



(21)申請案號：104114962

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 05 月 11 日

(51)Int. Cl. : A61K39/395 (2006.01)

C07K16/46 (2006.01)

C12P21/00 (2006.01)

(71)申請人：美商索倫多醫療公司(美國) SORRENTO THERAPEUTICS, INC. (US)

美國

(72)發明人：傅燕文 FU, YANWEN (CN)；考夫曼 古納 F KAUFMANN, GUNNAR F. (DE)；

瓊斯 布萊恩 JONES, BRYAN (US)；陶赫力 瑞荷夫 TOUGHIRI, RAHELEH (IR)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

US 5185433

US 2010/0105874A1

WO 2013/003555A1

CH Kim, et al. "Synthesis of Bispecific Antibodies with Genetically Encoded Unnatural Amino Acids", J Am Chem Soc. 2012 June 20; 134

(24): 9918-9921.

審查人員：吳祖漢

申請專利範圍項數：15 項 圖式數：31 共 70 頁

(54)名稱

化學鎖固之雙特異性抗體

(57)摘要

本發明揭示形成化學鎖固之雙特異性或異源二聚體抗體之方法，該等抗體較佳為 IgG 種類，具有高特異性及高均質性。更具體而言，本發明揭示具有以生物正交點擊化學連接至一起之鏈接區之化學鎖固之雙特異性 IgG 種類抗體。

There is disclosed a process for forming chemically-locked bispecific or heterodimer antibodies, preferably in the IgG class, in high specificity and with high homogeneity. More specifically, there is disclosed a chemically-locked bispecific IgG class antibody having a linkage region joined together with bio-orthogonal click chemistry.

指定代表圖：

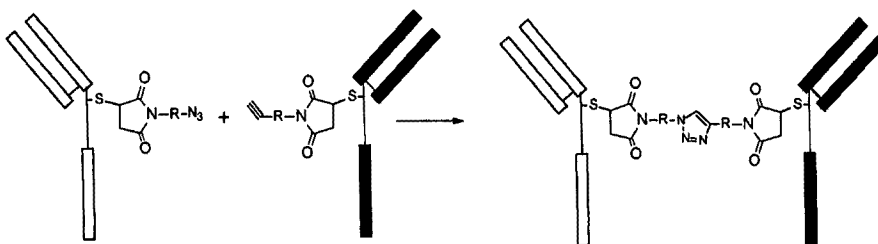


圖 2

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

化學鎖固之雙特異性抗體

CHEMICALLY-LOCKED BISPECIFIC ANTIBODIES

【技術領域】

本揭示內容提供以高特異性及高均質性形成化學鎖固之雙特異性或異源二聚體抗體、較佳地IgG種類之方法。更具體而言，本揭示內容提供具有以生物正交點擊化學連接至一起之鏈接區之化學鎖固之雙特異性IgG種類抗體。

相關申請案之交叉參考

本專利申請案主張來自2014年5月10日提出申請之美國臨時專利申請案61/991,508之優先權。

【先前技術】

人類免疫球蛋白G或IgG抗體存在4種子類，其各自具有不同結構及功能性質。IgG係由兩個重鏈-輕鏈對(半抗體)構成，該兩個重鏈-輕鏈對經由直接連接鉸鏈區中之Cys殘基(EU索引編號：半胱胺酸殘基226及229；Kabat編號：半胱胺酸殘基239及242)之重鏈間二硫鍵連結。人類IgG4分子存在不同之處在於不存在或存在重鏈間二硫鍵之各種分子形式。

已研發各種重組抗體格式，舉例而言，藉由融合IgG抗體格式及單鏈結構域來獲得四價雙特異性抗體(Coloman等人，*Nature Biotech* 15 (1997) 159-163；WO 2001/077342；及Morrison，*Nature Biotech* 25 (2007) 1233-1234)。另一格式不再保留抗體核心結構(IgA、IgD、IgE、IgG或IgM)，例如雙特異性抗體、三特異性抗體或四特異性抗

體、微抗體、若干單鏈格式(scFv、Bis-scFv)。但該等格式能夠結合兩種或更多種抗原(Holliger等人，*Nature Biotech* 23 (2005) 1126-1136；Fischer及Leger，*Pathobiology* 74 (2007) 3-14；Shen等人，*J. Immunological Methods* 318 (2007) 65-74；及Wu等人，*Nature Biotech.*25 (2007) 1290-1297)。

使經由至少一種鏈間二硫鏈接連接之二聚體與並不經由至少一種鏈間二硫鏈接連接之二聚體自包括此兩種類型多肽二聚體之混合物分離或優先合成前一類二聚體的方法報導於US 2005/0163782中。

雙特異性抗體難以使用傳統雜交-雜交瘤及化學偶聯方法產生足夠量及品質之材料。另外，WO2005/062916及美國專利申請案2010/0105874闡述如何藉由還原抗體「AA」及抗體「BB」以將二硫鏈分離成具有單一結合區之單一重鏈-輕鏈單元(A或B) (其中A及B結合至不同靶)來形成雙特異性抗體。然後，該等抗體容許二硫鏈發生異構化，從而抗體AB、BA、AA及BB各自以約25%之概率重新形成。然而，AB及BA係相同雙特異性抗體且由此代表至多約50%之產率。因此，此需要額外步驟來分離所形成之期望雙特異性抗體與原始重構抗體。然而，美國專利申請案2010/0105874涉及在IgG4中具有CPSC序列之鉸鏈區且陳述：「CPSC序列得到更具撓性之核心鉸鏈且可形成鏈內二硫鍵。據信，具有IgG4樣核心鉸鏈序列之抗體可具有重排二硫鍵之固有活性，此藉由本發明方法中所使用之條件所模擬。」(第0013段)。此外，使用藉由改變抗體A及B之重鏈序列製得之「凸起及孔洞」結構來製備其他形式之雙特異性抗體。

因此，本揭示內容提供產生化學鎖固之雙特異性IgG抗體之製程，該等抗體解決了業內對於較改變固定抗體區中之胺基酸序列之凸起及孔洞方法具有極高雙特異性抗體產率及較佳穩定性之需要。

【發明內容】

本揭示內容提供自IgG 1、IgG2或IgG4種類抗體或其Fab2片段「A」及IgG1、IgG2或IgG4種類抗體或其Fab2片段「B」生成化學鎖固之雙特異性抗體「AB」或「BA」之製程。該製程包括：

(a) 使第一抗體「A」與還原劑在足以裂解鉸鏈區中之重鏈之間之實質上所有二硫鏈接的條件下接觸以得到一對第一抗體片段A'，其各自包括附接至單一重鏈之單一輕鏈，重鏈具有一或多個自該等二硫鏈接之還原形成之反應性硫醇基團；

(b) 使第一異雙官能連接體附接至第一抗體片段A'，其中第一異雙官能連接體包括(i)第一硫醇反應性官能基，其用於共價附接至第一抗體片段A'之重鏈之反應性硫醇基團，及(ii)疊氮化物，從而形成疊氮化物官能化第一抗體片段；

(c) 使第二抗體「B」與還原劑在足以裂解鉸鏈區中之重鏈之間之實質上所有二硫鏈接的條件下接觸以得到一對第二抗體片段B'，其各自包括附接至單一重鏈之單一輕鏈，重鏈具有一或多個自該等二硫鏈接之還原形成之反應性硫醇基團；

(d) 使第二異雙官能連接體附接至該第二抗體片段B'，該第二異雙官能連接體包括：(i)第二硫醇反應性官能基，其用於共價附接至該第二抗體片段之該重鏈之反應性硫醇基團；及(ii)炔；從而形成炔官能化第二抗體片段；

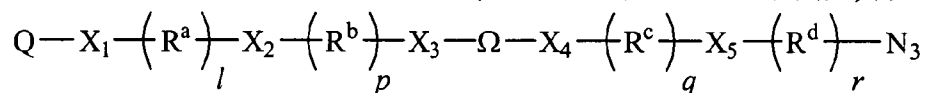
(e) 使該疊氮化物官能化第一抗體片段與該炔官能化第二抗體片段進行反應以經由該疊氮化物至該炔之1,3-偶極環加成使該第一抗體片段共價附接至該第二抗體片段以形成化學鎖固之雙特異性抗體「AB」或「BA」。

還原鉸鏈區中之二硫鏈接之步驟較佳地在並不實質上還原重鏈與輕鏈之間之二硫鏈接下實施，此意味著，在一些實施例中，至少約90%或至少約95%或至少約99%之重鏈與輕鏈之間之該等二硫鏈接在

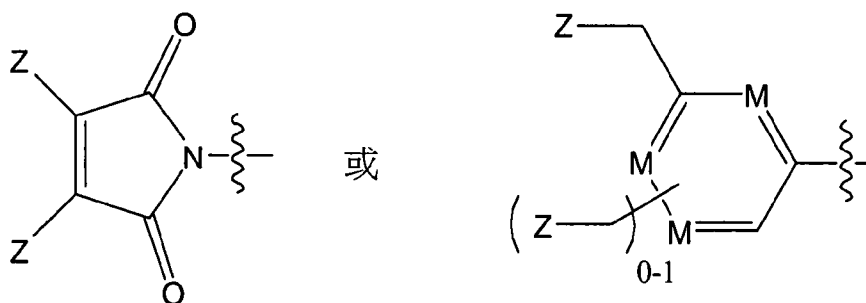
裂解鉸鏈區中的二硫鍵後保持完整。

較佳地，第一異雙官能連接體具有形式Q-L-N₃，其中Q係硫醇反應性官能基，L係烴連接體，且N₃係疊氮化物。較佳地，硫醇反應性官能基Q係烷基鹵化物(例如烷基氯化物、溴化物、或碘化物)、苄基鹵化物、馬來醯亞胺、鹵基-馬來醯亞胺(溴馬來醯亞胺)或二鹵基-馬來醯亞胺(二溴馬來醯亞胺)。較佳地，L係在Q與N₃之間之直接鏈中具有3-60個原子(例如更通常而言6-50個)之烴連接體。更佳地，L係聚環氧烷(PEF)基團或L係聚合物，其中每一聚體單元係-(CH₂CH₂-O)_n-或-(O-CH₂CH₂)_n- (其中「n」獨立地係1-20、更通常而言1-8之整數)。

較佳地，第一異雙官能連接體(附接至第一抗體片段)係



其中Q可為任一適於使連接體連接至抗體片段之基團，但較佳地能夠與來自重鏈之鉸鏈區中之半胱胺酸殘基之硫醇共價鍵結。實例性基團Q係：



其中Z獨立地選自由以下組成之群：H、Br、I及SPh。較佳地，Z在至少一次出現時並非H，但在馬來醯亞胺情形下，Z可在每次出現時皆為氫。M獨立地係CR*或N。

X₁、X₂、X₃、X₄及X₅獨立地選自由以下組成之群：鍵(亦即其不存在)、-O-、-NR^N-、-N=C-、-C=N-、-N=N-、-CR*=CR*- (順式或反式)、-C≡C-、-(C=O)-、-(C=O)-O-、-(C=O)-NR^N-、-(C=O)-(CH₂)_n-、-(C=O)-O-(CH₂)_n-、-(C=O)-NR^N-(CH₂)_n- 及 -(C=O)-NR^N-

$(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O})_n$ ，其中「 n 」係零或1-10之整數；

R^a 、 R^b 、 R^c 及 R^d 獨立地選自由以下組成之群： $-\text{O}-$ 、 $-\text{NR}^N-$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-(\text{CR}^*_2)_n-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O})_n-$ 、 $-(\text{CR}^*_2\text{CR}^*_2\text{-O})_n-$ 、 $-(\text{O-CH}_2\text{CH}_2)_n-$ 、 $-(\text{O-CR}^*_2\text{CR}^*_2)_n-$ 、 $-\text{CR}^*=\text{CR}^*$ （順式或反式）、 $-\text{N}=\text{C}-$ 、 $-\text{C}=\text{N}-$ 、 $-\text{N}=\text{N}-$ 、 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-(\text{C}=\text{O})-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-(\text{C}=\text{O})-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-\text{O}-(\text{C}=\text{O})-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-(\text{C}=\text{O})-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-(\text{C}=\text{O})-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-(\text{C}=\text{O})-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-\text{NR}^N-(\text{C}=\text{O})-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})-\text{NR}^N-$ 、 $-\text{NR}^N-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-(\text{C}=\text{O})-\text{NR}^N-$ 、 $-\text{NR}^N-(\text{C}=\text{O})-\text{NR}^N-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-(\text{C}=\text{O})-\text{NR}^N-$ 、 $-\text{NR}^N-(\text{C}=\text{O})-(\text{CH}_2)_n$ 、 $-(\text{C}=\text{O})-\text{NR}^N-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{NR}^N-(\text{C}=\text{O})-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-(\text{C}=\text{O})-\text{NR}^N-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{NR}^N-(\text{C}=\text{O})-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})-\text{NR}^N-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O})_n-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O})_n-(\text{C}=\text{O})-\text{NR}^N-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-(\text{C}=\text{O})-\text{NR}^N-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O})_n-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O})_n-(\text{C}=\text{O})-\text{NR}^N-(\text{CH}_2)_n-$ 及2-8員環狀烴、雜環、芳基或雜芳基環；其中「 n 」獨立地係零或1-10之整數；且其中「 l 」、「 p 」、「 q 」及「 r 」獨立地係零或1-10之整數；

Ω 係鍵（亦即，其不存在）或 C_{3-26} 烴環或稠合環系統，其視情況包括至多4個稠合環，每一環具有3-8個成員且視情況在每一環中包括1-4個選自O、S及N之雜原子。較佳地， Ω 係稠合至環辛烷環或稠合至8員雜環或環系統之1,2,3-三唑環；

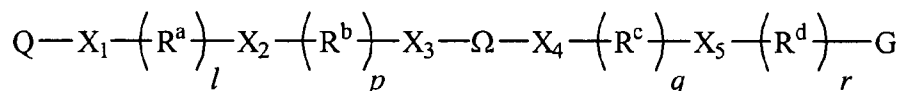
R^* 及 R^N 在每次出現時獨立地係H或 C_{1-12} 烴，其視情況經1-6個選自鹵素、O、S及N之雜原子取代；且其中任兩個基團 R^* 及/或 R^N 可一起形成3-8員環。

第二異雙官能連接體具有形式Q-L-G，其中Q係硫醇反應性官能基，L係烴連接體，且G係含炔基團。硫醇反應性官能基Q係選自由以下組成之群：烷基鹵化物（例如烷基氯化物、溴化物、或碘化物）、苄

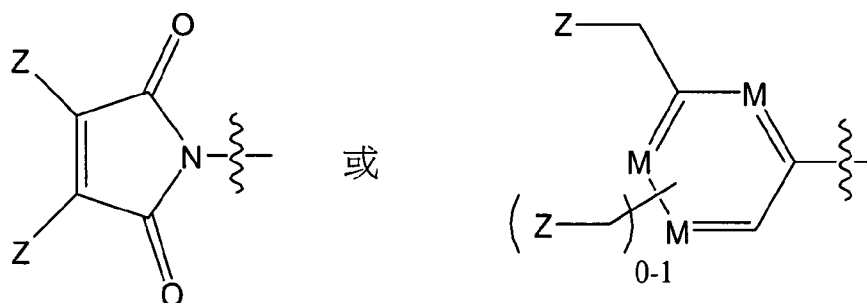
基鹵化物、馬來醯亞胺、鹵基-馬來醯亞胺(例如溴馬來醯亞胺)及二鹵基-馬來醯亞胺(例如二溴馬來醯亞胺)。L係在Q與G之間之直接鏈中具有3-60個原子(例如較佳地6-50個)之烴連接體。較佳地，L係聚環氧烷基團(PEG)，較佳地，L係單元 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_n-$ 或 $-(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2)_n-$ 之聚合物(其中「n」獨立地係1-20、更通常而言1-8之整數)。

G係任一能夠與疊氮化物發生環加成之含炔基團。在一些實施例中，G包括末端炔，例如 $-\text{C}\equiv\text{CH}$ 。在其他實施例中，G包括在環中具有 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 鍵之環或環系統。在一實施例中，G包括具有 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 鍵之C8環。在一實施例中，含 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 環經應變。

第二異雙官能連接體具有以下形式：



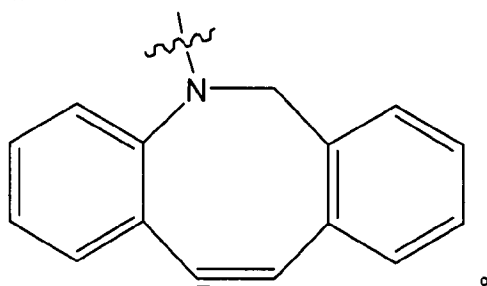
Q與第一異雙官能連接體相同或不同。Q通常係以下形式之硫醇反應性基團：



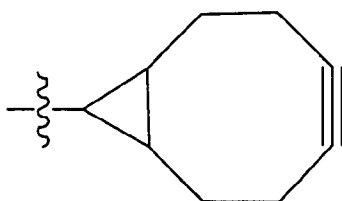
其中Z在每次出現時獨立地選自H、Br、I及SPh。在一些實施例中，Z在至少一次出現時並非H，但在馬來醯亞胺情形下，Z可在每次出現時皆為氫。M在每次出現時獨立地係CR*或N。

