(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119173529 A
(43)申请公布日 2024.12.20

(21)申请号 202380039460.2

(22)申请日 2023.05.11

(30)优先权数据
22172759.7 2022.05.11 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.11.08

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2023/062545 2023.05.11

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/217933 EN 2023.11.16

(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司
地址 瑞士

(72)发明人 罗兰·贝克曼 约尔格·本兹
大卫·贝尔托多
费伊·玛丽·德劳内尔
德里克·费恩斯特拉
塞巴斯蒂安·芬恩
斯特凡·弗罗斯特 马龙·赫那尔
克里斯蒂安·霍博尔特·詹森
丹妮拉·马切科
阿纳斯塔西娅·梅尔
奥利弗·普罗特纳
贾尼娜·斯佩克
帕梅拉·斯特拉斯堡
芭芭拉·玛丽-路易斯·韦瑟
加布里埃拉·维德默

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
专利代理师 高丽娜 张莹

(51)Int.Cl.
*C07K 16/00*(2006.01)
*C07K 16/22*(2006.01)
*C07K 16/24*(2006.01)
*C07K 16/46*(2006.01)

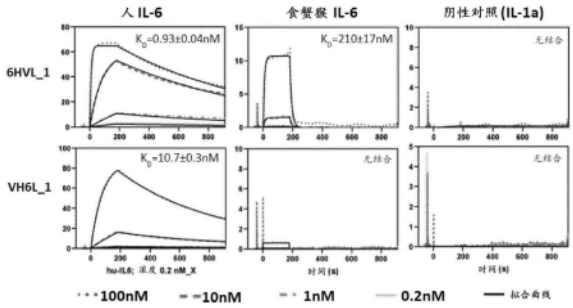
权利要求书1页 说明书55页
序列表（电子公布） 附图21页

(54)发明名称

# 与VEGF-A和IL6结合的抗体及使用方法

(57)摘要

本发明涉及例如呈双特异性Fab片段的形式的抗VEGF-A/抗IL6抗体及其使用方法。




CN 119173529 A

1.一种与人VEGF-A和与人IL6结合的抗体,所述抗体包含:VH结构域,所述VH结构域包含:(a)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR-H1,(b)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR-H2和(c)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR-H3;以及VL结构域,所述VL结构域包含:(d)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR-L1,(e)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR-L2和(f)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR-L3;所述抗体包含:可变重链结构域,所述可变重链结构域包含具有至多5个氨基酸取代的SEQID NO:22的氨基酸序列;以及可变轻链结构域,所述可变轻链结构域包含具有至多5个氨基酸取代的SEQ ID NO:21的氨基酸序列。

2.根据权利要求1所述的抗体,其中所述至多5个氨基酸取代出现在相应可变结构域的FR区中。

3.根据权利要求1或2所述的抗体,其包含SEQ ID NO:22的VH序列和SEQ ID NO:21的VL序列。

4.根据前述权利要求中的一项所述的抗体,其包含SEQ ID NO:24的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:23的轻链氨基酸序列。

5.一种与人VEGF-A和与人IL6结合的抗体,其包含SEQ ID NO:22的VH序列和SEQ ID NO:21的VL序列。

6.一种与人IL6结合的抗体,所述抗体与具有SEQ ID NO:35的VL结构域和SEQ ID NO:36的VH结构域的抗体结合至IL6上的相同表位。

7.根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体为Fab片段。

8.根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体为双特异性抗体片段。

9.一种经分离的核酸,其编码根据权利要求1至8中任一项所述的抗体。

10.一种宿主细胞,其包含根据权利要求9所述的核酸。

11.一种产生与人VEGF-A和与人IL6结合的抗体的方法,所述方法包括培养根据权利要求10所述的宿主细胞,从而产生所述抗体。

12.根据权利要求11所述的方法,其中所述宿主细胞为CHO细胞。

13.一种药物制剂,其包含根据权利要求1至8中任一项所述的抗体以及药用载体。

14.一种输液港递送装置,其包括根据权利要求1至8中任一项所述的抗体。

15.根据权利要求1至8中任一项所述的抗体,其用于作为药物使用。

16.一种输液港递送装置,其包括根据权利要求1至8中任一项所述的抗体或根据权利要求13所述的药物制剂。

# 与VEGF-A和IL6结合的抗体及使用方法

## 技术领域

[0001] 本发明涉及抗VEGF-A/抗IL6抗体及其使用方法。

## 背景技术

[0002] 与VEGF结合的抗体(例如,兰尼单抗)用作用于治疗眼部血管疾病如年龄相关性黄斑变性的治疗剂。与IL6结合的抗体(例如,如WO2014/074905中公开的)已建议用于治疗眼部疾病。

[0003] WO2012/163520公开了在一对VH和VL结构域(“DutaFab”)中包含两个互补位的双特异性抗体。WO2012/163520的双特异性抗体的每个互补位包含来自重链和来自轻链CDR的氨基酸,其中重链CDR-H1和CDR-H3以及轻链CDR-L2促成第一互补位,而轻链CDR-L1和CDR-L3以及重链CDR-H2促成第二互补位。包含各个互补位的单特异性抗体是从不同的Fab文库中独立分离的,Fab文库在第一或第二互补位中均多样化。鉴定所述单特异性抗体的氨基酸序列,并合并成双互补位的VH和VL对。WO2012/163520中公开了一种与VEGF和IL-6特异性结合的示例性Fab片段作为概念证明实例,该片段称为“VH6L”,其具有SEQ ID NO:01的VL序列和SEQ ID NO:02的VH序列。

[0004] 的确需要改善的与VEGF和与IL6结合的治疗性抗体以用于眼部疾病的临床应用,例如,通过改善与标准护理相比的疗效以及通过改善作用的持续时间并继而降低玻璃体内注射的频率以使针对患者的施用负担减小来实现。

## 发明内容

[0005] 本发明涉及双特异性抗VEGF-A/抗IL6抗体及其使用方法。

[0006] 在一方面,本发明涉及一种与人VEGF-A和与人IL6结合的抗体,该抗体包含:VH结构域,该VH结构域包含:(a)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR-H1,(b)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR-H2和(c)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR-H3;以及VL结构域,该VL结构域包含:(d)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR-L1,(e)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR-L2和(f)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR-L3;该抗体包含:可变重链结构域,该可变重链结构域包含具有至多5个氨基酸取代的SEQ ID NO:22的氨基酸序列;以及可变轻链结构域,该可变轻链结构域包含具有至多5个氨基酸取代的SEQ ID NO:21的氨基酸序列。

[0007] 本发明的一个实施例涉及一种与人VEGF-A和与人IL6结合的抗体,该抗体包含SEQ ID NO:22的VH序列和SEQ ID NO:21的VL序列。

[0008] 本发明的一个实施例涉及一种抗体,其包含SEQ ID NO:24的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:23的轻链氨基酸序列。

[0009] 本发明的一个实施例涉及一种与人VEGF-A和与人IL6结合的抗体Fab片段。

[0010] 本发明的一个实施例涉及一种与人VEGF-A和与人IL6结合的双特异性抗体Fab片段。

[0011] 在另一方面,本发明提供了一种与IL6结合的抗体,该抗体与根据本发明的抗体结合至IL6上的相同表位。

[0012] 在另一方面,本发明提供了一种与人IL6结合的抗体,该抗体包含:

[0013] a)基于人VH3框架的VH结构域,其中IL6互补位包含氨基酸残基

[0014] Y1、I2、Q3、Y26、E27、F28、T29、H30、Q31、D32、P52a、R94、I96、D97、F98、D101、T102,以及基于人Vκ1框架的VL结构域,其中IL6互补位包含氨基酸残基Y49、D50、S53、N54、Y55、P56、S57、Y91、Y96;或者

[0015] b)基于人VH3框架的VH结构域,其中IL6互补位包含氨基酸残基Y1、P2、Q3、V26、L27、F28、K29、H30、Q31、D32、P52a、R94、L96、D97、F98、D101、E102,以及基于人Vκ1框架的VL结构域,其中IL6互补位包含氨基酸残基Y49、D50、D53、R54、Y55、P56、E57、Y91、Y96(根据Kabat编号)。

[0016] 在另一方面,本发明提供了一种与IL6结合的抗体,该抗体与具有SEQ ID NO:35的VL结构域和SEQ ID NO:36的VH结构域的抗体结合至IL6上的相同表位。在一个实施例中,抗体包含:具有人VH3框架的VH结构域,其中IL6互补位包含氨基酸残基1、2、3、26、27、28、29、30、31、32、52a、94、96、97、98、101、102;以及具有人Vκ1框架的VL结构域,其中IL6互补位包含氨基酸残基49、50、53、54、55、56、57、91、96。

[0017] 在一方面,本发明提供了一种编码本发明的抗体的经分离的核酸。

[0018] 在一方面,本发明提供了一种包含本发明的核酸的宿主细胞。在一个实施例中,宿主细胞为CHO细胞。在一个实施例中,宿主细胞为大肠杆菌细胞。

[0019] 在一方面,本发明提供了一种包含本发明的核酸的表达载体。

[0020] 在一方面,本发明提供了一种产生与人VEGF-A和与人IL6结合的抗体的方法,该方法包括培养本发明的宿主细胞,从而产生抗体。

[0021] 在一方面,本发明提供了通过本发明的方法产生的抗体。

[0022] 在一方面,本发明提供了一种包含本发明的抗体和药用载体的药物制剂。

[0023] 在一方面,本发明提供了一种包含本发明的抗体和药用载体的预填充注射器。

[0024] 在一方面,本发明提供了一种包含本发明的抗体和药用载体的眼部植入物。在一个实施例中,本发明包括一种输液港(port)递送装置,其包括本发明的抗体。

[0025] 在本发明的一个方面,输液港递送装置施用抗体或药物制剂。

[0026] 在一方面,本发明提供了本发明的抗体,其用于作为药物使用,在一个实施例中,其用于在治疗血管疾病中使用。

[0027] 在一方面,本发明提供了本发明的抗体或本发明的药物组合物在制备药物、在一个实施例中为用于治疗血管疾病的药物中的用途。

[0028] 在一方面,本发明提供了一种治疗患有血管疾病的个体的方法,该方法包括向该个体施用有效量的本发明的抗体或本发明的药物组合物。

[0029] 在一方面,本发明提供了一种抑制个体的血管生成的方法,该方包括向该个体施用有效量的本发明的抗体或本发明的药物组合物以抑制血管生成。

[0030] 根据本发明,提供了一种治疗性抗VEGF-A/抗IL6抗体,即使当以抗体Fab片段形式提供时,该抗体也能够独立地结合其靶抗原。它表现出优异的在药理学相关范围内的与食蟹猴靶标的KD和物种交叉反应性。本发明的抗体适用于眼部血管疾病的治疗。本发明的抗

体提供了几种有价值的特性,包括允许其治疗应用的良好可表达性和可开发性(例如,高结合效力、高生物物理和生物化学稳定性、高浓度制剂),特别是支持低有效剂量的对两个靶标的高亲和力,以及有利于长持续时间的高稳定性。与非抗体方法相比,本发明的抗体由于其高度人性化和缺乏人工结构域和接头而倾向于更容易接受。此外,本发明的抗体有利于以高浓度液体制剂提供,其粘度适合于眼部应用。因为其能以高浓度提供,所以利用本发明的抗体进行治疗对于患者而言更容易接受,因为在一次治疗中可以应用更高剂量的治疗剂,从而允许更长的治疗周期。双特异性Fab片段诸如本发明中描述的双特异性Fab片段由于分子量低得多而具有优于双特异性全长IgG抗体的额外优点。而在提供相同数量的结合位点时,Fab的分子量为约50kDa,全长抗体的重量是Fab的分子量的三倍(约150kDa)。因此,对于给定量的药物,双特异性Fab片段将含有为全长IgG抗体三倍的结合位点。

## 附图说明

[0031] 图1:通过表面等离子体共振确定的亲本双特异性抗体6HVL_1和V6HL_1与人和食蟹猴IL6的结合

[0032] 图2:使用人VEGF-165得到的亲本双特异性抗体6HVL_1和V6HL_1的VEGF IC50

[0033] 图3:通过表面等离子体共振确定的改进的双特异性抗体与人和食蟹猴IL6的结合。

[0034] 图4:使用人VEGF-121和VEGF-165得到的改进的双特异性抗体的VEGF IC50。

[0035] 图5:Fab0182-IL-6复合物的晶体结构。与Fab 0182结合的IL-6结构的总体视图。IL-6呈浅橙色,Fab 0182的轻链和重链分别呈青色和蓝色。

[0036] 图6:Fab 6HVL4.1-IL-6复合物的晶体结构。与Fab 6HVL4.1结合的IL-6结构的总体视图。IL-6呈浅橙色,Fab 6HVL4.1的轻链和重链分别呈小麦色和蓝色。

[0037] 图7:使用固定化抗Fab抗体通过SPR评估的抗VEGF/抗IL-6Fab与其靶标的同时结合

[0038] 图8:使用固定化VEGF-A通过SPR评定的在存在IL-6的情况下,抗VEGF/抗IL-6Fab对VEGF-R2结合的阻断

[0039] 图9:通过基于细胞的IL-6特异性报告基因测定(无预孵育)如下评定VEGF结合对IL6活性的影响

[0040] 图10:通过基于细胞的IL-6特异性报告基因测定(有预孵育)如下评定VEGF结合对IL6活性的影响

[0041] 图11:6HVL_4对HRMEC中IL-6信号传导的抑制

[0042] 图12:6HVL_4对VEGF-A诱导的HUVEC增殖的抑制%的剂量依赖性变化

[0043] 图13:6HVL_4对IL6/IL6R/VEGF诱导的HRMVEC屏障破坏的恢复

[0044] 图14:阿柏西普对IL6/IL6R/VEGF诱导的HRMVEC屏障破坏的恢复

[0045] 图15:所示抗体的VH和VL结构域的氨基酸序列。显示了氨基酸位置的Kabat编号。实例13中鉴定的对IL6互补位有贡献的氨基酸位置由黑框突出显示。

[0046] 图16:IL6/IL6R/gp130复合物的图像(顶部;pdb-acc.#1p9m)与结合至IL6的Fab 0182的结构和来自pdb-acc.1p9m的IL6/IL6R复合物的结构的叠加的比较(底部)。

[0047] 图17:IL6/IL6R/gp130复合物的图像(顶部;pdb-acc.#1p9m)与结合IL6的Fab

6HVL4.1的结构和来自pdb-acc.1p9m的IL6/IL6R复合物的结构的叠加的比较(底部)。

[0048] 图18:研究IL6R当参与和Fab P1AE2421的预先形成的复合物时与IL6结合的能力的SPR桥接实验。

[0049] 图19:研究Fab P1AE2421与人“hyper-IL6”(人IL6和IL6R的嵌合体)结合的能力的SPR结合实验。

[0050] 图20:确定Fab P1AE2421以阻断IL6与IL6R结合的方式与IL6结合的能力的ELISA竞争实验。

[0051] 图21:通过表面等离子体共振确定的IL6结合抗体6HdL2.05与人和食蟹猴IL6的结合

## 具体实施方式

[0052] 1.定义

[0053] 除非本文另有定义,否则与本发明相关的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。此外,除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数,而复数术语应包括单数。本公开的方法和技术通常根据本领域公知的常规方法进行。通常,与本文所述的生物化学、酶学、分子和细胞生物学、微生物学、遗传学以及蛋白质和核酸化学和杂交相关的术语和技术是本领域公知的和常用的。

[0054] 除非本文另有定义,否则术语“包括”应包括术语“由……组成”。

[0055] 如本文结合特定值(例如温度、浓度、时间等)使用的术语“约”应指术语“约”指的特定值的+/-1%的变化。

[0056] 本文的术语“抗体”在最广泛意义上使用并且涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、单特异性和多特异性抗体(例如,双特异性抗体),以及抗体片段,只要它们表现出所需的抗原结合活性即可。

[0057] “分离的”抗体为已从其自然环境的组分中分离的抗体。在一些实施例中,如通过例如电泳(例如,SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳)或色谱(例如,离子交换或反相HPLC)方法确定的,将抗体纯化至大于95%或99%的纯度。关于评定抗体纯度的方法的综述,请参见例如Flatman等人,J.Chromatogr.B 848:79-87(2007)。

[0058] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体,即,除了可能的变体抗体(例如,含有天然存在的突变或在单克隆抗体制剂的生产期间产生,此类变体通常以少量形式存在)之外,包含该群体的个别抗体具有同一性和/或结合相同表位。与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,单克隆抗体制剂中的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。因此,修饰语“单克隆”表示抗体的特征是从基本上同质的抗体群体获得的,并且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。

[0059] 术语“全长抗体”、“完整抗体”及“全抗体”在本文中可互换地用于指代具有基本上类似于天然抗体结构的结构或具有含有如本文所定义的Fc区的重链的抗体。

[0060] 抗体的“类别”是指抗体的重链所具有的恒定结构域或恒定区的类型。存在五大类抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且它们中的一些可以进一步分为亚类(同种型),例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。在某些实施例中,抗体是IgG1同种型。在某些实施例中,抗体是具有P329G、L234A和L235A突变以降低Fc区效应功能的IgG1同种型。在其他实施

例中,抗体是IgG2同种型。在某些实施例中,抗体是在铰链区具有S228P突变的IgG4同种型,以改善IgG4抗体的稳定性。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为α、δ、ε、γ和μ。抗体的轻链基于其恒定结构域的氨基酸序列,可以归属于两种类型中的一种,这两种类型称为卡帕(κ)和兰姆达(λ)。

[0061] 本文的术语"Fc区"用于定义免疫球蛋白重链的C末端区,该C末端区包含恒定区的至少一部分。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。在一个实施例中,人IgG重链Fc区从Cys226或从Pro230延伸至重链的羧基末端。除非本文另外规定,否则Fc区或恒定区中氨基酸残基的编号是根据EU编号系统,EU编号系统也称为EU索引,如在Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991中所述。

[0062] 术语"可变区"或"可变结构域"是指抗体重链或轻链的参与抗体与抗原结合的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为VH和VL)通常具有相似的结构,其中每个结构域包含四个保守框架区(FR)和三个高变区(HVR)(参见,例如,Kindt等人,Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007))。在本发明的抗体中,单一VH结构域和VL结构域对,即同源的VH/VL对,与其两个靶标特异性结合:VEGF-A和IL6。

[0063] "DutaFab"是如WO2012/163520中所公开的双特异性抗体。在DutaFab中,单一VH结构域和VL结构域对与两个不同的表位特异性结合,其中一个互补位包含来自CDR-H2、CDR-L1和CDR-L3的氨基酸残基,另一个互补位包含来自CDR-H1、CDR-H3和CDR-L2的氨基酸残基。DutaFab包含在同源VH/VL对内的两个不重叠的互补位,并且可以同时与两个不同的表位结合。WO2012/163520中公开了DutaFab及其通过筛选包含单特异性Fab片段的文库而产生的方法。

[0064] "人抗体"是这样的抗体,该抗体具有的氨基酸序列对应于由人或人细胞产生的抗体的氨基酸序列,或来源于利用人抗体全套库或其他人抗体编码序列的非人源的抗体的氨基酸序列。人抗体的该定义特别地排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。在本文中从人抗体文库分离出的抗体或抗体片段被认为是人抗体或人抗体片段。

[0065] "人共有框架"是这样的框架,其表示在人免疫球蛋白VL或VH框架序列的选择中最常存在的氨基酸残基。一般而言,人免疫球蛋白VL或VH序列的选择来自于可变结构域序列的亚组。一般而言,序列的亚组是如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,NIH Publication 91-3242,Bethesda MD(1991),第1至3卷中的亚组。在一个实施例中,对于VL,该亚组是如Kabat等人(出处同上)中的亚组κI。在一个实施例中,对于VH,该亚组是如Kabat等人(出处同上)中的亚组III。

[0066] "抗体片段"是指除了完整抗体以外的分子,该分子包含完整抗体的一部分,该部分结合完整抗体所结合的抗原。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')2;双体抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如scFv);以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0067] 如本文可互换使用的,"互补位"或"抗原结合位点"是指识别并结合抗原的抗体的一部分。互补位是由来自抗体重链和轻链可变结构域中排列的几个单个氨基酸残基形成的,这些残基在Fv区的三级结构中空间邻近排列。本发明的抗体包含在一个同源的VH/VL对中的两个互补位。

[0068] 如本文所用,“VEGF-A互补位”是与VEGF-A结合的互补位或抗原结合位点。本发明的抗体的VEGF-A互补位包含来自抗体的CDR-H2、CDR-L1和CDR-L3的氨基酸残基。

[0069] 如本文所用,“IL6互补位”是与IL6结合的互补位或抗原结合位点。本发明的抗体的IL6互补位包含来自抗体的CDR-H1、CDR-H3和CDR-L2的氨基酸残基。

[0070] 除非另外指明,否则如本文所用的术语“血管内皮生长因子”(缩写为“VEGF”)是指来自任何脊椎动物来源的任何天然VEGF,该脊椎动物来源包括哺乳动物(诸如灵长类动物(例如,人))和啮齿动物(例如,小鼠和大鼠)。该术语涵盖“全长”的未加工VEGF,以及通过细胞中加工产生的任何形式的VEGF。该术语还涵盖VEGF的天然存在的变体,例如剪接变体或等位基因变体。示例性人VEGF的氨基酸序列示出于SEQ ID NO:27中。

[0071] 术语“抗VEGF-A抗体”和“与VEGF-A结合的抗体”是指这样的抗体,其能够以足够的亲和力与抗VEGF-A结合,使得抗体可用作靶向VEGF-A的诊断和/或治疗剂。在一个实施例中,例如通过表面等离子体共振(SPR)测量的,抗VEGF-A抗体与不相关的、非VEGF-A蛋白的结合程度小于抗体与VEGF-A的结合的约10%。在某些实施例中,与VEGF-A结合的抗体具有1nM、≤0.1nM或≤0.01nM的解离常数(KD)。当抗体的$K_D$为1μM或更小时,则称该抗体“特异性结合”VEGF-A。

[0072] 除非另外指明,否则如本文所用的术语“白介素-6”(缩写为“IL6”)是指来自任何脊椎动物来源的任何天然IL6,该脊椎动物来源包括哺乳动物(诸如灵长类动物(例如,人))和啮齿动物(例如,小鼠和大鼠)。该术语包括“全长”的未加工IL6,以及通过细胞中加工产生的任何形式的IL6。该术语还涵盖IL6的天然存在变体,例如剪接变体或等位基因变体。示例性人IL6的氨基酸序列示出于SEQ ID NO:28中。

[0073] 本发明的抗体“同时与人VEGF-A和人IL6结合”,这意味着(a)与人IL6结合的本发明的抗体Fab片段(也)与人VEGF-A特异性结合,和(b)与人VEGF-A结合的本发明的抗体Fab片段(也)与人IL6特异性结合。可以用本领域已知的方法(例如通过本文所述的表面等离子体共振)评估同时结合。

[0074] 如本文所用,术语“互补决定区”或“CDR”是指抗体可变结构域的每个区域,其在序列上是高变的并且包含抗原接触残基。通常,抗体包含六个CDR;三个在VH结构域中(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3),并且三个在VL结构域中(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3)。除非另有说明,否则可变结构域中的CDR残基和其他残基(例如FR残基)根据Kabat编号系统在本文中编号(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991)。

[0075] 如本文所用,“框架”或“FR”是指除CDR残基以外的可变结构域氨基酸残基。可变结构域的框架通常由以下四个框架结构域组成:FR1、FR2、FR3和FR4。因此,CDR和FR氨基酸序列通常在(a)VH结构域中以以下序列出现:FR1—CDR-H1—FR2—CDR-H2—FR3—CDR-H3—FR4;在(b)VL结构域中:FR1—CDR-L1—FR2—CDR-L2—FR3—CDR-L3—FR4。

[0076] “亲和力”是指分子(例如,抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另有说明,否则如本文所用,“结合亲和力”是指内在结合亲和力,其反映了结合对的成员(例如,抗体和抗原)之间的1:1相互作用。分子X对其配偶体Y的亲和力一般可以由解离常数($K_D$)表示。亲和力可以通过本领域已知的常规方法测量,包括本文所述的那些方法。本文将描述用于测量结合亲和力的具体说明性和示例性

实施例。

[0077] 术语“表位”表示抗体结合的蛋白质或非蛋白质抗原上的位点。表位既可以由连续的氨基酸伸长段(线性表位)形成,也可以通过包含非连续的氨基酸(构象表位)形成,例如由于抗原折叠,即由于蛋白质抗原的三级折叠而在空间上接近。在蛋白质抗原暴露于变性剂后,线性表位通常仍被抗体结合,而构象表位通常在用变性剂处理后被破坏。表位包含独特的立体构象中的至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个或8至10个氨基酸。

[0078] 抗体结合的筛选可以使用本领域常规的方法进行,例如但不限于丙氨酸扫描、肽印迹(参见Meth.Mol.Biol.248(2004)443-463)、肽切割分析、表位切除,表位提取、抗原的化学修饰(参见Prot.Sci.9(2000)487-496)和交叉阻断(参见“Antibodies”,Harlow和Lane(Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harb.,NY)。

[0079] 基于抗原结构的抗体谱分析(ASAP),也被称为修饰辅助谱分析(MAP),允许基于来自众多抗体的每种抗体和化学或酶修饰的抗原表面的结合谱,将多种与VEGF-A或IL6特异性结合的单克隆抗体分类(参见例如US2004/0101920)。每个组中的抗体结合相同的表位,该表位可以是独特的表位,该独特的表位与另一个组所代表的表位明显不同或部分重叠。

[0080] 此外,竞争性结合可以用于容易地确定抗体是否与本发明的参考抗体结合相同的VEGF-A或IL6表位,或者竞争以结合本发明的参考抗体。例如,作为参考抗体的“与VEGF-A和IL6上的相同表位结合的抗体”是指在各自的竞争测定中将参考抗体与其抗原的结合阻断50%或更多的抗体,并且相反,参考抗体在各自的竞争测定中将抗体与其抗原的结合阻断了50%或更多。同样例如,为了确定抗体是否与参考抗体结合相同的表位,使参考抗体在饱和条件下与VEGF-A或IL6结合。在除去过量的参考抗体之后,评估所讨论的抗体与VEGF-A或IL6结合的能力。如果所讨论抗体在参考抗体饱和结合之后能够与VEGF-A或IL6结合,则可以得出结论,所讨论的抗体与参考抗体结合不同的表位。但是,如果所讨论的抗体在参考抗体饱和结合之后不能与VEGF-A或IL6结合,则所讨论的抗体可以与参考抗体结合相同的表位。为了确认所讨论的抗体是与同一表位结合还是由于空间原因而使其受阻,可以使用常规实验(例如,使用ELISA、RIA、表面等离子体共振、流式细胞术或任何其他本领域可获得的定量或定性的抗体结合测定法进行的肽突变和结合分析)。该测定应以两种设置进行,即,两种抗体均为饱和抗体。如果在两种设置中,只有第一(饱和)抗体能够与VEGF-A或IL6结合,则可以得出结论,所讨论的抗体和参考抗体竞争以与VEGF-A或IL6的结合。

[0081] 在一些实施例中,如在竞争性结合测定中测量的,如果一种抗体1、5、10、20或100倍过量抑制另一种抗体的结合至少50%、至少75%、至少90%或甚至99%或更高,则认为两种抗体结合相同或重叠的表位(参见例如Junghans等人,Cancer Res.50(1990)1495-1502)。

[0082] 在一些实施例中,如果抗原中减少或消除一种抗体的结合的基本上所有氨基酸突变也减少或消除另一种抗体的结合,则认为两种抗体结合相同的表位。如果只有一种减少或消除一种抗体结合的氨基酸突变的子集减少或消除另一种抗体的结合,则两种抗体被认为具有“重叠表位”。

[0083] 相对于参照多肽序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”被定义为在比对候选序列与参考多肽序列并引入空位(如果必要的话)以实现最大的序列同一性百分比之后,并且出于比对的目的在不考虑将任何保守取代作为序列同一性的组成部分的情况下,候选序列

中的氨基酸残基与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比的比对可以通过本领域技术范围内的各种方式实现,例如使用公众可获得的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、Clustal W、Megalign(DNASTAR)软件或FASTA程序包。本领域技术人员可确定用于比对序列的适当参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。可替代地,可以使用序列比较计算机程序ALIGN-2来生成同一性百分比值。ALIGN-2序列比较计算机程序由基因泰克公司编写,并且源代码已经与用户文档一起提交到U.S.Copyright Office,Washington D.C.,20559,在那里以美国版权登记号TXU510087注册,并且在WO 2000/005319中有所描述。

[0084] 然而,除非另有说明,否则出于本文的目的,用BLOSUM50比较矩阵,使用FASTA包第36.3.8c版或更高版本的ggsearch程序生成氨基酸序列同一性%的值。FASTA程序包由W.R.Pearson和D.J.Lipman(1988),"Improved Tools for Biological Sequence Analysis",PNAS 85:2444-2448;W.R.Pearson(1996)"Effective protein sequence comparison"Meth.Enzymol.266:227-258;以及Pearson等人(1997)Genomics 46:24-36创作并且可从www.fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_down.shtml或www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta公开获得。可替代地,可以使用可在fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/index.cgi处访问的公共服务器来比较序列,使用ggsearch(全局蛋白质:蛋白质)程序和默认选项(BLOSUM50;开放:-10;ext:-2;Ktup=2)来确保执行全局而非局部比对。在输出比对标头中给出氨基酸同一性百分比。

[0085] 术语"核酸分子"或"多核苷酸"包括包含核苷酸聚合物的任何化合物和/或物质。每个核苷酸由碱基组成,特别是嘌呤或嘧啶碱基(即胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U))、糖(即脱氧核糖或核糖)和磷酸酯基团。通常,核酸分子通过碱基序列进行描述,其中所述碱基代表核酸分子的一级结构(线性结构)。碱基序列通常表示为从5'至3'。在本文中,术语核酸分子涵盖脱氧核糖核酸(DNA)(包括例如互补DNA(cDNA)和基因组DNA)、核糖核酸(RNA)(特别是信使RNA(mRNA))、DNA或RNA的合成形式,以及包含这些分子中的两种或更多种的混合聚合物。核酸分子可以是线性的或环状的。此外,术语核酸分子包括有义链和反义链,以及单链和双链形式。此外,本文所描述的核酸分子可含有天然存在的或非天然存在的核苷酸。非天然存在的核苷酸的实例包括具有衍生化的糖或磷酸主链键或经化学修饰的残基的经修饰的核苷酸碱基。核酸分子还涵盖适合作为用于本发明的抗体的体外和/或体内(例如,在宿主或患者体内)直接表达的载体的DNA和RNA分子。此类DNA(例如cDNA)或RNA(例如mRNA)载体可以是未修饰的或经修饰的。举例而言,可以对mRNA进行化学修饰以增强RNA载体的稳定性和/或编码分子的表达,使得可以将mRNA注射到受试者体内以在体内产生抗体(参见例如Stadler等人,Nature Medicine 2017,在线发表于2017年6月12日,doi:10.1038/nm.4356或EP 2 101 823 B1)。

