



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119451982 A

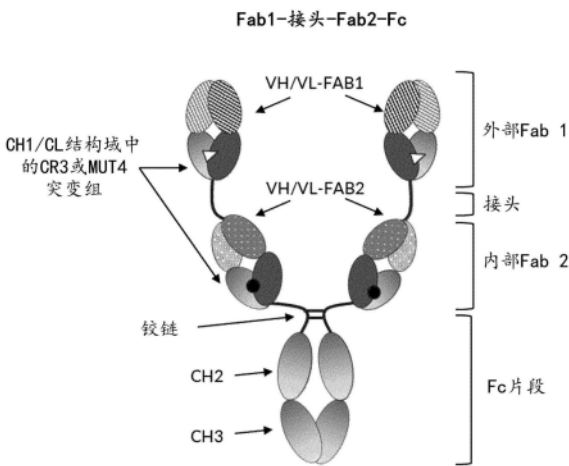
(43) 申请公布日 2025. 02. 14

(21) 申请号 202380025034.3	(72) 发明人 E • 朱科夫斯基 P-E • 杰拉德 C • 拉伯雷特 R • 埃米利亚 T • 查德斯 A • 佩莱格里恩
(22) 申请日 2023.03.01	
(30) 优先权数据 22305242.4 2022.03.02 EP	(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105 专利代理师 涂滔
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2024.09.02	(51) Int.Cl. C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/32 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/EP2023/055243 2023.03.01	
(87) PCT国际申请的公布数据 W02023/166098 EN 2023.09.07	
(71) 申请人 拜奥穆尼克斯制药 地址 法国巴黎 申请人 国家医疗保健研究所 蒙彼利埃大学 法国蒙彼利埃癌症研究中心	

权利要求书2页 说明书41页
序列表（电子公布） 附图14页

(54) 发明名称
结合HER-3和HER-2或EGFR的双特异性抗体
(57) 摘要

本发明涉及靶向HER3和选自HER-2和EGFR抗原的另一种抗原的双特异性结合分子（特别是抗体）、这些分子的生产方法、组合物及其用途。



1. 双特异性抗原结合片段,其能够同时结合HER-3和选自HER-2和EGFR抗原的另一种抗原,所述双特异性抗原结合片段包含:

(i) Fab片段,其包含与抗体1 (Ab1) 的VL-CL轻链缔合的VH-CH1重链,和

(ii) Fab片段,其包含与抗体2 (Ab2) 的VL-CL轻链缔合的VH-CH1重链,

其中Ab1的Fab片段的VH结构域的N端末端通过多肽接头与Ab2的Fab片段的CH1结构域的C端末端连接,

其中Ab1或Ab2中的一个为帕曲妥单抗或其功能性衍生物;

并且Ab1或Ab2中的另一个选自曲妥珠单抗或其功能性衍生物、马妥珠单抗或其功能性衍生物和西妥昔单抗或其功能性衍生物组成的组。

2. 权利要求1所述的双特异性抗原结合片段,其中Ab2是帕曲妥单抗或其功能性衍生物,并且其中Ab1选自曲妥珠单抗或其功能性衍生物、马妥珠单抗或其功能性衍生物和西妥昔单抗或其功能性衍生物组成的组。

3. 权利要求1或2中任一项所述的双特异性抗原结合片段,其中所述西妥昔单抗的功能性衍生物是人源化形式,其包含分别与西妥昔单抗的VH和VL链氨基酸序列至少80%相同的VH和VL链氨基酸序列。

4. 权利要求1至3中任一项所述的双特异性抗原结合片段,其中Ab1的CH1和CL结构域具有不同于Ab2的CH1和CL结构域的序列。

5. 权利要求1至4中任一项所述的双特异性抗原结合片段,其中Ab1或Ab2之一的Fab CH1结构域是衍生自免疫球蛋白的CH1结构域的突变结构域,其通过在所述CH1结构域的位置192处用谷氨酸替换苏氨酸残基实现,并且同源CL结构域是衍生自免疫球蛋白的CL结构域的突变结构域,其通过在所述CL结构域的位置137处用赖氨酸残基替换天冬酰胺残基和在所述CL结构域的位置114处用丙氨酸残基替换丝氨酸残基实现,和/或其中Ab1或Ab2中的一个或另一个的Fab CH1结构域是衍生自免疫球蛋白的CH1结构域的突变结构域,其通过在所述CH1结构域的位置143处用谷氨酰胺替换亮氨酸残基和在所述CH1结构域的位置188处用缬氨酸残基替换丝氨酸残基实现,并且同源CL结构域是衍生自免疫球蛋白的CL结构域的突变结构域,其通过在所述CL结构域的位置133处用苏氨酸残基替换缬氨酸残基和在所述CL结构域的位置176处用缬氨酸残基替换丝氨酸残基实现。

6. 权利要求1至5中任一项所述的双特异性抗原结合片段,其中所述多肽接头序列包含以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成:EPKX1CDKX2HX3X4PPX5PAPELLGGPX6X7PPX8PX9PX10GG (SEQ ID NO:33),其中X1、X2、X3、X4、X5、X6、X7、X8、X9、X10相同或不同,是任意氨基酸。

7. 双特异性分子,其包含两个相同的抗原结合臂,每个抗原结合臂由权利要求1至6中任一项所定义的抗原结合片段组成。

8. 权利要求7所述的双特异性分子,其是包含两条重链和四条轻链的全长抗体,

其中每条重链包含

d. 免疫球蛋白的Fc区,其包含铰链-CH2-CH3结构域;

e. 所述Fc区通过所述铰链结构域与Ab1的Fab VH-CH1重链连接,其中所述铰链结构域将Ab1的所述CH2结构域的N端末端和CH1结构域的C端末端连接起来;

f. 所述Ab1的Fab VH-CH1重链进而通过所述多肽接头序列与Ab2的Fab VH-CH1重链连

接,其中所述多肽接头序列将Ab1的所述VH结构域的N端末端和Ab2的所述CH1结构域的C端末端连接起来,

并且其中所述四条轻链包含与其同源重链结构域缔合的Ab1的两条Fab VL-CL轻链和Ab2的两条Fab VL-CL轻链。

9.权利要求7或8中任一项所述的双特异性分子,其包含a)两条重链,每条重链包含SEQ ID NO:27,优选地由SEQ ID NO:27组成,和b)四条轻链,两条轻链包含SEQ ID NO:14,优选地由SEQ ID NO:14组成,另外两条轻链包含SEQ ID NO:18,优选地由SEQ ID NO:18组成。

10.权利要求7或8中任一项所述的双特异性分子,其包含a)两条重链,每条重链包含SEQ ID NO:29,优选地由SEQ ID NO:29组成,和b)四条轻链,两条轻链包含SEQ ID NO:14,优选地由SEQ ID NO:14组成,另外两条轻链包含SEQ ID NO:16,优选地由SEQ ID NO:16组成。

11.权利要求7或8中任一项所述的双特异性分子,其包含a)两条重链,每条重链包含SEQ ID NO:31,优选地由SEQ ID NO:31组成,和b)四条轻链,两条轻链包含SEQ ID NO:14,优选地由SEQ ID NO:14组成,另外两条轻链包含SEQ ID NO:20,优选地由SEQ ID NO:20组成。

12.用于产生权利要求7至11中任一项所述的双特异性分子的方法,所述方法包括以下步骤:

a.在合适的培养基和培养条件下培养宿主细胞,所述宿主细胞表达如权利要求6至10中任一项所定义的抗体重链和如权利要求6至10中任一项所定义的抗体轻链,和

b.从所述培养基或从所述培养细胞回收所述产生的抗体。

13.权利要求1至6中任一项所述的双特异性抗原结合片段或权利要求7至11中任一项所述的双特异性分子,其用作药物。

14.权利要求1至6中任一项所述的双特异性抗原结合片段或权利要求7至11中任一项所述的双特异性分子,其用于治疗癌症,优选实体瘤,例如胰腺癌、头颈癌、结直肠癌、乳腺癌或肺癌,优选用于治疗胰腺癌。

结合HER-3和HER-2或EGFR的双特异性抗体

[0001] 本发明涉及靶向HER-3和选自HER-2和EGFR的另一种抗原的双特异性抗原结合分子(特别是抗体)、这些分子的生产方法、组合物及其用途。

背景技术

[0002] HER家族,其包括4种酪氨酸激酶受体(EGFR/HER1、HER2、HER3和HER4),激活多个部分冗余的、相互连接的下游信号传导级联反应,例如MAPK和PI3K/AKT通路,这些通路参与细胞增殖。HER受体共有的一般结构由胞外结构域、单跨膜结构域和含有保守催化激酶结构域的胞内结构域和羧基末端尾部组成。该家族中信号传导的基本方面是两种受体的二聚化。两个HER家族成员的同二聚化和异二聚化以及它们细胞内区域的转磷酸化生成导致许多下游信号传导通路激活的初始信号。HER家族的四个成员能够形成28个同二聚体和异二聚体。

[0003] 在许多人类肿瘤中观察到通过基因扩增或突变的HER信号传导的失调,并且大量的实验证据支持这些事件在癌症发病机理中的病因作用。在大量实体瘤(肺、结肠直肠、胰腺等)中观察到HER异常信号传导。例如,有证据表明HER家族在胰腺癌中失调。EGFR在45%-95%的胰腺癌中表达,并且表达通常与切除的胰腺癌中较差的结果相关。在7%-58%的胰腺癌中也描述了HER2的过表达,并且HER2扩增的胰腺癌显示出非典型的转移模式,这表明HER2也可能是胰腺癌中肿瘤发生的重要驱动因素。另外,HER3表达与患有胰腺癌的患者肿瘤进展和生存降低相关。

[0004] 胰腺癌是欧洲癌症死亡的第四大常见原因,每年都有越来越多的病例。(男性+2%,女性+10%)。即使早期诊断,它的预后也非常差。它是过去40年生存率几乎没有提高的仅有的癌症之一:1年和5年后的生存率分别低于20%和5%。胰腺癌仍然是罕见疾病,由于缺乏有效的治疗,2020年全球记录的死亡人数(466,003)与新诊断的患者(495,773)一样多。目前,胰腺腺癌(90%的胰腺癌)要么通过化疗手术治疗,要么通过放疗和化疗的组合进行治疗,但结果有限。1996年吉西他滨作为一线治疗的推出将无复发生存期中位数提高了1.3个月,并且一年总生存率(OS)从2%提高到18%。自2005年以来,只有 **Tarceva®** (埃罗替尼,erlotinib) 和 **Abraxane®** (nab-紫杉醇) 两种药物被批准用于胰腺癌,尽管进行了各种临床试验,但主要涉及组合但几乎没有创新。埃罗替尼是第一种靶向疗法,与吉西他滨联合使用,将无复发生存期中位数提高了仅1个月。关于HER3抑制剂,多种分子正在临床试验(I/II期)中研究和评估。

[0005] 通过直接靶向HER受体或下游激酶的治疗剂进行的治疗通常面临获得性抗性或受到信号转导网络内在鲁棒性的限制。

[0006] 在这种情况下,组合疗法已经作为自然对策出现,但是它们的最佳设计并不简单,并且可能取决于肿瘤或其亚型,因此需要事先对患者进行分层(Fitzgerald JB,Schoeberl B,Nielsen UB,Sorger PK.Systems biology and combination therapy in the quest for clinical efficacy.Nat Chem Biol.2006;2:458-66.)。目前可用于抑制HER信号传导的武器包括小分子酪氨酸激酶抑制剂(TKI),例如拉帕替尼或埃罗替尼,和治疗性抗体,例如西妥昔单抗或曲妥珠单抗。实际上,相对于仅限于信号传导调节的TKI,抗体代表了一种

强有力的方法,除了信号传导减少外,还能诱导免疫学效应以帮助清除肿瘤。

[0007] 许多作者已经提出了基于抗体的组合疗法。通过mAb组合靶向HER二聚体,特别是EGFR/HER2异二聚体,被证明有利于抑制胰腺肿瘤生长。

[0008] 已经进一步设计了双特异性抗体(BsAb),其组合了两种mAb的靶标。然而,它们经受复杂的设计,这通常导致较差的可制造性和稳定性,并且这些抗体的功效仍然可以改进,因为体内胰腺癌模型肿瘤甚至在用双特异性抗体治疗时继续生长。

[0009] 例如,刘及其同事(Liu et al. A Novel Antibody Engineering Strategy for Making Monovalent Bispecific Heterodimeric IgG Antibodies by Electrostatic Steering Mechanism. J Biol. Chem. 2015; 290(12): 7535-62)描述了双特异性抗EGFR和抗HER2抗体的构建和表征,其中分别利用了帕尼单抗和曲妥珠单抗序列。该抗体在体外和体内显示出针对EGFR+/HER2+细胞系的改善的活性,然而该抗体的活性仍需要改善。

[0010] MM-111,由Merrimack Pharma开发的抗HER2/抗HER3双特异性抗体(McDonagh et al., 2012; Spiess et al., 2015)已经在患有远端食管、胃食管(GE)交界处和胃的HER2阳性癌的患者中进行了研究。II期临床试验由于不显著的结果而停止。

[0011] 度戈妥珠单抗(Duligotuzumab),其是抗EGFR/抗HER3双特异性抗体(Schaefer et al., 2011b; Spiess et al., 2015),与作为患有转移性结直肠癌的患者的第二线疗法的与FOLFIRI组合的西妥昔单抗进行了比较。在该试验中,度戈妥珠单抗未显示出优于与FOLFIRI组合的西妥昔单抗的益处,因此被放弃。

[0012] 鉴于上述,仍然需要靶向HER受体的改进的双特异性抗体,用于治疗肿瘤。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明人现在已经设计了靶向HER3和选自EGFR或HER2的另一种抗原的新型双特异性抗体,其可用于治疗多种癌症。

[0015] 本发明更具体地提供了双特异性抗原结合片段,其能够同时结合HER-3和选自HER-2和EGFR抗原的另一种抗原,该双特异性抗原结合片段包含:

[0016] (i) Fab片段,其包含与抗体1(Ab1)的VL-CL轻链缔合的VH-CH1重链的,和

[0017] (ii) Fab片段,其包含与抗体2(Ab2)的VL-CL轻链缔合的VH-CH1重链,

[0018] 其中Ab1的Fab片段的VH结构域的N端末端通过多肽接头与Ab2的Fab片段的CH1结构域的C端末端连接,

[0019] 其中Ab1或Ab2之一是帕曲妥单抗或其功能性衍生物;

[0020] 并且Ab1或Ab2中的另一个选自由曲妥珠单抗或其功能性衍生物、马妥珠单抗或其功能性衍生物和西妥昔单抗或其功能性衍生物组成的组。

[0021] 在优选的实施方案中,Ab2是帕曲妥单抗或其功能性衍生物,并且其中Ab1选自由曲妥珠单抗或其功能性衍生物、马妥珠单抗或其功能性衍生物和西妥昔单抗或其功能性衍生物组成的组。

[0022] 在特定的实施方案中,西妥昔单抗的功能性衍生物是人源化形式,其包含分别与西妥昔单抗的VH和VL链氨基酸序列至少80%相同的VH和VL链氨基酸序列。

[0023] 在特定的实施方案中,Ab1的CH1和CL结构域具有不同于Ab2的CH1和CL结构域的序列。

[0024] 在特定的实施方案中,Ab1或Ab2之一的Fab CH1结构域是衍生自免疫球蛋白的CH1

结构域的突变结构域,其通过在所述CH1结构域的位置192处用谷氨酸取代苏氨酸残基实现,并且同源CL结构域是衍生自免疫球蛋白的CL结构域的突变结构域,其通过在所述CL结构域的位置137处用赖氨酸残基取代天冬酰胺残基和在所述CL结构域的位置114处用丙氨酸残基取代丝氨酸残基实现,和/或其中Ab1或Ab2之一或另一个的Fab CH1结构域是衍生自免疫球蛋白的CH1结构域的突变结构域,其通过在所述CH1结构域的位置143处用谷氨酰胺取代亮氨酸残基和在所述CH1结构域的位置188处用缬氨酸残基取代丝氨酸残基实现,并且同源CL结构域是衍生自免疫球蛋白的CL结构域的突变结构域,其通过在所述CL结构域的位置133处用苏氨酸残基取代缬氨酸残基和在所述CL结构域的位置176处用缬氨酸残基取代丝氨酸残基实现。

[0025] 在特定的实施方案中,多肽接头序列包含氨基酸序列或由其组成:EPKX1CDKX2HX3X4PPX5PAPELLGGPX6X7PPX8PX9PX10GG (SEQ ID NO:33),其中X1、X2、X3、X4、X5、X6、X7、X8、X9、X10相同或不同,是任意氨基酸。

[0026] 本发明还提供了双特异性分子,其包含两个相同的抗原结合臂,每个抗原结合臂由如上所定义的抗原结合片段组成。

[0027] 在优选的实施方案中,本发明的双特异性分子是包含两条重链和四条轻链的全长抗体,

[0028] 其中每条重链包含

[0029] a.免疫球蛋白的Fc区,其包含铰链-CH2-CH3结构域

[0030] b.Fc区通过所述铰链结构域与Ab1的Fab VH-CH1重链连接,其中铰链结构域将Ab1的所述CH2结构域的N末端和CH1结构域的C末端连接起来;

[0031] c.其进而通过多肽接头序列与Ab2的Fab VH-CH1重链连接,其中多肽接头序列将Ab1的所述VH结构域的N末端和Ab2的所述CH1结构域的C末端连接起来,

[0032] 并且其中所述四条轻链包含与其同源重链结构域缔合的Ab1的两条Fab VL-CL轻链和Ab2的两条Fab VL-CL轻链。

[0033] 在另一实施方案中,双特异性分子包含a)两条重链,每条重链包含SEQ ID NO:27,优选地由SEQ ID NO:27组成,和b)四条轻链,两条轻链包含SEQ ID NO:14,优选地由SEQ ID NO:14组成,并且另外两条轻链包含SEQ ID NO:18,优选地由SEQ ID NO:18组成。

[0034] 在另一实施方案中,双特异性分子包含a)两条重链,每条重链包含SEQ ID NO:29,优选地由SEQ ID NO:29组成,和b)四条轻链,两条轻链包含SEQ ID NO:14,优选地由SEQ ID NO:14组成,并且另外两条轻链包含SEQ ID NO:16,优选地由SEQ ID NO:16组成。

[0035] 在另一实施方案中,双特异性分子包含a)两条重链,每条重链包含SEQ ID NO:31,优选地由SEQ ID NO:31组成,和b)四条轻链,两条轻链包含SEQ ID NO:14,优选地由SEQ ID NO:14组成,并且另外两条轻链包含SEQ ID NO:20,优选地由SEQ ID NO:20组成。

[0036] 本发明还涉及产生本发明的双特异性分子的方法,所述方法包括以下步骤:

[0037] a.在合适的培养基和培养条件下培养宿主细胞,所述宿主细胞表达如上所定义的抗体重链和如上所定义的抗体轻链,和

[0038] b.从培养基或从所述培养细胞回收所述产生的抗体。

[0039] 本发明还涉及用作药物的本发明的双特异性抗原结合片段或双特异性分子。

[0040] 本发明还涉及双特异性抗原结合片段或本发明的双特异性分子,其用于治疗癌

症,优选实体瘤,例如胰腺癌、头颈癌、结直肠癌、乳腺癌或肺癌,优选用于治疗胰腺癌。

附图说明

[0041] 图1.本发明的双特异性抗体的示意图。

[0042] 图2.通过ELISA同时双重接合2种抗原。结合曲线显示了以下同时结合情况:(A) Patri-Trastu-Fc与固定的HER3-Fc和HER2-His(左图)以及与固定的HER2-Fc和HER3-His(右图), (B) Patri-Matu-Fc与固定的HER3-Fc和EGFR-His(左图)以及与固定的EGFR-Fc和HER3-His(右图),或 (C) Patri-Cetu-Fc与固定的HER3-Fc和EGFR-His(左图)以及与固定的EGFR-Fc和HER3-His(右图)。指示了来自ELISA结合曲线的半数最大有效浓度(EC50)。

[0043] 图3.抑制AKT磷酸化(pAKT)和ERK磷酸化(pERK)的双特异性抗体的生物学特性。在添加NRG1/EGF配体的混合物之前20分钟,细胞系(a)用双特异性抗体(B)预刺激另外的10分钟。细胞裂解后,通过HTRF定量pAKT和pERK的表达水平。相对于在没有双特异性抗体的NRG1/EGFR刺激的细胞中获得的最大磷酸化(100%;培养基),在Pherastar读取器上测量TR-FRET信号(665nm/620nm发射比率)。磷酸化水平以百分比表示,范围从0%(白色)至100%(黑色),对应于在不存在BsAb“培养基”的情况下的磷酸化。

[0044] 图4.双特异性抗体在裸鼠模型中的体内功效。用Sw1990(A)和PDX P2846(B) PDAC细胞异种移植的双特异性抗体治疗的小鼠的肿瘤生长(左图)和存活(中图)。右图中指示了治疗结束时的肿瘤生长抑制(TGI)的%和50%存活益处(天)。灰色区域对应于抗体治疗的持续时间。

[0045] 图5.Sw-1990异种移植物中双特异性抗体的瘤内渗透。通过双特异性抗体对Sw1990肿瘤渗透的免疫组织化学分析。使用过氧化物酶缀合的抗人Fc标记双特异性抗体。BsAb IRR是靶向CD19和CD3的对照双特异性抗体。9%NaCl溶液用作阴性对照。Patri-Cetu-Fc的肿瘤渗透在整个肿瘤切片(左)和在x40显微镜(右)下整体可视化。

[0046] 图6.在用本发明的双特异性抗体治疗后,在Sw1990-异种移植的胰腺小鼠模型中观察到TME的抗肿瘤特征。(A)免疫组织化学分析以监测来自治疗小鼠的切除的Sw1990异种移植物中的CD31+血管生成。Patri-Cetu-Fc-与BsAb IRR和NaCl处理的异种移植物切片的显微图像显示为示例(左图)。使用Qupath软件在整个肿瘤切片上定量肿瘤中CD31+微血管的平均尺寸。(B)通过流式细胞术对来自BiXAb治疗的小鼠的切除的Sw1990异种移植物进行的NK细胞免疫表型分析。用人L/D、CD45、CD3、CD19、CD49、NKp46、IFN γ 和CD107a特异性抗体标记解离的细胞。在阴性选择CD45+CD3+CD19+细胞后,阳性门控CD49+NKp46+NK细胞,然后用CD107a和细胞内IFN γ 标记。(C)体内ErbB降解分析。Patri-Cetu-Fc-与BsAb IRR和NaCl处理的Sw1990异种移植物切片的EGFR染色的免疫荧光显微图像(上图)。分别用NaCl溶液、Patri-Trastu-Fc、Patri-Matu-Fc和Patri-Cetu-Fc处理的每种Sw1990异种移植物提取物的ErbB受体表达的蛋白质印迹分析。微管蛋白用作上样对照。使用LI-COR Odyssey成像系统对蛋白质印迹进行可视化和定量(中图)。在每组切除的异种移植物中定量ErbB表达,相对于微管蛋白归一化(下图)。每个实验在三只Sw1990-异种移植小鼠上进行。BsAb IRR是同时结合人CD19和CD3的阴性对照。

[0047] 图7.双特异性抗体Patri-Cetu-Fc与单特异性抗体的体内功效。用Sw1990细胞异种移植的经治疗小鼠的肿瘤生长(上图)和存活(下图)。基于其Fc含量,不同小鼠队列中的

所有抗体含有相同摩尔浓度的抗体:Patri-Cetu-Fc以17mg/kg使用,单克隆对照(帕曲妥单抗或西妥昔单抗)以10mg/kg使用,并且组合(帕曲妥单抗+西妥昔单抗)以各自5mg/kg使用。灰色区域对应于抗体治疗的持续时间。

