

靶向 HER2 的抗原结合构建体及用途

技术领域

本发明涉及抗原结合构建体，具体的涉及靶向 HER2 的抗原结合构建体及用途。

背景技术

Her2 (human epidermal growth factor receptor 2, 人类表皮生长因子受体 2), 也称为 ErbB-2 (Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2), 是人类表皮生长因子受体 (HER/EGFR/ERBB) 家族的成员, 该家族包括 EGFR (ErbB-1)、Her2/c-neu (ErbB-2)、Her3 (ErbB-3) 和 Her4 (ErbB-4)。Her2 蛋白具有细胞外配体结合结构域 (domain I-IV)、跨膜结构域和细胞内结构域。Her2 的配体未知。Her2 与其它三种受体 (ErbB-1、ErbB-3、ErbB-4) 的任何一种形成异源二聚体, 二聚化导致受体胞质结构域内酪氨酸残基的自磷酸化, 并激活多种信号通路, 包括 MAPK (mitogen-activated protein kinase)、PI3K/Akt (phosphoinositide 3-kinase)、PKC (protein kinase C)、STAT (Signal transducer and activator of transcription)。Her2 基因的扩增或过表达在某些侵袭性乳腺癌的发生和发展中起重要作用, 15%~30%乳腺癌患者中为 Her2 阳性, Her2 是乳腺癌患者重要生物标志物和治疗靶标。此外, 7%~34%的胃癌患者 Her2 过表达、30%的涎腺导管癌 Her2 过表达。

治疗 Her2 阳性肿瘤的多款靶向 Her2 抗体药物已经上市, 包括靶向 Her2 胞外结构域 IV (ECD4) 的罗氏单抗药物 Herceptin®, 靶向 Her2 胞外结构域 II (ECD2) 的罗氏 Perjeta®, 以及罗氏 ADC 药物 T-DM1® (ado-trastuzumab memtansine)。这些单抗药物的作用机理包括: 1) 下调 Her2 信号, 2) 结合 Her2 形成信号传导异源二聚体的表位, 3) 内吞 Her2, 4) 单抗的 ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity, 抗体依赖的细胞毒性作用)。单特异性靶向不针对在信号传导和发病机制中可能有关的其它靶表位, 允许药物抗性和逃避机制。

抗体的聚集将带来表达和/或纯化、免疫原性、毒性、降解、亲和力受损、或储存之后失去活性等方面的困难。因此, 在工业应用中, 降低抗体的聚集是需要的。对于 scFv, 其是单链分子, 更易聚集, 可聚集成二聚体 (Diabody)、三聚体 (triabody) 和四聚体 (tetraabody)。

发明内容

本发明提供了抗原结合构建体, 降低了抗原结合构建体的聚集。本发明还提供了抗原结合构建体的用途。

一方面, 本发明提供了一种抗原结合构建体, 其包含单价且特异性地结合 HER2 表达细胞上的 HER2 的 ECD4 抗原的第一抗原结合片段, 所述第一抗原结合片段为 scFv; 所述第一抗原结合片段的重链可变区包含根据 Kabat 编号系统的位置 30 处的氨基酸突变, 优选地, 突变后的氨基酸为 E, 或/和所述第一抗原结合片段的轻链可变区包含根据 Kabat 编号系统的位置 53 处的氨基酸突变, 优选地, 突变后的氨基酸为 Y。

或者, 本发明提供了一种抗原结合构建体, 其包含单价且特异性地结合 HER2 表达细胞上的 HER2 的 ECD4 抗原的第一抗原结合片段, 所述第一抗原结合片段为 scFv; 所述第一抗原结合片段的重链可变区包含根据 Kabat 编号系统的位置 30 处的氨基酸为 K 或 E, 或/和所述第一抗原结合片段的轻链可变区包含根据 Kabat 编号系统的位置 53 处的氨基酸为 F 或 Y; 但是所述第一抗原结合片段的重链可变区的根据 Kabat 编号系统的位置 30 处的氨基酸为 K 时, 所述第一抗原结合片段的轻链可变区的根据 Kabat 编号系统的位置 53 处的氨基酸不为 F。

在一些实施方案中, 所述第一抗原结合片段的重链可变区包含根据 Kabat 编号系统的 K30E 突变, 或/和所述第一抗原结合片段的轻链可变区包含根据 Kabat 编号系统的 F53Y 突变。在一些具体的实施方案中, 所述第一抗原结合片段的重链可变区包含根据 Kabat 编号系统的 K30E 突变。在另一些具体的实施方案中, 所述第一抗原结合片段的轻链可变区包含根据 Kabat 编号系统的 F53Y 突变。在一些实施方案中, 所述第一抗原结合片段的重链可变区包含根据 Kabat 编号系统的 K30E 突变, 并且所述第一抗原结合片段的轻链可变区包含根据 Kabat 编号系统的 F53Y 突变。

在一些实施方案中, 所述的第一抗原结合片段包含选自以下的 CDR 的组:

- 包含重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3, 所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 27、28 和 29 的氨基酸序列;
- 包含重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3, 所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含与分别根据 SEQ ID NOs: 27、28 和 29 的氨基酸序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列;
- 包含轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3, 所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 30、34 和 32 的氨基酸序列;
- 包含轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3, 所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含与分

别根据 SEQ ID NOs: 30、34 和 32 的氨基酸序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列；

v. 包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3，所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 27、28 和 29 的氨基酸序列，所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 30、34 和 32 的氨基酸序列；

vi. 包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3，所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含与分别根据 SEQ ID NOs: 27、28 和 29 的氨基酸序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列，所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含与分别根据 SEQ ID NOs: 30、34 和 32 的氨基酸序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列；

vii. 包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3，所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 43、28 和 29 的氨基酸序列，所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 30、31 和 32 的氨基酸序列；

viii. 包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3，所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 43、28 和 29 的氨基酸序列，所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 30、33 和 32 的氨基酸序列；或

ix. 包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3，所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 44、28 和 29 的氨基酸序列，所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 30、31 和 32 的氨基酸序列。

其中 SEQ ID NO: 27 所示序列为 GFNIX₂DTYIH, X₂ 为 K 或 E; SEQ ID NO: 34 所示序列为 SASX₁LYS, X₁ 为 F 或 Y。

在一些实施方案中，所述的第一抗原结合片段包含曲妥珠单抗的重链可变区或其突变体，以及曲妥珠单抗的轻链可变区或其突变体，所述重链可变区的突变体包含根据 Kabat 编号系统的 K30E 突变，轻链可变区的突变体包含根据 Kabat 编号系统的 F53Y 突变。

在一些实施方案中，所述的第一抗原结合片段选自：

i. 所述的第一抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区包含分别根据 SEQ ID NOs: 41 和 42 的氨基酸序列；

ii. 所述的第一抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区包含与分别根据 SEQ ID NOs: 41 和 42 的氨基酸序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列；

iii. 所述的第一抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区包含分别根据 SEQ ID NOs: 35 和 36 的氨基酸序列；

iv. 所述的第一抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区包含分别根据 SEQ ID NOs: 35 和 39 的氨基酸序列；或

v. 所述的第一抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区包含分别根据 SEQ ID NOs: 40 和 36 的氨基酸序列；

其中，SEQ ID NO: 41 所示序列为：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIX₂DTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKG
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSS, X₂ 为 K 或 E；

SEQ ID NO: 42 所示序列为：

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASX₁LYSGVPSRFSGRS
GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYYTTPPTFGQGTKVEIK, X₁ 为 F 或 Y。

在一些实施方案中，本文所述的抗原结合构建体还包含单价且特异性地结合 HER2 表达细胞上的 HER2 的 ECD2 抗原的第二抗原结合片段。在一些实施方案中，所述的第二抗原结合片段为 Fab。在一些实施方案中，所述的第二抗原结合片段包含帕妥珠单抗的重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3。在一些实施方案中，所述的第二抗原结合片段包含帕妥珠单抗的重链可变区和帕妥珠单抗的轻链可变区。

在一方面，本发明提供了药物组合物，其包含根据本文所述的抗原结合构建体和药学上可接受的载体。

在一方面，本发明提供了分离的核酸或分离的核酸集合，其包含编码根据本文所述的抗原结合构建体的至少一个抗原结合片段的至少一个核酸序列。

在一方面，本发明提供了载体或载体集合，其包含本文所述的核酸或核酸集合中的一种或多种。

在一方面，本发明提供了分离的细胞，其包含根据本文所述的核酸或核酸集合，或根据本文所述的载体或载体集合。

在一方面，本发明提供了制备本文所述的抗原结合构建体的方法，其包括在适于表达所述抗原结合构建体的条件下培养宿主细胞，其中所述宿主细胞包含编码根据本文所述的抗原结合构建体的核酸、或者根

据本文所述的载体或载体集合；并且纯化所述构建体。

另一方面，本发明提供了治疗患有 HER2 表达肿瘤的受试者的方法，其包括向所述受试者施用治疗有效量的根据本文所述的抗原结合构建体或根据本文所述的药物组合物。

另一方面，本发明提供了杀伤 HER2 表达肿瘤细胞或抑制 HER2 表达肿瘤细胞生长的方法，其包括使所述肿瘤细胞与根据本文所述的抗原结合构建体接触。

另一方面，本发明提供了抑制、减少或阻断细胞中的 HER2 信号传导的方法，其包括向所述细胞施用有效量的根据本文所述的抗原结合构建体或根据本文所述的药物组合物。

另一方面，本发明提供了检测或测量样品中的 HER2 的方法，其包括使所述样品与根据本文所述的抗原结合构建体接触并且检测或测量结合复合物。

又一方面，本发明提供了增强抗原结合构建体的聚集抗性的方法，其中，所述抗原结合构建体包含单价且特异性地结合 HER2 表达细胞上的 HER2 的 ECD4 抗原的第一抗原结合片段，所述第一抗原结合片段为 scFv；所述方法包括：对抗原结合构建体进行修饰，使得所述第一抗原结合片段的重链可变区包含根据 Kabat 编号系统的位置 30 处的氨基酸突变，突变后的氨基酸为 E，或/和所述第一抗原结合片段的轻链可变区包含根据 Kabat 编号系统的位置 53 处的氨基酸突变，突变后的氨基酸为 Y。

附图说明

图 1 为 anti-HER2 双特异抗体 Expi Her2-2 糖谱分析；

图 2 为 anti-HER2 双特异抗体 23C2 Her2-2 糖谱分析；

图 3 为联用的曲妥珠单抗和帕妥珠单抗、以及 anti-HER2 双特异抗体对 BT474 肿瘤细胞的杀伤率；

图 4 为曲妥珠单抗、联用的曲妥珠单抗和帕妥珠单抗、T-DM1 以及 anti-HER2 双特异抗体对 NCI-N87 肿瘤细胞的杀伤率；

图 5 为曲妥珠单抗、联用的曲妥珠单抗和帕妥珠单抗、T-DM1 以及 anti-HER2 双特异抗体对 JIMT-1 肿瘤细胞的杀伤率；

图 6 为曲妥珠单抗、联用的曲妥珠单抗和帕妥珠单抗、以及 anti-HER2 双特异抗体对 BT474 肿瘤细胞的增殖抑制；

图 7 为联用的曲妥珠单抗和帕妥珠单抗、以及 anti-HER2 双特异性抗体对胃癌 N87 小鼠异种肿瘤移植模型的小鼠肿瘤体积变化的影响；

图 8 为联用的曲妥珠单抗和帕妥珠单抗、以及 anti-HER2 双特异性抗体对胃癌 N87 小鼠异种肿瘤药效中的小鼠体重变化的影响；

图 9 为一些示例性的 anti-HER2 双特异性抗体的结构；其中用一条显示为黑色的链（第一 Fc 多肽）和另一条显示为灰色的链（第二 Fc 多肽）描绘二聚 Fc，第一抗原结合片段为 scFv，与第一 Fc 多肽融合，而第二抗原结合片段为 Fab，与第二 Fc 多肽融合。

具体实施方式

术语

术语“抗原结合构建体”是指能够与抗原结合的任何试剂，如多肽或多肽复合物。在一些方面，抗原结合构建体是与目标抗原特异性结合的多肽。抗原结合构建体可以是单体、二聚体、多聚体、蛋白质、肽、或蛋白质或肽复合物；抗体或其抗原结合部分；scFv 等。抗原结合构建体可以是单特异性、双特异性或多特异性的多肽构建体。在一些方面，抗原结合构建体可包括例如与一个或多个 Fc 连接的一个或多个抗原结合组分（例如，Fab 或 scFv）。在下面描述并且在实施例中提供了抗原结合构建体的其它实例。

术语“双特异性”旨在说明任何试剂例如抗原结合构建体包括具有两个抗原结合部分（例如抗原结合片段），所述部分各自具有独特结合特异性。例如，第一抗原结合片段与第一抗原上的表位结合，而第二抗原结合片段与第二抗原上的表位结合。又例如，第一抗原结合片段、第二抗原结合片段分别与同种抗原的不同表位相结合。

“抗体”以其最广义使用，特别涵盖完整的单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体（例如双特异性抗体）、多功能抗体以及抗体片段，只要它们具有所需的生物学活性。

术语“可变区”是指抗体的轻链或重链的 N 端结构域限定的约 100 至 110 个或更多个氨基酸的主要负责抗原识别的结构域。术语轻链可变区（VL）和重链可变区（VH）分别指这些轻链和重链结构域。

