



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104185642 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 03

(21) 申请号 201280064787. 7

代理人 陶家蓉

(22) 申请日 2012. 12. 27

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C07K 16/46 (2006. 01)

61/580, 491 2011. 12. 27 US

C07K 16/18 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 06. 26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/071780 2012. 12. 27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/101909 EN 2013. 07. 04

(71) 申请人 财团法人生物技术开发中心

地址 中国台湾新北市康宁街 169 巷 101 号

申请人 DCB- 美国有限责任公司

(72) 发明人 徐悠深 许寿山 张铭一 骆正凯

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

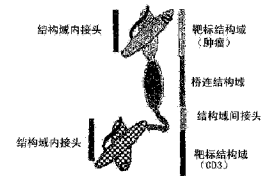
权利要求书1页 说明书11页
序列表3页 附图38页

(54) 发明名称

轻链桥连的双特异性抗体

(57) 摘要

本发明描述了用于临床治疗的具有免疫激活性质的新形式单体双特异性融合蛋白。双特异性融合蛋白包括对感兴趣的第一靶标具有特异性的第一靶向结构域;衍生自免疫球蛋白的轻链或重链的恒定区的桥连结构域,该免疫球蛋白可以是人免疫球蛋白;和对感兴趣的第二靶标具有特异性的第二靶向结构域。双特异性融合蛋白还可以包括融合到桥连结构域的N-端或C-端的接头。第一靶向结构域融合到桥连结构域并且第二靶向结构域融合到桥连结构域或接头上。接头可以包括GGGGS序列。感兴趣的第一靶标可以是CD20、Her2/neu或EpCAM,并且第二靶向结构域是T-淋巴细胞激活结构域。



结构域内接头, 例如, 可以包含以下接头序列之一:

1. GGGSGGGGS
2. GGGSSGGSSGGGGGS
3. GGGSSGGSSGGSSGGSSGGGS

ScFv靶向结构域的取向包含以下结构域取向之一:

1. 轻链可变-重链可变
2. 重链可变-轻链可变

桥连结构域, 例如, 可以包含以下轻链恒定结构域之一:

1. κ 链
2. λ 2 链
3. λ 3 链/也称为替代轻链

结构域间接头, 例如, 可以包含以下接头序列之一:

1. GGGGS
2. GGGSSGGGS
3. GGGSSGGSSGGGS

1. 一种双特异性融合蛋白,所述蛋白包含:
对感兴趣的第一靶标具有特异性的第一靶向结构域;
衍生自免疫球蛋白的轻链或重链的恒定区的桥连结构域;和
对感兴趣的第二靶标具有特异性的第二靶向结构域。
2. 如权利要求 1 所述的双特异性融合蛋白,其特征在于,还包含融合到所述桥连结构域的 N-端或 C-端的接头。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的双特异性融合蛋白,其特征在于,所述第一靶向结构域融合到所述桥连结构域或所述接头上并且所述第二靶向结构域融合到所述桥连结构域或所述接头上。
4. 如权利要求 1-3 中任一项所述的双特异性融合蛋白,其特征在于,所述免疫球蛋白是人免疫球蛋白。
5. 如权利要求 4 所述的双特异性融合蛋白,其特征在于,所述桥连结构域是 κ 链, λ 链, λ -5 替代轻链,或模拟轻链恒定区的所述 κ 链、所述 λ 链、所述 λ -5 替代轻链的突变体,或所述 κ 链、所述 λ 链、所述 λ -5 替代轻链的衍生物。
6. 如权利要求 2-5 中任一项所述的双特异性融合蛋白,其特征在于,所述接头包含 GGGGS 序列。
7. 如权利要求 1-6 中任一项所述的双特异性融合蛋白,其特征在于,所述第二靶向结构域是 T-淋巴细胞激活结构域。
8. 如权利要求 1-7 中任一项所述的双特异性融合蛋白,其特征在于,所述感兴趣的第一靶标是 CD20、Her2/neu 或 EpCAM。
9. 如权利要求 1-8 中任一项所述的双特异性融合蛋白,其特征在于,所述第一靶向结构域包含对所述感兴趣的第一靶标具有特异性的第一 ScFv,并且所述第二靶向结构域包含对所述感兴趣的第二靶标具有特异性的第二 ScFv。
10. 如权利要求 9 所述的双特异性融合蛋白,其特征在于,所述第一 ScFv 和所述第二 ScFv 各包含人序列。
11. 如权利要求 9 或 10 所述的双特异性融合蛋白,其特征在于,所述第一 ScFv 包含对第一抗原具有结合特异性的 VH-接头-VL 或 VL-接头-VH,并且所述第二 ScFv 包含对第二抗原具有结合特异性的 VH-接头-VL 或 VL-接头-VH。
12. 如权利要求 11 所述的双特异性融合蛋白,其特征在于,所述接头包含 GGGGS 序列。

轻链桥连的双特异性抗体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2011 年 12 月 27 日提交的临时申请系列号 61/580,491 的优先权,其公开通过引用全文纳入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及双特异性或多重特异性生物分子,诸如双特异性抗体的制备方法及其产物。

[0004] 发明背景

[0005] 结合具有不同功能的生物分子可能产生具有需要或改良性质的新分子。例如,在多特异性抗体,包括双特异性抗体和双特异性肿瘤靶向 T-淋巴细胞衔接子(engager)中的最新进展已经证明与单克隆抗肿瘤治疗相比,具有免疫活性性质的多重特异性分子经常在肿瘤治疗中递送增强的功效。

[0006] 例如,双特异性抗体(BsAb)可以由来自不同抗体的两种不同结合结构域(即,可变区)的片段组成。两种不同的结合结构域可以结合两种不同类型的抗原。这些分子可以在临床治疗中有所应用,诸如肿瘤免疫治疗。对于这类应用,BsAbs 可以被设计成同时结合细胞毒性细胞(使用受体如 CD3(Kurby immunology(Kurby 免疫学). San Francisco: W. H. Freeman. ISBN1-492-0211-4)) 和靶标如癌细胞(例如,癌细胞上的抗原)。

[0007] 双特异性和多重特异性蛋白的构建包括多个蛋白结构域的融合。然而,这样的融合可能由于融合伙伴不同的生物和/或生理性质而造成融合伙伴之间的不相容。另外,生理限制,包括肾过滤或循环途径的渗透性,也可能挑战医学上可用的多重特异性肿瘤靶向分子的设计。

发明内容

[0008] 本发明的实施方式涉及用于生物医学应用如临床治疗的具有免疫活性性质的新形式双特异性或多重特异性融合蛋白。这些蛋白包括通过桥连结构域连接的两个特异性结合结构域(靶向结构域),桥连结构域可以包括一个或两个任选的接头。桥连结构域可以衍生自抗体的免疫球蛋白结构域,使得融合蛋白中的不同伙伴是相容的并且可以保留需要的生物性质。可以用作桥的免疫球蛋白结构域可包括轻链恒定区或重链恒定区。这样的融合蛋白可以被称为轻链桥连的抗体或重链桥连的抗体。

[0009] 例如,本发明的实施方式所述的双特异性融合蛋白可以包括抗肿瘤生物标记,诸如 CD20(Hybridoma. 19832;17)、Her2/neu(Am J Clin Pathol 2003 120(suppl 1);S53) 或 EpCAM(J. Immunol. 1992 148(2);590),作为细胞靶向或生物分子靶向结构域的单链连接的 Fv 片段(ScFv),作为桥的轻链恒定结构域,任选的接头(其可以省去),和作为 T-淋巴细胞激活结构域的抗-CD3 ScFv。这样的轻链桥连的双特异性免疫激活剂同时显示出对肿瘤表达的细胞靶标和 T-淋巴细胞的结合特异性。结合两个靶标特异性地诱导对肿瘤靶标的 T-淋巴细胞-介导的细胞毒作用。

[0010] 除了上述的抗肿瘤 ScFv 示例以外,也可使用其他细胞-靶向结构域。这类其他分子可以具有对其他细胞靶标的特异性结合能力。除了 T-淋巴细胞激活结构域以外,其他细胞靶向结构域的示例可以包括具有所需特异性的 ScFv 或毒素多肽、酶、激素、细胞因子、信号分子。此外,本发明的实施方式所述的融合蛋白可以在原核或真核细胞中表达。另外,ScFv 的取向可以是轻链可变区连接到重链可变区上,或反之。这样的双特异性分子的应用包括药物应用,诸如载特定生物标记细胞的消耗治疗,诸如肿瘤治疗。另外,这样的分子可以在诊断应用中使用。

[0011] 本发明的一个方面涉及双特异性融合蛋白。本发明的一个实施方式所述的双特异性融合蛋白可以包括对感兴趣的第一靶标具有特异性的第一靶向结构域;衍生自免疫球蛋白的轻链或重链的恒定区的桥连结构域,该免疫球蛋白可以是人免疫球蛋白;和对感兴趣的第二靶标具有特异性的第二靶向结构域。靶向结构域可以对靶标生物分子或细胞有特异性。

[0012] 按照本发明的一些实施方式,双特异性融合蛋白还可以包括与桥连结构域的 N-端或 C-端融合的接头。第一靶向结构域融合到桥连结构域或接头上而第二靶向结构域融合到桥连结构域或接头上。接头可以包括 GGGGS 序列。感兴趣的第一靶标可以是 CD20、Her2/neu、EpCAM 等,并且第二靶向结构域可以是 T-淋巴细胞激活结构域,诸如抗-CD3。

[0013] 按照本发明的一些实施方式,双特异性融合蛋白可以省去上述的接头结构域,例如,其中对感兴趣的第一靶标具有特异性的第一靶向结构域和对感兴趣的第二靶标具有特异性的第二靶向结构域各直接融合到桥连结构域的两个末端。

[0014] 按照本发明的一些实施方式,双特异性融合蛋白可以包括间插在第一靶向结构域和桥连结构域之间,以及桥连结构域和第二靶向结构域之间的一个或多个上述的接头。即,第一靶向结构域和第二靶向结构域都与接头单独融合,这些接头与桥连结构域的两个末端融合。

[0015] 在任意的上述实施方式中,第一靶向结构域可以包括对感兴趣的第一靶标具有特异性的第一 ScFv,并且第二靶向结构域可以包括对感兴趣的第二靶标具有特异性的第二 ScFv。

[0016] 在任意的上述实施方式中,第一 ScFv 和第二 ScFv 各自可以包括人免疫球蛋白序列。在上述实施方式中,第一 ScFv 可以包括对第一抗原具有结合特异性的 VH-接头-VL 或 VL-接头-VH,并且第二 ScFv 可以包括对第二抗原具有结合特异性的 VH-接头-VL 或 VL-接头-VH。

[0017] 在任意上述实施方式中,接头可以包括一个或多个 GGGGS(G4S) 序列。例如,接头可以包括 1 个 G4S 序列、2 个 G4S 序列(重复)、3 个 G4S 序列等。另外,接头可以包括与 G4S 序列结合的其他氨基酸序列。例如,这类其他氨基酸序列可以包括铰链序列(例如,CPPCP)。

[0018] 从下面的详述和所附权利要求书很容易了解本发明的其他方面和优点。

[0019] 附图简要说明

[0020] 图 1A 和图 1B 显示了说明本发明的实施方式所述的各种双特异性 T-淋巴细胞激活剂的构建体的示意图。

[0021] 图 2A 和图 2B 显示了本发明的实施方式所述来自真核和原核表达系统的轻链桥连

双特异性 T- 淋巴细胞激活剂的表达和纯化。图 2B 显示了考马斯亮蓝染色 (组图 A) 和由 BL-21 (DE3)pLysS 表达的可溶蛋白上针对带 His- 标签的 LCBTA 的 Western 印迹 (组图 B) 。两个组图中的泳道 1 和 3 是 IPTG 诱导前的提取物。两个组图中的泳道 2 和 4 是用 IPTG 诱导的提取物。泳道 1 和 2 表示 Ka LCBTA-1 的 EpCAM 靶向。泳道 3 和 4 表示 Ka LCBTA-1 的 Her2/neu 靶向。

[0022] 图 3A 显示选择的肿瘤靶向单克隆抗体和轻链桥连的双特异性 T- 淋巴细胞激活剂的尺寸排阻 - 高效液相色谱 (SEC-HPLC) 分析。图 3B 显示 SEC-HPLC 分析轻链桥连的双特异性 T- 淋巴细胞激活剂的均匀性和它们的抗原结合活性以及产率的改善。

[0023] 图 4A 和 4B 显示了本发明的实施方式所述的结合 CD20⁺ 拉吉 (Raji) 淋巴瘤细胞、Her2/neu⁺BT474 乳腺癌细胞、EpCAM⁺HT29 结直肠癌细胞 (图 4A) 和 Jurkat 淋巴瘤细胞的 CD3 (图 4B) 的不同肿瘤靶向轻链桥连的双特异性抗体的示例。

[0024] 图 5 显示了本发明的实施方式所述的几个双特异性抗体的 Ig 轻链桥连的双特异性 T- 淋巴激活剂的瞬时表达的比较。

[0025] 图 6 证明了 La LCBTA 和 Ka LCBTA 的体外血清稳定性分析。

[0026] 图 7 显示在单克隆抗体和本发明的实施方式所述肿瘤靶向双特异性抗体 (同时靶向 EpCAM 和 Her2) 的刺激之后外周血单核细胞 (PBMC) 的细胞因子分泌概况的示例。

[0027] 图 8A 显示了本发明的实施方式所述 Ig 轻链桥连的双特异性 T- 淋巴细胞激活剂对 CD20⁺B- 淋巴瘤 (拉吉) 的细胞毒性。图 8B 显示了本发明的实施方式所述 Ig 轻链桥连的双特异性 T- 淋巴细胞激活剂对 Her2/neu⁺/EpCAM⁺ 结直肠癌 (HT29) 的细胞毒性。图 8C 显示了本发明的实施方式所述 Ig 轻链桥连的双特异性 T- 淋巴细胞激活剂对 Her2/neu⁺/EpCAM⁺ 胰腺癌 (Capan-1) 的细胞毒性。

[0028] 图 9A 显示由本发明的实施方式所述靶向 CD20 的 Ig 轻链桥连的双特异性 T- 淋巴细胞激活剂根除肿瘤的移植研究。图 9B 显示由本发明的实施方式所述靶向 Her2/neu 的 Ig 轻链桥连的双特异性 T- 淋巴细胞激活剂根除肿瘤的移植研究。图 9C 显示由本发明的实施方式所述靶向 EpCAM 的 Ig 轻链桥连的双特异性 T- 淋巴细胞激活剂根除肿瘤的移植研究。

[0029] 发明详述

[0030] 本发明的实施方式涉及用于生物医学应用如临床治疗的具有免疫激活性质的新形式双特异性或多重特异性融合蛋白。本发明的实施方式所述的单体双特异性或多重特异性免疫激活分子可以指轻链桥连的双特异性免疫激活剂 (LCBTA), 或更具体地指免疫球蛋白桥连的双特异性或多重特异性生物分子。本发明的实施方式所述的生物分子可以是双特异性的或多重特异性的。然而, 为清楚起见, 下面的说明书将这些分子称为“双特异性”分子。应理解这样提及“双特异性”旨在包括“双特异性”和“多重特异性”。

[0031] 本发明的实施方式所述的双特异性分子可以包括连接两个靶向结构域的桥连结构域。本发明的实施方式所述的桥连结构域可以包括蛋白或肽, 并且这两个靶向结构域可以分别连接桥连结构域的 N- 端和 C- 端。本发明的实施方式所述的这两个靶向结构域可以衍生自抗体的特异性结合结构域 (即, 可变区) 。这两个靶向结构域之一可以是 T- 淋巴细胞 - 激活结构域, 而另一个靶向结构域可以对靶标分子或细胞, 诸如肿瘤细胞、肿瘤抗原、病毒、细菌等有特异性。

[0032] 本发明的双特异性分子的示例可以包括下式 (I) 和 (VI) 中所示的那些, 其中 TgD

是靶向结构域, BD 是桥连接结构域, TAD 是 T- 淋巴细胞激活结构域, 并且 LNK 是接头:

[0033] TgD - BD - TAD 式 (I)

[0034] TAD - BD - TgD 式 (II)

[0035] TgD - LNK - BD - TAD 式 (III)

[0036] TAD - BD - LNK - TgD 式 (IV)

[0037] TgD - LNK - BD - LNK - TAD 式 (V)

[0038] TAD - LNK - BD - LNK - TgD 式 (VI)

[0039] 一些示例可以包括靶向结构域和桥连接结构域之间的接头。一些示例可以包括 T- 淋巴细胞 - 激活结构域和桥连接结构域之间的接头。一些示例可以包括靶向结构域和桥连接结构域之间的接头和 T- 淋巴细胞 - 激活结构域和桥连接结构域之间的另一个接头。

[0040] 按照本发明的实施方式, 靶向结构域 (TD) (例如, 肿瘤靶向结构域、抗原靶向结构域、生物分子靶向结构域等) 可以衍生自抗体的可变区。抗体衍生的靶向结构域可以包括轻链可变区和重链可变区, 其可以两种构型 (取向) 存在: (1) 轻链可变区在 N- 端而重链可变区在 C- 端, 或 (2) 重链可变区在 N- 端而轻链可变区在 C- 端。

[0041] 在靶向结构域 (例如, 肿瘤靶向结构域) 中, 重链可变区和轻链可变区可以与接头连接, 其可以包括任意合适的接头, 诸如短肽片段。例如, 本发明的实施方式所述的接头可以包括短肽, 其通常包括小氨基酸残基或亲水氨基酸残基 (例如, 甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、脯氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺等)。这样的肽的一个示例是 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (G4S)。其他示例可以在序列中包含这些氨基酸的变换, 诸如 GGGSG、GGSGG、GSGGG 或 SGGGG。其他示例可以包括含有 G 或 S 以外的氨基酸残基的肽, 诸如 GGTGS、GTSPGG、GNGGGS 等。本领域技术人员会理解许多常用的肽接头可以用于本发明的实施方式中。

[0042] 按照本发明的实施方式, 这样的短肽接头可以包括重复单元以增加接头长度。例如, 一些接头可以包括 2 个 G4S- 重复的接头、3 个 G4S- 重复的接头、或 4 个 G4S- 重复的接头。此外, 一些“重复-样”接头可以包括不同肽序列的混合物, 诸如 G4S-GGSGG-G4S-SGGGG。

[0043] 按照本发明的实施方式, 桥连接头可以包括肽片段, 优选衍生自抗体的片段。在优选的实施方式中, 桥连接结构域可以衍生自重链、轻链, 具体地重链或轻链中的恒定区。例如, 本发明的实施方式所述的桥可以衍生自轻链, 诸如 kappa (κ) 链、lambda-2 (λ -2) 链、或 lambda-5 (λ -5) 链 (或替代轻链)。在一些实施方式中, 桥可以包括衍生自轻链的区域或结构域, 诸如 kappa (κ) 链、lambda-2 (λ -2) 链, 或 lambda-5 (λ -5) 链的恒定区。相似地, 桥连接结构域可以衍生自重链或重链的区域 (例如, 恒定区)。本文使用的术语“衍生自”是指桥连接结构域与轻链或重链的结构域 (例如, 恒定区) 的全长序列具有基本的同源性 (例如, $\geq 50\%$, 优选 $\geq 70\%$, 更优选 $\geq 80\%$, 最优选 $\geq 90\%$)。

[0044] 另外, 按照本发明的实施方式, 桥连接结构域可以是模拟轻链恒定区的 κ 链、 λ 链、或 λ -5 (或替代轻链) 的突变体, 或 κ 链、 λ 链、或 λ -5 替代轻链的衍生物。本文使用的“突变体”是指保守性突变体或非保守性突变体。如本文所述, 本发明的实施方式所述的突变体保留了用作桥连接结构域的功能。本领域技术人员会理解保守性突变体包括用相似的氨基酸取代氨基酸并且通常会具有保持的生物活性或结构。保守性突变体可以包括 1-50 个氨基酸取代, 优选 1-30 个氨基酸, 更优选 1-20 个氨基酸, 并且最优选 1-10 个氨基酸。非保守性突变体可能具有一个或多个氨基酸残基, 例如 1-50 个氨基酸, 优选 1-30 个氨基酸, 更

优选 1-20 个氨基酸,并且最优选 1-10 个氨基酸的删除、取代或插入。

[0045] 按照本发明的一些实施方式,桥(或桥连结构域)可以与靶向结构域和 T-淋巴细胞激活结构域直接连接。按照本发明的其他实施方式,可以在桥和靶向结构域或 T-淋巴细胞激活结构域之间提供接头。按照本发明的其他实施方式,可以在桥和靶向结构域之间提供一个接头,并且在桥和 T-淋巴细胞激活结构域之间提供第二个接头。

[0046] 桥连结构域和靶向结构域或 T-淋巴细胞激活结构域之间的接头可与上述的那些结构域内接头相似。例如,桥连结构域和靶向结构域或 T-淋巴细胞激活结构域之间的接头可以包括 G4S 接头或 G4S- 重复接头(其可以是双重复、三重等)。另外,如上述,接头可以包括其他氨基酸序列。

[0047] 按照本发明的实施方式,T-淋巴细胞激活结构域可以用或不用间插结构域与桥连结构域的一个末端相连用于 T-淋巴细胞激活。各种 T-淋巴细胞激活分子为本领域已知,包括抗-CD3 抗体(单克隆或多克隆),或此类抗体的 CD3- 结合片段或配体或对 4-1BB 分子的抗体。例如,按照本发明的实施方式,T-淋巴细胞激活结构域可以包括针对 CD3 的单克隆抗体的可变区。在这样的实施方式中,可以在两个取向上使用可变区的重链和轻链:(1)轻链可变区位于 N- 端并且重链可变区位于 C- 端,或(2)重链可变区位于 N- 端并且轻链可变区位于 C- 端。

[0048] 与靶向结构域的描述相似,接头可连接 T-淋巴细胞结合结构域的重链可变区和轻链可变区。例如,这样的接头可以包括任意合适的氨基酸序列,诸如 G4S 或双、三或四 G4S- 重复的接头。另外,接头可以包括其他氨基酸序列。

