优选人 CD3 ϵ 。在另一个实施方案中, 本发明提供了这样的双特异性 IgG CLEC12A \times CD3 抗体的 F(ab)' 2 片段。

[0039] 本发明的一个方面提供了根据本发明的双特异性 IgG 抗体, 其中两条臂包含共有轻链。根据本发明的术语“共有轻链”指的是可以是相同的或具有一些氨基酸序列差异同时保留了抗体结合特异性的轻链。例如, 可能在本文所使用的共有轻链的定义范围之内, 例如, 通过引入和测试保守氨基酸改变来制备或发现不相同的但仍然功能上等价的轻链, 所述保守氨基酸改变是指当与重链配对时, 对结合特异性没有帮助或仅有部分帮助的区域氨基酸的变化等。添加或不添加术语“重排”的术语“共有轻链”、“共有 VL”、“单条轻链”、“单 VL”在本文中全都可以互换使用。本发明的一个方面是使用可与不同的重链组合以形成具有功能性抗原结合结构域之抗体的人轻链作为共有轻链 (W02004/009618、W02009/157771、

Merchant 等,1998,Nissim 等,1994)。优选地,共有轻链具有种系序列。一种优选的种系序列是经常在人类库中使用的且具有与许多不同的 VH 区配对的优越能力,以及具有良好的热力学稳定性、产率和溶解度的轻链可变区。最优选的种系轻链是 012,优选重排的种系人 κ 轻链 IgV κ 1-39 * 01/IGJ κ 1 * 01(根据 IMGT 数据库万维网 imgt.org 的命名法) 或者其片段或功能衍生物。术语重排的种系人 κ 轻链 IgV κ 1-39 * 01/IGJ κ 1 * 01、IGKV1-39/IGKJ1、huV κ 139 轻链或简称 huV κ 1-39 在整个申请中可互换使用。显然,本领域的技术人员将认识到“共有”还指其氨基酸序列不相同的轻链的功能等同物。所述轻链存在许多变体,其中突变(缺失、替换、添加)的存在实质上不影响功能性结合区的形成。

[0040] 在一个特别优选的实施方案中,提供了根据本发明的双特异性 IgG 抗体,其中特异性识别 CLEC12A 或其功能等同物的臂包含以下序列:由与 SGYTFTSY 至少 90%相同的序列组成的重链 CDR1 序列、由与 IINPSGGS 至少 90%相同的序列组成的重链 CDR2 序列以及由与 GTTGDWFD 至少 90%相同的序列组成的重链 CDR3 序列。优选地,所述重链 CDR 1、2 和 3 序列由与所列举的 CDR 序列至少 95%,更优选至少 97%,更优选至少 98%,更优选至少 99%相同的序列组成。通常,允许与所列举的 CDR 序列相比有 1、2 或 3 个氨基酸残基的变化,同时保持相同种类的结合活性(在性质上,未必在数量上)。因此,所述重链 CDR1、2 和 3 序列优选包含偏离所列举 CDR 序列不超过 3 个,优选不超过 2 个,更优选不超过 1 个氨基酸的序列。在一个特别优选的实施方案中,所述重链 CDR 1、2 和 3 序列与所列举的 CDR 序列相同。如实施例中所示,所列举的 CDR 序列是 Fab 臂 4327 的 CDR 序列,其具有良好的 CLEC12A 结合性质。因此,在图 20 中示出了 Fab 臂 4327 的重链序列,CLEC12A 特异性抗体 4327 的 VH。在一个优选的实施方案中,根据本发明的双特异性 IgG 抗体包含与抗体 4327 的该 VH 至少 90%相同的可变重链(VH)序列。因此,还提供了根据本发明的双特异性 IgG 抗体,其中特异性识别 CLEC12A 或其功能等同物的臂包含由与序列

[0041] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMHWRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFGQGRVT
MTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCAKGTGDFWYWGQGLTVTS

[0042] 至少 90%,优选至少 95%,更优选至少 97%,更优选至少 98%,更优选至少 99%或甚至 100%相同的序列组成的 VH 序列。如实施例中所示,包含上述 VH 序列以及识别 CD3 Fab 臂的 VH 序列(连同共有轻链)之根据本发明的双特异性抗体具有诱导 T 细胞介导的 CLEC12A 阳性 AML 肿瘤细胞裂解的优异能力。

[0043] 在另一个优选的实施方案中,提供了根据本发明的双特异性 IgG 抗体,其中特异性识别 CLEC12A 或其功能等同物的臂包含以下序列:由与 SGYTFTSY 至少 90%相同的序列组成的重链 CDR1 序列、由与 IINPSGGS 至少 90%相同的序列组成的重链 CDR2 序列以及由与 GNYGDEFDY 至少 90%相同的序列组成的重链 CDR3 序列。优选地,所述重链 CDR1、2 和 3 的序列由与所列举的 CDR 序列至少 95%,更优选至少 97%,更优选至少 98%,更优选至少 99%相同的序列所组成。如上所述,通常,允许与所列举的 CDR 序列相比有 1、2 或 3 个氨基酸残基的变化,同时保持相同种类的结合活性(在性质上,未必在数量上)。因此,所述重链 CDR1、2 和 3 序列优选包含偏离所列举的 CDR 序列不超过 3 个,优选不超过 2 个,更优选不超过 1 个氨基酸的序列。在一个特别优选的实施方案中,所述重链 CDR1、2 和 3 序列与所列举的 CDR 序列相同。如在实施例中所示,所列举的 CDR 序列是抗体 4331VH 区的 CDR 序列,其具有良好的 CLEC12A 结合性质。在图 20 中也示出了 Fab 臂 4331 的 VH 序列。在一个优

选的实施方式中,根据本发明的双特异性的 IgG 抗体包含与 Fab 臂 4331 的该 VH 至少 90% 相同的 VH 序列。因此,还提供了根据本发明的双特异性 IgG 抗体,其中特异性识别 CLEC12A 或其功能等同物的臂包含由与序列

[0044] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVT
MTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGNYGDEFDYGWQGTLVTVSS

[0045] 至少 90%, 优选至少 95%, 更优选至少 97%, 更优选至少 98%, 更优选至少 99% 或甚至 100% 相同的序列组成的 VH 序列。如实施例所示,根据本发明的包含 Fab 臂 4331 的 VH 序列以及识别 CD3 的 Fab 臂的 VH 序列(连同共有轻链)之根据本发明的双特异性抗体具有诱导 T 细胞介导的 CLEC12A 阳性 AML 肿瘤细胞裂解的优异能力。

[0046] 另一个优选的实施方式提供了根据本发明的双特异性 IgG 抗体,其中特异性识别 CLEC12A 或其功能等同物的臂包含以下序列:由与 SGYTFTGY 至少 90% 相同的序列组成的重链 CDR1 序列、由与 WINPNSGG 至少 90% 相同的序列组成的重链 CDR2 序列以及由与 DGYFADAFDY 至少 90% 相同的序列组成的重链 CDR3 序列。优选地,所述重链 CDR1、2 和 3 由与所列举的 CDR 序列至少 95%, 更优选至少 97%, 更优选至少 98%, 更优选至少 99% 相同的序列所组成。此外,通常,允许与所列举的 CDR 序列相比有 1、2 或 3 个氨基酸残基的变化,同时保持相同种类的结合活性(在性质上,未必在数量上)。因此,所述重链 CDR1、2 和 3 序列优选包含偏离所列举的 CDR 序列不超过 3 个,优选不超过 2 个,更优选不超过 1 个氨基酸的序列。在一个特别优选的实施方式中,所述重链 CDR1、2 和 3 的序列与所列举的 CDR 序列相同。如在实施例中所示,所列举的 CDR 序列是抗体 3918 的 VH 的 CDR 序列,其也具有好的 CLEC12A 结合性质。在图 20 中也示出了抗体 3918 的 VH 序列。在一个优选的实施方式中,根据本发明的双特异性 IgG 抗体包含与抗体 3918 的该 VH 至少 90% 相同的 VH 序列。因此,还提供了根据本发明的双特异性抗体,其中特异性识别 CLEC12A 或其功能等同物的臂包含由与序列

[0047] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVT
MTRDTSISTAYMELSRSLRSDDTAVYYCARDGYFADAFDYWGQGTLVTVSS

[0048] 至少 90%, 优选至少 95%, 更优选至少 97%, 更优选至少 98%, 更优选至少 99% 或甚至 100% 相同的序列组成的 VH 序列。如实施例中所示,包含 Fab 臂 3918 的 VH 序列以及识别 CD3 的 Fab 臂的 VH 序列(连同共有轻链)之根据本发明的双特异性抗体具有诱导 T 细胞介导的 CLEC12A 阳性 AML 肿瘤细胞裂解的良好能力。

[0049] 在另一个优选的实施方式中,提供了根据本发明的双特异性 IgG 抗体,其中第二臂特异性识别 CD3 并且包含以下序列:由序列 SYGMH 组成的重链 CDR1 序列、由序列 IIWYSGSKKNYADSVK 组成的重链 CDR2 序列以及由序列 GTGYNWFD 组成的重链 CDR3 序列。优选地,所述 CD3 特异性的臂包含由序列

[0050] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCLASGFTFRSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYSGSKKNYADSVKGRFT
ISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGTGYNWFDPWGQGTLVTVSS

[0051] 组成的 VH 序列。所列举的 CDR 序列和 VH 序列是抗体 3896 的序列。在图 20 中也描述了这些序列。包含这些 CD3 特异性 CDR 序列和 / 或 Fab 臂 3896 的所列举的 VH 序列的重链优选用于根据本发明的双特异性抗体,因为这些序列为双特异性抗体提供了对于表达 CD3 之免疫细胞的最佳亲和力,同时使得足以与 CLEC12A 阳性 AML 肿瘤细胞相结合。不希

望受限于理论,认为双特异性抗体的总体效果是由一条臂对抗原 1 的亲合力与另一条臂对抗原 2 的亲合力的组合效果来确定的。对于本发明的对 CLEC12A(或其功能等同物)和在免疫效应细胞上的抗原(优选 CD3)具有特异性的抗体,优选结合至 CD3⁻阳性免疫细胞和表达 CLEC12A 的肿瘤细胞的最佳时间以有效地诱导 T 细胞介导的 CLEC12A 阳性肿瘤细胞的裂解。假设 CLEC12A/CD3 双特异性抗体的亲合力之间的平衡是非常重要的。认为对于 CD3 显著较高的亲合力与对于 CLEC12A 低得多的亲合力(即对于 CD3 过高的亲合力)将导致其中抗体将主要与表达 CD3 的 T 细胞结合的情况。这样的“装载双特异性抗体”的 T 细胞可内在化其 CD3 或者可以侵入组织,从而甚至在它们遇到 CLEC12A⁻阳性肿瘤细胞之前离开循环。这会降低双特异性抗体的治疗效果。

[0052] 以一种更加有利的作用方式,CLEC12A⁻阳性肿瘤细胞首先由根据本发明的一种或更多种双特异性抗体所结合,当 T 细胞由双特异性抗体游离的 CD3 臂吸引后,随后发生 T 细胞活化。或者,CD3 阳性 T 细胞和 CLEC12A⁻阳性肿瘤细胞基本上同时被双特异性抗体所结合。因此,优选地选择或调节对于 CLEC12A(或其功能等同物)和免疫效应细胞上的抗原(优选 CD3)两者的亲合力,使得达到正确的平衡,即所得到的双特异性抗体将基本上同时与 CLEC12A 和 CD3 结合或双特异性抗体具有与 CLEC12A 阳性肿瘤细胞结合至足够程度的趋势,当 T 细胞的活化发生后,肿瘤细胞裂解。根据本发明,优选通过使具有 Fab 臂 3896(其为 CD3 特异性)之 CDR 序列的 VH(或整个 VH 序列)与具有 Fab 臂 4327 或 4331 或 3918 或 3116(其为 CLEC12A 特异性)之 CDR 序列的 VH(或整个 VH 序列)组合来实现 CD3 和 CLEC12A 结合亲合力之间这种优异的平衡。这样得到的双特异性抗体显示了 CD3 和 CLEC12A 结合亲合力之间的有利平衡,从而使 T 细胞和 CLEC12A 阳性 AML 肿瘤细胞有效地集合在一起,并且最佳地诱导 T 细胞介导的 CLEC12A 阳性 AML 肿瘤细胞的裂解。

[0053] 如前文所述,优选提供了根据本发明的双特异性 IgG 抗体,其中两条臂都包含共有轻链可变结构域。特别优选的共有轻链是人重排的 κ 轻链 IgV κ 1-39 * 01/IgJ κ 1 * 01,又名 012。在图 20 中也描述了 012VL 的核苷酸序列和氨基酸序列。CDR 序列以粗体和下划线表示。因此,优选含有至少包含 012 之 CDR 序列的共有轻链的根据本发明的双特异性抗体。因此,本发明的一个方面提供了根据本发明的双特异性 IgG 抗体,其中,第一臂和第二臂还包含以下序列:由与 RASQSISSYLN 至少 90%相同的序列组成的轻链 CDR1 序列、由与 AASSLQS 至少 90%相同的序列组成的轻链 CDR2 序列以及由与 QQSYSTPPT 至少 90%相同的序列组成的轻链 CDR3 序列。优选地,所述轻链 CDR1、2 和 3 序列由与所列举的 CDR 序列至少 95%,更优选至少 97%,更优选至少 98%,更优选至少 99%相同的序列所组成。此外,通常,允许与所列举的 CDR 序列相比有 1、2 或 3 个氨基酸残基的变化。因此,所述轻链 CDR1、2 和 3 序列优选包含偏离所列举的 CDR 序列不超过 3 个,优选不超过 2 个,更优选不超过 1 个氨基酸的序列。在一个特别优选的实施方案中,所述轻链 CDR1、2 和 3 序列与所列举的 CDR 序列相同。在一个优选的实施方案中,根据本发明的双特异性 IgG 抗体包含与 012VL 链至少 90%相同的 VL 序列。因此,还提供了根据本发明的双特异性抗体,其中第一臂和第二臂包含由与序列

[0054] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK

[0055] 至少 90%,优选至少 95%,更优选至少 97%,更优选至少 98%,更优选至少 99%或

甚至 100% 相同的序列所组成的 VL 序列。

[0056] 本文中术语“%相同的”定义为在比对两个序列和引入空位（如果必要的话）以获得最大相同百分比之后，与参考序列中的残基相同的候选氨基酸序列中的残基的百分比。比对的方法和计算机程序是本领域中公知的。一种目的在于确定候选序列是否属于这一定义范围内之可使用或可改编的计算机程序是“Align 2”，其由 Genentech 公司创造，已于 1991 年 12 月 10 日与用户文档（user documentation）一起提交美国版权局，Washington, D. C. 20559。

[0057] 根据本发明定义的双特异性全长 IgG 抗体具有两个不同的抗原结合位点，但 IgG 的 Fc 区还包含 Fc 受体的第三结合位点。如果细胞携带 Fc 受体和一种双特异性抗体的靶标两者，Fc 受体和所述细胞表面上的靶标可能发生交联，这可能会导致不期望的效果。在一个优选的实施方案中，本发明提供了根据本发明的双特异性全长 IgG 抗体，其中所述双特异性 IgG 抗体具有突变的下铰链和 / 或 CH2 结构域，使得所述双特异性 IgG 抗体与 Fc γ 受体的相互作用显著降低。如本文所使用的术语“使得所述双特异性 IgG 抗体与 Fc γ 受体的相互作用显著降低”意指如果这样的 Fc γ 受体存在于所述抗体的附近，那么所述双特异性 IgG 抗体与 Fc γ 受体相互作用的能力降低。因此，根据本发明，使抗体的区域（优选抗体的下铰链和 / 或 CH2 结构域）突变（通常通过表达编码其的突变核酸序列），由此与 Fc 受体相互作用的能力被减弱。优选与 Fc 受体的相互作用基本上被消除。之前已经对参与结合 Fc γ 受体的人 IgG1 中的氨基酸残基进行了作图（map）。除了当改变时仅提高了对特定受体的结合或同时提高了对一种类型的受体的结合而降低了对另一种类型的受体结合的残基，发现几个消除了与一种或更多种受体结合的残基（Shields RL 等，JBC. 2001 (276) 6591-6604；Armour 等，Mol. Immunol. 2003 (40) 585-593）。在另一个优选的实施方案中，所述突变的下铰链和 / 或 CH2 结构域在 235 和 / 或 236 位氨基酸（根据 Kabat 编号）包含至少一个替换。优选地，235 和 236 位氨基酸两者都被替换。在实施例表明在这些位置的替换基本上能够防止双特异性抗体与存在于肿瘤细胞上的 Fc 受体之间的相互作用。特别地，表明了替换 L235G 和 / 或 G236R 非常适合于该目的。因此，本文还提供了根据本发明的双特异性 IgG 抗体，其中所述突变的 CH2 和 / 或下铰链结构域包含替换 L235G 和 / 或 G236R。优选地，L235G 和 G236R 两者都被替换。或者，本领域技术人员可引入包含替换 234F、235E 和 / 或 331S 的下铰链和 / 或 CH2 结构域突变（Oganessian 等，Biol. Crystall. 2008 (D64) 700）。优选地，所有的三个替换是在该替选方案中引入的。

