(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119490582 A
(43)申请公布日 2025.02.21

(21)申请号 202411240681.9
(22)申请日 2020.01.22
(30)优先权数据
62/795,367 2019.01.22 US
62/838,071 2019.04.24 US
(62)分案原申请数据
202080009758.5 2020.01.22
(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司
地址 瑞士巴塞尔
(72)发明人 T·N·隆巴纳 J·A·佐恩
M·L·松本 C·施皮斯
C·西费里 A·埃斯特韦斯
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 岑晓东
(51)Int.Cl.
C07K 16/00(2006.01)

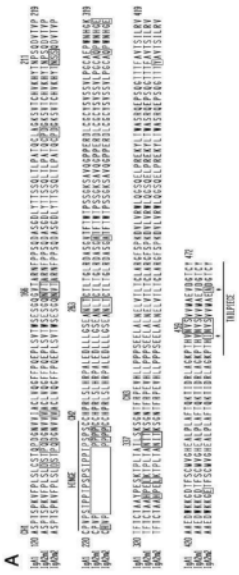
权利要求书1页 说明书67页 附图146页

(54)发明名称

免疫球蛋白A抗体以及制备和使用方法

(57)摘要

本发明涉及免疫球蛋白A抗体以及制备和使用方法。具体地,本发明提供了抗体例如IgA抗体和IgG-IgA融合分子、包含此类抗体的组合物以及制备和使用此类抗体和组合物的方法。



CN 119490582 A

1.一种分离的IgA抗体或其片段,其中所述IgA抗体在氨基酸V458、N459和/或S461处包含取代。

2.根据权利要求1所述的分离的IgA抗体,其中氨基酸V458被异亮氨酸(V458I)取代,氨基酸N459被谷氨酰胺(N459Q)、甘氨酸(N459G)或丙氨酸(N459A)取代,并且/或者氨基酸S461被丙氨酸(S461A)取代。

3.一种分离的IgA抗体或其片段,其中所述IgA抗体在氨基酸I458处包含取代。

4.根据权利要求3所述的分离的IgA抗体,其中氨基酸I458被缬氨酸(I458V)取代。

5.一种分离的IgA抗体或其片段,其中所述IgA抗体在选自由N166、T168、N211、S212、S213、N263、T265、N337、I338、T339、N459、S461及它们的组合组成的组中的氨基酸处包含一个或多个取代。

6.根据权利要求5所述的分离的IgA抗体,其中在氨基酸N166、S212、N263、N337、I338、T339和N459处的取代是N166A、S212P、N263Q、N337T、I338L、T339S和N459Q。

7.根据权利要求1-6所述的分离的IgA抗体,其中所述IgA抗体是IgA1、IgA2m1、IgA2m2或IgA2mn抗体。

8.根据权利要求5或6所述的分离的IgA抗体,其中所述IgA抗体在氨基酸N337、I338和T339处具有取代,并且在T168、N211、S212、S213、N263、T265、N459、S461及它们的组合处具有一个或多个取代。

9.根据权利要求8所述的分离的IgA抗体,其中所述IgA抗体是IgA2m1、IgA2m2或IgA2mn抗体。

10.根据权利要求1-9中任一项所述的分离的IgA抗体,其中所述IgA抗体是人源化抗体、嵌合抗体或人抗体。

免疫球蛋白A抗体以及制备和使用方法

[0001] 本申请是申请日为2010年2月22日、中国申请号为2020800097585、发明名称为“免疫球蛋白A抗体以及制备和使用方法”的发明申请的分案申请。

[0002] 相关专利申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2019年1月22日提交的美国临时申请号62/795,367和2019年4月24日提交的美国临时申请号62/838,071的优先权,这些临时申请各自借此以全文引用的方式并入,并主张其优先权。

技术领域

[0004] 本公开涉及抗体,例如IgA抗体和IgG-IgA融合分子,和包含此类抗体的组合物,以及制备和使用此类抗体和组合物的方法。

背景技术

[0005] 免疫球蛋白质A(IgA)是大多数哺乳动物粘膜分泌物中存在的一类主要抗体,是抵御吸入和摄入病原体在脆弱粘膜表面入侵的第一道防线。在人类中,有两种IgA同种型,IgA1和IgA2,其区别在于IgA1重链(HC)的铰链区中的13残基延伸在IgA2分子中并不存在(Leusen,Mol.Immunol.68:35-9(2015))。两种同种型在所有器官和组织中都丰富,除了在IgA2占主导地位的肠中和在发现几乎只有IgA1单体的血清中(Kerr,Biochem.J.271:285-96(1990))。IgA2有三种同种异型:m1(Tsuzukida et al.,Proc Natl Acad Sci USA 76:1104-8(1979))、m2(Toraño et al.,Proc Natl Acad Sci USA 75:966-9(1978))和mn(Chintalacharuvu et al.,J Immunol 152:5299-304(1994))。m2和mn同种异型形成典型的轻链(LC)-HC二硫键,而IgA2m1中HC的第221位脯氨酸的存在导致LC-LC二硫键形成(Chintalacharuvu etal.,J Immunol 157:3443-9(1996))。IgA2m1同种异型中脯氨酸221突变为精氨酸(P221R)(这在m2和mn同种异型中发现),恢复了典型的LC-HC键(Lohse et al.,Cancer Res 76:403-17(2016)and Chintalacharuvu et al.(1996))。IgA1和IgA2同种型之间的序列同一性相当高,约为90%,在IgA2同种异型中序列同一性甚至更高,m1和m2之间只有六个残基差异,m1或m2与mn之间有两个残基差异(Chintalacharuvu et al.(1994))。

[0006] 与其他人类免疫球蛋白类别相反,IgA具有既可作为单体可溶性物质又可作为聚合可溶性物质而天然存在的独特能力,而只有聚合IgA(pIgA)才能与pIgR结合以进行随后的转胞吞作用(Yoo et al.,Clin.Immunol.116:3-10(2005))。IgA的寡聚化通过HC的C末端的18个残基延伸(称为尾端)和137个氨基酸的连接链(JC)来促进。第一个IgA单体的IgA尾端的倒数第二个残基Cys471介导与JC的Cys15形成二硫键,而第二个IgA单体的Cys471介导与JC的Cys69形成二硫键从而形成由单个JC保持在一起的共价IgA二聚体(Zikan et al.,Mol Immunol 23:541-4(1986)and Halpern et al.,J Immunol 111:1653-60(1973))。由于每个IgA单体由两个HC组成,每个HC都有一个尾端,因此IgA二聚体具有两个未配对的Cys471残基,通过这些残基可以连接额外的IgA单体。已经报道了更高阶的IgA寡聚体,例如

三聚体、四聚体和五聚体(Suzuki et al.,Proc Natl Acad Sci USA 112:7809-14(2015))。血清IgA主要是单体,而聚合IgA由固有层中的血浆细胞产生。聚合IgA中JC的存在是结合上皮基底外侧的pIgR和主动转运至粘膜组织顶侧所必需的(Wu et al.,Clin Dev Immunol 11:205-13(2004))。在转胞吞作用时,pIgR的胞外结构域被蛋白水解切割,产生所谓的分泌组分(SC),该组分通过pIgR中的Cys467和一个HC中的Cys311之间的二硫键保持共价附接到聚合IgA重链上(Fallgreen-Gebauer et al.,Biol Chem Hoppe-Seyler 374:1023-8(1993)and Bastian et al.,Adv Exp Med Biol371A:581-3(1995))。该复合物被认为是分泌性IgA(sIgA),粘膜免疫的主要决定因素(Mantis et al.,Mucosal Immunol 4:603-11(2011)and Johansen etal.Mucosal Immunol 4:598-602(2011))。

[0007] 与基于IgG的传统疗法相比,疫球蛋白质A(IgA)研究突出了单体和聚合免疫球蛋白质A(IgA)抗体的多种潜在治疗应用和独特的作用机制(Yoo et al.(2005),Bakema et al.,MAbs 3:352-61(2011)and Leusen(2015))。在肿瘤学中,受FcαRI介导的细胞毒性或更有效的受体结合和下调所驱动,单体和聚合抗EGFR和抗CD20 IgA已显示出优于IgG的肿瘤细胞杀伤(Pascal et al.,Haematologica 97:1686-94(2012),Boross et al.,EMBO Molecular Medicine 5:1213-26(2013)and Lohse et al.(2016))。IgA的细胞毒活性可以通过IgG/A融合体或杂交分子对FcγR和FcαRI的双重接合作用进一步提高(Li et al.,Oncotarget(2017)and Kelton et al.,Chem Biol 21:1603-9(2015))。对于传染病,IgA多价靶接合在流感感染模型中实现了卓越的抗原结合和中和(Suzuki et al.(2015))。此外,在多囊肾病小鼠模型中,人IgA二聚体(dIgA)可以通过与聚合免疫球蛋白受体(pIgR)结合而有效递送至肾腔,而IgG分子则不能(Olsan et al.,Journal of Biological Chemistry290:15679-86(2015))。利用IgA的特定转胞吞作用活性可能允许接近当前IgG疗法无法有效靶向的粘膜组织腔侧内的治疗靶点(Bakema et al.(2011),Olsan et al.(2015)and Borrok et al.,JCI Insight 3(2018))。

[0008] 重组单体IgA的制备比工艺成熟的IgG分子更具挑战性。IgA抗体通常具有较差的表达和异源糖基化。人类IgG1通常只有两个N-联糖基化位点,每个C_H2结构域中有一个,而人类IgA包含多个可能对聚糖异质性敏感的糖基化位点(Leusen(2015))。IgA1在铰链区有多个O-联糖基化位点,在HC恒定结构域中也有两个N-联糖基化位点。虽然IgA2分子不会被O-联聚糖修饰,但它们确实包含四个(IgA2m1)或五个(IgA2m2和IgA2mn)N-联糖基化位点(Yoo et al.(2005)and Bakema et al.(2011))。JC还包含一个N-联糖基化位点。三个多肽链(LC、HC和JC)的组装导致多种寡聚状态,并进一步导致重组聚合IgA的整体复杂性(Rouwendal et al.,MAbs 8:74-86(2016)and Brunke et al.,MAbs 5:936-45(2013))。随着IgA寡聚物大小的增加,不仅糖基化位点数量增加,而且可能出现更多聚糖异质性。

[0009] IgA先前已被证明在多个物种中具有较短的循环半衰期(<1天至约4天)(Challacombe et al.,Immunology 36:331-8(1979)和Leusen(2015))。与IgG不同,IgA不与新生儿受体FcRn结合,因此不能进行内体再循环和逃避溶酶体降解(Roopenian et al.,Nat Rev Immunol 7:715-25(2007))。除了缺乏FcRn结合外,未成熟的N-联聚糖还可以通过使重组IgA成为碳水化合物特异性内吞受体(例如去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)(Boross et al.(2013)和(Rifai et al.,J Exp Med 191:2171-82(2000))和甘露糖受体(Lee et al.,Science 295:1898-901(2002)and Heystek et al.,J Immunol 168:102-7(2002)))的易

感靶点,从而缩短重组IgA的血清半衰期。这些高度集中在肝脏中的清除受体识别带有不完全唾液酸化N-联聚糖的糖蛋白,并将它们从循环中清除(Tomana et al.,Gastroenterology 94:762-70(1988)and Daniels et al.,Hepatology 9:229-34(1989))。

[0010] 因此,本领域需要具有更长半衰期的IgA抗体以及改进表达水平和聚合IgA生成的制备方法。

发明内容

[0011] 本公开涉及IgA抗体和包含此类抗体的组合物,以及制备和使用此类抗体和组合物的方法。

[0012] 在某些实施例中,本公开涉及分离的IgA抗体。例如,但不作为限制,本公开的分离的IgA抗体或其片段在氨基酸V458处包含取代。在某些实施例中,氨基酸V458被异亮氨酸(即V458I)取代。在某些实施例中,分离的IgA抗体是IgA1、IgA2mn或IgA2m1抗体。

[0013] 在某些实施例中,本公开的分离的IgA抗体或其片段在氨基酸I458处包含取代。在某些实施例中,氨基酸I458被缬氨酸取代(即I458V)。在某些实施例中,分离的IgA抗体为IgA2m2抗体。

[0014] 本公开进一步提供了一种分离的IgA抗体,其在氨基酸N459和/或S461处包含取代。在某些实施例中,氨基酸N459被谷氨酰胺(即N459Q)取代。在某些实施例中,氨基酸S461被丙氨酸取代(即S461A)。在某些实施例中,IgA抗体为IgA1或IgA2m1抗体。

[0015] 本公开还提供了一种分离的IgA抗体,其在选自由N166、T168、N211、S212、S213、N263、T265、N337、I338、T339、N459、S461和它们的组合组成的组中包含一个或多个取代。在某些实施例中,IgA抗体在氨基酸N459处具有取代并且是IgA1、IgA2m1或IgA2m2抗体。在某些实施例中,IgA抗体在氨基酸N166处具有取代并且是IgA2m1或IgA2m2抗体。在某些实施例中,IgA抗体在氨基酸S212处具有取代并且是IgA2m2抗体。在某些实施例中,IgA抗体在氨基酸N263处具有取代并且是IgA1、IgA2m1或IgA2m2抗体。在某些实施例中,IgA抗体在氨基酸N337、I338、T339处具有取代并且是IgA2m1或IgA2m2抗体。在某些实施例中,IgA抗体在氨基酸N337、I338、T339处具有取代并且在T168、N211、S212、S213、N263、T265、N459、S461和它们的组合处具有一个或多个取代。在某些实施例中,IgA抗体是IgA2m2抗体并且在氨基酸N166、S212、N263、N337、I338、T339和N459处包含取代。例如但不限于,氨基酸N166、S212、N263、N337、I338、T339和N459处的取代可以是N166A、S212P、N263Q、N337T、I338L、T339S和N459Q。

[0016] 本公开进一步提供了分离的IgG-IgA融合分子。在某些实施例中,分离的IgG-IgA融合分子可包含全长IgG抗体,所述全长IgG抗体在其C末端与IgA抗体的Fc区融合,其中IgA抗体的Fc区包含包括P221或R221至IgA抗体重链的C末端的序列,其中IgG抗体进一步包含氨基酸K447的缺失。本公开提供了一种分离的IgG-IgA融合分子可包含全长IgG抗体,所述全长IgG抗体在其C末端与IgA抗体的Fc区融合,其中IgA抗体的Fc区包含包括C242至IgA抗体重链的C末端的序列。在某些实施例中,IgG抗体包括氨基酸K447的缺失。在某些实施例中,IgG抗体选自由IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体和IgG4抗体组成的组。例如但不限于,IgG抗体可以是IgG1抗体。在某些实施例中,IgA抗体选自由IgA1抗体、IgA2m1抗体、IgA2m2抗体

和IgA2mn抗体组成的组。例如,但不限于此,IgA抗体是IgA2m1抗体。

[0017] 本公开进一步提供了编码本文公开的IgA抗体或IgG-IgA融合分子的分离的核酸和包含此类核酸的宿主细胞。本公开进一步提供了产生抗体的方法,包括培养本文公开的宿主细胞,从而产生IgA抗体或IgG-IgA融合分子。该方法进一步可包括从宿主细胞回收IgA抗体或IgG-IgA融合分子。

[0018] 本公开提供包含本文公开的IgA抗体或IgG-IgA融合分子和药用载体的药物组合物。在某些实施例中,药物组合物还可包括额外的治疗剂。

[0019] 本公开进一步提供治疗患有疾病的个体的方法,其中该方法包括向个体施用有效量的本文公开的IgA抗体或IgG-IgA融合分子。在某些实施例中,疾病是炎性疾病、自身免疫性疾病或癌症。

[0020] 本公开提供增强IgA二聚体表达的方法。在某些实施例中,该方法包括相对于编码轻链(LC)和重链(HC)的DNA的量,增加引入第一细胞的编码连接链(JC)的DNA的量,其中增强的表达是相对于以下而言的:在引入等量JC、LC和HC DNA的第二细胞中产生的IgA二聚体的量。例如但不限于,引入第一细胞的编码HC的DNA的量与编码LC的DNA的量与编码JC的DNA的量的比率(HC:LC:JC)大约是从约1:1:2到约1:1:5。

[0021] 在某些实施例中,本公开提供增强IgA二聚体、三聚体或四聚体表达的方法。在某些实施例中,该方法包括相对于编码轻链(LC)和重链(HC)的DNA的量,减少引入第一细胞的编码连接链(JC)的DNA的量,其中增强的表达是相对于以下而言的:在引入相对于JC DNA的量的更多量的HC和LC DNA的第二细胞中产生的IgA三聚体或四聚体的量。在某些实施例中,引入第一细胞的编码HC的DNA的量与编码LC的DNA的量与编码JC的DNA的量的比率(HC:LC:JC)为从约1:1:0.25到约1:1:0.5。

[0022] 本公开提供增加IgA1或IgA2m1聚合物产量的方法。在某些实施例中,该方法包括在第一细胞中表达在氨基酸V458处具有取代(例如V458I)的IgA1或IgA2m1抗体,其中增加的产量是相对于以下而言的:在表达于氨基酸V458处没有取代的IgA1或IgA2m1抗体的第二细胞中产生的IgA1或IgA2m1聚合物的量。本公开进一步提供增加IgA2m2二聚体产量的方法,包括在第一细胞中表达在氨基酸I458处具有取代(例如I458V)的IgA2m2抗体,其中增加的产量是相对于以下而言的:在表达于氨基酸I458处没有取代的IgA2m2抗体的第二细胞中产生的IgA2m2二聚体的量。在某些实施例中,用于增加IgA1或IgA2m1聚合物产量的方法包括在第一细胞中表达在氨基酸N459和/或S461处(例如N459Q和/或S461A)具有取代的IgA1或IgA2m1抗体,其中增加的产量是相对于以下而言的:在表达于氨基酸N459或S461处没有取代的IgA1或IgA2m1抗体的第二细胞中产生的IgA1或IgA2m1聚合物的量。在某些实施例中,用于减少IgA2m2聚合物产量的方法包括在第一细胞中表达在氨基酸C471处具有取代(例如C471S)的IgA2m2抗体,其中减少的产量是相对于以下而言的:在表达于氨基酸C471处没有取代的IgA2m2抗体的第二细胞中产生的IgA2m2聚合物的量。在某些实施例中,包括在氨基酸C471处的取代(例如C471S)的IgA抗体可以进一步包括在P221处的取代(例如P221R),

[0023] 本公开提供了增强IgA2m2抗体瞬时表达的方法,包括在第一细胞中表达IgA2m2抗体,该抗体包含在选自由N166、S212、N263、N337、I338、T339、N459和它们的组合组成的组的氨基酸处的取代,其中增强的瞬时表达是相对于以下而言的:在表达于选自由N166、S212、

N263、N337、I338、T339、N459和它们的组合组成的组的氨基酸处没有取代的IgA2m2抗体的第二细胞中产生的瞬时表达量。

[0024] 本公开进一步提供表达IgG-IgA融合分子的二聚体的方法,包括表达包含全长IgG抗体的IgG-IgA融合分子,所述全长IgG抗体在其C末端与IgA抗体的Fc区融合。在某些实施例中,IgA抗体的Fc区包含包括P221或R221至IgA抗体重链的C末端的序列,其中IgG抗体包含氨基酸K447的缺失。在某些实施例中,本公开提供了表达IgG-IgA融合分子的二聚体、三聚体和四聚体的方法,包括表达包含全长IgG抗体的IgG-IgA融合分子,所述全长IgG抗体在其C末端与IgA抗体的Fc区融合,其中IgA抗体的Fc区包含包括C242至IgA抗体重链的C末端的序列。在某些实施例中,IgG抗体包含氨基酸K447的缺失。

[0025] 本公开提供用于纯化本文公开的IgA和IgG-IgA融合分子和/或用于纯化本文公开的IgA和IgG-IgA融合分子的特定寡聚状态,例如二聚体、三聚体或四聚体的方法。在某些实施例中,用于从包含IgA抗体和至少一种宿主细胞蛋白的混合物中纯化IgA抗体的方法包括:将混合物施加于包含蛋白质L的柱以结合IgA抗体,用包含PBS的洗涤缓冲液洗涤蛋白质L柱,并通过包含磷酸的洗脱缓冲液从蛋白质L柱洗脱IgA抗体。在某些实施例中,用于从包含IgA抗体或IgG-IgA融合分子和至少一种宿主细胞蛋白的混合物中纯化寡聚状态的IgA抗体或IgG-IgA融合分子的方法可以包括:将混合物施加于包含蛋白质L或蛋白质A的亲和纯化柱以结合IgA抗体或IgG-IgA融合分子,用洗涤缓冲液洗涤亲和纯化柱,用洗脱缓冲液从亲和纯化柱上洗脱IgA抗体或IgG-IgA融合分子以形成第一洗脱物,将第一洗脱物施加到尺寸排阻色谱柱以分离不同的IgA寡聚状态以及获得包含寡聚状态的IgA抗体或IgG-IgA融合分子的流出物。

附图说明

[0026] 图1A-B和图1C-图1D.人IgA重链恒定结构域和J链的蛋白质序列。图1A-B的小图A:IgA1、IgA2m1和IgA2m2的人类重链恒定结构域C_H1,C_H2,C_H3、铰链(Brezski et al.Curr Opin Immunol 40:62-9(2016))以及尾端(Toraño et al.75:966-9(1978))的蛋白质序列比对。相对于IgA1序列的错配以灰色突出显示,N-联糖基化基序以方框表示,星号表示IgA2m2与IgA1和IgA2m1在尾端中的氨基酸差异。图1A-B的小图B:人J链的蛋白质序列,N-联糖基化基序以方框表示。图1C:IgA2mn的人重恒定链结构域C_H1,C_H2,C_H3、铰链和尾端的蛋白质序列。N-联糖基化位点以方框表示。图1D:具有轻链(LC)、重链(HC)和连接链(JC)的IgA寡聚状态示意图。IgA聚合物代表三聚体、四聚体和五聚体物种。

[0027] 图2A-2F.重组产生的IgA的寡聚状态受转染中使用的J链DNA的量和重链尾端序列的影响。图2A-图2C:使用不同比例的轻链(LC)、重链(HC)和连接链(JC)DNA对以下同种型/同种异型进行小规模瞬时转染的亲和纯化的IgA归一化分析尺寸排阻色谱的叠加图。图2A:IgA1、图2B:IgA2m1或图2C:IgA2m2。指示了单体(M)、二聚体(D)和聚合物(P)峰。基于每个色谱图的最高信号对值进行归一化。图2D-图2F为IgA产生的变体的单体、二聚体和三聚体/四聚体物种的相对数量,由分析SEC定量。图2D:IgA1、IgA2m1和IgA2m2的IgA尾端中第458和467位的突变对三聚体/四聚体形成的影响。去除图2E:IgA1或图2F:IgA2m2中N-联糖基化位点的突变对三聚体/四聚体形成的影响。

[0028] 图3A-3D.重组IgA寡聚物的生物物理和结构表征。图3A-3D的小图A:纯化的IgA1、

IgA2m1、IgA2m1 P221R和IgA2m2单体、二聚体和四聚体的分析尺寸排阻色谱的叠加图。图3A-3D的小图B:非还原(DTT)和还原(+DTT)IgA1、IgA2m1、IgA2m1 P221R和IgA2m2单体(M)、二聚体(D)和四聚体(T)的SDS-PAGE分析。重链(HC)、轻链(LC)和连接链(*)在还原样品中表示,IgA2m1的LC-LC二聚体用箭头表示。图3A-3D的小图C-D,上图:来自负染色电子显微镜的无参考2D类(reference-free 2Dclasses),用于图3A-3D的小图C:IgA2m2二聚体或图3A-3D的小图D:IgA2m2四聚体。图3A-3D的小图C-D,下图:原始图像粒子与其指定的2D类别相比,显示在叠加在2D类别上的IgA模型旁边,其中Fc结构域和Fab片段突出显示。

[0029] 图4A-4B.重组产生的IgA寡聚物在体外是稳定和功能性的。图4A-4B的小图A:转染人pIgR的MDCK细胞中抗mIL-13hIgA单体、二聚体和四聚体的体外转胞吞作用。IgA聚合物转胞吞,而单体则不然。图4A-4B的小图B:通过差示扫描荧光法(DSF)测量抗mIL-13IgA、IgG1和IgG1Fab片段的热稳定性。所有样品仅观察到一个熔融转变。

[0030] 图5A-5B和图5C.重组IgA寡聚物在体内显示出快速的血清清除率。图5A:小鼠中IgA或IgG的血清时间浓度曲线。Balb/c小鼠在给药后5分钟、15分钟、30分钟、1小时、1天、3天、7天和14天接受单次5mg/kg静脉内(IV)剂量的IgA或IgG分子的总体血清暴露。所有小鼠在异氟烷下眼眶后放血以评估血清浓度曲线。人血清IgA单体以10mg/kg施用,并显示为虚线。图5B-图5C:注射后1小时小鼠中IgA或IgG的组织分布。所有图均为n＝4的每组的平均值±SEM。图5B:每个组织(除了血液)的完整抗体的浓度差减血液归一化,表示为^{125}I(%ID/g组织)。(C)通过从^{111}In(%ID/g组织)中减去^{125}I(%ID/g组织)来确定分解代谢抗体浓度值。

[0031] 图6A-6B和图6C.重组IgA分子的不完全糖基化。图6A:N-联聚糖加工示意图。图6B:重组IgA和从人血清中纯化的IgA的全局N-联聚糖分析。在抗体去糖基化和随后的聚糖富集之后通过质谱分析进行聚糖分析。虽然人血清IgA的唾液酸化率超过90%,但所有重组表达的IgA分子的唾液酸化率都低于60%。图6C:IgA2m1二聚体的位点特异性N-联聚糖分析揭示了IgA2m1重链(HC)和连接链(JC)上不同N-联糖基化位点之间的异源聚糖组成。

[0032] 图7A-7C和图7D-7E.与野生型IgA相比,IgG1-IgA2m1 Fc融合体和非糖基化IgA2m2在体内显示出增加的血清暴露,并证明了体外转胞吞的能力。图7A:具有轻链(LC,黑色)、重链(HC,白色)和连接链的IgA2m2四聚体的示意图,其具有41个N连接的糖基化位点(菱形)(左)或无糖基化(右)。图7B:IgG1、IgA2m1二聚体或IgG1-IgA2m1Fc二聚体形式的示意图,包括LC(黑色)、IgG1 HC(点线)、IgA2m1HC(白色)、JC和N-联糖基化(菱形)。图7C:在小鼠血浆中孵育0小时(黑色)、24小时(橙色)或96小时(蓝色)后碘化IgG1-IgA2m1 Fc二聚体或四聚体的分析SEC。最初的IgG1-L-P221R IgA2m1 Fc四聚体和二聚体显示出类似于抗HER2 IgG1(曲妥珠单抗)峰值的降解,而重新工程改造的IgG1ΔK-P221 IgA2m1 Fc或IgG1ΔK-C242 IgA2m1 Fc二聚体是稳定的。图7D:小鼠中IgA或IgG的血清时间浓度曲线。施用单次30mg/kg IV剂量的IgA分子的Balb/c小鼠的总体血清暴露。之前以30mg/kg单次静脉(IV)注射给药的典型人IgG1(抗gD)的内部浓度数据显示为虚线。所有小鼠在异氟烷下眼眶后放血或通过心脏穿刺取血以评估血清浓度曲线。图7E:转染人pIgR的MDCK细胞中hIgA的体外转胞吞作用。

[0033] 图8A-8B.IgA2m2二聚体和四聚体纯化的原始负染色EM图像。图8A-8B的小图A:纯化的IgA2m2二聚体的负染色电子显微镜(EM)原始图像显示良好的单分散粒子。图8A-8B的小图B:纯化的IgA2m2四聚体的负染色EM原始图像显示良好的单分散径向粒子。

[0034] 图9.完整抗体分布归一化为血浆浓度。注射后1小时小鼠中IgA或IgG的组织分布。

所有值代表血液校正后组织的％ID/g,归一化为血浆的％ID/mL。所有图均为n＝4的每组的平均值±SD。

[0035] 图10.一天后完整抗体的组织分布。每个组织的完整抗体的组织浓度的差减血液归一化,表示为^{125}I(％ID/g组织)并在注射后一天计算。所有图均为n＝4的每组的平均值±SEM。

[0036] 图11.一天后降解的抗体的组织分布。通过从^{111}In(％ID/g组织)中减去^{125}I(％ID/g组织)来确定分解代谢的抗体值,并在注射后1天计算。所有图均为n＝4的每组的平均值±SEM。

[0037] 图12.IgG1-IgA2m1 Fc融合寡聚物示意图。IgG1-L-P221R IgA2m1 Fc融合体(Borrok et al.MAbs 7:743-51(2015))被制成二聚体和四聚体,但在小鼠血浆中的稳定性较差(图7C)。为了消除潜在的弗林蛋白酶切割位点,IgG1的C末端赖氨酸(K)和居间的亮氨酸残基(L)被删除。此外,IgA2m1野生型(WT)序列在第221位用脯氨酸恢复以制备IgG1ΔK-P221IgA2m1 Fc融合体。IgG1ΔK-C242 IgA2m1 Fc融合设计类似,但IgA2m1 Fc从残基C242开始,从而删除IgA2m1铰链(Δ铰链)。

[0038] 图13.工程改造的IgA寡聚物的全局聚糖分析。CHO重组产生的抗mIL-13IgG1ΔK与P221或C242 IgA2m1 Fc融合的二聚体和非糖基化抗HER2 IgA2m2四聚体融合的全局N-联聚糖分析。抗mIL-13IgG1ΔK与P221或C242 IgA2m1 Fc融合的二聚体均具有约20％的唾液酸化,正如预期的那样,未检测到无糖基化抗HER2 IgA2m2四聚体的糖基化。

[0039] 图14.来自人类和其他物种的IgA重链恒定结构域的蛋白质序列。人类重链恒定结构域C_H1、C_H2、C_H3、铰链(Brezski et al.(2016))和尾端(Toraño et al.(1978))的蛋白质序列比对。物种之间蛋白质序列的保守性以灰色突出显示,而N-联糖基化基序以方框表示。

[0040] 图15A-图15C.图15A:来自Expi293细胞中进行的小规模瞬时转染的亲和纯化的xmuIL13.huIgA1的分析尺寸排阻色谱图,轻链(LC)、重链(HC)和连接链(JC)DNA的比例介于1:1:0.25至1:1:2之间。图15B:来自Expi293细胞中进行的小规模瞬时转染的亲和纯化的xmuIL13.huIgA1的分析尺寸排阻色谱图,轻链(LC)、重链(HC)和连接链(JC)DNA的比例介于1:1:1至1:1:5之间。图15C:产生的IgA抗体的二聚体和四聚体物种的数量。

[0041] 图16A-图16B.图16A:来自Expi293细胞中进行的小规模瞬时转染的亲和纯化的xmuIL13.IgA2m1的分析尺寸排阻色谱图,轻链(LC)、重链(HC)和连接链(JC)DNA的比例不同。图16B:产生的IgA抗体的二聚体和四聚体物种的数量。

[0042] 图17A-图17B.图17A:来自Expi293细胞中进行的小规模瞬时转染的亲和纯化的xmuIL13.IgA2m1.P221R的分析尺寸排阻色谱图,轻链(LC)、重链(HC)和连接链(JC)DNA的比例不同。图17B:产生的IgA抗体的二聚体和四聚体物种的数量。

[0043] 图18A-图18E.图18A:来自Expi293细胞中进行的小规模瞬时转染的亲和纯化的xmuIL13.huIgA2m2的分析尺寸排阻色谱图,轻链(LC)、重链(HC)和连接链(JC)DNA的比例不同。图18B:来自Expi293细胞中进行的小规模瞬时转染的亲和纯化的xmuIL13.huIgA2m2的分析尺寸排阻色谱图,轻链(LC)、重链(HC)和连接链(JC)DNA的比例介于1:1:1至1:1:5之间。图18C:产生的IgA抗体的二聚体和四聚体物种的数量。图18D:来自Expi293细胞中进行的小规模瞬时转染的亲和纯化的xmuIL13.huIgA2m2的分析尺寸排阻色谱图,轻链(LC)、重链(HC)、连接链(JC)和分泌组分(SC)DNA的比例不同。图18E:通过质谱法确认

xmuIL13.huIgA2m2的重链、轻链和J链。

[0044] 图19描绘了以下同种型/同种异型的以下抗IL-13抗体的Biacore分析:IgA1二聚体、IgA2m1二聚体、IgA2m2二聚体和IgA2m2四聚体。

[0045] 图20A-图20B.图20A:来自Expi293细胞中进行的小规模瞬时转染的亲和纯化的xmuGP120.3E5.huIgA1的分析尺寸排阻色谱图,轻链(LC)、重链(HC)和连接链(JC)DNA的比例不同。图20B:来自Expi293细胞中进行的小规模瞬时转染的亲和纯化的xmuGP120.3E5.IgA2m1.P221R的分析尺寸排阻色谱图,轻链(LC)、重链(HC)和连接链(JC)DNA的比例不同。

[0046] 图21描绘了来自Expi293细胞中进行的小规模瞬时转染的亲和纯化的xmuGP120.3E5.huIgA2m2的分析尺寸排阻色谱图,轻链(LC)、重链(HC)和连接链(JC)DNA的比例不同。

[0047] 图22描绘了来自Expi293细胞中进行的小规模瞬时转染的亲和纯化的xmuGP120.3E5.huIgA2m2的分析尺寸排阻色谱图,轻链(LC)、重链(HC)和连接链(JC)DNA的比例不同。

[0048] 图23描绘了来自Expi293细胞中进行的小规模瞬时转染的亲和纯化的小鼠xgD.5B6.hIgA2m2的分析尺寸排阻色谱图,轻链(LC)、重链(HC)和连接链(JC)DNA的比例不同。

[0049] 图24A-图24C描绘了IgA2m2和J链的糖基化位点的修饰。图24A:与野生型相比,对IgA2m2重链和J链的修饰及其体外表达的总结。图24B:IgA2m2单糖基化变体的瞬时表达的总结。图24C:具有多个突变的IgA2m2糖基化变体的瞬时表达的总结。

[0050] 图25描绘了对来自人血清的IgA单体、野生型IgA2m2四聚体和IgA2m2四聚体(无糖基化)和J链(糖基化)的受体结合特性的分析。

[0051] 图26描述了每个IgA分子的聚糖特性分析。

[0052] 图27.在雌性Balb/C小鼠中单次10mg/kg IV注射后IgA分子的浓度时间曲线。

[0053] 图28A-图28B.图28A:分析半胱氨酸突变以防止与分泌组分或J链形成二硫键。图28B:将连接链添加到轻链和重链时,IgA2m2二聚体和更高阶寡聚物的形成需要C471而不是C311。

[0054] 图29描述了分泌组分、连接链、轻链和重链的共转染分析。

[0055] 图30A-图30E.图30A:为消除pIgR结合而产生的xmuIL13.IgA2m2变体的表达水平。图30B:来自Expi293细胞中进行的小规模瞬时转染的xmuIL13.IgA2m2变体的分析尺寸排阻色谱图。图30C:结合小鼠pIgR的xmuIL13.IgA2m2变体的Biacore分析。图30D:结合人pIgR的xmuIL13.IgA2m2变体的Biacore分析。图30E:结合人FcαRI的xmuIL13.IgA2m2变体的Biacore分析。

[0056] 图31A-图31B描述了细胞培养条件的分析以增加抗Jag1 IgA2m2的唾液酸化。图31A:xJAG1.2B3.hIgA2m2稳定细胞系的细胞培养条件矩阵。图31B:分析细胞培养条件对xJAG1.2B3.hIgA2m2的糖基化的影响。

[0057] 图32通过差示扫描荧光法(DSF)描绘了IgA变体的稳定性。

[0058] 图33A-图33D描述了全长抗鼠IL-13IgG1.Leu-P221R.IgA2m1 Fc融合分子的表征和工程改造以增强寡聚物稳定性。图33A:来自Expi293细胞中进行的小规模瞬时转染的亲

和纯化的糖基化全长抗鼠IL-13IgG1.Leu-P221R.IgA2m1 Fc融合分子的分析尺寸排阻色谱图,轻链(LC)、重链(HC)和连接链(JC)DNA的比例不同。图33B:结合小鼠pIgR的IgA寡聚物的Biacore分析。图33C:IgA寡聚物与小鼠pIgR和人pIgR结合的总结。图33D:DSF测定的IgA寡聚物的稳定性。

[0059] 图34A-图34C.图34A:IgG1全长-IgA Fc构建体设计,以消除弗林蛋白酶位点和不稳定性。图34B:工程改造的构建体的全长抗鼠IL-13IgG1-IgA Fc瞬时表达数据。图34C:工程改造的抗鼠IL-13IgA分子的小鼠血浆稳定性数据。

[0060] 图35A-图35B.图35A:IgA寡聚物与人FcαRI结合的Wasatch分析。图35B:由Wasatch表面等离子体共振(SPR)确定的IgA寡聚物与FcαRI的结合的总结。

[0061] 图36A-图36D.图36A:通过在CHO细胞和Expi293细胞中瞬时表达产生的IgA2m2二聚体和四聚体与小鼠和人类pIgR的结合的Wasatch分析。图36B:IgA2m2糖基化变体与小鼠pIgR的结合的Wasatch分析。图36C:IgA2m2糖基化变体与人pIgR的结合的Wasatch分析。图36D:由Wasatch SPR确定的IgA寡聚物与小鼠和人pIgR的结合的总结。

[0062] 图37A-图37C.图37A:hIgG1-hIgA1融合分子的表达谱。图37B:hIgG1-hIgA1融合分子的分析尺寸排阻色谱图。图37C:hIgG1-hIgA1融合分子与小鼠和人pIgR和人FcαRI的结合的Biacore分析。

[0063] 图38描绘了对各种IgA1抗体的N-联糖基化去除的分析。

[0064] 图39.重组表达的人抗mIL-13IgA2m2在Capto L柱上亲和纯化。然后使用3.5μm、7.8mm x 300mm Water's XBridge Protein BEH SEC 200 Å色谱柱在HPLC上通过尺寸排阻色谱(SEC)分析Capto L洗脱物。在分析SEC洗脱曲线中观察到三个主峰,对应于通过多角度光散射(MALS)和负染色电子显微镜确定的更高阶聚合物(峰1,包括三聚体、四聚体和五聚体)、二聚体(峰2)和单体(峰3)。

[0065] 图40.使用HiLoad 16/600Superose 6制备级(pg)柱通过尺寸排阻色谱(SEC)尝试分离在Capto L亲和柱洗脱物中看到的重组人抗mIL-13IgA2m2寡聚物种的混合物。在Superose 6洗脱曲线中观察到四个主峰,对应于由多角度光散射(MALS)耦合分析SEC和负染色电子显微镜确定的高分子量聚集体(峰1,在柱的空隙体积中洗脱)、高阶聚合物(峰2,可能包括三聚体、四聚体和五聚体)、二聚体(峰3)和单体(峰4)。显示了从峰2和峰3的馏分中测量的蛋白质的摩尔质量(MW)和多分散指数(PDI)。

[0066] 图41.使用3.5μm、7.8mm x 300mm Water's XBridge Protein BEH SEC 450 Å色谱柱在HPLC上通过尺寸排阻色谱(SEC)将重组人抗mIL-13IgA2m2二聚体与更高阶聚合物分离。在分析SEC洗脱曲线中观察到三个主峰,对应于通过多角度光散射(MALS)耦合分析SEC和负染色电子显微镜确定的更高阶聚合物(峰1,包括三聚体、四聚体和五聚体)、二聚体(峰2)和单体(峰3)。

[0067] 图42A-42D.图42A-42D的小图A:使用3.5μm、7.8mm x 300mm Water's XBridge Protein BEH SEC 200 Å色谱柱在HPLC上通过尺寸排阻色谱(SEC)分析人抗mIL-13IgA2m2的Capto L亲和柱洗脱。观察到三个主峰对应于更高阶聚合物(峰1,包括三聚体、四聚体和五聚体)、二聚体(峰2)和单体(峰3),这是通过多角度光散射(MALS)耦合分析型SEC和负染色电子显微镜确定的。图42A-42D的小图B:通过在3.5μm、7.8mm x 300mm Water's XBridge Protein BEH SEC 450 Å色谱柱上进行纯化,从图(A)中分离出峰1,如图41所示。此处显示

了在与MALS检测器耦合的3.5μm、7.8mm x 300mm Water's XBridge Protein BEH SEC 200 Å色谱柱上进行的峰1纯化后分析。由MALS确定的摩尔质量(MW)和多分散指数(PDI)与主要为四聚体IgA2m2的预期质量一致。图42A-42D的小图C:通过在3.5μm、7.8mm x 300mm Water's XBridge Protein BEH SEC 450 Å色谱柱上进行纯化,从图(A)中分离出峰2,如图41所示。此处显示了在与MALS检测器耦合的3.5μm、7.8mm x 300mm Water's XBridge Protein BEH SEC 200 Å色谱柱上进行的峰2纯化后分析。MALS确定的MW和PDI与主要为二聚体IgA2m2的预期质量一致。图42A-42D的小图D:在非还原(-DTT)或还原(+DTT)条件下,通过SDS-PAGE分析来自图42A-42D的小图B和小图C的峰1和2的纯化蛋白质。观察到还原的样品条带以重链(HC)、轻链(LC)和J链(JC)的预期质量迁移。

[0068] 图43A-43B.小图A:来自图42B中峰1的人抗mIL-13IgA2m2颗粒的负染色电子显微镜(EM)的代表性原始图像。小图B:来自图42B中峰1的颗粒负染色EM的无参考2D类,表明样品主要是四聚体。

[0069] 图44A-44B.图44A-44B的小图A:来自图42C中峰2的人抗mIL-13IgA2m2颗粒的负染色电子显微镜(EM)的代表性原始图像。图44A-44B的小图B:来自图42C中峰2的颗粒负染色EM的无参考2D类,表明样品主要是二聚体。

[0070] 图45.从图42A-42D中的小图C中的峰2纯化的人抗mIL-13IgA2m2二聚体的质谱分析。在热变性、用二硫苏糖醇还原和用PNGaseF去糖基化后进行的质谱分析证实存在正确的连接链(JC)、轻链(LC)和重链(HC)。

[0071] 图46A-46C.图46A-46C的小图A:使用3.5μm、7.8mm x 300mm Water's XBridge Protein BEH SEC 200 Å色谱柱在HPLC上通过尺寸排阻色谱(SEC)分析人抗mIL-13IgA1的Capto L亲和柱洗脱。在分离低聚物之前,观察到三个主峰对应于更高阶的聚合物(峰1,包括三聚体、四聚体和五聚体)、二聚体(峰2)和单体(峰3)。图46A-46C的小图B:通过3.5μm、7.8mm x 300mm Water's XBridge Protein BEH SEC 450 Å色谱柱在HPLC上纯化分离图(A)中的峰2,如图41所示。此处显示了在与多角度光散射(MALS)检测器耦合的3.5μm、7.8mm x 300mm Water'sXBridge Protein BEH SEC 200 Å色谱柱上进行的峰2纯化后分析。由MALS确定的摩尔质量(MW)和多分散指数(PDI)与主要为二聚体IgA1的预期质量一致。图46A-46C的C:在非还原(-DTT)或还原(+DTT)条件下,通过SDS-PAGE分析来自图(B)的峰2的纯化蛋白质。观察到还原的样品条带以重链(HC)、轻链(LC)和、J链(JC)的预期质量迁移。

[0072] 图47A-47C.图47A-47C的小图A:使用3.5μm、7.8mm x 300mm Water's XBridge Protein BEH SEC 200 Å色谱柱在HPLC上通过尺寸排阻色谱(SEC)分析人抗mIL-13IgA2m1的Capto L亲和柱洗脱。在分离低聚物之前,观察到三个主峰对应于更高阶的聚合物(峰1,包括三聚体、四聚体和五聚体)、二聚体(峰2)和单体(峰3)。图47A-47C的小图B:通过3.5μm、7.8mm x 300mm Water's XBridge Protein BEH SEC 450 Å色谱柱在HPLC上纯化分离图(A)中的峰2,如图41所示。此处显示了在与多角度光散射(MALS)检测器耦合的3.5μm、7.8mm x 300mm Water'sXBridge Protein BEH SEC 200 Å色谱柱上进行的峰2纯化后分析。由MALS确定的摩尔质量(MW)和多分散指数(PDI)与主要为二聚体IgA2m1的预期质量一致。图47A-47C的C:在非还原(-DTT)或还原(+DTT)条件下,通过SDS-PAGE分析来自图(B)的峰2的纯化蛋白质。观察到还原的样品条带以重链(HC)、轻链(LC)和、J链(JC)的预期质量迁移。

[0073] 图48A-48C.图48A-48C的小图A:使用3.5μm、7.8mm x 300mm Water's XBridge Protein BEH SEC 200 Å色谱柱在HPLC上通过尺寸排阻色谱(SEC)分析重链含有P221R突变的人抗mIL-13IgA2m1的Capto L亲和柱洗脱。在分离低聚物之前,观察到三个主峰对应于更高阶的聚合物(峰1,包括三聚体、四聚体和五聚体)、二聚体(峰2)和单体(峰3)。图48A-48C的小图B:通过3.5μm、7.8mm x 300mm Water's XBridge Protein BEH SEC 450 Å色谱柱在HPLC上纯化分离图(A)中的峰2,如图41所示。显示了在3.5μm、7.8mm x 300mm Water's XBridge Protein BEH SEC 200 Å色谱柱上进行的峰2纯化后分析。图48A-48C的小图C:在非还原(-DTT)或还原(+DTT)条件下,通过SDS-PAGE分析来自图48A-48C的小图B的峰2的纯化蛋白质。观察到还原的样品条带以重链(HC)、轻链(LC)和、J链(JC)的预期质量迁移。

[0074] 图49描绘了单体和聚合抗HER2 IgA抗体导致HER2+乳腺癌细胞系KPL-4、BT474-M1和SKBR3死亡的能力。

[0075] 图50描绘了在来自不同供体的中性粒细胞存在的情况下,单体和聚合抗HER2 IgA抗体导致SKBR3乳腺癌细胞死亡的能力。

[0076] 图51描绘了糖基化和非糖基化IgA聚合物和单体导致SKBR3乳腺癌细胞死亡的能力。

[0077] 图52A-图52B.图52A:IgA寡聚物和四聚体与人FcαRI的结合的Biacore分析。图52B:由Biacore SPR确定的IgA寡聚物和四聚体与FcαRI的结合的总结。

具体实施方式

[0078] 为清楚起见而不是作为限制,目前公开的主题的详细描述分为以下小节:

[0079] I.定义;

[0080] Ⅱ.抗体;

[0081] III.抗体制备和纯化的方法;

[0082] IV.治疗方法;

[0083] V.药物组合物;

