

1. 一种抗体药物偶联物, 包含包含抗可替宁单链可变片段scFv的双特异性抗体; 以及与肽交联的二价可替宁和药物的偶联物。
2. 根据权利要求1所述的抗体药物偶联物, 其中, 所述抗可替宁单链可变片段与所述二价可替宁结合。
3. 根据权利要求1所述的抗体药物偶联物, 其中, 所述二价可替宁是两个可替宁分别与6-18肽的N末端和C末端交联的二价可替宁。
4. 根据权利要求1所述的抗体药物偶联物, 其中, 所述药物和与所述二价可替宁交联的6-18肽中的赖氨酸残基偶联。
5. 根据权利要求1所述的抗体药物偶联物, 其中, 所述双特异性抗体是在C_H3结构域与所述抗可替宁单链可变片段scFv之间插入肽接头(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃的双特异性抗体。
6. 根据权利要求1所述的抗体药物偶联物, 其中, 所述药物是选自由以下组成的组中的任一种: 倍癌霉素、澳瑞他汀、秋水仙素、葱环霉素、卡里奇霉素、美登醇、吡咯并苯二氮卓、海兔毒素、微管溶素、美登醇、多柔比星、念珠藻素、埃博霉素、番红精、脱乙酰秋水仙素、美登醇、韦多汀、马佛多汀、美坦新、美登素、拉夫坦辛、索拉素、他利林、特司林、吡啶咪苯二氮卓、伊立替康前药、依喜替康衍生物和微管蛋白抑制剂; 或抑制发生癌症的基因表达的siRNA。
7. 根据权利要求1所述的抗体药物偶联物, 其中, 所述双特异性抗体包括选自由以下组成的组中的任一种: 西妥昔单抗、曲妥珠单抗、奥戈伏单抗、依决洛单抗、阿仑单抗、拉贝妥珠单抗、贝伐单抗、替伊莫单抗、奥法木单抗、帕尼单抗、利妥昔单抗、托西莫单抗、伊匹单抗、吉妥珠单抗、布仑妥昔单抗、伐达妥昔单抗、格仑妥木单抗、迪妥昔珠单抗、珀拉妥珠单抗、地宁妥珠单抗、恩弗妥单抗、特立妥珠单抗、替索妥单抗、匹那妥珠单抗、利法妥珠单抗、英度妥单抗、万多妥珠单抗、索非妥珠单抗、沃瑟妥珠单抗、曲妥珠单抗、米妥昔单抗、考妥昔单抗、那妥昔单抗、英达妥昔单抗、阿奈妥单抗、洛沃妥珠单抗、坎妥珠单抗、拉妥昔单抗、比伐珠单抗、伐他昔单抗、洛伐妥珠单抗、艾诺妥珠单抗、沙西妥珠单抗、拉贝妥珠单抗、米拉妥珠单抗、鲁帕妥单抗和阿普卢妥单抗。
8. 一种用于治疗癌症的药物组合物, 包含权利要求1所述的抗体药物偶联物。
9. 根据权利要求8所述的用于治疗癌症的药物组合物, 其中, 所述癌症是具有KRAS突变的肺腺癌。
10. 一种用于制备抗体药物偶联物的方法, 包括:
 - (s1) 制备包含抗可替宁单链可变片段scFv的双特异性抗体的步骤;
 - (s2) 制备与肽交联的二价可替宁和药物的偶联物的步骤; 以及
 - (s3) 混合(s1)步骤中制备的所述双特异性抗体和(s2)步骤中制备的所述偶联物的步骤。
11. 根据权利要求10所述的用于制备抗体药物偶联物的方法, 其中, (s3)步骤是所述抗可替宁单链可变片段和所述二价可替宁特异性地结合的步骤。
12. 根据权利要求10所述的用于制备抗体药物偶联物的方法, 其中, 所述二价可替宁是

两个可替宁分别与6-18肽的N末端和C末端交联的二价可替宁。

13. 根据权利要求10所述的用于制备抗体药物偶联物的方法, 其中, 所述药物和与所述二价可替宁交联的6-18肽中的赖氨酸残基偶联。

14. 一种用于治疗癌症的方法, 包括将有效剂量的权利要求1所述的抗体药物偶联物施用到动物中的步骤。

15. 一种将权利要求1所述的抗体药物偶联物施用到动物中以提高药物半衰期的方法。

使用双特异性抗体的抗体药物偶联物平台

技术领域

[0001] 本发明涉及使用双特异性抗体的抗体药物偶联物及其用途。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2016年6月21日提交的美国临时专利申请第62/352804号的优先权,该申请的说明书和附图中公开的全部内容通过引用并入本申请。

背景技术

[0004] 抗体药物偶联物(ADC)是新类型的抗癌剂,并且被开发为用于选择性地将细胞毒性剂递送至表达抗原的肿瘤细胞。传统ADC具有高适用性和使用位点特异性结合方法的许多优势。然而,为了将细胞毒性剂与抗体连接,需要多步结合方法,并且需要优化单个抗体的过程,因此难以使用ADC。

[0005] 表皮生长因子受体(EGFR)是属于ErbB家族的受体酪氨酸激酶。在各种人癌症(包括头颈癌、结直肠癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌、肾癌、胰腺癌、卵巢癌、脑癌和膀胱癌)中经常观察到EGFR的过表达。在癌症治疗中,已使用两种药理学方法来阻断EGFR信号:单克隆抗体(西妥昔单抗(Erbitux)和帕尼单抗(Vetibix))和小分子酪氨酸激酶抑制剂(吉非替尼(Iressa)和埃罗替尼(Tarceva))。然而,EGFR及其下游信号分子的一些突变已经导致临床应答差和EGFR靶向治疗的困难。例如,KRAS突变对EGFR阳性癌症患者中EGFR靶向治疗的原发性耐药性有影响。在25%的非小细胞肺癌(NSCLC)和39%的结直肠癌病例中发现了KRS突变。尽管已经确定KRAS是人癌症中常见的致癌基因畸变中的一个,但尚无有效的治疗。

[0006] 另一方面,ADC对具有KRAS突变的EGFR阳性癌症可以是有效的。可以通过接头将细胞毒性剂交联到单克隆抗体来制备ADC。ADC可以克服传统抗体或非特异性细胞毒性剂的治疗限制。例如,两种ADC(本妥昔单抗(Adcetris)和曲妥珠单抗-美坦新(Kadcyla))分别被美国食品和药物管理局(FDA)批准用于治疗淋巴瘤和人表皮样生长因子受体-2(Her2)阳性转移性乳腺癌。

[0007] 小分子与抗体的传统偶联使用赖氨酸残基的 ϵ -氨基酸链或半胱氨酸残基上的脱氧链间二硫键。非特异性偶联产生具有可变的药物抗体比率(DAR)和偶联位点位置的异质ADC混合物。这种异质性可以对ADC的溶解性、稳定性、药代动力学和批次变化具有影响。

[0008] 为了避免如上所述的ADC的异质性,已经研究了使用有意插入半胱氨酸残基或非天然氨基酸残基的位点特异性偶联方法、或酶促偶联。此外,ADC的结合活性、稳定性和偶联效率随着不同的偶联位点而变化。因此,为了最大化ADC的性质,需要用于找到合适的偶联残基并将其对应每种抗体而优化的方法。通常,ADC需要多步复杂的偶联过程和复杂的分析来验证终产物。结果是,使用位点特异性偶联来开发传统ADC存在许多困难。

发明内容

[0009] 技术问题

[0010] 本发明要解决的问题是提供新的抗体药物偶联物平台,其中,解决了传统抗体药

物偶联物具有的缺点。

[0011] 另外,本发明要解决的问题是提供包含该抗体药物偶联物平台的药物组合物和使用它治疗疾病的方法。

[0012] 技术方案

[0013] 本发明提供抗体药物偶联物平台,该抗体药物偶联物平台包含含有抗可替宁单链可变片段(scFv)的双特异性抗体;以及与肽交联的二价可替宁和药物的偶联物。

[0014] 本发明的发明人深入研究以解决传统抗体药物偶联物(ADC)需要多步结合过程和抗体优化的缺点,结果是,他们开发了新的抗体药物偶联物平台,该抗体药物偶联物平台使用同时结合人EGFR和半抗原偶联的细胞毒性剂的四价双特异性抗体。

[0015] 首先,本发明人选择了先前报导的四价双特异性抗体形式,并且开发了与人EGFR和可替宁反应的双特异性抗体。本发明的双特异性抗体使用抗可替宁单链可变片段(scFv)与可替宁形成复合物。可替宁是尼古丁的主要代谢产物,由于外源性、生理惰性和无毒性,它可以在临床方法中用作理想的半抗原。

[0016] 在本发明的一个示例中,本发明的双特异性抗体(ERC6)形成为包含人EGFR结合抗体(西妥昔单抗)。然后,倍癌霉素(duocarmycin)制备交联的二价可替宁结合肽(可替宁-倍癌霉素),并且通过与双特异性抗体混合形成抗体药物偶联物。结果是,本发明的发明人开发了由包含双特异性西妥昔单抗×抗可替宁抗体、和与倍癌霉素交联的二价可替宁结合肽(可替宁-倍癌霉素)的四价偶联物组成的抗体药物偶联物平台(图1a)。本发明的抗体药物偶联物平台在体外模型和体内模型中对具有KRAS突变的EGFR阳性西妥昔单抗难治性肺腺癌均显示出显著的抗肿瘤活性。该实验结果表明,使用双特异性抗体的本发明的ADC平台可以是用于治疗疾病(例如癌症)的有用递送工具。

[0017] 本发明的双特异性抗体的抗可替宁单链可变片段(scFv)可以通过与药物偶联的二价可替宁肽的二价可替宁特异性结合而形成抗体药物偶联物。抗可替宁单链可变片段的核苷酸序列可以由SEQ ID NO:1的重链和SEQ ID NO:2的轻链组成。另外,抗可替宁单链可变片段的氨基酸序列可以由SEQ ID NO:3的重链和SEQ ID NO:4的轻链组成。此外,氨基酸序列(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n(n为1至5的整数)、优选(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₄可以插入抗可替宁单链可变片段的轻链序列和重链序列之间。由此,它可以帮助表达的抗可替宁单链可变片段以适当地进行抗原-抗体反应。

[0018] 优选地,本发明的双特异性抗体可以在C_H3结构域和抗可替宁单链可变片段(scFv)之间插入富含甘氨酸和丝氨酸的肽接头(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n(n为1至5的整数)、优选(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃。由此,本发明的双特异性抗体可以提高灵活性。

[0019] 本文中,二价可替宁可以是两个可替宁分别与6-18肽的N末端和C末端交联。优选地,当可替宁和肽偶联时,可替宁可以是羧基可替宁(反式-4-可替宁羧酸),并且可以通过其羧基基团有效地实现与肽的交联。

[0020] 本文中,作为与两个可替宁交联的肽,可以使用6个至18个长度的肽。肽可以由选自自由甘氨酸(G)、丝氨酸(S)和赖氨酸(K)等组成的组中的一种或多种组成。优选地,作为肽,可以使用GSKGSK、GGGGSKGGGGSK、GSKGSKGSKGSKK或GGGSGGGSKGGGSGGGSK等。更优选地,作为肽,可以使用GSKGSKGSKGSKK,并且它可以与本发明的药物(例如倍癌霉素)稳定地偶联。

