

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2016年7月14日 (14.07.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/110267 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 16/46 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01) G01N 33/577 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/070447

(22) 国际申请日: 2016年1月8日 (08.01.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201510008045.8 2015年1月8日 (08.01.2015) CN

(71) 申请人: 苏州康宁杰瑞生物科技有限公司 (SUZHOU ALPHAMAB CO., LTD) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市苏州工业园区星湖街218号生物纳米园C23, Jiangsu 215125 (CN)。

(72) 发明人: 徐霆 (XU, Ting); 中国江苏省苏州苏州工业园区星湖街218号生物纳米园C23, Jiangsu 215125 (CN)。 须涛 (XU, Tao); 中国江苏省苏州苏州工业园区星湖街218号生物纳米园C23, Jiangsu 215125 (CN)。 汪鼎鼎 (WANG, Xiaoxiao); 中国江苏省苏州苏州工业园区星湖街218号生物纳米园C23, Jiangsu 215125 (CN)。 李倩 (LI, Qian); 中国江苏省苏州苏州工业园区星湖街218号生物纳米园C23, Jiangsu 215125 (CN)。 逢敏洁 (PANG, Minjie); 中国江苏省苏州苏州工业园区星湖街218号生物纳米园C23, Jiangsu 215125 (CN)。 张慧敏 (ZHANG, Huimin); 中国江苏省苏州苏州工业园区星湖街218号生物纳米园C23, Jiangsu 215125 (CN)。 韩莉 (HAN, Li); 中国江苏省苏州苏州工业

园区星湖街218号生物纳米园C23, Jiangsu 215125 (CN)。 张庆青 (ZHANG, Qingqing); 中国江苏省苏州苏州工业园区星湖街218号生物纳米园C23, Jiangsu 215125 (CN)。

(74) 代理人: 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 (CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE); 中国北京市西城区阜成门外大街2号万通新世界广场8层, Beijing 100037 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: BISPECIFIC ANTIBODY OR ANTIBODY MIXTURE WITH COMMON LIGHT CHAINS

(54) 发明名称: 具有共同轻链的双特异性抗体或抗体混合物

(57) Abstract: The present invention provides a bispecific antibody or an antibody mixture with common light chains and a preparation method therefor. The present invention also provides a nucleic acid molecule encoding the antibody or the mixture, a recombinant vector and a recombinant cell comprising the nucleic acid molecule, as well as a detection and quantification method for the antibody or the mixture.

(57) 摘要: 本发明提供了具有共同轻链的双特异性抗体或抗体混合物及其制备方法。本发明还提供了编码所述抗体或混合物的核酸分子、含有该核酸分子的重组载体和重组细胞, 以及所述抗体或混合物的检测和定量方法。



WO 2016/110267 A1

具有共同轻链的双特异性抗体或抗体混合物

技术领域

本发明涉及双特异性抗体或抗体混合物，以及所述双特异性抗体或抗体混合物的制备方法。本发明还涉及编码所述双特异性抗体或抗体混合物的核酸分子、含有该核酸分子的重组载体和重组细胞，以及所述双特异性抗体或抗体混合物的检测和定量方法。

背景技术

单克隆抗体药物的上市在近十五年内增长迅速，成为制药行业的成长点。自 1996 年起，一共有 30 个左右单抗药物被批准上市。其中有九个单抗药物年销售超过十亿美元。2010 年单抗药物总销售超过 300 亿美元，并且年增长率超过 10%。由于单克隆抗体的靶标特异性强，只能抑制单一靶点，而在多种疾病中，包括肿瘤和自体免疫性疾病等，需要抑制多重信号通路来避免代偿效应。对于病毒感染疾病，由于病毒的高突变率，往往需要抑制多抗原位点来防止逃逸。因此，有以下几种备选方案可以解决此类问题。一种备选方案是使用多克隆抗体，或通过改造抗体 Fc 段获得异二聚体如双特异性抗体，至少可以对两个不同抗原或者同一个抗原的不同结合位点具有活性。还有一种方案是使用抗体混合物来治疗，抗体混合物可包含两种或更多种针对同一靶物上不同表位的抗体，或针对不同靶物的抗体的混合物。

双特异性抗体 (Bispecific antibody, BsAbs) 是含有两个不同配体结合位点的免疫球蛋白分子。它取代了经典的抗体 Fab 两臂相同的序列，而是用两个不同的 Fab 序列，因此 Y 型两臂可以结合不同的抗原表位。双特异性抗体在癌症治疗中的应用已经被多篇文献所综述 (Carter 2001; Chames and Baty 2009; Chames and Baty 2009)。BsAbs 的一臂可以连接肿瘤细胞表面的相关抗原而另外一臂则可以触发免疫效应细胞进一步杀伤细胞，通过免疫系统来杀死癌症肿瘤细胞。

对于双特异性抗体的制备，早在 90 年代，Carter 等人用“把手-孔洞”(knob into hole)模型改造抗体重链的部分氨基酸，比较成功的实现了双特异性抗体的制备 (Ridgway, Presta et al. 1996; Carter 2001)。然而在他们的研究结果中，“孔洞-孔洞”模型对阻碍同二聚体的形成的能力仍然不够，依旧遗留了大概有 5% 的同二聚体。之后该研究组通过随机突变-噬菌体展示等方法进一步提高异二聚体的含量，但也没有解决根本问题。

本发明的发明人通过电荷氨基酸相互作用网络修改 Fc 的 CH3 相关氨基酸来减弱区域自身相互作用（有利于形成同二聚体）并增强区域之间的相互作用（有利于形成异二聚体），成功的解决了“把手-孔洞”模型中 5% 同二聚体的残留，相关方法已经发表专利（公开号：CN102558355A）。

相对异二聚体平台技术，混合抗体生产平台的发展相对比较早期。其中最受关注的是丹麦的 Symphogen A/S 公司的抗体混合物技术。该技术首先通过抗体筛选平台的筛选获得多个针对同一靶标的抗体，随后针对每个抗体分别进行细胞株构建。之后将不同细胞摇瓶培养的种子液进行混合，最后进行混合物逐步扩大培养放大，并进行纯化工艺优化获得最终的产品。尽管使用这一方法通过培养多个细胞的混合群可以直接从一个重组生产过程中获得多个抗体，但是由于对混合细胞群培养的控制的难度，以及因此带来的放大生产的复杂性，使得该方案依然有一些潜在的问题。

本发明申请人通过对 Fc 部分进行突变，改变 Fc 直接相互作用，发明了一种用于在单一重组细胞中生成包含两种或多种同二聚体蛋白或抗体混合物的方法。该方案避免了混合细胞培养带来的工艺控制及放大的潜在困难，提供了一种更为经济有效的抗体混合物制备与生产方式。此方案也已发表专利（公开号：CN 103388013A）。

但不论上述哪种方法，在利用全抗体框架制备双特异性抗体或抗体混合物时，都可能出现轻链和重链之间错配的现象，进而影响抗体的活性，目前本领域比较成熟的方法是 Roche（Genentech）开发的 Crossmab，即通过对其中一组 Fab 进行轻链-重链序列的互相替换来防止该轻链序列与另一组轻链-重链之间的错配（专利号 US20090162359, US20120164726）。此方法虽然能解决大部分的重链-轻链错配问题，但是又会因为对重轻链序列进行人为改造而带来新的问题，如轻链的解离，聚体含量增加，以及对有些 Fab 序列，会对抗原表位的识别造成一些影响。

赫赛汀（Herceptin，也叫曲妥珠单抗，Trastuzumab）作为第一个在乳腺癌中显示有切实疗效的治疗性单抗，为人类的抗人类表皮生长因子受体 2(HER2)单克隆抗体，它作用于乳腺癌细胞的 HER2-Neu 表面蛋白，干扰癌细胞的生物学进程，最终致其死亡。赫赛汀（Herceptin）的主要适宜人群是 HER2 过度表达（免疫组化 3+ 或者荧光原位杂交 FISH 阳性）的乳腺癌患者，而该人群约占所有乳腺癌患者的 20~30%。

帕妥珠单抗（pertuzumab）是一种重组的单克隆抗体，与 HER-2 受体胞外结构域 II 区结合，抑制二聚体的形成，抑制受体介导的信号转导通路（Agus DB, Gordon MS, Taylor C, et al.2005）。这可能部分解释帕妥珠

单抗抑制 HER-2 低表达肿瘤生长的原因，而曲妥珠单抗与 HER-2 受体的细胞外IV区结合，二聚体的形成不涉及IV区，因此曲妥珠单抗只对 HER-2 过表达的乳腺癌患者有效。目前正在进行帕妥珠单抗治疗 HER-2 低表达晚期乳腺癌的 II 期临床研究。Baselga (Baselga J, et al.2007) 等的研究显示帕妥珠单抗联合赫赛汀 (曲妥珠单抗) 对难治 HER-2 阳性乳腺癌患者具有确凿的抗肿瘤活性。该研究显示 1/5 的患者对帕妥珠单抗治疗有效 (肿瘤缩小或消失)，另外 1/5 的患者病情保持稳定达 6 个月以上。帕妥珠单抗治疗乳腺癌的 III 期临床试验结果显示，该药能极大延长 ERBB2 阳性转移性乳腺癌患者的无进展生存期。

日前，罗氏公司公布了一项最新实验结果，该试验是一项评估采用帕妥珠单抗和赫赛汀 (曲妥珠单抗) 联合化疗 (多西他赛)，来治疗早期原癌基因人类表皮生长因子受体 2 (HER2) 阳性乳腺癌女性患者的疗效的 II 期新辅助治疗研究。美国癌症研究协会 (CTRC-AACR) 在圣安东尼奥乳腺癌研讨会 (SABCS) 上发布的数据显示，在术前新辅助治疗中给予两种抗体联合多西他赛治疗的乳腺肿瘤完全消失率 (45.8% 的病例完全缓解率) 较赫赛汀联合多西他赛 (29.0% 的病例完全缓解率) 显著提高 50% 以上。和赫赛汀及化疗相比，帕妥珠单抗和帕妥珠单抗联合多西他赛不会导致副作用或心脏风险显著增加。

本发明即以帕妥珠单抗和曲妥珠单抗为例，制备得到了同时具备帕妥珠单抗和曲妥珠单抗功能的双特异性抗体和抗体混合物，并在此基础上找到了一种制备轻链和重链能够正确组合的双特异性抗体或抗体混合物的新方法。

发明内容

本发明的发明人通过反复实验，令人惊奇地发现，可以将两个原始抗体或抗体混合物中的轻链替换为共同轻链，以得到具有共同轻链的双特异性抗体或抗体混合物，该具有共同轻链的双特异性抗体或抗体混合物能够实现轻链和重链的正确组合，并且与两个原始抗体相比，具有良好的结合特性、生物学活性和稳定性，甚至在生物学活性上优于原始抗体。

本发明第一方面涉及双特异性抗体或其抗原结合部分，其特征在于所述双特异性抗体或其抗原结合部分具有共同轻链，所述共同轻链是指两条轻链具有相同的序列。

在本发明的一个实施方案中，其重链能够分别与所述轻链在生理条件或体外的蛋白表达状态下正确结合。

在本发明的一个实施方案中，所述双特异性抗体或其抗原结合部分的

共同轻链从两株原始单克隆抗体（已知单克隆抗体）改造获得，所述共同轻链至少与两株原始单克隆抗体中一株的轻链序列不同。在本发明的一个实施方案中，所述共同轻链与两株原始单克隆抗体中一株的轻链相同，或者在其基础上经过改造（例如氨基酸序列改造）获得，改造的目的是尽可能保持与各自的抗原或抗原表位的亲和力。在本发明的一个实施方案中，所述氨基酸序列改造包括氨基酸的突变、缺失或添加，例如突变、缺失或添加不超过3个氨基酸，优选不超过2个氨基酸，更优选不超过1个氨基酸。

在本发明的一个实施方案中，所述双特异性抗体或其抗原结合部分的重链 Fc 段经过改造以更有利于形成异二聚体蛋白。

在本发明的一个实施方案中，两株原始单克隆抗体为帕妥珠抗体和曲妥珠抗体。

在本发明的一个实施方案中，其中所述共同轻链能够分别与帕妥珠单抗和曲妥珠单抗的重链结合。

在本发明的一个实施方案中，其中所述共同轻链选自帕妥珠单抗或曲妥珠单抗的轻链或者它们的突变体。在本发明的一个实施方案中，所述双特异性抗体或其抗原结合部分的重链（包括可变区和恒定区）可以与两株原始单克隆抗体相同，或者经过改造以更有利于形成异二聚体蛋白；所述改造例如为对重链 Fc 段进行改造以更有利于形成异二聚体蛋白。

在本发明的一个实施方案中，其中所述共同轻链的可变区的序列包含选自如 SEQ ID NO: 1 ~ SEQ ID NO: 6 中第 1 ~ 107 位氨基酸所示的序列。

在本发明的一个实施方案中，其中所述轻链恒定区的序列包含 SEQ ID NO: 1 中第 108 ~ 214 位氨基酸所示的序列。

在本发明的一个实施方案中，其重链可变区分别为帕妥珠单抗和曲妥珠单抗的重链可变区。

在本发明的一个实施方案中，其两条重链可变区的序列分别包含如 SEQ ID NO: 23 和 SEQ ID NO: 24 所示的序列。

在本发明的一个实施方案中，其两条重链 Fc 段的序列分别包含如 SEQ ID NO: 25 和 SEQ ID NO: 26 所示的序列。

在本发明的一个实施方案中，其两条重链的序列分别包含如 SEQ ID NO: 19 和 SEQ ID NO: 20 所示的序列。

本发明第二方面涉及能够在一个细胞中正确产生的抗体或其抗原结合部分的混合物，所述混合物包括至少两种抗体或其抗原结合部分，所述

抗体或其抗原结合部分具有共同轻链，所述共同轻链是指两条轻链的可变区具有相同的序列。

在本发明的一个实施方案中，其中所述抗体或其抗原结合部分的重链能够分别与所述轻链在生理条件或体外的蛋白表达状态下正确结合。

在本发明的一个实施方案中，所述双特异性抗体或其抗原结合部分的共同轻链从两株原始单克隆抗体（已知单克隆抗体）改造获得，所述共同轻链至少与两株原始单克隆抗体中一株的轻链序列不同。在本发明的一个实施方案中，所述共同轻链与两株原始单克隆抗体中一株的轻链相同，或者在其基础上经过改造（例如氨基酸序列改造）获得，改造的目的是尽可能保持与各自的抗原或抗原表位的亲和力。在本发明的一个实施方案中，所述氨基酸序列改造包括氨基酸的突变、缺失或添加，例如突变、缺失或添加不超过3个氨基酸，优选不超过2个氨基酸，更优选不超过1个氨基酸。

在本发明的一个实施方案中，所述双特异性抗体或其抗原结合部分的重链来源于两株原始单克隆抗体，所述双特异性抗体或其抗原结合部分的重链可变区序列和/或 CH1 结构域序列与原始单克隆抗体相同。

在本发明的一个实施方案中，所述双特异性抗体或其抗原结合部分的重链（包括可变区和恒定区）可以与两株原始单克隆抗体相同，或者经过改造以更有利于形成同二聚体蛋白；所述改造例如为对重链 Fc 段进行改造以更有利于形成同二聚体蛋白。

在本发明的一个实施方案中，两株原始单克隆抗体为帕妥珠抗体和赫赛汀抗体。

在本发明的一个实施方案中，其中所述的重链能够分别与帕妥珠单抗和曲妥珠单抗的重链结合。

在本发明的一个实施方案中，其中所述的重链选自帕妥珠单抗或曲妥珠单抗的轻链或者它们的突变体。

在本发明的一个实施方案中，其中所述共同轻链的可变区的序列包含选自如 SEQ ID NO: 1~ SEQ ID NO: 6 中第 1~107 位氨基酸所示的序列。

在本发明的一个实施方案中，其中所述轻链恒定区的序列包含 SEQ ID NO: 1 中第 108~214 位氨基酸所示的序列。

在本发明的一个实施方案中，其中所述抗体或其抗原结合部分的重链可变区分别为帕妥珠单抗和曲妥珠单抗的重链可变区。

在本发明的一个实施方案中，其两条重链可变区的序列分别包含如 SEQ ID NO: 23 和 SEQ ID NO: 24 所示的序列。

在本发明的一个实施方案中,其两条重链Fc段的序列分别包含如SEQ ID NO: 27 和 SEQ ID NO: 28 所示的序列。

在本发明的一个实施方案中,其中所述抗体或其抗原结合部分的重链序列分别包含如 SEQ ID NO: 21 和 SEQ ID NO: 22 所示的序列。

本发明第三方面涉及 HER2 蛋白胞外区域的变体蛋白,其与野生型 HER2 蛋白胞外区域的序列相比,具有选自如下一组的突变:

- 1) 第 558 位谷氨酸的突变和第 573 位苯丙氨酸的突变;
- 2) 第 288 位丝氨酸的突变和第 296 位组氨酸的突变。

在本发明的一个实施方案中,将第 558 位谷氨酸突变为丙氨酸。

在本发明的一个实施方案中,将第 573 位苯丙氨酸突变为丙氨酸。

在本发明的一个实施方案中,将第 288 位丝氨酸突变为丙氨酸。

在本发明的一个实施方案中,将第 296 位组氨酸突变为丙氨酸。

在本发明的一个实施方案中,所述 HER2 变体蛋白包含选自如 SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14 和 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列。

在本发明的一个实施方案中,野生型 HER2 蛋白胞外区域的序列如 SEQ ID NO: 18 所示。

本发明第四方面涉及核酸分子,其编码本发明第一方面任一项的双特异性抗体或其抗原结合部分或者第二方面任一项的混合物中所述的抗体或其抗原结合部分、或者所述抗体或其抗原结合部分的部分序列(例如轻链和/或重链),或者编码第三方面任一项的 HER2 变体蛋白。

本发明第五方面涉及重组载体,其含有本发明第四方面任一项的核酸分子。

本发明第六方面涉及重组细胞,其含有本发明第五方面任一项的重组载体或第四方面任一项的核酸分子。

本发明第七方面涉及一种根据两株针对不同抗原表位的单克隆抗体或其抗原结合部分制备双特异性抗体或其抗原结合部分的方法,其包括以下步骤:

根据两株单克隆抗体的轻链序列得到能够分别与两株单抗重链结合的共同轻链序列,所述共同轻链是指两条轻链具有相同的序列,优选地,

该共同轻链为其中一株单抗的轻链或者为其中一株单抗轻链的突变体。

在本发明的一个实施方案中，其还进一步包括以下步骤：

分别将两株单抗的重链序列和共同轻链序列构建于表达载体中，得到两个重组表达载体；优选地，对重链序列特别是 Fc 段进行突变，以更有利于具有不同重链的两株单抗的 Fc 段的结合；

将两个重组表达载体转入同一宿主细胞，诱导表达，得到双特异性抗体或其抗原结合部分。

在本发明的一个实施方案中，其中所述共同轻链的可变区的获取方法为，首先确定两株单抗的轻链可变区与各自抗原或抗原表位之间接触的界面氨基酸，然后确定以任意其中一株单抗的轻链可变区为候选共同轻链的可变区时，该共同轻链与该株单抗的抗原或抗原表位之间接触的界面氨基酸与另一株单抗轻链可变区的氨基酸相比较时的差异氨基酸，选取差异氨基酸数量较少的轻链可变区为共同轻链的可变区；优选地，对该共同轻链可变区进一步突变以获得与抗原或抗原表位亲和力更好的共同轻链的可变区。在本发明的一个实施方案中，其中所述共同轻链的恒定区的获取方法为，将已确定为提供共同轻链的可变区的这一株单克隆抗体的轻链恒定区作为共同轻链的恒定区，或对该轻链恒定区进一步突变以获得共同轻链的恒定区。

在本发明的一个实施方案中，所述突变是指对其中的界面氨基酸进行突变。

在本发明的一个实施方案中，所述与抗原或抗原表位亲和力更好是指在该共同轻链与该双特异性抗体或其抗原结合部分对应的两个抗原或抗原表位的亲和力之间达到一个平衡，使该双特异性抗原或其抗原结合部分具有更好的生物学活性和理化特性（例如稳定性）。

本发明第八方面涉及一种制备包括至少两种单克隆抗体或其抗原结合部分的混合物的方法，所述方法包括以下步骤：

根据两株单克隆抗体的轻链序列得到能够分别与两株单抗重链结合的共同轻链序列，所述共同轻链是指两条轻链具有相同的序列，优选地，该共同轻链为其中一株单抗的轻链或者为其中一株单抗轻链的突变体。

在本发明的一个实施方案中，其进一步包括以下步骤：

分别将两株单抗的重链序列和共同轻链序列构建于表达载体中，得到两个重组表达载体；优选地，对重链序列特别是 Fc 段进行突变，以更有利于具有相同重链的单抗的 Fc 段的结合；

将两个重组表达载体转入同一宿主细胞，诱导表达，得到抗体或其抗原结合部分的混合物。

在本发明的一个实施方案中，其中所述共同轻链的可变区的获取方法为，首先确定两株单抗的轻链可变区与各自抗原或抗原表位之间接触的界面氨基酸，然后确定以任意其中一株单抗的轻链可变区为候选共同轻链的可变区时，该共同轻链与该株单抗的抗原或抗原表位之间接触的界面氨基酸与另一株单抗轻链可变区的氨基酸相比较时的差异氨基酸，选取差异氨基酸数量较少的轻链可变区为共同轻链的可变区；优选地，对该共同轻链可变区进一步突变以获得与抗原或抗原表位亲和力更好的共同轻链的可变区。在本发明的一个实施方案中，其中所述共同轻链的恒定区的获取方法为，将已确定为提供共同轻链的可变区的这一株单克隆抗体的轻链恒定区作为共同轻链的恒定区，或对该轻链恒定区进一步突变以获得共同轻链的恒定区。

在本发明的一个实施方案中，所述突变是指对其中的界面氨基酸进行突变。

在本发明的一个实施方案中，所述与抗原或抗原表位亲和力更好是指在该共同轻链与该混合物中两株单抗对应的两个抗原或抗原表位的亲和力之间达到一个平衡，使该混合物具有更好的生物学活性和理化特性（例如稳定性）。

本发明还涉及一种检测抗体或其抗原结合部分是否为双特异性抗体或其抗原结合部分和/或对其定量的方法，所述方法包括以下步骤(参见图25的示意图):

1) 分别制备能够和双特异性抗体或其抗原结合部分中的抗原结合部分1结合而不和抗原结合部分2结合的特异性抗原1，以及能够和抗原结合部分2结合而不和抗原结合部分1结合的特异性抗原2；

2) 取特异性抗原1（或者特异性抗原2）包被酶标板，加入待检抗体，反应一段时间，再加入标记的特异性抗原2（或者特异性抗原1），反应一段时间，最后加入能够与前述标记分子结合的检测分子，反应一段时间，所述检测分子带有可检测的标记，根据检测原理读数，判断为反应阳性或阴性；

