



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 120248121 A

(43) 申请公布日 2025. 07. 04

(21) 申请号 202510302510.2

C07K 16/30 (2006.01)

(22) 申请日 2020.10.02

A61K 47/68 (2017.01)

(30) 优先权数据

A61P 35/00 (2006.01)

62/973,475 2019.10.04 US

(62) 分案原申请数据

202080070426.8 2020.10.02

(71) 申请人 TAE生命科学有限责任公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 S·康 K·莫里森

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司
11287

专利代理师 蒋林清

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

权利要求书1页 说明书61页

C07K 16/32 (2006.01)

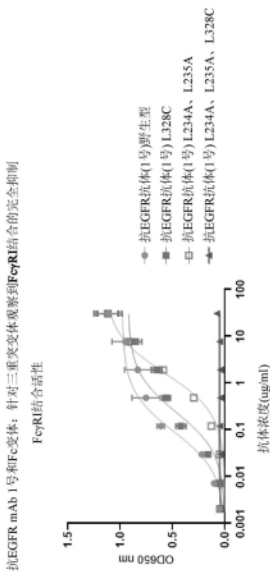
序列表(电子公布) 附图61页

(54) 发明名称

包括FC突变和位点特异性缀合性质的抗体
组合物

(57) 摘要

本申请涉及包括FC突变和位点特异性缀合性质的抗体组合物。本文公开了在L234A、L235A和L328C处含有三重突变的结合Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA的抗体以及制造此类三重突变抗体的方法。因此,所述三重突变抗体含有通过Fc沉默修饰的效应子功能,并且能够在L328C处进行位点特异性缀合以形成抗体-药物缀合物(ADC),所述抗体-药物缀合物可以施用于患者并提供治疗癌症、免疫性和神经性病症的方法。



1. 一种包括三重突变的抗体组合物, 其中所述三重突变包括L234A修饰、L235A修饰和L328C修饰, 并且其中所述三重突变修饰Fc γ 受体结合和抗体效应子功能。
2. 根据权利要求1所述的抗体, 其中所述抗体包括EGFR抗体。
3. 根据权利要求1所述的抗体, 其中所述抗体包括Her2抗体。
4. 根据权利要求1所述的抗体, 其中所述抗体包括Trop2抗体。
5. 根据权利要求1所述的抗体, 其中所述抗体包括CDH3抗体。
6. 根据权利要求1所述的抗体, 其中所述抗体包括肿瘤相关抗原 (TAA) 抗体。
7. 根据权利要求6所述的抗体, 其中所述TAA在表IV中列出。
8. 一种抗体-药物缀合物 (ADC), 其包括,
 - (i) 包括三重突变的抗体组合物, 其中所述三重突变包括L234A修饰、L235A修饰和L328C修饰, 并且其中所述三重突变修饰抗体效应子功能;
 - (ii) 连接子; 和
 - (iii) 药物单元, 其中所述药物单元在L328C位点处特异性缀合。
9. 根据权利要求8所述的ADC, 其中所述抗体组合物包括EGFR抗体。
10. 根据权利要求8所述的ADC, 其中所述抗体组合物包括Her2抗体。
11. 根据权利要求8所述的ADC, 其中所述抗体组合物包括Trop2抗体。

包括FC突变和位点特异性缀合性质的抗体组合物

[0001] 本申请是申请日为2020年10月2日、申请号为“202080070426.8”、名称为“包括FC突变和位点特异性缀合性质的抗体组合物”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2019年10月4日提交的美国临时专利申请号62/973,475的优先权,其内容通过引用完全并入本文。

[0004] 序列表的提交

[0005] 本分案申请的原申请提交了2020年10月2日记录的序列表的纸质副本。本分案申请递交了ST.26格式的序列表。

[0006] 联邦资助研究下的本发明的权利的声明

[0007] 不适用。

技术领域

[0008] 本文所述的发明涉及抗体、其抗原结合片段、抗体药物缀合物(ADC)和抗体硼缀合物(ABC),它们已被工程改造成包含多种功能性质,包含Fc沉默和位点特异性缀合。本发明进一步涉及用于治疗癌症以及免疫性和神经性病症的预后、预防和治疗方法和组合物。

背景技术

[0009] 癌症是全球仅次于冠心病的第二大死因。每年有数百万人死于癌症,仅在美国每年就有超过50万人死于癌症,其中2017年诊断出1,688,780例新癌症病例(美国癌症协会)。尽管心脏病造成的死亡人数已显著下降,但癌症导致的死亡人数普遍呈上升趋势。据估计,到2040年,全世界每年将有超过1600万人死于癌症(来源;国际癌症研究机构,2018年),因此除非医学发展改变当前趋势,否则癌症将超过心脏病成为最大的死因。

[0010] 几种癌症的死亡率很高。特别地,肺癌(占有所有癌症死亡的18.4%)、乳腺癌(占有所有癌症死亡的6.6%)、结肠直肠癌(占有所有癌症死亡的9.2%)、肝癌(占有所有癌症死亡的8.2%)和胃癌(占有所有癌症死亡的8.2%)代表了全球所有年龄段男女癌症死亡的主要原因(GLOBOCAN 2018)。这些和几乎所有其它癌症都有一个共同的致命特征,即它们转移到远离原发性肿瘤的部位,并且很少有例外。此外,即使对于那些最初在原发性癌症中幸存下来的癌症患者,普遍的经验也表明他们的生活发生了巨大的变化。许多癌症患者由于意识到复发或治疗失败的可能性而感到强烈的焦虑。许多癌症患者在治疗后还会出现身体虚弱。此外,许多癌症患者的疾病会复发。

[0011] 尽管癌症疗法在过去几十年中有所改善并且存活率有所提高,但癌症的异质性仍然需要利用多种治疗方式的新治疗策略。在治疗解剖关键部位处的实体瘤(例如,成胶质细胞瘤、头颈部鳞状细胞癌和肺腺癌)时尤其如此,所述实体瘤有时仅限于标准放射疗法和/或化学疗法。尽管如此,这些疗法的不利影响是化疗和放疗耐药,这除了会降低患者生活质量的严重副作用外,还会促进局部复发、远处转移和第二原发性肿瘤。

[0012] 在抗击癌症和其它医学病状中,单克隆抗体(mAb)(G.科勒(G.KOHLER)和C.米尔斯

坦(C.MILSTEIN),自然(Nature),256:495-497(1975))的治疗效用正在实现。现在,MAb已被批准用作移植、癌症、传染病、心血管疾病和炎症的疗法。不同的同种型具有不同的效应子功能。这种功能差异反映在各种免疫球蛋白同种型的不同3维结构中(P.M.阿尔扎里(P.M.ALZARI)等人,免疫学年鉴(Annual Rev.Immunol.),6:555-580(1988))。

[0013] 通常,抗体通过多种机制发挥作用,其中大部分与免疫系统的其它武器有关。抗体可以简单地阻断分子的相互作用,或者它们可以通过C1复合物上的C1q与成簇抗体的相互作用来激活经典补体途径(被称为补体依赖性细胞毒性或CDC)。至关重要的是,抗体还通过Fc受体的参与充当抗体介导的免疫反应和细胞介导的免疫反应之间的联系。

[0014] Fc工程方法已被用于确定Fc结构域与Fc γ 受体和C1q的关键相互作用位点,然后对这些位置进行突变以减少或消除结合,以改善治疗性质,例如调节效应子功能并降低毒性等。参见赫扎尔(HEZAREH)等人,病毒学杂志(J.Virol.),75(24):12161-8(2001年12月)和奥加尼扬(OGANESYAN)等人,结晶学学报D部分:生物结晶学(Acta Crystallographica.D.Biol Crystallogr),64:(第6期):700-4(2008年6月)。

[0015] 此外,抗体-药物缀合物(ADC)是一类新兴的靶向治疗剂,与传统化学疗法相比,其治疗指数有所改善。除了(单克隆)抗体(mAb)和靶标选择之外,药物和连接子一直是ADC开发的焦点。然而,最近,已经探索了缀合物同质性的重要性。据报道,可以通过应用位点特异性缀合技术来改善ADC的药理学特征,所述技术利用表面暴露的半胱氨酸残基,所述半胱氨酸残基被工程改造成抗体,所述抗体然后缀合到连接子药物上,从而产生具有限定的药物/抗体比(DAR)的位点特异性缀合ADC。相对于使用常规赖氨酸和半胱氨酸缀合方法产生的异质混合物,位点特异性缀合ADC通常表现出至少等同的体内效力、改善的PK和扩大的治疗窗口。

[0016] 现有技术公开了几种获得位点特异性缀合和所得ADC的方法。参见例如W02006/034488(Genentech)、萨瑟兰(SUTHERLAND)等人,血液(Blood),122(8):1455-1463(2013)、W02014/124316(Novartis)和US2017/0080103(Synthon Biopharmaceuticals)等。

[0017] 在迄今为止公开的所有现有技术方法中,重点放在了在表面/溶剂暴露位置处、在表现出高硫醇反应性的位置处以及在单克隆抗体的尤其恒定区中的位置处对连接子药物进行位点缀合,目的是改善同质性和药代动力学性质。

[0018] 尽管上述常规的赖氨酸和半胱氨酸缀合方法已产生FDA批准的抗体-药物缀合物,并且正在使用它们来构建目前处于临床前和临床试验中的大量ADC中的大部分,但仍然需要新的缀合策略,其目的在于(进一步)改善ADC的物理化学、药代动力学、药理学和/或毒理学性质,以获得具有可接受的抗原结合性质、体内功效、治疗指数和/或稳定性的ADC。

[0019] 综上所述,对于本领域的技术人员来说显而易见的是,需要一种用于治疗癌症和免疫性疾病的新的治疗模式。通过使用现代抗体工程技术以及新的缀合方法,可以实现一类新的抗体,其总体目标是实现更有效的治疗、减少副作用和降低生产成本。

[0020] 鉴于本领域已知的当前缺陷,本发明的一个目的是提供利用经三重突变工程改造的抗体以降低抗体效应子功能并包含位点特异性缀合点来治疗癌症、免疫性病症和其它疾病的新的和改进的抗体和结合配体以及方法。

发明内容

[0021] 本发明提供了结合到包含但不限于Her2、EGFR、Trop2、CDH3的蛋白质和包含但不限于Her2、EGFR、Trop2、CDH3和的蛋白质的多肽片段的抗体、抗原结合片段、抗体药物缀合物(ADC)、抗体免疫修饰缀合物和抗体硼缀合物(ABC)。在一些实施例中,本发明包括与治疗剂缀合的完全人抗体。在一些实施例中,本发明包括与硼化合物缀合的完全人抗体。在一些实施例中,所述抗体已经被工程改造成经由Fc沉默降低效应子功能。在一些实施例中,所述抗体含有能够缀合到药物部分的位点特异性突变。在一些实施例中,所述抗体包括三重突变,由此使Fc沉默,并且插入位点特异性突变以缀合到药物部分。在另外的实施例中,所述三重突变包括L234A、L235A、L328C。

[0022] 本发明进一步提供了各种免疫原性或治疗性组合物,例如用于治疗表达Her2、EGFR、Trop2、CDH3和如表IV所列的那些的其它肿瘤相关抗原(TAA)的癌症的抗体、抗体药物缀合物和策略。

[0023] 在另一个实施例中,本公开教导了合成三突变体抗体的方法。

[0024] 在另一个实施例中,本公开教导了合成三重突变体抗体并在其位点特异性位置处缀合药物部分的方法。

[0025] 在另一个实施例中,本公开教导了合成单重突变体抗体的方法。

[0026] 在另一个实施例中,本公开教导了合成单重突变体抗体并在其位点特异性位置处缀合药物部分的方法。

[0027] 在另一个实施例中,本公开教导了治疗人类中的癌症、免疫性病症和其它疾病的方法。

附图说明

[0028] 图1.抗Her2 Mab和Fc变体:Fc变体不影响靶标结合。

[0029] 图2.抗EGFR Mab 1号和Fc变体:Fc变体不影响靶标结合。

[0030] 图3.抗EGFR Mab 2号和Fc变体:Fc变体不影响靶标结合。

[0031] 图4.抗EGFR Mab 3号和Fc变体:Fc变体不影响靶标结合。

[0032] 图5.抗Trop2 Mab和Fc变体:Fc变体不影响靶标结合。

[0033] 图6.抗CDH3 Mab和Fc变体:Fc变体不影响靶标结合。

[0034] 图7.抗Her2 Mab和Fc变体:针对三重突变体观察到Fc γ RI结合的完全抑制。

[0035] 图8.抗EGFR Mab 1号和Fc变体:针对三重突变体观察到Fc γ RI结合的完全抑制。

[0036] 图9.抗EGFR Mab 2号和Fc变体:针对三重突变体观察到Fc γ RI结合的完全抑制。

[0037] 图10.抗EGFR Mab 3号和Fc变体:针对三重突变体观察到Fc γ RI结合的几乎完全抑制。

[0038] 图11.抗Trop2 Mab和Fc变体:针对三重突变体观察到Fc γ RI结合的完全抑制。

[0039] 图12.抗CDH3 Mab和Fc变体:针对三重突变体观察到Fc γ RI结合的几乎完全抑制。

[0040] 图13.抗Her2 Mab和Fc变体:针对单重和三重突变体观察到Fc γ RIIA结合的遏制。

[0041] 图14.抗EGFR Mab 1号和Fc变体:针对单重和三重突变体观察到Fc γ RIIA结合的遏制。

[0042] 图15.抗Trop2 Mab和Fc变体:针对单重和三重突变体观察到Fc γ RIIA结合的遏制。

制。

[0043] 图16.抗CDH3 Mab和Fc变体:针对单重和三重突变体观察到Fc γ RIIA结合的遏制。

[0044] 图17.抗Her2 Mab和Fc变体:针对单重和三重突变体观察到Fc γ RIIIA结合的抑制。

[0045] 图18.抗EGFR Mab 1号和Fc变体:针对单重和三重突变体观察到Fc γ RIIIA结合的抑制。

[0046] 图19.抗EGFR Mab 2号和Fc变体:针对单重和三重突变体观察到Fc γ RIIIA结合的抑制。

[0047] 图20.抗EGFR Mab 3号和Fc变体:针对单重和三重突变体观察到Fc γ RIIIA结合的抑制。

[0048] 图21.抗Trop2 Mab和Fc变体:针对单重和三重突变体观察到Fc γ RIIIA结合的抑制。

[0049] 图22.抗CDH3 Mab和Fc变体:针对单重和三重突变体观察到Fc γ RIIIA结合的抑制。

[0050] 图23.抗Her2 Mab和Fc变体:对于Fc变体未观察到FcRn结合的显著减少。

[0051] 图24.抗EGFR Mab 1号和Fc变体:对于Fc变体未观察到FcRn结合的显著减少。

[0052] 图25.抗EGFR Mab 2号和Fc变体:对于Fc变体未观察到FcRn结合的显著减少。

[0053] 图26.抗EGFR Mab 3号和Fc变体:对于Fc变体未观察到FcRn结合的显著减少。

[0054] 图27.抗Trop2 Mab和Fc变体:对于Fc变体未观察到FcRn结合的显著减少。

[0055] 图28.抗CDH3 Mab和Fc变体:对于Fc变体未观察到FcRn结合的显著减少。

[0056] 图29.抗Her2抗体和Fc变体对Fc γ RI、IIA、IIB、IIIA、IIIB和FcRn的结合动力学分析。三重突变体对所有Fc γ R同种型表现出显著结合抑制,但对FcRn未表现出结合抑制

[0057] 图30.抗Her2抗体和Fc变体对Fc γ RI的结合动力学分析。与野生型和单重突变相比,三重突变的解离速率更快。

[0058] 图31.抗HER2 mAb和Fc变体:对于Fc变体观察到ADCC的降低。

[0059] 图32.抗EGFR mAb 1号和Fc变体:对于Fc变体观察到ADCC的降低。

[0060] 图33.抗Trop2 mAb和Fc变体:对于Fc变体观察到ADCC的降低。

[0061] 图34.抗CDH3 mAb和Fc变体:对于Fc变体观察到ADCC的降低。

[0062] 图35.抗HER2 mAb和Fc变体:对于Fc变体观察到CDC的降低。

[0063] 图36.抗EGFR mAb 1号和Fc变体:对于Fc变体观察到CDC的降低。

[0064] 图37.抗Trop2 mAb和Fc变体:对于Fc变体观察到CDC的降低。

[0065] 图38.抗CDH3 mAb和Fc变体:对于Fc变体观察到CDC的降低。

[0066] 图39.抗HER2 mAb和Fc变体:对于Fc变体观察到C1q结合的减少。

[0067] 图40.抗EGFR mAb 1号和Fc变体:对于Fc变体观察到C1q结合的减少。

[0068] 图41.抗Trop2 mAb和Fc变体:对于Fc变体观察到C1q结合的减少。

[0069] 图42.抗CDH3 mAb和Fc变体:对于Fc变体观察到C1q结合的减少。

[0070] 图43.与专有有效载荷 (LOL1) 缀合的抗Her2 Mab三重突变体的反相柱色谱图谱。未缀合三重突变体抗HER2 mAb (峰1)、缀合三重突变体抗HER2 mAb (峰2) 的叠加UV迹线。

[0071] 图44.LOL1缀合三重突变体抗HER2 mAb的完整质量分析证实缀合物具有100%位

点特异性。(A).全谱,(B).放大的LC区域,(C).放大的HC区域。

[0072] 图45.与vcMMAE缀合的抗HER2 mAb(A)和抗EGFR mAb(B)的L328C变体的反相色谱图谱。具有单个有效载荷的重链(H1)是主要物种,从而表明缀合具有位点特异性,并且有效载荷驻留在Cys328上而不在铰链区内。

[0073] 图46.与vcMMAE缀合的抗TROP2 mAb的L328C变体的反相色谱图谱。(A).轻链(峰1)、未缀合重链(峰2)、具有1个有效载荷的缀合重链(峰3);具有2个和3个有效载荷的缀合重链(峰4-5)。(B).mAb和ADC的叠加UV214nm迹线。抗TROP2抗体的未缀合L328C变体(黑色);抗TROP2抗体的vcMMAE缀合L328C变体(红色)。

[0074] 图47.与vcMMAE缀合的三重突变体抗TROP2 mAb的反相HPLC分析。(A).轻链(峰1)、未缀合重链(峰2)、具有1个有效载荷的缀合重链(峰3);分别具有2个和3个有效载荷的缀合重链(峰4-5)。(B).mAb和ADC的叠加UV214nm迹线。抗TROP2抗体的未缀合L328C变体(黑色);抗TROP2抗体的vcMMAE缀合L328C变体(红色)。

[0075] 图48.与vcMMAE缀合的抗EGFR mAb的L234A、L235A、L328C变体的反相色谱图谱。(A).具有三重Fc突变的未缀合抗EGFR mAb 3号的图谱。(B).具有三重Fc突变的未缀合抗EGFR mAb 1号的图谱。(C).具有三重Fc突变的vcMMAE缀合抗EGFR mAb3号的图谱。(D).具有三重Fc突变的vcMMAE缀合抗EGFR mAb 1号的图谱。

[0076] 图49.基于反相色谱数据(图48中提供)的峰分配和DAR计算的一个实例。未缀合mAb(对照)用于标识重链和轻链的保留时间和UV250/280比。这些参数是正确峰分配和DAR确定所必需的。

[0077] 图50.所得ADC的分析属性的汇总:示出了vcMMAE或LOL1缀合mAb以及单重或三重Fc变体的平均DAR、体积排阻色谱法(SEC)的单体百分比和DAR1重链百分比。

[0078] 图51.vcMMAE-肽片段化后的特征子离子。

[0079] 图52.与vcMMAE缀合的抗EGFR抗体1号以及三重突变体的序列覆盖率。(A).重链,(B).轻链。

[0080] 图53.用胰蛋白酶消化后的肽的代表性TIC色谱图。(A)具有三重突变的非缀合抗EGFR抗体1号,(B)具有三重突变的vcMMAE缀合抗EGFR抗体1号。

[0081] 图54.通过ACPAPIEK重链肽的MS/MS证实具有三重突变的抗EGFR抗体1号的缀合位点。示出了ACPAPIEK-脲甲基(例如,烷基化mAb,A、B)和ACPAPIEK-vcMMAE(C、D)肽的完整MS(A、C)和MS/MS片段化(B、D)。代表肽或vcMMAE的片段分别由实心或空心箭头指示。

[0082] 图55.经由ACPAPIEK重链肽的MS/MS对具有单重突变的抗EGFR抗体1号ADC中的缀合位点的证实。示出了ACPAPIEK-脲甲基(例如,烷基化mAb,A、B)和ACPAPIEK-vcMMAE(C、D)肽的完整MS(A、C)和MS/MS片段化(B、D)。代表肽或vcMMAE的片段分别由实心或空心箭头指示。

[0083] 图56.由与vcMMAE缀合的抗HER2抗体的L328C变体介导的细胞毒性。将HCC1954(Her2/neu阳性)细胞孵育72到96小时,并使用CellTiter-Glo细胞活力测定测量存活细胞的百分比。

[0084] 图57.由与vcMMAE缀合的抗EGFR抗体1号的L328C变体介导的细胞毒性。将MDA-MB-468(EGFR阳性)细胞孵育72到96小时,并使用CellTiter-Glo细胞活力测定测量存活细胞的百分比。

[0085] 图58. 由与vcMMAE缀合的抗EGFR抗体1号的L234A、L235A、L328C变体介导的细胞毒性。将MDA-MB-468 (EGFR阳性) 细胞孵育72到96小时, 并使用CellTiter-Glo细胞活力测定测量存活细胞的百分比。

[0086] 图59. 由与vcMMAE缀合的抗EGFR抗体3号的L234A、L235A、L328C变体介导的细胞毒性。将MDA-MB-468 (EGFR阳性) 细胞孵育72到96小时, 并使用CellTiter-Glo细胞活力测定测量存活细胞的百分比。

[0087] 图60. 由与vcMMAE缀合的抗Trop2抗体的L328C变体介导的细胞毒性。将SK BR3 (TROP2阳性) 细胞孵育72到96小时, 并使用CellTiter-Glo细胞活力测定测量存活细胞的百分比。

[0088] 图61. 由与vcMMAE缀合的抗Trop2抗体的L234A、L235A、L328C变体介导的细胞毒性。将SK BR3 (TROP2阳性) 细胞孵育72到96小时, 并使用CellTiter-Glo细胞活力测定测量存活细胞的百分比。

具体实施方式

[0089] 章节大纲

[0090] I.) 定义

[0091] II.) 抗体

[0092] III.) 修饰效应子功能的Fc突变

[0093] IV.) 抗体-药物缀合物

[0094] V.) ADC的位点特异性缀合形式

[0095] VI.) 连接子单元

[0096] VII.) 延伸子单元

[0097] VIII.) 氨基酸单元

[0098] IX.) 间隔子单元

[0099] X.) 药物单元

[0100] XI.) 确定ADC的细胞毒性作用的方法

[0101] XII.) 表达Her2、EGFR、Trop2、CDH3和TAA的癌症的治疗

[0102] XIII.) 组合疗法

[0103] XIV.) 试剂盒/制品

[0104] I.) 定义:

[0105] 除非另有定义, 否则本文使用的所有技术术语、符号和其它科学术语或用词旨在具有本发明所属领域的技术人员通常理解的含义, 除非上下文另有明确指示。在一些情况下, 为了清楚和/或便于参考起见, 本文对具有通常理解的含义的术语进行了定义, 并且本文中这些定义不应被必然解释为代表与本领域通常理解的含义有实质性差异。

[0106] 当本文中使用时, 除非上下文另有指示, 否则商标名还指商标名产品的产品调配物、通用药物以及活性药物成分。

[0107] 术语“晚期癌症”、“局部晚期癌症”、“晚期疾病”和“局部晚期疾病”意指已经延伸至相关组织包膜的癌症, 并且旨在包含美国泌尿协会 (AUA) 系统下的C期疾病、惠特莫尔-杰维特 (Whitmore-Jewett) 系统下的C1-C2期疾病以及TNM(肿瘤、淋巴结、转移) 系统下的T3-

T4和N+期疾病。通常,不建议对患有局部晚期疾病的患者进行手术,并且与患有临床局限性(器官局限性)癌症的患者相比,这些患者的预后要差得多。

[0108] 术语“经取代的”意指指定基团或部分带有一或多个取代基。术语“未经取代的”意指指定基团不带有取代基。术语“经任选地取代的”意指指定基团未被取代或被一或多个取代基取代。在使用术语“经取代的”来描述结构系统的情况下,取代旨在在系统上的任何化合价允许的位置处发生。

[0109] 除非另有明确指示,否则术语“抗体”在最广泛的意义上使用。因此,“抗体”可以是天然存在的或人造的,例如通过常规杂交瘤或转基因小鼠技术产生的单克隆抗体。Her2、EGFR、Trop2、CDH3和/或TAA抗体包括单克隆和多克隆抗体以及含有这些抗体的抗原结合结构域和/或一或多个互补决定区的片段。如本文使用,术语“抗体”是指特异性结合Her2、EGFR、Trop2、CDH3和/或任何TAA和/或表现出期望生物活性的任何形式的抗体或其片段,并且具体地涵盖单克隆抗体(包含全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要它们特异性结合Her2、EGFR、Trop2、CDH3和/或表现出期望生物活性。任何特异性抗体均可以用于本文提供的方法和组合物。因此,在一个实施例中,术语“抗体”涵盖包括至少一个来自轻链免疫球蛋白分子的可变区和至少一个来自重链分子的可变区的分子,所述可变区组合形成靶抗原的特异性结合位点。在一个实施例中,抗体是IgG抗体。例如,抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。可用于本方法和组合物的抗体可以在细胞培养物中、噬菌体中、酵母中或各种动物中生成,所述动物包含但不限于牛、兔、山羊、小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、绵羊、狗、猫、猴子、黑猩猩和猿。因此,在一个实施例中,本发明的抗体是哺乳动物抗体。噬菌体技术可以用于分离初始抗体或生成具有改变的特异性或亲合力特性的变体。此类技术是常规的并且本领域中熟知的。在一个实施例中,抗体通过本领域中已知的重组手段产生。例如,重组抗体可以通过用包括编码抗体的DNA序列的载体转染宿主细胞来产生。一或多种载体可以用于转染宿主细胞中的表达至少一个VL和一个VH区的DNA序列。抗体生成和生产的重组手段的示范性描述包含德尔维斯(Delves),抗体生产:基本技术(ANTIBODY PRODUCTION:ESSENTIAL TECHNIQUES)(威利出版社,1997);谢泼德(SHEPARD)等人,单克隆抗体(MONOCLOAL ANTIBODIES)(牛津大学出版社,2000);戈丁(GODING),单克隆抗体:原理与实践(MONOCLOAL ANTIBODIES:PRINCIPLES AND PRACTICE)(学术出版社,1993);和免疫学实验室指南(CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY)(约翰威利父子出版社,最新版)。本发明的抗体可以通过重组手段进行修饰,以提高抗体在介导期望功能中的功效。因此,在本发明的范围内,可以使用重组手段通过取代来修饰抗体。典型地,取代将是保守取代。例如,抗体的恒定区中的至少一个氨基酸可以被不同残基置换。参见例如美国专利第5,624,821号、美国专利第6,194,551号、申请号WO 9958572;和安格尔(ANGAL)等人,分子免疫学(Mol.Immunol.),30:105-08(1993)。氨基酸的修饰包含氨基酸的缺失、添加和取代。在一些情况下,进行此类改变是为了减少不期望的活性,例如补体依赖性细胞毒性。抗体常常通过共价或非共价接合提供可检测信号的物质来标记。多种多样的标记和缀合技术是已知的并且广泛报道于科学和专利文献中。可以针对结合到正常的或有缺陷的FLT3来对这些抗体进行筛选。参见例如抗体工程:一种实用方法(ANTIBODY ENGINEERING:APRACTICAL APPROACH)(牛津大学出版社,1996)。可以使用以下体外测定和以下体内测定标识具有期望生物活性的合适抗体,所述体外测定包含但不限于增殖、迁移、粘附、软琼脂生长、血管生

成、细胞间通讯、凋亡、转运、信号转导,所述体内测定例如肿瘤生长的抑制。本文提供的抗体也可以用于诊断应用。作为捕获或非中和抗体,可以针对结合到特异性抗原而不抑制抗原的受体结合或生物活性的能力来对它们进行筛选。作为中和抗体,抗体可以用于竞争性结合测定。它们还可以用于量化Her2、EGFR、Trop2和/或CDH3或其受体。

[0110] 如本文使用,抗体的术语“抗原结合片段”或“抗体片段”(或简称为“抗体部分”)是指保留特异性结合到抗原(例如,Her2、EGFR、Trop2、CDH3和/或变体)的能力的Her2、EGFR、Trop2、CDH3和/或TAA抗体的一或多个片段。已经表明,抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段进行。抗体的术语“抗原结合片段”内涵盖的结合片段的实例包含(i) Fab片段,其是由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_H1 结构域组成的单价片段;(ii) $F(ab')_2$ 片段,其是包括通过铰链区处的二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由 V_H 和 C_H1 结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体的单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的Fv片段,(v) dAb片段(沃德(WARD)等人(1989),自然(Nature), 341:544-546),其由 V_H 结构域组成;和(vi) 经分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个结构域 V_L 和 V_H 是由不同的基因编码的,但它们可以使用重组方法通过合成连接子接合,从而使它们能够制成单个蛋白质链,其中 V_L 和 V_H 区配对形成单价分子(称为单链Fv(scFv);参见例如伯德(BIRD)等人(1988),科学(Science), 242:423-426;和休斯顿(HUSTON)等人(1988),美国科学院院报(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 85:5879-5883)。这类单链抗体也旨在涵盖在抗体的术语“抗原结合片段”内。这些抗体片段是使用本领域的技术人员已知的常规技术获得的,并且以与完整抗体相同的方式针对效用对片段进行筛选。

[0111] 如本文使用,术语“Fc”是指包括铰链区、 CH_2 和/或 CH_3 结构域的区域。

[0112] 如本文使用,任何形式的“抗原”可以用于生成本发明的对Her2、EGFR、Trop2、CDH3和/或任何TAA具有特异性的抗体。因此,引发抗原可以是单个表位、多个表位或单独的整个蛋白质或与本领域已知的一或多种免疫原性增强剂组合。引发抗原可以是经分离的全长蛋白质、细胞表面蛋白质(例如,用至少一部分抗原转染的细胞免疫)或可溶性蛋白质(例如,仅用蛋白质的细胞外结构域部分免疫)。抗原可以在遗传修饰的细胞中产生。编码抗原的DNA可以是基因组的或非基因组的(例如,cDNA)并且编码细胞外结构域的至少一部分。如本文使用,在抗原的背景下,术语“部分”是指视情况而定构成感兴趣的抗原的免疫原性表位的最小数量的氨基酸或核酸。可以采用任何适合转化感兴趣的细胞的遗传载体,包括但不限于腺病毒载体、质粒和非病毒载体,例如阳离子脂质。在一个实施例中,本文的方法和组合物的抗体特异性结合感兴趣的靶标的细胞外结构域的至少一部分。

[0113] 本文提供的抗体或其抗原结合片段可以构成“生物活性剂”或是其一部分。如本文使用,术语“生物活性剂”是指结合抗原和/或增强或介导期望生物效应以增强细胞杀伤毒素的任何合成或天然存在的化合物。在一个实施例中,可用于本发明的结合片段是生物活性片段。如本文使用,术语“生物活性”是指能够结合期望抗原表位并直接或间接发挥生物效应的抗体或抗体片段。直接效应包含但不限于生长信号的调节、刺激和/或抑制,抗凋亡信号的调节、刺激和/或抑制,凋亡或坏死信号的调节、刺激和/或抑制,ADCC级联的调节、刺激和/或抑制,和CDC级联和/或Fc沉默的调节、刺激和/或抑制。

[0114] 如本文关于抗原结合蛋白使用,术语“特异性结合”意指抗原结合蛋白结合到靶标以及靶标内的离散结构域或离散氨基酸序列,而不与其它(例如,不相关的)蛋白质结合或与其它(例如,不相关的)蛋白质非显著结合。然而,本术语不排除抗体或其结合片段也可能

与密切相关的分子发生交叉反应的事实。本文所述的抗体及其片段以及包括这些的抗体药物缀合物可以以比它们与密切相关的分子结合的亲和力大至少2、5、10、50、100或1000倍的亲和力特异性结合到本文公开的Her2、EGFR、Trop2、CDH3和/或TAA。

[0115] “双特异性”抗体也可以用于本方法和组合物。如本文使用,术语“双特异性抗体”是指对至少两种不同抗原表位具有结合特异性的抗体,通常是单克隆抗体。在一个实施例中,表位来自相同抗原。在另一个实施例中,表位来自两种不同抗原。用于制造双特异性抗体的方法是本领域中已知的。例如,可以使用两个免疫球蛋白重链/轻链对的共表达来重组产生双特异性抗体。参见例如米尔斯坦 (MILSTEIN) 等人,自然 (Nature), 305:537-39 (1983)。可替代地,可以使用化学键制备双特异性抗体。参见例如布伦南 (BRENNAN) 等人,科学 (Science), 229:81 (1985)。双特异性抗体包含双特异性抗体片段。参见例如霍林格 (HOLLINGER) 等人,美国科学院院报 (Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.), 90:6444-48 (1993); 格鲁伯 (GRUBER) 等人,免疫学杂志 (J.Immunol.), 152:5368 (1994)。

[0116] 本文所述的单克隆抗体具体地包含“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与源自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相对应序列具有同一性或同源性,而链的其余部分与源自另一个物种或属于另一个抗体类别或亚类的抗体以及此类抗体的片段中的相对应序列具有同一性或同源性,只要它们特异性结合靶抗原和/或表现出期望生物活性 (美国专利第4,816,567号; 和莫里森 (MORRISON) 等人,美国科学院院报 (Proc.Natl.Acad.Sci.USA), 81:6851-6855 (1984))。

[0117] 如本文使用,术语“癌症”和“肿瘤 (neoplasm/tumor)”可互换使用,并且无论是单数或复数形式,是指已经经历了恶性转化的细胞,这使得它们对宿主生物体来说是病理性的。通过成熟的技术,特别是组织学检查,可以很容易地将原发性癌细胞 (即从恶性转化部位附近获得的细胞) 与非癌细胞区分开来。如本文使用,癌细胞的定义不仅包含原发性癌细胞,而且还包含源自癌细胞祖先的任何细胞。这包含转移的癌细胞以及源自癌细胞的体外培养物和细胞系。当是指一种通常表现为实体瘤的癌症时,“临床可检测”肿瘤是基于肿瘤块可检测到的肿瘤;例如通过如CAT扫描、MR成像、X射线、超声或触诊等程序,和/或由于可获自患者的样本中的一或多种癌症特异性抗原的表达而可检测到的肿瘤。肿瘤可以是造血肿瘤,例如血细胞肿瘤等,即液体肿瘤。基于这种肿瘤的临床病状的具体实例包含白血病,例如慢性髓细胞性白血病或急性髓细胞性白血病;骨髓瘤,例如多发性骨髓瘤;淋巴瘤等。

[0118] 术语“治疗剂”是指如本文定义的提供治疗益处和/或具有治疗有效性的所有药剂。治疗剂可以例如逆转、改善、减轻、抑制或限制疾病、病症或病状的进展或降低其严重程度,或影响或改善 (improve/ameliorate) 如癌症等疾病的一或多种症状。这种试剂可以是细胞毒性的或细胞抑制的。所述术语包含但不限于本文定义的化学治疗剂、抗肿瘤剂和“药物单元”剂。

[0119] 术语“抗肿瘤剂”是指如本文定义的在肿瘤或癌症的治疗中提供治疗益处和/或具有治疗有效性的所有试剂。

[0120] 术语“化学治疗剂”是指有效抑制肿瘤生长的所有化学化合物。化学治疗剂的非限制性实例包含烷基化剂;例如,氮芥、乙烯亚胺化合物和烷基磺酸盐;抗代谢物,例如叶酸、嘌呤或嘧啶拮抗剂;有丝分裂抑制剂,例如抗微管蛋白剂,例如长春花生物碱、澳瑞他汀和鬼臼毒素衍生物;细胞毒性抗生素;损害或干扰DNA表达或复制的化合物,例如DNA小沟结合

剂;和生长因子受体拮抗剂。此外,化学治疗剂包含细胞毒性剂(如本文定义)、抗体、生物分子和小分子。

[0121] 术语“互补决定区”和“CDR”在本领域中已知是指抗体可变区内的氨基酸的非连续序列,其赋予抗原特异性和结合亲和力。通常,每个重链可变区中有三(3)个CDR(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3),而每个轻链可变区有三(3)个CDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3)。

[0122] 使用多种熟知方案中的任何一种,可以很容易地确定给定CDR的精确氨基酸序列边界,所述熟知方案包含以下所述的那些:卡巴特(Kabat)等人(1991),“具有免疫学意义的蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)”,第5版,公共卫生署,国立卫生研究院,贝塞斯达,马里兰州(“卡巴特”编号方案);阿尔-拉齐卡尼(AL-LAZIKANI)等人(1997),JMB,273,927-948(“乔西亚(Chothia)”编号方案);麦卡伦(MACCALLUM)等人,分子生物学杂志(J.Mol.Biol.),262:732-745(1996);“抗体-抗原相互作用:接触分析和结合位点拓扑图(Antibody-antigen interactions:Contact analysis and binding site topography)”,分子生物学杂志(J.Mol.Biol.),262,732-745(“接触”编号方案);勒弗拉克M.P.(LEFRANC M.P.)等人,“免疫球蛋白和T细胞受体可变结构域和Ig超家族V样结构域的IMGT唯一编号(IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains)”,发育与比较免疫学(Dev Comp Immunol),2003年1月;27(1):55-77(“IMGT”编号方案);以及奥涅格A.(HONEGGER A.)和普里克松A.(PLICKTHUN A.),“免疫球蛋白可变结构域的另一种编号方案:一种自动建模和分析工具(Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains:an automatic modeling and analysis tool)”,分子生物学杂志(J Mol Biol),2001年6月8日;309(3):657-70(AHo编号方案)。

[0123] 给定CDR的边界可能取决于用于标识的方案而有所不同。例如,卡巴特方案基于结构比对,而乔西亚方案基于结构信息。卡巴特和乔西亚方案的编号均基于最常见的抗体区域序列长度,其中插入由插入字母表示,例如“30a”,并且一些抗体中存在缺失。两种方案在不同位置处放置某些插入和缺失(“插入缺失”),从而产生不同的编号。接触方案基于复合晶体结构的分析并且在多个方面与乔西亚编号方案类似。

[0124] 因此,除非另有指定,否则给定抗体或其区的术语“CDR”和“互补决定区”,如可变区以及抗体或其区的个别CDR(例如,CDR-H1、CDR-H2)应被理解为涵盖如上文所描述的已知方案中的任一个所定义的互补决定区。在一些实例中,指定了用于标识一或多个特定CDR的方案,如由卡巴特、乔西亚或接触方法所定义的CDR。

[0125] 如本文使用,术语“保守取代”是指本领域的技术人员已知的氨基酸和/或氨基酸序列的取代,并且通常可以在不改变所得分子的生物活性的情况下进行。本领域的技术人员认识到,通常,多肽的非必需区域中的单个氨基酸取代不会显著改变生物活性(参见例如沃森(WATSON)等人,基因的分子生物学(MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE),本杰明/卡明斯出版公司,第224页(第4版,1987))。这种示范性取代优选根据表II和表III所列的那些进行。例如,这种改变包含用异亮氨酸(I)、缬氨酸(V)和亮氨酸(L)中的任何一个取代这些疏水性氨基酸中的任何另一个;用天冬氨酸(D)取代谷氨酸(E),并且反之亦然;用谷氨酰胺(Q)取代天冬酰胺(N),并且反之亦然;以及用丝氨酸(S)取代苏氨酸(T),并且反之亦然。其它取代也可以被认为是保守的,这取决于特定氨基酸的环境及其在蛋白质三维结构中的作

用。例如,甘氨酸(G)和丙氨酸(A)经常可以互换,丙氨酸(A)和缬氨酸(V)也可以互换。相对疏水的蛋氨酸(M)经常可以与亮氨酸和异亮氨酸互换,有时也可以与缬氨酸互换。赖氨酸(K)和精氨酸(R)在氨基酸残基的显著特征是其电荷且这两个氨基酸残基的不同pK不显著的位置经常可互换。在特定环境中,其它变化可以被认为是“保守的”(参见例如本文的表III;第13-15页,“生物化学(Biochemistry)”,第2版。卢伯特·斯特莱尔(Lubert Stryer)编辑(斯坦福大学);海尼科夫(HENIKOFF)等人,美国科学院院报(PNAS),1992,第89卷,10915-10919;雷(LEI)等人,生物化学杂志(J Biol Chem),1995年5月19日;270(20):11882-6)。其它取代也是允许的,并且可以根据经验或根据已知的保守取代来确定。

[0126] 术语“细胞毒性剂”是指抑制或阻止细胞的表达活性、细胞的功能和/或引起细胞的破坏的物质。所述术语旨在包含放射性同位素、化学治疗剂和毒素,例如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素,包含其片段和/或变体。细胞毒性剂的实例包含但不限于奥瑞他汀、金霉素、美登木素生物碱、蓖麻毒素、蓖麻毒素A链、卡贝塔汀(combrestatin)、倍癌霉素、海兔毒素、多柔比星、道诺霉素、他克唑、顺铂、cc1065、溴化乙锭、丝裂霉素、依托泊苷、替诺泊苷(tenoposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、二羟基蒽二酮、放线菌素、白喉毒素、假单胞菌外毒素(PE)A、PE40、相思豆毒素、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α -帚曲霉素(sarcin)、白树毒素、丝林霉素(mitogellin)、局限曲菌素(retstrictocin)、酚霉素、伊诺霉素、麻疯树毒素(curicin)、巴豆毒素、卡奇霉素、肥皂草(Sapaonaria officinalis)抑制剂和糖皮质激素和其它化学治疗剂,以及放射性同位素,例如At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²或²¹³、P³²,以及Lu的放射性同位素,包含Lu¹⁷⁷。

[0127] 抗体,包含本发明的抗体,也可以缀合到任何上述细胞毒性剂以及能够将前药转化为其活性形式的抗癌前药激活酶。

[0128] 如本文使用,术语“双抗体”是指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,所述片段包括相同多肽链(V_H-V_L)中的连接到轻链可变区(V_L)的重链可变区(V_H)。通过使用太短以至于不允许在相同链上的两个结构域之间配对的连接子,结构域被迫使与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合位点。双抗体更充分地描述于例如EP 404,097;WO 93/11161;和霍林格(HOLLINGER)等人,美国科学院院报(Proc.Natl.Acad.Sci.USA),90:6444-48(1993)中。

[0129] 术语“同源物”是指通过例如在相对应位置处具有相同或相似的化学残基序列而表现出与另一个分子的同源性的分子。

[0130] 术语“同一性”或“序列同一性”指示当最佳比对并与适当的插入或缺失比较时的两个核酸或两个氨基酸序列之间的同一性程度。

[0131] 两个序列之间的“同一性百分比”随序列共享的相同位置的数量而变化(即同一性% = 相同位置的数量/位置的总数乘以100),这需考虑到空位的数量以及每个空位的长度,这些都需要引入以进行两个序列的最佳比对。如下所述,可以使用数学算法完成序列的比较和两个序列之间的同一性百分比的确定。可以使用GCG软件包中的GAP程序,使用NWSgapdna.CMP矩阵以及空位权重40、50、60、70或80和长度权重1、2、3、4、5或6来确定两个核苷酸序列之间的同一性百分比。也可以使用迈耶斯(Meyers)等人,生物科学中的计算机应用(Comput.Appi.Biosci.),4:11-17(1988)的算法,使用PAM120权重残基表、空位长度罚

分12、空位罚分4来确定两个核苷酸或氨基酸序列之间的同一性百分比,所述算法已并入ALIGN程序(版本2.0)。此外,可以使用尼德曼(NEEDLEMAN)等人,分子生物学杂志(J.Mol.Biol.),48:444-453(1970)算法,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵以及空位权重16、14、12、10、8、6或4和长度权重1、2、3、4、5或6来确定两个氨基酸序列之间的同一性百分比,所述算法已并入GCG软件包中的GAP程序。

