



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116199784 A

(43) 申请公布日 2023.06.02

(21) 申请号 202111461071.8

A61P 35/02 (2006.01)

(22) 申请日 2021.11.30

(71) 申请人 泽达生物医药有限公司

地址 英属维尔京群岛托尔托拉道路城克雷
格米尔钱伯斯

(72) 发明人 王定和 朱祯平 黄浩旻

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

专利代理师 徐迅 马莉华

(51) Int. Cl.

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书3页 说明书28页

序列表14页 附图9页

(54) 发明名称

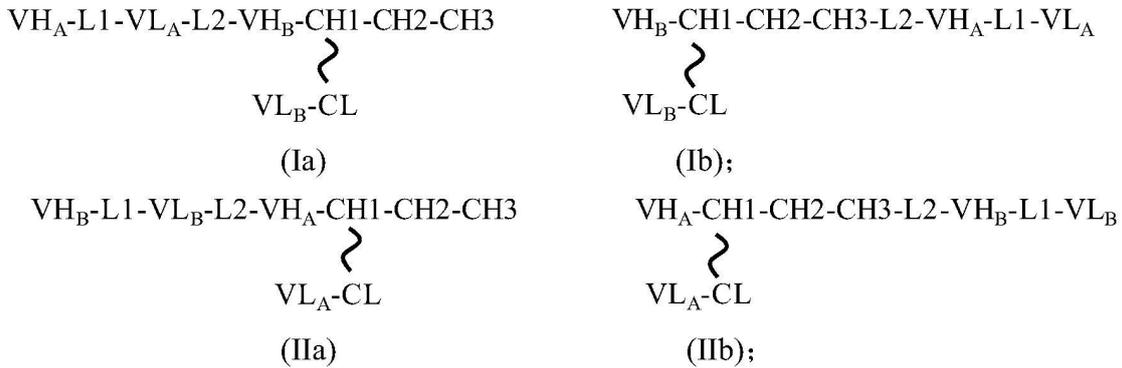
抗TROP-2/PD-L1双特异性抗体

(57) 摘要

本发明涉及一种抗TROP-2/PD-L1双特异性抗体、制备方法和在抗肿瘤中的应用。具体地,单链可变片段scFv和免疫球蛋白抗体IgG通过肽接头连接获得双特异性抗体,该双特异性抗体能同时靶向肿瘤细胞表面分子TROP-2和PD-L1抗原。实验结果显示,本发明提供的双特异性抗体,能够降解TROP-2阳性肿瘤细胞的PD-L1蛋白,从而阻断PD-1/PD-L1的结合,解除T细胞的抑制状态,发挥抗肿瘤的作用。

1. 一种双特异性抗体,其特征在于,所述双特异性抗体包含:
 第一抗原结合结构域D1;和
 第二抗原结合结构域D2;
 其中,D1特异性结合靶分子TROP-2蛋白;D2特异性结合靶分子PD-L1蛋白;
 所述D1为特异性结合TROP-2蛋白的抗体或其抗原结合片段;和/或
 所述D2为特异性结合PD-L1蛋白的抗体或其抗原结合片段;
 其中,所述的抗原结合片段的结构选自下组:(i) Fab片段;(ii) F(ab')₂片段;(iii) Fv片段;或(iv) 单链Fv(scFv)。

2. 如权利要求1所述的双特异性抗体,其特征在于,所述双特异性抗体为同源二聚体,其从N端到C端具有式Ia、Ib、IIa或IIb所示的结构:



其中,

VL_A代表抗TROP-2抗体的轻链可变区;

VH_A代表抗TROP-2抗体的重链可变区;

VL_B代表抗PD-L1抗体的轻链可变区;

VH_B代表抗PD-L1抗体的重链可变区;

CH代表重链恒定区;

CL代表轻链恒定区;

L1、L2各自独立地为键或接头;

“~”代表二硫键或共价键;

“-”代表肽键;

其中,所述双特异性抗体具有同时结合TROP-2以及结合PD-L1的活性。

3. 如权利要求2所述的双特异性抗体,其特征在于,所述抗PD-L1抗体包含以下三个互补决定区HCDR:

SEQ ID NO.7所示的HCDR1;

SEQ ID NO.8所示的HCDR2;和

SEQ ID NO.9所示的HCDR3;和

所述抗PD-L1抗体包含以下三个互补决定区LCDR:

SEQ ID NO.10所示的LCDR1;

SEQ ID NO.11所示的LCDR2;和

SEQ ID NO.12所示的LCDR3。

4. 如权利要求2所述的双特异性抗体,其特征在于,所述抗TROP-2抗体包含以下三个互

补决定区HCDR:

SEQ ID NO.1所示的HCDR1;

SEQ ID NO.2所示的HCDR2;和

SEQ ID NO.3所示的HCDR3;和

所述抗TROP-2抗体包含以下三个互补决定区LCDR:

SEQ ID NO.4所示的LCDR1;

SEQ ID NO.5所示的LCDR2;和

SEQ ID NO.6所示的LCDR3。

5.如权利要求2所述的双特异性抗体,其特征在于,所述抗PD-L1抗体的重链可变区如SEQ ID NO.15所示;所述抗PD-L1抗体的轻链可变区如SEQ ID NO.16所示;和/或所述抗TROP-2抗体的重链可变区如SEQ ID NO.13所示;所述抗TROP-2抗体的轻链可变区如SEQ ID NO.14所示。

6.如权利要求2所述的双特异性抗体,其特征在于,所述的双特异性抗体选自下组:

(1)所述双特异性抗体的重链氨基酸序列如SEQ ID NO.20所示,和所述双特异性抗体的轻链氨基酸序列如SEQ ID NO.21所示;

(2)所述双特异性抗体的重链氨基酸序列如SEQ ID NO.22所示,和所述双特异性抗体的轻链氨基酸序列如SEQ ID NO.21所示;或

(3)将(1)或(2)中的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的,且具有同时抗TROP-2活性和抗PD-L1活性的由(1)或(2)衍生的多肽。

7.一种多核苷酸分子,其特征在于,所述多核苷酸分子编码根据权利要求1至6中任一所述的双特异性抗体。

8.一种表达载体,其特征在于,所述表达载体含有根据权利要求7所述的多核苷酸分子。

9.一种宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞含有根据权利要求8所述的表达载体。

10.一种如权利要求1至6中任一所述的双特异性抗体的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括以下步骤:

a)在表达条件下,培养根据权利要求9所述的宿主细胞,从而表达双特异性抗体;

b)分离并纯化步骤a)所述的双特异性抗体。

11.一种药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包含有效量的根据权利要求1至6中任一所述的双特异性抗体和一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

12.根据权利要求1至6中任一所述的双特异性抗体、或根据权利要求11所述的药物组合物在制备癌症或肿瘤的药物中的用途。

13.如权利要求12所述的用途,其特征在于,所述癌症或肿瘤选自:肺癌、骨癌、胃癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、子宫癌、卵巢癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、直肠癌、结肠癌、肛门区癌、乳腺癌、食管癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、胰腺癌、脑癌、睾丸癌、淋巴瘤、移行细胞癌、膀胱癌、肾癌或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、软组织肉瘤、儿童实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊柱肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、黑素瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌、

鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、慢性、急性白血病或其组合。

14. 一种免疫偶联物,其特征在于,所述免疫偶联物包括:

- (a) 如权利要求1至6中任一项所述的双特异性抗体;和
- (b) 选自下组的偶联部分:可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、或酶。

抗TROP-2/PD-L1双特异性抗体

技术领域

[0001] 本发明属于肿瘤治疗和生物技术领域,涉及一种抗TROP-2和PD-L1的双特异性抗体。

背景技术

[0002] 人滋养层细胞表面抗原2(human trophoblast cell surface antigen 2,TROP-2)是由TACSTD2基因编码表达的细胞表面糖蛋白。TROP-2为单次跨膜的I型膜蛋白,由323个氨基酸构成,其中信号肽26个氨基酸,胞外区248个氨基酸,跨膜区23个氨基酸,胞内区26个氨基酸。截至目前,TROP-2的配体蛋白还没有鉴定到,因此对其生理生化功能还不十分明确。但是大量的临床研究和文献报道,TROP-2蛋白在各种人类上皮癌中高表达并且与患者的预后不良和癌细胞转移密切相关,包括乳腺癌、肺癌、胃癌、胰腺癌、前列腺癌、宫颈癌等。美国FDA已经批准TROP-2抗体偶联药物-sacituzumab govitecan用于转移性三阴性乳腺癌的治疗。

[0003] PD-1蛋白(人程序性细胞死亡受体-1)是CD28超家族的一个成员,激活的T细胞表面表达的PD-1蛋白和配体PD-L1(programmed cell death-Ligand1)和PD-L2(programmed cell death-Ligand2)相互作用,会抑制T细胞的免疫反应。在各种实体瘤和血液系统恶性肿瘤中均发现了PD-L1和PD-L2的高表达,越来越多的证据表明肿瘤细胞利用PD-1和PD-L1介导的免疫抑制反应逃避免疫监视。Atezolizumab单抗是全球第一个获批的PD-L1单抗药物,用于局部晚期或转移性尿路上皮癌和非小细胞肺癌等肿瘤的治疗。

[0004] 双特异性抗体(bispecific antibody,BsAb)也称为双功能抗体,是同时靶向两种不同抗原或相同抗原不同表位的特异性药物。这种双重特异性打开了广泛的应用领域,包括将T细胞重定向至肿瘤细胞周围、同时阻断两个不同的信号通路等。

[0005] 然而,目前本领域尚缺乏令人满意的针对TROP-2和PD-L1的双特异性抗体。因此,本领域亟待开发一种抗TROP-2和PD-L1的双特异性抗体。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种抗TROP-2和PD-L1的双特异性抗体及其制备方法和应用。

[0007] 本发明的目的在于提供一种能与TROP-2和PD-L1特异结合的双特异性抗体;提供编码所述双特异性抗体的核苷酸分子;提供包含所述核苷酸分子的表达载体;提供包含所述表达载体的宿主细胞;提供所述双特异性抗体的制备方法;提供包含所述双特异性抗体的药物组合物;提供所述双特异性抗体在制备药物中的应用。

[0008] 在本发明的第一方面,提供了一种双特异性抗体,所述双特异性抗体包含:

[0009] 第一抗原结合结构域D1;和

[0010] 第二抗原结合结构域D2;

[0011] 其中,D1特异性结合靶分子TROP-2蛋白;D2特异性结合靶分子PD-L1蛋白;

- [0012] 所述D1为特异性结合TROP-2蛋白的抗体或其抗原结合片段;和/或
- [0013] 所述D2为特异性结合PD-L1蛋白的抗体或其抗原结合片段;
- [0014] 其中,所述的抗原结合片段的结构选自下组:(i) Fab片段;(ii) F(ab')₂片段;(iii) Fv片段;或(iv) 单链Fv(scFv)。
- [0015] 在另一优选例中,所述的特异性结合TROP-2蛋白的抗体包括:单链抗体、双链抗体、纳米抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、鼠源抗体、人源化抗体和双特异性抗体。
- [0016] 在另一优选例中,所述的特异性结合PD-L1蛋白的抗体包括:单链抗体、双链抗体、纳米抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、鼠源抗体、人源化抗体和双特异性抗体。
- [0017] 在另一优选例中,所述的D1和/或D2为IgG抗体。
- [0018] 在另一优选例中,所述IgG抗体为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。
- [0019] 在另一优选例中,所述的D1和/或D2为scFv。
- [0020] 在另一优选例中,所述D1为抗TROP-2的scFv。
- [0021] 在另一优选例中,所述D2为抗PD-L1的IgG抗体。
- [0022] 在另一优选例中,所述D1包含一个、两个、三个或多个抗TROP-2的scFv。
- [0023] 在另一优选例中,所述D2包含一个、两个、三个或多个抗PD-L1的IgG抗体。
- [0024] 在另一优选例中,所述D1连接到所述的抗PD-L1抗体的选自下组的区域:重链可变区、重链恒定区、轻链可变区、轻链恒定区或其组合。
- [0025] 在另一优选例中,所述D1为抗TROP-2的scFv;和所述D2为抗PD-L1的IgG抗体,其中D1连接在D2的重链可变区末端,或D1连接在D2的重链恒定区末端。
- [0026] 在另一优选例中,所述D1为抗TROP-2的IgG抗体。
- [0027] 在另一优选例中,所述D2为抗PD-L1的scFv。
- [0028] 在另一优选例中,所述D1包含一个、两个、三个或多个抗TROP-2的IgG抗体。
- [0029] 在另一优选例中,所述D2包含一个、两个、三个或多个抗PD-L1的scFv。
- [0030] 在另一优选例中,所述D2连接到所述的抗TROP-2抗体的选自下组的区域:重链可变区、重链恒定区、轻链可变区、轻链恒定区或其组合。
- [0031] 在另一优选例中,所述D1为抗TROP-2的IgG抗体;和所述D2为抗PD-L1的scFv,其中D2连接在D1的重链可变区末端,或D2连接在D1的重链恒定区末端。
- [0032] 在另一优选例中,所述D1和所述D2通过接头或直接相连。
- [0033] 在另一优选例中,所述接头的序列为(G4S)_n,较佳地,n为1-4。
- [0034] 在另一优选例中,所述双特异性抗体为同源或异源二聚体,优选为同源二聚体。在另一优选例中,所述双特异性抗体包含抗PD-L1的IgG抗体和两个抗TROP-2的scFv,其中每个scFv包含可变区VH和可变区VL,VH与VL通过接头L1连接,每个抗TROP-2的scFv通过接头L2与抗PD-L1的免疫球蛋白抗体IgG串联。
- [0035] 在另一优选例中,所述抗TROP-2的scFv中的VL或VH通过接头L2与抗PD-L1的免疫球蛋白抗体IgG的重链可变区、重链恒定区、轻链可变区或轻链恒定区连接。
- [0036] 在另一优选例中,所述双特异性抗体包含抗TROP-2的IgG抗体和两个抗PD-L1的scFv,其中每个scFv包含可变区VH和可变区VL,VH与VL通过接头L1连接,每个抗PD-L1的scFv通过接头L2与抗TROP-2的免疫球蛋白抗体IgG串联。
- [0037] 在另一优选例中,所述抗PD-L1的scFv中的VL或VH通过接头L2与抗TROP-2的免疫

- [0068] SEQ ID NO.2所示的HCDR2;和
- [0069] SEQ ID NO.3所示的HCDR3。
- [0070] 在另一优选例中,所述抗TROP-2抗体包含以下三个互补决定区LCDR:
- [0071] SEQ ID NO.4所示的LCDR1;
- [0072] SEQ ID NO.5所示的LCDR2;和
- [0073] SEQ ID NO.6所示的LCDR3。
- [0074] 在另一优选例中,所述抗TROP-2抗体包含SEQ ID NO.13所示的重链可变区。
- [0075] 在另一优选例中,所述抗TROP-2抗体包含SEQ ID NO.14所示的轻链可变区。
- [0076] 在另一优选例中,所述抗TROP-2的scFv的序列如SEQ ID NO.19所示。
- [0077] 在另一优选例中,所述的双特异性抗体选自下组:
- [0078] (1) 所述双特异性抗体的重链氨基酸序列如SEQ ID NO.20所示,和所述双特异性抗体的轻链氨基酸序列如SEQ ID NO.21所示;
- [0079] (2) 所述双特异性抗体的重链氨基酸序列如SEQ ID NO.22所示,和所述双特异性抗体的轻链氨基酸序列如SEQ ID NO.21所示;或
- [0080] (3) 将(1)或(2)中的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的,且具有同时抗TROP-2活性和抗PD-L1活性的由(1)或(2)衍生的多肽。
- [0081] 在另一优选例中,所述双特异性抗体包括所述双特异性抗体的活性片段和/或衍生物,其中,所述活性片段和/或所述衍生物保留了所述双特异性抗体的70-100%(如70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%)的抗TROP-2活性和70-100%的抗PD-L1活性。
- [0082] 在另一优选例中,所述抗体的衍生物具有与本发明抗体至少85%的序列同一性。
- [0083] 在另一优选例中,所述抗体的衍生物是本发明抗体经过一个或几个氨基酸缺失、插入和/或取代后并保持至少85%的同一性的序列。
- [0084] 在另一优选例中,所述抗体的衍生物具有与本发明抗体至少86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的序列同一性。
- [0085] 在另一优选例中,所述的取代为保守性取代。
- [0086] 在另一优选例中,所述双特异性抗体包含抗TROP-2的scFv,其包含SEQ ID NO.13所示的重链可变区或其衍生序列,所述衍生序列包含选自下组的一个或多个位点的氨基酸取代:SEQ ID NO.13所示氨基酸序列的第5、31、32、38、46、48、50、53、58、60、61、62、68和97位。
- [0087] 在另一优选例中,所述衍生序列包含选自下组的一个或多个位点的氨基酸取代:Q5V、N31D、Y32Q、K38R、K46E、M48I、W50Y、Y53K、T58Y、T60A、D61E、D62E、A68V和F97Y。
- [0088] 在另一优选例中,所述双特异性抗体包含抗TROP-2的scFv,其包含SEQ ID NO.14所示的轻链可变区或其衍生序列,所述衍生序列包含选自下组的一个或多个位点的氨基酸突变:SEQ ID NO.14所示氨基酸序列的第4、20、24、30、31、53、54、56、60、85、93和96位。
- [0089] 在另一优选例中,所述衍生序列包含选自下组的一个或多个位点的氨基酸取代:L4M、S20T、K24R、S30N、I31T、Y53F、R54L、T56S、D60R、V85T、I93T和L96P。
- [0090] 在另一优选例中,所述抗PD-L1抗体包含SEQ ID NO.15所示的重链可变区或其衍生序列,所述衍生序列包含选自下组的一个或多个位点的氨基酸突变:SEQ ID NO.15所示