[0021] 本文中,二价可替宁和药物的偶联可以通过与二价可替宁交联的6-18肽中的赖氨

酸残基的ε氨基基团和药物的偶联来实现。

[0022] 用于本发明的抗体药物偶联物的药物可以是选自由以下组成的组中的任一种：倍癌霉素、澳瑞他汀(auristatin)、秋水仙素、葱环霉素、卡里奇霉素、美登醇(maytansinoid)、吡咯并苯二氮卓、海兔毒素、微管溶素(tubulysin)、美登醇、多柔比星、念珠藻素、埃博霉素、番红、脱乙酰秋水仙素、美登醇、韦多汀(vedotin)、马佛多汀(mafodotin)、美坦新、美登素(mertansine)、拉夫坦辛(ravtansine)、索拉素(soravtansine)、他利林(talirine)、特司林(tesirine)、吡啶啉苯二氮卓、伊立替康前药、依喜替康衍生物和微管蛋白抑制剂等，它们是细胞毒性剂。优选地，本发明的抗体药物偶联物可以包含倍癌霉素或美坦新。由于强烈的DNA烷基化活性，倍癌霉素可以用作杀死癌细胞的有效细胞毒性药物。例如，当倍癌霉素通过与肽结合形成药物偶联物时，它可以以4个缬氨酸-瓜氨酸PAB-连接的二甲基氨基乙基倍癌霉素的形式使用。另外，例如，当美坦新通过与肽结合形成药物偶联物时，它可以通过MCC(环己烷-1-羧酸马来酰亚胺甲酯)接头结合。在本发明的实验性示例中，实验了包含倍癌霉素(图3e)或美坦新(图6b)的抗体-药物偶联物对癌细胞的细胞毒性，并且在两种情况下，均显示出对A549细胞的显著抑制活性。从该结果可以看出，本发明的抗体药物偶联物平台具有与上述各种药物结合的通用性。

[0023] 另外，用于本发明的抗体药物偶联物的药物可以是抑制发生癌症的基因表达的siRNA。例如，siRNA可以选自抑制由选自以下组成的组中的一种或多种基因的表达的siRNA：Mcl-1、Wnt-1、Hec1、Survivin、Livin、Bcl-2、XIAP、Mdm2、EGF、EGFR、VEGF、VEGFR、GASC1、IGF1R、Akt1、Grp78、STAT3、STAT5a、β-连环蛋白、WISP1、c-myc、RRM2、KSP、PKN3、PLK1、KRAS、MYC和EPHA2等。此处，siRNA抑制通过核糖核酸介导的干扰(RNA介导的干扰，RNAi)在癌细胞中表达的特异性基因的表达以杀死癌细胞，因此，包含siRNA的抗体药物偶联物可以用作优异的抗癌剂。

[0024] 本文中，siRNA和可替宁-肽的偶联可以通过接头实现。由此，本发明的抗体-药物偶联物具有将各种类型的siRNA与偶联物结合的通用性。例如，接头可以是SMCC(琥珀酰亚胺基反式-4-(马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯)接头或缬氨酸-瓜氨酸-PAB接头。具体地，当siRNA通过SMCC接头与可替宁-肽结合时，siRNA的5'端或3'端可以被修饰并与SMCC接头交联，并且它可以与可替宁-GSCGSCGSCGSK-可替宁(C=半胱氨酸)偶联。另外，当siRNA通过缬氨酸-瓜氨酸-PAB接头与可替宁-肽结合时，siRNA可以通过该接头与可替宁-GSKGSKGSKGSK-可替宁偶联。

[0025] 本发明的抗体药物偶联物中包含的双特异性抗体可以包括选自由以下组成的组中的任意一种：西妥昔单抗、曲妥珠单抗、奥戈伏单抗、依决洛单抗、阿仑单抗、拉贝妥珠单抗(labetuzumab)、贝伐单抗、替伊莫单抗、奥法木单抗、帕尼单抗、利妥昔单抗、托西莫单抗、伊匹单抗、吉妥珠单抗、布伦妥昔单抗(brentuximab)、伐达妥昔单抗(vadastuzumab)、格仑妥木单抗(glembatumumab)、迪妥昔单抗(depatuzumab)、珀拉妥珠单抗(polatuzumab)、地宁妥珠单抗(denintuzumab)、恩弗妥单抗(enfortumab)、特立妥珠单抗(telisotuzumab)、替索妥单抗(tisotumab)、匹那妥珠单抗(pinatuzumab)、利法妥珠单抗(lifastuzumab)、英度妥单抗(indusatumab)、万多妥珠单抗(vandortuzumab)、索非妥珠单抗(sofituzumab)、沃瑟妥珠单抗(vorsetuzumab)、曲妥珠单抗、米妥昔单抗(mirvetuzumab)、考妥昔单抗(coltuzumab)、那妥昔单抗(naratuzumab)、英达妥昔单抗

(indatuximab)、阿奈妥单抗(anetumab)、洛沃妥珠单抗(lorvotuzumab)、坎妥珠单抗(cantuzumab)、拉妥昔单抗(laprituximab)、比伐珠单抗(bivatuzumab)、伐他昔单抗、洛伐妥珠单抗(rovalpituzumab)、艾诺妥珠单抗(inotuzumab)、沙西妥珠单抗(sacituzumab)、拉贝妥珠单抗(labetuzumab)、米拉妥珠单抗(milatuzumab)、鲁帕妥单抗(lupartumab)和阿普卢妥单抗(aprutumab)等。优选地,本发明的抗体药物偶联物可以包括人EGFR结合抗体(西妥昔单抗)。西妥昔单抗是FDA临床批准用于治疗非小细胞癌、转移性结肠癌或头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)的单克隆抗体。西妥昔单抗的核苷酸序列可以由SEQ ID NO:5的重链和SEQ ID NO:6的轻链组成。另外,西妥昔单抗的氨基酸序列可以由SEQ ID NO:7的重链和SEQ ID NO:8的轻链组成。

[0026] 此外,本发明提供用于治疗癌症的、包含抗体药物偶联物的药物组合物。其中本发明的抗体药物偶联物显示治疗效果的癌症可以是选自由以下组成的组中的一种或多种:头颈癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌、肾癌、胰腺癌、卵巢癌、脑癌或膀胱癌等。优选地,本发明的由包含双特异性西妥昔单抗×抗可替宁、和与倍癌霉素交联的二价可替宁结合肽(可替宁-倍癌霉素)的四价偶联物组成的抗体药物偶联物显示出对具有EGFR靶向西妥昔单抗治疗的原发性耐药性的KRAS突变肺腺癌具有显著的治疗效果。优选地,由包含双特异性西妥昔单抗×抗可替宁抗体、和可替宁-倍癌霉素的四价偶联物组成的抗体药物偶联物的总氨基酸序列可以由SEQ ID NO:9的轻链序列和SEQ ID NO:10的重链序列组成。

[0027] 本发明的药物组合物可以通过本领域已知的各种方法施用。施用途径或施用方法可以根据期望的结果而不同,并且可以通过静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下或接近靶向部位施用。可以通过本领域技术人员已知的传统方法将本发明的抗体药物偶联物配制成药学上可接受的施用形式。

[0028] 此外,本发明提供了用于制备抗体药物偶联物的方法,该方法包括(s1)制备包含抗可替宁单链可变片段(scFv)的双特异性抗体的步骤;(s2)制备与肽交联的二价可替宁和药物的偶联物的步骤;以及(s3)混合(s1)步骤中制备的双特异性抗体和(s2)步骤中制备的偶联物的步骤。在(s3)步骤中,抗可替宁单链可变片段和二价可替宁特异性地结合,从而制备抗体药物偶联物。另外,可以使用其中两个可替宁与6-18肽的N-末端和C-末端交联的二价可替宁。另外,制备方法可以包括a)将编码抗可替宁scFv结合的双特异性抗体的核酸分子插入载体中的步骤;b)将该载体引入宿主细胞的步骤;以及c)培养该宿主细胞的步骤。

[0029] 此外,本发明提供了治疗癌症的方法,包括将有效剂量的抗体药物偶联物施用到动物中的步骤。此外,本发明提供了本发明的抗体药物偶联物用于制备用于治疗癌症的药物组合物的用途。

[0030] 本发明的治疗癌症的方法可以包括以治疗有效剂量施用包含本发明的抗体药物偶联物的组合物。本文中,术语“治疗有效剂量”表示有效预防或治疗癌症相关疾病的本发明的抗体药物偶联物的量或包含该抗体药物偶联物的组合物的量。

[0031] 本发明的药物组合物中抗体药物偶联物的实际剂量水平可以不同,以便达到用于实现对特定患者、组合物和施用方法的期望治疗反应且对患者无毒的有效量的活性成分。剂量水平可以根据各种药效动力学因素而不同,该因素例如使用的本发明的抗体药物偶联物的活性,施用途径,施用时间,使用的偶联物的排出速度,治疗时期,与该偶联物一起使用的其他药物、化合物或材料,年龄,性别,体重,病情,要治疗的患者的总体健康状况以及既

往病史、或其他因素等。

[0032] 本文中,可以滴定药物组合物的治疗剂量以优化稳定性和功效。当全身施用本发明的抗体药物偶联物时,剂量范围可以是每1kg宿主体重约0.0001mg至100mg、更通常是0.01mg至15mg。例如,治疗方法可以伴随每两周一次全身施用、或每月一次全身施用、或每3个月至6个月一次全身施用。

[0033] 此外,本发明提供了通过抗体药物偶联物提高药物半衰期的方法。在本发明的实验实施例3中,当形成与ERC6的偶联物时,进行药代动力学分析以评价可替宁负载(payload)的稳定性。实验结果是,证实了可替宁负载由于其低分子量而在血流中被快速除去,但另一方面,当它与ERC6结合时,半衰期延长。此外,通过使用与肽交联的二价可替宁,本发明的抗体药物偶联物与单一的可替宁-药物偶联物相比可以显著增强偶联物的稳定性。

[0034] 本文中,“抗体”是指通过免疫系统中的抗原刺激产生的物质,其种类没有特别限制。本文中,抗体可以包括动物抗体、嵌合抗体、人源化抗体或完整的人抗体。另外,本文中,抗体可以包括具有抗原结合能力的抗体片段,例如Fab。嵌合抗体是指其中抗体可变区或其互补决定区(CDR)来源于不同动物或来源于抗体其他部分的抗体。该抗体可以是其中抗体可变区来源于除了人以外的动物(例如小鼠、兔、家禽、等)的抗体,并且抗体不变区来源于人。该嵌合抗体可以通过本领域已知的方法(例如基因重组等)制备。

[0035] 本文中,“重链”是指包含可变结构域 V_H 和3个不变区结构域 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 及其片段全部的全长重链,所述可变结构域 V_H 包含足以对抗原提供特异性的可变区的氨基酸序列。另外,“轻链”是指包含可变结构域 V_L 和不变区结构域 C_L 全部的全长轻链,所述可变结构域 V_L 包含足以对抗原提供特异性的可变区的氨基酸序列。

[0036] 本文中,“偶联物”是指异源分子,并且可以通过将一种或多种多肽(通常是一种多肽)共价连接至一种或多种非多肽部分(特别是聚合物部分,例如聚合物分子、亲脂性化合物、碳水化合物部分和有机衍生剂)来产生。另外,偶联物可以连接到一个或多个碳水化合物部分、特别是使用N-糖基化或O-糖基化连接到一个或多个碳水化合物部分。共价连接的含义是指彼此共价直接连接多肽和非多肽部分,或通过交联桥、空间、连接部分或介导部分等彼此共价间接连接多肽和非多肽部分。本定义中包括例如偶联本文公开的药物和可替宁的偶联物。

[0037] 另外,本发明提供了体外生物分析方法,其中,可替宁和药物的偶联物用作分析工具。体外生物分析方法可以选自由以下组成的组:细胞计数法、蛋白质印迹分析、免疫沉淀分析和酶联免疫化学分析等。