[0048] 图8.HER3抗原结合ELISA中BMX003-001(Patri-Cetu-Fc)、BMX003-010(人源化Patri-Cetu-Fc)和BMX003-011(人源化Patri-Cetu-Fc修饰的)的结合谱(n=1)。

[0049] 图9.EGFR抗原结合ELISA中BMX003-001(Patri-Cetu-Fc)、BMX003-010(人源化Patri-Cetu-Fc)和BMX003-011(人源化Patri-Cetu-Fc修饰的)的结合谱(n=3)。

[0050] 图10.使用流式细胞术测量的BMX003-001(Patri-Cetu-Fc)、BMX003-010(人源化Patri-Cetu-Fc)和BMX003-011(人源化Patri-Cetu-Fc修饰的)结合SW-1990细胞的细胞表面上表达的HER3和EGFR蛋白的能力(n=3)。

[0051] 图11.BMX003-001(Patri-Cetu-Fc)、BMX003-010(人源化Patri-Cetu-Fc)和BMX003-011(人源化Patri-Cetu-Fc修饰的)响应于生长因子抑制AKT(A)和ERK(B)磷酸化的生物学特性。

[0052] 图12.BMX003-001(Patri-Cetu-Fc)、BMX003-010(人源化Patri-Cetu-Fc)和BMX003-011(人源化Patri-Cetu-Fc修饰的)在HCT-116癌细胞存在下诱导NK细胞脱粒(CD107a的表达)的能力(2个独立供体,A和B)。

[0053] 图13.BMX003-001(Patri-Cetu-Fc)、BMX003-010(人源化Patri-Cetu-Fc)和BMX003-011(人源化Patri-Cetu-Fc修饰的)与SW1990胰腺癌异种移植模型的体内功效研究(BMX003-01、BMX003-010和BMX003-011以8.5mg/kg使用,BMX对照以17mg/kg使用)。

[0054] 发明详述

[0055] 定义:

[0056] 天然存在的抗体分子的基本结构是由两条相同的重链和两条相同的轻链组成的Y形四聚体四级结构,通过非共价相互作用和通过链间二硫键保持在一起。

[0057] 在哺乳动物物种中,有五种类型的重链: α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ ,它们决定了免疫球蛋白的类别(同种型):分别为IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。重链N-端可变结构域(VH)之后是恒定区,其在重链 γ 、 α 和 δ 中含有三个结构域(从N端至C端编号为CH1、CH2和CH3),而重链 μ 和 ϵ 的恒定区包含四个结构域(从N端至C端编号为CH1、CH2、CH3和CH4)。IgA、IgG和IgD的CH1和CH2结构域由柔性铰链分开,柔性铰链的长度在不同类别之间不同,并且在IgA和IgG的情况下,在不同亚型:IgG1、IgG2、IgG3和IgG4之间分别具有15、12、62(或77)和12个氨基酸的铰链,并且IgA1和IgA2分别具有20和7个氨基酸的铰链。

[0058] 存在两种类型的轻链: λ 和 κ ,其可以与任何重链同种型缔合,但两者在给定抗体分子中为相同类型。两条轻链似乎在功能上相同。它们的N端可变结构域(VL)之后是由单一结构域组成的恒定区,称为CL。

[0059] 重链和轻链通过CH1和CL结构域之间的蛋白质/蛋白质相互作用以及经由VH/VL相互作用配对,并且两条重链通过其CH3结构域之间的蛋白质/蛋白质相互作用缔合。免疫球蛋白分子的结构通常通过CH1和CL结构域之间以及铰链之间的链间二硫键来稳定。

[0060] 抗原结合区或抗原结合片段对应于Y形结构的臂,其由与重链的VH和CH1结构域配对的每个完整轻链组成,并且被称为Fab片段(对于抗原结合片段)。Fab片段首先通过木瓜蛋白酶消化从天然免疫球蛋白分子生成,木瓜蛋白酶消化在链间二硫键的氨基端侧的铰链

区中切割抗体分子,从而释放两个相同的抗原结合臂。其他蛋白酶如胃蛋白酶也在铰链区切割抗体分子,但在链间二硫键的羧基端侧,释放由两个相同的Fab片段组成并通过二硫键保持连接的片段;F(ab')₂片段中二硫键的还原生成Fab'片段。

[0061] 抗原结合区对应于VH和VL结构域的部分称为Fv片段(对于可变片段);它含有CDR(互补决定区),其形成抗原结合位点(也称为互补位)。

[0062] 抗体的效应子区域,其负责其与效应子分子或细胞的结合,对应于Y形结构的茎,并且含有配对的重链的CH2和CH3结构域(或CH2、CH3和CH4结构域,取决于抗体的类别),并且被称为Fc(对于可结晶片段)区域。

[0063] 由于两条重链和两条轻链的同一性,天然存在的抗体分子具有两个相同的抗原结合位点,因此同时结合两个相同的表位。

[0064] 如果抗体以比其与其它物质结合更大的亲和力、亲合力、更容易和/或更长的持续时间结合,则抗体“特异性结合”靶抗原。“特异性结合”或“优先结合”不必须要求(尽管可以包括)排他性结合。通常,但不必须,提及结合意指优先结合。

[0065] 术语“受试者”、“个人和“患者”在本文中可互换使用,并且是指正在评估用于治疗 and/或正在治疗的哺乳动物。受试者可以是人,但也包括其他哺乳动物,特别是可用作人类疾病的实验室模型的那些哺乳动物,例如小鼠、大鼠、兔、狗等。

[0066] 术语“治疗(treatment或treating)”是指动作、应用或疗法,其中受试者(包括人类)接受医疗援助,目的是直接或间接改善受试者的病况。特别地,在一些实施方案中,该术语是指降低发病率或减轻症状、消除复发、预防复发、预防发病率、改善症状、改善预后或其组合。本领域技术人员将理解,治疗不一定导致症状的完全没有或消除。例如,关于癌症,“治疗(treatment或treating)”可以指减慢肿瘤或恶性细胞生长、增殖或转移,预防或延迟肿瘤或恶性细胞生长、增殖或转移的发展,或其某些组合。

[0067] 术语“肿瘤”在本文中与术语“癌症”可互换使用,例如,两个术语均涵盖实体肿瘤和液体肿瘤,例如,弥漫性或循环性肿瘤。如本文所用,术语“癌症”或“肿瘤”包括癌前病变以及恶性癌症和肿瘤。

[0068] 术语“突变衍生物”、“突变体”或“功能性衍生物”表示通过缺失、取代或插入一个或几个氨基酸而与其所指的亲本序列不同的序列。优选地,突变衍生物具有与天然序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0069] 西妥昔单抗(**Erbitux®**; ImClone/Lilly, Merck-Serono)是靶向表皮生长因子受体(EGFR)的嵌合小鼠-人单克隆抗体(ATCC HB-9764&ATCC-97-63)。另参见EP0359282、EP0667165和US6217866。西妥昔单抗被批准用于治疗结直肠癌和头颈部鳞状细胞癌。

[0070] 曲妥珠单抗(**Herceptin®**; Genentech/Roche)是干扰HER2/neu受体的人源化IgG1。另参见EP0590058、US5821337、US8075890、US6407213、US6054297、US5772997、US6165464、US6399063和US6639055。其适应症为辅助和转移性乳腺癌及转移性胃癌的治疗。

[0071] 帕曲妥单抗(U1-59/U3-1287/AMG888)是具有IgG1样同种型的全人抗HER3单克隆抗体,对其靶标具有1-3nM亲和力,并且针对HER3的近膜部分。帕曲妥单抗在肺癌、头颈癌和乳腺癌模型中显示出有希望的体外和体内抗肿瘤效应,其中它有效地阻断HER3磷酸化,降

解HER3受体,并降低肿瘤负荷。

[0072] 马妥珠单抗(EMD72000)是衍生自鼠抗体MAb 425(EMD55900)的人化IgG1,该鼠抗体MAb 425从用人A431鳞状细胞癌细胞免疫的BALB/c小鼠脾脏通过淋巴细胞杂交产生。马妥珠单抗已经在针对多种癌症的I期临床试验中进行了测试(单独使用以及与化疗组合使用)。

[0073] 1. 双特异性抗原结合片段的设计

[0074] 本发明提供了双特异性二价抗原结合片段,其包含与HER-3的一个结合位点和与选自HER-2或EGFR抗原的另一抗原的一个结合位点。在特定的实施方案中,双特异性抗原结合片段能够同时结合HER-3和HER-2。在另一个特定的实施方案中,双特异性抗原结合片段能够同时结合HER-3和EGFR。

[0075] 本发明的抗原结合片段基本上由串联排列的Fab片段组成。本发明具体涉及使用两种单克隆抗体“Ab1”和“Ab2”的重链(VH)和轻链(VL)可变区的氨基酸序列构建的双特异性抗原结合片段,其中Ab1或Ab2之一是帕曲妥珠单抗或其功能性衍生物,并且Ab1或Ab2中的另一个选自由曲妥珠单抗或其功能性衍生物、马妥珠单抗或其功能性衍生物和西妥昔单抗或其功能性衍生物组成的组。

[0076] 所述双特异性抗原结合片段包含:

[0077] (i) Fab片段,其包含与抗体1(Ab1)的VL-CL轻链缔合的VH-CH1重链,和

[0078] (ii) Fab片段,其包含与抗体2(Ab2)的VL-CL轻链缔合的VH-CH1重链,

[0079] 其中Ab1的Fab片段的VH结构域的N端末端通过多肽接头与Ab2的Fab片段的CH1结构域的C端末端连接,

[0080] 其中Ab1或Ab2之一是帕曲妥单抗或其功能性衍生物;

[0081] 并且Ab1或Ab2中的另一个选自由曲妥珠单抗或其功能性衍生物、马妥珠单抗或其功能性衍生物和西妥昔单抗或其功能性衍生物组成的组。

[0082] 在特定的实施方案中,双特异性抗原结合片段包含具有不同CH1和CL结构域的两个Fab片段。在优选的实施方案中,双特异性抗原结合片段包含具有不同CH1和CL结构域的两个Fab片段,该两个Fab片段由以下组成:

[0083] (i) Fab片段,其具有衍生自人IgG1/ κ 的CH1和CL结构域,和Ab1的VH和VL结构域,

[0084] (ii) Fab片段,其具有衍生自人IgG1/ κ 的CH1和CL结构域和Ab2的VH和VL结构域。

[0085] 在特定的实施方案中,Ab1是帕曲妥单抗或其功能性衍生物,并且Ab2是曲妥珠单抗或其功能性衍生物。在另一个特定的实施方案中,Ab1是曲妥珠单抗或其功能性衍生物,并且Ab2是帕曲妥单抗或其功能性衍生物。

[0086] 在特定的实施方案中,Ab1是帕曲妥单抗或其功能性衍生物,并且Ab2是西妥昔单抗或其功能性衍生物。在另一个特定的实施方案中,Ab1是西妥昔单抗或其功能性衍生物,并且Ab2是帕曲妥单抗或其功能性衍生物。

[0087] 在特定的实施方案中,Ab1是帕曲妥单抗或其功能性衍生物,并且Ab2是马妥珠单抗或其功能性衍生物。在另一个特定的实施方案中,Ab1是马妥珠单抗或其功能性衍生物,并且Ab2是帕曲妥单抗或其功能性衍生物。

[0088] 在优选的实施方案中,Ab2是帕曲妥单抗或其功能性衍生物,并且Ab1选自由曲妥珠单抗或其功能性衍生物、马妥珠单抗或其功能性衍生物和西妥昔单抗或其功能性衍生物

组成的组。

[0089] 在特定的实施方案中,双特异性抗原结合片段包含Fab片段,该Fab片段包含与帕曲妥单抗或其功能性衍生物的VL-CL轻链缔合的VH-CH1重链,其中:

[0090] -VH结构域包含SEQ ID NO:5或其突变衍生物,优选地由SEQ ID NO:5或其突变衍生物组成;和

[0091] -VL结构域包含SEQ ID NO:6或其突变衍生物,优选地由SEQ ID NO:6或其突变衍生物组成;

[0092] 其中,CH1结构域优选为人IgG1的CH1恒定结构域或其突变衍生物;

[0093] 并且其中CL结构域优选为人 κ 恒定结构域或其突变衍生物。

[0094] 在特定的实施方案中,双特异性抗原结合片段包含Fab片段,该Fab片段包含与西妥昔单抗或其功能性衍生物的VL-CL轻链缔合的VH-CH1重链,其中:

[0095] -VH结构域包含SEQ ID NO:7或其突变衍生物,优选地由SEQ ID NO:7或其突变衍生物组成;和

[0096] -VL结构域包含SEQ ID NO:8或其突变衍生物,优选地由SEQ ID NO:8或其突变衍生物组成;

[0097] 其中,CH1结构域优选为人IgG1的CH1恒定结构域或其突变衍生物;

[0098] 并且其中CL结构域优选为人 κ 恒定结构域或其突变衍生物。

[0099] 在特定的实施方案中,双特异性抗原结合片段包含Fab片段,该Fab片段包含与曲妥珠单抗或其功能性衍生物的VL-CL轻链缔合的VH-CH1重链,其中:

[0100] -VH结构域包含SEQ ID NO:9或其突变衍生物,优选地由SEQ ID NO:9或其突变衍生物组成;和

[0101] -VL结构域包含SEQ ID NO:10或其突变衍生物,优选地由SEQ ID NO:10或其突变衍生物组成;

[0102] 其中,CH1结构域优选为人IgG1的CH1恒定结构域或其突变衍生物;

[0103] 并且其中CL结构域优选为人 κ 恒定结构域或其突变衍生物。

[0104] 在特定的实施方案中,双特异性抗原结合片段包含Fab片段,该Fab片段包含与马妥珠单抗或其功能性衍生物的VL-CL轻链缔合的VH-CH1重链,其中:

[0105] -VH结构域包含SEQ ID NO:11或其突变衍生物,优选地由SEQ ID NO:11或其突变衍生物组成;和

[0106] -VL结构域包含SEQ ID NO:12或其突变衍生物,优选地由SEQ ID NO:12或其突变衍生物组成;

[0107] 其中,CH1结构域优选为人IgG1的CH1恒定结构域或其突变衍生物;

[0108] 并且其中CL结构域优选为人 κ 恒定结构域或其突变衍生物。

[0109] 突变衍生物

[0110] 本发明利用野生型序列(帕曲妥单抗、马妥珠单抗、西妥昔单抗或曲妥珠单抗的野生型序列)或其突变衍生物。

[0111] 术语“突变衍生物”、“突变体”或“功能性衍生物”指代通过缺失、取代或插入一个或几个氨基酸而与其所指的亲本序列不同的序列。优选地,突变衍生物或功能性变体具有与天然序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相

同的氨基酸序列。在特定的实施方案中,突变不会显著影响抗体的功能。

[0112] 突变衍生物或功能性变体可以包含VH链、VL链或两者,其中,VH链包含与本文所列举的任何参考序列至少80% (例如,至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%) 相同的氨基酸序列,VH链具有与本文所列举的任何参考序列至少80% (例如,至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%) 相同的氨基酸序列。帕曲妥单抗的功能性变体能够结合HER3。西妥昔单抗的功能性变体能够结合EGFR。马妥珠单抗的功能变体能够结合EGFR。曲妥珠单抗的功能性变体能够结合HER2。

[0113] 在一些示例中,变体相对于上述参考抗体具有相似的抗原结合亲和力(例如,具有小于 1×10^{-8} ,优选小于 1×10^{-9} 或 1×10^{-10} M的Kd)。在一些实施方案中,原始抗体的功能性变体具有相同的结合特异性,并且与其靶标的亲和力为原始抗体亲和力的至少50%,例如至少60%、70%、80%或至少90%。结合的亲和力由术语 k_a (缔合速率常数)、 k_d (解离速率常数) 或KD (平衡解离) 定义。通常,当相对于抗体使用时,特异性结合是指抗体以小于 10^{-8} M,例如,小于 10^{-9} M或 10^{-10} M的亲和力(KD) 值特异性结合(“识别”) 其靶标。较低的KD值代表较高的结合亲和力(即,较强的结合),因此 10^{-9} 的KD值指示比 10^{-8} 的KD值更高的结合亲和力。

[0114] 两个氨基酸序列的“同一性百分比”是使用Karlin and Altschul Proc.Natl.Acad.Sci.USA87:2264-68,1990的算法确定的,该算法在Karlin and Altschul Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:5873-77,1993中进行了修改。这样的算法被并入Altschul, et al.J.Mol.Biol.215:403-10,1990的NBLAST and XBLAST programs (version 2.0)。BLAST 蛋白搜索可以用XBLAST程序执行,评分=50,字长=3,以获得与感兴趣的蛋白质分子同的氨基酸序列。其中两个序列之间存在空位,可以如Altschul et al.,Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402,1997中所述利用Gapped BLAST。当利用BLAST和Gapped BLAST程序时,可以使用各自程序(例如,XBLAST和NBLAST) 的默认参数。

[0115] 在其他实施方案中,本文所述的功能性变体可以含有一个或多个突变(例如,保守取代),其优选地不在预测与一个或多个CDR相互作用的残基处发生。

[0116] 本文描述了与参考抗体实质上相同的突变衍生物或功能性变体。

[0117] 术语“实质上相同”或“非实质的”意指变体的相关氨基酸序列(例如,在框架区(FR)、CDR、VH或VL结构域中) 与参考抗体相比实质上不相似(例如,包括保守氨基酸取代),使得变体相对于参考抗体具有实质上相似的结合活性(例如,亲和力、特异性或两者) 和生物活性。这种变体可以包括微小的氨基酸变化,例如在指定区域的5个氨基酸序列中的1个或2个取代。通常,与CDR区相比,可以在FR区中进行更多的取代,只要它们不会不利地影响抗体的结合功能(例如与原始抗体相比将结合亲和力降低超过50%)。在一些实施方案中,在原始抗体和修饰抗体之间,序列同一性可以是约85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高。在一些实施方案中,修饰的抗体具有与原始抗体相同的结合特异性并且具有原始抗体至少50%的亲和力。在一些实施方案中,突变不在CDR区内发生。

[0118] 保守取代将产生具有与进行此类修饰的分子的功能和化学特征相似的功能和化学特征的分子。例如,“保守氨基酸取代”可以涉及用另一个残基取代天然氨基酸残基,使得对该位置处的氨基酸残基的极性 or 电荷影响很小或没有影响。期望的氨基酸取代(无论是保守的还是非保守的) 可以由本领域技术人员确定。例如,氨基酸取代可用于鉴定分子序列的重要残基,或增加或降低本文所述的分子的亲和力。包含一个或多个保守氨基酸取代的

变体可以根据本领域普通技术人员已知的用于改变多肽序列的方法制备,例如在汇编此类方法的参考文献中发现的那些,例如Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J.Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, or Current Protocols in Molecular Biology, F.M.Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. 氨基酸的保守取代包括在下组内的氨基酸之间进行的取代: (a) M、I、L、V; (b) F、Y、W; (c) K、R、H; (d) A、G; (e) S、T; (f) Q、N; 和 (g) E、D。

[0119] 本公开还提供了抗体变体,其具有改善的抗体生物学特性,例如更高或更低的结合亲和力,或具有改变的ADCC特性,或具有改变的表达HER3、EGFR和/或HER2的细胞的活力抑制效果。

[0120] 抗体的氨基酸序列变体可以通过将适当的核苷酸变化引入抗体核酸中或经由肽合成来制备。此类修饰包括,例如,抗体的氨基酸序列内的残基的缺失、和/或插入和/或取代。进行缺失、插入和取代的任何组合以获得最终构建体,条件是最终构建体具有期望的特征。编码抗体的氨基酸序列变体的核酸分子可以通过本领域已知的多种方法制备。这些方法包括,但不限于,抗体的较早制备的变体或非变体(天然)版本的寡核苷酸介导的(或定点的)诱变、PCR诱变和盒式诱变。在一个实施方案中,本发明的抗体的平衡解离常数(KD)值小于 10^{-8} M,特别是小于 10^{-9} M或 10^{-10} M。可以使用本领域已知的技术,例如ELISA或生物特异性相互作用分析,或本领域已知的其他技术来确定结合亲和力。

[0121] 可以按照常规方法检测本文所述的任何抗体以确定其特性,例如抗原结合活性、抗原结合特异性和生物学功能。

[0122] 本文所述的任何抗体可以被修饰以含有本领域已知的并且容易获得的另外的非蛋白质部分,例如,通过聚乙二醇化、高糖基化、毒素的缀合、放射性标记等。可以增强血清半衰期的修饰是令人感兴趣的。

[0123] 本发明的抗体可以是糖基化的或不是糖基化的,或者可以显示多种糖基化谱。在优选的实施方案中,抗体在重链和轻链的可变区上未糖基化,但在Fc区上糖基化。

[0124] 例如,为了去除西妥昔单抗VH结构域中的N-糖基化位点,根据序列SEQ ID NO:77将Kabat位置H85处的Asn突变为天冬氨酸(D),或者根据序列SEQ ID NO:78将Kabat位置H85处的Asn突变为谷氨酸(E)。

[0125] 西妥昔单抗的某些突变衍生物是参考西妥昔单抗抗体的人源化形式,其原始形式是具有鼠源的重链和轻链可变区的嵌合抗体。在人源化方法中,将来自供体小鼠可变区的互补决定区(CDR)和某些其他氨基酸移植到人可变受体区中,然后连接至人恒定区;一些CDR氨基酸可以进一步被受体区的人种系序列中发现的氨基酸替代。参见,例如Riechmann et al., Nature 332:323-327(1988);美国专利号5,225,539。

[0126] 本发明进一步涵盖含有人源化版本的西妥昔单抗的轻链和/或重链的双特异性抗原结合片段。

[0127] 在特定的实施方案中,Ab1或Ab2是西妥昔单抗或西妥昔单抗的人源化版本。在特定的实施方案中,西妥昔单抗的人源化形式具有VH结构域和VL结构域,其中,VH结构域具有与SEQ ID NO:7至少80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%或至少99%相同的氨基酸序列;VL结构域具有与SEQ ID NO:8至少80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%或至少99%

相同的氨基酸序列。

[0128] 在特定的实施方案中,西妥昔单抗的人源化形式是专利申请W02012020059中描述的任何人源化形式。

[0129] 在特定的实施方案中,Ab1或Ab2是能够结合EGFR的西妥昔单抗的人源化形式,并且其包含:

[0130] -重链可变区(VH),其包含具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的CDR3;和/或

[0131] -轻链可变区(VL),其包含具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的CDR3。

[0132] 在一个实施方案中,人源化西妥昔单抗的重链可变区(VH)的框架区1、2和3中的至少2个且优选全部衍生自或对应于编码包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的人种系VH基因4-59*01。此外,重链可变区(VH)的框架区4优选衍生自或对应于编码包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的人种系基因JH1。在一个实施方案中,人源化西妥昔单抗的轻链可变区(VL)的框架区1、2和3中的至少一个衍生自或对应于编码包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的人种系VL基因6-21*01。优选地,轻链可变区的框架区1、2和3中的至少2个,更优选全部3个衍生自或对应于编码包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的人种系VL基因6-21*01。此外,轻链可变区(VL)的框架区4优选衍生自或对应于编码包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的人种系基因JK2。

