



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104144949 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 12

(21) 申请号 201280063059. 4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 12. 19

C07K 16/46(2006. 01)

(30) 优先权数据

C07K 16/18(2006. 01)

61/579, 450 2011. 12. 22 US

A61K 39/395(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 06. 19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/070432 2012. 12. 19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/096346 EN 2013. 06. 27

(71) 申请人 财团法人生物技术开发中心

地址 中国台湾新北市

(72) 发明人 徐悠深 许寿山 张铭一 张铭传

阮大同

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限

责任公司 11287

代理人 曹晓斐

权利要求书1页 说明书10页 附图13页

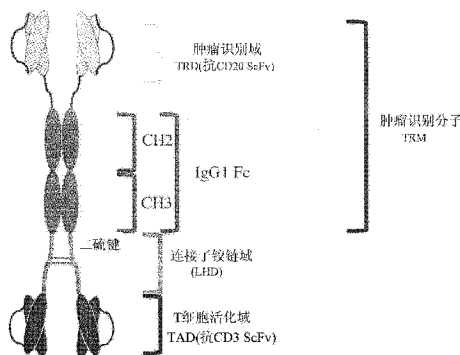
(54) 发明名称

双特异性 T 细胞活化剂抗体

(57) 摘要

本发明涉及双特异性抗体,其具有连接子与铰链序列的组合,以形成具有生物学显著性的连接子-铰链界面域。这些连接子-铰链界面域使两个分子共价相连,维持所连分子的生物学活性(靶靶结合),稳定新分子的生物学特性(溶解性和 4℃ 稳定性),维持所连分子的化学、生物化学和物理性质(细胞毒性),和调节所连分子的生物学特性(活化 T 淋巴细胞而无显著增殖迹象)。需要连接子(GGGGS)与铰链(CPPCP)序列两者来建立功能性连接子-铰链界面域,因为缺失任一组分均会引起 T 淋巴细胞介导的活性显著丧失。

抗CD20/ScFv-IgG/Fc-LHD-抗CD3/ScFv
(具有LHD的ScFv-IgG BsAb)



1. 一种包含连接子序列和铰链序列的蛋白质域 (LHD), 其中所述连接子序列包含甘氨酸 - 甘氨酸 - 甘氨酸 - 甘氨酸 - 丝氨酸, 且所述铰链序列包含半胱氨酸 - 脯氨酸 - 脯氨酸 - 半胱氨酸 - 脯氨酸。
2. 根据权利要求 1 所述的蛋白质域, 其中所述蛋白质域包含两个或两个以上连接子序列。
3. 根据权利要求 1 所述的蛋白质域, 其中所述蛋白质域包含 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 的序列。
4. 一种包含根据权利要求 1 所述的蛋白质域的蛋白质, 其进一步包含经由肽键融合到所述蛋白质域的 N 末端的 N 末端部分和经由肽键融合到所述蛋白质域的 C 末端的 C 末端部分。
5. 根据权利要求 4 所述的蛋白质, 其中所述 N 末端部分和所述 C 末端部分各自独立地为全长免疫球蛋白或抗体的单链可变区片段 (ScFv)。
6. 根据权利要求 4 所述的蛋白质, 其中所述 N 末端部分和所述 C 末端部分中的一者包含含有抗 CD3 抗体或抗 CD3 抗体的单链可变区片段 (ScFv) 的 T 淋巴细胞活化域, 而所述 N 末端部分和所述 C 末端部分的另一者包含含有抗 CD20 抗体或抗 CD20 抗体的单链可变区片段 (ScFv) 的肿瘤识别域。
7. 根据权利要求 4 所述的蛋白质, 其中所述 N 末端部分包含抗肿瘤特异性标记、发炎疾病标记、自体免疫性疾病标记或过敏症相关标记。
8. 一种包含根据权利要求 4-7 中任一权利要求所述的蛋白质的二聚体的生物分子, 其包含介于所述二聚体的铰链序列之间的二硫键。
9. 根据权利要求 8 所述的生物分子, 其中所述生物分子维持 T 淋巴细胞活化能力。
10. 根据权利要求 8 所述的生物分子, 其中所述生物分子维持抗体结合到抗原的能力。
11. 根据权利要求 8 所述的生物分子, 其中所述生物分子在表达、产生或纯化期间维持溶解性。
12. 根据权利要求 8 所述的生物分子, 其中所述生物分子的促有丝分裂性低于抗 CD3 单株抗体的促有丝分裂性。
13. 根据权利要求 8 所述的生物分子, 其中所述生物分子能够在不低于抗 CD3 单株抗体诱导的水准的水准下诱导 CD69 和 CD25 表达。

双特异性 T 细胞活化剂抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及制备双特异性或多特异性生物分子,例如双特异性抗体的方法,和其产物。特定来说,本发明是有关用于分子交联的新颖交联子和使用其的方法。

背景技术

[0002] 组合具有不同功能的生物分子可产生具有所要或改良性质的新分子。举例来说,组合分子可具有双重功能并且可具有改良的稳定性。组合生物分子的常见方法为使用化学连接剂将这些分子交联。然而,当化学交联时,组合分子的生物学活性并不总是得以保存。因此,仍需要用于生物分子交联的更好方法。

发明内容

[0003] 本发明涉及制备双特异性或多特异性生物分子,例如双特异性抗体 (BsAb) 的方法,和由此制得的产物。特定来说,本发明是有关用于连接生物分子的新颖连接子-铰链域,和使用其的方法。

[0004] 本发明的一个方面涉及称为“连接子-铰链域”(LHD)的蛋白质域。根据本发明的一个实施例的 LHD 包括连接子序列和铰链序列,其中所述连接子序列包含甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-丝氨酸 (GGGGS),并且所述铰链序列包含半胱氨酸-脯氨酸-脯氨酸-半胱氨酸-脯氨酸 (CPPCP)。LHD 可包括两个或两个以上连接子序列。LHD 域的实例可包括 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 的序列。

[0005] 本发明的一个方面涉及具有上述 LHD 域的蛋白质。根据本发明的一个实施例的蛋白质可进一步包括一个 N 末端部分,其经肽键融合到蛋白质域的 N 末端;和/或一个 C 末端部分,其经肽键融合到蛋白质域的 C 末端。N 末端部分和 C 末端部分可各独立地为肽、全长免疫球蛋白或抗体的单链可变区片段 (ScFv)。举例来说, N 末端部分和 C 末端部分的一者可包括 T 淋巴细胞活化域,所述 T 淋巴细胞活化域包含抗 CD3 抗体或抗 CD3 抗体的单链可变区片段 (ScFv),而 N 末端部分和 C 末端部分的另一者可包括肿瘤识别域,所述肿瘤识别域包含抗 CD20 抗体或抗 CD20 抗体的单链可变区片段 (ScFv)。或者, N 末端部分包含抗肿瘤特异性标记、发炎疾病标记、自体免疫性疾病标记或过敏症相关标记。

[0006] 本发明的一个方面涉及生物分子,各生物分子包含上述蛋白质的二聚体,所述二聚体的铰链序列之间具有二硫键。生物分子维持 T 淋巴细胞活化能力,或生物分子维持抗体结合到抗原的能力。生物分子可具有改良的溶解性、稳定性和药物动力学。

[0007] 本发明的其它方面和优点由以下实施方式和随附权利要求书将显而易见。

附图说明

[0008] 图 1A 到 1E 显示示意图,其说明根据本发明实施例的各种双特异性抗体 (BsAb) 的构筑体。

- [0009] 图 2A 和 2B 显示电泳结果,说明 IgG-FL Δ H BsAb 的聚集。
- [0010] 图 3 显示各种 BsAb 在长期储存后的稳定性。
- [0011] 图 4 显示 LHD 中无铰链的 BsAb 和根据本发明实施例的具有各种连接子长度的 BsAb 的结合亲和力。
- [0012] 图 5A 到 5C 显示根据本发明实施例的各种 BsAb 的细胞毒性。
- [0013] 图 6 显示根据本发明实施例的 BsAb 诱导 PBMC 增殖。
- [0014] 图 7 显示根据本发明的一个实施例的 LHD 融合 BsAb 的药物动力学 (PK) 分析。

具体实施方式

[0015] 本发明的实施例涉及制备双特异性或多特异性生物分子,例如双特异性抗体的方法,和其产物。本发明的一些实施例是有关用于分子交联的新颖交联子和使用其的方法。本发明的交联子可包含连接子域和铰链域。因此,这些交联子可称为“连接子-铰链域”或 LHD。

[0016] 根据本发明的实施例,连接子域可具有甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-丝氨酸 (GGGS) 的序列,并且铰链域可具有半胱氨酸-脯氨酸-脯氨酸-半胱氨酸-脯氨酸 (CPPCP) 的序列。一些交联剂可包含一个或多个连接子序列。铰链序列可使含有这些序列的分子的二聚体之间形成二硫键。

[0017] 根据本发明的实施例,这些 LHD 可用于构建双特异性或多特异性生物分子。所述生物分子可为抗体,也就是,双特异性或多特异性抗体。在本说明书中,双特异性抗体可称为“BsAb”。

[0018] 根据本发明实施例的双特异性抗体可包含 LHD,其经由肽键连接到免疫球蛋白 (IgG) 的恒定区片段 (Fc),也就是,融合蛋白 IgG-Fc-LHD。两个特异性配位体结合部分可连接到此融合蛋白的 N 末端和 C 末端,而产生双特异性生物分子。位于 LHD-IgG Fc 的 N 末端或 C 末端的特异性配位体结合部分可为蛋白质或肽。这些部分的实例可包括抗体的单链可变区 (称为“ScFv”) 或结合特异性配位体 (包括抗原) 的肽。

[0019] 本发明的双特异性生物分子可具有抗体样结构并且称为“双特异性抗体”或 BsAb。下文将描述一些实例以说明本发明的实施例。虽然仅描述有限数目个实例,但所属领域的技术人员会了解,这些实例可具有其它变型或变化形式而不悖离本发明的范畴。