氨基酸序列的第28、31、40、41、234、235、252、254和256位。

[0091] 在另一优选例中,所述衍生序列包含选自下组的一个或多个位点的氨基酸取代:S28Q、S31Q、P40A、P41A、L234A、L235A、M252Y、S254T和T256E。

[0092] 在另一优选例中,所述抗PD-L1抗体包含SEQ ID NO.16所示的轻链可变区或其衍生序列,所述衍生序列包含选自下组的一个或多个位点的氨基酸突变:SEQ ID NO.16所示氨基酸序列的第24、28、29、31、36和89位。

[0093] 在另一优选例中,所述衍生序列包含选自下组的一个或多个位点的氨基酸取代:R24K、S28V、I29V、T31S、Y36F和Q89L。

[0094] 在本发明的第二方面,提供了一种多核苷酸分子,所述多核苷酸分子编码根据如本发明第一方面所述的双特异性抗体。

[0095] 在另一优选例中,编码所述双特异性抗体的重链的多核苷酸分子序列如SEQ ID NO:23或SEQ ID NO.25所示。

[0096] 在另一优选例中,编码所述双特异性抗体的轻链的多核苷酸分子序列如SEQ ID NO:24所示。

[0097] 在本发明的第三方面,提供了一种表达载体,所述表达载体含有根据在本发明的第二方面所述的多核苷酸分子。

[0098] 在另一优选例中,所述表达载体为病毒或质粒,较佳地为噬菌体或者噬菌粒。

[0099] 在另一优选例中,所述表达载体选自下组:pcDNA3.4,pDR1,pcDNA3.1(+),pcDNA3.1/ZEO(+),pDHFR,pTT5,pDHFF,pGM-CSF或pCHO 1.0,较佳地为pcDNA3.4。

[0100] 在本发明的第四方面,提供了一种宿主细胞,所述宿主细胞含有根据在本发明的第三方面所述的表达载体。

[0101] 在另一优选例中,所述宿主细胞选自下组:COS、CHO、NS0、sf9、sf21、DH5 α 、BL21(DE3)或TG1,更佳地为E.coli TG1、BL21(DE3)细胞(表达单链抗体或Fab抗体)或者CHO-K1细胞(表达全长IgG抗体)。

[0102] 在另一优选例中,所述宿主细胞为真核细胞,优选CHO细胞或293F细胞。

[0103] 在本发明的第五方面,提供了一种如在本发明的第一方面所述的双特异性抗体的制备方法,所述制备方法包括以下步骤:

[0104] a) 在表达条件下,培养根据在本发明的第四方面所述的宿主细胞,从而表达双特异性抗体;

[0105] b) 分离并纯化步骤a)所述的双特异性抗体。

[0106] 在本发明的第六方面,提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含有效量的根据在本发明的第一方面所述的双特异性抗体和一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0107] 在本发明的第七方面,提供了根据本发明的第一方面所述的双特异性抗体、或根据在本发明的第六方面所述的药物组合物在制备癌症或肿瘤的药物中的用途。

[0108] 在另一优选例中,所述癌症或肿瘤选自:肺癌、骨癌、胃癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、子宫癌、卵巢癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、直肠癌、结肠癌、肛门区癌、乳腺癌、食管癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、胰腺癌、脑癌、睾丸癌、淋巴癌、移行细胞癌、膀胱癌、肾

癌或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、软组织肉瘤、儿童实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、中枢神经系统 (CNS) 肿瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊柱肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、黑素瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、慢性、急性白血病或其组合。

[0109] 在本发明的第八方面,提供了一种免疫偶联物,所述免疫偶联物包括:

[0110] (a) 如在本发明的第一方面所述的双特异性抗体;和

[0111] (b) 选自下组的偶联部分:可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、或酶。

[0112] 在另一优选例中,所述偶联物部分选自:荧光或发光标记物、放射性标记物、MRI (磁共振成像) 或CT (电子计算机X射线断层扫描技术) 造影剂、或能够产生可检测产物的酶、放射性核素、生物毒素、细胞因子(如IL-2等)。

[0113] 在另一优选例中,所述的免疫偶联物包括抗体-药物偶联物(ADC)。

[0114] 在另一优选例中,所述的免疫偶联物用于制备治疗癌症或肿瘤的药物组合物。

[0115] 在本发明的第九方面,提供了一种治疗癌症或肿瘤的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用根据在本发明的第一方面所述的双特异性抗体、根据在本发明的第六方面所述的药物组合物、根据本发明的第八方面所述的免疫偶联物。

[0116] 在另一优选例中,所述方法还包括和其他的抗肿瘤药联合给药。

[0117] 本发明的积极进步效果在于:此TROP-2/PD-L1双特异性抗体可以降解TROP-2阳性肿瘤细胞的PD-L1,从而持续的阻断PD-1/PD-L1的结合,发挥优于PD-L1单抗的效果。

[0118] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0119] 图1A显示了抗TROP-2/PD-L1双抗a结构示意图。

[0120] 图1B显示了抗TROP-2/PD-L1双抗b结构示意图。

[0121] 图2A显示了抗TROP-2/PD-L1双抗a的HPLC检测图谱。

[0122] 图2B显示了抗TROP-2/PD-L1双抗b的HPLC检测图谱。

[0123] 图3A显示了ELISA检测抗TROP-2/PD-L1双抗a,b与TROP-2的结合。

[0124] 图3B显示了ELISA检测抗TROP-2/PD-L1双抗a,b与PD-L1的结合。

[0125] 图4A显示了抗TROP-2/PD-L1双抗a与TROP-2的亲和力常数检测结果图。

[0126] 图4B显示了抗TROP-2/PD-L1双抗a与PD-L1的亲和力常数检测结果图。

[0127] 图4C显示了抗TROP-2/PD-L1双抗b与TROP-2的亲和力常数检测结果图。

[0128] 图4D显示了抗TROP-2/PD-L1双抗b与PD-L1的亲和力常数检测结果图。

[0129] 图5A显示了抗TROP-2/PD-L1双抗a对NCI-H292细胞PD-L1蛋白的降解-1。

[0130] 图5B显示了抗TROP-2/PD-L1双抗a对NCI-H292细胞PD-L1蛋白的降解-2。

[0131] 图6A显示了抗TROP-2/PD-L1双抗a对PD1/PD-L1结合阻断的细胞水平活性-1。

[0132] 图6B显示了抗TROP-2/PD-L1双抗a对PD1/PD-L1结合阻断的细胞水平活性-2。

[0133] 图6C显示了抗TROP-2/PD-L1双抗a对PD1/PD-L1结合阻断的细胞水平活性-3。

- [0134] 图7显示了抗TROP-2/PD-L1双抗a的MLR结果。
- [0135] 图8A显示了抗TROP-2/PD-L1双抗a在NCI-H292移植瘤模型上的抗肿瘤作用。
- [0136] 图8B显示了抗TROP-2/PD-L1双抗a对NCI-H292移植瘤中PD-L1蛋白的降解。
- [0137] 图9A显示了抗TROP-2/PD-L1双抗a的DSC图。
- [0138] 图9B显示了抗TROP-2/PD-L1双抗b的DSC图。
- [0139] 图9C显示了抗TROP-2/PD-L1双抗a的37°C稳定性-0时的SEC结果。
- [0140] 图9D显示了抗TROP-2/PD-L1双抗a的37°C稳定性-28天的SEC结果。

具体实施方式

[0141] 本发明人经过广泛而深入地研究,首次获得一种靶向肿瘤细胞表面分子TROP-2和PD-L1的双特异性抗体。具体地,本发明的双特异性抗体由单链可变片段scFv和免疫球蛋白抗体IgG通过肽接头连接获得,其能够保持两端抗体的活性,能同时结合TROP-2和PD-L1抗原。特别地,本发明的双特异性抗体在细胞水平上,能够降解TROP-2阳性肿瘤细胞的PD-L1蛋白,从而阻断和T细胞表面的PD-1的结合;动物实验上,hPBMC免疫系统人源化小鼠NCI-H292模型的实验结果显示,该双特异性抗体可以抑制肿瘤增殖并表现出两个单抗联用的协同效果。在此基础上完成了本发明。

[0142] 术语

[0143] 为了可以更容易地理解本公开,首先定义某些术语。如本申请中所使用的,除非本文另有明确规定,否则以下术语中的每一个应具有下面给出的含义。在整个申请中阐述了其它定义。

[0144] 术语“约”可以是指在本领域普通技术人员确定的特定值或组成的可接受误差范围内的值或组成,其将部分地取决于如何测量或测定值或组成。

[0145] 如本文所用,术语“含有”或“包括(包含)”可以是开放式、半封闭式和封闭式的。换言之,所述术语也包括“基本上由…构成”、或“由…构成”。

[0146] 本发明中,术语“抗体(Antibody,缩写Ab)”和“免疫球蛋白G(Immunoglobulin G,缩写IgG)”是有相同结构特征的异四聚糖蛋白,其由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连,而不同免疫球蛋白同种型(isotype)的重链间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区(VH),其后是恒定区,重链恒定区由三个结构域CH1、CH2、以及CH3构成。每条轻链的一端有可变区(VL),另一端有恒定区,轻链恒定区包括一个结构域CL;轻链的恒定区与重链恒定区的CH1结构域配对,轻链的可变区与重链的可变区配对。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但是它们表现出不同的效应功能,例如参与抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用(ADCC,antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)等。重链恒定区包括IgG1、IgG2、IgG3、IgG4亚型;轻链恒定区包括κ(Kappa)或λ(Lambda)。抗体的重链和轻链通过重链的CH1结构域和轻链的CL结构域之间的二硫键共价连接在一起,抗体的两条重链通过铰链区之间形成的多肽间二硫键共价连接在一起。

[0147] 本发明所述的“免疫球蛋白抗体IgG”是约150kDa的分子,它由四条肽链构成,含有两条相同的约50kDa的γ重链,和两条相同的约25kDa的轻链,从而具有四聚体四级结构。两条重链通过二硫键相互连接,并各自与一条轻链连接。所成的四聚体具有相同的两半,二者

形成叉型或者类似Y的形状,叉的每一端含有一个相同的抗原结合位点。IgG抗体可以基于重链的恒定区中氨基酸序列的微小差异而分为多个亚类(例如IgG1、2、3、4)。

[0148] 本发明中,术语“双特异性抗体(或双抗)”是指能同时特异性结合两种抗原(靶点)或两种表位的抗体分子。根据对称性,双特异性抗体可以分为结构对称的和不对称的分子。根据结合位点的多少,双特异性抗体可以分为二价、三价、四价和多价分子。

[0149] 本发明中,术语“单克隆抗体(单抗)”指从一类基本均一的群体获得的抗体,即该群体中包含的单个抗体是相同的,除少数可能存在的天然发生的突变外。单克隆抗体高特异性地针对单个抗原位点。而且,与常规多克隆抗体制剂(通常是具有针对不同抗原决定簇的不同抗体的混合物)不同,各单克隆抗体是针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性外,单克隆抗体的好处还在于它们可以通过杂交瘤培养来合成,不会被其它免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表示了抗体的特性,是从基本均一的抗体群中获得的,这不应被解释成需要用任何特殊方法来生产抗体。

[0150] 如本文所用,术语“抗原结合片段”,指具有抗原结合活性的Fab片段,Fab'片段, $F(ab')_2$ 片段,或单一Fv片段。抗原结合片段的非限制性例子包括:(i) Fab片段;(ii) $F(ab')_2$ 片段;(iii) Fv片段;或(iv) 单链Fv(scFv)。如本文所用,表述“抗原结合片段”内部也涵盖其他工程化分子,如结构域特异性抗体,单结构域抗体,结构域缺失抗体,嵌合抗体,CDR移植抗体、双体抗体、三体抗体、四体抗体、微型抗体、纳米体(例如单价纳米体、双价纳米体等)、小模块免疫药物(SMIP)和鲨鱼可变IgNAR域。

[0151] 本发明中,术语“Fab”和“Fc”是指木瓜蛋白酶可将抗体裂解为两个完全相同的Fab段和一个Fc段。Fab段由抗体的重链的VH和CH1以及轻链的VL和CL结构域组成。Fc段即可结晶片段(fragment crystallizable, Fc),由抗体的CH2和CH3结构域组成。Fc段无抗原结合活性,是抗体与效应分子或细胞相互作用的部位。术语“ $F(ab')_2$ 片段” $F(ab')_2$ 片段抗体是由胃蛋白酶消化整个IgG抗体,去除大部分Fc区同时完整保留一些铰链区后得到的,具有通过二硫键连接在一起的两个抗原结合F(ab)部分。

[0152] 本发明中,术语“scFv”或“单链可变区片段scFv”为单链抗体(single chain antibody fragment, scFv),是指包含免疫球蛋白重链VH和轻链VL可变区的融合蛋白,VH与VL通过15~25个氨基酸的接头(linker)相连,其中所述融合蛋白保留了完整免疫球蛋白相同的抗原特异性。

[0153] 本发明中,术语“Fv片段”或“Fv抗体”含有抗体重链可变区、轻链可变区,但没有恒定区,并具有全部抗原结合位点的最小抗体片段。一般的,Fv片段还包含VH和VL结构域之间的多肽接头,且能够形成抗原结合所需的结构。

[0154] 本发明中,术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同,它形成各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而,可变性并不均匀地分布在整个抗体可变区中。它集中于重链可变区和轻链可变区中称为互补决定区(complementarity-determining region, CDR)或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为框架区(frame region, FR)。天然重链和轻链的可变区中各自包含四个FR区,它们大致上呈 β -折叠构型,由形成连接环的三个CDR相连,在某些情况下可形成部分 β 折叠结构。每条链中的CDR通过FR区紧密地靠在一起并与另一链的CDR一起形成了抗体的抗原结合部位(参见Kabat等,NIH Publ.No.91-3242,卷I,647-669页(1991))。

[0155] 如本文所用,术语“框架区”(FR)指插入CDR间的氨基酸序列,即指在单一物种中不同的免疫球蛋白间相对保守的免疫球蛋白的轻链和重链可变区的那些部分。免疫球蛋白的轻链和重链各具有四个FR,分别称为FR1-L、FR2-L、FR3-L、FR4-L和FR1-H、FR2-H、FR3-H、FR4-H。相应地,轻链可变结构域可因此称作(FR1-L)-(CDR1-L)-(FR2-L)-(CDR2-L)-(FR3-L)-(CDR3-L)-(FR4-L)且重链可变结构域可因此表示为(FR1-H)-(CDR1-H)-(FR2-H)-(CDR2-H)-(FR3-H)-(CDR3-H)-(FR4-H)。优选地,本发明的FR是人抗体FR或其衍生物,所述人抗体FR的衍生物与天然存在的人抗体FR基本相同,即序列同一性达到85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0156] 获知CDR的氨基酸序列,本领域的技术人员可轻易确定框架区FR1-L、FR2-L、FR3-L、FR4-L和/或FR1-H、FR2-H、FR3-H、FR4-H。

[0157] 如本文所用,术语“人框架区”是与天然存在的人抗体的框架区基本相同的(约85%或更多,具体地90%、95%、97%、99%或100%)框架区。

[0158] 如本文所用,术语“接头”是指插入免疫球蛋白结构域中为轻链和重链的结构域提供足够的可动性以折叠成交换双重可变区免疫球蛋白的一个或多个氨基酸残基。在本发明中,优选的接头是指接头L1和L2,其中L1连接单链抗体(scFv)的VH和VL,而L2用于将scFv与另一抗体的重链进行连接。

[0159] 合适的接头实例包括单甘氨酸(Gly)、或丝氨酸(Ser)残基,接头中氨基酸残基的标识和序列可随着接头中需要实现的次级结构要素的类型而变化。

[0160] 本发明中,术语“抗”、“结合”、“特异性结合”是指两分子间的非随机的结合反应,如抗体和其所针对的抗原之间的反应。通常,抗体以小于大约 10^{-7} M,例如小于大约 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M或更小的平衡解离常数(KD)结合该抗原。本发明中,术语“KD”是指特定抗体-抗原相互作用的平衡解离常数,其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。平衡解离常数越小,抗体-抗原结合越紧密,抗体与抗原之间的亲和力越高。例如,使用表面等离子体共振术(Surface Plasmon Resonance,缩写SPR)在BIAcore仪中测定抗体与抗原的结合亲和力或使用ELISA测定抗体与抗原结合的相对亲和力。

[0161] 本发明中,术语“表位”是指与抗体特异性结合的多肽决定簇。本发明的表位是抗原中被抗体结合的区域。

[0162] 双特异性抗体

[0163] 本发明的双特异性抗体为一种能与TROP-2和PD-L1特异结合的双特异性抗体,其包含抗PD-L1抗体部分和抗TROP-2抗体部分。具体地,其包含免疫球蛋白抗体IgG和两个相同的单链可变区片段scFv,其中每个单链可变片段scFv包含可变区VH和可变区VL,VH与VL通过肽接头L1连接,每个单链可变片段scFv通过接头肽L2与免疫球蛋白抗体IgG串联。