[0086] "分离的"核酸是指已从其自然环境的组分中分离的核酸分子。经分离的核酸包括这样的核酸分子,其包含在通常含有核酸分子的细胞中,但该核酸分子存在于染色体外或与其天然染色体位置不同的染色体位置处。

[0087] "编码抗体的分离的核酸"是指编码抗体重链和轻链(或其片段)的一个或多个核酸分子,包括在单一载体或不同的载体中的此类核酸分子,以及存在于宿主细胞中一个或多个位置的此类核酸分子。

[0088] 如本文所用的术语“载体”是指能够载运与其相连的另一核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体,以及并入其已被引入的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与其可操作地连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。

[0089] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,并且是指外源核酸已被引入其中的细胞,包括此类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化细胞”,其包括原代转化细胞和来源于该原代转化细胞的子代,不考虑传代次数。子代可能不与亲本细胞的核酸内容物完全一致,而是可能含有突变。本文包括如在原始转化细胞中筛选或选择的具有相同功能或生物活性的突变子代。

[0090] 术语“药物组合物”或“药物配制物”是指处于允许包含在其中的活性成分的生物活性有效的形式,并且不含对于将被施用该药物组合物的受试者具有不可接受的毒性的附加组分的制剂。

[0091] “药用载体”是指药物组合物或制剂中除活性成分之外的成分,其对受试者是无毒的。药用载体包括但不限于缓冲液、赋形剂、稳定剂,或防腐剂。

[0092] 药剂(例如药物组合物)的“有效量”是指能够以必需的剂量在必需的时段内有效地实现期望的治疗或预防结果的量。

[0093] “个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯养的动物(例如牛、绵羊、猫、犬和马)、灵长类动物(例如人和非人灵长类动物,诸如猴)、兔以及啮齿类动物(例如小鼠和大鼠)。在某些实施例中,该个体或受试者为人。

[0094] 如本文所用,“治疗(treatment)”(及其语法变体诸如治疗(treat)或治疗(treating))是指试图改变所治疗个体的疾病的自然病程,并且可以执行以用于预防或可以在临床病理学过程中执行的临床干预措施。治疗的期望效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、减轻症状、削弱疾病的任何直接或间接病理学后果、预防转移、降低疾病进展的速率、改善或减轻疾病状态,以及缓解或改善预后。在一些实施例中,本发明的抗体用于延迟疾病的发展或减缓疾病的进展。

[0095] 如本文所用,术语“眼部疾病”包括与病理性血管生成和/或萎缩相关的任何眼部疾病。眼部疾病的特征可以在于新血管改变或不受调节的增殖和/或侵袭到诸如视网膜或角膜的眼部组织的结构中。眼部疾病的特征可以是视网膜组织(感光器和下面的视网膜色素上皮(RPE)和脉络膜毛细血管)萎缩。非限制性眼病包括例如AMD(例如,湿性AMD、干性AMD、中度AMD、晚期AMD和地图状萎缩(GA))、黄斑变性、黄斑水肿、DME(例如,局部、非中心性DME以及弥漫性、涉及中心的DME)、视网膜病变、糖尿病性视网膜病变(DR)(例如,增生性DR(PDR)、非增生性DR(NPDR)和高海拔DR)、其他与缺血有关的视网膜病变、ROP、视网膜静脉闭塞(RVO)(例如中心(CRVO)和分支(BRVO)形式)、CNV(例如近视CNV)、角膜新生血管形成、与角膜新生血管形成相关的疾病、视网膜新生血管形成、与视网膜/脉络膜新生血管形成相关的疾病、中心浆液性视网膜病变(CSR)、病理性近视、希佩尔-林道综合征、眼睛组织胞浆菌病、FEVR、冠茨病、诺里病、与骨质疏松症-假性神经胶质瘤综合征(OPPG)相关的视网膜异常、结膜下出血、红肿、眼部新血管病、新生血管性青光眼、色素性视网膜炎(RP)、高血压性视网膜病变、视网膜血管瘤增生、黄斑毛细血管扩张、虹膜新生血管形成、眼内新生血管形成、视网膜变性、囊状黄斑水肿(CME)、血管炎、乳头水肿、视网膜炎(包括但不限于CMV视网膜炎)、眼黑色素瘤、视网膜母细胞瘤、结膜炎(例如,传染性结膜炎和非感染性(例如过敏性

结膜炎))、利伯先天性黑蒙(也称为雷氏黑蒙或LCA)、葡萄膜炎(包括感染性和非感染性葡萄膜炎)、脉络膜炎(例如多灶性脉络膜炎)、眼组织胞浆菌病、睑缘炎、干眼症、眼外伤、干燥疾病和其他眼科疾病(其中该疾病与眼新血管生成、血管渗漏和/或视网膜水肿或视网膜萎缩有关)。另外的示例性眼部疾病包括视网膜分裂症(视网膜神经感觉层的异常分裂)、与虹膜红变相关的疾病(角部新生血管形成)以及由纤维血管或纤维组织的异常增生引起的疾病,包括所有形式的增生性玻璃体视网膜病变。与角膜新生血管形成相关的示例性疾病包括但不限于流行性角膜结膜炎、维生素A缺乏症、接触镜过度症、特应性角膜炎、上缘性角膜炎、翼状胬肉干燥性角膜炎、干燥综合征、酒渣鼻痤疮、小水疱病、梅毒、分枝杆菌感染、脂质变性、化学灼伤、细菌性溃疡、真菌性溃疡、单纯疱疹病毒感染、带状疱疹感染、原生动物感染、卡波西肉瘤、蚕蚀性角膜溃疡、Terrien角膜边缘变性、边缘性角膜溶解、类风湿性关节炎、系统性狼疮、多发性动脉硬化、创伤、韦格纳氏结节病(Wegener's sarcoidosis)、巩膜炎、史提芬强生症候群、放射状角膜切开术和角膜移植排斥。与脉络膜新生血管形成和视网膜脉管系统缺陷有关的示例性疾病(包括血管渗漏增加、动脉瘤和毛细血管脱落)包括但不限于糖尿病性视网膜病变、黄斑变性、镰状细胞性贫血、结节病、梅毒、弹力纤维性假黄瘤、佩吉特氏病、静脉阻塞、动脉阻塞、颈动脉阻塞性疾病、慢性葡萄膜炎/玻璃体炎、分枝杆菌感染、莱姆病、系统性红斑狼疮、早产儿视网膜病变、视网膜水肿(包括黄斑水肿)、伊尔斯氏病、白塞氏病、感染引起的视网膜炎或脉络膜炎(例如多焦点脉络膜炎)、推测的眼组织胞浆菌病、贝斯特氏病(玻璃体黄斑变性)、近视、视神经凹陷、睫状体平坦部炎、视网膜脱离(例如慢性视网膜脱落)、高黏度综合征、弓形体病、创伤和激光后并发症。与视网膜组织(光感受器和底层RPE)萎缩相关的示例性疾病包括但不限于萎缩性或非渗出性AMD(例如,地图状萎缩或晚期干性AMD)、黄斑性萎缩(例如,与新血管生成和/或地图状萎缩相关的萎缩)地理萎缩)、糖尿病性视网膜病变、斯特格氏病、眼底营养不良、视网膜分裂症和色素性视网膜炎。

[0096] 术语"包装插页"用于指治疗产品的商业包装中通常包括的说明书,其含有涉及此类治疗产品的使用的有关适应证、用法、剂量、施用、组合疗法、禁忌和/或警告的信息。

[0097] 2.具体实施方式

[0098] 一方面,本发明部分基于提供用于治疗应用的双特异性抗体。在某些方面,提供了与人VEGF-A和人IL6结合的抗体。本发明的抗体可用于例如治疗血管疾病,例如眼部血管疾病。

[0099] A.与人VEGF-A和人IL6结合的示例性抗体

[0100] 在一个方面,本发明提供了与人VEGF-A和人IL6结合的抗体。在一个方面,提供了与人VEGF-A和人IL6结合的分离的抗体。在一个方面,本发明提供了与人VEGF-A和人IL6特异性结合的抗体。

[0101] 在某些方面,提供了一种与人VEGF-A和与人IL6结合的抗体,其中该抗体包含在VL结构域和VH结构域的一个同源对内的VEGF-A互补位(即与VEGF-A结合的抗原结合位点)和IL6互补位(即与IL6结合的抗原结合位点),其中

[0102] ●其中该VEGF-A互补位包含来自该抗体的CDR-H2、CDR-L1和CDR-L3的氨基酸残基,其中该IL6互补位包含来自该抗体的CDR-H1、CDR-H3和CDR-L2的氨基酸残基;和/或

[0103] ●IL6互补位包含来自抗体的CDR-H2、CDR-L1和CDR-L3的氨基酸残基,其中VEGF-A

互补位包含来自抗体的CDR-H1、CDR-H3和CDR-L2的氨基酸残基;

[0104] ●所述可变轻链结构域和可变重链结构域对与人VEGF-A和人IL6同时结合;和/或

[0105] ●所述抗体与具有SEQ ID NO:22的可变重链结构域和SEQ ID NO:

[0106] 21的可变轻链结构域的抗体相比,结合至人VEGF-A上的相同表位和与人IL6上的相同表位;和/或

[0107] ●该抗体的抗体Fab片段与以下项结合:(i)人VEGF-A121,其中

[0108] 通过表面等离子体共振测量的$K_D$小于50pM,和(ii)人IL6,其中通过表面等离子体共振测量的$K_D$小于50pM;和/或

[0109] ●该抗体的抗体Fab片段表现出60℃或更高、在一些实施例中为70℃或更高的聚集起始温度;和/或

[0110] ●该抗体的抗体Fab片段表现出通过动态光散射测量的大于80℃的解链温度。

[0111] 在另一方面,本发明提供了一种与人VEGF-A和与人IL6结合的抗体,该抗体包含:VH结构域,该VH结构域包含:(a)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR-H1,(b)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR-H2和(c)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR-H3;以及VL结构域,该VL结构域包含:(d)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR-L1,(e)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR-L2和(f)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR-L3;该抗体包含:(a)VH结构域,该VH结构域包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列;和(b)VL结构域,该VL结构域包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0112] 在另一方面,本发明提供了一种与人VEGF-A和与人IL6结合的抗体,该抗体包含:(a)VH结构域,该VH结构域包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列;和(b)VL结构域,该VL结构域包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0113] 在另一方面,本发明提供了一种与人VEGF-A和与人IL6结合的抗体,该抗体包含:(a)VH结构域,该VH结构域包含具有至多15个、至多10个或至多5个氨基酸取代的SEQ ID NO:22的氨基酸序列;和(b)可变轻链结构域,该可变轻链结构域包含具有至多15个、至多10个或至多5个氨基酸取代的SEQ ID NO:21的氨基酸序列。

[0114] 在另一方面,本发明提供了一种与人VEGF-A和与人IL6结合的抗体,该抗体包含:VH结构域,该VH结构域包含:(a)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR-H1,(b)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR-H2和(c)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR-H3;以及VL结构域,该VL结构域包含:(d)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR-L1,(e)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR-L2和(f)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR-L3,该抗体包含:(a)VH结构域,该VH结构域包含具有至多15个、至多10个或至多5个氨基酸取代的SEQ ID NO:22的氨基酸序列;和(b)可变轻链结构域,该可变轻链结构域包含具有至多15个、至多10个或至多5个氨基酸取代的SEQ ID NO:21的氨基酸序列。

[0115] 在一方面,本发明提供了一种与人VEGF-A和与人IL6结合的抗体,该抗体包含:VH结构域,该VH结构域与SEQ ID NO:22的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。在某些方面,具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VH序列相对于参考序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失,但是包含该VH序列的与人VEGF-A和人IL6结合的抗体保留了与人VEGF-A和人IL6结合的能力。在某些方面,在SEQ ID NO:22中,总共有至多10个氨基酸已被取代、插入和/或缺失。在某些方面,取代、插入或缺失发生在CDR之外的区域(即,在FR中)。在特定方面,VH包含:(a)CDR-H1,其包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列,(b)CDR-H2,其包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列和(c)CDR-H3,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列。

[0116] 在一方面,本发明提供了一种与人VEGF-A和与人IL6结合的抗体,该抗体包含:VL结构域,该VL结构域与SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。在某些方面,具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VL序列相对于参考序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失,但是包含该VL序列的与人VEGF-A和人IL6结合的抗体保留了与人VEGF-A和人IL6结合的能力。在某些方面,在SEQ ID NO:21中,总共有至多10个氨基酸已被取代、插入和/或缺失。在某些方面,取代、插入或缺失发生在CDR之外的区域(即,在FR中)。在特定方面,VL包含:(d)CDR-L1,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的,(e)CDR-L2,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列和(f)CDR-L3,其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0117] 在另一方面,提供了一种与人VEGF-A和人IL6结合的抗体,其中该抗体包含如以上提供的任何方面中的VH序列和如以上提供的任何方面中的VL序列。在一个方面,抗体分别包含SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:21中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。

[0118] 在另一方面,提供了一种与人VEGF-A和人IL6结合的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:24的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:23的轻链氨基酸序列。

[0119] 在本发明的其他方面,根据上述方面中任一者的与人VEGF-A和人IL6结合的抗体是单克隆抗体。在一个方面,与人VEGF-A和人IL6结合的抗体是抗体片段,例如,Fv、Fab、Fab'、scFv、双抗体或$F(ab')_2$片段。在另一方面,抗体为全长抗体。

[0120] 在另一方面,本发明提供了一种与IL6结合的抗体,该抗体源自本发明的抗体。针对本发明的抗体公开的IL6互补位可以用于提供其他抗体,例如,与IL6和另一抗原结合的单特异性抗体或双特异性抗体。经由x射线晶体学鉴定本文公开的抗体6HVL4.1的IL6互补位(实例13)。抗体6HVL4.1基于具有人VH3框架的VH结构域以及具有人Vκ1框架的VL结构域。包含抗体6HVL4.1的IL6互补位的抗体与IL6上的相同表位结合。本文针对与人VEGF-A和人IL6结合的本发明的抗体公开的所有实施例也适用于与IL6结合的抗体。

[0121] 因此,在一个实施例中,本发明提供了一种与人IL6结合的抗体,该抗体包含:

[0122] c)基于人VH3框架的VH结构域,其中IL6互补位包含氨基酸残基Y1、I2、Q3、Y26、E27、F28、T29、H30、Q31、D32、P52a、R94、I96、D97、F98、D101、T102,以及基于人Vκ1框架的VL结构域,其中IL6互补位包含氨基酸残基Y49、D50、S53、N54、Y55、P56、S57、Y91、Y96;或者

[0123] d)基于人VH3框架的VH结构域,其中IL6互补位包含氨基酸残基Y1、P2、Q3、V26、L27、F28、K29、H30、Q31、D32、P52a、R94、L96、D97、F98、D101、E102,以及基于人Vκ1框架的VL结构域,其中IL6互补位包含氨基酸残基Y49、D50、D53、R54、Y55、P56、E57、Y91、Y96(根据

Kabat编号)。

[0124] 在另一方面,本发明提供了一种与IL6结合的抗体,该抗体与具有SEQ ID NO:35的VL结构域和SEQ ID NO:36的VH结构域的抗体结合至IL6上的相同表位。在一个实施例中,抗体包含具有人VH3框架的VH结构域,其中IL6互补位包含本发明的与人VEGF-A和IL6结合的抗体的氨基酸残基1、2、3、26、27、28、29、30、31、32、52a、94、96、97、98、101、102;以及具有人Vκ1框架的VL结构域,其中IL6互补位包含本发明的与人VEGF-A和IL6结合的抗体的氨基酸残基49、50、53、54、55、56、57、91、96。

[0125] 在一个实施例中,与如上所述的IL6结合的所述抗体是与IL6和另一靶标结合的多特异性抗体。

[0126] 在其他方面,根据上述方面中任一者的与人VEGF-A和人IL6结合的抗体或者根据上述方面中任一者的与人IL6结合的抗体可以单独或组合地结合特征中的任一者,如以下第1至5节中所述:

[0127] 1.抗体亲和力

[0128] 在某些实施例中,本文提供的抗体以≤1nM、≤0.1nM或≤0.01nM的解离常数(KD)与VEGF-A结合。在优选的实施例中,本文提供的抗体以≤10pM、在优选的实施例中≤5pM的解离常数(KD)与人VEGF-A结合。在优选的实施例中,本文提供的抗体以≤10pM、在优选的实施例中≤5pM的解离常数(KD)与人VEGFA-121结合。在优选的实施例中,本文提供的抗体以≤10pM、在优选的实施例中≤5pM的解离常数(KD)与人VEGFA-165结合。

[0129] 在某些实施例中,与IL6结合的抗体具有≤1nM、≤0.1nM或≤0.03nM的解离常数($K_D$)。在优选实施例中,本文提供的抗体以解离常数($K_D$)≤10pM、在优选实施例中≤5pM与人IL6结合。在一方面,$K_D$使用表面等离子体共振测定、在一个实施例中为BIACORE®表面等离子体共振测定来测量。

[0130] 在另一方面,使用KinExA测定法测量$K_D$。在一个实施例中,使用KinExA测定法在下文材料和一般方法部分所述的用于检测VEGF-A结合的$K_D$或用于检测IL6结合的$K_D$的条件下测量$K_D$。

[0131] 例如,抗体与VEGF-A结合的$K_D$在使用来自Sapidyne Instruments(Boise,ID)的KinExA 3200仪器的测定中测量,PMMA珠根据KinExA手册方案(吸附涂层,Sapidyne)使用1ml PBS(pH 7.4)中的30μg抗VEGF抗体MAB293(R&D)以抗原涂布。KinExA平衡测定在室温下使用含0.01%BSA及0.01%Tween20的PBS pH 7.4作为运行缓冲液进行,样品和珠在LowCross缓冲液(Candor Bioscience)中制备。使用0.25ml/分钟的流速。用被测抗体滴定恒定量的VEGFA-121-His(50pM以及在第二实验中为500pM),并使平衡的混合物透过KinExA系统中的抗VEGF抗体(Mab293)偶联珠的管柱,对于50pM恒定VEGF,体积为750μl;对于500pM恒定VEGF,体积为125μl。通过以下检测结合的VEGFA-121:使用浓度为250ng/ml的第二生物素化抗VEGF抗体(BAF293),然后在样品缓冲液中注射250ng/ml链霉亲和素Alexa Fluor™ 647缀合物。$K_D$是通过使用KinExA软件(版本4.0.11)中包含的单位点同质结合模型,使用“标准分析”方法对数据进行非线性回归分析而获得的。软件通过将数据点拟合到理论$K_D$曲线来计算$K_D$并确定95%置信区间。95%置信区间以$K_D$低和$K_D$高给出。

[0132] 例如,抗体与IL6结合的$K_D$在使用表面等离子体共振(SPR)的测定中在Biacore 8K仪器(Cytiva)上在25℃使用HBS-EP+(1x;BR100669;Cytiva)作为运行缓冲液来测量。将人

Fab结合物(28958325,Cytiva)在10mM乙酸钠缓冲液(pH 5.0)中稀释至终浓度10μg/ml,并使用标准胺偶联化学固定在CM5传感器芯片上。在蛋白质测量之前,任选地进行五个启动循环以用于调节目的,其中在每个循环中,使HBS-EP+缓冲液流动约120秒,随后通过应用10mM甘氨酸缓冲液pH2.0 60秒来再生衍生化芯片表面。将浓度为75nM的抗体Fab片段在HBS-EP+缓冲液中以10ul/min的流速在该表面上捕获60秒。未将Fab片段应用于参考通道。随后,以30μl/min的流速在HBS-EP+缓冲液中以适当的稀释系列应用人或食蟹猴IL-6(优选使用180秒的接触时间和720秒的解离时间)。如上所述实现了衍生化芯片表面的再生。使用8K评估软件(Biacore Insight Evaluation3.0)评估数据。

[0133] 2.抗体片段

[0134] 在某些方面,本文提供的抗体是抗体片段。

[0135] 一方面,抗体片段是Fab'、Fab'-SH或$F(ab')_2$片段,特别是Fab片段。木瓜蛋白酶消化完整抗体产生两个称为"Fab"片段的相同的抗原结合片段,每个"Fab"片段含有重链可变结构域和轻链可变结构域(分别为VH和VL)以及轻链的恒定结构域(CL)和重链的第一恒定结构域(CH1)。因此,术语"Fab片段"是指包括包含VL结构域和CL结构域的轻链以及包含VH结构域和CH1结构域的重链片段的抗体片段。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于Fab'片段在CH1结构域的羧基末端添加了残基,这些残基包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是Fab'片段,其中恒定结构域的半胱氨酸残基具有游离巯基。胃蛋白酶处理产生$F(ab')_2$片段,该片段具有两个抗原结合位点(两个Fab片段)和Fc区的一部分。对于包含挽救受体结合表位残基且具有延长的体内半衰期的Fab片段和$F(ab')_2$片段的讨论,参阅美国专利号5,869,046。

[0136] 抗体片段可以通过各种技术制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及由重组宿主细胞(例如大肠杆菌、CHO)重组产生,如本文所述。

[0137] 在优选的实施例中,本文提供的抗体是Fab片段。

[0138] 在一个实施例中,本文提供的抗体的VH结构域包含人VH3框架。

[0139] 在一个实施例中,本文提供的抗体的VL结构域包含人Vkappa1框架。

[0140] 在一个实施例中,本文提供的抗体的CL结构域是kappa同种型。

[0141] 在一个实施例中,本文提供的抗体的CH1结构域是人IgG1同种型。

[0142] 在一个优选的实施例中,本文提供的抗体是包含kappa同种型的CL结构域和人IgG1同种型的CH1结构域的Fab片段。

[0143] 3.热稳定性

[0144] 本文提供的抗体表现出优异的热稳定性。在某些实施例中,本文提供的抗体的Fab片段表现出60℃或更高、在一个实施例中为70℃或更高的聚集起始温度。在某些实施例中,本文提供的抗体的Fab片段表现出通过动态光散射测量的大于80℃的解链温度。

[0145] 4.多特异性抗体

[0146] 在某些方面,本文提供的抗体是多特异性抗体。"多特异性抗体"是对至少两个不同位点(即,不同抗原上的不同表位或相同抗原上的不同表位)具有结合特异性的单克隆抗体。在某些方面,多特异性抗体具有三种或更多种结合特异性。

[0147] 具有三种或更多种结合特异性,包含本文提供的抗体的多特异性抗体可以以不对称形式提供,在具有相同抗原特异性的一个或多个结合臂中具有结构域交叉,即通过交换

VH/VL结构域(参见例如WO 2009/080252和WO 2015/150447),CH1/CL结构域(参见例如WO 2009/080253)或完整的Fab臂(参见例如WO 2009/080251,WO 2016/016299,也参见Schaefer等人,PNAS,108(2011)1187-1191,和Klein等人,MAbs 8(2016)1010-20)。多特异性抗体的各种其他分子形式是在本领域中已知的并且包括在本文中(参见例如Spiess等人,Mol Immunol 67(2015)95-106)。

[0148] 5.抗体变体

[0149] 在某些方面中,设想了本文提供的抗体的氨基酸序列变体。例如,可能期望改变抗体的结合亲和力和/或其他生物学特性。抗体的氨基酸序列变体可以通过向编码抗体的核苷酸序列中引入适当的修饰或通过肽合成来制备。此类修饰包括例如抗体氨基酸序列内残基的缺失、和/或插入和/或取代。可以进行缺失、插入和取代的任何组合以实现最终构建体,前提条件是最终构建体具有期望的特征,例如抗原结合。

[0150] 在某些方面,提供了具有一个或多个氨基酸取代的抗体变体。用于取代诱变的感兴趣的位点包括CDR和FR。保守型取代显示在下表的“优选取代”标题下。表1中的“示例性取代”标题下提供了更多实质性变更,并且下文将参考氨基酸侧链类别进行进一步描述。可以将氨基酸取代引入目的抗体中,并对产物进行所需活性(例如,保留的/改善的抗原结合、降低的免疫原性,或改善的ADCC或CDC)筛选。

[0151] 表

[0152]

| 原始残基 | 示例性取代 | 优选的取代 |
|---|---|---|
| Ala (A) | Val; Leu; Ile | Val |
| Arg (R) | Lys; Gln; Asn | Lys |
| Asn (N) | Gln; His; Asp、Lys; Arg | Gln |
| Asp (D) | Glu; Asn | Glu |
| Cys (C) | Ser; Ala | Ser |
| Gln (Q) | Asn; Glu | Asn |
| Glu (E) | Asp; Gln | Asp |
| Gly (G) | Ala | Ala |
| His (H) | Asn; Gln; Lys; Arg | Arg |
| Ile (I) | Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸 | Leu |

[0153]

| 原始<br>残基 | 示例性<br>取代 | 优选的<br>取代 |
|---|---|---|
| Leu (L) | 正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe | Ile |
| Lys (K) | Arg; Gln; Asn | Arg |
| Met (M) | Leu; Phe; Ile | Leu |
| Phe (F) | Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr | Tyr |
| Pro (P) | Ala | Ala |
| Ser (S) | Thr | Thr |
| Thr (T) | Val; Ser | Ser |
| Trp (W) | Tyr; Phe | Tyr |
| Tyr (Y) | Trp; Phe; Thr; Ser | Phe |
| Val (V) | Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸 | Leu |

[0154] 可根据共同的侧链特性将氨基酸分组:

[0155] (1)疏水性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0156] (2)中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0157] (3)酸性:Asp、Glu;

[0158] (4)碱性:His、Lys、Arg;

[0159] (5)影响链取向的残基:Gly,Pro;

[0160] (6)芳族:Trp、Tyr、Phe。

[0161] 非保守性取代将需要用这些类别中的一个的成员交换另一类别的成员。

[0162] 一种类型的取代变体涉及取代亲本抗体(例如,人源化抗体或人抗体)的一个或多个CDR残基。通常,相对于亲本抗体,选为用于进一步研究的一个或多个所得变体将在某些生物学特性方面(例如,亲和力增加、免疫原性降低)有改变(例如,改善)和/或将基本上保留亲本抗体的某些生物学特性。示例性取代变体是亲和力成熟抗体,其可例如使用诸如本文所述的那些基于噬菌体展示的亲和力成熟技术方便地生成。简言之,将一个或多个CDR残基突变并且将变体抗体展示在噬菌体上并针对特定生物活性(例如结合亲和力)进行筛选。

[0163] 在某些方面,取代、插入或缺失可发生在一个或多个CDR内,只要此类改变基本上不降低抗体结合抗原的能力即可。例如,可在CDR中进行基本上不降低结合亲和力的保守性改变(例如,如本文提供的保守性取代)。这样的改变可以例如在CDR中的抗原接触残基的外部。在上文提供的某些变体VH和VL序列中,每个CDR要么保持不变,要么包含不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[0164] 可用于鉴别可被靶向诱变的抗体残基或区域的方法称作“丙氨酸扫描诱变”,如Cunningham和Wells(1989)Science,244:1081-1085所述。在此方法中,鉴别残基或一组靶残基(例如,带电残基,诸如arg、asp、his、lys和glu)并用中性或带负电的氨基酸(例如,丙

氨酸或多丙氨酸)替换以确定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可在对初始取代展示功能敏感性的氨基酸位置引入其他取代。替代性地或附加地,可以使用抗原-抗体复合物的晶体结构鉴定抗体与抗原之间的接触点。可靶向或消除作为取代的候选的此类接触残基和相邻残基。可筛选变体以确定它们是否具备期望的特性。

[0165] 氨基酸序列插入包括长度范围为一个残基至含有一百个或更多个残基的多肽的氨基和/或羧基末端融合,以及一个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N末端甲硫氨酰残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括将抗体的N末端或C末端与增加抗体的血清半衰期的酶(例如,对于ADEPT(抗体定向酶前药治疗))或多肽融合。

[0166] a)糖基化变体

[0167] 在某些方面,改变本文提供的抗体以增加或降低抗体糖基化的程度。糖基化位点向抗体的添加或缺失可通过改变氨基酸序列以产生或去除一个或多个糖基化位点而方便地实现。

[0168] 当抗体包含Fc区时,与其相连的寡糖可以被改变。由哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含支链的双触角寡糖,该双触角寡糖通常通过N-键合连接至Fc区的CH2结构域的Asn297。参见,例如,Wright等人TIBTECH 15:26-32(1997)。寡糖可包括各种碳水化合物,例如,甘露糖、N-乙酰基葡糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及附接于双触角寡糖结构的"主干"中的GlcNAc的岩藻糖。在一些方面中,可对本发明的抗体中的寡糖进行修饰,以产生具有某些改善的特性的抗体变体。

[0169] 一方面,提供了具有非岩藻糖基化的寡糖的抗体变体,即缺少(直接或间接地)连接在Fc区的岩藻糖的寡糖结构。这样的非岩藻糖基化的寡糖(也称为"去岩藻糖基化"的寡糖)特别是N-连接的寡糖,其缺少在双触角寡糖结构的茎中连接第一GlcNAc的岩藻糖残基。一方面,提供了与天然或亲本抗体相比在Fc区中具有增加比例的非岩藻糖基化寡糖的抗体变体。例如,非岩藻糖基化寡糖的比例可以为至少约20%、至少约40%、至少约60%、至少约80%或甚至约100%(即不存在岩藻糖基化寡糖)。非岩藻糖基化寡糖的百分比,如例如WO 2006/082515中所述,如通过MALDI-TOF质谱法测量的,是缺少岩藻糖残基的寡糖的(平均)量相对于与Asn 297连接的所有寡糖(例如复杂、杂合和高甘露糖结构)之和。Asn297是指位于Fc区中约297位的天冬酰胺残基(Fc区残基的EU编号);然而,由于抗体中的微小序列变化,Asn297也可以位于297位上游或下游大约±3个氨基酸,即在294位和300位之间。在Fc区中具有非岩藻糖基化寡糖比例增加的此类抗体可具有改善的Fcγ RIIIa受体结合和/或改善的效应子功能,特别是改善的ADCC功能。参见例如US2003/0157108和US2004/0093621。

[0170] 能够生产岩藻糖基化减少的抗体的细胞系的实例包括缺乏蛋白质岩藻糖基化的Lec13 CHO细胞(Ripka等人.Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);US2003/0157108;和WO 2004/056312,尤其是在实例11中),以及敲除细胞系,例如α-1,6-岩藻糖基转移酶基因,FUT8,敲除CHO细胞(参见,例如,Yamane-Ohnuki等人.Biotech.Bioeng.87:614-622(2004);Kanda,Y.等人,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006);和WO 2003/085107),或具有降低或取消的GDP-岩藻糖合成或转运蛋白活性的细胞(参见,例如,US2004259150、US2005031613、US2004132140、US2004110282)。