[0084] VI.制品;和

[0085] VII.示例性实施例。

[0086] I.定义

[0087] 如本文所用,术语"约"或"大致"是指在如本领域普通技术人员所确定的特定值的可接受误差范围内,所述可接受误差范围将部分地取决于如何测量或确定该值,即测量系统的局限性。例如,按照本领域中的实践,"约"可以意谓3个内或多于3个标准偏差。可替代地,"约"可以表示给定值的至多20%,优选地至多10%,更优选地至多5%,并且更优选地至多1%的范围。可替代地,特别是关于生物系统或过程,该术语可以意指在某一值的某一数量级内,优选地在5倍以内,更优选地在2倍以内。

[0088] 除非上下文另外清楚规定,术语"一个"、"一种"、"所述"包含复数指代。术语"一个/一种"以及"一个/多个"和"至少一个"在本文中可互换使用。此外,在本文中使用的"和/或"将被视为两个特定特征或组分件中的每一个的具体公开,其中包含或不包含另一个。因此,本文短语诸如"A和/或B"中所用的术语"和/或",旨在包括A和B、A或B、A(单独)和B(单独)。同样,短语诸如"A、B和/或C"中所用的术语"和/或",旨在涵盖以下方面中的每个:A、B

和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

[0089] 本文的术语“抗体”以最广泛的含义使用,并且包括各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体、抗体片段和抗体融合分子,只要它们表现出所需的抗原结合活性即可。

[0090] “抗体片段”是指除了完整抗体以外的分子,其包含完整抗体的一部分且结合完整抗体结合的抗原。抗体片段的示例包括但不限于Fv、Fab、Fab’、Fab’-SH、$F(ab')_2$;双体抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如,scFv);以及由抗体片段形成的多特异性抗体。关于某些抗体片段的综述,请参见Holliger和Hudson,Nature Biotechnology 23:1126-1136(2005)。

[0091] 术语“嵌合”抗体是指这样的抗体,在所述抗体中重链和/或轻链的一部分来源于特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分来源于不同的来源或物种。

[0092] 抗体的“类别”是指抗体的重链所具有的恒定结构域或恒定区的类型。存在五大类抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且它们中的一些可以进一步分为亚类(同种型),例如IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1,以及IgA_2。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为α、δ、ε、γ和μ。

[0093] 术语“IgA抗体”是指IgA类抗体的抗体,包括IgA同种型IgA1和IgA2,以及IgA2的三种同种异型,m1、m2和mn。

[0094] 如本文所用,术语“细胞毒性剂”是指抑制或阻止细胞功能和/或导致细胞死亡或破坏的物质。细胞毒性剂包括但不限于放射性同位素(例如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);化疗剂或药物((例如甲氨蝶呤、阿霉素、长春花生物碱(长春新碱、长春花碱、依托泊苷)、多柔比星、美法仑、丝裂霉素C、苯丁酸氮芥、柔红霉素或其他嵌入剂);生长抑制剂;酶及其片段诸如溶核酶;抗生素;毒素诸如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素,包括其片段和/或变体;以及以下公开的各种抗肿瘤或抗癌药。

[0095] “效应子功能”是指可归因于抗体的Fc区、随着抗体同种型的变化而变化的那些生物学活性。抗体效应子功能的实例包括:C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如B细胞受体)的下调;以及B细胞活化。

[0096] 药剂(例如药物组合物)的“有效量”是指在必需的剂量和时段上有效实现期望的治疗或预防结果的量。例如但不作为限制,“有效量”可以指本文公开的抗体的量,其能够减轻、最小化和/或预防疾病和/或疾患的症状,延长存活和/或延长时间直至疾病和/或疾患复发。

[0097] 本文中的术语“Fc区”用于定义含有恒定区的至少一部分的免疫球蛋白重链的C末端区域。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。在某些实施例中,人IgG重链Fc区从Cys226或从Pro230延伸至重链的羧基末端。因此,Fc区的C末端赖氨酸(Lys447)或C末端甘氨酸(Gly446)可以存在或可以不存在。在某些实施例中,人IgA重链Fc区从Pro221(P221)、Arg221(R221)、Val222(V222)、Pro223(P223)或从Cys242(C242)延伸至重链的羧基端(参见图1A和C)。除非本文另外规定,否则Fc区或恒定区中氨基酸残基的编号是根据EU编号系统,EU编号系统也称为EU索引,如在Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological

Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991中所述。

[0098] “Fc受体”或“FcR”是指与抗体的Fc区结合的受体。Fc受体包括但不限于FcαRI(识别IgA抗体的Fc区)和Fcγ RII(识别IgG抗体的Fc区)。Fcγ RII受体包括Fcγ RIIA(“活化性受体”)和Fcγ RIIB(“抑制性受体”),这两者具有相似的氨基酸序列,主要区别在于它们的胞质结构域。活化性受体Fcγ RIIA在其胞质结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制性受体Fcγ RIIB在其胞质结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)。(参见例如Daëron,Annu.Rev.Immunol.15:203-234(1997))。关于FcR的综述见于例如:Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol9:457-92(1991);Capel et al.,Immunomethods 4:25-34(1994);和de Haas etal.,J.Lab.Clin.Med.126:330-41(1995)。本文中的术语“FcR”涵盖其他FcR,其中包括有待将来鉴定的那些。

[0099] 该术语“Fc受体”或“FcR”还包括新生儿受体FcRn,该受体负责将母体IgG转移给胎儿(Guyer et al.,J.Immunol.117:587(1976)和Kim et al.,J.Immunol.24:249(1994))和调节免疫球蛋白的稳态。测量与FcRn的结合的方法是已知的(参见例如Ghetie和Ward.,Immunol.Today 18(12):592-598(1997);Ghetie et al.,Nature Biotechnology,15(7):637-640(1997);Hinton et al.,J.Biol.Chem.279(8):6213-6216(2004);WO 2004/92219(Hinton et al.)。可在例如表达人FcRn的转基因小鼠或转染的人细胞系中或者在给予具有变体Fc区的多肽的灵长类动物中,测定与人FcRn的体内结合以及人FcRn高亲和力结合多肽的血清半衰期。WO 2000/042072(Presta)描述了与FcR的结合得到改善或有所减少的抗体变体。也参见例如Shields et al.,J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001)。

[0100] “框架”或“FR”是指除互补决定区(CDR)之外的可变结构域残基。可变结构域的FR通常由以下四个FR结构域组成:FR1、FR2、FR3和FR4。因此,CDR和FR序列通常在VH(或VL)中以如下序列出现:FR1-CDR-H1(CDR-L1)-FR2-CDR-H2(CDR-L2)-FR3-CDR-H3(CDR-L3)-FR4。

[0101] 术语“全长抗体”、“完整抗体”及“全抗体”在本文中可互换地用于指代具有基本上类似于天然抗体结构的结构或具有含有如本文所定义的Fc区的重链的抗体。

[0102] 如本文可互换使用的术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”与“宿主细胞培养物”是指其中已引入外源核酸的细胞,包括此类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化细胞”,其包括原代转化细胞和来源于所述原代转化细胞的子代,不考虑传代次数。子代可能不与亲本细胞的核酸内容物完全一致,而是可能含有突变。本文包括如在原始转化细胞中筛选或选择的具有相同功能或生物活性的突变子代。

[0103] “人抗体”是这样的抗体,其具有的氨基酸序列与由人或人细胞产生的抗体或利用人抗体库或其他人抗体编码序列的非人来源衍生的抗体的氨基酸序列相对应。人抗体的该定义特别地排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0104] “人共有框架”是这样的框架,其表示在人免疫球蛋白VL或VH框架序列的选择中最常存在的氨基酸残基。一般而言,人免疫球蛋白VL或VH序列的选择来自于可变结构域序列的亚组。一般而言,序列的亚组是如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,NIH Publication 91-3242,Bethesda MD(1991),第1-3卷中所述的亚组。在某些实施例中,对于VL,该亚组是如Kabat等人,出处同上中的亚组κI。在某些实施例中,对于VH,该亚组是如Kabat等人,出处同上中的亚组III。

[0105] “人源化”抗体是指这样的嵌合抗体,其包含来自非人CDR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基。在某些方面中,人源化抗体将基本上包含所有的至少一个,通常两个可变结构域,其中所有或基本上所有CDR对应于非人抗体的HVR,并且所有或基本上所有的FR对应于人抗体的FR。人源化抗体任选地可以包含来源于人抗体的抗体恒定区的至少一部分。“人源化形式”的抗体,例如非人抗体,是指已经进行过人源化的抗体。

[0106] 如本文所用,术语“高变区”或“HVR”是指以下项中的每一种:抗体可变结构域的在序列中高变(本文也称为“互补决定区”或“CDR”)和/或形成结构上限定的环(“高变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触点”)的区域。除非另外指明,否则可变结构域中的HVR残基和其他残基(例如,FR残基)在本文中根据Kabat等人,出处同上编号。通常,抗体包含六个HVR:三个在VH中(H1、H2、H3),并且三个在VL中(L1、L2、L3)。

[0107] “免疫缀合物”是指与一种或多种异源分子(包括但不限于细胞毒性剂)缀合的抗体。

[0108] 如本文可互换使用的“个体”或“受试者”为哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯养的动物(例如牛、绵羊、猫、犬和马)、灵长类动物(例如人和非人灵长类动物,诸如猴)、兔以及啮齿动物(例如小鼠和大鼠)。在某些实施例中,该个体或受试者为人。

[0109] “分离的”抗体为已从其自然环境的组分中分离的抗体。在某些实施例中,通过例如电泳(例如,SDS-PAGE、等电聚焦(isoelectric focusing,IEF)、毛细管电泳)或色谱(例如,离子交换或反相HPLC)测定,将抗体纯化至大于95%或99%的纯度。关于评定抗体纯度的方法的综述,请参见例如Flatman等人,J.Chromatogr.B 848:79-87(2007)。

[0110] “分离的”核酸是指已从其自然环境的组分中分离的核酸分子。分离的核酸包括这样的核酸分子,其包含在通常含有所述核酸分子的细胞中,但所述核酸分子存在于染色体外或与其天然染色体位置不同的染色体位置处。

[0111] “编码抗体的分离的核酸”是指编码抗体重链和轻链(或其片段)的一个或多个核酸分子,包括在单一载体或不同的载体中的此类核酸分子,以及存在于宿主细胞中一个或多个位置的此类核酸分子。

[0112] 术语“核酸分子”或“多核苷酸”包括包含核苷酸聚合物的任何化合物和/或物质。每个核苷酸由碱基组成,特别是嘌呤或嘧啶碱基(即胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U))、糖(即脱氧核糖或核糖)和磷酸基团。通常,核酸分子通过碱基序列进行描述,由此所述碱基代表核酸分子的一级结构(线性结构)。碱基序列通常表示为从5’至3’。在本文中,术语核酸分子涵盖脱氧核糖核酸(DNA)(包括例如互补DNA(cDNA)和基因组DNA)、核糖核酸(RNA)(特别是信使RNA(mRNA))、DNA或RNA的合成形式,以及包含这些分子中的两种或更多种的混合聚合物。核酸分子可以是线性的或环状的。此外,术语核酸分子包括有义链和反义链,以及单链和双链形式。此外,本文所描述的核酸分子可含有天然存在的或非天然存在的核苷酸。非天然存在的核苷酸的示例包括具有衍生化的糖或磷酸主链键或经化学修饰的残基的经修饰的核苷酸碱基。核酸分子还涵盖适合作为用于本发明的抗体的体外和/或体内(例如,在宿主或患者体内)直接表达的载体的DNA和RNA分子。此类DNA(例如cDNA)或RNA(例如mRNA)载体可以是未修饰的或经修饰的。例如,可以对mRNA进行化学修饰以增强RNA载体的稳定性和/或编码分子的表达,使得可以将mRNA注射到受试者体内以产生体内抗体(参见例如Stadler et al.,Nature Medicine 2017,在线发表于2017年6月12日,

doi:10.1038/nm.4356or EP 2101823 B1)。

[0113] 如本文所使用,术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体,即,除了可能的变异抗体(例如,含有天然存在的突变或在单克隆抗体制剂的制备过程中产生,此类变体通常以少量存在)之外,包含所述群体的各个抗体是相同的和/或结合相同的表位。与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,单克隆抗体制剂中的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。因此,修饰语“单克隆”表示抗体的特征是从基本上同质的抗体群体获得的,并且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,根据目前公开的主题所使用的单克隆抗体可通过多种技术制备,包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法,以及利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法,在本文中描述了用于制备单克隆抗体的此类方法和其他示例性方法。

[0114] “裸抗体”是指不缀合至异源部分(例如,细胞毒性部分)或放射性标记的抗体。裸抗体可存在于医药组合物中。

[0115] “天然抗体”是指具有不同结构的天然免疫球蛋白分子。例如,天然IgG抗体是约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,由经二硫键合的两条相同轻链和两条相同重链组成。从N末端到C末端,每条重链具有可变区(VH)(也称为可变重链结构域或重链可变结构域),后接三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3)。类似地,自N末端至C末端,各轻链具有可变区(VL),也称为可变轻链结构域或轻链可变结构域,继之以恒定轻链(CL)结构域。抗体的轻链基于其恒定结构域的氨基酸序列,可以归属于两种类型中的一种,所述两种类型称为卡帕(κ)和兰姆达(λ)。

[0116] 本文所用术语“包装插页”是指治疗产品的商业包装中通常包括的说明书,其含有涉及此类治疗产品的使用的有关适应症、用法、剂量、施用、联合疗法、禁忌症和/或警告的信息。

[0117] 关于参考多肽序列的“氨基酸序列同一性百分比”被定义为在对序列进行比对并引入空位(如果必要的话)以实现最大的序列同一性百分比,出于比对的目的而不考虑将任何保守取代作为序列同一性的一部分之后,候选序列中的氨基酸残基与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比的比对可以通过本领域技术范围内的各种方式实现,例如使用公众可获得的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、Clustal W、Megalign(DNASTAR)软件或FASTA程序包。本领域技术人员可确定用于比对序列的适当参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。可替代地,可使用序列比较计算机程序ALIGN-2生成同一性百分比值。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech,Inc.编写,并且源代码已经与用户文档一起提交到U.S.Copyright Office,Washington D.C.,20559,在那里以美国版权登记号TXU510087注册,并且如WO 2001/007611所述。

[0118] 除非另有说明,否则出于本文的目的,用BLOSUM50比较矩阵,使用FASTA包第36.3.8c版或更高版本的ggsearch程序生成氨基酸序列同一性百分比的值。FASTA程序包由W.R.Pearson和D.J.Lipman(1988),“Improved Tools for Biological Sequence Analysis”,PNAS 85:2444-2448;W.R.Pearson(1996)“Effective protein sequence comparison”Meth.Enzymol.266:227-258;以及Pearson等人,(1997)Genomics 46:24-36创作,并且可从www.fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_down.shtml或www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta公开获得。可替代地,可以使用可在

fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/index.cgi处访问的公共服务器来比较序列,使用ggsearch(全局蛋白质:蛋白质)程序和默认选项(BLOSUM50;开放:-10;ext:-2;Ktup=2)来确保执行全局而非局部比对。在输出的比对标头(alignment header)中给出氨基酸同一性百分比。

[0119] 术语“药物组合物”是指一种制备物,该制备物的形式允许该制备物中所含的活性成分的生物活性有效,并且该制备物不含对组合物将施用至的受试者具有不可接受的毒性的附加组分。

[0120] 如本文所用,“药用载体”是指药物组合物中除活性成分外的对受试者无毒的成分。药用载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂,或防腐剂。

[0121] 如本文所用,“治疗(treatment)”(及其语法变型,诸如“治疗(treat)”或“治疗(treating)”)是指试图改变待治疗个体的自然进程的临床干预,并且可以是为了预防或在临床病理学的进程中进行。治疗的期望效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、减轻症状、削弱疾病的任何直接或间接病理学后果、预防转移、减小疾病进展的速率、改善或减轻疾病状态,以及缓解或改善预后。在某些实施例中,本公开的抗体可用于延迟疾病的发展或减缓疾病的进展。

[0122] 术语“可变区”或“可变结构域”是指抗体重链或轻链的参与抗体与抗原结合的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为VH和VL)通常具有相似的结构,其中每个结构域包含四个保守框架区(FR)和三个互补决定区(CDR)。(参见例如,Kindt et al.Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007)。)单个VH或VL结构域可足以赋予抗原结合特异性。此外,结合特定抗原的抗体可分别使用来自结合该抗原的抗体的VH或VL结构域来进行分离,以筛选互补VL或VH结构域的文库。参见例如,Portolano et al.,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等人,Nature 352:624-628(1991)。

[0123] 如本文所用的术语“载体”是指能够载运与其相连的另一核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体,以及整合入其已被引入的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与其可操作连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。

[0124] Ⅱ.抗体

[0125] 在某些实施例中,本公开部分基于工程改造抗体的方法,例如IgA抗体和IgG-IgA融合分子,以表现出改善的血清保留和增加聚合抗体产量。在某些实施例中,本公开的抗体表现出与FcRn的结合。在某些实施例中,本公开的抗体表现出增加的IgR介导的转胞吞作用。在某些实施例中,本公开的抗体表现出与FcαRI的结合减弱和/或不结合。在某些实施例中,本公开的抗体可以通过在施用后最小化促炎应答而在治疗环境中提供优异的安全性。

[0126] 在某些实施例中,本公开提供了表现出改善的血清保留的抗体,例如IgA抗体和IgG-IgA融合分子。例如但不作为限制,本公开的抗体,例如IgA抗体和IgG-IgA Fc融合分子,在血浆中稳定长达约1天、长达约2天、长达约3天、长达约4天或长达约5天。在某些实施例中,本公开的抗体,例如IgA抗体和IgG-IgA融合分子,在血浆中稳定长达约4天。

[0127] 在某些实施例中,本公开提供具有减少的糖基化或无糖基化的抗体,例如IgA抗体和IgG-IgA融合分子。例如但不作为限制,与未修饰的IgA或未修饰的IgG-IgA融合分子相比,本公开的抗体表现出至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约95%的糖基化减少。在某些实

施例中,本公开的抗体小于约0.5%、小于约1%、小于约2%、小于约5%糖基化、小于约10%糖基化、小于约20%糖基化、小于约30%糖基化或少于约40%糖基化。在某些实施例中,本公开的抗体具有0%糖基化,即是无糖基化的。

[0128] A.示例性抗体

[0129] 1.IgA抗体变体

[0130] 本公开提供了IgA抗体,例如IgA1、IgA2m1、IgA2m2和IgA2mn抗体,它们已经被修饰以减少抗体被糖基化的程度。抗体糖基化位点的删除可以通过改变抗体的氨基酸序列以去除一个或多个糖基化位点来实现。在某些实施例中,可以修饰本公开的抗体以去除一个或多个、两个或多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个或六个或更多个糖基化位点,例如N-联糖基化位点和/或O-联糖基化位点。

[0131] 在某些实施例中,可以修饰本公开的抗体以去除一个或多个N-联糖基化基序N-X-S/T,其中X是任何氨基酸。在某些实施例中,N-联糖基化位点的去除可包括对糖基化位点基序中存在的一个或多个氨基酸进行修饰,例如突变。例如但不作为限制,N、X和/或S/T氨基酸可以在糖基化位点的基序中被修饰,例如突变。在某些实施例中,基序的所有三个氨基酸都可以突变。

[0132] 在某些实施例中,可以修饰本公开的抗体以从重链恒定结构域去除一个或多个、两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个或五个或更多个糖基化位点。例如但不作为限制,可以修饰本公开的抗体以去除重链恒定结构域氨基酸166、211、263和/或337处的一个或多个、两个或更多个、三个或更多个或全部4个N-联糖基化位点。在某些实施例中,可以修饰本公开的抗体以去除重链尾端中的一个或多个糖基化位点(参见图1A)。例如但不作为限制,可以修饰本公开的抗体以去除重链尾端的氨基酸459处的N-联糖基化位点。在某些实施例中,可以修饰本公开的IgA1抗体以去除氨基酸263和/或449处的一个或多个N-联糖基化位点。在某些实施例中,可以修饰本公开的IgA2m1抗体以去除氨基酸166、263、337和/或449处的一个或多个N-联糖基化位点。在某些实施例中,可以修饰本公开的IgA2m2或IgA2mn抗体以去除氨基酸166、211、263、337和/或449处的一个或多个N-联糖基化位点。在某些实施例中,可以修饰抗体以从抗体的重链去除所有N-联糖基化位点,包括重链恒定结构域和尾端。

[0133] 在某些实施例中,本公开的抗体可以是无糖基化的。例如但不作为限制,本公开的无糖基化抗体是在包括重链恒定区和尾端的抗体重链上没有糖基化的抗体。在某些实施例中,本公开的无糖基化抗体是在重链(包括重链恒定区和尾端)上没有糖基化,并且在J链上没有糖基化的抗体。

[0134] 在某些实施例中,本公开提供了一种IgA抗体,其具有一个或多个、两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个、九个或更多个、十个或更多个、十一个或更多个或十二个在氨基酸166、168、211、212、213、263、265、337、338、339、459和/或461处的修饰,例如取代,以减少IgA抗体的糖基化。例如,但不作为限制,本公开提供了一种IgA抗体,其具有一个或多个、两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个、九个或更多个、十个或更多个、十一个或更多个或十二个在氨基酸N166、T168、N211、S212、S213、N263、T265、N337、I338、T339、N459和/或S461处的修饰,例如取代,以减少IgA抗体的糖基

化。

[0135] 在某些实施例中,本公开的IgA1抗体在氨基酸263、265、459和/或461处,例如在氨基酸N263、T265、N459和/或S461处具有一个或多个、两个或更多个、三个或更多个或四个修饰。在某些实施例中,本公开的IgA2m1抗体在氨基酸166、168、263、265、337、338、339、459和/或461处,例如在氨基酸N166、T168、N263、T265、N337、I338、T339、N459和/或S461处具有一个或多个、两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个或八个修饰。在某些实施例中,本公开的IgA2m2或IgA2mn抗体在氨基酸166、168、211、212、213、263、265、337、338、339、459和/或461处,例如在氨基酸N166、T168、N211、S212、S213、N263、T265、N337、I338、T339、N459和/或S461处具有一个或多个、两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个、九个或更多个、十个或更多个、十一个或更多个或十二个修饰。在某些实施例中,本公开的IgA2m1、IgA2m2或IgA2mn抗体在所有三个氨基酸337、338和339处,例如在氨基酸N337、I338和T339处被修饰。

[0136] 在某些实施例中,本公开的IgA抗体,例如IgA2m1、IgA2m2或IgA2mn抗体,在氨基酸N166处具有修饰。在某些实施例中,本公开的IgA抗体,例如IgA2m1、IgA2m2或IgA2mn抗体,在氨基酸N168处具有修饰。在某些实施例中,本公开的IgA抗体,例如IgA2m2或IgA2mn抗体,在氨基酸S211处具有修饰。在某些实施例中,本公开的IgA抗体,例如IgA2m2或IgA2mn抗体,在氨基酸S212处具有修饰。在某些实施例中,本公开的IgA抗体,例如IgA2m2或IgA2mn抗体,在氨基酸S213处具有修饰。在某些实施例中,本公开的IgA抗体,例如IgA1、IgA2m1、IgA2m2或IgA2mn抗体,在氨基酸N263处具有修饰。在某些实施例中,本公开的IgA抗体,例如IgA1、IgA2m1、IgA2m2或IgA2mn抗体,在氨基酸N265处具有修饰。在某些实施例中,本公开的IgA抗体,例如IgA2m1、IgA2m2或IgA2mn抗体,在三个氨基酸N337、I338和T339处具有修饰。在某些实施例中,本公开的IgA抗体,例如IgA1、IgA2m1、IgA2m2或IgA2mn抗体,在氨基酸N459处具有修饰。在某些实施例中,本公开的IgA抗体,例如IgA1、IgA2m1、IgA2m2或IgA2mn抗体,在氨基酸S461处具有修饰。

[0137] 在某些实施例中,氨基酸N可突变为A、G或Q氨基酸。在某些实施例中,氨基酸S可突变为A氨基酸。在某些实施例中,氨基酸T可突变为A氨基酸。在某些实施例中,本公开的IgA抗体,例如本公开的IgA2m2或IgA2mn抗体,可以被修饰以包含以下突变N166A、S212P、N263Q、N337T、I338L、T339S和N459Q中的一个或多个、两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个或所有七个。例如但不作为限制,本公开的IgA1抗体可以被修饰以包含以下突变N263Q和N459Q中的一个或多个或所有两个。在某些实施例中,本公开的IgA2m1抗体可以被修饰为包含以下突变N166A、N263Q、N337T、I338L、T339S和N459Q中的一个或多个、两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个或所有六个。在某些实施例中,本公开的IgA2m2或IgA2mn抗体可以被修饰以包含以下突变N166A、S212P、N263Q、N337T、I338L、T339S和N459Q中的一个或多个、两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个或所有七个。

[0138] 在某些实施例中,可以修饰本公开的抗体的J链以去除一个或多个糖基化位点。在某些实施例中,可以修饰本公开的抗体以去除J链的氨基酸49处的N-联糖基化位点,例如通过修饰包含氨基酸49、50和51的糖基化位点基序的一个或多个氨基酸。例如但不作为限制,

J链的氨基酸N49和/或氨基酸S51可以被修饰。在某些实施例中,氨基酸N可突变为A、G或Q氨基酸和/或氨基酸S可突变为A氨基酸。例如,但不作为限制,本公开的抗体的J链可以包含N49A/G/Q突变和/或S51A突变。在某些实施例中,本公开的抗体的J链可包含N49Q突变。

[0139] 在某些实施例中,本公开的抗体可以被修饰以从重链去除一个或多个、两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个或五个或更多个糖基化位点,并被修饰以从J链去除一个糖基化位点。在某些实施例中,本公开的抗体在重链的氨基酸N166、T168、N211、S212、S213、N263、T265、N337、I338、T339、N459和/或S461处具有一个或多个、两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个、九个或更多个、十个或更多个的十一个或更多或十二个修饰,例如取代,并且在J链的氨基酸N49和/或S51处具有一个或两个修饰,例如取代。在某些实施例中,本公开的抗体在重链的氨基酸N166、S212、N263、N337、I338、T339和/或N459处具有一个或多个、两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个或所有七个修饰,例如取代,并且在J链的氨基酸N49和/或S51处具有一或两个修饰,例如取代。

[0140] 在某些实施例中,本公开的IgA抗体,例如IgA1、IgA2m1、IgA2m2或IgA2mn抗体,可以在氨基酸N459或S461处具有一个或多个修饰以减少IgA抗体的糖基化。在某些实施例中,氨基酸N459和/或S461的修饰导致抗体产生聚合物例如二聚体、三聚体、四聚体和五聚体的能力增强。

[0141] 在某些实施例中,本公开的抗体,例如IgA抗体,可以在氨基酸458处具有修饰,例如取代。在某些实施例中,本公开提供在氨基酸V458处具有取代的IgA1、IgA2m1和IgA2mn抗体。在某些实施例中,氨基酸V458可以突变为异亮氨酸(即V458I)。在某些实施例中,本公开提供在氨基酸I458处具有取代的IgA2m2抗体。在某些实施例中,氨基酸I458可突变为缬氨酸(即I458V)。在某些实施例中,如本文所述,这些修饰中的一个或多个可以存在于糖基化减少或没有糖基化的抗体中。

[0142] 在某些实施例中,本公开的抗体,例如IgA抗体,可以在氨基酸C471和/或C311处具有修饰,例如取代。在某些实施例中,IgA抗体可在氨基酸C471,例如C471S处具有突变。在某些实施例中,IgA抗体可在氨基酸C311,例如C311S处具有突变。

[0143] 在一些实施例中,可对本公开的抗体进行修饰,以产生具有某些改善特性的抗体变体。例如但不作为限制,具有减少的糖基化的本公开的抗体可以表现出改善的血清保留。在某些实施例中,具有减少的糖基化的本公开的抗体可以具有增强的产生聚合物例如二聚体、三聚体、四聚体和五聚体的能力。在某些实施例中,具有减少的糖基化的本公开的抗体可表现出与IgA特异性hFc受体FcαRI的结合减弱,例如不与FcαRI结合。在某些实施例中,与在氨基酸458、459和/或S461处没有一个上述修饰的抗体相比,具有修饰的本公开的抗体增强了产生聚合物(例如二聚体、三聚体、四聚体和五聚体)的能力。在某些实施例中,在氨基酸C471处具有修饰的本文公开的抗体产生聚合物例如二聚体、三聚体、四聚体和五聚体的能力减弱。

[0144] 2.IgG-IgA融合分子

[0145] 本公开进一步提供了包含IgG抗体的至少一部分和IgA抗体的至少一部分的抗体,在本文中称为IgG-IgA融合分子。在某些实施例中,本公开的IgG-IgA融合分子对蛋白酶(例如弗林蛋白酶)的抗性增强,活性和/或血清半衰期增加(参见表9)。在某些实施例中,本公

开的IgG-IgA融合分子结合FcRn。

[0146] 在某些实施例中,本公开的IgG-IgA融合分子的IgG抗体可以是全长IgG抗体。在某些实施例中,IgG抗体可以是结合新生儿Fc受体(FcRn)的任何IgG抗体。例如但不限于,IgG抗体可以是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在某些实施例中,IgG抗体是抗IgG1抗体。在某些实施例中,IgG抗体是抗IgG2抗体。在某些实施例中,IgG抗体是抗IgG3抗体。在某些实施例中,IgG抗体是抗IgG4抗体。

[0147] 在某些实施例中,本公开的IgG-IgA融合分子可包括与IgA抗体的片段融合的IgG抗体。在某些实施例中,IgA抗体可以是IgA1抗体、IgA2m1抗体、IgA2mn抗体或IgA2m2抗体。在某些实施例中,IgA片段可以是约300个氨基酸长度、约250个氨基酸长度、约200个氨基酸长度、约150个氨基酸长度、约100个氨基酸长度、约80个氨基酸长度、约60个氨基酸长度、约40个氨基酸长度或约20个氨基酸长度。在某些实施例中,IgA片段的长度约为250个氨基酸。在某些实施例中,IgA片段的长度约为20个氨基酸,例如约18个氨基酸。例如但不作为限制,IgA片段可以包括IgA抗体的Fc区。在某些实施例中,IgA片段可包括IgA抗体的CH2和CH3结构域。在某些实施例中,IgA片段可进一步包括IgA抗体的铰链区。在某些实施例中,IgA片段可进一步包括IgA抗体的尾端。

[0148] 在某些实施例中,本公开的IgG-IgA融合分子可包括IgG抗体、和IgA抗体的Fc区。在某些实施例中,IgG-IgA融合分子可包括在IgG抗体的C末端融合至本文公开的IgA抗体的Fc区的IgG抗体。例如但不作为限制,IgG-IgA融合分子可包括在IgG重链序列的C末端与IgA重链的Fc区融合的全长IgG重链序列(参见图7B、12和34A)。

[0149] 在某些实施例中,融合分子的IgA部分,例如IgA抗体的Fc区,可包含P221至重链的C末端的序列。例如但不作为限制,IgA抗体部分可以包括IgA抗体的氨基酸P221-Y472。在某些实施例中,IgA抗体例如IgA1或IgA2m1抗体的Fc区,可包含P221至重链的C末端的序列。在某些实施例中,P221氨基酸可以突变为精氨酸(R),即P221R。在某些实施例中,IgA抗体例如IgA2m2或IgA2mn抗体的Fc区,可包含R221至重链的C末端的序列,例如可包含IgA抗体的氨基酸R221-Y472。可替代地,IgA抗体的Fc区可包含C242至重链的C末端的序列,其删除了IgA抗体的铰链区。例如但不作为限制,融合分子的IgA部分可以包括IgA抗体的氨基酸C242-Y472。在某些实施例中,融合分子的IgA部分,例如IgA抗体的Fc区,可包含V222至重链的C末端的序列。例如但不作为限制,IgA抗体部分可以包括IgA抗体例如IgA1、IgA2m1、IgA2mn或IgA2m2抗体的氨基酸V222-Y472。在某些实施例中,融合分子的IgA部分,例如IgA抗体的Fc区,可包含P223至重链的C末端的序列。例如但不作为限制,IgA抗体部分可以包括IgA抗体例如IgA1、IgA2m1、IgA2mn或IgA2m2抗体的氨基酸P223-Y472。在某些实施例中,融合分子的IgA部分,例如IgA抗体的Fc区,可包含C241至重链的C末端的序列。例如但不作为限制,IgA抗体部分可以包括IgA抗体例如IgA1、IgA2m1、IgA2m2或IgA2mn抗体的氨基酸C241-Y472。

[0150] 在某些实施例中,融合分子的IgA部分,例如IgA抗体的Fc区,可包含P237至重链的C末端的序列。例如但不作为限制,IgA抗体部分可以包括IgA抗体例如IgA1、IgA2m1、IgA2mn或IgA2m2抗体的氨基酸P237-Y472。在某些实施例中,融合分子的IgA部分,例如IgA抗体的Fc区,可包含P238至重链的C末端的序列。例如但不作为限制,IgA抗体部分可以包括IgA抗体例如IgA2m1、IgA2m2或IgA2mn抗体的氨基酸P238-Y472。在某些实施例中,融合分子的IgA部分,例如IgA抗体的Fc区,可包含S238至重链的C末端的序列。例如但不作为限制,IgA抗体

部分可以包括IgA抗体例如IgA1抗体的氨基酸S238-Y472。在某些实施例中,融合分子的IgA部分,例如IgA抗体的Fc区,可包含P239至重链的C末端的序列。例如但不作为限制,IgA抗体部分可以包括IgA抗体例如IgA1、IgA2m1、IgA2m2或IgA2mn抗体的氨基酸P239-Y472。在某些实施例中,融合分子的IgA部分,例如IgA抗体的Fc区,可包含P240至重链的C末端的序列。例如但不作为限制,IgA抗体部分可以包括IgA抗体例如IgA2m1、IgA2m2或IgA2mn抗体的氨基酸P240-Y472。在某些实施例中,融合分子的IgA部分,例如IgA抗体的Fc区,可包含S240至重链的C末端的序列。例如但不作为限制,IgA抗体部分可以包括IgA抗体例如IgA1抗体的氨基酸S240。在某些实施例中,融合分子的IgA部分不包括IgA抗体的尾端,例如氨基酸454-472。

[0151] 在某些实施例中,本公开的IgG-IgA融合分子可以包括来自一种IgA同种型的Fc区和来自第二种同种型的铰链区。例如但不作为限制,本公开的IgG-IgA融合分子可以包括来自IgA2例如IgA2m1、IgA2m2或IgA2mn抗体的铰链区,并且包括来自IgA1抗体的Fc区。

[0152] 在某些实施例中,IgG抗体的重链已被修饰以去除C末端赖氨酸,例如IgG抗体(例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)的氨基酸K447。例如但不作为限制,本公开提供了一种IgG-IgA融合分子,其包括缺乏氨基酸K447的IgG抗体和包括IgA抗体的氨基酸P221-Y472或R221-Y472的IgA部分。

[0153] 在某些实施例中,IgG抗体和IgA抗体的Fc区之间的连接可包含氨基酸序列TQKSLSLSPGPVPPPPPCC(SEQ ID NO:1)或其片段或其保守取代。在某些实施例中,IgG抗体和IgA抗体的Fc区之间的连接可包含氨基酸序列TQKSLSLSPGC(SEQ ID NO:2)或其片段或其保守取代。表1中提供了保守取代的非限制性实例。在某些实施例中,IgG抗体和IgA抗体的Fc区之间的连接可以包含如图34A中公开的氨基酸序列。

[0154] 在某些实施例中,本公开的IgG-IgA Fc融合体在血浆中稳定长达约1天、长达约2天、长达约3天、长达约4天或长达约5天。例如但不作为限制,本公开的IgG1-IgA Fc融合体在血浆中稳定长达约4天。

[0155] 在某些实施例中,本公开的IgG-IgA融合分子可进一步包括一个或多个如上所述的氨基酸取代以减少糖基化。例如但不作为限制,可以修饰本公开的IgG-IgA融合分子以去除IgG-IgA融合分子的IgA抗体的重链和/或J链的糖基化。在某些实施例中,IgG-IgA融合分子的IgA抗体是无糖基化的。在某些实施例中,本公开的IgG-IgA融合分子结合FcRn但不结合FcαRI。

[0156] 在某些实施例中,本公开的IgG-IgA融合分子可以进一步包括对一个或多个Fc区残基238、265、269、270、297、327和329的取代。例如但不作为限制,本公开的IgG-IgA融合分子可进一步包括在氨基酸297例如N297G处的取代。

[0157] 在某些实施例中,本公开的IgG-IgA融合分子可进一步包括在氨基酸C471和/或C311处的取代。在某些实施例中,本公开的IgG-IgA融合分子可在氨基酸C471例如C471S处具有突变。在某些实施例中,本公开的IgG-IgA Fc融合分子可在氨基酸C311例如C311S处具有突变。

[0158] B.嵌合和人源化抗体

[0159] 在某些实施例中,本公开的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体描述于,例如,美国专利号4,816,567;和Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984)中。在某些实施例中,本公开的嵌合抗体包含非人可变区(例如,源自小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵

长类动物(诸如猴)的可变区)和人恒定区。在另一实例中,嵌合抗体可以是其中类别或亚类已经与亲本抗体的类别或亚类改变的“类别转换”抗体。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0160] 在某些实施例中,本公开的嵌合抗体可以是人源化抗体。通常,将非人抗体人源化以减少对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包含一个或多个可变结构域,其中HVR,例如CDR(或其部分)源自非人抗体,而FR(或其部分)源自人抗体序列。人源化抗体任选地还将包含人恒定区的至少一部分。在某些实施例中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,HVR残基所来源于的抗体)的相应残基取代,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0161] 人源化抗体及其制备方法在例如Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008)中综述,并且进一步描述于例如Riechmann等人,Nature 332:323-329(1988);Queen等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 86:10029-10033(1989);美国专利号5,821,337、7,527,791、6,982,321和7,087,409;Kashmiri等人,Methods 36:25-34(2005)(描述了特异性决定区(SDR)移植);Padlan,Mol.Immunol.28:489-498(1991)(描述了“表面再塑”);Dall'Acqua等人,Methods 36:43-60(2005)(描述了“FR改组”);以及Osbourn等人,Methods 36:61-68(2005)和Klimka等人,Br.J.Cancer,83:252-260(2000)(描述了用于FR改组的“指导选择”方法)中。

[0162] 可用于人源化的人框架区包括但不限于:使用“最佳拟合”方法选择的框架区(参见例如Sims et al.,J.Immunol.151:2296(1993));来源于轻链或重链可变区的特定亚组的人抗体的共有序列的框架区(参见例如Carter et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285(1992);和Presta et al.,J.Immunol.,151:2623(1993));人成熟(体细胞突变)框架区或人种系框架区(参见例如,Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008));以及来源于筛选FR文库的框架区(参见例如Baca et al.,J.Biol.Chem.272:10678-10684(1997)和Rosok et al.,J.Biol.Chem.271:22611-22618(1996))。

[0163] C.人抗体

[0164] 在某些实施例中,本公开的抗体可以是人抗体。可以使用本领域已知的各种技术来产生人抗体。人抗体一般描述于van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74(2001)以及Lonberg,Curr.Opin.Immunol.20:450-459(2008)中。

[0165] 可以通过以下方式来制备人抗体:将免疫原施用于转基因动物,所述转基因动物已被修饰以应答于抗原激发而产生具有人可变区的完整人抗体或完整抗体。此类动物通常含有全部或部分人免疫球蛋白基因座,所述全部或部分人免疫球蛋白基因座替代内源性免疫球蛋白基因座,或者在动物的染色体外存在或随机整合至动物的染色体中。在此类转基因小鼠中,内源性免疫球蛋白基因座通常已被灭活。关于从转基因动物获得人抗体的方法的综述,参见Lonberg,Nat.Biotech.23:1117-1125(2005)。还参见例如描述XENOMOUSE™技术的美国专利号6,075,181和6,150,584;描述HUMAB®技术的美国专利号5,770,429;描述K-M MOUSE®技术的美国专利号7,041,870,以及描述VELOCIMOUSE®技术的美国专利申请公开号US2007/0061900)。可以进一步修饰来自由此类动物产生的完整抗体的人可变区,例如通过与不同的人恒定区组合。

[0166] 人抗体也可以通过基于杂交瘤的方法制备。已经描述了用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人杂交骨髓瘤细胞系。(参见例如Kozbor J.Immunol.,133:3001(1984);

Brodeur et al.,Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,pp.51-63(Marcel Dekker,Inc.,New York,1987);和Boerner et al.,J.Immunol.,147:86(1991)。)经由人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体也如Li等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,103:3557-3562(2006)所述。另外的方法包括例如在美国专利号7,189,826(描述了从杂交瘤细胞系产生单克隆人IgM抗体)和Ni,Xiandai Mianyixue,26(4):265-268(2006)(描述了人-人杂交瘤)中描述的那些方法。人类杂交瘤技术(Trioma技术)也描述于Vollmers和Brandlein,Histology and Histopathology,20(3):927-937(2005)和Vollmers和Brandlein,Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology,27(3):185-91(2005)中。

[0167] 人抗体还可以通过分离选自人源噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列产生。然后可以将此类可变结构域序列与预期的人恒定结构域结合。从抗体文库中选择人抗体的技术描述如下。

[0168] D.抗体变体

[0169] 当前公开的主题进一步提供了所公开抗体的氨基酸序列变体。例如,可能期望改善抗体的结合亲和力和/或其他生物特性。抗体的氨基酸序列变体可以通过向编码抗体的核苷酸序列中引入适当的修饰或通过肽合成来制备。此类修饰包括但不限于抗体氨基酸序列内残基的缺失和/或插入和/或取代。可以进行缺失、插入和取代的任何组合以实现最终构建体,前提条件是最终抗体(即修饰的)具有所需特征,例如抗原结合。

[0170] 1.取代、插入和缺失变体

[0171] 在某些实施例中,抗体变体可以具有一或多个氨基酸取代。用于取代突变的目的位点包括HVR和FR。保守取代的非限制性实例在表1中的“优选取代”标题下示出。在表1中的“示例性取代”标题下提供了更实质性的变化的非限制性实例,如下面参考氨基酸侧链类别所进一步描述的。可以将氨基酸取代引入目标抗体中,并对产物进行所需活性(例如保留/改善的抗原结合、减弱的免疫原性、或改善的补体依赖细胞毒性(CDC)或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC))筛选。

[0172] 表1.