术语“CDR”（互补决定区），也称为“高变区”，是指在序列上高度可变和/或形成结构限定的环的抗体可变结构域的每个区域。天然四链抗体通常包含六个 CDR，三个在重链可变区中，三个在轻链可变区

中。

术语“Fab”是指含有轻链的恒定结构域（CL）和重链的第一恒定结构域（CH1）连同分别在轻链和重链上的可变结构域 VL（轻链可变区）和 VH（重链可变区）。可变结构域包含参与抗原结合的互补决定区（CDR）。

术语“scFv”包括抗体的 VH 和 VL 结构域，其中这些结构域存在于单一多肽链中。在一些实施方案中，scFv 还包含介于 VH 和 VL 结构域之间的多肽接头，其使得 scFv 能够形成抗原结合所需的结构。

术语“ECD”为胞外结构域。HER2 的胞外结构域包括四个结构域，分别为 ECD1、ECD2、ECD3 和 ECD4。

“曲妥珠单抗”（通用名 Trastuzumab）是一种重组的人源化单克隆抗体，选择性地作用于人表皮生长因子受体-2（HER2）的 ECD4，可以用于治疗 HER2 阳性的癌症，其一个实例是以商品名 HERCEPTIN® 上市的治疗性单克隆抗体产品。

“帕妥珠单抗”（通用名 Pertuzumab）是一种重组的人源化单克隆抗体，选择性地作用于人表皮生长因子受体-2（HER2）的 ECD2，可以用于治疗 HER2 阳性的癌症。

术语“HER2”是 EGFR 家族的第二个成员，具有酪氨酸激酶活性。

术语“可操作地连接”是指两个或更多个肽或多肽结构域或核酸（例如，DNA）区段之间的功能连接关系。在蛋白、抗体或其他多肽的上下文中，术语“可操作地连接”是指两个或更多个氨基酸区段被连接以便产生功能性多肽。

术语“EC50”是指有效浓度，引起抗原结合构建体的 50%最大应答。如本文所用，术语“IC50”是指抑制浓度，引起抗原结合构建体的 50%最大应答。EC50 和 IC50 两者均可以通过 ELISA 或 FACS 分析或本领域已知的任何其它方法进行测量。

术语“KD”在用于本文时指平衡解离常数，以摩尔浓度（M）表示。抗原结合构建体的 KD 值可以使用本领域公知的方法测定。一种优选的测定抗原结合构建体 KD 的方法是使用表面等离子共振（surface plasmon resonance），更优选使用生物传感器系统，例如 Biacore 系统。

术语“治疗”是指为了以统计学显著的方式治疗、治愈、减轻、缓解、改变、补救、改善、改进或影响疾患（例如疾病）、疾患的症状，或预防或延缓症状、并发症、生化指标的发作，或以其它方式阻滞或抑制疾病、疾患或病症的进一步发展而使用措施。

术语“治疗有效量”是指向受试者提供治疗性和/或预防性益处所必需的抗原结合构建体或组合物的量。

术语“受试者”包括任何人类或非人动物。术语“非人动物”包括所有的脊椎动物，例如哺乳动物和非哺乳动物，诸如非人灵长类、绵羊、犬、猫、马、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。优选地，根据本发明的受试者是人。除非标明，术语“患者”或“受试者”可以互换使用。

如本文所用，“约”表示在本领域普通技术人员判定的对特定值可以接受的误差范围内，其部分取决于如何测量或测定该值，即测量系统的限制。例如，“约”按照本领域实践可表示 1 倍或超过 1 倍标准偏差以内。或者，“约”可以表示多至 5%（即±5%）的范围，例如在所给定的具体数值范围±2%范围内、±1%范围内或±0.5%范围内波动。当本申请或权利要求中给出特定值时，除非另有说明，“约”的含义应认为是在该特定值的可接受的误差范围内。

术语“同一性（identity）”，也称一致性。两序列间的百分比同一性为序列共有的相同位置数的函数（即%同一性=相同位置数/位置总数×100），其中需考虑产生两序列的最优比对需要引入的缺口数和每个缺口的长度。如下述非限制性实施例所示，可以使用数学算法完成序列的比较和两序列间百分比同一性的测定。可以使用 E.Meyers 和 W.Miller 的算法（Comput.Appl.Biosci.,4:11-17(1988)）测定两氨基酸序列间的百分比同一性，该算法已收入到 ALIGN 程序（版本 2.0）中，其使用 PAM120 残基权重表，缺口长度罚分为 12，缺口罚分为 4。此外，可以使用 Needleman 和 Wunsch 的算法（J. Mol.Biol. 484-453(1970)）测定两氨基酸序列的百分比同一性，该算法已掺入到 GCG 软件包（可在 www.gcg.com 获得）中的 GAP 程序中，其使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵，缺口权重为 16、14、12、10、8、6 或 4，长度权重为 1、2、3、4、5 或 6。

术语“Xn”和“Xaa”等同，是指未指定的氨基酸（Unspecified Amino Acid），通过相关表述中的后续定义来指定其涵盖的范围。

在本文中，除非另有说明，术语“包括”或其等同物（例如含有、包含等）为开放式术语，表示包括但不限于所指明的要素、步骤或者组成，而是对于未指明的要素、步骤或者组成是开放的。

在本文中，除非另有说明，否则单数术语涵盖复数的指代物，反之亦然。

为了描述和公开的目的，以引用的方式将所有的专利、专利申请和其它已确定的出版物在此明确地并入本文。这些出版物仅因为它们的公开早于本申请的申请日而提供。所有关于这些文件的日期的声明或这些文件的内容的表述是基于申请者可得的信息，并且不构成任何关于这些文件的日期或这些文件的内容的正确性的承认。而且，在任何国家，在本文中对这些出版物的任何引用并不构成关于该出版物成为本领域的公知常识的一部分的认可。本发明的各个方面将在下述分部中进一步详细描述。

抗原结合构建体

本发明提供了抗原结合构建体，其包含单价且特异性地结合 HER2 表达细胞上的 HER2 的 ECD4 抗原的第一抗原结合片段，所述第一抗原结合片段为 scFv；所述第一抗原结合片段的重链可变区包含根据 Kabat 编号系统的位置 30 处的氨基酸突变（在一些实例中，位置 30 处的突变后的氨基酸为 E），或/和所述第一抗原结合片段的轻链可变区包含根据 Kabat 编号系统的位置 53 处的氨基酸突变（在一些实例中，位置 53 处的突变后的氨基酸为 Y）。

在一些实施方案中，本文的抗原结合构建体还包含单价且特异性地结合 HER2 表达细胞上的 HER2 的 ECD2 抗原的第二抗原结合片段。

在一些实施方案中，本文提供的抗原结合构建体包含与第一抗原结合片段或/和第二抗原结合片段可操作地连接的免疫球蛋白功能域，例如抗体的 CL 区、CH1 区、CH2 区、和/或 CH3 区中的一个或多个。

在一些实施方案中，本文提供的抗原结合构建体包含与第一抗原结合片段或/和第二抗原结合片段可操作地连接的恒定区。所述恒定区可以是免疫球蛋白天然序列恒定区或突变的恒定区，例如天然的或突变的 CL、CH1、CH2、和/或 CH3 功能域中的一个或多个，在一些实例中，这些功能域通过本领域常规的方式可操作地连接。恒定区可以源自人免疫球蛋白的恒定区，如源自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。在一些实例中，恒定区可以具有修饰以改善其介导效应子功能的能力。

在一些实施方案中，本文提供的抗原结合构建体包含与第一抗原结合片段或/和第二抗原结合片段可操作地连接的免疫球蛋白功能域或骨架（skeleton），例如 Fc。该术语 Fc 包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。Fc 可以是人 Fc，如源自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。Fc 可以具有修饰以改善其介导效应子功能的能力，例如，在一些实施方案中，所述骨架具有修饰如 knob into hole、H435R、Y436F、去岩藻糖等。

本文提供的抗原结合构建体可以是单价的、二价的或多价的；可以是单特异性的、双特异性的、或多特异性的。在一些实施方案中，本文提供的抗原结合构建体是抗体。

意外的发现，在抗原结合构建体的 scFV 形式的第一抗原结合片段的可变区引入突变，可以降低抗原结合构建体的聚集。这些突变例如可以是第一抗原结合片段的重链可变区的 30 位（Kabat 编号）氨基酸突变为带负电的谷氨酸（E），或者将第一抗原结合片段的轻链可变区的 53 位（Kabat 编号）氨基酸突变为不带电荷的酪氨酸（Y），或者同时引入这两个突变。另外，发明人发现直接将原始未突变（第 30 位非 E 或/和第 53 位为非 Y）的 scFV 形式的第一抗原结合片段构建双特异性抗原结合构建体，会将其不期望的聚集性能赋予双特性抗原结合构建体，而在 scFV 中引入本文所述的突变后，构建的双特异性抗体展现了优异的抗聚集性。在一些实施方案中，突变的引入并未显著降低抗原结合构建体（例如单特异性、双特异性的抗原结合构建体）对 HER2 抗原的亲和力。在一些实施方案中，抗原结合构建体对 HER2 抗原具有良好的亲和力。在一些实施方案中，双特异性抗原结合构建体（23C2 Her2-2 等）展现了比曲妥珠单抗与帕妥珠单抗对抗原 Her2 更高的结合亲和力。在一些实施方案中，抗原结合构建体对 Her2 抗原的 KD 为约 1E-8M 或更小、约 1E-9M 或更小、约 6.11E-10M 或更小、约 1E-11M 或更小、或约 1E-11M 或更小。在一些实施方案中，Her2 抗原为人 Her2 抗原。在一些实施方案中，通过 Biacore 来测量本文提供的抗原结合构建体的结合亲和力 KD。

在一些实施方案中，本文的抗原结合构建体还展现了优异的抗肿瘤性能例如杀伤肿瘤细胞、抑制肿瘤生长等。在一些实施方案中，本文构建的抗原结合构建体对多种肿瘤细胞、多种 HER2 不同表达水平的细胞展现了良好的杀伤性。例如，一些抗原结合构建体对 BT474（Her2+++）肿瘤细胞展现了良好的杀伤性；一些抗原结合构建体对 NCI-N87（Her2++）肿瘤细胞展现了良好的杀伤性；一些抗原结合构建体对曲妥珠抗性的肿瘤细胞（例如 JIMT-1）展现了良好的杀伤性；还有一些抗原结合构建体对 Her2 低表达的肿瘤细胞（例如 MCF-7 Her2 0/+）展现了良好的杀伤性。

在一些实施方案中，通过小鼠模型实验发现，本文的抗原结合构建体没有明显的毒性作用。

双特异性抗原结合构建体

本文提供了结合 HER2 的双特异性抗原结合构建体。双特异性抗原结合构建体包括两个抗原结合片段，其各自与 HER2 的特定结构域或表位结合。

本文提供的抗原结合构建体是双特异性抗原结合构建体，其包含单价且特异性地结合 HER2 表达细胞上的 HER2 的 ECD4 抗原的第一抗原结合片段，和单价且特异性地结合 HER2 表达细胞上的 HER2 的 ECD2 抗原的第二抗原结合片段；

其中，所述第一抗原结合片段为 scFv；所述第一抗原结合片段的重链可变区包含根据 Kabat 编号系统的位置 30 处的氨基酸突变，突变后的氨基酸为 E，或/和所述第一抗原结合片段的轻链可变区包含根据 Kabat 编号系统的位置 53 处的氨基酸突变，突变后的氨基酸为 Y。

在一些实施方案中，本文提供的抗原结合构建体是双特异性抗原结合构建体，其中所述第一抗原结合片段的重链可变区包含根据 Kabat 编号系统的位置 30 处的氨基酸突变，突变后的氨基酸为 E。

在一些实施方案中，本文提供的抗原结合构建体是双特异性抗原结合构建体，其中所述第一抗原结合片段的轻链可变区包含根据 Kabat 编号系统的位置 53 处的氨基酸突变，突变后的氨基酸为 Y。

在一些实施方案中，本文提供的抗原结合构建体是双特异性抗原结合构建体，其中所述第一抗原结合片段的重链可变区包含根据 Kabat 编号系统的位置 30 处的氨基酸突变，突变后的氨基酸为 E；以及所述第一抗原结合片段的轻链可变区包含根据 Kabat 编号系统的位置 53 处的氨基酸突变，突变后的氨基酸为 Y。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合片段的重链可变区包含根据 Kabat 编号系统的位置 30 处的氨基酸突变，突变前的氨基酸为非 E；在一些方案中，该突变前的氨基酸为 K，也就是说，在一些方案中，所述第一抗原结合片段的重链可变区包含根据 Kabat 编号系统的 K30E 突变。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合片段的轻链可变区包含根据 Kabat 编号系统的位置 53 处的氨基酸突变，突变前的氨基酸为非 Y；在一些方案中，该突变前的氨基酸为 F，也就是说，在一些方案中，所述第一抗原结合片段的轻链可变区包含根据 Kabat 编号系统的 F53Y 突变。