[0049] 本发明的双特异性分子可以用于靶向细胞或分子,同时激活 T-淋巴细胞应答。用下面的工作实施例来说明这些分子的一些生物用途。

[0050] 免疫球蛋白轻链桥连的双特异性 T-淋巴细胞激活剂的产生

[0051] 在第一组示例中,抗-CD20、抗-Her2/neu 或抗-EpCAM ScFv(可变区的单链片段)用作细胞靶向结构域(CtD),并且选择抗-CD3 ScFv 作为 T-淋巴细胞激活结构域(TAD)。所选的 CtD 和 TAD 通过桥连接,例如其可能包括衍生自抗体轻链或重链的免疫球蛋白结构域。这类桥的示例可以包括选自人免疫球蛋白恒定区的那些。这类选自人免疫球蛋白恒定区的免疫球蛋白链桥的具体示例可能包括,但不限于以下所示的 SEQ ID No. 1、SEQ ID No. 2、SEQ ID No. 3 和 SEQ ID No. 4:

[0052] • SEQ ID No. 1:V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N
NF Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S
T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

[0053] - 人免疫球蛋白 κ 恒定区

[0054] • SEQ ID No. 2:G Q P K A A P S V T L F P P S S E E L Q A N K A T L V C
L I S D F Y P G A V T V A W K A D G S P V K A G V E T T T P S K Q S N N K Y A A
S S Y L S L T P E Q W K S H R S Y S C Q V T H E G S T V E K T V A P T E C S

[0055] - 人免疫球蛋白 λ 2 恒定区

[0056] • SEQ ID No. 3:V T H V F G S G T Q L T V L S Q P K A T P S V T L F P P
S S E E L Q A N K A T L V C L Met N D F Y P G I L T V T W K A D G T P I T Q G V
E Met T T P S K Q S N N K Y A A S S Y L S L T P E Q W R S R R S Y S C Q V Met H

E G S T V E K T V A P T E C S

[0057] - 人免疫球蛋白 λ5 恒定区

[0058] • SEQ ID No. 4 : T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K
D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T
V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K A E P K S C

[0059] - 人免疫球蛋白重链恒定区 1(CH1)

[0060] 按照本发明的一些实施方式, CtD 的 C- 端可以与所选桥 (例如, 衍生自人免疫球蛋白恒定区的桥) 的 N- 端融合。按照本发明的其他实施方式, CtD 的 C- 端可以与所选的接头序列的 N- 端融合, 并且该接头随后与所选桥 (例如, 衍生自人免疫球蛋白恒定区的桥) 的 N- 端融合。

[0061] 在轻链桥的 C- 端, 接头可以任选地与该桥的 C- 端融合。按照本发明的实施方式, 接头可以包括任意合适的上述肽序列。例如, 接头可以包括一个或多个 GGGGS 序列 (G4S), 含有或不含有其他序列 (例如, 铰链序列, CPPCP)。然后该构建体可以与 TAD 连接形成图 1 所示的双特异性分子。

[0062] 如上述, 本发明的一些实施方式可以在桥的 N- 端具有 TAD, 含有或不含有间插接头, 并且在桥的 C- 端具有 CtD, 含有或不含有间插接头。此外, 本领域技术人员会理解可以用针对其他靶标分子的其他特异性结合结构域取代 CtD。

[0063] 图 1 所示的 LCBTA 是二价 (双特异性) 分子, 具有针对细胞靶标的一价特异性和针对 T- 淋巴细胞上的 CD3 分子的另一价特异性。该 LCBTA 可以在哺乳动物、真核或原核细胞中表达并纯化, 例如通过轻链特异性亲和柱纯化至均一 (图 2)。SEC-HPLC (尺寸排阻 HPLC) 分析显示大多数的经纯化双特异性分子是单体形式 (图 3)。然而, ScFv 的取向、结构域间接头的长度、ScFv 结构域与桥连结构域的相容性、和 / 或翻译的效率可能影响双特异性分子的翻译和翻译后加工, 其可能导致多聚体形成的增加和 / 或改变的生物功能 (I 和 J, 图 3, 表 1)。

[0064] 表 1

[0065]

肿瘤靶标	桥形式	ScFvs 的取向	接头形式	FACS 分析	均匀性
				CD3 结合% (10 µg/ml)	
CD20	κ	HLHL	3*G4S	91.98	单体, 二聚体
CD20	κ	HLLH	3*G4S	23.1	单体
CD20	λ2	HLHL	1xG4S	88.8	单体, 二聚体

[0066]

CD20	$\lambda 2$	LHLH	1xG4S	12.2		单体
CD20	κ	HLLH	3*G4S	68.7		单体, 轻二聚体
EpCAM	κ	HLLH	3*G4S	5.73		单体
Her2/neu	κ	LHHL	3*G4S	81.44		单体, 二聚体
Her2/neu	κ	HLLH	3*G4S	35.61		单体, 二聚体
EpCAM	$\lambda 2$	HLLH	G4S	3.8		单体, 二聚体
EpCAM	$\lambda 2$	LHHL	G4S	74.46		单体, 二聚体
				EpCAM 结合%		
				10 $\mu\text{g}/\text{m}$ 1	1 $\mu\text{g}/\text{m}$ 1	
EpCAM	κ	HLLH	3*G4S	96.5 8	58.1	单体, 轻二聚体
EpCAM	$\lambda 2$	HLLH	3*G4S	86.7	7.37	单体

[0067] 除了取向、结构域间接头、结构域间相容性和翻译与翻译后修饰对单体或多聚体形成的影响以外, 结构域内接头也可能影响双特异性分子的生物性质。如图 3B 所示, 例如, 包括 G4SG4SG4S 的结构域内接头的 Ka Her2/neu 靶向 LCBTA-1 经工程改造包括结构域内接头 G4SG4S (Ka LCBTA-1-A) 和 G4SG4SG4SG4S (Ka LCBTA-1-B)。虽然对三种形式的 SEC-HPLC 和靶标结合分析显示出相似的结果, 在最终的蛋白产率中发现了显著的变化。

[0068] 参比双特异性抗体的构建

[0069] 构建 IgG-FL (免疫球蛋白 G 全长) 双特异性抗体 (BsAb) 作为参比 (参见图 1)。该 BsAb 包括位于 N-端的作为细胞靶向结构域 (CtD) 的全长抗-CD20 单克隆抗体和位于 C 端的作为 T-淋巴细胞-激活结构域 (TAD) 的两个抗-CD3 κ Fv。包括 GGGGSGGGGSCPPCPGGGS 肽, 其中含两个接头 (GGGS 或 G4S) 序列和铰链 (CPPCP) 序列的接头/铰链结构域可以插入到该参比 IgG-FL BsAb 的 CtD 和 TAD 之间 (图 1)。该 IgG-FL BsAb 是具有两个细胞靶标特异性结合位点和另两个 CD3 分子特异性结合位点的四价分子。

[0070] 除了上述的 IgG-FL BsAb 以外,也构建了两个串联-重复 BsAb 作为参比。如图 1 所示,串联-重复-1 具有位于 N-端作为 CtD 的抗-CD20ScFv、紧跟 CtD 的 C-端的 GGGGS 接头、和作为 TAD 的与接头 C-端融合的抗-CD3 ScFv。串联-重复-2 具有与串联-重复-1 相反顺序的 CtD 和 TAD,即,TAD 位于接头的 N-端而 CtD 位于接头的 C-端。

[0071] 结合试验

[0072] 细胞靶标和 T-淋巴细胞的结合特异性是双特异性分子治疗指标的重要部分。上述双特异性抗体的结果显示,具有作为 CtD 的一价抗-CD20、抗-Her2/neu 或抗-EpCAM ScFv 确实可以分别结合拉吉表达的 CD20、BT474 表达的 Her2/neu (ErbB2)、或 HT29 表达的 EpCAM。这种结合接近于单克隆抗-CD20、抗-Her2/neu 或抗-EpCAM 抗体(图 4A)。与二价单克隆抗-CD3 抗体相比,单价 TAD(抗-CD3 ScFv)融合至 LCBTA 的 C-端降低了与 Jurkat 表达的 CD3 分子的结合亲和力(图 4B)。这样的降低与二价参比形式(IgG-FL BsAb)是相当的(图 4B)。参比 IgG-FL BsAb 是类似于全抗体的双特异性抗体,只是有抗-CD3 ScFv 共价融合至各重链的 C-端(图 1)。

[0073] 免疫球蛋白轻链桥连的双特异性 T-淋巴细胞激活剂的表达

[0074] 在哺乳动物细胞系中瞬时转染的 LCBTA 的表达示于图 2、3 和 5。参比形式(IgG-FL BsAb)显示出表达率不低于 $1 \mu\text{g/ml}$,这与 λ 或 κ 桥连的 LCBTA 形式或其衍生物相似。桥连的结构域的生理学性质对于双特异性 T-细胞激活剂的表达和稳定性是重要的。例如, $\lambda 5$,也称为替代轻链,是由未成熟 B-淋巴细胞表达的免疫球蛋白轻链样蛋白。与 λ 或 κ 桥连的 LCBTA 相比,由哺乳动物的 $\lambda 5$ 桥连的 LCBTA 的瞬时表达降低。另外,与参比(如 λ 或 κ 桥连的 LCBTA)相比,作为 λ 或 κ 桥取代的来自 IgG1 的恒定重链结构域的 CH1 也导致弱表达率。

[0075] 桥连的 LCBTA 包括 4 个主要结构域;肿瘤靶向结构域,轻链桥,接头和 T-细胞激活结构域。与全分子相比,对任意这些结构域的改变可能诱导结构域间干扰并且导致功能的降低或丧失。如表 1 所示,将肿瘤靶向 ScFv 的取向/结构从轻链-重链(Ka LCBTA-1)改为重链-轻链会造成与 T-细胞激活结构域的结合降低,反之亦然。基于 SEC-HPLC 分析,这类取向操作也改变了单体产生的形成(图 3A)。在这些实施例中的接头结构域包括一小段重复的 4 个甘氨酸和 1 个丝氨酸。结果显示结构域间接头的长度或大小可以大幅度影响桥连 LCBTA 分子的生物特征(表 2)。

[0076] 表 2

[0077]

肿瘤靶标	桥形式	ScFv 的取向	接头形式	细胞毒性 EC50 pM	产率(瞬时 mg/L)	均匀性
CD20	κ	LHHL	3*G4S	0.1	0.9	单体
CD20	κ	LHHL	1*G4S	10	0.4	单体, 二聚体

[0078] 也通过 SEC-HPLC 检查表达的桥连 LCBTA 来评价多聚体 LCBTA 的污染。不希望的多聚体双特异性分子污染的升高造成使用 ScFv 作为组分的其它开发者的问题。如图 3 所

示,无论何种靶向分子,大多数经纯化的桥连 LCBTA 是单体形式。另外, κ 或 λ 作为桥连并不影响 LCBTA 单体的均匀性。

[0079] 串联重复 BsAb 的表达是高度 ScFv 依赖性的,因为从 N 端到 C 端颠倒 ScFv 抗体或相反会造成蛋白表达率的显著变化。结果,LCBTA 展现出的表达率优于串联重复 BsAb 形式(参见,例如,泳道 1 和 2,图 5),并且当 TAD 位于分子的 C-端时,这样的差异进一步扩大。

[0080] ScFv 或片段化的 Ig 分子的短血清稳定性已经是生物制药界中的常识(Cancer Res August 8, 2000 60; 433)。轻链作为桥时,含有 ScFv 的双特异性分子的稳定性示于图 6。结果表明即使在血清中 37°C 孵育一周后,两种形式的 LCBTA 仍使得超过 50% 的 ScFv 稳定。

[0081] Ka LCBTA 和单克隆抗体处理的 PBMC 的炎性细胞因子分泌概况。

[0082] 已知抗-CD3 单克隆抗体处理诱导 T-淋巴细胞的激活和炎性细胞因子的增强分泌(图 7)。如图 7 所示,除了 IL-8,桥连 LCBTA 并不诱导炎性细胞因子的分泌。桥连 LCBTA 并不包括任意重链恒定序列,并且,因此 FcR 介导的激活无法解释 IL8 的升高。低炎性细胞因子分泌概况表明 T-淋巴细胞依赖性治疗的副作用的风险降低。

[0083] 免疫球蛋白轻链桥连的双特异性 T-淋巴细胞激活剂的细胞毒性

[0084] 为了证明本发明的实施方式的生物功能,测试了靶向 CD20 的 κ -桥连的 LCBTA、抗-CD20 mAb 和 IgG-FL BsAb 的抗肿瘤能力(图 1 和 8)。如图 8 所示, κ -桥连的 LCBTA 在肿瘤根除中高度有效,具有亚 pM 范围内的 EC50,与抗-CD20mAb 的 22pM 或 IgG-FL BsAb 的个位数 pM 形成对比。 κ -桥连的 LCBTA 也显示出最高达 90% 的最大肿瘤根除率,而抗-CD20mAb 只有 35%, IgG-FL BsAb 为 75%。

[0085] 为了证明本发明的实施方式的生物功能,在 Her2/neu⁺ 和 EpCAM⁺HT29 结直肠癌细胞上测试靶向 Her2/neu 或 EpCAM 的 κ -桥连的 LCBTA 以评价它们的肿瘤根除能力(图 8B)。如图 8B 所示,靶向 Her2/neu 和 EpCAM 的 κ -桥连的 LCBTA 在肿瘤根除中高度有效,具有最高达 100% 的最大细胞毒性,与抗-Her2/neu 和抗-EpCAM mAb 分别为 28% 和 51% 的肿瘤杀伤率形成对比。

[0086] 为了证明本发明的实施方式的生物功能,在 Her2/neu⁺ 和 EpCAM⁺Capan-1 胰腺癌细胞上测试靶向 Her2/neu 或 EpCAM 的 κ -桥连的 LCBTA 以评价它们的肿瘤根除能力(图 8C)。如图 8C 所示,靶向 Her2/neu 和 EpCAM 的 κ -桥连的 LCBTA 在肿瘤根除中都是高度有效的,靶向 Her2/neu 和 EpCAM 的 κ -桥连的 LCBTA 分别具有超过 75% 和 100% 的最大细胞毒性率,与抗-Her2/neu 和抗-EpCAM mAb 分别为 39% 和 34% 的肿瘤杀伤率形成对比。

[0087] 荷瘤动物的异种移植分析

[0088] 为了证明本发明的实施方式的治疗潜力,在荷有 CD20⁺ 人淋巴瘤(拉吉细胞)的 SCID 小鼠上测试靶向 CD20 的 κ -桥连的 LCBTA 和抗-CD20mAb 的抗肿瘤能力(图 1 和 8)。在治疗之前,用拉吉细胞和 PBMC 皮下接种 SCID 小鼠。如图 9A 所示,用 Ka LCBTA 作为治疗剂处理的动物与用抗-CD20mAb 作为治疗剂处理的动物相比,发展出的肿瘤小得多。

[0089] 为了证明本发明的实施方式的治疗潜力,在荷有 Her2/neu⁺ 人结直肠癌(HT29 细胞)的 SCID 小鼠上测试靶向 Her2/neu 的 κ -桥连的 LCBTA 和抗-Her2/neu mAb 的抗肿瘤能力(图 1 和 8)。在治疗之前,用预混有预激活的或未处理(naive)的 PBMC 的 HT29 细胞皮下接种 SCID 小鼠。如图 9B 所示,用靶向 Her2/neu 的 Ka LCBTA 作为治疗剂处理的动物与用抗-Her2/neu mAb 作为治疗剂处理的动物相比,发展出的肿瘤明显较小。

[0090] 为了证明本发明的实施方式的治疗潜力,在荷有 EpCAM⁺ 人结直肠癌 (HT29 细胞) 的 SCID 小鼠上测试靶向 EpCAM 的 κ -桥连的 LCBTA 和抗 -EpCAM mAb 的抗肿瘤能力 (图 1 和 8)。在治疗之前,用预混有预激活的 PBMC 的 HT29 细胞皮下接种 SCID 小鼠。如图 9B 所示,靶向 EpCAM 的 κ LCBTA 有效抑制了肿瘤发展。

[0091] 构建双特异性抗体

[0092] 限制性酶购自多个供应商。DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶 Klenow 酶和 T4DNA 聚合酶来自英杰公司 (纽约州格兰德岛 (Grand Island, NY))。所有的酶按照制造商所推荐地使用。

[0093] 所有用于 PCR 扩增的引物购自供应商。DNA 扩增在 PCR 仪器中如下进行:使用 94°C 下 2 分钟的预变性步骤,之后是 35 个如下循环:变性步骤 (94°C)、退火步骤 (50°C) 和延伸步骤 (72°C) 各持续 50 秒。

[0094] 所有的表达模块如图 1 所示。

[0095] 抗 -CD20、抗 -Her2/neu 和抗 -EpCAM 轻链以及截短的重链被分别克隆到载体 pGEM 中。抗 -CD20、抗 -Her2/neu 和抗 -EpCAM VH 以及 VL 的单链片段被克隆到载体 TCAE8 并用于后续的抗肿瘤 ScFv。

[0096] 细胞系制备

[0097] 用于本发明的拉吉、BT474、Capan-1 和 HT29 细胞分别是生物资源收集和研究中心 (BCRC) 得到的 B- 淋巴肿瘤细胞系、乳腺癌细胞系、胰腺癌细胞系和结直肠癌细胞系,该研究中心是中国台湾的食品工业发展研究所 (FIRDI) 的分支机构。Jurkat 细胞是来自 ATCC 的 T- 淋巴瘤细胞系。拉吉和 Jurkat 细胞都培养在补充 10% 胎牛血清 (海克隆公司 (Hyclone))、0.03% L- 谷氨酰胺和 0.4mM 丙酮酸钠的 RPMI1640 培养基 (英国佩斯利的 GibcoBRL 生命技术公司 (GibcoBRL Life Technologies)) 中。在 37°C 下含有 5% 的 CO₂ 的潮湿培养箱中孵育之后,细胞传代培养或在无菌缓冲液中洗涤用于测试。按照 ATCC 的指南来培养 BT474、Capan-1 和 HT29。

[0098] 外周血单核细胞 (PBMC) 的制备

[0099] 用 Ficol1-Paque PLUS 通过密度离心从正常健康成人供体的全血中分离外周血单核细胞 (PBMC)。在分离后,PBMC 在补充 10ng/ml 的抗 -CD3mAb、75IU/ml 的白介素 -2 (IL-2)、和 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中培养并预激活 5-10 天。

[0100] 细胞毒性试验 (钙黄绿素 AM 细胞毒性)

[0101] 靶细胞 (拉吉细胞) 在补充 5% FBS 的无酚红 RPMI1640 培养基中在 37°C 下用 10 μ M 的钙黄绿素标记 30 分钟。在钙黄绿素孵育结束时,用含有 5% FBS 的无酚红 RPMI1640 培养基洗涤细胞 2 次,并且用含有 5% FBS 的无酚红 RPMI1640 培养基将细胞密度调节至 3 \times 10⁵ 细胞 /ml。对于反应混合物,各自含有 3 \times 10⁴ 细胞的 100 μ l 等分的培养基被放置在 96- 孔培养平板的各孔中。计算效应细胞 (PBMC) 培养物的细胞密度并且用含有 5% FBS 的无酚红 RPMI1640 培养基调节至 3 \times 10⁶ 细胞 /ml。对于细胞毒性试验,不同量的不同 BsAb 和 100 μ l (3 \times 10⁵ 细胞) 的效应细胞被加入到预加载拉吉细胞的 96 孔培养板中并且在 37°C 下,5% CO₂ 富集的培养箱中孵育 4 小时。在孵育结束时,培养板在 700g 下离心 5 分钟。然后,130 μ l 来自各反应孔的上清被单独转移至新的平板上并在融合 α 微板读数仪 (Fusion alpha micro-plate reader) 中定量释放的染料。细胞毒性的百分比按照下式计算:

[0102] [荧光(样品)-荧光(对照)]/[荧光(总-裂解)-荧光(对照)]*100。

[0103] 总-裂解定义为用 0.9% 的曲通处理 10 分钟的靶细胞。

[0104] 流式细胞分析试验

[0105] 肿瘤靶标(B-淋巴瘤)的结合亲和力

[0106] 靶细胞,包括拉吉、BT474 和 HT29 细胞 (1×10^6 细胞 / 反应),在室温下用不同浓度的不同 BsAb 处理 30 分钟。在孵育结束时,所有反应用补充 2% FBS 的 PBS 洗涤 2 次。在洗涤之后,细胞用 $1 \mu\text{l}$ 的 FITC 偶联的、亲和纯化的 F(ab')₂ 片段、羊抗人 IgG(Fab')₂ 片段特异性抗体在室温下再次孵育 30 分钟。在孵育之后,细胞用冰冷的补充 2% FBS 的 PBS 洗涤 2 次并且由 FACS 设备监测。

[0107] Jurkat 细胞 (1×10^6 细胞 / 反应) 在室温下用不同浓度的不同 BsAb 处理 30 分钟。在孵育结束时,所有反应用补充 2% FBS 的 PBS 洗涤 2 次。在洗涤之后,细胞用 $1 \mu\text{l}$ 的 FITC 偶联的、亲和纯化的 F(ab')₂ 片段、羊抗人 IgG(Fab')₂ 片段特异性抗体在室温下再次孵育 30 分钟。在孵育之后,细胞用冰冷的补充 2% FBS 的 PBS 洗涤 2 次并且由 FACS 设备监测。

[0108] 免疫球蛋白轻链桥连的双特异性抗体的原核克隆和表达

[0109] 需要的肿瘤靶向轻链桥连的双特异性抗体的相应合成基因使用 Nco I 和 Xho I 限制性位点克隆进 pET20b 载体中。大约 20ng 的各重组构建体被转化到 Novagen® BL21 (DE3) pLysS (EMD 密理博公司 (EMD Millipore)) 中,在补充氨苄青霉素 ($100 \mu\text{g/ml}$) 的 LB 琼脂平板上筛选转化体。

[0110] 含有重组构建体的 BL21 (DE3) pLysS 的单菌落在 5mL 的补充有氨苄青霉素的 LB 中 37°C 生长过夜。培养物在振荡条件下 37°C 下孵育。然后当菌群达到 0.6-0.7 的 OD₆₀₀ 时加入诱导剂 (IPTG)。在 0 小时和过夜孵育后通过离心 ($4000 \times g$ 持续 15 分钟) 来收获等分。为了验证靶标特异性轻链桥连的双特异性抗体的表达,通过 SDS-PAGE (4 ~ 12% 丙烯酰胺) 来分析溶解部分的总蛋白提取物。通过加入样品缓冲液并且煮沸 5 分钟来制备样品。在分离后,用 0.1% 考马斯亮蓝 R-250 对胶进行染色。使用抗 -His mAb 分析 Western 印迹。