[0058] 在我们的美国临时申请 61/635,935 中，其已被美国正式申请 No. 13/866,747 和 PCT 申请 No. PCT/NL2013/050294（通过引用并入本文）所跟进，我们公开了用于从单个细胞产生双特异性抗体的方法和手段，从而提供了相对于单特异性抗体的形成，更有利于双特异性抗体的形成的手段。这些方法也可有利地用于本发明。因此，本发明提供了用于从单个细胞产生根据本发明的双特异性全长 IgG 抗体的方法，其中所述双特异性全长 IgG 抗体包含能够形成界面的两个 CH3 结构域，所述方法包括在所述细胞中提供：a) 编码第一含 CH3 结构域之多肽链的第一核酸分子，b) 编码第二含 CH3 结构域之多肽链的第二核酸分子，其中所述核酸分子具有用于使所述第一含 CH3 结构域之多肽与所述第二含 CH3 结构域之多肽优先配对的手段，所述方法还包括培养所述宿主细胞以及允许所述两种核酸分子表达并且从培养物收获所述双特异性全长 IgG 抗体的步骤。所述第一核酸分子和第二核酸分子可以

是相同载体或基因递送载剂的一部分,并且可以被整合到宿主细胞基因组的相同位点上。或者,将所述第一核酸分子和第二核酸分子分开提供给所述细胞。

[0059] 一个优选的实施方案提供了用于从单个细胞产生根据本发明的全长双特异性 IgG 抗体的方法,其中所述双特异性抗体包含能够形成界面的两个 CH3 结构域,所述方法包括提供:

[0060] - 这样的细胞,所述细胞具有 a) 编码特异性识别 CLEC12A 且包含第一 CH3 结构域之 IgG 重链的第一核酸序列;和 b) 编码特异性识别免疫效应细胞上的抗原(优选 CD3)且包含第二 CH3 结构域之 IgG 重链的第二核酸序列,其中所述核酸序列具有用于使所述第一 CH3 结构域和第二 CH3 结构域优先配对的手段,所述方法还包括培养所述细胞以及允许所述两种核酸序列表达并从培养物收获所述双特异性 IgG 抗体的步骤。在一个特别优选的实施方案中,所述细胞还具有编码共有轻链的第三核酸序列。如上所述,优选的共有轻链是 012,优选重排的种系人 κ 轻链 IgV κ 1-39 * 01/IGJ κ 1 * 01。基本上仅产生双特异性全长 IgG 分子的优选突变是第一 CH3 结构域中的氨基酸替换 L351K 和 T366K(根据 Kabat 编号)以及第二 CH3 结构域中的氨基酸替换 L351D 和 L368E,或反之亦然。因此,还提供了根据本发明用于产生双特异性 IgG1 抗体的方法,其中所述第一 CH3 结构域包含氨基酸替换 L351K 和 T366K(根据 Kabat 编号)并且其中所述第二 CH3 结构域包含氨基酸替换 L351D 和 L368E,所述方法还包括培养所述细胞以及允许所述核酸序列表达并且从培养物收获所述双特异性抗体的步骤。还提供了根据本发明用于产生双特异性 IgG1 抗体的方法,其中所述第一 CH3 结构域包含氨基酸替换 L351D 和 L368E(根据 Kabat 编号)并且其中所述第二 CH3 结构域包含氨基酸替换 L351K 和 T366K,所述方法还包括培养所述细胞以及允许所述核酸序列表达并且从培养物收获所述双特异性抗体的步骤。可通过这些方法生产的抗体也是本发明的一部分。

[0061] 本发明还提供了包含根据本发明的双特异性 IgG 抗体和可药用载体的药物组合物。如本文所用的,这样的“可药用载体”包括生理上相容的任何和所有的溶剂、盐、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。根据施用的途径(例如,静脉内、皮下、关节内等),活性化合物可被包被在材料中以保护化合物免受酸和其他可失活所述化合物的天然条件的作用。

[0062] 根据本发明的抗体和药物组合物可用于治疗多种骨髓来源的白血病和白血病前期疾病,以及 B 细胞淋巴瘤。可根据本发明治疗的疾病包括髓性白血病或白血病前期疾病例如 AML、MDS 和 CML 以及霍奇金淋巴瘤和大多数非霍奇金淋巴瘤。因此,本发明提供了根据本发明的双特异性全长 IgG 抗体在治疗骨髓增生异常综合征(MDS)、慢性髓性白血病(CML)或优选急性髓性白血病(AML)中用作药物。还提供了根据本发明的双特异性 IgG 抗体在制备用于治疗或预防骨髓增生异常综合征(MDS)、慢性髓性白血病(CML)或优选急性髓性白血病(AML)的药物中的用途。

[0063] 待向患者施用的根据本发明的抗体的量通常在治疗窗(therapeutic window)中,这意味着使用足够的量用于获得治疗效果,然而量不能超过导致不可接受程度之副作用的阈值。需要用于获得期望治疗效果的抗体的量越低,治疗窗通常越大。因此,优选在低剂量下发挥足够治疗效果的根据本发明的抗体。

[0064] 在欧洲和美国,每年大约有 30,000 患者被诊断为患有急性髓性白血病(AML)。这

些患者大多数为 60 岁或更大年龄。较大的年龄是 AML 结果的主要负决定因素并且强化治疗的老年 AML 患者的长期生存 (5 年) 为约 10%。在诱导化疗后,在几乎所有的已经实现缓解的患者中,在 3 年内观察疾病进展。目前的缓解后治疗已经在患有 AML 的老年患者中显示出有限的值 (如果有的话)。因此,保留显著负荷的残留抗性白血病而且存活的抗药性白血病细胞亚群迅速产生复发。需要具有完全不同作用方式的新型药物来靶向这些化疗无响应的 AML 肿瘤细胞以努力地诱发和维持完全的缓解。虽然在超过 50% 的稍老 AML 患者和约 80% 的稍年轻患者中可用许多加强化疗组合来实现完全缓解 (CR),但是响应或存活率的提升仍然是重要的研究挑战。在一项最近发表的患有 AML 的老年患者之 65 个随机临床试验 (15,110 位患者) 的网络元分析中,大多数修正的研究诱导方案相比于具有柔红霉素和阿糖胞苷的常规 3+7 诱导方案具有类似或甚至更差的效力谱。AML 的这种标准治疗与高发病率以及甚至死亡率相关。由于化疗后剩余的白血病干细胞,大多数患者在 CR 中复发。由于不可接受的毒性,进一步剂量强化受到限制。因此,迫切需要特别在患有 AML 的老年患者中出现优选的具有较小毒性的新治疗方式。

[0065] 可通过使用双特异性抗体使得来自患者自身免疫系统的 T 细胞与 AML 肿瘤细胞衔接来实现化疗无响应的 AML 治疗。以这种方式,患者的免疫系统被加强并重新靶向以攻击和根除 AML 肿瘤细胞。本发明提供了有效诱导 AML 肿瘤细胞裂解的 CD3×CLEC12A 双特异性 IgG 抗体。因此,CD3×CLEC12A 双特异性抗体是特异性根除白血病干细胞以改善 AML 患者预后的几乎无副作用的靶向治疗。因为 CLEC12A 在白血病干细胞 (LSC) 上表达而不在正常的造血干细胞上表达,所以针对此抗原 (如已在体外示出) 的治疗将根除 LSC 同时不伤害 (spare) 正常的干细胞。最可能其将会在微小残留病 (Minimal Residual Disease, MRD) 的情况下具有最大的影响。期望的是,由于 MRD 的根除,复发百分比将会下降。因此,这种新的治疗方式对 AML 患者的影响将是具有较小的复发百分比的毒性较低的治疗,导致了与更好的生活质量相关的改善结果。在复发的 AML 患者中对这些全长 IgG 双特异性抗体进行临床评价。使用在骨髓中 AML 母细胞的减少作为客观响应标准对临床功效进行分析。对于目前还没有可用治疗的大部分患者 (patient segment),AML 的有效双特异性 IgG 提供了一种新的治疗选择。除了提供实现持久缓解的手段外,当在缓解期间施用该治疗选择还具有 AML 的治愈潜力。

实施例

[0066] 实施例 1:候选 CD3×CLEC12 双特异性 IgG1 的产生与功能表征为了证实实用双特异性全长 IgG 将免疫效应细胞靶向至异常细胞的概念,产生了候选 CD3×CLEC12A 双特异性 IgG1,其中 CD3 和 CLEC12A 的 Fab 臂衍生自先前所描述的抗体。在 CD3Fab 臂上,使用来自抗 -CD3 抗体 15C3 (如在 W02005/118635 中公开的一种 CD3 特异性抗体) 的 VH 区,该 VH 被称为 '3056'。在 CLEC12A Fab 臂上,使用来自 scFv SC02-357 (如在 W02005/000894 中公开的一种 CLEC12A 特异性抗体) 的 VH 区 (以下称为 'CLEC12A 基准 [Fab 臂或抗体]';或者,该 VH 被称为 '3116')。在图 20 中提供了这种候选分子的 CD3 臂 VH(3056) 的核苷酸序列和氨基酸序列以及 CLEC12A 臂 VH(3116) 的核苷酸序列和氨基酸序列,这种候选分子被称为候选 3056×3116。在图 20 中还提供了共有 VL(huV κ 1-39 ;012) 的核苷酸序列和氨基酸序列。

[0067] 使用本领域中已知的用于产生双特异性 IgG1 的方法 (Gunasekaran 等 JBC 2010(285)19637-19646 ;W02009/089004) 将各个 VH 区连同重排的人 IGKV1-39/IGKJ1(huV κ 1-39) 轻链克隆到表达载体中。先前表明 huV κ 1-39 能够与超过一条重链进行配对,从而产生具有不同特异性的抗体,这有利于双特异性分子的产生 (De Wildt RM 等, J. Mol. Biol. 1999(285)895901 ;De Kruif 等, J. Mol. Biol. 2009(387)548-58 ;W02009/157771)。

[0068] 首先,通过流式细胞术证明了候选 3056 \times 3116CD3 \times CLEC12A 双特异性 IgG1 与 HPB-ALL 细胞上 CD3 ϵ 的结合,其根据本领域已知的标准程序进行(表 1)。使用转染有 CD3 δ/ϵ 或 CD3 γ/ϵ 的 CHO 细胞证实了与表达 CD3 ϵ 细胞的结合。使用转染有 CLEC12A 表达构建体的 CHO 细胞确定了候选 3056 \times 3116 双特异性 IgG1 与 CLEC12A 的结合;CD3 单特异性抗体 (3056 \times 3056) 和 CLEC12A 单特异性抗体 (3116 \times 3116) 以及不相关的 IgG1 同种型对照 mAb 作为对照。

[0069] 表 1 :通过流式细胞术的与表达 CD3 和 CLEC12A 之细胞的结合。

[0070]

IgG	HPB-ALL 细胞*	CLEC12A-转染的 CHO 细胞*
候选 3056 \times 3116 CD3 \times CLEC12A	6216	5299
CD3	6899	282
CLEC12A	199	4147
同种型对照	34	289

[0071] * 以平均荧光强度给出结果。

[0072] 通过表面等离子共振 (BIAcore) 来确定候选 3056 \times 3116 双特异性 IgG1 对 CD3 δ/ϵ 和 CLEC12A 之胞外结构域的亲和力测量。简言之,使用游离胺化学将纯化的重组抗原共价偶联至 CM5 传感器芯片的表面:在 kAc 缓冲液中将抗原稀释至 10 μ g/mL 并偶联至用 NHS/EDC 活化的表面(根据制造商的建议)。为了确定存在于双特异性抗体中的 Fab 臂的亲和力,在 HEPES 缓冲盐水 (HBS) 中将它们连续稀释至 100nM、50nM、20nM、10nM、1nM 和 0.1nM 并以高 (30 μ L/分钟) 流速流过 CM5 传感器芯片的抗原偶联表面(以防止重新结合)。使用流动池 (flow cell) 1 (FC1) 作为对照 (空白) 表面并且从其他流动池 (FC) 所测量的响应中减去从该表面产生的响应 (传感图 (sensor gram))。对于被双特异性抗体识别的两种不同的抗原使用 FC2 和 FC3 以能够在所有三个表面之上运行的单动力学中测量两条 Fab 臂的亲和力。因为当抗体流过抗原偶联的表面时,抗体的浓度并没有显著改变,所

以同时测量了双特异性抗体识别的两种不同抗原上它们的结合率 (on-rate) (其为浓度依赖性的)。由此获得了不同双特异性蛋白的缔合和解离相的传感图。使用 BIA 评估软件和采用 1 : 1 相互作用模型 (对于单价相互作用) 的曲线拟合, 测定了 Fab 臂的亲合力。在双特异性蛋白与传感器芯片之抗原包被的表面的结合被破坏的情况下 (即, 当结合很少蛋白质时, 导致了低响应和 / 或非常快的解离率 (off-rate)), 实验的设置是相反的: 使用游离胺化学将双特异性抗体共价偶联到传感器芯片的表面并将重组的纯化抗原以高 (30 μ L/分钟) 流速流过所述表面以测量 Fab 臂对该抗原的亲合力。

[0073] 接着, 测试了候选 3056 \times 3116CD3 \times CLEC12A 双特异性 Ig 的功能。首先, 用健康供体静息 T 细胞研究了 T 细胞的刺激能力。简言之, 在知情同意后, 从健康供体获得外周血。通过标准密度梯度分离来分离 T 细胞以富集外周血单核细胞 (PBMC), 接着使用磁珠 (全 T 细胞试剂盒, Miltenyi Biotec 目录号 130-091-155) 进行阴性选择。使用这种纯化策略, T 细胞是所谓的“未接触的 (untouched)” (即, 不被抗体染色的, 所谓的“静息 T 细胞”) 来限制预活化的可能性。随后在 10% 胎牛血清 (FBS) 或 10% 正常人血清 (HS) 中用来自白血病衍生的 HL60 细胞系的细胞以效应细胞 : 靶细胞 10 : 1 的比孵育纯化的静息 T 细胞两天。结果表示为 CD4 阳性或 CD8 阳性 T 细胞群中 CD69 阳性或 CD25 阳性细胞的百分比。

[0074] 二价的 CD3IgG 和 CD3 \times CLEC12A 双特异性 IgG 抗体两者都有效地诱导 CD4 阳性和 CD8 阳性 T 细胞上的 T 细胞活化标志物 CD69 和 CD25 的上调 (图 2)。在存在不阻断存在于 HL60 细胞上之 Fc 受体的 FBS 的情况下 (Liesveld 等, 1988, J. Immunol. 140 (5), 第 1527-1533 页), 对照双特异性分子 CD3 \times 同种型对照 IgG 也显示出诱导 T 细胞活化。在 HS 存在时这种效果被削弱, 表明观察到的由单价 CD3 结合的 CD3 \times 同种型对照 IgG 的 T 细胞活化依赖于 Fc 的交联。然而, 由候选 3056 \times 3116CD3 \times CLEC12A 双特异性 IgG 诱导的 T 细胞活化仅部分依赖于 Fc 的相互作用, 因为在 HS 存在时, 大部分保留了上调 CD69 和 CD25 的效力 (图 2)。这表明在与其他 Fab 臂结合后当结合分子桥接到 HL60 靶细胞上的 CLEC12A 抗原时, 单价 CD3 结合的固有效力足以活化 T 细胞。

[0075] 为了研究由候选 3056 \times 3116CD3 \times CLEC12A 双特异性 IgG 引起的 T 细胞活化的程度是否足以诱导靶细胞裂解, 在此测定中, 用羧基荧光素双乙酸琥珀酰亚胺酯 (CFSE) 标记 HL60 细胞并以多种效应细胞 : 靶细胞的比与 T 细胞进行共培养。在一天、两天或三天之后, 通过流式细胞术对存活的 CFSE 阳性 HL60 细胞进行定量。结果表示为 PBS 相关之特异性裂解的百分比。

[0076] 正如所预期的, CD3 单特异性二价 IgG 诱导了静息 T 细胞介导的 HL60 细胞的杀伤 (图 3)。出人意料的是, CD3 \times CLEC12A 双特异性单价 IgG 和对照 CD3 \times 同种型对照也诱导了静息 T 细胞介导的 HL60 细胞的杀伤。当不存在过量的人 IgG, 即当不阻断 HL60 靶细胞上的 Fc 受体的情况下进行测定时, 这些效果最显著 (FBS 条件; 图 3)。出人意料的是, 即使在存在过量的人 IgG (10% 的 HS 条件) 时, CD3 \times CLEC12A 双特异性 IgG 在杀伤 HL60 细胞中也非常有效, 表明诱导 HL60 裂解不依赖于与 Fc γ 受体的相互作用。在第 3 天, 还观察到 CD3 \times 同种型对照诱导的 HL60 裂解, 可能是由于经延长的孵育期后, 不完整的 Fc γ 受体阻断。HL60 靶细胞的杀伤随不同的效应细胞 : 靶细胞比而变化 (图 4)。

