



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108779182 A

(43)申请公布日 2018.11.09

(21)申请号 201680082823.0

(22)申请日 2016.12.28

(30)优先权数据

62/271,844 2015.12.28 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.08.28

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/068808 2016.12.28

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/117179 EN 2017.07.06

(71)申请人 麻省理工学院

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 R·萨希塞克哈兰 K·萨拉卡拉曼

V·萨布拉马尼安 E·弗莱舍尔

A·P·哈塔斯

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 袁元

(51)Int.Cl.

C07K 16/46(2006.01)

C07K 16/32(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

C07K 16/22(2006.01)

权利要求书5页 说明书68页 附图22页

(54)发明名称

具有恒定区突变的双特异性抗体及其用途

(57)摘要

本文描述了促进异二聚化的双特异性抗体的CH1/CL界面和CH3恒定区中的突变以及有效产生双特异性抗体的方法。还公开了使用抗体的治疗和诊断方法。

1. 一种双特异性抗体,其特异性结合第一抗原和第二抗原,且包含第一重链(HC'),第二重链(HC''),第一轻链(LC')和第二轻链(LC''),

其中根据Kabat编号,所述HC',HC''或HC'和HC''两者包含下列残基L133,L150,K152,H173,S188,E357,K370和K409中的任一个处的氨基酸置换,或其组合;和

其中所述LC',LC''或LC'和LC''两者包含以下残基Q123,V132,N136,T177中的任一个处的氨基酸置换,或其组合,和

其中所述HC'优先与LC'配对,且HC''优先与LC''配对,从而形成异二聚体。

2. 根据权利要求1所述的双特异性抗体,其中HC'包含残基L133,L150,E357和K409处的氨基酸置换。

3. 根据权利要求1所述的双特异性抗体,其中HC'包含残基L133,L150和K370处的氨基酸置换。

4. 权利要求1-3中任一项所述的双特异性抗体,其中HC''包含残基K152,H173,S188和K370处的氨基酸置换。

5. 权利要求1-3中任一项所述的双特异性抗体,其中HC''包含残基K152,H173,S188,E357和K409处的氨基酸置换。

6. 权利要求1-3中任一项所述的双特异性抗体,其中HC''包含残基K152,H173和K370处的氨基酸置换。

7. 权利要求1-3中任一项所述的双特异性抗体,其中HC''包含残基K152,H173,E357和K409处的氨基酸置换。

8. 前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体,其中LC',LC''或LC'和LC''两者包含残基Q123和N136处的氨基酸置换。

9. 前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体,其中LC',LC''或LC'和LC''两者包含残基Q123,V132和N136处的氨基酸置换。

10. 前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体,其中LC',LC''或LC'和LC''两者包含残基Q123,N136和T177处的氨基酸置换。

11. 前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体,其中HC',HC''或HC'和HC''两者包含选自L133V,L150A,K152D,H173D,S188W,E357K,K370E和K409R或其组合的氨基酸置换。

12. 前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体,其中LC',LC''或LC'和LC''两者包含选自Q123D,Q123K,N136D,N136K和T177A或其组合的氨基酸置换。

13. 一种双特异性抗体,其包含,根据Kabat编号:

(a) 第一重链,其包含可变结构域(VH1)和人IgG恒定结构域(CH1',CH2'和CH3'),其中所述CH1'结构域包含(i)残基L133和L150处的氨基酸置换,或(ii)野生型CH1结构域,并且其中所述CH3'结构域包含(i)残基K370处的氨基酸置换,或(ii)残基E357和K409处的氨基酸置换;

(b) 第一轻链,其包含可变结构域(VL1)和人Igκ恒定结构域(CL'),其中所述CL'结构域包含(i)残基Q123和N136处的氨基酸置换,或(ii)残基Q123,V132和N136处的氨基酸置换;

(c) 第二重链,其包含可变结构域(VH2)和人IgG恒定结构域(CH1'',CH2'',CH3''),其中所述CH1''结构域包含(i)残基K152,H173和S188处的氨基酸置换,或(ii)残基K152和H173处的氨基酸置换,并且其中所述CH3''结构域包含(i)残基K370处的氨基酸置换,或(ii)残基E357

和K409处的氨基酸置换；

(d) 第二轻链,其包含可变结构域(VL2)和人Igκ恒定结构域(CL”),其中所述CL”结构域包含(i) 残基Q123,N136和T177处的氨基酸置换,或(ii) 残基Q123和N136处的氨基酸置换,和

其中所述VH1和VL1结构域特异性结合第一抗原,并且所述VH2和VL2结构域特异性结合第二抗原。

14. 根据权利要求13所述的双特异性抗体,其中所述CH1’ 结构域包含残基L133和L150处的氨基酸置换,所述CL’ 结构域包含残基Q123和N136处的氨基酸置换,所述CH1”结构域包含残基K152,H173和S188处的氨基酸置换,所述CL”结构域包含残基Q123,N136和T177处的氨基酸置换,所述CH3’ 包含残基K370处的氨基酸置换,并且所述CH3”包含残基E357和K409处的氨基酸置换。

15. 根据权利要求13所述的双特异性抗体,其中所述CH1’ 结构域包含残基L133和L150处的氨基酸置换,所述CL’ 结构域包含残基Q123和N136处的氨基酸置换,所述CH1”结构域包含残基K152,H173和S188处的氨基酸置换,所述CL”结构域包含残基Q123,N136和T177处的氨基酸置换,所述CH3’ 包含残基E357和K409处的氨基酸置换,并且所述CH3”包含残基K370处的氨基酸置换。

16. 根据权利要求13所述的双特异性抗体,其中所述CH1’ 结构域包含野生型CH1结构域,所述CL’ 结构域包含残基Q123和N136处的氨基酸置换,所述CH1”结构域包含残基K152和H173处的氨基酸置换,所述CL”结构域包含残基Q123和N136处的氨基酸置换,所述CH3’ 包含残基K370处的氨基酸置换,并且所述CH3”包含残基E357和K409处的氨基酸置换。

17. 根据权利要求13所述的双特异性抗体,其中所述CH1’ 结构域包含野生型CH1结构域,所述CL’ 结构域包含残基Q123和N136处的氨基酸置换,所述CH1”结构域包含残基K152和H173处的氨基酸置换,所述CL”结构域包含残基Q123和N136处的氨基酸置换,所述CH3’ 包含残基E357和K409处的氨基酸置换,并且所述CH3”包含残基K370处的氨基酸置换。

18. 根据权利要求13所述的双特异性抗体,其中所述CH1’ 结构域包含残基L133和L150处的氨基酸置换,所述CL’ 结构域包含残基Q123,V132和N136处的氨基酸置换,所述CH1”结构域包含残基K152,H173和S188处的氨基酸置换,所述CL”结构域包含残基Q123,N136和T177处的氨基酸置换,所述CH3’ 包含残基K370处的氨基酸置换,并且所述CH3”包含残基E357和K409处的氨基酸置换。

19. 根据权利要求13所述的双特异性抗体,其中所述CH1’ 结构域包含残基L133和L150处的氨基酸置换,所述CL’ 结构域包含残基Q123,V132和N136处的氨基酸置换,所述CH1”结构域包含残基K152,H173和S188处的氨基酸置换,所述CL”结构域包含残基Q123,N136和T177处的氨基酸置换,所述CH3’ 包含残基E357和K409处的氨基酸置换,并且所述CH3”包含残基K370处的氨基酸置换。

20. 根据权利要求13-19中任一项所述的双特异性抗体,其中残基Q123,N136,K357,E370和K409处的氨基酸置换是酸性或碱性残基。

21. 根据权利要求20所述的双特异性抗体,其中残基Q123,N136,K357,E370和K409处的氨基酸置换是选自天冬氨酸和谷氨酸的酸性残基,或选自精氨酸,赖氨酸和组氨酸的碱性残基。

22. 根据权利要求13-21中任一项所述的双特异性抗体,其中CH1' 和CH1''氨基酸置换包括L133V,L150A,K152D,H173D和S188W。

23. 根据权利要求13-22中任一项所述的双特异性抗体,其中CL' 和CL''氨基酸置换包括Q123D,Q123K,Q123E,Q123R,Q123H,V132W,N136D,N136K,N136E,N136R,N136H,T177A和T177R。

24. 根据权利要求13-23中任一项所述的双特异性抗体,其中CH3' 和CH3''氨基酸置换包括K370E,K370D,K370R,K370H,E357K,E357R,E375H,E357D,K409R,K409H,K409E和K409D。

25. 根据权利要求13所述的双特异性抗体,其中CH1' 氨基酸置换包括L133V和L150A,CL' 氨基酸置换包括Q123D和N136D,CH1''氨基酸置换包括K152D,H173D和S188W,CL''氨基酸置换包括Q123K,N136K和T177A,CH3' 氨基酸置换包括K370E,并且CH3''氨基酸置换包括E357K和K409R。

26. 根据权利要求13所述的双特异性抗体,其中CH1' 氨基酸置换包括L133V和L150A,CL' 氨基酸置换包括Q123D和N136D,CH1''氨基酸置换包括K152D,H173D和S188W,CL''氨基酸置换包括Q123K,N136K和T177A,CH3' 氨基酸置换包括E357K和K409R,并且CH3''氨基酸置换包括K370E。

27. 根据权利要求13所述的双特异性抗体,其中所述CH1' 结构域包含野生型CH1结构域,CL' 氨基酸置换包括Q123D和N136D,CH1''氨基酸置换包括K152D和H173D,CL''氨基酸置换包括Q123K和N136K,CH3' 氨基酸置换包括K370E,并且CH3''氨基酸置换包括E357K和K409R。

28. 根据权利要求13所述的双特异性抗体,其中所述CH1' 结构域包含野生型CH1结构域,CL' 氨基酸置换包括Q123D和N136D,CH1''氨基酸置换包括K152D和H173D,CL''氨基酸置换包括Q123K和N136K,CH3' 氨基酸置换包括E357K和K409R,并且CH3''氨基酸置换包括K370E。

29. 根据权利要求13所述的双特异性抗体,其中CH1' 氨基酸置换包括L133V和L150A,CL' 氨基酸置换包括Q123D,V132W和N136D,CH1''氨基酸置换包括K152D,H173D和S188W,CL''氨基酸置换包括Q123K,N136K和T177A,CH3' 氨基酸置换包括K370E,并且CH3''氨基酸置换包括E357K和K409R。

30. 根据权利要求13所述的双特异性抗体,其中CH1' 氨基酸置换包括L133V和L150A,CL' 氨基酸置换包括Q123D,V132W和N136D,CH1''氨基酸置换包括K152D,H173D和S188W,CL''氨基酸置换包括Q123K,N136K和T177A,CH3' 氨基酸置换包括E357K和K409R,并且CH3''氨基酸置换包括K370E。

31. 一种双特异性抗体,其包含,根据Kabat编号:

(a) 第一重链,其包含可变结构域(VH1) 和人IgG恒定结构域(CH1',CH2' 和CH3'),其中所述CH1' 结构域包含残基L133处的缬氨酸和残基L150处的丙氨酸,并且其中所述CH3' 结构域包含残基E357处的赖氨酸和残基K409处的精氨酸;

(b) 第一轻链,其包含可变结构域(VL1) 和人Igκ恒定结构域(CL'),其中所述CL' 结构域包含残基Q123处的天冬氨酸和残基N136处的天冬氨酸;

(c) 第二重链,其包含可变结构域(VH2) 和人IgG恒定结构域(CH1'',CH2'',CH3''),其中所述CH1''结构域包含残基K152处的天冬氨酸,残基H173处的天冬氨酸和残基S188处的色氨酸,其中所述CH3''结构域包含残基K370处的谷氨酸;和

(d) 第二轻链,其包含可变结构域(VL2) 和人Igκ恒定结构域(CL''),其中所述CL''结构域

包含Q123处的赖氨酸,N136处的赖氨酸和T177处的丙氨酸,和

其中所述VH1和VL1结构域特异性结合第一抗原,并且所述VH2和VL2结构域特异性结合第二抗原。

32. 一种双特异性抗体,其包含,根据Kabat编号:

(a) 第一重链,其包含可变结构域(VH1)和人IgG恒定结构域(CH1',CH2'和CH3'),其中所述CH1'结构域包含残基L133处的缬氨酸和残基L150处的丙氨酸,并且其中所述CH3'结构域包含残基K370处的谷氨酸;

(b) 第一轻链,其包含可变结构域(VL1)和人Igκ恒定结构域(CL'),其中所述CL'结构域包含残基Q123处的天冬氨酸和残基N136处的天冬氨酸;

(c) 第二重链,其包含可变结构域(VH2)和人IgG恒定结构域(CH1'',CH2'',CH3''),其中所述CH1''结构域包含残基K152处的天冬氨酸,残基H173处的天冬氨酸和残基S188处的色氨酸,其中所述CH3''结构域包含残基E357处的赖氨酸和残基K409处的精氨酸;和

(d) 第二轻链,其包含可变结构域(VL2)和人Igκ恒定结构域(CL''),其中所述CL''结构域包含Q123处的赖氨酸,N136处的赖氨酸和T177处的丙氨酸,和

其中所述VH1和VL1结构域特异性结合第一抗原,并且所述VH2和VL2结构域特异性结合第二抗原。

33. 根据前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体,其中所述双特异性抗体的热稳定性在母体单特异性抗体的热稳定性的10℃以内。

34. 一种核酸,其包含编码前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体的轻链,重链或轻链和重链两者的核苷酸序列。

35. 一种表达载体,其包含权利要求34所述的核酸。

36. 一种用权利要求35所述的表达载体转化的细胞。

37. 一种产生双特异性抗体的方法,其包括培养转化的宿主细胞以表达以下,根据Kabat编号:

(a) 第一重链,其包含可变结构域(VH1)和人IgG恒定结构域(CH1',CH2'和CH3'),其中所述CH1'结构域包含(i) 残基L133和L150处的氨基酸置换,或(ii) 野生型CH1结构域,并且其中所述CH3'结构域包含(i) 残基K370处的氨基酸置换,或(ii) 残基E357和K409处的氨基酸置换;

(b) 第一轻链,其包含可变结构域(VL1)和人Igκ恒定结构域(CL'),其中所述CL'结构域包含(i) 残基Q123和N136处的氨基酸置换,或(ii) 残基Q123,V132和N136的氨基酸置换;

(c) 第二重链,其包含可变结构域(VH2)和人IgG恒定结构域(CH1'',CH2'',CH3''),其中所述CH1''结构域包含(i) 残基K152,H173和S188处的氨基酸置换,或(ii) 残基K152和H173处的氨基酸置换,并且其中所述CH3''结构域包含(i) 残基K370处的氨基酸置换,或(ii) 残基E357和K409处的氨基酸置换;

(d) 第二轻链,其包含可变结构域(VL2)和人Igκ恒定结构域(CL''),其中所述CL''结构域包含(i) 残基Q123,N136和T177处的氨基酸置换,或(ii) 残基Q123和N136处的氨基酸置换,和

其中所述VH1和VL1结构域特异性结合第一抗原,并且所述VH2和VL2结构域特异性结合第二抗原。

38. 一种抗原结合片段 (Fab), 其包含, 根据Kabat编号:

(a) 第一重链, 其包含可变结构域 (VH1) 和人IgG恒定结构域 (CH1'), 其中所述CH1' 结构域包含 (i) 残基L133和L150处的氨基酸置换, 或 (ii) 野生型CH1结构域;

(b) 第一轻链, 其包含可变结构域 (VL1) 和人Igκ恒定结构域 (CL'), 其中所述CL' 结构域包含 (i) 残基Q123和N136处的氨基酸置换, 或 (ii) 残基Q123, V132和N136处的氨基酸置换;

(c) 第二重链, 其包含可变结构域 (VH2) 和人IgG恒定结构域 (CH1''), 其中所述CH1'' 结构域包含 (i) 残基K152, H173和S188处的氨基酸置换, 或 (ii) 残基K152和H173处的氨基酸置换;

(d) 第二轻链, 其包含可变结构域 (VL2) 和人Igκ恒定结构域 (CL''), 其中所述CL'' 结构域包含 (i) 残基Q123, N136和T177处的氨基酸置换, 或 (ii) 残基Q123和N136处的氨基酸置换, 和

其中所述VH1和VL1结构域特异性结合第一抗原, 并且所述VH2和VL2结构域特异性结合第二抗原。

39. 根据权利要求38所述的Fab, 其中所述CH1' 结构域包含残基L133和L150处的氨基酸置换, 所述CL' 结构域包含残基Q123和N136处的氨基酸置换, 所述CH1'' 结构域包含残基K152, H173和S188处的氨基酸置换, 所述CL'' 结构域包含残基Q123, N136和T177处的氨基酸置换。

40. 根据权利要求38所述的Fab, 其中所述CH1' 结构域包含野生型CH1结构域, 所述CL' 结构域包含残基Q123和N136处的氨基酸置换, 所述CH1'' 结构域包含残基K152和H173处的氨基酸置换, 所述CL'' 结构域包含残基Q123和N136处的氨基酸置换。

41. 根据权利要求38所述的Fab, 其中所述CH1' 结构域包含残基L133和L150处的氨基酸置换, 所述CL' 结构域包含残基Q123, V132和N136处的氨基酸置换, 所述CH1'' 结构域包含残基K152, H173和S188处的氨基酸置换, 所述CL'' 结构域包含残基Q123, N136和T177处的氨基酸置换。

42. 一种双特异性抗体, 其包含权利要求38-41中任一项所述的Fab。

43. 根据权利要求42所述的双特异性抗体, 其中所述Fc结构域含有铰-扣突变。

44. 一种异二聚体多肽, 其包含第一人IgG恒定结构域 (CH3') 和第二人IgG恒定结构域 (CH3''), 其中所述CH3' 结构域包含 (i) 残基K370处的氨基酸置换, 或 (ii) 残基E357和K409处的氨基酸置换, 并且其中所述CH3'' 结构域包含 (i) 残基K370处的氨基酸置换, 或 (ii) 残基E357和K409处的氨基酸置换, 从而在所述CH3结构域之间形成异二聚体。

45. 根据权利要求44所述的异二聚体多肽, 其中所述多肽是双特异性抗体。

46. 一种治疗疾病的方法, 其包括施用权利要求1-33中任一项所述的双特异性抗体。

47. 根据权利要求46所述的方法, 其中所述疾病是癌症。

48. 根据权利要求1-33中任一项所述的双特异性抗体, 其用于治疗或诊断癌症。

具有恒定区突变的双特异性抗体及其用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2015年12月28日提交的美国临时申请No.62/271,844的优先权日的权益。该临时申请的内容通过引用整体并入本文。

背景技术

[0003] 双特异性抗体可以同时结合两种不同的抗原。该特性使得能够开发常规单克隆抗体无法实现的治疗策略。已经开发的大量富有想象力的双特异性抗体形式反映了对这些分子的强烈兴趣。见Spiess, C.等, *Molecular Immunology* (2015) Vol.67 (2):95-106。

[0004] 双特异性抗体通常通过细胞融合技术(例如,杂交瘤)产生。该过程涉及两种不同的细胞类型。两条重链和两条轻链随机组装,导致产生10种抗体组合。期望的异二聚体抗体仅是产生的抗体的一小部分。此外,期望的异二聚体抗体的纯化极大降低产量并增加制造成本。因此,需要改进双特异性抗体的产生和纯化。

发明内容

[0005] 本文描述的发明涉及具有增加期望的异二聚体的产率和纯度的、在CH1/CL界面和CH3区域中的突变的双特异性抗体。为了测定在人IgG免疫球蛋白的CH1/CL界面中的相互作用氨基酸对之间和CH3恒定区之间的残基间原子相互作用,开发了框架并使残基间相互作用成为2D图形格式以分析连接性网络。如通过结构分析和连接网络所评估的,鉴定了CH1/CL界面和CH3恒定区中促成更有利接触的突变,并分析了可能介导新的或改善的接触的各种氨基酸残基。

[0006] 因此,本发明涉及人IgG免疫球蛋白的CH1/CL界面和/或CH3恒定区中的突变,其增加双特异性抗体中的异二聚体形成。由于在可变区中没有产生突变,所得的双特异性抗体保留了每个母体抗体的功能特征。本文还提供了编码所述双特异性抗体的核酸,宿主细胞和用这些双特异性抗体治疗疾病的方法。

[0007] 在一个方面,本文提供了双特异性抗体,其特异性结合第一抗原和第二抗原,且包含第一重链(HC'),第二重链(HC''),第一轻链(LC')和第二轻链(LC''),其中根据Kabat编号,HC', HC''或HC'和HC''两者包含以下残基L133, L150, K152, H173, S188, E357, K370和K409中的任一个处的氨基酸置换,或其组合;其中LC', LC''或LC'和LC''两者包含以下残基Q123, V132, N136, T177中的任一个处的氨基酸置换,或其组合,并且其中HC'优先与LC'配对,并且HC''优先与LC''配对,从而形成异二聚体。

[0008] 在一些方面,本发明涉及具有HC', HC'', LC'和LC''的双特异性抗体,其中HC'包含残基L133, L150, E357和K409处的氨基酸置换。在其他方面,本发明涉及具有HC', HC'', LC'和LC''的双特异性抗体,其中HC'包含残基L133, L150和K370处的氨基酸置换。

[0009] 在另一方面,本发明涉及具有HC', HC'', LC'和LC''的双特异性抗体,其中HC''包含残基K152, H173, S188和K370处的氨基酸置换。本发明的另一方面涉及具有HC', HC'', LC'和LC''的双特异性抗体,其中HC''包含残基K152, H173, S188, E357和K409处的氨基酸置换。在其他

方面,本发明涉及具有HC',HC'',LC'和LC''的双特异性抗体,其中HC''包含残基K152,H173和K370处的氨基酸置换。在其他方面,本发明涉及具有HC',HC'',LC'和LC''的双特异性抗体,其中HC''包含残基K152,H173,E357和K409处的氨基酸置换。

[0010] 在其他方面,本发明涉及具有HC',HC'',LC'和LC''的双特异性抗体,其中LC',LC''或LC'和LC''两者包含残基Q123和N136处的氨基酸置换。在一些方面,本发明涉及具有HC',HC'',LC'和LC''的双特异性抗体,其中LC',LC''或LC'和LC''两者包含残基Q123,V132和N136处的氨基酸置换。在其他方面,本发明涉及具有HC',HC'',LC'和LC''的双特异性抗体,其中LC',LC''或LC'和LC''两者包含残基Q123,N136和残基Q133处的氨基酸置换。T177。

[0011] 本发明的一些方面涉及具有HC',HC'',LC'和LC''的双特异性抗体,其中HC',HC''或HC'和HC''两者包含选自L133V,L150A,K152D,H173D,S188W,E357K,K370E和K409R或其组合的氨基酸置换。在其他方面,本发明涉及具有HC',HC'',LC'和LC''的双特异性抗体,其中LC',LC''或LC'和LC''两者包含选自Q123D,Q123K,N136D,N136K和T177A或其组合的氨基酸置换。

[0012] 本发明涉及具有前述HC',HC'',LC'和LC''的组合的双特异性抗体。

[0013] 本发明的一个方面涉及双特异性抗体,其包含,根据Kabat编号:

[0014] (a) 第一重链,其包含可变结构域(VH1)和人IgG恒定结构域(CH1',CH2'和CH3'),其中CH1'结构域包含(i)残基L133和L150处的氨基酸置换,或(ii)野生型CH1结构域,并且其中CH3'结构域包含(i)残基K370处的氨基酸置换,或(ii)残基E357和K409处的氨基酸置换;

[0015] (b) 第一轻链,其包含可变结构域(VL1)和人Igκ恒定结构域(CL'),其中CL'结构域包含(i)残基Q123和N136处的氨基酸置换,或(ii)残基Q123,V132和N136处的氨基酸置换;

[0016] (c) 第二重链,其包含可变结构域(VH2)和人IgG恒定结构域(CH1'',CH2'',CH3''),其中CH1''结构域包含(i)残基K152,H173和S188处的氨基酸置换,或(ii)残基K152和H173处的氨基酸置换,并且其中CH3''结构域包含(i)残基K370处的氨基酸置换,或(ii)残基E357和K409处的氨基酸置换;

[0017] (d) 第二轻链,其包含可变结构域(VL2)和人Igκ恒定结构域(CL''),其中CL''结构域包含(i)残基Q123,N136和T177处的氨基酸置换,或(ii)残基Q123和N136处的氨基酸置换,并且其中VH1和VL1结构域特异性结合第一抗原,并且VH2和VL2结构域特异性结合第二抗原。

[0018] 在一些方面,本发明涉及双特异性抗体,其中CH1'结构域包含残基L133和L150处的氨基酸置换,CL'结构域包含残基Q123和N136处的氨基酸置换,CH1''结构域包含残基K152,H173和S188处的氨基酸置换,CL''结构域包含残基Q123,N136和T177处的氨基酸置换,CH3'包含残基K370处的氨基酸置换,并且CH3''包含残基E357和K409处的氨基酸置换。

[0019] 在其他方面,本发明涉及双特异性抗体,其中CH1'结构域包含残基L133和L150处的氨基酸置换,CL'结构域包含残基Q123和N136处的氨基酸置换,CH1''结构域包含残基K152,H173和S188处的氨基酸置换,CL''结构域包含残基Q123,N136和T177处的氨基酸置换,CH3'包含残基E357和K409处的氨基酸置换,并且CH3''包含残基K370的氨基酸置换。

[0020] 另一方面,本发明涉及双特异性抗体,其中CH1'结构域包含野生型CH1结构域,CL'结构域包含残基Q123和N136处的氨基酸置换,CH1''结构域包含K152和H173残基处的氨基酸置换,CL''结构域包含残基Q123和N136处的氨基酸置换,CH3'包含残基K370处的氨基酸置

换,并且CH3”包含残基E357和K409处的氨基酸置换。

[0021] 在一些方面,本发明涉及双特异性抗体,其中CH1’结构域包含野生型CH1结构域,CL’结构域包含残基Q123和N136处的氨基酸置换,CH1”结构域包含K152和H173残基处的氨基酸置换,CL”结构域包含残基Q123和N136处的氨基酸置换,CH3’包含残基E357和K409处的氨基酸置换,并且CH3”包含残基K370处的氨基酸置换。

[0022] 在其他方面,本发明涉及双特异性抗体,其中CH1’结构域包含残基L133和L150处的氨基酸置换,CL’结构域包含残基Q123,V132和N136处的氨基酸置换,CH1”结构域包含残基K152,H173和S188处的氨基酸置换,CL”结构域包含残基Q123,N136和T177处的氨基酸置换,CH3’包含残基K370处的氨基酸置换,并且CH3”包含残基E357和K409处的氨基酸置换。

[0023] 本发明的其他方面涉及双特异性抗体,其中CH1’结构域包含残基L133和L150处的氨基酸置换,CL’结构域包含残基Q123,V132和N136处的氨基酸置换,CH1”结构域包含残基K152,H173和S188处的氨基酸置换,CL”结构域包含残基Q123,N136和T177处的氨基酸置换,CH3’包含残基E357和K409处的氨基酸置换,并且CH3”包含残基K370处的氨基酸置换。

[0024] 在其他方面,本发明涉及双特异性抗体,其中残基Q123,N136,K357,E370和K409处的氨基酸置换是酸性或碱性残基。在一些方面,本发明涉及双特异性抗体,其中残基Q123,N136,K357,E370和K409处的氨基酸置换是选自天冬氨酸和谷氨酸的酸性残基,或选自精氨酸,赖氨酸和组氨酸的碱性残基。

[0025] 在一些方面,本发明涉及双特异性抗体,其中CH1’和CH1”氨基酸置换包括L133V,L150A,K152D,H173D和S188W。在其他方面,本发明涉及双特异性抗体,其中CL’和CL”氨基酸置换包括Q123D,Q123K,Q123E,Q123R,Q123H,V132W,N136D,N136K,N136E,N136R,N136H,T177A和T177R。在其他方面,本发明涉及双特异性抗体,其中CH3’和CH3”氨基酸置换包括K370E,K370D,K370R,K370H,E357K,E357R,E375H,E357D,K409R,K409H,K409E,K409D。

[0026] 在一些方面,本发明涉及双特异性抗体,其中CH1’氨基酸置换包含L133V和L150A,CL’氨基酸置换包含Q123D和N136D,CH1”氨基酸置换包含K152D,H173D和S188W,CL”氨基酸置换包含Q123K,N136K和T177A,CH3’氨基酸置换包含K370E,CH3”氨基酸置换包含E357K和K409R。

[0027] 在其他方面,本发明涉及双特异性抗体,其中CH1’氨基酸置换包含L133V和L150A,CL’氨基酸置换包含Q123D和N136D,CH1”氨基酸置换包含K152D,H173D和S188W,CL”氨基酸置换包含Q123K,N136K和T177A,CH3’氨基酸置换包含E357K和K409R,

[0028] CH3”氨基酸置换包含K370E。

[0029] 本发明的一些方面涉及双特异性抗体,其中CH1’结构域包含野生型CH1结构域,CL’氨基酸置换包括Q123D和N136D,CH1”氨基酸置换包括K152D和H173D,CL”氨基酸置换包括Q123K和N136K,CH3’氨基酸置换包括K370E,CH3”氨基酸置换包括E357K和K409R。

[0030] 另一方面,本发明涉及双特异性抗体,其中CH1’结构域包含野生型CH1结构域,CL’氨基酸置换包括Q123D和N136D,CH1”氨基酸置换包括K152D和H173D,CL”氨基酸置换包括Q123K和N136K,CH3’氨基酸置换包括E357K和K409R,CH3”氨基酸置换包括K370E。

[0031] 另一方面,本发明涉及双特异性抗体,其中CH1’氨基酸置换包括L133V和L150A,CL’氨基酸置换包括Q123D,V132W和N136D,CH1”氨基酸置换包括K152D,H173D和S188W,CL”氨基酸置换包括Q123K,N136K和T177A,CH3’氨基酸置换包括K370E,CH3”氨基酸置换包括

E357K和K409R。

[0032] 在一些方面,本发明涉及双特异性抗体,其中CH1'氨基酸置换包括L133V和L150A,CL'氨基酸置换包括Q123D,V132W和N136D,CH1''氨基酸置换包括K152D,H173D和S188W,CL''氨基酸置换包括Q123K,N136K和T177A,CH3'氨基酸置换包括E357K和K409R,CH3''氨基酸置换包括K370E。

[0033] 本发明涉及具有前述CH1',CL',CH1'',CL'',CH3'和CH3''的组合的双特异性抗体。

[0034] 本发明的一个方面涉及双特异性抗体,其包含,根据Kabat编号:

[0035] (a) 第一重链,其包含可变结构域(VH1)和人IgG恒定结构域(CH1',CH2'和CH3'),其中CH1'结构域包含残基L133处的缬氨酸和残基L150处的丙氨酸,并且其中CH3'结构域包含残基E357处的赖氨酸和残基K409处的精氨酸;

[0036] (b) 第一轻链,其包含可变结构域(VL1)和人Igκ恒定结构域(CL'),其中CL'结构域包含残基Q123处的天冬氨酸和残基N136处的天冬氨酸;

[0037] (c) 第二重链,其包含可变结构域(VH2)和人IgG恒定结构域(CH1'',CH2'',CH3''),其中CH1''结构域包含残基K152处的天冬氨酸,残基H173处的天冬氨酸和残基S188处的色氨酸,其中CH3''结构域包含残基K370处的谷氨酸;和

[0038] (d) 第二轻链,其包含可变结构域(VL2)和人Igκ恒定结构域(CL''),其中CL''结构域包含Q123处的赖氨酸,N136处的赖氨酸和T177处的丙氨酸,其中VH1和VL1结构域特异性结合第一抗原,并且VH2和VL2结构域特异性结合第二抗原。

[0039] 本发明的另一方面涉及双特异性抗体,其包含,根据Kabat编号:

[0040] (a) 第一重链,其包含可变结构域(VH1)和人IgG恒定结构域(CH1',CH2'和CH3'),其中CH1'结构域包含残基L133处的缬氨酸和残基L150处的丙氨酸,并且其中CH3''结构域包含残基K370处的谷氨酸;

[0041] (b) 第一轻链,其包含可变结构域(VL1)和人Igκ恒定结构域(CL'),其中CL'结构域包含残基Q123处的天冬氨酸和残基N136处的天冬氨酸;

[0042] (c) 第二重链,其包含可变结构域(VH2)和人IgG恒定结构域(CH1'',CH2'',CH3''),其中CH1''结构域包含残基K152处的天冬氨酸,残基H173处的天冬氨酸和残基S188处的色氨酸,其中CH3'结构域包含残基E357处的赖氨酸和残基K409处的精氨酸;和(d) 第二轻链,其包含可变结构域(VL2)和人Igκ恒定结构域(CL''),其中CL''结构域包含Q123处的赖氨酸,N136处的赖氨酸和T177处的丙氨酸,其中VH1和VL1结构域特异性结合第一抗原,并且VH2和VL2结构域特异性结合第二抗原。

[0043] 本发明的其他方面涉及任何前述双特异性抗体,其中双特异性抗体的热稳定性在母体单特异性抗体的热稳定性的10℃以内。

[0044] 在其他方面,本发明涉及包含编码任何前述双特异性抗体的轻链,重链或轻链和重链两者的核苷酸序列的核酸。在一些方面,本发明涉及包含所述核酸的表达载体。在其他方面,本发明涉及用表达载体转化的细胞,所述表达载体包含核酸,所述核酸包含编码任何前述双特异性抗体的轻链,重链或轻链和重链两者的核苷酸序列。

[0045] 本发明的一个方面涉及产生双特异性抗体的方法,其包括培养转化的宿主细胞以表达以下,根据Kabat编号:

[0046] (a) 第一重链,其包含可变结构域(VH1)和人IgG恒定结构域(CH1',CH2'和CH3'),

其中CH1' 结构域包含 (i) 残基L133和L150处的氨基酸置换,或(ii) 野生型CH1结构域,并且其中CH3' 结构域包含 (i) 残基K370处的氨基酸置换,或(ii) 残基E357和K409处的氨基酸置换;

[0047] (b) 第一轻链,其包含可变结构域(VL1) 和人Ig κ 恒定结构域(CL'),其中CL' 结构域包含 (i) 残基Q123和N136处的氨基酸置换,或(ii) 残基Q123,V132和N136处的氨基酸置换;

[0048] (c) 第二重链,其包含可变结构域(VH2) 和人IgG恒定结构域(CH1'',CH2'',CH3''),其中CH1'' 结构域包含 (i) 残基K152,H173和S188处的氨基酸置换,或(ii) 残基K152和H173处的氨基酸置换,并且其中CH3'' 结构域包含 (i) 残基K370处的氨基酸置换,或(ii) 残基E357和K409处的氨基酸置换;和

[0049] (d) 第二轻链,其包含可变结构域(VL2) 和人Ig κ 恒定结构域(CL''),其中CL'' 结构域包含 (i) 残基Q123,N136和T177处的氨基酸置换,或(ii) 残基Q123和N136处的氨基酸置换,其中VH1和VL1结构域特异性结合第一抗原,并且VH2和VL2结构域特异性结合第二抗原。

[0050] 本发明的另一方面涉及抗原结合片段(Fab),其包含,根据Kabat编号:

[0051] (a) 第一重链,其包含可变结构域(VH1) 和人IgG恒定结构域(CH1'),其中CH1' 结构域包含 (i) 残基L133和L150处的氨基酸置换,或(ii) 野生型CH1结构域;

[0052] (b) 第一轻链,其包含可变结构域(VL1) 和人Ig κ 恒定结构域(CL'),其中CL' 结构域包含 (i) 残基Q123和N136处的氨基酸置换,或(ii) 残基Q123,V132和N136处的氨基酸置换;

[0053] (c) 第二重链,其包含可变结构域(VH2) 和人IgG恒定结构域(CH1''),其中CH1'' 结构域包含 (i) 残基K152,H173和S188处的氨基酸置换,或(ii) 残基K152和H173处的氨基酸置换;和

[0054] (d) 第二轻链,其包含可变结构域(VL2) 和人Ig κ 恒定结构域(CL''),其中CL'' 结构域包含 (i) 残基Q123,N136和T177处的氨基酸置换,或(ii) 残基Q123和N136处的氨基酸置换,其中VH1和VL1结构域特异性结合第一抗原,并且VH2和VL2结构域特异性结合第二抗原。

[0055] 在一些方面,本发明涉及Fab,其中CH1' 结构域包含残基L133和L150处的氨基酸置换,CL' 结构域包含残基Q123和N136处的氨基酸置换,CH1'' 结构域包含残基K152,H173和S188处的氨基酸置换,CL'' 结构域包含残基Q123,N136和T177处的氨基酸置换。

[0056] 在其他方面,本发明涉及Fab,其中CH1' 结构域包含野生型CH1结构域,CL' 结构域包含残基Q123和N136处的氨基酸置换,CH1'' 结构域包含残基K152和H173处的氨基酸置换,并且CL'' 结构域包含残基Q123和N136处的氨基酸置换。

[0057] 在其他方面,本发明涉及Fab,其中CH1' 结构域包含残基L133和L150处的氨基酸置换,CL' 结构域包含残基Q123,V132和N136处的氨基酸置换,CH1'' 结构域包含残基K152,H173和S188处的氨基酸置换,并且CL'' 结构域包含残基Q123,N136和T177处的氨基酸置换。

[0058] 在一些方面,本发明涉及包含本文所述的任何Fab的双特异性抗体,其具有或不具有本文所述的具有CH3区突变的恒定区。

[0059] 在其他方面,本发明涉及异二聚体多肽,其包含第一人IgG恒定结构域(CH3') 和第二人IgG恒定结构域(CH3''),其中CH3' 结构域包含 (i) 残基K370处的氨基酸置换。或者(ii) 残基E357和K409处的氨基酸置换,并且其中CH3'' 结构域包含 (i) 残基K370处的氨基酸置换,或(ii) 残基E357和K409处的氨基酸置换,从而形成CH3结构域之间的异二聚体。在一些方面,本发明涉及异二聚体多肽,其中所述多肽是双特异性抗体。

[0060] 在一些方面,本发明涉及双特异性抗体,其包含帕妥珠单抗的CDR(或可变区)和DL11的CDR(或可变区)和具有本文所述的任何CH1/CL界面突变和/或CH3恒定区突变的恒定区。在其他方面,本发明涉及包含SEQ ID NO:15,16,17和18的双特异性抗体。在一些方面,本发明涉及双特异性抗体,其包含利妥昔单抗的CDR(或可变区)和obinutuzumab的CDR(或可变区)和具有本文描述的任何CH1/CL界面突变和/或CH3恒定区突变的恒定区。在其他方面,本发明涉及包含SEQ ID NO:19,20,21和22的双特异性抗体。在一些方面,本发明涉及双特异性抗体,其包含nivolumab的CDR(或可变区)和贝伐单抗的CDR(或可变区)和具有本文描述的CH1/CL界面突变和/或CH3恒定区突变的恒定区。在其他方面,本发明涉及包含SEQ ID NO:23,24,25和26的双特异性抗体。

[0061] 在一些方面,本发明涉及通过施用任何前述双特异性抗体治疗或诊断疾病或病症(例如,癌症)的方法。在其他方面,本发明涉及用于治疗应用的任何前述双特异性抗体。在其他方面,本发明涉及用于癌症的诊断或治疗的任何前述双特异性抗体。

附图说明

[0062] 图1显示了当在宿主细胞中表达两条不同的重链和两条不同的轻链时由于错配而导致的双特异性抗体种类的数量。

[0063] 图2A显示凝胶电泳的结果,其中分离了具有指定突变的纯化抗体。圈出了完整抗体(顶部)、相应野生型(WT)和半抗体(底部)种类。

[0064] 图2B显示凝胶电泳的结果,其中分离了具有指定突变的纯化抗体。泳道4,5和6形成半抗体片段,而泳道2,3和7则不。

[0065] 图3A显示当双特异性抗体具有来自单克隆抗体DL11和帕妥珠单抗的重链和轻链而没有任何突变时的阳离子交换色谱的结果。

[0066] 图3B显示当双特异性抗体具有来自单克隆抗体DL11和帕妥珠单抗的重链和轻链且在CH1/CL界面和CH3区中具有突变时的阳离子交换色谱的结果。选择圈出的峰进行纯化和进一步测试。

[0067] 图4显示了纯化的帕妥珠单抗/DL11双特异性抗体(“P/D”)的原生质谱的结果。

[0068] 图5A是显示通过ELISA测量的帕妥珠单抗,DL11和P/D与Her1结合的结果的线图。

[0069] 图5B是显示通过ELISA测量的帕妥珠单抗,DL11和P/D与Her2结合的结果的线图。

[0070] 图5C是显示通过ELISA测量的帕妥珠单抗,DL11和P/D与Her3结合的结果的线图。

[0071] 图6A是显示通过夹心ELISA测量的帕妥珠单抗,DL11和P/D同时结合Her1和Her2的结果的线图。

[0072] 图6B是显示通过夹心ELISA测量的帕妥珠单抗,DL11和P/D同时结合Her2和Her3的结果的线图。

[0073] 图7显示了通过原生质谱测量的具有CH1/CL界面和CH3区中的突变的利妥昔单抗/obinutuzumab双特异性抗体(“Rxm/Ga101”)的纯度。

[0074] 图8是显示通过圆二色性测量的Rxm/GA101与母体抗体利妥昔单抗(“Rxm”)和obinutuzumab(“GA101”)相比的热稳定性的图。

[0075] 图9是描绘通过动态光散射测量的Rxm/Ga101的质量百分比(y轴)相对于半径(nM)(x轴)的条形图。峰宽对应于多分散性(PD%)。

[0076] 图10是显示通过ELISA测量的Rxm/GA101与母体抗体Rxm和GA101相比的CD20结合结果的线图。

[0077] 图11是显示由膜联蛋白阳性细胞百分比 (Anx%) 测量的Rxm/Ga101, 利妥昔单抗, Ga101和赫赛汀 (同种型对照) 在Daudi细胞中诱导的总细胞凋亡的条形图。

[0078] 图12是显示通过荧光测量的Rxm/GA101与母体抗体Rxm和GA101相比的对WIL2-S细胞中补体依赖性细胞毒性的诱导的线图。

[0079] 图13是显示通过发光测量的Rxm/GA101与母体抗体Rxm和GA101相比对抗体依赖性细胞毒性的诱导的线图。

[0080] 图14显示了通过原生质谱测量的具有CH1/CL界面和CH3区中的突变的nivolumab/贝伐单抗双特异性抗体的纯度。

[0081] 图15是显示通过圆二色性测量的nivolumab/贝伐单抗双特异性抗体 (“BsAb”) 与母体抗体nivolumab和贝伐单抗相比的热稳定性的图。

[0082] 图16是描绘通过动态光散射测量的nivolumab/贝伐单抗双特异性抗体的质量百分比 (y轴) 相对于半径 (nm) (x轴) 的条形图。峰宽对应于多分散性 (PD%)。

[0083] 图17是显示通过夹心ELISA测量的nivolumab/贝伐单抗双特异性抗体 (“BsAb”) 与母体抗体nivolumab和贝伐单抗相比与PD1和VEGF同时结合的结果的线图。

具体实施方式

[0084] 本文描述的发明涉及具有增加期望异二聚体的产率和纯度、在CH1/CL界面和CH3区中的突变的双特异性抗体。设计人IgG的恒定区中的突变以引起单个宿主细胞中重链和轻链的优先配对, 以控制重链和轻链组装的异二聚化。分析了各种氨基酸突变对链间原子间网络的影响, 并且识别了由于原子间接触 (例如, 推定的氢键 (包括水桥键), π 键, 极性相互作用, 盐桥和范德华相互作用 (非氢)) 的丧失或获得而造成的原子间网络变化, 其导致个体节点和/或边缘的丧失或获得。与野生型相比保留或增加原子间接触的氨基酸置换被识别为形成有利的网络, 而导致丧失原子间接触的氨基酸突变被识别为形成不利的网络。

