



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118580366 A

(43) 申请公布日 2024. 09. 03

(21) 申请号 202410816138.2

(22) 申请日 2018.08.09

(30) 优先权数据
17185572.9 2017.08.09 EP

(62) 分案原申请数据
201880059748.5 2018.08.09

(71) 申请人 美勒斯公司
地址 荷兰

(72) 发明人 塞西利亚·安娜·威廉明娜·热延
罗伯特斯·科内利斯·罗弗斯
马克·思罗斯比
科内利斯·阿德里安·德克吕夫
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
专利代理师 张福誉 韩晓帆

(51) Int.Cl.
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/517 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书3页 说明书45页
序列表（电子公布） 附图27页

(54) 发明名称
结合EGFR和cMET的抗体

(57) 摘要

本申请涉及结合EGFR和cMET的抗体。如本文中公开的本发明涉及双特异性抗体,其包含可结合表皮生长因子受体 (EGFR) 的胞外部分的第一可变结构域和可结合MET原癌基因受体酪氨酸激酶 (cMET) 的胞外部分的第二可变结构域。所述抗体可包含共同轻链,所述抗体可以是人抗体。所述抗体可以是全长抗体。在一些实施方案中,所述双特异性抗体是抗EGFR、抗cMET化学计量为1:1的IgG1形式抗体。在一些实施方案中,所述抗体具有可结合EGFR的一个可变结构域和可结合cMET的一个可变结构域。

name		核苷酸序列	
start	end	5'	3'
1	500	ATG	CTG
100	500	CTG	CTG
200	500	CTG	CTG
300	500	CTG	CTG
400	500	CTG	CTG
500	500	CTG	CTG
600	500	CTG	CTG
700	500	CTG	CTG
800	500	CTG	CTG
900	500	CTG	CTG
1000	500	CTG	CTG
1100	500	CTG	CTG
1200	500	CTG	CTG
1300	500	CTG	CTG
1400	500	CTG	CTG
1500	500	CTG	CTG
1600	500	CTG	CTG
1700	500	CTG	CTG
1800	500	CTG	CTG
1900	500	CTG	CTG
2000	500	CTG	CTG
2100	500	CTG	CTG
2200	500	CTG	CTG
2300	500	CTG	CTG
2400	500	CTG	CTG
2500	500	CTG	CTG
2600	500	CTG	CTG
2700	500	CTG	CTG
2800	500	CTG	CTG
2900	500	CTG	CTG
3000	500	CTG	CTG
3100	500	CTG	CTG
3200	500	CTG	CTG
3300	500	CTG	CTG
3400	500	CTG	CTG
3500	500	CTG	CTG
3600	500	CTG	CTG
3700	500	CTG	CTG
3800	500	CTG	CTG
3900	500	CTG	CTG
4000	500	CTG	CTG
4100	500	CTG	CTG
4200	500	CTG	CTG
4300	500	CTG	CTG
4400	500	CTG	CTG
4500	500	CTG	CTG
4600	500	CTG	CTG
4700	500	CTG	CTG
4800	500	CTG	CTG
4900	500	CTG	CTG
5000	500	CTG	CTG
5100	500	CTG	CTG
5200	500	CTG	CTG
5300	500	CTG	CTG
5400	500	CTG	CTG
5500	500	CTG	CTG
5600	500	CTG	CTG
5700	500	CTG	CTG
5800	500	CTG	CTG
5900	500	CTG	CTG
6000	500	CTG	CTG
6100	500	CTG	CTG
6200	500	CTG	CTG
6300	500	CTG	CTG
6400	500	CTG	CTG
6500	500	CTG	CTG
6600	500	CTG	CTG
6700	500	CTG	CTG
6800	500	CTG	CTG
6900	500	CTG	CTG
7000	500	CTG	CTG
7100	500	CTG	CTG
7200	500	CTG	CTG
7300	500	CTG	CTG
7400	500	CTG	CTG
7500	500	CTG	CTG
7600	500	CTG	CTG
7700	500	CTG	CTG
7800	500	CTG	CTG
7900	500	CTG	CTG
8000	500	CTG	CTG
8100	500	CTG	CTG
8200	500	CTG	CTG
8300	500	CTG	CTG
8400	500	CTG	CTG
8500	500	CTG	CTG
8600	500	CTG	CTG
8700	500	CTG	CTG
8800	500	CTG	CTG
8900	500	CTG	CTG
9000	500	CTG	CTG
9100	500	CTG	CTG
9200	500	CTG	CTG
9300	500	CTG	CTG
9400	500	CTG	CTG
9500	500	CTG	CTG
9600	500	CTG	CTG
9700	500	CTG	CTG
9800	500	CTG	CTG
9900	500	CTG	CTG
10000	500	CTG	CTG

1. 双特异性抗体,其包含可结合人表皮生长因子受体(EGFR)的胞外部分的第一可变结构域和可结合人MET原癌基因受体酪氨酸激酶(cMET)的胞外部分的第二可变结构域。

2. 权利要求1所述的双特异性抗体,其包含共同轻链。

3. 权利要求1或权利要求2所述的双特异性抗体,其是人抗体。

4. 权利要求1至3中任一项所述的双特异性抗体,其是全长抗体。

5. 权利要求1至4中任一项所述的双特异性抗体,其是抗EGFR、抗cMET化学计量为1:1的IgG1形式抗体。

6. 权利要求1至5中任一项所述的双特异性抗体,其具有可结合EGFR的一个可变结构域和可结合cMET的一个可变结构域。

7. 权利要求1至6中任一项所述的双特异性抗体,其中所述可结合人EGFR的可变结构域也可结合食蟹猴和小鼠EGFR。

8. 权利要求1至7中任一项所述的双特异性抗体,其中所述可结合人EGFR的可变结构域与人EGFR的结构域III结合。

9. 权利要求1至8中任一项所述的双特异性抗体,其中所述可结合cMET的可变结构域阻断抗体5D5与cMET的结合。

10. 权利要求1至9中任一项所述的双特异性抗体,其中所述可结合cMET的可变结构域阻断HGF与cMET的结合。

11. 权利要求1至10中任一项所述的双特异性抗体,其中一个CH3结构域中第405和409位的氨基酸与另一CH3结构域中相应位置处的氨基酸相同(EU编号)。

12. 权利要求1至11中任一项所述的双特异性抗体,其中所述第一可变结构域包含具有CDR1序列SYGIS、CDR2序列WISAYX₁X₂NTNYAQLQG和包含序列X₃X₄X₅X₆HWLX₇A的CDR3的重链可变区,其中

X₁=N或S;X₂=A或G;X₃=D或G;X₄=R、S或Y;X₅=H、L或Y;X₆=D或W并且X₇=D或G;在除了X₁至X₇之外的位置具有0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合,并且其中所述第二可变结构域包含重链可变区,所述重链可变区具有带有0至10个、优选0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合的SEQ ID NO:1至23的序列之一的氨基酸序列。

13. 权利要求12所述的双特异性抗体,其中

X₁=N;X₂=G;X₃=D;X₄=S;X₅=Y;X₆=W并且X₇=G;

X₁=N;X₂=A;X₃=D;X₄=S;X₅=Y;X₆=W并且X₇=G;

X₁=S;X₂=G;X₃=D;X₄=S;X₅=Y;X₆=W并且X₇=G;

X₁=N;X₂=G;X₃=D;X₄=R;X₅=H;X₆=W并且X₇=D;

X₁=N;X₂=A;X₃=D;X₄=R;X₅=H;X₆=W并且X₇=D;

X₁=S;X₂=G;X₃=D;X₄=R;X₅=H;X₆=W并且X₇=D;

X₁=N;X₂=G;X₃=G;X₄=Y;X₅=L;X₆=D并且X₇=G;

X₁=N;X₂=A;X₃=G;X₄=Y;X₅=L;X₆=D并且X₇=G;或

X₁=S;X₂=G;X₃=G;X₄=Y;X₅=L;X₆=D并且X₇=G。

14. 权利要求12或权利要求13所述的双特异性抗体,其中

X₁=N;X₂=G;X₃=D;X₄=R;X₅=H;X₆=W并且X₇=D;

X₁=N;X₂=A;X₃=D;X₄=R;X₅=H;X₆=W并且X₇=D;或

$X_1=S; X_2=G; X_3=D; X_4=R; X_5=H; X_6=W$ 并且 $X_7=D$ 。

15. 权利要求12至14中任一项所述的双特异性抗体, 其中

$X_1=N; X_2=G; X_3=D; X_4=R; X_5=H; X_6=W$ 并且 $X_7=D$; 或

$X_1=N; X_2=A; X_3=D; X_4=R; X_5=H; X_6=W$ 并且 $X_7=D$ 。

16. 权利要求1至15中任一项所述的双特异性抗体, 其中所述第二可变结构域的重链可变区包含具有0至10个、优选0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合的SEQ ID NO:1至3、7、8、10、13、15、16、17、21、22或23的序列之一的氨基酸序列。

17. 权利要求1至16中任一项所述的双特异性抗体, 其中所述第二可变结构域的重链可变区包含具有0至10个、优选0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合的SEQ ID NO:2、7、8、10、13或23的序列之一的氨基酸序列。

18. 权利要求1至17中任一项所述的双特异性抗体, 其中所述第一可变结构域包含具有CDR1序列SYGIS、CDR2序列WISAYNGNTNYAQLQG和包含序列DRHWHWWLDA的CDR3的重链可变区, 并且其中所述第二可变结构域包含具有CDR1序列SYSMN、CDR2序列WINTYTGDPYTAQGFTG和CDR3序列ETYFYDRGGYPFDP的重链可变区。

19. 权利要求1至17中任一项所述的双特异性抗体, 其中所述第一可变结构域包含具有CDR1序列SYGIS、CDR2序列WISAYNANTNYAQLQG和包含所述序列DRHWHWWLDA的CDR3的重链可变区, 并且其中所述第二可变结构域包含具有CDR1序列TYSMN、CDR2序列WINTYTDPTYTAQGFTG和包含序列ETYFYDRGGYPFDP的CDR3的重链可变区。

20. 权利要求1至19中任一项所述的双特异性抗体, 其中所述第一和第二可变结构域包含共同轻链, 优选图9B的轻链。

21. 权利要求1至20中任一项所述的抗体, 所述抗体抑制HGF诱导的HGF生长应答细胞的生长。

22. 权利要求1至21中任一项所述的抗体, 所述抗体抑制EGF诱导的EGF生长应答细胞的生长。

23. 权利要求1至22中任一项所述的抗体, 其用于治疗涉及异常细胞的疾病。

24. 权利要求1至23中任一项所述的双特异性抗体, 其用于治疗患有肿瘤的对象。

25. 权利要求24所述应用的双特异性抗体, 其中所述肿瘤是EGFR阳性肿瘤、cMET阳性肿瘤或EGFR及cMET阳性肿瘤。

26. 权利要求24或权利要求25所述应用的双特异性抗体, 其中所述肿瘤是乳腺癌; 结肠癌; 胰腺癌; 胃癌; 卵巢癌; 结直肠癌; 头颈癌; 肺癌, 包括非小细胞肺癌; 或膀胱癌。

27. 权利要求24至26中任一项所述应用的双特异性抗体, 其中所述肿瘤对用EGFR酪氨酸激酶抑制剂进行的治疗具有抗性。

28. 权利要求27所述的双特异性抗体, 其中所述EGFR酪氨酸激酶抑制剂是厄洛替尼、吉非替尼或阿法替尼; 厄洛替尼、吉非替尼或阿法替尼的类似物; 或者其相应化合物和/或类似物中一种或更多种的组合。

29. 权利要求28所述应用的双特异性抗体, 其中所述EGFR酪氨酸激酶抑制剂是厄洛替尼。

30. 权利要求23至29中任一项所述应用的双特异性抗体, 其中所述治疗还包括用EGFR酪氨酸激酶抑制剂进行的治疗。

31. 权利要求30所述应用的双特异性抗体,其中所述EGFR酪氨酸激酶抑制剂是厄洛替尼。

32. 权利要求30或31所述应用的双特异性抗体,其中所述双特异性抗体与所述EGFR酪氨酸激酶抑制剂同时、依次或分开施用。

33. 权利要求1至22中任一项所述的双特异性抗体,其用于治疗涉及异常细胞的疾病,其中所述双特异性抗体与EGFR酪氨酸激酶抑制剂同时、依次或分开施用。

34. 治疗患有肿瘤的对象的方法,所述方法包括向有此需要的个体施用权利要求1至22中任一项所述的双特异性抗体。

35. 权利要求34所述的方法,其中所述个体患有涉及异常细胞的疾病。

36. 权利要求34或权利要求35所述的方法,其中所述肿瘤是EGFR阳性肿瘤、cMET阳性肿瘤或EGFR及cMET阳性肿瘤。

37. 权利要求34至36中任一项所述的方法,其中所述肿瘤是乳腺癌;结肠癌;胰腺癌;胃癌;卵巢癌;结直肠癌;头颈癌;肺癌,包括非小细胞肺癌;或膀胱癌。

38. 权利要求34至37中任一项所述的方法,其中所述肿瘤对用EGFR酪氨酸激酶抑制剂进行的治疗具有抗性。

39. 权利要求38所述的方法,其中所述EGFR酪氨酸激酶抑制剂是厄洛替尼、吉非替尼或阿法替尼;厄洛替尼、吉非替尼或阿法替尼的类似物;或者其相应化合物和/或类似物中一种或更多种的组合。

40. 权利要求39所述的方法,其中所述EGFR酪氨酸激酶抑制剂是厄洛替尼。

41. 权利要求34至40中任一项所述的方法,其中所述治疗还包括向所述有此需要的个体施用EGFR酪氨酸激酶抑制剂。

42. 权利要求41所述的方法,其中所述EGFR酪氨酸激酶抑制剂是厄洛替尼。

43. 权利要求41或权利要求42所述的方法,其中所述双特异性抗体与所述EGFR酪氨酸激酶抑制剂同时、依次或分开施用。

44. 权利要求1至22中任一项所述的双特异性抗体,其用于制备用于治疗涉及异常细胞的疾病的药物。

45. 抗体,其包含能够结合人EGFR、小鼠EGFR和食蟹猴EGFR的胞外部分的可变结构域。

结合EGFR和cMET的抗体

[0001] 本申请是申请号为201880059748.5的发明名称为“结合EGFR和cMET的抗体”的中国专利申请的分案申请,原申请是2018年08月09日提交的PCT国际申请PCT/NL2018/050537于2020年03月13日进入中国国家阶段的申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及抗体领域。特别地,本发明涉及用于治疗涉及异常细胞的疾病的治疗性抗体(包括人抗体)的领域。此外,本发明涉及结合EGFR和cMET的抗体,包括多特异性抗体,及其在结合EGFR和cMET阳性细胞(特别是肿瘤细胞)中的用途。

背景技术

[0003] 表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)是胞外蛋白配体的表皮生长因子家族(EGF家族)的成员的细胞表面受体。EGFR也称为ErbB-1受体。该受体在过去已被赋予多种名称(EGFR;ERBB;ERBB1;HER1;PIG61;mENA)。在本发明中,在人中的ErbB-1、EGFR或HER1的名称将可互换使用。EGFR是ErbB受体家族的成员,该家族是四个紧密相关的受体酪氨酸激酶的亚家族:ErbB-1(EGFR)、ErbB-2(HER2/c-neu;Her2)、ErbB-3(Her 3)和ErbB-4(Her 4)。

[0004] EGFR存在于细胞表面上,并且可通过其特异性配体(包括表皮生长因子和转化生长因子 α (transforming growth factor α ,TGF α))的结合而被激活。一旦被其生长因子配体激活之后,该受体可经历从无活性的大部分单体形式向活性同二聚体的转换。除了在配体结合之后形成同二聚体之外,EGFR还可与ErbB受体家族的另一个成员(例如ErbB2)配对,以产生激活的异二聚体。二聚体在不存在配体结合的情况下也可形成,并且在配体结合之后可形成激活的EGFR簇。

[0005] EGFR二聚化刺激固有的胞内蛋白酪氨酸激酶(protein-tyrosine kinase,PTK)活性。该活性诱导了导致细胞增殖和分化的数种信号转导级联反应。EGFR的激酶结构域可使其复合的其他受体的酪氨酸残基交叉磷酸化(cross-phosphorylate),并且可以以该方式自身激活。

[0006] 在数种类型的癌症中已鉴定涉及EGFR的突变。其是不断扩大的(expanding)抗癌治疗类别的靶标。这样的治疗包括EGFR酪氨酸激酶抑制剂(EGFR tyrosine kinase inhibitor,EGFR-TKI),例如用于肺癌的吉非替尼和厄洛替尼;以及抗体,例如用于结肠癌和头颈癌的西妥昔单抗和帕尼单抗。

[0007] 西妥昔单抗和帕尼单抗是抑制受体的单克隆抗体。临床开发中的另一些单克隆抗体(monoclonal)是扎鲁单抗(zalutumumab)、尼妥珠单抗(nimotuzumab)和马妥珠单抗(matuzumab)。单克隆抗体的目的在于主要通过阻断配体与受体的结合来阻断胞外配体诱导的受体的激活。在结合位点被阻断的情况下,信号诱导分子可无法有效地附着,并因此也无法激活下游信号传导。配体诱导的受体激活也可通过无活性受体构象的稳定性来抑制(马妥珠单抗)。

[0008] 迄今为止,EGFR靶向治疗已随着时间的推移而与产生治疗抗性相关。已经描述了针对EGFR-TKI抗性的多种机制。在患有晚期非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的患者中,抗性机制包括继发突变(例如,T790M、C797S)的发生,替代信号传导(例如,Met、HGF、AXL、Hh、IGF-1R)的激活,异常下游途径(例如,AKT突变、PTEN缺失),EGFR-TKI介导的凋亡途径的损伤(例如,BCL2样11/BIM缺失多态性)和组织学转化。尽管已经鉴定了一些抗性机制,但另一些仍有待鉴定。类似地,用EGFR抗体治疗的结直肠癌患者也会随着时间的推移而产生抗性。这可通过KRAS突变的出现而发生。对于不具有KRAS突变的那些;MET原癌基因的扩增可能与抗EGFR治疗期间的获得性抗性相关(Bardelli et al.,2013; Cancer Discov. Jun;3(6):658-73.doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0558)。肿瘤可以是从头(ab initio)抗性或在治疗期间产生抗性。在许多EGFR阳性癌症中均见到针对EGFR靶向治疗的抗性,并且在本领域中已证明需要更有效的EGFR癌症治疗,所述EGFR癌症治疗改善护理标准(standard of care),并且在应对EGFR靶向治疗抗性方面具有优异的能力。

[0009] MET原癌基因受体酪氨酸激酶(MET Proto-Oncogene,Receptor Tyrosine Kinase,cMET)和肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor,HGF)的失调已在多种肿瘤中报道。在数种癌症中已观察到配体驱动的cMET激活(ligand-driven cMET activation)。在肺癌、乳腺癌和多发性骨髓瘤中观察到血清和瘤内HGF升高(J.M.Siegfried et al.,Ann Thorac Surg66,1915(1998);P.C.Ma et al.,Anticancer Res 23,49(2003);B.E.Elliott et al.Can J Physiol Pharmacol 80,91(2002);C.Seidel,et al,Med Oncol 15,145(1998))。cMET的过表达、cMET扩增或突变已在多种癌症(例如结直肠癌、肺癌、胃癌和肾癌)中报道,并且可驱动配体非依赖性的受体激活(C.Birchmeier et al,Nat Rev Mol Cell Biol 4,915(2003);G.Maulik et al.,Cytokine Growth Factor Rev 13,41(2002))。HGF的表达也与HGF/cMET信号传导途径的激活相关,并且也是在通过EGFR靶向治疗选择下的肿瘤的逃逸机制之一。

[0010] cMET受体是通过将共同前体蛋白水解加工成单程(single-pass)、二硫键连接的 α/β 异二聚体而形成。cMET的胞外部分由三种结构域类型构成。N端区域折叠形成大臂板蛋白(large semaphorin)(Sema)结构域,其涵盖整个 α 亚基和部分 β 亚基。丛状蛋白-臂板蛋白-整联蛋白(plexin-semaphorin-integrin,PSI)结构域紧随Sema结构域,并且包含四个二硫键。该结构域通过与免疫球蛋白样结构域相关的四个免疫球蛋白-丛状蛋白-转录(immunoglobulin-plexin-transcription,IPT)结构域与跨膜螺旋连接。在胞内,cMET受体包含酪氨酸激酶催化结构域,其侧翼是独特的近膜和羧基端序列(Oran and Tsao.Therapeutic advances in medical oncology 3.1_suppl(2011):S7-S19,其通过引用整体并入本文中)。

[0011] cMET的配体,肝细胞生长因子(HGF;也称为离散因子(scatter factor))及其剪接同工型(NK1、NK2)是cMET受体的已知配体。HGF在1991年被鉴定为强效促分裂原(mitogen)/形态发生素(morphogen)。HGF/cMET信号传导途径在多种癌症的发生和进展中发挥重要作用。人癌症中HGF或cMET的失调和/或超激活与不良预后相关。cMET可通过过表达、扩增或突变来激活。激活可促进癌症的发生、进展、侵袭性生长和转移。可以以HGF相关和HGF非依赖性的方式激活cMET。HGF非依赖性激活发生在cMET过表达的情况下。在不存在配体的情况下,丰富的cMET还可触发(异)二聚化和胞内信号传导。其他配体看来不影响这样的cMET过

表达细胞的功能。cMET扩增与cMET过表达相关,并已成为肿瘤亚型的生物标志物。

[0012] HGF在全身无处不在地表达,表明该生长因子是全身可用的细胞因子并且来自肿瘤间质。cMET激活的阳性旁分泌和/或自分泌环可导致cMET进一步表达。HGF特异性抗体利妥木单抗(Rilotumumab)(AMG102)被开发用于胃癌。I期和II期试验看来很有希望,但是在预先计划的数据监测委员会对研究20070622进行安全审查之后,与顺铂和卡培他滨作为胃癌中的一线治疗的III期研究(RILOMET-2)被终止。

[0013] cMET/HGF信号转导与针对EGFR靶向治疗之抗性的相关性刺激了应对抗性之方式的开发。迄今为止,基于抗体的方法包括抗HGF抗体;抗cMET或cMET抗体和尚未在临床上有效的抗cMET/EGFR(在Lee et al., 2015; Immunotargets and Therapy 4:35-44中综述)。cMET抗体Onartuzumab(MetMabTM)和Emibetuzumab(LY-2875358)已在II期临床试验中进行了评价。其中,在与EGFR抑制剂厄洛替尼一起的组合治疗中,Onartuzumab看来针对结直肠癌有效。然而,这些结果在随机III期临床试验中可能无法重复。MetMab是针对cMET的单价单克隆抗体(monovalent monoclonal antibody, mAb),可阻断HGF与cMET的结合以及随后的途径激活(Jin et al., 2008 Cancer Research Vol. 68: pp 4360-68)。

[0014] 克服抗EGFR、cMET和HGF免疫治疗的问题,本发明提供了新的双特异性抗体,其包含可结合表皮生长因子受体(EGFR)的胞外部分的第一可变结构域和可结合cMET原癌基因受体酪氨酸激酶(cMET)的胞外部分的第二可变结构域。

[0015] 迄今为止,本领域中已经描述了某些双特异性EGFR x cMET抗体。Castoldi R. et al. (2013)描述了定名为MetHer1的双特异性EGFR x cMET抗体,其具有抗体5D5(或MetMab)的cMET结合位点和西妥昔单抗的EGFR结合位点。双特异性抗体的固定EGFR和cMET结合化学计量为2:1(参见补充图)。

[0016] US20140378664描述了在多种其他双特异性抗体中的cMET x EGFR双特异性抗体。完整的双特异性抗体作为单一蛋白质产生,随后被蛋白水解切割。这两个VH/VL结构域作为单链Fv片段产生。抗体的结合在胃癌细胞系中诱导cMET降解和Akt磷酸化。Moores et al (2016)描述了由根据EU编号在第405和409位具有突变的受控Fab臂互换(controlled Fab-arm exchange, cFAE)产生的定名为JNJ-61186372的双特异性cMET x EGFR抗体,其可具有潜在的免疫原性。使用表达cMET配体HGF的肿瘤细胞系H1975的异种移植模型,显示JNJ-61186372在体内具有活性。已知该肿瘤模型将取决于抗体的ADCC活性(Ahmed et al., 2015)。据报道,JNJ-61186372具有对cMET的亲和力比对EGFR的亲和力高约40倍的亲和力失衡(Moores et al. (2016)),并且已知来源于扎鲁单抗的抗EGFR臂引起输注相关反应、皮肤病等问题。

[0017] LY3164530是双特异性cMET x EGFR抗体,其包含作为与cMET结合抗体LY2875358的重链可变结构域融合的单链Fv片段的西妥昔单抗的EGFR结合结构域(Emibetuzumab; Kim和Kim 2017)。其是所谓的包含针对每个抗原的两个结合位点的双可变结构域抗体。没有提供关于抗体的HGF抑制的数据。据报道,该抗体结合cMET和EGFR并使其内化而没有激动活性。作者回顾了多种cMET、EGFR和cMET x EGFR的靶向治疗,并且得出的结论是,迄今为止这些抑制剂均未在临床试验中显示出显著的效力。

[0018] 因此,需要新的双特异性cMET x EGFR抗体,其包括可具有如本文中所描述的优异特征的那些。

发明内容

[0019] 在一个方面中,本发明提供了双特异性抗体,其包含可结合人表皮生长因子受体(EGFR)的胞外部分的第一可变结构域和可结合人MET原癌基因受体酪氨酸激酶(cMET)的胞外部分的第二可变结构域。

[0020] 双特异性抗体可包含共同轻链(common light chain)。第一和第二可变结构域优选地包含相同或基本上相同的(共同的)轻链可变区。所述共同轻链可变区可以是已知与经历重组的多样的人可变区基因区段良好配对的那些。更优选地,所述共同轻链优选地是由种系Vk基因区段,优选012/IgV κ 1-39*01可变区基因区段编码的可变区。优选的轻链可变区包含重排的IgV κ 1-39*01/IgJ κ 1*01或IgV κ 1-39*01/IgJ κ 5*01。cMET结合臂的轻链和EGFR结合臂的轻链优选地是相同的(共同的)轻链。共同轻链优选地为与人轻链恒定区连接的重排 κ 轻链IgV κ 1-39*01/IgJ κ 1*01或IgV κ 1-39*01/IgJ κ 5*01。双特异性抗体可以是人抗体。双特异性抗体可以是全长抗体。其可具有可结合EGFR的一个可变结构域和可结合cMET的一个可变结构域。在一个方面中,可结合人EGFR的可变结构域也可有益地结合小鼠EGFR和/或食蟹猴(cynomolgus)EGFR。可结合人EGFR的可变结构域可与人EGFR的结构域III结合。可结合cMET的可变结构域可阻断抗体5D5与cMET的结合。可结合cMET的可变结构域可阻断HGF与cMET的结合。cMET抗体的Kd可比EGFR抗体的Kd小至少10倍。一个CH3结构域中第405和409位的氨基酸可与另一CH3结构域中相应位置处的氨基酸相同(EU编号)。

[0021] 第一可变结构域可包含具有CDR1序列SYGIS、CDR2序列WISAYX₁X₂NTNYAQLQG和包含序列X₃X₄X₅X₆HWLX₇A的CDR3的重链可变区

[0022] 其中X₁=N或S;X₂=A或G;X₃=D或G;X₄=R、S或Y;X₅=H、L或Y;X₆=D或W并且X₇=D或G;在除了X₁至X₇之外的位置具有0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合。

[0023] 第二可变结构域可包含重链可变区,所述重链可变区具有带有0至10个、优选0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合的SEQ ID NO:1至23的序列之一的氨基酸序列。

[0024] 描述了双特异性抗体,其中

[0025] X₁=N;X₂=G;X₃=D;X₄=S;X₅=Y;X₆=W并且X₇=G;

[0026] X₁=N;X₂=A;X₃=D;X₄=S;X₅=Y;X₆=W并且X₇=G;

[0027] X₁=S;X₂=G;X₃=D;X₄=S;X₅=Y;X₆=W并且X₇=G;

[0028] X₁=N;X₂=G;X₃=D;X₄=R;X₅=H;X₆=W并且X₇=D;

[0029] X₁=N;X₂=A;X₃=D;X₄=R;X₅=H;X₆=W并且X₇=D;

[0030] X₁=S;X₂=G;X₃=D;X₄=R;X₅=H;X₆=W并且X₇=D;

[0031] X₁=N;X₂=G;X₃=G;X₄=Y;X₅=L;X₆=D并且X₇=G;

[0032] X₁=N;X₂=A;X₃=G;X₄=Y;X₅=L;X₆=D并且X₇=G;或

[0033] X₁=S;X₂=G;X₃=G;X₄=Y;X₅=L;X₆=D并且X₇=G。在一

[0034] 些实施方案中

[0035] X₁=N;X₂=G;X₃=D;X₄=R;X₅=H;X₆=W并且X₇=D;

[0036] X₁=N;X₂=A;X₃=D;X₄=R;X₅=H;X₆=W并且X₇=D;或

[0037] X₁=S;X₂=G;X₃=D;X₄=R;X₅=H;X₆=W并且X₇=D。

[0038] 在一个优选的实施方案中,X₃至X₇=DRHWD,并且X₁和X₂为NG;SG或NA。

[0039] 描述了双特异性抗体,其中第二可变结构域的重链可变区包含具有0至10个、优选

0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合的SEQ ID NO:1至3、7、8、10、13、15、16、17、21、22或23的序列之一的氨基酸序列。

[0040] 本发明还提供了用于治疗患有肿瘤的对象的方法,所述方法包括向有此需要的个体施用如本文中所述的双特异性抗体。通常来说,个体是患有涉及异常细胞的疾病的个体,例如,个体可患有肿瘤。

[0041] 本发明还提供了双特异性抗体,其包含可结合表皮生长因子受体(EGFR)的胞外部分的第一可变结构域和可结合MET原癌基因受体酪氨酸激酶(cMET)的胞外部分的第二可变结构域,其中第一可变结构域包含具有CDR1序列SYGIS、CDR2序列WISAYX₁X₂NTNYAQLQG和包含序列X₃X₄X₅X₆HWLX₇A的CDR3的重链可变区,其中

[0042] X₁=N或S;X₂=A或G;X₃=D或G;X₄=R、S或Y;X₅=H、L

[0043] 或Y;X₆=D或W并且X₇=D或G;在除了X₁至X₇之外的位置具有0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合,并且其中第二可变结构域包含重链可变区,所述重链可变区具有带有0至10个、优选0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合的SEQ ID NO:1至23的序列之一的氨基酸序列。

[0044] 第一可变结构域优选地包含具有CDR1序列SYGIS、CDR2序列WISAYNGNTNYAQLQG和包含序列DRHWHWLDADFY的CDR3的重链可变区,以及第二可变结构域优选地包含具有CDR1序列SYSMN、CDR2序列WINTYTGDPTYAQGFTG和CDR3序列ETYYYDRGGYPFDP的重链可变区。

[0045] 本发明还提供了如本文中公开的本发明的双特异性抗体,其用于治疗患有涉及异常细胞的疾病(例如肿瘤)的对象。

[0046] 还提供了如本文中公开的本发明的双特异性抗体在制备用于治疗涉及异常细胞的疾病(例如肿瘤或癌症)的药物中的用途。

[0047] 还提供了用于治疗患有肿瘤,优选地为EGFR阳性肿瘤、cMET阳性肿瘤或EGFR及cMET阳性肿瘤的对象的方法,所述方法包括向有此需要的个体施用双特异性抗体。

[0048] 如本文中公开的本发明的抗体优选在伤口愈合测定中抑制HGF诱导的EBC1细胞的迁移。优选地,抑制比西妥昔单抗和MetMab的组合更好。例如,优选通过在存在具有或不具有EGF的HGF的情况下预防伤口闭合来实现抑制(HGF以15ng/ml存在,而EGF在存在时以12.5ng/ml的量存在)。

[0049] 当与TKI组合使用时,本文中公开的本发明的抗体抑制HGF和EGF/HGF诱导的EGFR TKI抗性肿瘤细胞系PC-9和HCC827的生长。TKI优选地是吉非替尼。

