



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107922486 B

(45) 授权公告日 2022. 05. 31

(21) 申请号 201680048188.4  
 (22) 申请日 2016.06.15  
 (65) 同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 107922486 A  
 (43) 申请公布日 2018.04.17  
 (30) 优先权数据  
 15001758.0 2015.06.15 EP  
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日  
 2018.02.13  
 (86) PCT国际申请的申请数据  
 PCT/EP2016/001002 2016.06.15  
 (87) PCT国际申请的公布数据  
 W02016/202457 EN 2016.12.22  
 (73) 专利权人 努玛治疗有限公司  
 地址 瑞士瓦登韦尔  
 (72) 发明人 塞巴斯蒂安·迈耶 大卫·乌雷克

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司  
 11332  
 专利代理师 刘明海 宁涛

(51) Int.Cl.  
 C07K 16/24 (2006.01)  
 C07K 16/28 (2006.01)

(56) 对比文件  
 WO 2014122529 A1, 2014.08.14  
 WO 2014022540 A1, 2014.02.06  
 WO 2011086091 A1, 2011.07.21  
 WO 2012135345 A1, 2012.10.04  
 WO 2012088290 A2, 2012.06.28  
 WO 2014180577 A1, 2014.11.13  
 WO 2013003652 A1, 2013.01.03  
 WO 2010132872 A1, 2010.11.18

审查员 刘俊

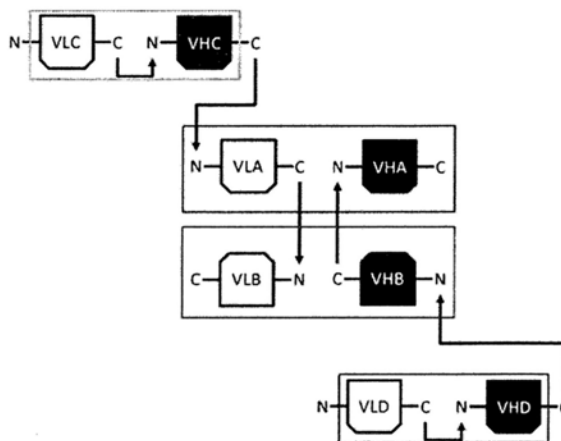
权利要求书2页 说明书20页  
 序列表2页 附图15页

## (54) 发明名称

异源二聚体多特异性抗体形式

## (57) 摘要

本发明涉及多个抗体可变结构域的新型异源二聚体多特异性形式,其包含两个分开的可变结构域对的核心,其中,全部两个可变轻结构域和两个同源可变重结构域分别串联位于两个单独的蛋白链上。



1. 一种异源二聚体蛋白,其包含第一和第二单链蛋白,  
其中,所述第一单链蛋白包含第一氨基酸序列,所述第一氨基酸序列由以下组成(从N末端至C末端):

- (ia) 第一VL结构域;
- (iia) 第一多肽接头,以及
- (iiaa) 第二VL结构域,并且

其中所述第二单链蛋白包含第二氨基酸序列,所述第二氨基酸序列由以下组成(从N末端至C末端):

- (ib) 第一VH结构域;
- (iib) 第二多肽接头,以及
- (iibb) 第二VH结构域,并且

其中所述第一VL结构域与所述第一或所述第二VH结构域形成可变结构域第一同源对,其对第一靶标抗原具有特异性,并且所述第二VL结构域与另一个所述VH结构域形成可变结构域第二同源对,其对第二靶标抗原具有特异性,并且其中所述第一或所述第二单链蛋白中的至少一个还包含

(iv) 至少一个作为第三功能性结构域的额外的结构域,其通过第三多肽接头与所述第一或所述第二氨基酸序列融合;

其中所述异源二聚体蛋白不包含(i) 第一和第二免疫球蛋白恒定结构域的同源对,其中所述第一免疫球蛋白恒定结构域被包含在所述第一单链蛋白中,并且其中所述第二免疫球蛋白恒定结构域被包含在所述第二单链蛋白中,并且其中所述异源二聚体蛋白不包含(ii) 除可变结构域第一和第二同源对之外的任何其他异源关联结构域的对,其中所述其他异源关联结构域的对中的一个异源关联结构域位于第一单链蛋白上,而另一个异源关联结构域位于第二单链蛋白上,

其中所述VL和/或VH结构域中的至少一个包含人框架区域,其中所述VL结构域中的至少一个包含(i) 人V<sub>k</sub>框架区域I至III; (ii) CDR结构域CDR1、CDR2和CDR3; (iii) 框架区域IV,其是框架区域IV的人V<sub>λ</sub>种系序列。

2. 权利要求1所述的异源二聚体蛋白,其还包含

(v) 第四功能性结构域,其通过第四多肽接头与所述第一或所述第二氨基酸序列融合;  
(vi) 第四和第五功能性结构域,其分别通过第四和第五多肽接头与所述第一或所述第二氨基酸序列融合;或者

(vi) 第四、第五和第六功能性结构域,其分别通过第四、第五和第六多肽接头与所述第一或所述第二氨基酸序列融合。

3. 权利要求1或2所述的异源二聚体蛋白,其中所述第一多肽接头由5至20个氨基酸残基。

4. 权利要求3所述的异源二聚体蛋白,其中所述第一多肽接头由6至15个氨基酸残基组成。

5. 权利要求1或2所述的异源二聚体蛋白,其中(a) 所述第一VL结构域(ia) 与所述第一VH结构域(ib) 形成对第一靶标抗原可变结构域第一同源对,其具有特异性,并且所述第二VL结构域(iia) 与所述第二VH结构域(iib) 形成可变结构域第二同源对,其与第二靶标抗原

具有特异性;或者(b)所述第一VL结构域(ia)与所述第二VH结构域(iib)形成可变结构域第一同源对,其对第一靶标抗原具有特异性的,并且所述第二VL结构域(ia)与所述第一VH结构域(ib)形成可变结构域第二同源对,其对第二靶标抗原具有特异性。

6. 权利要求1或2所述的异源二聚体蛋白,其中所述第三、第四、第五和/或第六功能性结构域独立地选自以下:结合结构域、毒素、酶、激素、信号传导蛋白和白蛋白。

7. 权利要求6所述的异源二聚体蛋白,其中所述第三、第四、第五和/或第六功能性结构域独立地选自结合结构域;其中所述结合结构域独立地选自以下:基于抗体的结合结构域,包括scFv片段、Fab片段和单抗体可变结构域,以及基于替代骨架的结合结构域,包括基于锚蛋白的结构域、低聚物、avimer、anticalin、纤连蛋白和构建到抗体的恒定区域中的结合位点。

8. 权利要求1或2所述的异源二聚体蛋白,其中至少一个所述抗体可变结构域包含源自亲本兔抗体的CDR区域。

9. 权利要求1或2所述的异源二聚体蛋白,其中,所述第一和所述第二VL和VH结构域之一的同源对对于选自以下的抗原是特异性的:癌症靶标;和存在于免疫效应细胞上的靶标。

10. 权利要求9所述的异源二聚体蛋白,其中所述存在于免疫效应细胞上的靶标是CD3。

11. 编码权利要求1或2所述的异源二聚体蛋白的第一和第二单链蛋白的一种核酸或两种核酸。

12. 包含权利要求11的所述一种核酸或所述两种核酸的一种载体或两种载体。

13. 包含权利要求12的所述一种载体或所述两种载体的一种宿主细胞或多种宿主细胞。

14. 用于生产权利要求1至10中任一项的异源二聚体蛋白或所述异源二聚体蛋白的第一或第二单链蛋白的方法,其包含(i)提供权利要求11的一种核酸或两种核酸或权利要求12的一种载体或两种载体,表达所述一种核酸序列或多种核酸序列或所述一种载体或多种载体,并收集所述异源二聚体蛋白,或者(ii)提供根据权利要求13的一种宿主细胞或多种宿主细胞,培养所述一种宿主细胞或多种宿主细胞,并从细胞培养物中收集所述第一和第二单链蛋白,或所述异源二聚体蛋白。

15. 一种药物组合物,其包含权利要求1至10中任一项所述的异源二聚体蛋白和药学上可接受的载体。

16. 权利要求1至10中任一项所述的异源二聚体蛋白在制备用于治疗选自癌症、炎症和自身免疫疾病的疾病的药物中的用途,其中所述VL和VH结构域的同源对的至少一种或所述第三、第四、第五或第六功能性结构域中的至少一种能够与所述疾病中的治疗相关性靶标特异性相互作用。

## 异源二聚体多特异性抗体形式

### 技术领域

[0001] 本发明涉及多个抗体可变结构域的新型异源二聚体多特异性形式,其包含两个分开的可变结构域对的核心,其中,全部两个可变轻结构域和两个同源可变重结构域分别串联位于两个独立的蛋白链上。

### 背景技术

[0002] 自从开发了第一种单克隆抗体[R17]以来的过去四十年间,抗体已成为用于研究、诊断和治疗目的越来越重要的一类生物分子。

[0003] 抗体作为治疗剂正朝着更合理地设计功能发展,从而改善和扩大其固有性质。实例包括通过糖工程优化效应子功能[R18]、特异性定位如跨血脑屏障转移[R19]或通过例如增加对FcRn的结合来调节半衰期。

[0004] 抗体功能化的补充方法是在一个分子中组合不同的靶标特异性以产生双特异性或多特异性抗体或抗体片段,从而能够有替代作用机制,如重新靶向T细胞,例如双特异性抗体Blinatumomab或三特异性抗体Catumaxomab。

[0005] 尽管到目前为止已经开发了大量不同的多特异性抗体形式[R21],但是双特异性和多特异性抗体形式目前的种类仍然给工业化留下了相当大的技术挑战和很少的灵活性,只有少数形式允许三特异性和多特异性结合,更少的形式支持形成异源二聚体蛋白。

[0006] 过去已经提出了不同的多特异性形式。从概念上讲,这些形式可以分为三类:a) 单链多特异性形式,其中不同的靶标结合结构域全部位于单个蛋白链上,由单个基因表达,b) 同源二聚体和同源多聚体形式,其中不同的靶标结合结构域位于相同的蛋白链上,其通过使用多聚化结构域来组装,形成二价/多价和任选地还有多特异性复合物,以及c) 异源二聚体形式,其中靶标结合结构域位于不同的蛋白链上,并且两条蛋白链的组装由异源二聚化结构域驱动。

[0007] 原则上,异源二聚体多特异性形式提供了以下优点:通过两条异源二聚化蛋白链的简单置换,可以很容易地测试各种组合中具有不同特异性和亲和性的结合结构域,从而能够在最终形式中直接筛选特异性和亲和性的最佳组合,而不需要繁琐的克隆。

[0008] 在各种结构域的结合性质和/或效力需要彼此谨慎匹配以获得双特异性蛋白的最佳效力、并同时最小化非特异性作用风险的情况下,需要最终产物形式中的这种筛选。在临床情况下,这将转化为在最低不良作用风险下的最佳功效。需要这种最佳组合的情况,可以例如是同时阻断在疾病过程中产生的不同浓度的两种疾病驱动细胞因子。在这种情况下,治疗性双特异性蛋白应当能够在一个且相同的治疗剂量下有效地阻断两种细胞因子。

[0009] 多特异性分子的靶标结合结构域的特征必须协调一致的另一个实例是:用细胞毒性抗体靶向肿瘤细胞上的两个细胞表面靶标来治疗癌症。虽然在这种情况下抗体的两个细胞表面靶标可能仅在癌细胞上共表达,但它们可以在各种健康组织中单独表达。为了在肿瘤治疗中在最低的不良副作用风险下获得最好的功效,细胞毒性抗体应当优先与两个靶标共表达的细胞结合,而不应当与仅表达两个靶标之一的组织结合。为了实现这一点,需要调

整两个靶标结合结构域的亲和性,以使得一方面,单独的结构域与其靶标的亲和性太弱而不能导致细胞裂解,并且另一方面,由于双特异性分子与癌细胞上的两个靶标同时结合而产生的协同亲和力足以诱导细胞裂解。由于与固定在细胞表面上的不同大分子同时结合而产生的几何约束,实现最大协同结合的结构域组合不仅是亲和性功能,而且是抗原表位功能,并且仅可能通过测试实际产物形式中的不同结构域组合来鉴定。

[0010] 天然IgG型抗体可以被认为是同源二聚体形式。

[0011] 为了增加使用传统IgG结构作为支架的同源二聚体抗体形式的特异性数量,可以将额外的结合部分,例如单链Fvs [R15]、Fvs [R16]、单个结构域[例如Nanobodies:Huang等人,Expert Rev Mol Diagn.10 (2010):777-85]或替代支架[例如Fynomers:Schlatter等人,MAbs.4 (2012) 497-508]附加到重链和轻链的氨基或羧基末端。该方法的一个优点是可以用常规IgG作为核心结构域来产生双特异性至三特异性构建体,这使得能够利用大多数已经为常规IgG建立的制造和修饰技术。然而,由于常规Fc区域同源二聚体性质,该方法将总是在每个分子中产生至少两个相同的结合结构域,并因此导致与某些靶标二价结合。这并不总是想要的,特别是(a)当只有与两个靶标协同结合才能产生预期作用时,或(b)当分子量不应当进一步增加时。此外,该方法经常遇到附加的结合部分的结构域稳定性较差,使其不适合于药物开发。

[0012] 融合另外的结合结构域以增加特异性的概念也可应用于Fab片段[R14]或IgG的其他抗原结合片段[R23]。由于由重链和轻链组成的Fab的异源二聚体性质,Fab片段可以用作异源二聚化结构域。例如,Fab片段已被用于工程化设计所谓的三体(Tribody)。在这种形式中,将scFv片段与Fab的轻链和重链的羧基末端融合,形成真正的异源二聚体三特异性分子。Fab的轻链-重链交联主要由CL-CH1之间的相互作用驱动,其另外通过共价二硫键连接[R2]。这种形式的挑战是:(a)最不稳定组分的稳定性限制,所述最不稳定组分将最有可能是附加的scFv,以及(b)最多三个靶标特异性的限制。

[0013] 作为解决同源二聚体双特异性形式的限制的方法,引入了异源二聚体IgG[R31]。来自一个细胞的两种不同mAb的简单共表达,导致组装异源二聚体双特异性IgG的可能性非常低,在所述异源二聚体双特异性IgG中,两种不同的重链将彼此配对,并且两种不同的轻链将与其相对应的重链配对[R24]。然而,它还将导致A)具有不同特异性的重链和轻链的错配,以及B)形成单特异性和双特异性变体的不同重链组合的混合物。为了解决这些困难,已经采取了几种方法,这几种方法在分子中造成了人为的不对称性。“knob-into-hole”概念[R3,R4]使用重链/重链或重链/轻链结合点(interface)的工程化设计以驱动共表达链向预期构型交联。在另一种方法中,CrossMab方法[R5]允许工程化的轻链/重链对选择性配对。这些方法的缺点是,任何错配分子的残留级分都很难从产物中分离。因此,其他技术通过改变单特异性和双特异性结合物[R22]的差异结合性质来关注分离问题,另一方面还忍受由变体的随机分布引起的产量损失。

[0014] 基于IgG的异源二聚体形式的另外的限制是它们都必须包含Fc效应子结构域。在其中异源二聚化将由导向至任意选择靶标的结合结构域驱动的形式中,将能够在相同或更低的分子量下增加特异性/功能性的数量。具有较低分子量的分子能更有效地穿透靶标组织(例如实体癌),因此有希望在相同或较低剂量下改善功效。