3) 当反应为阳性、并且该反应具有浓度依赖性时，则判断该抗体或其抗原结合部分为双特异性抗体或其抗原结合部分；任选地，根据所得阳性数值进一步对双特异性抗体或其抗原结合部分进行定量。

在本发明中，所述抗原结合部分1和2分别是指双特异性抗体或其抗原结合部分中的两个分别与不同抗原或抗原表位结合的部分；在本发明的实施方案中，所述抗原结合部分1和2分别在两株原始抗体的基础上改造获得，并且抗原结合部分1和2分别和两株原始抗体结合的抗原或抗原表位相同。

在本发明的一个实施方案中，所述特异性抗原1和特异性抗原2是HERm1和HERm2。

在本发明的一个实施方案中，所述标记的特异性抗原是用生物素标记的特异性抗原。

在本发明的一个实施方案中，所述检测分子是指可用于检测的底物分子，例如为HRP标记的链霉亲和素。

本发明还涉及一种检测抗体或其抗原结合部分的混合物是否为同二聚体蛋白的方法，所述混合物包括两种抗体（抗体1和抗体2）或其抗原结合部分，所述方法包括以下步骤(参见图26的示意图)：

1) 分别制备能够和抗体1结合而不和抗体2结合的特异性抗原1，以及能够和抗体2结合而不和抗体1结合的特异性抗原2；

2) 取特异性抗原1（或者特异性抗原2）包被酶标板，加入待检混合物，反应一段时间，再加入标记的特异性抗原1（或者特异性抗原2），反应一段时间，最后加入能够与前述标记分子结合的检测分子，反应一段时间，所述检测分子带有可检测的标记，根据检测原理读数，判断为反应阳性或阴性；

3) 另取特异性抗原1（或者特异性抗原2）包被酶标板，加入待检混合物，反应一段时间，再加入标记的特异性抗原2（或者特异性抗原1），反应一段时间，最后加入能够与前述标记分子结合的检测分子，反应一段时间，所述检测分子带有可检测的标记，根据检测原理读数，判断为反应阳性或阴性；

4) 当步骤2) 反应阳性、并且该反应具有浓度依赖性，同时步骤3) 反应阴性时，则判断混合物中为同二聚体蛋白并且不含异二聚体蛋白；当步骤2) 反应阳性同时步骤3) 反应阳性时，则判断混合物中既含有同二聚体蛋白也含有异二聚体蛋白。

在本发明的一个实施方案中，所述特异性抗原1和特异性抗原2是HERm1和Herm2。

在本发明的一个实施方案中，所述标记的特异性抗原是用生物素标记的抗原。

在本发明的一个实施方案中，所述检测分子是指可用于检测的底物分子，例如为HRP标记的链霉亲和素。

本发明还涉及组合物（例如药物组合物），其含有本发明第一方面任一项的双特异性抗体或其抗原结合部分，以及任选的药学上可接受的载体或赋形剂。

本发明还涉及组合物（例如药物组合物），其含有本发明第二方面任一项的混合物，以及任选的药学上可接受的载体或赋形剂。

本发明还涉及试剂盒，其含有本发明第一方面任一项的双特异性抗体或其抗原结合部分，以及任选的缓冲液和/或说明书。

在本发明的一个实施方案中，所述试剂盒用于诊断HER2阳性肿瘤（例如乳腺癌、胃癌）。

本发明还涉及试剂盒，其含有本发明第二方面任一项的混合物，以及任选的缓冲液或说明书。

在本发明的一个实施方案中，所述试剂盒用于诊断HER2阳性肿瘤（例如乳腺癌、胃癌）。

本发明还涉及本发明第一方面任一项的双特异性抗体或其抗原结合部分在制备预防和/或治疗HER2阳性肿瘤（例如乳腺癌、胃癌）的药物中的用途。

本发明还涉及本发明第二方面任一项的混合物在制备预防和/或治疗HER2阳性肿瘤（例如乳腺癌、胃癌）的药物中的用途。

本发明还涉及本发明第一方面任一项的双特异性抗体或其抗原结合部分在制备诊断HER2阳性肿瘤（例如乳腺癌、胃癌）的试剂或试剂盒中的用途。

本发明还涉及本发明第二方面任一项的混合物在制备诊断HER2阳性肿瘤（例如乳腺癌、胃癌）的试剂或试剂盒中的用途。

本发明还涉及本发明第三方面任一项的HER2蛋白胞外区域的变体蛋白用于检测第一方面任一项的双特异性抗体或其抗原结合部分或者用于检测第二方面任一项的混合物的用途。

本发明还涉及预防和/或治疗HER2阳性肿瘤（例如乳腺癌、胃癌）的方法，所述方法包括给有需要的受试者预防或治疗有效量的本发明第一方面任一项的双特异性抗体或其抗原结合部分的步骤。

本发明还涉及预防和/或治疗HER2阳性肿瘤（例如乳腺癌、胃癌）的方法，所述方法包括给有需要的受试者预防或治疗有效量的本发明第二方面任一项的混合物的步骤。

本发明还涉及诊断HER2阳性肿瘤（例如乳腺癌、胃癌）的方法，所述方法包括使用本发明第一方面任一项的双特异性抗体或其抗原结合部分的步骤。

本发明还涉及诊断HER2阳性肿瘤（例如乳腺癌、胃癌）的方法，所述方法包括使用本发明第二方面任一项的混合物的步骤。

本发明还涉及检测本发明第一方面任一项的双特异性抗体或其抗原结合部分或者检测本发明第二方面任一项的混合物的方法，所述方法包括使用本发明第三方面任一项的HER2蛋白胞外区域的变体蛋白的步骤。

本发明还涉及本发明第一方面任一项的双特异性抗体或其抗原结合部分，其用于预防和/或治疗HER2阳性肿瘤（例如乳腺癌、胃癌）。

本发明还涉及本发明第二方面任一项的混合物，其用于预防和/或治疗HER2阳性肿瘤（例如乳腺癌、胃癌）。

以下对本发明做进一步描述。

在本发明中，术语“抗体”是指通常由两对相同的多肽链（每对具有一条“轻”（L）链和一条“重”（H）链）组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ 和 λ 轻链。重链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，并且分别将抗体的同种型定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在轻链和重链内，可变区和恒

定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。重链恒定区由 3 个结构域(CH1、CH2 和 CH3)组成。各轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞(例如，效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)的结合。VH 和 VL 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR))，其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各 VH 和 VL 由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区(VH 和 VL)分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 或 Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883 的定义。术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如，其包括，特别地，重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体，例如，IgG (例如，IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 亚型)，IgA1, IgA2, IgD, IgE 或 IgM 抗体。

在本发明中，术语抗体的“抗原结合部分”是指全长抗体的一个或多个部分，所述部分保持结合抗体所结合的相同抗原(例如，HER2)的能力，与完整抗体竞争对抗原的特异性结合。通常参见，Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 第 2 版，Raven Press, N.Y. (1989))，其以其全文通过引用合并入本文，用于所有目的。可通过重组 DNA 技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗原结合部分。在一些情况下，抗原结合部分包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb 和互补决定区(CDR)片段、单链抗体(例如，scFv)、嵌合抗体、双抗体(diabody)和这样的多肽，其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。可使用本领域技术人员已知的常规技术(例如，重组 DNA 技术或酶促或化学断裂法)从给定的抗体(例如单克隆抗体 2E12)获得抗体的抗原结合部分(例如，上述抗体片段)，并且以与对于完整抗体的方式相同的方式就特异性筛选抗体的抗原结合部分。

在本发明中，术语“Fd 片段”意指由 V_H 和 C_{H1} 结构域组成的抗体片段；术语“Fv 片段”意指由抗体的单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的抗体片段；术语“dAb 片段”意指由 V_H 结构域组成的抗体片段(Ward 等人，Nature 341:544-546 (1989))；术语“Fab 片段”意指由 V_L、V_H、C_L 和 C_{H1} 结构域

组成的抗体片段；术语“F(ab')₂ 片段”意指包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个 Fab 片段的抗体片段。

在本发明中，术语“抗体Fc段”是熟练的技术人员公知的术语并基于抗体的木瓜蛋白酶裂解而定义，指的是人免疫球蛋白链恒定区，特别是免疫球蛋白重链恒定区的羧基端或其中的一部分。例如，免疫球蛋白Fc区可包括重链CH₂、CH₃、CH₄的两个或更多结构域与免疫球蛋白铰链区的组合。根据重链恒定区的氨基酸序列，免疫球蛋白可以分为不同的种类，主要有5类免疫球蛋白：IgA，IgD，IgE，IgG和IgM，其中一些还可进一步分成亚类(同种型)，如IgG-1，IgG-2，IgG-3，IgG-4，IgA-1和IgA-2。从特定的免疫球蛋白类别和亚类中选择特定的免疫球蛋白Fc区在本领域技术人员所掌握的范围之内。

在本发明一个的实施方案中，本发明所用的抗体 Fc 段包括至少一个免疫球蛋白铰链区，一个 CH₂ 结构域和一个 CH₃ 结构域，例如为人 IgG1 Fc。

在本发明中，术语“双特异性抗体”能够分别和两种抗原或抗原表位结合，其包括能够特异性结合第一抗原或抗原表位的抗体的轻链和重链，以及能够特异性结合第二抗原或抗原表位的抗体的轻链和重链。在本发明的一个实施方案中，所述双特异性抗体中能够特异性结合第一抗原或抗原表位的抗体的轻链和能够特异性结合第二抗原或抗原表位的抗体的轻链具有相同的序列。在本发明的一个实施方案中，所述双特异性抗体中能够特异性结合第一抗原或抗原表位的抗体的重链和能够特异性结合第二抗原或抗原表位的抗体的重链具有不同的序列。

在本发明中，术语“表位”或“抗原表位”是指，抗原上被免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位。“表位”在本领域内也称为“抗原决定簇”。表位或抗原决定簇通常由分子的化学活性表面基团例如氨基酸或碳水化合物或糖侧链组成并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。例如，表位通常以独特的空间构象包括至少 3，4，5，6，7，8，9，10，11，12，13，14 或 15 个连续或非连续的氨基酸，其可以是“线性的”或“构象的”。参见，例如，Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology，第 66 卷，G. E. Morris，Ed. (1996)。在线性表位中，蛋白质与相互作用分子（例如抗体）之间的所有相互作用的点沿着蛋白质的一级氨基酸序列线性存在。在构象表位中，相互作用的点跨越彼此分开的蛋白质氨基酸残基而存在。

在本发明中，20 种常规氨基酸和其缩写遵从常规用法。参见 Immunology - A Synthesis (第 2 版，E.S. Golub 和 D.R. Gren, Eds., Sinauer

Associates, Sunderland, Mass. (1991)), 其通过引用合并入本文。

在本发明中, 对两株针对不同抗原或抗原表位的单克隆抗体(即原始抗体)的轻链序列(特别是可变区序列)进行分析和验证, 获得能够和两株单克隆抗体的重链结合的共同轻链。该共同轻链和重链结合后, 仍能特异性结合原单抗的抗原或抗原表位。

在本发明中, 该共同轻链可以用于表达双特异性抗体, 也可以用于表达含有两种抗体的混合物; 在表达双特异性抗体时, 该抗体含有能够和第一种抗原结合的轻链和重链, 以及能够和第二种抗原结合的轻链和重链, 其中的两条轻链序列完全相同, 即为该共同轻链; 在表达抗体混合物时, 每种抗体各含有两条轻链和重链, 其中的轻链序列完全相同, 即为该共同轻链。

在本发明中, 所述两株原始抗体的轻链恒定区可以为 κ 型或 λ 型; 所述 κ 型轻链恒定区包括各种同种异型, 如 Km1、Km1,2、Km3; 所述 λ 型轻链恒定区包括各种同种异型, 如 CL1、CL2、CL3、CL6 和 CL7。

本领域公知, 可变区对抗原和抗体的特异性结合至关重要, 因此在改造或获得抗体时, 对可变区序列的选择和改造尤为关键。因此, 在本发明中, 为了获得本发明的具有共同轻链的双特异性抗体或抗体混合物时, 首先需要获得该共同轻链的可变区。在根据本发明上述的方法选择其中一株原始单克隆抗体的轻链可变区或其突变序列作为该共同轻链的可变区后, 再确定该共同轻链的恒定区。通常情况下, 会选择已确定为该共同轻链的可变区的这一株单克隆抗体的轻链恒定区作为该共同轻链的恒定区; 当然, 在某些情况下, 也可以选择另一株单克隆抗体的轻链恒定区作为共同轻链的恒定区。如果有必要, 可以根据本领域的公知技术对原轻链恒定区进行改造(例如氨基酸的添加、缺失或突变等)以获得更适宜的共同轻链的恒定区, 例如通过改造使其具有更好的 ADCC、CDC、内吞、稳定性、免疫原性或半衰期等。

在本发明中, 两株原始抗体的重链类型可以相同或不同, 优选为类型相同。在本发明的一个实施方案中, 在制备双特异性抗体和抗体混合物时, 与原始抗体相比, 其重链序列的可变区和 CH1 结构域的序列不变。

在本发明中, 所述双特异性抗体中的两个臂或含有两种抗体混合物中的抗体都来源于两株原始单克隆抗体。在构建双特异性抗体或抗体混合物时, 仅需要改变轻链可变区的序列以获得共同轻链, 而不需要改变重链可变区的序列。也就是说, 在构建的双特异性抗体和抗体混合物中, 抗体的重链可变区序列与原始抗体可以是相同的, 但至少其中一个轻链可变区序列与原始抗体不同。

在本发明中，可以根据不同的需要或目的选择两种原始单克隆抗体，例如可以选择针对同一抗原不同抗原表位的两株单抗，也可以其中一种抗体连接肿瘤细胞表面的相关抗原，而另一种抗体可以触发免疫效应细胞以进一步杀伤细胞。

在本发明的实施方案中，在制备双特异抗体时，可以利用现有技术对重链例如 Fc 段进行改造，以在抗体表达时，更有利于异二聚体蛋白的形成。

在本发明的实施方案中，在制备抗体混合物时，可以利用现有技术对重链例如 Fc 段进行改造，以在抗体表达时，更有利于同二聚体蛋白的形成。

在本发明中，通过改造抗体重链的 Fc 段以更有利于同二聚体或异二聚体蛋白的技术为本领域所公知，例如可参考 Ridgway, Presta et al. 1996; Carter 2001, 专利 CN 102558355A, 专利 CN 103388013A。

在本发明的实施方案中，用到融合具有不同抗原识别表位的多肽的技术包括但不限于如具体实施例中的异二聚体 Fc 融合技术，也可以是“Fab”技术,见图 1。

在本发明的实施方案中，本发明所用到的异二聚体 Fc 融合技术，可以为“把手”-“孔洞”模型，也可以是“电荷排斥”模型，但不仅仅限制于这两种模型。

在本发明的实施方案中，本发明所用到的能够在单一重组细胞生产制备的抗体混合物平台可以是“电荷排斥”模型，但不仅仅限制于这一模型。

在本发明的一些实施方案中，当用于制备双特异抗体或抗体混合物时，所述核酸分子编码针对第一抗原的抗体的轻链和/或重链，或者编码针对第二抗原的抗体的轻链和/或重链。在本发明的实施方案中，所述轻链为共同轻链；在本发明的实施方案中，所述重链的 Fc 段进行了改造。

在本发明的一些实施方案中，所述载体可以为克隆载体或表达载体。所述克隆载体用于克隆抗体的相关片段；所述表达载体用于表达双特异抗体或抗体混合物。可以根据本领域的公知常识选择适合抗体表达的载体。在本发明的具体实施方案中，所述表达载体为 pcDNA4m，其是在载体 pcDNA4/myc-HisA 的基础上进行改造后得到的载体。

在本发明的一些实施方案中，所述表达载体中含有编码针对第一抗原的抗体的轻链和/或重链的核酸分子，或者含有编码针对第二抗原的抗体的轻链和/或重链的核酸分子。

在本发明的一些实施方案中，所述宿主细胞为适合抗体表达的宿主细胞，例如为原核细胞(例如 *E. Coli*)或真核细胞；所述真核细胞例如为酵母细胞、植物细胞或哺乳动物细胞，所述哺乳动物细胞例如为 CHO 细胞、HEK293

细胞或骨髓瘤细胞等。

在本发明的一些实施方案中，所述宿主细胞中同时含有表达针对第一抗原的抗体的轻链和/或重链的表达载体以及表达针对第二抗原的抗体的轻链和/或重链的表达载体；在本发明的具体实施方案中，所述轻链为共同轻链；在本发明的实施方案中，所述重链的 Fc 段进行了改造。当用于表达双特异抗体时，通过 Fc 段的改造，使针对不同抗原的抗体的轻链和重链更容易结合，以形成双特异抗体；当用于表达抗体混合物时，通过 Fc 段的改造，使针对同一抗原的抗体的轻链和重链更容易结合，以形成抗体混合物。

双特异性抗体或抗体混合物可以用标准的实验手段从宿主细胞中纯化。纯化方法包括但不限于色谱技术如体积排阻、离子交换、亲和色谱法及超滤法。在本发明的实施方案中，通过 ProteinA 亲和层析法对双特异性抗体和抗体混合物进行纯化。

在本发明中，本发明的双特异性抗体或其抗原结合部分或其混合物还可与化疗药物和/或其它抗体联用，因此本发明的组合物中还可含有化疗药物和/或其它抗体。

在本发明中，所述化疗药物包括但不限于：阿霉素(Adriamycin)、环磷酰胺和紫杉烷类[紫杉醇(Taxol)和多西他赛(Taxotere)]、卡培他滨(Xeloda)、吉西他滨(Gemzar)、长春瑞滨(Navelbine)、他莫昔芬、芳香酶抑制剂(瑞宁得、弗隆、阿诺新)、5-FU 加亚叶酸、伊立替康(camptosar)、奥沙利铂、顺铂、卡铂、雌莫司汀、米托蒽醌(Novantrone)、泼尼松、长春新碱(Oncovin)等，或它们的组合。

在本发明中，通过对HER2蛋白突变，制备得到了仅能够和帕妥珠单抗和赫赛汀单抗中的一种特异性结合的HER2蛋白突变体。在本发明的实施方案中，利用这几种突变体对双特异抗体和抗体混合物进行鉴定。

在本发明中，通过双抗原夹心ELISA(也叫桥式ELISA)方法结合突变的HER2蛋白鉴定抗体是否为双特异性抗体或者抗体混合物中是否含有同二聚体蛋白，并进一步对双特异性抗体或抗体混合物中的同二聚体蛋白进行定量。

在本发明中，所述双抗原夹心法ELISA为本领域所公知，其工作原理为利用连接于固相载体上的抗原和酶标抗原分别与样品中被检测抗体分子上两个抗原结合位点结合，形成固相抗原-抗体-酶标抗原免疫复合物。该方法的检测步骤例如包括：(1)将特异性抗原包被固相载体。孵育一定时间，使形成固相抗原，洗涤除去未结合的抗原和杂质。(2)加待检标本，孵育，使标本中的抗体与固相载体上的抗原充分反应，形成固相抗原抗体复合物。洗涤

除去其他未结合物质。(3)加酶标抗原, 孵育, 使形成固相抗原-待测抗体-酶标抗原夹心复合物。洗涤除去未结合酶标抗原。(4)加底物显色。固相上的酶催化底物产生有色产物, 通过比色, 测标本中抗体的量。

在本发明中, 所述HER2阳性肿瘤既包括HER2蛋白过表达的肿瘤(例如乳腺癌、胃癌、食管癌、卵巢癌、子宫内膜癌、膀胱癌、肺癌、结肠癌和头颈部肿瘤), 也包括HER2蛋白低表达的肿瘤(例如HER2低表达的乳腺癌、胃癌、肺癌等)。

本发明通过分析两株不同单抗的轻链序列, 获得能够分别与两株单抗重链结合的共同轻链, 并在此基础上制备了具有共同轻链的双特异性抗体和抗体混合物, 实验证明利用该方法制备得到的双特异性抗体和抗体混合物具有良好的结合特性、生物学活性和稳定性, 并且在生物学活性方面可能优于原始抗体。

该共同轻链技术简单、可控, 在不影响抗体稳定性、活性及纯度的情况下, 有效解决了双特异性抗体中重轻链错配的难题; 对于抗体混合物, 更是使其可以在同一宿主细胞中表达, 能避免混合细胞群培养的难度, 更有利于放大生产。

附图说明

图 1. 异二聚体蛋白融合示意图。a 图表示异二聚体 Fc 融合技术, b 图表示“Fab”技术。

图 2 帕妥珠单抗和曲妥珠单抗轻链高变区的识别, 其中 A 为帕妥珠单抗轻链高变区识别结果, B 为曲妥珠单抗轻链高变区识别结果, C 为帕妥珠单抗和曲妥珠单抗轻链序列比对及抗原界面氨基酸综合分析结果。

图 3. 曲妥珠单抗 Fab 片段和 Her2 胞外区域(ECD) 结构图。

图 4. Her2m1 和 Her2m2 变体蛋白 SDS-PAGE 电泳分析结果 (18%SDS-PAGE 非还原条件)。

1: HER2m1; 2: HER2m2; M: 蛋白质质量标准。

图 5. ELISA 法检测 HER2 变体蛋白对 Trastuzumab 或 Pertuzumab 的特异性结合

图 6: 一步亲和层析纯化得到的共同轻链单抗蛋白样品利用非还原的 SDS-PAGE 进行初步的检测 (12%SDS-PAGE 还原条件)

1~6: TmabCLC1~6; 7~12: PmabCLC1~6; M: 蛋白质质量标准。

图 7: 带有共同轻链的 Trastuzumab 对其特异性抗原 HER2m1 的亲合力

图 8: 带有共同轻链的 Pertuzumab 对其特异性抗原 HER2m2 的亲合力
图 9 一步亲和层析纯化得到的 KN026 抗体蛋白样品利用 SDS-PAGE 进行初步的检测 (12%SDS-PAGE 还原条件)

1: KN026 瞬时表达细胞培养上清; 2: KN026 亲和层析流穿; 3: KN026 一步亲和层析后纯化蛋白样品 (还原); 4: KN026 一步亲和层析后纯化蛋白样品 (非还原) M: 蛋白质量标准。

图 10KN026 抗体蛋白纯度的 SE-HPLC 检测结果

图 11 双特异性抗体 KN026 识别两种抗原的亲合曲线

图 12 一步亲和层析纯化得到的 KN010 抗体蛋白样品利用 SDS-PAGE 进行初步的检测 (12%SDS-PAGE 还原条件)

