



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118480117 A

(43) 申请公布日 2024.08.13

(21) 申请号 202410359228.3

(22) 申请日 2022.01.17

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2021/072424 2021.01.18 CN

(62) 分案原申请数据

202280010258.2 2022.01.17

(71) 申请人 上海药明合联生物技术有限公司

地址 200131 上海市浦东新区中国(上海)
自由贸易试验区富特北路211号302部
位368室

(72) 发明人 金明志 陈晓悦 李满荣 姜来

阴丽 蔡洁行 王俊

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

专利代理师 余颖

(51) Int. Cl.

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

A61K 47/55 (2017.01)

A61K 38/07 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书22页

序列表(电子公布) 附图8页

(54) 发明名称

工程化抗体和包含工程化抗体的抗体-药物
偶联物

(57) 摘要

本文提供了一种工程化二聚体抗体,其包含
抗体Fab作为第一Fab结构域、包含TCR恒定结构
域的第二Fab结构域、工程化铰链结构域和具有
杵臼突变的Fc结构域。还提供了一种抗体-药物
偶联物及其制备方法,包含所述抗体-药物偶联
物的组合物及其在治疗疾病、紊乱或病症中的用
途,所述抗体-药物偶联物包含通过连接子偶联
一个或多个药物分子的所述工程化抗体。

1. 一种工程化二聚体抗体,其中第一单体包含第一Fab结构域和与之可操作性连接的第一工程化铰链区以及在此之后与该铰链区可操作性连接的第一Fc区,第二单体包含第二Fab结构域和与之可操作性连接的第二铰链区以及在此之后与该铰链区可操作性连接的第二Fc区;

其中,所述第一Fab结构域是抗体Fab结构域,所述第二Fab结构域包含抗体Fv结构域和与之融合的TCR恒定结构域;并且

其中,所述第一工程化铰链区由截短IgG1铰链区部分和截短IgG4铰链区部分构成或者是修饰的IgG4铰链区,所述第一工程化铰链区与所述第二铰链区偶合构成的铰链结构域包含至少两个链间二硫键,所述工程化铰链区包含SEQ ID NO:3所示的序列;并且

其中,所述第一Fc区与所述第二Fc区偶合构成的Fc结构域包含杵臼突变。

2. 如权利要求1所述的工程化抗体,其中,所述第二单体是含有TCR恒定结构域的WuXiBody™抗体半抗体。

3. 如权利要求1所述的工程化抗体,其中,所述抗体Fab结构域是人IgG1型的;且/或所述Fv结构域是人IgG类的。

4. 如权利要求1所述的工程化抗体,其中所述Fc结构域是人IgG1或人IgG4型的。

5. 如权利要求1所述的工程化抗体,其中,所述第一Fc区包含臼突变,所述第二Fc区包含杵突变。

6. 如权利要求1所述的工程化抗体,其包含,

第一重链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:12列,

第一轻链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:15,

第二重链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:14,和

第二轻链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:16;

其中,所述第一重链和第一轻链形成所述第一单体,所述第二重链和第二轻链形成所述第二单体。

7. 一种抗体-药物偶联物,其包含通过连接子偶联一个或多个药物分子的权利要求1所述的工程化抗体。

8. 如权利要求7所述的抗体-药物偶联物,其特征在于以下一项或多项:

其中,所述连接子是-MC-vc-PAB-;

其中,所述药物是MMAE;

其中,所述偶联物的药物/抗体比为2或6;

其中,所述偶联物具有两个药物分子,都连接在所述工程化抗体的所述抗体Fab结构域,所述TCR恒定结构域基本上没有药物分子与之相连;且/或

其中,所述偶联物具有六个药物分子,都连接在所述工程化抗体的所述抗体Fab结构域和所述铰链结构域处,所述TCR恒定结构域基本上没有药物分子与之相连。

9. 一种组合物,其包含权利要求7所述抗体-药物偶联物的混合物或由所述抗体-药物偶联物的混合物组成,其中,至少65%的所述抗体-药物偶联物的药物/抗体比为2;或其中,至少80%的所述抗体-药物偶联物的药物/抗体比为6。

10. 一种药物组合物,其包含权利要求7所述的抗体-药物偶联物和药学上可接受的载体。

11. 一种制备权利要求7所述的抗体-药物偶联物的方法,其包括部分还原的权利要求1所述抗体与带有马来酰亚胺或卤代乙酰基部分的连接子-药物载荷化合物通过迈克尔加成反应偶联。

12. 如权利要求11所述的方法,进一步包括用温和还原剂对权利要求1所述的工程化抗体进行部分还原以提供所述部分还原的抗体。

13. 如权利要求12所述的方法,具有一项或多项以下特征:

所述温和还原剂是TCEP或DTT;

所述还原剂/抗体比为1-20;

所述部分还原步骤在pH4.0至8.0进行;

所述部分还原步骤进行0.5至24小时;且/或

所述部分还原步骤在4至37°C的温度下进行。

14. 如权利要求13所述的方法,具有以下一项或多项特征:

所述还原剂/抗体比为2-15;且/或

所述部分还原步骤进行1至24小时。

15. 如权利要求13所述的方法,具有以下一项或多项特征:

所述还原剂/抗体比为3-20;

所述部分还原步骤在pH6至8进行;且/或

所述部分还原步骤进行3至24小时。

16. 一种用权利要求13所述方法获得的抗体-药物偶联物产品,其包含权利要求7所述抗体-药物偶联物的混合物或由所述抗体-药物偶联物的混合物组成,其中,至少65%的抗体-药物偶联物的药物/抗体比为2;或者,所述抗体-药物偶联物产品包含权利要求7所述抗体-药物偶联物的混合物或由所述抗体-药物偶联物的混合物组成,其中,至少80%的抗体-药物偶联物的药物/抗体比为6。

17. 权利要求7所述的抗体-药物偶联物用于制造治疗癌症例如乳腺癌的药物的应用。

工程化抗体和包含工程化抗体的抗体-药物偶联物

技术领域

[0001] 本发明主要涉及生物制药领域,尤其工程化抗体和抗体-药物偶联物。

背景技术

[0002] 抗体是多功能的免疫球蛋白,具有对靶抗原独特的结合特异性以及一系列非抗原依赖性免疫相互作用,由此在免疫系统中发挥着重要作用。当前使用的许多治疗用生物药、诊断试剂和研究试剂是针对感兴趣的病理、免疫机制或生物学机制相关抗原的抗体。

[0003] 近年来,人们为开发带有药物载荷的抗体偶联物做出了大量的努力。就抗体药物偶联物(ADC)而言,ADC包含用于靶向的抗体,用于药物附接的连接子和作为效应物的强效的药物载荷。抗体或其相关形式通过抗体-抗原相互作用将细胞毒性药物带向表达抗原的细胞或其他靶细胞。同时,药物与抗体偶联后毒性显著下降。因此,ADC通过降低最小有效剂量(MED)和提高最大耐受剂量(MTD)扩大了治疗窗口。FDA批准的ADC药物有例如Mylotarg、Adcetris、Kadcyla、Besponsa、Polivy、Padcev、Enhertu、Trodelvy和Blenrep。

[0004] ADC研发成功依赖于抗体的选择、连接子-药物载荷的选择、连接子-药物载荷的偶联方式以及偶联过程的研究。抗体中的半胱氨酸巯基作为强亲核试剂是理想的偶联反应基团。抗体的天然形式中,半胱氨酸残基以二硫键形式存在,因此,抗体轻链与重链之间的二硫键还原为偶联提供了理想的游离半胱氨酸巯基。为了应对优选药物载荷-抗体比(PAR)和偶联位置的相关机遇与挑战,本领域开发了多种偶联方法。理想情况下,应将适量的药物载荷连接到抗体,由此得到的是异质性的ADC产品。低PAR的偶联产品疗效不足,高PAR的产品则毒性高且不稳定。所以,ADC的异质性阻碍了治疗窗口的扩大。因此,进行了诸如抗体工程之类的努力来提高ADC产品的均质性。

[0005] 一种方法采用对抗体进行点突变来引入具有高反应性残基的氨基酸供偶联之用。Thiomab™技术由基因泰克(Genentech)公司开发,通过诱导抗体上的半胱氨酸突变(Jagath R Junutula,等,细胞毒性药物与抗体位点特异性偶联改进治疗指数(Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index),Nature Biotechnology,2008,26(8):925-932)。与Thiomab的偶联发生在还原后的经改造的半胱氨酸残基上,产生了高均质性的偶联产物。非天然氨基酸(NNAA)技术也用于生产均质性的偶联物。例如,用非天然氨基酸在抗体中引入酮基或叠氮基作为偶联位点(Jun Y. Axup,等,使用非天然氨基酸合成位点特异性抗体-药物偶联物(Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids),PNAS,2012,109(40):16101-16106;Michael P. VanBrunt,等,在哺乳动物细胞中遗传编码含有氨基酸的叠氮化物,使用点击环加成化学能够实现位点特异性抗体-药物偶联物(Genetically Encoded Azide Containing Amino Acid in Mammalian Cells Enables Site-Specific Antibody-Drug Conjugates Using Click Cycloaddition Chemistry),Bioconjugate Chem.,2015,26(11):2249-2260),由于特异性反应,也得到了高度均质的产物。

[0006] 基于点突变的方法存在一些缺点。首先,需要仔细选择突变位点,否则抗体的稳定性和结合效率都会受到影响。其次,点突变抗体的表达水平通常很低,这在化学成分生产和控制(CMC)阶段会成为问题。

[0007] 另一种方法是引入可被酶识别的短多肽标签作为偶联位点。谷氨酰胺标签(LLQG)作为mTG识别基序(Pavel Strop等,“位点的重要性:结合位点调节抗体药物偶联物的稳定性和药代动力学(Location Matters:Site of Conjugation Modulates Stability and Pharmacokinetics of Antibody Drug Conjugates)”,*Chemistry&Biology*,2013,20(2):161-167),LPETG作为分选酶A识别基序(Roger R.Beerli等,“分选酶介导形成体外体内高效力的位点特异性抗体药物偶联物(Sortase Enzyme-Mediated Generation of Site-Specifically Conjugated Antibody Drug Conjugates with High In Vitro and In Vivo Potency)”,*PLoS ONE*,2015,10(7):e0131177)、以及LCxPxR作为甲酰基甘氨酸生成酶(FGE)识别基序(Peng Wu等,“用遗传编码醛标签在哺乳动物细胞中产生的定点化学修饰的重组蛋白(Site-specific chemical modification of recombinant proteins produced in mammalian cells by using the genetically encoded aldehyde tag)”,*PNAS*,2009,106(9):3000-3005)用于偶联获得了高度均质的产物,其中,药物连接于多肽标签。

[0008] 短多肽标签的缺点与基于点突变的方法相似。需要筛选多肽标签的插入位点,而多肽标签的可用位点是有限的。并且,使用该策略时带标签抗体的表达滴度也是个难点。

[0009] 生产抗体偶联物最直接的方法是利用抗体重链多肽和轻链多肽中天然半胱氨酸的巯基。巯基作为一种强亲核试剂,可在水相中实现快速高效的偶联反应。在FDA批准的ADC药物例如Adcetris和Polivy中,通过半胱氨酸残基上的巯基与用于单甲基澳瑞他汀E(MMAE)的连接子中的马来酰亚胺基团反应从而将MMAE偶联在部分还原链间二硫键产生的半胱氨酸残基上。在此优选部分还原而非完全还原是因为药物的疏水性和所有半胱氨酸残基有连接时的位阻导致ADC药物在血浆中不稳定。然而,部分还原后制得的产品均质性很差,对CMC造成了困难,特别是偶联过程的控制和QC达标分析。另一方面,ADC混合物中具有不同DAR的物质在体内显示出不同的稳定性和疗效,这意味着在异质ADC产品中并非所有物质都符合预期结构型式。

[0010] IgG亚类IgG1、IgG2、IgG3和IgG4之间在二硫键结构方面有许多相似之处和不同之处。以最常用作治疗用生物药的IgG1和IgG4为例,IgG1和IgG4的两条重链都通过两个二硫键连接并且总共有12个链内二硫键;然而,IgG1的轻链通过其最后一个残基与重链第五个半胱氨酸残基之间的二硫键与重链相连,而IgG4的轻链通过其最后一个半胱氨酸残基与重链第三个半胱氨酸残基之间的二硫键与重链相连。通常,链内二硫键和链间二硫键的溶剂暴露水平不同。链内二硫键都埋置在各个结构域的二级结构之间,不向溶剂暴露。位于铰链区的链间二硫键都高度暴露在溶剂中,包括IgG1和IgG4的重链-重链间二硫键和IgG1的重链-轻链间二硫键。IgG4重链-轻链间二硫键位于比较不易触及的VH和CH1结构域界面之间,因此与溶剂的接触度不高。不同二硫键之间的溶剂暴露差异对抗体的生物偶联有重要影响,因为暴露的半胱氨酸残基被认为比不暴露的半胱氨酸残基更有反应性(Hongcheng Liu&Kimberly May,IgG分子的二硫键结构:结构变化、化学修饰以及对稳定性和生物功能的可能影响(Disulfide bond structures of IgG molecules:Structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological

function), *Mabs*, 2012, 4(1):17-23)。有实验表明, IgG1的重链-轻链间二硫键和重链-重链间二硫键均为强反应性。

[0011] 铰链区是抗体Fab与Fc之间的柔性连接器。IgG亚类IgG1、IgG2、IgG3和IgG4之间, 铰链区的长度和柔性差异很大。以最常用作治疗用生物药的IgG1和IgG4为例, IgG1的铰链区含15个氨基酸, 很有柔性, IgG4的铰链区较短, 仅12个氨基酸 (Gestur Vidarsson, 等, IgG亚类和同种异型: 从结构到效应子功能 (IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions), *Front. Immunol.*, 2014, 5:520)。野生型IgG1和IgG4在核心铰链区 (EU编号226-229) 相差一个氨基酸: IgG1中为Cys-Pro-Pro-Cys而IgG4中为Cys-Pro-Ser-Cys。天然IgG4在核心铰链区存在链间半胱氨酸二硫键与链内半胱氨酸二硫键之间的平衡, 因此可以观察到重链臂交换和分泌后有IgG4半抗体分子存在。业已证实, IgG4的S228P突变可防止自然臂交换从而显著稳定IgG4重链之间的共价相互作用 (S. Angal等, “单个氨基酸取代消除了嵌合小鼠/人 (IgG4) 抗体的异质性 (A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody)”, *Molecular Immunology*, 1993, 30(1):105-108; John-Paul Silva等, “新型定量免疫测定法联合生理基质制备证明S228P突变可防止体内和体外IgG4 Fab臂交换 (The S228P Mutation Prevents in Vivo and in Vitro IgG4 Fab-arm Exchange as Demonstrated using a Combination of Novel Quantitative Immunoassays and Physiological Matrix Preparation)”, *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(9):5462-5469), 因此已广泛用于IgG4抗体的开发和生产。S228P突变在IgG4铰链中形成多脯氨酸螺旋 (下铰链区有5个Pro), 配合较短的IgG4铰链长度, 与IgG1铰链 (下铰链区有3个Pro) 相比进一步限制了其柔性。不同铰链之间的柔性差异对抗体的生物偶联具有重要意义, 因为柔性铰链片段中的半胱氨酸残基被认为比刚性铰链中的半胱氨酸残基更具反应性。有实验表明, S228P IgG4的重链-轻链间二硫键和重链-重链间二硫键均为弱反应性。