[0077] 总之, 本实施例证明了 CD3 \times CLEC12A 双特异性分子是 T 细胞介导的肿瘤细胞裂解的有效诱导物, 并且证实了我们的假设, 即有效地杀伤异常细胞的 T 细胞衔接可通过

CD3×CLEC12A 全长 IgG1 双特异性抗体来介导。出人意料的是,由 CD3×CLEC12A 双特异性 IgG 诱导的活性不依赖于 Fc γ 受体的相互作用。为了延长 CD3×CLEC12A 双特异性全长 IgG 的组以达到最终的临床候选,产生了 CD3 Fab 臂和 CLEC12A Fab 臂的组。通过使用在当前实施例示出的来自候选 3056×3116CD3×CLEC12A 双特异性 IgG 之各自的 Fab 来固定另一条臂以完成对 CD3 和 CLEC12A Fab 臂的特异性和功能的证实。

[0078] 实施例 2 :CD3×CLEC12 bsAb 之 CD3 Fab 臂的产生和表征

[0079] 实施例 1 表明 CD3×CLEC12A 双特异性分子可以是 T 细胞介导的肿瘤细胞裂解的有效诱导物。因此,为了产生更大量的这种双特异性分子的组,产生了 CD3 结合物以及 CLEC12A 结合物的单独组。

[0080] 为了产生 CD3 结合物的组,通过用以下多种形式的 CD3 ϵ 对具有 huV κ 1-39 轻链 (WO2009/157771) 和人重链 (HC) 微小基因座 (minilocus) 之转基因的小鼠进行免疫接种以产生 CD3 ϵ 特异性 VH 区:(1) 可被融合偶联至本领域中已知的载体分子(例如人 IgG-Fc 或 His- 标签)的分离的 CD3 δ/ϵ 或 CD3 γ/ϵ , 有或没有佐剂,(2) 表达 CD3 δ/ϵ 或 CD3 γ/ϵ 的细胞,或(3) 编码 CD3 δ/ϵ 或 CD3 γ/ϵ 的 DNA 构建体,或这些策略的组合。从通过 ELISA 和/或流式细胞术测定显示了足够的抗原特异性效价的免疫小鼠中,收获脾和/或淋巴结,由此产生 Fab 噬菌体文库。或者,通过深度测序 VH 区序列直接衍生自脾和淋巴结材料(共同未决的美国临时申请 61/539, 116)。

[0081] 抗原特异性的 Fab 臂选自免疫小鼠的噬菌体文库或选自其中包含 huV κ 1-39 轻链的 VL 区和人 VH 区集合的合成噬菌体展示文库。为了产生合成文库,使用如在 De Kruif 等,1995, J Mol Biol 248(1), 第 97-105 页中描述的随机 CDR3 引物。在首轮中针对与可偶联到载体分子(见上文)之分离的 CD3 δ/ϵ 蛋白的结合,或与表达 CD3 ϵ 的细胞(例如 HPB-ALL 或与转染以表达 CD3 δ/ϵ 或 CD3 γ/ϵ 的细胞)的结合,或这些策略的组合选择来自这些文库的噬菌体。除去未结合的噬菌体并且将结合的噬菌体用酸性缓冲液洗脱,或用针对特定表位的抗体(例如用与食蟹猴 CD3 ϵ 交叉反应的抗体)将所选择的 Fab 库指向期望的特异性。然后将这些噬菌体转染到感受态细菌中,其在含有噬菌体细菌的选择压力下生长。在挑选了一些存活的细菌菌落后,营救(rescue)噬菌体并提交至下一轮选择。

[0082] 在完成选择后,通过流式细胞术筛选与表达抗原的细胞结合的剩余噬菌体并通过 ELISA 分离抗原。作为结合的阳性对照,使用本领域那些已知的基准 CD3 抗体,例如 OKT-3。将来自基本上所有噬菌体的核苷酸材料提交至菌落 PCR 以扩增 VH 区和测序 PCR(sequence PCR) 以确定 VH 区序列,所述噬菌体表现出与表达抗原之细胞的特异性结合。所得的序列基于它们 HCDR3 的独特性而被聚类。对于来自免疫小鼠的序列,其中可发生(有限的)体细胞超变,基于独特 VDJ 的可能性(即如果不同簇中的 HCDR3 含有 < 2 个氨基酸的差异,则认为它们是相同簇的部分并将其分到一起)将 VH 序列进一步分组。对于每个簇,每个簇的一个或几个 VH 区被选择克隆到载体中以 IgG 单特异性二价形式连同 huV κ 1-39 轻链中进行表达。随后,将确认的特异性与分离的抗原和表达抗原的细胞结合的 VH 区克隆到用于以 CD3×CLEC12A 双特异性形式表达的载体中。然后,表征它们以选择具有治疗潜力的候选物(参见以下实施例)。

[0083] 实施例 3 :CD3×CLEC12 bsAb 之 CLEC12 Fab 臂的产生和表征

[0084] 如实施例 1 证明的,CD3×CLEC12A 双特异性分子具有诱导 T 细胞介导的肿瘤细胞

裂解的效力,接下来我们希望建立更大量的此类双特异性分子的组。除了如实施例 2 中描述的 CD3 结合物的组之外,我们还产生了 CLEC12A 结合物的组。

[0085] 简言之,从含有重排的人 IGKV1-39/IGKJ1 VL 区和人 VH 区集的 Fab 合成噬菌体展示文库选择 CLEC12A 特异性 Fab 臂 (De Kruif 等, *Biotechnol Bioeng.* 2010 (106) 741-50)。在两轮中针对与 CLEC12A 的结合选择来自这些库的噬菌体。这是通过用偶联至包被到表面上之 His 标签 (Sino Biological, 目录号 11896-H07H) 的 CLEC12A 的胞外结构域 (氨基酸 75 至 275) 孵育来完成的。除去未结合的噬菌体,将结合的噬菌体进行化学洗脱并用来感染在含噬菌体细菌的选择压力下生长的细菌。在挑选了一些存活的细菌菌落后,营救噬菌体并提交至下一轮的选择和繁殖。

[0086] 在完成选择之后,通过流式细胞术筛选与肿瘤细胞系 HL60 上表达的 CLEC12A 结合的剩余噬菌体。作为结合的阳性对照,使用 CLEC12A 基准抗体。将来自基本上所有噬菌体的核苷酸材料提交至菌落 PCR 以扩增 VH 区和测序 PCR 以确定 VH 区序列,所述噬菌体表现出与表达 CLEC12A 之细胞的特异性结合。所得的序列基于它们 HCDR3 的独特性而被聚类。来自每个独特 HCDR3 簇的 VH 区被克隆到用于以 IgG 单特异性或双特异性形式连同重排的人 IGKV1-39/IGKJ1 LC 表达的载体中。

[0087] 三个选择的具有独特 HCDR3 序列的 CLEC12A 结合分子表现出以 IgG 形式的所需谱,其包括下列特征 (表 2 和数据未示出):

[0088] 与分离的 CLEC12A 胞外结构域特异性地结合。

[0089] 与在肿瘤细胞系上表达的 CLEC12A 特异性地结合。

[0090] 确认人 PBMC 上髓系特异性的表达模式。

[0091] 表 2 :CLEC12A Fab 臂的表征。

[0092]

Fab	CDR3 长度	与 包 被 的 CLEC12A 结 合*	与 表 达 CLEC12A 的 细胞结合 **	表 位 与 CLEC12A 基 准的竞争***
CLEC12A 基准	9	1.422	1467	-
3918	10	1.253	899	是
4327	9	1.307	1559	否
4331	9	1.328	1106	是

[0093] * 在ELISA中测试,以2 μ g/mL包被的CLEC12A(Sino Biological)的胞外结构域,以光密度(同种型对照背景信号:0.127)给出结果。

[0094] ** 通过流式细胞术对具有优化的IgG浓度的HL60细胞进行测试,以平均荧光强度(同种型对照背景信号:116)给出结果。

[0095] *** ELISA中以Fab形式的测试,以20 μ g/mL针对基准IgG。

[0096] 实施例4:CD3 \times CLEC12 bsAb之功能 CLEC12 Fab臂的选择

[0097] 随后在具有新CD3 Fab臂作为固定臂的双特异性IgG形式中表达如实施例3中所描述之选定的CLEC12A Fab臂。这个新的CD3 Fab臂,称为“3896 CD3 IgG”或简称“3896”,其也使用huV κ 1-39轻链。图20中描述了这种CD3特异性VH候选3896的核苷酸序列和氨基酸序列。因此,表达的多种双特异性CD3 \times CLEC12A分子均具有相同的3896抗CD3臂但CLEC12A臂不同(CLEC12A基准臂或候选CLEC12A Fab臂4327、4331或3918中的任一)。然后,在如实施例1中所述的靶细胞裂解测定中对这些CD3 \times CLEC12A双特异性分子进行功能测试。结果表示为同种型对照相关的特异性裂解的百分比。所有的候选CLEC12A Fab臂都表现了双特异性形式的HL60靶细胞的剂量依赖性特异性裂解,与使用CLEC12A基准Fab臂具有类似的或更好的动力学(图5)。

[0098] 另外,虽然对于相同的程度的特异性裂解需要高1 log的浓度,但是CD3 \times 同种型对照bsAb示出了剂量依赖性的靶细胞裂解。尽管通过添加HS,存在过量的人IgG,此单价CD3 IgG的杀伤活性仍然明显,可能是通过Fc介导的交联。如由实施例7清楚地,这个靶标的非特异性裂解确实可以通过CH2改造沉默Fc受体的相互作用而完全消除。

[0099] 实施例5:使用AML T细胞和/或AML肿瘤细胞之CD3 \times CLEC12产物候选物的效力

[0100] 实施例 1 和 4 证明了使用 CD3 Fab 臂 3056 或 3896 和使用 CLEC12A Fab 臂候选物 4327、4331 或 3918 或 CLEC12A 基准 Fab 臂 3116 之 CD3×CLEC12A 双特异性 IgG 在诱导由健康供体静息 T 细胞介导的 HL60 靶细胞裂解中的效力。在本实例中,研究 T 细胞是否衍生自 AML 患者(为 CD3×CLEC12A 双特异性药物的治疗应用中的一个主要指示),在用 CD3×CLEC12A 双特异性全长 IgG 刺激后,其可被刺激以杀伤肿瘤靶标。接着,确定来源于患者的 T 细胞在 CD3×CLEC12A 双特异性全长 IgG 刺激后是否可以杀伤自体 AML 肿瘤细胞母细胞。

[0101] 根据实施例 1 中所述的程序,从 AML 患者的外周血分离 T 细胞。然后,用 CFSE 标记的 HL60 细胞孵育纯化的来源于患者的 T 细胞并如实施例 1 中所述对细胞裂解进行监测。

[0102] 另外,用从相同患者分离的 AML 肿瘤母细胞进行 T 细胞介导的靶细胞裂解测定(Norde 等, Blood 2009 (113) 2312)。然后用 CFSE 标记分离的母细胞并在如 Norde 等所述的细胞因子混合物存在的情况下以及 CD3×CLEC12A 双特异性 IgG 或对照存在的情况下,与来源于患者的自体 T 细胞进行共培养。如实施例 1 中所述对靶细胞裂解进行监测。

[0103] 实施例 6 :在与 CD3×CLEC12A 双特异性 IgG 接触之后由 T 细胞释放细胞因子

[0104] 使用 T 细胞刺激性生物制品, T 细胞的过度刺激是有严重风险的,因为这可能会导致细胞因子释放综合征(Suntharalingam 等, 2006, New England J Med 355(10), 第 1018-1028 页 ;Chatenoud 等 1990, Transplantation 49(4), 第 697-702 页)。为了研究由 CD3×CLEC12A 双特异性 IgG 诱导的 T 细胞刺激的程度,研究了 T 细胞和表达 Fc 受体的靶细胞之共培养物中 T 细胞细胞因子的诱导。

[0105] 简言之,如实施例 1 中所述,在候选 3056×3116 CD3×CLEC12A 双特异性 IgG(1 μ g/mL) 或对照 IgG 存在的情况下,与 HL60 靶细胞共培养健康供体静息 T 细胞。两天之后,将上清液取样并使用人细胞因子人 10-Plex 面板(Invitrogen, 目录号 LHC0001)以本领域已知的 Lumincx 测定来测定细胞因子的产生水平。此面板覆盖了 10 种主要的 Th1 和 Th2 细胞因子。

[0106] 如预期的, CD3 单特异性二价 IgG 诱导 IFN γ 、TNF α 和 IL-2 的强产生(表 3),认为这主要驱动了细胞因子释放综合征。此外,通过与 CD3 IgG 进行孵育,增加了 IL-4、IL-6、IL-8 和 IL 10 的产生。与此相反, CD3×CLEC12A 双特异性 IgG 仅诱导 IL 8 生产至与 CD3IgG 类似的水平;其他细胞因子并没有通过双特异性 IgG 被显著诱导。在任何条件下 GM-CSF 都低于检测极限。

[0107] 表 3 :抗体诱导的 T 细胞细胞因子释放。

[0108]

细胞因子	CD3 IgG	CD3×CLEC12A IgG	CD3× 同种型对照
IFN γ	484.3 \pm 155.0	13.5 \pm 19.1	0.0 \pm 0.0
TNF α	85.8 \pm 23.1	14.5 \pm 1.4	4.6 \pm 1.1
IL-2	285.6 \pm 325.5	3.4 \pm 0.8	1.7 \pm 0.6
IL-4	23.6 \pm 3.7	10.2 \pm 0.2	7.3 \pm 1.3

IL-6	9.0±1.8	3.7±0.3	2.3±0.0
IL-8	1567.8±5.2	1280.1±118.4	359.6±183.6
IL-10	531.5±224.0	21.1±3.0	3.7±4.0
IL-1 β	4.4±0.4	3.3±0.1	2.5±0.1
IL-5	2.1±0.2	0.7±0.0	0.6±0.1

[0109] 结果以两个供体细胞因子的平均浓度 pg/ml \pm 标准差给出。

[0110] 这里示出的数据表明对于不同的 CD3 \times CLEC12A 双特异性 IgG 分子有利的治疗特性,因为它们有效地诱导靶细胞裂解(实施例 1 和 4),而没有触发如用 CD3 IgG 所观察到的 T 细胞分泌潜在有害量的促炎性细胞因子。

[0111] 实施例 7 :Fc 沉默对 CD3 \times CLEC12A bsAb 之体外效力的影响

[0112] 表明实施例 4 中示出的通过 CD3 \times 同种型对照 bsAb 的剂量依赖性靶细胞裂解是由 bsAb Fc 部分与 HL60 靶细胞上 Fc 受体的相互作用引起的。因为这种靶向非特异性细胞裂解还可通过与在靶细胞上或旁观者细胞(例如 NK 细胞)上的 Fc 受体的相互作用体内发生,所以采用 CH2/ 下铰链区的改造来诱导 Fc 介导的 bsAb 活性的沉默。

[0113] 为此,使用 235G 236R 双突变(DM ;DM-Fc)或 234F 235E 331S 三突变(TM, TM-Fc)检验了两种 Fc 突变策略。产生了具有 DM-Fc 或 TM-Fc 的 CD3 \times CLEC12A bsAb(3056 \times 3116)并通过流式细胞术证实了与表达 CLEC12A 的细胞结合,其与具有野生型 Fc 的 bsAb 有相同的强度(数据未示出)。接着,在 HL60 靶细胞裂解测定(参见实施例 1 和 4)中测试了这些 bsAb 和 CD3 \times 同种型对照 bsAb 的野生型、DM-Fc 和 TM-Fc 形式。结果表示为同种型对照相关的特异性裂解的百分比。

[0114] 通过 DM 或通过 TM 的 Fc 沉默对于 CD3 \times CLEC12A bsAb 诱导的 HL60 细胞特异性裂解的程度没有影响或只有轻微的影响(图 6)。然而,对于 CD3 \times 同种型对照 bsAb,诱导 HL60 细胞裂解的效力被 TM 显著降低,并甚至被 DM 进一步降低。

[0115] 这证明由 CH2/ 下铰链改造引起的 Fc 沉默通过产生高效且特异性募集效应细胞的双特异性 CD3 \times CLEC12A IgG1 形式进一步有助于异常细胞的靶向特异性杀伤,并减少由表达正常 Fc γ 受体的辅助细胞介导的潜在非特异性免疫活化。