[0133] 优选地,人源化西妥昔单抗包含重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL),其中,重链可变区包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列,轻链可变区包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列。重链可变区(VH)优选包含选自SEQ ID NO:61至68组成的组的氨基酸序列,特别是SEQ ID NO:63的氨基酸序列。在特定的实施方案中,人源化西妥昔单抗的重链可变区(VH)优选包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列。此外,轻链可变区(VL)优选包含选自SEQ ID NO:69至72组成的组的氨基酸序列,特别是SEQ ID NO:71的氨基酸序列。特别优选的是包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的人源化抗体,其中,重链可变区包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列,轻链可变区包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列。另一特别优选的是包含重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)的人源化西妥昔单抗,其中,重链可变区包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列,轻链可变区包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列。

[0134] 在特定的实施方案中,人源化西妥昔单抗包含:

[0135] -SEQ ID NO:81的VH结构域和SEQ ID NO:2的CH1结构域(对应于SEQ ID NO:83的VH-CH1序列)

[0136] -SEQ ID NO:71的VL结构域和SEQ ID NO:4的CL结构域(对应于SEQ ID NO:84的VL-CL序列)。

[0137] 在特定的实施方案中,人源化西妥昔单抗包含重链可变区(VH),其包含与SEQ ID NO:59或与SEQ ID NO:61至68,特别是与SEQ ID NO:63的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%或至少99%同一性的氨基酸序列。在特定的实施方案中,人源化西妥昔单抗包含轻链可变区(VL),其包含与SEQ ID NO:60或与SEQ ID NO:69至72,特别是与SEQ ID NO:71的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%或至少99%同一性的氨基酸序列。

[0138] 在一些示例中, Ab1或Ab2是人源化西妥昔单抗, 其包含:

[0139] -西妥昔单抗的轻链人源化版本, 其基于如IMGT/基因数据库中定义的人免疫球蛋白基因 κ 可变6-11等位基因02 (IGKV6-21*02),

[0140] EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTNIHWYQQKPDQSPKLLI KYASESISGVPSRFSGSGS GTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQNNNWPTTFG QGTKLEIK (SEQ ID NO:73)

[0141] 其中在以下Kabat位置处, 氨基酸残基是:

[0142] Kabat位置L31 Thr或Ser

[0143] Kabat位置L32 Asn或Ser

[0144] Kabat位置L33 Ile或Leu

[0145] Kabat位置L53 Glu或Gln Kabat位置L89 Gln或His

[0146] 以及任选地, Kabat位置L91 Asn、Ser、His、Lys或Arg

[0147] Kabat位置L92 Asn、Ser、His、Lys或Arg

[0148] Kabat位置L93 Asn、Ser、His、Lys或Arg

[0149] Kabat位置L94 Trp、Tyr或Phe

[0150] Kabat位置L96 Thr或Tyr。

[0151] 为了清楚起见, L31是指轻链中的残基31。

[0152] -西妥昔单抗的轻链人源化版本, 其基于如IMGT/基因数据库中定义的人免疫球蛋白基因 κ 可变3-11等位基因01 (IGKV3-11*01),

[0153] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSIGTNIHWYQQKPGQAPRLLIK YASESISGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQNNNWPTTFGQG TKLEIK (SEQ ID NO:74)

[0154] 其中在以下Kabat位置处, 氨基酸残基是:

[0155] Kabat位置L29 Ile或Val

[0156] Kabat位置L30 Gly或Ser

[0157] Kabat位置L31 Thr或Ser

[0158] Kabat位置L32 Asn或Tyr

[0159] Kabat位置L33 Ile或Leu

[0160] Kabat位置L34 His或Ala

[0161] Kabat位置L49 Lys或Tyr

[0162] Kabat位置L50 Tyr或Asp

[0163] Kabat位置L53 Glu或Asn

[0164] Kabat位置L54 Ser或Arg

[0165] Kabat位置L55 Ile或Ala

[0166] Kabat位置L56 Ser或Thr

[0167] 以及任选地, Kabat位置L91 Asn、Arg、His或Lys

[0168] Kabat位置L92 Asn、Ser、His、Lys或Arg

[0169] Kabat位置L94 Trp、Tyr或Phe

[0170] Kabat位置L96 Thr或Tyr。

[0171] -西妥昔单抗mAb的重链人源化版本, 其基于如IMGT/基因数据库中定义的人免疫球蛋白基因重可变区4-59等位基因01 (IGHV4-59*01),

[0172] QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWVRQPPGKGLE WLGVWSGGNTDYNTPLTSRL
TISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCA RALTYDYEFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:75)

[0173] 其中在以下Kabat位置处,氨基酸残基是:

[0174] Kabat位置H29 Leu或Ile

[0175] Kabat位置H30 Thr或Ser

[0176] Kabat位置H31 Asn或Ser

[0177] Kabat位置H33 Gly或Tyr

[0178] Kabat位置H35 His或Ser

[0179] Kabat位置H37 Val或Ile

[0180] Kabat位置H48 Leu或Ile

[0181] Kabat位置H50 Val或Tyr

[0182] Kabat位置H52 Trp、Tyr或Phe

[0183] Kabat位置H53 Ser或Tyr

[0184] Kabat位置H54 Gly或Ser

[0185] Kabat位置H56 Asn或Ser

[0186] Kabat位置H58 Asp或Asn

[0187] Kabat位置H61 Thr或Pro

[0188] Kabat位置H62 Pro或Ser

[0189] Kabat位置H64 Thr或Lys

[0190] Kabat位置H67 Leu或Val

[0191] Kabat位置H73 Asn或Thr

[0192] Kabat位置H78 Val或Phe。

[0193] 为了清楚起见,H29是指重链中的残基29。

[0194] -西妥昔单抗mAb的重链人源化版本,其基于如IMGT/基因数据库中定义的人免疫球蛋白基因重可变区3-33等位基因01 (IGHV3-33*01),

[0195] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAVSGFSLTNYGVHWVRQAPGKGL EWLGVWSGGNTDYNTPVTSRF
TISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYY CARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:76)

[0196] 其中在以下Kabat位置处,氨基酸残基是:

[0197] Kabat位置H28 Ser或Thr

[0198] Kabat位置H30 Thr或Ser

[0199] Kabat位置H48 Leu或Val

[0200] Kabat位置H49 Gly或Ala

[0201] Kabat位置H53 Ser或Asp

[0202] Kabat位置H55 Gly或Ser

[0203] Kabat位置H57 Lys或Thr

[0204] Kabat位置H58 Asp或Tyr

[0205] Kabat位置H60 Asn或Ala

[0206] Kabat位置H61 Thr或Asp

[0207] Kabat位置H62 Pro或Ser

[0208] Kabat位置H64 Thr或Lys

[0209] Kabat位置H65 Ser或Gly

[0210] Kabat位置H78 Val或Leu。

[0211] 在特定的实施方案中,Ab1的Fab片段和/或Ab2的Fab片段包含VH/VL结构域中的突变,以促进Fab轻链与Fab重链的配对。具体突变描述于国际专利申请W02020/136566中,其全部通过引用并入本文。

[0212] 在特定的实施方案中,Ab1的Fab片段和/或Ab2的Fab片段包含突变的VH结构域和VL结构域,其中,VH结构域的Kabat位置39处的残基已经从谷氨酰胺突变为赖氨酸;VL结构域的Kabat位置38处的残基已从谷氨酰胺突变为谷氨酸。

[0213] 在特定的实施方案中,Ab1的Fab片段和/或Ab2的Fab片段包含突变的VH结构域和VL结构域,其中,VH结构域的Kabat位置39处的残基已经从谷氨酰胺突变为赖氨酸;VL结构域的Kabat位置38处的残基已从谷氨酰胺突变为天冬氨酸。

[0214] 在特定的实施方案中,Ab1的Fab片段和/或Ab2的Fab片段包含突变的VH结构域和VL结构域,其中,VH结构域的Kabat位置39处的残基已经从谷氨酰胺突变为谷氨酸;VL结构域的Kabat位置38处的残基已从谷氨酰胺突变为赖氨酸。

[0215] CH1/CL突变结构域

[0216] Fab结构域的组装经由轻链和重链的天然配对完成,而不使用肽接头。为了使轻链和重链之间的同源配对的倾向最大化,可以考虑在Fab片段中的轻链和重链的界面(CL/CH1界面)处引入突变。

[0217] 在特定的实施方案中,Ab1和/或Ab2的CH1结构域是来自任何同种异型的人IgG1的CH1恒定结构域或其突变衍生物。在特定的实施方案中,Ab1和/或Ab2的CH1结构域是G1m(1,17)同种异型的人IgG1的CH1结构域或其突变衍生物。在另一个特定的实施方案中,Ab1和/或Ab2的CH1结构域是G1m(3)同种异型的人IgG1的CH1结构域或其突变衍生物。

[0218] 在优选的实施方案中,每个CH1结构域携带至少一个突变,并且每个CL1结构域还携带至少一个突变,选择这些突变使得CH1和CL1结构域的正确同源配对得到改善。

[0219] 这些突变可以选自以下列表:

[0220] -重新引入的离子对或已经存在于Fab片段的重链和轻链界面处的天然离子对的反极性带电突变;

[0221] -“杵臼”突变;

[0222] -使Fab片段中重链和轻链界面的相对恒定区重新表面化以将它们从强极性改变为高度疏水性或反之亦然突变。

[0223] 因此,几组突变是合适的,如下文更详细描述。

[0224] 值得注意的是,在整个本说明书中,本文用于CH1和CL结构域的氨基酸序列和序列位置编号是根据Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)定义的。

[0225] 可以在CL_K结构域中突变的残基可以例如选自下组:S114、F 116、F118、E 123(例如E123K)、Q 124、T 129、S131、V 133、L 135、N 137、Q160、S162、S174、S176、T 178和T 180。

[0226] 可以在CH1结构域中突变的残基可以例如选自下组:L 124、A139、L143、D 144、K

145、D 146、H 172、F 174、P 175、Q 179、S183、S188、V 190、T 192和K 221 (例如K221E)。

[0227] 具体的突变描述于美国专利申请2014/0200331、2014/150973、2014/0154254和国际专利申请W02007/147901中,其全部通过引用并入本文。

[0228] 下面描述了CH1/CL突变衍生生物的示例。

[0229] 根据特定的实施方案,双特异性抗原结合片段包含:

[0230] -对应于SEQ ID NO:1的来自人IgG1的突变CH1恒定结构域 (Kabat位置192处的残基已从苏氨酸突变为谷氨酸(E));

[0231] -对应于SEQ ID NO:45的来自人IgG1的突变CH1恒定结构域 (Kabat位置192处的残基已从苏氨酸突变为天冬氨酸(D));

[0232] -对应于SEQ ID NO:2的来自人IgG1的突变CH1恒定结构域 (Kabat位置143处的残基已从亮氨酸突变为谷氨酰胺(Q);并且Kabat位置188处的残基已从丝氨酸突变为缬氨酸(V));

[0233] -对应于SEQ ID NO:46的来自人IgG1的突变CH1恒定结构域 (Kabat位置124处的残基已从亮氨酸突变为谷氨酰胺(Q);并且Kabat位置188处的残基已从丝氨酸突变为缬氨酸(V));

[0234] -对应于SEQ ID NO:3的突变人 κ 恒定结构域 (Kabat位置114处的残基已从丝氨酸突变为丙氨酸(A)并且Kabat位置137处的残基已从天冬酰胺突变为赖氨酸(K));

[0235] -对应于SEQ ID NO:4的突变人 κ 恒定结构域 (Kabat位置133处的残基已从缬氨酸突变为苏氨酸(T)并且Kabat位置176处的残基已从丝氨酸突变为缬氨酸(V));

[0236] 在优选的实施方案中,相互作用的极性界面残基对交换为中性和盐桥形成残基对。可以选择在CH1链上通过谷氨酸或天冬氨酸取代Thr192和在CL链上将Asn137置换为Lys,任选地用丙氨酸残基替换所述CL结构域的位置114处的丝氨酸残基。

[0237] 在另一组突变中,可以通过Gln残基取代CH1结构域的Leu143,然而CL链的对面残基,即Val133,通过Thr残基取代。这种首次双突变构成了从疏水相互作用到极性相互作用的转换。同时,两个相互作用的丝氨酸(CH1链上的Ser188和CL链上的Ser176)同时突变为缬氨酸残基可以实现从极性相互作用到疏水相互作用的转换。

[0238] 在又一个实施方案中,突变可以包含用谷氨酰胺替换CH1结构域的位置124处的亮氨酸残基和用缬氨酸残基替换CH1结构域的位置188处的丝氨酸残基;以及用苏氨酸残基替换CL结构域的位置133处的缬氨酸残基和用缬氨酸残基替换所述CL结构域的位置176处的丝氨酸残基。

[0239] “杵臼”突变包括突变组(KH1),其中CH1结构域的Leu 124和Leu 143已分别被Ala和Glu残基取代,而CL链的Val 133已被Trp残基取代,然而,在名为H2的突变组中,CH1结构域的Val 190已被Ala残基取代,并且CL链的Leu 135和Asn 137已分别被Trp和Ala残基取代。

[0240] 优选的突变公开于下表中:

[0241]	优选的突变 (LC 是轻链, HC 是重链)	突变组的名称
	LC(S114A/N137K)、 HC(T192E)	CR3 突变
	LC(S114A/N137K)、 HC(T192D)	CC1 突变
	LC(V133T/S176V)、 HC(L143Q/S188V)	Mut4
	LC(V133T/S176V)、 HC(L124Q/S188V)	ML1

[0242] 在特定的实施方案中,多特异性抗体可以携带双突变,例如一个Fab具有CR3突变并且另一个Fab具有Mut4突变。

[0243] 更具体地描述了双特异性抗原结合片段,其中Ab1或Ab2是帕曲妥单抗或其突变衍生物,其包含:

[0244] -由SEQ ID NO:5或其突变衍生物组成的VH结构域,

[0245] -选自下组的CH1结构域:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46或SEQ ID NO:47,

[0246] -由SEQ ID NO:6或其突变衍生物组成的VL结构域,

[0247] -选自下组的CL结构域:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:48,

[0248] 其中CL和CH1结构域优选如下缔合:

[0249] -SEQ ID NO:48与SEQ ID NO:47,

[0250] -SEQ ID NO:3与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:45,

[0251] -SEQ ID NO:4与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:46。

[0252] 优选地,Ab1或Ab2是帕曲妥单抗或其突变衍生物,其包含:

[0253] -由SEQ ID NO:5或其突变衍生物组成的VH结构域,

[0254] -由SEQ ID NO:1或其突变衍生物组成的CH1结构域,

[0255] -由SEQ ID NO:6或其突变衍生物组成的VL结构域,

[0256] -由SEQ ID NO:3或其突变衍生物组成的CL结构域,

[0257] 优选地,Ab1或Ab2是帕曲妥单抗或其突变衍生物,其包含:

[0258] -VH-CH1重链,其包含SEQ ID NO:13或与SEQ ID NO:13具有至少80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%或至少99%序列同一性的功能性变体或由其组成;和

[0259] -VL-CL轻链,其包含SEQ ID NO:14或与SEQ ID NO:14具有至少80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%或至少99%序列同一性的功能性变体或由其组成。

[0260] 更具体地描述了双特异性抗原结合片段,其中Ab1或Ab2是西妥昔单抗或其突变衍生物,其包含:

- [0261] -由SEQ ID NO:7、其突变衍生物或其人源化衍生物组成的VH结构域，
- [0262] -选自下组的CH1结构域:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46或SEQ ID NO:47，
- [0263] -由SEQ ID NO:8、其突变衍生物或其人源化衍生物组成的VL结构域，
- [0264] -选自下组的CL结构域:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:48，
- [0265] 其中CL和CH1结构域优选如下缔合：
- [0266] -SEQ ID NO:48与SEQ ID NO:47，
- [0267] -SEQ ID NO:3与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:45，
- [0268] -SEQ ID NO:4与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:46。
- [0269] 优选地，Ab1或Ab2是西妥昔单抗或其突变衍生物，其包含：
- [0270] -由SEQ ID NO:7、其突变衍生物或其人源化衍生物组成的VH结构域，
- [0271] -由SEQ ID NO:2或其突变衍生物组成的CH1结构域，
- [0272] -由SEQ ID NO:8、其突变衍生物或其人源化衍生物组成的VL结构域，
- [0273] -由SEQ ID NO:4或其突变衍生物组成的CL结构域，
- [0274] 优选地，Ab1或Ab2是西妥昔单抗或其突变衍生物，其包含：
- [0275] -VH-CH1重链，其包含SEQ ID NO:15或与SEQ ID NO:15具有至少80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%或至少99%序列同一性的功能性变体或由其组成；和
- [0276] -VL-CL轻链，其包含SEQ ID NO:16或与SEQ ID NO:16具有至少80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%或至少99%序列同一性的功能性变体或由其组成。
- [0277] 更具体地描述了双特异性抗原结合片段，其中Ab1或Ab2是曲妥珠单抗或其突变衍生物，其包含：
- [0278] -由SEQ ID NO:9或其突变衍生物组成的VH结构域，
- [0279] -选自下组的CH1结构域:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46或SEQ ID NO:47，
- [0280] -由SEQ ID NO:10或其突变衍生物组成的VL结构域，
- [0281] -选自下组的CL结构域:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:48，
- [0282] 其中CL和CH1结构域优选如下缔合：
- [0283] -SEQ ID NO:48与SEQ ID NO:47，
- [0284] -SEQ ID NO:3与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:45，
- [0285] -SEQ ID NO:4与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:46。
- [0286] 优选地，Ab1或Ab2是曲妥珠单抗或其突变衍生物，其包含：
- [0287] -由SEQ ID NO:9或其突变衍生物组成的VH结构域，
- [0288] -由SEQ ID NO:2或其突变衍生物组成的CH1结构域，
- [0289] -由SEQ ID NO:10或其突变衍生物组成的VL结构域，
- [0290] -由SEQ ID NO:4或其突变衍生物组成的CL结构域，
- [0291] 优选地，Ab1或Ab2是曲妥珠单抗或其突变衍生物，其包含：
- [0292] -VH-CH1重链，其包含SEQ ID NO:17或与SEQ ID NO:17具有至少80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%或至少99%序列同一性的功能性变体或由其组成；和
- [0293] -VL-CL轻链，其包含SEQ ID NO:18或与SEQ ID NO:18具有至少80%、85%、90%、

92%、94%、96%、98%或至少99%序列同一性的功能性变体或由其组成。

[0294] 更具体地描述了双特异性抗原结合片段,其中Ab1或Ab2是马妥珠单抗或其突变衍生物,其包含:

[0295] -由SEQ ID NO:11或其突变衍生物组成的VH结构域,

[0296] -选自下组的CH1结构域:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46或SEQ ID NO:47,

[0297] -由SEQ ID NO:12或其突变衍生物组成的VL结构域,

[0298] -选自下组的CL结构域:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:48,

[0299] 其中CL和CH1结构域优选如下缔合:

[0300] -SEQ ID NO:48与SEQ ID NO:47,

[0301] -SEQ ID NO:3与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:45,

[0302] -SEQ ID NO:4与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:46。

[0303] 优选地,Ab1或Ab2是马妥珠单抗或其突变衍生物,其包含:

[0304] -由SEQ ID NO:11或其突变衍生物组成的VH结构域,

[0305] -由SEQ ID NO:2或其突变衍生物组成的CH1结构域,

[0306] -由SEQ ID NO:12或其突变衍生物组成的VL结构域,

[0307] -由SEQ ID NO:4或其突变衍生物组成的CL结构域,

[0308] 优选地,Ab1或Ab2是马妥珠单抗或其突变衍生物,其包含:

[0309] -VH-CH1重链,其包含SEQ ID NO:19或与SEQ ID NO:19具有至少80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%或至少99%序列同一性的功能性变体或由其组成;和

[0310] -VL-CL轻链,其包含SEQ ID NO:20或与SEQ ID NO:20具有至少80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%或至少99%序列同一性的功能性变体或由其组成。

[0311] 在特定的实施方案,双特异性抗原结合片段包含:

[0312] (i) Fab片段,其包含与曲妥珠单抗或其功能性衍生生物的VL-CL轻链缔合的VH-CH1重链,和

[0313] (ii) Fab片段,其包含与帕曲妥单抗或其功能性衍生生物的VL-CL轻链缔合的VH-CH1重链,

[0314] 其中曲妥珠单抗的Fab片段的VH结构域的N末端通过多肽接头与帕曲妥单抗的Fab片段的CH1结构域的C末端连接,

[0315] 其中曲妥珠单抗的VH-CH1重链优选由SEQ ID NO:17组成,曲妥珠单抗的VL-CL轻链优选由SEQ ID NO:18组成,帕曲妥单抗的VH-CH1重链优选由SEQ ID NO:13组成,和/或其中帕曲妥单抗的VL-CL轻链优选由SEQ ID NO:14组成。

[0316] 在优选的实施方案中,双特异性抗原结合片段包含一条含有SEQ ID NO:21或其功能性变体(或由SEQ ID NO:21或其功能性变体组成)的重链,和两条含有SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:14或其功能性变体(或由SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:14或其功能性变体组成)的不同的轻链。

[0317] 在特定的实施方案,双特异性抗原结合片段包含:

[0318] (i) Fab片段,其包含与帕曲妥单抗或其功能性衍生生物的VL-CL轻链缔合的VH-CH1重链,和

[0319] (ii) Fab片段,其包含与曲妥珠单抗或其功能性衍生生物的VL-CL轻链缔合的VH-CH1重链,

[0320] 其中帕曲妥单抗的Fab片段的VH结构域的N末端末端通过多肽接头与曲妥珠单抗的Fab片段的CH1结构域的C末端末端连接,

[0321] 其中曲妥珠单抗的VH-CH1重链优选由SEQ ID NO:17组成,曲妥珠单抗的VL-CL轻链优选由SEQ ID NO:18组成,帕曲妥单抗的VH-CH1重链优选由SEQ ID NO:13组成,和/或其中帕曲妥单抗的VL-CL轻链优选由SEQ ID NO:14组成。

[0322] 在优选的实施方案中,双特异性抗原结合片段包含一条含有SEQ ID NO:22或其功能性变体(或由SEQ ID NO:22或其功能性变体组成)的重链,和两条含有SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:14或其功能性变体(或由SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:14或其功能性变体组成)的不同的轻链。

[0323] 在特定的实施方案,双特异性抗原结合片段包含:

[0324] (i) Fab片段,其包含与西妥昔单抗或其功能性或人源化衍生生物的VL-CL轻链缔合的VH-CH1重链,和

[0325] (ii) Fab片段,其包含与帕曲妥单抗或其功能性衍生生物的VL-CL轻链缔合的VH-CH1重链,

[0326] 其中西妥昔单抗的Fab片段的VH结构域的N末端末端通过多肽接头与帕曲妥单抗的Fab片段的CH1结构域的C末端末端连接,

[0327] 其中西妥昔单抗的VH-CH1重链优选由SEQ ID NO:15组成,西妥昔单抗的VL-CL轻链优选由SEQ ID NO:16组成,帕曲妥单抗的VH-CH1重链优选由SEQ ID NO:13组成,和/或其中帕曲妥单抗的VL-CL轻链优选由SEQ ID NO:14组成。

[0328] 在优选的实施方案中,双特异性抗原结合片段包含一条含有SEQ ID NO:23或其功能性变体(或由SEQ ID NO:23或其功能性变体组成)的重链,和两条含有SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:14或其功能性变体(或由SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:14或其功能性变体组成)的不同的轻链。

[0329] 在特定的实施方案,双特异性抗原结合片段包含:

[0330] (i) Fab片段,其包含与帕曲妥单抗或其功能性衍生生物的VL-CL轻链缔合的VH-CH1重链,和

[0331] (ii) Fab片段,其包含与西妥昔单抗或其功能性或人源化衍生生物的VL-CL轻链缔合的VH-CH1重链,

[0332] 其中帕曲妥单抗的Fab片段的VH结构域的N末端末端通过多肽接头与西妥昔单抗的Fab片段的CH1结构域的C末端末端连接,

[0333] 其中西妥昔单抗的VH-CH1重链优选由SEQ ID NO:15组成,西妥昔单抗的VL-CL轻链优选由SEQ ID NO:16组成,帕曲妥单抗的VH-CH1重链优选由SEQ ID NO:13组成,和/或其中帕曲妥单抗的VL-CL轻链优选由SEQ ID NO:14组成。