[0012] 利用天然半胱氨酸进行抗体偶联的缺点是IgG1和IgG4中四个链间二硫键之间的反应性相似导致偶联产物高度异质。而如前所述, 这种异质性缩小了临床使用的偶联药物的治疗窗口。例如, 通过部分还原IgG1抗体中的天然链间二硫键而产生的ADC会产生具有正态分布的产物混合物。部分还原IgG4抗体的产品异质性甚至更高, 完全还原的抗体水平已经很高时却仍有很多抗体没有被还原。

[0013] WuXiBody™ (以下亦称“WuXiBody”) 是药明生物 (WuXi Biologics) 研发的创新双特异性抗体 (双抗 (bsAb) 平台。其主要特点是用T细胞受体 (TCR) 恒定结构域替换抗体Fab结构域中的CH1/CL恒定结构域, 如PCT申请PCT/CN2018/106766 (国际公开W02019/057122) 所述。WuXiBody™设计可确保同源HC-LC配对。基于WuXiBody的BsAb可采用不对称形式或可采用对称形式。通过“杵臼” (“KIH”) 技术, 可以确保异二聚体化。

[0014] 尽管如此, 仍然需要改善抗体生物偶联的PAR, 特别是对于治疗应用而言, 从而尽可能消除部分或全部上述不足。

发明内容

[0015] 本公开提供了工程化抗体, 其包含具有如WuXiBody™中的TCR恒定结构域的Fab结构域、工程化铰链区和具有KIH突变的Fc结构域。令人惊讶的是, 用这种工程化抗体生产的

ADC具有高均质性和受控良好的DAR。这些ADC有利地具有高稳定性和极佳治疗效果的特点。

[0016] 在第一方面,本文提供了一种工程化二聚体抗体,其中第一单体包含第一Fab结构域和与之可操作性连接的第一工程化铰链区以及在此之后与该铰链区可操作性连接的第一Fc区,第二单体包含第二Fab结构域和与之可操作性连接的第二铰链区以及在此之后与该铰链区可操作性连接的第二Fc区;

[0017] 其中,所述第一Fab结构域是抗体Fab结构域,所述第二Fab结构域包含融

[0018] 合至TCR恒定结构域的抗体Fv结构域;以及

[0019] 其中,所述第一工程化铰链区由截短IgG1铰链区部分和截短IgG4铰链区部分构成或是修饰的IgG4铰链区,从而,所述第一工程化铰链区与所述第二铰链区偶联,由其构成的所述铰链结构域包含至少两个链间二硫键;且

[0020] 其中,所述第一Fc区与所述第二Fc区偶联,由其构成的所述Fc结构域包含杵臼突变。

[0021] 另一方面,本文提供一种核酸分子或核酸分子组合,所述核酸分子或核酸分子组合编码本发明的工程化抗体。

[0022] 在另一方面,本文提供了包含本发明工程化抗体的抗体-药物偶联物,本发明的工程化抗体通过连接子偶联一个或多个药物分子。

[0023] 在另一方面,本文提供了一种包含本发明抗体-药物偶联物的混合物或由本发明抗体-药物偶联物的混合物组成的组合物,其中至少约65%、优选至少约70%、至少约75%、至少约80%或至少约90%的抗体-药物偶联物的药物/抗体比为2(DAR2)。

[0024] 另一方面,本文还提供了一种包含本发明抗体-药物偶联物的混合物或由本发明抗体-药物偶联物的混合物组成的产品,其中,至少约80%、优选至少约85%、或至少约90%的抗体-药物偶联物的药物/抗体比为6(即DAR6)。

[0025] 另一方面,本文提供了一种药物组合物,包含本发明的抗体-药物偶联物和药学上可接受的载体。

[0026] 另一方面,本文提供了一种制备本发明抗体-药物偶联物的方法,包括部分还原的本发明抗体与带有马来酰亚胺或卤代乙酰基部分的连接子-药物载荷化合物通过迈克尔加成反应偶联。

[0027] 另一方面,本文提供了一种用本发明方法获得的抗体-药物偶联物产品,其包含本发明抗体-药物偶联物的混合物或由本发明抗体-药物偶联物的混合物组成,其中至少约65%、优选至少约70%、至少约75%、至少约80%或至少约90%抗体-药物偶联物的药物/抗体比为2。

[0028] 另一方面,本文提供了一种用本发明方法获得的抗体-药物偶联物产品,其包含本发明抗体-药物偶联物的混合物或由本发明抗体-药物偶联物的混合物组成,其中至少约80%、优选至少约85%、至少约90%的抗体-药物偶联物的药物/抗体比为6。

[0029] 另一方面,本文提供了为有需要的对象治疗疾病、紊乱或病症的方法,包括给予所述对象治疗有效量的本发明抗体药物偶联物。所述疾病可以是癌症。

[0030] 再一方面,本文提供了用于为有需要的对象治疗疾病、紊乱或病症的本发明抗体-药物偶联物。所述疾病可以是癌症。

[0031] 本发明具有多项优势。由于使用天然免疫球蛋白G铰链序列并在其天然结构位置

发生了交换而不引入任何全新氨基酸序列,因此所得的工程化抗体在体内引起的免疫原性会更少。而且,本发明的工程化抗体可以获得与其IgG1或IgG4对应参照相当的蛋白质表达滴度。此外,本发明工程化抗体能够获得高度均质的DAR受控良好的ADC产品。

[0032] 本发明抗体-药物偶联物的生产可显著简化,可以是简单的(一锅式)偶联过程,包括:首先用温和还原剂进行部分还原,然后在同一缓冲系中进行偶联。本发明的ADC产品具有高度均质的受控良好的DAR,例如,DAR2型的百分比超过90%或DAR6型的百分比超过87%。此外,本发明的ADC具有优异的体外和体内稳定性。

[0033] 通过以下详细说明,本发明的其他目的、特征和优点将显而易见。然而,应当理解,详细描述和具体实施例在显示本发明优选实施方式的同时仅是示例性描述,因为本领域技术人员能够从这些详细描述领会本发明的构思和范围内的各种改变和调整。

附图说明

[0034] 所述附图属于说明书的一部分,用以进一步说明本发明的相关内容。以下一幅或多幅附图与具体实施方式的详细描述有助于更好地理解本发明。

[0035] 图1:本发明工程化抗体的示意图,以及用该抗体生产ADC以DAR2或DAR6为主要产物的示意图。

[0036] 图2显示抗体886-39的结构,及其与MC-vc-PAB-MMAE偶联的HIC-HPLC结果。如HIC-HPLC结果所示,DAR2是主要产物。

[0037] 图3显示886-39-MMAE-DAR2的LC-MS表征结果。根据轻链上结合药物分子的测得丰度和重链上结合药物分子的测得丰度,大部分药物分子加载在抗体Fab结构域上,没有药物加载在TCR恒定结构域上。

[0038] 图4显示抗体886-39的结构,及其与MC-vc-PAB-MMAE偶联的HIC-HPLC结果。如HIC-HPLC结果所示,DAR6是主要产物。

[0039] 图5显示886-39-MMAE-DAR6的LC-MS表征结果。如LC-MS结果所示,没有药物加载在TCR恒定结构域。

[0040] 图6显示抗体886-40的结构,及其与MC-vc-PAB-MMAE偶联的HIC-HPLC结果。如HIC-HPLC结果所示,DAR2是主要产物。

[0041] 图7显示886-40-MMAE-DAR2的LC-MS表征结果。根据轻链上结合药物分子的测得丰度和重链上结合药物分子的测得丰度,大部分药物分子加载在抗体Fab结构域上,没有药物加载在TCR恒定结构域上。

[0042] 图8显示抗体886-40的结构,及其与MC-vc-PAB-MMAE偶联的HIC-HPLC结果。如HIC-HPLC结果所示,DAR6是主要产物。

[0043] 图9显示886-40-MMAE-DAR6的LC-MS表征结果。如LC-MS结果所示,没有药物加载在TCR恒定结构域。

[0044] 图10显示抗体886-41的结构,及其与MC-vc-PAB-MMAE偶联的HIC-HPLC结果。如HIC-HPLC结果所示,DAR2是主要产物。

[0045] 图11显示886-41-MMAE-DAR2的LC-MS表征结果。根据轻链上结合药物分子的测得丰度和重链上结合药物分子的测得丰度,大部分药物分子加载在抗体Fab结构域上,没有药物加载在TCR恒定结构域上。

[0046] 图12显示抗体886-41的结构,及其与MC-vc-PAB-MMAE偶联的HIC-HPLC结果。如HIC-HPLC结果所示,DAR6是主要产物。

[0047] 图13显示886-41-MMAE-DAR6的LC-MS表征结果。如LC-MS结果所示,没有药物加载在TCR恒定结构域。

[0048] 图14:示例抗体的轻链序列和重链序列,其中可变区为粗体,KIH突变残基为粗体,工程化铰链区加有下划线。其中,“LC”指包含抗体Fab结构域的单体的轻链(LC),“TCR-LC”指Fab结构域内含TCR恒定结构域的单体的轻链(LC),“TCR-HC-杵”指Fc区含杵突变的重链(HC),“HC-臼”指Fc区含臼突变的重链(HC)。

[0049] 定义

[0050] 本文中,“一个”、“一种”和“该/所述”引导的单数形式包括复数含义,除非另作说明。而且,术语“一个(种)”、“一个(种)或多个(种)”和“至少一个(种)”在本文中可以互换使用。

[0051] 诸如“第一”、“第二”、“第三”、“第四”等序数并不表示要求一定的顺序或相关性,而只是为了方便和清楚起见分别指向多个各自独立的实体或组分,除非上下文另有明确说明。

[0052] 本文中,术语“约”或“大约”指量、水平、值、数目、频率、百分比、维度、尺寸、量、重量或长度相对于参考量、水平、值、数目、频率、百分比、维度、尺寸、量、重量或长度相差至多30%、25%、20%、25%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的。在特定实施方式中,术语“约”或“大约”在一个数值前面时表示该值加减15%、10%、5%或1%的范围。

[0053] 本文中,术语“基本上没有”就某种情形或某种物质的存在性而言不仅表示不存在(即“无”、“零”等)还表示无显著意义的存在或低于检查限因而无法测知的存在或存在量。这是本领域技术人员所熟知的。

[0054] 本文中,术语“示例性”表示“用作示例、实例或展示”。本文描述为“示例性”的任何内容不一定解释为比其他方面更优选或有利。

[0055] 在本文中,术语“包括”、“包含”、“以…为特征”和“具有”,以及它们的语法变体可以互换使用,应理解为包括明示的步骤或元素而不排除任何其他步骤或元素。因此,它们包括由封闭式术语“由…组成”及其语法变体所表示的排他性包含,以及由术语“基本上由…组成”所表示的半封闭式包含,该术语仅对质量和/或数量上不重要的元素是开放式的。

[0056] 本文中一种实施方式中的一项或多项特征可以与另一实施方式中的一项或多项特征组合,这并不背离本发明的构思和概念。

[0057] 除非另做定义,本发明使用的所有技术和科学术语其意义与本发明所属领域普通技术人员通常所理解的相同。文中列举的公开文献和专利文献都通过援引纳入本文并适用于各种目的。本说明书引用的文献应视为本领域普通技术人员的技术水平,但这不应理解为承认本发明不可因发明在先而早于这种公开。

[0058] 本文中,术语“抗体”涵盖任何与一种或多种特定抗原结合的免疫球蛋白、单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体或双特异性(二价)抗体。通常,就像天然完整抗体那样,抗体包括两条重链和两条轻链。每条重链包括可变区(“VH”)和第一、第二、第三恒定区(CH1、CH2、CH3)以及条件性的第四恒定区(CH4),如IgM和IgE抗体的情况,而每条轻链由可变区(“VL”)和恒定区(CL)组成。哺乳动物的重链分为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 型,而哺乳动物的轻链分为 λ

和 κ 型。轻链和重链的可变区负责抗原结合。每个可变区通常包含三个高度可变的环,称为“互补性决定区(CDR)”。CDR的边界可以通过Kabat、Chothia或Al-Lazikani的规则来定义或鉴定。三个CDR插在与之侧接的框架区(FR)之间,框架区与CDR相比高度保守并形成了支撑高变环的支架。重链和轻链的恒定区不参与抗原结合,但表现出多种效应子功能。主要的五类抗体是IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其特征分别在于 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 型重链。几个主要的抗体类别被分为亚类,例如IgG1(γ 1重链)、IgG2(γ 2重链)、IgG3(γ 3重链)、IgG4(γ 4重链)、IgA1(α 1重链)或IgA2(α 2重链)。因此,在本发明中,特定的IgG型,例如“IgG1型”或“IgG1型”,是指指定亚类的各IgG同种型,而不同的IgG型是指不同亚类的IgG同种型。

