



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 117642425 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 01

(21) 申请号 202280037903.X

(22) 申请日 2022.05.30

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2021/097239 2021.05.31 CN

PCT/CN2021/097240 2021.05.31 CN

PCT/CN2021/106783 2021.07.16 CN

PCT/CN2021/106784 2021.07.16 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.11.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2022/095841 2022.05.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/253156 EN 2022.12.08

(71) 申请人 石家庄以岭药业股份有限公司

地址 050035 河北省石家庄市高新技术产
业开发区天山大街238号

(72) 发明人 贾振华

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 岑晓东

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

权利要求书2页 说明书21页 附图11页

(54) 发明名称

针对CLDN18.2的单克隆抗体及其Fc工程化
形式

(57) 摘要

提供了一组单克隆抗体,所述单克隆抗体与
CLDN18.2特异性结合并且不与CLDN18.1特异性
结合,并且任选地具有工程化Fc区。

1. 一种与CLDN18.2特异性结合的单克隆抗体,所述单克隆抗体包含:

如SEQ ID NO:7所示的VH中包含的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3,以及如SEQ ID NO:8所示的VL中包含的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3。

2. 根据权利要求1所述的单克隆抗体,所述单克隆抗体包含:

(1) 如SEQ ID NO:29所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:30所示的HVR-H2、如SEQ ID NO:31所示的HVR-H3、如SEQ ID NO:32所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:33所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:34所示的HVR-L3;

(2) 如SEQ ID NO:40所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:41所示的HVR-H2、如SEQ ID NO:42所示的HVR-H3、如SEQ ID NO:43所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:44所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:45所示的HVR-L3;

(3) 如SEQ ID NO:46所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:47所示的HVR-H2、如SEQ ID NO:48所示的HVR-H3、如SEQ ID NO:49所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:50所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:51所示的HVR-L3;或

(4) 如SEQ ID NO:52所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:53所示的HVR-H2、如SEQ ID NO:54所示的HVR-H3、如SEQ ID NO:55所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:56所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:57所示的HVR-L3。

3. 根据权利要求1所述的单克隆抗体,所述单克隆抗体包含:

如SEQ ID NO:7所示的VH和如SEQ ID NO:8所示的VL。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的单克隆抗体,所述单克隆抗体是鼠抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

5. 根据权利要求1至3中任一项所述的单克隆抗体,所述单克隆抗体是全长抗体。

6. 根据权利要求5所述的单克隆抗体,所述单克隆抗体包含任选地如SEQ ID NO:9所示的人IgG、特别是IgG1重链恒定区和/或任选地如SEQ ID NO:10所示的人 κ 轻链恒定区。

7. 根据权利要求1至3中任一项所述的单克隆抗体,所述单克隆抗体是任选地选自以下的抗原结合抗体片段:Fab片段、Fab' 片段、F(ab')₂片段、scFv片段和双抗体。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的单克隆抗体,所述单克隆抗体是分离的、裸的和/或缀合的。

9. 一种与CLDN18.2特异性结合的Fc工程化单克隆抗体,所述单克隆抗体包含:

如SEQ ID NO:7所示的VH中包含的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3,以及如SEQ ID NO:8所示的VL中包含的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3,并且

包含Fc区中的一个或多个突变。

10. 根据权利要求9所述的单克隆抗体,所述单克隆抗体包含:

(1) 如SEQ ID NO:29所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:30所示的HVR-H2、如SEQ ID NO:31所示的HVR-H3、如SEQ ID NO:32所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:33所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:34所示的HVR-L3;

(2) 如SEQ ID NO:41所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:42所示的HVR-H2、如SEQ ID NO:43所示的HVR-H3、如SEQ ID NO:44所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:45所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:46所示的HVR-L3;

(3) 如SEQ ID NO:47所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:48所示的HVR-H2、如SEQ ID NO:49所

示的HVR-H3、如SEQ ID NO:50所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:51所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:52所示的HVR-L3;或

(4) 如SEQ ID NO:53所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:54所示的HVR-H2、如SEQ ID NO:55所示的HVR-H3、如SEQ ID NO:56所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:57所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:58所示的HVR-L3。

11. 根据权利要求9所述的单克隆抗体,所述单克隆抗体包含:

如SEQ ID NO:7所示的VH和如SEQ ID NO:8所示的VL,
任选地,其中所述VH的前两个N末端氨基酸残基不存在。

12. 根据权利要求9至11中任一项所述的单克隆抗体,所述单克隆抗体是嵌合抗体或人源化抗体。

13. 根据权利要求9至12中任一项所述的单克隆抗体,其中所述Fc区中的所述一个或多个突变是改变,例如增加或降低,与Fc受体的结合和/或效应子功能,例如ADCC和/或CDC,的一个或多个突变。

14. 根据权利要求13所述的单克隆抗体,其中所述Fc区中的所述一个或多个突变是选自以下的一个或多个取代:L235V、F243L、R292P、Y300L和P396L。

15. 根据权利要求9至11中任一项所述的单克隆抗体,所述单克隆抗体包含
任选地如SEQ ID NO:40所示的人IgG、特别是IgG1重链恒定区,和/或
任选地如SEQ ID NO:10所示的人κ轻链恒定区。

16. 根据权利要求9至15中任一项所述的单克隆抗体,所述单克隆抗体是分离的、裸的和/或缀合的。

17. 一种分离的核酸,所述分离的核酸编码根据权利要求1至16中任一项所述的单克隆抗体。

18. 一种载体,所述载体包含根据权利要求17所述的核酸。

19. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含根据权利要求17所述的核酸或根据权利要求18所述的载体。

20. 一种产生根据权利要求1至16中任一项所述的单克隆抗体的方法,所述方法是通过培养根据权利要求19所述的宿主细胞从而产生所述抗体,以及任选地从所述宿主细胞或所述细胞培养物中回收所述抗体。

21. 一种组合物,所述组合物包含根据权利要求1至16中任一项所述的单克隆抗体。

针对CLDN18.2的单克隆抗体及其Fc工程化形式

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2021年5月31日提交的PCT专利申请号PCT/CN2021/097239和PCT/CN2021/097240以及2021年7月16日提交的PCT专利申请号PCT/CN2021/106783和PCT/CN2021/106784的优先权,将其内容通过引用以其整体而并入。

技术领域

[0002] 提供了一组单克隆抗体,所述单克隆抗体与CLDN18.2特异性结合并且不与CLDN18.1特异性结合,并且任选地具有工程化Fc区。

背景技术

[0003] 紧密连接分子密蛋白(Claudin)18剪接变体2(密蛋白18.2,CLDN18.2)是紧密连接蛋白的密蛋白家族的一员。CLDN18.2是一种包含四个跨膜结构域与两个小的胞外环的27.8kDa的跨膜蛋白。

[0004] 在除胃以外的正常组织中,RT-PCR无法检测到CLDN18.2的表达。用CLDN18.2特异性抗体进行免疫组织化学揭示到胃是唯一的阳性组织。

[0005] CLDN18.2是一种仅在短寿命的分化的胃上皮细胞上表达的高度选择性胃谱系抗原。CLDN18.2在恶性转化过程中得到保持,因此经常在人胃癌细胞的表面上展示。此外,此泛肿瘤抗原在食管腺癌、胰腺腺癌和肺腺癌中以显著水平被异位激活。CLDN18.2蛋白还定位于胃癌腺癌的淋巴结转移中,以及远处转移中,尤其是定位到卵巢(所谓的克鲁肯贝格瘤)中。

发明内容

[0006] 本发明提供了抗CLDN18.2抗体。

[0007] 本发明提供了一种与人CLDN18.2特异性结合的分离的单克隆抗体(特别是Fc工程化的),其中所述抗体包含

(1) 如SEQ ID NO:1所示的VH中包含的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3,以及如SEQ ID NO:2所示的VL中包含的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3;

(2) 如SEQ ID NO:3所示的VH中包含的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3,以及如SEQ ID NO:4所示的VL中包含的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3;

(3) 如SEQ ID NO:5所示的VH中包含的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3,以及如SEQ ID NO:6所示的VL中包含的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3;或

(4) 如SEQ ID NO:7所示的VH中包含的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3,以及如SEQ ID NO:8所示的VL中包含的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3,

例如,如图1A、图1B、图1C或图1D所示,并且

任选地,包含Fc区中的一个或多个突变。

[0008] 在一个实施方案中,所述抗体包含

(1) 如SEQ ID NO:11所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:12所示的HVR-H2、如SEQ ID NO:13所示的HVR-H3、如SEQ ID NO:14所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:15所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:16所示的HVR-L3;

(2) 如SEQ ID NO:17所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:18所示的HVR-H2、如SEQ ID NO:19所示的HVR-H3、如SEQ ID NO:20所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:21所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:22所示的HVR-L3;

(3) 如SEQ ID NO:23所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:24所示的HVR-H2、如SEQ ID NO:25所示的HVR-H3、如SEQ ID NO:26所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:27所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:28所示的HVR-L3;或

(4) 如SEQ ID NO:29所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:30所示的HVR-H2、如SEQ ID NO:31所示的HVR-H3、如SEQ ID NO:32所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:33所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:34所示的HVR-L3。

[0009] 在一个实施方案中,所述抗体包含

(1) 如SEQ ID NO:41所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:42所示的HVR-H2、如SEQ ID NO:43所示的HVR-H3、如SEQ ID NO:44所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:45所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:46所示的HVR-L3;

(2) 如SEQ ID NO:47所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:48所示的HVR-H2、如SEQ ID NO:49所示的HVR-H3、如SEQ ID NO:50所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:51所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:52所示的HVR-L3;或

(3) 如SEQ ID NO:53所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:54所示的HVR-H2、如SEQ ID NO:55所示的HVR-H3、如SEQ ID NO:56所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:57所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:58所示的HVR-L3。

[0010] 本发明进一步提供了一种与人CLDN18.2特异性结合的分离的单克隆抗体(特别是Fc工程化的),其中所述抗体包含

(1) 包含如SEQ ID NO:11所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:12所示的HVR-H2和如SEQ ID NO:13所示的HVR-H3的VH,以及包含如SEQ ID NO:14所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:15所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:16所示的HVR-L3的VL;

(2) 包含如SEQ ID NO:17所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:18所示的HVR-H2和如SEQ ID NO:19所示的HVR-H3的VH,以及包含如SEQ ID NO:20所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:21所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:22所示的HVR-L3的VL;

(3) 包含如SEQ ID NO:23所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:24所示的HVR-H2和如SEQ ID NO:25所示的HVR-H3的VH,以及包含如SEQ ID NO:26所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:27所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:28所示的HVR-L3的VL;或

(4) 包含如SEQ ID NO:29所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:30所示的HVR-H2和如SEQ ID NO:31所示的HVR-H3的VH,以及包含如SEQ ID NO:32所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:33所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:34所示的HVR-L3的VL,并且

任选地,包含Fc区中的一个或多个突变。

[0011] 本发明进一步提供了一种与人CLDN18.2特异性结合的分离的单克隆抗体(特别是Fc工程化的),其中所述抗体包含

(1) 包含如SEQ ID NO:41所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:42所示的HVR-H2和如SEQ ID NO:43所示的HVR-H3的VH,以及包含如SEQ ID NO:44所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:45所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:46所示的HVR-L3的VL;

(2) 包含如SEQ ID NO:47所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:48所示的HVR-H2和如SEQ ID NO:49所示的HVR-H3的VH,以及包含如SEQ ID NO:50所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:51所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:52所示的HVR-L3的VL;或

(3) 包含如SEQ ID NO:53所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:54所示的HVR-H2和如SEQ ID NO:55所示的HVR-H3的VH,以及包含如SEQ ID NO:56所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:57所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:58所示的HVR-L3的VL,并且

任选地,包含Fc区中的一个或多个突变。

[0012] 本发明进一步提供了一种与人CLDN18.2特异性结合的分离的单克隆抗体(特别是Fc工程化的),其中所述抗体包含

(1) 如SEQ ID NO:1所示的VH和如SEQ ID NO:2所示的VL;

(2) 如SEQ ID NO:3所示的VH和如SEQ ID NO:4所示的VL;

(3) 如SEQ ID NO:5所示的VH和如SEQ ID NO:6所示的VL;或

(4) 如SEQ ID NO:7所示的VH和如SEQ ID NO:8所示的VL,并且

任选地,包含Fc区中的一个或多个突变,

任选地,其中所述VH的前两个N末端氨基酸残基不存在。

[0013] 在一个实施方案中,所述Fc区中的所述一个或多个突变是改变(例如,增加或降低)与Fc受体的结合和/或效应子功能(例如,ADCC和/或CDC)的一个或多个突变。在一个实施方案中,所述Fc区中的所述一个或多个突变是选自以下的一个或多个取代:L235V、F243L、R292P、Y300L和P396L。在一个实施方案中,所述Fc区中的所述一个或多个突变是L235V、F243L、R292P、Y300L和P396L。