[0116] 实施例 8 :Fc 沉默对于与 FcRn、CD16、CD32、CD64 和 C1q 结合的影响

[0117] 通过生物膜层干涉技术(Bio-Layer Interferometry, BLI, Octet QK, FortéBio)确定具有 WT Fc 或具有沉默的 DM-Fc 或 TM-Fc 之候选 3056 \times 3116CD3 \times CLEC12A bsAb 与人 FcRn 的结合。简言之,于室温下在含 1.0mg/ml BSA pH6.0 的 0.1M 磷酸盐缓冲液 /0.002% 吐温 20(FcRn 结合缓冲液)中,以 50 μ g/ml 的浓度将纯化的 CD3 \times CLEC12AWT Fc IgG1、DM-Fc IgG1 或 TM-Fc IgG1 捕获至 Protein L 传感器(FortéBio, 目录号 18-5085)。接着于室温下,以 FcRn 结合缓冲液中的 1 μ g/ml 浓度添加可溶人 FcRn(Sino Biological Inc, CT009-H08H)。使用 Octet QK 分析软件分析数据显示,在将 IgG 与 ProtL 传感器的结合归一化之后,随后具有 DM 或 TM 沉默 Fc 的 CD3 \times CLEC12A bsAb 与人 FcRn 的结合与具有野生型 Fc 尾的 CD3 \times CLEC12A bsAb 相当(图 7),因而 FC 沉默不会影响 FcRn 结合。

[0118] 通过生物膜层干涉技术 (BLI, Octet QK, FortéBio) 确定具有沉默 Fc 的 CD3×CLEC12A bsAb 与 CD16、CD32 和 CD64 的结合。方案简述如下:于室温下在 1×动力学缓冲液 (FortéBio 18-5032) 中以 50 μg/ml 的浓度将纯化的 CD3×CLEC12A WT Fc IgG1、DM-Fc IgG1 或 TM-Fc IgG1 捕获至 Protein L 生物传感器 (FortéBio, 目录号 18-5085)。随后于室温下,以动力学缓冲液 (FortéBio 18-5032) 中 1.0 μg/ml 的浓度添加重组的 CD16 (Sino Biological Inc, 10389-H08H1)、CD32 (Sino Biological Inc, 10374-H08H) 和 CD64 (Sino Biological Inc, 10256-H08H) 蛋白。使用 Octet QK 分析软件分析 Fc 受体与 bsAb 的结合。

[0119] 通过捕获 ELISA 测定具有沉默 Fc 的 CD3×CLEC12A bsAb 与人 C1q 的结合。为此,于 4℃ 下在 PBS 中将纯化的 CD3×CLEC12A WT Fc IgG1、DM-Fc IgG1 或 TM-Fc IgG1 以 25-0.012 μg/ml 的浓度范围包被在 Nunc-Immuno maxisorp F96 板上 (Nunc, 439454) 过夜。随后,在 ELISA 缓冲液 (2% MILK/PBST) 中以 2.0 μg/ml 添加人 C1q 抗体 (Quidel, A400)。然后使用绵羊抗人 C1q 多克隆 IgG (Meridian, K90020C) 和兔抗绵羊 HRP 缀合的多克隆 IgG (Southern Biotech, 6150-05) 使复合物可见。最后,开发使用 TMB 底物 (BD 51-2606KC/51-2607KC) 结合并且使用微板阅读器 (Multiskan EX, Thermo Electron Corporation) 量化 OD450。

[0120] 实施例 9:评估 CD3×CLEC12A 双特异性 IgG 的体内效力。

[0121] 使用表达荧光素酶的 HL60 细胞 (HL60(-Luc) 细胞) 进行动物的异种移植研究以确认并扩展使用 CD3×CLEC12A 双特异性 IgG1 的体外发现。更具体地,进行这些研究以确定有效剂量的稳态血浆浓度,将在设定 1 期临床评价的起始剂量中考虑到这点。为此,NOD/SCID 小鼠 (或相当的免疫受损小鼠) 经皮下注射一定量的活 HL60(-Luc) 细胞,其导致了在注射后两周内大多数动物中建立了皮下 HL60 肿瘤。在 HL60 (Luc) 接种的同时或在最初的肿瘤形成后,施用 5×10⁶ 或 1×10⁷ 人 PBMC。在施用 PBMC 的第 1 天以及 3、6 和 9 天后,以多个剂量水平静脉内施用 CD3×CLEC12A 双特异性 IgG 或对照单特异性 IgG 或对照双特异性 IgG。在初始 HL60 (Luc) 接种后 1 周对肿瘤尺寸进行评分。将每个组中肿瘤尺寸的算术平均值 (或者表示为肿瘤体积或总生物发光) 相对于时间作图。

[0122] 实施例 10:双特异性全长 IgG1 抗体 CD3×CLEC12A 在 Ia/Ib 期研究中的用途。

[0123] 最后领先的 CD3×CLEC12A 双特异性全长 IgG1 候选物被用于制造 GMP 级的材料以及在 AML 患者中进行临床评价。首先,进行产物候选物的正式的非临床安全性分析以建立首次在人研究中的安全起始剂量。此后,在复发性 and / 或难治性 AML 以及在不宜强化治疗的患者中进行开放 (open-label) 多中心剂量递增的 Ia/b 期试验,以探索静脉 (i. v.) 施用后 CD3×CLEC12A 双特异性 IgG 的安全性和耐受性。次要的评估指标 (endpoint) 包括药代动力学和药效学特征以及初步的效力分析。通过评估骨髓中 AML 母细胞的减少来评价总体反应率。根据单次 / 多次剂量的递增评估 Ia 期中的最大耐受剂量 (maximum tolerated dose, MTD)。在中期 PK 分析后,研究的 1b 期部分形成在 MTD 的剂量扩展队列 (dose extension cohort) 或形成给药频率的进一步探索。

[0124] 实施例 11:CD3×CLEC12A bsAb 诱导 T 细胞增殖的能力。

[0125] AML 患者的 T 细胞数目比诊断时 AML 母细胞的量低。众所周知活化后 T 细胞进行增殖从而导致了 T 细胞数目的增加。此外,在实施例 1 中我们已经证明了 CD3×CLEC12A bsAb 可以活化 T 细胞并且具有诱导 T 细胞介导的肿瘤细胞裂解的效力。我们假设用

CD3×CLEC12A bsAb 处理的 AML 患者受益于 CD3×CLEC12A 双特异性分子介导的 T 细胞活化后 T 细胞亚群的扩增,因为 T 细胞的增殖将导致效应 T 细胞的数目增加。为了证明 CD3×CLEC12A bsAb 体外诱导 T 细胞增殖,将静息 T 细胞进行纯化,用羧基荧光素双乙酸琥珀酰亚胺酯 (CFSE) 进行标记并在 CD3×CLEC12A bsAb 或对照 Ab 的存在下与自体 CLEC12A+ 单核细胞共培养。为了具体地研究没有非特异性 Fc γ 活化的 CD3×CLEC12A 诱导的 T 细胞增殖,使用如实施例 7 和 8 中描述的具有 DM-Fc 尾的 CD3×CLEC12A bsAb。作为对照,包括 CD3× 同种型对照 WT-Fc bsAb,CD3× 同种型对照 DM-Fc bsAb,具有 WT-Fc 的单克隆 CD3 和不相关的同种型对照 (具有 WT-Fc 的 IgG)。通过标准密度梯度分离来分离来自健康供体外周血的单核细胞和 T 细胞以富集外周血单核细胞 (PBMC),接着使用 CD14 微珠 (人 CD14 微珠, Miltenyi Biotec, 目录号 130-050-201) 对单核细胞进行 CD14 阳性选择,并且使用与针对其他白细胞的磁珠 (全 T 细胞分离试剂盒, Miltenyi Biotec, 目录号 130-096-535) 对未接触的 T 细胞进行阴性选择。全 T 细胞分离试剂盒使得分离静息 (未接触) 的 T 细胞 (即未用抗体染色) 以避免 T 细胞预活化的可能性。

[0126] 随后在具有 10% 正常人血清 (HS) 的培养基中以效应细胞:靶细胞为 5 : 1 的比值用纯化的单核细胞和 bsAb 孵育 CFSE 标记的纯化的静息 T 细胞 7 天。在第 7 天,通过流式细胞术测量作为 T 细胞增殖读出的 CFSE 信号的降低。结果表示为直方图中每个 CD3+、CD3+CD4+ 或 CD3+CD8+T 细胞的 CFSE 信号。

[0127] 阳性对照 CD3WT-FcAb 诱导 T 细胞增殖,然而具有 WT-Fc 的同种型对照 IgG 不诱导 T 细胞增殖 (图 8)。如所预期的,CD3× 同种型对照 WT-Fc bsAb 确实诱导 T 细胞增殖,但当与二价单特异性抗 CD3 IgG 对照相比时程度较低。相比之下,CD3× 同种型对照 DM-Fc bsAb 由于其沉默的 Fc 尾不诱导 T 细胞增殖。CD3×CLEC12A DM-Fc bsAb 也诱导由特异性桥接 CD3 与 CLEC12A 抗原所介导的所需 T 细胞增殖。

[0128] 这表明如以前证明的 CD3×CLEC12A bsAb 不仅能够靶特异性诱导 T 细胞介导的肿瘤裂解,而且还可以有效地诱导导致 T 细胞数目增加的靶特异性 T 细胞增殖。此外,这还证明了由 CH2/ 下铰链改造引起的 Fc 沉默不仅有助于靶特异性杀伤异常细胞,而且通过 CD3×CLEC12A DM-Fc bsAb IgG 靶特异性诱导 T 细胞增殖。

[0129] 实施例 12 :评估 CD3×CLEC12A 诱导来自 AML 患者的 T_{EMRA} 亚群的扩增。

[0130] 因为证明了 CD3×CLEC12 DM-Fc bsAb 的 T 细胞增殖的活化,所以我们接下来想研究 CD3×CLEC12A DM-Fc bsAb 是否能够诱导 AML 患者中 CD8+ 细胞毒性 T 细胞区室的增殖。已经认识到 CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞是介导肿瘤消退的主要效应因子 (Sluijter 等, 2010)。CD8+T 细胞可被分为四个亚群:幼稚细胞 (CCR7+CD45RA+), 中央记忆细胞 (T_{CM}, CCR7+CD45RA-), 效应记忆细胞 (T_{EM}, CCR7-CD45RA-) 和 CD45RA⁺ 效应记忆细胞 (T_{EMRA}, CCR7-CD45RA+)。研究表明幼稚和记忆 CD8+T 细胞亚群响应 TCR 刺激具有不同增殖和分化能力 (Geginat 等, 2003)。

[0131] 首先,分析了相比于健康供体,在临床缓解的 AML 患者外周中血的 CD8+ 区室。为此,通过标准密度梯度分离的方法从来自 AML 患者和健康供体的冷冻外周血分离 PBMC。接着,用 CCR7、CD3、CD4、CD8、CD45RA 和 CD45RO 抗体对 PBMC 进行染色以通过流式细胞术分析 CD8+T 细胞亚群。结果表示为在总 CD8+T 细胞区室中亚群的百分比。

[0132] 类似于之前所描述的,观察到与来自健康个体的幼稚 CD8+T 细胞亚群相比,来自

AML 患者的血液中幼稚 CD8+T 细胞亚群减少,然而,相比于健康供体,AML 患者中 T_{EMRA} 区室 (CCR7-CD45RA+) 增加 (图 9)。

[0133] 接下来,进行实验以研究 AML 患者 T 细胞区室的肿瘤靶特异性 T 细胞增殖。更具体地,进行这些实验以确定相对于 AML 患者的幼稚 CD8+T 细胞,CD3×CLEC12A DM-Fc bsAb 是否可以增强 AML 患者的 T 细胞的增殖和效应 T 细胞亚群 (T_{EM} 和 T_{EMRA}) 的生长。

[0134] 为此,根据实施例 11 纯化来自临床缓解之 AML 患者的静息 T 细胞。通过用 CCR7、CD3、CD4、CD8、CD45RA 和 CD45RO 抗体对 PBMC 染色随后进行流式细胞术分析在第 0 天对 CD8+T 细胞亚群的组分进行分析。此外,用 CFSE 标记静息 T 细胞或者不进行标记 (如实施例 11 中所述的 CFSE 标记) 并与具有对照或测试抗体的 HL60 白血病细胞以 E : T 比 5 : 1 共培养 7 天。使用 CFSE 标记的 T 细胞进行 T 细胞增殖的量化,而使用未标记的 T 细胞来确定增殖 T 细胞亚群的百分比。用 1 μg/ml 的 PBS、同种型对照 WT-Fc Ab、CD3×CLEC12A DM-Fc bsAb、CD3× 同种型对照 DM-Fc bsAb 和具有 WT-Fc 的 CD3 单克隆 Ab 孵育 CFSE 标记和未标记的 T 细胞。7 天后,用 CD3、CD4 和 CD8 抗体对 CFSE 标记的 T 细胞染色,并进行 FACS 分析以确定绝对的 T 细胞数和细胞分裂的次数,而用 CCR7、CD3、CD4、CD8、CD45RA 和 CD45RO 抗体染色未标记的 CFSE T 细胞,通过流式细胞术确定增殖的 CD8+T 细胞亚群的组分。T 细胞的增殖表示为直方图中每个 T 细胞亚群的 CFSE 信号并且四个 CD8+T 细胞亚群的大小表示为总 CD8+T 细胞区室内的百分比。

[0135] 实施例 13 :CD3×CLEC12A bsAb 诱导 AML 患者 T 细胞介导的肿瘤细胞裂解的功效

[0136] 在实施例 1 中证明了 CD3×CLEC12A bsAb 可诱导通过来自健康供体的静息 T 细胞对 CLEC12A 阳性 HL60 细胞的杀伤。接下来,我们研究了 CD3×CLEC12A bsAb 诱导 AML 患者 T 细胞之靶特异性活化的能力以及其诱导 AML 患者 T 细胞介导的 HL60 细胞杀伤的能力。

[0137] 使用如实施例 11 中描述的全 T 细胞分离试剂盒从临床缓解中的 AML 患者 (AML FAB 分类 AML-M1/M2、M4 或 M5) 的冷冻外周血分离 T 细胞。随后,在 PBS、同种型对照 WT-Fc Ab、CD3×CLEC12A DM-Fc、CD3× 同种型 DM-Fc 和阳性对照 CD3WT-Fc Ab (所有抗体都以 1 μg/ml 的浓度) 存在下,在补充有 10% 正常 HS 的培养基中以效应细胞 : 靶细胞 5 : 1 的比值用 CFSE 标记的 HL60 细胞孵育纯化的来源于 AML 患者的静息 T- 细胞两天。在共培养两天后,通过流式细胞术分析测定 CD3、CD4 和 CD25 的 T 细胞活化。这些结果表示为每个 CD4+T 细胞的 CD25+ 细胞百分比。此外,通过流式细胞术对存活的 CFSE 阳性 HL60 细胞进行量化。结果表示为相对于 IgG 的特异性裂解百分比。

[0138] 这些数据表明由 CD3×CLEC12A DM-Fc bsAb 介导的健康供体和 AML 患者 T 细胞的抗原特异性活化是可比较的 (图 10A)。如所预期的,CD3× 同种型对照 DM-Fc bsAb 不诱导健康供体或来源于 AML 患者的 T 细胞的活化。证明了通过来源于 AML 患者的 T 细胞之 CD3×CLEC12A DM-Fc bsAb 介导的 HL60 细胞的裂解 (68% 的 HL60 细胞裂解) 与健康供体 T 细胞 (69% 的 HL60 细胞裂解,图 10B) 相当。如所预期的,CD3× 同种型对照 DM-Fc bsAb 不诱导通过 AML 患者 T 细胞或者通过健康供体 T 细胞对 HL60 细胞的杀伤。因此,CD3×CLEC12A 双特异性分子是 T 细胞介导的肿瘤细胞裂解的有效诱导物,而不管这些 T 细胞是否来源于 AML 患者或来自健康供体。

[0139] 如所表明的,CD3×CLEC12A bsAb 具有诱导通过 AML 患者 T 细胞有效裂解 HL60 肿瘤细胞的能力,随后对 CD3×CLEC12A bsAb 靶向特异性活化 AML T 细胞的能力进行了评