[0085] 因此, 本发明涉及具有CH1/CL界面和CH3恒定区突变的双特异性抗体, 所述突变设计成增加有利的网络, 从而提高期望异二聚体的产率和纯度, 同时避免可变区 (VH和VL) 结构域中的突变。得到的双特异性抗体保留Fc效应特性 (例如, ADCC, CDC, 半衰期等)。

[0086] 定义

[0087] 除非另有说明, 否则权利要求和说明书中使用的术语定义如下。

[0088] 除非上下文另有说明, 否则术语“第一”抗体和“第二”抗体及其变体仅仅是通用标识符, 不应视为识别本发明的具体或特定抗体或者抗体的组分。

[0089] 在某些实施方式中, 本文提及的“抗体”包括完整抗体和任何抗原结合片段 (即“抗原结合部分”) 或其单链。在某些实施方式中, “抗体”是指包含通过二硫键链内连接的至少两条重 (HC) 链和两条轻 (LC) 链的糖蛋白, 或其抗原结合部分。每条重链由重链可变区 (本文中缩写为V_H) 和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域CH1, CH2和CH3组成。每条轻链由轻链可变区 (本文中缩写为V_L) 和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。V_H和V_L区可以进一步细分为高变区, 称为互补决定区 (CDR), 散布有更保守的区域, 称为框架区 (FR)。每个V_H和V_L由三个CDR和四个FR组成, 按照以下顺序从氨基末端到羧基末端排列: FR1,

CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补系统的第一组分(C1q)。抗体的实例包括如本文所述的单克隆抗体,多克隆抗体,多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段。

[0090] 如本文所用,术语抗体的“抗原结合部分”(或简称“抗体部分”)是指保留特异性结合抗原的能力的抗体的一个或多个片段。这样的“片段”例如长度为约8至约1500个氨基酸,合适地长度为约8至约745个氨基酸,合适地为约8至约300个氨基酸,例如约8至约200个氨基酸,或约长度为10至约50或100个氨基酸。已经显示抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段进行。包含在术语抗体的“抗原结合部分”内的结合片段的实例包括(i) Fab片段,由V_L,V_H,CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,包含在铰链区处通过二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由V_H和CH1结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体的单臂的V_L和V_H结构域组成的Fv片段,(v) dAb片段(Ward等(1989) *Nature* 341:544-546),其由V_H结构域组成;(vi) 分离的互补决定区(CDR),或(vii) 两个或更多个分离的CDR的组合,其可任选地通过合成接头连接。此外,虽然Fv片段的两个结构域V_L和V_H由分开的基因编码,但它们可以通过合成接头使用重组方法连接,所述合成接头使得它们可以作为单个蛋白质链制备,其中V_L和V_H区配对以形成单价分子(称为单链Fv(scFv);参见例如Bird等(1988) *Science* 242:423-426;和Huston等(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883)。这样的单链抗体也旨在包括在术语抗体的“抗原结合部分”内。使用本领域技术人员已知的常规技术获得这些抗体片段,并以与完整抗体相同的方式筛选片段的效用。抗原结合部分可以通过重组DNA技术产生,或通过完整免疫球蛋白的酶促或化学切割产生。

[0091] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指表现出对特定表位的单一结合特异性和亲和力的抗体。因此,术语“人单克隆抗体”是指表现出单一结合特异性并且具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变和任选恒定区的抗体。在一个实施方式中,人单克隆抗体由杂交瘤产生,所述杂交瘤包括获自转基因非人动物(例如转基因小鼠)的B细胞,所述转基因小鼠具有包含融合到永生生化细胞的人重链转基因和轻链转基因的基因组。

[0092] 如本文所用的术语“双特异性抗体”是指能够选择性结合两个或更多个表位的抗体。双特异性抗体通常包含两个不同的重链/轻链对,并且特异性结合不同的表位,或者在两个不同的分子(例如,抗原)上,或者在相同的分子上(例如,在相同抗原上)。

[0093] 如本文所用,“半抗体”是指与一种免疫球蛋白轻链相关的一种免疫球蛋白重链。本领域技术人员将容易理解,半抗体还可具有由单个可变结构域组成的抗原结合结构域。

[0094] 如本文所用,术语“Fc区”是指由其两条重链的相应Fc结构域(或Fc部分)形成的天然免疫球蛋白的部分。如本文所用,术语“Fc结构域”是指单个免疫球蛋白(Ig)重链的一部分,其中Fc结构域不包含Fv结构域。因此,Fc结构域也可称为“Ig”或“IgG”。在某些实施方式中,Fc结构域起始于木瓜蛋白酶切割位点上游的铰链区,并终止于抗体的C末端。因此,完整的Fc结构域至少包含铰链结构域,CH2结构域和CH3结构域。在某些实施方式中,Fc结构域包含以下中的至少一个:铰链(例如,上,中和/或下铰链区)结构域,CH2结构域,CH3结构域,CH4结构域或变体,部分,或其片段。在某些实施方式中,Fc结构域包含完整的Fc结构域(即,铰链结构域,CH2结构域和CH3结构域)。在某些实施方式中,Fc结构域包含与CH3结构域(或其部分)融合的铰链结构域(或其部分)。在某些实施方式中,Fc结构域包含与CH3结构域(或

其部分)融合的CH2结构域(或其部分)。在某些实施方式中,Fc结构域由CH3结构域或其部分组成。在某些实施方式中,Fc结构域由铰链结构域(或其部分)和CH3结构域(或其部分)组成。在某些实施方式中,Fc结构域由CH2结构域(或其部分)和CH3结构域组成。在某些实施方式中,Fc结构域由铰链结构域(或其部分)和CH2结构域(或其部分)组成。在某些实施方式中,Fc结构域缺少CH2结构域的至少一部分(例如,CH2结构域的全部或部分)。本文的Fc结构域通常是指包含免疫球蛋白重链的全部或部分Fc结构域的多肽。这包括但不限于包含整个CH1,铰链,CH2和/或CH3结构域的多肽以及仅包含例如铰链,CH2和CH3结构域的这样的肽的片段。Fc结构域可以衍生自任何物种和/或任何亚型的免疫球蛋白,包括但不限于人IgG1,IgG2,IgG3,IgG4,IgD,IgA,IgE或IgM抗体。Fc结构域包括天然Fc和Fc变体分子。与Fc变体和天然Fc一样,术语Fc结构域包括单体或多聚体形式的分子,无论是消化自完整抗体还是通过其他方式产生。

[0095] 将氨基酸残基编号分配至抗体的恒定区是根据Kabat的定义。参见,例如,Sequences of Proteins of Immunological Interest (Table of Contents, Introduction and Constant Region Sequences sections),第5版,Bethesda,MD:NIH vol.1:647-723 (1991);Kabat等,"Introduction"Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Dept of Health and Human Services,NIH,第5版,Bethesda,MD vol.1:xiii-xcvi (1991);Chothia&Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917 (1987);Chothia等,Nature 342:878-883 (1989),其各自出于所有目的通过引用并入本文。

[0096] 如本文所述,本领域普通技术人员将理解,任何Fc结构域可以被修饰,使得其氨基酸序列与天然存在的免疫球蛋白分子的天然Fc结构域不同。在某些实施方式中,Fc结构域具有降低的效应子功能(例如Fc γ R结合)。

[0097] 本发明的抗体的Fc结构域可以衍生自不同的免疫球蛋白分子。例如,Fc结构域可包含衍生自IgG1分子的CH2和/或CH3结构域和衍生自IgG3分子的铰链区。在另一个实例中,Fc结构域可以包含部分衍生自IgG1分子且部分衍生自IgG3分子的嵌合铰链区。在另一个实例中,Fc结构域可包含部分衍生自IgG1分子且部分衍生自IgG4分子的嵌合铰链。

[0098] "Fc受体"或"FcR"描述了结合抗体的Fc区的受体。在某些实施方式中,FcR是人FcR。此外,在某些实施方式中,FcR结合IgG抗体(γ 受体),并包括Fc γ RI,Fc γ RII和Fc γ RIII亚类的受体,包括这些受体的等位基因变体和替代剪接形式。Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA("激活性受体")和Fc γ RIIB("抑制性受体"),其具有区别主要在于其胞质结构域的相似氨基酸序列。激活性受体Fc γ RIIA在其胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的激活性基序(ITAM)。抑制性受体Fc γ RIIB在其胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的抑制性基序(ITIM)(参见综述M.Daeron,Annu.Rev.Immunol.15:203-234 (1997))。FcR在Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-492 (1991);Capel等,Immunomethods 4:25-34 (1994);和de Haas等,J.Lab.Clin.Med.126:330-41 (1995)中综述。本文的术语"FcR"涵盖其他FcR,包括未来识别的FcR。该术语还包括新生儿受体FcRn,其负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer等,J.Immunol.17:587 (1976)和Kim等,J.Immunol.24:249 (1994))。

[0099] "功能性Fc区"具有天然序列Fc区的"效应子功能"。示例性的"效应子功能"包括C1q结合;CDC;Fc受体结合;ADCC;吞噬作用;细胞表面受体(例如,B细胞受体;BCR)的下调等。这样的效应子功能通常需要Fc区与结合结构域(例如,抗体可变结构域)组合,并且可以

使用如例如在本文的定义中公开的各种测定评估。

[0100] “天然序列Fc区”包含与自然中发现的Fc区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。天然序列人Fc区包括天然序列人IgG₁ Fc区(非A和A同种异型);天然序列人IgG₂ Fc区;天然序列人IgG₃ Fc区;和天然序列人IgG₄ Fc区,以及其天然存在的变体。

[0101] “变体Fc区”包含与天然序列Fc区相差至少一个氨基酸修饰的氨基酸序列。在某些实施方式中,变体Fc区与天然序列Fc区或母体多肽的Fc区相比具有天然序列Fc区或母体多肽的Fc区中的至少一个氨基酸置换,例如,约1至约10个氨基酸置换,并且在某些实施方式中,约1至约5个氨基酸置换。在某些实施方式中,变体Fc区具有与天然序列Fc区和/或母体多肽的Fc区至少约80%的同源性,与其至少约90%的同源性,与其至少约95%,至少约96%,至少约97%,至少约98%或至少约99%的同源性。

[0102] 在某些实施方式中,含Fc多肽包含IgG Fc区,优选衍生自野生型人IgG c区。“野生型”人IgG Fc是指在人群中天然存在的氨基酸序列。当然,正如Fc序列在个体之间可以略有不同,可以对野生型序列进行一个或多个改变,并且仍然在本发明的范围内。例如,Fc区可含有与本发明无关的额外改变,例如糖基化位点的突变或包含非天然氨基酸。

[0103] 术语“可变区”或“可变结构域”是指抗体重链或轻链的结构域,其参与抗体与抗原的结合。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为V_H和V_L)通常具有相似的结构,每个结构域包含四个保守框架区(FR)和三个高变区(HVR)。参见,例如,Kindt等,Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007年)。单个V_H或V_L结构域可足以赋予抗原结合特异性。此外,可以使用来自结合抗原的抗体的V_H或V_L结构域分离结合特定抗原的抗体,以分别筛选互补的V_L或V_H结构域的文库。参见,例如,Portolano等,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等,Nature 352:624-628(1991)。

[0104] 如本文所用的术语“Fab”是指抗体的抗原结合片段。如上所述,木瓜蛋白酶可用于消化完整抗体。木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段,即“Fab”片段和残留的“Fc”片段(即,Fc区,见上文)。Fab片段由整个L链以及H链的可变区结构域(V)和一条重链的第一恒定结构域(CH1)组成。

[0105] 本文提及的术语“纽-扣(knob-into-hole)”或“KnH”技术是指通过在其相互作用的界面处将突出(纽(knob))引入一个多肽中和将腔(扣(hole))引入另一个多肽中而引导两个多肽在体外或体内配对在一起的技术。例如,KnH已被引入抗体的Fc:Fc结合界面,C_L:C_{H1}界面或V_HA_L界面(例如,US2007/0178552,W096/027011,W098/050431和Zhu等(1997) Protein Science 6:781-788)。这对于在多特异性抗体的制备过程中驱动两种不同重链配对在一起是有用的。例如,在其Fc区中具有KnH的双特异性抗体可以进一步包含与每个Fc区连接的单个可变结构域,或者进一步包含与相似或不同的轻链可变结构域配对的不同重链可变结构域。在某些实施方式中,本文所述的双特异性抗体包含残基T366处的纽突变,例如T366W。在某些实施方式中,本文所述的双特异性抗体包含残基T366,L368和/或Y407处的扣突变。在一些实施方式中,本文所述的双特异性抗体包括残基T366S,L368A和Y407V处的扣突变。在一些实施方式中,本文所述的双特异性抗体包括残基T366处的纽突变,例如T366W,和残基T366,L368和/或Y407处的扣突变,例如T366S,L368A和Y407V。

[0106] 如本文所用,术语“重组人抗体”包括通过重组方式制备,表达,产生或分离的所有人抗体,例如(a)从对于人免疫球蛋白基因或由其制备的杂交瘤为转基因或转染色体的动

物(例如小鼠)分离的抗体,(b)从转化以表达抗体的宿主细胞(例如从转染瘤)分离的抗体,(c)从重组、组合人抗体文库分离的抗体,和(d)通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接到其他DNA序列的任何其他方式制备,表达,产生或分离的抗体。这样的重组人抗体包含可变区和恒定区,其利用由种系基因编码的特定人种系免疫球蛋白序列,但包括随后的重排和突变,其例如在抗体成熟期间发生。如本领域已知的(参见,例如,Lonberg (2005) *Nature Biotech.* 23 (9):1117-1125),可变区含有抗原结合结构域,其由重排以形成对外来抗原具有特异性的抗体的各种基因编码。除了重排之外,可以通过多个单氨基酸改变(称为体细胞突变或超突变)进一步修饰可变区,以增加抗体对外来抗原的亲和力。恒定区将在对抗原的进一步响应方面改变(即同种型转换)。因此,编码轻链和重链免疫球蛋白多肽以响应抗原的重排和体细胞突变的核酸分子可以与原始核酸分子不具有序列同一性,而是基本上相同或相似(即,具有至少80%的同一性)。

[0107] 术语“人抗体”包括具有人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区(如果存在)的抗体。本发明的人抗体可包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或定点诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)(参见Lonberg,N.等(1994) *Nature* 368 (6474):856-859;Lonberg,N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101;Lonberg,N.和Huszar,D. (1995) *Intern.Rev.Immunol.* Vol.13:65-93,和Harding,F.和Lonberg,N. (1995) *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 764:536-546)。然而,术语“人抗体”不包括其中衍生自另外的哺乳动物物种(例如小鼠)的种系的CDR序列已经移植到人框架序列上的抗体(即人源化抗体)。

[0108] 如本文所用,“异源抗体”是相对于产生这样的抗体的转基因非人生物定义的。该术语是指具有氨基酸序列或编码核酸序列的抗体,其对应于在不是由转基因非人动物组成的生物体中发现的,并且通常是来自与转基因非人动物的物种不同的物种。

[0109] 如本文所用,“中和抗体”是指抗体,例如双特异性抗体,其能够破坏形成的病毒颗粒或抑制病毒颗粒的形成或防止病毒颗粒与哺乳动物细胞结合或感染哺乳动物细胞。

[0110] 如本文所用,“诊断抗体”或“检测抗体”或“检测抗体”是指抗体,例如双特异性抗体,其能够检测样品中抗原靶标的存在。如本领域技术人员所理解的,这样的诊断抗体优选对其抗原靶标具有高特异性。

[0111] 术语“人源化免疫球蛋白”或“人源化抗体”是指包含至少一种人源化免疫球蛋白或抗体链(即,至少一种人源化轻链或重链)的免疫球蛋白或抗体。术语“人源化免疫球蛋白链”或“人源化抗体链”(即,“人源化免疫球蛋白轻链”或“人源化免疫球蛋白重链”)是指具有可变区的免疫球蛋白或抗体链(即分别为轻链或重链),所述可变区包含基本上来自人免疫球蛋白或抗体的可变框架区和基本上来自非人免疫球蛋白或抗体的互补决定区(CDR)(例如,至少一个CDR,优选两个CDR,更优选三个CDR),并且还包括恒定区(例如,在轻链的情况下至少一个恒定区或其部分,并且在重链的情况下优选三个恒定区)。术语“人源化可变区”(例如,“人源化轻链可变区”或“人源化重链可变区”)是指可变区,其包含基本上来自人免疫球蛋白或抗体的可变框架区和基本上来自非人免疫球蛋白或抗体的互补决定区(CDR)。

[0112] 短语“基本上来自人免疫球蛋白或抗体”或“基本上人”是指当出于比较目的而与人免疫球蛋白或抗体氨基酸序列比对时,该区域与人框架或恒定区序列共享至少80-90%,

优选至少90-95%，更优选至少95-99%的同一性（即，局部序列同一性），允许例如保守置换，共有序列置换，种系置换，回复突变等。保守置换，共有序列置换，种系置换，回复突变等的引入通常被称为人源化抗体或链的“优化”。短语“基本上来自非人免疫球蛋白或抗体”或“基本上非人”是指具有与非人生物体（例如非人哺乳动物）至少80-95%，优选至少90-95%，更优选96%，97%，98%或99%相同的免疫球蛋白或抗体序列。

[0113] 优选地，不相同的残基位置不同在于保守氨基酸置换。为了将氨基酸置换分类为保守或非保守，将氨基酸分组如下：第I组（疏水侧链）：leu,met,ala,val,leu,ile；第II组（中性亲水侧链）：cys,ser,thr；第III组（酸性侧链）：asp,glu；第IV组（碱性侧链）：asn,gln,his,lys,arg；第V组（影响链取向的残基）：gly,pro；和VI族（芳香族侧链）：trp,tyr,phe。保守置换涉及在相同类别中的氨基酸之间的置换。非保守置换构成将这些类别之一的成员交换为另一个类别的成员。

[0114] 突变（例如，回复突变）被称为基本上影响重链或轻链指导抗原结合的能力，如果其使包含所述链的完整免疫球蛋白或抗体（或其抗原结合片段）的结合亲和力与包含缺少所述突变的等价链的抗体（或其抗原结合片段）的结合亲和力相比影响（例如，降低）至少一个数量级。突变“基本上不影响（例如，降低）链指导抗原结合的能力”，如果其使包含所述链的完整免疫球蛋白或抗体（或其抗原结合片段）的结合亲和力与包含缺乏所述突变的等价链的抗体（或其抗原结合片段）的结合亲和力相比仅仅影响（例如，降低）两倍，三倍或四倍。

[0115] 在某些实施方式中，人源化免疫球蛋白或抗体以相应非人源化抗体的亲和力的三倍、四倍或五倍内的亲和力结合抗原。例如，如果非人源化抗体具有 10^9M^{-1} 的结合亲和力，则人源化抗体将具有至少3倍的 10^9M^{-1} ，4倍的 10^9M^{-1} 或 10^9M^{-1} 的结合亲和力。当描述免疫球蛋白或抗体链的结合特性时，可以基于其“引导抗原结合”的能力来描述链。当链赋予完整免疫球蛋白或抗体（或其抗原结合片段）特异性结合特性或结合亲和力时，则其被称为“引导抗原结合”。突变（例如，回复突变）被称为基本上影响重链或轻链指导抗原结合的能力，如果其使包含所述链的完整免疫球蛋白或抗体（或其抗原结合片段）的结合亲和力与包含缺少所述突变的等价链的抗体（或其抗原结合片段）的结合亲和力相比影响（例如，降低）至少一个数量级。突变“基本上不影响（例如，降低）链指导抗原结合的能力”，如果其使包含所述链的完整免疫球蛋白或抗体（或其抗原结合片段）的结合亲和力与包含缺乏所述突变的等价链的抗体（或其抗原结合片段）的结合亲和力相比仅仅影响（例如，降低）两倍，三倍或四倍。

[0116] 术语“嵌合免疫球蛋白”或抗体是指免疫球蛋白或抗体，其可变区衍生自第一物种并且其恒定区衍生自第二物种。可以例如通过基因工程化从属于不同物种的免疫球蛋白基因区段构建嵌合免疫球蛋白或抗体。术语“人源化免疫球蛋白”或“人源化抗体”不旨在包括如下文所定义的嵌合免疫球蛋白或抗体。尽管人源化免疫球蛋白或抗体在其构建中是嵌合的（即，包含来自多于一个种类的蛋白质的区域），但它们包括在如本文所定义的嵌合免疫球蛋白或抗体中未发现的额外特征（即，包含供体CDR残基和受体框架残基的可变区）。

[0117] 如本文所用，“分离的抗体”意指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体。分离的抗体通常基本上不含其他细胞材料和/或化学品。

[0118] 术语“表位”或“抗原决定簇”是指免疫球蛋白或抗体特异性结合的抗原上的位点。表位可以由连续氨基酸或者通过蛋白质的三级折叠并置的非连续氨基酸两者形成。由连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时保留，而通过三级折叠形成的表位通常在用变

性溶剂处理时丢失。表位通常包含独特空间构象中的至少3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14或15个氨基酸。确定哪种表位与给定抗体结合的方法(即表位映射(epitope mapping))是本领域熟知的,包括例如免疫印迹和免疫沉淀测定。确定表位的空间构象的方法包括本领域中的技术和本文所述的那些,例如,X射线晶体学和二维核磁共振(参见,例如,Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol.66, G.E. Morris, Ed. (1996))。

[0119] 识别相同表位的抗体可以在简单的免疫测定中鉴定,所述测定显示一种抗体阻断另一种抗体与靶抗原结合的能力,即竞争性结合测定。竞争性结合在测定中测定,其中待测免疫球蛋白抑制参照抗体与共同抗原的特异性结合。已知许多类型的竞争性结合测定,例如:固相直接或间接放射免疫测定(RIA),固相直接或间接酶免疫测定(EIA),夹心竞争测定(参见Stahli等,Methods in Enzymology 9:242(1983));固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(参见Kirkland等,J. Immunol. 137:3614(1986));固相直接标记测定,固相直接标记夹心测定(参见Harlow和Lane,Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988));使用¹²⁵I标记的固相直接标记RIA(参见Morel等,Mol. Immunol. 25(1):7(1988));固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(Cheung等,Virology 176:546(1990));和直接标记的RIA(Moldenhauer等,Scand. J. Immunol. 32:77(1990))。通常,这样的测定涉及使用与固体表面结合的纯化抗原或携带这些中的任一者的细胞:未标记的测试免疫球蛋白和标记的参照免疫球蛋白。通过测定在测试免疫球蛋白存在下与固体表面或细胞结合的标记的量而测量竞争性抑制。通常,测试免疫球蛋白过量存在。通常,当竞争性抗体过量存在时,其将使参考抗体与共同抗原的特异性结合抑制至少50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75%或者更多。

[0120] 术语“表位映射”是指鉴定用于抗体-抗原识别的分子决定簇的过程。用于表位映射的许多方法是本领域已知的,例如x射线分析,蛋白酶映射,氢/氘交换质谱(HDX-MS), 2D核磁共振,丙氨酸扫描和深度突变扫描。

[0121] “结合亲和力”通常是指分子(例如抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另有说明,否则如本文所用,“结合亲和力”是指固有结合亲和力,其反映结合对(例如,抗体和抗原)的成员之间的1:1相互作用。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可由解离常数(K_d)表示。例如,K_d可以是约200nM, 150nM, 100nM, 60nM, 50nM, 40nM, 30nM, 20nM, 10nM, 8nM, 6nM, 4nM, 2nM, 1nM, 或更强。亲和力可以通过本领域已知的常规方法测量,包括本文所述的那些。低亲和力抗体通常缓慢地结合抗原并且易于解离,而高亲和力抗体通常更快地结合抗原并且倾向于保持更长时间的结合。测量结合亲和力的各种方法是本领域已知的,其中任何方法都可用于本发明的目的。

[0122] 如本文所用,术语“特异性结合”,“选择性结合”,“选择性结合”和“特异性结合”是指抗体与预定抗原上的表位结合。通常,当使用期望抗原作为分析物和使用抗体作为配体,在BIAcore 2000仪器中通过表面等离子体共振(SPR)技术测定时,抗体以约小于10⁻⁷M的平衡解离常数(K_D)结合,例如约小于10⁻⁸M, 10⁻⁹M或10⁻¹⁰M或甚至更低,并以比其结合除预定抗原或紧密相关抗原之外的非特异性抗原(例如BSA,酪蛋白)的亲和力高至少两倍的亲和力结合预定抗原。短语“识别抗原的抗体”和“对抗原具有特异性的抗体”在本文中可与术语“与抗原特异性结合的抗体”互换使用。

[0123] 如本文所用,术语“ K_D ”意指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。

[0124] 如本文所用,术语“ k_d ”意指抗体从抗体/抗原复合物解离的离去速率(off rate)常数。

[0125] 如本文所用,术语“ k_a ”意指抗体与抗原结合的开启速率(on rate)常数。

[0126] 如本文所用,“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类别(例如,IgM或IgG1)。在一个实施方式中,本发明的人单克隆抗体属于IgG1同种型。在某些实施方式中,人IgG1具有如SEQ ID NO:1所示的重链恒定结构域序列和如SEQ ID NO:2所示的轻链恒定结构域序列。

[0127] 如本文所用,术语“核酸分子”旨在包括DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链或双链的,例如,编码本发明的双特异性抗体重链和轻链的单链mRNA或双链DNA。

[0128] 本发明还包括序列表8中列出的序列的“保守序列修饰”,即核苷酸和氨基酸序列修饰,其不消除由核苷酸序列编码或含有氨基酸序列的结合的抗体对抗原的结合。这样的保守序列修饰包括保守核苷酸和氨基酸置换,以及核苷酸和氨基酸添加和缺失。例如,可以通过本领域已知的标准技术将修饰引入序列表中列出的序列,例如定点诱变和PCR介导诱变。保守氨基酸置换包括其中氨基酸残基用具有相似侧链的氨基酸残基替换的氨基酸置换。本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如赖氨酸,精氨酸,组氨酸),酸性侧链(例如天冬氨酸,谷氨酸),不带电的极性侧链(例如甘氨酸,天冬酰胺,谷氨酰胺,丝氨酸,苏氨酸,酪氨酸,半胱氨酸,色氨酸),非极性侧链(如丙氨酸,缬氨酸,亮氨酸,异亮氨酸,脯氨酸,苯丙氨酸,蛋氨酸), β -支链侧链(如苏氨酸,缬氨酸,异亮氨酸)和芳香族侧链(如酪氨酸,苯丙氨酸,色氨酸,组氨酸)的氨基酸。因此,双特异性抗体中预测的非必需氨基酸残基优选被来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基替换。鉴定不消除抗原结合的核苷酸和氨基酸保守置换的方法是本领域公知的(参见,例如,Brummell等,Biochem.32:1180-1187(1993);Kobayashi等,Protein Eng.12(10):879-884(1999);和Burks等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:412-417(1997))。

[0129] 对于核酸,术语“基本上同源性”表示当两个核酸或其指定序列在最佳比对和比较时,在至少约80%的核苷酸中相同,具有适当的核苷酸插入或缺失,通常至少约90%至95%,更优选至少约98%至99.5%的核苷酸。或者,当片段将在选择性杂交条件下与链的互补序列杂交时,存在基本上同源性。

[0130] 两个序列之间的同一性百分比是序列共有的相同位置的数量的函数(即%同源性=相同位置的数量/位置总数 \times 100),考虑到间隙的数量和每个间隙的长度,其需要被引入以实现两个序列的最佳比对。如下面的非限制性实施例中所述,可以使用数学算法完成序列的比较和两个序列之间的百分比同一性的确定。

[0131] 两个核苷酸序列之间的同一性百分比可以使用GCG软件包(可从<http://www.gcg.com>获得)中的GAP程序确定,使用NWSgapdna.CMP矩阵和40,50,60,70或80的空位权重和1,2,3,4,5或6的长度权重。两个核苷酸或氨基酸序列之间的同一性百分比也可以使用E.Meyers和W.Miller(CABIOS,4:11-17(1989))的算法确定,该算法已被并入ALIGN程序(版本2.0),使用PAM120权重残基表格,空位长度罚分为12,空位罚分为4。另外,两个氨基酸序列之间的同一性百分比可以使用Needleman和Wunsch(J.Mol.Biol.(48):444-453(1970))算法确定,该算法已经结合到GCG软件包(可从<http://www.gcg.com>获得)中的GAP

程序中,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵,空位权重为16,14,12,10,8,6或4,长度权重为1,2,3,4,5或6。

[0132] 本发明的核酸和蛋白质序列可以进一步用作“查询序列”以对公共数据库进行搜索,以例如鉴定相关序列。可以使用Altschul等(1990) J.Mol.Biol.215:403-10的NBLAST和XBLAST程序(版本2.0)来执行这样的搜索。可以用NBLAST程序进行BLAST核苷酸搜索,得分=100,字长=12,以获得与本发明的核酸分子同源的核苷酸序列。可以用XBLAST程序进行BLAST蛋白质搜索,得分=50,字长=3,以获得与本发明的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空位比对,可以如Altschul等(1997) Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402所述利用空位BLAST。当使用BLAST和Gapped BLAST程序时,可以使用各个程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认参数。见<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

[0133] 核酸可以存在于完整细胞中,细胞裂解物中,或部分纯化或基本上纯的形式中。当通过标准技术(包括碱/SDS处理,CsCl条带,柱层析,琼脂糖凝胶电泳和本领域熟知的其他)从其他细胞组分或其他污染物(例如其他细胞核酸或蛋白质)中纯化出来时,核酸被“分离”或“使得基本上纯”。参见F.Ausubel等编辑,Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York(1987)。

[0134] 当给出氨基酸序列时,本领域技术人员可以对编码它的核苷酸序列进行保守置换而不改变氨基酸序列,考虑到遗传密码中的冗余性。来自cDNA,基因组或其混合物的、通常为天然序列(除了修饰的限制性位点等)的核酸组合物可以根据标准技术进行突变以提供基因序列。对于编码序列,这些突变可以根据需要影响氨基酸序列。特别地,考虑了与天然V,D,J,恒定,开关和本文描述的其他这样的序列基本上同源或衍生自它们的DNA序列(其中“衍生”表示序列与另一序列相同或从另一序列修饰而来)。

[0135] 如本文所用,术语“肽”定义为氨基酸残基的链,通常具有确定的序列。如本文所用,术语肽可与术语“多肽”和“蛋白质”互换。在本发明的上下文中,术语“肽”定义为包含通过修饰或未修饰的肽键连接的至少两个氨基酸的任何肽或蛋白质。术语“肽”是指短链分子,例如寡肽或寡聚体,或指长链分子,例如蛋白质。根据本发明的肽可包含修饰的氨基酸。因此,本发明的肽也可以通过自然过程如转录后修饰或通过化学过程进行修饰。这些修饰的一些实例是:乙酰化,酰化,ADP-核糖基化,酰胺化,与黄素的共价键合,与血红素的共价键合,与核苷酸或核苷酸衍生物的共价键合,与修饰或未修饰的碳水化合物部分的共价键合,与脂质或脂质衍生物键合,与磷脂酰肌醇共价键合,交联,环化,二硫键形成,去甲基化,半胱氨酸分子形成,焦谷氨酸形成,甲酰化, γ -羧化,羟基化,碘化,甲基化,氧化,磷酸化,外消旋化,羟基化等。因此,任何不具有消除肽的免疫原性作用的肽的修饰都包括在本发明的范围内。

[0136] 本文所述肽的个体残基可通过肽键或肽键模拟物引入肽中。肽键模拟物包括本领域技术人员熟知的肽骨架修饰。这样的修饰包括酰胺氮, α -碳,酰胺羰基,酰胺键的完全替换,延伸,缺失或骨架交联的修饰。通常参见Spatola, Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol.VII (Weinstein编,1983)。已知几种肽骨架修饰,这些包括 ψ [CH₂S], ψ [CH₂NH], ψ [CSNH₂], ψ [NHCO], ψ [COCH₂]和 ψ [(E)或(Z)CH=CH]。上面使用的命名法遵循上面Spatola建议的。在这种上下文下, ψ 表示不存在酰胺键。取代酰胺基团的结构在括号内指定。

[0137] 氨基酸模拟物也可以引入肽中。本文使用的“氨基酸模拟物”是天然存在的氨基酸以外的部分,其在构象和功能上用作本发明的肽中的氨基酸的替代物。如果这种部分不干扰肽与抗体结合的能力,则它用作氨基酸残基的替代物。氨基酸模拟物可包括非蛋白质氨基酸,例如 β -、 γ -、 δ -氨基酸, β -、 γ -、 δ -亚氨基酸(例如哌啶-4-羧酸)以及L- α -氨基酸的许多衍生物。许多合适的氨基酸模拟物是本领域技术人员已知的,它们包括环己基丙氨酸,3-环己基丙氨酸,L-金刚烷基丙氨酸,金刚烷基乙酸等。此外,D-氨基酸可视为模拟物。适用于本发明的肽的肽模拟物由Morgan和Gainor, (1989) Ann. Repts. Med. Chem. 24:243-252论述。

[0138] 如本文所用,术语“载体”意指能够转运与其连接的另一核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,其是指环状双链DNA环,其中可以连接额外的DNA区段。另一种类型的载体是病毒载体,其中额外的DNA区段可以连接到病毒基因组中。某些载体能够在它们重新引入的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其他载体(例如,非附加型哺乳动物载体)可以在引入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中,由此与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导它们可操作地连接的基因的表达。这样的载体在本文中称为“重组表达载体”(或简称为“表达载体”)。通常,在重组DNA技术中有用的表达载体通常是质粒的形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可互换使用,因为质粒是载体中最常用的形式。然而,本发明旨在包括其他形式的表达载体,例如病毒载体(例如,复制缺陷型逆转录病毒,腺病毒和腺相关病毒),其起到相同的功能。

[0139] 如本文所用,术语“重组宿主细胞”(或简称“宿主细胞”)意指其中已引入重组表达载体的细胞。应当理解,这些术语不仅意指特定的本发明细胞,而且意指这种细胞的后代。因为某些修饰可能由于突变或环境影响而在后代中发生,所以这些后代实际上可能不与母体细胞相同,但仍包括在本文所用的术语“宿主细胞”的范围内。

[0140] 术语“癌症”和“癌性”是指或描述哺乳动物中通常以不受调节的细胞生长/增殖为特征的生理状况。该定义包括良性和恶性癌症。癌症的实例包括但不限于癌,淋巴瘤,胚细胞瘤,肉瘤和白血病。这样的癌症的更具体的实例包括鳞状细胞癌,小细胞肺癌,非小细胞肺癌,肺腺癌,肺鳞状细胞癌,腹膜癌,肝细胞癌,胃癌或胃癌,包括胃肠癌,胰腺癌,胶质母细胞瘤,胶质瘤,宫颈癌,卵巢癌,肝癌,膀胱癌,肝癌,乳腺癌,结肠癌,结直肠癌,子宫内膜癌或子宫癌,唾液腺癌,肾癌(如肾细胞癌),肝癌,前列腺癌,外阴癌,甲状腺癌,肝癌,肛门癌,阴茎癌,黑色素瘤和各种类型的头颈癌。“早期癌症”是指非侵袭性或转移性或被分类为0期,I期或II期癌症的癌症。术语“癌前期”是指通常在癌症之前或发展成癌症的病症或生长。“非转移性”是指良性或保留在原发部位并且未渗入淋巴或血管系统或除原发部位以外的组织的癌症。通常,非转移性癌症是任何癌症,其是0期,I期或II期癌症,并且偶尔是III期癌症。

[0141] 本文的“过敏性或炎性病症”是由个体免疫系统的过度激活引起的疾病或病症。示例性过敏性或炎性病症包括但不限于哮喘,牛皮癣,类风湿性关节炎,特应性皮炎,多发性硬化症,系统性红斑狼疮,红斑狼疮,湿疹,器官移植,年龄相关的肌肉退化,克罗恩病,溃疡性结肠炎,嗜酸细胞性食管炎和与炎症相关的自身免疫疾病。

[0142] 本文的“自身免疫疾病”是由个体自身组织或其共分离或表现或由此产生的状况产生或针对这些的疾病或病症。自身免疫疾病或病症的实例包括但不限于关节炎(类风湿性关节炎,例如急性关节炎,慢性类风湿性关节炎,痛风性关节炎,急性痛风性关节炎,慢性

炎性关节炎,退行性关节炎,感染性关节炎,莱姆关节炎,增生性关节炎,银屑病关节炎,椎关节炎,和青少年型类风湿性关节炎,骨关节炎,慢性进展性关节炎,变形性关节炎,慢性多发性关节炎,反应性关节炎和强直性脊柱炎),炎症性过度增生性皮肤病,牛皮癣,如牛皮癣,gutatte牛皮癣,脓疱型牛皮癣和指甲牛皮癣,皮炎,包括接触性皮炎,慢性接触性皮炎,过敏性皮炎,过敏性接触性皮炎,疱疹性皮炎,特应性皮炎,x连锁高IgM综合征,荨麻疹如慢性过敏性荨麻疹和慢性特发性荨麻疹,包括慢性自身免疫性荨麻疹,多发性肌炎/皮肌炎,青少年皮肌炎,中毒性表皮坏死松解症,硬皮病(包括系统性硬皮病),硬化症如系统性硬化症,多发性硬化症(MS)如脊柱-眼睛MS,原发进展型MS(PPMS)和复发缓解MS(RRMS),进行性系统性硬化症,动脉粥样硬化,动脉硬化,传染性硬化症和共济失调性硬化症,炎症性肠病(IBD)(例如,克罗恩病,自身免疫介导的胃肠疾病,结肠炎如溃疡性结肠炎,溃疡性结肠炎,显微结肠炎,胶原性结肠炎,结肠炎息肉,坏死性小肠结肠炎,透壁性结肠炎,自身免疫性炎症性肠病),坏疽性脓皮病,结节性红斑,原发性硬化性胆管炎,巩膜外炎),呼吸窘迫综合征,包括成人或急性呼吸窘迫综合征(ARDS),脑膜炎,全身或部分葡萄膜炎,虹膜炎,脉络膜炎,自身免疫血液系统疾病,类风湿性脊椎炎,突发性听力丧失,IgE介导的疾病,如过敏反应和过敏性和特应性鼻炎,脑炎如Rasmussen脑炎和边缘和/或脑干脑炎,葡萄膜炎,如前葡萄膜炎,急性前葡萄膜炎,肉芽肿性葡萄膜炎,非肉芽肿性葡萄膜炎,恶性葡萄膜炎,后葡萄膜炎或自身免疫性葡萄膜炎,伴有和不伴有肾病综合征的肾小球肾炎(GN),如慢性或急性肾小球肾炎,如原发性GN,免疫介导的GN,膜性GN(膜性肾病),特发性膜性GN或特发性膜性肾病,膜性或膜性增殖性GN(MPGN),包括I型和II型,以及快速进展型GN,过敏性疾病,过敏反应,湿疹包括过敏性或特应性湿疹,哮喘如哮喘支气管炎,支气管哮喘和自身免疫哮喘,涉及T细胞浸润和慢性炎症的病症反应,慢性肺部炎症,自身免疫性心肌炎,白细胞粘附缺陷,系统性红斑狼疮(SLE)或系统性红斑狼疮,如皮肤SLE,亚急性皮肤红斑狼疮,新生儿狼疮综合征(NLE),红斑狼疮,狼疮(包括肾炎,脑炎,小儿,非肾,肾外,盘状,脱发),青少年发病(I型)糖尿病,包括小儿胰岛素依赖型糖尿病(IDDM),成人发病的糖尿病(II型糖尿病),自身免疫性糖尿病,特发性尿崩症,与细胞因子和T淋巴细胞介导的急性和迟发性超敏反应相关的免疫反应,结核病,结节病,肉芽肿病,包括淋巴瘤样肉芽肿病,韦格纳肉芽肿病,粒细胞缺乏症,血管炎,包括血管炎(包括大血管炎(包括风湿性多肌炎和巨细胞)(Takayasu's)动脉炎),中血管血管溃疡(包括川崎病和结节性多动脉炎),显微镜下多动脉炎,中枢神经系统血管炎,坏死性,皮肤或过敏性血管炎,全身性坏死性血管炎和ANCA相关性血管炎,如Churg-Strauss血管炎或综合征(CSS),颞动脉炎,再生障碍性贫血,自身免疫性再生障碍性贫血,Coombs阳性贫血,Diamond Blackfan贫血,溶血性贫血或免疫性溶血性贫血,包括自身免疫性溶血性贫血(AIHA),恶性贫血(恶性贫血),Addison病,纯红细胞贫血或发育不全(PRCA),因子VIII缺乏,血友病A,自身免疫性中性粒细胞减少症,全血细胞减少症,白细胞减少症,涉及白细胞减少的疾病,CNS炎症性疾病,多器官损伤综合征如继发于败血症,创伤或出血的那些,抗原-抗体复合物介导的疾病,抗肾小球基底膜疾病,抗磷脂抗体综合征,过敏性神经炎,Bechet或Behcet病,Castleman综合征,Goodpasture综合征,Reynaud综合征,干燥综合征,Stevens-Johnson综合征,类天疱疮类天疱疮和类天疱疮类天疱疮,天疱疮(包括寻常型天疱疮,天疱疮天疱疮,天疱疮粘膜膜类天疱疮和天疱疮),自身免疫性多发性内分泌病,Reiter病或综合征,免疫复合性肾炎,抗体介导的肾炎,视神经脊髓炎,多发性

