(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117467017 A
(43)申请公布日 2024.01.30

(21)申请号 202311507433.1
(22)申请日 2015.12.19
(30)优先权数据
62/095,348 2014.12.22 US
(62)分案原申请数据
201580073430.9 2015.12.19
(71)申请人 西雅图免疫公司
地址 美国华盛顿州雷德蒙德市东北95街15318号
申请人 成都百利多特生物药业有限责任公司
(72)发明人 高泽人 朱义 菲尔·谭布莱尔·伦肖 布莱恩·科瓦切维奇
(74)专利代理机构 北京京万通知识产权代理有限公司 11440
专利代理师 许天易 徐小琴
(51)Int.Cl.
C07K 16/46(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61K 47/68(2017.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 43/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书12页
序列表（电子公布） 附图12页

(54)发明名称

双特异性四价抗体及其制备和使用方法

(57)摘要

一种双特异性四价抗体,其包含具有一对重链和一对轻链的IgG,并且两个scFv组分连接至重链或轻链的C端或N端。双特异性四价抗体可以对HER2受体上的两种不同表位具有结合特异性。

CN 117467017 A

1.一种双特异性四价抗体,所述双特异性四价抗体包含:

两条IgG1重链;

两条kappa轻链;以及

两个单链Fv(scFv)结构域。

其中所述两条IgG1重链和kappa轻链形成对HER2的第一结构域具有结合特异性的IgG部分;

其中所述两个scFv结构域对HER2的第二结构域具有结合特异性,并且每个scFv结构域通过具有氨基酸序列(gly-gly-gly-gly-ser)n((G4S)n)的连接体与任一个IgG1重链的C端残基连接;其中n是至少为2-20的整数;并且

其中每个scFv结构域具有N端-可变重链结构域-接头-可变轻链结构域-C端或N端-可变轻链结构域-接头-可变重链结构域-C端的结构顺序,并且其中所述接头可以由(gly-gly-gly-gly-ser)m((G4S)m)氨基酸序列组成。其中m是至少为3-30的整数。

2.根据权利要求1所述的双特异性四价抗体,其中,

所述IgG1重链中的至少一个是人源化的或人IgG1重链。

3.根据权利要求1所述的双特异性四价抗体,其中,

两条IgG1重链是人源化的或人IgG1重链。

4.根据权利要求1所述的双特异性四价抗体,其中,

所述kappa轻链中的至少一个是人源化的或人kappa轻链。

5.根据权利要求1所述的双特异性四价抗体,其中,

两条kappa轻链是人源化的或人kappa轻链。

6.根据权利要求1所述的双特异性四价抗体,其中,

可变轻链中的至少一个包含选自SEQ ID NO 36的氨基酸序列。

7.根据权利要求1所述的双特异性四价抗体,其中,

可变重链中的至少一个包含选自SEQ ID NO 41的氨基酸序列。

8.根据权利要求1所述的双特异性四价抗体,其中,scFv结构域中的至少一个包含选自SEQ ID NO 42的氨基酸序列。

9.根据权利要求1所述的双特异性四价抗体,其中,

所述IgG1重链中的至少一个包含SEQ ID NO40的氨基酸序列。

10.根据权利要求1所述的双特异性四价抗体,其中,

所述IgG部分对HER2的结构域4具有结合特异性,并且所述scFv结构域对HER2的结构域2具有结合特异性;其中所述IgG1重链、连接体以及scFv结构域具有SEQ ID NO 40的氨基酸序列,并且所述kappa轻链具有SEQ ID NO 35的氨基酸序列。

双特异性四价抗体及其制备和使用方法

[0001] 本申请是2015年12月19日提交的发明名称为“双特异性四价抗体及其制备和使用方法”(申请号:2015800734309)的中国发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关专利申请的交叉引用

[0003] 本申请要求于2014年12月22日提交的题为“BISPECIFIC ANTIBODIES(双特异性抗体)”的美国第62095348号临时申请的优先权,其通过引用整体并入本文。

技术领域

[0004] 本公开总体上涉及抗体的技术领域,更具体地涉及双特异性抗体。

背景技术

[0005] HER2是ErbB/HER受体家族的成员,在乳腺和卵巢的几种癌症中过表达和/或失调(King,Kraus and Aaronson,Science 1985;229:974-976;Slamon et al.,Science 1989;244:707-712)。HER2靶向治疗药物已经在临床上成功使用,并已被美国FDA批准。这样的抗体治疗药物包括曲妥珠单抗(Horton,Cancer Control 2001:8(1),103-110)和帕妥珠单抗(Badache and Hynes,Cancer Cell;5(4):299-301)。一些研究表明,与单一抗体单药治疗相比,可以通过组合两种或多种表位不同的抗HER2抗体(诸如曲妥珠单抗和帕妥珠单抗)来实现增强治疗(Kasprzyk et al.,Cancer Res 1992;52:2771-2776,Ben-Kasus et al.,Proc Natl Acad Sci USA,106(9)3294-3329)。结合HER2细胞外结构域4的曲妥珠单抗抑制非配体依赖性信号传导、刺激ADCC、阻断HER2脱落但不抑制HER2二聚化。与细胞外结构域2结合的帕妥珠单抗抑制HER2二聚化和与其他HER家族受体的二聚化,抑制多种配体依赖性HER介导的信号通路并刺激ADCC(O'Sullivan and Connolly,Oncology 2014;28(3):186-194)。

[0006] 基于单独使用曲妥珠单抗的显著临床益处,FDA已经于2013年批准了曲妥珠单抗和帕妥珠单抗组合治疗HER2阳性转移性癌症作为HER2阳性乳腺癌的新治疗方法,(Baselga et al.N Engl J Med.2012 Jan 12;366(2):109-19)。然而,使用两种或多种单克隆抗体的简单组合的功效是次优的。此外,单独生产两种或多种单克隆抗体的成本高。

[0007] 因此,需要通过组合单克隆抗体来改善癌症治疗的功效并降低与单克隆抗体生产相关的成本。

发明内容

[0008] 本公开提供双特异性四价抗体。双特异性四价抗体可以包括两条IgG1重链;两条kappa轻链;以及两个单链Fv(scFv)结构域。两条IgG1重链和kappa轻链可以形成对HER2的第一结构域具有结合特异性的IgG部分。两个scFv结构域可以对HER2的第二结构域具有结合特异性。IgG部分和两个scFv结构域共价连接,作为双特异性四价抗体起作用。从以下结合附图对其优选实施例的详细描述中,本公开的目的和优点可变得显而易见。

附图说明

[0009] 现在可以参考附图来描述根据本公开的优选实例,其中相同的附图标记表示相同的元件。

[0010] 图1示出了根据本发明一实例的四价双特异性抗体结构。

[0011] 图2示出了根据本发明的实例的示例性四价双特异性抗体4X1、4X2、4X3和4X4的功能框图。

[0012] 图3示出了示例性单特异性抗体4C1和4C2的功能框图。

[0013] 图4示出了示例性Fc-scFv抗体4C3、4C4、4C5、4C6、4C7、4C8、4C10和4C11的功能框图。

[0014] 图5示出了SI-4X和SI-4C抗体对BT-474细胞增殖的作用。

[0015] 图6示出了将连接体长度从10个氨基酸扩展到30个氨基酸对BT-474细胞增殖的作用。

[0016] 图7示出了将连接体长度扩展到40个氨基酸对BT-474细胞增殖的作用。

[0017] 图8示出了SI-4X抗体对BT-474细胞上HER2内化的作用。

具体实施方式

[0018] 本公开提供了双特异性四价抗体。该抗体可以具有同时靶向HER2的细胞外结构域2和4的优点。

[0019] 必须注意的是,如本文和所附权利要求中所使用的,除非上下文另有明确规定,否则在整个本说明书和权利要求书中,单数形式“一”、“和”以及“该”,词语“包含”或诸如“包含”或“包含……的”将被理解为暗示包含所述整数或整数组,但不排除任何其他整数或整数组,包括复数对象。

[0020] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,优选是完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括Fv、Fab、Fab’、F(ab’)2、Fab’-SH;双抗体;线性抗体(参见美国专利第5,641,870号,实例2;Zapata et al.,Protein Eng.8(10):1057-1062(1995));单链抗体分子(例如,scFv)。尽管在本说明书中并且在整个说明书中,提及抗体和抗体的各种性质,但是相同的公开内容也适用于功能性抗体片段,例如,双重作用Fab片段。

[0021] 一方面,双特异性四价抗体可以包括两条IgG1重链;两条kappa轻链;以及两个单链Fv(scFv)结构域。两条IgG1重链和kappa轻链可以形成对HER2的第一结构域具有结合特异性的IgG部分。两个scFv结构域可以对HER2的第二结构域具有结合特异性。每个scFv结构域可以通过具有氨基酸序列$(gly\text{-}gly\text{-}gly\text{-}gly\text{-}ser)_n$($(G_4S)_n$)的连接体与任一个IgG1重链的C端残基连接。每个scFv结构域可以具有N端-可变重链-接头-可变轻链-C端或N端-可变轻链-接头-可变重链-C端的结构顺序,并且接头可以包括$(gly\text{-}gly\text{-}gly\text{-}gly\text{-}ser)_m$($(G_4S)_m$)氨基酸序列。n和m均为整数,n可以是至少为2的整数。在一实施例中,n为1至10或2至9。在一些实施例中,n至少为9。在一些实施例中,n为2至20。m可以是至少为2的整数。在一些实施例中,m可以是2、3、4或5。在一些实施例中,m可以是选自2、3、4、5、6、7、8、9和10的整数。

[0022] 在一些实施例中,IgG1重链或kappa轻链中的至少一个是人源化的或人的。在一些实施例中,两条IgG1重链均是人源化的或人的。在一些实施例中,两条kappa轻链均是人源

化的或人的。

[0023] 在一些实施例中,HER2的结构域独立地选自HER2的结构域2和结构域4。在一些实施例中,双特异性四价抗体可以包括具有经由肽接头连接到重链或轻链的C端或N端的scFv的IgG部分。IgG部分可以对HER2(人表皮生长因子2)表达细胞的细胞外结构域2或4具有结合特异性,而scFv结构域可以分别对HER2表达细胞的胞外域4或2具有结合特异性。结合可以是二价的。

[0024] 肽接头的长度可能不同。在一些实施例中,肽接头可包括约15至约45个氨基酸。在一些实施例中,肽接头可包括约20至约50个氨基酸。在一些实施例中,肽接头可包括约10至约30个氨基酸。