[0038] 其中抗可替宁抗体与根据本发明的药物和可替宁的偶联物结合的偶联物可以通过使用可替宁作为半抗原而保留药物和抗体的所有独特特征。具体地,本发明的抗体药物偶联物可以保留分子的特异性反应性和功能、以及作为抗体特征的补体介导细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和长的体内半衰期。

[0039] 有益效果

[0040] 本发明的抗体药物偶联物可以有效地将药物递送至抗体特异性结合的靶标,并且提高药物在体内的半衰期,从而改善治疗效果。特别地,与西妥昔单抗×抗可替宁抗体和倍癌霉素偶联的二价可替宁-肽的双特异性偶联物显示出对具有KRAS突变的EGFR阳性西妥昔

单抗难治性肺腺癌的显著抗肿瘤活性。

[0041] 另外,本发明的抗体药物偶联物平台不需要优化抗体,并且通过简单培养将细胞毒性剂与感兴趣的抗体偶联,从而可以大幅减少多步复杂偶联过程。换句话说,本发明的抗体药物偶联物平台可以用于克服传统ADC的限制,并最终开发下文中更有效的治疗剂。

附图说明

[0042] 图1a至图1d显示双特异性(西妥昔单抗×抗可替宁)抗体(ERC6)的制备和表征。图1a是使用双特异性抗体的抗体药物偶联物(ADC)的示意图。双特异性(西妥昔单抗×抗可替宁)抗体(ERC6)设计为对人EGFR和可替宁负载均具有结合特异性。图1b显示SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)结果。将经纯化的ERC6插入到4%至12%(重量/体积) SDS-PAGE。用考马斯亮蓝对凝胶染色使条带可视化。道1或道2分别是有还原剂或没有还原剂的样本。图1c是尺寸排阻色谱(SEC)。将经纯化的ERC6经使用高压液相色谱的SEC(SEC-HPLC)分析。图1d显示ERC6的药代动力学分析结果。将200 μ g ERC6静脉内注射到Balb/c小鼠(n=4只)中,并通过眼眶中的静脉采集血液样本。通过酶联免疫吸附分析(ELISA)分析ERC6的循环血清水平。结果显示为从进行三次的实验获得的平均值 \pm SD。

[0043] 图2a至图2d显示ERC6与人EGFR和可替宁的结合反应性。图2a显示酶免疫分析结果。将西妥昔单抗、抗可替宁-IgG和ERC6加入到包被有人EGFR或可替宁的微量滴定板的孔中。用HRP复合的抗人IgG(Fab特异性)抗体探测孔。图2b显示经交联的dPEG6生物素与二价可替宁-偶联的肽(可替宁-生物素)的化学结构。图2c是将西妥昔单抗、抗可替宁-IgG和ERC6加入到包被有人EGFR的微量滴定板的其他孔中、然后加入可替宁-生物素并用HRP-偶联的链霉亲和素检测孔。在包被有BSA的对照孔中测量背景信号。在650nm下测量吸光度。图2d显示ERC6复合的可替宁-生物素的药代动力学分析。将用溶解在100 μ L无菌PBS中的1.85 μ g可替宁-生物素预培养的200 μ g ERC6静脉内注射到Balb/c小鼠中(n=4只)。通过眼眶中的静脉采集血液样本,并通过ELISA测量ERC6复合的可替宁-生物素的循环血清水平。结果显示为从进行三次的实验获得的平均值 \pm SD。

[0044] 图3a至图3e显示ERC6复合的可替宁-倍癌霉素在EGFR阳性肺腺癌细胞系中的增强的抗增殖作用。图3a是流式细胞术结果。在有可替宁-生物素或没有可替宁-生物素的情况下,将A549细胞用西妥昔单抗、抗可替宁-IgG或ERC6培养。为了分析,用PE偶联的链霉亲和素和FITC偶联的抗人Fc检测细胞。图3b显示游离倍癌霉素的结构。图3c显示与四个倍癌霉素交联的二价偶联的肽(可替宁-倍癌霉素)的化学结构。R代表缬氨酸-瓜氨酸PAB连接的二甲基氨基乙基倍癌霉素。图3d是游离倍癌霉素的细胞存活率分析结果。图3e是可替宁-倍癌霉素的细胞存活率分析结果。用帕利珠单抗和DMSO处理A549细胞系(●);用西妥昔单抗和DMSO处理A549细胞系(■);用ERC6和DMSO处理A549细胞系(▲);用帕利珠单抗和倍癌霉素处理A549细胞系(○);用西妥昔单抗和倍癌霉素处理A549细胞系(□);用ERC6和倍癌霉素处理A549细胞系(△)。帕利珠单抗用作双特异性抗体的同种型对照。DMSO用作可替宁-倍癌霉素的载剂对照。在培养细胞72小时后,使用Cell Titer-Glo试剂测量细胞ATP含量,从而测量相对细胞存活率。结果显示为从进行三次的实验获得的平均值 \pm SD。

[0045] 图4a至图4e显示ERC6复合的可替宁-倍癌霉素在小鼠异种移植肿瘤模型中的增强的抗增殖作用。将A549细胞皮下注射到每只Balb/c裸鼠的左侧和右侧。当肿瘤体积达到

150mm³时,将小鼠随机分为三组(n=4只/组),治疗5周。每个组腹腔内注射帕利珠单抗和可替宁-倍癌霉素、ERC6和载剂或ERC6复合的可替宁-倍癌霉素。帕利珠单抗用作双特异性抗体的同种型对照。DMSO用作可替宁-倍癌霉素的载剂对照。图4a是测量肿瘤体积32天的结果,图4b是观察治疗期间体重的结果。图4c是第32天的平均肿瘤体积。图4d是处死小鼠时解剖肿瘤的平均质量。图4e显示三个治疗组在终点的肿瘤照片。结果显示为平均值±SD;与该组相比,*P<0.05,**P<0.01,Student t检验。

[0046] 图5是ERC6复合的可替宁-生物素的药代动力学分析结果。(a)将以1:1的摩尔比溶解在100μL无菌PBS中的964皮摩尔可替宁-生物素预培养的200μg ERC6静脉内注射到Ba1b/c小鼠中(n=4只)。该肽在两个可替宁分子之间具有6个氨基酸、12个氨基酸或18个氨基酸的各种长度。通过眼眶中的静脉采集血液样本,并通过ELISA测定ERC6复合的可替宁-生物素的循环血清水平。(b)通过ELISA测量总ERC6的循环血清水平。结果显示为平均值±SD;与该组相比,*P<0.05,**P<0.01,Student t检验。

[0047] 图6显示ERC6复合的可替宁-DM1(美坦新)在EGFR阳性肺腺癌细胞系中的抗增殖作用。图6a显示与四个DM1交联的二价可替宁-偶联的肽(可替宁-DM1)的化学结构。R代表MCC-连接的DM1。图6b是可替宁-DM1(美坦新)的细胞存活率分析结果。用帕利珠单抗和DMSO处理A549细胞系(●);用西妥昔单抗和DMSO处理A549细胞系(■);用ERC6和DMSO处理A549细胞系(▲);用帕利珠单抗和可替宁-DM1处理A549细胞系(○);用西妥昔单抗和可替宁-DM1处理A549细胞系(□);用ERC6和可替宁-DM1处理A549细胞系(△)。帕利珠单抗用作双特异性抗体的同种型对照。DMSO用作可替宁-duocarmycin的载剂对照。在培养细胞72小时后,使用Cell Titer-Glo试剂测量细胞ATP含量,从而测量相对细胞存活率。结果显示为从进行三次的实验获得的平均值±SD。

具体实施方式

[0048] 下文将详细描述示例等以便于理解本发明。然而,根据本发明的示例可以修改为各种其他形式,并且本发明的范围不应该理解为限于以下示例。提供本发明的示例以使本领域技术人员能够更全面地理解本发明。

[0049] 实施例1:细胞培养

[0050] 从韩国细胞系库获得A549(人肺腺癌)细胞,并在补充有10%热灭活的胎牛血清(GIBCO,美国纽约州格兰德岛)、100U/mL青霉素、和100μg/mL链霉素的RPMI-1640培养基(Welgene,韩国首尔)中,在含有5%CO₂的湿润气氛中生长。HEK293F细胞(Invitrogen,美国加州卡尔斯巴德)在具有通气帽的锥形组织培养瓶(Corning Inc.,美国纽约州)中、在含有100U/mL青霉素和100μg/mL链霉素的FreeStyle™ 293Expression培养基(GIBCO)中、在135rpm的回转式振荡培养箱(Minitron,INFORS HT,瑞士博特明根)中、在37℃下、在含有7%CO₂的70%湿润气氛中生长。

[0051] 实施例2:双特异性西妥昔单抗×抗可替宁抗体的构建和纯化

[0052] 为了构建双特异性西妥昔单抗×抗可替宁抗体表达载体,化学合成了编码西妥昔单抗轻链和西妥昔单抗重链-接头(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃-抗可替宁单链可变片段(scFv)的基因(Genscript,美国新泽西州皮斯卡塔韦)。将限制性位点AgeI和XbaI分别插入编码西妥昔单抗轻链的基因的5'端和3'端。将另外的限制性位点NheI和BsiWI插入编码西

妥昔单抗重链的基因的5'端和抗可替宁scFv基因的3'端。将轻链和重链-接头-抗可替宁-scFv亚克隆到设计为用于分泌重组蛋白的哺乳动物表达载体中,如以下描述的方法:Park S, Lee DH, Park JG, Lee YT, Chung J. A sensitive enzyme immunoassay for measuring cotinine in passive smokers. Clin Chim Acta 2010; 411 (17-18): 1238-42。

[0053] 如以下描述的方法: Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B等人, A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92 (16): 7297-301, 将编码ERC6的表达载体用25-kDa线性聚乙烯亚胺 (Polyscience, 美国宾夕法尼亚州沃灵顿) 转染到HEK293F (Invitrogen) 中。如以下描述的方法: Kim H, Park S, Lee HK, Chung J. Application of bispecific antibody against antigen and hapten for immunodetection and immunopurification. Exp Mol Med 2013; 45: e43, 通过使用蛋白A琼脂糖珠 (RepliGen, 美国马塞诸塞州沃尔瑟姆) 的亲色谱从培养上清液中纯化ERC6。

[0054] 实施例3: 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

[0055] 根据制造商的说明书, 通过使用NuPage 4%至12%的Bis-Tris凝胶 (Invitrogen) 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行分析。用考马斯亮蓝R-250 (Amresco, 美国俄勒冈州科隆) 对凝胶染色。

[0056] 实施例4: 尺寸排阻色谱 (SEC)

[0057] 使用配备装有含*57300Å孔的3µm颗粒的Bio SEC-3柱 (7.8mm×300mm) 的Agilent 1260Infinity高压液相色谱 (HPLC) 系统 (Agilent 1260, Agilent technologies Inc., 美国加州), 通过SEC-HPLC分析经纯化的ERC6。流动相包含50mM磷酸钠和pH7.0的150mM氯化钠。注射20µL的ERC6 (1mg/ml) 并以1mL/分钟的流速等度地 (isocratically) 洗脱30分钟。用紫外线检测器在280nm下监控柱流出物并表示为mAU。基于峰面积, 量化单体、聚集体和片段的百分比。

[0058] 实施例5: 可替宁偶联物的合成

[0059] 使用Fmoc-固相肽合成 (Peptron, 韩国) 化学合成本实验中使用的的所有肽。两种反式-4'-可替宁羧酸 (Sigma-Aldrich, 美国密西西比州圣路易斯) 在GGGGSKGGGGSK肽和GSKGSKGSKGSKK肽的N-末端和C-末端与游离胺基交联。在用三苯基膦 (四) 钯除去肽中间的赖氨酸上的烯丙氧羰基 (alloc) 基团后, 将dPEG6 (Peptide international Inc., 美国肯塔基州路易斯维尔) 与GGGGSKGGGGSK肽的游离胺基偶联。然后, 使生物素与dPEG6偶联的肽 (Peptron) 上的游离胺交联。为了简化, 将与生物素交联的二价可替宁偶联的肽 (可替宁-GGGGSK [dPEG6]-生物素) GGGGSK-可替宁) 缩写为可替宁-生物素。