[0059] 本文中,就抗体而言的“可变区”指包含一个或多个CDR的抗体可变区或其片段。虽然可变区可以包括完整的可变区(如VH或VL),但也可以是不够完整的可变区而仍保留与抗原结合或形成抗原结合位点的能力。

[0060] 抗体可以呈“Y”形,其中的两个臂也称“抗原结合片段(Fab)”,而干部包括抗体的铰链结构域和Fc结构域。

[0061] 术语“Fab”、“Fab结构域”和“Fab臂”可互换使用,指免疫球蛋白(如抗体)中轻链与重链在可变区和第一恒定区偶合形成的结构域。通常,Fab结构域可包含一个或多个链间二硫键。在一些实施方式中,轻链和重链的恒定区可以用TCR恒定区代替。Fab结构域负责多种抗原结合活性。

[0062] 本文中,“Fc区”指重链的第二恒定区(CH2)及此后的恒定区组成的片段,或指铰链区的一部分、重链的第二恒定区(CH2)及此后的恒定区组成的片段。并且,本文中,二聚体抗体的“Fc结构域”指偶合重链中各链Fc区所在的部分。Fc区具有多种效应子功能,例如ADCC和CDC。

[0063] 本文中,重链的“铰链”或“铰链区”是指连接重链CH1区C-末端和CH2区N-末端的区域。铰链区的长度可以是约12-62个氨基酸残基。人IgG1中,铰链区包括第216至230位残基,在人IgG4中包括第219至230位残基,以上按照EU编号。本文中,二聚体抗体的“铰链结构域”指偶合重链中各链铰链区所在的部分。通常,铰链结构域可包含一个、两个或更多个链间二硫键。铰链区是柔性的从而允许两个Fab结构域各自活动。

[0064] 铰链区是抗体Fab与Fc之间的柔性连接区域。IgG亚类IgG1、IgG2、IgG3和IgG4之间,铰链区的长度和柔性差异很大。以最常用作治疗性生物制品的IgG1和IgG4为例,IgG1的铰链区包含15个氨基酸(例如EPKSCDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:9)),很有柔性,IgG4的铰链区较短,仅12个氨基酸。野生型IgG1和IgG4在核心铰链区(EU编号226-229)相差一个氨基酸: IgG1中为Cys-Pro-Pro-Cys而IgG4中为Cys-Pro-Ser-Cys。天然IgG4的核心铰链区存在链间与链内半胱氨酸二硫键之间的平衡,因此会发生重链臂交换和分泌后有IgG4半抗体分子存在。业已证实,IgG4的S228P突变(如ESKYGPPCPPCP(SEQ ID NO:10))可通过防止自然臂交换来显著稳定IgG4重链之间的共价相互作用,因此已广泛用于IgG4抗体的开发和生产。S228P突变在IgG4铰链中形成多脯氨酸螺旋(PPCPPCP),配合较短的IgG4铰链长度,与IgG1铰链相比会进一步限制其柔性。不同铰链之间的柔性差异对抗体的生物偶联具有重要意义,因为位于柔性铰链片段中的半胱氨酸残基被认为比位于刚性铰链中的半胱氨酸残基更具反应性。有实验表明,S228P IgG4的重链-轻链间二硫键和重链-重链间二硫键均为弱反应性。

[0065] 本文中,“CH2结构域”指重链分子中如下所述部分,即按照常规编号方案IgG抗体

中约第244位氨基酸至第360位氨基酸所在的部分(按Kabat编号的氨基酸244至360,按EU编号的氨基酸231至340)。

[0066] “CH3结构域”从IgG分子的CH2结构域延至C末端,包含大约108个氨基酸。某些免疫球蛋白(例如IgM和IgE)还含有CH4区。

[0067] “Fv”、“Fv片段”和“Fv结构域”可以互换使用,指包含抗体完整抗原结合位点的最小结构域。Fv结构域通常包括彼此偶合的轻链可变区(VL)和重链可变区(VH)。

[0068] 生物序列(包括氨基酸序列和核酸序列)之间的同一性(相同)百分比(%)指待查序列与参考序列按最大匹配比对时两者之间相同残基的百分比。序列同一性可以用公共工具来测定,如BLASTN、BLASTp(可在美国国家生物技术信息中心(NCBI)的网站上找到)、ClustalW2(可在欧洲生物信息学研究所的网站上找到),以及ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。

[0069] 本文中,“特异性结合”或“特异性地结合”指两个分子之间(例如抗体和抗原之间)的非随机结合反应。在一些实施方式中,本文提供的工程化抗体可特异性地结合抗原,结合亲和力(K_D) $\leq 10^{-6}$ M(例如 $\leq 5 \times 10^{-7}$ M、 $\leq 2 \times 10^{-7}$ M、 $\leq 10^{-7}$ M、 $\leq 5 \times 10^{-8}$ M、 $\leq 2 \times 10^{-8}$ M、 $\leq 10^{-8}$ M、 $\leq 5 \times 10^{-9}$ M、 $\leq 2 \times 10^{-9}$ M、 $\leq 10^{-9}$ M或 $\leq 10^{-10}$ M)。本文中的 K_D 指解离速率与缔合速率之比(k_{off}/k_{on})。

[0070] “可操作性地连接/相连”指两个或更多个目标生物序列并置,彼此之间有或没有间隔子或接头,并置的方式使得它们的关系允许各自以预期方式起作用。用于描述多肽时表示多肽序列以此种方式相连使得连接产物具有预期的生物功能。例如,抗体可变区可与恒定区可操作性相连得到具有抗原结合活性的稳定产物。该术语也可用于描述多核苷酸。例如,当编码多肽的多核苷酸与调控序列(如启动子、增强子、沉默子序列等)可操作性相连时表示这些多核苷酸序列以此种方式连接实现所述多核苷酸受调控地表达多肽。

[0071] 与参照序列不是100%相同的序列可能在一个或多个位置包含突变,突变可以是取代、添加、缺失或其组合。取代可以是“保守取代”,指用侧链理化性质类似的不同氨基酸进行替换,或在序列的活性或功能不重要的位点进行取代。例如,保守取代可以是具有非极性侧链的氨基酸(如Met、Ala、Val、Leu和Ile、Pro、Phe、Trp)之间的替换、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(如Cys、Ser、Thr、Asn、Gly和Gln)之间的替换,具有酸性侧链的氨基酸(如Asp、Glu)之间的替换,具有碱性侧链的氨基酸(如His、Lys和Arg)之间的替换,具有 β 分支侧链的氨基酸(如Thr、Val和Ile)之间的替换,具有含硫侧链的氨基酸(如Cys和Met)之间的替换,或具有芳族侧链的氨基酸(如Trp、Tyr、His和Phe)之间的替换。保守取代不会引起构象结构的显著变化因而能够保留蛋白质的生物活性。

[0072] 本文中,“对象”指人或非人动物。非人动物可以是哺乳动物,例如灵长类动物。非人类哺乳动物对象的例子包括但不限于豢养动物、畜牧动物和动物园动物、竞技动物或宠物,例如犬、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、猪、牛和熊。优选地,对象是人。“有需要的对象”指有疾病、紊乱或病症需要进行诊断、预后、缓解、预防和/或治疗的对象。

具体实施方式

[0073] 以下描述仅为说明本文的各种实施方式。因此,在此讨论的具体修改、改换等不应解释为对本文公开范围的限制。对于本领域技术人员来说显而易见的是,在本文公开范围

之内可以得出各种等同形式、调整和改换,应当明白,这些等同实施方式均包括在本文范围之内。本文引用的所有参考文献,包括出版物、专利和专利申请,都通过引用全文纳入本文。

[0074] 工程化抗体

[0075] 内容之一,本文提供了一种工程化二聚体抗体,其中第一单体包含第一Fab结构域、与之可操作性连接的第一工程化铰链区及其后与之接可操作性连接的第一Fc区,第二单体包含第二Fab结构域、与之可操作性连接的第二铰链区及其后与之接可操作性连接的第二Fc区;

[0076] 其中,所述第一Fab结构域是抗体Fab结构域,所述第二Fab结构域包含抗

[0077] 体Fv结构域和与之融合的TCR恒定结构域;以及

[0078] 其中,所述第一工程化铰链区由截短IgG1铰链区部分和截短IgG4铰链区部分构成或者是修饰的IgG4铰链区,所述第一工程化铰链区与所述第二铰链区偶合构成的铰链结构域包含至少两个链间二硫键;且

[0079] 其中,所述第一Fc区与所述第二Fc区偶合构成的Fc结构域包含杵臼突变。

[0080] 在一些实施方式中,本发明的工程化抗体可以如图1的示意图所示,其中,TCR恒定结构域以一对矩形代表。单体通过链间结合力(包括链间键和/或链间相互作用)偶合形成二聚体抗体。链间结合力的例子包括但不限于二硫键、氢键、静电相互作用、盐桥、疏水-亲水相互作用和杵臼(Knobs-into-Holes)机制。本发明的工程化抗体是异二聚体。

[0081] 就本发明的工程化抗体而言,“抗体Fab结构域”符合本领域技术人员通常理解的标准含义,指具有公知认为的抗体免疫球蛋白中Fab结构域典型结构和功能的Fab结构域。本发明中也可简单理解为不含有利用WuXiBody™技术将恒定结构域替换为TCR恒定结构域的经典Fab结构域。

[0082] 本发明中,抗体Fab结构域可以是源自任何抗体的Fab结构域,特别是那些临床用抗体。在一些实施方式中,抗体Fab结构域源自特异性结合肿瘤抗原(TA)例如肿瘤特异性抗原(TSA)和肿瘤相关抗原(TAA)的抗体。肿瘤抗原的例子包括但不限于:CD20、CD38、CD123、ROR1、ROR2、BCMA、PSMA、SSTR2、SSTR5、CD19、FLT3、CD33、PSCA、ADAM 17、CEA、Her2、EGFR、EGFR-vIII、CD30、FOLR1、GD-2、CA-IX、Trop-2、CD70、CD38、间皮素、EphA2、CD22、CD79b、GPNMB、CD56、CD138、CD52、CD74、CD30、CD123、RON和ERBB2。TA特异性抗体的例子包括但不限于:曲妥珠单抗(Trastuzumab)、利妥昔单抗(Rituximab)、西妥昔单抗(Cetuximab)、贝伐单抗(Bevacizumab)、帕尼图单抗(Panitumumab)、阿仑单抗(Alemtuzumab)、马妥珠单抗(Matuzumab)、吉妥珠单抗(Gemtuzumab)、泊洛妥珠单抗(Polatuzumab)、伊妥珠单抗(Inotuzumab)等。

[0083] 第二Fab结构域中,抗体Fv结构域根据PCT/CN2018/106766中所描述的WuXiBody™与TCR恒定结构域融合。具体而言,重链中重链可变区(VH)与TCR恒定区融合,轻链中轻链可变区(VL)与另一个TCR恒定区融合。就本发明的工程化抗体而言,“抗体Fv”结构域指上述抗体Fab的Fv结构域。本发明的工程化抗体的第一Fab结构域和第二Fab结构域可具有相同或不同的结合特异性。

[0084] 第二单体中,TCR恒定结构域可由TCR的C α 区和C β 区配对或C γ 区和C δ 区配对构成。在一些实施方式中,TCR恒定结构域是C $\alpha\beta$ 恒定结构域。在一些实施方式中,第二单体是含有TCR恒定结构域的WuXiBody™抗体半抗体。尽管TCR恒定结构域也有链间二硫键,但其还原反

应性要低得多,所以比抗体Fab结构域的链间二硫键更难发生药物偶联。本发明至少部分利用了这种还原反应性差异,从而实现了高均质性且DAR控制更好的ADC生产。

[0085] 在一些实施方式中,抗体Fab结构域是IgG1抗体的Fab结构域,即IgG1型的Fab结构域。优选地,抗体Fab结构域是人IgG1抗体Fab结构域。在一些实施方式中,Fv结构域是IgG抗体的Fv结构域,即IgG类的Fv结构域,优选人IgG的Fv结构域。

[0086] 本发明的工程化抗体特征性地在第一单体中含有工程化的铰链区即“第一工程化铰链区”,它由截短IgG1铰链区部分和截短IgG4铰链区部分构成或者是修饰的IgG4铰链区,从而,由第一工程化铰链区与第二铰链区偶联构成的铰链结构包含至少两个链间二硫键。工程化铰链区由天然氨基酸构成,包括用于在重链之间形成至少两个链间二硫键的半胱氨酸残基。

[0087] IgG1的野生型铰链区包括15个氨基酸(例如EPKSCDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:9)),很有柔性,而IgG4的铰链较短,仅12个氨基酸(同前)。野生型IgG1和IgG4在核心铰链区(EU编号226-229)相差一个氨基酸: IgG1中为Cys-Pro-Pro-Cys而IgG4中为Cys-Pro-Ser-Cys,具有S228P突变的IgG铰链可由序列ESKYGPPCPPCP(SEQ ID NO:10)表示。S228P突变在IgG4铰链中形成多脯氨酸螺旋(PPCPPCP),配合较短的IgG4铰链长度,与IgG1铰链相比进一步限制其柔性。不同铰链之间的柔性差异对抗体的生物偶联具有重要意义,因为位于柔性铰链片段中的半胱氨酸残基被认为比位于刚性铰链中的半胱氨酸残基更具反应性。有实验表明,S228P IgG4的重链-轻链间二硫键和重链-重链间二硫键均为弱反应性。

[0088] 本发明人惊奇地发现,本发明的工程化铰链区在生物偶联过程中提供药物载荷-抗体比(PAR,相当于DAR)改进,利用的是铰链结构域的链间二硫键与Fab结构域的链间二硫键对还原剂的可及性存在差异。具体而言,如前所述,对于ADC生产和ADC产品本身而言,具有工程化铰链区的工程化抗体具有多项优势,例如高均质性,更受控的DAR,简化生产、理想的药代动力学特性和/或药效动力学特性。