[0025] 在一些实施例中,IgG部分可以对HER2的结构域2具有结合特异性。在一些实施例中,scFv结构域可以对HER2的结构域4具有结合特异性。在一些实施例中,IgG部分可以对HER2的结构域4具有结合特异性。在一些实施例中,scFv结构域可以对HER2的结构域2具有结合特异性。

[0026] 在一些实施例中,IgG1重链中的至少一个或两个包含SEQ ID NO 7、15、30、40、50和58的氨基酸序列或与SEQ ID NO 7、15、30、40、50和58具有至少95%、98%或99%相似性的氨基酸序列。在一些实施例中,IgG1重链、连接体以及scFv结构域具有SEQ ID NO 30、50、40和58的氨基酸序列或与SEQ ID NO 30、50、40和58具有至少95%、98%或99%相似性的氨基酸序列。在一些实施例中,kappa轻链中的至少一个或两个包含SEQ ID NO 3、11、25、35、45和53的氨基酸序列或与SEQ ID NO 3、11、25、35、45和53具有至少95%、98%或99%相似性的氨基酸序列。在一些实施例中,可变轻链中的至少一个或两个包含SEQ ID NO 4、12、26、36、46和54的氨基酸序列或与SEQ ID NO 4、12、26、36、46和54具有至少95%、98%或99%相似性的氨基酸序列。在一些实施例中,可变重链中的至少一个或两个包含SEQ ID NO 8、16、31、41、79和59的氨基酸序列或与SEQ ID NO 8、16、31、41、79和59具有至少95%、98%或99%相似性的氨基酸序列。在一些实施例中,至少一个或两个scFv结构域包含SEQ ID NO 19、22、32、42、80、60、63、66、69、72、75、78的氨基酸序列或与SEQ ID NO 19、22、32、42、80、60、63、66、69、72、75、78具有至少95%、98%或99%相似性的氨基酸序列。

[0027] 在一些实施例中,IgG部分可以对HER2的结构域2具有结合特异性,并且scFv结构域可以对HER2的结构域4具有结合特异性。在一实施例中,IgG1重链、连接体以及scFv结构域可以具有SEQ ID NO 30的氨基酸序列或与SEQ ID NO 30具有至少95%相似性的氨基酸序列,并且kappa轻链可以具有SEQ ID NO 25的氨基酸序列或与SEQ ID NO 25具有至少95%相似性的氨基酸序列。在一实施例中,IgG1重链、连接体以及scFv结构域可以具有SEQ ID NO 50的氨基酸序列或与SEQ ID NO 50具有至少95%相似性的氨基酸序列,并且kappa轻链可以具有SEQ ID NO 45的氨基酸序列或与SEQ ID NO 45具有至少95%相似性的氨基酸序列。

[0028] 在一些实施例中,IgG部分可以对HER2的结构域4具有结合特异性,并且scFv结构域可以对HER2的结构域2具有结合特异性。在一实施例中,IgG1重链、连接体以及scFv结构域可以具有SEQ ID NO 40的氨基酸序列或与SEQ ID NO 40具有至少95%相似性的氨基酸序列,并且kappa轻链可以具有SEQ ID NO 35的氨基酸序列或与SEQ ID NO 35具有至少95%相似性的氨基酸序列。在一实施例中,IgG1重链、连接体以及scFv结构域可以具有SEQ

ID NO 58的氨基酸序列或与SEQ ID NO 58具有至少95％相似性的氨基酸序列,并且kappa轻链可以具有SEQ ID NO 53的氨基酸序列或与SEQ ID NO 53具有至少95％相似性的氨基酸序列。

[0029] 双特异性四价抗体具有抑制癌细胞生长的活性。在某些实施例中,本发明的抗体对于其靶标EGRF或HER3的解离常数(Kd)≤80nM、≤50nM、≤30nM、≤20nM、≤10nM或≤0.1nM。抗体可以同时与两个靶标结合。在一些实施例中,抗体可以以小于1nM、10nM、20nM、50nM或100nM的Kd与HER2的结构域2结合。在一些实施例中,抗体可以以小于5nM、10nM、20nM、50nM或100nM的Kd与HER2的结构域4结合。在一些实施例中,抗体可以以小于30nM的Kd与HER2的结构域4结合,并以小于30nM的Kd与HER2的结构域2结合。在一些实施例中,抗体可以以小于50nM的Kd与HER2的结构域4结合,并同时以小于20nM的Kd与HER2的结构域2结合。

[0030] 在一些实施例中,IgG部分可以为scFv结构域提供稳定性。另外可选地,IgG部分可以提供对表位的特异性。在一些实施例中,双特异性抗体可介导对表达HER2的细胞的ADCC(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性)。在一些实施例中,抗体可能能够结合HER2抗原上的至少两个结构域(即表位)。在一些实施例中,抗体可以同时结合HER2抗原上的多个结构域。

[0031] 在一些实施例中,抗体可以在体外和体内增殖试验中提供比单特异性抗体亲本对照或单特异性抗体亲本对照的组合更强的肿瘤抑制。不希望被理论限制,据信通过对两种不同表位的相同抗原作用,本文公开的双特异性四价抗体可以增强受体(HER2)的内化,并且比单独单特异性抗体或两种单特异性抗体的组合之一更有效地下调信号通路。

[0032] 在一些实施例中,双特异性四价抗体可抑制癌细胞生长。在一些实施例中,癌细胞可以表达HER2。在一些实施例中,双特异性四价抗体可抑制癌细胞生长。在一些实施例中,癌细胞可以表达HER2+。

[0033] 在另一方面,本公开提供了编码本文公开的双特异性四价抗体、片段或亚组分的分离的核酸。

[0034] 在另一方面,本公开提供了具有编码本文公开的双特异性四价抗体、片段或亚组分的分离的核酸的表达载体。载体可在宿主细胞中表达。宿主细胞可以是原核的或真核的。

[0035] 在另一方面,本公开提供具有本文公开的双特异性四价抗体、片段或亚组分的分离的核酸的宿主细胞,或包括该核酸序列的表达载体。

[0036] 在另一方面,本公开提供了制备双特异性四价抗体的方法。在一实施例中,该方法可以包括培养上述宿主细胞,使得产生抗体。

[0037] 在另一方面,本公开提供了免疫交联物,包括本文所述的双特异性四价抗体和细胞毒性剂。

[0038] 在另一方面,本公开提供了药物组合物。药物组合物可以包括双特异性四价抗体或本文所述的免疫交联物和药学上可接受的载体。在一些实施例中,组合物还可包括放射性同位素、放射性核素、毒素、治疗剂、化学治疗剂或其组合。

[0039] 在另一方面,本公开提供了治疗癌症患者的方法。在一实施例中,该方法包括对患者施用有效量的本文所述的双特异性四价抗体的步骤。癌症可以包括表达HER2、结构域、表位、片段或其衍生物的细胞。癌症可能是HER2+乳腺癌、结肠直肠癌、卵巢癌、胃癌、食管癌、头颈癌以及非小细胞肺癌。

[0040] 在一实施例中,该方法还可包括共同施用有效量的治疗剂。治疗剂可以是例如抗

体、化疗剂、酶或其组合。在一些实施例中,治疗剂可以是抗雌激素剂,受体酪氨酸抑制剂或其组合。在一些实施例中,治疗剂可以是卡培他滨、顺铂、曲妥珠单抗、氟维司群、他莫昔芬、来曲唑、依西美坦、阿那曲唑、氨鲁米特、睾丸酯、伏氯唑、福美斯坦、法倔唑、来曲唑、厄洛替尼、阿法替尼、达沙替尼、吉非替尼、伊马替尼、帕唑帕尼、拉帕替尼、舒尼替尼、尼罗替尼、索拉非尼、白蛋白结合型紫杉醇。在一些实施例中,需要这种治疗的患者是人。在一些实施例中,治疗剂可以是生物制剂。在一些实施例中,治疗剂可以是检查点抑制剂,包括但不限于PD1、PDL1、CTLA4、4-1BB、OX40、GITR、TIM3、LAG 3、TIGIT、CD40、CD27、HVEM、BTLA、VISTA和B7H4。

[0041] 在一实施例中,本公开提供了通过向患者施用有效量的双特异性四价抗体以抑制HER2受体的生物学活性来治疗患者的方法。

[0042] 在一实施例中,本公开提供了具有有效浓度的双特异性四价抗体的溶液。在一实施例中,该溶液是患者中的血浆。

[0043] 双特异性四价抗体的一般结构示意图如图1所示。在一实施例中,双特异性四价抗体包括两条人IgG1重链、两条人kappa轻链以及两个单链Fv(scFv)结构域。两条人IgG1重链和人kappa轻链形成IgG部分。两个scFv结构域分别连接到具有连接体的人IgG1重链的C端残基,该连接体具有gly-gly-gly-gly-ser-重复(也被称为$(G_4S)_n$)的氨基酸序列。n可以是整数。在一实施例中,n为2至10。在一些实施例中,n可以是1至15。scFv可以为顺序:N端-可变重链-接头-可变轻链-C端。scFv接头可以包括Gly-gly-gly-gly-ser重复(也被称为(G4S)m)的氨基酸序列。m为整数。例如,m可以是3或4。对于所有构建体,CHI、CH2、CH3和CL氨基酸序列可以相同。有4个双特异性抗体,称为4X1、4X2、4X3和4X4。这些在图2中示出。

[0044] 每个双特异性四价抗体可以在一端与HER2的细胞外结构域2特异性结合,在另一端与HER2的细胞外结构域4特异性结合。这2种抗-HER2结合结构域分别称为4C1和4C2。结构4X1在双特异性抗体的氨基末端具有常规IgG1/kappa重链和轻链形式的4C1结合结构域,在羧基末端加入4C2作为单链Fv。4X2方向相反,4C2位于氨基末端,4C1为羧基末端单链Fv。存在可以使用这些结合对创建的多种其他类型的双特异性抗体结构,包括接头和连接体序列的改变以及这些结合结构域的可选位置和/或形式。例如,通过将4X1的连接体从(G_4S)x2扩展到(G_4S)x6可以创建4X3,并且可以通过将4X2的连接体从(G_4S)x2扩展到(G_4S)x6来创建4X4。