[0014] 本发明进一步提供了一种与人CLDN18.2特异性结合的分离的单克隆抗体(特别是Fc工程化的),其中所述抗体:

i) 与抗CLDN18.2抗体竞争结合人CLDN18.2,所述抗体包含(1) 如SEQ ID NO:1所示的VH和如SEQ ID NO:2所示的VL;(2) 如SEQ ID NO:3所示的VH和如SEQ ID NO:4所示的VL;(3) 如SEQ ID NO:5所示的VH和如SEQ ID NO:6所示的VL;或(4) 如SEQ ID NO:7所示的VH和如SEQ ID NO:8所示的VL,和/或

ii) 与抗CLDN18.2抗体结合人CLDN18.2上的相同表位,所述抗体包含(1) 如SEQ ID NO:1所示的VH和如SEQ ID NO:2所示的VL;(2) 如SEQ ID NO:3所示的VH和如SEQ ID NO:4所示的VL;(3) 如SEQ ID NO:5所示的VH和如SEQ ID NO:6所示的VL;或(4) 如SEQ ID NO:7所示的VH和如SEQ ID NO:8所示的VL;和/或

iii) 介导PBMC对表达人CLDN18.2的细胞(例如,293T细胞或CHO细胞或CT26细胞或KATOIII细胞或NCI-N87细胞)的ADCC,例如EC50值为、约或小于10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM、0.1nM、0.09nM、0.08nM、0.07nM、0.06nM、0.05nM、0.04nM、0.03nM、0.02nM、0.01nM、0.009nM、0.008nM、0.007nM、0.006nM、0.005nM、0.004nM、0.003nM、0.002nM或0.001nM,例如经由LDH或FACS所确定;和/或

iv) 不介导PBMC对表达人CLDN18.1的细胞(例如,293T细胞或CHO细胞或CT26细胞或KATOIII细胞或NCI-N87细胞)的ADCC;和/或

v) 介导对表达人CLDN18.2的细胞(例如,293T细胞或CHO细胞或CT26细胞或KATOIII细胞或NCI-N87细胞)的CDC,例如EC50值为、约或小于10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM、0.1nM、0.09nM、0.08nM、0.07nM、0.06nM、0.05nM、0.04nM、0.03nM、0.02nM、0.01nM、0.009nM、0.008nM、0.007nM、0.006nM、0.005nM、0.004nM、0.003nM、0.002nM或0.001nM,例如经由LDH或FACS所确定;和/或

vi) 不介导对表达人CLDN18.1的细胞(例如,293T细胞或CHO细胞或CT26细胞或KATOIII细胞或NCI-N87细胞)的CDC;和/或

vii) 与在细胞表面上表达人CLDN18.2的细胞(例如,293T细胞或CHO细胞)结合,例如Kd值为、约或小于50pM、45pM、40pM、38.6pM、35pM、30pM、25pM、20pM、15pM、13.1pM、10pM、9.5pM、9pM或5pM;和/或

viii) 不与在细胞表面上表达人CLDN18.1的细胞(例如,293T细胞或CHO细胞)结合;和/或

ix) 与人CLDN18.2特异性结合,例如Kd值为、约或小于10nM、9.5nM、9nM、8.5nM、8nM、7.5nM、7nM、6.5nM、6.4nM、6nM、5.5nM、5nM、4.5nM、4nM、3.8nM、3.5nM、3nM、2.5nM、2nM、1.7nM、1.5nM或1nM;和/或

x) 不与人CLDN18.1特异性结合。

[0015] 在一个实施方案中,根据本发明的抗CLDN18.2单克隆抗体是鼠抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

[0016] 在一个实施方案中,根据本发明的抗CLDN18.2单克隆抗体是任选地选自以下的抗原结合抗体片段:Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、scFv片段和双抗体。

[0017] 在一个实施方案中,根据本发明的抗CLDN18.2单克隆抗体是全长抗体。在一个实施方案中,根据本发明的抗CLDN18.2单克隆抗体包含任选地如SEQ ID NO:9所示的人IgG(特别是IgG1)重链恒定区。在一个实施方案中,根据本发明的抗CLDN18.2单克隆抗体包含任选地如SEQ ID NO:40所示的突变的人IgG(特别是IgG1)重链恒定区。在一个实施方案中,根据本发明的抗CLDN18.2单克隆抗体包含任选地如SEQ ID NO:10所示的人κ轻链恒定区。在一个实施方案中,根据本发明的抗CLDN18.2单克隆抗体是嵌合抗体(例如,鼠/人嵌合抗体)。在一个实施方案中,根据本发明的抗CLDN18.2单克隆抗体是Fc工程化的。

[0018] 在一个实施方案中,本发明的单克隆抗体(mAb)或Fab片段具有交叉形式(x-mAb或x-Fab),其中轻链和重链的可变结构域或(第一)恒定结构域被交换。

[0019] 本发明提供了一种编码本发明的单克隆抗体的分离的核酸。本发明提供了一种包含本发明的核酸的载体(例如,克隆载体或表达载体)。本发明提供了一种包含本发明的核酸或本发明的载体的宿主细胞。本发明提供了一种产生本发明的单克隆抗体的方法,所述方法包括培养所述宿主细胞从而产生所述抗体。在一个实施方案中,所述方法进一步包括从所述宿主细胞或所述细胞培养物中回收所述抗体。

[0020] 本发明提供了一种包含本发明的单克隆抗体的组合物。本发明提供了一种包含本发明的单克隆抗体和药学上可接受的载体的药物配制品。

[0021] 本发明提供了用于作为药剂使用的本发明的单克隆抗体。本发明提供了用于在治疗癌症中使用的本发明的单克隆抗体。本发明提供了本发明的单克隆抗体在制造药剂中的用途。在一个实施方案中,所述药剂用于治疗癌症。本发明提供了一种治疗患有癌症的个体的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的本发明的单克隆抗体。

附图说明

[0022] 图1A示出了本发明的抗体的VH和VL的氨基酸序列的比对,其中根据Kabat的HVR序列通过阴影突出显示。

[0023] 图1B示出了本发明的抗体的VH和VL的氨基酸序列的比对,其中根据IMGT的HVR序列通过阴影突出显示。

[0024] 图1C示出了本发明的抗体的VH和VL的氨基酸序列的比对,其中根据Chothia的HVR序列通过阴影突出显示。

[0025] 图1D示出了本发明的抗体的VH和VL的氨基酸序列的比对,其中根据Contact的HVR序列通过阴影突出显示。

[0026] 图2示出了本发明的抗体与表达CLDN18.2的细胞的结合。

[0027] 图3示出了本发明的抗体与表达CLDN18.1的细胞的结合。

[0028] 图4示出了由本发明的抗体介导的对表达CLDN18.2的细胞的ADCC。

[0029] 图5示出了本发明的抗体与huCLDN18.2的结合曲线。

[0030] 图6示出了本发明的抗体与表达huCLDN18.2的细胞的结合曲线。

[0031] 图7示出了本发明的抗体的ADCC测定的结果。

[0032] 图8示出了本发明的抗体的细胞结合测定的结果。

[0033] 图9示出了本发明的抗体的CDC测定的结果。

[0034] 图10示出了本发明的抗体的ADCC测定的结果。

[0035] 图11示出了通过LDH测定确定的由本发明的抗体介导的对表达CLDN18.2的CT26的CDC效应。

[0036] 图12示出了通过LDH测定确定的由本发明的抗体介导的对表达CLDN18.2的KATOIII的CDC效应。

[0037] 图13示出了通过LDH测定确定的由本发明的抗体介导的对表达CLDN18.2的KATOIII的ADCC效应。

[0038] 图14示出了通过LDH测定确定的由本发明的抗体介导的对表达CLDN18.2的NCI-N87的ADCC效应。

具体实施方式

I. 定义

[0039] 本文的术语“抗体”在最广泛的意义上使用,并且包括多种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和只要展现出所需的抗原结合活性的抗体片段。

[0040] “抗体片段”是指不同于完整抗体的分子,其包含完整抗体的结合完整抗体所结合的抗原的部分。抗体片段的例子包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双抗体;线

性抗体;单链抗体分子(例如,scFv);和从抗体片段形成的多特异性抗体。

[0041] 术语“嵌合”抗体是指这样的抗体,其中重链和/或轻链的一部分源自特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分源自不同来源或物种。

[0042] 抗体的“类别”是指其重链所具有的恒定结构域或恒定区的类型。存在五种主要的抗体类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且其中几种类别可以进一步分为亚类(同种型),例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。基于恒定结构域的氨基酸序列,轻链可以被归为两种明显不同的类型(称为 κ 和 λ)中的一种。

[0043] “效应子功能”是指可归因于抗体Fc区的那些生物活性,其随抗体同种型的变化而变化。抗体效应子功能的例子包括:C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如,B细胞受体)的下调;和B细胞激活。

[0044] 如本文所用,术语“工程化(engineer)、工程化(engineered)、工程化(engineering)”被认为包括对肽骨架的任何操作或对天然存在的或重组的多肽或其片段的翻译后修饰。工程化包括对氨基酸序列的修饰、对糖基化模式的修饰或对个体氨基酸的侧链基团的修饰,以及这些方法的组合。

[0045] 本文的术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的含有恒定区的至少一部分的C末端区。所述术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。在一个实施方案中,人IgG重链Fc区从Cys226或从Pro230延伸至重链的羧基末端。然而,Fc区的C末端赖氨酸(Lys447)可以存在或可以不存在。在一个实施方案中,如本文所述的抗CLDN18.2抗体是IgG1同种型的,并且包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:40的重链恒定区。在一个实施方案中,它另外包含C末端赖氨酸(Lys447)。除非本文另有说明,否则Fc区或恒定区中的氨基酸残基的编号是根据如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991中所述的EU编号系统(也称为EU索引)。

[0046] “框架”或“FR”是指除了高变区(HVR)残基之外的可变结构域残基。可变结构域的FR通常由以下四个FR结构域组成:FR1、FR2、FR3和FR4。因此,HVR和FR序列通常按以下序列出现在VH(或VL)中:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0047] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文中可互换地使用以指代具有与天然抗体结构基本上相似的结构或具有含有Fc区的重链的抗体。

[0048] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换地使用,并且是指已经引入外源核酸的细胞,包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化细胞”,其包括原代转化细胞和源自其的后代,不考虑传代次数。后代的核酸含量可能与亲代细胞不完全相同,但是可能含有突变。本文包括如在初始转化细胞中所筛选或选择的具有相同功能或生物活性的突变型后代。

[0049] “人源化”抗体是指包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中,人源化抗体将包含至少一个(并且通常两个)可变结构域的基本上全部,其中全部或基本上全部HVR(例如,CDR)对应于非人抗体的HVR,并且全部或基本上全部FR对应于人抗体的FR。人源化抗体任选地可以包含源自人抗体的抗体恒定区的至少

一部分。抗体(例如,非人抗体)的“人源化形式”是指已经经历人源化的抗体。

[0050] 如本文所用的术语“高变区”或“HVR”是指抗体可变结构域的在序列上是高变的(“互补决定区”或“CDR”)和/或形成结构确定的环(“高变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触(antigen contact)”)的每个区。通常,抗体包含六个HVR:三个在VH中(H1、H2、H3),并且三个在VL中(L1、L2、L3)。本文的示例性HVR包括:

(a) 存在于以下氨基酸残基处的高变环:26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)(Chothia和Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987));

(b) 存在于以下氨基酸残基处的CDR:24-34(L1)、50-56(L2)、89-97(L3)、31-35b(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)(Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

(c) 存在于以下氨基酸残基处的抗原接触:27c-36(L1)、46-55(L2)、89-96(L3)、30-35b(H1)、47-58(H2)和93-101(H3)(MacCallum等人 J. Mol. Biol. 262:732-745(1996)); 以及

(d) (a)、(b)和/或(c)的组合,包括HVR氨基酸残基46-56(L2)、47-56(L2)、48-56(L2)、49-56(L2)、26-35(H1)、26-35b(H1)、49-65(H2)、93-102(H3)和94-102(H3)。

HVR残基可以在网站(例如,<https://www.novopro.cn/tools/cdr.html>)上识别。

[0051] 除非另有指示,否则可变结构域中的HVR残基和其他残基(例如,FR残基)在本文中根据Kabat等人,同上来编号。

[0052] 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(即,构成所述群体的各个抗体是相同的和/或结合相同的表位,但是例如含有天然存在的突变或在单克隆抗体制剂的产生期间产生的可能变体抗体除外,此类变体通常以少量存在)获得的抗体。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,单克隆抗体制剂的每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。因此,修饰语“单克隆”指示从基本上同质的抗体群体获得的抗体的特征,并且不应被解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,根据本发明待使用的单克隆抗体可以通过多种技术制备,所述技术包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法和利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法,本文描述了制备单克隆抗体的此类方法和其他示例性方法。

[0053] 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的结合的结构域。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,每个结构域包含四个保守的框架区(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)。单个VH或VL结构域可能足以赋予抗原结合特异性。此外,结合特定抗原的抗体可以使用来自结合所述抗原的抗体的VH或VL结构域来分离,以分别筛选互补的VL或VH结构域的文库。参见例如,Portolano等人, J. Immunol. 150:880-887(1993); Clarkson等人, Nature 352:624-628(1991)。

[0054] 如本文所用,术语“载体”是指能够传播其所连接的另一种核酸的核酸分子。所述术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及掺入已经引入它的宿主细胞基因组中的载体。某些载体能够引导它们可操作地连接的核酸的表达。此类载体在本文中被称为“表达载体”。

II. 示例性抗体

[0055] 本发明提供了与人CLDN18.2特异性结合的分离的单克隆抗体(特别是Fc工程化的),其中所述抗体包含含有如SEQ ID NO:11所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:12所示的HVR-H2和如SEQ ID NO:13所示的HVR-H3的VH,以及含有如SEQ ID NO:14所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:15所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:16所示的HVR-L3的VL。在一个实施方案中,所述抗体包含如SEQ ID NO:1所示的VH和如SEQ ID NO:2所示的VL。任选地,所述VH的前两个N末端氨基酸残基不存在。

[0056] 本发明提供了与人CLDN18.2特异性结合的分离的单克隆抗体(特别是Fc工程化的),其中所述抗体包含含有如SEQ ID NO:17所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:18所示的HVR-H2和如SEQ ID NO:19所示的HVR-H3的VH,以及含有如SEQ ID NO:20所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:21所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:22所示的HVR-L3的VL。在一个实施方案中,所述抗体包含如SEQ ID NO:3所示的VH和如SEQ ID NO:4所示的VL。任选地,所述VH的前两个N末端氨基酸残基不存在。