[0015] 通过简单地添加例如与血清白蛋白相互作用的结合结构域,可将这种小的形式工

程化设计成具有与IgG相当的血清半衰期。

[0016] 另一种方法使用非抗体融合蛋白来赋予例如scFv部分预期的多特异性。这种融合蛋白的实例有Dock-and-Lock [R25]、barnase-barstar [R26]、jun-fos [R27]、TNF [R28] 或 HSA [R29]。这些概念的共同之处在于添加了至少一对结构域,以异源二聚体方式相互作用以将双特异性或多特异性结合结构域连接在一起。这些异源二聚化结构域不直接参与靶标结合,但是它们增加了蛋白的分子量——类似于三体形式中的恒定区1 (C1)。此外,通过掺入非人抗原表位和序列,它们可能具有增加的免疫原性风险。

[0017] 与以上讨论的CL和CH1之间的相互作用相比,形成抗体结合部位的VL-VH结构域的交联通常被认为是弱的。然而,有几个仅由抗体可变结构域组成的异源二聚体抗体片段概念。如双抗体 (diabody) [R6]、DART [R10] 和 tandab [R7,R8] 等方法提供了优雅和简约的方法以产生同源和异源二聚体双特异性和二价到四价组装体。这些形式策略的最重要的限制是 (a) 通过使例如scFv与双抗体的任一链的或DART的氨基或羧基末端融合来添加另外的特异性可以导致可变轻结构域和可变重结构域的链内配对,从而使得两条蛋白链的异源二聚化非常具有挑战性,以及 (b) 由于过去经常观察到的可变轻链和可变重链之间的弱的结构域结合点结合,这些形式的单体稳定性差且生产性差,因此进一步的工程化设计,例如引入结构域间二硫键 [R12] 以稳定VL/VH结合点被认为是必要的。

[0018] 为了构建多特异性单链串联Fv抗体,Kipriyanov等人 [R30] 提出了一种包含两条蛋白链的设计,每条蛋白链由两个按VL-(接头1)-VH-(接头2)-VL-(接头3)-VH顺序排列的分开的Fv结构域组成。为了构建异源二聚体四特异性蛋白,异源二聚体将由具有以下结构的两条蛋白链组成。链1:VLA-(接头1)-VHA-(接头12)-VLB-(接头13)-VHC,和链B:VLD-(接头1)-VHD-(接头2)-VLC-(接头3)-VHB,其中,FvB和FvC的组装将驱动两条链的异源二聚化(参见图10A)。为了防止链内组装形成串联的单链Fv(scFv2)样形式,并为了促进两条单体蛋白链的异源二聚化,已经提出缩短接头3位置处的接头,最多为10个氨基酸(EP1293514 A1)。然而,所提出的具有至少15个氨基酸的接头2的两个分开的可变结构域的组织安排导致第二可变结构域可能折叠回到N末端结构域上,导致由不匹配的VH/VL对组成的单链双抗体(scDb)样形式,因此可能无法与其靶标结合。另外,还有可能形成其中蛋白链1上的所有可变重链和轻链将分别与蛋白链2的可变轻链和重链配对的异源二聚体,从而防止末端scFv(scFvA和scFvD)的形成并形成非同源可变结构域的配对。串联的scFv(scFv2)型或scDb型副产物可能是在非多聚化的蛋白链的表观分子量下观察到非常高的蛋白级分的原因 [R30]。

[0019] 理论上,上述方法中scDb样结构的形成可通过同样缩短两个分开的可变结构域之间的第二接头(接头2)而进一步减少。然而,这将限制构建体的灵活性,这在许多情况下会对允许两个靶标同时结合的可用抗原表位的范围造成负面影响。当两种膜蛋白同时结合时,这些几何约束特别具体限制性。

[0020] 另外,然而,最重要的是,两种单体都可能形成同源二聚体片段(参见图10B),因此统计上多达三分之二的二聚体产物由两种同源二聚体组成,而只有三分之一由需要的异源二聚体组成。

[0021] 总而言之,对于允许在最终形式中进行不同结合结构域的简单置换和随后的表征的异源二聚体多特异性形式,有强烈的行业需求。这种形式的主要挑战是 (a) 特异性异源二

聚化的效率相对较差,导致生产产量不理想,以及(b)必须使用非靶标结合蛋白作为异源二聚化结构域或工程化的异源二聚体Fc效应子结构域,其在调节血清半衰期方面具有较差的灵活性,并且限制了添加新功能而不增加分子量的灵活性。

[0022] 因此,最佳的异源二聚体多特异性形式将仅由靶标结合结构域组成,并且将能够例如通过自由改变不同结合结构域之间的接头长度来调整分子的几何形状以适应由相互作用配偶体(partner)(靶标)限定的几何约束。迄今为止,在现有技术中既没有给出也没有建议针对这个问题——即修饰单体链上可变结构域的顺序——的解决方案。

## 发明内容

[0023] 本发明涉及多个抗体可变结构域的新型异源二聚体多特异性形式,其包含两个分开的可变结构域对的核心,其中,全部两个可变轻结构域和两个同源可变重结构域分别串联位于两个独立的蛋白链上,由此驱动两条蛋白链的同源二聚化。多达两个额外的结合结构域,特别是基于抗体的结合结构域,例如scFv片段,与任一蛋白链的氨基或羧基末端融合,形成多达六特异性异源二聚体蛋白。

[0024] 因此,第一方面,本发明涉及一种异源二聚体蛋白,其包含第一和第二单链蛋白,

[0025] 其中所述第一单链蛋白包含第一氨基酸序列,所述第一氨基酸序列由以下组成(从N末端至C末端):

[0026] (ia) 第一VL结构域;

[0027] (iia) 第一多肽接头,以及

[0028] (iiia) 第二VL结构域,并且

[0029] 其中所述第二单链蛋白包含第二氨基酸序列,所述第二氨基酸序列由以下组成(从N末端至C末端):

[0030] (ib) 第一VH结构域;

[0031] (iib) 第二多肽接头,以及

[0032] (iiib) 第二VH结构域,并且

[0033] 其中所述第一VL结构域与所述第一或所述第二VH结构域形成可变结构域第一同源对(cognate pair),其对第一靶标抗原具有特异性,并且所述第二VL结构域与另一个所述VH结构域形成可变结构域第二同源对,其对第二靶标抗原具有特异性,并且其中所述第一或所述第二单链蛋白中的至少一个还包含

[0034] (iv) 至少一个作为第三功能性结构域的额外的结构域,其通过第三多肽接头与所述第一或所述第二氨基酸序列融合,

[0035] 其中,任选地,所述异源二聚体蛋白不包含第一和第二免疫球蛋白恒定结构域的同源对,其中所述第一免疫球蛋白恒定结构域被包含在所述第一单链蛋白中,并且其中所述第二免疫球蛋白恒定结构域被包含在所述第二单链蛋白中。

[0036] 第二方面,本发明涉及编码所述第一和第二单链蛋白的一种或两种核酸序列。

[0037] 第三方面,本发明涉及包含所述一种或两种核酸序列的一种或两种载体。

[0038] 第四方面,本发明涉及包含一种或两种载体的一种宿主细胞或多种宿主细胞。

[0039] 第四方面,本发明涉及用于生产本发明的第一和第二单链蛋白或异源二聚体蛋白的方法,其包含(i)提供根据本发明的一种核酸或多种核酸,或根据本发明的一种载体或多

种载体,表达所述一种核酸或多种核酸或所述一种载体或多种载体,并从表达系统收集所述第一和第二单链蛋白,或所述异源二聚体蛋白,或者(ii)提供本发明的一种宿主细胞或多种宿主细胞,培养所述一种宿主细胞或多种宿主细胞,并从细胞培养物收集所述第一和第二单链蛋白,或所述异源二聚体蛋白。

[0040] 第五方面,本发明涉及一种药物组合物,其包含本发明的异源二聚体蛋白和药学上可接受的载体。

[0041] 第六方面,本发明涉及用于治疗疾病,特别是人类疾病,更特别是选自癌症、炎症和自身免疫疾病的人类疾病的本发明的异源二聚体蛋白,其中,所述VL和VH结构域的同源对的至少一种或所述第三、第四、第五或第六功能性结构域中的至少一种能够与相应疾病中的治疗相关性靶标特异性相互作用。

[0042] 第七方面,本发明涉及用于治疗患有疾病,特别是人类疾病,更特别是选自癌症、炎症和自身免疫疾病的人类疾病的患者的方法,所述方法包含向受试者施用有效量的本发明的异源二聚体蛋白,其中,所述VL和VH结构域的同源对的至少一种或所述第三、第四、第五或第六功能性结构域中的至少一种能够与相应疾病中的治疗相关性靶标特异性相互作用。

[0043] 在所附的从属权利要求中阐述了本发明的特定实施方案。

## 附图说明

[0044] 图1示出了组装体1的示意图(参见实施例1)。

[0045] 图2示出了组装体3的示意图(参见实施例1)。

[0046] 图3示出了组装体5的示意图(参见实施例1)。

[0047] 图4示出了组装体7的示意图(参见实施例1)。

[0048] 图5示出了1步纯化后的尺寸排阻色谱图。(A) 组装体1; (B) 组装体3; (C) 组装体5; (D) 组装体7。

[0049] 图6示出了1步纯化后的SDS-PAGE分析:图A:PR0356(组装体1):还原条件:泳道4;非还原条件:泳道10;PR0357(组装体3):还原条件:泳道5;非还原条件:泳道11;PR0358(组装体5)还原条件:泳道6;非还原条件:泳道12;PR0355(组装体7)还原条件:泳道3;非还原条件:泳道9。图B:在样品制备期间具有较低温度的重复SDS-PAGE,显示PR0357(组装体3)非还原条件的显著交联。

[0050] 图7示出了与在4°C储存(图7A)相比,PR0356(组装体1);PR0357(组装体3);PR0358(组装体5);PR0355(组装体7)在37°C下储存28天后的蛋白含量(1g/L)(图7B)。

[0051] 图8示出了与在4°C储存(图8A)相比,PR0356(组装体1);PR0357(组装体3);PR0358(组装体5);PR0355(组装体7)在37°C下储存28天后的单体含量(1g/L)(图8B)。

[0052] 图9示出了在37°C孵育4周后稳定性样品的SDS-PAGE分析:PR0356(组装体1):还原条件:泳道4;非还原条件:泳道10;PR0357(组装体3):还原条件:泳道5;非还原条件:泳道11;PR0358(组装体5)还原条件:泳道6;非还原条件:泳道12;PR0355(组装体7)还原条件:泳道3;非还原条件:泳道9。

[0053] 图10示出了根据Kipriyanov等人[R30]的多特异性单链串联Fv抗体的示意图:VL结构域:灰色背景;VH结构域:白色背景;同源对由相同的填充模式表示。(A) 单链和异源二



聚体产物的示意图。(B)潜在同源二聚体的示意图。

[0054] 图11示出了来自SPR实验的结果,其中,将MATCH(通过同源异源二聚化形成的的基于多特异性抗体的治疗剂(multispecific antibody-based therapeutics by cognate hetero-dimerization))分子固定在传感器芯片上,并按所示序列应用4种抗原。产生的传感图显示,RU变化与由每个MATCH形式诱导的所有四种抗原的同时参与是一致的。

[0055] 图12示出了结合量与无活性的MATCH分子的分析结果。将MATCH分子与过量的TNF(形成Fv结构域的二聚体之一的抗原)预孵育,并将复合物在SE-HPLC上运行。分析所得到的色谱图以计算“活性”(结合的)与“无活性”MATCH分子的级分。当应用保守峰值拟合时,分析显示了11.4%至4.7%的无活性蛋白。

### 具体实施方式

[0056] 在这里,我们提出了一种新型形式,所述新型形式呈现出含有多抗体可变结构域的两条蛋白链的定量异源二聚体组装。这个形式由两个分开的可变结构域对(两个Fv片段)的核心组成,其中,两个可变轻结构域和两个可变重结构域各自位于一条独立的蛋白链上,由此驱动两条蛋白链的同源二聚化。最多达两个具有高结构域内和结构域间稳定性的scFv形式中的额外的可变结构域与任一肽链的氨基和/或羧基末端融合,形成最多达六特异性异源二聚体蛋白。

[0057] 因此,第一方面,本发明涉及一种异源二聚体蛋白,其包含第一和第二单链蛋白,其中所述第一单链蛋白包含第一氨基酸序列,所述第一氨基酸序列由以下组成(从N末端至C末端):

[0058] (ia) 第一VL结构域;

[0059] (iia) 第一多肽接头,以及

[0060] (iiia) 第二VL结构域,并且

[0061] 其中所述第二单链蛋白包含第二氨基酸序列,所述第二氨基酸序列由以下组成(从N末端至C末端):

[0062] (ib) 第一VH结构域;

[0063] (iib) 第二多肽接头,以及

[0064] (iiib) 第二VH结构域,并且

[0065] 其中所述第一VL结构域与所述第一或所述第二VH结构域形成可变结构域第一同源对,其对第一靶标抗原具有特异性,并且所述第二VL结构域与另一个所述VH结构域形成可变结构域第二同源对,其对第二靶标抗原具有特异性,并且其中所述第一或所述第二单链蛋白中的至少一个还包含

[0066] (iv) 至少一个作为第三功能性结构域的额外的结构域,其通过第三多肽接头与所述第一或所述第二氨基酸序列融合。

[0067] 在整篇说明书和随后的权利要求书中,除非上下文另有要求,否则词语“包含”将被理解为暗示包含所述整体、组合物或步骤或整体或步骤的组,而任意额外的整体、组合物或步骤或整体、组合物或步骤的组也可任选地存在,包括其中不存在额外的整体、组合物或步骤或整体、组合物或步骤的组的实施方案。关于这些后面的实施方案,术语“包含”因此包括较窄的术语“由……组成”。

[0068] 在本说明书全文中引用了若干文献。无论是上文还是下文，本文引用的每个文件（包括所有专利、专利申请、科学出版物、制造商说明书、说明书、GenBank登录号序列提交等）其整体通过引用并入本文至在相应专利法下可能的程度。本文中没有任何内容被解释为承认本发明无权通过在先发明早于这些公开。

[0069] 在本发明的上下文中，术语“VL结构域”和“VH结构域”分别指抗体的可变轻链结构域和可变重链结构域。在本发明的上下文中，术语“抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分，即含有特异性结合抗原的抗原结合位点的分子，即包括包含至少一个抗体的抗原结合片段的抗体部分。

[0070] 在本发明的上下文中，如果抗体或任意结合分子与作为靶标的抗原/同源结合配偶体具有100 $\mu$ M或更小，优选50 $\mu$ M或更小，优选30 $\mu$ M或更小，优选20 $\mu$ M或更小，优选10 $\mu$ M或更小，优选5 $\mu$ M或更小，更优选1 $\mu$ M或更小，更优选900nM或更小，更优选800nM或更小，更优选700nM或更小，更优选600nM或更小，更优选500nM或更小，更优选400nM或更小，更优选300nM或更小，更优选200nM或更小，甚至更优选100nM或更小，进一步优选为90nM或更小，进一步优选为80nM或更小，进一步优选为70nM或更小，进一步优选为60nM或更小，进一步优选为50nM或更小，进一步优选为40nM或更小，甚至更优选30nM或更小，甚至更优选20nM或更小，甚至更优选10nM或更小的解离常数KD，则所述抗体或任意结合分子通常被认为与所述抗原（对于抗体的情况）或与所述同源结合配偶体（通常对于结合分子的情况）“特异性结合”。

[0071] 在本发明的上下文中，术语“功能性结构域”是指具有预定义功能，例如酶活性或与同源配体特异性结合的蛋白类结构域，其中，所述蛋白类结构域是具有至少一个二级结构要素的结构域。用于确定多肽或蛋白质中二级结构的存在的方法，例如X-射线晶体法、圆二色谱法（CD）、振动圆二色谱法（VCD）、NMR或FT-IR，或用于预测多肽中二级结构的存在的方法，例如PEP-FOLD（Shen等人，*J.Chem.Theor.Comput.* 10 (2014) 4745-4758）是本领域技术人员所熟知的。在特定的实施方案中，所述蛋白类结构域是具有三级结构的结构化的结构域。在特定的实施方案中，所述蛋白类结构域包含至少约20个氨基酸残基（参见Heitz等人，*Biochemistry* 38 (1999) 10615-25），特别是至少约50个氨基酸残基，更特别是至少约100个氨基酸残基。