[0089] 在一些实施方式中,工程化铰链区包含下式(I)所示的序列:

[0090] $EPKx_1C x_2 x_3 x_4 x_5 x_6 x_7 x_8 CPPCP$ (I)

[0091] 其中, x_1 =缺省或S,优选S; x_2 =缺省或E或S,优选缺省; x_3 =缺省或S; x_4 =缺省或K或D; x_5 =Y或K,优选Y; x_6 =G或T,优选G;且/或 x_7x_8 =PP、PT、HP或HT,优选PP。在一些实施方式中,工程化铰链区包含式 $EPKx_1C x_2 x_3 x_4 x_5 x_6 PPCPPCP$ 所示的序列。在一些实施方式中,工程化铰链区包含式 $EPKSC x_2 x_3 x_4 x_5 x_6 PPCPPCP$ 所示的序列。

[0092] 工程化铰链区的优选实例包括:

[0093] EPKSCESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:1),

[0094] EPKSCSKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:2),

[0095] EPKSCKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:3),

[0096] EPKSCYGPCCPPCP (SEQ ID NO:4),

[0097] EPKCESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:5),

[0098] ESKYGHTCPPCP (SEQ ID NO:6),

[0099] ESKYGHPCCPPCP (SEQ ID NO:7),

[0100] ESKYGPTCPPCP (SEQ ID NO:8);和

[0101] 与上述任一个序列具有至少85%、优选至少90%和更优选至少95%相同的序列。

[0102] 在一些实施方式中,工程化铰链区还可包括位于所述铰链区的任一側或兩側的其他铰链区段(例如上铰链区区段)。

[0103] 就本发明的工程化抗体而言,术语“铰链结构域”是指偶联重链中两铰链区所在的部分。例如PCT/CN2018/106766中所述,两个重链中的第一和第二铰链区从N-末端其彼此对齐。根据本发明,第二单体中的第二铰链区可以是天然的,也可以是工程化TCR铰链区或抗体铰链区或其杂交体。

[0104] 本发明的工程化抗体包含具有杵臼突变的Fc结构域,用以促进异二聚体化。在一些实施方式中,Fc结构域是人Fc结构域。优选地,Fc结构域是IgG Fc结构域,即IgG类的Fc结构域,更优选的是IgG1或IgG4型的Fc结构域。该Fc结构域具有KIH突变从而通过KIH机制实现异二聚体化。

[0105] “杵臼(Knobs-in-Holes)” (“KIH”)结构是一种确保高异二聚化的机制。它指也可以选择性地通过氨基酸工程改造产生空间效应从而有利于异二聚体形成而不利于同二聚体形成,这有时也称为“杵臼(knobs and holes)”。在一些实施方式中,第一Fc区,即包含抗体Fab结构域的第一单体中的Fc区,包含臼突变,第二Fc区,即包含具有TCR恒定结构域替换的第二Fab结构域的第二单体中的Fc区,包含杵突变。这进一步增强了异二聚体化,避免两个单体之间的错配,由此提供所需的WuXiBody™结构。

[0106] 作为实施方式举例,本发明的工程化抗体可包含如以下(a)、(b)和(c)组的一组四条链:

[0107] (a) 第一重链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:11或与之至少85%相同的序列,

[0108] 第一轻链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:15或与之至少85%相同的序列,第二重链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:14或与之至少85%相同的序列,和

[0109] 第二轻链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:16或与之至少85%相同的序列;

[0110] (b) 第一重链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:12或与之至少85%相同的序列,

[0111] 第一轻链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:15或与之至少85%相同的序列,第二重链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:14或与之至少85%相同的序列,和

[0112] 第二轻链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:16或与之至少85%相同的序列;

[0113] 或

[0114] (c) 第一重链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:13或具有与SEQ ID NO:13

[0115] 至少85%相同的序列,

[0116] 第一轻链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:15或与之至少85%相同的序列,第二重链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:14或与之至少85%相同的序列,和

[0117] 第二轻链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:16或与之至少85%相同的序列;

[0118] 其中,所述第一重链和第一轻链形成所述第一单体,所述第二重链和第二轻链形成所述第二单体。

[0119] 另一方面,本发明提供编码本发明工程化抗体的核酸分子或核酸分子组合,所述核酸分子或核酸分子组合。在一些实施方式中,所述核酸分子或所述组合的各核酸分子编码:SEQ ID NO:11和14至16中的一个或多个序列或与之至少85%相同的序列;SEQ ID NO:12和14至16中的一个或多个序列或与之至少85%相同的序列;或SEQ ID NO:13和14至16中的一个或多个序列或与之至少85%相同的序列。一些实施方式中,所述核酸分子可以是一

个或多个载体,特别是表达载体。本领域技术人员可以看出,编码抗体重链和轻链的核酸可以克隆在分开的表达载体中并共转染到宿主中重组产生抗体,也可以将这些链的编码序列插入同一表达载体。本领域所知的表达载体和宿主均可用于本发明。例如但不限于质粒、病毒载体、合成载体、细菌宿主、酵母、昆虫细胞和动物细胞,如CHO细胞。在一些实施方式中,所述核酸分子(如载体)或核酸分子组合可以试剂盒形式提供,所述试剂盒可任选地包含使用所述核酸分子重组生产所述抗体的说明。

[0120] 抗体-药物偶联物

[0121] 本发明内容之一,本文提供了包含本发明工程化抗体的抗体-药物偶联物,本发明的工程化抗体通过连接子偶联一个或多个药物分子。

[0122] 如上所述,本发明的工程化抗体包括第一Fab结构域和第二Fab结构域,所述第一Fab结构域是抗体Fab结构域,所述第二Fab结构域包含Fv结构域和与之融合的TCR恒定结构域。第一Fab结构域和第二Fab结构域可以具有相同或不同的结合特异性,并且抗体Fab结构域和Fv结构域各自可以来源于任何抗体,特别是那些临床使用的相关抗体,例如特异性结合肿瘤抗原(TA)(如肿瘤特异性抗原(TSA)和肿瘤相关抗原(TAA))的抗体。

[0123] 本发明对于可用的药物(也称为“药物载荷”)没有特别限制。本发明可用的药物包括细胞毒性药物,尤其癌症治疗所用的那些。此类药物包括但不限于DNA损伤剂,DNA结合剂,抗代谢物,酶抑制剂(如胸苷酸合成酶抑制剂和拓扑异构酶抑制剂),微管蛋白抑制剂和毒素(如细菌、真菌、植物或动物来源的毒素)。具体例子包括,例如,紫杉醇,氨甲蝶呤,甲氨蝶呤,二氯氨甲蝶呤,5-氟尿嘧啶,6-巯基嘌呤,阿糖胞苷,美法仑,环氧长春碱,长春西定,放线菌素,柔红霉素,多柔比星,丝裂霉素C,丝裂霉素A,洋红霉素,氨基蝶呤,他利霉素,鬼臼及鬼臼衍生物如足叶乙甙或磷酸足叶乙甙,长春花碱,长春新碱,长春地辛,紫杉烷包括紫杉醇,多西他赛视黄酸,丁酸,N8-乙酰基亚精胺,喜树碱,卡奇霉素,埃斯培拉霉素,烯-二炔,多卡霉素A,多卡霉素SA,卡奇霉素,喜树碱,哈密特林,美登木素(包括DM1,DM2,DM3,DM4)和奥瑞他汀类(包括单甲基奥瑞他汀E(MMAE)、单甲基奥瑞他汀F(MMAF)、单甲基奥瑞他汀D(MMAD))。在一些实施方式中,优选奥瑞他汀类,如MMAE。药物可以用任何合适的本领域所知的方法与连接子连接。在一些实施方式中,药物以中间体连接子-药物载荷化合物的形式参与偶联反应,例如“MC-vc-PAB-MMAE”。

[0124] 本发明采用的药物可通过连接子与抗体结合。本领域有多种用于ADC的连接子。本发明对于可用的连接子没有特别限制,只要它包含能与抗体上的巯基反应从而与抗体相连的部分。特别适用于本发明的是氨酰亚胺(amleimido)或卤酰基官能化的连接子。例子包括但不限于-MC-vc-PAB- (“MC”:马来酰亚胺-己酰基;“-vc-”:“-Val-Cit-”二肽;“PAB”:对氨基苄基),-MC-GGFG- (“-GGFG-”:“-Gly-Gly-Phe-Gly-”四肽),-MC-vc-, -MC-和-SMCC- (琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯)。在一些实施方式中,连接子是-MC-vc-PAB-。

[0125] 一些实施方式中,连接子-药物载荷与还原反应打开选定链间二硫键而参与反应的半胱氨酸残基相连。在一些实施方式中,本发明偶联物的药物/抗体之比(DAR)可以是约2至6,优选约2或约6。该比率可以是分子群的平均值,例如ADC群的DAR平均值为DAR2或DAR6。而且,优选实施方式之一中,偶联物具有两个药物分子,都连接在抗体Fab结构域,TCR恒定结构域基本上没有药物分子与之相连。在另一个优选实施方式中,偶联物具有6个药物分

子,都连在抗体Fab结构域和铰链结构域,TCR恒定结构域基本上没有药物分子与之相连。

[0126] 另一方面,本文提供了一种包含本发明抗体-药物偶联物的混合物或由本发明抗体-药物偶联物的混合物组成的组合物,混合物中至少约65%、优选至少约70%、至少约75%、至少约80%或至少约90%的DAR为2(即DAR2)。优选地,DAR2偶联物的两个药物分子都连在抗体Fab结构域,TCR恒定结构域基本上没有药物分子与之相连。本文还提供了一种包含本发明抗体-药物偶联物的混合物或由本发明抗体-药物偶联物的混合物组成的产品,其中至少约80%、优选至少约85%、或至少约90%的抗体-药物偶联物其药物/抗体比为6(即DAR6)。优选地,DAR6偶联物的6个药物分子都连在抗体Fab结构域和铰链结构域,TCR恒定结构域基本上没有药物分子与之相连。

[0127] 另一方面,本发明还提供一种药物组合物,包含前文所述的抗体-药物偶联物或其混合物和药学上可接受的载体。

[0128] 抗体-药物偶联物的制备

[0129] 本发明的ADC可用本领域所知任何合适的方法制备。本发明中,连接子-药物载荷偶联在经温和还原剂还原而由二硫键释放的半胱氨酸残基处。具体地,本发明的工程化铰链区改变了铰链结构域中二硫键的还原反应性,因此,温和还原剂对抗体的部分还原使得二硫键选择性地被还原。此外,在Fab结构域之一中引入TCR恒定结构域更有利于控制ADC产品的DAR。总体而言,本发明使用工程化铰链区和引入TCR恒定结构域得到了DAR控制更好、高度均质的ADC产品,所述ADC产品包含两分子连接子-药物载荷且主要连接在抗体Fab结构域的偶联物,或者包含六分子连接子-药物载荷且主要连接在抗体Fab结构域和铰链结构域的偶联物,TCR恒定结构域则基本上没有连接子-药物载荷与之相连。

[0130] 本文提供了制备本发明抗体-药物偶联物的方法。简言之,该方法可包括抗体部分还原反应和部分还原的抗体与连接子-药物载荷的偶联反应,如图1示意图所示。优选地,在还原缓冲剂中进行偶联,所述还原缓冲剂含有作为添加剂的有机溶剂用于促进连接子-药物载荷的溶解。具体地,该方法可以包括部分还原的本发明抗体与带有马来酰亚胺或卤代乙酰基基团的连接子-药物载荷化合物通过迈克尔加成反应偶联。部分还原的抗体可用温和还原剂对本发明的工程化抗体进行部分还原来生产。一些实施方式中,所述方法可以包括:

[0131] 用温和还原剂对本发明的工程化抗体进行部分还原,以及

[0132] 部分还原的抗体与带有马来酰亚胺或卤代乙酰基基团的连接子-药物载荷化合物通过迈克尔加成反应偶联。

[0133] 在一些实施方式中,所述温和还原剂是TCEP或DTT。在一些实施方式中,还原剂/抗体比是约1-20,优选约2-15,且更优选约3-10。在一些实施方式中,部分还原在pH约4.0至8.0的条件下进行,优选约5至7。在一些实施方式中,所述部分还原进行约0.5至24小时,优选约1至24小时、约1至16小时、约10至24小时或约16至24小时。在一些实施方式中,部分还原在温度约4至37°C的条件下进行,优选约4至15°C或约4至10°C。在一些实施方式中,本方法提供包含本发明抗体-药物偶联物的混合物或由本发明抗体-药物偶联物的混合物组成的产品,混合物中至少约65%、优选至少约70%、至少约75%、至少约80%或至少约90%的DAR为2。优选地,DAR2偶联物的两个药物分子都连在抗体Fab结构域,TCR恒定结构域基本上没有药物分子与之相连。

[0134] 在一些其他实施方式中,所述温和还原剂是TCEP或DTT。在一些实施方式中,还原剂/抗体比是约1-20,优选约3-20,约3-10或约10-20。在一些实施方式中,部分还原在pH约4.0至8.0的条件下进行,优选约6至8。在一些实施方式中,所述部分还原进行约0.5至24小时,优选约3至24小时,约3至16小时,约10至24小时或约16至24小时。在一些实施方式中,部分还原在温度4至37°C的条件下进行,优选约4至15°C或约4至10°C。在一些实施方式中,本方法提供包含本发明抗体-药物偶联物混合物或由本发明抗体-药物偶联物混合物组成的产品,所述抗体-药物偶联物中至少约80%、优选至少约85%、或至少约90%的药物/抗体比为6(即DAR6)。优选地,DAR6偶联物的6个药物分子都连在抗体Fab结构域和铰链结构域,TCR恒定结构域基本上没有药物分子与之相连。

[0135] 在一些实施方式中,偶联在pH约4.0至8.0的缓冲液中、可选的有机添加剂(例如有机溶剂或有机助溶剂)的条件下进行,所述有机添加剂的量为约0.0重量%至20.0重量%,优选约5.0重量%至15.0重量%或约10.0重量%至15.0重量%。在一些实施方式中,药物/抗体比可以是约7-20,优选约7-10;反应温度可以是约4至37°C,优选约4至20°C或约4至10°C;且/或反应时间可以是约0.5-4小时,优选约1-3小时。