[0334] 在优选的实施方案中,双特异性抗原结合片段包含一条含有SEQ ID NO:24或其功能性变体(或由SEQ ID NO:24或其功能性变体组成)的重链,和两条含有SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:14或其功能性变体(或由SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:14或其功能性变体组成)的不同的轻链。

[0335] 在特定的实施方案,双特异性抗原结合片段包含:

[0336] (i) Fab片段,其包含与马妥珠单抗或其功能性衍生物的VL-CL轻链缔合的VH-CH1重链,和

[0337] (ii) Fab片段,其包含与帕曲妥单抗或其功能性衍生物的VL-CL轻链缔合的VH-CH1重链,

[0338] 其中马妥珠单抗的Fab片段的VH结构域的N末端末端通过多肽接头与帕曲妥单抗的Fab片段的CH1结构域的C末端末端连接,

[0339] 其中马妥珠单抗的VH-CH1重链优选由SEQ ID NO:19组成,马妥珠单抗的VL-CL轻链优选由SEQ ID NO:20组成,帕曲妥单抗的VH-CH1重链优选由SEQ ID NO:13组成,和/或其中帕曲妥单抗的VL-CL轻链优选由SEQ ID NO:14组成。

[0340] 在优选的实施方案中,双特异性抗原结合片段包含一条含有SEQ ID NO:25或其功能性变体(或由SEQ ID NO:25或其功能性变体组成)的重链,和两条含有SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:14或其功能性变体(或由SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:14或其功能性变体组成)的不同的轻链或其功能性变体。

[0341] 在特定的实施方案,双特异性抗原结合片段包含:

[0342] (i) Fab片段,其包含与帕曲妥单抗或其功能性衍生物的VL-CL轻链缔合的VH-CH1重链,和

[0343] (ii) Fab片段,其包含与马妥珠单抗或其功能性衍生物的VL-CL轻链缔合的VH-CH1重链,

[0344] 其中帕曲妥单抗的Fab片段的VH结构域的N末端末端通过多肽接头与马妥珠单抗的Fab片段的CH1结构域的C末端末端连接,

[0345] 其中马妥珠单抗的VH-CH1重链优选由SEQ ID NO:19组成,马妥珠单抗的VL-CL轻链优选由SEQ ID NO:20组成,帕曲妥单抗的VH-CH1重链优选由SEQ ID NO:13组成,和/或其中帕曲妥单抗的VL-CL轻链优选由SEQ ID NO:14组成。

[0346] 在优选的实施方案中,双特异性抗原结合片段包含一条含有SEQ ID NO:26或其功能性变体(或由SEQ ID NO:26或其功能性变体组成)的重链,和两条含有SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:14或其功能性变体(或由SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:14或其功能性变体组成)的不同的轻链。

[0347] 接头的设计

[0348] 多肽接头用于将Ab1的Fab片段的VH结构域的N末端末端连接至Ab2的Fab片段的CH1结构域的C末端末端。

[0349] 在本发明的上下文中,术语“多肽接头序列”是约20至80个氨基酸,优选30至60个氨基酸,仍优选30至40个氨基酸的多肽。多肽接头序列通常由少于80个氨基酸,优选少于60个氨基酸,仍优选少于40个氨基酸组成。有利地,接头序列是“铰链衍生的”,这意味着多肽接头包含一种或多种免疫球蛋白的铰链区的全部或部分序列,该一种或多种免疫球蛋白选自IgA、IgG和IgD,优选是人源的。它也被称为“铰链衍生的多肽接头序列”或“假铰链接头”。所述多肽接头可以包含仅一种免疫球蛋白的铰链区的全部或部分序列。在这种情况下,所述免疫球蛋白可以属于与衍生相邻CH1结构域的免疫球蛋白相同的同种型和亚类,或者属于不同的isotype或亚类。或者,所述多肽接头可以包含不同同种型或亚类的至少两种免

疫球蛋白的铰链区的全部或部分序列。在这种情况下,直接跟随CH1结构域的多肽接头的N端部分优选由免疫球蛋白的全部或部分铰链区组成,该免疫球蛋白属于与衍生所述CH1结构域的免疫球蛋白相同的同种型和亚类。

[0350] 任选地,所述多肽接头可以进一步包含免疫球蛋白的CH2结构域的2至15个,优选5至10个N端氨基酸的序列。

[0351] 在一些情况下,可以使用来自天然铰链区的序列;在其他情况下,可以对这些序列进行点突变,特别是用丙氨酸或丝氨酸取代天然IgG1、IgG2或IgG3铰链序列中的一个或多个半胱氨酸残基,以避免不期望的链内或链间二硫键。

[0352] 在特定的实施方案中,多肽接头序列包含氨基酸序列EPKX1CDKX2HX3X4PPX5PAPELLGGPX6X7PPX8PX9PX10GG (SEQ ID NO:33) 或由其组成,其中X1、X2、X3、X4、X5、X6、X7、X8、X9、X10相同或不同,是任意氨基酸。

[0353] 在特定的实施方案中,X1、X2和X3相同或不同,是苏氨酸(T)或丝氨酸(S)。

[0354] 在另一个特定的实施方案中,X1、X2和X3相同或不同,选自由Ala(A)、Gly(G)、Val(V)、Asn(N)、Asp(D)和Ile(I)组成的组,仍优选地,X1、X2和X3相同或不同,可以是Ala(A)或Gly(G)。

[0355] 或者,X1、X2和X3相同或不同,可以是Leu(L)、Glu(E)、Gln(Q)、Met(M)、Lys(K)、Arg(R)、Phe(F)、Tyr(T)、His(H)、Trp(W),优选Leu(L)、Glu(E)或Gln(Q)。

[0356] 在特定的实施方案中,X4和X5相同或不同,是选自由丝氨酸(S)、半胱氨酸(C)、丙氨酸(A)和甘氨酸(G)组成的组的任意氨基酸。

[0357] 在优选的实施方案中,X4是丝氨酸(S)或半胱氨酸(C)。

[0358] 在优选的方面,X5是丙氨酸(A)或半胱氨酸(C)。

[0359] 在特定的实施方案中,X6、X7、X8、X9、X10相同或不同,是除了苏氨酸(T)或丝氨酸(S)之外的任意氨基酸。优选地,X6、X7、X8、X9、X10相同或不同,选自由Ala(A)、Gly(G)、Val(V)、Asn(N)、Asp(D)和Ile(I)组成的组。或者,X6、X7、X8、X9、X10相同或不同,可以是Leu(L)、Glu(E)、Gln(Q)、Met(M)、Lys(K)、Arg(R)、Phe(F)、Tyr(T)、His(H)、Trp(W),优选Leu(L)、Glu(E)或Gln(Q)。在优选的实施方案中,X6、X7、X8、X9、X10相同或不同,选自由Ala(A)和Gly(G)组成的组。

[0360] 在又一个优选的实施方案中,X6和X7是相同的,并且优选地选自由Ala(A)和Gly(G)组成的组。

[0361] 在优选的实施方案中,多肽接头序列包含序列SEQ ID NO:33或由其组成,其中

[0362] X1、X2和X3相同或不同,是苏氨酸(T)、丝氨酸(S);

[0363] X4是丝氨酸(S)或半胱氨酸(C);

[0364] X5是丙氨酸(A)或半胱氨酸(C);

[0365] X6、X7、X8、X9、X10相同或不同,选自由Ala(A)和Gly(G)组成的组。

[0366] 在另一个优选的实施方案中,多肽接头序列包含序列SEQ ID NO:33或由其组成,其中

[0367] X1、X2和X3相同或不同,是Ala(A)或Gly(G);

[0368] X4是丝氨酸(S)或半胱氨酸(C);

[0369] X5是丙氨酸(A)或半胱氨酸(C);

- [0370] X6、X7、X8、X9、X10相同或不同,选自Ala(A)和Gly(G)组成的组。
- [0371] 特别地,多肽接头序列可以包含选自下组的序列或由其组成:
- [0372] EPKSCDKTHTSPAPAPPELLGGPAAPPAPAPAGG (SEQ ID NO:34);
- [0373] EPKSCDKTHTAPPAPAPPELLGGPAAPPAPAPAGG (SEQ ID NO:35);
- [0374] EPKSCDKTHTSPAPAPPELLGGPGGPPGPGPGGG (SEQ ID NO:36);
- [0375] EPKSCDKTHTSPAPAPPELLGGPAAPPGPAPGGG (SEQ ID NO:37);
- [0376] EPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSTPPTPSPSGG (SEQ ID NO:38);
- [0377] 和EPKSCDKTHTSPSPAPPELLGGPSTPPTPSPSGG (SEQ ID NO:39)。
- [0378] 优选地,多肽接头序列包含SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:35的氨基酸序列或由其组成。
- [0379] 在抗体包含不同Fab片段的实施方案中,分离Fab片段的多肽接头可以是相同的或不同的。
- [0380] 2. 双特异性抗体的设计
- [0381] 本发明还涉及双特异性分子,其包含两个相同的抗原结合臂,每个抗原结合臂由如上所定义的抗原结合片段组成。在优选的实施方案中,双特异性分子是全长抗体。
- [0382] 如果希望获得无Fc介导效应的抗体或对其靶向的两种抗原中的每一种单价的抗体,则抗体将不包含Fc区。在这种情况下,两个抗原结合臂可以连接在一起,例如:
- [0383] -通过由分离Fab片段的多肽接头提供的链间二硫键使抗原结合臂同二聚化;和/或
- [0384] -通过在每个抗原结合臂的C末端添加含有允许形成链间二硫键的半胱氨酸残基的多肽延伸,以及所述多肽延伸的同二聚化,导致铰链样结构;作为非限制性示例,所述多肽延伸可以是例如IgG1、IgG2或IgG3的铰链序列;
- [0385] -通过接头,优选半刚性接头,连接两个抗原结合臂的重链的C末端以形成单一多肽链,并使所述抗原结合臂彼此之间保持足够的距离。
- [0386] 或者,如果期望效应子功能,例如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)、补体依赖性细胞毒性 (CDC) 和/或抗体依赖性吞噬作用 (ADP) 或对两种抗原中的每一种的二价结合,则本发明的多特异性抗体可以进一步包含提供这些效应子功能的Fc结构域。Fc结构域的选择将取决于期望效应子功能的类型。
- [0387] 本发明还提供了双特异性四价抗体,其包含两个与HER-3的结合位点和两个与另一种抗原 (为HER-2或EGFR) 的结合位点。更特别地,本发明涉及包含两个相同抗原结合臂 (从而提供对称抗体形式) 的双特异性抗体,其中每个抗原结合臂包含一个与HER-3的结合位点和一个与HER-2的结合位点。本发明还涉及包含两个相同抗原结合臂 (从而提供对称抗体形式) 的双特异性抗体,其中每个抗原结合臂包含一个与HER-3的结合位点和一个与EGFR的结合位点。
- [0388] 在特定的实施方案中,每个抗原结合臂由如上定义的双特异性抗原结合片段组成。
- [0389] 在优选的实施方案中,接头以四Fab双特异性抗体形式连接两对Fab结构域,其氨基酸序列包含通过接头连接的至少两个Fab的重链序列,接着是铰链序列,接着是与适当的轻链序列共表达的Fc序列。

[0390] 具有IgG样结构的本发明抗体的示例在图1中示出。

[0391] 在特定的实施方案中,双特异性抗体具有免疫球蛋白样结构,并且包含:

[0392] -两个相同的抗原结合臂,每个抗原结合臂由如本文所述的双特异性抗原结合片段组成,和

[0393] -Fc结构域,其优选是功能性的,即其允许激活效应子功能,例如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、吞噬作用和补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0394] 在特定的实施方案,本发明的双特异性抗体包含:

[0395] -由Fc(铰链-CH2-CH3)构建的连续重链

[0396] -接着是抗体1(Ab1)的Fab重链(CH1-VH)和抗体2(Ab2)的连续Fab重链(CH1-VH),后者通过如上所述的多肽接头序列连接,

[0397] -并且在蛋白质表达期间,所得重链组装成同二聚体,同时共表达的Ab1的两条轻链(VL-CL)和Ab2的两条轻链(VL-CL)与其同源重链缔合以形成最终串联F(ab)'₂-Fc分子,

[0398] 其中Ab1或Ab2之一是帕曲妥单抗或其功能性衍生物;

[0399] 并且Ab1或Ab2中的另一个选自由曲妥珠单抗或其功能性衍生物、马妥珠单抗或其功能性衍生物和西妥昔单抗或其功能性衍生物组成的组。

[0400] 应当理解,铰链结构域将CH2结构域的N末端连接至Ab1的CH1结构域的C末端,并且多肽接头序列将Ab1的VH结构域的N末端连接至Ab2的CH1结构域的C末端。

[0401] 在特定的实施方案中,双特异性抗体具有免疫球蛋白样结构,其包含:

[0402] -两个相同的抗原结合臂,每个抗原结合臂由如本文所述的双特异性抗原结合片段组成;

[0403] -免疫球蛋白的二聚化CH2和CH3结构域

[0404] -免疫球蛋白的铰链区,其将抗原结合臂的CH1结构域的C末端连接至CH2结构域的N末端。

[0405] 在特定的实施方案中,CH2和/或CH3结构域是IgG1或IgG4同种型的CH2和CH3结构域或其突变衍生物。优选地,CH2结构域是人IgG1的CH2结构域(SEQ ID NO:41)。优选地,CH3结构域是G1m(3)同种异型的人IgG1的CH3结构域(SEQ ID NO:42)。在另一个特定的实施方案中,CH3结构域是G1m(1,17)同种异型的人IgG1的CH3结构域。

[0406] 在特定的实施方案中,铰链区是IgA、IgG1、IgG4、IgD或其突变衍生物的铰链区,其将抗原结合臂的CH1结构域的C末端连接至CH2结构域的N末端。在特定的实施方案中,铰链区是IgG4的铰链区,具有S228P替换。优选地,铰链区是SEQ ID NO:40的IgG1的区域。

[0407] 在特定的实施方案中,双特异性抗体具有免疫球蛋白样结构,并且包含Fc结构域,其可以是野生型免疫球蛋白Fc结构域或其突变衍生物。在特定的实施方案中,Fc结构域是IgG1 Fc结构域的突变衍生物,或IgG4 Fc结构域的突变衍生物。在特定的实施方案中,所述突变衍生物是与亲本Fc结构域相比至少一种Fc γ 受体(Fc γ R)具有修饰的亲合力的Fc结构域。

[0408] 在特定的实施方案中,双特异性抗体具有免疫球蛋白样结构,并且包含与野生型Fc结构域相比具有与Fc γ 受体降低的结合的Fc结构域,例如IgG1或IgG4 Fc结构域,导致双特异性抗体具有降低的效应子功能。

[0409] 在特定的实施方案中,双特异性抗体具有免疫球蛋白样结构,并且包含与野生型

Fc结构域相比显示不结合或基本上不结合Fc γ 受体的Fc结构域,例如IgG1或IgG4 Fc结构域,导致双特异性抗体具有沉默或降低的效应子功能。

[0410] 所述Fc结构域可以包含减少或消除其与Fc γ 受体结合的一个或多个突变,例如CH2和/或CH3结构域中的突变。所述突变包括氨基酸取代、插入和/或缺失。降低或消除Fc结构域与Fc γ 受体的结合活性的示例性突变包括,但不限于:L/F234A、L235A/E、G236R/de1、G237A、P238S、D265A、H/Q268A、L328R、P329G、S/A330R/S和/或P331S。Fc结构域中的所有突变残基在本文中根据EU命名惯例进行编号。

[0411] 为了清楚起见,“L/F234A”表示亮氨酸或苯丙氨酸(无论是存在于IgG1或IgG4中,分别位于位置234)被丙氨酸替换。为了清楚起见,“L235A/E”表示位置235处的亮氨酸被丙氨酸或谷氨酸取代。为了清楚起见,“G236R/de1”表示位置236处的甘氨酸被精氨酸取代,或位置236处的甘氨酸残基缺失。为了清楚起见,“A/S330R/S”表示丙氨酸或丝氨酸(无论是存在于IgG1或IgG4中,分别位于位置330)被精氨酸或丝氨酸取代。

[0412] 降低或消除IgG1 Fc结构域与Fc γ 受体的结合活性的示例性突变包括,但不限于:L234A、L235A/E、G236R/de1、G237A、P238S、D265A、H268A、L328R、P329G、A330R/S和/或P331S。降低或消除IgG4 Fc结构域与Fc γ 受体的结合活性的示例性突变包括,但不限于:F234A、L235A/E、G236R/de1、G237A、P238S、D265A、Q268A、L328R、P329G和/或S330R。

[0413] 在另一个特定的实施方案中,双特异性抗体具有免疫球蛋白样结构,并且包含与野生型Fc结构域相比具有与Fc γ 受体增加的结合的Fc结构域,例如IgG1或IgG4 Fc结构域,导致双特异性抗体具有提高的效应子功能。

[0414] 所述Fc结构域可以包含增加其与Fc γ 受体结合的一个或多个突变,例如CH2和/或CH3结构域中的突变。增加Fc结构域,例如IgG1或IgG4 Fc结构域,与Fc γ 受体的结合活性的示例性突变包括,但不限于:S239D、I332E、S298A、E333A、K334A、D280H、K290S、S298D、F243L、R292P、Y300L、V305I、P396L、A330L、G236A、L234Y、G236W和/或S298A。在优选的实施方案中,Fc结构域,例如IgG1或IgG4 Fc结构域包含突变S239D和I332E。

[0415] 在特定的实施方案中,Fc结构域,例如IgG1或IgG4 Fc结构域,在CH2结构域中位置297处的Fc聚糖中具有降低的岩藻糖含量。

[0416] 根据特定的实施方案,Fc结构域,例如IgG1或IgG4 Fc结构域,在糖基化位点(Asn 297)上具有N-聚糖,所述N-聚糖具有低于65%、优选低于60%、优选低于55%、优选低于50%、更优选低于45%、优选低于40%、优选低于35%、优选低于30%、优选低于25%、优选低于20%、优选低于10%的岩藻糖基化程度。

[0417] 根据更特定的实施方案,Fc结构域在糖基化位点(Asn 297)上具有N-聚糖,所述N-聚糖具有等于0%的岩藻糖基化程度。因此,本发明提供了双特异性抗体,其包含在其糖基化位点Asn297上具有N-聚糖的Fc结构域,其特征在于Fc结构域的所述N-聚糖不含岩藻糖。

[0418] 有利地,在位置297的糖基化位点处具有修饰的糖基化,特别是低岩藻糖基化的Fc结构域显示出与Fc- γ 受体增加的结合。

[0419] 在特定的实施方案中,Fc结构域包含以下(优选由以下组成):

[0420] -SEQ ID NO:40的铰链结构域;和

[0421] -SEQ ID NO:43的CH2-CH3结构域。

[0422] 在特定的实施方案中,Fc结构域包含SEQ ID NO:44或与SEQ ID NO:44具有至少

80%、90%、95%、96%、97%、98%或至少99%序列同一性的功能性变体(优选由其组成)。在另一个特定的实施方案中,Fc结构域包含SEQ ID NO:82或与SEQ ID NO:82具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或至少99%序列同一性的功能性变体(优选由其组成)。

[0423] 特定的实施方案涉及包含两条重链和四条轻链的双特异性抗体,其中每条重链包含:

[0424] a.免疫球蛋白的Fc区,其包含如上所述的铰链-CH2-CH3结构域或突变衍生物,

[0425] b.该Fc区通过所述铰链结构域与抗体1(Ab1)的Fab CH1-VH重链连接,

[0426] c.其进而通过多肽接头序列与抗体2(Ab2)的Fab CH1-VH重链连接,其中多肽接头序列将Ab1的所述VH结构域的N端与Ab2的所述CH1结构域的C端连接,

[0427] 其中四条轻链包含与其同源重链结构域缔合的Ab1的两条Fab CL-VL轻链和Ab2的两条Fab CL-VL轻链;

[0428] 其中,如上所述,Ab1或Ab2之一是帕曲妥单抗或其功能性衍生物;

[0429] 并且,如上所述,Ab1或Ab2中的另一个选自曲妥珠单抗或其功能性衍生物、马妥珠单抗或其功能性衍生物和西妥昔单抗或其功能性或人源化衍生物组成的组。

[0430] 特定的实施方案涉及包含两条重链和四条轻链的双特异性抗体,其中每条重链包含:

[0431] a.免疫球蛋白的Fc区,其包含如上所述的铰链-CH2-CH3结构域或突变衍生物,

[0432] b.该Fc区通过所述铰链结构域与抗体1(Ab1)的Fab CH1-VH重链连接,

[0433] c.其进而通过多肽接头序列与抗体2(Ab2)的Fab CH1-VH重链连接,其中多肽接头序列将Ab1的所述VH结构域的N端与Ab2的所述CH1结构域的C端连接,

[0434] 其中四条轻链包含与其同源重链结构域缔合的Ab1的两条Fab CL-VL轻链和Ab2的两条Fab CL-VL轻链;

[0435] 其中,如上所述,Ab2是帕曲妥单抗或其功能性衍生物;

[0436] 并且,如上所述,Ab1选自曲妥珠单抗或其功能性衍生物、马妥珠单抗或其功能性衍生物和西妥昔单抗或其功能性或人源化衍生物组成的组。

[0437] 在特定的实施方案中,双特异性抗体包含以下(优选由以下组成):

[0438] a) 两条重链,每条重链包含SEQ ID NO:27或其突变衍生物(优选由SEQ ID NO:27或其突变衍生物组成)和

[0439] b) 四条轻链,两条包含SEQ ID NO:14或其突变衍生物(优选由SEQ ID NO:14或其突变衍生物组成),另外两条包含SEQ ID NO:18或其突变衍生物(优选由SEQ ID NO:18或其突变衍生物组成)。

[0440] SEQ ID NO:27的重链包含:

[0441] -帕曲妥单抗的VH(SEQ ID NO:5)

[0442] -帕曲妥单抗Fab的CH1结构域(具有突变T192E的G1m(1,17)同种异型的人IgG1)(SEQ ID NO:1)

[0443] -AP接头(SEQ ID NO:34);

[0444] -曲妥珠单抗的VH(SEQ ID NO:9)

[0445] -曲妥珠单抗Fab的CH1结构域(具有突变L143Q和S188V的G1m(1,17)同种异型的人IgG1)(SEQ ID NO:2)