[0020] 实例

[0021] 构建靶向 CD20 的双特异性抗体 (具有 LHD 的 BsAb)

[0022] 为改良多特异性分子的生物学功能性,构建包含连接子-铰链界面域 (LHD) 的双特异性抗体 (BsAb) 并且测试其功能。如本文所述,“连接子-铰链”界面域 (“LHD”) 包括构建一个或多个甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-丝氨酸 (GGGS 或 G4S 连接子) 连接子序列和单一的半胱氨酸-脯氨酸-脯氨酸-半胱氨酸-脯氨酸 (CPPCP 铰链) 铰链序列。(表 1)。

[0023] 表 1

[0024] 连接子-铰链域序列的清单

[0025]

编码	LHD 序列	SEQ ID No.
15H	GGGSGGGSGGGSCPPCP	1
10H	GGGSGGGSCPPCP	2
5H	GGGSCPPCP	3
10H5	GGGSGGGSCPPCPGGGS	4
5H10	GGGSCPPCPGGGSGGGGS	5
5H5	GGGSCPPCPGGGS	6
Δ H	GGGSGGGSGGGSGGGGS	7
Δ L	CPPCP	8

[0026] 本发明的实施例使用这些 LHD 实际地将多个功能性生物分子（包括肽和蛋白质）连接。这些经连接的生物分子具有一种或多种优点，包括维持所连接分子 / 域的生物学活性、稳定新分子的生物学特性、维持化学、生物化学和物理性质、调节生物学特性等。

[0027] 为说明 LHD 在构建多特异性分子中的益处，构建若干具有 LHD 形式的 BsAb，所述 BsAb 可识别分别作为肿瘤标记和 T 淋巴细胞活化分子的 CD20 和 CD3。这些 BsAb 构筑体，包括抗 CD20/ScFv-IgG/Fc-CH2-CH3-LHD- 抗 CD3/ScFv(ScFv-IgG BsAb)、抗 CD20(完整 mAb)-LHD- 抗 CD3/ScFv(IgG-FL BsAb)，和抗 CD20(完整 mAb)-LHD/Δ CPPCP- 抗 CD3/ScFv(IgG-FL Δ H) (图 1A-1E)。

[0028] 图 1A 说明产生双特异性抗体 (BsAb) 的一实例，所述抗体含有包含抗 CD20 单株抗体 (mAb) 的单链可变区片段 (ScFv) 的肿瘤识别域 (TRD) 和包含抗 CD3mAb 的单链可变区片段 (ScFv) 的 T 细胞活化域 (TAD)。在此实例中，构建肿瘤识别分子 (TRM)，缩写为 ScFv-IgG，其包含两部分：肿瘤识别域 (TRD) 和 IgG 重链恒定域。肿瘤识别域 (TRD) 包含抗 CD20mAb 的 ScFv。IgG 重链恒定域包含免疫球蛋白 G1 恒定区片段 (IgG1Fc) 的 CH2 和 CH3 域。

[0029] 接着，使 TRM 连接到 LHD (连接子铰链域)，所述 LHD 包含表 1 中所列的 LHD 序列中的任一 LHD 序列 (除 SEQ No. 7 外)。LHD 共价融合到 TRM 的 CH3 域的 C 末端。最后，使 T 淋巴细胞活化域 (TAD) (也称为单链抗 CD3 单株抗体域) 融合到 LHD 的 C 末端。换言之，此重组蛋白包含 (从 N 末端到 C 末端)：TRD (抗 CD20ScFv)、IgG1Fc、LHD 和 TAD (抗 CD3ScFv)。

[0030] 如同一般抗体，此 ScFv-IgG 双特异性抗体 (BsAb) 的生物学活性形式将形成同型二聚体。二聚作用中，单体 ScFv-IgG BsAb 的 LHD 域中的 CPPCP 序列可与另一个单体 ScFv-IgG 的另一个 LHD 域中的 CPPCP 序列形成二硫键，如图 1A 中所示。所得分子为抗体样分子，其恒定链 (也就是 IgG1Fc) 的两端 (C 末端和 N 末端) 具有两个不同可变域。因此，所得分子可称为双特异性抗体 (BsAb)。

[0031] 图 1B 说明形成双特异性抗体 (BsAb) 的另一种方法，所述抗体具有的双特异性 (也就是抗 CD20 和抗 CD3) 与图 1A 中所示的双特异性相同。除了 TRM 使用全长抗 CD20mAb

代替单链抗 CD20 抗体的外,此 BsAb 类似于图 1A 中所示的 BsAb。全长 mAb 包括全长 IgG1 重链恒定域 (IgG1Fc),也就是,重链恒定域包括 CH1、CH2 和 CH3 域。

[0032] 如上所述 ScFv-IgG BsAb (图 1A) 中, LHD 融合到 TRM (也就是全长抗 CD20mAb) 的 C 末端,也就是融合到 TRM 的 CH3 域的 C 末端。LHD 序列可为表 1 中的任一序列,除 SEQ No. 8 外。接着,使 TAD (也就是抗 CD3ScFv) 融合到 LHD 序列的 C 末端。如同图 1A 所示的 ScFv-IgG BsAb,此构筑体将形成二聚体。二聚作用中,单体 IgG-FL BsAb 的 LHD 中的 CPPCP 序列可与另一单体 IgG-FL 的 LHD 形成二硫键,如图 1B 中所示。此分子的双特异性与图 1A 中所示分子的双特异性相同。

[0033] 图 1C 说明图 1A 中所示的双特异性抗体 (BsAb) 的变异体。其具有相同 TRM 和 TAD。然而,此变异体中的 LHD 域具有序列 SEQ ID NO :8 (表 1),也就是,不含 GGGGS 连接子序列。此变异体称为 ScFv-IgG Δ L BsAb。如同母体形式,ScFv-IgG Δ L BsAb 的 LHD 内的二硫键是在单体 ScFv-IgG Δ L BsAb 二聚之后产生,如图 1C 中所示。

[0034] 图 1D 显示图 1A 中所示的双特异性抗体的另一变异体。在此变异体中, LHD 具有序列 SEQ ID NO :7 (表 1),其缺乏 CPPCP 铰链序列。此变异体称为 IgG-FL Δ H BsAb。因为 LHD 缺乏用于形成二硫键的半胱氨酸残基,所以 IgG-FL Δ H BsAb 不含介于两个 LHD 之间的二硫键。

[0035] 图 1E 显示图 1A 的 BsAb 的类似物。在此类似物中,TRD 与 TAD 域对换,也就是,TAD 位于 IgG1Fc 的 N 末端,而 TRD 位于 LHD 的 C 末端。此类似物 (称为“N 末端 TADBsAb”) 具有的双特异性与图 1A 中所示的 BsAb 的双特异性相同。

[0036] 上述 BsAb 具有改良的性质,例如生产产量和稳定性,同时保留其结合特异性和效力,如下文所说明。

[0037] 如下文所说明,上述 BsAb 具有改良的性质 (生产产量和稳定性),同时保留其结合特异性和效力。

[0038] 具有 LHD 的 BsAb 提供产能的改良

[0039] 在以蛋白质为基础的治疗剂的商业化中,产量扮演着关键的角色。根据本发明的实施例,蛋白质中包含 LHD 可改良多特异性分子的产量。为证明根据本发明实施例的 LHD 的效用,将 ScFv-IgG、IgG-FL 和 IgG-FL Δ H BsAb 克隆、表达,并且用 FS293 哺乳动物细胞来测试,评估其产量和稳定性。

[0040] 这些测试的结果显示,不论 LHD 中的连接子序列的重复数为何,所有 BsAb 形式在短暂转染生产下皆具有相似的产率 ($\geq 1 \mu\text{g/ml}$)。尽管 IgG-FL Δ H BsAb 的粗物质产量与 IgG-FL 或 ScFv-IgG BsAb 形式的产量类似,但注意到 IgG-FL Δ H BsAb 纯化之后的回收率不良 (表 2)。

[0041] 表 2

[0042] 具有 LHD 的 BsAb 构筑体在纯化之后的回收率

[0043]

SEQ ID NO	标记	回收率
1	15H	$\geq 90\%$

2	10H	$\geq 90\%$
3	5H	$\geq 90\%$
4	10H5	$\geq 90\%$
5	5H10	$\geq 90\%$
6	5H5	$\geq 90\%$
7	ΔH	$\leq 45\%$
8	ΔL	$\geq 90\%$

[0044] 进一步分析显示大量聚集物形成,下沉集结于 IgG-FL ΔH BsAb 的纯化装置的底部。随后 SDS 分析显示, BsAb 为这些团块的主要组分(图 2)。

[0045] 以液态储存的蛋白质药物在 4°C 的稳定性在蛋白质工程中已成问题,尤其含有连接子的蛋白质(参见美国专利申请公开案第 2009/0175867A1 号)。本文所述的实例显示,具有一到两个连接子重复的 BsAb 被观测到发生轻度的蛋白水解分裂,而其它 LHD 构筑体发生的蛋白水解分裂则很少(图 3)。

[0046] 具有 LHD 的 BsAb 的抗原结合能力未减小

[0047] 为使 BsAb 获得 T 细胞介导的细胞毒性, CD3 与 T 细胞表面的结合为必需的。CD3 分子为 T 细胞受体 (TCR) 的共受体并且负责 MHC 与抗原复合物刺激之后的信号传导。抗 CD3ScFv 直接融合到 ScFv-IgG、IgG-FL 和 IgG-FL ΔH BsAb 的 C 末端会对这些分子的 CD3 结合能力产生一些负面影响,如表 3 中所示。

[0048] 表 3

[0049] LHD 融合 BsAb 对 CD20 和 CD3 的结合常数分析

[0050]