[0111] 上述实施例证明了本发明的实施方式的效用,这些实施方式是双特异性或多重特异性分子。上述实施例也表明可以使用各种靶向结构域来靶向不同的分子或细胞。因此,本领域技术人员会理解可以与在本文所述的双特异性分子相同的框架中使用对于不同靶标的其他靶向结构域。因此,本发明的范围不限于实施例中所显示的特别优选的实施方式。

[0112] 尽管已经用有限数量的实施方式描述了本发明,但是本领域技术人员得益于本发明的公开,会理解能设计出其他的实施方式而在不偏离本文所揭示的本发明范围。因此,本发明的范围应仅由所附权利要求书限定。

[0001]

序列表

<110> 财团法人生物技术开发中心 (Development Center for Biotechnology DCB-USA LLC)

<120> 轻链桥连的双特异性抗体

<130> 17787/005W01

<150> US 61/580,491

<151> 2011-12-27

<160> 4

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> I05

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

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

<210> 2

<211> I06

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

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

[0002]

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 85 90 95
 Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105
 <210> 3
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 3
 Val Thr His Val Phe Gly Ser Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Ser Gln
 1 5 10 15
 Pro Lys Ala Thr Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 20 25 30
 Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Met Asn Asp Phe Tyr
 35 40 45
 Pro Gly Ile Leu Thr Val Thr Trp Lys Ala Asp Gly Thr Pro Ile Thr
 50 55 60
 Gln Gly Val Glu Met Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 65 70 75 80
 Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Arg Ser Arg
 85 90 95
 Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Met His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 100 105 110
 Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 115 120
 <210> 4
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 4
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 1 5 10 15
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 20 25 30
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 35 40 45
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 50 55 60
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 65 70 75 80
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala

[0003]

85

90

95

Glu Pro Lys Ser Cys
100

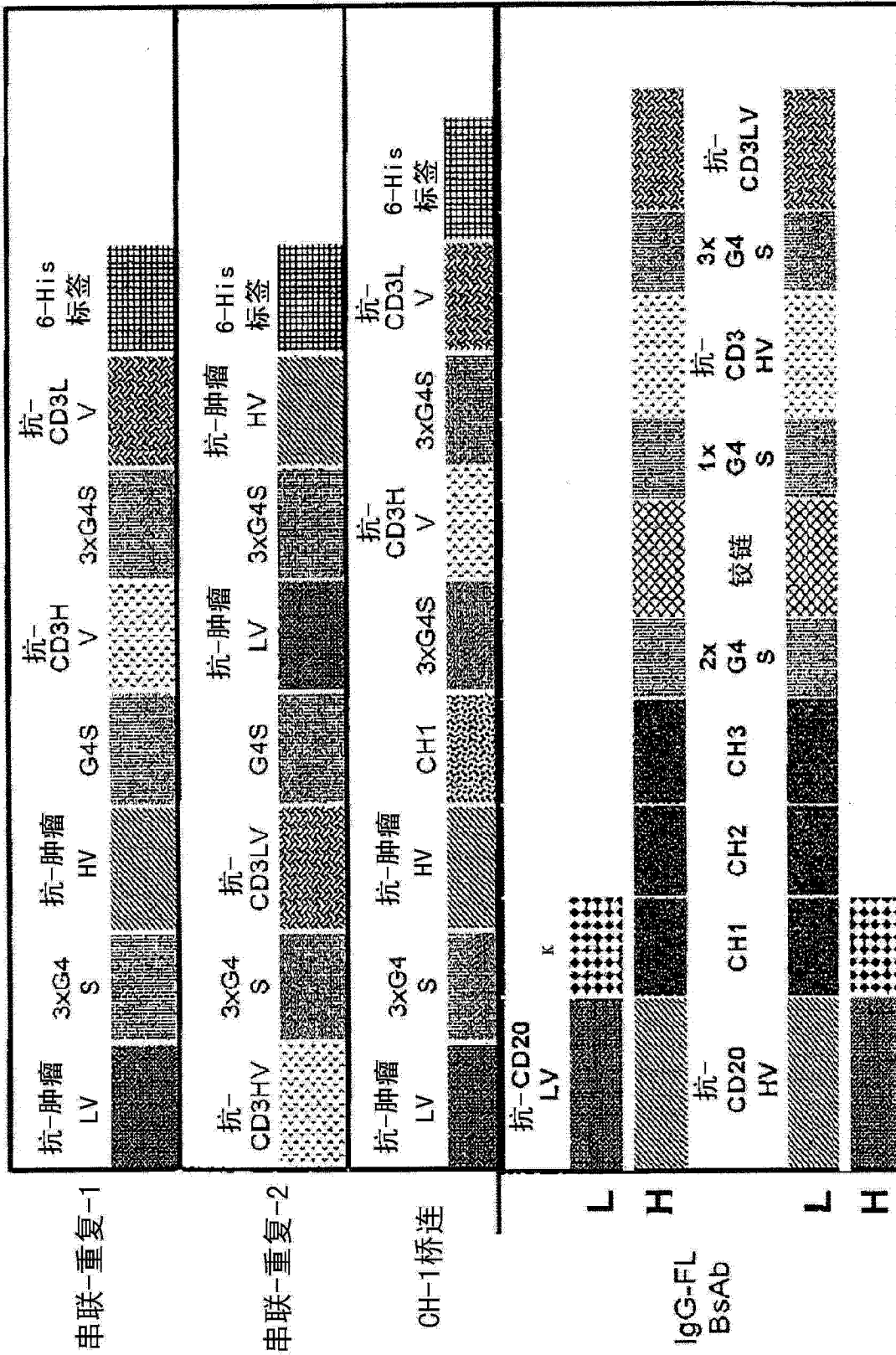


图 1A

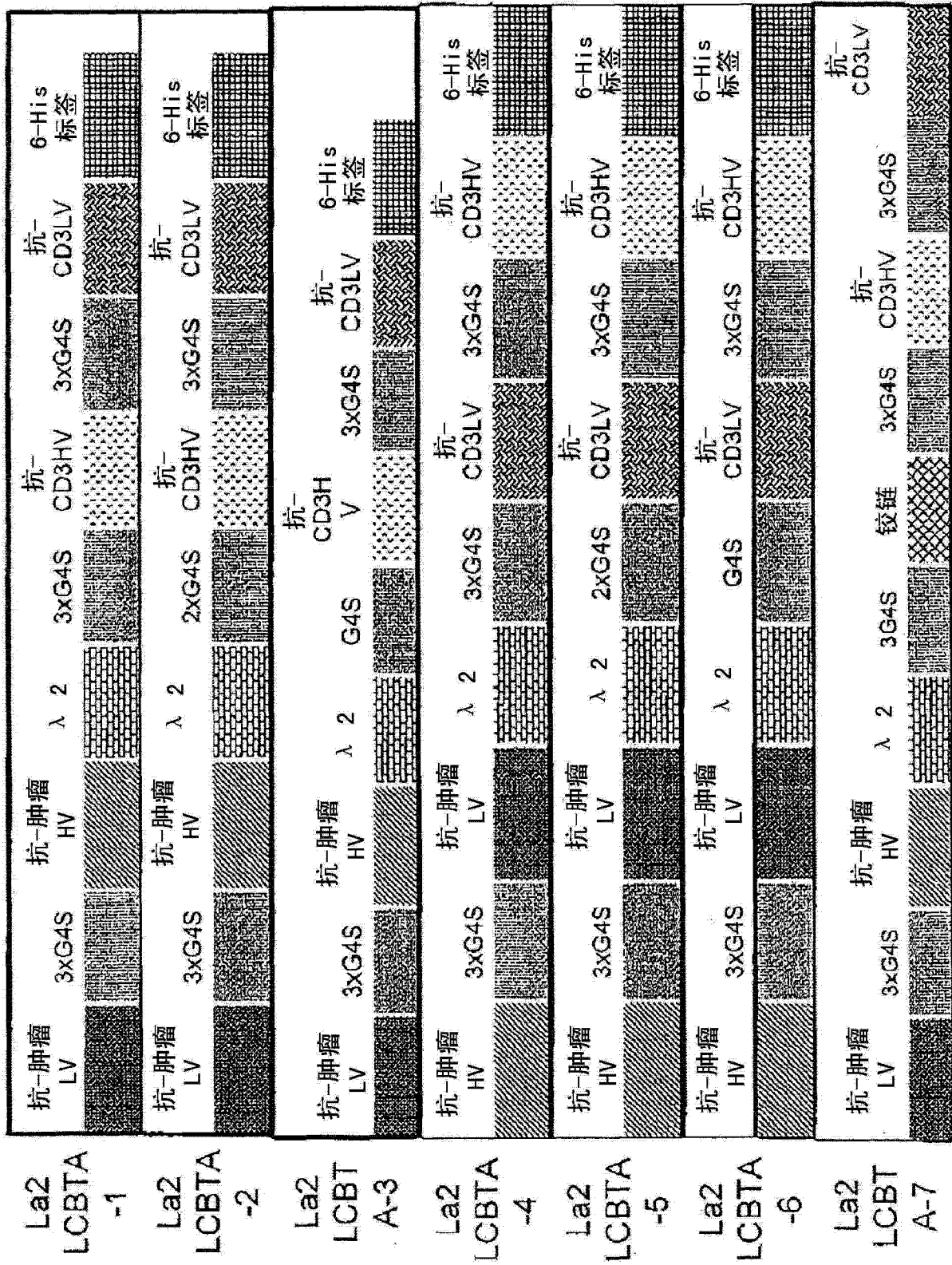


图 1A(续)

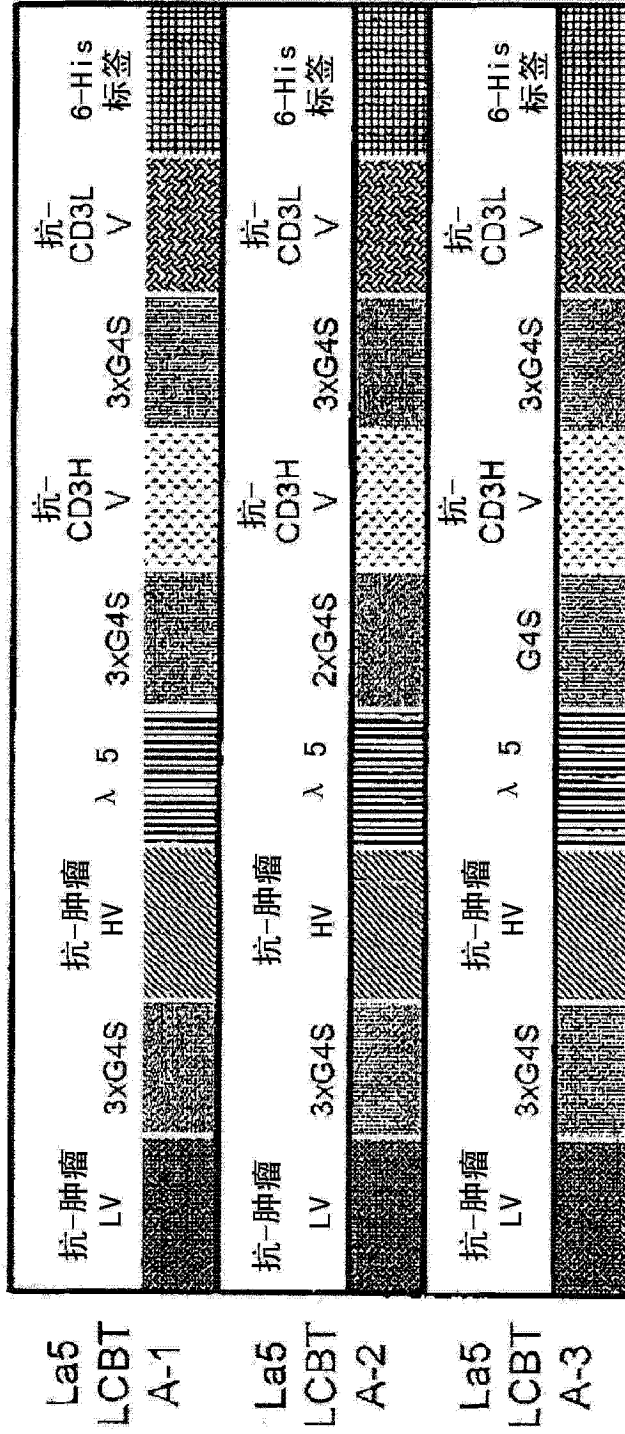


图 1A(续)

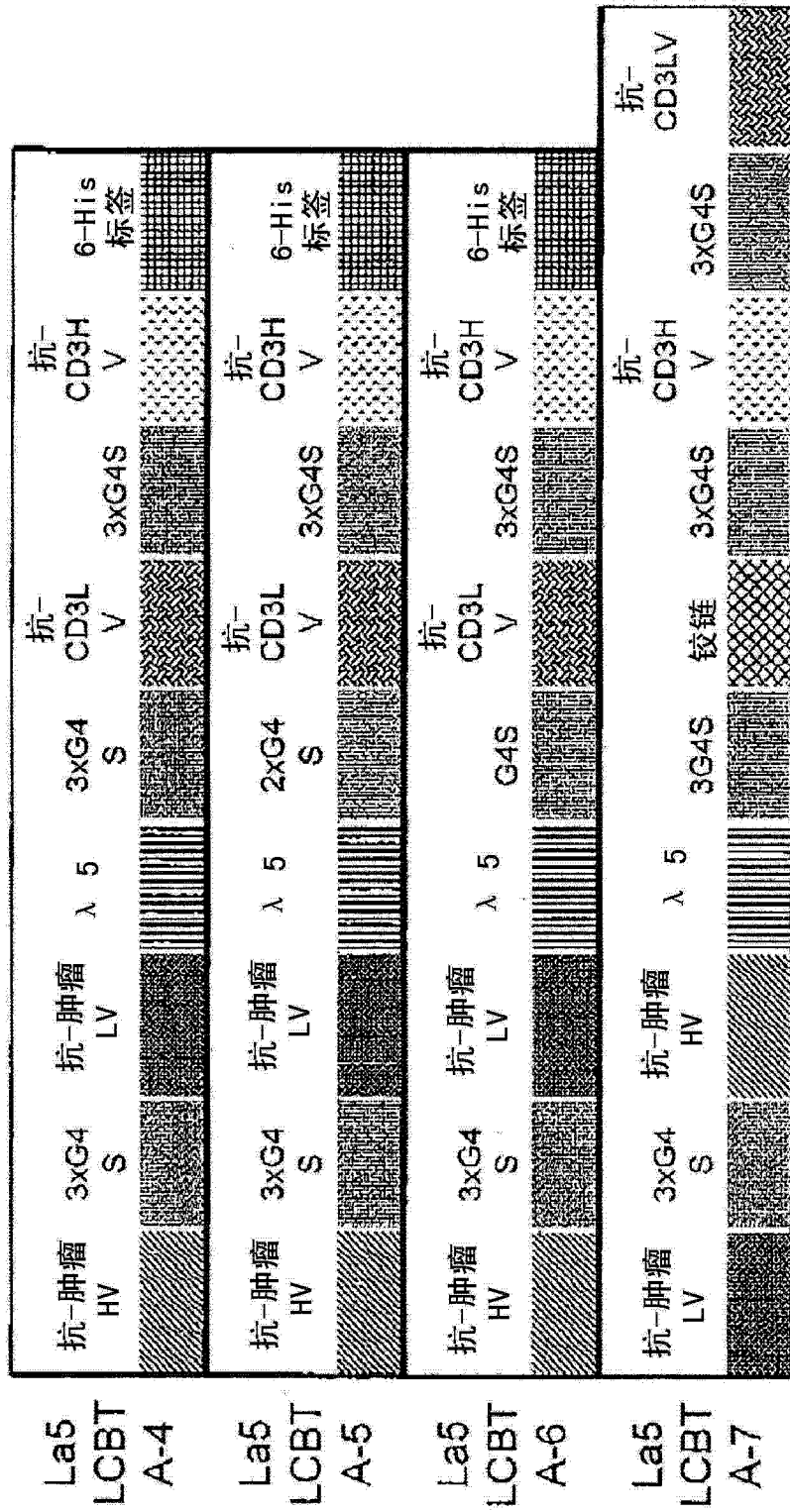


图 1A(续)

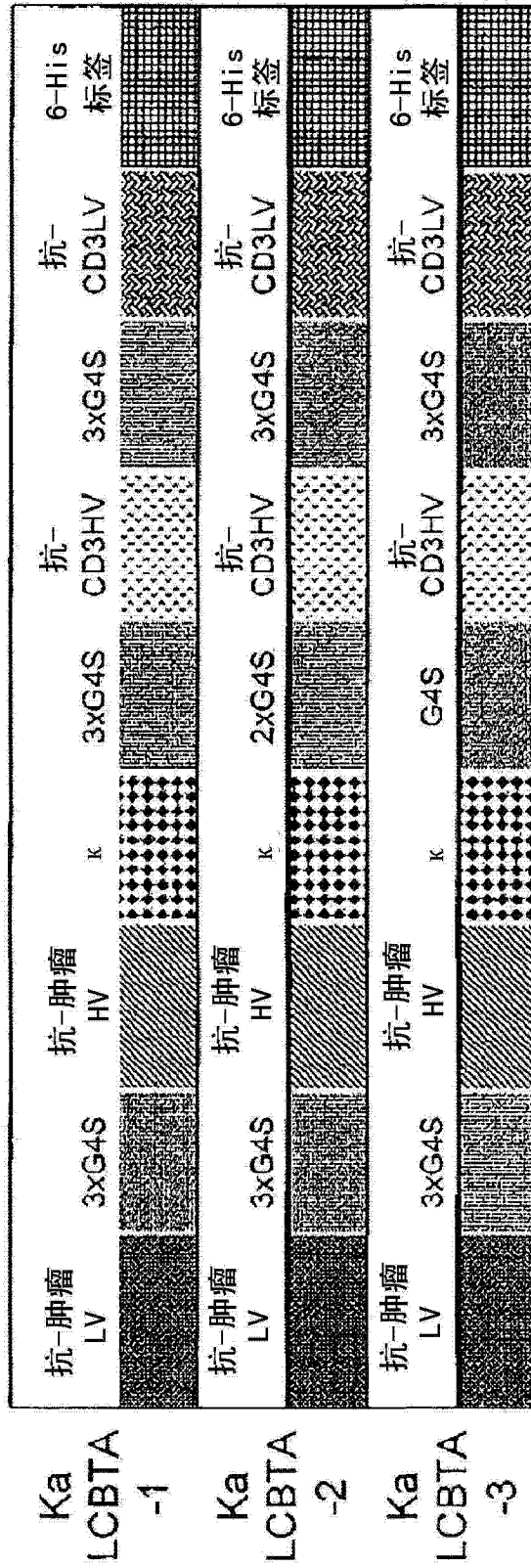


图 1A(续)

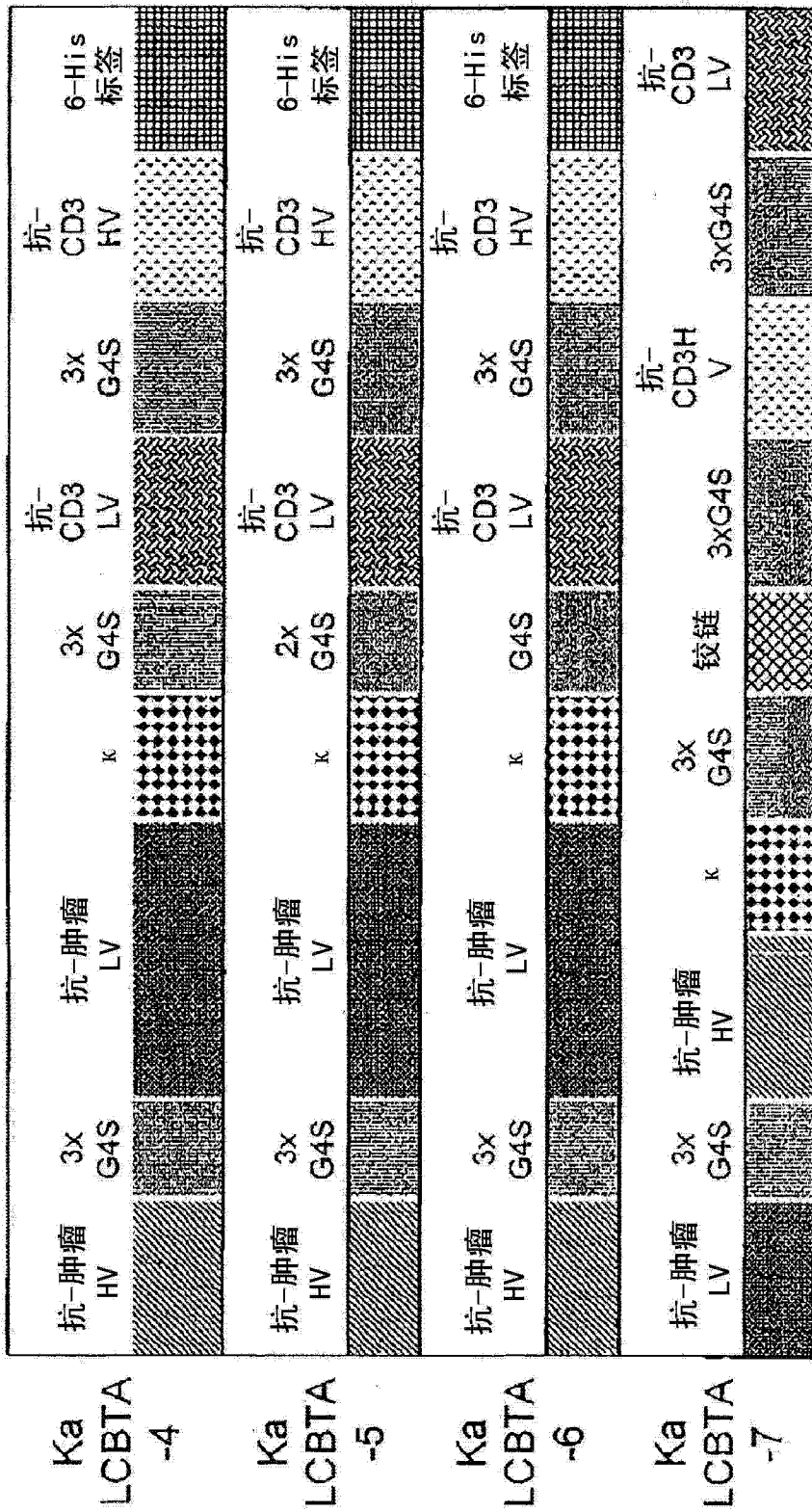


图 1A(续)