[0171] 在另一方面,抗体变体提供了二等分的寡糖,例如,其中连接至抗体的Fc区的双触角寡糖被GlcNAc二等分。如上所述,这样的抗体变体可以具有减少的岩藻糖基化和/或改善

的ADCC功能。此类抗体变体的实例描述于例如Umana等人,Nat Biotechnol 17,176-180(1999);Ferrara等人,Biotechn Bioeng 93,851-861(2006);WO 99/54342;WO 2004/065540,WO 2003/011878。

[0172] 还提供了在连接于Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。这样的抗体变体可以具有改善的CDC功能。此类抗体变体描述于例如WO 1997/30087、WO 1998/58964和WO 1999/22764中。

[0173] b)Fc区变体

[0174] 在某些方面,一个或多个氨基酸修饰可引入本文提供的抗体的Fc区中,从而生成Fc区变体。Fc区变体可包含人Fc区序列(例如人$IgG_1$、$IgG_2$、$IgG_3$或$IgG_4$ Fc区),其在一个或多个氨基酸位置上包含氨基酸修饰(例如取代)。

[0175] 在某些方面,本发明考虑具有一些但不是全部效应功能的抗体变体,这使其成为其中抗体的体内半衰期很重要而某些效应功能(诸如补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC))不必要或有害的应用的理想候选者。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定,以确认CDC和/或ADCC活性的降低/耗尽。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定以确保抗体缺乏Fcγ R结合(因此可能缺乏ADCC活性),但是保留FcRn结合能力。介导ADCC的主要细胞NK细胞仅表达Fcγ RIII,而单核细胞表达Fcγ RI、Fcγ RII和Fcγ RIII。造血细胞上的FcR表达总结在Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-492(1991)的第464页的表3中。用于评估目标分子的ADCC活性的体外测定的非限制性实例描述于美国专利号5,500,362(参见例如Hellstrom,I.等人Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 83:7059-7063(1986))和Hellstrom,I等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 82:1499-1502(1985);5,821,337(参见Bruggemann,M.等人,J.Exp.Med.166:1351-1361(1987))。替代性地,可使用非放射性测定方法(参见例如,用于流式细胞术的ACTI™非放射性细胞毒性测定(CellTechnology,Inc.Mountain View,CA);以及CytoTox 96®非放射性细胞毒性测定(Promega,Madison,WI)。用于此类测定的有用效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。替代性地或附加地,可例如在诸如在Clynes等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 95:652-656(1998)中公开的动物模型中体内评定感兴趣的分子的ADCC活性。也可以进行C1q结合测定以确认抗体不能结合C1q,因此缺乏CDC活性。参见例如WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体活化,可以执行CDC测定(参见例如Gazzano-Santoro等人,J.Immunol.Methods202:163(1996);Cragg,M.S.等人,Blood 101:1045-1052(2003);以及Cragg,M.S.和M.J.Glennie,Blood 103:2738-2743(2004))。FcRn结合和体内清除率/半衰期测定也可以使用本领域已知的方法执行(参见例如Petkova,S.B.等人,Int'l.Immunol.18(12):1759-1769(2006);WO 2013/120929A1)。

[0176] 具有降低的效应子功能的抗体包括具有Fc区残基238、265、269、270、297、327和329中的一者或多者的取代的那些(美国专利号6,737,056)。此类Fc突变体包括在第265、269、270、297和327位氨基酸处的两个或更多个处具有取代的Fc突变体,包括所谓的"DANA"Fc突变体,其残基265和297被取代为丙氨酸(美国专利号7,332,581)。

[0177] 描述了具有改善的或降低的与FcR的结合的某些抗体变体。(参见例如美国专利号6,737,056;WO 2004/056312;以及Shields等人,J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001)。)

[0178] 在某些方面,抗体变体包含具有一个或多个改善ADCC的氨基酸取代的Fc区,例如,

在Fc区的298、333和/或334位的取代(残基的EU编号)。

[0179] 在某些方面,抗体变体包含具有一个或多个减少Fc γR结合的氨基酸取代的Fc区,例如Fc区的234位和235位的取代(残基的EU编号)。一方面,取代是L234A和L235A(LALA)。在某些方面,抗体变体进一步包含在衍生自人$IgG_1$ Fc区的Fc区中的D265A和/或P329G。一方面,在衍生自人$IgG_1$ Fc区的Fc区中,取代是L234A、L235A和P329G(LALA-PG)。(参见例如WO 2012/130831)。在另一方面,在衍生自人$IgG_1$ Fc区的Fc区中,取代是L234A、L235A和D265A(LALA-DA)。

[0180] 在一些方面,在Fc区中进行导致改变(即,改善或减少)C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)的改变,例如,如美国专利号6,194,551、WO 99/51642以及Idusogie等人.J.Immunol.164:4178-4184(2000)中所描述。

[0181] 具有延长的半衰期和改善的新生儿Fc受体(FcRn)结合、负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer,R.L.等人,J.Immunol.117:587(1976),以及Kim,J.K.等人,J.Immunol.24:249(1994))的抗体描述于US2005/0014934(Hinton等人)中。那些抗体包含这样的Fc区,该Fc区中具有改善Fc区与FcRn的结合的一个或多个取代。此类Fc变体包括在以下Fc区残基中的一处或多处具有取代的Fc变体:238、252、254、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434,例如对Fc区残基434的取代(参见,例如美国专利号7,371,826;Dall'Acqua,W.F.等人.J.Biol.Chem.281(2006)23514-23524)。

[0182] 通过定点诱变已经鉴定了对小鼠Fc-小鼠FcRn相互作用至关重要的Fc区残基(参见例如Dall'Acqua,W.F.等人.J.Immunol 169(2002)5171-5180)。相互作用涉及残基I253、H310、H433、N434和H435(EU索引编号)(Medesan,C.等人,Eur.J.Immunol.26(1996)2533;Firan,M.等人,Int.Immunol.13(2001)993;Kim,J.K.等人,Eur.J.Immunol.24(1994)542)。发现残基I253、H310和H435对于人Fc与鼠FcRn的相互作用至关重要(Kim,J.K.等人,Eur.J.Immunol.29(1999)2819)。对人Fc-人FcRn复合物的研究表明,残基I253、S254、H435和Y436对于相互作用至关重要(Firan,M.等人,Int.Immunol.13(2001)993;Shields,R.L.等人,J.Biol.Chem.276(2001)6591-6604)。在Yeung,Y.A.等人(J.Immunol.182(2009)7667-7671)中已经报道并检查了残基248至259和301至317和376至382和424至437的各种突变体。

[0183] 在某些方面,抗体变体包含具有一个或多个减少FcRn结合的氨基酸取代的Fc区,例如,在Fc区的253、和/或310和/或435位的取代(残基的EU编号)。在某些方面,抗体变体包含在位置253、310和435位具有氨基酸取代的Fc区。一方面,在衍生自人IgG1 Fc区的Fc区中,取代是I253A、H310A和H435A。参见,例如Grevys,A.等人,J.Immunol.194(2015)5497-5508。

[0184] 在某些方面,抗体变体包含具有一个或多个减少FcRn结合的氨基酸取代的Fc区,例如,在Fc区的310、和/或433和/或436位的取代(残基的EU编号)。在某些方面,抗体变体包含在位置310、433和436位具有氨基酸取代的Fc区。一方面,在衍生自人IgG1 Fc区的Fc区中,取代是H310A、H433A和Y436A。(参见,例如,WO 2014/177460 A1)。

[0185] 在某些方面,抗体变体包含具有一个或多个增加FcRn结合的氨基酸取代的Fc区,例如,在Fc区的252、和/或254和/或256位的取代(残基的EU编号)。在某些方面,抗体变体包含在位置252、254和256位具有氨基酸取代的Fc区。一方面,在衍生自人$IgG_1$ Fc区的Fc区

中,取代是M252Y、S254T和T256E。有关Fc区变体的其他实例,另外参见:Duncan和Winter,Nature 322:738-40(1988);美国专利号5,648,260;美国专利号5,624,821;以及WO 94/29351。

[0186] 如本文报道的抗体的重链的C末端可以是以氨基酸残基PGK结束的完整C末端。重链的C末端可以是缩短的C末端,在所述缩短的C末端中已经去除了一个或两个C末端氨基酸残基。在一个优选的方面,重链的C末端是以PG结束的缩短的C末端。在本文报道的所有方面中的一个方面,如本文所指定的包含包括C末端CH3结构域的重链的抗体,包含C末端甘氨酸-赖氨酸二肽(G446和K447,氨基酸位置的EU索引编号)。在本文报道的所有方面的一个方面中,如本文所指定的包含包括C末端CH3结构域的重链的抗体,包含C末端甘氨酸残基(G446,氨基酸位置的EU索引编号)。

[0187] c)经半胱氨酸工程改造的抗体变体

[0188] 在某些方面,可能需要产生半胱氨酸工程化改造的抗体,例如THIOMAB™抗体,其中抗体的一个或多个残基被半胱氨酸残基取代。在特定实施例中,取代的残基存在于抗体的可接近位点。如本文进一步描述的,通过用半胱氨酸取代那些残基,从而将反应性硫醇基团定位于抗体的可接近位点,并且可用于将抗体与其他部分(诸如药物部分或接头-药物部分)缀合,以产生免疫缀合物。半胱氨酸工程化改造的抗体可以如例如在美国专利号7,521,541、8,30,930、7,855,275、9,000,130或WO 2016040856中所述产生。

[0189] B.重组方法和组合物

[0190] 可以使用重组方法和组合物来产生抗体,例如,如在US 4,816,567中所述。对于这些方法,提供了编码抗体的一种或多种分离的核酸。

[0191] 一方面,提供了编码本发明抗体的分离的核酸。

[0192] 在一个方面,提供了一种制备与人VEGF-A和人IL6结合的抗体的方法,其中该方法包括:在适于表达抗体的条件下培养包含如上提供的编码该抗体的核酸的宿主细胞;以及任选地从该宿主细胞(或宿主细胞培养基)中回收该抗体。

[0193] 为了重组产生与人VEGF-A和人IL6结合的抗体,将例如如上所述的编码抗体的核酸分离,并插入到一种或多种载体中,以在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。可以使用常规程序来容易地对此类核酸进行分离和测序(例如,通过使用能够与编码抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针),或通过重组方法产生或通过化学合成获得此类核酸。

[0194] 用于克隆或表达编码抗体的载体的合适宿主细胞包括本文所述的原核或真核细胞。例如,可以在细菌中产生抗体,特别是当不需要糖基化和Fc效应子功能时。关于在细菌中表达抗体片段和多肽,参见例如US 5,648,237、US 5,789,199和US 5,840,523。(还参见Charlton,K.A.,在:Methods in Molecular Biology,第248卷,Lo,B.K.C.主编,Humana Press,Totowa,NJ(2003),第245-254页中,描述抗体片段在大肠杆菌中的表达。)抗体可在表达后在可溶性级分中从细菌细胞糊中分离,并且可以进一步纯化。在一些实施例中,宿主细胞是大肠杆菌细胞。

[0195] 脊椎动物细胞也可用作宿主。例如,适于在悬浮液中生长的哺乳动物细胞系可能是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其他实例是由SV40转化的猴肾CV1系(COS-7);人胚肾细胞系(如在例如Graham,F.L.等人,J.Gen Virol.36(1977)59-74中所述的293或293T

细胞);小仓鼠肾细胞(BHK);小鼠塞尔托利氏细胞(例如在Mather,J.P.,Biol.Reprod.23(1980)243-252中描述的TM4细胞);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK);布法罗大鼠肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562);TRI细胞(如例如在Mather,J.P.等人,Annals N.Y.Acad.Sci.383(1982)44-68中所述);MRC 5细胞;以及FS4细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括DHFR-CHO细胞(Urlaub,G.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77(1980)4216-4220);以及骨髓瘤细胞系,诸如YO、NSO和Sp2/0。关于适用于抗体产生的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,参见例如Yazaki,P.和Wu,A.M.,Methods in Molecular Biology,第248卷,Lo,B.K.C.(编辑),Humana Press,Totowa,NJ(2004),第255-268页。

[0196] 一方面,宿主细胞是真核细胞,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴细胞(例如YO、NSO、Sp20细胞)。在一个优选的实施例中,宿主细胞为CHO细胞。在CHO细胞中产生本发明的抗体可以提高抗体的可注射性。

[0197] C.药物组合物

[0198] 在其他方面,提供了包含本文提供的任一种抗体的药物组合物,其例如用于以下任一种治疗方法中。在一个方面,药物组合物包含任一种本文提供的抗体和药用载体。在另一方面,药物组合物包含任一种本文提供的抗体和例如如下所述的至少一种另外的治疗剂。

[0199] 通过将具有所需纯度的抗体与一种或多种任选的药用载体混合,来制备本文所述的与人VEGF-A和人IL6结合的抗体的药物组合物(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编辑(1980)),以冻干组合物或水溶液的形式。药用载体通常在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒,包括但不限于:缓冲剂,诸如组氨酸、磷酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,诸如钠;金属络合物(例如锌蛋白络合物);和/或非离子表面活性剂,诸如聚乙二醇(PEG)。本文的示例性药用载体还包括间质药物分散剂,诸如可溶中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,诸如rHuPH20(HYLENEX®,Halozyme,Inc.)。某些示例性sHASEGP和使用方法(包括rHuPH20)描述于美国专利公开号2005/0260186和2006/0104968中。在一个方面中,将sHASEGP与一种或多种另外的糖胺聚糖酶(诸如软骨素酶)组合。

[0200] 示例性的冻干抗体组合物描述于美国专利号6,267,958中。水性抗体组合物包括在美国专利号6,171,586和WO 2006/044908中描述的那些,后者中的组合物包含组氨酸-乙酸盐缓冲液。

[0201] 本文的药物组合物还可含有多于一种对于所治疗的特定适应症是必需的活性成分,优选是具有不会彼此不利地影响的互补活性的活性成分。此类活性成分适当地以对预

期目的有效的量组合存在。

[0202] 活性成分可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合而制备的微胶囊(例如,分别为羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)中;包埋在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊)中;或包埋在粗乳液中。此类技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编(1980)中。

[0203] 可以制备用于缓释的药物组合物。缓释制剂的合适实例包括含有抗体的固态疏水聚合物的半透性基质,这些基质是例如膜或微胶囊等成型制品的形式。

[0204] 用于体内施用的药物组合物通常是无菌的。例如,无菌可以通过无菌过滤膜过滤而容易地实现。

[0205] D.治疗方法和施用途径

[0206] 本文提供的与人VEGF-A和人IL6结合的任何抗体均可以用于治疗方法。

[0207] 在一个方面,提供了一种与人VEGF-A和人IL6结合的抗体用作药物。在其他方面,提供了一种与人VEGF-A和人IL6结合的抗体用于治疗血管疾病。在某些方面,提供了一种与人VEGF-A和人IL6结合的抗体用于治疗方法。在某些方面,本发明提供了一种与人VEGF-A和人IL6结合的抗体用于治疗患有血管疾病的个体的方法,该方法包括向该个体施用有效量的与人VEGF-A和人IL6结合的抗体。在一个这样的方面,例如如下所描述的,该方法进一步包括向个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂(例如,一种、两种、三种、四种、五种或六种另外的治疗剂)。在其他方面,本发明提供了一种与人VEGF-A和人IL6结合的抗体用于抑制血管生成。在某些方面,本发明提供了一种与人VEGF-A和人IL6结合的抗体用于在个体中抑制血管生成的方法,该方法包括向该个体施用有效量的与人VEGF-A和人IL6结合的抗体以抑制血管生成。根据上述方面中的任一者的"个体"优选地是人。

[0208] 在其他方面,提供了一种与人VEGF-A和人IL6结合的抗体用于治疗眼部疾病。在一个实施例中,眼部疾病选自:AMD(例如,湿性AMD、干性AMD、中度AMD、晚期AMD和地图状萎缩(GA))、黄斑变性、黄斑水肿、DME(在一个实施例中,局部、非中心性DME以及弥漫性、涉及中心的DME)、视网膜病变、糖尿病性视网膜病变(DR)(在一个实施例中为增生性DR(PDR)、非增生性DR(NPDR)和高海拔DR)、其他与缺血有关的视网膜病变、ROP、视网膜静脉闭塞(RVO)(在一个实施例中为中心(CRVO)和分支(BRVO)形式)、CNV(在一个实施例中为近视CNV)、角膜新生血管形成、与角膜新生血管形成相关的疾病、视网膜新生血管形成、与视网膜/脉络膜新生血管形成相关的疾病、中心浆液性视网膜病变(CSR)、病理性近视、希佩尔-林道综合征、眼睛组织胞浆菌病、FEVR、冠茨病、诺里病、与骨质疏松症-假性神经胶质瘤综合征(OPPG)相关的视网膜异常、结膜下出血、红肿、眼部新血管病、新生血管性青光眼、色素性视网膜炎(RP)、高血压性视网膜病变、视网膜血管瘤增生、黄斑毛细血管扩张、虹膜新生血管形成、眼内新生血管形成、视网膜变性、囊状黄斑水肿(CME)、血管炎、乳头水肿、视网膜炎(包括但不限于CMV视网膜炎)、眼黑色素瘤、视网膜母细胞瘤、结膜炎(例如,传染性结膜炎和非感染性(在一个实施例中为过敏性结膜炎))、利伯先天性黑蒙(也称为雷氏黑蒙或LCA)、葡萄膜炎(包括感染性和非感染性葡萄膜炎)、脉络膜炎(例如多灶性脉络膜炎)、眼组织胞浆菌病、睑缘炎、干眼症、眼外伤、干燥疾病和其他眼科疾病(其中该疾病与眼新血管生成、血管渗漏和/或视网膜水肿或视网膜萎缩有关)。在一个实施例中,眼部疾病选自:AMD(在一个实施例中为湿性AMD、干性AMD、中度AMD、晚期AMD和地图状萎缩(GA))、黄斑变性、黄斑水肿、DME(在

一个实施例中为局部、非中心性DME以及弥漫性、涉及中心的DME)、视网膜病变、糖尿病性视网膜病变(DR)(在一个实施例中为增生性DR(PDR)、非增生性DR(NPDR)和高海拔DR)。

[0209] 在其他方面,本发明提供了一种与人VEGF-A和人IL6结合的抗体在药物的生产或制备中的用途。一方面,所述药物用于治疗血管疾病。在其他方面,药物用于治疗血管疾病的方法,该方法包括向患有血管疾病的个体施用有效量的药物。在一个这样的方面,例如如下所描述的,该方法进一步包括向个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂。

[0210] 一方面,所述药物用于治疗眼部疾病。在其他方面,药物用于治疗眼部疾病的方法,该方法包括向患有眼部疾病的个体施用有效量的药物。在一个这样的方面,例如如下所描述的,该方法进一步包括向个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂。

[0211] 在其他方面,本发明提供了一种用于治疗血管疾病的方法。在一方面,该方法包括向患有这种血管疾病的个体施用有效量的与人VEGF-A和人IL6结合的抗体。在一个这样的方面,如下所描述的,该方法进一步包括向个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂。

[0212] 在另一方面,本发明提供了一种用于治疗眼部疾病的方法。在一方面,该方法包括向患有这种眼部疾病的个体施用有效量的与人VEGF-A和人IL6结合的抗体。在一个这样的方面,如下所描述的,该方法进一步包括向个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂。

[0213] 根据上述方面中的任一方面的“个体”可以为人。

[0214] 在其他方面,本发明提供了包含本文提供的与人VEGF-A和人IL6结合的任何抗体的药物组合物,例如,用于以上任何治疗方法。在一个方面,药物组合物包含本文提供的与人VEGF-A和人IL6结合的任何抗体和药用载体。在另一方面,药物组合物包含本文提供的与人VEGF-A和人IL6结合的任何抗体和至少一种另外的治疗剂,例如如下所述。

[0215] 本发明的抗体可以通过玻璃体内施用(例如,玻璃体内注射)或使用输液港递送装置来施用。在一个实施例中,在重新填充输液港递送装置之前,本发明的抗体在六个月或更长;在一个实施例中,在8个月或更长;在一个实施例中,在9个月或更长;在一个实施例中,在12个月或更长的时段内使用该输液港递送装置来施用。在一个实施例中,本发明的抗体使用输液港递送装置来施用,其中抗体以150mg/ml或更高的浓度;在一个实施例中,以200mg/ml或更高的浓度施加于输液港递送装置。

[0216] 本发明的抗体可以单独施用或用于组合疗法。例如,该组合疗法包括施用本发明的抗体并且施用至少一种另外的治疗剂(例如,一种、两种、三种、四种、五种或六种另外的治疗剂)。

[0217] 在根据(或应用于)以上任何实施例的某些实施例中,眼部疾病是眼内新血管疾病,其选自由以下项组成的组:增生性视网膜病变、脉络膜新生血管形成(CNV)、年龄相关性黄斑变性(AMD)、糖尿病性和其他与缺血相关的视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、病理性近视、希佩尔-林道综合征、眼睛组织胞浆菌病、包括CRVO和BRVO在内的视网膜静脉闭塞(RVO)、角膜新生血管形成、视网膜新生血管形成和早产儿视网膜病变(ROP)。

[0218] 在一些情况下,可以将如本文提供的一种与人VEGF-A和人IL6结合的抗体与至少一种其他治疗剂组合施用,用于治疗眼部疾患,例如,本文所述的眼部疾患(例如,AMD(例如,湿性AMD)、DME、DR、RVO或GA)。

[0219] 可以将任何合适的AMD治疗剂作为另外的治疗剂与本文提供的与人VEGF和人IL6结合的抗体组合施用,用于治疗眼部疾患(例如,AMD,DME,DR,RVO或GA),所述合适的AMD治

疗剂包括但不仅限于:VEGF拮抗剂、例如抗VEGF抗体(例如LUCENTIS®(雷珠单抗)、RTH-258(以前为ESBA-1008,抗VEGF单链抗体片段;诺华)或双特异性抗VEGF抗体(例如,抗VEGF/抗血管生成肽2双特异性抗体,例如faricimab;罗氏))、可溶性VEGF受体融合蛋白(例如,EYLEA®(阿柏西普))、抗VEGF DARPin®(例如abicipar pegol);Molecular Partners AG/Allergan)或抗VEGF适体(例如,MACUGEN®(哌加他尼钠));血小板衍生的生长因子(PDGF)拮抗剂,例如抗PDGF抗体、抗PDGFR抗体(例如REGN2176-3)、抗PDGF-BB聚乙二醇化适体(例如;FOVISTA®;Ophthotech/诺华)、可溶性PDGFR受体融合蛋白或双重PDGF/VEGF拮抗剂(例如,小分子抑制剂(例如,DE-120(Santen)或X-82(TyrogeneX))或双特异性抗PDGF/抗VEGF抗体));与光动力疗法组合的VISUDYNE®(维替泊芬);抗氧化剂;补体系统拮抗剂、例,如补体因子C5拮抗剂(例如,小分子抑制剂(例如,ARC-1905;Opthotech)或抗C5抗体(例如,LFG-316;诺华)、备解素拮抗剂(例如,抗备解素抗体,例如CLG-561;爱尔康),或补体因子D拮抗剂(例如,抗补体因子D抗体,例如兰帕利珠单抗;罗氏));C3阻断肽(例如APL-2,Appellis);视觉周期调节剂(例如,emixustat盐酸盐);角鲨胺(例如,OHR-102;Ohr Pharmaceutical);维生素和矿物质补充剂(例如,与年龄有关的眼部疾病研究1(AREDS1;锌和/或抗氧化剂)和研究2(AREDS2;锌、抗氧化剂、叶黄素、玉米黄质和/或omega-3脂肪酸)中所述的那些);基于细胞的疗法,例如,NT-501(Renexus);PH-05206388(辉瑞)、huCNS-SC细胞移植(StemCells)、CNTO-2476(脐带干细胞系;Janssen)、OpRegen(RPE细胞悬浮液;Cell Cure Neurosciences)或MA09-hRPE细胞移植(Ocata Therapeutics);组织因子拮抗剂(例如,hI-con1;Iconic Therapeutics);α-肾上腺素能受体激动剂(例如酒石酸溴莫尼定;Allergan);肽疫苗(例如,S-646240;盐野义);淀粉样蛋白β拮抗剂(例如,抗β淀粉样蛋白单克隆抗体,例如,GSK-933776);S1P拮抗剂(例如,抗S1P抗体,例如,iSONEP™;Lpath Inc);ROBO4拮抗剂(例如,抗ROBO4抗体,例如DS-7080a;第一三共株式会社);表达内皮抑素和血管抑素的慢病毒载体(例如,RetinoStat);及其任何组合。在一些情况下,可以将AMD治疗剂(包括任何先前的AMD治疗剂)共同配制。例如,抗PDGFR抗体REGN2176-3可以与阿柏西普(EYLEA®)共同配制。在某些情况下,此类共制剂可以与本发明的与人VEGF和人IL6结合的抗体组合施用。在某些情况下,眼部疾患是AMD(例如湿性AMD)。

[0220] 可以将任何合适的DME和/或DR治疗剂与本发明的与人VEGF和人IL6结合的抗体组合施用,用于治疗眼部疾患(例如,AMD、DME、DR、RVO或GA),所述合适的DME和/或DR治疗剂包括但不限于VEGF拮抗剂(例如LUCENTIS®或EYLEA®)、皮质类固醇(例如皮质类固醇植入物(例如OZURDEX®(地塞米松玻璃体内植入物)或ILUVIEN®(醋酸氟轻松玻璃体内植入物),或配制用于通过玻璃体内注射施用的皮质类固醇(例如曲安奈德)或其组合。在某些情况下,眼部疾患是DME和/或DR。

[0221] 如本文提供的一种与人VEGF和人IL6结合的抗体可以与用于治疗眼部疾患(例如、AMD、DME、DR、RVO或GA)的疗法或外科手术方法组合施用,包括:例如,激光光凝(例如,全视网膜光凝(PRP))、玻璃疣激光、黄斑裂孔手术、黄斑移位手术、植入式微型望远镜、PHI运动血管造影术(也称为微激光疗法和饲养血管治疗)、质子束疗法、微刺激疗法、视网膜脱落和玻璃体手术、巩膜扣、黄斑手术、经瞳孔热疗法、光系统I疗法、使用RNA干扰(RNAi)、体外流产术(也称为膜差分过滤和流变疗法)、微芯片植入、干细胞疗法、基因替代疗法、核酶基因疗法(包括用于缺氧应答元件的基因疗法、牛津生物医药公司;Lentipak,Genetix;和PDEF

基因疗法,GenVec)、视细胞/视网膜细胞移植(包括可移植的视网膜上皮细胞,Diacrin、Inc.;视网膜细胞移植,例如阿斯特拉斯制药美国公司,ReNeuron,CHA Biotech)、针灸及其组合。

[0222] 上述此类组合疗法涵盖组合施用(其中两种或更多种治疗剂包括在相同或不同的制剂中)和单独施用,在单独施用的情况下,本发明的与人VEGF和人IL6结合的抗体的施用可以在施用另外的治疗剂或药剂之前、同时和/或之后进行。在一个实施例中,本发明的与人VEGF和人IL6结合的抗体的施用和另外的治疗剂的施用各自发生在约一、二、三、四或五个月内,或在约一、二或三周内,或在约一、二、三、四、五或六天内。

[0223] 本发明的抗体(和任何另外的治疗剂)可以通过任何合适的方式施用,包括肠胃外、肺内和鼻内,并且如果需要的话用于局部治疗、病灶内施用。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。给药可以通过任何合适的途径进行,例如通过注射,诸如静脉内或皮下注射,部分取决于施用是短暂的还是长期的。本文考虑了各种投配时间安排,包括但不限于在各个时间点处的单次或多次施用、推注施用,以及脉冲输注。

[0224] 本发明的抗体将以符合良好医学实践的方式配制、给药和施用。在这种情况下需要考虑的因素包括所治疗的特定疾患、所治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床病症、疾患的原因、药剂的递送部位、施用方法、施用的时间安排,以及执业医师已知的其他因素。该抗体不是必须的,而是任选地与一种或多种目前用于预防或治疗所讨论的疾患的制剂共同配制。这些其他制剂的有效量取决于药物组合物中存在的抗体的量、疾患或治疗的类型以及上面讨论的其他因素。这些通常以与如本文所述相同的剂量和施用途径使用,或以本文描述的剂量的约1%至99%使用,或以任何剂量且通过经验/临床上确定为合适的任何途径使用。

[0225] 为了预防或治疗疾病,本发明的抗体的适当剂量(当单独使用或与一种或多种其他另外治疗剂组合使用时)将取决于待治疗的疾病类型、抗体的类型、疾病的严重程度和病程、施用分子用于预防还是治疗目的、患者的病史和对抗体的应答以及主治医师的酌处权。抗体适当地一次或在一系列治疗中施用于患者。取决于疾病的类型和严重性,约1μg/kg至15mg/kg(例如0.1mg/kg-10mg/kg)的抗体可以是例如通过一次或多次单独施用或通过连续输注而施用于患者的初始候选剂量。取决于上述因素,一种典型的日剂量的范围可以为约1μg/kg至100mg/kg或更多。对于数天或更长时间的重复施用,取决于病症,治疗通常会持续直至发生所需的疾病症状抑制。抗体的一种示例性剂量的范围为约0.05mg/kg至约10mg/kg。因此,可以向患者施用约0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg或10mg/kg(或它们的任何组合)的一种或多种剂量。此类剂量可以间歇施用,例如每周或每三周施用(例如,使得患者接受约两次至约二十次,或例如约六次剂量的抗体)。可施用初始较高负荷剂量,然后施用一种或多种较低剂量。通过常规技术和测定可以容易地监测该疗法的进展。

[0226] E.制品

[0227] 在本发明的另一方面中,提供了一种制品,其含有可用于治疗、预防和/或诊断上述疾患的物质。该制品包括容器和在该容器上或与该容器相关的标签或包装插页(package insert)。合适的容器包括,例如,小瓶、注射器等。容器可以由诸如玻璃或塑料等多种材料形成。该容器容纳组合物,该组合物本身或与另一种组合物组合能够有效地治疗、预防和/或诊断病症,并且该容器可以具有无菌进入口(例如,该容器可以是静脉内溶液袋或具有可

由皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。组合物中的至少一种活性剂是本发明的抗体。标签或包装插页指示该组合物用于治疗所选择的病症。