[0060] 四个缬氨酸-瓜氨酸PAB-连接的二甲基氨基乙基倍癌霉素与存在于二价可替宁-交联的GSKGSKGSKGSKK肽 (Concortis, 美国加州圣地亚哥) 中的4个赖氨酸中的游离氨基酸基团偶联。为了简化, 将与4个倍癌霉素交联的二价可替宁-偶联的肽 (可替宁-[GSK (倍癌霉素)]₄K-可替宁) 缩写为可替宁-倍癌霉素。

[0061] 可替宁-生物素和可替宁-倍癌霉素通过使用C18柱的反相纯化。在纯化后, 通过使用配备有Capcell Pak C18柱 (4.6mm×50mm, 120Å) 的Agilent 1100毛细管LC和HPLC系统 (Shimadzu Corp., 日本京都) 质谱, 分析和验证它们。

[0062] 实施例6:ERC6和可替宁负载的复合

[0063] 为了产生ERC6和可替宁偶联的负载的复合物,将可替宁负载和ERC6以1:1的摩尔比通过上下吸液而混合。然后,将混合物在室温下培养30分钟。然后,复合物在体外或体内使用而无需另外的修饰。

[0064] 实施例7:酶联免疫吸附试验(ELISA)

[0065] 将96孔微量滴定板(Corning)的孔用包被缓冲液(蒸馏水中0.1M碳酸氢钠,pH8.6)中的人EGFR(Sigma)或BSA-偶联的可替宁在4℃下包被过夜,并用3%的牛血清白蛋白(BSA)的PBS溶液在37℃下封闭1小时。将在50μL封闭缓冲液中浓度为1μg/mL的抗体加入每个孔中,并在37℃下温育2小时。在用0.05%的吐温20的PBS溶液(PBST)洗涤后,加入在封闭缓冲液中稀释的HRP偶联的抗人IgG(Fab特异性)抗体(Sigma),并在37℃下温育1小时。然后,在用0.05%PBST再次洗涤该板后,向每个孔中加入50μL 3,3',5,5'-四甲基联苯胺底物溶液(TMB)(GenDEPOT,美国德克萨斯州巴克),并且用Multiskan Ascent酶标仪(Labsystems,芬兰赫尔辛基)在650nm下测量吸光度。

[0066] 为了证实ERC6的双特异性,用上述抗体培养人EGFR包被的孔。在用0.05%PBST洗涤后,向每个孔中加入可替宁-生物素,在37℃下培养1小时。然后,加入在封闭缓冲液中稀释的HRP偶联的链霉亲和素(Thermo Fishers Scientific,美国马萨诸塞州沃尔瑟姆),并在37℃下温育1小时。在洗涤后,向每个孔中加入TMB,在650nm下测量吸光度。

[0067] 实施例8:药代动力学分析

[0068] 本实验中使用的所有动物均经韩国国家癌症中心研究所的机构动物护理和使用委员会(IACUC)审查和批准(许可证号:NCC-15-267)。根据AAALAC国际动物护理政策将动物保持在国家癌症中心动物设施中。

[0069] 将8周龄雄性Balb/c小鼠静脉注射以1比1的摩尔比溶解于100μL无菌PBS中的ERC6(200μg)和可替宁-生物素(1.85μg)的复合物(n=4只/组)。在注射后0小时、1小时、24小时、48小时、72小时、96小时和168小时从眶内静脉采集血液样本。将样本在室温下放置2小时直至血液凝固。然后,通过在4℃下以3500rpm离心15分钟获得血清。通过酶联免疫吸附试验(ELISA)测定总ERC6和ERC6复合的可替宁-生物素的循环血清水平。

[0070] 如下测量血清样本中的总ERC6:在4℃下将96孔微量滴定板(Corning)的孔用包被缓冲液中的山羊抗人IgG(Fc特异性)捕获抗体(EMD Millipore,德国达姆施塔特)包被过夜,在37℃下用3%的BSA的PBS溶液封闭1小时。将在封闭缓冲液和标准溶液中稀释的血清样本加入每个孔中,并在37℃下温育2小时。在用0.05%PBST洗涤后,加入在封闭缓冲液中稀释的HRP偶联的抗人C_κ抗体(Thermo Fisher Scientific,美国马萨诸塞州沃尔瑟姆),并在37℃下温育1小时。在洗涤后,向每个孔中加入TMB(GenDEPOT),在650nm下测定吸光度。

[0071] 如下测量血清样本中ERC6和可替宁-生物素的复合物:用如上所述的血清样本培养用人EGFR(Sigma)包被的孔。在用0.05%PBST洗涤后,加入HRP偶联的链霉亲和素(Thermo Fisher Scientific Pierce),并在37℃下培养1小时。在洗涤后,向每个孔中加入TMB,并且在650nm下测量吸光度。

[0072] 实施例9:流式细胞术

[0073] 将A549细胞接种在v形底96孔板(Corning)中,每个样本的终浓度为4×10⁵个细胞。用在流式细胞仪缓冲液(0.1%[重量/体积]的含有1%[重量/体积]BSA的叠氮化钠的

PBS溶液)中稀释的0或100nM的ERC6和可替宁-生物素在37℃下处理细胞30分钟。对于对照实验,使用帕利珠单抗(Synagis,Boehringer Ingelheim Pharma,德国里斯河畔比伯拉赫)、抗可替宁-IgG或西妥昔单抗(Erbitux,Merck K GaA,德国达姆施塔特),代替ERC6。在用流式细胞术缓冲液洗涤后,用藻红蛋白(PE)偶联的链霉亲和素(BD Biosciences Pharmingen,美国加州圣地亚哥)和FITC偶联的抗人IgG(Fc特异性)抗体(Thermo Fisher Scientific Pierce)在黑暗中在37℃下培养细胞1小时。在用相同缓冲液另外洗涤后,将细胞重悬浮于200μL PBS中,并使用配备有488nm激光的FACS Canto II仪器(BD Bioscience,美国加州圣地亚哥)通过流式细胞术分析。检测每次测量为10000个细胞,并用FlowJo软件(TreeStar,美国俄勒冈州阿什兰)分析数据。

[0074] 实施例10:细胞存活率试验

[0075] 使用Cell Titer-Glo试剂(Promega Corp.,美国威斯康辛州麦迪逊)评价ERC6和可替宁-倍癌霉素对肿瘤细胞存活率的作用。将A549细胞接种于黑壁96孔板的50μL RPMI-1640培养基中(每孔4000个细胞),并使其在37℃、5%CO₂和湿润气氛中粘附过夜。然后,将ERC6和可替宁-倍癌霉素的复合物在新鲜培养基中连续稀释10倍(0.02nM至2000nM)。在对照实验中,使用帕利珠单抗(Boehringer Ingelheim Pharma)、或西妥昔单抗(Merck K GaA)代替ERC6。将在50μL培养基中稀释的可替宁-倍癌霉素和抗体加入每个孔中,并培养72小时。在向每个孔中加入Cell Titer-Glo试剂(Promega Corp.)后,根据制造商的说明书,使用微孔板发光计(PerkinElmer,美国马萨诸塞州沃尔瑟姆)测量发光信号。所有实验一式三份进行。通过除以对照发光信号计算相对细胞存活率[存活率%=(测试-背景)/(对照-背景)×100]。

[0076] 实施例11:异种移植

[0077] 六周龄雌性Balb/c裸鼠在每个小鼠的左侧和右侧皮下注射A549(1×10⁷个细胞)。当肿瘤体积达到约150mm³时,将所有动物随机分成三组(n=4只/组)并治疗五周。在前两周,每周两次给小鼠腹膜内注射适当的对照:第I组施用帕利珠单抗(2.15mg/kg)和可替宁-倍癌霉素(95μg/kg);第II组施用ERC6(3mg/kg)和二甲基亚砷(DMSO);第III组施用ERC6(3mg/kg)和可替宁-倍癌霉素(95μg/kg)的复合物。然后,在接下来的三周内每周三次注射三倍剂量的药物。帕利珠单抗用作双特异性抗体的同种型对照。DMSO用作可替宁-倍癌霉素的载剂对照。在注射后32天内,每周两次使用数字卡尺测量肿瘤体积。肿瘤体积计算为长度×(宽度)²×0.5,其中长度是最长轴线,宽度是垂直于长度的距离。通过每周两次测量体重来评价全身毒性。注射后第35天处死小鼠,解剖肿瘤并称重。

[0078] 实施例12:免疫荧光

[0079] Balb/c裸鼠在左侧和右侧皮下注射A549(1×10⁷个细胞)。当肿瘤体积达到500mm³时,通过以下单次腹膜内(i.p.)注射施用于具有肿瘤的小鼠:第I组施用144μg帕利珠单抗和1.85μg可替宁-生物素;第II组施用200μg ERC6和载剂(蒸馏水);第III组施用ERC6(200μg)和可替宁-生物素(1.85μg)的复合物。在注射后24小时内,用异氟烷麻醉小鼠并通过经心脏灌注10ml 4%[重量/体积]的多聚甲醛PBS溶液实施安乐死。将解剖的肿瘤在含有30%[重量/体积]蔗糖的PBS溶液的冷冻保存溶液中,在4℃下平衡24小时,并在液氮中在最佳切割温度包埋培养基(Sakura Finetek,美国加州托伦斯)中冷冻,并且储存在-80℃下直至切割。对于免疫荧光染色,制备厚度为4μm的冷冻切片,并在室温下用4%的多聚甲醛PBS溶液

固定10分钟。在用PBS洗涤后,用10% [体积/体积]的常规山羊血清 (CST,美国马萨诸塞州丹佛)的IHC-Tek抗体稀释溶液 (pH 7.4) (IHC WORLD,美国马里兰州伍德斯托克),在室温下封闭这些切片1小时。将这些组织切片用Alexa Fluor 488偶联的链霉亲和素 (Molecular Probes Inc.,美国俄勒冈州尤金)培养8小时,并在黑暗中以4°C的湿润室中用Alexa Fluor 594偶联的抗人IgG抗体 (Molecular Probes Inc.)染色16小时。在用PBS洗涤后,根据制造商的说明,用4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI;Pierce,美国伊利诺伊州罗克福德)染色细胞核。将切片固定在具有荧光固定培养基 (DAKO,丹麦格洛斯楚普)的载玻片上,并使用FV1000激光扫描显微镜 (Olympus,日本东京)用FV10ASW软件获得40倍放大图像。布置发射滤光器和激发滤光器以便以三种颜色成像。

[0080] 统计分析

[0081] 使用GraphPad Prism 5.0版软件 (GraphPad Software Inc.,美国加州圣地亚哥)进行实验中使用的统计。结果表示为指定数量的单独测量的±标准偏差 (SD)的平均值。使用双尾未配对Student t检验确定统计学显著性,并且小于0.05的P值被认为是统计学上显著的。P值在图中和它们的图例中表示。