[0173]

原始的 残基	示例性 取代	优选的 取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp、Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0174] 可根据共同的侧链特性将氨基酸分组:

[0175] (1)疏水性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0176] (2)中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0177] (3)酸性:Asp、Glu;

[0178] (4)碱性:His、Lys、Arg;

[0179] (5)影响链取向的残基:Gly、Pro;

[0180] (6)芳香族:Trp、Tyr、Phe。

[0181] 在某些实施例中,非保守性取代将需要用这些类别中的一个的成员交换另一类别。

[0182] 在某些实施例中,一种类型的取代变体涉及置换亲本抗体(例如,人源化抗体或人抗体)的一个或多个高可变区残基。通常,相对于亲本抗体,选为用于进一步研究的一个或多个所得变体将在某些生物学特性方面(例如但不限于,亲和力增强、免疫原性减弱)有改变(例如,改善)和/或将基本上保留亲本抗体的某些生物学特性。取代变体的非限制性实例是亲和力成熟抗体,其可例如使用诸如本文所述的那些基于噬菌体展示的亲和力成熟技术方便地生成。简而言之,将一个或多个HVR残基突变并且将变体抗体展示在噬菌体上并针对

特定生物学活性(例如,结合亲和力)进行筛选。

[0183] 在某些实施例中,例如可改变(例如取代)HVR,以改善抗体亲和力。此类改变可发生于HVR“热点”中,即由体细胞成熟过程中发生高频突变的密码子编码的残基(参见例如:Chowdhury,Methods Mol.Biol.207:179-196(2008))和/或与抗原接触的残基(检测所得变体VH或VL的结合亲和力)。通过构建并自二级文库重新选择而实现的亲和力成熟已描述于例如Hoogenboom等人,Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien等人编,Human Press,Totowa,NJ,(2001))中。在亲和力成熟的某些实施例中,通过多种方法(例如,易错PCR、链改组或寡核苷酸定向突变)中的任一个可将多样性引入出于成熟目的而挑选的可变基因中。然后创建一个二级文库。然后筛选该文库以鉴定具有所需亲和力的任何抗体变体。引入多样性的另一种方法涉及HVR定向方法,其中将若干HVR残基(例如每次4-6个残基)随机化。参与抗原结合的HVR残基可例如使用丙氨酸扫描突变或建模来特异性地鉴定。特别是CDR-H3和CDR-L3经常成为目标。

[0184] 在某些实施例中,取代、插入或缺失可发生在一个或多个HVR内,只要此类改变基本上不减弱抗体的抗原结合能力即可。例如,可在HVR中进行基本上不减弱结合亲和力的保守性改变(例如,如本文提供的保守性取代)。此类改变可以在HVR的抗原接触残基之外。在上文提供的变体VH和VL序列的某些实施例中,每个HVR保持不变,或包含不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[0185] 可用于鉴别可被靶向诱变的抗体残基或区域的方法称作“丙氨酸扫描诱变”,如Cunningham和Wells(1989)Science,244:1081-1085所描述。在此方法中,鉴别残基或一组靶残基(例如带电残基,诸如arg、asp、his、lys和glu)并用中性或带负电的氨基酸(例如,丙氨酸或多丙氨酸)置换以确定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可在对初始取代展示功能敏感性的氨基酸位置引入其他取代。可替代地或另外地,利用抗原-抗体复合物的晶体结构鉴定抗体与抗原之间的接触点。可靶向或消除作为取代的候选的此类接触残基和相邻残基。可筛选变体以确定它们是否具备期望的特性。

[0186] 氨基酸序列插入包括长度范围为一个残基至含有一百个或更多个残基的多肽的氨基和/或羧基末端融合,以及一个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N末端甲硫氨酰残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括将抗体的N末端或C末端与增加抗体的血清半衰期的酶(例如,对于抗体定向酶前药疗法(ADEPT))或多肽融合。

[0187] 2.Fc区变体

[0188] 在某些实施例中,一个或多个氨基酸修饰可引入本文提供的抗体的Fc区中,从而生成Fc区变体。Fc区变体可以包含人Fc区序列(例如人IgA Fc区或人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区),其在一个或多个氨基酸位置上包含氨基酸修饰(例如取代)。

[0189] 在某些实施例中,本公开提供了具有一些但不是全部效应子功能的抗体变体,这使其成为应用的期望候选物,其中体内抗体的半衰期为重要的而某些效应子功能(诸如补体和ADCC)为不必要的或有害的。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定,以确认CDC和/或ADCC活性的减弱/耗尽。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定以确保抗体缺乏IgA-特异性hFc受体(即FcαRI)结合,但是保留FcRn结合能力。造血细胞上的FcR表达总结在Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-492(1991)的第464页的表3中。例如,介导ADCC的原代细胞、NK细胞仅表达Fcγ RIII,而单核细胞表达Fcγ RI、Fcγ RII和Fcγ RIII。用于评价目标分

子的ADCC活性的体外测定的其他非限制性实例描述于美国专利号5,500,362(参见例如Hellstrom,I.等人.Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 83:7059-7063(1986))和Hellstrom,等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 82:1499-1502(1985);5,821,337(参见Bruggemann,M.等人,J.Exp.Med.166:1351-1361(1987))。可替代地,可以使用非放射性测定方法(参见例如,用于流式细胞术的ACTI™非放射性细胞毒性测定(Cell Technology,Inc.Mountain View,CA;以及CYTOTOX 96®非放射性细胞毒性测定(威斯康星州,麦迪逊市,普洛麦格公司(Promega,Madison,WI)。用于此类测定的有用效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。可替代地或另外地,可例如在诸如在Clynes等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 95:652-656(1998)中公开的动物模型中体内评估目的分子的ADCC活性。也可以进行C1q结合测定以确认抗体不能结合C1q,因此缺乏CDC活性。参见例如,WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评定补体活化,可以执行CDC测定(参见例如Gazzano-Santoro et al.,J.Immunol.Methods 202:163(1996);Cragg,M.S.et al.,Blood 101:1045-1052(2003);和Cragg,M.S.and M.J.Glennie,Blood 103:2738-2743(2004))。FcRn结合和体内清除/半衰期测定也可以使用本领域已知的方法执行(参见例如Petkova,S.B.et al.,Int'l.Immunol.18(12):1759-1769(2006))。在某些实施例中,例如在美国专利号6,194,551、WO 99/51642和Idusogie et al.J.Immunol.164:4178-4184(2000)中所述,在Fc区中可进行改变,导致改变(即改善或减少)的C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0190] 具有减弱的效应子功能的抗体包括具有Fc区残基238、265、269、270、297、327和329中一个或多个的取代的那些(美国专利号.6,737,056)。此类Fc突变体包括在第265、269、270、297和327位氨基酸中两个或多个处具有取代的Fc突变体,包括所谓的"DANA"Fc突变体,其残基265和297被取代为丙氨酸(美国专利7,332,581)。

[0191] 描述了具有改善的或减弱的与FcR的结合的某些抗体变体。(参见例如美国专利号6,737,056;WO 2004/056312,以及Shields.等人,J.Biol.Chem 9(2):6591-6604(2001))。

[0192] 在某些实施例中,本公开的抗体变体包含具有一个或多个氨基酸取代的Fc区,取代改善ADCC,例如在Fc区的298、333和/或334位(残基的EU编号)处的取代。

[0193] 在某些实施例中,在本文公开的抗体例如双特异性抗体的Fc区中进行的改变可产生变体抗体,其具有延长的半衰期和改善的新生儿Fc受体(FcRn)结合、负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer等人,J.Immunol.117:587(1976);以及Kim等人,J.Immunol.24:249(1994))的抗体描述于US2005/0014934A1(Hinton等人)中。那些抗体包含这样的Fc区,其具有改善Fc区与FcRn的结合的一个或多个取代。此类Fc变体包括在以下Fc区残基中的一处或多处具有取代的Fc变体:238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434,例如对Fc区残基434的取代(美国专利号7,371,826)。

[0194] 另参见Duncan&Winter,Nature 322:738-40(1988);美国专利号5,648,260;美国专利号5,624,821;和WO 94/29351关于Fc区变体的其它实例。

[0195] 3.经半胱氨酸工程改造的抗体变体

[0196] 在某些实施例中,可期望产生半胱氨酸工程改造的抗体,例如,"thioMAb",其中抗体的一个或多个残基被半胱氨酸残基置换。在特定实施例中,取代的残基存在于抗体的可接近位点。如本文进一步描述的,通过用半胱氨酸取代那些残基,从而将反应性硫醇基团定

位于抗体的可接近位点,并且可用于将抗体与其他部分(诸如药物部分或连接基-药物部分)缀合,以产生免疫缀合物。在某些实施例中,可用半胱氨酸取代下列残基中的任何一个或多个:轻链的V205(Kabat编号);重链的A118(EU编号);以及重链Fc区的S400(EU编号)。可如例如美国专利号7,521,541中所述生成半胱氨酸工程化的抗体。

[0197] 4.抗体衍生物

[0198] 在某些实施例中,可进一步修饰本公开的抗体以使其含有本领域已知且易于获得的另外的非蛋白质部分。适合于抗体衍生化的部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三氧杂环已烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或随机共聚物)和葡聚糖或聚(N-乙烯吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇以及它们的混合物。由于其在水中的稳定性,聚乙二醇丙醛在制造中可具有优势。聚合物可具有任何分子量,并且可以具有支链或不具有支链。附接于抗体的聚合物的数目可变化,并且如果附接了多于一个聚合物,那么它们可以为相同或不同的分子。通常,可基于以下考虑因素测定用于衍生化的聚合物的数目和/或类型,包括但不限于抗体待改善的特定特性或功能、抗体衍生物是否将用于限定条件下的疗法等。

[0199] 在某些实施例中,提供了抗体和可通过暴露于辐射而选择性地加热的非蛋白质性部分的缀合物。在一个实施例中,非蛋白质性部分为碳纳米管(Kam等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102:11600-11605(2005))。在某些实施例中,辐射可具有任何波长,并且包括但不限于对普通细胞没有伤害、但是将非蛋白质性部分加热至抗体-非蛋白质性部分近端的细胞被杀死的温度的波长。

[0200] 5.免疫缀合物

[0201] 本公开的主题还提供免疫缀合物,其包含与一种或多种细胞毒性剂缀合的本文所述抗体,所述一种或多种细胞毒性剂为诸如化学治疗剂或药物、生长抑制剂、蛋白质、肽、毒素(例如,细菌、真菌、植物或动物来源的蛋白质毒素、酶活性毒素,或它们的片段),或放射性同位素。例如,所公开主题的抗体可以功能性连接(例如,通过化学偶联、基因融合、非共价缔合或其他方式)至一个或多个其他结合分子,例如另一抗体、抗体片段、肽或结合模拟物。

[0202] 在某些实施例中,免疫缀合物为抗体-药物缀合物(ADC),其中本公开的抗体缀合至一种或多种药物,包括但不限于美登木素类(参见美国专利号5,208,020、5,416,064和欧洲专利EP 0 425 235 B1);auristatin,诸如单甲基auristatin药物部分DE和DF(MMAE和MMAF)(参见美国专利号5,635,483和5,780,588以及7,498,298);多拉司他汀;卡奇霉素或其衍生物(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;Hinman等人,Cancer Res.53:3336-3342(1993);和Lode等人,Cancer Res.58:2925-2928(1998));蒽环类药物,诸如柔红霉素或阿霉素(参见Kratz等人,Current Med.Chem.13:477-523(2006);Jeffrey等人,Bioorganic&Med.Chem.Letters16:358-362(2006);Torgov等人,Bioconj.Chem.16:717-721(2005);Nagy等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:829-834(2000);Dubowchik等人,Bioorg.&Med.Chem.Letters 12:1529-1532(2002);King等人,J.Med.Chem.45:4336-4343(2002);以

及美国专利号6,630,579);甲氨蝶呤;长春地碱;紫杉烷,诸如多西他赛、紫杉醇、拉罗他赛、替塞他赛和奥他他赛;单端孢霉毒素和CC1065。

[0203] 在某些实施例中,免疫缀合物包含与酶活性毒素或其片段缀合的本文所述的抗体,所述酶活性毒素或其片段包括但不限于白喉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)、蓖麻毒蛋白质A链、相思豆毒蛋白质A链、蒴莲根毒素A链、α-帚曲霉素、油桐蛋白、石竹黄素蛋白、美洲商陆抗病毒蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜抑制剂、姜黄素、巴豆素、肥皂草抑制剂、明胶、米托菌素、局限曲霉素、酚霉素、依诺霉素和单端孢菌素。

[0204] 在某些实施例中,免疫缀合物包括与放射性原子缀合以形成放射性缀合物的本文所述的抗体。多种放射性同位素可用于制备放射性缀合物。非限制性实例包括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。当放射性缀合物用于检测时,它可能包含用于闪烁显像研究的放射性原子,例如,tc99m或I^{123},或用于核磁共振(NMR)成像(也称为磁共振成像,mri)的自旋标记物,诸如碘-123、碘-131、铟-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

[0205] 可以使用多种双功能蛋白偶联剂,诸如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)、亚氨基硫杂环戊烷(IT)、亚氨基酯的双官能衍生物(诸如己二酸二甲酯盐酸盐)、活性酯(诸如辛二酸二琥珀酰亚胺基酯)、醛(诸如戊二醛)、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(诸如双-(对重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)制备抗体片段和细胞毒剂的缀合物。例如,可以如Vitetta等人,Science 238:1098(1987)中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14标记的1-异硫氰基苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)为一种示例性螯合剂,用于将放射性核苷酸缀合至抗体。参见WO 94/11026。连接基可以为促进细胞中细胞毒性药物释放的“可切割连接基”。例如,可以使用对酸不稳定的连接基、肽酶敏感的连接基、对光不稳定的连接基、二甲基连接基或含二硫键的连接基(Chari et al.,Cancer Res.52:127-131(1992);美国专利号5,208,020)。连接基的非限制性实例在上文公开。

[0206] 本文明确公开的免疫缀合物考虑但不限于用交联剂制备的此类缀合物,包括但不限于市售的(例如,来自Pierce Biotechnology,Inc.,Rockford,IL.,U.S.A)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、磺基-SMPB和SVSB(琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基砜)苯甲酸酯)。

[0207] Ⅲ.抗体制备和纯化方法

[0208] A.抗体制备方法

[0209] 本文公开的抗体可以使用本领域任何可用的或已知的技术制备。例如但不限于,可以使用重组方法和组合物产生抗体,例如,如美国专利号4,816,567中所述。产生本公开的抗体例如IgA抗体和IgG-IgA融合分子的详细程序在以下实施例中描述。

[0210] 本公开的主题进一步提供了编码本文公开的抗体的分离的核酸。例如,分离的核酸可以编码氨基酸序列,该氨基酸序列编码本公开的无糖基化抗体。在某些实施例中,本公开的分离的核酸可以编码氨基酸序列,该氨基酸序列编码的IgA抗体已经被修饰以去除一

个或多个、两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个或六个或更多个糖基化位点，例如N-联糖基化位点和/或O-联糖基化位点。在某些实施例中，本公开的分离的核酸可以编码氨基酸序列，该氨基酸序列编码的IgA抗体具有一个或多个、两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个、九个或更多个、十个或更多个、十一个或更多个或十二个在氨基酸N166、T168、N211、S212、S213、N263、T265、N337、I338、T339、N459和/或S461处的修饰，例如取代。在某些实施例中，本公开的分离的核酸可以编码氨基酸序列，该氨基酸序列编码IgG-IgA融合分子，例如本文公开的IgG-IgA Fc融合分子。

[0211] 在某些实施例中，核酸可以存在于一种或多种载体(例如表达载体)中。如本文所用，术语“载体”是指能够转运与其相连接的另一核酸的核酸分子。载体的一种类型是“质粒”，其是指另外的DNA链段可以连接到其中的环状双链DNA环。载体的另一种类型是病毒载体，其中另外的DNA链段可以连接到病毒基因组中。某些载体能够在引入它们的宿主细胞(例如，具有细菌复制起点的细菌载体和附加体哺乳动物载体)中自主复制。在导入宿主细胞中之后，将其他载体(例如，非附加体哺乳动物载体)整合到宿主细胞的基因组中，从而与宿主基因组一起复制。此外，某些载体(表达载体)能够引导与其可操作地连接的核酸的表达。通常，在重组DNA技术中有效用的表达载体通常是以质粒(载体)的形式。然而，所公开的主题旨在包括这些其他形式的表达载体，例如具有同等功能的病毒载体(例如，复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0212] 在某些实施例中，可以将编码本公开的抗体的核酸和/或包括该核酸的一种或多种载体引入宿主细胞中。在某些实施例中，可通过本领域已知的任何方法将核酸引入细胞，包括但不限于转染、电穿孔、显微注射、用含有核酸序列的病毒或噬菌体载体感染、细胞融合、染色体介导的基因转移、微细胞介导的基因转移、原生质球融合等。在某些实施例中，宿主细胞可以包括，例如，已经用以下转化：(1)包含核酸的载体，该核酸编码包含抗体轻链的氨基酸序列、包含抗体重链的氨基酸序列和包含抗体J链的氨基酸序列；(2)(a)包含核酸的第一载体，该核酸编码包含抗体轻链的氨基酸序列和包含抗体重链的氨基酸序列，以及(b)包含核酸的第二载体，该核酸编码包含抗体J链的氨基酸序列；或(3)(a)包含核酸的第一载体，该核酸编码包含抗体轻链的氨基酸序列，(b)包含核酸的第二载体，该核酸编码包含抗体重链的氨基酸序列(c)包含核酸的第三载体，该核酸编码包含抗体J链的氨基酸序列。在某些实施例中，宿主细胞可以包括，例如，已经用以下转化：(a)包含核酸的第一载体，该核酸编码包含抗体轻链的氨基酸序列，(b)包含核酸的第二载体，该核酸编码包含抗体重链的氨基酸序列，(c)包含核酸的第三载体，该核酸编码包含抗体J链的氨基酸序列的和(d)包含核酸的第四载体，该核酸编码包含抗体分泌组分的氨基酸。

[0213] 在某些实施例中，宿主细胞为真核的，例如，中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。在某些实施例中，宿主细胞为293细胞，例如Expi293细胞。

[0214] 在某些实施例中，制备本公开的抗体的方法包括在适合表达抗体的条件下培养宿主细胞(其中已引入一种或多种编码抗体的核酸)，并任选地从宿主细胞和/或宿主细胞培养基中回收抗体。在某些实施例中，通过色谱技术从宿主细胞回收抗体。

[0215] 关于本公开的抗体的重组产生，可以将编码例如如上所述的抗体的核酸分离并插入一或多个载体中以便于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。可以使用常规程序来容易

地对此类核酸进行分离和测序(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)。

[0216] 用于克隆或表达编码抗体的载体的合适宿主细胞包括本文所述的原核或真核细胞。例如,可以在细菌中产生抗体,特别是当不需要糖基化和Fc效应子功能时。关于在细菌中表达抗体片段和多肽,参见例如美国专利No.5,648,237、No.5,789,199和No.5,840,523。(另请参见Charlton,Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo编,Humana Press,Totowa,NJ,2003),第245-254页,其描述抗体片段在大肠杆菌中的表达。)抗体可在表达后在可溶性级分中从细菌细胞糊中分离,并且可以进一步纯化。

[0217] 除了原核生物外,诸如丝状真菌或酵母等真核微生物也是用于编码抗体的载体的合适克隆或表达宿主,所述真核微生物包括真菌和酵母菌株,其糖基化途径已经“人源化”,从而导致产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体。参见Gerngross,Nat.Biotech.22:1409-1414(2004),和Li et al.,Nat.Biotech.24:210-215(2006)。用于表达糖基化抗体的合适宿主细胞也可来源于多细胞生物(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物细胞和昆虫细胞。已经鉴定出了许多可以与昆虫细胞一起使用的杆状病毒株,特别是用于转染草地夜蛾(Spodoptera frugiperda)细胞。

[0218] 用于表达糖基化抗体的合适宿主细胞也来源于多细胞生物(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物细胞和昆虫细胞。已经鉴定出了许多可以与昆虫细胞一起使用的杆状病毒株,特别是用于转染草地夜蛾(Spodoptera frugiperda)细胞。

[0219] 在某些实施例中,植物细胞培养物可用作宿主细胞。参见例如美国专利号5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978和6,417,429(描述了用于在转基因植物中产生抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0220] 在某些实施例中,也可以使用脊椎动物细胞作宿主。例如但不作为限制,适于在悬浮液中生长的哺乳动物细胞系可能是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的非限制性示例为由SV40转化的猴肾CV1系(COS-7);人胚肾系(293或293细胞,如例如在Graham et al.,J.Gen Virol.36:59(1977)中所述);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠塞尔托利氏细胞(TM4细胞,如例如在Mather,Biol.Reprod.23:243-251(1980)中所述);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK);布法罗大鼠肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤细胞(MMT 060562);TRI细胞(如例如在Mather et al.,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982)中所述);MRC 5细胞;以及FS4细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,其包括DHFR-CHO细胞(Urlaub等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));以及骨髓瘤细胞系诸如Y0、NS0和Sp2/0。关于适用于抗体产生的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,参见例如Yazaki和Wu,Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo编,Humana Press,Totowa,NJ),第255-268页(2003)。

[0221] 在某些实施例中,动物系统可用于产生本公开的抗体。一种用于制备杂交瘤的动物系统是鼠系统。在小鼠中产生杂交瘤是一个工艺成熟的程序。用于分离用于融合的免疫脾细胞的免疫方案和技术是本领域已知的。融合配偶体(例如,鼠骨髓瘤细胞)和融合程序也是已知的(参见例如,Harlow和Lane(1988),Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor New York)。

[0222] 1.聚合IgA制备方法

[0223] 本公开提供了制备聚合IgA的方法。在某些实施例中,本公开的方法可用于制备含有两种或更多种IgA单体,例如约两种至约五种IgA单体的IgA聚合物。例如但不作为限制,本公开的方法可用于产生IgA二聚体、三聚体、四聚体和/或五聚体。在某些实施例中,此类方法包括改变引入(例如转染)到细胞中的编码J链的DNA的量与编码轻链(LC)和/或重链(HC)的DNA的量的比率。在某些实施例中,此类方法包括改变引入(例如转染)到细胞中的编码J链的DNA的量与编码LC、HC和分泌组分(SC)的DNA的量的比率。

[0224] 本公开提供用于增加IgA二聚体产生的方法。在某些实施例中,增加IgA二聚体产生的方法包括相对于编码轻链和重链的DNA的量,增加引入例如转染到细胞中的编码J链的DNA的量。在某些实施例中,增强的表达是相对于以下而言的:引入例如转染等量的J链、重链和轻链DNA的细胞中产生的IgA二聚体的量。例如但不作为限制,该方法可用于产生IgA1、IgA2m1、IgA2m1.P221R二聚体、IgA2m2和IgA2mn二聚体。在某些实施例中,该方法可以包括以编码重链的DNA的量与编码轻链的DNA的量与编码J链的DNA的量的比率(HC:LC:JC),即约1:1:2、约1:1:3、约1:1:4或约1:1:5的比率引入例如转染宿主细胞以增加IgA二聚体的产生,例如,比率为约1:1:2到约1:1:5。在某些实施例中,该方法可以包括用编码轻链的DNA的量和/或编码重链的DNA量的约2倍、约3倍、约4倍或约5倍量的编码J链的DNA转染细胞。

[0225] 本公开提供增加IgA聚合物产量的方法。例如但不作为限制,本公开提供了用于增加IgA二聚体、三聚体、四聚体和/或五聚体的产量的方法。在某些实施例中,用于增加IgA聚合物(例如二聚体、三聚体、四聚体和/或五聚体)产量的方法包括相对于编码轻链和重链的DNA量减少引入细胞的编码J链的DNA量。在某些实施例中,增加的产量是相对于细胞中制备的IgA聚合物(例如二聚体、三聚体、四聚体和/或五聚体)的量而言,该细胞引入例如转染了相对于J链DNA的量的等量的重链和轻链DNA。例如但不作为限制,该方法可用于制备IgA1、IgA2m1、IgA2m1P221R、IgA2m2或IgA2mn聚合物,例如二聚体、三聚体、四聚体和/或五聚体。在某些实施例中,该方法可以包括以编码重链的DNA的量与编码轻链的DNA的量与编码J链的DNA的量的比率(HC:LC:JC),即约1:1:0.25或约1:1:0.5,例如约1:1:0.25至约1:1:0.5的比率转染宿主细胞,以增加IgA三聚体、四聚体和/或五聚体的产生。在某些实施例中,编码J链的DNA的量可以是编码轻链的DNA的量和/或编码重链的DNA的量的不到约3倍、不到约2倍或不到约1倍。在某些实施例中,编码J链的DNA的量可以是编码轻链的DNA的量和/或编码重链的DNA的量的不到约0.5倍或不到约0.25倍。

[0226] 在某些实施例中,用于增加IgA1、IgA2m1和/或IgA2mn三聚体、四聚体和五聚体产量的方法可以包括在细胞中表达在氨基酸V458处具有取代的IgA1抗体、IgA2m1抗体和/或IgA2mn抗体。在某些实施例中,氨基酸V458可以突变为异亮氨酸(即V458I)。在某些实施例中,IgA1、IgA2m1和/或IgA2mn三聚体、四聚体和五聚体的产量增加是相对于以下而言的:在氨基酸V458处没有取代细胞中表达IgA1抗体、IgA2m1抗体和/或IgA2mn抗体得来的IgA1、IgA2m1和/或IgA2mn三聚体、四聚体和五聚体的产量。

[0227] 在某些实施例中,增加IgA2m2二聚体产量的方法可包括表达在氨基酸I458处具有取代的IgA2m2抗体。在某些实施例中,氨基酸I458可突变为缬氨酸(即I458V)。在某些实施例中,IgA2m2二聚体产量的增加是相对于以下而言的:表达在氨基酸I458处没有取代的IgA2m2抗体得来的IgA2m2二聚体的产量。

[0228] 在某些实施例中,用于增加IgA聚合物产量的方法可以包括从IgA抗体中去除一个或多个糖基化位点,例如通过氨基酸取代(如上所述),产量的增加是例如相对于通过未经修饰以去除糖基化位点的抗体IgA产生的IgA聚合物产量而言的。在某些实施例中,增加IgA聚合物产量的方法可以包括在氨基酸N459和/或S461处的一个或多个取代。例如但不作为限制,IgA抗体可在氨基酸N459处具有取代。在某些实施例中,IgA抗体可在氨基酸S461处具有取代。在某些实施例中,IgA抗体可在氨基酸N459和/或S461处具有取代。此类取代的非限制性实例包括将N459突变为A、G或Q。在某些实施例中,氨基酸S461可突变为A。在某些实施例中,增加IgA1聚合物产量的方法包括表达在氨基酸N459和/或S461处具有取代的IgA1抗体,例如在氨基酸N459和S461处的取代,例如,其中增强的表达是相对于通过表达在氨基酸N459和/或S461处没有取代的IgA1抗体产生的IgA1聚合物的量而言的。在某些实施例中,用于增加IgA2聚合物(例如IgA2m1、IgA2m2和IgA2mn聚合物)产量的方法包括表达在氨基酸N459和/或S461处具有取代,例如在氨基酸N459和S461处具有取代的IgA2抗体。在某些实施例中,IgA2聚合物产量的增加是相对于以下而言的:由表达在氨基酸N459和/或S461处没有取代的IgA2抗体得来的IgA2聚合物的产量。

[0229] 在某些实施例中,用于减少IgA聚合物产量(例如,增加IgA单体的产量)的方法包括表达在氨基酸C471处具有取代(例如C471S突变)的IgA抗体,例如IgA1、IgA2m1、IgA2m2或IgA2mn抗体。例如但不作为限制,减少IgA2m2聚合物产量的方法包括表达在氨基酸C471处具有取代(例如C471S突变)的IgA2m2抗体。在某些实施例中,IgA聚合物(例如IgA2m2聚合物)产量的减少是相对于以下而言的:表达在氨基酸C471处没有取代的IgA抗体(例如IgA2m2抗体)得来的IgA聚合物(例如IgA2m2聚合物)的产量。

[0230] 2.聚合IgG-IgA融合分子的制备方法

[0231] 本公开进一步提供了产生本公开的IgG-IgA融合分子的方法。在某些实施例中,本公开提供用于产生本文公开的IgG-IgA融合分子的二聚体的方法。在某些实施例中,本公开提供用于产生本文公开的IgG-IgA融合分子的聚合物(例如二聚体、三聚体和/或四聚体)的方法。

[0232] 在某些实施例中,该方法涉及产生IgG-IgA融合分子的二聚体。例如但不作为限制,表达IgG-IgA融合分子的二聚体的方法可以包括表达包含全长IgG抗体的IgG-IgA融合分子,所述全长IgG抗体在其C末端与IgA抗体的Fc区融合,其中IgA抗体的Fc区包含包括P221或R221至IgA抗体重链的C末端的序列,并且IgG抗体包含氨基酸K447的缺失。

[0233] 在某些实施例中,该方法涉及本文公开的IgG-IgA融合分子的聚合物的制备。例如但不作为限制,表达IgG-IgA融合分子的聚合物的方法包括表达包含全长IgG抗体的IgG-IgA融合分子,所述全长IgG抗体在其C末端与IgA抗体的Fc区融合,其中IgA抗体的Fc区包含包括C242至IgA抗体重链的C末端的序列。在某些实施例中,IgG抗体包括氨基酸K447的缺失。在某些实施例中,通过该方法产生的IgG-IgA融合分子的聚合物包括IgG-IgA融合分子的二聚体、三聚体和/或四聚体。

[0234] B.抗体纯化方法

[0235] 本公开进一步提供用于纯化本文公开的抗体的方法。例如,但不作为限制,本公开提供了用于分离本文公开的寡聚状态的抗体的方法,例如,将抗体的二聚状态与四聚状态分开。

[0236] 在某些实施例中,用于纯化本公开的抗体的方法可包括使用蛋白质亲和柱纯化抗体。在某些实施例中,该方法还可包括进行尺寸排阻色谱法(SEC)。例如但不作为限制,可以进行SEC以纯化和/或分离本文公开的特定寡聚状态的抗体,例如IgA抗体和/或IgG-IgA融合分子。在某些实施例中,可以进行SEC以纯化和/或分离本文公开的抗体的一种寡聚状态,例如,二聚状态、三聚状态、四聚状态和/或五聚状态。

[0237] 在某些实施例中,蛋白质亲和柱可以是MabSelect Sure(GE Healthcare)柱。在某些实施例中,本公开的抗体,例如主要包含一种寡聚状态的IgA样品,可以使用MabSelect Sure(GE Healthcare)亲和纯化,随后使用HiLoad Superdex柱(GE Healthcare)进行SEC。

[0238] 在某些实施例中,本公开的抗体,例如本文公开的IgA抗体,可以用Protein L(GE Healthcare)然后用SEC纯化。在某些实施例中,可以用包含Tris缓冲液(25mM Tris,pH 7.5、150mM NaCl、5mM EDTA、2mM NaN_3)的第一洗涤缓冲液洗涤蛋白质L柱。在某些实施例中,可以用包含Triton X-114缓冲液(25mM Tris,pH 7.5、150mM NaCl、5mM EDTA、0.1% Triton X-114、2mM NaN_3)的第二洗涤缓冲液进一步洗涤蛋白质L柱以去除内毒素。在某些实施例中,可以用包括Tris缓冲液的第三洗涤缓冲液洗涤蛋白质L柱,用包括KP缓冲液(0.4M磷酸钾,pH 7.0,5mM EDTA,0.02% Tween20,2mM NaN3)的第四洗涤缓冲液和/或用包含Tris缓冲液的第五洗涤缓冲液洗涤。可替代地或另外地,可以用包含PBS的洗涤缓冲液洗涤蛋白质L柱一次或多次。

[0239] 在某些实施例中,可以使用包含150mM乙酸、pH 2.7的缓冲液从蛋白质L柱洗脱抗体,其可以用1M精氨酸、0.4M琥珀酸盐、pH 9.0中和。可替代地或另外地,可以使用包含pH 3.0的50mM磷酸的缓冲液从蛋白质L柱洗脱抗体。在某些实施例中,洗脱的抗体可以用pH 11的20XPBS中和。

[0240] 在某些实施例中,IgA样品包含复杂的寡聚物,蛋白质L洗脱物可以使用3.5μm、7.8mm x 300mm XBridge Protein BEH 450 ÅSEC柱(Waters)进一步纯化,例如,以分离特定的寡聚状态(例如二聚体、三聚体和/或四聚体状态)的抗体。在某些实施例中,将不大于100μL的进样体积(其中总蛋白质少于1mg)以1mL/min运行,使用Agilent 1260Infinity HPLC,以0.2M精氨酸、0.137M琥珀酸盐、pH 5.0作为流动相,收集200μL级分。在某些实施例中,可以选择性地汇集来自SEC的级分以主要分离一种寡聚状态。可以进行一次或多次进样,并且可以将来自每次进样的给定寡聚物的级分汇集在一起。

[0241] Ⅳ.治疗方法

[0242] 本公开的主题进一步提供了使用所公开的抗体例如IgA和IgG-IgA融合分子的方法。在某些实施例中,该方法针对本公开抗体的治疗用途。

[0243] 在某些实施例中,本公开主题的一种或多种抗体可用于治疗受试者的疾病和/或疾患。例如但不作为限制,本公开的抗体可用于治疗炎性疾病、自身免疫性疾病和癌症。在某些实施例中,本公开的抗体可用于治疗癌症。在某些实施例中,缺乏与FcαRI的结合且不能活化FcαRI的本公开的抗体可用于治疗炎性疾病、自身免疫性疾病和癌症。在某些实施例中,本公开的抗体可用于治疗需要抗体转胞吞作用以达到治疗效果和/或接近治疗靶标的疾病和/或疾患。例如但不作为限制,本公开的抗体可用于治疗需要抗体跨粘膜转胞吞作用的疾病和/或疾患。

[0244] 在某些实施例中,本公开提供了用于治疗患有特定疾病和/或疾患的个体的方法

中的抗体,所述方法包括向个体施用有效量的抗体或包含该抗体的组合物。在某些实施例中,该方法进一步包括向所述个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂。在某些实施例中,本公开提供了用于抑制特定分子途径和/或机制的抗体。在某些实施例中,本公开提供了用于抑制个体中特定分子途径和/或机制的方法中的抗体,该方法包括向个体施用有效的抗体以抑制特定分子途径和/或机制。在某些实施例中,本公开提供了用于活化特定分子途径和/或机制的抗体。在某些实施例中,本公开提供了用于抑制活化个体中特定分子途径和/或机制的方法中的抗体,该方法包括向个体施用有效的抗体以抑制特定分子途径和/或机制。

[0245] 如本文可互换使用的“个体”、“患者”或“受试者”指哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯养的动物(例如牛、绵羊、猫、犬和马)、灵长类动物(例如人和非人灵长类动物,诸如猴)、兔以及啮齿类动物(例如小鼠和大鼠)。在某些实施例中,该个体或受试者为人。

[0246] 本公开进一步提供了抗体在制造或制备用于治疗受试者的疾病和/或疾患的药物中的用途。在某些实施例中,药物用于治疗特定疾病和/或疾患。在某些实施例中,药物用于治疗特定疾病和/或疾患的方法中,所述方法包括向具有所述疾病的个体施用有效量的所述药物。在某些实施例中,该方法进一步包括向所述个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂。在某些实施例中,药物用于抑制或活化特定的分子途径和/或机制。在某些实施例中,药物用于抑制或活化个体中特定分子途径和/或机制的方法,包括向个体施用有效量的药物以抑制特定分子途径和/或机制。

[0247] 在某些实施例中,用于所公开的治疗方法的抗体可以存在于药物组合物中,如本文所述。在某些实施例中,药物组合物可包括药用载体,如本文所述。在某些实施例中,药物组合物可包含一种或多种本公开的抗体。

[0248] 另外地或可替代地,药物组合物可包括第二治疗剂。当一种或多种公开的抗体与另一种治疗剂一起施用时,一种或多种抗体和另一种治疗剂可以序贯地或同时施用。上述此类组合疗法涵盖组合施用(其中两种或更多种治疗剂包括在相同或单独的制剂中)和单独施用,在单独施用的情况下,本文公开的抗体的施用可以在施用另外的治疗剂或药剂之前、同时和/或之后进行。在某些实施例中,本公开的抗体的施用和另外的治疗剂的施用在彼此相距约一个月内,或在约一周、两周或三周内,或在约一天、二天、三天、四天、五天或六天之内进行。

[0249] 本公开的抗体(和任何另外的治疗剂)可以通过任何合适的方式施用,包括肠胃外、肺内和鼻内,并且如果需要的话用于局部治疗、病灶内施用。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下给药。给药可以通过任何合适的途径进行,例如通过注射,诸如静脉内或皮下注射,部分取决于施用是短暂的还是长期的。本文考虑了各种给药时间安排,包括但不限于在各个时间点处的单次或多次施用、推注施用,以及脉冲输注。

[0250] 本公开的抗体将以符合良好医学实践的方式配制、给药和施用。在这种情况下需要考虑的因素包括所治疗的特定疾患、所治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床病症、疾患的原因、药剂的递送部位、施用方法、施用的时间安排,以及执业医师已知的其他因素。所述抗体不是必须的,而是任选地与一种或多种目前用于预防或治疗所讨论的疾患的制剂共同配制。此类其他药剂的有效量取决于所用制剂中存在的抗体的量、疾患或治疗的类型,以及上面讨论的其他因素。这些通常以与本文所述相同的剂量和施用途径使用,或以本文所述

剂量的约1％至99％使用,或以任何剂量且通过经验/临床上确定为合适的任何途径使用。

[0251] 为了预防或治疗疾病,本公开的抗体的适当剂量(当单独使用或与一种或多种其他另外治疗剂组合使用时)将取决于待治疗的疾病类型、抗体的类型、疾病的严重程度和病程、施用抗体用于预防还是治疗目的、先前疗法、患者的病史和对抗体的应答以及主治医师的酌处权。在某些实施例中,可以根据需要施用本公开的抗体。在某些实施例中,抗体可以在一次或在一系列治疗中施用于患者。例如但不作为限制,抗体和/或包含抗体的药物组合物,如本文所公开的,可以每天两次、每天一次、每两天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次、每周一次、每两周一次、每三周一次、每月一次、每两个月一次、每三个月一次、每六个月一次或每年一次。

[0252] 在某些实施例中,取决于疾病的类型和严重性,约1μg/kg至15mg/kg(例如0.1mg/kg-10mg/kg)的抗体可以是例如通过一次或多次单独施用或通过连续输注而施用于患者的初始候选剂量。取决于上述因素,一种典型的日剂量的范围可以为约1μg/kg至100mg/kg或更多。在某些实施例中,日剂量可大于约100mg/kg。在某些实施例中,可以调整剂量以实现1-1000μg/ml的血浆抗体浓度,并且在一些方法中为25-300μg/ml。

[0253] 对于数天或更长时间的重复施用,取决于病症,治疗通常会持续直至发生所需的疾病症状抑制。抗体的一种示例性剂量的范围为约0.05mg/kg至约10mg/kg。在某些实施例中,可以向患者施用约0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg或10mg/kg(或它们的任何组合)的一种或多种剂量。可替代地,抗体可以作为缓释制剂施用,在这种情况下需要较少的施用频率。剂量和频率可根据抗体在患者体内的半衰期而有所不同。在某些实施例中,此类剂量可以间歇施用,例如每周或每三周施用(例如,使得患者接受约两次至约二十次,或例如约六次剂量的抗体)。可施用初始较高负荷剂量,然后施用一种或多种较低剂量。

[0254] 在某些实施例中,该方法还可包括监测受试者并确定治疗的有效性。例如,该疗法的进展可以通过常规技术和测定而容易地监测。

[0255] Ⅴ.药物组合物

[0256] 本公开的主题进一步提供了药物组合物,其含有一种或多种本公开的抗体,例如IgA和IgG-IgA Fc融合蛋白,以及药用载体。在某些实施例中,药物组合物可以包括本公开主题的多种(例如,两种或更多种)抗体和/或其抗原结合部分的组合。

[0257] 在某些实施例中,公开的药物组合物和制剂可通过将具有所需纯度的抗体与一种或多种任选的药用载体(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编(1980))组合),制成冻干制剂或水溶液的形式。例如,但不作为限制,冻干的抗体制剂描述于美国专利号6,267,958中。在某些实施例中,水性抗体制剂可包括在美国专利号6,171,586和WO2006/044908中描述的那些,后一者中的制剂包含组氨酸-乙酸盐缓冲剂。在某些实施例中,抗体的纯度可以大于约80％、大于约90％、大于约91％、大于约92％、大于约93％、大于约94％、大于约95％、大于约96％、大于约97％、大于约98％、大于约99％、大于约99.1％、大于约99.2％、大于约99.3％、大于约99.4％、大于约99.5％、大于约99.6％、大于约99.7％、大于约99.8％或大于约99.9％。

[0258] 药用载体通常在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒,包括但不限于:缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和蛋氨酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲

酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、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,诸如EDTA;糖,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,诸如钠;金属络合物(例如锌蛋白络合物);和/或非离子表面活性剂,诸如聚乙二醇(PEG)。本文的示例性药用的载体还包括间质药物分散剂例如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),诸如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,例如rHuPH20(HYLENEX®,Baxter International,Inc.)。某些示例性sHASEGP和使用方法,包括rHuPH20,描述于美国专利公开No.2005/0260186和2006/0104968中。一方面,将sHASEGP与一种或多种另外的糖胺聚糖酶(诸如软骨素酶)组合。

[0259] 载体可适用于静脉内、肌肉内、皮下、肠胃外、脊髓或表皮施用(例如,通过注射或输注)。根据施用途径,抗体可以包被在材料中以保护化合物免受酸和其他可能使化合物失活的自然条件的作用。

[0260] 本公开的药物组合物也可以联合疗法施用,即与其他药剂联合。在某些实施例中,本文公开的药物组合物还可含有多于一种对于所治疗的特定适应症是必需的活性成分,例如是具有不会彼此不利地影响的互补活性的活性成分。在某些实施例中,药物组合物可包含用于治疗由第一治疗剂治疗的相同疾病的第二活性成分。此类活性成分适当地以对预期目的有效的量组合存在。例如但不作为限制,本公开的制剂还可含有多于一种对于所治疗的特定适应症是必需的活性成分,优选是具有不会彼此不利地影响的互补活性的活性成分。例如,可能需要进一步提供用于治疗相同疾病的第二治疗剂。此类活性成分适当地以对预期目的有效的量组合存在。

[0261] 本公开的制剂可通过本领域中已知的多种方法来施用。施用途径和/或施用方式取决于所需的结果。活性化合物可以与保护化合物免于快速释放的载体一起制备,例如控释制剂,包括植入物、透皮贴剂和微囊化递送系统。可以使用可生物降解的生物相容性聚合物,例如乙烯醋酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备此类制剂的许多方法描述于例如,Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems,J.R.Robinson编辑,Marcel Dekker,Inc.,New York,1978。在某些实施例中,药物组合物是在美国食品和药物管理局的良好生产规范(GMP)条件下制造的。

[0262] 还可以制备含有公开的抗体的缓释制剂。缓释制备物的合适实例包括含有抗体的固态疏水聚合物的半透性基质,所述基质是例如膜或微胶囊等成型制品的形式。在某些实施例中,活性成分可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合而制备的微胶囊(例如分别为羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)中;在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊)中;或在粗乳液中。此类技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编辑(1980)。

[0263] 为了通过某些施用途径施用本公开的抗体,可能需要用材料包被化合物或将化合物与材料共同施用以防止其失活。例如,化合物可以在合适的载体例如脂质体或稀释剂中施用于受试者。药用稀释剂包括盐水和水性缓冲溶液。脂质体包括水包油包水CGF乳剂以及常规脂质体(Strejan et al.,J.Neuroimmunol.7:27(1984))。

[0264] 药用载体包括无菌水溶液或分散体和用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。此类介质和试剂用于药物活性物质的用途是本领域已知的。除了在任何传统介质或药剂与活性化合物不相容的情况之外,都考虑将其用于本公开的药物组合物中。补充活性化合物也可并入该组合物中。

[0265] 治疗组合物基本上必须是无菌的、基本等渗的,并且在制造和储存条件下稳定。该组合物可以配制成溶液、微乳液、脂质体或其他适合高药物浓度的有序结构。载体可以是包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适混合物的溶剂或分散介质。例如,可以通过使用诸如卵磷脂之类的包衣、在分散的情况下通过保持所需的粒度以及通过使用表面活性剂来保持适当的流动性。在许多情况下,优选在组合物中包括等渗剂,例如糖、多元醇如甘露醇、山梨糖醇或氯化钠。可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中包括延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸盐和明胶来实现。

[0266] 无菌可注射溶液可以通过如下来制备:将所需量的一种或多种公开的抗体与一种或多种以上列举的成分根据需要掺入合适的溶剂中,然后进行灭菌微量过滤,例如通过无菌过滤膜过滤。通常,分散体是通过将活性化合物掺入无菌载体中来制备的,该载体包含基本分散介质和来自上文列举的那些所需的其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干),所述真空干燥和冷冻干燥产生来自其先前无菌过滤的溶液的活性成分加上任何另外的所需成分的粉末。

[0267] 治疗组合物也可以与本领域已知的医疗装置一起施用。例如,本公开的治疗组合物可以用无针皮下注射装置施用,例如在例如美国专利号5,399,163、5,383,851、5,312,335、5,064,413、4,941,880、4,790,824或4,596,556中公开的装置。可用于本公开的植入物和模块的实例包括:美国专利号4,487,603,公开了一种植入式微型输液泵,用于以受控速率分配药物;美国专利号4,486,194,公开了一种通过皮肤施用药物的治疗装置;美国专利号4,447,233,公开了一种药物输液泵,用于以精确的输液速率递送药物;美国专利号4,447,224,公开了一种用于连续递送药物的可变流量植入式输液装置;美国专利号4,439,196,公开了一种具有多室隔室的渗透药物递送系统;和美国专利号4,475,196,其中公开了一种渗透性药物递送系统。许多其他此类植入物、递送系统和模块是已知的。

[0268] 对于治疗组合物,本公开的制剂包括适合于口服、鼻腔、局部(包括口腔和舌下)、直肠、阴道和/或肠胃外施用的那些。所述制剂可以方便地以单位剂量形式呈现,并可以用药学技术领域中的任何已知方法制备。可与载体材料组合以产生单一剂型的抗体的量根据所治疗的受试者和特定的施用方式而变化。可与载体材料组合以产生单一剂型的抗体的量通常是产生治疗效果的组合物的量。通常,以百分比计,该量范围在约0.01%至约99%活性成分、约0.1%至约70%或约1%至约30%。

[0269] 用于本公开的组合物的局部或透皮施用的剂型包括粉剂、喷雾剂、软膏剂、糊剂、乳膏剂、洗剂、凝胶剂、溶液剂、贴剂和吸入剂。活性化合物可以在无菌条件下与药用载体以及可能需要的任何防腐剂、缓冲剂或推进剂混合。

[0270] 短语“肠胃外施用”和“经肠胃外施用”意指肠内和局部施用以外的其他施用方式(通常通过注射进行施用),并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、气管内、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、椎管内、硬膜外以及胸骨内注射和输注。

[0271] 这些药物组合物还可包含佐剂,诸如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可通过上述灭菌程序并且通过加入各种抗菌和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等)以确保无微生物存在。还可能希望在组合物中包括等渗剂,例如糖、氯化钠等。此外,可注射药物形式的延长吸收可以通过包含延迟吸收的药剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来实现。

[0272] 在某些实施例中,当本公开的抗体作为药物施用于人和动物时,它们可以被单独给予或作为药物组合物给予,该药物组合物包含例如从约0.01%至约99.5%(或约0.1至约90%)的本文所述抗体,与药用载体。

[0273] Ⅵ.制品

[0274] 本公开的主题进一步涉及一种制品材料,例如,含有一种或多种本公开的抗体,其用于上述疾病和/或疾患的治疗和/或预防。

[0275] 在某些实施例中,制品包括容器和在容器上或与容器相关的标签或包装插页。合适的容器的非限制性实例包括例如瓶子、小瓶、注射器、IV溶液袋等。所述容器可以由诸如玻璃或塑料等多种材料形成。所述容器可以容纳组合物,该组合物本身或与另一种组合物组合以有效治疗、预防和/或诊断病症,并且所述容器可具有无菌进入口(例如,所述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)。

[0276] 在某些实施例中,在组合物中至少一种活性剂是本公开的主题的抗体。标签或包装插页可以指示该组合物用于治疗所选择的病症。

[0277] 在某些实施例中,所述制品可包括(a)第一容器,所述第一容器中含有包含本公开的抗体的组合物;以及(b)第二容器,所述第二容器中含有包含另外的细胞毒性剂或其他治疗剂组合物。在某些实施例中,该制品可以进一步包括指示该组合物可用于治疗特定病症的包装插页。

[0278] 可替代地或另外地,所述制品可进一步包括另外的容器,例如第二或第三容器,所述第二或第三容器包括药用缓冲液,诸如但不限于抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和葡萄糖溶液。制品可包括从商业和用户角度所需的其他材料,其包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0279] Ⅶ.示例性实施例

[0280] A.在某些非限制性实施例中,本公开的主题提供了一种分离的IgA抗体或其片段,其中IgA抗体包含在氨基酸V458、N459和/或S461处的取代。

[0281] A1.根据A的前述分离的IgA抗体,其中氨基酸V458被异亮氨酸(V458I)取代,氨基酸N459被谷氨酰胺(N459Q)、甘氨酸(N459G)或丙氨酸(N459A)取代,并且/或者氨基酸S461被丙氨酸(S461A)取代。

[0282] B.在某些非限制性实施例中,本公开的主题提供了一种分离的IgA抗体或其片段,其中IgA抗体包含在氨基酸I458处的取代。

[0283] B1.根据B的前述分离的IgA抗体,其中氨基酸I458被缬氨酸(I458V)取代。

[0284] C.在某些非限制性实施例中,本公开的主题提供了一种分离的IgA抗体或其片段,其中所述IgA抗体在选自由N166、T168、N211、S212、S213、N263、T265、N337、I338、T339、N459、S461和其组合组成的组中的氨基酸处包含一个或多个取代。

[0285] C1.根据C的前述分离的IgA抗体,其中在氨基酸N166、S212、N263、N337、I338、T339

和N459处的取代是N166A、S212P、N263Q、N337T、I338L、T339S和N459Q。

[0286] C2.根据A-C1任一项的前述分离的IgA抗体,其中所述IgA抗体是IgA1、IgA2m1、IgA2m2或IgA2mn抗体。

[0287] C3.根据C和C1中任一项的前述分离的IgA抗体,其中所述IgA抗体在氨基酸N337、I338和T339处具有取代,并且在T168、N211、S212、S213、N263、T265、N459、S461及其组合处具有一个或多个取代。