[0228] 此外,该制品可包括(a)第一容器,其中该第一容器中含有包含本发明的抗体的组合物;以及(b)第二容器,该第二容器中含有包含另外的细胞毒性剂或其他治疗剂组合物。本发明该方面中的制品还可包含包装插页,该包装插页指示该组合物可用于治疗特定病症。替代性地或另外地,该制品可以进一步包含第二(或第三)容器,该第二(或第三)容器包含药用缓冲液,诸如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和葡萄糖溶液。所述制品还可包括从商业和用户角度所需的其他物质,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0229] F.装置

[0230] 可以使用眼部植入物,在一个实施例中,使用输液港递送装置将本发明的抗体施用到眼部中。

[0231] 输液港递送装置是可植入的、可重新填充的装置,该输液港递送装置可以在几个月的时段(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多个月)内释放治疗剂(例如,本发明的抗体)。可以使用的示例性输液港递送装置包括来自ForSight Labs,LLC和/或ForSight VISION4的那些,例如,如国际专利申请公开号WO 2010/088548、WO2015/085234、WO 2013/116061、WO 2012/019176、WO 2013/040247和WO 2012/019047中所述,这些专利申请全文以引用方式并入本文。

[0232] 例如,本发明提供了输液港递送装置,该输液港递送装置包括含有本文所述的任何抗体的储存器。输液港递送装置还可以包括近端区域、与储存器流体连通的偶联至近端区域的管状主体,以及与储存器流体连通并被构造成将组合物释放到眼部中的一个或多个出口。管状主体的外径可以被构造成通过眼部约0.5mm或更小的切口或开口插入。装置的长度可以为约1mm至约15mm(例如,长约1mm、约2mm、约4mm、约5mm、约6mm、约7mm、约9mm、约11mm、约13mm或15mm)。储存器可以具有任何合适的容积。在一些情况下,储存器具有约1μl至约100μl(例如,约1μl、约5μl、约10μl、约20μl、约50μl、约75μl或约100μl)的容积。装置或其组成部分可以由任何合适的材料制成,例如,聚酰亚胺。

[0233] 在一些情况下,输液港递送装置包括含有本文所述的任何抗体和一种或多种另外的化合物的储存器。

[0234] 在一些情况下,输液港递送装置包括本文所述的任何抗体或抗体缀合物和另外的VEGF拮抗剂。

[0235] 3.本发明的具体实施例

[0236] 下面列出本发明的具体实施例。

[0237] 1.一种与人VEGF-A和与人IL6结合的抗体,所述抗体包含:VH结构域,所述VH结构域包含:(a)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR-H1,(b)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR-H2和(c)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR-H3;以及VL结构域,所述VL结构域包含:(d)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR-L1,(e)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR-L2和(f)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR-L3;所述抗体包含:(a)VH结构域,所述VH结构域包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列;和

(b)VL结构域,所述VL结构域包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0238] 2.一种与人VEGF-A和与人IL6结合的抗体,所述抗体包含:VH结构域,所述VH结构域包含:(a)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR-H1,(b)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR-H2和(c)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR-H3;以及VL结构域,所述VL结构域包含:(d)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR-L1,(e)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR-L2和(f)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR-L3;所述抗体包含:可变重链结构域,所述可变重链结构域包含具有至多5个氨基酸取代的SEQ ID NO:22的氨基酸序列;以及可变轻链结构域,所述可变轻链结构域包含具有至多5个氨基酸取代的SEQ ID NO:21的氨基酸序列。

[0239] 3.一种与人VEGF-A和与人IL6结合的抗体,所述抗体包含:(a)VH结构域,所述VH结构域包含具有至多15个、至多10个或至多5个氨基酸取代的SEQ ID NO:22的氨基酸序列;和(b)可变轻链结构域,所述可变轻链结构域包含具有至多15个、至多10个或至多5个氨基酸取代的SEQ ID NO:21的氨基酸序列。

[0240] 4.一种与人VEGF-A和与人IL6结合的抗体,其包含SEQ ID NO:22的VH序列和SEQ ID NO:21的VL序列。

[0241] 5.根据前述实施例中的一项所述的抗体,其包含SEQ ID NO:24的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:23的轻链氨基酸序列。

[0242] 6.根据前述实施例中任一项所述的抗体,其中VEGF-A互补位包含来自所述抗体的CDR-H2、CDR-L1和CDR-L3的氨基酸残基,其中IL6互补位包含来自所述抗体的CDR-H1、CDR-H3和CDR-L2的氨基酸残基,或者其中IL6互补位包含来自所述抗体的CDR-H2、CDR-L1和CDR-L3的氨基酸残基,其中VEGF-A互补位包含来自所述抗体的CDR-H1、CDR-H3和CDR-L2的氨基酸残基;和/或

[0243] ●所述可变轻链结构域和可变重链结构域对与人VEGF-A和人IL6同时结合;和/或

[0244] ●所述抗体与具有SEQ ID NO:22的可变重链结构域和SEQ ID NO:21的可变轻链结构域的抗体相比,结合至人VEGF-A上的相同表位和与人IL6上的相同表位;和/或

[0245] ●该抗体的抗体Fab片段与以下项结合:(i)人VEGF-A121,其中通过表面等离子体共振测量的$K_D$小于50pM,和(ii)人IL6,其中通过表面等离子体共振测量的$K_D$小于50pM;和/或

[0246] ●所述抗体的抗体Fab片段表现出60℃或更高、在一个实施例中为70℃或更高的聚集起始温度;和/或

[0247] •该抗体的抗体Fab片段表现出通过动态光散射测量的大于80℃的解链温度。

[0248] 7.一种与人VEGF-A和与人IL6特异性结合的抗体,其包含SEQ ID NO:24的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:23的轻链氨基酸序列。

[0249] 8.根据前述实施例中任一项所述抗体,其中所述抗体为Fab片段。

[0250] 9.根据前述实施例中任一项所述抗体,其中所述抗体为双特异性抗体片段。

[0251] 10.根据前述实施例中任一项所述的抗体,其为单克隆抗体。

[0252] 11.根据前述实施例中任一项所述的抗体,其中所述抗体的抗体Fab片段表现出70

℃和更高的聚集起始温度。

[0253] 12.根据前述实施例中任一项所述的抗体,其中所述抗体的抗体Fab片段表现出通过动态光散射测量的大于80℃的解链温度。

[0254] 13.根据前述实施例中任一项所述的抗体,其为单克隆抗体。

[0255] 14.根据前述实施例中任一项所述的抗体,其为与人VEGF-A和与人IL6结合的抗体片段。

[0256] 15.根据前述实施例中任一项所述抗体,其中所述抗体为双特异性的。

[0257] 16.根据前述实施例中任一项所述抗体,其中所述抗体为Fab片段。

[0258] 17.根据前述实施例中任一项所述抗体,其中所述抗体为双特异性抗体片段。

[0259] 18.根据前述实施例中任一项所述的抗体,其中所述抗体为多特异性抗体。

[0260] 19.根据前述实施例中任一项所述抗体,其中所述抗体与人VEGF-A特异性结合。

[0261] 20.根据前述实施例中任一项所述抗体,其中所述抗体与人IL6特异性结合。

[0262] 21.一种与人IL6结合的抗体,该抗体与具有SEQ ID NO:35的VL结构域和SEQ ID NO:36的VH结构域的抗体结合至IL6上的相同表位。

[0263] 22.一种与人IL6结合的抗体,其中所述抗体包含:具有人VH3框架的VH结构域,其中IL6互补位包含根据实施例1至20中任一项所述的与人VEGF-A和IL6结合的抗体的氨基酸残基1、2、3、26、27、28、29、30、31、32、52a、94、96、97、98、101、102;以及具有人Vκ1构架的VL结构域,其中IL6互补位包含根据实施例1至20中任一项所述的与人VEGF-A和IL6结合的抗体的氨基酸残基49、50、53、54、55、56、57、91、96。

[0264] 23.一种与人IL6结合的抗体,所述抗体包含:

[0265] a)基于人VH3框架的VH结构域,其中IL6互补位包含氨基酸残基Y1、I2、Q3、Y26、E27、F28、T29、H30、Q31、D32、P52a、R94、I96、D97、F98、D101、T102,以及基于人Vκ1框架的VL结构域,其中IL6互补位包含氨基酸残基Y49、D50、S53、N54、Y55、P56、S57、Y91、Y96;或者

[0266] b)基于人VH3框架的VH结构域,其中IL6互补位包含氨基酸残基Y1、P2、Q3、V26、L27、F28、K29、H30、Q31、D32、P52a、R94、L96、D97、F98、D101、E102,以及基于人Vκ1框架的VL结构域,其中IL6互补位包含氨基酸残基Y49、D50、D53、R54、Y55、P56、E57、Y91、Y96(根据Kabat编号)。

[0267] 24.一种分离的核酸,其编码根据实施例1至23中任一项所述的抗体。

[0268] 25.一种宿主细胞,其包含根据实施例24所述的核酸。

[0269] 26.一种产生与人VEGF-A和与人IL6结合的抗体的方法,其包括培养根据实施例25所述的宿主细胞,从而产生所述抗体。

[0270] 27.根据实施例26所述的方法,其中所述宿主细胞为CHO细胞。

[0271] 28.一种药物制剂,其包含根据实施例1至23中任一项所述的抗体以及药用载体。

[0272] 29.一种输液港递送装置,其包括根据实施例1至23中任一项所述的抗体。

[0273] 30.根据实施例1至23中任一项所述的抗体,其用作药物。

[0274] 31.根据实施例26所述的方法,其进一步包括从宿主细胞回收抗体。

[0275] 32.通过实施例26或31所述的方法产生的抗体。

[0276] 33.一种药物制剂,其包含根据实施例1至23中任一项所述的抗体以及药用载体。

[0277] 34.根据实施例1至23中任一项所述的抗体,其用作药物。

[0278] 35.根据实施例1至23中任一项所述的抗体,其用于治疗血管疾病。

[0279] 36.根据实施例1至23中任一项所述的抗体,其用于治疗眼血管疾病。

[0280] 37.根据实施例1至23中任一项所述的抗体或根据实施例65所述的药物组合物在制备药物中的用途。

[0281] 38.根据实施例1至23中任一项所述的抗体或根据实施例65所述的药物组合物在制备用于抑制血管生成的药物中的用途。

[0282] 39.一种治疗患有血管疾病的个体的方法,其包括向该个体施用有效量的根据实施例1至23中任一项所述的抗体或实施例33所述的药物制剂。

[0283] 40.一种治疗患有眼部血管疾病的个体的方法,其包括向该个体施用有效量的根据实施例1至23中的一项所述的抗体或实施例33所述的药物制剂。

[0284] 41.一种抑制个体中血管生成的方法,其包括向该个体施用有效量的根据实施例1至23中任一项所述的抗体或实施例33所述的药物制剂以抑制血管生成。

[0285] 42.一种输液港递送装置,其包括根据实施例1至23中任一项所述的抗体或根据实施例33所述的药物制剂。

[0286] 43.根据实施例1至23中任一项的抗体或实施例33的药物制剂用于通过输液港递送装置进行眼部施用。

[0287] 44.根据实施例1至23中任一项所述的抗体或者根据实施例33所述的药物制剂,其用于通过根据实施例42所述的输液港递送装置进行眼部施用,其中在重新填充所述输液港递送装置之前,在六个月或更长;在一个实施例中,在8个月或更长;在一个实施例中,在9个月或更长的时段内施用。

[0288] 45.根据实施例1至23中任一项所述的抗体或者根据实施例33所述的药物制剂,其用于作为通过使用输液港递送装置施用所述抗体或所述药物制剂的药物使用,其中所述抗体以150mg/ml或更高的浓度;在一个实施例中,以200mg/ml或更高的浓度施加于所述输液港递送装置。

[0289] 氨基酸序列的描述

[0290]

| | |
|---|---|
| **SEQ ID NO:1** | VL VH6L-BM（公开于 WO2012/163520 中）<br>NIQKTQSPSSLSASVGDRVTITCRALWHISSYLAWYQQKPGKA PKLLIYAASHLHYGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQYSGLPYTFGQGTKVEIK |
| **SEQ ID NO:2** | VH VH6L-BM（公开于 WO2012/163520 中）<br>YYQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAADGFLFSGYAMSWIRQAPG KGLEWIGQISGSGGSTVYNYNVLGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARDTGYFDHWGQGTLVTVSS |
| **SEQ ID NO:3** | VL 6HVL_1<br>DQMTQSPSSLSASVGDRVTITCNAWWNISNYLAWYQQKPGKA PKLLIFDAKYRAPEVPSRFSGSGSGSQFTLTISSLQPEDFATYYC QQYSGWPFTFGQGTKVEIK |
| **SEQ ID NO:4** | VH 6HVL_1<br>GQLVESGGGLVKPGGSLRLSCKASGFYWGPGAMSWVRQAPG KGLEWVGSISPKGGSEWFNPEIKGRFTISRDNNQDTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARDIGFFDTWGQGTLVTVSS |
| **SEQ ID NO:5** | VL 6HVL_2<br>DQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKALWEVRDYLAWYQQKPGKA PKLLIFDGEYRAPEVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC QHYAGWPYTFGQGTKLEIK |
| **SEQ ID NO:6** | VH 6HVL_2<br>GQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFYWGPGQMSWVRQAPG KGLEWVGSIDTKGDDEWYDPKFDGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDIGFFDTWGQGTLVTVSS |

[0291]

| | |
|---|---|
| **SEQ ID NO:7** | VL 6HVL_3<br>IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRALWEIRDYLAWYQQKPGKAP KLLIFDGEYRAPEVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ HYAGWPYTFGQGTKLEIK |
| **SEQ ID NO:8** | VH 6HVL_3<br>GQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFYWGPGQMSWVRQAPG KGLEWVGSIDTKGRDEWYDPKFDGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDIGFFDTWGRGTLVTVSS |
| **SEQ ID NO:9** | VL VH6L_1<br>AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHGSYWLSSEVAWYQQKPGKA PKLLIYDGDDVVPEVPSRFSGSGSHEDYTLTISSLQPEDFATYYC QQYRYHPYTFGHGTKVEIK |
| **SEQ ID NO:10** | VH VH6L_1<br>YIQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAGYEFTHQDMSWVRQAPGK GLEWVGSISPKGDHKYLNTKFIGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDIGFFDTWGQGTLVTVSS |
| **SEQ ID NO:11** | VL VH6L_2<br>AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHGSYWLSSEVAWYQQKPGKA PKLLIYDASSNYPSVPSRFSGSGSHEDYTLTISSLQPEDFATYYC QQYRYHPYTFGHGTKVEIK |
| **SEQ ID NO:12** | VH VH6L_2<br>YIQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAGYEFTHQDMSWVRQAPGK GLEWVGSISPKGDHKYLNTKFIGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDIDFFDTWGQGTLVTVSS |
| **SEQ ID NO:13** | VL VH6L_3<br>AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHGSYWLNSEVAWYQQKPGK APKLLIYDGDTVYPEVPSRFSGSGSHEDYTLTISSLQPEDFATYY CQQYRYHPYTFGQGTKVEIK |
| **SEQ ID NO:14** | VH VH6L_3<br>YPQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASVLFKHQDMSWVRQAPGK GLEWVGSISPKGDHKYLNTKFIGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDIDFFDEWGQGTLVTVSS |
| **SEQ ID NO:15** | LCDR-1 6HVL_4<br>QASYWLNSELA |

[0292]

| | |
|---|---|
| **SEQ ID NO:16** | LCDR-2 6HVL_4<br>DGDDRYP |
| **SEQ ID NO:17** | LCDR-3 6HVL_4<br>QQYRYTPYT |
| **SEQ ID NO:18** | HCDR-1 6HVL_4<br>QDMS |
| **SEQ ID NO:19** | HCDR-2 6HVL_4<br>SIDPRGDHKYYNTKFID |
| **SEQ ID NO:20** | HCDR-3 6HVL_4<br>DLDFMDE |
| **SEQ ID NO:21** | VL 6HVL_4<br>AIYMHQEPSSLSASVGDRVTITCQASYWLNSELAWYQQKPGK APKLLIYDGDDRYPEVPSRFSGSGSHEDYTLTISSLQPEDFATYY CQQYRYTPYTFGQGTKLEIK |
| **SEQ ID NO:22** | VH 6HVL_4<br>YPQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASVLFKHQDMSWVRQAPGK GLEWVGSIDPRGDHKYYNTKFIDRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDLDFMDEWGQGTLVTVSS |
| **SEQ ID NO:23** | LC 6HVL_4<br>AIYMHQEPSSLSASVGDRVTITCQASYWLNSELAWYQQKPGK APKLLIYDGDDRYPEVPSRFSGSGSHEDYTLTISSLQPEDFATYY CQQYRYTPYTFGQGTKLEIK**RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC** |
| **SEQ ID NO:24** | HC 6HVL_4<br>YPQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASVLFKHQDMSWVRQAPGK GLEWVGSIDPRGDHKYYNTKFIDRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDLDFMDEWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHT** |

[0293]

| | |
|---|---|
| **SEQ ID NO:25** | VL 6HVL_4 YHE<br>AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASYWLNSELAWYQQKPGKA PKLLIYDGDDRYPEVPSRFSGSGSHEDYTLTISSLQPEDFATYYC QQYRYTPYTFGQGTKLEIK |
| **SEQ ID NO:26** | VH 6HVL_4 YHE<br>YPQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASVLFKHQDMSWVRQAPGK GLEWVGSIDPRGDHKYYNTKFIDRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDLDFMDEWGQGTLVTVSS |
| **SEQ ID NO:27** | 人 VEGFA-121<br>MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEV VKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCG GCCNDEGLECVPTEESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNK CECRPKKDRARQEKCDKPRR |
| **SEQ ID NO:28** | 人 IL6<br>MNSFSTSAFGPVAFSLGLLLVLPAAFPAPVPPGEDSKDVAAPHR QPLTSSERIDKQIRYILDGISALRKETCNKSNMCESSKEALAENN LNLPKMAEKDGCFQSGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRF ESSEEQARAVQMSTKVLIQFLQKKAKNLDAITTPDPTTNASLLT KLQAQNQWLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM |
| **SEQ ID NO:29** | CL<br>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| **SEQ ID NO:30** | CH1<br>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT |
| **SEQ ID NO:31** | Fab 0182 VL<br>TPVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHGFWDIRDYLAWYQQKPG KAPKLLIFDAKYRAPEVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATY YCQQYSGWPFTFGQGTKVEIK |

[0294]

| | |
|---|---|
| **SEQ ID NO:32** | Fab 0182 VH<br>GQLVESGGGLVKPGGSLRLSCKASGFYWGPGAMSWVRQAPG<br>KGLEWVGSIDLKGEDAWFDHEFSGRFTISRDNSKDTLYLQMNS<br>LRAEDTAVYYCARDIGFFDTWGQGTLVTVSS |
| **SEQ ID NO:33** | Fab 0182 LC<br>TPVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHGFWDIRDYLAWYQQKPG<br>KAPKLLIFDAKYRAPEVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATY<br>YCQQYSGWPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA<br>SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST<br>YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| **SEQ ID NO:34** | Fab 0182 HC<br>GQLVESGGGLVKPGGSLRLSCKASGFYWGPGAMSWVRQAPG<br>KGLEWVGSIDLKGEDAWFDHEFSGRFTISRDNSKDTLYLQMNS<br>LRAEDTAVYYCARDIGFFDTWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA<br>PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA<br>VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE<br>PKSCDKTHT |
| **SEQ ID NO:35** | 6HVL4.1 VL<br>AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHGSYWLNSEVAWYQQKPGK<br>APKLLIYDASSNYPSVPSRFSGSGSHEDYTLTISSLQPEDFATYY<br>CQQYRYHPYTFGQGTKVEIK |
| **SEQ ID NO:36** | 6HVL4.1 VH<br>YIQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAGYEFTHQDMSWVRQAPGK<br>GLEWVGSISPKGDHKYLNTKFIGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR<br>AEDTAVYYCARDIDFFDTWGQGTLVTVSS |
| **SEQ ID NO:37** | 6HVL4.1 LC<br>MTMITPSFGAFFLEIFNMKQSTIALALLPLLFTPVSKAAIQMTQS<br>PSSLSASVGDRVTITCHGSYWLNSEVAWYQQKPGKAPKLLIYD<br>ASSNYPSVPSRFSGSGSHEDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYRYH<br>PYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN<br>FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL<br>SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE |

[0295]

| | |
|---|---|
| **SEQ ID NO:38** | 6HVL4.1 HC<br>YIQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAGYEFTHQDMSWVRQAPGK GLEWVGSISPKGDHKYLNTKFIGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDIDFFDTWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK S |
| **SEQ ID NO:39** | VL 6HVL_5<br>AIYMHQEPSSLSASVGDRVTITCQASYWLNSELAWYQQKPGK APKLLIYDGDTNYPEVPSRFSGSGSHEDYTLTISSLQPEDFATYY CQQYRYTPYTFGQGTKLEIK |
| **SEQ ID NO:40** | VH 6HVL_5<br>YPQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASVLFKHQDMSWVRQAPGK GLEWVGSIDPRGDHKYYNTKFIDRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDLDFMDEWGQGTLVTVSS |
| **SEQ ID NO:41** | VL 6HVL_6<br>AIYMHQEPSSLSASVGDRVTITCQASYWLNSELAWYQQKPGK APKLLIYDGDDTYPEVPSRFSGSGSHEDYTLTISSLQPEDFATYY CQQYRYTPYTFGQGTKLEIK |
| **SEQ ID NO:42** | VH 6HVL_6<br>YPQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASVLFKHQDMSWVRQAPGK GLEWVGSISPRGDHKYYNTKFIDRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDLDFMDEWGQGTLVTVSS |
| **SEQ ID NO:43** | VL VH6L_4<br>IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRALWEIRDYLAWYQQKPGKAP KLLIFDGEYRAPEVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQ HYAGWPYTFGQGTKLEIK |
| **SEQ ID NO:44** | VH VH6L_4<br>GQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFYWGPGQMSWVRQAPG KGLEWVGSIDTKGDDEWYDPKFDGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDIGFFDTWGRGTLVTVSS |

[0296]

| | |
|---|---|
| **SEQ ID NO:45** | VL VH6L_5<br>AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRALWEIRDYLAWYQQKPGKA PKLLIFDGEYRAPEVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QHYAGWPYTFGQGTKLEIK |
| **SEQ ID NO:46** | VH VH6L_5<br>GQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFYWGPGQMSWVRQAPG KGLEWVGSIDTKGRDEWYDPKFDGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDIGFFDTWGRGTLVTVSS |
| **SEQ ID NO:47** | LC 6HDL2.05<br>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKA PKLLIYDGDDRYPEVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQYYSTPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| **SEQ ID NO:48** | HC 6HDL2.05<br>YPQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASVLFKHQDMSWVRQAPGK GLEWVGSISPSGGSTYYNDNVLGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDLDFMDEWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTSPPGSGMASMTGGQQMG |

[0297] 实例

[0298] 提供以下实例以帮助理解本发明,本发明的真正范围在所附权利要求中阐明。应当理解,在不脱离本发明的精神的情况下,可对所阐述的程序进行修改。

[0299] 实例1:

[0300] 双特异性抗VEGF/抗6Fab片段的生成

[0301] 双特异性抗VEGF/抗IL-6Fab片段是通过使用类似于之前已经描述的方法(例如在WO2012/163520中描述的方法)的方法提供具有与VEGF和IL-6结合的单独的、非重叠互补位的抗体而生成的。

[0302] 在此处,利用合成Fab片段的两个不同的噬菌体展示文库,其中在第一噬菌体展示文库中,Fab片段的CDR-H1、CDR-H3和CDR-L2区内的残基是多样化的,并且其中在第二噬菌体展示文库中,Fab片段的CDR-L1、CDR-L3和CDR-H2区内的残基是多样化的。在每个文库中,相应的其他三个CDR区保持非多样化,并且——与使用不变的非结合、种系样(“虚拟”)序列的WO2012/163520的方法相反——代表能够与VEGF-A结合的互补位。

[0303] 在第一文库的情况下,能够与VEGF-A结合的互补位源自WO 2021/198034中描述的VEGF-A结合互补位。

[0304] 在第二文库的情况下,如下获得VEGF-A结合互补位:

[0305] 对于初始选择,用其中CDR-H1、CDR-H3和CDR-L2已经多样化的文库进行噬菌体文

库淘选,如WO2012/163520中所述。使用非结合的种系样序列使剩余的CDR序列保持恒定。分4轮进行,其中第一轮使用预固定在Dynabeads M-280链霉亲和素(Thermofisher目录号11206D)上的100nM生物素化VEGF-121或VEGF-165进行。分别使用溶液中的75nM、15nM和3nM生物素化靶标进行第2至4轮淘选,然后在Dynabeads M-280链霉亲和素上捕获噬菌体上的Fab/靶标复合物。用PBST和PBS缓冲液多次洗涤噬菌体/靶标/珠复合物。根据标准方案,使用100mM DTT从M-280珠上洗脱捕获的带有靶标特异性Fab的噬菌体克隆,将该噬菌体克隆用于感染对数期TG1大肠杆菌(E.coli)细胞,并使用M13 KO7辅助噬菌体进行拯救。

[0306] 对于选择输出的筛选,由感染的TG1大肠杆菌细胞制备相应选择轮次的多克隆质粒小量制备物。将质粒重新格式化以在大肠杆菌上清液中产生可溶性Fab,该可溶性Fab在Fab CH1结构域的C末端处带有T7标签。将编码T7标签化Fab的连接多克隆质粒转化至TG1大肠杆菌细胞(Zymo Research目录号T3017)中,并将单菌落挑入微量滴定板中。可溶性Fab在微量滴定板中表达,并通过离心澄清上清液。通过针对VEGF的ELISA测量以及针对VEGF受体2的竞争ELISA评定靶标结合。候选结合物的选择基于对VEGF的高结合信号以及对受体结合的良好抑制。

[0307] 随后以更大体积表达和纯化结合物,并使用SPR测量评定与VEGF的结合。获得的克隆之一通过迭代蛋白质工程化和测试策略进一步优化,并作为针对CDR-H1、CDR-H3和CDR-L2的不变序列整合到噬菌体展示文库中。简而言之,蛋白质工程化工作流程由以下项组成:最初几轮用于识别相关有益突变的侦查突变,接着是连续两轮基于以下项的亲和力成熟:基于寡核苷酸的突变文库生成和基于噬菌体展示的选择,接着是筛选和进一步测试。

[0308] 在两个文库中,Fab片段的CH1结构域均经由接头与截短的基因III蛋白融合,以促进噬菌体展示。因此,一个文库旨在筛选双特异性Fab片段,其中IL6互补位包含来自CDR-H1、CDR-H3和CDR-L2的氨基酸残基(本文称为“6HVL”文库),而另一个文库旨在筛选双特异性Fab片段,其中IL6互补位包含来自CDR-H2、CDR-L1和CDR-L3的氨基酸残基(本文中称为“VH6L”文库)。

[0309] 通过噬菌体文库淘选,富集了每个文库中针对人IL-6的结合物。淘选后,为噬菌粒载体的两个富集池产生质粒微量制备物。用限制酶消化小量制备物以切除编码截短的基因III蛋白的区域,并通过连接使其重新环化,以获得编码可溶性Fab片段的表达载体池,该Fab片段富集了IL-6结合物。将这些载体池转化到TG1大肠杆菌细胞中,并挑选单个菌落并进行培养,以在微量滴定板中可溶性表达单个Fab克隆。使用标准ELISA方法针对与IL-6和VEGF-A的结合筛选包含可溶性Fab片段的上清液。

[0310] 基于筛选数据,选择双特异性抗VEGF/抗IL-6Fab片段,并分别对产生特异性结合物的TG1克隆进行DNA质粒制备和测序,以获得共同编码一个双特异性Fab片段的VH和VL序列对,该双特异性Fab片段与来自每个文库的IL-6和VEGF-A均特异性结合:

[0311] 这些克隆是6HVL_1,其特征在于SEQ ID NO:03的重链和SEQ ID NO:04的轻链,以及VH6L_1,其特征在于SEQ ID NO:09的重链和SEQ ID NO:10的轻链。

[0312] 实例2:

[0313] 双特异性抗VEGF/抗IL-6Fab片段6HVL_1和VH6L_1的表达和表征

[0314] 对所得双特异性抗VEGF/抗IL-6Fab片段进行表征。将如实例1中所述获得的载体转化至TG1大肠杆菌细胞中,并且对于6HVL_1和VH6L_1两者,培养单独的菌落以用于双特异

性抗体Fab片段的可溶性表达。通过亲和色谱从TG1培养物上清液中纯化双特异性抗体。评定双特异性抗体6HVL_1和VH6L_1与来自人和食蟹猴IL6的IL-6、人VEGF121和人VEGF165的结合。

[0315] 实例3:

[0316] 双特异性抗VEGF/抗IL-6Fab片段6HVL_1和VH6L_1的表征通过表面等离子体共振(SPR)评定的IL-6结合动力学:

[0317] 使用表面等离子体共振(SPR)来测量代表性VEGF-IL-6Fab片段与本文公开的人和食蟹猴IL-6的结合动力学和亲和力。

[0318] 使用HBS-EP+(1x;BR100669;Cytiva)作为运行缓冲液,在25℃在Biacore 8K仪器(Cytiva)上对来自人和食蟹猴的相应Fab片段IL-6的结合进行SPR分析。将人Fab结合物(28958325,Cytiva)在10mM乙酸钠缓冲液(pH 5.0)中稀释至终浓度10μg/ml,并使用标准胺偶联化学固定在CM5传感器芯片上。该固定程序产生约5000个共振单位(RU)的配体密度。对参考通道进行相应处理。

[0319] 在蛋白质测量之前,进行五个启动循环以用于调节目的。在每个循环中,使HBS-EP+缓冲液流动约120秒,随后通过应用10mM甘氨酸缓冲液pH2.0 60秒来再生衍生化芯片表面。将浓度为75nM的抗体Fab片段在HBS-EP+缓冲液中以10ul/min的流速在该表面上捕获60秒。没有将Fab片段应用于参考通道。随后,以30ul/min的流速在HBS-EP+缓冲液中以适当的稀释系列应用人或食蟹猴IL-6(接触时间180秒,解离时间720秒)。如上所述实现了衍生化芯片表面的再生。使用8K评估软件(Biacore Insight Evaluation 3.0)评估数据。使用双重参考并使用1:1结合模型来拟合原始数据。

[0320] 图1显示了针对测试的Fab片段确定的代表性SPR迹线和拟合曲线,并在图中提供了相应的Fab名称。针对与人和食蟹猴IL-6以及与作为阴性对照的IL-1α(IL-1a)的结合描绘了数据。图中提供的亲和力对应于三个独立实验的平均值和标准偏差。