[0132] 举例来说,多核苷酸序列可以与与参考序列具有100%同一性的参考多核苷酸序列具有同一性,或者它可以包含相较于参考序列的至多某一整数数量的核苷酸改变,例如具有至少50、60、70、75、80、85、90、95、98或99%同一性。此类改变选自至少一种核苷酸缺失、取代,包含转换和颠换,或插入,并且其中所述改变可能发生在参考核苷酸序列的5'或3'端位置处或这些端位置之间的任何位置,单独地散布在参考序列中的核苷酸之间或散布在参考序列内的一或多个连续基团中。核苷酸改变的数量通过将本文所述的参考多核苷酸序列中的核苷酸总数乘以相应同一性百分比的数字百分比(除以100)并用参考多核苷酸序列中的所述核苷酸总数减去所述乘积来确定,或: $n_n \leq x_n - (x_{ny})$,其中 n_n 是核苷酸改变的数量, x_n 是本文所述的参考多核苷酸序列中的核苷酸总数(关于示范性参考多核苷酸序列,参见“序列表”中的核酸序列),并且 y 是代表50%的0.50、代表60%的0.60、代表70%的0.70、代表75%的0.75、代表80%的0.80、代表85%的0.85、代表90%的0.90、代表95%的0.95、代表98%的0.98、代表99%的0.99或代表100%的1.00,其是乘法运算符的符号,并且其中 x_n 和 y 的任何非整数乘积向下舍入到最接近的整数,然后用 x_n 减去所述整数。类似地,多肽序列可以与本文所述的多肽参考序列具有同一性,即具有100%同一性,或者它可以包含相较于参考序列的至多某一整数数量的核苷酸改变,使得同一性%小于100%,例如具有至少50、60、70、75、80、85、90、95、98或99%同一性。此类改变选自由以下组成的群组:至少一种核苷酸缺失、取代,包含保守和非保守取代,或插入,并且其中所述改变可能发生在参考多肽序列的氨基或羧基端位置处或这些端位置之间的任何位置,单独地散布在参考序列中的氨基酸之间或散布在参考序列内的一或多个连续基团中。给定同一性%的氨基酸改变的数量通过将由多肽参考序列编码的多肽序列中的氨基酸总数乘以相应同一性百分比的数字百分比(除以100),然后用本文所述的多肽参考序列中的所述氨基酸总数减去所述乘积来确定,或: $n_a \leq x_a - (x_{ay})$,其中 n_a 是氨基酸改变的数量, x_a 是参考多肽序列中的氨基酸总数,并且 y 是代表50%的0.50、代表60%的0.60、代表70%的0.70、代表75%的0.75、代表80%的0.80、代表85%的0.85、代表90%的0.90、代表95%的0.95、代表98%的0.98、代表99%的0.99或代表100%的1.00,其是乘法运算符的符号,并且其中 x_a 和 y 的任何非整数乘积向下舍入到最接近的整数,然后用 x_a 减去所述整数。同一性百分比可以在整个序列长度上确定。如本文定义,术语“超过75%同一性”包含超过75%、80%、85%、95%和99%的同一性以及在本范围内的所有离散值和离散子范围。

[0133] 在一个实施例中,本文提供的抗体是“人抗体”。如本文使用,术语“人抗体”是指其中轻链和重链序列的基本上整个序列,包含互补决定区(CDR),来自人基因的抗体。在一个实施例中,人单克隆抗体通过三源杂交瘤技术、人B细胞技术(参见例如科兹伯(KOZBOR)等人,当代免疫(Immunol.Today),4:72(1983)、EBV转化技术(参见例如科尔(COLE)等人,单克隆抗体和癌症疗法(MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY),77-96(1985))、或使用噬菌体展示(参见例如马克斯(MARKS)等人,分子生物学杂质(J.Mol.Biol.),222:581

(1991)) 制备。在一个具体实施例中,人抗体在转基因小鼠中生成。用于制造这种部分至完全人抗体的技术在本领域中是已知的,并且可以使用任何这种技术。根据一个特别优选的实施例,完全人抗体序列在经工程改造以表达人重链和轻链抗体基因的转基因小鼠中制造。制备产生人抗体的转基因小鼠的示范性描述见于申请号W0 02/43478和美国专利第6,657,103号 (Abgenix) 及其后续 (progeny)。然后,可以融合来自产生期望抗体的转基因小鼠的B细胞,以制造用于连续产生抗体的杂交瘤细胞系。参见例如美国专利第5,569,825号;第5,625,126号;第5,633,425号;第5,661,016号;第5,545,806号;和雅克博维次 (JAKOBOVITS), 高级药物递送综述 (Adv. Drug Del. Rev.), 31:33-42 (1998); 格林 (GREEN) 等人, 实验医学杂志 (J. Exp. Med.), 188:483-95 (1998)。

[0134] 如本文使用,术语“人源化抗体”是指含有来自非人 (例如,鼠) 抗体以及人抗体的序列的抗体形式。此类抗体是嵌合抗体,其含有源自非人免疫球蛋白的最小序列。通常,人源化抗体将包括至少一个并且典型地两个可变域中的基本上全部,其中全部或基本上全部的高变环都对应于非人免疫球蛋白的高变环,并且全部或基本上全部的FR区都是人免疫球蛋白序列的FR区。人源化抗体任选地还将包括免疫球蛋白恒定区 (Fc) 的至少一部分,典型地是人免疫球蛋白的至少一部分。参见例如卡比利 (CABILLY), 美国专利第4,816,567号;奎因 (QUEEN) 等人 (1989), 美国科学院院报 (Proc. Nat'l Acad. Sci. USA), 86:10029-10033;和抗体工程:一种实用方法 (ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL APPROACH) (牛津大学出版社,1996)。

[0135] 如本文使用,术语“抑制 (inhibit/inhibition of)”意指减少可测量的量,或完全防止。

[0136] 术语“哺乳动物”是指任何归类为哺乳动物的生物体,包含小鼠、大鼠、兔、狗、猫、牛、马和人。在本发明的一个实施例中,哺乳动物是小鼠。在本发明的另一个实施例中,哺乳动物是人。

[0137] 术语“转移性癌症”和“转移性疾病”意指已扩散到区域淋巴结或远处部位的癌症,并且旨在包含AUA系统下的D期疾病和TNM系统下的T×N×M+期。

[0138] 如本文使用,术语“修饰的”是指存在对天然氨基酸、非天然氨基酸、天然氨基酸多肽或非天然氨基酸多肽的改变。此类改变或修饰可以通过天然氨基酸、非天然氨基酸、天然氨基酸多肽或非天然氨基酸多肽的合成后修饰,或通过共翻译,或通过天然氨基酸、非天然氨基酸、天然氨基酸多肽或非天然氨基酸多肽的翻译后修饰获得。

[0139] “分子识别”意指宿主分子能够与第二分子 (即客体) 形成复合物的化学事件。本过程通过非共价化学键发生,包含但不限于氢键合、疏水相互作用、离子相互作用。

[0140] 如本文使用,术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体,即构成所述群体的个体抗体是相同的,除了可能以少量存在的可能的天然发生的突变。针对单一抗原表位,单克隆抗体具有高度特异性。相反,常规 (多克隆) 抗体制剂典型地包含大量的针对不同表位 (或对其具有特异性) 的抗体。在一个实施例中,多克隆抗体在含有多个抗原表位的单一抗原内含有多种具有不同表位特异性、亲和力或亲合力的单克隆抗体。修饰词“单克隆”指示抗体的特征是从基本上同质的抗体群体获得的,并且不应被解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,待根据本发明使用的单克隆抗体可以通过首先由科勒 (KOHLER) 等人,自然 (Nature), 256:495 (1975) 描述的杂交瘤方法制造,或者可以通过重组

DNA方法(参见例如美国专利第4,816,567号)制造。“单克隆抗体”也可以使用例如克拉克森(CLACKSON)等人,自然(Nature),352:624-628(1991)和马克斯(MARKS)等人,分子生物学杂志(J.Mol.Biol.),222:581-597(1991)描述的技术从噬菌体抗体文库中分离。这些单克隆抗体将通常以至少约1 μ M、更通常至少约300nM、典型地至少约30nM、优选至少约10nM、更优选至少约3nM或更好的Kd结合,通常通过ELISA确定。

[0141] “非天然氨基酸”或以其它方式写为“nnAA”是指不是二十(20)种常见氨基酸或焦赖氨酸或硒代半胱氨酸中的一个的氨基酸。可以与术语nnAA同义使用的其它术语是“非天然编码氨基酸”、“非天然氨基酸”、“非天然存在的氨基酸”。此外,术语nnAA包含但不限于非天然存在且可以通过合成获得或可以通过修饰非天然氨基酸获得的氨基酸。

[0142] “药用赋形剂”包括如佐剂、载体、pH调节和缓冲剂、张力调节剂、润湿剂、防腐剂等材料。

[0143] “药学上可接受的”是指在生理上与人或其它哺乳动物相容的无毒、惰性和/或组合物。

[0144] 术语“多肽”意指至少约4、5、6、7或8个氨基酸的聚合物。在整个说明书中,使用氨基酸的标准三字母(参见表II)或单字母名称。在本领域中,本术语经常与“肽”或“蛋白质”互换使用。

[0145] 如本文使用,术语“单链Fv”或“scFv”或“单链”抗体是指包括抗体的V_H和V_L结构域的抗体片段,其中这些结构域存在于单个多肽链中。通常,Fv多肽进一步包括V_H和V_L结构域之间的多肽连接子,其使sFv能够形成用于抗原结合的期望结构。关于sFv的综述,参见普拉克松(PLUCKTHUN),单克隆抗体的药理学(THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES),第113卷,罗森伯格(Rosenburg)和摩尔(Moore)编辑,施普林格出版社,纽约,第269-315页(1994)。

[0146] 如本文使用,术语“特异性”、和“特异性结合(specifically binds/binds specifically)”是指抗体与靶抗原表位的选择性结合。可以通过在一组给定条件下将与适当抗原的结合和与无关抗原或抗原混合物的结合进行比较来测试抗体的结合特异性。如果抗体与适当抗原的结合比与无关抗原或抗原混合物的结合多至少2、5、7倍且优选10倍,则认为它是特异性的。在一个实施例中,特异性抗体是结合Her2、EGFR、Trop2、CDH3抗原但不结合到无关抗原的抗体。在另一个实施例中,特异性抗体是结合人Her2、EGFR、Trop2、CDH3-4抗原但不结合与Her2、EGFR、Trop2、CDH3抗原具有70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大氨基酸同源性的非人Her2、EGFR、Trop2、CDH3抗原的抗体。在另一个实施例中,特异性抗体是结合人Her2、EGFR、Trop2、CDH3抗原但不结合与Her2、EGFR、Trop2、CDH3抗原的氨基酸序列具有70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大同一性百分比的非人Her2、EGFR、Trop2、CDH3抗原的抗体。在另一个实施例中,特异性抗体是结合人Her2、EGFR、Trop2、CDH3抗原并结合鼠类Her2、EGFR、Trop2、CDH3抗原的抗体,但结合人抗原的程度更高。在另一个实施例中,特异性抗体是结合人Her2、EGFR、Trop2、CDH3抗原并结合灵长类动物Her2、EGFR、Trop2、CDH3抗原的抗体,但结合人抗原的程度更高。在另一个实施例中,特异性抗体结合到人Her2、EGFR、Trop2、CDH3抗原并结合到任何非人Her2、EGFR、Trop2、CDH3抗原,但结合人抗原或其任何组合的程度更高。

[0147] 如本文使用,“治疗”或“治疗性”和语法相关术语是指对疾病的任何结果的任何改善,例如延长存活、降低发病率和/或减轻作为替代治疗方式的副产物的副作用;如本领域容易了解,完全根除疾病是优选的,但这并非治疗行为的必要条件。

[0148] 术语“变体”是指表现出与所描述的类型或规范不同的分子,例如在具体描述的蛋白质的相对对应位置具有一或多个不同氨基酸残基的蛋白质(例如,Her2、EGFR、Trop2、CDH3蛋白质)。类似物是变体蛋白质的一个实例。剪接同种型和单核苷酸多态性(SNP)是变体的另外的实例。

[0149] II.) 抗体

[0150] 本发明的另一个方面提供了结合到本文公开的Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA的抗体。在一个实施例中,抗体结合到Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA相关蛋白。

[0151] 如本领域已知,本发明的Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA抗体在癌症中特别有用(参见例如表I),用于预后测定、成像、诊断和治疗方法。在一个实施例中,本文公开的Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA结合测定用于检测癌症,例如在免疫测定中。类似地,此类抗体可用于(例如,当在ADC中与治疗剂组合时)癌症(例如,表I所列的癌症)的治疗和/或预后,其程度是Her2、EGFR、Trop2、CDH3和/或其它TAA也在这些其它癌症中表达或过表达。此外,细胞内表达的抗体(例如,单链抗体)在治疗涉及Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它靶标的表达的癌症方面表现出治疗性作用。

[0152] 用于制备抗体,特别是单克隆抗体的各种方法是本领域熟知的。例如,可以通过使用Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA相关蛋白、肽或片段以分离或免疫缀合形式免疫合适的哺乳动物宿主来制备抗体(抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual), CSH出版社,哈洛(Harlow)和雷恩(Lane)编辑(1988);哈洛(Harlow),抗体(Antibodies),冷泉港出版社,纽约(1989))。此外,还可以使用Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA的融合蛋白,例如Her2、EGFR、Trop2、CDH3 GST融合蛋白。在一个特定实施例中,产生了包括Her2、EGFR、Trop2、CDH3的全部或大部分氨基酸序列的GST融合蛋白,然后将其用作免疫原以生成合适的抗体。在另一个实施例中,合成了Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA相关蛋白并将其用作免疫原。

[0153] 此外,使用本领域已知的裸DNA免疫技术(在有或没有经纯化的Her2、EGFR和其它TAA相关蛋白或Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA表达细胞的情况下)来生成对编码免疫原的免疫反应(关于综述,参见唐纳利(DONNELLY)等人,1997,免疫学年鉴(Ann.Rev.Immunol.),15:617-648)。

[0154] 用于生成Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA抗体的优选方法通过本文提供的实例进一步说明。用于制备用作免疫原的蛋白质或多肽的方法是本领域熟知的。本领域还熟知用于制备蛋白质与如BSA、KLH或另一种载体蛋白等载体的免疫原性缀合物的方法。在一些情况下,使用了使用例如碳二亚胺试剂的直接缀合;在其它实例中,连接试剂,例如由Pierce Chemical Co.,罗克福德,伊利诺伊州提供的那些,是有效的。如本领域理解,Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA免疫原的施用通常通过在合适的时间段内注射并使用合适的佐剂来进行。在免疫计划期间,可以采用抗体滴度来确定抗体形成的充分性。

[0155] Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA单克隆抗体可以通过本领域熟知的各种手段产生。例如,分泌期望单克隆抗体的永生化细胞系使用科勒(Kohler)和米尔斯坦(Milstein)

的标准杂交瘤技术或使抗体产生B细胞永生化的修饰来制备,如通常已知。分泌期望抗体的永生化细胞系通过免疫测定进行筛选,其中抗原是Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA相关蛋白。当标识出合适的永生化细胞培养物时,可以对细胞进行扩增,并从体外培养物或腹水中产生抗体。

[0156] 本发明的抗体或片段也可以通过重组手段产生。特异性结合到Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA蛋白质的期望区域的区域也可以在多物种来源的嵌合或互补决定区(CDR)移植抗体的背景下产生。也可以产生人源化或人Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA抗体,并优选将其用于治疗背景。用于通过用一或多种非人抗体CDR取代相对应的人抗体序列来人源化鼠和其它非人抗体的方法是熟知的(参见例如琼斯(JONES)等人,1986,自然(Nature),321:522-525;里希曼(RIECHMANN)等人,1988,自然(Nature),332:323-327;维霍耶恩(VERHOEYEN)等人,1988,科学(Science),239:1534-1536)。另参见卡特(CARTER)等人,1993,美国科学院院报(Proc.Natl.Acad.Sci.USA),89:4285和西姆斯(SIMS)等人,1993,免疫学杂志(J.Immunol.),151:2296。

[0157] 在一个实施例中,本发明的人单克隆抗体可以使用VelocImmune小鼠制备,其中在免疫球蛋白重链(VH、DH和JH区段)和/或 κ 轻链(VK和JK)基因座处带有内源性小鼠可变区段的基因组序列已全部地或部分地用带有人免疫球蛋白重链(VH、DH和JH)和/或 κ 轻链(VK和JK)基因座的未重排种系可变区段的人基因组序列(Regeneron,塔里敦,纽约州)替换。参见例如美国专利第6,586,251号、第6,596,541号、第7,105,348号、第6,528,313号、第6,638,768号和第6,528,314号。

[0158] 此外,可以使用HuMAb小鼠(Medarex, Inc.)生成本发明的人抗体,所述小鼠含有编码未重排人重链(μ 和 γ)和 κ 轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因小基因座以及使内源性 μ 和 κ 链基因座失活的靶向突变(参见例如伦贝格(LONBERG)等人(1994),自然(Nature),368(6474):856-859)。

[0159] 在另一个实施例中,本发明的完全人抗体可以使用在转基因和转染色体上携带人免疫球蛋白序列的小鼠产生,例如携带人重链转基因和人轻链转染色体的小鼠。此类小鼠在本文中被称作“KM小鼠”,此类小鼠描述于富冢(TOMIZUKA)等人(2000),美国科学院院报(Proc.Natl.Acad.Sci.USA),97:722-727和授予富冢(TOMIZUKA)等人的PCT出版物W0 02/43478中。

[0160] 本发明的人单克隆抗体也可以使用用于筛选人免疫球蛋白基因文库的噬菌体展示方法制备。用于分离人抗体的此类噬菌体展示方法是在本领域中确立已久的。参见例如:美国专利第5,223,409号;第5,403,484号;和授予拉德纳(LADNER)等人的美国专利第5,571,698号;授予道尔(DOWER)等人的美国专利第5,427,908号和第5,580,717号;授予麦卡弗蒂(MCCAFFERTY)等人的美国专利第5,969,108号和第6,172,197号;和授予格里菲思(GRIFFITHS)等人的美国专利第5,885,793号;第6,521,404号;第6,544,731号;第6,555,313号;第6,582,915号和第6,593,081号。

[0161] 本发明的人单克隆抗体也可以使用SCID小鼠制备,其中人免疫细胞已经重构,使得可以在免疫后生成抗体反应。此类小鼠描述于例如授予威尔森(WILSON)等人的美国专利第5,476,996号和第5,698,767号。

[0162] 此外,本发明的人抗体可以通过使用转基因小鼠的技术制造,所述小鼠被失活以

用于抗体生产,用人重链和轻链基因座进行工程改造,其被称为Xenomouse (Amgen Fremont, Inc., 前身为Abgenix, Inc.)。制备产生人抗体的转基因小鼠的示范性描述可见于美国专利第6,657,103号中。另参见美国专利第5,569,825号;第5,625,126号;第5,633,425号;第5,661,016号;第5,545,806号;和门德斯(MENDEZ)等人,自然-遗传学(Nature Genetics),15:146-156(1998);凯勒曼,S.A. (KELLERMAN, S.A.)和格林,L.L. (GREEN, L.L.),生物技术的最新观点(Curr.Opin.Biotechnol),13,593-597(2002)。

[0163] 上述任何生产方法产生了具有一定的结合Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA的能力的抗体,或与Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA具有85、90、91、92、93、94、95、96、9、98、或99%序列同一性的同源物或片段或多肽序列。

[0164] 抗体、其结合片段和包括其的抗体药物缀合物对Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA的结合亲和力(K_D)可以是1mM或更小、100nM或更小、10nM或更小、2nM或更小或1nM或更小。可替代地, K_D 可以在5和10nM之间;或在1和2nM之间。 K_D 可以在1微摩尔和500微摩尔之间或在500微摩尔和1nM之间。

[0165] 抗原结合蛋白的结合亲和力由缔合常数(K_a)和解离常数(K_d)确定($KD=Kd/Ka$)。结合亲和力可以通过BIAcore测量,例如通过将测试抗体捕获到经蛋白A涂覆的传感器表面上并使Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA流过本表面。可替代地,结合亲和力可以通过FORTEBIO测量,例如将测试抗体受体捕获到经蛋白A涂覆的针上并使Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA流过本表面。本领域的技术人员可以标识本领域已知的其它合适的测定以测量结合亲和力。

[0166] 本发明的经工程改造的抗体包含对 V_H 和/或 V_L 内的框架残基进行了修饰(例如,以改善抗体的性质)的那些。典型地,进行这类框架修饰以降低抗体的免疫原性。例如,一种方法是使一或多个框架残基“反向突变”成相对应的种系序列。更具体地,已经经历了体细胞突变的抗体可以含有与抗体所源自的种系序列不同的框架残基。此类残基可以通过将抗体框架序列与抗体所源自的种系序列进行比较来标识。为了使框架区序列恢复到其种系构型,体细胞突变可以通过例如定点诱变或PCR介导的诱变“反向突变”成种系序列(例如,从亮氨酸“反向突变”成甲硫氨酸)。这种“反向突变”抗体也旨在被本发明所涵盖。

[0167] 另一种类型的框架修饰涉及使框架区内或甚至一或多个CDR区内的一或多个残基突变,以去除T细胞表位,从而降低抗体的潜在免疫原性。这种方法也被称为“去免疫”,并且更详细地描述于卡尔(CARR)等人的美国专利公开号2003/0153043中。

[0168] 除了在框架或CDR区内进行的修饰之外或作为其替代,本发明的抗体可以被工程改造成包含Fc区内的修饰,典型地以改变抗体的一或多种功能性质,例如血清半衰期、补体固定、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性。此外,本发明的Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA MAb可以被化学修饰(例如,一或多个化学部分可以附接到抗体上)或被修饰以改变其糖基化,再次改变MAb的一或多种功能性质。下文更详细地描述这些实施例中的每一个。

[0169] 在一个实施例中,对CH1的铰链区进行修饰,使得铰链区中的半胱氨酸残基的数量发生改变,例如增加或减少。本方法进一步描述于博德默(BODMER)等人的美国专利第5,677,425号中。CH1的铰链区中的半胱氨酸残基的数量被改变,以例如促进轻链和重链的组装或提高或降低Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA MAb的稳定性。

[0170] 在另一个实施例中,抗体的Fc铰链区被突变以缩短Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它

TAA MAbs的生物半衰期。更具体地,将一或多个氨基酸突变引入到Fc铰链片段的CH2-CH3结构域界面区中,使得相对于天然Fc铰链结构域葡萄球菌A蛋白(SpA)结合,抗体的SpA结合受损。这种方法更详细地描述于沃德(WARD)等人的美国专利第6,165,745号中。

[0171] 在另一个实施例中,Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA MAbs被修饰以延长其生物半衰期。各种方法都是可能的。例如,可以引入突变,如授予沃德(Ward)的美国专利第6,277,375号中所述。可替代地,为了延长生物半衰期,可以在CH1或CL区内改变抗体以含有取自IgG的Fc区的CH2结构域的两个环的补救受体结合表位,如普雷斯塔(PRESTA)等人的美国专利第5,869,046号和第6,121,022号中所述。

[0172] 在其它实施例中,通过用不同氨基酸残基替换至少一个氨基酸残基来改变Fc区以改变Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA MAbs的效应子功能。例如,选自氨基酸特异性残基的一或多个氨基酸可以用不同的氨基酸残基替换,使得抗体对效应子配体的亲和力发生改变但保留亲本抗体的抗原结合能力。亲和力改变的效应子配体可以是例如补体的Fc受体或C1组分。这种方法更具体地描述于温特(Winter)等人的美国专利第5,624,821号和第5,648,260号中。

[0173] 在一个优选实施例中,Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA MAbs在以下位置处包括三重取代:L234A、L235A、L328C。

[0174] 在一个优选实施例中,Her2 MAbs在以下位置处包括三重取代:L234A、L235A、L328C。

[0175] 在一个优选实施例中,EGFR MAbs在以下位置处包括三重取代:L234A、L235A、L328C。

[0176] 在一个优选实施例中,Trop2 MAbs在以下位置处包括三重取代:L234A、L235A、L328C。

[0177] 在一个优选实施例中,CDH3 MAbs在以下位置处包括三重取代:L234A、L235A、L328C。

[0178] 在另一个优选实施例中,TAA MAbs在以下位置处包括三重取代:L234A、L235A、L328C。

[0179] 在另一个实施例中,Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA MAbs在以下位置处包括单重取代:L328C。

[0180] 在另一个实施例中,Her2 MAbs在以下位置处包括单重取代:L328C。

[0181] 在另一个实施例中,EGFR MAbs在以下位置处包括单重取代:L328C。

[0182] 在另一个实施例中,Trop2 MAbs在以下位置处包括单重取代:L328C。

[0183] 在另一个实施例中,CDH3 MAbs在以下位置处包括单重取代:L328C。

[0184] 在另一个实施例中,本公开的TAA MAbs在以下位置处包括单重取代:L328C。

[0185] 在另一个实施例中,Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA MAbs在以下位置处包括双重取代:L234A、L235A。

[0186] 在另一个实施例中,Her2 MAbs在以下位置处包括双重取代:L234A、L235A。

[0187] 在另一个实施例中,EGFR MAbs在以下位置处包括双重取代:L234A、L235A。

[0188] 在另一个实施例中,Trop2 MAbs在以下位置处包括双重取代:L234A、L235A。

[0189] 在另一个实施例中,CDH3 MAbs在以下位置处包括双重取代:L234A、L235A。

[0190] 在另一个实施例中,本公开的TAA Mab在以下位置处包括双重取代:L234A、L235A。

[0191] Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA抗体的反应性可以通过许多熟知手段来确定,包含蛋白质印迹、免疫沉淀、ELISA和FACS分析,视情况而定使用Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA相关蛋白、Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA表达细胞或其提取物。Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA抗体或其片段可以用可检测标志物标记或缀合到第二分子。合适的可检测标志物包含但不限于放射性同位素、荧光化合物、生物发光化合物、化学发光化合物、金属螯合剂或酶。

[0192] III.) 修饰效应子功能的Fc突变

[0193] 抗体的Fc区(即跨结构域CH2、CH3和部分铰链区的抗体的重链的末端)的可变性有限,并且参与了对抗体所起的生理作用的影响。归因于抗体的Fc区的效应子功能随抗体的类别和亚类而有所不同,并且包含抗体经由Fc区结合到细胞上的特异性Fc受体(“FcR”),从而触发各种生物反应。

[0194] 这些受体典型地具有介导结合到Fc的细胞外结构域、跨膜区和可以在细胞内介导某些信号传导事件的细胞内结构域。这些受体在多种免疫细胞中表达,包含单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、血小板、B细胞、大颗粒淋巴细胞、朗格汉斯细胞、自然杀伤(NK)细胞和T细胞。Fc/Fc γ R复合物的形成将这些效应子细胞募集到结合抗原的位点,从而典型地导致细胞内的信号传导事件和重要的后续免疫反应,例如炎症介质的释放、B细胞激活、内吞、吞噬和细胞毒性攻击。介导细胞毒性和吞噬效应子功能的能力是抗体破坏靶向细胞的潜在机制。其中表达Fc γ R的非特异性细胞毒性细胞识别靶细胞上的结合抗体并随后导致靶细胞的裂解的细胞介导反应被称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)(参见拉文奇(RAVETCH)等人,免疫学年鉴(Annu. Rev. Immunol.), 19(2001) 275-290)。其中表达Fc γ R的非特异性细胞毒性细胞识别靶细胞上的结合抗体并随后导致靶细胞的吞噬的细胞介导反应被称为抗体依赖性细胞介导的吞噬(ADCP)。此外,分子的Fc区上的重叠位点还控制由补体介导的非细胞依赖性细胞毒性功能的激活,所述功能也被称为补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0195] 此外,补体炎性级联是先天免疫反应的一部分,对个体抵御感染的能力至关重要。另一种重要的Fc配体是补体蛋白C1q。结合到C1q的Fc介导了一个被称为补体依赖性细胞毒性(CDC)的过程。C1q能够结合六种抗体,但结合到两种IgG足以激活补体级联。C1q与C1r和C1s丝氨酸蛋白酶形成复合物,以形成补体途径的C1复合物。

[0196] 在许多情况下,由免疫球蛋白的Fc区介导的效应子功能的结合和刺激是非常有益的。然而,在某些实例中,降低或甚至消除效应子功能可能更有利。对于被设计成用于将药物(例如,毒素和同位素)递送到靶细胞的那些抗体尤其如此,其中Fc/Fc γ R介导的效应子功能将健康的免疫细胞带到致命的有效载荷附近,从而导致正常淋巴组织与靶细胞一起耗尽(参见哈钦斯(HUTCHINS)等人,美国科学院院报(PNAS USA), 92(1995) 11980-11984。在这些情况下,使用募集补体或效应子细胞较差的抗体将具有巨大的益处(另参见美国专利第6,194,551号;美国专利第5,885,573号和PCT出版物WO 04/029207)。

[0197] 在其它实例中,例如在以阻断广泛表达的受体与其同源配体的相互作用为目标的情况下,降低或消除所有抗体效应子功能以降低不需要的毒性将是有利的。此外,在治疗性抗体在许多人体组织中表现出混杂结合的实例中,谨慎的做法是,将效应子功能的靶向限

于多种组织以限制毒性。最后,抗体对Fc γ RII受体的亲和力的降低将尤其有利于抗体经由Fc γ RII受体结合诱导血小板激活和聚集,这将是此类抗体的严重副作用。参见泰姆(TAM)等人,抗体(Antibodies),6:12(2017)。另参见韦伯(WEBER)等人,药学研究(Pharm Res),35:169(2018)。

[0198] 尽管某些亚类的人免疫球蛋白缺乏特定的效应子功能,但尚不存在已知的天然存在的缺乏所有效应子功能的免疫球蛋白。另一种方法是对Fc区中负责效应子功能的关键残基进行工程改造或突变。参见施罗特豪尔(SCHLOTHAUER)等人,蛋白质工程、设计与选择(Protein Eng.Design,and Selection),第29卷,第10期,第457-466页(2016)和王(WANG)等人,蛋白质细胞(Protein Cell),9(1),第63-73页(2018)。事实上,一些研究实体已经尝试过这种努力。参见例如PCT出版物WO 2009/100309(Medimmune)、WO 2006/076594(Xencor)、WO 1999/58572(剑桥大学)、US2006/0134709(Macrogenics)、WO 2006/047350(Xencor)、WO 2006/053301(Xencor),美国专利第6,737,056号(Genentech)、美国专利第5,624,821号(Scotgen Pharmaceuticals)、US2010/0166740(Roche)和US 8,969,526(Roche Glycart AG)。

[0199] IgG与激活性和抑制性Fc γ 受体或补体的第一组分(C1q)的结合取决于位于铰链区和CH2结构域的残基。CH2结构域的两个区域对Fc γ R和补体C1q结合至关重要,并且具有独特的序列。位置233-236处的人IgG1和IgG2残基以及位置327、330和331处的IgG4残基的取代大大降低了ADCC和CDC(参见阿穆尔(ARMOUR)等人,欧洲免疫学杂志(Eur.J.Immunol.),29(8)(1999)2613-2624;希尔兹(SHIELDS)等人,生物化学杂志(J.Biol.Chem.),276(9)(2001)6591-6604)。

[0200] 此外,伊度索基耶(IDUSOGIE)等人,免疫学杂志(J.Immunol.),166(2000)2571-2575绘制了美罗华(RITUXAN)的C1q结合位点,并且表明Pro329Ala降低了利妥昔单抗结合C1q和激活补体的能力。此外,据报道,用Ala取代Pro329会导致与Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIIIA受体的结合的减少(参见希尔兹(SHIELDS)等人,生物化学杂志(J.Biol.Chem.),276(9)(2001)6591-6604)。然而,这种突变也被描述为表现出与Fc γ RI和Fc γ RII的野生型样结合,并且与Fc γ RIIIA受体的结合只有非常小的减少(参见EP 1,068,241,Genentech)。

[0201] 此外,奥加尼扬(OGANESYAN)等人,结晶学学报(Acta Crystallographica),D64(2008)700-704将三重突变L234F/L235E/P331S引入下铰链和C2H结构域,并且表明了与人IgG1分子与人C1q受体、Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIIIA的结合活性的降低。

[0202] 针对前述背景,本发明涉及了一种用于制造包括Fc变体的多肽的方法,其中Fc被沉默和/或抑制。“亲本”、“起始”、“非变体”或“野生型”多肽使用本领域可用于生成包括Fc区的多肽或抗体的技术来制备。在本发明的优选实施例中,亲本多肽是抗体,并且用于生成抗体的示范性方法在本公开中更详细地描述。在进一步优选的实施例中,野生型多肽是结合本公开的Her2、EGFR、Trop2、CDH3和/或任何TAA的抗体(参见表IV)。

[0203] 本发明的一个实施例涵盖包括抗体的Fc区的多肽,其包括对Fc区的至少一个氨基酸残基的添加、取代或缺失,从而导致对至少一种Fc受体的亲和力的降低或消除。Fc区与许多受体或配体相互作用,包含但不限于Fc受体(例如,Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIIA)、补体蛋白C1q和其它分子,例如蛋白A和G。如本公开中所述,这些相互作用对于多种效应子功能和下游信号传导事件是必需的,包含但不限于抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗

体依赖性细胞吞噬 (ADCP) 和补体依赖性细胞毒性 (CDC)。

[0204] 因此,在某些实施例中,与具有与包括本发明的Fc变体但不包括对Fc区的至少一个氨基酸残基的添加、取代或缺失的多肽(在本文中也称为“野生型多肽”)相同的氨基酸序列的多肽相比,本发明的变体对负责效应子功能的Fc受体具有降低或消除的亲和力。在某些实施例中,包括本发明的Fc变体的多肽包括至少一或多种以下性质:降低或消除了效应子 (ADCC和/或CDC和/或ADCP) 功能、减少或消除了与Fc受体的结合、减少或消除了与C1q的结合、或降低或消除了毒性。更具体地,本发明的实施例提供对Fc γ 受体(例如,Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、Fc γ RIIIA、Fc γ RIIIB) 和/或补体蛋白C1q的亲和力降低的抗Her2、抗EGFR、抗Trop2、抗CDH3和抗TAA(肿瘤相关抗原(表IV)) 抗体。

[0205] 在一个实施例中,本发明包括包括三重突变的Her2、EGFR、Trop2、CDH3和TAA MAb。

[0206] 在一个实施例中,本发明的抗体包括在位置328处包括氨基酸残基的至少一个添加、取代或缺失的Fc区,其中恒定区的编号系统是卡巴特 (KABAT) 等人,NIH出版物,91 (1991) 3242,国家技术信息服务局,斯普林菲尔德,弗吉尼亚州所列的EU索引的编号系统。

[0207] 在一个实施例中,本发明的抗体包括在位置234处包括氨基酸残基的至少一个添加、取代或缺失的Fc区,其中恒定区的编号系统是卡巴特 (KABAT) 等人,NIH出版物,91 (1991) 3242,国家技术信息服务局,斯普林菲尔德,弗吉尼亚州所列的EU索引的编号系统。

[0208] 在一个实施例中,本发明的抗体包括在位置235处包括氨基酸残基的至少一个添加、取代或缺失的Fc区,其中恒定区的编号系统是卡巴特 (KABAT) 等人,NIH出版物,91 (1991) 3242,国家技术信息服务局,斯普林菲尔德,弗吉尼亚州所列的EU索引的编号系统。

[0209] 在本发明的某个方面,包括Fc变体的多肽包括抗体。在本发明的另一个方面,包括Fc变体的多肽包括人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区。在本发明的又一个方面,变体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。

[0210] 在另一个具体实施例中,上述多肽包括人IgG1区。

[0211] 在一个具体实施例中,本发明的多肽包括野生型人Fc多肽的Fc变体,所述变体在位置L328C处包括氨基酸取代,其中IgG Fc区中的残基的编号是如卡巴特 (Kabat) 中的EU索引的编号。在又一个实施例中,所述变体包括至少另一个氨基酸取代。在又一个实施例中,所述变体包括至少另一个氨基酸取代。在又一个实施例中,所述变体在L234A、L235A和L328C处包括三 (3) 个氨基酸取代。

[0212] 在一个具体实施例中,本发明的抗Her2 MAb包括野生型人Fc Her2 Mab的Fc变体,其在L234A、L235A和L328C处包括三 (3) 个氨基酸取代。

[0213] 在一个具体实施例中,本发明的抗EGFR MAb包括野生型人Fc EGFR Mab的Fc变体,其在L234A、L235A和L328C处包括三 (3) 个氨基酸取代。

[0214] 在一个具体实施例中,本发明的抗Trop2 MAb包括野生型人Fc Trop2 Mab的Fc变体,其在L234A、L235A和L328C处包括三 (3) 个氨基酸取代。

[0215] 在一个具体实施例中,本发明的抗CDH3 MAb包括野生型人Fc CDH3 Mab的Fc变体,其在L234A、L235A和L328C处包括三 (3) 个氨基酸取代。

[0216] 在一个具体实施例中,本发明的TAAMAb包括野生型人Fc TAA Mab的Fc变体,其在L234A、L235A和L328C处包括三 (3) 个氨基酸取代。

[0217] 在一个方面,与未经修饰的抗体相比,包括Fc变体的多肽不影响靶标结合。

[0218] 在一个方面,与未经修饰的抗体相比,包括本发明的Fc变体的多肽表现出Fc γ RI结合的抑制。

[0219] 一个方面,与未经修饰的抗体相比,包括本发明的Fc变体的多肽表现出Fc γ RII结合的抑制。

[0220] 在一个方面,与未经修饰的抗体相比,包括本发明的Fc变体的多肽表现出Fc γ RIIIa结合的抑制。

[0221] 在一个方面,与未经修饰的抗体相比,包括本发明的Fc变体的多肽基本上不影响FcRn结合。

[0222] 如本领域的普通技术人员将了解,并且本发明发现的令人惊讶的认识发现,对三重突变的需要,具体地是在L234A和L235A处添加氨基酸取代,是由于以下观察结果。首先,L328C本身仅表现出Fc效应子功能的部分降低。通过组合另外的突变可以实现更大程度的Fc沉默。选择L234和L235是因为这些残基位于铰链区附近并且在突变成丙氨酸时可以部分地减少Fc γ R结合。L234A和L235A与L328C的组合对测试的所有同种型表现出Fc γ R相互作用的几乎完全抑制。

[0223] 如所观察,即使完全消除了Fc γ R结合,三重突变(L328C与L234A/L235A组合)也不会影响靶抗原结合,因为与野生型对应物相比,观察到了相当的结合活性。抗体稳定性和表达也保持与野生型抗体相当。因此,三重突变允许完全抑制Fc效应子功能,而不会损害靶标特异性、抗体质量和产量。

[0224] 此外,如下文讨论,特定的三重突变可以促进有效的位点特异性缀合。

[0225] IV.) 抗体药物缀合物

[0226] 在另一个方面,本发明提供了抗体-药物缀合物(ADC),其包括缀合到治疗剂的抗体。治疗剂可以是细胞毒性剂、细胞抑制剂、化学治疗剂、药物、生长抑制剂、毒素(例如,细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素,或其片段)或放射性同位素(即放射性缀合物)。在另一个方面,本发明进一步提供了使用ADC的方法。在一个方面,ADC包括与细胞毒性剂或可检测剂共价附接或经由铰键附接的上述Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAAMAb中的任一个。

[0227] 在另一个实施例中,ADC包括Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA Mab,其在以下位置处进一步包括三重取代:L234A、L235A、L328C。

[0228] 在一个优选实施例中,ADC包括Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA Mab,其在以下位置处进一步包括三重取代:L234A、L235A、L328C,并且在L328C处进一步包括位点特异性缀合。

[0229] 作为背景,抗体-药物缀合物用于局部递送细胞毒性剂或细胞抑制剂,即递送药物以在癌症治疗中杀死或抑制肿瘤细胞(锡里戈斯(Syrigos)和埃佩内托斯(Epenetos), (1999)抗癌研究(Anticancer Research), 19:605-614;尼库莱斯库-杜瓦兹(NICULESCU-DUVAZ)和施普林格(SPRINGER), (1997)高级药物递送综述(Adv.Drg.Del.Rev.), 26:151-172;美国专利第4,975,278号),这允许将药物部分靶向递送到肿瘤并在其中进行细胞内积聚,其中这些未缀合药物试剂的全身性施用可能对正常细胞以及寻求消除的肿瘤细胞造成不可接受水平的毒性(鲍德温(BALDWIN)等人, (1986)柳叶刀(Lancet), (1986年3月15日)第603-05页;索普(Thorpe), (1985)“癌症疗法中的细胞毒性剂的抗体载体:综述(Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy:A Review)”, 84年单克隆抗体:生物

学和临床应用(Monoclonal Antibodies'84:Biological and Clinical Applications), A.平凯拉(A.PINCHERA)等人(编辑),第475-506页)。由此,寻求具有最小毒性的最大功效。多克隆抗体和单克隆抗体都已被报道在这些策略中(罗兰(Rowland)等人,(1986)癌症免疫现状(Cancer Immunol.Immunother.),21:183-87)。这些方法中使用的药物包含道诺霉素、多柔比星、甲氨蝶呤和长春地新(罗兰(ROWLAND)等人,(1986)同上)。抗体-毒素缀合物中使用的毒素包含细菌毒素,例如白喉毒素、植物毒素,例如蓖麻毒素、小分子毒素,例如格尔德霉素(曼德勒(MANDLER)等人,(2000)国家癌症研究所杂志(Jour.of the Nat.Cancer Inst.),92(19):1573-1581;曼德勒(MANDLER)等人,(2000)生物有机与药物化学快讯(Bioorganic&Med.Chem.Letters),10:1025-1028;曼德勒(MANDLER)等人,(2002)生物缀合化学(Bioconjugate Chem.),13:786-791)、美登木素生物碱(EP 1391213;刘(LIU)等人,(1996)美国科学院院报(Proc.Natl.Acad.Sci.USA),93:8618-8623)和卡奇霉素(洛德(LODE)等人,(1998)癌症研究(Cancer Res.),58:2928;辛曼(HINMAN)等人,(1993)癌症研究(Cancer Res.)53:3336-3342)。毒素可能通过包含微管蛋白结合、DNA结合或拓扑异构酶抑制的机制影响它们的细胞毒性和细胞抑制作用。当缀合到大抗体或蛋白受体配体时,一些细胞毒性药物往往无活性或活性较低。

[0230] 抗体药物缀合物的实例有ADCETRIS(本妥昔单抗,Seattle Genetics)、ZEVALIN®(替伊莫单抗,Biogen/Idec)、MYLOTARG™(吉妥单抗,Wyeth Pharmaceuticals)、KADCYLA®(ado曲妥珠单抗,Genentech)、BESPONSA®(奥英妥珠单抗,Pfizer/Wyeth)、POLIVY(泊洛妥珠单抗,Genentech/Roche)、莫坎妥珠单抗(Immunogen,Inc.)和MLN-2704(Millennium Pharm.,BZL Biologics,Immunogen Inc.)。

[0231] 此外,本文描述了治疗剂,包括但不限于可用于生成ADC的化学治疗剂。可以使用的酶活性毒素及其片段包含白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌)、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α -帚曲霉素、油桐蛋白、石竹毒素(dianthin)蛋白、美洲商陆蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜抑制剂、麻疯树毒素、巴豆毒素、肥皂草抑制剂、白树毒素、丝林霉素、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素和单端孢霉烯。参见例如1993年10月28日出版的WO 93/21232。多种放射性核素可用于生产放射性缀合抗体。实例包含²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y和¹⁸⁶Re。抗体和细胞毒性剂的缀合物是使用多种双官能蛋白偶联剂制成的,例如N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶二巯基)丙酸酯(SPDP)、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯的双官能衍生物(例如,己二亚胺酸二甲酯HCl)、活性酯(例如,辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛(例如,戊二醛)、双叠氮化合物(例如,双(对叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(例如,双-(对重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(例如,甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(例如,1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可以如维泰塔(Vitetta)等人,(1987)科学(Science),238:1098中所述制备蓖麻毒素免疫毒素。碳-14标记的1-异硫氰苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸缀合到抗体的示范性螯合剂(WO94/11026)。

[0232] 可以缀合到本发明的抗体的其它抗肿瘤剂包含BCNU、链脲菌素、长春新碱和5-氟尿嘧啶、描述于美国专利第5,053,394号、第5,770,710号中的被统称为LL-E33288复合物的试剂家族以及埃斯培拉霉素(美国专利第5,877,296号)。

[0233] 可以使用的酶活性毒素及其片段包含白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒

素A链(来自铜绿假单胞菌)、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α -帚曲霉素、油桐蛋白、石竹毒素蛋白、美洲商陆蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜抑制剂、麻疯树毒素、巴豆毒素、肥皂草抑制剂、白树毒素、丝林霉素、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素和单端孢霉烯。参见例如WO 93/21232(1993年10月28日出版)。