神经病,慢性神经病如IgM多发性神经病或IgM介导的神经病,血小板减少症(例如由心肌梗塞患者开发),包括血栓性血小板减少性紫癜(TTP)和自身免疫或免疫介导的血小板减少症,如特发性血小板减少性紫癜(ITP),包括慢性或急性ITP,睾丸和卵巢的自身免疫性疾病,包括自身免疫性睾丸炎和卵巢炎,原发性甲状腺功能减退症,甲状旁腺功能减退症,自身免疫性内分泌疾病,包括甲状腺炎,如自身免疫甲状腺炎,桥本氏病,慢性甲状腺炎(桥本甲状腺炎)或亚急性甲状腺炎,自身免疫性甲状腺疾病,特发性甲状腺功能减退症,格雷夫氏病,多发性综合征如自身免疫性多腺体综合征(或多腺内分泌综合征),副肿瘤综合征,包括神经系统副肿瘤综合征等。Lambert-Eaton肌无力综合征或Eaton-Lambert综合征,僵硬或僵硬综合征,脑脊髓炎如过敏性脑脊髓炎或过敏性脑脊髓炎和实验性过敏性脑脊髓炎(EAE),重症肌无力,如胸腺瘤相关性重症肌无力,小脑变性,神经性肌强直,斜视眼阵挛或斜视眼阵挛肌阵挛综合征(OMS),感觉神经病,多灶性运动神经病,Sheehan综合征,自身免疫性肝炎,慢性肝炎,狼疮性肝炎,巨细胞肝炎,慢性活动性肝炎或自身免疫性慢性活动性肝炎,淋巴间隙重症肺炎,闭塞性细支气管炎(非移植)vs NSIP,格林-巴利综合征,伯格氏病(IgA肾病),特发性IgA肾病,线性IgA皮肤病,原发性胆汁性肝硬化,肺炎,自身免疫性肠病综合征,腹腔疾病,腹腔疾病,乳糜泻口炎(麸质肠病),难治性口炎性腹泻,特发性口炎性腹泻,冷球蛋白血症,肌萎缩侧索硬化症(ALS;Lou Gehrig病),冠状动脉疾病,自身免疫性耳疾病如自身免疫性内耳病(AIED),自身免疫性听力丧失,斜视眼阵挛肌阵挛综合征(OMS),多软骨炎如难治性或复发性多软骨炎,肺泡蛋白沉积症,淀粉样变性,巩膜炎,非癌性淋巴细胞增多症,一种原发性淋巴细胞增多症,包括单克隆B细胞淋巴细胞增多症(如良性单克隆丙种球蛋白病和重要性未定的单克隆性丙种球蛋白病,MGUS),周围神经病变,副肿瘤综合征,癫痫,偏头痛,心律失常,肌肉疾病,耳聋,失明等蛔虫病,CNS,自闭症,炎性肌病,局灶性节段性肾小球硬化症(FSGS),内分泌眼病,葡萄膜视网膜炎,脉络膜视网膜炎,自身免疫性肝病,纤维肌痛,多发性内分泌失调,施密特综合征,肾上腺炎,胃萎缩,老年前期痴呆,周期性麻痹和通道病,脱髓鞘疾病等自身免疫性脱髓鞘疾病,糖尿病肾病,Dressler综合征,斑秃,CREST综合征(钙质沉着症,雷诺氏现象,食管运动障碍,硬化性和毛细血管扩张症),男性和女性自身免疫性不孕症,混合性结缔组织病,Chagas病,风湿热,反复发作流产,农民肺,多形性红斑,心脏切开术后综合征,库欣综合征,鸟类肺癌,过敏性肉芽肿性血管炎,良性淋巴细胞性血管炎,Alport综合征,过敏性肺炎和纤维性肺炎等肺炎,间质性肺病,输血反应,麻风病,疟疾,利什曼病,kypanosomiasis,血吸虫病,蛔虫病,曲霉病,Sampter综合征,Caplan综合征,登革热,心内膜炎,心内膜心肌纤维化,弥漫性间质性肺纤维化,间质性肺纤维化,特发性肺纤维化,囊性纤维化,眼内炎,持久性隆起性红斑,胎儿成红细胞增多症,嗜酸性粒细胞性腹膜炎,Shulman综合征,Felty综合征,萎缩,慢性周期炎,异时性周期炎,虹膜睫状体炎或Fuch's cyclitis, Henoch-Schonlein紫癜,人类免疫缺陷病毒(HIV)感染,埃可病毒感染,心肌病,阿尔茨海默病,细小病毒感染,风疹病毒感染,接种后综合征,先天性风疹感染,Epstein-Barr病毒感染,腮腺炎,Evan综合征,自身免疫性腺功能衰竭,Sydenham舞蹈病,链球菌感染后肾炎,血栓性溃疡,甲状腺毒症,背痛,绒毛膜炎,巨细胞多肌痛,内分泌性眼病,慢性过敏性肺炎,干燥性角膜结膜炎,流行性角膜结膜炎,特发性肾病综合征,微小病变肾病,良性家族性和缺血再灌注损伤,视网膜自身免疫,关节炎,支气管炎,慢性阻塞性气道疾病,矽肺病,口疮,口疮性口炎,动脉硬化性疾病,精子异常,自身免

疫性溶血,Boeck病,冷球蛋白血症,Dupuytren挛缩,眼球内陷性嗜铬细胞瘤,过敏性肠炎,结节性红斑,特发性面瘫,慢性疲劳综合症,风湿性疟疾,Hamman-Rich病,感觉性耳聋,血红蛋白尿症,性腺功能低下症,区域性回肠炎,白细胞减少症,单核细胞增多症,横贯性脊髓炎,原发性特发性粘液性水肿,肾病,眼炎症,睾丸炎性肉芽肿,胰腺炎,多发性神经根炎,坏疽性脓皮病,Quervain甲状腺炎,后天性萎缩,抗精子抗体引起的不孕症,非恶性胸腺瘤,白癜风,SCID和Epstein-Barr病毒相关疾病,获得性免疫缺陷综合症(艾滋病),寄生虫病如利什曼原虫,中毒性休克综合症,食物中毒,涉及T细胞浸润的病症,白细胞粘附缺陷,免疫反应相关由细胞因子和T淋巴细胞介导的急性和迟发性超敏反应,涉及白细胞渗漏,多器官损伤综合征,抗原-抗体复合物介导的疾病,抗肾小球基底膜疾病,过敏性神经炎,自身免疫性多内分泌病,卵巢炎,原发性粘液性水肿,自身免疫性萎缩性胃炎,交感性眼炎,风湿性疾病,混合性结缔组织病,肾病综合征,胰岛炎,多发性内分泌失败,周围神经病变,I型自身免疫性多腺综合征,成人特发性甲状旁腺功能减退症(AOIH),秃头症,扩张型心肌病,大疱性表皮(EBA),血色病,心肌炎,肾病综合征,原发性硬化性胆管炎,化脓性或非脓性鼻窦炎,急性或慢性鼻窦炎,筛窦,额叶,上颌骨或蝶窦炎,嗜酸性粒细胞相关疾病,如嗜酸粒细胞增多,肺浸润嗜酸性粒细胞增多,嗜酸粒细胞增多症-肌痛综合征,Loffler综合征,慢性嗜酸性粒细胞性肺炎,热带肺嗜酸性粒细胞增多症,支气管肺炎曲霉菌病,曲霉菌病或含嗜酸性粒细胞的肉芽肿,过敏反应,血清阴性脊柱关节炎,多发性内分泌自身免疫性疾病,硬化性胆管炎,巩膜,巩膜外层,慢性粘膜皮肤念珠菌病,Bruton综合征,婴儿短暂性低丙种球蛋白血症,Wiskott-Aldrich综合征,共济失调性毛细血管扩张症,与胶原病相关的自身免疫性疾病,风湿病,神经系统疾病,缺血性再灌注障碍,血压反应降低,血管功能障碍,抗癫痫,组织损伤,心血管缺血,痛觉过敏,脑缺血和伴随疾病血管化,过敏性过敏症,肾小球肾炎,再灌注损伤,心肌或其他组织的再灌注损伤,急性炎症性组织的皮肤病,急性化脓性脑膜炎或其他中枢神经系统炎症性疾病眼,眼眶炎症性疾病,粒细胞输血相关综合征,细胞因子诱导的毒性,急性严重炎症,慢性顽固性炎症,肾盂炎,肺炎,糖尿病视网膜病变,糖尿病大动脉疾病,动脉内增生,消化性溃疡,瓣膜炎和子宫内膜异位症。

[0143] 如本文所用的术语“细胞毒性剂”是指抑制或阻止细胞功能和/或引起细胞破坏的物质。该术语旨在包括放射性同位素(例如,At²¹¹,I¹³¹,I¹²⁵,Y⁹⁰,Re¹⁸⁶,Re¹⁸⁸,Sm¹⁵³,Bi²¹²,Ra²²³,P³²和Lu的放射性同位素),化学治疗剂例如甲氨蝶呤,阿霉素,长春花生物碱(长春新碱,长春碱,依托泊苷),多柔比星,美法仑,丝裂霉素C,苯丁酸氮芥,柔红霉素或其他插层剂,酶及其片段如核溶酶,抗生素和毒素如小分子毒素或者细菌,真菌,植物或动物来源的酶活性毒素,包括其片段和/或变体,以及本文公开的各种抗肿瘤剂,抗癌剂和化学治疗剂。本文描述了其他细胞毒性剂。杀肿瘤剂导致肿瘤细胞的破坏。

[0144] “化学治疗剂”是可用于治疗癌症的化学化合物。化学治疗剂的实例包括烷化剂,例如塞替派和CYTOXAN®环磷酰胺;氨基磺酸盐,例如白消安,英丙舒凡和哌泊舒凡;氮杂环庚烷,例如benzodopa,卡巴醌,meturedopa和uredopa;乙烯亚胺和methyldiamines,包括六甲蜜胺,曲他胺,三乙烯磷酰胺,三乙烯硫代磷酰胺和trimethylolomelamine;acetogenins(特别是bullatacin和bullatacinone); δ -9-四氢大麻酚(dronabinol,MARINOL®); β -拉帕醌;拉帕醇;秋水仙碱;桦木酸;喜树碱(包括合

成类似物拓扑替康(**HYCAMTIN®**),CPT-11(伊立替康,**CAMPTOSAR®**),乙酰喜树碱,scopolectin和9-氨基喜树碱);苔藓抑素;callystatin;CC-1065(包括其adozelesin,carzelesin和bizelesin合成类似物);鬼臼毒素;足叶草酸;替尼泊苷;cryptophycins(特别是cryptophycin 1和cryptophycin 8);多拉司他汀;duocarmycin(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);eleutherobin;pancratistatin;sarcodictyin;spongistatin;氮芥,如苯丁酸氮芥,氯苯哒嗪,氯磷酰胺,雌莫司汀,异环磷酰胺,氮芥,盐酸甲氧氮芥,美法仑,新恩比兴,phenesterine,泼尼氮芥,曲洛磷胺,乌拉莫司汀;亚硝基脲类,如卡莫司汀,氯噻菌素,福莫司汀,洛莫司汀,尼莫司汀和雷尼莫司汀;抗生素如烯二炔抗生素(例如,加利车霉素,尤其是加利车霉素 γ 1(参见例如Agnew,Chem Intl.Ed.Engl.33:183-186(1994));dynemicin,包括dynemicin A;esperamicin;以及新制癌菌素发色团和相关色素蛋白烯二炔类抗生素发色团),阿克拉霉素,放线菌素,高霉素,重氮丝氨酸,博来霉素,cactinomycin,carabycin,洋红霉素,carzinophilin,chromomycinis,更生霉素,柔红霉素,detorubicin,6-二氮杂-5-氧代-L-正亮氨酸,**ADRIAMYCIN®**多柔比星(包括吗啉代-多柔比星,氰基吗啉代-多柔比星,2-吡咯啉基-多柔比星和去氧多柔比星),表柔比星,伊曲霉素,伊达比星,马克霉素,丝裂霉素,丝裂霉素C,霉酚酸,诺加拉霉素,olivomycins,培洛霉素,potfiromycin,嘌呤霉素,quelamycin,rodorubicin,链黑菌素,链佐星,杀结核菌素,乌苯美司,净司他丁,佐柔比星;抗代谢产物,如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物如二甲叶酸,甲氨蝶呤,蝶呤,三甲曲沙;嘌呤类似物,如氟达拉滨,6-巯基嘌呤,硫胺素,硫鸟嘌呤;嘧啶类似物如安西他滨,阿扎胞苷,6-氮杂尿苷,卡莫氟,阿糖胞苷,双脱氧尿苷,多西氟尿苷,依那西班,氟尿苷;卡普唑酮,屈他雄酮丙酸酯,环硫雄醇,美雄烷,睾内酯等雄激素;抗肾上腺素,如氨基乙酰亚胺,米托坦,曲洛司坦;叶酸补充剂如氟喹啉酸;醋葡萄糖内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;恩尿嘧啶;安吡啶;bestrabucil;比生群;edatraxate;defofamine;美可辛;diaziquone;elfornithine;醋酸乙烯酯;埃博霉素;etoglucid;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;lonidainine;美登素类,如美登素和安沙霉素;mitoguazone;米托蒽醌;mopidanmol;nitraerine;喷司他丁;phenamet;吡柔比星;洛索;2-ethylhydrazide;甲基苄肼;**PSK®**多糖复合物(JHS Natural Products,Eugene,OR);razoxane;根霉素;西佐;螺环锗;tenuazonic acid;三亚胺;2,2',2"-三氯三乙胺;单端孢霉烯(特别是T-2毒素,verracurina,roridina和anguidine);urethan;vindesine(**ELDISINE®**,**FILDESIN®**);达卡巴嗪;mannomustine;mitobronitol;mitolactol;pipobroman;gacytosine;阿拉伯糖苷("Ara-C");thiotepa;紫杉烷类,例如,紫杉醇(Bristol-MyersSquibbOncology,Princeton,NJ),紫杉醇的ABRAXANETM无Cremophor、白蛋白工程化纳米颗粒制剂(American Pharmaceutical Partners,Schaumburg,IL),和**TAXOTERE®**多西紫杉醇(Rhone-Poulenc Rorer,Antony,France);氯醌;吉西他滨(**GEMZAR®**);6-巯鸟嘌呤;巯嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物如顺铂和卡铂;长春碱(**VELBAN®**);铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱(**ONCOVIN®**);奥沙利铂;leucovorin;长春瑞滨(**NAVELBINE®**);

novantrone; edatrexate; 道诺霉素; 氨基嘌呤; 伊班膦酸盐; 拓扑异构酶抑制剂RFS2000; 二氟甲基鸟氨酸 (DMFO); 维甲酸类如维甲酸酸; capecitabine(**XELODA®**); 任何上述的药学上可接受的盐, 酸或衍生物; 以及上述两种或跟多种的组合, 例如CHOP, 其是环磷酰胺, 多柔比星, 长春新碱和泼尼松龙的联合治疗的缩写, 和FOLFOX, 其是奥沙利铂与5-FU和leucovorin联合的治疗方案的缩写(ELOXATINTM)。

[0145] 该定义还包括抗激素剂, 其用于调节, 减少, 阻断或抑制可促进癌症生长的激素的作用, 并且通常以全身或全身治疗的形式。它们本身可以是激素。实例包括抗雌激素和选择性雌激素受体调节剂 (SERM), 包括例如他莫昔芬 (包括**NOLVADEX®** 他莫昔芬), **EVISTA®** 雷洛昔芬, 屈洛昔芬, 4-羟基他莫昔芬, 曲沃昔芬, keoxifene, LY1 17018, onapristone和**FARESTON®** 托瑞米芬; 抗孕酮; 雌激素受体下调因子 (ERDs); 用于抑制或关闭卵巢的药剂, 例如, 激素释放激素 (LHRH) 激动剂, 例如**LUPRON®** 和**ELIGARD®** 醋酸亮丙瑞林, 醋酸戈舍瑞林, 醋酸布舍瑞林和tripterelin; 其他抗雄激素如氟他胺, 尼鲁米特和比卡鲁胺; 抑制酶芳香酶的芳香酶抑制剂, 其调节肾上腺中雌激素的产生, 例如, 4(5)-咪唑, 氨鲁米特, **MEGASE®** 醋酸甲地孕酮, **AROMASIN®** 依西美坦, formestane, fadrozole, **RIVISOR®** vorozole, **FEMARA®** 来曲唑和**ARIMIDEX®** 阿那曲唑。此外, 化学治疗剂的这种定义包括双膦酸盐, 如氯膦酸盐 (例如, **BONEFOS®** 或 **OSTAC®**), **DIDROCAL®** 依替膦酸盐, NE-58095, **ZOMETA®** 唑来膦酸/唑来膦酸盐, **FOSAMAX®** 阿仑膦酸盐, **AREDIA®** 帕米膦酸盐, **SKELID®** 替唑膦酸盐或**ACTONEL®** 利塞膦酸盐; 以及曲沙他滨 (1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物); 反义寡核苷酸, 特别是那些抑制与粘附细胞增殖有关的信号传导通路中的基因的表型的反义寡核苷酸, 例如PKC- α , Raf, H-Ras和表皮生长因子受体 (EGF-R); 疫苗如**THERATOPE®** 疫苗和基因治疗疫苗, 例如**ALLOVECTIN®** 疫苗, **LEUVECTIN®** 疫苗和**VAXID®** 疫苗; **LURTOTECAN®** 拓扑异构酶1抑制剂; **ABARELIX®** rmRH; 拉帕替尼二甲苯磺酸盐 (ErbB-2和EGFR双酪氨酸激酶小分子抑制剂, 也称为GW572016); 和任何上述的药学上可接受的盐, 酸或衍生物。

[0146] 当在本文中使用时, “生长抑制剂” 是指在体外或体内抑制细胞生长的化合物或组合物。因此, 生长抑制剂可以是显著降低S期细胞百分比的生长抑制剂。生长抑制剂的实例包括阻断细胞周期进展的试剂 (在S期以外的位置), 例如诱导G1停滞和M期停滞的试剂。经典的M期阻滞剂包括长春花 (例如长春新碱和长春碱), 紫杉烷和拓扑异构酶II抑制剂, 例如多柔比星, 表柔比星, 柔红霉素, 依托泊苷和博来霉素。阻滞G1的药剂也溢出到阻滞S期, 例如, DNA烷化剂如他莫昔芬, 强的松, 达卡巴嗪, 氮芥, 顺铂, 甲氨蝶呤, 5-氟尿嘧啶和ara-C。进一步的信息可见于The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, 标题为“Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs”, Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), 特别是第13页。紫杉烷类 (紫杉醇和多西紫杉醇) 是来自紫杉树的抗癌药物。多西紫杉醇 (**TAXOTERE®**, Rhone-Poulenc Rorer) 衍生自欧洲红豆杉, 是紫杉醇的半合成类似物 (**TAXOL®**, Bristol-Myers

Squibb)。紫杉醇和多西紫杉醇促进微管蛋白二聚体的微管组装,并通过防止解聚来稳定微管,从而抑制细胞中的有丝分裂。

[0147] 如本文所用的“抗癌疗法”是指减少或抑制受试者中的癌症的治疗。抗癌疗法的实例包括细胞毒性放射疗法以及向受试者施用治疗有效量的细胞毒剂,化学治疗剂,生长抑制剂,癌症疫苗,血管生成抑制剂,前药,细胞因子,细胞因子拮抗剂,皮质类固醇,免疫抑制剂,止吐药,抗体或抗体片段,或镇痛药。

[0148] 本申请中使用的术语“前药”是指药物活性物质的前体或衍生物形式,与母体药物相比对肿瘤细胞的细胞毒性较小,并且能够被酶促活化或转化为更活跃的母体形式。参见,例如,Wilman,“Prodrugs in Cancer Chemotherapy”Biochemical Society Transactions,14,pp.375-382,615th Meeting Belfast(1986)and Stella et al.,“Prodrugs:A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery,”Directed Drug Delivery,Borchardt et al.,(ed.),pp.247-267,Humana Press(1985)。前药包括但不限于含磷酸盐的前药,含硫代磷酸酯的前药,含硫酸盐的前药,含肽的前药,D-氨基酸修饰的前药,糖基化的前药,含 β -内酰胺的前药,含任选取代的苯氧基乙酰胺的前药或含任选取代的苯基乙酰胺的前药,5-氟胞嘧啶和其它5-氟尿苷前药,它们可以转化成更具活性的无细胞毒性药物。可以衍生成用于本发明的前药形式的细胞毒性药物的实例包括但不限于上述那些化学治疗剂。

[0149] 术语“细胞因子”是由一种细胞群释放的蛋白质的总称,其作为细胞间介质作用于另一细胞。这些细胞因子的实例是淋巴因子,单核因子和传统的多肽激素。细胞因子包括生长激素,如人生长激素(HGH),N-甲硫氨酰人生长激素和牛生长激素;甲状旁腺激素;甲状腺素;胰岛素;胰岛素原;松弛素;松弛素原;糖蛋白激素,如促卵泡激素(FSH),促甲状腺激素(TSH)和黄体生成素(LH);表皮生长因子(EGF);肝生长因子;成纤维细胞生长因子(FGF);催乳素;胎盘催乳素;肿瘤坏死因子- α 和- β ;苗勒抑制物质;小鼠促性腺激素相关肽;抑制素;激活素;血管内皮生长因子;整合素;血小板生成素(TPO);神经生长因子如NGF- α ;血小板生长因子;转化生长因子(TGFs)如TGF- α 和TGF- β ;胰岛素样生长因子-1和-II;促红细胞生成素(EPO);骨诱导因素;干扰素如干扰素- α , - β 和 γ -集落刺激因子(CSFs),如巨噬细胞-CSF(M-CSF);粒细胞-巨噬细胞-CSF(GM-CSF);和粒细胞-CSF(G-CSF);白细胞介素(ILs),如IL-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-18是肿瘤坏死因子,如TNF- α 或TNF- β ;和其他多肽因子包括LIF和kit配体(KL)。如本文所用,术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质和天然序列细胞因子的生物活性等同物。

[0150] “细胞因子拮抗剂”是指部分或完全阻断,抑制或中和至少一种细胞因子的生物活性的分子。例如,细胞因子拮抗剂可以通过抑制细胞因子表达和/或分泌,或通过结合细胞因子或细胞因子受体或细胞因子来抑制细胞因子活性。细胞因子拮抗剂包括结合细胞因子或细胞因子受体的抗体,合成或天然序列肽,免疫粘附素和小分子拮抗剂。细胞因子拮抗剂任选与细胞毒性蛋白缀合或融合。示例性TNF拮抗剂是依那西普(ENBREL),英夫利昔单抗(REMICADE)和阿达木单抗(HUMIRATM)。

[0151] 如本文所用的术语“免疫抑制剂”是指用于抑制或掩盖所治疗的受试者的免疫系统的物质。这包括抑制细胞因子产生,下调或抑制自身抗原表达或掩盖MHC抗原的物质。免

疫抑制剂的实例包括2-氨基-6-芳基-5-取代的嘧啶(参见美国专利No.4,665,077);吗替麦考酚酯,如**CELLCEPT®**;硫唑嘌呤(**IMURAN®**, **AZASAN®**)/6-巯基嘌呤;溴隐亭;达那唑;氨苯砒;戊二醛(其掩盖MHC抗原,如美国专利No.4,120,649中所述);针对MHC抗原和MHC片段的抗独特型抗体;环孢菌素A;类固醇,如皮质类固醇和糖皮质激素,如泼尼松,泼尼松龙,如**PEDIAPRED®**(泼尼松龙钠)或**ORAPRED®**(泼尼松龙钠口服液),甲基强的松龙和地塞米松;甲氨蝶呤(口服或皮下)(**RHEUMATREX®**, **TREXALL™**) 羟基喹啉/氯喹;柳氮磺胺吡啶;来氟米特;细胞因子或细胞因子受体拮抗剂,包括抗干扰素- γ , - β 或- α 抗体,抗肿瘤坏死因子- α 抗体(英夫利昔单抗或阿达木单抗),抗TNF α 免疫粘附素(**ENBREL®**),依那西普,抗肿瘤坏死因子- β 抗体,抗白细胞介素-2抗体和抗IL-2受体抗体;抗LFA-1抗体,包括抗CD11a和抗CD18抗体;抗L3T4抗体;异源抗淋巴细胞球蛋白;多克隆或泛T抗体,或单克隆抗CD3或抗CD4/CD4a抗体;含有LFA-3结合结构域的可溶性肽(W090/08187);链激酶;TGF- β ;链道酶;来自宿主的RNA或DNA;FK506;RS-61443;脱氧精肌菌素;雷帕霉素;T细胞受体(Cohen等,美国专利号5,114,721);T细胞受体片段(Offner等, Science251:430-432(1991);W090/11294;laneway, Nature 341:482(1989);和W091/01133);T细胞受体抗体(EP340,109)如T10B9;环磷酰胺(**CYTOXAN®**);氨苯砒;青霉胺(**CUPRIMINE®**);血浆交换;或静脉注射免疫球蛋白(IVIG)。这些可以单独使用或彼此组合使用,特别是类固醇和另一种免疫抑制剂的组合或这样的组合,然后用非类固醇剂维持剂量以减少对类固醇的需要。

[0152] “镇痛药”是指用于抑制或抑制受试者疼痛的药物。示例性镇痛药包括非甾体抗炎药(NSAID),包括布洛芬(**MOTRIN**),萘普生(**NAPROSYN**),乙酰水杨酸,吲哚美辛,舒林酸和托美汀,包括其盐和衍生物,以及用于减少可能发生的刺痛的其他各种药物,包括抗惊厥药(加巴喷丁,苯妥英,卡马西平)或三环类抗抑郁药。具体实例包括对乙酰氨基酚,阿司匹林,阿米替林(**ELAVIL®**),卡马西平(**TEGRETOL®**),苯妥英(**DILANTIN®**),加巴喷丁(**NEURONTIN®**), (E)-N-香草基-8-甲基-6-非酰胺(**CAPSAICIN®**),或神经阻滞剂。

[0153] “皮质类固醇”是指几种合成或天然存在的物质中的任何一种,其具有类固醇的一般化学结构,其模拟或增强天然存在的皮质类固醇的作用。合成皮质类固醇的实例包括泼尼松,泼尼松龙(包括甲基强的松龙),地塞米松曲安西龙和倍他米松。

[0154] 如本文所用的“癌症疫苗”是刺激受试者中针对癌症的免疫应答的组合物。癌症疫苗通常由癌症相关物质或细胞(抗原)的来源组成,其对于受试者可以是自体的(来自自身)或同种异体的(来自其他),以及其他组分(例如佐剂)以进一步刺激和增强对抗原的免疫反应。癌症疫苗可导致刺激受试者的免疫系统以产生针对一种或多种特异性抗原的抗体,和/或产生杀伤性T细胞以攻击具有那些抗原的癌细胞。

[0155] 本文所用的术语“治疗”,“治疗”和“治疗”是指本文所述的治疗或预防措施。“治疗”的方法采用对需要这种治疗的受试者施用本发明的人抗体,例如,需要针对特定抗原的增强免疫应答的受试者,或最终可能获得这样的疾病的受试者,以为了预防,治愈,延缓,减轻或改善疾病或复发性疾病的一种或多种症状,或为了使受试者的生存期延长超过在没有

这种治疗的情况下所预期的。

[0156] 术语“有效剂量”或“有效剂量”定义为足以达到或至少部分达到所需效果的量。术语“治疗有效剂量”定义为足以治愈或至少部分地阻止已经患有疾病的患者的疾病及其并发症的量。对此用途有效的量取决于所治疗疾病的严重程度和患者自身免疫系统的一般状态。

[0157] 术语“患者”包括接受预防性或治疗性治疗的人和其他哺乳动物受试者。

[0158] 如本文所用,术语“受试者”包括任何人或非人动物。例如,本发明的方法和组合物可用于治疗患有免疫疾病的受试者。术语“非人类动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,例如非人类灵长类动物,绵羊,狗,牛,鸡,两栖动物,爬行动物等。

[0159] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是指细胞毒性形式,其中分泌的Ig结合存在于某些细胞毒性细胞(例如,自然杀伤(NK)细胞,中性粒细胞和巨噬细胞)上的Fc受体(FcR),使这些细胞毒性效应细胞能够特异性结合携带抗原的靶细胞,然后用细胞毒性剂杀死靶细胞。抗体“武装”细胞毒性细胞并且绝对是这种杀死所必需的。介导ADCC的主要细胞NK细胞仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI,Fc γ RII和Fc γ RIII。在造血细胞上的FcR表达总结在Ravetch and Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-92(1991)第464页的表3中。为了评估感兴趣分子的ADCC活性,可以进行体外ADCC测定,例如美国专利号5,500,362或5,821,337中描述的测定。用于这样的测定的有效效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。替代地或另外地,可以在体内评估感兴趣分子的ADCC活性,例如,在Clynes et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:652-656(1998)公开的动物模型中。

[0160] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”是指在补体存在下裂解靶细胞。经典补体途径的激活通过补体系统的第一组分(C1q)结合与其同源抗原结合的抗体(合适的亚类)而启动。为了评估补体激活,可以进行CDC测定,例如,如Gazzano-Santoro et al.,J.Immunol.Methods 202:163(1996)中所述。

[0161] 在以下小节中更详细地描述了本发明的各个方面。

[0162] 具有恒定区突变的双特异性抗体

[0163] 恒定区

[0164] 双特异性抗体含有第一抗体的轻链和重链(LC'和HC')以及第二抗体的轻链和重链(LC''和HC'')。这四个链的组合导致错配的可能性。图1说明了这九个错配和一个期望的配对。期望的配对形成LC'和HC'以及和LC''和HC''之间的异二聚体。为了产生基本上同质的异二聚体抗体群,抗体结构域必须具有相对于同型二聚体形成异二聚体的强烈偏好。设计人IgG恒定区中的突变以引起单个宿主细胞中重链和轻链的优先配对,以控制重链和轻链组装的异二聚化。分析了各种氨基酸突变对链间原子间网络的影响,并且鉴定了由于导致个体节点和/或边缘的损失或获得的原子间接触的损失或获得所导致的原子间网络变化。与野生型相比保留或增加原子间接触的氨基酸置换被鉴定为形成有利的网络,而导致失去原子间接触的氨基酸突变被鉴定为形成不利的网络。

[0165] 因此,本发明涉及在人IgG恒定结构域(CH1,CL和/或CH3区)的任何一个或多个中具有一个或多个氨基酸置换的重链和轻链,这些置换促进形成有利的网络,从而导致HC'和LC'与(i)HC'和LC''和(ii)HC''和LC'相比优先配对;以及HC''和LC''与(i)HC''和LC'和(ii)HC'和LC''相比优先配对。在某些实施方式中,HC'中的氨基酸置换导致与LC'的有利相互作用

用,但与LC”的不利相互作用”。在某些实施方式中,LC’中的氨基酸置换导致与HC’的有利相互作用,但与HC”的不利相互作用。在某些实施方式中,HC”中的氨基酸置换导致与LC”的有利相互作用”,但与LC’的不利相互作用。在某些实施方式中,LC”中的氨基酸置换导致与HC”的有利相互作用,但与HC’的不利相互作用。

[0166] 如本文所述的具有CH1/CL界面和CH3恒定区突变的双特异性抗体包含来自第一抗体的第一重链和第一轻链和来自第二抗体的第二重链和第二轻链。第一重链包含IgG重链恒定结构域,表示为CH1’,CH2’和CH3’,而第二重链包含IgG重链恒定结构域,表示为CH1”,CH2”和CH3”。在某些实施方式中,CH1’和CH1”是人IgG1CH1 (SEQ ID NO:3)。在某些实施方式中,CH3’和CH3”是IgG1CH3 (SEQ ID NO:4)。双特异性抗体还包含第一轻链和第二轻链,第一轻链包含表示为CL’的Igκ恒定结构域,第二轻链包含表示为CL”的Igκ恒定结构域。在某些实施方式中,CL’和CL”是人IgκCL (SEQ ID NO:5)。当本文所述的重链和轻链在细胞中共表达时,它们优先配对在一起形成异二聚体。具体而言,CH1/CL界面和CH3区域的突变有利于CH1’和CL’;CH1”和CL”;和CH3’和CH3”之间配对。在某些实施方式中,本文所述的突变不利于在CH1’和CL”;CH1’和CH1”;CH1”和CL’;以及CL’和CL”之间形成二聚体。除非另有说明,否则残基的编号基于Kabat编号惯例。参见,例如,Sequences of Proteins of Immunological Interest (Table of Contents, Introduction and Constant Region Sequences sections),第5版,Bethesda,MD:NIH vol.1:647-723 (1991);Kabat et al.,“Introduction”Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Dept of Health and Human Services,NIH,第5版,Bethesda,MD vol.1:xiii-xcvi (1991)。

[0167] CH1/CL界面置换

[0168] 作为本文所述的基于结构的方法的结果,鉴定了与CH1/CL野生型界面相比有利于原子间接触的人IgG1的CH1/CL界面内的某些氨基酸。这样的接触形成有利的网络并导致异二聚体的优先形成,并且引入如本文所述的Fab和双特异性抗体。CH1中的这些残基包括但不限于L133,A134,P135,K138,A146,L147,L150,K152,H173,F175,P176,L179,S188,V190,K218,K223和C225。在某些实施方式中,有利于CH1异二聚体形成的残基是L133,L150,K152,H173和/或S188。本文所述的Fab和双特异性抗体在这些氨基酸残基的任何一个或组合处具有一个或多个置换。在某些实施方式中,Fab或双特异性抗体包括下列残基中的任一个或组合处的氨基酸置换:L133,L150,K152,H173和S188。在某些实施方式中,Fab或双特异性抗体包括CH1结构域中的一个或多个以下置换:L133V,L150A,L150D,K152D,H173D和S188W。

[0169] 在某些实施方式中,Fab或双特异性抗体具有CH1’,CH1”,CL’和CL”区域,其中CH1’结构域包含残基L133和L150处的氨基酸置换。在某些实施方式中,氨基酸置换是L133V和L150A。在某些实施方式中,CH1’结构域具有SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,CH1’结构域是野生型。在某些实施方式中,CH1’结构域具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,Fab或双特异性抗体具有CH1”结构域,其包含残基K152,H173和S188处的氨基酸置换。在某些实施方式中,氨基酸置换是K152D,H173D和S188W。在某些实施方式中,CH1”结构域具有SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,CH1”结构域包含残基K152和H173处的氨基酸置换。在某些实施方式中,置换是K152D和H173D。在某些实施方式中,CH1”结构域具有SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,Fab或双特异性抗体在CH1’结构域中具有L133V和L150A置换,并且在CH1”结构域中具有K152D,

H173D和S188W置换。在某些实施方式中,Fab或双特异性抗体具有SEQ ID NO:6所示的CH1'结构域和SEQ ID NO:7所示的CH1"结构域。在某些实施方式中,Fab或双特异性抗体在CH1'结构域中没有置换(野生型)和在CH1"结构域中具有K152D和H173D置换。在某些实施方式中,Fab或双特异性抗体具有SEQ ID NO:3所示的CH1'结构域和SEQ ID NO:8所示的CH1"结构域。

[0170] 同样地,当与上述CH1突变组合时,双特异性抗体的CL结构域内的某些氨基酸被鉴定为有利于异二聚体的形成,并且被引入本文所述的Fab和双特异性抗体中。IgκCL中的这些残基包括但不限于F115,F117,D121,E122,Q123,V132,L134,N136,N137,Q159,S161,V162,D166,S173,L174,T177,F208,E212,和C213。在某些实施方式中,Fab或双特异性抗体包括选自Q123,N136,T177和V132或其组合的残基中的突变。在某些实施方式中,这些残基中的任一个处或多个被适合使用的另一种氨基酸置换。在某些实施方式中,Fab或双特异性抗体在CL结构域中包括一个或多个以下置换:Q123D,Q123K,V132W,N136D,N136K和T177A。在某些实施方式中,Fab或双特异性抗体具有CL'和CL"结构域,其中CL'结构域包含残基Q123和N136处的氨基酸置换。在某些实施方式中,置换是Q123D和N136D。在某些实施方式中,CL'结构域具有SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,Fab或双特异性抗体包括CL'结构域,其包含残基Q123,V132和N136处的氨基酸置换。在某些实施方式中,置换是Q123D,V132W和N136D。在某些实施方式中,CL'结构域具有SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,Fab或双特异性抗体具有CL'和CL"结构域,其中CL"结构域包含残基Q123,N136和T177处的氨基酸置换。在某些实施方式中,置换是Q123K,N136K和T177A。在某些实施方式中,CL"结构域具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,Fab或双特异性抗体包括CL"结构域,其包含残基Q123和N136处的氨基酸置换。在某些实施方式中,置换是Q123K和N136K。在某些实施方式中,CL"结构域具有SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,Fab或双特异性抗体包括CH1',CH1",CL'和CL"结构域,其中CL'结构域具有Q123D和N136D置换,并且CL"结构域具有Q123K,N136K和T177A置换。在某些实施方式中,Fab或双特异性抗体包括SEQ ID NO:9中所示的CL'和如SEQ ID NO:11中所示的CL"。在某些实施方式中,Fab或双特异性抗体包括具有Q123D和N136D置换的CL'结构域,和具有Q123K和N136K置换的CL"结构域。在某些实施方式中,Fab或双特异性抗体具有SEQ ID NO:9中所示的CL',和如SEQ ID NO:12中所示的CL"结构域。在某些实施方式中,Fab或双特异性抗体包括具有Q123D,V132W和N136D置换的CL'结构域,和具有Q123K,N136K和T177A置换的CL"结构域。在某些实施方式中,Fab或双特异性抗体包括如SEQ ID NO:10中所示的CL'结构域,和如SEQ ID NO:11中所示的CL"结构域。

[0171] 在某些实施方式中,Fab或双特异性抗体具有CH1',CH1",CL'和CL"区,其中CH1'结构域具有置换L133V和L150A,CL1'结构域具有置换Q123D和N136D,CH1"结构域具有置换K152D,H173D和S188W,并且CL"结构域具有置换Q123K,N136K和T177A。在某些实施方式中,Fab或双特异性抗体具有CH1',CH1",CL'和CL"区,其中CH1'结构域没有置换,CL1'结构域具有置换Q123D和N136D,CH1"结构域具有置换K152D和H173D,以及CL"结构域具有置换Q123K和N136K。在某些实施方式中,Fab或双特异性抗体具有CH1',CH1",CL'和CL"区,其中CH1'结构域具有置换L133V和L150A,CL1'结构域具有置换Q123D,V132W和N136D,CH1"结构域具有置换K152D,H173D和S188W,并且CL"结构域具有置换Q123K,N136K和T177A。

[0172] CH3替代

[0173] 本发明的其他方面涉及新鉴定的CH3突变,其有利于双特异性抗体中Fc结构域的异二聚化。如本文所述,CH3结构域内的某些氨基酸被识别为促进异二聚体的形成。人IgG1中的这些CH3残基包括但不限于L351,P352,P353,D356,E357,L365,T366,K370,K392,P395,V397,D399,F405,Y407,K409和K439。在某些实施方式中,对CH3异二聚体形成重要的残基是E357,K370或K409,或其组合。在某些实施方式中,这些残基中的任一个或多个在异二聚体多肽或双特异性抗体中被任何其他适合使用的氨基酸替代。在某些实施方式中,异二聚体多肽或双特异性抗体在CH3结构域中包括一个或多个以下置换:E357K,K370E和K409R。在某些实施方式中,异二聚体多肽或双特异性抗体包括残基K370处具有氨基酸置换的CH3' 结构域。在某些实施方式中,置换是K370E。在某些实施方式中,异二聚体多肽或双特异性抗体包括具有SEQ ID NO:13所示氨基酸序列的CH3' 结构域。在某些实施方式中,异二聚体多肽或双特异性抗体包括残基E357和K409处具有氨基酸置换的CH3' 结构域。在某些实施方式中,置换是E357K和K409R。在某些实施方式中,异二聚体多肽或双特异性抗体包括具有SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的CH3' 结构域。在某些实施方式中,异二聚体多肽或双特异性抗体包括残基K370处具有氨基酸置换的CH3" 结构域。在某些实施方式中,置换是K370E。在某些实施方式中,异二聚体多肽或双特异性抗体包括具有SEQ ID NO:13所示氨基酸序列的CH3" 结构域。在某些实施方式中,异二聚体多肽或双特异性抗体包括残基E357和K409处具有氨基酸置换的CH3" 结构域。在某些实施方式中,置换是E357K和K409R。在某些实施方式中,异二聚体多肽或双特异性抗体包括具有SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的CH3" 结构域。在某些实施方式中,异二聚体多肽或双特异性抗体包括具有K370E置换的CH3' 结构域,和具有E357K和K409R置换的CH3"。在某些实施方式中,异二聚体多肽或双特异性抗体具有SEQ ID NO:13所示的CH3' 结构域和SEQ ID NO:14所示的CH3" 结构域。在某些实施方式中,异二聚体多肽或双特异性抗体包括具有E357K和K409R置换的CH3', 和具有K370E置换的CH3" 结构域。在某些实施方式中,异二聚体多肽或双特异性抗体具有SEQ ID NO:14所示的CH3' 结构域和SEQ ID NO:13所示的CH3" 结构域。

[0174] 以前,CH3结构域中的异二聚体通过使用纽-扣技术优先形成。使用纽-扣作为产生双特异性抗体的方法是本领域熟知的。参见,1998年3月24日授予和转让给Genentech的美国专利号5,731,168,2009年7月16日公布和转让给Amgen的PCT公布号W02009089004,于,2009年7月16日公布和转让给Novo Nordisk A/S的美国专利号20090182127。还参见,Marvin和Zhu,ActaPharmacologica Sincia (2005) 26 (6) :649-658和Kontermann (2005) Acta Pharacol.Sin.,26:1-9。在一些实施方式中,具有本文所述CH1/CL突变的Fab可以与具有纽-扣突变的CH3结构域组合。例如,Fab可以与具有纽突变T366W和扣突变T366S,L368A,和Y407V的恒定区组合。

[0175] 在某些实施方式中,与具有野生型恒定区的双特异性抗体或具有纽-扣CH3突变的双特异性抗体相比,本文所述的双特异性抗体的Fc具有减少头尾(head-to-tail)形成或增加总产量的突变。在某些实施方式中,双特异性抗体包含至少一条重链上的选自S239,V240,F241,F243,V264,R301,K334,Y349,T350,L368,K370,N389,Y391,K392,P395,P396,D399,F405,Y407的残基处的至少一个,两个,三个,四个,五个,六个,七个,八个,九个或十个采用不同于野生型Fc多肽中存在的氨基酸的氨基酸的置换。改变效应子功能可以是期望

的,并且预期一些突变可增强或降低效应子功能。优选突变不显著改变抗体的其他功能特征,例如效应子功能。

[0176] CH1/CL和CH3恒定区突变的组合

[0177] 恒定区的适当异二聚化对于产生所需双特异性抗体的同源群是重要的。在某些实施方式中,本发明的双特异性抗体包括CL' 结构域中的Q123D和N136D置换;CH1' 结构域中的L133V和L150A置换;CH3' 结构域中的K370E置换;CL'' 结构域中的Q123K,N136K和T177A置换;CH1'' 结构域中的K152D,H173D和S188W置换;和CH3'' 结构域中的E357K和K409R置换。在某些实施方式中,双特异性抗体包括如SEQ ID NO:9所示的CL' 结构域,如SEQ ID NO:6所示的CH1' 结构域,如SEQ ID NO:13所示的CH3' 结构域,如SEQ ID NO:11所示的CL'' 结构域,如SEQ ID NO:7所示的CH1'' 结构域,和如SEQ ID NO:14所示的CH3'' 结构域。

[0178] 在某些实施方式中,双特异性抗体包括CL' 结构域中的Q123D和N136D置换;CH1' 结构域中的L133V和L150A置换;CH3' 结构域中的E357K和K409R置换;CL'' 结构域中的Q123K,N136K和T177A置换;CH1'' 结构域中的K152D,H173D和S188W置换;和CH3'' 结构域中的K370E置换。在某些实施方式中,双特异性抗体具有如SEQ ID NO:9所示的CL' 结构域,如SEQ ID NO:6所示的CH1' 结构域,如SEQ ID NO:14所示的CH3' 结构域,如SEQ ID NO:11所示的CL'' 结构域,如SEQ ID NO:7所示的CH1'' 结构域,和如SEQ ID NO:13所示的CH3'' 结构域。

[0179] 在某些实施方式中,双特异性抗体包括CL' 结构域中的Q123D和N136D置换;CH1' 结构域中没有置换;CH3' 结构域中的K370E置换;CL'' 结构域中的Q123K和N136K置换;CH1'' 结构域中的K152D和H173D置换;和CH3'' 结构域中的E357K和K409R置换。在某些实施方式中,双特异性抗体包括如SEQ ID NO:9所示的CL' 结构域,如SEQ ID NO:3所示的CH1' 结构域,如SEQ ID NO:13所示的CH3' 结构域,SEQ ID NO:12中所示的CL'' 结构域,SEQ ID NO:8中所示的CH1'' 结构域和SEQ ID NO:14中所示的CH3'' 结构域。