[0321] 我们观察到6HVL_1和VH6L_1与人IL-6的明显结合。仅VH6L_1显示出对cyIL-6的显著亲和力,尽管解离速率明显非常快。未观察到与阴性对照靶标IL-1a的结合。SPR数据拟合结果如表1所示。数据为三个实验的平均值,并提供解离常数KD的标准偏差。对于6HVL_1,我们观察到亲和力为KD=0.9nM,而对于VH6L_1,亲和力为KD=10.7nM。

[0322] 表1:所示抗体与人和食蟹猕猴IL6的亲和力

[0323]

| | 人 IL6 | | 食蟹猴 IL6 | |
|---|---|---|---|---|
| | $K_D$ [nM] | SD [nM] | $K_D$ [nM] | SD [nM] |
| 6HVL_1 | 0.93 | 0.04 | 210 | 17 |
| VH6L_1 | 10.7 | 0.3 | - | - |

[0324] 通过竞争ELISA评定的VEGF结合:

[0325] 为了测试需要哪种抗体浓度来阻断VEGF121和VEGF165与其受体的相互作用,使用6HVL_1和VH6L_1进行竞争ELISA实验。VEGF结合Fab片段兰尼单抗用作阳性对照,并且仅使用缓冲液的实验用作阴性对照。简而言之,将所有样品的1:3稀释系列(从20nM开始)与恒定浓度的10pM VEGF121(Humanzyme HZ-1206)或10pM VEGF165(Humanzyme HZ-1153)混合,并

孵育90分钟。然后,用2%MPBST阻断Maxisorp板表面后,将该混合物转移至已包被有VEGF受体1(VEGF-R1,R&Dsystems,1μg/ml,于NaHCO3中,pH 9.4)的Maxisorp板。Fab-抗原混合物与受体包被板之间的接触时间在室温下限制为10分钟,以最小化对结合平衡的干扰。孵育和2次洗涤步骤后,使用生物素化的抗VEGF mAb(BAF203,R&D systems)和辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(HRP-链霉亲和素)对VEGFR1包被的板上的VEGF121/VEGF165进行检测。后者利用HRP底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺TMB显色转化为3,3',5,5'-四甲基联苯胺二胺进行检测,随后可在450nm处出现吸光度变化。将TMB预热至室温并在板上孵育5分钟,然后通过添加1N $H_2SO_4$淬灭。

[0326] 靶标VEGF165的结果如图2以及表5和表6所示。显然,与临床上成熟的VEGF-A拮抗剂兰尼单抗相比,VH6L_1和6HVL_1都展示出大大提高的与VEGF165和VEGF121二者竞争与VEGFR1结合的能力。

[0327] 实例4:

[0328] 双特异性抗VEGF-A/抗IL6 Fab片段的改进

[0329] 如上所述,两种抗体均未表现出与食蟹猴IL6的交叉反应性或表现出较低的交叉反应性,但该交叉反应性对于临床开发来说是需要的。除此之外,眼部血管疾病的治疗需要将治疗剂注射到眼中,并且因此最佳的治疗剂应该对靶抗原展示出高亲和力和高浓度,以最大化治疗效果的持久性和患者便利性。因此,出于预期目的,需要进一步改进最初鉴定的分子。

[0330] 通过在VH和VL结构域中引入不同的氨基酸取代,进行了几轮成熟。在成熟期间,基于它们在产率、亲和力、同时的抗原结合、亲水性、稳定性、粘度和其他参数方面的期望特性,筛选和选择衍生自两种"亲本"抗体6HVL_1和VH6L_1的候选抗体。

[0331] 从来自每轮成熟的多个测试的候选抗体分子中选择改进的候选抗体6HVL_2、6HVL_3和6HVL_4以及VH6L_2和VH6L_3。候选物选择基于所需的特性,特别是改进人IL6结合和食蟹猴IL6交叉反应性,同时确保高浓度下的可注射性并保持其他有利特性,例如VEGF-A亲和力和热稳定性。

[0332] 从多个被测候选抗体分子中选择改进的候选抗体6HVL_4作为优选候选物。

[0333] 表2:所示双特异性Fab片段的氨基酸序列(数字指本文所用的SEQ ID NO)

[0334]

| | VL | VH | 轻链 | 重链 |
|---|---|---|---|---|
| 6HVL_2 | 5 | 6 | | |
| 6HVL_3 | 7 | 8 | | |
| VH6L_2 | 11 | 12 | | |
| VH6L_3 | 13 | 14 | | |
| 6HVL_4 | 21 | 22 | 23 | 24 |
| 6HVL_4_YHE | 25 | 26 | | |

[0335] 所有Fab片段均包括与抗体VH6L_4的全长轻链和重链氨基酸序列中包含的恒定区(即具有SEQ ID NO:29的CL和具有SEQ ID NO:30的CH1)相同的恒定区。

[0336] 如实例2所述表达候选抗体。

[0337] 实例5:

[0338] 改善的抗VEGF-A/抗IL6 Fab片段的抗原结合动力学

[0339] 如上所述,使用所示Fab片段(如表2和实例2中所示的氨基酸序列)评定针对候选抗体的与人和食蟹猴IL6的结合动力学以及VEGF/VEGFR1竞争的竞争IC50。为了确定本发明的抗体相对于现有技术的效力,采用以下对照:双特异性抗体VH6L(WO2012/163520中公开的VH/VL序列,本文称为"VH6L-BM")、抗VEGF抗体兰尼单抗(INN)和在人与食蟹猴IL6之间发生交叉反应的抗IL6抗体,如WO2014/074905(阳性对照)中公开的。上述现有技术的抗体是通过重组表达制备的。

[0340] 图3以及表3和4显示了人和食蟹猴IL6结合的评定结果。6HVL_4和6HVL_4-YHE(具有三个另外的框架氨基酸突变的6HVL_4的变体)与最初选择的亲本分子相比,表现出改进的人IL6结合以及在药理学相关范围内的食蟹猴IL6交叉反应性。

[0341] 表3:SPR人IL6

[0342]

| | $K_D$[nM] | SD[nM] |
|---|---|---|
| 6HVL_1 | 0.927 | 0.042 |
| 6HVL_2 | 0.036 | 0.003 |
| 6HVL_3 | 0.043 | 0.013 |
| 6HVL_4 | 0.069 | 0.002 |
| 6HVL_4_YHE | 0.065 | 0.002 |
| VH6L_1 | 10.7 | 0.3 |
| VH6L_2 | 0.157 | 0.003 |
| VH6L_3 | 0.191 | 0.027 |
| VH6L_BM | 3.5 | 0.6 |
| 阳性对照 | 0.035 | 0.007 |

[0343] 表4:SPR食蟹猴IL6

[0344]

| | $K_D$ [nM] | SD [nM] |
|---|---|---|
| 6HVL_1 | 210 | 16.57 |
| 6HVL_2 | 23.37 | 0.84 |
| 6HVL_3 | 0.98 | 0.07 |
| **6HVL_4** | **1.48** | **0.09** |
| 6HVL_4_YHE | 1.39 | 0.04 |

[0345]

| | | |
|---|---|---|
| VH6L_1 | n.s.* | |
| VH6L_2 | 1.3E-03 | 0.29 |
| VH6L_3 | 5.3E-03 | 0.51 |
| VH6L_BM | n.s.* | |
| 阳性对照 | 1.8E-04 | 0 |

[0346] *无可评估信号

[0347] 图4以及表5和6显示了使用人VEGF121和人VEGF165通过竞争ELISA评定的VEGF结合的评定结果。图4示出了现有技术分子6HVL_BM表现出的亲和力太低而无法在测定条件下检测到,并且因此肯定远低于本发明的抗体的亲和力。

[0348] 表5:IC50 VEGF121

[0349]

| | IC50[pM] | SEM[nM] |
|---|---|---|
| 6HVL_1 | 173 | 12 |
| 6HVL_2 | 194 | 13 |
| 6HVL_3 | 171 | 11 |
| 6HVL_4 | 458 | 30 |
| 6HVL_4_YHE | 528 | 35 |
| VH6L_1 | 26 | 2 |
| VH6L_2 | 38 | 3 |
| VH6L_3 | 20 | 1 |
| 兰尼单抗 | 503 | 25 |

[0350] 表6:IC50 VEGF165

[0351]

| | IC50 [pM] | SEM [nM] |
|---|---|---|
| 6HVL_1 | 182 | 17 |
| 6HVL_2 | 143 | 13 |
| 6HVL_3 | 114 | 11 |
| **6HVL_4** | **111** | **10** |
| 6HVL_4_YHE | 135 | 13 |
| VH6L_1 | 65 | 6 |

[0352]

| | | |
|---|---|---|
| VH6L_2 | 62 | 6 |
| VH6L_3 | 32 | 3 |
| 兰尼单抗 | 1184 | 81 |

[0353] 实例6:

[0354] 抗VEGF/抗IL-6Fab片段的同时结合

[0355] 使用固定化的抗Fab抗体捕获本发明的抗VEGF/抗IL-6Fab片段,通过表面等离子体共振如下评定本发明的抗体与其靶标的同时结合:

[0356] 使用标准胺偶联化学将抗Fab抗体(Cytiva 28958325)的大约5000个共振单位(RU)固定至S系列传感器芯片CM5(Cytiva BR100530)。使用HBS-P+(10mM HEPES、150mM NaCl pH 7.4、0.05%表面活性剂P20)作为运行和稀释缓冲液,并将流动池的温度设置为25℃。

[0357] 通过以5μL/min的流速注射10μg/mL溶液30秒,经由κ链捕获抗VEGF/抗IL-6Fab片段,从而形成抗Fab抗体/抗VEGF/抗IL-6Fab复合物。依次或同时添加两种抗原:人VEGFA121

(内部产生,P1AA1779-010)和人IL-6(商业,Peprotech#200-06),以允许形成包含抗Fab抗体、抗VEGF/抗IL-6Fab、人VEGFA和人IL-6的复合物。监测相应的SPR响应单位曲线(Biacore T200,Cytiva)。对于顺序结合,注射浓度为300nM的人VEGFA 180秒,然后另外注射浓度为300nM的人IL-6 180秒。还以相反顺序注射相同浓度(首先注射人IL-6,然后注射人VEGFA)。类似地,两种抗原的混合物以各300nM的浓度注射180秒。每个实验之后,通过以5μL/min的流速注射10mM甘氨酸pH 2.1 60秒进行表面再生。通过减去空白注射并通过减去从没有捕获Fab的对照流通池获得的响应来校正大折射率偏差。

[0358] 结果在图7中示出。将人VEGF-A添加到抗Fab/抗VEGF/抗IL-6Fab复合物中引起结合并形成抗Fab/Fab/VEGF-A复合物。人IL-6的连续添加引起抗Fab/DutaFab/VEGF-A/IL-6复合物的形成(虚线)。这清楚地证明人VEGF-A和人IL-6与抗VEGF/抗IL-6Fab的同时结合是可能的。

[0359] 按照相反的顺序,首先添加人IL-6,然后依次添加人VEGF-A,同时结合的减少是明显的(虚线)。这表明人IL-6的结合首先在空间上干扰人VEGF-A的结合,从而使抗VEGF/抗IL-6Fab与人VEGF-A之间的结合能力降低,但仍然是可能的。

[0360] 在两个靶标均存在的情况下,人IL-6的结合似乎是优选的,并且与人VEGF-A的结合减少(实线)。这种效应是合理的,因为与人VEGF-A相比,抗VEGF/抗IL-6Fab对人IL-6的固有亲和力更高。

[0361] 在另一测定中,使用固定化的VEGF-A利用表面等离子体共振通过抑制测定来评定在IL-6存在下抗VEGF/抗IL-6Fab片段对VEGF-R2的阻断:

[0362] 为了显示人VEGF-A和人IL-6与抗VEGF/抗IL-6Fab片段的同时结合,使用标准胺偶联化学将人VEGF受体2(VEGFR2,商业的R&DSystems 357-KD)固定到S系列传感器芯片CM5(Cytiva BR100530),产生的表面密度为约11000个共振单位(RU)。使用HBS-P+(10mM HEPES,150mM NaCl pH 7.4,0.05%表面活性剂P20)作为运行和稀释缓冲液。

[0363] 作为参考,使用50nM人VEGFA溶液中的0-200nM抗VEGF/抗IL-6Fab片段的1:2稀释系列,并测试VEGFA和VEGFR2抑制。将抗VEGF/抗IL-6Fab片段/VEGFA混合物以5μL/min的流速注射到固定化的VEGFR2表面上30秒。在持续60秒的解离期之后,通过以5μL/min的流速注射5mM NaOH 30秒进行VEGFR2表面再生。通过减去空白注射并通过减去从空白对照流通池获得的应答来校正大折射率偏差。对于评估,在注射结束后五秒采取结合响应。将RU中的衍生响应转化为相对于与没有双特异性Fab的配体相对应的初始信号的结合响应。使用4参数逻辑模型(XLfit,ID Business Solutions Ltd.)计算IC50值。

[0364] 除了参考之外,将在存在10nM人IL-6的溶液中的0-200nM抗VEGF/抗IL-6Fab片段的稀释液预孵育15分钟并进行测试以计算IC50值(图3)。

[0365] 结果在图8中示出。该图显示了VEGFR2/VEGF-A相互作用的抑制依赖于竞争性抗VEGF/抗IL-6Fab的浓度。在不存在抗VEGF/抗IL-6Fab的情况下,实现了100% VEGFR2/VEGF-A结合(0%抑制),而增加抗VEGF/抗IL-6Fab浓度则增加了抑制(带叉的实线)。添加模拟治疗相关条件的人IL-6不会影响VEGFR2/VEGF-A的抑制程度,并产生非常相似的IC50值(IC50=33nM,没有人IL-6(带三角形的虚线);IC50=37nM,含有额外的人IL-6(带三角形的黑色虚线))。

[0366] 在第三测定中,通过基于细胞的IL-6特异性报告基因测定如下评定VEGF结合对

IL6活性的影响：

[0367] 为了评定人VEGFA和人IL-6与抗VEGF/抗IL-6Fab的同时结合，使用利用报告细胞系HEK-Blue™ IL-6细胞(InvivoGen)的基于细胞的IL-6特异性报告基因测定。在不存在和存在过量人VEGF-A的情况下，通过同时添加(图9)或在预孵育双特异性Fab和人IL-6之后添加(图10)，将细胞与抗VEGF/抗IL-6Fab和人IL-6一起孵育20+/-1小时。人IL-6与其HEK-Blue™ IL-6细胞表面上的受体IL-6R的结合通过Janus家族(JAK1、JAK2和Tyk2)的酪氨酸激酶触发信号传导级联，从而引起激活信号转导子和转录激活子3(STAT3)以及随后分泌SEAP(分泌型胚胎碱性磷酸酶)。在抗VEGF/抗IL-6Fab与人IL-6结合的情况下，信号传导被抑制并且不产生SEAP。随后通过将QUANTI-Blue SEAP底物添加到上清液等分式样中来定量细胞培养物上清液中的SEAP水平。SEAP将QUANTI-Blue底物转化为可以使用酶标仪在650nm吸光度处进行测量的产物。然后通过绘制平均吸光度与抗VEGF/抗IL-6Fab浓度的图来评定人VEGFA和人IL-6的同时结合，并将数据拟合到经约束的4参数曲线。使用4参数逻辑曲线拟合计算样品的相对效力(抑制浓度)。

[0368] 结果在图9和图10中示出。

[0369] 图9显示了没有预孵育的结果。增加抗VEGF/抗IL-6Fab的量的滴定显示出清晰的剂量响应曲线，其中计算的$IC_{50}$值为1.134ng/mL(约22.5pM)，表明通过增加抗VEGF/抗IL-6Fab的量明显抑制了人IL-6反应。为了解决人IL-6和VEGFA与双特异性Fab的同时结合，同时孵育两种靶分子并测量人IL-6效应。无论选择的人VEGFA:人IL-6的比例(1:1/2.5:1/5:1)如何，仅观察到有效$IC_{50}$值略有降低。该值从不存在人VEGFA时的$IC_{50}$＝1.134ng/mL到当人VEGF-A以5倍过量存在时的$IC_{50}$＝1.724ng/mL略有变化，这种情况密切反映了体内相关条件。

[0370] 图10显示了有预孵育的结果，表明IL6的结合不影响IL6结合。

[0371] 实例7：

[0372] 通过X射线晶体学确定的抗VEGF/抗IL-6Fab片段与IL-6的结合以及提议的作用模式

[0373] IL-6信号传导是通过形成IL6与其非信号传导共受体IL6R和细胞因子受体gp130的六聚体复合物来启动的。这里，已经定义了三个表位(位点1、2和3)来识别复合物中形成的接触表面(Boulanger MJ等人，Science 2003,27;300(5628):2101-4.)。IL-6首先通过称为“位点1”的相互作用表面与IL-6R结合。“位点2”是由IL-6和IL-6R二元复合物形成的与gp130的结构域2和3相互作用的表位。随后IL6的“位点3”与gp130的结构域1之间的相互作用引起形成IL6/IL6R/gp130三聚体的二聚体，并因此形成六聚信号传导复合物。

[0374] 为了了解IL6的哪些表位与我们的两个Fab系列(6HVL和VH6L)结合，我们对IL-6和分别代表本发明的抗VEGF/抗IL-6Fab片段的抗体Fab之间的复合物进行了结构分析。所使用的Fab 6HVL4.1与Fab 6HVL_2非常密切相关，并且差异仅在于两个突变，并且Fab 0182与Fab VH6L_1最密切相关。由于所有6HVL克隆均源自相同的Fab(6HVL_1)，并且同样所有VH6L克隆分别源自Fab VH6L_1的事实，因此可以安全地假设以下获得的结构结果适用于Fab的个别系列中的每一者。形成了Fab和IL-6的复合物，并且复合物结构的分析通过X射线晶体学如下进行：

[0375] IL6-Fab复合物通过分别将等摩尔量的Fab片段0182(轻链氨基酸序列SEQ ID NO:

33,重链氨基酸序列SEQ ID NO:34)或6HVL4.1(轻链氨基酸序列SEQ ID NO:37,重链氨基酸序列SEQ ID NO:38)与IL-6(PeproTech,批次号031316-2)混合来制备。

[0376] 在冰上孵育90分钟后,将蛋白质复合物浓缩至针对Fab片段0182的23.1mg/ml和针对6HVL4.1的21.3mg/ml。初始结晶试验在21℃在坐滴蒸汽扩散装置中进行。

[0377] 对于Fab片段0182,在两天内自0.1M $MgCl_2$、0.1M柠檬酸钠pH 5、15%(w/v)PEG 4000中出现针状晶体。随后将晶体用于接种实验,并且可以自0.1M乙酸钙、12%(w/v)PEG 8000、0.1M二甲胂酸钠pH 5.5中获得大的四角形晶体。

[0378] 对于6HVL4.1,在一天内自0.2M硫酸铵、0.1M Tris pH 7.5pH和20%(w/v)PEG MME 5000中出现菱形晶体。

[0379] 对于数据收集,将收集的晶体在补充有15%乙二醇的结晶溶液中在100K快速冷却。使用PILATUS 6M检测器以瑞士光源(Villigen,Switzerland)的光束线X10SA以0.9999 Å(针对Fab片段0182)和0.9982Å(针对6HVL4.1)的波长收集X-射线衍射数据。数据已使用XDS(Kabsch,W.,XDS.Acta Cryst.D66,125-132(2010))处理,使用AIMLESS(P.R.Evans和G.N.Murshudov"How good are my data and what is the resolution?"Acta Cryst.(2013)。D69,1204-1214)进行缩放并使用STARANISO(Tickle,I.J.,Flensburg,C.,Keller,P.,Paciorek,W.,Sharff,A.,Vonrhein,C.,Bricogne,G.(2018).STARANISO(http://staraniso.globalphasing.org/cgi-bin/staraniso.cgi).Cambridge,United Kingdom:Global Phasing Ltd.)分析各向异性。

[0380] 包括Fab 0182的复合物的晶体属于空间群$P2_1$,其中晶胞轴为a=65.93 Å, b=65.46 Å, c=159.30 Å,β=91.65°,并且衍射至2.18 Å的分辨率。

[0381] 包括6HVL4.1的复合物的晶体属于空间群$P2_12_12_1$,其中晶胞轴为a=57.56 Å, b=64.98 Å, c=203.68 Å,并且衍射至1.94 Å的分辨率。

[0382] 结构利用PHASER(McCoy,A.J.,Grosse-Kunstleve,R.W.,Adams,P.D.,Winn,M.D.,Storoni,L.C.,&Read,R.J.Phaser crystallographic software.J Appl Cryst.40,658-674(2007)),使用内部Fab的坐标和IL-6(pdb条目1alu)作为搜索模型通过分子置换来确定。根据序列差异,使用差异电子密度来改变氨基酸。该结构使用来自CCP4套件(Winn,M.D.等人Overview of the CCP4 suite and current developments.Acta.Cryst.D67,235-242(2011))和BUSTER(Bricogne,Blanc,G.E.,Brandl,M.,Flensburg,C.,Keller,P.,Paciorek,W.,Roversi,P.,Sharff,A.,Smart,O.S.,Vonrhein,C.,Womack,T.O.Buster版本2.9.5Cambridge,United Kingdom:Global Phasing Ltd.(2011))的程序进行精修。手动重建是使用COOT完成的(Emsley,P.,Lohkamp,B.,Scott,W.G.,Cowtan,K.Features and Development of Coot.Acta Cryst.D66,486-501(2010))。

[0383] 表7汇总了数据收集和优化统计信息。所有图形演示均使用PYMOL(Pymol分子图形系统,版本1.7.4.Schrödinger,LLC.)制备。

[0384] 表7数据收集和精修统计

| | Fab0182 – IL-6 复合物 | Fab 6HVL4.1 – IL6 复合物 |
|---|---|---|
| **数据收集** | | |
| 空间群 | $P2_1$ | $P2_12_12_1$ |
| 细胞尺寸 | | |
| *a*, *b*, *c* (Å) | 65.930、65.46、159.30 | 57.56、64.98、203.68 |
| α、β、γ (°) | 90、91.65、90 | 90、90、90 |
| 分辨率 (Å) | 2.18 | 1.94 |
| $R_{meas}$ | 0.12 | 0.10 |
| $I / \sigma I$ | 9.98 (1.87) | 10.00 (0.85) |
| CC(1/2) | 0.996 (0.579) | 99.2 (98.6) |
| 椭球整体完整性 (%) | 48.1 | |
| 椭球内壳完整性 (%) | | |
| 椭圆外壳完整性 (%) | 99.7 | |
| | 6.0 | |
| 冗余 | 3.80 (3.55) | 7.34 (7.55) |
| **细化** | | |
| 分辨率 (Å) | 79.62 – 2.18 | 38.80 – 1.94 |
| 反射数 | 34236 | 57144 |
| $R_{工作} / R_{游离}$ | 17.70/24.80 | 19.80/23.10 |

[0385]

[0386]

| | | |
|---|---|---|
| 原子数 | | |
| 蛋白质 | 8774 | 4502 |
| 水 | 411 | 347 |
| *B* 因子 | | |
| 蛋白质 | 49.37 | 48.57 |
| 水 | 30.70 | 56.30 |
| R.m.s. 偏差 | | |
| 键长 (Å) | 0.010 | 0.010 |
| 键角 (°) | 1.22 | c |
| PROASIS ID | 1txqc | |

[0387] *括号中的值针对最高分辨率壳。

[0388] Fab 0182-IL-6复合物的结构

[0389] 以2.18 Å的分辨率确定Fab 0182(Fab的VH6L系列的代表)与IL-6复合的复合物的晶体结构(图5)。该结构显示Fab 0182通过重链的CDR2和轻链的CDR1、CDR3的贡献而与IL-6结合。与IL-6的进一步相互作用由Fab 0182轻链的N末端残基Val3和Gln4维持。IL-6贡献的界面由螺旋A和螺旋C的残基形成。

[0390] 图16示出了Fab 0182与IL6的结合模式。为了说明的目的,我们生成了两个结构的叠加:首先是Fab与IL6的复合物结构的叠加,并且其次是IL6R与IL6的复合物结构(取自IL6、IL6R和gp130的共晶结构,pdb登录号为1p9m,参见Boulanger MJ等人,Science 2003,27;300(5628):2101-4)的叠加。将其与IL6与IL6R和gp130的三聚复合物进行比较,显然Fab以与gp130非常相似的方式与IL6结合,即它与IL6的位点2结合。预期这种结合模式允许Fab和IL6R两者与IL6的同时结合,即IL6与IL6R的相互作用应该仍然是可能的,并且先验预期这种IL6拮抗剂通过经由与IL6的位点2的结合来抑制IL6/IL6R复合物与gp130的相互作用而发挥作用。

[0391] Fab 6HVL4.1-IL-6复合物的结构

[0392] 我们以1.94 Å的分辨率确定了Fab 6HVL4.1与IL-6复合的复合物的晶体结构(图6)。该结构显示Fab 6HVL4.1通过重链的CDR1、CDR3和轻链的CDR2、CDR3的主要贡献而与IL-6结合。与IL-6的进一步相互作用由Fab 6HVL4.1的重链的前三个N末端残基维持。IL-6贡献的界面由螺旋A和螺旋C的残基形成。

[0393] 与对Fab 0182所做的类似,我们使用结构叠加并通过分析如上所述的相互作用残基来分析Fab 6HVL4.1与IL6的结合模式。图17表明,6HVL4.1也以与gp130非常相似的方式与IL6结合,并且因此从结构的角度来看,必须将其视为位点2结合物。

[0394] 与IL6的结合模式的实验研究

[0395] 类似6HVL4.1克隆及其衍生物是IL6位点2结合物的事实可以通过利用表面等离子体共振的测定进行功能性证实。

[0396] 在一项此类测定中,经由抗Fab抗体和IL6在SPR芯片表面上捕获代表克隆的6HVL系列(包括6HVL4.1(抗体“P1AE2421”))的Fab片段,并且随后使三种不同浓度(250nM、500nM、1000nM)的IL6R流过芯片表面。在这里,如果IL6能够与Fab和IL6R都结合,则我们预计会出现两步连续信号增加。并且事实上,对于测试的Fab,观察到的情况如下(图18):在SPR信号迹线中,IL6的添加引起信号强烈增加,并且在添加IL6R后信号进一步增强。这清楚地表明IL6R和Fab与IL6的同时结合是可能的。这一发现得到以下事实的进一步证实:IL6和IL6R的共价嵌合体(称为“hyper-IL6”,其中IL6的位点1被完全屏蔽且不可接近)当包被到SPR芯片上时,仍然促进相应Fab分子的结合,并且使用浓度为26nM的Fab进行探测(图19)。

[0397] 然而,当利用ELISA实验研究捕获的Fab片段是否与IL6竞争与IL6R的结合时,我们获得了令人惊讶的结果。测定设置如下:首先,将恒定浓度的IL6与也用于SPR实验并且代表克隆的6HVL系列的Fab片段P1AE2421的滴定系列预孵育。然后将其在直接包被有IL6R的ELISA板上孵育。洗涤后,利用辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(Strep-HRP),用生物素化抗IL6抗体检测与板结合的IL6R结合的IL6。在该测定中(图20),我们观察到的结果强烈表明Fab几乎完全抑制了IL6/IL6R相互作用。

[0398] 鉴于我们从可得晶体结构和SPR实验中知道IL6的位点1仍然可用于结合,我们必须解释这些结果,以便本专利中描述的IL6抗体不仅能够空间阻断IL6/IL6R复合物与gp130的结合,而且还以变构方式强烈降低IL6与IL6R的结合亲和力,即另外在功能上充当IL6位点1拮抗剂。

[0399] 由于以下原因,预期这种作用模式具有最佳特性:

[0400] 1.由于是IL6位点2结合物,IL6拮抗剂能够同样有效地阻断通过IL6与膜结合的IL6R和gp130的结合而形成的信号传导复合物(顺式信号传导)或IL6和IL6R的预形成复合物(反式信号传导)的形成。相反,IL6位点1结合物不能与IL6和IL6R的预形成复合物结合,但只有在复合物解离时才能拮抗它。

[0401] 2.由于以变构方式降低了IL6对IL6R的亲和力,与不表现出这种效果的位点2结合物相比,预期此处描述的IL6拮抗剂会通过不利于第一步信号传导的形成(即IL6/IL6R复合物的形成)而展示出增加的效力。预期不以变构方式干扰位点1结合的位点2结合物具有缺点,特别是对于顺式信号传导,即当必须阻断细胞表面上IL6/IL6R-gp130复合物形成的第二步时,预期相对有效的IL6/IL6R和gp130的浓度会非常高。

[0402] 3.已知当全身用作抗体时,IL6位点1结合物会导致IL6与抗体的复合物的强烈积累,这是因为与单独的IL6相比,复合物的半衰期大幅增加。相反,预期IL6位点2结合物仍然通过与膜结合的IL6R结合以及随后摄取复合物的细胞的内化和降解来消除IL6/抗体复合物。在这方面,预期此处描述的IL6拮抗剂将结合位点1和位点2结合物二者的所需特性:虽然在功能上能够阻断IL6/IL6R/gp130信号传导复合物形成的第一步,但它们仍然允许经由细胞上的IL6R结合来降解IL6/mAb复合物。

[0403] 4.在眼科适应症中以及用作Fab分子,此类结合物的预期行为可能仍然更有益:与IL6位点1结合物类似,Fab/IL6复合物可以使眼部空间相对不受IL6R结合的阻碍,并且可以

通过肾过滤过快速全身消除。

[0404] 实例8:

[0405] 改进的抗VEGF/抗IL6 Fab片段的热稳定性

[0406] 生成了改进的抗VEGF/抗IL-6抗体的进一步序列变体,包括表8中鉴定的氨基酸序列。

[0407] 表8:所示双特异性Fab片段的氨基酸序列(数字指本文所用的SEQ ID NO)

[0408]

| | VL | VH |
|---|---|---|
| 6HVL_5 | 39 | 40 |
| 6HVL_6 | 41 | 42 |
| VH6L_4 | 43 | 44 |
| VH6L_5 | 45 | 46 |

[0409] 如下评定所示双特异性抗体的热稳定性。

[0410] 热稳定性:

[0411] 在20mM组胺酸/组胺酸氯化物、140mM NaCl(pH 6.0)中制备浓度为1mg/mL的双特异性抗体Fab片段的样品,并将其转移至10μL微量比色皿阵列。使用UNcle仪器(Unchained Labs),记录以266nm激光激发之后的静态光散射数据和荧光数据,同时样品以0.1℃/min的速率从30℃加热至90℃。样品重复测量三次。

[0412] 对起始温度的评估由UNcle分析软件完成。聚集开始温度被定义为散射强度开始增大时的温度。通过萤光信号的重心均值(BCM)随热量的偏移来监测蛋白质的变性。解链温度被定义为BCM(nm)相对于温度的曲线图中的拐点。