[0082] 实验实施例1:使用四价双特异性抗体形式的抗体药物偶联物平台的设计

[0083] 通过将两个单链可变片段 (scFv)融合到重链 C_{H3} 结构域中,设计了基于IgG的四价形式的双特异性抗体 (图1a)。为了灵活性,将富含甘氨酸和丝氨酸的肽接头 [(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃]插入 C_{H3} 结构域和scFv之间。由此,产生含有2个双特异性抗体的Fab臂和2个重链C末端的scFv的四价抗体,从而同时分别靶向表皮生长因子受体 (EGFR)和可替宁。为了开发双特异性西妥昔单抗×抗可替宁scFv抗体 (ERC6),将编码西妥昔单抗IgG、接头和抗可替宁scFv的基因结构克隆到真核表达载体中,使用蛋白A亲和柱色谱从临时转染的HEK393F培养上清液中纯化ERC6。

[0084] 传统抗体药物偶联物需要用于偶联物的多步过程以使药物与抗体偶联,并且通常优化过程是必需的。另一方面,使用可替宁偶联的双特异性抗体的靶向药物递送需要可替宁和药物的偶联。因此,如果建立了羧基可替宁 (反式-4-可替宁羧酸)化学交联过程,则该平台与传统ADC相比将存在优势。两个羧基可替宁在13个氨基酸长度的肽的N-末端和C-末端交联。通过效价效应,双特异性抗体与二价可替宁交联的肽的结合能力更稳定 (图5)。根据目的,各种负载可以与肽中赖氨酸的ε-氨基酸链偶联。在本发明中,生物素或倍癌霉素与二价可替宁偶联的肽偶联 (图2b,图3c)。

[0085] 实验实施例2:双特异性西妥昔单抗×抗可替宁scFv抗体 (ERC6)的性质

[0086] 为了分析纯化的ERC6的纯度和分子量,在用考马斯亮蓝染色的十二烷基硫酸钠 (SDS)聚丙烯酰胺凝胶中使ERC6可视化。在非还原条件下观察到分子量为206kDa的主要条带,在非还原条件下观察到78kDa和25kDa的两个主要条带 (图1b)。分子量为206kDa的重组蛋白质对应于由ProtParam工具 (ExPASy)预期的完全组装的ERC6。通过还原二硫键使25kDa的未修饰轻链和75kDa的与 C_{H3} 结构域上的一个scFv融合的重链可视化。因此,数据证明双特异性抗体是纯的并且在没有损害的情况下制备。

[0087] 通过使用高压液相色谱的尺寸排阻色谱 (SEC-HPLC)分析纯化的重组蛋白质的物理化学性质。ERC6显示为具有对应于正确组装形式的清晰分子量的单一主峰。这些数据示ERC6不产生片段,并且它没有聚集,并且它产生多聚体 (图1c)。

[0088] 另外,为了测量体内ERC6的稳定性,进行药代动力学分析。在Ba1b/c小鼠中测定ERC6的血清半衰期($n=4$ 只)。使用从眼眶静脉采集的血液样本,通过酶联免疫吸附试验(ELISA)测定ERC6的循环血清水平。静脉内注射的ERC6在小鼠血清中稳定到第5天,这与西妥昔单抗IgG的结果相似。

[0089] 实验实施例3:ERC6对人EGFR和可替宁的结合反应性

[0090] 为了实验ERC6对EGFR和可替宁的反应性,将实施酶免疫试验(图2a)。由于证实了ERC6与EGFR的结合活性,证实了对EGFR的反应性与另外的scFv无关。此外,证实了抗可替宁scFv模块对可替宁的亲合力被保持(图2a)。

[0091] 为了确定ERC6是否同时结合人EGFR和可替宁,使用链霉亲和素-生物素检测系统进行额外的酶免疫试验。在用ERC6培养人EGFR包被的微量滴定板后,向每个孔中加入与生物素交联的二价可替宁-偶联的肽(可替宁-生物素)(图2b),然后加入HRP偶联的链霉亲和素。ERC6同时与EGFR和可替宁偶联(图2c)。

[0092] 为了评价与ERC6形成复合物时可替宁负载的稳定性,进行药代动力学分析。将用可替宁-生物素预培养的ERC6静脉内注射给小鼠($n=4$ 只),并通过ELISA测量循环血清水平。由于其低分子量,可替宁负载在小鼠血流中被快速清除($t_{1/2}=0.557h$)。另一方面,通过与ERC6结合,可替宁-生物素的循环半衰期延长($t_{1/2}=18$ 小时)(图2d)。ERC6与可替宁的二元性通过增加的结合能力增强了ERC6复合的可替宁-生物素的稳定性(图6)。此外,可替宁-生物素的清除模式与ERC6的分解模式相匹配,这意味着偶联物的半衰期主要取决于ERC6的药代动力学(图2d)。

[0093] 实验实施例4:ERC6复合的可替宁-倍癌霉素诱导对具有KRAS突变的肺腺癌细胞的强烈细胞毒性作用。

[0094] A549是表达野生型EGFR、具有KRAS突变的肺腺癌细胞系,显示出对EGFR靶向治疗(例如西妥昔单抗)的原发性耐药性。因此,为了测试ERC6偶联的可替宁细胞毒剂对具有野生型EGFR和KRAS突变的癌细胞的功效,使用该细胞系。

[0095] 在细胞毒性分析之前,通过流式细胞术分析证实了EGFR在A549细胞表面上的表达(图3a)。ERC6显示出与质膜中表达的EGFR相似的结合活性,该结合活性与西妥昔单抗的水平相似。如预测的,当存在ERC6时,可替宁-生物素显示出对A549细胞的结合活性。可替宁-生物素和抗可替宁IgG或西妥昔单抗的混合物不产生任何来自链霉亲和素-PE的显著信号。另外,可替宁-生物素不影响ERC6与EGFR的结合能力。这些数据证明ERC6通过同时结合活性以靶向特异性方式介导可替宁-生物素递送至EGFR阳性细胞。

[0096] 通过细胞存活率分析研究了对A549细胞的细胞毒性活性(图3e)。通过测量与可存活细胞的数量直接相关的细胞ATP含量来确定相对细胞存活率。没有负载的倍癌霉素(游离倍癌霉素)显示出比可替宁-倍癌霉素更强的抗肿瘤作用(图3d、图3e)。如果可替宁-倍癌霉素的毒性低于游离倍癌霉素,则通过细胞质膜的渗透效果较差。

[0097] ERC6或西妥昔单抗也不能显著地抑制A549细胞的增殖,这是由于A549细胞对EGFR靶向治疗的原发性耐药性(图3e)。然而,当使ERC6和可替宁-倍癌霉素结合时,与西妥昔单抗或阴性对照的抗体相比,细胞毒性作用相比可替宁-倍癌霉素混合物显著增强。

[0098] 最大抑制浓度的一半(IC_{50})为0.3nM。实验结果表明,ERC6通过受体介导的内吞作用有效促进可替宁-倍癌霉素与EGFR阳性细胞的内化。结果是,克服了KRAS介导的ERC6复合

的可替宁-倍癌毒素的原发性耐药性。

[0099] 此外,通过另外的实验,实验了其中ERC6和可替宁-美坦新(Cot-DM1)结合的抗体药物偶联物的细胞毒性作用。该抗体药物偶联物也显示出对A549细胞系的显著高的细胞毒性作用,与可替宁-倍癌毒素结合的偶联物相同(图6b)。

[0100] 实验实施例5:ERC6复合的可替宁-倍癌毒素在具有肺腺癌的动物模型中抑制肿瘤生长

[0101] 为了评价ERC6复合的可替宁-倍癌毒素的体内功效,将西妥昔单抗难治性A549细胞移植到小鼠(n=4只/组)。当肿瘤体积达到150mm³时,给小鼠腹膜内注射帕利珠单抗和可替宁-倍癌毒素、ERC6和载剂、或ERC6复合的倍癌毒素五周。每周两次给小鼠施用药物持续两周,然后每周三次施用持续三周。

[0102] 与仅用可替宁-倍癌毒素或ERC6治疗的动物相比,接受ERC6复合的可替宁-倍癌毒素的小鼠显示抑制肿瘤生长(图4a)。尽管可替宁-倍癌毒素在体外显示出对A549有效的抗增殖作用,但双特异性抗体的同种型对照并未抑制体内肿瘤生长。该观察结果表明,只有可替宁-倍癌毒素不能选择性地递送到肿瘤部位并抑制肿瘤生长。由于非特异性和低分子量而从小鼠血流中快速清除可以解释这种功效不足。另一方面,ERC6允许可替宁-倍癌毒素延长循环半衰期并被递送至表达EGFR的肿瘤组织。因此,ERC6和可替宁-倍癌毒素在体内协同增加EGFR阳性西妥昔单抗难治性肿瘤的抗增殖功效。

[0103] 此外,在5周的治疗期间,小鼠没有显著的体重减轻(图4b)。该观察结果间接地意味着ERC6和可替宁-倍癌毒素没有全身毒性。因此,这些数据表明ERC6可以作为药物递送系统起作用,并以靶向特异性方式选择性地递送可替宁的细胞毒性药物递送至表达EGFR的肿瘤组织而没有全身毒性。

[0104] 实验实施例6:ERC6复合的可替宁负载在小鼠异种移植肿瘤模型中的组织分布

[0105] 药代动力学证明ERC6复合的负载的循环半衰期通过与ERC6结合而延长。为了研究可替宁负载特异性递送到表达抗原的肿瘤组织中,在A549异种移植小鼠模型中进行免疫荧光分析。将A549细胞皮下注射到每只Balb/c裸鼠的左侧。当肿瘤达到500mm³时,将帕利珠单抗和可替宁-生物素、西妥昔单抗和载剂、或ERC6复合的可替宁-生物素腹膜内注射到具有肿瘤的小鼠中。在注射24小时之后,将动物处死,并且将解剖的肿瘤组织离体成像。通过荧光标记的二级抗体检测肿瘤组织中的可替宁负载和抗体。通过Alexa 594标记的抗人Fc检测抗体(红色),并通过Alexa 488标记的链霉亲和素检测可替宁-生物素(绿色)。作为参考,通过DAPI染色细胞核(蓝色),图像放大倍数x40。通过共聚焦显微镜观察ERC6复合的可替宁-生物素的组织分布。

[0106] 与用作双特异性抗体的同种型对照的帕利珠单抗相比,在人EGFR阳性肿瘤组织中观察到ERC6的积累。另外,仅在注射ERC6的情况下观察到可替宁-生物素在肿瘤中的位置。由于其低分子量,不含ERC6的可替宁-生物素可以在血流中被快速清除。该观察结果表明,ERC6在体内以靶标特异性方式选择性地递送可替宁负载至期望的肿瘤部位。

<110> 首尔大学校产学协力团
 <120> 使用双特异性抗体的抗体药物偶联物平台
 <130> PCT17-057, SNU-2016-0600-US-PC
 <150> US 62/352,804
 <151> 2016-06-21
 <160> 10
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 抗可替宁scFv的重链

<400> 1

```

gaggtgcagc  tggaggagag  cgggggcggc  ctggtgcagc  ctggaggaag  cctgcgactg  60
tcctgtgcag  cttctggaca  cctgcggaga  agggactgga  tgaactgggt  gcggcaggca  120
ccaggaaaag  gcctggagtg  ggtcgcagcc  atcggacgat  ccggcgacac  ctactatgct  180
acatgggcaa  aaggcagggt  cacaattagt  gctgatactt  caaagaacac  cgcatacctg  240
cagatgaata  gtctgagggc  cgaagacact  gctgtgtact  attgctcccg  catcccttat  300
tttgggtgga  acaatggaga  tatttggggg  caggaacac  tggtgactgt  cagctcc  357
  