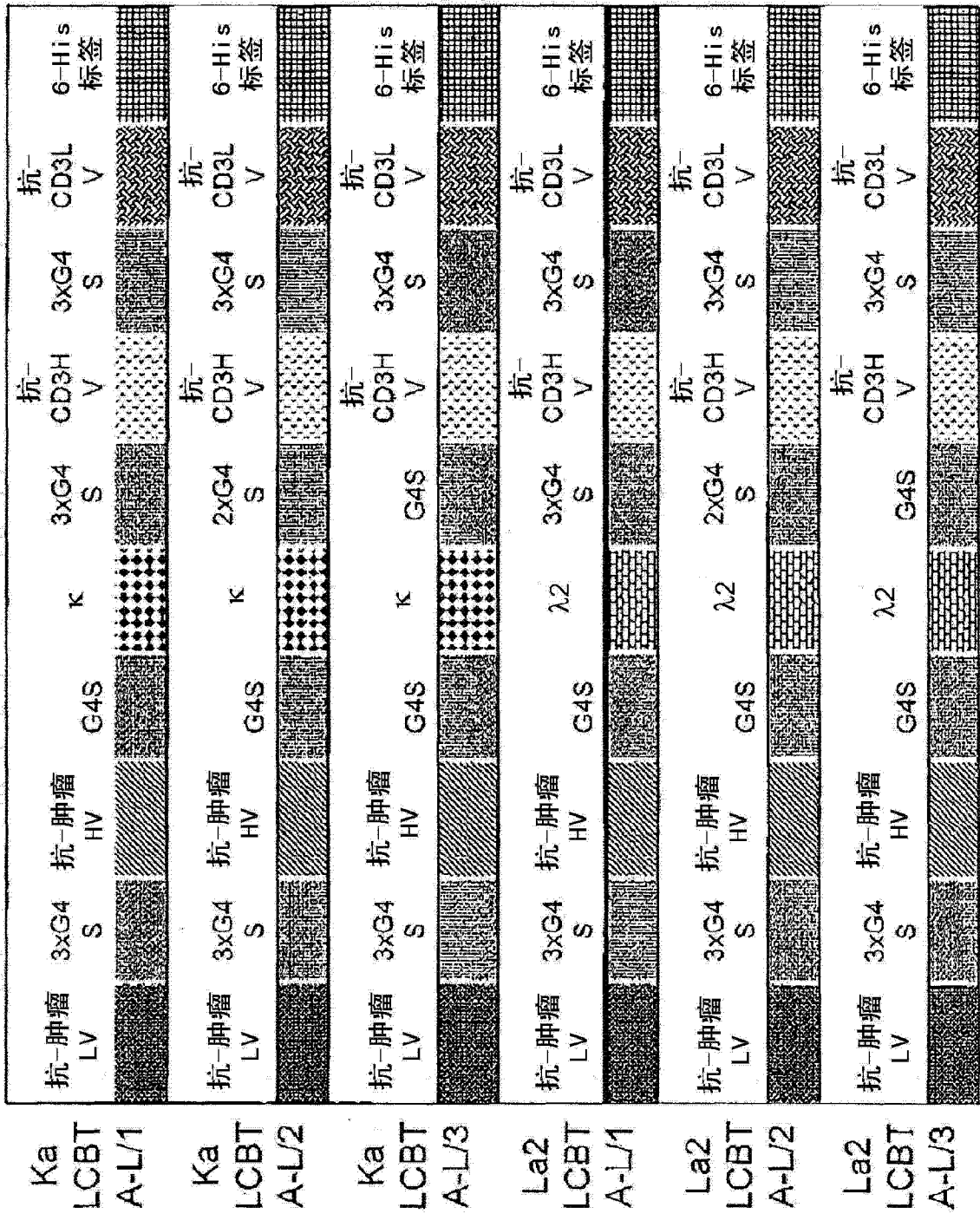
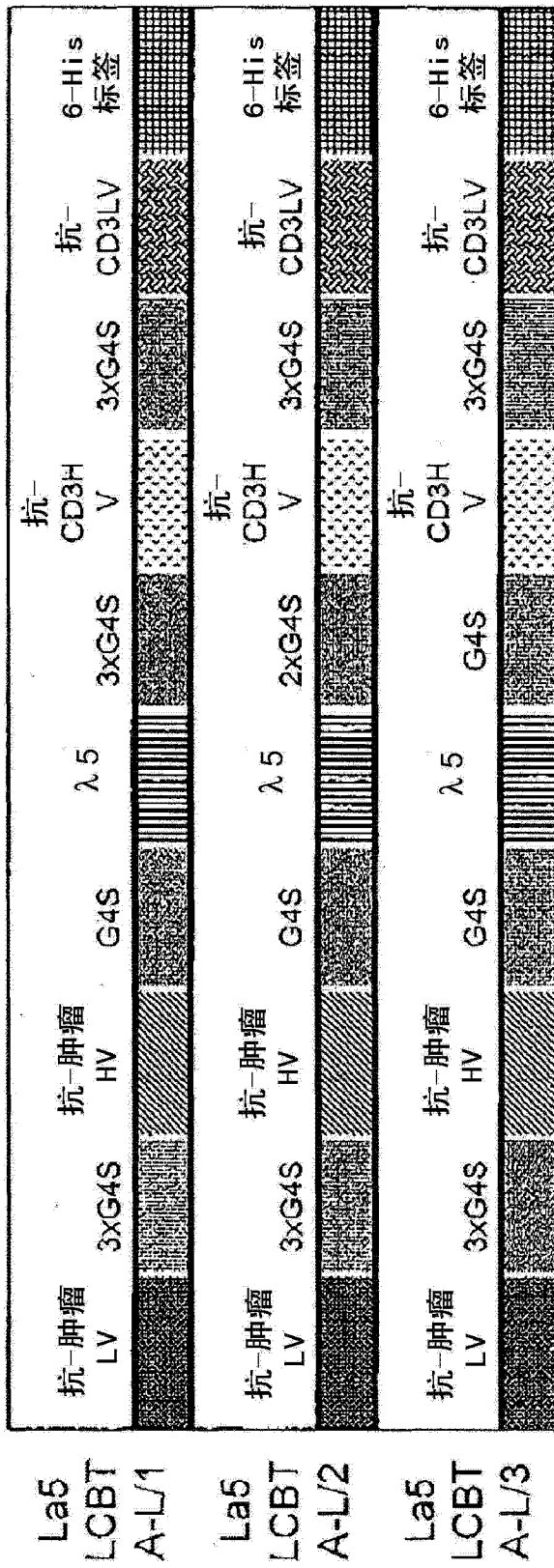


图 1A(续)



LV: 轻链可变序列
 HV: 重链可变序列
 抗-肿瘤: 抗肿瘤特异性标记ScFv
 抗-CD3: 抗-人CD3特异性ScFv
 G4S: 甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-丝氨酸(GGGGS)或接头序列
 3xG4S: GGGGS接头序列的3重复
 6-His标签: 组氨酸-组氨酸-组氨酸-组氨酸-组氨酸
 肿瘤标记: CD20、Her2/neu和EpCAM

图 1A(续)

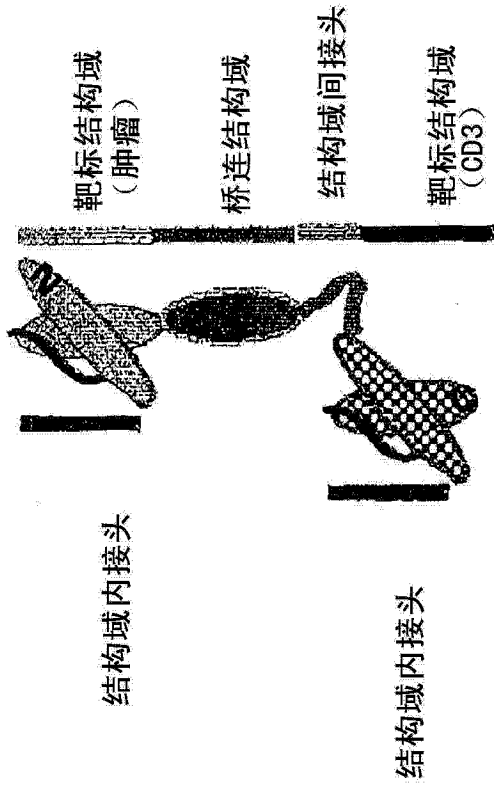


图 1B

结构域内接头, 例如, 可以包含以下接头序列之一:

1. GGGSGGGGS
2. GGGSGGGSGGGGS
3. GGGSGGGSGGGSGGGGS

ScFv 靶向结构域的取向包含以下结构域取向之一:

1. 轻链可变-重链可变
2. 重链可变-轻链可变

桥连结构域, 例如, 可以包含以下轻链恒定结构域之一:

1. κ 链
2. λ 2 链
3. λ 5 链/也称为替代轻链

结构域间接头, 例如, 可以包含以下接头序列之一:

1. GGGGS
2. GGGSGGGGS
3. GGGSGGGSGGGGS

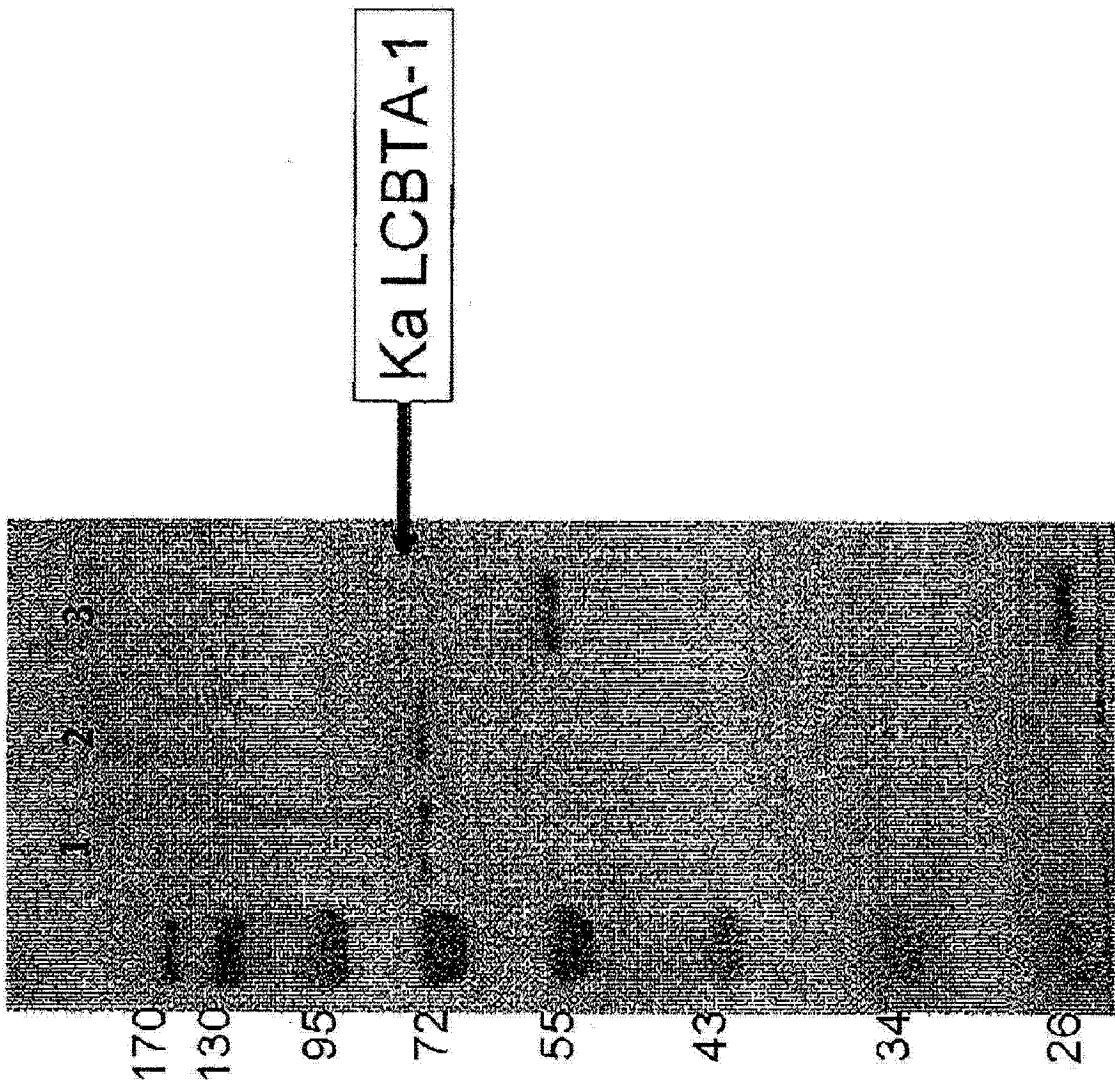


图 2A

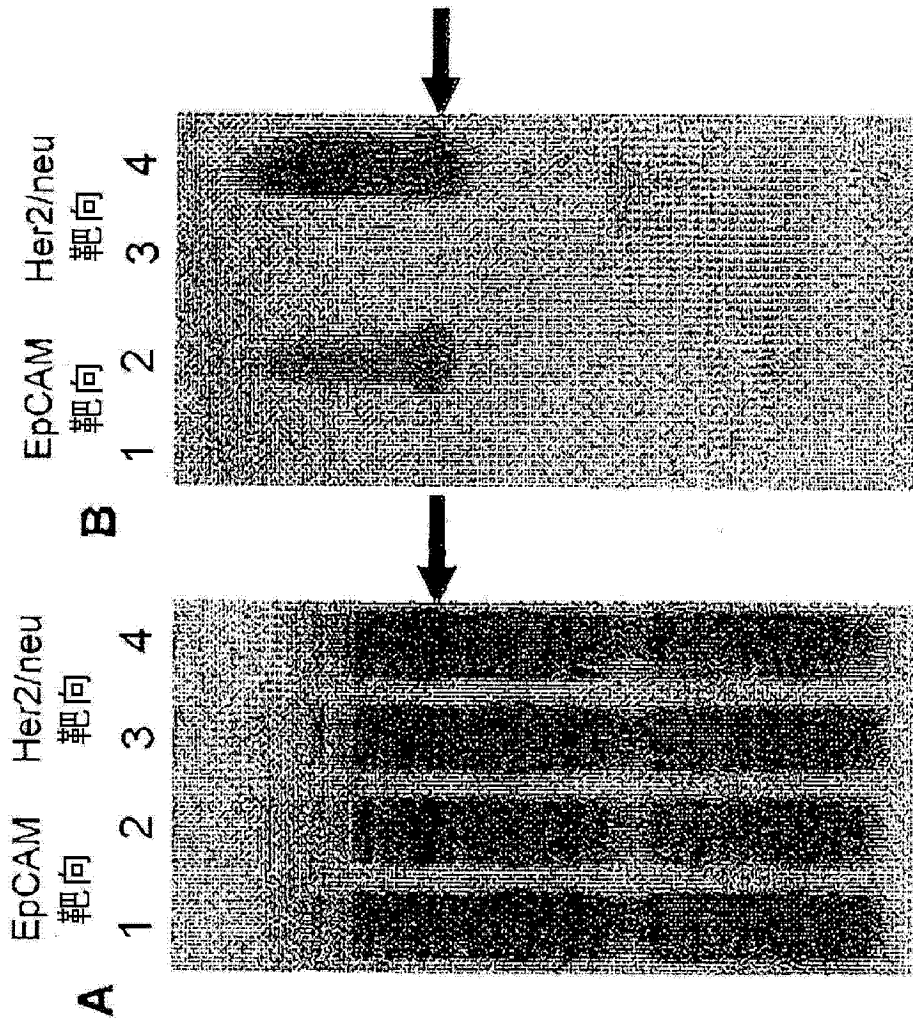


图 2B

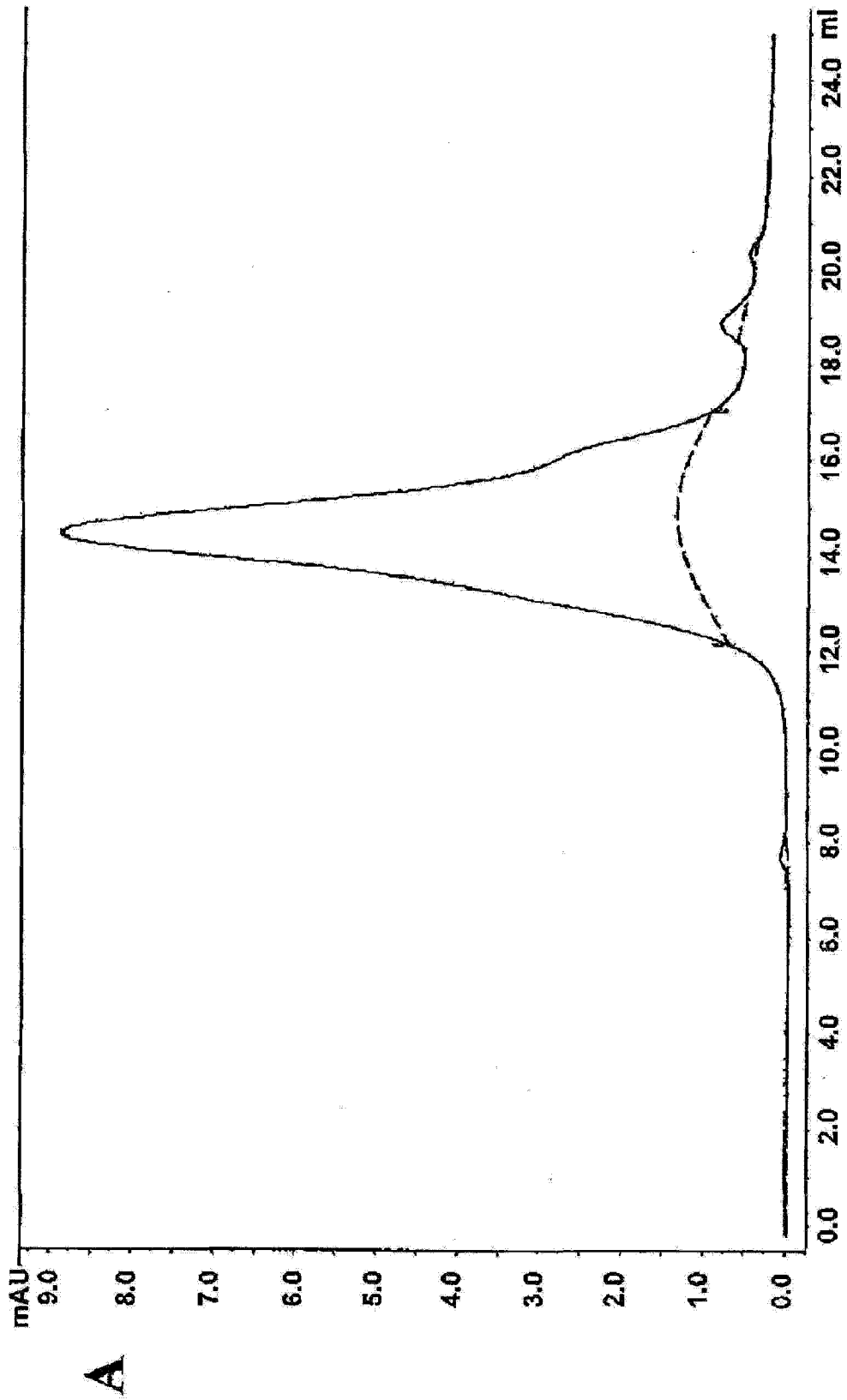


图 3A

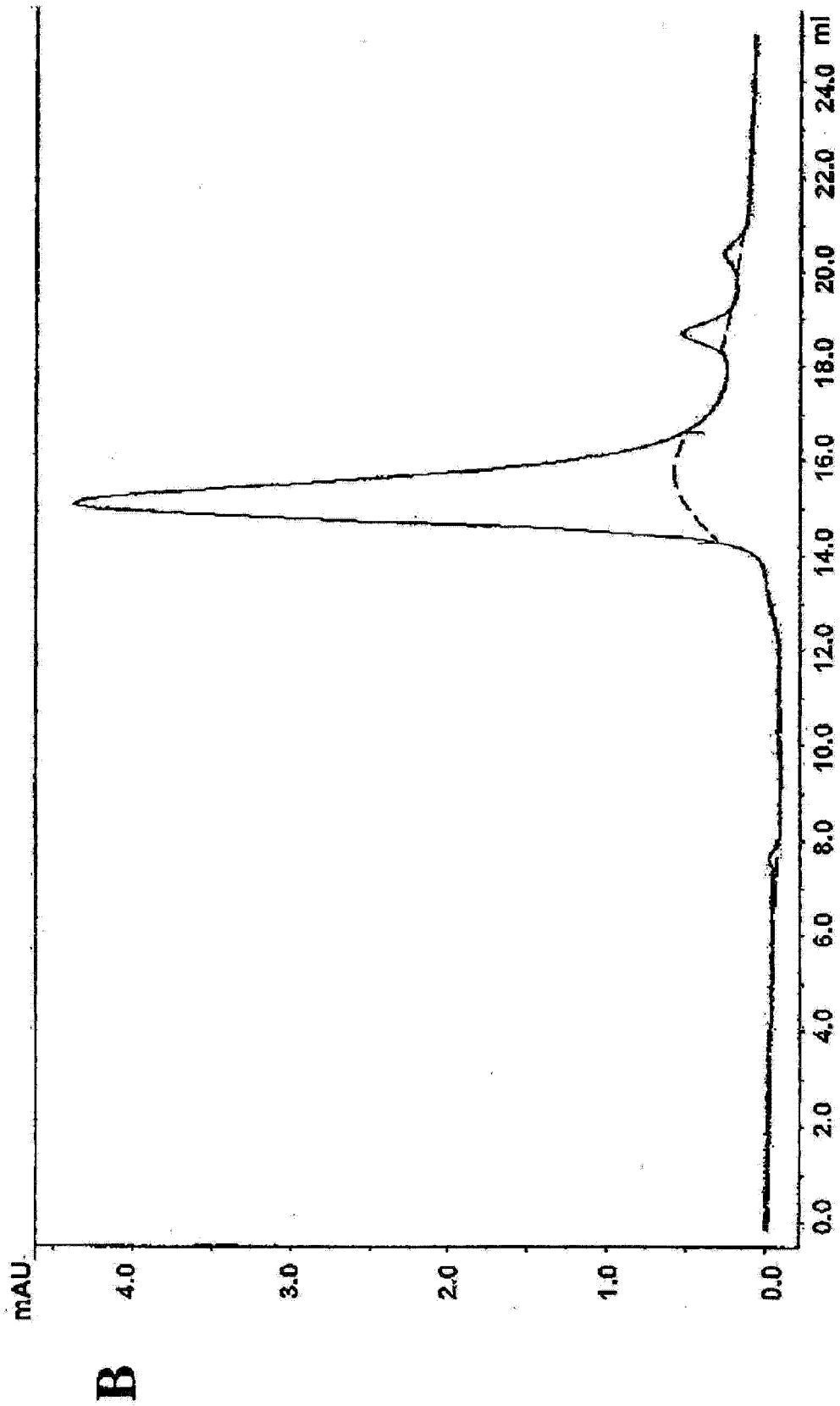


图 3A

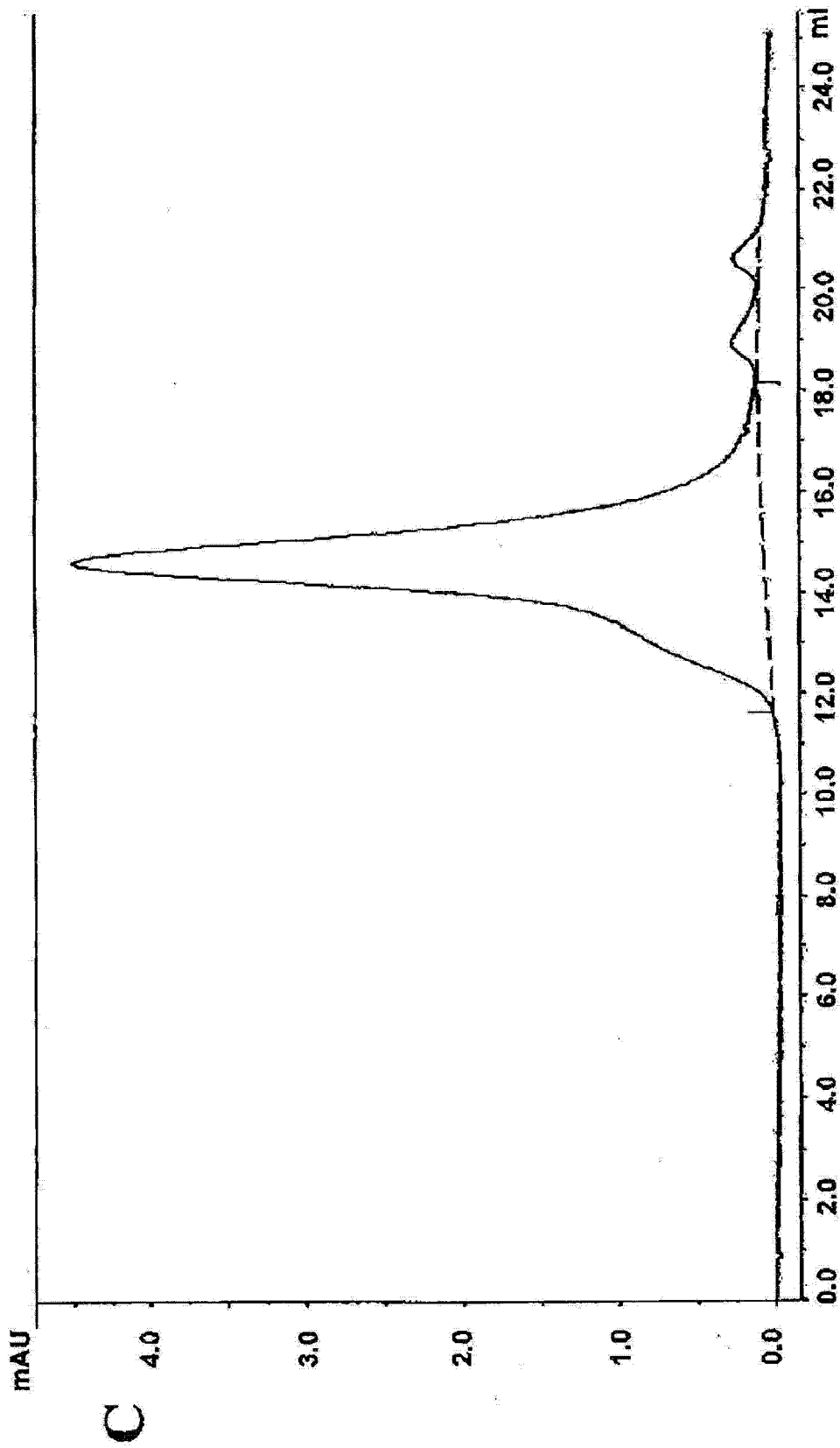
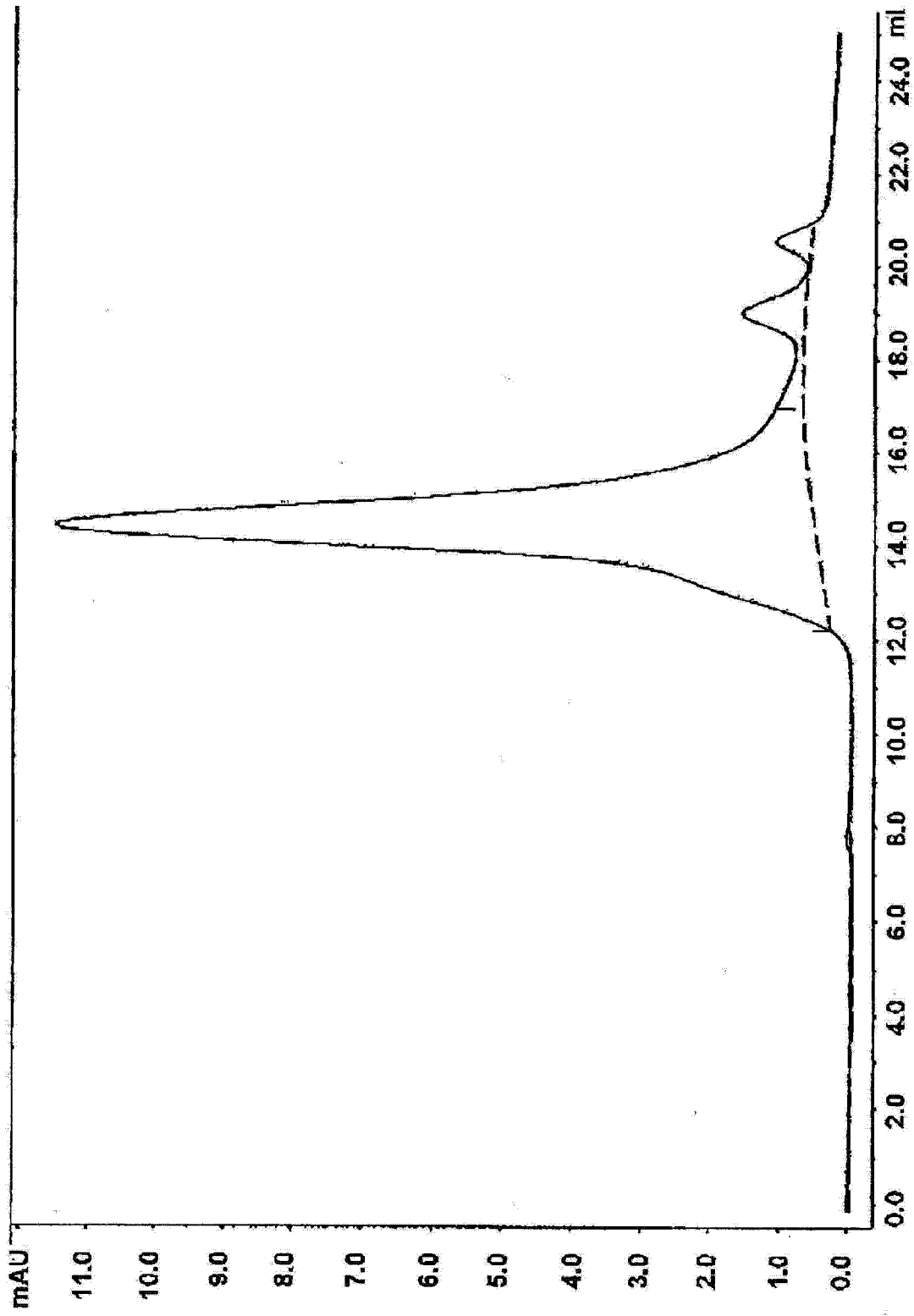