[0164] 本发明所述的“双特异性抗体”是指拥有两个不同的抗原结合位点,能同时结合TROP-2和PD-L1的双特异性抗体,其包含两个单链可变片段scFv和与之缀合的免疫球蛋白抗体IgG,每个scFv经由肽接头L2连接至免疫球蛋白抗体IgG每条重链,形成双特异性抗体的重链融合蛋白,其中每个scFv包含可变区VH和可变区VL,VH与VL通过肽接头L1连接。

[0165] 如上所述,本发明的双特异性抗体中的抗PD-L1抗体部分为特异性结合PD-L1蛋白的抗体或其抗原结合片段,抗TROP-2抗体部分为特异性结合TROP-2蛋白的抗体或其抗原结合片段;所述的抗原结合片段的结构可以选自下组:(i) Fab片段;(ii) F(ab')₂片段;(iii)

Fv片段;或(iv)单链Fv(scFv)。

[0166] 本发明的双特异性抗体可以为二聚体、三聚体或多聚体,优选为同源或异源二聚体。本发明的双特异性抗体中抗PD-L1或抗TROP-2的抗体部分可以包括一个或多个抗体或其抗原结合片段,较佳地,1、2、3、4、5、6个。

[0167] 作为优选的方案,本发明的双特异性抗体包含抗TROP-2抗体的scFv和PD-L1的IgG抗体,其中所述抗TROP-2抗体的VH包含互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,其中HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示;

[0168] 所述抗TROP-2抗体的VL包含互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示,LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示,LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示;

[0169] 所述PD-L1的IgG抗体的VH包含互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,其中HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示,HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示,HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示;

[0170] 所述PD-L1的IgG抗体的VL包含互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示,LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示,LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示。

[0171] 本领域中,抗体的结合区通常均含有一条轻链可变区和一条重链可变区,每一个可变区均含有3个CDR结构域。抗体的重链和轻链的CDR结构域分别称为HCDR和LCDR。因此,常规抗体抗原结合位点包含六个CDR,包括分别来自重链和轻链V区的CDR集合。

[0172] 在本发明中,本发明双特异性抗体的还包括其保守性变体,指与本发明双特异性抗体的氨基酸序列相比,有至多10个,较佳地至多8个,更佳地至多5个,最佳地至多3个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表A进行氨基酸替换而产生。

[0173] 表A

[0174]

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg (R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn (N)	Gln;His;Lys;Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro;Ala	Ala
His (H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg
Ile (I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe	Leu
Leu (L)	Ile;Val;Met;Ala;Phe	Ile
Lys (K)	Arg;Gln;Asn	Arg
Met (M)	Leu;Phe;Ile	Leu

Phe (F)	Leu;Val;Ile;Ala;Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr;Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp;Phe;Thr;Ser	Phe
Val (V)	Ile;Leu;Met;Phe;Ala	Leu

[0175] 作为优选的方案,scFv的VH的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示或在SEQ ID NO:13的序列基础上还具有选自5、31、32、38、46、48、50、53、58、60、61、62、68和97中一个或多个位点的氨基酸突变的序列;优选具有选自Q5V、N31D、Y32Q、K38R、K46E、M48I、W50Y、Y53K、T58Y、T60A、D61E、D62E、A68V和F97Y中一个或多个位点氨基酸突变的序列;VL的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示或在SEQ ID NO:14的序列基础上还具有选自4、20、24、30、31、53、54、56、60、85、93和96中一个或多个位点的氨基酸突变的序列;优选具有选自L4M、S20T、K24R、S30N、I31T、Y53F、R54L、T56S、D60R、V85T、I93T和L96P中一个或多个位点氨基酸突变的序列;所述免疫球蛋白抗体IgG的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示或在SEQ ID NO:15的序列基础上还具有选自28、31、40、41、234、235、252、254和256中一个或多个位点的氨基酸突变的序列;优选具有选自S28Q、S31Q、P40A、P41A、L234A、L235A、M252Y、S254T和T256E中一个或多个位点氨基酸突变的序列;轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示或在SEQ ID NO:16的序列基础上还具有选自24、28、29、31、36和89中一个或多个位点的氨基酸突变的序列;优选具有选自R24K、S28V、I29V、T31S、Y36F和Q89L中一个或多个位点氨基酸突变的序列。

[0176] 作为优选的方案,所述肽接头L1的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示。

[0177] 作为优选的方案,所述肽接头L2的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示。

[0178] 作为优选的方案,所述单链可变片段scFv的分子结构形式为VH-L1-VL,每个scFv的N末端经由肽接头L2连接至免疫球蛋白抗体IgG重链的C末端。

[0179] 作为优选的方案,所述单链可变片段scFv的分子结构形式为VH-L1-VL,每个scFv的C末端经由肽接头L2连接至免疫球蛋白抗体IgG重链的N末端。

[0180] 作为优选的方案,所述单链可变片段scFv的氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示。

[0181] 作为优选的方案,所述双特异性抗体的重链氨基酸序列如SEQ ID NO:20所示,其轻链氨基酸序列如SEQ ID NO:21所示。

[0182] 作为优选的方案,所述双特异性抗体的重链氨基酸序列如SEQ ID NO:22所示,其轻链氨基酸序列如SEQ ID NO:21所示。

[0183] 在构建本发明的双特异性抗体时,与该双特异性抗体的化学和物理稳定性相关的问题也得到了解决,诸如表达物理稳定的分子、增加热和盐依赖的稳定性、降低聚集、增加在高浓度下的溶解度以及维持分别针对两种抗原TROP-2和PD-L1的亲合力等。

[0184] 编码核酸和表达载体

[0185] 本发明另一方面提供了一种多核苷酸分子,所述核苷酸分子编码上述所述的双特异性抗体。本发明的多核苷酸可以是DNA形式或RNA形式。DNA形式包括cDNA、基因组DNA或人工合成的DNA。DNA可以是单链的或是双链的。DNA可以是编码链或非编码链。

[0186] 作为优选的方案,所述核苷酸分子编码能与TROP-2和PD-L1特异结合的双特异性抗体的重链的核苷酸序列如SEQ ID NO:23所示,编码其轻链的核苷酸序列如SEQ ID NO:24所示;或所述核苷酸分子编码能与TROP-2和PD-L1特异结合的双特异性抗体的重链的核苷酸序列如SEQ ID NO:25所示,编码其轻链的核苷酸序列如SEQ ID NO:24所示。

[0187] 本发明所述核苷酸分子的制备方法为本领域常规的制备方法,较佳地包括以下制备方法:通过基因克隆技术例如PCR方法等,获得编码上述单克隆抗体的核苷酸分子,或者通过人工全序列合成的方法得到编码上述单克隆抗体的核苷酸分子。

[0188] 本领域技术人员知晓,编码上述双特异性抗体的氨基酸序列的核苷酸序列可以适当引入替换、缺失、改变、插入或增加来提供一个多聚核苷酸的同系物。本发明中多聚核苷酸的同系物可以通过对编码该双特异性抗体基因的一个或多个碱基在保持抗体活性范围内进行替换、缺失或增加来制得。

[0189] 本发明另一方面提供了一种表达载体,所述表达载体含有上述的核苷酸分子。

[0190] 其中所述表达载体为本领域常规的表达载体,是指包含适当的调控序列,例如启动子序列、终止子序列、多腺苷酰化序列、增强子序列、标记基因和/或序列以及其他适当的序列的表达载体。所述表达载体可以是病毒或质粒,如适当的噬菌体或者噬菌粒,更多技术细节请参见例如Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989。许多用于核酸操作的已知技术和方案请参见Current Protocols in Molecular Biology,第二版,Ausubel等编著。本发明所述表达载体较佳地为pDR1,pcDNA3.1(+),pcDNA3.4,pcDNA3.1/ZEO(+),pDHFR,pTT5,pDHFF,pGM-CSF或pCHO 1.0,更佳地为pcDNA3.4。

[0191] 本发明另外提供了一种宿主细胞,所述宿主细胞含有上述的表达载体。

[0192] 本发明所述的宿主细胞为本领域常规的各种宿主细胞,只要能满足使上述重组表达载体稳定地自行复制,且所携带所述的核苷酸可被有效表达即可。其中所述宿主细胞包括原核表达细胞和真核表达细胞,所述宿主细胞较佳地包括:COS、CHO(中国仓鼠卵巢,Chinese Hamster Ovary)、NS0、sf9、sf21、DH5 α 、BL21(DE3)或TG1,更佳地为E.coli TG1、BL21(DE3)细胞(表达单链抗体或Fab抗体)或者CHO-K1细胞(表达全长IgG抗体)。将前述表达载体转化至宿主细胞中,即可得本发明优选的重组表达转化体。其中所述转化方法为本领域常规转化方法,较佳地为化学转化法,热激法或电转法。

[0193] 作为优选的方案,所述宿主细胞是真核细胞。优选CHO细胞或293F细胞。

[0194] 一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

[0195] 本发明还涉及包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞,以使其能够表达蛋白质。

[0196] 本发明另一方面提供了上述能与TROP-2和PD-L1特异结合的双特异性抗体的制备方法,所述制备方法包括以下步骤:

[0197] a) 在表达条件下,培养上述的宿主细胞,从而表达能与TROP-2和PD-L1特异结合的双特异性抗体;

[0198] b) 分离并纯化步骤a)所述的双特异性抗体。

[0199] 本发明所述的宿主细胞的培养方法、所述抗体的分离和纯化方法为本领域常规方

法,具体操作方法请参考相应的细胞培养技术手册以及抗体分离纯化技术手册。本发明中公开的抗TROP-2/PD-L1双特异性抗体的制备方法包括:在表达条件下,培养上述的宿主细胞,从而表达能与TROP-2和PD-L1特异结合的双特异性抗体;分离和纯化所述的抗TROP-2/PD-L1双特异性抗体。利用上述方法,可以将重组蛋白纯化为基本均一的物质。

[0200] 可以利用亲和层析的方法对本发明公开的抗TROP-2/PD-L1双特异性抗体进行分离纯化,根据所利用的亲和柱的特性,可以使用常规的方法例如高盐缓冲液、改变PH等方法洗脱结合在亲和柱上的抗TROP-2/PD-L1双特异性抗体。本发明的发明人对所得抗TROP-2/PD-L1双特异性抗体进行了检测实验,实验结果表明该抗TROP-2/PD-L1双特异性抗体能很好地与靶细胞和抗原结合,具有较高的亲和力。

[0201] 药物组合物

[0202] 本发明的另一方面提供了一种组合物,所述组合物包含上述所述的能与TROP-2和PD-L1特异结合的双特异性抗体和一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。优选地,所述的组合物是药物组合物。

[0203] 本发明提供的双特异性抗体,可以和药学上可接受的载体一起组成药物制剂组合物从而更稳定地发挥疗效,这些制剂可以保证本发明的双特异性抗体的氨基酸核心序列的构像完整性,同时还保护蛋白质的多官能团防止其降解(包括但不限于凝聚、脱氨或氧化)。通常,可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中,其中pH通常约为5-8,较佳地pH约为6-8,尽管pH值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药,其中包括(但不限于):静脉注射、静脉滴注、皮下注射、局部注射、肌肉注射、瘤内注射、腹腔内注射(如腹膜内)、颅内注射、或腔内注射。通常情况下,对于液体制剂,通常可以在2°C-8°C条件下保存至少稳定一年,对于冻干制剂,在30°C至少六个月保持稳定。所述双特异性抗体制剂可为制药领域常用的混悬、水针、冻干等制剂。

[0204] 本发明中,术语“药物组合物”是指本发明的双特异性抗体可以和药学上可以接受的载体一起组成药物制剂组合物从而更稳定地发挥疗效,这些制剂可以保证本发明公开的双特异性抗体的氨基酸核心序列的构象完整性,同时还保护蛋白质的多官能团防止其降解(包括但不限于凝聚、脱氨或氧化)。

[0205] 本发明的药物组合物含有安全有效量(如0.001-99wt%,较佳地0.01-90wt%,更佳地0.1-80wt%)的本发明上述的双特异性抗体(或其偶联物)以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但不限于):盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式,例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液宜在无茵条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量,例如每天约10微克/千克体重-约50毫克/千克体重。此外,本发明的双特异性抗体还可与其他治疗剂一起使用。

[0206] 使用药物组合物时,是将安全有效量的双特异性抗体或其免疫偶联物施用于哺乳动物,其中该安全有效量通常至少约10微克/千克体重,而且在大多数情况下不超过约50毫克/千克体重,较佳地该剂量是约10微克/千克体重-约10毫克/千克体重。当然,具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素,这些都是熟练医师技能范围内的。

[0207] 应用

[0208] 本发明另一方面提供了上述能与TROP-2和PD-L1特异结合的双特异性抗体、或上述药物组合物在制备药物中的应用,所述药物用于治疗癌症或肿瘤。

[0209] 本发明所称的用于治疗癌症或肿瘤的药物,指具有抑制和/或治疗肿瘤的药物,可以包括伴随肿瘤相关症状发展的延迟和/或这些症状严重程度的降低,进一步还包括已存在的肿瘤伴随症状的减轻并防止其他症状的出现,还包括减少或防止肿瘤的转移等。

[0210] 本发明所述的药物所针对的肿瘤较佳地包括但不限于:肺癌、骨癌、胃癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、子宫癌、卵巢癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、直肠癌、结肠癌、肛门区癌、乳腺癌、食管癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、胰腺癌、脑癌、睾丸癌、淋巴瘤、移行细胞癌、膀胱癌、肾癌或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、软组织肉瘤、儿童实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊柱肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、黑素瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、慢性或急性白血病和所述癌的组合。

[0211] 本发明的双特异性抗体及其组合物在对包括人在内的动物给药时,给药剂量因病人的年龄和体重,疾病特性和严重性,以及给药途径而异,可以参考动物实验的结果和种种情况,总给药量不能超过一定范围。具体讲静脉注射的剂量是1-1800mg/天。

[0212] 本发明的双特异性抗体及其组合物还可以和其他的抗肿瘤药联合给药以达到更加有效治疗肿瘤的目的,这些抗肿瘤药包括但不限于:1、细胞毒类药物:1) 作用于核酸化学结构的药物:烷化剂如氮芥类、亚硝脲类、甲基磺酸酯类;铂类化合物如顺铂(Cisplatin)、卡铂(Carboplatin)和草酸铂(Oxaliplatin)等;抗生素类如阿霉素(Adriamycin/Doxorubicin)、放线菌素D(DactinomycinD)、柔红霉素(Daunorubicin)、表阿霉素(Epirubicin)、光辉霉素(Mithramycin)等;2) 影响核酸代谢的药物:二氢叶酸还原酶抑制剂如甲氨喋呤(MTX)和培美曲塞(Pemetrexed)等;胸腺核苷合成酶抑制剂如氟尿嘧啶类(5-氟尿嘧啶、卡培他滨)等;嘌呤核苷合成酶抑制剂如6-巯基嘌呤等;核苷酸还原酶抑制剂如羟基脲(Hydroxycarbamide)等;DNA多聚酶抑制剂如阿糖胞苷(Cytosinearabioside)和吉西他滨(Gemcitabine)等;3) 作用于微管蛋白的药物:多西他赛(Docetaxel)、长春花碱(Vincristine)、长春瑞滨(Vinorelbine)、鬼臼砒类、高三尖杉酯碱等;2、激素类药物:抗雌激素如他莫昔芬(Tamoxifen)、屈洛昔芬(Droloxifene)、依西美坦(Exemestane)等;芳香化酶抑制剂如氨鲁米特(Aminoglutethimide)、福美司坦(Formestane)、来曲唑(Letrozle)、阿那曲唑(Anastrozole)等;抗雄激素:氟它氨RH-LH激动剂/拮抗剂:诺雷德、依那通等;3、生物反应调节剂类药物:此类药物主要通过调节机体免疫功能以到抗肿瘤的效果,如干扰素类(Interferon);白细胞介素-2(Interleukin-2);胸腺肽类(Thymosins)等;4、单克隆抗体类药物:曲妥昔单抗(Trastuzumab)、利妥昔单抗(Rituximab)、西妥昔单抗(Cetuximab)、贝伐单抗(Bevacizumab)等;5、其他类抗肿瘤药物:包括一些目前机制尚不明确、有待进一步研究的药物等。本发明公开的双特异性抗体及其组合物可以和上述的抗肿瘤药物之一或其组合联合用药。

[0213] 本发明的主要优点包括

[0214] (1) 本发明首次提供了一种能同时靶向肿瘤细胞表面分子TROP-2和PD-L1抗原的双特异性抗体。

[0215] (2) 本发明提供的双特异性抗体,能够降解TROP-2阳性肿瘤细胞的PD-L1蛋白,从而阻断PD-1/PD-L1的结合,解除T细胞的抑制状态,发挥抗肿瘤的作用。

[0216] (3) 本发明提供的双特异性抗体能够增强免疫反应。

[0217] 下面结合具体实施例,进一步陈述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明详细条件的实验方法,通常按照常规条件如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。

[0218] 以下实施例中使用的实验材料和来源以及实验试剂的配制方法具体说明如下。

[0219] 实验材料:

[0220] 293F细胞:品牌GIBCO,货号R79007。

[0221] 人肺癌细胞NCI-H292:中科院细胞库,目录号SCSP-582。

[0222] PD-L1aAPC/CHO-K1细胞:品牌Promega,货号J1252。

[0223] PBMC:购自澳赛尔斯,货号:FPB004F-C-MLR。

[0224] DC细胞:购自澳赛尔斯,货号FPB-DC002F-C。

[0225] 0.45 μ m的过滤器:品牌密理博,货号SLHV013SL。

[0226] 0.45 μ m的PVDF膜:品牌密理博,货号IPVH00010。

[0227] Anti-Human IgG Fc探针:品牌FORTEBIO,货号18-5060。

[0228] 实验试剂:

[0229] 包被液:碳酸钠1.59克,碳酸氢钠2.93克,加入双蒸水定容至1L。

[0230] TROP-2-HIS蛋白:品牌恺佶,货号TRP-HM121。

[0231] ELISA封闭液:PBST+1%BSA。

[0232] PBST:PBS+0.05%Tween 20。

[0233] Tween 20:品牌阿拉丁,货号T104863。

[0234] HRP标记的山羊抗人FC抗体:品牌博奥龙,货号BF03031。

[0235] TMB:品牌BD,货号555214。

[0236] BSA:购自生工生物工程(上海)股份有限公司,货号A60332。

[0237] 终止液:2M硫酸溶液。

[0238] HBS-EP工作液:品牌GE,货号BR-1006-69。

[0239] 0.25%胰酶-EDTA:品牌GIBCO,货号25200-072。

[0240] 1640完全培养基:RPMI1640培养基+10%FBS+1%Pen Strep+1%丙酮酸钠。

[0241] RPMI1640培养基:品牌GIBCO,货号22400089。

[0242] FBS:品牌GIBCO,货号10099-141。

[0243] Pen Strep:品牌Gibco,货号1514022。

[0244] 丙酮酸钠:品牌Gibco,货号11360-070。

[0245] RIPA裂解液:品牌Thermo,货号89900。

[0246] 磷酸酶抑制剂:品牌Thermo,货号78443。

[0247] PMSF:品牌solarbio,货号P0100-1。

[0248] 上样缓冲液:品牌bio-RAD,货号1610747。

- [0249] Bio-Glo:购自Promega,货号G7940。
- [0250] Streptavidin HRP:购自BD Biosciences,货号:554066。
- [0251] Purified Mouse Anti-Human IL-2:购自BD Pharmingen,货号:555051;0.5mg。
- [0252] Biotin Mouse Anti-Human IL-2:购自BD Pharmingen,货号:555040;0.5mg。
- [0253] Recombinant Human IL-2:购自BD Pharmingen,货号:554603;10ug。
- [0254] 5×电泳缓冲液:三羟甲基氨基甲烷75g,甘氨酸360g,十二烷基硫酸钠25g。
- [0255] 1×转膜缓冲液:10×转膜缓冲液100mL,双蒸水700mL,甲醇200mL。
- [0256] 10×转膜缓冲液:三羟甲基氨基甲烷60.6g,甘氨酸288g。
- [0257] WESTREN BOLT封闭液:TBST+5%blotting-grade blocker。
- [0258] blotting-grade blocker:品牌bio-RAD,货号1706404。
- [0259] TBST:TBS+0.05%Tween 20。
- [0260] PD-L1兔IgG抗体:品牌cell signaling,货号13684s。
- [0261] WESTREN BOLT显色液:品牌密理博,货号18075A4/18075B4。
- [0262] HRP标记的兔抗人山羊IgG抗体:品牌博奥龙,货号BF03008X。
- [0263] DMEM完全培养基:DMEM高糖培养基+10%FBS+1%Pen Strep+1%GLUMAX。
- [0264] DMEM高糖培养基:品牌GIBCO,货号11965-092。
- [0265] GlutaMAX:品牌GIBCO,货号35050-061。
- [0266] β-巯基乙醇:品牌沪式,货号80076928。
- [0267] polybrene助感染剂:品牌sigma,货号H9268。
- [0268] Lipofectamine 3000:品牌thermo,货号L3000015。
- [0269] F-12完全培养基:F-12培养基+10%FBS+250μg/ml G418+200μg/ml潮霉素B。
- [0270] F-12培养基:品牌GIBCO,货号11765054。
- [0271] G418 Sulfate:品牌GIBCO,货号1013102。
- [0272] AIM-V+AlbuMAX (BSA) (1X) 培养基:品牌GIBCO,货号31035-025。
- [0273] 潮霉素B:品牌merck货号400052。
- [0274] Streptavidin HRP:购自BD Biosciences,货号554066。
- [0275] 实验仪器:
- [0276] Hitrap Mabsselect Sure柱:购自Cytiva公司。
- [0277] HiLoad 26/600Superdex 200pg柱:购自Cytiva公司。
- [0278] Beckman Coulter CytoFLEX流式细胞仪:购自Beckman公司。
- [0279] SpectraMax i3x酶标仪:购自Molecular Devices公司。
- [0280] SpectraMaxM5酶标仪:购自Molecular Devices公司。
- [0281] 微量热差式扫描量热仪:MicroCal VP-Capillary DSC。
- [0282] 本发明的序列如下表所示:
- [0283] 表B.

[0284]

SEQ ID NO.	名称	序列
1	抗TROP-2单抗重链可变区 VH 中互补决定区 HCDR1氨基酸序列	NYGMN
2	抗TROP-2单抗重链可变区 VH 中互补决定区 HCDR2氨基酸序列	WINTYTGEPTYTDDFKG
3	抗TROP-2单抗重链可变区 VH 中互补决定区 HCDR3氨基酸序列	GGFGSSYWYFDV
4	抗TROP-2单抗轻链可变区 VL 中互补决定区 LCDR1氨基酸序列	KASQDVSIAVA
5	抗TROP-2单抗轻链可变区 VL 中互补决定区 LCDR2氨基酸序列	SASYRYT
6	抗TROP-2单抗轻链可变区 VL 中互补决定区 LCDR3氨基酸序列	QQHYITPLT
7	抗PD-L1单抗重链可变区 VH 中互补决定区	SYGVH

[0285]

	HCDR1氨基酸序列	
8	抗PD-L1单抗重链可变区VH中互补决定区HCDR2氨基酸序列	LIWSGGGTDYNPSLKS
9	抗PD-L1单抗重链可变区VH中互补决定区HCDR3氨基酸序列	QLGLRAMDY
10	抗PD-L1单抗轻链可变区VL中互补决定区LCDR1氨基酸序列	RASQSIGTTIH
11	抗PD-L1单抗轻链可变区VL中互补决定区LCDR2氨基酸序列	YASQSFS
12	抗PD-L1单抗轻链可变区VL中互补决定区LCDR3氨基酸序列	QQSNSWPLT
13	抗TROP-2单抗重链可变区VH氨基酸序列	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFGSSYWFYFDVWGQGLVTVSS
14	抗TROP-2单抗轻链可变区VL氨基酸序列	DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIATAVWYQKPKGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGAGTKVEIKR
15	抗PD-L1单抗重链可变区VH氨基酸序列	QVQLQQSGGGLVKPSQSLSLTCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGKGLEWIGLIWSGGGTDYNPSLKSRLTISRDTSKNQVSFKISSLTAADTAVYYCARQLGLRAMDYWGQGTSTVTVSS
16	抗PD-L1单抗轻链可变区VL氨基酸序列	EIVLTQSPDFLSVTPKEKVTITCRASQSIGTTIHWYQKPKDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSVEAEDAATYYCQQSNSWPLTFGAGTKLEIKR
17	肽接头L1的氨基酸序列	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
18	肽接头L2的氨基酸序列	GGGGSGGGGSGGGGS
19	抗TROP-2单抗的单链可变片段scFv的氨基酸序列	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFGSSYWFYFDVWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIATAVWYQKPKGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGAGTKVEIKR
20	抗TROP-2/PD-L1双抗a的重链氨基酸序列	QVQLQQSGGGLVKPSQSLSLTCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGKGLEWIGLIWSGGGTDYNPSLKSRLTISRDTSKNQVSFKISSLTAADTAVYYCARQLGLRAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN

[0286]

		HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGAGGGGSGGGGSGGGGSGVQLQQSGS ELKKPGASVKVCKASGYTFTNYGMNWVKQAP GQGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLDT SVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFGSSYWYF DVWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSI VAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGS GSDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGAGT KVEIKR
21	抗 TROP-2/PD-L1 双抗 a/b 的轻链氨基酸序列	EIVLTQSPDFLSVTPKEKVTITCRASQSIGTTIHWY QQKPDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGSGTDF TLTINSVEAEDAATYYCQQSNSWPLTFGAGTKLE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNIFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
22	抗 TROP-2/PD-L1 双抗 b 的重链氨基酸序列	QVQLQSGSELKKPGASVKVCKASGYTFTNYG MNWVKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYTDDF KGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCAR GGFGSSYWYFDVWGQGLVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCK ASQDVSI VAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTG VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQH YITPLTFGAGTKVEIKRGGGGSGGGGSGGGGSGV QLQQSGGGLVKPSQSLTCTVSGFSLTSYGVHW VRQPPGKGLEWIGLIWGGGTDYNPSLKSRLTIS RDTSKNQVSFKISSLTAADTAVYYCARQLGLRA MDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
23	抗 TROP-2/PD-L1 双抗 a 的重链核酸序列	CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCAGGAGGGGGCCT GGTGAAGCCATCACAGAGCCTGTCCTGACCT GCACAGTCTCTGGGTTCACTGACTTCATACG GAGTGCAGTGGGTCGACAGCCCCCTGGAAAG GGACTGGAGTGGATCGGCCTGATTGGTCTGG CGGGGGAACAGACTATAACCCCAGCCTGAAAT

[0287]

		CCCGGCTGACCATCTCTAGAGATACCAAGTAAG AATCAAGTGAGCTTTAAAATTAGCTCCCTGACA GCCGCTGACACTGCAGTGTACTATTGTGCAAG GCAGCTGGGACTGCGAGCTATGGATTACTGGG GACAGGGCACTTCCGTGACCGTCTCTAGTGCG AGCACCAAGGGACCTTCCGTGTTTCCCCTCGCC CCCAGCTCCAAAAGCACCAGCGGCGGAACAGC TGCTCTCGGCTGTCTCGTCAAGGATTACTTCCC CGAGCCCGTGACCGTGAGCTGGAACAGCGGAG CCCTGACAAGCGGCGTCCACACCTTCCCTGCTG TCCTACAGTCCTCCGGACTGTACAGCCTGAGCA GCGTGGTGACAGTCCCTAGCAGCTCCCTGGGC ACCCAGACATATATTTGCAACGTGAATCACAA GCCAGCAACACCAAGGTCGATAAGAAGGTGG AGCCTAAGTCCTGCGACAAGACCCACACATGT CCCCCTGTCCCGCTCCTGAACTGCTGGGAGGC CCTTCCGTGTTCCCTGTTCCCCCTAAGCCCAAG GACACCCTGATGATTTCCAGGACACCCGAGGT GACCTGTGTGGTGGTGGACGTCAGCCACGAGG ACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTACGTCGAT GGCGTGGAGGTGCACAACGCTAAGACCAAGCC CAGGGAGGAGCAGTACAATTCCACCTACAGGG TGGTGTCCGTGCTGACCGTCTCCATCAGGACT GGGTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCAAGGTG AGCAACAAGGCCCTCCCTGCTCCCATCGAGAA GACCATCAGCAAAGCCAAGGGCCAGCCCAGGG AACCTCAAGTCTATACCCTGCCTCCCAGCAGGG AGGAGATGACCAAGAACCAAGTGAGCCTCACA TGCCTCGTCAAGGGCTTCTATCCTTCCGATATT GCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGA GAACAACACTACAAGACAACACCCCCCGTGCTCG ATTCCGATGGCAGCTTCTTCCCTGTACTCCAAGC TGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAACAAGGC AACGTCTTCAGTTGCAGCGTCATGCATGAGGCC CTCCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTC CCTGAGCCCTGGAGCGGGCGGTGGGGGTAGTG GAGGCGGAGGTTCCGGGAGGGGGCGGTAGCCA GGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCTCTGAGCTGA AAAAGCCAGGAGCTTCTGTGAAAGTGTCTTGT AAGGCCTCTGGATATACTTTTACAAATTATGGC ATGAATTGGGTGAAACAGGCTCCTGGACAGGG ACTTAAGTGGATGGGATGGATTAACACATATA CCGGAGAACCTACATACTGATGATTTTAAG GGGAGATTCGCCTTTTCTCTGGATACTAGCGTG AGCACCGCCTATCTGCAGATCTCCAGCCTGAA GGCCGACGACACCGCCGTGTACTIONTCTGCGCCA GAGGCGGCTTCGGCAGCTCTTACTGGTACTTTCG ACGTGTGGGGCCAGGGCTCCCTGGTGACCGTG AGCAGCGGCGGTGGCGGCTCCGGCGGCGGTGG TAGTGGGGCGGGGGATCTGGAGGCGGAGGTA GTGACATCCAGCTGACCCAGTCCCCATCTAGCC
--	--	--

[0288]

		<p>TGAGTGCTAGCGTAGGGGATAGGGTTAGCATA ACCTGTAAGGCCTCGCAGGACGTGAGCATCGC CGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGG CCCCTAAGCTGCTGATCTACAGCGCCAGCTACC GGTACACCGGCGTGCCCGACCGGTTACAGCGGC TCCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATC AGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTTGCCGTGTAC TACTGCCAGCAGCACTACATCACCCCTGACC TTCGGCGCCGGCACCAAGGTGGAGATCAAGAG G</p>
<p>24</p>	<p>抗 TROP-2/PD-L1 双抗 a/b的轻链核酸序列</p>	<p>GAAATCGTGCTGACACAGAGCCCTGACTTTCTG TCCGTGACACCCAAGGAGAAAGTCACTATCAC CTGCCGGGCTAGCCAGTCCATCGGAACCACAA TTCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGACCAGAGC CCTAAGCTGCTGATTAATATGCCTCTCAGAGT TTCTCAGGCGTGCCATCCAGATTTAGCGGCTCC GGGTCTGGAAGTACTTCACTGACTATCAAC TCTGTCGAGGCAGAAGATGCCGCTACCTACTAT TGTCAGCAGAGTAATTCATGGCCCCTGACCTTT GCGCCCGGACAAAGCTGGAAATTAAGAAGAA CGTCGCCGCTCCCAGCGTCTTCATCTTCCCCC CAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGAACCGCCA GCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTACCCCA GGGAGGCCAAGGTGCAATGGAAGGTGGACAA CGCCCTACAGAGCGGCAACTCCAGGAGAGCG TGACCGAGCAGGACAGCAAGGATAGCACCTAC AGCCTGAGCAGCACCTCACCTGAGCAAGGC CGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCG AGGTGACCCATCAGGGCCTGAGCAGCCCTGTG ACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC</p>
<p>25</p>	<p>抗 TROP-2/PD-L1 双抗 b 的重链核酸序列</p>	<p>CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCTCTGAGCT GAAAAAGCCAGGAGCTTCTGTGAAAGTGTCTT GTAAGGCCTCTGGATATACTTTTACAAATTATG GCATGAATTGGGTGAAACAGGCTCCTGGACAG GGACTTAAGTGGATGGGATGGATTAACACATA TACCGGAGAACCTACATACTGATGATTTTAA GGGGAGATTCGCCTTTTCTCTGGATACTAGCGT GAGCACCGCCTATCTGCAGATCTCCAGCCTGA AGGCCGACGACACCGCCGTGTA CTCTGCGCC AGAGGCGGCTTCGGCAGCTCTTACTGGTACTTC GACGTGTGGGGCCAGGGCTCCCTGGTGACCGT GAGCAGCGGCGGTGGCGGCTCCGGCGGCGGTG GTAGTGGGGGCGGGGATCTGGAGGCGGAGGT AGTGACATCCAGCTGACCCAGTCCCCATCTAGC CTGAGTGCTAGCGTAGGGGATAGGGTTAGCAT AACCTGTAAGGCCTCGCAGGACGTGAGCATCG CCGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAG GCCCCTAAGCTGCTGATCTACAGCGCCAGCTAC CGGTACACCGGCGTGCCCGACCGGTTACAGCGG CTCCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCAT CAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTTGCCGTGTA</p>

[0289]