```

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗可替宁scFv的重链

<400> 2

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly His Leu Arg Arg Arg Asp
           20           25           30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
           35           40           45
Ala Ala Ile Gly Arg Ser Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
           50           55           60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
65           70           75           80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
  
```

	85		90		95
Arg Ile Pro Tyr Phe Gly Trp Asn Asn Gly Asp Ile Trp Gly Gln Gly					
	100		105		110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser					
	115				
<210> 3					
<211> 330					
<212> DNA					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 抗可替宁scFv的轻链					
<400> 3					
gacatccaga tgacacagtc tccatctagt ctgagtgcac cagtgggcga tagagtcacc 60					
attacatgtc agtcaagcca gagtcctac tcaaacgagt ggctgagctg gtatcagcag 120					
aagcccggaa aagcccctaa gctgctgac tacagatta gcacactggc ttccggcgtg 180					
ccttctcggc tcagcggctc cagatctggg actgacttta ctctgacct ctctctctg 240					
cagccagagg atttcgcaac ctactattgc gccggcgggt ataattttgg cctgttctctg 300					
tttggccagg ggaccaaagt ggaaattaag 330					
<210> 4					
<211> 110					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 抗可替宁scFv的轻链					
<400> 4					
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly					
1	5		10		15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Pro Tyr Ser Asn					
	20		25		30
Glu Trp Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu					
	35		40		45
Leu Ile Tyr Arg Ile Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe					
	50		55		60
Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu					
65	70		75		80
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Asn Phe					
	85		90		95
Gly Leu Phe Leu Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys					
	100		105		110

<210> 5

<211> 1347

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 西妥昔单抗的重链

<400> 5

```

caggtgcagc tgaagcagag cggccccgga ctggtgcagc cctcacagag cctgtccatc 60
acttgcaccg tgagtggctt ctcaactgaca aactacggag tccactgggt gcgacagagc 120
cctggcaagg ggctggagtg gctgggcgtg atctgggtccg gagggaacac tgactataat 180
actcccttca ccagccgget gtccattaac aaggataact ctaagagtca ggtgttcttt 240
aagatgaact ctctgcagag taatgacaca gctatctact attgcgctcg cgcactgact 300
tactatgatt acgagttcgc atattgggga cagggcacac tggtcaccgt gagegcccgc 360
agcaccaagg gaccagcgt gtttccactg gccccagct ccaaatcaac cagcggagga 420
acagcagccc tgggatgtct ggtgaaggac tacttcccag aaccctcac agtgtctctgg 480
aactctgggg cactgacatc tggagtccat acttttccag ccgtgctgca gtctagtggg 540
ctgtacagcc tgtcaagcgt ggtcactgtc ccctcctcta gtctgggaac acagacttat 600
atctgcaacg tgaatcacia gccaaagtaat accaaggtcg acaaaagagt ggagcccaag 660
agctgtgata aaaccatac atgccccctt tgtcctgcac cagaactgct ggggggacct 720
tccgtgttcc tgtttccacc caagcctaaa gacaccctga tgatttctag gactcccagag 780
gtcacctgcg tggctcgtgga cgtgagccac gaggatcctg aagtcaagtt caactggtac 840
gtggatggcg tcgaagtgca taatgctaag acaaacctc gggaggaaca gtacaacagc 900
acttatagag tcgtgtccgt cctgaccgtg ctgcaccagg attggctgaa cgggaaagag 960
tataagtgca aagtgagcaa taaggccctg cccgctccta tcgagaaaac catttccaag 1020
gccaaaggcc agcctagggg accacaggtg tacacactgc ctccatcccg cgaggaaatg 1080
accaagaacc aggtctctct gacatgtctg gtgaaaggat tctatccttc agacatcgct 1140
gtggagtggg aaagcaatgg ccagccagag aacaattaca agaccacacc ccctgtgctg 1200
gacagtgatg gctcattctt tctgtattct aagctgaccg tggataaaaag tcgatggcag 1260
caggggaatg tcttttctg ttctgtgatg cacgaagccc tgcacaacca ttacaccag 1320
aagagcctga gcctgtcccc cggcaaa 1347

```

<210> 6

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 西妥昔单抗的重链

<400> 6

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln

1

5

10

15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

	325		330		335
Thr	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr				
	340		345		350
Leu	Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr				
	355		360		365
Cys	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu				
	370		375		380
Ser	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu				
385		390		395	400
Asp	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys				
	405		410		415
Ser	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu				
	420		425		430
Ala	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly				
	435		440		445

Lys

<210> 7

<211> 642

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 西妥昔单抗的轻链

<400> 7