在一些实施方案中，本文的抗原结合构建体是双特异性抗原结合构建体，所述的第一抗原结合片段包含重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3，所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含与分别根据 SEQ ID NOs: 27、28 和 29 的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 81%同一性、至少 82%同一性、至少 83%同一性、至少 84%同一性、至少 85%同一性、至少 86%同一性、至少 87%同一性、至少 88%同一性、至少 89%同一性、至少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性或至少 99%同一性的氨基酸序列。在一些具体的实施方案中，本文的抗原结合构建体是双特异性抗原结合构建体，其中所述的第一抗原结合片段包含重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3，所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 27、28 和 29 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，本文的抗原结合构建体是双特异性抗原结合构建体，所述的第一抗原结合片段包含轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3，所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含与分别根据 SEQ ID NOs: 30、34 和 32 的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 81%同一性、至少 82%同一性、至少 83%同一性、至少 84%同一性、至少 85%同一性、至少 86%同一性、至少 87%同一性、至少 88%同一性、至少 89%同一性、至少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性或至少 99%同一性的氨基酸序列。在一些具体的实施方案中，本文的抗原结合构建体是双特异性抗原结合构建体，其中所述的第一抗原结合片段包含轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3，所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 30、34 和 32 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，本文的抗原结合构建体是双特异性抗原结合构建体，其中所述的第一抗原结合片段包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3，其中所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含与分别根据 SEQ ID NOs: 27、28 和 29 的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 81%同一性、至少 82%同一性、至少 83%同一性、至少 84%同一性、至少 85%同一性、至少 86%同一性、至少 87%同一性、至少 88%同一性、至少 89%同一性、至少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性或至少 99%同一性的氨基酸序列，所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含与分别根据 SEQ ID NOs: 30、34 和 32 的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 81%同一性、至少 82%同一性、至少 83%同一性、至少 84%同一性、至少 85%同一性、至少 86%同一性、至少 87%同一性、至少 88%同一性、至少 89%同一性、至少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性或至少 99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，本文的抗原结合构建体是双特异性抗原结合构建体，其中所述的第一抗原结合片段包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3，所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 27、28 和 29 的氨基酸序列，所述轻链 CDR1、

轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 30、34 和 32 的氨基酸序列。在一些实例中,所述的第一抗原结合片段包含分别根据 SEQ ID NOs: 43、28、29、30、31 和 32 的重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3。在一些实例中,所述的第一抗原结合片段包含分别根据 SEQ ID NOs: 43、28、29、30、33 和 32 的重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3。在一些实例中,所述的第一抗原结合片段包含分别根据 SEQ ID NOs: 44、28、29、30、31 和 32 的重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3。在一些实施方案中,本文的抗原结合构建体是双特异性抗原结合构建体,其中所述的第一抗原结合片段包含曲妥珠单抗的重链可变区的突变体和曲妥珠单抗的轻链可变区,所述重链可变区的突变体包含根据 Kabat 编号系统的 K30E 突变。

在一些实施方案中,本文的抗原结合构建体是双特异性抗原结合构建体,其中所述的第一抗原结合片段包含曲妥珠单抗的重链可变区和曲妥珠单抗的轻链可变区的突变体,所述轻链可变区的突变体包含根据 Kabat 编号系统的 F53Y 突变。

在一些实施方案中,本文的抗原结合构建体是双特异性抗原结合构建体,其中所述的第一抗原结合片段包含曲妥珠单抗的重链可变区的突变体和曲妥珠单抗的轻链可变区的突变体,所述重链可变区的突变体包含 K30E 突变,并且轻链可变区的突变体包含 F53Y 突变。

第一抗原结合片段为 scFV,包含重链可变区和轻链可变区,在一些实施方案中,所述重链可变区为所述曲妥珠单抗的重链可变区或其突变体,所述轻链可变区为所述曲妥珠单抗的轻链可变区或其突变体。

在一些实施方案中,本文的抗原结合构建体是双特异性抗原结合构建体,所述的第一抗原结合片段的重链可变区和轻链可变区包含与分别根据 SEQ ID NOs: 41 和 42 的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 85%同一性、至少 86%同一性、至少 87%同一性、至少 88%同一性、至少 89%同一性、至少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性或至少 99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述的第一抗原结合片段包含本文任一上述的 CDR 区序列特征。在一些实施方案中,所述的第一抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区包含分别根据 SEQ ID NOs: 41 和 42 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述的第一抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区包含分别根据 SEQ ID NOs: 35 和 36 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述的第一抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区包含分别根据 SEQ ID NOs: 35 和 39 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述的第一抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区包含分别根据 SEQ ID NOs: 40 和 36 的氨基酸序列。

在一些实施方案中,第一抗原结合片段的重链可变区和轻链可变区之间通过接头(linker)连接,形成 scFV。接头可以采用任何适宜的、例如带电的和/或柔性的接头。在具体的实施方案中,接头由通过肽键连接的 1 到 50 个氨基酸组成,其中所述氨基酸可以选自 20 个天然存在的氨基酸;在更优选的实施方案中,1 到 50 个氨基酸选自甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺和赖氨酸;甚至更优选的,接头由大部分空间上不受阻碍的氨基酸(诸如甘氨酸和丙氨酸)组成。特别有用的柔性接头是(GGGGS)_n(也称作(G4S)_n)。在一些实施方案中,n 是 1-10 之间的任意数,即 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10,或由前述数字中的任意两个限定的任何范围,例如 1-5、2-5、3-6、2-4、1-4 等等。在一些具体实施方案中,所述接头含有序列为 GSGGSGSGGSGG (SEQ ID NO: 52) 的柔性连接肽。在一些具体实施方案中,所述接头含有序列为 GGGGSGGGSGGGG (SEQ ID NO: 53) 的柔性连接肽。在一些具体实施方式中,所述接头含有序列为 GGGGSGGGSGGGSGGGG (SEQ ID NO: 54) 的柔性连接肽。在一些具体实施方案中,所述接头含有序列为 GGGPGKR (SEQ ID NO: 55) 的柔性连接肽。其它合适的接头的例子还包括专利申请 WO2019195535 的表 4 所公开的那些。

在一些实施方案中,本文所述的抗原结合构建体是双特异性抗原结合构建体,其中所述的第一抗原结合片段的 VH 和 VL 从 N-末端到 C-末端按照如下顺序排列: VH-linker-VL。在一些实施方案中,所述的第一抗原结合片段的 VH 和 VL 从 N-末端到 C-末端按照如下顺序排列: VL-linker-VH。

在一些实施方案中,本文所述的抗原结合构建体是双特异性抗原结合构建体,其中所述的第二抗原结合片段为 Fab。第二抗原结合片段特异性地结合 HER2 表达细胞上的 HER2 的 ECD2 抗原。

在一些实施方案中,所述的第二抗原结合片段包含帕妥珠单抗的重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3。在一些实施方案中,所述的第二抗原结合片段包含帕妥珠单抗的轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3。在一些实施方案中,所述的第二抗原结合片段包含帕妥珠单抗的重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3。帕妥珠单抗的重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 的氨基酸序列依次分别为: GFTFTDYTMD (SEQ ID NO: 45)、

DVNPNSGGSIYNQRFGK (SEQ ID NO: 46)、NLGPSFYFDY (SEQ ID NO: 47)、KASQDVSIGVA (SEQ ID NO: 48)、SASYRYT (SEQ ID NO: 49)、QQYYIYPYT (SEQ ID NO: 50)。

在一些实施方案中,所述的第二抗原结合片段包含帕妥珠单抗的重链可变区和轻链可变区。在一些实施方案中,所述第二抗原结合片段为帕妥珠单抗的 Fab 片段。所述帕妥珠单抗的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 37 所示,轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 38 所示。

在一些实施方案中,本文所述的抗原结合构建体是双特异性抗原结合构建体,包含恒定区。在一些实施方案中,所述恒定区通过接头与第一抗原结合片段和第二抗原结合片段连接。在一些实施方案中,恒定区直接与第一抗原结合片段和第二抗原结合片段连接。

在一些实施方案中,本文所述的抗原结合构建体是双特异性抗原结合构建体,包含骨架 (skeleton)。在一些实施方案中,所述骨架通过接头多肽 (例如选自 IgG1、IgG2 或 IgG4 铰链区的免疫球蛋白铰链区多肽) 与第一抗原结合片段和第二抗原结合片段连接。在一些实施方案中,骨架直接与第一抗原结合片段和第二抗原结合片段连接。

在一些实施方案中,所述骨架为包含第一 Fc 多肽和第二 Fc 多肽的二聚 Fc。本文的 Fc 用于定义含恒定区的至少一个部分的免疫球蛋白重链的 C 端区域,二聚 Fc 的 Fc 多肽是指形成二聚 Fc 结构域的两个多肽之一,即包含免疫球蛋白重链的 C 端恒定区,能够稳定自我缔合的多肽。除非本文另有说明,否则 Fc 区或恒定区中氨基酸残基的编号是根据 EU 编号系统。例如,二聚 IgG Fc 的 Fc 多肽包含 IgG CH2 和 IgG CH3 恒定结构域序列。CH3 结构域包含两个 CH3 序列,分别来自于第一 Fc 多肽和第二 Fc 多肽,CH2 结构域包含两个 CH2 序列,分别来自于第一 Fc 多肽和第二 Fc 多肽。在一些实施方案中,所述第一抗原结合片段与第一 Fc 多肽可操作地连接,第二抗原结合片段与第二 Fc 多肽可操作地连接。在一些实施方案中,第一抗原结合片段与第一 Fc 多肽之间通过第一多肽接头可操作地连接,第二抗原结合片段与第二 Fc 多肽之间通过第二多肽接头可操作地连接。所述第一接头多肽和第二接头多肽能够相互形成共价键,例如二硫键。在一些实施方案中,第一接头多肽或/和第二接头多肽包含 IgG1 的铰链区;在一些实施方案中,第一接头多肽或/和第二接头多肽包含 IgG2 的铰链区;在一些实施方案中,第一接头多肽或/和第二接头多肽包含 IgG3 的铰链区;在一些实施方案中,第一接头多肽或/和第二接头多肽包含 IgG4 的铰链区。

在一些实施方案中,所述的二聚 Fc 为人 IgG1 的 Fc。在一些实施方案中,所述的二聚 Fc 为人 IgG4 的 Fc。

在一些实施方案中,所述的二聚 Fc 具有修饰。在一些实施方案中,二聚 Fc 具有 H435R 或/和 Y436F,该修饰可以处于第一 Fc 多肽、第二 Fc 多肽的任意一条多肽链上。在一些具体实施方案中,二聚 Fc 具有 H435R 或/和 Y436F,该修饰仅发生在一条 Fc 多肽上,而不发生在另一条 Fc 多肽上。在一些实施方案中,二聚 Fc 具有 knob-into-hole 的突变位点,例如 Y349C、T366S、L368A、Y407V、S354C 和 T366W 等。在一些实施方案中,二聚 Fc 的一条链具有 T366Y/W 或/和 S354C,且另一条链具有 Y407T/V、Y349C、T366S 或/和 L368A。

在一些实施方案中,二聚 Fc 不含岩藻糖。

在一些实施方案中,本文的抗原结合构建体经糖基化。

在一些实施方案中,本文的抗原结合构建体无岩藻糖基化。通过去岩藻糖基化可以提高 IgG1 与 FcγRIIIa 的相互作用,进而增强抗体的 ADCC 作用。生成在 Fc 糖基化位点上具有很少或没有岩藻糖的抗原结合构建体,而不改变氨基酸序列的方法在本领域是已知的,例如调整表达细胞所处培养基的成分,或者敲除表达细胞的岩藻糖表达相关基因如 FUT8。

在一些实施方案中,本文提供的双特异性抗原结合构建体是二价的。

表 S1 示例性的提供了双特性抗原结合构建体。在一些实施方案中,本文的双特异性抗原结合构建体是双特异性抗体。表 S2 示例性的提供了双特异性抗体,例如 Expi Her2-2、Expi Her2-3、Expi Her2-4、23C-HER2-2、23C-HER2-3、23C-HER2-4, CDR 区及可变区的序列提供于表 S2 中。示例性的双特性抗体包含两条重链和一条轻链,Expi Her2-2、23C-HER2-2 的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13 所示,轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示;Expi Her2-3、23C-HER2-3 的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 13 所示,轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示;Expi Her2-4、23C-HER2-4 的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 13 所示,轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示。

本文还提供了一些 ADCC 增强的双特异性抗原结合构建体。本文提供了示例性的 ADCC 增强的双特异性抗体例如 23C-HER2-2、23C-HER2-3、23C-HER2-4。

表 S1: 示例性双特异性抗原结合构建体

名称	说明	第一抗原结合片段	第二抗原结合片段
/	含表位的结构域	ECD4	ECD2
	形式	scFV	Fab
	原始序列	曲妥珠单抗	帕妥珠单抗
1	序列取代	VL: F53Y	/
2	序列取代	VH: K30E	/
3	序列取代	VL: F53Y VH: K30E	/