[0072] 在本发明的上下文中，术语“多肽接头”是指连接两个结构域的通过肽键连接的由氨基酸残基链组成的接头，每个结构域与接头的一端连接。在特定的实施方案中，多肽接头具有2至30个氨基酸残基（例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸残基）的连续链。在特定的实施方案中，多肽接头是非结构化的多肽。如上所述，用于确定多肽中二级结构的存在的方法，例如X-射线晶体法、圆二色谱法（CD）、振动圆二色谱法（VCD）、NMR或FT-IR，或用于预测多肽中二级结构的存在的方法，流入PEP-FOLD（Shen等人，*J.Chem.Theor.Comput.* 10 (2014) 4745-4758）是本领域技术人员所熟知的。

[0073] 本发明的特征如下：

[0074] • 使用抗体可变结构域以产生异源二聚体形式，其中，两个VL均位于一条蛋白链上，而相应的VH位于第二条蛋白链上。

[0075] • 异源二聚体核心结构域允许附加额外的功能性结构域，例如结合结构域，以产生三、四、五或六特异性实体。

[0076] • 多个异源二聚体核心组装体的高效配对的实例。

[0077] • 组合筛选共享一个共同的异源二聚体核心结构域的多个结合结构域混合物的解决方案简单。

[0078] 在一个特定的实施方案中,本发明涉及一种异源二聚体蛋白,其中所述第一或所述第二单链蛋白还包含

[0079] (v) 第四功能性结构域,其通过第四多肽接头与所述第一或所述第二氨基酸序列融合。

[0080] 在一个特定的实施方案中,本发明涉及一种异源二聚体蛋白,其中所述第一或所述第二单链蛋白还包含

[0081] (vi) 第五功能性结构域,其通过第五多肽接头与所述第一或所述第二氨基酸序列融合。

[0082] 在一个特定的实施方案中,本发明涉及一种异源二聚体蛋白,其中所述第一或所述第二单链蛋白还包含

[0083] (vii) 第六功能性结构域,其通过第六多肽接头与所述第一或所述第二氨基酸序列融合。

[0084] 在特定的实施方案中,所述异源二聚体蛋白包含所述第三和所述第四功能性结构域。在这样的实施方案中,所述异源二聚体蛋白是四价的,在特定的实施方案中,所述异源二聚体蛋白是四特异性的。

[0085] 在特定的实施方案中,所述异源二聚体蛋白包含所述第三、所述第四、所述第五和所述第六功能性结构域。在这样的实施方案中,所述异源二聚体蛋白是六价的,在特定的实施方案中,所述异源二聚体蛋白是六特异性的。

[0086] 在特定的实施方案中,所述异源二聚体蛋白不包含第一和第二免疫球蛋白恒定结构域的同源对,其中,所述第一免疫球蛋白恒定结构域被包含在所述第一单链蛋白中,并且其中,所述第二免疫球蛋白恒定结构域被包含在所述第二单链蛋白中。在特定的实施方案中,所述第一和所述第二单链蛋白中的至少一个不包含免疫球蛋白恒定结构域。在特定的实施方案中,所述第一和所述第二单链蛋白均不包含免疫球蛋白恒定结构域。

[0087] 在特定的实施方案中,除了(i)所述第一VL结构域和所述第一VH结构域的同源对以及(ii)所述第二VL结构域和所述第二VH结构域的同源对,所述异二聚体蛋白不包含所述第一单链蛋白中的第一蛋白类相互作用结构域和所述第二单链蛋白中的第二蛋白类相互作用结构域的同源对。

[0088] 在特定的实施方案中,所述第一多肽接头由5至20个氨基酸残基,特别是6至15个氨基酸残基组成。在特定的实施方案中,所述多肽接头具有序列(GmS)<sub>n</sub>;其中m独立地选自2、3和4;并且n选自1、2、3、4和5。

[0089] 在特定的其他实施方案中,所述第一多肽接头由11至20个氨基酸残基,特别是11至15个氨基酸残基组成。在特定的实施方案中,所述多肽接头具有序列(GmS)<sub>n</sub>;其中m独立地选自2、3和4;并且n选自3、4和5。

[0090] 在特定的实施方案中,所述第二多肽接头由5至20个氨基酸残基,特别是6至15个氨基酸残基组成。在特定的实施方案中,所述多肽接头具有序列(GmS)<sub>n</sub>;其中m独立地选自2、3和4;并且n选自1、2、3、4和5。

[0091] 在特定的其他实施方案中,所述第二多肽接头由11至20个氨基酸残基,特别是11至15个氨基酸残基组成。在特定的实施方案中,所述多肽接头具有序列 (GmS)<sub>n</sub>;其中m独立地选自2、3和4;并且n选自3、4和5。

[0092] 在特定的实施方案中,所述第三、第四、第五和/或第六多肽接头由8至20个氨基酸残基,特别是10至15个氨基酸残基组成。在特定的实施方案中,所述多肽接头独立地具有序列 (GmS)<sub>n</sub>;其中m独立地选自2、3和4,特别是4;并且n选自1、2、3、4和5,特别是选自2和3。

[0093] 在特定的实施方案中,所述第一VL结构域 (ia) 和所述第一VH结构域 (ib) 形成可变结构域第一同源对,其对第一靶标抗原具有特异性,并且所述第二VL结构域 (iia) 和所述第二VH结构域 (iib) 形成可变结构域第二同源对,其对第二靶标抗原具有特异性。在这样的实施方案中,所述第一和所述第二单链蛋白以所述单链蛋白的平行排列方式形成所述异源二聚体蛋白。

[0094] 在特定的这种实施方案中,所述第一多肽接头由10至20个氨基酸残基,特别是12至17个氨基酸残基,特别是15个氨基酸残基组成。在特定的实施方案中,所述多肽接头具有序列 (GmS)<sub>n</sub>;其中m独立地选自2、3和4,特别是4;并且n选自1、2、3、4和5,特别是3。

[0095] 在特定的这种实施方案中,所述第二多肽接头由10至20个氨基酸残基,特别是12至17个氨基酸残基,特别是15个氨基酸残基组成。在特定的实施方案中,所述多肽接头具有序列 (GmS)<sub>n</sub>;其中m独立地选自2、3和4,特别是4;并且n选自1、2、3、4和5,特别是3。

[0096] 在特定的这种实施方案中,所述第三、第四、第五和/或第六多肽接头由10至20个氨基酸残基,特别是12至17个氨基酸残基,特别是15个氨基酸残基组成。在特定的实施方案中,所述多肽接头具有序列 (GmS)<sub>n</sub>;其中m独立地选自2、3和4,特别是4;并且n选自1、2、3、4和5,特别是3。

[0097] 在特定的其他实施方案中,所述第一VL结构域 (ia) 和所述第二VH结构域 (iib) 形成可变结构域第一同源对,其对第一靶标抗原具有特异性,并且所述第二VL结构域 (iia) 和所述第一VH结构域 (ib) 形成可变结构域第二同源对,其对第二靶标抗原具有特异性。在这样的实施方案中,所述第一和所述第二单链蛋白以所述单链蛋白的反向平行排列方式形成所述异源二聚体蛋白。

[0098] 在特定的这种实施方案中,所述第一多肽接头由5至12个氨基酸残基,特别是5至10个氨基酸残基,特别是6个氨基酸残基组成。在特定的实施方案中,所述多肽接头具有序列 (GmS)<sub>n</sub>;其中m独立地选自2、3和4,特别是2;并且n选自1、2、3、4和5,特别是2。

[0099] 在特定的这种实施方案中,所述第二多肽接头由5至12个氨基酸残基,特别是6至10个氨基酸残基,特别是8个氨基酸残基组成。在特定的实施方案中,所述多肽接头具有序列 (GmS)<sub>n</sub>;其中m独立地选自2、3和4,特别是3;并且n选自1、2、3、4和5,特别是2。

[0100] 在特定的这种实施方案中,所述第三、第四、第五和/或第六多肽接头由10至20个氨基酸残基,特别是8至12个氨基酸残基,特别是10个氨基酸残基组成。在特定的实施方案中,所述多肽接头具有序列 (GmS)<sub>n</sub>;其中m独立地选自2、3和4,特别是4;并且n选自1、2、3、4和5,特别是2。

[0101] 在特定的实施方案中,所述第三、第四、第五和/或第六功能性结构域独立地选自以下:结合结构域、毒素、酶、激素、信号传导蛋白和白蛋白。

[0102] 在特定的实施方案中,所述第三、第四、第五和/或第六功能性结构域独立地选自

结合结构域。

[0103] 在特定的这种实施方案中,结合结构域独立地选自以下:基于抗体的结合结构域,包括但不限于scFv、Fab和单个抗体可变结构域,基于来自鲨鱼的VNAR结构的单结构域抗体,以及基于替代骨架的结合结构域,包括但不限于基于锚蛋白的结构域、低聚物、avimer、anticalin、纤连蛋白和构建到抗体的恒定区的结合位点(例如f-star技术)。

[0104] 在特定的这种实施方案中,所述结合结构域是基于抗体的结合结构域,其选自单链Fv片段和单抗体可变结构域。

[0105] 在某些这种实施方案中,这种单链Fv片段中的可变结构域的顺序选自(从N端至C端)VL-(接头)-VH和VH-(接头)-VL。在某些实施方案中,对于包含在异源二聚体蛋白中的所有单链Fv片段,可变结构域的顺序是相同的。在某些实施方案中,三个VL结构域分别通过所述第一多肽接头和所述第三、第四和第五多肽接头中的一个彼此连接,例如,其中按VL-(接头)-VH顺序的单链Fv片段是来自所述第一氨基酸序列的C-末端。在某些实施方案中,三个VL结构域分别通过所述第二多肽接头和所述第三、第四和第五多肽接头中的一个彼此连接,例如,其中按VL-(接头)-VH顺序的单链Fv片段是来自所述第二氨基酸序列的N-末端(参见图1和4)。因此,在某些实施方案中,所述第一和所述第二单链蛋白中的至少一个包含由分别通过两个多肽接头连接的三个VL结构域或三个VH结构域组成的氨基酸序列。

[0106] 在某些其他实施方案中,通过相应的接头与所述第一或第二氨基酸序列的N-末端和/或C-末端直接相连的任意这种基于抗体的结合结构域的可变结构域是(a)在与所述第一氨基酸序列融合的情况下,是VH结构域,以及(b)在与所述第二氨基酸序列融合的情况下,是VL结构域。因此,VH结构域与VL-接头-VL核心区域的N-末端和/或C-末端融合,并且VL结构域与VH-接头-VH核心区域的N-末端和/或C-末端融合(例如参见图3)。

[0107] 在特定的实施方案中,所述第三、第四、第五和/或第六结合结构域是单链Fv片段。

[0108] 在特定的这种实施方案中,连接所述单链Fv片段的可变结构域的多肽接头由15至25个氨基酸残基,特别是20个氨基酸残基组成。在特定的实施方案中,所述多肽接头具有序列(GGGGS)<sub>n</sub>,n选自3、5和4,特别是4。

[0109] 在特定的实施方案中,至少一个所述抗体可变结构域包含源自亲本兔抗体的CDR区域。

[0110] 在特定的实施方案中,至少一个所述抗体可变结构域包含人框架区域(framework region)。

[0111] 在特定的这种实施方案中,至少一个所述VL结构域包含(i)人V<sub>k</sub>框架区域I至III;(ii)CDR结构域CDR1、CDR2和CDR3;和(iii)框架区域IV,其选自

[0112] a. 用于框架区域IV的人V<sub>λ</sub>种系序列,特别是选自以下列表的V<sub>λ</sub>种系序列:

[0113] 根据WO 2014/206561的SEQ ID NO.16至22;

[0114] b. 基于V<sub>λ</sub>的序列,其是(bi)来自用于框架区域IV的人V<sub>λ</sub>种系序列的共有V<sub>λ</sub>序列,特别是根据WO 2014/206561的SEQ ID NO.17;或者是(bii)

[0115] 来自用于框架区域IV的重排的人V<sub>λ</sub>序列的共有V<sub>λ</sub>序列,特别是选自以下列表的V<sub>λ</sub>共有序列:根据WO 2014/206561的SEQ ID NO.16和17

[0116] c. 基于V<sub>λ</sub>的序列,与用于框架区域IV的最接近的人V<sub>λ</sub>种系序列相比,其具有一个或两个突变,特别是一个突变。

[0117] 在某些实施方案中,所述第一和所述第二VL和VH结构域之一的同源对对于选自以下列表的抗原是特异性的:癌症靶标;和存在于免疫效应细胞上的靶标,例如CD3。

[0118] 在特定的所述实施方案中,所述第三、第四、第五和/或第六结合结构域是对选自以下的靶标具有特异性的单链Fv片段:癌症靶标,和存在于免疫效应细胞上的靶标,例如CD3。

[0119] 在本申请的上下文中,术语“靶标”是指结合结构域的同源结合配偶体,例如由这种结合结构域特异性结合的抗体的抗原。

[0120] 在特定的实施方案中,所述靶标是癌症靶标,特别是与非肿瘤细胞表面相比,其以增加的浓度和/或以不同的空间构型存在于一种或多种肿瘤细胞类型或肿瘤相关细胞的表面上的抗原或抗原表位。特别地,所述癌症靶标存在于一种或多种肿瘤或肿瘤基质细胞类型的表面上,但不存在于非肿瘤细胞的表面上。

[0121] 在其它特定的实施方案中,所述靶标是优先在参与自身免疫疾病的细胞上表达的抗原或抗原表位。在其它实施方案中,所述抗原或抗原表位优先在参与炎症疾病的细胞上表达。

[0122] 在特定的实施方案中,所述靶标是存在于免疫效应细胞上的靶标。在特定的实施方案中,所述靶是CD3。

[0123] 在某些实施方案中,所述第一和所述第二单链蛋白选自以下,其中,VLA、VLB、VHA和VHB对应于所述第一和第二VL和VH结构域,并且VLC、VLD、VLE、VLF、VHC、VHD、VHE和VHF是带有接头的单链片段的一部分,对应于别通过第三、第四、第五和/或第六接头(LINKER3、LINKER4、LINKER5和LINKER6)与核心结构域(以粗体字母表示)连接的所述第三、第四、第五和/或第六功能性结构域;所有构建体都以N-末端至C-末端的方向书写:

[0124] A(平行;6Fvs):

[0125] 链1:VLC-(接头)-VHC-(接头3)-VLA-(接头1)-VLB-(接头4)-VLD-(接头)-VHD

[0126] 链2:VLE-(接头)-VHE-(接头5)-VHA-(接头2)-VHB-(接头6)-VLF-(接头)-VHFB(反向平行6Fvs):

[0127] 链1:VLC-(接头)-VHC-(接头3)-VLA-(接头1)-VLB-(接头4)-VLD-(接头)-VHD

[0128] 链2:VLE-(接头)-VHE-(接头5)-VHB-(接头2)-VHA-(接头6)-VLF-(接头)-VHF

[0129] C1(反向平行4Fvs)(参见图1):

[0130] 链1:VLC-(接头)-VHC-(接头3)-VLA-(接头1)-VLB

[0131] 链2:VLD-(接头)-VHD-(接头4)-VHB-(接头2)-VHA

[0132] C2(反向平行4Fvs)(参见图3):