[0045] 为了研究连接体长度的作用,已经生成了称为4C3、4C4、4C5、4C6、4C7、4C8、4C10和4C11的多个Fc-scFv构建体。4C3包含来自4C1的scFv,而4C4包含来自4C2的scFv。为4C4生成(G_4S)x3至(G_4S)x8的连接体变体,如图4所示,例如,4C5具有15个氨基酸(G_4S)x3的连接体长度,而4C11具有40个氨基酸(G_4S)x8的连接体长度。表1示出了不同变体的连接体长度。

[0046] 表1.变体名称和连接体长度

[0047]

变体名称	连接体长度
4C4	(G_4S)x2

[0048]

4C5	$(G_4S)x3$
4C6	$(G_4S)x4$
4C7	$(G_4S)x\ 5$
4C8	$(G_4S)x\ 6$
4C10	$(G_4S)x\ 7$
4C11	$(G_4S)x\ 8$

[0049] 可变轻链,可变重链和单链Fv(scFv)DNA片段通过基因合成生成。通过基因合成生成人Gamma-1重链和人kappa轻链DNA片段。通过使用限制性位点的DNA连接将片段组装在一起,并克隆到设计用于哺乳动物细胞中瞬时表达的载体中。载体含有强CMV衍生的启动子,以及瞬时表达所需的其他上游和下游元件。通过DNA测序验证所得IgG表达质粒含有预期的DNA序列。按CSH手册所述(CSH Protocols;2008;doi:10.1101/pdb.prot4977),用线性PEI转染悬浮适应的HEK293F细胞来实现抗体构建体的瞬时表达。简言之,将DNA加入每个含有F17表达培养基的管中,该培养基已在37℃预热,然后加入PEI。在室温下孵育15分钟,并将DNA/PEI混合物加入含有HEK293细胞(在F17完全培养基中HEK293细胞密度为约$1x10^6$细胞/ml)的烧瓶中。在37℃下振荡孵育5天,然后将样品离心,收集上清液并在4℃下储存以进行纯化。

[0050] 需要时使用蛋白质亲和层析和尺寸排阻色谱法从所得转染上清液中纯化抗体。蛋白质质量用Superdex 200柱分析。用于所有试验的蛋白质纯度大于90%。

[0051] 对HER2两个不同表位特异的双特异性抗体可用于治疗许多HER2表达的癌症,诸如乳腺癌、卵巢癌、胃癌、食道癌、前列腺癌、肺癌以及神经内分泌癌。

[0052] 在一实施例中,双重特异性抗体具有四价双特异性。其包括IgG和两个scFv,其与单特异性抗体IgG相比提供两种不同的结合特异性。IgG组分提供了优于仅使用scFv(诸如BiTE技术(Lutterbuese et al,Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107.28(2010):12605-12610.PMC.Web.2Dec.2014)和其他(美国专利第7332585号))的其他双特异性抗体的稳定性。其也能够介导ADCC,而无Fc组分的那些则不能(美国专利第7332585号)。四价双重特异性性质为双特异性抗体提供了优于一些其他双特异性抗体的同时结合能力,其可以一次仅结合一种抗原(Kontermann,MAbs.2012 Mar-Apr;4(2):182-97;Schanzer et al,Antimicrob.Agents Chemother.2011,55(5):2369;EP272942)。

[0053] 为了便于叙述,双特异性抗体的序列或与双特异性抗体相关的序列总结在下面的表2中。

[0054] 表2.双特异性抗体或与之相关的核苷酸和氨基酸序列的总结

[0055]

SI-4C1 序列	
SEQ ID NO 1	SI-4C1 轻链全长核苷酸序列
SEQ ID NO 2	SI-4C1 轻链可变轻链核苷酸序列
SEQ ID NO 3	si-4c1 轻链全长氨基酸序列。人 kappa 恒定结构域加下划线
SEQ ID NO 4	si-4c1 轻链可变轻链氨基酸序列。互补决定区加下划线
SEQ ID NO 5	si-4c1 重链全长核苷酸序列
SEQ ID NO 6	SI-4C1 重链可变重链核苷酸序列
SEQ ID NO 7	si-4c1 重链全长氨基酸序列。人 gamma-1 结构域加下划线
SEQ ID NO 8	si-4c1 重链可变重链氨基酸序列。互补决定区加下划线
SI-4C2 序列	
SEQ ID NO 9	SI4C2 轻链全长核苷酸序列
SEQ ID NO 10	SI-4C2 轻链可变轻链核苷酸序列
SEQ ID NO 11	si-4c2 轻链全长氨基酸序列。人 kappa 恒定结构域加下划线
SEQ ID NO 12	si-4c2 轻链可变轻链氨基酸序列。互补决定区加下划线
SEQ ID NO 13	si-4c2 重链全长核苷酸序列
SEQ ID NO 14	SI-4C2 重链可变重链核苷酸序列
SEQ ID NO 15	si-4c2 重链全长氨基酸序列。人 gamma-1 结构域加下划线
SEQ ID NO 16	si-4c2 重链可变重链氨基酸序列。互补决定区加下划线
SI-4C3 序列	
SEQ ID NO 17	SI-4C3 全长核苷酸序列
SEQ ID NO 18	SI-4C3 全长蛋白质序列。人 gamma-1 结构域加下划线，连接体为斜体，scfv 为粗体
SEQ ID NO 19	SI-4C3 scfv 氨基酸序列。顺序：vh-接头-vl。互补决定区加下划线。接头为粗斜体

[0056]

SI-4C4 序列	
SEQ ID NO 20	SI-4C4 全长核苷酸序列
SEQ ID NO 21	SI-4C4 全长蛋白质序列。人 gamma-1 结构域加下划线，连接体为斜体，scfv 为粗体
SEQ ID NO 22	SI-4C4 scfv 氨基酸序列。顺序：vh-接头-vl。互补决定区加下划线。接头为粗斜体
Si-4X1 序列	
SEQ ID NO 23	SI4X1 轻链全长核苷酸序列
SEQ ID NO 24	SI-4X1 轻链可变轻链核苷酸序列
SEQ ID NO 25	si-4X1 轻链全长氨基酸序列。人 kappa 恒定结构域加下划线
SEQ ID NO 26	si-4X1 轻链可变轻链氨基酸序列。互补决定区加下划线
SEQ ID NO 27	si-4X1 双特异性重链全长核苷酸序列
SEQ ID NO 28	SI-4X1 双特异性重链可变重链核苷酸序列
SEQ ID NO 29	SI-4X1 双特异性重链 scfv 核苷酸序列
SEQ ID NO 30	si-4x1 双特异性重链全长氨基酸序列。人 gamma-1 结构域加下划线，连接体为斜体，scfv 为粗体
SEQ ID NO 31	si-4x1 双特异性重链可变重链氨基酸序列。互补决定区加下划线
SEQ ID NO 32	si4x1 双特异性重链 scfv 氨基酸序列。顺序：vh-接头-vl。互补决定区加下划线。接头为粗斜体
Si-4X2 序列	
SEQ ID NO 33	SI4X2 轻链全长核苷酸序列
SEQ ID NO 34	SI-4X2 轻链可变轻链核苷酸序列
SEQ ID NO 35	si-4X2 轻链全长氨基酸序列。人 kappa 恒定结构域加下划线
SEQ ID NO 36	si-4X2 轻链可变轻链氨基酸序列。互补决定区加下划线
SEQ ID NO 37	si-4X2 双特异性重链全长核苷酸序列
SEQ ID NO 38	SI-4X2 双特异性重链可变重链核苷酸序列
SEQ ID NO 39	SI-4X2 双特异性重链 scfv 核苷酸序列
SEQ ID NO 40	si-4x2 双特异性重链全长氨基酸序列。人 gamma-1 结构域加下划线，连接体为斜体，scfv 为粗体
SEQ ID NO 41	si-4x2 双特异性重链可变重链氨基酸序列。互补决定区加下

[0057]

	划线
SEQ ID NO 42	si4x2 双特异性重链 scfv 氨基酸序列。顺序：vh-接头-vl。互补决定区加下划线。接头为粗斜体
Si-4X3 序列	
SEQ ID NO 43	SI4X3 轻链全长核苷酸序列
SEQ ID NO 44	SI-4X3 轻链可变轻链核苷酸序列
SEQ ID NO 45	si-4X3 轻链全长氨基酸序列。人 kappa 恒定结构域加下划线
SEQ ID NO 46	Si-4X3 轻链可变轻链氨基酸序列。互补决定区加下划线
SEQ ID NO 47	Si-4X3 双特异性重链全长核苷酸序列
SEQ ID NO 48	SI-4X3 双特异性重链可变重链核苷酸序列
SEQ ID NO 49	SI-4X3 双特异性重链 scfv 核苷酸序列
SEQ ID NO 50	Si-4x3 双特异性重链全长氨基酸序列。人 gamma-1 结构域加下划线，连接体为斜体，scfv 为粗体
SEQ ID NO 79	Si-4x3 双特异性重链可变重链氨基酸序列。互补决定区加下划线
SEQ ID NO 80	si4x3 双特异性重链 scfv 氨基酸序列。顺序：vh-接头-vl。互补决定区加下划线。接头为粗斜体
Si-4X4 序列	
SEQ ID NO 51	SI4X4 轻链全长核苷酸序列
SEQ ID NO 52	SI-4X4 轻链可变轻链核苷酸序列
SEQ ID NO 53	si-4X4 轻链全长氨基酸序列。人 kappa 恒定结构域加下划线
SEQ ID NO 54	si-4X4 轻链可变轻链氨基酸序列。互补决定区加下划线
SEQ ID NO 55	si-4X4 双特异性重链全长核苷酸序列
SEQ ID NO 56	SI-4X4 双特异性重链可变重链核苷酸序列
SEQ ID NO 57	SI-4X4 双特异性重链 scfv 核苷酸序列
SEQ ID NO 58	Si-4x4 双特异性重链全长氨基酸序列。人 gamma-1 结构域加下划线，连接体为斜体，scfv 为粗体
SEQ ID NO 59	Si-4x4 双特异性重链可变重链氨基酸序列。互补决定区加下划线
SEQ ID NO 60	si4x4 双特异性重链 scfv 氨基酸序列。顺序：vh-接头-vl。互补决定区加下划线。接头为粗斜体

[0058]