		C T A C T G C C A G C A G C A C T A C A T C A C C C C C C T G A C C T T C G G C G C C G G C A C C A A G G T G G A G A T C A A G A G G G G C G G T G G G G G T A G T G G A G G C G G A G G T T C G G G A G G G G G C G G T A G C C A G G T C C A G C T G C A G C A G T C A G G A G G G G C C T G G T G A A G C C A T C A C A G A G C C T G T C C C T G A C C T G C A C A G T C T C T G G G T T C A G T C T G A C T T C A T A C G G A G T G C A C T G G G T C C G A C A G C C C C C T G G A A G G G A C T G G A G T G G A T C G G C C T G A T T T G G T C T G G C G G G G A A C A G A C T A T A A C C C C A G C C T G A A A T C C C G G C T G A C C A T C T C T A G A G A T A C C A G T A A G A A T C A A G T G A G C T T T A A A A T T A G C T C C C T G A C A G C C G C T G A C A C T G C A G T G T A C T A T T G T G C A A G G C A G C T G G G A C T G C G A G C T A T G G A T T A C T G G G G A C A G G G C A C T T C C G T G A C C G T C T C T A G T G C G A G C A C C A A G G G A C C T T C C G T G T T T C C C C T C G C C C C A G C T C C A A A A G C A C C A G C G G C G G A A C A G C T G C T C T C G G C T G T C T C G T C A A G G A T T A C T T C C C C G A G C C C G T G A C C G T G A G C T G G A A C A G C G G A G C C C T G A C A A G C G G C G T C C A C A C C T T C C C T G C T G T C C T A C A G T C C T C C G G A C T G T A C A G C C T G A G C A G C G T G G T G A C A G T C C C T A G C A G C T C C C T G G G C A C C C A G A C A T A T A T T T G C A A C G T G A A T C A C A A G C C C A G C A A C A C C A A G G T C G A T A A G A A G G T G G A G C C T A A G T C C T G C G A C A A G A C C C A C A C A T G T C C C C C C T G T C C C G C T C C T G A A C T G C T G G G A G G C C C T T C C G T G T T C C T G T T C C C C C C T A A G C C C A A G G A C A C C C T G A T G A T T T C C A G G A C A C C C G A G G T G A C C T G T G T G G T G G T G G A C G T C A G C C A C G A G G A C C C C G A G G T G A A A T T C A A C T G G T A C G T C G A T G G C G T G G A G G T G C A C A A C G C T A A G A C C A A G C C C A G G G A G G A G C A G T A C A A T T C C A C C T A C A G G G T G G T G T C C G T G C T G A C C G T C C T C C A T C A G G A C T G G C T G A A C G G C A A A G A G T A T A A G T G C A A G G T G A G C A A C A A G G C C C T C C C T G C T C C C A T C G A G A A G A C C A T C A G C A A A G C C A A G G G C C A G C C C A G G G A A C C T C A A G T C T A T A C C C T G C C T C C C A G C A G G G A G G A G A T G A C C A A G A A C C A A G T G A G C C T C A C A T G C C T C G T C A A G G G C T T C T A T C C T T C C G A T A T T G C C G T C G A G T G G G A G T C C A A C G G A C A G C C C G A G A A C A A C T A C A A G A C A A C A C C C C C C G T G C T C G A T T C C G A T G G C A G C T T C T T C C T G T A C T C C A A G C T G A C C G T G G A C A A G T C C A G A T G G C A A C A A G G C A A C G T C T T C A G T T G C A G C G T C A T G C A T G A G G C C C T C C A C A A C C A C T A C A C C C A G A A G A G C C T C T C C C T G A G C C C T G G A A A G
--	--	---

[0290] 实施例1. 抗TROP-2/PD-L1双抗分子的构建

[0291] 本发明采用了PD-L1的单抗IgG和TROP-2单抗scFv串联的方式, 构建了抗TROP-2/PD-L1双特异性抗体a和b, 结构如图1A和图1B所示。

[0292] 其中, PD-L1的单抗来源于专利PCT/CN2021/088154公开的抗PD-L1人源化单克隆抗体, TROP-2单抗来源于PCT/GB2003/000885专利中公开的RS7单克隆抗体。

[0293] 实施例中的抗PD-L1单抗和抗TROP-2单抗对照分别为: 按照上述相应的专利中公开的单抗氨基酸序列, 参照实施例2中相同的表达纯化方法得到的单克隆抗体。

[0294] 其中scFv是通过L1 (SEQ ID NO:17) 连接TROP-2重链可变区VH (SEQ ID NO:13) 和

TROP-2轻链可变区VL (SEQ ID NO:14), 得到VH-L1-VL, 即TROP-2-scFv (SEQ ID NO:19), 再由L2 (SEQ ID NO:18) 将scFv与PD-L1的单克隆抗体连接, PD-L1单抗的轻链 (SEQ ID NO:21) 保持不变。抗TROP-2/PD-L1双特异性抗体a和b的区别在于其重链, a分子是PD-L1的单抗的IgG与TROP-2单抗scFv的重链通过L2连接获得, 即IgG-L2-scFv (SEQ ID NO:20), b分子是TROP-2单抗scFv的轻链与PD-L1的单抗IgG通过L2连接获得, 即scFv-L2-IgG (SEQ ID NO:22)。

[0295] 为了提高抗体分子在CHO细胞中的表达效率, 委托生工生物工程有限公司对抗TROP-2/PD-L1双特异性抗体分子的核酸序列进行密码子优化, 主要考虑密码子的偏好性、GC含量、mRNA的二级结构、重复序列等因素, 并委托该公司对序列进行合成。

[0296] 实施例2. 双抗的表达与纯化

[0297] 将抗TROP-2/PD-L1双特异性抗体的重链和轻链的DNA片段分别亚克隆到载体pcDNA3.4中, 提取重组质粒并共转染293F细胞和/或CHO细胞。细胞培养5-7天后, 将培养液通过高速离心、0.22 μ m滤膜过滤后上样至Hitrap Mabsselect Sure亲和层析柱中, 用100mM柠檬酸, pH3.5的洗脱液一步洗脱蛋白, 回收目的样品并透析换液至pH7.4的PBS中, 抗TROP-2/PD-L1双特异性抗体a蛋白样品经UPLC-SEC检测。将抗TROP-2/PD-L1双特异性抗体b进一步通过HiLoad 26/600Superdex 200pg (Cytiva) 分子筛纯化, 将纯化后的蛋白用UPLC-SEC检测。

[0298] 抗TROP-2/PD-L1双抗a和b分子的检测结果如图2A和图2B所示, 其中抗体分子状态均一, 单体纯度达到95%以上。

[0299] 实施例3. 酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定双抗对抗原的亲和力

[0300] 3.1检测抗TROP-2/PD-L1双特异性抗体对TROP-2的亲和力

[0301] 将重组TROP-2-HIS蛋白用包被液稀释至200ng/ml, 以100 μ l/孔加入到酶标板中, 常温放置2小时。去掉包被液 (用吸水纸去掉残留液滴), 以200 μ l/孔加入封闭液, 常温放置1小时。去掉封闭液 (用吸水纸去掉残留液滴), 再用封闭液稀释TROP-2/PD-L1双特异性抗体至10 μ g/ml, 四倍稀释形成12个浓度梯度 (最高浓度10 μ g/ml, 最低浓度0.002ng/ml), 以100 μ l/孔依次加入到封闭过的酶标板中, 常温放置1小时。用PBST洗板3次 (用吸水纸去掉残留液滴), 以100 μ l/孔加入含HRP标记的山羊抗人FC抗体, 常温放置30分钟。用PBST洗板3次 (用吸水纸去掉残留液滴), 以100 μ l/孔加入TMB, 室温避光放置5分钟, 以100 μ l/孔加入终止液, 终止底物显色反应, 用酶标仪读取450nm处的OD值, 用GraphPad对数据进行分析, 作图并计算 EC_{50} 。

[0302] 试验结果如图3A所示, 抗TROP-2/PD-L1双特异性抗体分子a、b和阳性对照TROP-2单抗与TROP-2-HIS的 EC_{50} (单位:nM) 分别为1.689、0.135和0.123。

[0303] 3.2检测抗TROP-2/PD-L1双特异性抗体对PD-L1的亲和力

[0304] 将重组PD-L1-HIS蛋白用包被液稀释至200ng/ml, 以100 μ l/孔加入到酶标板中, 常温放置2小时。去掉包被液 (用吸水纸去掉残留液滴), 以200 μ l/孔加入封闭液, 常温放置1小时。去掉封闭液 (用吸水纸去掉残留液滴), 再用封闭液稀释TROP-2/PD-L1双特异性抗体至10 μ g/ml, 四倍稀释形成12个浓度梯度 (最高浓度10 μ g/ml, 最低浓度0.002ng/ml), 以100 μ l/孔依次加入到封闭过的酶标板中, 常温放置1小时。用PBST洗板3次 (用吸水纸去掉残留液滴), 以100 μ l/孔加入含HRP标记的山羊抗人Fab抗体, 常温放置30分钟。用PBST洗板3次 (用

吸水纸去掉残留液滴),以100 μ l/孔加入TMB,室温避光放置5分钟,以100 μ l/孔加入终止液,终止底物显色反应,用酶标仪读取450nm处的OD值,用GraphPad对数据进行分析,作图并计算EC₅₀。

[0305] 试验结果如图3B所示,抗TROP-2/PD-L1双特异性抗体分子a、b和阳性对照PD-L1单抗与PD-L1-HIS的EC₅₀(单位:nM)分别为0.221、0.253和0.187。

[0306] 实施例4.Fortibio测定抗TROP-2/PD-L1双抗对抗原的亲合力

[0307] 使用Fortebio Octet分子相互作用仪,以及Anti-Human IgG Fc探针捕获法测定抗TROP-2/PD-L1双特异性抗体和抗原TROP-2-HIS结合的动力学参数。将Anti-Human IgG Fc探针浸泡在1 \times HBS-EP工作液中10分钟,对探针进行活化。将TROP-2/PD-L1双抗a和b用1 \times HBS-EP工作液稀释至20 μ g/ml,并将探针浸泡在其中180秒,使探针与抗体结合。再将探针浸泡在1 \times HBS-EP工作液中120秒,对探针进行封闭。将抗原TROP-2-HIS用1 \times HBS-EP工作液从86nM往下2倍稀释,设置6个浓度梯度,将探针浸泡在其中300秒,测定抗原抗体结合速率,再将探针浸泡在1 \times HBS-EP工作液中720秒,测定抗原抗体解离速率。

[0308] 使用Fortebio Octet分子相互作用仪,以及Anti-Human IgG Fc探针捕获法测定抗TROP-2/PD-L1双特异性抗体和抗原PD-L1-HIS结合的动力学参数。将Anti-Human IgG Fc探针浸泡在1 \times HBS-EP工作液中10分钟,对探针进行活化。将TROP-2/PD-L1双抗a和b用1 \times HBS-EP工作液稀释至40 μ g/ml,并将探针浸泡在其中180秒,使探针与抗体结合。再将探针浸泡在1 \times HBS-EP工作液中120秒,对探针进行封闭。将抗原PD-L1-HIS用1 \times HBS-EP工作液从100nM往下2倍稀释,设置6个浓度梯度,将探针浸泡在其中300秒,测定抗原抗体结合速率,再将探针浸泡在1 \times HBS-EP工作液中720秒,测定抗原抗体解离速率。

[0309] 抗TROP-2/PD-L1双抗a和TROP-2-HIS、PD-L1-HIS结合的动力学参数见表1,动力学特征参数检测结果如图4A、4B所示。结果表明,TROP-2/PD-L1双抗a与TROP-2和PD-L1有良好的亲合力。

[0310] 表1抗TROP-2/PD-L1双抗a与抗原结合的动力学参数

Analyte Solution	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
TROP-2-HIS	9.32E+04	2.55E-04	2.73E-09
PD-L1-HIS	1.89E+05	1.36E-03	7.20E-09

[0312] KD为亲和力常数;ka为抗原抗体结合速率;kd为抗原抗体解离速率;KD=kd/ka。

[0313] 抗TROP-2/PD-L1双抗b和TROP-2-HIS、PD-L1-HIS结合的动力学参数见表2,动力学特征参数检测结果如图4C、4D所示。结果表明,TROP-2/PD-L1双抗b与TROP-2和PD-L1有良好的亲合力。

[0314] 表2抗TROP-2/PD-L1双抗b与抗原结合的动力学参数

Analyte Solution	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
TROP-2-HIS	1.16E+05	3.73E-04	3.21E-09
PD-L1-HIS	1.72E+05	1.26E-03	7.34E-09

[0316] KD为亲和力常数;ka为抗原抗体结合速率;kd为抗原抗体解离速率;KD=kd/ka。

[0317] 实施例5.检测抗TROP-2/PD-L1双抗对靶细胞PD-L1蛋白的降解

[0318] 将NCI-H292细胞用0.25%胰酶-EDTA消化后,用1640完全培养基稀释NCI-H292细胞,加入到12孔板中,每孔20万个细胞。待细胞贴壁后,加入抗TROP-2/PD-L1双抗a、抗TROP-

2单抗和抗PD-L1单抗,抗体终浓度为1 μ g/ml或20 μ g/ml。所加抗体终浓度为1 μ g/ml的细胞分别在0h、24h和48h后裂解细胞提取蛋白,所加抗体终浓度20 μ g/ml的细胞在24h后裂解细胞提取蛋白。将RIPA裂解液以100:1的比例加入磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂,提取H292细胞总蛋白,将12孔板放在冰上,将12孔板中的培养基去掉,用预冷的1 \times PBS洗3次,每孔加入200 μ l裂解液,冰上放置10分钟,收集H292细胞总蛋白。12000g 4 $^{\circ}$ C离心15分钟,收集蛋白上清液。上样缓冲液按9:1的比例加入 β -巯基乙醇,蛋白上清液中与上样缓冲液1:1混匀,70 $^{\circ}$ C煮沸10分钟,-80 $^{\circ}$ C保存备用。

[0319] WESTREN BOLT法检测细胞中PD-L1蛋白的含量。电泳:配置12%SDS-PAGE电泳凝胶,组装电泳装置,加入1 \times 电泳缓冲液,将样品加入到点样孔中,调节电压至80v,待蓝色条带迁移至分离胶后,将电压调节至120v,直到蓝条带迁移至底部。转膜:将0.45 μ m PVDF膜在甲醇中浸泡1分钟,按照装置负极、电泳凝、PVDF膜、装置正极的顺序组装湿转装置,加入1 \times 转膜缓冲液,将电流调节至300mA,恒流湿转2小时。封闭:将PVDF膜浸泡在5%脱脂牛奶封闭液中,摇床轻微震动封闭2小时。一抗孵育:用1%的BSA按1:1000的比例稀释PD-L1兔IgG抗体,4 $^{\circ}$ C过夜孵育。洗膜:用TBST洗PVDF膜浸泡3次,每次摇床轻微震动清洗10分钟。二抗孵育:用1%的脱脂牛奶按1:10000的比例稀释HRP标记的兔抗人山羊抗体,PVDF膜用一抗浸泡,摇床轻微震动孵育2小时。洗膜:TBST洗3次,每次摇床轻微震动清洗10分钟。显色:用WESTREN BOLT显色液A液和B液以1:1比例混合均匀,曝光PVDF膜。

[0320] 检测结果如图5A和图5B所示,随着抗体与细胞反应时间增加,PD-L1蛋白的含量逐渐减少;与NC(不加抗体对照)相比,抗TROP-2/PD-L1双抗a显著降解PD-L1蛋白。

[0321] 实施例6.双抗阻断PD1/PD-L1结合的细胞水平活性

[0322] 将293TF细胞用0.25%胰酶-EDTA消化后,用DMEM完全培养基稀释293TF细胞,加入到6孔板中,每孔70万个细胞。待细胞贴壁后,用Lipofectamine 3000转染试剂将包装病毒载体PLVX(载体中已插入人源trop2基因)与293TF细胞反应。48小时后,收集293TF细胞培养基,500g离心5分钟并取上清,用0.45 μ m的过滤器过滤上清液,并按1000:1加入polybrene助感染剂,将2ml上清液加入到T25培养皿中(24小时前加入25万个PD-L1-Aapc/CHO-K1细胞)。48小时后,将PD-L1-Aapc/CHO-K1细胞用0.25%胰酶-EDTA消化,用含抗性的F12完全培养基培养传代至细胞长势稳定,获得PD-L1-Aapc/CHO-K1/HumanTrop2细胞群。将PD-L1-Aapc/CHO-K1/HumanTrop2细胞群用培养基稀释至2-3个细胞/ml,加入到96孔板中进行单克隆分选,获得PD-L1-Aapc/CHO-K1/HumanTrop2细胞株。用流式细胞术对PD-L1-Aapc/CHO-K1/HumanTrop2细胞株的trop2基因表达效率进行检测,PD-L1-Aapc/CHO-K1/HumanTrop2细胞株的trop2基因表达效率最高为86.71%(结果未展示)。将培养至对数期的PD-L1-Aapc/CHO-K1和PD-L1-Aapc/CHO-K1/HumanTrop2细胞,分别用胰蛋白酶消化成单个细胞后计数,按照40000细胞/孔,100 μ l/孔,转移至3903白色底透96孔板,置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂的孵箱孵育过夜。将抗TROP-2/PD-L1双抗a,抗TROP-2单抗,抗PD-L1单抗逐级4倍稀释成2X的工作液浓度,起始浓度为100nM。将培养至对数期的PD1效应细胞,离心,计数,使其密度在1.25 \times 10⁶/ml,细胞活率在95%以上的单细胞悬浮液。将前一天铺好板的PD-L1-Aapc/CHO-K1和PD-L1-Aapc/CHO-K1/HumanTrop2细胞吸掉上清,加入40 μ l梯度稀释的双抗,单抗的工作液,再加入等体积的PD1效应细胞,于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂的孵箱孵育6h。每孔加入80 μ l的Bio-Glo检测试剂。室温孵育5-10min,用spectramax i3读取Luminescence。所有数据均为双复孔,所得信号值

取平均后用4-parameter法拟合,绘制曲线。

[0323] 实验结果如图6A所示,抗TROP-2/PD-L1双抗a和抗PD-L1单抗阻断PD1和PD-L1-Aapc/CHO-K1细胞表面PD-L1结合的IC₅₀分别为1.255nM和1.288nM。

[0324] 实验结果如图6B所示,抗TROP-2/PD-L1双抗a和抗PD-L1单抗阻断PD1和PD-L1-Aapc/CHO-K1/HumanTrop2细胞表面PD-L1结合的IC₅₀分别为0.4404nM和0.8251nM。抗TROP-2/PD-L1双抗a的抑制活性与抗PD-L1单抗相当。