- [0446] -人IgG1的铰链(SEQ ID NO:40)
- [0447] -人IgG1的CH2结构域(SEQ ID NO:41)
- [0448] -G1m(3)同种异型的人IgG1的CH3结构域(SEQ ID NO:42)
- [0449] 在特定的实施方案中,双特异性抗体包含以下(优选由以下组成):
- [0450] a) 两条重链,每条重链包含SEQ ID NO:28或其突变衍生物(优选由SEQ ID NO:28或其突变衍生物组成)和
- [0451] b) 四条轻链,两条包含SEQ ID NO:14或其突变衍生物(优选由SEQ ID NO:14或其突变衍生物组成),另外两条包含SEQ ID NO:18或其突变衍生物(优选由SEQ ID NO:18或其突变衍生物组成)。
- [0452] SEQ ID NO:28的重链包含:
- [0453] -曲妥珠单抗的VH(SEQ ID NO:9)
- [0454] -曲妥珠单抗Fab的CH1结构域(具有突变L143Q和S188V的G1m(1,17)同种异型的人IgG1)(SEQ ID NO:2)
- [0455] -AP接头(SEQ ID NO:34);
- [0456] -帕曲妥单抗的VH(SEQ ID NO:5)
- [0457] -帕曲妥单抗Fab的CH1结构域(具有突变T192E的G1m(1,17)同种异型的人IgG1)(SEQ ID NO:1)
- [0458] -人IgG1的铰链(SEQ ID NO:40)
- [0459] -人IgG1的CH2结构域(SEQ ID NO:41)
- [0460] -G1m(3)同种异型的人IgG1的CH3结构域(SEQ ID NO:42)
- [0461] 在特定的实施方案中,双特异性抗体包含以下(优选由以下组成):
- [0462] a) 两条重链,每条重链包含SEQ ID NO:29或其突变衍生物(优选由SEQ ID NO:29或其突变衍生物组成)和
- [0463] b) 四条轻链,两条包含SEQ ID NO:14或其突变衍生物(优选由SEQ ID NO:14或其突变衍生物组成),另外两条包含SEQ ID NO:16或其突变衍生物(优选由SEQ ID NO:16或其突变衍生物组成)。
- [0464] SEQ ID NO:29的重链包含:
- [0465] -帕曲妥单抗的VH(SEQ ID NO:5)
- [0466] -帕曲妥单抗Fab的CH1结构域(具有突变T192E的G1m(1,17)同种异型的人IgG1)(SEQ ID NO:1)
- [0467] -AP接头(SEQ ID NO:34);
- [0468] -西妥昔单抗的VH(SEQ ID NO:7)
- [0469] -曲妥珠单抗Fab的CH1结构域(具有突变L143Q和S188V的G1m(1,17)同种异型的人IgG1)(SEQ ID NO:2)
- [0470] -人IgG1的铰链(SEQ ID NO:40)
- [0471] -人IgG1的CH2结构域(SEQ ID NO:41)
- [0472] -G1m(3)同种异型的人IgG1的CH3结构域(SEQ ID NO:42)
- [0473] 在特定的实施方案中,双特异性抗体包含以下(优选由以下组成):
- [0474] a) 两条重链,每条重链包含SEQ ID NO:30或其突变衍生物(优选由SEQ ID NO:30

或其突变衍生物组成)和

[0475] b) 四条轻链,两条包含SEQ ID NO:14或其突变衍生物(优选由SEQ ID NO:14或其突变衍生物组成),另外两条包含SEQ ID NO:16或其突变衍生物(优选由SEQ ID NO:16或其突变衍生物组成)。

[0476] SEQ ID NO:30的重链包含:

[0477] -西妥昔单抗的VH(SEQ ID NO:7)

[0478] -西妥昔单抗Fab的CH1结构域(具有突变L143Q和S188V的G1m(1,17)同种异型的人IgG1)(SEQ ID NO:2)

[0479] -AP接头(SEQ ID NO:34);

[0480] -帕曲妥单抗的VH(SEQ ID NO:5)

[0481] -帕曲妥单抗Fab的CH1结构域(具有突变T192E的G1m(1,17)同种异型的人IgG1)(SEQ ID NO:1)

[0482] -人IgG1的铰链(SEQ ID NO:40)

[0483] -人IgG1的CH2结构域(SEQ ID NO:41)

[0484] -G1m(3)同种异型的人IgG1的CH3结构域(SEQ ID NO:42)

[0485] 在特定的实施方案中,双特异性抗体包含以下(优选由以下组成):

[0486] a) 两条重链,每条重链包含SEQ ID NO:31或其突变衍生物(优选由SEQ ID NO:31或其突变衍生物组成)和

[0487] b) 四条轻链,两条包含SEQ ID NO:14或其突变衍生物(优选由SEQ ID NO:14或其突变衍生物组成),另外两条包含SEQ ID NO:20或其突变衍生物(优选由SEQ ID NO:20或其突变衍生物组成)。

[0488] SEQ ID NO:31的重链包含:

[0489] -帕曲妥单抗的VH(SEQ ID NO:5)

[0490] -帕曲妥单抗Fab的CH1结构域(具有突变T192E的G1m(1,17)同种异型的人IgG1)(SEQ ID NO:1)

[0491] -AP接头(SEQ ID NO:34);

[0492] -马妥珠单抗的VH(SEQ ID NO:11)

[0493] -曲妥珠单抗Fab的CH1结构域(具有突变L143Q和S188V的G1m(1,17)同种异型的人IgG1)(SEQ ID NO:2)

[0494] -人IgG1的铰链(SEQ ID NO:40)

[0495] -人IgG1的CH2结构域(SEQ ID NO:41)

[0496] -G1m(3)同种异型的人IgG1的CH3结构域(SEQ ID NO:42)

[0497] 在特定的实施方案中,双特异性抗体包含以下(优选由以下组成):

[0498] a) 两条重链,每条重链包含SEQ ID NO:32或其突变衍生物(优选由SEQ ID NO:32或其突变衍生物组成)和

[0499] b) 四条轻链,两条包含SEQ ID NO:14或其突变衍生物(优选由SEQ ID NO:14或其突变衍生物组成),另外两条包含SEQ ID NO:20或其突变衍生物(优选由SEQ ID NO:20或其突变衍生物组成)。

[0500] SEQ ID NO:32的重链包含:

- [0501] -马妥珠单抗的VH(SEQ ID NO:11)
- [0502] -西妥昔单抗Fab的CH1结构域(具有突变L143Q和S188V的G1m(1,17)同种异型的人IgG1)(SEQ ID NO:2)
- [0503] -AP接头(SEQ ID NO:34);
- [0504] -帕曲妥单抗的VH(SEQ ID NO:5)
- [0505] -帕曲妥单抗Fab的CH1结构域(具有突变T192E的G1m(1,17)同种异型的人IgG1)(SEQ ID NO:1)
- [0506] -人IgG1的铰链(SEQ ID NO:40)
- [0507] -人IgG1的CH2结构域(SEQ ID NO:41)
- [0508] -G1m(3)同种异型的人IgG1的CH3结构域(SEQ ID NO:42)
- [0509] SEQ ID NO:14的轻链包含:
- [0510] -帕曲妥单抗的VL(SEQ ID NO:6)
- [0511] -具有突变S114A和N137K的C κ 结构域(SEQ ID NO:3)
- [0512] SEQ ID NO:16的轻链包含:
- [0513] -西妥昔单抗的VL(SEQ ID NO:8)
- [0514] -具有突变V133T和S176V的C κ 结构域(SEQ ID NO:4)
- [0515] SEQ ID NO:18的轻链包含:
- [0516] -曲妥珠单抗的VL(SEQ ID NO:10)
- [0517] -具有突变V133T和S176V的C κ 结构域(SEQ ID NO:4)
- [0518] SEQ ID NO:20的轻链包含:
- [0519] -马妥珠单抗的VL(SEQ ID NO:12)
- [0520] -具有突变V133T和S176V的C κ 结构域(SEQ ID NO:4)
- [0521] 在特定的实施方案中,双特异性抗体包含以下(优选由以下组成):
- [0522] a) 两条重链,每条重链包含SEQ ID NO:85或其突变衍生物(优选由SEQ ID NO:85或其突变衍生物组成)和
- [0523] b) 四条轻链,两条包含SEQ ID NO:14或其突变衍生物(优选由SEQ ID NO:14或其突变衍生物组成),另外两条包含SEQ ID NO:84或其突变衍生物(优选由SEQ ID NO:84或其突变衍生物组成)。
- [0524] 在特定的实施方案中,双特异性抗体包含以下(优选由以下组成):
- [0525] a) 两条重链,每条重链包含SEQ ID NO:86或其突变衍生物(优选由SEQ ID NO:86或其突变衍生物组成)和
- [0526] b) 四条轻链,两条包含SEQ ID NO:14或其突变衍生物(优选由SEQ ID NO:14或其突变衍生物组成),另外两条包含SEQ ID NO:84或其突变衍生物(优选由SEQ ID NO:84或其突变衍生物组成)。
- [0527] 3. 双特异性抗体的产生
- [0528] 对于表达多特异性抗体的通用技术,技术人员可以参考国际专利申请W02013/005194,其通过引用并入本文。
- [0529] 本文还描述了包含编码本发明分子或抗体的蛋白链的序列的多核苷酸。所述多核苷酸还可以包含另外的序列:特别地,它可以有利地包含编码允许所述蛋白质链分泌的前

导序列或信号肽的序列。还公开了用所述多核苷酸转化的宿主细胞。

[0530] 通常,双特异性抗体的氨基酸序列用于设计DNA序列,任选地在针对哺乳动物表达的密码子优化之后。对于重链,合成了编码以下的DNA:信号肽、Fab1的可变区和恒定CH1结构域的DNA,随后是铰链接头以及Fab2的可变区和恒定CH1结构域,以及用于限制性酶消化的侧翼序列。对于轻链,合成了编码以下的DNA:信号肽以及可变和恒定κ区。

[0531] 将编码本发明的双特异性抗原结合片段或抗体的重链和轻链的核酸插入表达载体中。轻链和重链可以克隆在相同或不同的表达载体中。编码免疫球蛋白链的DNA片段可操作地连接至表达载体中的确保免疫球蛋白多肽表达的控制序列。此类控制序列包括信号序列、启动子、增强子和转录终止序列。表达载体通常作为附加体或作为宿主染色体DNA的组成部分在宿主生物体中复制。通常,表达载体将含有选择标志物,例如,四环素或新霉素,以允许检测用期望DNA序列转化的那些细胞。

[0532] 在一个示例中,重链编码序列和轻链编码序列(例如,编码VH和VL、VH-CH1和VL-CL、或全长重链和全长轻链的序列)均包括在一个表达载体中。在另一个示例中,将抗体的重链和轻链中的每一个克隆到单独的载体中。在后一种情况下,可以将编码重链和轻链的表达载体共转染到一个宿主细胞中用于表达两条链,其可以在体内或体外组装以形成完整的抗体。或者,可以将编码重链的表达载体和编码轻链的表达载体引入不同的宿主细胞中用于表达重链和轻链中的每一个,然后可以在体外将其纯化和组装以形成完整的抗体。

[0533] 在特定的实施方案中,用三种独立的表达载体,例如质粒,共转染宿主细胞,导致所有三条链(即分别为重链HC和两条轻链LC1和LC2)的共产生和双特异性抗体的分泌。更特别地,这三种载体可以按照以下2:1:1(HC:LC1:LC2)的分子比率有利地使用。

[0534] 用于表达本文所述抗体的重组载体通常含有编码抗体氨基酸序列的核酸,其可操作地连接至组成型或诱导型启动子。载体可以适于在原核生物、真核生物或两者中复制和整合。典型的载体含有可用于调节编码抗体的核酸的表达的转录和翻译终止子、起始序列和启动子。载体任选地包含含有至少一个独立终止子序列的通用表达盒、允许盒在真核生物和原核生物中复制的序列(即,穿梭载体)以及用于原核和真核系统的选择标志物。

[0535] 如本文所述的双特异性抗体可以在原核或真核表达系统中产生,例如细菌、酵母、丝状真菌、植物、昆虫(例如使用杆状病毒载体)和哺乳动物细胞。本发明的重组抗体不必糖基化或在真核细胞中表达;然而,通常优选在哺乳动物细胞中表达。有用的哺乳动物宿主细胞系的示例是人胚胎肾系(293细胞)、幼仓鼠肾细胞(BHK细胞)、中国仓鼠卵巢细胞/-或+DHFR(CHO、CHO-S、CHO-DG44、Flp-in CHO细胞)、非洲绿猴肾细胞(VERO细胞)和人肝细胞(Hep G2细胞)。

[0536] 优选哺乳动物组织细胞培养来表达和产生多肽,因为本领域已经开发了许多能够分泌完整免疫球蛋白的合适的宿主细胞系,并且该宿主细胞系包括CHO细胞系、各种Cos细胞系、HeLa细胞,优选骨髓瘤细胞系(例如NS0),或转化的B细胞或杂交瘤。

[0537] 在最优选的实施方案中,本发明的双特异性抗体通过使用CHO细胞系,最有利地是CHO-S或CHO-DG-44细胞系或其衍生物产生。这些细胞的表达载体可以包括表达控制序列,例如复制起点、启动子和增强子,以及必要的加工信息位点,例如核糖体结合位点、RNA剪接位点、聚腺苷酸化位点和转录终止子序列。优选的表达控制序列是衍生自免疫球蛋白基因、SV40、腺病毒、牛乳头瘤病毒、巨细胞病毒等的启动子。含有感兴趣的多核苷酸序列(例如,

重链和轻链编码序列和表达控制序列)的载体可以通过熟知的方法转移到宿主细胞中,该方法取决于细胞宿主的类型而不同。例如,磷酸钙处理或电穿孔可以用于其他细胞宿主。(一般参见Sambrook et al.,Molecular Cloning:ALaboratory Manual(Cold Spring Harbor Press,2nd ed.,1989)。当重链和轻链在分开的表达载体上克隆时,将载体共转染以获得完整免疫球蛋白的表达和组装。

[0538] 用载体转化或转染宿主细胞(例如,通过化学转染或电穿孔方法)并在常规营养培养基(或适当修饰)中培养以诱导启动子、选择转化体或扩增编码期望序列的基因。

[0539] 抗体的表达可以是瞬时的或稳定的。

[0540] 优选地,双特异性抗体通过稳定表达的方法产生,其中用编码双特异性抗体的所有多肽链的DNA稳定转染的细胞系能够持续表达,这使得能够制备治疗剂。例如,在CHO细胞系中的稳定表达是特别有利的。

[0541] 一旦表达,可以进一步分离或纯化本发明的完整抗体、其二聚体、单独的轻链和重链或其它免疫球蛋白形式,以获得基本上同质的制剂,用于进一步的测定和应用。可以使用本领域已知的标准蛋白质纯化方法。例如,合适的纯化程序可以包括免疫亲和柱或离子交换柱上的分级、乙醇沉淀、高效液相色谱(HPLC)、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、硫酸铵沉淀和凝胶过滤(一般参见Scopes,Protein Purification(Springer-Verlag,N.Y.,1982)。优选具有至少约90%-95%同质性,并且最优选98%-99%或更高的同质性的基本上纯的免疫球蛋白,用于药物用途。

[0542] 体外生产允许扩大规模以产生大量期望的本发明的双特异性抗体。此类方法可以采用同质悬浮培养物,例如在气升式反应器中或在连续搅拌反应器中,或固定或包埋的细胞培养物中,例如中空纤维、微胶囊中,琼脂糖微珠或陶瓷盒上。

[0543] 4. 治疗用途

[0544] 本发明的双特异性抗体已显示诱导肿瘤生长抑制。

[0545] 本发明的双特异性抗原结合片段或抗体可用作药物,特别是用于治疗癌症。

[0546] 如本文所用,术语“癌症”包括任何癌症,特别是胰腺癌和以HER3、EGFR或HER2表达或过表达为特征的任何其他癌症,并且特别是以HER3和EGFR或HER3和HER2两者的共表达为特征的那些癌症。

[0547] 在一些实施方案中,癌症包含具有野生型KRAS基因的细胞。

[0548] 癌症的实例是实体瘤,例如胰腺癌、头颈癌,包括鳞状细胞癌、结肠直肠癌、乳腺癌、肺癌、胃癌、食道癌、卵巢癌。

[0549] 优选地,癌症是胰腺癌。

[0550] 因此描述了通过向需要这种治疗的所述患者施用根据本发明的抗体来治疗患有癌症的患者的方法。因此,本发明的另一方面是根据本发明的双特异性抗体用于制备用于治疗癌症的药物的用途。

[0551] 本发明的一个方面是包含根据本发明的双特异性分子的药物组合物。本发明的另一方面是根据本发明的双特异性分子用于制备药物组合物的用途。本发明的进一步的方面是用于制备包含根据本发明的双特异性分子的药物组合物的方法。

[0552] 在另一方面,本发明提供了组合物,例如药物组合物,其含有与药物载剂一起配制的、如本文所定义的双特异性分子。

[0553] 如本文所用,“药物载剂”包括任何和所有生理上兼容的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延缓剂等。优选地,载剂适于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊髓或表皮施用(例如通过注射或输注)。

[0554] 本发明的组合物可以通过本领域已知的多种方法施用。施用途和/或模式将取决于期望的结果而不同。

[0555] 为了通过某些施用途施用本发明的双特异性分子或抗体,可能需要用防止其失活的材料包被本发明的双特异性分子或抗体,或者将本发明的双特异性分子或抗体与防止其失活的材料共同施用。例如,本发明的双特异性分子或抗体可以在适当的载剂,例如,脂质体或稀释剂中施用于受试者。药学上可接受的稀释剂包括盐水和水性缓冲溶液。药物载剂包括无菌水溶液或分散体和用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。此类介质和药剂对于药物活性物质的用途是本领域中众所周知的。

[0556] 这些组合物还可以含有佐剂,例如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。可以通过灭菌程序和通过包含各种抗菌剂和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等)来确保防止微生物的存在。还可能期望在组合物中包括等渗剂,例如氯化钠。另外,可注射药物形式的延缓的吸收可以通过包含延迟吸收的药剂来实现。

[0557] 可以改变本发明的药物组合物中的活性成分的实际剂量水平,以便获得可以有效实现特定患者、组合物和施用方式的期望治疗反应而对患者无毒的活性成分的量。

[0558] 所选择的剂量水平将取决于多种药代动力学因素,包括所采用的本发明的特定组合物的活性、施用途、施用时间、治疗持续时间、与所采用的特定组合物联合使用的其他药物、化合物和/或材料、被治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、总体健康和既往病史以及医学领域熟知的类似因素。例如,本发明的双特异性分子或抗体可以以0.2-20mg/kg的剂量从每周3次至每月1次施用。

[0559] 因此,通过参考下面的实施例,将更容易理解如上所述的本发明,这些实施例是通过说明的方式提供的,并且不旨在限制本发明。

实施例

[0560] 实施例1.本发明的双特异性抗体的制备。

[0561] 本发明的双特异性抗体(BsAb)包含2条重链和4条轻链。特别地,BsAb具有4个抗原结合位点(Fab),其中2个Fab来自Ab1,并且另外2个Fab来自Ab2(图1)。因此,它们对2个靶抗原中的每一个具有双倍结合能力(四价)。Fc结构域远端的Fab称为“外部Fab”,并且Fc结构域近端的Fab称为“内部Fab”(图1)。

[0562] 基于4个亲本抗体:帕曲妥单抗(抗HER3)、阿特珠单抗(抗PDL1)、西妥昔单抗(抗EGFR)和马妥珠单抗(抗EGFR)设计了6个抗体。表1中详述了每种构建体的命名法和重链和轻链的序列:

[0563]

名称	外部 Fab	内部 Fab	重链	轻链(外部 Fab)	轻链(内部 Fab)
Patri-trastu-Fc	帕曲妥单抗	曲妥珠单抗	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 18
Trastu-Patri-Fc	曲妥珠单抗	帕曲妥单抗	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 14
Patri-Cetu-Fc	帕曲妥单抗	西妥昔单抗	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 16
Cetu-Patri-Fc	西妥昔单抗	帕曲妥单抗	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 14
Patri-Matu-Fc	帕曲妥单抗	马妥珠单抗	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 20
Matu-Patri-Fc	马妥珠单抗	帕曲妥单抗	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 14

[0564] 表1: 双特异性抗体构建体的描述

[0565] 如图1所示, 每个双特异性抗体包含:

[0566] - 2条相同的重链, 其中每条重链包含 (从N端至C端): 外部Fab的VH结构域和CH1结构域、接头、内部Fab的VH结构域和CH1结构域、恒定Fc结构域 (包含铰链-Ch2-Ch3)。

[0567] - 外部Fab的2条相同轻链, 其中每条轻链包含 (从N端至C端): 外部Fab的VL结构域和CL结构域。

[0568] - 内部Fab的2条相同轻链, 其中每条轻链包含 (从N端至C端): 内部Fab的VL结构域和CL结构域。

[0569] 表2中提供了构成每个构建体的重链和轻链的序列的细节。

[0570]

名称	重链						轻链(外部 Fab)		轻链	
	外部 Fab		内部 Fab						(内部 Fab)	
	VH	CH1	接头	VH	CH1	Fc	VL	CL	VL	CL
Patri-trastu-Fc	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 4
Trastu-Patri-Fc	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 3
Patri-Cetu-Fc	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 4
Cetu-Patri-Fc	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 3
Patri-Matu-Fc	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 4
Matu-Patri-Fc	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 3

[0571] 表2:关于每个双特异性构建体的序列的细节。

[0572] 基因合成

[0573] 在针对哺乳动物表达进行密码子优化后,使用帕曲妥单抗(抗HER3)、阿特珠单抗(抗PDL1)、西妥昔单抗(抗EGFR)和马妥珠单抗(抗EGFR)的氨基酸序列设计DNA序列。这些抗体被称为“亲本”抗体。

[0574] 重链的DNA构建体如下进行设计:

[0575] -信号肽(SEQ ID NO:79),

[0576] -接着是由外部Fab的可变区,随后是外部Fab的恒定CH1结构域组成的序列

[0577] -接着是接头

[0578] -接着是内部Fab的可变区,接着是内部Fab的恒定CH1结构域。

[0579] 在重链DNA构建体的两个末端引入用于限制性酶消化的侧翼序列。

[0580] 外部Fab的轻链的DNA构建体如下进行设计:

[0581] -信号肽(SEQ ID NO:80),

[0582] -接着是外部Fab的可变区,接着是外部Fab的恒定κ区。

[0583] 内部Fab的轻链的DNA构建体如下进行设计:

[0584] -信号肽(SEQ ID NO:80),

[0585] -接着是内部Fab的可变区,接着是内部Fab的恒定κ区。

[0586] 所有DNA构建体均由GeneWis或Eurofins合成。使用PfuTurbo Hot Start进行PCR反应以扩增插入片段,然后分别用NotI和ApaI以及NotI和HindIII消化重链和轻链。将双消化的重链片段与NotI和ApaI消化的Icosagen的专有pQMCF表达载体连接,该载体中已经插

入了后接CH2-CH3结构域的人IgG1铰链。将双消化的轻链片段与NotI和HindIII消化的Icosagen的专有pQMCF表达载体连接。通过双链DNA测序验证质粒DNA。

[0587] 表达和纯化

[0588] 通过以2:1:1=HC:LC1:LC2分子比(1条连续重链(HC)和2条轻链(LC))共转染在单独载体上编码的3个基因,采用瞬时基因表达产生双特异性抗体。对于50mL规模的表达,将Icosagen专有的pQMCF载体中的总共50μg的质粒DNA(25μg重链+每条轻链LC1和LC2 12.5μg)混合在1.5mL Eppendorf管中,1mL含有Icosagen专有的转染试剂007的CHO TF(Xe11 AG)生长培养基,室温孵育20分钟。将混合物以 $1-2 \times 10^6$ 个细胞/mL加载到125mL摇瓶中的CHO TF(Xe11 AG)生长培养基中的49mL CHOEBNaLT85 $1E^9$ 细胞上。将细胞在37°C下摇动2天;在第3天,将温度移至32°C并饲喂培养物;并且第4天,将温度降至30°C;完全生产的持续时间为10天。通过以3,000rpm离心细胞15分钟来收获上清液。通过蛋白质A树脂(MabSelect SuRe 5mL柱)纯化从双特异性抗体收获的上清液。使用0.1M甘氨酸pH 3.5从蛋白质A洗脱抗体,并通过1M TRIS中和洗脱液。采用使用Superdex 200HiLoad26/60pg制备柱的凝胶过滤色谱进一步纯化双特异性抗体,然而,采用Superdex 200Increase 10/300GL纯化Fab-Fab抗体;将所有抗体缓冲交换到PBS pH 7.4中。使用0.2μm Ultra Capsule GF对所有样品进行无菌过滤。使用Ladder Precision Plus Protein Unstained Standards(Biorad)测定表观MW。双特异性抗体通常在瞬时CHO表达中表现出良好的表达滴度。