G通常係包括能夠與疊氮化物發生1,3偶極環加成反應之 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 鍵之C₈₋₂₀烴基團。在一些實施例中，G具有形式 $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$ 。在其他實施例中，G包括具有 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 鍵之環。特定而言，G可包括具有三鍵(例如環辛炔)之8員環。該環可視情況稠合至一個、兩個或更多個其他環，該等其他環通常係C₃₋₆環狀烴環，包含芳基、雜芳基及雜環。含有三鍵

之8員環可在環中包含一或多個(例如1-4個)雜原子，例如氮及氧。在一實施例中，8員環在環中含有氮原子，其提供至L之附接點，如下文所展示之實例性結構中：



較佳地，G具有以下形式：



X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及 X_5 在每次出現時獨立地選自由以下組成之群：鍵(亦即，其不存在)、 $-O-$ 、 $-NR^N-$ 、 $-N=C-$ 、 $-C=N-$ 、 $-N=N-$ 、 $-CR^*=CR^*$ (順式或反式)、 $-C\equiv C-$ 、 $-(C=O)-$ 、 $-(C=O)-O-$ 、 $-(C=O)-NR^N-$ 、 $-NR^N-(C=O)-$ 、 $-NR^N-(C=O)-O-$ 、 $-(C=O)-(CH_2)_n-$ 、 $-(C=O)-O-(CH_2)_n-$ 、 $-(C=O)-NR^N-(CH_2)_n-$ 及 $-(C=O)-NR^N-(CH_2CH_2-O)_n-$ ，其中「 n 」係零或1-10之整數；

R^a 、 R^b 、 R^c 及 R^d 在每次出現時獨立地選自 $-O-$ 、 $-NR^N-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_n-$ 、 $-(CR^*_2)_n-$ 、 $-(CH_2CH_2-O)_n-$ 、 $-(CR^*_2CR^*_2-O)_n-$ 、 $-(O-CH_2CH_2)_n-$ 、 $-(O-CR^*_2CR^*_2)_n-$ 、 $-CR^*=CR^*$ (順式或反式)、 $-N=C-$ 、 $-C=N-$ 、 $-N=N-$ 、 $-C\equiv C-$ 、 $-(C=O)-$ 、 $-(CH_2)_n-(C=O)-$ 、 $-(C=O)-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-(C=O)-(CH_2)_n-$ 、 $-O-(C=O)-$ 、 $-(C=O)-O-$ 、 $-O-(C=O)-O-$ 、 $-(CH_2)_n-(C=O)-O-$ 、 $-O-(C=O)-(CH_2)_n$ 、 $-(C=O)-O-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-O-(C=O)-$ 、 $-(CH_2)_n-(C=O)-O-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-O-(C=O)-(CH_2)_n-$ 、 $-NR^N-(C=O)-$ 、 $-(C=O)-NR^N-$ 、 $-NR^N-(C=O)-O-$ 、 $-O-(C=O)-NR^N-$ 、 $-NR^N-(C=O)-NR^N-$ 、 $-(CH_2)_n-(C=O)-NR^N-$ 、 $-NR^N-(C=O)-(CH_2)_n$ 、 $-(C=O)-$

$\text{NR}^{\text{N}}-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{NR}^{\text{N}}-(\text{C}=\text{O})-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-(\text{C}=\text{O})-\text{NR}^{\text{N}}-(\text{CH}_2)_n-$ 、
 $-(\text{CH}_2)_n-\text{NR}^{\text{N}}-(\text{C}=\text{O})-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})-\text{NR}^{\text{N}}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_n-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_n-(\text{C}=\text{O})-\text{NR}^{\text{N}}-$ 、
 $-(\text{CH}_2)_n-(\text{C}=\text{O})-\text{NR}^{\text{N}}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_n-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_n-(\text{C}=\text{O})-\text{NR}^{\text{N}}-(\text{CH}_2)_n-$ 或2-8員環狀烴、雜環、芳基或雜芳基環；其中
 「 n 」在每次出現時獨立地係零或1-10之整數；且其中「 l 」、「 p 」、「 q 」及「 r 」獨立地係零或1-10之整數；

Ω 係鍵(亦即，其不存在)或 C_{3-26} 烴環或稠合環系統，其視情況包括至多4個稠合環，每一環具有3-8個成員且視情況在每一環中包括1-4個選自O、S及N之雜原子。在一實施例中， Ω 包括稠合至環辛烷環或稠合至8員雜環或環系統之1,2,3-三唑環。

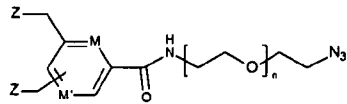
R^* 及 R^{N} 在每次出現時獨立地係H或 C_{1-12} 烴，其視情況經1-6個選自鹵素、O、S及N之雜原子取代；且其中兩個基團 R^* 及/或 R^{N} 可一起形成3-8員環。

疊氮化物與炔之間之環加成反應可經由1,3偶極環加成反應進行。該反應可由銅離子催化。在一些實施例中，環加成反應係在中性或生理學pH下發生。

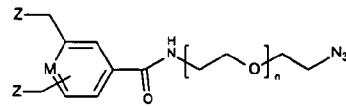
本揭示內容另外提供還原具有鉸鏈殘基序列(EU索引編號：殘基226-229；Kabat編號：殘基239-242) CPPC或CPSC或SPPC或SPSC之抗體「A」及具有鉸鏈殘基序列(殘基226-229) CPPC或CPSC或SPPC或SPSC之第二抗體「B」以形成半抗體A及半抗體B之方法，其包括：

(a)還原每一抗體A及抗體B，其中還原條件破裂具有鉸鏈殘基序列(EU索引編號：殘基226-229；Kabat編號：殘基239-242) CPPC或CPSC或SPPC或SPSC之每一抗體之鉸鏈區中之任一鏈間或鏈內二硫鍵；

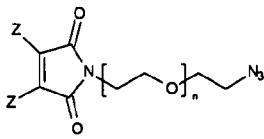
(b)使選自由下列組成之群之化合物連接：



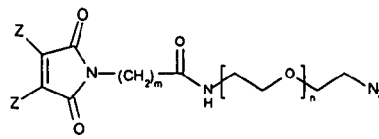
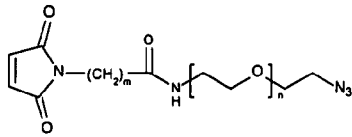
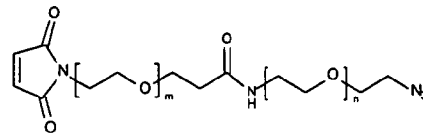
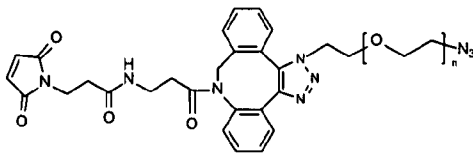
n = 1-8



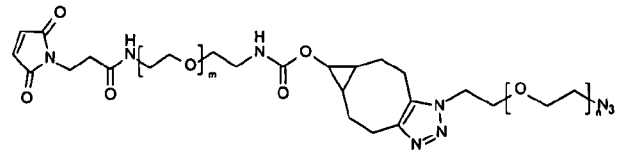
n = 1-8



n = 1-8

m = 1-8
n = 1-8m = 1-8
n = 1-8m = 1-8
n = 1-8

n = 1-8

m = 1-8
n = 1-8

M = N、C

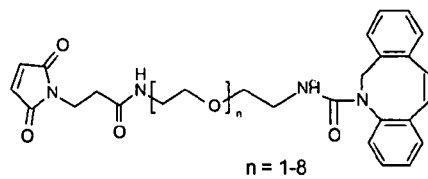
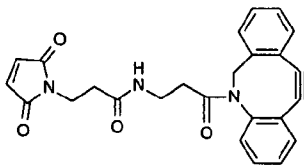
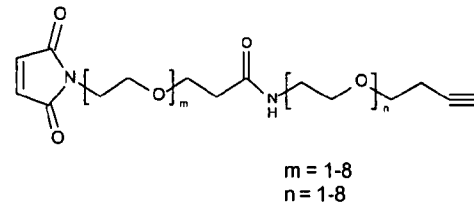
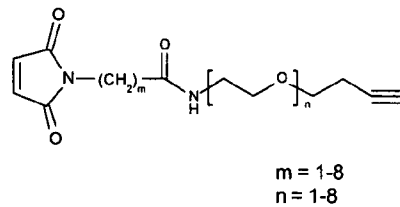
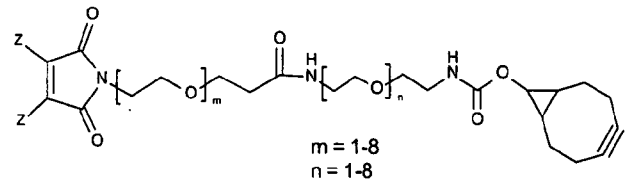
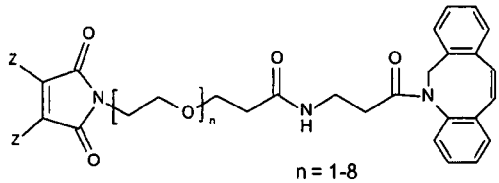
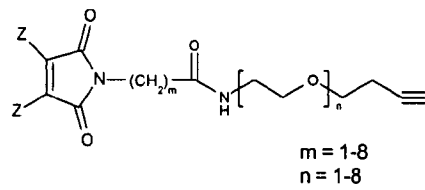
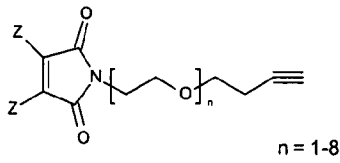
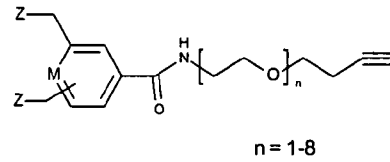
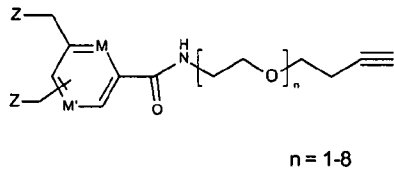
M' = N、C

Z = I、Br、SPh

其中N₃係-N=N=N；

至半抗體A之鉸鏈核心序列之一或兩個Cys殘基(EU索引編號：殘基226及229；Kabat編號：殘基239及242)以形成經連接半抗體A；

(c)使選自由下列組成之群之化合物連接：



$M = N、C$

$M' = N、C$

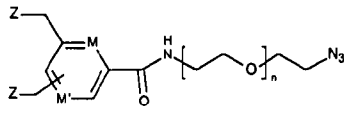
$Z = I、Br、SPh$

至抗體B之鉸鏈核心序列之一或兩個Cys殘基226及229 (EU索引編號：殘基226及229；Kabat編號：殘基239及242)以形成經連接抗體B；及

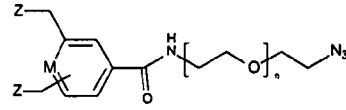
(d)在中性條件下一起培育大約等莫耳量之經連接抗體A與經連接抗體B以形成經連接雙特異性抗體AB。

較佳地，在還原劑中還原抗體A以形成半抗體A且還原抗體B以形成半抗體B，其中還原劑係選自由以下組成之群：L-半胱胺酸、二硫蘇糖醇、 β -巯基乙醇、半胱胺、TCEP (叁(2-羧基乙基)膦)、2-MEA

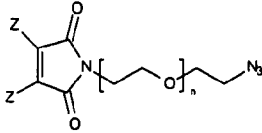
(2-巯基乙基胺)及其組合。較佳地，使抗體A中具有一或兩個Cys殘基之銜鏈區與具有選自由以下組成之群之結構的部分A連接：



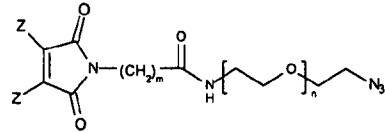
$n = 1-8$



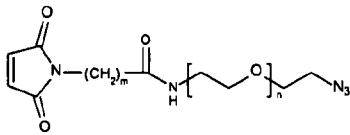
$n = 1-8$



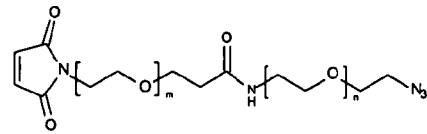
$n = 1-8$



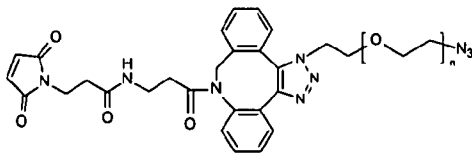
$m = 1-8$
 $n = 1-8$



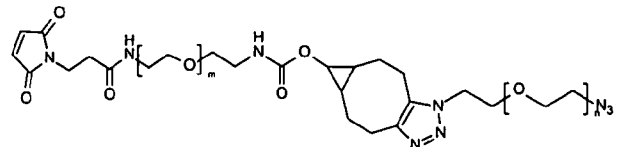
$m = 1-8$
 $n = 1-8$



$m = 1-8$
 $n = 1-8$



$n = 1-8$



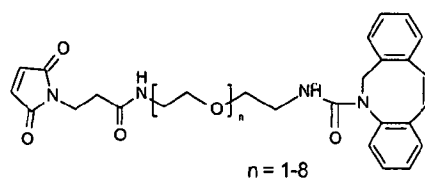
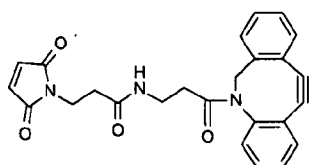
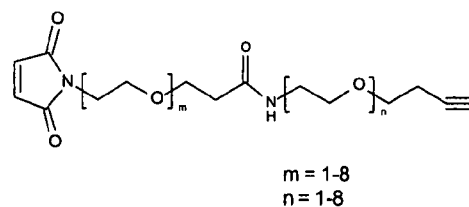
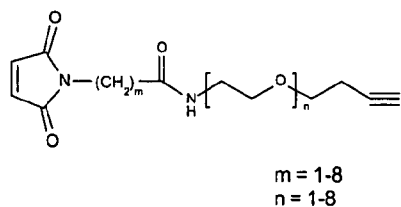
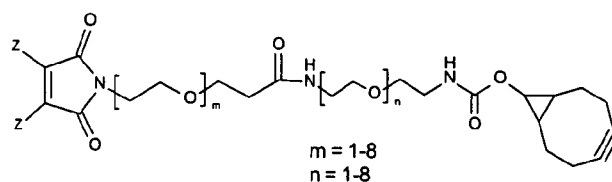
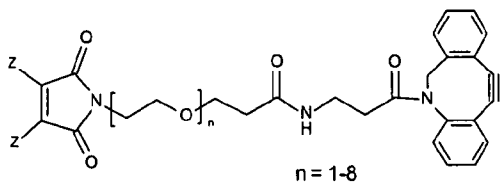
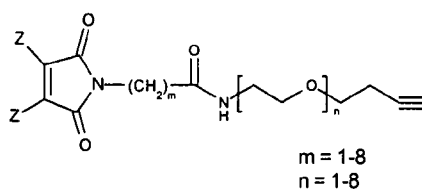
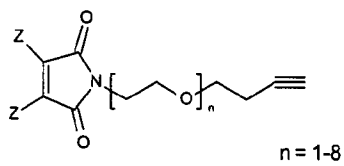
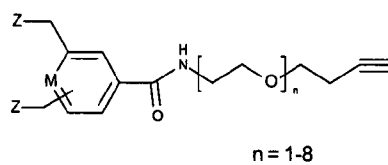
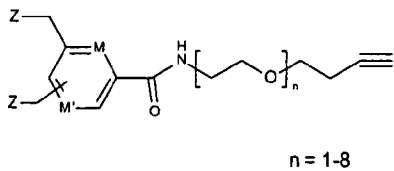
$m = 1-8$
 $n = 1-8$