[0288] C4.根据C3的前述分离的IgA抗体,其中所述IgA抗体是IgA2m1、IgA2m2或IgA2mn抗体。

[0289] C5.根据A-C4中任一项的前述分离的IgA抗体,其中所述IgA抗体是人源化的、嵌合抗体或人抗体。

[0290] D.在某些非限制性实施例中,本公开的主题提供了分离的包含全长IgG抗体的IgG-IgA融合分子,所述全长IgG抗体在其C末端与IgA抗体的Fc区融合,其中所述IgA抗体的所述Fc区包含包括P221或R221至所述IgA抗体的重链的C末端的序列,其中所述IgG抗体进一步包含氨基酸K447的缺失。

[0291] E.在某些非限制性实施例中,本公开的主题提供了分离的包含全长IgG抗体的IgG-IgA融合分子,所述全长IgG抗体在其C末端与IgA抗体的Fc区融合,其中所述IgA抗体的所述Fc区包含包括C242至IgA抗体重链的C末端的序列。

[0292] E1.根据E的前述分离的IgG-IgA融合分子,其中所述IgG抗体进一步包含氨基酸K447的缺失。

[0293] E2.根据D-E1中任一项的前述分离的IgG-IgA融合分子,其中所述IgG抗体选自由IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体和IgG4抗体组成的组。

[0294] E3.根据D-E2中任一项的前述分离的IgG-IgA融合分子,其中所述IgG抗体是IgG1抗体。

[0295] E4.根据D-E3中任一项的前述分离的IgG-IgA融合分子,其中所述IgA抗体选自由IgA1抗体、IgA2m1抗体、IgA2m2抗体和IgA2mn抗体组成的组。

[0296] E5.根据D-E4中任一项的前述分离的IgG-IgA融合分子,其中所述IgA抗体是IgA2m1抗体。

[0297] F.在某些非限制性实施例中,本公开的主题提供了编码A-C4中任一项的IgA抗体或D-E5中任一项的IgG-IgA融合分子的分离的核酸。

[0298] G.在某些非限制性实施例中,本公开的主题提供了一种包含F的核酸的宿主细胞。

[0299] H.在某些非限制性实施例中,本公开的主题提供了一种制备IgA抗体或IgG-IgA的方法,包括培养G宿主细胞以制备IgA抗体或IgG-IgA融合分子。

[0300] H1.根据H的前述方法,其进一步包括从所述宿主细胞回收所述IgA抗体或IgG-IgA融合分子。

[0301] H2.前述IgA抗体或IgG-IgA融合分子由H制备或从H1回收。

[0302] I.在某些非限制性实施例中,本公开的主题提供了一种药物组合物,其包含一种或多种A-C4和H2中任一项的IgA抗体,或一种或多种D-E5和H2中任一项的IgG-IgA融合分子,以及药用载体。

[0303] I1.根据I的前述药物组合物,其进一步包含另外的治疗剂。

[0304] J.在某些非限制性实施例中,本公开的主题提供了一种治疗患有疾病的个体的方法,其中该方法包括向个体施用有效量的一种或多种A-C4和H2中任一项的IgA抗体、或一种或多种D-E5和H2中任一项的IgG-IgA融合分子。

[0305] J1.根据J的前述方法,其中所述疾病是炎性疾病、自身免疫性疾病或癌症。

[0306] K.根据A-C4和H2中任一项的前述IgA抗体或D-E5和H2中任一项的前述IgG-IgA融合分子,其用作药物。

[0307] L.根据A-C4和H2中任一项的前述IgA抗体或D-E5和H2任一项的前述IgG-IgA融合分子,其用于治疗疾病。

[0308] M.根据L的前述IgA抗体或IgG-IgA融合分子,其中所述疾病是炎性疾病、自身免疫性疾病或癌症。

[0309] N.在某些非限制性实施例中,本公开的主题提供了A-C4和H2中任一项的IgA抗体或D-E5和H2中任一项的IgG-IgA融合分子在制造一种治疗疾病的药物中的用途。

[0310] N1.根据N的前述用途,其中所述疾病是炎性疾病、自身免疫性疾病或癌症。

[0311] O.在某些非限制性实施例中,本公开的主题提供了一种增强IgA二聚体的表达的方法,其包括相对于编码轻链(LC)和重链(HC)的DNA的量,增加引入第一细胞的编码连接链(JC)的DNA的量,其中增强的表达是相对于以下而言的:在引入等量JC、LC和HC DNA的第二细胞中产生的IgA二聚体的量。

[0312] O1.根据O的前述方法,其中引入所述第一细胞的编码所述HC的DNA的量与编码所述LC的DNA的量与编码所述JC的DNA的量的比率(HC:LC:JC)为从约1:1:2到约1:1:5。

[0313] P.在某些非限制性实施例中,本公开的主题提供了一种增强IgA二聚体、三聚体或四聚体的表达的方法,其包括相对于编码轻链(LC)和重链(HC)的DNA的量,减少引入第一细胞的编码连接链(JC)的DNA的量,其中增强的表达是相对于以下而言的:在引入相对于JC DNA的量的更多量的HC和LC DNA的第二细胞中产生的IgA三聚体或四聚体的量。

[0314] P1.根据P的前述方法,其中引入所述第一细胞的编码所述HC的DNA的量与编码所述LC的DNA的量与编码所述JC的DNA的量的比率(HC:LC:JC)为从约1:1:0.25到约1:1:0.5。

[0315] Q.在某些非限制性实施例中,本公开的主题提供了一种增加IgA1或IgA2m1聚合物的产量的方法,其包括在第一细胞中表达在氨基酸V458处具有取代的IgA1或IgA2m1抗体,其中增加的产量是相对于以下而言的:在表达于氨基酸V458处没有取代的IgA1或IgA2m1抗体的第二细胞中产生的IgA1或IgA2m1聚合物的量。

[0316] Q1.根据Q的前述方法,其中氨基酸被异亮氨酸(V458I)取代。

[0317] R.在某些非限制性实施例中,本公开的主题提供了一种增加IgA2m2二聚体的产量的方法,其包括在第一细胞中表达在氨基酸I458处具有取代的IgA2m2抗体,其中增加的产量是相对于以下而言的:在表达于氨基酸I458处没有取代的IgA2m2抗体的第二细胞中产生的IgA2m2二聚体的量。

[0318] R1.根据R的前述方法,其中氨基酸被缬氨酸(I458V)取代。

[0319] S.在某些非限制性实施例中,本公开的主题提供了一种增加IgA1或IgA2m1聚合物的产量的方法,其包括在第一细胞中表达在氨基酸N459或S461处具有取代的IgA1或IgA2m1抗体,其中增加的产量是相对于以下而言的:在表达于氨基酸N459或S461处没有取代的IgA1或IgA2m1抗体的第二细胞中产生的IgA1或IgA2m1聚合物的量。

[0320] S1.根据S的前述方法,其中氨基酸N459被N459Q、N459G或N459A突变取代并且/或者氨基酸S461被S461A突变取代。

[0321] T.一种减少IgA2m2聚合物的产量的方法,其包括在第一细胞中表达在氨基酸C471处具有取代的IgA2m2抗体,其中减少的产量是相对于以下而言的:在表达于氨基酸C471处没有取代的IgA2m2抗体的第二细胞中产生的IgA2m2聚合物的量。

[0322] T1.根据T的前述方法,其中氨基酸C471被C471S突变取代。

[0323] U.在某些非限制性实施例中,本公开提供了一种增强IgA2m2抗体瞬时表达的方法,包括在第一细胞中表达IgA2m2抗体,该抗体包含在选自由N166、S212、N263、N337、I338、T339、N459及其组合组成的组的氨基酸处的取代,其中增强的瞬时表达是相对于以下而言的:在表达于选自由N166、S212、N263、N337、I338、T339、N459及其组合组成的组的氨基酸处没有取代的IgA2m2抗体的第二细胞中产生的瞬时表达量。

[0324] V.在某些非限制性实施例中,本公开主题提供了一种表达IgG-IgA融合分子的二聚体的方法,其包括表达包含全长IgG抗体的IgG-IgA融合分子,所述全长IgG抗体在其C末端与IgA抗体的Fc区融合,其中所述IgA抗体的所述Fc区包含包括P221或R221至所述IgA抗体的重链的C末端的序列,并且IgG抗体包含氨基酸K447的缺失。

[0325] W.在某些非限制实施例中,本公开主题提供了一种表达IgG-IgA融合分子的二聚体、三聚体和四聚体的方法,其包括表达包含全长IgG抗体的IgG-IgA融合分子,所述全长IgG抗体在其C末端与IgA抗体的Fc区融合,其中IgA抗体的Fc区包含包括C242至IgA抗体重链的C末端的序列。

[0326] W1.根据W的前述方法,其中所述IgG抗体包含氨基酸K447的缺失。

[0327] X.在某些非限制性实施例中,本公开的主题提供了一种用于从包含IgA抗体和至少一种宿主细胞蛋白的混合物中纯化IgA抗体的方法,其包含:

[0328] (a)将所述混合物施加到包含蛋白质L的柱子上以结合所述IgA抗体;

[0329] (b)用包含PBS的洗涤缓冲液洗涤所述蛋白质L柱;和

[0330] (c)通过包含磷酸的洗脱缓冲液从所述蛋白质L柱上洗脱所述IgA抗体。

[0331] Y.在某些非限制性实施例中,本公开的主题提供了一种用于从包含IgA抗体或IgG-IgA融合分子和至少一种宿主细胞蛋白的混合物中纯化寡聚状态的IgA抗体或IgG-IgA融合分子的方法,其包含:

[0332] (a)将所述混合物施加到包含蛋白质L或蛋白质A的亲和纯化柱上以结合所述IgA抗体或IgG-IgA融合分子;

[0333] (b)用洗涤缓冲液洗涤所述亲和纯化柱;

[0334] (c)用洗脱缓冲液从所述亲和纯化柱上洗脱所述IgA抗体或IgG-IgA融合分子,以形成第一洗脱物;和

[0335] (d)将所述第一洗脱物施加到尺寸排阻色谱柱上以分离不同寡聚状态的IgA抗体或IgG-IgA融合分子以及获得包含寡聚状态的所述IgA抗体或IgG-IgA融合分子的流出物。

[0336] 以下实例仅是对本公开的主题的说明,不应以任何方式视为限制。实例1:糖基化和FcRn结合对小鼠体内的聚合IgA的药代动力学参数作用的评估

[0337] 与传统的基于IgG的药物相比,IgA抗体具有作为新型治疗平台的广泛潜力,因为它们具有优异的受体介导的细胞毒活性、有效中和病原体的能力以及通过聚合免疫球蛋白

受体(pIgR)介导的跨粘膜屏障的胞吞转运能力。然而,IgA向临床开发的过渡受到复杂表达和表征以及快速血清清除的挑战,据认为这是由重组产生的带有不完全唾液酸化N-联聚糖的IgA单体的聚糖受体清除介导的。在本实例中,提供了重组产生的单体、二聚体和聚合人IgA的全面生化、生物物理和结构表征。此外,确定了两种克服聚合IgA血清快速清除的策略:(1)去除N-联糖基化位点,产生无糖基化或部分无糖基化的聚合IgA,和(2)工程改造生成聚合IgG-IgA Fc融合体与FcRn的结合。

[0338] 方法:

[0339] 质粒克隆和序列比对。使用的抗体可变结构域序列包括人源化抗人HER2抗体((Carter et al.,Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-9(1992))和鼠抗鼠IL-13抗体(Genentech)。人IgA恒定重链IgA1、IgA2m1和IgA2m2、其他IgA物种和人J链的蛋白质序列获自Uniprot(www.uniprot.org)或NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov/protein)。获得的其他物种包括IgA2m1中的突变,即P221R,其如先前报道的那样稳定轻链-重链二硫化物(Chintalacharuvu et al.,J Immunol 157:3443-9(1996))。编码抗体可变结构域与人轻链和人IgA1、IgA2m1和IgA2m2重链恒定结构域的融合体的基因被合成并克隆到哺乳动物pRK载体中(Eaton et al.,Biochemistry 25:8343-7(1986))。定点诱变用于引入点突变。所有质粒都经过序列验证。使用GSeqWeb(Genentech)和Excel(Microsoft)进行序列比对。

[0340] 小规模抗体表达和纯化。Expi293T™细胞在30mL规模下,用15μgLC和HC的DNA进行瞬时转染(对于IgA单体),或用总共30μg不同比例的LC、HC和JC的DNA(对于IgA寡聚物)(Bos et al.,Journal of Biotechnology 180:10-6(2014)和Bos et al.,Biotechnol Bioeng 112:1832-42(2015))。IgA用Protein L(GE Healthcare)分批亲和纯化,因为所有抗体都含有κ轻链。蛋白质L洗脱物通过分析型SEC-HPLC(Tosoh Bioscience LLC TSKgel SuperSW3000 column,Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000HPLC)表征。将恒定体积加载到色谱柱上,并使用Chromeleon色谱数据系统软件(Thermo Scientific)对每条曲线下的面积进行定量。

[0341] 大规模抗体表达和纯化。如前所述,IgA、IgG和IgG-IgA Fc融合体在CHO DP12细胞中瞬时表达(Wong et al.,Biotechnol Bioeng 106:751-63(2010))。对于低表达克隆,产生了TI稳定细胞系。使用MabSelect Sure(GE Healthcare)亲和纯化IgG和IgG-IgA Fc融合体,然后使用HiLoad Superdex 200pg柱(GE Healthcare)进行尺寸排阻色谱(SEC)。IgA使用Capto L(GE Healthcare)亲和纯化,随后进行SEC。对于DNA比率成功地将表达偏向于主要一种寡聚状态的IgA样品,将HiLoad Superdex 200pg柱(GE Healthcare)用于SEC。对于含有复杂寡聚物混合物的IgA样品,使用3.5μm、7.8mm x 300mm Xbridge Protein BEH 450 ÅSEC柱(Waters)更好地分离二聚体和四聚体峰。

[0342] SEC-MALS.聚合IgA在3.5μm、7.8mm x 300mm Xbridge Protein BEH 200 ÅSEC柱(Waters)上运行,并直接注入DAWN HELEOS/Optilab T-rEX II(Wyatt)多角度光散射检测器进行摩尔质量测定和多分散性测量。

[0343] 差示扫描荧光法(DSF)。如前所述执行DSF(Lombana et al.,Sci Rep5:17488(2015))。

[0344] 体外转胞吞作用测定。Madin-Darby犬肾(MDCKII)细胞(European Collection of Authenticated Cell Cultures,Salisbury,U.K.)细胞用含有编码人pIgR基因的cDNA的逆

转录病毒转导(Retro-X,Takara Bio;OriGene,Rockvile,MD)。pIgR基因的表达通过qRT-PCR和蛋白质印迹法得到证实。表达pIgR的MDCKII细胞保存在补充有10% FBS、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素(Thermo Fisher,Carlsbad,CA)和2μg/ml嘌呤霉素(Takara Bio,Mountain View,CA)的DMEM中。对于转胞吞作用测定,将细胞接种在0.4μm Millicell 24孔细胞插入式培养皿(Millipore,Burlington,MA)上并培养4天。在实验当天,将细胞用FluoroBrite DMEM(Thermo Fisher)洗涤两次,并将6μg IgA分子添加到基底外侧区室中。孵育24小时后,收集来自顶端和基底外侧区室的培养基用于ELISA分析。

[0345] 电子显微镜。纯化的抗IL-13IgA2m2二聚体和四聚体样品首先通过在0.015%戊二醛(Polysciences,Inc.)中室温孵育10分钟进行交联。固定后,使用TBS缓冲液稀释样品以达到10ng/μL的浓度。然后在用2%(w/v)醋酸双氧铀阴性染色剂(Electron Microscopy Sciences)处理之前,将4μl的每个样品在新辉光放电的400目铜网格上孵育40秒,该网格覆盖有薄层连续碳。IgA二聚体和四聚体然后使用Tecnai Spirit T12(Thermo Fisher)在120keV下以25,000x(2.2 Å/像素)的放大倍数进行成像。在低剂量条件下使用Gatan 4096x 4096像素CCD相机记录图像。然后使用EMAN2包内的e2boxer.py软件(Tang et al.,J Struct Biol 157:38-46(2007))使用128像素的粒子框尺寸,选择和提取IgA二聚体和四聚体的约5000个粒子。RELION图像软件包(Scheres J Struct Biol 180:519-30(2012))内的无参考2D类用于生成两个样品的平均图像。

[0346] 全局N-联聚糖组成分析(LC-MS分析)。10μg每个IgA样品用8M盐酸胍以1:1的体积比进行变性,并在95℃下用100mM二硫苏糖醇(DTT)还原10分钟。样品用100mM Tris HCl,pH 7.5稀释至2M盐酸胍的终浓度,然后在37℃下用2μl的P0705S PNGase F(New England BioLabs)过夜进行N-联去糖基化。去糖基化后,将150ng每个样品注入Agilent 1260Infinity LC色谱系统,并通过以下洗脱:等度梯度的2%至32%溶剂B(溶剂A:99.88%水,含有0.1%甲酸和0.02%三氟乙酸;溶剂B:90%乙腈,含有9.88%水加0.1%甲酸和0.02%三氟乙酸)。HPLC系统通过Agilent G4240A Chip Cube MS系统耦合到G6520B Q-TOF质谱仪。使用在Chip Cube MS系统中的G4240-64025 mAb-Glyco芯片内构建的多孔石墨化碳柱对样品进行聚糖富集和分离。数据采集:1.9kV喷射电压;325℃气体温度;5l/min干燥气体流量;160V碎裂电压;65V撇渣器电压;750V oct 1RF Vpp电压;400至3000m/z扫描范围;正极性;使用扩展动态范围(2GHz)仪器模式进行MS1质心数据采集;3光谱/s;333.3ms/频谱;3243瞬态/频谱;CE设置为0。利用精确质量和10ppm质量容差以及用于聚糖鉴定的预期保留时间的组合,在Agilent MassHunter定性分析软件中的聚糖库中搜索获得的质谱数据。基于每个聚糖的提取化合物色谱图中的AUC,N-联聚糖相对于每个样品内所有已鉴定的N-联聚糖进行无标记定量。

[0347] N-联糖肽位点映射分析(LC-MS/MS分析)。10μg IgA在37℃下用10mM DTT还原1hr,在室温下用10mM碘乙酰胺烷基化20分钟,分别用0.2μg胰蛋白酶(Promega)和0.2μg糜蛋白酶(Thermo Fisher Scientific)在37℃下消化过夜,用0.1%三氟乙酸(TFA)猝灭,并用C18(3M Empore C18提取盘)级吸头(50%乙腈、49.9%水、0.1% TFA)进行清洁。通过自动进样器将200fmol样品注入Waters NanoAcquity UPLC系统,并在45℃下在Waters Acquity M-Class BEH C18柱(0.1mm×100mm,1.7μm树脂)上进行分离。使用2%至40%的梯度溶剂B进行洗脱(溶剂A:99.9%水,0.1%甲酸;溶剂B 99.9%乙腈、0.1%甲酸)。

[0348] 使用以下数据采集参数,对通过纳米喷射电离进入Orbitrap Elite质谱仪(Thermo Fisher Scientific)的分离的肽进行在线分析:60000分辨率;375-1600m/z扫描范围;正极性;质心模式;1m/z分离宽度,0.25活化Q和10ms活化时间;CID活化;CE设置为35。数据以数据依赖模式收集,母离子在FTMS中进行分析,前15个最丰富的离子被选择用于ITMS中的碎裂和分析。使用Protein Metrics Byonic软件针对蛋白质序列搜索获得的质谱数据,并在Protein Metrics Byologic软件中进行分析。每个糖基化位点的肽鉴定是根据MS2碎片光谱、提取离子色谱图(XIC)和保留时间的组合手动验证的。通过XIC的AUC整合,N-联糖肽相对于其未修饰的肽进行无标记定量。

[0349] 小鼠研究。雌性Balb/C小鼠(6-8周龄)从Charles River实验室获得。到达后,所有小鼠均在标准12h光照/12h黑暗循环下在21℃室温下饲养在无病原体的动物设施中,可随意进食和饮水。所有小鼠接受单次静脉内(IV)注射相应抗体(IgG或IgA)。在注射后的不同时间,在异氟烷麻醉下,通过眶-后窦或心脏穿刺收集血样(150-200μL)。将样品收集到血清分离管中。将血液在室温下凝结至少20分钟。在1小时的收集时间内开始将凝结的样品保持在室温直至离心。每个样品在2-8℃下以1500-2000x g的相对离心力离心5分钟。离心后20分钟内将血清与血样分离,并转移到标记的2.0-mL聚丙烯锥形-底微量离心管中。

[0350] 仅将看起来健康且没有明显异常的动物用于研究。所有进行的动物工作都经过基因泰克的机构动物护理和使用委员会(IACUC)的审查和批准。

[0351] IgAELISA用于转胞吞作用和药代动力学研究。IgA抗体水平通过夹心ELISA测量。将384-微量滴定板的孔在4℃下用含2μg/ml山羊抗人κ抗体(SouthernBiotech,Cat#2060-01)的25μl包被缓冲液(0.05M碳酸钠,pH 9.6)包被过夜,然后在37℃下用50μl含0.5% BSA的PBS阻断2小时。然后将稀释于样品缓冲液(1x PBS,pH 7.4,0.5% BSA,0.35MNaCl,0.05% Tween20,0.25% CHAPS,5mM EDTA)中的样品(25μl)加入到封闭板中,并在室温下孵育2小时。孵育后,加入25μl辣根过氧化物酶缀合的山羊抗人IgA(SouthernBiotech,Cat#2053-05)并在室温下孵育1小时。然后将板与25μl TMB(Moss,Cat#TMBE-1000)一起孵育15min,并用25μl 1M H_3PO_4终止反应。使用盘式分析仪在450nm处测量吸光度,吸光度在630nm处减少。在步骤之间,将板用200μl洗涤缓冲液(含0.05% Tween-20的PBS)洗涤六次。作为定量参考,使用连续稀释的储备材料(20ng/ml-0.15ng/ml)为每个IgA分子建立标准曲线。IgA ELISA可耐受高达10%的小鼠血清和10%的组织裂解液的生物基质。

[0352] 放射化学。碘-125[^{125}I]从Perkin Elmer(Boston,MA)以含碘化钠的0.1N氢氧化钠的形式获得。1mCi的^{125}I(~3μL)用于使用间接碘原法(Pierce Chemical Co.,Rockford,IL),以~10μCi/μg的比活性用^{125}I通过酪氨酸残基随机标记。通过在37℃下孵育含^{111}In和1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)-缀合(通过赖氨酸随机地)mAb的0.3M醋酸铵pH 7持续1小时来实现^{111}In标记抗体(~8μCi/μg)的放射合成。使用在PBS中平衡并通过尺寸排阻色谱法确认的NAP5柱实现了所有放射免疫缀合物的纯化。

[0353] 使用间接碘原添加方法对抗体进行放射性碘化(Chizzonite et al.,JImmunol;147:1548-56(1991))。使用在PBS中预平衡的NAP5^{TM}柱(GE Healthcare Life Sciences,cat.17-0853-01)纯化放射性标记的蛋白质。放射性碘化后,标记的抗体通过SEC-HPLC进行表征,以与未标记的抗体进行比较。将样品注入串联的Agilent 1100系列HPLC(Agilent Technology,Santa Clara,CA)和Yarra SEC-3000,3μM 300mm x 7.8mm(Phenomenex,

Torrance,CA,cat.00H-4513-K0)尺寸排阻柱,并用磷酸盐缓冲盐水(PBS pH 7.0)以0.8mL/min的流速洗脱20分钟。通过在280nm处的吸光度和通过在线Gabi γ 计数器(Elysia-Raytest,德国)中测量洗脱级分的放射性来监测洗脱。

[0354] 组织分布研究设计和分析。方案、住房和麻醉经基因泰克实验动物资源机构动物护理和使用委员会批准,符合实验动物护理评估和认证协会的规定。

[0355] 从Jackson/West(CA)获得体重范围为20-30g并且6-7周龄的雌性BALB-c小鼠。本研究使用六组,每组12只小鼠。为防止甲状腺对^{125}I的隔离,在给药前1小时和24小时腹膜内施用了100μL 30mg/mL的碘化钠。所有小鼠接受由^{125}I-标记抗体和^{111}In-标记抗体(各5μCi)加上相应未修饰抗体的混合物组成的总剂量为5mg/kg的单次IV注射。在注射后5min、15min、30min、1hr、4hr、12hrs、1天、2天和3天,将4只小鼠的组在异氟烷下(吸入作用)眼眶后放血。在1小时、1天和3天;将4只动物在氯胺酮(75-80mg/kg)/二甲苯(7.5-15mg/kg)麻醉下通过开胸术实施安乐死。收集以下组织,在冷PBS中冲洗、吸干、称重并冷冻:脑、肝、肺、肾、脾、心、胃、小肠、肌肉、皮肤、脂肪、大肠。使用1480WIZARD^{TM} γ 计数器在能量窗口中对样品放射性进行^{111}In(245keV;衰减$t_{1/2}$=2.8天)和^{125}I(35keV;衰减$t_{1/2}$=59.4天)计数,具有自动背景和衰减校正。使用GraphPad Prism(Windows 7.00版,GraphPad Software,San Diego California USA,www.graphpad.com)分析和绘制数据。

[0356] 小鼠血浆稳定性。小鼠血浆(含有抗凝剂肝素锂)获自BioIVT(Westbury,NY),并通过混合牛血清白蛋白(Sigma-Aldrich;St.Louis,MO,cat.A2058)与PBS(PBS+0.5% BSA)来制得缓冲液对照。将放射性标记抗体以5μCi的放射性标记示踪剂混合到小鼠血浆或缓冲液对照中,然后在设置为37℃和5% CO_2的培养箱中孵育。在孵育0、24和96小时的设定时间点,将样品从培养箱中取出并储存在-80℃的冰箱中直至分析。

[0357] 样品通过上述SEC-HPLC方法分析,样品在PBS中稀释为1:1。结果色谱图在时间点之间进行比较,以监测从零时母峰的变化。

[0358] Wasatch测定的抗体动力学。96×96基于阵列的SPR成像系统(Carterra USA)用于分析纯化的IgA、IgG-IgA Fc融合体或IgG在25℃下的动力学。抗体在10mM醋酸钠缓冲液pH 4.5中以10μg/ml稀释,并使用胺偶联,使用连续流动微点测仪直接固定在SPR感应棱镜CMD 200M芯片(XanTec Bioanalytics,德国)上。在运行缓冲液(10mM HEPES pH 7.4、150mM NaCl、0.05% Tween 20、1mM EDTA)中稀释的抗原以不同浓度注射3分钟,并使其解离10分钟,在循环之间使用10mM甘氨酸pH2.5进行再生。抗原来自R&D Systems(mIL-13,413-ML-025/CF;mpIgR,2800-PG-050;hpIgR,2717-PG-050;hFcαRI,3939-FA-050)、Sino Biologicals(hHER2,10004-H08H)或Genentech,与物种特异性βeta-2微球蛋白(m/hFcRn)共表达。数据使用Wasatch动力学软件工具进行处理。

[0359] Biacore测定的抗体动力学。在Biacore T200仪器(GE Healthcare)上使用表面等离子体共振测量抗IL-13或抗HER2 IgA2m2抗体的结合动力学。所有动力学实验均在25℃下以30μL/min的流速进行,运行缓冲液为10mM HEPES,pH 7.4、150mM NaCl、0.05% Tween 20和1mM EDTA。来自人Fab捕获试剂盒(GE Healthcare)的Fab结合剂通过基于胺的偶联固定在CM5传感器芯片上。浓度为50-100ug/mL的IgA抗体以5uL/min的速度捕获210秒。使用1000nM、333nM和111nM的浓度测量与抗体结合的重组人FcαRI抗原(R&D Systems,3939-FA-050)。使用90秒注射时间,接着是120秒解离时间和用两个60秒甘氨酸pH 2.1注射的表面再

生来记录结合的传感图。1:1Langmuir结合模型用于计算动力学和结合常数。

[0360] 结果:

[0361] 影响IgA寡聚物形成的因素。单体IgA的重组制备是众所周知的,可以通过轻链(LC)和重链(HC)的共表达来实现,类似于IgG的制备。相比之下,聚合IgA的组装需要LC、HC和连接链(JC)的共表达,并且得到的IgA寡聚状态的特征不太好。为了更好地了解IgA寡聚物的组装过程,对各种人类IgA同种型和同种异型的表达进行了表征,包括IgA1、IgA2m1、IgA2m1.P221R(二硫化物稳定的LC-HC配对)和IgA2m2(图1A-B的小图A)。抗小鼠白细胞介素13(mIL-13)抗体的鼠可变结构域被克隆为具有人κLC和IgA HC恒定结构域的嵌合体。然后在存在和不存在人类JC的情况下共表达嵌合LC和HC(图1A-B的小图B)。用蛋白质L亲和纯化后,在没有共转染的JC的情况下,在30mL Expi293T瞬时表达中制备的IgA产出相对纯的单体。在这些实验中,细胞用等量的LC和HC DNA转染。相比之下,等质量数量的LC、HC和JC DNA的转染产生了多种寡聚物物种,对应于包含三到五个IgA单体的IgA单体、二聚体和聚合物(图1D和图2A-图2C)。发现IgA1、IgA2m1和IgA2m1.P221R主要产生二聚IgA(图2A-图2B),而IgA2m2产生大致等量的二聚体和聚合物(图2C)。在放大到"升"级的CHO瞬时表达中观察到类似的寡聚物分布。

[0362] 通过二次纯化从聚合物中分离IgA二聚体证明在更大规模上具有挑战性。为了使组装偏向于二聚体形成,相对于LC和HC DNA量的JC DNA量增加,以促进JC表达水平的增强。这导致二聚体物种的相对百分比增加和聚合物物种的相对百分比减少(图2A-图2C;另请参见图15A-图15C、图16A-图16B、图17A-图17B和图20A-图20B)。相反,相对于LC和HC DNA量而言,减少JC DNA的量会导致更高阶聚合物(三聚体/四聚体/五聚体)的百分比增加(图18A-图18E和图21-图23)。对于IgA2m2物种,基于JC DNA量影响寡聚物种的能力最为明显。此外,与没有分泌组分的连接链、轻链和重链的共转染相比,分泌组分、连接链、轻链和重链的共转染产生了更高阶的寡聚物(图29)。

[0363] 为了理解为什么IgA2m2比IgA1或IgA2m1更倾向于形成更大的寡聚物,比较了不同同种型/同种异型的HC尾端的氨基酸序列。虽然IgA1和IgA2m1尾段的序列相同,但IgA2m2有两个残基不同。残基458和467在IgA1和IgA2m1中都是缬氨酸,而IgA2m2在这些位置分别具有异亮氨酸和丙氨酸(图1A-B中的小图A,星号)。因此,研究了这两种氨基酸差异是否可以解释重组IgA2m2形成更大寡聚物的独特倾向。事实上,当IgA1或IgA2m1中第458位的缬氨酸被异亮氨酸取代时,会产生更多的聚合物,这与残基467处的丙氨酸或缬氨酸无关(图2D)。相反,当IgA2m2中的458位从异亮氨酸变为缬氨酸时,聚合物物种的含量会减少,有利于二聚体含量的增加。

[0364] 产生IgA2m2抗体重链中某些半胱氨酸残基的突变,以防止与分泌组分或连接链形成二硫键,并进行分析以确定此类突变对寡聚物形成的影响。Cys311突变为丝氨酸阻止了与分泌组分的二硫键,而Cys471突变为丝氨酸阻止了与连接链的二硫键。如图28B所示,当将连接链添加到轻链和重链时,IgA2m2二聚体和更高阶寡聚物的形成需要C471而不是C311的突变。

[0365] 已知糖基化在IgA寡聚化中起作用(Chuang et al.,J Immunol 158:724-32(1997))。因此,进行了突变以去除IgA1和IgA2m2中的每个N-联糖基化位点。四个单独的突变(N459A/G/Q或S461A)去除了IgA1或IgA2m2尾端的N-联糖基化位点,也增加了聚合物的产

生量,而去除尾端外糖基化位点的突变并没有改变寡聚物的形成(分别参见图2E和图2F;另请参见图38)。因此,除了调节转染中的DNA比例外,还可以通过在尾端氨基残基458处添加异亮氨酸或阻止IgA尾段的N-联糖基化来增加IgA聚合物的形成。

[0366] IgA单体和寡聚物的大规模纯化和生物物理表征。利用通过小规模表达获得的对IgA寡聚物形成的深入了解,使用CHO瞬时表达放大了单体、二聚体和四聚体IgA。分离了IgA1、IgA2m1、IgA2m1.P221R和IgA2m2的单体和二聚体,以及IgA2m2的四聚体(图3A-3D的小图A)。这些样品的非还原SDS-PAGE分析显示主要的分子量条带分别与IgA单体、二聚体和四聚体的预期质量~150 kDa、~310 kDa和~610 kDa一致(图3A-3D的小图B)。这些预期质量基于没有糖基化的氨基酸序列,并假设每个寡聚物掺入一个JC。纯化的寡聚物种的摩尔质量也通过SEC-MALS测量,发现与二聚体和四聚体IgA的预期质量一致(表2)。对纯化的IgA样品进行的还原性SDS-PAGE分析证实了单体的LC和HC条带的存在分别为~25 kDa和~55 kDa,而在寡聚样品中也可以检测到JC的条带刚好低于25 kDa(图3A-3D的小图B)。LC、HC和JC的同一性另外通过还原和酶促去糖基化后的质谱法确认(图18E)。负染色电子显微镜(EM)也用于进一步验证分离的物种的寡聚状态。IgA2m2二聚体(图3A-3D的小图C)和四聚体(图3A-3D的小图D)的负染色图像分别证实了两个或主要是四个IgA分子的存在。在二聚体中,两个IgA分子通过它们的Fc结构域尾对尾连接成一个细长的颗粒,而在四聚体中,四个Fc域之间的相互作用产生了四个IgA分子的紧密复合物。两个样品的原始图像都显示存在表现良好的单分散粒子(图8A-8B)。

[0367] 表2.通过SEC-MALS测量的重组IgA的摩尔质量

[0368]

	预测 MW (Da)	SEC-MALS MW (g/mol)	多分散性 (Mw/Mn)
抗 mIL-13 IgA1 二聚体	3.160×10^5	3.277×10^5 +/- 0.802%	1.001 +/- 1.127%
抗 mIL-13 IgA2m1 二聚体	3.114×10^5	3.264×10^5 +/- 0.675%	1.001 +/- 0.951%

[0369]

抗 mIL-13 IgA2m2 二聚体	3.117×10^5	3.437×10^5 +/- 0.646%	1.002 +/- 0.911%
抗 mIL-13 IgA2m2 四聚体	6.078×10^5	6.580×10^5 +/- 0.510%	1.005 +/- 0.720%

[0370] 将蛋白质注射到Waters Xbridge Protein BEH 200 Å分析型尺寸排阻色谱(SEC)柱上,该色谱柱与Wyatt DAWN HELEOS II/Optilab T-rEX多角度光散射(MALS)检测器耦合,用于测量摩尔质量和多分散性。IgA分子的预测分子量(MW)仅基于氨基酸组成,假设每个二聚体或四聚体掺入一个JC,并且不考虑任何潜在的N-联聚糖或O-联聚糖。

[0371] 抗mIL-13IgA单体、二聚体和四聚体以与抗mIL-13IgG1相似的亲和力结合鼠IL-13(表3和图19),表明Fab区在重组IgA中正确折叠并具有功能。正如预期的那样,小鼠和人pIgR结合仅见于IgA寡聚物,而单体和寡聚抗mIL-13IgA均以相似的亲和力结合人FcαRI(表3)。此外,从CHO细胞或Expi293细胞中的瞬时表达纯化的IgA2m2表现出与小鼠和人pIgR相似的结合(图36A)。由于pIgR结合能力,使用异位表达人pIgR的MDCK细胞系,所有IgA寡聚物(但不是单体)都能够在体外进行转胞吞作用(图4A-4B的小图A和图7E)。此外,通过差示扫描荧光法(DSF)测量,IgA单体和寡聚物,与抗mIL-13人IgG1相比都表现出更高的稳定性,与IgG1 Fab片段相比表现出相似或更高的稳定性(图4A-4B的小图B)。

[0372] 表3.抗小鼠IL-13IgA和IgG分子对抗原和受体的结合亲和力。

[0373]

	K_D (nM)			
	小鼠 IL-13	小鼠 pIgR	人 pIgR	人 FcαRI
IgA1 单体	0.78 ± 0.05	NB	NB	425 ± 7
IgA2m1 单体	1.09 ± 0.03	NB	NB	429 ± 6
IgA2m1 P221R 单体	1.16 ± 0.01	NB	NB	443 ± 8
IgA2m2 单体	0.70 ± 0.01	NB	NB	455 ± 5
IgA1 二聚体	0.34 ± 0.01	2.66 ± 1.45	8.80 ± 0.55	369 ± 3
IgA2m1 二聚体	0.18 ± 0.01	2.54 ± 0.15	5.05 ± 0.88	499 ± 7
IgA2m1 P221R 二聚体	0.84 ± 0.01	5.59 ± 0.03	15.5 ± 0.10	462 ± 4
IgA2m2 二聚体	0.81 ± 0.01	2.45 ± 0.98	13.9 ± 0.10	597 ± 5

[0374]

IgA2m2 四聚体	0.97 ± 0.02	0.69 ± 0.05	1.93 ± 0.02	533 ± 5
IgG1	0.88 ± 0.05	NB	NB	NB

[0375] NB:没有结合。所有实验至少进行n＝3次。

[0376] 重组IgA的药代动力学曲线和生物分布。分析了所公开的重组IgA寡聚物的血清浓度时间曲线,并确定了那些与先前使用重组单体报告的数据相当的数据(图5A和表4)(Boross et al.(2013),Rouwendal et al.(2016)和Lohse et al.,Br J Haematol 112:4170(2017))。单次施用重组IgA寡聚物后,观察到非常快速的血清清除率(>200mL/天/kg)。血清纯化的人IgA单体表现出较慢的整体清除率,血清PK曲线通常与先前报道的高度唾液酸化IgA单体一致(Rouwendal et al.(2016))。除了表征血清浓度时间曲线外,还对具有双重I-125和In-111标记抗体的小鼠进行了放射性标记生物分布研究。双示踪剂方法提供了区分溶酶体降解之前的完整抗体(I-125)和内化/分解代谢的抗体(In-111减去I-125)的能力(图5B和图5C)(Boswell et al.,Bioconjugate Chem 21:2153-63(2010),Mandikian et al.,Mol Cancer Ther 17:776-85(2018)和Rajan et al.,MAbs 9:1379-88(2017))。简而言之,碘迅速扩散出细胞并在碘化抗体经历溶酶体降解后被清除,而In-111标记抗体显示溶酶体降解后In-111-加合物的细胞间积累。由于与IgG1相比,IgA抗体的清除速度如此之快,因此很难直接比较组织分布数据,因为原始组织值代表间质和血管浓度。因此,完整抗体分布数据如先前所述进行血液校正以仅代表组织中的间质浓度(Boswell et al.,Mol Pharmaceutics 11:1591-8(2014))。与IgG1相比,1小时后在肝脏、胃、小肠、大肠和皮肤中观察到完整IgA寡聚物的稍微富集(所有pIgR表达组织(Asano et al.,Scand J Immunol 60:267-72(2004)和Wang et al.,Scand JImmunol 83:235-43(2016)),尽管水平较低(图5B)。在肝脏和小肠中给药1小时后,在研究的抗体形式中也发现了高水平的IgA降解(图5C)。为了解释在抗体形式之间观察到的总血液浓度的差异,还描述了个体组织与血浆浓度的比率(图9)。1天后,几乎没有完整的IgA抗体留在组织中(图10)并且检测到肝脏中最大的

分解代谢(图11),尽管可能未检测到小肠中的分解代谢,因为In-111在肠细胞的后期时间点积累得不是太好(Boswell et al.,British Journal of Pharmacology 168:445-57(2013))。不受特定理论的束缚,假设与IgG相比,减少IgA的降解和最终清除机制可以进一步提高粘膜组织对IgA分子的吸收。

[0377] 据报道,单体IgA分子的N-联聚糖上的唾液酸化含量与通过特定聚糖受体的抗体清除率呈负相关(Rouwendal et al.(2016))。因此,分析了所公开的IgA分子以确定它们的总体唾液酸化含量。聚糖根据加工水平进行分类,复合物和唾液酸化是IgA分子最需要的(图6A)。重组产生的IgA1、IgA2m1、IgA2m1.P221R、IgA2m2的二聚体以及IgA2m2单体和的四聚体被约20-50%唾液酸化(图6B、图25和图26以及表5)。这表明IgA分子包含可以被聚糖受体识别的未完全加工的聚糖。此外,检查了IgA2m1二聚体上每个位点的唾液酸化含量,发现所有位点,包括JC上的位点,都包含未完全加工的聚糖,表明不完全的聚糖加工并非仅发生在一个特定位点(图6C和表6)。与公开的重组IgA分子相比,从人血清中纯化的IgA具有95%的唾液酸化含量(图6B和表5),并且如通过SEC-MALS确定的那样是单体的。由于已知血清IgA主要是单体的(Kerr(1990)),它可能富含高度唾液酸化的分子,因为唾液酸化含量与抗体的全身暴露呈正相关。不受特定理论的束缚,认为与重组IgA单体相比,人纯化的IgA单体的这种唾液酸化水平增加将与小鼠中该分子的血清清除率减少相关。事实上,这被证明是正确的,这表明与肝脏中特定聚糖受体的结合可能是IgA单体的重要清除机制(图5A、图25和图27)。

[0378] 表4.向Balb/C小鼠IV推注5mg/kg IgA单体/寡聚物后的药代动力学参数估计值(平均值)

[0379]

	C_{max} (μg/mL)	$AUC_{最终}$ (天*μg/mL)	CL (mL/天/kg)	半衰期（天）
IgA2m2 单体	76.42	8.674	573.2	0.36
IgA1 二聚体	85.17	14.61	341.3	0.31
IgA2m1 二聚体	92.53	13.40	372.9	0.26
IgA2m1 P221R 二聚体	107.8	17.55	284.5	0.27
IgA2m2 二聚体	144.7	20.88	238.9	0.31
IgA2m2 四聚体	60.47	6.127	788.1	0.22
人血清 IgA 单体#	203.3	203.0	45.74	0.97

[0380]

IgG1	100.1	339.3	14.30	2.89

[0381] $AUC_{最终}$=浓度-时间曲线下面积,最终可测量的浓度;CL=清除率;观察到的C_{max}=最大浓度;IV=注射;#给药10mg/kg静脉推注给Balb/c小鼠。注:由于对所有小鼠PK数据进行了稀疏PK分析,因此汇集了每组各个小鼠的数据并且未报告SD。

[0382] 产生减少pIgR结合的IgA变体。产生IgA2m2变体以确定突变对pIgR结合的影响。产生了具有氨基酸Y411、V413和T414突变为丙氨酸(本文称为“411-414AAA”)、P440R突变、C311S突变或其组合的IgA2m2变体。图30A中提供了此类变体的表达水平。图30B提供了小规

模纯化的抗IL-13IgA2m2变体的SEC表征。如图30C-图30D所示,具有Y411、V413和T414氨基酸突变的IgA2m2变体不与小鼠pIgR或人pIgR结合,而P440R变体导致对鼠pIgR的亲和力减少10倍并显著丧失与人pIgR的结合能力。此外,具有氨基酸411、413和414突变的IgA2m2变体也不与FcαRI结合(图30E)。

[0383] 表5.单体和聚合IgA分子的全局N-联聚糖分析。

[0384]

		IgA2m2 单体	IgA1 二聚体	IgA2m1 二聚体	IgA2m1 P221R 二聚体	IgA2m2 二聚体	IgA2m2 四聚体	人血清 IgA 单体
高甘露糖		1.4%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
		1.7%	1.1%	0%	0.9%	0%	2.2%	0%
		2.7%	13.6%	11.8%	6.4%	4.7%	3.9%	0%
		2.6%	6.6%	4.7%	3.4%	3.2%	4.2%	0%
		2.3%	0%	0.8%	0.5%	0%	1.5%	0%
		1.3%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
		1.1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
		0%	0%	0%	0.9%	0%	0%	0%
		0%	3.9%	16.8%	14.0%	13.2%	15.1%	0%

[0385]

		IgA2m2 单体	IgA1 二聚体	IgA2m1 二聚体	IgA2m1 P221R 二聚体	IgA2m2 二聚体	IgA2m2 四聚体	人血清 IgA 单体
复合物、无唾液酸化 & 杂合物		0.6%	4.7%	2.2%	1.0%	1.6%	0.8%	0%
		0%	1.3%	1.0%	0%	0%	0%	0%
		1.9%	8.3%	7.6%	1.8%	2.0%	3.2%	0%
		1.0%	2.3%	0.8%	0.8%	0%	0%	0%
		0.8%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
		0%	0%	0.9%	0%	0.8%	0.9%	2.3%
		0%	0%	0%	0%	0%	0%	1.2%
		1.2%	2.8%	1.9%	2.8%	3.3%	0.5%	0%
		32.8%	12.7%	5.8%	6.7%	9.3%	8.3%	0%
		2.6%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
		0%	0%	0.9%	0%	1.7%	0%	0%
		10.5%	2.6%	2.9%	2.8%	3.4%	3.6%	0%
		8.4%	0%	0%	0%	0%	0.9%	0%
		1.2%	0%	0%	0%	0%	0%	0.6%
		0%	0.8%	0%	0%	0%	0%	1.0%
		0%	0%	0%	1.3%	0.8%	0%	0%
复合物、唾液酸化		0%	0%	0.6%	0%	0%	0%	0%
		0%	1.3%	2.3%	1.7%	3.0%	2.7%	0%
		0%	0%	0%	0%	0%	0%	1.4%
		0%	1.8%	0%	0%	0.7%	0%	0%

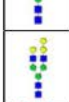
[0386]

	IgA2m2 单体	IgA1 二聚体	IgA2m1 二聚体	IgA2m1 P221R 二聚体	IgA2m2 二聚体	IgA2m2 四聚体	人血清 IgA 单体
	0%	0%	0.9%	0%	0%	0%	0%
	0%	14.7%	0%	0%	2.1%	0%	6.0%
	0%	0.7%	0%	0%	0%	0%	0%
	0%	0%	0%	0%	0%	0%	6.0%
	0%	1.2%	0%	0.9%	1.1%	0.7%	0%
	0%	0%	1.0%	0%	0%	0%	0%
	1.0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	0.5%	0.8%	3.7%	0%	0%	0%	33.6%
	10.2%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	0%	7.0%	0.5%	3.4%	3.8%	0%	1.0%
	14.1%	7.1%	32.7%	49.9%	45.6%	48.9%	2.1%
	0%	1.5%	0%	0%	0%	0%	0%
	0%	0%	0%	0%	0%	0%	2.0%
	0%	0%	0%	0%	0%	0%	25.4%
	0%	0.9%	0%	0.8%	0%	0%	0%
	0%	1.6%	0%	0%	0%	0%	0%
	0%	0.5%	0%	0%	0%	0.7%	7.2%
	0%	0%	0%	0%	0%	0%	10.1%
	0%	0%	0%	0%	0%	1.7%	0%