[0057] 本发明提供了与人CLDN18.2特异性结合的分离的单克隆抗体(特别是Fc工程化的),其中所述抗体包含含有如SEQ ID NO:23所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:24所示的HVR-H2和如SEQ ID NO:25所示的HVR-H3的VH,以及含有如SEQ ID NO:26所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:27所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:28所示的HVR-L3的VL。在一个实施方案中,所述抗体包含如SEQ ID NO:5所示的VH和如SEQ ID NO:6所示的VL。任选地,所述VH的前两个N末端氨基酸残基不存在。

[0058] 本发明提供了与人CLDN18.2特异性结合的分离的单克隆抗体(特别是Fc工程化的),其中所述抗体包含含有如SEQ ID NO:29所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:30所示的HVR-H2和如SEQ ID NO:31所示的HVR-H3的VH,以及含有如SEQ ID NO:32所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:33所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:34所示的HVR-L3的VL。本发明提供了与人CLDN18.2特异性结合的分离的单克隆抗体(特别是Fc工程化的),其中所述抗体包含含有如SEQ ID NO:41所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:42所示的HVR-H2和如SEQ ID NO:43所示的HVR-H3的VH,以及含有如SEQ ID NO:44所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:45所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:46所示的HVR-L3的VL。本发明提供了与人CLDN18.2特异性结合的分离的单克隆抗体(特别是Fc工程化的),其中所述抗体包含含有如SEQ ID NO:47所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:48所示的HVR-H2和如SEQ ID NO:49所示的HVR-H3的VH,以及含有如SEQ ID NO:50所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:51所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:52所示的HVR-L3的VL。本发明提供了与人CLDN18.2特异性结合的分离的单克隆抗体(特别是Fc工程化的),其中所述抗体包含含有如SEQ ID NO:53所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:54所示的HVR-H2和如SEQ ID NO:55所示的HVR-H3的VH,以及含有如SEQ ID NO:56所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:57所示的HVR-L2和如SEQ ID NO:58所示的HVR-L3的VL。在一个实施方案中,所述抗体包含如SEQ ID NO:7所示的VH和如SEQ ID NO:8所示的VL。任选地,所述VH的前两个N末端氨基酸残基不存在。

[0059] 在一个实施方案中,所述Fc区中的所述一个或多个突变是改变(例如,增加或降低)与Fc受体的结合和/或效应子功能(例如,ADCC和/或CDC)的一个或多个突变。在一个实施方案中,所述Fc区中的所述一个或多个突变是选自以下的一个或多个取代:L235V、F243L、R292P、Y300L和P396L。在一个实施方案中,所述Fc区中的所述一个或多个突变是

L235V、F243L、R292P、Y300L和P396L。

[0060] 在一个实施方案中,根据本发明的抗CLDN18.2单克隆抗体是鼠抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

[0061] 在一个实施方案中,根据本发明的抗CLDN18.2单克隆抗体是任选地选自以下的抗原结合抗体片段:Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、scFv片段和双抗体。

[0062] 在一个实施方案中,根据本发明的抗CLDN18.2单克隆抗体是全长抗体。在一个实施方案中,根据本发明的抗CLDN18.2单克隆抗体包含任选地如SEQ ID NO:9所示的人IgG(特别是IgG1)重链恒定区。在一个实施方案中,根据本发明的抗CLDN18.2单克隆抗体包含任选地如SEQ ID NO:40所示的突变的人IgG(特别是IgG1)重链恒定区。在一个实施方案中,根据本发明的抗CLDN18.2单克隆抗体包含任选地如SEQ ID NO:10所示的人κ轻链恒定区。在一个实施方案中,根据本发明的抗CLDN18.2单克隆抗体是嵌合抗体(例如,鼠/人嵌合抗体)。在一个实施方案中,根据本发明的抗CLDN18.2单克隆抗体是Fc工程化的。

[0063] 在一个实施方案中,本发明的单克隆抗体(mAb)或Fab片段具有交叉形式(x-mAb或x-Fab),其中轻链和重链的可变结构域或(第一)恒定结构域被交换。

III. 重组方法和组合物

[0064] 可以使用重组方法和组合物产生抗体,例如如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。

[0065] 在天然抗体或天然抗体片段的情况下,需要两种核酸,一种用于轻链或其片段并且一种用于重链或其片段。一种或多种此类核酸编码包含所述抗体的VL的氨基酸序列和/或包含所述抗体的VH的氨基酸序列(例如,所述抗体的一条或多条轻链和/或重链)。这些核酸可以在相同的表达载体上或在不同的表达载体上。

[0066] 在一个实施方案中,提供了编码如在如本文报道的方法中使用的抗体的分离的核酸。

[0067] 在另一实施方案中,提供了包含一种或多种此类核酸的一种或多种载体(例如,表达载体)。

[0068] 在另一实施方案中,提供了一种包含一种或多种此类核酸的宿主细胞。

[0069] 在一个这样的实施方案中,宿主细胞包含(例如,已经被转化):

(1) 载体,所述载体包含编码包含所述抗体的VL的氨基酸序列和包含所述抗体的VH的氨基酸序列的核酸,或者

(2) 第一载体和第二载体,所述第一载体包含编码包含所述抗体的VL的氨基酸序列的核酸,所述第二载体包含编码包含所述抗体的VH的氨基酸序列的核酸。

[0070] 在一个实施方案中,所述宿主细胞是真核的,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴细胞(例如,Y0、NS0、Sp2/0细胞)。在一个实施方案中,提供了制备抗体的方法,其中所述方法包括在适合于表达所述抗体的条件下培养包含编码如以上所提供的抗体的核酸的宿主细胞,以及任选地从所述宿主细胞或宿主细胞培养基中回收所述抗体。

[0071] 对于抗体的重组产生,将编码例如如上所述的抗体的核酸分离并且插入一种或多种载体中,用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。此类核酸可以使用常规程序(例如,通过使用能够与编码所述抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)容易地分离和测序,或者通过重组方法产生或通过化学合成获得。

[0072] 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。对于抗体片段和多肽在细菌中的表达,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.(编辑),Humana Press,Totowa,NJ(2003),第245-254页,描述了抗体片段在大肠杆菌(E.coli)中的表达。在表达后,可以以可溶性级分从细菌细胞体(cell paste)中分离所述抗体,并且可以将其进一步纯化。

[0073] 除原核生物之外,真核微生物(诸如丝状真菌或酵母)也是编码抗体的载体的合适克隆或表达宿主,包括其糖基化途径已经“人源化”从而产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体的真菌和酵母菌株。参见Gerngross,T.U.,Nat.Biotech.22(2004)1409-1414;和Li,H.等人,Nat.Biotech.24(2006)210-215。

[0074] 用于表达糖基化抗体的合适宿主细胞也源自多细胞有机体(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的例子包括植物细胞和昆虫细胞。已经鉴定出可以与昆虫细胞结合使用的许多杆状病毒株,特别是用于草地贪夜蛾(Spodoptera frugiperda)细胞的转染。

[0075] 植物细胞培养物也可以用作宿主。参见例如,US 5,959,177、US 6,040,498、US 6,420,548、US 7,125,978和US 6,417,429(描述了用于在转基因植物中产生抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0076] 脊椎动物细胞也可以用作宿主。例如,适于悬浮生长的哺乳动物细胞系可以是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其他例子是由SV40转化的猴肾CV1系(COS-7);人胚肾系(如例如在Graham,F.L.等人,J.Gen Virol.36(1977)59-74中所述的293或293细胞);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠支持细胞(如例如在Mather,J.P.,Biol.Reprod.23(1980)243-252中所述的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);水牛大鼠肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562);如例如在Mather,J.P.等人,Annals N.Y.Acad.Sci.383(1982)44-68中所述的TRI细胞;MRC 5细胞;和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);和骨髓瘤细胞系(诸如Y0、NS0和Sp2/0)。关于某些适合于抗体生产的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。

IV. 测定

[0077] 本文提供的抗体可以通过本领域已知的各种测定鉴定、筛选或表征其物理/化学特性和/或生物活性。

结合测定和其他测定

[0078] 在一方面,例如通过诸如ELISA、蛋白质印迹等已知方法来测试本发明的抗体的抗原结合活性。

[0079] 在另一方面,竞争测定可以用于鉴定与aCLDN18.2竞争结合CLDN18.2的抗体。在某些实施方案中,这种竞争抗体结合与aCLDN18.2所结合的表位相同的表位(例如,线性表位或构象表位)。用于为抗体所结合的表位作图的详细示例性方法提供于Morris(1996)“Epitope Mapping Protocols,”Methods in Molecular Biology第66卷(Humana Press,

Totowa,NJ) 中。

[0080] 在示例性竞争测定中,将固定化CLDN18.2在包含与CLDN18.2结合的第一标记抗体和第二未标记抗体的溶液中孵育,测试所述第二未标记抗体与第一抗体竞争结合CLDN18.2的能力。第二抗体可以存在于杂交瘤上清液中。作为对照,将固定化CLDN18.2在包含第一标记抗体但不包含第二未标记抗体的溶液中孵育。在允许第一抗体与CLDN18.2结合的条件下孵育后,除去过量的未结合的抗体,并且测量与固定化CLDN18.2缔合的标记的量。如果相对于对照样品,在测试样品中与固定化CLDN18.2缔合的标记的量明显减少,则表明第二抗体与第一抗体竞争结合CLDN18.2。参见Harlow和Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*第14章(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY)。

活性测定

[0081] 在一方面,提供了用于鉴定具有生物活性的其抗CLDN18.2抗体的测定。生物活性可以包括例如抗CLDN18.2抗体对PBMCC对表达CLDN18.2的靶细胞的ADCC的作用。还提供了在体内和/或在体外具有这种生物活性的抗体。

实施例

[0082] 在初始筛选后,鉴定出与表达CLDN18.2的细胞特异性结合但不与表达CLDN18.1的细胞特异性结合的来自免疫小鼠的四种阳性杂交瘤细胞系。

实施例1:从小鼠杂交瘤细胞克隆四种CLDN18.2特异性单克隆抗体(mAb)。

[0083] 本实施例说明了从小鼠杂交瘤细胞中克隆抗体的H链和L链基因以获得对CLDN18.2具有特异性的可变区序列以产生嵌合抗体。

[0084] 按照本领域的常规程序,使用Quick-RNATM Microprep试剂盒(ZYMO Research,目录号R1050)从杂交瘤细胞中分离和纯化RNA。合成第一链cDNA,并且使用SMARTer[®] RACE 5' / 3' 试剂盒(Takara Bio USA, Inc., 目录号634858)连同IgG1 3' 恒定引物(SEQ ID NO:35)、IgG2a 3' 恒定引物(SEQ ID NO:36)和 κ 3' 恒定引物(SEQ ID NO:37)进行RACE。对RACE DNA产物用NuceloSpin凝胶和PCR Clean-Up试剂盒(Takara,目录号740986.20)进行凝胶提取。将线性化pRACE载体和凝胶纯化的PACE产物的in-fusion反应混合物转化到Stellar感受态细胞(Clontech,目录号636766)中。将质粒DNA使用QIAprep Spin Miniprep试剂盒(Qiagen,目录号27104)从转化体中分离,并且使用M13测序引物对其进行桑格测序(GENEWIZ)。获得了四对重链和轻链的最终基因序列(数据未示出),下面将其确定为CLDN18.2 mAb(mAb1、mAb2、mAb3和mAb4)。

[0085] 实施例2:用来自人的恒定区替代小鼠恒定区来构建嵌合抗体

[0086] 本实施例说明了通过用来自人IgG1重链和 κ 轻链的恒定区替代4种分子克隆小鼠mAb的恒定区来构建嵌合抗体。

[0087] 将含有人IgG1重链的恒定区(SEQ ID NO:9)的质粒pFUSE-CHIg-hG1(InvivoGen,目录号pfuse-hchg1)和含有人 κ 轻链的恒定区(SEQ ID NO:10)的质粒pFUSE2-CLIg-hk(InvivoGen,目录号pfuse2-hclk)用Hind III和Nhe I(用于IgG1)或BsiW I(用于 κ)(所有都来自NEB lab)消化。使用NucleoSpin凝胶和PCR Clean-up试剂盒(Takara,目录号740986.20)通过凝胶纯化来纯化线性化质粒。将mAb1、mAb2、mAb3和mAb4的小鼠重链和轻链可变区的编码序列使用来自实施例1中获得的质粒的HiFi HotStart(Kapa(Roche), KK2602)连同特异性引物(数据未示出)进行PCR扩增,并且使用NucleoSpin凝胶和PCR

Clean-up试剂盒 (Takara, 目录号740986.20) 通过凝胶纯化来纯化。使用GibsonAssembly® HiFi一步试剂盒 (SGI (VWR), 目录号GA1100-50) 组装线性化载体和插入片段。将组装反应混合物转化到Stellar感受态细胞 (Clontech, 目录号636766) 中。将质粒DNA使用QIAprep Spin Miniprep试剂盒 (Qiagen, 目录号27104) 从转化体中分离, 并且对其进行桑格测序 (GENEWIZ)。构建了四种嵌合抗体, 每种抗体包括来自实施例1中产生的四种小鼠mAb之一的可变区。将新的嵌合抗体指定为YL-G1-19-01、YL-G1-19-02、YL-G1-19-03和YL-G1-19-04。