[0050] 本文中公开的本发明的抗体抑制HGF诱导的HGF应答细胞(优选EGFR TKI抗性肿瘤细胞系PC-9或HCC827)的生长。

[0051] 本文中公开的本发明的抗体抑制EGF诱导的EGF应答细胞的生长,而不诱导与高亲和力和二价EGFR抗体相关的毒性(例如疹和腹泻)。这使得抗体理想上适合与具有自身毒性谱的TKI组合。

[0052] 本发明还包括药物组合物,其包含本文中公开的双特异性抗体。

[0053] 本发明的抗体可用于治疗对用EGFR酪氨酸激酶抑制剂进行的治疗具有抗性,例如对厄洛替尼、吉非替尼或阿法替尼;厄洛替尼、吉非替尼或阿法替尼的类似物;或者其相应化合物和/或类似物中的一种或更多种的组合产生抗性的肿瘤。

[0054] 根据本发明的治疗可还包括用EGFR酪氨酸激酶抑制剂进行治疗,例如其中EGFR酪

氨酸激酶抑制剂是厄洛替尼。

[0055] 因此,本发明的双特异性抗体可与EGFR酪氨酸激酶抑制剂同时、依次或分开施用。

[0056] 本发明还包括核酸分子或核酸分子组,其单独或一起编码本文中公开的双特异性抗体或其变体的重链或重链可变区。还提供了核酸分子或核酸分子组,其编码本文中公开的抗体。

[0057] 在一个优选的实施方案中,重链包含IgG1抗体,优选人IgG1抗体的恒定区。所述IgG1恒定区的CH2区可被改造以改变抗体的ADCC和/或CDC活性,或者不改变抗体的ADCC和/或CDC活性。在一个优选的实施方案中,所述改变导致增强的ADCC和/或CDC活性。在一个优选的实施方案中,抗体的CH3区被改造以促进重链的异二聚化,所述重链包含结合EGFR的第一重链和结合cMET的第二重链。

[0058] 本发明还包括包含一种或更多种核酸分子的细胞,所述核酸分子单独或一起编码如本文中公开的双特异性抗体或其变体。还提供了使用所述细胞产生本文中公开的双特异性抗体或其变体的方法,优选地,所述方法还包括从细胞培养物中收获双特异性抗体或其变体。

[0059] 本发明还包括包含本文中公开的双特异性抗体或其变体的细胞系统。

[0060] 本发明还提了表达双特异性抗体和/或包含编码所述双特异性抗体的核酸分子的细胞。

[0061] 本发明还包括如本文中公开的双特异性抗体,所述双特异性抗体还包含标记,优选用于体内成像的标记。

附图说明

[0062] 图1:本申请中提及的可变结构域的重链可变区的氨基酸序列。

[0063] 图2:抗EGFR cLC二价抗体在抑制EGF诱导的A431细胞死亡中的功能性。Y轴(计数)示出了测定的荧光读出,提示代谢活性细胞的数目,作为所使用抗体浓度(X轴)的函数。PG3370能够抑制EGF诱导的细胞死亡,并因此随着提高的抗体浓度显示出增强的细胞生长。具有西妥昔单抗/爱必妥(Erbix)的可变区氨基酸序列的分子在本文中称为西妥昔单抗或参照抗体西妥昔单抗在实验中用作内标(黑点)。

[0064] 图3:cMET x EGFR双特异性抗体对H385细胞(图A)和EBC-1细胞(图B)中的伤口愈合的作用。

[0065] 将细胞在不添加(模拟)或添加12.5ng/ml EGF或15ng/ml HGF或者HGF和EGF(15ng/ml和12.5ng/ml)的组合,同时添加5种单独的cMETxEGFR双特异性抗体的情况下孵育。作为对照,与2994Fab组合的西妥昔单抗包括在内。Y轴描绘了通过时间序列显微术测量的伤口闭合的百分比。

[0066] 图4:针对TKI抗性NSCLC细胞HCC827和PC-9细胞中EGFR和cMET表达分析的FACS分析。

[0067] (A) 使用荧光标记的抗体对这两种细胞系EGFR(x轴)和cMET(y轴)的表达进行表征。所有HCC827细胞均显示EGFR表达,并且可细分为EGFR^{high} cMET^{pos}群和EGFR^{pos} cMET^{neg}群。PC-9细胞包含小群的EGFR^{high}和cMET^{pos}细胞,以及最小群的EGFR^{pos}和cMET^{neg}细胞。

[0068] (B) 代表PC-9和HCC827细胞中不同细胞群分布的图。

[0069] 图5:PB8532和PB8388在PC-9 (图A) 和HCC827 (图B) 细胞中对HGF诱导的针对TKI抑制剂的抗性的作用的实例。

[0070] 将细胞用双特异性PB8532、PB8388或西妥昔单抗/5D5 Fab混合物预处理,并与TKI抑制剂组合的HGF和/或EGF一起孵育,在此之后测量增殖。PB8532在PC-9细胞和HCC827细胞中抑制HGF介导的和EGF介导的吉非替尼抗性。

[0071] 图6:用所指定抗体进行的处理对PC-9和HCC827细胞上HGF诱导的cMET磷酸化或EGF诱导的EGFR磷酸化的作用。将抗体(100nM)在37℃下孵育15分钟,然后在其中生成细胞提取物并将其应用于Western印迹分析以检测(p) EGFR和(p) cMET。抗黏着斑蛋白抗体包括在内作为蛋白质上样对照。

[0072] 图7:MF3370及其变体。MF8226中的CDR1、CDR2和CDR3序列从左至右加下划线。其他序列中的CDR在相应位置。

[0073] 图8:MF4356及其变体。MF4356中的CDR1、CDR2和CDR3序列从左至右加下划线。其他序列中的CDR在相应位置。

[0074] 图9:单特异性和双特异性IgG中使用的共同轻链。

[0075] 图9A:共同轻链氨基酸序列。图9B:共同轻链可变结构域DNA序列及翻译物(IGKV1-39/jk1)。图9C:共同轻链恒定区DNA序列及翻译物。图9D:IGKV1-39/jk5共同轻链可变结构域翻译物。图9E:V区IGKV1-39A。

[0076] 图10:用于生成双特异性分子的IgG重链。图10A:CH1区。图10B:铰链区。图C:CH2区。图10D:包含L235G和G236R沉默替换的CH2。图10E:包含L351K和T366K替换的CH3结构域(KK)。图10F:包含L351D和L368E替换的CH3结构域(DE)。

[0077] 图11:在ELISA中EGF与重组EGFR结合的抑制。

[0078] 在存在IgG的系列稀释液的情况下,允许生物素化EGF结合包被的EGFR。西妥昔单抗用作阳性对照,以及PG2708用作阴性对照抗体(Neg ctrl Ab)。EGF结合通过链霉亲和素HRP进行检测。

[0079] 图12:通过FACS分析确定食蟹猴EGFR交叉反应性。用人EGFR或食蟹猴EGFR构建体转染CHO-K1细胞。允许抗体以5μg/ml结合经转染的细胞和CHO-K1细胞。西妥昔单抗用作阳性对照,以及PG2708用作阴性对照抗体(Neg ctrl Ab)。结合的抗体通过PE缀合的抗体进行检测。

[0080] 图13:通过ELISA确定小鼠EGFR和cMET交叉反应性。上图;将固定浓度(5μg/ml)的抗体在用小鼠EGFR和人EGFR包被的微量滴定板中的系列滴定液中进行测试。允许抗EGFR抗体和PG2708(neg Ctrl Ab)结合并通过HRP缀合的抗体检测。下图;允许抗体的系列滴定液结合包被的人和小鼠cMET。人/小鼠交叉反应性抗体BAF527包括在内作为阳性对照抗体,以及添加PG2708作为阴性对照抗体(Neg Ctrl Ab)。结合的抗体通过链霉亲和素HRP进行检测。

[0081] 图14:配体依赖性N87增殖的抑制。在存在HGF(A)、EGF(B)或EGF/HGF(C)的情况下,将系列抗体滴定液与N87细胞孵育。细胞增殖通过阿尔玛蓝(Alamar Blue)测量。等摩尔浓度的Fab 5D5/西妥昔单抗包括在内作为阳性对照抗体。Y轴代表作为细胞增殖指标的荧光强度。X轴代表受试抗体的不同浓度。

[0082] 图15:使用高亲和力FcγRIIIaADCC报道子测定(reporter assay)在N87细胞(A)和

MKN-45细胞(B)中cMETxEGFR双特异性抗体的ADCC活性的实例。X轴代表增加的抗体浓度。Y轴代表作为ADCC活性的读出的发光(Luminescence,RLU)。抗EGFR抗体西妥昔单抗包括在内作为阳性对照抗体。

[0083] 图16:HGF对PC-9(A)和HCC827(B)细胞中TKI厄洛替尼和吉非替尼的效力的作用。将细胞与与300nM厄洛替尼或吉非替尼组合的提高了的浓度的HGF(0至120ng/mL)孵育,在此之后测量细胞增殖。在这两种细胞系中,HGF均诱导了针对TKI的剂量依赖性抗性。

[0084] 图17:ADCC增强型c-MET x EGFR变体的亲和力结合的测试。将稳定表达EGFR的CHO-K1细胞(A)或内源性表达c-MET的MKN-45细胞(B)以 2×10^5 个细胞/孔与如所指定的提高了的浓度的抗体孵育。在洗涤之后,用抗人IgG-PE(3 μ g/ml)检测结合。在iQue系统上分析经染色的细胞,并计算平均荧光强度(mean fluorescence intensity,MFI)。对照抗体是MF1337xMF1337;(TTxTT阴性对照;在底部的黑色三角形)和MF4356xMF3770(PB8532p04;c-MET的c-METxEGFR阳性对照;黑色三角形)。TT代表破伤风类毒素。ADCC表示通过与编码从IgG1的Fc区中去除岩藻糖残基的RMD酶的DNA共转染而具有增强ADCC功能的抗体。

[0085] 图18:用于确认增强ADCC效应物功能的ADCC报道子测定的结果。将表达EGFR的BxPC-3细胞(左)或表达c-MET的MKN-45细胞(右)与ADCC效应细胞以15:1的E:T比例混合,并在存在受试抗体的滴定液(0.01至10 μ g/ml)的情况下孵育。在6小时之后,添加Bio-Glo试剂,并使用微板阅读仪测量发光。发光的水平越高,由受试抗体诱导的靶细胞与效应细胞之间的相互作用的程度越高。上图示出了高亲和力测定的结果,以及下图示出了低亲和力测定的结果。阴性对照抗体为PG1337p218(抗TT,在底部的浅色三角形);另一些对照抗体为3178x4280(HER3 x EGFR,ADCC增强型,浅色闭合圆圈(在左侧上图中的上方));3178x4280(HER3 x EGFR,非ADCC增强型,黑色交叉,在底部);4356x3370(c-MET x EGFR,ADCC增强型,空心浅色圆圈);3370x4356(EGFR x c-MET,非ADCC增强型,黑色交叉和虚线);以及西妥昔单抗(抗EGFR,小黑色圆圈)。

[0086] 图19:厄洛替尼在移植有HCC827细胞的NGS-hHGFki小鼠中诱导抗肿瘤应答,只要小鼠接受治疗即可。黑色箭头指示治疗的开始。

[0087] 图20:单独的和与厄洛替尼组合的PB8532在移植有HCC827细胞的NGS-hHGFki小鼠中诱导抗肿瘤应答。黑色箭头指示治疗的开始;X轴中的灰色箭头指示每周的抗体治疗。

[0088] 图21:即使在治疗停止之后,由单独的和与厄洛替尼组合的PB8532诱导的抗肿瘤应答仍优于厄洛替尼诱导的抗肿瘤应答。黑色箭头指示治疗的开始;X轴中的灰色箭头指示每周的抗体治疗。

[0089] 图22:由单独的和与厄洛替尼组合的PB8532诱导的抗肿瘤应答优于厄洛替尼诱导的抗肿瘤应答。黑色箭头指示治疗的开始;X轴中的灰色箭头指示每周的抗体治疗。用无论是否与厄洛替尼治疗组合的cMET抗体LY2875358的治疗比即使不与厄洛替尼治疗组合的PB8532效力更低。

[0090] 图23:由cMETxEGFR双特异性抗体PB19478诱导的抗肿瘤应答也在当肿瘤对厄洛替尼产生抗性时有效。黑色箭头指示厄洛替尼治疗的开始和PB19478治疗的开始。

具体实施方式

[0091] EGFR是四个受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase,RTK)(称为Her-或

cErbB-1、-2、-3和-4) 家族的成员。EGFR具有由四个亚结构域构成的胞外结构域(extracellular domain,ECD),所述四个亚结构域的其中两个参与配体结合,且其中一个参与同二聚化和异二聚化(Ferguson (2008))。在本节中使用的文献编号是指标题为“本说明书中引用”的列表中的文献编号,所述每个文献均通过引用并入。EGFR整合了来自多种配体的胞外信号,以产生多种胞内应答(Yarden et al.2001;以及Jorrisen et al.2003)。EGFR参与数种人上皮恶性肿瘤,特别是乳腺癌、膀胱癌、非小细胞肺癌、肺癌、结肠癌、卵巢癌、头颈癌和脑癌。已经发现了基因中的激活突变,以及受体及其配体的过表达,导致自分泌激活环(对于综述,参见Robertson et al.2000)。因此,该RTK已被广泛用作癌症治疗的靶标。靶向RTK的小分子抑制剂和针对胞外配体结合结构域的单克隆抗体(mAb)二者均已开发,并且迄今已显示出数项临床成功,尽管大部分是针对患者的选定组。人EGFR蛋白及其编码基因的数据库登录号为(GenBank NM_005228.3)。基因和/或蛋白质的另一些数据库标识符为HGNC:3236;Entrez基因:1956;Ensembl:ENSG00000146648;OMIM:131550和UniProtKB:P00533。给出登录号主要是为了提供将EGFR蛋白鉴定为靶标的另一种方法,由抗体结合的EGFR蛋白的实际序列可能变化,例如因为编码基因中的突变(例如发生在一些癌症等中的突变)。除非另有说明,否则在本文中提及EGFR时,该提及是指人EGFR。结合EGFR的抗原结合位点结合EGFR及其多种变体,例如在一些EGFR阳性肿瘤上表达的那些。

[0092] 本文中使用的术语“EGFR配体”是指结合并激活EGFR的多肽。EGFR配体的一些实例包括但不限于EGF、TGF- α 、HB-EGF、双调蛋白(amphiregulin)、乙胞素(betacellulin)和上皮调节蛋白(epiregulin)(综述为Olayioye MA et al.;EMBO J(2000) Vol 19:pp 3159-3167)。该术语包括天然存在的多肽的生物活性片段和/或变体。

[0093] cMET,也称为酪氨酸蛋白激酶MET或肝细胞生长因子受体(hepatocyte growth factor receptor,HGFR),是在人中由MET基因编码的蛋白质。该蛋白质具有酪氨酸激酶活性。初级单链前体蛋白在翻译后被切割以产生 α 和 β 亚基,它们经二硫键连接以形成成熟受体。

[0094] 异常激活的cMET可诱导肿瘤生长,向肿瘤提供营养的新血管的形成(血管生成),以及扩散至其他器官(转移)的癌症。cMET在许多类型的人恶性肿瘤,包括肾癌、肝癌、胃癌、乳腺癌和脑癌中失调(deregulate)。cMET基因以许多不同的名称而己知,例如MET原癌基因受体酪氨酸激酶;肝细胞生长因子受体;酪氨酸蛋白激酶Met;离散因子受体;原癌基因C-Met;HGF/SF受体;HGF受体;SF受体;EC 2.7.10.1;Met原癌基因;EC 2.7.10;DFNB97;AUTS9;RCCP2;C-Met;MET;HGFR;cMET的外部Id为HGNC:7029;Entrez基因:4233;Ensembl:ENSG00000105976;OMIM:164860和UniProtKB:P08581。给出登录号主要是为了提供将cMET蛋白鉴定为靶标的另一种方法,由抗体结合的cMET蛋白的实际序列可能变化,例如因为编码基因中的突变(例如发生在一些癌症等中的突变)。除非另有说明,否则在本文中提及cMET时,该提及是指人cMET。结合cMET的抗原结合位点结合cMET及其多种变体,例如在一些cMET阳性肿瘤上表达的那些。

[0095] 抗体通常仅识别抗原的一部分。抗原通常但并非必须是蛋白质。由抗体结合的抗原上识别或结合位点称为表位,其中表位可以是线性或构象的。抗体与抗原的结合通常是特异性的。抗体的“特异性”是指其对特定表位的选择性,而“亲和力”是指抗体的抗原结合位点与其结合的表位之间相互作用的强度。

[0096] 本文中公开的本发明的示例性抗体与EGFR和cMET(优选人EGFR和人cMET)结合。本文中公开的本发明的EGFR/cMET双特异性抗体与EGFR结合,并且在其他方面相同的条件下,与同一物种的同源受体ErbB-2和ErbB-4以低至少100倍结合。本文中公开的本发明的EGFR/cMET双特异性抗体与cMET结合,并且在其他方面相同的条件下,与同一物种的受体ErbB-2和ErbB-4以低至少100倍结合。考虑到受体是细胞表面受体,所述结合可在表达受体的细胞上评估。本文中公开的本发明的双特异性抗体优选与人EGFR、食蟹猴EGFR和/或小鼠EGFR结合。

[0097] 结合EGFR和cMET的抗体也可结合其他蛋白质,如果这样的其他蛋白质包含相同的表位。因此,术语“结合”不排除抗体与包含相同表位的另一种蛋白质或更多种蛋白质的结合。这样的结合通常称为交叉反应性。EGFR/cMET双特异性抗体通常不与除出生后的人(优选成人)中细胞膜上EGFR和/或cMET之外的其他蛋白质结合。本文中公开的根据本发明的抗体通常能够以至少 1×10^{-6} M的结合亲和力(即平衡解离常数 K_d)结合EGFR,如下文中更详细地概述。

[0098] 本文中使用的术语“抗体”意指优选属于免疫球蛋白类别的蛋白质的蛋白质分子。抗体通常包含结合抗原上表位的两个可变结构域。这样的结构域来源于抗体的可变结构域或与其具有序列同源性。如本文中公开的本发明的双特异性抗体优选地包含两个可变结构域。用于治疗用途的抗体优选地尽可能接近待治疗的对象的天然抗体(例如用于人对象的人抗体)。抗体结合可依据特异性和亲和力表示。特异性确定由结合结构域特异性结合哪种抗原或其表位。通常来说,用于治疗应用的抗体可具有高至 1×10^{-10} M或更高的亲和力。本文中公开的本发明的抗体例如双特异性抗体优选地包含天然抗体的恒定结构域(Fc部分)。本文中所公开的本发明的抗体通常是优选人IgG亚类的双特异性全长抗体。优选地,本发明的抗体是人IgG1亚类的。如本文中公开的本发明的这样的抗体可具有良好的ADCC特性,在向人体内施用之后具有良好的半衰期,并且存在可提供经修饰的重链的CH3改造技术,所述经修饰的重链在克隆细胞中共表达之后,与同二聚体相比优先形成异二聚体。抗体的ADCC活性也可通过本领域中技术人员已知的技术来改善。

[0099] 如本文中公开的本发明的抗体优选地是“全长”抗体。如本文中公开的根据本发明的术语“全长”被定义为包含基本上完整的抗体,然而,其并非必须具有完整抗体的所有功能。为了避免疑问,全长抗体包含两条重链和两条轻链。每条链包含恒定(C)和可变(V)区,可将其分解为定名为CH1、CH2、CH3、VH和CL、VL的结构域。通常来说,抗体通过Fab部分中包含的可变结构域与抗原结合,并且在结合之后可通过恒定结构域(主要通过Fc部分)与免疫系统的分子和细胞相互作用。本文中公开的根据本发明的全长抗体涵盖其中可存在提供所期望特征的突变的抗体。术语“全长抗体”内包括其中一个或数个氨基酸残基缺失而基本上不改变所得抗体的特异性和/或亲和力特征的抗体。例如,IgG抗体可在恒定区中具有1至20个氨基酸残基插入、缺失或替换或其组合。

[0100] 如本文中公开的本发明的抗体优选地是双特异性IgG抗体,优选双特异性全长IgG1抗体,并且更优选人IgG1。全长IgG抗体是优选的,因为其通常具有良好的半衰期,并且出于免疫原性的原因期望保持完全接近自体(人)分子。在一些实施方案中,本发明的抗体是全长IgG1、全长IgG2、全长IgG3或全长IgG4抗体。

[0101] 本文中公开的本发明包括双特异性抗体,其包含可结合EGFR的胞外部分的第一可

变结构域和可结合cMET的胞外部分的第二可变结构域,其中第一可变结构域以小于西妥昔单抗的Kd为0.39nM的亲合力结合EGFR(Kim et al 2008)。第一可变结构域优选以 $10e-6M$ 至 $10e-9M$ 的Kd结合EGFR。Kd优选地为 $10e-7M$ 至 $10e-9M$,优选 $10e-8M$ 至 $10e-9M$ 。第二可变结构域优选以 $10e-7M$ 或更小的Kd结合cMET。Kd优选地为 $10e-7M$ 至 $10e-11M$ 。第二可变结构域对cMET的亲合力优选高于第一可变结构域对EGFR的亲合力。换言之,在该优选的实施方案中,针对cMET的抗体的Kd小于针对EGFR的抗体的Kd。在一个优选的实施方案中,针对cMET的抗体的Kd比针对EGFR的抗体的Kd小至少5倍,并且优选小至少10倍。在该实施方案中,针对相应抗原的Kd值优选如本段中所示。亲和力的这种适当失衡允许本文中公开的本发明的双特异性抗体优选地通过与EGFR结合而停靠在细胞上,并且阻断配体HGF与cMET的结合。

[0102] 可结合EGFR的可变结构域优选地是在二价单特异性抗体的情况下抑制EGF诱导的A431细胞死亡的可变结构域。优选在10nM EGF和10 $\mu g/ml$ 抗体的浓度下测量对EGF诱导的细胞死亡的抑制。对EGF诱导的细胞死亡的抑制可通过在允许(但对EGF除外)A431细胞生长的条件下将A431培养3至7天之后,对在具有和不具有抗体的情况下的细胞数目进行比较来检测。不受理论的束缚,认为抗体与EGFR的结合阻断EGF与EGFR的结合。可结合EGFR的可变结构域优选地是在二价单特异性抗体的情况下抑制EGF诱导的BxPC3或BxPC3-luc2细胞的增殖的可变结构域。

[0103] 如本文中公开的本发明的抗体优选在伤口愈合测定中抑制HGF诱导的EBC1细胞的迁移。伤口愈合测定优选地为实施例中所所述的测定。伤口愈合的抑制优于西妥昔单抗和MetMab的组合。抑制通常不是100%。在存在抑制性抗体的情况下也发生一些伤口愈合。

[0104] 当与TKI组合使用时,如本文中公开的本发明的抗体抑制HGF和EGF/HGF诱导的EGFR TKI抗性肿瘤细胞系PC-9和HCC827的生长。TKI优选地是吉非替尼。

[0105] 如本文中公开的本发明的抗体抑制HGF诱导的HGF应答细胞(优选EGFR TKI抗性肿瘤细胞系PC-9或HCC827)的生长。

[0106] 如本文中公开的本发明的抗体抑制EGF诱导的EGF应答细胞的生长,而不诱导与高亲合力二价EGFR抗体相关的显著的常见毒性,例如疹和泄泻等。这使得抗体理想上适合与具有其自身毒性谱的TKI组合。

[0107] 诱导的生长优选地使用如实施例中所所述的测定来测量。抑制通常不是100%。在抑制性抗体的情况下也发生一些生长。

[0108] 可结合EGFR并包含如本文中所示的MF3370或其变体的氨基酸序列的可变结构域优选与EGFR结构域III结合(参见国际专利申请PCT/NL2015/050124的表4;W02015/130172,其通过引用并入本文中)。通过西妥昔单抗可抑制可变结构域与EGFR的结合。可变结构域结合不同于由西妥昔单抗和扎鲁单抗所识别的表位的表位。例如,可变结构域与小鼠EGFR结合,而西妥昔单抗和扎鲁单抗不结合,这表明在小鼠与人EGFR结构域III之间不同的一个或多个残基在西妥昔单抗和扎鲁单抗结合中发挥作用,但在本文中所述的发明的抗体中未发挥作用。具有人、小鼠、食蟹猴EGFR交叉反应性的本文中所述的本发明的双特异性抗体的一个优点在于,其允许将异种移植研究与人类癌症模型一起使用,这就有效性和毒性而言可更具预测性,因为抗体还与具有受体的正常小鼠细胞结合,同时也能够用于食蟹猴毒理学研究。在一个方面中,本发明提供了双特异性抗体,其包含可结合人表皮生长因子受体(EGFR)的胞外部分的第一可变结构域和可结合人MET原癌基因受体酪氨酸激酶(cMET)的

胞外部分的第二可变结构域,其中所述第一可变结构域还可结合小鼠EGFR、食蟹猴EGFR或二者。

[0109] cMET可变结构域优选地包含如本文中所示的MF4356或其变体的氨基酸序列,并且优选阻断抗体MetMab与cMET的结合。可变结构域优选阻断配体HGF与cMET的结合。当在存在饱和量的所述可变结构域的情况下,在半最大结合条件下MetMab与cMET的结合降低了至少40%,并且优选至少60%时,所述可变结构域阻断抗体MetMab与cMET的结合。优选在二价单特异性抗体的情况下提供可变结构域。cMET可变结构域可优选结合cMET的sema结构域。本发明的cMET可变结构域可与5D5竞争结合cMET,或者不与所报道的抗cMET参照抗体例如5D5竞争。参见表2。

[0110] 本文中公开的本发明的可变结构域可结合EGFR(第一可变结构域),并且优选地包含具有CDR1序列SYGIS、CDR2序列W1SAYX₁X₂NTNYAQKLQG和包含序列X₃X₄X₅X₆HWLX₇A的CDR3的重链可变区,其中X₁=N或S;X₂=A或G;X₃=D或G;X₄=R、S或Y;X₅=H、L或Y;X₆=D或W并且X₇=D或G。

[0111] X_{1至7}优选地为:

[0112] X₁=N;X₂=G;X₃=D;X₄=S;X₅=Y;X₆=W并且X₇=G;

[0113] X₁=N;X₂=A;X₃=D;X₄=S;X₅=Y;X₆=W并且X₇=G;

[0114] X₁=S;X₂=G;X₃=D;X₄=S;X₅=Y;X₆=W并且X₇=G;

[0115] X₁=N;X₂=G;X₃=D;X₄=R;X₅=H;X₆=W并且X₇=D;

[0116] X₁=N;X₂=A;X₃=D;X₄=R;X₅=H;X₆=W并且X₇=D;

[0117] X₁=S;X₂=G;X₃=D;X₄=R;X₅=H;X₆=W并且X₇=D;

[0118] X₁=N;X₂=G;X₃=G;X₄=Y;X₅=L;X₆=D并且X₇=G;

[0119] X₁=N;X₂=A;X₃=G;X₄=Y;X₅=L;X₆=D并且X₇=G;或

[0120] X₁=S;X₂=G;X₃=G;X₄=Y;X₅=L;X₆=D并且X₇=G。

[0121] 在一个优选的实施方案中

[0122] X₁=N;X₂=G;X₃=D;X₄=R;X₅=H;X₆=W并且X₇=D;

[0123] X₁=N;X₂=A;X₃=D;X₄=R;X₅=H;X₆=W并且X₇=D;或

[0124] X₁=S;X₂=G;X₃=D;X₄=R;X₅=H;X₆=W并且X₇=D。

[0125] 优选地X₁=N;X₂=G;X₃=D;X₄=R;X₅=H;X₆=W并且X₇=D。

[0126] 在第一可变结构域的CDR3序列中的序列X₉X₄X₅X₆HWLX₇A中的氨基酸A之后的氨基酸可以变化。序列X₃X₄X₅X₆HWLX₇A之后的氨基酸序列可以是FDY。第一可变结构域的CDR3优选地包含序列X₃X₄X₅X₆HWLX₇AF,优选X₃X₄X₅X₆HWLX₇AFD,更优选X₃X₄X₅X₆HWLX₇AFDY。

[0127] 第一可变结构域优选地包含具有CDR1序列SYGIS、CDR2序列WISAYNGNTNYAQKLQG和CDR3序列X₃X₄X₅X₆HWLX₇A的重链可变区。

[0128] 第一可变结构域优选地包含具有CDR1序列SYGIS、CDR2序列WISAYNGNTNYAQKLQG和包含序列DRHWHWWLDA的CDR3的重链可变区。第一可变结构域的CDR3序列中LDA序列之后的氨基酸可以变化。序列LDA之后的氨基酸序列可以是FDY。第一可变结构域的CDR3优选地包含序列DRHWHWWLDAF,优选DRHWHWWLDAFD,更优选DRHWHWWLDAFDY。

[0129] 第一可变结构域优选地包含重链可变区,所述重链可变区具有如图7中所示的以下的氨基酸序列:MF3353、MF8229、MF8228、MF3370、MF8233、MF8232、MF3393、MF8227或

MF8226,所述氨基酸序列相对于所示序列具有至多10个,优选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个、并且优选地具有0、1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、替换或其组合。在一个优选的实施方案中,第一可变结构域包含重链可变区,所述重链可变区具有如图7中所示的以下的氨基酸序列:MF3353、MF8229、MF8228、MF3370、MF8233、MF8232、MF3393、MF8227或MF8226。

[0130] 可结合cMET的可变结构域(第二可变结构域)优选地包含重链可变区,所述重链可变区包含具有0至10个、优选0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合的SEQ ID NO:1至23的序列之一的氨基酸序列。第二可变结构域的重链可变区优选地包含具有0至10个、优选0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合的SEQ ID NO:1至3、7、8、10、13、15、16、17、21、22或23的序列之一的氨基酸序列。第二可变结构域的重链可变区优选地包含具有0至10个、优选0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合的SEQ ID NO:2、7、8、10、13或23的序列之一的氨基酸序列。第二可变结构域的重链可变区优选地包含具有0至10个、优选0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合的SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:23的序列的氨基酸序列。

[0131] 在一个优选的实施方案中,第一可变结构域包含具有CDR1序列SYGIS、CDR2序列WISAYNGNTNYAQLQG和包含序列DRHWHWWLDA,优选DRHWHWWLDAFDY的CDR3的重链可变区,以及其中第二可变结构域包含具有CDR1序列SYSMN、CDR2序列WINTSTGDPTYAQGFTG和CDR3序列ETYYYDRGGTPFDP的重链可变区。第一可变结构域和第二可变结构域的轻链的CDR1、CDR2和CDR3优选地分别包含氨基酸序列CDR1-QSISY、CDR2-AAS、CDR3-QQSYSTP,即IGKV1-39的CDR(根据IMGT)。

[0132] 在一个优选的实施方案中,第一可变结构域包含具有CDR1序列SYGIS、CDR2序列WISAYNGNTNYAQLQG和包含序列DRHWHWWLDA的CDR3的重链可变区,并且其中第二可变结构域包含具有CDR1序列TYSMN、CDR2序列WINTYTGDPTYAQGFTG和包含序列ETYFYDRGGYPFDP的CDR3的重链可变区。第一可变结构域和第二可变结构域的轻链的CDR1、CDR2和CDR3优选地分别包含氨基酸序列CDR1-QSISY、CDR2-AAS、CDR3-QQSYSTP,即IGKV1-39的CDR(根据IMGT)。

[0133] 双特异性抗体,其包含可结合EGFR的胞外部分的第一可变结构域和可结合cMET的胞外部分的第二可变结构域,其中第一可变结构域包含具有CDR1序列SYGIS、CDR2序列WISAYNANTNYAQLQG和包含序列DRHWHWWLDA的CDR3的重链可变区,并且其中第二可变结构域包含具有CDR1序列SYSMN、CDR2序列WINTYTGDPTYAQGFTG和CDR3序列ETYYYDRGGYPFDP的重链可变区。第一可变结构域和第二可变结构域的轻链的CDR1、CDR2和CDR3优选地分别包含氨基酸序列CDR1-QSISY、CDR2-AAS、CDR3-QQSYSTP,即IGKV1-39的CDR(根据IMGT)。