[0136] 治疗

[0137] 本发明的抗体药物偶联物可用于有需要的对象治疗其疾病、紊乱或病症,所述治疗包括给与对象治疗有效量的抗体药物偶联物。本申请还提供用于有需要的对象治疗其疾病、紊乱或病症的本发明抗体药物偶联物。治疗的疾病包括但不限于癌症,包括实体瘤和血液癌。此类癌症的例子包括但不限于乳腺癌、胃癌、胰腺癌、肝癌、肺癌(例如NSCLC)、头颈部癌、结直肠癌、B细胞淋巴瘤(例如非霍金斯淋巴瘤(NHL))和白血病。

[0138] 缩写

- [0139] ADC: 抗体-药物偶联物
- [0140] CH: 重链恒定区
- [0141] CMC: 化学成分生产和控制
- [0142] DAR: 药物/抗体之比
- [0143] DMA: N,N'-二甲基乙酰胺
- [0144] DTT: 1,4-二硫苏糖醇
- [0145] EGFR: 表皮生长因子受体
- [0146] Fab: 抗原结合片段
- [0147] Fc: 可结晶片段,
- [0148] FDA: 食品药品监督管理局
- [0149] FGE: 甲酰甘氨酸生成酶
- [0150] HIC: 疏水相互作用色谱
- [0151] HPLC: 高效液相色谱
- [0152] IC50: 半数最大抑制浓度
- [0153] IgG: 免疫球蛋白G
- [0154] MC: 马来酰亚胺-己酰基
- [0155] MED: 最小有效剂量
- [0156] MMAE: 单甲基澳瑞他汀E

- [0157] MTD:最大耐受剂量
- [0158] MWC0:截留分子量
- [0159] NaCl:氯化钠
- [0160] NNAA:非天然氨基酸
- [0161] mTG:微生物转谷氨酰胺酶
- [0162] PAB:对氨基苄基
- [0163] PAR:药物载荷-抗体之比
- [0164] RP:反相
- [0165] SEC:尺寸排阻色谱
- [0166] TCEP:三(2-羧基乙基)膦
- [0167] VH:重链可变区
- [0168] eq:还原剂/抗体摩尔比
- [0169] 实施例
- [0170] 通用方法
- [0171] 抗体的制备

[0172] 本文中全部抗体分子均进行了灰仓鼠 (*Cricetulus griseus*) 密码子优化,按照标准分子生物学方法合成并克隆到生产载体中,然后由TOP10大肠杆菌大量扩增后进行质粒抽提制得。

[0173] 转染前72小时,将CHO K1宿主细胞按 $2-4 \times 10^5$ 个细胞/mL接种在CD CHO培养基中。用Vi-CELL计点宿主细胞计算细胞密度, $290g$ 离心7分钟(min),转染前重悬于预回温的新鲜CD CHO培养基中。使用前,重悬宿主细胞在Kuhner摇床中孵育(36.5°C ,75%湿度,6% CO_2 ,120rpm),待用。

[0174] 将总共4mg编码目标抗体的质粒加入宿主细胞重悬液,然后加12mg聚醚酰亚胺。经转染的培养物在Kuhner摇床中于 36.5°C 、75%湿度、6% CO_2 、120rpm培养4小时。加入自有补料培养基,经转染的培养物在Kuhner摇床中于 31°C 、75%湿度、6% CO_2 、120rpm培养9-10天。

[0175] 在收获日,经转染的培养物先 $1,000g$ 离心10分钟再 $10,000g$ 离心40分钟澄清化,然后 $0.22\mu\text{m}$ 过滤器过滤除菌。取上清液测定滴度并用ProA色谱纯化。ProA洗脱物中加入1-2%中和缓冲液(1M Tris-HCl,pH 9.0)进行中和,然后配制在pH 5.5的20mM组氨酸-乙酸盐缓冲液中。

[0176] 偶联之前所有蛋白质均经过质控检测,包括还原和非还原SDS-PAGE、SEC-HPLC、通过LAL凝胶法(LAL gel clot assay)检测内毒素,并通过质谱进行分子鉴定。

[0177] ADC的制备

[0178] 向缓冲液(pH 4.0-8.0,制备DAR6则pH 6.0-8.0更适宜,例如组氨酸-乙酸盐缓冲液)配制的1mg/ml至20mg/ml抗体溶液中加入1至20eq(制备DAR2优选2-15eq,制备DAR6优选3-20eq)还原剂(例如TCEP或DTT)。在 $4-37^{\circ}\text{C}$ 进行还原,温和振荡或搅拌反应0.5至24小时(制备DAR2优选1-24小时,制备DAR6优选3-24小时)。不纯化,在部分还原的抗体中加入有助溶剂(例如DMA)至浓度0%至20%,马来酰亚胺或卤代乙酰基官能化的连接子-药物载荷7-20eq。在 $4-37^{\circ}\text{C}$ 随温和振荡或搅拌进行偶联反应0.5至4小时(图1)。最终的偶联产物表征

包括UV-vis测浓度,HIC-HPLC测偶联物分布和DAR,LC-MS测轻链上和重链上的药物负载,RP-HPLC测游离药物残留,SEC-HPLC测聚集体和纯度,动力学比浊法测内毒素水平。

[0179] HIC-HPLC

HPLC 参数				
设备	Agilent 1260 系列 HPLC			
柱	TSKgel Butyl-NPR, (2.5) 4.6*35, 0014947			
柱温	25°C			
流动相	A: 1.5M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 50mM K ₂ HPO ₄ , PH 7.0 B: 50mM K ₂ HPO ₄ , 25% IPA, PH 7.0			
流速	0.5-0.8 mL/分钟			
进样温度	23 °C			
[0180] 进样量	40-50 µg			
检测波长	280 nm			
梯度	时间(分钟)	A%	B%	流速(ml/分钟)
	0	100	0	0.5
	12	0	100	0.8
	17	0	100	0.8
	18	100	0	0.8
	30	100	0	0.8

[0181] SEC-HPLC

[0182]

HPLC 参数	
设备	Agilent 1260 系列 HPLC

[0183]

柱	TSKgel G3000SWXL ((5) 7.8*300)		
柱温	25°C		
流动相	A: 200mM KPi, 250mM KCl, 15% IPA, PH 7.0		
流速	0.75 mL/分钟		
进样温度	4 °C		
进样量	50ug		
检测波长	280nm, 252 nm, 248nm		
梯度	时间(分钟)	A%	B%
	0	100	0
	18	100	0

[0184] RP-HPLC测药物负载

[0185] 过程:将20 μ l ADC样品与75 μ l 8M盐酸胍和5 μ l Tris-HCl混合,pH 8.0。向混合物中加入1 μ l的0.5M TCEP溶液。37 $^{\circ}$ C反应30分钟(min),然后用RP-HPLC测定抗体上的药物负载。

HPLC 参数			
设备	Agilent 1260 系列 HPLC		
柱	Agilent, PLRP-S 2.1 \times 150mm, 8 μ m 或等效柱		
柱加热温度	80 $^{\circ}$ C		
流动相	A:0.05% (v/v)的 TFA 水溶液 B:0.05% (v/v)的 TFA 的 ACN 溶液		
流速	0.8 mL/分钟		
进样量	20 μ l		
检测波长	280nm		
[0186] 梯度设置	时间(分钟)	%A	%B
	0	75	25
	3	75	25
	28	50	50
	30	5	95
[0187]	32	5	95
	33	75	25
	40	75	25

[0188] RP-HLPC测定游离药物

[0189] 过程:85 μ l ADC溶液与15 μ l DMA混合,然后用100 μ l沉淀缓冲液(NaCl饱和的37.5%v/v甲醇/乙腈溶液)沉淀蛋白质,22 $^{\circ}$ C以1400rpm漩涡搅拌10分钟(min)。

[0190] 样品以16000rpf离心10分钟。取上清液与标准样品一起进行RP-HPLC检测以测定游离药物。

[0191]

HPLC 参数			
设备	Agilent 1260 系列 HPLC		
柱	Agilent poroshell 120SB-C18 2.7um, 4.6*100mm		
柱温	40°C		
流动相	A:0.05% (v/v)的 TFA 水溶液 B:0.05% (v/v)的 TFA 的 ACN 溶液		
流速	0.6ml/分钟		
进样温度	10 °C		
进样量	40µl		
检测波长	248nm		
梯度	时间(分钟)	A%	B%
	0	55	45
	1	55	45
	11	30	70
	12.5	5	95
	14	5	95
	14.1	55	45
	16	55	45

[0192] LC-MS测定DAR

[0193] 过程:85µl ADC溶液与15µl 50mM TCEP混合,然后在22°C孵育30分钟。

[0194] 样品用LC-MS测定DAR。

	气温	350 °C			
	干燥气体	13 L/分钟			
	雾化器	45 psig			
	VCap	5000 V			
	裂解电压(Fragment)	170 V			
	质量范围	300 – 8000 m/z			
	采集速率	3 光谱/s			
	设备	安捷伦科技公司(Agilent Technologies) 6224 TOF LC/MS			
	柱	Agilent PLRP-S 1000A, 8 μm, 50 x 2.1 mm			
	柱温	80°C			
[0195]	流动相	流动相 A: 0.05%的 TFA 的水溶液; 流动相 B: 0.05%的乙腈溶液			
	流速	0.4 mL/分钟			
	进样量	2 μg			
	检测波长	280 nm, 214 nm, 650 nm			
	梯度	时间	A (%)	B (%)	流速(mL/分钟)
		0.00	75	25	0.500
		0.70	66	34	0.400
		5.00	55	45	0.400
		6.00	10	90	0.400
		7.00	10	90	0.400
		7.10	75	25	0.400
		10.00	75	25	0.400

[0196] 以下实施例仅用于本发明展示,不对本发明范围构成限制。

[0197] 实施例1

[0198] 用序列为EPKSCSKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:2) 的工程化铰链区构建抗-Her2抗体 886-39 (IgG-TCR, IgG1-Fab, IgG4-Fc), 图14中也称为“WBP886-39”。其第一轻链(LC)序列为

SEQ ID NO:15,第一重链(HC)序列为SEQ ID NO:11,第二LC序列为SEQ ID NO:16,第二HC序列为SEQ ID NO:14.第一LC与第一HC形成具有抗体Fab和Fc区含“臼”突变的单体,第二LC与第二HC形成Fab域含TCR恒定结构域替换而Fc区含“杵”突变的单体.该抗体按一般方法部分所述重组生产。

[0199] 所述抗体溶于20mM组氨酸缓冲液(150mM NaCl、pH 5.5),浓度为8.66mg/ml.制剂缓冲液改为PBS pH7.0且浓度为4mg/ml.向抗体溶液中加入2.0eq的TCEP,混合物于4°C孵育16小时.向还原抗体中加入DMA至浓度为10%,然后加入7eq的MC-vc-PAB-MMAE.偶联反应在4°C进行1小时.偶联产物用40KD MWC0脱盐柱纯化,于pH7.0的PBS中保存.用HIC-HPLC测定DAR和药物分布,LC-MS测定偶联位置,由此进行最终产物特征鉴定(图2和图3)。DAR和药物分布的HIC-HPLC结果如下所示:

ADC	TCEP 比率/T	D0	D2	D4	D6	D8	DAR
886-39-MMAE-DAR2	2.0/4°C	9.5	90.5	0.00	0.00	0.00	1.8

[0201] 结果显示,在抗体中引入TCR恒定结构域并对铰链结构域工程改造,利用该抗体制得的ADC均质性改善出人意料,DAR2是主要产物.该产品高度均质,主产物DAR2型ADC的百分比达90.5%。此外,LC-MS结果显示,药物分子主要负载在抗体Fab结构域,TCR恒定结构域没有药物负载。

[0202] 实施例2

[0203] 用序列为EPKSKYGPCCPPCP (SEQ ID NO:3)的工程化铰链区构建抗-Her2抗体886-40(IgG-TCR,IgG1-Fab,IgG4-Fc),图14中也称为“WBP886-40”。其第一轻链(LC)序列为SEQ ID NO:15,第一重链(HC)序列为SEQ ID NO:12,第二LC序列为SEQ ID NO:16,第二HC序列为SEQ ID NO:14.第一LC与第一HC形成具有抗体Fab和Fc区含“臼”突变的单体,第二LC与第二HC形成Fab域含TCR恒定结构域替换而Fc区含“杵”突变的单体.该抗体按一般方法部分所述重组生产。

[0204] 所述抗体溶于20mM组氨酸(150mM NaCl、pH 5.5),浓度为10.83mg/ml.制剂缓冲液改为PBS pH7.0且浓度为4mg/ml.向抗体溶液中加入2.0eq的TCEP,混合物于4°C孵育16小时.向还原抗体中加入DMA至浓度为10%,然后加入7eq的MC-vc-PAB-MMAE.偶联反应在4°C进行1小时.偶联产物用40KD MWC0脱盐柱纯化,于pH7.0的PBS中保存.用HIC-HPLC测定DAR和药物分布,LC-MS测定偶联位置,由此进行最终产物特征鉴定(图6和图7)。DAR和药物分布的HIC-HPLC结果如下所示:

ADC	TCEP 比率/T	D0	D2	D4	D6	D8	DAR
886-40-MMAE-DAR2	2.0/4°C	15.4	73.2	5.3	6.2	0.00	2.1

[0206] 结果显示,在抗体中引入TCR恒定结构域并对铰链结构域工程改造,利用该抗体制得的ADC均质性改善出人意料,DAR2是主要产物.该产品高度均质,主产物DAR2型ADC的百分比达73.2%。此外,LC-MS结果显示,药物分子主要负载在抗体Fab结构域,TCR恒定结构域没有药物负载。