SEQ No.	标记	结合到 CD20 (IgG-FL BsAb) M	结合到 CD3 (IgG-FL BsAb) M
1	15H	$2-4 \times 10^{-8}$	2.7×10^{-8}
2	10H	$2-4 \times 10^{-8}$	3.3×10^{-7}
3	5H	$2-4 \times 10^{-8}$	6×10^{-8}
4	10H5	$2-4 \times 10^{-8}$	5.2×10^{-8}
5	5H10	$2-4 \times 10^{-8}$	-
6	5H5	$2-4 \times 10^{-8}$	1.5×10^{-7}
7	ΔH	$2-4 \times 10^{-8}$	-
8	ΔL		
	抗 CD3 mAb	-	1×10^{-9}
	ScFv-IgG (15H)	$8-9 \times 10^{-8}$	5×10^{-8}
	化学联结的 BsAb	$2-4 \times 10^{-8}$	1×10^{-9}

[0051] 在这些 BsAb 中, IgG-FL ΔH BsAb 与 CD3 的结合最显著的降低(表 3 和图 4A)。此未预测到的结果凸显了 LHD 在 BsAb 的生物学上有效性的必要性。然而,改变 LHD 内的连接

子序列的长度并不足以完全恢复 CD3 与 BsAb 的结合能力 (表 3 和图 4B)。相较于亲本全长抗 CD3 抗体, ScFv-IgG 与 IgG-FL BsAb 对配位体 (CD3) 的亲合力均观测到降低的现象 (表 3)。另一方面, 三种 BsAb (ScFv-IgG、IgG-FL 和 IgG-FL Δ H) 对表达 CD20 的淋巴瘤的结合常数则不受影响 (表 3)。

[0052] 具有 LHD 的 BsAb 可将 B 淋巴瘤的细胞毒性增强

[0053] 由 T 细胞所介导, 针对肿瘤的细胞毒性被视为 BsAb 疗法中的圣品。以下实例显示 LHD 有助于 BsAb 增强 T 淋巴细胞介导的肿瘤消除。如同化学结合的 BsAb, IgG-FL 与 ScFv-IgG BsAb 均能够在低浓度下消除 CD20⁺B 细胞淋巴瘤 (图 5A)。从 LHD (也就是 ScFv-IgG Δ L BsAb) 移除连接子序列 (GGGS) 也会消除 T 淋巴细胞介导的细胞毒性 (图 5A)。

[0054] 除了 IgG-FL Δ H BsAb 因缺乏 CPPCP 序列而不能在二聚之后形成 LHD 相关的二硫键的外, IgG-FL Δ H BsAb 与 IgG-FL BsAb 具有高度的结构相似性。在缺乏 LHD 相关的二硫键下, 会导致 T 淋巴细胞介导的细胞毒性显著降低 (图 5C)。

[0055] 尽管 TRM 与 TAD 之间具有 LHD 的 BsAb 可提供改良的肿瘤特异性细胞毒性, 但改良程度对于表 1 中所列的 LHD 序列并非普遍适用。已发现 ScFv-IgG BsAb 的最佳细胞毒性与 SEQ ID4、5 或 6 相关 (表 1, 图 5A)。然而, 当使用全套抗 CD20mAb 作为 IgG-FL 形式中的 TRM 时, 肿瘤特异性细胞毒性的变化会显得难以分辨 (图 5B)。Rituxan[®] (一种抗 CD20mAb) 已显示可经由抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 介导 B 细胞消耗。实验证明, 相较于 Rituxan[®], 包含 LHD 的 BsAb (例如 IgG-FL 和 ScFv-IgG 形式) 能经由 ADCC 更有效地消除 B 淋巴瘤 (图 5A、5B 和表 4)。先前结果显示, Rituxan[®] 诱导的 ADCC 需要较高的效应剂 : 目标比率 (E : T 比率为 40 : 1 或高于 40 : 1) 和较高的 Rituxan[®] 效价 (μ g/ml) 以保持 30-50% 的最大细胞毒性。然而, 所选 LHD 的 IgG-FL BsAb 形式不仅改良肿瘤消除能力 (高达 80%), 而且将 E : T 比率降低到 10 : 1 (表 4)。

[0056] 表 4

[0057] LHD 融合 BsAb 介导针对肿瘤细胞的细胞毒性

[0058]

SEQ No.	标记	细胞毒性(BsAb)			
		ScFv-IgG 与 LHD BsAb 构筑体; E:T = 10:1		IgG-FL 与 LHD BsAb 构筑体; E:T = 10:1	
		EC50 (pM)	最大细胞毒性相 对于抗 CD20 mAb 改良的倍数	EC50 (pM)	最大细胞毒性相对 于抗 CD20 mAb 改良的倍数
1	15H	14.2	2.55	4.0	2.78
2	10H	9.5	2.55	2.0	2.82
3	5H	41.7	2.55	4.6	2.82
4	10H5	3.9	2.55	3.5	2.82
5	5H10				
6	5H5	4.3	2.55	2.8	2.82
7	ΔH			15.6	1
8	ΔL		≤ 1		

[0059] 相较于亲本抗 CD3 单株抗体, 具有 LHD 的 ScFv-IgG BsAb 和具有 LHD 的 IgG-FLBsAb 可轻度诱导 PBMC 的增殖

[0060] 全长单株抗 CD3 抗体为熟知的用于非特异性 T 细胞活化的促有丝分裂诱导剂。已有人提出, 在单株抗 CD3 抗体治疗之后, 此促有丝分裂性会引起较大的不良反应, 例如流感样症状和细胞激素释放症候群 (CRS)。申请人已发现, 如同 N 末端 TAD BsAb (图 1E), 亲本抗 CD3mAb 可显著诱导新鲜培养的周边血液单核细胞 (PBMC) 增殖 (图 6)。相较于单独抗 CD3mAb, 通过抗 CD20mAb 与抗 CD3mAb 化学结合而制备的 BsAb 显示会稍微将低促有丝分裂的潜力。然而 IgG-FL/15H BsAb 仅在高浓度下展现促有丝分裂效应 (图 6)。

[0061] 具有 LHD 的 BsAb 使 T 细胞活化标记增强

[0062] 增殖分析为测量 T 淋巴细胞活化的“标准”, 不论活化后是否产生异质细胞。申请人已发现 IgG-FL BsAb 可增强对 B 淋巴瘤的细胞毒性效应, 不论其是否会降低增殖概况 (图 5 和图 6)。为合理地说明这些观测结果, 将 T 淋巴细胞活化标记 CD69 与 CD25 均染色, 并且在各种刺激之后通过 FACS 来显示 (表 5)。实例显示, 含有 LHD 的 IgG-FL BsAb 在增强 CD69 与 CD25 表达方面, 比抗 CD3mAb 更有效。N 末端 TAD BsAb 的活化概况与含有 LHD 的 IgG-FL BsAb 的活化概况也相似。ScFv-IgG 与 LHD/ΔL 融合不能有效消除肿瘤细胞 (图 5A), 此生物功能丧失也可由活化 T 淋巴细胞的能力的丧失来反映 (表 5)。

[0063] 表 5

[0064] 具有 LHD 的 IgG-FL BsAb 增强 CD69 和 CD25 的表达

[0065]

		平均荧光指数(MFI)		
		α -CD3	α -CD69	α -CD25
第 0 日	空白	189.62	10.16	22.2
第 4 日	空白	223.62	21.75	44.01
	IL-2	240.74	148.76	108.7
	抗 CD3 mAb	214.22	45.53	612.89
	IgG-FL (LHD/15H) BsAb	310.45	48.92	828.58
	N 末端抗 CD3 BsAb	314.97	49.09	697.62
	化学联结的 BsAb	308.12	40.39	716.17
	ScFv-IgG-LHD/ Δ L BsAb	244.09	23.35	51.86

[0066] 这些结果进一步证明功能性 LHD 域需要连接子与铰链。这些实例证明本发明 LHD (表 1) 可维持所连分子 / 域的生物学活性和调节所要的生物学特性。

[0067] 具有 LHD 的 IgG-FLBsAb 显示可改良药物动力学性质

[0068] PK (药物动力学) 为药物成功的主要指标, 因为扩大的 PK 不仅转化稳定性更好, 可减少给药频率, 并且患者和临床医师更易接受。IgG-FL 对小鼠的 PK 显示约 96 个小时的 $T^{1/2}$ (图 7)。

[0069] 构建双特异性抗体

[0070] 限制酶购自各个供应商, DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶克列诺酶 (Klenow enzyme) 和 T4DNA 聚合酶购自英杰公司 (Invitrogen) (纽约州格兰德岛市 (Grand Island, NY))。所有酶根据制造商的建议使用。

[0071] 用于 PCR 扩增的所有引子皆购自各个供应商。DNA 扩增是在制造商的 PCR 机器中使用预变性步骤、随后执行预定循环 (含有变性步骤、粘接步骤和扩增步骤, 各 30 分钟) 来执行。

[0072] 所有表达模块示意性显示于图 1A-1E 中。

[0073] 将抗 CD20 轻链和截断的重链克隆于载体 A 和载体 B 中。将抗 CD20VH 和 VL 的单链片段克隆于载体 C 中, 并且用于随后的抗 CD20ScFv。

[0074] 细胞株制备

[0075] 本发明所用的 Raji 细胞为 B 淋巴瘤肿瘤细胞株, 其获自生物资源保存和研究中心 (Biorescouce Collection and Research Center, BCRC), 所述中心为中华民国 (R. O. C) 台湾食品工业研究发展研究所 (Food Industry Research and Development Institute, FIRDI) 的一个部门。Jurkat 细胞为获自 ATCC 的 T 淋巴瘤细胞株。Raji 细胞与 Jurkat 细胞均在补充有 10% 胎牛血清 (海康公司 (Hyclone))、0.03% L-谷氨酰胺和 0.4mM 丙酮酸钠的 RPMI1640 培养基 (英国佩斯利 GibcoBRL 生物技术公司 (GibcoBRL Life Technologies, Paisly, UK)) 中培养。在含有 5% CO₂ 的 37°C 增湿恒温箱中培育后, 将细胞在无菌缓冲液中继代培养或洗涤用于测试。

[0076] 制备周边血液单核细胞 (PBMC)

[0077] 使用 Ficoll-Paque PLUS, 通过密度离心从正常健康成人供者的全血分离周边血液单核细胞 (PBMC)。分离之后, PBMC 在补充有 10ng/ml 抗 CD3mAb、75IU/ml 介白素-2 (IL-2) 和 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中培养并且活化 6 到 14 天。