[0234] 本发明进一步考虑了在抗体和具有核溶解活性的化合物(例如,核糖核酸酶或DNA核酸内切酶,例如脱氧核糖核酸酶;DNA酶)之间形成的ADC。

[0235] 对于肿瘤的选择性破坏,抗体可以包括高放射性原子。多种放射性同位素可用于生产放射性缀合抗体。实例包含 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{88} 、 Sm^{53} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 和Lu的放射性同位素。当缀合物用于检测时,它可以包括用于闪烁显像研究的放射性原子,例如 $\text{tc}^{99\text{m}}$ 或 I^{123} ,或用于核磁共振(NMR)成像(也被称为磁共振成像,mri)的自旋标记,例如再次提及的碘-123、碘-131、钆-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

[0236] 可以以已知方式将放射性标记或其它标记掺入缀合物中。例如,肽可以是生物合成的,或者可以通过化学氨基酸合成使用合适的氨基酸前体合成,其涉及例如用氟-19代替氢。如 $\text{tc}^{99\text{m}}$ 或 I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 和 In^{111} 等标记可以经由肽中的半胱氨酸残基附接。钆-90可以经由赖氨酸残基附接。可以使用IODOGEN方法(弗雷克(FRAKER)等人,(1978)生物化学和生物物理学研究通讯(Biochem.Biophys.Res.Comm.),80:49-57来掺入碘-123。“免疫闪烁显像中的单克隆抗体(Monoclonal Antibodies in Immunoscinigraphy)” (沙塔尔(CHATAL),CRC出版社,1989)详细地描述了其它方法。

[0237] 本发明尤其提供了用于靶向递送治疗剂的抗体-药物缀合物化合物。发明人已经发现,抗体-药物缀合物化合物对表达Her2、EGFR、Trop2、CDH3和其它TAA的细胞具有强效的细胞毒性和/或细胞抑制活性。

[0238] 抗体-药物缀合物化合物包括与至少一个药物单元共价连接的抗体单元。药物单元可以直接共价连接或经由连接子单元(-LU-)连接到抗体单元。此外,药物单元在L328C处的位点特异性位置处缀合。

[0239] 在一些实施例中,抗体药物缀合物化合物具有下式:

[0240] $\text{L}-(\text{LU}-\text{D})_p(\text{I})$

[0241] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物;其中:

[0242] O L是抗体单元,例如本发明的Her2、EGFR、Trop2、CDH3或另一种TAA MAb;并且其中MAb在以下位置处包括三重突变:L234A、L235A和L328C;

[0243] $\text{O}(\text{LU}-\text{D})$ 是连接子单元-药物单元部分,其中:

[0244] O LU-是一个连接器单元,并且

[0245] $\text{O}-\text{D}$ 是对靶细胞具有细胞抑制或细胞毒性活性的药物单元;并且

[0246] O p的范围为1到20或者1-50。

[0247] 此外,药物单元部分在L328C处的MAb上的位点特异性位置处缀合。

[0248] 在一些实施例中,抗体药物缀合物化合物具有下式:

[0249] $\text{L}-(\text{A}_a-\text{W}_w-\text{Y}_y-\text{D})_p(\text{II})$

[0250] 或其药学上可接受的盐或溶剂合物,其中:

[0251] O L是抗体单元,例如Her2、EGFR、Trop2、CDH3或另一种TAA MAb,并且其中MAb在以下位置处包括三重突变:L234A、L235A和L328C;并且

[0252] $\bigcirc-A_a-W_w-Y_y$ -是连接子单元 (LU), 其中:

[0253] $\bigcirc-A$ -是延伸子单元,

[0254] $\bigcirc a$ 是0或1或2或3,

[0255] $\bigcirc$ 每个-W-独立地是氨基酸单元,

[0256] $\bigcirc w$ 是0到12的整数,

[0257] $\bigcirc-Y$ -是自我牺牲型间隔子单元,

[0258] $\bigcirc y$ 是0、1或2;

[0259] $\bigcirc-D$ 是对靶细胞具有细胞抑制或细胞毒性活性的药物单元;并且

[0260] $\bigcirc p$ 是1到20或者1-50的整数。

[0261] 此外, 药物单元部分在L328C处的MAb上的位点特异性位置处缀合。

[0262] 对于包括多种抗体的组合物, 载药量由p表示, 其为每个抗体的平均药物分子数。每个抗体的载药量范围为1到20个药物(D)。缀合反应物的制备中的每个抗体的平均药物数可以通过常规手段表征, 例如质谱、ELISA测定和HPLC。也可以确定抗体-药物缀合物以p表示的定量分布。在一些实例中, 可以通过如反相HPLC或电泳等手段实现其中p为某一值的同质抗体-药物缀合物与具有其它载药量的抗体-药物缀合物的分离、纯化和表征。在示范性实施例中, p为2到8。

[0263] 抗体-药物缀合物化合物的生成可以通过本领域的技术人员已知的任何技术来完成。简而言之, 抗体-药物缀合物化合物包括Her2、EGFR、Trop2、CDH3或另一种TAA MAb, 并且其中MAb包括作为抗体单元的三重突变、药物和任选的连接子, 所述三重突变位于以下位置处: L234A、L235A和L328C; 所述连接子将药物和结合剂接合在一起。在一个优选实施例中, 药物单元在L328C处的位点特异性位置处缀合。

[0264] 许多不同的反应可用于药物和/或连接子与结合剂的共价附接。这通常通过结合剂(例如, 抗体分子)的氨基酸残基的反应来完成, 所述氨基酸残基包含赖氨酸的胺基团、谷氨酸和天冬氨酸的游离羧酸基团、半胱氨酸的巯基和芳香族氨基酸的各个部分。最常用的非特异性共价附接方法之一是将化合物的羧基(或氨基)基团与抗体的氨基(或羧基)基团连接的碳二亚胺反应。此外, 已使用如二醛或亚胺酯等双官能试剂来将化合物的氨基基团连接到抗体分子的氨基基团。席夫碱反应也可用于药物与结合剂的附接。本方法涉及含有二醇或羟基基团的药物的高碘酸盐氧化, 从而形成醛, 其然后与结合剂反应。经由与结合剂的氨基基团形成席夫碱而发生附接。也可以使用异硫氰酸酯作为偶联剂来将药物共价附接到结合剂。其它技术是本领域的技术人员已知的并且在本发明的范围内。

[0265] 在某些实施例中, 作为连接子前体的中间体在适当条件下与药物反应。在某些实施例中, 在药物和/或中间体上使用反应性基团。药物和中间体或衍生药物之间的反应的产物随后在适当条件下与Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA MAb反应。

[0266] V.) ADC的位点特异性缀合形式

[0267] 如本领域的普通技术人员将了解, 在ADC的背景下优化有效载荷放置和缀合物组成的能力是有利的努力。参见阿比基特 (ABHIJIT) 等人, 生物过程国际 (Bioprocess Int.), Mab上游加工 (Mab Upstream Processing) (2014年10月)。

[0268] 一般来说, 生物缀合策略涉及将蛋白质或肽(生物剂)与小分子、碳水化合物、寡核苷酸、合成聚合物或另一种蛋白质/肽共价连接。这种方法对于在竞争激烈的生物剂市场中

创造差异化和推动产品开发至关重要。这些策略对于开发高度成功的缀合物疫苗,例如 Prevnar 13、Menactra、Menomune和HibTITER,是必不可少的。这四(4)种是通过将细菌多糖缀合到免疫原性载体蛋白而产生的。类似地,与半衰期延长聚合载体,例如聚乙二醇(PEG),的生物缀合的应用产生了目前的商业药物,例如赛妥珠单抗(Cimzia)、培非格司亭(Neulasta)和培维索孟(Somavert),其作用持续时间比其非缀合对应物更长并且给药方案促进患者依从性。

[0269] 如本领域已知,用于制造第一代ADC的连接子和缀合化学的选择取决于使用蛋白质的限制。因此,用被设计成与属于如半胱氨酸(硫醇)或赖氨酸(胺)等天然氨基酸的表面可及的亲核氨基酸侧链特异性反应的反应性基团对连接子进行官能化。

[0270] 然而,用二硫苏糖醇(DTT)或三(2-羧乙基)膦(TCEP)等还原剂处理抗体可能破坏这些二硫键并暴露游离硫醇,其然后可以容易地与含马来酰亚胺连接子缀合。可以还原至多四个链间二硫键,从而暴露至多八个反应性硫醇基团以进行缀合。为硫醇化学缀合开发的条件导致二硫键的完全或部分还原,并且使用本方法制造的缀合物可以在每个抗体分子中含有零个、两个、四个、六个或八个药物。

[0271] 值得注意的是,除了每个抗体分子的药物数之外,另一个异质性水平也来自缀合位点。因此,通过半胱氨酸缀合生成的具有特定药物/抗体比(DAR)的ADC仍然是具有不同缀合位点的缀合物的异质混合物。然而,公平地说,因为只有八个位点可用于半胱氨酸缀合(相较于至多80个可用于赖氨酸指向化学),半胱氨酸缀合方法提供了更好的对缀合位点的控制,从而有助于更好的表征。受控还原-烷基化策略已成功用于制造经批准的ADCETRIS(Seattle Genetics,波塞尔,华盛顿州)产品以及目前正在进行临床试验的许多其它ADC。

[0272] 研究人员研究了靶向CD30+肿瘤细胞的ADC的体内效应,其中每个抗体分子具有两个、四个和八个一甲基奥瑞他汀E(MMAE)毒素;并且证明了载药量的化学计量显著影响药物的药代动力学(PK)、功效和毒性。汉布莱特(HAMBLETT)等人发现在他们的系统中,每个抗体具有四个药物的ADC比每个抗体具有两个药物的那些更强效,但相较于每个抗体具有八个药物的那些具有相当的功效和更好的耐受性。结果指示,通常,具有较高的载药量的ADC具有较大的清除率、较高的功效和更高的毒性。这意味着每个ADC将具有在功效和毒性的适当平衡下的最佳载药量。

[0273] 这项开创性工作确立了DAR是ADC的关键设计参数的概念。很明显,与天然半胱氨酸或赖氨酸残基的化学缀合不是最理想的,因为它们会产生异质ADC混合物。异质性来自DAR和缀合位点的差异,从而导致ADC亚群可能较不强效、毒性更大,并且具有不同的处置和PK性质。此外,制造期间的分析表征和控制批次间变化仍然是此类非选择性缀合方法的重大挑战。为了克服这些限制,位点特异性缀合的概念已经有所发展,最初的目标是生产同质ADC并控制DAR和缀合位点。

[0274] 使用多种技术来优化有效载荷放置,证实了几种位点特异性缀合技术(参见例如, ThioMab(Genentech)、Seattle Genetics和Ambrx, Inc.)。

[0275] 所报道的关于ThioMab的工作揭示了另一个基本概念:不仅ADC同质性是改善生物物理和治疗性质的关键,而且抗体骨架上的实际结合位点也对ADC分子的体内行为产生重大影响。沈(SHEN)等人使用MMAE有效载荷制造了具有HER2靶向抗体的多种同质TDC缀合物,其中用于缀合的经工程改造的半胱氨酸位于抗体的轻链(LC)、重链(HC)或Fc区。所有缀合

物都表现出相当的体外效力,但作者报告了它们在体内功效和PK性质方面的显著差异。

[0276] 当在小鼠异种移植模型中研究时,LC缀合物表现出最大的功效,其中HC缀合物具有中等活性,而Fc缀合物几乎没有活性。一项小鼠PK研究揭示了类似的趋势,其中LC缀合物表现出最大的稳定性和最低的清除率,其次是HC缀合物,而Fc缀合ADC清除最快并提供最低的ADC暴露。这些结果归因于局部微环境和溶剂可及性的差异,这导致不同位点处的连接子系统的稳定性不同。

[0277] 已经报道了另外的几种位点特异性生物缀合方法,其目标是递送相对于第一代赖氨酸和半胱氨酸缀合的同质ADC,但这些技术中只有一部分在为给定抗体-有效载荷组合找到最佳缀合位点方面提供了更大的多功能性。这些包含通过遗传密码修饰引入的非天然氨基酸 (nnAA) 的缀合 (Ambrx, 拉荷亚, 加利福尼亚州; Sutro Biopharma, 南圣弗朗西斯科, 加利福尼亚州; Allozyne, 由Medimmune收购, 西雅图, 华盛顿州); 以及转谷氨酰胺酶 (TG) 介导的与经工程改造的谷氨酰胺标签的缀合 (Pfizer, 纽约, 纽约州); 以及与由共表达的甲酰甘氨酸生成酶 (FGE) 生成的醛标记抗体的缀合 (Redwood Bioscience, 由Catalent Pharma Solutions收购, 埃默里维尔, 加利福尼亚州)。

[0278] 基于上述,对提供灵活位点特异性缀合选项的技术进行的研究已经确定缀合位点显著影响ADC的药理学性质。因此,它应被视为产品设计中的关键参数,并且为特定有效载荷-抗体组合找到最佳位点的能力对于一或多种产品的开发的成功可能至关重要。参见舒马赫 (SCHUMACHER) 等人,临床免疫学杂志 (J.Clin.Immunol), 36 (副刊1): S100-S107 (2016); 德纳雷恩 (DEONARAIN) 等人,药物发现专家意见 (Expert Opin.Drug Discov), 10 (5) (2015); 周 (ZHOU), 生物医学 (Biomedicines), 5:64 (2017); 帕诺斯基 (PANOWSKI) 等人,单克隆抗体 (mAbs), 6:1, 第34-45页 (2014年1月/2月); PCT专利出版物W02018/20081和美国专利出版物号:2017/0080103。

[0279] 在一个实施例中,经由在单克隆抗体的Fc结构域中将Leu-328转化为Cys的位点特异性缀合方法允许受控缀合而不影响靶标结合。此外,据表明,L328C的引入不会损害抗体的表达水平和稳定性。

[0280] 在另一个实施例中,经由在Her2抗体的Fc结构域中将Leu-328转化为Cys的位点特异性缀合方法允许受控缀合而不影响靶标结合。此外,据表明,L328C的引入不会损害抗体的表达水平和稳定性。

[0281] 在另一个实施例中,经由在EGFR抗体的Fc结构域中将Leu-328转化为Cys的位点特异性缀合方法允许受控缀合而不影响靶标结合。此外,据表明,L328C的引入不会损害抗体的表达水平和稳定性。

[0282] 在另一个实施例中,经由在Trop2抗体的Fc结构域中将Leu-328转化为Cys的位点特异性缀合方法允许受控缀合而不影响靶标结合。此外,可以表明,L328C的引入不会损害抗体的表达水平和稳定性。

[0283] 在另一个实施例中,经由在CDH3抗体的Fc结构域中将Leu-328转化为Cys的位点特异性缀合方法允许受控缀合而不影响靶标结合。此外,据表明,L328C的引入不会损害抗体的表达水平和稳定性。

[0284] 在另一个实施例中,经由在TAA抗体 (例如,表IV所列的TAA) 的Fc结构域中将Leu-328转化为Cys的位点特异性缀合方法允许受控缀合而不影响靶标结合。此外,据表明,

L328C的引入不会损害抗体的表达水平和稳定性。

[0285] 选择由L328C介导的位点特异性缀合方法以是药物产品更具同质性并改善缀合效率。包含抗体药物缀合物(ADC)的各种治疗方式可以受益于位点特异性缀合,因为它可以防止异质混合物的形成,这会对体内功效和治疗指数产生负面影响。类似地,将含硼实体附接到抗体分子的特定位置可以改善硼中子捕获疗法(BNCT)的功效,所述硼中子捕获疗法是一种用于治疗癌症的非侵入性治疗方式。

[0286] 单克隆抗体的Fc结构域中的Leu-328向Cys的转化允许受控缀合而不影响靶标结合。此外,L328C的引入不会损害抗体的表达水平和稳定性。经由尺寸排阻色谱进行的质量评估示出>99%的主峰,与野生型对应物相当。因此,针对L328C未观察到通常与非成对半胱氨酸的引入相关的聚集倾向。与非特异性缀合对应物所需的复杂且低效的生产过程相比,由L328C介导的具有100%缀合效率的均匀产物形成意味着更简单的制造过程。通过L328C缀合介导的明确且同质的组合物大大降低了治疗负担并实现了更简单的制造过程,其能够加速ADC和用于BNCT应用的抗体硼缀合物的发现和开发。

[0287] 此外,L328C还表现出降低Fc效应子功能的额外益处。已经报道了与治疗性单克隆抗体触发的输液反应及其与Fc γ R的相互作用相关的安全负担。在不损害抗体稳定性的情况下部分地沉默Fc效应子功能的能力是L328C的一个吸引人的特征。可以针对L328C介导的缀合或作为裸抗体进一步开发改善临床安全性的潜在缓解策略,其可能与先前示出的其它变型组合以降低Fc效应子功能。

[0288] VI.) 连接子单元

[0289] 典型地,抗体-药物缀合物化合物包括药物单元和抗体单元之间的连接子单元。在一些实施例中,连接子在细胞内条件下是可切割的,使得连接子的切割从细胞内环境中的抗体释放药物单元。在其它实施例中,连接子单元是不可切割的,并且药物例如通过抗体降解而释放。

[0290] 在一个优选实施例中,连接子在位点特异性位置L328C处缀合。

[0291] 在一些实施例中,连接子可被存在于细胞内环境中(例如,溶酶体或内体或小窝内)的切割剂切割。连接子可以是例如肽基连接子,其被细胞内肽酶或蛋白酶切割,包括但不限于溶酶体或内体蛋白酶。连接子也可以被存在于细胞外环境中(例如,细胞膜或组织空间附近)的切割剂切割。连接子可以是例如肽基连接子,其被细胞外肽酶或蛋白酶切割,包括但不限于组织蛋白酶家族酶或基质金属蛋白酶。

[0292] 在其它实施例中,可切割连接子是pH敏感的,即在某些pH值下对水解敏感。典型地,pH敏感连接子可在酸性条件下水解。例如,可以使用可在溶酶体中水解的酸不稳定连接子(例如,脲、脲、半卡巴脲、硫代半卡巴脲、顺乌头酰胺、原酸酯、缩醛、缩酮等)。(参见例如美国专利第5,122,368号;第5,824,805号;第5,622,929号;杜博奇克(DUBOWCHIK)和沃克尔(WALKER),1999,药理学和治疗学(Pharm. Therapeutics),83:67-123;内维尔(NEVILLE)等人,1989,生物化学(Biol. Chem.),264:14653-14661)。

[0293] 在其它实施例中,连接子可在本领域已知的还原条件下切割。(参见例如索普(Thorpe)等人,1987,癌症研究(Cancer Res.),47:5924-5931;瓦夫齐恩扎克(WAWRZYNCZAK)等人,免疫缀合物:放射成像和癌症疗法中的抗体缀合物(Immunoconjugates:Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer)

(C.W.沃格尔(C.W.VOGEL)编辑,牛津大学出版社,1987。另参见美国专利第4,880,935号)。连接子也可以在细胞内(或细胞外)发现的还原条件下被切割。例如,在一个优选实施例中,特定的连接子N-O键可以在形式上被还原并断裂,以导致连接子的切割。

[0294] 在其它实施例中,连接子单元是不可切割的,并且药物通过抗体降解而释放。(参见PCT公开案第W02012/166560号(Ambrx, Inc.),其通过引用整体并出于所有目的并入本文)。

[0295] 在其它非相互排斥的实施例中,连接子促进本领域已知的细胞内化。

[0296] 可以与本发明组合和方法一起使用的多种示范性连接子描述于W0 2004/010957、美国公开案第2006/0074008号、美国公开案第20050238649号和美国公开案第2006/0024317号(其中每一个都通过引用整体并出于所有目的并入本文)。

[0297] VII.) 延伸子单元

[0298] 当存在时,延伸子单元(A)能够将抗体单元连接到氨基酸单元(-W-) (如果存在),连接到间隔子单元(-Y-) (如果存在);或连接到药物单元(-D)。可以天然存在或经由化学操纵存在于Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA MAb上的有用官能团包含但不限于酮基、醛、巯基、氨基、羟基、碳水化合物的异头羟基和羧基。合适的官能团是酮基、醛、巯基和氨基。在一个实例中,酮基基团位于掺入本发明的MAb的非天然氨基酸(nnAA)上。在另一个实例中,醛基团位于掺入本发明的MAb的nnAA上。在另一个实例中,巯基可以通过Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA MAb的分子内二硫键的还原而生成。在另一个实施例中,巯基可以通过Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA MAb的赖氨酸部分的氨基与2-亚氨基硫烷(特劳特试剂)或其它巯基生成试剂的反应而生成。在某些实施例中,Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA MAb是重组抗体并且被工程改造成携带一或多个赖氨酸。在某些其它实施例中,重组Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAAMAb被工程改造成携带另外的巯基,例如另外的半胱氨酸。

[0299] 在一个优选实施例中,Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA MAb在L234A、L235A处包括Fc修饰,并且在L328C处进一步包括另一个修饰,并且在L328C处进一步包括位点特异性缀合。

[0300] 在一个优选实施例中,延伸子单元位于L328C处。

[0301] VIII.) 氨基酸单元

[0302] 当存在时,氨基酸单元(-W-)将延伸子单元连接到间隔子单元(如果间隔子单元存在),将延伸子单元连接到药物部分(如果间隔子单元不存在),并将抗体单元连接到药物单元(如果延伸子单元和间隔子单元不存在)。

[0303] 在某些实施例中,氨基酸单元可以包括天然氨基酸。在其它实施例中,氨基酸单元可以包括非天然氨基酸。

[0304] 在一些实施例中,氨基酸单元可以被包含癌症或肿瘤相关蛋白酶的一或多种酶酶促切割,以释放药物单元(-D),在一个实施例中,所述药物单元在释放后在体内被质子化以提供药物(D)。

[0305] 在一个优选实施例中,氨基酸单元位于L328C处。

[0306] IX.) 间隔子单元

[0307] 当存在时,间隔子单元(-Y-)将氨基酸单元连接到药物单元(当氨基酸单元存在时)。可替代地,当氨基酸单元不存在时,间隔子单元将延伸子单元连接到药物单元。当氨基

酸单元和延伸子单元都不存在时,间隔子单元还将药物单元连接到抗体单元。间隔子单元有两种一般类型:非自我牺牲型或自我牺牲型。本发明的可能的间隔子的实例在本领域中是已知的。参见托奇(TOKI)等人,2002,有机化学杂志(J.Org.Chem.),67:1866-1872和自然-生物技术(Nature Biotechnology),21(7):778-784)。

[0308] 自我牺牲型间隔子的其它实例包含但不限于在电子上与PAB基团相似的芳香族化合物,例如2-氨基咪唑-5-甲醇衍生物(哈伊(HAY)等人,1999,生物有机与药物化学快讯(Bioorg.Med.Chem.Lett.),9:2237)和邻或对氨基苄基缩醛。可以使用在酰胺键水解时发生环化的间隔子,例如经取代和未经取代的4-氨基丁酸酰胺(罗德里格斯(RODRIGUES)等人,1995,化学生物学(Chemistry Biology),2:223)、经适当取代的双环[2.2.1]和双环[2.2.2]环系(斯托姆(STORM)等人,1972,美国化学学会杂志(J.Amer.Chem.Soc.),94:5815)和2-氨基苯基丙酸酰胺(阿姆斯伯里(AMSBERRY)等人,1990,有机化学杂志(J.Org.Chem.),55:5867)。在甘氨酸的 α 位处取代的含胺药物的消除(金斯伯里(KINGSBURY)等人,1984,药物化学杂志(J.Med.Chem.),27:1447)也是自我牺牲型间隔子的实例。

[0309] 在一个优选实施例中,氨基酸单元位于L328C处。

[0310] X.) 药物单元

[0311] 药物单元(D)可以是任何治疗剂。例如,药物单元可以是具有细胞毒性、细胞抑制性或免疫调节性(例如,免疫抑制性)的部分或化学治疗剂。D是具有可以与间隔子单元(如果存在)、氨基酸单元(如果存在)、延伸子单元(如果存在)或抗体单元形成键的原子的药物单元(部分)。在一些实施例中,药物单元D具有可以与间隔子单元(如果使用)形成键的氮原子。如本文使用,术语“药物单元”和“药物部分”是同义词并且可互换使用。

[0312] XI.) 确定ADC的细胞毒性作用的方法

[0313] 确定药物或抗体-药物缀合物是否对细胞发挥细胞抑制和/或细胞毒性作用的方法是已知的。通常,ADC的细胞毒性或细胞抑制活性可以通过以下测量:将表达抗体药物缀合物的靶蛋白的哺乳动物细胞暴露在细胞培养基中;培养细胞约6小时到约5天;并测量细胞活力。可以使用基于细胞的体外测定来测量抗体药物缀合物的活力(增殖)、细胞毒性和凋亡诱导(半胱天冬酶激活)。

[0314] 为了确定ADC是否发挥细胞抑制作用,可以使用胸苷掺入测定。例如,可以在96孔板中以5,000个细胞/孔的密度培养表达靶抗原的癌细胞72小时,并在72小时期间的最后8小时内暴露于 $0.5\mu\text{Ci}$ 的 ^3H -胸苷。在存在和不存在ADC的情况下测量 ^3H -胸苷在培养细胞中的掺入。

[0315] 为了确定细胞毒性,可以测量坏死或凋亡(程序性细胞死亡)。坏死典型地伴有质膜通透性增加;细胞肿胀和质膜破裂。凋亡典型地表征为膜出泡、细胞质浓缩和内源性核酸内切酶的激活。任何这些对癌细胞的作用的确定指示ADC可用于治疗癌症。

[0316] 细胞活力可以通过测定细胞中的染料的吸收来测量,所述染料例如中性红、台盼蓝或ALAMARTM蓝(参见例如佩奇(PAGE)等人,1993,国际肿瘤学杂志(Intl.J.Oncology),3:473-476)。在此测定中,将细胞在含有染料的培养基中孵育,洗涤细胞,并通过分光光度法测量剩余的染料,这反映了细胞对染料的吸收。也可以使用蛋白质结合染料磺基罗丹明B(SRB)来测量细胞毒性(斯基汉(SKEHAN)等人,1990,国家癌症研究所杂志(J.Natl.Cancer

Inst.), 82:1107-12)。

[0317] 可替代地,可以在通过检测活细胞而并非死细胞的哺乳动物细胞存活和增殖的定量比色测定中使用四唑鎓盐,例如MTT(参见例如莫斯曼(MOSMANN),1983,免疫学方法杂志(J.Immunol.Methods),65:55-63)。

[0318] 凋亡可以通过测量例如DNA片段化来量化。

[0319] 可使用用于DNA片段化的定量体外确定的商业光度测定法。此类测定的实例,包含TUNEL(其检测片段化DNA中的标记核苷酸的掺入)和基于ELISA的测定,描述于生物化学(Biochemica),1999,第2期,第34-37页(Roche Molecular Biochemicals)中。

[0320] 凋亡也可以通过测量细胞中的形态变化来确定。例如,与坏死一样,质膜完整性的丧失可以通过测量某些染料(例如,荧光染料,例如吖啶橙或溴化乙锭)的吸收来确定。用于测量凋亡细胞数的方法已由杜克(Duke)和科恩(Cohen),免疫学实验室指南(Current Protocols in Immunology)(科利根(COLIGAN)等人编辑,1992,第3.17.1-3.17.16页)描述。细胞也可以用DNA染料(例如,吖啶橙、溴化乙锭或碘化丙锭)进行标记,并观察细胞沿内核膜的染色质浓缩和边缘化。可以测量以确定凋亡的其它形态变化包含例如细胞质浓缩、膜出泡增加和细胞收缩。

[0321] 可以在培养物的附着和“浮动”区室中测量凋亡细胞的存在。例如,两种区室可以通过去除上清液、对附着细胞进行胰蛋白酶消化、在离心洗涤步骤(例如,在2000rpm下10分钟)后合并制剂、并检测凋亡(例如,通过测量DNA片段化)来收集。(参见例如皮亚扎(PIAZZA)等人,1995,癌症研究(Cancer Research),55:3110-16)。

[0322] 在体内,可以在合适的动物模型中评价Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA MAbs治疗性组合物的效果。例如,可以使用异种癌症模型,其中将癌症外植体或传代异种移植组织引入免疫受损动物,例如裸小鼠或SCID小鼠(克莱因(KLEIN)等人,1997,自然-医学(Nature Medicine),3:402-408)。例如,PCT专利申请W098/16628和美国专利第6,107,540号描述了人前列腺癌的各种异种移植模型,其能够概括原发性肿瘤、微转移的发展和代表晚期疾病特性的成骨细胞转移的形成。可以使用测量对肿瘤形成、肿瘤消退或转移等的抑制的测定来预测功效。

[0323] 评价凋亡促进的体内测定可用于评价治疗性组合物。在一个实施例中,可以检查来自用治疗性组合物治疗的荷瘤小鼠的异种移植体是否存在凋亡病灶,并将其与未经治疗的对照荷异种移植体小鼠进行比较。在经治疗的小鼠的肿瘤中发现凋亡病灶的程度提供了组合物的治疗功效的指示。

[0324] 在前述方法的实践中使用的治疗性组合物可以被调配成包括适合于期望的递送方法的载体的药物组合物。合适的载体包含当与治疗性组合物组合时保留治疗性组合物的抗肿瘤功能并且通常不与患者的免疫系统反应的任何材料。实例包含但不限于多种标准药物载体中的任何一种,例如无菌磷酸盐缓冲盐溶液、抑菌水等(通常参见雷明顿制药科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)第16版,A.奥莎尔(A.Osal)编辑,1980)。

[0325] 可以将治疗性调配物溶解并将其经由能够将治疗性组合物递送到肿瘤部位的任何途径施用。潜在有效的施用途径包含但不限于静脉内、肠胃外、腹膜内、肌肉内、肿瘤内、皮内、器官内、原位等。用于静脉注射的优选调配物包括治疗性组合物于防腐抑菌水、无菌无防腐水中的溶液和/或于聚氯乙烯或聚乙烯袋中含有0.9%无菌注射用氯化钠,USP的稀

释液。治疗性蛋白质制剂可以冻干并储存为无菌粉末,优选在真空下,然后在注射前在抑菌水(例如,含有苯醇防腐剂)或无菌水中重构。

[0326] 用于使用前述方法治疗癌症的剂量和施用方案将随方法和靶癌症而有所不同,并且通常将取决于本领域了解的许多其它因素。

[0327] 在一个实施例中,由于Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA MAb的修饰,本发明的药物组合物可以包括多于一个本发明的ADC物种。例如,本发明包含包括本发明的ADC的药物组合物,其中Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA MAb是C端赖氨酸部分去除或完全去除的抗体、具有N端翻译后修饰的抗体、缺乏重链C端赖氨酸且具有N端翻译后修饰的抗体、和/或具有重链C端赖氨酸不具有N端翻译后修饰的抗体。

[0328] 在一个优选实施例中,Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA MAb是L234A、L235A和L328C处的三重突变,其中L328C是用于位点特异性缀合的位置。

[0329] XII.) 表达Her2、EGFR、Trop2、CDH3和TAA的癌症的治疗

[0330] 将Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA标识为通常在—组受限制的组织或细胞中表达但也在诸如表I所列的那些癌症中表达的蛋白质,开辟了多种治疗此类癌症的治疗方法。

[0331] 值得注意的是,即使靶向蛋白质在正常组织或细胞上表达,甚至在重要的正常器官组织上表达,靶向抗肿瘤疗法也是有用的。重要器官是维持生命所必需的器官,例如心脏或结肠。非重要器官是可以被去除的器官,因此个体仍然能够存活。非重要器官的实例是卵巢、乳房和前列腺。

[0332] 靶蛋白质在正常组织,甚至是重要的正常组织中的表达,不会破坏所述蛋白质的靶向剂作为所述蛋白质也被过表达的某些肿瘤的治疗剂的效用。例如,重要器官中的表达本身并无害。此外,被认为可有可无的器官,例如前列腺和卵巢,可以在不影响死亡率的情况下被去除。最后,由于免疫豁免,一些重要器官不受正常器官表达的影响。免疫豁免器官是通过血液-器官屏障保护免受血液影响的器官,因此无法进行免疫疗法。免疫豁免器官的实例是大脑和睾丸。

[0333] 因此,抑制Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA蛋白质的活性的治疗方法可用于患有表达Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA的癌症(诸如例如表I所列的那些癌症)的患者。这些治疗方法通常分为三类。第一类调节Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA功能,因为它与肿瘤细胞生长有关,从而导致抑制或延缓肿瘤细胞生长或诱导其杀伤。第二类包括用于抑制Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA蛋白质与其结合配偶体或其它蛋白质结合或缔合的各种方法。第三类包括用于抑制Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA基因的转录或Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA mRNA的翻译的各种方法。

[0334] 因此,可以评价癌症患者的Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA表达的存在和水平,优选使用肿瘤组织的免疫组织化学评估,定量Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA成像或可靠地指示Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA表达的存在和程度的其它技术。如果适用,出于此目的优选肿瘤活检或手术标本的免疫组织化学分析。用于肿瘤组织的免疫组织化学分析的方法是本领域熟知的。

[0335] XIII.) 组合疗法

[0336] 在一个实施例中,当用Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA ADC与化学治疗剂或放射或其组合治疗包含人肿瘤在内的肿瘤时,存在协同作用。换言之,在与化学治疗剂或放射

或其组合组合时,Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA ADC对肿瘤生长的抑制增强得超过预期。例如,协同作用可以表现为,相较于仅用Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAAADC治疗所预期,组合治疗更大地抑制了肿瘤生长;或用Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA ADC治疗和化学治疗剂或放射获得了累加效应。优选地,协同作用表现为,在未期望通过用Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA ADC进行治疗或使用Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA ADC和化学治疗剂或放射的累加组合进行治疗来实现缓解的情况下的癌症的缓解。

[0337] 用于使用Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA ADC以及化学疗法或放射或两者的组合抑制肿瘤细胞生长的方法包括在开始化学疗法或放射疗法之前、期间或之后施用Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAAADC,以及其任何组合(即在开始化学疗法或放射疗法之前和期间、在开始化学疗法或放射疗法之前和之后、在开始化学疗法或放射疗法期间和之后、或在开始化学疗法或放射疗法之前、期间和之后)。例如,Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA ADC典型地在开始放射疗法和/或化学疗法前1至60天,优选3至40天,更优选5至12天施用。然而,取决于治疗方案和特定患者需求,所述方法以将提供最有效的治疗并最终延长患者的生命的方式进行。

[0338] 化学治疗剂的施用可以以多种方式完成,包含通过肠胃外和肠内途径全身施用。在一个实施例中,Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA ADC和化学治疗剂作为单独的分子施用。化学治疗剂或化学疗法的特定实例包含顺铂、达卡巴嗪(DTIC)、放线菌素、甲氯乙胺(氮芥)、链脲菌素、环磷酰胺、卡莫司汀(BCNU)、洛莫司汀(CCNU)、多柔比星(阿霉素)、道诺霉素、丙卡巴肼、丝裂霉素、阿糖胞苷、依托泊苷、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、长春碱、长春新碱、博来霉素、紫杉醇(他克唑)、多西他赛(泰索帝)、阿地白介素、天冬酰胺酶、白消安、卡铂、克拉屈滨、达卡巴嗪、氟尿苷、氟达拉滨、羟基脲、异环磷酰胺、干扰素 α 、亮丙瑞林、甲地孕酮、美法仑、巯基嘌呤、普卡霉素、米托坦、培门冬酶、喷司他丁、哌泊溴烷、普卡霉素、链脲菌素、他莫昔芬、替尼泊苷、睾内酯、硫鸟嘌呤、噻替哌、乌拉莫司汀、长春瑞滨、吉西他滨、苯丁酸氮芥、他克唑及其组合。

[0339] 与Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA ADC组合使用的放射源可以在接受治疗的患者的外部或内部。当所述源在患者的外部时,所述疗法被称为外束放射疗法(EBRT)。当放射源在患者的内部时,所述治疗被称为近距离放射疗法(BT)。在一个实施例中,放射疗法是硼中子捕获疗法。在一个实施例中,放射是质子硼融合疗法。

[0340] 上述治疗方案可以进一步与另外的癌症治疗剂和/或方案组合,例如另外的化学疗法、癌症疫苗、信号转导抑制剂、可用于治疗异常细胞生长或癌症的试剂、抗体(例如,如WO/2005/092380中所述的抗CTLA-4抗体(Pfizer))或通过结合到IGF-1R而抑制肿瘤生长的其它配体和细胞因子。

[0341] 当哺乳动物接受另外的化学疗法时,可以使用上述化学治疗剂。此外,可以使用生长因子抑制剂、生物反应调节剂、抗激素疗法、选择性雌激素受体调节剂(SERM)、血管生成抑制剂和抗雄激素。例如,可以使用抗激素,例如抗雌激素,例如Nolvadex(他莫昔芬);或抗雄激素,例如Casodex(4'-氰基-3-(4-氟苯基磺酰基)-2-羟基-2-甲基-3-''-(三氟甲基)丙酰苯胺)。

[0342] 上述治疗方法可以与各种手术、化学疗法或放射疗法方案中的任一种相组合。本发明的治疗方法能够使用降低剂量的化学疗法(或其它疗法)和/或降低施用频率,这对所

有患者来说是有利的,特别是不能很好地耐受化学治疗剂的毒性的那些患者。

[0343] XIV.) 试剂盒/制品

[0344] 对于本文所述的在实验室、预后、预防、诊断和治疗应用中的用途使用,试剂盒在本发明的范围内。此类试剂盒可以包括载体、包装或容器,其被分隔以接收一或多个容器,例如小瓶、管等,每个容器包括待用于所述方法的单独元件中的一个以及包括用途(例如,本文所述的用途)说明的标签或插页。例如,容器可以包括本公开的一种Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA Mab或几种Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA MAb。试剂盒可以包括包括药物单元的容器。试剂盒可以包含全部或部分Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA ADC和/或用于检测癌症和/或其它免疫性病症的诊断测定。

[0345] 本发明的试剂盒将典型地包括上述容器和与其相关的一或多个其它容器,所述其它容器包括从商业和用户角度看需要的材料,包含缓冲液、稀释剂、过滤器、针、注射器;列出内容和/或用途说明的载体、包装、容器、小瓶和/或试管标签,以及具有用途说明的包装插页。

[0346] 标签可以存在于容器上或与容器一起存在,以指示所述组合物用于特定疗法或非治疗应用,例如预后、预防、诊断或实验室应用,并且还可以指示体内或体外的用法说明,例如本文所述的那些。用法说明和/或其它信息也可以包含在与试剂盒一起包含或包含在试剂盒上的插页或标签上。标签可以在容器上或与容器相关联。当形成标签的字母、数字或其它字符被模制或蚀刻到容器本身时,标签可以在容器上;当存在于还容纳容器的容具或载体体内时,标签可以与容器相关联,例如作为包装插页。标签可以指示所述组合物用于诊断、治疗、预防或预后病状,例如癌症或其它免疫性病症。

[0347] 术语“试剂盒”和“制品”可以用作同义词。

[0348] 在本发明的另一个实施例中,制品含有组合物,例如本公开的Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA ADC。制品典型地包括至少一个容器和至少一个标签。合适的容器包含例如瓶子、小瓶、注射器和试管。容器可以由多种材料形成,例如玻璃、金属或塑料。所述容器可以容纳一或多种Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA ADC和/或一或多种治疗剂量的Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA ADC。

[0349] 容器可以可替代地容纳对治疗、诊断、预后或预防病状有效的组合物并且可以具有无菌接入口(例如,容器可以是静脉注射溶液袋或具有可被皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。组合物中的活性剂可以是本公开的Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA Mab或ADC。

[0350] 制品可以进一步包括第二容器,所述第二容器包括药学上可接受的缓冲液,例如磷酸盐缓冲盐水、林格溶液和/或葡萄糖溶液。它可以进一步包含从商业和用户的角度看需要的其它材料,包含其它缓冲液、稀释剂、过滤器、搅拌器、针、注射器和/或具有指示和/或用途说明的包装插页。

[0351] 示范性实施例

[0352] 在所提供的实施例中:

[0353] 1) 一种包括三重突变的抗体组合物,其中所述三重突变包括L234A修饰、L235A修饰和L328C修饰,并且其中所述三重突变修饰所述Fc γ 受体结合和抗体效应子功能。

[0354] 2) 根据技术方案1所述的抗体,其中所述抗体包括EGFR抗体。

[0355] 3) 根据技术方案1所述的抗体,其中所述抗体包括Her2抗体。

- [0356] 4) 根据技术方案1所述的抗体,其中所述抗体包括Trop2抗体。
- [0357] 5) 根据技术方案1所述的抗体,其中所述抗体包括CDH3抗体。
- [0358] 6) 根据技术方案1所述的抗体,其中所述抗体包括GPNMB抗体。
- [0359] 7) 根据技术方案1所述的抗体,其中所述抗体包括DLL3抗体。
- [0360] 8) 根据技术方案1所述的抗体,其中所述抗体包括ENPP3抗体。
- [0361] 9) 根据技术方案1所述的抗体,其中所述抗体包括SLITRK6抗体。
- [0362] 10) 根据技术方案1所述的抗体,其中所述抗体包括CA9抗体。
- [0363] 11) 根据技术方案1所述的抗体,其中所述抗体包括PSMA抗体。
- [0364] 12) 根据技术方案1所述的抗体,其中所述抗体包括CDH6抗体。
- [0365] 13) 根据技术方案1所述的抗体,其中所述抗体包括磷脂酰肌醇蛋白聚糖3抗体。
- [0366] 14) 根据技术方案1所述的抗体,其中所述抗体包括EDNRB抗体。
- [0367] 15) 根据技术方案1所述的抗体,其中所述抗体包括NECTIN-4抗体。
- [0368] 16) 根据技术方案1所述的抗体,其中所述抗体包括SLC34A2抗体。
- [0369] 17) 根据技术方案1所述的抗体,其中所述抗体包括Her3抗体。
- [0370] 18) 根据技术方案1所述的抗体,其中所述抗体包括NRP1抗体。
- [0371] 19) 根据技术方案1所述的抗体,其中所述抗体包括肿瘤相关抗原 (TAA) 抗体。
- [0372] 20) 根据技术方案3所述的Her2抗体,其进一步包括包括SEQ ID NO:2的所述抗体重链。
- [0373] 21) 根据技术方案3所述的Her2抗体,其进一步包括包括SEQ ID NO:3的所述抗体重链。
- [0374] 22) 根据技术方案3所述的Her2抗体,其进一步包括包括SEQ ID NO:4的所述抗体重链。
- [0375] 23) 根据技术方案2所述的EGFR抗体,其进一步包括包括SEQ ID NO:7的所述抗体重链。
- [0376] 24) 根据技术方案2所述的EGFR抗体,其进一步包括包括SEQ ID NO:8的所述抗体重链。
- [0377] 25) 根据技术方案2所述的EGFR抗体,其进一步包括包括SEQ ID NO:9的所述抗体重链。
- [0378] 26) 根据技术方案2所述的EGFR抗体,其进一步包括包括SEQ ID NO:12的所述抗体重链。
- [0379] 27) 根据技术方案2所述的EGFR抗体,其进一步包括包括SEQ ID NO:13的所述抗体重链。
- [0380] 28) 根据技术方案2所述的EGFR抗体,其进一步包括包括SEQ ID NO:14的所述抗体重链。
- [0381] 29) 根据技术方案2所述的EGFR抗体,其进一步包括包括SEQ ID NO:17的所述抗体重链。
- [0382] 30) 根据技术方案2所述的EGFR抗体,其进一步包括包括SEQ ID NO:18的所述抗体重链。
- [0383] 31) 根据技术方案2所述的EGFR抗体,其进一步包括包括SEQ ID NO:19的所述抗体重链。

重链。

[0384] 32) 根据技术方案4所述的Trop2抗体,其进一步包括包括SEQ ID NO:22的所述抗体重链。

[0385] 33) 根据技术方案4所述的Trop2抗体,其进一步包括包括SEQ ID NO:23的所述抗体重链。

[0386] 34) 根据技术方案4所述的Trop2抗体,其进一步包括包括SEQ ID NO:24的所述抗体重链。

[0387] 35) 根据技术方案5所述的CDH3抗体,其进一步包括包括SEQ ID NO:27的所述抗体重链。

[0388] 36) 根据技术方案5所述的CDH3抗体,其进一步包括包括SEQ ID NO:28的所述抗体重链。

[0389] 37) 根据技术方案5所述的CDH3抗体,其进一步包括包括SEQ ID NO:29的所述抗体重链。

[0390] 38) 一种抗体-药物缀合物(ADC),其包括,

[0391] (i) 包括三重突变的抗体组合物,其中所述三重突变包括L234A修饰、L235A修饰和L328C修饰,并且其中所述三重突变修饰所述抗体效应子功能;