图 13 混合抗体蛋白 KN026 纯度的 SE-HPLC 检测结果

图 14 混合抗体蛋白 KN026 识别两种抗原的亲合曲线

图 15 Ptmap 双特异性抗体 (KN026) 以及 Pertuzumab、Trastuzumab 与 BT474 细胞结合的浓度依存性曲线

图 16 Ptmap 双特异性抗体 (KN026) 以及 Pertuzumab、Trastuzumab 与 N-87 细胞结合的浓度依存性曲线

图 17 Pmap、Tmap 抗体混合物 (KN010) 以及 Pertuzumab、Trastuzumab 与 BT474 细胞结合的浓度依存性曲线

图 18 KN026、Trastuzumab 及 Trastuzumab + Pertuzumab 联合用药对人乳腺癌 BT474 细胞增殖的抑制作用

图 19 KN026、Trastuzumab 及 Trastuzumab + Pertuzumab 联合用药对人胃癌 N-87 细胞增殖的抑制作用

图 20 Ptmap 双特异性抗体 KN026 (浅色曲线) 以及 Trastuzumab 参比样品 (深色曲线) 的热稳定性 (Tm 值) 检测

图 21 KN026 和 Trastuzumab 的药代曲线

图 22 Ptmap 双特异性抗体对人卵巢癌 SKOV3 裸鼠移植瘤的肿瘤体积的影响

图 23 Ptmap 双特异性抗体对人胃癌 N-87 裸鼠移植瘤的肿瘤体积的影响

图 24PTmap 双特异性抗体对人胃癌 N-87 裸鼠移植瘤的肿瘤体积的影响

图 25 检测抗体是否为双特异性抗体的方法以及定量方法的示意图。

图 26 检测抗体混合物是否为同二聚体蛋白的方法的示意图。

图 27 PTmap 双特异性抗体对 HER2 低表达肿瘤株人非小细胞肺癌 NCI-H522 小鼠移植瘤模型的剂量依赖性。

图 28 PTmap 双特异性抗体对 HER2 低表达肿瘤株人非小细胞肺癌

NCI-H522 小鼠移植瘤模型的药效作用与等摩尔数 Trastuzumab 标准品加等摩尔数 Pertuzumab 标准品联合使用时相当。

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将会理解，下列实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

实施例 1 共同轻链的获取

1. 序列及结构获得

从蛋白质数据库 (PDB, www.pdb.org) 中获得曲妥珠单抗和帕妥珠单抗的复合物晶体结构，曲妥珠单抗 PDB 编号为 1N8Z，帕妥珠单抗 PDB 编号为 1S78。有两个筛选策略可用来识别 CH3-CH3 之间的氨基酸接触：(i) 氨基酸作用的距离 (ii) 溶剂可及区域分析。这里根据氨基酸作用距离进行筛选。

2. 单抗轻链及抗原 HER2 界面氨基酸获取

根据氨基酸接触规则，界面氨基酸指侧链重原子与另外一条链的任何一个氨基酸的重原子之间的距离小于一个阈值的那些氨基酸。在这里阈值选择为 4.5Å。在某些文献中也可以选择 5.5 Å (Bahar 和 Jernigan 1997)。表 1 为曲妥珠单抗轻链及抗原 HER2 相互作用的氨基酸列表。表 1 所列的为通过氨基酸接触筛选规则所筛选出的曲妥珠单抗的 12 个界面氨基酸。

表 1 曲妥珠单抗轻链-抗原 HER2 界面氨基酸列表

曲妥珠单抗轻链	抗原 HER2
ASP28A(CL1)	GLU598C
ASN30A(CL1)	PRO571C, ASP596C, GLU598C, ALA600C, CYS601C, GLN602C
THR31A(CL1)	CYS601C, GLN602C, PRO603C
ALA32A(CL1)	PRO571C
TYR49A	PRO603C
SER50A(CL2)	LYS593C, PRO603C
PHE53A(CL2)	PRO603C, CYS604C, PRO605C

ARG66A	ASP596C, GLU598C
HIS91A(CL3)	ASP570C, PRO571C, PRO572C
TYR92A(CL3)	LYS569C, PRO571C, PRO572C, GLU598C, ALA600C
THR93A(CL3)	ASP560C, PRO572C
THR94A(CL3)	ASP560C, PRO572C

表 2 为帕妥珠单抗轻链及抗原 HER2 相互作用的氨基酸列表。表 2 所列的为通过氨基酸接触筛选规则所筛选出的帕妥珠单抗的 8 个界面氨基酸。

表 2 帕妥珠单抗轻链-抗原 HER2 界面氨基酸列表

帕妥珠单抗轻链	抗原 HER2
ILE31C(CL1)	SER313A
LEU46C	HIS296A
TYR49C	HIS296A, CYS312A, SER313A, LYS314A, PRO315A
SER50C(CL2)	SER313A
TYR53C(CL2)	SER313A, LYS314A, PRO315A
TYR55C(CL2)	LEU295A, HIS296A
THR56C(CL2)	LEU295A, HIS296A
TYR94C(CL3)	THR254A, ASP255A, THR256A, PHE257A

3. 帕妥珠单抗和曲妥珠单抗轻链高变区 (CDRL1, CDRL2, CDRL3) 的识别

将帕妥珠单抗和曲妥珠单抗轻链通过高变区识别系统-kabat 编号进行识别, 识别软件为 <http://www.bioinf.org.uk/abs/abnum/>。帕妥珠单抗轻链高变区识别结果见图 2-A, 曲妥珠单抗高变区轻链识别结果见图 2-B。

4. 帕妥珠单抗和曲妥珠单抗轻链序列比对及轻链与抗原界面氨基酸综合分析

帕妥珠单抗和曲妥珠单抗轻链序列比对及抗原界面氨基酸综合分析结果见图 2-C, 帕妥珠单抗(P-mab)和曲妥珠单抗(T-mab)轻链与抗原接触氨基酸用背景颜色黑色显示。如以曲妥珠单抗轻链为共同轻链, 则该共同轻链上与抗原接触的界面氨基酸与帕妥珠单抗(P-mab)轻链上的界面氨基酸相比较得到的差异氨基酸见表 3。

表 3 帕妥珠单抗(P-mab)和曲妥珠单抗(T-mab)轻链与抗原接触的差异氨基酸

Kabat number	P-mab	T-mab
Kabat31	I	T
Kabat53	Y	F
Kabat56	T	S
Kabat94	Y	T

如以帕妥珠单抗轻链为共同轻链，则该共同轻链上与抗原接触的界面氨基酸与曲妥珠单抗(T-mab)轻链上的界面氨基酸相比较得到的差异氨基酸见表 4。

表 4 帕妥珠单抗(P-mab)和曲妥珠单抗(T-mab)轻链与抗原接触的差异氨基酸

Kabat number	P-mab	T-mab
Kabat30	S	N
Kabat31	I	T
Kabat32	G	A
Kabat53	Y	F
Kabat56	T	S
Kabat66	G	R
Kabat91	Y	H
Kabat93	I	T
Kabat94	Y	T

从帕妥珠单抗(P-mab)和曲妥珠单抗(T-mab)轻链与抗原接触的差异氨基酸分析，分别选择曲妥珠单抗(T-mab)的轻链为框架，引入 T31I 或/及 T94Y 突变，得到帕妥珠、曲妥珠双特异性抗体的共同轻链序列 CLC1~CLC4；选择帕妥珠单抗(P-mab)的轻链为框架，引入 T31I 或/及 Y94T 突变，得到帕妥珠、曲妥珠双特异性抗体的共同轻链序列 CLC5~CLC6。各共同轻链的氨基酸序列如下：

CLC1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP
 KLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYT
 TPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
 EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKH
 KVIYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 1)

CLC2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNIAVAWYQQKPGKAPK
 LLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTP
 PTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
 KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKV
 YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 2)

CLC3

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP
 KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYT
 YPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
 EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKH
 KVVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 3)

CLC4

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNIAVAWYQQKPGKAPK
 LLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTYP
 PTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
 KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKV
 YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 4)

CLC5

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPK
 LLIYSASYRYTGVPSRFSRSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYP
 YTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
 AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHK
 VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 5)

CLC6

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPK
 LLIYSASYRYTGVPSRFSRSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYITP
 YTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
 AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHK
 VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 6)

实施例 2 抗原蛋白 HER2 变体蛋白的制备及功能验证

1. 只结合帕妥珠单抗 HER2 变体蛋白的设计

Robert F. Kelley' and Mark P. O'Connell 在 1993 年公布了曲妥珠单抗及相应的突变和 HER2 胞外区域(ECD)结合的动力学参数。其中 H91A, R50A,

W95A, Y100aA 对曲妥珠单抗与 HER2 胞外域的结合造成了重大影响。Hyun-Soo Cho 团队在 2003 年对曲妥珠单抗 Fab 片段和 HER2 胞外区域 (ECD) 的复合物进行了结晶 (PDB 编号: 1N8Z), 该项结果发表于 Nature 上。通过分析曲妥珠单抗 Fab 片段和 HER2 胞外区域 (ECD) (其序列为 SEQ ID NO: 18 所示) 的复合物的结构, 我们获得了曲妥珠单抗 Fab 片段和 HER2 胞外区域 (ECD) 的界面接触氨基酸, 如表 5。

着重对 H91L, R50H, W95H, Y100aH 接触的氨基酸进行分析。发现有两个组合可能对这几个氨基酸结合具有重要作用。组合 1: ASP570, PRO571 和 PRO572, 组合 2: GLU558 和 PHE573。

表 5 曲妥珠单抗 Fab 片段和 HER2 胞外区域 (ECD) 的界面接触氨基酸

编号	曲妥珠单抗轻链	抗原 HER2
1	ASP28L(CL1)	GLU598C
2	ASN30L(CL1)	PRO571C, ASP596C, GLU598C, ALA600C, CYS601C, GLN602C
3	THR31L(CL1)	CYS601C, GLN602C, PRO603C
4	ALA32L(CL1)	PRO571C
5	TYR49L	PRO603C
6	SER50L(CL2)	LYS593C, PRO603C
7	PHE53L(CL2)	PRO603C, CYS604C, PRO605C
8	ARG66L	ASP596C, GLU598C
9	HIS91L(CL3)	ASP570C, PRO571C, PRO572C
10	TYR92L(CL3)	LYS569C, PRO571C, PRO572C, GLU598C, ALA600C
11	THR93L(CL3)	ASP560C, PRO572C
12	THR94L(CL3)	ASP560C, PRO572C
13	TYR33H	GLU558C, PHE573C
14	ARG50H	GLU558C, ASP560C, PRO572C, PHE573C
15	TYR52H	GLU558C
16	TYR57H	TYR532C, PRO540C, PRO557C, GLU558C
17	THR58H	GLU558C
18	ARG59H	GLU558C, ASP560C, GLN561C
19	TRP99H	PRO572C, PHE573C
20	GLY101H	ILE591C
21	ASP102H	PRO579C, ILE591C
22	GLY103H	ASP570C, PRO579C, ILE591C, LYS593C
23	PHE104H	ILE591C, LYS593C

24	TYR105H	ASP570C,PRO571C,PRO572C,PHE573C,VAL575C,LYS593C
----	---------	---

从以上结果可以看出

组合 1: P571,P572 本身与 Fab 几个关键氨基酸都有作用力的形成。考虑这两个氨基酸处于 loop 转角处, 如突变将影响本身结构稳定性。

组合 2: GLU558 与曲妥珠 Fab 重链 ARG50 形成离子键, 同 Fab 重链多个氨基酸形成范德华力, 破坏可以阻断曲妥珠 Fab 与 HER2 的作用, 因此选择将 GLU558→ALA558; PHE573 与 Fab 重链多个氨基酸形成范德华力, 包括关键氨基酸 ARG508,TRP99,TYR105, 破坏可以阻断 Fab 与 HER2 的作用, 因此选择将 PHE573→ALA573。

以上分析结果可以见图 3。

2. 只结合曲妥珠单抗的 HER2 变体蛋白的设计

Matthew C. Franklin 在 Cancer cell 上发表了帕托珠单抗 Fab 与 HER2 胞外结构的复合物结构。该团队同时用丙氨酸扫描的方法研究了 HER2 哪些关键氨基酸会影响与帕托珠单抗 Fab 的结合。其研究表明, HER2 蛋白表面 H296, S288, L295 等氨基酸具有明显的作用, 本发明选择了 S288A/H296A 双突变用于获得只结合曲妥珠单抗的 HER2 抗原。

其中只被 Trastuzumab 识别的 HER2 变体蛋白命名为 HER2m1, 只被 Pertuzumab 识别的 HER2 变体蛋白命名为 HER2m2 和 HER2m3。HER2 变体蛋白的氨基酸序列分别为:

HER2m1:

TQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYL
PTNASLSFLQDIQEVQGYVLIHQNVRQVPLQRLRIVRGTTQLFEDNYA
LAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQL
CYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRWGES
SEDCQSLTRTVCAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLA
CLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYN
YLSTDVGACTLVCPLANQEVTAEADGTQRCEKCSKPCARVCYGLGME
HLREVRVAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQ
LQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPLDSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTL
QGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNTLHLCFVHTVPWDQLFRNPHQA
LLHTANRPEDECVGEGGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQ
ECVVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCV

ACAHYKDPPFCVARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTH
SCVDLDDKGCPAEQRASPLT (SEQ ID NO: 13)

HER2m2:

TQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYL
PTNASLSFLQDIQEVQGYVLIHQNVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYA
LAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQL
CYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRWGES
SEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLA
CLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYN
YLSTDVGSCTLVCPLHNQEVTAEADGTQRCEKCSKPCARVCYGLGME
HLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQ
LQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPLDSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTL
QGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNTLHLCFVHTVPWDQLFRNPHQA
LLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQ
ECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPAADQC
VACAHYKDPAFCVARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCT
HSCVDLDDKGCPAEQRASPLT (SEQ ID NO: 14)

HER2m3:

TQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYL
PTNASLSFLQDIQEVQGYVLIHQNVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYA
LAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQL
CYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRWGES
SEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLA
CLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYN
YLSTDVGSCTLVCPLHNQEVTAEADGTQRCEKCSKPCARVCYGLGME
HLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQ
LQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPLDSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTL
QGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNTLHLCFVHTVPWDQLFRNPHQA
LLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQ
ECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCV
ACAHYKDAAFVCVARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTH
SCVDLDDKGCPAEQRASPLT (SEQ ID NO: 15)

3. 商业化哺乳动物细胞表达载体 pcDNA4/myc-HisA 的改造

商业化载体 pcDNA4/myc-HisA (Invitrogen, V863-20) 含有两个 PvuII 酶切位点, 分别在大约 1411bp 和 3160bp 的位置。对质粒定点突变, 将 3160bp 位置的碱基 C 突变为 G, 去除在该位置的 PvuII 酶切位点, 只保留在大约 1411bp 处的一个酶切位点, 新的载体命名为 pcDNA4m。

根据 NCBI 上人免疫球蛋白 gamma1 (IgG1) 的可结晶片段 (Fc) 的 DNA 序列 (AY623427) 设计引物, 如下

F: AAGCTTCCCTTACCCGGATCCGAAATCCTCTGACAAAAC
AC (SEQ ID NO: 29)

R: CCCGAATTCTATTTACCCGGAGACAGGGAG (SEQ ID NO:
30)

其中上游引物中添加了 HindIII 以及 BamHI 的酶切位点, 用于后续克隆, 下游引物中添加了 EcoRI 的酶切位点。

以 PBMC 的全 cDNA 为模板, 扩增得到 Fc 片段的基因, 之后经 Takara 公司的 HindIII 与 EcoRI 双酶切克隆到改造的载体 pcDNA4m 中, 测序验证构建质粒的准确性, 获得重组质粒 pcDNA4m-Fc。

4. HER2 变体蛋白真核表达载体的构建

根据 NCBI 上 HER2 蛋白的 DNA 序列信息 (NM_004448.2) 设计引物, 将野生型 HER2 蛋白的胞外结构域 (第 1 至第 652 位氨基酸残基) 克隆出来, 所用引物如下:

F: GCCAAGCTTGCCACCATGGAGCTGGCGGCCT (SEQ ID NO:
31)

R: CGCGGATCCATCGTCAGAGGGCTGGCTCTC (SEQ ID NO:
32)

引物中包含了上游的 HindIII 识别位点以及下游的 BamHI 识别位点。利用 BT474 细胞 (购自中科院上海细胞库) 的 cDNA 作为模板, 扩增得到编码 HER2wt 的胞外结构域的 1.9kb 长的 DNA 片段并克隆进商业化的 T 载体中 (pMD19-T Simple Vector; 购自 Takara 公司), 得到 T-Her2ECD 质粒, 测序确认序列的正确性。

根据前述得到的只被 Trastuzumab 识别的 HER2 变体蛋白 HER2m1 以及只被 Pertuzumab 识别的 HER2 变体蛋白 HER2m2 以及 HER2m3 的氨基酸序列, 根据突变位点设计相应的突变引物:

M1-F: GCACCCTCGTCTGCCCCCTGGCTAACCAAGAGG
(SEQ ID NO: 33)

M1-R: GGGGGCAGACGAGGGTGCAAGCTCCCACGT

(SEQ ID NO: 34)

M2-1-F: GGACCGGCGGCTGACCA (SEQ ID NO: 35)

M2-1-R: TGGTCAGCCCGCGGTCC (SEQ ID NO: 36)

M2-2-F: TATAAGGACCCTGCCTTCTGCG (SEQ ID NO: 37)

M2-2-R: CGCAGAAGGCAGGGTCCTTAT (SEQ ID NO: 38)

M3-F: CTATAAGGACGCTGCCTTCTGCG (SEQ ID NO: 39)

M3-R: CGCAGAAGGCAGCGTCCTTATAG (SEQ ID NO: 40)

以 T-Her2ECD 质粒为模板, 利用上述引物进行定点突变, 得到三个 HER2 胞外结构域的变体蛋白 (HER2m1, HER2m2, HER2m3) 的基因。之后, 经 Takara 公司的 HindIII 与 BamHI 双酶切克隆到载体 pcDNA4m-Fc 上, 将 HER2m1, HER2m2, HER2m3 三个基因分别融合于 Fc 基因的 5' 端, 得到三个新载体, 命名为: pcDNA4m-Her2m1-Fc, pcDNA4m-Her2m2-Fc, pcDNA4m-Her2m3-Fc。这三个载体可用于在哺乳动物细胞中表达融合蛋白 HER2m1-Fc, HER2m2-Fc, HER2m3-Fc。

5. HER2 变体蛋白的瞬时表达及纯化

转染前两天, 准备 200mL × 3 经悬浮驯化的 HEK293 (ATCC, CRL-1573™) 细胞用于瞬时转染, 接种密度为 0.8×10^6 cells/mL。两天后对待转染细胞悬液进行计数细胞密度为 $3.5 \sim 4 \times 10^6$ cells/mL, 取细胞悬液 1000rpm 离心 5min, 弃上清液。用 40mL × 3 的新鲜的 Freestyle293 培养基重新悬浮细胞, 再次 1000rpm 离心 5min, 弃上清液。用 200mL × 3 Freestyle293 培养基重新悬浮 293 细胞。将实施例 2-4 中所得的 3 个 HER2 变体蛋白的表达载体各取 200μg, 分别用 2mL Freestyle293 培养基稀释。随后用 5mL Freestyle293 培养基稀释 1.5mL Polyethylenimine, 配置转化所需 PEI 溶液。分别在稀释好的 2mL 的表达用质粒中加入 2mL 的 PEI 溶液并混匀, 室温静置 5 分钟。将 3 份质粒/PEI 混合物分别加入 3 份 200mL 细胞悬液中, 放置在 37°C, 10% CO₂, 90rpm 中培养; 同时补加 50μg/L IGF-1。四小时后于每份转化样品中再分别补加 200mL EX293 培养基, 2mM Glutamine 和 50ug/L IGF-1, 135rpm 培养。二十四小时后加 3.8mM VPA。

培养 5~6 天后, 分别收集 3 份 400mL 的 HER2 变体蛋白细胞瞬时表达培养上清液, 通过 ProteinA 亲和层析法, 初步纯化得到 HER2 变体蛋白样品。其中 HER2m3 表达水平非常低, 其细胞培养上清中模板蛋白的滴度小于 0.5mg/L, 推测主要是由于蛋白变体不稳定造成的, 因此对该蛋白没有进一步纯化。得到的 HER2m1 和 HER2m2 变体蛋白通过纯化计算的表达水平约 20mg/L。得到的蛋白样品利用 SDS-PAGE 进行初步的检测, 可以清晰

的看到目的条带（见图 4）。

6. 用 ELISA 法检测 HER2 变体蛋白对 Trastuzumab 或 Pertuzumab 的特异性结合

用 Trastuzumab 单抗蛋白或 Pertuzumab 单抗包被酶标板，4℃过夜。之后加入 3% BSA 溶液，室温封闭 2 小时。待检样品（HER2m1 或是 HER2m2 蛋白）预先用生物素标记，之后生物素化的蛋白 HER2m1-Biotin 以及 HER2m2-Biotin 自 16μg/mL 起，1:4 梯度稀释，直至 0.224ng/μL，共 9 个梯度。酶标板中加入梯度稀释的生物素化的 HER2 变体蛋白样品，室温反应 2 小时。之后加入 HRP 标记的链霉亲和素，室温作用 1.5 小时，最后催化底物显色读数。得到的数据通过四参数法拟合，得到亲和曲线。

如图 5 所示，HER2m1 蛋白对 Pertuzumab 的表观亲和力与其对 Trastuzumab 的表观亲和力相比，降低了 20 倍，可以认为该变体蛋白为 Trastuzumab 特异性抗原蛋白。而 HER2m2 蛋白对 Trastuzumab 的表观亲和力比起对 Trastuzumab 的表观亲和力降低了 >2 个数量级，表现为 Pertuzumab 特异性抗原。

实施例 4 用共同轻链替换 Tmab 及 Pmab 原始轻链，并验证共同轻链的效果

1. 携带共同轻链的 Tmab 及 Pmab 单抗真核表达载体的构建

根据专利 US2009/0285837A1 搜索到的 Trastuzumab 和 Pertuzumab 全抗体的氨基酸序列（专利中图 2 及图 16），利用 DNAnworks 在线工具（<http://helixweb.nih.gov/dnaworks/>）设计对应的编码 DNA 序列，并通过人工合成方法获得 Trastuzumab 的重链基因（SEQ ID NO:16）、Pertuzumab 的重链基因（SEQ ID NO:17）。根据实施例 1 中得到的一组共同轻链的氨基酸序列（SEQ ID NO:1~6），利用 DNAnworks 在线工具（<http://helixweb.nih.gov/dnaworks/>）设计对应的编码 DNA 序列，并通过人工合成方法获得 Pmab-Tmab 双特异性抗体的共同轻链基因 CLC1（SEQ ID NO: 7）以及 CLC5（SEQ NO: 11）。

之后根据 CLC2~CLC6 的序列设计突变引物，序列如下：

T31I-F: GACGTGAACATTGCCGTTGC (SEQ ID NO: 41)

T31I-R: GCAACGGCAATGTTTCACGTC (SEQ ID NO: 42)

T94Y-F: AGCACTATACTTATCCTCCAACATTC (SEQ ID NO:

43)

T94Y-R: ATGTTGGAGGATAAGTATAGTGCTG (SEQ ID NO: 44)