[0325] 为了研究双抗协同将过表达TROP-2细胞的PD-L1蛋白降解,将培养至对数期的PD-L1-Aapc/CHO-K1/HumanTrop2细胞,用胰蛋白酶消化成单个细胞后计数,按照40000细胞/孔,100 μ l/孔,转移至3903白色底透96孔板,置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂的孵箱孵育过夜。将TROP-2/PD-L1双抗a,抗TROP-2单抗,抗PD-L1单抗逐级4倍稀释成2X的工作液浓度,起始浓度为100nm。将前一天铺好板的PD-L1-Aapc/CHO-K1HumanTrop2细胞吸掉上清,加入40 μ l梯度稀释的双抗,单抗的工作液,培养过夜。第二天,吸掉上清后,加入TROP-2-HIS,PD-L1-HIS抗原,浓度为200ng/ml,培养2-4h以充分竞争与细胞表面抗原结合的抗体,吸掉上清。将培养至对数期的PD1效应细胞离心,计数,使其密度在1.25*10⁶/ml,细胞活率在95%以上的单细胞悬浮液,每个PD-L1-Aapc/CHO-K1 HumanTrop2细胞孔中加入等体积的PD1效应细胞,于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂的孵箱孵育6h。每孔加入80 μ l的Bio-Glo检测试剂。室温孵育5-10min,用spectramax i3读取Luminescence。所有数据均为双复孔,所得信号值取平均后用4-parameter法拟合,绘制曲线。

[0326] 实验结果如图6C所示,抗TROP-2/PD-L1双抗a阻断PD1和PD-L1结合的IC₅₀为5.075nM,而抗PD-L1单抗基本没有阻断功能。因此,抗TROP-2/PD-L1双抗a协同地将过表达TROP-2细胞的PD-L1蛋白降解,从而可以持续地阻断PD-1/PD-L1通路。

[0327] 实施例7. 双抗MLR实验

[0328] 将购买的冻存的PBMC细胞用Pan T cell Isolation Kit分离出T细胞(10⁵个/孔),将冻存的树突状细胞(10⁴个/孔)按比例混匀后接种到圆底板96孔板(Corning:3799)中,体积为每孔150 μ l;用AIM-V培养基在96孔板中稀释TROP-2/PD-L1双抗a,抗TROP-2单抗,抗PD-L1单抗逐级4倍稀释成2X的工作液浓度,起始浓度为100nM。将50 μ l梯度稀释好的抗体加入上述细胞培养板中;转移至37 $^{\circ}$ C,5%CO₂细胞培养箱中孵育3-6天。收集上清液之后,用ELISA来检测IL-2的释放。提前一天,将Purified Mouse Anti-Human IL-2包板,终浓度为2.5 μ g/ml,于4 $^{\circ}$ C冰箱过夜孵育。第二天,用1%BSA的PBST封闭液,200 μ l/孔室温封闭2h。上清液用1%BSA的PBST稀释,Recombinant Human IL-2的最高浓度为100ng/ml,4倍梯度稀释之后备用。用1X的PBST清洗三遍之后,加入上述准备好的上清液或者Recombinant Human IL-2室温孵育1h。用1X的PBST清洗3遍之后,按照1:1000的比例加入Biotin Mouse Anti-Human IL-2,室温孵育1h。1X的PBST清洗3遍之后,按照1:1000的比例加入Streptavidin HRP,室温孵育30min。1X的PBST清洗3遍之后加入显色液(临用前将ELISA显色A液与显色B液按1:1的体积比混匀),100 μ l/孔,室温孵育5-30min。待标准曲线孔的颜色梯度明显时加70 μ l/孔的终止液终止反应,立即用酶标仪在450nm波长处测量各孔的OD值,并使用酶标仪自带软件计算各孔IL-2表达水平;用GraphPad Prism6作图分析数据。

[0329] 实验结果如图7所示,抗TROP-2/PD-L1双抗a能够增强免疫反应,优于抗PD-L1单抗。

[0330] 实施例8. 抗TROP-2/PD-L1双抗a在NCI-H292移植瘤模型上的抗肿瘤作用

[0331] 收集体外培养的人非小细胞肺癌NCI-H292细胞,将细胞悬液浓度调整为 1×10^8 /mL,与基质胶以1:1等比例混合。体外复苏购买的PBMC (Peripheral blood mononuclear cell, 外周血单个核细胞),用PBS重悬PBMC细胞,将PBMC悬液浓度调整为 1×10^7 /mL。将混合好的肿瘤细胞悬液和PBMC悬液1:1混合。在无菌条件下,接种200 μ L细胞混合悬液于M-NSG小鼠右侧上背部皮下。当天将接种混合细胞的小鼠按体重随机分组。

[0332] 受试样品抗TROP-2/PD-L1双抗a,抗TROP-2单抗和抗PD-L1单抗的用药剂量均为67nmol/kg。对照组给以相同体积的PBS。给药方式为腹腔给药,给药体积为0.2mL/鼠(20g),每周给药2次,连续给药四周。

[0333] 整个实验过程中,每周2次测量移植瘤直径,同时称小鼠体重。肿瘤体积(tumor volume, TV)的计算公式为:TV=1/2 \times 长 \times 宽²。抗肿瘤活性的评价指标为相对肿瘤增殖率T/C(%),计算公式如下:T/C(%)=(TV_t/CV_t) \times 100%(TV_t:治疗组TV;CV_t:阴性对照组TV)。肿瘤抑制率TGI(%)=(1-T/C) \times 100%。实验结果如图8A所示,在人非小细胞肺癌NCI-H292细胞混合人PBMC移植瘤模型上,抗TROP-2单抗+抗PD-L1单抗肿瘤抑制率TGI为42.71%;抗TROP-2/PD-L1双抗a肿瘤抑制率为62.91%。结果表明,在此移植瘤模型上,抗TROP-2/PD-L1双抗a能够显著抑制肿瘤生长,抑瘤作用强于抗TROP-2单抗+抗PD-L1单抗。

[0334] 按照PMSF:RIPA=1:100的比例准备好裂解液,将肿瘤组织置于裂解液中,用电动匀浆器搅碎,低温裂解2h后,用4 $^{\circ}$ C离心机12000r,离心20min,吸取上清,-80 $^{\circ}$ C保存样品备用。

[0335] 配置12%的SDS-PAGE胶准备电泳,蛋白上清液与上样缓冲液以1:1的比例混合均匀,于70 $^{\circ}$ C煮10min,备用。配置好1 \times 的Running Buffer,装配好电泳装置,点样完毕后,调节电压为80v 30min,待红色marker出现时更改为120v 1h。配置1 \times 的湿转液,其中10 \times 的湿转液100mL,水700mL,甲醇200mL;选择0.45 μ m的PVDF膜,提前用甲醇浸泡;装配好湿转装备,选择300mA 2h进行湿转。封闭液5%牛奶(如:1g牛奶,20ml TBST)封闭2h。一抗孵育过夜,PD-L1一抗用1%的BSA的TBST配置,其中一抗比例为1:1000。洗膜:TBST洗3次,每次10分钟。二抗:二抗用1%牛奶配置,其中二抗比例为1:10000。洗膜:TBST洗3次,每次10分钟。曝光,发光液A液和B液以1:1比例混合均匀,进行曝光操作。

[0336] 结果表明,抗TROP-2/PD-L1双抗a显著降解肿瘤组织的PD-L1蛋白(图8B)。

[0337] 实施例9. 抗TROP-2/PD-L1双抗a和b的稳定性研究

[0338] 本实验可用于评估与相互作用有关的热力学参数,如在辅料加入情况下蛋白质去折叠的情况等,从而揭示研发最优制剂所需的重要信息。

[0339] 实验使用MicroCal VP-Capillary DSC,用0.22 μ m滤膜将样品及其缓冲液过滤,分别取400 μ l样品及其匹配缓冲液置于96孔板中,样品在25 $^{\circ}$ C-100 $^{\circ}$ C条件下扫描,扫描速率为每小时150 $^{\circ}$ C。

[0340] 抗TROP-2/PD-L1双抗a保存在20mM醋酸盐+7%海藻糖+1%盐酸精氨酸+0.02%吐温80,pH 5.0的buffer中,抗TROP-2/PD-L1双抗b保存在pH7.4的PBS buffer中,DSC检测的图谱见图9A,9B。

[0341] 结果表明,此双抗比较稳定。抗TROP-2/PD-L1双抗a的37 $^{\circ}$ C长期稳定性实验结果也验证了这一点。HPLC-SEC结果见图9C,9D。

[0342] 讨论

[0343] 由上述实验可知,本发明提供的双特异抗体可以同时结合TROP-2和PD-L1,能够阻断PD-1/PD-L1通路,可恢复T细胞的免疫杀伤功能,发挥杀伤肿瘤细胞的作用。尤其是,图5(5A和5B)、图6C和图8B结果显示该双特异抗体可以发挥依赖TROP-2的PD-L1降解功能,可以持续阻断PD-1/PD-L1通路,优于抗PD-L1单抗。图8A的结果显示该双特异抗体移植瘤模型上能够显著抑制肿瘤生长,抑瘤作用强于抗TROP-2单抗+抗PD-L1单抗。

[0344] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 5

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 6

Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 7

Ser Tyr Gly Val His

1 5

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 8

Leu Ile Trp Ser Gly Gly Gly Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 9

Gln Leu Gly Leu Arg Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 10

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Thr Ile His

1 5 10

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 11

Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 12

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 13

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 13

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 14

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 14

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 15

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 15

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Ile Trp Ser Gly Gly Gly Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Phe
 65 70 75 80
 Lys Ile Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gln Leu Gly Leu Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 16

<211> 108

<212> PRT

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

<210> 20

<211> 711

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 20

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Ile Trp Ser Gly Gly Gly Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Phe
 65 70 75 80
 Lys Ile Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gln Leu Gly Leu Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

340	345	350
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
355	360	365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
370	375	380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
385	390	395
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
405	410	415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
420	425	430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala Gly		
435	440	445
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val		
450	455	460
Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val		
465	470	475
Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met		
485	490	495
Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp		
500	505	510
Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe Lys Gly		
515	520	525
Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln		
530	535	540
Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg		
545	550	555
Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly		
565	570	575
Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
580	585	590
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr		
595	600	605
Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile		
610	615	620
Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala Val Ala Trp Tyr Gln		
625	630	635
Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr		
645	650	655

Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 660 665 670
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val
 675 680 685
 Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly
 690 695 700
 Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 705 710
 <210> 21
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 21
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Leu Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Thr
 20 25 30
 Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Val Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 22
 <211> 711
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 22
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln
 130 135 140
 Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
 145 150 155 160
 Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala Val Ala Trp
 165 170 175
 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala
 180 185 190
 Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 195 200 205
 Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe
 210 215 220
 Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly
 225 230 235 240
 Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly
 260 265 270
 Gly Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val
 275 280 285
 Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro
 290 295 300
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Trp Ser Gly Gly Gly
 305 310 315 320
 Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp
 325 330 335
 Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu Thr Ala Ala
 340 345 350
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Leu Gly Leu Arg Ala Met
 355 360 365
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 370 375 380
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 385 390 395 400
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 405 410 415
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 420 425 430
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 435 440 445
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 450 455 460
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 465 470 475 480
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 485 490 495
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 500 505 510
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 515 520 525
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 530 535 540
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 545 550 555 560
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

	565		570		575										
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
	580		585		590										
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
	595		600		605										
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys
	610		615		620										
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
625			630		635										640
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
	645		650		655										
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
	660		665		670										
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
	675		680		685										
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
	690		695		700										
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys									
705			710												

<210> 23

<211> 2133

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 23

caggtccagc tgcagcagtc aggagggggc ctggtgaagc catcacagag cctgtccctg 60
acctgcacag tctctgggtt cagtctgact tcatacggag tgcactgggt cgcacagccc 120
cctggaaagg gactggagtg gatcggcctg atttggtctg gcgggggaac agactataac 180
cccagcctga aatcccggct gaccatctct agagatacca gtaagaatca agtgagcttt 240
aaaattagct ccctgacagc cgctgacact gcagtgtact attgtgcaag gcagctggga 300
ctgcgagcta tggattactg gggacagggc acttccgtga ccgtctctag tgcgagcacc 360
aagggacctt ccgtgtttcc cctcgcccc agctccaaa gcaccagcg cggaacagct 420
gctctcggct gtctcgtcaa ggattacttc cccgagcccc tgaccgtgag ctggaacagc 480
ggagccctga caagcggcgt ccacaccttc cctgctgtcc tacagtctc cggactgtac 540
agcctgagca gcgtgggtgac agtccttagc agtccttg gcaccagac atatatttgc 600
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtcgataaga agtgaggacc taagtctctc 660
gacaagacc acacatgtcc ccctgtccc gctcctgaac tgctgggagg cccttccgtg 720
ttcctgttcc cccctaagcc caaggacacc ctgatgattt ccaggacacc cgaggtgacc 780
tgtgtggtgg tggacgtcag ccacgaggac cccgaggtga aattcaactg gtacgtcgat 840
ggcgtggagg tgcacaacgc taagaccaag cccagggagg agcagtacaa ttccacctac 900

aggggtggtgt ccgtgctgac cgtcctccat caggactggc tgaacggcaa agagtataag 960
 tgcaagggtga gcaacaaggc cctccctgct cccatcgaga agaccatcag caaagccaag 1020
 ggccagccca gggaacctca agtctatacc ctgcctccca gcagggagga gatgaccaag 1080
 aaccaagtga gcctcacatg cctcgtcaag ggcttctatc cttccgatat tgccgtcgag 1140
 tgggagtcca acggacagcc cgagaacaac tacaagacia cacccccctg gctcgattcc 1200
 gatggcagct tcttcctgta ctccaagctg accgtggaca agtccagatg gcaacaaggc 1260
 aacgtcttca gttgcagcgt catgcatgag gccctccaca accactacac ccagaagagc 1320
 ctctccctga gccctggagc gggcgggtggg ggtagtggag gcggaggttc gggagggggc 1380
 ggtagccagg tgcagctgca gcagctctggc tctgagctga aaaagccagg agcttctgtg 1440
 aaagtgtctt gtaaggctc tggatatact ttacaaatt atggcatgaa ttgggtgaaa 1500
 caggctcctg gacagggact taagtggatg ggatggatta acacataac cggagaacct 1560
 acatacactg atgattttaa ggggagattc gccttttctc tggatactag cgtgagcacc 1620
 gcctatctgc agatctccag cctgaaggcc gacgacaccg ccgtgtactt ctgcgccaga 1680
 ggcggcttcg gcagctctta ctggtacttc gacgtgtggg gccagggctc cctggtgacc 1740
 gtgagcagcg gcggtggcgg ctccggcggc ggtggtagtg ggggcggggg atctggaggc 1800
 ggaggtagtg acatccagct gaccagctc ccatctagcc tgagtgctag cgtaggggat 1860
 agggttagca taacctgtaa ggctcgcag gacgtgagca tcgccgtggc ctggtaccag 1920
 cagaagcccc gcaaggcccc taagctgctg atctacagcg ccagctaccg gtacaccggc 1980
 gtgcccgacc ggttcagcgg ctccggctcc ggcaccgact tcaccctgac catcagctcc 2040
 ctgcagcccc aggactttgc cgtgtactac tgccagcagc actacatcac ccccctgacc 2100
 ttccgcccgc gcaccaaggt ggagatcaag agg 2133

<210> 24

<211> 642

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 24

gaaatcgtgc tgacacagag ccctgacttt ctgtccgtga cacccaagga gaaagtcact 60
 atcacctgcc gggctagcca gtccatcgga accacaattc actggtacca gcagaagccc 120
 gaccagagcc ctaagctgct gattaaatat gcctctcaga gtttctcagg cgtgccatcc 180
 agattttagcg gctccgggtc tggaactgac ttcacactga ctatcaactc tgtcgaggca 240
 gaagatgccg ctacctacta ttgtcagcag agtaattcat ggcccctgac ctttggcgcc 300
 gggacaaaagc tggaatttaa aagaaccgtc gccgtccca gegtcttcat ctccccccc 360
 agcgatgagc agctgaagag cggaaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 420
 cccagggagg ccaaggtgca atggaaggtg gacaacgccc tacagagcgg caactcccag 480
 gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggat agcacctaca gcctgagcag caccctcacc 540
 ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgctt gcgaggtgac ccatcagggc 600
 ctgagcagcc ctgtgaccaa gagettcaac aggggcgagt gc 642