[0133] 链1:VLC-(接头)-VHC-(接头3)-VLA-(接头1)-VLB

[0134] 链2:VHB-(接头2)-VHA-(接头4)-VLD-(接头)-VHD

[0135] C3(反向平行4Fvs):

[0136] 链1:VLA-(接头1)-VLB-(接头3)-VLC-(接头)-VHC

[0137] 链2:VLD-(接头)-VHD-(接头4)-VHB-(接头2)-VHA

[0138] C4(反向平行4Fvs):

[0139] 链1:VLA-(接头1)-VLB-(接头3)-VLC-(接头)-VHC

[0140] 链2:VHB-(接头2)-VHA-(接头4)-VLD-(接头)-VHD

[0141] D1 (平行4Fvs) (参见图4) :

[0142] 链1:VLC- (接头) -VHC- (接头3) -VLA- (接头1) -VLB

[0143] 链2:VLD- (接头) -VHD- (接头4) -VHA- (接头2) -VHB

[0144] D2 (平行4Fvs) :

[0145] 链1:VLC- (接头) -VHC- (接头3) -VLA- (接头1) -VLB

[0146] 链2:VHA- (接头2) -VHB- (接头4) -VLD- (接头) -VHD

[0147] D3 (平行4Fvs) :

[0148] 链1:VLA- (接头1) -VLB- (接头3) -VLC- (接头) -VHC

[0149] 链2:VLD- (接头) -VHD- (接头4) -VHA- (接头2) -VHB

[0150] D4 (平行4Fvs) :

[0151] 链1:VLA- (接头1) -VLB- (接头3) -VLC- (接头) -VHC

[0152] 链2:VHA- (接头2) -VHB- (接头4) -VLD- (接头) -VHD

[0153] 在这种形式中,在一条蛋白链上的两个分开的可变重结构域VHB和VHC以及在另一条蛋白链上的两个对应的可变轻结构域VLB和VLC的定位 (VH-VH/VL-VL) 防止了链内结构域配对的形成,链内结构域配对的形成产生无活性的单链双抗体 (scDb) 样结构,如同使用传统双抗体的VH-VL/VH-VL取向——类似于Kipriyanov等人提出的设计——来驱动异源二聚化的情况一样。相比之下,VH-VH/VL-VL取向迫使形成仅有异源二聚体双特异性至六特异性蛋白。

[0154] 由于VHA与VLB和VHB与VLA的不适当配对会形成VHA-VLB和VHB-VLA对,理论上存在以下可能:结合靶标A和B的VHA-VHB/VLA-VLB核心结构域的VH/VL结构域配对将导致无活性核心结构域。出乎意料的且令人震惊的是,迄今为止还没有观察到这种无活性变体。不希望受理论束缚,由于相对于不匹配配对中发生的潜在的组装干扰,同源对的CDR的组装更有效,所以二聚化可以朝向同源配对驱动。

[0155] 为了进一步驱动异源二聚化朝向VH-VH/VL-VL核心结构域中的活性配对,可以在VH-VH/VL-VL核心结构域的一个或两个(如果相互应用)VL/VH对中应用knob-into-hole或类似技术。因此,在某些实施方案中,所述异源二聚体蛋白的VH-VH/VL-VL核心结构域中的活性配对还由选自以下的技术支持:knob-into-hole和链间半胱氨酸桥。

[0156] 第二方面,本发明涉及编码所述第一和第二单链蛋白的一种或两种核酸序列。

[0157] 第三方面,本发明涉及包含所述一种或两种核酸序列的一种或两种载体。

[0158] 第四方面,本发明涉及包含一种或两种载体的一种宿主细胞或多种宿主细胞。

[0159] 第四方面,本发明涉及用于生产本发明的第一和第二单链蛋白或异源二聚体蛋白的方法,其包含(i)提供根据本发明的一种核酸或多种核酸,或根据本发明的一种载体或多种载体,表达所述一种核酸或多种核酸或所述一种载体或多种载体,并从表达系统收集所述第一和第二单链蛋白,或所述异源二聚体蛋白,或者(ii)提供本发明的一种宿主细胞或多种宿主细胞,培养所述一种宿主细胞或多种宿主细胞,并从细胞培养物收集所述第一和第二单链蛋白,或所述异源二聚体蛋白。

[0160] 第五方面,本发明涉及一种药物组合物,其包含本发明的异源二聚体蛋白和药学上可接受的载体。

[0161] 第六方面,本发明涉及用于治疗疾病的本发明的异源二聚体蛋白,所述疾病选自

癌症、炎症和自身免疫疾病,其中,所述VL和VH结构域的同源对的至少一种或所述第三、第四、第五或第六功能性结构域中的至少一种能够与相应疾病中的治疗相关性靶标特异性相互作用。

[0162] 第七方面,本发明涉及用于治疗患有疾病的患者的方法,所述疾病选自癌症、炎症和自身免疫疾病,所述方法包含向受试者施用有效量的本发明的异源二聚体蛋白,其中,所述VL和VH结构域的同源对的至少一种或所述第三、第四、第五或第六功能性结构域中的至少一种能够与相应疾病中的治疗相关性靶标特异性相互作用。

[0163] 文献

[0164] R1.Skerra,A.,and Pliickthun,A.(1988).Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli.Science 240,1038-1041.

[0165] R2.Rothlisberger et al.,(2005).Domain interactions in the Fab fragment:A comparative evaluation of the single-chain Fv and Fab format engineered with variable domains of different stability.J Mol Biol 347,773-789.

[0166] R3.Ridgway et al.,1996.'Knobs-into-holes'engineering of antibody CH3domains for heavy chain heterodimerization.Protein Eng.9,617-621.

[0167] R4.Zhu(1997)Remodeling domain interfaces to enhance heterodimer formation.Protein Sci.6,781-788

[0168] R5.Schaefer,W.,et al.,201 1b.Immunoglobulin domain crossover as a generic approach for the production of bispecific IgG antibodies.Proc.Natl.A cad.Sci.U.S.A.108,1 1 187-1 1192.

[0169] R6.Holliger et al.,."Diabodies":small bivalent and bispecific antibody fragments.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90,6444-6448.

[0170] R7.Arndt et al.,1999.Abispecific diabody that mediates natural killer cell cytotoxicity against xeno-transplantated human Hodgkin's tumors.Blood 94,2562-2568.

[0171] R8.Kipriyanov et al.,1999.Bispecific tandem diabody for tumor therapy with improved antigen binding and pharmacokinetics.J.Mol.Biol.293,41-56.

[0172] R9.Alt et al.,1999.Novel tetravalent and bispecific IgG-like antibody molecules combining single-chain diabodies with the immunoglobulin gamma Fc or CH3 region.FEBS Lett.454,90-94.

[0173] R10.Johnson et al.,2010.Effector cell recruitment with novel Fv-based dual-affinity retargeting protein leads to potent tumor cytolysis and in vivo B-cell depletion.J.Mol.Biol.399,436-449.

[0174] R11.De Jonge et al.,(1995)Production and characterization of bispecific single-chain antibody fragments.Mol.Immunol.32,1405-1412.

[0175] R12.Reiter et al.,(1994)Engineering interchain disulfide bonds into conserved framework regions of Fv fragments:improved biochemical characteristics of recombinant immunotoxins containing disulfide-stabilized



Fv.Protein Eng.7,697-704.

[0176] R13.Pack,P.,and Pliickthun,A.(1992).Miniantibodies:Use of amphipathic helices to produce functional,flexibly linked dimeric Fv fragments with high avidity in Escherichia coli.Biochemistry 31,1579-1584.

[0177] R14.Schoonjans et al.,Fab chains as an efficient heterodimerization scaffold for the production of recombinant bispecific and trispecific antibody derivatives.J Immunol.2000 Dec 15;165(12):7050-7.

[0178] R15.Orcutt et al.,2009.A modular IgG-scFv bispecific antibody topology.Protein Eng.Des.Sel.23,221-228.

[0179] R16.Wu,C.et al.,2007.Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin.Nat.Biotechnol.25,1290-1297.

[0180] R17."mAbs";Kohler&Milstein,Nature.256(1975)495-7

[0181] R18.Umafia et al.,1999.Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity.Nat.Biotechnol.17,176-180

[0182] R19.Yu,Y.J.et al.Sci.Trans.Med.3,84ra44(2011).

[0183] R20.Hinton PR.et al.,2004.Engineered human IgG antibodies with longer serum half-lives in primates.J Biol Chem.279(8):6213-6.

[0184] R21.Spiess et al.,2015.Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies.Mol Immunol.2015 Jan 27.

[0185] R22.Davis et al.,2013.Readily isolated bispecific antibodies with native immunoglobulin format.US Patent 8,586,713.Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

[0186] R23.Shahied LS,et al.,Bispecific minibodies targeting HER2/neu and CD16exhibit improved tumor lysis when placed in a divalent tumor antigen binding format.J Biol Chem.2004 Dec 24;279(52):53907-14.Epub 2004 Oct 7.

[0187] R24.Milstein.C and Cuello.A.C.(1983)Nature,305,537-54

[0188] R25.Chang et al.,The dock and lock method:a novel platform technology for building multivalent,multifunctional structures of defined composition with retained bioactivity.Clin Cancer Res.2007 Sep 15;13(18 Pt 2):5586s-5591s.

[0189] R26.Deyev et al.,(2003).Design of multivalent complexes using the barnase-barstar module.Nature biotechnology,21(12),1486-1492.

[0190] R27.Pack,P.,and Pliickthun,A.(1992).Miniantibodies:Use of amphipathic helices to produce functional,flexibly linked dimeric Fv fragments with high avidity in Escherichia coli.Biochemistry 31,1579-1584.

[0191] R28.Halin et al.(2003).Synergistic therapeutic effects of a tumor targeting antibody fragment,fused to interleukin 12 and to tumor necrosis

factor a. *Cancer research*, 63 (12), 3202-3210.

[0192] R29. D. Muller et al., Improved pharmacokinetics of recombinant bispecific antibody molecules by fusion to human serum albumin *J. Biol. Chem.*, 282 (2007), pp. 12650-12660 R30. EP1293514

[0193] R30. Milstein C, and Cuello AC (1983) Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. *Nature* 305:537-540.

[0194] 实施例

[0195] 实施例1:多特异性形式的构建

[0196] 为了构建被命名为通过同源异源二聚化形成的基于多特异性抗体的治疗剂 (MATCH) 的异源二聚体多特异性形式, 选择了四个良好表征的可变结构域, 其分别定向针对人肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF)、人白细胞介素-5受体 (IL5R)、人CD3 $\epsilon$  (CD3) 和白细胞介素-23受体 (IL23R)。基于scFv形式中各个可变结构域的已知结合特征, 在多特异性分子的背景下评估了同源VL/VH对的活性, 并由此评估了正确交联。分子外周的可变结构域位于每条蛋白链的氨基(N)-末端或者羧基(C)-末端作为单链Fv (scFv) 片段, 或者位于异源二聚化核心结构域。相对于VL和VH位于相同蛋白链上的外周scFv片段, 核心结构域的同源可变结构域VL和VH位于两条不同的蛋白链上。在下面提供的实施例中, 位于两个核心结构域中的靶标结合结构域分别定向针对CD3或TNF。与IL23R或IL5R结合的可变结构域已经用于外周scFv模块, 所述外周scFv模块通过使用10或15个氨基酸的柔性氨基酸接头与核心结构域的N-末端或C-末端融合。

[0197] 为了探索本文呈现的异源二聚体核心组装体的不同变体, 已经产生了同源可变结构域对的平行以及反向平行取向, 每个都具有一个或两个额外的scFv模块附加到核心域的N-末端或C-末端。

[0198] 在反向平行排列方式中, 从每个蛋白链 (蛋白链1至9) 的N-末端至C-末端, 按取向VHA-VHB/VLB-VLA构建了核心结构域。在一个实施方案中, 通过将一个scFv模块与两条蛋白链中的每一条进行N-末端融合而形成四特异性形式 (构建体由蛋白链1+2组成)。相应的三特异性形式含有仅与两条蛋白链中的一条融合的scFv模块 (构建体1+5)。为了研究工程化的二硫桥可能对核心结构域组装体产生的稳定化作用, 还产生了具有C-末端半胱氨酸的上述两种形式, 这导致每条蛋白链核心结构域中的同源Fv交联。对于四特异性形式, 各个异源二聚体形式由蛋白链3+4组成, 对于三特异性形式, 由蛋白链4+6组成。在反平行排列方式的变体中, 位于核心结构域中的含有串联VH的链上的scFv模块与C-末端而不是N-末端融合, 并与含有组装的scFv模块的蛋白链在N-末端结合, 形成四特异性形式 (蛋白链1+7), 或与仅含有一个核心结构域的蛋白链结合, 形成三特异性形式 (蛋白质链5+7)。

[0199] 在平行排列方式中, 从每条蛋白链排列方式的N-末端至C-末端, 按取向VHA-VHB/VLA-VLB构建了核心结构域。通过蛋白链9+10的共表达, 产生了两个scFv模块均与核心结构域的N-末端侧融合的四特异性形式。通过蛋白链10+11的共表达, 产生了相应的三特异性组装体, 其中scFv模块仅在含有串联VH的链上。

[0200] 为了产生表1中概述的构建体, 将Fv结构域和接头的氨基酸序列回译成相应的核酸序列, 其被从头合成。通过标准分子生物学技术 (例如 Sambrook, J. 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*) 组装编码序列并克隆到合适的表达载体 (例如 pcDNA3.1,

Invitrogen) 中用于重组蛋白分泌。

#### [0201] 实施例2:表达和纯化

[0202] 通过使用瞬时基因表达方案 (FreeStyle™ MAX系统), 将构建体共转染到悬浮细胞系 (例如CHO-S Freestyle™, Invitrogen) 中来进行多特异性形式组装体的表达。表2中概述了用于产生多特异性形式组装体的共表达表达载体的组合。培养数天后, 回收分泌抗体片段的细胞的上清液用于纯化。将蛋白捕获在合适的亲和树脂 (例如Canto L, GE Healthcare) 上, 充分洗涤并通过pH变换洗脱。将洗脱的蛋白中和并交换缓冲液以得到纯化的混合物。通过尺寸排阻高效液相色谱 (SE-HPLC) (表3和图5) 和十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) (图6) 分析蛋白的纯度和UV/Vis光谱以分析蛋白含量。将蛋白浓度调节至所需水平并进行稳定性分析。

[0203] 使用单步亲和色谱法, 所有构建体都可以以高纯度和单体级分洗脱 (图5和6), 证实同源可变结构域的有效性和正确配对。此外, 在非还原SDS-Page中, PRO357几乎以共价连接的异源二聚体的大小 (-106kDa) 定量迁移, 证实了恰当的MATCH链间交联并展现出高效性并接近完全形成链间二硫键。由于结构限制, 在错误配对的可变结构域之间不太可能形成这种二硫键。因此, 该结果表明异源二聚化几乎仅在同源可变结构域对之间发生。

#### [0204] 实施例3:储存稳定性评估

[0205] 通过蛋白L纯化的样品中蛋白质含量的显著均质性 (homogeneity) 进一步证明了有效的MATCH链二聚化。在4周的过程中并储存在4°C和37°C下, 通过SE-HPLC分析了蛋白的寡聚化并通过SDS-PAGE分析了蛋白的降解 (参见图7至9)。在研究之前, 将样品浓度调节至1g/L, 并确定t0时间点。通过在Shodex KW-402.5-4F (Showa Denko) 上分离样品并评价所得的色谱图来量化单体含量。为了计算蛋白单体的相对百分比, 将单体峰的面积除以不能归因于样品基质的峰的总面积。用Any kD Mini-Protean TGX凝胶 (Bio-Rad Laboratories) 和考马斯亮蓝染色, 通过SDS-PAGE分析评估蛋白降解。使用配备有Nanoquant板 (Tecan Group Ltd.) 的Infinity读数器M200Pro, 通过UV-Vis光谱监测不同时间点的蛋白浓度。