[0078] 细胞毒性分析 (钙黄绿素 AM 细胞毒性)

[0079] 目标细胞 (Raji) 在补充有 5% FBS 的无酚红 RPMI1640 培养基中、在 37°C 用 10 μ M 钙黄绿素标记 30 分钟。在钙黄绿素培育结束时, 细胞用具有 5% FBS 的无酚红 RPMI1640 培养基洗涤两次并且用具有 5% FBS 的无酚红 RPMI1640 将细胞密度调节到 3×10^5 个细胞 / 毫升。作为反应混合物, 将含有 3×10^4 个细胞的 100 μ l 培养基放置于 96 孔培养盘的各孔中。计算效应细胞 (PBMC) 培养物的细胞密度并且用具有 5% FBS 的无酚红 RPMI1640 培养基调节到 3×10^6 个细胞 / 毫升。对于细胞毒性反应, 将不同量的不同 BsAb 和 100 μ l (3×10^5 个细胞) 效应细胞添加到 96 孔培养盘的 Raji 预加料中并且在 37°C 5% CO₂ 富集恒温箱中培育 4 小时。在培育结束时, 培养盘以 700g 离心 5 分钟, 接着从各反应孔个别地转移 130 μ l 上清液到新盘中并且用 Fusion alpha 微盘读取器定量所释放的染料。根据下式计算细胞毒性百分比:

[0080] [荧光 (样品) - 荧光 (对照)] / [荧光 (总溶胞) - 荧光 (对照)] * 100。

[0081] 总溶胞定义为经 0.9% Triton 处理 10 分钟的目标细胞。

[0082] 流式细胞术分析

[0083] 对肿瘤目标 (B- 淋巴瘤) 的结合亲和力

[0084] Raji 细胞 (1×10^6 个细胞 / 反应) 用不同浓度的不同 BsAb 在室温下处理 30 分钟。在培育结束时, 所有反应物用补充有 2% FBS 的 PBS 洗涤两次。洗涤之后, 细胞与 1 μ l 结合 FITC 的亲和力纯化 F(ab')₂ 片段 (山羊抗人类 IgG(Fab')₂ 片段) 特异性抗体, 在室温下再培育 30 分钟。培育之后, 细胞用补充有 2% FBS 的冰冷 PBS 洗涤两次并且通过 FACS 装置监测。

[0085] Jurkat 细胞 (1×10^6 个细胞 / 反应) 用不同浓度的不同 BsAb 在室温下处理 30 分钟。在培育结束时, 所有反应物用补充有 2% FBS 的 PBS 洗涤两次。洗涤之后, 细胞与 1 μ l 结合 FITC 的亲和力纯化 F(ab')₂ 片段 (山羊抗人类 IgG(Fab')₂ 片段) 特异性抗体在室温下再培育 30 分钟。培育之后, 细胞用补充有 2% FBS 的冰冷 PBS 洗涤两次并且通过 FACS 装置监测。

[0086] T 淋巴细胞活化标记分析

[0087] 除了将所分离的 PMBC 活化 2 或 4 天的外, 如“制备周边血液单核细胞 (PBMC)” 章节中所述分离周边血液单核细胞 (PBMC)。除了所用目标细胞为活化 PBMC 的外, 如“对肿瘤目标的结合亲和力” 章节中所述, 用抗人类 CD25 和 CD69 标记对 PMBC 进行免疫荧光染色。简言之, 1×10^6 个细胞 / 反应用不同浓度的荧光结合抗人类 CD25 或 CD69 单株抗体在室温下处理 30 分钟。在培育结束时, 所有反应物用补充有 2% FBS 的 PBS 洗涤两次。洗涤之后, 通过 FACS 装置监测细胞。

[0088] 对包含 LHD 融合双特异性抗体的融合蛋白的 PK 分析

[0089] 向 Balb/c 小鼠 (n = 4) 注射 3mg/kg 抗 CD20IgG-LHD- 抗 CD3/ScFcBsAb, 并且在多个时间点收集血液样品。经由离心收集所集中的动物血清, 并且经由 ELISA 测量 BsAb 浓度。简言之, 将连续稀释的小鼠血清, 在预涂有抗人类 Fab 抗体 (杰克逊实验室 (JacksonLab)) 的 ELISA 盘中培育 1 小时。培育之后, 将微量滴定盘用 PBST 缓冲液洗涤若干次, 并且通过 5% 脱脂乳阻断 1 小时。在阻断结束时, 将微量滴定盘用 PBST 再次洗涤, 并且与结合 HRP 的抗人类 Fc 抗体再培育 1 小时。此培育之后, 再次洗涤微量滴定盘并且根据制造商建议加以显色和侦测。

[0090] 虽然例示了双特异性生物分子,但所属领域的技术人员了解也可利用此方法制备多特异性生物分子。类似地,此处例示使用 GGGGS 的连接子序列并且例示使用 CPPCP 的铰链序列。然而,所属领域的技术人员了解可使用其它类似序列。连接子序列是为不同域提供适当空间,而铰链域是为同型二聚体中的二硫键形成提供残基。

[0091] 虽然本发明已结合有限数目个实施例加以描述,但受益于本发明的所属领域的技术人员将了解,可构想不悖离如本文揭示的本发明范畴的其它实施例。因此,本发明范畴应仅由随附权利要求书限定。

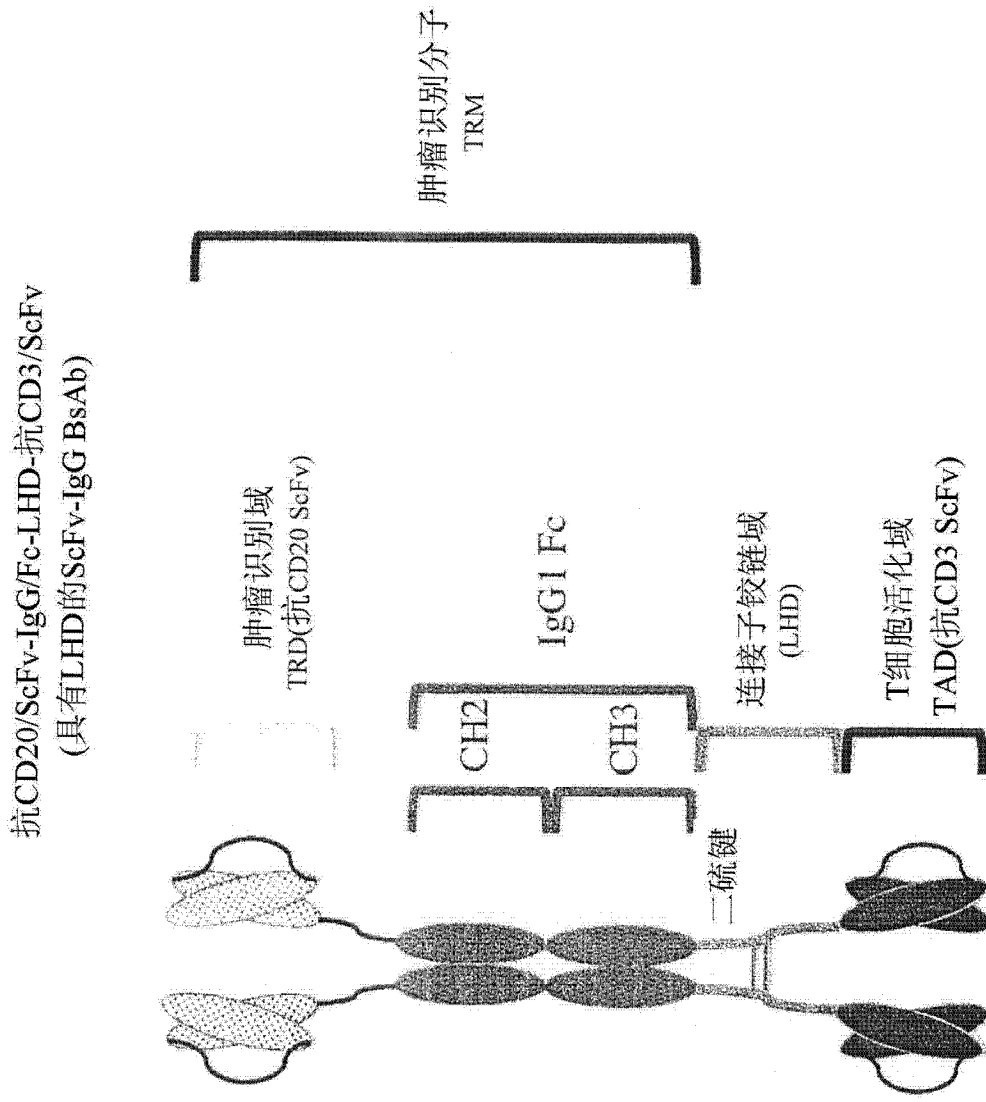


图 1A

抗CD20-IgG-LHD-抗CD3/ScFv
(具有LHD的IgG-FL BsAb)