[0387] 修改细胞培养条件以增加IgA抗体的唾液酸化含量。修改表达IgA抗体的细胞的培养条件以增加抗体的唾液酸化含量。测试的细胞培养条件在图31A中提供。如图31B所示,在7天收获中,在半乳糖和N-乙酰甘露糖胺(ManNac)存在下,在加入唾液酸转移酶(ST)和半乳糖基转移酶(GT)后,IgA2m2抗体的唾液酸化增强。

[0388] 表6.IgA2m1二聚体的位点特异性N-联聚糖分析。

[0389]

		HC N166	HC N263	HC N337	HC N459	JC N49
无糖基化		0%	0%	0%	41.4%	0%
高甘露糖		0%	0.6%	0%	0%	1.7%
		1.8%	12.5%	1.7%	4.2%	1.6%
		0%	12.1%	0%	5.6%	2.9%
		0.8%	6.1%	0%	0.7%	0%
		0%	3.5%	0%	0%	9.7%
		1.0%	1.2%	0%	0%	0%
		11.4%	0%	0%	2.6%	0%
复合物、无唾液酸化 & 杂合物		1.0%	10.0%	1.3%	0.6%	1.2%
		0%	4.3%	0%	0%	3.0%
		0.7%	11.1%	1.8%	1.5%	0.9%
		2.6%	6.3%	1.0%	0.8%	4.6%
		0.7%	2.8%	0.7%	1.7%	8.6%
		1.3%	0%	0%	0%	0%
		0%	0%	0%	0%	4.8%
		0%	0%	0%	1.0%	0%
		0%	0%	0%	0%	1.1%

[0390]

		HC N166	HC N263	HC N337	HC N459	JC N49
		0%	0%	0%	0%	2.7%
		3.1%	0%	2.9%	0%	0%
		16.8%	0%	24.8%	1.7%	10.6%
		0%	0%	1.8%	1.3%	1.0%
		1.3%	0%	1.2%	0%	1.6%
		11.6%	0%	17.6%	19.7%	1.8%
		4.5%	0%	9.7%	0.6%	3.9%
		0.8%	0%	0%	0%	0%
		0%	0%	1.1%	0.6%	0.6%
		0%	0%	0.8%	0%	0%
复合物、唾液酸化		0%	0%	0.6%	0%	2.7%
		0%	3.6%	0%	0.7%	0%
		4.2%	0%	0%	0.7%	1.9%
		0%	7.8%	0%	1.1%	0%
		0.7%	0%	0%	0%	0%
		0%	4.0%	0%	2.2%	0%
		0%	4.2%	0%	0.9%	2.3%
		1.3%	10.1%	0.8%	1.0%	1.5%
		6.5%	0%	10.6%	1.2%	0%
		1.5%	0%	0%	0%	0%
		11.9%	0%	16.9%	2.0%	0%

[0391]

	HC N166	HC N263	HC N337	HC N459	JC N49
	0.7%	0%	0%	0%	0%
	1.7%	0%	0%	0%	0%
	11.4%	0%	3.9%	2.6%	0.8%
	0%	0%	0%	0.8%	0%
	0%	0%	0%	0.7%	0%
	0.7%	0%	0.6%	0.6%	0.6%
	0%	0%	0%	0%	0.7%
	0%	0%	0%	0%	6.0%
	0%	0%	0%	1.2%	21.1%

[0392] 通过糖基化位点和FcRn工程改造改善重组IgA的药代动力学曲线。采取了两种平行的方法来减少小鼠中重组聚合IgA的清除率。首先,通过诱变去除IgA2m2中的所有五个N-联糖基化基序和JC中的单个位点,以产生不含聚糖的分子(无糖基化)(图7A和图25)。无糖基化IgA聚合物不会被聚糖受体识别,并且允许独立于聚糖受体介导的清除机制研究药代动力学。如图36B-图36D所示,各个IgA2m2糖基化变体与小鼠pIgR和人pIgR具有相似的结合。为了去除IgA2m2中的N-联糖基化基序N-X-S/T,有三种情况,N突变为A/G/Q或S/T突变为A或将基序恢复为无糖基化IgA1序列(图1A-B中的小图A)。JC残基N49突变为A/G/Q或S51突变为A。发现个体IgA2m2突变N166A、S212P、N263Q、N337T.I338L.T339S和N459Q,并且N49Q JC突变给出最高瞬时表达水平,然而,去除IgA2m2中所有五个糖基化位点的突变组合导致表达不佳,而进一步添加J链N49Q突变完全消除了它。另请参见图24A-C。与来自单一物种的免疫球蛋白相比,嵌合免疫球蛋白在哺乳动物细胞中的表达水平通常较低。因此,将鼠抗mIL13可变结构域转换为人源化抗HER2以生成人源化IgA,但这并没有提高瞬时表达水平。因此,产生了CHO靶向整合(TI)稳定细胞系,以提高无糖基化人抗HER2 IgA2m2聚合物的表达水平,该聚合物被纯化为寡聚物种的混合物。

[0393] 其次,设计了两个IgG1-IgA Fc融合体,以利用FcRn结合作为减少溶酶体降解的一种方式(图7B)。先前的研究表明,这种方法将IgA单体血清清除率挽救到与IgG1相当的水平(Li et al.(2017)and Borrok et al.(2015))。最初,制备了先前报道的IgG1-IgA2m1 P221R Fc融合体(Borrok et al.(2015))的二聚体和四聚体版本,但观察到这些在4天时在小鼠血浆中表现出不稳定性(图7C)。主要截短产物在分析SEC中洗脱的时间与全长抗HER2 IgG1(曲妥珠单抗)相似,表明这种不稳定性是由内切蛋白酶在IgG1-IgA2m1 P221R Fc连接处切割引起的。检查了连接处的氨基酸序列,并鉴定了一段类似于弗林蛋白酶样切割位点的带正电荷的残基(图12)。为了减轻蛋白水解切割,通过去除IgG1重链的C末端K447来消除连接处的这些带正电荷的残基,并用P221-天然IgA2m1残基(而不是P221R突变)起始IgA2m1

Fc,或用C242起始IgA2m1 Fc(其删除了IgA2m1铰链)(图12和图34A)。C242 Fc起始点也包括在内,因为它是IgA1 Fc晶体结构构建体的第一个残基,因此被假定为稳定的截短蛋白(Herr et al.,Nature 423:614-20(2003))。当重新工程改造的IgG1ΔK-P221IgA2m1 Fc和IgG1ΔK-C242 IgA2m1 Fc融合体以二聚体形式产生时,发现两者在小鼠血浆中均可稳定长达4天(图7C)。图34B提供了全长抗IL-13IgG1-IgA Fc融合体的瞬时表达数据。与IgG1和原始构建体相比,一些工程改造的融合分子表现出改善的表达(图34B和图37A)。此外,如图33A所示,与LC和HC DNA的量相比,增加JC DNA的量导致产生的二聚体物种多于高级寡聚物物种。

[0394] IgG1-IgA1融合体也通过将IgG1在较低铰链残基E233或L234处与IgA1的Fc在C241或C242处融合而产生。如图37B所示,IgG1-IgA1融合体主要以二聚体形式表达,类似于IgA1。此外,IgG1-IgA1融合体以与IgA1相似的方式结合人和小鼠pIgR和人FcαRI(图37C)。

[0395] 通过差示扫描荧光法(DSF)分析工程改造的IgA抗体和IgG1-IgA融合分子的稳定性,证实与IgA1二聚体相比稳定性没有损失(图32)。

[0396] 对工程化的IgA抗体和IgG1-IgA融合分子进一步表征了全局聚糖含量、抗原结合和受体结合。无糖基化的抗HER2 IgA2m2聚合物确实没有糖基化,而抗mIL-13IgG1ΔK-P221IgA2m1 Fc和IgG1ΔK-C242 IgA2m1 Fc融合体仅含有~20%的复合物唾液酸化聚糖(图13和表8)。发现无糖基化抗HER2 IgA2m2聚合物对人(h)HER2、鼠(m)pIgR和hpIgR具有与糖基化IgA2m2四聚体相似的结合亲和力,但它不结合IgA特异性hFc受体hFcαRI,如由Wasatch SPR测定确定的(表7;也参见图33B-图33C)。有趣的是,在IgA2m2 HC上缺乏糖基化但保留了J链上的糖基化的IgA2m2四聚体,也无法结合hFcαRI(图35A-图35B),如Wasatch SPR测定所确定,表明需要IgA HC的糖基化用于受体结合。然而,如使用Biacore SPR系统(制药行业常用的SPR系统)所示,IgA聚合物的糖基化状态不影响与hFcαRI的结合(图52A-图52B)。如图52A-图52B所示,无糖基化的抗HER2 IgA2m2聚合物(称为"xHER2 4D5.IgA2m2四聚体N168A.S214P.N252Q.N326T.I327L.T328S.N461Q,J-N71Q")和部分抗糖基化的抗IL-13IgA2m2寡聚物保留了hFcαRI结合,如通过Biacore SPR测定确定的。不受特定理论的束缚,从两个SPR系统(即Wasatch和Biacore系统)获得的结果的差异可能部分是由于用于将抗体固定到本方法公开的SPR系统中使用的芯片的不同策略。

[0397] 此外,抗mIL-13IgG1ΔK-P221 IgA2m1 Fc和IgG1K-C242 IgA2m1 Fc二聚体对mIL-13、mFcRn和hFcRn具有与抗mIL-13IgG1相似的结合亲和力(表7),对mpIgR、hpIgR和hFcαRI具有与IgA2m1二聚体相似的结合亲和力(表3和7),如通过Wasatch SPR测定确定的。因此,IgG1-Ig2m1A Fc融合体保留了IgG和聚合IgA的所需属性。

[0398] 表7.使用Wasatch结合测定法测定IgG1-IgA2m1 Fc融合二聚体和非糖基化IgA2m2四聚体与抗原和受体的结合亲和力。

[0399]

	K_D (nM)						
	小鼠 IL-13	人 HER2	小鼠 pIgR	人 pIgR	小鼠 FcRn* pH 6.0	人 FcRn* pH 6.0	人 FcαRI

[0400]

抗 HER2 IgA2m2 四聚体	NB	0.21 ± 0.08	0.35 ± 0.01	0.50 ± 0.06	NB	NB	1,590 ± 200
抗 HER2 IgA2m2 四聚体无糖基化	NB	0.27 ± 0.07	0.55 ± 0.10	0.72 ± 0.06	NB	NB	NB
抗 IL-13 IgG1ΔK-P221 IgA2m1 Fc 二聚体	1.46 ± 0.33	NB	3.32 ± 1.07	7.67 ± 0.42	6,800 ± 556	8,400 ± 294	1,070 ± 69.8
抗 IL-13 IgG1ΔK-C242 IgA2m1 Fc 二聚体	1.38 ± 0.15	NB	3.32 ± 1.62	4.41 ± 1.72	7,400 ± 830	9,900 ± 838	938 ± 93.9
抗 IL-13 IgG1	1.15 ± 0.17	NB	NB	NB	7,800 ± 499	9,800 ± 1,081	NB
人血清 IgA 单体	NB	NB	NB	NB	NB	NB	1,750 ± 92.9

[0401] NB:没有结合。*K_D是使用稳态动力学计算的。所有实验至少进行n＝3次。

[0402] 表8.IgG1-IgA2m1 Fc融合寡聚物和无糖基化IgA2m2四聚体的全局N-联聚糖分析。

[0403]

		抗 IL-13 IgG1ΔK-P221 IgA2m1 Fc 二聚体	抗 IL-13 IgG1ΔK-C242 IgA2m1 Fc 二聚体	抗 HER2 IgA2m2 四聚体无糖基化
高甘露糖		2.7%	2.2%	0%
		1.4%	2.2%	0%
		5.0%	4.0%	0%
		0.5%	0.9%	0%
		2.9%	3.4%	0%
无唾液酸化&杂		1.2%	1.8%	0%
		0%	0.8%	0%

[0404]

		抗 IL-13 IgG1ΔK-P221 IgA2m1 Fc 二聚体	抗 IL-13 IgG1ΔK-C242 IgA2m1 Fc 二聚体	抗 HER2 IgA2m2 四聚体无糖基化
		4.4%	5.3%	0%
		2.3%	3.2%	0%
		1.4%	2.8%	0%
		4.1%	3.2%	0%
		46.1%	41.3%	0%
		1.5%	1.6%	0%
		2.5%	2.5%	0%
		3.5%	1.2%	0%
		0.9%	1.2%	0%
复合物、唾液酸化		0.5%	0.5%	0%
		1.9%	2.4%	0%
		0.6%	1.1%	0%
		0.7%	0.8%	0%
		3.0%	4.4%	0%
		4.9%	4.0%	0%
		8.0%	8.2%	0%
		0%	0.5%	0%
		0%	0.5%	0%

[0405] 在小鼠中测量了这两种新生成形式抗体的体外pIgR介导的转胞吞作用和血清浓度时间曲线。IgG1-IgA2m1 Fc融合物在小鼠的整体IgA血清暴露方面显示出最显著的改善(图7D、图34C和表9),但与无糖基化IgA2m2聚合物相比,体外转胞吞作用的水平最低,其显示出最高水平体外转胞吞作用(图7E)。

[0406] 表9.向Balb/C小鼠IV推注30mg/kg IgA寡聚物后的药代动力学参数估计值(平均值)。

[0407]

	C_{max} (μg/mL)	$AUC_{最终}$ (天*μg/mL)	CL (mL/天/kg)	半衰期 (天)
抗 HER2 IgA2m2 四聚体	48.9	617.8	612.8	0.87
抗 HER2 IgA2m2 四聚体无糖基化	159	1063.7	320.7	0.68
抗 IL-13 IgG1ΔK-P221 IgA2m1 Fc 二聚体	176	962.5	236.8	3.42
抗 IL-13 IgG1ΔK-C242 IgA2m1 Fc 二聚体	177	739.9	192.3	1.94
抗 IL-13 IgA2m1 二聚体	115	1371.8	430.9	0.41

[0408] $AUC_{最终}$＝浓度-时间曲线下面积,最终可测量的浓度;CL＝清除率;观察到的C_{max}＝最大浓度;IV＝静脉注射。注:由于对所有小鼠PK数据进行了稀疏PK分析,因此汇集了每组各个小鼠的数据并且未报告SD。

[0409] 讨论:

[0410] IgA有可能将单克隆抗体的治疗范围扩展超越IgG提供的当前功能。部分原因是IgA具有形成单体和聚合物物种的多功能性。在过去几年中,单体IgA的重组制备取得了重大进展(Leusen(2015),Dicker et al.,Bioengineered(2016),Vasilev et al.,Biotechnol Adv(2015)和Virdi et al.,Cell Mol Life Sci(2015)),提供了一种稳健的途径来分离特征明确的材料,其中N-联聚糖的唾液酸化含量增加,从而提高了血清清除率(Rouwendal et al.(2016))。虽然单体IgA的强细胞毒性特性是肿瘤学适应症的一个有吸引力的特征,但聚合IgA需要通过pIgR介导的转胞吞作用到达超越上皮屏障的目标。在本文所述的工作之前,仅重组制备的单体和寡聚体的混合物用于研究转胞吞作用的体内实验(Olsan et al.(2015)和Rifai et al.(2000))。本实例中描述的实验建立了允许富集二聚体和四聚体IgA的稳健的表达和纯化途径。特别地,调节用于转染的JC DNA量或IgA尾区域的糖基化状态能够影响寡聚物种的分布。有趣的是,IgA尾的N-联糖基化位点是物种间唯一极其保守的位点(图14),提供了一种控制体内高阶IgA寡聚物形成的方法。对于重组IgA的纯化,使用蛋白质L亲和色谱,然后使用HPLC-SEC,很容易将二聚体与四聚体分离。

[0411] 先前已经证明,通过克服聚糖受体介导的分解代谢,增强重组表达的IgA单体的唾液酸化水平会减少血清清除率(Rouwendal et al.(2016))。作为替代策略,消除了聚糖对寡聚IgA血清清除率的贡献,并产生了完全无糖基化的IgA2m2聚合物。如通过表面等离子共振评估的那样,缺乏N-联聚糖不会影响与pIgR的结合。令人惊讶的是,在体外MDCK转胞吞作用测定中,观察到与糖基化四聚体或二聚体相比,无糖基化物种显著改善了转胞吞作用。在先前对人IgA1二聚体(其已从抗体Fc区去除了N-联聚糖,但在鼠J链上仍存在碳水化合物)的研究中未观察到这种改善(Chuang etal.,(1997))。不受特定理论的束缚,一种解释是缺乏聚糖消除了与聚糖受体的结合,从而通过pIgR结合提供不受干扰且更有效的转胞吞作用。有趣的是,四聚体IgA2m2与FcαRI的结合依赖于糖基化,这与观察到的对工程改造为含有减少数量的糖基化位点的单体IgA2m1的结合缺乏影响形成对比。尽管未分析聚合IgA的

细胞毒性作用,但可以在不活化FcαRI的情况下进行转胞吞的IgA治疗剂对于炎症性疾病是可取的,因为这将防止中性粒细胞迁移引起的促炎应答(Aleyd et al.,Immunol Rev 268:123-38(2015))。

[0412] 在本文公开的实验中重组产生的糖基化IgA寡聚物和单体从血清中迅速清除,类似于先前对单体和聚合IgA观察到的情况(Rouwendal et al.(2016)和Chuang et al.,(1997))。快速清除归因于与聚糖受体的潜在结合以及随后在溶酶体中的降解。糖基化IgA的生物分布研究支持了这一结论,表明肝脏和小肠中的分解代谢最多。为了更好地了解具有聚糖的作用,生成了不含聚糖(无糖基化)的IgA聚合物,并将其体内PK曲线直接与糖基化版本进行比较。与糖基化聚合物相比,无糖基化IgA2m2聚合物在总体小鼠血清暴露方面没有明显差异(<2倍)。这表明N-联聚糖在清除小鼠IgA聚合物方面的作用很小。虽然需要进一步研究以了解为什么无糖基化IgA寡聚物不能提高血清清除率,但似乎pIgR介导的转胞吞作用和/或清除率可能在决定小鼠的总体血清浓度和聚合IgA的命运方面发挥重要作用。事实上,四聚体IgA对pIgR的平衡结合亲和力至少在皮摩尔范围内,允许与丰富的pIgR受体有效结合,然后进行转胞吞作用。然而,需要对组织分布谱进行详细的生物分布研究,以更好地解释分子的血清浓度时间曲线和无糖基化聚合IgA的分布。研究啮齿动物中聚合IgA分子的药代动力学特性和生物分布的一个重要警告是,pIgR的表达模式在啮齿动物和人类之间不同,这可能会混淆最终的临床解释。特别是,啮齿动物和兔子肝细胞中pIgR的高表达与聚合IgA的胆道清除机制有关(Daniels et al.(1989)),这认为不会发生在人类中,人类的而是在胆管细胞中发现pIgR表达(Tomana et al.(1988))。因此,需要单独评估pIgR在聚合IgA分子在小鼠体内的生物分布和清除中所起的确切作用。

[0413] 为避免加速血清清除和改善暴露而采取的替代策略是通过工程改造IgG1-IgA2m1 Fc融合体。结合FcRn的能力允许在内体中再循环,从而避免了溶酶体降解的分选。先前关于单体IgG-IgA Fc融合体的报告报道了与IgG相当的血清清除率(Li et al.Oncotarget(2017)and Borrok et al.(2015))。此外,还观察到与白蛋白结合肽融合的单体IgA的药代动力学改善(Meyer et al.,MAbs 8:87-98(2016))。由于从IgA聚合物中去除聚糖没有观察到很大的作用,因此制备了糖基化融合蛋白。虽然二聚体IgG1-IgA2 Fc融合体显示出改善的整体血清暴露,但它无法与IgG相比,正如对单体IgG-IgA Fc融合体所观察到的那样(Li et al.Oncotarget(2017)and Borrok et al.(2015))。通过表面等离子体共振,证明二聚体IgG1-IgA2m1 Fc融合体可以结合FcRn和pIgR,尽管在MDCK模型中减弱了体外转胞吞作用。虽然与FcRn的结合延长了终末半衰期,但IgG1-IgA2m1 Fc二聚体与pIgR的相互作用可能提供了一种清除机制,尤其是在早期阶段,这导致pIgR介导的转胞吞作用和/或清除,导致与IgG相比血清浓度减少。

[0414] 血清中的IgA主要由骨髓细胞分泌的IgA1单体构成,而聚合IgA2由转胞吞作用位置固有层中的浆细胞分泌(Yoo et al.116:3-10(2005))。聚合IgA和pIgR之间的高亲和力自然会导致聚合IgA从循环中快速清除,前提是有效清除循环中作为IgA-抗原复合物的有害抗原(Shroff et al.,Infect Immun 63:3904-13(1995))并且在治疗环境中可用于将药物活性限制在限定组织和短期内,这在激动细胞因子受体时可能特别有益。pIgR缺陷型NOD小鼠血清中IgA浓度增加约20倍进一步支持通过pIgR从小鼠血清中快速清除聚合IgA(Simpfendorfer et al.,PLoS ONE 10:e0121979(2015))。实例2:重组IgA抗体的纯化

[0415] 含有κ轻链的重组IgA在CHO细胞中表达为分泌蛋白,并使用Capto L(GE Healthcare)柱从细胞培养上清液中亲和捕获。捕获后,用5倍柱体积(CV)的Tris缓冲液(25mM Tris,pH 7.5、150mM NaCl、5mM EDTA、2mM NaN3)、20CV的Triton X-114缓冲液(25mM Tris,pH7.5、150mM NaCl、5mM EDTA、0.1% Triton X-114、2mM NaN3)(以去除内毒素)、5CV的Tris缓冲液、5CV的KP缓冲液(0.4M磷酸钾,pH7.0、5mM EDTA、0.02% Tween20、2mM NaN3)和10CV的Tris缓冲液洗涤柱。IgA用150mM乙酸(pH 2.7)洗脱,并立即用1/5体积的1M精氨酸、0.4M琥珀酸盐(pH 9.0)中和。

[0416] 亲和纯化后,重组IgA使用尺寸排阻色谱(SEC)进行纯化。对于主要存在一种寡聚状态(≥90%的单一类型寡聚物)的重组IgA样品,使用HiLoad Superdex 200pg柱(GE Healthcare)进行SEC,然后进行削峰以避免有害寡聚状态的污染物。对于含有接近等量寡聚物的复杂混合物(例如,~40%二聚体和~60%更高阶的聚合物)的IgA样品,测试了几种纯化方法。如图39所示的人抗mIL-13IgA2m2寡聚物混合物用于测试如下所述的不同类型的纯化。

[0417] 使用HiLoad Superose 6 16/600pg柱(GE Healthcare)的SEC在较高分子量范围内无法充分将IgA二聚体与较高阶的寡聚物分离,如图40所示。在Superose 6洗脱曲线上,峰1洗脱接近~35-39mL,这对应于色谱柱的空隙体积,因此很可能是聚集的蛋白质。峰2和峰3显著重叠,因此峰3显示为峰2后缘上的肩峰。如上所述,通过SEC-MALS分析峰2前缘和峰3后缘附近的级分分别得到735,000g/mol和375,300g/mol的摩尔质量。人类抗mIL-13IgA2m2单体的预期分子量为~148kDa、二聚体~312kDa、三聚体~460kDa、四聚体~608kDa和五聚体~756kDa。这表明峰2和3可能包含五聚体、四聚体、三聚体和二聚体的混合物。峰4稍后在~60mL左右洗脱,可能对应于单体IgA。

[0418] 使用HiLoad Superdex 200pg柱(GE Healthcare)或HiLoad Sephacryl400pg柱(GE Healthcare)的SEC也无法充分将IgA二聚体与更高阶的寡聚物分离。尝试通过使用SP HP柱(GE Healthcare)的阳离子交换色谱、使用Q FF柱(GE Healthcare)的阴离子交换色谱和使用5μm、7.8x 75mm ProPac HIC-10column(Dionex)的疏水相互作用色谱(HIC)来分离寡聚物也不成功。

[0419] 相比之下,对于人类抗mIL-13IgA2m2,使用3.5μm、7.8mm x 300mm XBridge Protein BEH 450 ÅSEC柱(Waters)进行小规模纯化可将IgA二聚体与更高阶的寡聚物的最佳地分离,如图41所示。为最大化分离度,将不大于100μL的进样体积(其中总蛋白质少于1mg)以1mL/min运行,使用Agilent 1260Infinity HPLC,以0.2M精氨酸、0.137M琥珀酸盐、pH 5.0作为流动相,收集200μL级分。然后选择性地汇集级分以主要分离一种寡聚状态。进行多次运行,并且合并来自每次运行的给定寡聚物的汇集级分。

[0420] 在汇集级分中发现的IgA同一性、纯度和寡聚状态通过如下进行表征:SEC-MALS使用3.5μm、7.8mm x 300mm XBridge Protein BEH 200 ÅSEC柱(Waters)(图42A-42D)、SDS-PAGE如下所述(图42A-42D)、负染色电子显微镜如下所述(图43A-43B和图44A-44B)和质谱如下所述(图45)。使用Agilent 1260Infinity HPLC用0.2M精氨酸、0.137M琥珀酸盐、pH 5.0作为流动相,将重组IgA以1mL/min的流速注射到3.5μm、7.8mm x 300mm Waters XBridge Protein BEH 200 Å尺寸排阻色谱(SEC)柱上来进行SEC-MALS。图39显示了来自Capto L亲和纯化的重组抗mIL-13IgA2m2的示例分析SEC曲线。从分析型SEC柱上洗脱的蛋

白质直接注入Wyatt DAWN HELEOS II/Optilab T-rEX多角度光散射(MALS)检测器,以测量给定样品中存在的各种IgA寡聚状态的摩尔质量和多分散性。

[0421] 对于抗mIL-13IgA2m2抗体,使用Waters XBridge Protein BEH 200 ÅSEC柱在分析型SEC上鉴定了三个主要峰(图42A-42D的小图A)。人类抗mIL-13IgA2m2单体的预期分子量为~148kDa、二聚体~312kDa、三聚体~460kDa、四聚体~608kDa和五聚体~756kDa。所有预期的分子量均基于氨基酸序列组成,并且不考虑潜在的N-联聚糖或O-联聚糖,因为糖组成通常是异质和可变的。在Waters XBridge Protein BEH 450 ÅSEC柱上分离后,MALS确定峰1的摩尔质量为658,000g/mol+/-0.510%(图42A-42D的小图B)。这表明峰1主要是四聚体IgA2m2。峰2的摩尔质量由MALS确定为343,700g/mol+/-0.646%(图42A-42D的小图C)。这表明峰2主要是二聚体IgA2m2。比二聚体晚洗脱的峰3可能是单体IgA(图42A-42D的小图A)。

[0422] 分别来自图42A-42D的小图B-C的未还原的纯化峰1和2的SDS-PAGE分析显示主要条带分别迁移到IgA四聚体和二聚体的预期分子量附近(图42A-42D的小图D)。这与MALS鉴定的摩尔质量一致(图42A-42D的小图B-C)。用DTT还原后,在凝胶上观察到三个条带(图42A-42D的小图D)。重链(HC)的预期分子量为50.2kDa,轻链(LC)为23.8kDa,连接链(JC)为15.6kDa。所有预期的分子量均基于氨基酸序列组成,并且不考虑潜在的N-联聚糖或O-联聚糖,因为糖组成通常是异质和可变的。三个条带大致以所有三个链的预测分子量运行,HC和JC运行稍大。HC有五个预测的N-联糖基化位点,而JC有一个预测的N-联糖基化位点,如果被占用,会增加分子量并减少在凝胶上的迁移。通过将重组IgA蛋白与LDS样品缓冲液(Thermo Fisher Scientific)混合,加或不加10mM二硫苏糖醇(DTT)并在70℃C加热10分钟来进行SDS-PAGE。然后在4-12% Bolt Bis-Tris Plus凝胶(Thermo Fisher Scientific)于MES缓冲液(Thermo Fisher Scientific)中运行样品,并用ClearPAGE Instant Blue stain (Expedeon)染色。

[0423] 通过负染色电子显微镜(EM)分析分别来自图42A-42D的小图B-C的人抗mIL-13IgA2m2纯化峰1和2。纯化的IgA2m2样品首先通过在0.015%戊二醛(Polysciences,Inc.)中室温孵育10分钟进行交联。固定后,使用TBS缓冲液稀释样品以达到10ng/μL的浓度。然后在用2%(w/v)醋酸双氧铀阴性染色剂(Electron Microscopy Sciences)处理之前,将4μL的每个样品在新辉光放电的400目铜网格上孵育40秒,该网格覆盖有薄层连续碳。IgA然后使用Tecnai Spirit T12(Thermo Fisher)在120keV下以25,000x(2.2 Å/像素)的放大倍数进行成像。在低剂量条件下使用Gatan4096x 4096像素CCD相机记录图像。然后使用EMAN2包内的e2boxer.py软件选择和提取每个IgA样品的大约5000个粒子,使用128像素的粒子框尺寸。RELION图像软件包内的无参考2D类用于生成两个样品的平均图像。显示了来自纯化峰1和2的IgA的原始图像文件和无参考2D类(图43A-43B和图44A-44B)。峰1主要是四聚体IgA2m2,也存在一些五聚体、三聚体和二聚体(图43A-43B)。峰2是二聚体IgA2m2(图44A-44B)。

[0424] 质谱分析证实预期分子量的5Da之内的JC、LC和HC的存在,其中JC和HC的氨基末端残基形成焦谷氨酸。通过在5mM DTT存在下在97℃C下加热0.5mg/mL的IgA 30分钟以还原和变性蛋白质来进行质谱分析。然后将样品在冰上冷却,然后在37℃C下用1,000单位的PNGaseF(NEB)脱糖基化过夜。然后使用Agilent 1290Infinity UHPLC以1mL/min的速度将

还原、变性和去糖基化的IgA注入3μm、4.6x 50mm反相色谱PLRP-S柱(Agilent)。使用含0.05％三氟乙酸(TFA)的水溶液(缓冲液A)和含0.05％ TFA的乙腈溶液(缓冲液B)在6分钟内进行5％-60％缓冲液B梯度。从反相柱上洗脱的蛋白质被直接注射到Agilent 6230电喷雾电离飞行时间质谱仪(ESI-TOF)上进行完整质量测量。

[0425] 除了图41、图42A-42D、图43A-43B、图44A-44B和图45中描述的IgA2m2的成功外,这种分离技术还适用于所有其他同种型和同种异型测试,包括IgA1(图46A-46C)、IgA2m1野生型(图47A-47C)和含有P221R突变以恢复轻链和重链之间的二硫键的IgA2m1(图48A-48C)。

实例3:重组IgA抗体和IgG-IgA融合分子的体外分析

[0426] 使用CellTiter-Glo发光细胞活力测定法在HER2+乳腺癌细胞系KPL-4、BT474-M1和SKBR3中体外分析了IgA抗体和IgG-IgA融合分子触发癌细胞死亡的能力。如下重复测定。使用EDTA作为抗凝剂收集来自健康供体的外周血。按照制造商的说明,使用EasySep™Direct Human Neutrophil Isolation Kit(STEMCELL Technologies)从外周血中分离用作效应细胞的人中性粒细胞。在检测试剂的存在下,中性粒细胞和HER2扩增的靶细胞(SK-BR3;每孔10,000个细胞的密度)以20:1的比例在黑色、透明底96孔板(Corning)中孵育48小时。使用Cell Titer-Glow发光细胞活力试剂(Promega cat#G7570)通过发光相对光单位(RLU)测量靶细胞活力。靶细胞杀伤活性计算如下:((RLU未处理-RLU处理)/RLU未处理)×100％。

[0427] 如图49所示,SKBR3和BT474-M1细胞系对抗HER IgA2m1单体(在图49中称为“4D5.IgA2m1.P221R.C471S单体”)敏感。特别是,与对BT474-M1细胞活力的影响相比,抗HER IgA2m1单体导致了对SKBR3细胞的显著杀伤。然而,KPL-4细胞系对抗IgA抗体不敏感。为了进一步分析IgA抗体导致癌细胞死亡的能力是否对中性粒细胞的供体具有特异性,在细胞活力测定中使用了来自两个不同供体的中性粒细胞。如图50所示,在单体抗HER2 IgA抗体和单体IgG-IgA融合分子存在的情况下,来自两个不同供体的中性粒细胞能够介导SKBR3细胞的死亡,表明抗体和融合分子的功效不是供体特异性的。与单体抗HER2 IgA抗体相比,聚合抗HER2 IgA抗体导致较少的细胞死亡(图50)。

[0428] 进行了额外的实验以确定抗体的糖基化状态是否影响其导致癌细胞死亡的能力。糖基化的单体和四聚体抗HER IgA抗体导致对SKBR3细胞的显著杀伤(图51)。然而,无糖基化四聚体抗HER IgA抗体不会导致靶向的SKBR3细胞死亡。不受特定理论的束缚,这些结果表明糖基化可以影响IgA抗体的有效性。

[0429] 除了所描绘和要求保护的各种实施例之外,所公开的主题还涉及具有本文所公开和要求保护的特征的其他组合的其他实施例。这样,本文所呈现的具体特征可以在所公开的主题的范围内以其他方式彼此组合,使得所公开的主题包括本文所公开的特征的任何合适的组合。出于图示和描述的目的,已经呈现了所公开主题的具体实施例的前文描述。其并不旨在穷举或将所公开的主题限制为所公开的那些实施例。

[0430] 对于本领域技术人员显而易见的是,在不脱离所公开主题的精神或范围的情况下,可以对所公开主题的组成和方法进行各种修改和变化。因此,其意图为,所公开的主题包括在所附权利要求及其等同内容的范围内的修改和变化。

[0431] 本文引用了各种出版物、专利和专利申请,其内容通过引用以其全文并入本文。

[0432] 本公开涉及下述实施方案:

[0433] 1.一种分离的IgA抗体或其片段,其中所述IgA抗体在氨基酸V458、N459和/或S461处包含取代。

[0434] 2.根据项1所述的分离的IgA抗体,其中氨基酸V458被异亮氨酸(V458I)取代,氨基酸N459被谷氨酰胺(N459Q)、甘氨酸(N459G)或丙氨酸(N459A)取代,并且/或者氨基酸S461被丙氨酸(S461A)取代。

[0435] 3.一种分离的IgA抗体或其片段,其中所述IgA抗体在氨基酸I458处包含取代。

[0436] 4.根据项3所述的分离的IgA抗体,其中氨基酸I458被缬氨酸(I458V)取代。

[0437] 5.一种分离的IgA抗体或其片段,其中所述IgA抗体在选自由N166、T168、N211、S212、S213、N263、T265、N337、I338、T339、N459、S461及它们的组合组成的组中的氨基酸处包含一个或多个取代。

[0438] 6.根据项5所述的分离的IgA抗体,其中在氨基酸N166、S212、N263、N337、I338、T339和N459处的取代是N166A、S212P、N263Q、N337T、I338L、T339S和N459Q。

[0439] 7.根据项1-6所述的分离的IgA抗体,其中所述IgA抗体是IgA1、IgA2m1、IgA2m2或IgA2mn抗体。

[0440] 8.根据项5或6所述的分离的IgA抗体,其中所述IgA抗体在氨基酸N337、I338和T339处具有取代,并且在T168、N211、S212、S213、N263、T265、N459、S461及它们的组合处具有一个或多个取代。

[0441] 9.根据项8所述的分离的IgA抗体,其中所述IgA抗体是IgA2m1、IgA2m2或IgA2mn抗体。

[0442] 10.根据项1-9中任一项所述的分离的IgA抗体,其中所述IgA抗体是人源化抗体、嵌合抗体或人抗体。

[0443] 11.一种分离的IgG-IgA融合分子,其包含全长IgG抗体,所述全长IgG抗体在其C末端与IgA抗体的Fc区融合,其中所述IgA抗体的所述Fc区包含包括P221或R221至所述IgA抗体的重链的C末端的序列,并且其中所述IgG抗体进一步包含氨基酸K447的缺失。

[0444] 12.一种分离的IgG-IgA融合分子,其包含全长IgG抗体,所述全长IgG抗体在其C末端与IgA抗体的Fc区融合,其中所述IgA抗体的所述Fc区包含包括C242至所述IgA抗体的重链的C末端的序列。

[0445] 13.根据项12所述的分离的IgG-IgA融合分子,其中所述IgG抗体进一步包含氨基酸K447的缺失。

[0446] 14.根据项11-13中任一项所述的分离的IgG-IgA融合分子,其中所述IgG抗体选自由IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体和IgG4抗体组成的组。

[0447] 15.根据项11-14中任一项所述的分离的IgG-IgA融合分子,其中所述IgG抗体是IgG1抗体。

[0448] 16.根据项11-15中任一项所述的分离的IgG-IgA融合分子,其中所述IgA抗体选自由IgA1抗体、IgA2m1抗体、IgA2m2抗体和IgA2mn抗体组成的组。

[0449] 17.根据项11-16中任一项所述的分离的IgG-IgA融合分子,其中所述IgA抗体是IgA2m1抗体。

[0450] 18.一种分离的核酸,其编码根据项1-10中任一项所述的抗体或根据项11-17中任一项所述的IgG-IgA融合分子。

[0451] 19.一种宿主细胞,其包含根据项18所述的核酸。

[0452] 20.一种制备IgA抗体或IgG-IgA的方法,其包括培养根据项19所述的宿主细胞以制备所述IgA抗体或IgG-IgA融合分子。

[0453] 21.根据项20所述的方法,其进一步包括从所述宿主细胞回收所述IgA抗体或IgG-IgA融合分子。

[0454] 22.根据项20制备或根据项21回收的所述IgA抗体或IgG-IgA融合分子。

[0455] 23.一种药物组合物,其包含一种或多种根据项1-10或项22中任一项所述的IgA抗体或一种或多种根据项11-17或项22中任一项所述的IgG-IgA融合分子以及药用载体。

[0456] 24.根据项23所述的药物组合物,其进一步包含另外的治疗剂。

[0457] 25.一种治疗患有疾病的个体的方法,其中所述方法包括对所述个体施用有效量的一种或多种根据项1-10或项22中任一项所述的IgA抗体或一种或多种根据项11-17或项22中任一项所述的IgG-IgA融合分子。

[0458] 26.根据项25所述的方法,其中所述疾病是炎性疾病、自身免疫性疾病或癌症。

[0459] 27.根据项1-10或项22中任一项所述的IgA抗体或根据项11-17或项22中任一项所述的IgG-IgA融合分子,其用作药物。

[0460] 28.根据项1-10或项22中任一项所述的IgA抗体或根据项11-17或项22中任一项所述的IgG-IgA融合分子,其用于治疗疾病。

[0461] 29.根据项28所述的IgA抗体或IgG-IgA融合分子,其中所述疾病是炎性疾病、自身免疫性疾病或癌症。

[0462] 30.根据项1-10或项22中任一项所述的IgA抗体或根据项11-17或项22中任一项所述的IgG-IgA融合分子用于制备药物的用途,所述药物用于治疗疾病。

[0463] 31.根据项30所述的用途,其中所述疾病是炎性疾病、自身免疫性疾病或癌症。

[0464] 32.一种增强IgA二聚体的表达的方法,其包括相对于编码轻链(LC)和重链(HC)的DNA的量,增加引入第一细胞的编码连接链(JC)的DNA的量,其中增强的表达是相对于在引入等量JC、LC和HC DNA的第二细胞中产生的IgA二聚体的量而言。

[0465] 33.根据项32所述的方法,其中引入所述第一细胞的编码所述HC的DNA的量与编码所述LC的DNA的量与编码所述JC的DNA的量的比率(HC:LC:JC)为从约1:1:2到约1:1:5。

[0466] 34.一种增强IgA二聚体、三聚体或四聚体的表达的方法,其包括相对于编码轻链(LC)和重链(HC)的DNA的量,减少引入第一细胞的编码连接链(JC)的DNA的量,其中增强的表达是相对于在引入相对于JC DNA的量的更多量的HC和LC DNA的第二细胞中产生的IgA三聚体或四聚体的量而言。

[0467] 35.根据项34所述的方法,其中引入所述第一细胞的编码所述HC的DNA的量与编码所述LC的DNA的量与编码所述JC的DNA的量的比率(HC:LC:JC)为从约1:1:0.25到约1:1:0.5。

[0468] 36.一种增加IgA1或IgA2m1聚合物的产量的方法,其包括在第一细胞中表达在氨基酸V458处具有取代的IgA1或IgA2m1抗体,其中增加的产量是相对于在第二细胞中产生的IgA1或IgA2m1聚合物的量而言,所述第二细胞表达在氨基酸V458处没有取代的IgA1或IgA2m1抗体。

[0469] 37.根据项36所述的方法,其中氨基酸被异亮氨酸(V458I)取代。

[0470] 38.一种增加IgA2m2二聚体的产量的方法,其包括在第一细胞中表达在氨基酸I458处具有取代的IgA2m2抗体,其中增加的产量是相对于在第二细胞中产生的IgA2m2二聚体的量而言,所述第二细胞表达在氨基酸I458处没有取代的IgA2m2抗体。

[0471] 39.根据项38所述的方法,其中氨基酸被缬氨酸(I458V)取代。

[0472] 40.一种增加IgA1或IgA2m1聚合物的产量的方法,其包括在第一细胞中表达在氨基酸N459或S461处具有取代的IgA1或IgA2m1抗体,其中增加的产量是相对于在第二细胞中产生的IgA1或IgA2m1聚合物的量而言,所述第二细胞表达在氨基酸N459或S461处没有取代的IgA1或IgA2m1抗体。

[0473] 41.根据项40所述的方法,其中氨基酸N459被N459Q、N459G或N459A突变取代并且/或者氨基酸S461被S461A突变取代。

[0474] 42.一种减少IgA2m2聚合物的产量的方法,其包括在第一细胞中表达在氨基酸C471处具有取代的IgA2m2抗体,其中减少的产量是相对于在第二细胞中产生的IgA2m2聚合物的量而言,所述第二细胞表达在氨基酸C471处没有取代的IgA2m2抗体。

[0475] 43.根据项42所述的方法,其中氨基酸C471被C471S突变取代。

[0476] 44.一种增强IgA2m2抗体瞬时表达的方法,其包括在第一细胞中表达IgA2m2抗体,所述IgA2m2抗体包含在选自由N166、S212、N263、N337、I338、T339、N459及它们的组合组成的组的氨基酸处的取代,其中增强的瞬时表达是相对于在第二细胞中产生的瞬时表达的量而言,所述第二细胞表达在选自由N166、S212、N263、N337、I338、T339、N459及它们的组合组成的组的氨基酸处没有取代的IgA2m2抗体。

[0477] 45.一种表达IgG-IgA融合分子的二聚体的方法,其包括表达IgG-IgA融合分子,所述IgG-IgA融合分子包含全长IgG抗体,所述全长IgG抗体在其C末端与IgA抗体的Fc区融合,其中所述IgA抗体的所述Fc区包含包括P221或R221至所述IgA抗体的重链的C末端的序列,并且其中所述IgG抗体包含氨基酸K447的缺失。

[0478] 46.一种表达IgG-IgA融合分子的二聚体、三聚体或四聚体的方法,其包括表达IgG-IgA融合分子,所述IgG-IgA融合分子包含全长IgG抗体,所述全长IgG抗体在其C末端与IgA抗体的Fc区融合,其中所述IgA抗体的所述Fc区包含包括C242至所述IgA抗体的重链的C末端的序列。

[0479] 47.根据项46所述的方法,其中所述IgG抗体包含氨基酸K447的缺失。

[0480] 48.一种用于从包含IgA抗体和至少一种宿主细胞蛋白质的混合物中纯化IgA抗体的方法,其包括:

[0481] (a)将所述混合物施加到包含蛋白质L的柱,以结合所述IgA抗体;

[0482] (b)用包含PBS的洗涤缓冲液洗涤所述蛋白质L柱;以及

[0483] (c)用包含磷酸的洗脱缓冲液从所述蛋白质L柱洗脱所述IgA抗体。

[0484] 49.一种用于从包含IgA抗体或IgG-IgA融合分子和至少一种宿主细胞蛋白质的混合物中纯化寡聚状态的IgA抗体或IgG-IgA融合分子的方法,其包括:

[0485] (a)将所述混合物施加到包含蛋白质L或蛋白质A的亲和纯化柱以结合所述IgA抗体或IgG-IgA融合分子;

[0486] (b)用洗涤缓冲液洗涤所述亲和纯化柱;

[0487] (c)用洗脱缓冲液从所述亲和纯化柱洗脱所述IgA抗体或IgG-IgA融合分子,以形

成第一洗脱物;以及

[0488] (d)将所述第一洗脱物施加到尺寸排阻色谱柱,以分离不同寡聚状态的所述IgA抗体或IgG-IgA融合分子以及获得包含寡聚状态的所述IgA抗体或IgG-IgA融合分子的流出物。

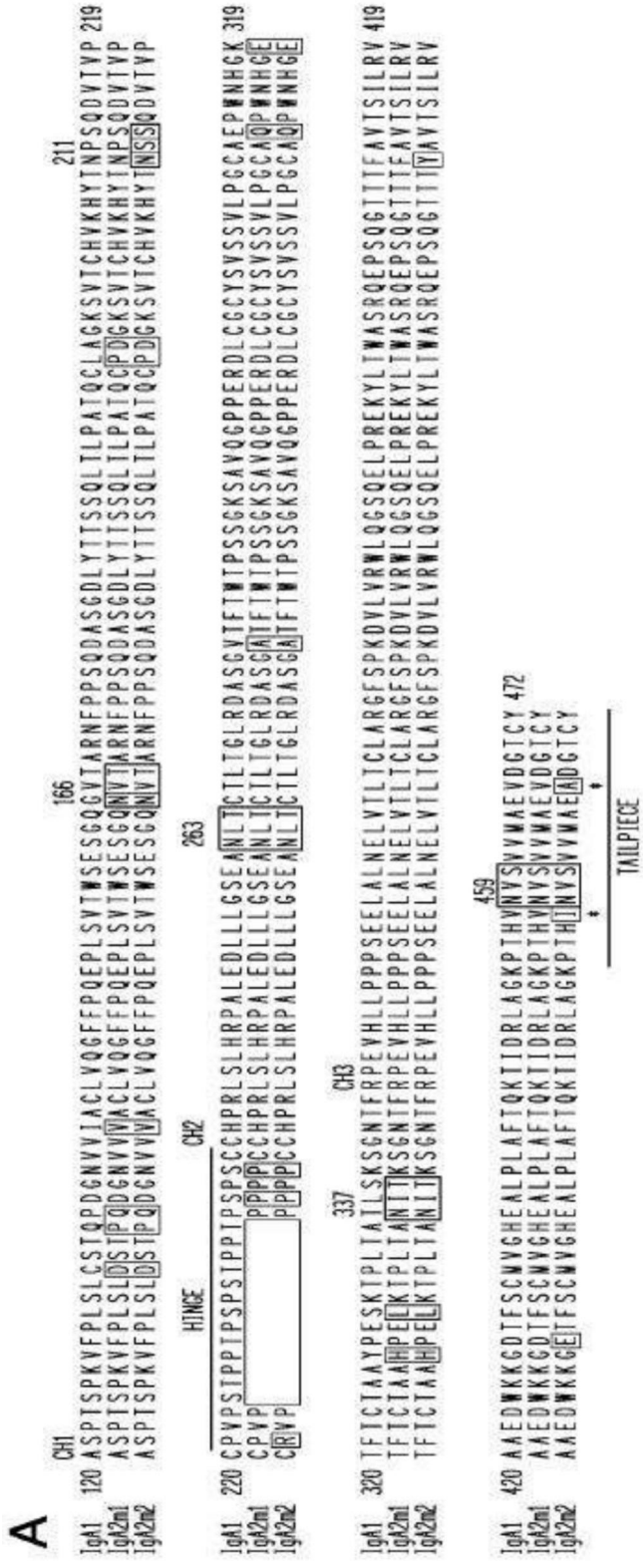


图1A


B
J 链 1 QEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRE NIS DPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATET 100
101 CYYYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMVETALTPDACYPD 137
15
49
69