Y94T-F: TCGCCACCACTTATTGTCAG (SEQ ID NO: 45)

Y94T-R: CTGACAATAAGTGGTGGCGA (SEQ ID NO: 46)

以 CLC1 基因为模板, 利用 T31I 及 T94Y 两对引物定点突变得得到 CLC2~CLC4 的基因序列 (SEQ ID NO: 8~SEQ ID NO: 10); 以 CLC5 为模板, 利用 Y94T 引物对定点突变得得到 CLC6 基因序列 (SEQ ID NO: 12)。

合成好的 Trastuzumab 的重链基因、Pertuzumab 的重链基因、以及共同轻链基因 (CLC1~CLC6) 分别经 Takara 公司的 HindIII 与 EcoRI 双酶切亚克隆到改造的载体 pcDNA4m 中, 测序验证构建质粒的准确性, 获得重组质粒 DNA 即: pcDNA4m-TmabHC, pcDNA4m-PmabHC 以及共同轻链相关载体 pcDNA4m-CLC1~pcDNA4m-CLC6。

取上述构建成功的共同轻链基因表达载体 pcDNA4m-CLC1~6 用 Takara 公司的 Bgl II, Pvu II 双酶切。酶切产物通过 0.8% 的琼脂糖电泳分离纯化, 并分别回收约 2 kb 大小含有共同基因的 DNA 片段; pcDNA4m-TmabHC 经 BglIII, NruI 双酶切回收约 6kb 大小含有 TmabHC 基因的 DNA 片段; pcDNA4m-PmabHC 经 BglIII, NruI 双酶切回收约 6kb 大小含有 PmabHC 基因的 DNA 片段。随后将酶切处理过的 DNA 片段进行连接, 将 TmabHC 或 PmabHC 的表达原件与不同序列的共同轻链表达原件整合在一起, 获得重组质粒 pcDNA4m-Tmab-CLC1、pcDNA4m-Tmab-CLC2、pcDNA4m-Tmab-CLC3、pcDNA4m-Tmab-CLC4、pcDNA4m-Tmab-CLC5、pcDNA4m-Tmab-CLC6、pcDNA4m-Pmab-CLC1、pcDNA4m-Pmab-CLC2、pcDNA4m-Pmab-CLC3、pcDNA4m-Pmab-CLC4、pcDNA4m-Pmab-CLC5、pcDNA4m-Pmab-CLC6。

2. 携带共同轻链的 Tmab 及 Pmab 单抗的瞬时表达及纯化

转染前两天, 准备 50mL × 12 经悬浮驯化的 HEK293 (ATCC, CRL-1573™) 细胞用于瞬时转染, 接种密度为 0.8×10^6 cells/mL。两天后对待转染细胞悬液进行计数细胞密度为 $3.5 \sim 4 \times 10^6$ cells/mL, 取细胞悬液 1000rpm 离心 5min, 弃上清液。用 10mL × 12 的新鲜的 Freestyle293 培养基重新悬浮细胞, 再次 1000rpm 离心 5min, 弃上清液。用 50mL × 12 Freestyle293 培养基重新悬浮 293 细胞。将实施例 4-1 中所得的 12 个共同轻链单抗相关的表达载体各取 50μg, 分别用 0.5mL Freestyle293 培养基稀释。随后用 5mL Freestyle293 培养基稀释 1.5mL Polyethylenimine, 配置转化所需 PEI 溶液。分别在稀释好的 0.5mL 的表达用质粒中加入 0.5mL 的 PEI 溶

液并混匀，室温静置 5 分钟。将 12 份质粒/PEI 混合物分别加入 12 份 50mL 细胞悬液中，放置在 37°C, 10% CO₂, 90rpm 中培养；同时补加 50μg/L IGF-1。四小时后于每份转化样品中再分别补加 50mL EX293 培养基，2mM Glutamine 和 50μg/L IGF-1，135rpm 培养。二十四小时后加 3.8mM VPA。

培养 5~6 天后，分别收集 12 份 100mL 的共同轻链单抗细胞瞬时表达培养上清液，通过 ProteinA 亲和层析法，初步纯化得到 12 个共同轻链单抗蛋白样品：Tmab-CLC1~6 以及 Pmab-CLC1~6；每个单抗通过纯化计算的表达水平见表 6。

一步亲和层析纯化得到的蛋白样品利用非还原的 SDS-PAGE 进行初步的检测。可以看到，如图 6 所示，所有的共同轻链单抗蛋白在还原胶上都能看到清晰的两条带，分别为位于 25kDa 与 35kDa 之间的轻链条带及位于 85kDa 和 50kDa 之间的重链条带。蛋白样品的纯度通过 SE-HPLC 进行检测，结果见表 6。

表 6 共同轻链单抗细胞瞬时表达水平及一步纯化后后样品纯度

共同轻链单抗样品	表达水平 (mg/L)	样品纯 (%)
TmabCLC1	56	98.7
TmabCLC2	28	98.8
TmabCLC3	38	98.7
TmabCLC4	56	96.4
TmabCLC5	25	95.2
TmabCLC6	38	96.1
PmabCLC1	48	95.7
PmabCLC2	50	96.8
PmabCLC3	51	96.9
PmabCLC4	46	98.9
PmabCLC5	40	98.7
PmabCLC6	42	98.9

3. 用 ELISA 法对携带共同轻链的 Tmab 及 Pmab 单抗进行亲和力分析
检测带有共同轻链的 Trastuzumab 及 Pertuzumab 对其各自的特异性抗原的亲和力变化，所用的间接 ELISA 的方法与实施例 2-6 中所述相似。其中，检测带有共同轻链的 Trastuzumab 的亲和力变化时，使用其特异性抗原蛋白 HER2m1 进行检测；检测带有共同轻链的 Pertuzumab 的亲和力变化时，使用其特异性抗原蛋白 HER2m2 进行检测。得到的亲和力曲线见图 7~8，

根据 EC50 判断, 当使用由原始 Trastuzumab 的轻链改造而来的共同轻链 (CLC1~CLC4) 时, Trastuzumab 对其特异性抗原 HER2m1 的亲合力没有明显改变; 而 Pertuzumab 对其特异性抗原 HER2m2 的亲合力略有降低, 但是这种变化在可接受范围内。而当使用由原始 Pertuzumab 的轻链改造得到的共同轻链 (CLC5 和 CLC6) 时, Pertuzumab 对其特异性抗原 HER2m2 的亲合力没有明显改变, 但是 Trastuzumab 对其特异性抗原 HER2m1 的亲合力降低了近一倍。

实施例 5 Ptmap 双特异性抗体的制备和鉴定

1. Ptmap 双特异性抗体的瞬时表达及纯化

对 pcDNA4m-Tmab-CLC1 中的 TmabHC 的 Fc 片段进行点突变, 使 TmabHC 成为 TmabHC-knob (重链序列为 SEQ ID NO: 19 所示; 突变的残基为: S354C, T366W), 并进一步构建 pcDNA4m-Tmabknob-CLC1; 同时利用定点突变, 将 pcDNA4m-Pmab-CLC1 中的 PmabHC 中的氨基酸残基参照专利 CN102558355A, 突变为 PmabHC-hole (重链序列为 SEQ ID NO: 20 所示, 突变的残基为: Y349C, T366S, L368A, Y407V), 并进一步构建 pcDNA4m-Pmabhole-CLC1。具体突变方案参照 CN102558355A。这两个新构建的质粒将在“把手-孔洞”模型上, 利用共同轻链模型构建 Pmab-Tmab 双特异性抗体。

2. Ptmap 双特异性抗体的瞬时表达及纯化

转染前两天, 准备 600mL 经悬浮驯化的 HEK293(ATCC, CRL-1573™) 细胞用于瞬时转染, 接种密度为 0.8×10^6 cells/mL。两天后对待转染细胞悬液进行计数细胞密度为 $3.5 \sim 4 \times 10^6$ cells/mL, 取细胞悬液 1000rpm 离心 5min, 弃上清液。用 100 mL 的新鲜的 Freestyle293 培养基重新悬浮细胞, 再次 1000rpm 离心 5min, 弃上清液。用 600 mL Freestyle293 培养基重新悬浮 293 细胞。取 pcDNA4m-Tmabknob-CLC1 及 pcDNA4m-Pmabhole-CLC1 各 300 μ g 混匀后用 3mL Freestyle293 培养基稀释。随后用 5mL Freestyle293 培养基稀释 1.5mL Polyethylenimine, 配制转化所需 PEI 溶液, 并在稀释好的 3mL 混合质粒中加入 3mL 的 PEI 溶液并混匀, 室温静置 5 分钟。将质粒/PEI 混合物加入 600mL 的细胞悬液中, 放置在 37°C, 10% CO₂, 90rpm 中培养; 同时补加 50 μ g/L IGF-1。四小时后于转化样品中再分别补加 600mL EX293 培养基, 2mM Glutamine 和 50 μ g/L IGF-1, 135rpm 培养。二十四小时后加 3.8mM VPA。

培养 6~7 天后, 收集 1200mL 的 Ptmap 双特异性抗体细胞瞬时表达培

养上清液，通过 ProteinA 亲和层析法以及离子交换层析法和分子筛层析法初步纯化得到 Ptmab 双特异性蛋白样品，命名为 KN026。根据 OD280 计算得到 KN026 瞬时表达水平可达到 80mg/L。

纯化得到的蛋白样品利用 SDS-PAGE 进行初步的检测。可以看到，如图 9 所示，KN026 双特异性抗体蛋白在还原胶上能看到清晰的两条带，分别为位于 25kDa 与 35kDa 之间的轻链条带及位于 85kDa 和 50kDa 之间的重链条带。同时，非还原条件下，KN026 为一条带。蛋白样品的纯度通过 SE-HPLC 进行检测，结果见图 10，纯度约 95%。

3. 用 Bridging ELISA 法验证 KN026 抗体蛋白能同时识别 Trastuzumab 和 Pertuzumab 各自的特异性抗原

用 Trastuzumab 特异性抗原蛋白 HER2m1 包被酶标板，4℃过夜。之后加入 3% BSA 溶液，室温封闭 2 小时。待检样品自 5μg/mL 起，1:3 梯度稀释，直至 1.06ng/uL，共八个梯度。酶标板中加入梯度稀释的待检样品，室温反应 2 小时。之后生物素化的 Pertuzumab 特异性抗原蛋白 HER2m2-Biotin 加入酶标板，和待检样品室温反应 2 小时。随后加入 HRP 标记的链霉亲和素，与 HER2m2-Biotin 室温作用 1.5 小时，最后催化底物显色读数。得到的数据通过四参数法拟合，得到亲和曲线。

如图 11 所示，只有同时能识别两种抗原的双特异性抗体 KN026 才能够得到亲和曲线，而对于只能特异性识别一种抗原的 Trastuzumab 或 Pertuzumab，则即使在最高浓度，也不能看到明显的显色读值。

实施例 6 Ptmab 抗体混合物的制备和鉴定

1. Ptmab 抗体混合物的瞬时表达及纯化

对 pcDNA4m-Tmab-CLC1 中的 TmabHC 的 Fc 片段进行点突变，使 TmabHC 成为 TmabHC-mix1（其中重链序列如 SEQ ID NO: 21 所示），并进一步构建 pcDNA4m-Tmabmix1-CLC1，具体突变方案参照专利 CN 103388013A 实施例 1。这两个新构建的质粒将在“电荷排斥”混合物模型上，利用共同轻链模型构建可在单一重组细胞株中表达的 Pmab、Tmab 抗体混合物。

2. Pmab、Tmab 抗体混合物的瞬时表达及纯化

转染前两天，准备 600mL 经悬浮驯化的 HEK293(ATCC, CRL-1573™) 细胞用于瞬时转染，接种密度为 0.8×10^6 cells/mL。两天后对待转染细胞悬液进行计数细胞密度为 $3.5 \sim 4 \times 10^6$ cells/mL，取细胞悬液 1000rpm 离心 5min，弃上清液。用 100 mL 的新鲜的 Freestyle293 培养基重新悬浮细胞，再次

1000rpm 离心 5min, 弃上清液。用 600 mL Freestyle293 培养基重新悬浮 293 细胞。取 pcDNA4m-Tmabmix1-CLC1 及 pcDNA4m-Pmab-CLC1 (其中重链序列如 SEQ ID NO: 22 所示) 各 300 μ g 混匀后用 3mL Freestyle293 培养基稀释。随后用 5mL Freestyle293 培养基稀释 1.5mL Polyethylenimine, 配制转化所需 PEI 溶液, 并在稀释好的 3mL 混合质粒中加入 3mL 的 PEI 溶液并混匀, 室温静置 5 分钟。将质粒/PEI 混合物加入 600mL 的细胞悬液中, 放置在 37 $^{\circ}$ C, 10% CO₂, 90rpm 中培养; 同时补加 50 μ g/L IGF-1。四小时后于转化样品中再分别补加 600mL EX293 培养基, 2mM Glutamine 和 50 μ g/L IGF-1, 135rpm 培养。二十四小时后加 3.8mM VPA。

培养 6~7 天后, 收集 1200mL 的 Pmab、Tmab 抗体混合物细胞瞬时表达培养上清液, 通过 ProteinA 亲和层析法, 初步纯化得到 Pmab、Tmab 抗体混合物蛋白样品, 命名为 KN010。根据 OD280 计算得到 KN010 瞬时表达水平可达到 100mg/L。

一步亲和层析纯化得到的蛋白样品利用 SDS-PAGE 进行初步的检测。可以看到, 如图 12 所示, 共同轻链混合单抗蛋白产物在还原胶上能看到清晰的两条带, 分别为位于 25kDa 与 35kDa 之间的轻链条带及位于 85kDa 和 50kDa 之间的重链条带。同时, 非还原条件下, KN010 为一条带。蛋白样品的纯度通过 SE-HPLC 进行检测, 结果见图 13, 纯度约 95%。

3. 用同抗原 Bridging ELISA 法验证 KN010 抗体蛋白能分别识别 Trastuzumab 和 Pertuzumab 各自的特异性抗原; 用异抗原 Bridging ELISA 法验证 KN010 不能同时识别这一对抗原。

用 Trastuzumab 特异性抗原蛋白 HER2m1 包被酶标板, 4 $^{\circ}$ C 过夜。之后加入 3% BSA 溶液, 室温封闭 2 小时。待检样品自 2.5 μ g/mL 起, 1:4 梯度稀释, 直至 0.61ng/ μ L, 共七个梯度。酶标板中加入梯度稀释的待检样品, 室温反应 2 小时。之后用生物素化的 Pertuzumab 特异性抗原蛋白 HER2m2-Biotin, 或者生物素化的 HER2m1-Biotin 加入酶标板, 和待检样品室温反应 2 小时。随后加入 HRP 标记的链霉亲和素, 与 HER2m2-Biotin 或者 HER2m1-Biotin 室温作用 1.5 小时, 最后催化底物显色读数。得到的数据通过四参数法拟合, 得到亲和曲线。

用 Perstuzumab 特异性抗原蛋白 HER2m2 包被酶标板, 4 $^{\circ}$ C 过夜。之后加入 3% BSA 溶液, 室温封闭 2 小时。待检样品自 2.5 μ g/mL 起, 1:4 梯度稀释, 直至 0.61ng/ μ L, 共七个梯度。酶标板中加入梯度稀释的待检样品, 室温反应 2 小时。之后用生物素化的 Pertuzumab 特异性抗原蛋白 HER2m2-Biotin 加入酶标板, 和待检样品室温反应 2 小时。随后加入 HRP

标记的链霉亲和素，与 HER2m2-Biotin 室温作用 1.5 小时，最后催化底物显色读数。得到的数据通过四参数法拟合，得到亲和曲线。

如图 14 所示，KN010 蛋白的两臂通过同抗原桥式 ELISA 证明能同时识别 Trastuzumab 的抗原，或者同时识别 Pertuzumab 的抗原。这说明 KN010 蛋白中至少包括了两种能识别不同抗原靶标的抗体。但是异抗原桥式 ELISA 没有得到显色，证明 KN010 的双臂不能同时识别两种抗原，即 KN010 中不含有 Ptmap 异二聚体的成分。

实施例 7 Ptmap 双特异性抗体的对细胞表面 HER2 蛋白的结合作用

1. Ptmap 双特异性抗体对人乳腺癌 BT474 细胞表面 HER2 蛋白的结合作用

利用流式细胞仪观察 HER2 高表达乳腺癌细胞 BT474 与 Ptmap 双特异性抗体、Pertuzumab、Trastuzumab 等 HER2 抗体的结合情况，并考察其作用的浓度依存性。

取 BT474 细胞，消化后用 5%BSA/PBS 重悬，并于每个 1.5mL 离心管中加入 3×10^5 个/管细胞；待测样品自 100 μ g/mL 起 3 倍稀释，至 0.001694 μ g/mL，共 11 个浓度。将样品与细胞反应，然后加入 FITC-兔抗人 IgG 检测与细胞结合待测抗体，并利用流式细胞仪读取平均荧光值 (MFI)。用 MFI 对抗体浓度的对数值做曲线，并通过四参数法拟合，得到待检抗体与 BT474 细胞结合的浓度依存性曲线。由图 15 可知，Ptmap 双特异性抗体 (KN026) 以及 Pertuzumab、Trastuzumab 都与 BT474 有明显结合，且此种作用存在浓度依存性。从结合曲线的 EC50 可以看出，KN026 对 BT474 细胞表面 HER2 蛋白的亲合力接近 Trastuzumab。

2. Ptmap 双特异性抗体对人胃癌 N-87 细胞表面 HER2 蛋白的结合作用

利用流式细胞仪观察 HER2 高表达胃癌细胞 N-87 与 Ptmap 双特异性抗体 KN026、Pertuzumab、Trastuzumab 等 HER2 抗体的结合情况，并考察其作用的浓度依存性。

取 N-87 细胞，消化后用 5%BSA/PBS 重悬，并于每个 1.5mL 离心管中加入 3×10^5 个/管细胞；待测样品自 40 μ g/mL 起，2 倍稀释至 0.009766 μ g/mL，共 13 个浓度。将样品与细胞反应，然后加入 FITC-兔抗人 IgG 检测与细胞结合待测抗体，并利用流式细胞仪读取平均荧光值 (MFI)。用 MFI 对抗体浓度的对数值做曲线，并通过四参数法拟合，得到待检抗体与 N-87 细胞结合的浓度依存性曲线。由图 16 可知，Ptmap 双特异性抗体 (KN026) 以及

Pertuzumab、Trastuzumab 都与 N-87 有明显结合，且此种作用存在浓度依存性。从结合曲线的 EC50 可以看出，KN026 对 N-87 细胞表面 HER2 蛋白的亲合力略低于 Trastuzumab 和 Pertuzumab。

实施例 8 Pmab、Tmab 抗体混合物对细胞表面 Her2 蛋白的结合作用

Pmab、Tmab 抗体混合物对人乳腺癌 BT474 细胞表面 HER2 蛋白的结合作用

利用流式细胞仪观察 HER2 高表达乳腺癌细胞 BT474 与 Pmab、Tmab 抗体混合物、Pertuzumab、Trastuzumab 等 HER2 抗体的结合情况，并考察其作用的浓度依存性。

取 BT474 细胞，消化后用 5%BSA/PBS 重悬，并于每个 1.5mL 离心管中加入 15×10^6 个/管细胞；待测样品自 1000 μ g/mL 起 3 倍稀释，至 0.01694 μ g/mL，共 11 个浓度。将样品与细胞反应，然后加入 FITC-兔抗人 IgG 检测与细胞结合待测抗体，并利用流式细胞仪读取平均荧光值 (MFI)。用 MFI 对抗体浓度的对数值做曲线，并通过四参数法拟合，得到待检抗体与 BT474 细胞结合的浓度依存性曲线。由图 17 可知，Pmab、Tmab 抗体混合物 (KN010) 以及 Pertuzumab、Trastuzumab 都与 BT474 有明显结合，且此种作用存在浓度依存性。从结合曲线的 EC50 可以看出，KN010 对 BT474 细胞表面 HER2 蛋白的亲合力介于 Trastuzumab 和 Pertuzumab 之间。

实施例 9 Ptmab 双特异性抗体的癌细胞增殖的抑制作用

1. Ptmab 双特异性抗体对人乳腺癌 BT474 细胞增殖的抑制作用

利用 CKK-8 法观察 HER2 高表达乳腺癌细胞 BT474 在 Ptmab 双特异性抗体、Pertuzumab、Trastuzumab 等 HER2 抗体存在的条件下其增殖情况的变化，从而比较并评价 Ptmab 双特异性抗体对 BT474 癌细胞增殖作用的抑制效果。

BT474 细胞用于 96 孔板，密度为 10000 cells/well，37 $^{\circ}$ C 贴壁培养 16h。用 assay medium (DMEM 培养基，补充 1%的胎牛血清) 分别配制不同浓度的样品：最高 10 μ g/ml~0.0015 μ g/ml，3 倍稀释，共 9 个浓度。每个细胞孔中加入 150 μ l 样品，72h 后 CKK-8 试剂盒 (DOJINDO) 测定细胞活力。将得到的细胞活力值对样品浓度对数作图，并通过四参数法拟合，得到待测样品 (Ptmab 双特异性抗体 KN026) 以及参比品 (Trastuzumab 以及

Trastuzumab+Pertuzumab 联合给药) 的细胞杀伤曲线。

由图 18 所示, KN026 与 Trastuzumab 及 Trastuzumab + Pertuzumab 联合用药都对 BT474 有明显杀伤效果, 且此效果具有浓度依存性。而双特异性抗体 KN026 在高浓度的情况下, 其对 BT474 的抑制效果要明显优于 Trastuzumab 单独使用或联合 Pertuzumab 使用。

2. Ptmaab 双特异性抗体对人胃癌 N-87 细胞增殖的抑制作用

利用 MTT 法观察 HER2 高表达胃癌细胞 N-87 在 Ptmaab 双特异性抗体、Pertuzumab、Trastuzumab 等 HER2 抗体存在的情况下其增殖情况的变化, 从而比较并评价 Ptmaab 双特异性抗体对 N-87 癌细胞增殖作用的抑制效果。

N-87 细胞用于 96 孔板, 密度为 10000 cells/well, 37°C 贴壁培养 16h。用 assay medium (RPMI-1640 培养基, 补充 1% 的胎牛血清) 分别配制不同浓度的样品: 最高 10 μ g/ml~0.0015 μ g/ml, 3 倍稀释, 共 9 个浓度。每个细胞孔中加入 150 μ l 样品, 72h 后 CKK-8 试剂盒 (DOJINDO) 测定细胞活力。将得到的细胞活力值对样品浓度对数作图, 并通过四参数法拟合, 得到待测样品 (Ptmaab 双特异性抗体) 以及参比品 (Trastuzumab 以及 Trastuzumab+Pertuzumab 联合给药) 的细胞杀伤曲线。