$M = N, C$

$M' = N, C$

$Z = I, Br, SPh$

其中 N_3 係 $-N=N=N$ 。較佳地，使抗體B中具有一或兩個Cys殘基之銜鏈區與具有選自由以下組成之群之結構的部分B連接：



M = N、C

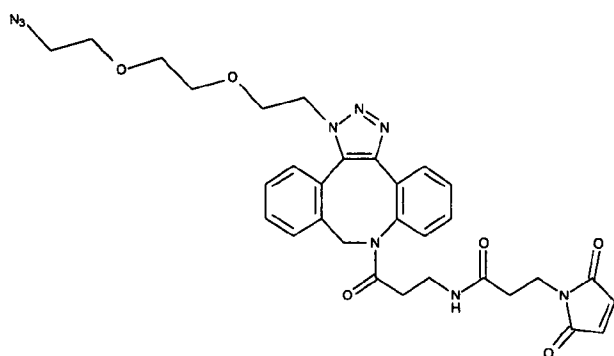
M' = N、C

Z = I、Br、SPh

以形成經連接半抗體B。

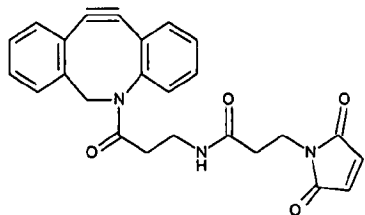
本揭示內容另外提供化學鎖固之雙特異性抗體AB，其中經連接

半抗體A



其中 N_3 係 $-N=N=N$ ；

與經連接抗體B連接

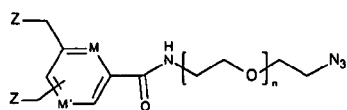


以形成具有圖10中所展示結構之雙特異性抗體AB。

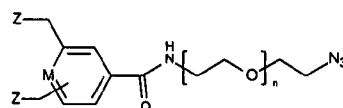
本揭示內容提供來自IgG種類抗體「A」或其片段及IgG種類抗體

「B」之化學鎖固之雙特異性抗體「AB」或「BA」，其包括具有選自

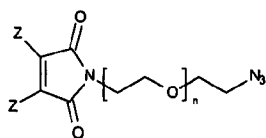
由以下組成之群之結構之半抗體A：



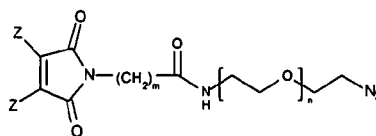
$n = 1-8$



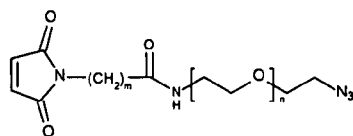
$n = 1-8$



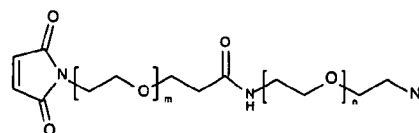
$n = 1-8$



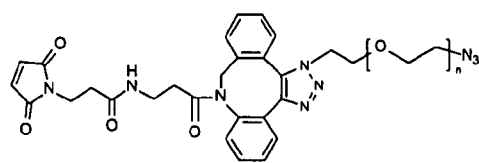
$m = 1-8$
 $n = 1-8$



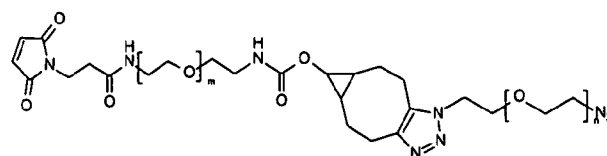
$m = 1-8$
 $n = 1-8$



$m = 1-8$
 $n = 1-8$



$n = 1-8$



$m = 1-8$
 $n = 1-8$

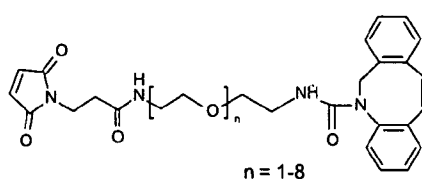
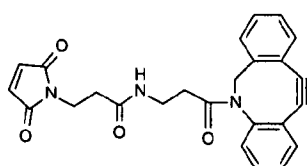
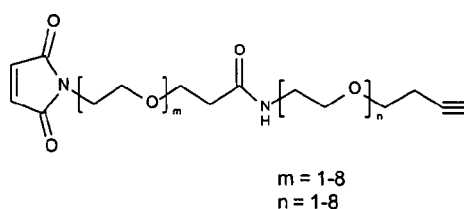
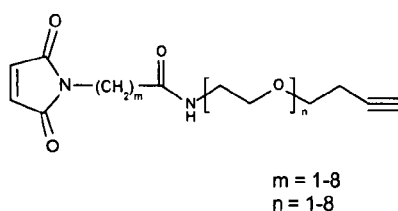
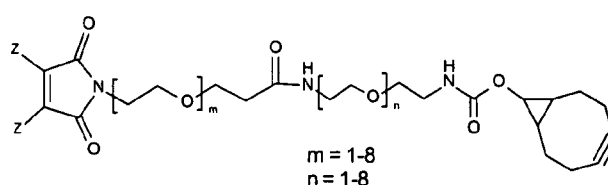
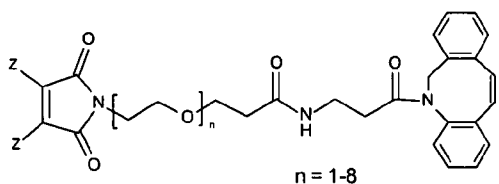
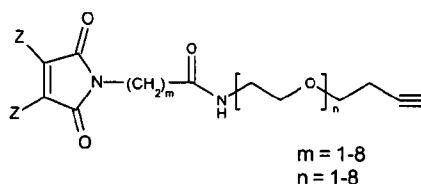
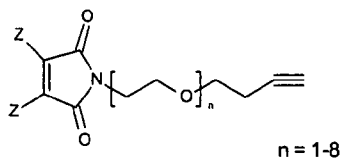
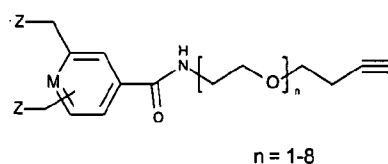
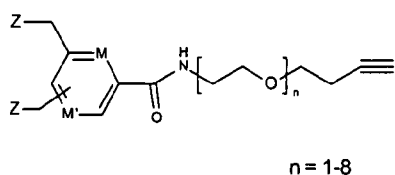
$M = N、C$

$M' = N、C$

$Z = I、Br、SPh$

其中 N_3 係 $-N=N=N$ ，且其中Z係離去基團；

及具有選自由以下組成之群之結構之半抗體B：



$M = N、C$

$M' = N、C$

$Z = I、Br、SPh$

本揭示內容另外提供一種雙特異性抗體，其包括：

(a) 第一抗體片段A'，其包括來自抗體A之單一重鏈及輕鏈，重鏈具有一或多個反應性硫醇基團；

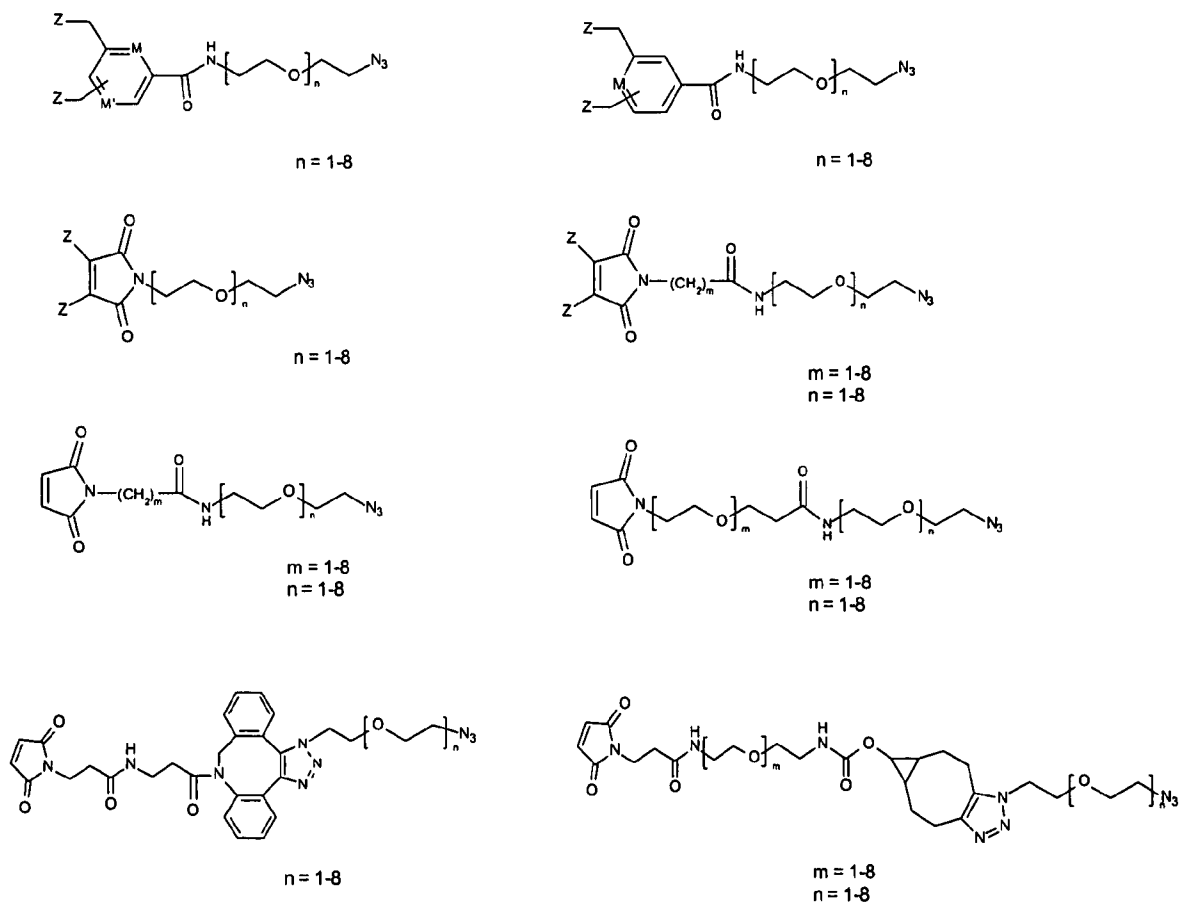
(b) 第二抗體片段B'，其包括單一重鏈及輕鏈，重鏈具有一或多個反應性硫醇基團；

其中該等第一及第二抗體片段經由1,2,3-三唑共價連接，該1,2,3-

三唑係藉由疊氮化物(經由連接體附接至該第一抗體片段上之反應性硫醇)及炔(經由連接體附接至該第二抗體片段上之反應性硫醇)之環加成反應形成。連接體闡述於上文中。抗體片段A'及B'係衍生自其Fab2片段之IgG1、IgG2或IgG4免疫球蛋白。

本揭示內容另外提供共價鍵結至連接體之抗體片段，其中該連接體包括具有能夠與疊氮化物發生環加成反應之 $-C\equiv C-$ 鍵之 C_8 環。本揭示內容另外提供共價鍵結至連接體之抗體片段，其中該連接體包括能夠與 $-C\equiv C-$ 鍵發生環加成反應之疊氮化物。

較佳地，在還原劑中還原抗體A以形成半抗體A且還原抗體B以形成半抗體B，其中還原劑係選自由以下組成之群：L-半胱胺酸、二硫蘇糖醇、 β -巰基乙醇、半胱胺、TCEP (叁(2-羧基乙基)膦)、2-MEA (2-巰基乙基胺)及其組合。較佳地，使抗體A中具有一或兩個Cys殘基之鉸鏈區與具有選自由以下組成之群之結構的部分A連接：



$M = N、C$

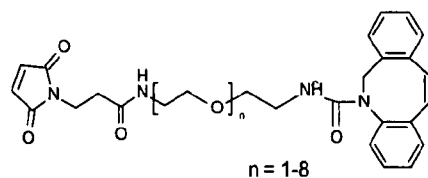
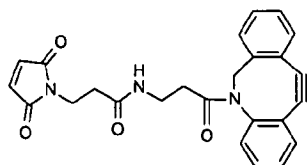
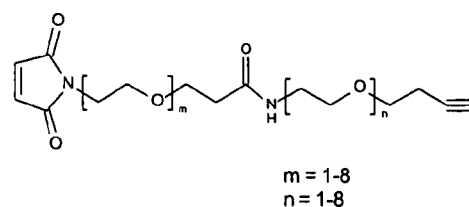
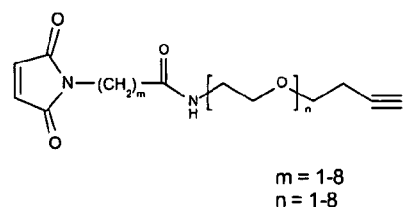
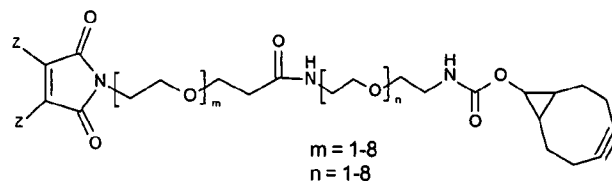
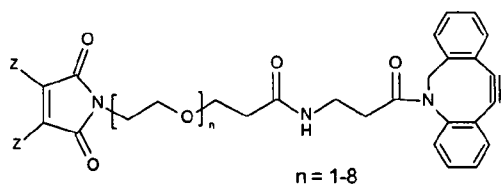
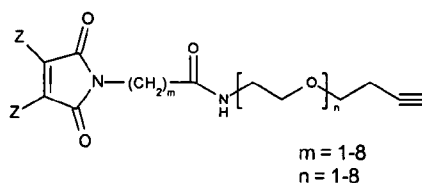
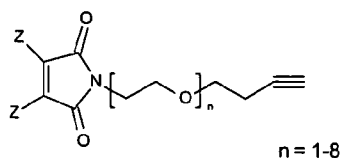
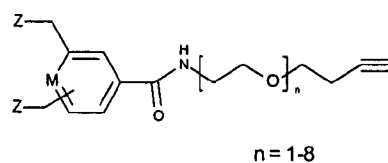
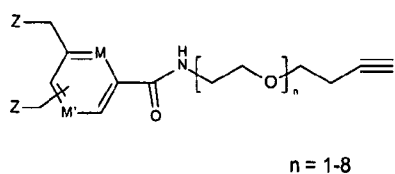
$M' = N、C$

$Z = I、Br、SPh$

其中 N_3 係 $-N=N=N$ ；

至半抗體A之鉸鏈核心序列之一或兩個Cys殘基(EU索引編號：殘基226及229；Kabat編號：殘基239及242)以形成經連接半抗體A；

(c)使選自由下列組成之群之化合物連接：



$M = N、C$

$M' = N、C$

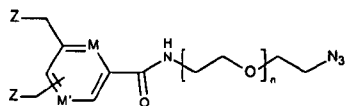
$Z = I、Br、SPh$

至抗體B之鉸鏈核心序列之一或兩個Cys殘基226及229 (EU索引

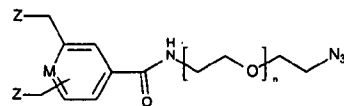
編號：殘基226及229；Kabat編號：殘基239及242)以形成經連接抗體B；及

(d)在中性條件下一起培育大約等莫耳量之經連接抗體A與經連接抗體B以形成經連接雙特異性抗體AB。

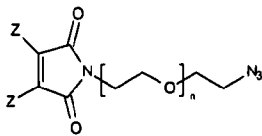
較佳地，在還原劑中還原抗體A以形成半抗體A且還原抗體B以形成半抗體B，其中還原劑係選自由以下組成之群：L-半胱胺酸、二硫蘇糖醇、 β -巰基乙醇、半胱胺、TCEP (叁(2-羧基乙基)膦)、2-MEA (2-巰基乙基胺)及其組合。較佳地，使抗體A中具有一或兩個Cys殘基之鉸鏈區與具有選自由以下組成之群之結構的部分A連接：