实施例3: 经由表面染色确认这四种嵌合单克隆抗体的特异性

[0088] 本实施例说明了与参考mAb (IMAB362, Ganymed) 相比, 具有CLDN18.2结合特异性的4种嵌合单克隆抗体的测试。

[0089] 将FACS缓冲液 (50 μ L) 中的密度为 2×10^6 个细胞/ml的表达CLDN18.2的293T细胞和表达CLDN18.1的293T细胞与嵌合抗体、参考抗体或IgG阴性对照的稀释系列 (FACS缓冲液中的60.00、20.00、6.67、2.22、0.74、0.25、0.08 μ g/mL) (50 μ L) 在96孔V底板中混合, 并且在冰上孵育30min。在用200 μ L/孔FACS缓冲液洗涤后, 将细胞重悬于30 μ L/孔二抗Alexa Fluor® 647AffiniPure山羊抗人IgG (Fc γ 片段特异性的) (Jackson, 目录号109-605-098) 中, 并且在冰上孵育20min。在用200 μ L/孔FACS缓冲液洗涤三次后, 将细胞用150 μ L/孔FACS缓冲液重悬, 并且使用BD LSR II流式细胞仪 (HTS) 对其进行FACS。使用几何平均值进行数据分析, 并且使用Prism GraphPad制图。流式细胞术分析表明与参考mAb相比, 4种嵌合抗体对表达CLDN18.2的细胞具有更高的特异性结合 (参见图2)。未显示出与表达CLDN18.1的细胞的结合 (参见图3), 表明这四种嵌合抗体的高特异性。

实施例4: 通过ADCC测定鉴定这四种嵌合抗体的功能活性。

[0090] 本实施例说明了与参考mAb (IMAB362, Ganymed) 相比, 这4种嵌合抗体的ADCC介导的杀伤活性的测试。

[0091] 将表达CLDN18.2的293T细胞和表达CLDN18.1的293T细胞使用eBioscience™ CFSE (Thermo, 目录号65-0850-84) 用CFSE标记。将Lympholyte® 细胞分离介质 (Cedarlane, 目录号CL5110) (50 μ L) 中的密度为 4×10^5 个细胞/ml的CFSE标记细胞与嵌合抗体、参考抗体或IgG阴性对照的稀释系列 (介质中的20.00、6.67、2.22、0.74、0.25、0.08、0.03 μ g/mL) (100 μ L) 在96孔V底板中混合, 并且在室温下在黑暗中孵育15min。然后, 添加密度为 5×10^6 个细胞/ml的PBMC (50 μ L), 并且将板在37°C下在黑暗中孵育2小时。将细胞用PBS洗涤两次, 并且将100 μ L eBioscience™ 可固定活力染料eFluor™ 660 (Thermo, 目录号65-0864) 的工作液添加到每个孔中。将板在黑暗中在冰上孵育30分钟。在用PBS洗涤后, 将细胞通过添加75 μ L/孔PBS和25 μ L/孔4%多聚甲醛重悬, 并且使用BD LSR II流式细胞仪 (HTS) 对其进行FACS。使用杀伤百分比 (CFSE/FVD-AF660双阳性群体除以CFSE阳性群体) 进行数据分析, 并且使用Prism GraphPad制图。通过基于FACS的方法得到的ADCC活性表明, 4种嵌合抗体可以介导针对表达CLDN18.2的细胞的ADCC活性 (参见图4)。

实施例5: 表征Fc工程化嵌合抗体。

[0092] 另外, 构建了四种Fc工程化嵌合抗体。与第1代初始嵌合抗体YL-G1-19-01、YL-G1-19-02、YL-G1-19-03和YL-G1-19-04相比, 第2代Fc工程化嵌合抗体YL-G2-A、YL-G2-B、YL-G2-C和YL-G2-D (与YL-G1-19-04相比, 在YL-G2-D中, VH结构域的前两个N末端氨基酸残基不存在) 在Fc区中包含五个取代, 即L235V、F243L、R292P、Y300L和P396L (根据EU编号)。人IgG1

重链的突变型恒定区(包括CH1、铰链、CH2和CH3)如SEQ ID NO:40所示。

[0093] 本实施例说明了这些Fc工程化嵌合抗体的表征。

5.1: 抗原-抗体结合相互作用。

[0094] 本实施例说明了YL-G2-B、YL-G2-C和YL-G2-D的抗原-抗体结合相互作用的表征。

[0095] 通过凭借使用KinExA 4000系统(KinExA,美国)监测与重组huCLDN18.2-Fc和过表达huCLDN18.2的CHO细胞的结合来分析YL-G2-B、YL-G2-C和YL-G2-D的体外生物活性。

[0096] 为了使用KinExA方法确定亲和力,在结合配偶体A(称为恒定结合配偶体,CBP)的背景下进行结合配偶体B(称为滴定剂)的连续稀释。这意味着CBP将保持恒定浓度,而滴定剂的浓度将变化。一旦这些溶液达到平衡,KinExA 4000仪器就可以直接测量留在溶液中的CBP的未结合的或游离的结合配偶体的量。使用Sapidyne的软件,可以将游离CBP的百分比相对于总滴定剂浓度制图,以生成结合曲线并确定亲和力。

[0097] 首先用抗体和购买自Sino Biological(P/N:20047-H02H)的重组人CLDN18.2确定Kd。对于平衡实验,将滴定剂(huCLDN18.2)在CBP的背景下连续稀释五倍。进行两个平衡实验:一个用10nM的高浓度CBP(20nM结合位点)与150nM连续稀释五倍的滴定剂,并且一个用100pM的低浓度CBP(200pM结合位点)与150nM连续稀释五倍的滴定剂。将数据在KinExA 4000上收集,并且使用Sapidyne Instruments n-Curve分析软件版本4.4.26进行分析。结合曲线在图5中示出。

[0098] 还使用KinExA 4000仪器测量抗体与完整细胞(即,过表达huCLDN18.2的CHO细胞)的表面蛋白的结合亲和力。将抗体浓度保持恒定(CBP),并且改变具有表面蛋白的全细胞的浓度(滴定剂)。将具有表面蛋白的全细胞的浓度稀释三倍。将滴定的细胞与恒定结合配偶体(CBP)一起孵育。一旦达到平衡,就将样品离心,回收上清液,并且用荧光标记的抗CBP分子检测游离CBP。结合曲线在图6中示出。

[0099] 为了建立更准确的Kd,制备并分析两条平衡曲线。一条曲线用100pM的低浓度CBP(200pM结合位点)和具有三倍稀释度的 10^6 个细胞/mL,并且一条曲线用10nM的高浓度CBP(20nM结合位点)和具有三倍稀释度的 10^6 个细胞/mL。KinExA 4000测量了溶液中的未结合的CBP的量。使用Sapidyne Instruments n-Curve分析软件版本4.4.26进行分析。平衡解离常数Kd的总结在表1中示出。

表1. YL-G2-B、YL-G2-C和YL-G2-D的Kd值

ID	与重组huCLDN18.2-Fc的结合 (nM)	与过表达huCLDN18.2的CHO细胞的结合 (pM)
YL-G2-B	1.7	9.4
YL-G2-C	3.8	38.6
YL-G2-D	6.4	13.1

5.2: 细胞结合测定。

[0100] 本实施例说明了YL-G2-B、YL-G2-C和YL-G2-D的细胞结合测定。

[0101] 使用表达huCLDN18.2的CHO细胞评估抗体的结合。对于每种样品,将细胞以 5×10^5 个细胞/100 μ l接种到96孔板的孔中。然后,将100 μ l每种连续稀释的抗体添加到细胞中,每种稀释液以40 μ g/ml开始并且稀释5倍。因此,每种抗体的最终浓度以20 μ g/ml开始,然后连续稀释5倍。在1小时后,将细胞洗涤两次,并且将100 μ l GAH-FITC(1:200稀释度)添加到每个孔中。在30分钟后,将细胞洗涤两次,并且重悬于120 μ l FACS缓冲液中。经由流式细胞术

分析细胞。

[0102] 将未染色的细胞用作设置总体靶细胞门控和建立FITC阴性群体的参考,允许我们为每个细胞系建立FITC阳性细胞门控。另外,计算整个细胞群体的平均荧光强度(MFI)以二次证实FITC阳性结果。将门控阳性细胞数与活细胞总数的比率视为阳性细胞的百分比。结果在图7中示出。

5.3: 补体依赖性细胞毒性(CDC)测定。

[0103] 本实施例说明了YL-G2-B、YL-G2-C和YL-G2-D的补体依赖性细胞毒性(CDC)测定。

[0104] 将靶细胞(即,表达huCLDN18.2的CHO细胞)用DPBS洗涤一次。然后将细胞以 2×10^4 个细胞、100 μ L/孔接种到U底板的RPMI中。将抗体以1:2连续稀释,并且在室温下以50 μ L/孔与细胞共孵育15分钟。然后将20%汇集的血清以50 μ L/孔添加到所有的孔中,包括自发释放孔和最大释放孔。将板在37 $^{\circ}$ C下在培养箱中孵育3.5小时。在孵育期结束前四十五分钟,将板以1200rpm离心5分钟,并且将20 μ L裂解缓冲液(CyQUANTTMLDH细胞毒性测定试剂盒,目录号C20300和C20301)仅添加到含有靶细胞的最大释放对照孔中。将50 μ L上清液连同50 μ L/孔的反应缓冲液(CyQUANTTMLDH细胞毒性测定试剂盒,目录号C20300和C20301)转移到黑壁96孔板中,将所述反应缓冲液添加到所有孔中(最大释放孔和自发释放孔同样添加)。将板在黑暗中孵育30分钟。在孵育结束时,将50 μ L终止溶液(CyQUANTTMLDH细胞毒性测定试剂盒,目录号C20300和C20301)添加到所有孔中,并且通过轻拍轻柔混合。在490nm和680nm处测量OD。活性是细胞毒性百分比:%细胞毒性=(实验值-靶细胞自发释放,无体积校正)/(靶细胞最大释放-靶细胞自发释放,体积校正)*100。结果在图8中示出。

5.4: 内化测定。

[0105] 本实施例说明了YL-G2-B、YL-G2-C和YL-G2-D的内化测定。

[0106] 在DMEM培养基中以 5×10^5 /mL制备表达huCLDN18.2的CHO细胞。在U底96孔板的每个孔中接种100 μ L细胞。将测试抗体和对照抗体稀释至40 μ g/ml,然后在培养基中以1:4连续稀释每种抗体。将每种稀释的抗体以50 μ L/孔添加到细胞中。将板在37 $^{\circ}$ C下孵育30分钟。然后,以50 μ L/孔将40 μ g/ml PEP-ZAP(与细胞毒性肽融合的小Fc结合肽,由AB Studio Inc.开发;参见WO 2020/018732 A1)添加到每个孔中使PEP-ZAP的最终浓度为10 μ g/ml。将板在37 $^{\circ}$ C下孵育72小时。最后,旋转细胞并且取100 μ L上清液用于测量LDH。结果在图9中示出。

5.5: 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)测定。

[0107] 本实施例说明了抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)测定。

[0108] 使用靶细胞(表达huCLDN18.2的CHO细胞)和效应细胞(NK 8837-F细胞,ATCC PTA-8837)评估抗体的ADCC功能。对于每种样品,将靶细胞以 2×10^4 个细胞/50 μ L接种到96孔板的孔的DMEM-F12+10% FBS培养基中。然后,将100 μ L每种1:10连续稀释的抗体添加到细胞中。在20分钟后,将NK细胞以 2×10^5 个细胞/50 μ L添加到板上,导致靶标:效应物比率为1:10。在此添加后,每种抗体的所得最终浓度以50 μ g/ml开始,然后是5、0.5和0.05 μ g/ml。将板在37 $^{\circ}$ C、CO₂培养箱中放置24小时。然后,将细胞用7AAD染色,洗涤两次,并且重悬于约200 μ L FACS缓冲液中。经由流式细胞术分析细胞。

[0109] 将未染色的细胞用作设置总体靶细胞门控和建立7AAD阴性群体的参考,允许区分7AAD(死细胞)与活细胞。

[0110] 也可以将表达huCLDN18.2的CT26细胞用作靶细胞,并且也可以经由LDH确定ADCC。

[0111] YL-G1-02与YL-G2-B(除Fc区中的VLPLL取代以外,具有相同的氨基酸序列)之间的ADCC活性的比较在图10中示出。EC50的总结在表2中示出。

表2.YL-G1-02相比于YL-G2-B的ADCC

ID	LDH		FACS	
	EC50 (nM)	Max (%)	EC50 (nM)	Max (%)
YL-G1-02	0.30	29.8	~0.2244	32.0
YL-G2-B	0.012	55.1	0.0073	44.1
同种型	NA	1.5	NA	8.3

实施例6:功能表征抗体。

6.1:细胞

[0112] 保持在含有10% FBS(ExCell Bio,目录号FND500)的DMEM培养基(Gibco,目录号31053-036)中的CT26 CLDN18.2细胞(小鼠结肠癌细胞,KyInno biotechnology,目录号KC-1195)、保持在含有10% FBS的RPMI1640培养基(Gibco,目录号22400-089)中的KATOIIIICLDN18.2细胞(人胃癌细胞,KyInno biotechnology,目录号KC-1453)和保持在含有10% FBS的RPMI1640培养基中的NCI-N87 CLDN18.2细胞(人胃癌细胞,KyInno biotechnology,目录号KC-1222)全部都是过表达人CLDN18.2的肿瘤细胞,并且使用它们确定主题抗体的CDC活性和ADCC活性。