图 3A



D

图 3A

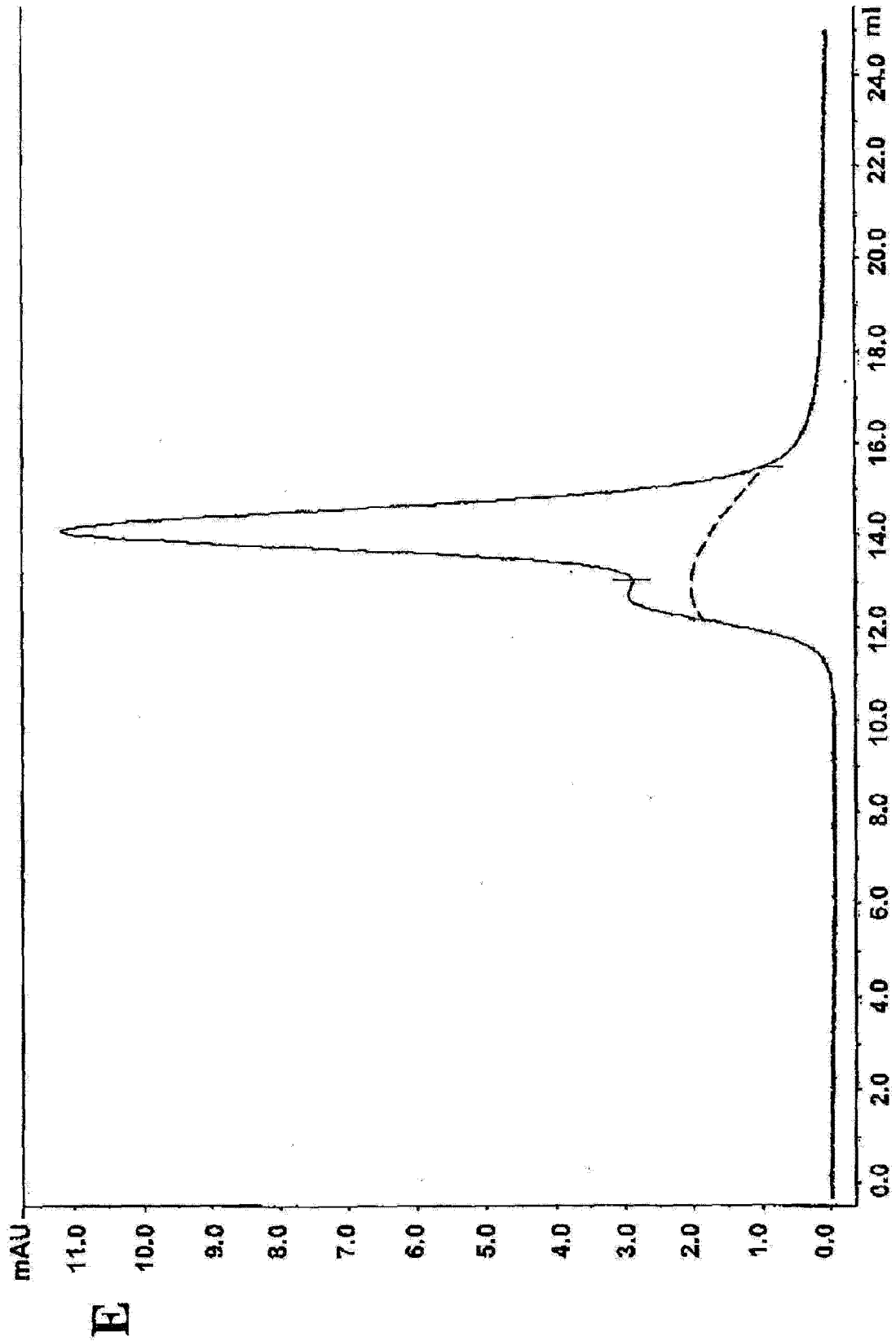


图 3A

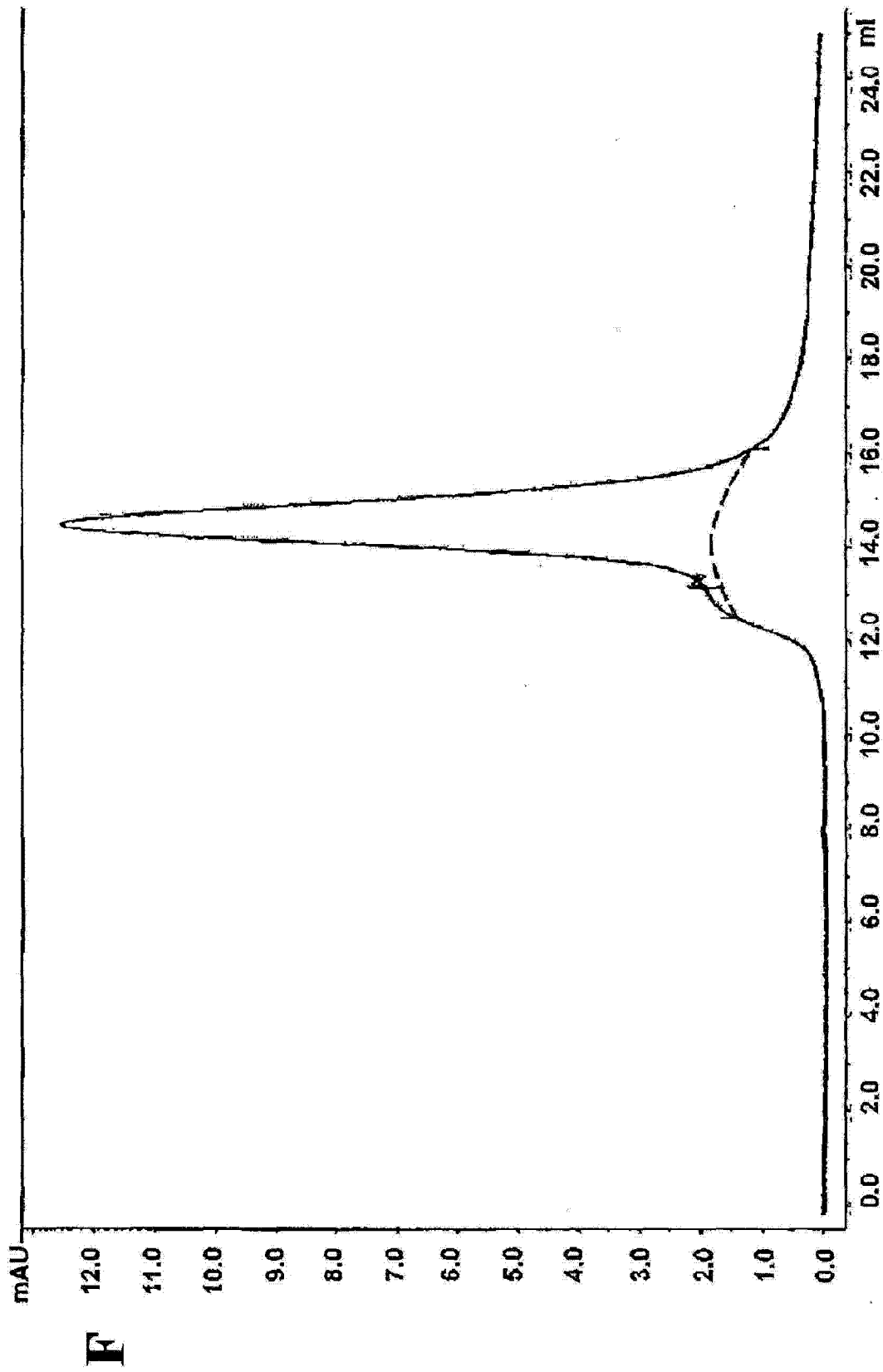


图 3A

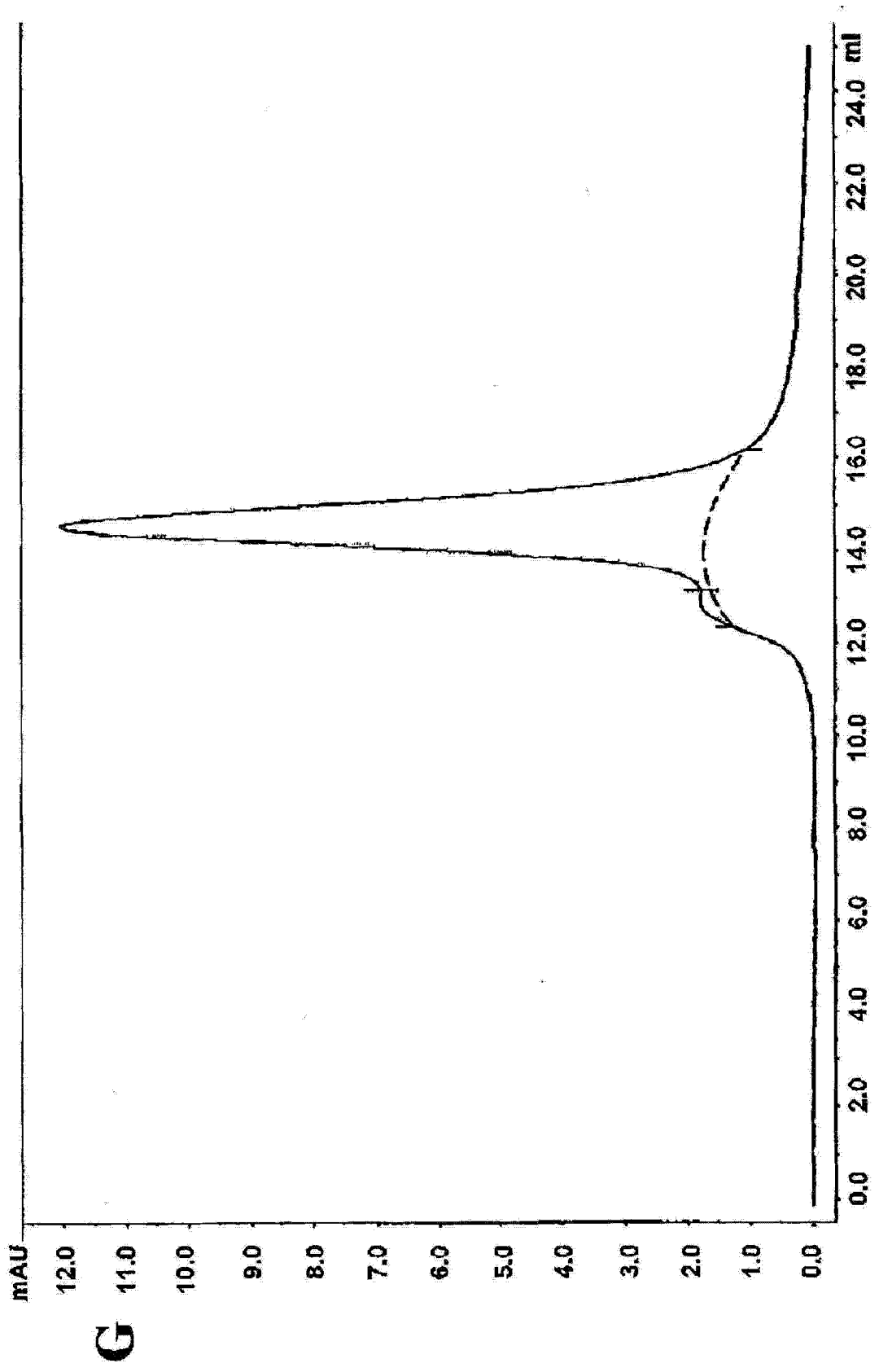


图 3A

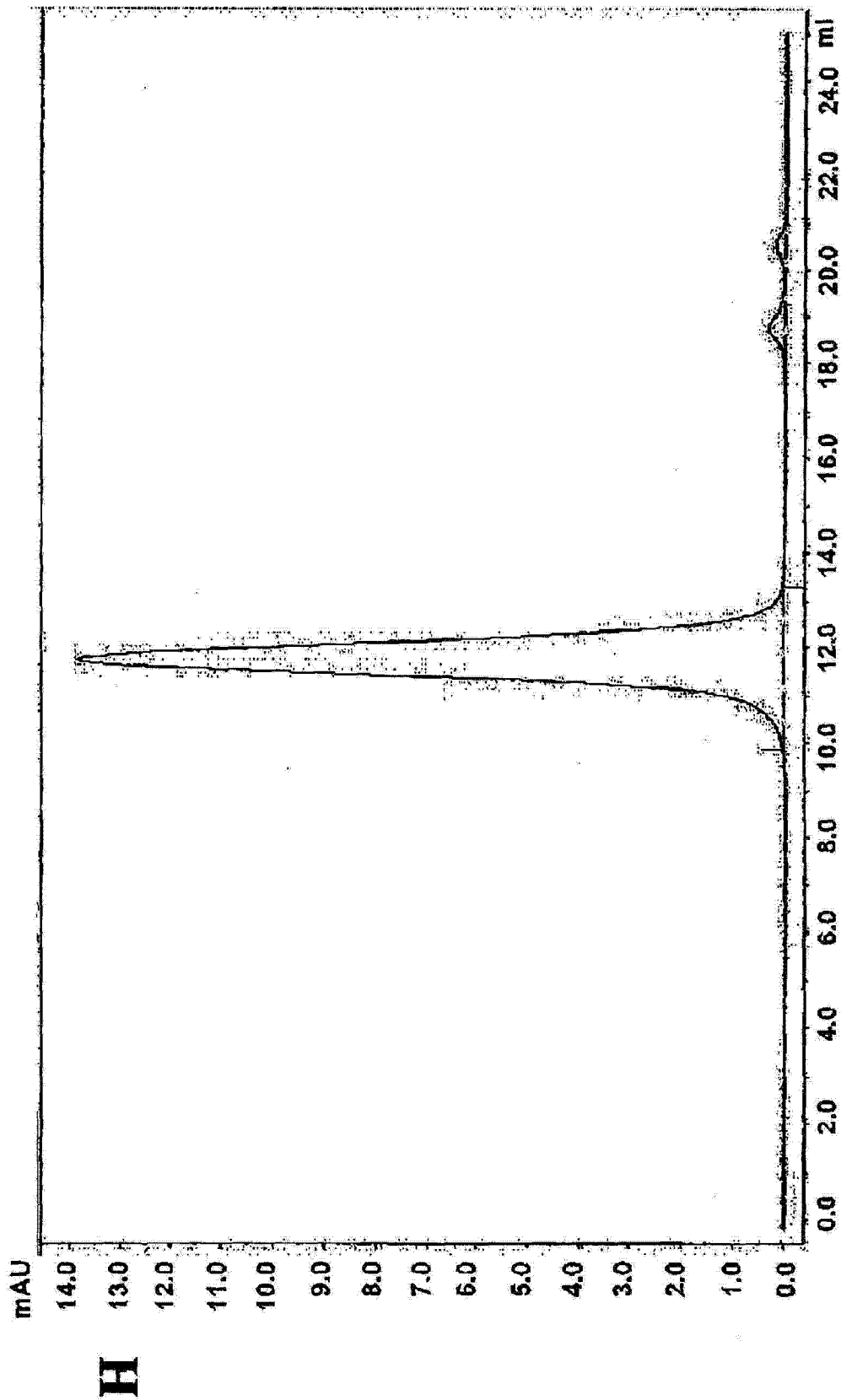
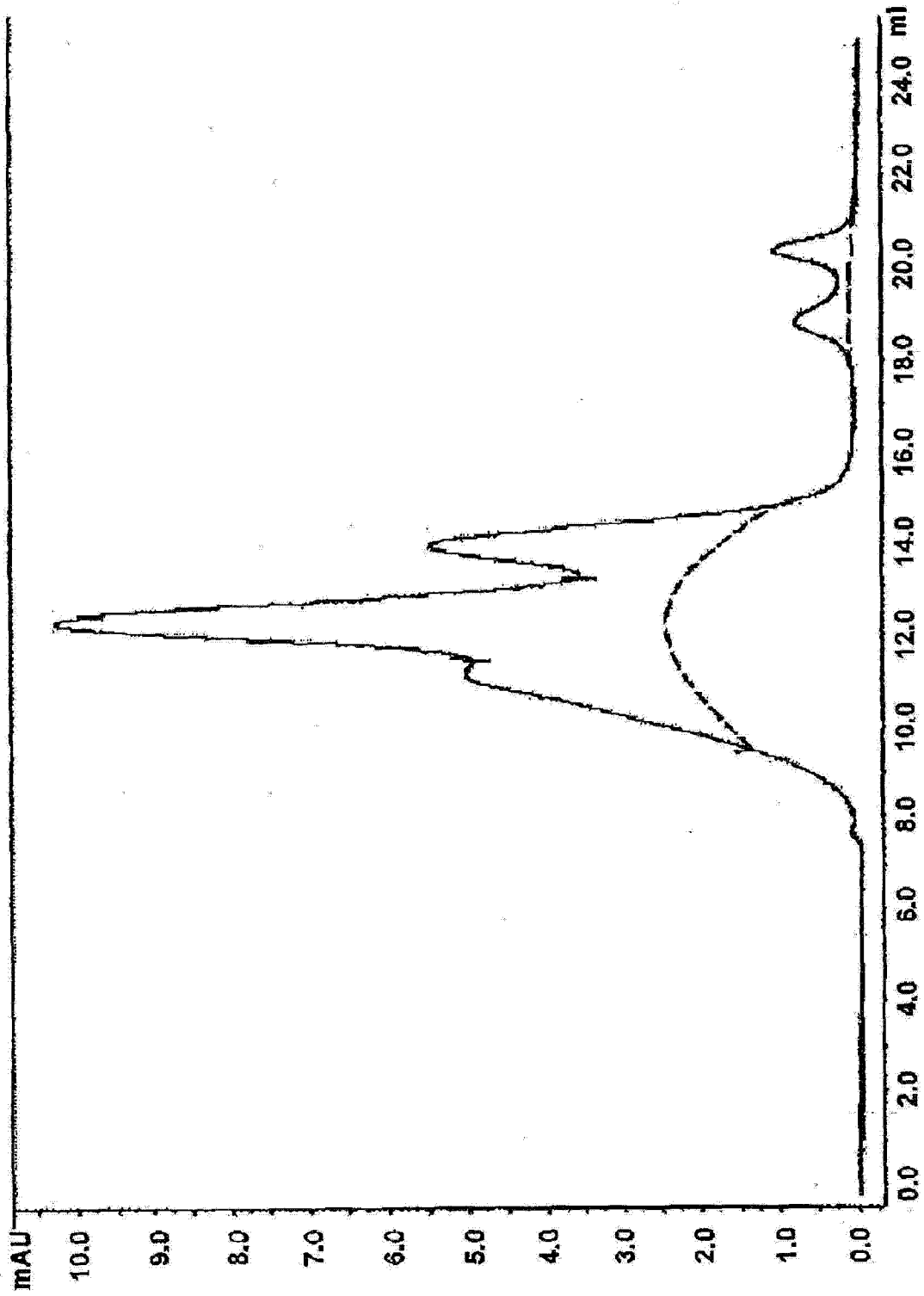


图 3A



I

图 3A

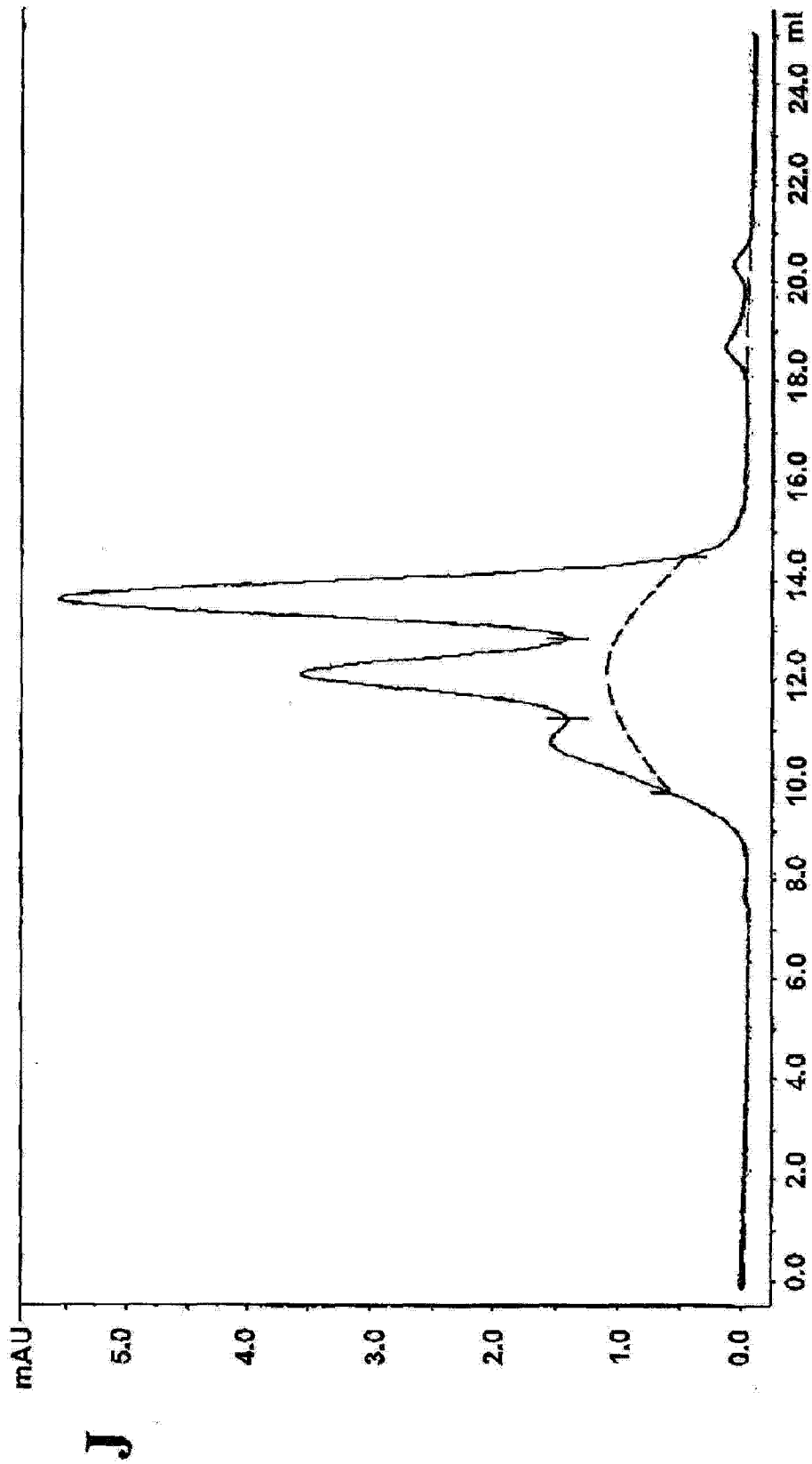


图 3A

抗体/BsAb	肿瘤靶向 ScFv 结构域内 接头重复	HT-29 细胞结合 (Her2/neu) 10 μg/ml	Jurkat 结合 (CD3) 10 μg/ml	产率
抗-CD3 mAb	不适用	不适用	89.87%	87.61%
抗-Her2/neu mAb	不适用	99.54%	不适用	不适用
Her2/neu 靶向 Ka LCBTA-1	3	98.16%	76.33%	50%
Her2/neu 靶向 Ka LCBTA-1-A	2	97.77%	82.97%	67.57%
Her2/neu 靶向 Ka LCBTA-1-B	4	98.64%	77.51%	61.43%

图 3B

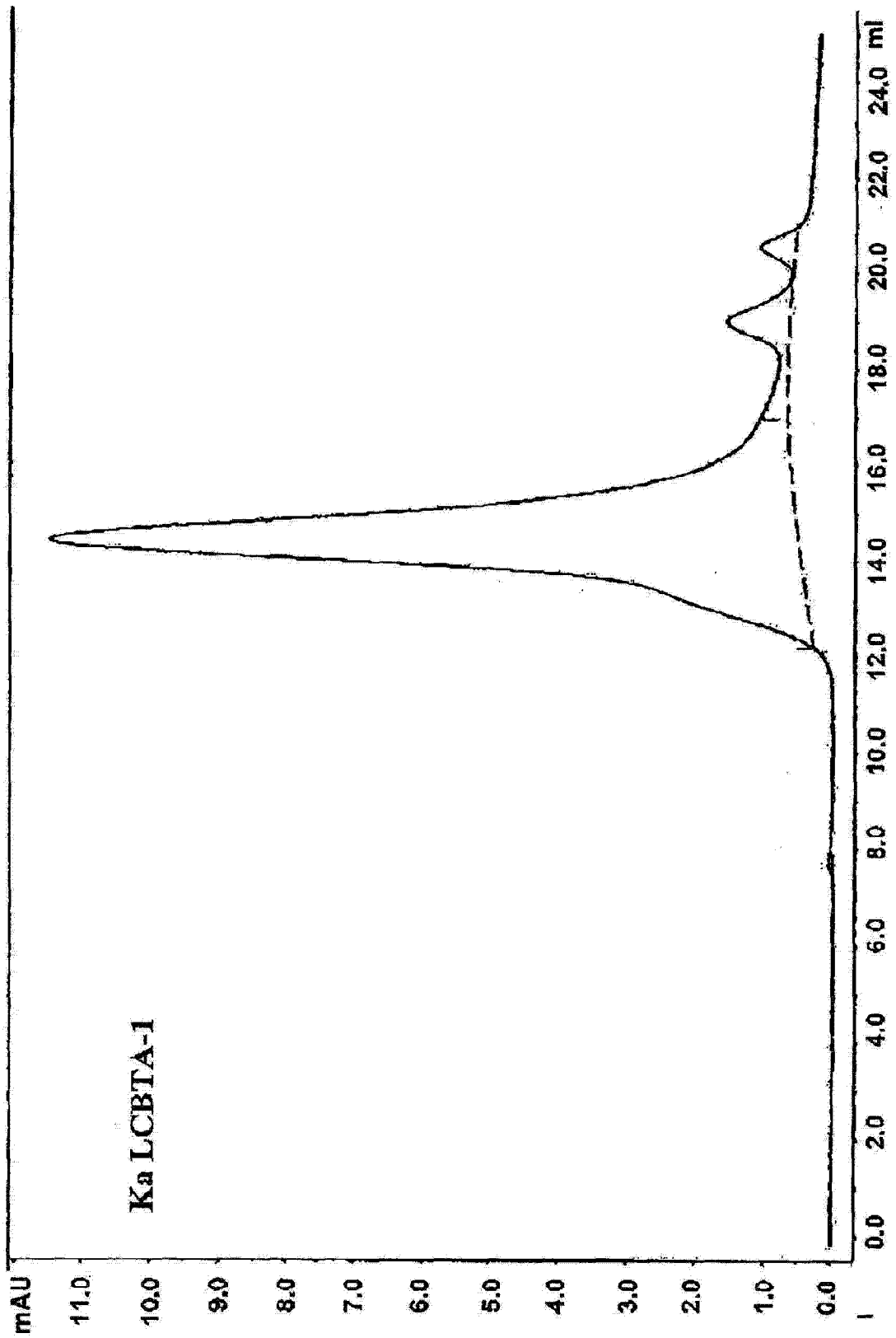


图 3B(续)

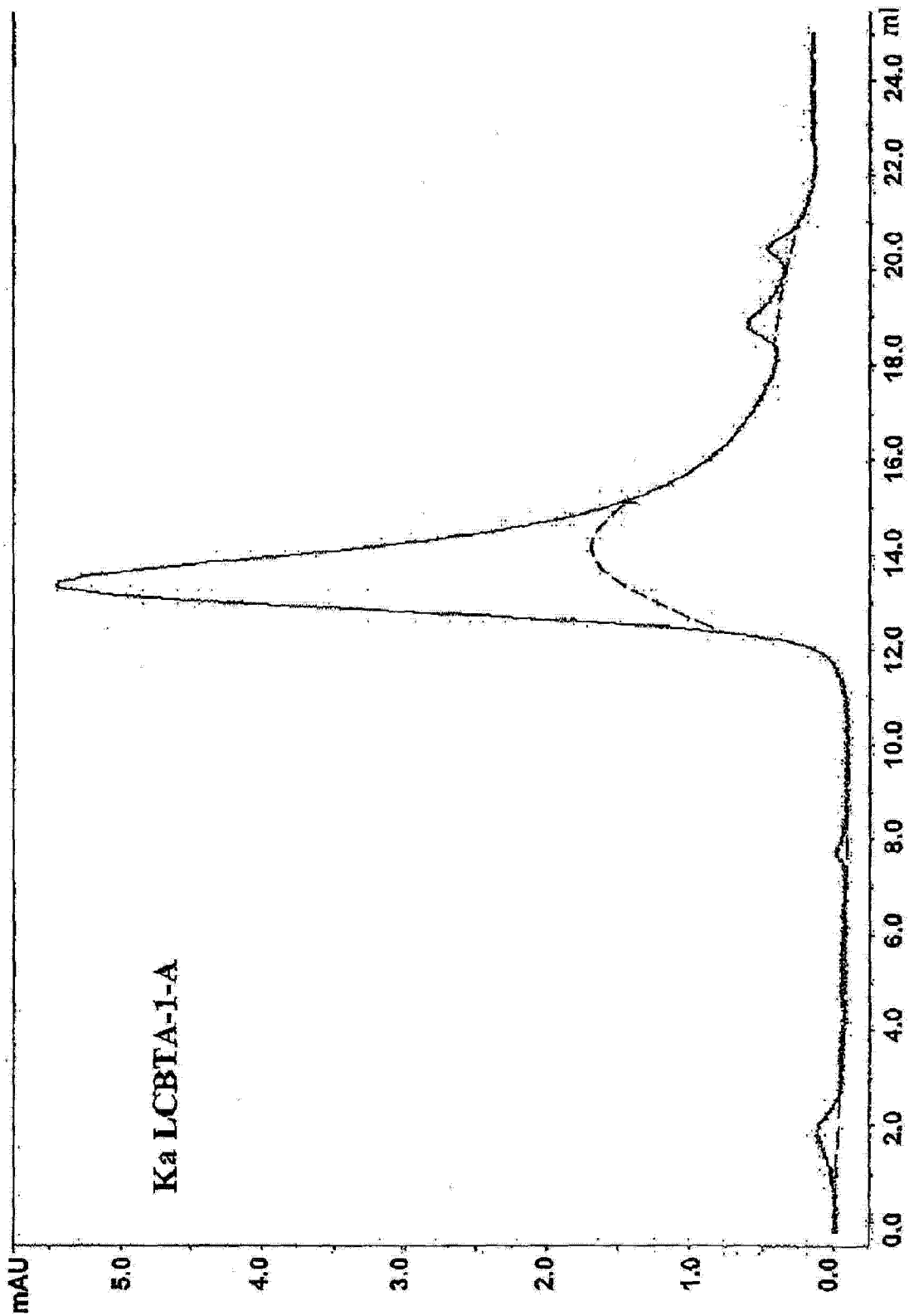


图 3B(续)

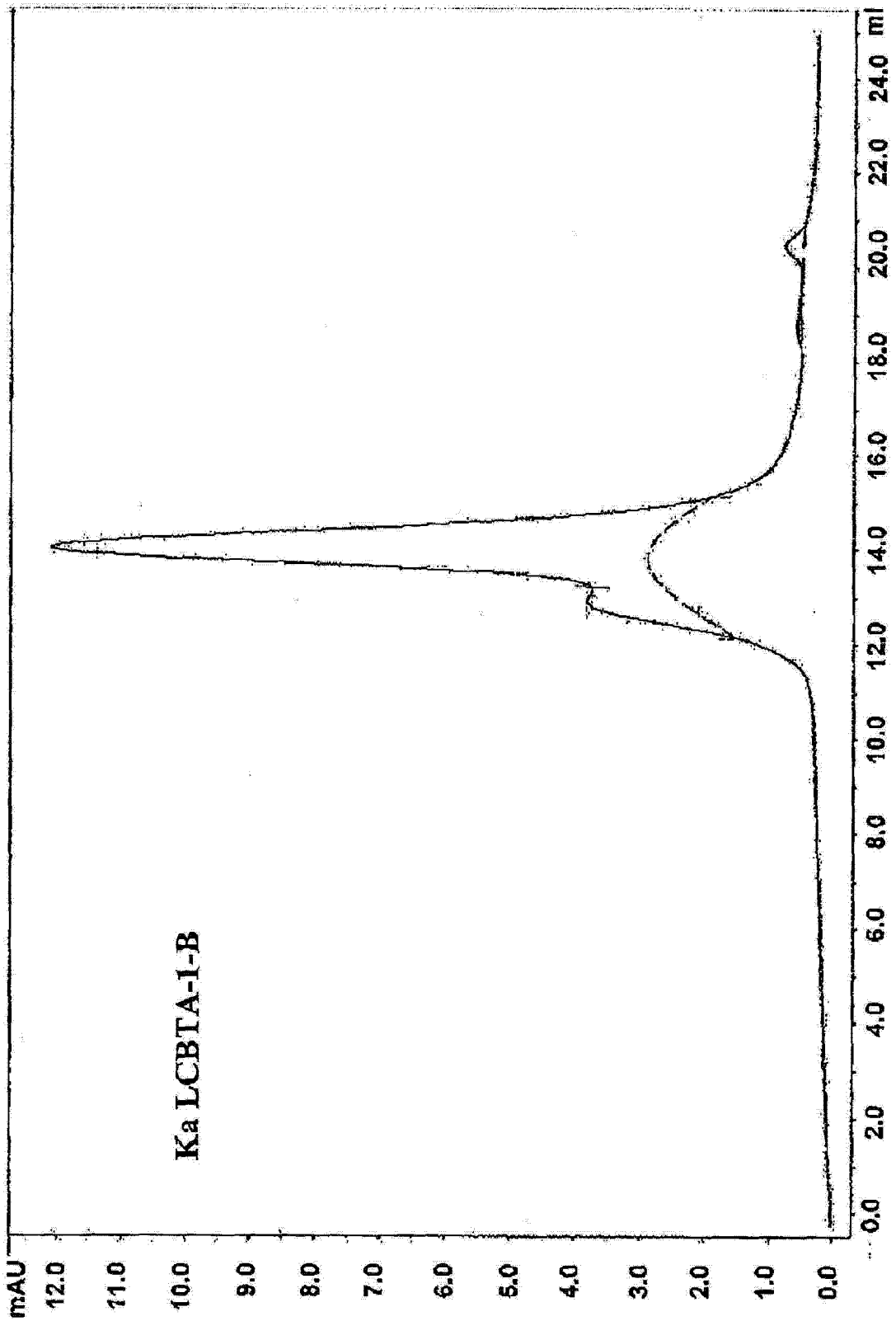


图 3B(续)