[0392] (ii) 连接子;和

[0393] (iii) 药物单元,其中所述药物单元在L328C位点处特异性缀合。

[0394] 39) 根据技术方案38所述的ADC,其中所述抗体组合物包括EGFR抗体。

[0395] 40) 根据技术方案38所述的ADC,其中所述抗体组合物包括Her2抗体。

[0396] 41) 根据技术方案38所述的ADC,其中所述抗体组合物包括Trop2抗体。

[0397] 42) 根据技术方案38所述的抗体,其中所述抗体包括CDH3抗体。

[0398] 43) 根据技术方案38所述的ADC,其中所述抗体组合物包括肿瘤相关抗原(TAA)抗体。

[0399] 44) 根据技术方案38所述的ADC,其中所述TAA在表IV中列出。

[0400] 45) 根据技术方案38所述的ADC,其进一步包括延伸子单元。

[0401] 46) 根据技术方案38所述的ADC,其进一步包括间隔子单元。

[0402] 47) 根据技术方案38所述的ADC,其进一步包括氨基酸单元。

[0403] 48) 一种包括根据技术方案1所述的抗体的制品。

[0404] 49) 一种包括根据技术方案38所述的ADC的制品。

[0405] 50) 一种药物组合物,其包括治疗有效量的根据技术方案38所述的ADC和药学上可接受的赋形剂。

[0406] 51) 一种药物组合物,其包括治疗有效量的根据技术方案1所述的抗体和药学上可接受的赋形剂。

[0407] 52) 一种治疗个体中的癌症的方法,其包括,

[0408] (i) 向所述个体施用治疗有效量的根据技术方案38所述的ADC,其中所述癌症包括表达表I所列的所述癌症的细胞。

[0409] 53) 一种治疗个体中的癌症的方法,其包括,

[0410] (i) 向所述个体施用治疗有效量的根据技术方案1所述的抗体,其中所述癌症包括

表达表I所列的所述癌症的细胞。

[0411] 54) 一种治疗个体中的疾病的方法,其包括,

[0412] (i) 向所述个体施用治疗有效量的根据技术方案38所述的ADC,其中所述疾病包括表达表V所列的所述癌症的细胞。

[0413] 55) 一种治疗个体中的疾病的方法,其包括,

[0414] (i) 向所述个体施用治疗有效量的根据技术方案1所述的抗体,其中所述疾病包括表达表V所列的所述癌症的细胞。

[0415] 56) 一种抗体-硼缀合物(ABC),其包括,

[0416] (i) 包括三重突变的抗体组合物,其中所述三重突变包括L234A修饰、L235A修饰和L328C修饰,并且其中所述三重突变修饰所述抗体效应子功能;

[0417] (ii) 连接子;和

[0418] (iii) 药物单元,其中所述药物单元包括硼化组合物,并且其中所述药物单元在位点L328C处特异性缀合。

[0419] 57) 根据技术方案56所述的ABC,其中所述抗体组合物包括EGFR抗体。

[0420] 58) 根据技术方案56所述的ABC,其中所述抗体组合物包括Her2抗体。

[0421] 59) 根据技术方案56所述的ABC,其中所述抗体组合物包括Trop2抗体。

[0422] 60) 根据技术方案56所述的ABC,其中所述抗体组合物包括CDH3抗体。

[0423] 61) 根据技术方案56所述的抗体,其中所述抗体包括GPNMB抗体。

[0424] 62) 根据技术方案56所述的抗体,其中所述抗体包括DLL3抗体。

[0425] 63) 根据技术方案56所述的抗体,其中所述抗体包括ENPP3抗体。

[0426] 64) 根据技术方案56所述的抗体,其中所述抗体包括SLITRK6抗体。

[0427] 65) 根据技术方案56所述的抗体,其中所述抗体包括CA9抗体。

[0428] 66) 根据技术方案56所述的抗体,其中所述抗体包括PSMA抗体。

[0429] 67) 根据技术方案56所述的抗体,其中所述抗体包括CDH6抗体。

[0430] 68) 根据技术方案56所述的抗体,其中所述抗体包括磷脂酰肌醇蛋白聚糖3抗体。

[0431] 69) 根据技术方案56所述的抗体,其中所述抗体包括EDNRB抗体。

[0432] 70) 根据技术方案56所述的抗体,其中所述抗体包括NECTIN-4抗体。

[0433] 71) 根据技术方案56所述的抗体,其中所述抗体包括SLC34A2抗体。

[0434] 72) 根据技术方案56所述的抗体,其中所述抗体包括Her3抗体。

[0435] 73) 根据技术方案56所述的抗体,其中所述抗体包括NRP1抗体。

[0436] 74) 根据技术方案56所述的ABC,其中所述抗体组合物包括肿瘤相关抗原(TAA)抗体。

[0437] 75) 根据技术方案56所述的ABC,其进一步包括包括SEQ ID NO:2的所述抗体重链。

[0438] 76) 根据技术方案56所述的ABC,其进一步包括包括SEQ ID NO:3的所述抗体重链。

[0439] 77) 根据技术方案56所述的ABC,其进一步包括包括SEQ ID NO:4的所述抗体重链。

[0440] 78) 根据技术方案56所述的ABC,其进一步包括包括SEQ ID NO:7的所述抗体重链。

[0441] 79) 根据技术方案56所述的ABC,其进一步包括包括SEQ ID NO:8的所述抗体重链。

[0442] 80) 根据技术方案56所述的ABC,其进一步包括包括SEQ ID NO:9的所述抗体重链。

[0443] 81) 根据技术方案56所述的ABC,其进一步包括包括SEQ ID NO:12的所述抗体重

链。

[0444] 82) 根据技术方案56所述的ABC,其进一步包括包括SEQ ID NO:13的所述抗体重链。

[0445] 83) 根据技术方案56所述的ABC,其进一步包括包括SEQ ID NO:14的所述抗体重链。

[0446] 84) 根据技术方案56所述的ABC,其进一步包括包括SEQ ID NO:17的所述抗体重链。

[0447] 85) 根据技术方案56所述的ABC,其进一步包括包括SEQ ID NO:18的所述抗体重链。

[0448] 86) 根据技术方案56所述的ABC,其进一步包括包括SEQ ID NO:19的所述抗体重链。

[0449] 87) 根据技术方案56所述的ABC,其进一步包括包括SEQ ID NO:22的所述抗体重链。

[0450] 88) 根据技术方案56所述的ABC,其进一步包括包括SEQ ID NO:23的所述抗体重链。

[0451] 89) 根据技术方案56所述的ABC,其进一步包括包括SEQ ID NO:24的所述抗体重链。

[0452] 90) 根据技术方案56所述的ABC,其进一步包括包括SEQ ID NO:27的所述抗体重链。

[0453] 91) 根据技术方案56所述的ABC,其进一步包括包括SEQ ID NO:28的所述抗体重链。

[0454] 92) 根据技术方案56所述的ABC,其进一步包括包括SEQ ID NO:29的所述抗体重链。

[0455] 93) 根据技术方案56所述的ABC,其进一步包括延伸子单元。

[0456] 94) 根据技术方案56所述的ABC,其进一步包括间隔子单元。

[0457] 95) 根据技术方案56所述的ABC,其进一步包括氨基酸单元。

[0458] 96) 一种药物组合物,其包括治疗有效量的根据技术方案56所述的ABC和药学上可接受的赋形剂。

[0459] 97) 一种治疗个体中的癌症的方法,其包括,

[0460] (i) 向所述个体施用治疗有效量的根据技术方案56所述的ABC,其中所述癌症包括表达表I所列的所述癌症的细胞。

[0461] 实例:

[0462] 本发明的各个方面通过以下几个实例进一步描述和说明,这些实施例均不旨在限制本发明的范围。

[0463] 实例1:生成抗体的方法。

[0464] 通过获得氨基酸序列并对相对应的核苷酸序列进行密码子优化来生成抗Her2、抗EGFR、抗Trop2和抗CDH3 MAbs。(参见表VI—抗体序列1-30)。合成基因片段并将其克隆到双HC和LC表达载体盒的限制酶位点中,以实现稳定表达。对于瞬时构建体,生成HC和LC的单独的表达载体,并以1比3的HC/LC比共转染。Fc变体经由定点诱变或部分基因片段合成,然后

使用本领域已知的技术进行亚克隆来构建。在转染前用无内毒素DNA纯化试剂盒构建和纯化稳定或瞬时表达载体。稳定转染的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞经过选择和恢复过程,以生成表达重组抗体和Fc变体的稳定池。对于抗体生成,针对稳定转染池使用典型培养持续时间为8到12天的补料分批生产过程,对于瞬时表达,经转染的细胞在转染后收获前培养6-8天。随后,对所收获的细胞培养流体进行蛋白-A亲和纯化,并将经纯化的材料缓冲交换到磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中。可以通过尺寸排阻色谱、SDS-PAGE和本领域已知的其它方法评估重组抗体的质量。

[0465] 实例2:单重和/或三重突变体MAb不影响靶标结合。

[0466] 使用酶联免疫测定法 (ELISA) 评价靶抗原结合。简而言之,用0.05-0.075ug Her2/ErbB2或EGFR或Trop2的重组人可溶性胞外结构域 (ECD) (Sino Biologicals, Inc, 北京, 中国) 或0.075ug重组人CDH3全长 (Abnova, 台湾, 中国) 包被96孔ELISA板。随后,洗涤板并用ELISA封闭缓冲液封闭。然后,将板与测试样本 (即抗HER2、抗EGFR、抗TROP2和抗CDH3 mAb的野生型或Fc变体,抗HER2和抗EGFR mAb的浓度范围为0.0001-6.667nM,而抗TROP2和抗CDH3 mAb的浓度范围为0.0003-20nM,在含有1% BSA、0.05%吐温-20的1x PBS中连续稀释3倍) 在室温下一起孵育两 (2) 小时。在洗涤以去除未结合的抗体后,结合的抗体用辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合山羊抗人Fc特异性多克隆抗体 (Jackson ImmunoResearch, 西格罗夫, 宾夕法尼亚州) 检测。在洗涤以去除未结合的检测抗体后,向孔中加入四甲基联苯胺 (TMB) 的缓慢动力学底物溶液,其中显色与测试样本量成比例。在650nm处测量颜色的光密度 (OD), 并使用其来确定结合到靶抗原的测试样本的量。使用GraphPad Prism的单位点结合非线性回归分析对测试浓度范围内的可检测到的抗体结合进行分析。

[0467] 结果表明,与野生型相比,具有单重突变L328C、双重突变L234A和L235A以及三重突变L234A、L235A和L328C的mAb结合了靶标,并且三重突变不影响靶标结合 (图1、2、3、4、5和6),与单重突变和双重突变的情况一样。

[0468] 实例3:针对三重突变体MAb观察到Fc γ RI结合的抑制。

[0469] 使用酶联免疫测定法 (ELISA) 评价Fc γ RI结合。简而言之,在1x PBS (pH 7.4) 包被缓冲液中用CD64/FCGR1A的重组人可溶性ECD (Sino Biological, Inc, 北京, 中国) 包被96孔ELISA板。随后,洗涤板并用ELISA封闭缓冲液封闭。将板与测试样本 (即曲妥珠单抗、帕尼单抗、西妥昔单抗、尼妥珠单抗、赛妥珠单抗或抗CDH3 (5836) 的野生型或Fc变体) (浓度范围为0.005-80ug/ml (或0.002 ~ 30ug/ml), 在含有1% BSA、0.05%吐温-20的1x PBS中连续稀释4倍) 在室温下一起孵育两 (2) 小时。在洗涤以去除未结合的抗体后,结合的抗体用辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合山羊抗人Fc特异性多克隆抗体 (Jackson ImmunoResearch, 西格罗夫, 宾夕法尼亚州) 检测。在洗涤以去除未结合的检测抗体后,向孔中加入四甲基联苯胺 (TMB) 的缓慢动力学底物溶液,其中显色与测试样本量成比例。在650nm处测量颜色的光密度 (OD), 并使用其来确定结合到Fc γ RI的测试样本的量。使用GraphPad Prism的单位点结合非线性回归分析对测试浓度范围内的可检测到的抗体结合进行分析。

[0470] 结果表明,与野生型、单重突变体L328C和双重突变体L234A和L235A相比,针对三重突变体观察到Fc γ RI结合的显著抑制 (图7、8、9、10、11和12)。

[0471] 实例4:针对三重突变体MAb观察到Fc γ RIIA (CD32) 结合的遏制。

[0472] 通过经改良的夹心式ELISA确定抗体与低亲和力Fc γ RIIA受体的结合。简而言之,

用4ug/ml 100ul/孔的抗his标签抗体 (Novus, NBP1-25939, 批号A4) 包被微量滴定板。然后, 孔用含有BSA的PBS封闭。然后, 加入Fc变体与Fc γ RIIa的不同比例混合物 (CD32) (Sino Biological, Inc, 北京, 中国, 目录号10374-H08H) 的连续稀释液, 并将板在4℃下孵育过夜。在用PBS洗涤后, 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗hIgG Fc (Jackson ImmunoResearch) 于PBS-T和1% BSA中的1:3,000稀释液, 以检测His标签捕获的Fc γ RIIA和Mab复合物。结果通过四甲基联苯胺 (TMB) 的加入和在650nm处测量的光密度 (OD) 可视化。使用GraphPad Prism软件的单位点结合非线性回归分析对表示Fc变体测试浓度范围内的可检测到的并且由抗his标签Ab捕获的抗体与Fc γ RIIA的结合的数据进行分析。

[0473] 结果表明, 对于所测试的所有抗体来说, 与野生型和双重突变体L234A和L235A相比, 针对三重突变体和单重突变体L328C观察到Fc γ RIIA结合的遏制 (图13、14、15和16)。

[0474] 实例5: 针对三重突变体Mab观察到Fc γ RIIIA结合的抑制。

[0475] 使用酶联免疫测定法 (ELISA) 评价Fc γ RIIIA结合。简而言之, 在1x PBS (pH 7.4) 包被缓冲液中, 用hCD16a/FCGRIIIA的重组人可溶性ECD (Sino Biological, Inc, 北京, 中国) 包被96孔ELISA板。随后, 洗涤板并用ELISA封闭缓冲液封闭。将板与测试样本 (即曲妥珠单抗、帕尼单抗、西妥昔单抗或尼妥珠单抗的野生型或Fc变体) (浓度范围为0.005-80ug/ml, 在含有1% BSA、0.05%吐温-20的1x PBS中连续稀释4倍) 在室温下一起孵育两 (2) 小时。在洗涤以去除未结合的抗体后, 结合的抗体用辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合山羊抗人Fc特异性多克隆抗体 (Jackson ImmunoResearch, 西格罗夫, 宾夕法尼亚州) 检测。在洗涤以去除未结合的检测抗体后, 向孔中加入四甲基联苯胺 (TMB) 的缓慢动力学底物溶液, 其中显色与测试样本量成比例。在650nm处测量颜色的光密度 (OD), 并使用其来确定结合到Fc γ RIIA的测试样本的量。使用GraphPad Prism的单位点结合非线性回归分析对测试浓度范围内的可检测到的抗体结合进行分析。

[0476] 结果表明, 对于所测试的所有抗体来说, 与野生型和双重突变体L234A和L235A相比, 针对三重突变体和单重突变体L328C观察到Fc γ RIIIA结合的显著抑制 (图17、18、19、20、21和22)。

[0477] 实例6: FcRn结合的抑制基本上不受Fc变体和/或三重突变体Mab影响。

[0478] 使用酶联免疫测定法 (ELISA) 评价FcRn结合。简而言之, 在1x PBS (pH 6.0) 包被缓冲液中, 用重组人FcRn (Sino Biological, Inc, 北京, 中国) 包被96孔ELISA板。随后, 洗涤板并用ELISA封闭缓冲液封闭。将板与测试样本 (即曲妥珠单抗、帕尼单抗、西妥昔单抗或尼妥珠单抗、赛妥珠单抗或抗CDH3 (5836) 的野生型或Fc变体) (浓度范围为0.04-90ug/ml (或0.04~30ug/ml), 在含有1% BSA、0.05%吐温-20的1x PBS (pH 6.0) 中连续稀释3倍) 在室温下一起孵育两 (2) 小时。在洗涤以去除未结合的抗体后, 结合的抗体用辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合山羊抗人Fc特异性多克隆抗体 (Jackson ImmunoResearch, 西格罗夫, 宾夕法尼亚州) 检测。在洗涤以去除未结合的检测抗体后, 向孔中加入四甲基联苯胺 (TMB) 的缓慢动力学底物溶液, 其中显色与测试样本量成比例。在650nm处测量颜色的光密度 (OD), 并使用其来确定结合到FcRn的测试样本的量。使用GraphPad Prism的单位点结合非线性回归分析对测试浓度范围内的可检测到的抗体结合进行分析。

[0479] 结果表明, 与野生型抗体相比, FcRn结合的抑制基本上不受Fc变体的影响, 包含但

不限于三重突变体抗体(图23、24、25、26、27和28)。

[0480] 实例7:使用Octet HTX系统对Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa、Fc γ RIIIb和FcRn的动力学和亲和力分析。

[0481] 使用Octet HTX系统(Molecular Devices)在25°C下测量不同Fc受体对抗Her2抗体和Fc变体的结合亲和力。简而言之,将人FcR His标签标记的重组蛋白组(Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、Fc γ RIIIA-F、Fc γ RIIIA-V、Fc γ RIIB和FcRn)加载到Anti-Penta His(H1S1K)生物传感器上。在由含有0.1% BSA、0.02%吐温-20的PBS构成的pH 7.4缓冲液或用于FcRn分析的pH 6.0缓冲液中,将加载后的传感器浸入Mab测试样本的连续稀释液(300nM起始,1:2稀释,7个点)。使用单价(1:1)结合模型计算动力学常数。已知结合到FcR组的抗体用作阳性对照。被定义为 k_{dis}/k_{on} 比的平衡解离常数(K_D)通过分析用几种不同浓度获得的传感图曲线来确定。

[0482] 如图29中汇总的结果示出了在Fc结构域中引入单重或三重突变对与Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、Fc γ RIIIA(F158和V158变体)和Fc γ RIIB结合的影响,以及对FcRn结合的影响。对于Fc γ RI结合,针对三重突变体观察到的 K_D 值的显著降低主要归因于抗体解离速率(k_d)的增加(图29)。色谱图中还描绘了三重突变体的与其抗原的快速解离(图30)。与野生型或单重突变体抗体相比,仅观察到三重突变体的缔合速率(k_{on})的轻微降低。由于无法检测到三重突变体的结合,因此无法确定其它Fc γ 受体的 K_D 值(图29)。相反,对于三重突变体,针对FcRn观察到的 K_D 值并未受损,从而表明三重突变体的结合亲和力的降低是特异于Fc γ 受体同种型的。

[0483] 实例8:使用Octet对Fc γ RI(解离速率)的结合动力学分析。

[0484] 在25°C下在Octet HTX上进行了另外的结合实验。简而言之,将人FcR His标签标记的重组蛋白组(FcRI)加载到Anti-Penta His(H1S1K)生物传感器上。在由含有0.1%BSA、0.02%吐温-20的PBS构成的pH 7.4缓冲液或用于FcRn分析的pH 6.0缓冲液中,将加载后的传感器浸入Mab测试样本的连续稀释液(300nM起始,1:2稀释,7个点)。使用单价(1:1)结合模型计算动力学常数。已知结合到FcR组的抗体用作阳性对照。

[0485] 结果表明,与野生型和单重突变体相比,Fc γ RI的三重突变体解离速率更快(图30)。

[0486] 实例9:使用流式细胞术对Fc变体的ADCC分析。

[0487] 为了评价Fc变体介导的抗体依赖性细胞毒性(ADCC),采用流式细胞术ADCC评价。简而言之,人癌细胞用作靶细胞,而冷冻PBMC用作效应子细胞。人癌细胞用8 μ M羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)染料(Selleckchem,目录号S8269,批号S826901)标记30分钟,用细胞培养基洗涤两次,然后加入到U底96板并加入合适浓度的Fc变体。ADCC是通过加入人PBMC作为效应子细胞来启动的(效应子细胞:靶标(E:T)比为4~8:1)。将板在5% CO2加湿气氛中在37°C下进一步孵育过夜。将细胞洗涤两次并用可固定活力染料(FVD,eBioscience,加利福尼亚州)的1:500稀释液染色,所述染料对死亡细胞进行染色。在孵育30分钟后,细胞用含有2% FBS的PBS洗涤,然后使用Attune Nxt(Thermo Fisher Scientific)进行流式细胞术分析。对于每个实验,一式三份进行测量。使用死亡靶细胞(CFSE阳性和FVD阳性)占总靶细胞(CFSE阳性)的百分比来确定细胞毒性%。数据被示出为使用GraphPad Prism软件的细胞毒性%条形图。

[0488] 结果表明,与野生型相比,对于Fc变体观察到ADCC的降低,其中三重突变体针对每种mAb显著减少(图31、32、33和34)。

[0489] 实例10:使用流式细胞术对Fc变体的CDC分析。

[0490] 使用小兔血清作为补体来源并且使用人癌细胞作为靶细胞,通过乳酸脱氢酶(LDH)释放测定法确定补体依赖性细胞毒性(CDC)。简而言之,将靶细胞(每孔 20×10^3 个)分配到96孔U底板中,并在冰上与Fc变体预孵育30分钟。然后,加入稀释补体并在37℃下(5% CO₂,加湿气氛)进一步孵育4小时。在有或没有抗体的情况下一式三份进行测定。用裂解溶液裂解的靶细胞制备最大释放。用非放射性细胞毒性测定试剂盒(Promega,目录号G1781)测量上清液LDH活性。通过使用分光光度计(Cytation1 Biotek)在490nm处的光密度读数确定所释放的指示细胞死亡的LDH活性。根据以下公式计算细胞毒性百分比:细胞毒性(%) = $100 \times (\text{实验释放} - \text{自发释放}) / (\text{最大释放} - \text{自发释放})$ 。数据被示出为使用GraphPad Prism软件创建的细胞毒性%条形图。

[0491] 结果表明,对于Fc变体观察到CDC减少,其中三重突变体针对每种MAb显著减少(图35、36、37和38)。

[0492] 实例11:使用ELISA的Fc变体的C1q结合。

[0493] 使用酶联免疫测定法(ELISA)评价C1q结合。简而言之,在1x PBS(pH 7.4)包被缓冲液中,用60ul/孔的1ug/ml测试样本(即曲妥珠单抗、帕尼单抗、赛妥珠单抗或抗CDH3-5836的野生型或Fc变体)包被96孔ELISA板。随后,洗涤板并用ELISA封闭缓冲液(含有1% BSA的PBS)封闭。将板与稀释人C1q(sigma,目录号C1740,批号SCC6462)(浓度范围为0.625-40ug/ml,在含有1% BSA、0.05%吐温-20的1x PBS中连续稀释2倍)在室温下一起孵育两(2)小时。在洗涤板后,加入60ul/孔的兔抗h C1q(Dako A0136,批号20047640)(浓度为5ug/ml,溶于PBS(PBS-T)中的1% BSA和0.05%吐温中)并在室温下孵育1.0小时。在洗涤以去除未结合的抗体后,结合的抗体用辣根过氧化物酶(HRP)缀合山羊抗兔HRP特异性多克隆抗体(Jackson ImmunoResearch,目录号111-036-046,西格罗夫,宾夕法尼亚州)检测。加入四甲基联苯胺(TMB)的缓慢动力学底物溶液,并在650nm处测量颜色的光密度(OD)。使用GraphPad Prism的单位点结合非线性回归分析对表示测试浓度范围内的可检测到的抗体结合的数据进行分析。

[0494] 结果表明,对于Fc变体观察到C1q结合的减少,并且三重突变体针对每种MAb显著减少(图39、40、41和42)。

[0495] 实例12:位点特异性ADC的生成和表征

[0496] 位点特异性硫醇的生成

[0497] 在室温下用DTT的PBS溶液还原Fc变体的铰链二硫化物十五(15)分钟,并通过使用PD-10柱将抗体脱盐到pH 6.5的缓冲液中来从过量的还原剂中纯化抗体。通过埃尔曼试验证实了预期的游离硫醇。然后,使用相对于抗体浓度35倍过量的脱氢抗坏血酸(DHA)重新形成铰链二硫化物。通过埃尔曼测试监测重新氧化的进程。当硫醇/抗体比达到大约2.0时,加入马来酰亚胺有效载荷。

[0498] 缀合物制备

[0499] 为了生成本发明的位点特异性ADC,通过将马来酰亚胺连接子加入到激活位点特异性抗体来制备使用被称为LOL1的专有连接子的抗体缀合物。激活的过程(即游离硫醇的

释放) 如上所述(位点特异性硫醇的生成)。连接子的DMSO溶液以连接子的1.2摩尔当量加入到硫醇。将反应物在室温下搅拌45-60分钟。使用PD-10或类似的脱盐柱将所得缀合物纯化到组氨酸调配物缓冲液(pH 6)中并进行分析。

[0500] 缀合物评价

[0501] 为了验证使用单重(即L328C)或三重突变体(即L234A、L235A、L328C)抗体产生位点特异性ADC的能力,采用了三种技术:(i)完整质量分析、(ii)肽图分析和(iii)反相HPLC。反相HPLC是用于剖析基于半胱氨酸的缀合物的主要方法,其用于证实有效载荷主要或仅缀合到重链且仅缀合在重链内的单个位置处并且因此产物具有特异性。通过质谱法进行的完整分析用于证实缀合重链具有正确和预期的质量(即HC+有效载荷),而肽图分析证实有效载荷被系连到重链内的特定位置。在此,完整质量分析用于证明具有三重突变的L0L-1缀合抗HER2 mAb包含单缀合重链和非缀合轻链(图44)。具有单重或三重突变的单重和三重突变体vcMMAE缀合抗EGFR mAb 1号的肽图分析表明,重链内的ACPAPIEK肽既是L328C突变位点又是缀合位点(图54、55)。

[0502] 虽然质量分析是低通量技术,但反相HPLC是示出了ADC的相对组成的高通量技术。它对于通过半胱氨酸侧链缀合的缀合物和ADC特别有用,因为对于单克隆抗体,野生型人IgG1中只有八(8)个半胱氨酸可用于缀合。

[0503] 通常,每个基于Cys的ADC都携带需要知道的有限数量的有效载荷。据普遍认为,利用vcMMAE作为有效载荷的ADC应在任意位置携带两(2)到四(4)个有效载荷以有效杀死肿瘤。此外,它们的构成便为有效载荷的分布,范围为0(未缀合)到8(完全缀合)。已经表明,被工程改造成携带限定数量(典型地,每个mAb 2个)有效载荷的抗体(即缺乏分布的位点特异性ADC和高有效载荷/mAb比物种)在临床功效、安全性或稳定性方面具有优势。

[0504] 因此,我们以反相色谱测定为主要技术使用分析方法来剖析由vcMMAE的缀合产生的ADC的构成。基于保留时间和UV250/280比标识每个物种(即重链、轻链和缀合物种),并计算DAR(药物/mAb比)。此外,我们表明,有效载荷被主要或完全系连到重链,并且具有单个有效载荷的重链是主要物种,这是位点特异性缀合的主要属性。

[0505] 分析的材料和方法如下:

[0506] 完整质谱分析

[0507] 简而言之,通过加入1/20体积的200mM DTT并在37°C下孵育1小时来制备样本。使用Agilent 1260LC和Agilent 6520Q-TOF质谱仪分析样本。液相色谱柱是2mm ID x10cm长的柱,其填充有10 μ m PLRPS聚苯乙烯反相填料。溶剂是0.1%甲酸水溶液(A)和0.1%甲酸乙腈溶液(B)。梯度是1分钟保持1% B,14分钟升到70% B,1分钟升到90% B,1分钟保持90% B,1分钟降到1% B。使用Agilent Mass Hunter数据采集软件采集数据,并使用具有Bioconfirm的Agilent Mass Hunter定性分析软件进行分析。反卷积使用最大熵模型。

[0508] 结果表明,具有三重突变的L0L1缀合抗HER2抗体产生了明显的保留偏移,表明仅形成了一种位置异构体并且其高度指示位点特异性缀合(图43)。完整质量分析的进一步证实表明,上述L0L1缀合三重突变体抗HER2抗体具有位点特异性(图44)。仅检测到平均质量为23440道尔顿(Da)的未缀合轻链(LC)(图44)。23462Da峰代表在LC-MS系统中通常形成的钠加合物。对于重链(HC),发现的缀合物种是平均质量为49487Da的产物(反映了在用于抗体生产的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞培养系统中典型地观察到的c端赖氨酸缺失(-K))和平均

质量为49613Da的产物(反映具有完整的未经加工的c端赖氨酸(+K)的HC)。未发现未缀合HC物种和具有第二结合位点的HC(图44)。总之,完整质量分析证实(i)仅单个LOL1有效载荷缀合到重链;(ii)未检测到与轻链的缀合,并且(iii)这种缀合只能与经工程改造的Cys-328形成,而不能与任何铰链区半胱氨酸形成。

[0509] 图43和44中的结果证实,对于三重Fc突变体,与专有有效载荷LOL-1缀合的ADC在L328C处具有100%位点特异性。

[0510] 反相色谱分析

[0511] 此外,使用以下方案通过反相色谱分析抗体和/或抗体药物缀合物。简而言之,用DTT还原ADC或mAb,并使用Waters H级UPLC系统使用Acquity C4宽孔柱(100x 2.1mm, 300Å, Waters)进行分析。将柱保持在80℃下。mAb轻链和重链在乙腈(0.1% TFA)梯度中分解。

[0512] 图45中的结果表明,具有单个有效载荷的重链(H1)是主要物种,这表明缀合具有位点特异性,并且有效载荷位于Cys328上而不是在铰链区内。此外,图46示出了与vcMMAE缀合的抗Trop2 Mab的L328C变体的反相柱色谱图谱。据示出,超过80%的位点特异性缀合发生在Cys328重链上。

[0513] 图47示出了与vcMMAE缀合的抗Trop2 Mab的L234A、L235A、L328C三重突变体变体的反相柱色谱图谱。据示出,超过70%的位点特异性缀合发生在Cys328重链上。图48示出了与vcMMAE缀合的抗EGFR Mab的L234A、L235A、L328C变体的反相柱色谱图谱。据示出,DAR1是主要物种,其中超过80%-90%的位点特异性缀合发生在Cys328重链上。

[0514] 图49示出了基于图49中提供的RP-HPLC数据的峰分配和DAR计算。未缀合Mab(对照)用于标识重链和轻链的保留时间和UV250/280比。应注意,这些参数是峰分配以及DAR确定所必需的。DAR计算如下:

$$[0515] \quad DAR = \left(\frac{LC_1}{LC_0 + LC_1} + \frac{\sum_{n=0}^3 (HC_n * n)}{HC_{Total}} \right) * 2$$

[0516] 其中

[0517] LC_0 、 LC_1 分别是未缀合和vcMMAE缀合LC的AUC

[0518] HC_n 是每个重链物种的AUC,并且n是vcMMAE有效载荷的倍数

[0519] 图50示出了分析属性的汇总,包含平均DAR、通过SEC确定的单体峰百分比以及vcMMAE或LOL1缀合mAb及单重或三重Fc变体的DAR1物种百分比。

[0520] 肽图分析

[0521] 为了证实有效载荷系连到重链内的特定位置,使用以下方案进行肽图分析。

[0522] (i) 样本制备:

[0523] 按照本领域已知的公开程序,用DTT还原Mab或ADC,并使用碘乙酰胺烷基化游离硫醇。为了获得胰蛋白酶消化肽图,将上述抗体消化如下:在使用5M胍的部分变性条件下用DTT还原抗体。以DTT两倍浓度加入碘乙酰胺。通过使用Zeba-Spin (Thermo) 柱将烷基化mAb脱盐到100mM磷酸盐缓冲液中来纯化烷基化mAb。将胰蛋白酶加入到每个样本中,并且将样本在37℃下孵育过夜,蒸发至干,并在100μL的5% ACN、95%水、0.1%甲酸中重悬沉淀物

[0524] (ii) LC-MS:

[0525] 在样本制备完成后,将5.0μL样本注入终极3000nano LC,其配备有填充有C18 3μm

散装树脂的75 μ m x 2cm捕集柱(Acclaim PepMap 100,Thermo Scientific)和具有C18 2 μ m树脂的75 μ m x 15cm分析柱(Acclaim PepMap RSLC,Thermo Scientific)。nanoLC梯度为40分钟内的3-35%溶剂B(A=含有0.1%甲酸的H₂O;B=含有0.1%甲酸的乙腈)和5分钟内的35%到85%溶剂B,流速为300纳升/分钟。nanoLC与Q Exactive Plus轨道阱质谱仪(Thermo Fisher Scientific,圣何塞,加利福尼亚州)耦合。ESI电压设置为1.9kV,毛细管温度设置为275 $^{\circ}$ C。全光谱(m/z 350-2000)在轮廓模式下获得,分辨率为70,000,m/z 200,自动增益控制(AGC)目标为 3×10^6 。丰度最高的15种离子通过更高能量的碰撞解离(HCD)进行片段化,归一化碰撞能量为25。MS/MS光谱在质心模式下获得,分辨率为17,500,m/z 200。片段离子的AGC目标设置为 2×10^4 ,最大进样时间为50ms。将电荷态1、7、8和未分配排除在串联MS实验之外。动态排除设置为45.0s。

[0526] 图51中的结果示出了vcMMAE肽片段化后的特征子离子。此外,图52示出了与vcMMAE缀合的具有三重突变的抗EGFR抗体1号的序列覆盖率。图53示出了代表性TIC色谱图。差异在圆圈中示出。图54示出了含有具有三重突变的抗EGFR抗体1号的缀合位点的肽的电荷态。未缀合对照mAb具有M/z为886的[M+1]离子,其与来自重链(A)的ACPAPIEK肽相匹配。它的+2离子示出在插图上。(B)中示出了M/z为486和654的两个主要子离子。在vcMMAE缀合物中,由于与半胱氨酸的缀合,此肽在不同位置从反相柱洗脱下来(参见前图)。所得产物以C标识(示出了+2和+3电荷态)。片段含有与上述相同的离子(D,实心箭头),从而证实了这是相同的ACPAPIEK肽。M/z为686、506和321的其它片段(D,空心箭头)属于VCMAE,并且对应于图52上的那些。最后,图55示出了具有单重突变(L328C)的抗EGFR抗体1号的缀合位点也在重链的ACPAPIEK肽上得到证实。

[0527] vcMMAE缀合抗EGFR抗体1号的单重突变体的肽图的抗体片段和置信度评分的列表表示出在表VII中。vcMMAE缀合抗EGFR抗体1号的三重突变体的肽图的抗体片段和置信度评分的列表表示出在表VIII中。

[0528] 实例13:vcMMAE的Fc单重突变体和/或三重突变体缀合物的细胞毒性

[0529] 使用CellTiter-Glo测定试剂盒(Promega,目录号G7571)测量与vcMMAE缀合的Fc单重突变体或三重突变体抗体对肿瘤细胞系的细胞毒性作用。CellTiter-Glo $^{\circ}$ 发光细胞活力测定是一种基于存在的ATP的量化确定培养物中活细胞数量的均相方法,存在ATP即表明存在代谢活性细胞。简而言之,将不透明壁多孔板中的人肿瘤细胞(100 μ l细胞培养基中的6000个人癌细胞/孔)与Fc单重突变体或三重突变体抗体vcMMAE缀合物的连续稀释液在37 $^{\circ}$ C下(5% CO₂,加湿气氛)一起孵育3到4天。孵育后,向孔中加入100 μ l CellTiter-Glo $^{\circ}$ 底物。使用Cytation1(Biotek)读板器在10分钟后记录发光。根据以下公式计算存活百分比:存活(%) = $100 \times (\text{实验RLU} - \text{仅培养基RLU}) / (\text{仅细胞RLU} - \text{仅培养基RLU})$,并且使用GraphPad Prism软件通过非线性回归log(抑制剂)相较于反应(三参数)的曲线拟合对数据进行分析。在细胞毒性测定中测试的细胞系对测定中使用的mAb的相应靶标具有阳性的表面表达。具体地,针对含有单重突变体(L328C)的抗HER2 mAb测试了HCC1954细胞系。针对抗EGFR mAb及单重或三重突变体,测试了MDA MB468细胞系。针对抗TROP2抗体及单重或三重突变体,评价了SK BR3细胞系。

[0530] 图56、57、58、59、60和61中的结果表明,抗体及单重或三重Fc突变体的体外细胞毒性通过它们与vcMMAE的缀合而增强,所述vcMMAE是一种具有可切割二肽缬氨酸-瓜氨酸

(vc)连接子的MMAE衍生物,其促进内化后溶酶体组织蛋白酶B在靶细胞内进行有效和选择性的药物切割。结果进一步表明,具有vcMMAE的位点特异性缀合mAb以剂量依赖性方式对抗原阳性肿瘤细胞系表现出强效和选择性的细胞毒性活性。相比之下,未缀合mAb及单重或三重突变体表现出显著较少的细胞毒性作用或未表现出细胞毒性作用。总之,这些结果证明了包含以位点特异性方式与细胞毒素共价连接的单克隆抗体的ADC的体外功效,其实现了细胞结合和内化后的细胞毒性药物的释放。

[0531] 实例14:通过使用Her2、EGFR、TROP2、CDH3或其它TAA三重突变MAb和位点特异性缀合ADC治疗人类癌症的人类临床试验。

[0532] 根据本发明合成Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA ADC,它们特异性地积聚在肿瘤细胞中并用于治疗某些肿瘤和其它免疫性病症和/或其它疾病(参见表I和表V)。针对这些适应症中的每一个,成功地采用了两种临床方法。

[0533] I.) 辅助疗法:在辅助疗法中,患者用Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA ADC与化学治疗剂或药物试剂或生物药物试剂或其组合的组合进行治疗。通过加入Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAAADC,按照标准方案治疗原发性癌症靶标。方案设计解决了通过以下实例评估的有效性,包括但不限于原发性或转移性病变的肿瘤量的减少;无进展存活率、总存活率的提高;患者健康的改善;疾病稳定以及减少常规剂量的标准化学疗法和其它生物剂的能力。这些剂量减少通过减少化学治疗剂或生物剂的剂量相关毒性而允许另外和/或延长的疗法。

[0534] II.) 单一疗法:与Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA ADC在肿瘤的单一样本中的使用有关,Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA ADC在没有化学治疗剂或药物试剂或生物药物试剂的情况下施用于患者。在一个实施例中,单一疗法在临床上在患有广泛转移性疾病的终末期癌症患者中进行。方案设计解决了通过以下实例评估的有效性,包括但不限于原发性或转移性病变的肿瘤量的减少;无进展存活率、总存活率的提高;患者健康的改善;疾病稳定以及减少常规剂量的标准化学疗法和其它生物剂的能力。

[0535] 剂量

[0536] 可以调整剂量方案以提供最佳的期望反应。例如,可以施用单次Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA ADC注射,可以随时间施用多个分次剂量,或者可以根据治疗情况的紧急性按比例减少或增加剂量。如本文使用,“剂量单位形式”是指适合作为待治疗的哺乳动物受试者的单位剂量的物理离散单位;每个单位均含有经计算与所需药物载体缔合产生期望治疗效果的预定量的活性化合物。本发明的剂量单位形式的规格由以下决定且直接取决于以下:(a)Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA ADC的独特特性、辐照机件(反应器)的个别机制和待实现的特定治疗或预防效果,以及(b)将这种化合物复合用于治疗个体敏感性的领域中所固有的局限性。

[0537] 临床开发计划(CDP)

[0538] CDP使用本公开的Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA ADC跟踪并开发癌症和/或免疫性病症(参见表I和表V)的治疗。试验最初证明了安全性,随后以重复剂量证实了功效。试验是开放性的,其对标准化学疗法与标准疗法加Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAAADC进行比较。如将了解,可以用于患者登记的一种非限制性标准是如通过本领域已知的标准检测方法确定的肿瘤中Her2、EGFR、Trop2、CDH3或其它TAA ADC的浓度。

[0539] 本发明的范围不受本文所公开的实施例的限制,这些实施例旨在作为本发明的各个方面的单一说明,并且功能等同的任何内容都在本发明的范围内。除了本文描述的那些之外,对本发明的模型、方法和生命周期方法的各种修改对于本领域的技术人员将通过前面的描述和教导而变得显而易见,并且类似地旨在落入本发明的范围内。可以在不背离本发明的真实范围和精神的情况下实践此类修改或其它实施例。

[0540] 表I.待治疗的癌症的列表。

[0541]	#	癌症
	1	急性髓性白血病
	2	肾上腺皮质癌
	3	成人 T 细胞白血病/淋巴瘤
	4	B 细胞慢性淋巴细胞性白血病
	5	B 细胞霍奇金淋巴瘤
	6	B 细胞非霍奇金淋巴瘤

[0542]

7	膀胱癌
8	乳腺癌
9	慢性淋巴性白血病
10	透明细胞肾细胞癌
11	结肠直肠癌
12	弥漫性大 B 细胞淋巴瘤
13	成胶质细胞瘤
14	胃癌
15	毛细胞白血病
16	头颈癌
17	血液系统癌症
18	霍奇金淋巴瘤
19	黑素瘤
20	转移性默克尔细胞癌
21	多发性骨髓瘤
20	成神经细胞瘤
21	非霍奇金淋巴瘤
22	非小细胞肺癌
23	卵巢癌
24	胰腺癌
25	前列腺癌
26	小细胞肺癌
27	胃肿瘤
28	鳞状细胞癌
29	三阴性乳腺癌
30	尿路上皮癌
31	生殖器癌
32	宫颈癌
33	食道癌
34	胃食管结合部腺癌
35	胶质瘤

[0543] 表II. 氨基酸缩写。

	单字母	三字母	全称
[0544]	F	Phe	苯丙胺
	L	Leu	亮氨酸
	S	Ser	丝氨酸
	Y	Tyr	酪氨酸
	C	Cys	半胱氨酸
	W	Trp	色氨酸
	P	Pro	脯氨酸
	H	His	组氨酸
	Q	Gln	谷氨酰胺
	R	Arg	精氨酸
[0545]	I	Ile	异亮氨酸
	M	Met	蛋氨酸
	T	Thr	苏氨酸
	N	Aan	天冬酰胺
	K	Lys	赖氨酸
	V	Val	缬氨酸
	A	Ala	丙氨酸
	D	Asp	天冬氨酸
	E	Glu	谷氨酸
	G	Gly	甘氨酸

[0546] 表III. 氨基酸取代矩阵。

[0547] 改编自GCG软件9.0BLOSUM62氨基酸取代矩阵(块取代矩阵)。值越高,在相关天然蛋白质中发现取代的可能性就越大。

	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	.
[0548]	4	0	-2	-1	-2	0	-2	-1	-1	-1	-2	-1	-1	-1	-1	1	0	0	-3	-2	A
		9	-3	-4	-2	-3	-3	-1	-3	-1	-1	-3	-3	-3	-3	-1	-1	-1	-2	-2	C
			6	2	-3	-1	-1	-3	-1	-4	-3	1	-1	0	-2	0	-1	-3	-4	-3	D
				5	-3	-2	0	-3	1	-3	-2	0	-1	2	0	0	-1	-2	-3	-2	E
					6	-3	-1	0	-3	0	0	-3	-4	-3	-3	-2	-2	-1	1	3	F
						6	-2	-4	-2	-4	-3	0	-2	-2	-2	0	-2	-3	-2	-3	G
							8	-3	-1	-3	-2	1	-2	0	0	-1	-2	-3	-2	2	H
								4	-3	2	1	-3	-3	-3	-3	-2	-1	3	-3	-1	I
									5	-2	-1	0	-1	1	2	0	-1	-2	-3	-2	K
										4	2	-3	-3	-2	-2	-2	-1	1	-2	-1	L
											5	-2	-2	0	-1	-1	-1	1	-1	-1	M
												6	-2	0	0	1	0	-3	-4	-2	N
													7	-1	-2	-1	-1	-2	-4	-3	P
														5	1	0	-1	-2	-2	-1	Q
															5	-1	-1	-3	-3	-2	R
																4	1	-2	-3	-2	S
																	5	0	-2	-2	T
																		4	-3	-1	V
																			11	2	W
																				7	Y

[0549] 表IV. 肿瘤相关抗原(TAA)。

[0550]

靶标
GPNMB
DLL3
ENPP3
SLITRK6
CA9
PSMA

[0551]

CDH6
磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3
EDNRB
NECTIN-4
SLC34A2
Her3
NRP1

[0552] 表V.待治疗的疾病(非癌症)的列表。

[0553]