[0413] 表9:热稳定性

[0414]

| | **Tagg (℃)** | **Tm** |
|---|---|---|
| **6HVL_4** | 64.7 | 70.1 |
| **6HVL_5** | 64.9 | 71.3 |

[0415]

| | Tagg (℃) | Tm |
|---|---|---|
| **6HVL_4** | 64.7 | 70.1 |
| **6HVL_6** | 63.4 | 66.8 |
| **VH6L_3** | 65.8 | 77.0 |
| **VH6L_4** | 66.6 | 76.3 |
| **VH6L_5** | 66.6 | 77.0 |

[0416] 实例9:

[0417] 改进的双特异性抗VEGF/抗IL6 Fab片段的生物物理特性(通过动态光散射(DLS)进行粘度评定)

[0418] 如前所述的抗体Fab片段通过标准方法在CHO细胞中表达。

[0419] 如前所述通过乳胶珠DLS方法测量粘度(He F等人;Anal Biochem.2010 Apr 1;399(1):141-3)。具体地,使用所示材料按照以下方案进行。

[0420] 粘度评估:

[0421] 仪器和材料

[0422] • 具有Greiner Bio-One微孔板的Wyatt DLS酶标仪

[0423] • 3000系列Nanosphere™尺寸标准品(Thermofisher目录号3300A)

[0424] • 吐温20(罗氏,目录号11332465001)和硅油,例如(Alfa Aesar目录号A12728)

[0425] • 用于浓度测定的紫外光度计(例如Nanodrop 8000)。

[0426] 样品制备

[0427] 将抗体样品重新缓冲并用20mM His/HCl(pH 5.5)(缓冲液)和0.02%Tween 20(最终浓度)稀释。加入珠浓度为0.03%的固体。制备至少三种不同的浓度,在可能的情况下,最高浓度为约200mg/mL。需要两个空白样品作为无抗体对照:一个包含重悬于水中的纳米球珠,并且另一个包含重悬于缓冲液中的纳米球珠。将样品转移到微孔板中,并用硅油覆盖每个孔。

[0428] 使用WyattDLS酶标仪进行测量

[0429] 所有样品和空白均在15℃至35℃的不同温度下以5℃的步长进行分析。采集时间为30秒,并且每个样品和温度的采集次数为40次。

[0430] 数据分析

[0431] 在软件模板(Microsoft Dynamics 7.10或更高版本)的概览中示出了以nm为单位的原始数据Dapp(表观半径)。用公式(ηreal=Dapp*ηH2O/Dreal)计算粘度。Dreal是空白样品中测得的珠大小,其等于珠大小(300nm)。在Excel曲线中显示计算出的粘度。使用Mooney曲线拟合(在Excel中),可以推断给定浓度下的粘度。在此,计算了粘度超过20cP的最大蛋白质浓度。

[0432] 在20℃达到20cP粘度的所示抗体的最大浓度如下所示。

[0433] 表10:通过DLS珠法测量的粘度。示出了在20℃达到20cP的所示抗体的最大可行浓度。

[0434]

| | 浓度[mg/ml] |
|---|---|
| 6HVL_4 | 195.4 |
| 6HVL_5 | 192.4 |
| VH6L_3 | 220.0 |
| VH6L_4 | 226.8 |
| VH6L_5 | 240.4 |

[0435] 结果表明,可以以高浓度配制本发明的抗体,该高浓度包含低于可注射能力的可接受的粘度极限的粘度。结果,本发明的抗体非常适合于眼内应用,因为它们允许在有限的注射量中提供高摩尔剂量,当与高效力结合时,这会产生高耐久性并因此降低给药频率,这对增加患者便利性和治疗依从性是需要的。

[0436] 实例10:

[0437] 用于证明VEGF/IL6双特异性抗体6HVL_4介导的IL6抑制的基于原代细胞的测定(HRMEC)

[0438] 为了测量HRMEC中的IL-6信号传导活性,建立了量化HRMEC中的ICAM-1表面表达的测定。用等摩尔浓度(2nM)的人IL-6和人IL-6R的组合刺激HRMEC 72小时。通过流式细胞术评定ICAM-1表面表达。为了测量6HVL_4的抑制活性,在应用于细胞之前,将IL-6/IL-6R混合物与浓度逐渐增加的抗体一起预孵育。

[0439] 细胞培养:将HRMEC(目录号PEL-PB-CH-160-8511;PELOBiotech Gmbh;Bayern,Germany)解冻并在175cm2烧瓶中的内皮细胞生长培养基(EGM-MV)中培养,该培养基包含内皮细胞基础培养基(EBM)(目录号CC-3156;Lonza;Basel,Switzerland)以及5%胎牛血清(FBS)、氢化可的松、人成纤维细胞生长因子B、VEGF、R3-IGF-1(胰岛素样生长因子-I的重组类似物,其中位置3处的Arg替换为Glu)、抗坏血酸、人表皮生长因子和GA-1000(全部包括在EGM-2MV微血管内皮细胞SingleQuotsTM试剂盒中;目录号CC-4147;Lonza),浓度为制造商推荐的浓度。铺板后二十四小时,用新鲜的EGM-MV更换培养基,并在测定前将细胞再生长3天。针对不同的传代次数和IL-6/可溶性IL-6R浓度优化测定条件。最终测定使用第6代的HRMEC和浓度为2nM的IL-6/可溶性IL-6R的等摩尔刺激物进行。

[0440] 流式细胞术测定:通过使用不含Ca2+和Mg2+的磷酸盐缓冲盐水(PBS)(目录号10010023;Life Technologies)洗涤两次,并使用细胞解离试剂Accutase(目录号A1110501;Thermo Fisher Scientific;Waltham,MA)洗涤一次,将HRMEC与烧瓶分离。洗涤后,向细胞中添加5mL细胞解离试剂,并将烧瓶在5% CO2培养箱中于37℃孵育3分钟。从烧瓶中收集分离的细胞并放入50mL锥形离心管中。用含有2% FBS的EBM将管填充至50mL,并在300g离心6分钟。弃去上清液,并将沉淀重悬于5mL饥饿培养基(含有2% FBS的EBM)中。使用TC20自动细胞计数器(Bio-Rad;Hercules,CA)对细胞数量进行定量,并使用饥饿培养基调整至300,000个细胞/mL。然后,将100μL细胞悬浮液添加到Costar 96孔板(目录号3596;Corning;Corning,NY)的每个孔中,从而产生30,000个细胞/孔。然后,将板在5% CO2培养箱中于37℃再孵育24小时。

[0441] 将重组人IL-6(目录号206-IL/CF;R&D Systems;Minneapolis,MN)和重组人IL-6R(目录号227-SR-025;R&D Systems)以等摩尔浓度在饥饿培养基中混合并在室温孵育1小时以允许形成IL-6-I/L-6R复合物。接下来,将50L 6HVL_4稀释系列(3倍7点稀释)添加到细胞中,并于37℃、5% CO2孵育1小时。最后,将50μL IL-6-I/L-6R复合物添加到细胞中,从而产生终浓度各为2nM的IL-6和IL-6R,和终浓度为200.009nM的6HVL_4。还包括未刺激的细胞和用不含6HVL_4的IL-6-I/L-6R复合物刺激的细胞,以分别确定背景ICAM-1表面表达和100%响应水平。将细胞在37℃在5% CO2培养箱中孵育72小时。

[0442] 为了分析ICAM-1表面表达,用PBS($Ca^{2+}$,$Mg^{2+}$;Life Technologies)洗涤细胞两次,并用细胞解离试剂Accutase(目录号A1110501;Thermo Fisher Scientific)洗涤一次。使用50μL细胞解离试剂(3分钟,37℃)将细胞与板分离,并转移至流式细胞术Falcon 96孔储存板(目录号353263;Corning)。将原始孔用含有2% FBS和2mM EDTA的100μLPBS洗涤一次,并将含有剩余细胞的洗涤培养基添加到流式细胞术板中。通过以300g离心6分钟沉淀细胞,并弃去上清液。将沉淀重悬于含有10μg/mL人IgG(目录号I2511;MilliporeSigma;Burlington;MA)的100μL PBS、2% FBS、2mM EDTA中,以阻断非特异性结合位点,并在室温孵育15分钟。阻断后,将0.5μg荧光素标记的抗ICAM-1抗体(目录号BBA20;R&D Systems)添加到细胞中,并将反应在28℃孵育45分钟。染色后,通过以300g离心6分钟沉淀细胞,并将沉淀重悬于含有2% FBS和2mM EDTA的150μL PBS中。使用Attune NxT流式细胞仪(Thermo Fisher Scientific)测量荧光素荧光。

[0443] 数据分析:对于所有3个测定,每个独立实验中的每种条件均一式四份进行。对于每个实验,从实验孔中减去未经刺激的细胞的背景信号并计算每种条件的平均信号。从用不含6HVL_4的IL-6/IL-6R刺激的细胞计算100%响应水平,并且然后将6HVL_4的抑制潜力表示为100%响应的抑制百分比。在3个独立实验中测量针对每个浓度的6HVL_4的抑制百分比,并计算平均值和SEM。利用ExcelXLfit软件版本5.5.0(IDBS;Guildford,UK)使用3个独立实验的平均值来计算平均IC50和SE。使用5参数逻辑模型(A+((B-A)/(1+(((B-E)*((C/x)^D))/(E-A)))))通过非线性回归分析拟合浓度响应曲线。

[0444] 表11:6HVL_4对HRMEC表面上IL-6诱导的ICAM-1表达的经计算的抑制%

[0445]

| 浓度 | 抑制 [%] | SEM [%] |
|---|---|---|
| 20 | 97.60 | 1.48 |
| 6.667 | 97.77 | 1.46 |
| 2.222 | 80.01 | 17.29 |
| 0.741 | 6.76 | 5.77 |
| 0.247 | -0.63 | 1.79 |

[0446]

| | | |
|---|---|---|
| 0.082 | -1.25 | 2.86 |
| 0.027 | -0.42 | 3.20 |

[0447] 6HVL_4引起HRMEC中IL-6信号传导的剂量依赖性抑制,其中50％抑制浓度(IC50)为1.52+/-0.04nM(图11)。

[0448] 实例11:

[0449] 用于证明VEGF/IL6双特异性抗体6HVL_4介导的VEGF抑制的基于原代细胞的测定(HUVEC)

[0450] 测定:

[0451] HUVEC获自Lonza(目录号00191027;Basel,Switzerland)。共同组成内皮细胞生长培养基(EGM-2)和测定培养基(EBM-2,含0.5％胎牛血清[FBS])的内皮细胞基础培养基(EBM-2;目录号CC-3156)和EGM-2内皮细胞SingleQuots试剂盒(目录号CC4176)也购自Lonza。

[0452] 包被有附着因子(AF)(目录号S-006-100;Gibco,Thermo Fisher Scientific;Waltham,MA)的T175细胞培养瓶(目录号353112;Corning;Corning,NY)用于维持HUVEC。StemProAccutase(目录号A11105-01;Gibco)用于分离细胞。

[0453] 使用alamarBlue(目录号DAL1100;Invitrogen,Thermo Fisher Scientific)在96孔纤连蛋白包被板(目录号354409;Corning)中进行细胞活力/增殖测定。

[0454] 重组人VEGF-A获自R&D(目录号293-VE;Minneapolis,MN),并以100μg/mL的库存浓度溶解在不含$Ca^{2+}$和$Mg^{2+}$的磷酸盐缓冲盐水(PBS)(目录号14190-094;Gibco)中。

[0455] Alamarblue含有细胞渗透性化合物刃天青。这种化合物会因健康细胞内的还原环境而改变颜色。生成的粉红色是活细胞的比例标记物,并且可用于通过测量570nm处的吸光度来检测增殖。VEGF-A诱导在细胞饥饿条件下生长的HUVEC的增殖。因此,可以通过使用VEGF-A中和抗体或Fab来抑制VEGF-A诱导的HUVEC增殖。

[0456] 使HUVEC保持在包被有AF的T175烧瓶中的EGM-2中,直至第5代。对于活力测定,使用Accutase分离HUVEC并在测定培养基(EBM-20.5％ FBS)中按1:1.66稀释。然后,将细胞离心并重悬于含有0.5％ FBS的EBM-2中至细胞密度为100,000个细胞/mL。然后,将100μL细胞悬液接种到纤连蛋白包被的96孔板上,从而产生10,000个细胞/孔的细胞密度。外孔未接种细胞,且然后仅填充测定培养基。将细胞于37℃在5％CO2培养箱中孵育过夜。

[0457] 第二天,使用VEGF-A储备溶液(100,000ng/mL,于PBS(Ca2+,Mg2+)中)在测定培养基(EBM 0.5％ FBS)中制备10倍工作溶液(750ng/mL)。

[0458] 6HVL_4储备溶液也在测定培养基中稀释以制备10倍工作溶液。这用于制备3倍8点稀释系列,以30,000ng/mL开始且以14ng/mL结束。

[0459] 接下来,将12.5μL 10预稀释的6HVL_4溶液和12.5μL 10VEGF-A溶液(750ng/mL)依次添加到每个板中的细胞中,一式四份。VEGF-A以恒定终浓度(75ng/mL)使用,并且6HVL_4以剂量响应形式使用,终浓度范围为3000ng/mL至1.4ng/mL。将细胞在37℃、5％ CO2孵育72小时。对于分析,将12μL alamarBlue添加到每个孔中,并且然后在细胞培养箱中孵育3小时。使用来自Molecular Devices的FlexStation 3酶标仪在570nm处测量吸光度,参考波长

为600nm。

[0460] 数据分析:

[0461] 对于每个实验,每种条件均一式四份进行。总共进行了4个独立实验。独立实验被认为是在同一天处理2个单独的板。因此,使用8个单独的板进行分析。从实验孔中减去未经刺激的细胞的背景信号并计算每种条件的平均信号。从经VEGF-A(75ng/mL)刺激的未经额外化合物暴露的细胞计算100%响应水平,且来自6HVL_4暴露孔的信号表示为100%响应的抑制百分比。

[0462] 使用ExcelXLfit软件版本5.5.0(IDBS;Guildford,UK)从每种抗体浓度的平均数据计算IC50值。使用相对于基础和最大抑制活性计算的4参数逻辑模型(A+((B-A)/(1+((C/x)^D))),通过非线性回归分析拟合浓度反应曲线。数据展示为4个独立实验的平均值,并带有平均值的标准误差(SEM)。

[0463] 表12:6HVL_4对VEGF-A诱导的HUVEC增殖的经计算的抑制%

[0464]

| 浓度 | 抑制[%] | SEM[%] |
|---|---|---|
| 62.4 | 87.8 | 5.3 |
| 20.8 | 87.8 | 6.5 |
| 6.9 | 90.9 | 5.3 |
| 2.3 | 58.4 | 8.5 |
| 0.77 | 6.6 | 6.3 |
| 0.26 | 7.1 | 3.1 |
| 0.09 | 7.0 | 2.0 |

[0465] 6HVL_4减少VEGF-A诱导的HUVEC增殖,50%抑制浓度(IC50)为2.06+/-0.30nM(图12)。

[0466] 实例12:

[0467] 在VEGF-A和IL6二者以及VEGF/IL6双特异性抗体6HVL_4存在的情况下屏障功能的恢复显示了该分子的生物活性

[0468] 为了评定本发明抗体的双重生物活性,即同时阻断两种靶向细胞因子(VEGF-A和IL6(与IL6R复合)),进行跨内皮细胞电阻(TER)测定。在此测定中,电致密的内皮细胞层通过丧失屏障功能来响应VEGF-A和IL6二者的添加。如下评定在存在两种细胞因子VEGF和IL6的情况下VEGF/IL6双特异性抗体6HVL_4对屏障功能的恢复:

[0469] 测定:

[0470] 将进一步命名为HRMVEC的人视网膜微血管内皮细胞(PELOBiotech;目录号PEL-PB-CH-160-8511)保持在包被有附着因子(Ginco,目录号S-006-100)的T175烧瓶(Falcon目录号353112)中的完全MV内皮细胞生长培养基(MV-EGM-2Lonza,目录号CC-3202)中,直至第5代。对于跨内皮细胞电阻测定,使用StemPro®Accutase®(Gibco,目录号A11105-01)分离细胞。此后,将细胞在100µl MV-EGM-2生长培养基中以120.000个细胞/孔的细胞密度接种到纤连蛋白包被的(目录号354008,Corning)Transwell过滤器(24孔Corning,目录号3470)的上室中。Transwell过滤器的下室装有600µl MV-EGM-2培养基。将细胞在37℃和5% CO2下孵育3天。之后将培养基改变至测定条件(不含VEGF的MV-EGM-2,含有2% FBS),并使用280µl培养基(上室)和810µl培养基(下室)将Transwell过滤器转移至cellZcope系统。然

后将细胞在37℃和5％ $CO_2$下孵育24小时,同时通过cellZcope测量TER。第二天,用终浓度为10ng/ml的VEGF(R&D Systems,目录号293-VE/CF)、50ng/ml的IL6(R&D Systems,目录号206-IL/CF)与100ng/ml的IL6R(R&D Systems,目录号227-SR-025/CF)和10ng/ml的VEGF的组合处理细胞,或用等量的测定培养基(每个条件八倍)处理细胞,并测量TER直至第二天。此后将终浓度分别为1μg/ml、2.3μg/ml的6HVL_4或阿柏西普或测定培养基添加到细胞中,随后测量接下来的24小时的TER。因此每个条件出现四次。

[0471] 数据分析:

[0472] 将一个孔生成的数据集归一化为在添加细胞因子混合物之前不久获得的TER值。对于每种条件,平均信号和标准偏差是由归一化数据计算的。

[0473] 结果:

[0474] 结果在图12(6HVL_4)和13(阿柏西普)中示出。

[0475] 使用单独的细胞因子VEGF以及与IL6/IL6R的组合降低HRMVEC的屏障功能。使用抗体6HVL_4时,被破坏的屏障在24小时后恢复至100％。

[0476] 实例13:

[0477] IL6互补位区的鉴定

[0478] 从6HVL4.1与IL6之间的复合物的晶体结构鉴定出与IL6接触的氨基酸残基。VH和VL结构域内的互补位氨基酸残基的位置说明如图15所示。为此,使用PyMOL的“byres”功能和5埃的截止距离鉴定Fab/IL6复合物中可能与IL6相互作用的残基。在此处,我们将分析限制在IL6的残基48-215(如Uniprot ID P05231中所定义),这些残基是发现通常在单独的IL6的结构中解析的残基(参见pdb登录号1alu和1IL6)。在图15中,还显示了6HVL4.1与基于本发明的抗体的单特异性抗IL6抗体6HdL2.05之间的比对,其中VEGF互补位被非结合区替代。6HdL2.05具有SEQ ID NO:48的VH结构域和SEQ ID NO:47的VL结构域。当如实例2所述表达和纯化并进行类似于实例3进行的利用人IL6或食蟹猴IL6的SPR测定时,抗体表现出如图20所描绘的SPR传感图。拟合实验数据后,6HdL2.05展示的亲和力与VEGF/IL6双特异性抗体的相应6HVL系列获得的最高亲和力相当(参见表3和表4),其中与人IL6的拟合KD为22pM,并且与食蟹猴IL6的拟合KD为1.3nM。

[0479] 在表13(对于可变的重链结构域氨基酸残基)和表14(对于可变的轻链结构域氨基酸残基)中鉴定出鉴定为促成抗原结合的氨基酸残基。根据Kabat编号系统对氨基酸位置进行编号(在图1+5中使用相同的编号)。抗原结合中涉及的氨基酸位置由其在VH或VL结构域中的Kabat位置鉴定。

[0480] 表13:显示针对6HdL2.05的在相同Kabat位置处的氨基酸残基,即通过晶体结构分析鉴定的参与IL6结合的可变结构域氨基酸残基

[0481]

| 结构域 | 6HVL4.1 | 6HdL2.05 |
|---|---|---|
| VH | Y1、I2、Q3，<br>Y26、E27、F28、T29、H30、Q31、D32，<br>P52a，<br>R94、I96、D97、F98、D101、T102 | Y1、P2、Q3，<br>V26、L27、F28、K29、H30、Q31、D32，<br>P52a，<br>R94、L96、D97、F98、D101、E102 |
| VL | Y49、D50、S53、N54、Y55、P56、S57，<br>Y91、Y96 | Y49、D50、D53、R54、Y55、P56、E57，<br>Y91、Y96 |

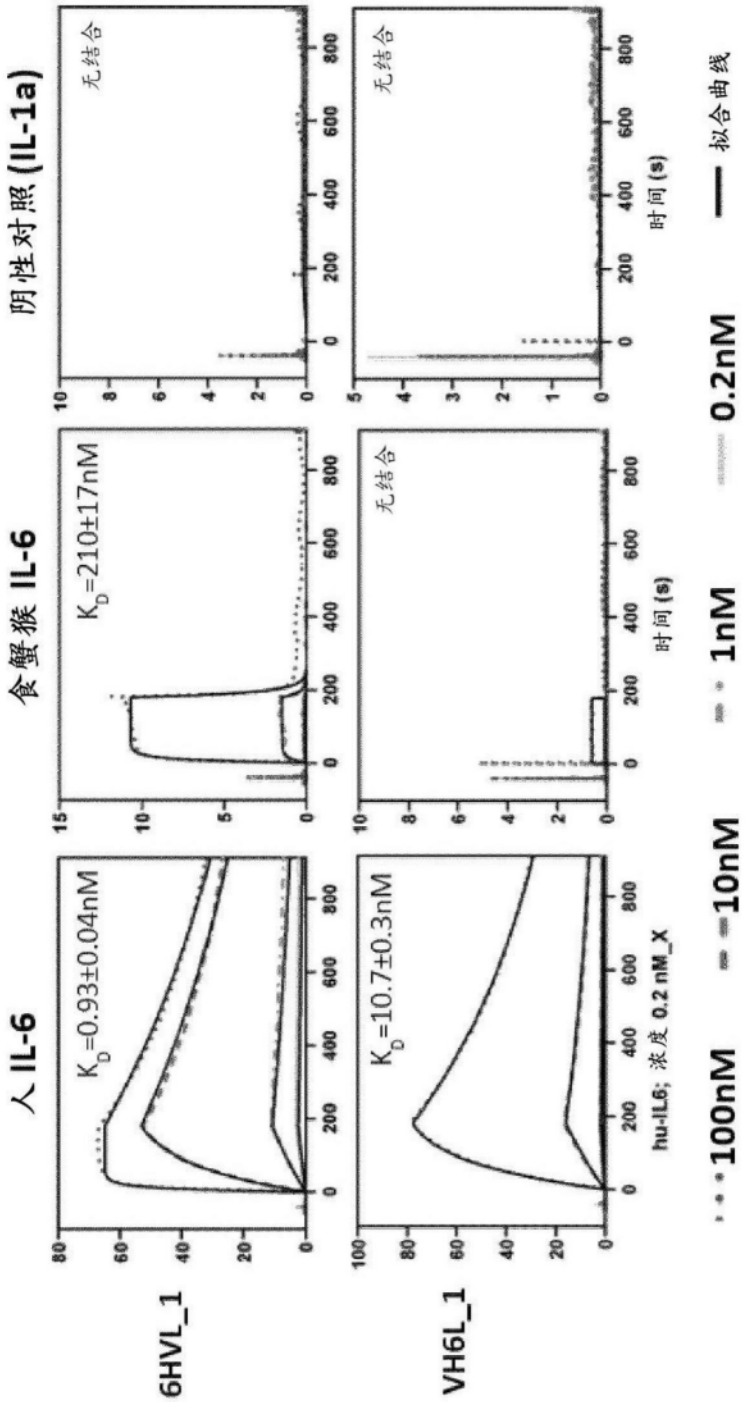

人 IL-6
食蟹猴 IL-6
阴性对照 (IL-1a)
6HVL_1
VH6L_1
$K_D$=0.93±0.04nM
$K_D$=210±17nM
无结合
$K_D$=10.7±0.3nM
无结合
无结合
时间 (s)
时间 (s)
hu-IL6; 浓度 0.2 nM_X
100nM
10nM
1nM
0.2nM
拟合曲线

图1

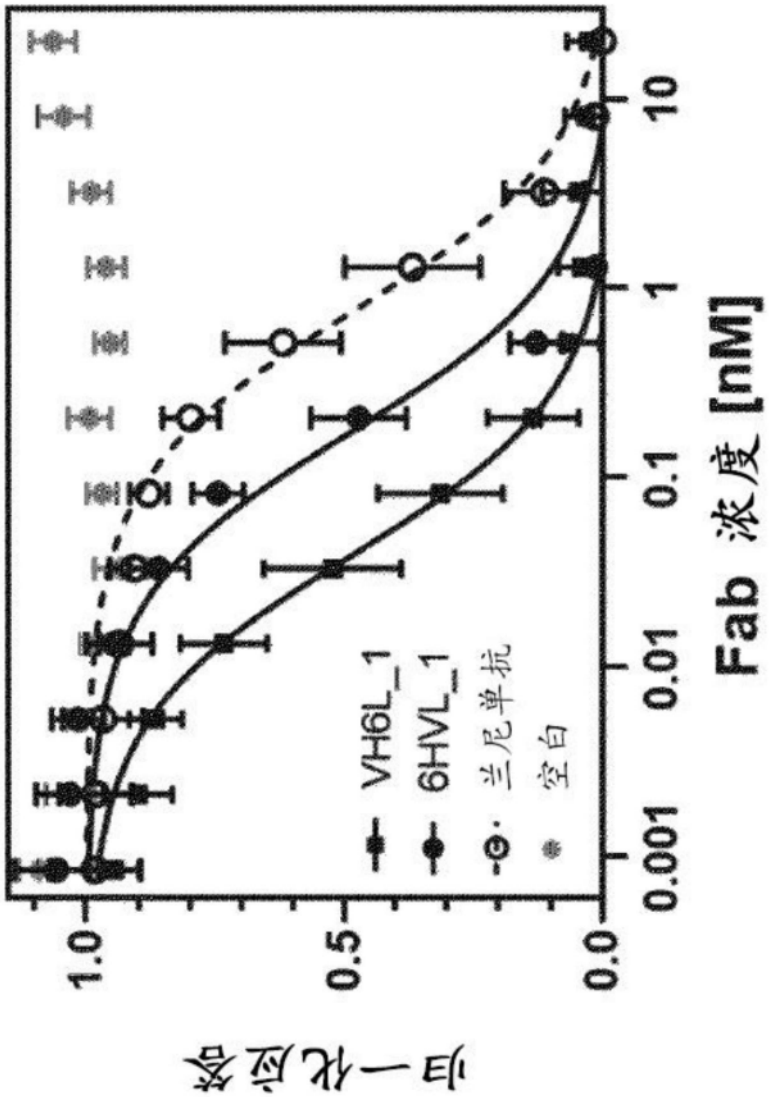



图2

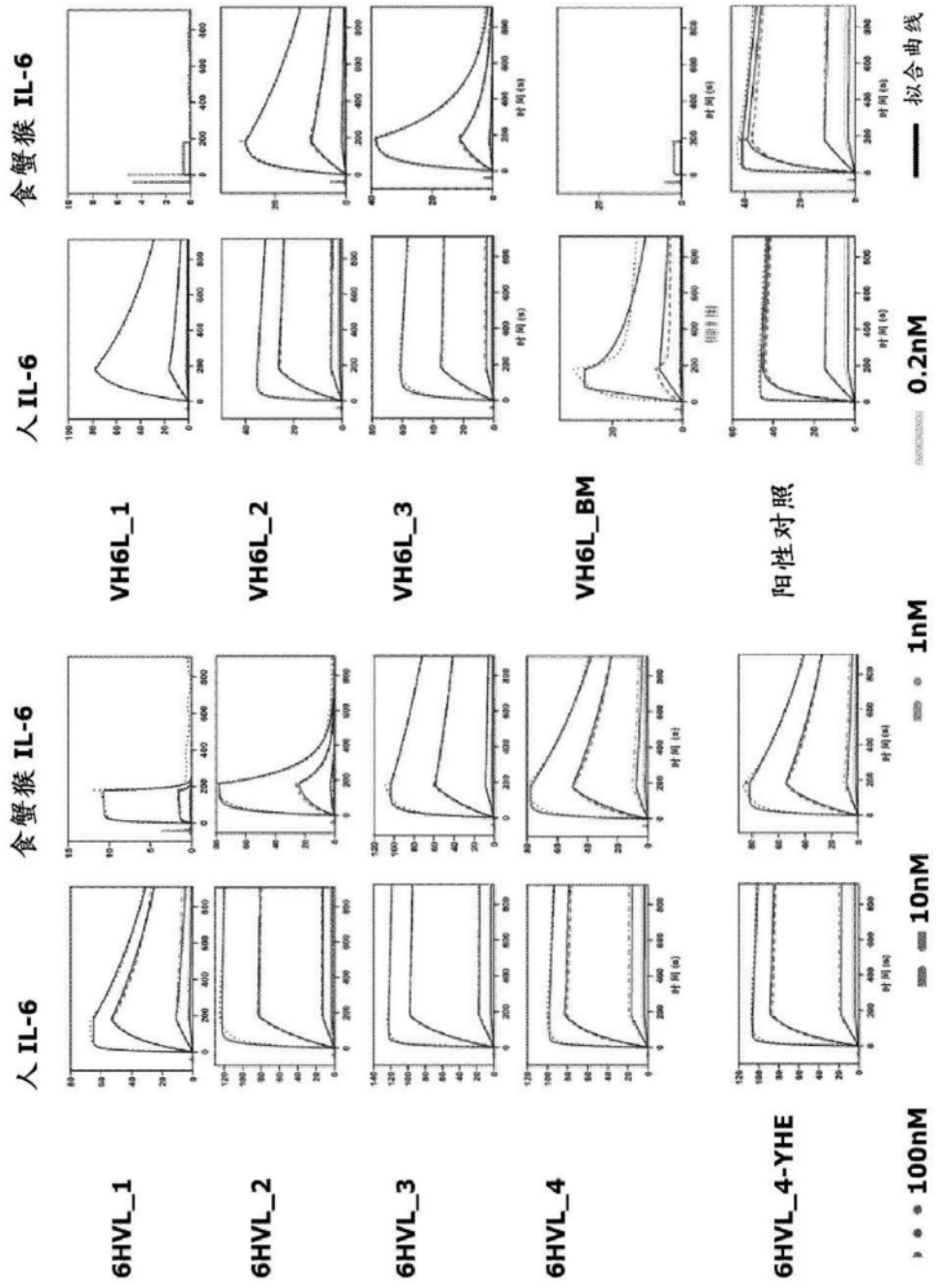

人 IL-6
食蟹猴 IL-6
人 IL-6
食蟹猴 IL-6
6HVL_1
6HVL_2
6HVL_3
6HVL_4
6HVL_4-YHE
VH6L_1
VH6L_2
VH6L_3
VH6L_BM
阳性对照
100nM
10nM
1nM
0.2nM
拟合曲线