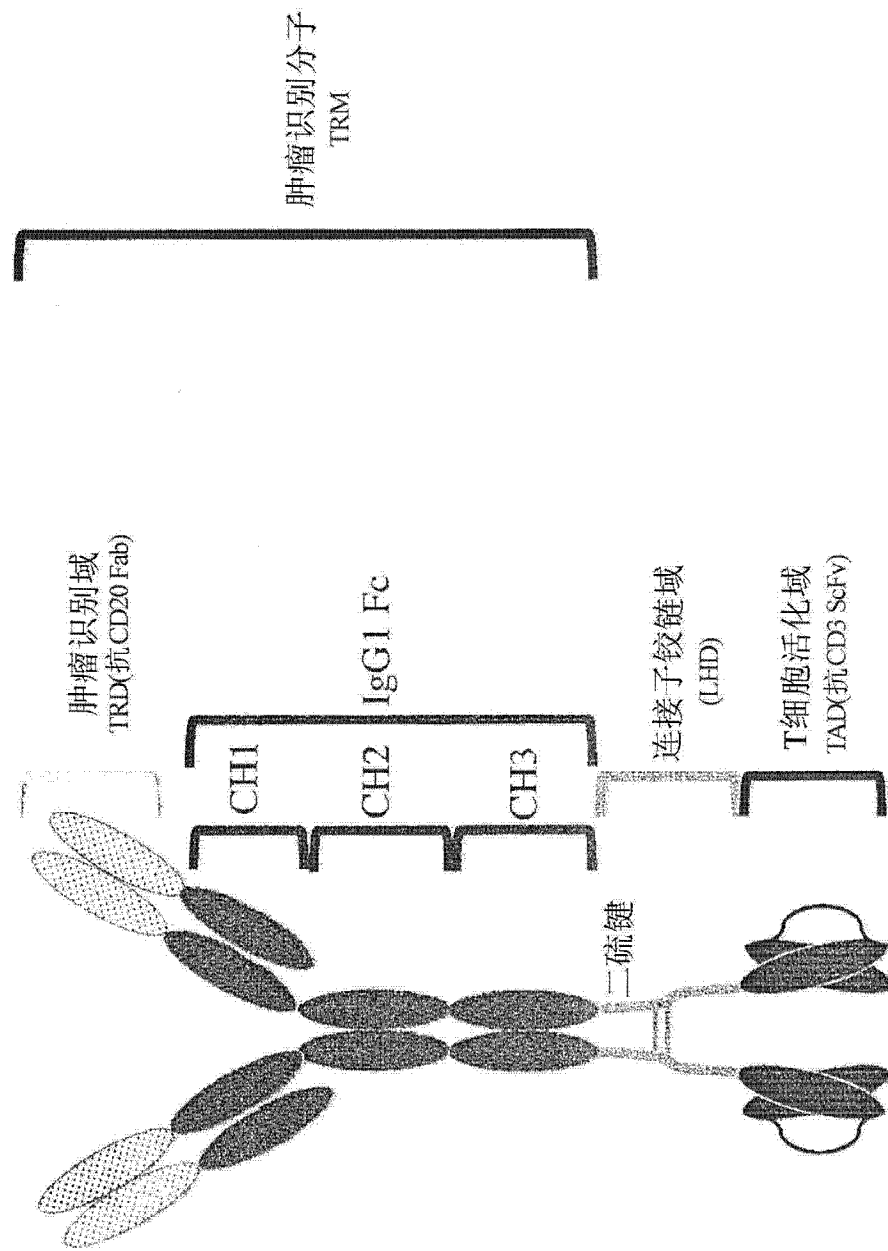


图 1B

抗CD20/ScFv-IgG/Fc-LHD/ Δ GGGGs-抗CD3/ScFv
(ScFv-IgG Δ L BsAb)