图1B


IgA2m 恒定区
120 ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQNVTARNFPPSQDAS
GDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNSSQDVTVPCRVPPPPPCCHPRLSLHRPA
LEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGPPERDLCGCYSVSSVLPGCA
QPWNHGETFTCTAAHPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLAR
GFSPKDVLVRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTFAVTSILRVAAEDWKKGDTFSC
MVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY 472

图1C

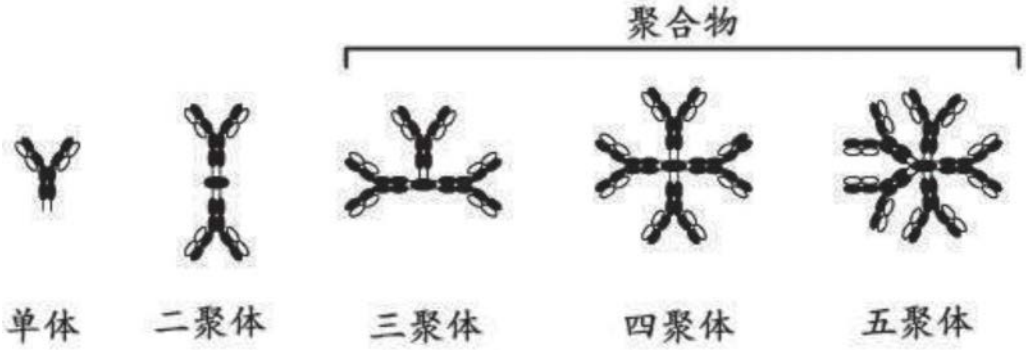

聚合物
单体
二聚体
三聚体
四聚体
五聚体

图1D

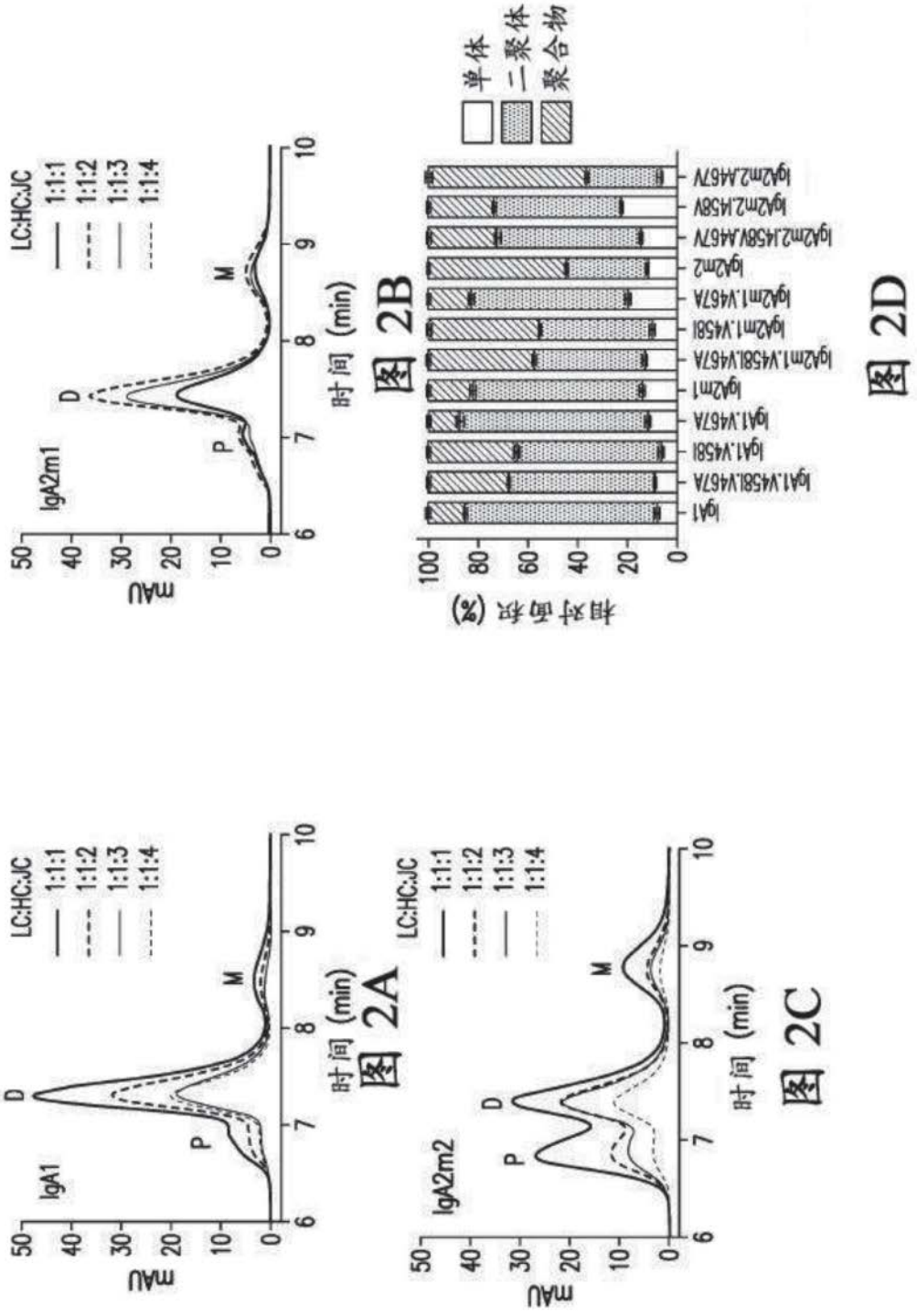

LC:HC:JC
1:1:1
1:1:2
1:1:3
1:1:4
IgA1
IgA2m1
IgA2m2
D
P
M
mAU
时间 (min)
图 2A
图 2B
图 2C
图 2D
相对面积 (%)
单体
二聚体
聚合物
IgA1
IgA1.V458I.V467A
IgA1.V458I
IgA1.V467A
IgA2m1
IgA2m1.V458I.V467A
IgA2m1.V458I
IgA2m1.V467A
IgA2m2
IgA2m2.I458V.A467V
IgA2m2.I458V
IgA2m2.A467V

图2A-2D

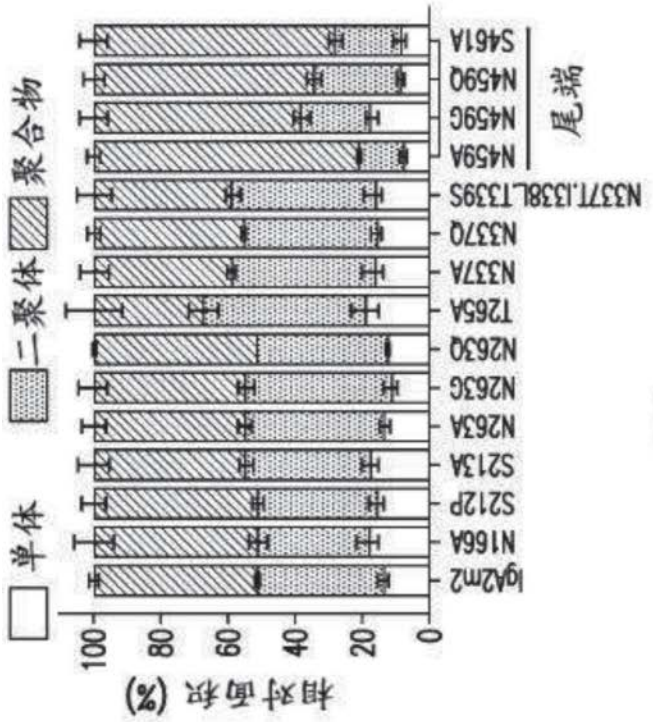


图 2F

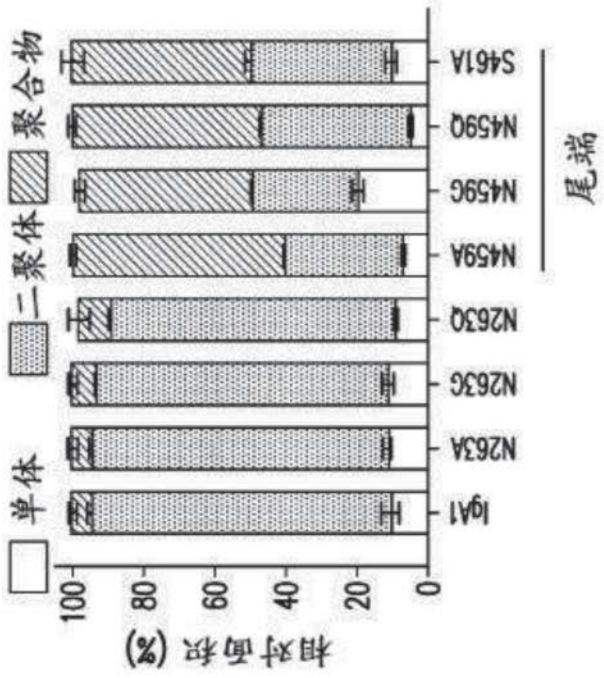


图 2E

图2E-2F

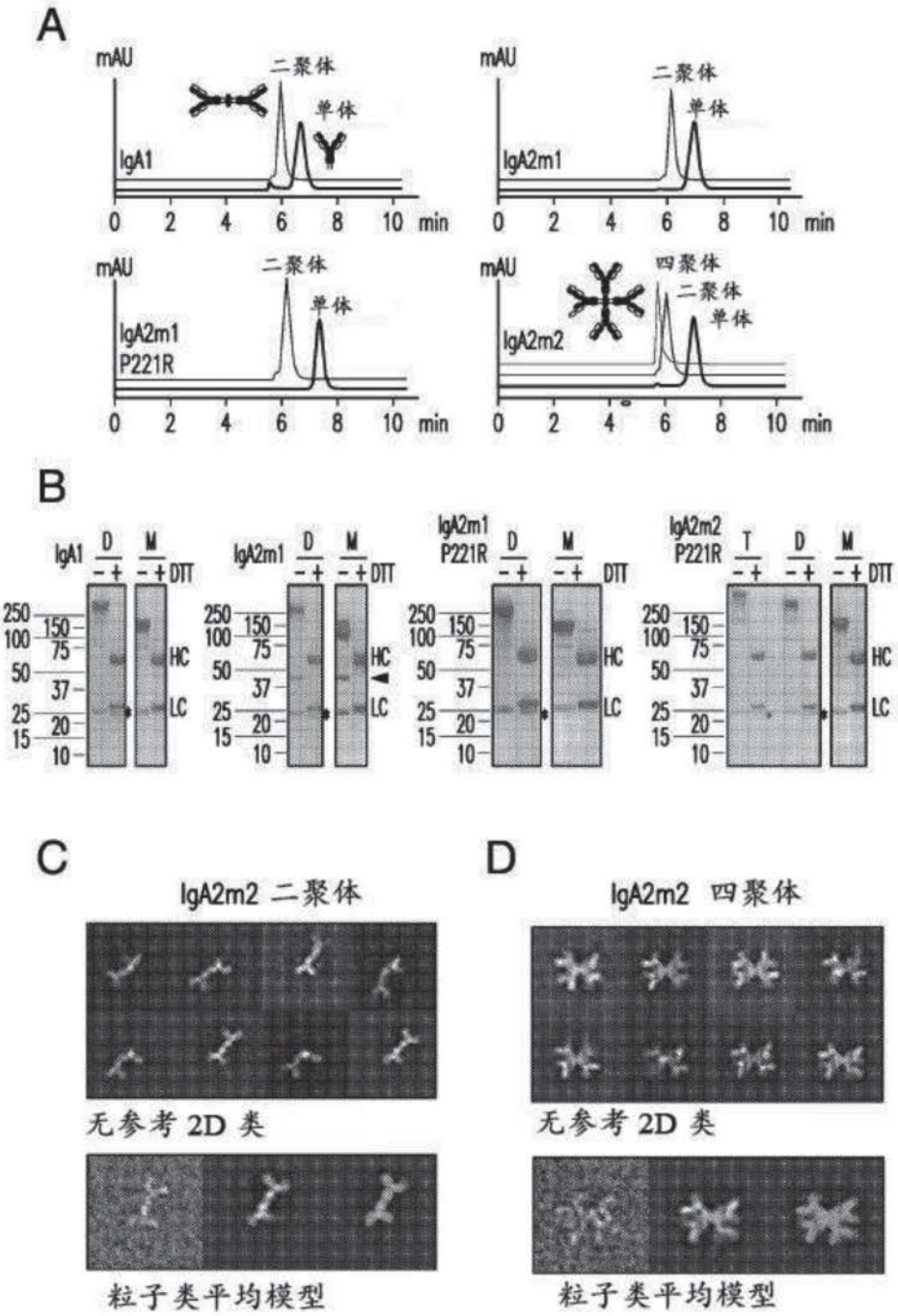

A
mAU
二聚体
单体
IgA1
IgA2m1
IgA2m1 P221R
IgA2m2
四聚体
0 2 4 6 8 10 min
B
IgA1
IgA2m1
IgA2m1 P221R
IgA2m2 P221R
D
M
T
DTT
HC
LC
250 150 100 75 50 37 25 20 15 10
C
IgA2m2 二聚体
无参考 2D 类
粒子类平均模型
D
IgA2m2 四聚体
无参考 2D 类
粒子类平均模型

图3A-3D

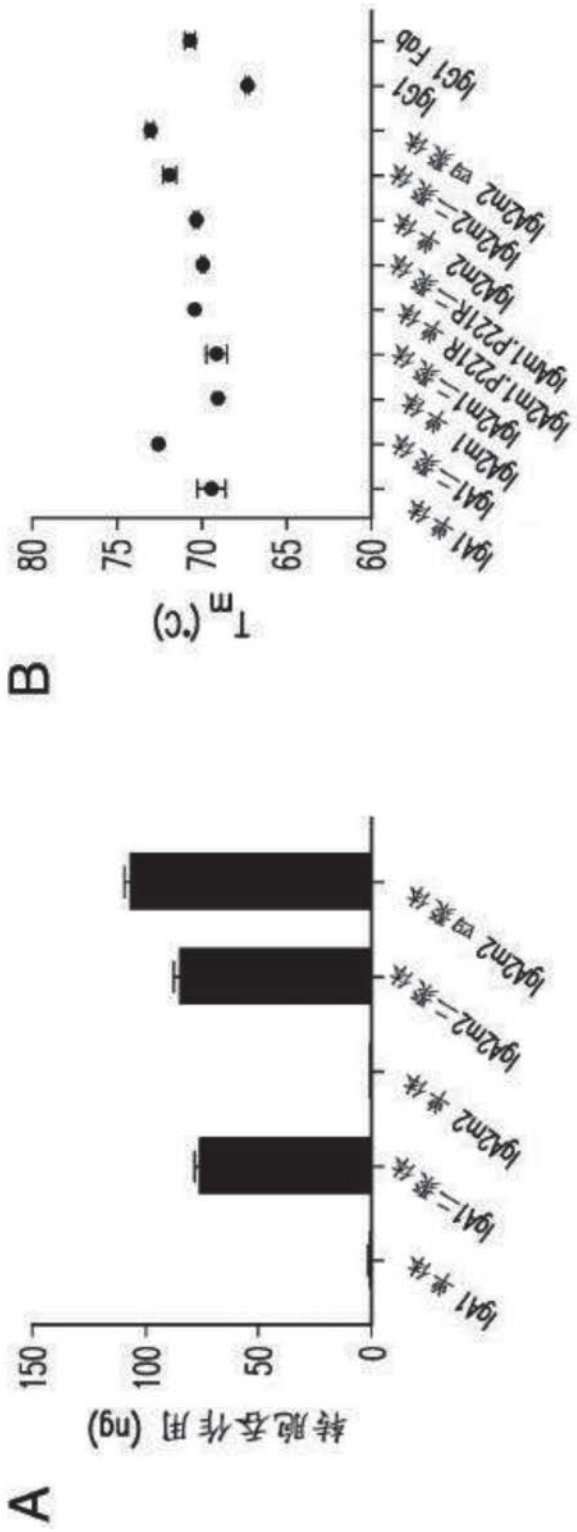

B
T_m (°C)
80
75
70
65
60
IgA1 单体
IgA1二聚体
IgA2m1 单体
IgA2m1二聚体
IgA2m1.P221R 单体
IgA2m1.P221R二聚体
IgA2m2 单体
IgA2m2二聚体
IgA2m2 四聚体
IgG1
IgG1 Fab
A
转胞吞作用 (ng)
150
100
50
0
IgA1 单体
IgA1二聚体
IgA2m2 单体
IgA2m2二聚体
IgA2m2 四聚体

图4A-4B

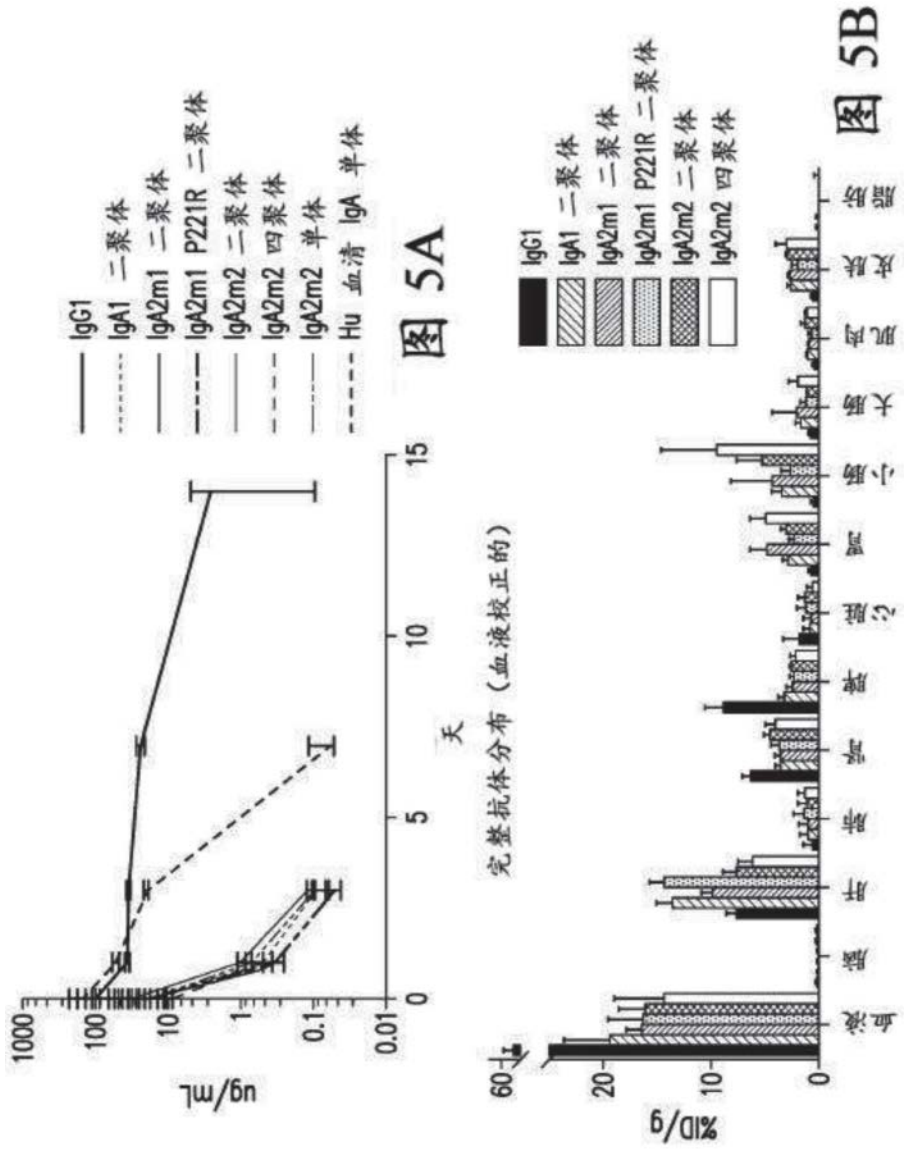

IgG1
IgA1 二聚体
IgA2m1 二聚体
IgA2m1 P221R 二聚体
IgA2m2 二聚体
IgA2m2 四聚体
IgA2m2 单体
Hu 血清 IgA 单体
ug/mL
天
完整抗体分布（血液校正的）
%ID/g
图 5A
图 5B

图5A-5B

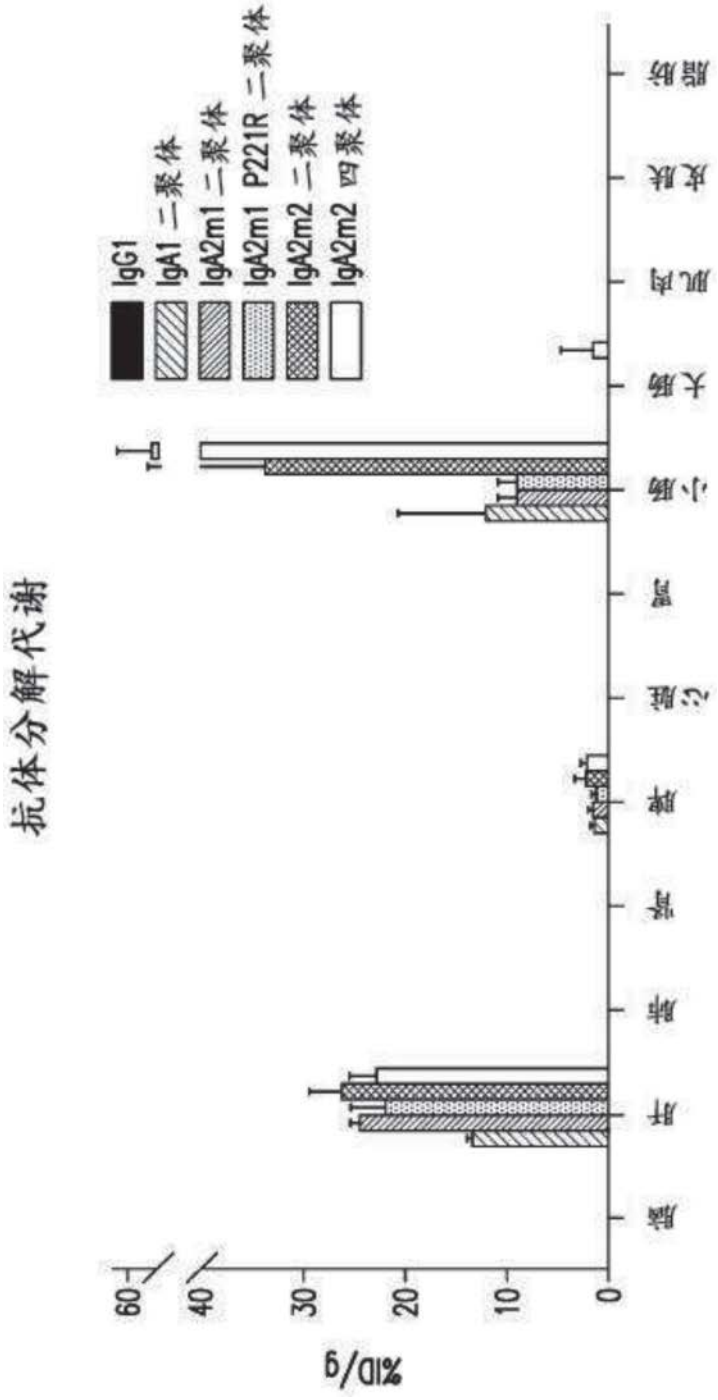

抗体分解代谢
%ID/g
60
40
30
20
10
0
脑
肝
肺
脾
肾
骨
心脏
胃
小肠
大肠
肌肉
皮肤
脂肪
IgG1
IgA1 二聚体
IgA2m1 二聚体
IgA2m1 P221R 二聚体
IgA2m2 二聚体
IgA2m2 四聚体

图5C

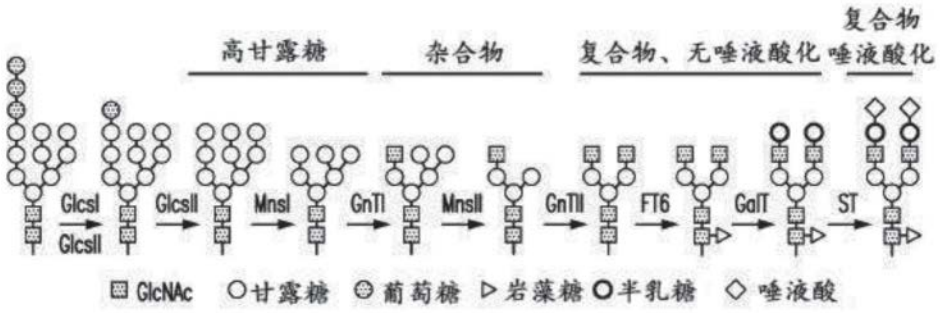


图 6A

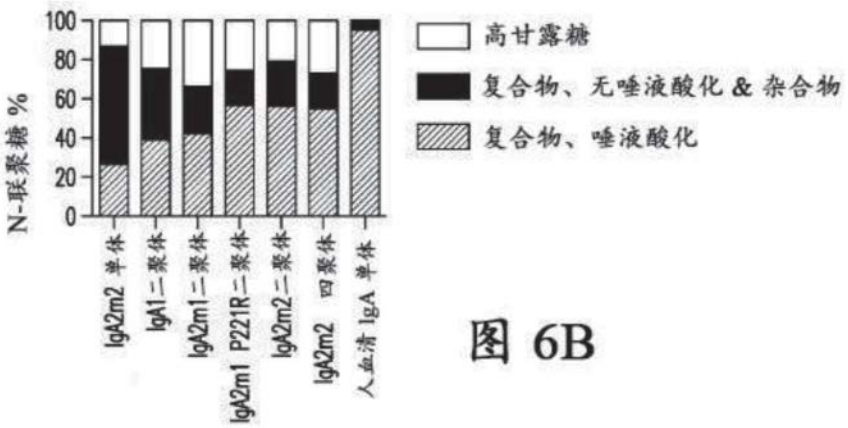


图 6B

图6A-6B

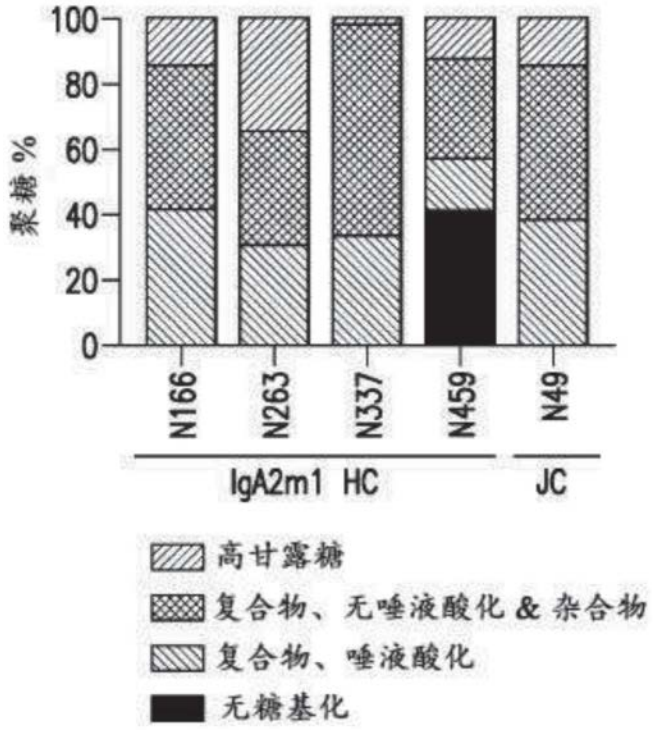

100
80
60
40
20
0
聚糖 %
N166
N263
N337
N459
N49
IgA2m1 HC
JC
高甘露糖
复合物、无唾液酸化 & 杂合物
复合物、唾液酸化
无糖基化

图6C

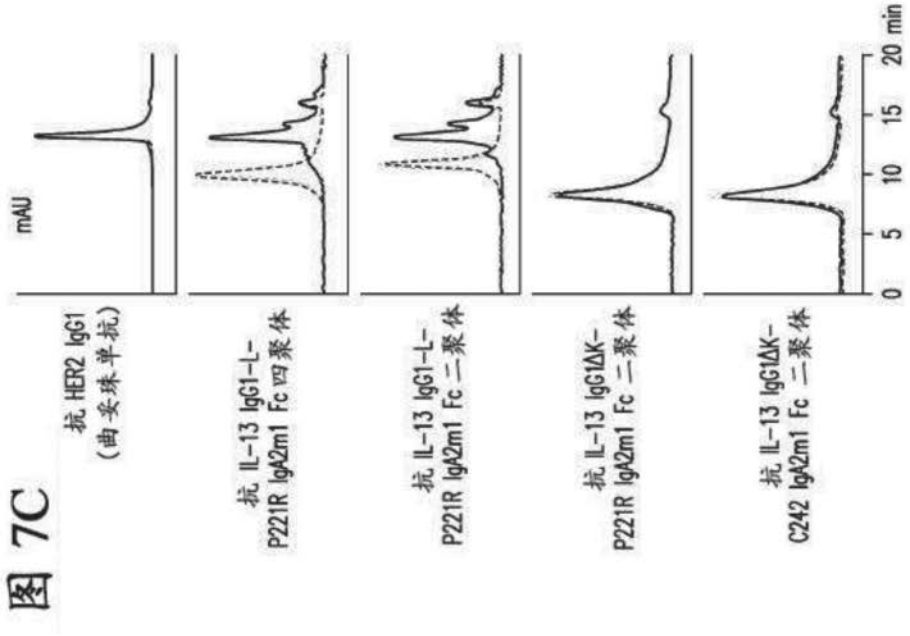


图 7C

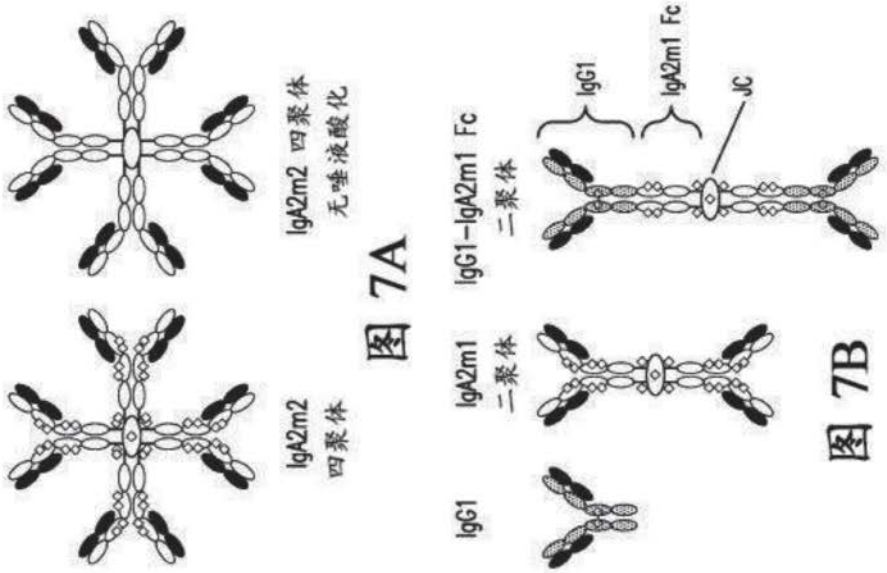


图 7A

图 7B

图7A-7C

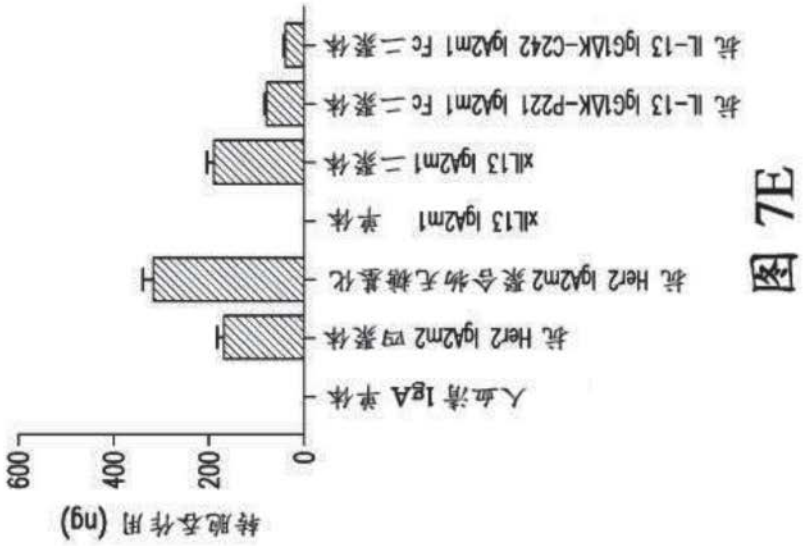


图 7E

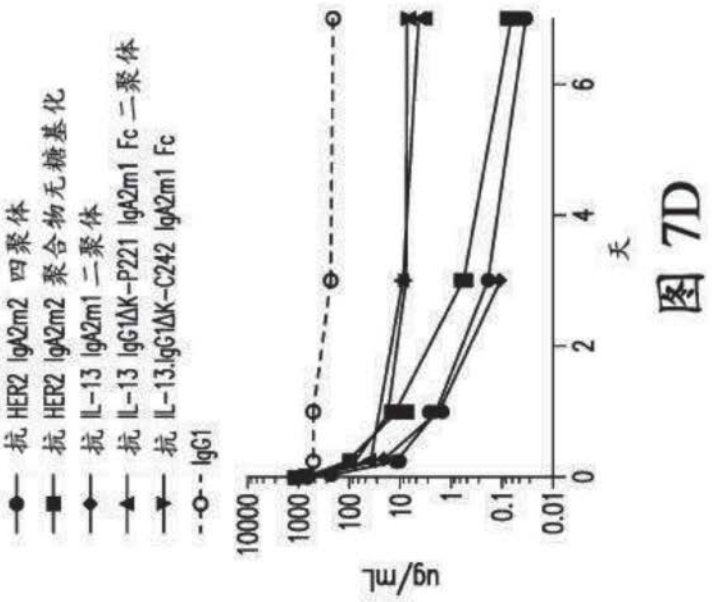


图 7D

图7D-7E

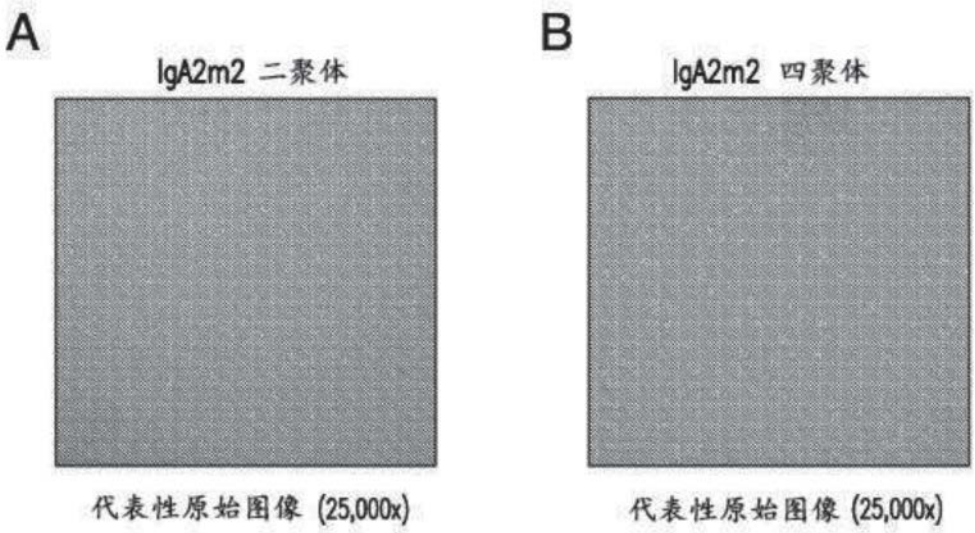


图8A-8B

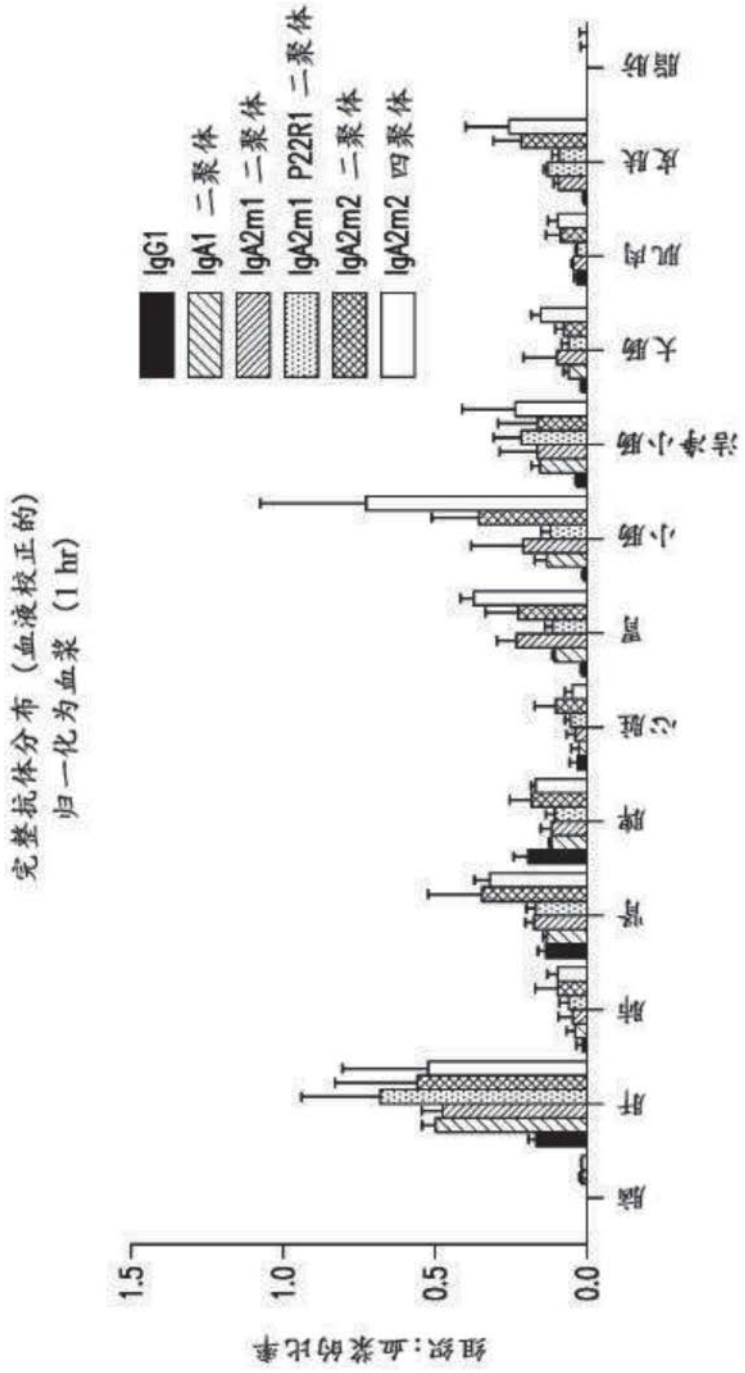

IgG1
IgA1 二聚体
IgA2m1 二聚体
IgA2m1 P22R1 二聚体
IgA2m2 二聚体
IgA2m2 四聚体
完整抗体分布（血液校正的）
归一化为血浆（1 hr）
组织：血浆的比率
1.5
1.0
0.5
0.0
脑
肝
肺
肾
脾
心脏
胃
小肠
结肠
大肠
肌肉
皮肤
脂肪

图9

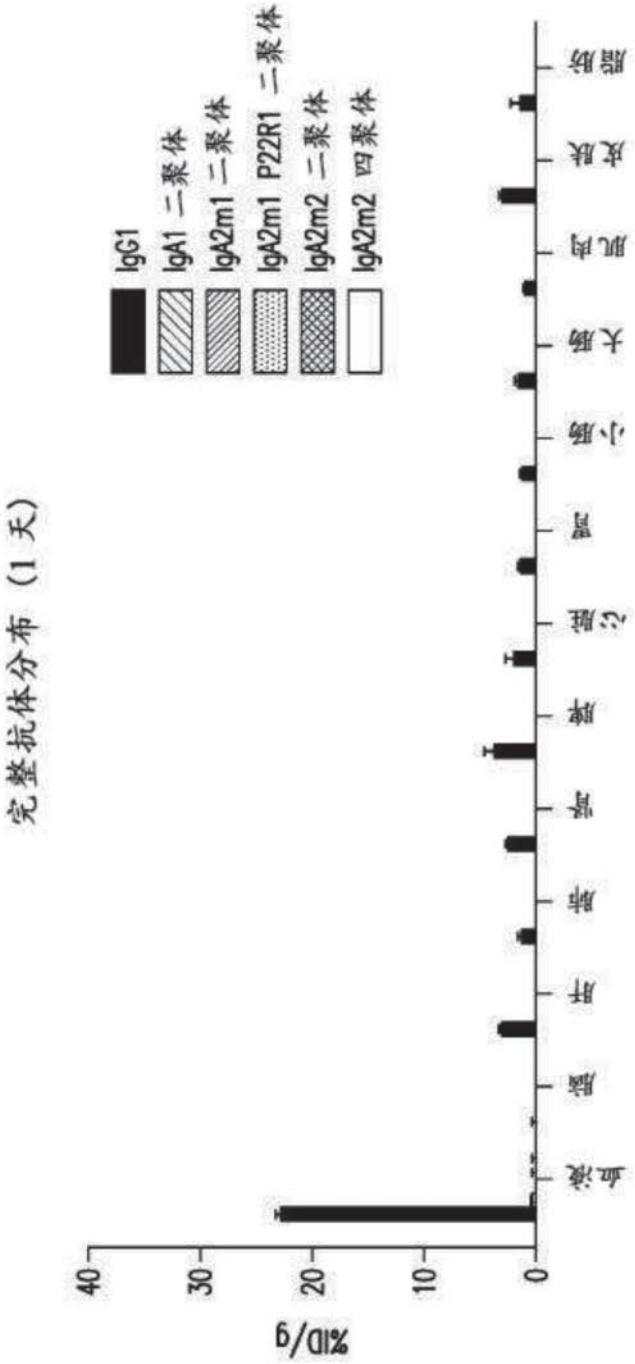

完整抗体分布（1 天）
%ID/g
0
10
20
30
40
IgG1
IgA1 二聚体
IgA2m1 二聚体
IgA2m1 P22R1 二聚体
IgA2m2 二聚体
IgA2m2 四聚体
血液
脑
肝
肺
肾
脾
心脏
胃
小肠
大肠
肌肉
皮肤
脂肪

图10

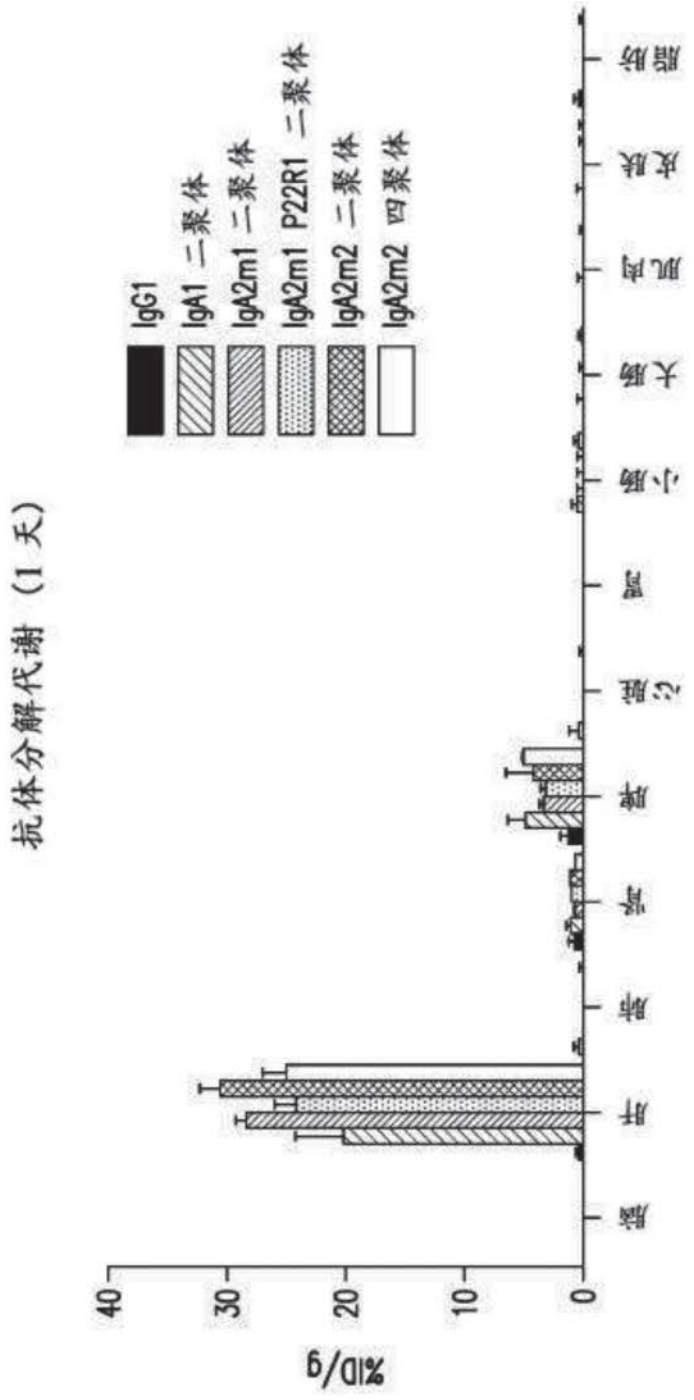

抗体分解代谢（1 天）
IgG1
IgA1 二聚体
IgA2m1 二聚体
IgA2m1 P22R1 二聚体
IgA2m2 二聚体
IgA2m2 四聚体
%ID/g
40
30
20
10
0
脂肪
皮肤
肌肉
大肠
小肠
胃
脾
肾
肺
肝
脑

图11


hIgG1 WT
221
IgA2m1
242
P221R
IgG1-L-P221R IgA2m1 Fc 融合
.....TQKSLSLSPGKLRVPPPPPCC.....
(Borrok MJ et al. 2015 mAbs)
潜在的弗林蛋白酶切割位点
hIgG1ΔK
221
242
IgA2m1 WT
IgG1ΔK-P221 IgA2m1 Fc 融合
.....TQKSLSLSPG--PVPPPPPCC.....
hIgG1ΔK
242
IgA2m1 Δ铰链
IgG1ΔK-C242 IgA2m1 Fc 融合
.....TQKSLSLSPG----------C.....