表 S2: 示例性双特异性抗体的 CDR 及可变区序列

名称		说明	氨基酸序列
Expi Her2- 2/ 23C- HER 2-2	第一抗 原结合 片段 (scFV)	重链 CDR1	GFNIEDTYIH (SEQ ID NO: 43)
		重链 CDR2	RIYPTNGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 28)
		重链 CDR3	WGGDGFYAMDYW (SEQ ID NO: 29)
		重链可变区	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIEDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 35)
		轻链 CDR1	CRASQDVNTAVAW (SEQ ID NO: 30)
		轻链 CDR2	SASYLYS (SEQ ID NO: 31)
		轻链 CDR3	QQHYTTPPT (SEQ ID NO: 32)
		轻链可变区	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYLYSG VPSRFGSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGKVEIK (SEQ ID NO: 36)
	第二抗 原结合 片段 (Fab)	重链可变区	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDVVRQAPGKGLEWVADVNP SGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 37)
		轻链可变区	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSGVAVYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTG VPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYIYPYTFQGKVEIK (SEQ ID NO: 38)
Expi Her2- 3/ 23C- HER 2-3	第一抗 原结合 片段 (scFV)	重链 CDR1	GFNIEDTYIH (SEQ ID NO: 43)
		重链 CDR2	RIYPTNGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 28)
		重链 CDR3	WGGDGFYAMDYW (SEQ ID NO: 29)
		重链可变区	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIEDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 35)
		轻链 CDR1	CRASQDVNTAVAW (SEQ ID NO: 30)
		轻链 CDR2	SASFLYS (SEQ ID NO: 33)
		轻链 CDR3	QQHYTTPPT (SEQ ID NO: 32)
		轻链可变区	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG VPSRFGSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGKVEIK (SEQ ID NO: 39)
	第二抗 原结合 片段 (Fab)	重链可变区	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDVVRQAPGKGLEWVADVNP SGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 37)
		轻链可变区	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSGVAVYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTG VPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYIYPYTFQGKVEIK (SEQ ID NO: 38)
Expi Her2- 4/ 23C- HER 2-4	第一抗 原结合 片段 (scFV)	重链 CDR1	GFNIKDTYIH (SEQ ID NO: 44)
		重链 CDR2	RIYPTNGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 28)
		重链 CDR3	WGGDGFYAMDYW (SEQ ID NO: 29)
		重链可变区	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 40)
		轻链 CDR1	CRASQDVNTAVAW (SEQ ID NO: 30)
		轻链 CDR2	SASYLYS (SEQ ID NO: 31)
		轻链 CDR3	QQHYTTPPT (SEQ ID NO: 32)
		轻链可变区	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYLYSG VPSRFGSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGKVEIK (SEQ ID NO: 36)
	第二抗 原结合	重链可变区	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDVVRQAPGKGLEWVADVNP SGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 37)

	片段 (Fab)	轻链可变区	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCKASQDVSIGVAWYQKPGKAPKLLIYSASYRTG VPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 38)
--	-------------	-------	--

单特异性抗原结合构建体

单特异性抗原结合构建体是指具有一种结合特异性的抗原结合构建体。

在一些实施方案中，本文提供的抗原结合构建体是单特异性抗原结合构建体，其为单价且特异性地结合 HER2 表达细胞上的 HER2 的 ECD4 抗原的第一抗原结合片段，其中，所述第一抗原结合片段为 scFv；所述第一抗原结合片段的重链可变区包含根据 Kabat 编号系统的位置 30 处的氨基酸突变，突变后的氨基酸为 E，或/和所述第一抗原结合片段的轻链可变区包含根据 Kabat 编号系统的位置 53 处的氨基酸突变，突变后的氨基酸为 Y。

在一些实施方案中，本文提供的抗原结合构建体是单特异性抗原结合构建体，其是二价的，包含两个所述单价且特异性地结合 HER2 表达细胞上的 HER2 的 ECD4 抗原的第一抗原结合片段。

在一些实施方案中，本文提供的抗原结合构建体是单特异性抗原结合构建体，其第一抗原结合片段可采用本文上述的双特异性抗原结合构建体的第一抗原结合片段的序列特征。

在一些实施方案中，本文提供的抗原结合构建体是单特异性抗原结合构建体，其是二价的，包含与第一抗原结合片段可操作地连接的 Fc。在一些实施方案中，Fc 为人 IgG1 的 Fc。

在一些实施方案中，所述抗原结合构建体为二价单特异性抗体，其包含 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述抗原结合构建体为二价单特异性抗体，其包含 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述抗原结合构建体为二价单特异性抗体，其包含 SEQ ID NO: 51 的氨基酸序列。

组合物

本文提供了药物组合物，所述药物组合物包含抗原结合构建体，或编码所述抗原结合构建体的核酸，并且还包含一种或多种药学上可接受的载体。在一些实施方案中，组合物包括双特异性抗体例如 Expi Her2-2、Expi Her2-3、Expi Her2-4、23C-HER2-2、23C-HER2-3、23C-HER2-4 中的一种或多种，以及药学上可接受的载体。药学上可接受的载体包括例如赋形剂、稀释剂、包封材料、填充剂、缓冲剂或其它试剂。

组合物中，抗原结合构建体可完全无岩藻糖基化（意味着其不含可检测的岩藻糖）或其可部分无岩藻糖基化，在一些实施方案中，约 20%或更少、约 18%或更少、约 16%或更少、约 14%或更少、约 12%或更少、约 10%或更少、约 8%或更少、约 6%或更少、约 5%或更少、约 3%或更少、约 2%或更少、约 1.5%或更少、约 1%或更少、约 0.9%或更少、约 0.8%或更少、约 0.7%或更少、约 0.6%或更少、约 0.5%或更少、约 0.4%或更少、约 0.3%或更少、约 0.2%或更少、约 0.1%或更少或约 0%的抗原结合构建体不含岩藻糖。在一些实施方案中，约 0 至约 20%、约 0 至约 18%、约 0 至约 16%、约 0 至约 14%、约 0 至约 12%、约 0 至约 10%、约 0 至约 8%、约 0 至约 6%、约 0 至约 5%、约 0 至约 3%、约 0 至约 2%、约 0 至约 1.5%、约 0 至约 1%、约 0 至约 0.9%、约 0 至约 0.8%、约 0 至约 0.7%、约 0 至约 0.6%、约 0 至约 0.5%、约 0 至约 0.4%、约 0 至约 0.3%、约 0 至约 0.2%、约 0 至约 0.1%、或约 0.5%至约 0.6%的抗原结合构建体不含岩藻糖。

分离的核酸

本文提供了分离的核酸或分离的核酸集合，其包含编码本文所述抗原结合构建体的至少一个多肽的至少一个核酸序列。在一些实施方案中，所述核酸编码本文所述抗原结合构建体的序列。在一些实施方案中，所述核酸可以编码包含本文所述抗原结合构建体的第一抗原结合片段或/和第二抗原结合片段的氨基酸序列。在另一些实施方案中，所述的核酸可以编码包含本文所述的抗原结合构建体重链或/和抗原结合构建体轻链的氨基酸序列。序列表中示例性的列举了一些抗原结合构建体例如双特异性抗体的抗原结合片段、抗原结合构建体重链和轻链的核酸序列。

载体

本发明提供了包含所述的分离的核酸或核酸集合中的一种或多种的载体或载体集合。在一些实施方案中，所述的载体为克隆载体；在另一些实施方案中，所述的载体为表达载体。

所述表达载体可选的为能够表达本文所述抗原结合构建体的任意表达载体。

宿主细胞

在一些实施方案中，本文提供包含所述载体的宿主细胞，宿主细胞为用于克隆或编码抗原结合构建体的适当宿主细胞。在一些实施方案中，宿主细胞为原核细胞。在另一些实施方案中，宿主细胞为真核细胞。在一些实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳细胞或适用于制备抗原结合构建体的其它细胞。哺乳细

胞例如为中国仓鼠（CHO）卵巢细胞、CHO-S细胞。

制备抗原结合构建体的方法

在一些实施方案中，本文提供了制备抗原结合构建体的方法，所述方法包括：在适合所述抗原结合构建体表达的条件下，培养包含编码所述抗原结合构建体的核酸的宿主细胞，从所述宿主细胞或宿主细胞培养基中回收所述抗原结合构建体。为了产生所述的抗原结合构建体，分离编码所述抗原结合构建体的核酸，并插入一个或多个载体，用于在宿主细胞中进一步克隆或/和表达。所述核酸可以采用基因拼接、化学合成、克隆等多种本领域所熟知的方法获取。

用途

本文提供了抗原结合构建体的用途。在具体的实施方案中，使用的抗原结合构建体可以为 Expi Her2-2、Expi Her2-3、Expi Her2-4、23C-HER2-2、23C-HER2-3、23C-HER2-4。

一些实施方案中，向受试者施用治疗有效量的本文的抗原结合构建体，可以杀伤 HER2 表达肿瘤细胞或抑制 HER2 表达肿瘤细胞生长。一些实施方案中，本文提供了抗原结合构建体在制备杀伤 HER2 表达肿瘤细胞或抑制 HER2 表达肿瘤细胞生长的药物中的用途。一些实施方案中，本文提供了用于杀伤 HER2 表达肿瘤细胞或抑制 HER2 表达肿瘤细胞生长中的抗原结合构建体。一些实施方案中，本发明提供了一种用于伤 HER2 表达肿瘤细胞或抑制 HER2 表达肿瘤细胞生长的治疗剂，其包含本文所述的抗原结合构建体作为活性成分。

一些实施方案中，向受试者施用治疗有效量的本文的抗原结合构建体，可以治疗 HER2 表达肿瘤。需要治疗的受试者包括那些已经患有疾病或病状的受试者，处于发展出疾病或病状的风险中的受试者，以及可能患疾病或病状并且其目的是预防、延迟或减弱疾病或病状的受试者。一些实施方案中，本文提供了所述的抗原结合构建体在制备治疗患有 HER2 表达肿瘤的受试者的药物中的用途。一些实施方案中，本文提供了用于治疗 HER2 表达肿瘤中的抗原结合构建体。一些实施方案中，本文提供了一种用于治疗 HER2 表达肿瘤的治疗剂，其包含本文所述的抗原结合构建体作为活性成分。肿瘤的实例包括但不限于：胆道癌、癌肉瘤、食管癌、胃食管结合部癌、乳腺癌、胃癌、胰腺癌、头颈癌、结直肠癌、肾癌、宫颈癌、卵巢癌、子宫内膜癌、子宫癌、恶性黑色素瘤、咽癌、口腔癌或皮肤癌。

在某些实施方案中，如通过 IHC 测定，肿瘤为 HER2 0-1+、1+、HER2 2+或 HER2 3+。在一些实施方案中，肿瘤为 HER2 2+或更低，或 HER2 1+或更低。

一些实施方案中，向细胞施用有效量的抗原结合构建体，可以抑制、减少或阻断细胞中的 HER2 信号传导。一些实施方案中，本文提供了抗原结合构建体在制备抑制、减少或阻断细胞中的 HER2 信号传导的药物中的应用。一些实施方案中，本文提供了用于抑制、减少或阻断细胞中的 HER2 信号传导中的抗原结合构建体。一些实施方案中，本文提供了一种用于抑制、减少或阻断细胞中的 HER2 信号传导的治疗剂，其包含本文所述的抗原结合构建体作为活性成分。一些实施方案中，所述细胞为肿瘤细胞。

在一些实施方案中，提供了检测或测量样品中的 HER2 的方法，其包括使所述样品与本文所述的抗原结合构建体接触并且检测或测量结合复合物。

增强抗原结合构建体的聚集抗性的方法

本文提供了增强抗原结合构建体的聚集抗性的方法，其中，所述抗原结合构建体包含单价且特异性地结合 HER2 表达细胞上的 HER2 的 ECD4 抗原的第一抗原结合片段，所述第一抗原结合片段为 scFv；所述方法包括：对抗原结合构建体进行修饰，使得所述第一抗原结合片段的重链可变区包含根据 Kabat 编号系统的位置 30 处的氨基酸突变，突变后的氨基酸为 E，或/和所述第一抗原结合片段的轻链可变区包含根据 Kabat 编号系统的位置 53 处的氨基酸突变，突变后的氨基酸为 Y。

在一些实施方案中，本文的所述抗原结合构建体还包含单价且特异性地结合 HER2 表达细胞上的 HER2 的 ECD2 抗原的第二抗原结合片段；所述的第二抗原结合片段为 Fab。在一些实施方案中，所述的第一抗原结合片段包含选自以下的 CDR 的组：

- 包含重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3，所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 27、28 和 29 的氨基酸序列；
- 包含重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3，所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含与分别根据 SEQ ID NOs: 27、28 和 29 的氨基酸序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列；
- 包含轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3，所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 30、34 和 32 的氨基酸序列；
- 包含轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3，所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含与分别根据 SEQ ID NOs: 30、34 和 32 的氨基酸序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列；
- 包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3，所述重链 CDR1、

重链 CDR2 和重链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 27、28 和 29 的氨基酸序列, 所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 30、34 和 32 的氨基酸序列;

vi. 包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3, 所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含与分别根据 SEQ ID NOs: 27、28 和 29 的氨基酸序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列, 所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含与分别根据 SEQ ID NOs: 30、34 和 32 的氨基酸序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列;

vii. 包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3, 所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 43、28 和 29 的氨基酸序列, 所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 30、31 和 32 的氨基酸序列;

viii. 包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3, 所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 43、28 和 29 的氨基酸序列, 所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 30、33 和 32 的氨基酸序列; 或 ix. 包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3, 所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 44、28 和 29 的氨基酸序列, 所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 30、31 和 32 的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 所述第一抗原结合片段的重链可变区包含根据 Kabat 编号系统的位置 30 处的氨基酸突变, 突变前的氨基酸为非 E; 在一些方案中, 该突变前的氨基酸为 K, 也就是说, 在一些方案中, 使所述第一抗原结合片段的重链可变区包含根据 Kabat 编号系统的 K30E 突变。