由图 19 所示, KN026 与 Trastuzumab 及 Trastuzumab + Pertuzumab 联合用药都对有明显杀伤效果, 且此效果具有浓度依存性。而双特异性抗体在高浓度的情况下, 其对 N-87 的抑制效果要明显优于 Trastuzumab 单独使用或联合 Pertuzumab 使用。

实施例 10 Ptmaab 双特异性抗体的热稳定性的评价

1. Ptmaab 双特异性抗体的 T_m 值的测定

采用 DSC (差式扫描热量仪) 的方法测定 Ptmaab 双特异性抗体 KN026 以及参考抗体 (此处用 Trastuzumab 作为参比品) 的 T_m 值, 并据此初步判断 Ptmaab 双特异性抗体的热稳定性。

样品蛋白于 1 \times PBS 缓冲液 (pH7.4) 中, 制备成 2mg/mL 浓度的溶液。自 10°C 开始, 以 60°C/hr 的速率对样品或空白缓冲液的比热容 (C_p) 进行扫描。将样品扫描的结果分别扣除相应缓冲液的结果, 利用得到的 C_p 值对温度作图, 其中, C_p 值明显升高的峰值所对应的温度即为样品的 T_m 值。

由图 20 可知, 与传统抗体相似, Ptmaab 双特异性抗体 KN026 以及 Trastuzumab 参比样品均显示两个明显的 T_m 值, 包括 60°C 左右的 CH₂ 溶解温度以及位于 80°C 左右的 CH₃ 的溶解温度。同时可以看出 60°C 左右的

T_m 值, 双特异性抗体和 Trastuzumab 参比品无显著差异; 80℃左右的 T_m 值, 双特异性抗体略低, 但是仍高于 80℃, 与参比品相比差别并不明显, 并不认为会对抗体的热稳定性造成影响。

实施例 11 Ptmap 双特异性抗体的小鼠药代实验

1. Ptmap 双特异性抗体的在小鼠中的代谢情况考察

选取 6~7 周 ICR 小鼠随机分为两组, 实验组单次腹腔注射 Ptmap 双特异性抗体 KN026 10mg/kg, 参比组单次腹腔注射 Trastuzumab 标准品 10mg/kg 进行实验。各组动物分为三个梯队, 每个梯队 4 只动物按时间点取血。各动物非终点取血(5 min - 96 h)时眼眶静脉丛取血约 0.2 ml; 终点取血时(192h - 576h), 异氟烷吸入麻醉后下腔静脉取血安乐死。血样采集后, 分离血清, -80℃冰箱暂存。

血清样品利用 Tmab 以及 Ptmap 特异性 ELISA 检测血药浓度, 检测出的血清中抗体含量对采血时间做曲线, 得到双特异性抗体 (KN026) 以及参比抗体 (赫赛汀) 的药代曲线 (见图 21), 并进一步计算相应药代参数 (表 7)。可以看到 Ptmap 双特异性抗体 (KN026) 在小鼠体内的半衰期比 Trastuzumab 略低一些, 但是仍然大于 10 天, 与大部分单抗药物在小鼠内的半衰期相似, 可以认为 Ptmap 在小鼠体内稳定性与常规单抗药物类似。

表 7 KN026 和 Trastuzumab 的药代参数

	t _{1/2}	T _{max}	C _{max}	AUC _{last}	AUC _{INF obs}	V _d	C ₁	MRT
	h	h	ug/ml	h*mg/ml	h*mg/ml	ml/kg	ml/h/kg	h
Ref.	288.15	24	95.40	25.57	33.51	124.05	0.30	208.55
KN026	259.23	8	83.63	18.48	23.33	160.29	0.43	203.23

实施例 12 Ptmap 双特异性抗体对人卵巢癌 SKOV3 裸鼠移植瘤模型的药效作用

Balb/c 裸鼠皮下接种人卵巢癌 SKOV3 细胞, 剂量为 5×10⁶cells+50%基质胶(matrigel)/只, 将成瘤小鼠随机分组, 每组 6 只(雌雄各半)。肿瘤大小长到约直径 100-150 mm³ 时, 开始注射抑瘤药物进行实验。腹腔给药, 每周给药两次; 连续给药 2 周。一周两次测量肿瘤的大小。实验组每次给药 Ptmap 双特性抗体 KN026 20mg/kg, 参比组每次给药 Trastuzumab 标准品, 或 Pertuzumab 标准品 20mg/kg, 空白对照组每次给药相同体积 PBS 缓冲液。

如图 22 所示, 实验组与参比组相对空白对照组, 对 SKOV3 的裸鼠移

植瘤模型均表现出一定的肿瘤抑制效果。其中 PTmab 双特异性抗体表现出比母本参比品 Trastuzumab 标准品, 或 Pertuzumab 标准品单独使用时更强的抑瘤效果。

实施例 13 Ptmap 双特异性抗体对人胃癌 N-87 裸鼠移植瘤模型的药效作用

Balb/c 裸鼠皮下接种人胃癌 N-87 细胞, 剂量为 4×10^6 cells/只, 将成瘤小鼠随机分组, 每组 6 只(雌雄各半)。肿瘤大小长到约直径 100-130 mm³ 时, 开始注射抑瘤药物进行实验。IP 给药, 每周给药两次; 连续给药 4-5 周。一周两次测量肿瘤的大小。

实验组每次给药 Ptmap 双特性抗体 KN026 5mg/kg, 参比组每次给药 Trastuzumab 标准品, 或 Pertuzumab 标准品 5mg/kg, 空白对照组每次给药相同体积 PBS 缓冲液。

如图 23 所示, 实验组与参比组相对空白对照组, 对 N-87 的裸鼠移植瘤模型均表现出一定的肿瘤抑制效果。其中 Ptmap 双特异性抗体表现出明显优于参比品 Trastuzumab 标准品, 或 Pertuzumab 标准品单独使用时的抑瘤效果。

实施例 14 Ptmap 双特异性抗体对人胃癌 N-87 裸鼠移植瘤模型的药效作用

Balb/c 裸鼠皮下接种人胃癌 N-87 细胞, 剂量为 4×10^6 cells/只, 将成瘤小鼠随机分组, 每组 6 只(雌雄各半)。肿瘤大小长到约直径 100-120 mm³ 时, 开始注射抑瘤药物进行实验。IP 给药, 每周给药两次, 连续给药 3 周。一周两次测量肿瘤的大小。

实验组给药 PTmap 双特性抗体 KN026 2.5mg/kg, 参比组每次给药 Trastuzumab 标准品与 Pertuzumab 标准品联合用药, 2.5mg/kg, 空白对照组每次给药相同体积 PBS 缓冲液。

如图 24 所示, 实验组与参比组相对空白对照组, 对 N-87 的裸鼠移植瘤模型均表现出一定的肿瘤抑制效果。其中 PTmap 双特异性抗体表现出比同等摩尔数给药参比品 Trastuzumab 标准品加 Pertuzumab 标准品联合使用时更强的抑瘤效果。

实施例 15 PTmap 双特异性抗体对 HER2 低表达肿瘤株人非小细胞肺癌 NCI-H522 小鼠移植瘤模型的剂量依赖性

NOD/SCID 免疫缺陷型小鼠皮下接种非小细胞肺癌 NCI-H522 细胞与 matrigel 混合物 (细胞: matrigel 比例为 1:1) 建立模型, 每只接种剂量为 5×10^6 cells/只, 将成瘤小鼠随机分组, 每组 6 只 (雌雄各半)。肿瘤大小长到约体积 100 mm^3 时, 开始注射抑瘤药物进行实验。首次 IP (腹腔) 给药当天标记为第 0 天。之后每周 IP 给药一次, 给药浓度为首次剂量减半; 连续给药 7 周。一周两次测量肿瘤的大小。

实验组共分三组, 分别按照如下剂量给药 PTmab 双特性抗体 KN026: 首次给药 30mg/kg, 之后每周每次给药 15mg/kg; 首次给药 10mg/kg, 之后每周每次给药 5mg/kg; 首次给药 3mg/kg, 之后每周每次给药 1.5mg/kg。空白对照组每次给药相同体积 PBS 缓冲液。

如图 27 所示, 三组实验组相对于空白对照组, 对 NCI-H522 小鼠移植瘤模型均表现出显著的肿瘤抑制效果, 且该效果呈现剂量依赖性。

实施例 16 PTmab 双特异性抗体对 HER2 低表达肿瘤株人非小细胞肺癌 NCI-H522 小鼠移植瘤模型的药效作用

NOD/SCID 免疫缺陷型小鼠皮下接种非小细胞肺癌 NCI-H522 细胞与 matrigel 混合物 (细胞: matrigel 比例为 1:1) 建立模型, 每只接种剂量为 5×10^6 cells/只, 将成瘤小鼠随机分组, 每组 6 只 (雌雄各半)。肿瘤大小长到约体积 100 mm^3 时, 开始注射抑瘤药物进行实验。首次 IP (腹腔) 给药当天标记为第 0 天, 给药剂量为 5mg/kg。之后每周 IP 给药一次, 给药浓度为首次剂量减半, 即 2.5mg/kg; 连续给药 7 周。一周两次测量肿瘤的大小。

实验组给药 PTmab 双特性抗体 KN026, 参比组每次给药 Trastuzumab 标准品与 Pertuzumab 标准品联合用药, 每种药都前述的剂量给, 即首次给药 5mgP+5mgT/kg, 之后每周每次给药 2.5mgP+2.5mgT/kg, 空白对照组每次给药相同体积 PBS 缓冲液。

如图 28 所示, 实验组与参比组相对空白对照组, 对 NCI-H522 小鼠移植瘤模型均表现出较为显著的肿瘤抑制效果。同时 PTmab 双特异性抗体单独给药与同等摩尔数给药参比品 Trastuzumab 标准品加 Pertuzumab 标准品联合使用时具有相当的抑瘤效果。

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述, 本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导, 可以对那些细节进行各种修改和替换, 这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

权 利 要 求

1. 双特异性抗体或其抗原结合部分，其特征在于所述双特异性抗体或其抗原结合部分具有共同轻链，所述共同轻链是指两条轻链具有相同的序列。

2. 权利要求 1 的双特异性抗体或其抗原结合部分，其重链能够分别与所述轻链在生理条件或体外的蛋白表达状态下正确结合。

3. 权利要求 1 或 2 的双特异性抗体或其抗原结合部分，其中所述共同轻链能够分别与帕妥珠单抗和曲妥株单抗的重链结合。

4. 权利要求 3 的双特异性抗体或其抗原结合部分，其中所述共同轻链选自帕妥珠单抗或曲妥株单抗的轻链或者它们的突变体。

5. 权利要求 4 的双特异性抗体或其抗原结合部分，其中所述共同轻链的可变区的序列包含选自如 SEQ ID NO: 1~SEQ ID NO: 6 中第 1~107 位氨基酸所示的序列。

6. 权利要求 3 的双特异性抗体或其抗原结合部分，其重链可变区分别为帕妥珠单抗和曲妥株单抗的重链可变区，例如分别包含如 SEQ ID NO: 23 和 SEQ ID NO: 24 所示的序列。

7. 权利要求 3 任一项的双特异性抗体或其抗原结合部分，其重链 Fc 段的序列分别包含如 SEQ ID NO: 25 和 SEQ ID NO: 26 所示的序列。

8. 权利要求 3 任一项的双特异性抗体或其抗原结合部分，其两条重链的序列分别包含如 SEQ ID NO: 19 和 SEQ ID NO: 20 所示的序列。

9. 能够在一个细胞中正确产生的抗体或其抗原结合部分的混合物，所述混合物包括至少两种抗体或其抗原结合部分，所述抗体或其抗原结合部分具有共同轻链，所述共同轻链是指两条轻链具有相同的序列。

10. 权利要求 9 的混合物，其中所述抗体或其抗原结合部分的重链能够分别与所述轻链在生理条件或体外的蛋白表达状态下正确结合。

11. 权利要求 9 或 10 的混合物，其中所述共同轻链能够分别与帕妥珠单抗和曲妥单抗的重链结合。

12. 权利要求 11 的混合物，其中所述共同轻链选自帕妥珠单抗或曲妥单抗的轻链或者它们的突变体。

13. 权利要求 11 的混合物，其中所述共同轻链的可变区的序列包含选自如 SEQ ID NO: 1 ~ SEQ ID NO: 6 中第 1 ~ 107 位氨基酸所示的序列。

14. 权利要求 11 的混合物，其中所述抗体或其抗原结合部分的重链可变区分别为帕妥珠单抗和曲妥单抗的重链可变区，例如分别包含如 SEQ ID NO: 23 和 SEQ ID NO: 24 所示的序列。

15. 权利要求 11 的混合物，其中所述抗体或其抗原结合部分的重链 Fc 段的序列分别包含如 SEQ ID NO: 27 和 SEQ ID NO: 28 所示的序列。

16. 权利要求 11 的混合物，其中所述抗体或其抗原结合部分的重链序列分别包含如 SEQ ID NO: 21 和 SEQ ID NO: 22 所示的序列。

17. HER2 蛋白胞外区域的变体蛋白，其与野生型 HER2 蛋白胞外区域的序列相比，具有选自如下一组的突变：

- 1) 第 558 位谷氨酸的突变和第 573 位苯丙氨酸的突变；
- 2) 第 288 位丝氨酸的突变和第 296 位组氨酸的突变。

18. 权利要求 17 的 HER2 蛋白胞外区域的变体蛋白，其特征在于以下 (1) ~ (4) 项中的一项或多项：

- (1) 将第 558 位谷氨酸突变为丙氨酸；
- (2) 将第 573 位苯丙氨酸突变为丙氨酸；
- (3) 将第 288 位丝氨酸突变为丙氨酸；
- (4) 将第 296 位组氨酸突变为丙氨酸。

19. 权利要求 18 的 HER2 蛋白胞外区域的变体蛋白，所述 HER2 蛋白胞外区域的变体蛋白包含选自如 SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14 和 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列。

20. 核酸分子，其编码权利要求 1-8 中任一项的双特异性抗体或其抗原结合部分或者权利要求 9-16 中任一项的混合物中所述的抗体或其抗原结合部分、或者所述抗体或其抗原结合部分的部分序列（例如轻链和/或重链），或者编码权利要求 17-19 任一项的 HER2 变体蛋白。

21. 重组载体，其含有权利要求 20 的核酸分子。

22. 重组细胞，其含有权利要求 21 的重组载体或权利要求 20 的核酸分子。

23. 一种根据两株针对不同抗原表位的单克隆抗体或其抗原结合部分制备双特异性抗体或其抗原结合部分的方法，其包括以下步骤：

根据两株单克隆抗体的轻链序列得到能够分别与两株单抗重链结合的共同轻链序列，所述共同轻链是指两条轻链具有相同的序列，优选地，该共同轻链为其中一株单抗的轻链或者为其中一株单抗轻链的突变体。

24. 权利要求 23 的方法，其进一步包括以下步骤：

分别将两株单抗的重链序列和共同轻链序列构建于表达载体中，得到两个重组表达载体；优选地，对重链序列特别是 Fc 段进行突变，以更有利于具有不同重链的两株单抗的 Fc 段的结合；

将两个重组表达载体转入同一宿主细胞，诱导表达，得到双特异性抗体或其抗原结合部分。

25. 权利要求 23 的方法，其中所述共同轻链的可变区的获取方法为，首先确定两株单抗的轻链可变区与各自抗原或抗原表位之间接触的界面氨基酸，然后确定以任意其中一株单抗的轻链可变区为候选共同轻链的可变区时，该共同轻链与该株单抗的抗原或抗原表位之间接触的界面氨基酸与另一株单抗轻链可变区的界面氨基酸相比较时的差异氨基酸，选取差异氨基酸数量较少的轻链可变区为共同轻链的可变区；优选地，对该共同轻链

的可变区进一步突变以获得与抗原或抗原表位亲合力更好的共同轻链的可变区。

26. 一种制备包括至少两种单克隆抗体或其抗原结合部分的混合物的方法，所述方法包括以下步骤：

根据两株单克隆抗体的轻链序列得到能够分别与两株单抗重链结合的共同轻链序列，所述共同轻链是指两条轻链具有相同的序列，优选地，该共同轻链为其中一株单抗的轻链或者为其中一株单抗轻链的突变体。

27. 权利要求 26 的方法，其进一步包括以下步骤：

分别将两株单抗的重链序列和共同轻链序列构建于表达载体中，得到两个重组表达载体；优选地，对重链序列特别是 Fc 段进行突变，以更有利于具有相同重链的单抗的 Fc 段的结合；

将两个重组表达载体转入同一宿主细胞，诱导表达，得到抗体或其抗原结合部分的混合物。

28. 权利要求 26 的方法，其中所述共同轻链的可变区的获取方法为，首先确定两株单抗的轻链可变区与各自抗原或抗原表位之间接触的界面氨基酸，然后确定以任意其中一株单抗的轻链可变区为候选共同轻链的可变区时，该共同轻链与该株单抗的抗原或抗原表位之间接触的界面氨基酸与另一株单抗轻链可变区的界面氨基酸相比较时的差异氨基酸，选取差异氨基酸数量较少的轻链可变区为共同轻链的可变区；优选地，对该共同轻链的可变区进一步突变以获得与抗原或抗原表位亲合力更好的共同轻链的可变区。

29. 一种检测抗体或其抗原结合部分是否为双特异性抗体或其抗原结合部分和/或对其定量的方法，所述方法包括以下步骤：

1) 分别制备能够和双特异性抗体或其抗原结合部分中的抗原结合部分 1 结合而不和抗原结合部分 2 结合的特异性抗原 1，以及能够和抗原结合部分 2 结合而不和抗原结合部分 1 结合的特异性抗原 2；

2) 取特异性抗原 1（或者特异性抗原 2）包被酶标板，加入待检抗体，反应一段时间，再加入标记的特异性抗原 2（或者特异性抗原 1），反应一段时间，最后加入能够与前述标记分子结合的检测分子，反应一段时间，

所述检测分子带有可检测的标记，根据检测原理读数，判断为反应阳性或阴性；

3) 当反应为阳性，并且该反应具有浓度依赖性时，则判断该抗体或其抗原结合部分为双特异性抗体或其抗原结合部分；任选地，根据所得阳性数值进一步对双特异性抗体或其抗原结合部分进行定量。

30. 一种检测抗体或其抗原结合部分的混合物中是否为同二聚体蛋白的方法，所述混合物包括两种抗体（抗体1和抗体2）或其抗原结合部分，所述方法包括以下步骤：

1) 分别制备能够和抗体1结合而不和抗体2结合的特异性抗原1，以及能够和抗体2结合而不和抗体1结合的特异性抗原2；

2) 取特异性抗原1（或者特异性抗原2）包被酶标板，加入待检混合物，反应一段时间，再加入标记的特异性抗原1（或者特异性抗原2），反应一段时间，最后加入能够与前述标记分子结合的检测分子，反应一段时间，所述检测分子带有可检测的标记，根据检测原理读数，判断为反应阳性或阴性；

3) 另取特异性抗原1（或者特异性抗原2）包被酶标板，加入待检混合物，反应一段时间，再加入标记的特异性抗原2（或者特异性抗原1），反应一段时间，最后加入能够与前述标记分子结合的检测分子，反应一段时间，所述检测分子带有可检测的标记，根据检测原理读数，判断为反应阳性或阴性；

4) 当步骤2) 反应阳性，并且该反应具有浓度依赖性，同时步骤3) 反应阴性时，则判断混合物中为同二聚体蛋白并且不含异二聚体蛋白；当步骤2) 反应阳性同时步骤3) 反应阳性时，则判断混合物中既含有同二聚体蛋白也含有异二聚体蛋白。

31. 组合物（例如药物组合物），其含有权利要求1-8任一项的双特异性抗体或其抗原结合部分、或者权利要求9-16任一项的混合物，以及任选的药学上可接受的载体或赋形剂。

32. 权利要求31的组合物，其还含有其它化疗药物和/或其它抗体。

33. 试剂盒，其含有权利要求1-8任一项的双特异性抗体或其抗原结合

部分、或者权利要求9-16任一项的混合物，以及任选的缓冲液和/或说明书。

34. 权利要求3-8任一项的双特异性抗体或其抗原结合部分在制备预防和/或治疗HER2阳性肿瘤（例如乳腺癌、胃癌）的药物中的用途。

35. 权利要求11-16任一项的混合物在制备预防和/或治疗HER2阳性肿瘤（例如乳腺癌、胃癌）的药物中的用途。

36. 权利要求3-8任一项的双特异性抗体或其抗原结合部分在制备诊断HER2阳性肿瘤（例如乳腺癌、胃癌）的试剂或试剂盒中的用途。

37. 权利要求11-16任一项的混合物在制备诊断HER2阳性肿瘤（例如乳腺癌、胃癌）的试剂或试剂盒中的用途。

38. 权利要求17-19任一项的HER2蛋白胞外区域的变体蛋白用于检测权利要求3-8任一项的双特异性抗体或其抗原结合部分或者用于检测权利要求11-16任一项的混合物的用途。

39. 预防和/或治疗HER2阳性肿瘤（例如乳腺癌、胃癌）的方法，所述方法包括给有需要的受试者预防或治疗有效量的权利要求3-8任一项的双特异性抗体或其抗原结合部分的步骤。