<210> 25

<211> 2133

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 25

```

cagggtgcagc tgcagcagtc tggctctgag ctgaaaaagc caggagcttc tgtgaaagtg 60
tcttgtaagg cctctggata tacttttaca aattatggca tgaattgggt gaaacaggct 120
cctggacagg gacttaagtg gatgggatgg attaacacat ataccggaga acctacatac 180
actgatgatt ttaaggggag attcgccttt tctctggata ctagcgtgag caccgcctat 240
ctgcagatct ccagcctgaa ggccgacgac accgccgtgt acttctgcgc cagaggcggc 300
ttcggcagct cttactggta cttcgacgtg tggggccagg gctccctggg gaccgtgagc 360
agcggcgggtg gcggtccgg cggcgggtgg agtggggggc ggggatctgg aggcggaggt 420
agtgacatcc agctgacceca gtccccatct agcctgagtg ctagcgtagg ggatagggtt 480
agcataacct gtaaggcctc gcaggacgtg agcatcgccg tggcctggta ccagcagaag 540
cccggcaagg cccctaagct gctgatctac agcgcagct accggtacac cggcgtgccc 600
gaccggttca gcggtccgg ctccggcacc gacttceacc tgaccatcag ctccctgcag 660
cccgaggact ttgccgtgta ctactgccag cagcactaca tcacccccct gaccttcggc 720
gccggcacca aggtggagat caagaggggc ggtgggggta gtggaggcgg aggttcggga 780
gggggcggtg gccaggtcca gctgcagcag tcaggagggg gcctggtgaa gccatcacag 840
agcctgtccc tgacctgcac agtctctggg ttcagtctga cttcatacgg agtgcactgg 900
gtccgacagc cccctggaaa gggactggag tggatcgcc tgatttggtc tggcggggga 960
acagactata accccagcct gaaatcccgg ctgaccatct ctagagatac cagtaagaat 1020
caagtgagct ttaaaattag ctccctgaca gccgctgaca ctgcagtgta ctattgtgca 1080
aggcagctgg gactgcgagc tatggattac tggggacagg gcacttccgt gaccgtctct 1140
agtgcgagca ccaagggacc ttccgtgttt ccctcggccc ccagctcaa aagcaccagc 1200
ggcggaacag ctgctctcgg ctgtctcgtc aaggattact tccccgagcc cgtgaccgtg 1260
agctggaaca gcgagaccct gacaagcggc gtccacacct tcctgctgt cctacagtcc 1320
tccgactgt acagcctgag cagcgtgggt acagtcccta gcagctccct gggcaccag 1380
acatatattt gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtcgataa gaaggtggag 1440
cctaagtcc tgcacaagac ccacacatgt cccccctgtc ccgctcctga actgctggga 1500
ggcccttccg tgttctgtt cccccctaag cccaaggaca ccctgatgat ttccaggaca 1560
cccgaggtga cctgtgtggt ggtggacgtc agccacgagg accccgaggt gaaattcaac 1620
tggtacgtcg atggcgtgga ggtgcacaac gctaagacca agcccaggga ggagcagtac 1680
aattccacct acaggggtgt gtccgtgctg accgtctec atcaggactg gctgaacggc 1740
aaagagtata agtgcaaggt gagcaacaag gccctcctg ctccatcga gaagaccatc 1800
agcaaagcca agggccagcc cagggaacct caagtctata cctgctctc cagcagggag 1860
gagatgacca agaaccaagt gagcctcaca tgctctgtea agggcttcta tcttccgat 1920
attgccgtcg agtgggagtc caacggacag cccgagaaca actacaagac aacaccccc 1980
gtgctcgatt ccgatggcag cttcttctg tactccaagc tgaccgtgga caagtccaga 2040
tggcaacaag gcaacgtctt cagttgcagc gtcatgcatg aggcctcca caaccactac 2100
accagaaga gcctctccct gagccctgga aag 2133