[0134] 双特异性抗体,其包含可结合EGFR的胞外部分的第一可变结构域和可结合cMET的胞外部分的第二可变结构域,其中第一可变结构域包含具有CDR1序列SYGIS、CDR2序列WISAYNANTNYAQLQG和包含序列DRHWHWWLDA的CDR3的重链可变区,并且其中第二可变结构域包含具有CDR1序列TYSMN、CDR2序列WINTYTGDPTYAQGFTG和包含序列ETYFYDRGGYPFDP的CDR3的重链可变区。第一可变结构域和第二可变结构域的轻链的CDR1、CDR2和CDR3优选地分别包含氨基酸序列CDR1-QSISY、CDR2-AAS、CDR3-QQSYSTP,即IGKV1-39的CDR(根据IMGT)。

[0135] 双特异性抗体,其包含可结合EGFR的胞外部分的第一可变结构域和可结合cMET的

胞外部分的第二可变结构域,其中第一可变结构域包含具有CDR1序列SYGIS、CDR2序列WISAYSGNTNYAQLQG和包含序列DRHWHWLLDA的CDR3的重链可变区,并且其中第二可变结构域包含具有CDR1序列SYSMN、CDR2序列WINTYTGDPTYAQGFTG和CDR3序列EYYYDRGGYPFDP的重链可变区。第一可变结构域和第二可变结构域的轻链的CDR1、CDR2和CDR3优选地分别包含氨基酸序列CDR1-QSISY、CDR2-AAS,CDR3-QQSYSTP,即IGKV1-39的CDR(根据IMGT)。

[0136] 双特异性抗体,其包含可结合EGFR的胞外部分的第一可变结构域和可结合cMET的胞外部分的第二可变结构域,其中第一可变结构域包含具有CDR1序列SYGIS、CDR2序列WISAYSGNTNYAQLG和包含序列DRHWHWLLDA的CDR3的重链可变区,并且其中第二可变结构域包含具有CDR1序列TYSMN、CDR2序列WINTYTGDPTYAQGFTG和包含序列ETYFYDRGGYPFDP的CDR3的重链可变区。第一可变结构域和第二可变结构域的轻链的CDR1、CDR2和CDR3优选地分别包含氨基酸序列CDR1-QSISY、CDR2-AAS,CDR3-QQSYSTP,即IGKV1-39的CDR(根据IMGT)。

[0137] 如本文中所述第一可变结构域和第二可变结构域的轻链的CDR1、CDR2和CDR3优选地分别包含氨基酸序列CDR1-QSISY、CDR2-AAS、CDR3-QQSYSTP,即IGKV1-39的CDR(根据IMGT)。在如本文中所述的双特异性抗体的一些实施方案中,第一可变结构域和第二可变结构域包含共同轻链,优选图9B的轻链。

[0138] 在另一个优选的实施方案中,EGFR/cMET双特异性抗体包含可结合人EGFR的胞外部分并且包含图1中所示MF3755的重链可变区的CDR1、CDR2和CDR3的第一可变结构域,以及可结合人cMET的胞外部分并且包含图1中所示MF4297的重链可变区的CDR1、CDR2和CDR3的第二可变结构域。所述第一可变结构域和第二可变结构域中的轻链可变区优选地为如本文中所述的共同轻链可变区。第一可变结构域和第二可变结构域的轻链的CDR1、CDR2和CDR3优选地分别包含氨基酸序列CDR1-QSISY、CDR2-AAS、CDR3-QQSYSTP,即IGKV1-39的CDR(根据IMGT)。在一个优选的实施方案中,抗体包含重链可变区,所述重链可变区具有如图1中所示的MF3755的氨基酸序列,所述氨基酸序列相对于指定序列具有至多10个,优选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个,并且优选地具有0、1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、替换或其组合。在一个优选的实施方案中,第一可变结构域包含重链可变区,所述重链可变区具有如图1中所示MF3755的氨基酸序列。可结合cMET的可变结构域(第二可变结构域)优选地包含重链可变区,所述重链可变区包含具有0至10个、优选0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合的如图1中所示MF4297的氨基酸序列。第二可变结构域的重链可变区优选地包含如图1中所示MF4297的氨基酸序列。

[0139] 在本发明的上下文中,术语“双特异性”(bispecific,bs)意指抗体能够结合两个不同的靶标或在同一靶标上的两个表位,例如,其中抗体的一个可变结构域(如上定义)与EGFR上的表位结合,并且第二可变结构域与cMET上的表位结合。取决于由双特异性抗体识别的两种抗原的表达水平、(亚)细胞定位和化学计量,抗体的两个Fab臂可以或可以不同时结合其表位。双特异性抗体的一个臂通常包含一个抗体的可变结构域,以及另一臂包含另一种抗体的可变结构域(即,双特异性抗体的一个臂由一条重链与一条轻链配对形成,而另一臂则由一条不同的重链与轻链配对形成)。因此,本文中公开的本发明的优选的双特异性抗体的化学计量是1:1的EGFR:cMET结合。

[0140] 如本文中公开的本发明的双特异性抗体的重链可变区通常彼此不同,而轻链可变

区优选相同。其中不同的重链可变区与相同的轻链可变区缔合的双特异性抗体也被称为具有共同轻链可变区(common light chain variable region, cLcv)的双特异性抗体。优选地,轻链恒定区也相同。这样的双特异性抗体被称为具有共同轻链(cLc)。因此,还提供了如本文中公开的根据本发明的双特异性抗体,其中两个臂包含共同轻链。

[0141] 本文中公开的根据本发明的术语“共同轻链”是指双特异性抗体中的两条或更多条轻链,所述轻链可以相同或具有一些氨基酸序列差异,而全长抗体的结合特异性不受影响。例如,在如本文中使用的共同轻链的定义的范围内,可制备或发现不相同但仍在功能上等同的轻链,例如通过引入和测试保守氨基酸变化,其是区域中当与重链配对时没有或仅部分促进结合特异性的氨基酸变化,等。术语“共同轻链”、“共同LC”、“cLC”、“单轻链”无论是否添加术语“重排的”在本文中均可互换使用。术语“共同轻链可变区”、“共同VL”、“共同LCv”、“cLCv”、“单VL”无论是否添加术语“重排的”在本文中均可互换使用。本发明的一个优选方面是:双特异性抗体具有可与具有不同结合特异性的至少两个且优选多个重链(可变区)组合的共同轻链(可变区)以形成具有功能性抗原结合结构域的抗体(例如,W02009/157771)。共同轻链(可变区)优选地是人轻链(可变区)。共同轻链(可变区)优选地具有种系序列。优选的种系序列是具有良好的热力学稳定性、产率和溶解度的轻链可变区。优选的种系轻链是012。共同轻链优选地包含由种系人Vk基因区段编码的轻链,并且优选地是重排的种系人κ轻链IgVκ1-39*01/IGJκ1*01(图9A)。共同轻链可变区优选地是重排的种系人κ轻链IgVκ1-39*01/IGJκ1*01的可变区。共同轻链优选地包含具有0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合的如图9B或9D中所示的轻链可变区。共同轻链优选地还包含轻链恒定区,优选κ轻链恒定区。可针对用于表达共同轻链蛋白的细胞系统对编码共同轻链的核酸进行密码子优化。编码核酸可偏离种系核酸序列。

[0142] 在一个优选的实施方案中,轻链包含轻链区,所述轻链区包含具有0至10个、优选0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合的如图9A中所示的012/IgVκ1-39*01基因区段的氨基酸序列。在说明书通篇,词组“012轻链”将用作“包含含有具有0至10个、优选0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合的如图9A中所示的012/IgVκ1-39*01基因区段的氨基酸序列的轻链可变区的轻链”的简称。IgVκ1-39是免疫球蛋白可变κ1-39基因的简称。该基因也称为免疫球蛋白κ可变1-39;IGKV139;IGKV1-39;012a或012。该基因的外部Id为HGNC:5740;Entrez基因:28930;Ensembl:ENSG00000242371。IgVκ1-39的一种优选氨基酸序列在图9E中给出。其列出了V区的序列。V区可与五个J区之一组合。图9B和9D描述了与J区组合的IgVκ1-39的两个优选序列。连接的序列表示为IGKV1-39/jk1和IGKV1-39/jk5;替代名称为IgVκ1-39*01/IGJκ1*01或IgVκ1-39*01/IGJκ5*01(根据在imgt.org的IMGT数据库万维网的命名)。

[0143] 优选地,包含012/IgVκ1-39*01的轻链可变区是种系序列。还优选地,包含IGJκ1*01或/IGJκ5*01的轻链可变区是种系序列。在一个优选的实施方案中,IGKV1-39/jk1或IGKV1-39/jk5轻链可变区是种系序列。

[0144] 在一个优选的实施方案中,轻链可变区包含种系012/IgVκ1-39*01。在一个优选的实施方案中,轻链可变区包含κ轻链IgVκ1-39*01/IGJκ1*01或IgVκ1-39*01/IGJκ5*01。在一个优选的实施方案中,IgVκ1-39*01/IGJκ1*01。轻链可变区优选地包含种系κ轻链IgVκ1-39*01/IGJκ1*01或种系κ轻链IgVκ1-39*01/IGJκ5*01,优选种系IgVκ1-39*01/IGJκ1*01。

[0145] 产生具有012轻链的抗体的成熟B细胞通常产生相对于种系序列(即在生物体的非淋巴样细胞中的正常序列)已经历一个或多个突变的轻链。导致这些突变的过程通常称为体细胞(超)突变。所得轻链称为亲和力成熟轻链。这样的轻链当来源于012种系序列时是012来源轻链。在本说明书中,词组“共同轻链”将包括“共同轻链来源轻链”,并且词组“012轻链”将包括012来源轻链。通过体细胞超突变引入的突变也可在实验室中人工引入。在实验室中,也可在不影响轻链的特性(种类,并非必须在量上)的情况下引入其他突变。如果轻链包含具有0至10个、优选0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合的如图9A、图9B、图9D或图9E中所示序列,则其至少是012轻链。在一个优选的实施方案中,012轻链是包含具有0至9、0至8、0至7、0至6、0至5、0至4个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合的如图9A、9B、9D或9E中所示序列的轻链。在一个优选的实施方案中,012轻链是包含具有0至5、优选0至4、更优选0至3个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合的如图9A、图9B、图9D或图9E中所示序列的轻链。在一个优选的实施方案中,012轻链是包含具有0至2、更优选0至1、最优选0个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合的如图9A、图9B、图9D或图9E中所示序列的轻链。在一个优选的实施方案中,012轻链是包含具有提及的氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合的如图9A或图9B中所示序列的轻链。在一个优选的实施方案中,轻链包含图9A的序列。在一个优选的实施方案中,轻链可变区包含图9B的序列。提及的1、2、3、4或5个氨基酸替换优选地是保守氨基酸替换,插入、缺失、替换或其组合优选地不在VL链的CDR3区中,优选地不在VL链的CDR1、CDR2或CDR3区或FR4区中。

[0146] 共同轻链可具有 λ 轻链,并且因此这在如本文中公开的本发明的上下文中也提供了,然而优选 κ 轻链。如本文中公开的本发明的共同轻链的恒定部分可以是 κ 或 λ 轻链的恒定区。其优选地是 κ 轻链的恒定区,优选地其中所述共同轻链是种系轻链,优选包含IgVK1-39基因区段的重排种系人 κ 轻链,最优选重排种系人 κ 轻链IgVK1-39*01/IGJK1*01(图9)。术语重排种系人 κ 轻链IgVK1-39*01/IGJK1*01、IGKV1-39/IGKJ1、huVK1-39轻链或简称huVK1-39、或简单地1-39在本申请通篇可互换使用。

[0147] 产生共同轻链的细胞可产生例如重排种系人 κ 轻链IgVK1-39*01/IGJK1*01和包含与 λ 恒定区融合的所提及轻链的可变区的轻链。

[0148] 在一个优选的实施方案中,轻链可变区包含具有0至10个、优选0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合的氨基酸序列

```
DIQMT QSPSS LSASV GDRVT ITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK  
LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PTFGQ  
GTKVE IK or DIQMT QSPSS LSASV GDRVT ITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK  
LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PITFG  
QGTRL EIK
```

[0149] 在一个优选的实施方案中,轻链可变区相对于指定氨基酸序列包含0至9、0至8、0至7、0至6、0至5、0至4,优选0至3,优选0至2,优选0至1,并且优选0个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合。插入、缺失、添加或替换的组合是如要求保护的组合,如果比对的序列在超过5个位置处没有差异。在一个优选的实施方案中,轻链可变区包含氨基酸序列

DIQMT QSPSS LSASV
GDRVITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS
GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PTFGQ GTKVE IK or DIQMT QSPSS
LSASV GDRVITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS
GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PITFG QGTRL EIK

[0150] 在一个优选的实施方案中,轻链可变区包含氨基酸序列

DIQMT
QSPSS LSASV GDRVITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASSLQ SGVPS
RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PTFGQ GTKVE IK

[0151] 在另一个优选的实施方案中,轻链可变区包含氨基酸序列

[0152] DIQMT QSPSS LSASV GDRVITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASSLQ
SGVPS RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PITFG QGTRL EIK

[0153] 氨基酸插入、缺失、替换、添加、或其组合优选地不在轻链可变区的CDR3区中,优选地不在轻链可变区的CDR1或CDR2区中。在一个优选的实施方案中,轻链可变区相对于指定序列不包含缺失、添加或插入。在该实施方案中,重链可变区相对于指定氨基酸序列可具有0至5个氨基酸替换。氨基酸替换优选地是保守氨基酸替换。本发明的抗体的轻链的CDR1、CDR2和CDR3优选地分别包含氨基酸序列CDR1-QSISSY、CDR2-AAS、CDR3-QQSYSTP,即IGKV1-39的CDR(根据IMGT)。

[0154] 如本文中所述的双特异性抗体优选地具有结合EGFR的胞外部分的一个重链可变区/轻链可变区(VH/VL)组合和结合cMET的胞外部分的第二VH/VL组合。在一个优选的实施方案中,所述第一VH/VL组合中的VL类似于所述第二VH/VL组合中的VL。在一个更优选的实施方案中,第一和第二VH/VL组合中的VL是相同的。在一个优选的实施方案中,双特异性抗体是全长抗体,其具有结合EGFR的胞外部分的一个重/轻(H/L)链组合和结合cMET的胞外部分的一个H/L链组合。在一个优选的实施方案中,所述第一H/L链组合中的轻链类似于所述第二H/L链组合中的轻链。在一个更优选的实施方案中,第一和第二H/L链组合中的轻链是相同的。

[0155] 已经公布了用于产生其表达有利于产生双特异性抗体或反之,单特异性抗体的宿主细胞的数种方法。在本发明中,优选地,相对于相应单特异性抗体的产生,抗体分子的细胞表达更有利于双特异性抗体的产生。这通常通过对重链的恒定区进行修饰以使得其与同二聚化相比更有利于异二聚化(即与另一重链/轻链组合的重链二聚化)来实现。在一个优选的实施方案中,如本文中公开的本发明的双特异性抗体包含具有相容性异二聚化结构域的两条不同的免疫球蛋白重链。多种相容性异二聚化结构域在本领域中已描述。相容性异二聚化结构域优选地是相容性免疫球蛋白重链CH3异二聚化结构域。当使用野生型CH3结构域时,两种不同重链(A和B)和共同轻链的共表达将产生三种不同的抗体物质:AA、AB和BB。AA和BB是两种单特异性二价抗体的表示,以及AB是双特异性抗体的表示。为了提高所期望的双特异性产物(AB)的百分比,可使用CH3改造,或者换言之,可使用具有相容性异二聚化结构域的重链,如下文所定义。本领域描述了其中可实现重链的这样的异二聚化的多种方式。一种方式是生成“结进孔(knob into hole)”双特异性抗体。

[0156] 本文中使用的术语“相容性异二聚化结构域”是指以下蛋白质结构域,其被改造使得改造的结构域A'将优先与改造的结构域B'形成异二聚体,反之亦然,A'-A'和B'-B'之间

的同二聚化减弱。

[0157] 在US13/866,747(现授权为US 9,248,181)、US14/081,848(现授权为US 9,358,286)和PCT/NL2013/050294(公布为W02013/157954,通过引用并入本文中)中,公开了使用相容性异二聚化结构域产生双特异性抗体的方法和手段。这些手段和方法也可有利地用于本发明。具体地,如本文中公开的本发明的双特异性抗体优选地包含突变以在宿主细胞中基本上产生双特异性全长IgG分子的表达。优选的突变是第一CH3结构域中的氨基酸替换L351K和T366K(“KK变体”重链)以及第二结构域中的氨基酸替换L351D和L368E(“DE变体”重链),或反之亦然。US 9,248,181和US 9,358,286专利以及W02013/157954PCT申请(其通过引用并入本文中)证明,DE变体与KK变体优先配对形成异二聚体(所谓的“DEKK”双特异性分子)。由于相同重链之间CH3-CH3界面中带电荷残基之间的排斥,不利于DE变体重链的同二聚化(DEDE同二聚体)。

[0158] 双特异性抗体可通过(瞬时)转染编码轻链和两种不同重链的质粒来生成,所述重链经CH3改造以确保有效异二聚化和双特异性抗体的形成。在单细胞中这些链的产生导致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。基本上仅产生双特异性全长IgG1分子的优选突变是第一CH3结构域中在第351和366位的氨基酸替换,例如L351K和T366K(根据EU编号进行编号)(“KK变体”重链),以及第二CH3结构域中在第351和368位的氨基酸替换,例如,L351D和L368E(“DE变体”重链),或反之亦然(参见例如,图10E和10F)。

[0159] 在一个实施方案中,包含结合EGFR的可变结构域的重链/轻链组合包含重链的DE变体。在该实施方案中,包含可与cMET结合的可变结构域的重链/轻链组合包含重链的KK变体。结合cMET的重链的KK变体不产生同二聚体,从而使双特异性抗体对HGF诱导的cMET激活抑制的观察到的作用非常精确。其避免了有时用二价cMET抗体观察到的cMET的激活(激动)。

[0160] Fc区介导抗体的效应物功能,例如补体依赖性细胞毒性(complement-dependent cytotoxicity,CDC)、抗体依赖性细胞毒性(antibody-dependent cellular cytotoxicity,ADCC)和抗体依赖性细胞吞噬作用(antibody-dependent cell phagocytosis,ADCP)。根据治疗性抗体或Fc融合蛋白的应用,可期望降低或提高效应物功能。如在本文中公开的本发明的一些实施方案中,当待激活、增强或刺激免疫应答时,可期望降低的效应物功能。具有降低的效应物功能的抗体可用于靶向免疫细胞的细胞表面分子,等。

[0161] 具有降低的效应物功能的抗体优选地是包含经修饰的CH2/下铰链区例如以降低Fc-受体相互作用或降低C1q结合的IgG抗体。在一些实施方案中,本发明的抗体是具有突变CH2和/或下铰链结构域的IgG抗体,使得双特异性IgG抗体与Fc- γ 受体的相互作用降低。包含突变CH2区的抗体优选地是IgG1抗体。这样的突变IgG1 CH2和/或下铰链结构域优选地包含在第235位和/或第236位的氨基酸替换(EU编号),优选L235G和/或G236R替换(图10D)。

[0162] 如本文中公开的本发明的抗体优选地具有效应物功能。如本文中公开的本发明的双特异性抗体优选地包含抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。抗体可经改造以增强ADCC活性(对于综述,参见Cancer Sci.2009Sep;100(9):1566-72)。改造的治疗性抗体具有改善的效应物功能(Kubota T,Niwa R,Satoh M,Akinaga S,Shitara K,Hanai N)。存在用于确定抗体或效应细胞在诱发ADCC中的效力的数种体外方法。其中包括铬51[Cr51]释放测

定、镱[Eu]释放测定和硫³⁵[S³⁵]释放测定。通常来说,将表达某种表面暴露的抗原的经标记靶细胞系与对该抗原具有特异性的抗体一起孵育。在洗涤之后,将表达Fc受体CD16的效应细胞与经抗体标记的靶细胞共孵育。随后通过闪烁计数器或分光光度法通过释放胞内标记来测量靶细胞裂解。在一个方面中,如本文中公开的本发明的双特异性抗体表现出ADCC活性。在这样的方面中,双特异性抗体可具有改善的ADCC活性。在另一方面中,如本文中公开的本发明的双特异性抗体不表现出ADCC活性。在这样的方面中,抗体可通过如本文中别处所述的一个或更多个CH2突变和通过本领域中已知的技术具有降低的ADCC。增强抗体的ADCC的一种技术是非岩藻糖基化。(参见例如Junttila,T.T.,K.Parsons,et al.(2010).“Superior In vivo Efficacy of Afucosylated Trastuzumab in the Treatment of HER2-Amplified Breast Cancer.”*Cancer Research* 70(11):4481-4489)。因此,还提供了非岩藻糖基化的根据如本文中公开的本发明的双特异性抗体。或者或另外地,可使用多种另一些策略来实现ADCC增强,所述策略例如包括糖工程化(Kyowa Hakko/Biowa,GlycArt (Roche)和Eureka Therapeutics)以及诱变,所有这些策略均试图改善Fc与低亲和力激活的FcγRIIIa的结合,和/或降低与低亲和力抑制性FcγRIIb的结合。如本文中公开的本发明的双特异性抗体优选地被非岩藻糖基化以便增强ADCC活性。当与正常CHO细胞中产生的相同抗体比较时,如本文中公开的本发明的双特异性抗体优选地在Fc区中包含降低量的岩藻糖基化的N-连接的碳水化合物结构。

[0163] 如本文中所述的抗体或双特异性抗体的变体包含抗体或双特异性抗体的功能部分、衍生物和/或类似物。变体维持(双特异性)抗体的结合特异性。功能部分、衍生物和/或类似物维持(双特异性)抗体的结合特异性。如本文中所述,结合特异性由结合第一膜蛋白和第二膜蛋白的胞外部分的能力限定。

[0164] 本文中公开的本发明的双特异性抗体优选地用于人。本发明一种优选的抗体是人或人源化抗体。本文中公开的本发明的双特异性抗体的恒定区优选地是人恒定区。恒定区可包含与天然存在人抗体的恒定区的一个或更多个、优选不超过10个、优选不超过5个氨基酸差异。优选地,恒定部分完全来源于天然存在人抗体。本文中产生的多种抗体来源于人抗体可变结构域文库。因此,这些可变结构域是人的。独特的CDR区可来源于人,是合成的,或来源于另一生物体。当可变区具有(除CDR区之外)与天然存在人抗体的可变区的氨基酸序列相同的氨基酸序列时,则被认为其是人源化可变区。在一些这样的实施方案中,如本文中公开的本发明的结合EGFR或cMET的抗体的可变结构域的VH可包含与天然存在人抗体的可变区的一个或更多个、优选不超过10个、优选不超过5个氨基酸差异,不计入CDR区的氨基酸序列中的可能差异。如本文中公开的本发明的抗体中的EGFR结合结构域和/或cMET结合结构域的轻链可变区可包含与天然存在人抗体的可变区的一个或更多个、优选不超过10个、优选不超过5个氨基酸差异,不计入CDR区的氨基酸序列中的可能差异。如本文中公开的本发明的抗体中的轻链可包含与天然存在人抗体的可变区的一个或更多个、优选不超过10个、优选不超过5个氨基酸差异,不计入CDR区的氨基酸序列中的可能差异。在体细胞超突变的背景下,这样的突变也自然发生。

[0165] 至少对于重链可变区,抗体可来源于多种动物物种。常见的实践为人源化,例如如使鼠重链可变区人源化。存在其中可实现人源化的多种方式,其中存在将CDR接枝到具有与鼠重链可变区的3D结构相匹配的3D结构的人重链可变区中;鼠重链可变区的去免疫化,优

选地通过从鼠重链可变区中去除已知或怀疑的T细胞或B细胞表位来完成。该去除通常是通过将表位中的一个或更多个氨基酸替换为另外的(通常是保守的)氨基酸,使得表位的序列被修饰从而使其不再是T细胞或B细胞表位来进行。

[0166] 去免疫化的鼠重链可变区在人中的免疫原性低于原始鼠重链可变区。优选地,如本文中公开的本发明的可变区或结构域被进一步人源化,例如如镶饰(veneer)。通过使用镶饰技术,免疫系统容易遇到的外部残基被人残基选择性地替换以提供包含弱免疫原性或基本上无免疫原性的镶饰表面的杂合分子。如本文中公开的本发明中使用的动物优选地是哺乳动物,更优选灵长类,最优选人。

[0167] 如本文中公开的根据本发明的双特异性抗体优选地包含人抗体的恒定区。根据其重链恒定结构域的差异,抗体分为五个类别或同种型:IgG、IgA、IgM、IgD和IgE。这些类别或同种型包含用相应的希腊字母命名的所述重链中的至少一种。一个优选的实施方案包含抗体,其中所述恒定区选自IgG、IgA、IgM、IgD和IgE恒定区,更优选地,所述恒定区包含IgG恒定区,即选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。优选地,所述恒定区是IgG1或IgG4恒定区,更优选地是突变的IgG1恒定区。IgG1恒定区中的一些变化自然发生和/或在不改变所得抗体的免疫学特性的情况下被允许。也可人工引入变化以将某些优选特征安置在抗体或其部分上。这样的特征例如在本文中在CH2和CH3的背景下描述。通常来说,在恒定区中允许约1至10个氨基酸插入、缺失、替换或其组合。

[0168] 图1、7或8的VH链相对于图1、7或8中所示VH链优选地具有至多15个,优选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、替换或其组合;相对于图1、7或8中所示VH链优选地具有0、1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、替换或其组合;相对于图1、7或8中所示VH链优选地具有0、1、2、3或4个插入、缺失、替换或其组合,优选0、1、2或3个插入、缺失、替换或其组合,更优选0、1或2个插入、缺失、替换或其组合,并且优选0或1个插入、缺失、替换或其组合。一个或更多个氨基酸插入、缺失、替换或其组合优选地不在VH链的CDR1、CDR2和/或CDR3区中。其也优选地不存在于Fr4区中。氨基酸替换优选地是保守氨基酸替换。

[0169] 合理的方法已经朝着使人环境中非人残基的含量最小化发展。多种方法可用于将抗体的抗原结合特性成功地接枝到另一抗体上。抗体的结合特性可主要存在于CDR3区的确切序列中,其通常由与可变结构域整体的适当结构组合的可变结构域中的CDR1和CDR2区的序列支持。用Kabat定义确定如本文中所述的CDR区的氨基酸序列。目前可用多种方法将CDR区接枝到另一抗体的合适可变结构域上。这些方法中的一些在J.C.Almagro1 and J.Fransson(2008)Frontiers in Bioscience 13,1619-1633中综述,其通过引用包括在本文中。因此,如本文中公开的本发明还提供了人或人源化双特异性抗体,其包含结合EGFR的第一抗原结合位点和结合cMET的第二抗原结合位点,其中包含EGFR结合位点的可变结构域包含如图1中针对MF3370所示的VH CDR3序列,并且其中包含cMET结合位点的可变结构域包含如图1中针对MF4356所示的VH CDR3区。包含EGFR结合位点的VH可变区优选地包含如图1中针对MF3370所示的VH链的CDR1区、CDR2区和CDR3区的序列。包含cMET结合位点的VH可变区优选地包含如图1中针对MF4356所示的VH链的CDR1区、CDR2区和CDR3区的序列。CDR接枝也可用于产生具有图1的VH的CDR区但具有不同框架的VH链。不同的框架可以是另一人VH的框架,或者是不同哺乳动物的框架。因此,如本文中公开的本发明还提供了人或人源化双特异性抗体,其包含结合EGFR的第一抗原结合位点和结合cMET的第二抗原结合位点,其中包

含EGFR结合位点的可变结构域包含如图7中针对MF8233所示的VH CDR3序列,并且其中包含cMET结合位点的可变结构域包含如图8中针对MF8230所示的VH CDR3区。包含EGFR结合位点的VH可变区优选地包含如图7中针对MF8233所示的VH链的CDR1区、CDR2区和CDR3区的序列。包含cMET结合位点的VH可变区优选地包含如图8中针对MF8230所示的VH链的CDR1区、CDR2区和CDR3区的序列。CDR接枝也可用于产生具有图7或图8的VH的CDR区,但具有不同框架的VH链。不同的框架可以是另一人VH的框架,或者是不同哺乳动物的框架。

[0170] 因此,如本文中公开的本发明还提供了人或人源化双特异性抗体,其包含结合EGFR的第一抗原结合位点和结合cMET的第二抗原结合位点,其中包含EGFR结合位点的可变结构域包含如图1中针对MF3370所示的VH CDR3序列,并且其中包含cMET结合位点的可变结构域包含如图8中针对MF8230所示的VH CDR3区。包含EGFR结合位点的VH可变区优选地包含如图1中针对MF3370所示的VH链的CDR1区、CDR2区和CDR3区的序列。包含cMET结合位点的VH可变区优选地包含如图8中针对MF8230所示的VH链的CDR1区、CDR2区和CDR3区的序列。CDR接枝也可用于产生具有图7或图8的VH的CDR区,但具有不同框架的VH链。不同的框架可以是另一人VH的框架,或者是不同哺乳动物的框架。

[0171] 因此,如本文中公开的本发明还提供了人或人源化双特异性抗体,其包含结合EGFR的第一抗原结合位点和结合cMET的第二抗原结合位点,其中包含EGFR结合位点的可变结构域包含如图7中针对MF8233所示的VH CDR3序列,并且其中包含cMET结合位点的可变结构域包含如图8中针对MF4356所示的VH CDR3区。包含EGFR结合位点的VH可变区优选地包含如图7中针对MF8233所示的VH链的CDR1区、CDR2区和CDR3区的序列。包含cMET结合位点的VH可变区优选地包含如图8中针对MF4356所示的VH链的CDR1区、CDR2区和CDR3区的序列。CDR接枝也可用于产生具有图7或图8的VH的CDR区,但具有不同框架的VH链。不同的框架可以是另一人VH的框架,或者是不同哺乳动物的框架。

[0172] 因此,如本文中公开的本发明还提供了人或人源化双特异性抗体,其包含结合EGFR的第一抗原结合位点和结合cMET的第二抗原结合位点,其中包含EGFR结合位点的可变结构域包含如图7中针对MF8232所示的VH CDR3序列,并且其中包含cMET结合位点的可变结构域包含如图8中针对MF8230所示的VH CDR3区。包含EGFR结合位点的VH可变区优选地包含如图7中针对MF8232所示的VH链的CDR1区、CDR2区和CDR3区的序列。包含cMET结合位点的VH可变区优选地包含如图8中针对MF8230所示的VH链的CDR1区、CDR2区和CDR3区的序列。CDR接枝也可用于产生具有图7或图8的VH的CDR区,但具有不同框架的VH链。不同的框架可以是另一人VH的框架,或者是不同哺乳动物的框架。

[0173] 因此,如本文中公开的本发明还提供了人或人源化双特异性抗体,其包含结合EGFR的第一抗原结合位点和结合cMET的第二抗原结合位点,其中包含EGFR结合位点的可变结构域包含如图7中针对MF8232所示的VH CDR3序列,并且其中包含cMET结合位点的可变结构域包含如图8中针对MF4356所示的VH CDR3区。包含EGFR结合位点的VH可变区优选地包含如图7中针对MF8232所示的VH链的CDR1区、CDR2区和CDR3区的序列。包含cMET结合位点的VH可变区优选地包含如图8中针对MF4356所示的VH链的CDR1区、CDR2区和CDR3区的序列。CDR接枝也可用于产生具有图7或图8的VH的CDR区,但具有不同框架的VH链。不同的框架可以是另一人VH的框架,或者是不同哺乳动物的框架。

[0174] 本发明还提供了人或人源化双特异性抗体,其包含结合EGFR的第一可变结构域和

结合cMET的第二可变结构域,其中第一可变结构域包含具有带有至多10个,优选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个,并且优选地具有0、1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、替换或其组合的如图7中所示MF3370的氨基酸序列的重链可变区,并且其中第二可变结构域包含包含具有0至10个、优选0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合的如图8中所示MF4356 (SEQ ID NO:23)的氨基酸序列的重链可变区。本发明还提供了人或人源化双特异性抗体,其包含结合EGFR的第一可变结构域和结合cMET的第二可变结构域,其中第一可变结构域包含具有带有至多10个,优选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个,并且优选地具有0、1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、替换或其组合的如图7中所示MF8233的氨基酸序列的重链可变区,并且其中第二可变结构域包含包含具有0至10个、优选0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合的如图8中所示MF8230 (SEQ ID NO:13)的氨基酸序列的重链可变区。