[0207] 实施例3

[0208] 用序列为EPKSCYGPCCPPCP (SEQ ID NO:4)的工程化铰链区构建抗-Her2抗体886-41 (IgG-TCR, IgG1-Fab, IgG4-Fc),图14中也称为“WBP886-41”。其第一轻链(LC)序列为SEQ ID NO:15,第一重链(HC)序列为SEQ ID NO:13,第二LC序列为SEQ ID NO:16,第二HC序列为SEQ ID NO:14。第一LC与第一HC形成具有抗体Fab和Fc区含“臼”突变的单体,第二LC与第二HC形成Fab域含TCR恒定结构域替换而Fc区含“杵”突变的单体。该抗体按一般方法部分所述进行重组生产。

[0209] 所述抗体溶于20mM组氨酸(150mM NaCl、pH 5.5),浓度为4mg/ml。向抗体溶液中加入14.0eq的TCEP,混合物于4°C孵育16小时。向还原抗体中加入DMA至浓度为10%,然后加入7eq的MC-vc-PAB-MMAE。偶联反应在4°C进行1小时。偶联产物用40KD MWC0脱盐柱纯化,于pH5.5的20mM组氨酸缓冲液中保存。用HIC-HPLC测定DAR和药物分布,LC-MS测定偶联位置,由此进行最终产物特征鉴定(图10和图11)。DAR和药物分布的HIC-HPLC结果如下所示:

[0210]	ADC	TCEP	D0	D2	D4	D6	D8	DAR
[0211]		比率/T						
	886-41-MMAE-DAR2	14.0/4°C	20.0	68.2	7.6	4.1	0.0	1.9

[0212] 结果显示,在抗体中引入TCR恒定结构域并对铰链结构域工程改造,利用该抗体制得的ADC均质性改善出人意料,DAR2是主要产物。该产品高度均质,主产物DAR2型ADC的百分比达68.2%。此外,LC-MS结果显示,药物分子主要负载在抗体Fab结构域,TCR恒定结构域没有药物负载。

[0213] 实施例4

[0214] 将抗-Her2抗体886-39溶于20mM组氨酸(150mM NaCl、pH 5.5),浓度为8.66mg/ml。制剂缓冲液改为PBS pH8.0且浓度为4mg/ml。向抗体溶液中加入12eq的TCEP,混合物于4°C孵育16小时。向还原抗体中加入DMA至浓度为10%,然后加入13eq的MC-vc-PAB-MMAE。偶联反应在4°C进行1小时。偶联产物用40KD MWC0脱盐柱纯化,于pH5.5的20mM组氨酸-乙酸盐缓冲液中保存。用HIC-HPLC测定DAR和药物分布,LC-MS测定偶联位置,由此进行最终产物特征鉴定(图4和图5)。DAR和药物分布的HIC-HPLC结果如下所示:

[0215]	ADC	TCEP 比率/T	D0	D2	D4	D6	D8	DAR
	886-39-MMAE-DAR6	12.0/4°C	0.2	2.8	9.9	87.1	0.00	5.7

[0216] 结果显示,在抗体中引入TCR恒定结构域并对铰链结构域工程改造,利用该抗体制得的ADC均质性改善出人意料,DAR6是主要产物。该产品高度均质,主产物DAR6型ADC的百分比达87.1%。此外,LC-MS结果显示,TCR恒定结构域没有药物负载。

[0217] 实施例5

[0218] 将抗-Her2抗体886-40溶于20mM组氨酸(150mM NaCl、pH 5.5),浓度为10.83mg/ml。制剂缓冲液改为PBS pH8.0且浓度为4mg/ml。向抗体溶液中加入14.0eq的TCEP,混合物于4°C孵育16小时。向还原抗体中加入DMA至浓度为10%,然后加入17eq的MC-vc-PAB-MMAE。

偶联反应在4°C进行1小时。偶联产物用40KD MWC0脱盐柱纯化,于pH5.5的20mM组氨酸-乙酸盐缓冲液中保存。用HIC-HPLC测定DAR和药物分布,由此进行最终产物特征鉴定(图8和图9)。DAR和药物分布的HIC-HPLC结果如下所示:

[0219]	ADC	TCEP 比率/T	D0	D2	D4	D6	D8	DAR
	886-40-MMAE-DAR6	14.0/4°C	1.8	4.6	9.2	84.4	0.00	5.5

[0220] 结果显示,在抗体中引入TCR恒定结构域并对铰链结构域工程改造,利用该抗体制得的ADC均质性改善出人意料,DAR6是主要产物。该产品高度均质,主产物DAR6物质百分比达84.4%。此外,LC-MS结果显示,TCR恒定结构域没有药物负载。

[0221] 实施例6

[0222] 将抗-Her2抗体886-41溶于20mM组氨酸(150mM NaCl、pH 5.5),浓度为10.40mg/ml。制剂缓冲液改为PBS pH8.0且浓度为4mg/ml。向抗体溶液中加入16.0eq的TCEP,混合物于4°C孵育16小时。向还原抗体中加入DMA至浓度为10%,然后加入19eq的MC-vc-PAB-MMAE。偶联反应在4°C进行1小时。偶联产物用40KD MWC0脱盐柱纯化,于pH5.5的20mM组氨酸-乙酸盐缓冲液中保存。用HIC-HPLC测定DAR和药物分布来进行最终产物特征鉴定(图12和图13)。DAR和药物分布的HIC-HPLC结果如下所示:

[0223]	ADC	TCEP 比率/T	D0	D2	D4	D6	D8	DAR
	886-41-MMAE-DAR6	16.0/4°C	0.5	4.4	7.6	87.5	0.00	5.6

[0224] 结果显示,在抗体中引入TCR恒定结构域并对铰链结构域工程改造,利用该抗体制得的ADC均质性改善出人意料,DAR6是主要产物。该产品高度均质,主产物DAR6型ADC的百分比达87.5%。此外,LC-MS结果显示,TCR恒定结构域没有药物负载。

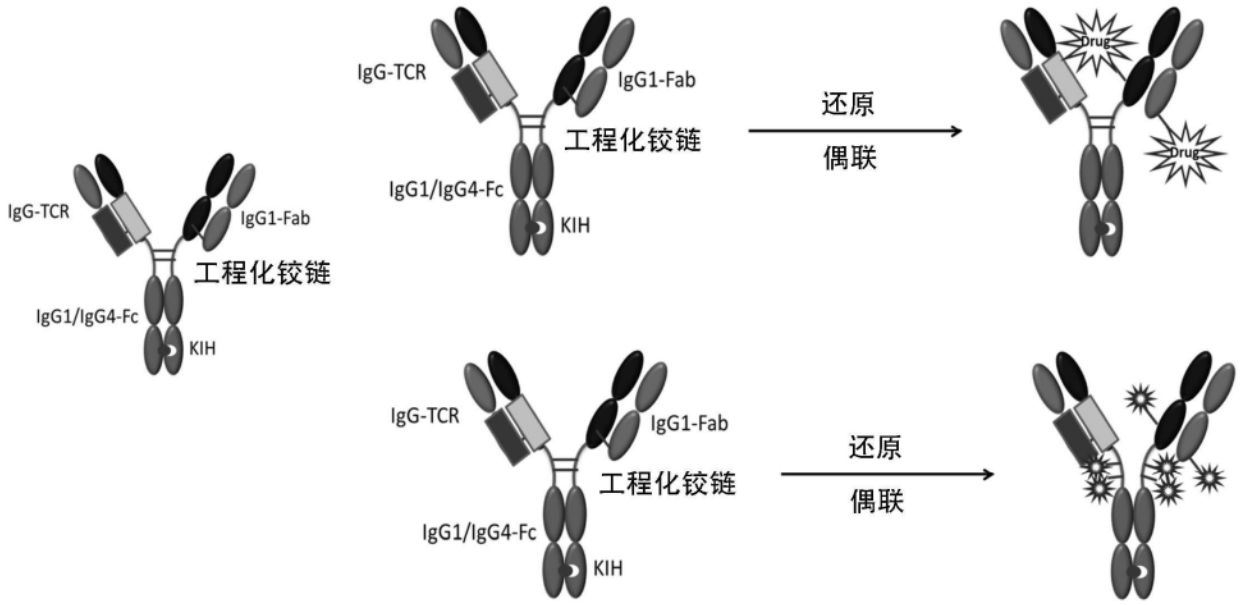
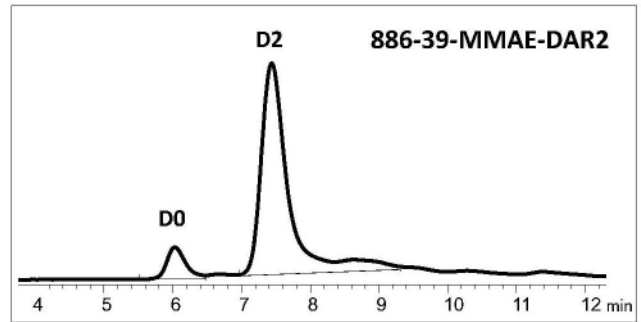
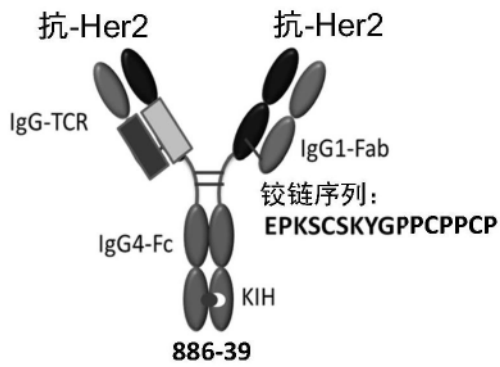