[0180] 在某些实施方式中,双特异性抗体包括CL' 结构域中的Q123D和N136D置换;CH1' 域中没有置换;CH3' 结构域中的E357K和K409R置换;CL'' 结构域中的Q123K和N136K置换;CH1'' 结构域中的K152D和H173D置换;和CH3'' 结构域中的K370E置换。在某些实施方式中,双特异性抗体包括如SEQ ID NO:9所示的CL' 结构域,如SEQ ID NO:3所示的CH1' 结构域,如SEQ ID NO:14所示的CH3' 结构域,如SEQ ID NO:12所示的CL'' 结构域,如SEQ ID NO:8所示的CH1'' 结构域,和如SEQ ID NO:13所示的CH3'' 结构域。

[0181] 在某些实施方式中,双特异性抗体包括CL' 结构域中的Q123D,V132W和N136D置换;CH1' 结构域中的L133V和L150A置换;CH3' 结构域中的K370E置换;CL'' 结构域中的Q123K,N136K和T177A置换;CH1'' 结构域中的K152D,H173D和S188W置换;和CH3'' 结构域中的E357K和K409R置换。在某些实施方式中,双特异性抗体包括如SEQ ID NO:10所示的CL' 结构域,如SEQ ID NO:6所示的CH1' 结构域,如SEQ ID NO:13所示的CH3' 结构域,如SEQ ID NO:11所示的CL'' 结构域,如SEQ ID NO:7所示的CH1'' 结构域,和如SEQ ID NO:14所示的CH3'' 结构域。

[0182] 在某些实施方式中,双特异性抗体包括CL' 结构域中的Q123D,V132W和N136D置换;CH1' 结构域中的L133V和L150A置换;CH3' 结构域中的E357K和K409R置换;CL'' 结构域中的Q123K,N136K和T177A置换;CH1'' 结构域中的K152D,H173D和S188W置换;和CH3'' 结构域中的K370E置换。在某些实施方式中,双特异性抗体包括如SEQ ID NO:10所示的CL' 结构域,如SEQ ID NO:6所示的CH1' 结构域,如SEQ ID NO:14所示的CH3' 结构域,如SEQ ID NO:11所示

的CL”结构域,如SEQ ID NO:7所示的CH1”结构域,和如SEQ ID NO:13所示的CH3”结构域。

[0183] 在某些实施方式中,如本文所述的双特异性抗体包括在以下位置中的任一个或组合处的重链恒定结构域(HC’,HC”或HC’和HC”两者)内的置换:L133,L150,K152,H173,S188,E357,K370和K409。在某些实施方式中,如本文所述的双特异性抗体包含在重链恒定结构域中的以下置换的任一个或组合:L133V,L150A,K152D,H173D,S188S,E357K,K370E和K409R。在某些实施方式中,如本文所述的双特异性抗体包括在以下位置中的任一个或组合处的轻链恒定域(LC’,LC”或LC’和LC”两者)内的置换:Q123,N136和T177。在某些实施方式中,如本文所述的双特异性抗体包含轻链恒定结构域中的以下置换的任一个或组合:Q123K,Q123D,N136D,N136K和T177A。

[0184] 可变区

[0185] 在某些实施方式中,第一和第二抗体的可变区保持不变。在某些实施方式中,修饰可变区以产生结构相关的双特异性抗体,其保持结合(即,至与未修饰的双特异性抗体相同的表位)。因此,在某些实施方式中,本文所述的工程化抗体的CDR1,2和/或3区可包含与母体单特异性抗体的精确氨基酸序列一样的确切氨基酸序列。然而,在其他实施方式中,双特异性抗体包含来自本文公开的抗体的确切CDR序列的衍生物,并且仍然保留结合期望表位的能力。这样的序列修饰可包括一个或多个氨基酸添加,缺失或置换,例如,如上所述的保守序列修饰。

[0186] 因此,在一个实施方式中,双特异性抗体可以由一个或多个CDR组成,所述CDR例如与本文公开的抗体的一个或多个CDR具有90%,95%,98%或99.5%的同一性。上述值中间的范围,例如,与一种或多种上述序列具有90-95%,95-98%或98-100%同一性的CDR也包括在本发明的范围内。

[0187] 在另一个实施方式中,可以改变CDR的一个或多个残基以改变结合以实现更有利的结合的开启速率,更有利的结合的离去速率,或两者,使得实现理想化的结合常数。使用该策略,可以实现具有例如 10^{10}M^{-1} 或更高的超高结合亲和力的抗体。本领域熟知的亲和成熟技术和本文所述的那些可用于改变CDR区,然后筛选所得结合分子以的结合的期望变化。因此,随着CDR的改变,可以监测结合亲和力以及免疫原性的变化并对其进行评分,使得实现就最佳组合的结合和低免疫原性而优化的抗体。

[0188] 因此,对于VH和/或VL CDR1,CDR2和/或CDR3区内的可变区修饰,可以进行定点诱变或PCR介导的诱变以引入突变,并且对抗体结合或感兴趣的其他功能特性的影响可以在体外或体内测定中评估。优选引入保守修饰(如本文所讨论的)。突变可以是氨基酸置换,添加或缺失,但优选是置换。此外,通常CDR区内不超过一个,两个,三个,四个或五个残基被改变。

[0189] 额外抗体修饰

[0190] 本发明的抗体可在轻链或重链可变区中含有一个或多个糖基化位点。由于抗原结合的改变,这种糖基化位点可导致抗体免疫原性增加或抗体pK改变(Marshall等(1972) Annu Rev Biochem 41:673-702;Gala和Morrison(2004) J Immunol 172:5489-94;Wallick等(1988) J Exp Med 168:1099-109;Spiro(2002) Glyco-biology 12:43R-56R;Parekh等(1985) Nature 316:452-7;Mimura等(2000) Mol Immunol 37:697-706)。已知糖基化发生在含有N-X-S/T序列的基序处。在某些情况下,优选具有不含可变区糖基化的双特异性抗体。

这可以通过选择不含可变区中的糖基化基序的抗体或通过突变糖基化区域内的残基来实现。

[0191] 例如,在某些实施方式中,改变抗体的糖基化,例如,改变可变区以消除留在可变区中的一个或多个糖基化位点。更具体地,期望的是在本发明抗体的序列中消除易于糖基化的位点。这是通过改变在母体可变区中出现的一个或多个N-X-(S/T)序列(其中X是任何氨基酸残基)的出现来实现的,特别是通过置换N残基和/或S或T残基。在一个实施方式中,T95突变为K95。在另一个实施方式中,N47突变为R47。

[0192] 例如,可以制备去糖基化抗体(即,其缺乏糖基化)。可以改变糖基化以例如增加抗体对抗原的亲合力。这种碳水化合物修饰可以通过例如改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来实现。例如,可以进行一个或多个氨基酸置换,其导致消除一个或多个可变区框架糖基化位点,从而消除位点处的糖基化。这种糖基化可以增加抗体对抗原的亲合力。参见,例如,美国专利号5,714,350和6,350,861。

[0193] 另外地或替代地,抗体可具有改变类型的糖基化,例如具有减少量的岩藻糖残基的低岩藻糖基化抗体或具有增加的二等分GlcNAc结构的抗体。已经证明这种改变的糖基化模式增加了抗体的ADCC能力。这种碳水化合物修饰可以通过例如在具有改变的糖基化机制的宿主细胞中表达抗体来完成。具有改变的糖基化机制的细胞已在本领域中描述,并且可用作宿主细胞,其中表达本发明的重组抗体,从而产生具有改变的糖基化的抗体。例如,细胞系Ms704,Ms705和Ms709缺乏岩藻糖基转移酶基因FUT8($\alpha(1,6)$ -岩藻糖基转移酶),使得在Ms704,Ms705和Ms709细胞系中表达的抗体在其碳水化合物上缺乏岩藻糖。通过使用两个替换载体靶向破坏CHO/DG44细胞中的FUT8基因来产生Ms704,Ms705和Ms709FUT8^{-/-}细胞系(参见美国专利公开号20040110704和Yamane-Ohnuki等(2004) *Biotechnol Bioeng* 87: 614-22)。作为另一个例子,EP1,176,195描述了具有功能性破坏的FUT8基因(其编码岩藻糖基转移酶)的细胞系,使得通过减少或消除 $\alpha-1,6$ 键相关酶而使在这种细胞系中表达的抗体表现出低糖基化。EP1,176,195还描述了细胞系,其具有用于向与抗体的Fc区结合的N-乙酰葡萄糖胺增加岩藻糖的低酶活性,或不具有酶活性,例如大鼠骨髓瘤细胞系YB2/0(ATCC CRL1662)。PCT公布W003/035835描述了变体CHO细胞系Lec13细胞,其具有降低的使岩藻糖与Asn(297)连接的碳水化合物附着的能力,还导致在该宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖基化(参见Shields et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740)。如PCT公开W006/089231中所述,也可以在鸡蛋中产生具有修饰的糖基化谱的抗体。或者,可以在植物细胞中产生具有修饰的糖基化谱的抗体。PCT公开W099/54342描述了经工程改造以表达糖蛋白修饰糖基转移酶(例如, $\beta(1,4)$ -N-乙酰葡萄糖胺基转移酶III(GnTIII))的细胞系,使得在工程化细胞系中表达的抗体表现出增加的二等分GlcNAc结构,其导致抗体的ADCC活性增加(还参见Umana et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180)。或者,可以使用岩藻糖苷酶切除抗体的岩藻糖残基;例如,岩藻糖苷酶 α -L-岩藻糖苷酶从抗体中去除岩藻糖残基(Tarentino等(1975) *Biochem.* 14:5516-23)。

[0194] 如上所述产生的抗体的可变区段(例如,人,嵌合或人源化抗体的重链和轻链可变区)通常与免疫球蛋白恒定区(Fc区)的至少一部分连接,通常是人免疫球蛋白。人恒定区DNA序列可以根据众所周知的方法从多种人细胞中分离,但优选永生B细胞(参见Kabat等,同上,和Liu等,W087/02671)(其各自出于所有目的通过引用全文并入)。通常,抗体将包

含轻链和重链恒定区。重链恒定区通常包括CH1, 铰链, CH2, CH3和CH4区。本文描述的抗体包括具有所有类型的恒定区的抗体, 包括IgM, IgG, IgD, IgA和IgE, 以及任何同种型, 包括IgG1, IgG2, IgG3和IgG4。当期望抗体(例如, 人源化抗体)表现出细胞毒活性时, 恒定结构域通常是补体固定恒定结构域, 并且该类通常是IgG1。人同种型IgG1是优选的。轻链恒定区可以是 λ 或 κ 。人源化抗体可包含来自一种以上类别或同种型的序列。抗体可以表达为含有两条轻链和两条重链的四聚体, 作为单独的重链, 轻链, 如Fab, Fab', F(ab')₂和Fv, 或作为单链抗体, 其中重链和轻链可变结构域通过间隔物连接。

[0195] 在某些实施方式中, 抗体包含可变区, 其被突变以改善抗体的物理稳定性。在一个实施方式中, 抗体是IgG4同种型抗体, 其在对应于重链恒定区的铰链区中的位置228 (S228P; EU索引) 的位置处包含丝氨酸至脯氨酸突变。据报道, 该突变消除了铰链区中重链间二硫键的异质性 (Angal等, 同上; 第241位基于Kabat编号系统)。例如, 在某些实施方式中, 如本文所述的双特异性抗体可包含与人IgG4恒定区连接的任何抗体的重链可变区, 其中位于对应于同上如Angal等所述位置241的位置的丝氨酸已经变异为脯氨酸。因此, 对于与人IgG4恒定区连接的重链可变区, 该突变对应于EU索引的S228P突变。

[0196] 在某些实施方式中, CH1的铰链区被修饰, 使得铰链区中半胱氨酸残基的数量改变, 例如, 增加或减少。该方法在美国专利No. 5,677,425中进一步描述。改变CH1铰链区中半胱氨酸残基的数目, 以例如促进轻链和重链的装配或增加或降低抗体的稳定性。

[0197] 另外, 可以将抗体聚乙二醇化, 例如, 以增加抗体的生物学(例如, 血清)半衰期。为了使抗体聚乙二醇化, 抗体或其片段通常在其中一个或多个PEG基团变得与抗体或抗体片段连接的条件与聚乙二醇(PEG)反应, 例如PEG的反应性酯或醛衍生物。优选地, 聚乙二醇化通过酰化反应或烷基化反应与反应性PEG分子(或类似的反应性水溶性聚合物)进行。如本文所用, 术语“聚乙二醇”旨在涵盖已经用于衍生其他蛋白质的任何形式的PEG, 例如单(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-马来酰亚胺。在某些实施方式中, 待聚乙二醇化的抗体是无糖基化的抗体。聚乙二醇化蛋白质的方法是本领域已知的, 并且可以应用于本发明的抗体。参见, 例如, EP0154316和EP0401384。

[0198] 生产双特异性抗体

[0199] 为了重组产生本文所述的双特异性抗体, 分离编码它的核酸并将其插入可复制的载体中以进一步克隆(扩增DNA)或用于表达。编码抗体的DNA或mRNA易于使用常规方法分离和测序(例如, 通过使用能够与编码抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。许多载体可用于表达DNA或mRNA。载体的选择部分取决于要使用的宿主细胞。通常, 优选的宿主细胞是原核的或真核来源(通常是哺乳动物, 但也包括真菌(例如酵母), 昆虫, 植物和来自其他多细胞生物的有核细胞)。

[0200] 原核宿主细胞

[0201] 编码本文所述双特异性抗体组分的核苷酸序列可使用标准重组技术获得。从例如产生抗体的细胞如杂交瘤细胞中分离和测序期望的核苷酸序列。或者, 可以使用核苷酸合成仪或PCR技术合成核苷酸。一旦获得, 将编码双特异性抗体的序列插入能够在原核宿主中复制和表达异源抗体的重组载体中。本领域可获得和已知的许多载体可用于本发明的目的。合适载体的选择将主要取决于待插入载体的核酸的大小以及待用载体转化的特定宿主细胞。每种载体含有各种组分, 这取决于其功能(异源抗体的扩增或表达, 或两者)及其与其

所在的特定宿主细胞的相容性。载体组分通常包括但不限于：复制起点，选择标记基因，启动子，核糖体结合位点 (RBS)，信号序列，异源核酸插入物和转录终止序列。

[0202] 通常，含有复制子和控制序列的质粒载体与这些宿主一起使用，所述复制子和控制序列衍生自与宿主细胞相容的物种。载体通常携带复制位点，以及标记能够在转化细胞中提供表型选择的序列。例如，通常使用pBR322转化大肠杆菌，pBR322是源自大肠杆菌物种的质粒。pBR322含有编码氨苄青霉素 (Amp) 和四环素 (Tet) 抗性的基因，因此提供了鉴定转化细胞的简便方法。pBR322，其衍生物或其他微生物质粒或噬菌体也可含有或经修饰以含有可被微生物用于表达内源蛋白质的启动子。用于表达特定抗体的pBR322衍生生物的实例在Carter等，美国专利号5,648,237中详细描述。

[0203] 另外，含有与宿主微生物相容的复制子和控制序列的噬菌体载体可用作与这些宿主相关的转化载体。例如，噬菌体例如 λ γ EMM-11可用于制备重组载体，其可用于转化易感宿主细胞，例如大肠杆菌LE392。

[0204] 本发明的表达载体可包含两个或更多个启动子-顺反子对，编码每种多肽组分。启动子是位于顺反子上游 (5') 的非翻译调节序列，其调节其表达。原核启动子通常分为两类，诱导型和组成型。诱导型启动子是响应于培养条件的变化，例如营养物的存在或不存在或温度的变化，启动在其控制下的顺反子的转录水平增加的启动子。

[0205] 由各种潜在宿主细胞识别的大量启动子是众所周知的。通过限制酶消化从源DNA中除去启动子并将分离的启动子序列插入本发明的载体中，所选择的启动子可以与编码例如轻链或重链的顺反子DNA可操作地连接。天然启动子序列和许多异源启动子都可以用于指导靶基因的扩增和/或表达。在一些实施方式中，使用异源启动子，因为与天然靶多肽启动子相比，它们通常允许表达的靶基因具有更高的转录和更高的产率。

[0206] 适用于原核宿主的启动子包括PhoA启动子， β -半乳糖酶和乳糖启动子系统，色氨酸 (trp) 启动子系统和杂合启动子如tac或trc启动子。然而，在细菌中起作用的其他启动子 (例如其他已知的细菌或噬菌体启动子) 也是合适的。它们的核苷酸序列已经公开，从而使技术人员能够将它们可操作地连接到编码多聚体蛋白基因的顺反子上，例如靶轻链和重链 (Siebenlist等 (1980) Cell 20:269)，使用接头或适体提供任何所需的限制位点。

[0207] 在某些实施方式中，重组载体内的每个顺反子包含分泌信号序列组分，其指导表达的多肽的跨膜转运。通常，信号序列可以是载体的组分，或者它可以是插入到载体中的靶多肽DNA的一部分。为本发明目的选择的信号序列应该是由宿主细胞识别和加工 (即被信号肽酶切割) 的信号序列。对于不识别和处理与异源多肽有关的信号序列的原核宿主细胞，信号序列被选自例如碱性磷酸酶，青霉素酶，Ipp或热稳定肠毒素II (STII) 前导体，LamB，PhoE，PelB，OmpA和MBP的原核信号序列取代。在本发明的一个实施方式中，在表达系统的两个顺反子中使用的信号序列是STII信号序列或其变体。

[0208] 在某些实施方式中，本文描述的免疫球蛋白的产生可以发生在宿主细胞的细胞质中，因此不需要在每个顺反子内存在分泌信号序列。在这方面，免疫球蛋白轻链和重链被表达，折叠和组装以在细胞质内形成功能性免疫球蛋白。某些宿主菌株 (例如，大肠杆菌trxB'菌株) 提供有利于二硫键形成的细胞质条件，从而允许表达的蛋白质亚基的正确折叠和组装。参见Proba和Pluckthun, Gene, 159:203 (1995)。

[0209] 适用于表达本文所述双特异性抗体的原核宿主细胞包括古细菌和真细菌，例如革

兰氏阴性或革兰氏阳性生物。有用细菌的实例包括埃希氏菌(例如,大肠杆菌),杆菌(例如枯草芽孢杆菌),肠杆菌,假单胞菌物种(例如铜绿假单胞菌),鼠伤寒沙门氏菌,粘质沙雷氏菌,克雷伯氏菌,变形杆菌,志贺氏菌,根瘤菌,透明颤菌,或副球菌。在一个实施方式中,使用革兰氏阴性细胞。在某些实施方式中,大肠杆菌细胞用作本发明的宿主。大肠杆菌菌株的实例包括菌株W3110(Bachmann,Cellular and Molecular Biology,Vol.2(Washington,D.C.:American Society for Microbiology,1987),第1190-1219页;ATCC保藏号为27,325)及其衍生物,包括具有基因型W31 10 AfhuA(AtonA)ptr3 lac Iq lacL8 AompTA(nmpc-fepE)degP41 kan^R的菌株33D3(美国专利号5,639,635)。其他菌株及其衍生物,例如大肠杆菌294(ATCC31446),大肠杆菌B,大肠杆菌x1776(ATCC31537)和大肠杆菌RV308(ATCC31608)也是合适的。在某些实施方式中,大肠杆菌Alpp具有特殊用途。这些示例是说明性的而非限制性的。构建具有确定基因型的任何上述细菌的衍生物的方法是本领域已知的,并描述于例如Bass等,Proteins,8:309-314(1990)中。考虑到复制子在细菌细胞中的可复制性,通常需要选择合适的细菌。例如,当众所周知的质粒如pBR322,pBR325,pACYC177或pKN410用于提供复制子时,大肠杆菌,沙雷氏菌或沙门氏菌物种可适合用作宿主。通常,宿主细胞应分泌最少量的蛋白水解酶,并且可以期望地将另外的蛋白酶抑制剂引入细胞培养物中。

[0210] 用上述表达载体转化宿主细胞,并在适当改变的常规营养培养基中培养,以诱导启动子,选择转化子或扩增编码期望序列的基因。

[0211] 转化意味着将DNA引入原核宿主中,使得DNA可以作为染色体外元件或通过染色体整合体复制。取决于所用的宿主细胞,使用适合于这样的细胞的标准技术进行转化。使用氯化钙的钙处理通常用于含有细胞壁屏障的细菌细胞。另一种转化方法使用聚乙二醇/DMSO。使用的另一种技术是电穿孔。

[0212] 用于产生本发明多肽的原核细胞在本领域已知并适合于所选宿主细胞的培养物的培养基中生长。合适的培养基的实例包括Luria肉汤(LB)和必需的营养补充剂。在某些实施方式中,培养基还含有选择剂,其基于表达载体的构建选择,以选择性地允许含有表达载体的原核细胞的生长。例如,将氨苄青霉素添加到培养基中以培养表达氨苄青霉素抗性基因的细胞。

[0213] 除了碳,氮和无机磷酸盐源之外的任何必需的补充物也可以以单独引入的适当浓度或作为与另外的补充物或介质(例如复合氮源)的混合物包含。任选地,培养基可含有一种或多种还原剂,所述还原剂选自谷胱甘肽,半胱氨酸,胱胺,巯基乙酸盐,二硫赤藓糖醇和二硫苏糖醇。

[0214] 原核宿主细胞在合适的温度下培养。例如,对于大肠杆菌生长,温度范围为约20℃至约39℃或约25℃至约37℃。在某些实施方式中,温度为约30℃。培养基的pH可以是约5至约9的任何pH,主要取决于宿主生物。对于大肠杆菌,pH优选为约6.8至约7.4,更优选约7.0。

[0215] 如果在表达载体中使用诱导型启动子,则在适于激活启动子的条件下诱导蛋白质表达。在某些实施方式中,PhoA启动子用于控制多肽的转录。因此,转化的宿主细胞在磷酸盐限制性培养基中培养用于诱导。优选地,磷酸盐限制性培养基是CRAP培养基(参见,例如,Simmons等,J.Immunol.Method(2002),263:133-147)。根据所用的载体构建体,可以使用多种其他诱导物,如本领域已知的。

[0216] 在某些实施方式中,分别培养第一和第二抗体宿主细胞,并将本发明的表达的多肽分别分泌到宿主细胞的周质中并从宿主细胞的周质中回收。在某些实施方式中,分别培养第一和第二抗体宿主细胞,并且在分离抗体之前,将宿主细胞培养物混合在一起并沉淀细胞。在某些实施方式中,分别培养第一和第二抗体宿主细胞,离心并分别重悬,然后在分离抗体之前混合在一起。在某些实施方式中,第一和第二含抗体的宿主细胞在同一培养容器中一起培养。蛋白质回收通常涉及破坏微生物细胞膜,通常通过诸如渗透作用,超声处理或裂解的方式。一旦细胞被破坏,可通过离心或过滤除去细胞碎片或全细胞。蛋白质可以进一步纯化,例如,通过亲和树脂色谱法。或者,蛋白质可以在培养基中转运并在其中分离。可以从培养物中除去细胞,过滤培养上清液并浓缩,以进一步纯化产生的蛋白质。表达的多肽可以使用通常已知的方法进一步分离和鉴定,例如聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和Western印迹分析。分离的多肽将用于产生异多聚体蛋白质

[0217] 在某些实施方式中,通过发酵过程大量进行双特异性抗体产生。各种大规模分批补料发酵程序可用于生产重组蛋白。大规模发酵具有至少1000升容量,优选约1,000至100,000升容量。这些发酵罐使用搅拌器叶轮来分配氧气和养分,尤其是葡萄糖(优选的碳/能源)。小规模发酵通常是指发酵罐中的发酵,其体积容量不超过约100升,并且可以在约1升至约100升的范围内。

[0218] 在发酵过程中,蛋白质表达的诱导通常在细胞已经在合适的条件下生长至期望密度(例如,OD₅₅₀为约180-220)之后开始,在该阶段细胞处于早期稳定期。根据所用的载体构建体,可以使用多种诱导物,如本领域已知的和如上所述。细胞可以生长更短的时间或诱导。细胞通常诱导约12-50小时,但可以使用更长或更短的诱导时间。

[0219] 为了提高本文所述的双特异性抗体的产量和质量,可以改变各种发酵条件。例如,为了改善分泌的双特异性抗体的正确组装和折叠,过表达分子伴侣蛋白如Dsb蛋白(DsbA, DsbB, DsbC, DsbD和/或DsbG)或FkpA(具有分子伴侣活性的肽基脯氨酰顺反异构酶)的另外载体可用于共转化宿主原核细胞。已经证明伴侣蛋白促进细菌宿主细胞中产生的异源蛋白质的正确折叠和溶解。Chen et al. (1999) J Bio Chem 274:19601-19605;Georgiou et al.,美国专利No.6,083,715;Georgiou et al.,美国专利No.6,027,888;Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105;Ramm and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113;Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210。

[0220] 为了使表达的双特异性抗体(特别是蛋白水解敏感的抗体)的蛋白水解最小化,某些缺乏蛋白水解酶的宿主种系可用于本发明。例如,可以修饰宿主细胞株以在编码已知细菌蛋白酶的基因中实现基因突变,例如蛋白酶III, OmpT, DegP, Tsp, 蛋白酶I, 蛋白酶Mi, 蛋白酶V, 蛋白酶VI及其组合。一些大肠杆菌蛋白酶缺陷型种系可获得并描述于例如Joly et al. (1998), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:2773-2777;Georgiou et al., U.S. Patent No. 5,264,365;Georgiou et al., U.S. Patent No. 5,508,192;Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996)。

[0221] 在某些实施方式中,缺乏蛋白水解酶并用过表达一种或多种伴侣蛋白的质粒转化的大肠杆菌菌株用作本发明表达系统中的宿主细胞。在第二个实施方式中,大肠杆菌菌株缺乏外膜的脂蛋白(Δ Ipp)。

[0222] 在某些实施方式中,进一步纯化本文产生的双特异性抗体以获得基本上同质的制

备物用于进一步测定和用途。可以使用本领域已知的标准蛋白质纯化方法。以下程序是合适的纯化程序的示例：免疫亲和或离子交换柱上的分馏，乙醇沉淀，反相HPLC，二氧化硅上的色谱法或阳离子交换树脂如DEAE，色谱聚焦，SDS-PAGE，硫酸铵沉淀，和使用例如Sephadex G-75的凝胶过滤。

[0223] 在某些实施方式中，固定在固相上的蛋白A用于例如本发明的全长抗体产物的免疫亲和纯化。蛋白A是来自金黄色葡萄球菌的41kD细胞壁蛋白，其以高亲和力结合抗体的Fc区。Lindmark等(1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13。固定有蛋白质A的固相优选为包含玻璃或二氧化硅表面的柱，更优选为受控孔径玻璃柱或硅酸柱。在一些应用中，柱已涂覆有试剂，例如甘油，以试图防止污染物的非特异性粘附。

[0224] 作为纯化的第一步，将源自如上所述的细胞培养物的制备物施加到蛋白A固定化固相上，以使感兴趣的抗体与蛋白A特异性结合。然后洗涤固相以除去与固相非特异性结合的污染物。通过洗脱从固相中回收双特异性抗体。

[0225] 真核宿主细胞

[0226] 载体组分通常包括但不限于以下一种或多种：信号序列，复制起点，一种或多种标记基因，增强子元件，启动子和转录终止序列。

[0227] 用于真核宿主细胞的载体还可含有在感兴趣的成熟蛋白质或多肽的N-末端处具有特异性切割位点的信号序列或其他多肽。选择的异源信号序列优选是被宿主细胞识别和加工(即被信号肽酶切割)的信号序列。在哺乳动物细胞表达中，可获得哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导序列，例如单纯疱疹gD信号。将这种前体区的DNA在阅读框中连接到编码期望异多聚体蛋白(例如抗体)的DNA。

[0228] 通常，哺乳动物表达载体不需要复制起点组分。例如，通常可以使用SV40起点，但仅仅是因为它含有早期启动子。

[0229] 表达和克隆载体可含有选择基因，也称为可选择标记物。典型的选择基因编码的蛋白质(a)赋予对抗生素或其他毒素的抗性，例如氨苄青霉素，新霉素，甲氨蝶呤或四环素，(b)补充营养缺陷(如果相关)，或(c)提供从复杂培养基无法获得的关键营养素。

[0230] 选择方案的一个实例利用药物来阻止宿主细胞的生长。用异源基因成功转化的细胞产生赋予抗药性的蛋白质，从而在选择方案中存活。这种显性选择的实例使用药物新霉素，霉酚酸和潮霉素。

[0231] 用于哺乳动物细胞的合适可选择标记的另一个例子是使得能够鉴定能够摄取抗体核酸的细胞的那些，例如DHFR，胸苷激酶，金属硫蛋白-1和-II，优选灵长类动物金属硫蛋白基因，腺苷脱氨酶，鸟氨酸脱羧酶等。

[0232] 例如，首先通过在含有甲氨蝶呤(Mtx)(DHFR的竞争性拮抗剂)的培养基中培养所有转化体来鉴定用DHFR选择基因转化的细胞。当采用野生型DHFR时，合适的宿主细胞是DHFR活性缺陷型中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系(例如，ATCC CRL-9096)。

[0233] 或者，用编码抗体，野生型DHFR蛋白和另一种可选择标记物如氨基糖苷3'-磷酸转移酶(APH)的DNA序列转化或共转化的宿主细胞(特别是含有内源DHFR的野生型宿主)可以通过在含有用于可选择标记物的选择剂(例如氨基糖苷类抗生素，例如卡那霉素，新霉素或G418)的培养基中细胞生长而选择。参见，例如，美国专利No.4,965,199。

[0234] 表达和克隆载体通常含有被宿主生物识别并与期望核酸可操作连接的启动子。对

于真核生物,启动子序列是已知的。事实上,所有真核基因都具有位于转录起始位点上游约25至30个碱基的富含AT的区域。在许多基因的转录开始的上游70至80个碱基处发现的另一个序列是CNCAAT区域,其中N可以是任何核苷酸。在大多数真核基因的3'末端是AATAAA序列,其可以是用于将聚A尾添加到编码序列的3'末端的信号。所有这些序列都适合插入真核表达载体中。

[0235] 哺乳动物宿主细胞中来自载体的期望多肽(例如,双特异性抗体)转录是如下控制,例如通过从病毒例如多瘤病毒,禽痘病毒,腺病毒(例如腺病毒2),牛乳头瘤病毒,禽肉瘤病毒,巨细胞病毒,逆转录病毒,乙型肝炎病毒和猿猴病毒40(SV40)的基因组,从异源哺乳动物启动子,例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子,或从热休克启动子获得的启动子,条件是这些启动子与宿主细胞系统相容。

[0236] SV40病毒的早期和晚期启动子可方便地作为SV40限制性片段获得,该片段还含有SV40病毒复制起点。人巨细胞病毒的即刻早期启动子可方便地作为Hind III限制片段获得。在美国专利No.4,419,446中公开了使用牛乳头瘤病毒作为载体在哺乳动物宿主中表达DNA的系统。在美国专利No.4,601,978中描述了该系统的改进。还参见Reyes等,Nature 297:598-601(1982),关于在来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子控制下的小鼠细胞中人 β -干扰素cDNA的表达。或者,鲁斯氏肉瘤病毒长末端重复序列可用作启动子。

[0237] 通过将增强子序列插入载体中,可以增加高等真核生物对编码期望抗体的DNA的转录。现已知来自哺乳动物基因的许多增强子序列(例如,珠蛋白,弹性蛋白酶,白蛋白, α -胎蛋白和胰岛素基因)。此外,可以使用来自真核细胞病毒的增强子。实例包括复制起点后侧的SV40增强子(bp100-270),巨细胞病毒早期启动子增强子,复制起点后侧的多瘤增强子,和腺病毒增强子。还参见Yaniv,Nature 297:17-18(1982),其中描述了用于增强真核启动子活化的元件。增强子可以在抗体多肽编码序列的5'或3'位置处剪接到载体中,条件是增强子,但通常位于启动子的5'位点。

[0238] 用于真核宿主细胞的表达载体通常还含有终止转录和使mRNA稳定化所必需的序列。这些序列通常可从真核或病毒DNA或cDNA的5'和偶尔3'非翻译区获得。这些区域含有在编码抗体的mRNA的非翻译部分中的转录为多腺苷酸化片段的核苷酸区段。一种有用的转录终止组分是牛生长激素多腺苷酸化区域。参见W094/11026和其中公开的表达载体。

[0239] 用于克隆或表达本文载体中的DNA的合适宿主细胞包括本文所述的高等真核细胞,包括脊椎动物宿主细胞。脊椎动物细胞在培养(组织培养)中的繁殖已成为常规程序。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例是由SV40转化的猴肾CV1系(COS-7,ATCC CRL 1651);人胚肾细胞系(亚克隆用于在悬浮培养中生长的293或293细胞,Graham等,J.Gen Virol.36:59(1977));小鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL10);中国仓鼠卵巢细胞/—DHFR(CHO,Urlaub等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));小鼠赛托利氏细胞(TM4,Mather,Biol.Reprod.23:243-251(1980));猴肾细胞(CV1ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76,ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA,ATCC CCL2);犬肾细胞(MDCK,ATCC CCL34);水牛大鼠肝细胞(BRL3A,ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138,ATCC CCL75);人肝细胞(HepG2,HB8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT060562,ATCC CCL51);TRI细胞(Mather等,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982));MRC5细胞;FS4细胞;和人肝癌细胞系(HepG2)。

[0240] 用上述表达或克隆载体转化宿主细胞以产生期望多肽(例如,双特异性抗体)并在

适当修饰的常规营养培养基中培养以诱导启动子,选择转化子或扩增编码期望序列的基因。

[0241] 用于产生期望多肽的宿主细胞(例如,双特异性抗体)可以在多种培养基中培养。商业上可获得的培养基如Ham's F10(Sigma),Minimal Essential Medium(MEM),(Sigma),RPMI-1640(Sigma)和Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM),Sigma)适合培养宿主细胞。此外,Ham等,Meth.Enz.58:44(1979),Barnes等,Anal.Biochem.102:255(1980),美国专利No.第4,767,704号;4,657,866;4,927,762;4,560,655;或5,122,469;W090/03430;W087/00195;或美国专利Re.30,985可用作宿主细胞的培养基。任何这些培养基都可以根据需要补充激素和/或其生长因子(如胰岛素,转铁蛋白或表皮生长因子),盐类(如氯化钠,钙,镁和磷酸盐),缓冲液(如HEPES),核苷酸(如腺苷和胸苷),抗生素(如GENTAMYCINTM药物),微量元素(定义为通常以微摩尔范围内的最终浓度存在的无机化合物),以及葡萄糖或等效能源。还可以以本领域技术人员已知的适当浓度包含任何其他必需补充剂。培养条件,例如温度,pH等,是先前与选择用于表达的宿主细胞一起使用的那些,并且对于普通技术人员是显而易见的。

[0242] 当使用重组技术时,双特异性抗体可以在细胞内产生,或直接分泌到培养基中。如果在细胞内产生双特异性抗体,作为第一步,例如通过离心或超滤除去宿主细胞或裂解片段的微粒碎片。当双特异性抗体分泌到培养基中时,通常首先使用市售的蛋白质浓缩滤器,例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元浓缩来自这样的表达系统的上清液。蛋白酶抑制剂如PMSF可以包括在任何前述步骤中以抑制蛋白水解,并且可以包括抗生素以防止偶然的共同成分的生长。

[0243] 由细胞制备的双特异性组合物可以使用例如羟磷灰石层析,凝胶电泳,透析和亲和层析来纯化。蛋白质A作为亲和配体的适合性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白Fc结构域的种类和同种型。蛋白A可用于纯化基于人 $\gamma 1$, $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链的抗体(Lindmark等,J.Immunol.Meth.62:1-13(1983))。对所有小鼠同种型和人 $\gamma 3$ 推荐蛋白G(Guss等,EMBO J.5:15671575(1986))。亲和配体所连接的基质通常是琼脂糖,但也可以使用其他基质。机械稳定的基质,如受控孔径玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯,允许与可用琼脂糖实现的相比更快的流速和更短的加工时间。当抗体包含CH3结构域时,Bakerbond ABXTM树脂(J.T.Baker,Phillipsburg,NJ)可用于纯化。用于蛋白质纯化的其他技术如离子交换柱上的分馏,乙醇沉淀,反相HPLC,二氧化硅上的色谱,阴离子或阳离子交换树脂(如聚天冬氨酸柱)上的肝素SEPHAROSETM色谱上的色谱,色谱聚焦,SDS-PAGE和硫酸铵沉淀取决于待回收的抗体也是可用的。

[0244] 在任何初步纯化步骤之后,可以使用pH在约2.5-4.5之间的洗脱缓冲液对包含感兴趣的抗体和污染物的混合物进行低pH疏水相互作用色谱,优选在低盐浓度下进行(例如,约0-0.25M盐)。双特异性抗体的产生可以替代地或另外地(对于任何前述特定方法)包括透析包含多肽混合物的溶液。

[0245] 使用例如lipofectin(可从GIBCO-BRL商购),通过将编码抗体或抗体片段的质粒和BaculoGoldTM病毒DNA(Pharmlngen)共转染到昆虫细胞如草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞(例如,Sf9细胞;ATCC CRL 1711)或黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)S2细胞中,可以产生重组杆状病毒。在一个特定的实例中,抗体序列融合在

杆状病毒表达载体中包含的表位标签的上游。这样的表位标签包括聚His标签。可以使用多种质粒,包括衍生自市售质粒例如pVL1393 (Novagen) 或pAcGP67B (PharMingen) 的质粒。简而言之,编码抗体或其片段的序列可以用与5' 和3' 区互补的引物通过PCR扩增。5' 引物可以包含侧翼(选择的)限制酶位点。然后可以用选择的限制酶消化产物并亚克隆到表达载体中。

[0246] 在用表达载体转染后,将宿主细胞(例如,Sf9细胞)在28℃温育4-5天,收获释放的病毒并用于进一步扩增。病毒感染和蛋白质表达可以如例如O'Reilly et al. (Baculovirus expression vectors:A Laboratory Manual.Oxford:Oxford University Press (1994))所述进行。

[0247] 然后可以例如通过如下的Ni²⁺-螯合亲和色谱法纯化表达的聚-His标记的抗体。如Rupert et al. (Nature 362:175-179 (1993))所述,可以从重组病毒感染的Sf9细胞制备提取物。简而言之,洗涤Sf9细胞,重悬于超声缓冲液(25mL HEPES pH7.9;12.5mM MgCl₂; 0.1mM EDTA;10%甘油;0.1%NP-40;0.4M KCl)中,并在冰上超声两次20秒。通过离心澄清超声处理物,并将上清液在上样缓冲液(50mM磷酸盐;300mM NaCl;10%甘油pH7.8)中稀释50倍,并通过0.45μm过滤器过滤。制备Ni²⁺-NTA琼脂糖柱(可从Qiagen商购),床体积为5mL,用25mL水洗涤,并用25mL上样缓冲液平衡。将过滤的细胞提取物以0.5mL/分钟加载到柱上。用加样缓冲液将柱洗涤至基线A280,此时开始收集馏分。接下来,用二级洗涤缓冲液(50mM磷酸盐;300mM NaCl;10%甘油pH6.0)洗涤柱,其洗脱非特异性结合的蛋白质。再次达到A280基线后,用在二级洗涤缓冲液中的0至500mM咪唑梯度显色柱。收集1mL级分并通过SDS-PAGE和银染色或具有Ni²⁺-NTA-缀合的碱性磷酸酶(Qiagen)的Western印迹分析。合并含有洗脱的His10标记抗体的级分并对上样缓冲液透析。

[0248] 或者,可以使用已知的色谱技术进行抗体的纯化,包括例如蛋白A或蛋白G柱层析。在一个实施方式中,可以通过洗脱到含有离液剂或温和洗涤剂的溶液中而从柱的固相回收感兴趣的抗体。示例性离液剂和温和洗涤剂包括但不限于胍-HCl,尿素,过氯酸锂,精氨酸,组氨酸,SDS(十二烷基硫酸钠),吐温,Triton和NP-40,所有这些都是可商购的。

[0249] 靶分子

[0250] 可以被本文描述的双特异性抗体靶向的分子的实例包括但不限于可溶性血清蛋白及其受体和其他膜结合蛋白(例如,粘附素)。与其他分子任选地偶联的可溶性抗原或其片段可用作用于产生抗体的免疫原。对于跨膜分子,例如受体,这些的片段(例如,受体的细胞外结构域)可以用作免疫原。或者,表达跨膜分子的细胞可用作免疫原。这样的细胞可以源自天然来源(例如,癌细胞系),或者可以是通过重组技术转化以表达跨膜分子的细胞。可用于制备抗体的其他抗原和其形式对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0251] 在某些实施方式中,本文所述的双特异性抗体能够结合一种,两种或更多种细胞因子,细胞因子相关蛋白,和选自以下的细胞因子受体:BMPI,BMP2,BMP3B(GDF10),BMP4,BMP6,BMP8,CSFI(M-CSF),CSF2(GM-CSF),CSF3(G-CSF),EPO,FGFI(aFGF),FGF2(bFGF),FGF3(int-2),FGF4(HST),FGF5,FGF6(HST-2),FGF7(KGF),FGF9,FGF10,FGF11,FGF12,FGF12B,FGF14,FGF16,FGF17,FGF19,FGF20,FGF21,FGF23,IGF1,IGF2,IFNA1,IFNA2,IFNA4,IFNA5,IFNA6,IFNA7,IFNBI,IFNG,IFNWI,FELI,FELI(EPSELON),FELI(ZETA),IL1A,IL1B,IL12,IL13,IL4,IL5,IL6,IL7,IL8,IL9,IL10,IL11,IL12A,IL12B,IL13,IL14,IL15,IL16,IL17,

IL17B, IL18, IL19, IL20, IL22, IL23, IL24, IL25, IL26, IL27, IL28A, IL28B, IL29, IL30, PDGFA, PDGFB, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3, LTA (TNF-b), LTB, TNF (TNF-a), TNFSF4 (OX40配体), TNFSF5 (CD40配体), TNFSF6 (FasL), TNFSF7 (CD27配体), TNFSF8 (CD30配体), TNFSF9 (4-1BB配体), TNFSF10 (TRAIL), TNFSF11 (TRANCE), TNFSF12 (AP03L), TNFSF13 (April), TNFSF13B, TNFSF14 (HVEM-L), TNFSF15 (VEGI), TNFSF18, HGF (VEGFD), VEGF, VEGFB, VEGFC, ILIR1, IL1R2, IL1RL1, LL1RL2, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3RA, IL4R, IL5RA, IL6R, IL7R, IL8RA, IL8RB, IL9R, IL10RA, IL10RB, IL11RA, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL15RA, IL17R, IL18R1, IL20RA, IL21R, IL22R, IL1HY1, ILIRAP, IL1RAPL1, IL1RAPL2, ILIRN, IL6ST, IL18BP, IL18RAP, IL22RA2, AIR, HGF, LEP (瘦蛋白), PTN和TH。