[0175] 本发明还提供了人或人源化双特异性抗体,其包含结合EGFR的第一可变结构域和结合cMET的第二可变结构域,其中第一可变结构域包含具有带有至多10个,优选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个,并且优选地具有0、1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、替换或其组合的如图7中所示MF3370的氨基酸序列的重链可变区,并且其中第二可变结构域包含包含具有0至10个、优选0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合的如图8中所示MF8230 (SEQ ID NO:13)的氨基酸序列的重链可变区。

[0176] 本发明还提供了人或人源化双特异性抗体,其包含结合EGFR的第一可变结构域和结合cMET的第二可变结构域,其中第一可变结构域包含具有带有至多10个,优选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个,并且优选地具有0、1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、替换或其组合的如图7中所示MF8233的氨基酸序列的重链可变区,并且其中第二可变结构域包含包含具有0至10个、优选0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合的如图8中所示MF4356 (SEQ ID NO:23)的氨基酸序列的重链可变区。

[0177] 本发明还提供了人或人源化双特异性抗体,其包含结合EGFR的第一可变结构域和结合cMET的第二可变结构域,其中第一可变结构域包含具有带有至多10个,优选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个,并且优选地具有0、1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、替换或其组合的如图7中所示MF8232的氨基酸序列的重链可变区,并且其中第二可变结构域包含包含具有0至10个、优选0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合的如图8中所示MF4356 (SEQ ID NO:23)的氨基酸序列的重链可变区。

[0178] 本发明还提供了人或人源化双特异性抗体,其包含结合EGFR的第一可变结构域和结合cMET的第二可变结构域,其中第一可变结构域包含具有带有至多10个,优选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个,并且优选地具有0、1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、替换或其组合的如图7中所示MF8232的氨基酸序列的重链可变区,并且其中第二可变结构域包含包含具有0至10个、优选0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加或其组合的如图8中所示MF8230 (SEQ ID NO:23)的氨基酸序列的重链可变区。

[0179] 提及的至多15个,优选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个,并且优选0、1、2、3、4或5个氨基酸替换优选地是保守氨基酸替换,插入、缺失、替换或其组合优选地不在VH链的CDR3区中,优选地不在VH链的CDR1、CDR2或CDR3区中,并且优选地不在FR4区中。

[0180] 可用多种方法产生双特异性抗体。一种方法涉及在细胞中表达两种不同的重链和两种不同的轻链,并收集由细胞产生的抗体。以该方式产生的抗体通常将包含具有重链和

轻链的不同组合的抗体的集合,其中一些是所期望的双特异性抗体。随后可从集合中纯化双特异性抗体。可以以多种方式提高由细胞产生的双特异性抗体与其他抗体的比例。在一个优选的实施方案中,该比例通过在细胞中不表达两种不同的轻链而是表达共同轻链来提高。当共同轻链与两种不同的重链表达时,相对于两种不同轻链的表达,由细胞产生的双特异性抗体与其他抗体的比例显著提高。由细胞产生的双特异性抗体的比例可通过相对于两种相同重链的配对而刺激两种不同重链彼此配对来进一步提高。公开了用于产生双特异性抗体(从单细胞)的方法和手段,由此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,如本文中公开的本发明在一个方面中提供了用于从单细胞产生双特异性抗体的方法,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,所述方法包括在所述细胞中提供:a)第一核酸分子,其编码含第一CH3结构域重链,b)第二核酸分子,其编码含第二CH3结构域重链,其中所述核酸分子提供用于所述含第一CH3结构域重链与含第二CH3结构域重链的优先配对,所述方法还包括培养所述宿主细胞并允许表达所述两种核酸分子并从培养物中收获所述双特异性抗体的步骤。所述第一和第二核酸分子可以是同一核酸分子、载体或基因递送载体的一部分,并且可以整合在宿主细胞基因组的相同位点。或者,向所述细胞分别提供所述第一和第二核酸分子。

[0181] 一个优选的实施方案提供了用于从单细胞产生如本文中公开的根据本发明的双特异性抗体的方法,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:

[0182] -具有以下的细胞:a)第一核酸分子,其编码包含可结合EGFR的抗原结合位点且含有第一CH3结构域的重链;以及b)第二核酸分子,其编码包含结合ErbB-3的抗原结合位点且含有第二CH3结构域的重链,其中所述核酸分子提供用于所述第一和第二CH3结构域的优先配对,

[0183] 所述方法还包括培养所述细胞并允许表达由所述两种核酸分子编码的蛋白质,并从培养物中收获所述双特异性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同轻链的第三核酸分子。所述第一、第二和第三核酸分子可以是同一核酸分子、载体或基因递送载体的一部分,并且可以整合在宿主细胞基因组的相同位点。或者,向所述细胞分别提供所述第一、第二和第三核酸分子。如上所述,优选的共同轻链基于012,其优选地是重排种系人 κ 轻链IgVk1 39*01/IGJk1*01。用于所述第一CH3结构域和所述第二CH3结构域的优先配对的手段优选地是重链编码区的CH3结构域中的相应突变。优先产生双特异性抗体的优选突变是第一CH3结构域中的氨基酸替换L351K和T366K(EU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,还提供了如本文中公开的根据本发明的用于产生双特异性抗体的方法,其中所述第一CH3结构域包含氨基酸替换L351K和T366K(EU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并允许表达由所述核酸分子编码的蛋白质,并从培养物中收获所述双特异性抗体的步骤。还提供了如本文中公开的根据本发明的用于产生双特异性抗体的方法,其中所述第一CH3结构域包含氨基酸替换L351D和L368E(EU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并允许表达所述核酸分子,并从培养物中收获所述双特异性抗体的步骤。可通过这些方法产生的抗体也是本发明的一部分。CH3异二聚化结构域优选地是IgG1异二聚化结构域。包含CH3异二聚化结构域的

重链恒定区优选地是IgG1恒定区。

[0184] 在本发明的一个实施方案中,包括编码抗体重链可变区的核酸分子。核酸分子(通常是体外的、分离的或重组的核酸分子)优选地编码如图7或图8中所示重链可变区或具有1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、替换或其组合的如图7或图8中所示重链可变区。在一个优选的实施方案中,核酸分子包含如图7或图8中所示氨基酸序列的密码子优化氨基酸序列。密码子优化针对抗体产生细胞的种类和/或细胞类型进行优化。例如,对于CHO产生,对该分子的核酸序列进行密码子优化以用于中国仓鼠细胞。本发明还提供了编码图7或图8的重链的核酸分子。

[0185] 如本文中公开的在本发明中使用的核酸分子通常是但并不并非绝对是核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)。替代核酸可为本领域中技术人员所用。如本文中公开的根据本发明的核酸例如包含在细胞中。当所述核酸在所述细胞中表达时,所述细胞可产生如本文中公开的根据本发明的抗体。因此,在本发明的一个实施方案中,包括包含如本文中公开的根据本发明的抗体和/或如本文中公开的根据本发明的核酸的细胞。所述细胞优选地是动物细胞,更优选哺乳动物细胞,更优选灵长类细胞,最优选人细胞。合适的细胞是能够包含并且优选地产生如本文中公开的根据本发明的抗体和/或如本文中公开的根据本发明的核酸的任何细胞。

[0186] 如本文中公开的本发明还提供了包含如本文中公开的根据本发明的抗体的细胞。优选地,所述细胞(通常是体外的、分离的或重组的细胞)产生所述抗体。所述细胞也可以是从储存中取出并培养时能够产生所述抗体的储存细胞。在一个优选的实施方案中,所述细胞是杂交瘤细胞、中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞、NS0细胞或PER-C6TM细胞。在一个特别优选的实施方案中,所述细胞是CHO细胞。还提供了包含如本文中公开的根据本发明的细胞的细胞培养物。多家机构和公司已经开发了用于大规模生产抗体的细胞系,例如用于临床应用。这样的细胞系的一些非限制性实例是CHO细胞、NS0细胞或PER.C6TM细胞。这些细胞还用于另一些目的,例如蛋白质的产生。为工业规模生产蛋白质和抗体而开发的细胞系在本文中还可称为工业细胞系。因此,一个优选的实施方案包括开发用于大规模生产抗体的细胞系用于产生如本文中公开的本发明的抗体的用途,所述细胞系优选地包括用于产生抗体的细胞,其包含编码如图7或图8中所示的VH、VL和/或重链的核酸分子。

[0187] 本发明还提供了用于产生抗体的方法,其包括培养如本文中公开的本发明的细胞并从所述培养物中收获所述抗体。优选地,所述细胞在无血清培养基中培养。优选地,所述细胞适合于悬浮生长。还提供了可通过如本文中公开的根据本发明的用于产生抗体的方法获得的抗体。优选从培养物的培养基中纯化抗体。优选地,对所述抗体进行亲和纯化。

[0188] 如本文中公开的本发明的细胞例如是杂交瘤细胞系、CHO细胞、293F细胞、NS0细胞或因其适合于抗体产生用于临床目的而已知的另一种细胞类型。在一个特别优选的实施方案中,所述细胞是人细胞。优选地,被腺病毒E1区或其功能等同物转化的细胞。这样的细胞系的一个优选实例是PER.C6TM细胞系或其等同物。在一个特别优选的实施方案中,所述细胞是CHO细胞或其变体。优选地,使用谷氨酰胺合成酶(Glutamine synthetase, GS)载体系统表达抗体的变体。

[0189] 在悬浮293F细胞中瞬时转染之后,如本文中公开的本发明的抗体可以以>50mg/L

的水平产生。可将双特异性抗体纯化至大于98%的纯度,产率>70%。分析型表征研究表明,双特异性IgG1抗体谱与二价单特异性IgG1相当。就功能活性而言,与西妥昔单抗在体外和体内相比,如本文中公开的本发明的双特异性抗体可显示出优异的效力。

[0190] 本发明还提供了药物组合物,其包含如本文中公开的根据本发明的抗体。药物组合物优选地包含优选可药用的赋形剂或载体。

[0191] 抗体可包含标记,优选用于体内成像的标记。这样的标记对于治疗应用来说通常是非必需的。例如,在诊断背景下,标记可有所帮助。例如,可用于使体内的靶细胞可视化。多种标记是合适的,并且许多标记是本领域中公知的。在一个优选的实施方案中,标记是用于检测的放射性标记。在另一个优选的实施方案中,标记是红外标记。优选地,红外标记适合于体内成像。多种红外标记对于本领域中技术人员而言是可用的。一些优选的红外标记是例如IRDye 800;IRDye 680RD;IRDye 680LT;IRDye 750;IRDye 700DX;IRDye 800RS;IRDye 650;IRDye 700亚磷酰胺;IRDye 800亚磷酰胺(LI-COR USA;4647Superior Street;Lincoln,Nebraska)。

[0192] 本发明还提供了用于治疗患有肿瘤或处于患有所述肿瘤的风险的对象的方法,所述方法包括向有此需要的对象施用如本文中公开的根据本发明的抗体或药物组合物。所述肿瘤优选地是EGFR、cMET或EGFR/cMET阳性肿瘤。在开始所述治疗之前,所述方法优选地还包括确定所述对象是否患有这样的EGFR、cMET或EGFR/cMET阳性肿瘤。本发明还提供了如本文中公开的本发明的抗体或药物组合物,其用于治疗患有EGFR、cMET或EGFR/cMET阳性肿瘤或处于其罹患风险中的对象。

[0193] 为了确认肿瘤是否为呈EGFR阳性,技术人员可例如确定EGFR扩增和/或免疫组织化学染色。活检中至少10%的肿瘤细胞应呈阳性。活检还可包含20%、30%、40%、50%、60%、70%或更多的阳性细胞。为了确认肿瘤是否呈cMET阳性,技术人员可例如确定cMET扩增和/或免疫组织化学染色。活检中至少10%的肿瘤细胞应呈阳性。活检还可包含20%、30%、40%、50%、60%、70%或更多的阳性细胞。

[0194] 如本文中公开的本发明可应用于广泛的癌症,例如乳腺癌;结肠癌;胰腺癌;胃癌;卵巢癌;结直肠癌;头颈癌;肺癌,包括非小细胞肺癌;膀胱癌,等。所述肿瘤可以是EGFR、cMET或EGFR/cMET阳性癌症。本发明的一个实施方案可优选地治疗为乳腺癌,例如早期乳腺癌的阳性癌症。在本发明的另一个实施方案中,可优选地治疗为结直肠癌的EGFR、cMET或EGFR/cMET阳性癌症。如本文中公开的本发明可应用于广泛的EGFR、cMET或EGFR/cMET阳性癌症,例如乳腺癌;结肠癌;胰腺癌;胃癌;卵巢癌;结直肠癌;头颈癌;肺癌,包括非小细胞肺癌;膀胱癌,等。该对象优选地是人对象。所述对象优选地是适合使用EGFR特异性抗体例如西妥昔单抗进行抗体治疗的对象。在一个优选的实施方案中,本发明可优选地治疗包含肿瘤,优选EGFR/cMET阳性癌症,优选具有EGFR RTK抗性表型、EGFR单克隆抗体抗性表型或其组合的肿瘤/癌症的对象。

[0195] 待施用于患者的抗体的量通常在治疗窗内,意指使用足够的量以获得治疗作用,而该量不超过导致不可接受程度的副作用的阈值。获得期望治疗作用所需的抗体量越低,治疗窗通常越大。因此,优选在低剂量下发挥足够治疗作用的如本文中公开的根据本发明的抗体。剂量可在西妥昔单抗的给药方案的范围内。剂量也可以更低。

[0196] 在其他方面相似的条件与西妥昔单抗相比,如本文中公开的根据本发明的双特

异性抗体优选地诱导更少的皮肤毒性。在其他方面相似的条件下与西妥昔单抗相比,如本文中公开的根据本发明的双特异性抗体优选地产生较少的促炎趋化因子,优选CXCL14。在其他方面相似的条件下与西妥昔单抗相比,如本文中公开的根据本发明的双特异性抗体优选地诱导较少的抗微生物RNA酶(RNAse)(优选RNA酶7)的损伤。

[0197] 本发明尤其描述了靶向EGFR和cMET受体,并且引起体外癌细胞系的强效增殖抑制和体内肿瘤生长抑制的抗体。如本文中公开的本发明的双特异性抗体可将低毒性谱与高效力组合。如本文中公开的本发明的抗体可用于多种类型和线(line)的EGFR靶向治疗。当与用两个臂结合相同抗原的抗体相比时,如本文中公开的本发明的抗体可具有提高的治疗窗。当与西妥昔单抗抗体相比时,如本文中公开的本发明的双特异性抗体可在体外、体内或其组合中表现出更好的生长抑制作用。

[0198] 本发明还提供了如本文中公开的本发明的双特异性抗体,其用于治疗可患有多种不同种类的肿瘤中的一种或更多种的对象。所述肿瘤可以是EGFR阳性肿瘤、cMET阳性肿瘤或EGFR及cMET阳性肿瘤。肿瘤可以是乳腺癌;结肠癌;胰腺癌;胃癌;卵巢癌;结直肠癌;头颈癌;肺癌,包括非小细胞肺癌;或膀胱癌。肿瘤可能对用EGFR酪氨酸激酶抑制剂进行的治疗具有抗性。EGFR酪氨酸激酶抑制剂优选地是厄洛替尼、吉非替尼或阿法替尼;厄洛替尼、吉非替尼或阿法替尼的类似物;或者其相应化合物和/或类似物中的一种或更多种的组合。所述治疗优选地还包括用EGFR酪氨酸激酶抑制剂进行治疗。当与EGFR酪氨酸激酶抑制剂共同治疗时,肿瘤可能对用EGFR酪氨酸激酶抑制剂进行的治疗具有抗性。共同治疗至少部分地恢复肿瘤对酪氨酸激酶抑制剂的敏感性。EGFR酪氨酸激酶抑制剂可以是第一代EGFR酪氨酸激酶抑制剂。临床相关的第一代EGFR酪氨酸激酶抑制剂的一些实例是厄洛替尼和吉非替尼。在该实施方案和另一些实施方案中,肿瘤可以是与HGF相关的肿瘤。

[0199] EGFR阳性肿瘤通常是具有EGFR激活突变的肿瘤。EGFR激活突变是导致EGF/EGFR信号传导途径激活的EGFR突变。EGFR激活突变对于肿瘤的癌状态可能很重要。其中这样的肿瘤可对EGFR靶向治疗变得不敏感的方式之一是通过激活HGF/cMET信号传导途径来进行。所述肿瘤可以是与HGF相关的肿瘤。cMET/HGF信号传导途径的激活是其中EGFR阳性肿瘤可逃逸用EGFR靶向治疗进行治疗的方式之一。cMET/HGF途径可以多种方式激活。在本领域中描述了激活的多种方法,其中一些在本文中详述。如本文中公开的本发明的抗体特别适合于治疗其中cMET/HGF信号传导途径的激活与HGF的存在或过量相关的肿瘤。这样的cMET阳性肿瘤被称为与HGF相关的肿瘤或HGF依赖性肿瘤。如本文中公开的本发明的抗体也可用于至少部分抑制EGFR阳性肿瘤的这种可能的逃逸机制。另外,这样的肿瘤可通过其中cMET/HGF信号传导途径激活的肿瘤细胞的选定外生长来逃逸EGFR靶向治疗。这样的细胞可能存在于EGFR靶向治疗的开始。与HGF/cMET信号传导阴性肿瘤细胞相比,这样的细胞具有选择性的生长优势。所述肿瘤可以是其中HGF/cMET信号传导途径被激活的肿瘤。所述肿瘤可以是与肝细胞生长因子(HGF)的升高水平或HGF受体c-Met的过表达相关的肿瘤。所述肿瘤可以是其中生长由EGF和/或HGF驱动的肿瘤。如果响应于生长因子的存在而激活了肿瘤细胞中的信号传导途径,并且生长因子的去除导致肿瘤细胞生长的抑制,则指示肿瘤由某种生长因子驱动。降低可通过降低的细胞分裂和/或诱导的细胞杀伤如凋亡来测量。在存在HGF的情况下,如果在其他方面允许肿瘤生长的条件下,肿瘤生长或生长更快,则肿瘤是与HGF相关的肿瘤。

[0200] 针对多种肿瘤的EGFR靶向治疗已由Vecchione et al., EGFR-targeted therapy."Experimental cell research Vol 317(2011):2765-2771综述。一般而言,EGFR靶向治疗是用与EGFR相互作用的分子治疗,并抑制细胞中的EGFR介导的信号传导。

[0201] 用于如本文中所指定的治疗的治疗方法或抗体优选地还包括确定肿瘤是否为与HGF相关的肿瘤的步骤。

[0202] 如本文中公开的本发明的抗体可抑制与HGF相关的肿瘤的生长。

[0203] 在一些实施方式中,其中cMET结合可变结构域被描述为具有CDR2序列“WINTYTGDPITYAQGFTG”,CDR2序列也可以是“WINTYTGDPITYAQGFT”。

[0204] 在本文中给出的范围为数字1至数字2时,所述范围包括数字1和数字2。例如,2至5的范围包括数字2和5。

[0205] 当本文中提及的亲合力高于另一个亲合力时, K_d = 低于另一个 K_d 。为了避免疑问, K_d 为 $10e^{-9}M$ 低于 K_d 为 $10e^{-8}M$ 。具有 K_d 为 $10e^{-9}M$ 的抗体针对靶标的亲合力高于当 K_d 为 $10e^{-8}M$ 时。

[0206] 本文中对所引用的专利文件或其他事项的引用不应被视为承认该文件或事项是已知的,或者其所包含的信息是任何要求保护的截止优先权日的公知常识的一部分。

[0207] 出于清楚和简明描述的目的,本文中将特征作为相同或分开的实施方案的一部分进行描述,然而,应当理解,如本文中公开的本发明的范围可包括具有所描述的特征中全部或一些的组合的实施方案。

[0208] 实施例

[0209] 如本文中使用的其中X独立地为数字0至9的“MFXXXX”是指包含其中VH具有由4个数字标识的氨基酸序列的可变结构域的Fab。除非另有说明,否则可变结构域的轻链可变区通常具有图9A、通常图9B的序列。“MFXXXX VH”是指由4个数字标识的VH的氨基酸序列。MF还包含轻链的恒定区和通常与轻链的恒定区相互作用的重链的恒定区。PG是指包含相同重链和轻链的单特异性抗体。PB是指具有两条不同重链的双特异性抗体。重链的VH可变区不同,并且通常CH3区也不同,其中一条重链具有其CH3结构域的KK突变,并且另一条重链具有其CH3结构域的互补性DE突变(参考PCT/NL2013/050294(公布为W02013/157954))。

[0210] 实施例1:材料和方法

[0211] 细胞系:

[0212] 购买EBC-1[JCRB0820]、PC-9[RCB0446]、H358[ATCC®CRL-5807™]、HCC827[ATCC®CRL-2868™]、MKN-45[DSMZ ACC 409]N87[ATCC®CRL-5822™]和A431[ATCC®CRL-1555™]细胞系,并常规维持在补充有10%热灭活胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的生长培养基中。HEK293F Freestyle细胞从Invitrogen获得,并常规维持在293FreeStyle培养基中。

[0213] cDNA构建体:

[0214] 用于生成稳定细胞系(cMET和EGFR)和用于免疫接种(cMET)的cMET和EGFR表达载体的生成

[0215] 每个靶标的包含用于克隆的独特限制性位点和用于有效翻译的科扎克共有序列(kozakconsensus sequence)的全长cDNA是合成的或者通过用特异性引物对包含靶cDNA的

可商购获得表达构建体进行PCR扩增获得,所述特异性引物引入用于克隆的独特限制性位点和用于有效翻译的科扎克共有序列。将每个靶标的全长cDNA克隆到真核表达构建体例如pcDNA3.1中,而将胞外结构域克隆到pVAX1和pDisplay中。通过与NCBI参照氨基酸序列进行比较验证插入序列。

[0216] 用于在细胞表面上表达的氨基酸序列全长人EGFR插入序列(与GenBank:NP_00533相同):

[0217]

```
MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKKVCQGSTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNNCEVVLGNLEIT
YVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLLENLQIIRGNMYYENSALAVLSNYDANKTGLKELF
MRNLQEIILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNHLSGSCQKCDPSCPNGSCWGAGE
ENCQKLTKIICAQQCSGRGCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCPPMLLYNP
TTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGFCRKVCNGI
GIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSI SGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQ
AWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVLIISGNKNLCYANTIN
WKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCGWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEG
EPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCFAGVMGENNTLVWKYAD
AGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFMRRRHIVRKRTL
RLLQERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGT VYKGLWIPEGEKVKIPVAIKELR
EATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLLGICLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLN
WCVQIAKGMNYLEDRLVHRDLAARNVLVKTPQHVKITDFGLAKLLGAEEKEYHAEGGKVP IKWMALE
SILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGSKPYDGIPASEISSILEKGERLPQPP ICTIDVYMIMVKCWM
IDADS RPKFRELIIEFSKMARDPQRYLVIQGDERMHLPSP TDSNFYRALMDEEDMDDVVDAD EYLIPQ
QGFFSSPSTSRTPLLSSLSATSNNSTVACIDRNLQSCPIKEDSFLQRYSSDPTGALTEDSIDDTFLP
VPEYINQSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHSTAVGNPEYLN TVQPTCVNSTFDSPA
HWAQKGS HQISLDNPDYQQDFFPKEAKPNGIFKGSTAENAEYLRVAPQSSEFIGA
```

[0218] 其中:

[0219] -MRPSGTAGAALLALLAALCPASR:信号肽。

[0220]

```
- ALEEKKVCQGSTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEV
AGYVLIALNTVERIPLLENLQIIRGNMYYENSALAVLSNYDANKTGLKELFMRNLQEIILHGAVRFSNN
PALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNHLSGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQCSG
RCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCPPMLLYNP TTYQMDVNPEGKYSFGA
TCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGFCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNI
KHFKNCTSI SGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEI
IRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVLIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISN
RGENSCKATGQVCHALCSPEGCGWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRREFVENSECIQCHPE
CLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCFAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCT
GPGLEGCP TNGPKIPS
```

[0221] 人EGFR的ECD。

[0222] -IATGMVGALLLLLVVALGIGLFM:预测的TM区。

[0223]

```
- RRRHIVRKRTLRRLLQERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGT VYKGL
WIPEGEKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLLGICLTSTVQLITQLMPFGCL
LDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRLVHRDLAARNVLVKTPQHVKITDFGLAKLLGAEE
KEYHAEGGKVP IKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGSKPYDGIPASEISSILEKGERLP
QPP ICTIDVYMIMVKCWMIDADS RPKFRELIIEFSKMARDPQRYLVIQGDERMHLPSP TDSNFYRALM
DEEDMDDVVDAD EYLIPQQGFFSSPSTSRTPLLSSLSATSNNSTVACIDRNLQSCPIKEDSFLQRY
SDPTGALTEDSIDDTFLPVPEYINQSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHSTAVGNPEY
LNTVQPTCVNSTFDSPA HWAQKGS HQISLDNPDYQQDFFPKEAKPNGIFKGSTAENAEYLRVAPQSSE
FIGA
```

[0224] 胞内尾区。

[0225] 由外显子2至7的框内缺失引起的天然存在EGFR变体VAR 066493[Ji H.,Zhao X; PNAS103:7817-7822(2006)],人EGFRvarIII胞外结构域的氨基酸序列。下方的指示缺失第30位至第297位氨基酸的位置

[0226] MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKK_GNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCR
KVCNGIGIGIEFKDSLSINATNIKHFKNCTSIISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEIT
GFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVLIISGNKNLC
YANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDK
CNLLEGEPPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCFAGVMGENNTL
VWKYADAGHVCHLCHPNCTYGTGPGLEGCPNGPKIPS

[0227] 其中:

[0228] -MRPSGTAGAALLALLAALVPASR:信号肽。

[0229] -- ALEEKK_GNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGIEFKDSLSI
NATNIKHFKNCTSIISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHA
FENLEIIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVLIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQK
TKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPPREFVENSEC
IQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCFAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPN
CTYGTGPGLEGCPNGPKIPS :

[0230] EGFRvarIII的ECD。

[0231] 用于在细胞表面上表达的与人EGFR跨膜结构域和胞内结构域杂合的氨基酸序列嵌合猕猴(macaque)(恒河猴(Macaca mulatta))胞外EGFR结构域(与GenBank:XP 014988922.1相同)。人EGFR序列在以下实例中加下划线。

[0232] MGPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKKVCQGTSENKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNNCEVVLGNLEIT
YVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLLENLQIIRGNMYENSALAVLSNYDANKTGLKELF
MRNLQEIILHGAVRFSNNPFCNVEISQWRDIVSSEFLSNMSMDFQNLHLSGCKQKDCPSCPNWSCWAGE
ENCQKLTKIICAQQCSGRGRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCPPMLLYNF
TTYQMDVNPPEGKYSFGATCVKKCPNXYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGI
GIGIEFKDTLSINATNIKHFKNCTSIISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQ
AWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVLIISGNKNLCYANTIN
WKKLFGTSSQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNILEG
EPREFVENSECIQCHPECLPQVMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCFAGVMGENNTLVWKYAD
AGHVCHLCHPNCTYGTGPGLEGCARNGPKIPSIATGMLGALLLLLVVALGIGLFMRRRHIVRKRTLR
RLLQERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTIVYKGLWIPEGEKVKIPVAIKELR
EATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLLGICLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLN
WCVQIAKGMNYLEDRLVHRDLAARNVLVKTPOHVKITDFGLAKLLGAEEKEYHAEGGKVPKWMMALE
SILARIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGSKPYDGIPASEISSILEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWM
IDADSPPKFRELIIEFSKMARDPQRYLVIOGDERMHLPSPDTSNIFYRALMDEEDMDLVVDADEYLIPO
QGFFSSPSTSRTPLLSSLSATSNNSTVACIDRNGLSQCPKEDSFLQRYSSDFTGALTEDSIDDTFLP
VPEYINQSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLNPAFSRDPHYQDPHSTAVGNPEYLNTVQPTCVNSTFDSFAH
WAQKGSHQISLDNPDYQQDFFPKPEAKPNGIFKGSTAENAEYLRVAPQSSEFIGA

[0233] 其中:

[0234] -MGPSGTAGAALLALLAALCPASR:信号肽。

[0235] - LEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVA
GYVLIALNTVERIFLENLQIIRGNMYEENSALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNP
ALCNVESTIQWRDIVSSDFLSNMMDFQNHILGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQCSGR
CRGKSPSDCCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCPPMLLYNPTTYQMDVNPBGKYSFGAT
CVKKCFRNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGIEFKDSLSINATNIKH
FKNCTSIISGDLHLILFVAFRGDSFTHTFPFLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEII
RGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVLIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNR
GENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRFVENSECQCHPEC
LPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHFNCTYGCCTG
PGLEGCPNNGPKIPS :

[0236] cyEGFR的ECD。

[0237] 用于在细胞表面上表达的氨基酸序列全长人cMET插入序列(与GenBank:P08581-2相同)。该序列与参照序列不同之处在于:在第755位-第755位具有以下插入:S→STWWKEPLNIVSFLFCFAS。

[0238] MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLNFTAEPTIQNVILHEHHIFLGATN
YIYVLNEEDLQKVAEYKTGPVLEHPDCFPQCDCSSKANLSGGVWKNINMALVVDITYDDQLISCGSV
NRGTCQRHVFPNNSTADIQSEVHCIFSPQIEEFSQCFDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSS
YFPDHFLLHSISVRLKETKDGFMFLTDQSYIDVLPFEFRDSYPIKYVHAFESNNFIYFLTVQRETLDQ
TFHTRIIRFCSINSGLHSYMEMPLECILTEKRKRSTKKEVFNIIQAAYVSKPGAQLARQIGASLND
ILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFP IKYVNDFFNKIVNKNVRCLOHFYGPNNHEHCFNRTLLRNSG
CEARRDEYRTEFTTALQKVDFLMGQFSEVLLTSISTFIKGLDTIANLGTSEGRFMQVVSRSRGPSTPH
VNFLLDSDHPVSPEVIVEHTLNQNGYTLVITGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPFPVQCGWCHDK
CVRSEECLSGTWTQQICLPAIYKVFPNSAPLEGGRRLTICGWDFGFRNNKFDLKKTRVLLGNESCTL
TLSESTMNTILKCTVGFAMNKHFNMSIILSNHGHTTQYSTFSYVDPVITSISP KYGPMAGGTLTLTLGN
YLNCGNSRHHISIGGKTCTILKSVSNSILECYTPAQTISTEFAVKLKIDLANRETSIFSYPEDPIVYEIR
PTKSFISTWWKEPLNIVSFLFCFASGGSTITGVGKNLNSVSVPRMVINVHEAGRNTTVACQHRNSSEI
ICCTTPSLQQNLNLQLPLKTKAPFMDGILSKYFDLIYVHNPFVFRPFEPVMISMGNENVLEIKGNDID
PEAVKGEVLKVGKNSCENIHLHSEAVLCTVPNDLLKLNSSELNIEWKQAISSTVLGKVIQPDQNF TGL
IAGVVSISTALLLLLGFLLWLKKRKQIKDLGSELVRYDARVHTPHLDRLVSARSVSPTTEMVSNESVD
YRATFPEDQFPNSSQNGSCRQVQYPLTDMSPILTSGDSDISSPELLQNTVHIDLSALNPELVQAVQHV
IGPSSLI VHFNEVIGRGHFGCVYHGTLNDGKKIHC AVKSLNRITDIGEVSQFLTEGIIMKDFSHPN
VLSLLGICLRSEGSPLVVLPMKHGDLRNFIRNETHNPTVKDLIGFGLQVAKGMKYLASKKFVHRDLA
ARNCMLDEKFTVKVADFG LARDMYDKEYYSVHNKTGAKLPVKWMALESLOTQKFTTKSDVWSFGVLLW
ELMTRGAPPYPDVNTFDITVYLLQGRRLLOPEYCPDPLYEVMLKCWHPKAEMKPSFSELVSRISAIFS
TFIGEHYVHV NATYVNVKCVAPYPSLLSSEDNADDEVDT RPASFWETS

[0240] 其中:

[0241] -MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRSNG:信号肽

- ECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQNVILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAEYKT
GPVLEHPDCFPQCDCSSKANLSGGVWKNINMALVVDITYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFFPHNHTADI
QSEVHCIFSPQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSSYFPDHPPLHSISVRRLKET
KDGFMFLTDQSYIDVLPFRDSYPIKYVHAFESNNFIYFLTVQRETLDQTFHTRIIRFCSINSGLHS
YMEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFNIIQAAVSKPGAQLARQIGASLNDIILFGVFAQSKPDSAEPMD
RSAMCAFFPIKYVNDFFNKIVKNNVRCLQHFYGPNEHCFNRITLLRNSSGCEARRDEYRTEFTTALQR
VDLFMGQFSEVLLTSISTFIKGLTIANLGTSEGRFMQVVSRSRGPSTPHVNFLLDSHPVSPVIVEH
TLNQNGYTLVITGKKITKIEPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFFVQCGWCHDKCVRSEECISGTWTQQICL
PAIYKVFNPNSAPLEGGTRLTICGWDFGFRNNKFDLKKTRVLLGNESCTLTLESTMTLKTCTVGPAM
NKHFNMSIIISNGHGTQYSTFSYVDPVITSISPKYGPMAAGTLLTLTGNYLNSGNSRHISIGGKTCT
LKSVSNSILECYTPAQTIISTEFAVKLKIDLANRETSIFSYPREDPIVYEIHPTKSFISGGSTITGVGKN
LNSVSVPFPMVINVHEAGRNFVACQHRNSNEIICCTTPSLQQLNLQLPLKTKAFFMLDGLSKYFDLI
YVHNFPVKPFEPKPMISMGNENVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGKNSCENIHLHSEAVLCTVPNDLLK
LNSELNIEWKQAISSSTVLGKVIVQPDQNF

[0242] :人cMET的ECD

[0243] -GLIAGVVSISTALLLLLGFFLWL:跨膜区

- KKRKQIKDLGSELVRYDARVHTPHLDRLVSARSVSPTTEMVSNESVDYRATFPEDQFPNSSQ
NGSCRQVQYPLTDMSPILTSGBSDISSPLLQNTVHIDLALNPQLVQAVQHVIGPSSLIVHFNEVIG
RGHFGCVYHGTLLDNDGKKIHCAVKSINRITDIGEVSQFLTEGIIMKDFSHPNVLSLLGICLRSEGSP
LVVLPMYKHGDLRNFI RNETHNPTVKDLIGFGLQVAKGMKYASKKFVHRDLAARNCMLDEKFTVKVAD
FGLARDMYDKEYYSVHNKTGAKLPVKWMALESIQTKFTTKSDVWSFGVLLWELMTRGAPPYPDVNTF
DITVYLLQGRRLQLQPEYCPDPLYEVMLKCWHPKAEMRPSFSELVSRI SAIFSTFIGEHYVHNATYVN
VKCVAFYPSLLSSEDNADDEVDTRPASFWETS

:

[0244] 胞内区。

[0245] 参照抗体

[0246] 抗cMET抗体是本领域中已知的(表1)。单特异性二价cMET抗体根据公布的信息构建,并在293F Freestyle细胞中表达。表1示出了相关的公开信息。针对cMET的单特异性二价抗体根据公布的信息构建,并在293F Freestyle细胞中表达。对于HGF配体阻断测定,将专利来源的抗cMET抗体的编码VH和编码VL的基因区段再克隆在噬菌体展示载体中用于在丝状噬菌体上展示。

[0247] 参照抗体西妥昔单抗(爱必妥)用作EGFR Fab组的参照抗体。

[0248] 通过木瓜蛋白酶消化从纯化的PG2994 IgG中生成2994Fab蛋白。因此,将PG2994与偶联在珠上的木瓜蛋白酶(Pierce#44985)一起孵育,并允许其在旋转下于37℃下消化5.5小时。通过在MabSelectSure LX上过滤,从消化混合物中纯化Fab片段。流过包含Fab蛋白的级分,使用10kDa的vivaspin20浓缩至3ml,并使用在PBS中的superdex75 16/600柱通过凝胶过滤进一步纯化。

[0249] 实施例2

[0250] 二价单克隆抗体的生成和抗体表征

[0251] 将通过VH基因序列及其一些序列变体判断的独特抗体的VH基因克隆在骨架IgG1载体中。将适合悬浮的293F Freestyle细胞在摇动平台上的T125烧瓶中培养,直至密度为 3.0×10^6 个细胞/ml。将细胞以 0.3×10^6 至 0.5×10^6 个活细胞/ml的密度接种在24深孔板的每个孔中。将细胞用单独的无菌DNA:PEI混合物进行瞬时转染,并进一步培养。在转染之后7天,收获上清液,并通过0.22μM(Sartorius)过滤,并使用分批纯化在蛋白A珠上进行纯化,随后将缓冲液更换为PBS。

[0252] EGF介导的凋亡的抑制

[0253] 高浓度(10nM)的EGF诱导A431细胞的(凋亡)细胞死亡[(Gulli et al.,1996)]。该作用可通过添加阻断配体的抗EGFR抗体(例如西妥昔单抗)而剂量依赖性地恢复。

[0254] 为了测试二价抗EGFR IgG其抑制EGF诱导的A431细胞死亡的效力,在存在10nM EGF的情况下,将抗体在系列滴定液(从10 μ g/ml起)中孵育。每个测定板均包含用作参照对照的阴性抗体(Ctrl Ab;PG2708)和阳性对照抗体(西妥昔单抗)的系列稀释液。在第三天,添加阿尔玛蓝(Invitrogen,#DAL1100)(每孔20 μ l),并在与阿尔玛蓝孵育6小时(在37 $^{\circ}$ C下)之后使用Biotek Synergy 2多模式微板阅读仪上的560nm激发和590nm读出测量荧光。图2示出了与西妥昔单抗和对照抗体的活性相比,cLC EGFR抗体的活性。与西妥昔单抗相比,抗体PG4280、3755和3752效力更强,而抗体PG4281和PG3370显示出较低的效力。

[0255] EGF阻断ELISA

[0256] 在不存在和存在摩尔过量的配体(EGF)的情况下,测试EGFR特异性噬菌体与重组EGFR的结合。因此,将5 μ g/ml的山羊抗人IgG包被至MAXISORPTM ELISA板于4 $^{\circ}$ C下过夜。将ELISA板的孔用包含2% ELK的PBS(pH 7.2)于摇动(700rpm)的同时在RT下封闭1h。接下来,允许5 μ g/ml重组人EGFR-Fc在RT下孵育1h。同时,将IgG与人生物素化EGF以系列滴定液在RT下混合1h。在洗去未结合的人EGFR-Fc之后,添加抗体/EGF混合物并在RT下允许结合1h。结合的EGF通过HRP-链霉亲和素在RT下持续1h进行检测。作为对照,该程序用对包被抗原(未示出)和阴性对照噬菌体具有特异性的抗体(Neg Ctrl Ab)同时进行。结合的二抗通过TMB/H₂O₂染色可视化,并且通过OD_{450 nm}测量对染色进行定量。图11描述了与西妥昔单抗相比,在抑制EGF介导的凋亡方面效力较弱的PG3370抗体显示出相似的EGF阻断活性。

[0257] 食蟹猴EGFR和小鼠EGFR交叉反应性测试

[0258] 为了测试抗EGFR IgG是否与食蟹猴EGFR反应,将编码全长人EGFR的构建体以及编码与胞内人EGFR融合的食蟹猴ECD的表达构建体均转染在(抗原阴性)CHO细胞中,并且然后将细胞用5 μ g/ml的抗EGFR抗体染色,并最后通过FACS分析。作为染色的阳性对照,使用临床使用的抗体西妥昔单抗,因为已知该抗体会与食蟹猴EGFR发生交叉反应。显示PG3370、PG3752、PG4280和PG4281与食蟹猴EGFR反应,因为表达人EGFR的细胞的染色与表达嵌合受体的细胞的染色几乎无法区分(图12)。

[0259] 为了测试抗EGFR IgG其与鼠EGFR的交叉反应性,进行ELISA。将起始于5 μ g/ml且稀释至0.038 μ g/ml的重组小鼠EGFR ECD-Fc的系列滴定液包被至MAXISORPTM ELISA板于4 $^{\circ}$ C下过夜。抗EGFR IgG与该抗原的结合在5 μ g/ml的固定浓度下测试,并允许其在RT下结合1h。作为抗体免疫反应性的阳性对照,使用人EGFR ECD-Fc融合蛋白作为抗原(R&D systems)进行相同的ELISA设置。接下来,山羊抗小鼠IgG HRP缀合物(BD Bioscience),并允许其在RT下结合2小时。结合的IgG通过OD_{450 nm}测量进行检测。已显示抗体PG3370识别鼠EGFR以及具有相似亲和力的人EGFR(图13-上图)。西妥昔单抗不能识别小鼠EGFR(125084爱必妥药理学综述第2部分-FDA)。因此,PG3370和西妥昔单抗不能识别人EGFR上的同一表位。

[0260] 小鼠cMET交叉反应性测试

[0261] 为了测试PG3342其与鼠cMET的交叉反应性,进行ELISA。将固定浓度的小鼠HGF R/c-MET Fc(R&D systems)HGF R/c-MET Fc在PBS中稀释至2.5 μ g/ml,并包被至MAXISORPTM ELISA板于4 $^{\circ}$ C下过夜。抗cMET IgG与该抗原的结合在半对数滴定(起始于10 μ g/ml)中进行

测试。允许抗体在RT下结合1H。作为抗体免疫反应性的阳性对照,使用人HGF R/c-MET Fc融合蛋白作为抗原(R&D systems)进行相同的ELISA设置。接下来,添加山羊抗小鼠IgG HRP缀合物(BD Bioscience),并允许其在RT下结合2小时。结合的IgG通过OD_{450 nm}测量进行检测。针对与生物素偶联的小鼠cMET的抗原亲和纯化的多克隆山羊IgG BAF527包括在内作为阳性对照抗体。用PG3342抗体未观察到与鼠cMET的交叉反应性(图13下图)。

[0262] 交叉阻断测定cMET抗体

[0263] 在ELISA中测试cMET特异性噬菌体与cMET参照抗体的竞争性。因此,将2.5 μ g/ml的cMET-Fc融合蛋白包被至MAXISORP™ ELISA板于4℃下过夜。将ELISA板的孔用包含2% ELK的PBS(pH 7.2)于摇动(700rpm)的同时在RT下封闭1H。接下来,以5 μ g/ml的浓度添加参照或阴性对照IgG,并允许于700rpm下在RT下结合15分钟。接下来,添加5 μ l经PEG沉淀的噬菌体,并允许于700rpm下在RT下结合1H。结合的噬菌体用经HRP标记的抗M13抗体于700rpm下在RT下持续1H进行检测。作为对照,该程序用对包被抗原和阴性对照噬菌体具有特异性的抗体同时进行。结合的二抗通过TMB/H₂O₂染色可视化,并且通过OD_{450nm}测量对染色进行定量。表2表明MF4040和MF4356显示出与5D5参照抗体竞争。MF4297与13.3.2和C8H241在较小程度上竞争。阳性对照噬菌体均显示出与相应IgG的完全竞争,而无抗体对照则不影响竞争测定。

[0264] 双特异性抗体的生成

[0265] 双特异性抗体通过以下生成:瞬时共转染编码具有不同VH结构域的IgG的两种质粒,使用专利CH3改造技术以确保有效的异二聚化和双特异性抗体形成。在同一质粒上或另一质粒上的共同轻链也被共转染在同一细胞中。在我们的共同待决申请(例如W02013/157954和W02013/157953;通过引用并入本文中)中,我们公开了用于从单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。具体地,基本上仅产生双特异性全长IgG分子的优选突变是第一CH3结构域中在第351和366位的氨基酸替换,例如L351K和T366K(根据EU编号进行编号) (“KK变体”重链),以及第二CH3结构域中在第351和368位的氨基酸替换,例如L351D和I368E (“DE变体”重链),或反之亦然。先前在我们的共同待决申请中已证明,带负电荷的DE变体重链和带正电荷的KK变体重链优先配对以形成异二聚体(所谓的“DEKK”双特异性分子)。由于相同重链之间CH3-CH3界面中带电荷残基之间的强排斥,不利于DE变体重链的同二聚化(DE-DE同二聚体)或KK变体重链的同二聚化(KK-KK同二聚体)。

[0266] 将cMET和EGFR Fab臂克隆在合适的KK和DE载体(表3)中。在产生之后,双特异性IgG通过蛋白A分批纯化来纯化,并将缓冲液更换为PBS。成功的产生产生了最低浓度为0.1mg/ml的IgG1全长抗体,并为其分配唯一的编号(PBnnnnnn;其中nnnnn代表随机生成的数字),以识别2种不同的靶结合Fab片段的特异性组合。在ELISA中测试成功产生的双特异性IgG与其相应靶标的结合。

[0267] 实施例3

[0268] EGF/HGF和HGF和EGF增殖测定中c-MET x EGFR双特异性抗体的筛选

[0269] 使用HGF/EGF、HGF和EGF测定在N87细胞中测试cMET x EGFR双特异性抗体组的效力。N87细胞系(正式名称为NCI-N87)是来源于转移性部位的胃癌细胞系,并且具有高的EGFR表达水平和中等的cMET表达水平(Zhang et al,2010)。抗体在半对数滴定(10 μ g/ml至3.16ng/ml)的8个步骤中进行测试。每种抗体以一式两份进行测试。抗RSV-G抗体PG2708用

作阴性对照。参照抗体2994Fab用作HGF测定的阳性对照,以及参照抗体西妥昔单抗用作EGF测定的阳性对照。

[0270] 等摩尔1:1西妥昔单抗/5D5 Fab用作EGF、HGF和EGF/HGF测定的阳性对照。

[0271] 具有一种配体、或配体的组合、和培养基对照的孔包括在内以确定测定窗口。将抗体在化学限定饥饿培养基(CDS:RPMI1640培养基,包含80U青霉素和80 μ g链霉素/ml,0.05%(w/v)BSA和10 μ g/ml全铁运铁蛋白)中稀释,并向96孔空白孔透明底板(Costar)的孔添加50 μ l的经稀释抗体。添加配体(50 μ l/孔的储备溶液,所述储备溶液包含在CDS中稀释的400ng/ml HGF和4ng/ml的EGF,以及浓度为4ng/ml EGF/400ng/ml HGF的EGF/HGF;R&D systems, cat.nr.396-HB和236-EG)。将N87细胞经胰蛋白酶消化、收获并计数,然后向板的每个孔添加100 μ l CDS中的8000个细胞。为避免边缘效应,将板在RT下放置一小时,然后将其放入37 $^{\circ}$ C细胞培养箱中的容器中放置三天。在第四天,添加阿尔玛蓝(Invitrogen, #DAL1100)(每孔20 μ l),并在与阿尔玛蓝孵育6小时(在37 $^{\circ}$ C下)之后使用BiotekSynergy 2多模式微板阅读仪上的560nm激发和590nm读出测量荧光。将荧光值相对于未经抑制的生长(无抗体,但添加这两种配体)进行归一化。HGF、EGF和EGF/HGF增殖测定的一个实例如图14(分别为图14A、B和C)中所示。

[0272] 表4列出了多种实验的结果。在N87 HGF/EGF测定中,鉴定出具有可与参照单特异性抗体(西妥昔单抗和5D5 Fab的等摩尔混合物)相当效力的14种不同的cMETxEGFR双特异性抗体:PB7679、PB7686、PB8218、PB8244、PB8292、PB8316、PB8340、PB8364、PB8388、PB8511、PB8535、PB8583、PB8607和PB8640。

[0273] 在N87 EGF测定中,鉴定出具有可与单特异性西妥昔单抗相当效力的11种不同的cMETxEGFR双特异性抗体:PB7679、PB8244、PB8292、PB8340、PB8364、PB8388、PB8511、PB8535、PB8583、PB8607和PB8640。它们均包含EGFR Fab臂MF3755。在HGF N87测定中,鉴定出与单特异性5D5 Fab参照抗体相比显示出更高效力的9种双特异性抗体:PB8218、PB8388、PB8511、PB8532、PB8535、PB8545、PB8583、PB8639和PB8640。它们包含六个不同的cMET Fab臂MF4040、MF4297、MF4301、MF4356、MF4491和MF4506。

[0274] ADCC活性

[0275] 测试24种cMetxEGFR双特异性抗体针对肿瘤细胞系N87(高EGFR,低cMET)和MKN-45(低EGFR,扩增的cMET)的ADCC活性。使用Promega ADCC生物测定试剂盒以384孔板形式进行ADCC测定。以半对数系列稀释液(10 μ g/ml至1ng/ml)9种不同浓度一式两份测试抗体。

[0276] 参照西妥昔单抗抗体包括在内作为该测定的阳性对照,以及PG2708用作阴性对照抗体。将抗体或测定培养基对照(无IgG)与ADCC效应细胞和靶细胞(N87或MKN-45)在37 $^{\circ}$ C下孵育6小时。使用Bio-Glo荧光素酶试剂对荧光素酶活性进行定量。

[0277] ADCC测定的一个实例如图15中所示。cMETxEGFR双特异性抗体在这两种细胞系中均未显示出显著的ADCC活性。阳性对照参照西妥昔单抗抗体对这两种细胞系均显示出剂量依赖性ADCC活性。

[0278] 选择由在N87 HGF/EGF测定中确实显示出高效力,且显示出高序列多样性的EGFR和cMet臂构成的五种双特异性抗体(表5)用于进一步分析。来自五种双特异性抗体中的两种包含MF4356,所述MF4356与5D5竞争与cMET的结合(表2)。表5概述了所选择候选物的特征。

[0279] 伤口愈合细胞迁移测定

[0280] 在伤口愈合测定中测试两种NSCLC细胞系:EBC-1和H358。选择这些细胞系是由于其表达高水平的EGFR和c-Met(Zhang et al,2010;Fong et al.,2013)。所述测定根据制造商的说明使用CytoSelect™ 24孔板伤口愈合测定(Cell Biolabs,CBA-120)进行。简言之,将 2.5×10^5 至 4×10^5 个癌细胞接种在每个孔中,并在37℃下孵育过夜以形成单层。然后去除孔插入物以产生0.9mm的伤口区域。在用PBS洗涤以去除伤口区域中的死细胞和碎片之后,将细胞与包含双特异性抗体(100nM)或西妥昔单抗:Fab2994对照抗体混合物(100nM,1:1摩尔比)的完全培养基(0.5%FBS)在37℃下孵育15分钟。然后每个孔补充有生长因子:HGF(15ng/ml)、EGF(12.5ng/ml)或二者的组合(15和12.5ng/ml)。使用共聚焦显微镜(Zeiss LSM780)在37℃下对伤口闭合进行延时监测持续14h。显示相对于未处理的对照,伤口闭合的程度(%)。

[0281] 暴露于单独的HGF或EGF之后,H358细胞显示出迁移(伤口闭合百分比)提高,这通过HGF和EGF的组合最为有效(图3)。该提高的迁移通过添加大多数的双特异性抗体来消除,并且使用PB8532最为显著。除了在存在EGF/HGF的情况下的抑制迁移之外,该抑制与西妥昔单抗与5D5 Fab的组合相当。

[0282] 通过添加HGF,EBC-1细胞显示出迁移略有提高,而在存在EGF或EGF/HGF组合的情况下,迁移没有提高。然而,伤口闭合可在所有测定条件下由双特异性抗体,特别是由PB8532抑制。PB8532与西妥昔单抗/5D5 Fab的组合一样有效或比其更加有效(EGF/HGF)。

[0283] 通过流式细胞术分析PC-9和HCC827细胞上EGFR和cMET的表达

[0284] 对厄洛替尼的获得性抗性可能是由HGF介导的c-MET激活的异常激活引起。选择NSCLC细胞系PC-9和HCC827以研究cMET xEGFR双特异性抗体在酪氨酸激酶抑制剂(TKI)抗性环境中抑制配体介导的增殖的能力。这两种细胞系均不具有EGFR突变,并且在存在HGF的情况下对厄洛替尼和吉非替尼二者或者吉非替尼和厄洛替尼的组合产生抗性(仅PC-9)。在PC-9细胞中,已有报道HGF诱导的厄洛替尼抗性可通过cMET抑制剂来消除(Nakade et al.,2014),并且吉非替尼抗性可通过抗HGF抗体来消除(Yano,2008)。使用荧光标记的抗体,通过FACS分析对PC-9和HCC827的cMET和EGFR的表达进行表征。用PBS2mM EDTA收获细胞。将单细胞混悬液(50μl中的 10×10^6 个细胞)与荧光标记的抗体在染色缓冲液(PBS2% FBS2mM EDTA)中于冰上孵育20分钟。以下抗体单独地或组合使用:Met Alexa Fluor 488缀合物(克隆D1C2,Cell Signaling,1:50稀释);EGF受体Alexa Fluor 647缀合物(克隆D38B1,Cell Signaling,1:50稀释)。在孵育之后,将细胞用染色缓冲液洗涤,并在BD FACSVerser流式细胞仪上进行FACS分析。

[0285] 所有HCC827细胞均显示EGFR表达,并且可细分为EGFR^{high} cMET^{pos}群和EGFR^{pos} cMET^{neg}群(图4)。PC-9细胞包含小群的EGFR^{high}和cMET^{pos}细胞,以及最小群的EGFR^{pos}和cMET^{neg}细胞。

[0286] PC-9和HCC827增殖测定

[0287] 进行初始实验以确定PC-9和HCC827细胞中建立厄洛替尼和吉非替尼抗性的HGF浓度。在包含0.5% FBS的培养基中过夜饥饿之后,将细胞与在10% FBS中补充有300nM厄洛替尼或吉非替尼的提高浓度的HGF(0至120ng/mL)孵育。在孵育72小时之后,根据制造商的说明使用WST-1试剂评估细胞增殖。用微板阅读仪在测试波长和参照波长分别为450和

630nm处测量吸光度。在PC-9 (图16A) 和HCC287 (图16B) 二者中,HGF的添加均以剂量依赖性方式诱导对TKI的抗性。

[0288] 测试PB8532和PB8388其在TKI抗性环境中的效力。将 4×10^3 个癌细胞接种在包含100 μ L完全RPMI 1640 (10% FBS) 的96孔板中。在包含0.5% FBS的培养基中过夜饥饿之后,将细胞与Biclonics® (100nM) 或西妥昔单抗:Fab2994对照单特异性抗体混合物 (100nM, 1:1摩尔比) 在37℃下预孵育15分钟。然后在每个孔中补充有包含吉非替尼或厄洛替尼 (300nM) 或者w/o HGF (30ng/ml)、EGF (30ng/ml) 或二者的组合 (在30ng/ml下) 的完全培养基 (10% FBS)。在孵育72小时之后,使用WST-1方法评估细胞增殖。

[0289] 图5示出了PB8532可在PC-9细胞中抑制HGF介导的和EGF介导的吉非替尼抗性。在HCC287细胞中,PB8532抑制HGF介导的TKI抗性,并且比施用双重单特异性西妥昔单抗5D5 Fab的组合效力更强。使用TKI厄洛替尼获得相当的结果。

[0290] 实施例4PB8532对EGF和cMET磷酸化的抑制

[0291] 在无FBS的培养基中过夜饥饿之后,将细胞与包含PB8532 (100nM) 或西妥昔单抗:Fab2994对照单特异性抗体混合物 (100nM, 1:1摩尔比) 的培养基 (0.5% FBS) 在37℃下孵育15分钟。然后将细胞用以下生长因子在37℃下刺激15分钟:HGF (30ng/ml) 或EGF (50ng/ml)。在刺激之后,将细胞用在存在1mM原钒酸盐 (orthovanadate) (Sigma-Aldrich) 的情况下的PBS洗涤。使用补充有完全蛋白酶抑制剂混合物 (Roche)、PhosSTOP磷酸酶抑制剂 (Roche) 和原钒酸盐 (1mM, Sigma-Aldrich) 的RIPA裂解缓冲液 (50mM Tris HCl pH 8, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS) 进行蛋白质提取。将裂解液在冰上孵育30分钟,然后在4℃下离心15分钟以去除细胞碎片。在离心之后,收集上清液,并根据制造商的说明使用二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 试剂 (Pierce) 确定蛋白质浓度。通过添加上样缓冲液6X (β -巯基乙醇0.6M; SDS 8%; Tris-HCl 0.25M pH 6, 8; 甘油40%; 溴酚蓝0.2%) 使蛋白质样品变性并在95℃下孵育5分钟。在电泳之后,将蛋白质使用Trans-Blot® Turbo™ 印迹系统 (Bio-Rad) 转移到硝酸纤维素膜上。将膜在Tris缓冲盐水-吐温0.1% (50mM Tris HCl pH 7.6, 150mM NaCl, 0.1% 吐温; TBS-T) 中的5% 非脂肪干乳中针对非特异性结合在室温 (RT) 下封闭1h,并与一抗在4℃下孵育过夜 (overnight, ON)。使用以下一抗:以1:500在TBS-T 5% BSA中的Phospho-Met (Tyr1234/1235, 克隆D26, Cell Signaling); 以1:1000在TBS-T 5% BSA中的Met (克隆D1C2, Cell Signaling); 以1:1000在TBS-T 5% 非脂肪干乳中的Phospho-EGF受体 (Tyr1068, 克隆D7A5, Cell Signaling); 以1:1000在TBS-T 5% BSA中的EGF受体 (克隆D38B1, Cell Signaling); 以1:4000在TBS-T 5% 非脂肪干乳中的黏着斑蛋白 (单克隆抗黏着斑蛋白, V9131, SIGMA Aldrich)。与所指定的一抗孵育之后,将膜在TBS-T中洗涤15分钟,然后与二抗 (以1:5000在TBS-T 5% 非脂肪干乳中) 在RT下孵育1h。使用以下二抗:山羊抗兔IgG-HRP (sc-2004, Santa Cruz biotechnology); 山羊抗小鼠IgG-HRP (sc-2005, Santa Cruz biotechnology)。使用增强型化学发光试剂 (ECL; Invitrogen) 或 SuperSignal West Femto 化学发光底物 (Thermo Scientific) 与数字成像仪 (ImageQuant LAS 4000, GE Health Care Life Science Technologies) 使信号可视化。

[0292] 图6示出了所进行实验的Western印迹分析。

[0293] 在PC-9细胞中,PB8532和5D5/西妥昔单抗能够降低HGF诱导的磷酸化。另外,在不存在和存在EGF的情况下,这两种抗体均轻微降低EGF磷酸化。

[0294] 在HCC827细胞中,在存在和不存在HGF的情况下,PB8532降低cMET的磷酸化。未观察到5D5/西妥昔单抗的组合的作用。此外,与5D5与西妥昔单抗的组合相反,在该细胞系中PB8532降低EGF诱导的EGFR的磷酸化。

[0295] 实施例5

[0296] 图7描绘了如本文中公开的EGFR结合可变结构域的重链的替代可变区的多种序列。图8描绘了如本文中公开的cMET结合可变结构域的重链的替代可变区的多种序列。重链可变区用于产生许多不同的cMET x EGFR双特异性抗体。这些抗体中的轻链具有如图9B中所示的序列。双特异性抗体如实施例1中所述产生。抗体也作为ADCC增强形式产生。ADCC增强形式通过共转染包含编码从IgG1的Fc区去除岩藻糖残基的还原酶的DNA的抗体构建体来产生。

[0297] 图17描绘了在实施例2中所述的CHO-K1 EGFR细胞(图A)上和在内源性表达c-MET的MKN-45细胞(图B)上的多种产生的双特异性抗体的滴定。将细胞以 2×10^5 个细胞/孔与如指定提高浓度的抗体孵育。在洗涤之后,用抗人IgG-PE(3 μ g/ml)检测结合。在iQue系统上分析经染色的细胞,并计算平均荧光强度(MFI)和曲线下面积(area under the curve,AUC)。对照抗体是MF1337xMF1337(PG1337p218;TTxTT阴性对照;在底部的黑色三角形)和MF4356xMF3770(PB8532p04;c-METxEGFR阳性对照;黑色三角形)。TT代表破伤风类毒素,包含如本文中所述的MF1337的VH(参见图1)和共同轻链的可变结构域,与破伤风类毒素结合,并因此预计不与CHO-K1 EGFR细胞和MKN-45细胞结合。注释(ADCC)表示通过与编码从IgG1的Fc区去除岩藻糖残基的RMD酶的DNA共转染而具有增强ADCC功能的抗体。对于使用的双特异性抗体及其PB编号的列表参见表6。

[0298] ADCC报道子测定

[0299] 进行ADCC报道子测定以确定编码RMD的DNA的共转染是否成功增强了ADCC效应物功能。使用高亲和力和低亲和力测定二者,将所有样品针对BxPC3细胞(其表达EGFR)和MKN-45细胞(其表达c-MET)一式两份地(in duplo)进行测试。该测定的高亲和力效应细胞表达人Fc γ R1IIa的V变体,而低亲和力效应细胞表达F变体。

[0300] 简言之,收获BxPC3和MKN-45靶细胞,并以30 μ L中的1000个细胞/孔种板,并在95%相对湿度、5%CO₂、37°C下孵育过夜。第二天,除去培养基,并向每个孔添加10 μ L抗体稀释液(抗体稀释度1.5x;具有半对数稀释步骤的9步系列滴定产生测定浓度为1ng/ml至10 μ g/ml)。在同一天,将效应细胞在37°C下解冻,然后将630 μ L添加至15ml管中的3.6ml测定缓冲液,并通过倒置混合;然后将5 μ L的该溶液(15,000个细胞)添加至测定板的孔中。将板在95%相对湿度、5%CO₂、37°C下孵育6小时,然后向测定孔添加15 μ LBio-Glo试剂。使用EnVision板阅读仪测量发光。

[0301] 表6中提供了受试样品的列表,以及图18提供了测定的结果。非ADCC增强型抗HER3 x EGFR对照抗体(批次PB4522p25;W02015/130172中所述的MF4280xMF3178)在所有四种测定中均为阴性(在图18中由黑色交叉和实线(自上第4)表示)。相反,该抗体的ADCC增强型形式(PB4522p34)在所有四种测定中均为阳性(由实心橙色圆圈表示)。类似地,非ADCC增强型抗c-MET x EGFR对照抗体(PB8532p04)在所有四种测定中均为阴性(在图18中由黑色交叉和虚线表示),而PB8532p05批次也是非ADCC-增强型(由绿色星号表示)。带星号的三条线均在四幅图的底部。然而,ADCC增强型p06变体(PB8532p06)在所有测定中均为阳性(由空心橙

色圆圈表示)。对于5种双特异性抗体(PB19474至PB19478),也发现了与PB8532p06类似的增强型ADCC效应物功能。这意指编码RMD的DNA的共转染成功增强了ADCC效应物功能。

[0302] 实施例6

[0303] PB8532的cMET可变结构域的重链可变区(VH)包含如例如图8中所示MF4356的氨基酸。PB19748的cMET可变结构域的重链可变区(VH)包含MF8230的氨基酸序列(参见图8)。PB8532的EGFR可变结构域的重链可变区(VH)包含如例如图7中所示MF3370的氨基酸。PB19748的EGFR可变结构域的重链可变区(VH)包含图7的MF8233的氨基酸序列。PB8532和PB19748中的轻链相同,并且示于图9B。cMET抗体LY2875358抗体尤其在Kim和Kim 2017中进行了描述。在异种移植小鼠模型中,测试单独的或与受体酪氨酸激酶抑制剂厄洛替尼组合的cMETxEGFR双特异性抗体PB8532或PB19748在体内抑制肿瘤生长的能力。在所选择模型中,将HCC827肿瘤细胞移植到免疫缺陷型NOD SCID γ (NOD SCID gamma, NSG)人肝细胞生长因子敲入(hHGFki)小鼠中,该小鼠表达人HGF(cMET的配体)代替内源性小鼠HGF。NSG-hHGFki小鼠的全称为NOD.Cg-Hgf^{tm1.1(HGF)}Aveo Prk^{dscid Il2rgtm1Wjl/J}(stk#014553)(NOD.Cg-Hgftm1.1(HGF)Aveo Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/J)。其不具有T或B细胞,缺乏功能性NK细胞,并且细胞因子信号传导不足,其允许更好地肿瘤移植。HCC827是表达EGFR和cMET的一种已确立的人非小细胞肺癌(non-small-cell lung carcinoma, NSCLC)细胞系,并已知在存在HGF的情况下对厄洛替尼产生抗性。