6.2:CDC测定

[0113] 通过测量在细胞裂解后释放到培养基中的LDH水平的变化来评估主题抗体的CDC活性。将CT26 CLDN18.2细胞或KATOIIIICLDN18.2细胞分别以4E+05个细胞/ml或6E+05个细胞/ml或1E+06个细胞/ml的密度悬浮在含有1% FBS的不含酚红的RPMI 1640培养基(Gibco,目录号11835-030)中。将主题抗体用含有1% FBS的不含酚红的RPMI 1640培养基稀释至200、50、12.5、3.13、0.78、0.195、0.0488、0.0122、0.00305、0.000763和0.000191nM。将正常人血清补体(Quidel,目录号A113)用含有1% FBS的不含酚红的RPMI 1640培养基以1:50稀释。向圆底96孔微孔板(Corning,目录号3799)的每个孔中添加50μL抗体稀释液、50μL正常人血清补体稀释液和50μL肿瘤细胞悬浮液。将人IgG1同种型抗体作为阴性对照包括在内。将参考抗体(IMAB362,Ganymed)作为阳性对照包括在内。将微孔板在设置为37℃和5% CO₂的培养箱中孵育3-4小时。在孵育后,根据与LDH细胞毒性测定试剂盒(Roche,目录号11644793001)一起提供的说明书检测LDH向细胞培养物的上清液中的释放。简言之,将微孔板(Eppendorf,型号5810R)以1500rpm离心5分钟,并且从每个孔中取出70μL上清液并将其转移到新的微孔板上的孔中。然后,将50μL LDH检测底物添加到每个孔中,并且将微孔板在室温下孵育0.5-2小时。使用SpectraMax M5e(Molecular Devices LLC)检测492nm处的光密度(OD),减去690nm处的光密度(OD_{492nm}-OD_{690nm})。通过使用以下公式的特异性细胞裂解百分比计算主题抗体的CDC活性:

$$\text{特异性细胞裂解(\%)} = (\text{OD}_{\text{抗体+补体+肿瘤细胞}} - \text{OD}_{\text{补体+肿瘤细胞}}) * 100 / (\text{OD}_{\text{肿瘤细胞+Triton}} - \text{OD}_{\text{肿瘤细胞}})。$$

[0114] 使用GraphPad Prism 7软件通过四参数非线性回归分析数据,并且计算并获得EC₅₀值。

6.3:ADCC测定

[0115] 通过测量在细胞裂解后释放到培养基中的LDH水平的变化来评估主题抗体的ADCC活性。将NCI-N87 CLDN18.2细胞或KATOIIIICLDN18.2细胞以6E+05个细胞/mL的密度悬浮在

不含酚红的RPMI 1640培养基中。将主题抗体用含有1% FBS的不含酚红的RPMI 1640培养基稀释至20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、1.28E-03、2.56E-04、5.12E-05、1.02E-05、2.05E-06、4.10E-07、8.19E-08、1.64E-08、3.28E-09、6.55E-10、1.31E-10、2.62E-11和5.24E-12nM。将新鲜的人PBMC细胞(Saily,来自志愿者#XC11057W)以1.2E+07个细胞/mL的密度悬浮在含有1% FBS的不含酚红的RPMI 1640培养基中。向圆底96孔微孔板的每个孔中添加50 μ L抗体稀释液、50 μ L人PBMC细胞悬浮液和50 μ L肿瘤细胞悬浮液。将人IgG1同种型作为阴性对照包括在内。将参考mAb (IMAB362, Ganymed) 作为阳性对照包括在内。将微孔板在设置为37°C和5% CO₂的培养箱中孵育4-6小时。在孵育后,根据与如上所述的LDH细胞毒性测定试剂盒一起提供的说明书检测LDH向细胞培养物的上清液中的释放。通过使用以下公式的特异性细胞裂解百分比计算主题抗体的ADCC活性: 特异性细胞裂解(%) = $(OD_{\text{抗体+PBMC+肿瘤细胞}} - OD_{\text{PBMC+肿瘤细胞}}) * 100 / (OD_{\text{肿瘤细胞+Triton}} - OD_{\text{肿瘤细胞}})$ 。

[0116] 使用GraphPad Prism 7软件通过四参数非线性回归分析数据,并且计算并获得EC₅₀值。

6.4: 通过LDH测定得到的对CT26 CLDN18.2细胞的CDC效应

[0117] 如图11和表3所示,两批YL-G2-B展现出可比的对CT26 CLDN18.2细胞的CDC效应(图11,小图A)。YL-G1-19-02、YL-G2-B、YL-G1-19-03、YL-G2-C、YL-G1-19-04和YL-G2-D全部都展现出比阳性对照更强的对CT26 CLDN18.2细胞的CDC效应(图11)。

表3: 对CT26 CLDN18.2细胞的CDC效应

抗体	浓度 (mg/mL)	纯度 (%)	CT26 CLDN18.2	
			EC ₅₀ (nM)	max (%细胞毒性)
阳性对照运行A	20.63	96.80%	~11.54	72.52
YL-G1-19-02	0.74	97.30%	0.26	73.44
YL-G2-B批次1	18.96	97.90%	0.14	75.99
YL-G2-B批次2	50	98.70%	0.12	74.74
hIgG1_同种型运行A	13.6	99.40%	NA	10.80
阳性对照运行B	20.63	96.80%	~10.70	54.74
YL-G1-19-03	10.73	96.00%	0.24	62.21
YL-G2-C	5.55	93.22%	0.10	65.24
hIgG1_同种型运行B	13.6	99.40%	NA	-0.23
阳性对照运行C	20.63	96.80%	~11.86	51.65
YL-G1-19-04	9.03	98.00%	0.19	59.21
YL-G2-D	4.37	98.01%	0.12	71.85
hIgG1_同种型运行C	13.6	99.40%	NA	-0.38

6.5: 通过LDH测定得到的对KATOIII CLDN18.2细胞的CDC效应

[0118] 如图12和表4所示,两批YL-G2-B展现出可比的对CT26 CLDN18.2细胞的CDC效应(图12,小图A)。YL-G1-19-02、YL-G2-B、YL-G1-19-03、YL-G2-C、YL-G1-19-04和YL-G2-D全部都展现出比阳性对照、阳性对照更强的对KATOIII CLDN18.2细胞的CDC效应(图12)。

表4: 对KATOIII CLDN18.2细胞的CDC效应

抗体	浓度 (mg/mL)	纯度 (%)	KATOIII CLDN18.2	
			EC ₅₀ (nM)	max (%细胞毒性)
阳性对照运行A	20.63	96.80%	~38.08	29.71
YL-G1-19-02	0.74	97.30%	1.95	35.43
YL-G2-B批次1	18.96	97.90%	1.24	39.65
YL-G2-B批次2	50	98.70%	1.33	39.42
hIgG1_同种型运行A	13.6	99.40%	NA	-0.85
阳性对照运行B	20.63	96.80%	~22.73	45.96
YL-G1-19-03	10.73	96.00%	~4.98	67.00
YL-G2-C	5.55	93.22%	~6.04	74.56
hIgG1_同种型运行B	13.6	99.40%	NA	-2.46
阳性对照运行C	20.63	96.80%	~27.48	34.89
YL-G1-19-04	9.03	98.00%	4.76	48.32
YL-G2-D	4.37	98.01%	2.40	49.19
hIgG1_同种型运行C	13.6	99.40%	NA	-1.53

6.6:通过LDH测定得到的对KATOIII CLDN18.2细胞的ADCC效应

[0119] 如图13和表5所示,两批YL-G2-B展现出可比的对KATOIII CLDN18.2细胞的ADCC效应(图13,小图A)。与阳性对照(三轮运行的EC₅₀=0.12nM、0.22nM或0.27nM)相比,YL-G2-B(不同批次的EC₅₀=0.028nM或0.018nM)、YL-G2-C(EC₅₀=0.019nM)和YL-G2-D(EC₅₀=0.021nM)展现出更强的对KATOIII CLDN18.2细胞的ADCC效应(更低的EC₅₀),并且YL-G1-19-02(EC₅₀=0.16nM)、YL-G1-19-03(EC₅₀=0.21nM)和YL-G1-19-04(EC₅₀=0.14nM)展现出可比的对KATOIII CLDN18.2细胞的ADCC效应(图13)。

表5:对KATOIII CLDN18.2细胞的ADCC效应

抗体	浓度 (mg/mL)	纯度 (%)	KATOIII CLDN18.2	
			EC ₅₀ (nM)	max (%细胞毒性)
阳性对照运行A	20.63	96.80%	0.12	27.89
YL-G1-19-02	0.74	97.30%	0.16	19.90
YL-G2-B批次1	18.96	97.90%	0.028	19.90
YL-G2-B批次2	50	98.70%	0.018	15.78
hIgG1_同种型运行A	13.6	99.40%	NA	0.3
阳性对照运行B	20.63	96.80%	0.22	24.46
YL-G1-19-03	10.73	96.00%	0.21	16.72
YL-G2-C	5.55	93.22%	0.019	17.57
hIgG1_同种型运行运行B	13.6	99.40%	NA	-5.51
阳性对照运行C	20.63	96.80%	0.27	24.54
YL-G1-19-04	9.03	98.00%	0.14	15.44
YL-G2-D	4.37	98.01%	0.021	18.42
hIgG1_同种型运行C	13.6	99.40%	NA	-7.64

6.7:通过LDH测定得到的对NCI-N87 CLDN18.2细胞的ADCC效应

[0120] 如图14和表6所示,两批YL-G2-B展现出可比的对NCI-N87 CLDN18.2细胞的ADCC效应(图14,小图A)。与阳性对照(三轮运行的EC₅₀=0.057nM、0.082nM或0.10nM)相比,YL-G2-B(不同批次的EC₅₀=0.0067nM或0.012nM)、YL-G2-C(EC₅₀=0.0078nM)和YL-G2-D(EC₅₀=0.0089nM)展现出更强的对KATOIII CLDN18.2细胞的ADCC效应(更低的EC₅₀),并且YL-G1-19-

02 ($EC_{50}=0.072nM$)、YL-G1-19-03 ($EC_{50}=0.13nM$) 和 YL-G1-19-04 ($EC_{50}=0.067nM$) 展现出可比的对 KATOIII CLDN18.2 细胞的 ADCC 效应 (图 14)。

表6:对NCI-N87 CLDN18.2细胞的ADCC效应

抗体	浓度 (mg/mL)	纯度 (%)	NCI-N87 CLDN18.2	
			EC_{50} (nM)	max (%细胞毒性)
阳性对照运行A	20.63	96.80%	0.057	26.05
YL-G1-19-02	0.74	97.30%	0.072	16.80
YL-G2-B批次1	18.96	97.90%	0.0067	19.04
YL-G2-B批次2	50	98.70%	0.012	21.05
hIgG1_同种型运行A	13.6	99.40%	NA	-6.73
阳性对照运行B	20.63	96.80%	0.082	22.06
YL-G1-19-03	10.73	96.00%	0.13	15.21
YL-G2-C	5.55	93.22%	0.0078	14.93
hIgG1_同种型运行B	13.6	99.40%	NA	-11.72
阳性对照运行C	20.63	96.80%	0.10	21.11
YL-G1-19-04	9.03	98.00%	0.067	12.59
YL-G2-D	4.37	98.01%	0.0089	18.60
hIgG1_同种型运行C	13.6	99.40%	NA	-9.22

6.8:SPR

[0121] 根据USP 43免疫学测试方法--表面等离子体共振<1105> (USP 43IMMUNOLOGICAL TEST METHODS--SURFACE PLASMON RESONANCE<1105>)和CP,2020版,第IV部分,总则,3429免疫化学,非标记免疫化学方法(IV)表面等离子体共振(CP,2020edition,Part IV, General Rules,3429IMMUNOCHEMISTRY,NON-LABELING IMMUNOCHEMICAL METHODS(IV) SURFACE PLASMON RESONANCE)经由SPR使用人抗体捕获试剂盒2型(Cytiva,目录号29234600)确定主题抗体的结合亲和力。简言之,将抗人IgG (Fc) 抗体用固定化缓冲液稀释至 $25\mu g/mL$,并且以 $10\mu L/分钟$ 的流速注射到S系列传感器CM5芯片(Cytiva,目录号BR100530)上持续6分钟,以达到约7000-14000响应单位(RU)的偶联二抗。然后,将主题抗体用运行缓冲液稀释至 $5\mu g/mL$,并且以 $10\mu L/分钟$ 的流速注射以达到约200RU的偶联一抗。对于动力学测量,以 $30\mu L/分钟$ 的流速注射His标记的人密蛋白18.2的两倍连续稀释液($0.195-50nM$),并且在Biacore 8K(Cytiva)上监测结合,对于缔合为120秒并且对于解离为300秒。使用简单的一对一结合模型通过同时拟合缔合和解离传感图来计算缔合速率(k_a)和解离速率(k_d)。平衡解离常数(K_D) 计算为比率 k_d/k_a 。结果在下表7中示出。

表7

主题抗体	捕获水平(RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	Rmax (RU)	Chi^2 (RU ²)
YL-G1-19-02	162.4	6.73E+05	1.41E-03	2.09E-09	181.1	7.15
YL-G1-19-03	163.1	4.75E+05	5.67E-04	1.19E-09	167.9	1.26
YL-G1-19-04	168.6	6.28E+05	7.80E-04	1.24E-09	175.1	3.30
YL-G2-B	168.7	6.86E+05	1.40E-03	2.05E-09	187.5	9.14
YL-G2-C	160.5	5.32E+05	5.91E-04	1.11E-09	177.7	3.85
YL-G2-D	169.4	7.07E+05	7.22E-04	1.02E-09	187.2	3.67