[0252] 在某些实施方式中,靶分子是趋化因子,趋化因子受体或选自以下的趋化因子相关蛋白:CCL1 (I-309), CCL2 (MCP-1/MCAF), CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (mcp-2), CCLH (eotaxin), CCL13 (MCP-4), CCL15 (MIP-1d), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19 (MDP-3b), CCL20 (MIP-3a), CCL21 (SLC/exodus-2), CCL22 (MDC/STC-I), CCL23 (MPIF-1), CCL24 (MPIF-2/eotaxin-2), CCL25 (TECK), CCL26 (eotaxin-3), CCL27 (CTACK/ILC), CCL28, CXCL1 (GR01), CXCL2 (GR02), CXCL3 (GR03), CXCL5 (ENA-78), CXCL6 (GCP-2), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CXCL11 (1-TAC), CXCL12 (SDF1), CXCL13, CXCL14, CXCL16, PF4 (CXCL4), PPBP (CXCL7), CX3CL1 (SCYDI), SCYE1, XCL1 (lymphotactin), XCL2 (SCM-1b), BLRI (MDR15), CCBP2 (D6/JAB61), CCRI (CKRI/HM145), CCR2 (mcp-IRB/RA), CCR3 (CKR3/CMKBR3), CCR4, CCR5 (CMKBR5/ChemR13), CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6), CCR7 (CKR7/EBI1), CCR8 (CMKBR8/TERI/CKR-LI), CCR9 (GPR-9-6), CCRLI (VSHKI), CCRL2 (L-CCR), XCRI (GPR5/CCXCRI), CMKLRI, CMKORI (RDCI), CX3CR1 (V28), CXCR4, GPR2 (CCR10), GPR31, GPR81 (FKSG80), CXCR3 (GPR9/CKR-L2), CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo), HM74, IL8RA (IL8Ra), IL8RB (IL8Rb), LTB4R (GPR16), TCP10, CKLFSF2, CKLFSF3, CKLFSF4, CKLFSF5, CKLFSF6, CKLFSF7, CKLFSF8, BDNF, C5R1, CSF3, GRCC10 (C10), EPO, FY (DARC), GDF5, HDFIA, DL8, PRL, RGS3, RGS13, SDF2, SLIT2, TLR2, TLR4, TREM1, TREM2和VHL。

[0253] 在某些实施方式中,本文所述的双特异性抗体能够结合选自以下的一种或多种靶标:ABCF1;ACVRI;ACVRIB;ACVR2;ACVR2B;ACVRLI;ADORA2A;Aggrecan;AGR2;AICDA;AIR;AIGI;AKAPI;AKAP2;AMH;AMHR2;ANGPT1;ANGPT2;ANGPTL3;ANGPTL4;ANPEP;APC;APOC1;AR;AZGPI (锌-a-糖蛋白);B7.1;B7.2;BAD;BAFF (BLys);BAGI;BAN;BCL2;BCL6;BDNF;BLNK;BLRI (MDR15);BMPI;BMP2;BMP3B (GDF10);BMP4;BMP6;BMP8;BMPRIA;BMPRIB;BMPR2;BPAGI (plectin);BRCA1;C19orf10 (IL27w);C3;C4A;C5;C5R1;CANTI;CASP1;CASP4;CAVI;CCBP2 (D6/JAB61);CCL1 (1-309);CCL11 (eotaxin);CCL13 (MCP-4);CCL15 (MIP-1d);CCL16 (HCC-4);CCL17 (TARC);CCL18 (PARC);CCL19 (MIP-3b);CCL2 (MCP-1);MCAF;CCL20 (MIP-3a);CCL21 (MTP-2);SLC;exodus-2;CCL22 (MDC/STC-I);CCL23 (MPIF-1);CCL24 (MPIF-2/eotaxin-2);CCL25 (TECK);CCL26 (eotaxin-3);CCL27 (CTACK/ILC);CCL28;CCL3 (MTP-1a);CCL4 (MDP-1b);CCL5 (RANTES);CCL7 (MCP-3);CCL8 (mcp-2);CCNA1;CCNA2;CCND1;CCNE1;CCNE2;CCRI (CKRI/HM145);CCR2 (mcp-IRB/RA);CCR3 (CKR3/CMKBR3);CCR4;CCR5 (CMKBR5/ChemR13);CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6);CCR7 (CKR7/EBI1);CCR8 (CMKBR8/TERI/CKR-LI);CCR9 (GPR-9-6);CCRLI (VSHKI);CCRL2 (L-CCR);CD164;CD19;CD1C;CD20;CD200;CD22;CD24;

CD28;CD3;CD37;CD38;CD3E;CD3G;CD3Z;CD4;CD40;CD40L;CD44;CD45RB;CD52;CD69;CD72;CD74;CD79A;CD79B;CD8;CD80;CD81;CD83;CD86;CDHI (E-cadherin);CDH10;CDH12;CDH13;CDH18;CDH19;CDH20;CDH5;CDH7;CDH8;CDH9;CDK2;CDK3;CDK4;CDK5;CDK6;CDK7;CDK9;CDKNIA (p21Wap1/Cipl);CDKNIB (p27Kip1);CDKNIC;CDKN2A (P16INK4a);CDKN2B;CDKN2C;CDKN3;CEBPB;CERI;CHGA;CHGB;几丁质酶;CHST10;CKLFSF2;CKLFSF3;CKLFSF4;CKLFSF5;CKLFSF6;CKLFSF7;CKLFSF8;CLDN3;CLDN7 (claudin-7);CLN3;CLU (clusterin);CMKLRI;CMKORI (RDCI);CNRI;COL18A1;COLIAI;COL4A3;COL6A1;CR2;CRP;CSFI (M-CSF);CSF2 (GM-CSF);CSF3 (GCSF);CTLA4;CTNNBI (b-连环蛋白);CTSB (组织蛋白酶B);CX3CL1 (SCYDI);CX3CR1 (V28);CXCLI (GROI);CXCL10 (I P-10);CXCL11 (1-TAC/IP-9);CXCL12 (SDFI);CXCL13;CXCL14;CXCL16;CXCL2 (GR02);CXCL3 (GR03);CXCL5 (ENA-78/LIX);CXCL6 (GCP-2);CXCL9 (MIG);CXCR3 (GPR9/CKR-L2);CXCR4;CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo);CYB5;CYCI;CYSLTRI;DAB2IP;DES;DKFZp451J01 18;DNCLI;DPP4;E2F1;ECGFI;EDGI;EFNAI;EFNA3;EFNB2;EGF;EGFR;ELAC2;ENG;EN01;EN02;EN03;EPHB4;EPO;ERBB2 (Her-2);EREG;ERK8;ESRI;ESR2;F3 (TF);FADD;FasL;FASN;FCERIA;FCER2;FCGR3A;FGF;FGFI (aFGF);FGF10;FGF11;FGF12;FGF12B;FGF13;FGF14;FGF16;FGF17;FGF18;FGF19;FGF2 (bFGF);FGF20;FGF21;FGF22;FGF23;FGF3 (int-2);FGF4 (HST);FGF5;FGF6 (HST-2);FGF7 (KGF);FGF8;FGF9;FGFR3;FIGF (VEGFD);FELI (EPSILON);FILI (ZETA);FLJ12584;FLJ25530;FLRTI (纤连蛋白);FLT1;FOS;FOSLI (FRA-I);FY (DARC);GABRP (GABAa);GAGEBI;GAGECI;GALNAC4S-6ST;GAT A3;GDF5;GFI 1;GGT1;GM-CSF;GNASI;GNRHI;GPR2 (CCRIO);GPR31;GPR44;GPR81 (FKSG80);GRCCIO (CIO);GRP;GSN (Gelsolin);GSTPI;HAVCR2;HDAC4;HDAC5;HDAC7A;HDAC9;HGF;HIFIA;HDPI;组胺和组胺受体;HLA-A;HLA-DRA;HM74;HMOXI;HUMCYT2A;ICEBERG;ICOSL;ID2;IFN-a;IFNAI;IFNA2;IFNA4;IFNA5;IFNA6;IFNA7;IFNB1;IFNgamma;DFNWI;IGBPI;IGFI;IGFIR;IGF2;IGFBP2;IGFBP3;IGFBP6;IL-1;IL10;M ORA;IL10RB;IL1 1;IL1 1 RA;IL-12;IL12A;IL12B;IL12RB1;IL12RB2;IL13;IL13RA1;IL13RA2;IL14;IL15;IL15RA;IL16;IL17;IL17B;IL17C;IL17R;IL18;IL18BP;IL18R1;IL18RAP;IL19;IL1A;IL1 B;IL1F10;IL1 F5;IL1 F6;IL1 F7;IL1 F8;IL1 F9;IL1 HYI;IL1 RI;IL1 R2;IL1 RAP;IL1 RAPL1;IL1 RAPL2;IL1 RL1;IL1 RL2;ILIRN;IL2;IL20;IL20RA;IL21 R;IL22;IL22R;IL22RA2;IL23;IL24;IL25;IL26;IL27;IL28A;IL28B;IL29;IL2RA;IL2RB;IL2RG;IL3;IL30;IL3RA;IL4;IL4R;IL5;IL5RA;IL6;IL6R;IL6ST (糖蛋白130);EL7;EL7R;EL8;IL8RA;DL8RB;IL8RB;DL9;DL9R;DLK;INHA;INHBA;INSL3;INSL4;IRAKI;ERAK2;ITGAI;ITGA2;ITGA3;ITGA6 (a6整合素);ITGAV;ITGB3;ITGB4 (b 4整合素);JAGI;JAKI;JAK3;JUN;K6HF;KAN;KDR;KITLG;KLF5 (GC Box BP);KLF6;KLK10;KLK12;KLK13;KLK14;KLK15;KLK3;KLK4;KLK5;KLK6;KLK9;KRT1;KRT19 (Keratin 19);KRT2A;KHTHB6 (毛发特异型H角蛋白);LAMAS;LEP (瘦蛋白);Lingo-p75;Lingo-Troy;LPS;LTA (TNF-b);LTB;LTB4R (GPR16);LTB4R2;LTBR;MACMARCKS;MAG or Omgp;MAP2K7 (c-Jun);MDK;MIBI;midkine;MEF;MIP-2;MKI67; (Ki-67);MMP2;MMP9;MS4A1;MSMB;MT3 (metallothionein-111);MTSSI;MUCI (粘蛋白);MYC;MYD88;NCK2;neurocan;NFKBI;NFKB2;NGFB (NGF);NGFR;NgR-Lingo;NgR-Nogo66 (Nogo);NgR-p75;NgR-Troy;NMEI (NM23A);NOX5;NPPB;NROBI;NROB2;NRIDI;NR1 D2;NR1 H2;NR1 H3;NR1 H4;NR1 I2;NR1 I3;NR2C1;NR2C2;NR2E1;NR2E3;NR2F1;NR2F2;NR2F6;NR3C1;NR3C2;NR4A1;

NR4A2;NR4A3;NR5A1;NR5A2;NR6A1;NRPI;NRP2;NT5E;NTN4;ODZI;OPRDI;P2RX7;PAP;PARTI;PATE;PAWR;PCA3;PCNA;PDGFA;PDGFB;PECAMI;PF4 (CXCL4);PGF;PGR;phosphacan;PIAS2;PIK3CG;PLAU (uPA);PLG;PLXDCI;PPBP (CXCL7);PPID;PRI;PRKCQ;PRKDI;PRL;PROC;PROK2;PSAP;PSCA;PTAFR;PTEN;PTGS2 (COX-2);PTN;RAC2 (p21 Rac2);RARB;RGS1;RGS13;RGS3;RNFIIO (ZNF144);ROB02;S100A2;SCGB1 D2 (lipophilin B);SCGB2A1 (乳腺珠蛋白2);SCGB2A2 (乳腺珠蛋白1);SCYEI (内皮单核细胞激活细胞因子);SDF2;SERPINAI;SERPINA3;SERP1 NB5 (maspin);SERPINEI (PAI-I);SERPDMF1;SHBG;SLA2;SLC2A2;SLC33A1;SLC43A1;SLIT2;SPPI;SPRRIB (Spr1);ST6GAL1;STABI;STAT6;STEAP;STEAP2;TB4R2;TBX21;TCPI0;TDGFI;TEK;TGFA;TGFB1;TGFBIII;TGFB2;TGFB3;TGFB1;TGFBRI;TGFBRI2;TGFBRI3;THIL;THBSI (血小板反应蛋白-1);THBS2;THBS4;THP0;TIE (Tie-1);TMP3;组织因子;TLRI0;TLR2;TLR3;TLR4;TLR5;TLR6;TLR7;TLR8;TLR9;TNF;TNF- α ;TNFAEP2 (B94);TNFAI P3;TNFRSFIIA;TNFRSFIA;TNFRSFIB;TNFRSF21;TNFRSF5;TNFRSF6 (Fas);TNFRSF7;TNFRSF8;TNFRSF9;TNFSFIO (TRAII L);TNFSFI 1 (TRANCE);TNFSF12 (AP03L);TNFSF13 (April);TNFSF13B;TNFSF14 (HVEM-L);TNFSF15 (VEGI);TNFSF18;TNFSF4 (OX40配体);TNFSF5 (CD40配体);TNFSF6 (FasL);TNFSF7 (CD27配体);TNFSF8 (CD30配体);TNFSF9 (4-1BB配体);TOLLIP;To11样受体;TOP2A (拓扑异构酶Ea);TP53;TPMI;TPM2;TRADD;TRAFI;TRAF2;TRAF3;TRAF4;TRAF5;TRAF6;TREMI;TREM2;TRPC6;TSLP;TWEAK;VEGF;VEGFB;VEGFC;versican;VHL C5;VLA-4;XCLI (lymphotactin);XCL2 (SCM-1b);XCRI (GPR5/CCXCRI);YYI;和ZFPM2。

[0254] 本发明包括的抗体的分子靶分子包括CD蛋白,例如CD3,CD4,CD8,CD16,CD19,CD20,CD34,CD64,CD200,ErbB受体家族的成员,例如EGF受体,HER2,HER3或HER4受体;细胞粘附分子如LFA-1,Mad,p150.95,VLA-4,ICAM-1,VCAM, α 4/ β 7整合素和 α v/ β 3整合素,包括其 α 或 β 亚基(例如,抗CD11a,抗CD18或抗CD11b抗体);生长因子如VEGF-A,VEGF-C;组织因子(TF); α 干扰素(alphalFN);TNF α ,白细胞介素,如IL-1 β ,IL-3,IL-4,IL-5,IL-8,IL-9,IL-13,IL17A/F,IL-18,IL-13Ra1,IL13Ra2,IL-4R,IL-5R,IL-9R,IgE;血型抗原(blood group antigens);flk2/flt3受体;肥胖(OB)受体;mpl受体;CTLA-4;RANKL,RANK,RSVF蛋白,蛋白C等

[0255] 在某些实施方式中,本文所述的双特异性抗体结合低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP)-1或LRP-8或转铁蛋白受体,和至少一种选自以下的靶标:1) β -分泌酶(BACE1或BACE2),2) α -分泌酶,3) γ -分泌酶,4) tau-分泌酶,5) 淀粉样前体蛋白(APP),6) 死亡受体6(DR6),7) 淀粉样 β 肽,8) α -突触核蛋白,9) Parkin,10) Huntingtin,11) p75NTR,和12) caspase-6。

[0256] 在某些实施方式中,本文所述的双特异性抗体结合选自以下的至少两种靶分子:IL-1 α 和IL-1 β ,IL-12和IL-18;IL-13和IL-9;IL-13和IL-4;IL-13和IL-5;IL-5和IL-4;IL-13和IL-1beta;IL-13和IL-25;IL-13和TARC;IL-13和MDC;IL-13和MEF;IL-13和TGF- β ;IL-13和LHR激动剂;IL-12和TWEAK,IL-13和CL25;IL-13和SPRR2a;IL-13和SPRR2b;IL-13和ADAM8,IL-13和PED2,IL17A和IL17F,CD3和CD19,CD138和CD20;CD138和CD40;CD19和CD20;CD20和CD3;CD38和CD138;CD38和CD20;CD38和CD40;CD40和CD20;CD-8和IL-6;CD20和BR3,TNF α 和TGF- β ,TNF α 和IL-1 β ;TNF α 和IL-2,TNF α 和IL-3,TNF α 和IL-4,TNF α 和IL-5,TNF α 和IL6,TNF α 和IL8,TNF α 和IL-9,TNF α 和IL-10,TNF α 和IL-11,TNF α 和IL-12,TNF α 和IL-13,TNF

α 和IL-14, TNF α 和IL-15, TNF α 和IL-16, TNF α 和IL-17, TNF α 和IL-18, TNF α 和IL-19, TNF α 和IL-20, TNF α 和IL-23, TNF α 和IFN α , TNF α 和CD4, TNF α 和VEGF, TNF α 和MIF, TNF α 和ICAM-1, TNF α 和PGE4, TNF α 和PEG2, TNF α 和RANK配体, . TNF α 和Te38; TNF α 和BAFF; TNF α 和CD22; TNF α 和CTLA-4; TNF α 和GP130; TNF α 和IL-12p40; VEGF和HER2, VEGF-A和HER2, VEGF-A和PDGF, HER1和HER2, VEGF-A和VEGF-C, VEGF-C和VEGF-D, HER2和DR5, VEGF和IL-8, VEGF和MET, VEGFR和MET受体, VEGFR和EGFR, HER2和CD64, HER2和CD3, HER2和CD16, HER2和HER3; EGFR (HER1) 和HER2, EGFR和HER3, EGFR和HER4, IL-13和CD40L, IL4和CD40L, TNFR1和IL-1 R, TNFR1和IL-6R和TNFR1和IL-18R, EpCAM和CD3, MAPG和CD28, EGFR和CD64, CSPGs和RGM A; CTLA-4和BTN02; IGF1和IGF2; IGF1/2和Erb2B; MAG和RGM A; NgR和RGM A; NogoA和RGM A; OMGP和RGM A; PDL-I和CTLA-4; 以及RGM A和RGM B。

[0257] 双特异性抗体的实例

[0258] 在某些实施方式中, 双特异性抗体同时结合HER2和EGFR/HER3。在某些实施方式中, 双特异性抗体包含来自抗HER2抗体帕妥珠单抗的轻(L')和重(H')链, 和来自抗-EGFR/HER3抗体DL11的轻(L'')和重(H'')链。在一些实施方式中, 双特异性抗体包括帕妥珠单抗的恒定轻链结构域(CL'), 其残基Q123和N136处具有置换(Kabat编号惯例)。在某些实施方式中, 置换是Q123D和N136D(Kabat编号惯例)。在某些实施方式中, 双特异性抗体包括具有SEQ ID NO:15所示置换的帕妥珠单抗的轻链。在某些实施方式中, 双特异性抗体包括帕妥珠单抗的CH1'结构域, 其残基L133和L150处具有置换(Kabat编号惯例)。在某些实施方式中, 置换是L133V和L150A(Kabat编号惯例)。在某些实施方式中, 双特异性抗体包括在E357和K409处具有置换的帕妥珠单抗的CH3'结构域(Kabat编号惯例)。在某些实施方式中, 置换是E357K和K409R(Kabat编号惯例)。在一些方面, 双特异性抗体包括具有SEQ ID NO:16所示的置换的帕妥珠单抗的重链。在某些实施方式中, 双特异性抗体包括DL11的恒定轻链结构域(CL''), 其残基Q123, N136和T177处具有置换(Kabat编号惯例)。在某些实施方式中, 置换是Q123K, N136K和T177A(Kabat编号惯例)。在一些方面, 双特异性抗体包括具有SEQ ID NO:17所示置换的DL11的轻链。在某些实施方式中, 双特异性抗体包括残基K152, H173和S188处具有置换的DL11的CH1''结构域(Kabat编号惯例)。在某些实施方式中, 置换是K152D, H173D和S188W(Kabat编号惯例)。在某些实施方式中, 双特异性抗体包括在K370处具有置换的DL11的CH3''结构域(Kabat编号惯例)。在某些实施方式中, 置换是K370E(Kabat编号惯例)。在一些方面, 双特异性抗体包括具有SEQ ID NO:18所示置换的DL11的重链。在一些方面, 双特异性抗体包括具有CL突变的帕妥珠单抗的轻链(SEQ ID NO:15), 具有CH1和CH3突变的帕妥珠单抗的重链(SEQ ID NO:16), 具有CL突变的DL11的轻链(SEQ ID NO:17)和具有CH1和CH3突变的DL11的重链(SEQ ID NO:18)。

[0259] 包含帕妥珠单抗和DL11的重链和轻链的双特异性抗体保留了单特异性母体抗体两者的功能特征。在某些实施方式中, 双特异性抗体和帕妥珠单抗结合HER2, 而DL11则不。在某些实施方式中, 双特异性抗体与HER2结合, Kd范围为200-50pM。在某些实施方式中, Kd为约100pM。在某些实施方式中, 双特异性抗体和DL11结合HER1和HER3, 而帕妥珠单抗则不。在某些实施方式中, 双特异性抗体与HER1和HER2结合, Kd范围为200-50pM。在某些实施方式中, Kd为约100pM。在某些实施方式中, 双特异性抗体同时结合HER1, HER2和HER3, 而单特异性母体抗体则不。

[0260] 在某些实施方式中,双特异性抗体结合CD20。在某些实施方式中,双特异性抗体包含来自利妥昔单抗的轻(L')和重(H')链,以及来自obinutuzumab的轻(L'')和重(H'')链。在一些方面,双特异性抗体包括利妥昔单抗的恒定轻链结构域(CL'),其残基Q123和N136处含有置换(Kabat编号惯例)。在某些实施方式中,所述置换是Q123D和N136D(Kabat编号惯例)。在一些方面,双特异性抗体包括利妥昔单抗的轻链,其具有SEQ ID NO:19中所示的置换。在一些方面,双特异性抗体包括利妥昔单抗的CH1'结构域,其残基L133和L150处具有置换(Kabat编号惯例)。在某些实施方式中,置换是L133V和L150A(Kabat编号惯例)。在一些方面,双特异性抗体包括利妥昔单抗的CH3'结构域,其在K370处具有置换(Kabat编号惯例)。在某些实施方式中,置换是K370E(Kabat编号惯例)。在一些方面,双特异性抗体包括利妥昔单抗的重链,其具有如SEQ ID NO:20中所示的置换。在某些实施方式中,双特异性抗体包括obinutuzumab的恒定轻链结构域(CL''),其残基Q123,N136和T177处具有置换(Kabat编号惯例)。在某些实施方式中,置换是Q123K,N136K和T177A(Kabat编号惯例)。在一些方面,双特异性抗体包括具有SEQ ID NO:21所示置换的obinutuzumab的轻链。在某些实施方式中,双特异性抗体包括残基K152,H173和S188处具有置换的obinutuzumab的CH1''结构域(Kabat编号惯例)。在某些实施方式中,置换是K152D,H173D和S188W(Kabat编号惯例)。在一些方面,双特异性抗体包括在E357和K409处具有置换的obinutuzumab的CH3''结构域(Kabat编号惯例)。在某些实施方式中,置换是E357K和K409R(Kabat编号惯例)。在一些方面,双特异性抗体包括具有如SEQ ID NO:22所示的置换的obinutuzumab的重链。在某些实施方式中,双特异性抗体包括具有CL突变的利妥昔单抗轻链(SEQ ID NO:19),具有CH1和CH3突变的利妥昔单抗的重链(SEQ ID NO:20),具有CL突变的obinutuzumab的轻链(SEQ ID NO:21)和具有CH1和CH3突变的obinutuzumab的重链(SEQ ID NO:22)。

[0261] 包含利妥昔单抗和obinutuzumab的重链和轻链的双特异性抗体保留单特异性母体抗体两者的功能特征。在某些实施方式中,双特异性抗体和obinutuzumab诱导细胞凋亡和补体依赖性细胞毒性,而利妥昔单抗则不。在某些实施方式中,双特异性抗体诱导单特异性母体抗体两者的相似水平的抗体依赖性细胞毒性。

[0262] 在某些实施方式中,双特异性抗体结合PD1和VEGF。在某些实施方式中,双特异性抗体包含来自抗PD1抗体nivolumab的轻(L')和重(H')链,和来自抗-VEGF抗体贝伐单抗的轻(L'')和重(H'')链。在一些方面,双特异性抗体包括残基Q123和N136处具有置换的nivolumab的恒定轻链结构域(CL')(Kabat编号惯例)。在某些实施方式中,置换是Q123D和N136D(Kabat编号惯例)。在一些方面,双特异性抗体包括具有如SEQ ID NO:23所示的置换基的nivolumab的轻链。在某些实施方式中,双特异性抗体包括nivolumab的CH1'结构域,其残基L133和L150处具有置换(Kabat编号惯例)。在某些实施方式中,置换是L133V和L150A(Kabat编号惯例)。在一些方面,双特异性抗体包括在K370处具有置换的nivolumab的CH3'结构域(Kabat编号惯例)。在某些实施方式中,置换是K370E(Kabat编号惯例)。在一些方面,双特异性抗体包括具有SEQ ID NO:24所示置换的nivolumab重链。在某些实施方式中,双特异性抗体包括贝伐单抗的恒定轻链结构域(CL''),其残基Q123,N136和T177处具有置换(Kabat编号惯例)。在某些实施方式中,置换是Q123K,N136K和T177A(Kabat编号惯例)。在一些方面,双特异性抗体包括贝伐单抗的轻链,其具有SEQ ID NO:25所示的置换。在某些实施方式中,双特异性抗体包括贝伐单抗的CH1''结构域,其残基K152,H173和S188处具有置换

(Kabat编号惯例)。在某些实施方式中,置换是K152D,H173D和S188W(Kabat编号惯例)。在一些方面,双特异性抗体包括在E357和K409处具有置换的贝伐单抗的CH3”结构域(Kabat编号惯例)。在某些实施方式中,置换是E357K和K409R(Kabat编号惯例)。在一些方面,双特异性抗体包括贝伐单抗的重链,其具有SEQ ID NO:26所示的置换。在某些实施方式中,双特异性抗体包括具有CL突变的nivolumab的轻链(SEQ ID NO:23),具有CH1和CH3突变的nivolumab的重链(SEQ ID NO:24),具有CL突变的贝伐单抗的轻链(SEQ ID NO:25)和具有CH1和CH3突变的贝伐单抗的重链(SEQ ID NO:26)。

[0263] 包含nivolumab和贝伐单抗的重链和轻链的双特异性抗体保留单特异性母体抗体两者的功能特征。在某些实施方式中,双特异性抗体同时结合PD1和VEGF,而单特异性母体抗体则不。

[0264] 活性测定

[0265] 本文所述的双特异性抗体可通过本领域已知的各种测定来表征其物理/化学性质和生物学功能。

[0266] 纯化的双特异性抗体可以通过一系列测定进一步表征,包括但不限于N-末端测序,氨基酸分析,非变性大小排阻高压液相色谱(HPLC),质谱,离子交换色谱和木瓜蛋白酶消化。

[0267] 在某些实施方式中,分析本文产生的双特异性抗体的生物活性。在某些实施方式中,测试本文所述的双特异性抗体的抗原结合活性。本领域已知的并且可以在本文中使用的抗原结合测定包括但不限于使用诸如蛋白质印迹,放射免疫测定,ELISA(酶联免疫吸附测定)、“夹心”免疫测定,免疫沉淀分析,荧光免疫分析和蛋白A免疫分析等技术的任何直接或竞争性结合测定。以下实施例部分提供了说明性的抗原结合测定。

[0268] 在某些实施方式中,本发明考虑了具有一些但不是所有效应子功能的改变的抗体,这使其成为许多应用的理想候选物,其中抗体体内的半衰期是重要的但某些效应子功能(例如补体和ADCC)是不必要的或有害的。在某些实施方式中,测量所产生的异多聚体蛋白质的Fc活性以确保仅维持期望性质。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定以确认CDC和/或ADCC活性的减少/消耗。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定以确保异多聚体蛋白质缺乏Fc γ R结合(因此可能缺乏ADCC活性),但保留FcRn结合能力。用于介导ADCC的主要细胞,即NK细胞,只表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI,Fcy上 γ RII和Fc γ RIII。Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol 9:457-92(1991)的第464页表3总结了造血细胞上的FcR表达。体外测定以评估感兴趣分子的ADCC活性的实例在美国专利号5,500,362或5,821,337中描述。用于这样的测定的有用效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。替代地,或者另外地,可以在体内评估感兴趣分子的ADCC活性,例如,在Clynes等PNAS(USA) 95:652-656(1998)公开的动物模型中。还可以进行C1q结合测定以确认抗体不能结合C1q并因此缺乏CDC活性。为了评估补体激活,可以进行CDC测定,例如如Gazzano-Santoro等,J.Immunol.Methods 202:163(1996)中描述的。还可以使用本领域已知的方法进行FcRn结合和体内清除/半衰期测定。

[0269] 缀合的蛋白质

[0270] 本发明还提供缀合的蛋白质,例如缀合的双特异性抗体或免疫缀合物(例如,“抗体-药物缀合物”或“ADC”),其包含本文所述的任何双特异性抗体,其中轻链或重链的恒定

区之一与化学分子例如染料或细胞毒性剂例如化学治疗剂,药物,生长抑制剂,毒素(例如细菌,真菌,植物或动物来源的酶活性毒素或片段)或放射性同位素(即放射性共轭物)缀合。特别地,如本文所述的恒定结构域的使用使得能够构建含有两条不同重链(H'和H'')以及两条不同轻链(L'和L'')的抗体。使用本文所述方法构建的免疫缀合物可含有与仅一条重链(H'或H'')或仅一条轻链(L'或L'')的恒定区缀合的细胞毒性剂。而且,因为免疫缀合物可以使细胞毒性剂仅附着在一条重链或轻链上,所以相对于施用具有附着于重链或轻链的细胞毒性剂的抗体,施用受试者的细胞毒性剂的量减少。减少施用受试者的细胞毒剂的量限制了与细胞毒剂相关的不良副作用。

[0271] 抗体-药物偶联物用于局部递送细胞毒性或细胞抑制剂(即在癌症治疗中杀死或抑制肿瘤细胞的药物)的用途(Syrigos and Epenetos, *Anticancer Research* 19:605-614 (1999); Niculescu-Duvaz and Springer, *Adv. Drg. Del. Rev.* 26:151-172 (1997); 美国专利 No. 4,975,278) 允许将药物部分靶向递送至肿瘤和其中的细胞内积累,其中全身施用这些未缀合的药物试剂可导致对正常细胞以及试图消除的肿瘤细胞不可接受的水平的毒性(Baldwin等, *Lancet* (1986年3月15日): 603-605 (1986); Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies'84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera et al. (ed.s), pp. 475-506)。由此寻求具有最小毒性的最大功效。据报道,多克隆抗体和单克隆抗体两者都可用于这些策略(Rowland等, *Cancer Immunol. Immunother.* 21:183-187 (1986))。在这些方法中使用的药物包括道诺霉素,多柔比星,甲氨蝶呤和长春地辛(Rowland等 (1986), 同上)。用于抗体-毒素缀合物的毒素包括细菌毒素,例如白喉毒素,植物毒素例如蓖麻毒素,小分子毒素例如格尔德霉素(Mandler等, *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19): 1573-1581 (2000); Mandler等, *Bioorganic&Med. Chem. Letters* 10:1025-1028 (2000); Mandler等, *Bioconjugate Chem.* 13:786-791 (2002)), 美登木素生物碱(EP1391213; Liu等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623 (1996)) 和 calicheamicin (Lode等, *Cancer Res.* 58:2928 (1998); Hinman等, *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993))。毒素可通过包括微管蛋白结合, DNA结合或拓扑异构酶抑制的机制影响其细胞毒性和细胞抑制作用。当与大抗体或蛋白质受体配体缀合时,一些细胞毒性药物倾向于无活性或活性较低。

[0272] 本文描述了可用于生成免疫缀合物的化学治疗剂(例如,上文)。可以使用的酶活性毒素及其片段包括白喉A链,白喉毒素的非结合活性片段,外毒素A链(来自铜绿假单胞菌),蓖麻毒素A链,相思豆毒素A链, modeccin A链, α -sarcin, 油桐蛋白, 石竹素蛋白, *Phytolacca americana* 蛋白(PAPI, PAPII和PAP-S), 苦瓜苦瓜素抑制剂, curcin, crotin, *sapaonaria officinalis* 抑制剂, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin 和 tricothecenes。参见,例如,1993年10月28日公开的W093/21232。多种放射性核素可用于生产放射性偶联抗体。实例包括 ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y 和 ^{186}Re 。抗体和细胞毒性剂的缀合物使用多种双功能蛋白偶联剂制备,例如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP), 亚氨基四氢噻吩(IT), 亚氨基酯的双官能衍生物(例如dimethyl adipimidate HCl), 活性酯(如二琥珀酰亚胺辛二酸酯), 醛类(如戊二醛), 双叠氮基化合物(如双(对-叠氮基苯甲酰基)己二胺), 双重氮衍生物(如双-(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺), 二异氰酸酯(如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可以如

Vitetta等, Science 238:1098 (1987) 中所述制备蓖麻毒素免疫毒素。碳-14-标记的1-异硫氰酸基苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是用于将放射性核苷酸与抗体缀合的示例性螯合剂。参见, 例如, W094/11026。

[0273] 本文还考虑了抗体和一种或多种小分子毒素的缀合物, 例如calicheamicin, 美登木素生物碱, dolastatins, aurostatins, 单端孢霉烯和CC1065, 以及具有毒素活性的这些毒素的衍生物。

[0274] 在一些实施方式中, 免疫缀合物包含与一种或多种美登木素生物碱分子缀合的本发明的抗体(全长或片段)。

[0275] 美登木素生物碱是通过抑制微管蛋白聚合起作用的有丝分裂抑制剂。美登素首先从东非灌木齿叶美登木(Maytenus serrata) 中分离出来(美国专利号3,896,111)。随后, 发现某些微生物也产生美登木素生物碱, 例如美登醇和C-3美登醇酯(美国专利号4,151,042)。合成的美登醇及其衍生物和类似物在例如美国专利No.4,137,230;4,248,870;4,256,746;4,260,608;4,265,814;4,294,757;4,307,016;4,308,268;4,308,269;4,309,428;4,313,946;4,315,929;4,317,821;4,322,348;4,331,598;4,361,650;4,364,866;4,424,219;4,450,254;4,362,663;和4,371,533中公开。

[0276] 美登木素生物碱药物部分是抗体药物缀合物中的有吸引力的药物部分, 因为它们: (i) 通过发酵或化学修饰制备、发酵产物的衍生化相对容易获得, (ii) 适合用适合经由非二硫化物接头缀合至抗体的官能团衍生化, (iii) 在血浆中稳定, 和(iv) 有效对抗多种肿瘤细胞系。

[0277] 含有美登木素生物碱的免疫偶联物, 其制备方法及其治疗用途公开于例如美国专利号5,208,020, 5,416,064和欧洲专利EP0425235B1中, 其公开内容明确地通过引用并入本文。Liu et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:8618-8623 (1996) 描述了包含与针对人结直肠癌的单克隆抗体C242连接的命名为DM1的美登木素生物碱的免疫缀合物。发现该偶联物具有针对培养的结肠癌细胞的高度细胞毒性, 而且在体内肿瘤生长测定中显示抗肿瘤活性。Chari等, Cancer Research 52:127-131 (1992) 描述了免疫缀合物, 其中美登木素生物碱通过二硫键接头缀合至结合人结肠癌细胞系上的抗原的鼠抗体A7, 或结合HER-2/neu致癌基因的另一种鼠单克隆抗体TA.1。在体外在人乳腺癌细胞系SK-BR-3上测试TA.1-美登木素生物碱偶联物的细胞毒性, 其表达每细胞 3×10^5 HER-2表面抗原。药物缀合物实现了与游离美登木素生物碱类似的一定程度的细胞毒性, 其可以通过增加每个抗体分子的美登木素生物碱分子的数量来增加。A7-美登木素生物碱偶联物在小鼠中显示出低的全身性毒性。

[0278] 通过将抗体与美登木素生物碱分子化学连接而不显著降低抗体或美登木素生物碱分子的生物活性来制备抗体-美登木素生物碱偶联物。参见, 例如, 美国专利号5,208,020 (其公开内容通过引用明确并入本文)。平均每个抗体分子缀合的3-4个美登木素生物碱分子已经显示出在增强靶细胞的细胞毒性而不负面影响抗体的功能或溶解度的方面的功效, 尽管会预期甚至一个分子的毒素/抗体使细胞毒性相对于使用裸抗体增强。美登木素生物碱是本领域公知的, 可以通过已知技术合成或从天然来源中分离。合适的美登木素生物碱公开于例如美国专利No.5,208,020和上文提及的其他专利和非专利出版物中。在某些实施方式中, 美登木素生物碱是美登醇和在芳香环中或在美登醇分子的其他位置处被修饰的美登醇类似物, 例如各种美登醇酯。

[0279] 本领域已知有许多用于制备抗体-美登木素生物碱偶联物的连接基团,包括例如美国专利No.5,208,020或EP专利0425235B1,Chari et al.,Cancer Research 52:127-131 (1992),和美国专利申请公开No.2005/0169933中公开的那些,其公开内容明确地通过引用并入本文。包含接头组分的抗体-美登木素生物碱缀合物SMCC可如美国专利申请公开号2005/0169933中所公开的那样制备。连接基团包括二硫化物基团,硫醚基团,酸不稳定基团,光不稳定基团,肽酶不稳定基团或酯酶不稳定基团,如上述专利中所公开的。在某些实施方式中,连接基团是二硫化物和硫醚基团。本文描述和举例说明了另外的连接基团。

[0280] 抗体和美登木素生物碱的缀合物可以使用多种双功能蛋白偶联剂制备,例如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP),琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC),亚氨基四氢噻吩(IT),亚氨基酯的双官能衍生物(如dimethyl adipimidate HCl),活性酯(如二琥珀酰亚胺辛二酸酯),醛类(如戊二醛),双叠氮基化合物(如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺),双重氮衍生物(如双-(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺),二异氰酸酯(如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。在某些实施方式中,偶联剂包括N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)(Carlsson et al.,Biochem.J.173:723-737 (1978))和N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(SPP)以提供二硫键。

[0281] 取决于连接的类型,接头可以在各种位置连接到美登木素生物碱分子上。例如,酯键可以通过使用常规偶联技术与羟基反应形成。反应可以在具有羟基的C-3位置,用羟甲基修饰的C-14位置,用羟基修饰的C-15位置和具有羟基的C-20位置发生。在某些实施方式中,连接在美登醇或美登醇类似物的C-3位置形成。

[0282] 在某些实施方式中,免疫缀合物包含与dolastatins或dolostatin肽类似物和衍生物(auristatins)(美国专利号5,635,483和5,780,588)缀合的本文公开的双特异性抗体。已显示dolastatins和auristatins干扰微管动力学,GTP水解,核和细胞分裂(Woyke等,Antimicrob.Agents and Chemother.45(12):3580-3584 (2001))并且具有抗癌(美国专利号5,663,149)和抗真菌活性(Pettit等,Antimicrob.Agents Chemother.42:2961-2965 (1998))。dolastatin或auristatin药物部分可以通过肽药物部分的N-(氨基)末端或C-(羧基)末端与抗体连接(W002/088172)。

[0283] 示例性的auristatin实施方式包括N-末端连接的单甲基auristatin药物部分DE和DF,公开于“Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands”,美国申请公开号2005/0238649,其公开内容明确地通过引用整体并入本文。

[0284] 通常,可以通过在两个或更多个氨基酸和/或肽片段之间形成肽键来制备基于肽的药物部分。这种肽键可以例如根据肽化学领域众所周知的液相合成方法(参见E.Schroder and K.Lijbke,“The Peptides,”volume 1,pp.76-136,1965,Academic Press)制备。auristatin/dolastatin药物部分可根据以下方法制备:美国专利号5,635,483和5,780,588;Pettit et al.,J.Nat.Prod.44:482-485 (1981);Pettit et al.,Anti-Cancer Drug Design 13:47-66 (1998);Poncet,Curr.Pharm.Des.5:139-162 (1999);和Pettit,Fortschr.Chem.Org.Naturst.70:1-79 (1997)。还参见Doronina,Nat.Biotechnol.21(7):778-784 (2003);和“Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands,”U.S.Application Publication No.2005/0238649,其全部内

容通过引用并入本文(公开了例如接头和制备单甲基缬氨酸化合物的方法,例如与接头缀合的MMAE和MMAF)。

[0285] 在某些实施方式中,免疫缀合物包含与一种或多种calicheamicin分子缀合的本文公开的双特异性抗体。calicheamicin抗生素家族能够在亚皮摩尔浓度下产生双链DNA断裂。对于calicheamicin家族的缀合物的制备,参见美国专利号5,712,374,5,714,586,5,739,116,5,767,285,5,770,701,5,770,710,5,773,001和5,877,296(均属于American Cyanamid Company)。可使用的calicheamicin的结构类似物包括,但不限于, $\gamma_1^1\alpha_2^1,\alpha_3^1$,N-乙酰基- γ_1^1 ,PSAG和 θ_1^1 (Hinman et al.,Cancer Research 53:3336-3342(1993),Lode et al.,Cancer Research 58:2925-2928(1998);和属于American Cyanamid Company的上述美国专利)。抗体可以缀合的另一种抗肿瘤药物是QFA,它是抗叶酸剂。calicheamicin和QFA两者都具有细胞内作用位点,并且不容易穿过质膜。因此,通过抗体介导的内化作用对这些试剂的细胞摄取大大增强了它们的细胞毒性作用。

[0286] 可与本文公开的或根据本文所述方法制备的双特异性抗体缀合的其他抗肿瘤剂包括BCNU,streptozocin,长春新碱和5-氟尿嘧啶,在美国专利号5,053,394和5,770,710中描述的共同称为LL-E33288复合物的试剂家族,以及esperamicins(美国专利号5,877,296)。

[0287] 可以使用的酶活性毒素及其片段包括白喉A链,白喉毒素的非结合活性片段,外毒素A链(来自铜绿假单胞菌),蓖麻毒素A链,abrin A链,modeccin A链, α -sarcin,Aleurites fordii蛋白,dianthin蛋白,Phytolaca americana蛋白(PAPI,PAPII和PAP-S),苦瓜苦瓜素抑制剂,curcin,crocin,sapaonaria officinalis抑制剂,gelonin,mitogellin,restrictocin,phenomycin,enomycin和tricothecenes(参见,例如,W093/21232,1993年10月28日公布)。

[0288] 在某些实施方式中,在双特异性抗体和具有核溶解活性的化合物(例如核糖核酸酶或DNA核酸内切酶,例如脱氧核糖核酸酶;DNase)之间形成免疫缀合物。

[0289] 对于肿瘤的选择性破坏,双特异性抗体可包含高放射性原子。有多种放射性同位素可用于生产放射性偶联抗体。实例包括 At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} 和Lu的放射性同位素。当缀合物用于检测时,它可以包含用于闪烁法研究的放射性原子,例如 tc^{99m} 或 I^{123} ,或用于核磁共振(NMR)成像(也称为磁共振成像,mri)的自旋标记,例如再次地碘-123,碘-131,铟-111,氟-19,碳-13,氮-15,氧-17,钆,锰或铁。

[0290] 放射性标记或其他标记可以以已知方式引入缀合物中。例如,肽可以是生物合成的,或者可以通过化学氨基酸合成使用合适的氨基酸前体合成,所述氨基酸前体包括例如代替氢的氟-19。可以通过肽中的半胱氨酸残基连接诸如 tc^{99m} 或 I^{123} , Re^{186} , Re^{188} 和 In^{111} 的标记。钇-90可以通过赖氨酸残基连接。IODOGEN方法(Fraker等,Biochem.Biophys.Res.Comm.80:49-57(1978))可用于引入碘-123。“Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy”(Chatal,CRC Press 1989)详细描述了其他方法。

[0291] 可以使用多种双功能蛋白偶联剂如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP),琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC),亚氨基四氢噻吩(IT),亚氨基酯(如dimethyl adipimidate HCl),活性酯(如二琥珀酰亚胺基辛二酸酯),醛类(如戊二醛)的双官能衍生物,双叠氮基化合物(诸如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺),双