```

gatattctgc tgactcagag ccccgtagatt ctgtctgtca gccccggcga gcgggtgtct 60
ttcagttgca gagcatcaca gagcatcgga acaaatattc actggtacca gcagaggact 120
aacggctccc cacgcctgct gatcaagtat gttccgaat ctatcagtgg gattccctct 180
cggttctcag gcagcgggtc cggaacagac ttactctgt ctatcaatag tgtggagtca 240
gaagacattg cggattacta ttgccagcag aacaataact ggcctaccac attcggcgct 300
gggaccaagc tggagctgaa acgaacagtg gccgetcaa gtgttctcat tttcccct 360
agcgacgaac agctgaaate cgggaccgcc tctgtgtct gtctgctgaa taacttttac 420
cctagagagg caaaggtgca gtggaaagtc gataatgcc tgcagagcgg aaactcccag 480
gagtctgtga ctgaacagga cagtaaggat tcaacctata gcctgagctc cactctgacc 540
ctgtccaaag ctgattacga aaagcataaa gtctatgcat gtgaggtcac tcatcagggg 600
ctgtccagtc cagtcaccaa gtccttcaat cggggggaat gc 642

```

<210> 8

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 西妥昔单抗的轻链

<400> 8

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30
 Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 9

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 包含双特异性西妥昔单抗x抗可替宁抗体的四价复合物的轻链

<400> 9

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30
 Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 10
 <211> 715
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 包含双特异性西妥昔单抗x抗可替宁抗体的四价复合物的重链
 <400> 10
 Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

355	360	365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
370	375	380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
385	390	395
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
405	410	415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
420	425	430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
435	440	445
Lys Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
450	455	460
Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro		
465	470	475
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly His Leu Arg Arg		