序列表

SEQ ID NO	描述	序列
1	YL-G1-19-01 VH	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGSGGTNY NEKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARVYYGNSFGYWGQGTlVTVSA
2	YL-G1-19-01 VL	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTR ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNEYFYPTFGSGTKLEIK
3	YL-G1-19-02 VH	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSTGYKMNWVKQSNKGSLEWIGNIDPYYGGTTY NPKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARYGKNTMDYWGQGTsvTVSS
4	YL-G1-19-02 VL	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTR ESGVPVDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNAIYIPLTFTGTGKLEIK
5	YL-G1-19-03 VH	QIQLVQSGPELRKPGETVKISCKASGFPFTTDGMSWVKQAPGKGLKWMGWINTYSGVPTY ADDFKGRVAFSLETSASTAYLQIKNLKNEATATYFCARFRNGALDNWGQGTsvTVSS
6	YL-G1-19-03 VL	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTR ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNNFYIPLTFTGAGTRLEIK
7	YL-G1-19-04 VH	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSTGYKMNWVKQSNKGSLEWIGNIDPYYGDTTY TQKFKGKATFTVDTSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYFCARYNRGNTMDYWGQGTsvTVSS
8	YL-G1-19-04 VL	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTLSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTR ESGVPVDRFTGSGSGADFTLTISVQAEDLAVYFCQNAFYIPLTFTGTGKLEIK
9	人IgG1 CH	ASTKGPVSFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKHTCPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTIVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
10	人κ CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
11	YL-G1-19-01 HVR-H1	GYAFTNYL
12	YL-G1-19-01 HVR-H2	INPGSGGT
13	YL-G1-19-01 HVR-H3	ARVYYGNSFGY
14	YL-G1-19-01 HVR-L1	QSLNLSGNQKNY
15	YL-G1-19-01 HVR-L2	WAS
16	YL-G1-19-01 HVR-L3	QNEYFYPT
17	YL-G1-19-02 HVR-H1	GYSFTGYK
18	YL-G1-19-02 HVR-H2	IDPYYGGT
19	YL-G1-19-02 HVR-H3	ARYGKNTMDY
20	YL-G1-19-02 HVR-L1	QSLNLSGNQKNY
21	YL-G1-19-02 HVR-L2	WAS
22	YL-G1-19-02 HVR-L3	QNAIYIPLT
23	YL-G1-19-03 HVR-H1	GFPFTTDG

24	YL-G1-19-03 HVR-H2	INTYSGVP
25	YL-G1-19-03 HVR-H3	ARFRRGNALDN
26	YL-G1-19-03 HVR-L1	QSLNLSGNQKNY
27	YL-G1-19-03 HVR-L2	WAS
28	YL-G1-19-03 HVR-L3	QNNYFYPLT
29	YL-G1-19-04 HVR-H1 IMGT	GYSFTGYK
30	YL-G1-19-04 HVR-H2 IMGT	IDPYYGDT
31	YL-G1-19-04 HVR-H3 IMGT	ARYNRGNTMDY
32	YL-G1-19-04 HVR-L1 IMGT	QSLNLSGNQKNY
33	YL-G1-19-04 HVR-L2 IMGT	WAS
34	YL-G1-19-04 HVR-L3 IMGT	QNAYFYPLT
35	IgG1 3'恒定 引物	GATTACGCCAAGCTTTCATTACCAGGAGAGTGGGAGAGGCTC
36	IgG2a 3'恒定 引物	GATTACGCCAAGCTTTCATTACCCGGAGTCCGGGAGAAGCTC
37	κ 3'恒定 引物	GATTACGCCAAGCTTTCACACTCATTCTGTGAAGCTCTTG
38	huCLDN18.2 (261 aa)	MAVTACQGLG FVVSILIGIAG IIAATCMDQW STQDLYNNPV TAVFNYQGLW RSCVRESSGF TECRGYFTLL GLPAMLQAVR ALMIVGIVLG AIGLLVSIFA LKCIRIGSME DSAKANMTLT SGIMFIVSGL CAIAGVSVFA NMLVTNFWMS TANMYTGMGG MVQTVQTRYT FGAALFVGWV AGGLTLIGGV MMCIACRGLA PEETNYKAVS YHASGHSVAY KPGGFKASTG FGSNTKNKKI YDGGARTEDE VQSYPSKHDY V
39	huCLDN18.1 (261 aa)	MSTTTCQVVA FLLSILGLAG CIAATGMDMW STQDLYDNPV TSVFQYEGW RSCVRQSSGF TECRPYFTIL GLPAMLQAVR ALMIVGIVLG AIGLLVSIFA LKCIRIGSME DSAKANMTLT SGIMFIVSGL CAIAGVSVFA NMLVTNFWMS TANMYTGMGG MVQTVQTRYT FGAALFVGWV AGGLTLIGGV MMCIACRGLA PEETNYKAVS YHASGHSVAY KPGGFKASTG FGSNTKNKKI YDGGARTEDE VQSYPSKHDY V
40	突变型 人IgG1 CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTCTPPCPAPELVGG PSVFL ~~L~~ PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP ~~P~~ EEQYN ST ~~L~~ RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP ~~L~~ VLDSDGSEFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
41	YL-G1-19-04 HVR-H1 Kabat	GYKMN
42	YL-G1-19-04 HVR-H2 Kabat	NIDPYYGDTTYTQKFKG
43	YL-G1-19-04 HVR-H3 Kabat	YNRGNTMDY
44	YL-G1-19-04 HVR-L1 Kabat	KSSQSLNLSGNQKNYLT
45	YL-G1-19-04 HVR-L2 Kabat	WASTRES
46	YL-G1-19-04 HVR-L3 Kabat	QNAYFYPLT
47	YL-G1-19-04 HVR-H1 Chothia	GYSFTGY
48	YL-G1-19-04 HVR-H2 Chothia	DPYYGD
49	YL-G1-19-04 HVR-H3 Chothia	YNRGNTMDY
50	YL-G1-19-04 HVR-L1 Chothia	KSSQSLNLSGNQKNYLT
51	YL-G1-19-04	WASTRES

	HVR-L2 Chothia	
52	YL-G1-19-04 HVR-L3 Chothia	QNAYFYPLT
53	YL-G1-19-04 HVR-H1 Contact	TGYKMN
54	YL-G1-19-04 HVR-H2 Contact	WIGNIDPYYGDTT
55	YL-G1-19-04 HVR-H3 Contact	ARYNRGNTMD
56	YL-G1-19-04 HVR-L1 Contact	LNSGNQKNYLTWY
57	YL-G1-19-04 HVR-L2 Contact	LLIYWASTRE
58	YL-G1-19-04 HVR-L3 Contact	QNAYFYPL

Kabat

重链可变区(小鼠)

YL-G1-19-01	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCASGYAFTNYLIEWVKQRPQGGLWIGVINPGSGGTNY	60
YL-G1-19-02	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYKMNWVKQSNKGSLEWIGNIDPYYGGTTY	60
YL-G1-19-03	QIQLVQSGPELRKPGETVKISCKASGFPFTIDGMSWVKQAPGKGLKWMGWINITYSGVPTY	60
YL-G1-19-04	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYKMNWVKQSNGESLEWIGNIDPYYGGTTY	60
	** * * ** ** * ** ***** ** ** * ** * ** ** *	
YL-G1-19-01	NEKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARVYYGNSFGYWGQGTLTVTSA	118
YL-G1-19-02	NQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARYGKGNIMDYWGQGTSTVTVSS	118
YL-G1-19-03	ADDFKGRVAFSLETSASTAYLQIKNLKNEDTATYFCARFRGNALDNWGQGTSTVTVSS	118
YL-G1-19-04	TQKFKGKATFTVDTSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYFCARYNRGNIMDYWGQGTSTVTVSS	118
	*** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	

轻链可变区(小鼠)

YL-G1-19-01	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTR	60
YL-G1-19-02	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQRPGQPPKLLIYWASTR	60
YL-G1-19-03	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTR	60
YL-G1-19-04	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTLSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQRPGQPPKLLIYWASTR	60
	* *	
YL-G1-19-01	ESGVPDRFTGSGSGDFTLTISVQAEDLAVYYCQNEYFYPLTFGSGTKLEIK	113
YL-G1-19-02	ESGVPVRFTGSGSGDFTLTISVQAEDLAVYYCQNAVYIPLTFGTGKLELK	113
YL-G1-19-03	ESGVPDRFTGSGSGDFTLTISVQAEDLAIYYCQNNFYPLTFGAGTRLELK	113
YL-G1-19-04	ESGVPVRFTGSGSGADFTLTISVQAEDLAVYFCQNAVYIPLTFGTGKLELR	113
	* * ** * ** * ** *	

图1A

IMGT

重链可变区(小鼠)

YL-G1-19-01	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGSGGTNY	60
YL-G1-19-02	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYKMNWVKQSNQKSLEWIGNIDPYYGGTTY	60
YL-G1-19-03	QIQLVQSGPELRKPGETVKISCKASGFPFTTDGMSWVKQAPGKGLKWMGWINTYSGVPTY	60
YL-G1-19-04	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYKMNWVKQSNQKSLEWIGNIDPYYGDTTY	60
	** * * ** ** * ** ***** ** ** * ** * ** *	
YL-G1-19-01	NEKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARVYYGNSFGYWGQGTLTVSA	118
YL-G1-19-02	NQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARYGKGNTMDYWGQGTSTVSS	118
YL-G1-19-03	ADDFKGRVAFSLETSASTAYLQIKNLKNEDTATYFCARFRRGNALDNWGQGTSTVSS	118
YL-G1-19-04	TQKFKGKATFTVDTSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYFCARYNRGNTMDYWGQGTSTVSS	118
	*** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** *	

轻链可变区(小鼠)

YL-G1-19-01	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTR	60
YL-G1-19-02	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQRPGQPPKLLIYWASTR	60
YL-G1-19-03	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTR	60
YL-G1-19-04	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTLSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQRPGQPPKLLIYWASTR	60
	* *	
YL-G1-19-01	ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNEYFYPTFGSGTKLEIK	113
YL-G1-19-02	ESGVPVRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNAVYIPLTFGTGKLELK	113
YL-G1-19-03	ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAIYYCQNNFYPLTFGAGTRLELK	113
YL-G1-19-04	ESGVPVRFTGSGSGADFTLTISVQAEDLAVYFCQNAVYIPLTFGTGKLELR	113
	* * ** * ** * ** *	

图1B

Chothia

重链可变区(小鼠)

YL-G1-19-01	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGSGGTNY	60
YL-G1-19-02	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYKMNWVKQSNQGSLEWIGNIDPYYGGTTY	60
YL-G1-19-03	QIQLVQSGPELRKPGETVKISCKASGFPFTTDGMSWVKQAPGKGLKWMGWINTYSGVPTY	60
YL-G1-19-04	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYKMNWVKQSNQGSLEWIGNIDPYYGDTTY	60
	** * * ** ** * ** ***** ** ** * ** * ** *	
YL-G1-19-01	NEKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARVYYGNSFGYWGQGLTVTSA	118
YL-G1-19-02	NQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARYGKGMTMDYWGQGSTVTVSS	118
YL-G1-19-03	ADDFKGRVAFSLETSASTAYLQIKNLKNEDTATYFCARFRRGNALDNWGQGSTVTVSS	118
YL-G1-19-04	TQKFKGKATFTVDTSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYFCARYNRGNTMDYWGQGSTVTVSS	118
	*** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * *	

轻链可变区(小鼠)

YL-G1-19-01	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTR	60
YL-G1-19-02	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQRPGQPPKLLIYWASTR	60
YL-G1-19-03	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTR	60
YL-G1-19-04	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTLSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQRPGQPPKLLIYWASTR	60
	* *	
YL-G1-19-01	ESGVPDRFTGSGSGDFTLTISVQAEDLAVYYCQNEYFYPTFGSGTKLEIK	113
YL-G1-19-02	ESGVPVRFTGSGSGDFTLTISVQAEDLAVYYCQNAVYIPLTFGTGKLELK	113
YL-G1-19-03	ESGVPDRFTGSGSGDFTLTISVQAEDLAIYYCQNNFYPLTFGAGTRLELK	113
YL-G1-19-04	ESGVPVRFTGSGSGADFTLTISVQAEDLAVYFCQNAVYIPLTFGTGKLELR	113
	* * ** * ** *	

图1C

Contact

重链可变区(小鼠)

YL-G1-19-01	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSKASGYAFTNYLIEWVKQRPQGGLWIGVINPGSGGTNY	60
YL-G1-19-02	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYKMNWVKQSNKGSLEWIGNIDPYYGGTTY	60
YL-G1-19-03	QIQLVQSGPELRKPGETVKISCKASGFPFTTDGMSWVKQAPGKGLKWMGWINTYSGVPTY	60
YL-G1-19-04	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYKMNWVKQSNKGSLEWIGNIDPYYGDTTY	60
	** * * ** ** * ** ***** ** ** ** * ** ** ** *	
YL-G1-19-01	NEKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARVYYGNSFGYWGQGTLTVSA	118
YL-G1-19-02	NQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARYGKGNTMDYWGQGTSTVSS	118
YL-G1-19-03	ADDFKGRVAFSLETSASTAYLQIKNLKNEDTATYFCARFRRGNALDNWGQGTSTVSS	118
YL-G1-19-04	TQKFKGKATFTVDTSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYFCARYNRGNTMDYWGQGTSTVSS	118
	*** ***** ** * ** ** * * * ** ** ** * *	

轻链可变区(小鼠)

YL-G1-19-01	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTR	60
YL-G1-19-02	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQRPGQPPKLLIYWASTR	60
YL-G1-19-03	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTR	60
YL-G1-19-04	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTLSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQRPGQPPKLLIYWASTR	60
	* *	
YL-G1-19-01	ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNEYFYPTFTGSGTKLEIK	113
YL-G1-19-02	ESGVPVRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNAVYIYPLTFGTGKLELK	113
YL-G1-19-03	ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAIYYCQNNFYIYPLTFGAGTRLELK	113
YL-G1-19-04	ESGVPVRFTGSGSGADFTLTISVQAEDLAVYFCQNAVYIYPLTFGTGKLELR	113
	* * ** * * * *	