1	血管性水肿
2	关节炎、类风湿性关节炎
3	哮喘
4	特应性疾病
5	自身免疫性疾病
6	自身免疫性肝炎
7	结肠炎
8	艰难梭菌结肠炎
9	克罗恩病
10	隐热蛋白相关周期性综合征
11	皮炎
12	血脂异常
13	小肠结肠炎
14	出血
15	失血性休克
16	甲型血友病
17	HIV 感染
14	高免疫球蛋白 D 综合征
15	免疫介导的炎性病症
16	气道、皮肤和胃肠道炎症
17	偏头痛
18	多发性硬化症
19	眼血管疾病
20	骨质疏松症
21	疼痛*
22	帕金森病*
23	阵发性睡眠性血红蛋白尿症
24	斑块状银屑病
25	银屑病
26	阵发性睡眠性血红素尿症
27	风湿性疾病
28	脊柱炎
29	金黄色葡萄球菌感染

[0554]

30	系统性红斑狼疮(SLE)
31	类风湿性关节炎
32	血栓性血小板减少性紫癜、血栓形成
33	溃疡性克罗恩病
35	X 连锁低磷酸盐血症

[0555] 表VI. 抗体序列

[0556] 抗HER2抗体重链野生型

- [0557] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFINIKDTYIHWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 1)
- [0558] 抗HER2抗体重链L328C
- [0559] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFINIKDTYIHWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
IS NO: 2)
- [0560] 抗HER2抗体重链L234A、L235A
- [0561] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFINIKDTYIHWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
IS NO: 3)
- [0562] 抗HER2抗体重链L234A、L235A、L328C
- [0563] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFINIKDTYIHWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 4)
- [0564] 抗HER2抗体轻链野生型
- [0565] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSQDFTLTISL
QPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKSTYSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 5)
- [0566] 抗EGFR抗体1号重链野生型
- [0566] QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPGKGLEWIGHIYSGNTNYPNPSLKSRLTISIDTSK
QFSLKLSSVTAADTAIYCVDRVTGAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:
6)
- [0567] 抗EGFR抗体1号重链L328C
- [0568] QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPGKGLEWIGHIYSGNTNYPNPSLKSRLTISIDTSK
QFSLKLSSVTAADTAIYCVDRVTGAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:
7)
- [0569] 抗EGFR抗体1号重链L234A、L235A

- [0570] QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPGKGLEWIGHIYSGNTNYPNPSLKSRLTISIDTSKT
QFSLKLSSVTAADTAIYCVDRVTGAFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APEAAGGSPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:
8)
- [0571] 抗EGFR抗体1号重链L234A、L235A、L328C
- [0572] QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPGKGLEWIGHIYSGNTNYPNPSLKSRLTISIDTSKT
QFSLKLSSVTAADTAIYCVDRVTGAFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APEAAGGSPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:
9)
- [0573] 抗EGFR抗体1号轻链野生型
- DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSTRFSGSGSGTDFTFTISSL
QPEDIATYFCQHFHPLAFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 10)
- [0574] 抗EGFR抗体2号重链野生型
- QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVWISGGNTDYNTPTFSTRLSINKDNSKS
QVFFKMNSLQSNDAIYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:
11)
- [0576] 抗EGFR抗体2号重链L328C
- QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVWISGGNTDYNTPTFSTRLSINKDNSKS
QVFFKMNSLQSNDAIYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:
12)
- [0577] 抗EGFR抗体2号重链L234A、L235A
- QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVWISGGNTDYNTPTFSTRLSINKDNSKS
QVFFKMNSLQSNDAIYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPP
CPAPEAAGGSPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:
13)
- [0579] 抗EGFR抗体2号重链L234A、L235A、L328C
- QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVWISGGNTDYNTPTFSTRLSINKDNSKS
QVFFKMNSLQSNDAIYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPP
CPAPEAAGGSPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:
14)
- [0581] 抗EGFR抗体2号轻链野生型

- [0583] DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESE
DIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC (SEQ ID NO: 15)
- [0584] 抗EGFR抗体3号重链野生型
QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYFTFTNYYIWVRQAPGQGLEWIGGINPTS GGSNFNEKFKTRVTITADESS
TTAYMELSSLRSEDTAFYFCTRQGLWFDSDGRGDFWQGQTTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 16)
- [0585] 抗EGFR抗体3号重链L328C
QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYFTFTNYYIWVRQAPGQGLEWIGGINPTS GGSNFNEKFKTRVTITADESS
TTAYMELSSLRSEDTAFYFCTRQGLWFDSDGRGDFWQGQTTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT
- [0586] HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 17)
- [0587] 抗EGFR抗体3号重链L234A、L235A
QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYFTFTNYYIWVRQAPGQGLEWIGGINPTS GGSNFNEKFKTRVTITADESS
TTAYMELSSLRSEDTAFYFCTRQGLWFDSDGRGDFWQGQTTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
- [0588] HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 18)
- [0589] 抗EGFR抗体3号重链L234A、L235A、L328C
QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYFTFTNYYIWVRQAPGQGLEWIGGINPTS GGSNFNEKFKTRVTITADESS
TTAYMELSSLRSEDTAFYFCTRQGLWFDSDGRGDFWQGQTTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT
- [0590] HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 19)
- [0591] 抗EGFR抗体3号轻链野生型
DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRSSQNIHVSNGNTYLDWYQQTPGKAPKLLIKVSNRFGVPSRFSGSGSGTDFT
- [0592] FTISSLQPEDATYYCFQYSHVPWTFGQGTQLQITREVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC (SEQ ID NO: 20)
- [0593] 抗Trop2抗体重链野生型
QVQLQQSGSELKPGASVKVSKASGYFTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLD
TSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFGSSYWFYFDVWQGSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT
- [0594] HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 21)
- [0595] 抗Trop2抗体重链L328C

- [0596] QVQLQQSGSELKPGASVKVSCASGYFTFTNYGMNWWVKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLD
TSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFGSSYWFYFDVWGQGS�TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKACPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 22)
- [0597] 抗Trop2抗体重链L234A、L235A
- [0598] QVQLQQSGSELKPGASVKVSCASGYFTFTNYGMNWWVKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLD
TSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFGSSYWFYFDVWGQGS�TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT
HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 23)
- [0599] 抗Trop2抗体重链L234A、L235A、L328C
- [0600] QVQLQQSGSELKPGASVKVSCASGYFTFTNYGMNWWVKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLD
TSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFGSSYWFYFDVWGQGS�TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT
HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKACPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 24)
- [0601] 抗Trop2抗体轻链野生型
- [0602] DIQLTQSPSSLSASVGDRTSITCKASQDVSIQAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQ
PEDFAVYYCQQHYITPLTFGAGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 25)
- [0603] 抗CDH3抗体重链野生型
- [0604] QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSQSAAWNWIQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYALSVKSRITINPD
TSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGEGYRGREGFAIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 26)
- [0605] 抗CDH3抗体重链L328C
- [0606] QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSQSAAWNWIQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYALSVKSRITINPD
TSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGEGYRGREGFAIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKACPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 27)
- [0607] 抗CDH3抗体重链L234A、L235A
- [0608] QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSQSAAWNWIQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYALSVKSRITINPD
TSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGEGYRGREGFAIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH
TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 28)
- [0609] 抗CDH3抗体重链L234A、L235A、L328C

[0610] QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSQSAAWNWRQSPSRGLEWLGRIYYRSKWYNDYALSVKSRITINPD
TSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGEGYRGEGFAIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVK
DYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTH
TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKACPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 29)

[0611] 抗CDH3抗体轻链野生型
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTISNTLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL
QPEDFATYYCQYLSWFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 30)

[0612] 表VII. 抗EGFR mAb 1号的单重突变体所得的肽图分析的抗体片段和置信度评分。

重链序列	修饰	XCorr	电荷	MH+ [Da]	ΔM [ppm]
ScDKTHTcPPcPAPEAAGGPSVFLFP PKPK	C2 (脲甲基); C8 (脲 甲基); C11 (脲甲基)	6.60	4	3250.55434	1.83
VTGAFDIWGQGMVTVSSASTK		6.55	2	2243.10307	0.76
THTcPPcPAPEAAGGPSVFLFPPKPK	C4 (脲甲基); C7 (脲 甲基)	6.47	3	2760.36362	-0.06
TPEVTcVVVDVSHEDPEVK	C6 (脲甲基)	5.25	3	2139.03019	1.24
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK		4.91	2	2544.13384	0.93
SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QK	C11 (脲甲基)	4.68	5	3044.40595	1.84
THTcPPcPAPEAAGGPSVF	C4 (脲甲基); C7 (脲 甲基)	4.40	2	1952.86479	0.90
VFCFSVMHEALHNHYTQK	C4 (脲甲基)	4.03	4	2188.00844	0.97
FNWYVDGVEVHNAK		3.94	3	1677.80436	1.38
THTcPPcPAPEAAGGPSVFLFPPK	C4 (脲甲基); C7 (脲 甲基)	3.93	3	2535.21146	-1.81
WQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK	C9 (脲甲基)	3.75	5	2801.26875	0.55
MHEALHNHYTQK		3.72	3	1508.71268	4.20
WYVDGVEVHNAK		3.69	2	1416.70049	6.91
ScDKTHTcPPcPAPEAAGGPSVF	C2 (脲甲基); C8 (脲 甲基); C11 (脲甲基)	3.66	3	2443.05136	1.52
YVDGVEVHNAK		3.54	2	1230.61699	4.57
IcNVNHKPSNTK	C2 (脲甲基)	3.52	4	1411.71242	0.93
WQQGNVFCFSVmHEALHNHYTQK	C9 (脲甲基); M12 (氧化)	3.51	4	2817.26357	0.52
STSGGTAALGcLVK	C11 (脲甲基)	3.50	2	1321.67266	-4.12
GQPREPQVYTLPPSR		3.48	3	1724.90805	0.08
ScSVMHEALHNHYTQK	C2 (脲甲基)	3.47	3	1941.86899	-0.25
EVTcVVVDVSHEDPEVK	C4 (脲甲基)	3.40	3	1940.92600	-0.55
ePQVYTLPPSREEMTK	N 端(Gln->pyro-Glu)	3.24	3	1887.91367	-1.11
qVQLQESGPGLVK	N 端(Gln->pyro-Glu)	3.23	2	1365.74162	3.15
GQPREPQVYTLPPSREEMTK		3.18	4	2343.17544	-0.35
TVLHQDWLNGK		3.11	2	1310.69036	3.92
IcNVNHKPSNTKVDK	C2 (脲甲基)	3.11	3	1753.90299	0.88
TTPPVLDSDGSFFLYSK		3.07	2	1873.92363	0.93
VVSVLTVLHQDWLNGK		3.03	2	1808.01262	3.35
GPSVFPLAPSSK		2.84	2	1186.64751	0.67
HQDWLNGK		2.70	2	997.48625	1.22
SVMHEALHNHYTQK		2.68	4	1694.80666	-0.08
EPQVYTLPPSREEMTK		2.67	3	1904.94852	3.25

[0614]

VVSVLTVLHQDWLNGKEYK		2.64	3	2228.21006	1.16
cNVNHKPSNTK	N 端 (Gln->pyro-Glu); C1 (脲甲基)	2.63	3	1281.60102	0.41
AKGQPREPQVYTLPPSR		2.60	4	1924.04104	0.54
TSGGTAALGcLVK	C10 (脲甲基)	2.57	2	1234.65386	6.31
LHQDWLNGK		2.52	2	1110.56560	-3.16
cNVNHKPSNTK	C1 (脲甲基)	2.48	3	1298.62781	0.60
GGPSVFLFPPKPK		2.47	2	1370.78435	0.87
DKTHTcPPcPAPEAAGGPSVFLFPPK PK	C6 (脲甲基); C9 (脲 甲基)	2.44	5	3003.48554	-0.05
IcNVNHKPSNTKVDKK	C2 (脲甲基)	2.40	5	1881.99628	-0.07
FNWYVDGVEVH		2.39	2	1364.62895	1.42
SGNTNYPNPSLK		2.36	2	1194.57561	0.53
VLHQDWLNGK		2.35	3	1209.63700	-0.44
NQVSLTcLVK	C7 (脲甲基)	2.34	2	1161.63066	0.86
EPQVYTLPPSREEmTK	M14 (氧化)	2.34	3	1920.93875	0.79
cVVVDVSHEDPEVK	N 端 (Gln->pyro-Glu); C1 (脲甲基)	2.34	2	1594.74370	1.17
qGNVFScSVMHEALHNHYTQK	N 端 (Gln->pyro-Glu); C7 (脲甲基)	2.27	4	2470.10976	2.84
GTAALGcLVK	C7 (脲甲基)	2.27	2	989.54595	1.07
fNWYVDGVEVHNAK	N 端(Gln->pyro-Glu)	2.27	2	1660.77812	1.58
SVLTVLHQDWLNGK		2.26	2	1609.87578	3.76
qVQLQESGPGLVKPSSETL	N 端(Gln->pyro-Glu)	2.25	2	1892.99919	1.44
PEAAGGPSVFLFPPKPK		2.25	2	1738.96257	5.64
PEVTcVVVDVSHEDPEVK	C5 (脲甲基)	2.15	3	2037.98178	0.95
VMHEALHNHYTQK		2.13	4	1607.78066	3.67
FNWYVDGVEVHN		2.13	2	1478.67217	1.50
NWYVDGVEVHNAK		2.13	2	1530.74016	4.27
DRVTFGAFDIWGQGTMTVSSAST K		2.12	3	2514.23526	2.32
MVTVSSASTK		2.11	2	1010.51879	0.06
SRWQQGNVF		2.09	2	1121.54936	0.58
QVSLTcLVK	C6 (脲甲基)	2.03	2	1047.58537	-1.30
VVVDVSHEDPEVK		2.01	3	1451.73648	-0.85
LTISIDTSK		2.01	2	977.55144	0.05
TKPREEQYNSTYR		2.00	4	1671.80764	-0.55
轻链序列	修饰	XCorr	电荷	MH+ [Da]	ΔM [ppm]
VDNALQSGNSQESVTEQDSK		5.42	2	2135.96855	-0.12
DIQmTQSPSSLSASVGDR	M4 (氧化)	4.67	2	1894.88262	0.75
RTVAAPSVFIFPPSDEQLK		4.41	3	2102.13095	1.32
TVAAPSVFIFPPSDEQLK		4.30	2	1946.03008	1.55
HKVYAcEVTHQGLSSPVTk	C6 (脲甲基)	4.30	4	2141.07485	-2.81

[0615]

VTITcQASQDISNYLNWYQQKPGK	C5 (脲甲基)	4.24	3	2842.38736	1.56
LLIYDASNLETGVPSR		4.09	2	1747.92595	1.94
DIQMTQSPSSLSASVGDR		4.06	2	1878.88994	1.95
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSK		3.64	3	3619.71457	1.41
FcQHFDHLPLAFGGGKTK	C2 (脲甲基)	3.57	3	1931.92472	1.31
VYAcEVTHQGLSSPVTk	C4 (脲甲基)	3.44	3	1875.92704	0.03
AcEVTHQGLSSPVTk	C2 (脲甲基)	3.41	2	1613.79631	0.66
vDNALQSGNSQESVTEQDSK	N 端(Gln->pyro-Glu)	3.40	2	2118.94292	0.31
SPSSLSASVGDR		3.20	2	1162.57573	5.01
SGTASVvcLLNNFYPR	C8 (脲甲基)	3.17	2	1797.89812	1.57
LNWYQQKPGKAPK		3.15	3	1557.85746	2.42
cAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSK	N 端(Gln->pyro-Glu)	3.14	4	2988.40053	-5.93
DSTYLSSTLTLSK		3.13	2	1502.76091	1.62
DIQMTQSPSSL		3.05	2	1206.56743	0.25
HKVYAcEVTHQGL	C6 (脲甲基)	3.01	3	1541.75260	-0.24
PPSDEQLK		2.86	2	913.46160	-1.08
qSPSSLSASVGDR	N 端(Gln->pyro-Glu)	2.83	2	1273.60100	-0.74
qASQDISNYLNWYQQKPGK	N 端(Gln->pyro-Glu)	2.79	3	2251.08304	2.29
VTITcQASQDISNYLNW	C5 (脲甲基)	2.62	2	2012.94023	0.97
cQHFDHLPLAFGGGKTK	C1 (脲甲基)	2.61	3	1784.84745	-3.55
qDISNYLNWYQQKPGK	N 端(Gln->pyro-Glu)	2.44	2	1964.95134	0.61
DIQMTQSPSSLSA		2.40	2	1364.63786	1.16
qGLSSPVTk	N 端(Gln->pyro-Glu)	2.39	2	899.48204	-1.41
VYAcEVTHQGL	C4 (脲甲基)	2.32	2	1276.59770	-1.08
LNWYQQKPGK		2.22	3	1261.67118	1.87
WYQQKPGK		2.21	2	1034.53960	-2.15
QSPSSLSASVGDR		2.18	2	1290.62883	0.26
ADYEKHKVYAcEVTHQGLSSPVTk	C11 (脲甲基)	2.17	5	2747.34357	-0.82
VTITcQASQDISNY	C5 (脲甲基)	2.08	2	1599.73369	1.08
INWYQQKPGK	N 端(Gln->pyro-Glu)	2.06	3	1244.64603	3.02
KVDNALQSGNSQESVTEQDSK		2.05	2	2264.06157	-0.98
IFPPSDEQLK		2.00	2	1173.61199	-2.63
SLSASVGDR		2.00	2	891.45268	-0.45

[0616] 表VIII. 抗EGFR mAb 1号的三重突变体所得的肽图分析的抗体片段和置信度评分。

[0617] 注意, “*”表示具有缀合位点的肽。

[0618]

重链序列	修饰	XCorr	电荷	MH+ [Da]	ΔM [ppm]
THTcPPcPAPEAAGGPSVFLFPPKPK	C4 (脲甲基); C7 (脲甲基)	7.39	3	2760.36710	1.20
TPEVTcVVVDVSHEDPEVK	C6 (脲甲基)	5.66	3	2139.03000	1.16
ScDKTHTcPPcPAPEAAGGPSVFLFP PKPK	C2 (脲甲基); C8 (脲甲基); C11 (脲甲基)	5.50	4	3250.55410	1.76
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK		4.79	2	2544.13262	0.45

[0619]

VVSVTLVLHQDWLNGKEYK		4.73	4	2228.21401	2.94
WQQGNVFS _{Sc} SVMHEALHNHYTQK	C9 (脲甲基)	4.58	4	2801.25576	-4.08
VVSVTLVLHQDWLNGK		4.36	2	1808.01164	2.81
THTePPcPAPEAAAGGPSVF	C4 (脲甲基); C7 (脲甲基)	4.25	2	1952.86479	0.90
cNVNHKPSNTKVDK	C1 (脲甲基)	4.14	4	1640.81948	1.28
FNWYVDGVEVHNAK		4.09	3	1677.80472	1.60
cSVMHEALHNHYTQK	C1 (脲甲基)	4.08	4	1854.84047	1.63
WYVDGVEVHNAK		3.85	2	1416.68852	-1.53
ScDKTHTePPcPAPEAAAGGPSVF	C2 (脲甲基); C8 (脲甲基); C11 (脲甲基)	3.84	3	2443.05173	1.67
VTGAFDIWGQGTMTVSSASTK		3.83	3	2243.10843	3.15
TPEVTcVVVDVSHED	C6 (脲甲基)	3.83	2	1685.76958	0.48
GQPREPQVYTLPPSR		3.69	3	1724.91098	1.78
YVDGVEVHNAK		3.64	2	1230.61040	-0.79
SRWQQGNVFS _{Sc} SVMHEALHNHYTQK	C11 (脲甲基)	3.55	5	3044.40229	0.64
IcNVNHKPSNTKVDKK	C2 (脲甲基)	3.49	5	1881.99720	0.42
nQVSLTeLVK	N 端 (Gln->pyro-Glu); C7 (脲甲基)	3.45	2	1144.60796	4.23
STSGGTAALGcLVK	C11 (脲甲基)	3.45	2	1321.67778	-0.24
SVTLVLHQDWLNGK		3.44	2	1609.87370	2.47
GQPREPQVYTLPPSREEMTK		3.25	4	2343.17592	-0.14
GPSVFPLAPSSK		3.23	2	1186.64739	0.57
ePQVYTLPPSREEMTK	N 端(Gln->pyro-Glu)	3.20	3	1887.92667	5.77
VSNAcPAPIEK*	C6 (脲甲基)	3.16	2	1313.69072	1.87
IcNVNHKPSNTK	C2 (脲甲基)	3.12	4	1411.71218	0.76
TSGGTAALGcLVK	C10 (脲甲基)	3.09	2	1234.65105	4.04
ScSV _m HEALHNHYTQK	C2 (脲甲基); M5 (氧化)	3.09	4	1957.86367	-0.37
GGPSVFLFPPKPK		3.01	2	1370.78752	3.18
wQQGNVFS _{Sc} SVMHEALHNHYTQK	N 端 (Gln->pyro-Glu); C9 (脲甲基)	2.98	5	2784.25367	4.68
IcNVNHKPSNTKVDK	C2 (脲甲基)	2.92	3	1753.90171	0.15
SGNTNYPNPSLK		2.91	2	1194.57671	1.45
EPQVYTLPPSREEMTK		2.86	2	1904.94658	2.24
qVQLQESGGLVK	N 端(Gln->pyro-Glu)	2.85	2	1365.74468	5.38
fNWYVDGVEVHNAK	N 端(Gln->pyro-Glu)	2.77	2	1660.77764	1.29
EVTcVVVDVSHEDPEVK	C4 (脲甲基)	2.74	3	1940.92545	-0.84
GGTAALGcLVK	C8 (脲甲基)	2.58	2	1046.56560	-0.72
AKGQPREPQVYTLPPSR		2.55	3	1924.04276	1.43
TTPPVLDSDGSFFLYSK		2.54	2	1873.92668	2.56
NQVSLTeLVK	C7 (脲甲基)	2.52	2	1161.63188	1.91
SVMHEALHNHYTQK		2.47	4	1694.80886	1.22
NWYVDGVEVHNAK		2.44	2	1530.73760	2.60

[0620]

PEAAGGPSVFLFPPKPK		2.42	2	1738.94597	-3.91
SSLGTQTYIcNVNHKPSNTK	C10 (脲甲基)	2.37	4	2249.09975	0.79
cPAPIEK	C1 (脲甲基)	2.37	2	814.41460	2.21
tcVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAK	N 端 (Gln->pyro-Glu); C2 (脲甲基)	2.30	3	3354.59543	6.48
EPQVYTLPPSREEmTK	M14 (氧化)	2.29	3	1920.93839	0.60
cNVNHKPSNTK	C1 (脲甲基)	2.28	3	1298.63092	2.99
EEMTKNQVSLTcLVK	C12 (脲甲基)	2.28	3	1779.90433	3.55
VLHQDWLNGK		2.26	3	1209.63782	0.24
AcPAPIEKTISKAK*	C2 (脲甲基)	2.23	4	1513.84084	0.06
EPQVYTLPPSR		2.22	2	1286.67912	4.01
LHQDWLNGK		2.21	2	1110.56914	0.03
LSSVTAADTAIYYcVR	C14 (脲甲基)	2.21	2	1789.88237	1.90
VDGVEVHNAK		2.20	2	1067.54704	-0.94
PEVTcVVVDVSHEDPEVK	C5 (脲甲基)	2.20	3	2037.98288	1.49
EEmTKNQVSLTcLVK	M3 (氧化); C12 (脲 甲基)	2.19	3	1795.89530	1.32
DGVEVHNAK		2.18	2	968.48192	2.36
HQDWLNGK		2.16	2	997.48693	1.89
FNWYVDGVEVH		2.16	2	1364.62871	1.24
IYYSGNTNYNPSLK		2.14	2	1633.78142	-2.61
LTISIDTSK		2.08	2	977.54796	-3.51
QVSLTcLVK	C6 (脲甲基)	2.03	2	1047.58293	-3.63
PPSREEMTK		2.03	2	1074.52556	0.63
轻链序列	修饰	XCorr	电荷	MH+ [Da]	ΔM [ppm]
VTITcQASQDISNYLNWYQQKPGK	C5 (脲甲基)	5.83	3	2842.38791	1.75
eAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSK	N 端(Gln->pyro-Glu)	4.91	4	2988.40835	-3.31
DIQmTQSPSSLSASVGDR	M4 (氧化)	4.91	2	1894.88396	1.46
VDNALQSGNSQESVTEQDSK		4.79	2	2135.96758	-0.58
DIQMTQSPSSLSASVGDR		4.24	2	1878.88860	1.24
RTVAAPSVFIFPPSDEQLK		4.23	3	2102.13059	1.15
SGTASVVcLLNFFYP	C8 (脲甲基)	4.20	2	1797.89861	1.84
VTITcQASQDISNYLNWYQQKPGK APK	C5 (脲甲基)	4.07	4	3138.57168	1.24
LLIYDASNLETGVPSR		4.02	2	1747.92705	2.57
HKVYAcEVTHQGLSSPVTk	C6 (脲甲基)	3.90	4	2141.08266	0.84
TVAAPSVFIFPPSDEQLK		3.87	2	1946.03081	1.93
VYAcEVTHQGLSSPVTk	C4 (脲甲基)	3.80	3	1875.92557	-0.75
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSK		3.61	3	3619.71640	1.92
DSTYLSSTLTLSK		3.39	2	1502.76250	2.67
HKVYAcEVTHQGL	C6 (脲甲基)	3.19	3	1541.75260	-0.24
LNWYQQKPGKAPK		3.17	3	1557.85251	-0.75
SPSSLSASVGDR		3.12	2	1162.57341	3.01
DIQMTQSPSSL		2.98	2	1206.56523	-1.57

[0621]

PPSDEQLK		2.95	2	913.46257	-0.01
qDISNYLNWYQQKPGK	N 端(Gln->pyro-Glu)	2.95	2	1964.94902	-0.58
FcQHFDHLPLAFGGGTK	C2 (脲甲基)	2.85	4	1931.92251	0.16
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSK		2.78	4	4161.01479	0.97
qGLSSPVTk	N 端(Gln->pyro-Glu)	2.67	2	899.48210	-1.34
qASQDISNYLNWYQQKPGK	N 端(Gln->pyro-Glu)	2.63	2	2251.08330	2.41
VYAcEVTHQGL	C4 (脲甲基)	2.58	2	1276.59905	-0.03
LLIYDASNLETGVPSRF		2.51	2	1894.99394	1.56
DIQMTQSPSSLSA		2.47	2	1364.63750	0.89
AcEVTHQGLSSPVTk	C2 (脲甲基)	2.38	3	1613.79654	0.80
VTITcQASQDISNYLNW	C5 (脲甲基)	2.36	2	2012.94121	1.46
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY		2.30	2	2602.13994	0.44
LNWYQQKPGK		2.28	3	1261.67154	2.16
ALQSGNSQESVTEQDSK		2.28	2	1807.83879	4.58
SNLETGVPSR		2.06	2	1059.54436	1.32