图3

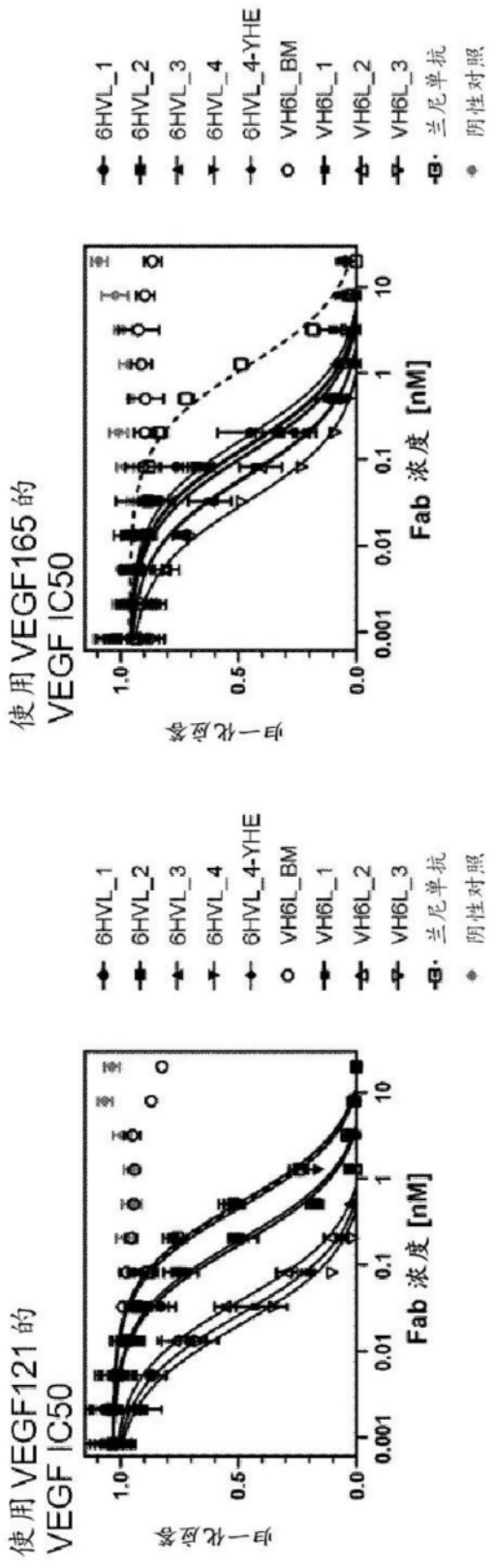

使用 VEGF165 的
VEGF IC50
归一化反应
Fab 浓度 [nM]
6HVL_1
6HVL_2
6HVL_3
6HVL_4
6HVL_4-YHE
VH6L_BM
VH6L_1
VH6L_2
VH6L_3
兰尼单抗
阴性对照
使用 VEGF121 的
VEGF IC50
归一化反应
Fab 浓度 [nM]
6HVL_1
6HVL_2
6HVL_3
6HVL_4
6HVL_4-YHE
VH6L_BM
VH6L_1
VH6L_2
VH6L_3
兰尼单抗
阴性对照

图4

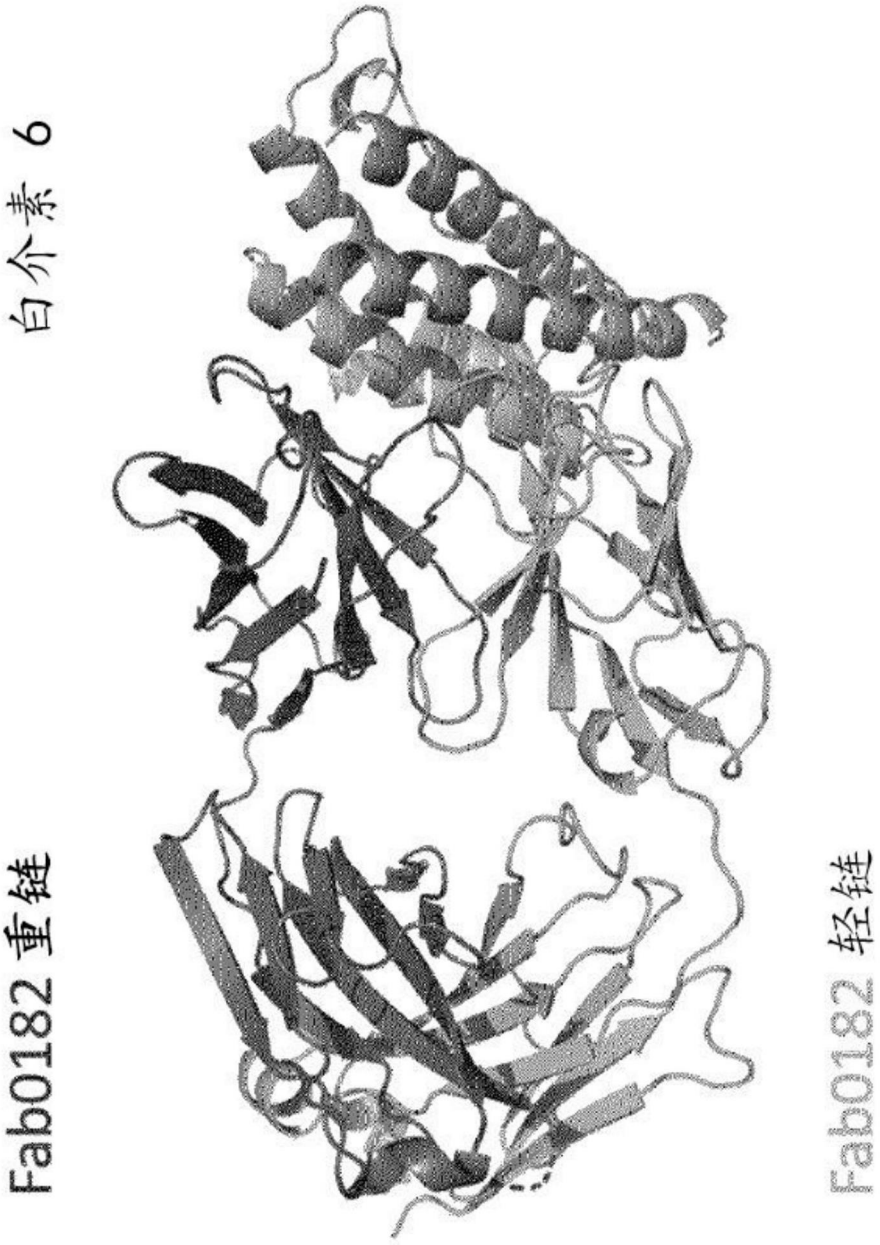



图5

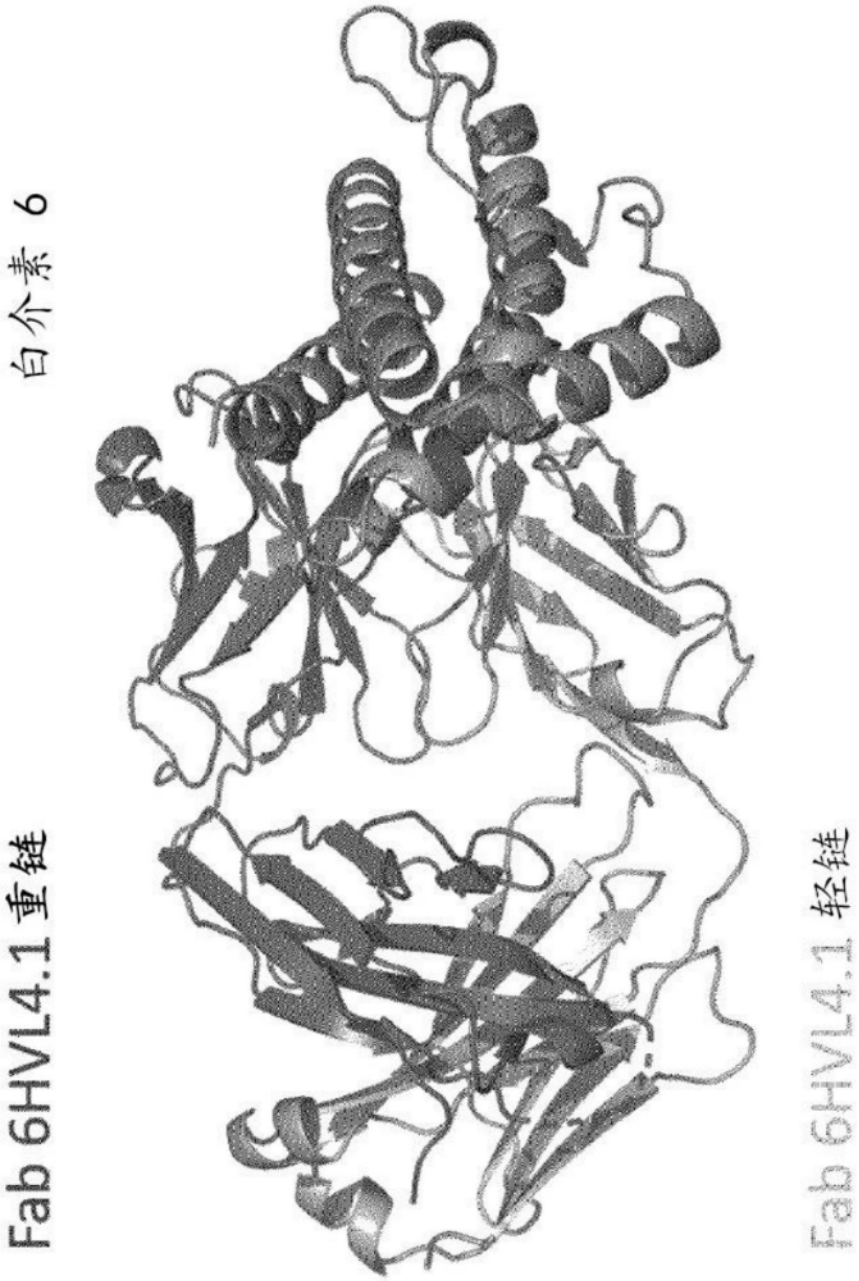



图6

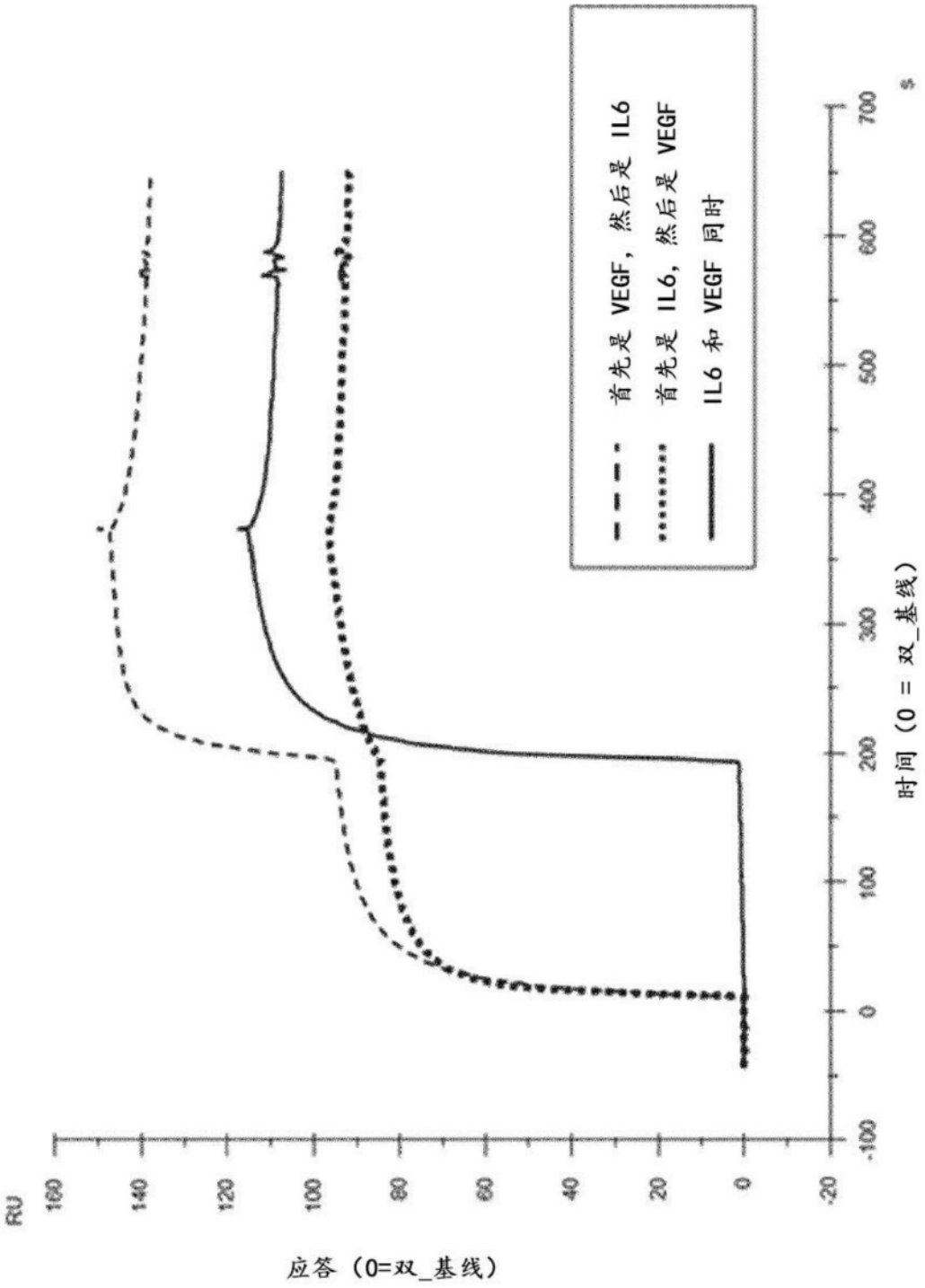

首先是 VEGF，然后是 IL6
首先是 IL6，然后是 VEGF
IL6 和 VEGF 同时
RU
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
-100
0
100
200
300
400
500
600
700
s
时间（0 = 双_基线）
应答（0=双_基线）

图7

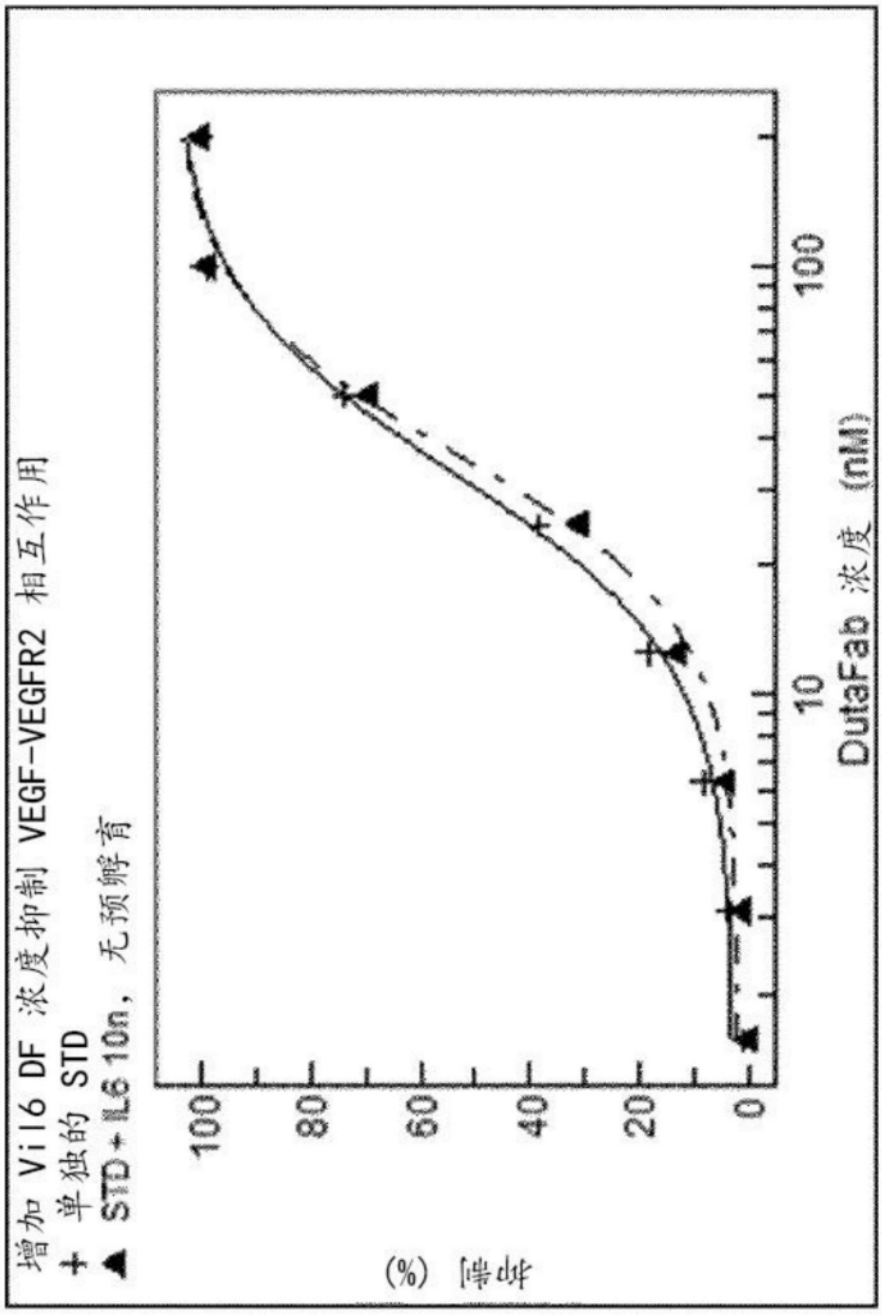

增加 Vi16 DF 浓度抑制 VEGF-VEGFR2 相互作用
+ 单独的 STD
▲ STD + IL6 10n，无预孵育
抑制 (%)
100
80
60
40
20
0
10
100
DutaFab 浓度 (nM)

图8

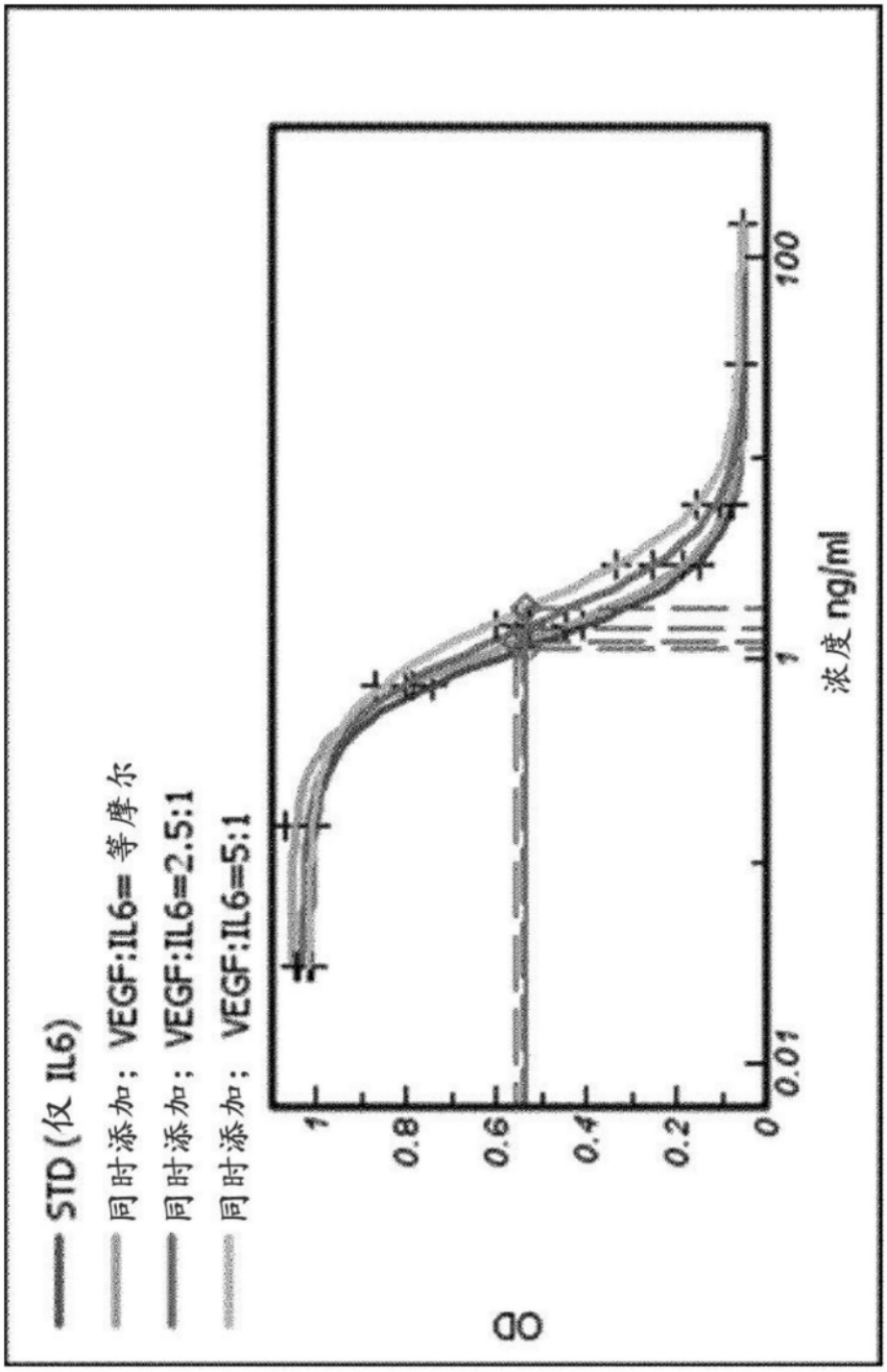

STD (仅 IL6)
同时添加；VEGF:IL6= 等摩尔
同时添加；VEGF:IL6=2.5:1
同时添加；VEGF:IL6=5:1
OD
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.01
1
100
浓度 ng/ml

图9

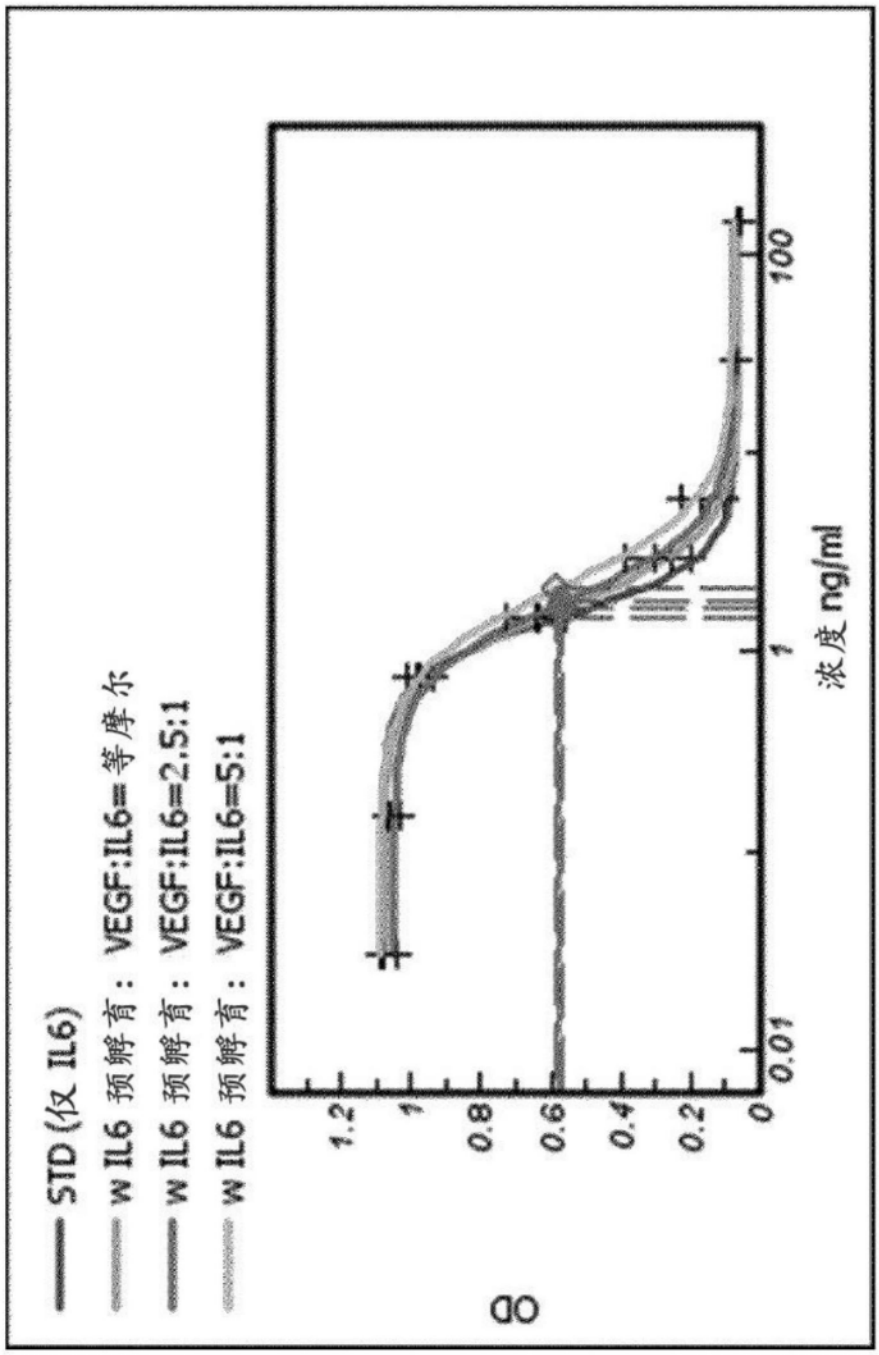

STD (仅 IL6)
w IL6 预孵育： VEGF:IL6= 等摩尔
w IL6 预孵育： VEGF:IL6=2.5:1
w IL6 预孵育： VEGF:IL6=5:1
OD
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.01
1
100
浓度 ng/ml