SI-4C5 序列	
SEQ ID NO 61	SI-4C5 全长核苷酸序列
SEQ ID NO 62	SI-4C5 全长蛋白质序列。人的 gamma-1 结构域加下划线，连接体为斜体，scfv 为粗体
SEQ ID NO 63	SI-4C5 scfv 氨基酸序列。顺序：vh-接头-vl。互补决定区加下划线。接头为粗斜体
SI-4C6 序列	
SEQ ID NO 64	SI-4C6 全长核苷酸序列
SEQ ID NO 65	SI-4C6 全长蛋白质序列。人 gamma-1 结构域加下划线，连接体为斜体，scfv 为粗体
SEQ ID NO 66	SI-4C6 scfv 氨基酸序列。顺序：vh-接头-vl。互补决定区加下划线。接头为粗斜体
SI-4C7 序列	
SEQ ID NO 67	SI-4C7 全长核苷酸序列
SEQ ID NO 68	SI-4C7 全长蛋白质序列。人的 gamma-1 结构域加下划线，连接体为斜体，scfv 为粗体
SEQ ID NO 69	SI-4C7 scfv 氨基酸序列。顺序：vh-接头-vl。互补决定区加下划线。接头为粗斜体
SI-4C8 序列	
SEQ ID NO 70	SI-4C8 全长核苷酸序列
SEQ ID NO 71	SI-4C8 全长蛋白质序列。人 gamma-1 结构域加下划线，连接体为斜体，scfv 为粗体
SEQ ID NO 72	SI-4C8 scfv 氨基酸序列。顺序：vh-接头-vl。互补决定区加下划线。接头为粗斜体
SI-4C10 序列	
SEQ ID NO 73	SI-4C10 全长核苷酸序列
SEQ ID NO 74	SI-4C10 全长蛋白质序列。人 gamma-1 结构域加下划线，连接体为斜体，scfv 为粗体
SEQ ID NO 75	SI-4C10 scfv 氨基酸序列。顺序：vh-接头-vl。互补决定区加下划线。接头为粗斜体
SI-4C11 序列	

[0059]

SEQ ID NO 76	SI-4C11 全长核苷酸序列
SEQ ID NO 77	SI-4C11 全长蛋白质序列。人 gamma-1 结构域加下划线，连接体为斜体，scfv 为粗体
SEQ ID NO 78	SI-4C11 scfv 氨基酸序列。顺序：vh-接头-vl。互补决定区加下划线。接头为粗斜体

[0060] 实例

[0061] 实例1

[0062] 为了评估抗HER2抗体的生长抑制潜力,测试了对作为乳腺导管癌肿瘤细胞系的BT-474细胞(ATCC HTB-20,Manassas,Va.)增殖的作用。将细胞用含有1％胎牛血清的100μl RPMI-1640培养基以6000细胞/孔的密度接种到96孔组织培养板中。4小时后,以0.0061nM至400nM的不同浓度加入试验抗体。在试验抗体存在下培养细胞7天。向每个孔中加入20μl MTS试剂(Promega,Madison,Wl),将细胞在37℃下孵育2小时。MTS容易被活跃增殖的细胞吸收,还原成甲腊(其易吸收490nm的光),然后分泌到培养基中。孵育后,使用BioTek(Winooski,VT)ELx800吸光度读数器测量OD490值。在抗体添加时也以这种方式获得对照细胞(仅用培养基处理)的OD490值,以确立基线代谢活性。可以通过从72小时OD490中减去对照基线OD490来计算增殖。来自抗体滴定的数据根据以下公式以对照群体的百分比表示:对照增殖的百分比＝(试验增殖/对照增殖)*100。

[0063] SI-4X1和SI-4X2对BT-474增殖的作用如图5所示。这两种分子均具有抗增殖作用,但两者均不如对照抗体SI-4C2或对照抗体SI-4C1和SI-4C2的组合有效。从SI-4X3可以看出,将C端scFv与hulgG分开的连接体G_4S接头的长度从2个重复增加到6个重复增加了功效。怀疑双特异性抗体的较低功效可能是C端scFv提供的促增殖活性的结果。之前有抗-Her2抗体显示出依赖其结构的激动活性的文献。为了研究这一点,我们创建了一系列含有相同抗-Her2 scFv的对照分子,但是具有逐渐变长的G_4S接头。如图6中所示,抗增殖作用与接头中G_4S元件的数量直接成正比,其中SI-4C8(6个重复)显示出最高的抗增殖活性,而SI-4C4(2个重复)则表现出激动活性。当接头增加到7(SI-4C10)和8(SI-4C11)个重复时,该作用甚至更明显,在图7中示出。

[0064] 实例2

[0065] 测试抗-Her2抗体被BT-474细胞内化的能力。使1mg等分试样的抗体标准PBS溶液与Alexa Fluor 488羧酸、TFP酯(Thermo Fisher#A-10235,Waltham,MA)在室温下反应1小时。使用Bio-Gel P-30柱通过凝胶过滤除去未结合的染料。偶联后,将3x10 5 BT-474细胞的等分试样在37℃或4℃(冰)下,在完全培养基(RPMI-1640+10％FBS)中与50nM每种Alexa 488标记的抗体一起孵育1小时。孵育后,将细胞在冷的离心机中用冰冷的PBS洗涤两次。然后将细胞重悬于500nM淬灭兔-抗-Alexa488抗体(Thermo Fisher#A-11094,Waltham,MA)或500nM兔IgG同种型对照抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories#011-000-003,West Grove,PA)任一者中,并在冰上孵育30分钟。向每种样品中加入两倍体积的2％多聚甲醛,并在室温下孵育10分钟。然后将细胞用1ml冰冷的PBS洗涤一次,重悬于200μl PBS中,并使用FACScalibur流式细胞仪分析。使用每个样品2x10 4个事件的几何平均荧光强度(GMFI)来计算内化抗体的百分比。由于在4℃不会发生内化,所以在冰上孵育随后与抗-Alexa488抗

体孵育的样品中测量的荧光被认为是不可淬灭的背景表面荧光,并在淬灭前从37℃孵育的样品所得GMFI值中扣除。内化如下计算:内化百分比＝(GMFI淬灭/GMFI未淬灭)*100。

[0066] 结果在图8中示出。双特异性抗体SI-4X2(39.3%)比单特异性对照抗体SI-4C1(18.29%)和SI-4C2(14.97%)以及SI-4C1+SI-4C2的组合(29.19%)更大程度地内化。

[0067] 药物组合物

[0068] 词语“有效量”是指有效实现期望效果的药物的量,例如改善患者的疾病。其中该疾病是癌症,有效量的药物可以抑制(例如,在一定程度上减缓、抑制或停止)以下一个或多个示例性特征,包括但不限于癌细胞生长、癌细胞增殖、癌细胞运动、癌细胞浸润到周围器官、肿瘤转移以及肿瘤生长。其中该疾病是癌症,当对患者施药时,有效量的药物可以可选地进行以下一种或多种:减缓或停止肿瘤生长、减小肿瘤尺寸(例如体积或质量)、在一定程度上缓解一种或多种与癌相关的症状、延长无进展生存期、产生客观疗效(包括例如部分疗效或完全疗效),以及增加卵巢生存时间。在药物可以预防生长和/或杀死现有癌细胞的程度上,其是抑制细胞生长和/或细胞毒性的。

[0069] 关于给诸如需要治疗的人类患者的患者施用合适的组合物的制剂,本文公开的抗体可以根据所选择的施药途径与本领域已知的药学上可接受的载体混合或组合。对本文公开的抗体的应用模式没有特别限制,并且合适的施药途径和合适的组合物的选择在本领域中是已知的而无需过多的实验。

[0070] 虽然许多施药形式是可能的,但是示例性施药形式将是注射溶液,具体用于静脉内或动脉内注射。通常,用于注射的合适的药物组合物可以包括药学上合适的载体或赋形剂,诸如但不限于缓冲液、表面活性剂或稳定剂。示例性缓冲液可以包括但不限于乙酸盐,磷酸盐或柠檬酸盐缓冲液。示例性表面活性剂可以包括但不限于聚山梨醇酯。示例性稳定剂可以包括但不限于人白蛋白。

[0071] 类似地,本领域技术人员有能力确定其中公开的抗体的有效量或浓度以有效治疗诸如癌症的病症。其他参数,诸如药物组合物中各种组分的比例、施药剂量以及频率可由本领域技术人员获得,而无需过多的实验。例如,合适的注射溶液可以包含但不限于约1至约20,约1至约10mg抗体/ml。示例性剂量可以是但不限于约0.1至约20,约1至约5mg/Kg体重。示例性施药频率可以是但不限于每天一次或每周三次。

[0072] 虽然已经参考特定实施例或示例描述了本公开,但是可以理解,实施例是说明性的,并且公开范围不受此限制。本公开的可选实施例对于本公开所属领域的普通技术人员来说可以变得显而易见。这些可选实施例被认为包含在本公开的范围内。因此,本公开的范围由所附权利要求限定,并且由前述描述支持。