抗HER2 mAb和Fc变体：Fc变体不影响靶标结合

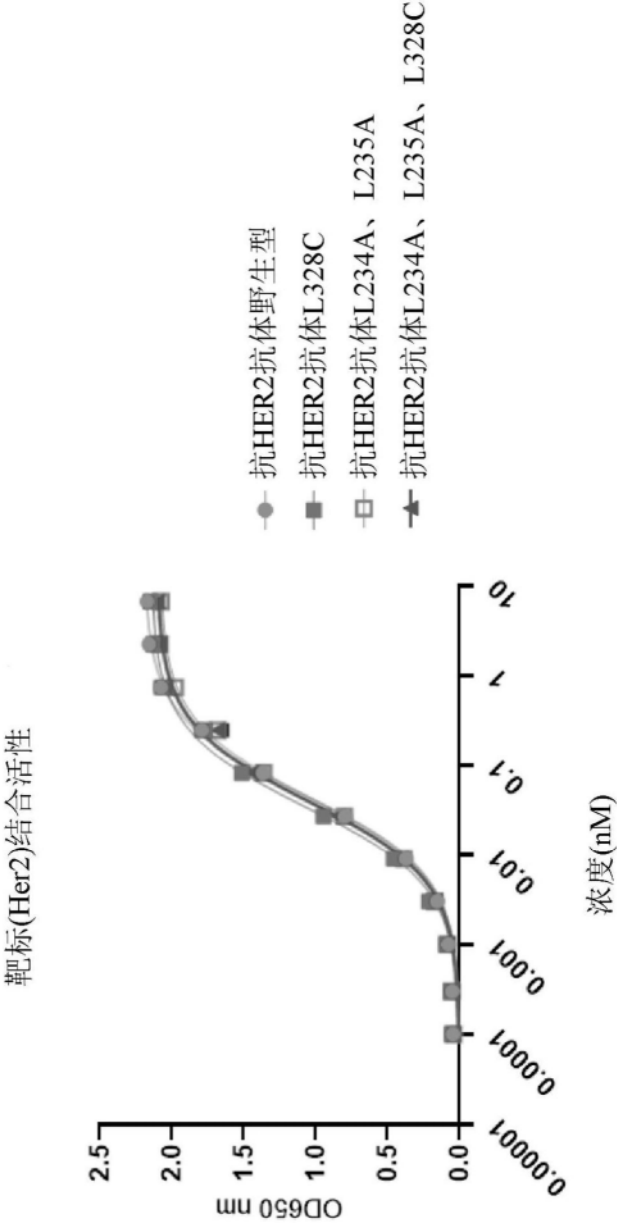


图1

抗EGFR mAb 1号和Fc变体：Fc变体不影响靶标结合

抗原(EGFR)结合活性

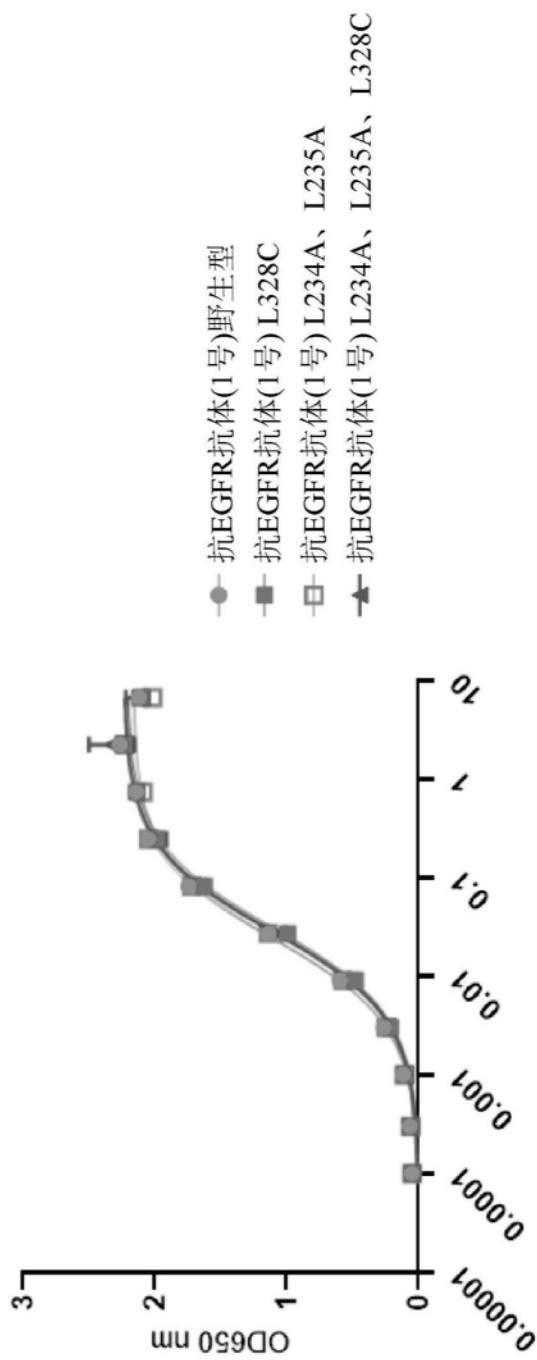


图2

抗EGFR mAb 2号和Fc变体：Fc变体不影响靶标结合
抗原(EGFR)结合活性

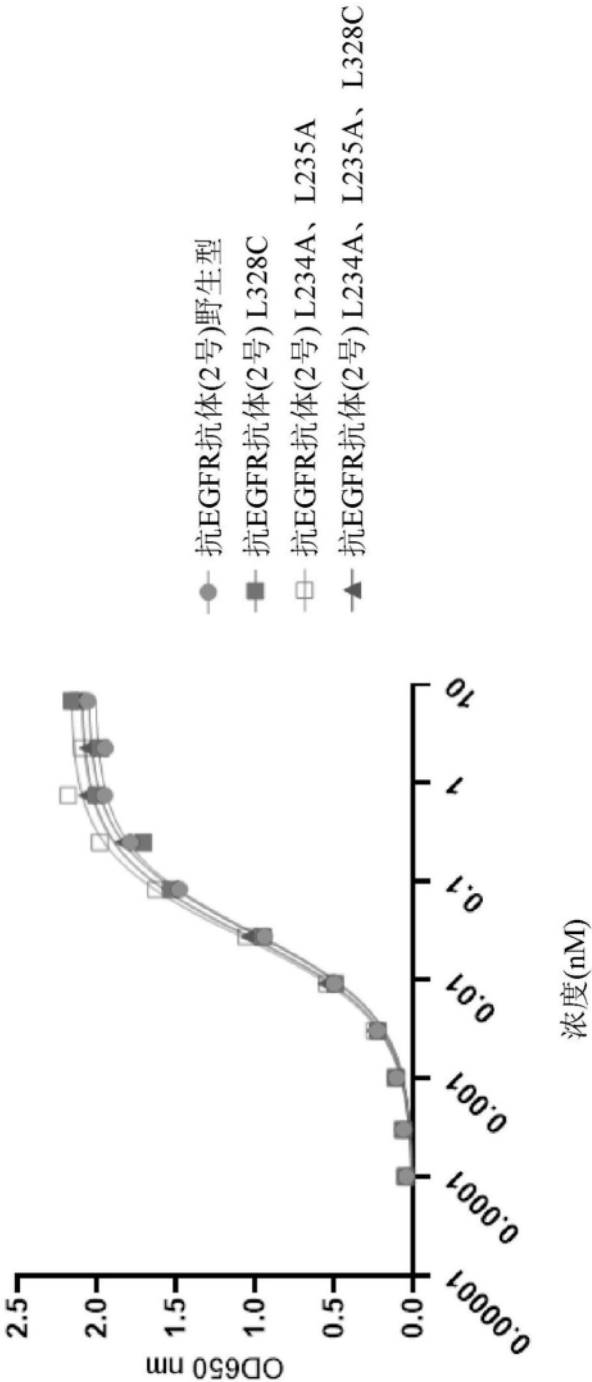


图3

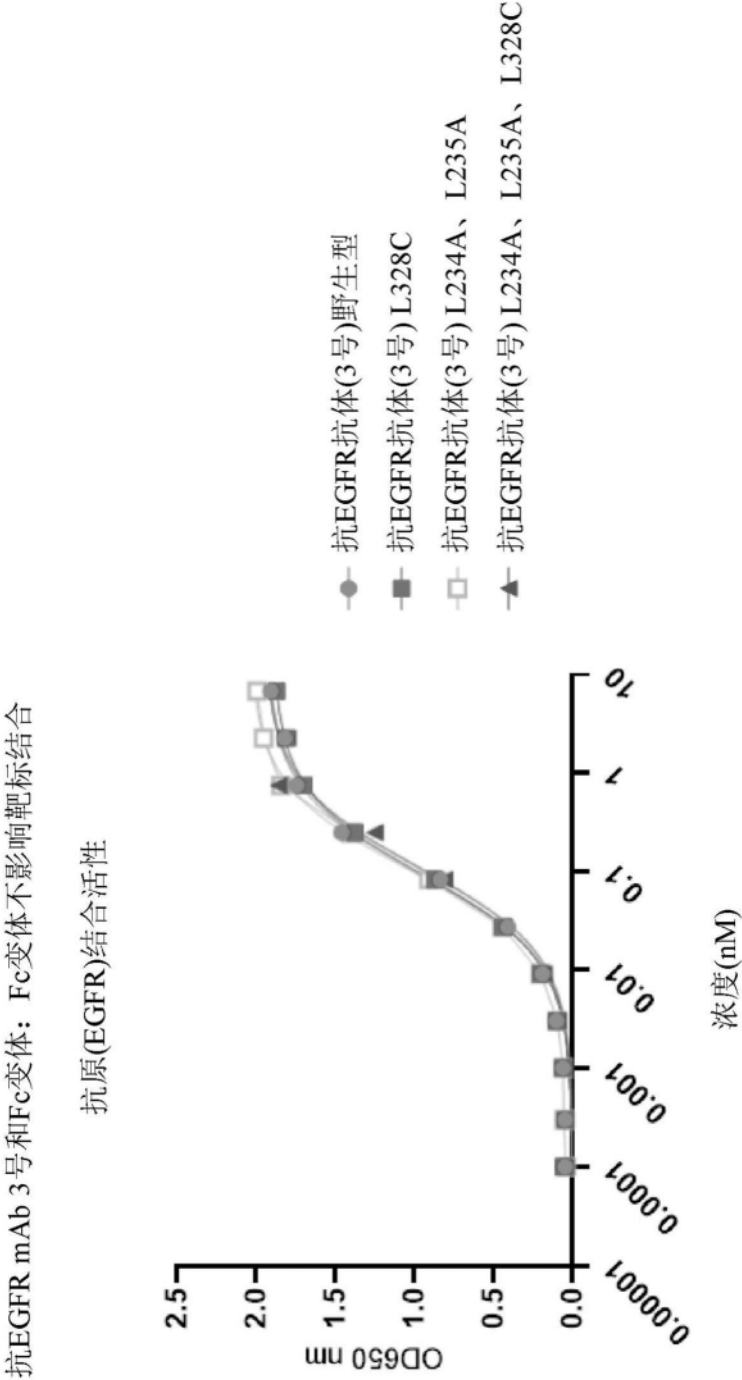


图4

抗Trop2 mAb和Fc变体: Fc变体不影响靶标结合

抗原(Trop2)结合活性

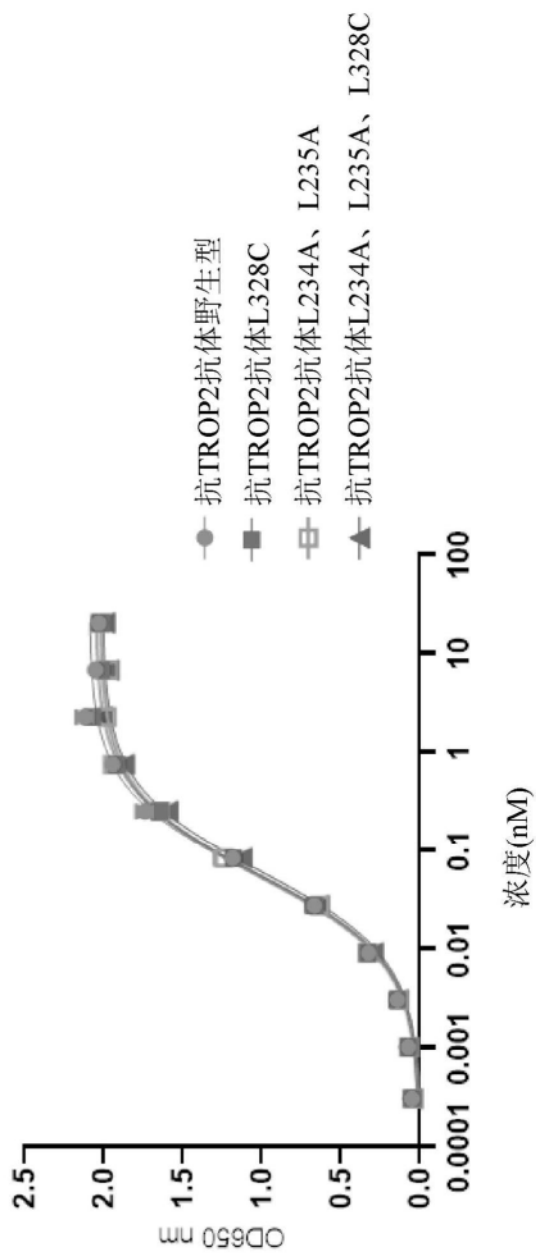


图5

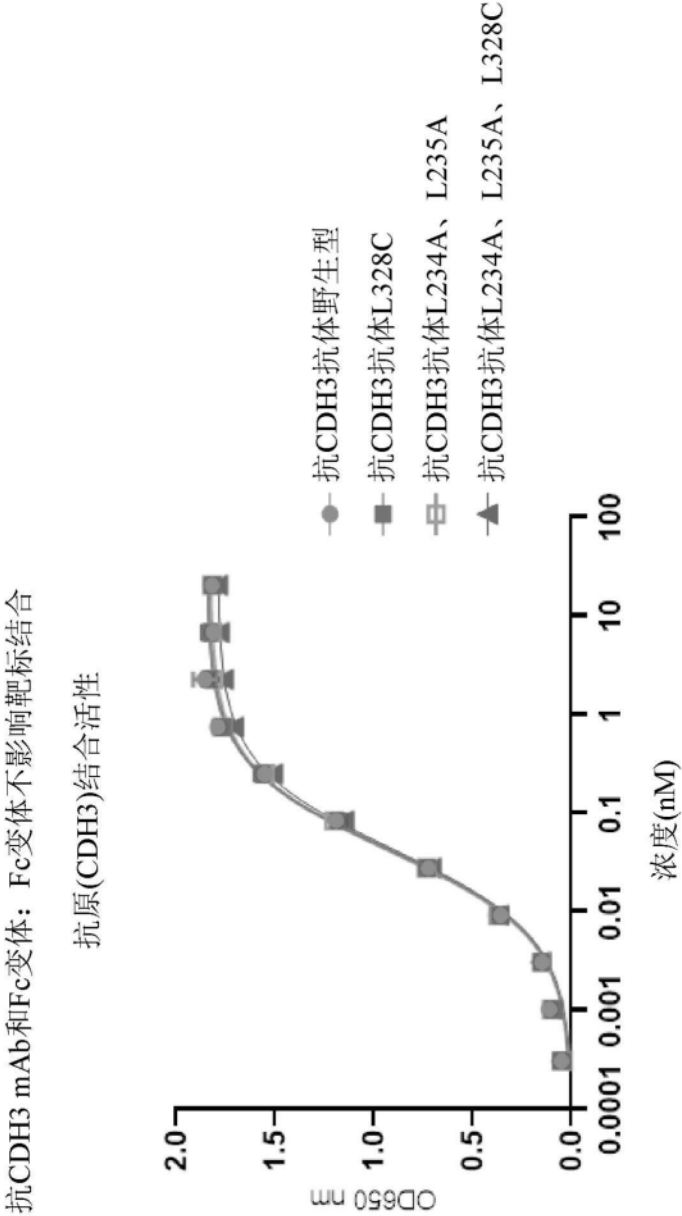


图6

抗HER2 mAb和Fc变体：针对三重突变体观察到FcγRI结合的完全抑制

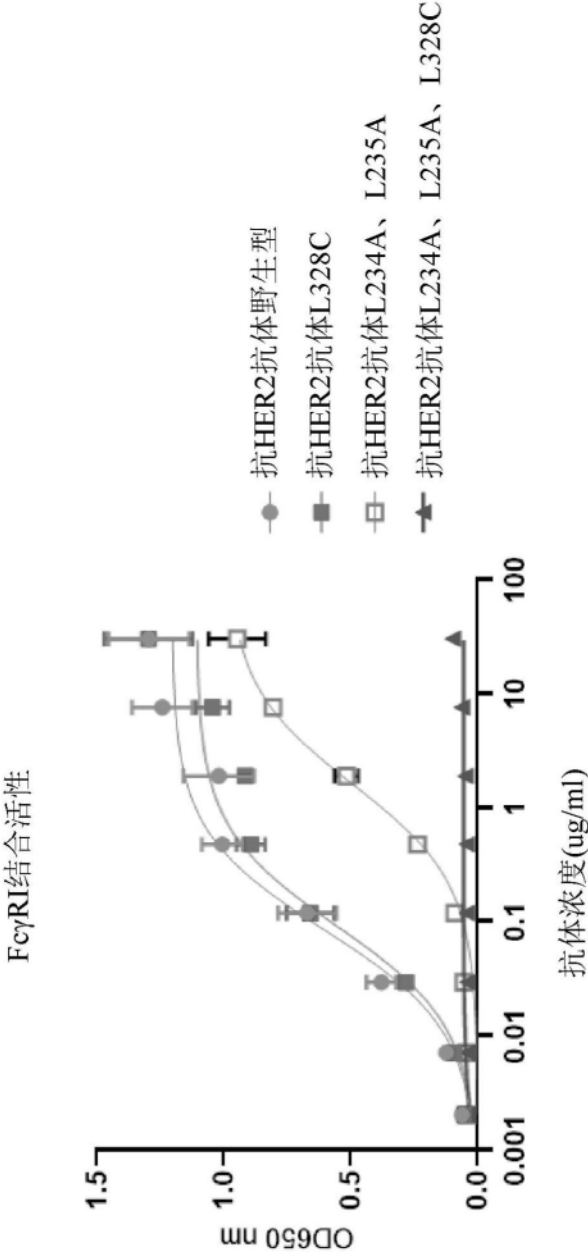


图7

抗EGFR mAb 1号和Fc变体：针对三重突变体观察到FcγRI结合的完全抑制

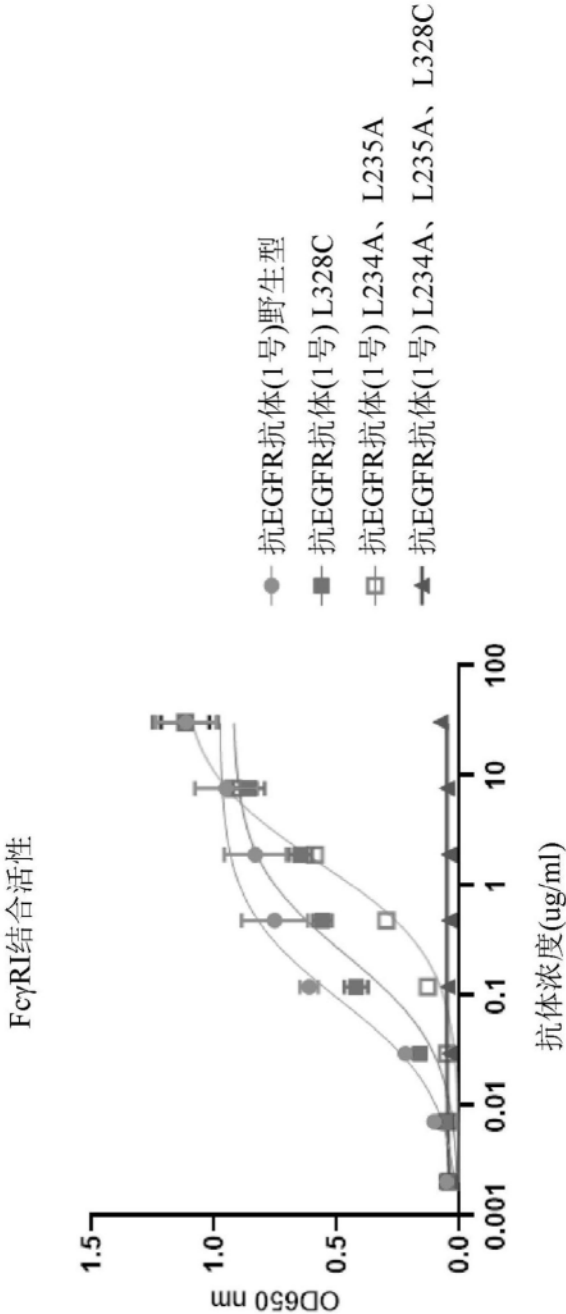


图8

抗EGFR mAb 2号Fc变体：针对三重突变体观察到FcγRI结合的完全抑制

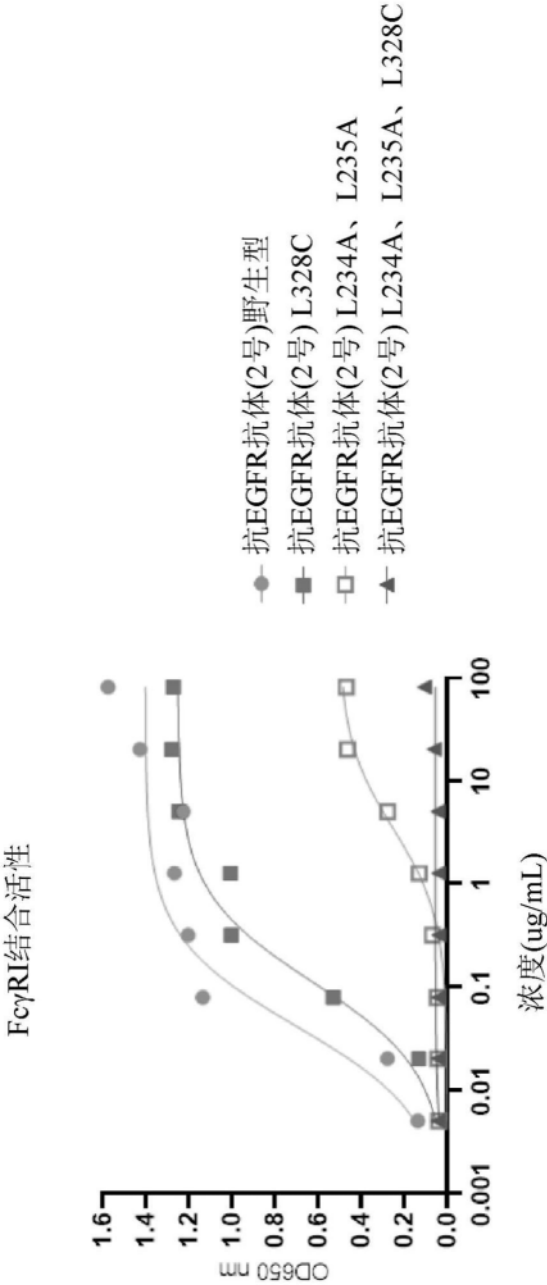


图9

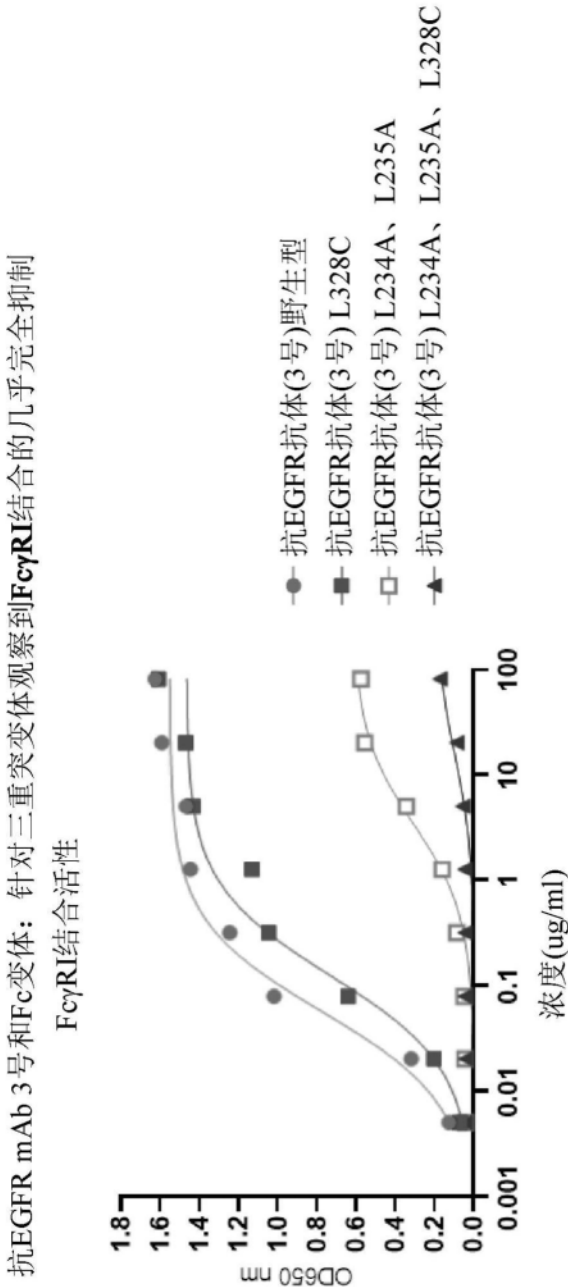


图10

抗Trop2 mAb和Fc变体：针对三重突变体观察到FcγRI结合的完全抑制

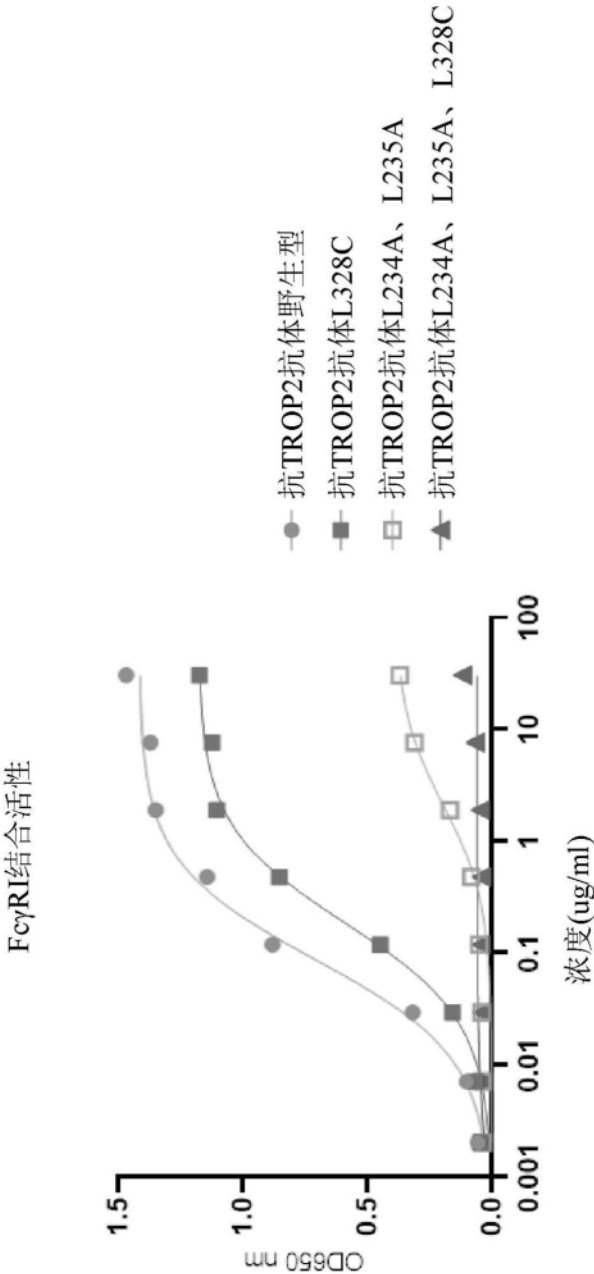


图11

抗CDH3 mAb和Fc变体：针对三重突变体观察到**FcγRI**结合的几乎完全抑制

FcγRI结合活性

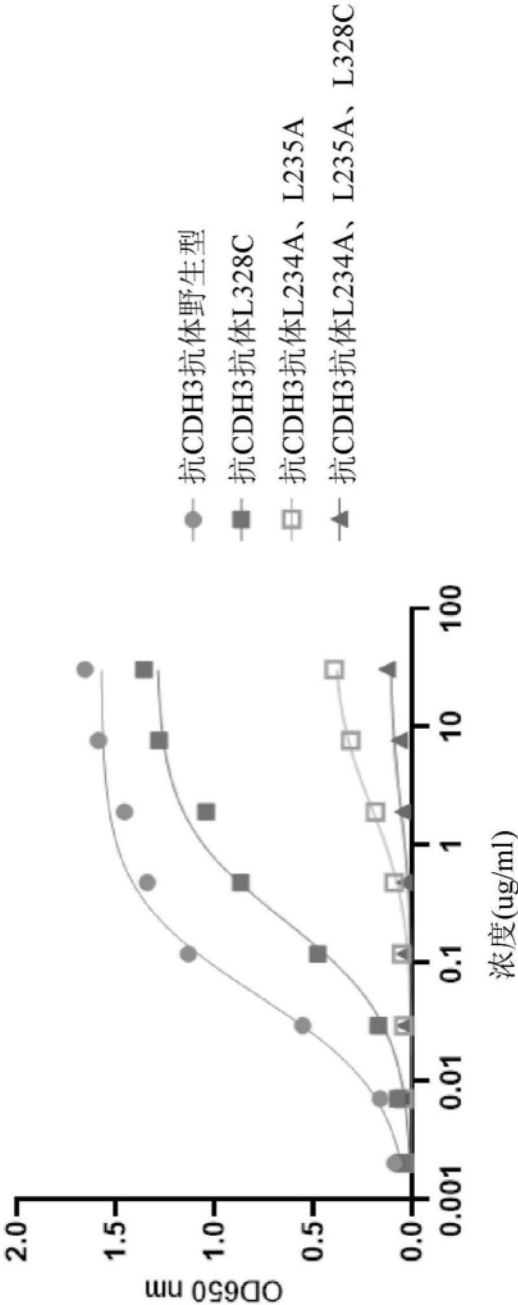


图12

抗HER2 mAb和Fc变体：针对单重和三重突变体观察到**FcγRIIA**结合的遏制
FcγRIIA结合活性

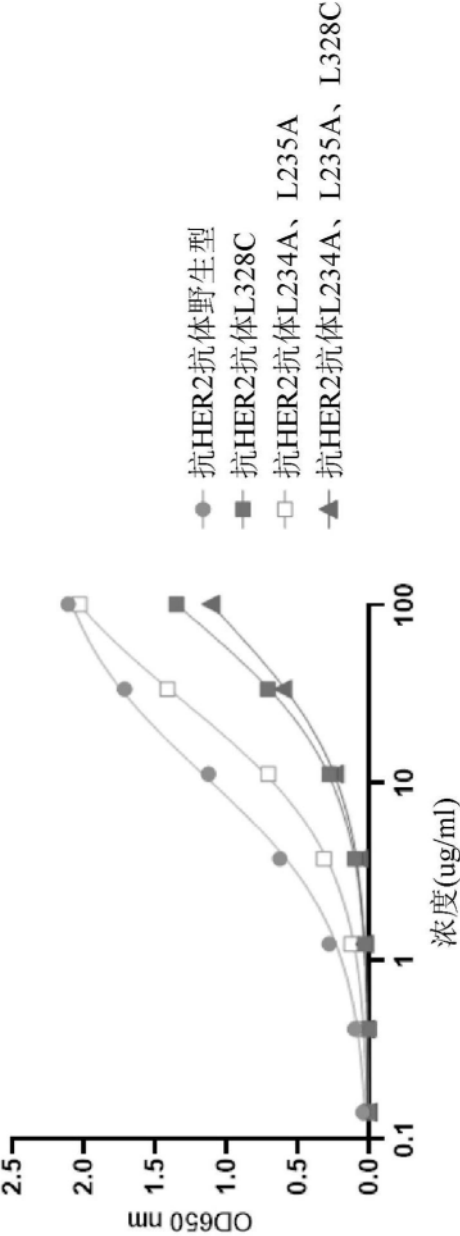


图13

抗EGFR mAb 1号和Fc变体：针对单重和三重突变体观察到FcγRIIA结合的遏制
FcγRIIA结合活性

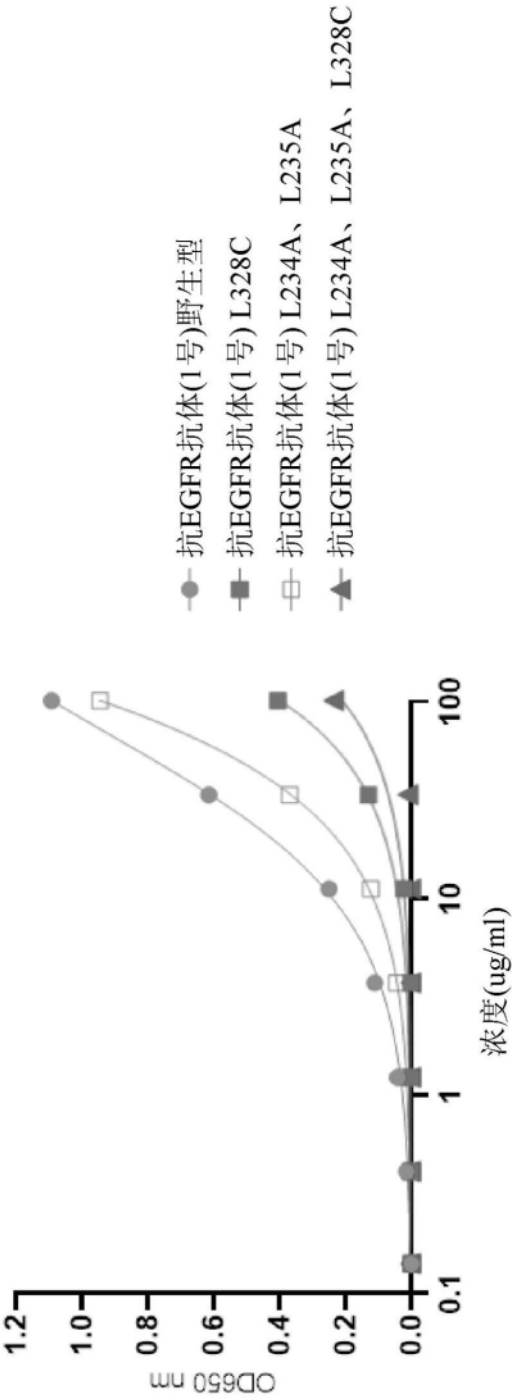


图14

抗TROP2 mAb和Fc变体：针对单重和三重变体观察到FcγRIIA结合的遏制

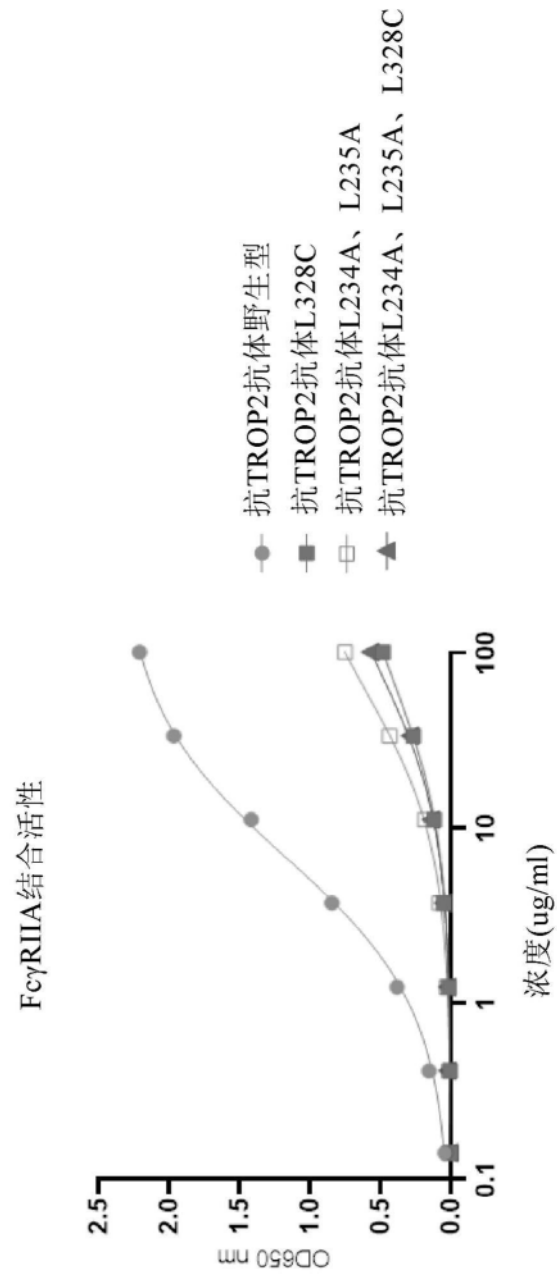


图15

抗CDH3 mAb和Fc变体：针对单重和三重突变体观察到**FcγRIIA**结合的遏制

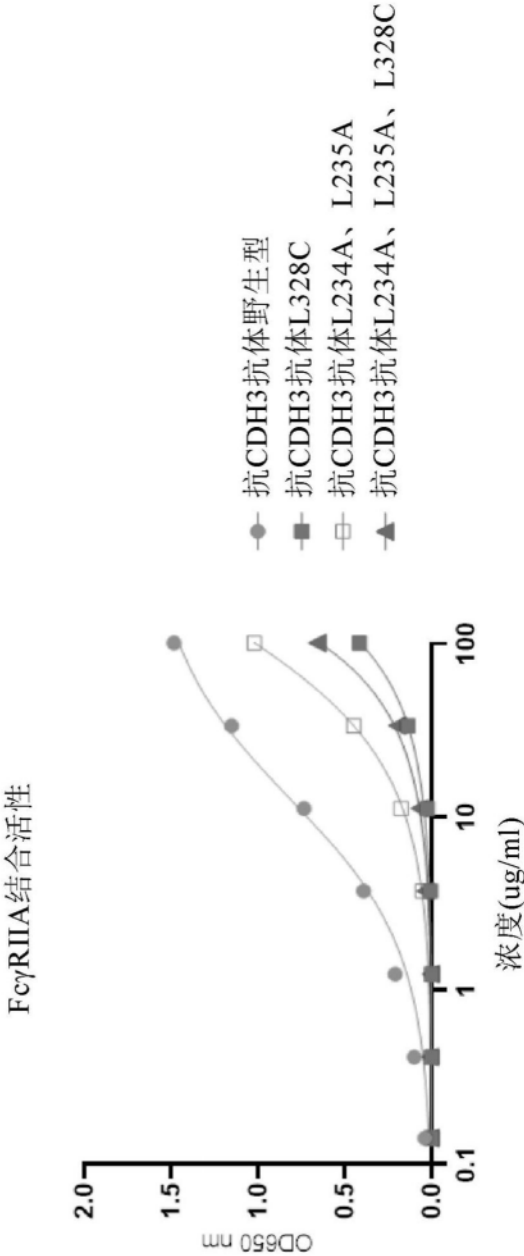


图16

抗HER2 mAb和Fc变体：针对单重和三重突变体观察到FcγRIIIA结合的抑制

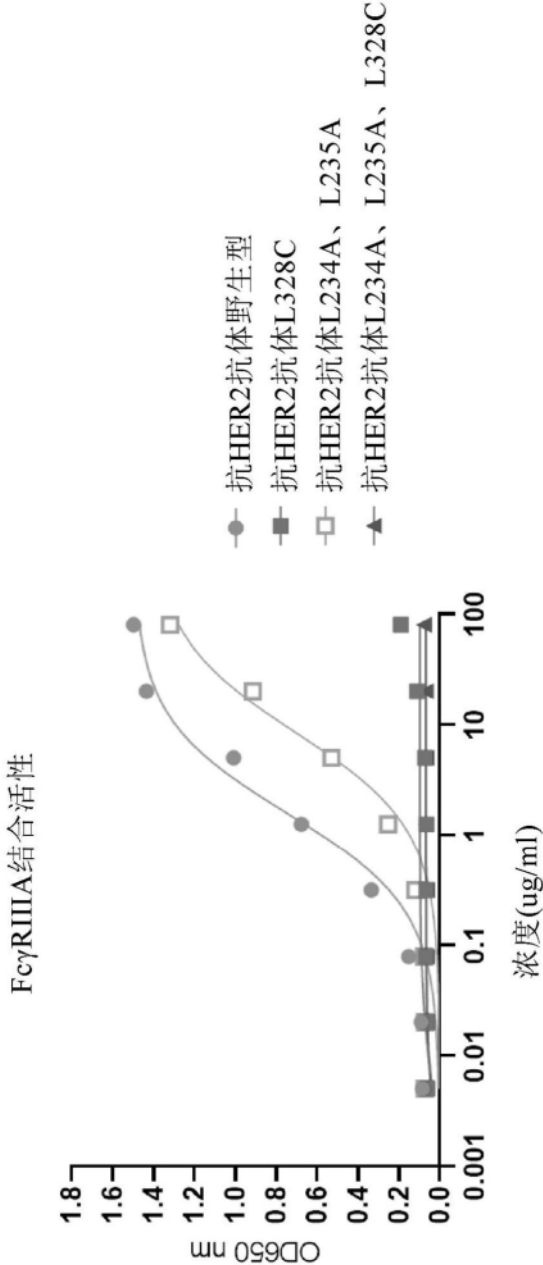


图17

抗EGFR mAb 1号 和Fc受体： 针对单重和三重突变体观察到FcγRIIIA 结合的抑制

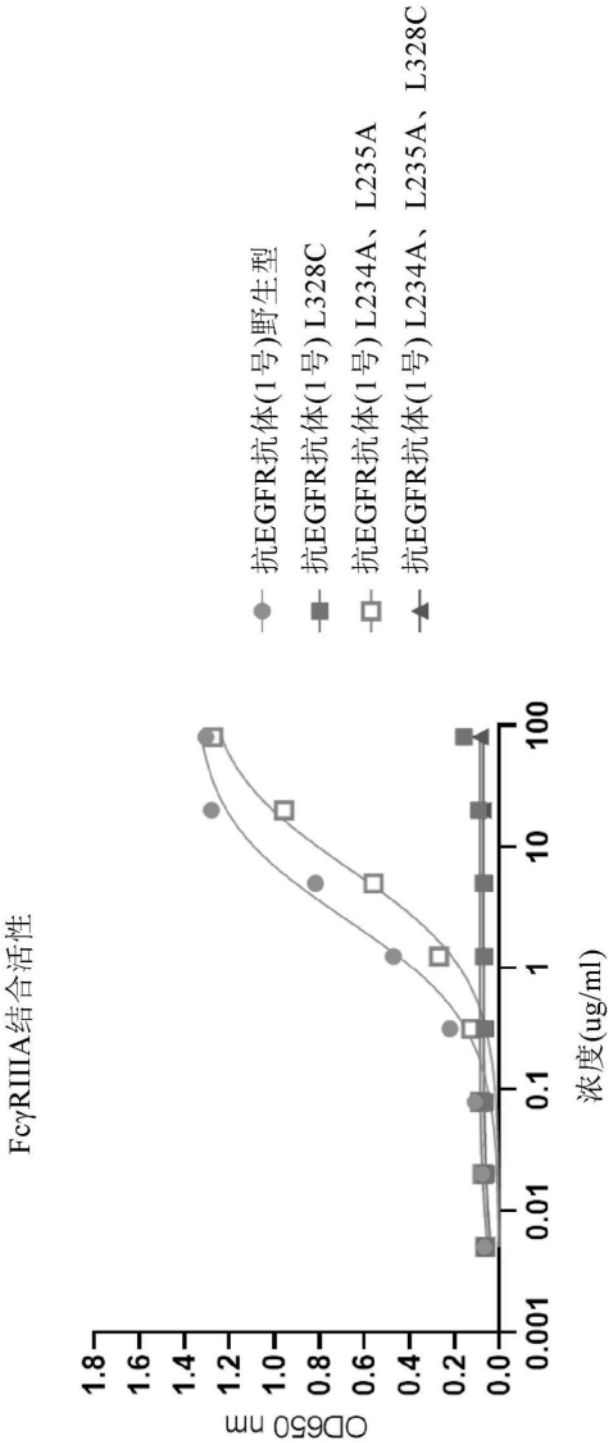


图18

抗EGFR mAb 2号Fc变体：针对单重和三重突变体观察到**FcγRIIIA**结合的抑制

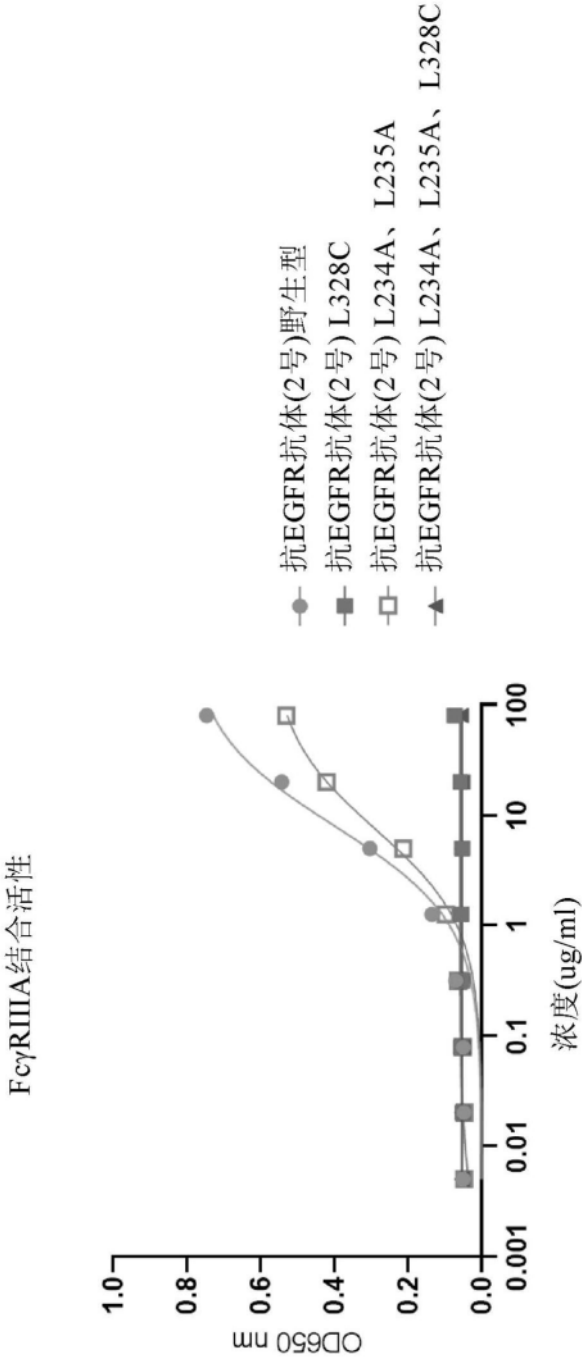


图19

抗EGFR mAb 3号和Fc变体：针对单重和三重变体观察到FcγRIIIA结合的抑制

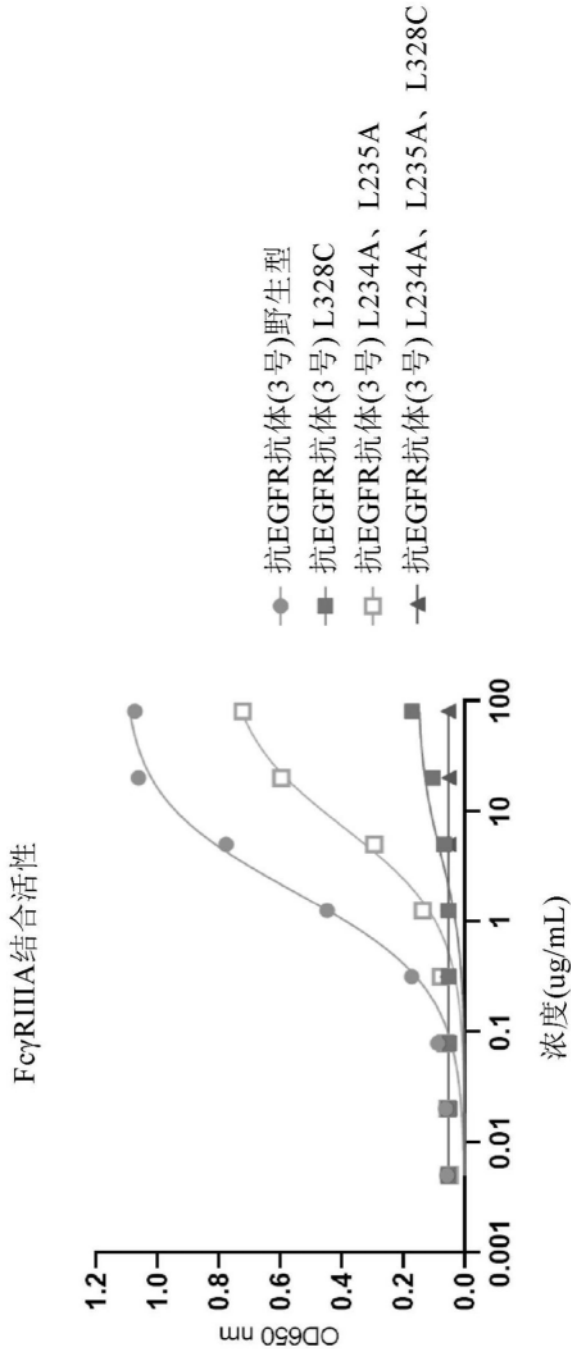


图20

抗Trop2和Fc变体：针对单重和三重突变观察到FcγRIIIA结合的抑制

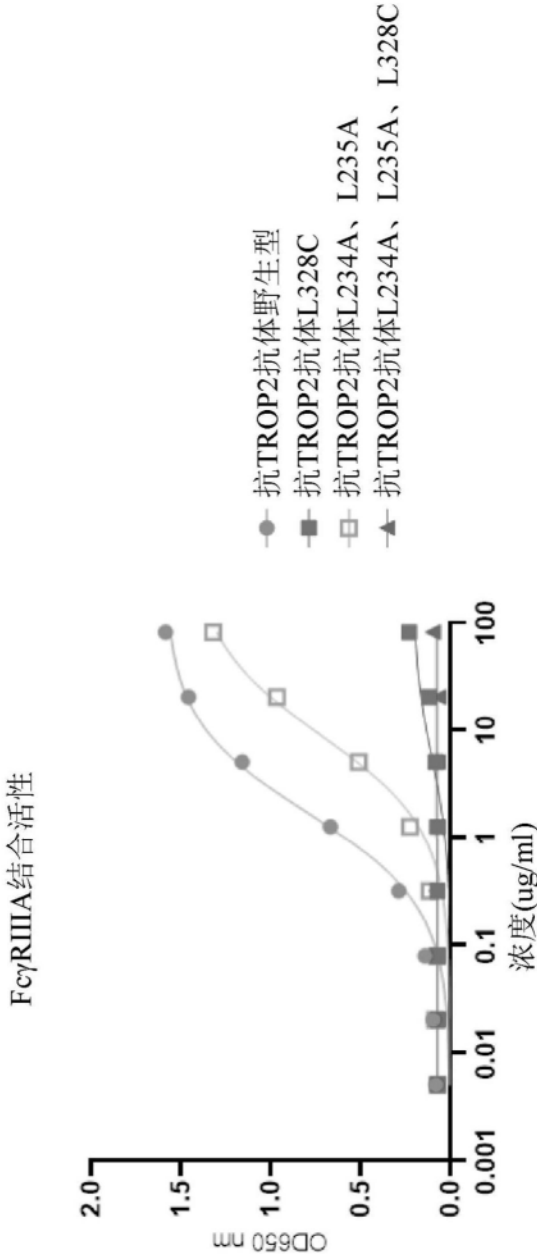


图21

抗CDH3和Fc变体：针对单重和三重突变体观察到**FcγRIIIA**结合的抑制

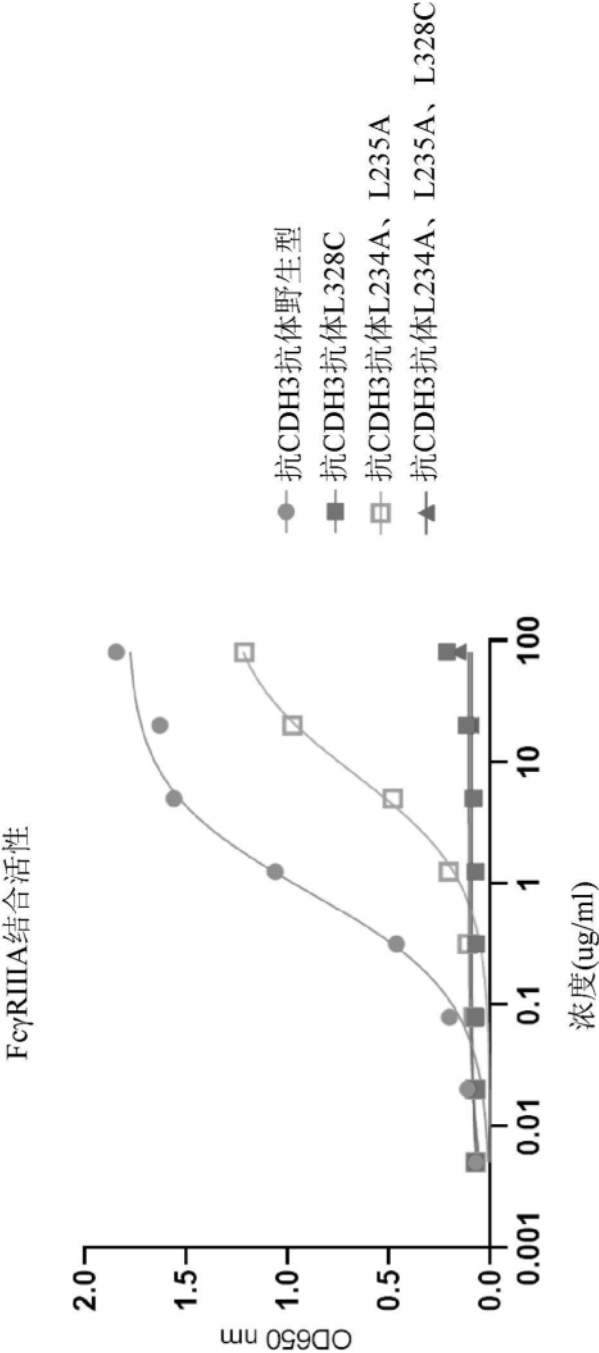


图22

抗HER2 mAb和Fc变体：对于Fc变体未观察到FcRn结合的显著减少

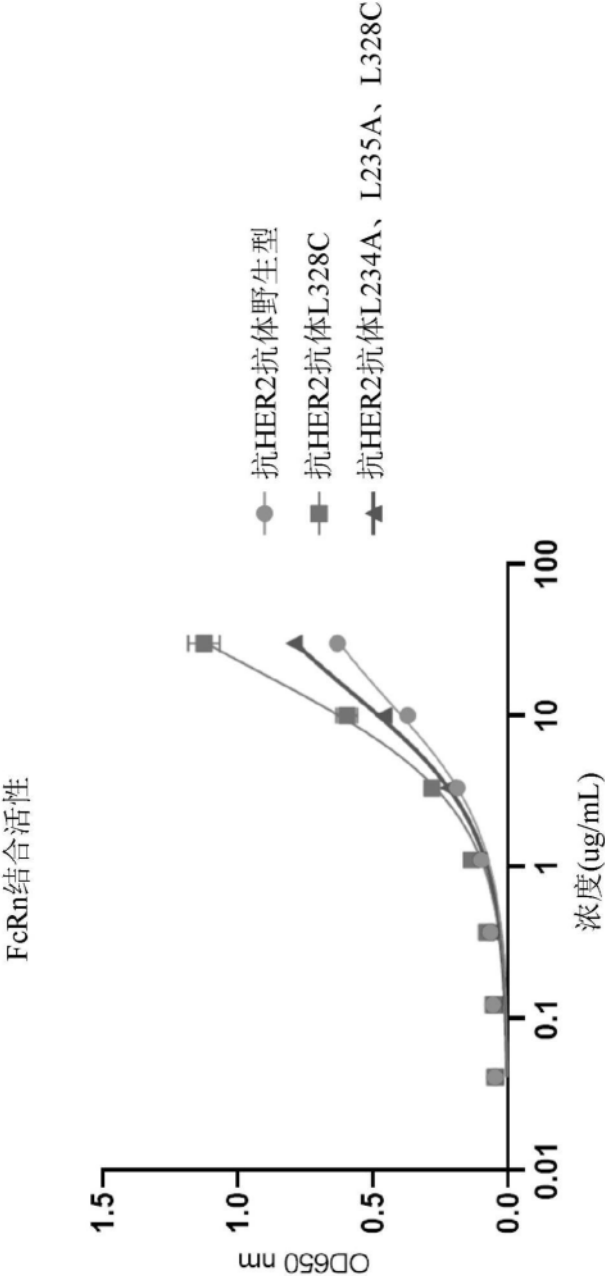


图23

抗EGFR mAb 1号和Fc变体：对于Fc变体未观察到**FcRn**结合的显著减少

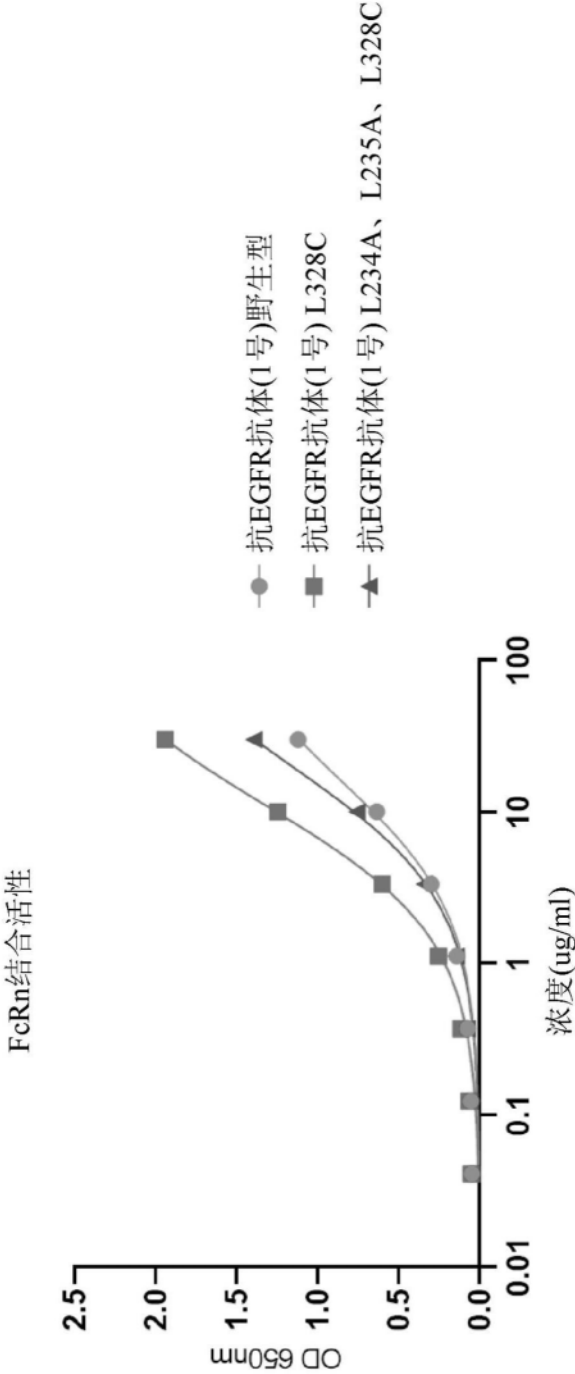


图24

抗EGFR mAb 2号和Fc变体：对于Fc变体未观察到FcRn结合的显著减少

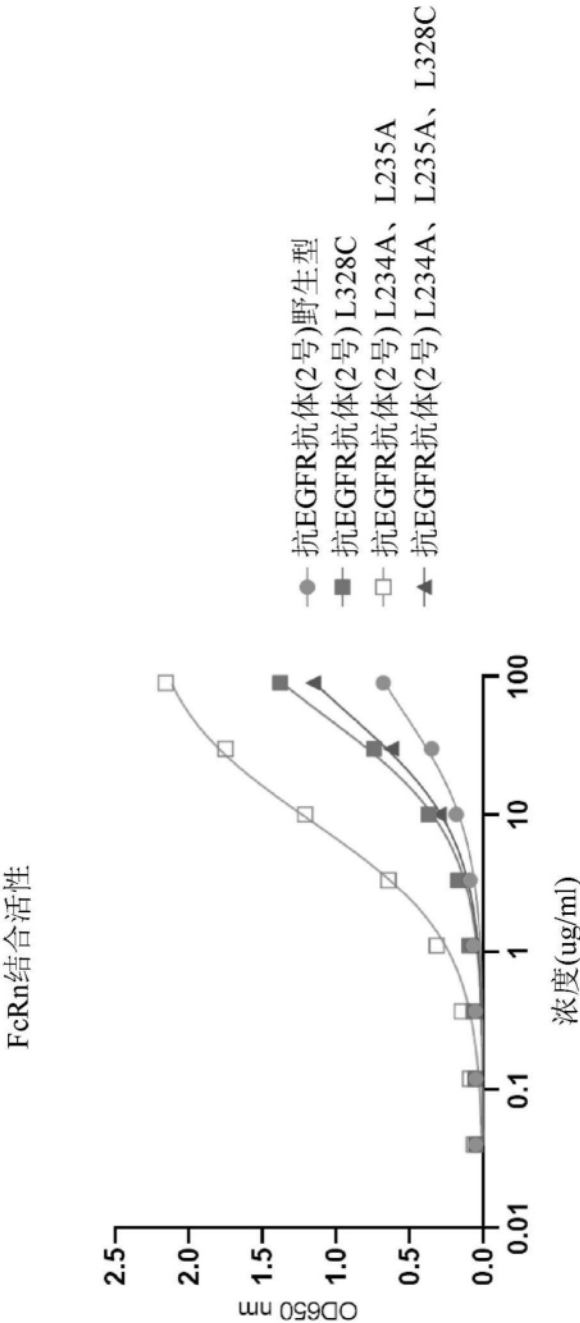


图25

抗EGFR mAb 3号和Fc变体：对于Fc变体未观察到FcRn结合的显著减少

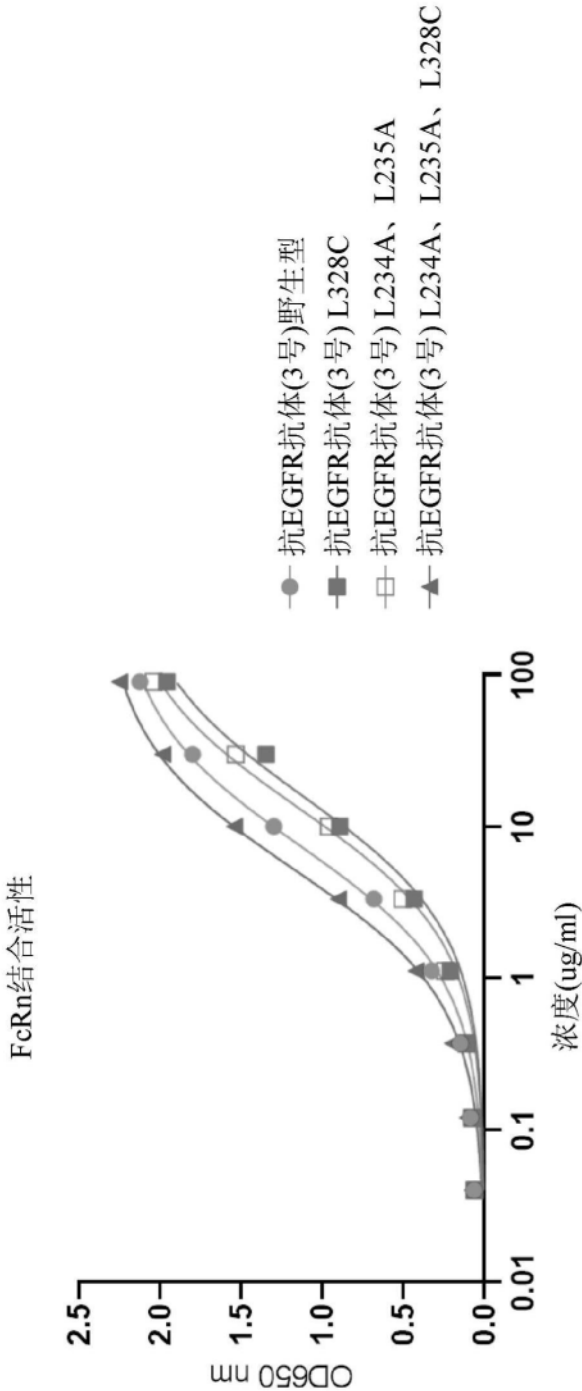


图26

抗Trop2 mAb和Fc变体：对于Fc变体未观察到FcRn结合的显著减少

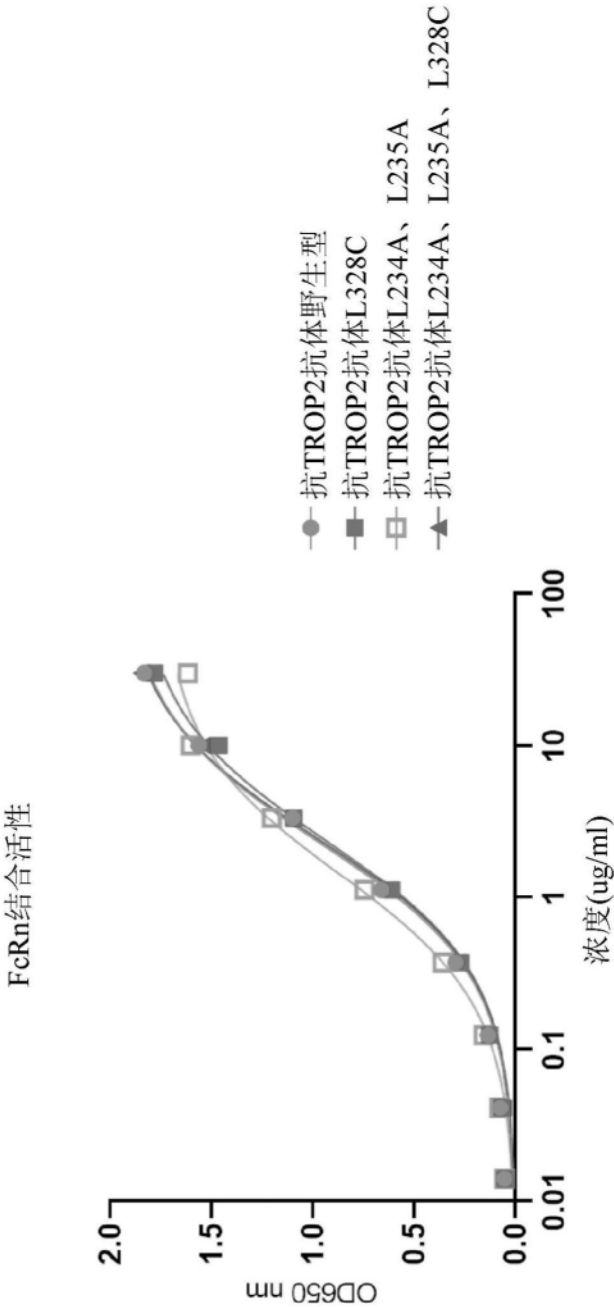


图27

抗CDH3 mAb和Fc变体：对于Fc变体未观察到FcRn结合的显著减少