重氮衍生物(如双-(对重氮苯甲酰基)-乙二胺),二异氰酸酯(如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-硝基苯)制备抗体和细胞毒剂的缀合物。例如,可以如 Vitetta等,Science 238:1098 (1987) 中所述制备蓖麻毒素免疫毒素。碳-14-标记的1-异硫氰酸基苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与抗体缀合的示例性螯合剂。参见,例如,W094/11026。接头可以是“可切割的接头”,其促进细胞中细胞毒性药物的释放。例如,可以使用酸不稳定接头,肽酶敏感接头,光不稳定接头,二甲基接头或含二硫化物的接头(Chari等,Cancer Research 52:127-131 (1992);美国专利No.5,208,020)。

[0292] 在某些实施方式中,化合物包括但不限于用以下交联剂试剂制备的ADC:BMPS,EMCS,GMBS,HBVS,LC-SMCC,MBS,MPBH,SBAP,SIA,SIAB,SMCC,SMPB,SMPH,磺基-EMCS,磺基-GMBS,磺基-KMUS,磺基-MBS,磺基-SIAB,磺基-SMCC和磺基-SMPB,以及SVSB(琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基苄基)苯甲酸酯),其可商购获得(例如,来自Pierce Biotechnology,Inc.,Rockford,IL,U.S.A)。参见第467-498页,2003-2004Applications Handbook and Catalog。

[0293] 在缀合的双特异性抗体中,双特异性抗体与一个或多个部分(例如,药物部分)缀合,例如,每个抗体约1至约20个部分,任选地通过接头连接。缀合的双特异性抗体可以通过几种途径制备,采用本领域技术人员已知的有机化学反应,条件和试剂,包括:(1)抗体的亲核基团通过共价键与二价接头试剂反应,然后与感兴趣的部分反应;(2)部分的亲核基团通过共价键与二价连接剂反应,然后与抗体的亲核基团反应。本文描述了制备缀合抗体的另外方法。

[0294] 接头试剂可以由一种或多种接头组分组成。示例性的接头组分包括6-马来酰亚胺基己酰基(“MC”),马来酰亚胺丙酰基(“MP”),缬氨酸-瓜氨酸(“val-cit”),丙氨酸-苯丙氨酸(“ala-phe”),对氨基苄氧基羰基(“PAB”),N-琥珀酰亚胺基4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(“SPP”),N-琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1羧酸酯(“SMCC”)和N-琥珀酰亚胺基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯(“SIAB”)。另外的接头组分是本领域已知的,并且一些在本文中描述。还参见“Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands”,美国申请公开号2005/0238649,其内容通过引用整体并入本文。

[0295] 在某些实施方式中,接头可包含氨基酸残基。示例性的氨基酸接头组分包括二肽,三肽,四肽或五肽。示例性的二肽包括:缬氨酸-瓜氨酸(vc或val-cit),丙氨酸-苯丙氨酸(af或ala-phe)。示例性的三肽包括:甘氨酸-缬氨酸-瓜氨酸(gly-val-cit)和甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(gly-gly-gly)。包含氨基酸接头组分的氨基酸残基包括天然存在的那些,以及次要氨基酸和非天然存在的氨基酸类似物,例如瓜氨酸。可以设计氨基酸接头组分并优化其对特定酶的酶促切割的选择性,例如肿瘤相关蛋白酶,组织蛋白酶B,C和D,或纤溶酶蛋白酶。

[0296] 抗体上的亲核基团包括但不限于:(i)N-末端胺基团,(ii)侧链胺基团,例如赖氨酸,(iii)侧链硫醇基团,例如胱氨酸,和(iv)糖羟基或氨基,其中抗体是糖基化的。胺,硫醇和羟基是亲核的并且能够与接头部分和接头试剂上的亲电子基团反应形成共价键,包括:(i)活性酯,例如NHS酯,HOBt酯,卤代甲酸酯和酰卤;(ii)烷基和苄基卤化物,如卤代乙酰胺;(iii)醛,酮,羧基和马来酰亚胺基团。某些抗体具有可还原的链间二硫键,即半胱氨酸

桥。通过用还原剂如DTT(二硫苏糖醇)处理,可以使抗体与接头试剂缀合反应。因此,每个半胱氨酸桥在理论上将形成两个反应性硫醇亲核体。通过赖氨酸与2-亚氨基四氢噻吩(Traut试剂)的反应,可以将额外的亲核基团引入抗体中,导致胺转化为硫醇。可以通过引入一个,两个,三个,四个或更多个半胱氨酸残基(例如,制备包含一个或多个非天然半胱氨酸氨基酸残基的突变体抗体)将反应性硫醇基团引入抗体(或其片段)中。

[0297] 本文所述的缀合的双特异性抗体还可以通过修饰抗体以引入亲电子部分来产生,所述亲电子部分可以与接头试剂或药物或其他部分上的亲核取代基反应。糖基化抗体的糖可以例如用高碘酸盐氧化剂氧化,以形成醛或酮基,其可以与接头试剂或药物或其他部分的胺基反应。得到的亚胺席夫碱基可以形成稳定的键,或者可以例如通过硼氢化物试剂还原以形成稳定的胺键。在一个实施方式中,糖基化抗体的碳水化合物部分与半乳糖氧化酶或偏高碘酸钠的反应可以在蛋白质中产生羰基(醛和酮)基团,其可以与药物或其他部分上的适当基团反应(Hermanson, Bioconjugate Techniques)。在另一个实施方式中,含有N-末端丝氨酸或苏氨酸残基的蛋白质可以与偏高碘酸钠反应,导致产生醛代替第一个氨基酸(Geoghegan和Stroh, Bioconjugate Chem. 3:138-146 (1992); 美国专利No. 5,362,852)。这种醛可以与药物部分或接头亲核体反应。

[0298] 同样,部分(例如药物部分)上的亲核基团包括但不限于:胺,硫醇,羟基,酰肼,肟,肟,缩氨基硫脲,肟羧酸盐,和能够与接头部分和接头试剂上的亲电子基团反应形成共价键的芳基酰肼基团,包括:(i) 活性酯,如NHS酯,HOBt酯,卤代甲酸酯和酰卤;(ii) 烷基和苄基卤化物,如卤代乙酰胺;(iii) 醛,酮,羧基和马来酰亚胺基团。

[0299] 或者,可以制备包含双特异性抗体和细胞毒性剂的融合蛋白。例如,通过重组技术或肽合成。DNA的长度可以包括编码缀合物的两个部分的相应区域,所述两个部分彼此相邻或由编码接头肽的区域分开,所述接头肽不破坏缀合物的期望特性。在某些实施方式中,双特异性抗体可以与“受体”(例如链霉抗生物素蛋白)缀合以用于肿瘤预靶向,其中将抗体-受体缀合物施用于个体,然后使用清除剂以从循环中除去未结合的缀合物。然后施用与细胞毒性剂(例如,放射性核苷酸)缀合的“配体”(例如,抗生物素蛋白)。

[0300] 效用

[0301] 本文所述的双特异性抗体在双特异性抗体的生产中具有工业实用性。

[0302] 本文描述的双特异性抗体可用于例如体外,离体和体内治疗方法。本发明提供了基于使用这些抗体中的一种或多种的各种方法。在某些病理条件下,双特异性抗体是必需的和/或期望的。本发明提供了这些双特异性抗体,其可用于多种目的,例如作为治疗剂,预防剂和诊断剂。例如,本发明提供了治疗疾病的方法,所述方法包括向需要治疗的受试者施用本文所述的双特异性抗体,由此治疗疾病。本文所述的任何双特异性抗体均可用于本文所述的治疗(或预防或诊断)方法。

[0303] 针对同一抗原分子上的两个独立表位的双特异性抗体不仅可以提供增强的结合亲和力(由于二价结合)的益处,而且还可以获得与任一母体抗体无关的新特性。因此,本文公开的双特异性抗体可用于例如受体-配体相互作用的阻断。

[0304] 本文所述的双特异性抗体还可用于同时阻断两个靶标与一个分子的信号传导途径的应用。

[0305] 治疗用途

[0306] 本文描述的双特异性抗体可用于治疗应用。例如,这样的抗体可用于治疗肿瘤,包括癌前,非转移性,转移性和癌性肿瘤(例如,早期癌症),用于治疗过敏性或炎性疾病,或用于治疗自身免疫疾病,或用于治疗具有发生癌症(例如,乳腺癌,结直肠癌,肺癌,肾细胞癌,神经胶质瘤或卵巢癌),过敏性或炎性疾病或自身免疫疾病的风险的受试者。

[0307] 术语癌症包括一系列增殖性疾病,包括但不限于癌前生长,良性肿瘤和恶性肿瘤。良性肿瘤仍然位于起源部位,并且没有渗透,侵入或转移到远处部位的能力。恶性肿瘤会侵入并破坏周围的其他组织。它们还可以从它们开始的地方脱离并扩散到身体的其他部位(转移),通常通过血流或通过淋巴结所在的淋巴系统。原发性肿瘤按其出现的组织类型分类;转移性肿瘤根据癌细胞来源的组织类别进行分类。随着时间的推移,恶性肿瘤的细胞变得更加异常并且看起来不像正常细胞。癌细胞外观的这种变化被称为肿瘤等级,并且癌细胞被描述为充分分化的,中度分化的,不良分化的或未分化的。充分分化的细胞表现非常正常并与它们所起源的正常细胞相似。未分化细胞是已经变得如此正常而不再可能确定细胞起源的细胞。

[0308] 肿瘤可以是实体瘤或非实体或软组织肿瘤。软组织肿瘤的实例包括白血病(例如,慢性髓性白血病,急性髓性白血病,成人急性淋巴细胞白血病,急性髓性白血病,成熟B细胞急性淋巴细胞白血病,慢性淋巴细胞白血病,多细胞白血病或毛细胞白血病)或淋巴瘤(例如,非霍奇金淋巴瘤,皮肤T细胞淋巴瘤或霍奇金病)。实体瘤包括除血液,骨髓或淋巴系统之外的任何身体组织的癌症。实体瘤可以进一步分为上皮细胞起源和非上皮细胞起源的肿瘤。上皮细胞实体瘤的实例包括胃肠道,结肠,乳房,前列腺,肺,肾,肝,胰,卵巢,头和颈,口腔,胃,十二指肠,小肠,大肠,肛门,胆囊肿瘤,阴唇,鼻窦,皮肤,子宫,男性生殖器官,泌尿器官,膀胱和皮肤。非上皮来源的实体瘤包括肉瘤,脑肿瘤和骨肿瘤。

[0309] 上皮癌通常从良性肿瘤发展到侵袭前阶段(例如,原位癌),到恶性癌症,其已经穿透基底膜并侵入上皮基质。

[0310] 双特异性抗体也可用于这些治疗应用,并且结合HER2的抗体尤其可用于治疗乳腺癌,结肠直肠癌,肺癌,肾细胞癌,神经胶质瘤或卵巢癌。

[0311] 作为接受本文所述的双特异性抗体的候选者的其他受试者具有以下疾病或处于发生以下疾病的风险中:维管组织异常增殖,红斑痤疮,获得性免疫缺陷综合征,动脉闭塞,特应性角膜炎,细菌性溃疡,Bechets病,血源性肿瘤,颈动脉阻塞性疾病,脉络膜新生血管,慢性炎症,慢性视网膜脱离,慢性葡萄膜炎,慢性玻璃体炎,隐形眼镜过度携带,角膜移植排斥反应,角膜新生血管形成,角膜移植新生血管形成,克罗恩病,Eales病,流行性角膜炎,真菌性溃疡,单纯疱疹感染,带状疱疹感染,高粘血症综合征,卡波西氏肉瘤,白血病,脂质变性,莱姆病,边缘角膜溶解,蚕蚀性溃疡,麻风病以外的分枝杆菌感染,近视,眼部新生血管疾病,视神经,Osler-Weber综合症(Osler-Weber-Rendu),骨关节炎,Paget病,睫状体扁平部炎,类天疱疮,phlyctenulosis,多动脉炎,激光后并发症,原生动物感染,弹性假黄瘤,干燥性翼状胬肉角膜炎,放射状角膜切开术,视网膜新生血管,早产儿视网膜病变,晶状体后纤维增生症,肉状瘤,巩膜炎,镰状细胞贫血,Sogren综合征,实体瘤,斯塔特病,史蒂文约翰逊病,上肢边缘性角膜炎,梅毒,系统性红斑狼疮,特雷恩氏边缘变性,弓形虫病,尤文肉瘤,神经母细胞瘤,骨肉瘤,视网膜母细胞瘤,横纹肌肉瘤,溃疡性结肠炎,静脉阻塞,维生素缺乏,韦格纳结节病,与糖尿病相关的不希望的血管生成,寄生虫病,伤口愈合异常,手术

后肥大,损伤或创伤(例如,急性肺损伤/ARDS),抑制毛发生长,抑制排卵和黄体形成,抑制植入,和抑制子宫中胚胎发育。

[0312] 可以使用根据本文描述的方法制备的双特异性抗体治疗的过敏性或炎性病症或自身免疫疾病或病症的实例包括但不限于关节炎(类风湿性关节炎,例如急性关节炎,慢性类风湿性关节炎,痛风性关节炎,急性痛风性关节炎,慢性炎症性关节炎,退行性关节炎,感染性关节炎,莱姆关节炎,增生性关节炎,银屑病关节炎,椎关节炎和青少年型类风湿性关节炎,骨关节炎,慢性关节炎,变形性关节炎,慢性多发性关节炎,反应性关节炎和强直性脊柱炎),炎症性过度增生性皮肤病,牛皮癣,如斑块状银屑病,gutatte牛皮癣,脓疱性牛皮癣,指甲银屑病,皮炎,包括接触性皮炎,慢性接触性皮炎,过敏性皮炎,过敏性接触性皮炎,疱疹样皮炎和特应性皮炎,x-连锁超IgM综合征,荨麻疹,如慢性过敏性荨麻疹和慢性特发性荨麻疹,包括慢性自身免疫性荨麻疹,多发性肌炎/皮肌炎,青少年皮肌炎,中毒性表皮坏死松解症,硬皮病(包括系统性硬皮病),硬化症如系统性硬化症,多发性硬化(MS),如脊柱-眼睛MS,原发进展型MS(PPMS),复发缓解型MS(RRMS),进行性系统性硬化症,动脉粥样硬化,动脉硬化,传染性硬化症和共济失调性硬化症,炎症性肠病(IBD)(例如,克罗恩病,自身免疫介导的胃肠道疾病,结肠炎如溃疡性结肠炎,溃疡性结肠炎,显微镜结肠炎,胶原性结肠炎,结肠炎息肉,坏死性小肠结肠炎和透壁结肠炎,以及自身免疫性炎症性肠病),坏疽性脓皮病,结节性红斑,原发性硬化胆管炎,粘膜炎),呼吸窘迫综合征,包括成人或急性呼吸窘迫综合征(ARDS),脑膜炎,全部或部分葡萄膜炎,虹膜炎,脉络膜炎,自身免疫性血液病,类风湿性脊椎炎,突发性听力丧失,IgE介导的疾病,如过敏反应和过敏性和特应性鼻炎,脑炎如拉斯穆森氏脑炎和边缘和/或脑干脑炎,葡萄膜炎,如前葡萄膜炎,急性前葡萄膜炎,肉芽肿性葡萄膜炎,非肉芽肿性葡萄膜炎,超声葡萄膜炎,后葡萄膜炎或自身免疫性葡萄膜炎,肾小球肾炎(GN)伴或不伴肾病综合征等慢性或急性肾小球肾炎,如原发性GN,免疫介导的GN,膜性GN(膜性肾病),特发性膜性GN或特发性膜性肾病,膜性或膜性增殖性GN(MPGN),包括I型和II型,以及快速进展GN,过敏性疾病,过敏反应,湿疹包括过敏性或异位性湿疹,哮喘等哮喘支气管炎,支气管哮喘和自身免疫性哮喘,T细胞浸润和慢性炎症反应,慢性肺部炎症,自身免疫性心肌炎,白细胞粘附缺陷,系统性红斑狼疮(SLE)或系统性红斑狼疮如皮肤SLE,亚急性皮肤红斑狼疮,新生儿狼疮综合征(NLE),红斑狼疮,狼疮(包括肾炎,脑炎,小儿,非肾,肾外,盘状,秃发),青少年发病(I型)糖尿病,包括小儿胰岛素依赖型糖尿病(IDDM),成人型糖尿病(II型糖尿病),自身免疫性糖尿病,特发性尿崩症,与细胞因子和T淋巴细胞介导的急性和迟发性超敏反应相关的免疫反应,结核,结节病,包括淋巴瘤样在内的肉芽肿肉芽肿病,韦格纳肉芽肿病,粒细胞缺乏症,血管炎,包括血管炎(包括大血管炎(包括风湿性多肌痛和巨细胞(Takayasu)动脉炎),中血管炎(包括川崎病和结节性多动脉炎),显微镜下多动脉炎,中枢神经系统血管炎,坏死性,皮肤或过敏性血管炎,全身性坏死性血管炎,以及ANCA相关性血管炎,如Churg-Strauss血管炎或综合征(CSS)),颞动脉炎,再生障碍性贫血,自身免疫性再生障碍性贫血,Coombs阳性贫血,Diamond Blackfan贫血,溶血性贫血或免疫性溶血性贫血,包括自身免疫性溶血性贫血(AIHA),恶性贫血(恶性贫血),艾迪生病,纯红细胞贫血或发育不全(PRCA),因子VIII缺乏症,血友病A,自身免疫性中性粒细胞减少症,全血细胞减少症,白细胞减少症,白细胞减少症,中枢神经系统炎症性疾病,继发于败血症,创伤或出血等的多器官损害综合征,抗原-抗体复合物介导的疾病,抗肾小球基底

膜疾病,抗磷脂抗体综合征,过敏性神经炎,Bechet或Behcet病,Castleman综合征,Goodpasture综合征,Reynaud综合征,干燥综合征,史蒂文斯-约翰逊综合征,类天疱疮类天疱疮和皮肤类天疱疮天疱疮,天疱疮(包括寻常型天疱疮,落叶性天疱疮,天疱疮粘膜-类天疱疮和天疱疮),自身免疫性多内分泌病,瑞特氏病或综合征,免疫复合性肾炎,抗体介导的肾炎,视神经脊髓炎,多发性神经病,慢性神经病如IgM多发性神经病或IgM-介导的神经病变,血小板减少症(由心肌梗塞患者开发),包括血栓性血小板减少性紫癜(TTP)和自身免疫或免疫介导的血小板减少症,如特发性血小板减少性紫癜(ITP),包括慢性或急性ITP,睾丸自身免疫性疾病和卵巢包括自身免疫睾丸炎和卵巢炎,原发性甲状腺功能减退症,甲状旁腺功能减退症,自身免疫性内分泌疾病,如甲状腺炎,如自身免疫性甲状腺炎,桥本氏病,慢性甲状腺炎(桥本甲状腺炎),或亚急性甲状腺炎,自身免疫性甲状腺疾病,特发性甲状腺功能减退症,格雷夫氏病,多发性综合征,如自身免疫性多腺体综合征(或多腺内分泌综合征),副肿瘤综合征,包括神经性副肿瘤综合征,如Lambert-Eaton肌无力综合征或Eaton-Lambert综合征,僵硬或僵硬综合征,脑脊髓炎,如过敏性脑脊髓炎或过敏性脑脊髓炎和实验性过敏性脑脊髓炎(EAE),重症肌无力,如胸腺瘤相关性重症肌无力,小脑变性,神经肌张力障碍,蛇床子炎或肌阵挛综合征(OMS),感觉神经病变,多灶性运动神经病变,Sheehan综合征,自身免疫性肝炎,慢性肝炎,狼疮性肝炎,巨细胞性肝炎,慢性活动性肝炎或自身免疫性慢性活动性肝炎,淋巴性间质性肺炎,闭塞性细支气管炎(非移植)vs NSIP,格林-巴利综合征,伯格氏病(IgA肾病),特发性IgA肾病,线性IgA皮肤病,原发性胆汁性肝硬化,肺炎,自身免疫性肠病综合征,腹腔疾病,腹腔疾病,乳糜泻(麸质肠病),难治性口炎性腹泻,特发性口炎性腹泻,冷球蛋白血症,肌萎缩侧索硬化症(ALS;Lou Gehrig病),冠状动脉疾病,自身免疫性耳疾病如自身免疫性内耳病(AIED),自身免疫性听力丧失,斜视眼阵挛肌阵挛综合征(OMS),多软骨炎如难治性或复发性多软骨炎,肺泡蛋白沉积症,淀粉样变性,巩膜炎,非癌性淋巴细胞增多症,一种原发性淋巴细胞增多症,包括单克隆B细胞淋巴细胞增多症(如良性单克隆丙种球蛋白病和重要性未定的单克隆性丙种球蛋白病,MGUS),周围神经病变,副肿瘤综合征,癫痫,偏头痛,心律失常,肌肉疾病,耳聋,失明等蛔虫病,CNS,自闭症,炎性肌病,局灶性节段性肾小球硬化症(FSGS),内分泌眼病,葡萄膜视网膜炎,脉络膜视网膜炎,自身免疫性肝病,纤维肌痛,多发性内分泌失调,施密特综合征,肾上腺炎,胃萎缩,老年前期痴呆,周期性麻痹和通道病,脱髓鞘疾病等自身免疫性脱髓鞘疾病,糖尿病肾病,Dressler综合征,斑秃,CREST综合征(钙质沉着症,雷诺氏现象,食管运动障碍,硬化性和毛细血管扩张症),男性和女性自身免疫性不孕症,混合性结缔组织病,恰加斯病,风湿热,反复流产,农民肺,多形性红斑,心脏切开后综合征,库欣综合征,鸟类肺癌,过敏性肉芽肿性血管炎,良性淋巴细胞性血管炎,Alport综合征,过敏性肺炎和纤维性肺炎等肺炎,间质性肺病,输血反应,麻风病,疟疾,利什曼病,kypanosomiasis,血吸虫病,蛔虫病,曲霉病,Sampter综合征,Caplan综合征,登革热,心内膜炎,心内膜心肌纤维化,弥漫性间质性肺纤维化,间质性肺纤维化,特发性肺纤维化,囊性纤维化,眼内炎,持久性隆起性红斑,胎儿成红细胞增多症,嗜酸性粒细胞性腹膜炎,舒尔曼综合征,Felty综合征,萎缩,慢性周期炎,异时性周期炎,虹膜睫状体炎或Fuch's cyclitis, Henoch-Schonlein紫癜,人类免疫缺陷病毒(HIV)感染,埃可病毒感染,心肌病,阿尔茨海默病,细小病毒感染,风疹病毒感染,接种后综合征,先天性风疹感染,Epstein-Barr病毒感染,腮腺炎,Evan综合征,自身免疫性

腺功能衰竭, Sydenham舞蹈病, 链球菌感染后肾炎, 血栓性溃疡, 甲状腺毒症, 背痛, 绒毛膜炎, 巨细胞多肌痛, 内分泌性眼病, 慢性过敏性肺炎, 干燥性角膜结膜炎, 流行性角膜结膜炎, 特发性肾病综合征, 微小病变肾病, 良性家族性和缺血再灌注损伤, 视网膜自身免疫, 关节炎, 支气管炎, 慢性阻塞性气道疾病, 矽肺病, 口疮, 口疮性口炎, 动脉硬化性疾病, 精子异常, 自身免疫性溶血, Boeck病, 冷球蛋白血症, Dupuytren挛缩, 眼球内陷性嗜铬细胞瘤, 过敏性肠炎, 结节性红斑, 特发性面瘫, 慢性疲劳综合征, 风湿性疟疾, Hamman-Rich病, 感觉性耳聋, 血红蛋白尿症, 性腺功能低下症, 区域性回肠炎, 白细胞减少症, 单核细胞增多症, 横贯性脊髓炎, 原发性特发性粘液性水肿, 肾病, 眼炎症, 睾丸炎性肉芽肿, 胰腺炎, 多发性神经根炎, 坏疽性脓皮病, Quervain甲状腺炎, 后天性萎缩, 抗精子抗体引起的不孕症, 非恶性胸腺瘤, 白癜风, SCID和爱泼斯坦-巴尔病毒相关疾病, 获得性免疫缺陷综合征(艾滋病), 寄生虫病如利什曼原虫, 中毒性休克综合征, 食物中毒, 涉及T细胞浸润的病症, 白细胞粘附缺陷, 免疫反应相关无细胞因子和T淋巴细胞介导的急性和迟发性超敏反应, 涉及白细胞渗漏, 多器官损伤综合征, 抗原-抗体复合物介导的疾病, 抗肾小球基底膜疾病, 过敏性神经炎, 自身免疫性多内分泌病, 卵巢炎, 原发性粘液性水肿, 自身免疫性萎缩性胃炎, 交感性眼炎, 风湿性疾病, 混合性结缔组织病, 肾病综合征, 胰岛炎, 多发性内分泌失败, 周围神经病变, I型自身免疫性多腺综合征, 成人特发性甲状旁腺功能减退症(AOIH), 秃头症, 扩张型心肌病, 大疱性表皮(EBA), 血色病, 心肌炎, 肾病综合征, 原发性硬化性胆管炎, 化脓性或非脓性鼻窦炎, 急性或慢性鼻窦炎, 筛窦, 额叶, 上颌骨或蝶窦炎, 嗜酸性粒细胞相关疾病, 如嗜酸粒细胞增多, 肺浸润嗜酸性粒细胞增多, 嗜酸粒细胞增多症-肌痛综合征, 的Löffler综合征, 慢性嗜酸性粒细胞性肺炎, 热带肺嗜酸性粒细胞增多症, 支气管肺炎曲霉菌病, 曲霉菌病或含嗜酸性粒细胞的肉芽肿, 过敏反应, 血清阴性脊柱关节炎, 多发性内分泌自身免疫性疾病, 硬化性胆管炎, 巩膜, 巩膜外层, 慢性粘膜皮肤念珠菌病, 布鲁顿综合征, 婴儿短暂性低丙种球蛋白血症, 维斯科特-Aldrich综合征, 共济失调性毛细血管扩张症, 与胶原病相关的自身免疫性疾病, 风湿病, 神经系统疾病, 缺血性再灌注障碍, 血压反应降低, 血管功能障碍, 抗癫痫, 组织损伤, 心血管缺血, 痛觉过敏, 脑缺血和伴随疾病血管化, 过敏性过敏症, 肾小球肾炎, 再灌注损伤, 心肌或其他组织的再灌注损伤, 急性炎症性组织的皮肤病, 急性化脓性脑膜炎或其他中枢神经系统炎症性疾病眼, 眼眶炎性疾病, 粒细胞输血相关综合征, 细胞因子诱导的毒性, 急性严重炎症, 慢性顽固性炎症, 肾盂炎, 肺炎, 糖尿病视网膜病变, 糖尿病大动脉疾病, 动脉内增生, 消化性溃疡, 瓣膜炎和子宫内膜异位症。

[0313] 除治疗用途外, 本文所述的双特异性抗体可用于其他目的, 包括诊断方法, 例如本文所述疾病和病症的诊断方法。

[0314] 剂量, 制剂和持续时间

[0315] 本文公开的双特异性抗体将以符合良好医学实践的方式配制, 给药和施用。在这种情况下考虑的因素包括所治疗的特定疾病, 所治疗的特定哺乳动物, 个体受试者的临床状况, 疾病的原因, 药剂的递送部位, 给药方法, 给药方案, 以及医生所知的其他因素。待施用的抗体的“治疗有效量”将受这些考虑因素控制, 并且是预防, 改善或治疗特定病症(例如, 癌症, 过敏性或炎性病症或自身免疫病症)所需的最小量。抗体不必是, 但任选地, 与一种或多种目前用于预防或治疗该病症的药剂一起配制。这些其他药剂的有效量取决于制剂中存在的蛋白质的量, 病症或治疗的类型, 以及上面讨论的其他因素。它们通常以与上文所

用相同的剂量和给药途径使用,或者约为迄今使用的剂量的1-99%。通常,减轻或治疗癌症涉及减轻与癌症相关的一种或多种症状或医学问题。治疗有效量的药物可以达到以下中的一种或组合:减少(减少至少10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,100%或更多)癌细胞的数量;减少或抑制肿瘤大小或肿瘤负担;抑制(即,减少到一定程度和/或停止)癌细胞浸润到外周器官中;减少腺瘤的激素分泌;降低血管密度;抑制肿瘤转移;减少或抑制肿瘤生长;和/或在一定程度上缓解与癌症相关的一种或多种症状。在一些实施方式中,蛋白质用于预防受试者中癌症或自身免疫病症的发生或复发。

[0316] 在某些实施方式中,所公开的双特异性抗体可用于增加易患或诊断患有癌症或自身免疫疾病的人受试者的存活持续时间。存活期限定义为从首次给药到死亡的时间。存活持续时间还可以通过治疗组与对照组的分层风险比(HR)来测量,其代表治疗期间受试者的死亡风险。

[0317] 在某些实施方式中,本文公开的双特异性抗体的治疗显著增加用各种抗癌疗法治疗的易感或诊断患有癌症的人受试者组的应答率。响应率定义为对治疗有反应的治疗受试者的百分比。在某些实施方式中,与单独使用手术,放射疗法或化学疗法的组相比,使用本文所述的双特异性抗体和手术,放射疗法或一种或多种化学治疗剂的组合治疗显著增加治疗的受试者组的应答率,增加具有小于0.005的卡方p值。在美国专利申请公开号20050186208中描述了治疗癌症的治疗功效的其他测量。

[0318] 使用本领域已知的标准方法,通过将具有期望纯度的活性成分与任选的生理学上可接受的载体,赋形剂或稳定剂混合来制备治疗制剂(Remington's Pharmaceutical Sciences (20th edition), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA)。可接受的载体,包括盐水,或缓冲剂,如磷酸盐,柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白,明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物如聚乙烯吡咯烷酮,氨基酸如甘氨酸,谷氨酰胺,天冬酰胺,精氨酸或赖氨酸;单糖,二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖,甘露糖或糊精;螯合剂如EDTA;糖醇如甘露醇或山梨糖醇;成盐抗衡离子如钠;和/或非离子表面活性剂,例如TWEENTM, PLURONICSTM或PEG。

[0319] 在某些实施方式中,制剂含有药学上可接受的盐,优选氯化钠,并且优选为约生理浓度。在某些实施方式中,本发明的制剂含有药学上可接受的防腐剂。在某些实施方式中,防腐剂浓度范围为0.1至2.0%,通常为v/v。合适的防腐剂包括制药领域中已知的那些。在某些实施方式中,防腐剂是苯甲醇,对苯二酚,间甲酚,对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯。任选地,本发明的制剂可包含浓度为0.005至0.02%的药学上可接受的表面活性剂。

[0320] 在某些实施方式中,制剂含有当所治疗的特定适应症所必要时一种以上的活性化合物,优选那些具有互补活性而不会相互产生不利影响的活性化合物。这些分子合适地以对预期目的有效的量组合存在。

[0321] 在某些实施方式中,将活性成分包埋在微囊中,例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备,例如,分别在胶体药物递送系统中或粗乳液中的羟甲基纤维素或明胶-微囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微囊(例如,脂质体,白蛋白微球,微乳,纳米颗粒和纳米囊剂)。这些技术在Remington's Pharmaceutical Sciences,同上中公开。

[0322] 在某些实施方式中,制备缓释制剂。缓释制剂的合适实例包括含有异多聚体蛋白

质的固体疏水聚合物的半透性基质,该基质是成型制品的形式,例如薄膜或微囊。缓释基质的实例包括聚酯,水凝胶(例如,聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯),或聚(乙烯醇)),聚交酯(美国专利号3,773,919),L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸酯的共聚物,不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯,可降解的乳酸-乙醇酸共聚物,如LUPRONDEPOTTM(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射微球)和po-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然诸如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸的聚合物使得分子能够释放超过100天,但某些水凝胶释放蛋白质的时间较短。当包封的异多聚体蛋白质在体内长时间保留时,它们可能由于暴露于37℃的水分而变性或聚集,导致生物活性的丧失和免疫原性的可能变化。可以设计合理的策略来稳定所涉及的机制。例如,如果发现聚集机理是通过硫代-二硫化物交换形成分子间S-S键,则可以通过改变巯基残基,从酸性溶液冻干,控制水分含量,使用适当的添加剂,和开发特定的聚合物基质组合物来实现稳定化。

[0323] 本文所述的双特异性抗体根据已知方法施用于人受试者,例如作为推注静脉内施用或通过连续输注一段时间,通过肌肉内,腹膜内,脑脊髓内,皮下,关节内,滑膜内,鞘内,口服,局部或吸入途径。如果广泛的副作用或毒性与对蛋白质识别的靶分子的拮抗作用相关,则局部施用可以是特别期望的。离体策略也可以用于治疗性应用。离体策略包括用编码本发明蛋白质的多核苷酸转染或转导从受试者获得的细胞。然后将转染或转导的细胞返回受试者。细胞可以是广泛类型中的任何一种,包括但不限于造血细胞(例如,骨髓细胞,巨噬细胞,单核细胞,树突细胞,T细胞或B细胞),成纤维细胞,上皮细胞,内皮细胞,角质细胞,或肌肉细胞。

[0324] 在某些实施方式中,当肿瘤的病症或位置允许时,局部施用双特异性抗体,例如直接注射,并且可以定期重复注射。在某些实施方式中,在手术切除肿瘤后,将双特异性抗体全身递送至受试者或直接递送至肿瘤细胞,例如递送至肿瘤或肿瘤床,以预防或减少局部复发或转移。

[0325] 制品

[0326] 本文描述了含有一种或多种双特异性抗体的制品以及可用于治疗或诊断病症(例如,自身免疫疾病或癌症)的材料。该制品包括容器和在容器上或与容器相关的标签或包装说明书。合适的容器包括例如瓶,小瓶,注射器等。容器可以由多种材料形成,例如玻璃或塑料。容器容纳有效治疗病症的组合物,并且可具有无菌入口(例如,容器可以是静脉内溶液袋或具有可由皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。组合物中的至少一种活性剂是如本文所述的双特异性抗体。标签或包装说明书表明该组合物用于治疗特定病症。标签或包装说明书还包括用于向受试者施用异多聚体蛋白质组合物的说明书。还考虑了包含本文所述的组合疗法的制品和试剂盒。

[0327] 包装说明书是指通常包括在治疗产品的商业包装中的说明书,其包含关于使用这些治疗产品的适应症,用法,剂量,给药,禁忌症和/或警告的信息。在某些实施方式中,包装说明书表明该组合物用于治疗乳腺癌,结直肠癌,肺癌,肾细胞癌,神经胶质瘤或卵巢癌。

[0328] 在某些实施方式中,制品还包含第二容器,其包含药学上可接受的缓冲液,例如注射用细菌注射用水(BWFI),磷酸盐缓冲盐水,林格氏溶液和右旋糖溶液。它还可以包括从商业和用户角度考虑的其他材料,包括其他缓冲剂,稀释剂,过滤器,针头和注射器。

[0329] 还提供了可用于各种目的的试剂盒,例如用于从细胞中纯化或免疫沉淀抗原(例

如,HER2或EGFR)。为了分离和纯化抗原(例如,HER2或EGFR),试剂盒可以含有与珠(例如,琼脂糖珠)偶联的双特异性抗体(例如,EGFR HER2抗体)。在某些实施方式中,试剂盒含有双特异性抗体,用于体外检测和定量抗原,例如,在ELISA或Western印迹中。与制品一样,试剂盒包括容器和在容器上或与容器相关的标签或包装说明书。所述容器保持包含至少一种本发明的异多聚体蛋白质(例如,多特异性抗体或抗体片段)的组合物。可以包括另外的容器,其包含例如稀释剂和缓冲剂或对照抗体。标签或包装说明书可提供组合物的描述以及预期的体外或诊断用途的说明。

[0330] 实施例

[0331] 材料和方法

[0332] 定点诱变和DNA制备:

[0333] 所有mAb序列均获自USPTO,RCSB(Protein Data Bank)和IMGT(国际ImMunoGeneTics信息系统),如表1所示,并在DNA2.0合成。使用Quick Change II XL(Agilent Technologies)进行定点诱变。使用PureLink HiPure Maxiprep Kit(Life Technologies)扩增序列验证的质粒。

[0334] 表1

[0335]

单抗	资源	登录/URL
利妥昔单抗	RCSB	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2OSL
GA101	RCSB	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3PP4
贝伐单抗	IMGT	http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/details.cgi?pdbcode=8017

[0336]

Nivolumab	USPTO	美国专利第 8,008,449 号
帕妥珠单抗	RCSB	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1S78
DL11	RCSB	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3P11

[0337] 抗体的表达和纯化:

[0338] 通过用聚乙烯亚胺(PEI)瞬时转染在Freestyle 293细胞中表达抗体,并通过蛋白A层析纯化。使用HiPrep Sephacryl S-100HR柱(GE Healthcare)通过凝胶过滤另外纯化双特异性抗体。

[0339] 分析型阳离子交换:

[0340] 使用Agilent 1200系统和WCX-NP5 4.6x250mm(Sepax)阳离子交换柱进行分析型阳离子交换色谱。将抗体加载到pH=6.0的20mM磷酸钠中,并使用20-200mM NaCl的梯度洗脱,并使用280nm处的在线吸光度进行检测。

[0341] 非还原考马斯凝胶:

[0342] 使用NuPAGE Novex 4-12%Bis-Tris Protein Gels (Invitrogen), 使用XCell SureLock Mini室分离纯化的抗体。用SimplyBlue SafeStain (Invitrogen) 使条带显色。

[0343] 酶联免疫吸附试验:

[0344] 在培养物上清液中的IgG的定量: 简言之, 在4℃下用MsαHu IgG (abcam) 涂覆96孔板过夜。洗涤板并用5%blotto (Santa Cruz Biotechnologies) 封闭。将培养上清液和人IgG标准品 (Invitrogen) 的稀释液加入板中并在室温下温育2小时。使用DkαHu IgG HRP缀合二抗 (Jackson Immuno Research), 然后添加TMB底物 (KPL), 检测结合的IgG。

[0345] 单抗原ELISA: 简言之, 在4℃下用合适的抗原涂覆96孔板过夜。洗涤板并用1%blotto (Santa Cruz Biotechnologies) 封闭。将抗体的系列稀释液加入板中并在室温下温育2小时。使用RbαHu IgG HRP缀合二抗 (Jackson Immuno Research), 然后添加TMB底物 (KPL), 检测抗原结合的IgG。

[0346] 双抗原ELISA: 简言之, 在4℃下用适当的抗原涂覆96孔板过夜。洗涤板并用1%blotto (Santa Cruz Biotechnologies) 封闭。将抗体的连续稀释液加入板中并在室温下温育2小时。洗涤后, 将第二抗原加入板中并在室温下温育2小时。使用合适的HRP缀合抗体, 然后添加TMB底物 (KPL), 检测第二抗原。该测定仅检测同时结合两种抗原的双特异性抗体。

[0347] 原生质谱:

[0348] 抗体在37℃下与PngaseF (New England Biolabs) 一起温育24小时。通过蛋白A亲和纯化去糖基化抗体。将样品加载到ProSwift RP-10R柱 (Thermo Scientific) 上, 并使用QExactive Orbitrap (Thermo Scientific) 进行分析。使用Protein Deconvolution Software (Thermo Scientific) 对数据进行解卷积。

[0349] 动态光散射:

[0350] 使用DynaPro NanoStar Light Scatterer (Wyatt Technology Corporation) 评估抗体的溶液相聚集。

[0351] 圆二色性热熔融:

[0352] 通过在218nm波长处, 40-90℃, 加热速率为1℃/min, 在202型圆二色性光谱仪 (Aviv biomedical inc.) 上测量温度依赖性圆二色性而监测热去折叠。

[0353] 基于细胞的结合测定:

[0354] Raji细胞 (ATCC®CCL-86™) 从培养液收集, 洗涤, 并在PBS中的1%BSA中在4℃下封闭1小时。洗涤的细胞在4℃下与不同浓度的抗体构建体一起温育1小时。洗涤的细胞在4℃下与PerCP-Cy5.5MsαHuCD19 (BD Pharmingen) 和AF647-缀合的AffiniPure F(ab')₂Fragment DkαHu IgG (Jackson ImmunoResearch) 的混合物一起温育1小时。洗涤的细胞悬浮在DAPI溶液中, 并在LSRFortessa (BD Biosciences) 上进行分析, 使用FACSDIVA软件 (BD Biosciences) 处理数据。

[0355] 细胞凋亡测定:

[0356] Daudi细胞 (ATCC®CCL-213™) 与10μg/ml的抗体构建体一起在24孔板中温育20小时, 在37℃/5%CO₂下静止。赫赛汀用作同种型对照。收获细胞并使用Molecular Probes Alexa Fluor 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Life Technologies) 处理。在LSRFortessa (BD Biosciences) 上分析样品, 使用FACSDIVA软件 (BD Biosciences) 处理数

据。

[0357] 补体依赖性细胞毒性

[0358] 将WIL2-S细胞(ATCC®CRL-885™)接种在96孔板中。添加抗体的系列稀释,接着是Rabbit Complement (Cedarlane Biolabs),并在37℃下温育2小时。添加Alamar Blue (Invitrogen),并使在37℃下显色16小时。荧光使用Spectramax M5^e (Molecular Devices)测量,在530nm处激发和在590nm处发射。

[0359] 抗体依赖性细胞毒性

[0360] 抗体依赖性细胞毒性使用ADCC Reporter Bioassay Kit (Promega) 定量,使用Spectramax M5^e (Molecular Devices) 测量发光。

[0361] 实施例1:鉴定用于双特异性抗体平台工程化的残基并测试突变

[0362] 为了确定哪些突变促进双特异性抗体的异二聚化并且可以用于产生具有任何感兴趣的母体单特异性抗体的可变重区和可变轻区的双特异性抗体,分析了人野生型IgG1的恒定区内的残基。鉴定了CH1,CL1和CH3区内对形成异二聚体重要的个体残基。通过首先分析界面残基,掩埋表面积以及恒定区的物理化学性质和几何形状来鉴定这些残基。

[0363] 分析每种残基的结构原理并用于产生氨基酸置换的组合。鉴定了CH1和CL界面中的突变组合。为了确定会在保留同源IgG表达的同时防止错配的组合,使用了两种人野生型IgG1抗体(DL11表示为“mAb1”,帕妥珠单抗表示为“mAb2”)。对于每种组合,产生原子间相互作用网络以确定组合的影响(参见例如Robinson LN等,Cell.2015年7月30日;162(3):493-504)。如果预测组合具有期望的效果(即,产生期望的双特异性种类),则通过实验测试组合。mAb1由CL'和CH1'组成,而mAb2由CL"和CH1"组成。在这些区域中进行的突变分别在表2的第1,3,4和6列中确定。在链上作出突变并作为具有正确轻链或错配轻链的单特异性抗体转染。具有同源重-轻配对的IgG(称为同源IgG)和错配重-轻链(称为错配IgG)的IgG以全长形式表达,其表达水平通过IgG ELISA定量,并表示为相对于相应WT抗体的百分比。表2第2列和第5列分别显示同源IgG,CL'-CH1'和CL"-CH1"的相对表达。表2第7列和第8列分别显示错配IgG,CL"-CH1'和CL'-CH1"的相对表达。选择CL'中的123D和136D,CH1'中的133V和150A,CL"中的123K,136K和177A,以及CH1"中的152D,173D和188W的组合用于进一步测试。

[0364] 表2

[0365]

正确组装的 mAb1			正确组装的 mAb2			错配	
mAb1			mAb2				
CL'	表达% (CL'-CH1' IgG/WT mAb1)	CH1'	CL"	表达% (CL"-CH1" IgG/WT mAb1)	CH1"	表达% (CL"-CH1' 错配 IgG/WT 错配 IgG)	表达% (CL'-CH1" 错配 IgG/WT 错配 IgG)
123D	73%	WT	123K,	84%	152D	47%	37%