[0304] 为了在该模型中确立厄洛替尼对肿瘤生长的作用,对两组小鼠进行了第一实验。在肿瘤细胞移植之前,在汇合度不超过80%的情况下,通过在补充有20%胎牛血清(FBS)的培养基中培养细胞过夜以增强HCC827细胞的细胞周期。第二天,将NSG-hHGFki小鼠(杰克逊实验室(The Jackson Laboratory))用混悬于300 μ l PBS加上包含高浓度的基底膜基质的30%基质胶中的 17×10^6 HCC827肿瘤细胞进行皮下接种。使用卡尺每周两次测量产生的肿瘤。当平均肿瘤体积达到约200mm³时,将小鼠随机分为两组(每组4至7只小鼠,其取决于肿瘤的生长和体积)并开始药物治疗。

[0305] 每周在水中0.05%羟丙基甲基纤维素(hydroxypropyl methylcellulose, HPMC)和0.2%吐温80中通过声处理新鲜制备厄洛替尼的细混悬液。

[0306] 从第19天起,以6mg/kg的剂量通过管饲每天一次(QD)使用厄洛替尼溶液治疗5只小鼠(n=5),以及用200 μ l载剂(水中的0.05% HPMC和0.1%吐温80)对4只小鼠的组给予每天一次管饲。使用卡尺每周两次测量肿瘤体积,并计算每组的平均肿瘤体积(和SEM)。当肿瘤尺寸达到1500mm³时,使小鼠安乐死。在第48天之后停止治疗,直至第62天测量存活小鼠中的肿瘤体积。

[0307] 在测试PB8532双特异性抗体(单独的和与厄洛替尼组合)在该模型中抑制肿瘤生长的能力的第二实验中,对具有肿瘤(如上所述生成)的NSG-hHGFki小鼠给予六种治疗之一或组合治疗,因此通过腹膜内(i.p.)注射每周给予抗体,以及通过管饲每天一次(QD)给予厄洛替尼或载剂。作为阴性对照,将小鼠还用PB17160(由与对无关靶标(irrelevant target)具有特异性的Fab臂组合的与PB8532中相同的抗cMET Fab臂组成的双特异性抗体)治疗。无关靶标例如是在小鼠和肿瘤中不存在的靶标。通常使用破伤风类毒素特定的可变结构域。合适的破伤风类毒素结合可变结构域具有如本文中公开的MF1337的VH(参见图1)和共同轻链,优选图9的序列。参见MF1337,具有靶向臂和非靶向(TT)臂的双特异性抗体尤其描述于W02017/069628,其通过引用并入本文中。另一个无关靶标是RSV-G。合适的RSV-G

可变结构域具有图1的MF2708的VH和优选图9中的之一(优选图9B)的共同轻链。

[0308] 在第21天,当平均肿瘤体积达到约 200mm^3 时,将小鼠随机分为6组(每组5至7只小鼠,其取决于肿瘤的生长和体积),并开始药物治疗:每天用单独的载剂管饲($n=5$);每周i.p.注射 25mg/kg PB8532抗体加上每天用载剂管饲($n=7$);每周i.p.注射 25mg/kg PB17160抗体加上每天用载剂经口管饲($n=6$);每天用 6mg/kg 厄洛替尼经口管饲($n=7$);每周i.p.注射 25mg/kg PB8532抗体加上每天用 6mg/kg 厄洛替尼经口管饲($n=7$);或每周i.p.注射 25mg/kg PB17160抗体加上每天用 6mg/kg 厄洛替尼经口管饲($n=7$)。如前所述,监测肿瘤体积并计算每组中的平均肿瘤体积(和SEM)。在第60天之后停止所有治疗,直至第82天测量存活小鼠中的肿瘤体积。

[0309] 在第三实验中,测试PB19478双特异性抗体(单独的和与厄洛替尼组合)在该模型中抑制肿瘤生长的能力。对患有肿瘤(如上所述生成)的NSG-hHGFki小鼠给予六种治疗之一或组合治疗,因此通过腹膜内(i.p.)注射每周给予抗体,以及通过管饲每天一次(QD)给予厄洛替尼或载剂。

[0310] 在第23天,当平均肿瘤体积达到约 200mm^3 时,将小鼠随机分为6组(每组5至6只小鼠,其取决于肿瘤的生长和体积),并开始药物治疗:每天用单独的载剂管饲($n=5$);每周i.p.注射 25mg/kg PB19478抗体加上每天用载剂管饲($n=5$);每天用 6mg/kg 厄洛替尼经口管饲($n=6$);每周i.p.注射 25mg/kg PB19478抗体加上每天用 6mg/kg 厄洛替尼经口管饲($n=4$,在实验期间一只小鼠死亡);每周i.p.注射 25mg/kg LY2875358抗体加上每天用载剂管饲($n=5$);每周i.p.注射 25mg/kg LY2875358抗体加上每天用 6mg/kg 厄洛替尼经口管饲($n=3$,在实验期间两只小鼠死亡)。如前所述,监测肿瘤体积并计算每组中的平均肿瘤体积(和SEM)。在第93天之后停止所有治疗,并且直至第93天测量存活小鼠中的肿瘤体积。

[0311] 在第四实验中,测试后来施用的PB19478的作用。对患有肿瘤(如上所述生成)的NSG-hHGFki小鼠给予两种治疗之一,因此通过腹膜内(i.p.)注射每周给予抗体,并通过管饲每天一次(QD)给予厄洛替尼或载剂。

[0312] 在第21天,当平均肿瘤体积达到约 200mm^3 时,所有14只小鼠开始每天用 6mg/kg 厄洛替尼进行经口管饲治疗。在第51天,当平均肿瘤体积明显超过 500mm^3 标记时,将小鼠随机分为两组。六组中的一组每天用 6mg/kg 厄洛替尼进行经口管饲治疗,而另一组8只则每周接受i.p.注射 25mg/kg PB19478抗体加上每天用 6mg/kg 厄洛替尼管饲。如前所述,监测肿瘤体积并计算每组中的平均肿瘤体积(和SEM)。在第72天之后停止所有治疗。

[0313] 第一实验的结果表明,厄洛替尼能够在移植有HCC827细胞的NSG-hHGFki小鼠中诱导抗肿瘤应答,但仅针对只要小鼠接受治疗即可(图19)。在约4周的治疗之后开始的无药期中,肿瘤体积在用厄洛替尼治疗的小鼠中明显提高。

[0314] 抗cMETxEGFR双特异性抗体PB8532也能够在移植有HCC827细胞的NSG-hHGFki小鼠中诱导抗肿瘤应答(图20)。当抗体与日剂量的厄洛替尼组合给予时,该作用更大。在2.5周内,所有肿瘤均从PB8532与厄洛替尼的组合中消失。无论是否与厄洛替尼组合,具有一个Fab臂靶向cMet的对照抗体PB17160均未诱导抗肿瘤应答。因此,通过与双特异性抗体PB8532中的EGFR靶向Fab臂组合的特异性靶向cMet Fab臂可克服HGF介导的厄洛替尼抗性。

[0315] 在约 $5^{1/2}$ 周治疗之后开始的无药期中,PB8532在降低肿瘤体积方面比厄洛替尼效力更高(图21),并且在PB8532+厄洛替尼组合组中未观察到肿瘤再生长。

[0316] 抗cMETxEGFR双特异性抗体PB19478也能够在移植有HCC827细胞的NGS-hHGFki小鼠中诱导抗肿瘤应答(图22)。当抗体与日剂量的厄洛替尼组合给予时,该作用更大。在2周内,所有肿瘤均从无论是否与厄洛替尼组合的PB19478中消失。与厄洛替尼组合,肿瘤在测试时期中未再现。不与厄洛替尼组合,肿瘤在约第50天很快再现,并保持在检测水平,直至其最终在第80天开始进一步生长。人源化单克隆抗体emibetuzumab(LY3875358)在与EGFR抑制剂厄洛替尼组合时也效力较差。因此,通过与双特异性抗体PB8532或PB19478中的EGFR靶向Fab臂组合的特异性靶向cMet Fab臂可克服HGF介导的厄洛替尼抗性。

[0317] 图23示出了当你在其中厄洛替尼抗性开始发生的时间点治疗肿瘤时,双特异性抗体PB19478即刻发挥作用。

[0318] 综上所述,来自移植到免疫缺陷型NSG-hHGFki小鼠中的HCC827肿瘤细胞异种移植模型的数据表明PB8532、PB19478和具有与图7和图8中给定相似VH序列的抗体具有在体内克服HGF介导的厄洛替尼抗性的能力。在停止治疗之后,组合治疗继续有效。

[0319] 参考文献

[0320] Ahmed,M et al.Lack of in Vivo Anibody Dependent Cellular Cytotoxicity with Antibody containing gold particles/Bioconjugate chemistry (2015):26 812-816.DOI:10.1021/acs.bioconjchem.5b00139.

[0321] Buday L,Downward J.Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor,Grb2 adapter protein,and Sos nucleotide exchange factor.Cell 1993;73:611-20.

[0322] Castoldi,R.,et al."A novel bispecific EGFR/Met antibody blocks tumor-promoting phenotypic effects induced by resistance to EGFR inhibition and has potent antitumor activity."Oncogene 32,50(2013):5593-5601.

[0323] Chen et al.,MET activation mediates resistance to lapatinib inhibition of HER2-amplified gastric cancer cells.Mol Cancer Ther 2012;11(3):650-669

[0324] Ferguson KM.Structure-based view of epidermal growth factor receptor regulation.Annu Rev Biophys 2008;37:353-73.

[0325] Fong JT,et al.,Alternative signaling pathways as potential therapeutic targets for overcoming EGFR and c-Met inhibitor resistance in non-small cell lung cancer.PLoS One.2013Nov 4;8(11):e78398.

[0326] Gale NW,Kaplan S,Lowenstein EJ,Schlessinger J,Bar-Sagi D,Grb2 mediates the EGF-dependent activation of guanine nucleotide exchange on Ras.Nature 1993;363:88-92.

[0328] Gulli LF1,Palmer KC,Chen YQ,Reddy KB,1996.Epidermal growth factor-induced apoptosis in A431 cells can be reversed by reducing the tyrosine kinase activity.Cell Growth Differ.Feb;7(2):173-8,

[0329] Jorissen RN,Walker F,Pouliot N,Garrett TP,Ward CW,Burgess AW.Epidermal growth factor receptor:mechanisms of activation and signalling.Exp Cell Res2003;284:31-53.

- [0330] Kim,George P.,and Axel Grothey."Targeting colorectal cancer with human anti-EGFR monoclonal antibodies: focus on panitumumab,"*Biologics*2.2 (2008):223-228.
- [0331] Kim,Ki-Hyan and Kim,Hyori.Progress of antibody-based inhibitors of the HGF-cMETaxis in cancer therapy.*Experimental&Molecular medicine*(2017), e307;doi:10.1038/emm.2017.17)
- [0332] Morgillo F,et al.*ESMO Open* 2016;1:e000060.doi:10.1136/esmoopen-2016-000060
- [0333] Moores,Sheri L.,et al"A novel bispecific antibody targeting EGFR and cMet is effective against EGFR inhibitor-resistant lung tumors."*Cancer research* 76.1S(2016):3942-3953.
- [0334] Nakade et al.Triple inhibition of EGFR,Met,and VEGF Suppresses regrowth of HGF-triggered,erlotinib-resistant lung cancer harboring an EGFR mutation.*J Thorac Oncol* 2014,9(6):775-83.
- [0335] Prigent SA,Gullick WJ.Identification of eErbB-3binding sites for phosphatidylinositol3-kinase and SHC using an EGF receptor/c-ErbB-3chimera.*EMBO J*1994;13:2831-41.
- [0336] Robertson SC,Tynan J,Donoghue DJ.RTK mutations and human syndromes: when good receptor turns bad.*Trends Genet*2000;16:368.
- [0337] Soltoff SP,Carraway KL,III,Prigent SA,Gullick WG, Cantley LC.ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor.*Mol Cell Biol* 1994;14:3550-8.
- [0338] Yano et alHepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations.*Cancer Res.*2008,15;68(22):9479-87.
- [0339] Yarden Y.The EGFR family and its ligands in human cancer.Signalling mechanismsand therapeutic opportunities.*Eur J Cancer* 2001;37(Suppl 4):S3-SS.
- [0340] Zhang et al.,MET kinase inhibitor SGX523 synergizes with epidermal growth factor receptorinhibitor erlotinib in a hepatocyte growth factor-dependent fashion to suppress carcinoma growth.*Cancer Res* 2010,70:6880-6890,
- [0341] US20120107234A1_Symphogen专利“PAN HER antibody composition”。
- [0342] 125084爱必妥药理学综述第2部分-FDA。

名称	INN名称	表位	MOA
5D5	MetMAb	Sema结构域	HGF阻断

13.3.2

[0343] 224G11

C8-H241	LY-2875358	HGF阻断， 内化
R13	13-MET	

[0344] 表1.具有针对cMET胞外结构域的报道的特异性的参照抗体。

受试MF	噬菌体与参照抗体的竞争						
	无IgG	13.3.2	5D5	R13	224G11	C8H241	R28
4040	1.915	1.818	0.066	1.608	1.907	1.979	1.787
4297	1.769	0.072	1.499	1.332	1.955	1.031	1.885
4356	2.380	2.541	0.088	2.231	2.170	1.806	1.825
13.3.2	2.172	0.311	1.934	1.988	2.221	1.893	2.129
5D5	1.868	1.773	0.164	1.660	2.025	2.054	2.035
R13	1.693	1.590	1.549	0.090	1.878	0.078	1.794

[0345] [0346] 表2.cMet参照抗体与cMET cLC抗体的竞争。示出的是OD450值。OD450值表明与所述抗体存在竞争或缺乏竞争。MF4506未受试。

[0347]

PB	PB MF 的			
	EGFR		cMET	
PB7678	MF4280	EGYYETTTYYYNLFD	MF4298	KLEPTGYYYYYMDV
PB7679	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF4487	KTERYSGYHYMDV
PB7686	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF4567	AHYDILTG
PB8021	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF3462	GKSHYSWDAFDY
PB8218	MF3752	DRNWGWDFDY	MF4040	GTYYYGSGSFSTEVDAFDV
PB8244	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF4044	QSRYSYGYASYFDY
PB8292	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF4130	QRRAYSGYNWYFDL
PB8301	MF4280	EGYYETTTYYYNLFD	MF4130	QRRAYSGYNWYFDL
PB8316	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF4293	RNDFWSGYLFDY
PB8339	MF3752	DRNWGWDFDY	MF4294	KTTVGYYYYYMDV
PB8340	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF4294	KTTVGYYYYYMDV
PB8364	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF4296	GPELGYYYYYMDI
PB8388	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF4297	ASSMITFGGVIVSWFDP
PB8511	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF4301	KVNEYSGYATYFDL
PB8532	MF3370	DRHWHWWLDAFDY	MF4356	ETYYYDRGGYPFDP
PB8535	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF4356	ETYYYDRGGYPFDP
PB8545	MF4281	GDLPITGTLDY	MF4356	ETYYYDRGGYPFDP
PB8582	MF3752	DRNWGWDFDY	MF4491	RTSRYSGYHYLDV
PB8583	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF4491	RTSRYSGYHYLDV
PB8607	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF4505	LLYDLFDL
PB8639	MF3752	DRNWGWDFDY	MF4506	SIDMATITDAFDI
PB8640	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF4506	SIDMATITDAFDI
PB8687	MF3752	DRNWGWDFDY	MF4508	GTTGNPYFYFYMDV
PB8688	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF4508	GTTGNPYFYFYMDV

[0348] 表3: 在N87 HGF/EGF增殖测定中进行剂量依赖性滴定实验之后选择的24种cMETxEGFR双特异性抗体的列表。表明了每个单独的PB中EGFR和cMET臂的MF编号及其HCDR3序列。

[0349]

PB	PB MF的		N87增殖测定		
	EGFR	cMET	HGF/ EGF	HGF	EGF
PB7678	MF4280	MF4298	+	+	+
PB7679	MF3755	MF4487	++	-	++
PB7686	MF3755	MF4507	++	+	+
PB8021	MF3755	MF3462	+	+	+
PB8218	MF3752	MF4040	++	+++	+
PB8244	MF3755	MF4044	++	+	++
PB8292	MF3755	MF4130	++	+	++
PB8301	MF4280	MF4130	+	++	+
PB8316	MF3755	MF4293	++	+	+
PB8339	MF3752	MF4294	+	+	+
PB8340	MF3755	MF4294	++	+	++
PB8364	MF3755	MF4296	++	+	++
PB8388	MF3755	MF4297	++	+++	++
PB8511	MF3755	MF4301	++	+++	++
PB8532	MF3370	MF4356	+	+++	+
PB8535	MF3755	MF4356	++	+++	++
PB8545	MF4281	MF4356	+	+++	+
PB8582	MF3752	MF4491	+	-	+
PB8583	MF3755	MF4491	++	+++	++
PB8607	MF3755	MF4505	++	-	++
PB8639	MF3752	MF4506	+	+++	+
PB8640	MF3755	MF4506	++	+++	++
PB8687	MF3752	MF4508	+	++	+
PB8688	MF3755	MF4508	+	-	+

[0350] 表4:使用24种cMETxEGFR双特异性抗体进行N87 HGF/EGF、HGF和EGF增殖测定而进行的抗体滴定实验的概述。双特异性抗体表示为PBXXXX,并且不同的Fab臂表示为MGXXXX。在个体测定中双特异性抗体的活性表示为:-无作用;+低于阳性对照的增殖抑制;+=与阳性对照抗体5D5 Fab相当的增殖抑制;+=高于阳性对照抗体5D5 Fab的增殖抑制。

[0351]

双特异性抗体	EGFR臂	与西妥昔单抗相比的EGFR阻断 (基于IC50)	cMET臂	交叉参照抗体阻断
PB8535	MF3755	100%	MF4356	5D5
PB8640	MF3755	100%	MF4506	ND
PB8388	MF3755	100%	MF4297	13.3.2
PB8218	MF3752	80%	MF4040	5D5
PB8532	MF3370	80%	MF4356	5D5

[0352] 表5:效力最强的EGFRxcMET双特异性抗体的组成及其与参照抗体的竞争。

[0353]

双特异性抗体	cMET臂	EGFR臂	ADCC增强
西妥昔单抗	-	-	-
PB8532p05	MF4356	MF3370	否
PB19474p01	MF4356	MF82S2	是
PB19475p01	MF4356	MF82SS	是
PB19476p01	MFS230	MF3S70	是
PB19477p01	MF8230	MF8232	是
PB19478p01	MF8230	MF8233	是
PB8532p06	MF4356	MF3S70	是
PB8532p04	MF4356	MF3S70	否
	HER- ₃ 臂	EGFR臂	
PB4522p34	MF3178	MF4280	是
PB4522p25	MF3178	MF4280	否
	TT臂	TT臂	
PG1337p218	MF13S7	MF1337	否

[0354] 表6:双特异性抗体的组成。pXX编号表示产生运行 (production run) 的编号,并且可用于鉴定抗体是否以ADCC形式产生。

MP nr	特异性	VH序列
1337	TT	EQQLVSTQASVYKNTGASVSKLASDYFTNYDINWVQAPOQLDVGWDSANTSTGTOYAKQKQGTWTDYDNTATYMLSSLSHTAVYPCARHSLPKTTHAPYTHALDVPWQGTITVSS
1339	EQFR	QVQLVQSLAEVKKPKGASVKSCFASGYSYISWYRQAPKQGLEWGWISAVNGINNYAQKLGHVMTHTSTSTAYMELHSLRSDDTAVYCAKDRHWIWDAPYVWQGTITVSS
1355	EQFR	QVQLVQSSSELKHPDASVYKSKASGDFTNYAMNWWVHQAPRHGLEWGWISAVNGINNYAQKLGHVMTHTSTSTAYMELHSLRSDDTAVYCAKDRHWIWDAPYVWQGTITVSS
4097	ch1e	EQQLVESGGGVVQVQGHSLRSCAASGPTFSKAWMWVWVQAFGCGLEWVVRHSEKTDGFTDYAAPVYKQPTSSKDSHETLYLQMSLKITPTAVYCTASSMIFPGGVSWEDFWGQGLTVSS
4356	ch1a	QVQLVQSSSELKHPDASVYKSKASGFTTSYEMNWWVQAPOQLWVWQWNTVYQHTPTAQPTQRYVSELTSTNTALQSSLAEDTAVYCAKDRHWIWDAPYVWQGTITVSS
2706	RSV-G	EVQLVESGGGVVQVQGHSLRSCAASGPTFSKAWMWVWVQAFGCGLEWVVRHSEKTDGFTDYAAPVYKQPTSSKDSHETLYLQMSLKITPTAVYCTASSMIFPGGVSWEDFWGQGLTVSS

MP nr	特异性	FR1	CDR2	FR2	CDR1	FR3	CDR3	IR4
1337	TT	EQQLVSTQASVYKNTGASVSKLASDYFTNYDINWVQAPOQLDVGWDSANTSTGTOYAKQKQGTWTDYDNTATYMLSSLSHTAVYPCARHSLPKTTHAPYTHALDVPWQGTITVSS	WNSANTGNGVLAQAFQ	WQKQREGQGLEWNG	LYDLEN	EVNTSDTSTGNTAVMSL	SSLPTECDAPYVEALDV	WQGTITVSS
1370	EQFR	QVQLVQSLAEVKKPKGASVSKLASDYFTNYDINWVQAPOQLDVGWDSANTSTGTOYAKQKQGTWTDYDNTATYMLSSLSHTAVYPCARHSLPKTTHAPYTHALDVPWQGTITVSS	WISANTGNGVLAQAFQ	WVQAPQKGLEWNG	SYGTS	SLTSDTAVYCTAR	DEHWMLEDAFQ	WQGTITVSS
1355	EQFR	QVQLVQSSSELKHPDASVYKSKASGDFTNYAMNWWVHQAPRHGLEWGWISAVNGINNYAQKLGHVMTHTSTSTAYMELHSLRSDDTAVYCAKDRHWIWDAPYVWQGTITVSS	WISANTGNGVLAQAFQ	WVQAPQKGLEWNG	LYDLEN	SLTSDTAVYCTAR	DEHWMLEDAFQ	WQGTITVSS
4097	ch1e	EQQLVESGGGVVQVQGHSLRSCAASGPTFSKAWMWVWVQAFGCGLEWVVRHSEKTDGFTDYAAPVYKQPTSSKDSHETLYLQMSLKITPTAVYCTASSMIFPGGVSWEDFWGQGLTVSS	WISANTGNGVLAQAFQ	WVQAPQKGLEWNG	LYDLEN	SLTSDTAVYCTAR	DEHWMLEDAFQ	WQGTITVSS
4356	ch1a	QVQLVQSSSELKHPDASVYKSKASGFTTSYEMNWWVQAPOQLWVWQWNTVYQHTPTAQPTQRYVSELTSTNTALQSSLAEDTAVYCAKDRHWIWDAPYVWQGTITVSS	WISANTGNGVLAQAFQ	WVQAPQKGLEWNG	LYDLEN	SLTSDTAVYCTAR	DEHWMLEDAFQ	WQGTITVSS
2706	RSV-G	EVQLVESGGGVVQVQGHSLRSCAASGPTFSKAWMWVWVQAFGCGLEWVVRHSEKTDGFTDYAAPVYKQPTSSKDSHETLYLQMSLKITPTAVYCTASSMIFPGGVSWEDFWGQGLTVSS	WISANTGNGVLAQAFQ	WVQAPQKGLEWNG	LYDLEN	SLTSDTAVYCTAR	DEHWMLEDAFQ	WQGTITVSS