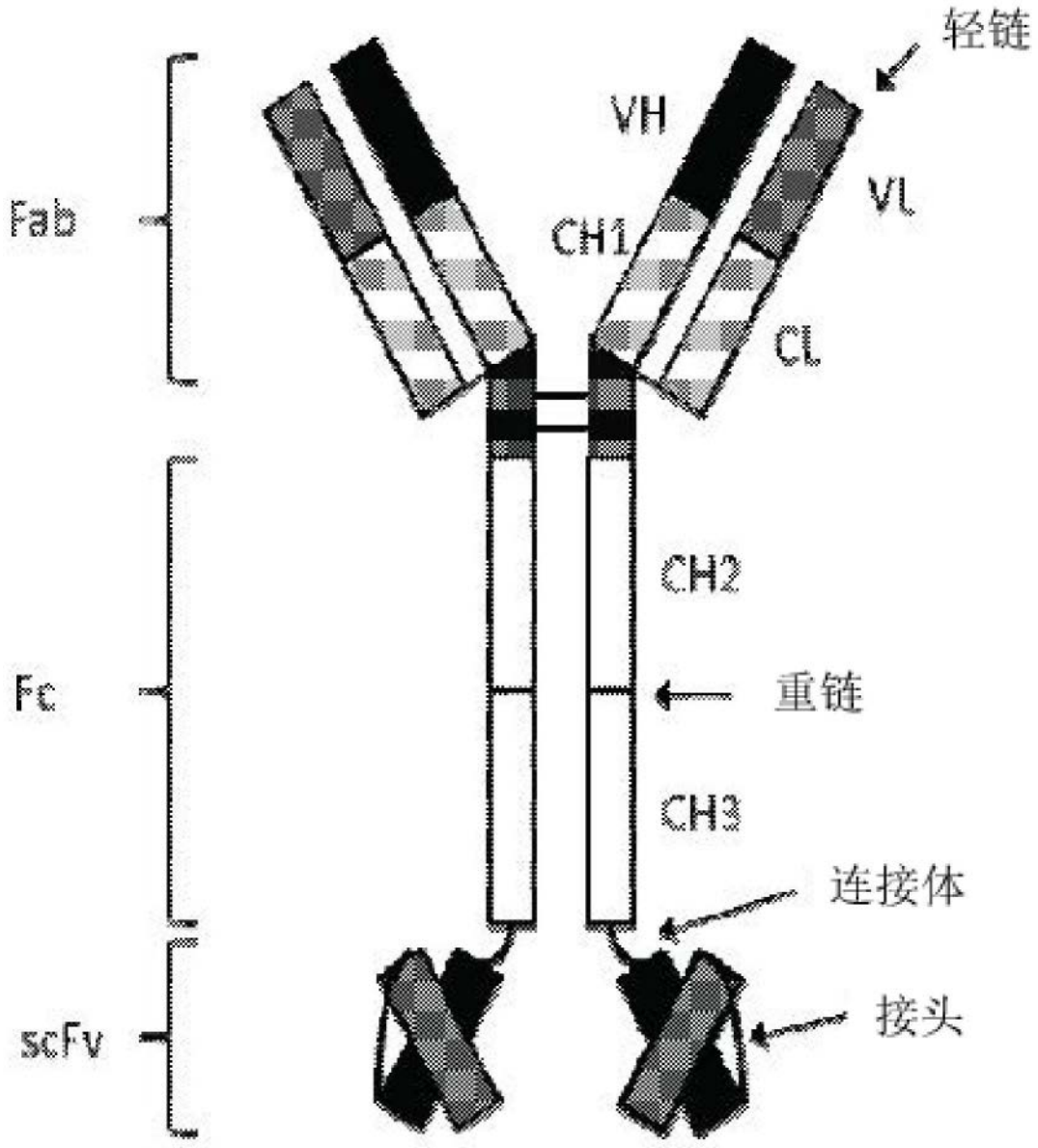
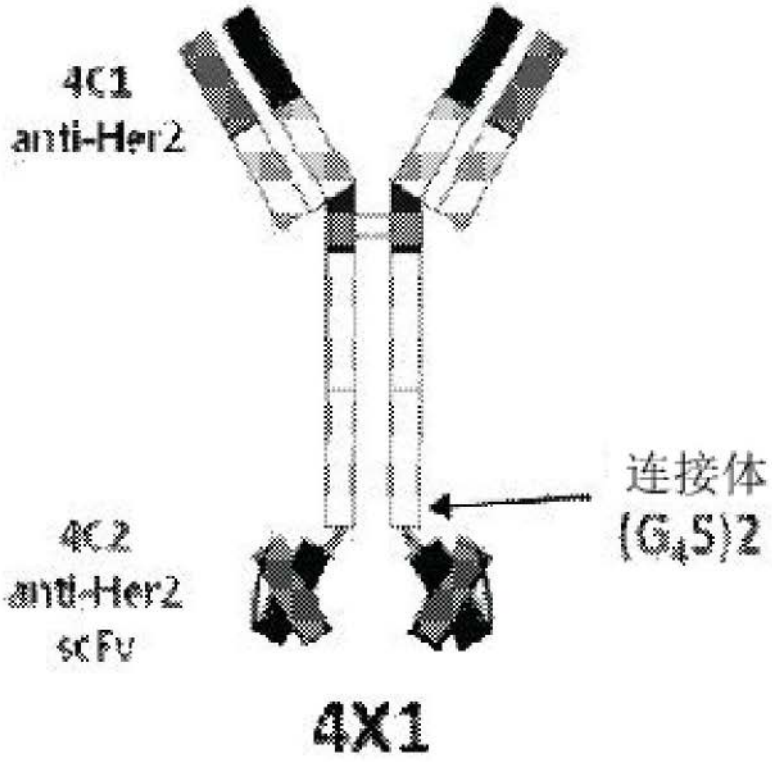


图1


4C1
anti-Her2
连接体
(G4S)2
4C2
anti-Her2
scFv
4X1

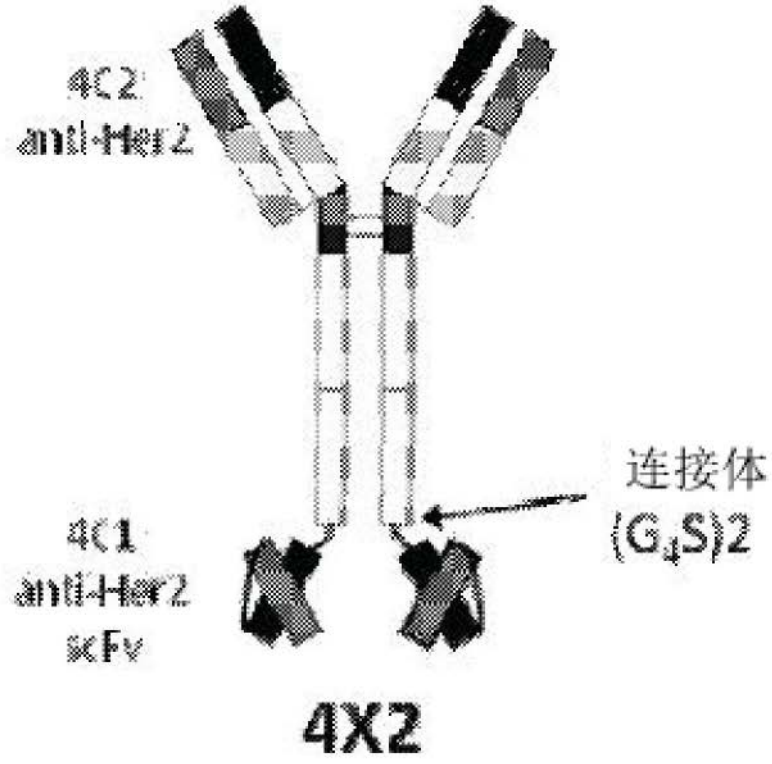
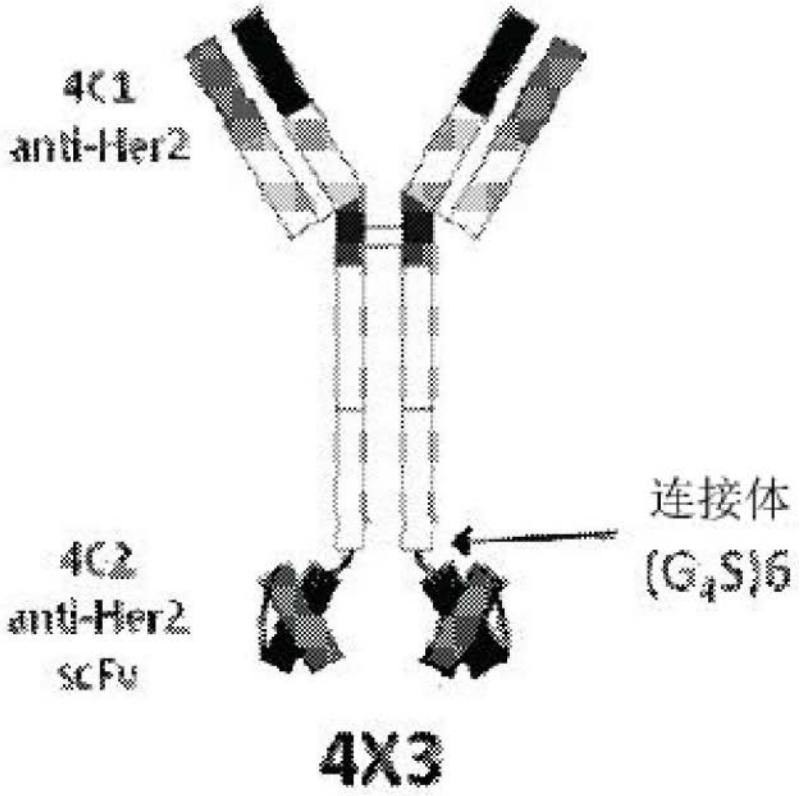

4C2
anti-Her2
连接体
(G4S)2
4C1
anti-Her2
scFv
4X2

图2a


4C1
anti-Her2
连接体
(G4S)6
4C2
anti-Her2
scFv
4X3

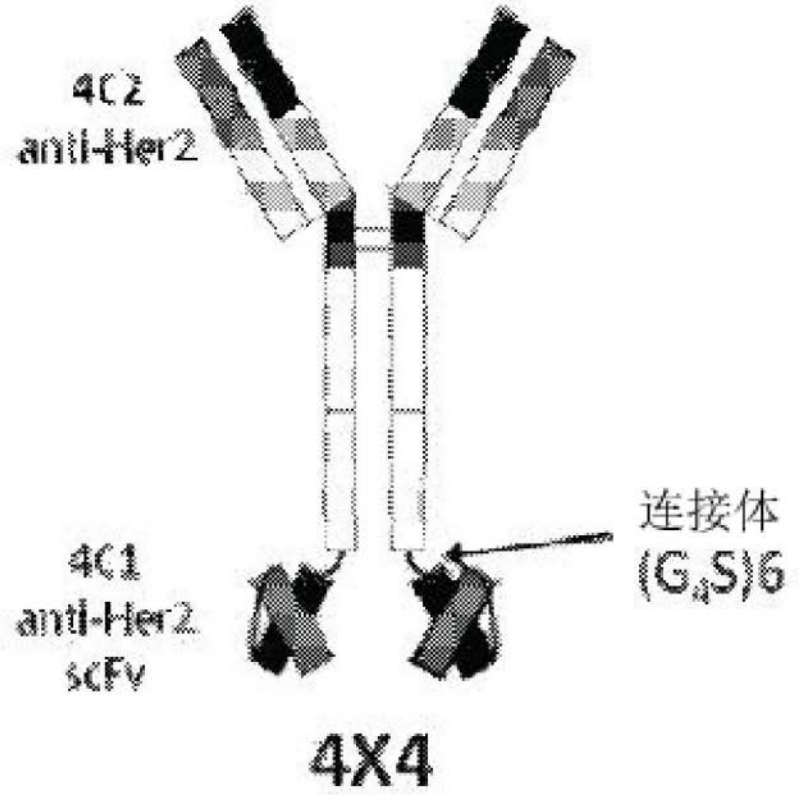
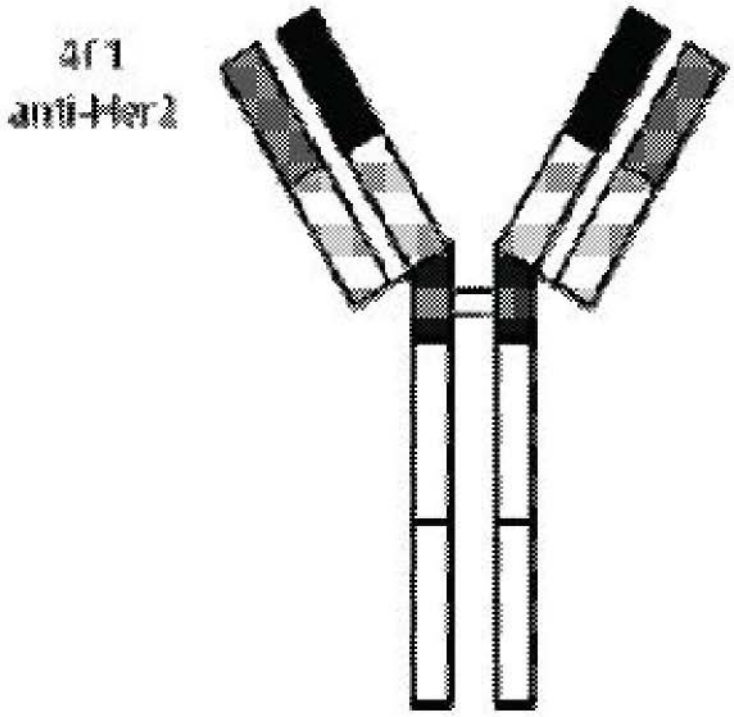