图1



D0 (%)	D2 (%)	D4 (%)	D6 (%)	D8 (%)	DAR
9.5	90.5	0.0	0.0	0.0	1.8

图2

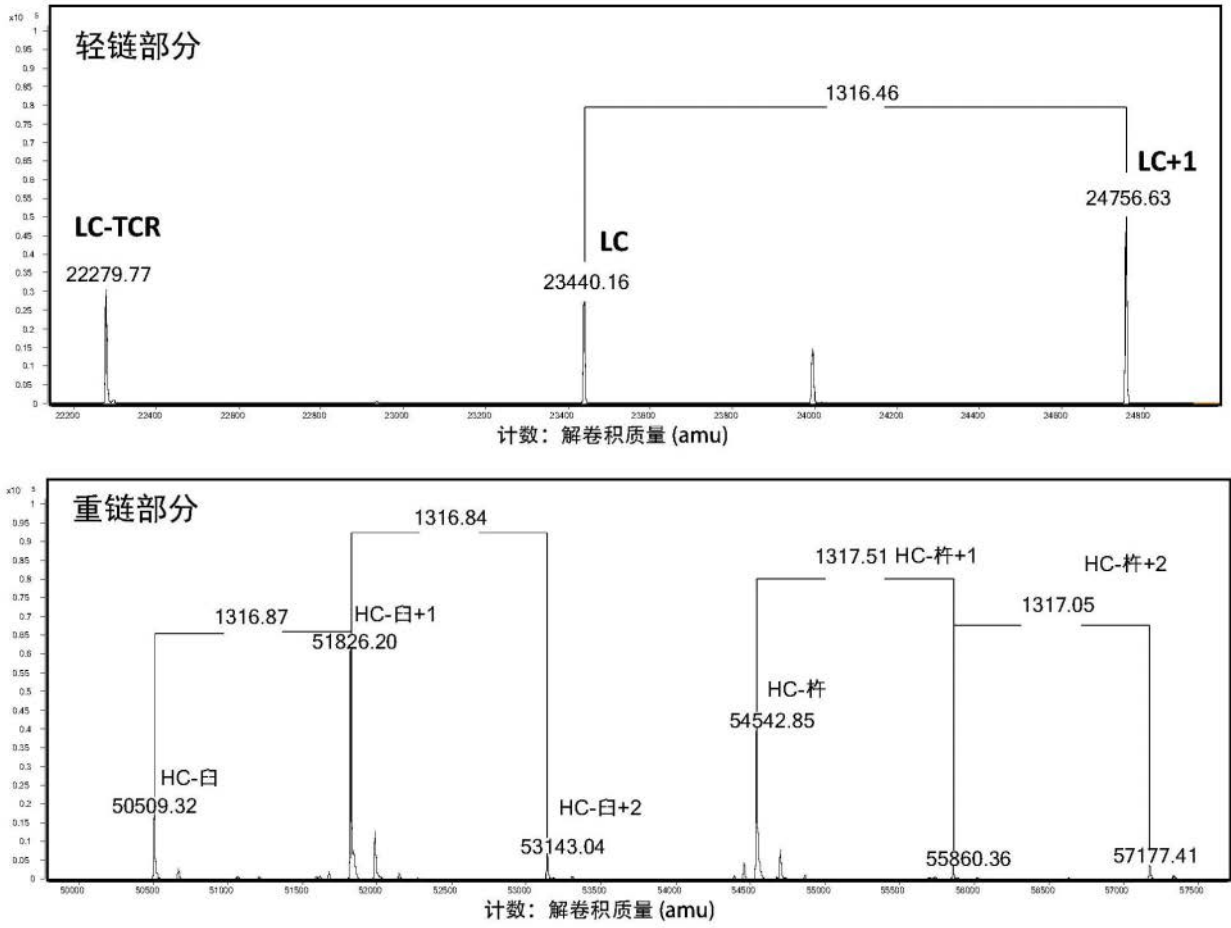


图3

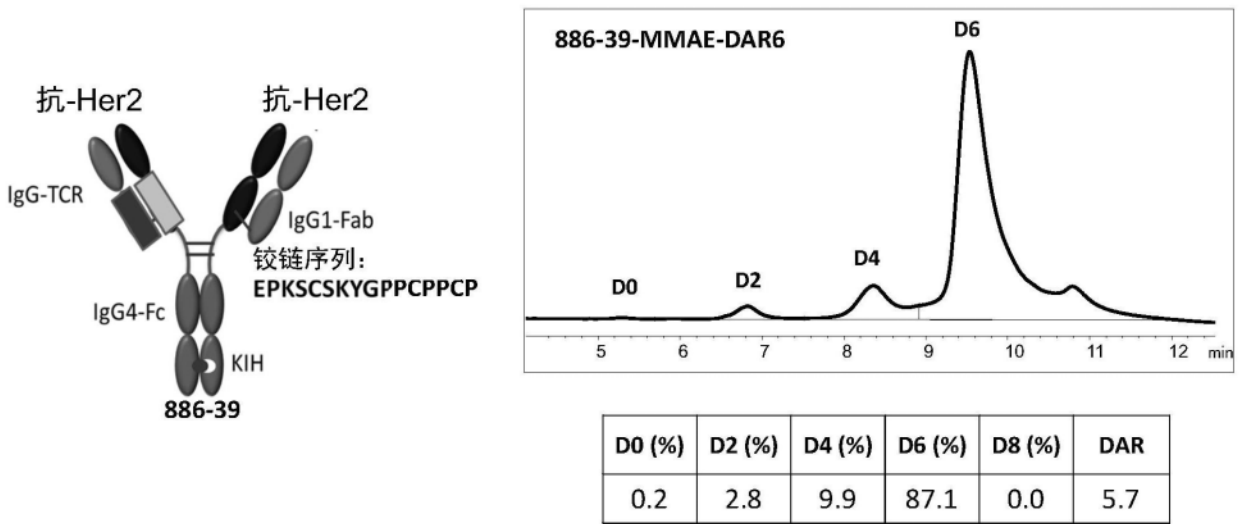


图4

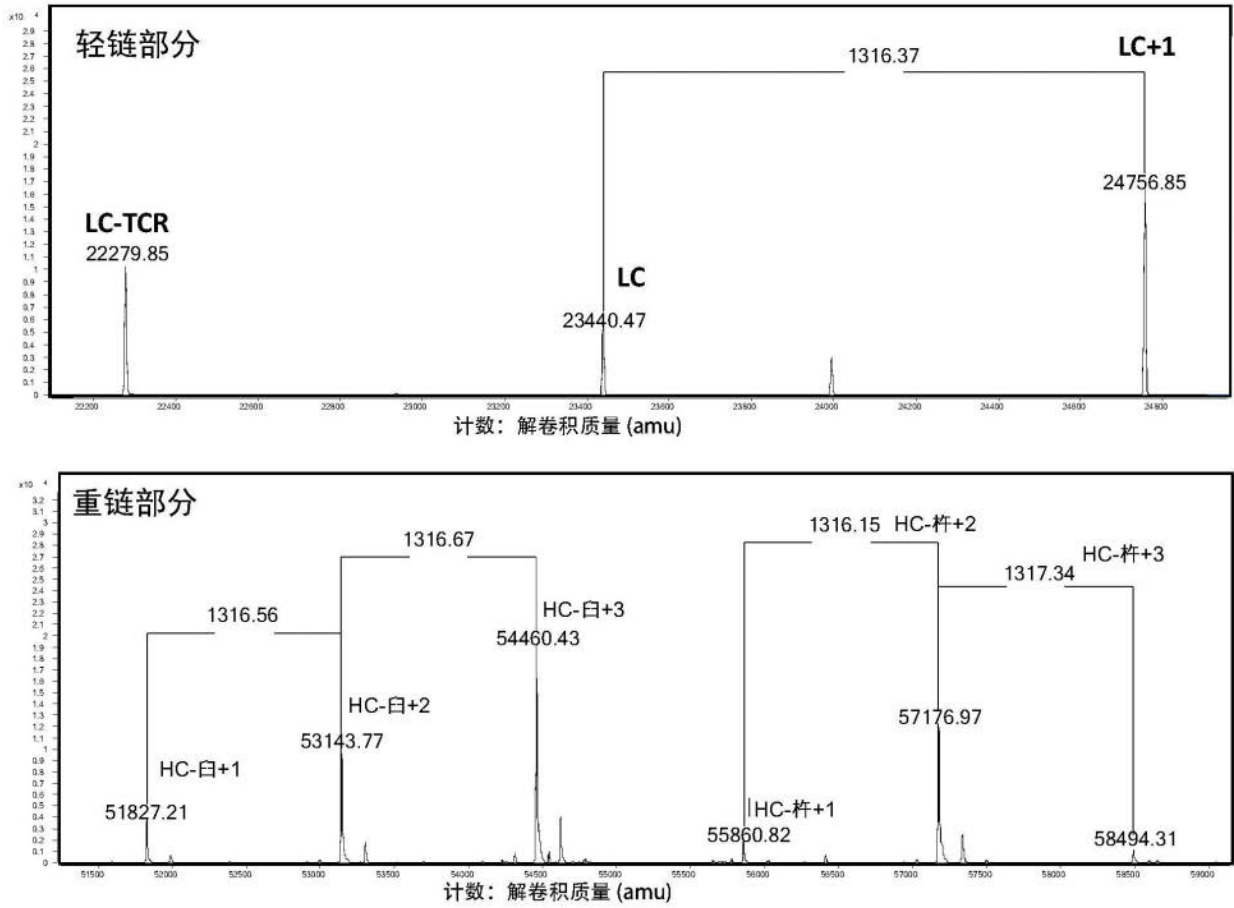


图5

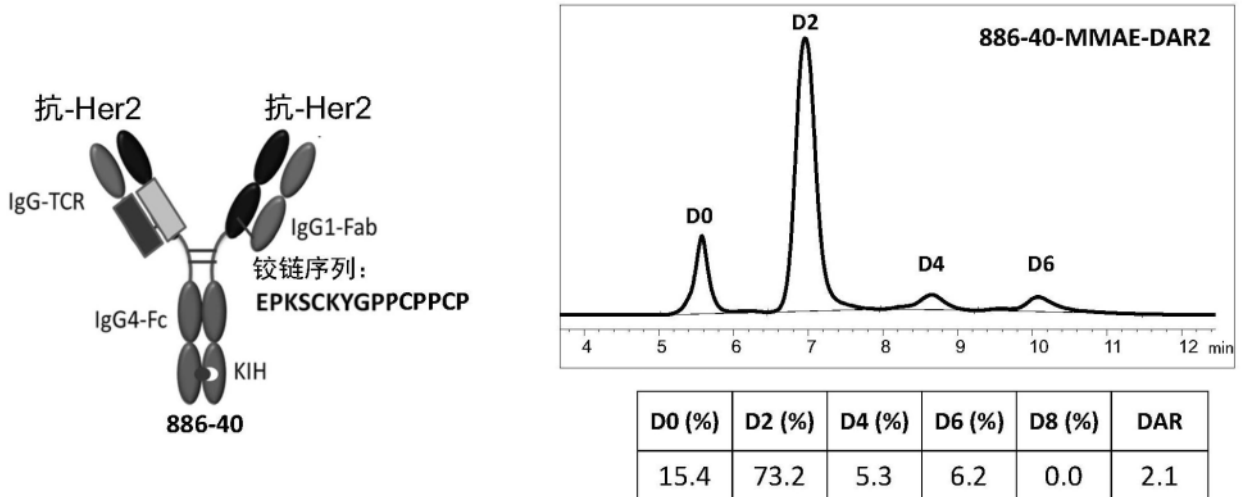


图6

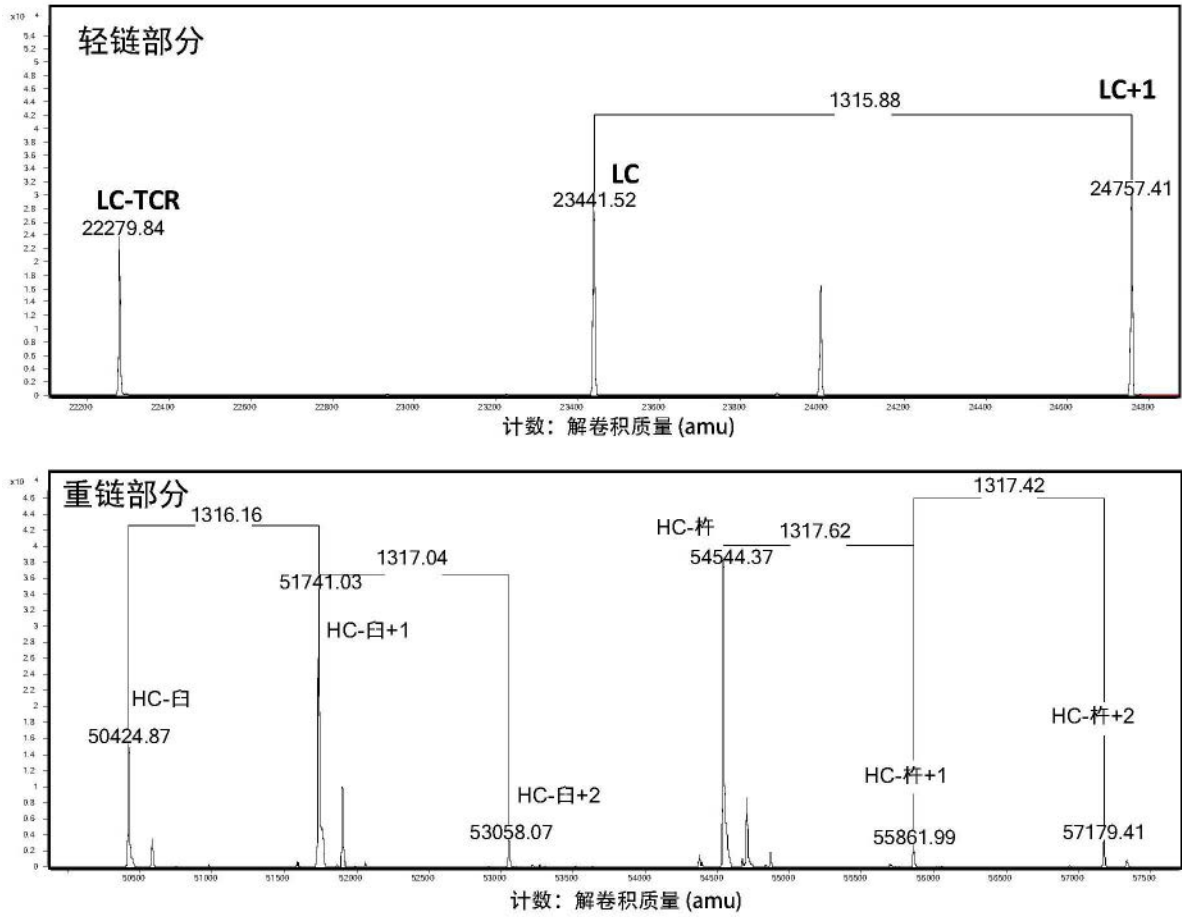


图7

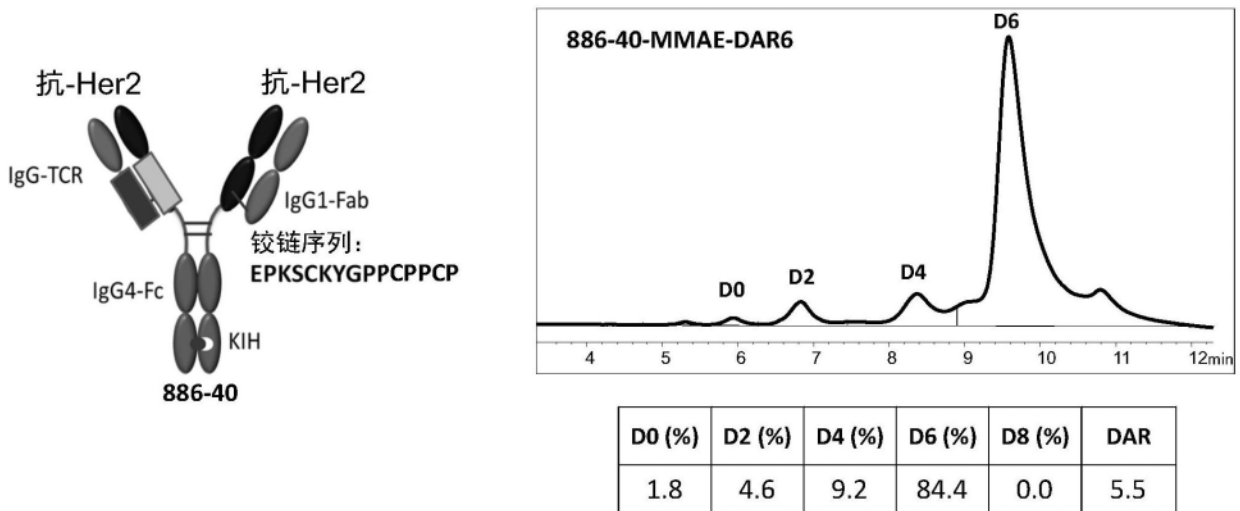


图8

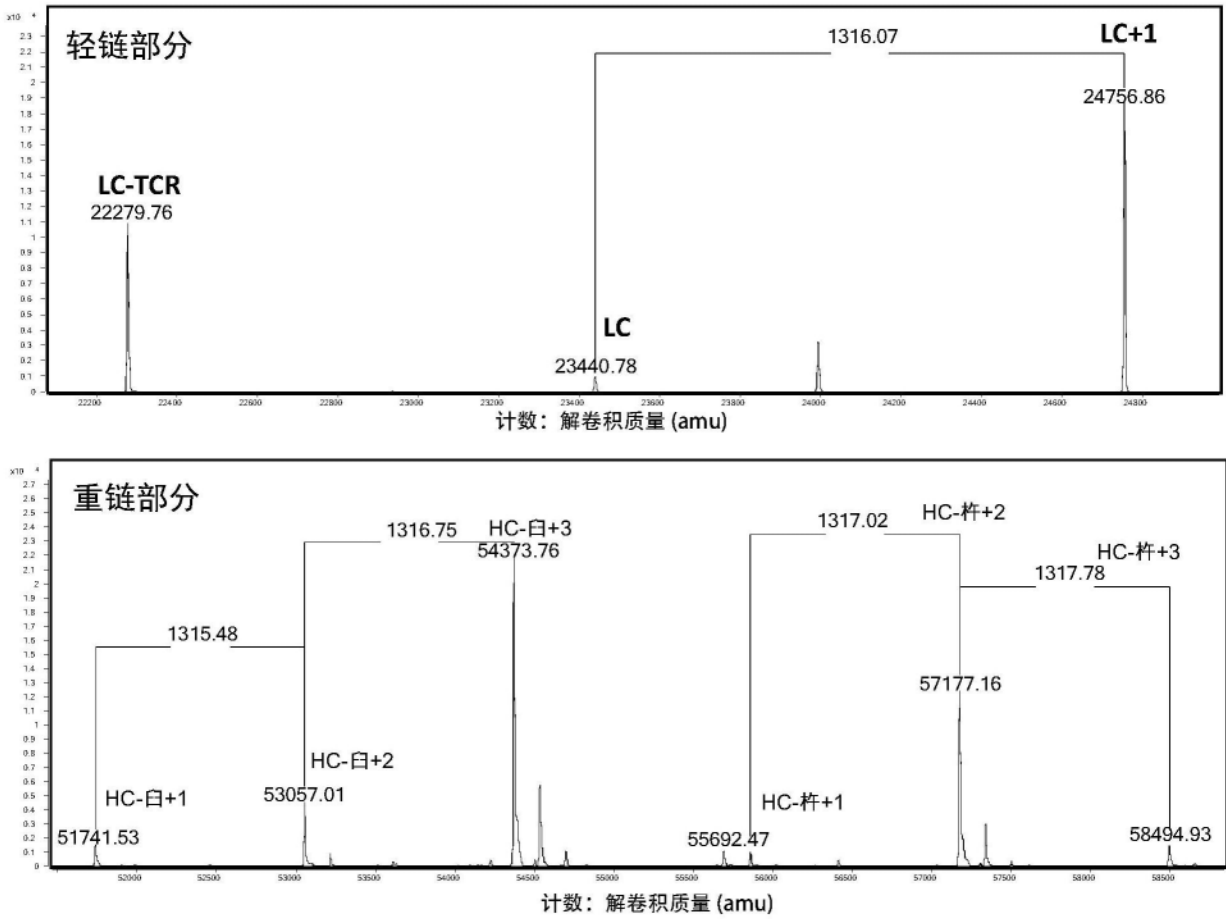
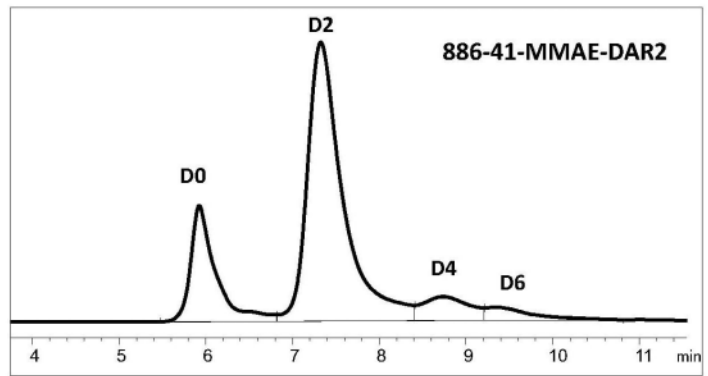
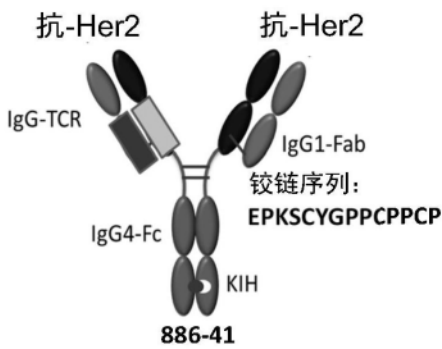


图9



D0 (%)	D2 (%)	D4 (%)	D6 (%)	D8 (%)	DAR
20.0	68.2	7.6	4.1	0.0	1.9

图10

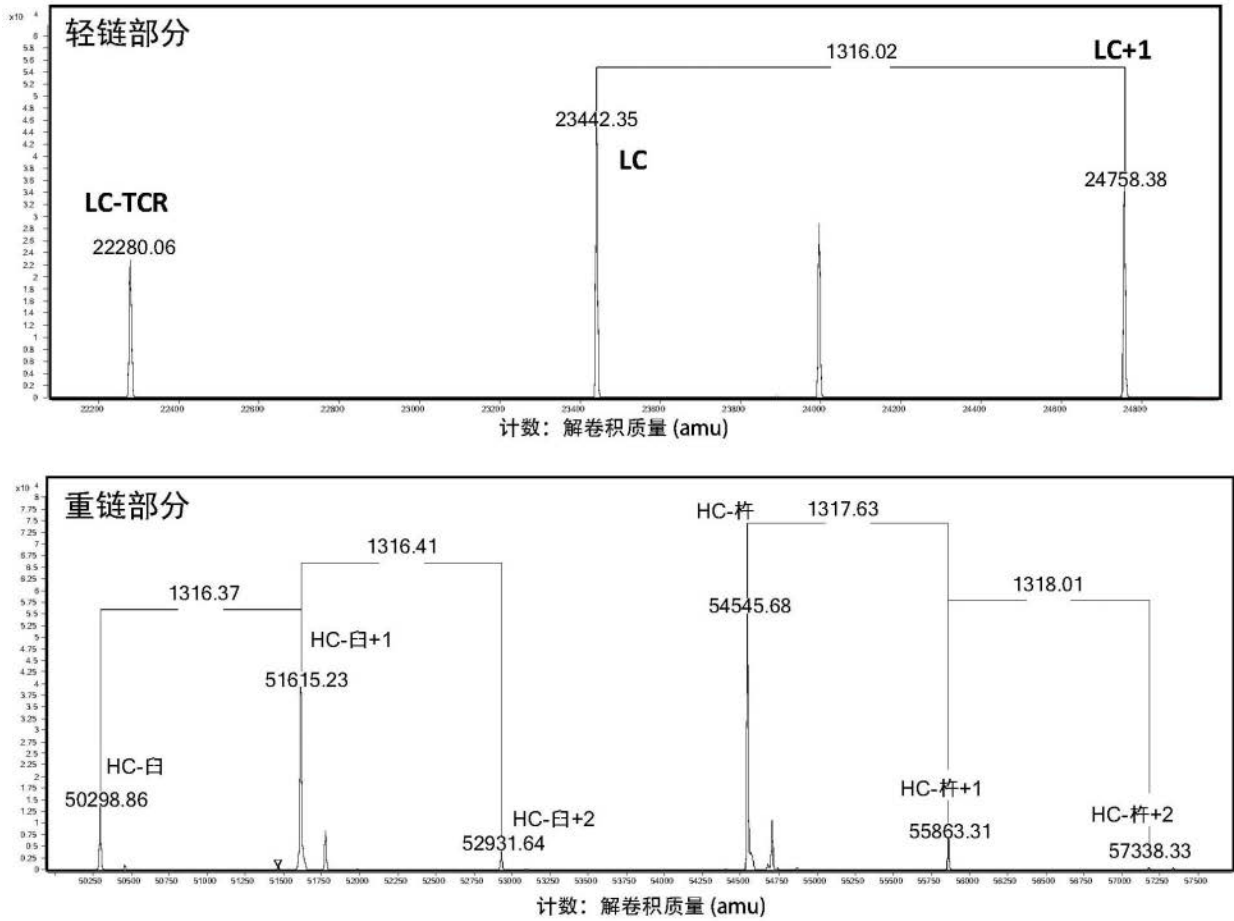


图11

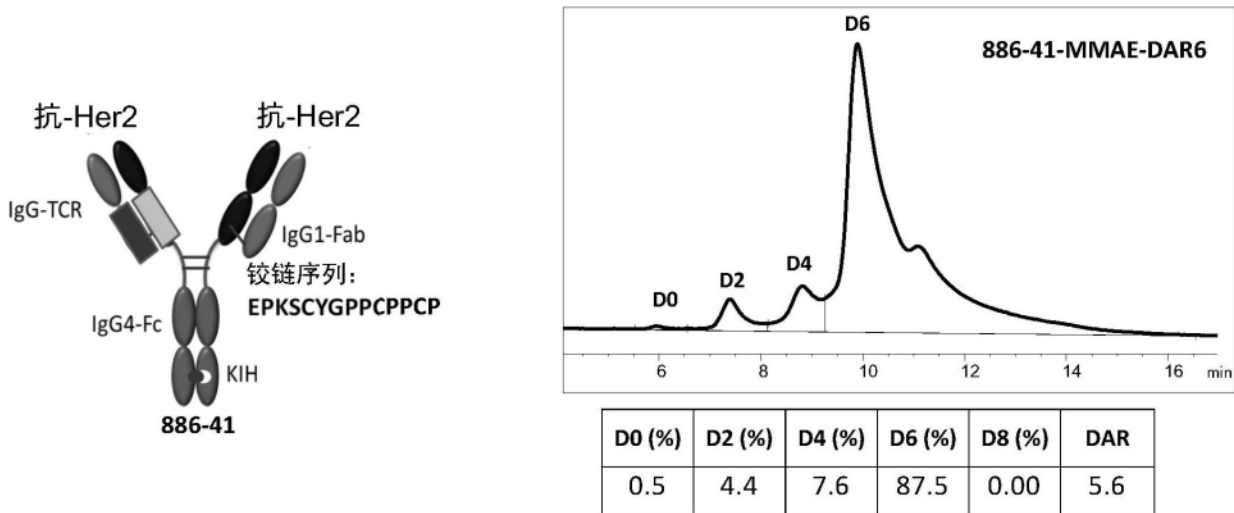


图12

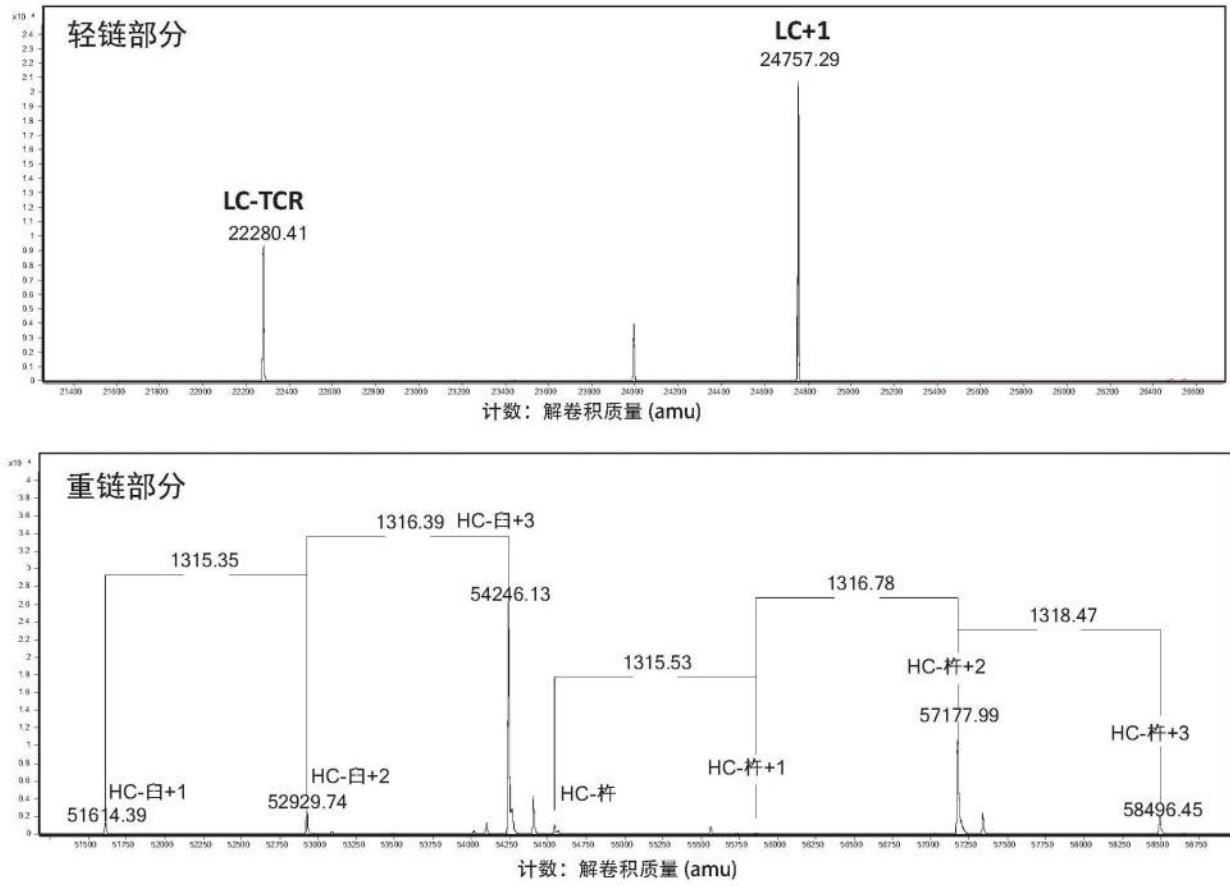


图13

> WBP886-39, -40和-41的LC氨基酸序列 (SEQ ID NO: 15)

**DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTISLQPEDFATY
YCCQHYHTPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**

> WBP886-39, -40和-41的TCR-LC氨基酸序列 (SEQ ID NO: 16)

**DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTISLQPEDFATY
YCCQHYHTPPTFGQGTKEIKPDIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKS
NSAVAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDTFFPSPESS**

> WBP886-39, -40和-41的TCR-HC-铰链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 14)

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQM
NSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWV
NGKEVHSGVCTDPQLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVIVSAEAWGRYG
PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK**

> WBP886-39的HC-臼链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 11)

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQM
NSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCSKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI
SKAKGQPREPQVcTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRITVDKSRWQEG
NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK**

> WBP886-40的HC-臼链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 12)

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQM
NSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCSKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIK
AKGQPREPQVcTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRITVDKSRWQEGNV
FSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK**

> WBP886-41的HC-臼链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 13)

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQM
NSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCSKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIK
AKGQPREPQVcTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRITVDKSRWQEGNV
FSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK**

图14