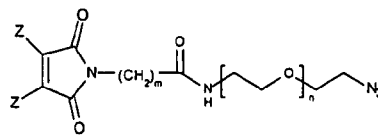
$n = 1-8$



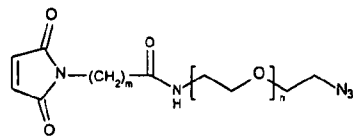
$n = 1-8$



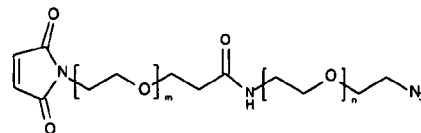
$n = 1-8$



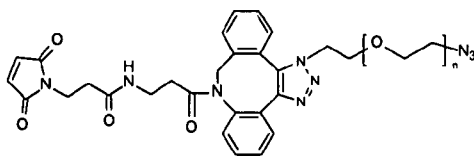
$m = 1-8$
 $n = 1-8$



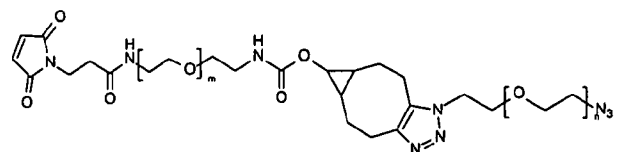
$m = 1-8$
 $n = 1-8$



$m = 1-8$
 $n = 1-8$



$n = 1-8$



$m = 1-8$
 $n = 1-8$

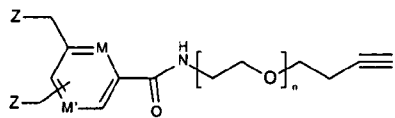
$M = N \cdot C$

$M' = N \cdot C$

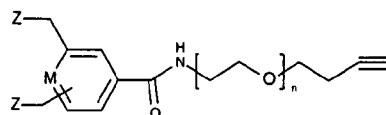
$Z = I \cdot Br \cdot SPh$

其中 N_3 係-N=N=N。較佳地，使抗體B中具有一或兩個Cys殘基之

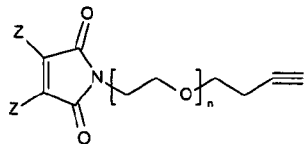
鉸鏈區與具有選自由以下組成之群之結構的部分B連接：



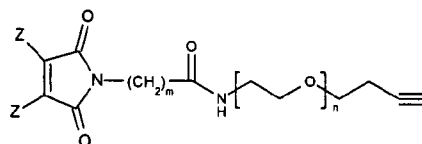
$n = 1-8$



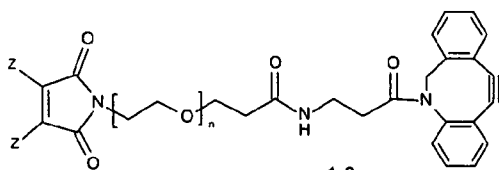
$n = 1-8$



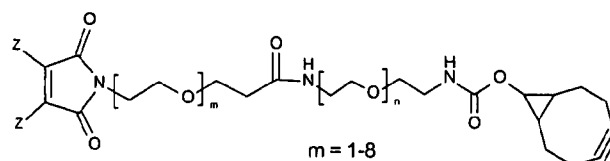
$n = 1-8$



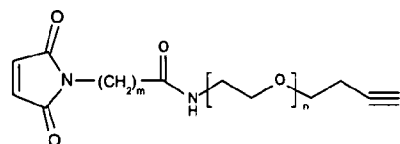
$m = 1-8$
 $n = 1-8$



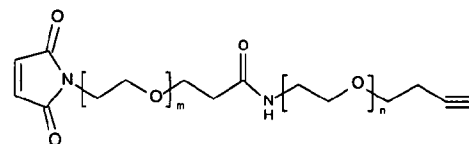
$n = 1-8$



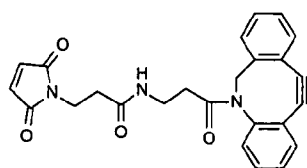
$m = 1-8$
 $n = 1-8$



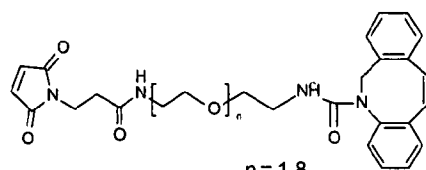
$m = 1-8$
 $n = 1-8$



$m = 1-8$
 $n = 1-8$



$n = 1-8$



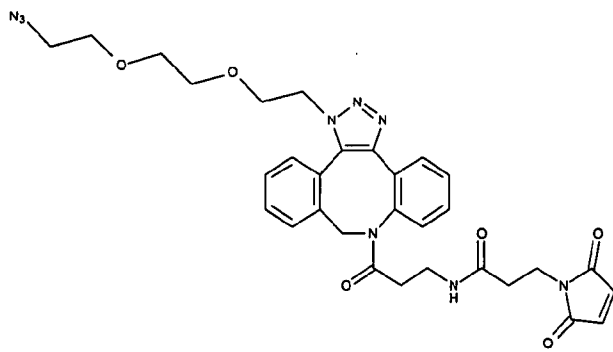
$M = N、C$

$M' = N、C$

$Z = I、Br、SPh$

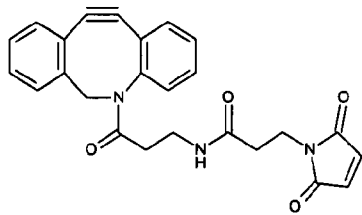
以形成經連接半抗體B。

本揭示內容另外提供化學鎖固之雙特異性抗體AB，其中經連接半抗體A



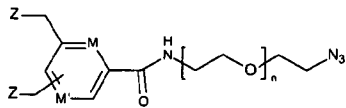
其中 N_3 係 $-N=N=N$ ；

與經連接抗體B連接

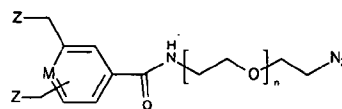


以形成具有圖10中所展示結構之雙特異性抗體AB。

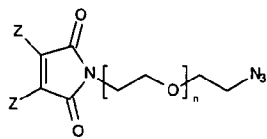
本揭示內容提供來自IgG種類抗體「A」及IgG種類抗體「B」之化學鎖固之雙特異性抗體「AB」或「BA」，其包括具有選自由以下組成之群之結構之半抗體A：



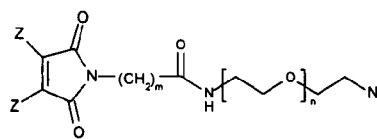
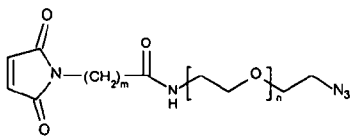
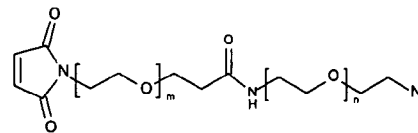
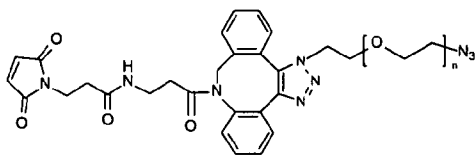
n = 1-8



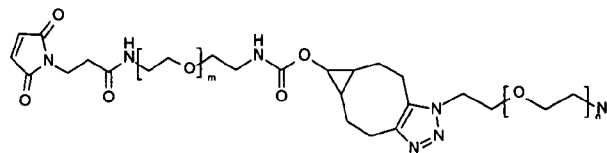
n = 1-8



n = 1-8

m = 1-8
n = 1-8m = 1-8
n = 1-8m = 1-8
n = 1-8

n = 1-8

m = 1-8
n = 1-8

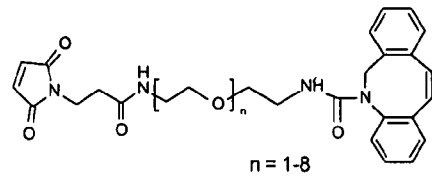
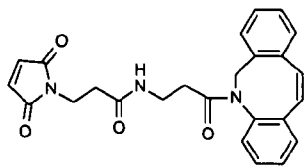
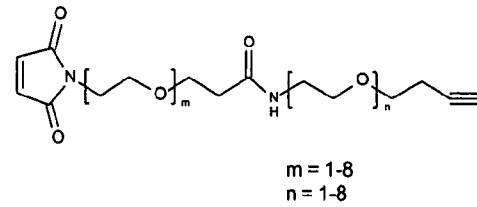
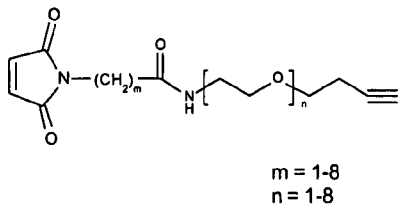
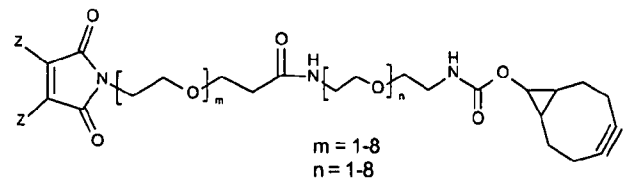
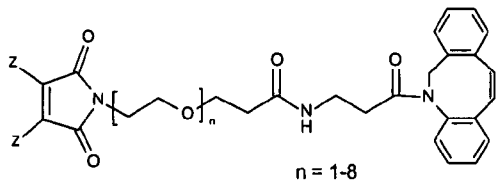
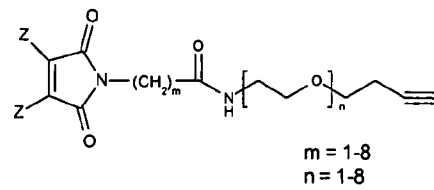
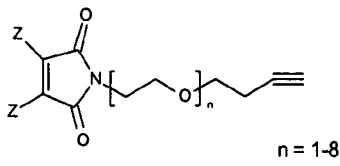
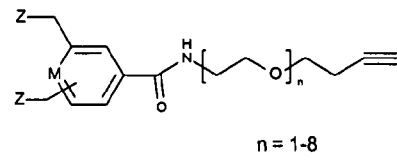
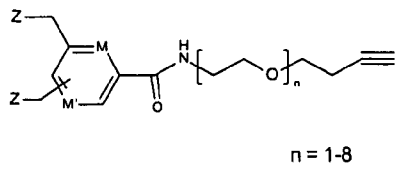
M = N、C

M' = N、C

Z = I、Br、SPh

其中N₃係-N=N=N，且其中Z係發生結合之離去基團；

及具有選自由以下組成之群之結構之半抗體B：



$M = N、C$

$M' = N、C$

$Z = I、Br、SPh$

【圖式簡單說明】

圖1展示建立經由化學偶聯至IgG種類抗體之鉸鏈區中之單一Cys殘基來生成雙特異性mAb之示意圖。

圖2展示根據本文揭示內容經由化學偶聯至IgG種類抗體之鉸鏈區中之單一Cys殘基進行鏈間交聯之示意圖。

圖3展示鏈內交聯至IgG種類抗體之鉸鏈區內之兩個Cys殘基之示意圖。

圖4展示(上圖及下圖)經由鏈間交聯至IgG種類抗體之鉸鏈區內之兩個Cys殘基生成雙特異性mAb之示意圖。

圖5展示化學鎖固之半mAb片段之SDS PAGE分析。

圖6展示來自裸mAb(上圖)、疊氮化物偶聯mAb片段(中圖)及炔偶聯mAb片段(下圖)之HC Fab之MS分析。

圖7展示來自疊氮化物附接半mAb及炔附接半mAb片段之交聯產物之SDS PAGE。

圖8展示來自起始mAb (上圖)及交聯產物(下圖)之(Fab)₂之MS分析。

圖9展示本文實例4中所產生之化學改質半抗體片段(泳道2及3)之非還原SDS PAGE。

圖10展示經由兩個半抗體片段之間之點擊偶聯來生成雙特異性抗體。

圖11展示半抗體片段(a)及點擊產物(b)之非還原SDS PAGE。半抗體-疊氮化物位於凝膠(a)中之泳道2中且半抗體-DBCO位於凝膠(a)中之泳道3中。點擊產物位於凝膠(b)中之泳道2中。

圖12展示IdeS消化點擊產物之質譜，其展示雙特異性抗體CBA-0710之質量。

圖13展示雙特異性抗體CBA-0710之SEC尺寸排除層析。

圖14展示BIAcore上之雙特異性抗體CBA-0710之結合。更具體而言，圖14展示BIAcore上雙特異性抗體CBA-0710與兩種抗原之同時結合。

圖15展示結合至三陰性乳癌細胞MDA-MB-231之雙特異性抗體CBA-0710。該等細胞表現抗原-1及抗原-2。STI-A0607係抗抗原-1單株抗體且STI-A1010係抗抗原-2單株抗體。

圖16展示雙特異性抗體CBA-0710在三陰性乳癌細胞中之拮抗活

性。STI-A0607係抗抗原-1單株抗體且STI-A1010係抗抗原2單株抗體。HGF係抗原-1之天然配體。

圖17展示因應於雙特異性抗體CBA-0710之增加之IFN- γ 釋放。STI-A1010係抗抗原-2 (免疫檢查點)單株抗體。競爭劑mAb係人類化抗抗原-2 (免疫檢查點)單株抗體。

圖18展示因應於雙特異性抗體CBA-0710之增加之IL-2釋放。STI-A1010係抗抗原-2 (免疫檢查點)單株抗體。競爭劑mAb係人類化抗抗原-2 (免疫檢查點)單株抗體。

圖19展示由A抗c-Met抗體及B抗PD-L1抗體構成之化學鎖固之雙特異性抗體與規則抗c-Met IgG1及抗PD-L1 IgG1抗體相比之改良效能。

圖20展示經由化學偶聯生成雙特異性F(ab)'₂之示意圖。

圖21展示F(ab)'₂及F(ab)'之SDS_PAGE凝膠分析。柱1係使用IdeS消化之抗體A。柱2係使用IdeS消化之抗體B。柱3係經消化且去除FC之抗體A。柱4係經消化且去除FC之抗體B。柱5係經消化且去除FC、使用2MEA及TCEP還原且與DBCO (二苄基環辛基)-馬來醯亞胺偶聯之抗體A。柱6係經消化且去除FC、使用2MEA及TCEP還原、與疊氮化物-馬來醯亞胺偶聯之抗體B。

圖22展示經由兩個F(ab)'片段之間之點擊偶聯生成F(ab)'₂化學鎖固之雙特異性抗體的示意圖。

圖23展示來自本文實例7之點擊F(ab)'₂之SEC。

圖24展示點擊雙特異性F(ab)'₂片段分析SDS PAGE。柱1係經消化且去除FC並使用2MEA及TCEP還原、與DBCO(二苄基環辛基)-馬來醯亞胺偶聯之抗體A。柱2係經消化且去除FC並使用2MEA及TCEP還原、與疊氮化物-馬來醯亞胺偶聯之抗體B。柱3係點擊_雙特異性F(ab)'₂。

圖25展示點擊產物之質譜，其展示雙特異性F(ab)'₂之質量。

圖26展示點擊F(ab)'₂之SEC。

圖27展示Octet Red上雙特異性F(ab)'₂與兩個抗原之同時結合。

圖28展示經由化學偶聯生成雙特異性IgG2之示意圖。

圖29展示IgG2片段分析SDS PAGE。柱1係抗體A。柱2係使用TCEP還原且與疊氮化物-馬來醯亞胺偶聯之抗體A。柱3係抗體B。柱4係使用TCEP還原且與疊氮化物-馬來醯亞胺偶聯之抗體B。

圖30A-C展示質譜，其展示(圖30A)與連接體偶聯之IgG2_A、(圖30B)與連接體偶聯之IgG2_B及(圖30C)形成於IgG2_A與B之間之雙特異性-IgG2的質量。

圖31展示IgG2_A、IgG2_B及點擊產物之SEC。

【實施方式】

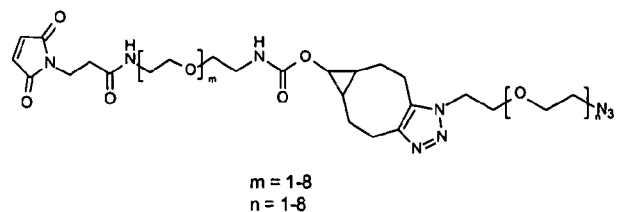
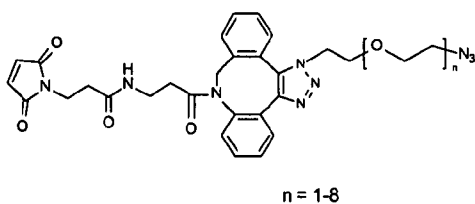
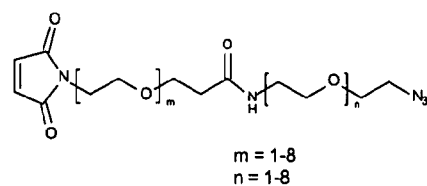
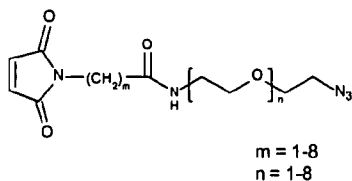
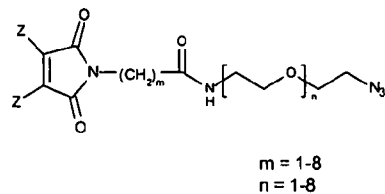
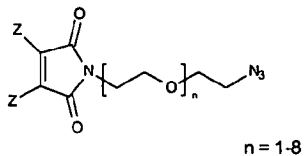
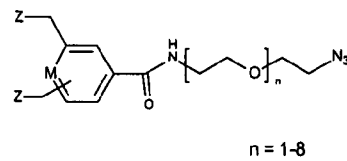
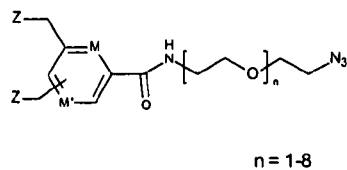
雙特異性抗體(BsAb)係由兩個在鉸鏈區處以化學方式連接之半抗體片段構成(圖1)。起始抗體係IgG1或IgG4同種型。起始抗體可含有改質鉸鏈區，其中Cys殘基首先突變至Ser，從而在鉸鏈處僅留下一種二硫化物。雙特異性抗體之生成涉及三個主要步驟。第一步驟係選擇性還原兩種抗體A及B以形成半抗體片段。第二步驟係經由基於半胱胺酸之偶聯將功能部分X或Y引入每一抗體半片段之鉸鏈區中，從而分別得到化學改質之抗體半片段A'及B'。在最後步驟中，使兩個抗體半片段經由X與Y部分之間之化學連接連接至一起以形成雙特異性抗體。