价。此外,测定了 CD3×CLEC12A bsAb 诱导通过来源于 AML 患者的自体 T 细胞裂解原代 CLEC12A 阳性 AML 母细胞的能力。首先,将来自诊断期 AML 患者冷冻保存的骨髓样品解冻,通过流式细胞术分析确定所述样品含有 > 70% 的原代 AML 母细胞,在如前所述 (Norde 等, 2009) 的补充有 10% FCS、100ng/ml GM-CSF、100ng/ml G-CSF、50ng/ml IL-3、25ng/ml SCF 和 20ng/ml Flt3L 的 IMDM 培养基中培养过夜 (0/N)。过夜培养后,通过流式细胞术对表面表达 CLEC12A、CD3、CD4、CD8、CD14、CD19、CD33、CD34、CD38、CD45 和 CD117 的原代 AML 母细胞进行表型并用 CFSE 进行标记。当患者达到了临床缓解时,收集来源于患者的静息自体 T 细胞,使用如实施例 11 所述的全 T 细胞分离试剂盒从外周血进行分离。随后,在具有 10% HS 的培养基中以 E : T 比 5 : 1 用静息自体 T 细胞共培养 AML 母细胞两天。测试的条件包括 PBS、同种型对照 Ab WT-Fc、CD3×CLEC12A DM-Fc、CD3× 同种型对照 DM-Fc 和阳性对照 CD3WT-Fc Ab (所有抗体都为 1 μg/ml)。在共培养两天后,通过流式细胞术分析 CD3、CD4、CD8 和 CD25 以确定 T 细胞的活化。这些结果表示为每个 CD4⁺ 或 CD8⁺ AML T 细胞的 CD25⁺ 细胞百分比。通过细胞流式术量化存活的 CFSE⁺/CD45^{low} 双阳性 AML 母细胞以测定 AML 母细胞的裂解。结果表示为相对于 IgG 的特异性母细胞裂解百分比。

[0140] 这些数据证明 CD3×CLEC12A DM-Fc bsAb 具有与单克隆 CD3WT-Fc 阳性对照 Ab 相当的诱导 AML 母细胞靶特异性活化 AML T 细胞的能力 (图 11A/B)。此外,这些数据证明 CD3×CLEC12A bsAb 通过来源于 AML 患者的 T 细胞诱导自体 AML 母细胞的有效杀伤,这与通过单克隆 CD3WT-Fc 阳性对照 Ab 诱导的杀伤一样有效 (图 11C)。如预期的,通过 CD3× 同种型对照 DM-Fc Ab 没有诱导 AML 母细胞的杀伤或有轻微杀伤,这表明观察到的由 CD3×CLEC12A bsAb 介导的 AML 母细胞杀伤是 T 细胞抗原特异性活化和 CLEC12A+AML 肿瘤细胞特异性裂解的主要结果。总的来说,这项研究证明了 CD3×CLEC12A bsAb 可通过 AML 患者 T 细胞有效地诱导 CLEC12A 阳性肿瘤细胞的杀伤。

[0141] 实施例 14 :Fc 沉默对非特异性细胞因子释放的影响

[0142] 实施例 7 和 8 中已证明具有由 CH2/ 下铰链改造引起的 Fc 沉默 (DM-Fc) 的 CD3×CLEC12A bsAb IgG1 形式导致了 Fc γ 受体亲和力的降低并消除了非特异性 Fc 受体介导之白血病衍生的 HL60 细胞系的细胞毒性。接着,研究了在 Fc 受体阳性旁观者细胞 (例如 NK 细胞) 的存在下,具有 DM-Fc 沉默的 bsAb IgG1 形式是否消除了非特异性 Fc 受体介导的细胞毒性。在这项研究中,在其他 Fc 受体阳性旁观者先天效应细胞 (例如 NK 细胞) 的存在下,自体健康供体来源的静息 T 细胞被重定向以针对 CLEC12A 阳性单核细胞。为此,通过密度梯度离心从健康供体的肝素化外周血液分离 PBMC 并以 1×10^6 细胞 /ml 的密度进行铺板。在 PBS、同种型对照 Ab、CD3×CLEC12A WT-Fc bsAb、CD3×CLEC12A DM-Fc bsAb、CD3× 同种型对照 WT-Fc bsAb、CD3× 同种型对照 DM-Fc bsAb 或具有 WT-Fc 的 CD3 单克隆 Ab 存在的条件下,在具有 10% FBS 的培养基中将 PBMC 培养两天。在两天培养之后,通过流式细胞术根据 CD14 的表达对存活的单核细胞进行量化。结果表示为相对于 IgG 的特异性裂解百分比。

[0143] 这证明对于 CD3×CLEC12A 双特异性抗体,通过存在 DM-Fc 区的 Fc 沉默仅对单核细胞的裂解有较小的影响 (图 12)。与此相反,对于 CD3× 同种型对照 bsAb,通过存在 DM-Fc 区的 Fc 沉默显著降低了单核细胞的非特异性裂解。由此可得出结论,在 CD3×CLEC12A bsAb 中的 Fc 沉默还有助于靶特异性杀伤 :CD3×CLEC12A DM-Fc bsAb 特异性募集 T 细胞并

减少由正常表达 Fc γ 受体的辅助细胞介导的非特异性免疫活化。

[0144] 接下来被质疑的是通过在 CD3 \times CLEC12A bsAb 中的 DM 突变引起的 Fc 沉默是否消除了 Fc 受体介导的细胞因子的释放, 已知其与细胞因子释放综合征 (CRS) 有关, 其是由辅助细胞带来的抗体治疗的常见临床事件。为此, 根据制造商的说明书使用 Luminex 平台的细胞因子人 10-plex 面板 (Invitrogen, LHC0001), 分析了图 13 中描述的单核细胞杀伤测定之上清液中的细胞因子谱。在第 2 天测定了上清液中以下人细胞因子的谱: GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10 和 TNF- α 。示出的结果都是以 pg/ml 计量的细胞因子浓度。GM-CSF、IL-4 和 IL-5 细胞因子的水平都低于该测定的检测限 (数据未示出)。

[0145] 数据表明 CD3 \times CLEC12A 和 CD3 \times 同种型对照 bsAb 都具有 WT-Fc 尾, 诱导 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-10、IL-2 和 IFN- γ 的释放 (图 13)。然而, 当携带 DM-Fc 尾时, 在 CD3 \times CLEC12A 和 CD3 \times 同种型对照 bsAb 中没有发现或仅发现低水平的那些细胞因子, IL-8 例外。因为单核细胞是 IL-8 的主要来源, 高 IL-8 水平被假定为从裂解的单核细胞中释放, 并且不是特异的 FcR 介导的释放的结果。结论是通过 bsAb IgG 形式中 DM 突变引起的 Fc 沉默显著消除了 Fc 受体介导的与 CRS 相关的 IL-1b、IL-6、TNF- α 、IL-2 和 IFN- γ 细胞因子的释放。总的来说, 这些数据证明由在 CH2/ 下铰链区中的 DM 突变引起的 Fc 沉默通过减低表达正常 Fc γ 受体的辅助细胞和相关的促炎性细胞因子的释放介导潜在的非特异性免疫活化, 而有助于增强通过 CD3 \times CLEC12A DM-bsAb 的效应细胞的功效和特异性募集。

[0146] 实施例 15

[0147] 使用表达 CD3 的 HPB-ALL 细胞通过 FACS 分析比较了候选 3896 作为全长二价单克隆抗 CD3 IgG 和候选 3056 作为全长二价单克隆抗 CD3IgG 与膜结合 CD3 的结合。不相关的人 IgG1 充当同种型对照 IgG。根据本领域已知的标准程序进行流式细胞术。如图 14A 中所示, 和 3056 CD3IgG 一样, 3896 CD3 IgG 剂量依赖性地与 HPB-ALL 细胞上的 CD3 结合。

[0148] 接下来, 在与鼠 OKT3 CD3 抗体、3056 CD3 IgG 和同种型对照 IgG 的直接比较中, 测试了 3896 CD3 IgG 诱导 T 细胞增殖的能力。简言之, 将抗体进行系列稀释并固定在 96 孔板上。在除去未结合的 IgG 后, 添加 CFSE 标记的 T 细胞并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育。在第 5 天, 通过流式细胞术分析诱导的 T 细胞增殖的水平。结果显示为显示出 CFSE 表达水平至少两倍下降的活 T 细胞的百分比, 并示于图 14B 中。证明了 3896 CD3 IgG 作为二价单特异性抗体与候选 3056 CD3 IgG 和鼠 OKT3 相比, 在诱导 T 细胞增殖方面效力较低。这些数据表明与 3056 CD3 IgG 相比, 作为由 3896 诱导的 T 细胞增殖的降低的水平反映了通过流式细胞仪所分析的 CD3 结合能力的降低。这种结合的差异允许选择具有所需亲和力的臂, 产生了在 CD3 和 CLEC12A 结合亲和力之间显示有利平衡的双特异性抗体, 使得 T 细胞和 CLEC12A 阳性 AML 肿瘤细胞有效地集合在一起并且最佳地诱导了 T 细胞介导的 CLEC12A 阳性 AML 肿瘤细胞的裂解。

[0149] 为了测试在 CD3 \times CLEC12A 双特异性抗体形式中新 3896 抗 CD3 臂相对于 3056 抗 CD3 臂的效力, 在如先前所述的 HL60 细胞毒性测定中对实施例 4 的 3896 \times CLEC12A 基准双特异性抗体 (候选 3896 \times 3116) 和实施例 1 的 3056 \times CLEC12A 基准双特异性 (bs) 抗体 (候选 3056 \times 3116) 进行了直接比较。结果示于图 15 中。观察到 3896 \times CLEC12A 基准 bsAb 与 3056 \times CLEC12A 基准 bsAb 具有相似的效力。因此, 因为两个双特异性抗体的不同

仅在于它们的 CD3 Fab 臂,而 CLEC12A Fab 臂相同,所以结论是在 CD3×CLEC12A 双特异性 Ab 中,3896 CD3 Fab 臂的功能类似于 3056 CD3 Fab 臂。应该注意的是在较低浓度时,候选 3896×3116 甚至比候选 3056×3116 更好。如本文前面所解释的,这是有利的,因为它提供了更大的治疗窗。

[0150] 实施例 16

[0151] 在实施例 3 中,从噬菌体展示文库选择 CLEC12A 特异性 Fab 臂组。所有的 CLEC12A 结合分子都包含 huVκ1-39 轻链。选择了三个 CLEC12A 结合分子:Fab 3918、4327 和 4331。这些 Fab 表示为全长的人 IgG1:3918CLEC12A IgG、4327 CLEC12A IgG 和 4331 CLEC12A IgG。在图 20 中提供了 3918 CLEC12A IgG 的 VH,4327 CLEC12A IgG 的 VH 和 4331CLEC12A IgG 的 VH 以及共有 VL (IGKV1-39 ;012) 的核苷酸序列和氨基酸序列。

[0152] 对于与由 HL60 细胞表达的 CLEC12A 结合的全长的 CLEC12A 抗体进行了测试。

[0153] 通过使用表达 CLEC12A 的 HL60 细胞由 FACS 分析比较了 3918CLEC12A IgG、4327CLEC12A IgG 和 4331CLEC12A IgG 与 CLEC12A 基准抗体 (3116) 与膜结合 CLEC12A 的结合。不相关的人 IgG1 充当同种型对照 IgG。根据本领域已知的标准程序进行流式细胞术。如图 16 所示,4327 CLEC12A IgG 以与 CLEC12A 基准抗体类似的方式与 CLEC12A 结合。另外两种抗体,3918 CLEC12A IgG 和 4331 CLEC12A IgG 也证明了与 HL60 细胞上之 CLEC12A 良好的剂量依赖性结合。它们与 CLEC12A 的结合似乎比 CLEC12A 基准抗体稍低。总之,Fab 3918、4327 和 4331 是良好的 CLEC12A 结合臂。

[0154] 实施例 17

[0155] 测试了包含 3896 CD3 Fab 臂和 CLEC12A Fab 臂 3981、4327 或 4331 的双特异性分子是否具有功能。

[0156] 为此,使用本领域用于产生双特异性 IgG1 的已知方法 (Gunasekaran 等, W02009/089004) 将 3896 CD3 Fab 臂的 VH 序列和 CLEC12A 基准抗体或 3918 CLEC12A Fab、4327 CLEC12A Fab 或 4331 CLEC12A Fab 的 VH 区连同重排的 huVκ 1-39 轻链克隆到表达载体中以产生双特异性抗体:3896×CLEC12A 基准、3896×3918、3896×4327 和 3896×4331。

[0157] 按照之前所述的 HL60 细胞毒性测定测试这些双特异性的功能。在不同浓度的双特异性抗体以 E:T 比 5:1 存在下或在 10% HS 存在 48 小时下,与 CFSE 标记的 HL60 细胞共培养来自两个健康供体 (HD1 和 HD2) 的静息 T 细胞。在第 2 天通过流式细胞术对存活的 CFSE 阳性 HL60 细胞进行量化。在图 17 中结果被表示为特异性裂解百分比。对于来自供体 1 (HD1 ;图 17 上图) 的 T 细胞和供体 2 (HD2 ;图 17 下图) 的 T 细胞的两个单独实验,证明当在高浓度下孵育时,所有的双特异性都与 3896×CLEC12A 基准双特异性一样有效。

[0158] 应当注意,特别是双特异性抗体在较低浓度时,观察到 3896×4327 和 3896×4331 的双特异性抗体均比 3896×CLEC12A 基准双特异性更有效。因此,因为这些双特异性抗体的不同仅在于其 CLEC12A 的 Fab 臂,而 CD3 的 Fab 臂相同,所以可得出的结论是 4327 和 4331CLEC12A Fab 臂的功能比 CLEC12A 基准 Fab 臂更有效。不希望受限于理论,观察到的 3896×4327 和 3896×4331 相对于 3896×CLEC12A 基准双特异性 IgG 之间的差异可能反映了这些新抗 CLEC12A Fab 臂的结合亲和力的不同或它们可能靶向不同的 CLEC12A 表位,使得肿瘤细胞与表达 CD3 的 T 细胞更有效的交联。

[0159] 实施例 18

[0160] 在实施例 2 中,证明了当在 ELISA 中进行测试时,CLEC12A Fab 3918 和 4331 竞争性地与 CLEC12A 上的表位结合,因为 Fab 形式针对 CLEC12A 基准抗体的 Fab 片段。然而。在该测定中,4327 CLEC12A Fab 并没有与 CLEC12A 基准 IgG 竞争结合(表 2)。

[0161] 在这个实验中,测试了 4327 CLEC12A IgG 的全长 IgG 是否与 CLEC12A 基准抗体竞争性地与 CLEC12A 结合。简言之,用 50 μ g/ml 的第一抗体在冰上预孵育 HL60 细胞 20 分钟。接着,将 Oregon Green (OG) 标记 (Invitrogen, 目录号 A10476) 的第二抗体以 1 μ g/ml 添加至细胞以及第一抗体(加入 OG 标记 IgG 后第一抗体的浓度为约 45 μ g/ml)。20 分钟后,洗涤细胞并通过 FACS 进行分析。

[0162] 结果示于图 18 中:结论是 4327 CLEC12A IgG 和 CLEC12A 基准 IgG 竞争性地与 CLEC12A 结合。这表明这两种 IgG 结合 CLEC12A 抗原上密切相关的表位或它们结合到由于空间位阻而不容许两个 IgG 同时结合的不同的表位上。

[0163] 实施例 19

[0164] 前面的实施例中已证明 CD3 \times CLEC12A 双特异性形式中的 CLEC12A Fab 臂 4327、4331、3918 以及 3116 是 CLEC12A 的良好结合物以及 T 细胞介导的杀伤的有效诱导物。迄今,使用用于驱动免疫球蛋白重链异源二聚化的已知方法获得双特异性抗体 (Gunasekaran 等)。

[0165] 在我们的共同未决的 US 和 PCT 申请(美国正式申请 NO:13/866,747 和 PCT/NL2013/050294;通过引用并入本文)中,我们已经公开了用于从单个细胞产生双特异性抗体的方法和手段,其中提供了相比于单特异性抗体的形成,有利于双特异性抗体形成的手段。这些方法也可有利地用于本发明中。特别地,基本上仅产生双特异性全长 IgG 分子的优选突变是第一 CH3 结构域中的氨基酸替换 L351K 和 T366K(根据 Kabat 编号)(‘KK-变体’重链)和第二 CH3 结构域中的氨基酸替换 L351D 和 L368E(‘DE-变体’重链),或者反之亦然。在我们之前的共同未决的 US13/866,747 和 PCT/NL2013/050294 申请中证明了 DE 变体和 KK-变体优先配对以形成异源二聚体(所谓的‘DEKK’双特异性分子)。由于相同重链之间的 CH3-CH3 界面中带电残基间的强斥力,因此几乎不发生 DE-变体重链的同源二聚化(DEDE 同源二聚体)或 KK-变体重链的同源二聚化(KKKK 同源二聚体)。

[0166] 为了证明 CD3 \times CLEC12A 双特异性分子的作用不受已知的用于异源二聚化的突变 (Gunasekaran) 或 DEKK 突变的影响,使用 DE 变体和 KK 变体重链驱动不同重链的异源二聚化以制备 CD3 \times CLEC12A 双特异性。另外,在这些 DE 和 KK 变体重链中引入 CH2/下铰链双突变(L235G 和 G236R;DM)。这些所得的双特异性分子的 Fc 尾被称为‘DM DEKK’。