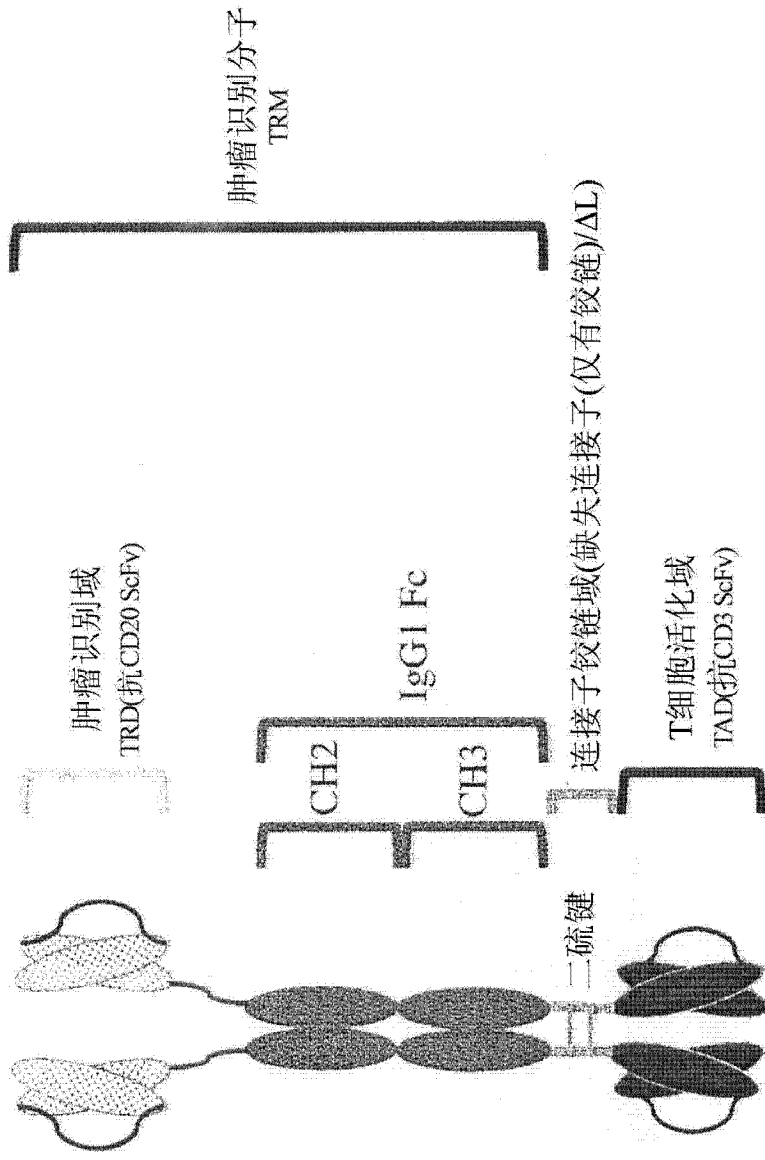


图 1C

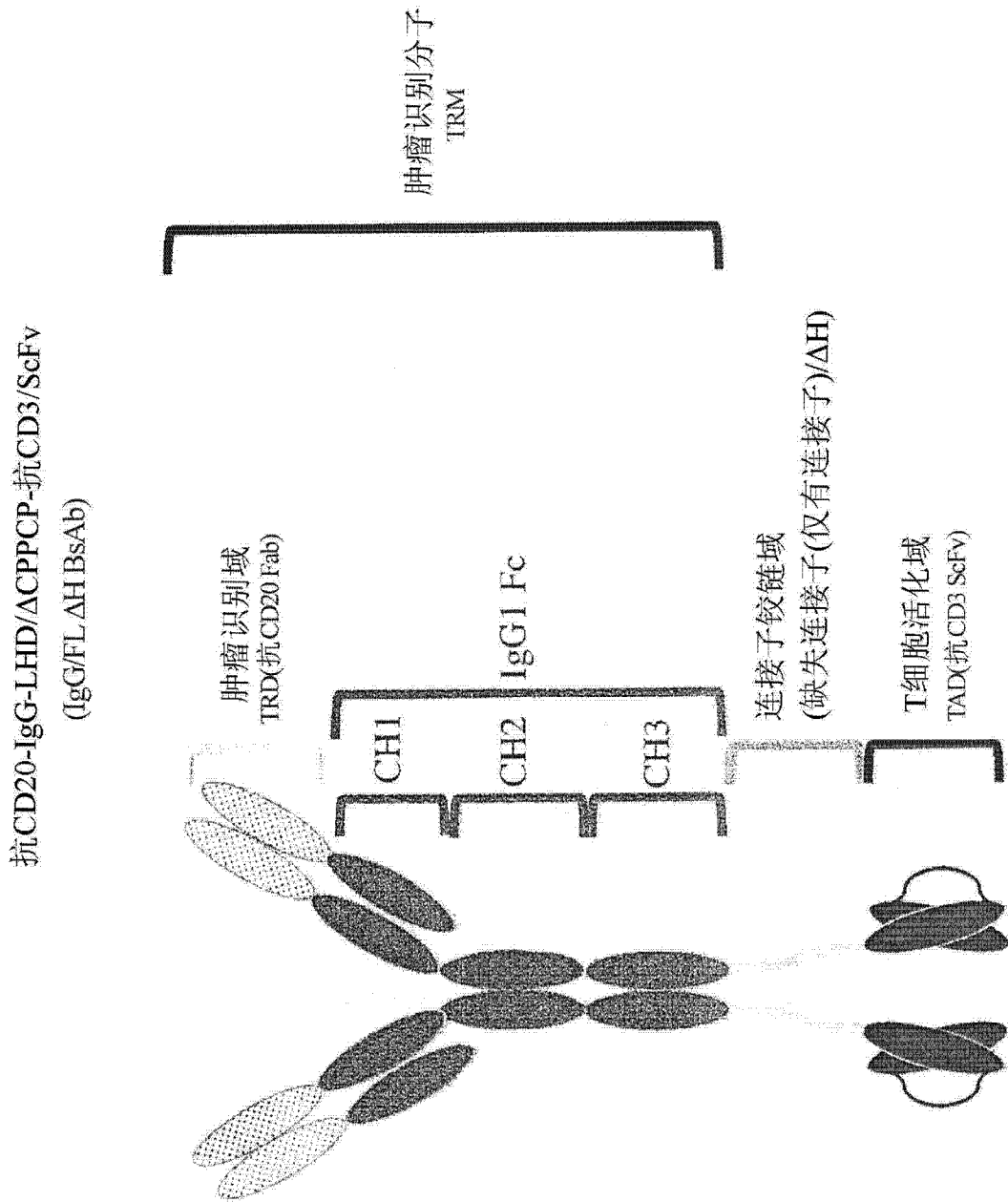


图 1D

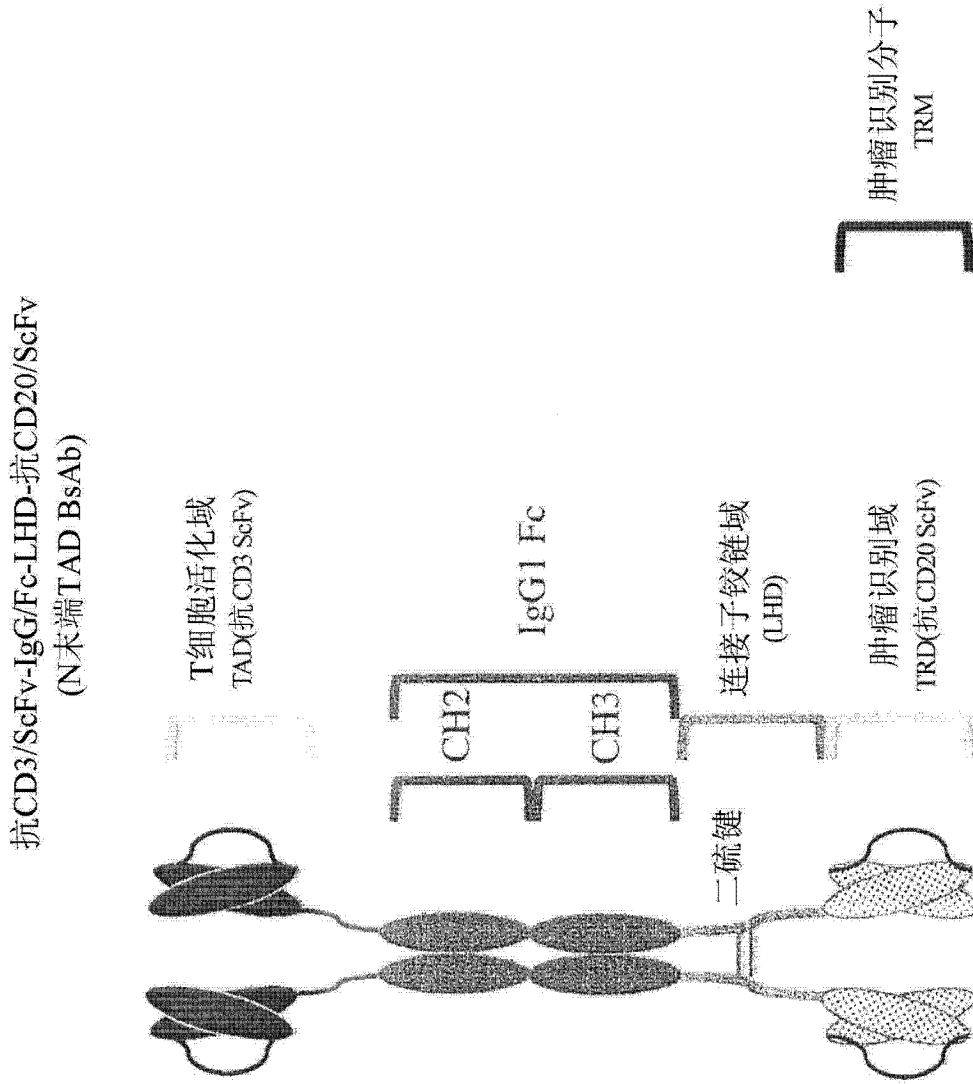


图 1E

IgG-FL Δ H 构筑体的结合亲和力和显著降低

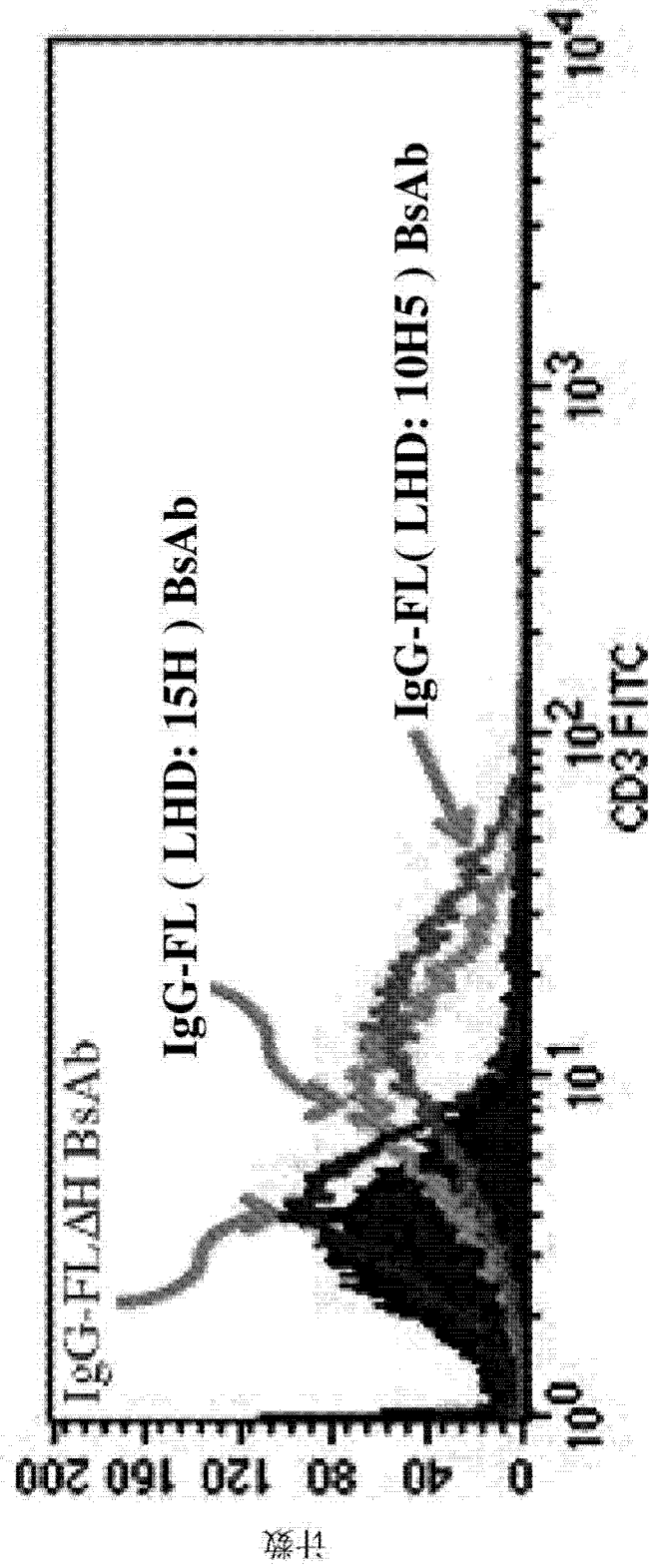


图 2A

IgG-FL 结合到 CD3 不受 LHD 形式影响

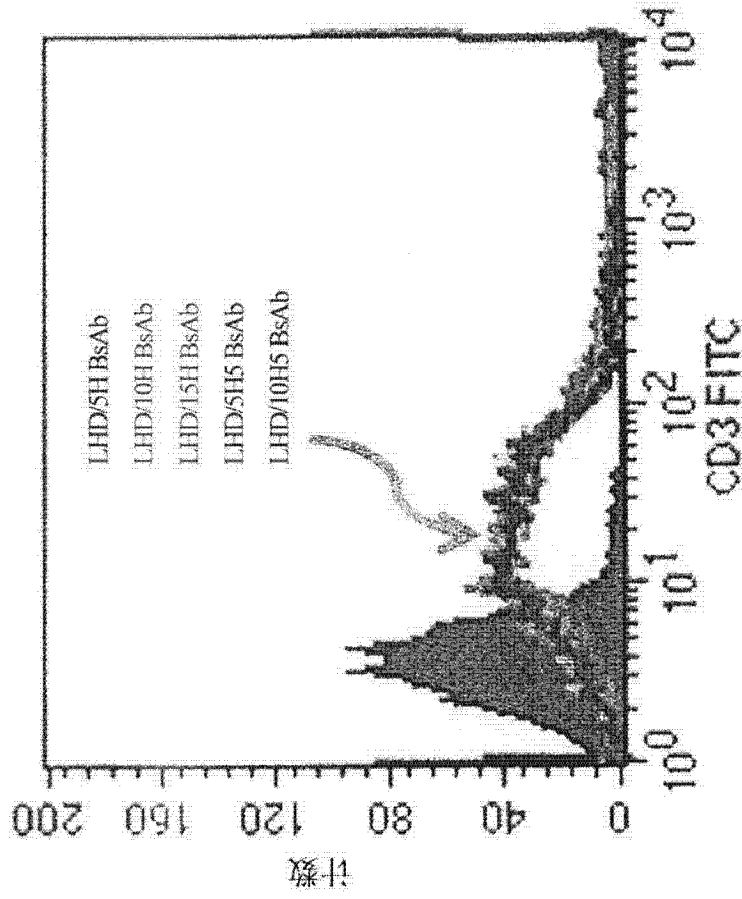