在一些实施方案中, 所述第一抗原结合片段的轻链可变区包含根据 Kabat 编号系统的位置 53 处的氨基酸突变, 突变前的氨基酸为非 Y; 在一些方案中, 该突变前的氨基酸为 F, 也就是说, 在一些方案中, 使所述第一抗原结合片段的轻链可变区包含根据 Kabat 编号系统的 F53Y 突变。

在一些实施方案中, 对抗原结合构建体进行修饰, 使所述第一抗原结合片段的重链可变区包含根据 Kabat 编号系统的 K30E 突变, 使所述第一抗原结合片段的轻链可变区包含根据 Kabat 编号系统的 F53Y 突变。在一些实施方案中, 所述第一抗原结合片段为 scFv 并且包含曲妥珠单抗的重链可变区或其突变体和曲妥珠单抗的轻链可变区或其突变体, 使所述重链可变区的突变体包含 K30E 突变, 使所述轻链可变区的突变体包含 F53Y 突变。

在一些实施方案中, 该方法还包括确认修饰的抗原结合构建体结合到 her2 抗原的能力。在一些实施方案中, 该方法还包括选择结合到 her2 抗原的修饰的抗原结合构建体。在一些实施方案中, 抗原结合构建体的亲和力 (例如 KD) 高于或与未修饰的抗原结合构建体相当。

在一些实施方案中, 该方法还包括选择与未修饰的抗原结合构建体相比聚集趋势降低的抗原结合构建体。

尽管为了清楚理解的目的, 已经通过举例说明和实施例相当详细地描述了前述发明, 但是根据本领域的教义, 本领域的普通技术人员将显而易见的是, 可另外对本发明进行某些改变和修改而不背离所附权利要求的精神和范围。以下实施例仅以说明方式提供, 而并不起限制作用。本领域的技术人员将容易地识别多种非关键性参数, 所述参数可发生改变或修改以产生基本上类似的结果。

除非另外指出, 否则本发明的实践将采用本领域技术范围内的蛋白质化学、生物化学、重组 DNA 技术和药理学的常规方法。文献中全面地解释了此类技术。参见, 例如, T.E.Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties*(W.H.Freeman 和公司, 1993); A.L.Lehninger, *Biochemistry*(Worth Publishers, Inc., 当前增加); Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(1989 年, 第 2 版); *Methods In Enzymology*(S.Colowick 和 N.Kaplan 编辑, Academic Press, Inc.); Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 第 18 版(Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey 和 Sundberg *Advanced Organic Chemistry* 第 3 版(Plenum Press)A 和 B 卷(1992)。

本发明还提供了以下一些具体的实施方案, 但本发明的保护范围不限于此:

实施方案 1. 一种抗原结合构建体, 其包含单价且特异性地结合 HER2 表达细胞上的 HER2 的 ECD4 抗原的第一抗原结合片段, 所述第一抗原结合片段为 scFv; 所述第一抗原结合片段的重链可变区包含根据 Kabat 编号系统的位置 30 处的氨基酸突变, 优选地, 突变后的氨基酸为 E, 或/和所述第一抗原结合片段的轻链可变区包含根据 Kabat 编号系统的位置 53 处的氨基酸突变, 优选地, 突变后的氨基酸为 Y。

实施方案 2. 根据实施方案 1 所述的抗原结合构建体, 其中所述第一抗原结合片段的重链可变区包含根据 Kabat 编号系统的 K30E 突变, 或/和所述第一抗原结合片段的轻链可变区包含根据 Kabat 编号系统的 F53Y 突变。

实施方案 3. 根据实施方案 1 或 2 所述的抗原结合构建体, 其为抗体。

实施方案 4. 根据实施方案 1-3 任一项所述的抗原结合构建体, 其中所述的第一抗原结合片段包含选自以下的 CDR 的组:

- i. 包含重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3, 所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 27、28 和 29 的氨基酸序列;
- ii. 包含重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3, 所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含与分别根据 SEQ ID NOs: 27、28 和 29 的氨基酸序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列;
- iii. 包含轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3, 所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 30、34 和 32 的氨基酸序列;
- iv. 包含轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3, 所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含与分别根据 SEQ ID NOs: 30、34 和 32 的氨基酸序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列;
- v. 包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3, 所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 27、28 和 29 的氨基酸序列, 所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 30、34 和 32 的氨基酸序列;
- vi. 包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3, 所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含与分别根据 SEQ ID NOs: 27、28 和 29 的氨基酸序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列, 所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含与分别根据 SEQ ID NOs: 30、34 和 32 的氨基酸序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列;
- vii. 包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3, 所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 43、28 和 29 的氨基酸序列, 所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 30、31 和 32 的氨基酸序列;
- viii. 包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3, 所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 43、28 和 29 的氨基酸序列, 所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 30、33 和 32 的氨基酸序列; 或
- ix. 包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3, 所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 44、28 和 29 的氨基酸序列, 所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 30、31 和 32 的氨基酸序列。

实施方案 5. 根据实施方案 1-4 任一项所述的抗原结合构建体, 其中所述的第一抗原结合片段包含曲妥珠单抗的重链可变区或其突变体, 以及曲妥珠单抗的轻链可变区或其突变体, 所述重链可变区的突变体包含根据 Kabat 编号系统的 K30E 突变, 轻链可变区的突变体包含根据 Kabat 编号系统的 F53Y 突变。

实施方案 6. 根据实施方案 4-5 任一项所述的抗原结合构建体, 其中所述的第一抗原结合片段选自:

- i. 所述的第一抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区和轻链可变区包含分别根据 SEQ ID NOs: 41 和 42 的氨基酸序列;
- ii. 所述的第一抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区和轻链可变区包含与分别根据 SEQ ID NOs: 41 和 42 的氨基酸序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列;
- iii. 所述的第一抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区和轻链可变区包含分别根据 SEQ ID NOs: 35 和 36 的氨基酸序列;
- iv. 所述的第一抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区和轻链可变区包含分别根据 SEQ ID NOs: 35 和 39 的氨基酸序列; 或
- v. 所述的第一抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区和轻链可变区包含分别根据 SEQ ID NOs: 40 和 36 的氨基酸序列。

实施方案 7. 根据实施方案 1-6 任一项所述的抗原结合构建体, 其中所述的第一抗原结合片段的 VH 和 VL 从 N-末端到 C-末端按照如下顺序排列: VH-linker-VL。

实施方案 8. 根据实施方案 1-7 任一项所述的抗原结合构建体, 其中所述抗原结合构建体还包含单价且特异性地结合 HER2 表达细胞上的 HER2 的 ECD2 抗原的第二抗原结合片段。

实施方案 9. 根据实施方案 8 所述的抗原结合构建体, 其中所述的第二抗原结合片段为 Fab。

实施方案 10. 根据实施方案 8 或 9 所述的抗原结合构建体, 其中所述的第二抗原结合片段包含帕妥珠单抗的重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3。

实施方案 11. 根据实施方案 8 或 9 所述的抗原结合构建体, 其中所述的第二抗原结合片段包含帕妥珠单抗的重链可变区和帕妥珠单抗的轻链可变区。

实施方案 12. 根据实施方案 8-11 任一项所述的抗原结合构建体, 其中抗原结合构建体包含与第一抗原结合片段或/和第二抗原结合片段可操作地连接的免疫球蛋白功能域, 所述免疫球蛋白功能域包含: i. CL,

CH1, CH2, 或 CH3 中的一个多几个, 或者 ii. Fc。

实施方案 13. 根据实施方案 12 所述的抗原结合构建体, 其中所述 CL、CH1、CH2、CH3、Fc 分别衍生自人 IgG 的 CL、CH1、CH2、CH3、Fc。

实施方案 14. 根据实施方案 12 所述的抗原结合构建体, 其中所述 CL、CH1、CH2、CH3 或 Fc 具有修饰或不具有修饰; 优选, 所述 CH3 或 Fc 具有的修饰例如是根据 Kabat 编号系统的第 435 或/和第 436 位氨基酸的取代。

实施方案 15. 根据实施方案 12 所述的抗原结合构建体, 其中所述 Fc 为包含第一 Fc 多肽和第二 Fc 多肽的二聚 Fc, 第一抗原结合片段与第一 Fc 多肽的可操作地连接, 第二抗原结合片段与第二 Fc 多肽的可操作地连接。

实施方案 16. 根据实施方案 1-15 任一项所述的抗原结合构建体, 其中抗原结合构建体为双特异性抗体或多特异性抗体。

实施方案 17. 根据实施方案 1-15 任一项所述的抗原结合构建体, 其是二价的或多价的。

实施方案 18. 根据实施方案 1-7 任一项所述的抗原结合构建体, 其中抗原结合构建体为单特异性抗体; 其中所述的抗原结合构建体为单价的、二价的或多价的。

实施方案 19. 根据实施方案 1 所述的抗原结合构建体, 其选自下组:

- i. 所述抗原结合构建体为二价双特异性抗体, 其包含: 包含 SEQ ID NO: 11 的重链、包含 SEQ ID NO: 13 的重链和包含 SEQ ID NO: 15 的轻链;
- ii. 所述抗原结合构建体为二价双特异性抗体, 其包含: 包含 SEQ ID NO: 21 的重链、包含 SEQ ID NO: 13 的重链和包含 SEQ ID NO: 15 的轻链;
- iii. 所述抗原结合构建体为二价双特异性抗体, 其包含: 包含 SEQ ID NO: 23 的重链、包含 SEQ ID NO: 13 的重链和包含 SEQ ID NO: 15 的轻链;
- iv. 所述抗原结合构建体为二价单特异性抗体, 其包含 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列;
- v. 所述抗原结合构建体为二价单特异性抗体, 其包含 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列; 或
- vi. 所述抗原结合构建体为二价单特异性抗体, 其包含 SEQ ID NO: 51 的氨基酸序列。

实施方案 20. 根据实施方案 1-19 任一项所述的抗原结合构建体, 其中所述的抗原结合构建体与第 30 位非 E 或/和第 53 位为非 Y 的抗原结合构建体相比具有降低的聚集性; 或/和, 所述的抗原结合构建体与第 30 位非 E 或/和第 53 位为非 Y 的抗原结合构建体相比未显著降低对 HER2 的 ECD4 抗原或/和 ECD2 抗原的结合亲和力。

实施方案 21. 根据实施方案 1-20 任一项所述的抗原结合构建体, 其中所述的抗原结合构建体是无岩藻糖基化的。

实施方案 22. 一种药物组合物, 其包含根据实施方案 1-21 任一项所述的抗原结合构建体和药学上可接受的载体。

实施方案 23. 一种分离的核酸或分离的核酸集合, 其包含编码根据实施方案 1-21 任一项所述的抗原结合构建体的至少一个抗原结合片段的至少一个核酸序列。

实施方案 24. 一种载体或载体集合, 其包含根据实施方案 23 所述的核酸或核酸集合中的一种或多种。

实施方案 25. 一种分离的细胞, 其包含根据实施方案 23 所述的核酸或核酸集合, 或根据权利要求 24 所述的载体或载体集合。

实施方案 26. 一种制备根据实施方案 1-21 任一项所述的抗原结合构建体的方法, 其包括在适于表达所述抗原结合构建体的条件下培养宿主细胞, 其中所述宿主细胞包含编码所述抗原结合构建体的核酸、或者根据实施方案 24 所述的载体或载体集合; 并且纯化所述构建体。

实施方案 27. 一种治疗患有 HER2 表达肿瘤的受试者的方法, 其包括向所述受试者施用治疗有效量的根据实施方案 1-21 中任一项所述的抗原结合构建体或根据实施方案 22 所述的药物组合物。

实施方案 28. 根据实施方案 27 所述的方法, 包括使肿瘤细胞与所述抗原结合构建体接触, 从而杀伤 HER2 表达肿瘤细胞或抑制 HER2 表达肿瘤细胞生长。

实施方案 29. 根据实施方案 27 或 28 所述的方法, 其中肿瘤为胆道癌、癌肉瘤、食管癌、胃食管结合部癌、乳腺癌、胃癌、胰腺癌、头颈癌、结直肠癌、肾癌、宫颈癌、卵巢癌、子宫内膜癌、子宫癌、恶性黑色素瘤、咽癌、口腔癌或皮肤癌。

实施方案 30. 根据实施方案 27-29 任一项所述的方法, 包括向细胞施用有效量的所述抗原结合构建体或所述药物组合物, 从而抑制、减少或阻断细胞中的 HER2 信号传导。

实施方案 31. 一种增强抗原结合构建体的聚集抗性的方法, 其中, 所述抗原结合构建体包含单价且特异性地结合 HER2 表达细胞上的 HER2 的 ECD4 抗原的第一抗原结合片段, 所述第一抗原结合片段为 scFv; 所述方法包括: 对所述抗原结合构建体进行修饰, 使得所述第一抗原结合片段的重链可变区包含根据 Kabat 编号系统的位置 30 处的氨基酸突变, 突变后的氨基酸为 E, 或/和所述第一抗原结合片段的轻链可变区包含根据 Kabat 编号系统的位置 53 处的氨基酸突变, 突变后的氨基酸为 Y。