本揭示內容提供自IgG種類抗體「A」及IgG種類抗體「B」生成化學鎖固之雙特異性抗體「AB」或「BA」之製程，其包括：

(a)還原具有鉸鏈殘基序列(EU索引編號：殘基226-229；Kabat編號：殘基239-242) CPPC或CPSC或SPPC或SPSC之第一抗體「A」及具有鉸鏈殘基序列(EU索引編號：殘基226-229；Kabat編號：殘基239-

242) CPPC或CPSC或SPPC或SPSC之第二抗體「B」以形成半抗體A及半抗體-B，其中抗體A結合至第一靶且抗體B結合至第二靶，其中還原條件破裂具有鉸鏈殘基序列(殘基226-229) CPPC或CPSC或SPPC或SPSC之抗體種類之鉸鏈區中之任一鏈間或鏈內二硫鍵；

(b)使式I化合物與半抗體A之鉸鏈核心序列之一或兩個Cys殘基(EU索引編號：殘基226及229；Kabat編號：殘基239及242)連接以形成具有選自由以下組成之群之結構的經連接半抗體A：



$M = N、C$

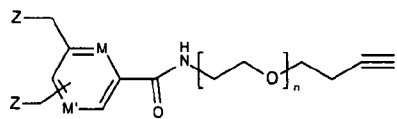
$M' = N、C$

$Z = I、Br、SPh$

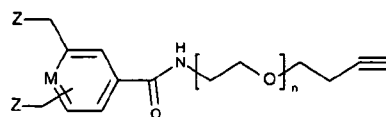
其中 N_3 係 $-N=N=N$ ；

(c)使式II化合物與抗體B之鉸鏈核心序列之一或兩個Cys殘基(EU索引編號：殘基226及229；Kabat編號：殘基239及242)連接以形成具

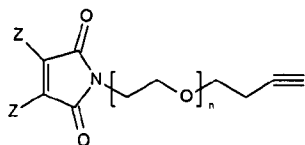
有選自由以下組成之群之結構的經連接抗體B：



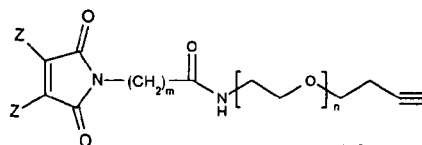
$n = 1-8$



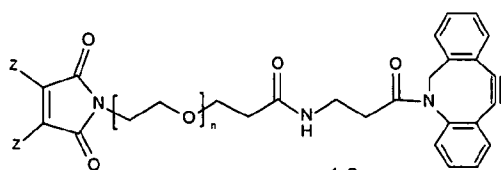
$n = 1-8$



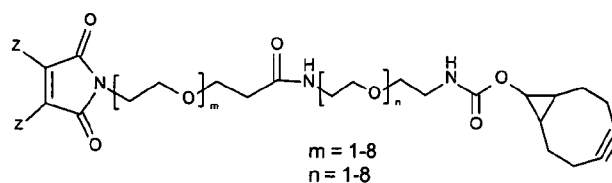
$n = 1-8$



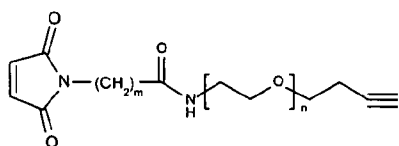
$m = 1-8$
 $n = 1-8$



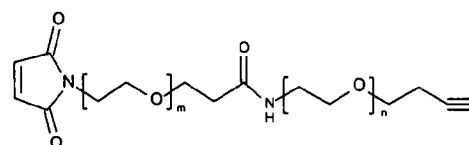
$n = 1-8$



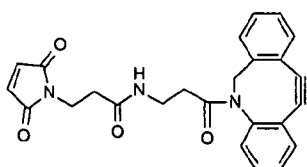
$m = 1-8$
 $n = 1-8$



$m = 1-8$
 $n = 1-8$



$m = 1-8$
 $n = 1-8$



$n = 1-8$

$M = N、C$

$M' = N、C$

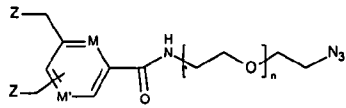
$Z = I、Br、SPh$

；及

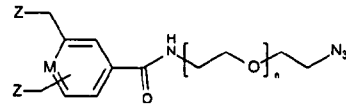
(d)在中性條件下一起培育大約等莫耳量之經連接抗體A與經連接抗體B以形成經連接雙特異性抗體AB。

較佳地，在還原劑(例如L-半胱胺酸、二硫蘇糖醇、 β -巰基乙醇、半胱胺、TCEP (叁(2-羧基乙基)膦)、2-MEA (2-巰基乙基胺)及其組合)中還原抗體A以形成半抗體A且還原抗體B以形成半抗體B。較佳地，使抗體A中具有兩個Cys殘基之鉸鏈區與具有選自由以下組成之

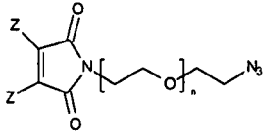
群之結構的部分A連接：



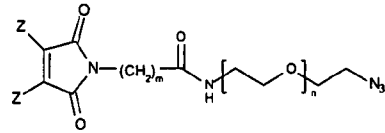
$n = 1-8$



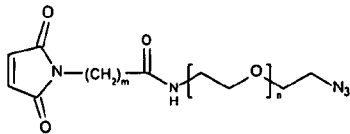
$n = 1-8$



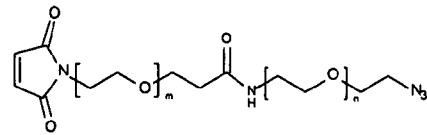
$n = 1-8$



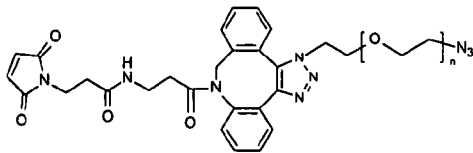
$m = 1-8$
 $n = 1-8$



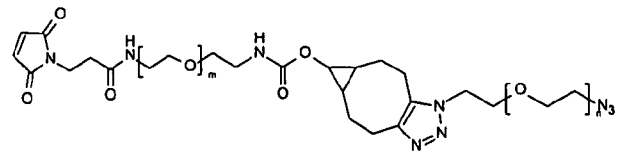
$m = 1-8$
 $n = 1-8$



$m = 1-8$
 $n = 1-8$



$n = 1-8$



$m = 1-8$
 $n = 1-8$

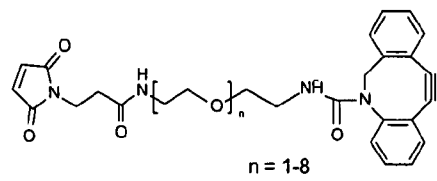
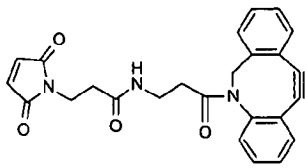
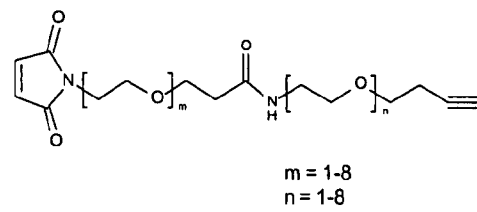
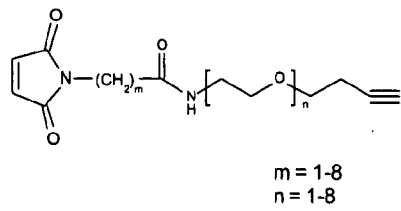
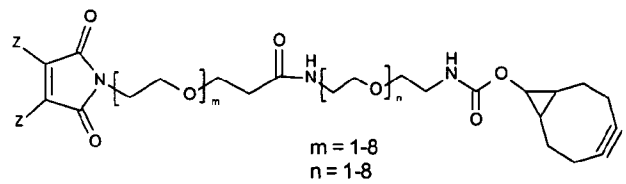
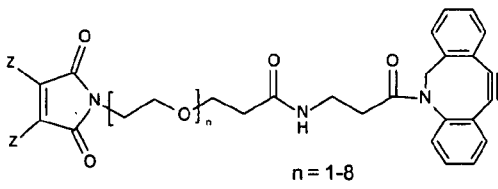
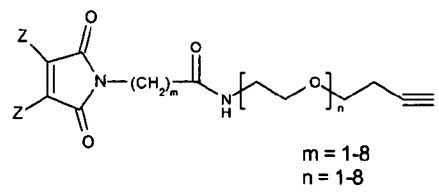
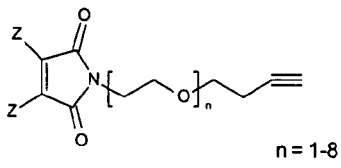
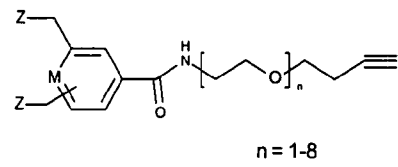
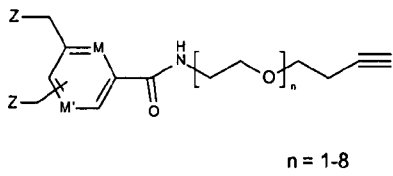
$M = N、C$

$M' = N、C$

$Z = I、Br、SPh$

其中 N_3 係 $-N=N=N$ 。較佳地，使抗體B中具有兩個Cys殘基之銜鏈

區與具有選自由以下組成之群之結構的部分B連接：



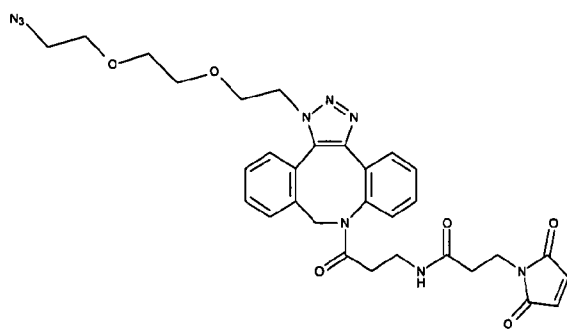
$M = N, C$

$M' = N, C$

$Z = I, Br, SPh$

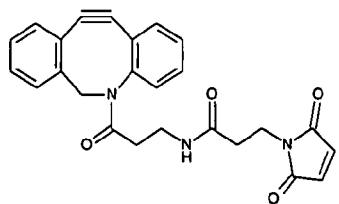
本揭示內容另外提供化學鎖固之雙特異性抗體AB，其中經連接

半抗體A



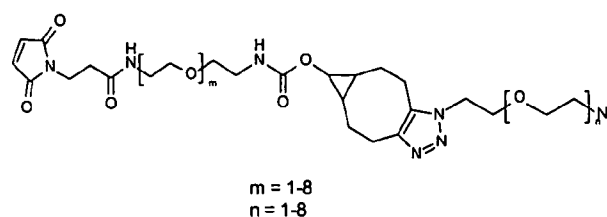
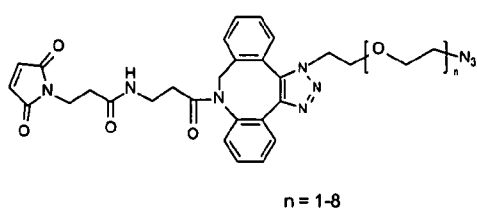
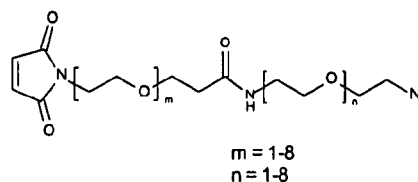
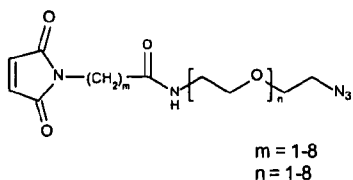
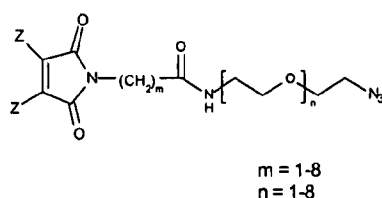
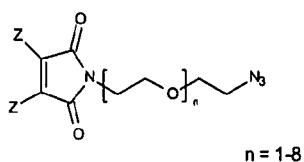
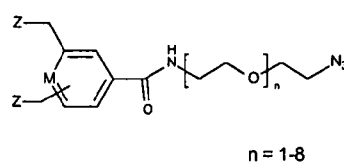
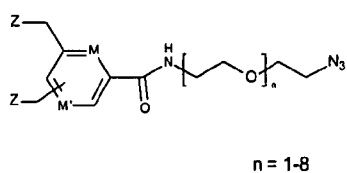
其中 N_3 係 $-N=N=N$ ；

與經連接抗體B連接



以形成具有圖10中所展示結構之雙特異性抗體AB。

本揭示內容提供來自IgG種類抗體「A」及IgG種類抗體「B」之化學鎖固之雙特異性抗體「AB」或「BA」，其包括具有選自由以下組成之群之結構之半抗體A：



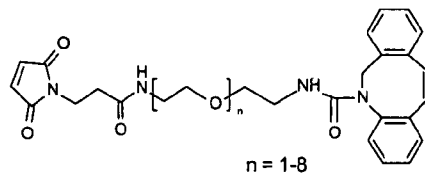
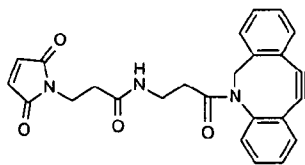
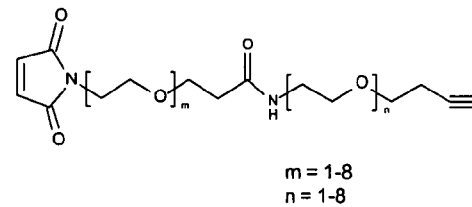
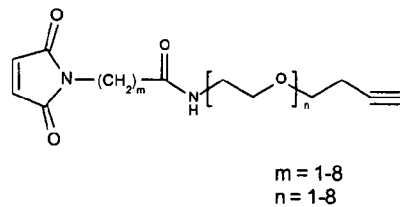
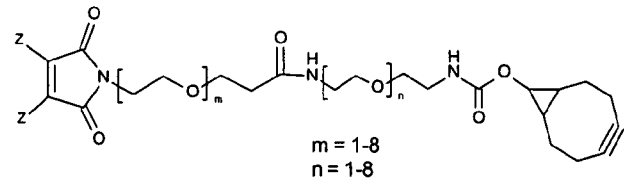
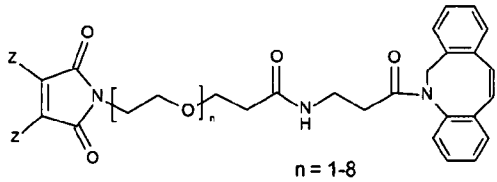
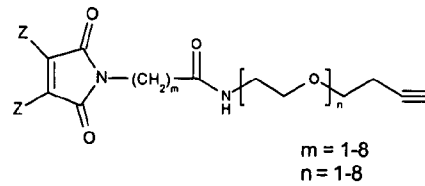
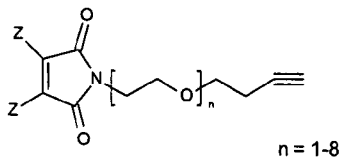
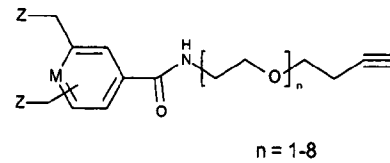
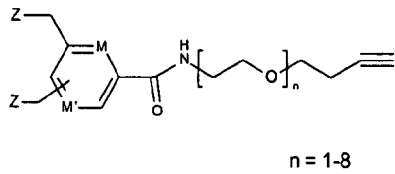
$M = N、C$

$M' = N、C$

$Z = I、Br、SPh$

其中 N_3 係 $-N=N=N$ ；

及具有選自由以下組成之群之結構之半抗體B：



$M = N、C$

$M' = N、C$

$Z = I、Br、SPh$

較佳地，在還原劑(例如L-半胱胺酸、二硫蘇糖醇、 β -巰基乙醇、半胱胺、TCEP (叁(2-羧基乙基)膦)、2-MEA (2-巰基乙基胺)及其組合)中還原抗體A以形成半抗體A且還原抗體B以形成半抗體B。

較佳地，抗體A及B係單株抗體。可藉由雜交瘤方法或藉由重組DNA及蛋白質表現方法產生單株抗體。另外，抗體A及B係全長抗體或抗體片段。

抗體A及B具有CPPC核心鉸鏈區序列或CPSC核心鉸鏈區序列或SPPC核心鉸鏈區序列或SPSC核心鉸鏈區序列(EU索引編號：殘基226-

229；Kabat編號：殘基239-242)。另外，步驟(d)培育進一步包括添加還原劑之步驟，其中還原劑係選自由以下組成之群：L-半胱胺酸、二硫蘇糖醇、 β -巰基乙醇、半胱胺、TCEP (叁(2-羧基乙基)膦)、2-MEA (2-巰基乙基胺)及其組合。