图 2B

IgG-FL ΔH 构筑体在纯化之后显示明显的聚集

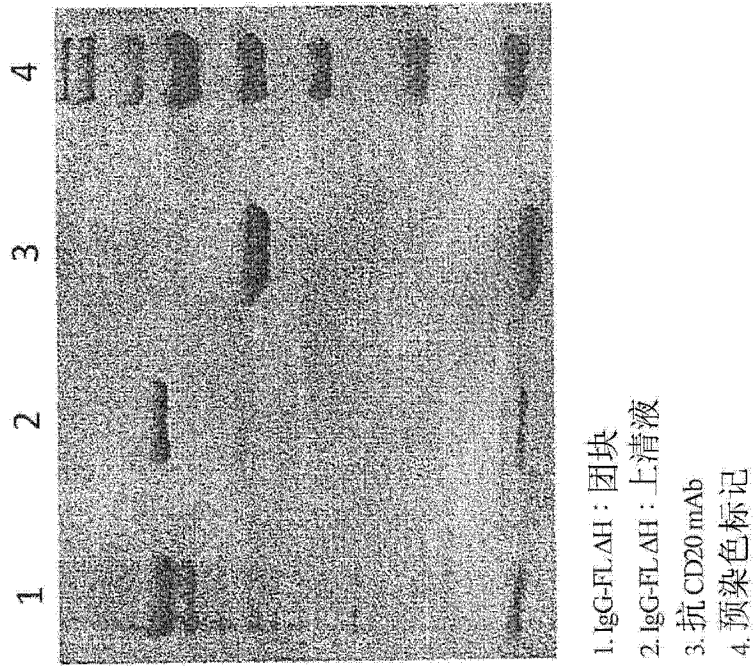


图 3

IgG-FL在4°C储存3个月之后显示良好稳定性

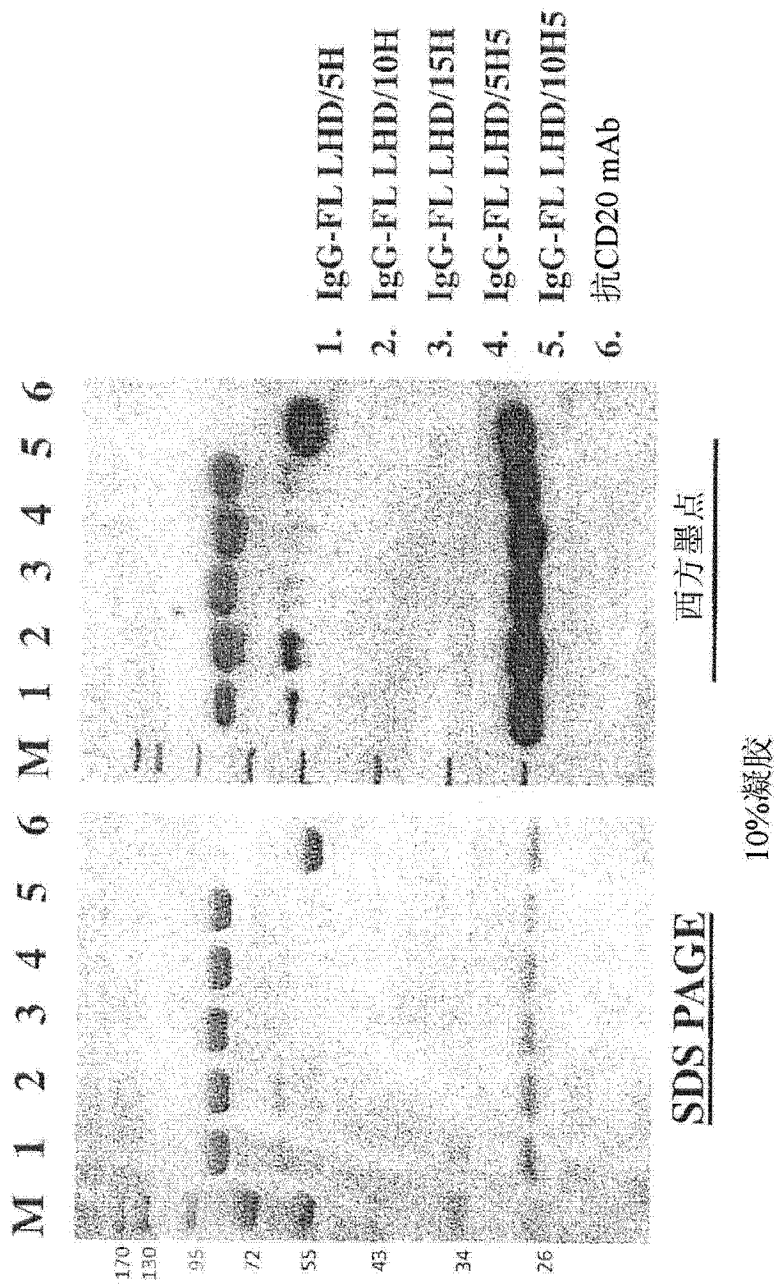


图 4

LHD融合ScFv-IgG BsAb介导针对肿瘤的细胞毒性
具有各种LHD的ScFv-IgG

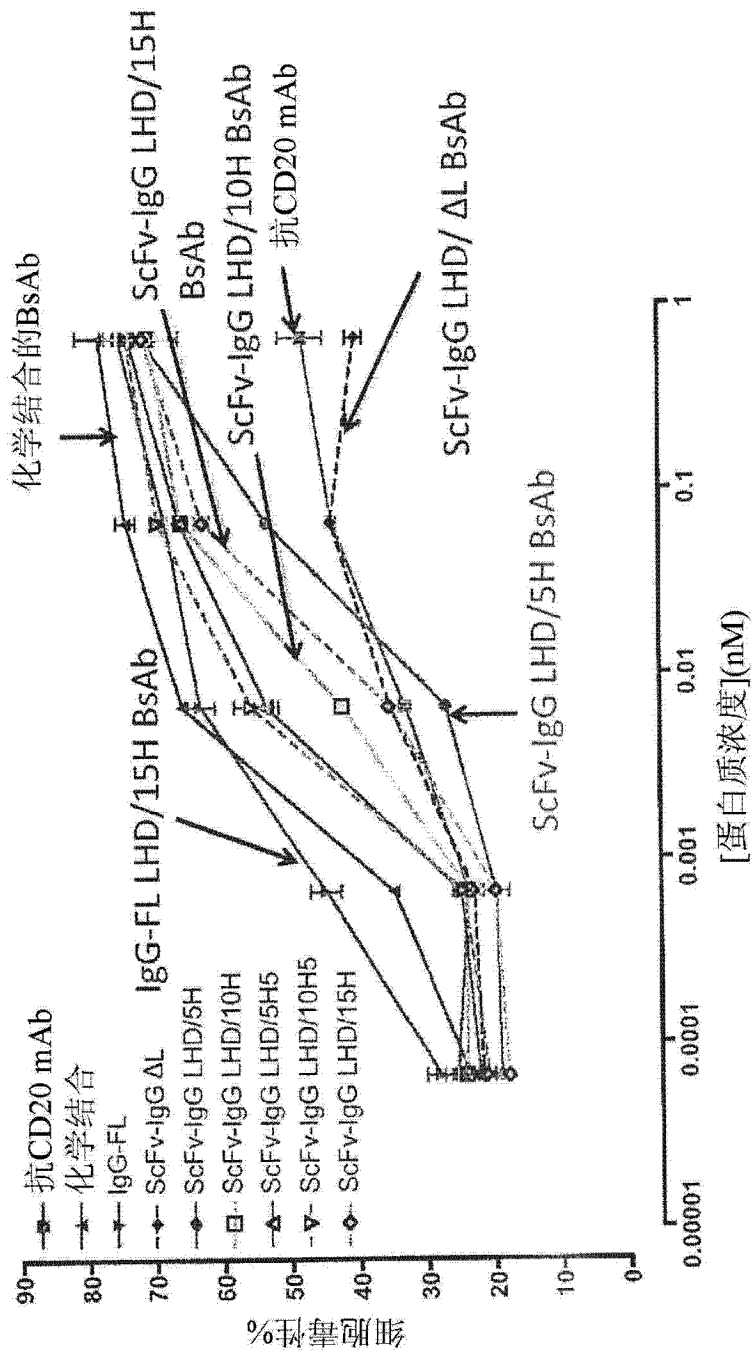


图 5A

LHD融合ScFv-IgG-FL BsAb介导针对肿瘤的细胞毒性