40. 预防和/或治疗HER2阳性肿瘤（例如乳腺癌、胃癌）的方法，所述方法包括给有需要的受试者预防或治疗有效量的权利要求11-16任一项的混合物的步骤。

41. 诊断HER2阳性肿瘤（例如乳腺癌、胃癌）的方法，所述方法包括使用权利要求3-8任一项的双特异性抗体或其抗原结合部分的步骤。

42. 诊断HER2阳性肿瘤（例如乳腺癌、胃癌）的方法，所述方法包括使用权利要求11-16任一项的混合物的步骤。

43. 检测权利要求3-8任一项的双特异性抗体或其抗原结合部分或者检

测权利要求11-16任一项的混合物的的方法，所述方法包括使用权利要求17-19任一项的HER2蛋白胞外区域的变体蛋白的步骤。

44. 权利要求3-8任一项的双特异性抗体或其抗原结合部分，其用于预防和/或治疗HER2阳性肿瘤（例如乳腺癌、胃癌）。

45. 权利要求11-16任一项的混合物，其用于预防和/或治疗HER2阳性肿瘤（例如乳腺癌、胃癌）。

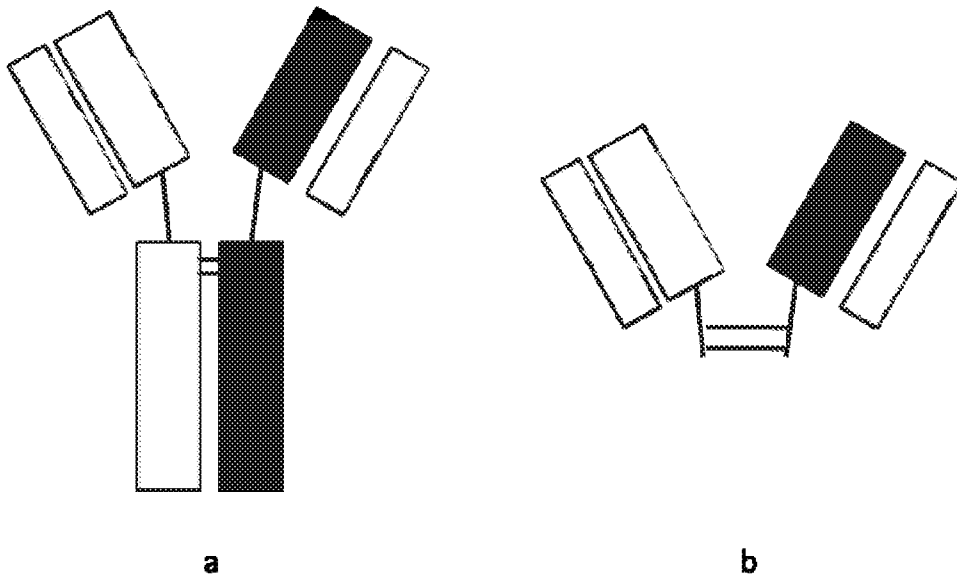
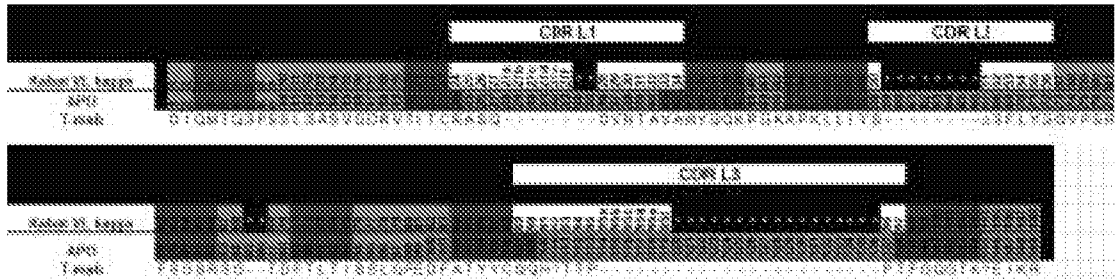
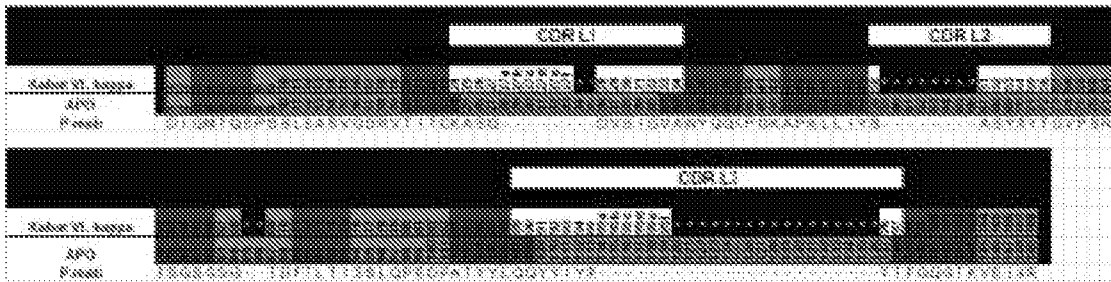