[0167] 简言之,将 3116、4327 或 4331 CLEC12A Fab 臂的 VH 区克隆到含有 DE-变体 +DM 重链的表达载体中,而将 3056 CD3 抗体的 VH 区克隆到含有 KK-变体 +DM 重链的表达载体中(美国正式申请 No:13/866,747 和 PCT/NL2013/050294),并且将这些表达载体连同编码重排的人 IGKV1-39/IGKJ1(huV κ 1-39)轻链的核酸分子一起提供至宿主细胞,使得所述宿主细胞表达并产生双特异性抗体。随后,以如之前所述在 HL60 细胞毒性测定中测试所得 3056 \times 3116 DM DEKK、3056 \times 4327 DM DEKK 和 3056 \times 4331 DM DEKK 双特异性抗体的效力。其结果示于图 19 中:证明所有的变体仍能够有效的裂解肿瘤细胞,并由此得出结论,DM 和 DEKK 突变可被引入到 CD3 \times CLEC12A 双特异性抗体的 Fc 区,同时保持诱导肿瘤细胞裂解的能力。

- [0168] 参考文献
- [0169] Armour et al. *Mol. Immunol.* 2003(40) 585-593
- [0170] Bakker A. B. et al. *Cancer Res* 2004,64, p8443-50
- [0171] Bargou et al. 2008 *Science* 321 :974
- [0172] Bluemel et al. 2010 *Cancer Immunol. Immunother.* 59 :1197
- [0173] Chames and Baty, *MABS* 2009(1) 539-547
- [0174] Chatenoud et al. 1990, *Transplantation* 49(4), pages 697-702
- [0175] Chen C. H. et al. *Blood* 2006,107, p1459-67
- [0176] Cui et al. *JBC* 2012(287) 28206-28214
- [0177] De Kruif et al. 1995, *J Mol Biol* 248(1), pages 97-105
- [0178] De Kruif et al. *J. Mol. Biol.* 2009(387) 548-58
- [0179] De Kruif et al. *Biotechnol Bioeng.* 2010(106) 741-50
- [0180] De Wildt RM et al. *J. Mol. Biol.* 1999(285) 895-901 ;
- [0181] Dreier et al. 2002 *Int. J. Canc.* 100 :690
- [0182] Geginat, J. et al. *Blood*, 2003. 101(11), p. 4260-6
- [0183] Gunasekaran et al. *JBC* 2010(285) 19637-19646
- [0184] Haagen et al. 1995 *Blood* 85 :3208
- [0185] Han Y. et al. *Blood* 2004,104, p2858-66
- [0186] Kipriyanov et al. 1998 *Int. J. Can.* 77 :763
- [0187] Kontermann, *MABS* 2012(4) 182-197
- [0188] Lanzavecchia et al. 1987, *Eur. J. Imm.* 17 :105
- [0189] Liu et al. 1985 *PNAS* 82 :8648
- [0190] Liesveld et al. 1988, *J. Immunol.* 140(5), pages 1527-1533
- [0191] Loffler et al. 2000 *Blood* 95 :2098
- [0192] Marshall A. S. et al. *J Biol Chem* 2004,279, p14792-802
- [0193] Merchant et al. *Nature Biotechnology* 1998 Volume 16, pp 677-681
- [0194] Moore et al. *Blood* 2011(117) 4542-4551
- [0195] Moshaver et al. 2008 *Stem Cells* 26 :3059
- [0196] Nissim et al. *The EMBO Journal* vol. 13 no. 3 pp. 692-698. 1994
- [0197] Norde W. J. et al. *Blood* 2009(113) (10) :p. 2312-23
- [0198] Offner et al. *Molecular Immunology* 2006(43) 763-771
- [0199] Oganessian et al. *Biol. Crystall.* 2008(D64) 700
- [0200] Schaefer et al (*Cancer Cell* 20,472-486, October 2011
- [0201] Sheridan C, *Nat Biotechnol.* 2012(30) :300-1
- [0202] Staerz et al. 1986 *PNAS* 83 :1453
- [0203] Shields RL et al. *JBC* 2001(276) 6591-6604
- [0204] Sluijter, B. J., et al. *Clin Immunol*, 2010. 137(2), p. 221-33
- [0205] Suntharalingam et al. 2006, *New England J Med* 355(10), pages 1018-1028
- [0206] Van Rhenen et al. 2007 *Blood* 110 :2659

-
- [0207] Zeidler et al. 1999 J. Immunol. 163 :1246
 - [0208] W02004/009618
 - [0209] W02005/118635
 - [0210] W02005/000894
 - [0211] W02005/000894
 - [0212] WO 2008/027236
 - [0213] W02009/089004
 - [0214] W02009/157771
 - [0215] WO 2010/108127

CLL-1: 预测的氨基酸序列, Bakker等, 2004
 KLRL1: 翻译的氨基酸序列, Han等, 2004 (=Zhang/Cao 组; 保藏号AF247788)
 MICL: 预测的氨基酸序列, Marshall等, 2004 (保藏号AY498550)
 DCAL-2: 预测的氨基酸序列, Chen等, 2006 (=E. A. Clark组, 保藏号AY426759)
 CLEC12B: 预测的氨基酸序列, H. F. Clark等, 2003 (保藏号AY358810)

```

KLRL1      MSEEVTYADLQFONSSEMEKIPKFKGKAPAPSHVWRPAALFTLLCLLLLGLGVLASMFHVTLK---IEMKRNKLNQNI
MICL      MSEEVTYADLQFONSSEMEKIPKFKGKAPAPSHVWRPAALFTLLCLLLLGLGVLASMFHVTLK---IEMKRNKLNQNI
DCAL-2    MSEEVTYADLQFONSSEMEKIPKFKGKAPAPSHVWRPAALFTLLCLLLLGLGVLASMFHVTLK---IEMKRNKLNQNI
CLL-1    MWIDFFTYSSMSEEVTYADLQFONSSEMEKIPKFKGKAPAPSHVWRPAALFTLLCLLLLGLGVLASMFHVTLK---IEMKRNKLNQNI
CLEC12B   MSEEVTYADLQFONSSEMEKIPKFKGKAPAPSHVWRPAALFTLLCLLLLGLGVLASMFHVTLK---IEMKRNKLNQNI

KLRL1      SEELQRNLSLQLSMNMNI-----SNKIRNLSSTLQTIATKLCSEELYSKEQEHKCKPCPRRMIWHKDSICYFLS--DDVQIWOESKMACAAQNAS
MICL      SEELQRNLSLQLSMNMNI-----SNKIRNLSSTLQTIATKLCRELYSKEQEHKCKPCPRRMIWHKDSICYFLS--DDVQIWOESKMACAAQNAS
DCAL-2    SEELQRNLSLQLSMNMNI-----SNKIRNLSSTLQTIATKLCRELYSKEQEHKCKPCPRRMIWHKDSICYFLS--DDVQIWOESKMACAAQNAS
CLL-1    SEELQRNLSLQLSMNMNI-----SNKIRNLSSTLQTIATKLCRELYSKEQEHKCKPCPRRMIWHKDSICYFLS--DDVQIWOESKMACAAQNAS
CLEC12B   IQQQQDNLSQQLCNSNNLSMEEFLKSQLSSVYKROEQMAIKLCQELI IHTSDHRCNFCPKWQWQYQNSCIYFTINEEKTWANSRKCDCIDKNSI

KLRL1      LLKINNKNALEFIKSCQRS--YDYWLGLSPEEDSTRGMRVDNIINSSAW-VIRNAPDL-NMNYCGYINRLYVQYXHYCTYKORMICERKMANPVQL
MICL      LLKINNKNALEFIKSCQRS--YDYWLGLSPEEDSTRGMRVDNIINSSAW-VIRNAPDL-NMNYCGYINRLYVQYXHYCTYKORMICERKMANPVQL
DCAL-2    LLKINNKNALEFIKSCQRS--YDYWLGLSPEEDSTRGMRVDNIINSSAW-VIRNAPDL-NMNYCGYINRLYVQYXHYCTYKORMICERKMANPVQL
CLL-1    LLKINNKNALEFIKSCQRS--YDYWLGLSPEEDSTRGMRVDNIINSSAW-VIRNAPDL-NMNYCGYINRLYVQYXHYCTYKORMICERKMANPVQL
CLEC12B   LVKIDSLEEKDFLMSQPLLMFSEFWLGLSWDSQGRSWMFEDSGSVSPFLSFKIKELDQINGSKGCAVYFQKGSNIYISRCSAEIIFWICERTAAPVYKI

KLRL1      GSTYFREA
MICL      GSTYFREA
DCAL-2    GSTYFREA
CLL-1    GSTYFREA
CLEC12B   EDLD
  