[0366]

, 136D			136K		, 173D		
123D , 136D	87%	133 V, 150 A	123K, 136K, 117A	63%	152D , 173D , 188W	0%	48%
123D , 132W , 136D	43%	133 V, 150 A	123K, 136K, 117A	57%	152D , 173D , 188W	0%	23%
1	2	3	4	5	6	7	8

[0367] 然后通过分析氨基酸相互作用网络鉴定CH3突变的组合。在DL11抗体中测试了在CH3'中鉴定的E357K和K409突变。通过在凝胶上跑纯化抗体并使用考马斯染色,测试该突变迫使形成半抗体种类的能力并与纽-扣突变(T366W(纽);T366S,L368A,Y407V(扣))进行比较。图2A显示CH3突变(泳道6)形成与纽-扣突变(泳道4和5)相当的完整且半抗体的种类。为了确定哪些突变组合会仅产生完整的异二聚体抗体,将含有E357K和K409突变的CH3'与几种具有各种突变的CH3"结构域组合(图2B)。CH3"中的K370E突变减少了半抗体片段的形成(泳道7),而L368E(泳道6)和D356K(泳道5)突变没有。CH3'中的E357K和K409与CH3"中的K370E的组合将半抗体片段的形成减少至与纽-扣突变(泳道3)相同的水平,表明这种新型组合可用于有效地形成CH3异二聚体。

[0368] 选择用于实施例2,3和4中的进一步测试的突变组合示于表3中。

[0369] 表3

[0370]

抗体	CH1 突变	CL 突变	CH3 突变
<i>mAb</i> <i>1</i>	L133V, L150A	Q123D, N136D	K370E 或 E357K 和 K409R
<i>mAb</i> <i>2</i>	K152D, H173D, S188W	Q123K, N136K, T177A	E357K 和 K409R 或 K370E

[0371] 实施例2:靶向HER2和EGFR/HER3的双特异性抗体

[0372] 基于帕妥珠单抗(抗HER2;Genentech;CAS号:380610-27-5)和DL11(抗EGFR/HER3;也称为MEHD7945A;Genentech;W02010/108127)的序列产生双特异性抗体。表4显示双特异性抗体的CL,CH1和CH3中的突变组合。

[0373] 表4

[0374]

抗体	CH1 突变	CL 突变	CH3 突变
帕妥珠单抗	L133V, L150A	Q123D, N136D	E357K, K409R
DL11	K152D, H173D, S188W	Q123K, N136K, T177A	K370E

[0375] 帕妥珠单抗/DL11双特异性抗体的氨基酸序列列于表8中。具体地,具有表4中所示突变的用于帕妥珠单抗的SEQ ID NO:15和16(分别为轻链和重链),和具有表4中所示突变的用于DL11的SEQ ID NO:17和18(分别为轻链和重链)。为了确定当组合四种抗体链时这些突变是否产生双特异性抗体,使用阳离子交换层析来比较没有突变的链(图3A)和具有表4中所述突变的链(图3B)之间的差异。图3A显示了许多峰,表明产生了许多种类。相比之下,图3B显示了画圈的单个主要峰,表明产生了一种双特异性抗体种类。这个峰被洗脱和纯化。通过原生质谱分析纯化抗体,其显示对应于双特异性抗体的期望分子量的单个主峰(图4)。

[0376] 通过ELISA分析纯化双特异性抗体(“P/D”)对HER1,HER2和HER3的结合特征(图5A-5C)。HER1和HER3被P/D和DL11两者结合,但不被帕妥珠单抗结合(图5A和5C)。HER2被P/D和帕妥珠单抗两者结合,但不被DL11结合。(图5B)。使用4参数拟合确定Kd' 值,并显示在表5中。

[0377] 表5

[0378]

抗体	HER1 (Kd')	HER2 (Kd')	HER3 (Kd')
帕妥珠单抗WT	N/A	103.3pM	N/A
DL11WT	41.52pM	N/A	48.44
P/D双特异性	89.76pM	124.48pM	89.76pM

[0379] 这些结果表明双特异性抗体结合被单特异性母体抗体靶向的相同抗原。

[0380] 双特异性抗体(例如,P/D)的期望特征是同时结合两种不同抗原的能力。夹心ELISA用于测定帕妥珠单抗/DL11双特异性抗体与HER1和HER2的结合。将HER1抗原涂覆在平板上,然后是双特异性抗体。然后加入HER2并检测HER2抗原。图6A显示P/D双特异性抗体与HER1和HER2两者结合,而母体抗体则不。为了测试与HER2和HER3的结合,首先在板上涂覆HER3抗原,然后是双特异性抗体。然后加入HER2并检测HER2抗原。图6B显示P/D双特异性抗体与HER2和HER3两者结合,而母体抗体则不。这些结果表明,双特异性抗体同时结合两种不同的抗原,HER1和HER2,或HER3和HER2。

[0381] 实施例3:结合CD20上的不同表位的双特异性抗体

[0382] 基于利妥昔单抗(Genentech;Cas号:174722-31-7)和obinutuzumab(也称为Ga101;Genentech;Cas号:949142-50-1)两种抗CD20抗体的序列产生双特异性抗体。表6显示了双特异性抗体中的突变。

[0383] 表6

[0384]

抗体	CH1 突变	CL 突变	CH3 突变
利妥昔单抗	L133V, L150A	Q123D, N136D	K370E
Obinutuzumab	K152D, H173D, S188W	Q123K, N136K, T177A	E357K, K409R

[0385] 双特异性抗体 (“Rxm/Ga101”) 的氨基酸序列在表8中。具体地, 具有表6中所述突变的用于利妥昔单抗的SEQ ID NO:19和20 (分别为轻链和重链), 以及具有表6中所述突变的用于obinutuzumab的SEQ ID NO:21和22 (分别为轻链和重链)。图7显示使用原生质谱法产生的双特异性抗体的纯度, 其中仅存在一个主峰并且其具有IgG双特异性抗体的预期质量。圆二色性用于测试Rxm/Ga101双特异性抗体的热稳定性。发现抗体与母体单特异性抗体利妥昔单抗 (“Rxm”) 和obinutuzumab (“Ga101”) 一样稳定 (图8)。使用动态光散射测量聚集体的形成。该数据显示没有聚集体, 质量分布是对单体IgG1分子所预期的 (图9)。总之, 双特异性抗体的产量和生物物理特性与母体单特异性抗体的产量和生物物理特性或对IgG1所预期的相似。

[0386] 测试了Rxm/Ga101双特异性抗体的功能特征。由于两种单特异性抗体都结合CD20, 因此通过ELISA测量双特异性抗体与CD20的结合 (图10)。双特异性抗体与母体抗体类似地结合CD20。尽管Ga101和利妥昔单抗两者都结合CD20, 但它们诱导不同的作用机制。Ga101诱导细胞凋亡和补体依赖性细胞毒性 (CDC)。Rxm/Ga101双特异性抗体诱导细胞凋亡 (图11) 和CDC (图12) 至与Ga101相似的水平。此外, 利妥昔单抗和Ga101两者均诱导抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。Rxm/Ga101双特异性抗体诱导与母体抗体两者相似的ADCC (图13)。

[0387] 这些结果进一步证实恒定区的突变产生针对相同抗原CD20上的限定表位的双特异性抗体, 其与母体抗体类似地发挥功能。

[0388] 实施例4: 靶向PD1和VEGF的双特异性抗体

[0389] 基于nivolumab (抗-PD1; Bristol-Myers Squibb; Cas号: 946414-94-4) 和贝伐单抗 (抗-VEGF; Genentech; Cas号: 216974-75-3) 的序列, 产生针对具有不同生物学功能的两种不同抗原的双特异性抗体。表7显示了双特异性抗体中使用的突变。

[0390] 表7

[0391]

抗体	CH1 突变	CL 突变	CH3 突变
Nivolumab	L133V, L150A	Q123D, N136D	K370E
贝伐单抗	K152D, H173D, S188W	Q123K, N136K, T177A	E357K, K409R

[0392] 双特异性抗体的氨基酸序列如表8中所述。具体地, 具有表7中所述突变的用于nivolumab的SEQ ID NO:23和24 (分别为轻链和重链), 和具有表7中所述突变的用于贝伐单抗的SEQ ID NO:25和26 (分别为轻链和重链)。图14显示使用原生质谱产生的双特异性抗体的纯度, 其中仅存在一个主峰并且其具有预期质量。还通过圆二色性测试双特异性抗体 (“BsAb”) 的热稳定性, 其显示双特异性抗体 (BsAb) 与母体单特异性抗体一样稳定 (图15)。

使用动态光散射测量聚集体的形成。该数据显示没有聚集体,并且质量分布是对单体IgG1分子所预期的(图16)。总之,双特异性抗体的产量和生物物理特性与母体单特异性抗体的产量和生物物理特性或对IgG1所预期的相似。

[0393] 测试了双特异性抗体(BsAb)的功能特征。进行夹心ELISA以测试双特异性抗体(BsAb)与PD1和VEGF两者的结合(图17)。双特异性抗体(BsAb)能够结合单特异性母体抗体所靶向的这两种抗原。

[0394] 这些结果显示本文鉴定的CL,CH1和CH3结构域中的突变产生双特异性抗体,其保留两种母体抗体抗PD1和抗VEGF的功能。

[0395] 表8:序列表

[0396]

SEQ ID	描述	序列
--------	----	----

[0397]

NO		
1.	人 IgG1 重链	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHT CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
2	人 IgG1 轻链 (kappa)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSST LTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
3	人 IgG1 CH1 区	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
4	人 IgG1 CH3 区	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
5	人 IgG1 CL 区	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTL TLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
6	人 IgG1 CH1 区 L133V, L150A (CH1')	ASTKGPSVFVAPSSKSTSGGTAALGCAVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
7	人 IgG1 CH1 区 K152D, H173D, S188W (CH1'')	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVDDYFPEP VTVSWNSGALTSGVDTFPAVLQSSGLYSLWSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
8	人 IgG1 CH1 区 K152D, H173D (CH1'')	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVDDYFPEP VTVSWNSGALTSGVDTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
9	人 IgG1 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEDLKSGTASVVCLLDNFYPREA

[0398]

	区 Q123D, N136D (CL')	KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTL TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
10	人 IgG1 CL 区 Q123D, V132W, N136D (CL')	RTVAAPSVFIFPPSDE DL KSGTASV W C LL DN FYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSST LTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
11	人 IgG1 CL 区 Q123K, N136K, T177A (CL'')	RTVAAPSVFIFPPSDE KL KSGTASV V C LL KN FYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSAL TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
12	人 IgG1 CL 区 Q123K, N136K (CL'')	RTVAAPSVFIFPPSDE KL KSGTASV V C LL KN FYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTL TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
13	人 IgG1 CH3 区 K370E (CH3')	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVEGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
14	人 IgG1 CH3 区 E357K, K409R (CH3'')	GQPREPQVYTLPPSRD KL TKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SR LT DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
15	帕妥珠单抗 轻链 Q123D 和 N136D	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWY QQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDE DL KSGTASV V C LL DN FYPRE AK <u>VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTL</u> <u>LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
16	帕妥珠单抗 重链 L133V, L150A, E357K 和 K409R	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMD WVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFT LSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSF YFDYWGQGTLVTVSS AST KGPSVFPV APSS KSTSGG <u>TAALGCAVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV</u> <u>LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT</u> <u>KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP</u>

[0399]

		KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDKLTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
17	DL11 轻链 Q123K, N136K 和 T177A	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDLATDVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQSEPEPYTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEKLKSGTASVVCLLKNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSAL TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
18	DL11 重链 K152D, H173D, S188W 和 K370E	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSGDWIIH WVRQAPGKGLEWLGEISAAGGYTDYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARES RVSFE AAMDYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVDDYFPEPVT VSWNSGALTSGVDTFP AVLQSSGLYSLWSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
19	利妥昔单抗 轻链 Q123D 和 N136D	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQ KPGSSPKPWIYATSNLASGV PVRFSGSGSGTSYSLTI SRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGGTKLEIKRTV AAPS VFIFPPSDEDLKSGTASVVCLLDNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
20	利妥昔单抗 重链 L133V, L150A 和 K370E	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNM HWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKA TLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYG GDWYFNVWGAGTTVT VSAASTKGPSVFVPVAPSSKS TSGGTAALGCAVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ

[0400]

		DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
21	Obinutuzumab 轻链 Q123K, N136K 和 T177A	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYL YWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLSVSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEKLKSGTASVVCLLKNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSL SSALTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
22	Obinutuzumab 重链 K152D, H173D, S188W, E357K 和 K409R	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWIN WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVT ITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGY WL VYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVDDYFPEPVT VSWNSGALTSGVDTFPA VLQSSGLYSLWSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRD KLTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
23	Nivolumab 轻链 Q123D 和 N136D	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFT LTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEDLKSGTASVVCLLDNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSLSSLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
24	Nivolumab 重链 L133V, L150A 和 K370E	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMH WVRQAPGKGLEWVA VIWYDGSKRYYADSVKGRF TISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDY WGQGT LVT VSSASTKGPSVFVPVAPSSKSTSGGTAAL GCAVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS

[0401]

		RDELTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
25	贝伐单抗轻 链 Q123K, N136K 和 T177A	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWY QQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEKLKSGTASVVCLLKNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSALT LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
26	贝伐单抗重 链 K152D, H173D, S188W, E357K 和 K409R	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFT FSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHY GSSHWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVDDYFPEPVTVSWNSGALTSGV DTFPAVLQSSGLYSLWSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRD KL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYS R LTVDKS RWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