[0589] SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳

[0590] 为了评估纯化抗体的质量,我们进行了SDS-PAGE。在运行缓冲液中存在十二烷基硫酸钠(SDS)的情况下,抗体在凝胶中迁移的速率主要取决于其大小,从而能够确定分子量。该测定在非还原条件和还原条件下进行;后者允许破坏二硫键,并且因此使单个多肽链(轻链和重链)可视化。

[0591] 所有双特异性抗体的SDS-PAGE在非还原和还原条件下均显示出预期的谱,并且与计算的理论分子量一致。

[0592] 尺寸排阻色谱法分析

[0593] 在工程化蛋白质分子中经常观察到蛋白质聚集。我们进行了分析尺寸排阻色谱(SEC)以测定凝胶过滤色谱后最终抗体制备物的高分子量种类含量。

[0594] SEC色谱图证明较高分子量种类的百分比含量很少(小于5%),并且类似于在CHO表达系统中产生的常规单克隆抗体。结果证实不存在或含有少量聚集体。结果还表明,每个抗体都正确组装。

[0595] 实施例2. 抗体与其同源抗原的单特异性结合

[0596] 通过直接ELISA评估BsAb“Patri-Trastu-Fc”、“Patri-Matu-Fc”和“Patri-Cetu-Fc”对EGFR、HER2和HER3的表观亲和力。将每个BsAb的单特异性结合(即一次针对一种抗原)与亲本MAb进行比较。然后定义每个BsAb和亲本抗体的EC50(在基线和最大结合之间诱导50%中值结合的抗体浓度)。

[0597] 材料和方法

[0598] 在Nunc Maxisorp 96板中,将800ng/ml EGFR His标签、HER2 His标签或HER3 His标签抗原稀释在50μl的1X PBS中。将板在4°C下过夜孵育,然后用0.1% PBS-Tween(PBS-T)洗涤4次,并用含有1% BSA的PBS-T在37°C下饱和1h。在0.1% PBS-T中洗涤4次后,将抗体

(BsAb、mAb和对照) 在1X PBS中以50μl的最终体积稀释,并在37℃孵育1h。在0.1% PBS-T中洗涤4次后,将检测抗体 (HRP偶联的抗人Fc) 以1/40000添加到50μl体积的1X PBS中,并在37℃下孵育1h。将板在0.1% PBS-T中洗涤4次,并向每个孔中添加50μl TMB,在室温并且避光的条件下保持10-30分钟。用50μl 1M盐酸终止反应,然后在450nm波长下读取光密度。

[0599] 结果

[0600] 结果示于下表3。

[0601]

ID	EC50(nM)		
	EGFR	HER2	HER3
马妥珠单抗	0.09	n.a.	n.a.
西妥昔单抗	0.07	n.a.	n.a.
曲妥珠单抗	n.a.	0.09	n.a.
帕曲妥单抗	n.a.	n.a.	0.09
Patri-Trastu-Fc	n.a.	0.09	0.18
Patri-Matu-Fc	0.39	n.a.	0.16
Patri-Cetu-Fc	0.14	n.a.	0.19

[0602] 表3. 与HER3、HER2或EGFR的单特异性结合的ELISA分析。针对HER3、HER2或EGFR抗原的每种亲本抗体 (作为阳性对照) 或BiXAb的半数最大有效浓度 (EC50) 的测量

[0603] 双特异性抗体都能够结合抗原,并显示出与相应亲本抗体非常相似的结合谱。测量了所有构建体对其同源抗原的亚纳摩尔表观亲和力,几乎与其亲本抗体相同。

[0604] 实施例3. 双特异性抗体与其同源抗原的双重结合

[0605] 通过ELISA夹心测定评估抗体与HER3/HER2和HER3/EGFR的双特异性结合。简而言之,将无标签抗原包被在板上,并首先与BsAb一起孵育,然后将第二抗原与His标签一起孵育;最后,抗HIS过氧化物酶抗体用于显色测定。该设计允许评估双特异性抗体对两种抗原的同时结合。

[0606] 材料和方法

[0607] 在Nunc Maxisorp 96板中,将1000ng/ml无EGFR、HER2或HER3标签的抗原稀释在50 μl的1X PBS中。将板在4℃下过夜孵育,然后在0.1%PBS-Tween中洗涤4次,并在37℃用含有1% BSA的PBS-T饱和1h。在0.1%PBS-T中洗涤4次后,将抗体 (BsAb或IRR) 以各种稀释度添加到最终体积为50μl的1X PBS中,并在37℃孵育1h。在0.1% PBS-T中洗涤4次后,将50μl PBS1X中的1000ng/ml EGFR His标签、HER2 His标签或HER3His标签抗原在37℃下孵育1h。用0.1% PBS-T洗涤板4次,并将HRP偶联的抗His标签检测抗体以1/2000添加到50μl 1X PBS中。将板在37℃下孵育1h。将板在0.1% PBS-T中洗涤4次,并在室温避光的条件下添加50μlTMB显色溶液,保持10-30分钟。用50μl 1M盐酸终止反应,然后在450nm波长下读取光密度。

[0608] 结果

[0609] 图2(A)的结合曲线显示Patri-Trastu-Fc以剂量依赖性方式与由可溶性HER2-His显色的固定的HER3(左图)和与由可溶性HER3-His显色的固定的HER2(右图)的同时结合谱。图2(B)的结合曲线显示Patri-Matu-Fc与固定的HER3-Fc和EGFR-His(左图)以及与固定的EGFR-Fc和HER3-His(右图)的同时结合。图2(C)中所示的Patri-Cetu-Fc的结合曲线也是这种情况

[0610] 因此,结果显示本发明的BsAb能够同时结合两种抗原。

[0611] 实施例4. 双特异性抗体抑制AKT和ERK的磷酸化

[0612] 靶向HER家族受体的抗体的主要抗肿瘤作用是其抑制与那些受体相关的信号传导的能力。因此,我们研究了与EGFR、HER2和HER3信号传导相关的两个主要信号传导通路: MAPK/ERK和PI3K/AKT。使用HTRF技术,我们评估了在用EGF+NRG1配体刺激后,通过添加双特异性抗体诱导的pERK和pAKT的磷酸化抑制。

[0613] 材料和方法

[0614] 在第0天,将每孔50,000个细胞接种在96孔平底板中的100 μ l完全培养基(DMEM或RPMI 10% SVF)中。在第1天,通过将10% FCS培养基改为2%FCS培养基来耗竭细胞的FCS。在第2天,去除所有条件下的培养基,并用在100 μ l 2% FCS培养基中稀释的70nM抗体(BsAb或mAb)处理细胞20分钟,在37 $^{\circ}$ C下向其中添加两种配体,16.6nM(100ng/ml)的EGF和3.71nM(100ng/ml)的NRG1,保持另外的10分钟。然后,在30分钟处理结束时,除去培养基并用冷的1X PBS冲洗细胞一次。然后将细胞在搅拌下裂解1h,并根据制造商的建议用HTRF试剂盒pERK Thr202/Tyr204(CisBio $^{\circledR}$, #64ERKPEG)和pAKT Ser473(CisBio $^{\circledR}$, #64AKSPET)测量pERK和pAKT水平。然后在Pherastar读取器(BMG LabTech)上以665nm和620nm读取板。

[0615] 结果

[0616] 对于测试的三种PDAC细胞系(BxPC-3、AsPC-1和CFPAC),所有BsAb(Patri-Trastu-Fc、Patri-Cetu-Fc和Patri-Matu-Fc)在配体诱导后表现出对pAKT和pERK信号传导的强烈抑制(图3B)。类似于HER2/HER3抗体,两种EGFR/HER3双特异性抗体在BxPC-3细胞中阻断几乎100%的基础pAKT信号传导,并且在ASPC1和CFPAC细胞中阻断约85%-90%。它们还有效地抑制了BxPC3细胞中的pERK信号传导(相比于Patri-Trastu-Fc的50%,Patri-Matu-Fc和Patri-Cetux-Fc分别为85%和99%)。所有抗体在BxPC3细胞系中抑制最强的信号传导通路,因为该细胞系是唯一表达WT Kras的细胞系,然而在表达突变Kras的ASPC1和CFPAC中pERK抑制较弱。在所有三种细胞系中,EGFR密度远高于HER2或HER3(图3A)。相较于抗HER2/HER3抗体,预期含有抗EGFR的BiXAb也具有优越性。

[0617] 实施例5. Patri-Trastu-Fc、Patri-Matu-Fc和Patri-Cetu-Fc的体内效用。

[0618] 评估了用Sw1990和PDX P2846 PDAC细胞异种移植的双特异性抗体治疗的小鼠的肿瘤生长和存活。这些模型表达突变的Kras和相似抗原密度的EGFR、HER2或HER3抗原。

[0619] 材料和方法

[0620] 在第0天,向5周龄的Swiss裸免疫缺陷小鼠皮下移植300万个Sw-1990细胞(n=9只小鼠/组)。当肿瘤平均为90mm³时开始治疗。以200 μ l注射腹膜内施用17mg/kg双特异性抗体治疗小鼠。治疗方案为每周2次注射,持续4周。用卡尺测量肿瘤尺寸。当肿瘤尺寸达到1500至2000mm³时,处死小鼠。

[0621] 将尺寸为150mm³的P2846 P7在棕色体下经肩胛骨进行移植。治疗方案保持与Sw-

1990小鼠模型相同。

[0622] 结果

[0623] 在用Sw1990细胞异种移植的小鼠中,Patri-Trastu-Fc、Patri-Matu-Fc和Patri-Cetu-Fc分别将肿瘤生长抑制了42%、62%和69% (图4A)。

[0624] Sw-1990异种移植小鼠的存活对于Patri-Trastu-Fc治疗组提高了11天,对于Patri-Matu-Fc治疗组提高了15天,以及对于Patri-Cetu-Fc治疗组提高了15天。相较于3Patri-2Trastu-Fc EGFR/HER2 BsAb(第46天为1200mm³),EGFR/HER3 BsAb诱导最强的肿瘤生长抑制(第46天3Patri-1Matu-Fc和3Patri-1Cetu-Fc为875mm³)。BsAb 3Patri-1Cetu-Fc提供了更好的总生存率。在该实验中未观察到毒性或体重减轻的迹象。阴性对照媒介物与无关双特异性抗体(BsAb IRR)显示出相似的肿瘤生长和存活。

[0625] 在用PDX P2846异种移植的小鼠中,用Patri-Cetu-Fc将肿瘤生长抑制了87%,用Patri-Trastu-Fc将肿瘤生长抑制了77%,用Patri-Matu-Fc将肿瘤生长抑制了63% (移植后45天) (图4B)。

[0626] 在第80天,相较于BsAb IRR组,Patri-Trastu-Fc和Patri-Cetu-Fc治疗组的用P2846 P7 PDX异种移植的小鼠的存活率提高了70%,以及Patri-Matu-Fc治疗组的存活率提高了20%。相较于Patri-Matu-Fc,BsAb Patri-Trastu-Fc和Patri-Cetu-Fc诱导了最强的肿瘤生长抑制。相较于对照BsAb IRR组,Patri-Trastu-Fc组的生存期提高了34天,Patri-Cetu-Fc组的生存期提高了41天。在该试验中未观察到毒性或体重减轻的迹象。

[0627] 实施例6.Sw-1990异种移植物中BsAb的瘤内渗透。

[0628] 关于相对于常规抗体(150kDa)的大分子量的BsAb(250kDa)的常见问题涉及它们渗透到肿瘤中的能力,特别是渗透到已知具有丰富和致密间质的胰腺肿瘤中的能力。从提取的肿瘤中制备组织学切片;通过免疫组织化学法分析双特异性抗体的Sw1990肿瘤渗透。使用过氧化物酶缀合的抗人Fc标记双特异性抗体。BsAb IRR是靶向CD19和CD3的对照双特异性抗体。NaCl用作阴性对照(图5)。

[0629] 在用Patri-Trastu-Fc、Patri-Matu-Fc和Patri-Cetu-Fc治疗的肿瘤中观察到BsAb的特异性标记。40X的图像显示,尽管间质致密,但肿瘤中心和周边之间的标记是均质的,这表明BsAb渗透了肿瘤。此外,在肿瘤中心的肿瘤上皮细胞膜处观察到明显的标记,证明了BsAb在肿瘤块内部的肿瘤细胞膜处的结合和积累。用NaCl处理的肿瘤未观察到非特异性标记。BsAb IRR在肿瘤外周或间质处微弱检测到,并且在肿瘤上皮细胞处未检测到,这表明BsAb IRR不与肿瘤细胞结合。

[0630] 实施例7.Patri-Trastu-Fc、Patri-Matu-Fc和Patri-Cetu-Fc减少血管生成

[0631] 通过免疫组织化学(IHC)使用抗CD31染色研究血管生成或新血管形成。CD31在内皮细胞上表达,并且因此允许标记血管。血管生成是肿瘤转化的主要参数,尤其是在胰腺癌中。相较于对照(NaCl和BsAb IRR),用3种BsAb治疗后评估血管的比例。对于每种治疗,标记对应于三种不同小鼠的3个肿瘤切片,并通过ImageJ软件分析图像。定量结果以直方图表示,突出显示了根据治疗的血管尺寸的变化(图6A)。

[0632] IHC结果表明,血管尺寸从对照组(NaCl、BsAb IRR)的75μm减小到用本发明的BsAb治疗的组的55μm。这表明BsAb抑制异种移植物新血管形成。

[0633] 实施例8.通过Patri-Trastu-Fc、Patri-Matu-Fc和Patri-Cetu-Fc治疗的肿瘤中

的NK浸润的离体分析。

[0634] 材料和方法

[0635] 通过流式细胞术对来自BsAb治疗的小鼠的切除的Sw1990异种移植物进行NK细胞免疫表型分析。用活/死、小鼠CD45、CD3、CD19、CD49、NKp46、IFN γ 和CD1070特异性抗体标记解离的细胞。使用含有用于阴性选择的藻红蛋白缀合的抗CD3和APC-Cy7缀合的抗CD19抗体,以及用于阳性选择的AF700缀合的抗CD45、APC-缀合的抗CD49b、荧光素缀合的抗NKp46的组分分离NK细胞用于免疫表型分析。在BV786缀合的抗CD107a和细胞内BV421-缀合的抗IFN γ 标记后,通过流式细胞术分析CD45+CD49b+NKp46+NK细胞的激活。

[0636] 结果

[0637] 如CD49+NKp46+分析所示,相较于NaCl和BsAb IRR组,用本发明的BsAb治疗的肿瘤中的NK浸润增加了2倍(图5B)。NK细胞上IFN γ +和CD107a+的增加表明,相较于未治疗的肿瘤,这些肿瘤内NK细胞也被激活,因此可以介导ADCC。

[0638] 实施例9.Patri-Trastu-Fc、Patri-Matu-Fc和Patri-Cetu-Fc对EGFR、HER2和HER3受体降解的离体功效

[0639] 材料和方法

[0640] 对Patri-Cetu-Fc-与BsAb IRR-和NaCl处理的Sw1990异种移植物切片进行EGFR染色。通过分别用NaCl、Patri-Trastu-Fc、Patri-Matu-Fc和Patri-Cetu-Fc处理的每种Sw1990异种移植物提取物的蛋白质印迹分析确定HER受体表达。微管蛋白用作上样对照。在添加第二IRDye800缀合的山羊抗兔IgG(1/20000稀释)之前,使用针对EGFR、HER2和HER3的第一兔单克隆抗体对蛋白质印迹进行可视化。使用LI-COR Odyssey成像系统对荧光进行定量。然后在每组切除的异种移植物中对HER受体表达进行定量并相对于微管蛋白归一化。每个实验在三只Sw1990-异种移植小鼠上进行。BsAb IRR是同时结合人CD19和CD3的阴性对照。

[0641] 结果

[0642] 在X20和X40放大倍数下获得的图像(图5C,上图)显示,相较于与用NaCl或BsAb IRR处理的肿瘤,用Patri-Cetu-Fc治疗的肿瘤中的EGFR信号明显降低。

[0643] 通过来自Sw-1990异种移植物的蛋白质提取物的蛋白质印迹评估EGFR、HER2和HER3总蛋白水平,并通过免疫荧光揭示。总蛋白水平进行定量并相对于微管蛋白归一化。图5C(中图和上图)的结果显示,相较于NaCl和BsAb IRR组,本发明的3种BsAb诱导EGFR、HER2或HER3降解。

[0644] 实施例10.在Sw1990异种移植模型中,与单特异性抗体或其组合相比,双特异性抗体Patri-Cetu-Fc更有效地降低肿瘤生长

[0645] 材料和方法

[0646] 用(1) BisAb IRR抗CD19-CD3(2) 双特异性抗体Patri-Cetu-Fc(17mg/Kg)(3) 西妥昔单抗亲本抗体(10mg/kg)(4) 帕曲妥单抗亲本抗体(10mg/kg)或组合(西妥昔单抗+帕曲妥单抗,5+5mg/kg)(每组9只小鼠)治疗用Sw1990细胞异种移植的小鼠。基于其Fc含量,双特异性抗体和亲本抗体的剂量具有相同的摩尔浓度。

[0647] 在第0天,向Swiss裸免疫缺陷小鼠皮下移植300万个Sw-1990细胞。当肿瘤的平均尺寸为140mm³时开始治疗。治疗方案为每周2次注射,持续4周。评估经治疗小鼠的肿瘤生长

和存活(图7)。

[0648] 结果

[0649] BsAb Patri-Cetu-Fc在体内诱导了对肿瘤生长的强烈抑制(相较于IRR治疗的小鼠,移植后第38天肿瘤生长抑制率为77%)。在移植后第38天,单特异性抗体,西妥昔单抗和帕曲妥单抗分别诱导50%和43%的肿瘤生长抑制。最后,当与IRR治疗的小鼠相比时,两种单克隆抗体的组合显示出65%的肿瘤生长抑制。因此,就肿瘤生长抑制而言,双特异性抗体Patri-Cetu-Fc比单特异性亲本抗体更有效。

[0650] Patri-Cetu-Fc在体内也诱导了强烈的生存益处。就生存益处而言,双特异性抗体Patri-Cetu-Fc显示比单特异性亲本抗体更有效。

[0651] 实施例11

[0652] 设计了包含人源化西妥昔单抗Fab的两个另外的双特异性抗体:

[0653] -“BMX003-010”抗体:其包含帕曲妥单抗Fab结构域(作为外部Fab)和西妥昔单抗Fab结构域的人源化版本(作为内部Fab)。

[0654] -“BMX003-011”抗体,其与BMX003-010相同,除了其在Fc结构域中进一步包含2个突变(S239D和I332E)。

[0655] BMX003-010和BMX003-011均包含人源化西妥昔单抗Fab,其包含:

[0656] -SEQ ID NO:81的VH结构域和SEQ ID NO:2的CH1结构域(对应于SEQ ID NO:83的VH-CH1序列)

[0657] -SEQ ID NO:71的VL结构域和SEQ ID NO:4的CL结构域(对应于SEQ ID NO:84的VL-CL序列)

[0658] BMX003-011与BMX003-010的不同之处在于其在Fc结构域(SEQ ID NO:82的突变Fc结构域)中包含2个突变(S239D和I332E)。

[0659]

名称	重链	轻链(外部Fab)	轻链(内部Fab)
BMX003-010	SEQ ID NO:85	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:84
BMX003-011	SEQ ID NO:86	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:84

[0660] 表4:双特异性构建体“BMX003-010”和“BMX003-011”的序列的细节。

[0661] 将包含人源化西妥昔单抗Fab片段的BMX003-010和BMX003-011的活性与包含亲本西妥昔单抗Fab的“BMX003-001”(“BMX003-001”对应于上述“Patri-cetu-Fc”构建体)的活性进行比较。

[0662] SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳和尺寸排阻色谱分析

[0663] 为了评估纯化抗体的质量,如上所述进行SDS-PAGE和尺寸排阻色谱(SEC)。BMX003-010和BMX003-011双特异性抗体的SDS-PAGE显示了预期的谱。SEC色谱图证实了不存在或含有少量聚集体,并表明每种抗体都正确组装。

[0664] 通过ELISA评估对HER3和EGFR的亲和力

[0665] 通过直接ELISA评估BsAb BMX003-010、BMX003-011和BMX003-001(Patri-Cetu-Fc)抗体对HER3和EGFR的表观亲和力。将每个BsAb的单特异性结合(即一次针对一种抗原)与亲本MAb进行比较。然后定义每个BsAb和亲本抗体的EC50(在基线和最大结合之间诱导50%中值结合的抗体浓度)。如上所述进行ELISA测定。

[0666] 图8和图9显示,双特异性抗体都能够与它们的抗原(分别为HER3和EGFR)结合,其

结合谱与相应的亲本抗体非常相似。

[0667] 流式细胞术结合谱

[0668] 通过流式细胞术测量BMX003-010、BMX003-011和BMX003-001 (Patri-Cetu-Fc) 结合SW-1990细胞的细胞表面上表达的HER3和EGFR蛋白的能力 ($n=3$)。

[0669] 图10的结果显示BMX-003-001以及人源化BMX-003-010和BMX-003-011具有非常相似的EC50和ECmax。

[0670] 磷酸化测定

[0671] 基于Perkin Elmer的Advanced Phospho-ERK和Advanced Phospho-AKT试剂盒。将HCT-116结肠癌细胞在96孔中以50,000个细胞/孔的密度铺板在cDMEM培养基中。平底微量滴定板,并在37°C (5% CO₂) 下过夜生长。移除组织培养基并用无血清培养基 (DMEM+ GlutaMAX) 替换,并将细胞在37°C (5% CO₂) 下继续孵育24hr。移除组织培养基并用重悬于DMEM中的测试制品 (BiXAb、MAb或对照) 替换,并在37°C (5% CO₂) 下孵育20分钟。将生长因子 (16.6nM EGF和3.71nM NRG1) 添加到孔中并继续孵育10分钟。除去培养基,然后用冷的PBS洗涤细胞一次。然后通过添加裂解缓冲液 (在Perkin Elmer的试剂盒中提供) 裂解细胞。通过遵循Perkin Elmer提供的FRET测定试剂盒说明书,实现磷光信号的定量。实质上,将4微升预混合的钬标记的抗体与细胞裂解物在室温下孵育4hr。然后将上清液转移至荧光板读取器,并在665nm和620nm处测量HTRF。

[0672] 结果显示,在配体诱导后,所有双特异性抗体均表现出对pAKT (图11A) 和pERK (图11B) 信号传导的强烈抑制。

[0673] 脱粒测定

[0674] 遵循标准程序制备来自两个独立供体的PBMC,并且在完全RPMI培养基中静置过夜。HCT116结肠癌细胞系在补充有10% FBS的RPMI组织培养基中生长。将20,000个HCT116细胞与100,000个PBMC一起铺在U形底96孔微量滴定板中 (基于NK群体占PBMC的约10%,给出了效应细胞与靶细胞 (E:T) 比例为1:2)。然后将BiXAb测试制品和对照与抗CD107a-AF488mAb一起添加到细胞混合物中,并在37°C (5% CO₂) 下孵育1hr。然后将GolgiStop添加至孔中,并将板继续孵育4hr。然后将抗CD45、抗CD3和CD56 mAb添加至孔中以允许通过典型的FAC染色鉴定NK细胞。通过对NK细胞进行门控,通过CD107a的FACS分析来评估NK脱粒。