图 1

A



B



C



图 2

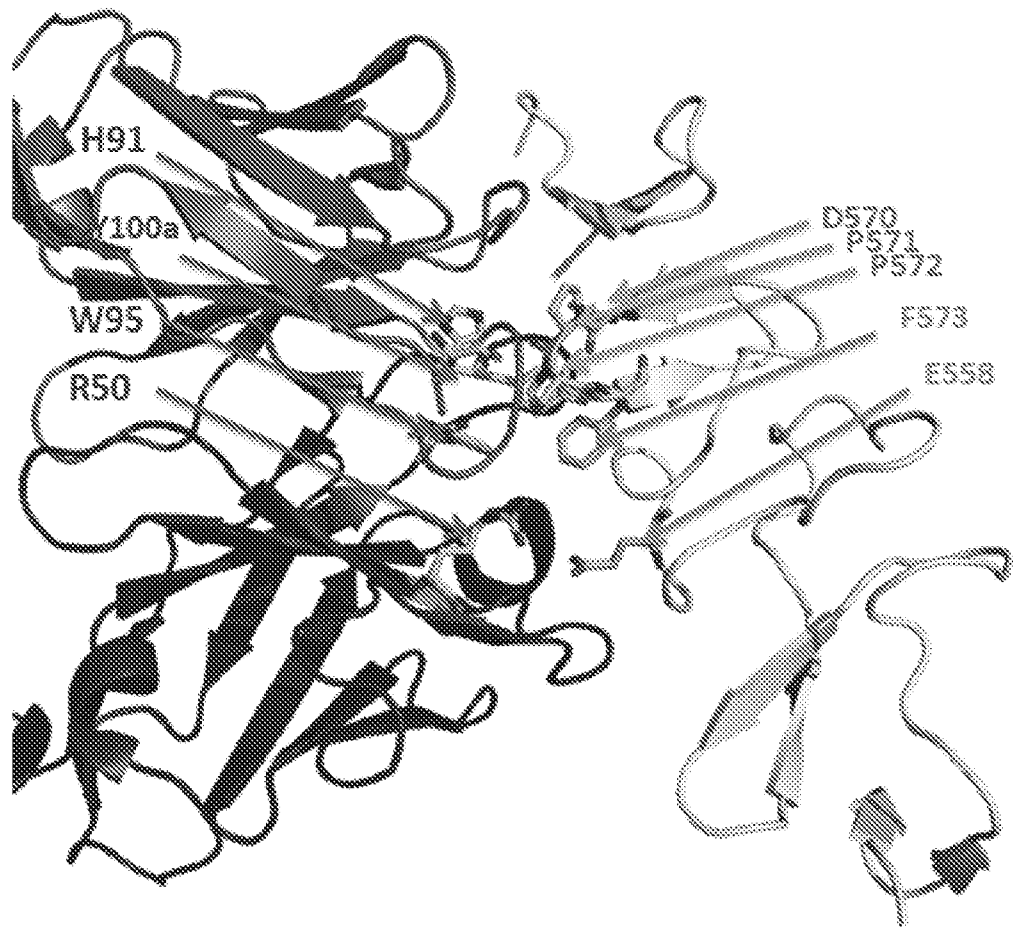


图 3

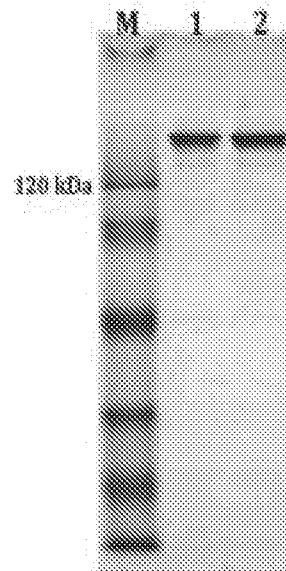


图 4

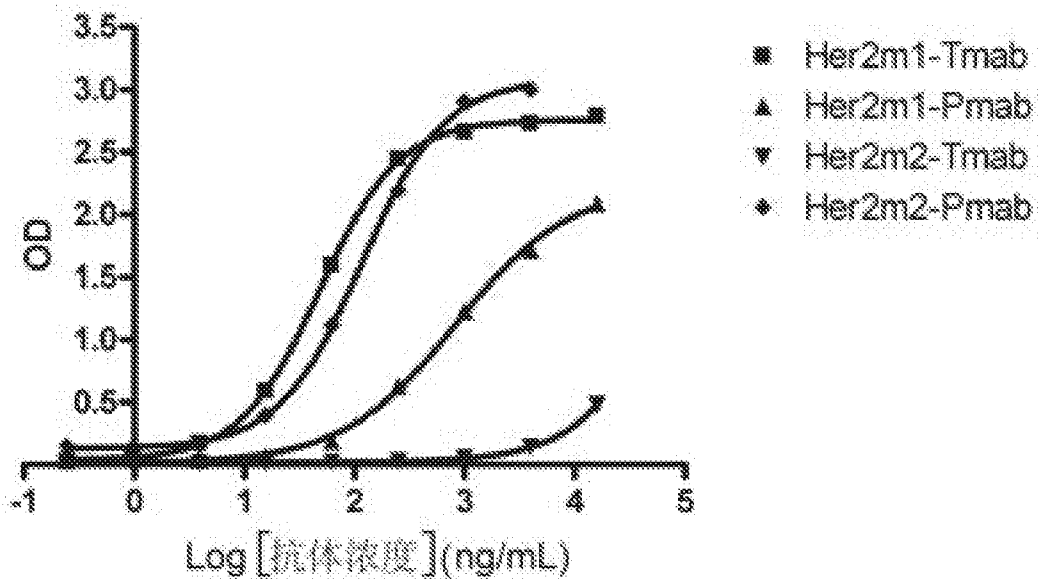


图 5

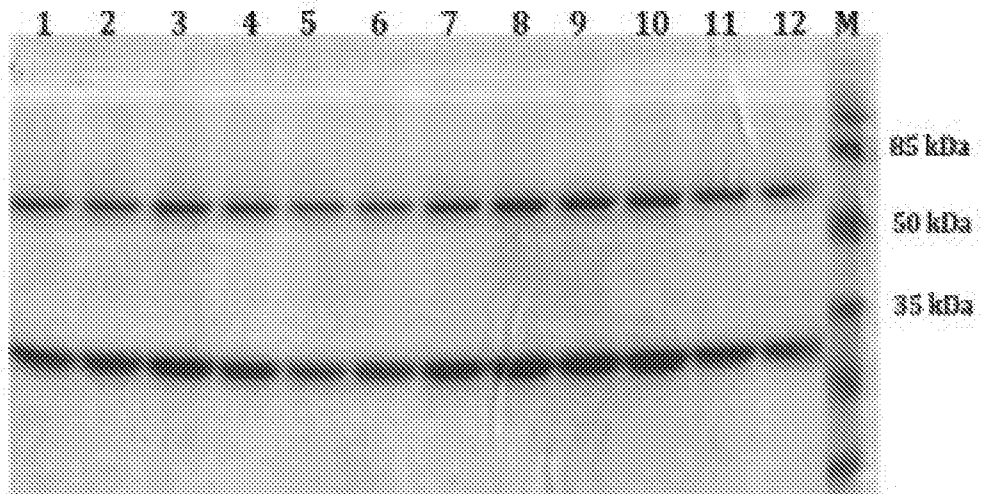


图 6

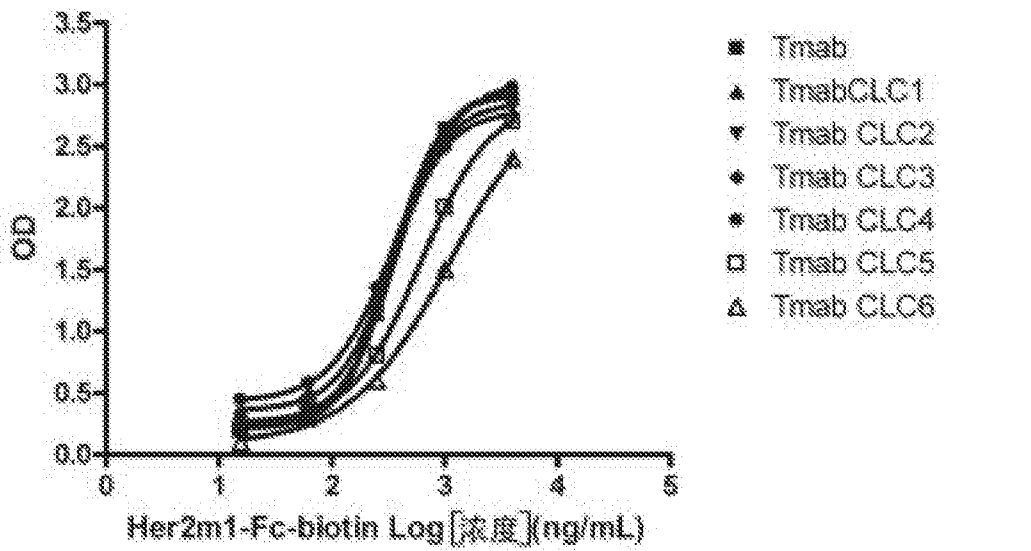


图 7

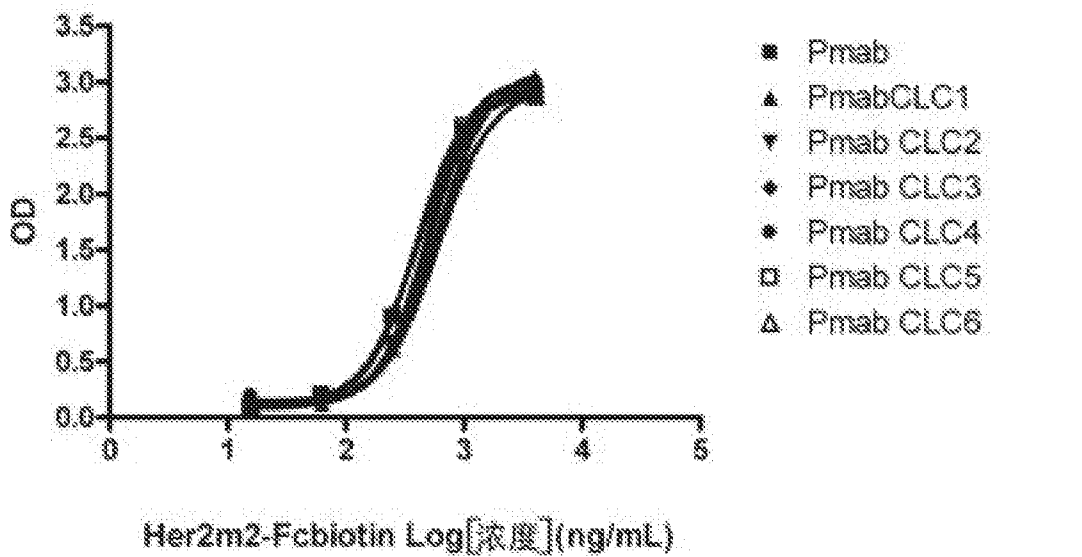


图 8

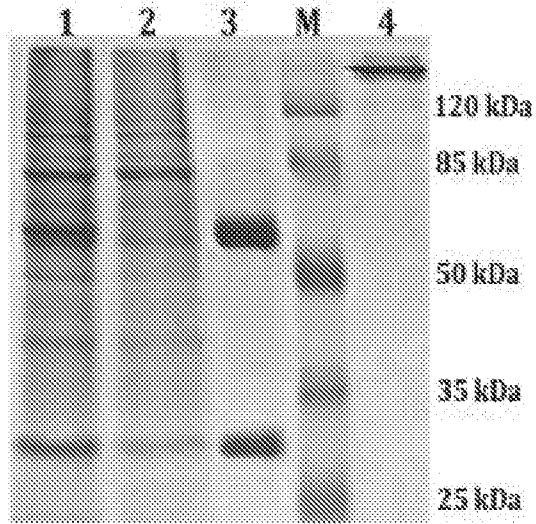


图 9

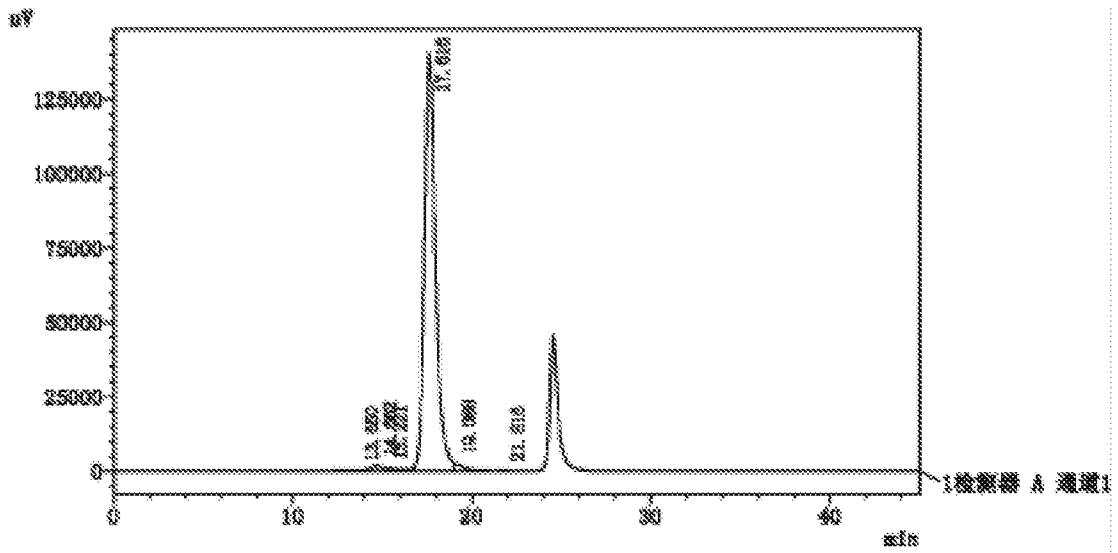


图 10

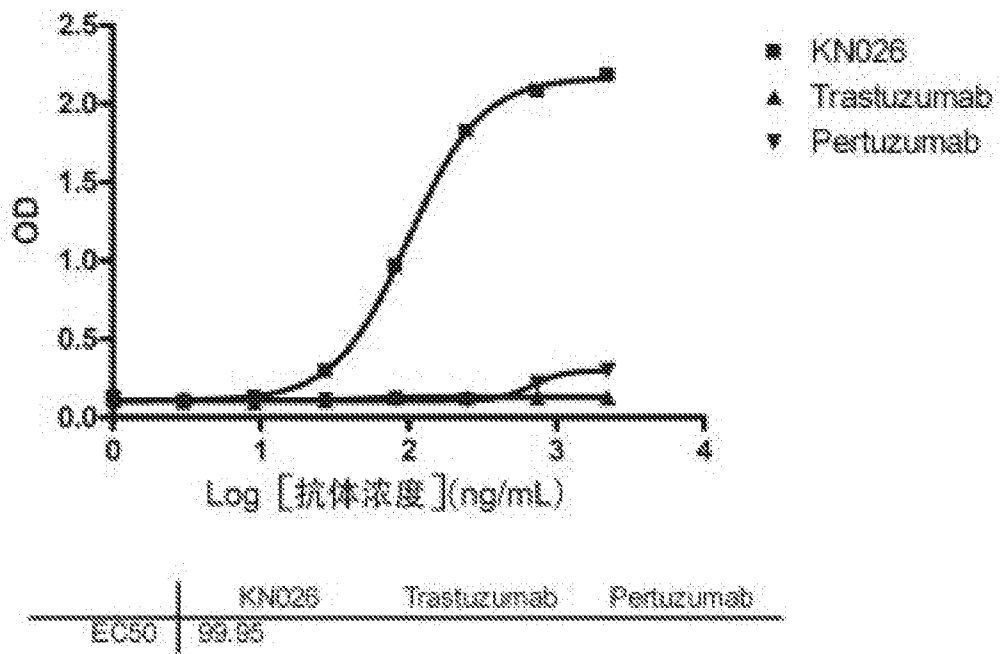


图 11

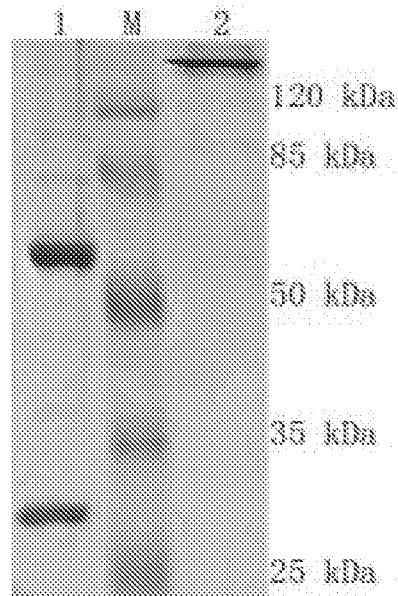


图 12

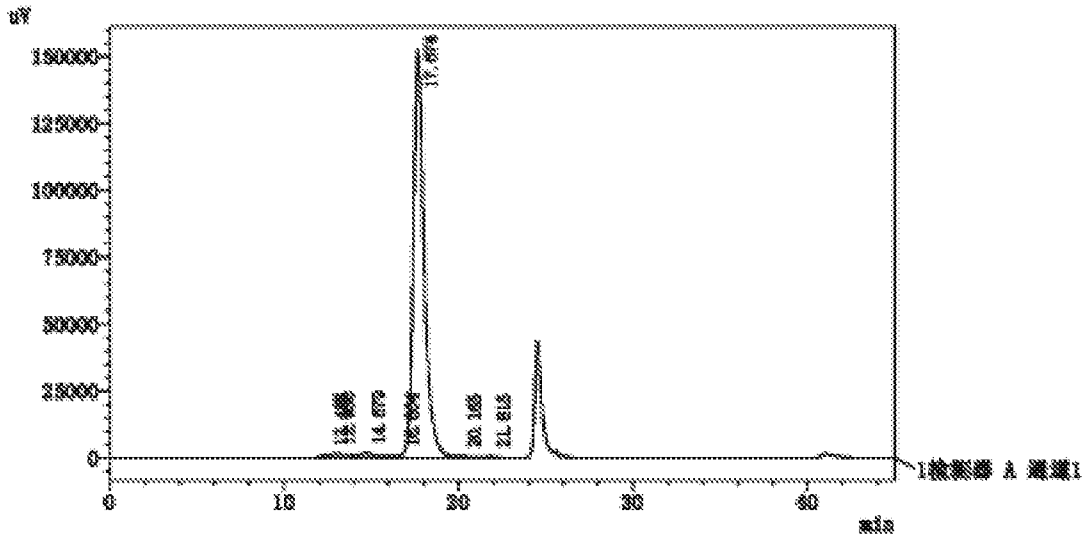


图 13

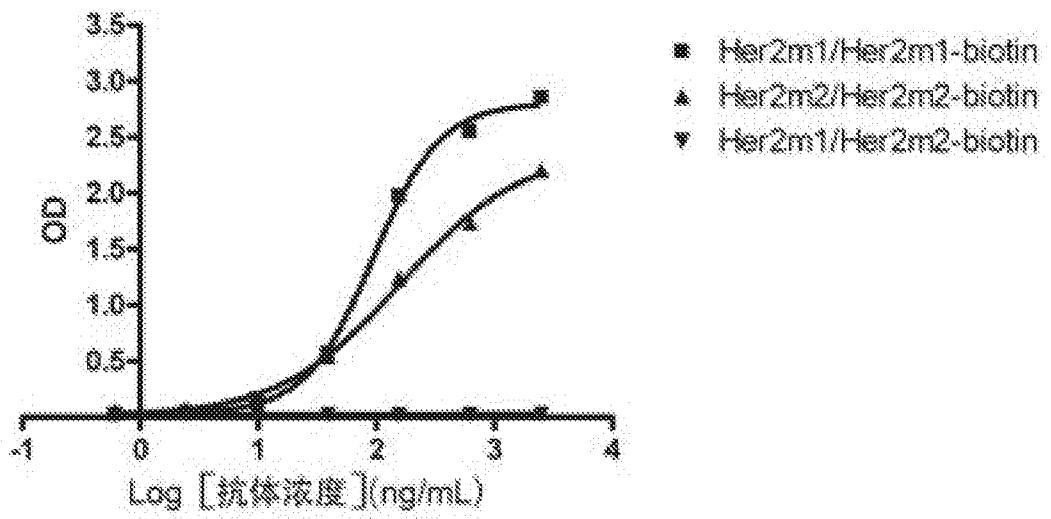


图 14

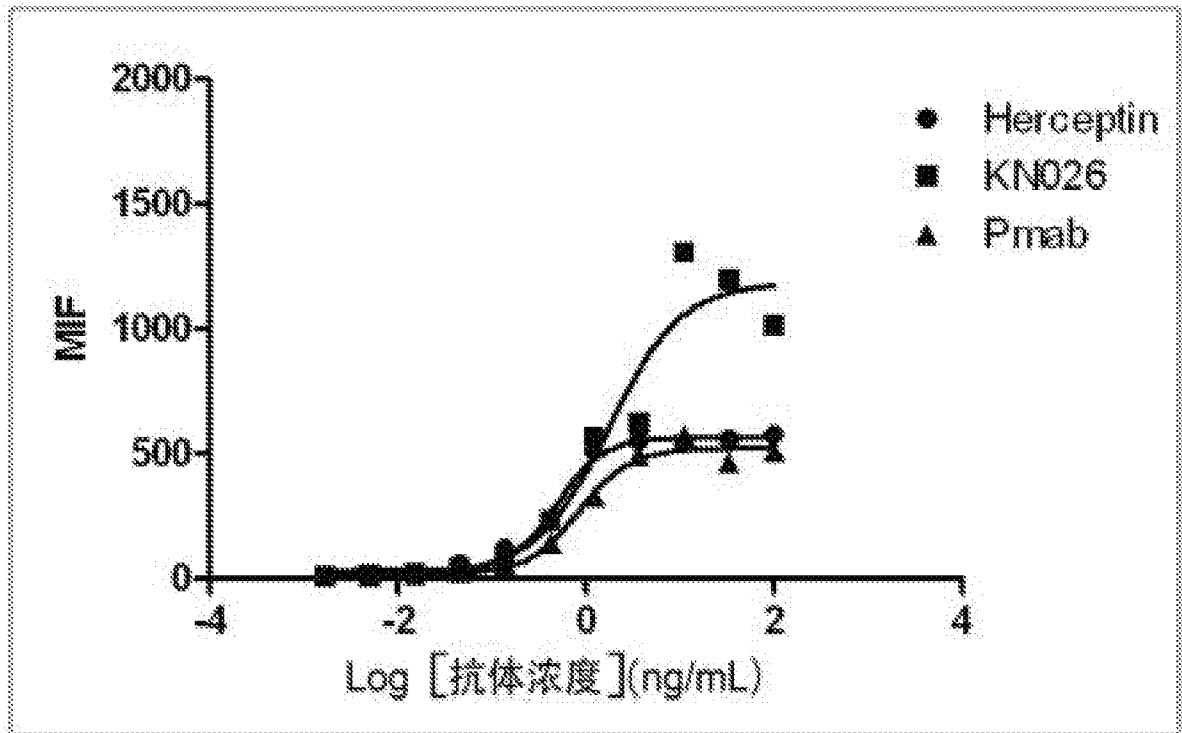


图15

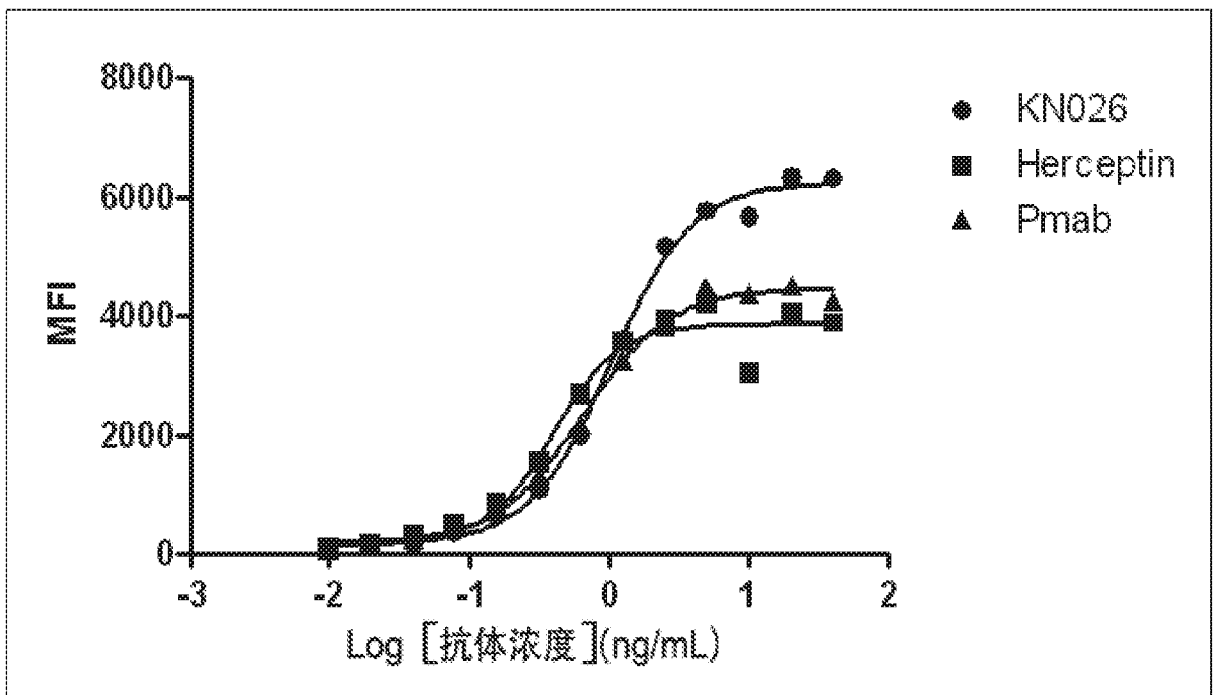


图16

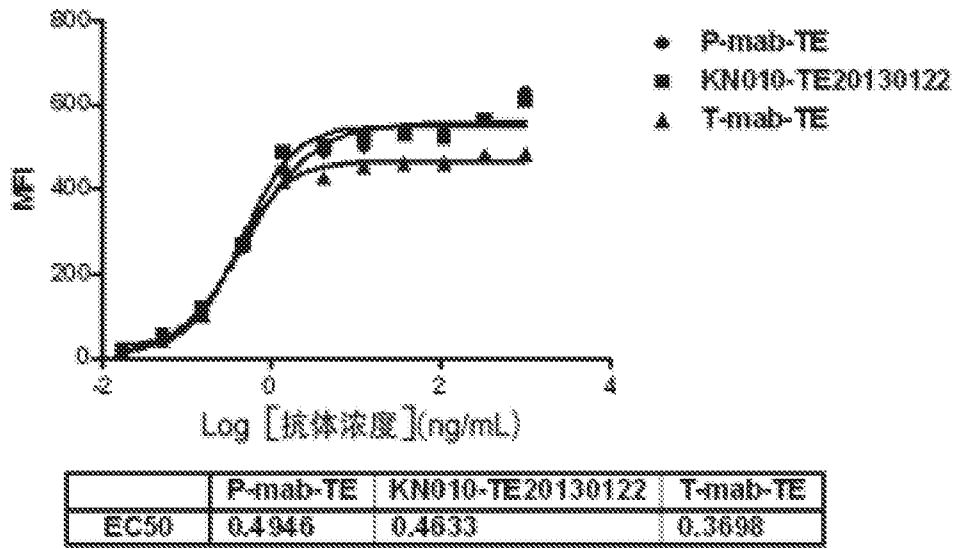


图 17

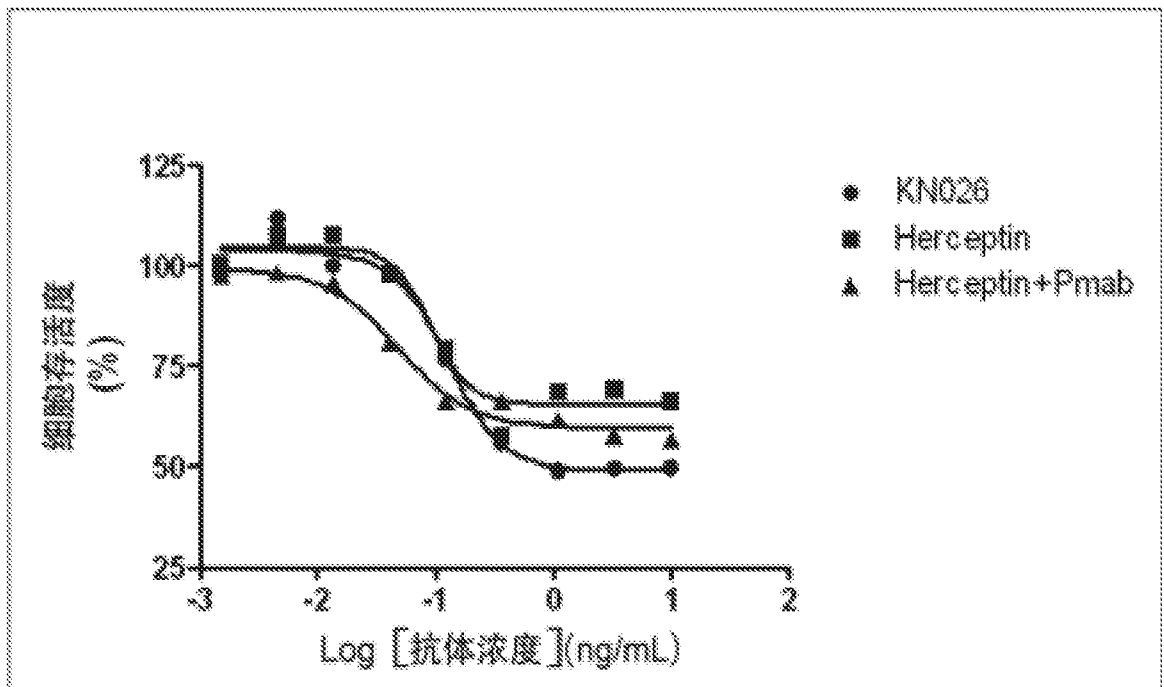


图 18

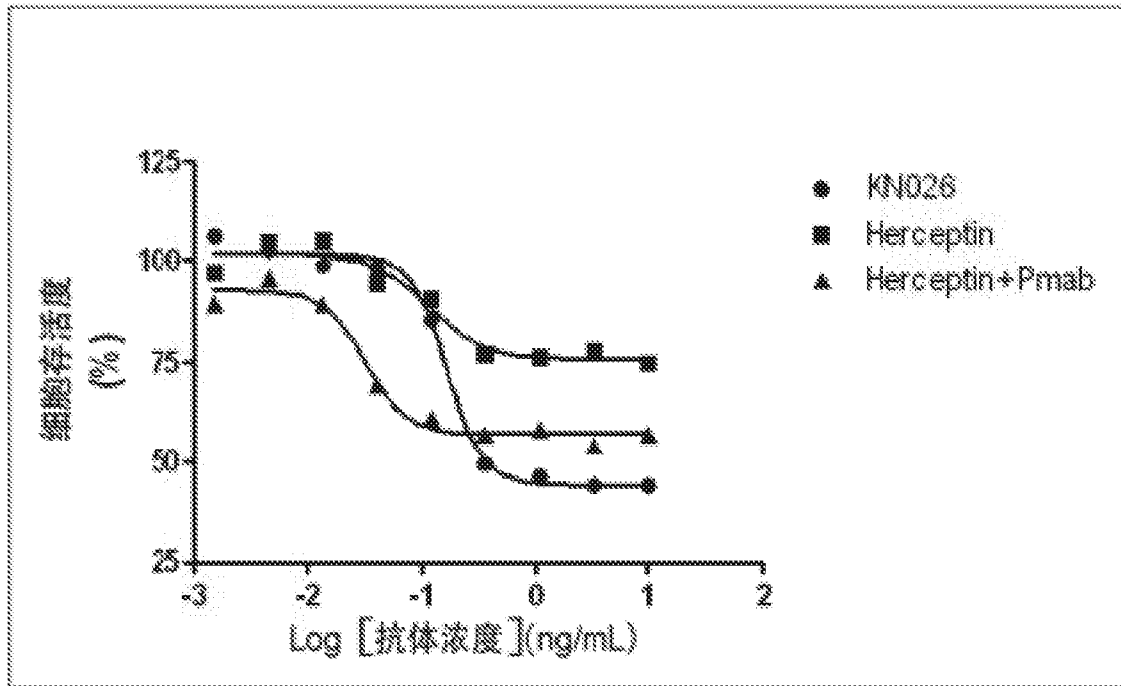


图19

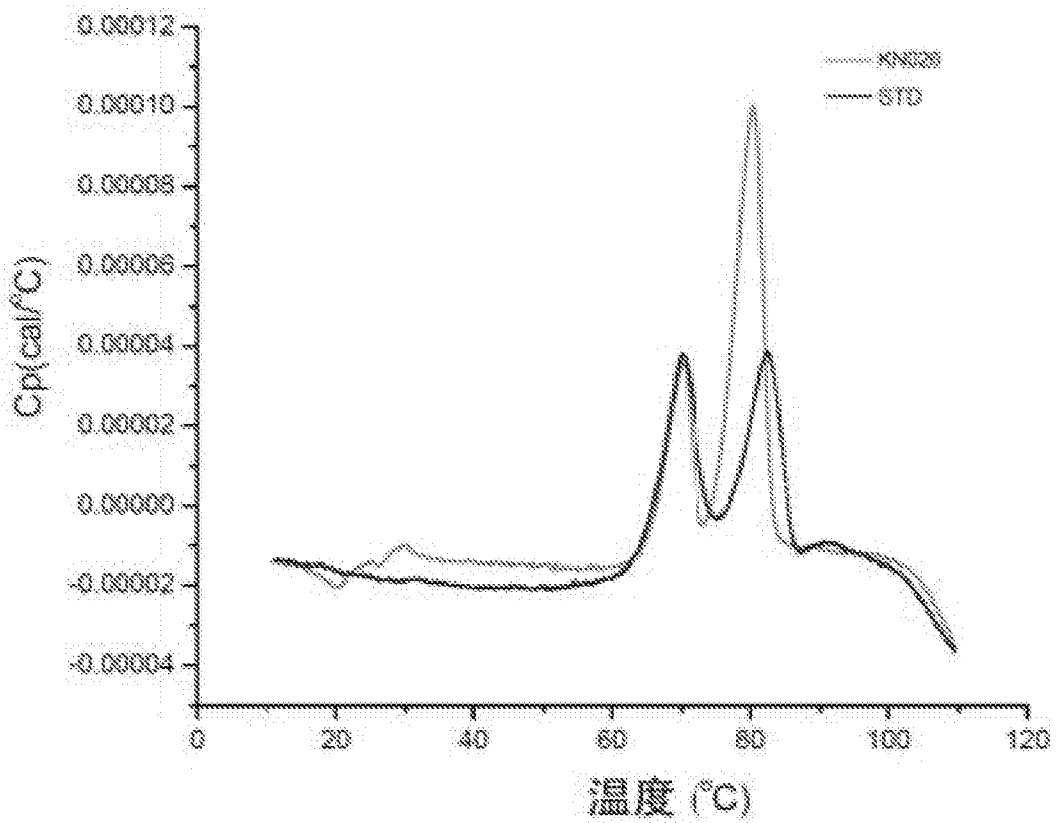


图20

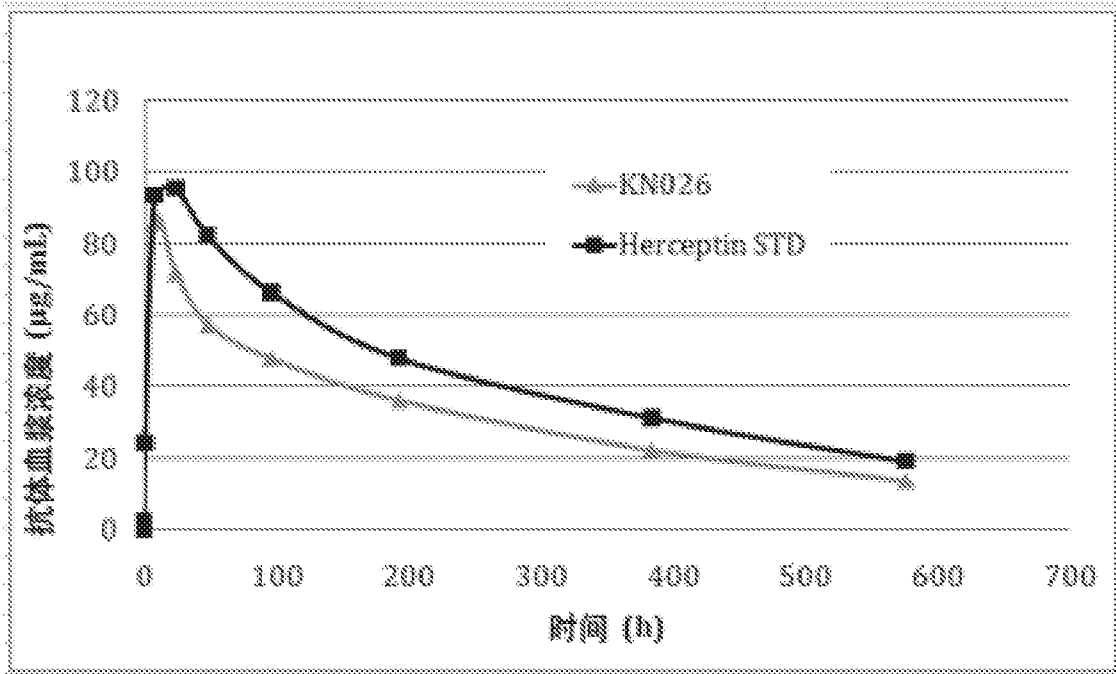


图21

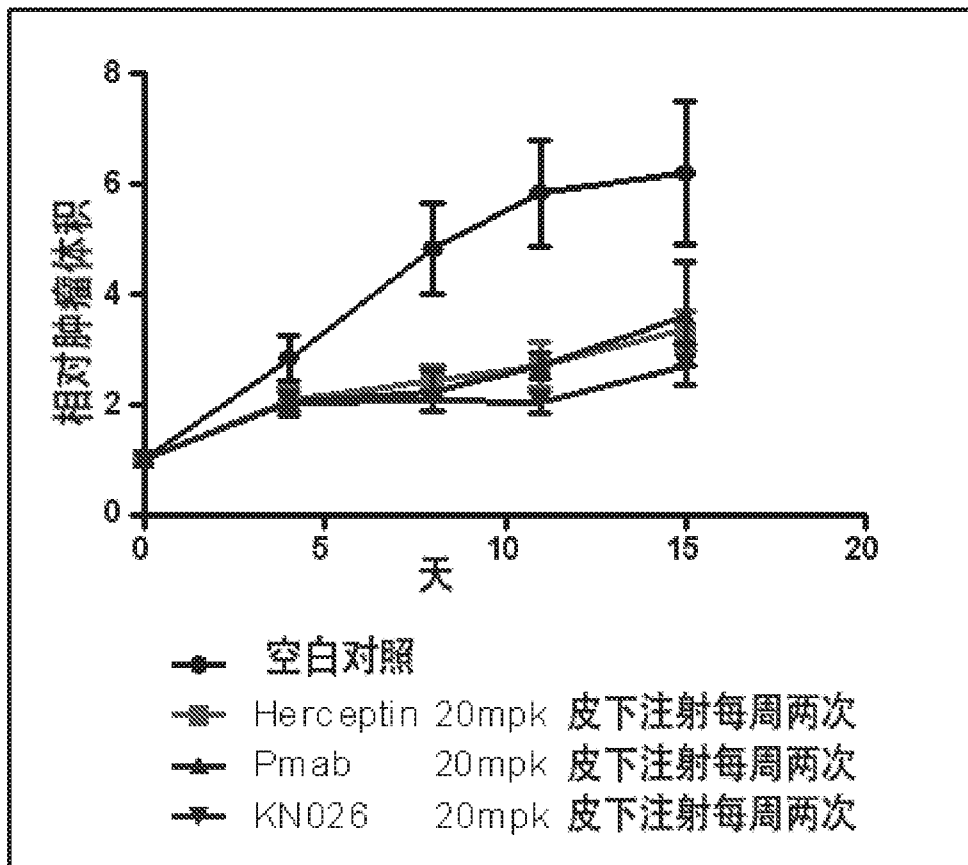


图22

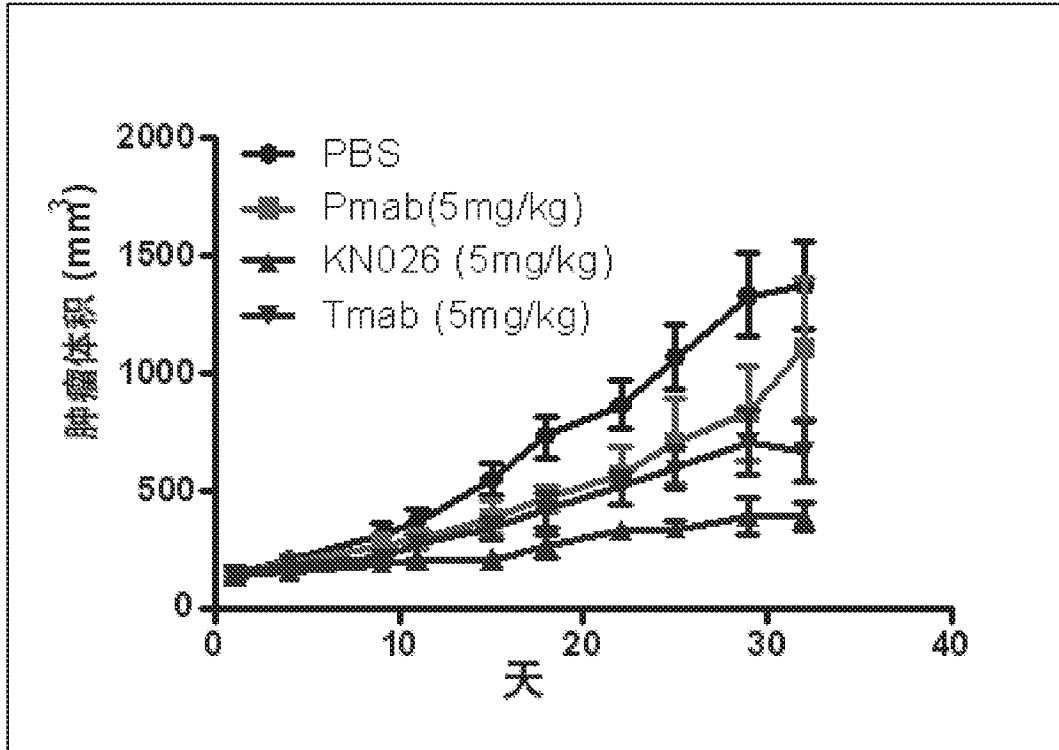


图23

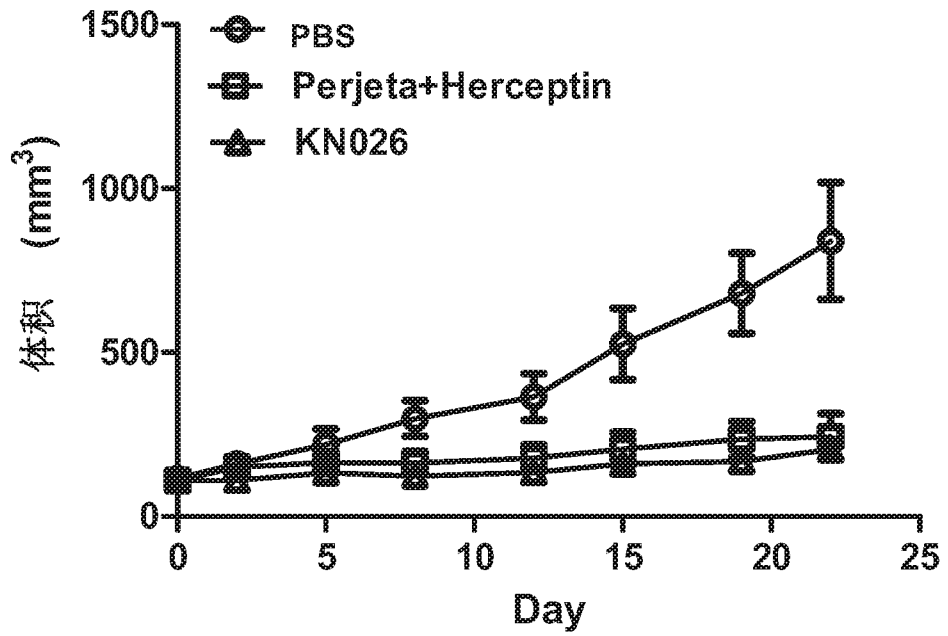


图24

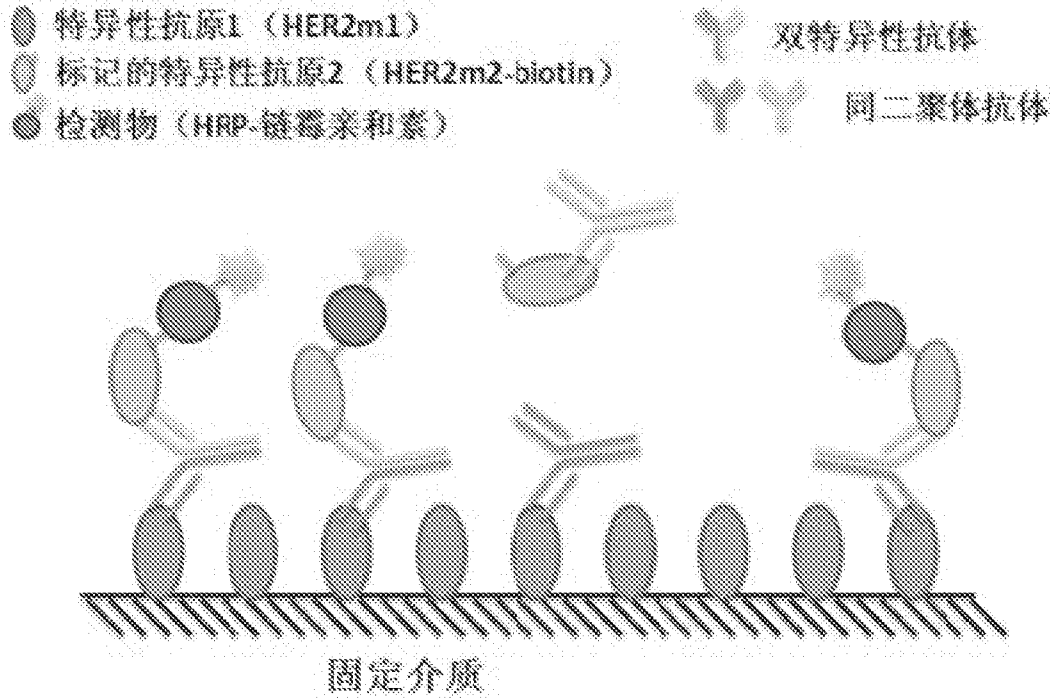


图 25

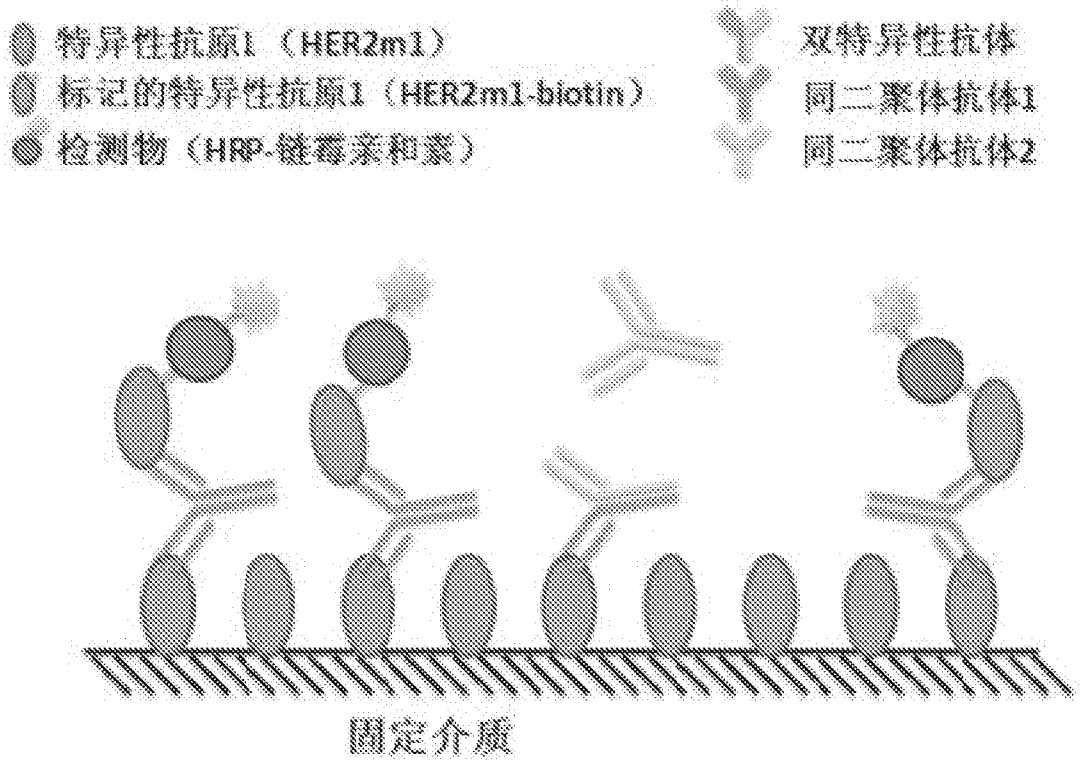


图 26

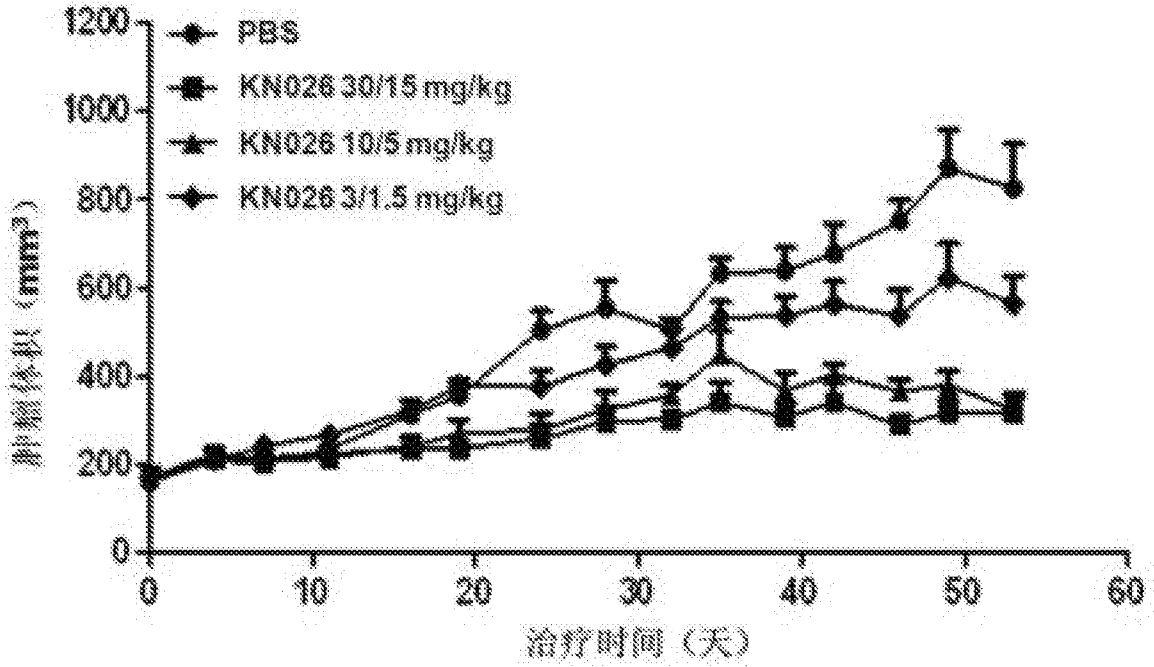


图 27

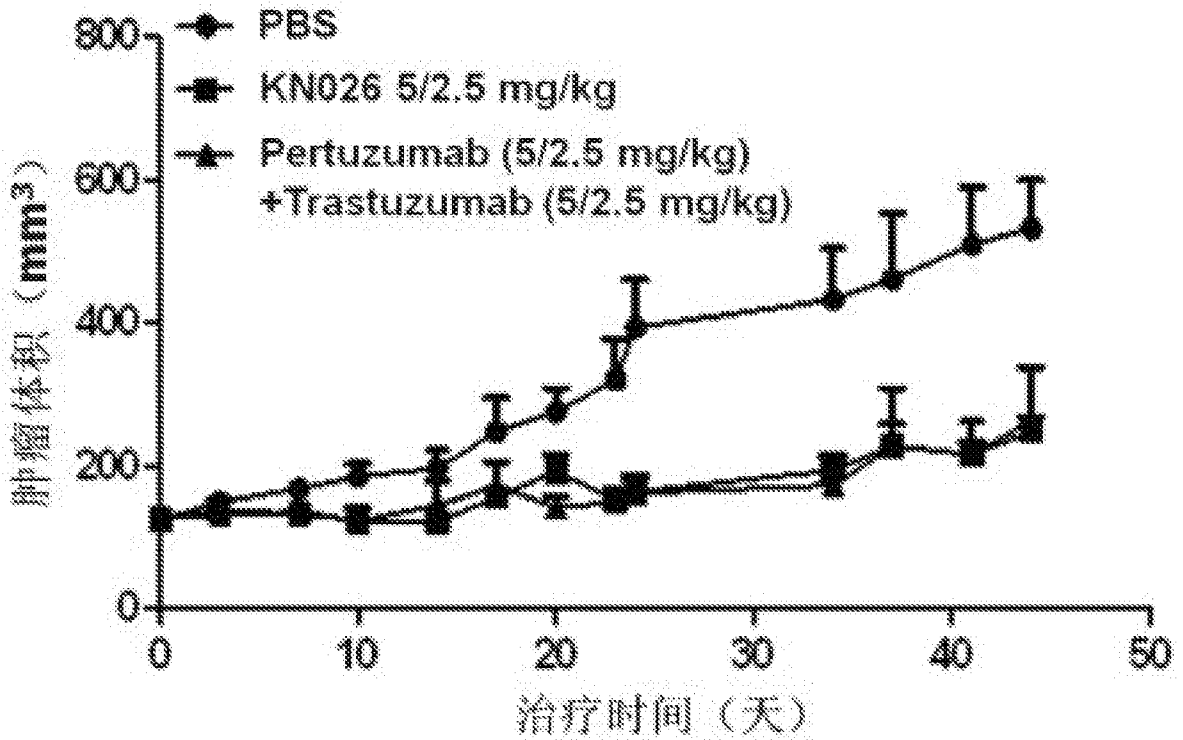


图 28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/070447

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/46 (2006.01) i; C07K 16/30 (2006.01) i; C07K 14/71 (2006.01) i; C12N 15/13 (2006.01) i; C12N 15/12 (2006.01) i; C12N 15/63 (2006.01) i; G01N 33/577 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; G01N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, EMBASE & SEARCH TERMS: perjeta, toltrazuril, HER2, bispecific, common, same, light chain, antibod+, extracellular domain, pertuzumab, trastuzumab, Herceptin etc.

GENBANK, EMBL, CHINA PATENT BIOLOGICAL SEQUENCE SEARCH SYSTEM AND SEARCHED SEQUENCES: SEQ ID NOS: 1-28

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 1668636 A (CRUCCELL HOLLAND B.V.), 14 September 2005 (14.09.2005), claims 1-54, and embodiment 1	1-2, 9-10, 20- 24, 26-27, 31-33
A	CN 1668636 A (CRUCCELL HOLLAND B.V.), 14 September 2005 (14.09.2005), the whole document	3-8, 11-19, 25, 28-30, 34-38, 43-45
X	LIN, Guigao, "Identification of natural bispecific antibody against hepatitis C virus NS3 and NS5 proteins C patients and the study of producing mechanism of the NS3/NS5 bispecific antibody", MEDICINE & PUBLIC HEALTH, CHINA DOCTORAL DISSERTATIONS FULL-TEXT DATABASE, number 2, 15 February 2014 (15.02.2014), ISSN: 1674-022X, text, pages 21-26, section 1.2.1.1, and figure 3	29, 30

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search
07 April 2016 (07.04.2016)

Date of mailing of the international search report
14 April 2016 (14.04.2016)

Name and mailing address of the ISA/CN:
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer
LI, Chen
Telephone No.: (86-10) **62411100**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/070447**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LIN, Guigao, "Identification of natural bispecific antibody against hepatitis C virus NS3 and NS5 proteins C patients and the study of producing mechanism of the NS3/NS5 bispecific antibody", MEDICINE & PUBLIC HEALTH, CHINA DOCTORAL DISSERTATIONS FULL-TEXT DATABASE, number 2, 15 February 2014 (15.02.2014), ISSN: 1674-022X, the whole document	1-28, 31-38, 43-45
A	CN 103796678 A (GENMAB A/S), 14 May 2014 (14.05.2014), the whole document, particularly claims 1-99	1-38, 43-45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/070447

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 39-42
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] PCT Rule 39.1(iv)—the methods of surgery or therapy for the treatment of a human or animal body.

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2016/070447

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1668636 A	14 September 2005	US 2009263864 A1	22 October 2009
		NZ 537277 A	30 April 2008
		JP 2006515503 A	01 June 2006
		WO 2004009618 A3	04 November 2004
		US 2011177073 A1	21 July 2011
		PT 1523496 E	29 September 2011
		CA 2872136 A1	29 January 2004
		US 2007077624 A1	05 April 2007
		EP 1523496 A2	20 April 2005
		AU 2010249150 A1	23 December 2010
		EP 2314629 A1	27 April 2011
		CN 101537180 A	23 September 2009
		AU 2003250074 B2	09 September 2010
		US 2005170398 A1	04 August 2005
		US 2007054362 A1	08 March 2007
		CN 101537180 B	10 February 2016
		JP 2014204734 A	30 October 2014
		DK 1523496 T3	17 October 2011
		PT 2314629 E	22 January 2014
		HK 1070902 A1	07 October 2011
		US 7429486 B2	30 September 2008
		AT 514717 T	15 July 2011
		CA 2492377 C	03 February 2015
		SI 1523496 T1	30 November 2011
		US 7932360 B2	26 April 2011
		AU 2010249150 B2	04 October 2012
		JP 2011177193 A	15 September 2011
		ES 2442615 T3	12 February 2014
		JP 4836451 B2	14 December 2011
		ES 2368733 T3	21 November 2011
		CN 100480260 C	22 April 2009
		EP 2314629 B1	16 October 2013
		US 2013243773 A1	19 September 2013
		US 7927834 B2	19 April 2011