可使用常規生物化學技術(例如吸光度量測、HP-SEC、SDS-PAGE、原始PAGE及RP-HPLC)分析所得雙特異性抗體之品質及純度。應注意，所揭示方法通常因式I連接體對式II連接體之親和力特異性而避免任何純化步驟。然而，存在各種提供US2010/0105874於中之純化步驟，其揭示內容以引用方式併入本文中。

所揭示製程進一步包括調配雙特異性抗體以用於治療應用之步驟。此係藉由在適於人類應用、尤其適於非經腸或靜脈內投與之水溶液中調配有效量之雙特異性抗體來達成。

圖2展示經由化學偶聯生成雙特異性單株抗體(mAb)之反應圖。本文所闡述之雙特異性mAb係由兩個在鉸鏈區處以化學方式連接之半抗體片段構成。雙特異性mAb生成之製程涉及三個主要步驟(圖2)。第一步驟係分別選擇性還原兩種不同mAb A及B中之鉸鏈二硫化物。第二步驟係經由連接體X或Y在每一mAb中同一重鏈上之兩個半胱胺酸之間引入鏈內連接。鏈內連接製程產生兩個化學鎖固之mAb片段A'及B'。在最後步驟中，使兩個mAb片段經由X與Y之間之化學連接連接至一起以形成雙特異性抗體AB。

在此研究中使用具有鉸鏈突變(CPSC)之IgG1、wt IgG4及具有鉸鏈突變(SPSC)之IgG4。

第一步驟係還原抗體A及抗體B中之每一者。在一實施例中，使用10莫耳當量之2-巰基乙基-胺(2-MEA)將抗體(10 mg)在37°C下於0.1M pH 7.4 PBS、1.0 mM二乙烯三胺五乙酸(DTPA)中處理2h。使用50 kDa過濾離心管利用在3,000 RPM下實施20分鐘之離心自部分還原

之mAb純化掉過量2-MEA。使用0.1M PBS實施總共三次洗滌。使用在280 nm下針對1.0mg/mL溶液之1.58之吸光度值來量化蛋白質濃度，且使用150,000 g/mol之分子量測定莫耳濃度。

在還原步驟之另一實施例中，使用3.0莫耳當量之二硫蘇糖醇(DTT)將抗體(10 mg)在24°C下於0.1M pH 7.4 PBS、1.0 mM二乙烯三胺五乙酸(DTPA)中處理2 h。使用50 kDa過濾離心管利用在3,000 RPM下實施20分鐘之離心自部分還原之mAb純化掉過量DTT。使用0.1M PBS實施總共3次洗滌。

在還原步驟之另一實施例中，使用2.0莫耳當量之叁(2-羧基乙基)-膦(TCEP)將mAb (10 mg)在24°C下於0.1M pH 8.0 PBS、1.0 mM二乙烯三胺五乙酸(DTPA)中處理2 h。mAb濃度為8.0 mM。部分還原之mAb未經純化即直接用於偶聯步驟中。

第二步驟係偶聯步驟。將來自還原步驟之存於0.1M PBS中之部分還原之mAb 「抗體A」添加至2.5莫耳當量的交聯劑Z-X-Z中(圖2及圖3)。交聯劑係自存於DMSO中之預製備儲備溶液(1 mg/mL)所獲取。在反應混合物中，部分還原之抗體之濃度為8.0 mg/mL且DMSO含量為5% (v/v)。在24°C下實施偶聯2 hr。使用半胱胺酸(1 mM最終)淬滅任一未反應、過量交聯劑。使用經磷酸鹽緩衝鹽水平衡之PD-10管柱純化偶聯mAb。偶聯mAb結構圖解說明於圖4中。在相同條件下，使第二mAb (抗體B)與交聯劑Z-Y-Z偶聯(圖5及圖6)且純化。偶聯mAb結構圖解說明於圖7及圖8中。

第三步驟係鏈間偶聯步驟。用於鏈間交聯之點擊偶聯圖解說明於圖9中。簡言之，向存於0.5 mL PBS (0.1M, pH 7.4)中之疊氮化物裝飾抗體片段(3.0 mg)中添加存於0.5 mL PBS (0.1M, pH 7.4)中之3.0 mg炔裝飾抗體片段。向此混合物中添加50 μ L乙腈且乙腈之最終含量為5% (v/v)。在室溫下反應3hr之後，使用100 kDa過濾離心管利用在

3,000 RPM下實施20分鐘之離心來純化混合物。使用PBS將混合物洗滌3次且對所得產物實施活體外表徵。

實例1

此實例展示根據所揭示製程來合成雙特異性抗體。圖4展示藉由化學偶聯至IgG種類抗體之鉸鏈區中之兩個Cys殘基來生成雙特異性單株抗體(mAb)之反應圖。所揭示雙特異性mAb係由在其各別鉸鏈區處以化學方式連接之兩個半抗體片段構成。合成雙特異性mAb之製程涉及圖5中所展示之三個主要步驟。第一步驟係分別選擇性還原兩種不同mAb A及B中之鉸鏈二硫化物。第二步驟係經由連接體X或Y在每一mAb中同一重鏈上之兩個半胱胺酸之間引入鏈內連接。鏈內連接製程產生兩個化學鎖固之mAb片段A'及B'。在最後步驟中，使兩個mAb片段經由X與Y之間之化學連接連接至一起以形成雙特異性抗體AB。

更具體而言，獲得具有鉸鏈突變(CPSC)之抗體「A」 IgG1及抗體「B」野生型IgG4。第一步驟係抗體還原。條件1：使用10莫耳當量之2-巰基乙基-胺(2-MEA)將抗體(10 mg)在37°C下於0.1M pH 7.4 PBS、1.0 mM二乙烯三胺五乙酸(DTPA)中單獨處理2h。使用50 kDa過濾離心管利用在3,000 RPM下實施20分鐘之離心自部分還原之mAb純化掉過量2-MEA。使用0.1M PBS實施總共三次洗滌。使用在280 nm下針對1.0 mg/mL溶液之1.58之吸光度值來量化蛋白質濃度，且使用150,000 g/mol之分子量測定莫耳濃度。

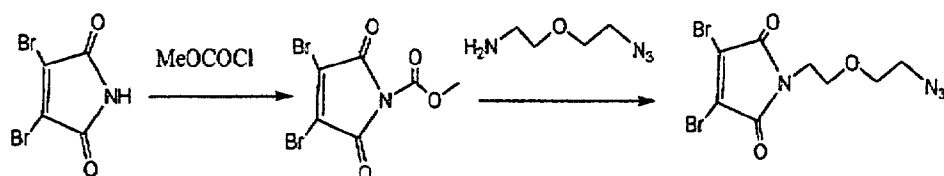
條件2：使用3.0莫耳當量之二硫蘇糖醇(DTT)將抗體(10 mg)在24°C下於0.1M pH 7.4 PBS、1.0 mM二乙烯三胺五乙酸(DTPA)中處理2h。使用50 kDa過濾離心管利用在3,000 RPM下實施20分鐘之離心自部分還原之mAb純化掉過量DTT。使用0.1M PBS實施總共3次洗滌。

條件3：使用2.0莫耳當量之叁(2-羧基乙基)-膦(TCEP)將mAb (10 mg)在24°C下於0.1M pH 8.0 PBS、1.0 mM二乙烯三胺五乙酸(DTPA)中

處理2 h。mAb濃度為8.0mM。部分還原之mAb未經純化即直接用於偶聯中。

實例2

此實例展示，在實例1中製得之雙特異性抗體保留兩種其原始半Mab結合特性。



1-(2-(2-疊氮基乙氧基)乙基)-3,4-二溴-1H-吡咯-2,5-二酮之合成：

向存於60 mL THF中之2.5 g 3,4-二溴-1H-吡咯-2,5-二酮(10 mmol)及1 g NMM中逐滴添加MeOCOCCl (10 mmol, 940 mg, 存於10 ml DCM中)，攪拌20 min，然後使用60 mL DCM稀釋反應溶液，藉由水洗滌3次，藉由無水硫酸鈉攪拌有機相，濃縮，獲得2.65g 3,4-二溴-2,5-二側氧基-2H-吡咯-1(5H)-甲酸甲酯。向311mg、1 mmol此化合物中添加2-(2-疊氮基乙氧基)乙胺(130 mg, 1 mmol)及5 mL DCM，TLC展示反應在20 min內完成，然後藉由DCM及鹽水萃取，藉由NH₄Cl溶液洗滌，在無水硫酸鈉上乾燥，且然後濃縮以用於管柱純化，藉由2:1己烷及乙酸乙酯實施急驟分析，獲得230 mg 1-(2-(2-疊氮基乙氧基)乙基)-3,4-二溴-1H-吡咯-2,5-二酮。¹HNMR: 3.32 ppm (t, J = 5.0 Hz, 1H), 3.40 ppm (t, J = 5.0 Hz, 1H), 3.50 ppm (q, J = 5.0 Hz, 1H), 3.62 ppm (t, J = 5.0 Hz, 1H), 3.63-3.69 ppm (m, 3H), 3.84 ppm (t, J = 5 Hz, 1H)。Fw: 365.9, C₈H₈Br₂N₄O₃；質量峰(1:2:1): 366.9, 368.9, 370.9。

實例3

此實例闡釋使用位於IgG種類抗體之鉸鏈區中之單一Cys殘基來化學生成雙特異性抗體。本文所闡述之起始mAb含有改造鉸鏈區，其

中每一鏈上同一位置之一個Cys突變至Ser，由此得到僅留下單一二硫化物之鉸鏈。雙特異性mAb生成之製程涉及三個主要步驟(圖1)。第一步驟係分別選擇性還原兩種不同mAb A及B中之鉸鏈二硫化物。第二步驟係經由基於半胱胺酸之偶聯引入功能部分X或Y。Cys-連接步驟產生兩個化學鎖固之mAb片段A'及B'。在最後步驟中，使兩個mAb片段經由X與Y之間之化學連接連接至一起以形成雙特異性抗體AB。在此研究中使用具有鉸鏈區突變(SPSC)之IgG1單株抗體。

條件1：使用10莫耳當量之2-巰基乙基-胺(2-MEA)將抗體(10 mg)在37°C下於0.1M pH 7.4 PBS、1.0 mM二乙烯三胺五乙酸(DTPA)中處理2h。使用50 kDa過濾離心管利用在3,000 RPM下實施20分鐘之離心自部分還原之mAb純化掉過量2-MEA。使用0.1M PBS實施總共三次洗滌。使用在280 nm下針對1.0mg/mL溶液之1.58之吸光度值來量化蛋白質濃度，且使用150,000 g/mol之分子量測定莫耳濃度。

條件2：使用3.0莫耳當量之二硫蘇糖醇(DTT)將抗體(10 mg)在24°C下於0.1M pH 7.4 PBS、1.0 mM二乙烯三胺五乙酸(DTPA)中處理2 h。使用50 kDa過濾離心管利用在3,000 RPM下實施20分鐘之離心自部分還原之mAb純化掉過量DTT。使用0.1M PBS實施總共3次洗滌。

條件3：使用2.0莫耳當量之叁(2-羧基乙基)-磷(TCEP)將mAb (10 mg)在24°C下於0.1M pH 8.0 PBS、1.0 mM二乙烯三胺五乙酸(DTPA)中處理2 h。mAb濃度為8.0 mM。部分還原之mAb未經純化即直接用於偶聯中。

實例4

此實例展示根據本文揭示製程製備具有使每一半抗體片段之鉸鏈區彼此連接之所揭示化學連接結構之雙特異性抗體之方法。抗體支架為：具有鉸鏈突變(SPSC)之IgG4。

首先經由化學改質來改質每一Ig抗體以生成半抗體。具體而言，

緩衝液交換反應將抗體(0.5-3 mg)添加至15 mL過濾離心管(Millipore, UFC903024)中且添加適當體積之pH 8.0 PBS、1 mM DTPA (二乙炔三胺五乙酸)緩衝液至管上之50 mL標記處。將管在3,000 RPM及5°C下離心20分鐘。將抗體轉移至1.5 mL塑膠小瓶中且使用Nanodrop (Fisher, ND-2000 UV-Vis分光光度計)檢查濃度。最終抗體濃度介於5-8 mg/mL之間。

製備存於pH 8.0 PBS (1.0 mM DTPA)緩衝液中之1 mg/mL TCEP ((叁(2-羧基乙基)膦)) (Sigma-Aldrich, C4706)之儲備溶液。使用下表計算需要添加至抗體中之TCEP溶液體積，此取決於在緩衝液交換之後所回收抗體之當量數及所得質量。

試樣	MW	當量	濃度(mmol)	質量(mg)	體積(mL)	濃度(mg/mL)
抗體	150000	1	2.74E-06	1	0.2	5
TCEP	286	3	0.00002	0.0057		
DBCO	427	5	3.33E-05	0.014233	0.01	1.4233

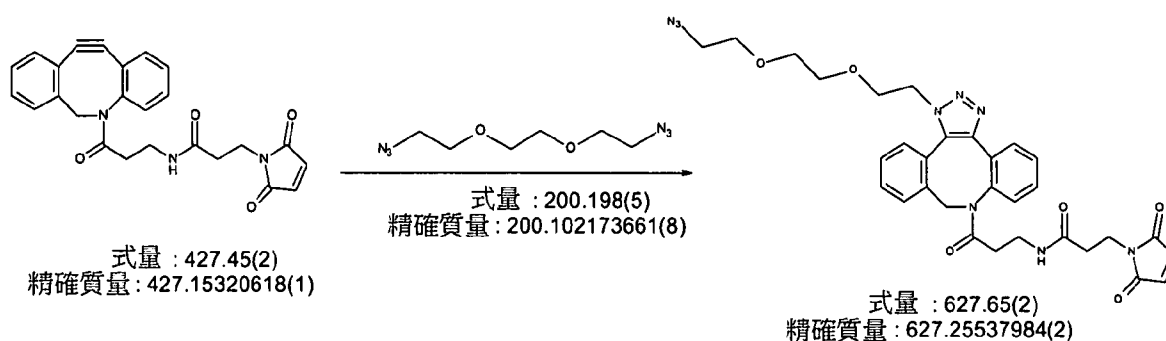
將適當體積之TCEP溶液(藉由上表計算)添加至抗體溶液中，輕微渦旋且將小瓶置於旋轉盤上。在室溫下實施還原反應90分鐘。

基於來自上表之計算來製備存於DMSO (Sigma-Aldrich, 472301)中之DBCO-馬來醯亞胺(Click Chemistry Tools, A108-100)之儲備溶液。將存於DMSO中之DBCO-馬來醯亞胺添加至抗體試樣(未純化TCEP)。抗體試樣中之DMSO之最終體積為約5% (v/v)。在室溫及混合下藉由旋轉盤實施偶聯反應1小時。將每一試樣置於單獨15 mL過濾離心管 (Millipore, UFC903024) 中且添加適當體積之1X DPBS (Corning, 21-031-CM，無鈣或鎂)緩衝液至管上之50 mL標記處。將試樣在3,000 RPM及5°C下離心20分鐘。再次重複洗滌步驟 在洗滌之後，將試樣轉移至單獨1.5 mL塑膠小瓶中且置於冰箱(5°C)中。

對於IgG4抗體而言，4.0當量之TCEP已提供大量半抗體。對於IgG1抗體而言，3.5當量之TCEP已提供大量半抗體。將5.0當量之DBCO用於兩種類型之抗體。

向存於DMSO (0.12 mL)中之DBCO-馬來醯亞胺(1.0 mg, 1.0當量)之溶液中添加存於DMSO (0.6 mL)中之疊氮基-PEG4-疊氮化物(2.5 mg, 5.0當量)。將混合物在室溫下攪拌2hr。反應已完成，如藉由LC/MS所指示。所得疊氮化物-馬來醯亞胺之分子量為627.65g/mol。

疊氮化物-馬來醯亞胺合成(反應圖1)



反應圖1.疊氮化物-馬來醯亞胺之合成

向抗體試樣中添加存於DMSO中之疊氮化物-馬來醯亞胺(5.0當量)。抗體試樣中之DMSO之最終體積為約5% (v/v)。在室溫及混合下藉由旋轉盤實施偶聯反應1小時。如先前所闡述洗滌試樣。

藉由疏水性相互作用管柱(HIC)純化每一半抗體片段。使用TOSOH丁基-NPR管柱在40°C管柱溫度及0.6 mL/min流速下實施HIC分析。洗脫係使用於50 mM磷酸鈉緩衝液(pH 7.0)中之30 min梯度來達成，其中鹽濃度遞減(自1.5 M至0 M硫酸銨)且有機改質劑遞增(自0%至25%異丙醇)。藉由SDS PAGE分析半抗體片段。具體而言，對於擬分析之每一試樣而言，需要20 μ L且濃度為0.6 mg/mL。遵循已確立用於運行SDS-PAGE凝膠(RTP AD001-01及AD002-01)之方案。圖9展示化學改質之半抗體片段(泳道2及3)之非還原SDS PAGE。