#### [0206] 实施例4:热诱导去折叠 (thermal unfolding)

[0207] 基本上如Niesen (Niesen等人, Nat Protoc. 2 (2007) 2212-21) 所述, 通过差示扫描荧光法 (DSF) 测定所测试的构建体的热诱导去折叠的转变中值。在qPCR仪器 (例如, MX3005p, Agilent Technologies) 中进行DSF测定。将样品在缓冲液 (柠檬酸盐-磷酸盐, pH 6.4, 0.25M NaCl) 中稀释, 所述缓冲液总体积为25μL, 含有5×SYPRO橙的终浓度为。样品测量三次, 温变自25-96X程序化。获得荧光信号, 并用GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.) 分析原始数据。

#### [0208] 实施例5:亲和性测定

[0209] 使用MASS-1SPR仪器 (Sierra Sensors), 通过表面等离子体共振 (SPR) 测量单链Fv (scFv) 形式中单独的靶标结合结构域以及纯化的异源二聚体四特异性构建体对重组靶标蛋白人IL-5受体 (IL5R)、人IL-23受体ECD (IL-2R)、人CD3 γ-ε单链 (CD3) 的结合亲和性。对于亲和性测量 (在HEPES运行缓冲液: 0.01M HEPES, 0.15M NaCl, 0.05%吐温中进行), 使用标准胺偶联法, 使用为每个单独的靶标优化的缓冲系统, 将人异源二聚体单链CD3 γ δ细胞外结构域 (内部生产)、人IL5R (R&D Systems)、人IL23R (Trenzyme) 和人TNF (Peprotech) 等靶标蛋白以100-250RU固定在传感器芯片 (SPR-2Affinity Sensor High Capacity Amine,

Sierra Sensors) 上。对于人TNF- $\alpha$  (TNF), 使用了标准胺传感器。将范围从90至0.703nM的纯化的异源二聚体四特异性构建体的两倍连续稀释液注射到流动池中3分钟(20 $\mu$ l/min), 并允许进行720秒解离。在每个注射周期后, 用45秒注射10mM甘氨酸-HCl pH 1.5使表面再生。通过拟合至少六个浓度的传感图来计算亲和性, 使得平均 $\chi^2$ 低于10%或 $R_{\max}$ 。对于TNF, 不进行连续稀释, 而是仅在90nM下进行单一浓度测量。对数据进行双减(减去参考通道和控制周期)。

[0210] 异源二聚体四特异性构建体对四个靶标中的每一个的亲和性通常非常类似于四特异性形式中使用的单独的结合域(scFv)的亲和性, 包括其免疫反应性被推测为依赖于适当二聚化(即分别由靶向TNF $\alpha$ 和CD3 $\epsilon$ 的二聚体形成的Fv所呈现的那些)的那些CDR。这证明了四特异性构建体中每个可变域的全部功能, 并确认了同源可变结构域对的正确组装。

[0211] 此外, 正如固定的MATCH蛋白的SPR分析所证明的, 看起来无论抗原相遇(antigen-encounter)的顺序如何, 三种多特异性的每一种均能够同时结合所有的四个靶标抗原(图11)。

[0212] 要承认的是, 虽然这些数据表明了适当的MATCH间链组装, 但它们并不一定表明不存在非同源可变结构域交联, 尤其是能产生嵌合型CDR集的MATCH链的“倒置”配对。已经提出, CDR集影响VL-VH配对的效率, 并且我们的SE-HPLC、SDS-PAGE和SPR数据似乎表明MATCH链的同源配对是非常有利的。然而, 为了评估MATCH链倒置配对的程度, 在将MATCH蛋白与摩尔当量的三聚体TNF $\alpha$ (即, 3倍过量的TNF $\alpha$ 抗原表位) 孵育后, 我们进行了抗体和抗体-抗原复合物的SE-HPLC分析。当将该分析方法应用于亲本抗-TNF $\alpha$ scFv时(数据未显示), SE-HPLC曲线显示与三种不同抗体-抗原复合物群体一致的离散峰, 反映了1倍、2倍和3倍scFv:TNF $\alpha$ 复合物的不同大小。此外, 观察到了与溶液中残留的未复合的TNF $\alpha$ 的存在相一致的峰, 而溶液中完全不存在非复合的scFv, 从而验证了该方法应用于鉴定“无活性”抗-TNF $\alpha$ 抗体。

[0213] 由于多特异性分子的分子量较大, MATCH蛋白和MATCH-抗原复合物的分离效率较低。然而, 我们的结果(图12)还清楚地显示了三种MATCH-TNF $\alpha$ 复合物群体和残留的非复合的TNF $\alpha$ 的存在。此外, 1 $\times$ MATCH:TNF $\alpha$ 复合物峰的“肩”表明存在无活性、但二聚的MATCH蛋白。为了估算溶液中无活性MATCH蛋白的比例, 使用PeakFit v.1.2软件对峰进行解卷积, 假定每个峰均为高斯分布, 并绘图以优化拟合优度(图12)。该分析估算, 无活性MATCH蛋白的比例在总MATCH蛋白含量的4.7和11.4%之间(PR0357<PR0356<PR0355), 表明MATCH链的适当二聚化是高度有利的, 特别是在反向平行形式中。

[0214] 表1: 构建体

[0215]

蛋白链	接头1	核心结构域Fv 1	接头2	核心结构域Fv 2	接头3
1	scFv (αIL23R)	VL (αTNFa)	GGSGGS	VL (αCD3)	
2	scFv (αIL5R)	VH (αCD3)	GGSGGS	VH (αTNFa)	
3	scFv (αIL23R)	VL (αTNFa)	GGSGGS	VL (αCD3)	GSC
4	scFv (αIL5R)	VH (αCD3)	GGSGGS	VH (αTNFa)	GSC
5		VL (αTNFa)	GGSGGS	VL (αCD3)	
6		VL (αTNFa)	GGSGGS	VL (αCD3)	GSC
7		VH (αCD3)	GGSGSGGS	VH (αTNFa)	GGGSGGGGS
8		VL (αTNFa)	GGSGGS	VL (αCD3)	
9	scFv (αIL23R) GGGS	VL (αTNFa)	GGGSGGGG GSGGGGS	VL (αCD3)	
10	scFv (αIL5R) GGGS	VH (αCD3)	GGGSGGGG GSGGGGS	VH (αTNFa)	
11		VL (αTNFa)	GGGSGGGG GSGGGGS	VL (αCD3)	

[0216] 表2:多特异性形式组装

[0217]

蛋白ID (Numab)	组装体	蛋白链1	蛋白链2
--------------	-----	------	------

PR0356	1 (参见图1)	1	2
PR0469	2	1	5
PR0357	3 (参见图2)	3	4
PR0470	4	4	6
PR0358	5 (参见图3)	1	7
PR0471	6	5	7
PR0355	7 (参见图4)	9	10
PR0468	8	10	11

[0218] 表3:1步纯化后的尺寸排阻色谱图

蛋白ID (内部)	组装体ID	单体含量	图
<i>PRO356</i>	组装体1	93.9	5A
<i>PRO357</i>	组装体3	94.4	5B
<i>PRO358</i>	组装体5	93.9	5C
<i>PRO355</i>	组装体7	90.4	5D

[0220] 表4:通过差示扫描量热法测定的蛋白热诱导去折叠的中值

蛋白ID (内部)	组装体ID	T <sub>m</sub> [°C]
<i>PRO356</i>	1	67.99
<i>PRO469</i>	2	67.24
<i>PRO357</i>	3	71.27
<i>PRO470</i>	4	70.34
<i>PRO358</i>	5	68.51
<i>PRO471</i>	6	67.98
<i>PRO355</i>	7	67.33
<i>PRO468</i>	8	66.67

[0222] 表5:异源二聚体四特异性构建体的亲和性

[0223]

蛋白ID	对IL5R的亲和性 [M]	对CD3的亲和性 [M]	对IL23R的亲和性 [M]	对TNF的亲和性 [M]
<i>scFvs</i>	2.32E-10	8.57E-09	1.50E-10	2.02E-10
<i>PRO355</i>	1.03E-10	2.01E-08	6.54E-10	3.30E-10
<i>PRO356</i>	1.26E-10	7.14E-09	3.41E-10	2.01E-10
<i>PRO357</i>	1.28E-10	6.69E-09	3.58E-10	1.81E-10
<i>PRO358</i>	2.12E-10	5.60E-09	4.14E-10	2.11E-10

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 努玛创新有限公司
- [0003] <120> 异源二聚体多特异性抗体形式
- [0004] <130> 111473P877PC
- [0005] <150> EP15001758.0 2015-06-15
- [0006] <160> 4
- [0007] <170> PatentIn version 3.5
- [0008] <210> 1
- [0009] <211> 10
- [0010] <212> PRT
- [0011] <213> 人工序列
- [0012] <220>
- [0013] <223> 人工接头
- [0014] <400> 1
- [0015] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
- [0016] 1 5 10
- [0017] <210> 2
- [0018] <211> 15
- [0019] <212> PRT
- [0020] <213> 人工序列
- [0021] <220>
- [0022] <223> 人工接头
- [0023] <400> 2
- [0024] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
- [0025] 1 5 10 15
- [0026] <210> 3
- [0027] <211> 6
- [0028] <212> PRT
- [0029] <213> 人工序列
- [0030] <220>
- [0031] <223> 人工接头
- [0032] <400> 3
- [0033] Gly Gly Ser Gly Gly Ser
- [0034] 1 5
- [0035] <210> 4
- [0036] <211> 8
- [0037] <212> PRT
- [0038] <213> 人工序列