		EP 1523496 B1	29 June 2011
		US 7262028 B2	28 August 2007
		DK 2314629 T3	20 January 2014
		CA 2492377 A1	29 January 2004
		AU 2003250074 A1	09 February 2004
		AU 2010249150 B9	19 December 2013
WO 2004009618 A2	29 January 2004		
CN 103796678 A	14 May 2014	JP 2014517823 A	24 July 2014
		CA 2832387 A1	26 October 2012
		WO 2012143523 A1	26 October 2012

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/070447

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 16/46(2006.01)i; C07K 16/30(2006.01)i; C07K 14/71(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; G01N 33/577(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>														
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; C12N; G01N; A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, EMBASE和检索词:双特异, 共同, 轻链, 抗体, 胞外区, 帕妥珠, 曲妥珠, 赫赛汀, HER2, bispecific, common, same, light chain, antibody +, extracellular domain, pertuzumab, trastuzumab, herceptin等; GENBANK, EMBL, 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: SEQ ID NO:1-28</p>														
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 1668636 A (克鲁塞尔荷兰公司) 2005年 9月 14日 (2005 - 09 - 14) 权利要求1-54、实施例1</td> <td>1-2, 9-10, 20-24, 26-27, 31-33</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 1668636 A (克鲁塞尔荷兰公司) 2005年 9月 14日 (2005 - 09 - 14) 全文</td> <td>3-8, 11-19, 25, 28-30, 34-38, 43-45</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>林贵高. "丙型肝炎患者血清抗NS3/NS5天然双特异性抗体的鉴定及其产生机制的研究" 中国博士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑, 第2期, 2014年 2月 15日 (2014 - 02 - 15), ISSN: 1674-022X, 正文第21-26页1.2.1.1部分, 图3</td> <td>29, 30</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 1668636 A (克鲁塞尔荷兰公司) 2005年 9月 14日 (2005 - 09 - 14) 权利要求1-54、实施例1	1-2, 9-10, 20-24, 26-27, 31-33	A	CN 1668636 A (克鲁塞尔荷兰公司) 2005年 9月 14日 (2005 - 09 - 14) 全文	3-8, 11-19, 25, 28-30, 34-38, 43-45	X	林贵高. "丙型肝炎患者血清抗NS3/NS5天然双特异性抗体的鉴定及其产生机制的研究" 中国博士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑, 第2期, 2014年 2月 15日 (2014 - 02 - 15), ISSN: 1674-022X, 正文第21-26页1.2.1.1部分, 图3	29, 30
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
X	CN 1668636 A (克鲁塞尔荷兰公司) 2005年 9月 14日 (2005 - 09 - 14) 权利要求1-54、实施例1	1-2, 9-10, 20-24, 26-27, 31-33												
A	CN 1668636 A (克鲁塞尔荷兰公司) 2005年 9月 14日 (2005 - 09 - 14) 全文	3-8, 11-19, 25, 28-30, 34-38, 43-45												
X	林贵高. "丙型肝炎患者血清抗NS3/NS5天然双特异性抗体的鉴定及其产生机制的研究" 中国博士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑, 第2期, 2014年 2月 15日 (2014 - 02 - 15), ISSN: 1674-022X, 正文第21-26页1.2.1.1部分, 图3	29, 30												
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>														
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&" 同族专利的文件</p>														
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2016年 4月 7日</p>	<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2016年 4月 14日</p>													
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>	<p>受权官员</p> <p>李晨</p> <p>电话号码 (86-10)62411100</p>													

C. 相关文件		
类型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	林贵高. “丙型肝炎患者血清抗NS3/NS5天然双特异性抗体的鉴定及其产生机制的研究” 中国博士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑, 第2期, 2014年 2月 15日 (2014 - 02 - 15), ISSN: 1674-022X, 全文	1-28, 31-38, 43-45
A	CN 103796678 A (根马布股份公司) 2014年 5月 14日 (2014 - 05 - 14) 全文, 特别是权利要求1-99	1-38, 43-45

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求： 39-42
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] PCT细则39.1(iv)——处置人体或者动物体的外科手术方法或治疗方法。
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/070447

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	1668636	A	2005年 9月 14日	US	2009263864	A1	2009年 10月 22日
				NZ	537277	A	2008年 4月 30日
				JP	2006515503	A	2006年 6月 1日
				WO	2004009618	A3	2004年 11月 4日
				US	2011177073	A1	2011年 7月 21日
				PT	1523496	E	2011年 9月 29日
				CA	2872136	A1	2004年 1月 29日
				US	2007077624	A1	2007年 4月 5日
				EP	1523496	A2	2005年 4月 20日
				AU	2010249150	A1	2010年 12月 23日
				EP	2314629	A1	2011年 4月 27日
				CN	101537180	A	2009年 9月 23日
				AU	2003250074	B2	2010年 9月 9日
				US	2005170398	A1	2005年 8月 4日
				US	2007054362	A1	2007年 3月 8日
				CN	101537180	B	2016年 2月 10日
				JP	2014204734	A	2014年 10月 30日
				DK	1523496	T3	2011年 10月 17日
				PT	2314629	E	2014年 1月 22日
				HK	1070902	A1	2011年 10月 7日
				US	7429486	B2	2008年 9月 30日
				AT	514717	T	2011年 7月 15日
				CA	2492377	C	2015年 2月 3日
				SI	1523496	T1	2011年 11月 30日
				US	7932360	B2	2011年 4月 26日
				AU	2010249150	B2	2012年 10月 4日
				JP	2011177193	A	2011年 9月 15日
				ES	2442615	T3	2014年 2月 12日
				JP	4836451	B2	2011年 12月 14日
				ES	2368733	T3	2011年 11月 21日
				CN	100480260	C	2009年 4月 22日
				EP	2314629	B1	2013年 10月 16日
				US	2013243773	A1	2013年 9月 19日
				US	7927834	B2	2011年 4月 19日
				EP	1523496	B1	2011年 6月 29日
				US	7262028	B2	2007年 8月 28日
				DK	2314629	T3	2014年 1月 20日
				CA	2492377	A1	2004年 1月 29日
				AU	2003250074	A1	2004年 2月 9日
				AU	2010249150	B9	2013年 12月 19日
WO	2004009618	A2	2004年 1月 29日				
CN	103796678	A	2014年 5月 14日	JP	2014517823	A	2014年 7月 24日
				CA	2832387	A1	2012年 10月 26日
				WO	2012143523	A1	2012年 10月 26日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)