實例5

此實例闡釋經由點擊反應生成雙特異性抗體。圖10展示經由兩個半抗體片段之間之點擊偶聯來生成雙特異性抗體。兩個半抗體片段之間之點擊反應展示於圖10中。向存於PBS (5.0 mg/mL)中之半抗體-疊氮化物片段(500 µg)中添加存於PBS (5.0 mg/mL)中之半抗體-DBCO片段(500 µg)。在室溫及混合下藉由旋轉盤實施反應2小時。對混合物實施SDS PAGE分析(圖11)且藉由離子交換層析純化。

在Agilent 1200 HPLC上使用Thermo WCX-10管柱在0.6 mL/min流速下純化雙特異性抗體。使用增加之鹽濃度(0 mM至100 mM NaCl)之30 min梯度在pH 5.7下於10 mM MES緩衝液中來達成洗脫。藉由IdeS蛋白酶消化雙特異性抗體STI CBA-0710且藉由Water Xevo G-2 QTOF質譜分析並證實(圖12)。

藉由雙特異性抗體之尺寸排除層析(SEC)測定雙特異性抗體STI CBA-0710之生物物理性質(圖13)。具體而言，在Agilent 1200 HPLC上使用TSK凝膠SuperSW3000管柱(4.6 mm ID × 30cm, 4 µm)分析雙特異性抗體。緩衝液係0.2 M磷酸鉀、0.25M KCl (pH 6.2)。

表2.雙特異性抗體CBA-0710之SEC數據

主要產物	HMWS	LMWS
98.3%	1.2%	0.5%

圖14展示BIAcore上之雙特異性抗體CBA-0710之結合。使用標準NHS/EDC偶合方法將第一抗原固定於CM5感測器晶片上直至大約1500 RU。運行用於基線之緩衝液。裝載雙特異性抗體且隨後裝載緩衝液，然後運行針對第二抗原之結合。

實例6

此實例展示本文所產生雙特異性抗體之各種分析結果。雙特異性抗體存在基於細胞之結合及功能。雙特異性抗體CBA-0710結合至MDA-MB-231 (人類乳癌)細胞(圖15)，如藉由流式細胞術所分析。測

定抗體之EC₅₀值。使用無酶細胞解離緩衝液(GIBCO)收穫表現抗原-1及抗原-2之MDA-MB-231三陰性乳癌(TNBC)細胞且轉移至V形底96孔板(50,000個細胞/孔)中。將細胞與存於FACS緩衝液(PBS+ 2% FBS) + NaN₃中之雙特異性抗體CBA-0710或親代單特異性抗抗原-1或抗抗原-2抗體之連續稀釋液在冰上一起培育45 min。在FACS緩衝液中洗滌2次之後，添加藻紅素偶聯抗人類IgG (γ -鏈特異性)之1:1000稀釋液且培育30 min。在最終洗滌後，在Intellicyt高通量流式細胞儀(HTFC)上量測螢光強度。使用Graphpad Prism軟體及非線性回歸擬合分析數據。數據點展示為陽性標記細胞之中值螢光強度(MFI) +/-標準誤差。EC₅₀值報告為達成50%之最大細胞結合之抗體濃度。

結果圖解說明於表3及圖15中，且展示，雙特異性抗體與MDA-MB-231細胞之結合與親代類型抗體相比有所改良，其中亞毫微莫耳EC₅₀值類似於抗抗原-2抗體，且結合強度與抗抗原-1抗體一般高。

表3. 雙特異性抗體及親代類型抗體之結合數據

	雙特異性抗體 CBA-0710	抗抗原-1抗體 STI-A0607	抗抗原-2抗體 STI-A1010
EC ₅₀ (nM)	0.93	24.35	0.49
結合強度(相對 螢光單元)	8095	8239	2598

雙特異性抗體 CBA-0710 展示拮抗活性。具體而言，遵循 PathScan[®] Phospho-Met (panTyr) Sandwich ELISA 套組第7333號方案運行雙特異性抗體 CBA-0710 對 c-MET 磷酸化之抑制。簡言之，將細胞裂解物添加至重構檢測抗體中且培育，隨後添加重構 HRP-連接體二級抗體。在洗滌之後，添加 TMB 受質且培育。在添加終止溶液之後，讀取結果。圖16展示雙特異性抗體 CBA-0710 在三陰性乳癌細胞中之拮抗活性。STI-A0607 係抗抗原-1 單株抗體且 STI-A1010 係抗抗原2 單

株抗體。HGF係抗原-1之天然配體。

雙特異性抗體CBA-0710具有免疫調節活性。為量測雙特異性抗體CBA-0710調變T細胞反應性之能力，將經純化CD4+細胞與異基因樹突狀細胞(藉由在GM-CSF及IL-4中培養單核球7天製得)一起培養。設置平行板以容許在第3天及第5天收集上清液，從而使用商業ELISA套組分別量測IL-2及IFN γ 。自行產生競爭劑之人類化抗抗原-2(免疫檢查點) mAb且用作陽性對照IgG1並利用非相關STI人類mAb作為陰性對照IgG抗體。圖17展示因應於雙特異性抗體CBA-0710之增加之IFN- γ 釋放。STI-A1010係抗抗原-2 (免疫檢查點)單株抗體。競爭劑mAb係人類化抗抗原-2 (免疫檢查點)單株抗體。

實例7

此實例闡釋使用F(ab)'₂抗體A'及B'合成所揭示雙特異性抗體之方案。本文所闡述之雙特異性F(ab)'₂係由兩個在鉸鏈區處以化學方式連接之F(ab)'片段構成(圖20)。起始抗體係IgG1或IgG4同種型。起始抗體含有改質鉸鏈區，其中Cys殘基突變至Ser殘基，從而在鉸鏈區處僅留下一個二硫化物。雙特異性F(ab)'₂化學鎖固之雙特異性抗體之生成涉及4個主要步驟。第一步驟係去除Fc片段。第二步驟係分別選擇性還原抗體A及B。第三步驟係經由基於半胱胺酸之偶聯將功能部分X或Y引入鉸鏈區中，從而分別得到化學改質之抗體片段A'及B'。在最後步驟中，經由X與Y之間之化學連接使兩個抗體片段連接至一起以形成雙特異性F(ab)'₂。用於此合成之反應圖展示於圖21中。

具體而言，實施用於合成含有IgG1 A抗體(具有鉸鏈突變(SPCC))及IgG4 B抗體(具有鉸鏈突變(SPSC))之F(ab)'₂化學鎖固之雙特異性抗體之製程。使用酶IdeS (其係裂解僅在鉸鏈區下方之一個特定位點處之IgG之消化酶)，將抗體(1.5 mg)添加至IdeS (A0-FR1-008)之每一管中且在37°C下於頭對頭旋轉器中培育過夜。然後使用蛋白質A純化去

除Fc片段。

將抗體(1-10 mg)添加至15 mL過濾離心管(Millipore, UFC903024)中且添加適當體積之50 mM磷酸鈉、150 mM NaCl、5 mM EDTA之pH 7.7緩衝液至管上之50 mL標記處。將管在3,000 RPM及22°C下離心20分鐘。將抗體轉移至1.5 mL塑膠小瓶中且使用Nanodrop (Fisher, ND-2000 UV-Vis分光光度計)檢查濃度。最終抗體濃度為最高至多10 mg/mL。

將1 mL 50 mM磷酸鈉、150 mM NaCl、5 mM EDTA之pH 7.7緩衝液添加至一個含有6 mg 2-巰基乙基胺·HCl之小瓶中(得到50 mM 2-MEA)。將50 mM 2-MEA添加至F(ab)₂中且最終濃度為15 mM，充分混合。在37°C下培育15 min。使用NAP-5 (GE17-0853-02)去鹽管柱使2-MEA與經還原F(ab)₂分離。

製備存於pH 8.0 PBS (1.0 mM DTPA)緩衝液中之1 mg/mL TCEP ((叁(2-羧基乙基)膦)) (Sigma-Aldrich, C4706)之儲備溶液。端視在蛋白質A純化之後所回收F(ab)₂之當量數及所得質量，將5當量TCEP添加至去鹽F(ab)₂中，充分搖動並在室溫下培育5 min。

對於DBCO(二苄基環辛基)-馬來醯亞胺及疊氮化物-馬來醯亞胺偶聯而言，製備存於DMSO (Sigma-Aldrich, 472301)中之DBCO-馬來醯亞胺(Click Chemistry Tools, A108-100)之儲備溶液且將20當量存於DMSO中之DBCO-馬來醯亞胺添加至F(ab)₂ (A)試樣中(未純化TCEP)。抗體試樣中之DMSO之最終體積為約5% (v/v)。在室溫及混合下藉由旋轉盤實施偶聯反應2小時。將存於DMSO中之疊氮化物-馬來醯亞胺(20當量)添加至F(ab)₂ (B)試樣中。抗體試樣中之DMSO之最終體積為約5% (v/v)。在室溫及混合下藉由旋轉盤實施偶聯反應2小時。

對於洗滌步驟而言，將每一試樣置於單獨15 mL過濾離心管(Millipore, UFC903024)中且添加適當體積之1X DPBS (Corning, 21-

031-CM，無鈣或鎂)緩衝液至管上之50 mL標記處。將試樣在3,000 RPM及22°C下離心20分鐘。再次重複洗滌步驟。在洗滌之後，將試樣轉移至單獨1.5 mL塑膠小瓶中且置於冰箱(5°C)中或用於點擊步驟。對於F(ab)'片段分析而言，使用SDS PAGE程序。對於擬分析之每一試樣而言，需要20 μ L且濃度為0.6 mg/mL。遵循已確立用於運行SDS-PAGE凝膠(RTP AD001-01及AD002-01)之方案(圖21)。

兩個F(ab)'片段之間之點擊反應反應圖展示於圖23中。向存於PBS (5.0 mg/mL)中之F(ab)' -疊氮化物片段(500 μ g)中添加存於PBS (5.0 mg/mL)中之F(ab)' -DBCO片段(500 μ g)。在室溫及混合下藉由旋轉盤實施反應過夜。對混合物實施SEC分析(圖24)。

使用尺寸排除層析(SEC)分析此實例中所製得雙特異性抗體之生物物理性質。使用尺寸排除層析(SEC) Agilent 1200 HPLC (使用TSK凝膠SuperSW3000管柱(4.6 mm ID \times 30 cm, 4 μ m))分析F(ab)'_A、F(ab)'_B及雙特異性點擊_F(ab)'₂ (圖24)。緩衝液係0.2 M磷酸鉀、0.25M KCl且pH為6.2。

藉由質譜證實雙特異性F(ab)'₂。在Water Xevo G-2 QTOF9上分析雙特異性F(ab)'₂ (圖25)。使用尺寸排除層析(SEC)純化雙特異性F(ab)'₂。使用尺寸排除層析(SEC) Agilent 1200 HPLC (使用TSK凝膠SuperSW3000管柱(4.6 mm ID \times 30 cm, 4 μ m))純化雙特異性點擊_F(ab)'₂ (圖26)。緩衝液係0.2 M磷酸鉀、0.25M KCl且pH為6.2。

活體外親和力量測係使用Octet Red者(圖27)。使用感測器AR2G在Octet Red (ForteBio公司)上量測雙特異性F(ab)'₂抗原相互作用。簡言之，量測方案如下：300秒基線、300秒載入10 μ g/ml雙特異性F(ab)'₂、120秒基線、300秒抗原A、300秒解離、300秒抗原B及300秒解離(圖27)。在PBS中實施感測器水合及基線與解離量測。

實例8

此實例闡釋使用IgG2抗體A'及B'合成所揭示雙特異性抗體之方案。本文所闡述之雙特異性IgG2係由兩個在鉸鏈區處以化學方式連接之IgG2片段構成(圖29)。起始抗體係IgG2同種型。雙特異性IgG2之生成涉及三個主要步驟。第一步驟係還原IgG2抗體之鉸鏈區中之一或兩個(總共4個)二硫結合，同時仍維持同源二聚體結構。第二步驟係經由基於半胱胺酸之偶聯將功能部分X或Y引入鉸鏈中，從而分別得到化學改質之抗體片段A'及B'。在最後步驟中，使兩個抗體經由X與Y之間之化學連接連接至一起以形成雙特異性_IgG2。

具體而言，實施合成IgG2化學鎖固之雙特異性抗體之製程。將抗體(1-10 mg)添加至15 mL過濾離心管(Millipore, UFC903024)中且添加適當體積之50 mM磷酸鈉、150 mM NaCl、5 mM EDTA之pH 7.7緩衝液至管上之50 mL標記處。將管在3,000 RPM及22 °C下離心20分鐘。將抗體轉移至1.5 mL塑膠小瓶中且使用Nanodrop (Fisher, ND-2000 UV-Vis分光光度計)檢查濃度。最終抗體濃度為最高至多10 mg/mL。

製備存於pH 8.0 PBS (2.0 mM DTPA)緩衝液中之1 mg/mL TCEP ((叁(2-羧基乙基)膦)) (Sigma-Aldrich, C4706)之儲備溶液。端視IgG2之當量數及所得質量，將兩當量TCEP添加至IgG2溶液中，充分搖動且在室溫下培育90 min。

DBCO(二苄基環辛基)-馬來醯亞胺及疊氮化物-馬來醯亞胺

對於偶聯而言，製備存於DMSO (Sigma-Aldrich, 472301)中之DBCO-馬來醯亞胺(Click Chemistry Tools, A108-100)之儲備溶液且將5當量存於DMSO中之DBCO-馬來醯亞胺添加至IgG2_A試樣中(未純化TCEP)。抗體試樣中之DMSO之最終體積為約5% (v/v)。在室溫及混合下藉由旋轉盤實施偶聯反應1小時。將存於DMSO中之疊氮化物-馬來醯亞胺(5當量)添加至IgG2 (B)試樣中。抗體試樣中之DMSO之最終體

積為約5% (v/v)。在室溫及混合下藉由旋轉盤實施偶聯反應1小時。

對於洗滌步驟而言，將每一試樣置於單獨15 mL過濾離心管 (Millipore, UFC903024)中且添加適當體積之1X DPBS (Corning, 21-031-CM，無鈣或鎂)緩衝液至管上之50 mL標記處。將試樣在3,000 RPM及22°C下離心20分鐘。再次重複洗滌步驟。在洗滌之後，將試樣轉移至單獨1.5 mL塑膠小瓶中且置於冰箱(5°C)中或用於點擊步驟。

對於擬分析之每一試樣而言，需要20 μ L且濃度為0.6 mg/mL。遵循已確立用於運行SDS-PAGE凝膠(RTP AD001-01及AD002-01)之方案(圖29)。

對於質譜而言，使用TCEP還原抗體A且與DBCO偶聯，在Water Xevo G-2 QTOF上進行分析。此數據表明2 DBCO (僅還原一個二硫結合)或4 DBCO (還原兩個二硫結合)偶聯至IgG2 (圖30A-C)。

使用尺寸排除層析(SEC)分析此實例中所製得雙特異性抗體之生物物理性質。使用尺寸排除層析(SEC) Agilent 1200 HPLC (使用TSK凝膠SuperSW3000管柱(4.6 mm ID \times 30 cm, 4 μ m))分析雙特異性IgG2 (圖31)。緩衝液係0.2 M磷酸鉀、0.25M KCl且pH為6.2。

【符號說明】

無

I687228

發明摘要

※ 申請案號：104114962

A61K 39/395 (2006.01)

※ 申請日：104年5月11日

※IPC 分類：

C07K 16/46 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

【發明名稱】

化學鎖固之雙特異性抗體

CHEMICALLY-LOCKED BISPECIFIC ANTIBODIES

【中文】

本發明揭示形成化學鎖固之雙特異性或異源二聚體抗體之方法，該等抗體較佳為IgG種類，具有高特異性及高均質性。更具體而言，本發明揭示具有以生物正交點擊化學連接至一起之鏈接區之化學鎖固之雙特異性IgG種類抗體。

【英文】

There is disclosed a process for forming chemically-locked bispecific or heterodimer antibodies, preferably in the IgG class, in high specificity and with high homogeneity. More specifically, there is disclosed a chemically-locked bispecific IgG class antibody having a linkage region joined together with bio-orthogonal click chemistry.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（2）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

申請專利範圍

1. 一種雙特異性抗體，其包括：

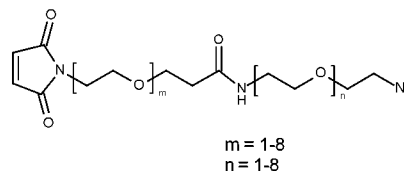
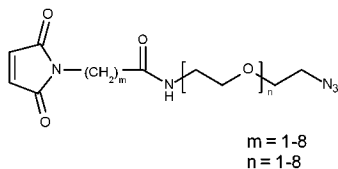
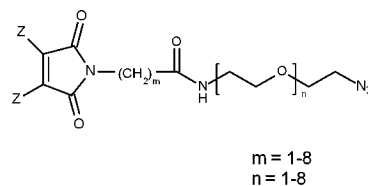
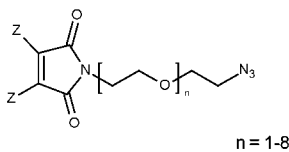
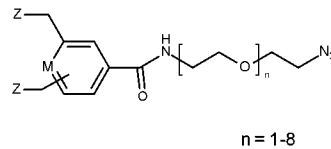
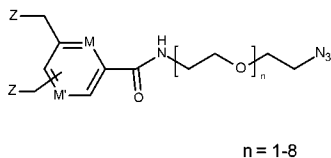
(a) 第一抗體片段A'，其包括來自抗體A之單一重鏈及輕鏈，其中該單一重鏈具有一或多個反應性硫醇基團；