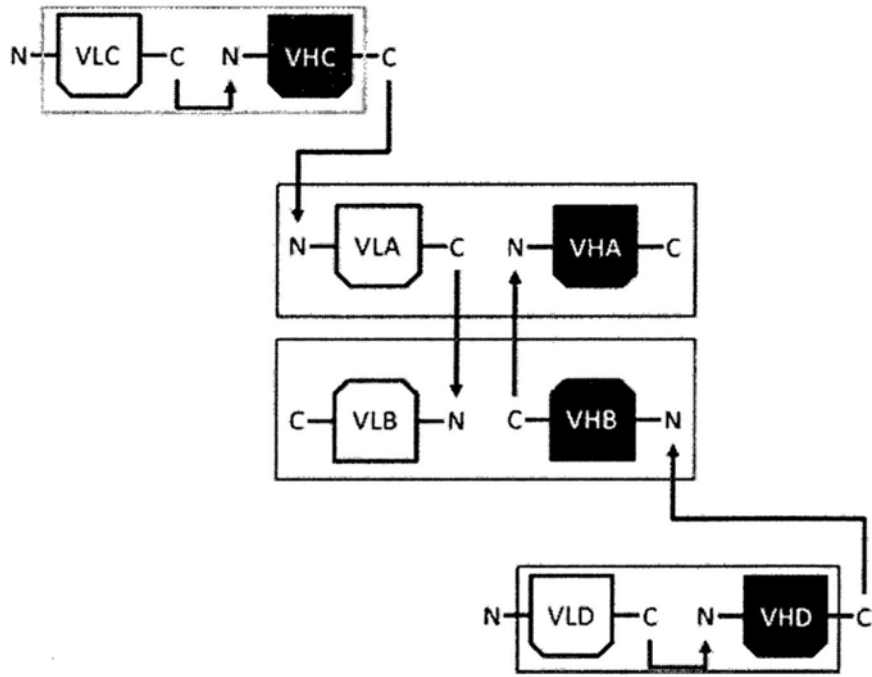


图1

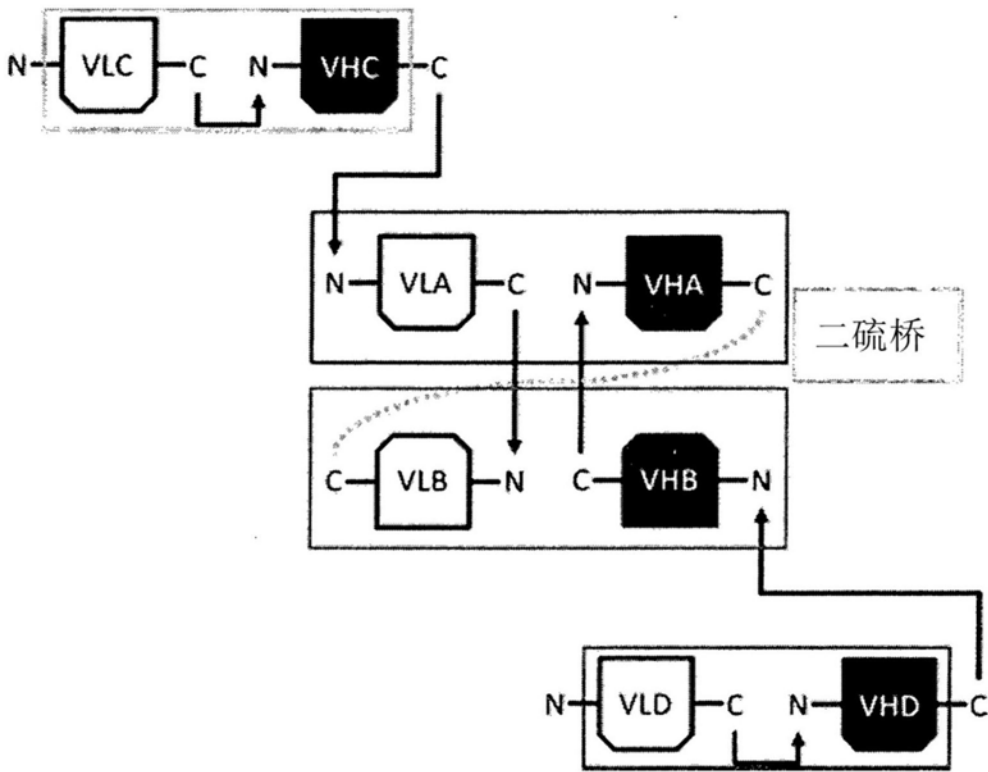


图2

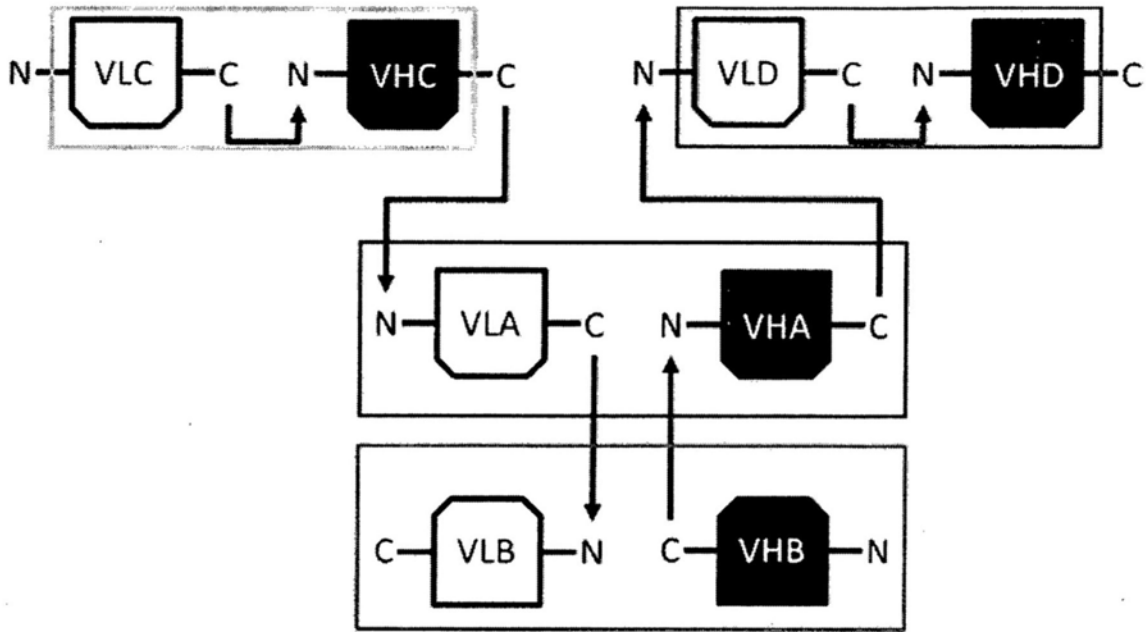


图3

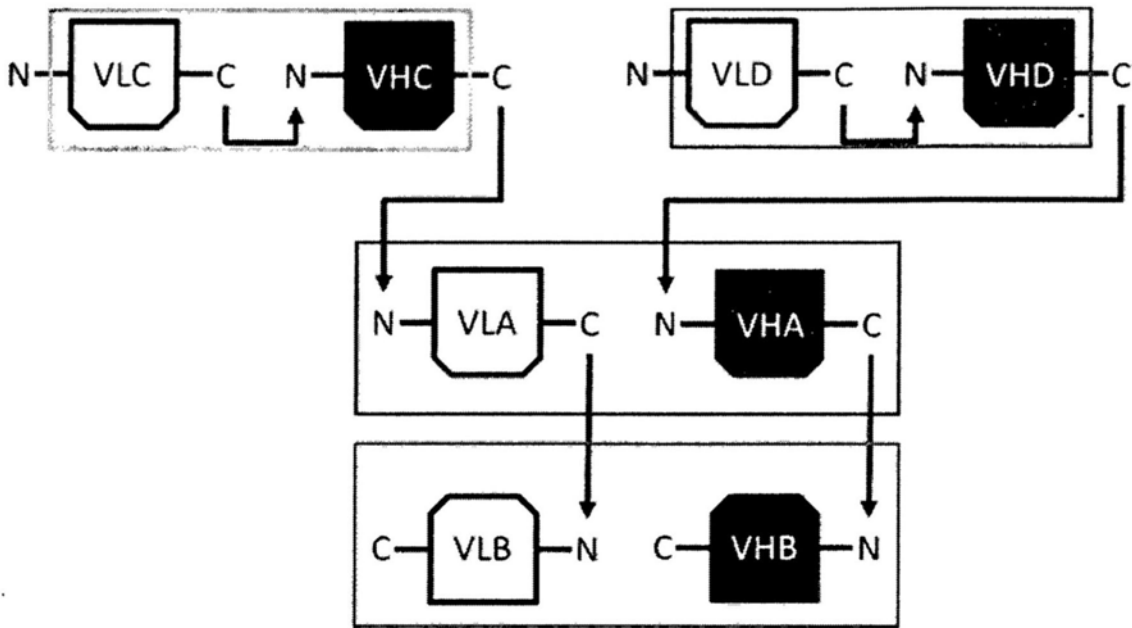
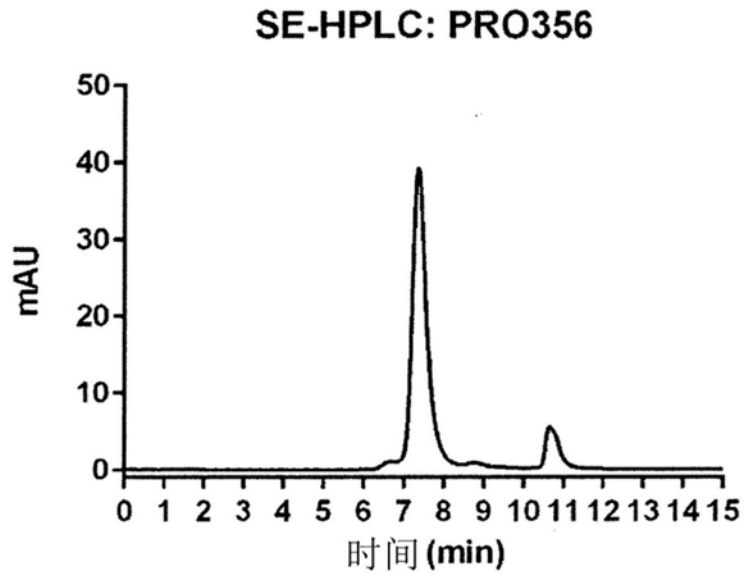


图4

**A:**



**B:**

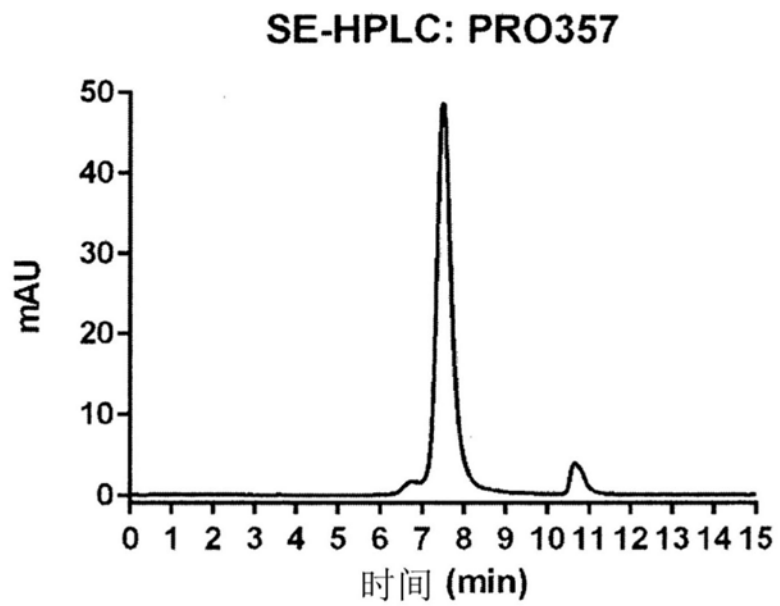
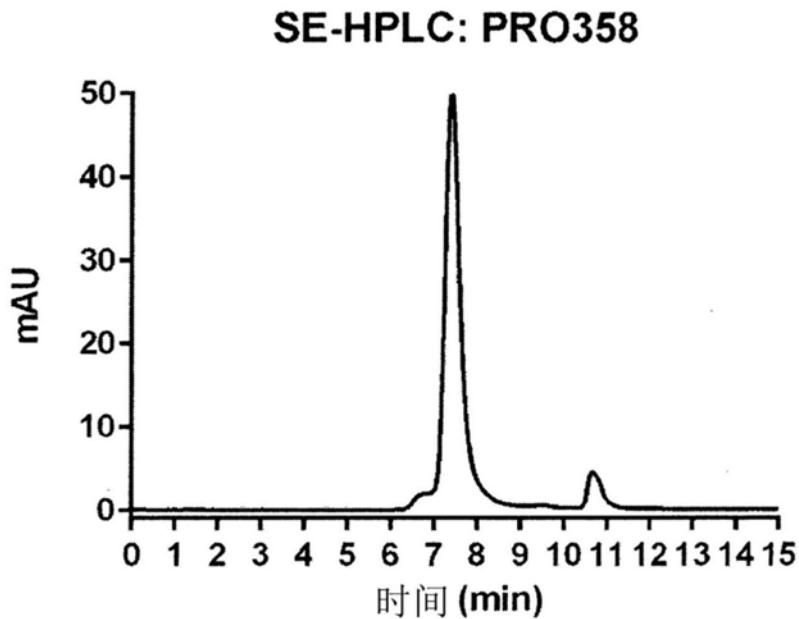


图5

**C:**



**D:**

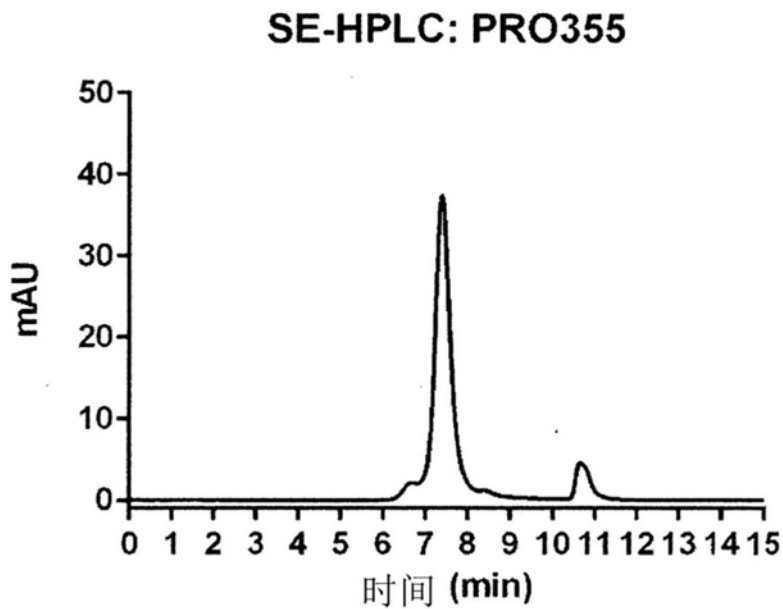


图5(续)

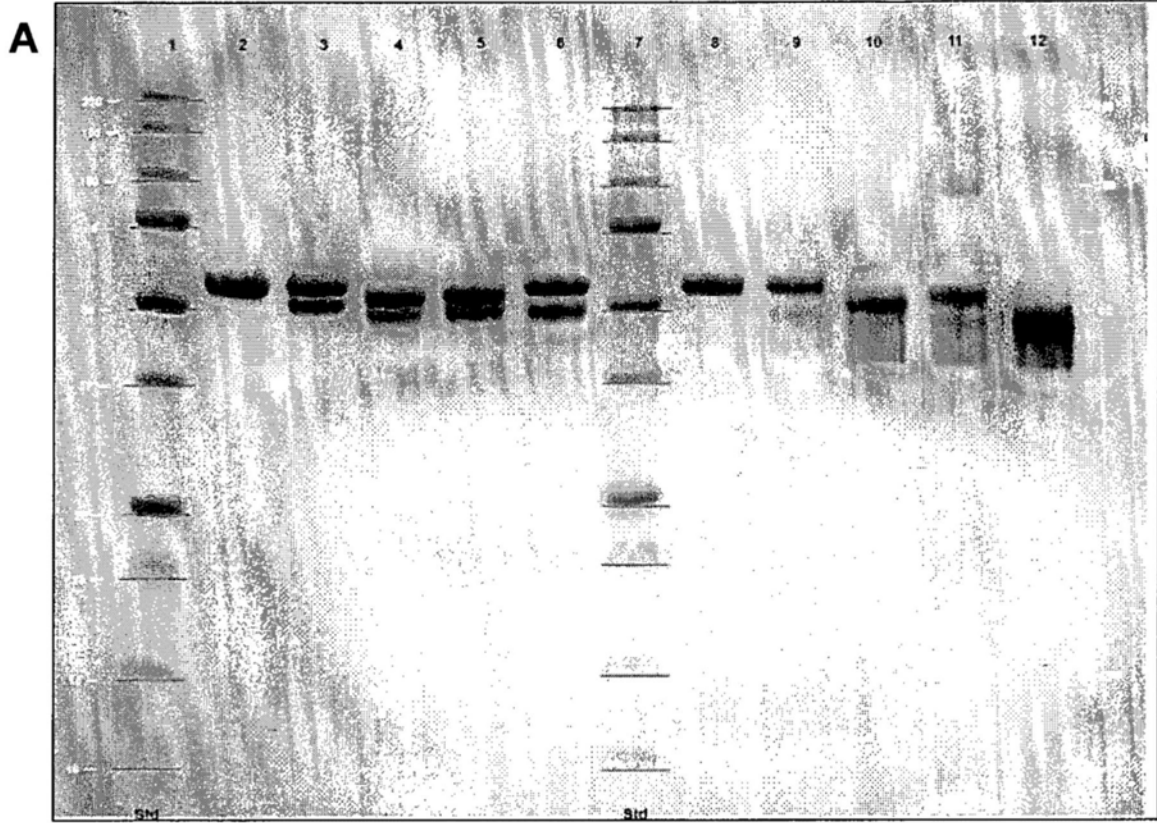
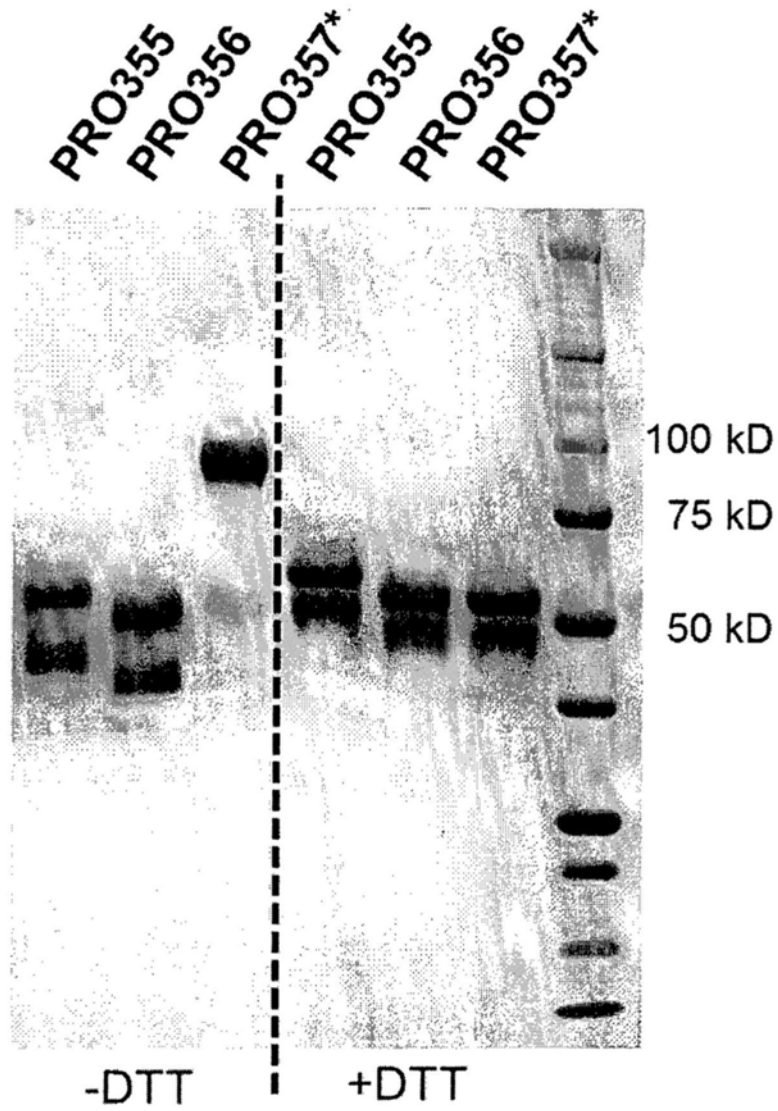


图6

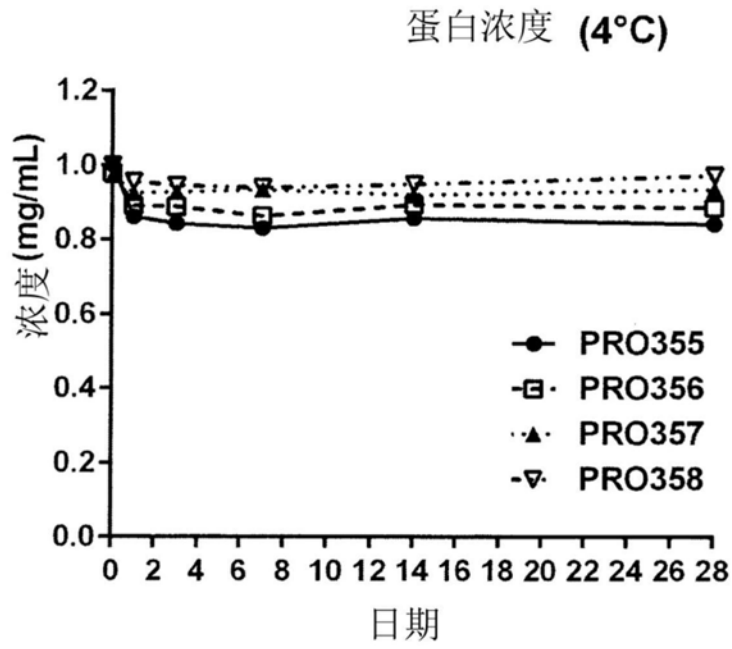
**B:**



\* 含链间二硫桥

图6(续)