图1

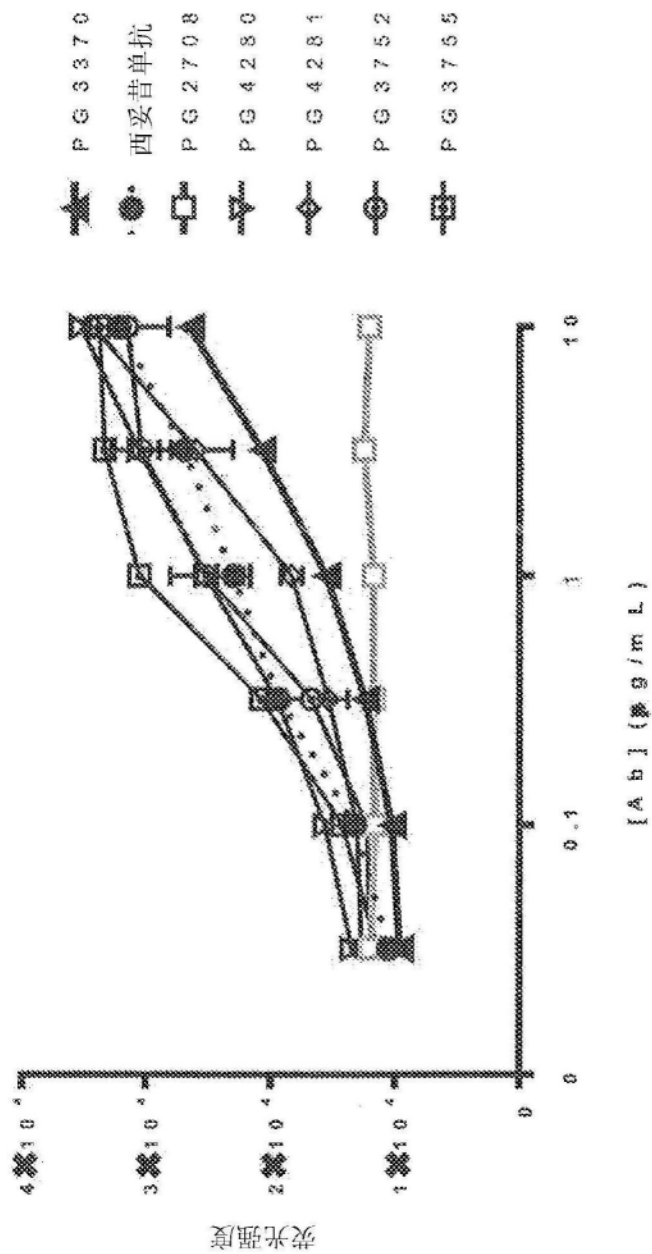


图2

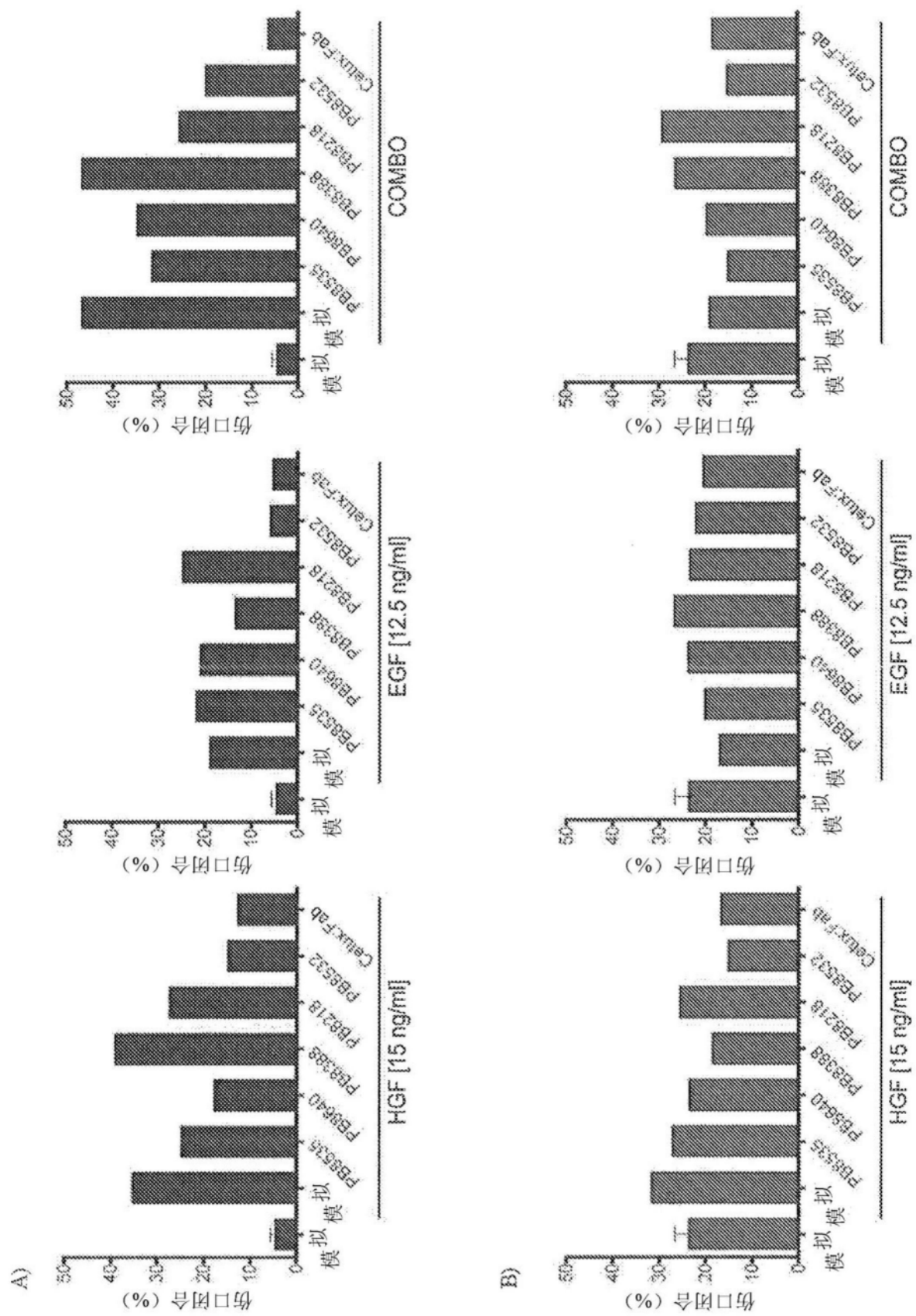


图3

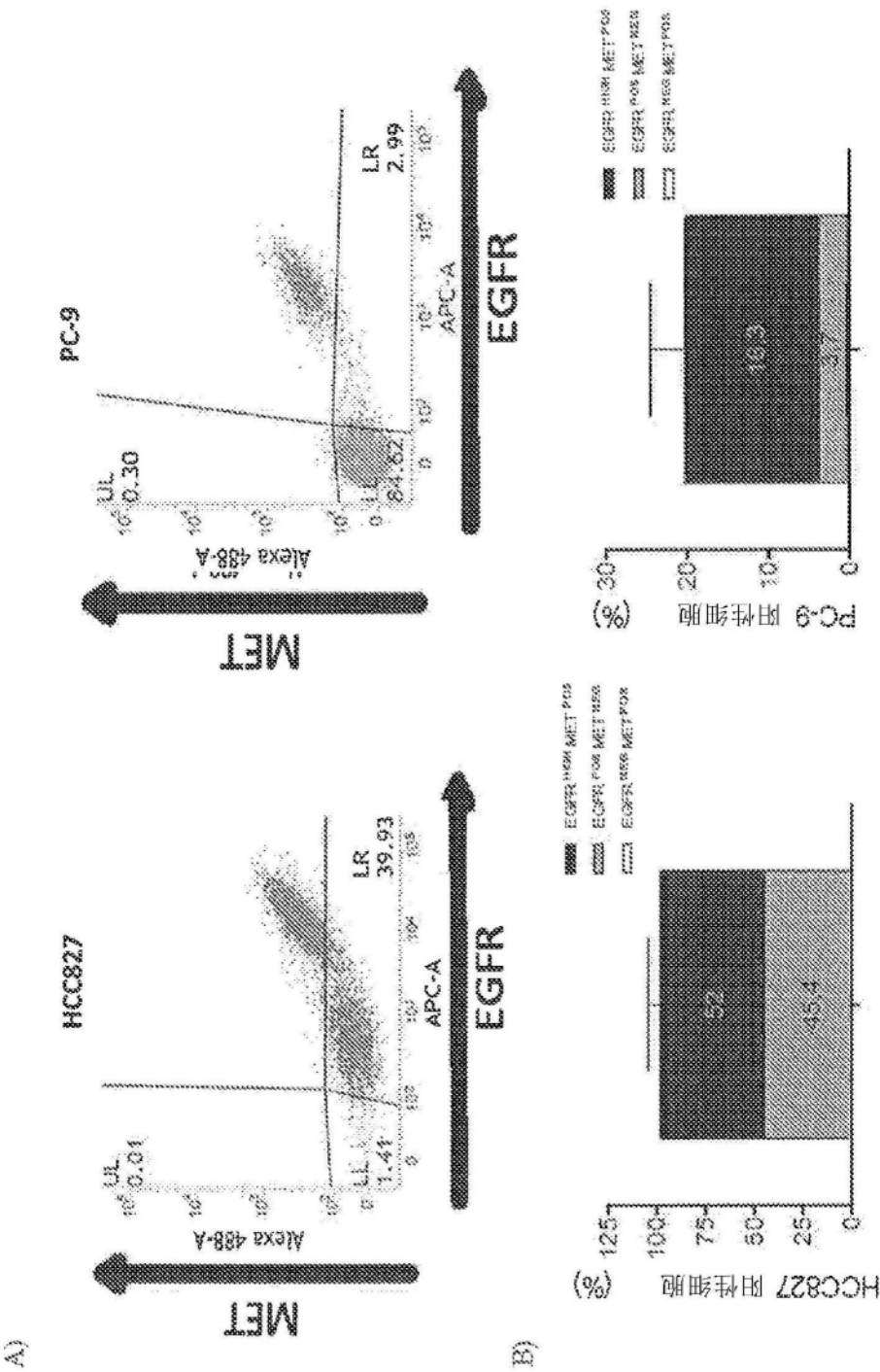


图4

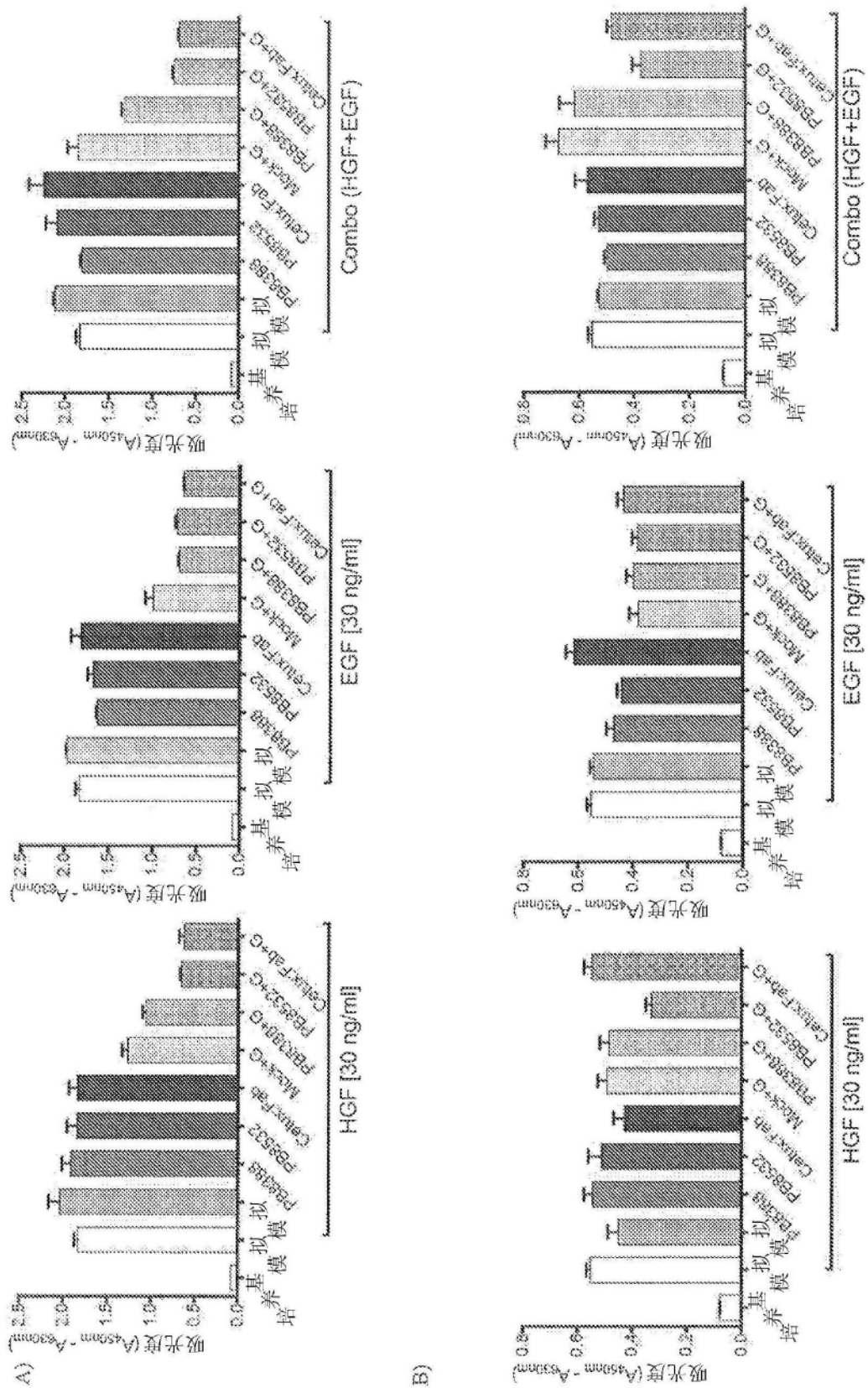


图5

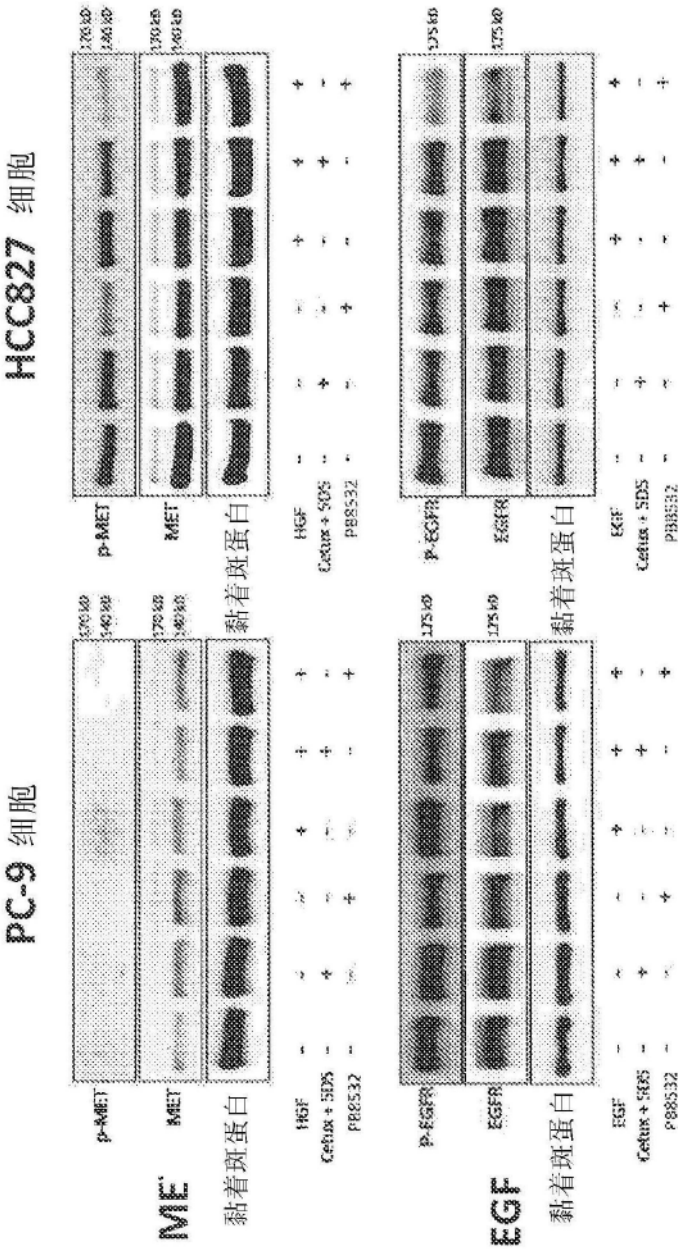


图6

MF3353	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGW
MF8229	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGW
MF8228	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGW
MF3370	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGW
MF8233	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGW
MF8232	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGW
MF3393	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGW
MF8227	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGW
MF8226	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGW

MF3353	ISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDS
MF8229	ISAYNANTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDS
MF8228	ISAYSGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDS
MF3370	ISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAKDR
MF8233	ISAYNANTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAKDR
MF8232	ISAYSGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAKDR
MF3393	ISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGY
MF8227	ISAYNANTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGY
MF8226	ISAYSGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGY

MF3353	YWHWWLGAFDYWGQGTLLVTVSS
MF8229	YWHWWLGAFDYWGQGTLLVTVSS
MF8228	YWHWWLGAFDYWGQGTLLVTVSS
MF3370	HWHWWLDAFDYWGQGTLLVTVSS
MF8233	HWHWWLDAFDYWGQGTLLVTVSS
MF8232	HWHWWLDAFDYWGQGTLLVTVSS
MF3393	LDHWWLGAFDYWGQGTLLVTVSS
MF8227	LDHWWLGAFDYWGQGTLLVTVSS
MF8226	LDHWWLGAFDYWGQGTLLVTVSS

图7

MF8225	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTTYSLNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8243	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTSYAMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8224	QVQLMQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTTYSMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8239	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTDYAMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8242	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTNYAMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8237	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTSFGMSWVRQAPGQGLEWMGW
MF8240	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTTYSMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8234	QVQLVQSGSELEKPGASVKVSCASGYTFISYAMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8245	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTSYAVNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8231	QVQVQSGSEVKKPGASVKVSCASGYTFTTYSMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8247	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTDYAMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8238	QVQLVQSGSELEKPGASVKVSCASGYTFTTYSMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8230	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTTYSMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8248	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTTYAINWVRQAPGQGLEWMGW
MF8246	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTTYAMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8223	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTTYAMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8222	QVELVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTTYSMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8235	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTTYSMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8236	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTTYSMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8241	QVQLVQSGSELEKPGASVKVSCASGYTFTTYSMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8244	QVQLVQSGSELEKPGASVKVSCASGYTFTTYSMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8221	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTDYAMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF4356	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTSYSMNWVRQAPGQGLEWMGW *:::*****;:*****:..****,*****
MF8225	INTYTGNTPTAQQFTGRFVFFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8243	INTNTGNPTAQQFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8224	INTNTGNPTAQQFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8239	INTYTGNTPTAQQFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8242	INTNTGNPTAQQFTGRFVFFLDTSVSTTYLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8237	INTNTGNPTAQQFTGRFVFSLDTSVSTAYLQINSLKAEDTAVYYCARES
MF8240	INTNTGNPTAQQFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLNTEDTAVYYCARET
MF8234	INTYTGNTPTAQQFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8245	INTYTGNTPTAQQFTGRFVFSSDTSVNTAYLQISSLKAEDTAVYYCAPET
MF8231	INTYTGDPITYVQGFGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8247	INTYTGNTPTAQQFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8238	INTYTGSPITYAQQFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAIYYCARET
MF8230	INTYTGDPITYAQQFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8248	INTNTGNPTAQQFTGRFVFSLDTSVSTAHQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8246	INTYTGDPITYAQQFTGRFVFSLDTSVNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8223	INTNTGNPTAQQFTGRFVFSLDTSSTAFQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8222	INTNTGTPTAQQFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8235	INTNTGTPTAQQFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8236	INTYTGNTPTAQQFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSELTEDTAVYYCARET
MF8241	INTYTGSPITYAQQFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8244	INTYTGSPITYAQQFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARET

图8


```

gacatccagatgacccagtcctccatccctccctgtctgcattctgtaggagacagagtcacc
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
atcacttgccggggaagtcagagcatttagcagctacttaattgggtatcagcagaaacca
I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P
gggaaagcccccctaagctccctgatctatgctgcattccagtttgcaaaagtgggggtcccatca
G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S
aggttcagtggtcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagtcctgcaacct
R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
gaagattttgcaacttactactgtccacagagttacagtaacccctccacgcttgggcca
E D F A T Y Y C Q Q S Y S T P P T P G Q
gggaccaaggtggagatcaaa
G T K V E I K

```

图9B

```

cgaactgtgggtgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatct
R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S
gggaactgcctctgttgtgtgctgaataacttctatcccagagaggccaagtcag
G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q
tggaaggtgggataacgcctccatccgggtaactccagagagtggtcacagagcaggac
W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D
agcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgaagctgagcaagcagactacgag
S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E
aaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctgcgcgcgcacaaag
K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K
agcttcaacaggggagagtgtag
S F N R G E C -

```

图9C

```

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPFTFGQTRLEIK

```

图9D

```

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTP

```

图9E

CH1:

```

gctagcaccsaaggccccatoggtcttccccctggcaacctctcccaagagcaacctctggg
A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G
ggcacagcggccctgggctgctgtcaaggactacttccccgaacctggtagcgtgtcg
G T A A L G C L V K D Y E P E P V T V S
tggaaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccccggtgtctacagtcctca
W N S G A L T S G V H T E P A V L Q S S
ggactctactcctcagcagcgtcgtgacccgtgccctccagcagcttgggcacccagacc
G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
tacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacacaaagggtggacaagagagtt
Y I C N V N H K P S N T K V D K R V

```

图10A

铰链:

```

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

```

图10B

CH2:

```

gcacctgaactcctggggggaccgtcagttcttctcttcccccccaaaacccaaggacacc
A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T
ctcatgatctccccgacccctgaggtcacatgcgtgggtggtagcgtgagccacgaagac
L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D
cctgaggtcaagttcaactgggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaag
P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K
ccgcggggaggagcagtagacaacagcacgtacccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcac
P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H
caggactggctgaatggcaaggagtagcaagtgcaagggtctccaacaaagccctcccagcc
Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A
cccatcgagaaaaaccatctccaaagccaaa
P I E K T I S K A K

```

图10C

包含L235G和G236R沉默替换的CH2:

```

gcacctgaactcggcaggggacccgtcagttcttctcttcccccccaaaacccaaggacacc
A P E L L G R G P S V F L F P P K P K D T
ctcatgatctccccgacccctgaggtcacatgcgtgggtggtagcgtgagccacgaagac
L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D
cctgaggtcaagttcaactgggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaag
P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K
ccgcggggaggagcagtagacaacagcacgtacccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcac
P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H
caggactggctgaatggcaaggagtagcaagtgcaagggtctccaacaaagccctcccagcc
Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A
cccatcgagaaaaaccatctccaaagccaaa
P I E K T I S K A K

```

图10D

CH3: DEKK的KK

```

gggcagccccgagaaaccacaggtgtacaccaagcccccatccccggaggagatgaccaag
G Q P R E P Q V Y T K P P S R E E M T K
aaccaggtcagcctgaagtgcctgggtcaaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
N Q V S L K C L V K G F Y P S D I A V E
tgggagagcaaatgggcagccggagaaacaactacaagaccacgcctccccgtgctggactcc
W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S
gacgggtcccttcttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg
D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G
aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgagggtctctgcacaaccactacacgcagaagagc
N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S
ctctccctgtctccgggtga
L S L S P G -

```

图10E

CH3: DEKK的DE

```

gggcagccccgagaaaccacaggtgtacaccgaccccccatccccggaggagatgaccaag
G Q P R E P Q V Y T D P P S R E E M T K
aaccaggtcagcctgacctgcgagggtcaaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
N Q V S L T C E V K G F Y P S D I A V E
tgggagagcaaatgggcagccggagaaacaactacaagaccacgcctccccgtgctggactcc
W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S
gacgggtcccttcttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg
D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G
aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgagggtctctgcacaaccactacacgcagaagagc
N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S
ctctccctgtctccgggtga
L S L S P G -