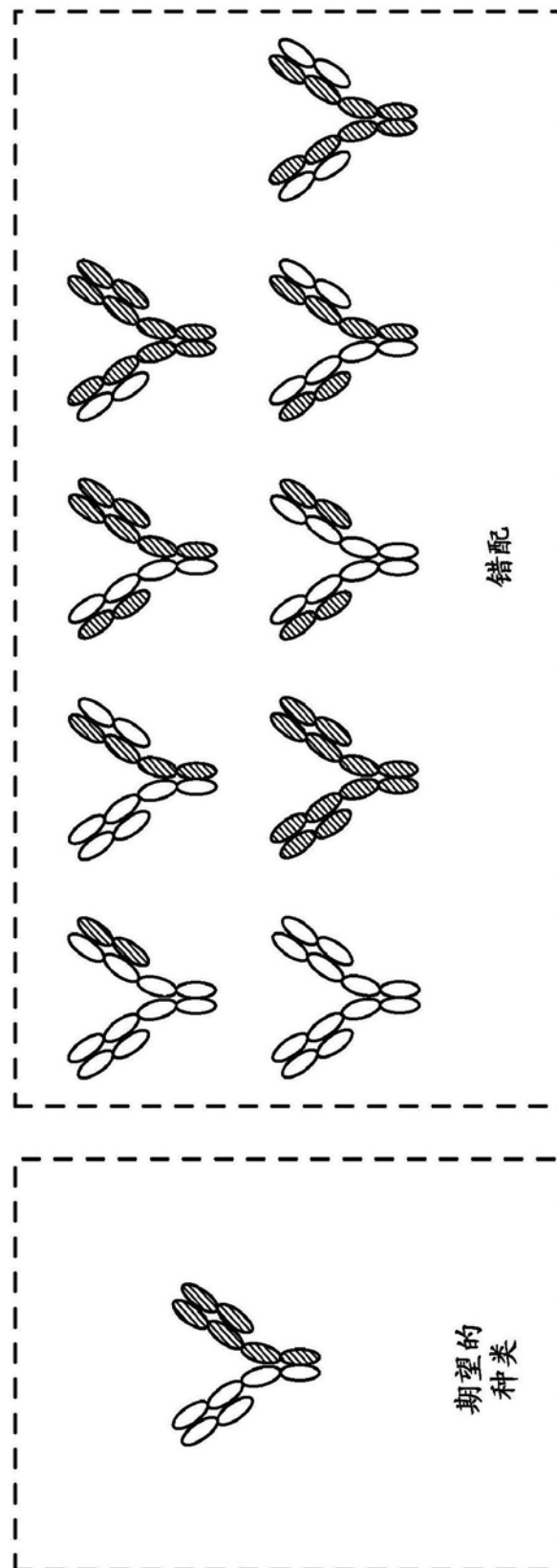


图1

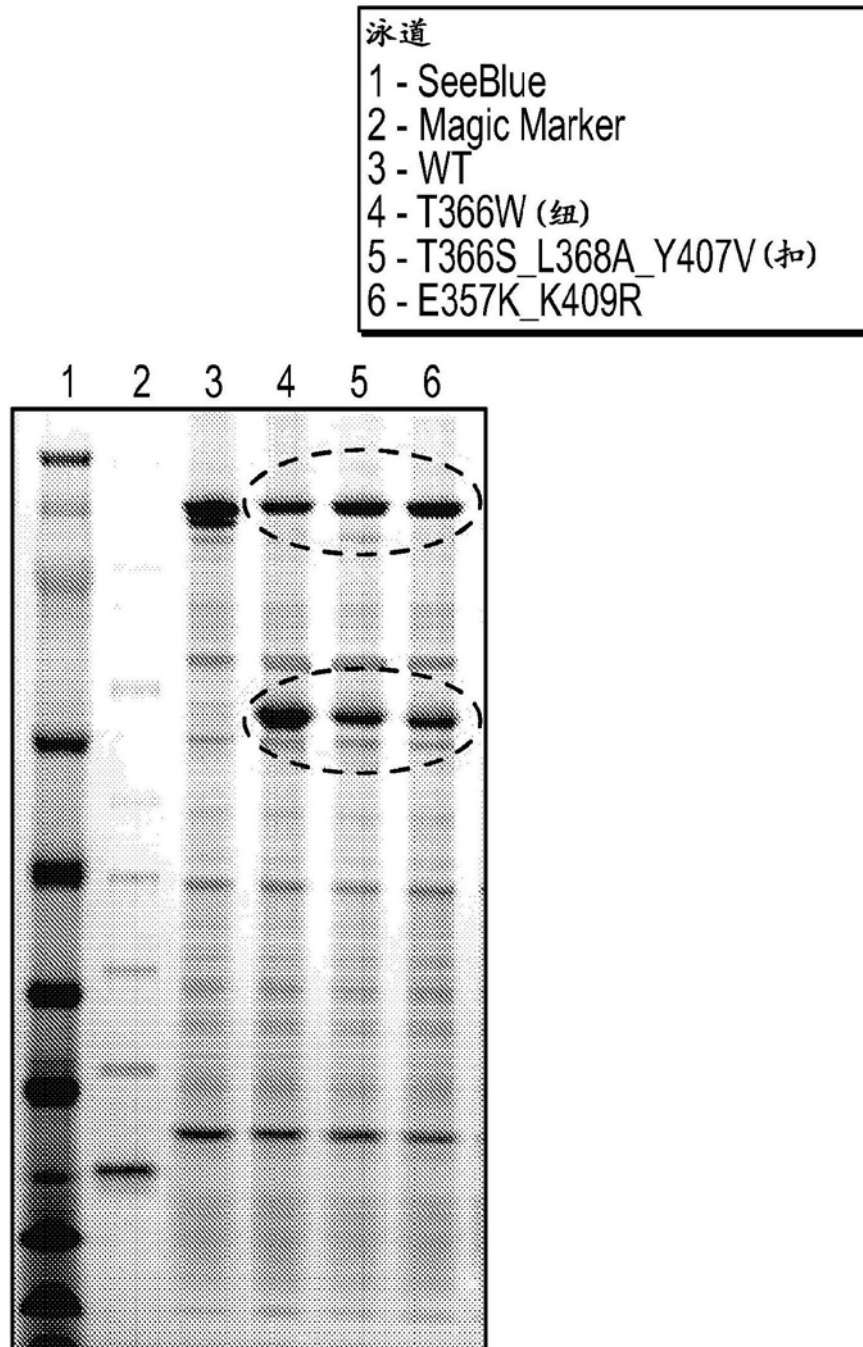


图2A

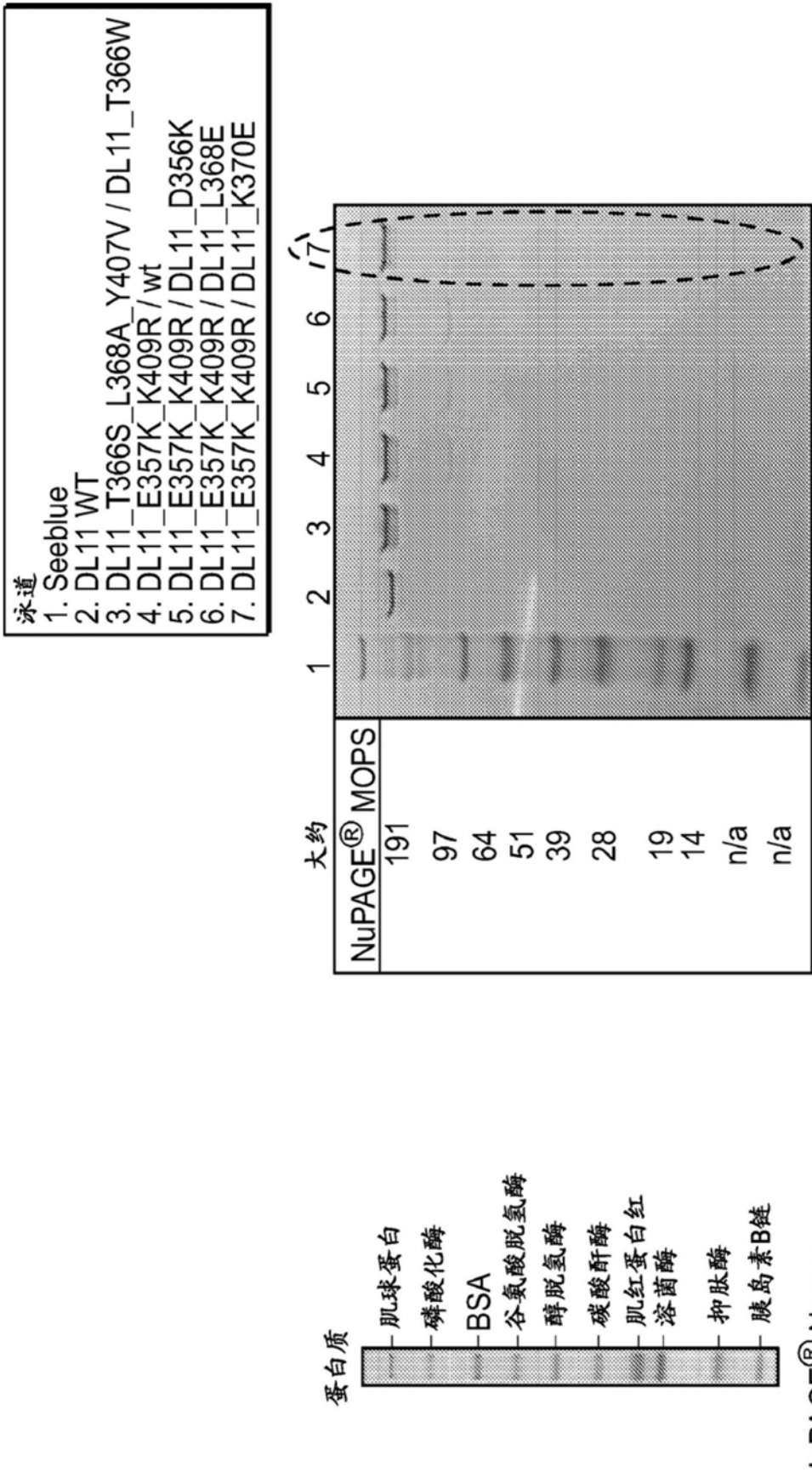


图2B

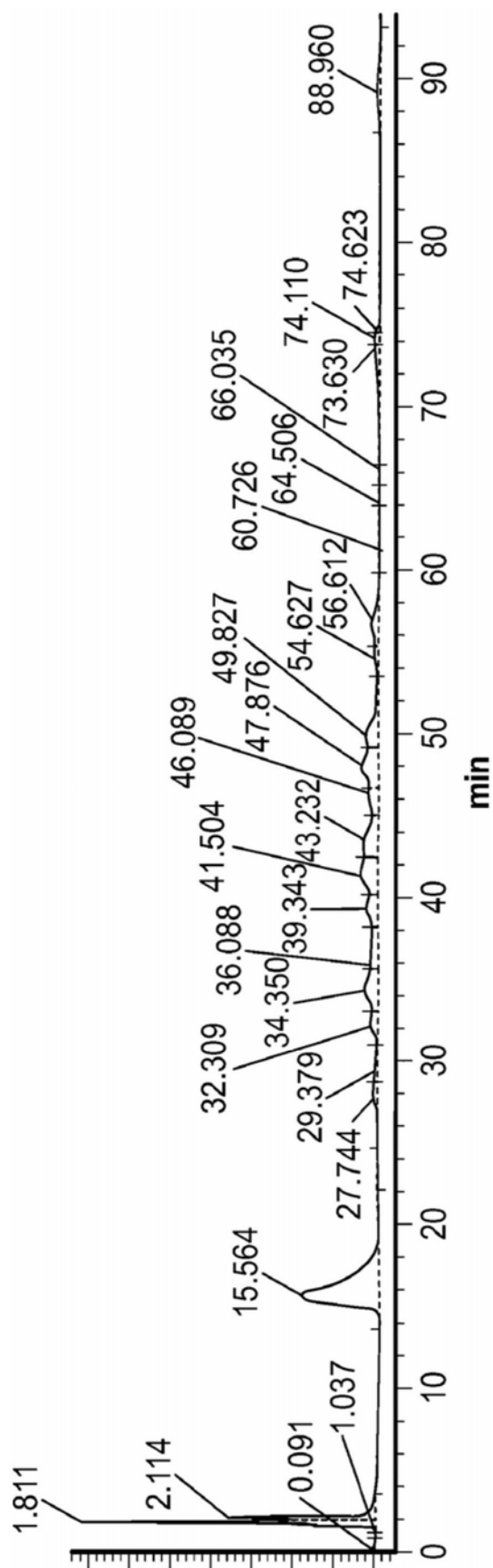


图3A

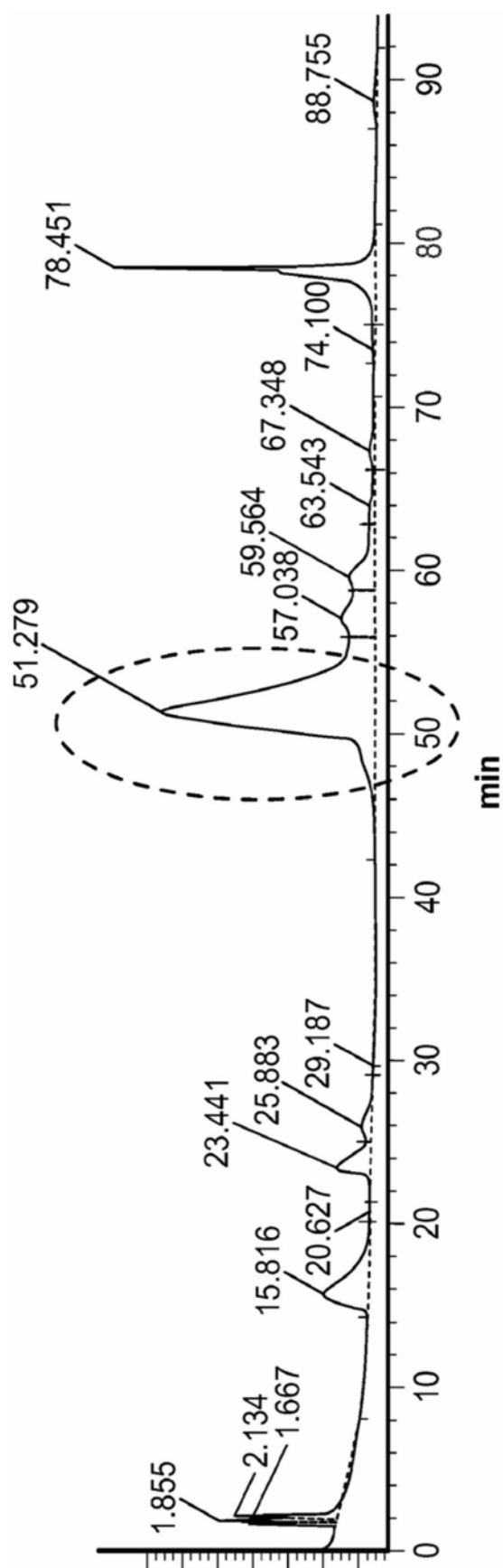


图3B

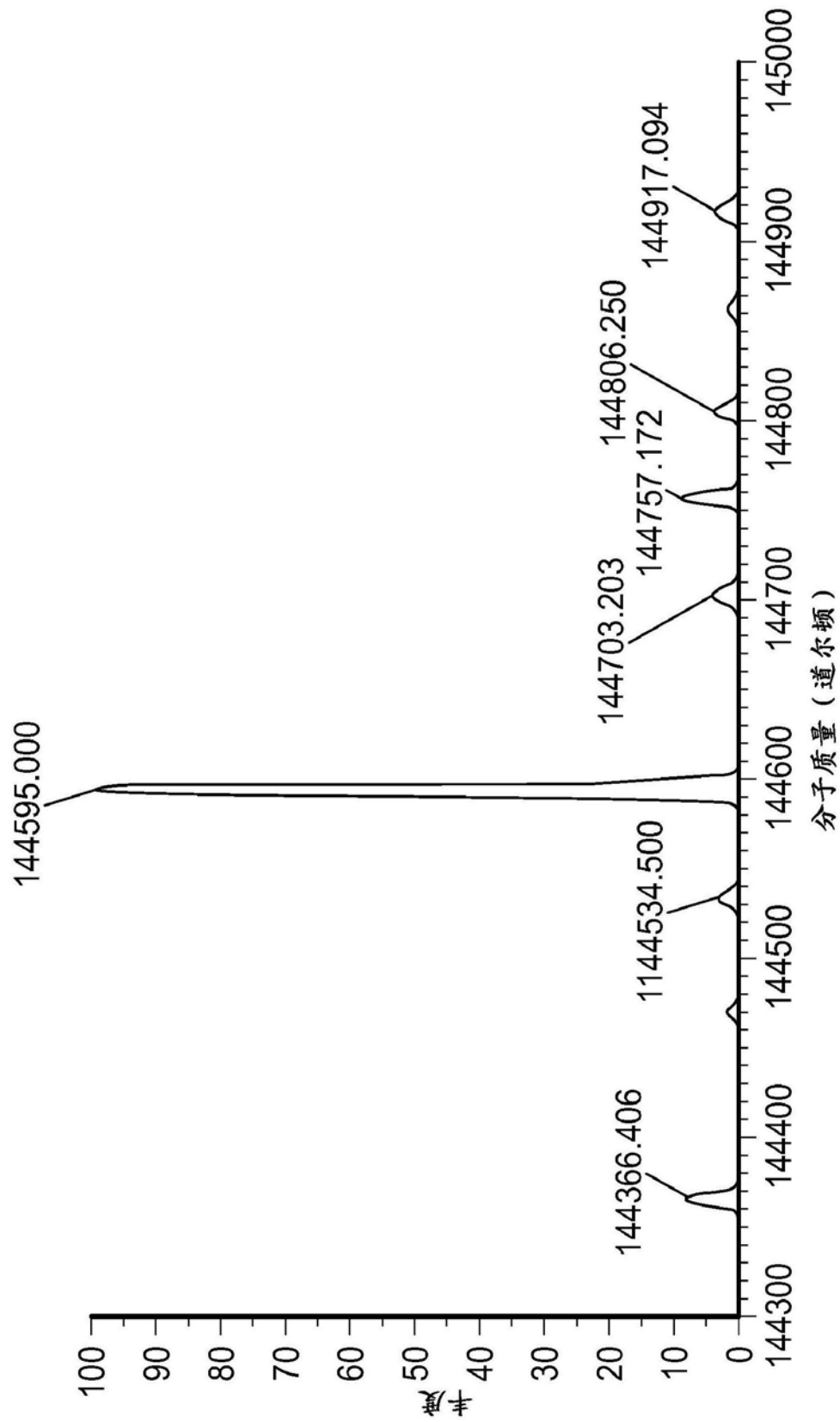


图4

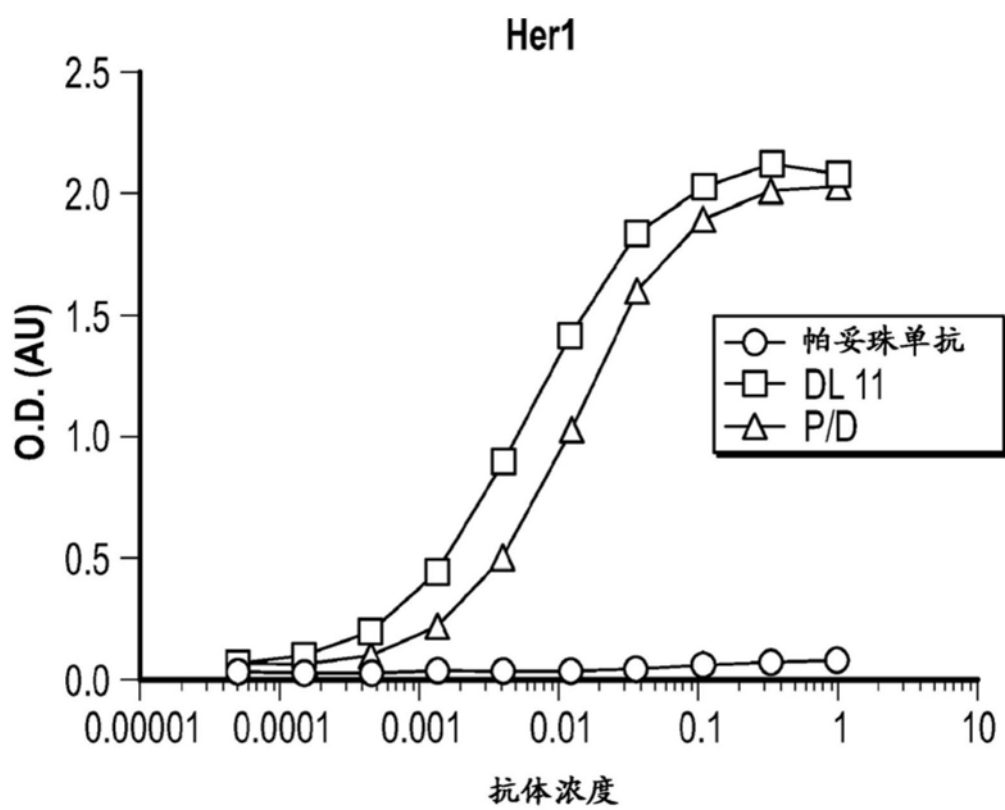


图5A

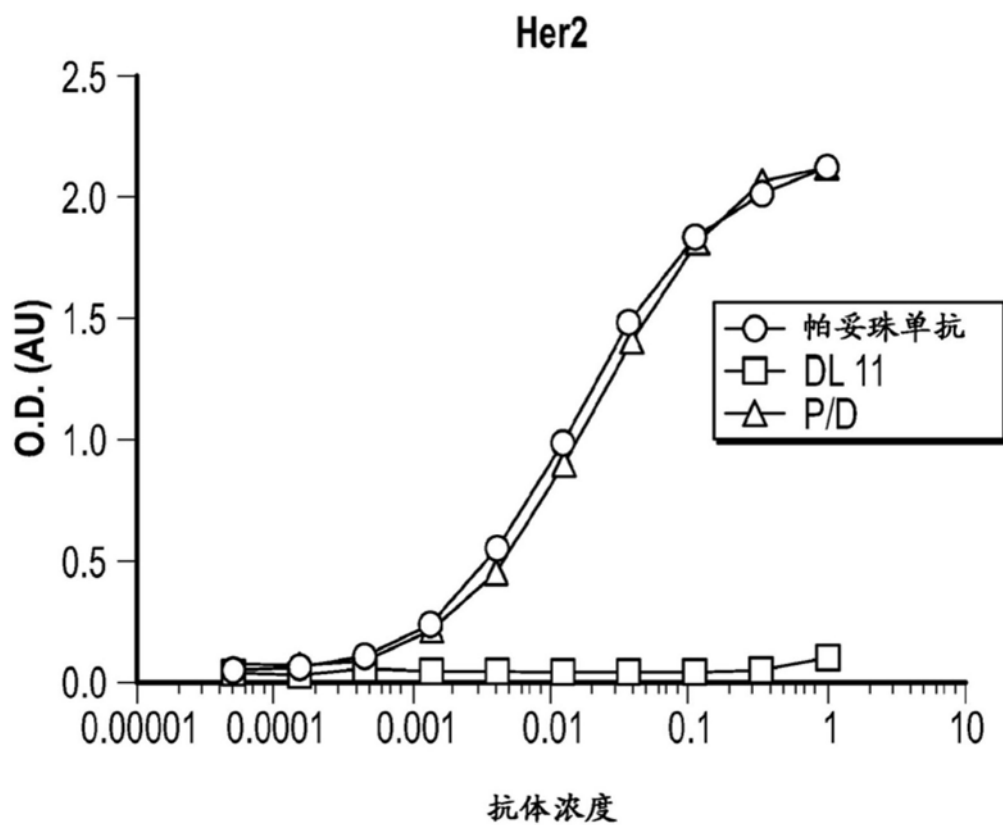


图5B

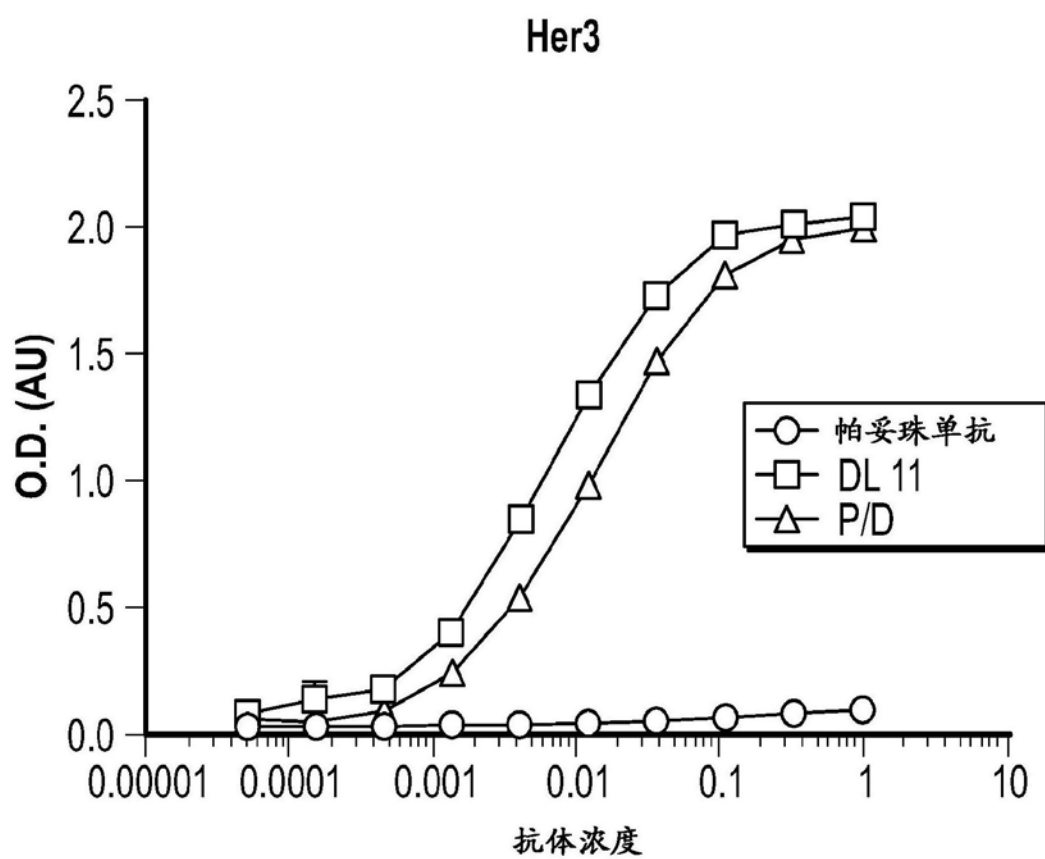


图5C

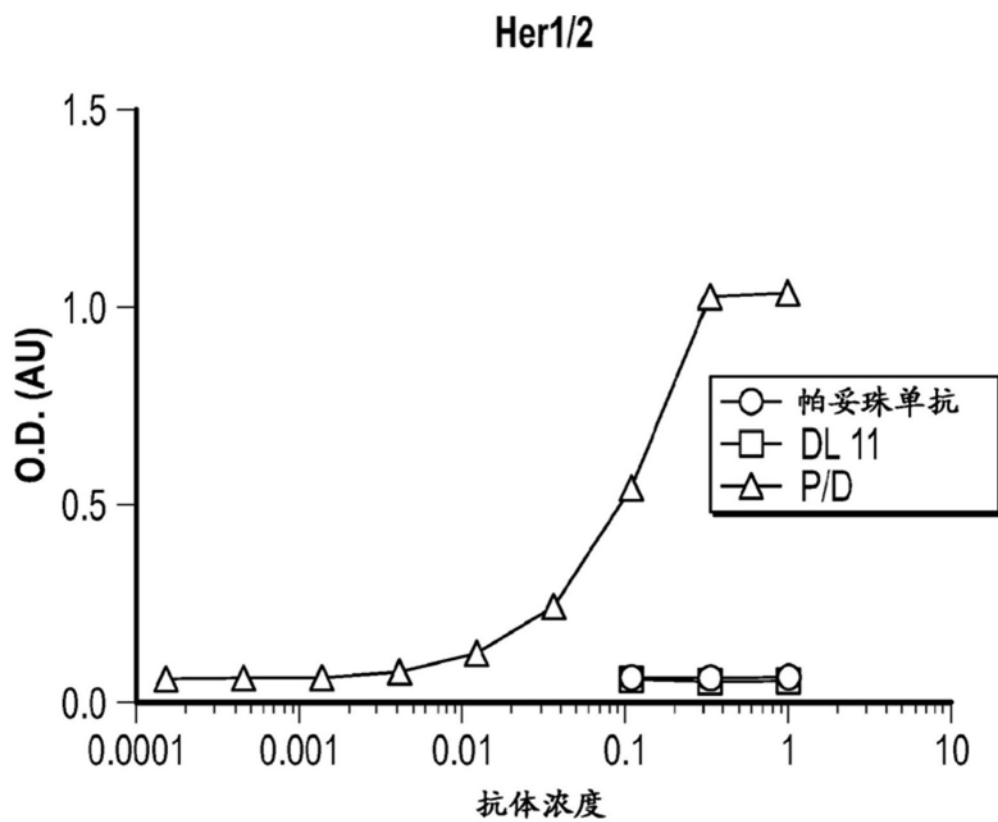


图6A

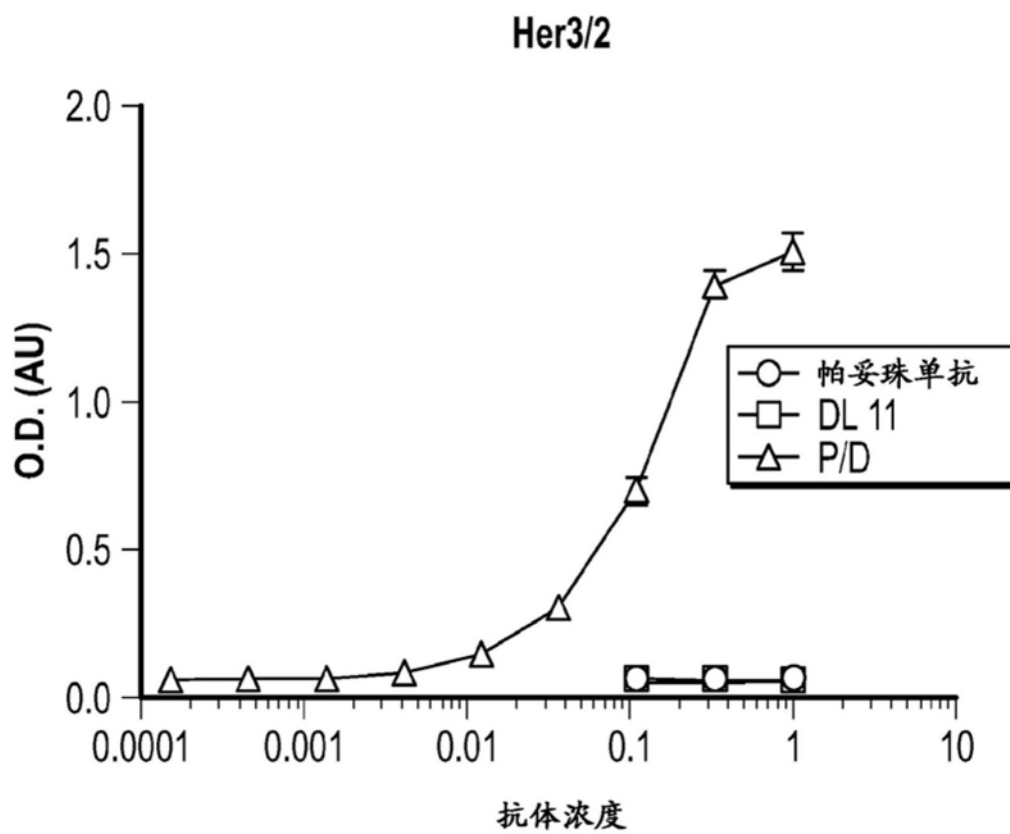


图6B

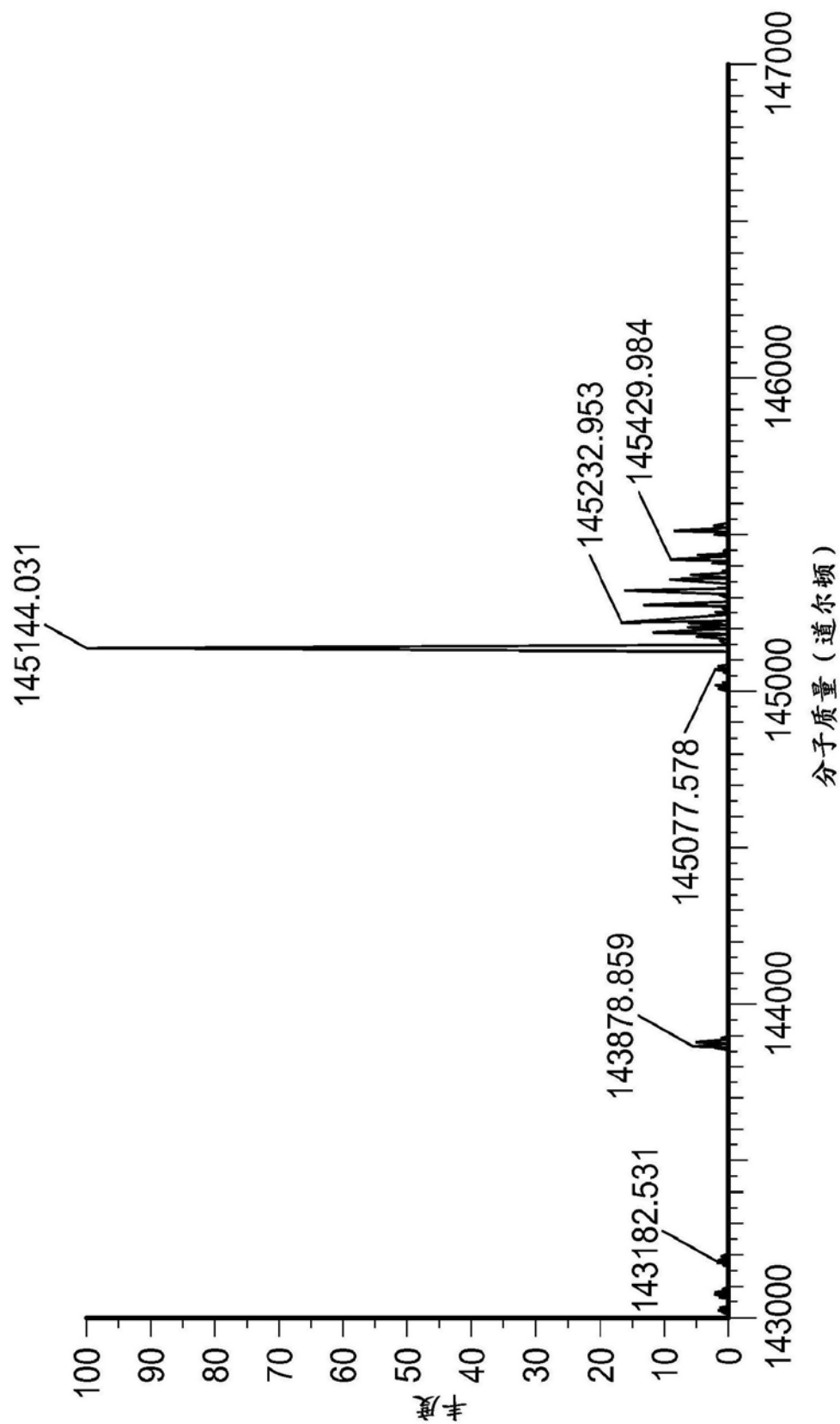


图7

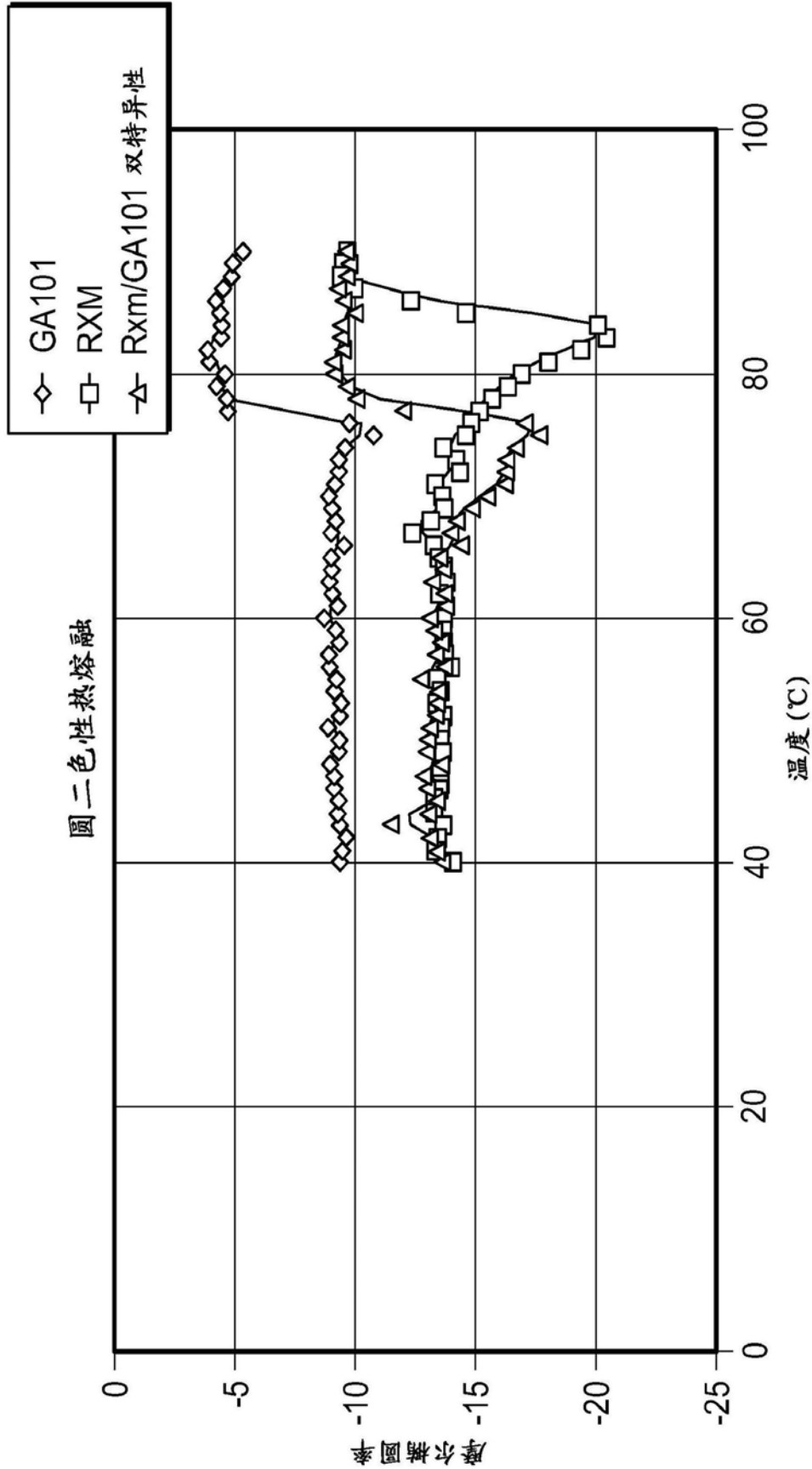


图8

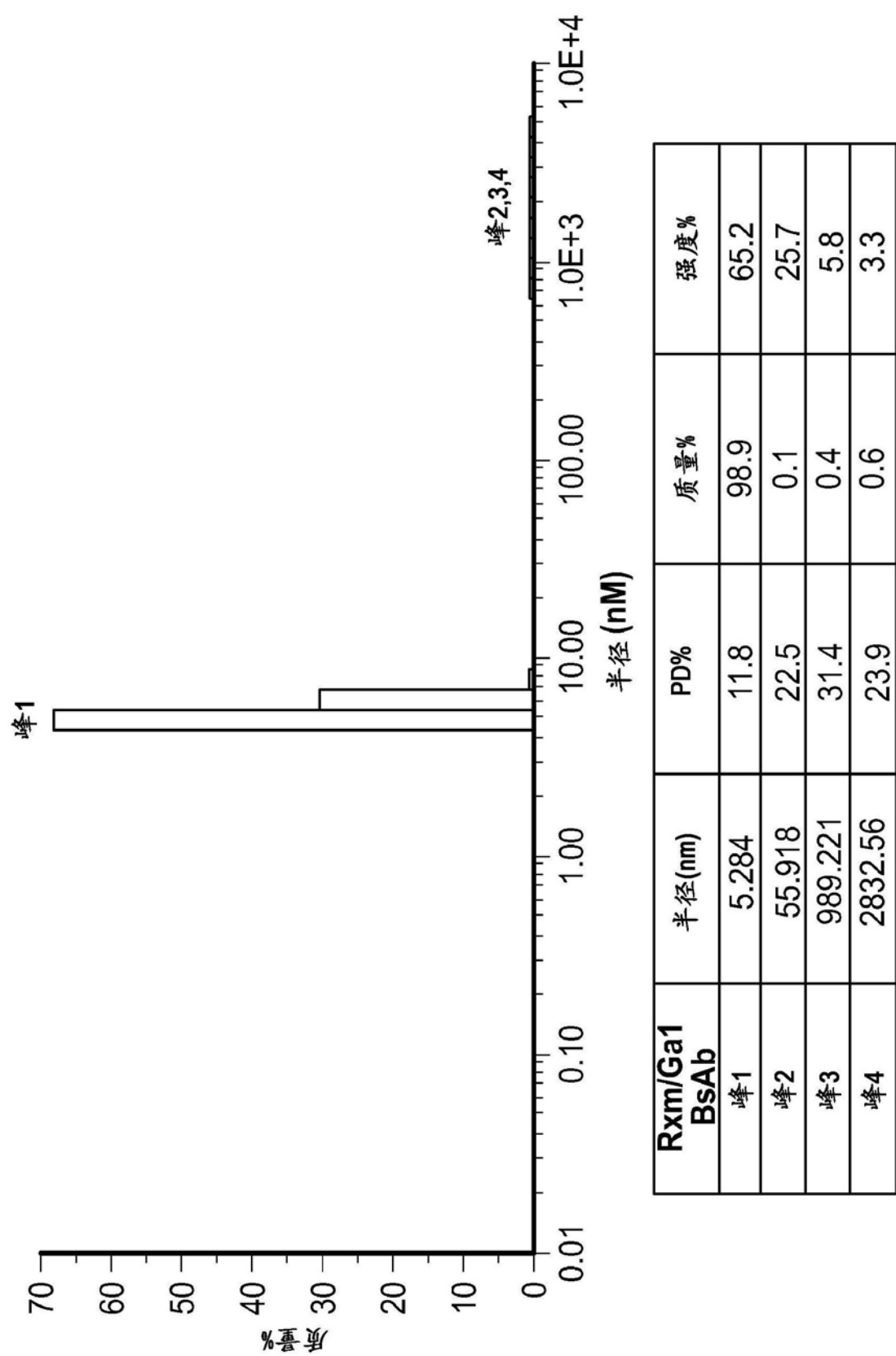


图9

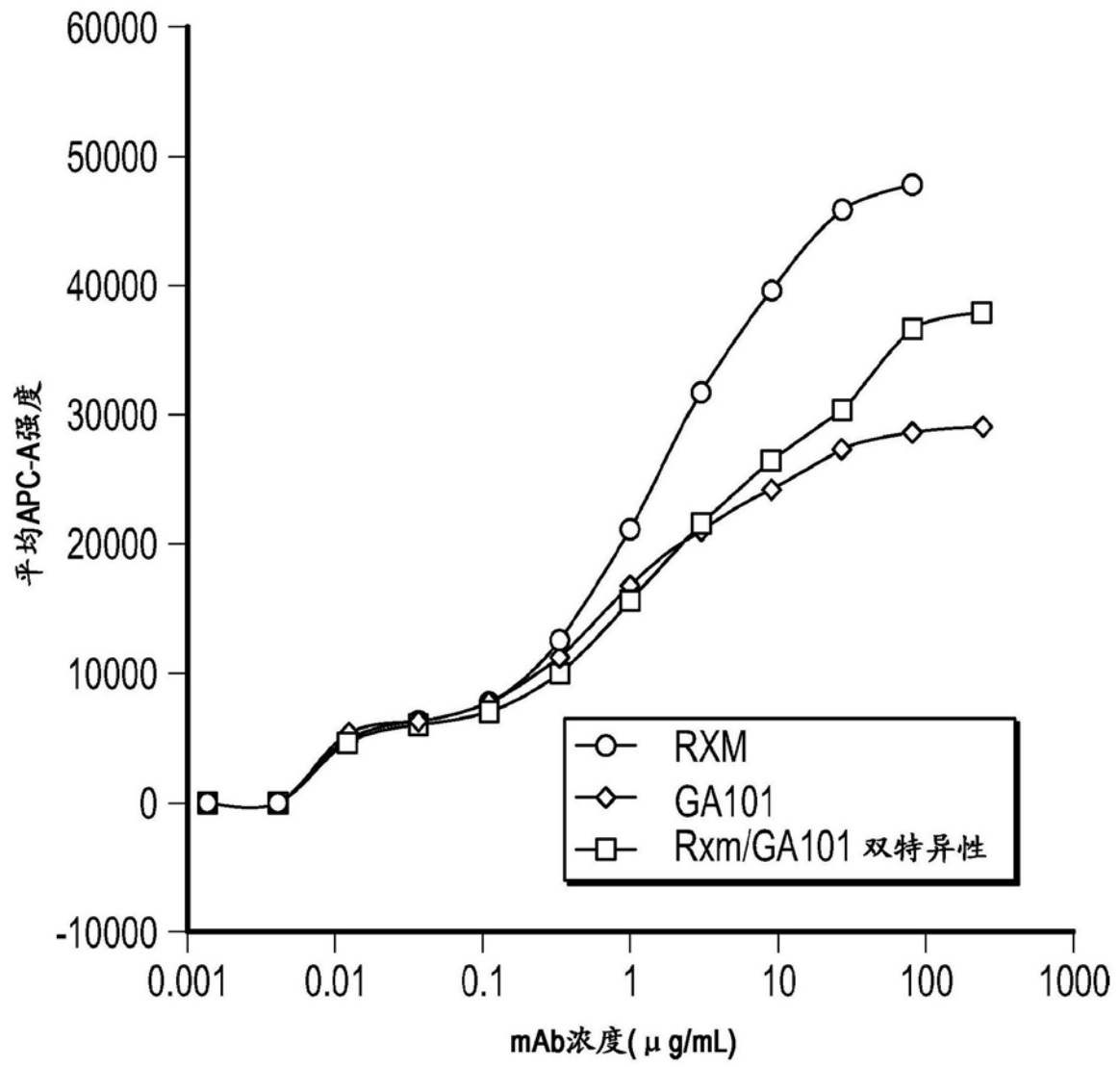


图10

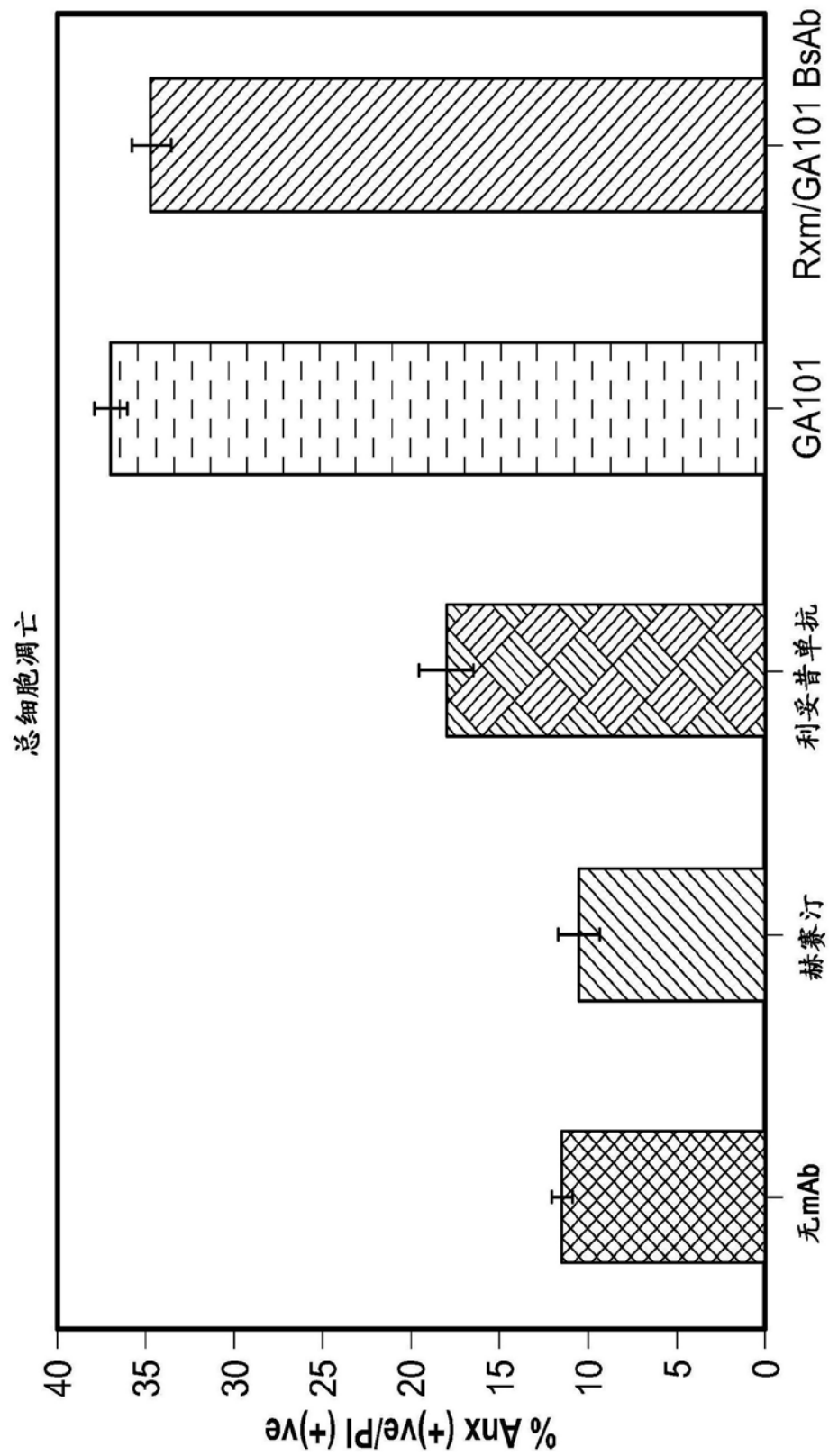


图11

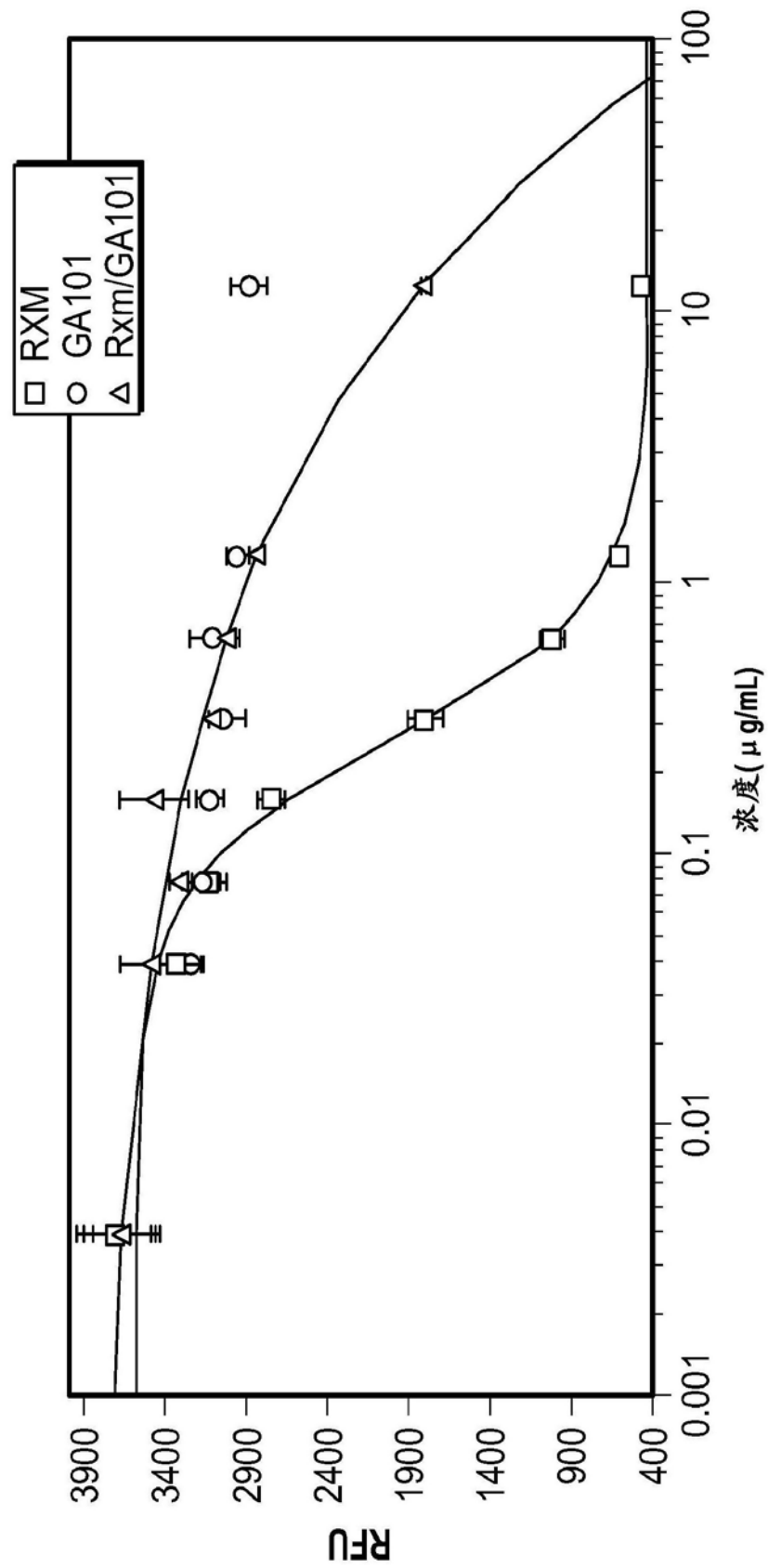


图12

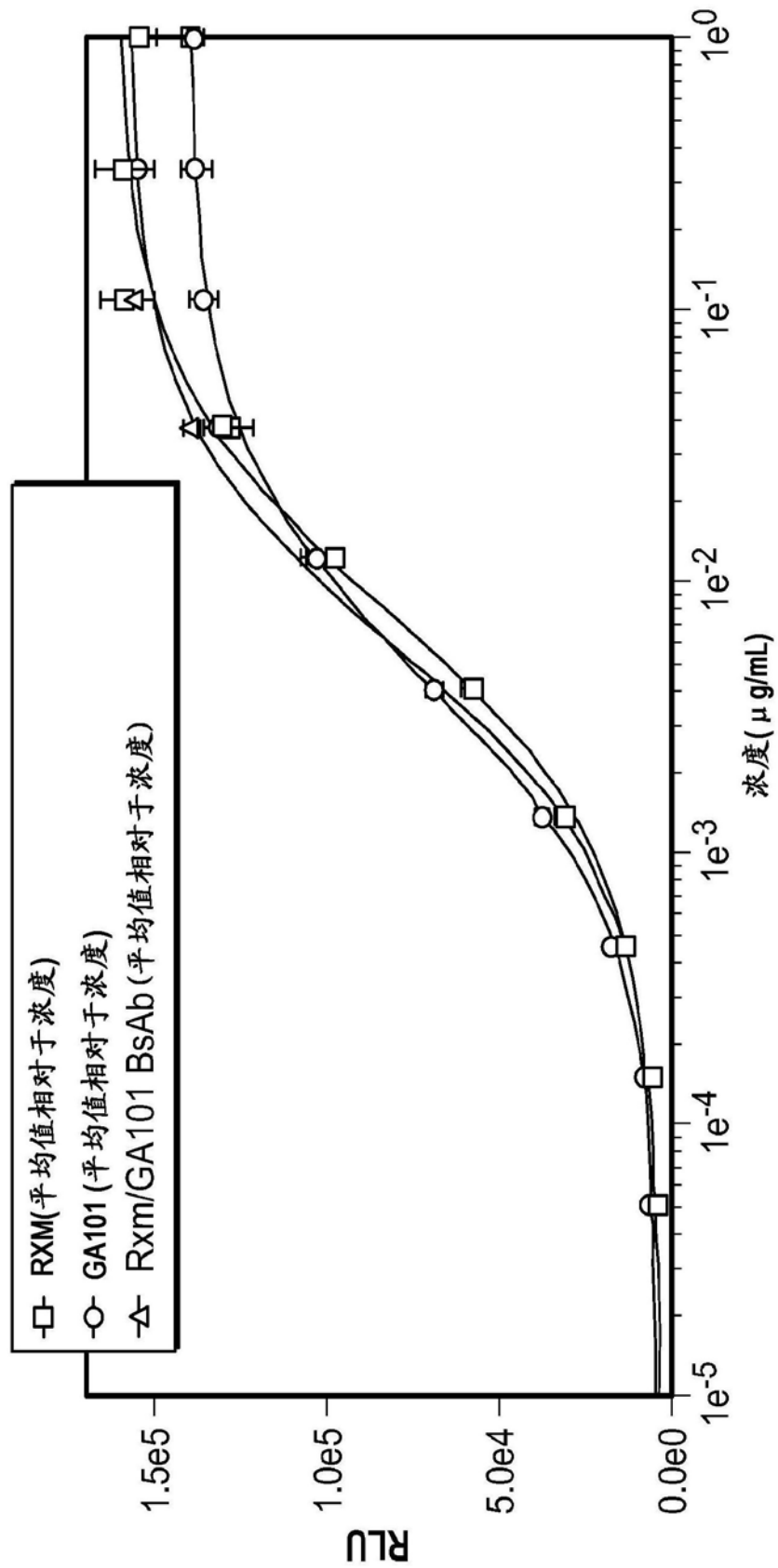


图13

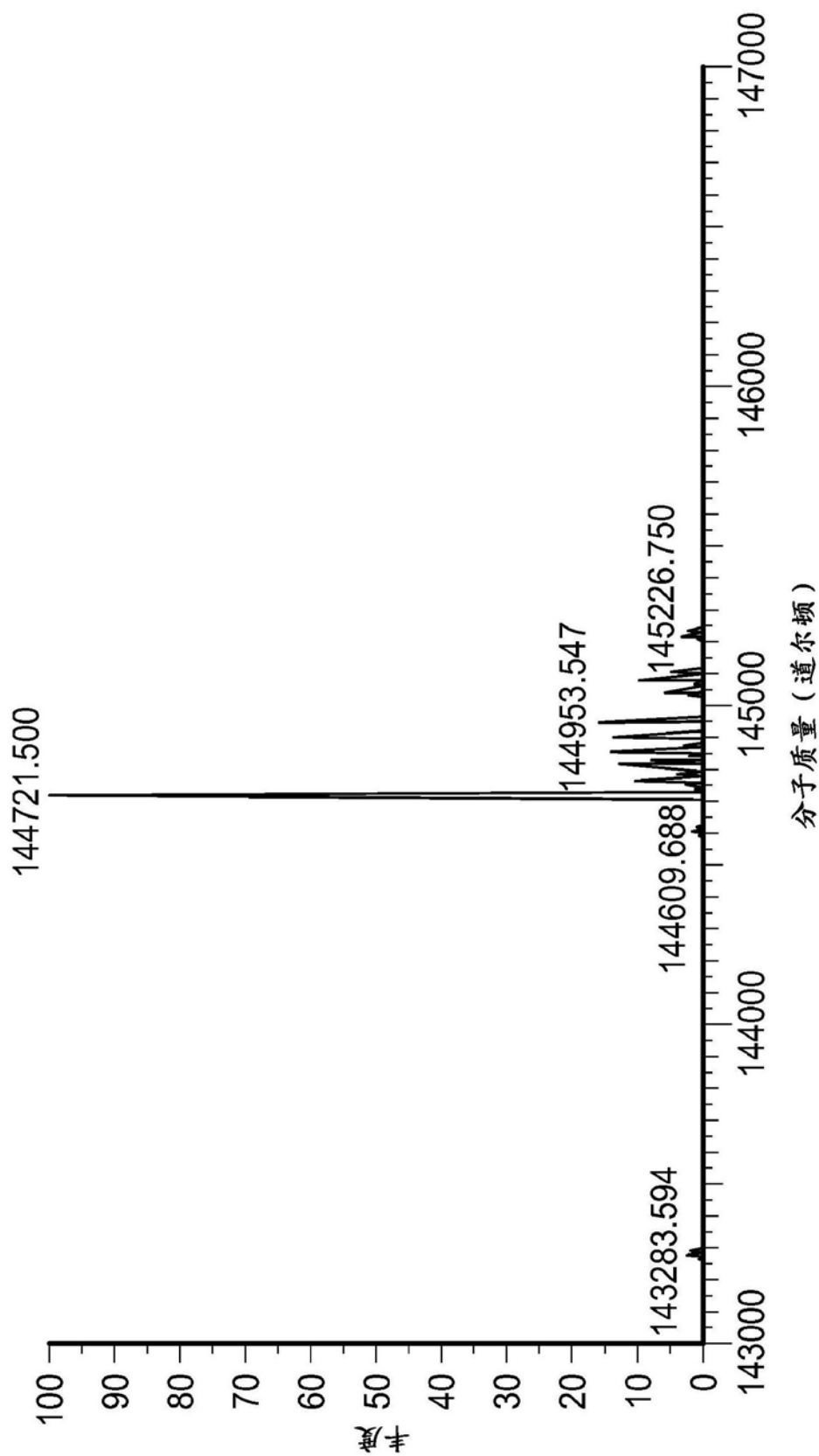


图14

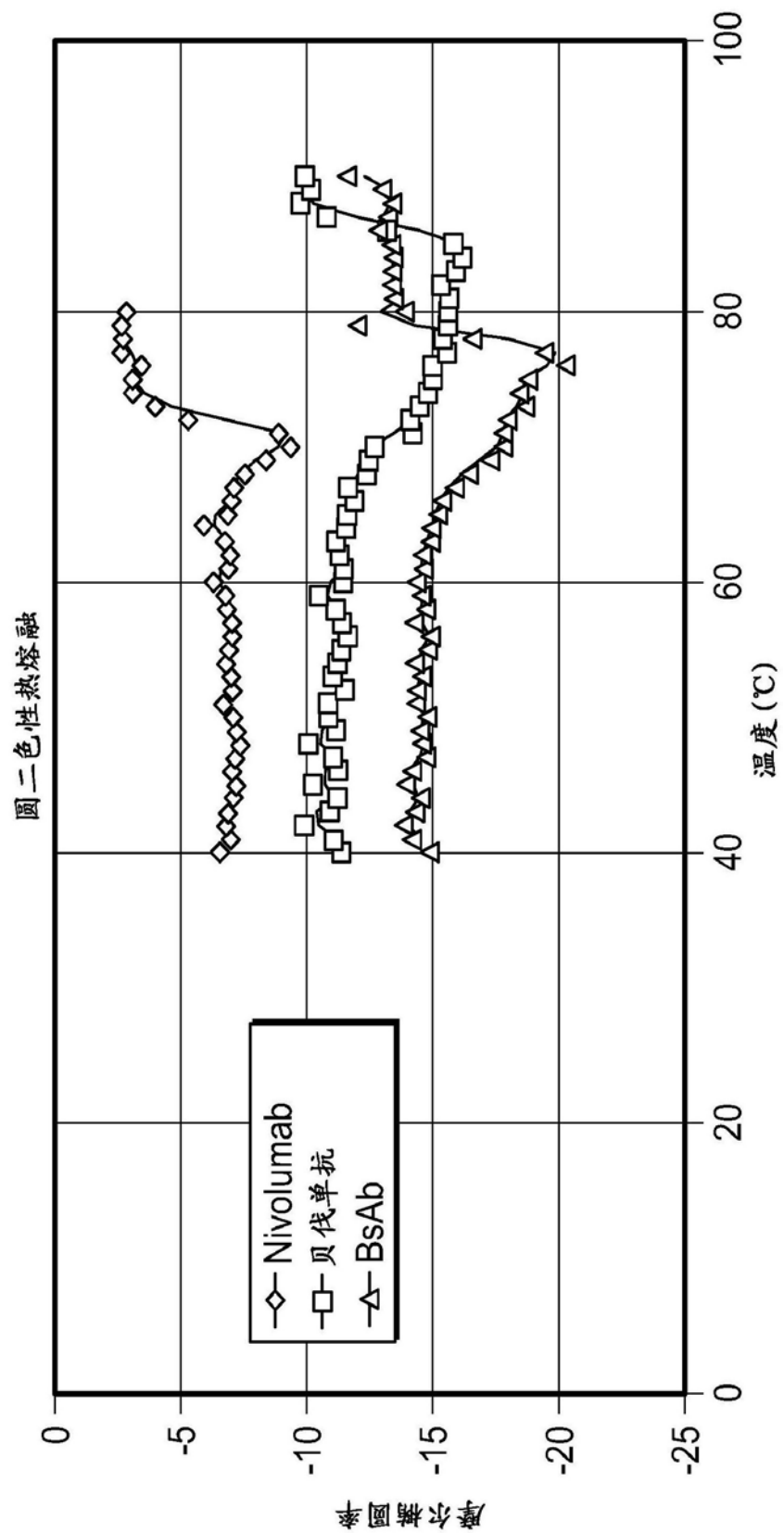


图15

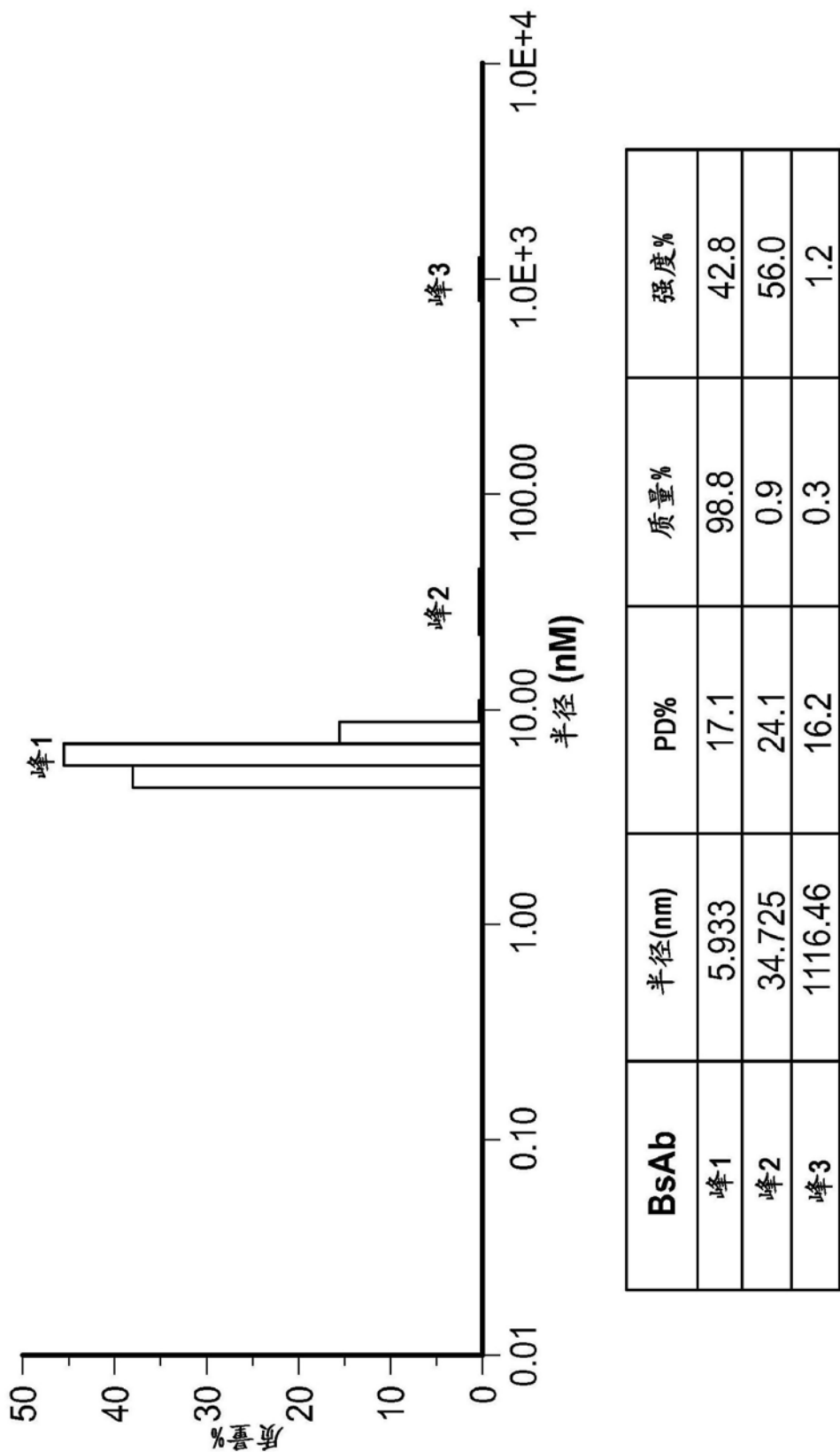


图16

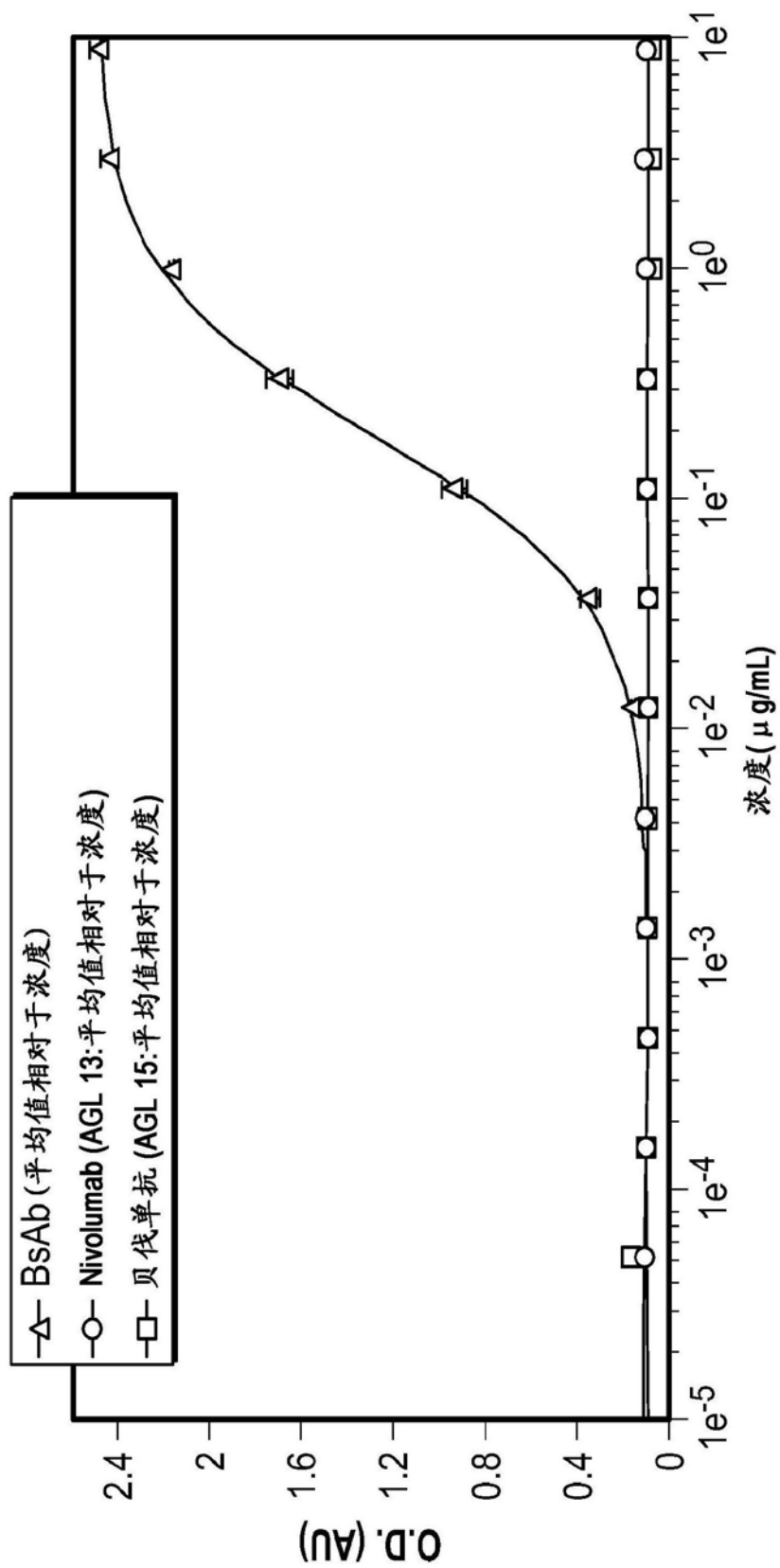


图17