[0675] 图12的结果显示西妥昔单抗、BMX003-001和BMX003-010具有可比性。在BMX003-011 (Fc修饰的) 的存在下观察到高得多的脱粒,这表明当与野生型Fc结构域相比时, BMX003-011突变的Fc结构域与Fc γ 受体的结合增加,这导致双特异性抗体具有改善的效应子功能。

[0676] 体内功效

[0677] 在SW1990胰腺癌异种移植模型中评估了BMX003-001 (Patri-Cetu-Fc)、BMX003-010 (人源化Patri-Cetu-Fc) 和BMX003-011 (人源化Patri-Cetu-Fc修饰的) 的体内功效。BMX003-01、BMX003-010和BMX003-011以8.5mg/kg使用,并且BMX对照以17mg/kg使用。方法如上所述。

[0678] 在第35天 (在第32天的最后一次注射之后),用HER3x EGFR BiXab治疗的所有组呈现出比对照组PBS显著更低的肿瘤体积。BMX003-001、BMX-003-010和BMX-003-011BiXAb之间未观察到重大差异。

[0679] 结论

[0680] 结果表明,本发明的双特异性抗体得到了有效生产,并且正确组装。结果还证明了双特异性抗体的治疗特性:

[0681] -当与亲本抗体相比时,以良好的亲和力同时结合其靶标;

[0682] -通过抑制磷酸化信号传导通路,抑制HER3/HER2/EGFR受体的激活;

[0683] -同时降解两种靶向受体;

[0684] -渗透到肿瘤中;

[0685] -抑制新血管形成;

[0686] -调节肿瘤中免疫细胞的浸润;和

[0687] -在体内显著抑制肿瘤生长并提高生存率。

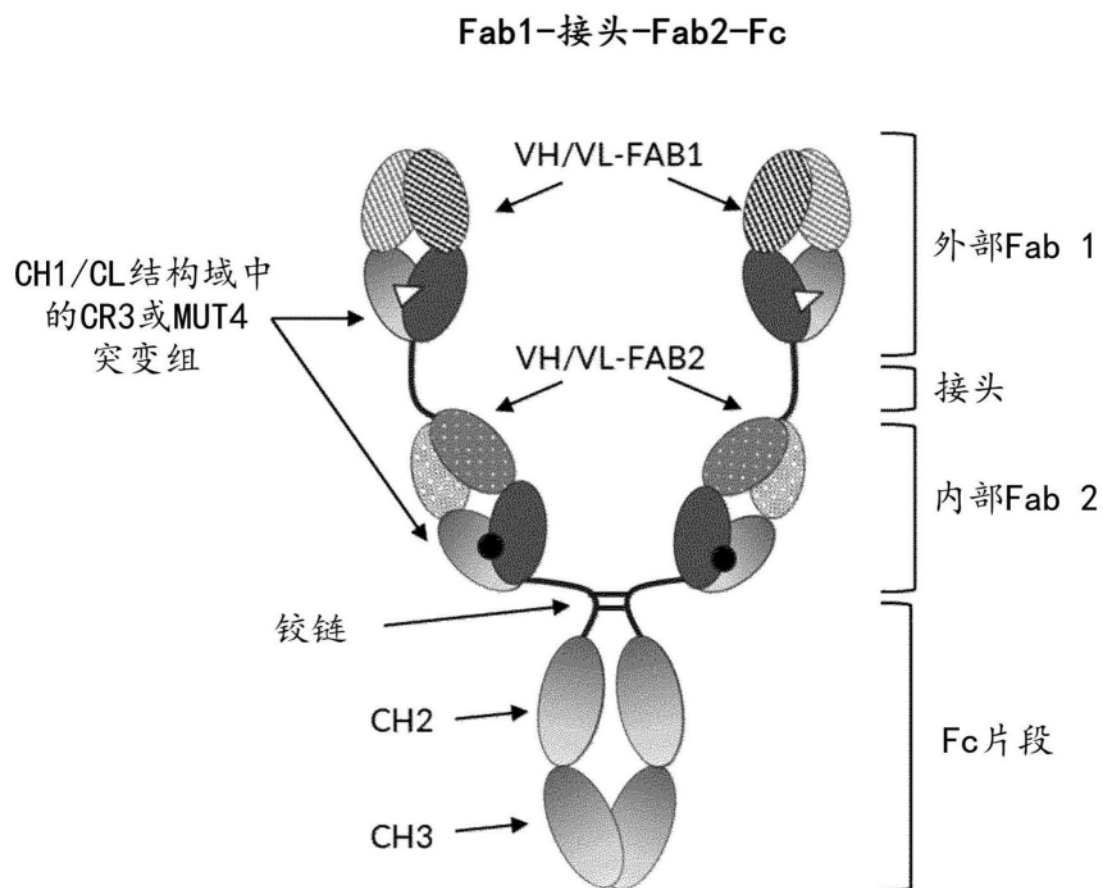


图1

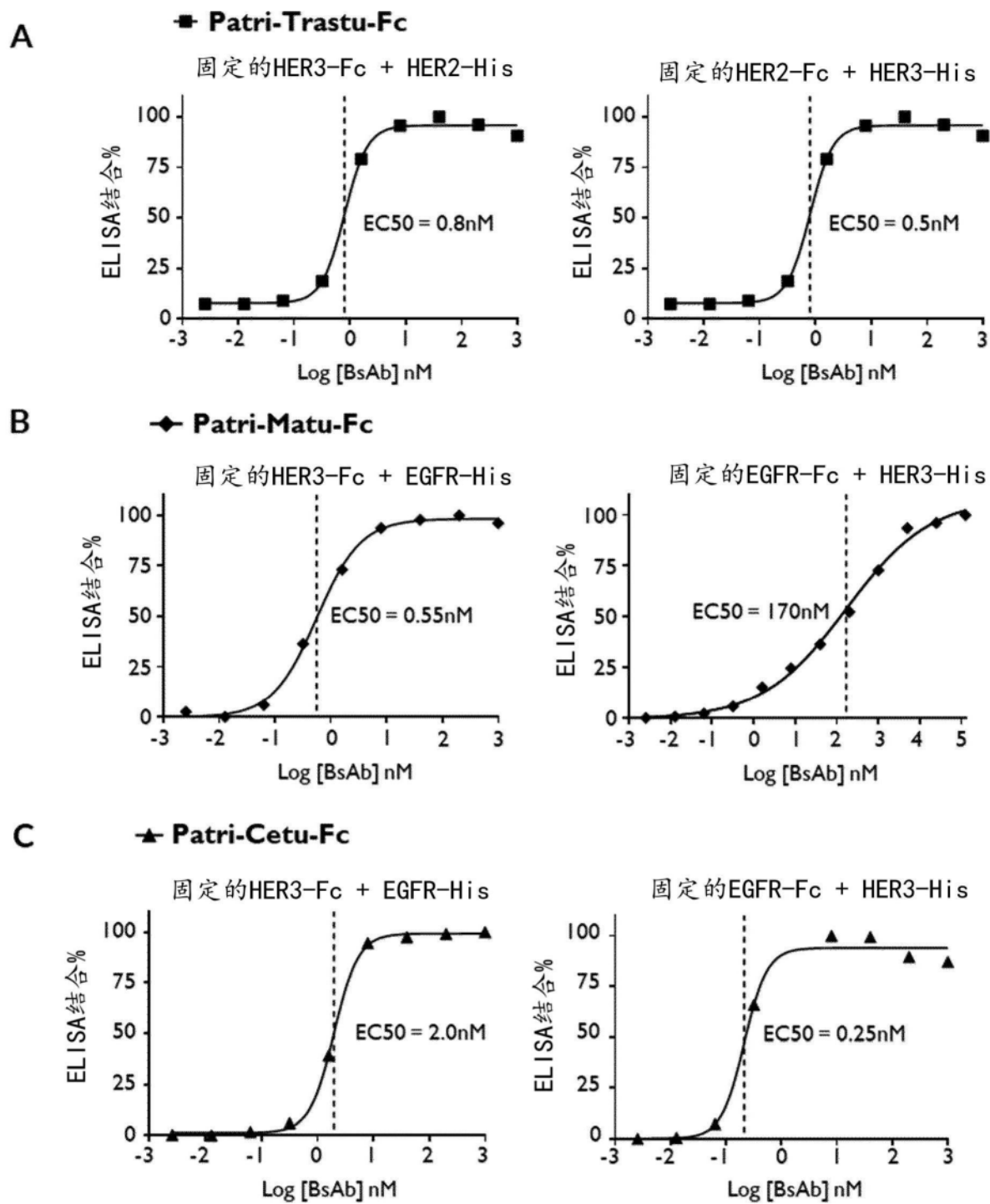


图2

A

	BXPC3	ASPC1	CFPAC
组织	胰腺	胰腺	胰腺
衍生的	初始	转移性腹水	转移性肝
Kras突变	WT	Mut	Mut
EGFR密度			
HER2密度			
HER3密度			

B

配体+ 细胞系	抗HER3/HER2		抗 HER3/EGFR				对照
	Patri-Trastu		Patri-Matu		Patri-Cetux		
	pAKT	pERK	pAKT	pERK	pAKT	pERK	
BXPC3	14	49	2	15	2	1	100
ASPC1	13	60	13	62	11	53	100
CFPAC	26	47	16	26	13	19	100



图3

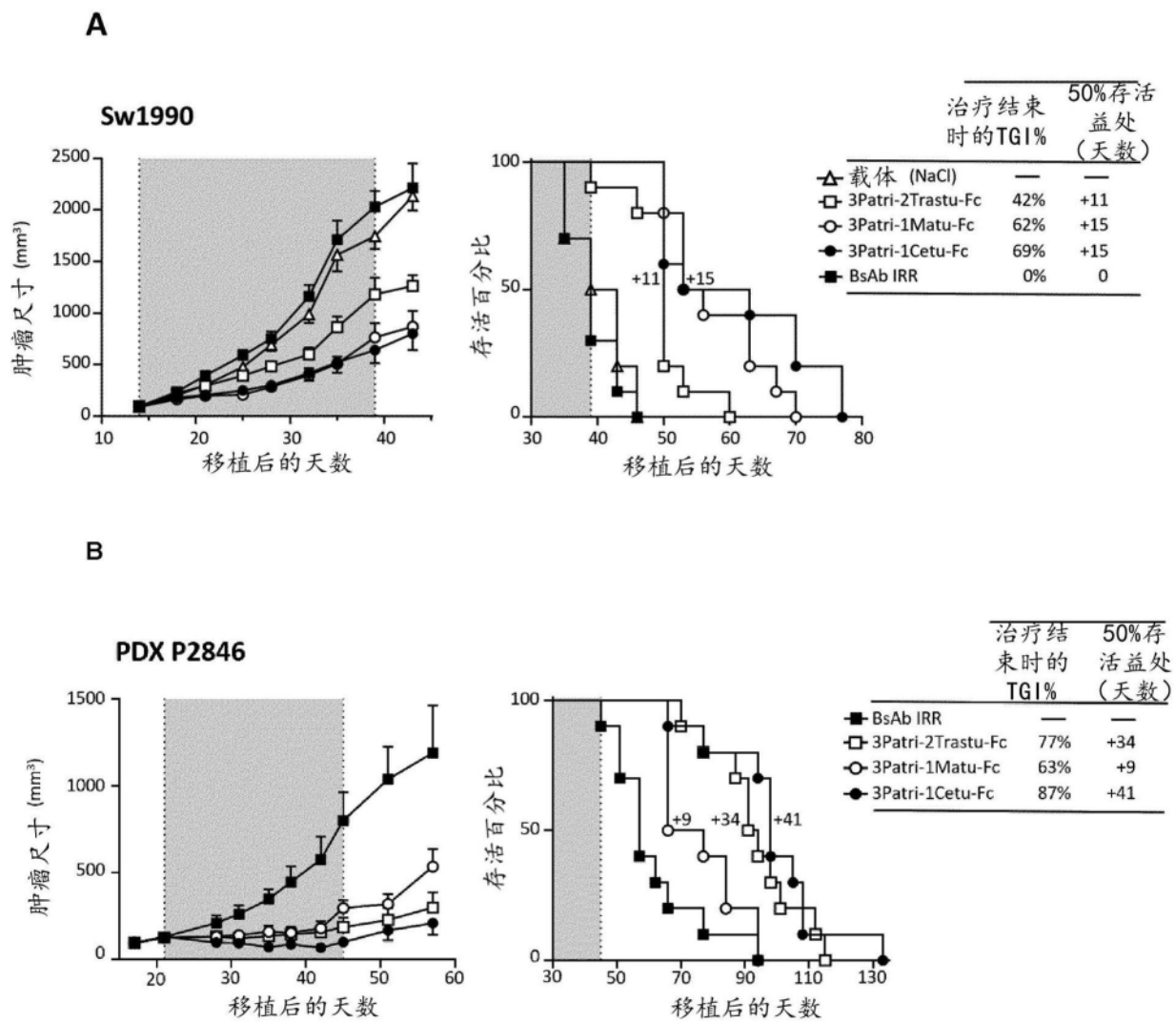


图4

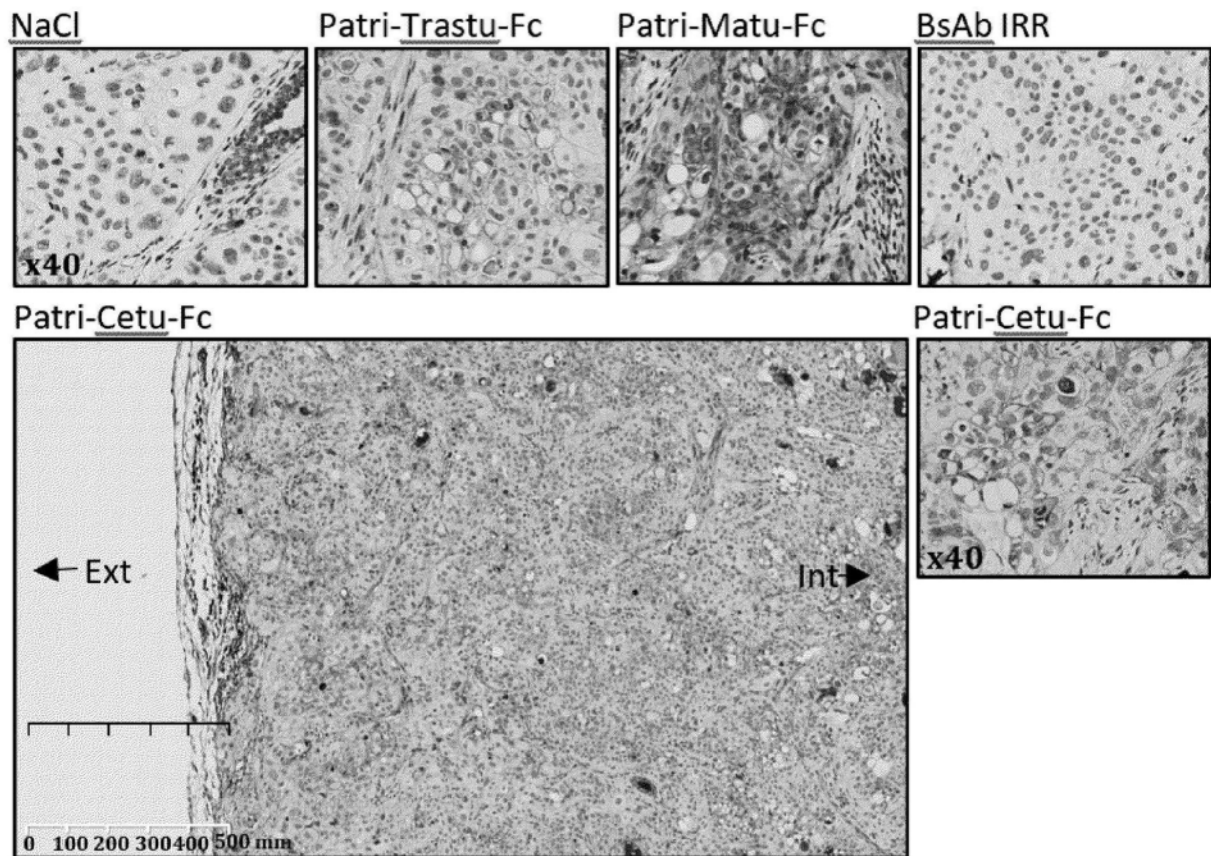


图5

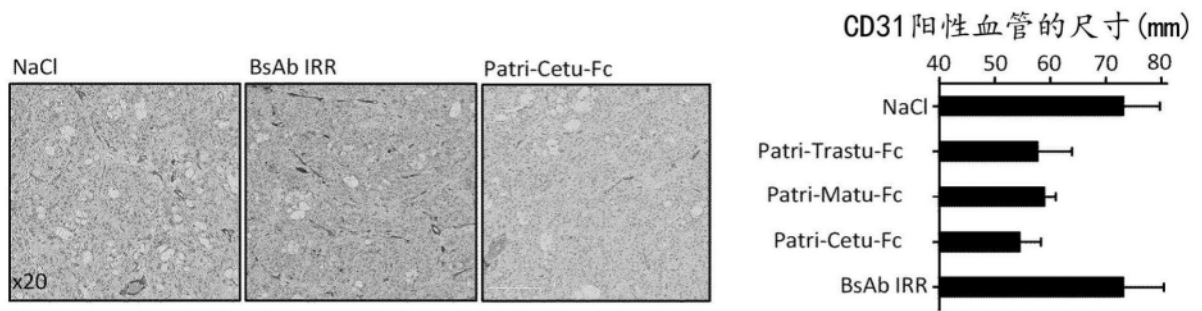
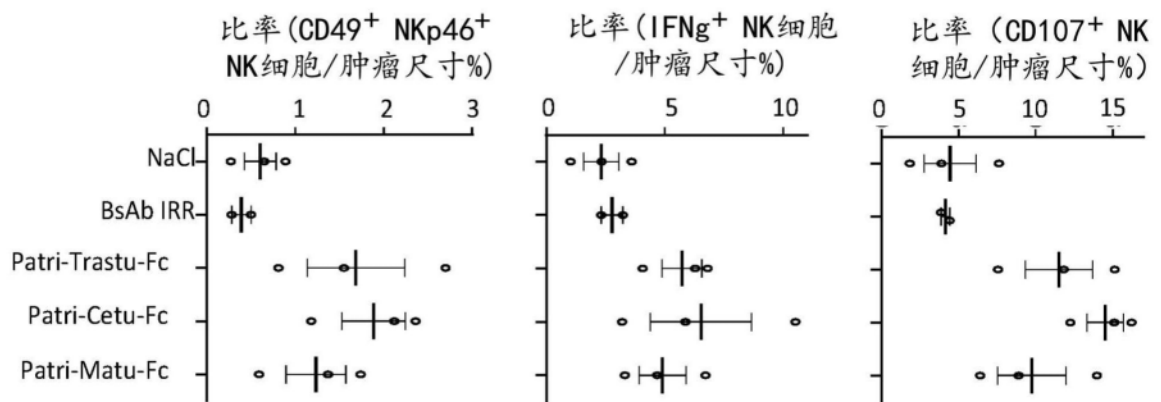
A**B**

图6

C

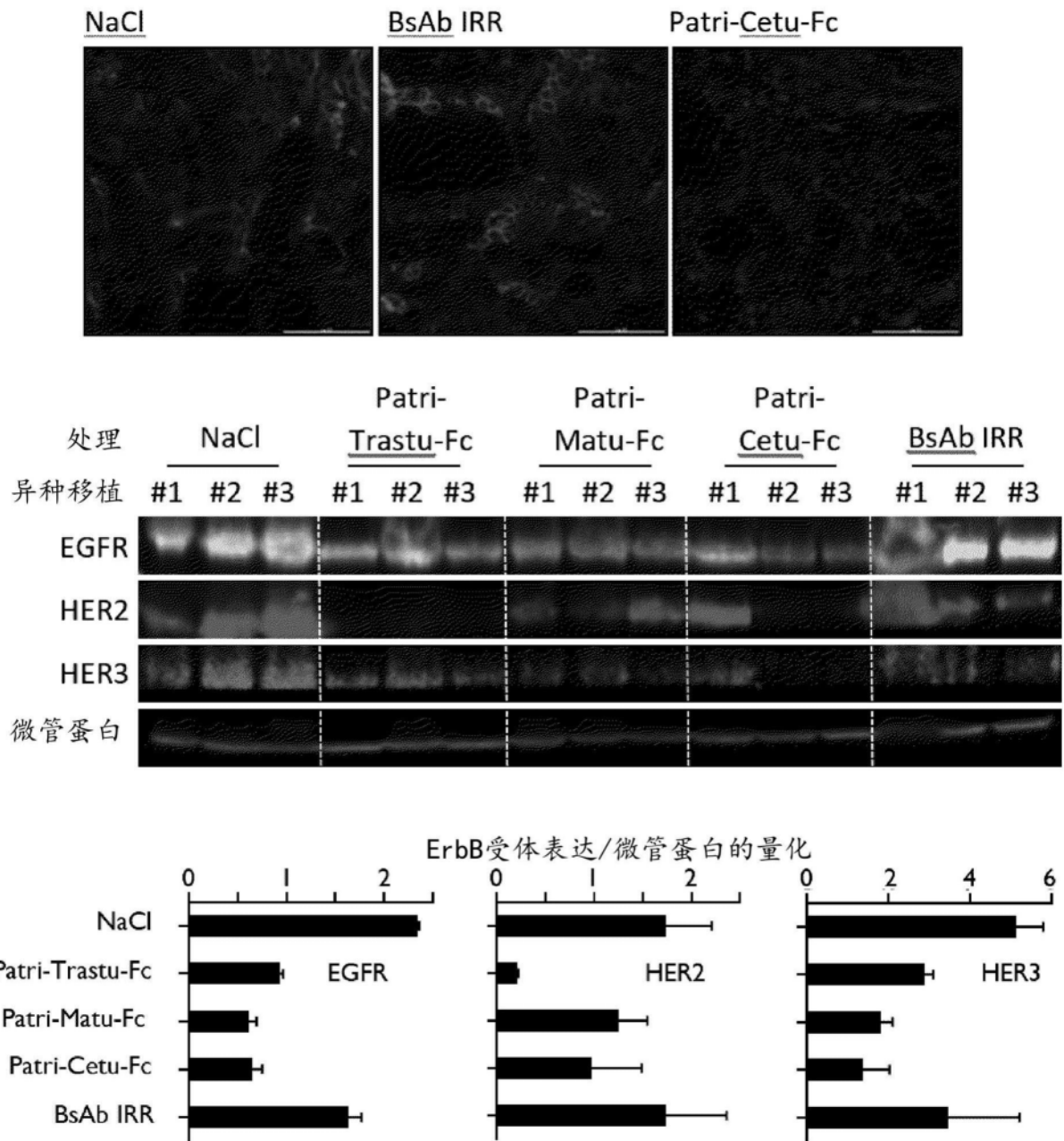


图6(续)