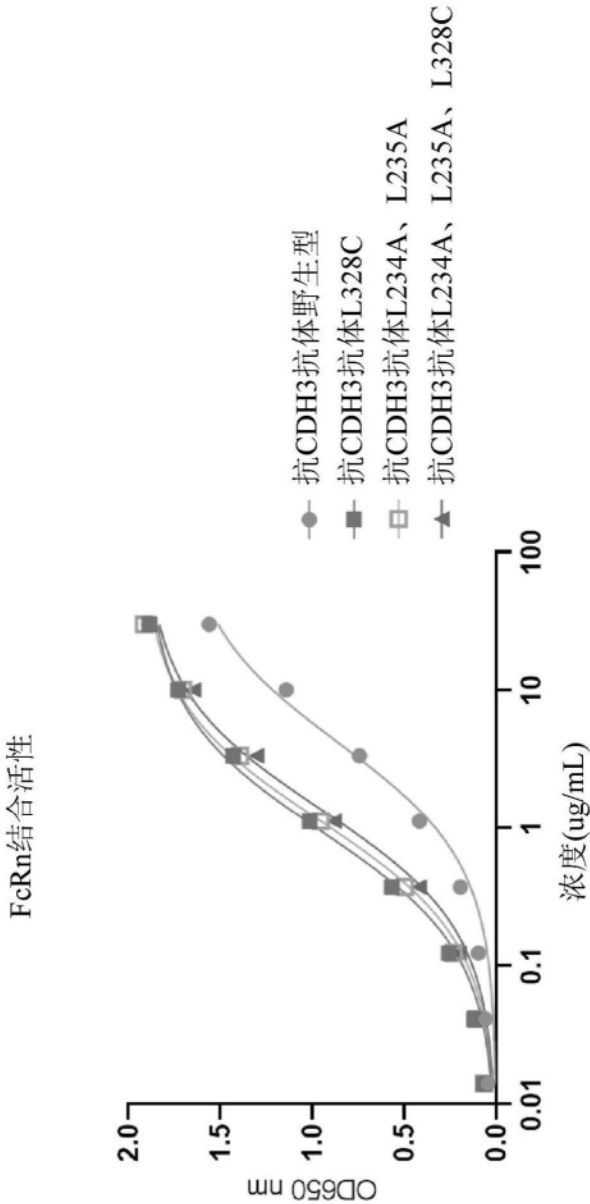


图28

抗Her2抗体和Fc受体对FcγRI、IIA、IIB、IIIA、IIIB和FcRn的结合动力学分析。
三重突变体对所有FcγR同种型表现出显著结合抑制，但对FcRn未表现出结合抑制。

Fcγ受体	Fc受体	KD (M)	k _{on} (1/Ms)	k _{dis} (1/s)
FcγRI	野生型	1.42E-08	1.53E+05	2.17E-03
	L328C	2.21E-08	1.51E+05	3.33E-03
	L234A、L235A、L328C	5.80E-07	1.11E+05	6.46E-02
FcγRIIA	野生型	2.80E-07	3.00E+05	8.40E-02
	L328C	9.85E-07	8.48E+04	8.35E-02
	L234A、L235A、L328C	无结合/低结合		
FcγRIIB	野生型	1.80E-07	4.17E+05	7.53E-02
	L328C	无结合/低结合		
	L234A、L235A、L328C	无结合/低结合		
FcγRIIIA (F158)	野生型	1.98E-07	3.04E+05	6.00E-02
	L328C	无结合/低结合		
	L234A、L235A、L328C	无结合/低结合		
FcγRIIIA (V158)	野生型	1.83E-07	2.85E+05	5.20E-02
	L328C	4.71E-07	2.55E+05	1.20E-01
	L234A、L235A、L328C	无结合/低结合		
FcγRIIIB	野生型	2.95E-07	2.98E+05	8.78E-02
	L328C	无结合/低结合		
	L234A、L235A、L328C	无结合/低结合		
FcRn (pH6.0)	野生型	6.55E-08	4.44E+05	2.91E-02
	L328C	5.87E-08	5.34E+05	3.13E-02
	L234A、L235A、L328C	6.79E-08	5.00E+05	3.39E-02

图29

抗Her2抗体和Fc变体对FcγRI的结合动力学分析。与野生型和单重突变相比，三重突变的解离速率更快。

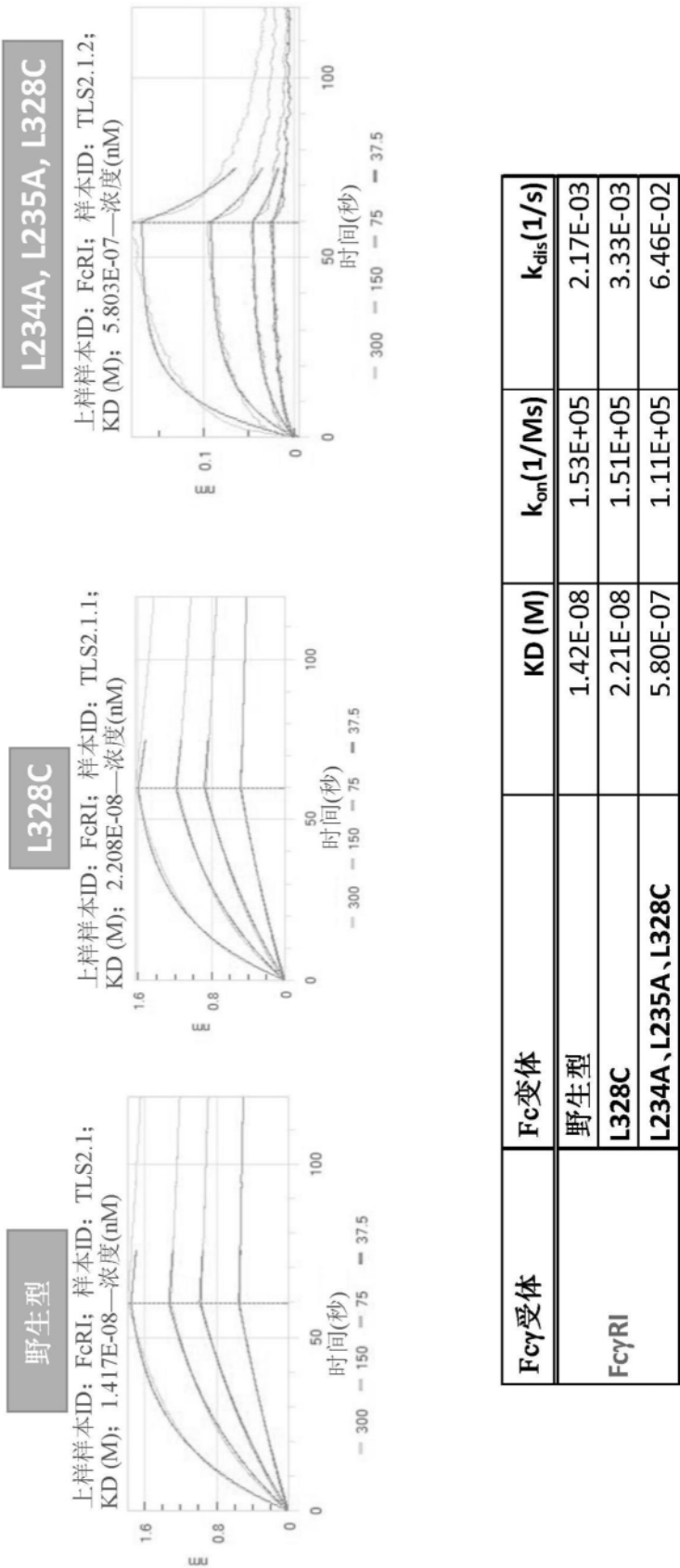


图30

抗HER2 mAb和Fc变体：对于Fc变体观察到抗体依赖性细胞介导的细胞毒性的降低

抗体依赖性细胞介导的细胞毒性

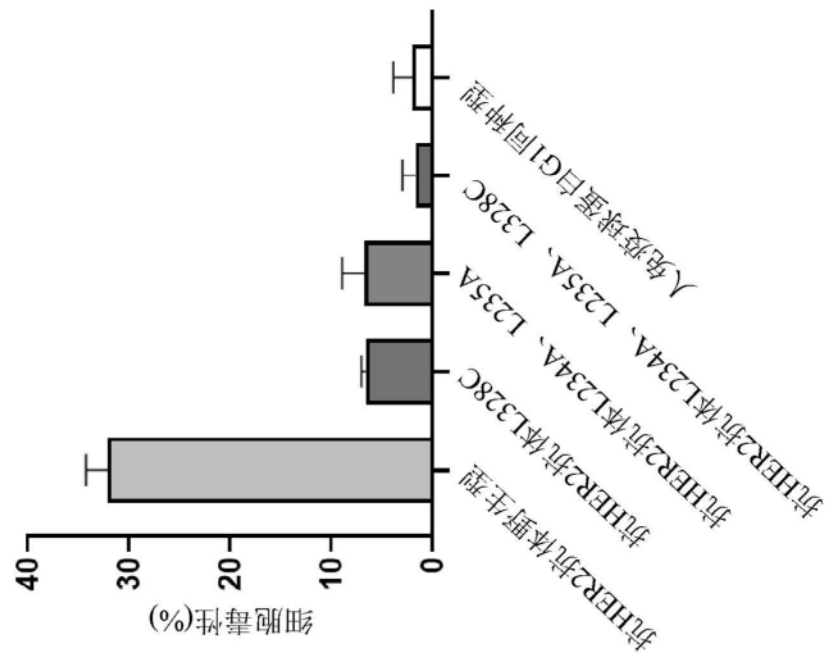


图31

抗EGFR mAb 1号和Fc变体：对于Fc变体观察到抗体依赖性细胞介导的细胞毒性的降低

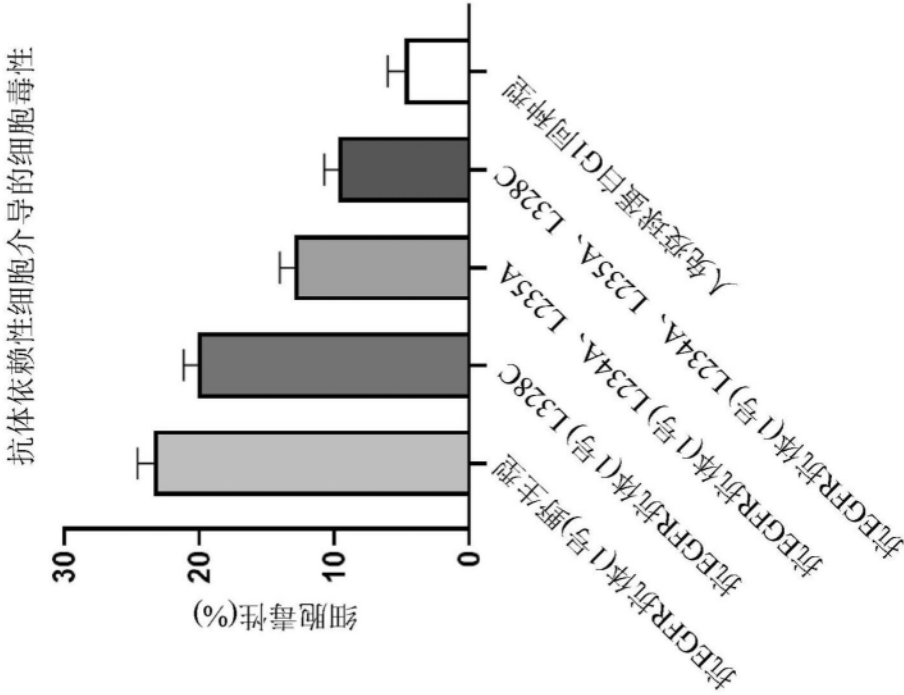


图32

抗Trop2 mAb和Fc变体：对于Fc变体观察到抗体依赖性细胞介导的细胞毒性的降低

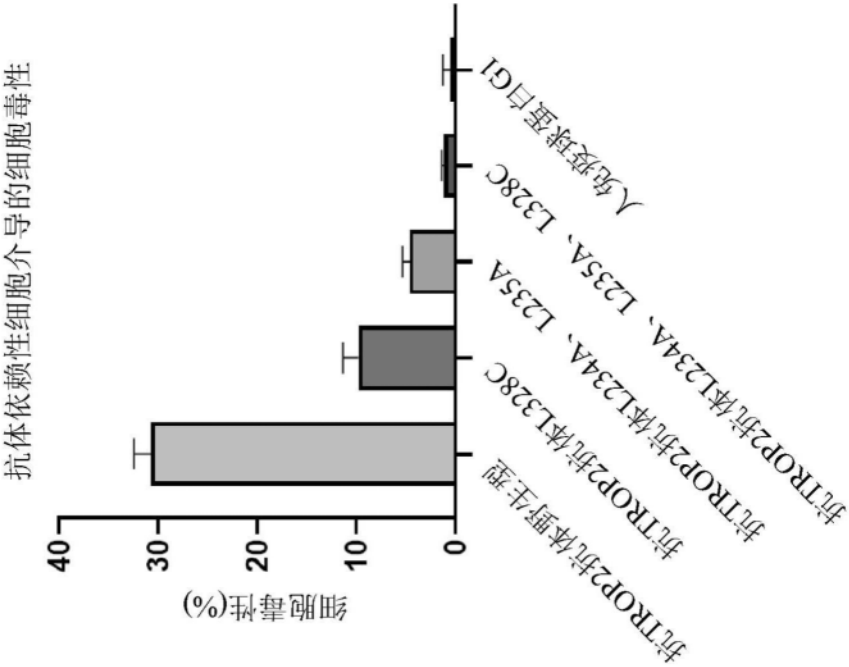


图33

抗CDH3 mAb和Fc变体：对于Fc变体观察到抗体依赖性细胞介导的细胞毒性的降低

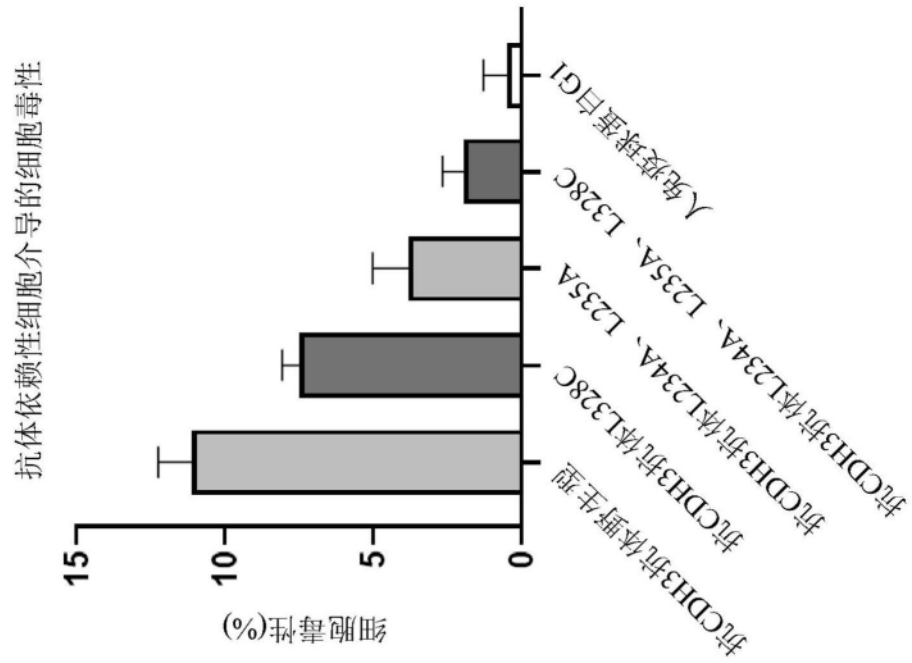


图34

抗HER2 mAb和Fc变体：对于Fc变体观察到补体依赖性细胞毒性的降低

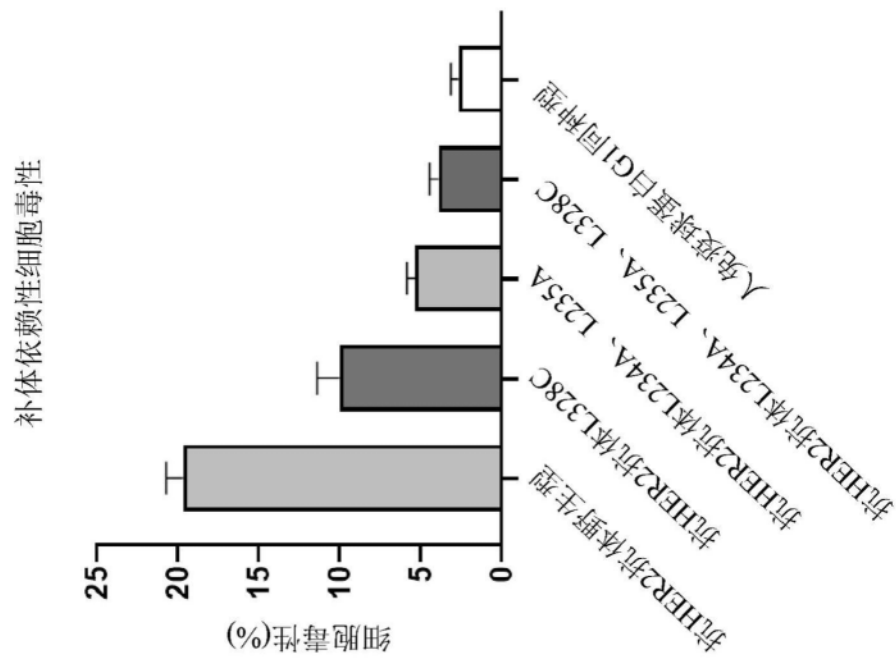


图35

抗EGFR mAb 1号和Fc变体：对于Fc变体观察到补体依赖性细胞毒性的降低

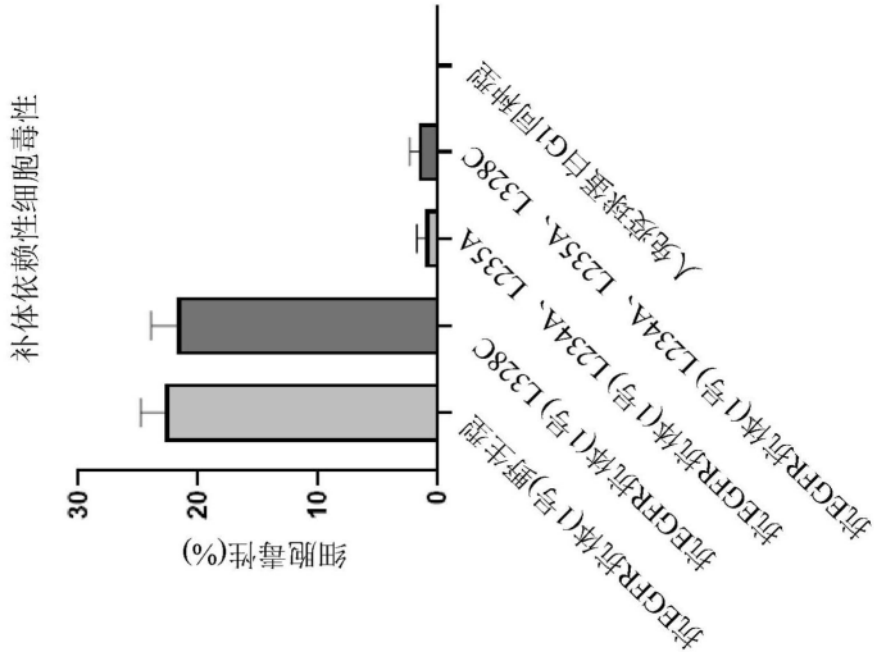


图36

抗Trop2 mAb和Fc变体：对于Fc变体观察到补体依赖性细胞毒性的降低

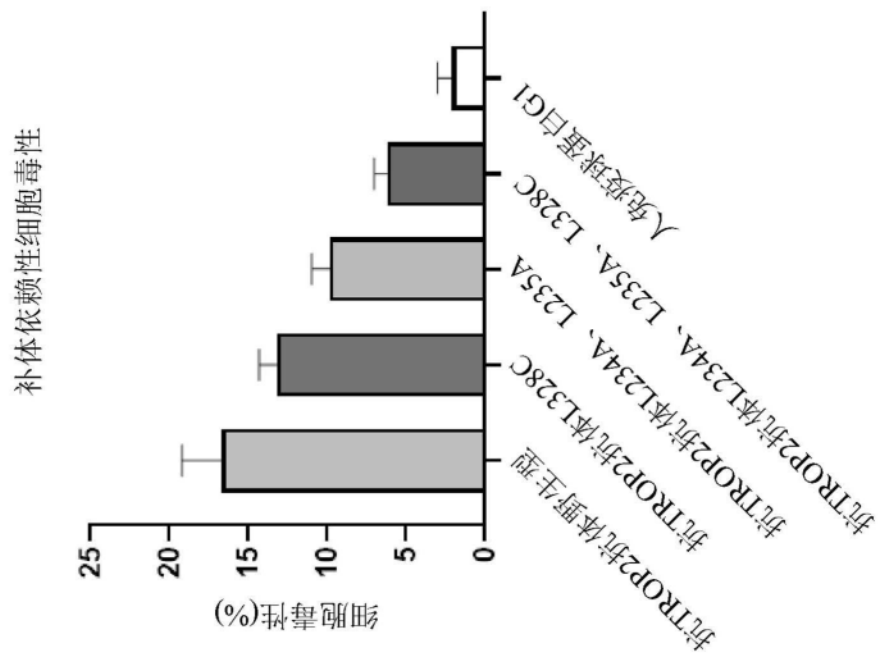


图37

抗CDH3 mAb和Fc变体: 对于Fc变体观察到补体依赖性细胞毒性的降低

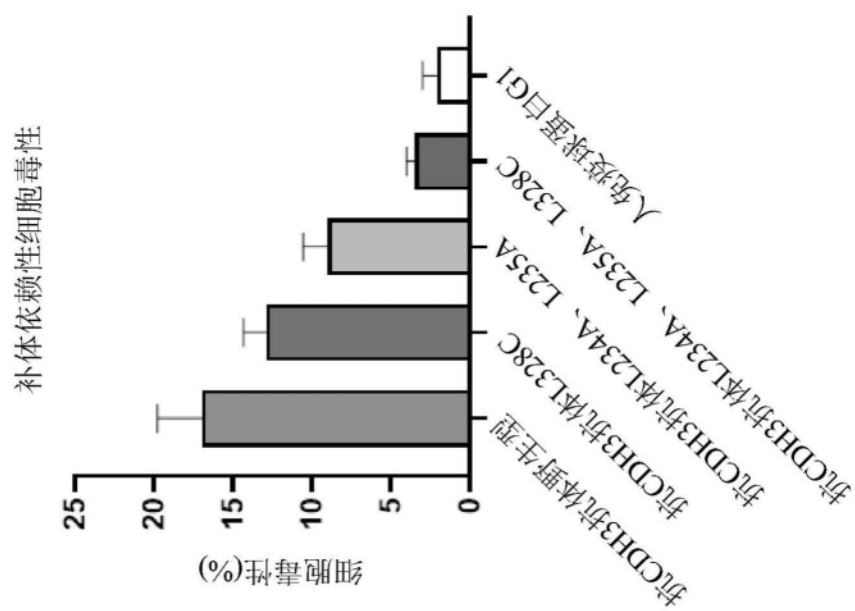


图38

抗Her2 mAb和Fc变体：对于Fc变体观察到C1q结合的减少

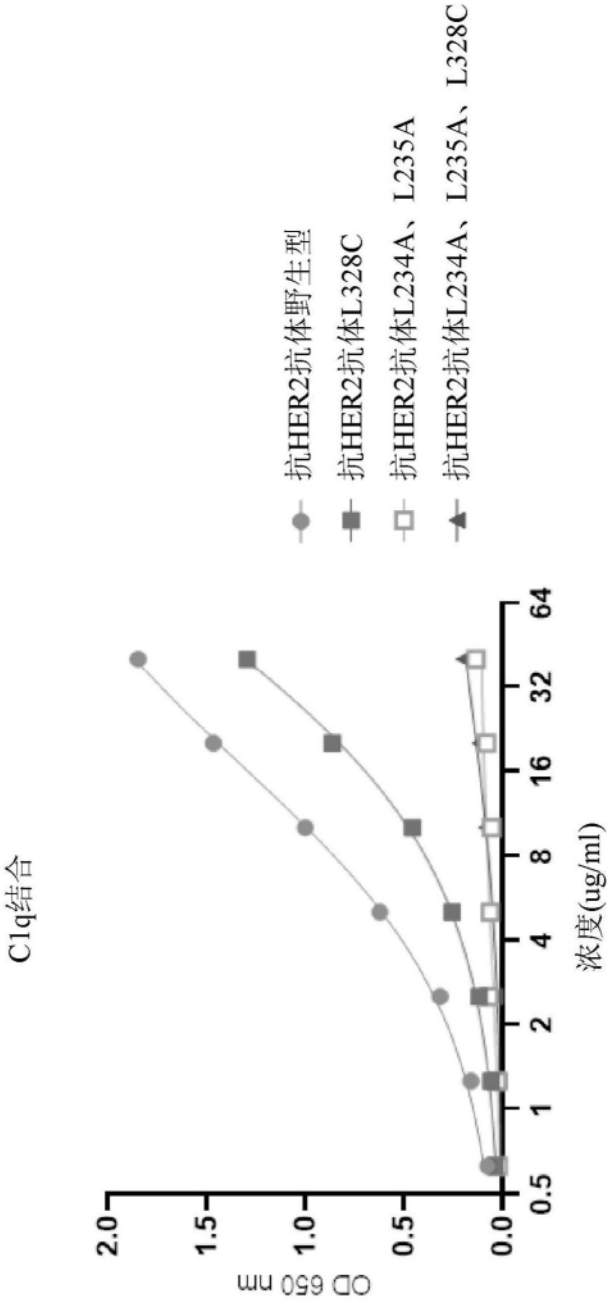


图39

抗EGFR mAb (1号)和Fc变体: 对于Fc变体观察到C1q结合的减少

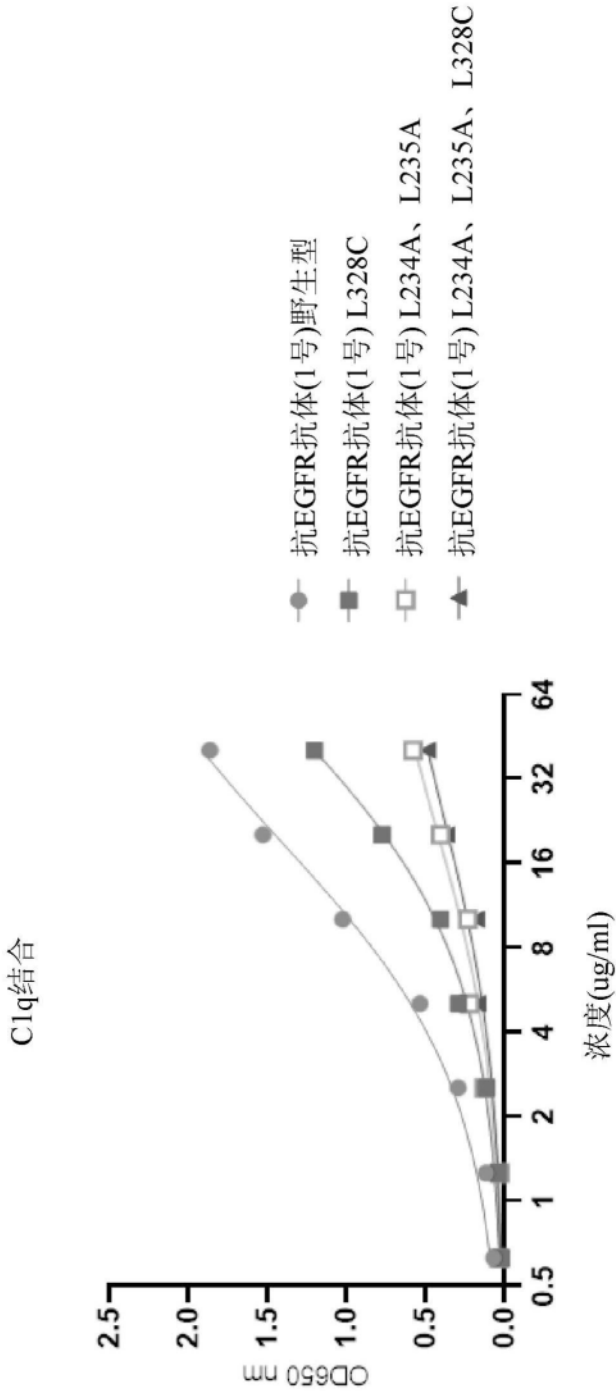


图40

抗Trop2 mAb和Fc变体：对于Fc变体观察到C1q结合的减少

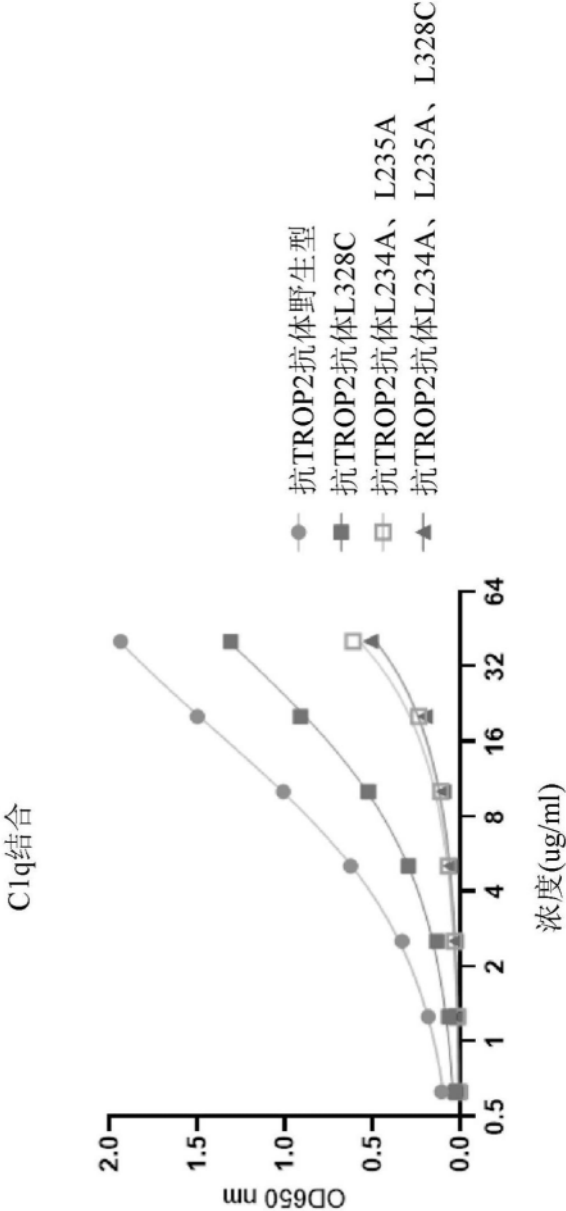


图41

抗CDH3 mAb和Fc变体：对于Fc变体观察到C1q结合的减少

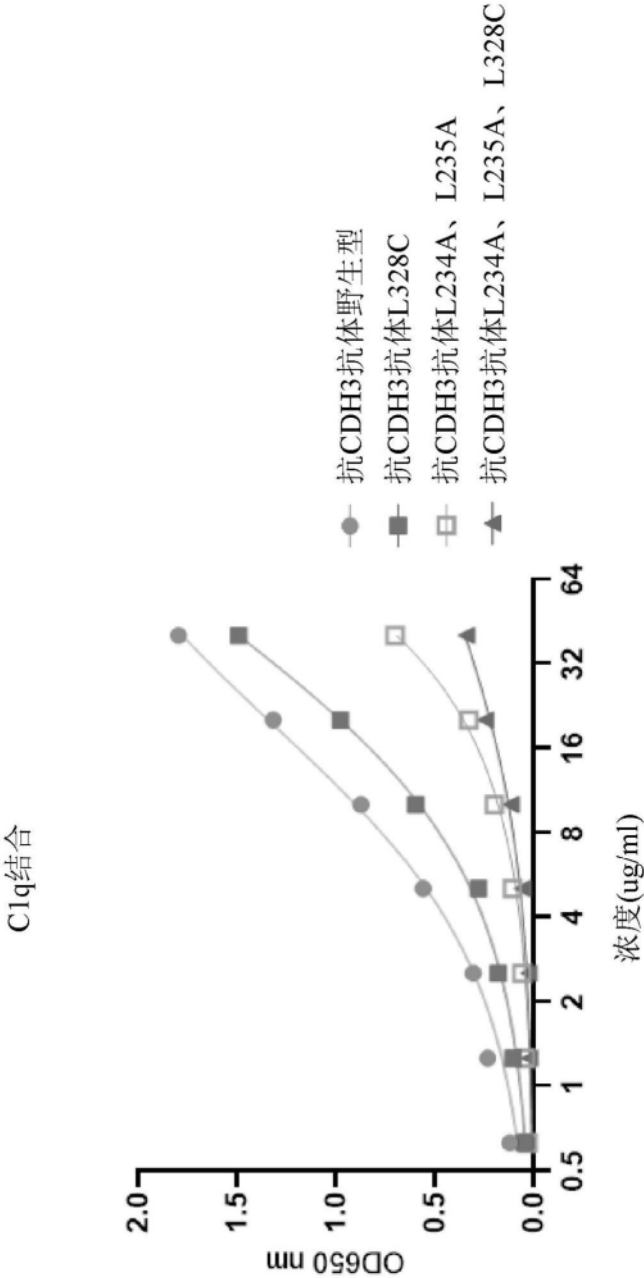


图42

与专有效载荷LOL1缀合的抗Her2 mAb三重突变体的反相色谱图谱。未缀合三重突变体抗HER2 mAb (峰1)、缀合三重突变体抗HER2 mAb (峰2)的叠加UV迹线。

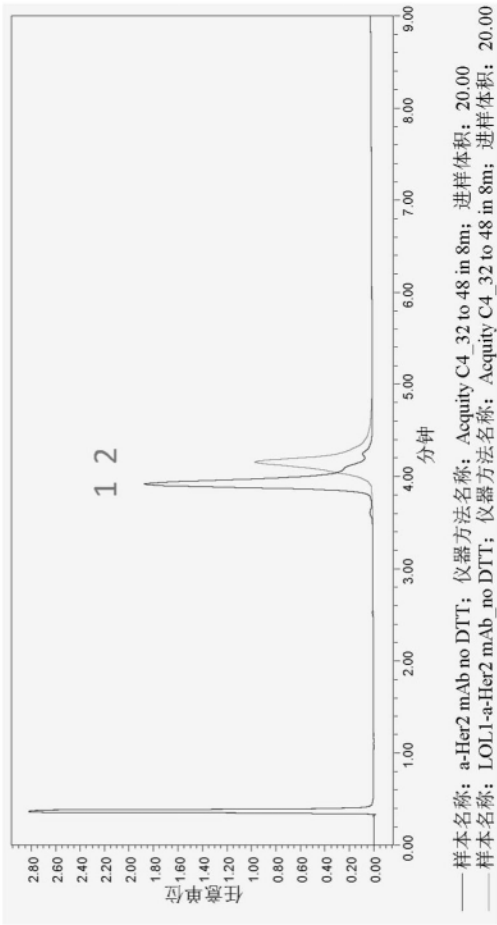


图43

LOL1缀合三重突变体抗HER2 mAb的完整质量分析证实缀合物具有100%位点特异性。
A全谱，**B**放大的轻链区域，**C**放大的重链区域。

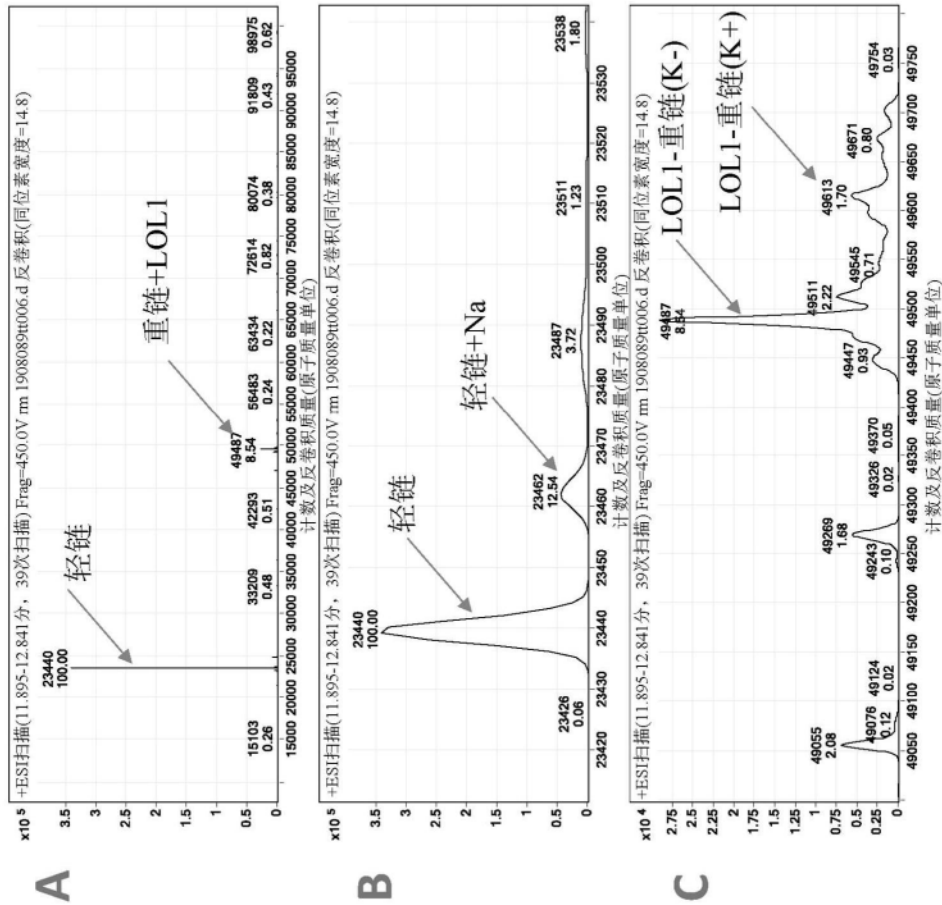
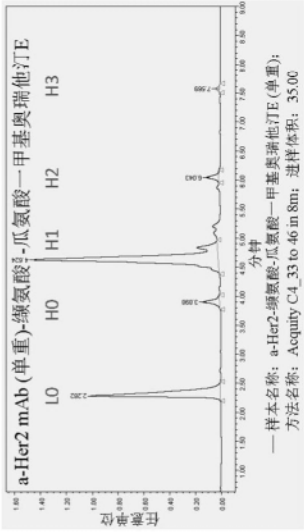