4C2
anti-Her2
连接体
(G4S)6
4C1
anti-Her2
scFv
4X4

图2b



4C1

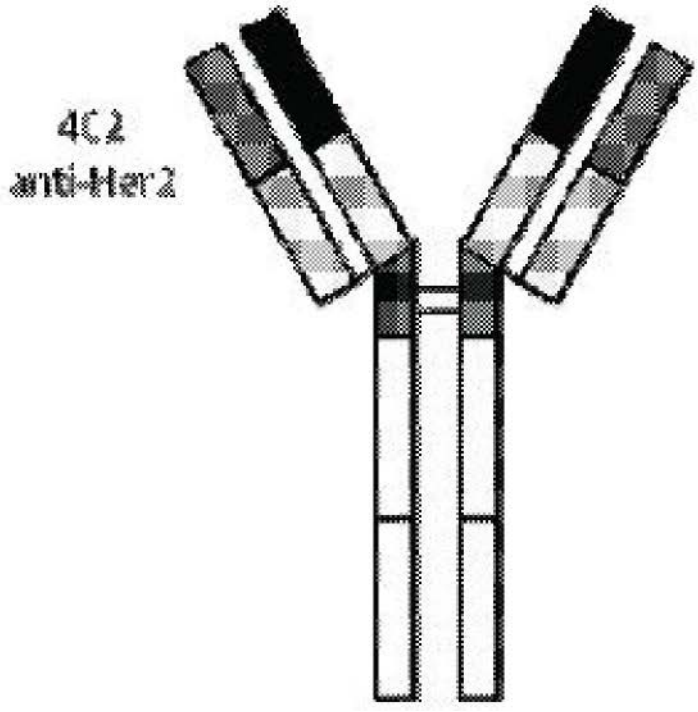


图3

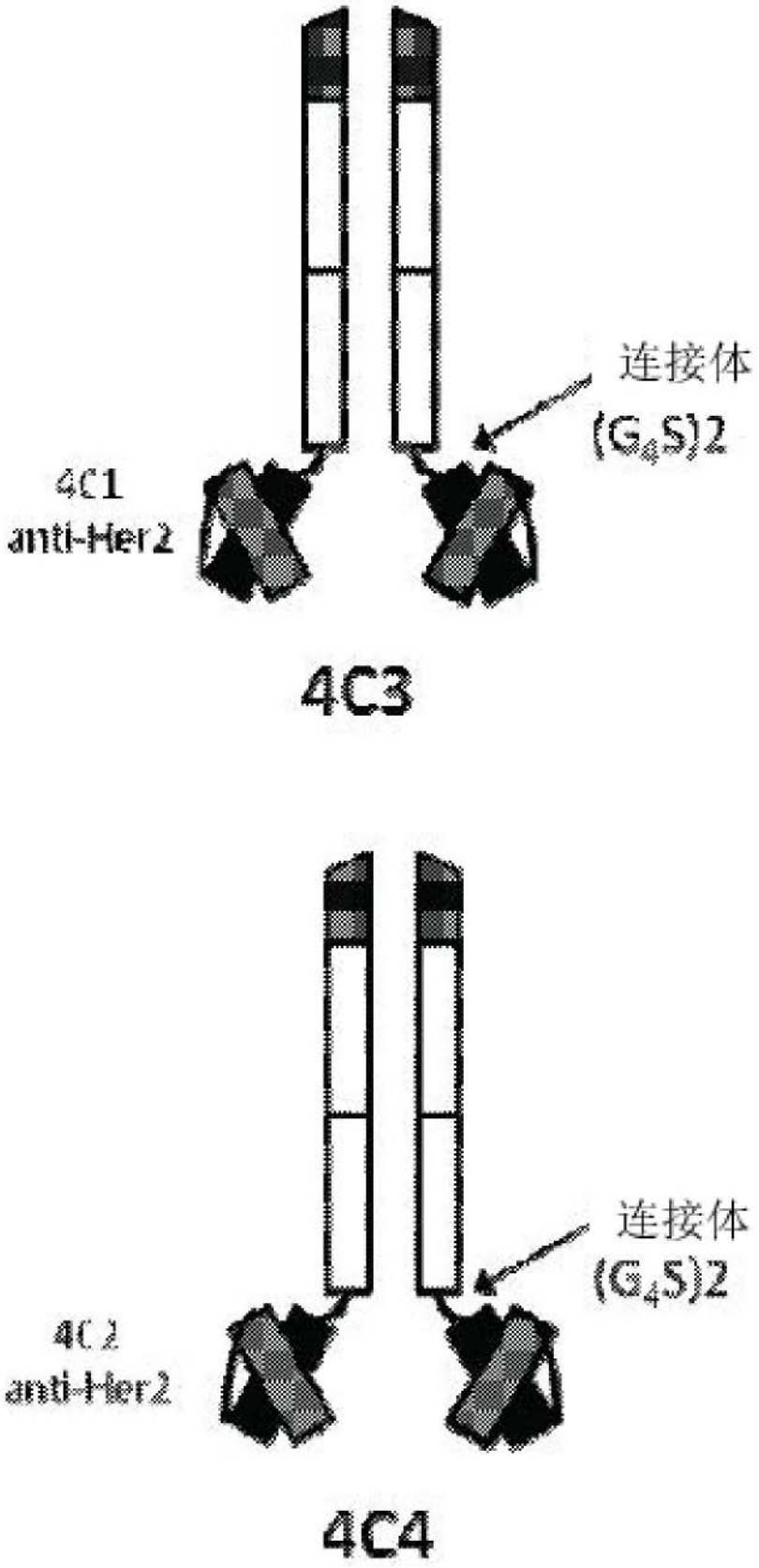


图4a