图1D

与表达CLDN18.2的细胞的抗体剂量-反应曲线

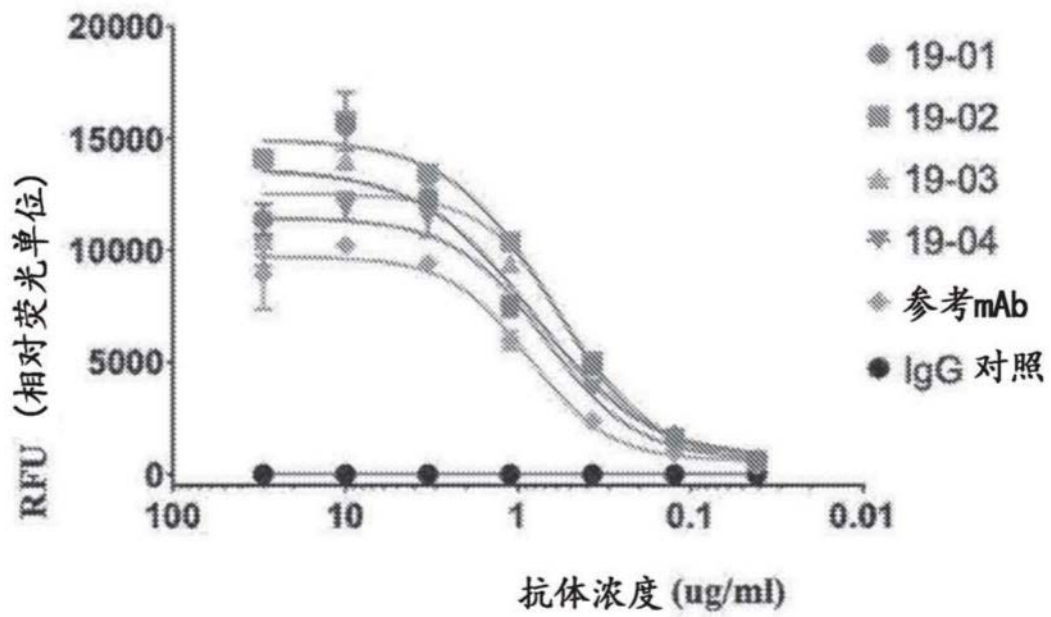


图2

与表达CLDN18.1的细胞的抗体剂量-反应曲线

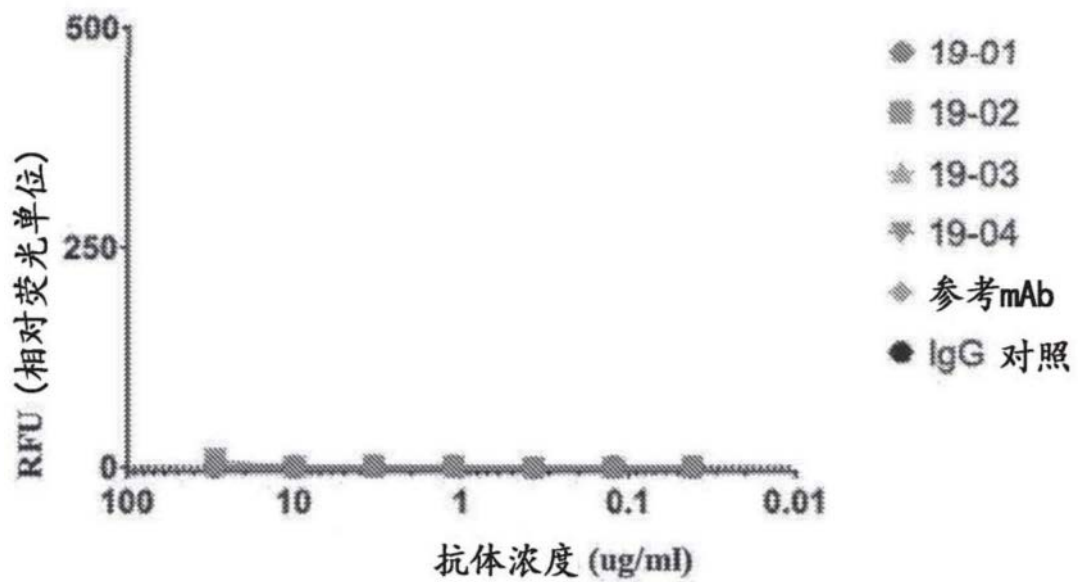


图3

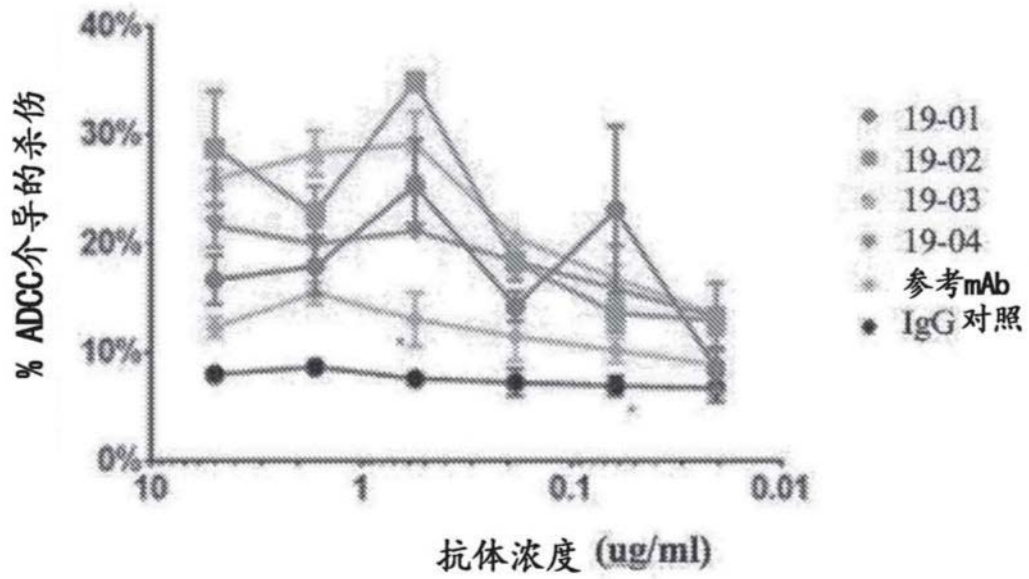


图4

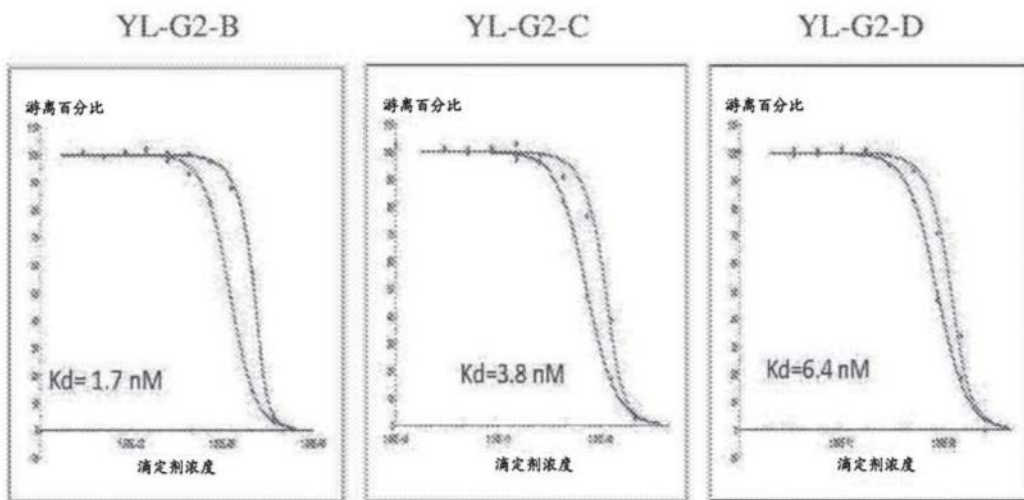


图5

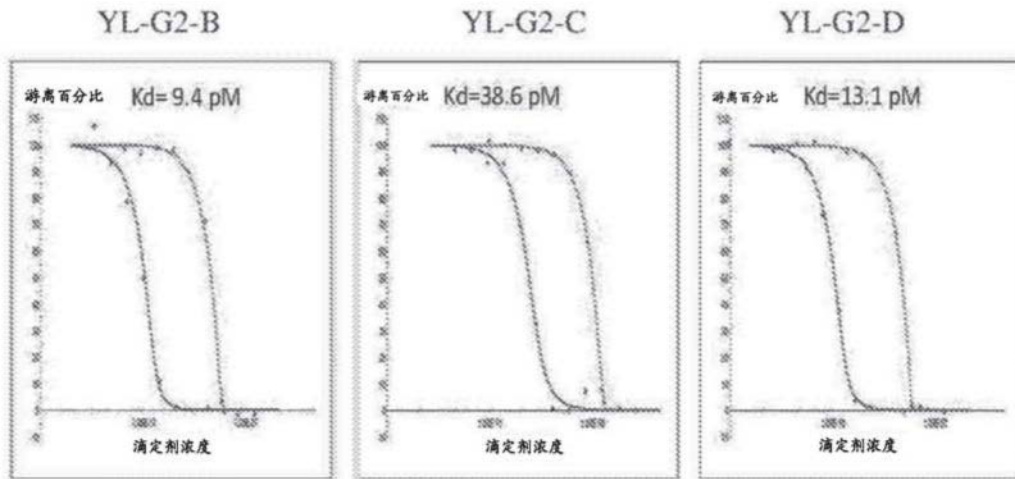


图6

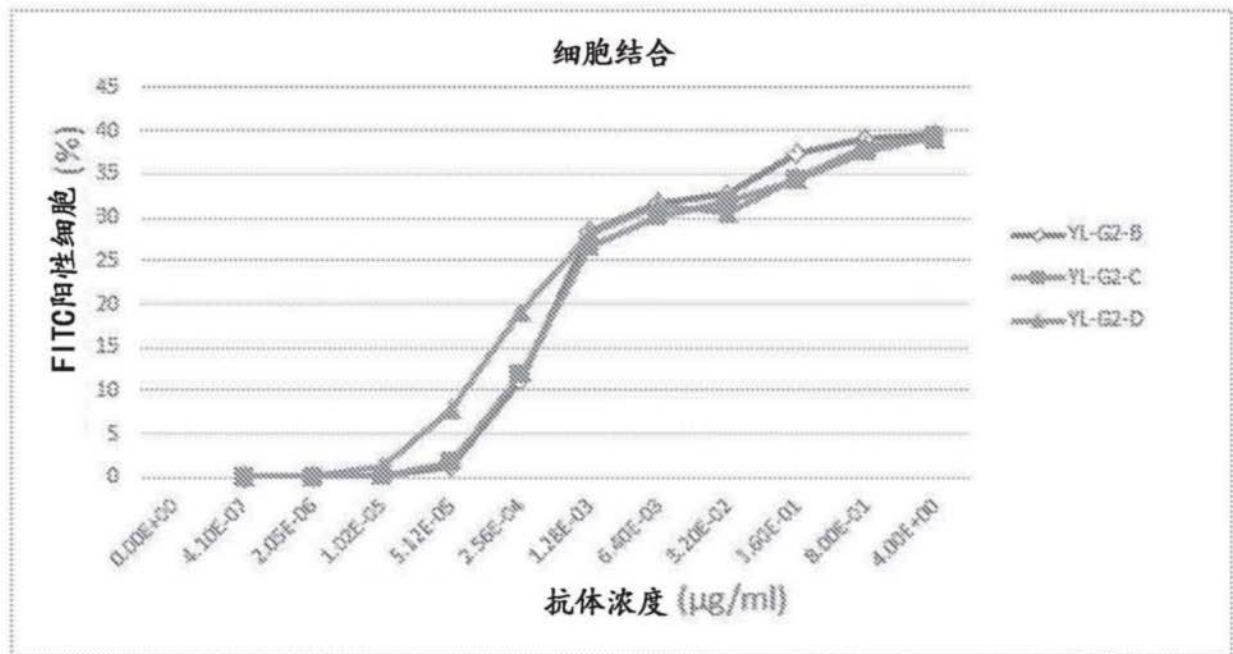


图7