具有各种LHD的IgG-FL

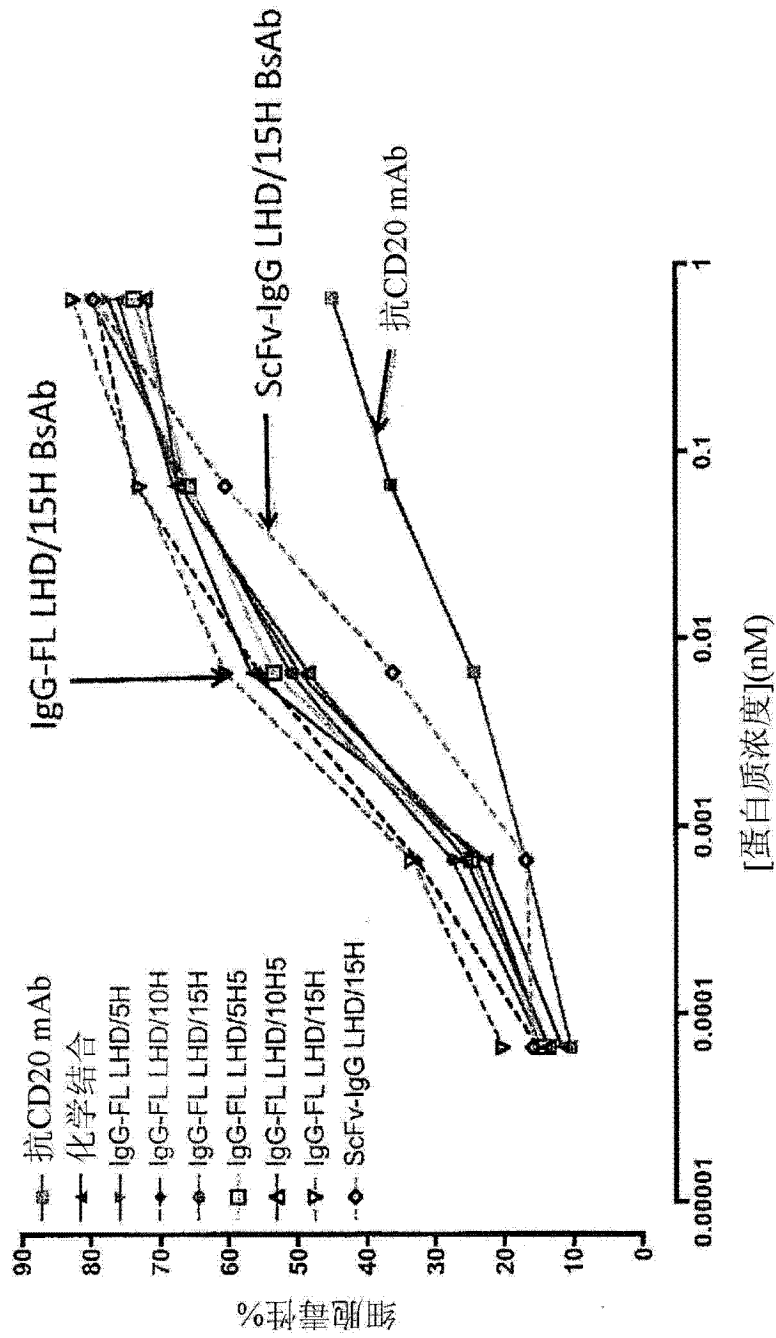


图 5B

LHD融合IgG-FL BsAb介导对肿瘤的细胞毒性

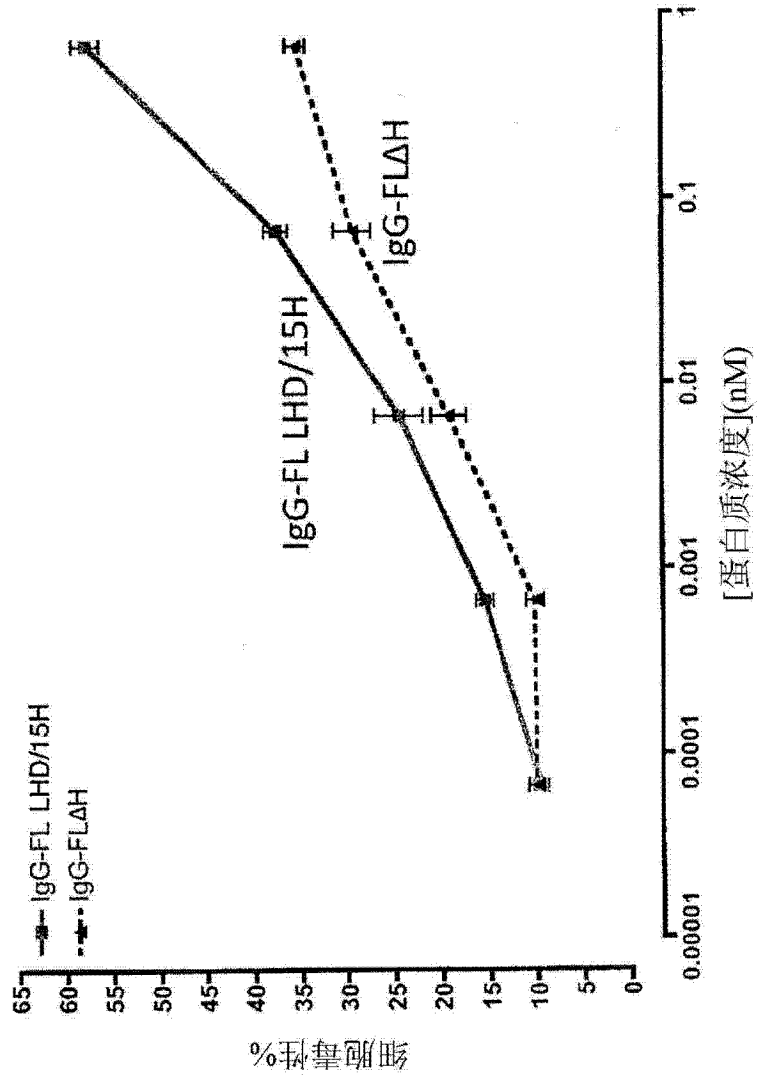


图 5C

IgG-FL 诱导周边血液单核细胞发生轻度的增殖

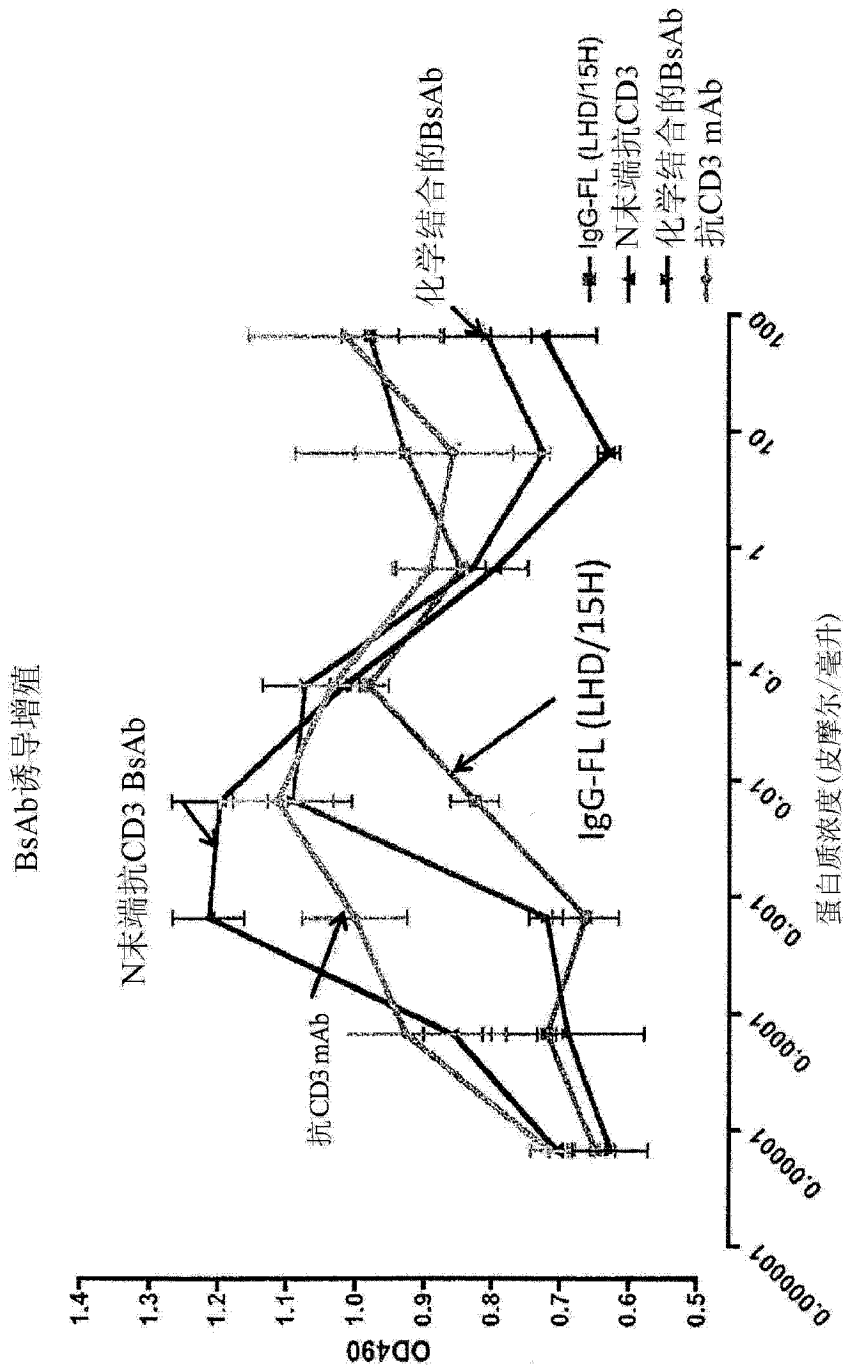


图 9

对LHD融合BsAb的药学动力学分析

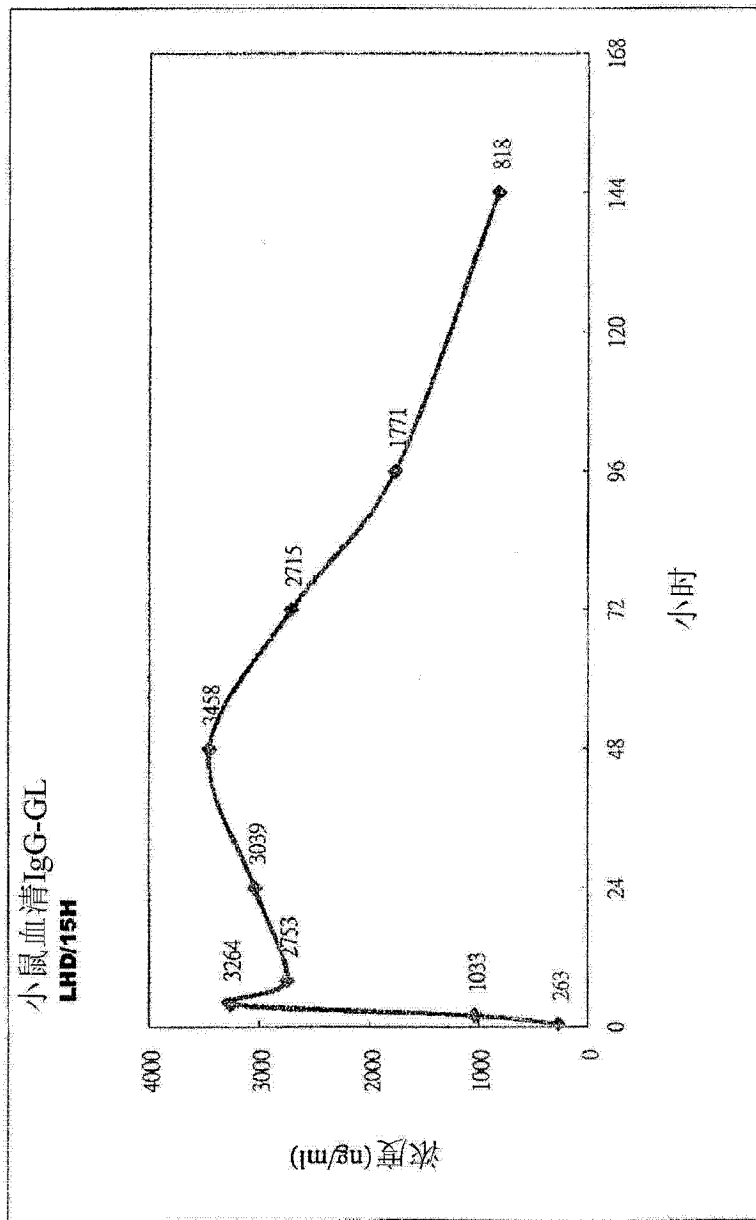


图 7