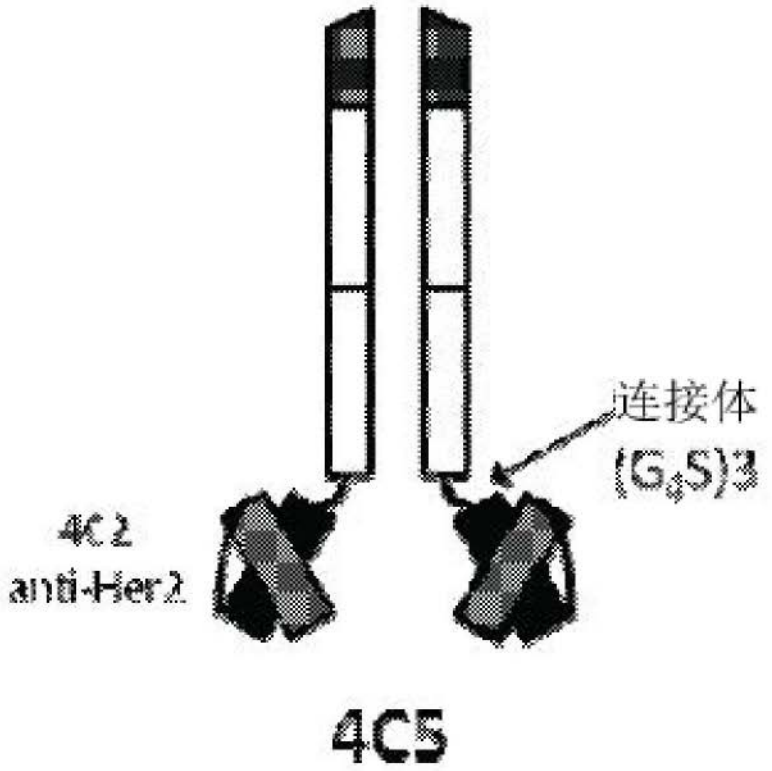


图4b

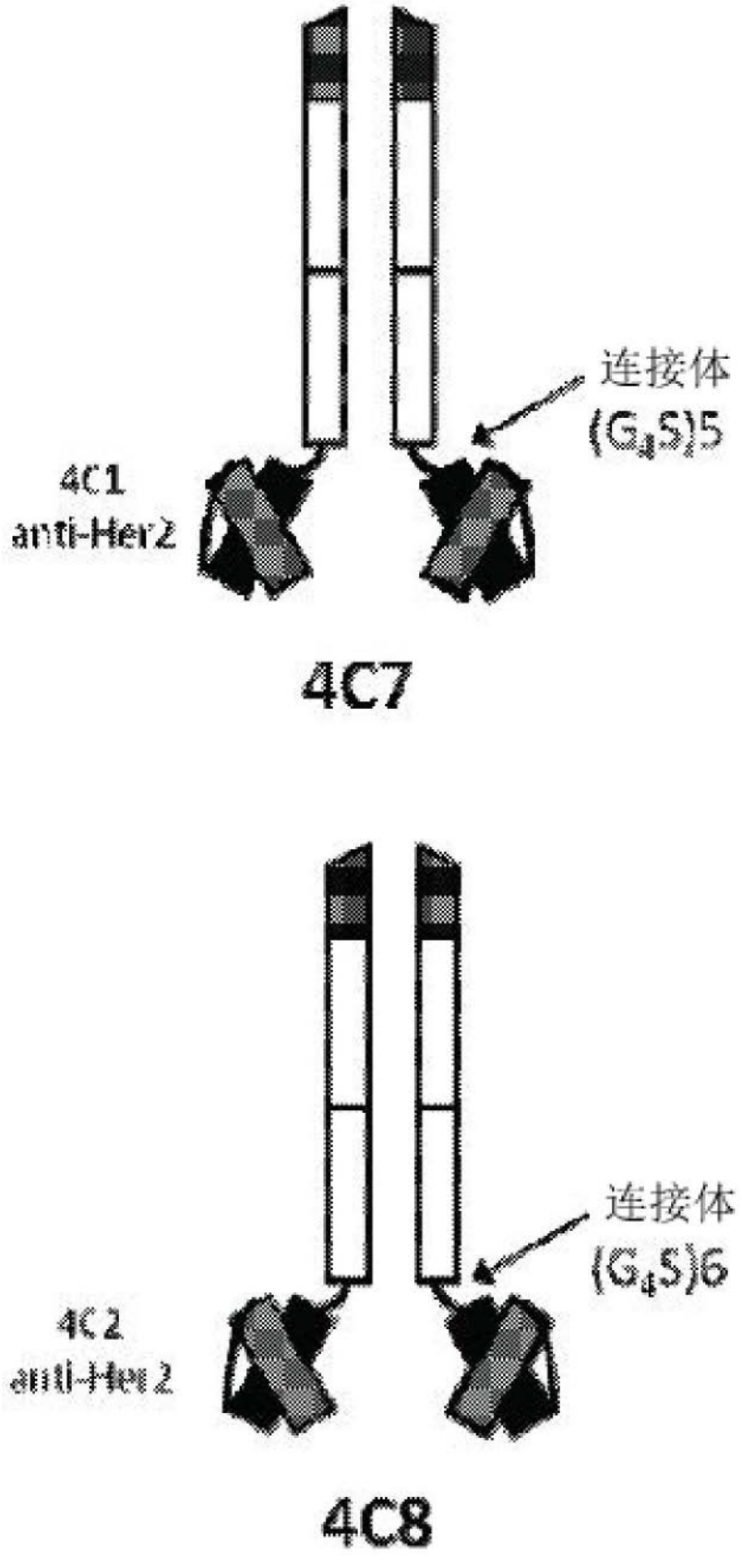


图4c

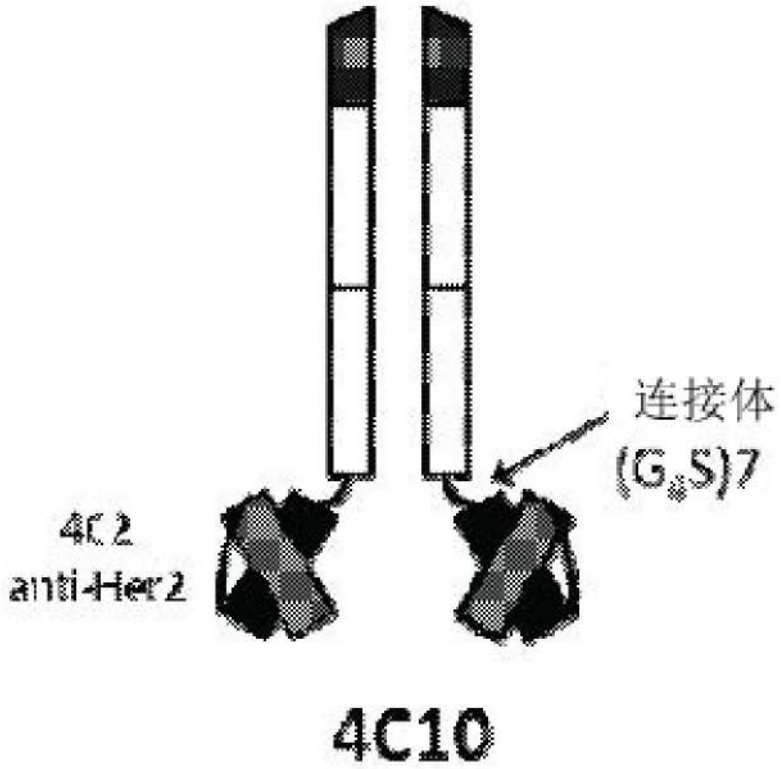
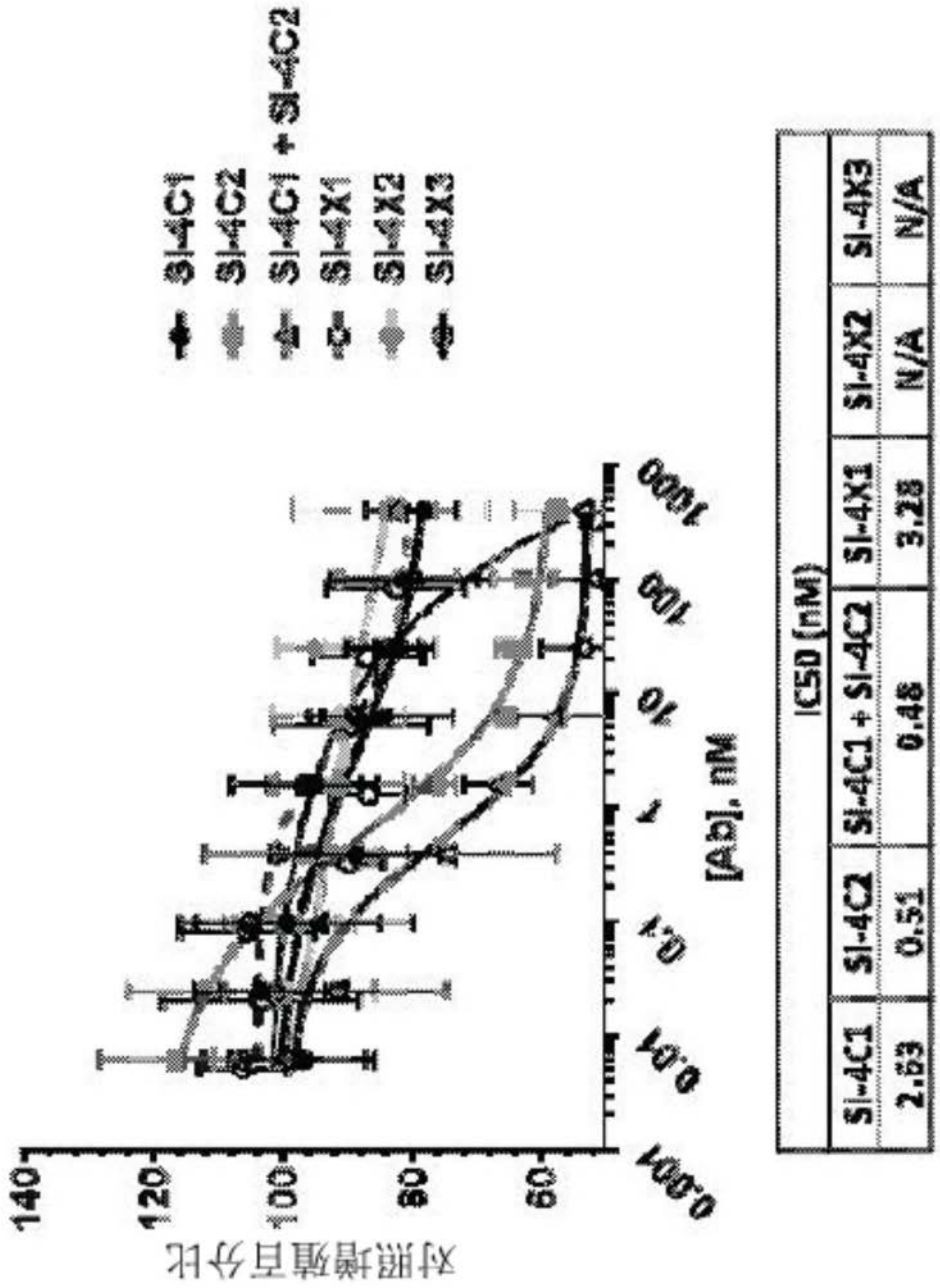