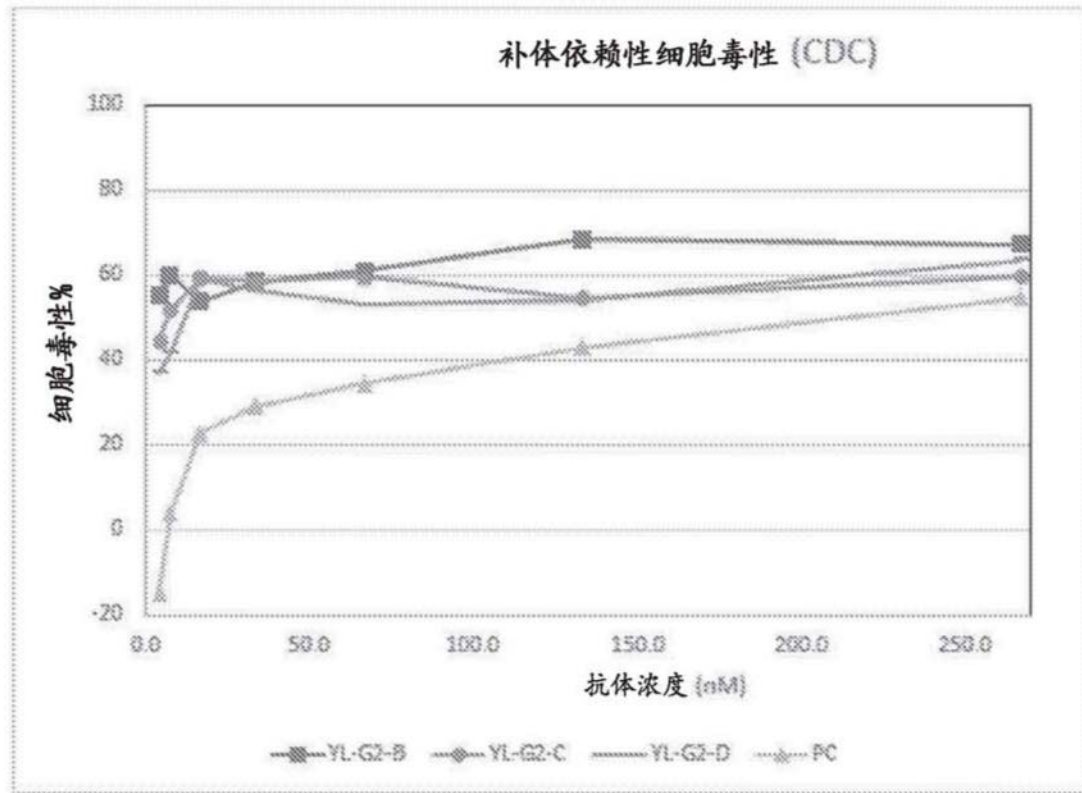


图8

用内化的Pep-Zap介导的细胞毒性

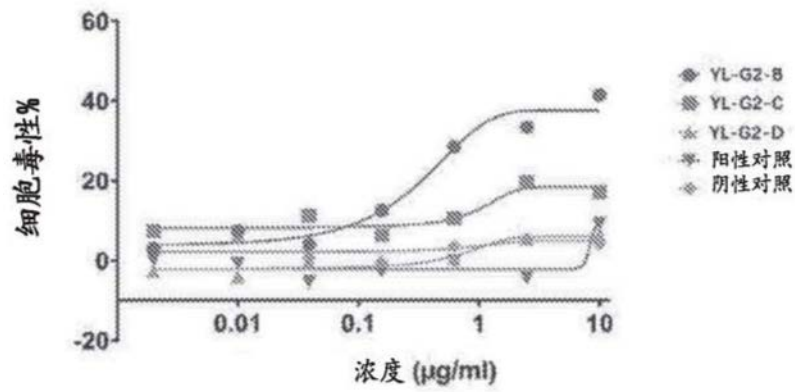


图9

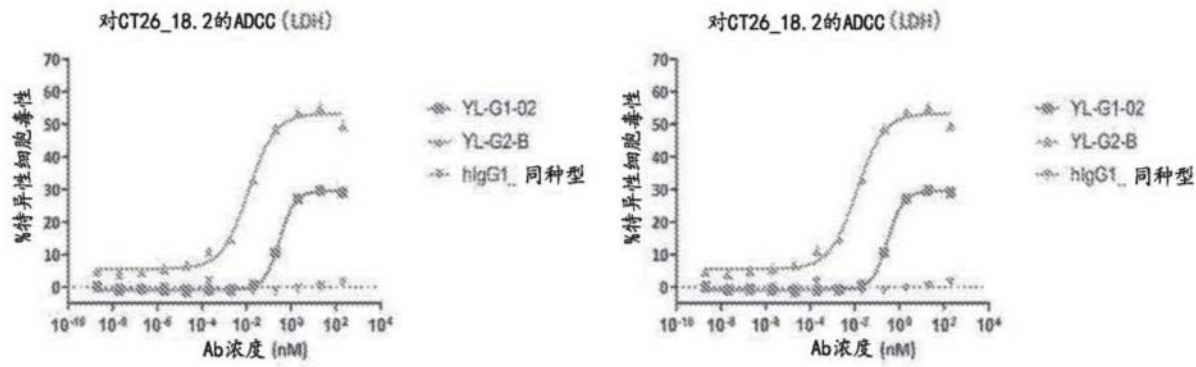


图10

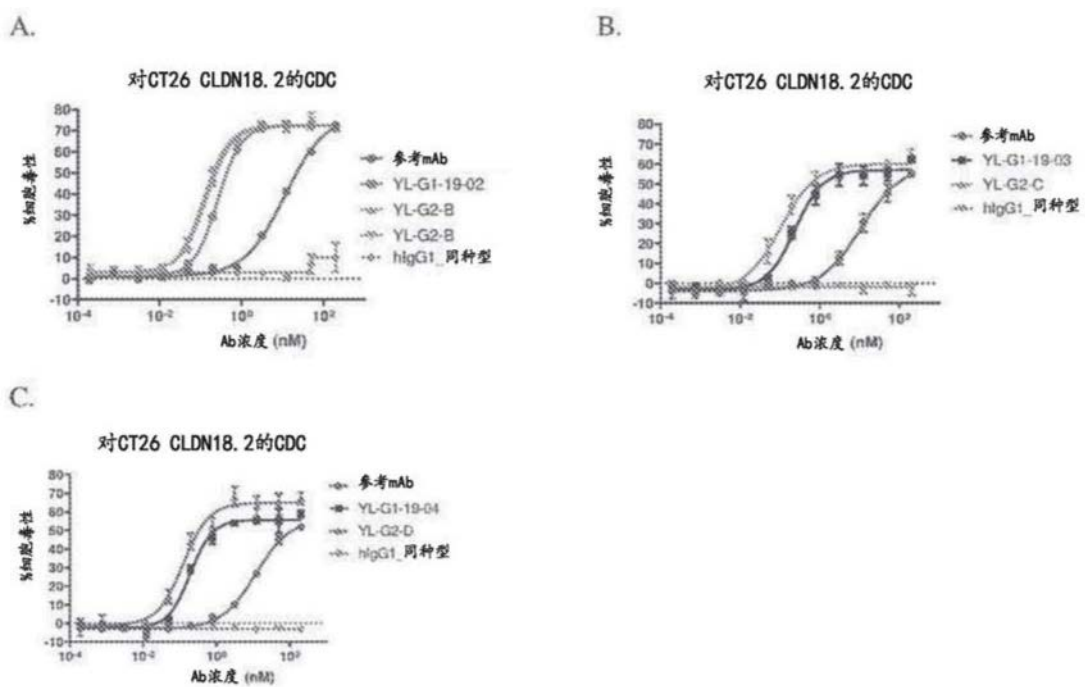


图11

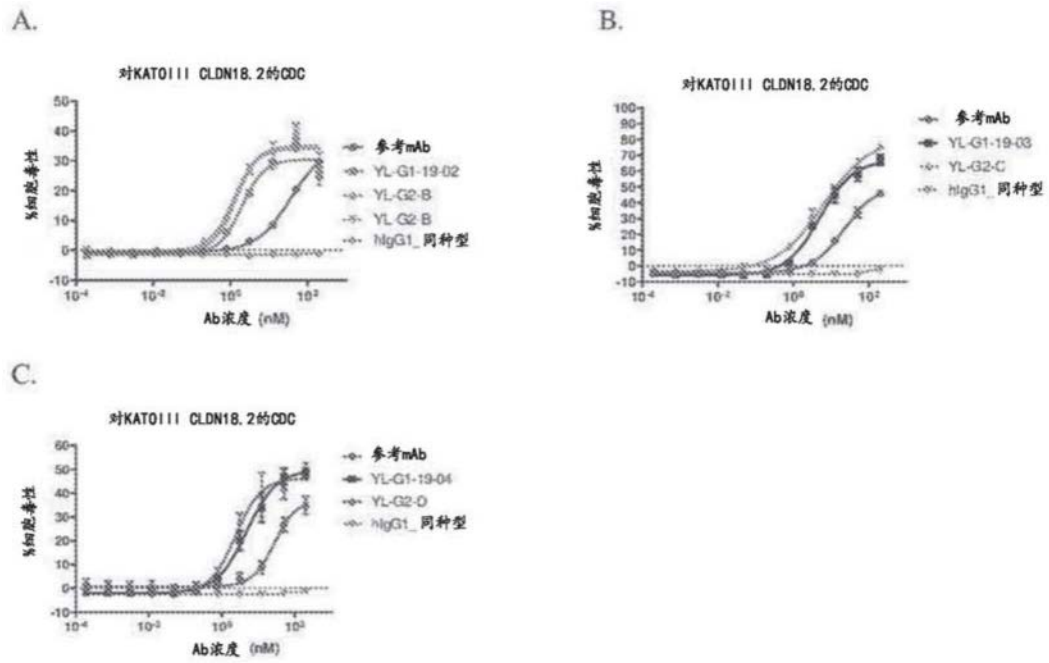


图12

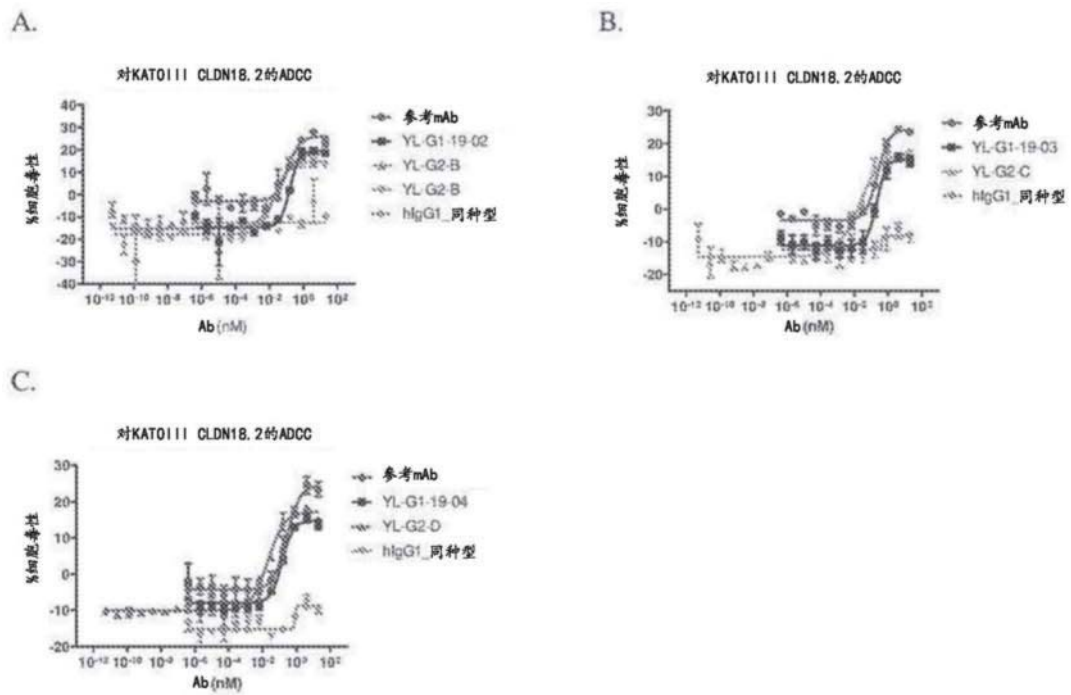


图13

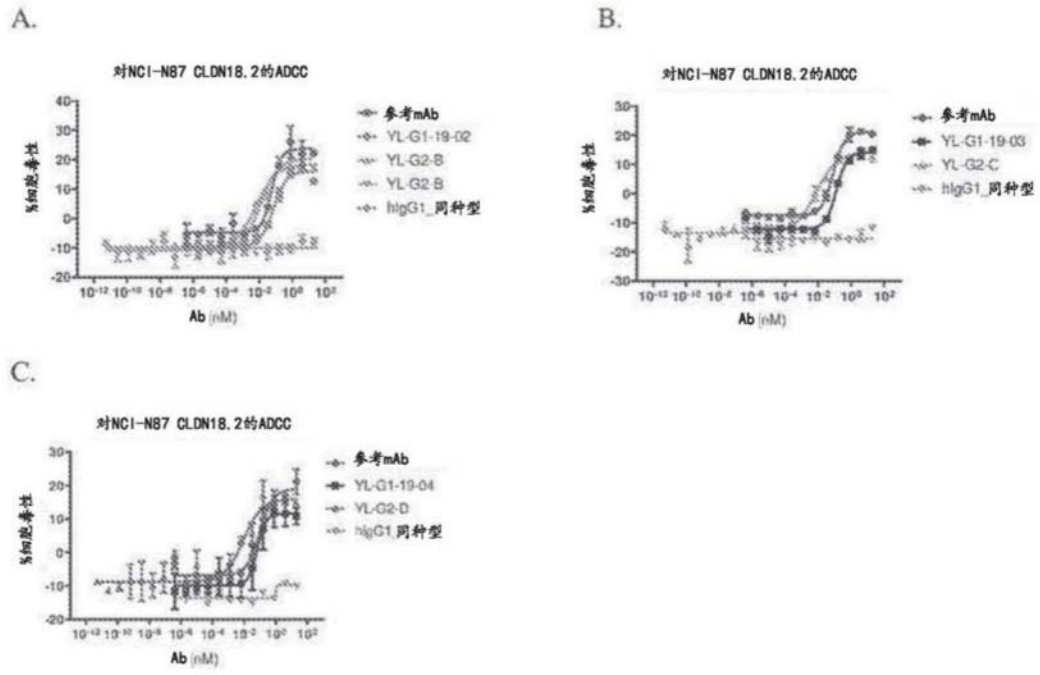


图14