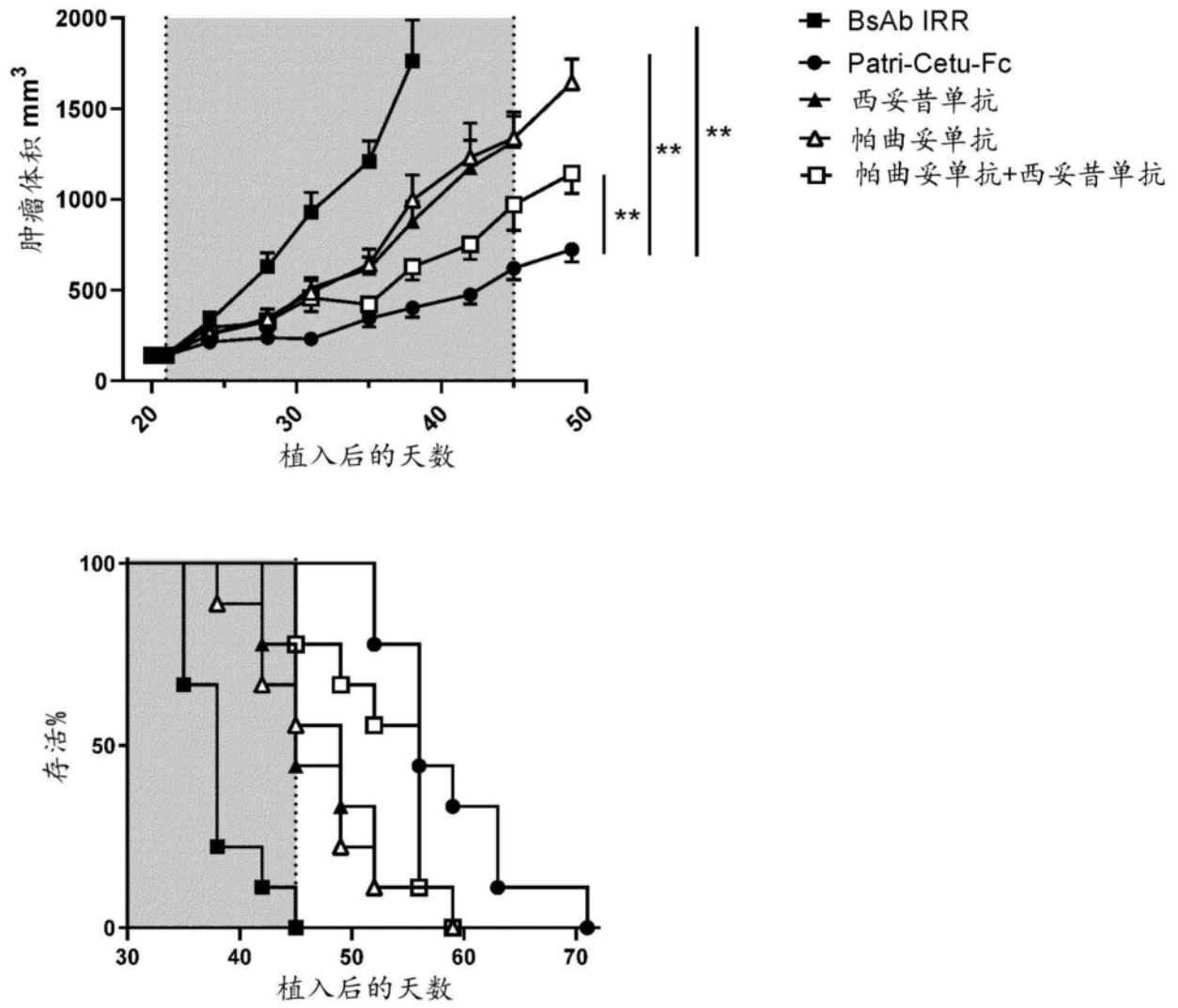
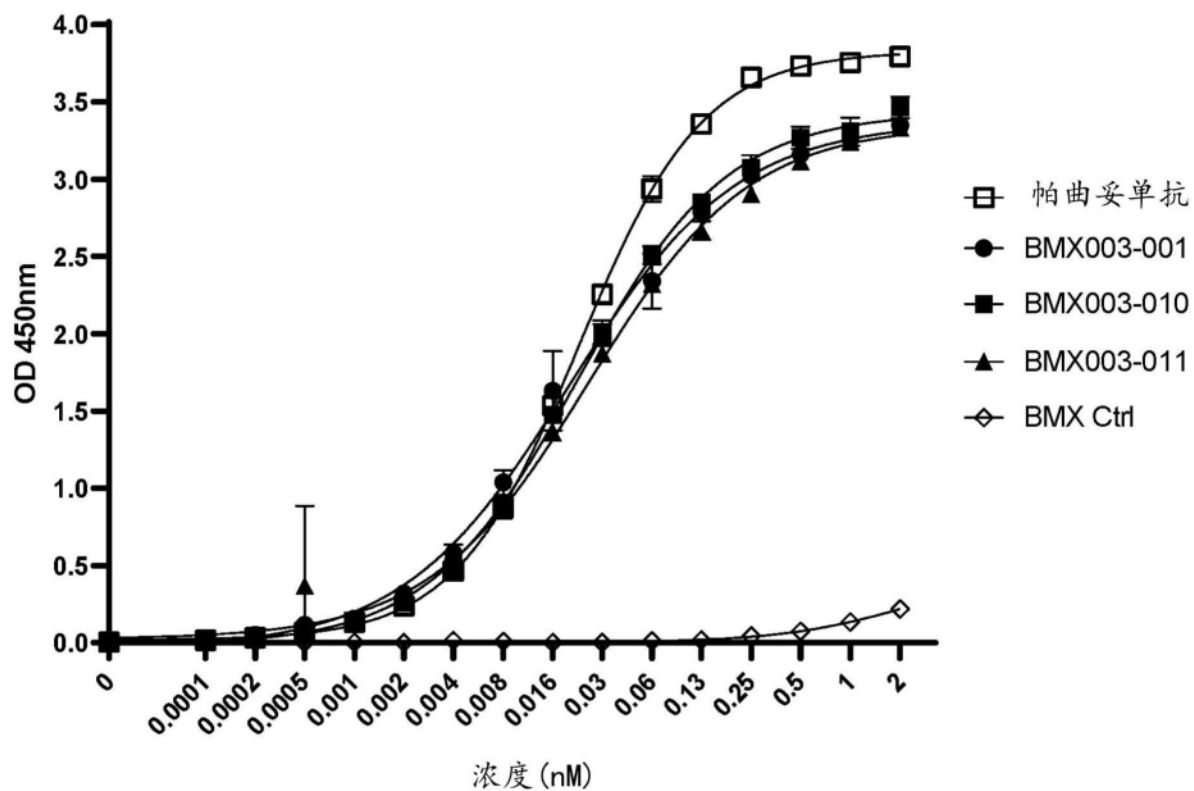
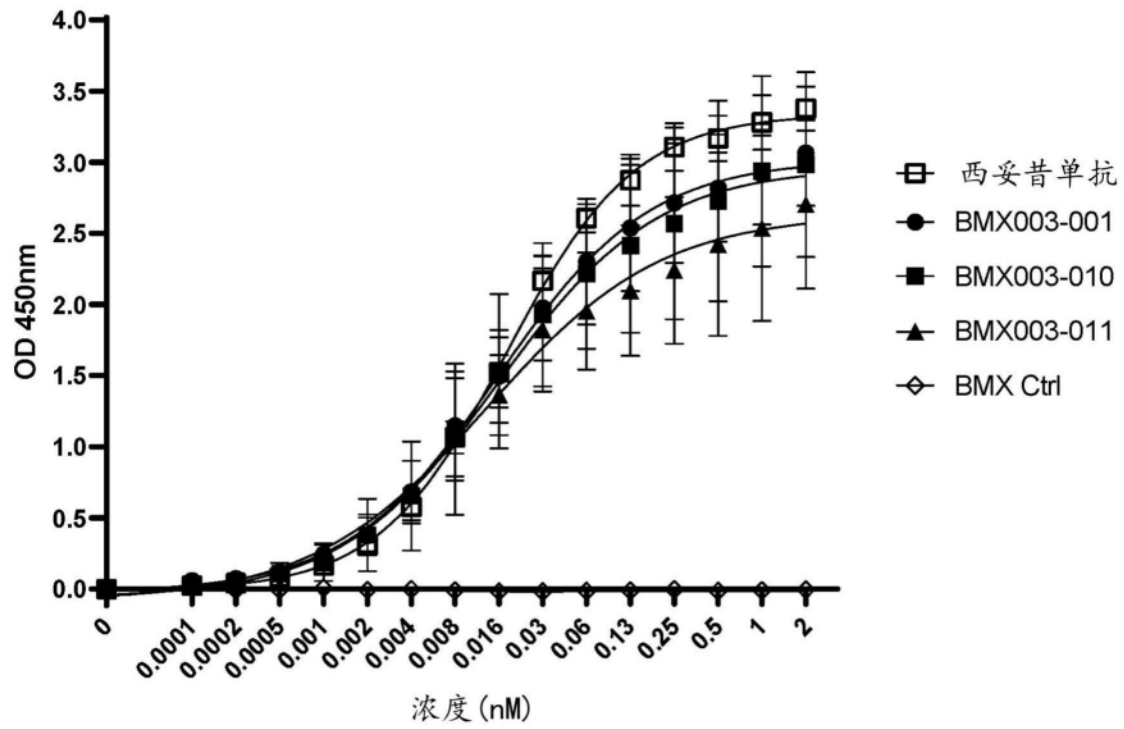


图7



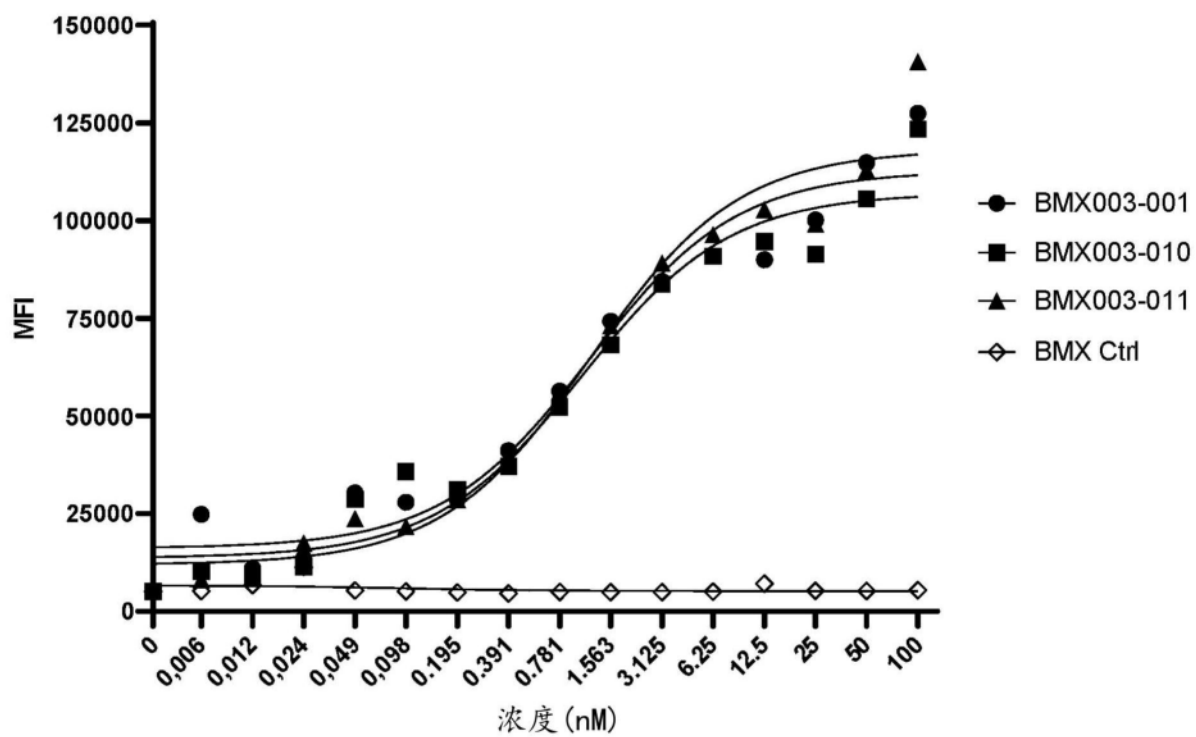
	BMX Ctrl	BMX003-001	BMX003-010	BMX003-011	帕曲妥单抗
底部	0,001904	-0,04086	-0,01792	0,02439	0,01773
顶部	0,4833	3,374	3,432	3,351	3,829
EC50	2,405	0,01972	0,02229	0,02593	0,02258

图8



	BMX Ctrl	BMX003-001	BMX003-010	BMX003-011	西妥昔单抗
底部	-0,01361	-0,02750	-0,06278	-0,08417	-0,01604
顶部	-0,004264	3,020	2,964	2,637	3,341
EC50	0,007195	0,01537	0,01550	0,01299	0,01766

图9



	BMX Ctrl	BMX003-001	BMX003-010	BMX003-011
底部	6641	16128	13639	11914
顶部	5197	112733	107053	118139
LogEC50	-1,052	0,06775	0,02676	0,07698

图10

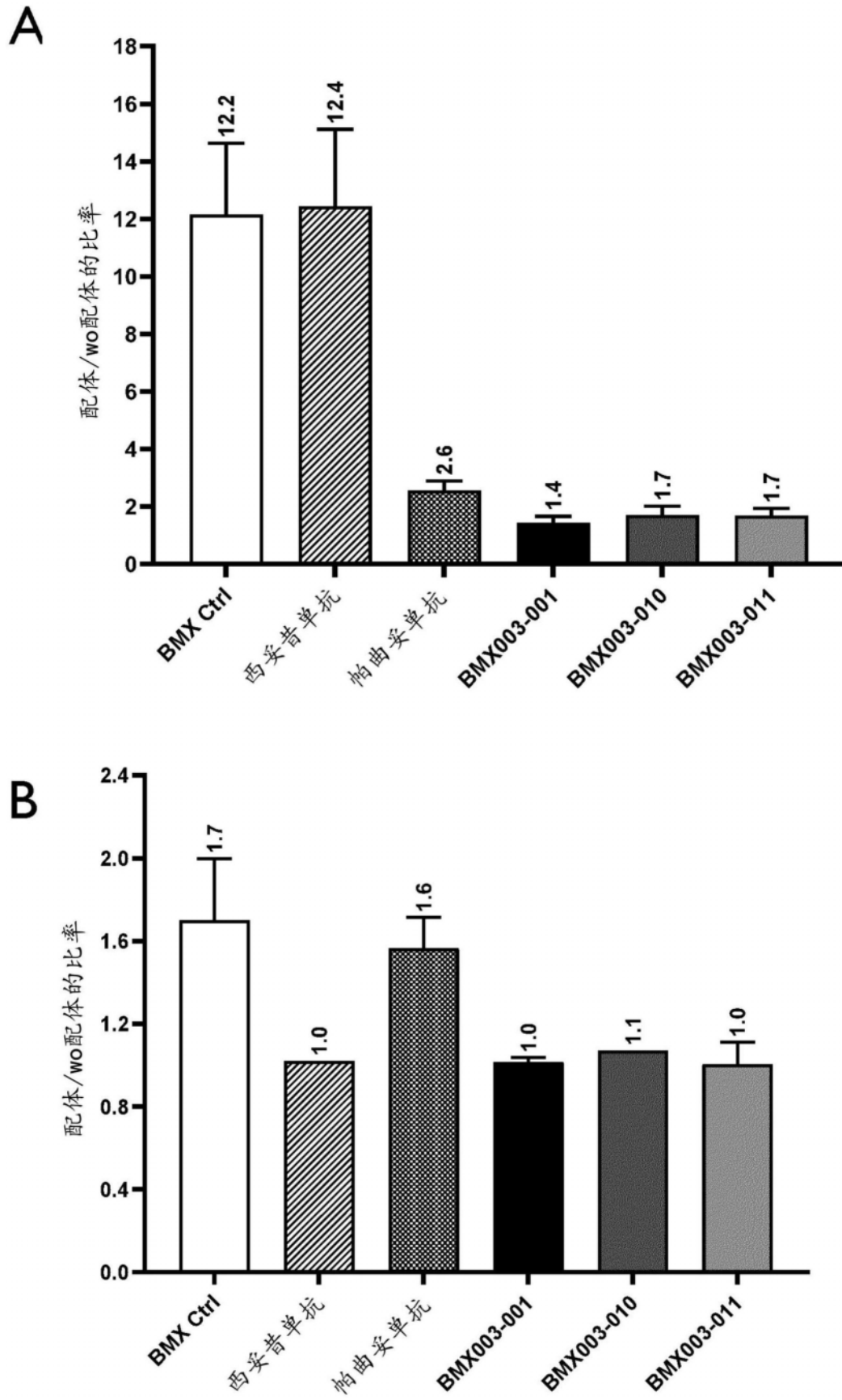


图11

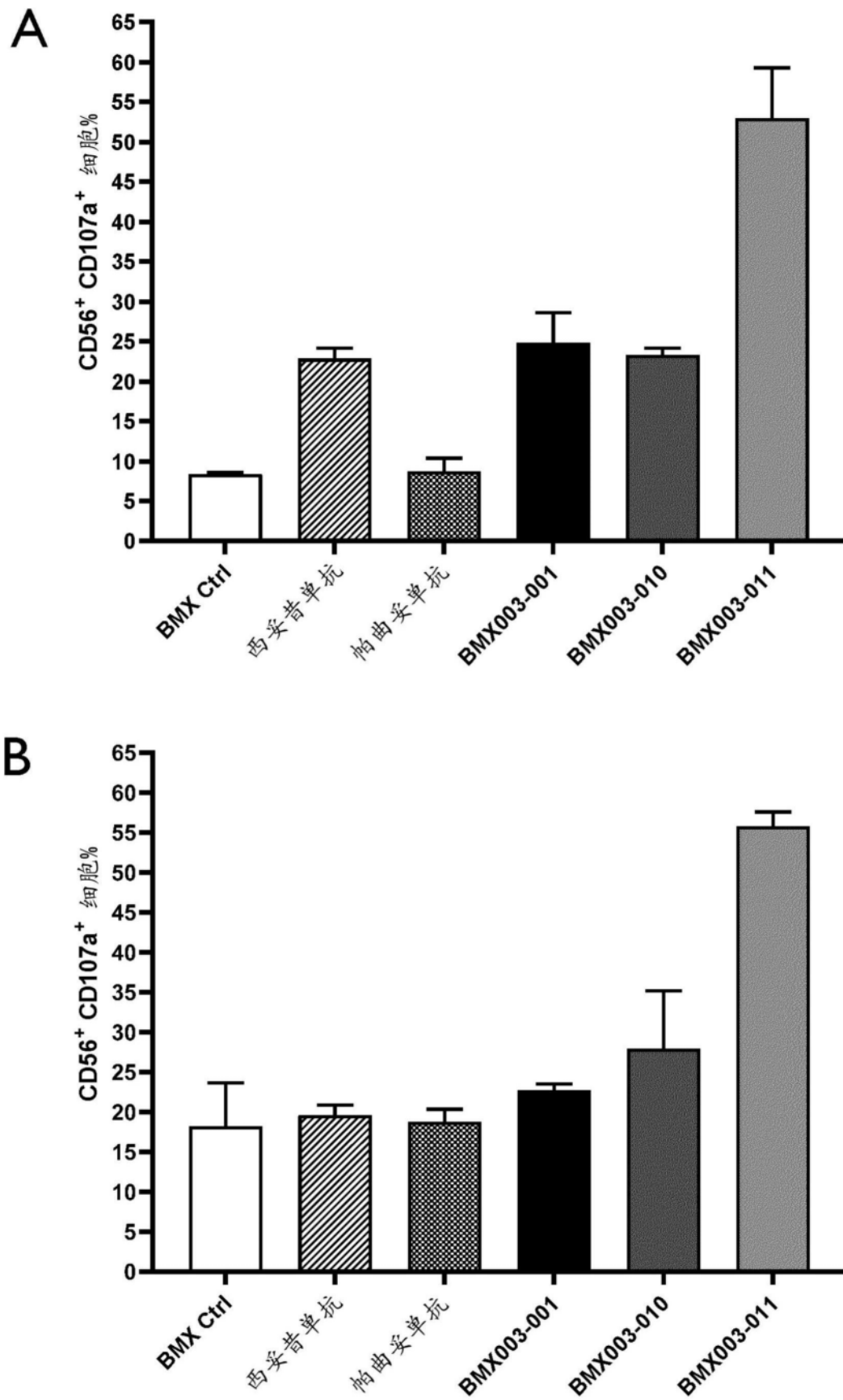


图12

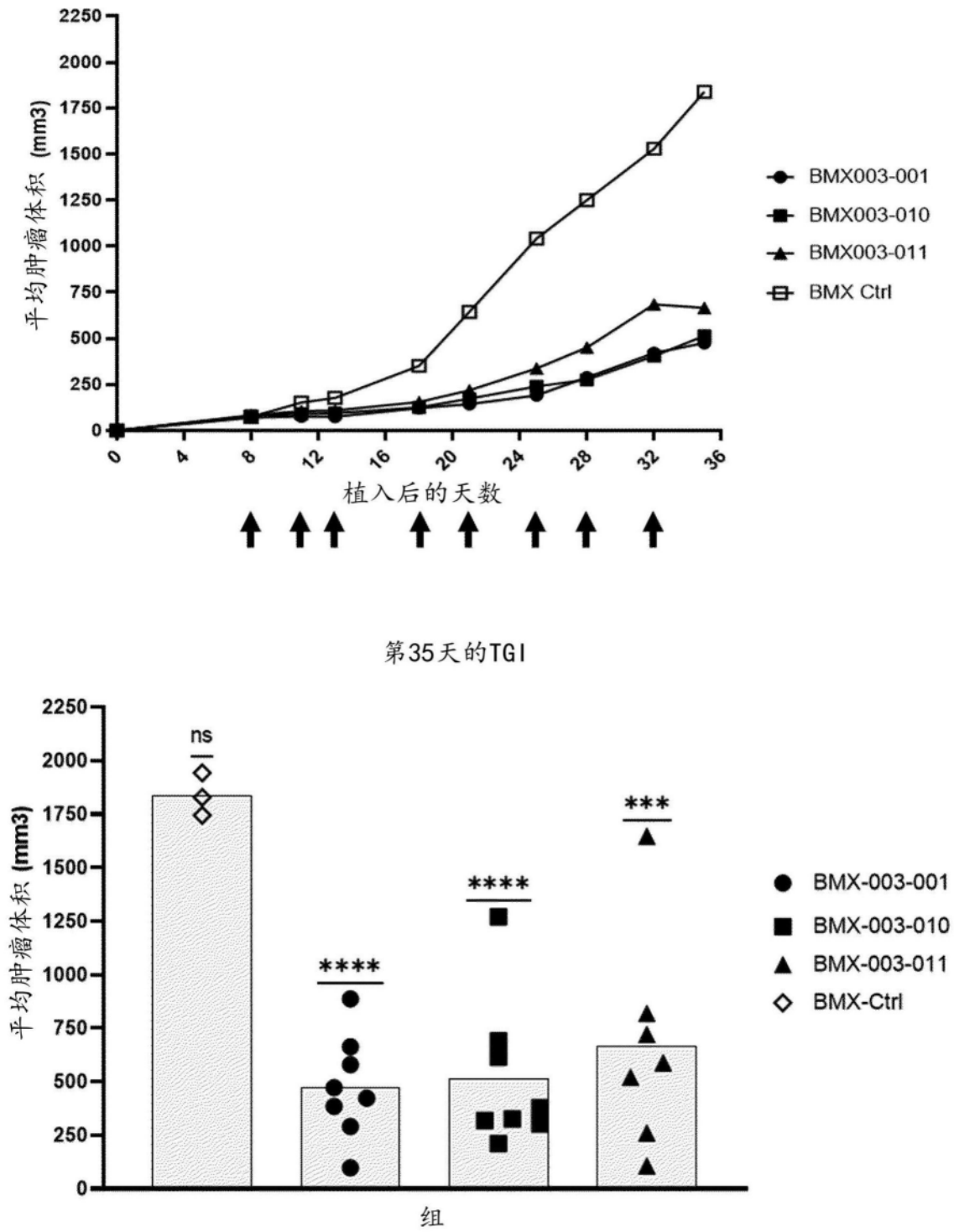


图13