A:



B:

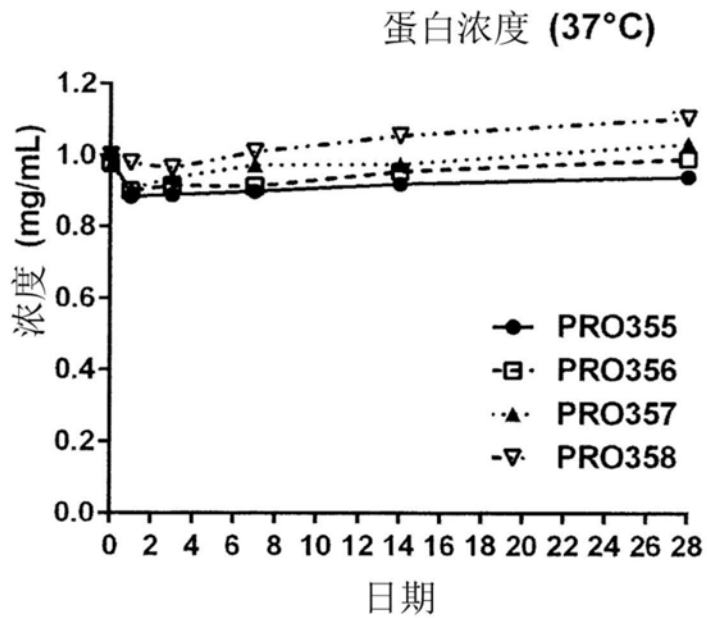
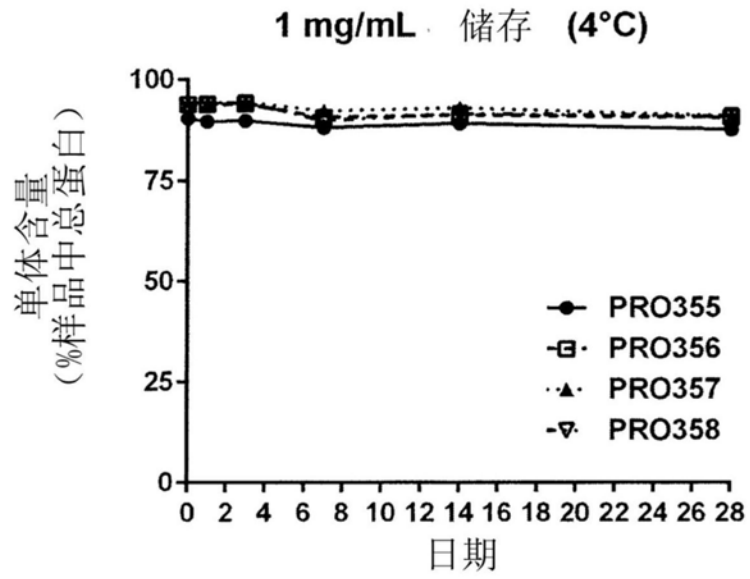


图7



**A:**



**B:**

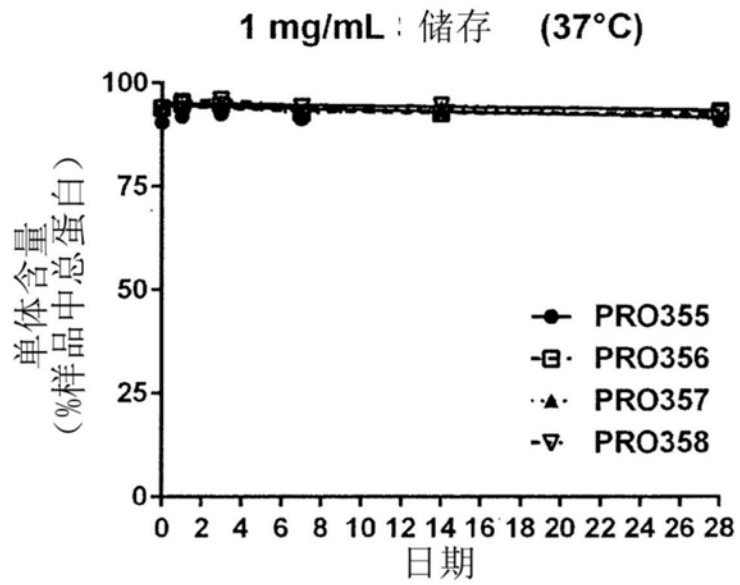


图8

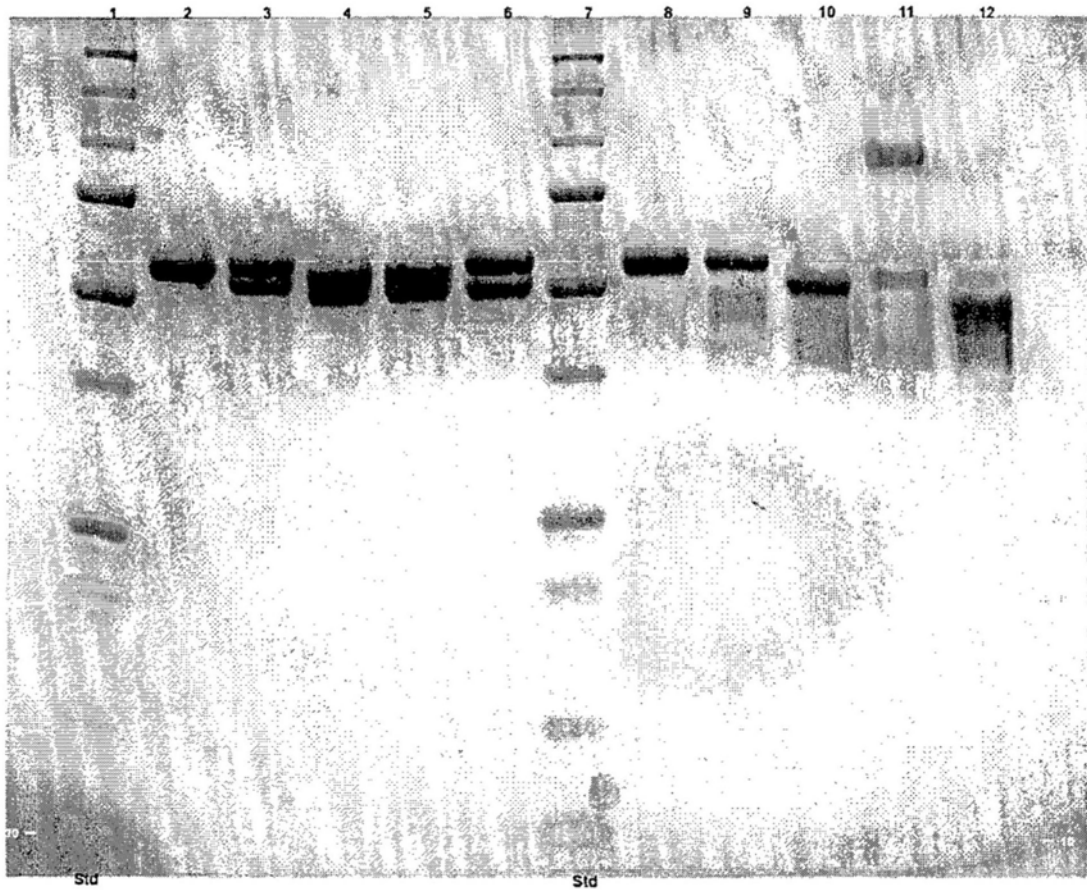
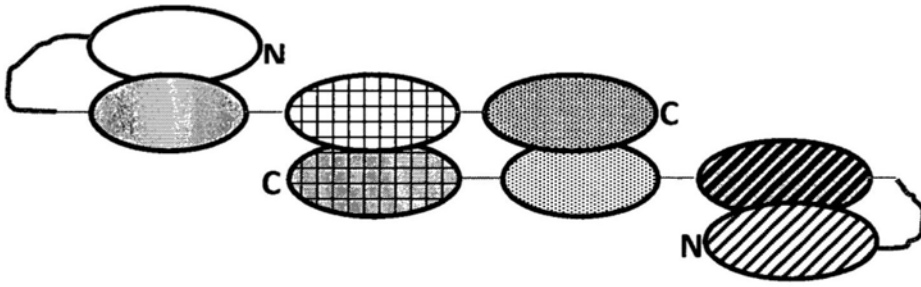


图9

**A:**



**B:**

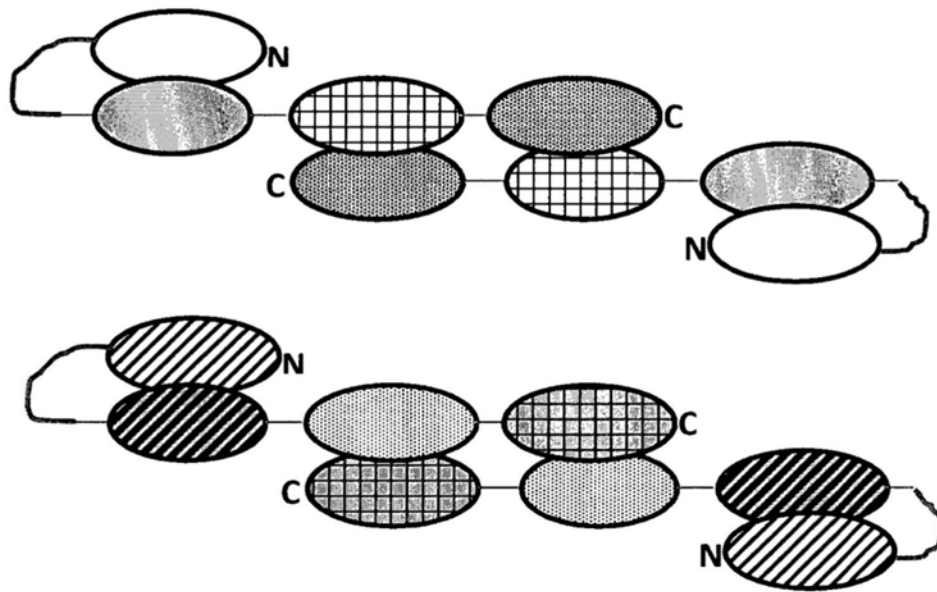


图10

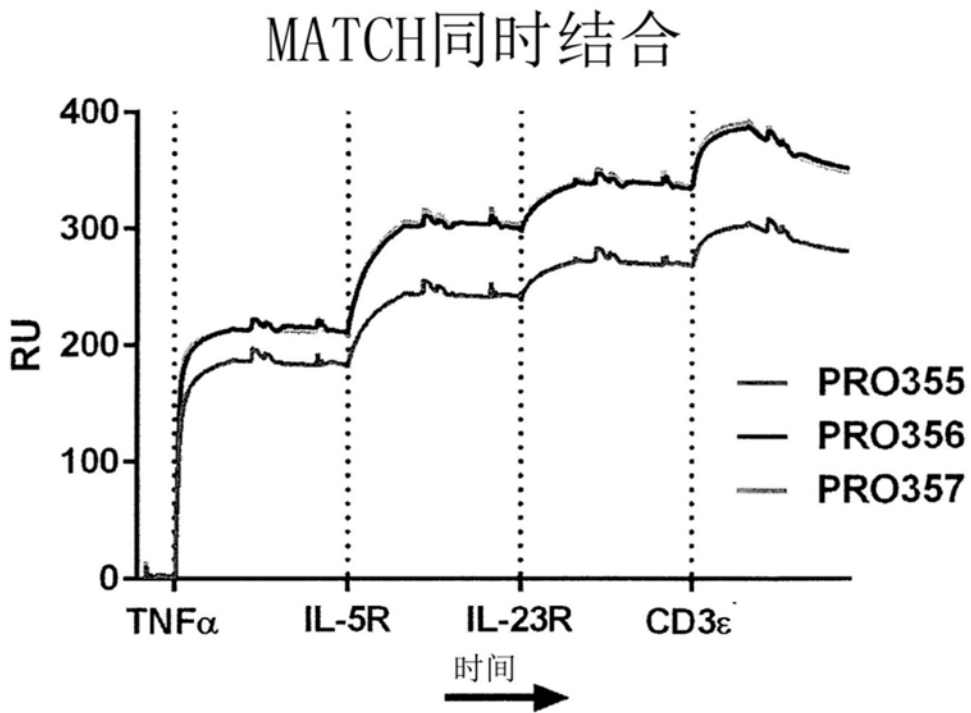
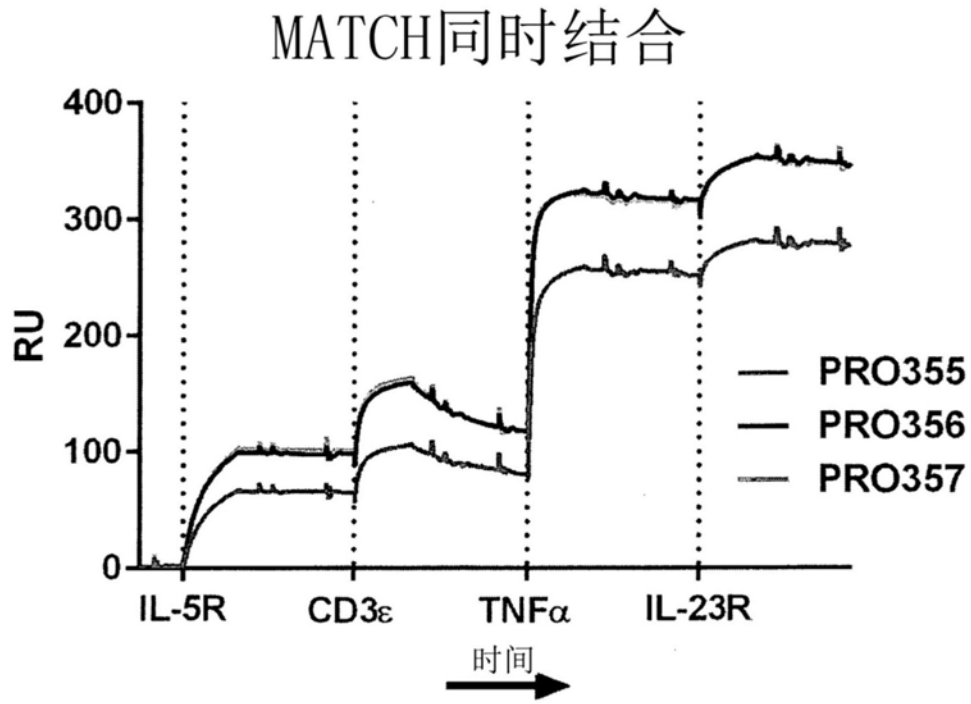