实施方案 32. 根据实施方案 31 所述的增强抗原结合构建体的聚集抗性的方法, 其中所述抗原结合构建体还包含单价且特异性地结合 HER2 表达细胞上的 HER2 的 ECD2 抗原的第二抗原结合片段; 所述的第二抗原结合片段为 Fab。

实施方案 33. 根据实施方案 31 或 32 所述的增强抗原结合构建体的聚集抗性的方法, 其中所述的第一抗原结合片段包含选自以下的 CDR 的组:

- i. 包含重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3, 所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NO: 27、28、29 的氨基酸序列;
- ii. 包含重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3, 所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含与分别根据 SEQ ID NO: 27、28、29 的氨基酸序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列;
- iii. 包含轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3, 所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NO: 30、34、32 的氨基酸序列;
- iv. 包含轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3, 所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含与分别根据 SEQ ID NO: 30、34、32 的氨基酸序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列;
- v. 包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3, 所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NO: 27、28、29 的氨基酸序列, 所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NO: 30、34、32 的氨基酸序列;
- vi. 包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3, 所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含与分别根据 SEQ ID NO: 27、28、29 的氨基酸序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列, 所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含与分别根据 SEQ ID NO: 30、34、32 的氨基酸序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列;
- vii. 包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3, 所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 43、28 和 29 的氨基酸序列, 所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 30、31 和 32 的氨基酸序列;
- viii. 包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3, 所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 43、28 和 29 的氨基酸序列, 所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 30、33 和 32 的氨基酸序列;
- ix. 包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3, 所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 44、28 和 29 的氨基酸序列, 所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 30、31 和 32 的氨基酸序列; 或
- ix. 包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3, 所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 44、28 和 29 的氨基酸序列, 所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 包含分别根据 SEQ ID NOs: 30、31 和 32 的氨基酸序列。

实施方案 34. 根据实施方案 31 或 32 所述的增强抗原结合构建体的聚集抗性的方法, 其中所述第一抗原结合片段为 scFv 并且包含曲妥珠单抗的重链可变区或其突变体和曲妥珠单抗的轻链可变区或其突变体, 使所述重链可变区的突变体包含 K30E 突变, 使所述轻链可变区的突变体包含 F53Y 突变。

实施例 1 anti-Her2-scFv-Fc 及其变体的构建、表达、纯化

构建 anti-Her2-scFv-Fc 时, Fc 部分采用人 IgG1, anti-Her2 臂可变区序列是基于 Herceptin® 单抗的序列, 通过设计的 linker 1 ((GGGGS)₃, SEQ ID NO: 53) 将 Herceptin® 单抗的轻重链可变区串联并形成 anti-Her2-scFv-Fc (SEQ ID NO: 1), 其氨基酸序列如下:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFRNIKDTYIHVWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI
SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDI
QMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQKPKGAPKLLIYSASFYSGVPSRFSRSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQHQHYTTPPTFGQGKVEIKGEPKSSDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTEPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK。

另外在 anti-Her2-scFv-Fc 序列上构建点突变, 构建以下变体:

anti-Her2-scFv-VL-F53Y-Fc (SEQ ID NO: 3): 衍生自野生型 anti-Her2-scFv-Fc, VL 区具有 F53Y; 其氨基酸序列如下:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFINIKDTYIHVWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI
SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDI
QMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQKPGKAPKLLIYSASYLYSGVPSRFSRSGTDFTL
TISLQPEDFATYYCQHYHTPPTFGQGTKEIKGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK。

anti-Her2-scFv-VL-F53A-Fc (SEQ ID NO: 5): 衍生自野生型 anti-Her2-scFv-Fc, VL 区具有 F53A; 其氨基酸序列如下:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFINIKDTYIHVWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI
SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDI
QMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQKPGKAPKLLIYSASALYSGVPSRFSRSGTDFTL
TISLQPEDFATYYCQHYHTPPTFGQGTKEIKGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK。

anti-Her2-scFv-VL-F53R-Fc (SEQ ID NO: 7): 衍生自野生型 anti-Her2-scFv-Fc, VL 区具有 F53R; 其氨基酸序列如下:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFINIKDTYIHVWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI
SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDI
QMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQKPGKAPKLLIYSASRLYSGVPSRFSRSGTDFTL
TISLQPEDFATYYCQHYHTPPTFGQGTKEIKGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK。

anti-Her2-scFv-VH-K30E-Fc (SEQ ID NO: 9): 衍生自野生型 anti-Her2-scFv-Fc, VH 区具有 K30E; 其氨基酸序列如下:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFINIEDTYIHVWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI
SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDI
QMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQKPGKAPKLLIYSASFYLYSGVPSRFSRSGTDFTL
TISLQPEDFATYYCQHYHTPPTFGQGTKEIKGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK。

合成 anti-Her2-scFv-Fc 及其变体的 DNA 序列(SEQ ID NOs: 2、4、6、8 和 10)并且分别克隆到 pcDNA3.1 表达载体中。通过使用 ExpiCHO™ 表达试剂盒 (Thermo Fisher, 目录号 A29133) 将 anti-Her2-scFv-Fc 或其变体的表达载体转染到 ExpiCHO 细胞 (CHO-S, Thermo 公司) 中。使细胞在 ExpiCHO 表达培养基中于 37°C、含有 8% CO₂ 的湿润气氛的培养箱中并在以 130 rpm 旋转的有轨摇床平台上培养。收集培养上清, 使用蛋白 A 磁珠(Genscript, 目录号 L00273)进行蛋白纯化。通过 UV-Vis 分光光度计(NanoDrop lite, Thermo Scientific) 测量蛋白浓度。

表 1: anti-Her2-scFv-Fc 及其变体的序列信息

名称	氨基酸序列 (SEQ ID NO)	编码 DNA 序列 (SEQ ID NO)	可变区突变位点
anti-Her2-scFv-Fc	1	2	无
anti-Her2-scFv-VL-F53Y-Fc	3	4	F53Y
anti-Her2-scFv-VL-F53A-Fc	5	6	F53A
anti-Her2-scFv-VL-F53R-Fc	7	8	F53R
anti-Her2-scFv-VH-K30E-Fc	9	10	K30E

实施例 2 anti-Her2-scFv-Fc 及其变体的聚集体验证以及与人 Her2 抗原结合检测

表达并纯化后的 anti-Her2-scFv-Fc 及其变体通过 Biacore T200 (GE 公司) 测定待测分子与人 Her2 蛋白的亲合力, 实验过程描述如下:

用偶联 Anti-hIgG 的芯片捕获一定量的 anti-Her2-scFv-Fc 或其变体, 然后于芯片表面流经抗原人源

HER2 蛋白 (Sino Biological, 目录号 10004-H08H), 利用 Biacore T200 实时检测反应信号, 从而获得结合和解离曲线。实验中用到的缓冲液为 Biacore 通用缓冲液 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄·12H₂O, 1.8 mM KH₂PO₄, 0.05%表面活性剂 P20 (GE, 目录号 BR-1000-54), pH 7.4)。Anti-hIgG (来源人类抗体捕获试剂盒, GE, 目录号 29-2346-00) 偶联至 CM5 芯片表面反应值达到 9000 RU 左右, 捕获 anti-Her2-scFv-Fc 或其变体约 200 RU, 然后检测不同浓度的人源 HER2 蛋白 (100 nM、50 nM、25 nM、12.5 nM、6.25 nM、3.125 nM) 与 anti-Her2-scFv-Fc 或其变体相互作用的信号值。流动池的流速为 50 µl/min, 结合时间 240 s, 解离时间 1400 s, 用 3 M MgCl₂ (GE 公司) 再生 60 s, 基线平稳。根据 biacore evaluation software 中 affinity and kinetics 1: 1 结合模式运算获得结果。anti-Her2-scFv-Fc 或变体与抗原人 Her2 蛋白的亲合力见表 2。与 anti-Her2-scFv-Fc (KD=0.77 nM) 相比, 变体 anti-Her2-scFv-VL-F53A-Fc (KD=1.26 nM) 对抗原人 Her2 蛋白的结合亲和力影响较大; 变体 anti-Her2-scFv-VL-F53Y-Fc (KD=0.8 nM) 对抗原人 Her2 蛋白的结合亲和力与 anti-Her2-scFv-Fc (KD=0.77 nM) 类似, 变体 anti-Her2-scFv-VH-K30E-Fc 对抗原人 Her2 蛋白的结合 KD=0.54 nM。可知 F53Y、K30E 突变的引入不会降低对抗原人 Her2 蛋白的结合亲和力。

采用凝胶色谱柱对 anti-Her2-scFv-Fc 或其变体的各组分进行分离。用中性 pH 的缓冲液作为流动相进行洗脱, 各分子量组分按照分子量由大到小的顺序依次被洗出。色谱柱为 ACQUITY UPLC Protein BEH SEC Column 200Å、1.7 µm、4.6 * 300 mm 规格的凝胶色谱柱, 柱温 25°C。流动相为 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 -200 mmol/L 氯化钠, pH 7.0 (称取二水合磷酸二氢钠 2.33 g、十二水合磷酸氢二钠 12.53 g、氯化钠 11.69 g, 加入约 800 ml 超纯水, 搅拌至充分溶解, 加超纯水至 1000 ml, 混匀后经 0.22 µm 滤膜过滤)。用流动相将样品稀释至 10 mg/ml 作为供试品溶液, 精密量取 2 µl 注入液相色谱仪 (若样品浓度低于 10 mg/ml, 则调整进样体积以进样 20 µg 蛋白), 在 280 nm 波长处检测。流速为 0.30 ml/min, 等度洗脱 15 min。数据处理, 采用面积归一化法对结果进行定量分析。分别计算聚集体、免疫球蛋白单体和低分子量杂质的峰面积百分比, 其中主峰前为聚集体, 主峰为免疫球蛋白单体, 主峰后为低分子量杂质。anti-Her2-scFv-Fc 或其变体主峰与聚集体含量比例见表 2。变体 anti-Her2-scFv-VL-F53Y-Fc 与 anti-Her2-scFv-VH-K30E-Fc 显著降低聚集体; 聚集体从 anti-Her2-scFv-Fc 的 6.31% 分别降低到 4.94%、3.39%。

表 2: anti-Her2-scFv-Fc 及其变体的聚集体含量及与抗原 Her2 的结合亲和力

名称	anti-Her2-scFv-Fc	anti-Her2-scFv-VL-F53Y-Fc	anti-Her2-scFv-VL-F53A-Fc	anti-Her2-scFv-VL-F53R-Fc	anti-Her2-scFv-VH-K30E-Fc
聚集体	6.31%	4.94%	6.96%	7.83%	3.39%
单体	93.43%	94.83%	92.80%	91.90%	96.32%
低分子片段	0.25%	0.24%	0.23%	0.26%	0.28%
抗原 Her2 (KD)	0.77 nM	0.8 nM	1.26 nM	未测	0.54 nM

实施例 3 anti-Her2 双特异性抗体的构建、表达、纯化

以 Knobs-into-holes (Ridgway, et al., 1996) Fc 工程改造产生作为人 IgG1 的 anti-Her2 双特异性抗体。其中一条重链的 Fc 区序列设计有 H435R、Y436F 突变 (Jendeborg et al., 1997) 降低 Fc 对蛋白 A 的亲和力, 有利于在蛋白 A 亲和纯化中去除双特异性抗体组装过程中形成的同源二聚体 (专利 US5945311A)。从实施例 2 中可知, anti-Her2-scFv-VL-F53Y-Fc 突变、anti-Her2-scFv-VH-K30E-Fc 突变可以显著降低 anti-Her2-scFv 聚集体, 同时未降低对 Her2 抗原亲和力, 本实施例中 anti-Her2 双特异性抗体的一条 anti-Her2 臂的抗原结合结构域为 scFv (VH-linker-VL 结构) 形式, 可变区序列包含突变 K30E (b-anti-Her2-scFv-VH-K30E-Fc, SEQ ID NO: 21)、突变 F53Y (b-anti-Her2-scFv-VL-F53Y-Fc, SEQ ID NO: 23) 或者同时包含这两个点突变 anti-Her2-scFv-VH-K30E-VL-F53Y-Fc (SEQ ID NO: 11); 本实施例中 anti-Her2 双特异性抗体的另一条 anti-Her2 臂的抗原结合结构域为 Fab 形式, 包括 anti-Her2-domain2-HC-Fc (SEQ ID NO: 13) 和 anti-Her2-domain2-LC (SEQ ID NO: 15); 另外以 scFv (VH-linker-VL 结构或 VL-linker-VH 结构) 不含突变构建 anti-Her2 双特异性抗体作为对照。

表 3: anti-Her2 双特异性抗体的序列信息

名称	组成	氨基酸序列 (SEQ ID NO)	核苷酸序列 (SEQ ID NO)
----	----	----------------------	----------------------