```

图10F

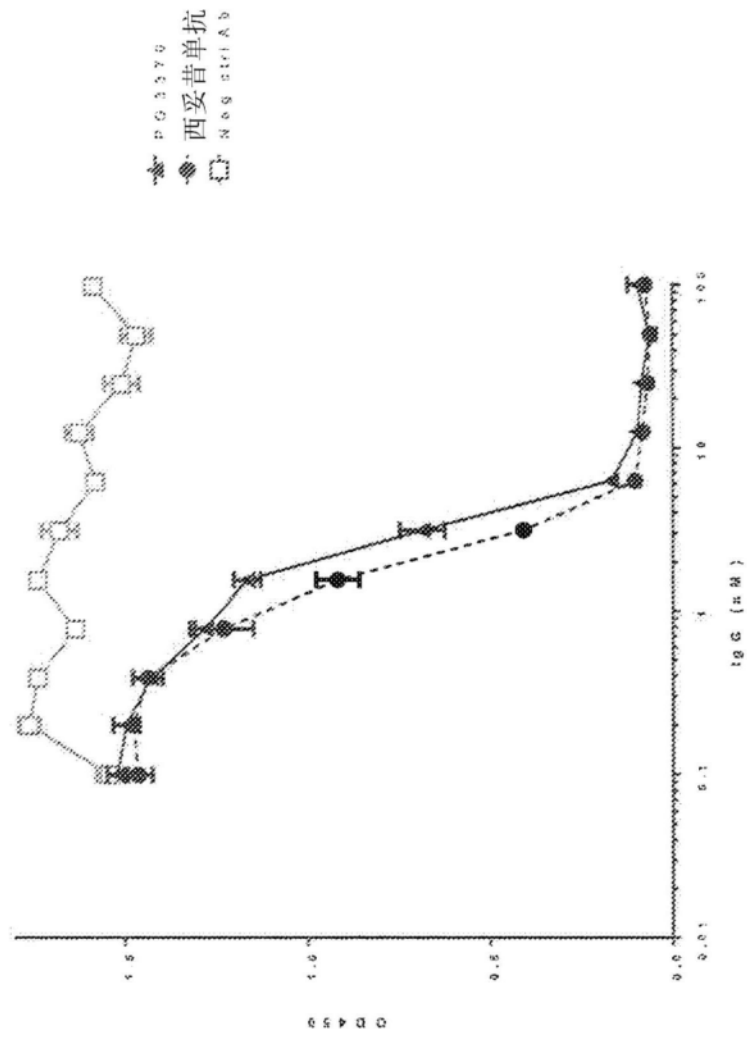


图11

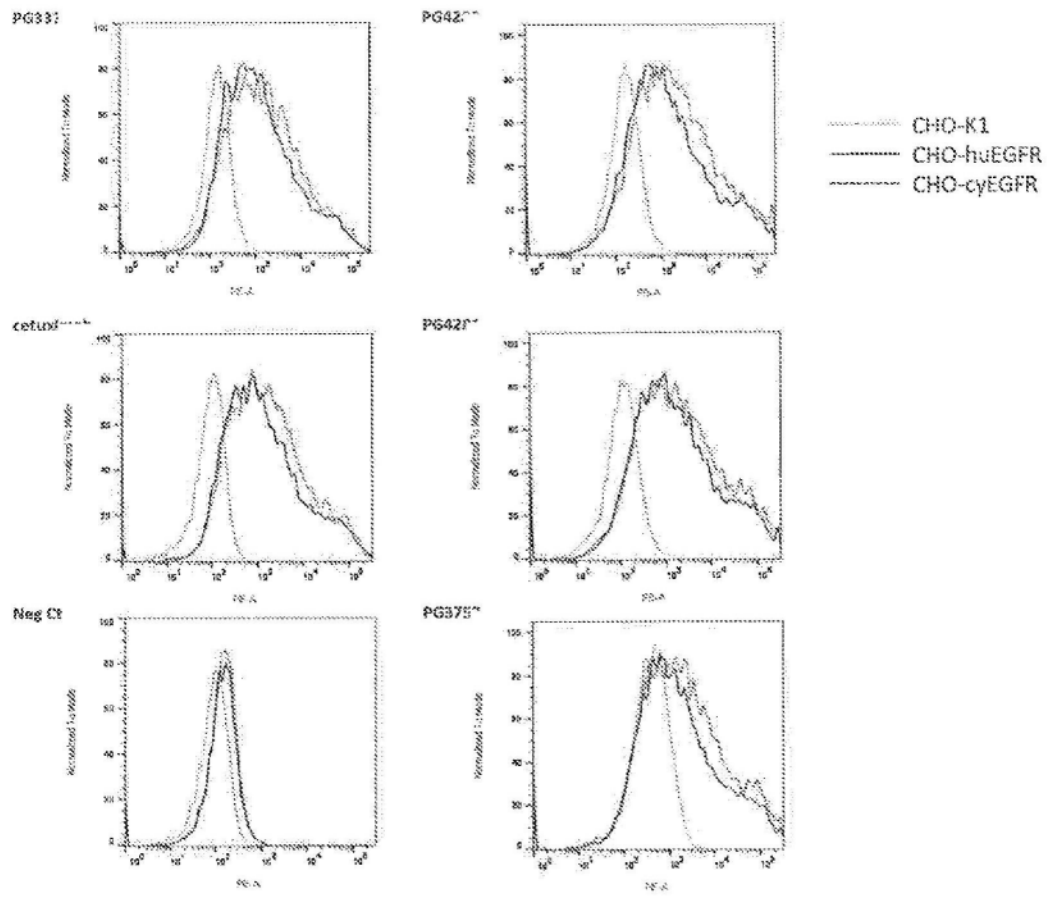


图12

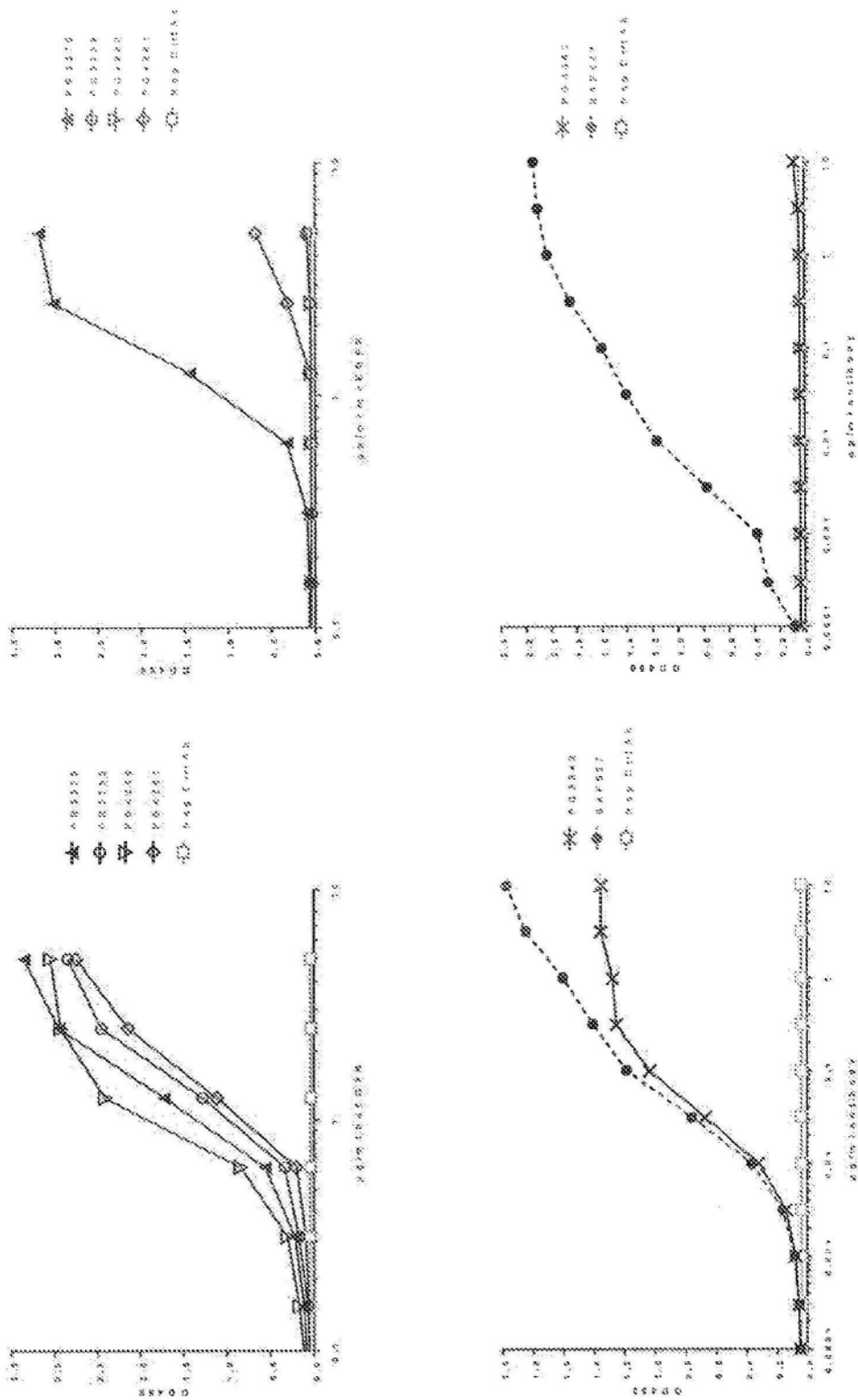


图13

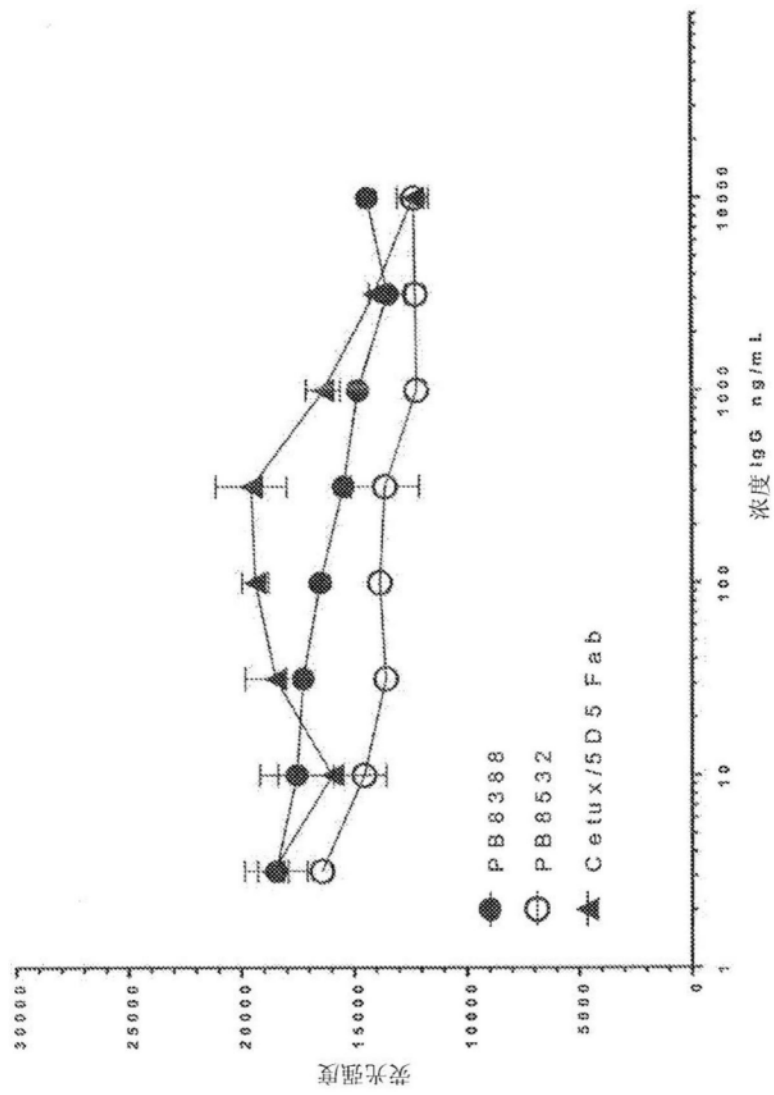


图14A

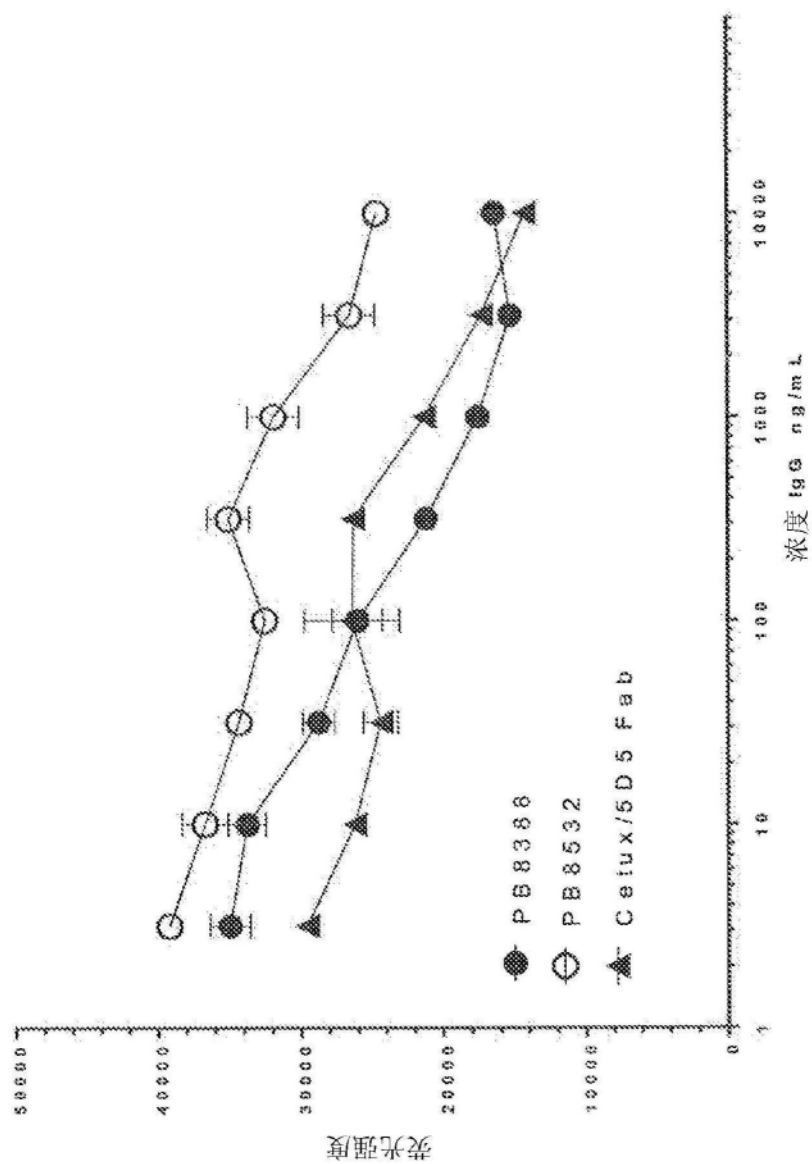


图14B

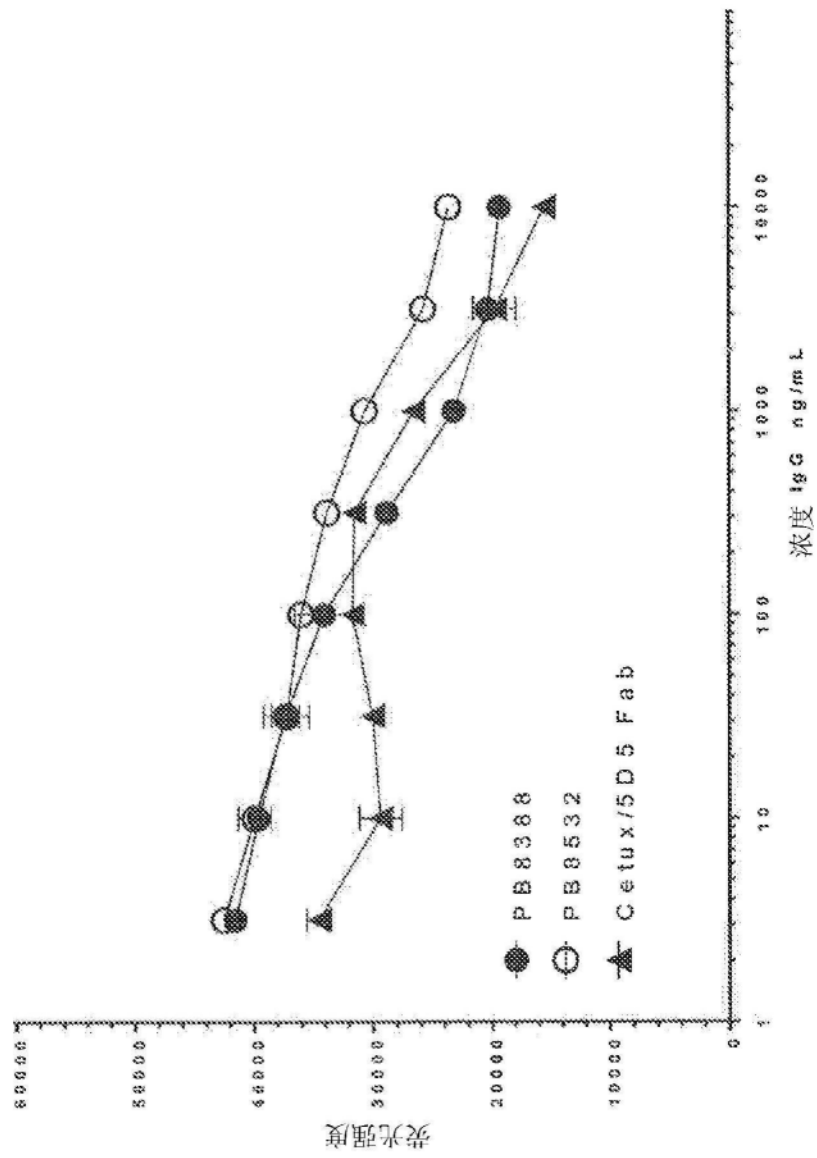


图14C

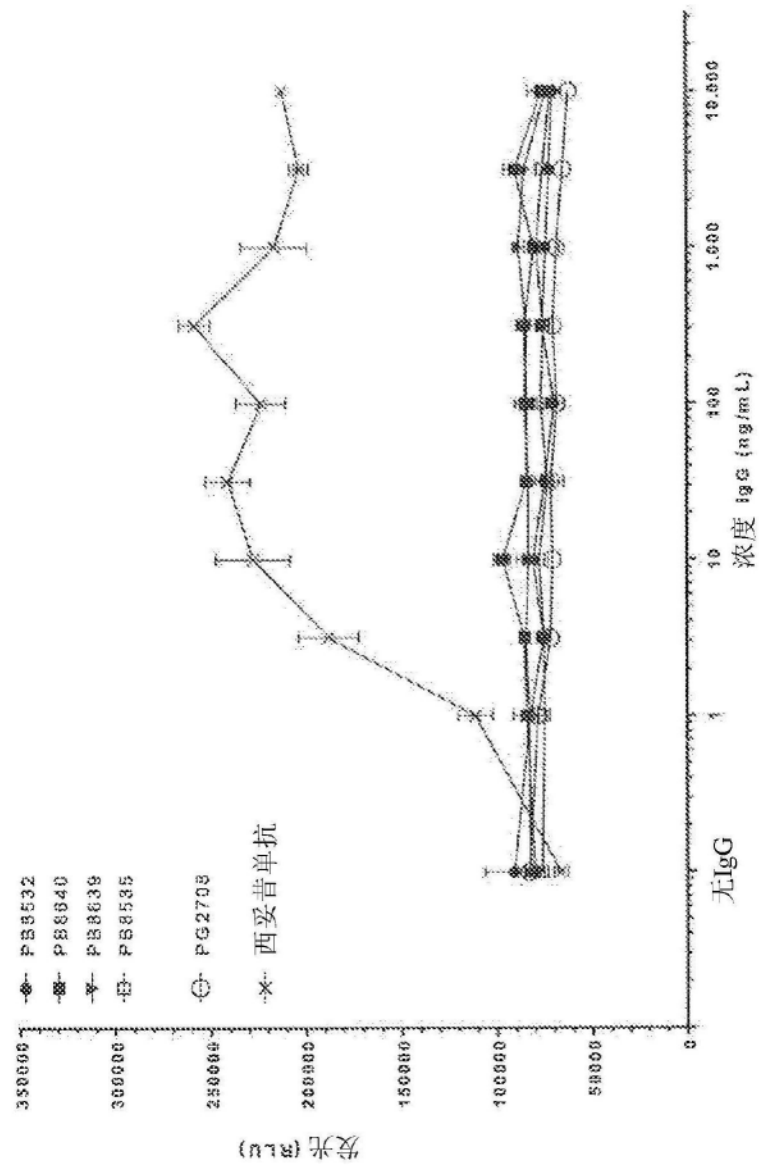


图15A

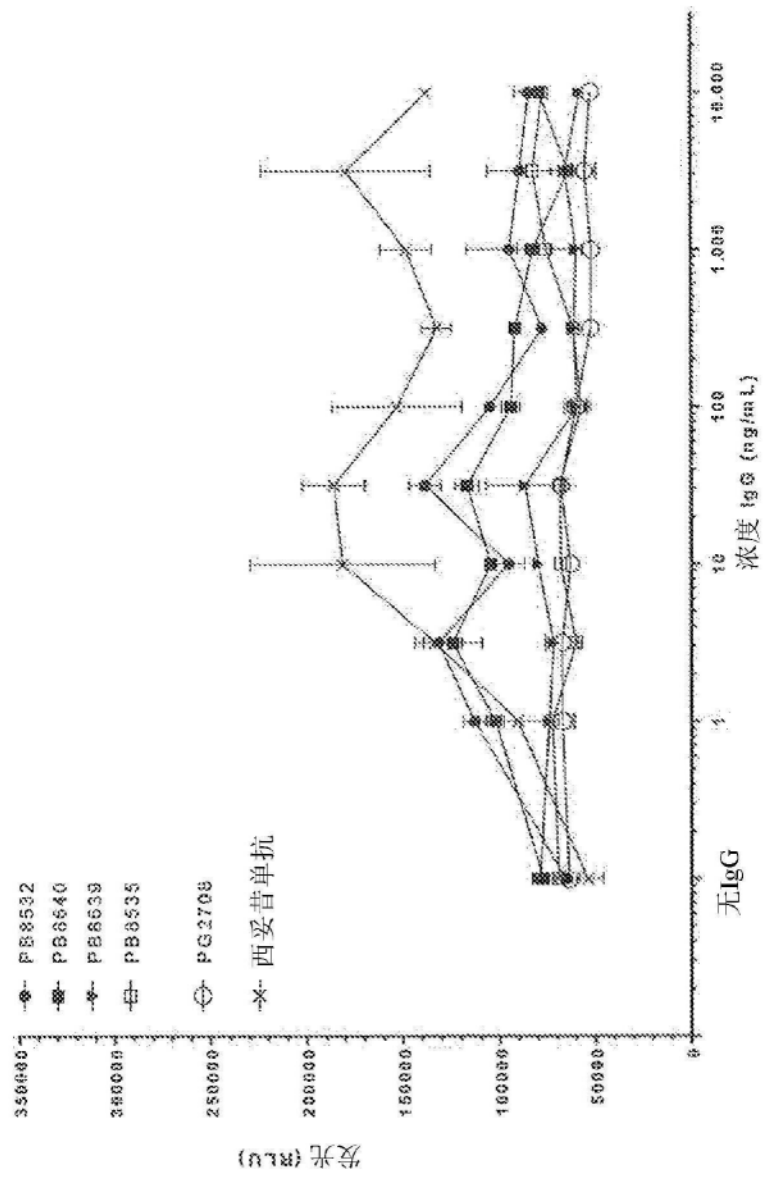


图15B

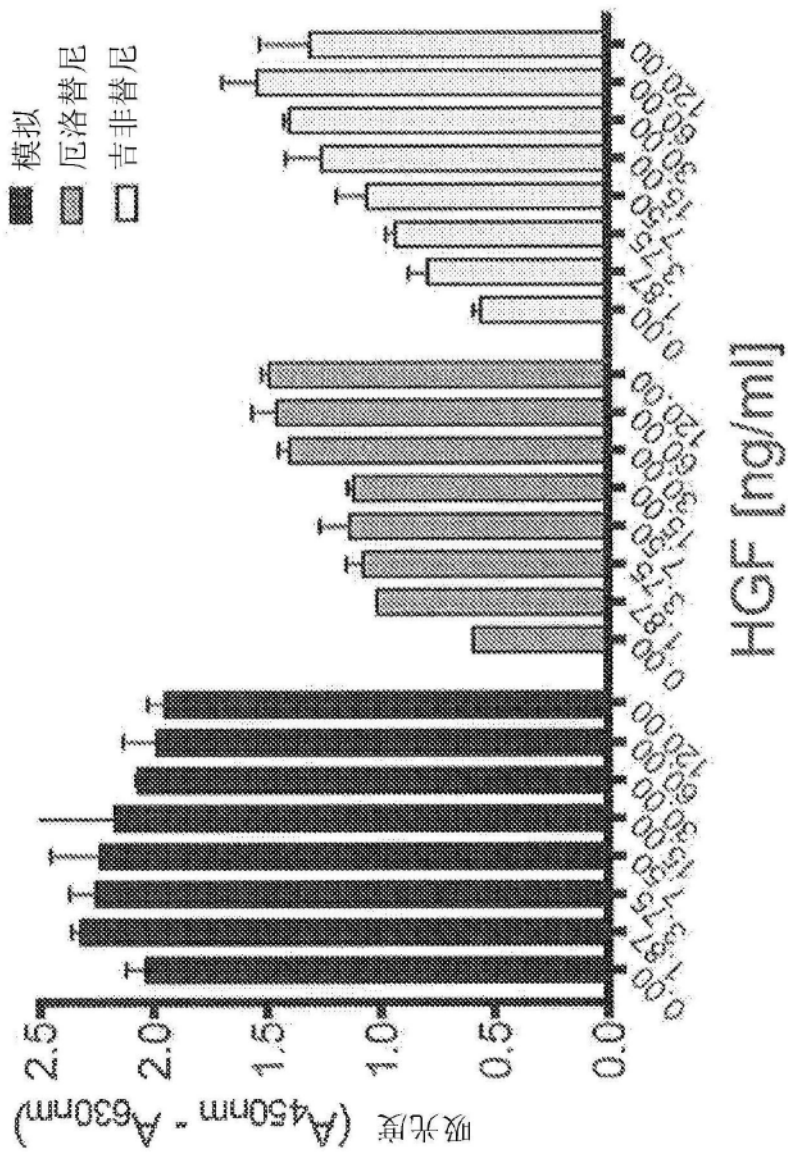


图16A

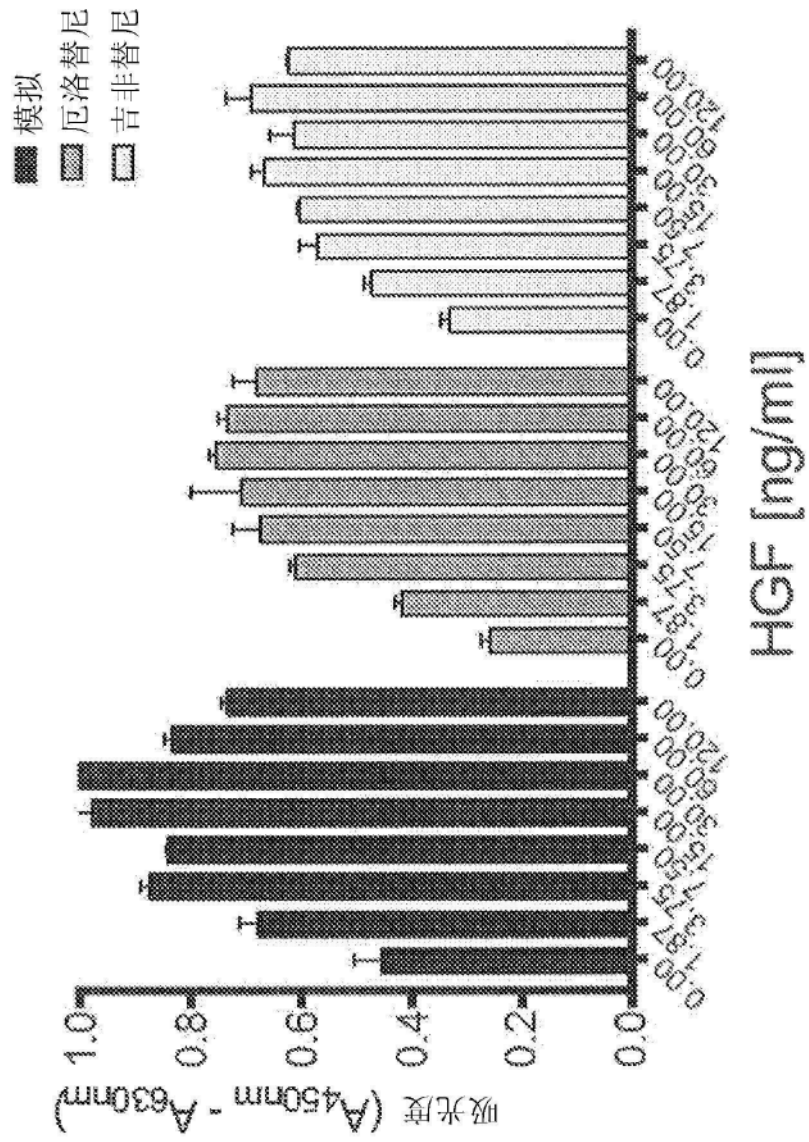


图16B

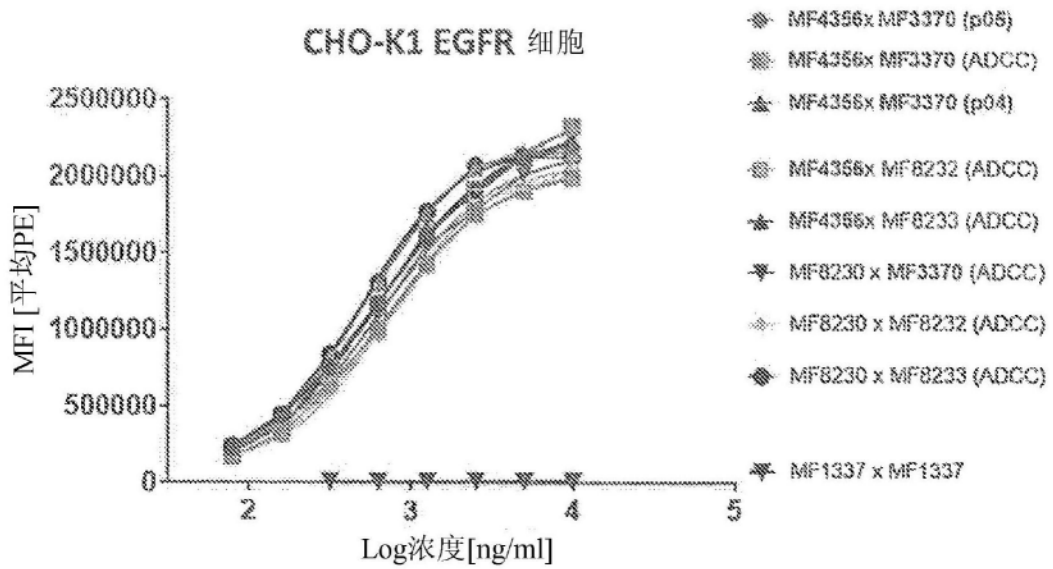


图17A

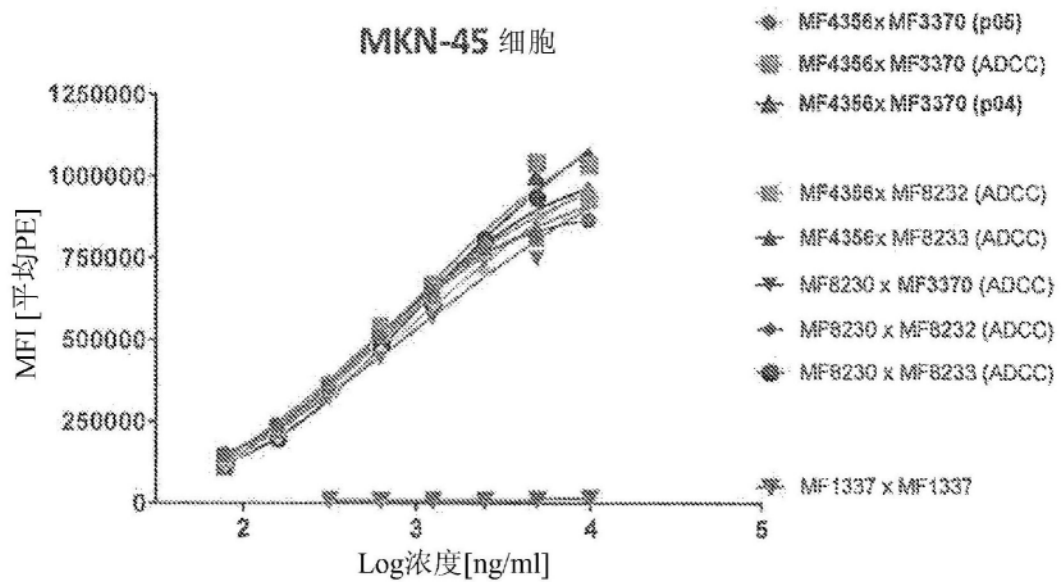


图17B

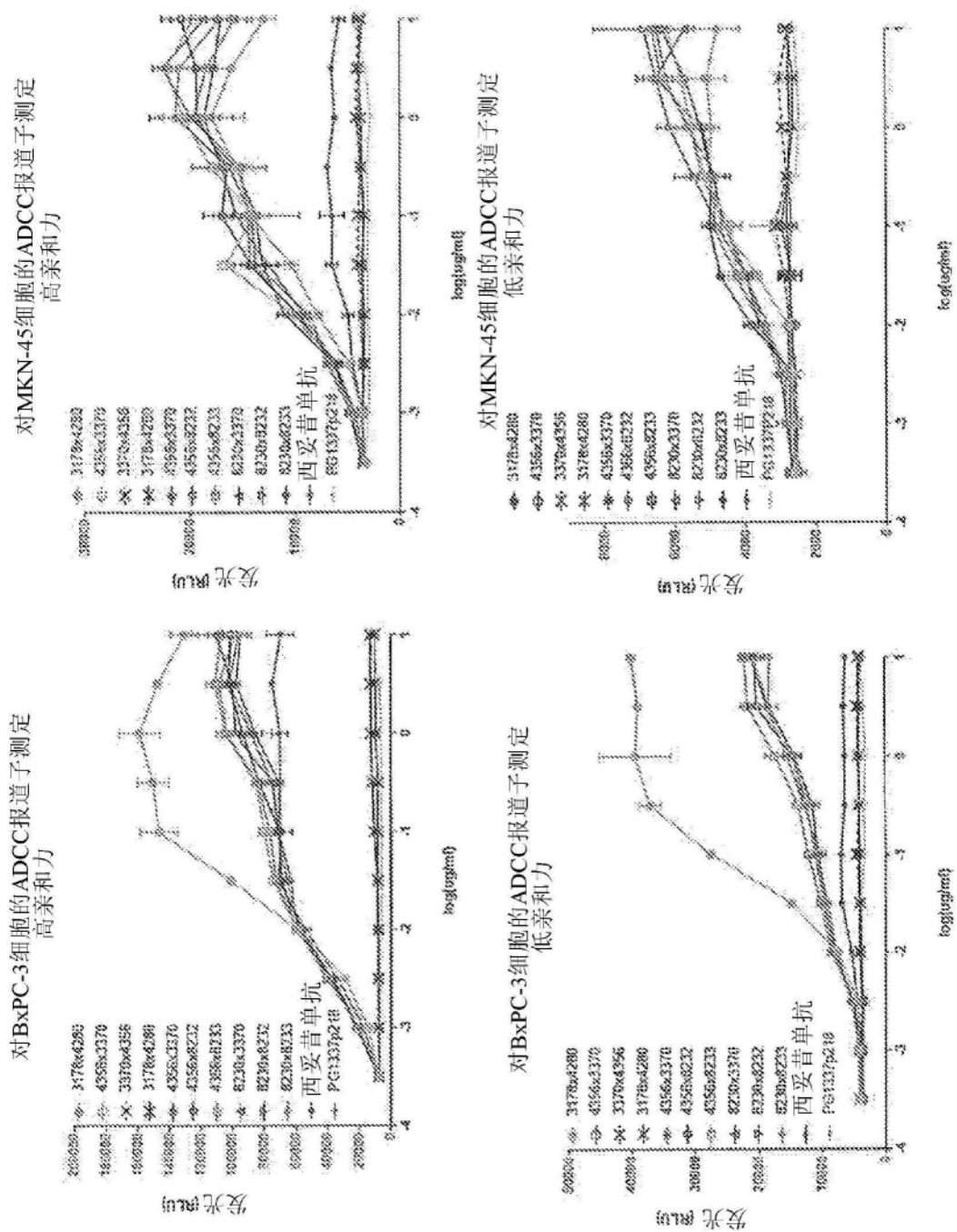


图18

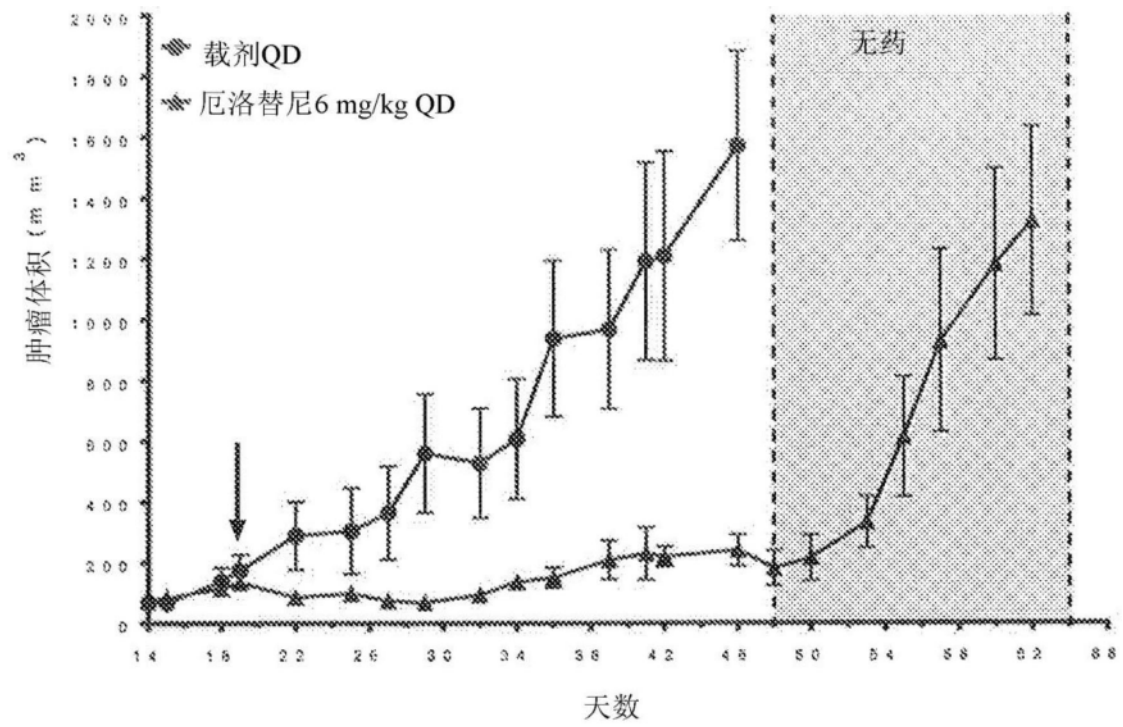


图19

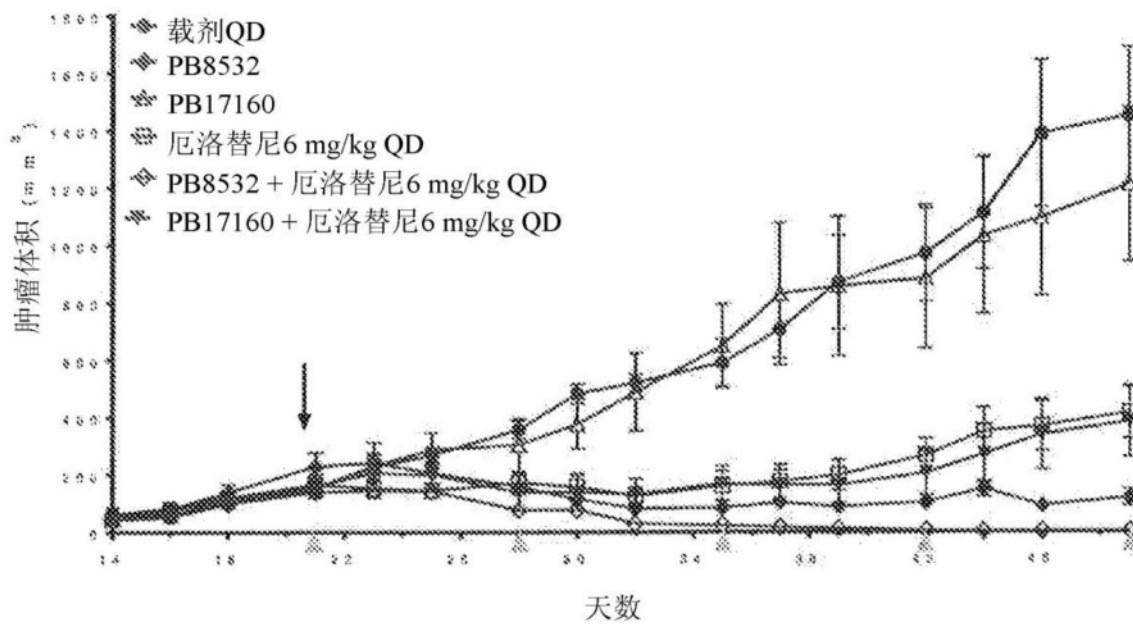


图20

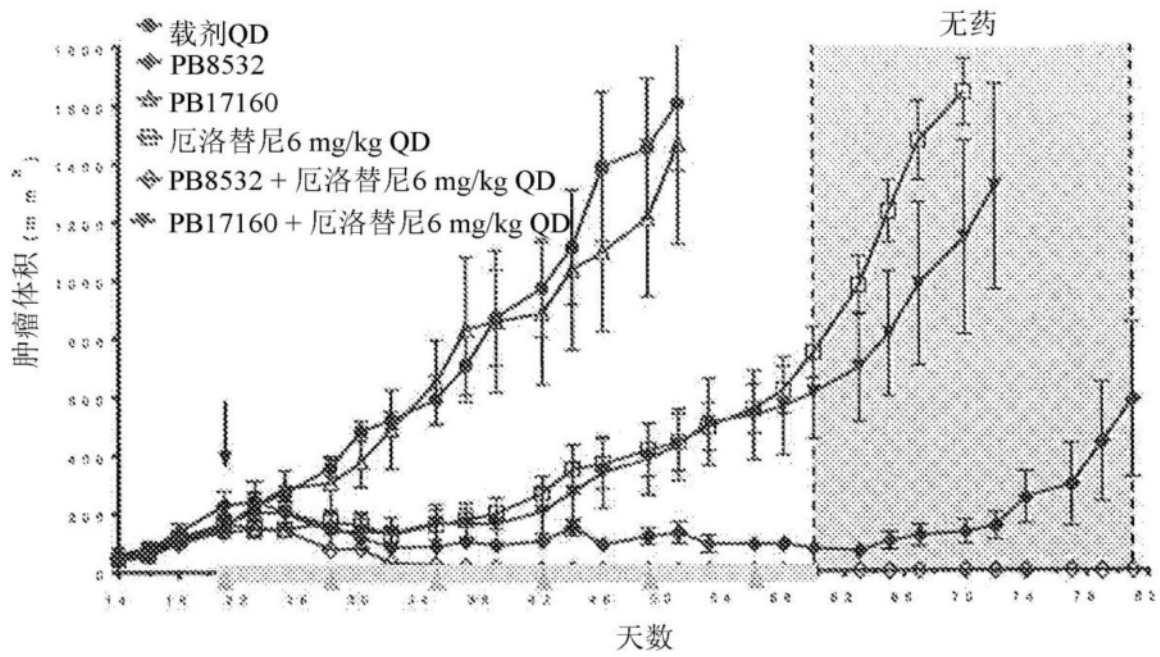


图21

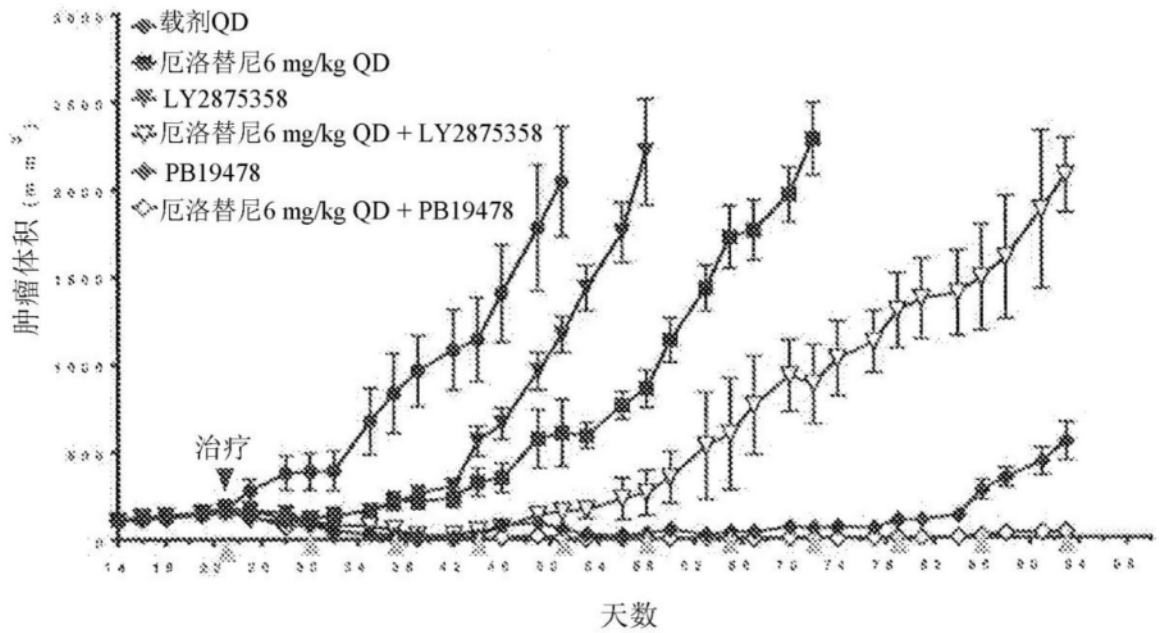


图22

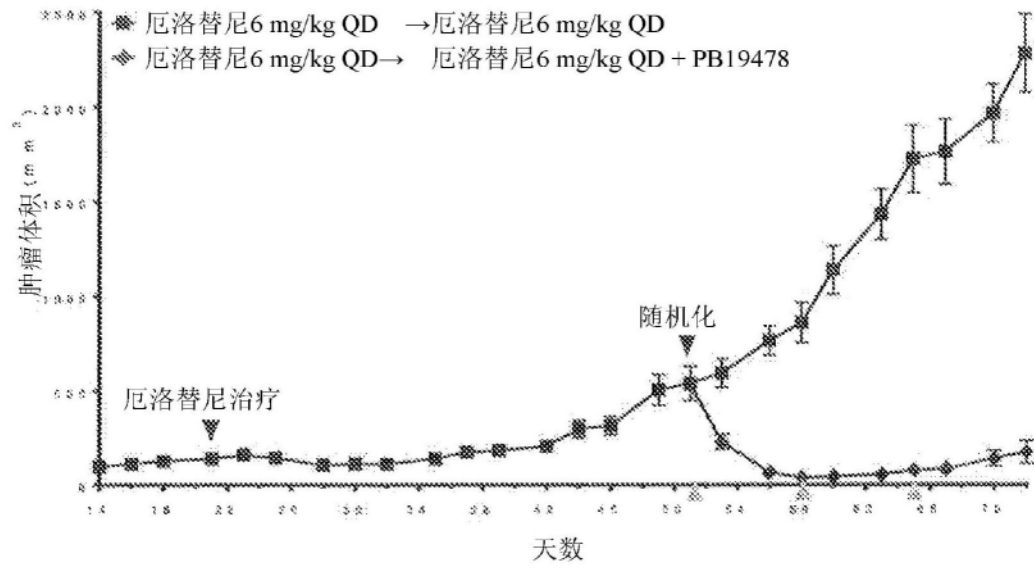


图23