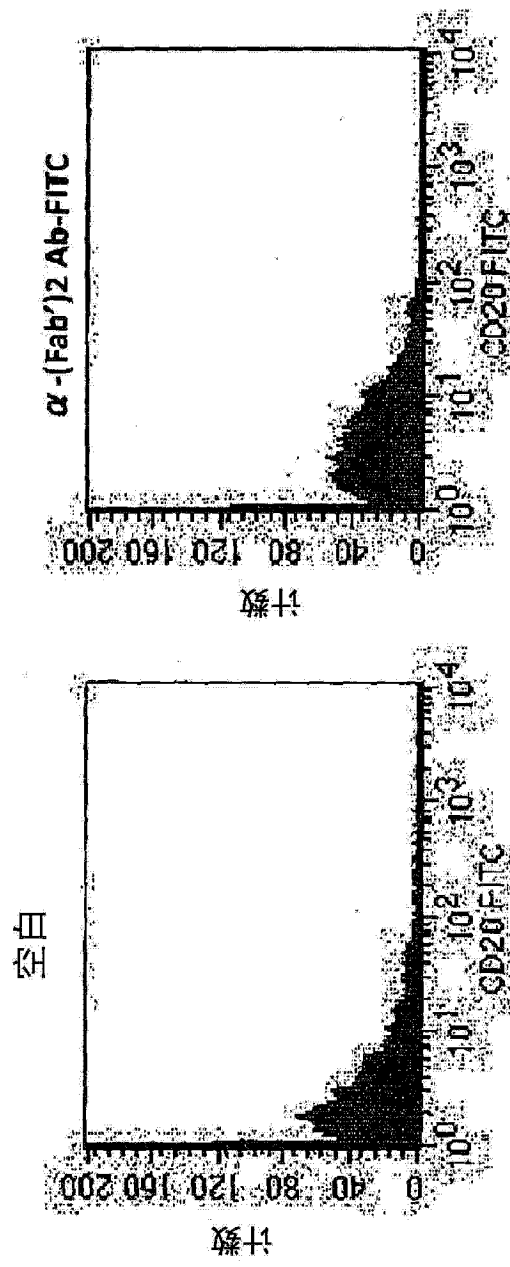


图 4A

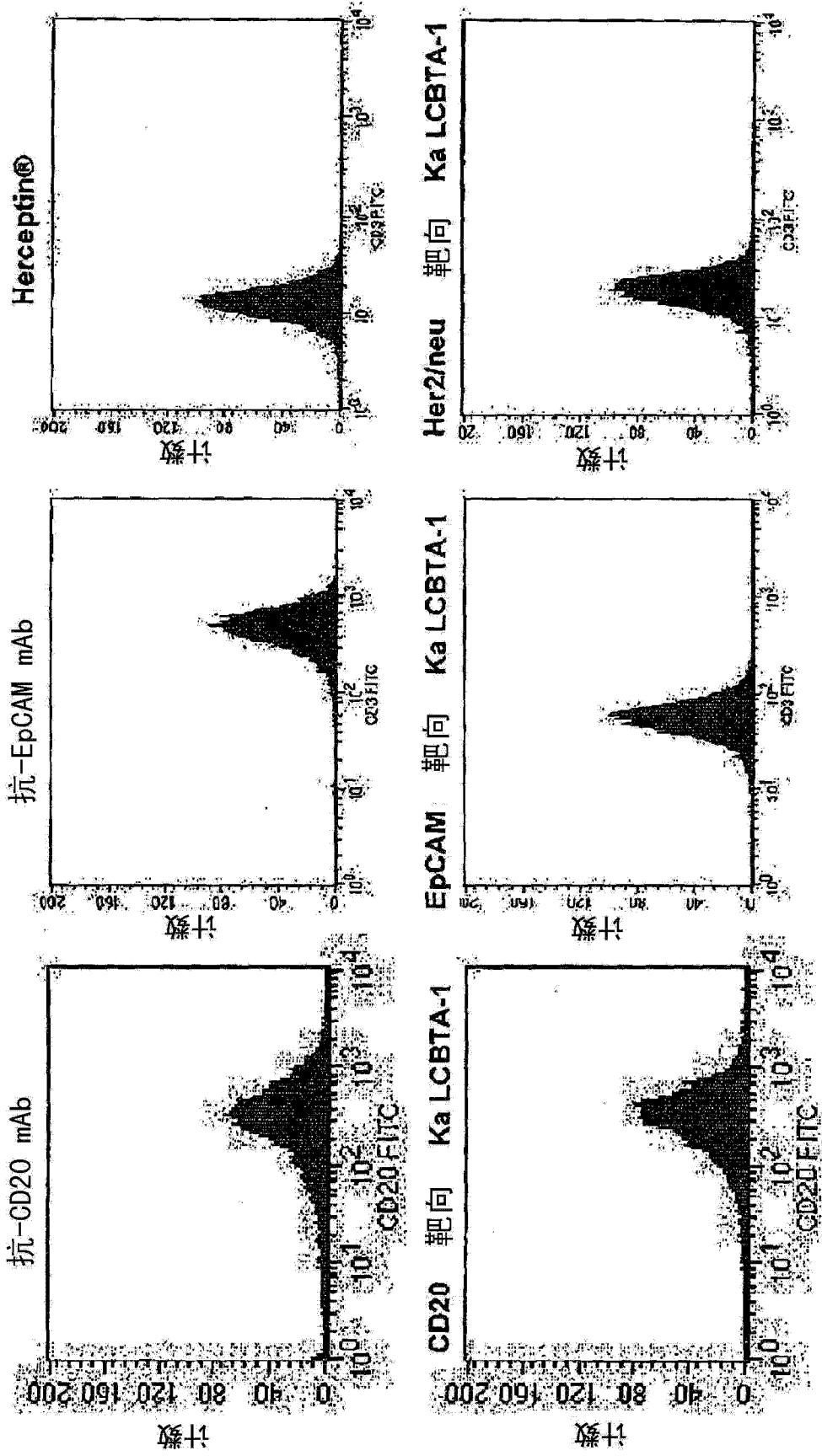


图 4A(续)

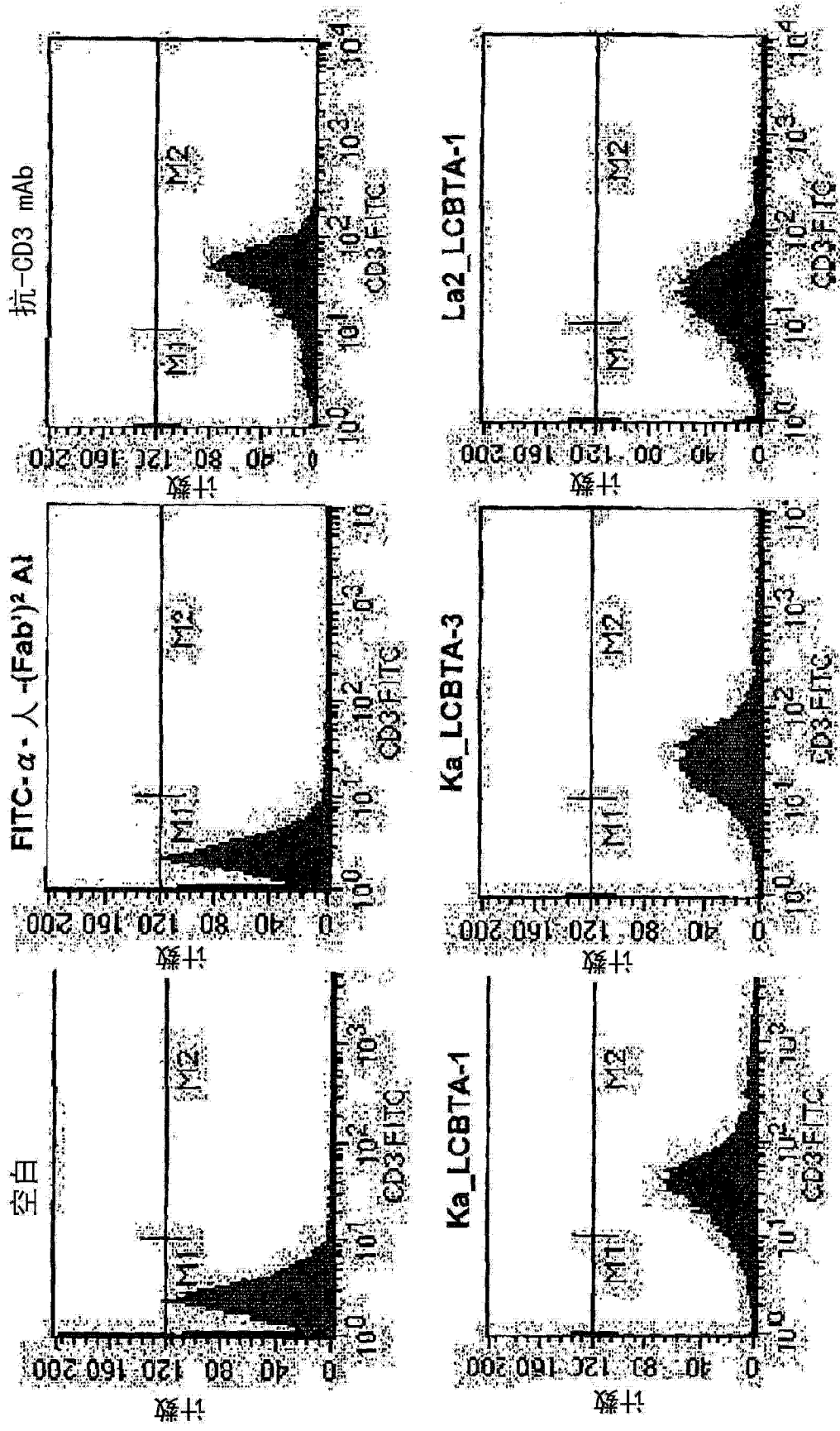


图 4B

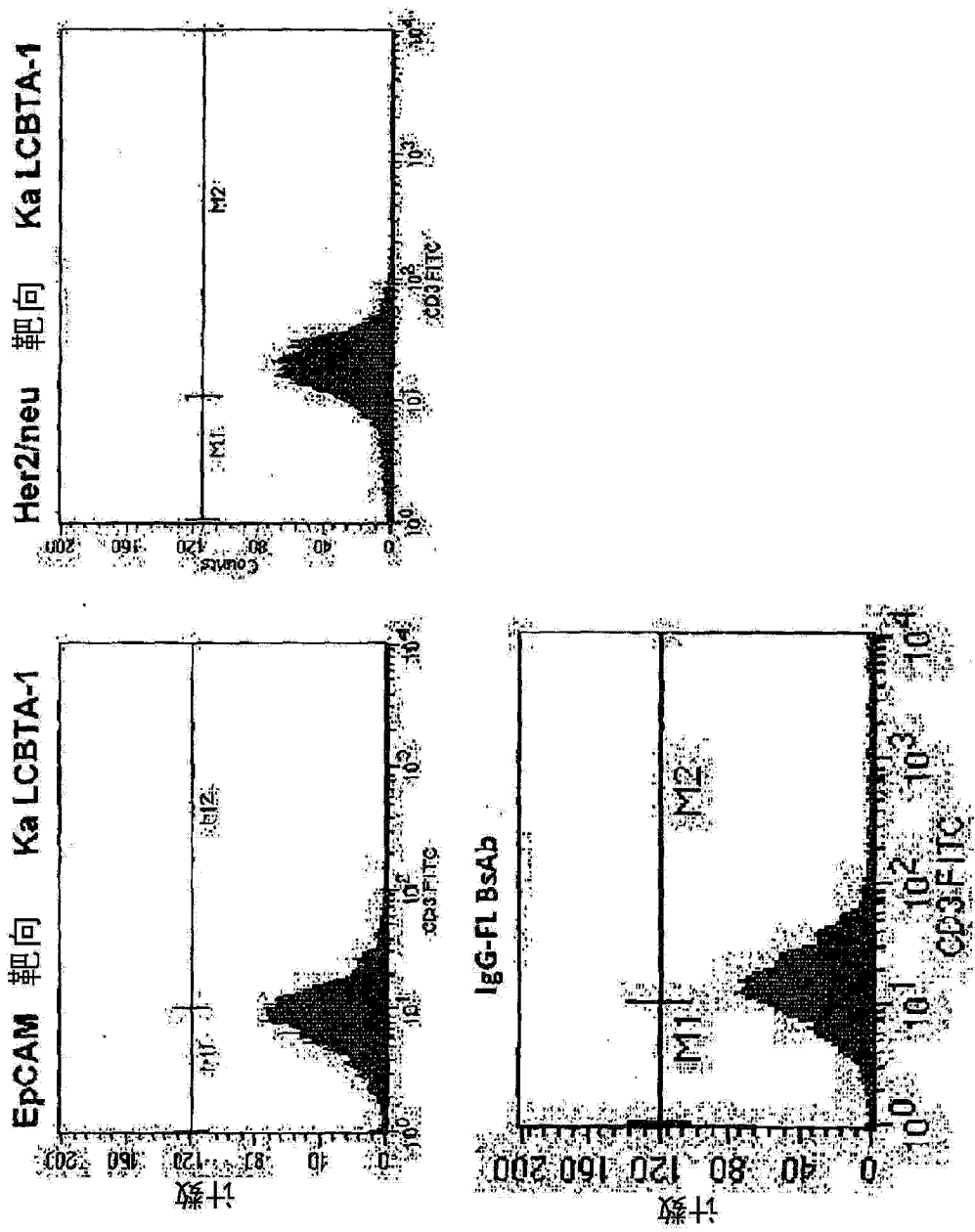


图 4B(续)