图12

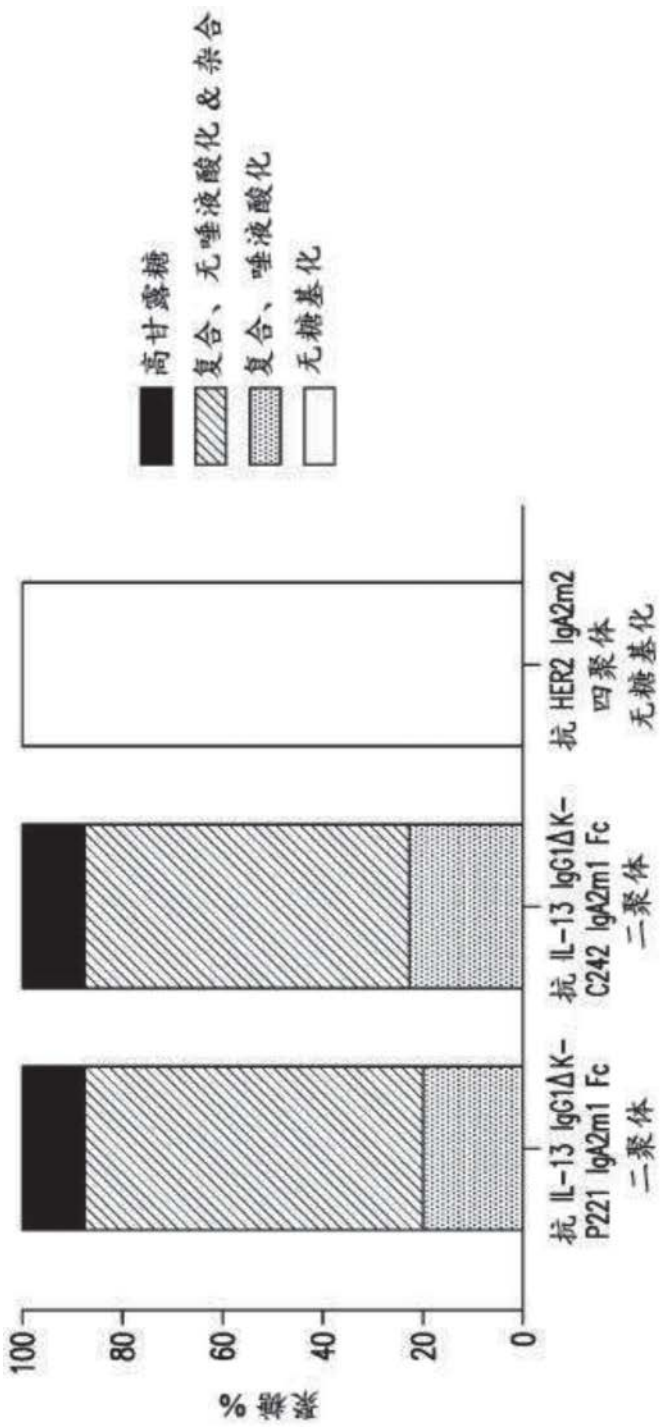

高甘露糖
复合、无唾液酸化 & 杂合
复合、唾液酸化
无糖基化
100
80
60
40
20
0
%
抗 IL-13 IgG1ΔK-P221 IgA2m1 Fc 二聚体
抗 IL-13 IgG1ΔK-C242 IgA2m1 Fc 二聚体
抗 HER2 IgA2m2 四聚体 无糖基化

图13

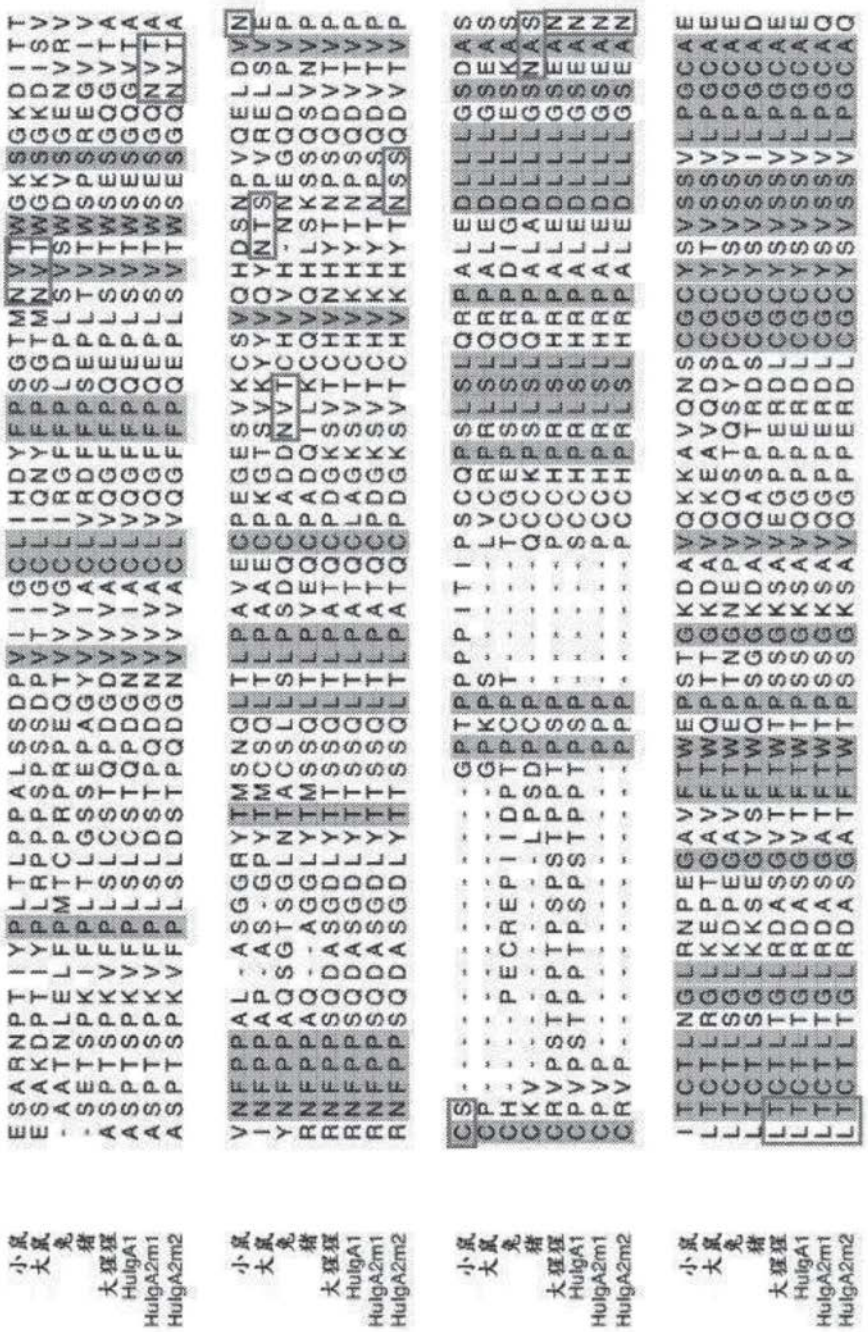


图14

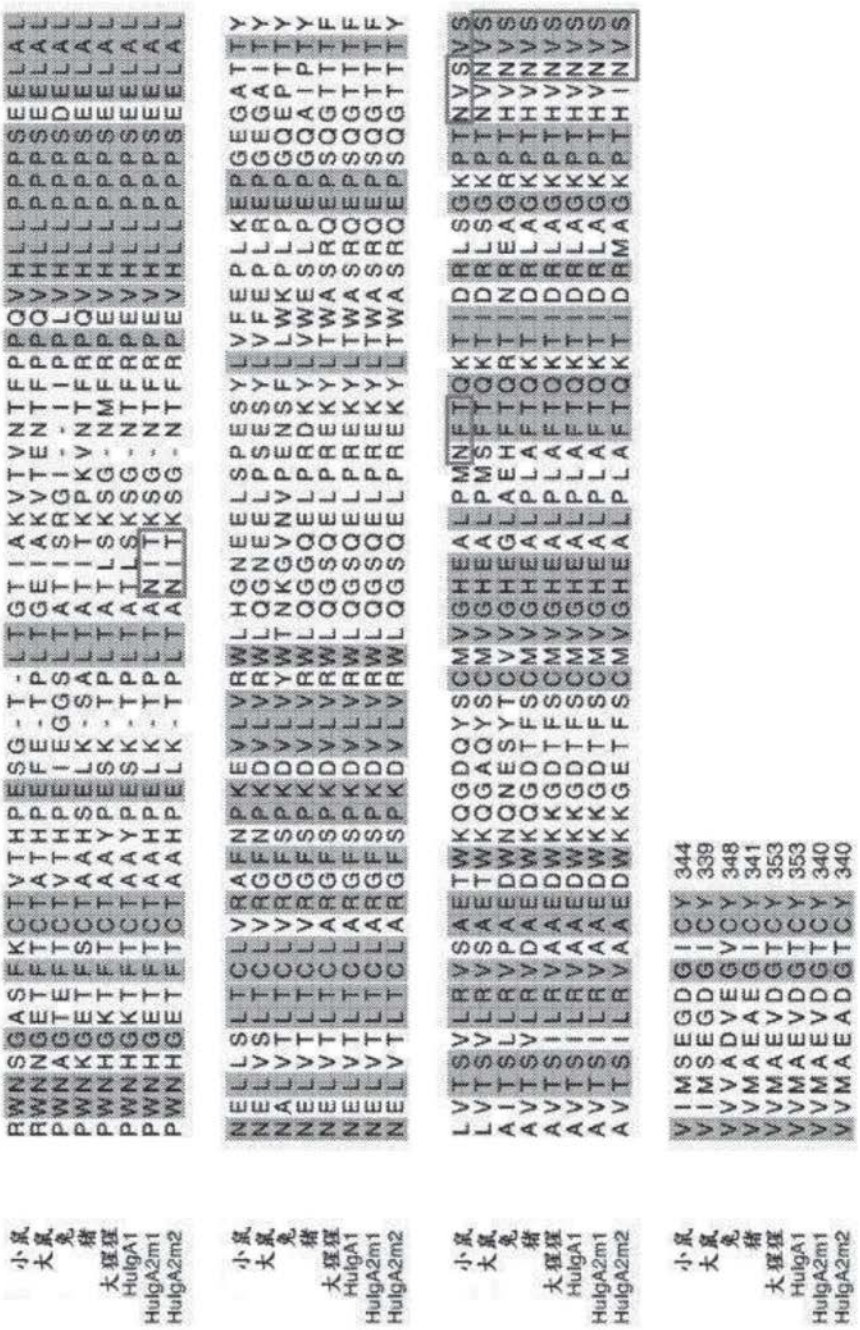

小鼠
大鼠
兔
猪
大猩猩
HuIgA1
HuIgA2m1
HuIgA2m2
344
339
348
341
353
353
340
340

图14续

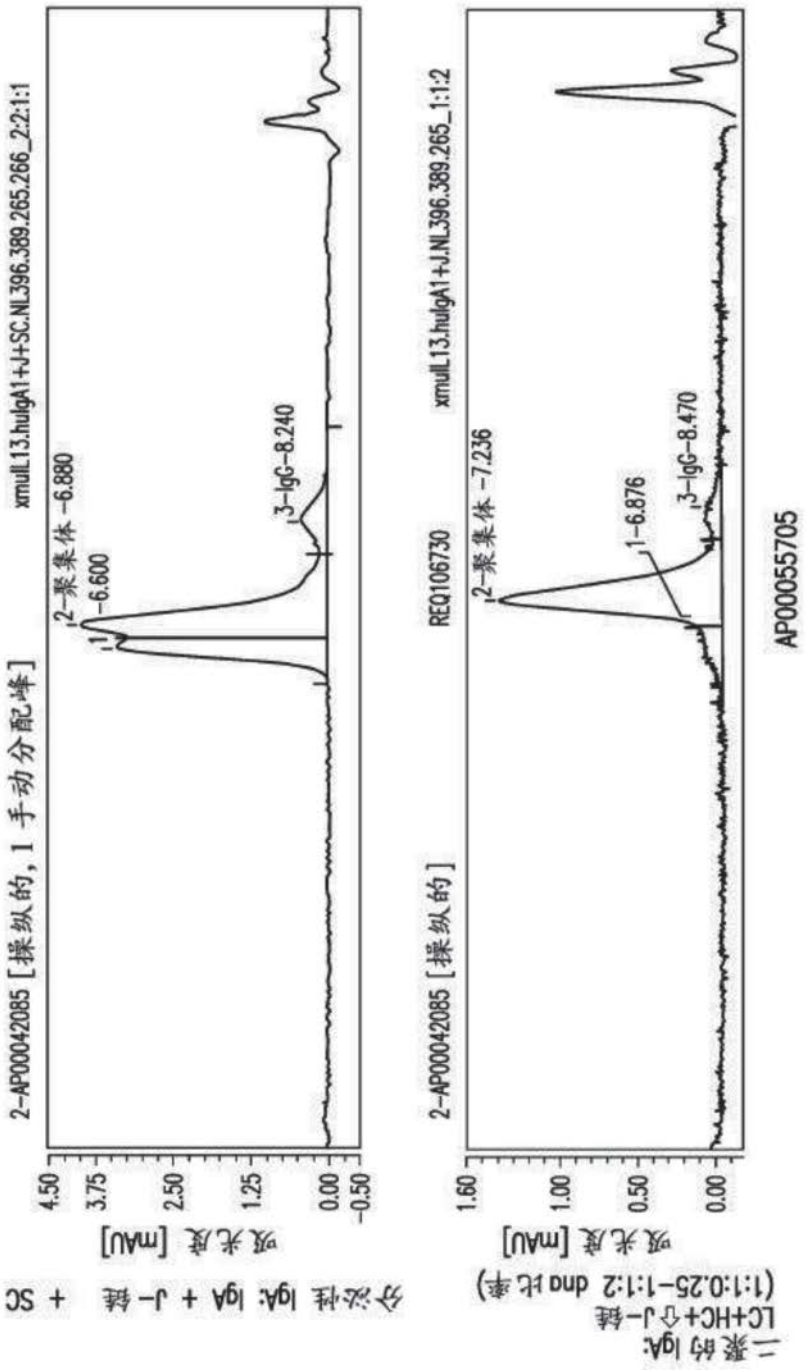

分泌性 IgA: IgA + J- 链 + SC
吸光度 [mAU]
4.50
3.75
2.50
1.25
0.00
-0.50
2-AP00042085 [操纵的, 1 手动分配峰]
xmulL13.huIgA1+J+SC.NL396.389.265.266_2:2:1:1
1
2-聚集体 -6.880
-6.600
3-IgG-8.240
二聚的 IgA:
LC+HC+⇩J-链
(1:1:0.25-1:1:2 dna 比率)
吸光度 [mAU]
1.60
1.00
0.50
0.00
2-AP00042085 [操纵的]
REQ106730
xmulL13.huIgA1+J.NL396.389.265_1:1:2
2-聚集体 -7.236
1-6.876
3-IgG-8.470
AP00055705

图15A

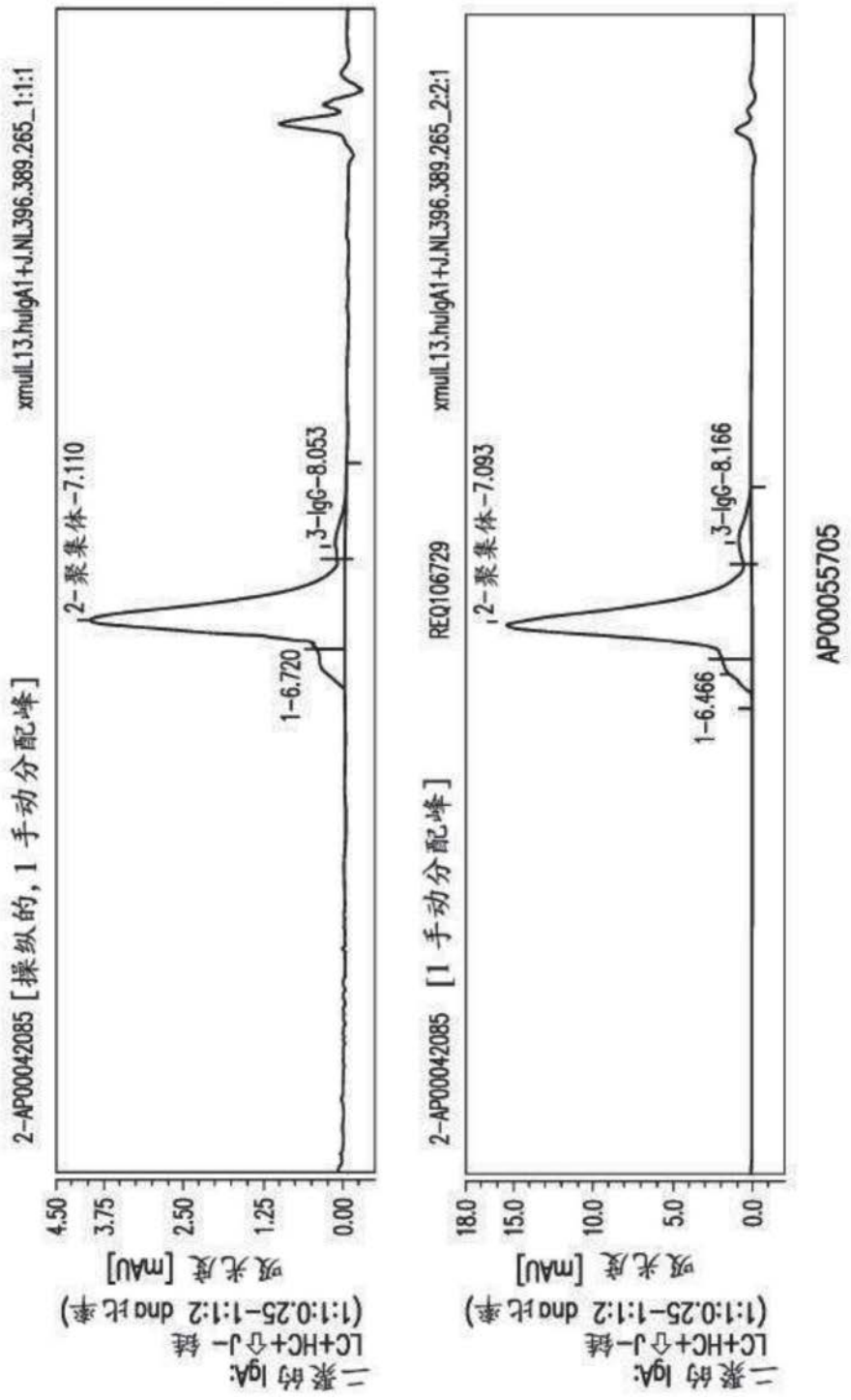

2-AP00042085 [操纵的，1 手动分配峰]
xmuIL13.huIgA1+J.NL396.389.265_1:1:1
2-聚集体-7.110
1-6.720
3-IgG-8.053
吸光度 [mAU]
4.50
3.75
2.50
1.25
0.00
二聚的 IgA:
LC+HC+⇩J- 链
(1:1:0.25-1:1:2 dna 比率)
2-AP00042085 [1 手动分配峰]
REQ106729
xmuIL13.huIgA1+J.NL396.389.265_2:2:1
2-聚集体-7.093
1-6.466
3-IgG-8.166
吸光度 [mAU]
18.0
15.0
10.0
5.0
0.0
二聚的 IgA:
LC+HC+⇩J-链
(1:1:0.25-1:1:2 dna 比率)
AP00055705

图15A续

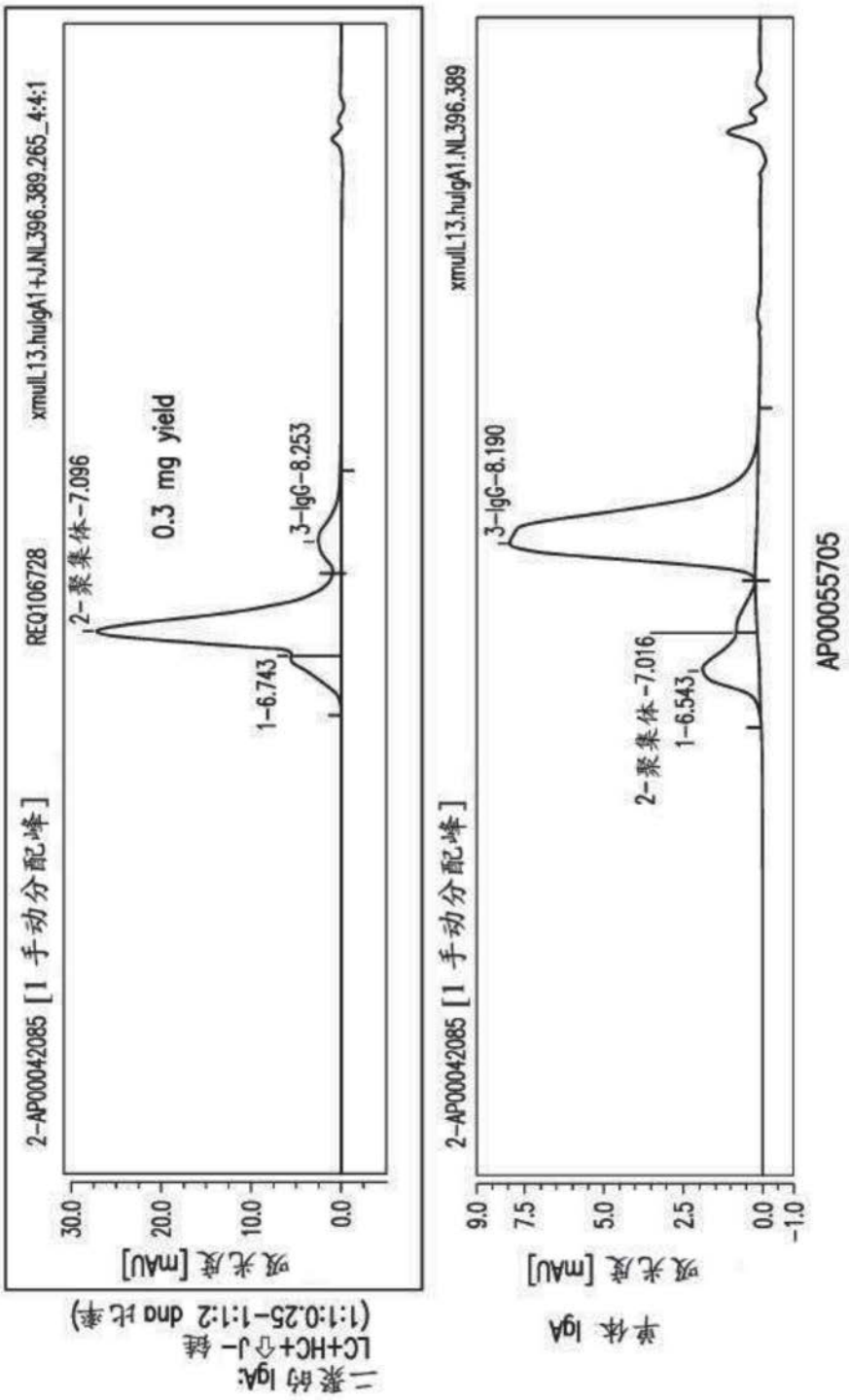

二聚的 IgA:
LC+HC+⇩J- 链
(1:1:0.25-1:1:2 dna 比率)
吸光度 [mAU]
30.0
20.0
10.0
0.0
2-AP000420085 [1 手动分配峰]
REQ106728
xmuIL13.huIgA1+J.NL396.389.265_4:4:1
2-聚集体-7.096
0.3 mg yield
1-6.743
3-IgG-8.253
单体 IgA
吸光度 [mAU]
9.0
7.5
5.0
2.5
0.0
-1.0
2-AP000420085 [1 手动分配峰]
xmuIL13.huIgA1.NL396.389
3-IgG-8.190
2-聚集体-7.016
1-6.543
AP00055705

图15A续2

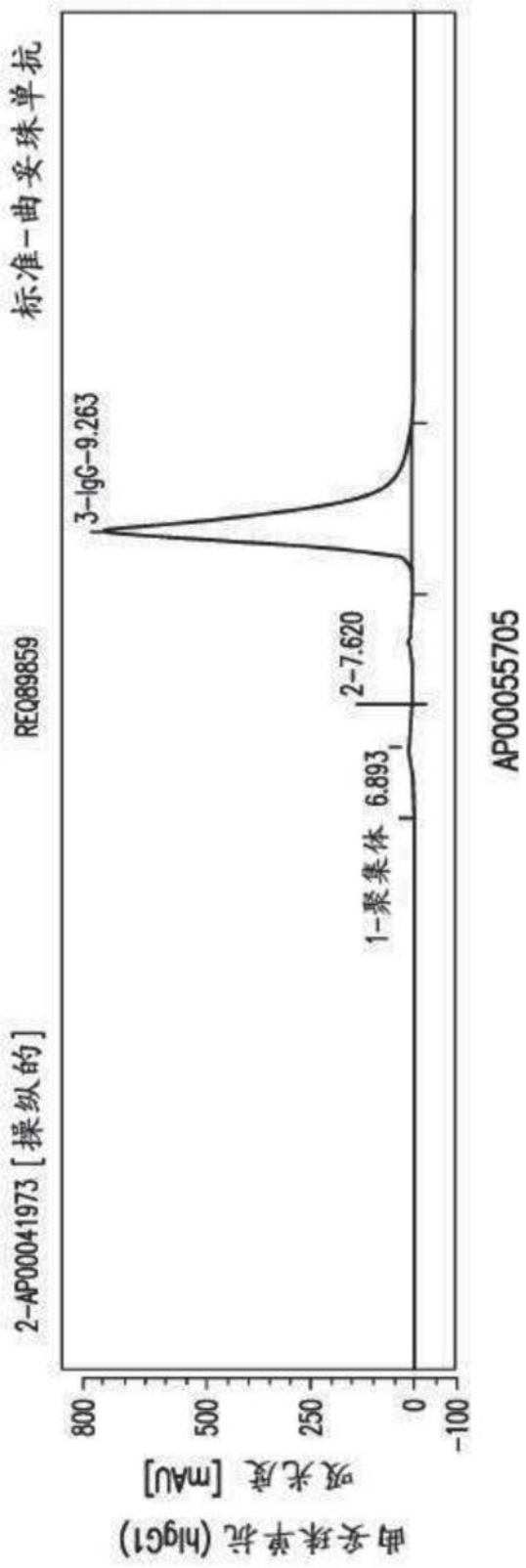

标准-曲妥珠单抗
REQ89859
2-AP00041973 [操纵的]
AP00055705
3-IgG-9.263
2-7.620
1-聚集体 6.893
曲妥珠单抗 (hIgG1)
吸光度 [mAU]
800
500
250
0
-100

图15A续3

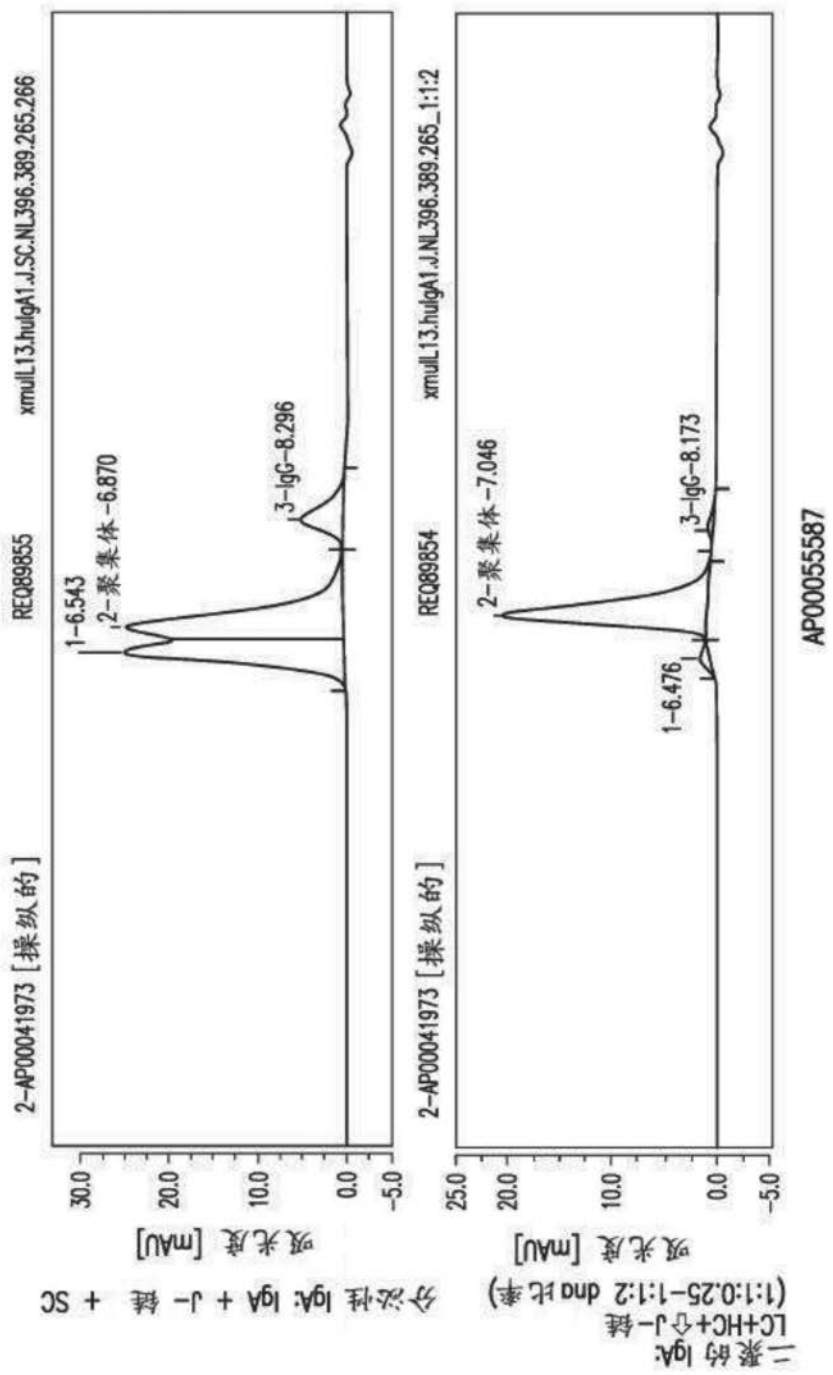

2-AP00041973 [操纵的]
REQ89855
xmulL13.huIgA1.J.SC.NL396.389.265.266
1-6.543
2-聚集体-6.870
3-IgG-8.296
吸光度 [mAU]
分泌性 IgA: IgA + J- 链 + SC
2-AP00041973 [操纵的]
REQ89854
xmulL13.huIgA1.J.NL396.389.265_1:1:2
2-聚集体-7.046
1-6.476
3-IgG-8.173
吸光度 [mAU]
二聚的 IgA:
LC+HC+J-链
(1:1:0.25-1:1:2 dna 比率)
AP00055587

图15A续4

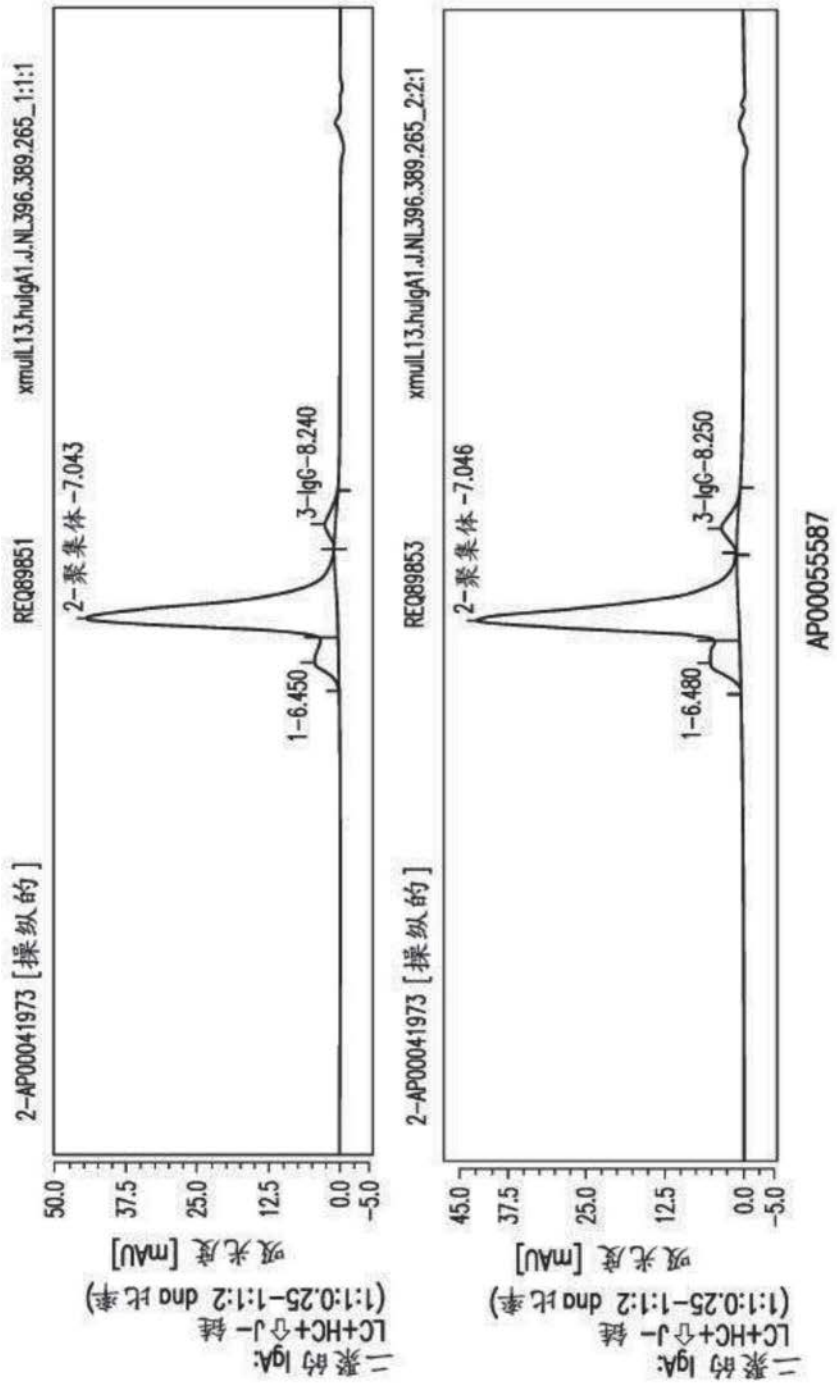

二聚的 IgA:
LC+HC+⇩J- 链
(1:1:0.25-1:1:2 dna 比率)
双光波 [mAU]
50.0
37.5
25.0
12.5
0.0
-5.0
2-AP00041973 [操纵的]
RE089851
xmuIL13.huIgA1.JJ.NL396.389.265_1:1:1
2-聚集体-7.043
1-6.450
3-IgG-8.240
二聚的 IgA:
LC+HC+⇩J- 链
(1:1:0.25-1:1:2 dna 比率)
双光波 [mAU]
45.0
37.5
25.0
12.5
0.0
-5.0
2-AP00041973 [操纵的]
RE089853
xmuIL13.huIgA1.JJ.NL396.389.265_2:2:1
2-聚集体-7.046
1-6.480
3-IgG-8.250
AP00055587

图15A续5

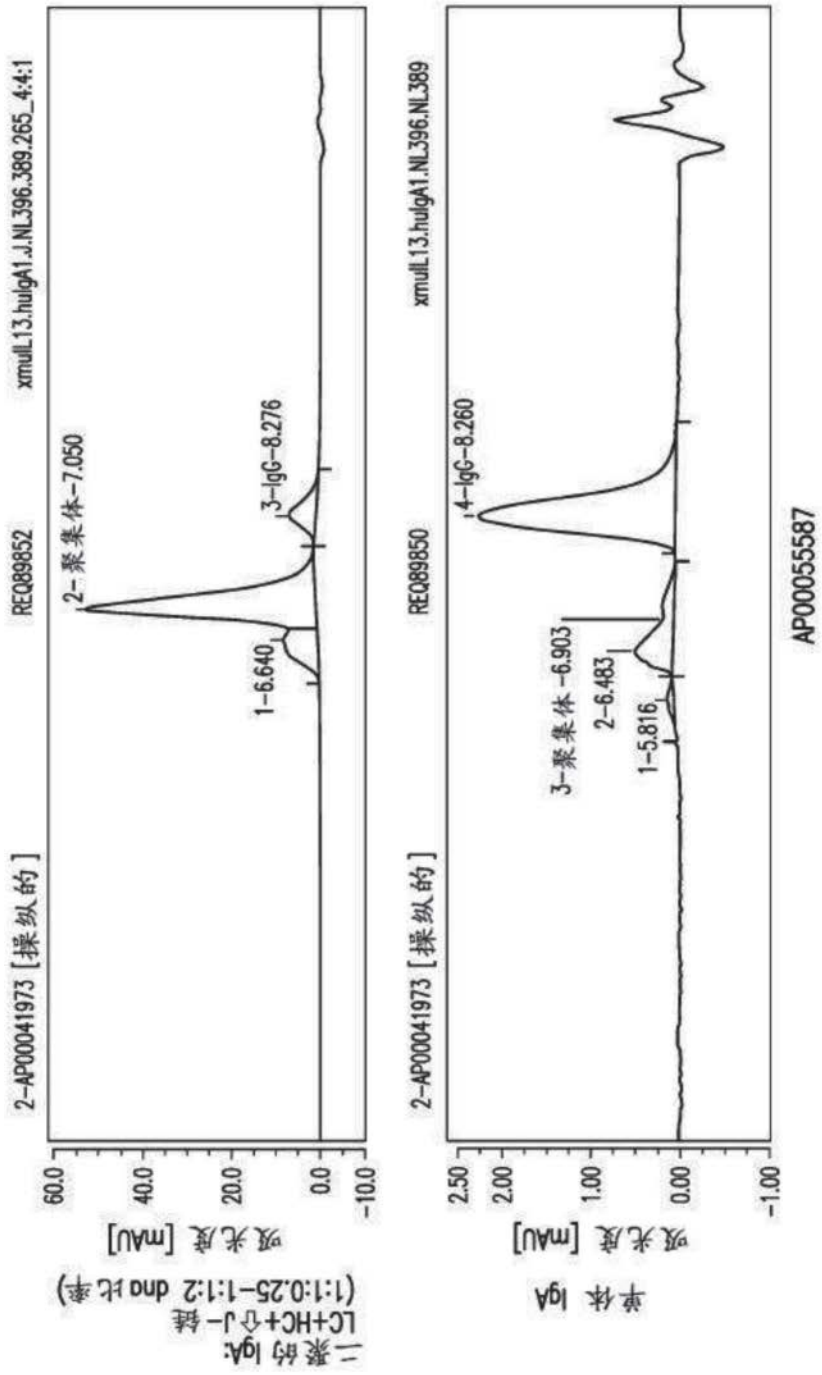

2-AP00041973 [操纵的]
RE089852
xmulL13.hulgA1.J.NL396.389.265_4:4:1
2-聚集体-7.050
3-IgG-8.276
1-6.640
吸光度 [mAU]
60.0
40.0
20.0
0.0
-10.0
二聚的IgA:
LC+HC+J-链
(1:1:0.25-1:1:2 dna比率)
2-AP00041973 [操纵的]
RE089850
xmulL13.hulgA1.NL396.NL389
4-IgG-8.260
3-聚集体-6.903
2-6.483
1-5.816
吸光度 [mAU]
2.50
2.00
1.00
0.00
-1.00
单体 IgA
AP00055587

图15A续6

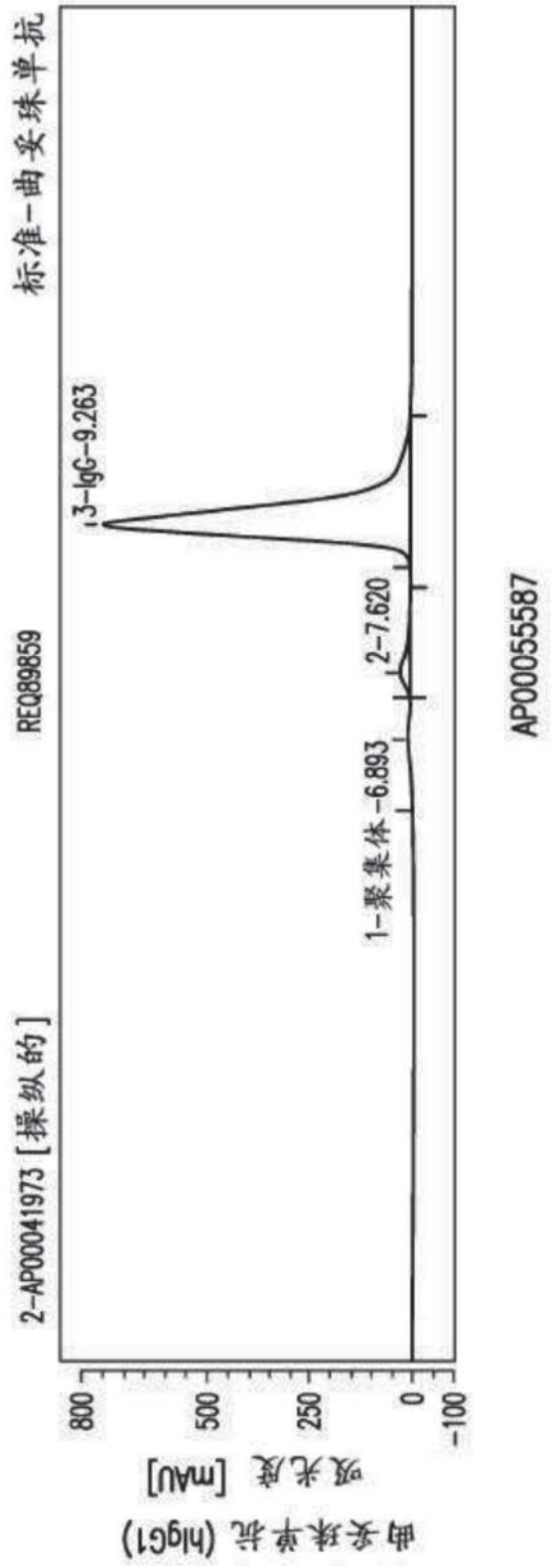

标准-曲妥珠单抗
REQ89859
AP00055587
2-AP00041973 [操纵的]
3-IgG-9.263
2-7.620
1-聚集体-6.893
800
500
250
0
-100
吸光度 [mAU]
曲妥珠单抗 (hIgG1)

图15A续7

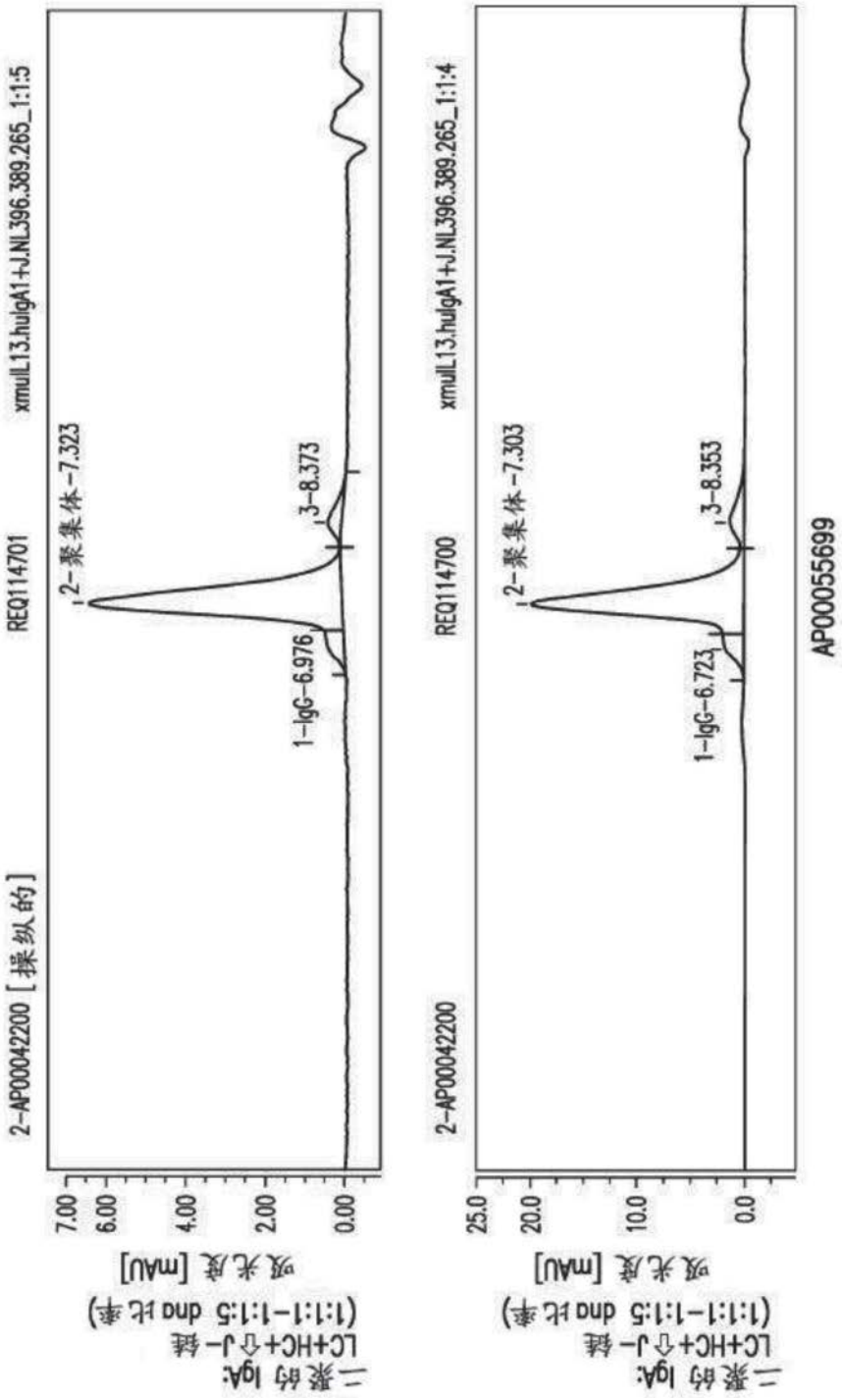

二聚的 IgA:
LC+HC+⇩J- 链
(1:1:1-1:1:5 dna 比率)
吸光度 [mAU]
7.00
6.00
4.00
2.00
0.00
2-AP00042200 [操纵的]
REQ114701
xmulL13.huIgA1+J.NL396.389.265_1:1:5
1-IgG-6.976
2-聚集体-7.323
3-8.373
二聚的 IgA:
LC+HC+⇩J- 链
(1:1:1-1:1:5 dna 比率)
吸光度 [mAU]
25.0
20.0
10.0
0.0
2-AP00042200
REQ114700
xmulL13.huIgA1+J.NL396.389.265_1:1:4
1-IgG-6.723
2-聚集体-7.303
3-8.353
AP00055699