图44

与缬氨酸-瓜氨酸-甲基奥瑞他汀E缀合的抗HER2 mAb (A)和抗EGFR mAb (B)的L328C变体的反相色谱图谱。具有单个有效载荷的重链(H1)是主要物种，从而表明缀合具有位点特异性，并且有效载荷驻留在Cys328上而不在于铰链区内。

A



B

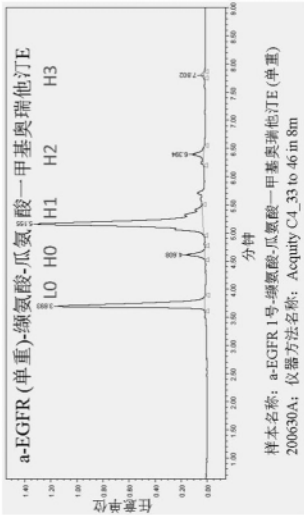


图45

与缬氨酸-瓜氨酸—甲基奥瑞他汀E缀合的抗TROP2 mAb的L328C变体的反相色谱图谱。

(A).轻链(峰1)、未缀加重链(峰2)、具有1个有效载荷的缀加重链(峰3);具有2个和3个有效载荷的缀加重链(峰4-5)。(B).抗TROP2抗体的未缀合L328C变体(黑色)和抗TROP2抗体的缬氨酸-瓜氨酸—甲基奥瑞他汀E缀合L328C变体(红色)的叠加UV214nm迹线。

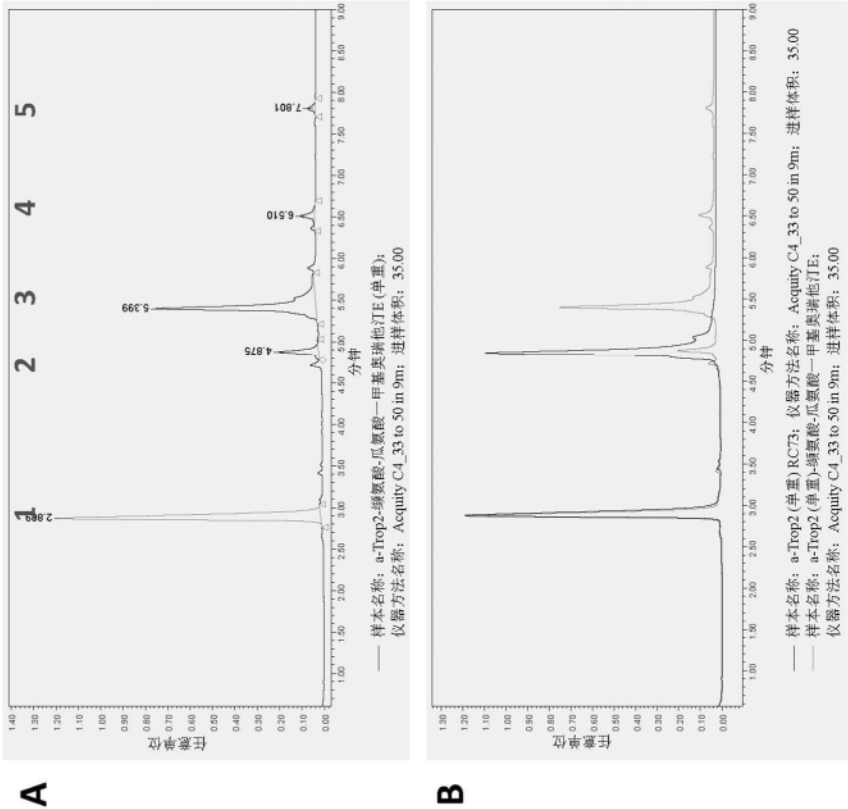


图46

与缬氨酸-瓜氨酸-甲基奥瑞他汀E缀合的三重突变体抗TROP2抗体的反相色谱谱。

(A).轻链(峰1)、未缀合重链(峰2)、具有1个有效载荷的缀合重链(峰3); 分别具有2个和3个有效载荷的缀合重链(峰4-5)。(B).抗TROP2抗体的未缀合L328C变体(黑色)和抗TROP2抗体的缬氨酸-瓜氨酸-甲基奥瑞他汀E缀合L328C变体(红色)的叠加UV214nm迹线。

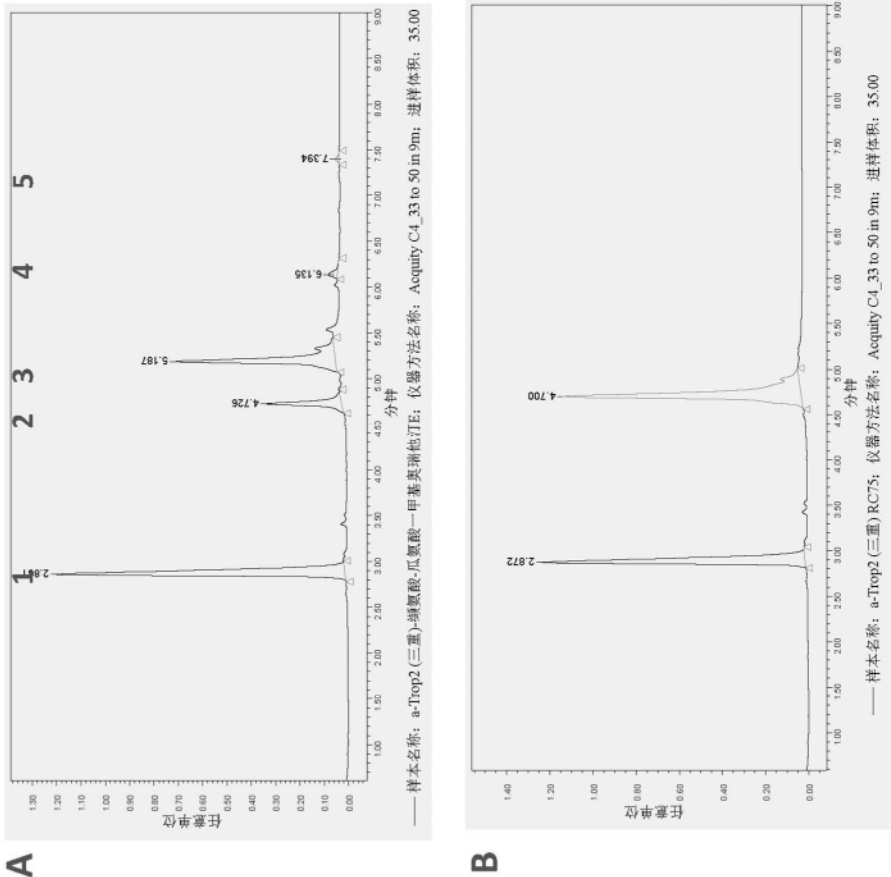


图47

与缬氨酸-瓜氨酸-甲基奥瑞他汀E缀合的抗EGFR mAb的L234A、L235A、L328C变体的反相色谱图谱。(A).具有三重Fc突变的未缀合抗EGFR mAb 3号的图谱。(B).具有三重Fc突变的未缀合抗EGFR mAb 1号的图谱。(C).具有三重Fc突变的缬氨酸-瓜氨酸-甲基奥瑞他汀E缀合抗EGFR mAb 3号的图谱。(D).具有三重Fc突变的缬氨酸-瓜氨酸-甲基奥瑞他汀E缀合抗EGFR mAb 1号的图谱。

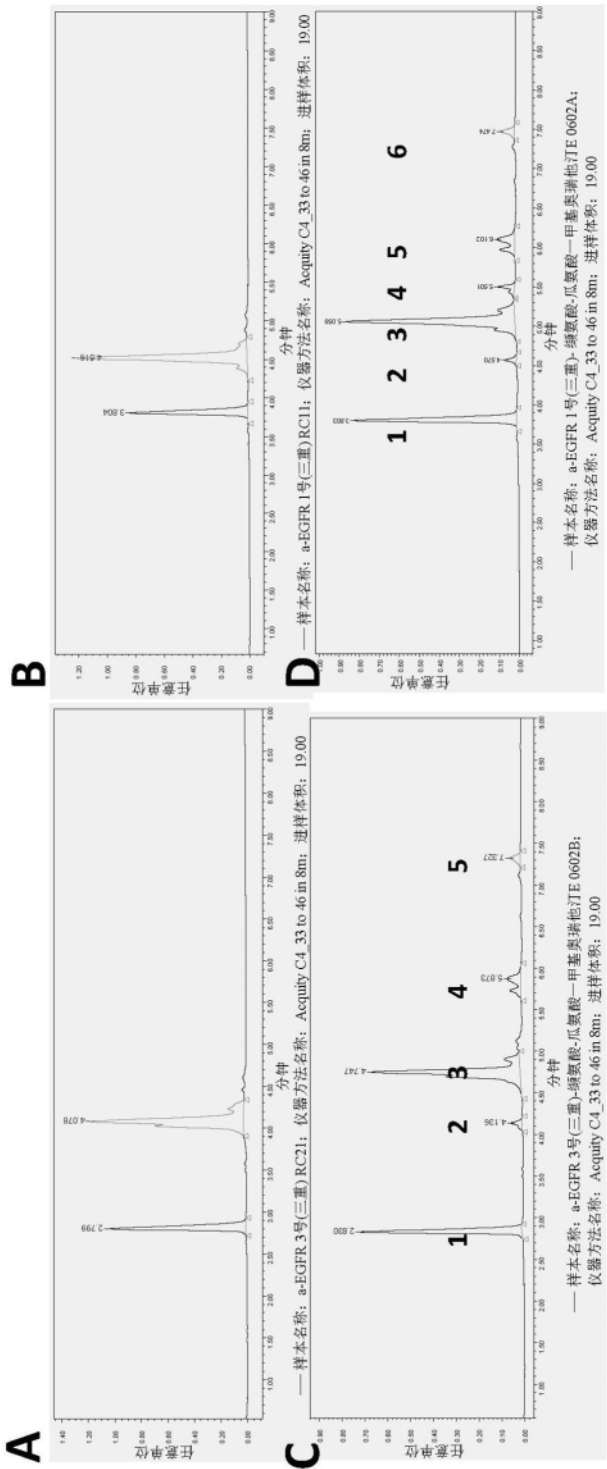


图48

基于反相色谱数据(图48中提供)的峰分配和药物/抗体比计算的一个实例。未缀合mAb (对照)用于标识重链和轻链的保留时间和UV250/280比。这些参数是正确峰分配和药物/抗体比确定所必需的。

抗体药物缀合物	峰数	名称	保留时间	面积%
与缬氨酸-瓜氨酸一甲基奥瑞他汀E缀合的a-EGFR 3号(三重)	1	轻链	2.83	100
	2	重链	4.136	3.7
	3 (位点特异性)	重链+1一甲基奥瑞他汀E	4.747	79.5
	4	重链+2一甲基奥瑞他汀E	5.873	12.3
	5	重链+3一甲基奥瑞他汀E	7.327	4.3
与缬氨酸-瓜氨酸一甲基奥瑞他汀E缀合的a-EGFR 1号(三重)	5	轻链	3.803	91
	1	重链	4.57	2.8
	2 (位点特异性)	重链+1一甲基奥瑞他汀E	5.058	78.7
	6	轻链+1一甲基奥瑞他汀E	5.501	4.5
	3	重链+2一甲基奥瑞他汀E	6.102	12.1
	4	重链+3一甲基奥瑞他汀E	7.474	4.5

图49

所得抗体药物缀合物的分析属性的汇总：示出了缬氨酸-瓜氨酸—甲基奥瑞他汀E或LOL1缀合mAb以及单重或三重Fc变体的平均药物/抗体比、体积排阻色谱法(SEC)的单体百分比和药物/抗体比1重链百分比。

缀合物(单重突变体)		靶标	药物/抗体比	体积排阻色谱法的单体%	药物/抗体比1 %
抗EGFR抗体1号(L328C)-缬氨酸-瓜氨酸—甲基奥瑞他汀E		EGFR	2.0	98.2%	90.0%
		HER2	2.0	98.2%	89.0%
		TROP2	2.0	99.6%	78.7%
缀合物(三重突变体)		靶标	药物/抗体比	单体%	药物/抗体比1 %
抗EGFR抗体1号(L234A、L235A、L328C)-缬氨酸-瓜氨酸—甲基奥瑞他汀E		EGFR	2.0	99.2%	80.0%
			2.3	98.0%	82.0%
LOL1-抗Her2抗体(L234A、L235A、L328C)		HER2	2.0	96.2%	86.0%
抗TROP2抗体(L234A、L235A、L328C)-缬氨酸-瓜氨酸—甲基奥瑞他汀E		TROP2	1.6	99.6%	70.2%

图50

缬氨酸-瓜氨酸-1-甲基奥瑞他汀E-肽片段化后的特征离子

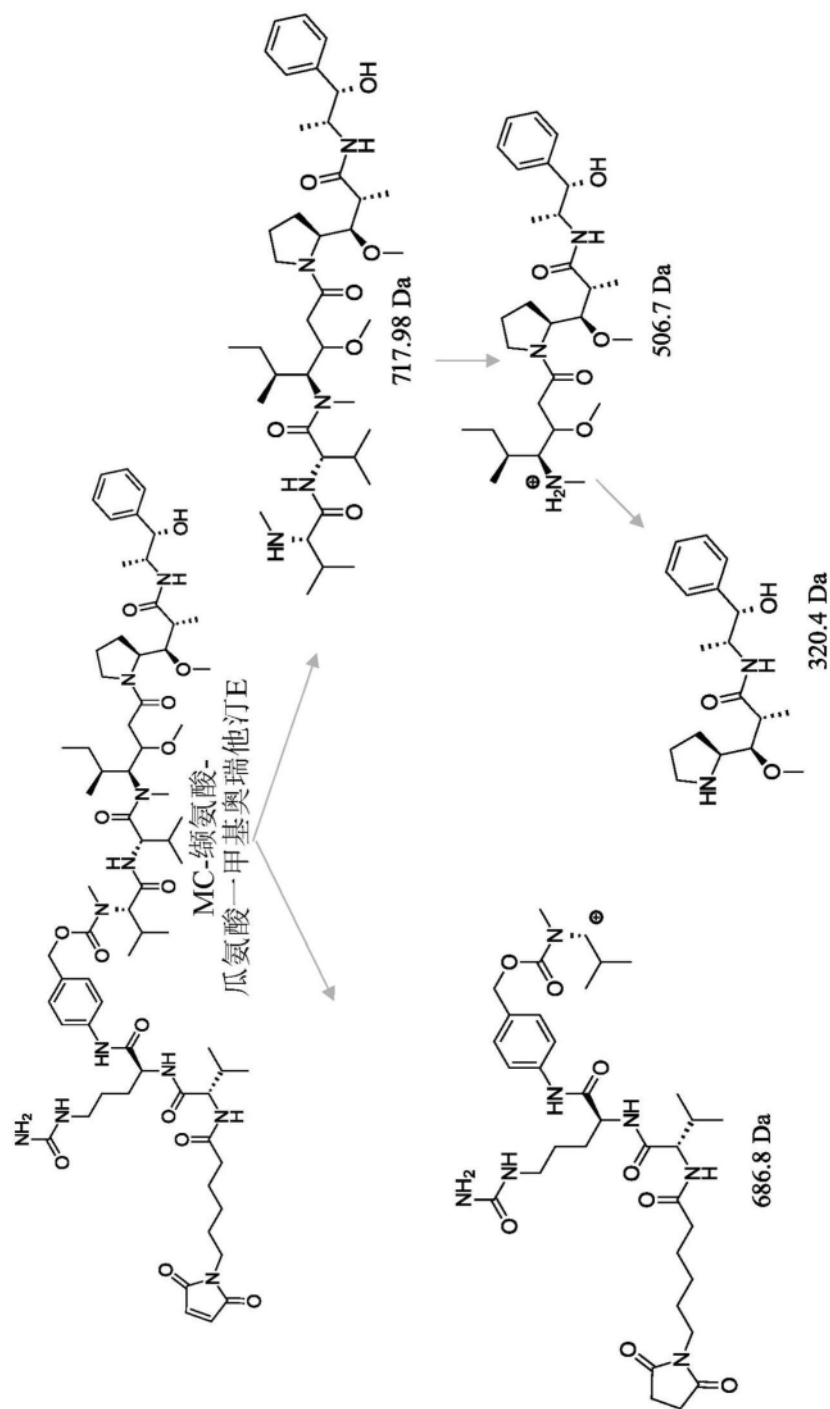


图51

用胰蛋白酶消化后的肽的代表性TIC色谱图。(A)具有三重突变的非缀合抗EGFR抗体1号，
(B)具有三重突变的缬氨酸-瓜氨酸一甲基奥瑞他汀E缀合抗EGFR抗体1号。

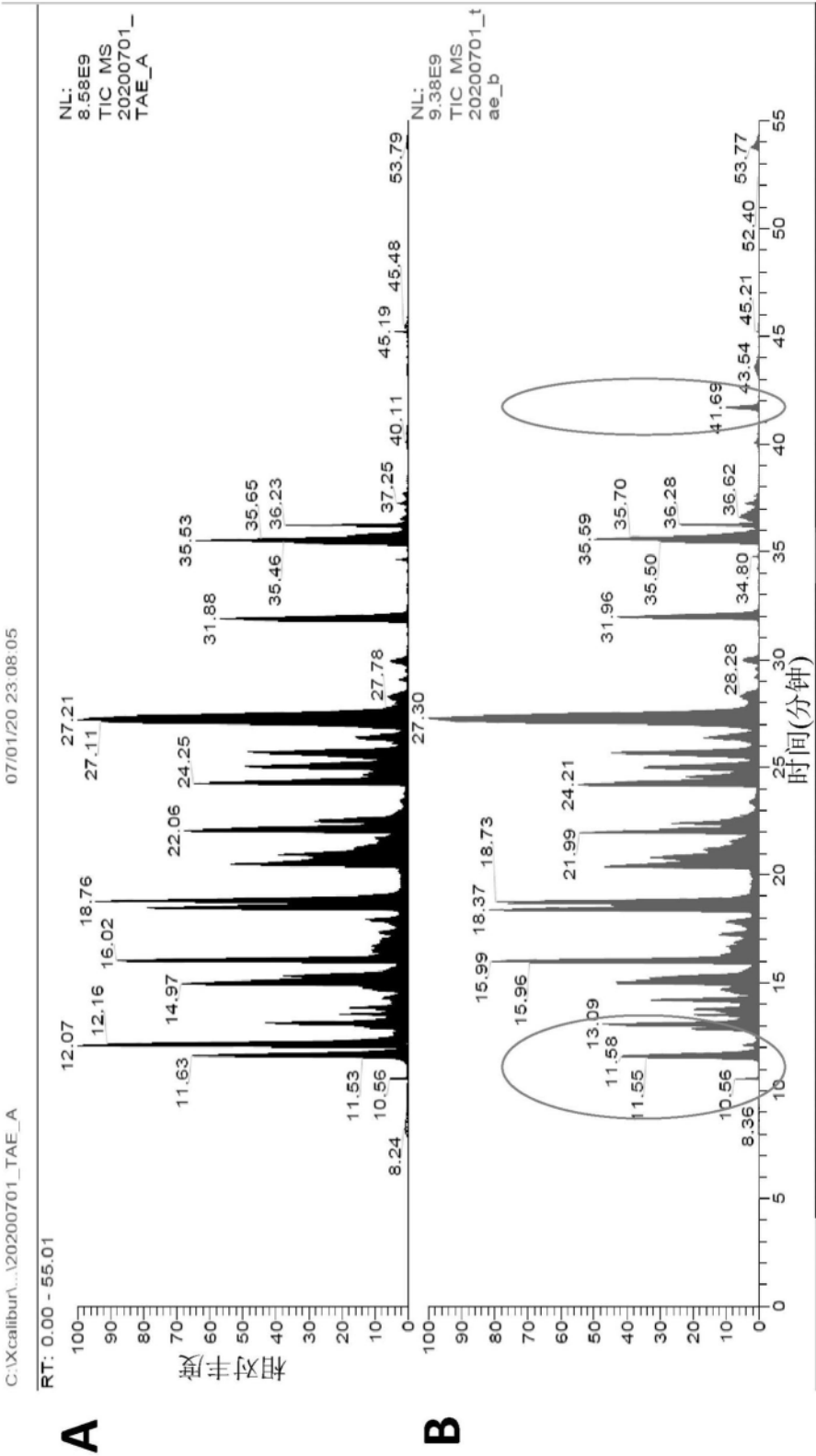


图53

通过ACPAPIEK重链肽的MS/MS证实具有三重突变的抗EGFR抗体1号的缀合位点。示出了ACPAPIEK-脯甲基(例如,烷基化mAb, A、B)和ACPAPIEK-缬氨酸-瓜氨酸或缬氨酸-瓜氨酸-mAb片段化(B、D)。代表肽或完整MS(A、C)和MS/MS片段化(B、D)。肽段分别由实心或空心箭头指示。

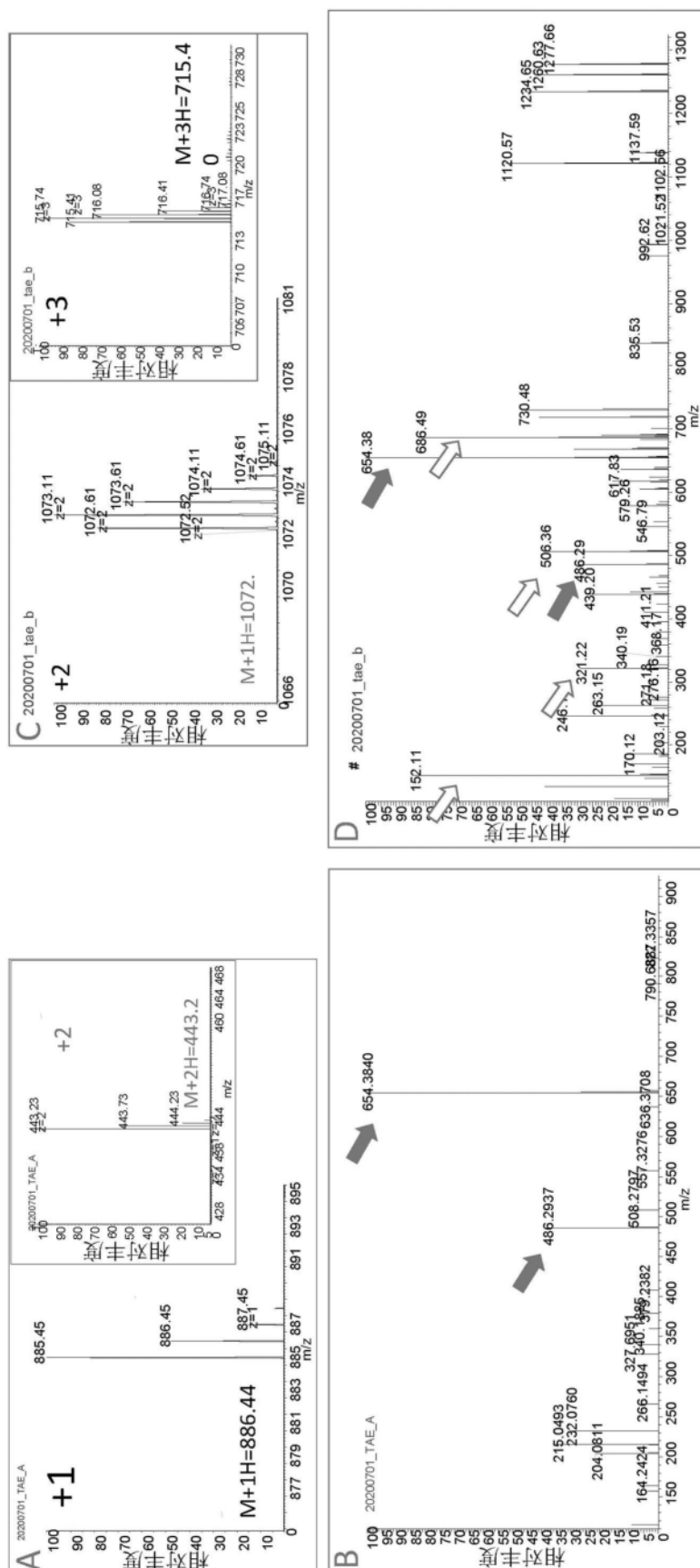
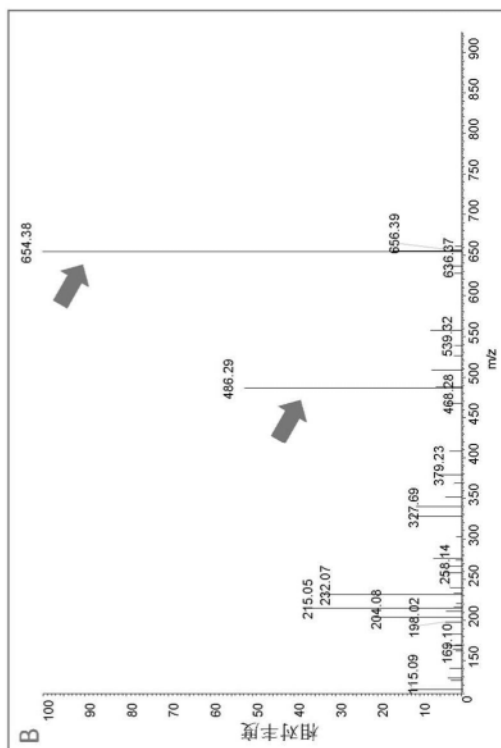
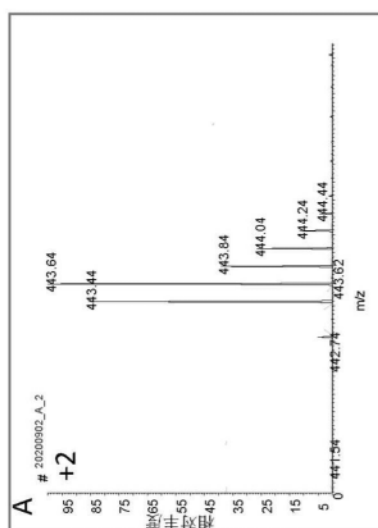


图54

经由ACPAPIEK重链肽的MS/MS对具有单重突变的抗EGFR抗体1号抗体药物缀合物中的缀合位点的证实。示出了ACPAPIEK-脲甲基(例如, 烷基化mAb, A、B)和ACPAPIEK-缬氨酸-瓜氨酸-甲基奥瑞他汀E (C、D)肽的完整MS (A、C)和MS/MS片段化(B、D)。代表肽或缬氨酸-瓜氨酸-甲基奥瑞他汀E的片段分别由实心或空心箭头指示。

ACPAPIEK-脲甲基



ACPAPIEK-缬氨酸-瓜氨酸-甲基奥瑞他汀E

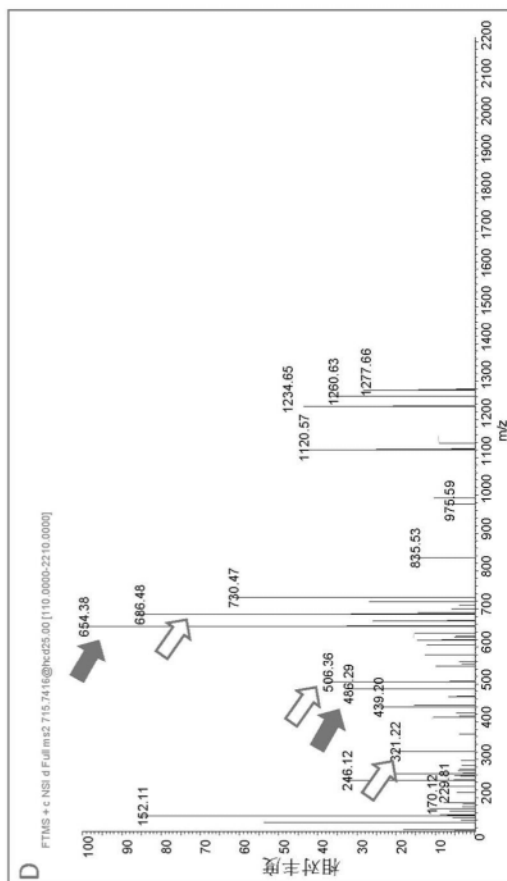
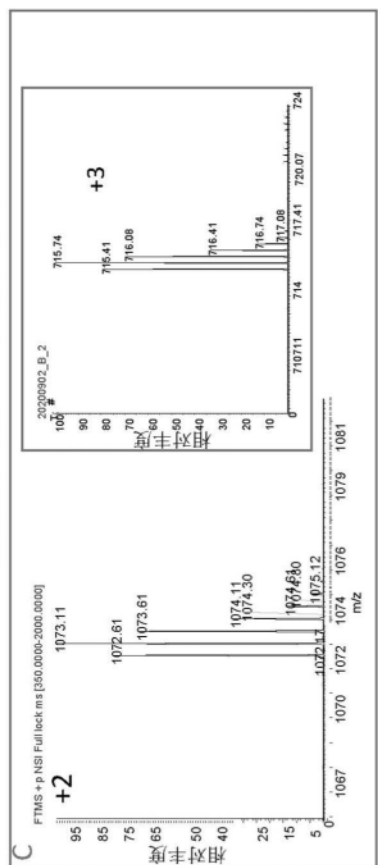


图55

由与缬氨酸-瓜氨酸-甲基奥瑞他汀E缀合的抗HER2抗体的L328C变体介导的细胞毒性。将HCC1954 (Her2/neu阳性)细胞孵育72到96小时，并使用CellTiter-Glo细胞活力测定测量存活细胞的百分比。

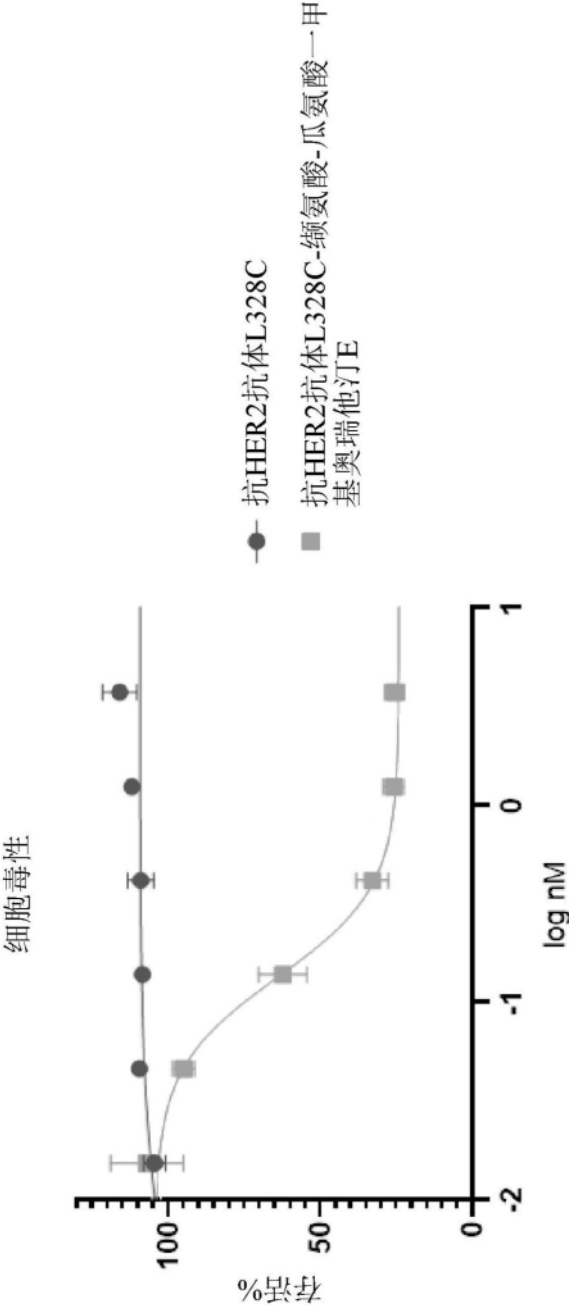


图56

由与缬氨酸-瓜氨酸-甲基奥瑞他汀E缀合的抗EGFR抗体1号的L328C变体介导的细胞毒性。
将MDA-MB-468 (EGFR阳性)细胞孵育72到96小时，并使用CellTiter-Glo细胞活力测定测量存
活细胞的百分比。

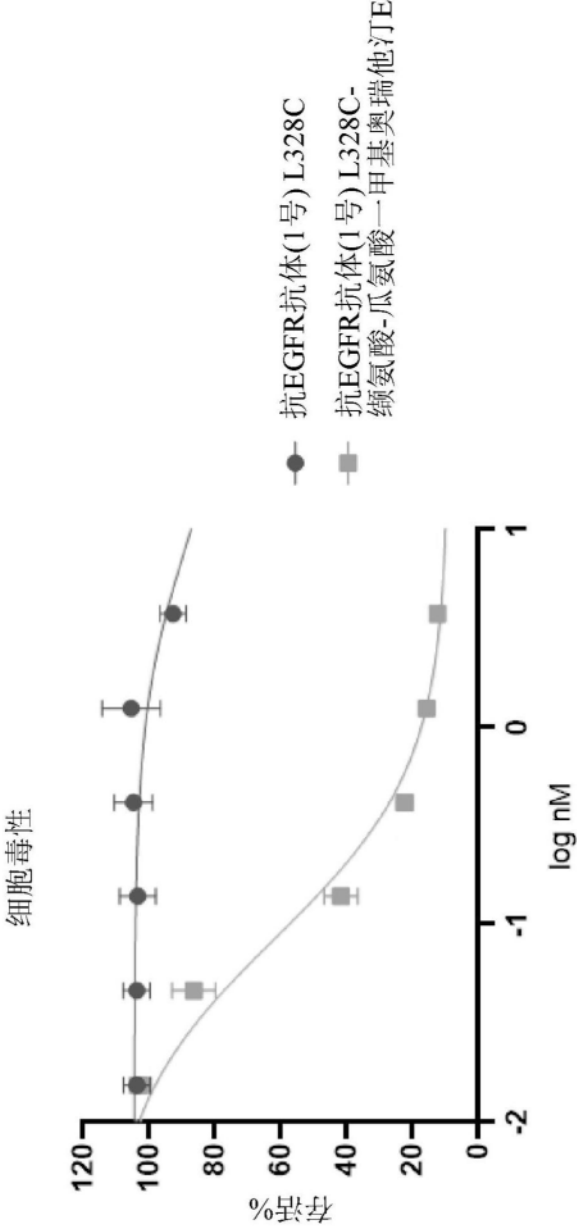


图57

由与缬氨酸-瓜氨酸-甲基奥瑞他汀E缀合的抗EGFR抗体1号的L234A、L235A、L328C变体介导的细胞毒性。将MDA-MB-468 (EGFR阳性)细胞孵育72到96小时，并使用CellTiter-Glo细胞活力测定测量存活细胞的百分比。

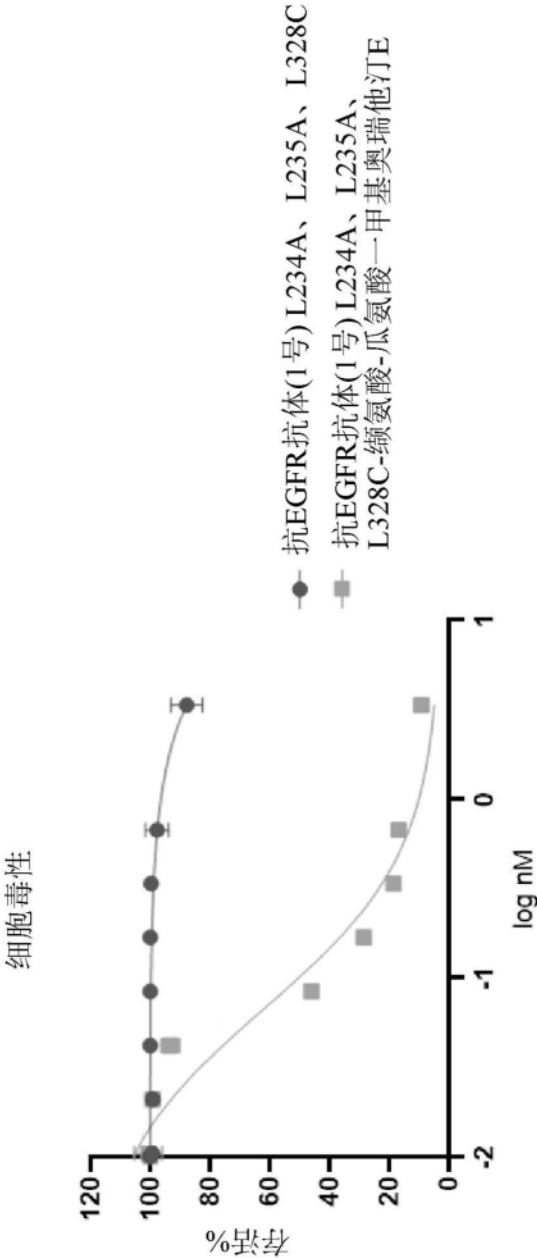


图58

由与缬氨酸-瓜氨酸-甲基奥瑞他汀E缀合的抗EGFR抗体3号的L234A、L235A、L328C变体介导的细胞毒性。将MDA-MB-468 (EGFR阳性)细胞孵育72到96小时，并使用CellTiter-Glo细胞活力测定测量存活细胞的百分比。

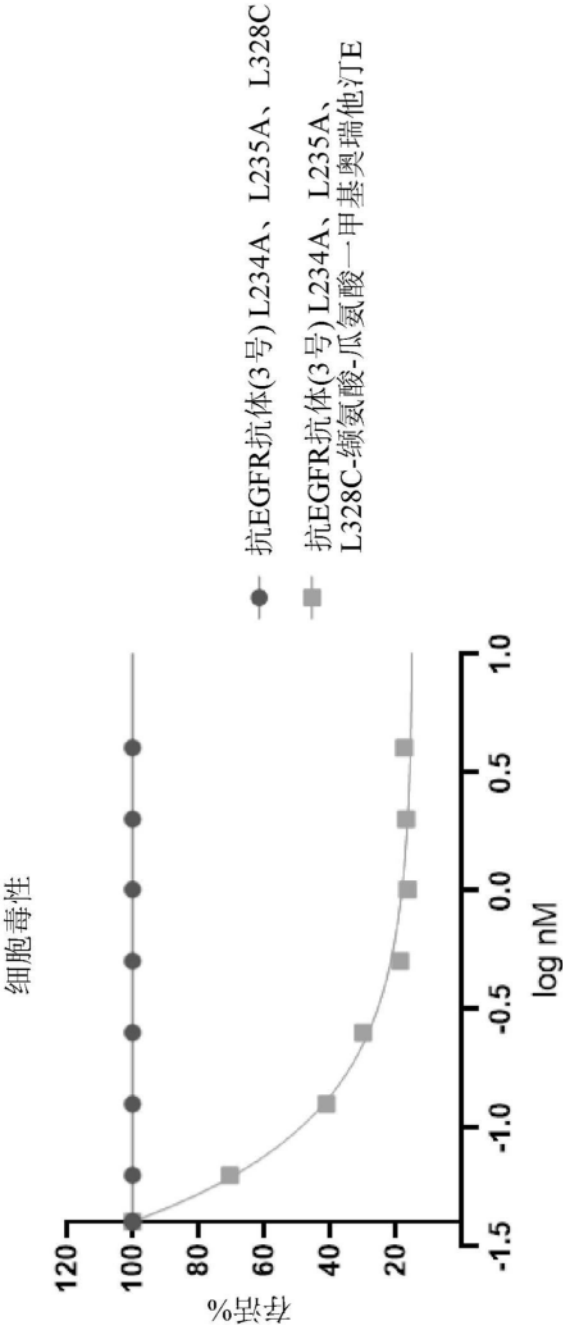


图59

由与缬氨酸-瓜氨酸-甲基奥瑞他汀E缀合的抗TROP2抗体的L328C变体介导的细胞毒性。将SK BR3 (TROP2阳性)细胞孵育72到96小时，并使用CellTiter-Glo细胞活力测定测量存活细胞的百分比。

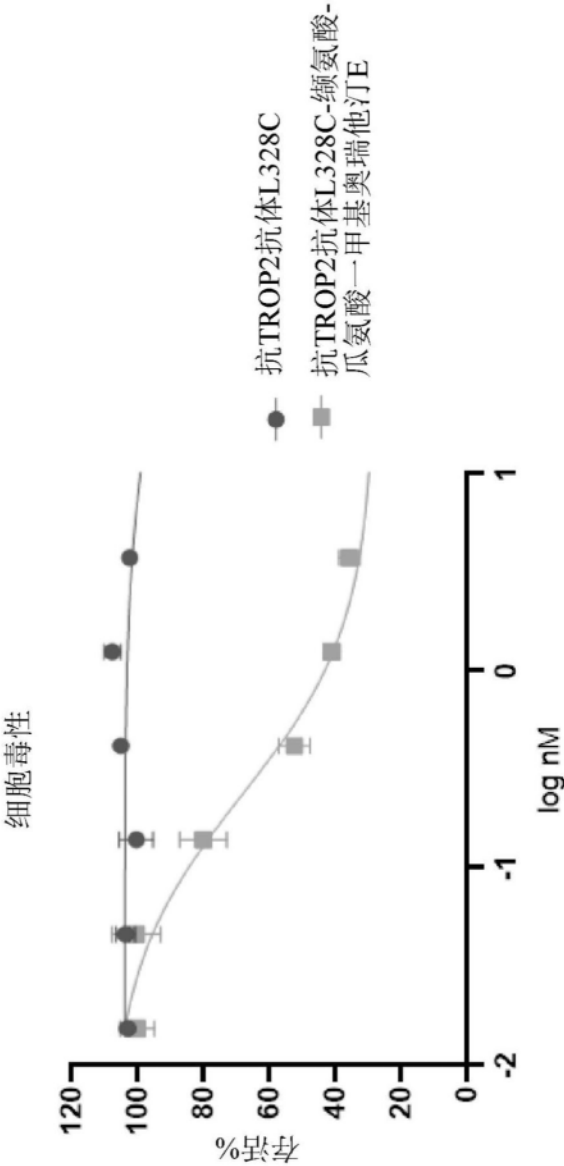


图60

由与缬氨酸-瓜氨酸-甲基奥瑞他汀E缀合的抗Trop2抗体的L234A、L235A、L328C变体介导的细胞毒性。
将SK BR3 (TROP2阳性)细胞孵育72到96小时，并使用CellTiter-Glo细胞活力测定测量存活细胞的百分比。

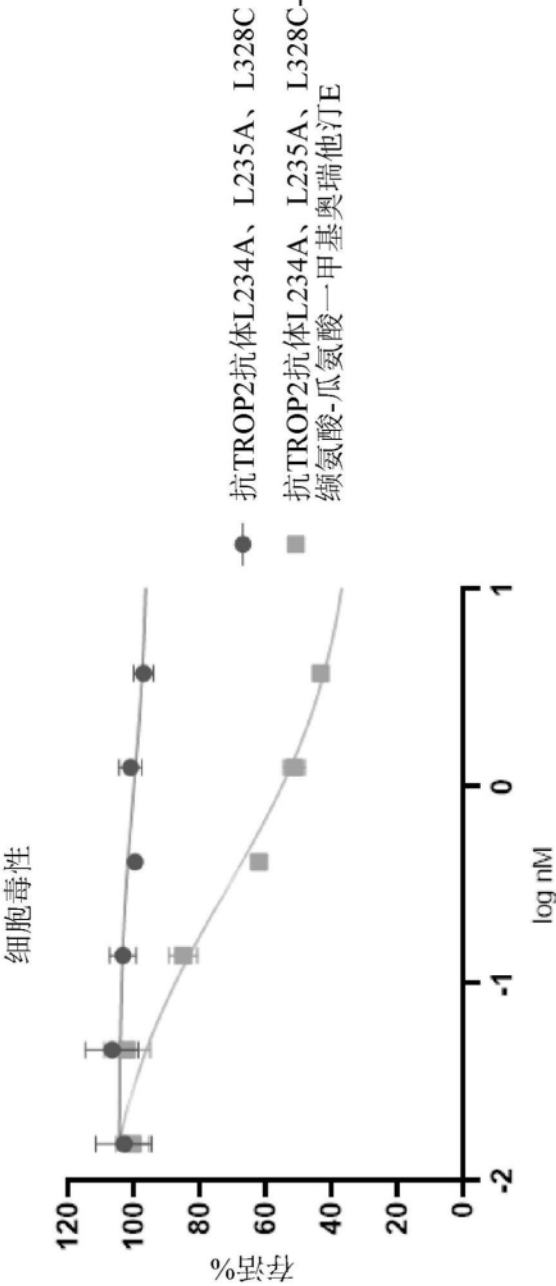


图61