485	490	495
Arg Asp Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
500	505	510
Trp Val Ala Ala Ile Gly Arg Ser Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp		
515	520	525
Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala		
530	535	540
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
545	550	555
Cys Ser Arg Ile Pro Tyr Phe Gly Trp Asn Asn Gly Asp Ile Trp Gly		
565	570	575
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
580	585	590
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln		
595	600	605
Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val		
610	615	620
Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Pro Tyr Ser Asn Glu Trp Leu		
625	630	635
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr		
645	650	655
Arg Ile Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser		
660	665	670

Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
675 680 685

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Asn Phe Gly Leu Phe
690 695 700

Leu Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
705 710 715

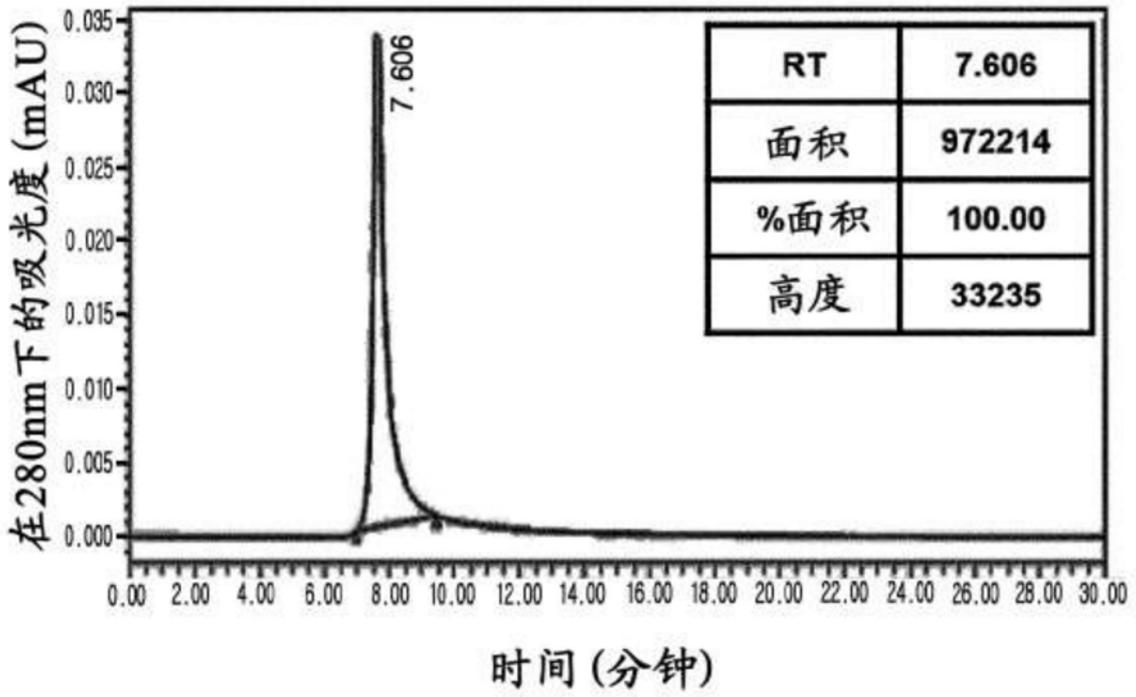


图1c

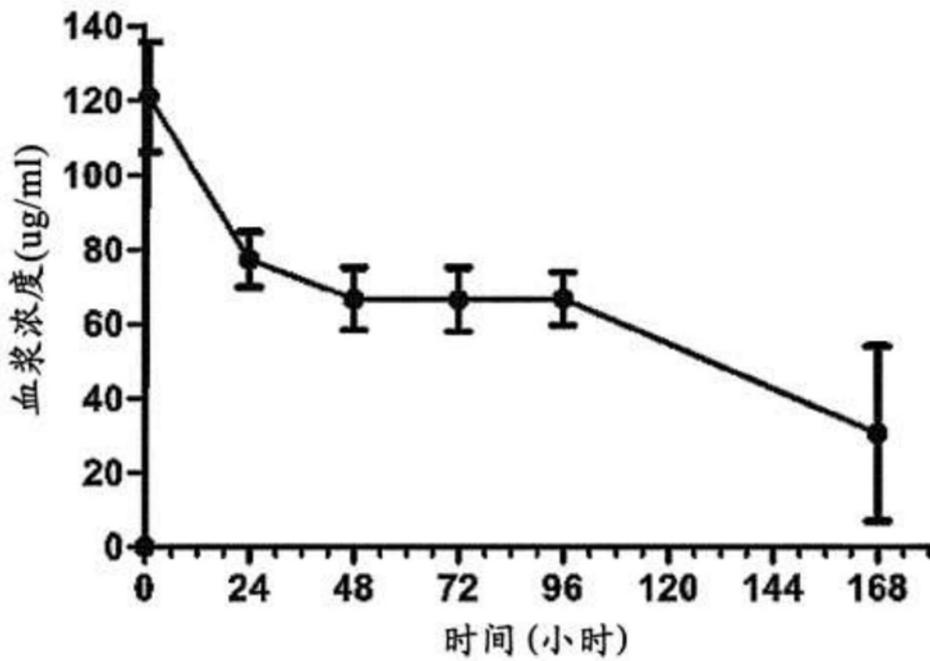


图1d

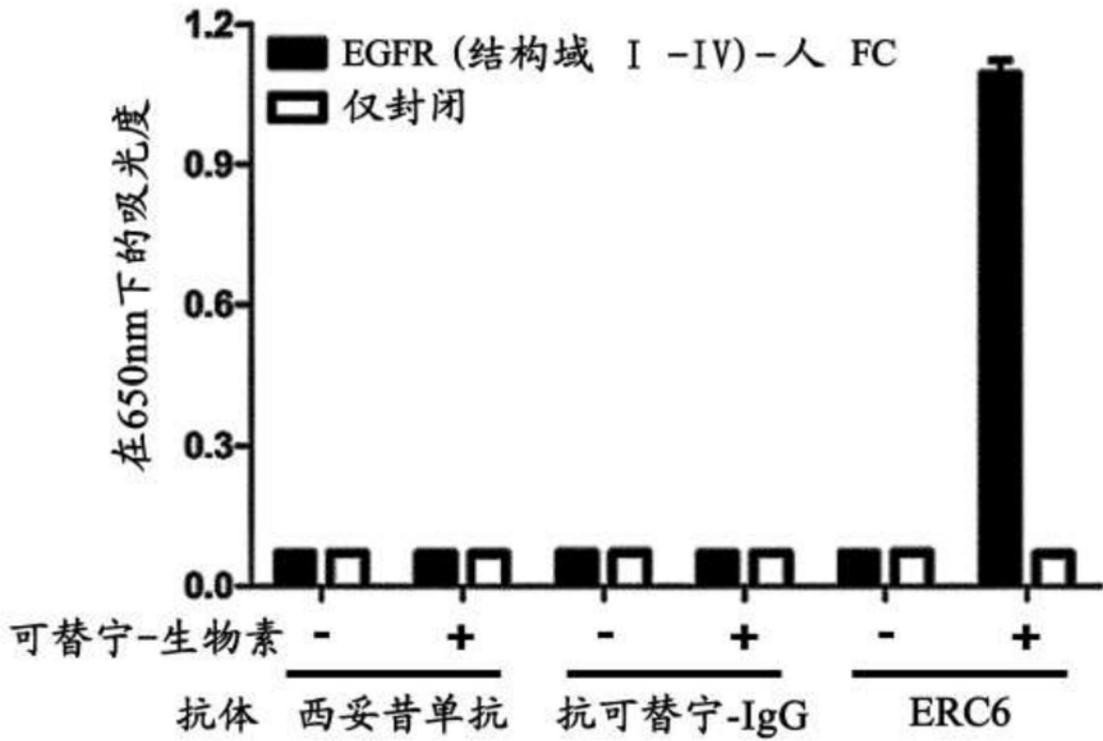


图2c

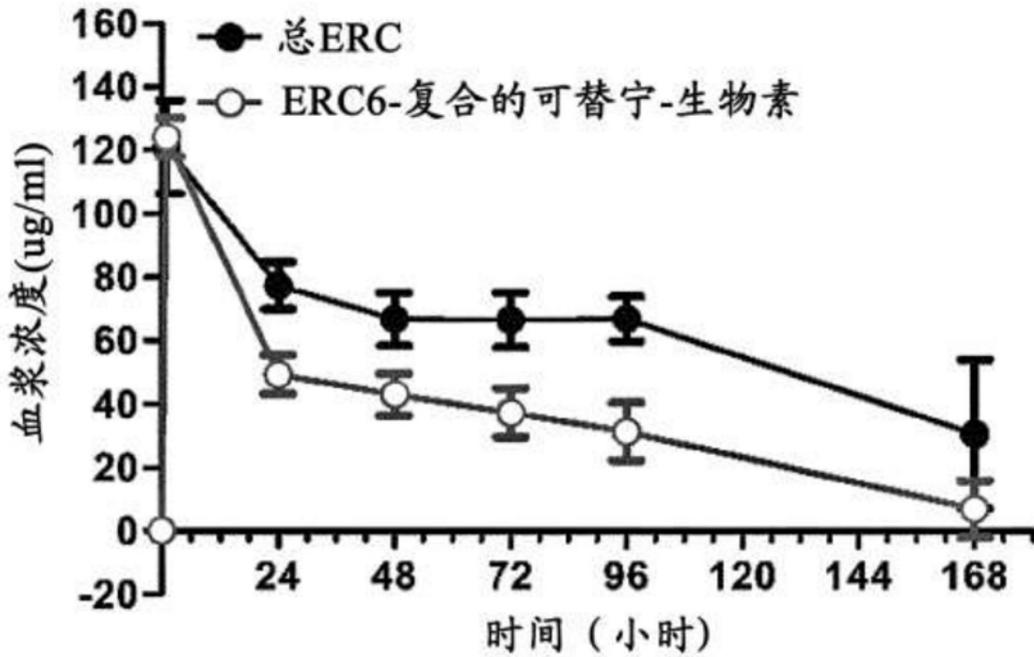


图2d

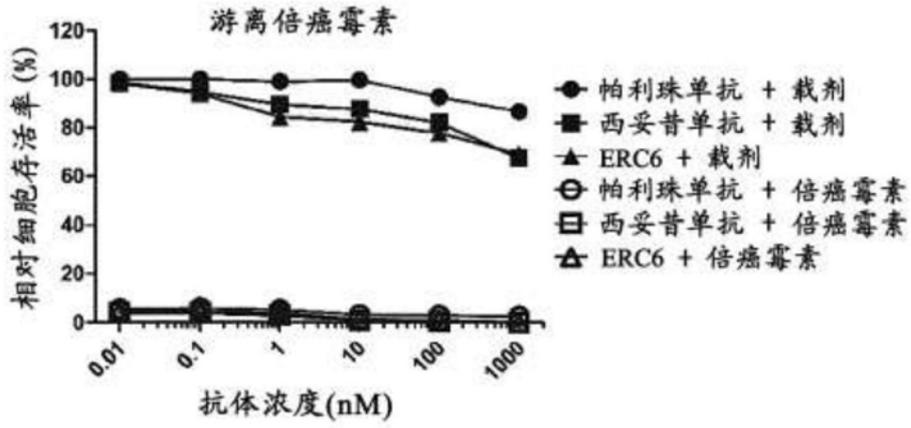


图3d

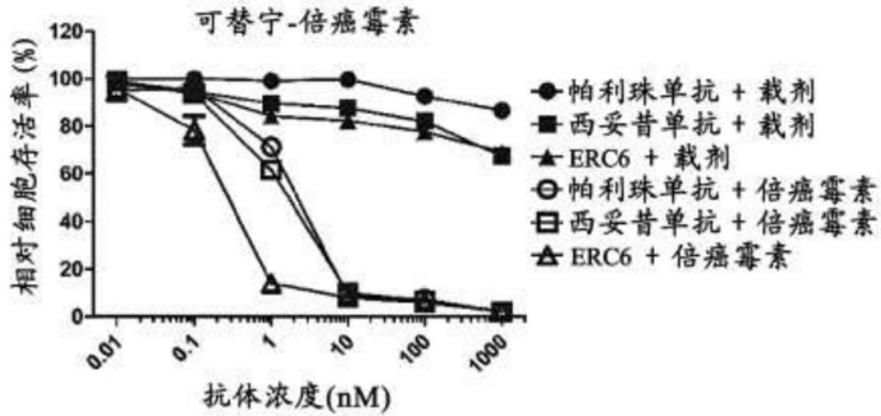


图3e

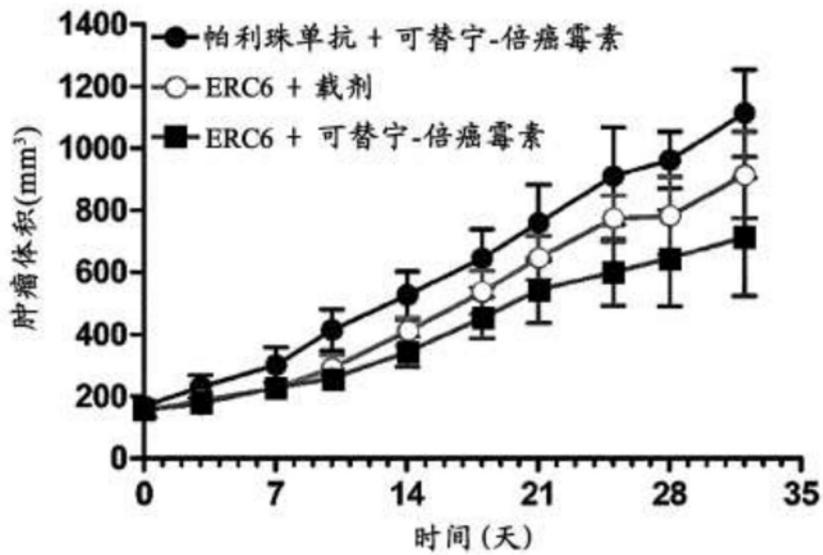


图4a

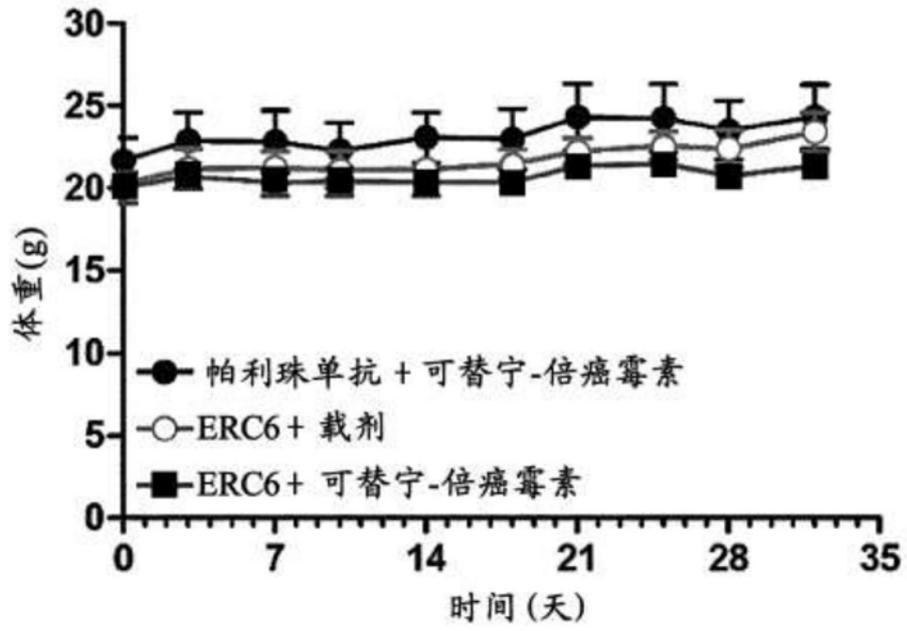


图4b

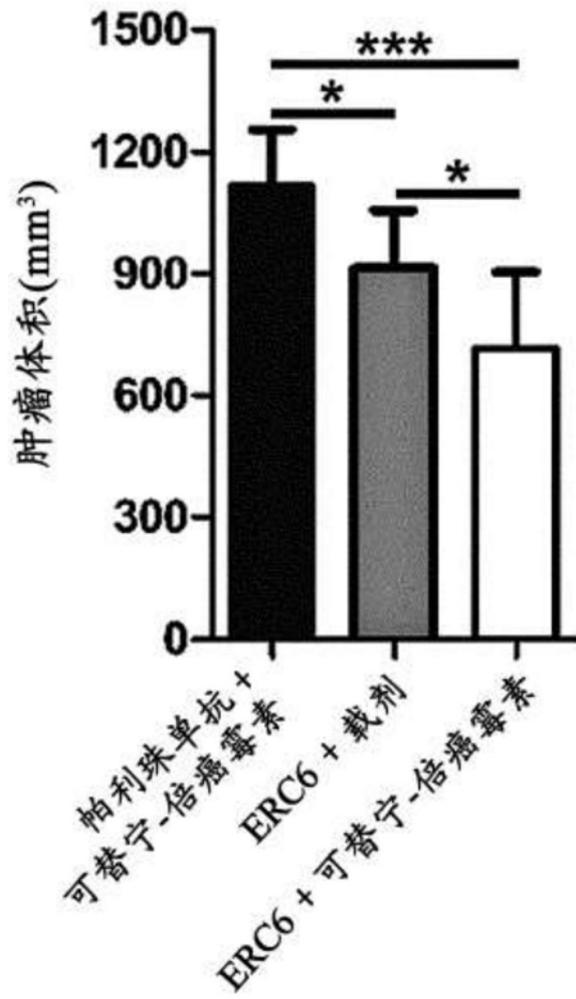


图4c

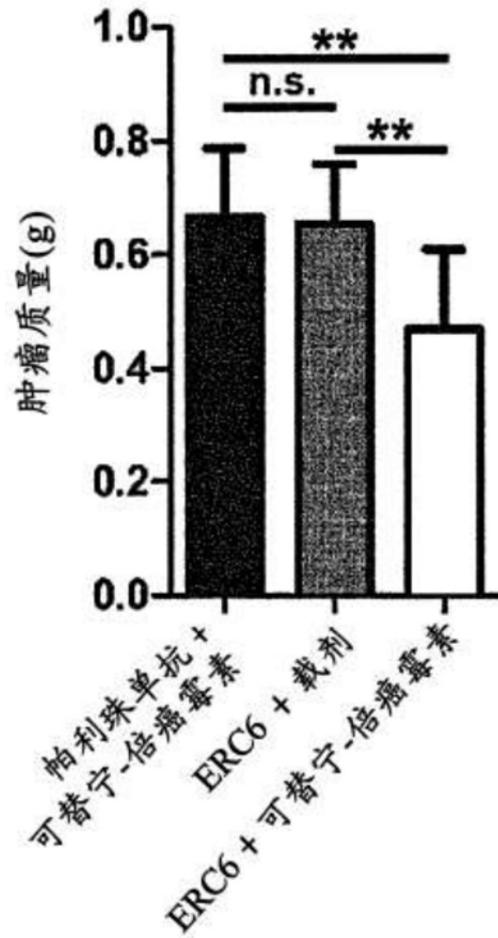
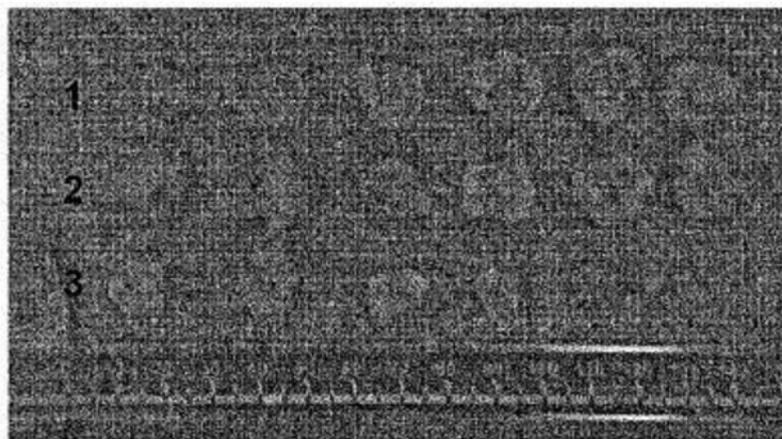


图4d



- 1. 帕利珠单抗 + 可替宁-倍癌霉素
- 2. ERC6 + 载剂
- 3. ERC6 + 可替宁-倍癌霉素

图4e

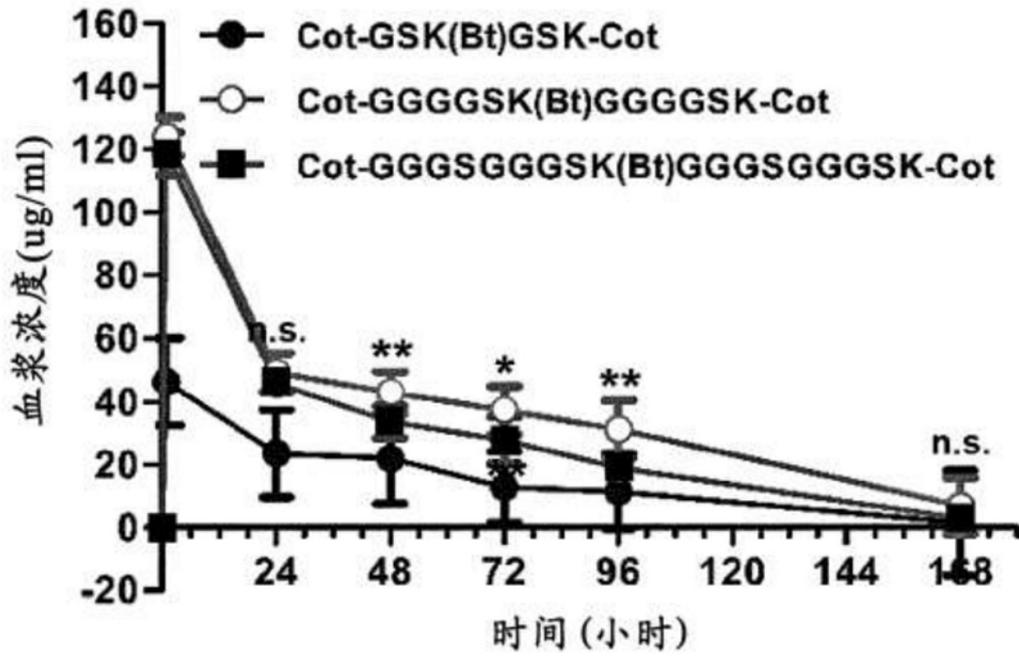


图5a

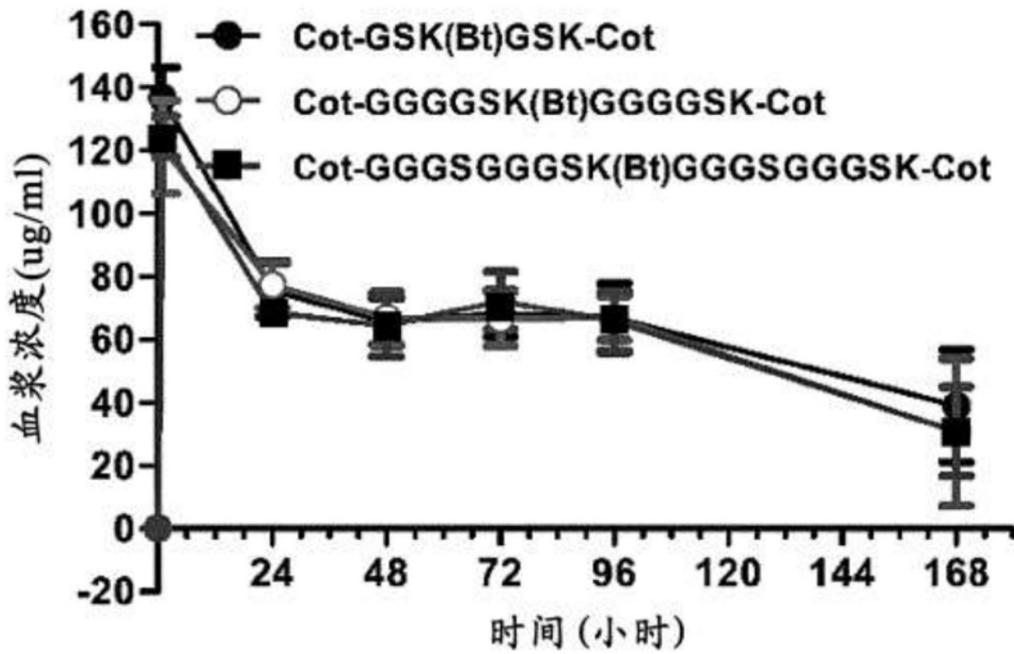


图5b

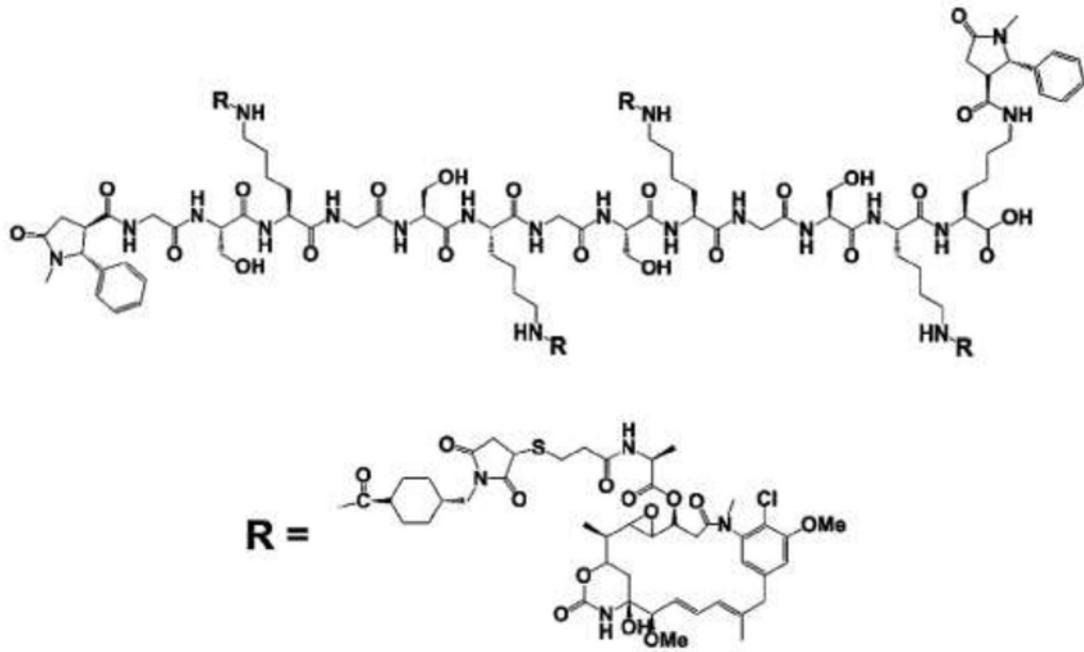


图6a

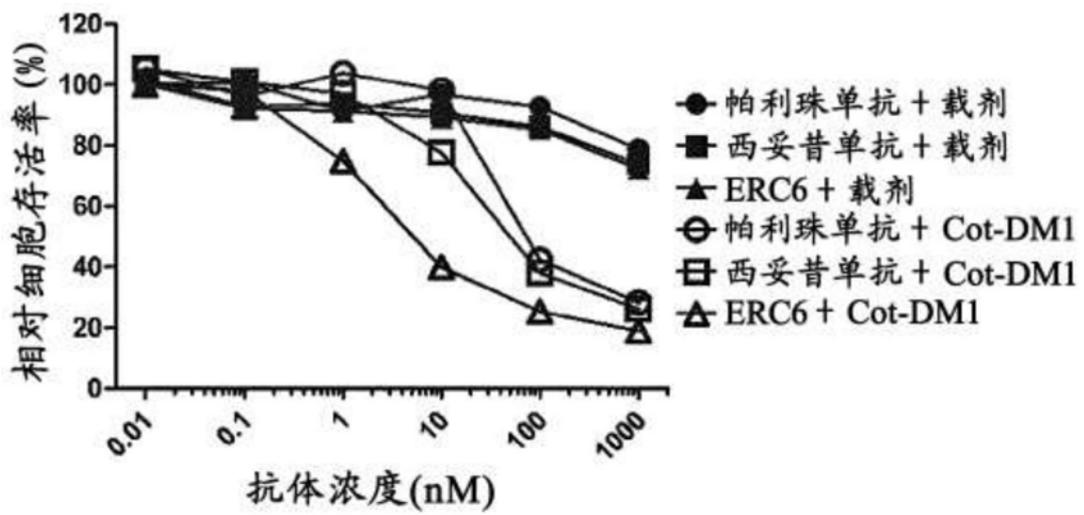


图6b