图4d



ICSD (nM)					
SI-4C1	SI-4C2	SI-4C1 + SI-4C2	SI-4X1	SI-4X2	SI-4X3
2.63	0.51	0.48	3.28	N/A	N/A

图5

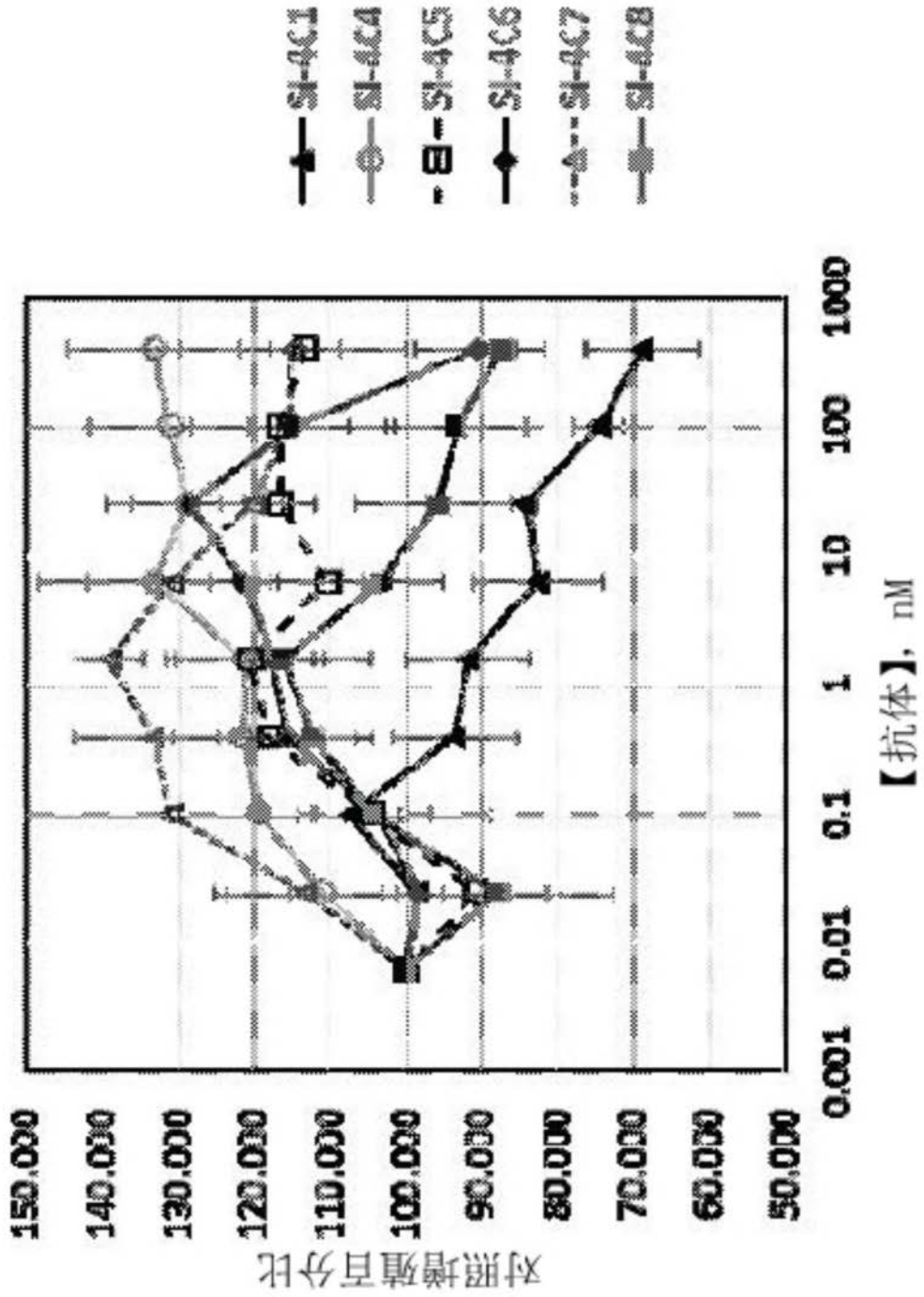

SI-4C1
SI-4C4
SI-4C5
SI-4C6
SI-4C7
SI-4C8
对照增殖百分比
150.000
140.000
130.000
120.000
110.000
100.000
90.000
80.000
70.000
60.000
50.000
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
【抗体】, nM

图6

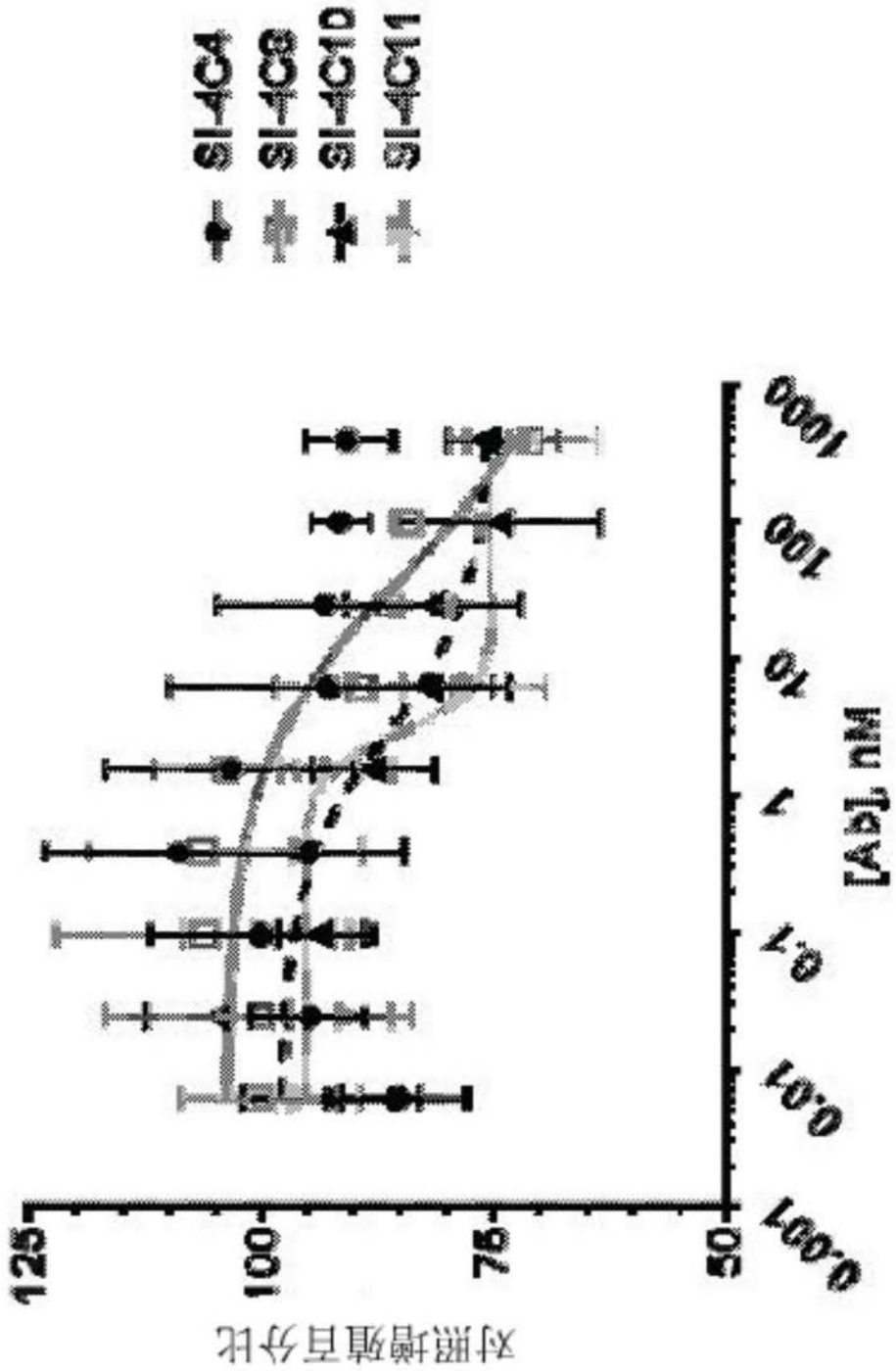

SI-4C4
SI-4C8
SI-4C10
SI-4C11
[Ab], nM
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
125
100
75
50
对照增殖百分比

图7

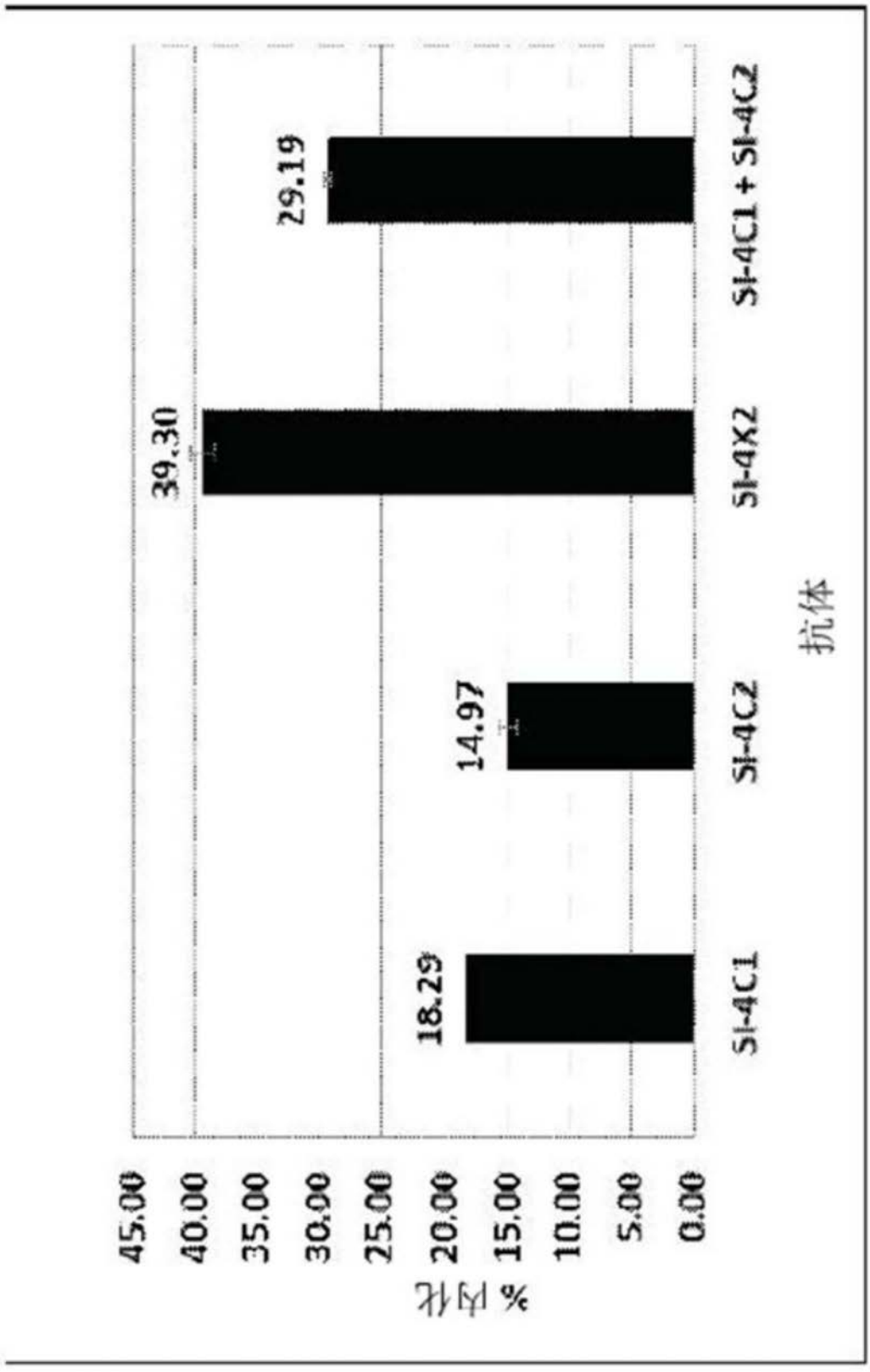

45.00
40.00
35.00
30.00
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
% 抑制
18.29
14.97
39.30
29.19
SI-4C1
SI-4C2
SI-4X2
SI-4C1 + SI-4C2
抗体

图8