图11

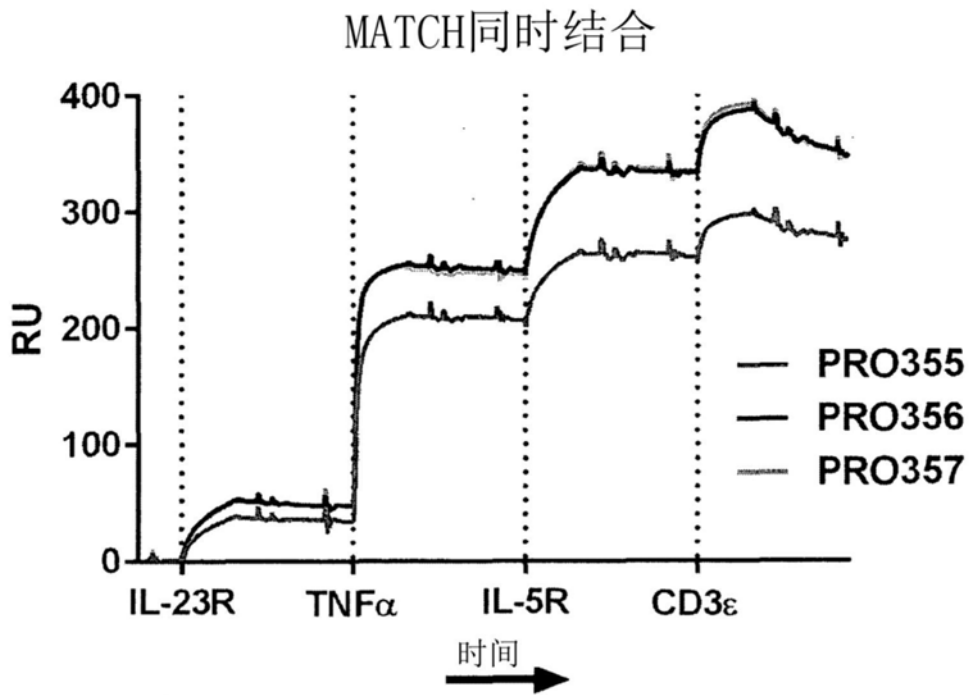
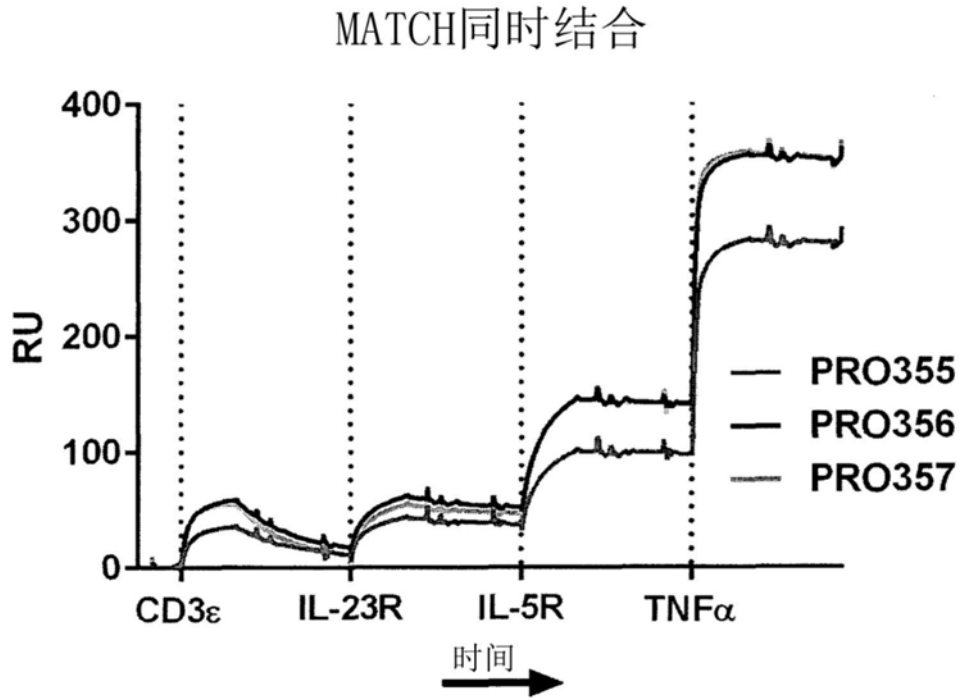


图11(续)

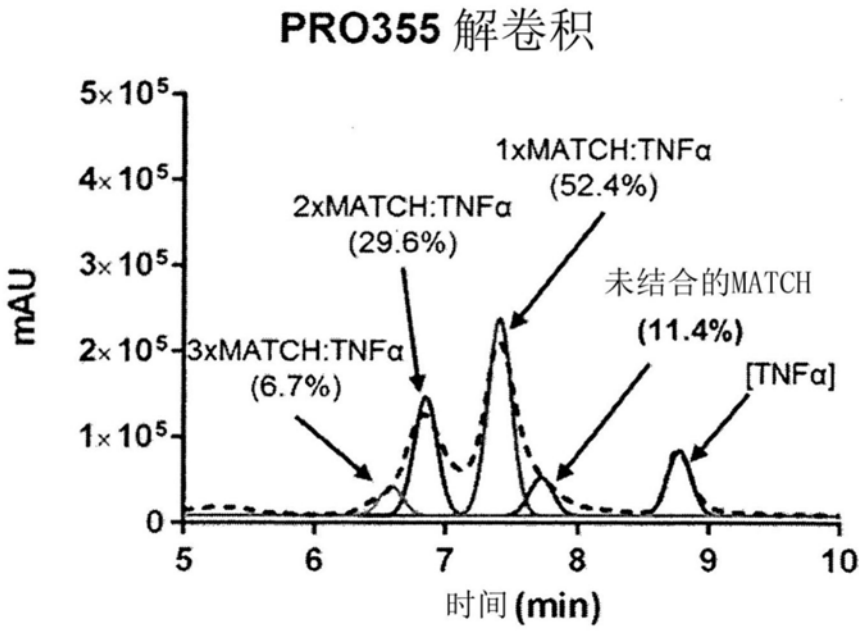
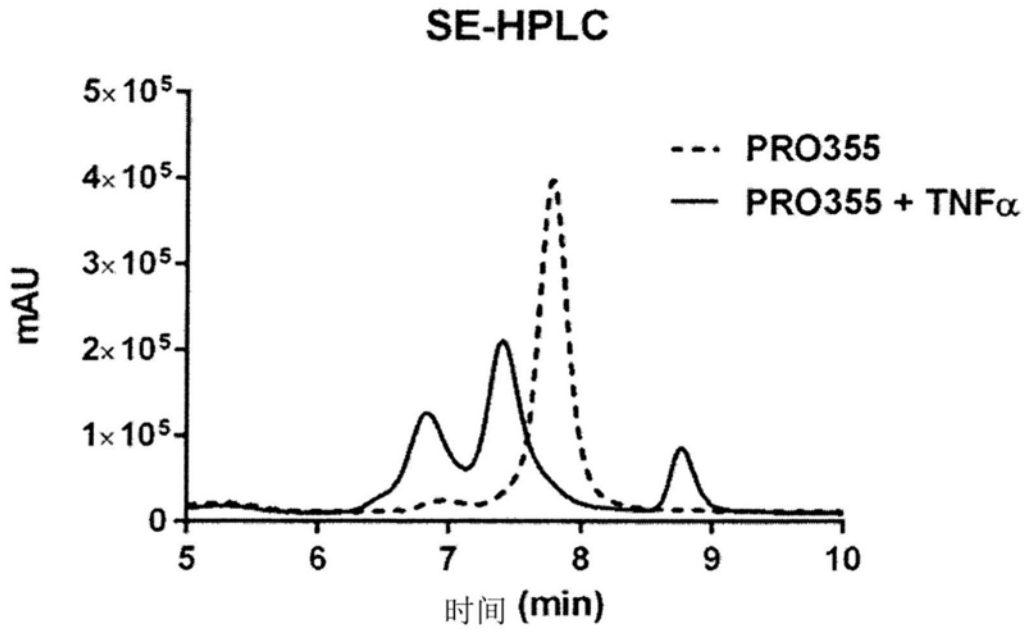


图12

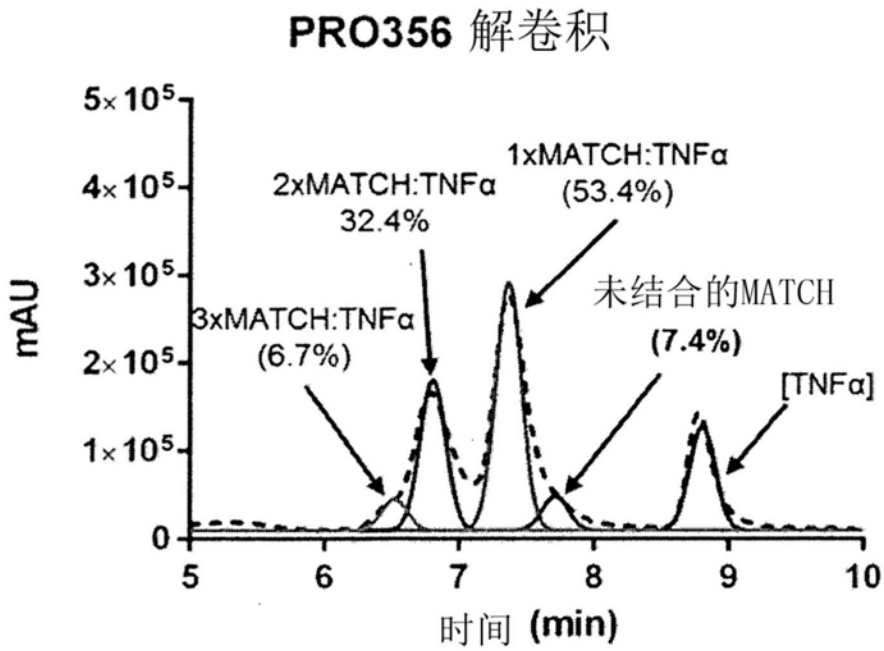
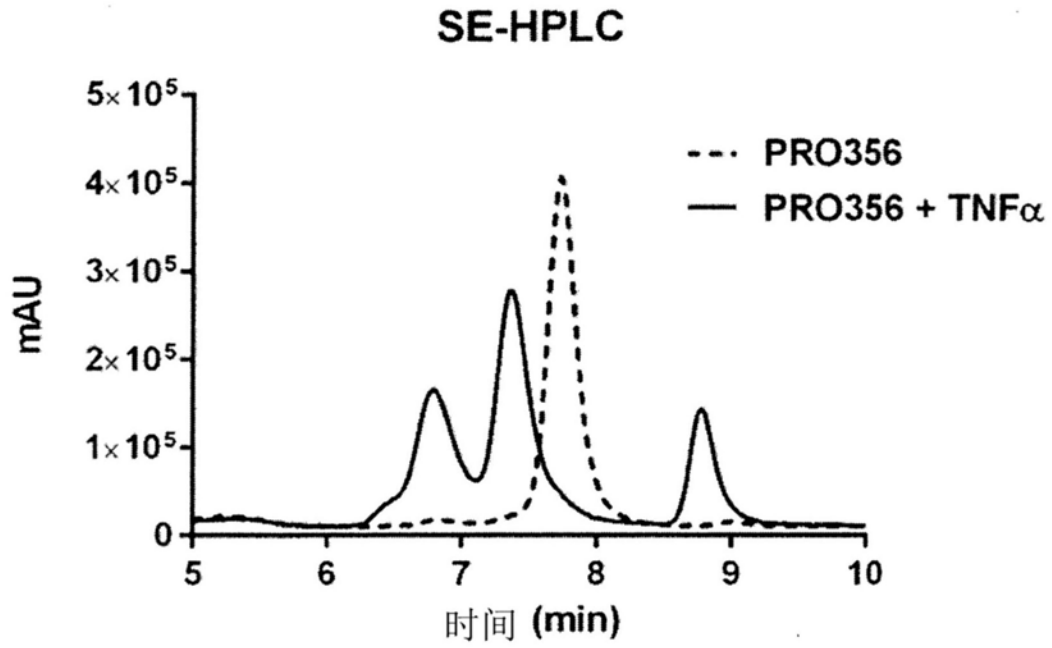


图12(续)

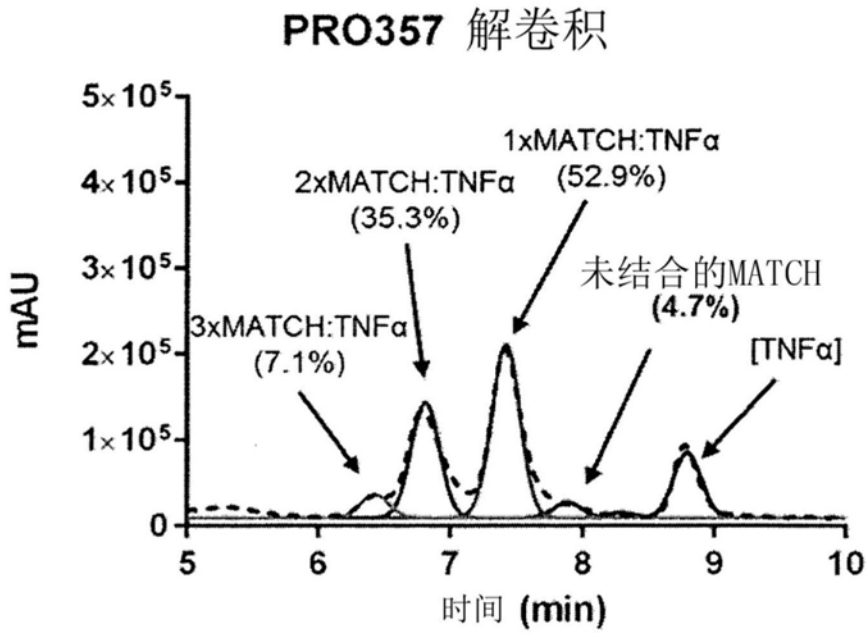
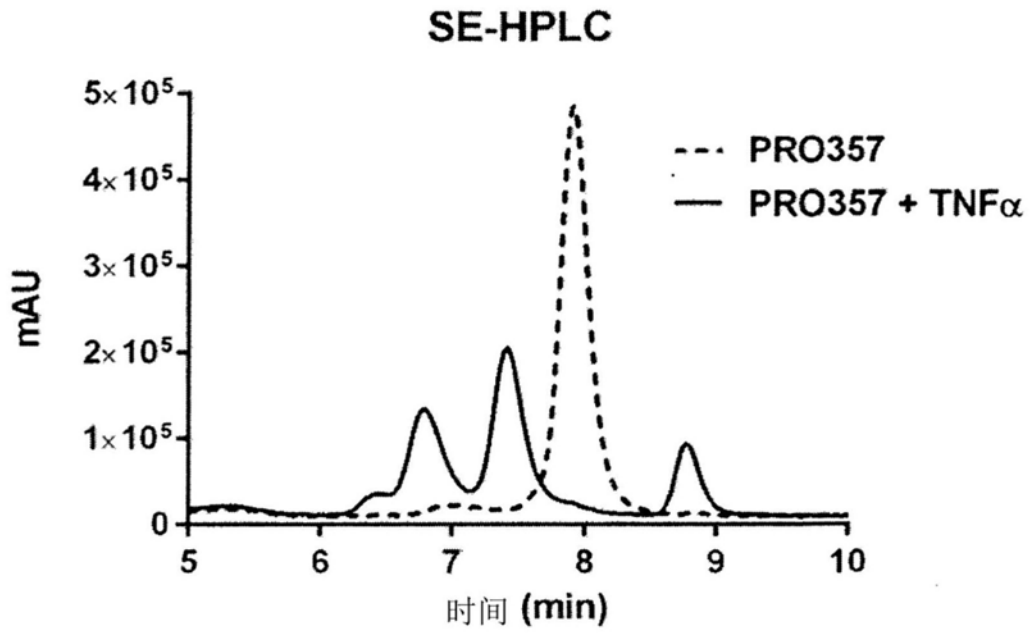


图12(续)