图10

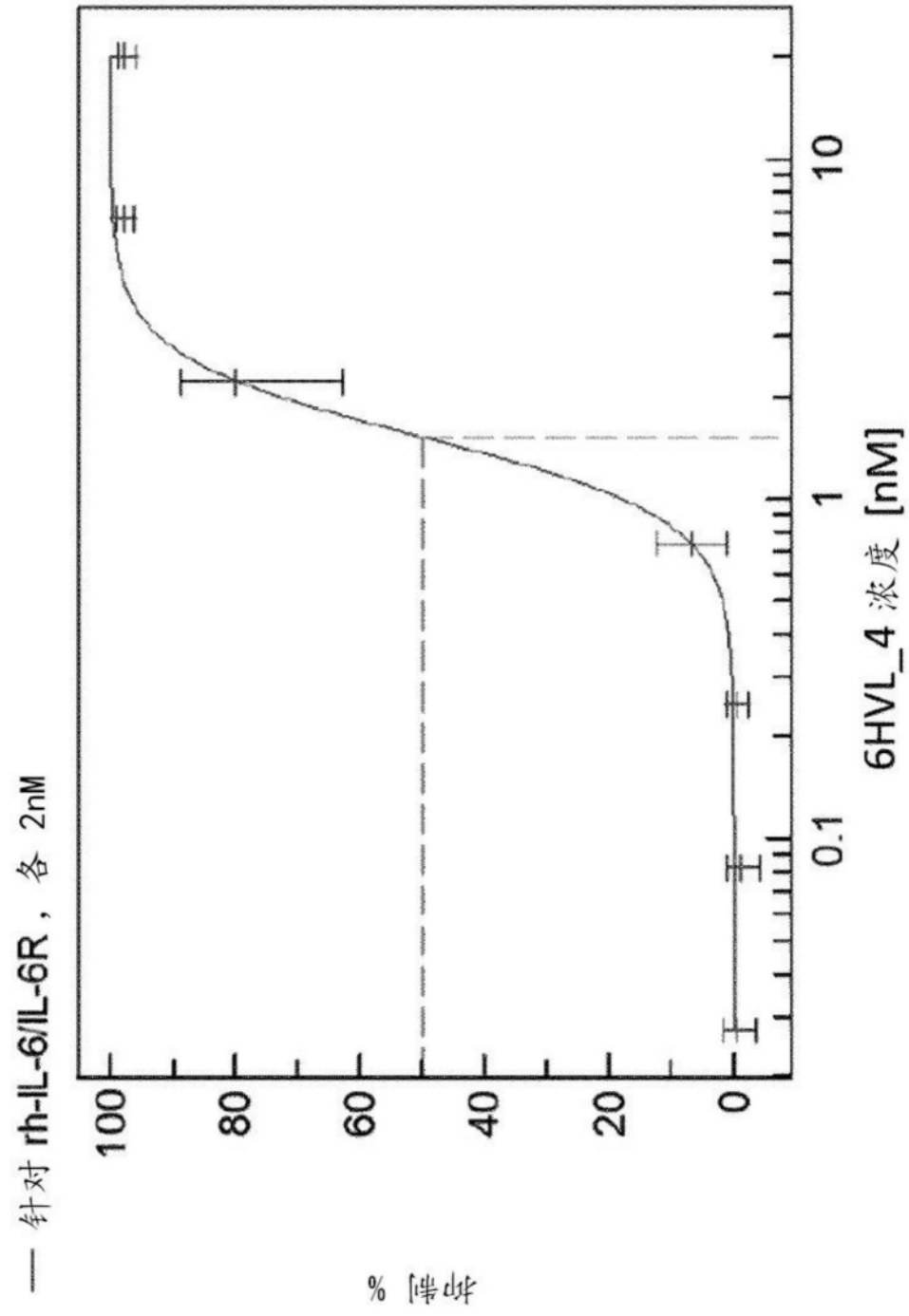



图11

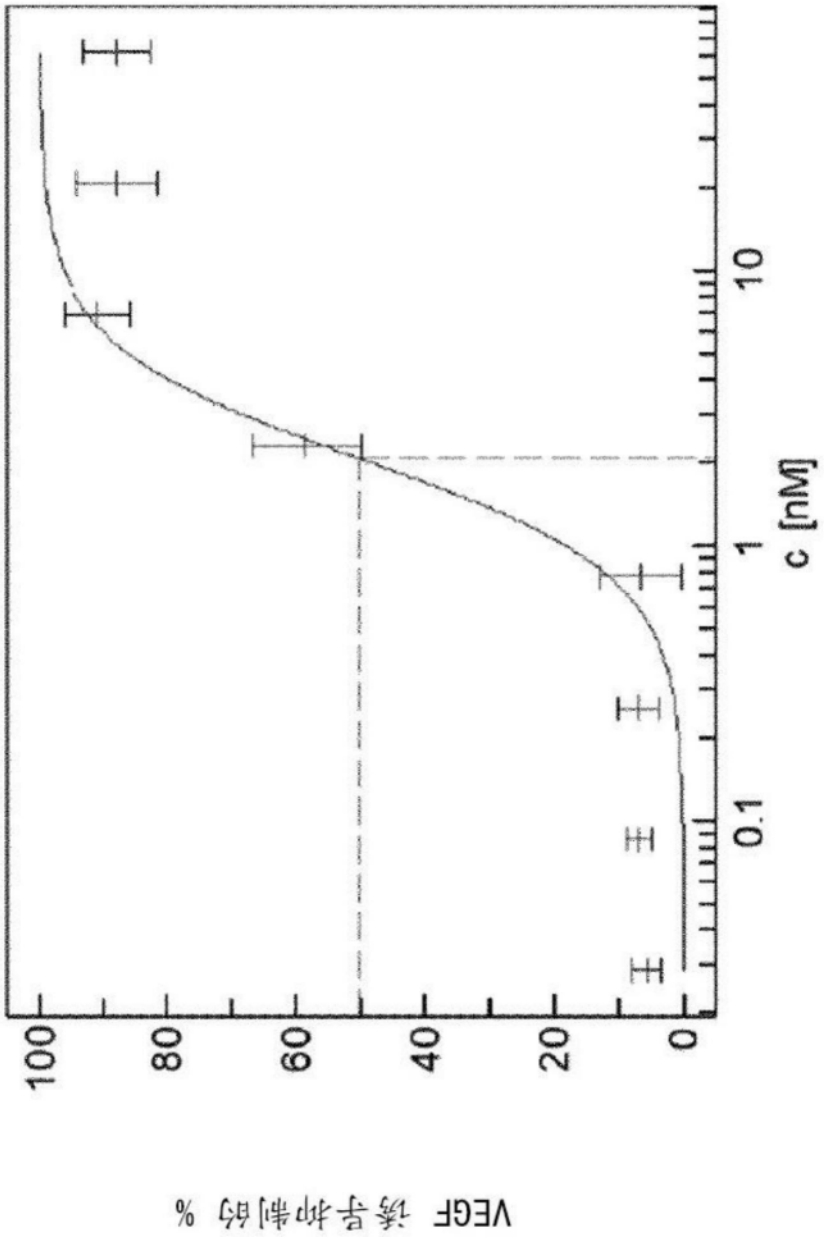



图12

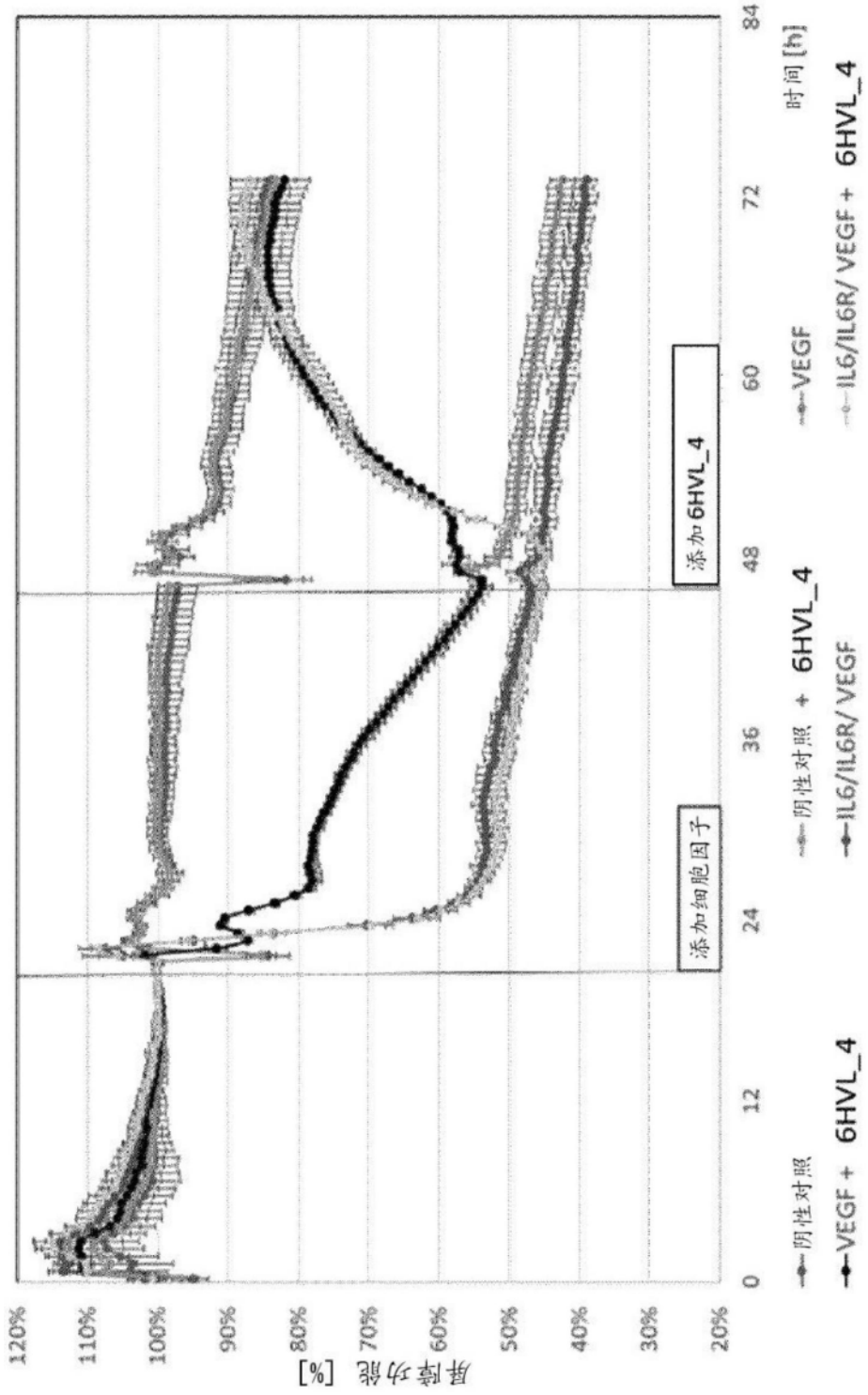

屏障功能 [%]
120%
110%
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
0
12
24
36
48
60
72
84
时间 [h]
添加细胞因子
添加6HVL_4
阴性对照
VEGF + 6HVL_4
阴性对照 + 6HVL_4
VEGF
IL6/IL6R/ VEGF
IL6/IL6R/ VEGF + 6HVL_4

图13

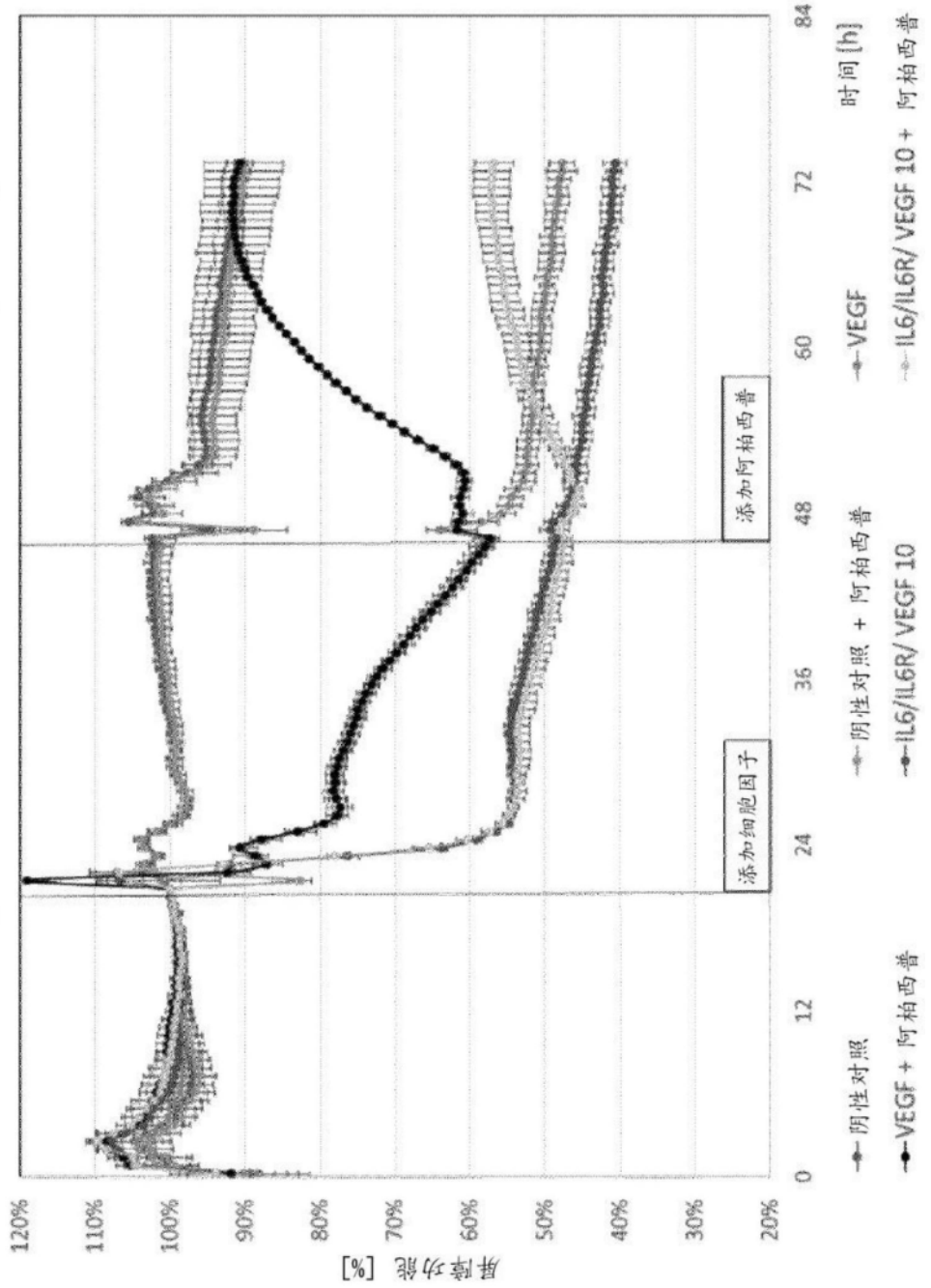

屏障功能 [%]
120%
110%
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
0
12
24
36
48
60
72
84
时间 [h]
添加细胞因子
添加阿柏西普
阴性对照
VEGF + 阿柏西普
阴性对照 + 阿柏西普
VEGF
IL6/IL6R/ VEGF 10
IL6/IL6R/ VEGF 10 + 阿柏西普

图14

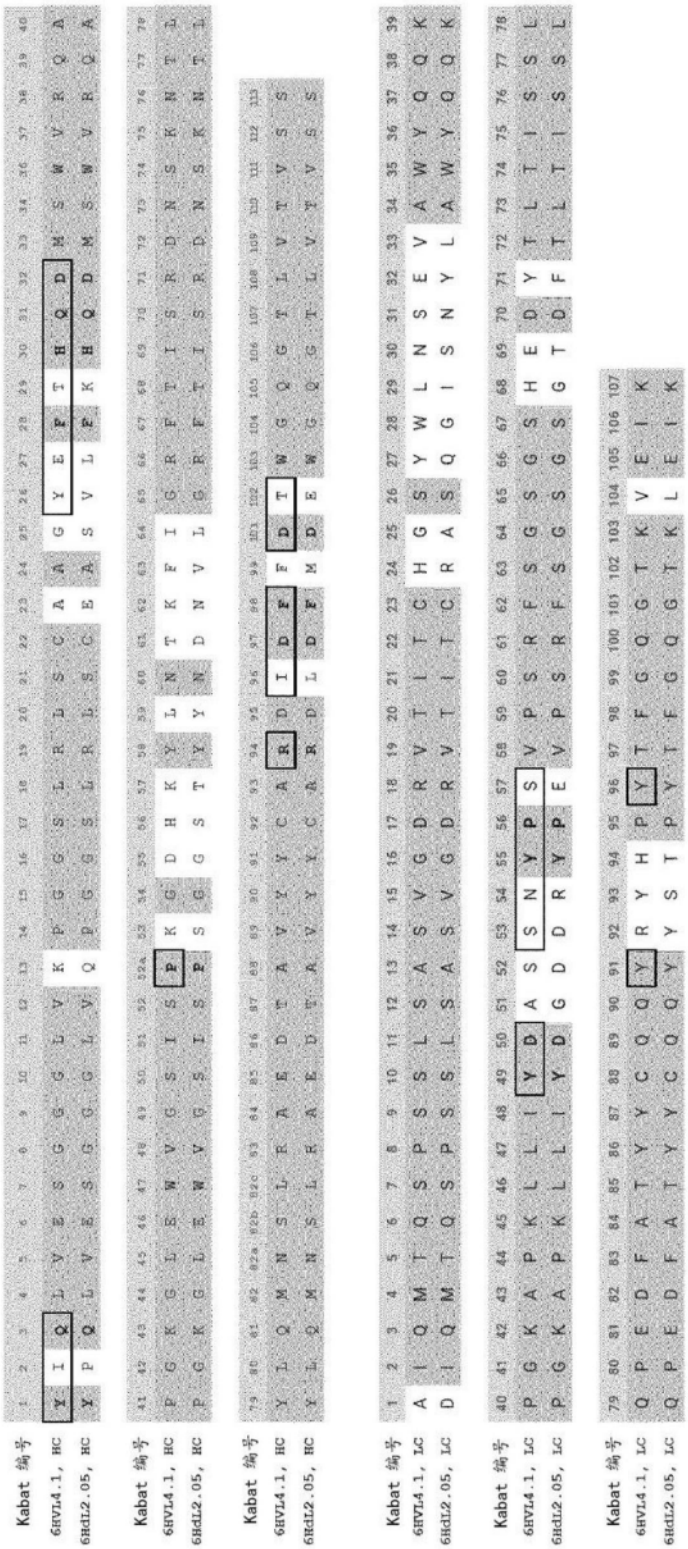


图15

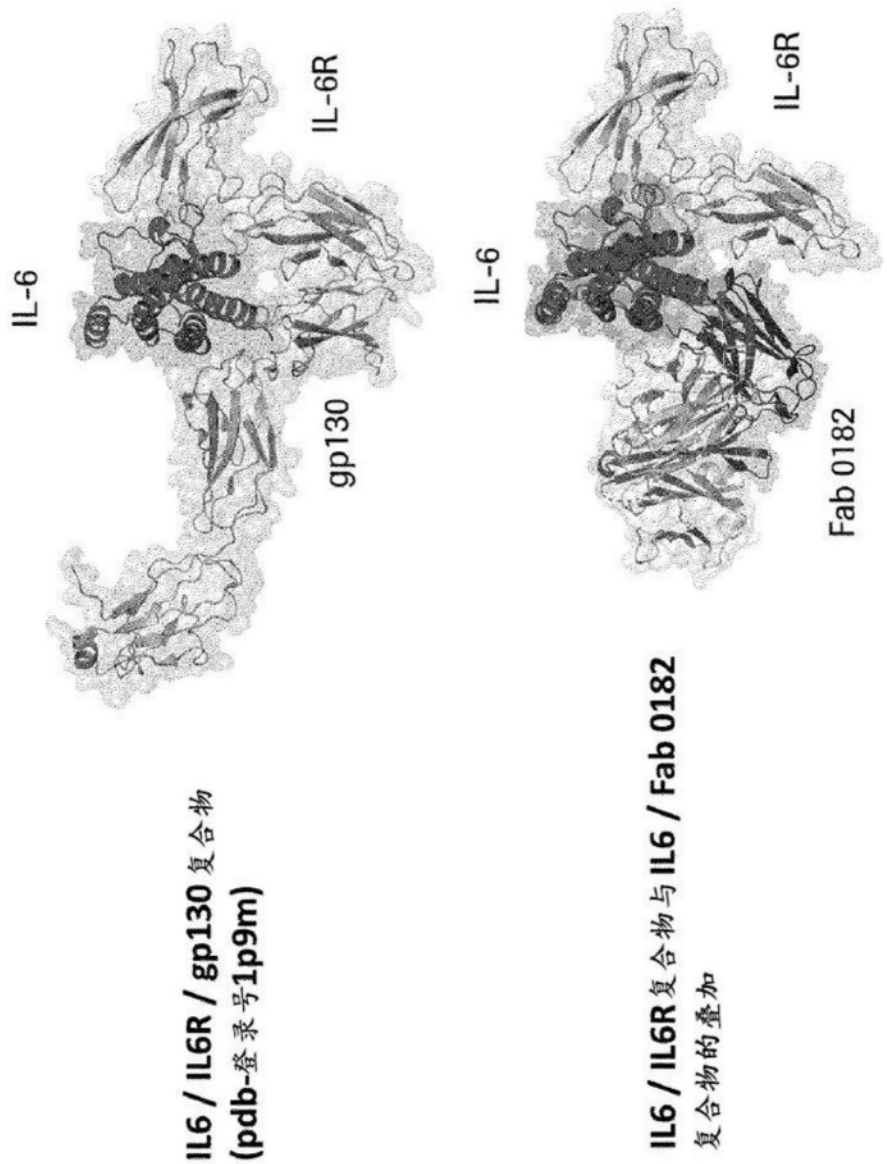

IL-6
IL-6R
gp130
IL6 / IL6R / gp130 复合物
(pdb-登录号1p9m)
IL-6
IL-6R
Fab 0182
IL6 / IL6R 复合物与 IL6 / Fab 0182
复合物的叠加

图16

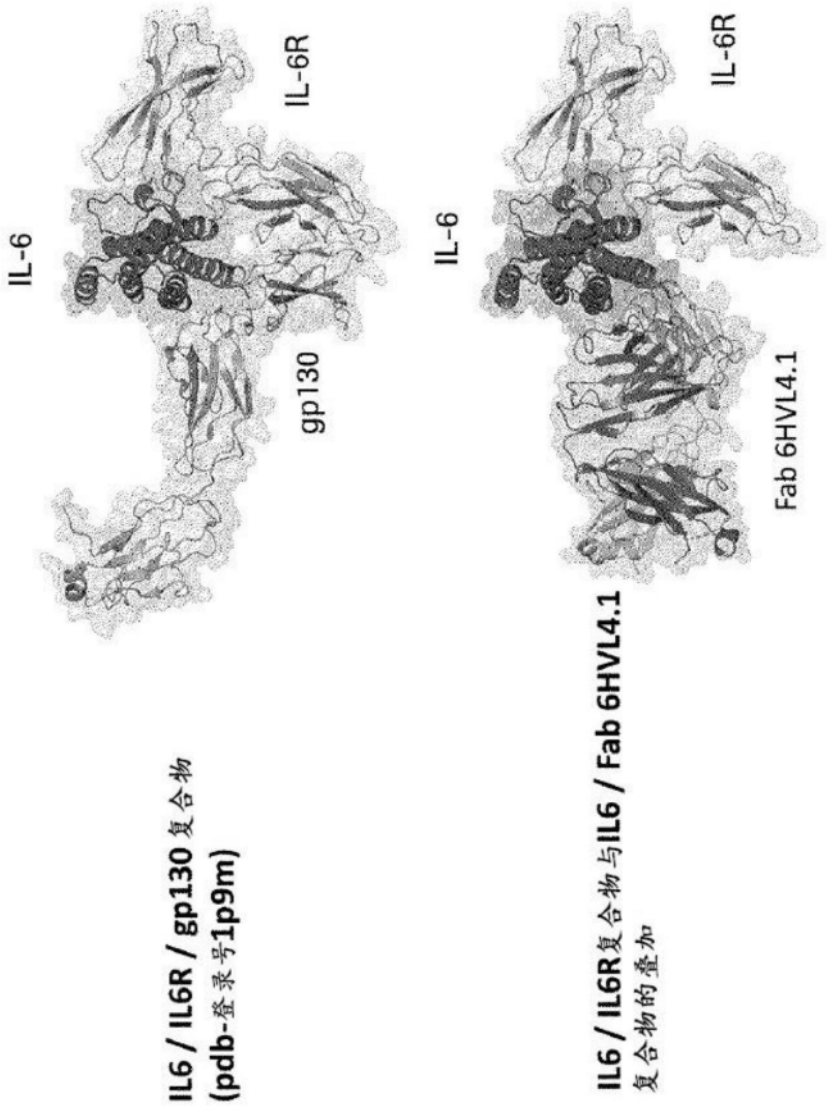

IL-6
IL-6R
gp130
IL6 / IL6R / gp130 复合物
(pdb-登录号1p9m)
IL-6
IL-6R
Fab 6HVL4.1
IL6 / IL6R复合物与IL6 / Fab 6HVL4.1
复合物的叠加

图17

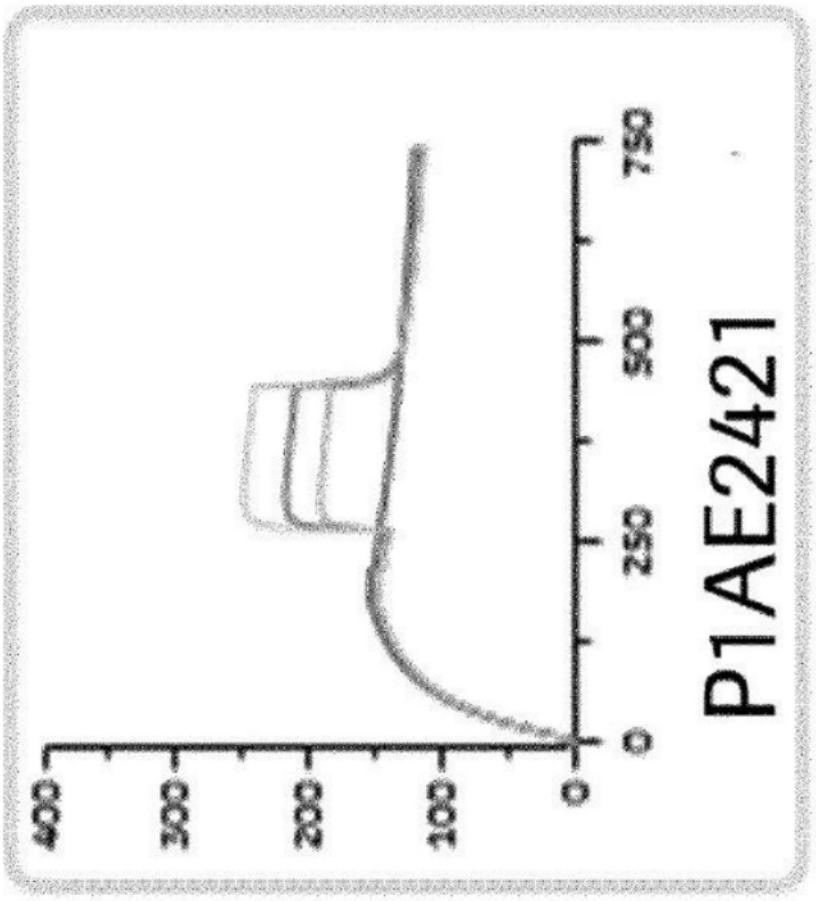



图18

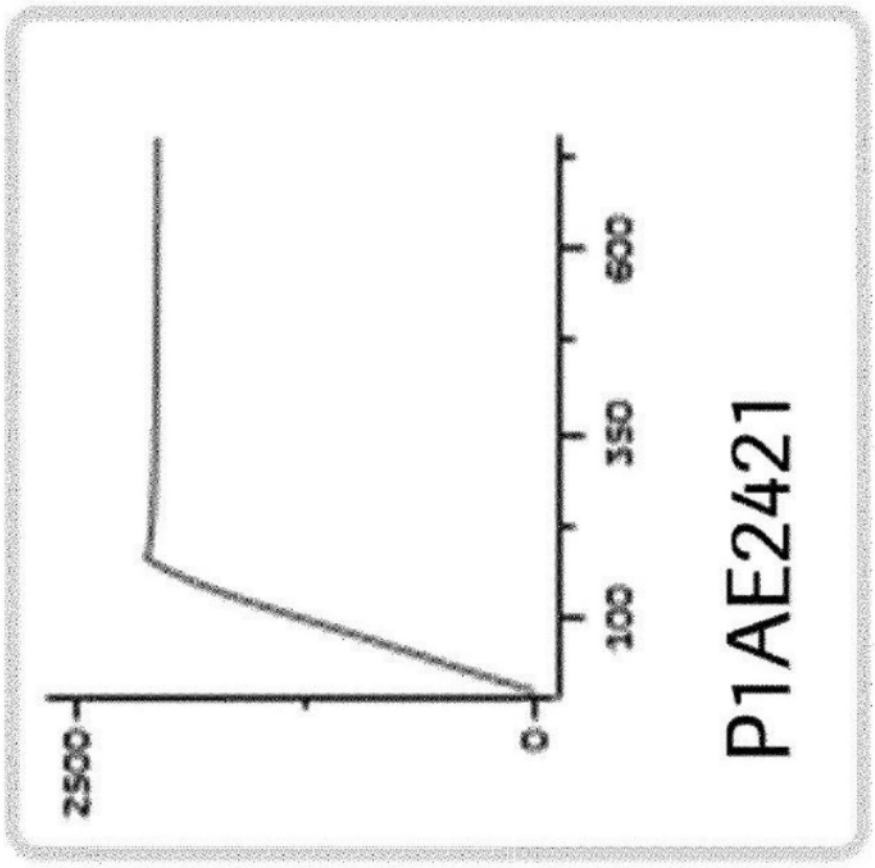



图19

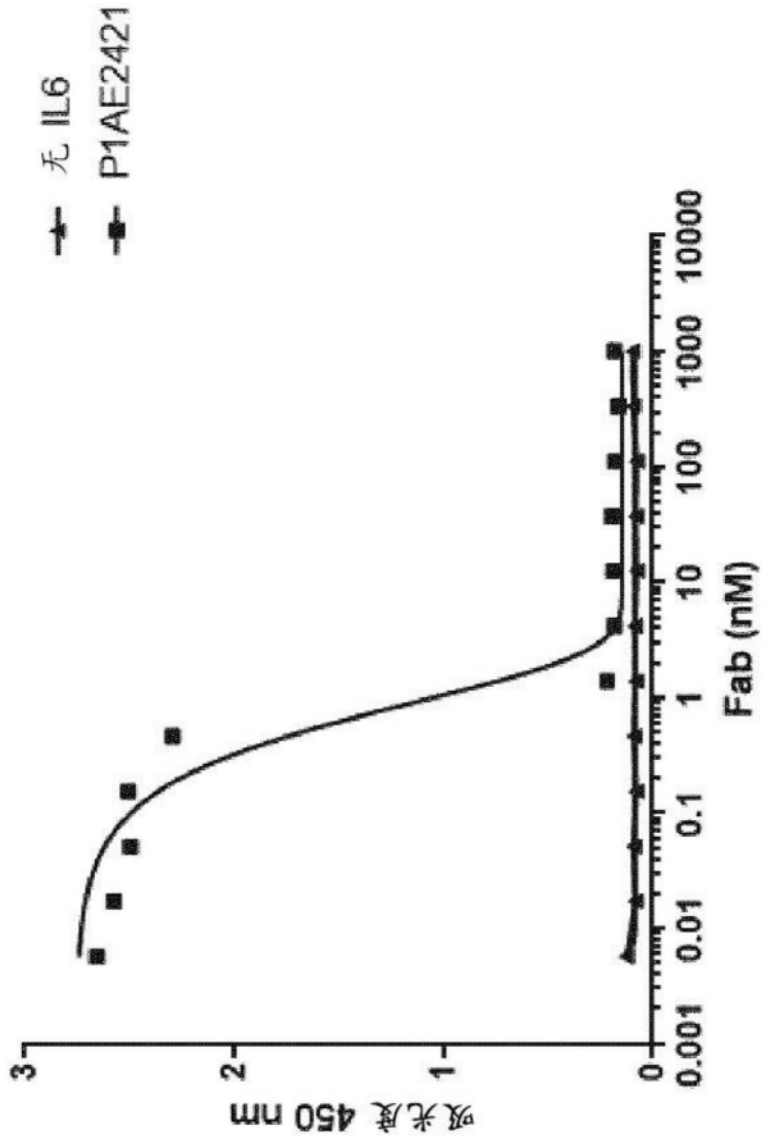

无 IL6
P1AE2421
吸光度 450 nm
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
Fab (nM)

图20

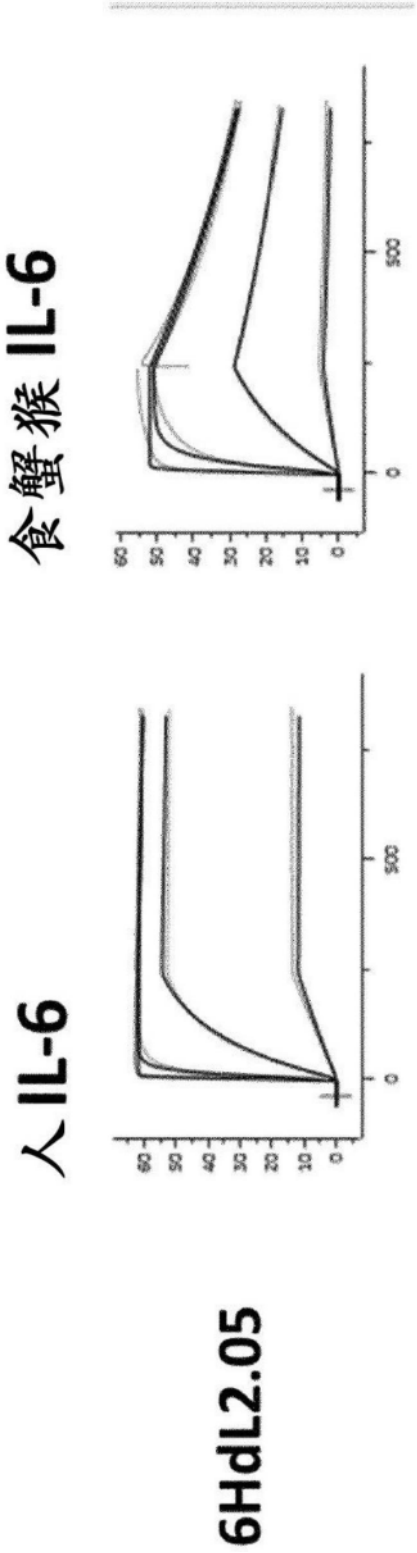



图21