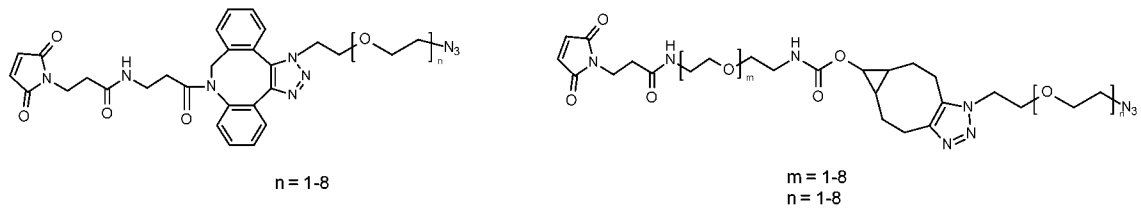
(b) 第二抗體片段B'，其包括來自抗體B之單一重鏈及輕鏈，其中該單一重鏈具有一或多個反應性硫醇基團；

其中該等第一及第二抗體片段經由藉由疊氮化物及炔之環加成反應形成之1,2,3-三唑共價連接，該疊氮化物經由連接體附接至該第一抗體片段之鉸鏈區中之反應性硫醇，該炔經由連接體附接至該第二抗體片段之鉸鏈區中之反應性硫醇。

2. 如請求項1之雙特異性抗體，其中該等片段A'及B'係衍生自IgG1或IgG4免疫球蛋白。

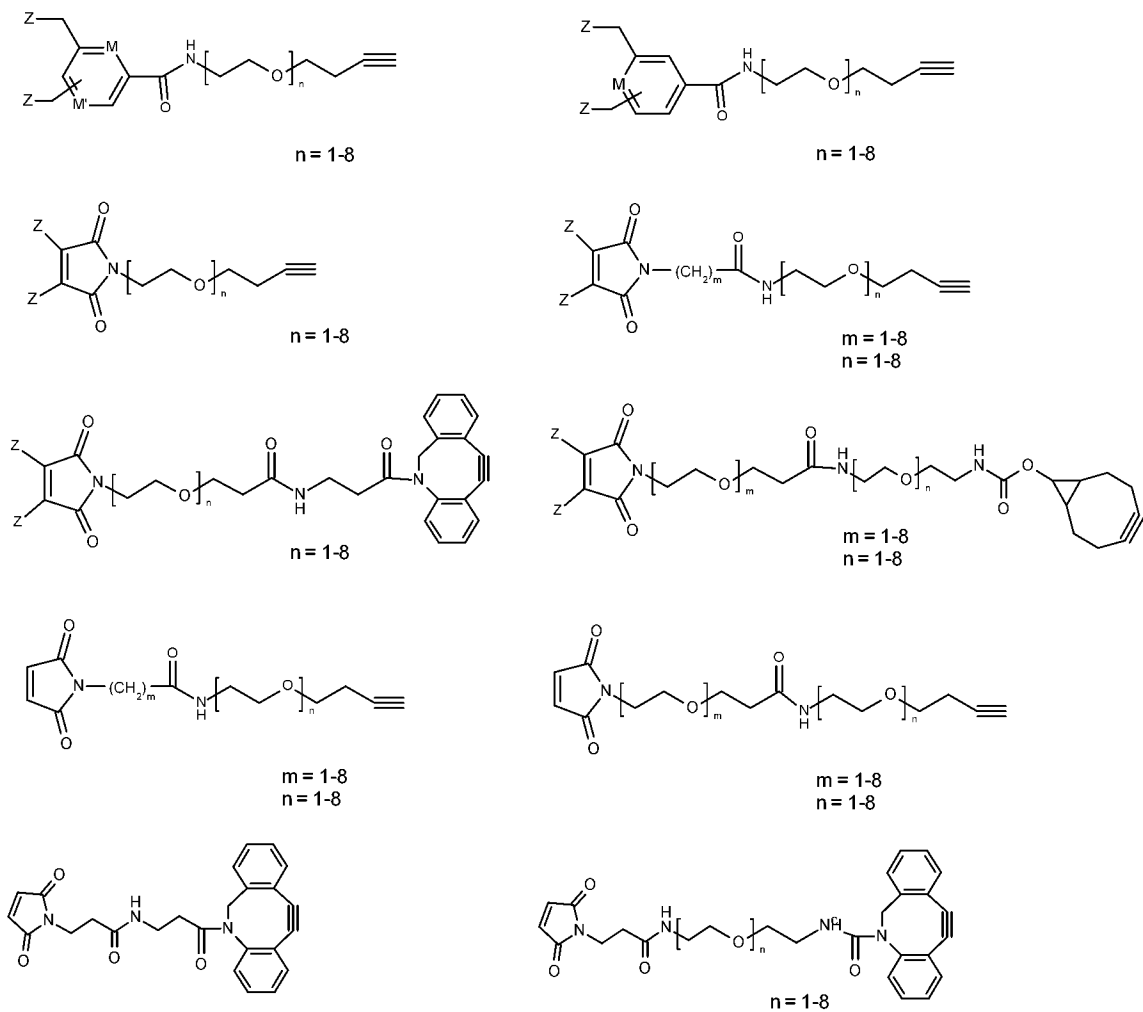
3. 如請求項1或2之雙特異性抗體，其中該與炔反應以形成1,2,3-三唑之疊氮化物係選自





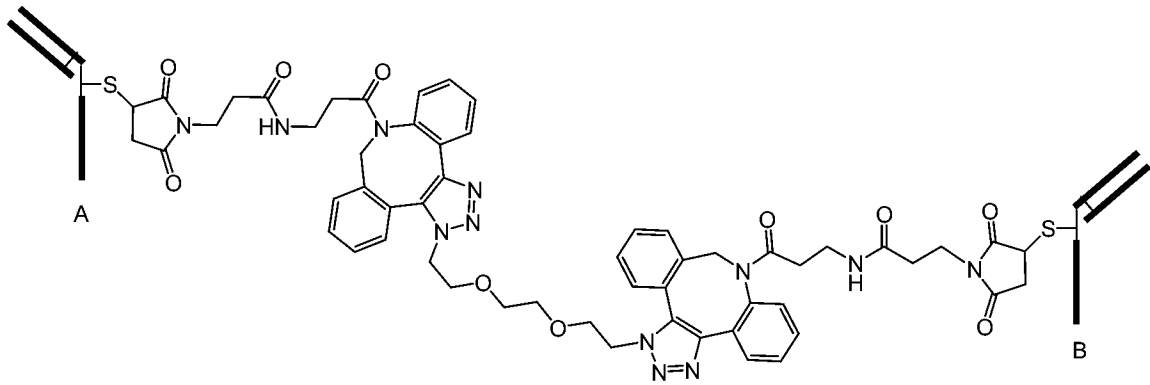
其中M為N或C；M'為N或C；及Z為I、Br或SPh。

4. 如請求項1或2之雙特異性抗體，其中該與疊氮化物炔反應以形成1,2,3-三唑之炔係選自



其中M為N或C；M'為N或C；及Z為I、Br或SPh。

5. 一種化學鎖固之雙特異性抗體AB，其具有下式：



6. 如請求項5之化學鎖固之雙特異性抗體，其中A及B為IgG種類抗體。
7. 如請求項5或6之化學鎖固之雙特異性抗體，其中A及B為IgG1或IgG4免疫球蛋白。
8. 如請求項1、2、5及6中任一項之雙特異性抗體，其中A為具有鉸鏈突變CPSC之IgG1，及B為野生型IgG4。
9. 如請求項1或5之雙特異性抗體，其中A為抗c-Met抗體，及B為抗PD-L1抗體。
10. 一種適用於人類應用之醫藥調配物，其包含水溶液中有效量之如請求項1至9中任一項之雙特異性抗體。
11. 一種自第一抗體「A」及第二抗體「B」製備雙特異性抗體「AB」或「BA」的方法，其包括：

(a)使該第一抗體A與還原劑在足以裂解鉸鏈區中之重鏈之間之實質上所有二硫鏈接的條件下接觸以得到一對第一抗體片段A'，其各自包括附接至單一重鏈之單一輕鏈，其中該重鏈具有一或多個自該等二硫鏈接之還原形成之反應性硫醇基團；

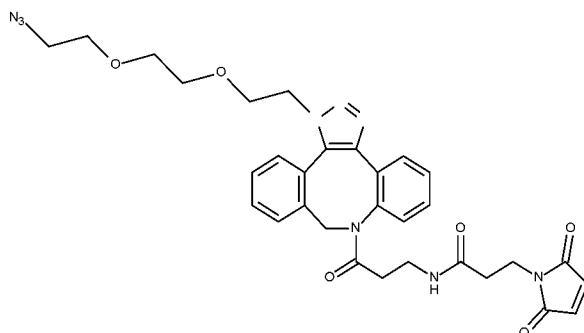
(b)使第一異雙官能連接體附接至該第一抗體片段A'，該第一異雙官能連接體包括(i)第一硫醇反應性官能基，其用於共價附接至該第一抗體片段之該重鏈之鉸鏈區中之反應性硫醇基團，及(ii)疊氮化物，由此形成疊氮化物官能化第一抗體片段；

(c)使該第二抗體B與還原劑在足以裂解該鉸鏈區中之該等重鏈之間之實質上所有二硫鏈接的條件下接觸以得到一對第二抗體片段B'，其各自包括附接至單一重鏈之單一輕鏈，其中該重鏈具有一或多個自該等二硫鏈接之還原形成之反應性硫醇基團；

(d)使第二異雙官能連接體附接至該第二抗體片段B'，該第二異雙官能連接體包括：(i)第二硫醇反應性官能基，其用於共價附接至該第二抗體片段之該重鏈之鉸鏈區中之反應性硫醇基團；及(ii)炔；由此形成炔官能化第二抗體片段；及

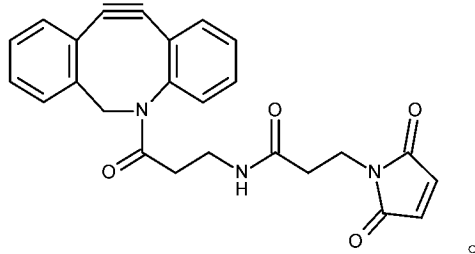
(e)使該疊氮化物官能化第一抗體片段與該炔官能化第二抗體片段進行反應以經由該疊氮化物至該炔之環加成使該第一抗體片段共價附接至該第二抗體片段以形成化學鎖固之雙特異性抗體「AB」或「BA」，其中該抗體片段A'及B'以該鉸鏈區連接。

12. 如請求項11之自第一抗體「A」及第二抗體「B」製備雙特異性抗體「AB」或「BA」之方法，其中抗體A或抗體B係IgG1免疫球蛋白。
13. 如請求項11之自第一抗體「A」及第二抗體「B」製備雙特異性抗體「AB」或「BA」之方法，其中抗體A或抗體B係IgG4免疫球蛋白。
14. 一種化學鎖固之雙特異性抗體AB，其包括經連接半抗體A，其經由鉸鏈區中之反應性硫醇基團連接至具有以下結構之部分：

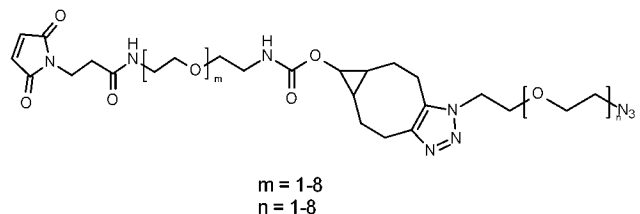
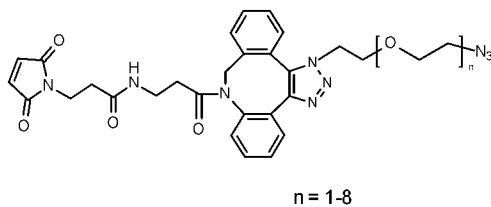
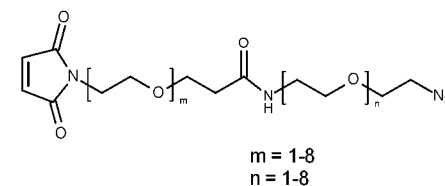
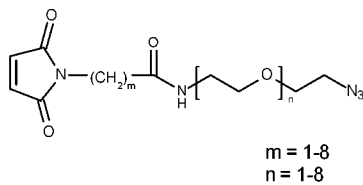
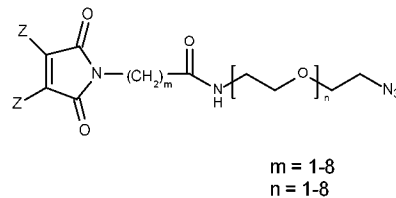
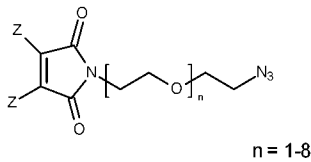
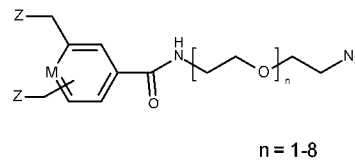
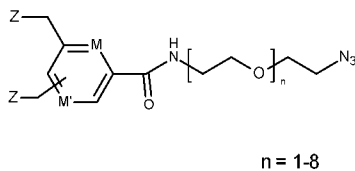


其中 N_3 係 $-N=N=N$ ；

該經連接半抗體A與經由鉸鏈區中之反應性硫醇基團連接至具有以下結構之部分之經連接抗體B連接：



15. 一種來自IgG種類抗體「A」及IgG種類抗體「B」之化學鎖固之雙特異性抗體「AB」或「BA」，其包括經由鉸鏈區中之反應性硫醇基團連接至選自由以下組成之群之結構之半抗體A：



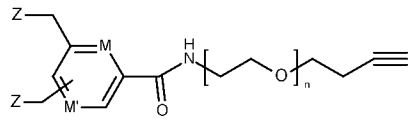
$M = N、C$

$M' = N、C$

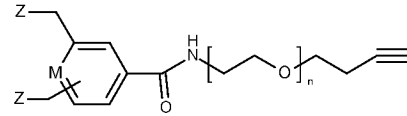
$Z = I、Br、SPh$

其中 N_3 係 $-N=N=N$ ；

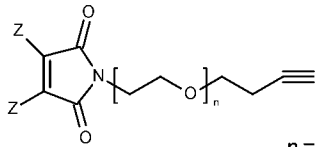
該半抗體 A 與經由鉸鏈區中之反應性硫醇基團連接至選自由以下組成之群之結構之半抗體 B 連接：



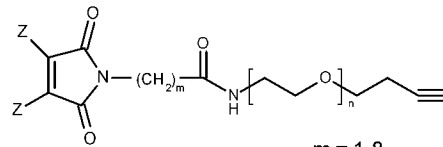
$n = 1-8$



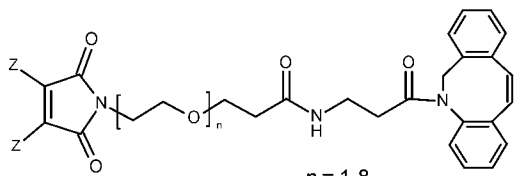
$n = 1-8$



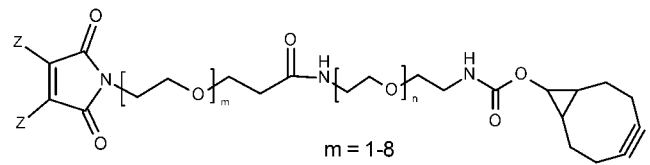
$n = 1-8$



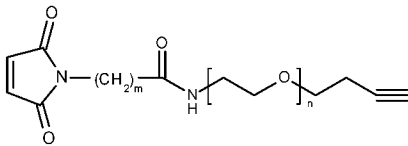
$m = 1-8$
 $n = 1-8$



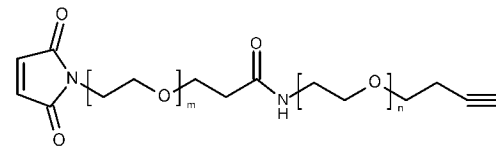
$n = 1-8$



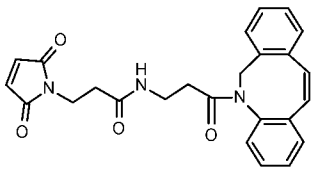
$m = 1-8$
 $n = 1-8$



$m = 1-8$
 $n = 1-8$



$m = 1-8$
 $n = 1-8$



$n = 1-8$

$M = N、C$

$M' = N、C$

$Z = I、Br、SPh。$