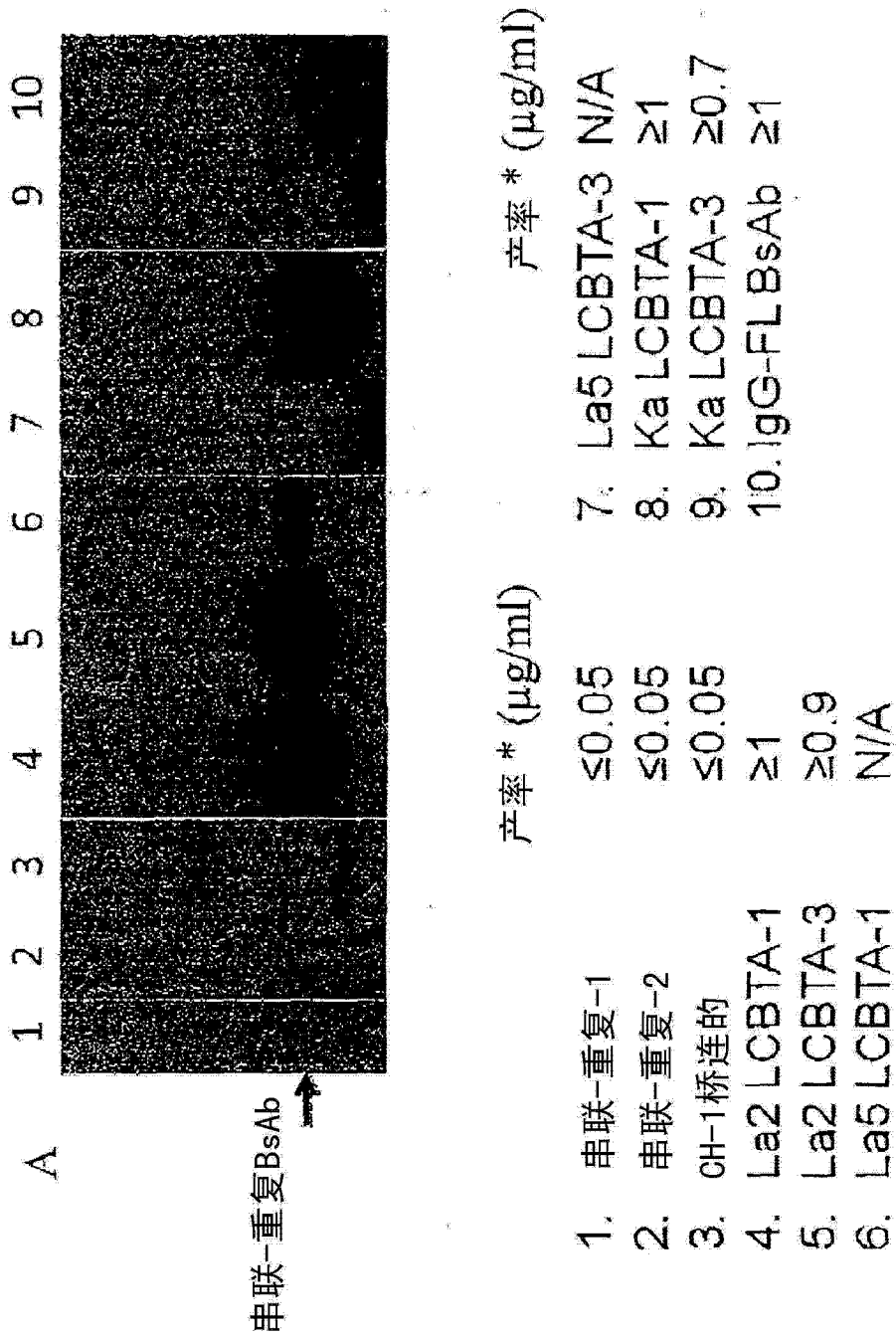


图 5

产率可能由于靶向分子的变化而改变

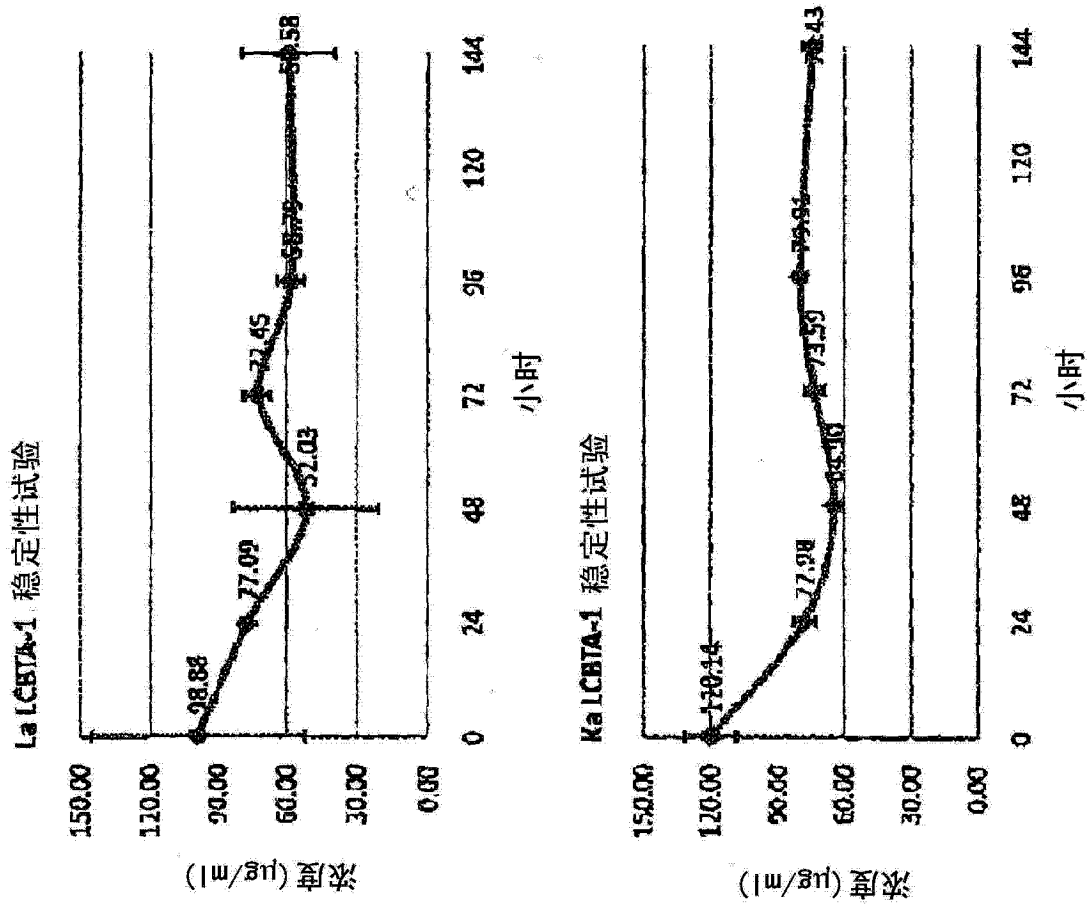


图 6

Ka LCBTA处理后的PBMC细胞因子概况

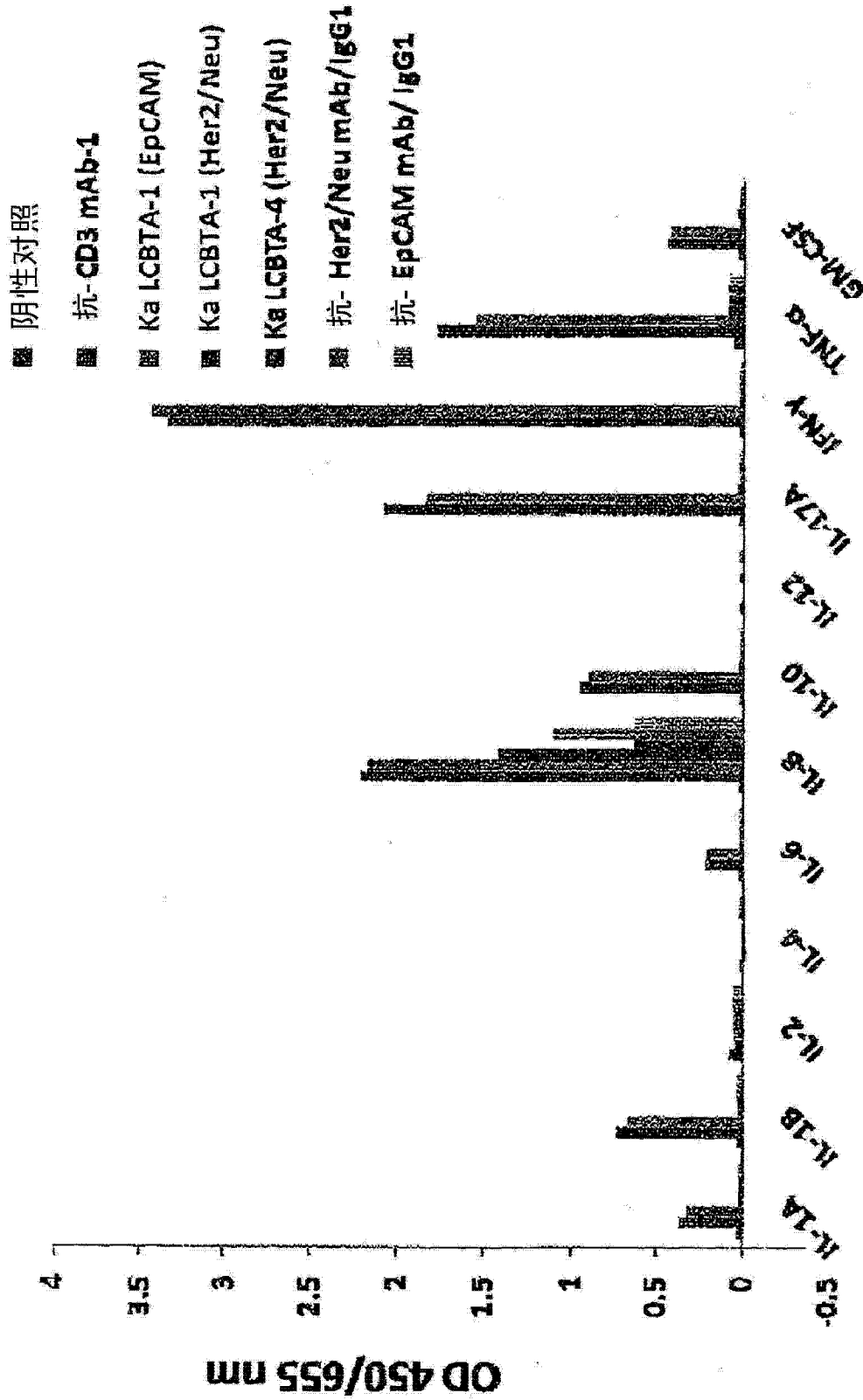


图 7

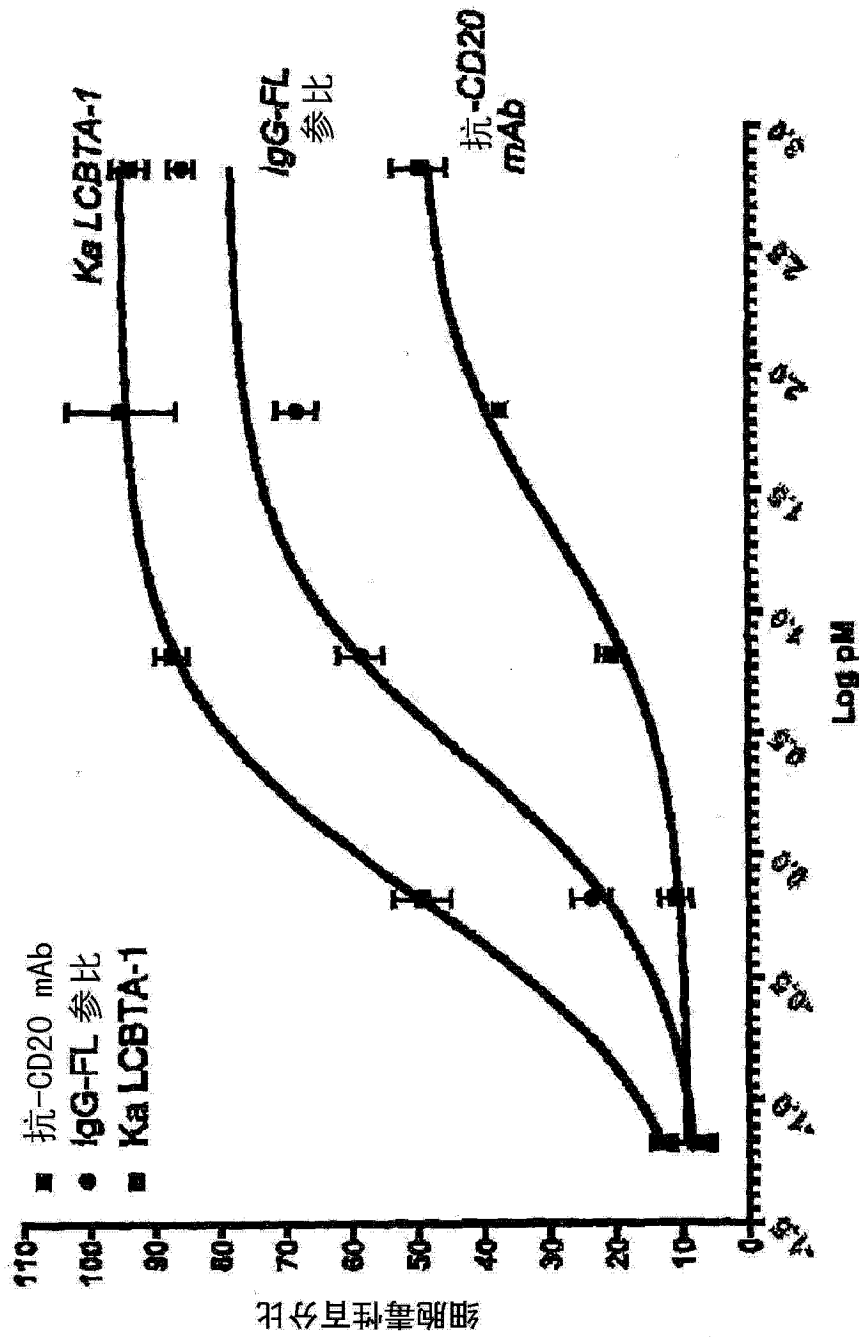


图 8A

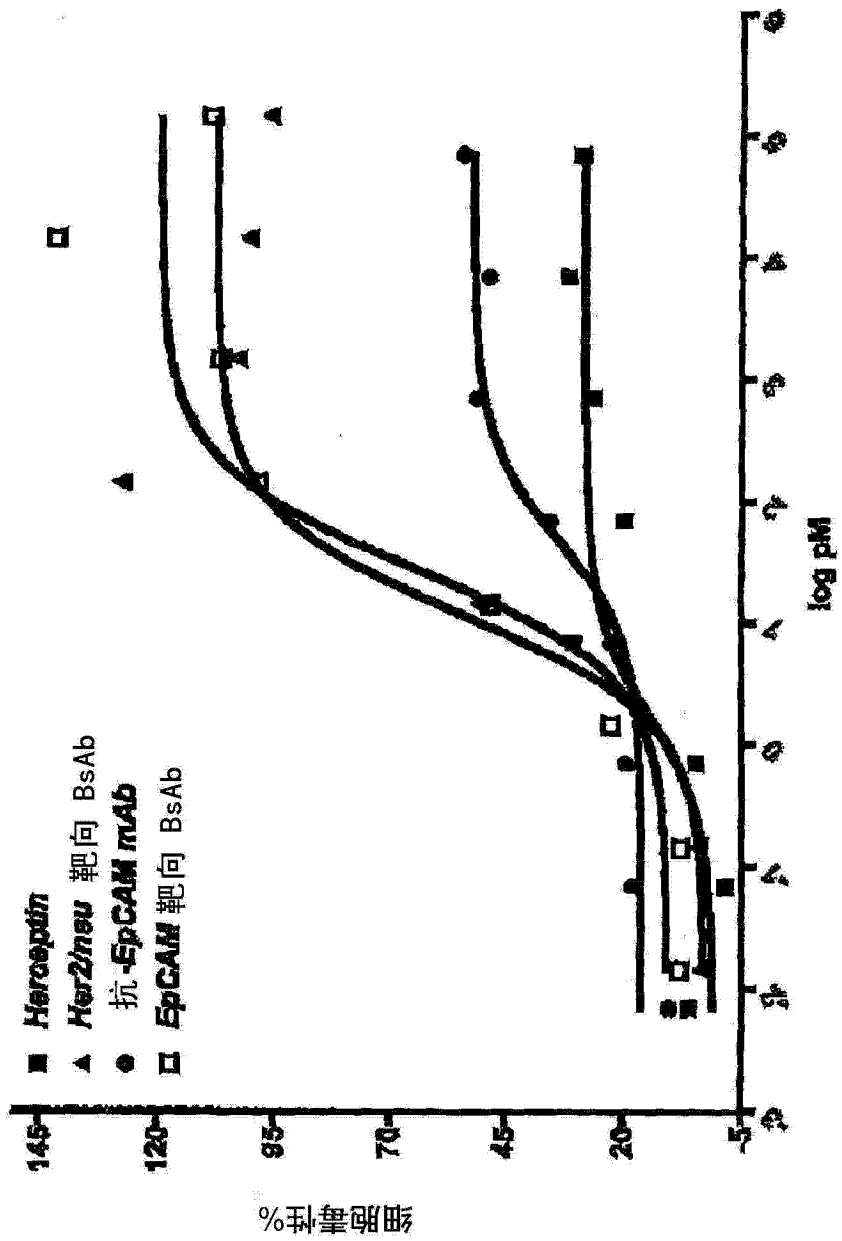


图 8B

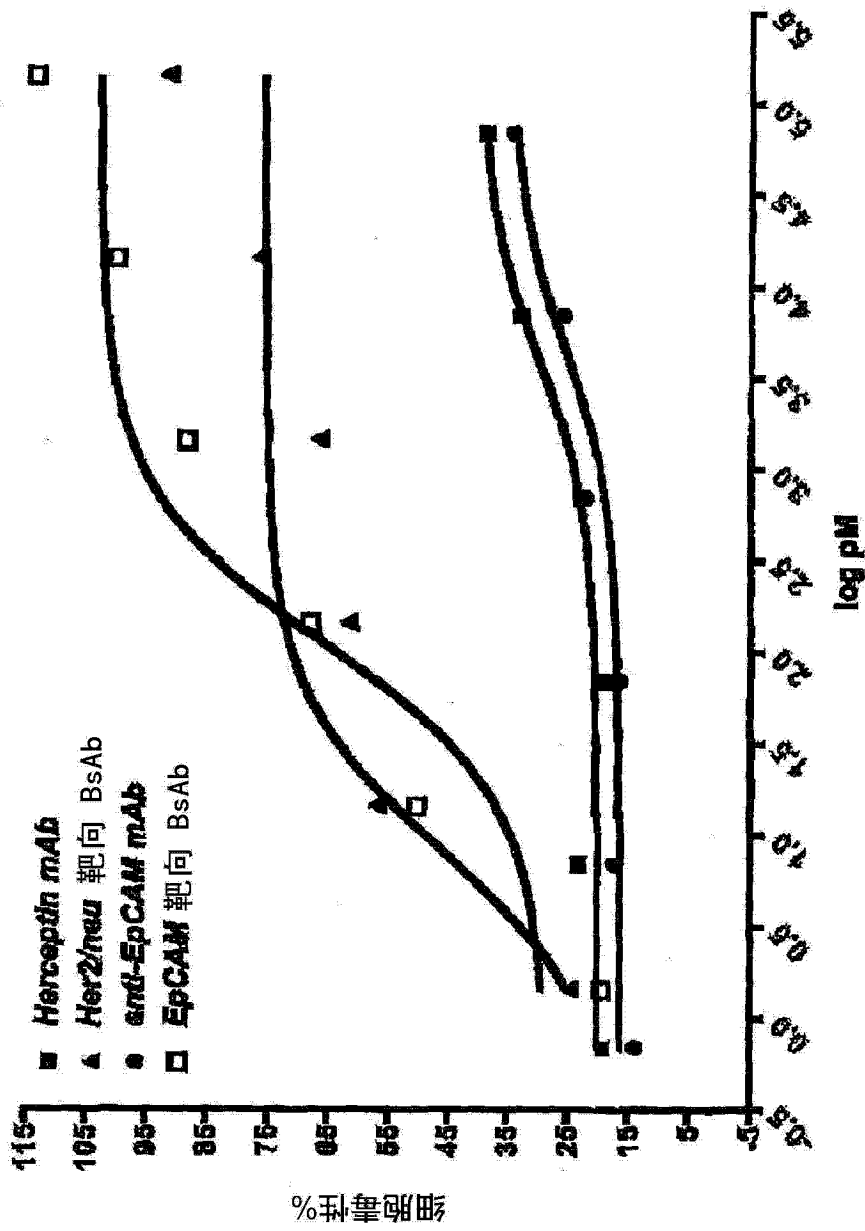


图 8C

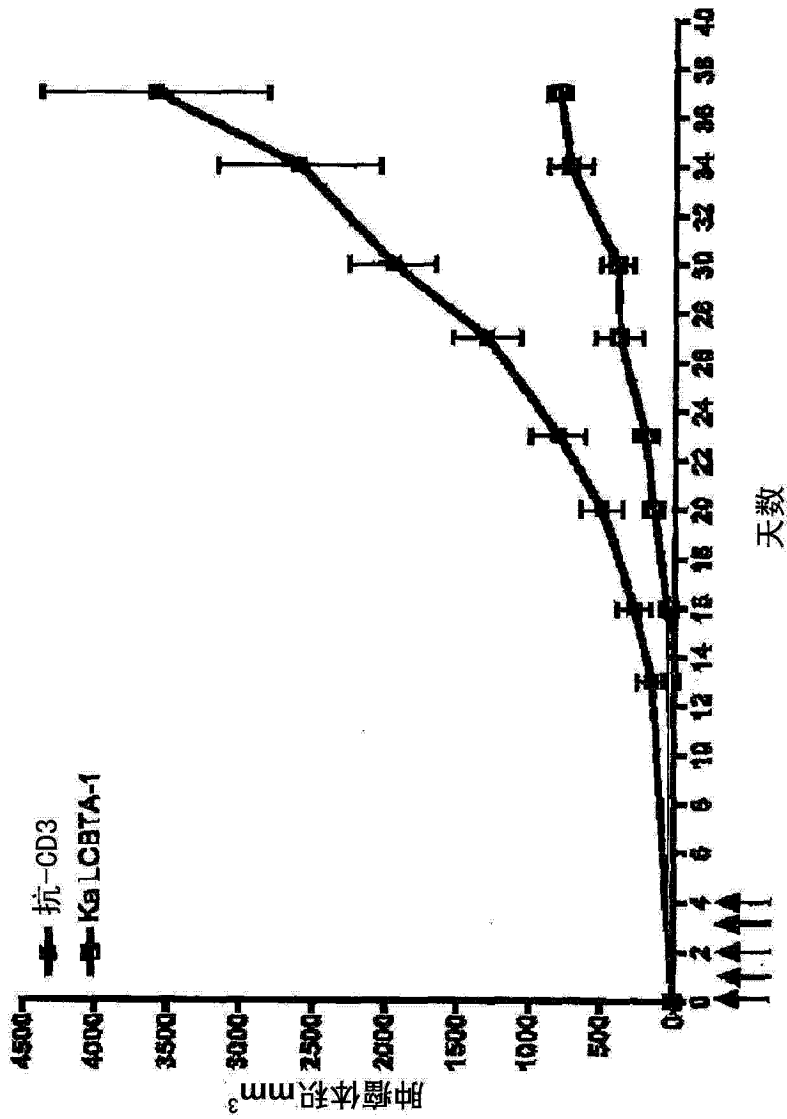


图 9A

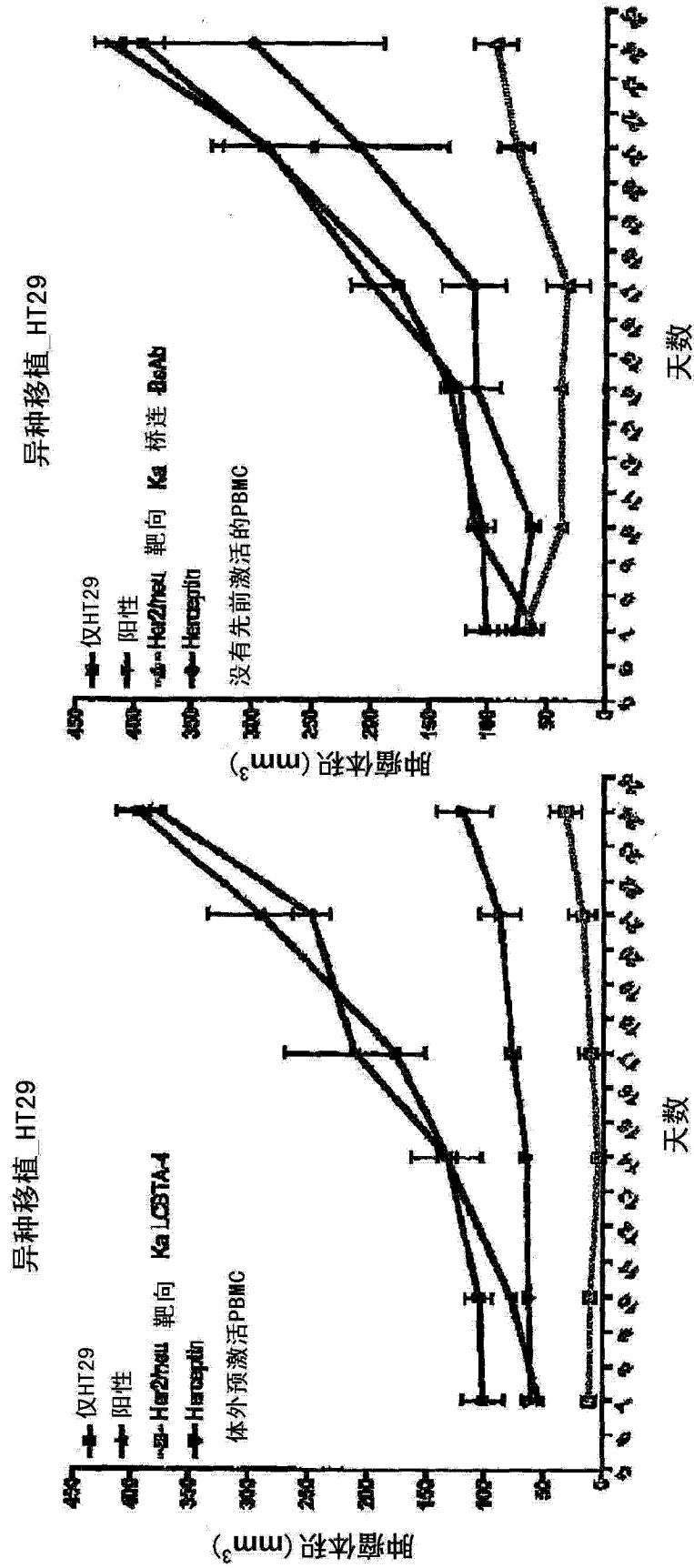


图 9B

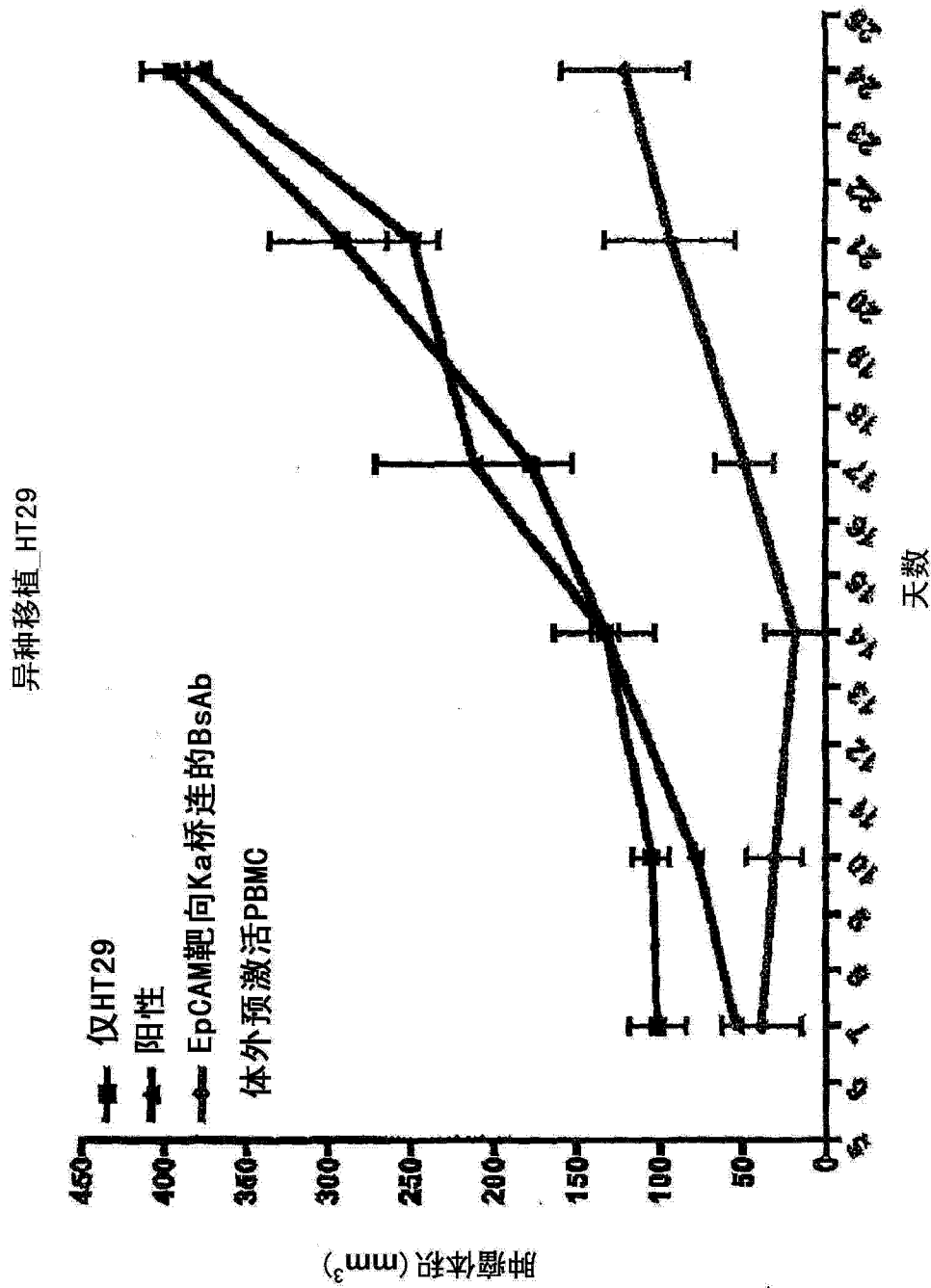


图 9C