```

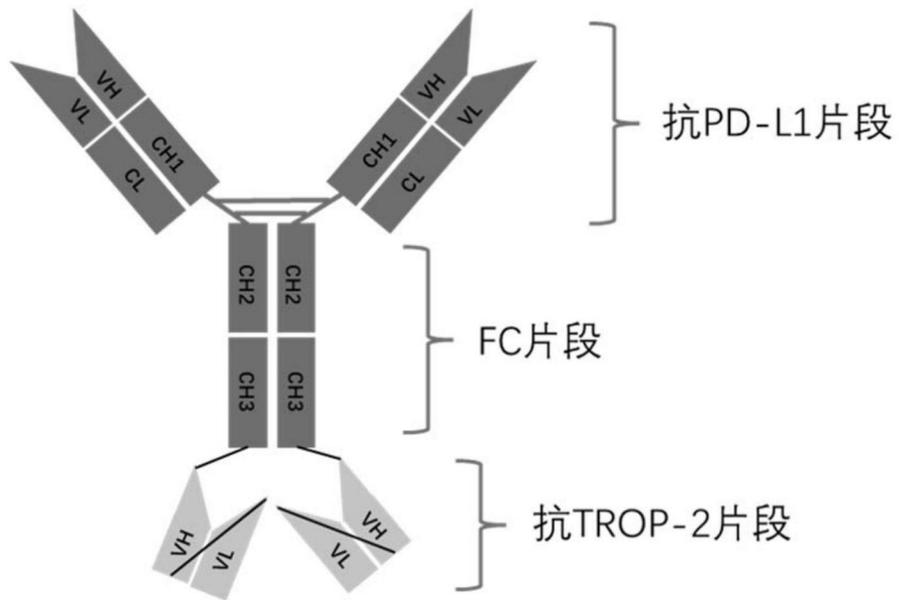


图1A

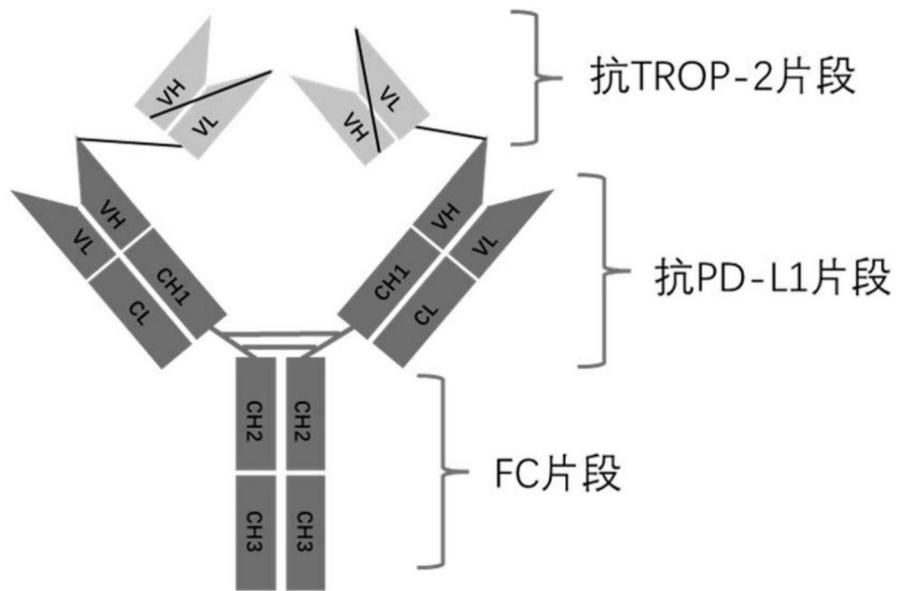


图1B

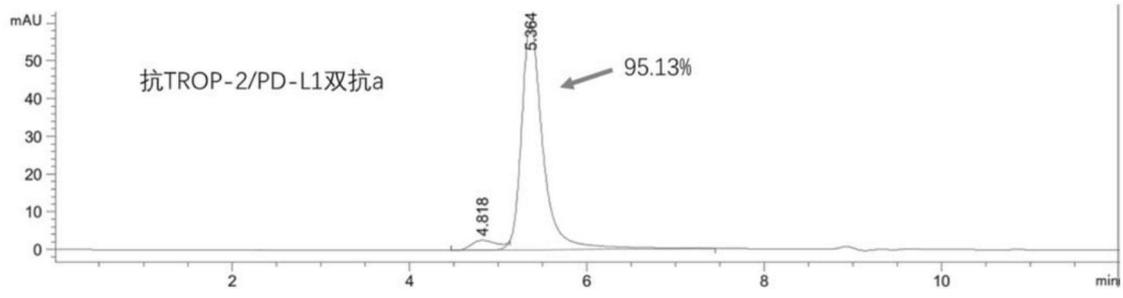


图2A

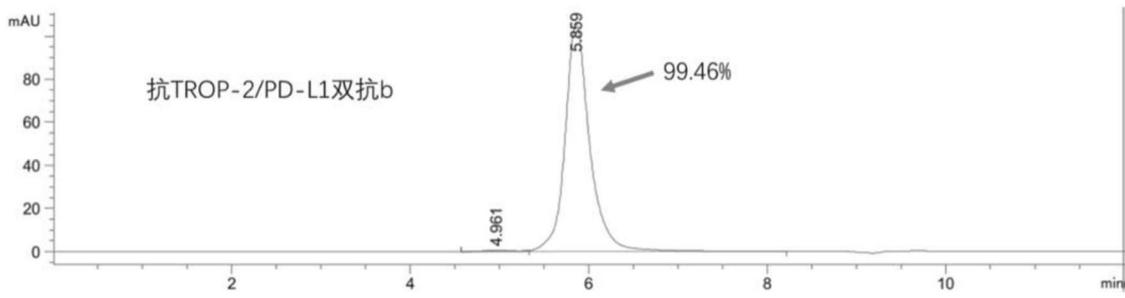


图2B

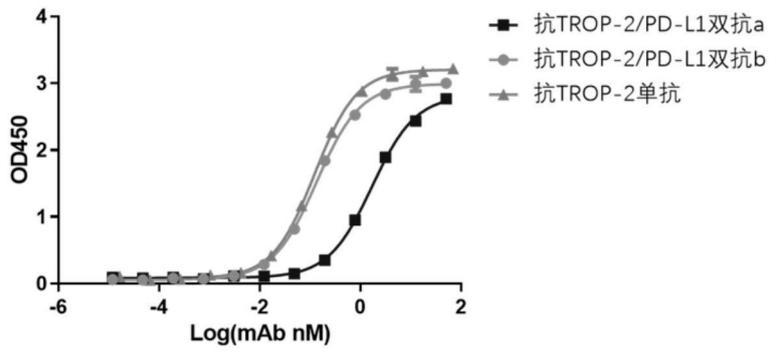


图3A

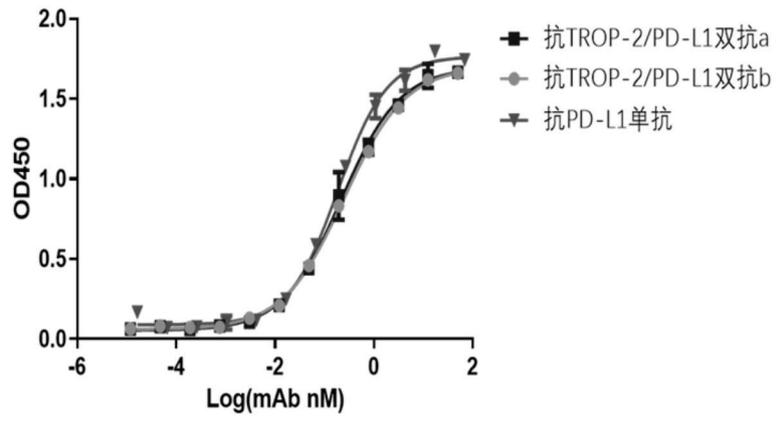


图3B

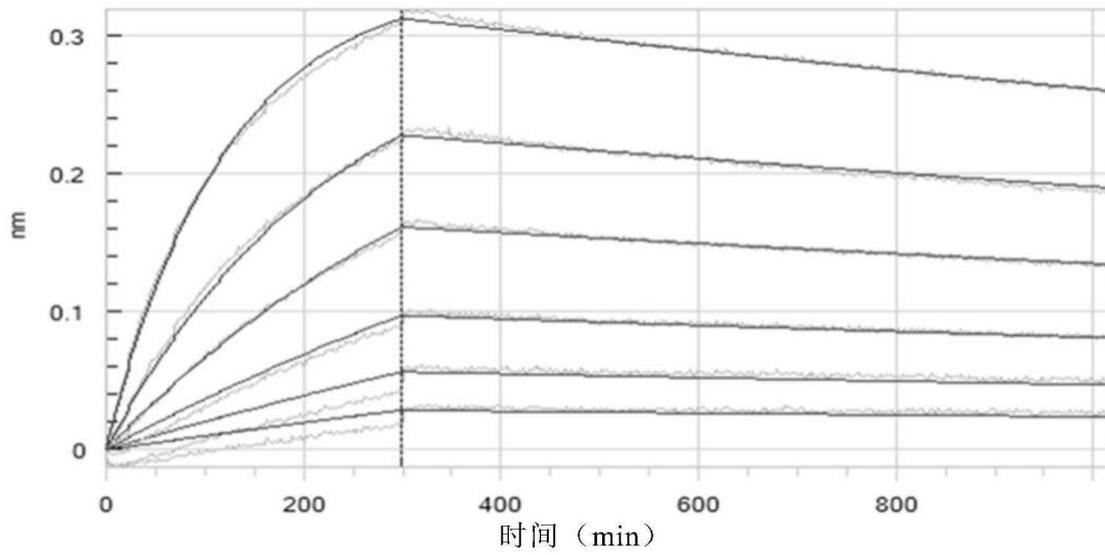


图4A

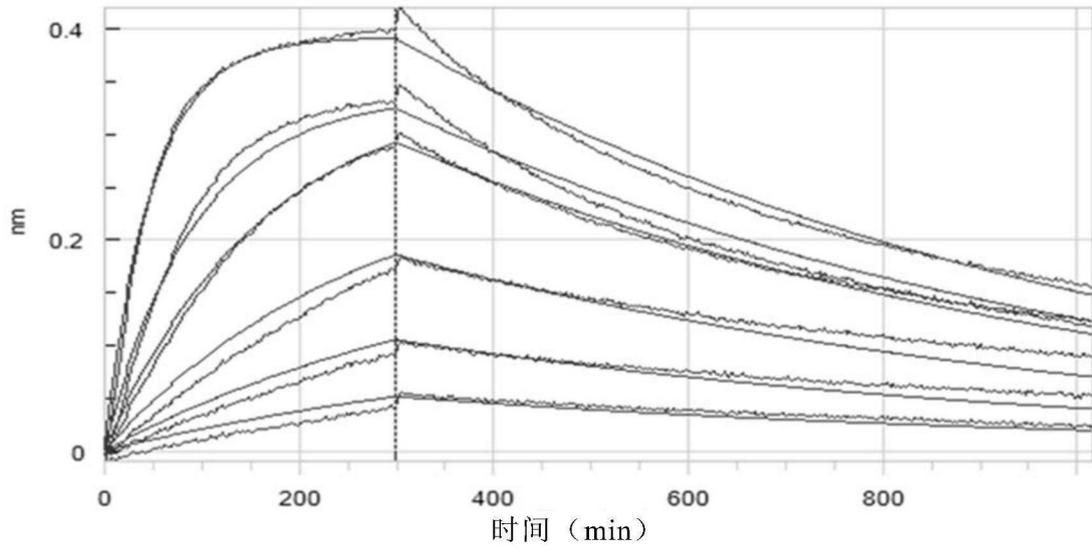


图4B

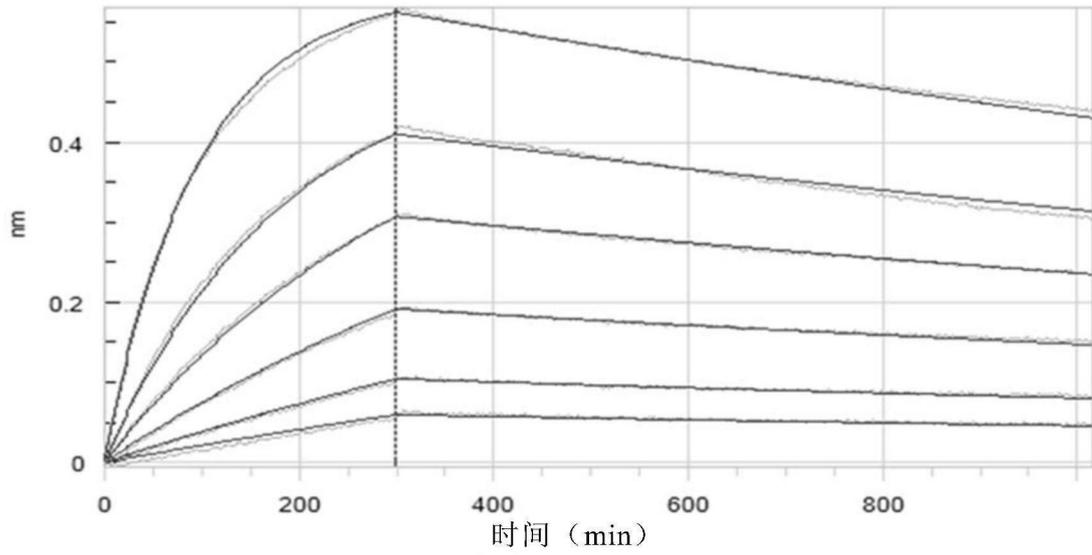


图4C

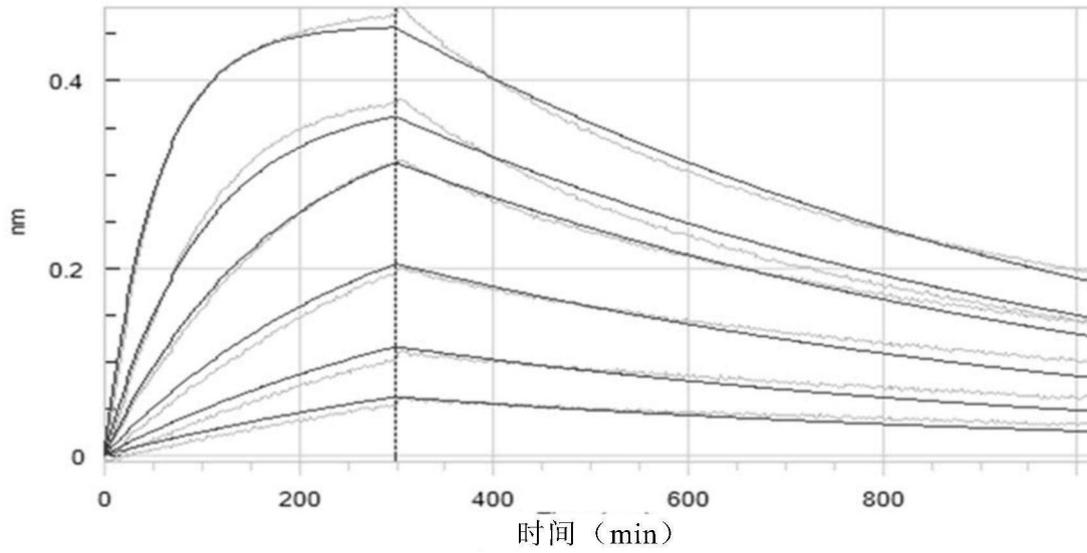


图4D

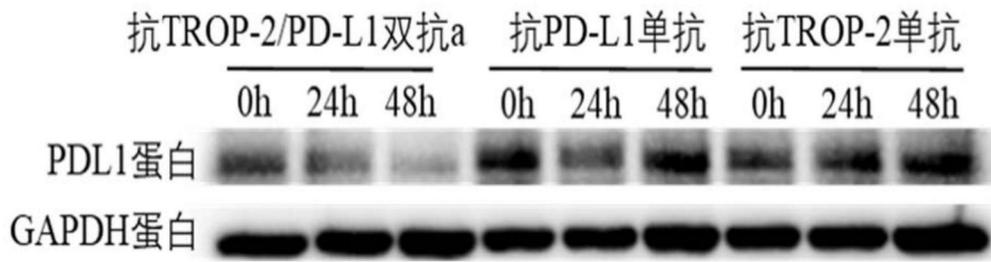


图5A

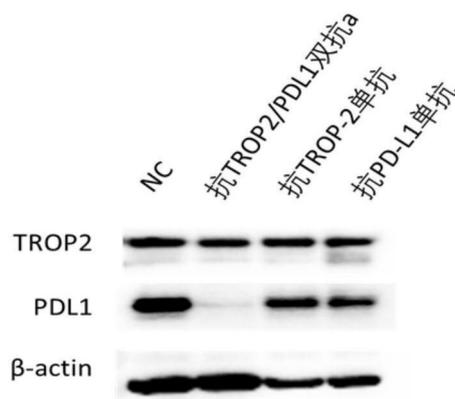


图5B

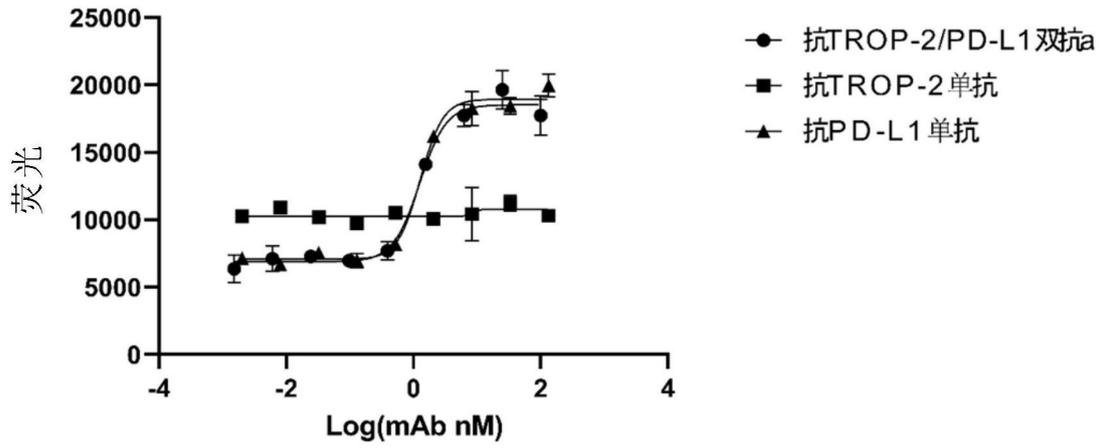


图6A

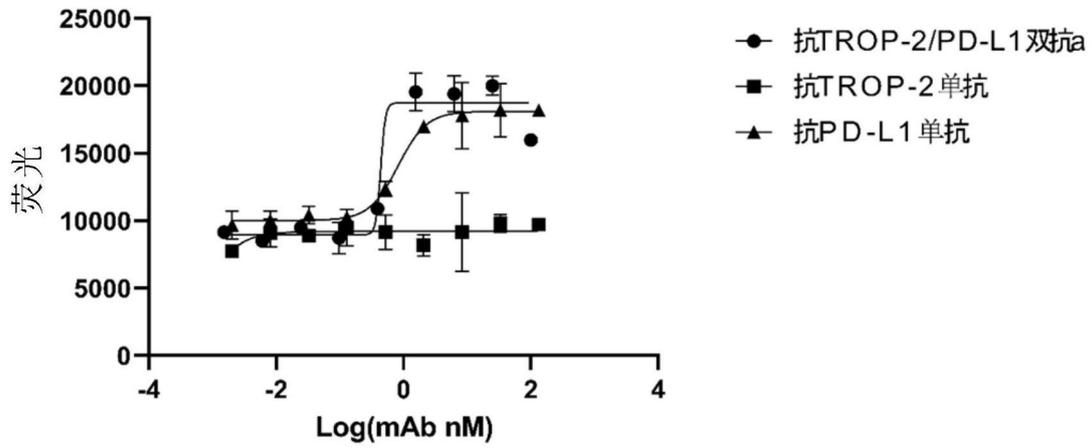


图6B

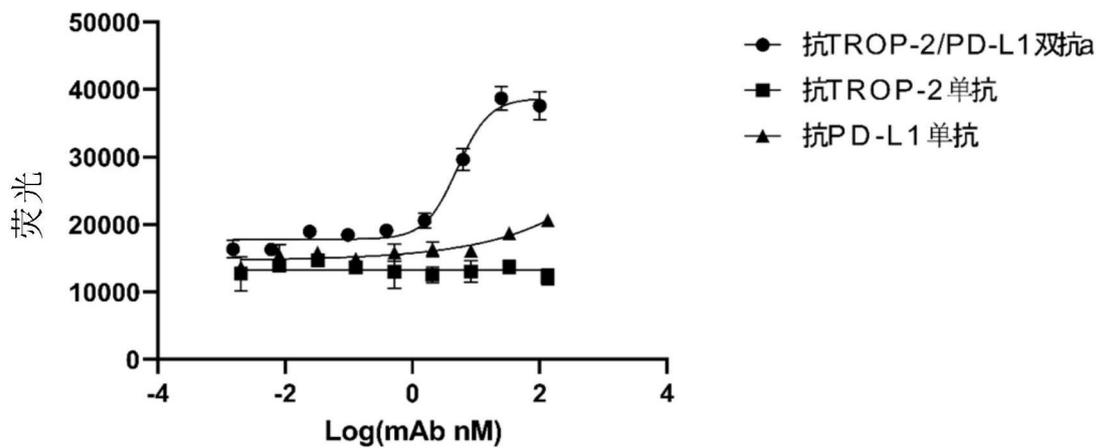


图6C

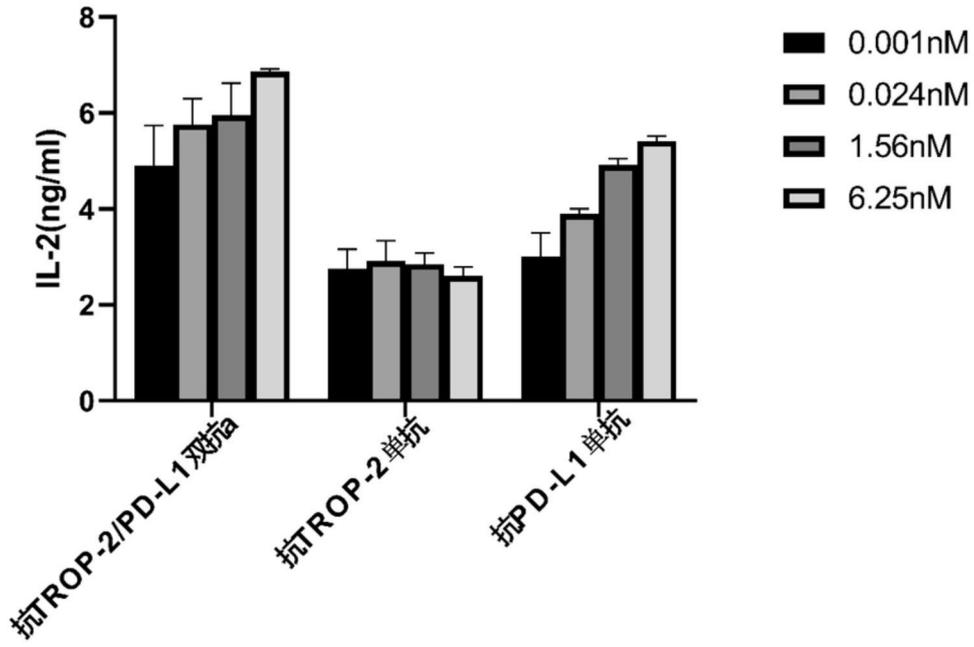


图7

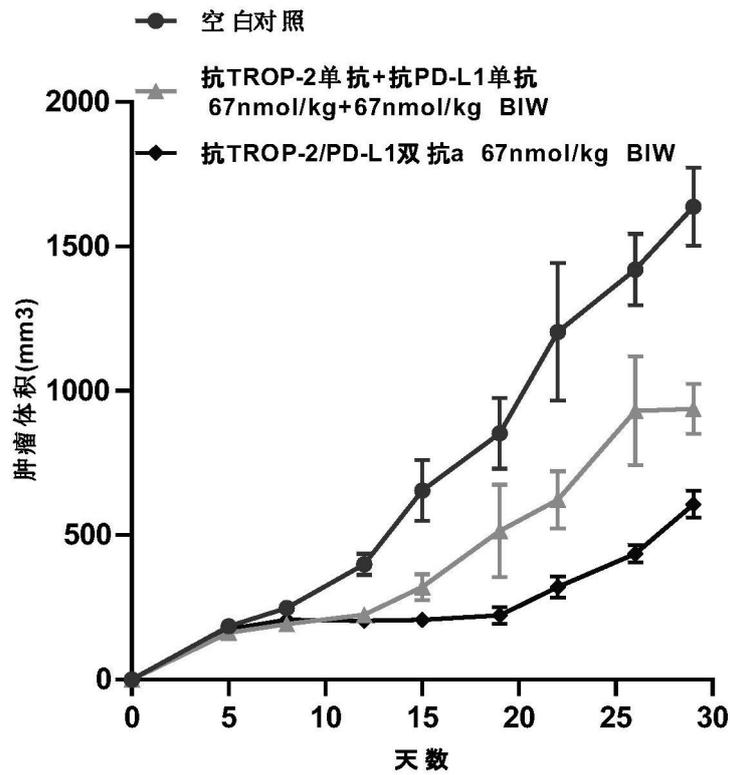


图8A

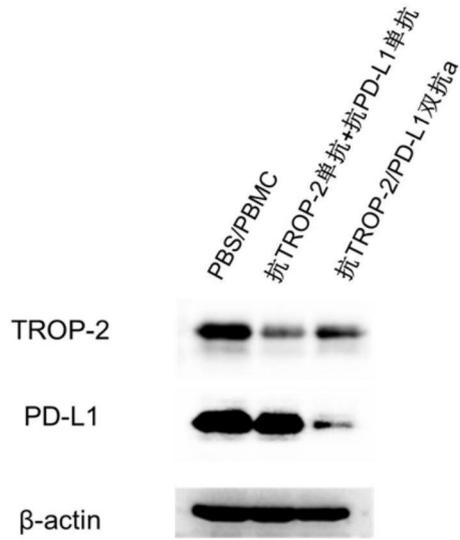


图8B

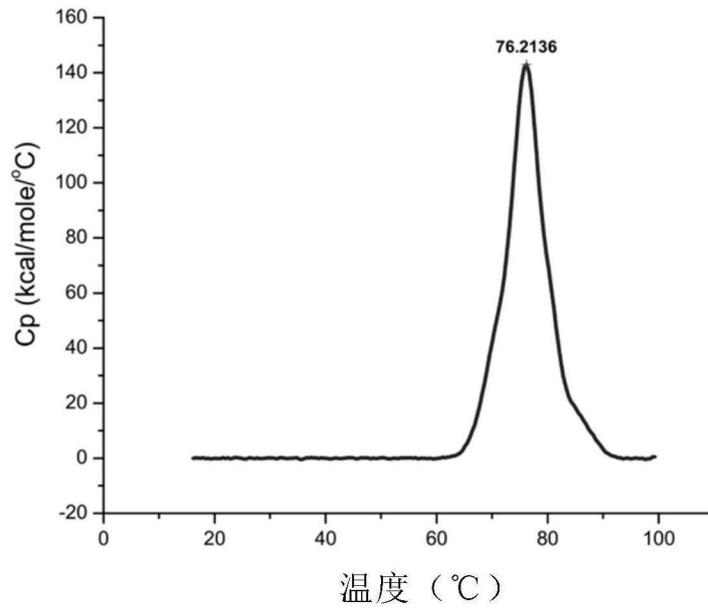


图9A

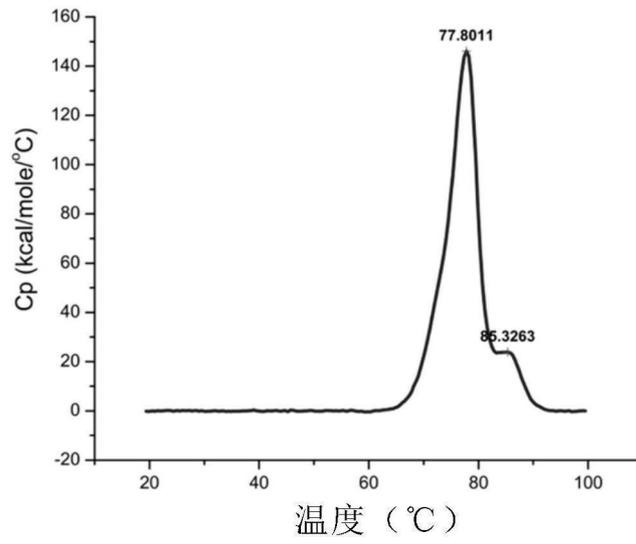


图9B

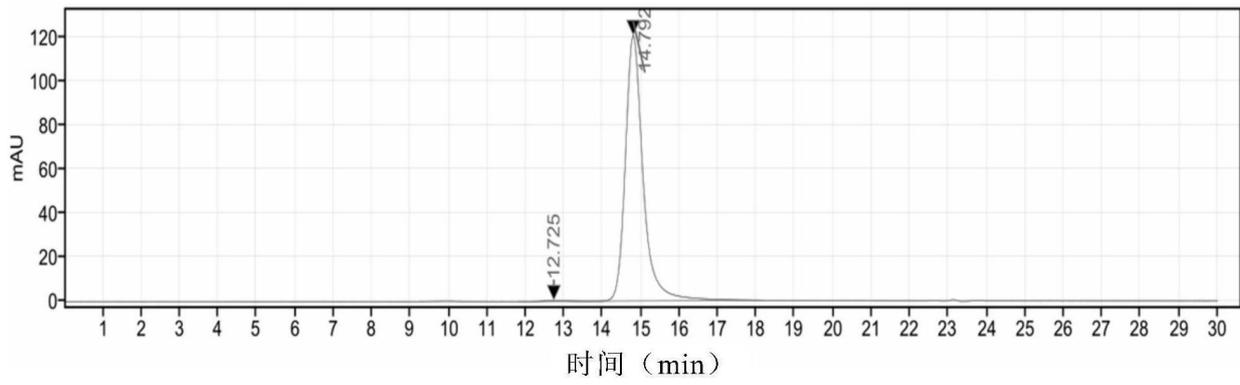


图9C

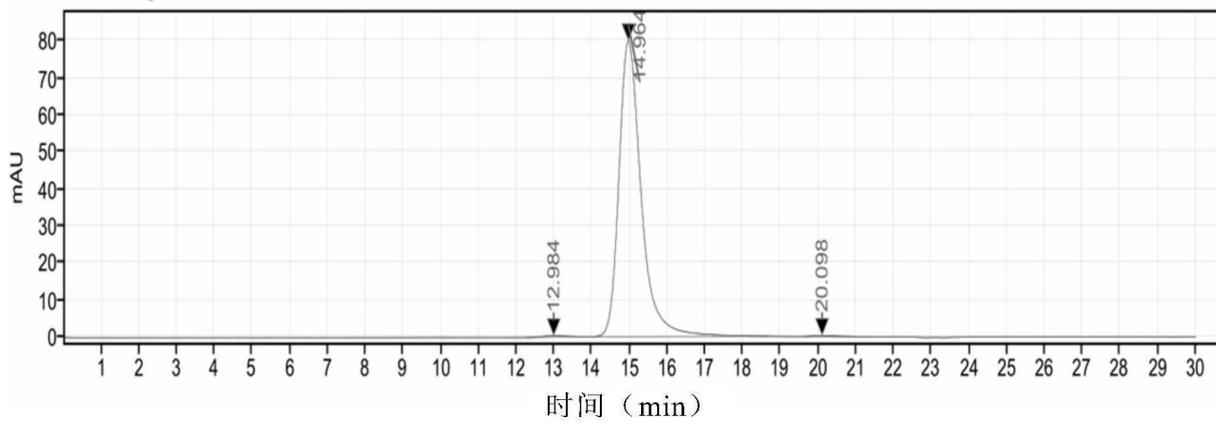


图9D