```

图 1

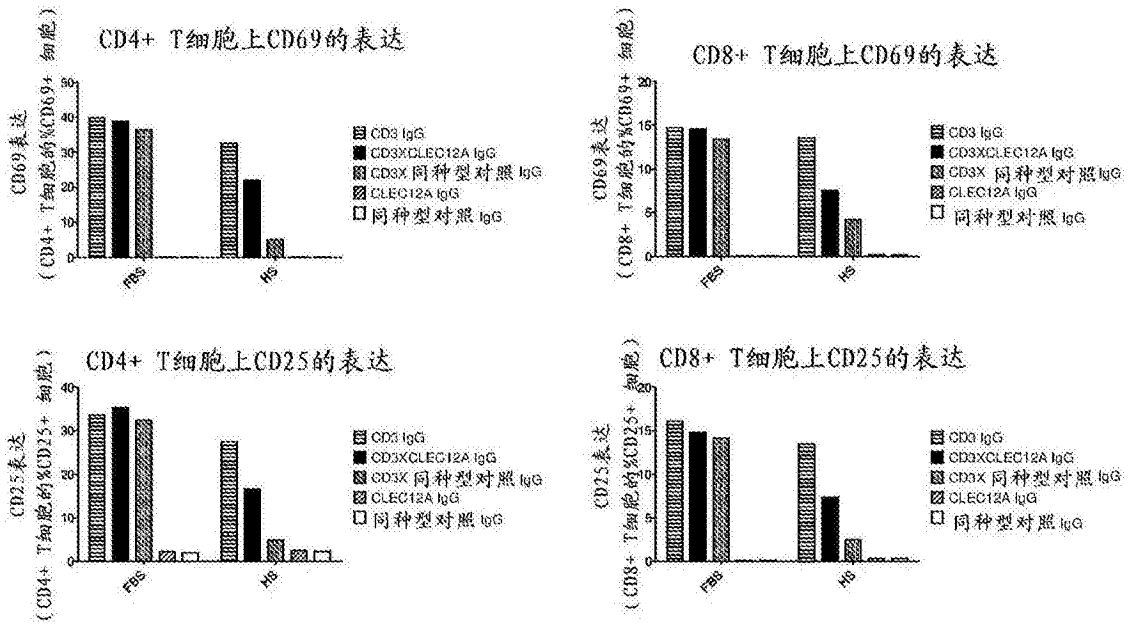


图 2

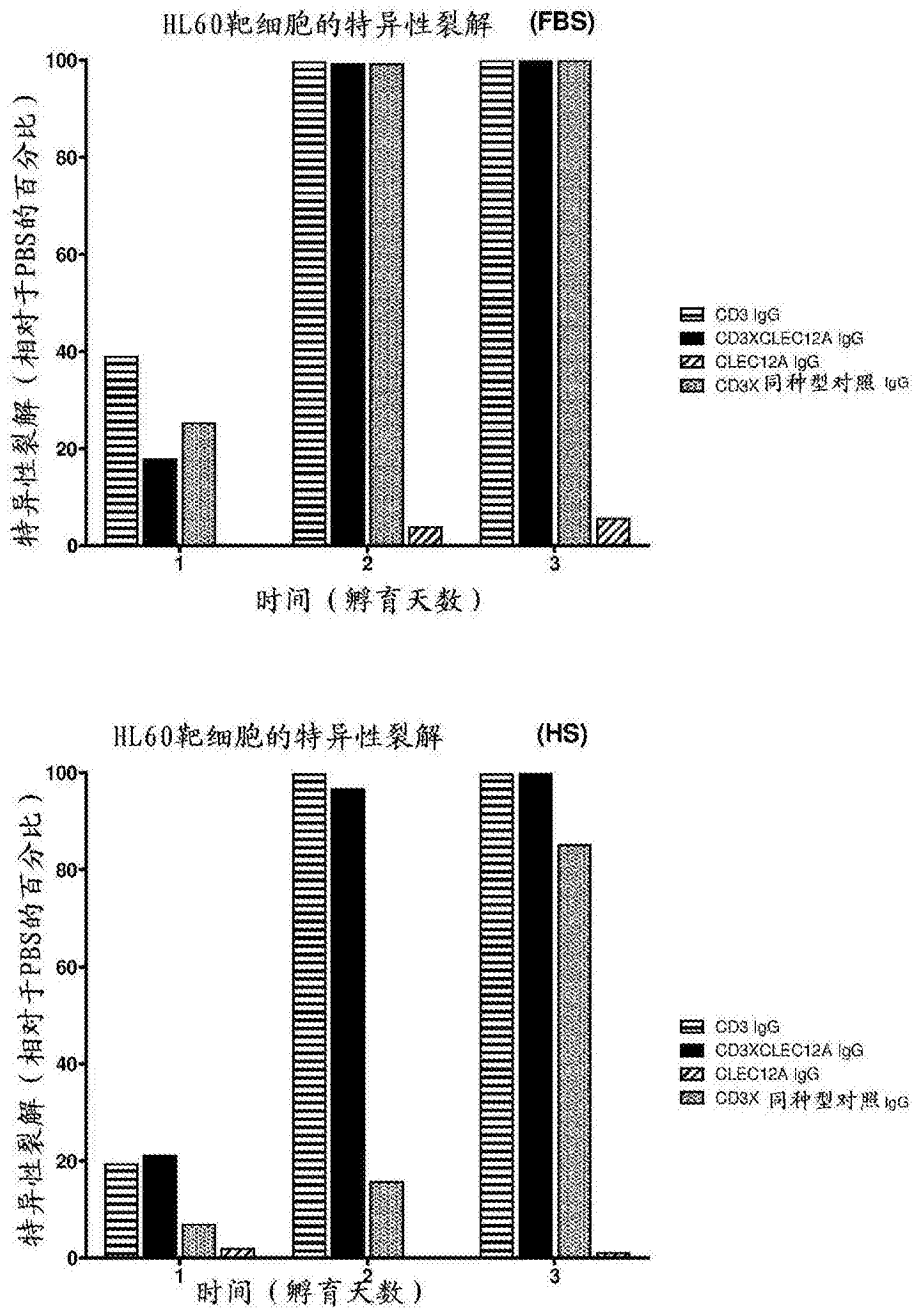


图 3

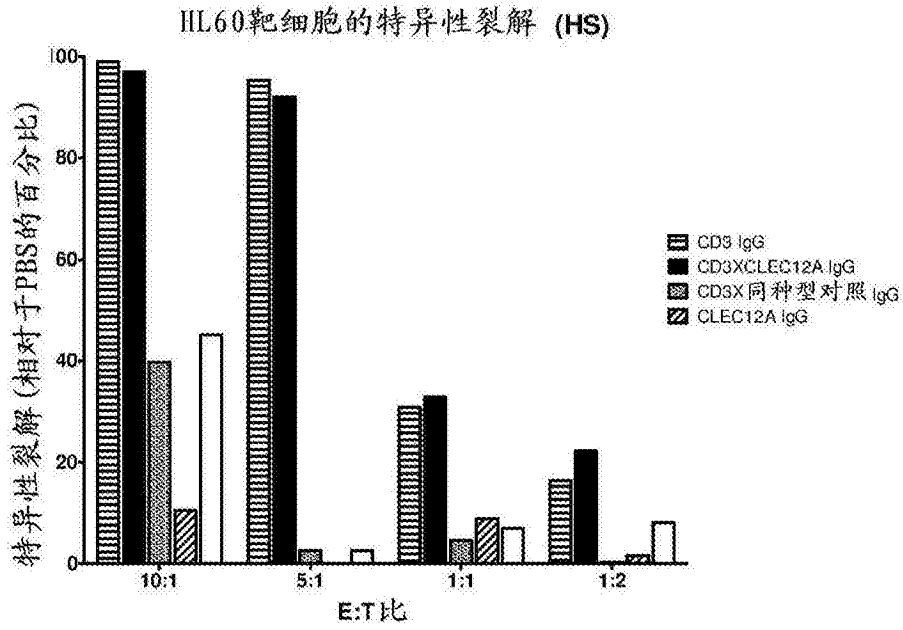


图 4

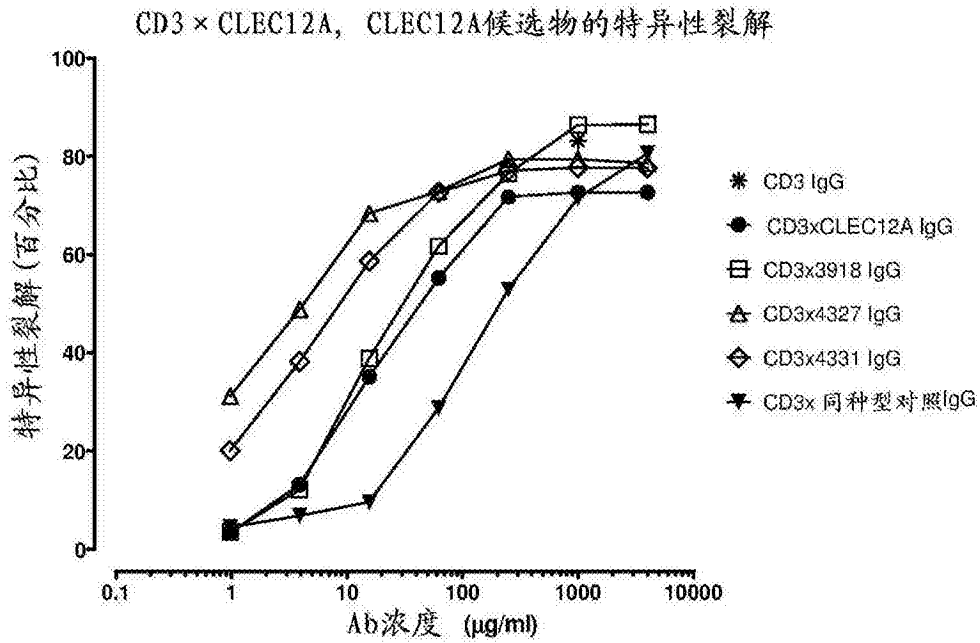


图 5

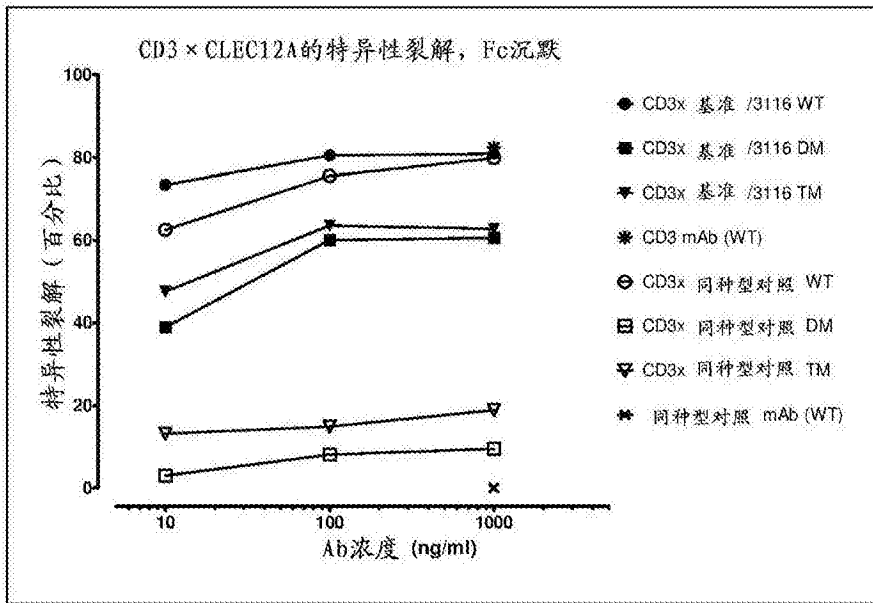


图 6

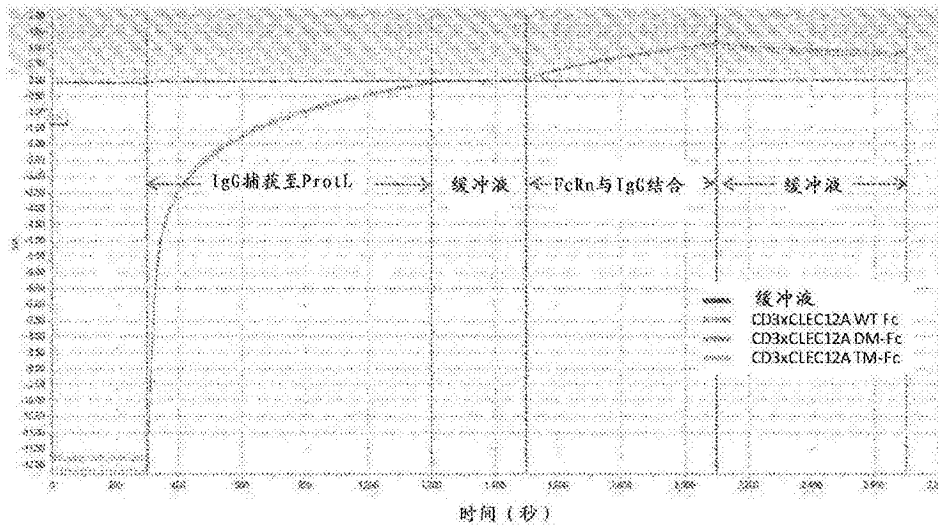


图 7

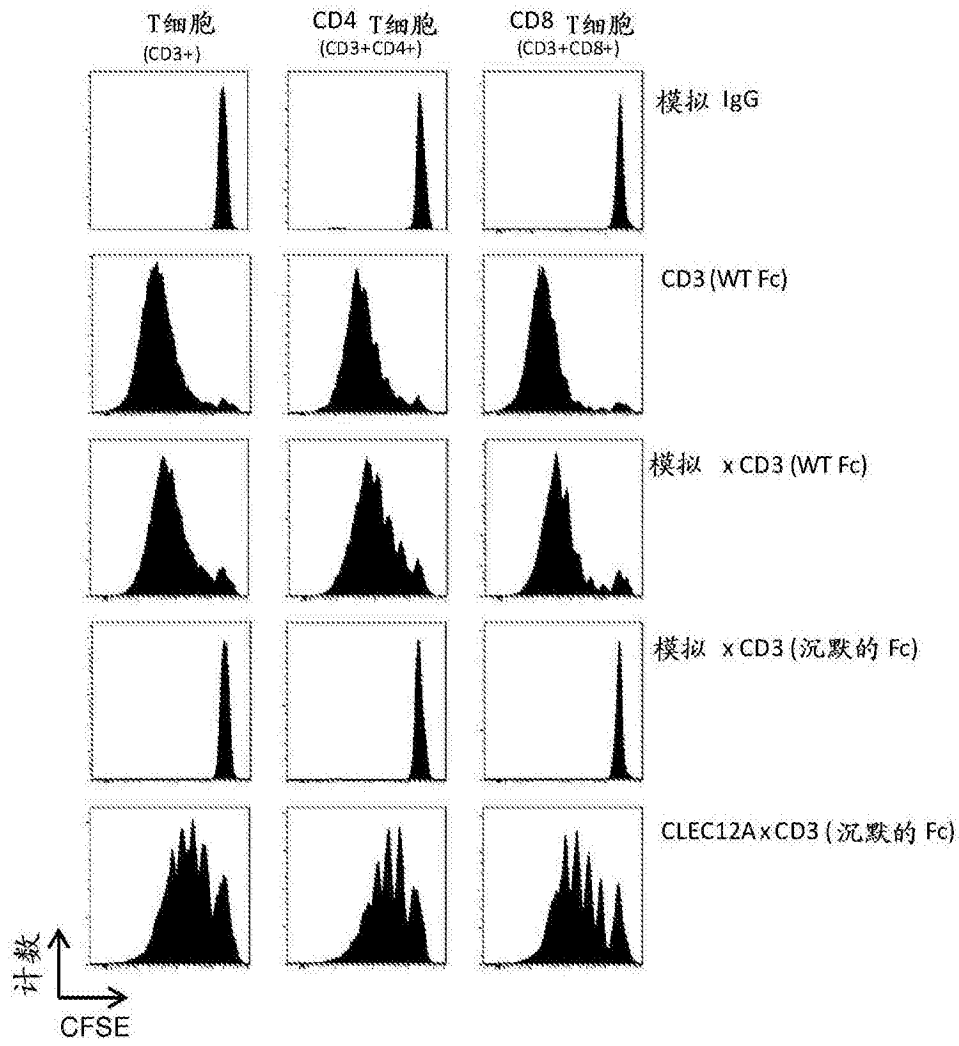


图 8

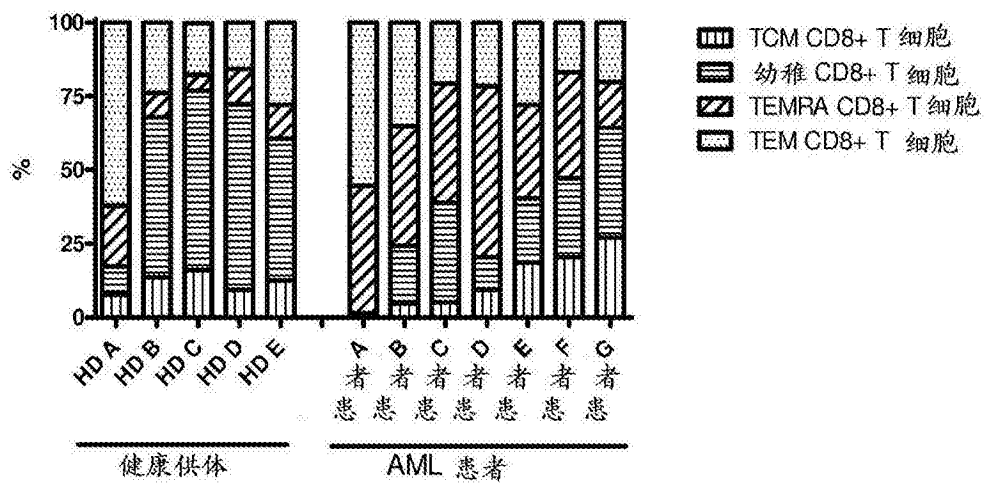


图 9

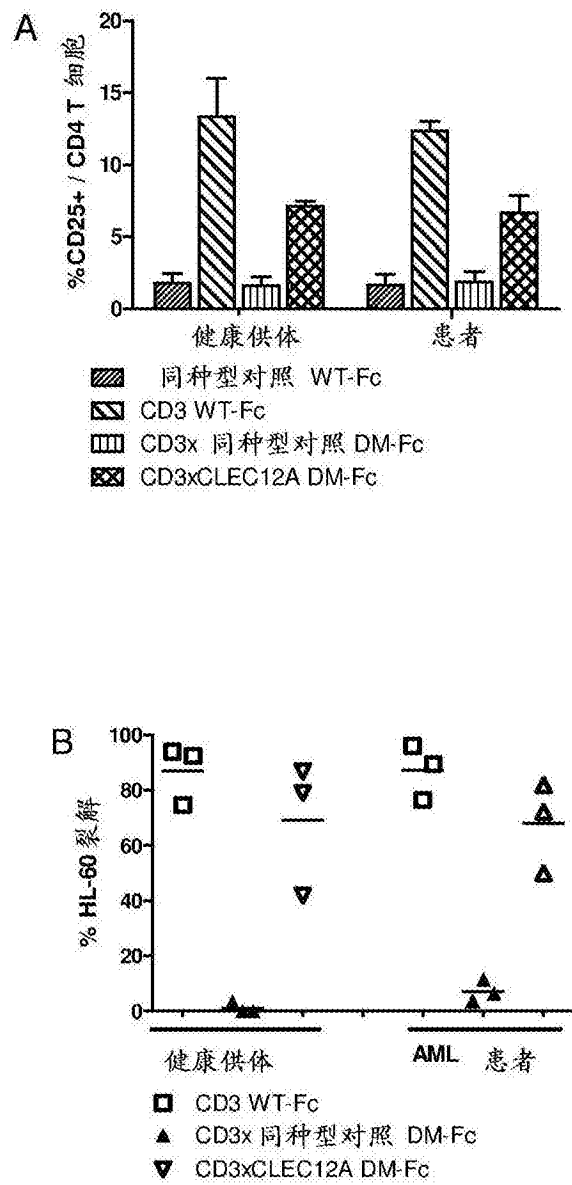


图 10

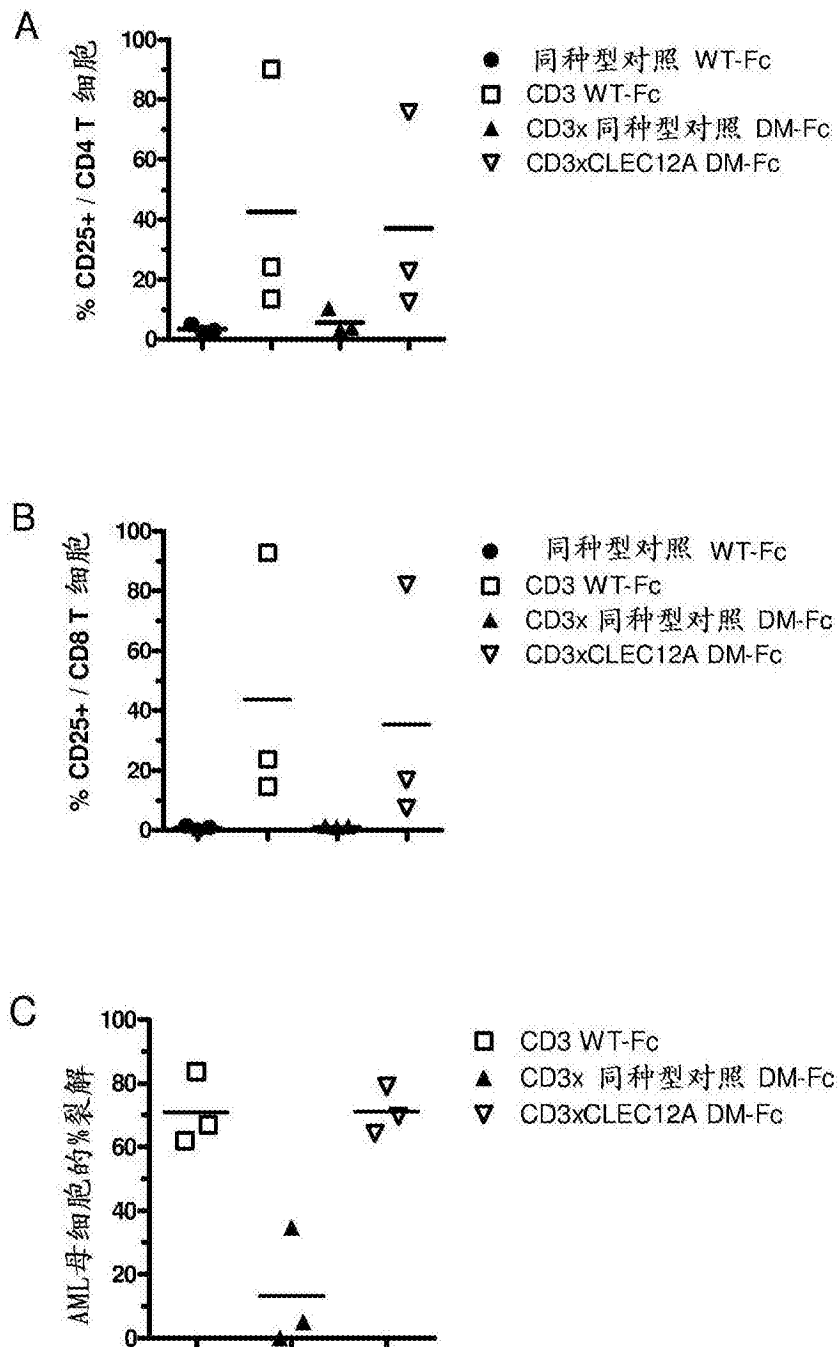


图 11

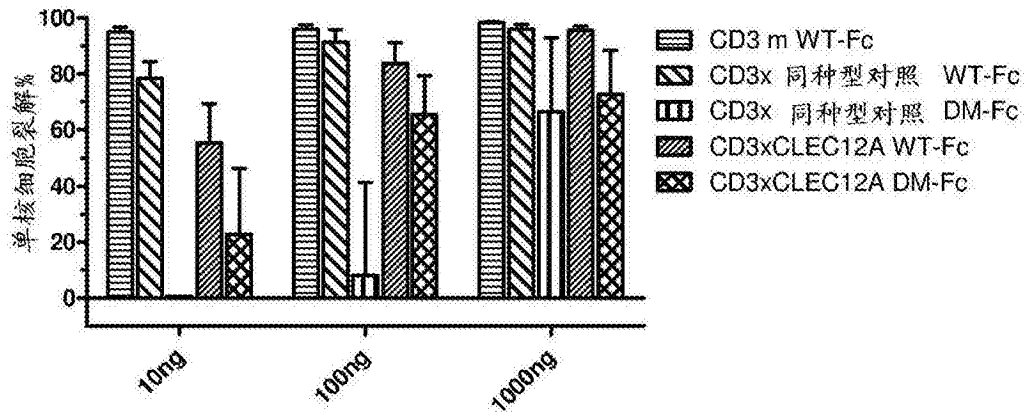


图 12

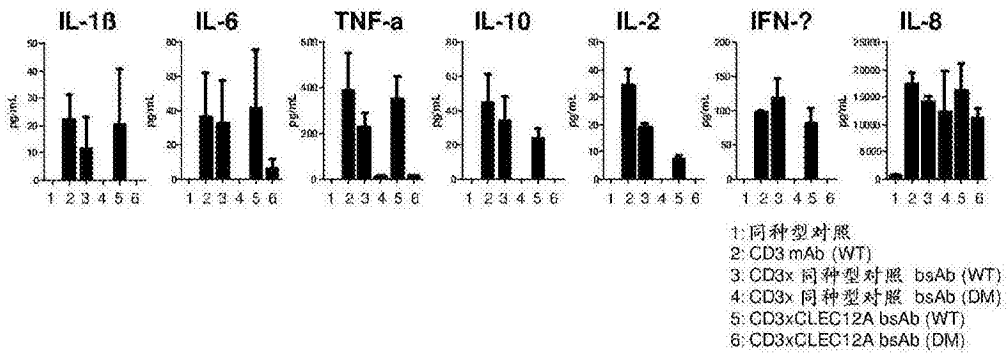


图 13

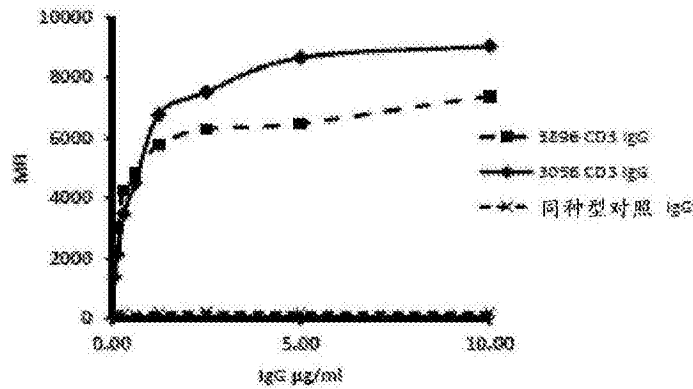


图 14A

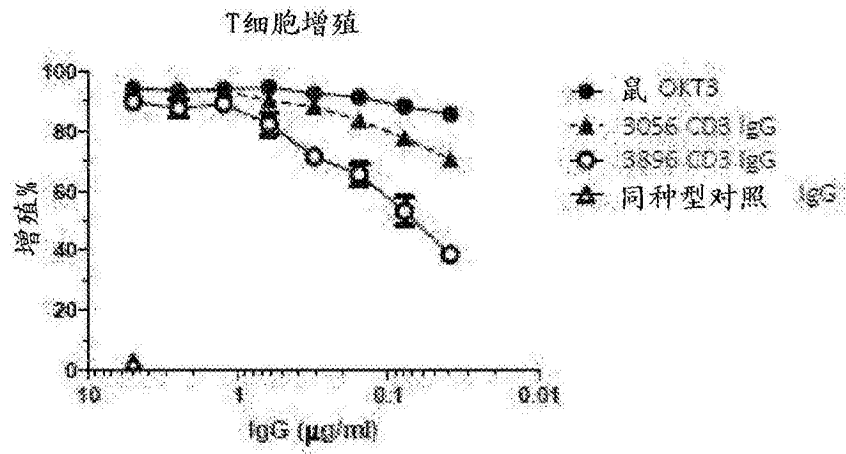


图 14B

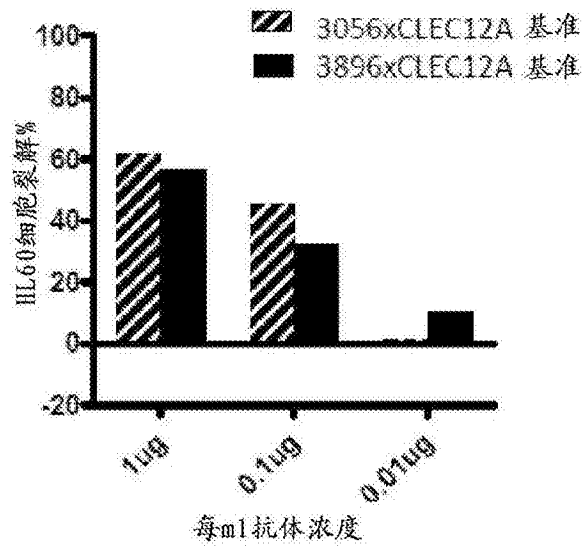


图 15

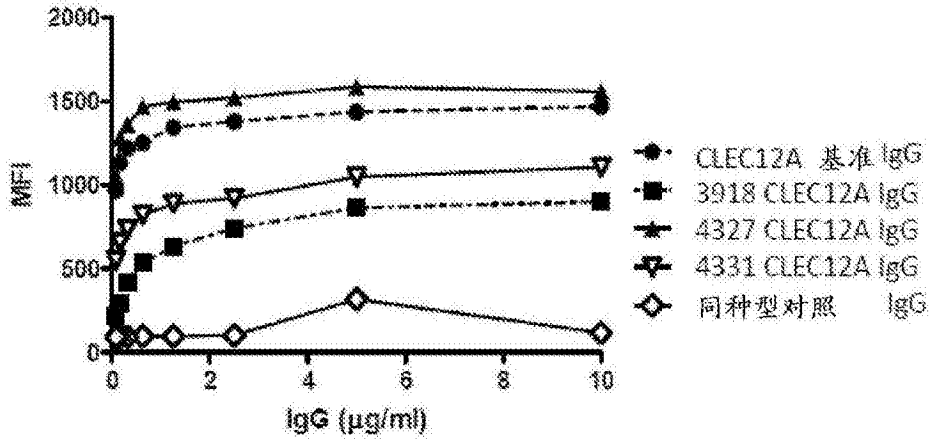


图 16

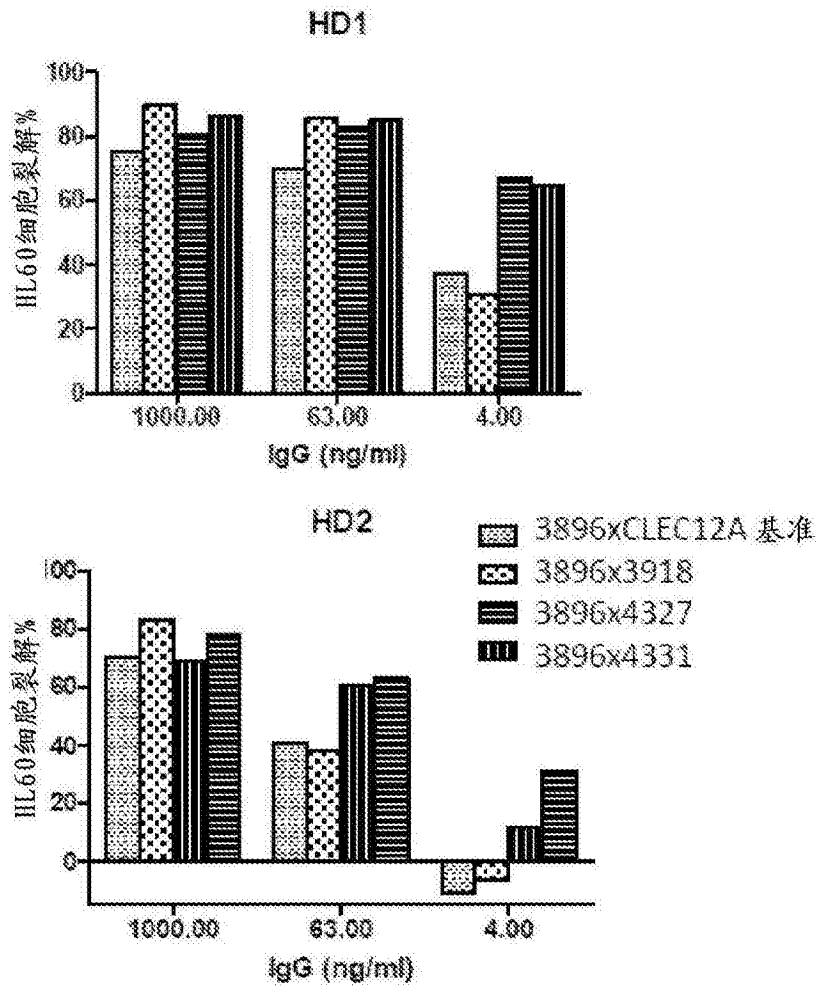


图 17

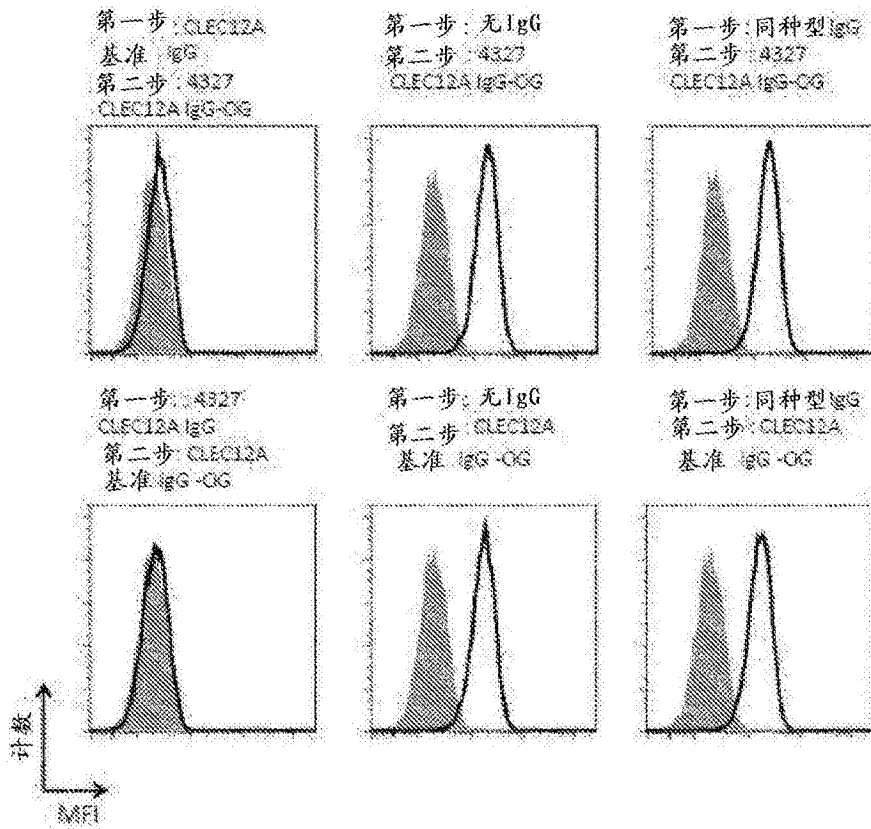


图 18

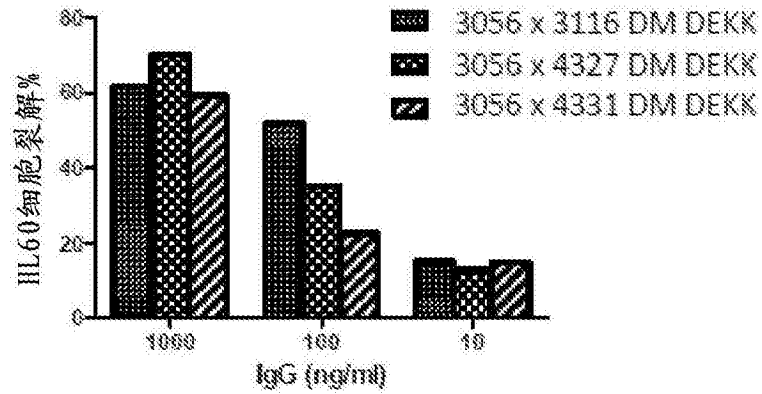


图 19

3056

VH (VDJ):

caggtgcagctggtgcagctctggcggcggagtggtgcagccggcagaagcctgagaactgagctgggtgg
ccagcggcttcacttcagcagctacggcatgcactgggtccgccaggccctggcaagggactggaatg
ggtggcccatcatctggtacaacggcgggaagcaggactacgccgacagcgtgaagggccggttcaccatc
agccgggacaacagcaagaacaccctgtacctgcagatgaacagcctccgggcccagacaccccgctgt
actactgtaccggggcaccggctacaattggttcgacccttggggccaggccaccctggtcaccgctctc
cagt

QVQLVQSGGQVVPGRSLRLSCVASGFTFSYKMHVVRQAPGKGLEWVAATWYNERKQDYADSYKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTYHWFDWQGTLTVSS

VL/O12 (VJ):

Gacatccagatgacccagctctccatcctccctgctcgcctctgtaggagacagagtccaccatcacttgcgggca
agtccagagcattagcagctacttaaatgggtatcagcagaaaccagggaagccctaaagctcctgatctatgct
gcctccagtttgcaaagtgggtcccatcaagggttcagtggcagtgatctgggacagatttcactctaccatc
agcagctctgcaacctgaagattttgcaacttactactgtccaccagagttacagtaaccctccaaagttggccaa
gggaccaaggtggagatcaaac

DIQMTQSPSSLSASVEDRVTITCEASQSSIESYLNWYQQKPKRAPKLLIYANSSLRQSGVPSRFSQSGSGTD
FTLTISSLQPEDFATYYCCGSYTFPFFGQETKVEIK

3896

VH:

caggtgcagctggtggagctctggcggcggagtggtgcagccggcagaagcctgagaactgagctggcggc
ccagcggcttcacttcagaagctacggcatgcactgggtccgccaggccctggcaagggactggaatg
ggtggccatcatctggtacagcggcagcaagaagaactacgccgacagcgtgaagggccggttcaccatc
agccgggacaacagcaagaacaccctgtacctgcagatgaacagcctccgggcccagacaccccgctgt
actactgtcccggggcaccggctacaattggttcgacccttggggccaggccaccctggtcaccgctctc
cagt

QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSYKMHVVRQAPGKGLEWVAITWYSGSRKKNYADSYKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSTYHWFDWQGTLTVSS

VL:

O12

CLEC12A 基准 (3116)

VH:

caggtgcagctgcaggaaatctggaccgggaactggtcaagcccagcgagacaetgagcctgacctgtgtgg
tgtccgggggcagcatcagcagcagcaattggtggtcttgggtccgacagccccctggcaagggcctgga
atggatcggcgagatctaccacagcggcagcccgaactacaaaccagcctgaagtcagagtgaccatc
agcgtggacaagagcgggaaccagttcagcctgaagctgagcagcgtgacagccggcagataccggcgtgt
actactgcccacaaagtgtccacggcggccttttccgactactggggccagggcacactggtcaccgtctc
cagt

QVQLQESGCPGLVKPGETLSLTGVVSGSSISSSNWWSWVRQPPGKGLEWIGRIYHSGSPDYNPSLKRVTI
SVDKSRNQFSLKLSVLAADIAVYYCAKVSISGFFDYWCQSTLVSS

VL:

O12

3918

VH:

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaaggtctcctgcaagg
cttctggatacaacttcaccggctactatatacactgggtggacagggccccctggacaagggcttgagtg
gatgggatggatcaaccctaacagtggtggcacaactatgcacagaagtccagggcagggtaacgatg
accagggacaagctccacagcagcagcctacatggagctgagcagcctgagatctgacgacaagggcgtgt
attactgtgcaagagatggttacttcgctgacgctctgattatggggccaaggtaccctggtcaccgt
ctccagt

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFFTSYMHWVRQAPCQGLEWMCWIFNFSGKTNIAQKPFQGRVTM
TRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAKPTFENWFFDYWCQSTLVTVSS

VL:

O12

4327

VH:

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaaggtctcctgcaagg
catctggatacaacttcaccagctactatatacactgggtggacagggccccctggacaagggcttgagtg
gatgggaataaacaaccctagtggtggtagcaacaagctaccgacagaagttccagggcagagtcaccatg
accagggacaagctccacgagcagcagctctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacaagggcgtgt
attactgtgcaagggcactactggtgattggtttgactactggggccaaggtaccctggtcaccgtctc
cagt

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFFTSYMHWVRQAPCQGLEWMCWIFNFSGKTSYAQKPFQGRVTM
TRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAKGTFFENWFFDYWCQSTLVTVSS

VL:
O12

4331
VH:

gaggtccagctgggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaagtttctctgcaagg
catctggatacaccttcaaccagctactatatgcaactgggtgcgacaggccctggacaagggcttgagtg
gatgggaataatcaaccctagtggtggtagcacaagctacgcacagaagttccagggcagagtcaccatg
accagggacacgtccacgagcacagtcacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccctgt
attactgtgcaaggggcaattatggtgatgagtttgactactggggccaaggtaccctggtcacctctc
cagt

EVQLVQSGAEVKKFGASVRVSCKASGFFTSYMHWRQAPGQGLEWMGFEINPSSGGS TSAQKFCGRVTM
TRDESTSTVYMEISSLRSEETAVYYCARGNVGEEDFYWCQGITLVTVSS

VL:
O12

图 20