Expi Her2-1	anti-Her2-scFv-VL-VH-Fc	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIK GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGEVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV ARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLICLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENRYMTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 17)	18
	anti-Her2-domain2-HC-Fc-2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYM DWVRQAPGKGLEWVADVNPNSSGGSIYNQRFKGR FTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLG PSFYFDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ REPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 19)	20
	anti-Her2-domain2-LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDV SIGVAW YQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVP SRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO: 15)	16
Expi Her2-2	anti-Her2-scFv-VH-K30E-VL-F53Y-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIEDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGD GFYAMDYWGQGT LTVSSGGGGSGGGSGGGGS GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVN TAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYLYSGVPSRFSGS RSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQ TKVEIKGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 11)	12

	anti-Her2-domain2-HC-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTEMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHRTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 13)	14
	anti-Her2-domain2-LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 15)	16
Expi Her2-3	b-anti-Her2-scFv-VH-K30E-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIEDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIKGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHRTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 21)	22
	anti-Her2-domain2-HC-Fc	SEQ ID NO: 13	14
	anti-Her2-domain2-LC	SEQ ID NO: 15	16
Expi Her2-4	b-anti-Her2-scFv-VL-F53Y-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIKGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHRTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 23)	24
	anti-Her2-domain2-HC-Fc	SEQ ID NO: 13	14

	anti-Her2-domain2-LC	SEQ ID NO: 15	16
Expi Her2-5	anti-Her2-scFv-VH-VL-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 25)	26
	anti-Her2-domain2-HC-Fc	SEQ ID NO: 13	14
	anti-Her2-domain2-LC	SEQ ID NO: 15	16

合成 anti-Her2 双特异性抗体的 DNA 序列 (SEQ ID NOs: 12、14 和 16) 并且分别克隆到 pcDNA3.1 表达载体中。通过使用 ExpiCHO™ 表达试剂盒 (Thermo Fisher, 目录号 A29133) 将 anti-Her2-scFv-VH-K30E-VL-F53Y-Fc (SEQ ID NO: 11)、anti-Her2-domain2-HC-Fc (SEQ ID NO: 13) 和 anti-Her2-domain2-LC (SEQ ID NO: 15) 的表达载体按转染比率 1: 1: 1.5 共转染到 ExpiCHO 细胞中。转染密度为 6×10^6 cells/ml。培养基为 ExpiCHO 表达培养基。连续培养至转染后第 10 天离心收集细胞培养上清。使用蛋白 A 磁珠 (Genscript, 目录号 L00273) 进行蛋白纯化。通过 UV-Vis 分光光度计 (NanoDrop lite, Thermo Scientific) 测量蛋白浓度。此样品命名为 Expi Her2-2。参照该方法, 按照上表给出的 DNA 序列表达纯化得到其它双特异性抗体 Expi Her2-1、Expi Her2-3、Expi Her2-4、Expi Her2-5。

实施例 4 岩藻糖敲除双特异性抗体制备与验证

通过敲除岩藻糖表达相关基因 FUT8 可以提高 IgG1 与 FcγRIIIa 的相互作用, 进而增强抗体的 ADCC 作用 (Shields et al., 2002; Yamane-Ohnuki et al., 2004)。在本实施例中, 用敲除 FUT8 的 CHO-S 细胞 (命名为 CHO FUT8-/-细胞) 制备岩藻糖敲除 anti-Her2 双特异性抗体。合成 anti-Her2 双特异性抗体的 DNA 序列 (SEQ ID NOs: 12、14 和 16) 并且分别克隆到 pcDNA3.1 表达载体中。通过使用 CHOgro® 高产表达系统 (货号: MIR 6270) 将 anti-Her2-scFv-VH-K30E-VL-F53Y-Fc、anti-Her2-domain2-HC-Fc 和 anti-Her2-domain2-LC 的表达载体按转染比率 1: 1: 1.5 共转染到敲除 FUT8 的 CHO-S 细胞中。转染密度为 6×10^6 cells/ml。培养基为 CHOgro® 表达培养基 (货号 MIR 6200, 厂家 Mirus)。连续培养至转染后第 10 天离心收集细胞培养上清。使用蛋白 A 磁珠 (Genscript, 目录号 L00273) 进行蛋白纯化。通过 UV-Vis 分光光度计 (NanoDrop lite, Thermo Scientific) 测量蛋白浓度。此样品命名为 23C2 Her2-2。参照此方法, 将表 3 中列出的 Expi Her2-1、Expi Her2-3、Expi Her2-4、Expi Her2-5 的序列在 CHO FUT8-/-细胞中表达, 对应获得岩藻糖敲除 anti-Her2 双特异性抗体 23C2 Her2-1、23C2 Her2-3、23C2 Her2-4、23C2 Her2-5。

使用 GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖试剂盒 (Waters, Milford, Mass., USA) 对 CHO FUT8-/-细胞和 CHO-S 细胞表达的 anti-Her2 双特异性抗体样品进行处理, 将 N-糖从蛋白上释放, 再对 N-糖进行标记, 经色谱柱分离, 采用 FLR 检测器 (Waters, Milford, Mass., USA) 进行分析, 可得到 N-糖的结构和含量, anti-Her2 双特异性抗体 Expi HER2-2 的糖谱分析见图 1, FUT8 敲除 CHO-S 细胞表达 anti-Her2 双特异性抗体 23C2 HER2-2 的糖谱分析见图 2, 糖型含量比例见表 4, 正常 anti-Her2 双特异性抗体 Expi HER2-2 中不含岩藻糖比例为 21.85%, 敲除 FUT8 的 CHO-S 细胞表达 anti-Her2 双特异性抗体 23C2 HER2-2 不含岩藻糖比例为 99.40%。

表 4: anti-Her2 双特异性抗体的糖型含量分析

成分名称 (Component name)	含量(%)	
	Expi HER2-2	23C2 HER2-2
A1(M3B)	1.81	9.84
A1G(4)I	0.16	0.17

A2	1.14	70.33
A2[3]G(4)1	/	2.34
A2[6]G(4)1	/	4.19
A2[3]BG(4)1	/	0.11
A2G(4)2	/	0.55
A2G(4)2S(3)1	/	0.21
A2G(4)2S(3,3)2	/	0.46
F(6)A1G(4)1	/	/
F(6)A1[3]G(4)1S(3)1	/	/
F(6)A1	12.77	/
F(6)A2	60.69	0.60
F(6)A2[3]G(4)1	1.20	/
F(6)A2[6]G(4)1	0.70	/
F(6)A2G(4)2	/	/
F(6)A2G(4)2S(3)1	/	/
M3	/	0.26
M4	/	0.07
M4A1G(4)1	/	0.36
M4 D1	/	0.08
M5	12.31	5.67
M5A1G(4)1	/	0.05
M6 D1	2.11	0.75
M6 D3	0.73	0.18
M7 D1	0.80	0.44
M8	0.20	0.15
去岩藻糖化糖型(De-Fucosylated Glycans)	21.85	99.40
双唾液酸修饰糖型(Di-Sialylated Glycans)	/	0.46
高甘露糖糖型(High Mannose Glycans)	20.07	7.24
单唾液酸修饰糖型(Mono-Sialylated Glycans)	0.18	0.21
非唾液酸修饰糖型(Non-Sialylated Glycans)	99.82	99.33

实施例 5 双特异性抗体的聚集体验证

本实施例涉及 anti-Her2 双特异性抗体 23C2 Her2-1、23C2 Her2-2、23C2 Her2-3、23C2 Her2-4、23C2 Her2-5 的聚集体验证。

采用凝胶色谱柱对 anti-Her2 双特异性抗体进行分离验证聚集体含量。用中性 pH 的缓冲液作为流动相进行洗脱，各分子量组分按照分子量由大到小的顺序依次被洗出。色谱柱为 ACQUITY UPLC Protein BEH SEC Column 200Å、1.7 μm、4.6 * 300 mm 规格的凝胶色谱柱，柱温 25℃。流动相为 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液-200 mmol/L 氯化钠，pH 7.0（称取二水合磷酸二氢钠 2.33 g、十二水合磷酸氢二钠 12.53 g、氯化钠 11.69 g，加入约 800 ml 超纯水，搅拌至充分溶解，加超纯水至 1000 ml，混匀后经 0.22 μm 滤膜过滤）。用流动相将样品稀释至 10 mg/ml 作为供试品溶液，精密量取 2 μl 注入液相色谱仪（若样品浓度低于 10 mg/ml，则调整进样体积以进样 20 μg 蛋白），在 280 nm 波长处检测。流速为 0.30 ml/min，等度洗脱 15 min。数据处理，采用面积归一化法对结果进行定量分析。分别计算聚集体、免疫球蛋白单体和低分子量杂质的峰面积百分比，其中主峰前为聚集体，主峰为免疫球蛋白单体，主峰后为低分子量杂质。

表 5：anti-Her2 双特异性抗体的聚集体含量

样品名称	聚集体	单体	低分子片段
23C2 Her2-2	8.51%	91.02%	0.47%
23C2 Her2-1	19.55%	80.05%	0.40%

结果表明，将 scFV（不含突变）组装成双特异性抗体，双特异性抗体仍然会产生大量的聚集体，而通过引入突变则可以降低双特异性抗体的聚集体的含量，与未含突变的 23C2 Her2-1 相比，23C2 Her2-2 的聚集体含量可以降低至 8.51%（表 5）。

实施例 6 anti-Her2 双特异性抗体的抗原结合检测

表达并纯化后的 anti-Her2 双特异性抗体通过 Biacore T200（GE 公司）测定待测分子与 HER2 蛋白的亲和力，实验过程描述如下：

用偶联 Anti-hIgG 的芯片捕获一定量的 anti-Her2 双特异性抗体，然后于芯片表面流经人源 Her2（Sino Biological，目录号 10004-H08H），利用 Biacore T200 实时检测反应信号，从而获得结合和解离曲线。实验中用到的缓冲液为 Biacore 通用缓冲液（137 mM NaCl，2.7 mM KCl，10 mM Na₂HPO₄·12H₂O，1.8 mM KH₂PO₄，0.05%表面活性剂 P20，pH 7.4）。Anti-hIgG（来源人类抗体捕获试剂盒，GE，目录号 29-2346-00）偶联至 CM5 芯片表面反应值达到 9000RU 左右，捕获 anti-Her2 双特异性抗体约 200RU，然后分别检测不同浓度的 Her2 蛋白（100 nM、50 nM、25 nM、12.5 nM、6.25 nM、3.125 nM）与 anti-Her2 双特异性抗体相互作用的信号值。流动池的流速为 50 μl/min，结合时间 240 s，解离时间 1400 s，用 3M MgCl₂（GE）再生 60 s，基线平稳。

根据 biacore evaluation software 运算获得结果，anti-Her2 双特异性抗体 23C2 Her2-2 与抗原 Her2 结合亲和力以及对照曲妥珠单抗与帕妥珠单抗见表 6，anti-Her2 双特异性抗体 23C2 Her2-2 对抗原 Her2 结合 KD 为 6.11E-10M，曲妥珠单抗与抗原 Her2 结合 KD 为 1.22E-09 M，帕妥珠单抗与抗原 Her2 结合 KD 为 2.35E-09M，anti-Her2 双特异性抗体 23C2 Her2-2 比曲妥珠单抗与帕妥珠单抗对抗原 Her2 有更高的亲和力。

表 6：anti-Her2 双特异性抗体对人 Her2 抗原的亲和力

	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
23C2 Her2-2	1.79E+05	1.09E-04	6.11E-10
曲妥珠单抗对照	1.73E+05	2.12E-04	1.22E-09
帕妥珠单抗对照	1.15E+05	2.69E-04	2.35E-09

实施例 7 anti-Her2 双特异性抗体的抗原结合检测

参照实施例 6 的实验过程，通过 Biacore T200（GE）测定表达并纯化后的 anti-Her2 双特异性抗体 23C2 Her2-1、23C2 Her2-2、23C2 Her2-3、23C2 Her2-4、23C2 Her2-5 与 HER2 蛋白的亲和力。

anti-Her2 双特异性抗体与抗原人 Her2 蛋白的亲和力见表 7。结合表 6 和表 7 的结果可知，引入 F53Y、K30E 突变可以提高 anti-Her2 双特异抗体对抗原人 Her2 蛋白的结合亲和力。

表 7：anti-Her2 双特异性抗体对人 Her2 抗原的亲和力

样品名称	23C2 Her2-1
抗原 Her2 KD	4.02 nM

实施例 8 anti-Her2 双特异性抗体对 Her2 阳性靶细胞 BT474 的杀伤

通过人 PBMC（外周血单个核细胞；效应细胞）提供 NK 细胞来研究 anti-Her2 双特异性抗体对靶细胞（BT474 Her2+++，来源：中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库）的杀伤作用，计算 EC50，评价 anti-Her2 双特异性抗体的体外活性。

具体实验过程如下：

BT474 细胞使用含 2% FBS（胎牛血清）的 1640 实验培养基调整细胞密度至 3×10⁵ cells/ml，50 μl 每孔接种于 96 孔细胞培养板（eppendorf，货号：0030730199）。使用 1640 实验培养基配制不同浓度（分别为 1000 ng/ml、333 ng/ml、111 ng/ml、37 ng/ml、12.3 ng/ml、4.11 ng/ml、1.37 ng/ml、0.46 ng/ml、0.15 ng/ml、0.05 ng/ml）的 anti-Her2 双特异性抗体，将不同浓度的抗体加入上述 96 孔细胞培养板中，每孔 50 μl。人 PBMC 使用 1640 实验培养基调整细胞密度至 1.5×10⁶ cells/ml，每孔 100 μl。设置给药组（靶细胞+效应细胞+抗体）、靶细胞组（BT474 细胞）、效应细胞组（人 PBMC）、靶细胞+效应细胞组、空白对照组（培养基）和裂解液对照组、靶细胞最大释放组（靶细胞+裂解液），效靶比为 10：1。在检测前 45min，靶细胞最大释放组和裂解液对照组加入 20 μl/孔裂解液（Promega，货号 G182A）。45min 后使用 CytoTox96®非放射性细胞毒性检测试剂盒（cytotox 96 nonradioactive cytotoxicity assay，Promega，G1780）试剂盒检测细胞裂解率（杀伤率）。

裂解率（%）= (OD_{给药组} - OD_{靶细胞+效应细胞组}) / (OD_{靶细胞最大释放组} - OD_{靶细胞组}) × 100%

图 3 显示了 anti-Her2 双特异性抗体对 BT474 Her2+++肿瘤细胞的杀伤率。ADCC 增强 anti-Her2 双特异性抗体 23C2 HER2-1 和 23C2 HER2-2 对 BT474 肿瘤细胞的杀伤优于曲妥珠+帕妥珠单抗联用，优于 CHO-S 表达的 anti-Her2 双特异性抗体 Expi Her2-1 和 Expi HER2-2；其中曲妥珠+帕妥珠单抗（1:1）联用 EC50 为 8.627 ng/ml，Expi HER2-1 的 EC50 为 38.05 ng/ml，Expi HER2-2 优于 Expi HER2-1，其 EC50 为 35.17 ng/ml；ADCC 增强的 23C2 HER2-1 的 EC50 为 4.728 ng/ml，ADCC 增强的 23C2 HER2-2 优于 23C2 HER2-1，其 EC50 为 3.658 ng/ml。

实施例 9 anti-Her2 双特异性抗体对 Her2 阳性靶细胞 NCI-N87 的杀伤

通过人 PBMC（外周血单个核细胞；效应细胞）提供 NK 细胞来研究 anti-Her2 双特异性抗体对靶细胞（NCI-N87 Her2⁺⁺，来源：中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库）的杀伤作用，计算 EC₅₀，评价 anti-Her2 双特异性抗体的体外活性。

具体实验过程如下：

NCI-N87 细胞使用含 2% FBS（胎牛血清）的 1640 实验培养基调整细胞密度至 3×10^5 cells/ml，50 μ l 每孔接种于 96 孔细胞培养板（eppendorf，货号：0030730199）。使用 1640 实验培养基配制不同浓度（分别为 8.1nM、2.7nM、0.9nM、0.3nM、0.1nM、0.03nM、0.01nM、0.003nM、0.001nM、0.0004nM）的 anti-Her2 双特异性抗体或对照药，将不同浓度的抗体或对照药加入上述 96 孔细胞培养板中，每孔 50 μ l。人 PBMC 使用 1640 实验培养基调整细胞密度至 1.5×10^6 cells/ml，每孔 100 μ l。设置给药组（靶细胞+效应细胞+抗体）、靶细胞组（NCI-N87 细胞）、效应细胞组（人 PBMC）、靶细胞+效应细胞组、空白对照组（培养基）和裂解液对照组、靶细胞最大释放组（靶细胞+裂解液），效靶比为 10: 1。在检测前 45min，靶细胞最大释放组和裂解液对照组加入 20 μ l/孔裂解液（Promega，货号 G182A）。45min 后使用 CytoTox96® 非放射性细胞毒性检测试剂盒（cytotox 96 nonradioactive cytotoxicity assay, Promega, G1780）试剂盒检测细胞裂解率（杀伤率）。以曲妥珠单抗、T-DM1（曲妥珠单抗-美坦新偶联物，商品名 Kadcyla®）、曲妥珠单抗+帕妥珠单抗联用（1:1）、Expi HER2-1 作为对照药。

$$\text{裂解率 (\%)} = (\text{OD}_{\text{给药组}} - \text{OD}_{\text{靶细胞+效应细胞组}}) / (\text{OD}_{\text{靶细胞最大释放组}} - \text{OD}_{\text{靶细胞组}}) \times 100\%$$

图 4 显示了曲妥珠单抗+帕妥珠单抗联用、曲妥珠单抗、T-DM1 以及 anti-Her2 双特异性抗体对 NCI-N87 肿瘤细胞的杀伤率。ADCC 增强 anti-Her2 双特异性抗体 23C2 HER2-2 对 NCI-N87 肿瘤细胞的杀伤优于曲妥珠单抗+帕妥珠单抗联用、曲妥珠单抗、T-DM1 以及 Expi HER2-1；其中 ADCC 增强的 anti-Her2 双特异性抗体 23C2 HER2-2 的 EC₅₀ 为 0.02447 nM，曲妥珠+帕妥珠单抗联用 EC₅₀ 为 0.08267 nM，Expi HER2-1 的 EC₅₀ 为 0.1048 nM，T-DM1 的 EC₅₀ 为 0.07392 nM，曲妥珠单抗的 EC₅₀ 为 0.07468 nM。

实施例 10 anti-Her2 双特异性抗体对曲妥珠耐药细胞 JIMT-1 的杀伤

通过人 PBMC（外周血单个核细胞；效应细胞）提供 NK 细胞来研究 anti-Her2 双特异性抗体对靶细胞（JIMT-1，来源：AddexBio，Catalog#: C0006005）的杀伤作用，计算 EC₅₀，评价 anti-Her2 双特异性抗体的体外活性。

具体实验过程如下：

JIMT-1 细胞使用含 2% FBS（胎牛血清）的 1640 实验培养基调整细胞密度至 3×10^5 cells/ml，50 μ l 每孔接种于 96 孔细胞培养板（eppendorf，货号：0030730199）。使用 1640 实验培养基配制不同浓度（分别为 8.1nM、2.7nM、0.9nM、0.3nM、0.1nM、0.03nM、0.01nM、0.003nM、0.001nM、0.0004nM）的 anti-Her2 双特异性抗体或对照药，将不同浓度的抗体或对照药加入上述 96 孔细胞培养板中，每孔 50 μ l。人 PBMC 使用 1640 实验培养基调整细胞密度至 1.5×10^6 cells/ml，每孔 100 μ l。设置给药组（靶细胞+效应细胞+抗体或对照药）、靶细胞组（BT474 细胞）、效应细胞组（人 PBMC）、靶细胞+效应细胞组、空白对照组（培养基）和裂解液对照组、靶细胞最大释放组（靶细胞+裂解液），效靶比为 20: 1。在检测前 45min，靶细胞最大释放组和裂解液对照组加入 20 μ l/孔裂解液（Promega，货号 G182A）。45min 后使用 CytoTox96® 非放射性细胞毒性检测试剂盒（cytotox 96 nonradioactive cytotoxicity assay, Promega, G1780）试剂盒检测细胞裂解率（杀伤率）。以曲妥珠单抗、T-DM1、曲妥珠单抗+帕妥珠单抗联用（1:1）、Expi HER2-1 作为对照药。

$$\text{裂解率 (\%)} = (\text{OD}_{\text{给药组}} - \text{OD}_{\text{靶细胞+效应细胞组}}) / (\text{OD}_{\text{靶细胞最大释放组}} - \text{OD}_{\text{靶细胞组}}) \times 100\%$$

图 5 显示了曲妥珠单抗+帕妥珠单抗联用、曲妥珠单抗、T-DM1 以及 anti-Her2 双特异性抗体对 JIMT-1 肿瘤细胞的杀伤率。ADCC 增强 anti-Her2 双特异性抗体 23C2 HER2-2 对 JIMT-1 肿瘤细胞的杀伤优于曲妥珠单抗+帕妥珠单抗联用、曲妥珠单抗、T-DM1、Expi HER2-1；其中 ADCC 增强的 anti-Her2 双特异性抗体 23C2 HER2-2 的 EC₅₀ 为 0.01006 nM，曲妥珠+帕妥珠单抗联用 EC₅₀ 为 0.06727 nM，Expi HER2-1 的 EC₅₀ 为 0.08066 nM，T-DM1 的 EC₅₀ 为 0.08357 nM，曲妥珠单抗的 EC₅₀ 为 0.07443nM，此外，anti-Her2 双特异性抗体 23C2 HER2-2 具有更高的细胞裂解率。

实施例 11 anti-Her2 双特异性抗体对 BT474 Her2⁺⁺⁺肿瘤细胞的增殖抑制

将 23C2 Her2-2、曲妥珠单抗、帕妥珠单抗使用含 2% FBS（胎牛血清，厂家 GIBCO，货号：10099-141）的 DMEM/F12 培养基（GIBCO，货号 11330-032）稀释至终浓度为 3.2 μ g/ml，然后按照 1: 1 的比例梯度稀释 9 个浓度（1.6 μ g/ml、0.8 μ g/ml、0.4 μ g/ml、0.2 μ g/ml、0.1 μ g/ml、0.05 μ g/ml、0.025 μ g/ml、0.0125 μ g/ml、0.00625 μ g/ml）。取对数生长期 BT474 Her2⁺⁺⁺细胞，调整密度至 1×10^5 cells/ml 进行铺板，每孔加入 100 μ l，并设置无细胞空白孔作为对照。加入上述梯度稀释的抗体，每孔 50 μ l。于 37℃、5% CO₂ 二氧化碳培养箱

中培养 5 天。弃掉培养液，加入 CCK-8（日本同仁化学，货号：CK04）工作液，每孔 100 μl，孵育显色 4~5 小时后置于酶标仪中（厂家 Thermo，型号：VarioskanFlash），以 630 nm 为参比波长，读取并记录波长 450 nm 下孔板的吸光度值。计算肿瘤细胞增殖抑制率。

结果见图 6，ADCC 增强的 anti-Her2 双特异性抗体 23C2 Her2-2 对 BT474 肿瘤细胞增殖抑制率为 78.38%，优于曲妥珠单抗的增殖抑制率 54.12%或曲妥珠单抗+帕妥珠单抗联用的增殖抑制率 53.7%。

实施例 12 anti-Her2 双特异性抗体对 NCI-N87 Her2++胃癌裸小鼠异种移植瘤抑制作用

通过 NCI-N87 Her2++胃癌细胞（中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库）在小鼠异种肿瘤移植模型中评价 anti-Her2 双特异性抗体体内药效。准备 NCI-N87 Her2++胃癌细胞，浓度 5×10^7 个/ml *0.1ml/只小鼠，在无菌条件下，接种于裸小鼠（来自常州卡文斯实验动物有限公司，裸鼠，14-17g，雄性，饲养环境：SPF 级）右侧腋窝下。裸小鼠移植瘤用游标卡尺测量移植瘤直径，待肿瘤生长至 $100\text{-}250\text{mm}^3$ 后将动物分成 5 组：

- 组 1：对照（Control）
- 组 2：Expi Her2-1，10 mg/kg
- 组 3：23C2 Her2-2，5 mg/kg
- 组 4：23C2 Her2-2，10 mg/kg
- 组 5：Per+Tra（曲妥珠单抗+帕妥珠单抗联用），5+5mg/kg

各给药组按相应剂量静脉注射给药，每周 2 次，连续给药 3 周（6 次）左右。除组 5 联用组两个药物的给药体积分别为 5 ml/kg 小鼠体重，其余各组给药体积均为 10 ml/kg 小鼠体重。组 1 通过 i.v.给予 10 ml/kg PBS（Hyclone；货号：sh30256.01）。联用组给药时，给完帕妥珠单抗后至少 30min 再给予曲妥珠单抗。

使用测量瘤径的方法，动态观察被试物抗肿瘤的效应，每周测 2-3 次瘤体积（具体测量时间见表 8），同时称鼠重，记录数据；每日观察小鼠一般表现。

检测指标：

肿瘤体积（TV），计算公式为： $TV=1/2\times a\times b^2$ ，其中 a、b 分别表示长、宽。

本实验从 d0 天开始给药，共给药 6 次（d0、d3、d7、d10、d14、d17 天）。至实验 d21 天，无动物死亡。各组小鼠平均体重呈增长趋势（图 8）。药物无明显毒性作用。

至 d21 天，组 2（10 mg/kg）、组 3（5 mg/kg）、组 4（10 mg/kg）、组 5（5+5 mg/kg）的对 NCI-N87 胃癌裸小鼠异种移植瘤体积影响见表 7 与图 7，23C2 Her2-2 在 10mg/kg 剂量下对 NCI-N87 胃癌裸小鼠异种移植瘤抑制优于 Expi Her2-1（10mg/kg）与 Per+Tra 联用组（5+5mg/kg）。

表 8：anti-HER2 双特异性抗体对 NCI-N87 胃癌裸小鼠异种移植瘤体积的影响（mean±SD）

组别	剂量 (mg/kg)	给药 途径	动物数(只)		TV (mm ³)							
			d0	d21	d0	d3	d6	d9	d12	d15	d18	d21
Control	-	i.v.	6	6	204± 40	284± 58	363± 78	481± 109	586± 161	724± 261	808± 241	863± 251
Expi Her2-1	10	i.v.	6	6	204± 23	235± 46	207± 35	179± 30	195± 24	204± 44	195± 50	178± 35
23C2 Her2-2	5	i.v.	6	6	204± 31	246± 37	250± 47	277± 67	318± 79	348± 86	353± 84	358± 101
23C2 Her2-2	10	i.v.	6	6	204± 44	201± 39	154± 39	136± 33	151± 35	173± 46	165± 35	144± 29
Per+Tra	5+5	i.v.	6	6	204± 34	224± 48	199± 59	202± 65	205± 45	231± 93	218± 94	218± 91

备注：于 d0、d3、d7、d10、d14、d17 天共给药 6 次。