图15B

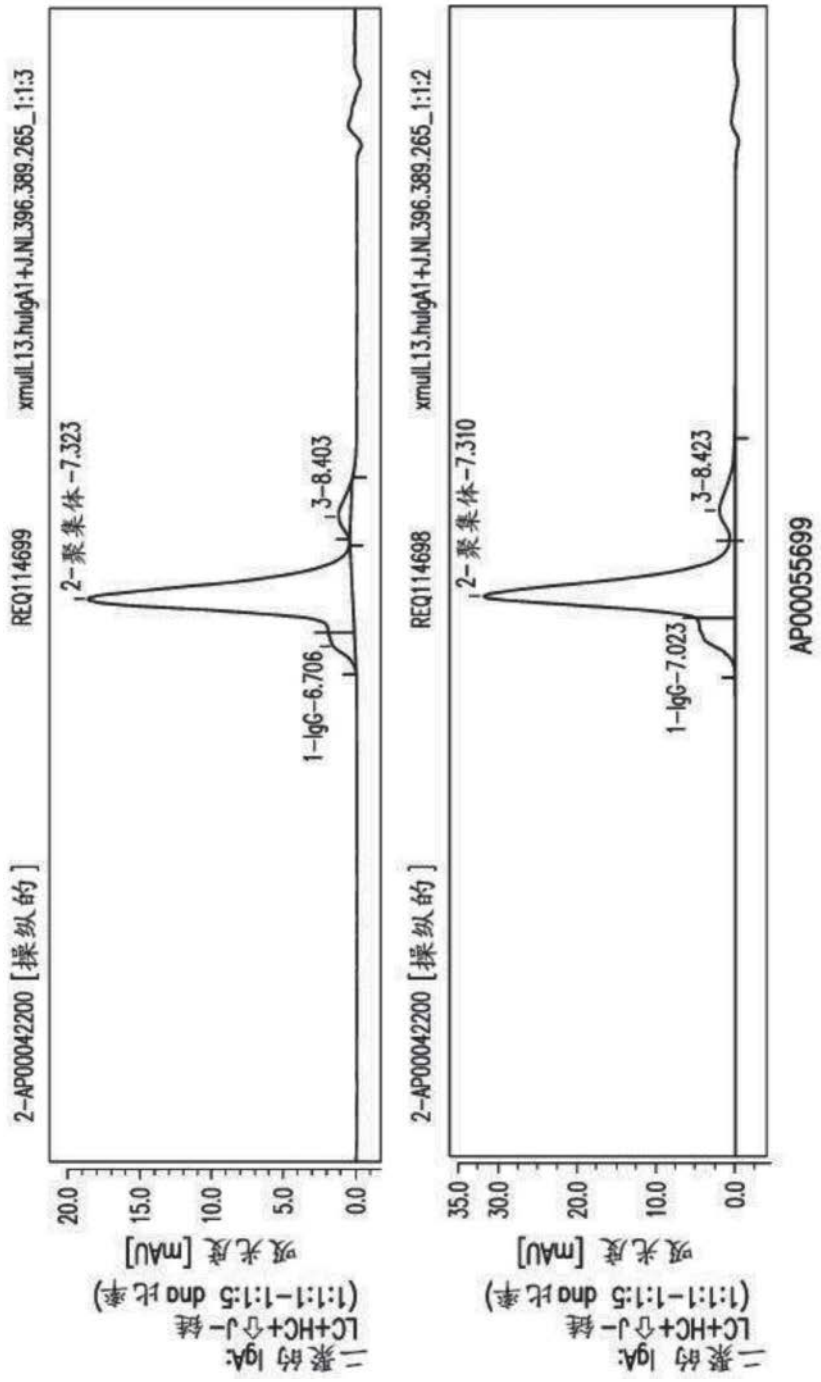

二聚的 IgA:
LC+HC+⇩J- 链
(1:1:1-1:1:5 dna 比率)
吸光度 [mAU]
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
2-APO00042200 [操纵的]
REQ114699
xmuIL13.huIgA1+J.NL396.389.265_1:1:3
1-IgG-6.706
2-聚集体-7.323
3-8.403
二聚的 IgA:
LC+HC+⇩J- 链
(1:1:1-1:1:5 dna 比率)
吸光度 [mAU]
35.0
30.0
20.0
10.0
0.0
2-APO00042200 [操纵的]
REQ114698
xmuIL13.huIgA1+J.NL396.389.265_1:1:2
1-IgG-7.023
2-聚集体-7.310
3-8.423
APO0055699

图15B续1

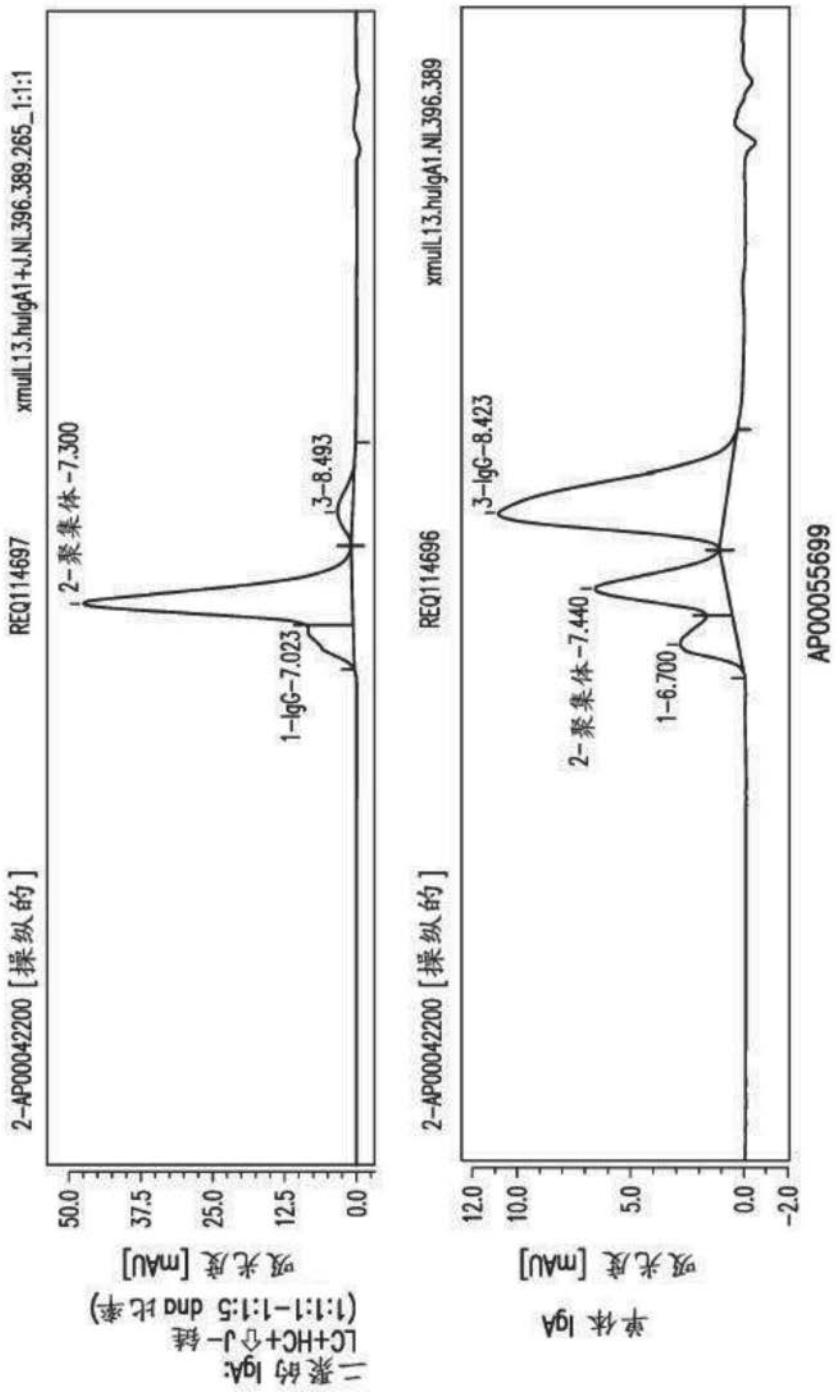

二聚的IgA:
LC+HC+⇩J-链
(1:1:1-1:1:5 dna比率)
吸光度 [mAU]
50.0
37.5
25.0
12.5
0.0
2-APO0042200 [操纵的]
REQ114697
xmuIL13.hulgA1+J.NL396.389.265_1:1:1
2-聚集体-7.300
3-8.493
1-IgG-7.023
单体IgA
吸光度 [mAU]
12.0
10.0
5.0
0.0
-2.0
2-APO0042200 [操纵的]
REQ114696
xmuIL13.hulgA1.NL396.389
3-IgG-8.423
2-聚集体-7.440
1-6.700
APO0055699

图15B续2

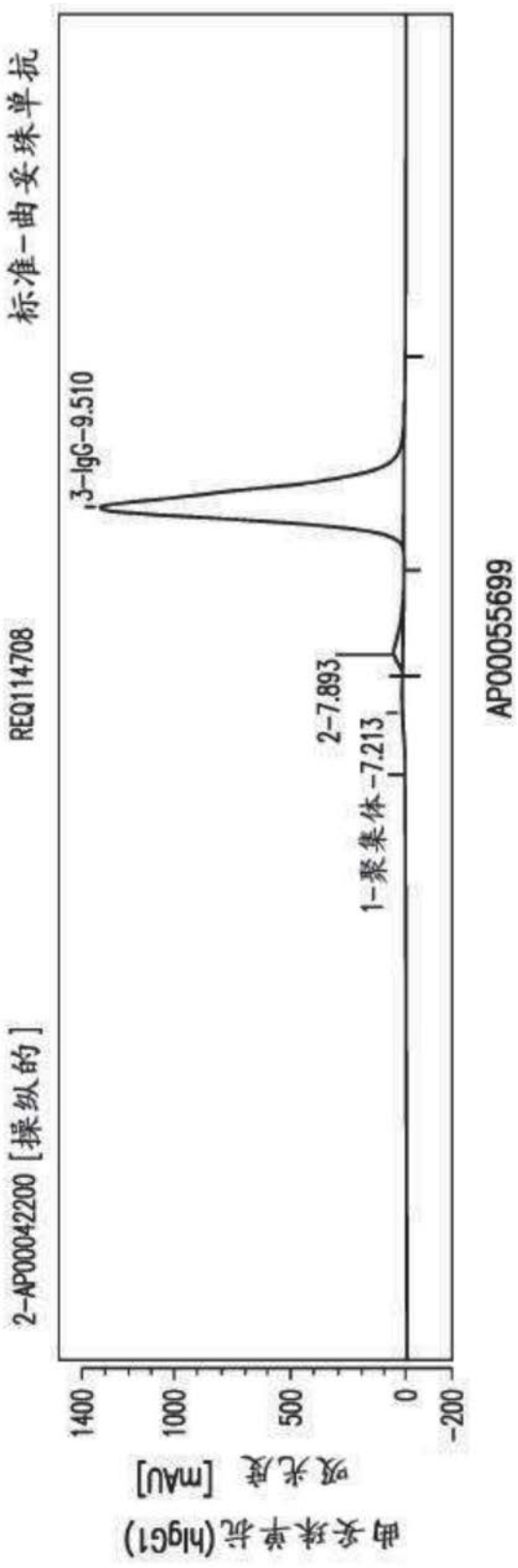
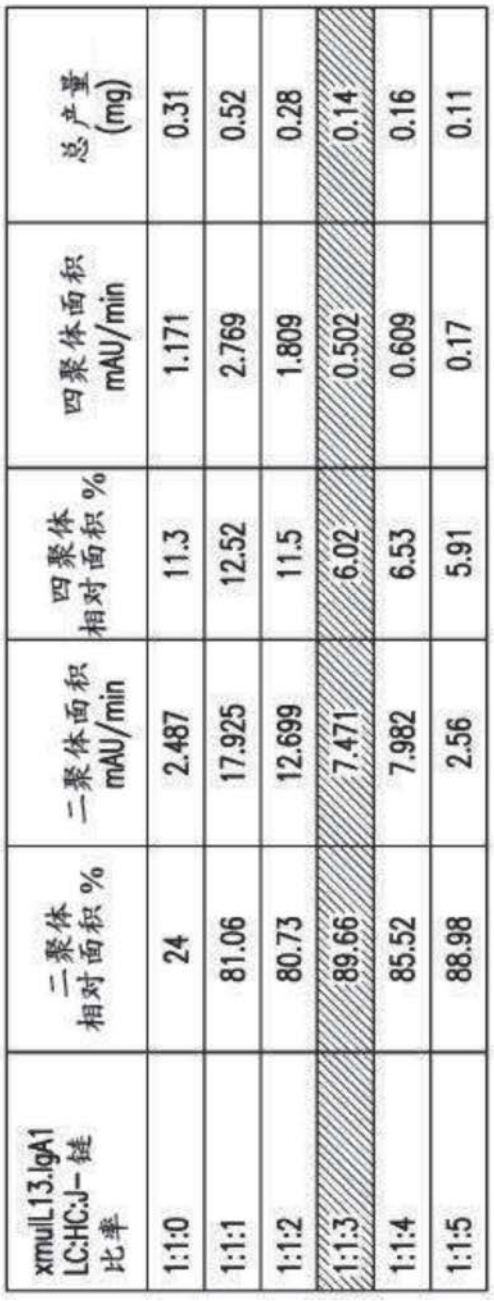

标准-曲妥珠单抗
REQ114708
AP00055699
2-AP00042200 [操纵的]
3-IgG-9.510
2-7.893
1-聚集体-7.213
曲妥珠单抗(hIgG1)
吸光度 [mAU]
1400
1000
500
0
-200

图15B续3



xmuIL13.IgA1 LC:HC:J-链比率	二聚体相对面积 %	二聚体面积 mAU/min	四聚体相对面积 %	四聚体面积 mAU/min	总产量 (mg)
1:1:0	24	2.487	11.3	1.171	0.31
1:1:1	81.06	17.925	12.52	2.769	0.52
1:1:2	80.73	12.699	11.5	1.809	0.28
1:1:3	89.66	7.471	6.02	0.502	0.14
1:1:4	85.52	7.982	6.53	0.609	0.16
1:1:5	88.98	2.56	5.91	0.17	0.11

图15C

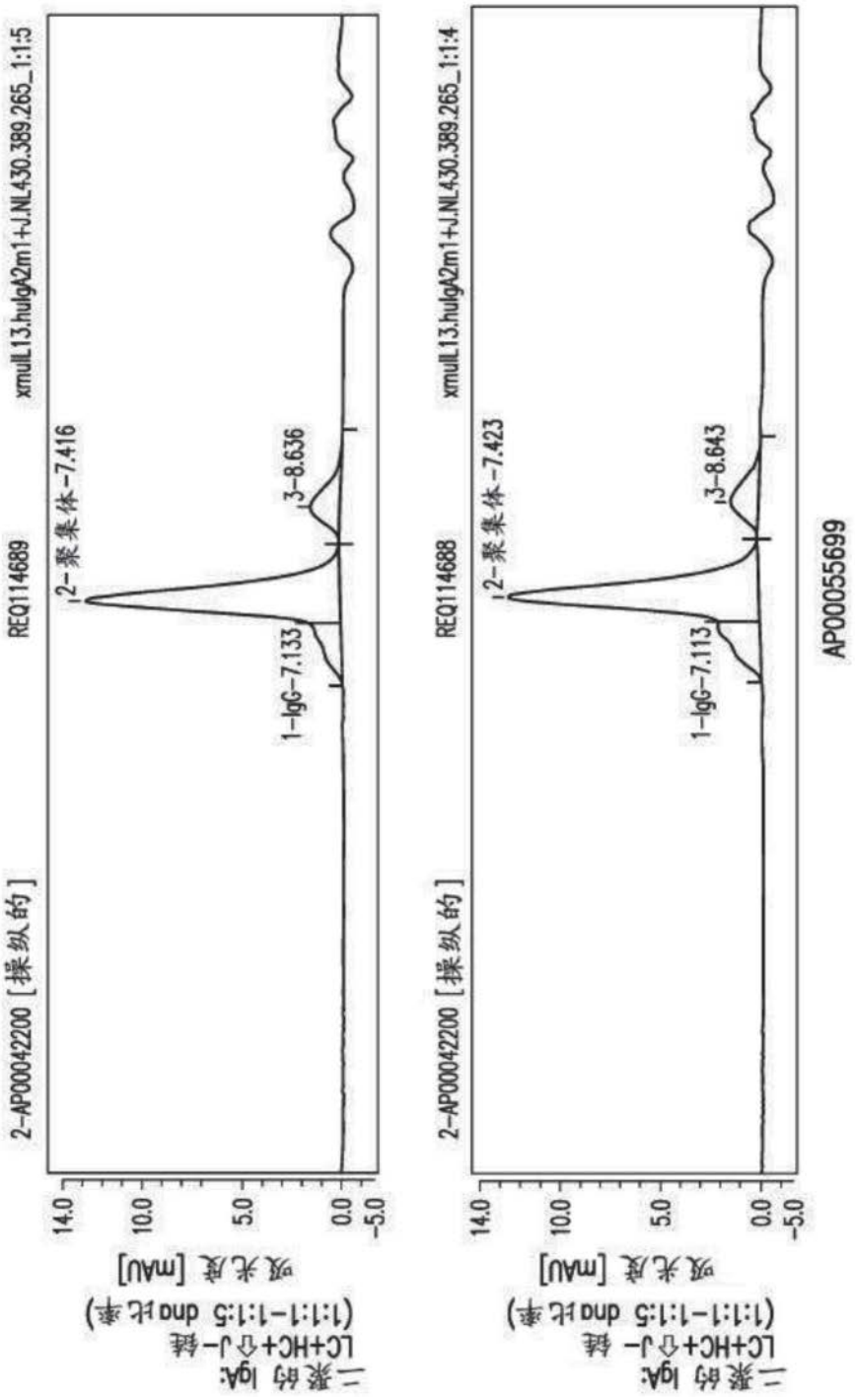

2-AP00042200 [操纵的]
REQ114689
xmulL13.hulgA2m1+J.NL430.389.265_1:1:5
2-聚集体-7.416
3-8.636
1-IgG-7.133
14.0
10.0
5.0
0.0
-5.0
吸光度 [mAU]
二聚的 IgA:
LC+HC+⇩J- 链
(1:1:1-1:1:5 dnp比率)
2-AP00042200 [操纵的]
REQ114688
xmulL13.hulgA2m1+J.NL430.389.265_1:1:4
2-聚集体-7.423
3-8.643
1-IgG-7.113
14.0
10.0
5.0
0.0
-5.0
吸光度 [mAU]
二聚的 IgA:
LC+HC+⇩J- 链
(1:1:1-1:1:5 dnp比率)
AP00055699

图16A

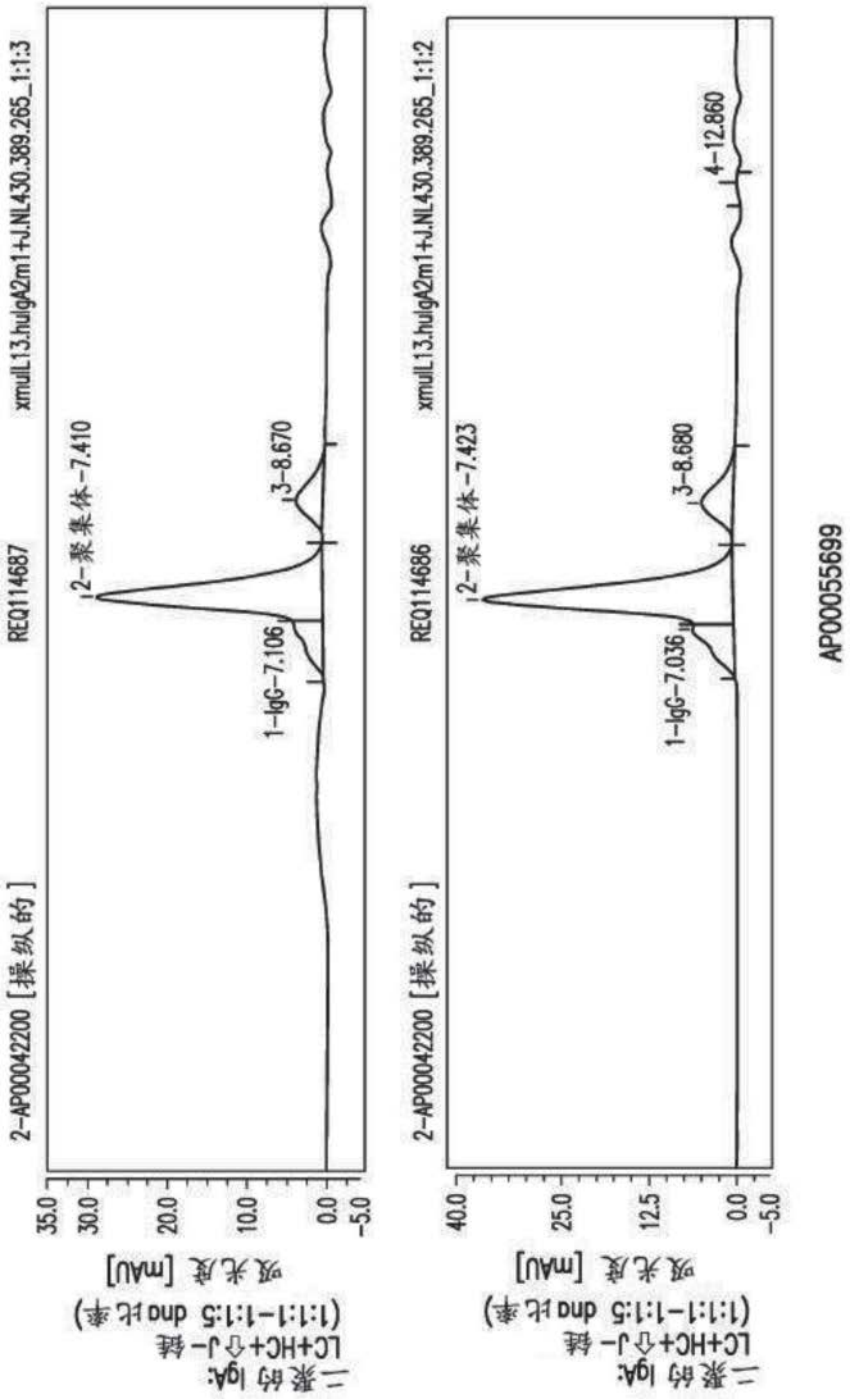

二聚的IgA:
LC+HC+⇩J- 链
(1:1:1-1:1:5 dnp比率)
吸光度 [mAU]
35.0
30.0
20.0
10.0
0.0
-5.0
2-AP00042200 [操纵的]
REQ114687
xmulL13.hulgA2m1+J.NL430.389.265_1:1:3
1-IgG-7.106
2-聚集体-7.410
3-8.670
二聚的IgA:
LC+HC+⇩J- 链
(1:1:1-1:1:5 dnp比率)
吸光度 [mAU]
40.0
25.0
12.5
0.0
-5.0
2-AP00042200 [操纵的]
REQ114686
xmulL13.hulgA2m1+J.NL430.389.265_1:1:2
1-IgG-7.036
2-聚集体-7.423
3-8.680
4-12.860
AP00055699

图16A续1

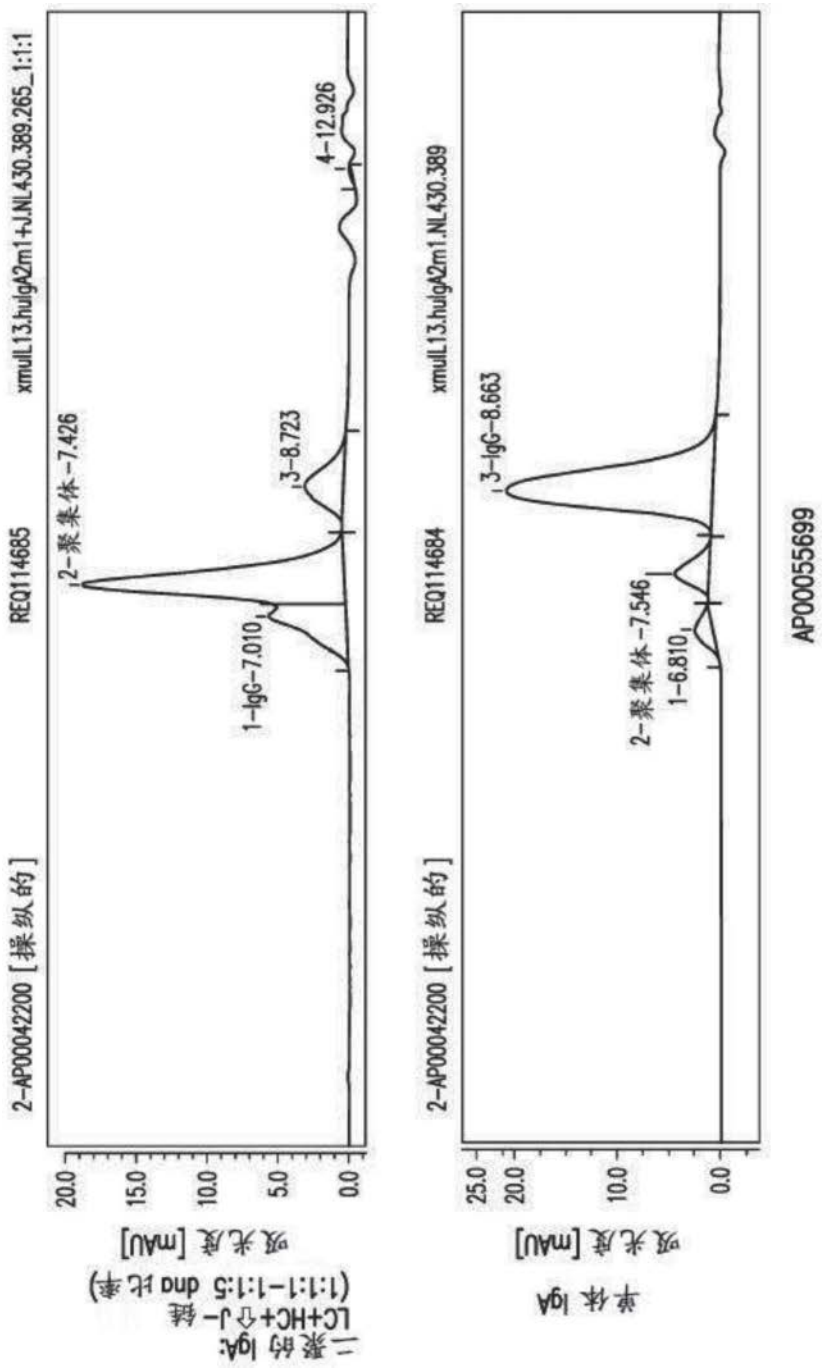

二聚的IgA:
LC+HC+⇩J-链
(1:1:1-1:1:5 dna比率)
吸光度 [mAU]
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
2-AP00042200 [操纵的]
REQ114685
xmulL13.hulgA2m1+J.NL430.389.265_1:1:1
1-IgG-7.010
2-聚集体-7.426
3-8.723
4-12.926
单体IgA
吸光度 [mAU]
25.0
20.0
10.0
0.0
2-AP00042200 [操纵的]
REQ114684
xmulL13.hulgA2m1.NL430.389
2-聚集体-7.546
1-6.810
3-IgG-8.663
AP00055699

图16A续2

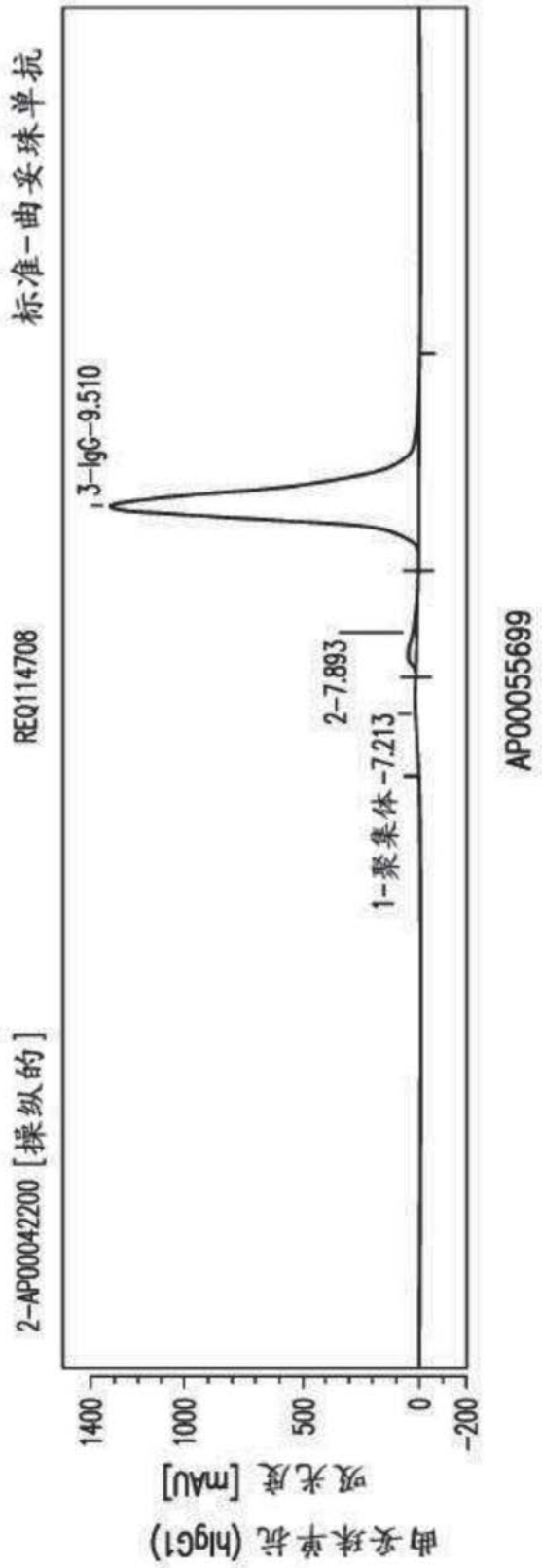
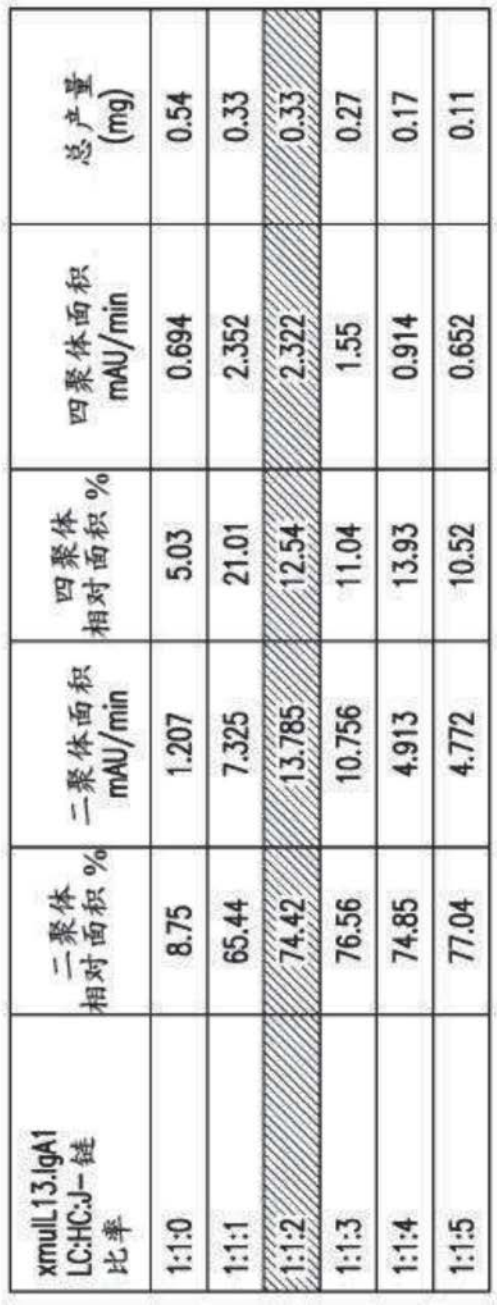

曲妥珠单抗 (hIgG1)
吸光度 [mAU]
1400
1000
500
0
-200
2-AP00042200 [操纵的]
REQ114708
标准-曲妥珠单抗
3-IgG-9.510
2-7.893
1-聚集体-7.213
AP00055699

图16A续3



xmuIL13.IgA1 LC:HC:J-链 比率	二聚体 相对面积 %	二聚体面积 mAU/min	四聚体 相对面积 %	四聚体面积 mAU/min	总产量 (mg)
1:1:0	8.75	1.207	5.03	0.694	0.54
1:1:1	65.44	7.325	21.01	2.352	0.33
1:1:2	74.42	13.785	12.54	2.322	0.33
1:1:3	76.56	10.756	11.04	1.55	0.27
1:1:4	74.85	4.913	13.93	0.914	0.17
1:1:5	77.04	4.772	10.52	0.652	0.11

图16B

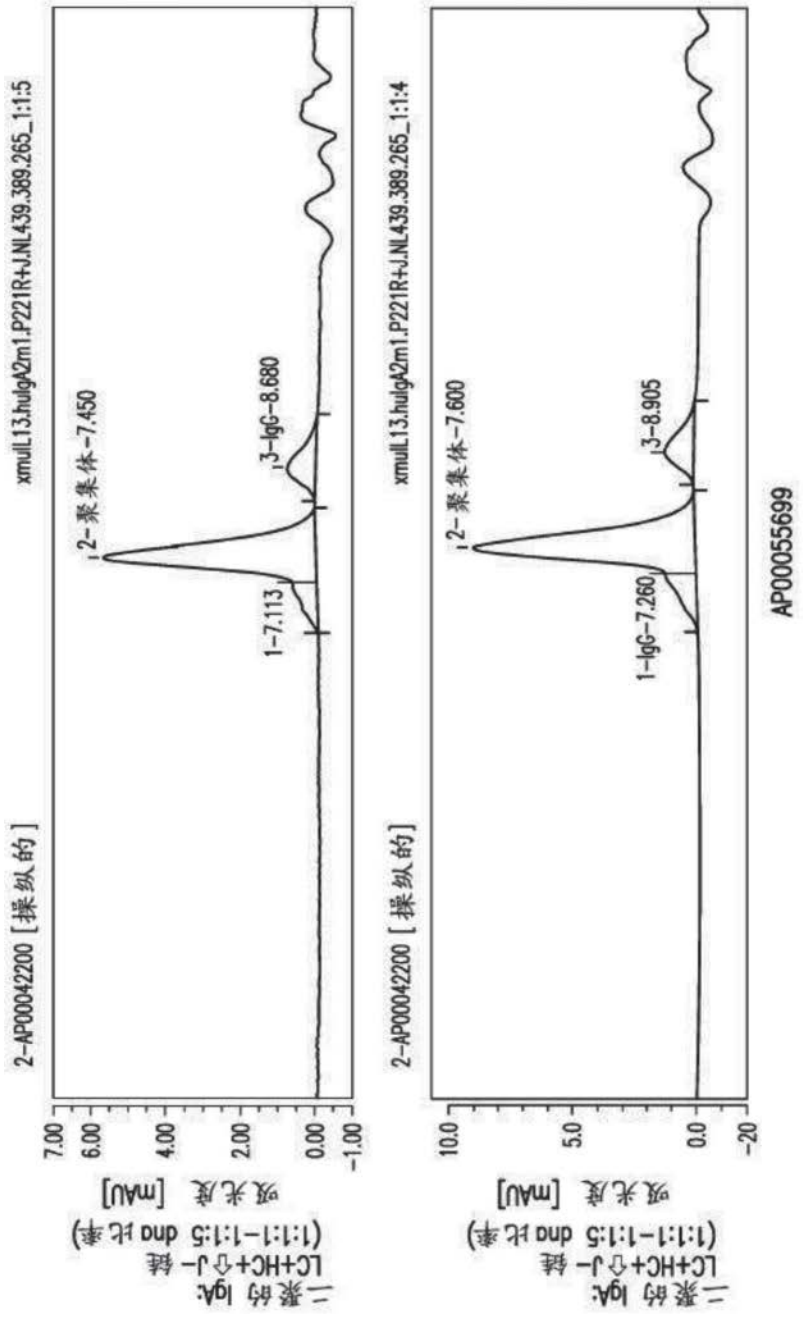

xmull.13.hulgA2m1.P221R+J.NL439.389.265_1:1:5
2-AP00042200 [操纵的]
2-聚集体-7.450
3-IgG-8.680
1-7.113
7.00
6.00
4.00
2.00
0.00
-1.00
二聚的 IgA:
LC+HC+⇩J- 链
(1:1:1-1:1:5 dna 比率)
吸光度 [mAU]
xmull.13.hulgA2m1.P221R+J.NL439.389.265_1:1:4
2-AP00042200 [操纵的]
2-聚集体-7.600
3-8.905
1-IgG-7.260
10.0
5.0
0.0
-20
二聚的 IgA:
LC+HC+⇩J- 链
(1:1:1-1:1:5 dna 比率)
吸光度 [mAU]
AP00055699

图17A

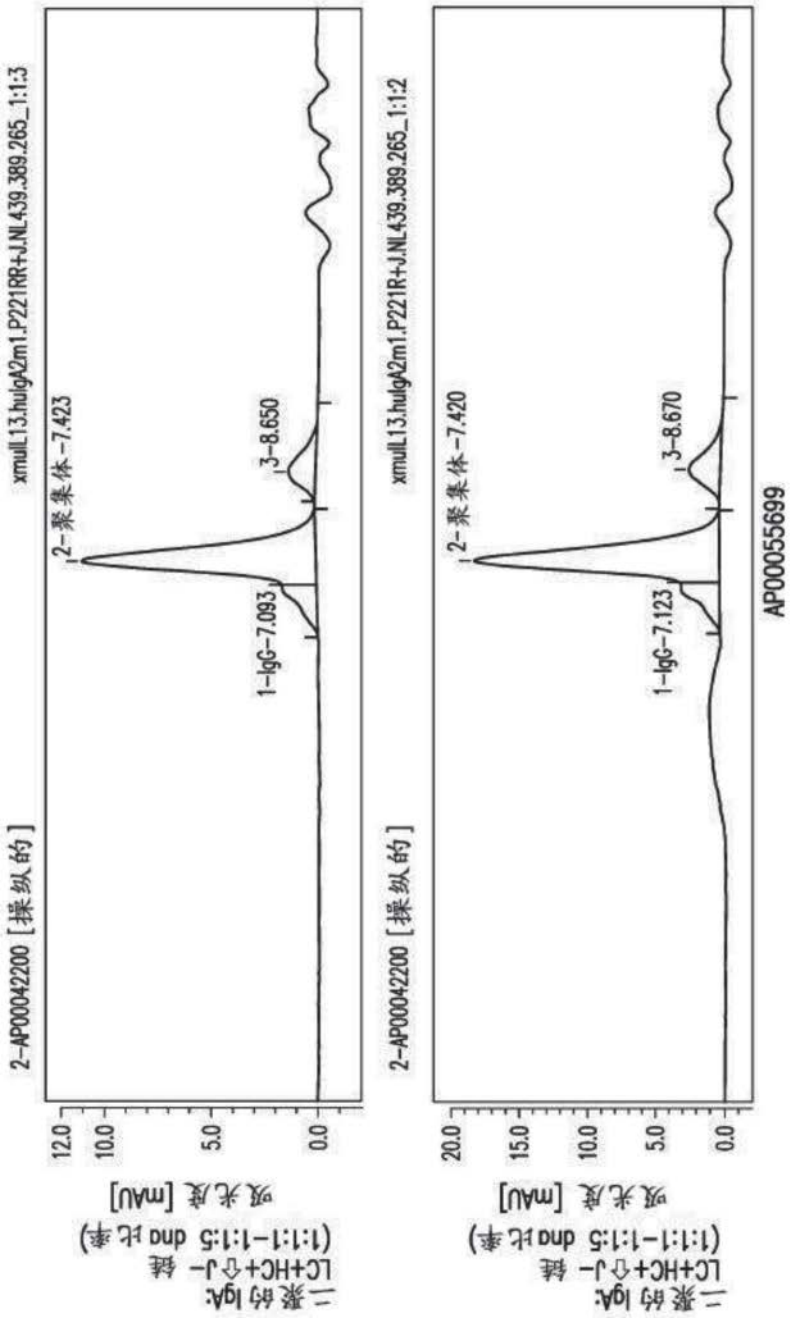

xmull13.hulgA2m1.P221RR+J.NL439.389.265_1:1:3
2-AP00042200 [操纵的]
2-聚集体-7.423
1-IgG-7.093
3-8.650
12.0
10.0
5.0
0.0
xmull13.hulgA2m1.P221R+J.NL439.389.265_1:1:2
2-AP00042200 [操纵的]
2-聚集体-7.420
1-IgG-7.123
3-8.670
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
AP00055699

图17A续1

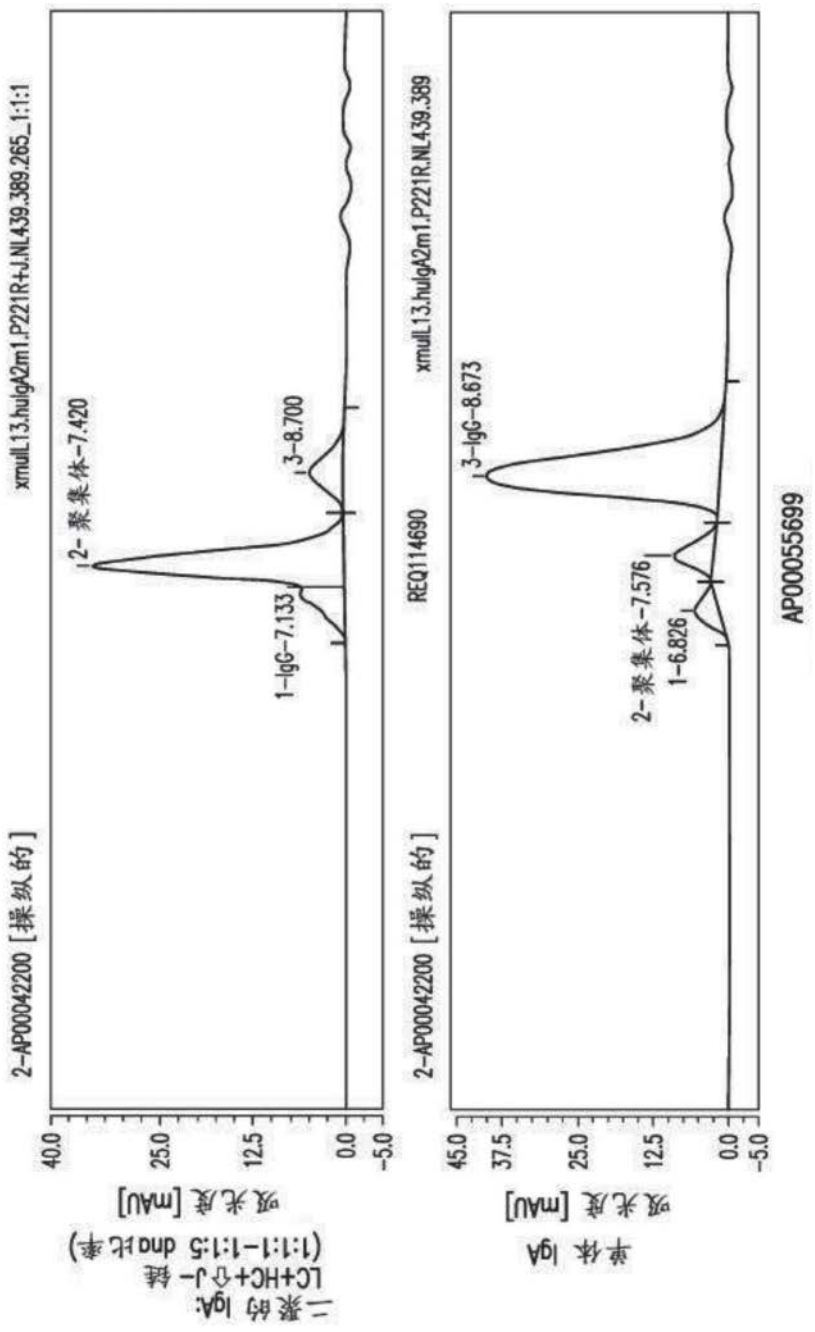

二聚的 IgA:
LC+HC+⇩J- 链
(1:1:1-1:1:5 dna比率)
吸光度 [mAU]
2-AP00042200 [操纵的]
xmullL13.huIgA2m1.P221R+J.NL439.389.265_1:1:1
1-IgG-7.133
2-聚集体-7.420
3-8.700
40.0
25.0
12.5
0.0
-5.0
单体 IgA
吸光度 [mAU]
2-AP00042200 [操纵的]
REQ114690
xmullL13.huIgA2m1.P221R.NL439.389
2-聚集体-7.576
1-6.826
3-IgG-8.673
AP00055699
45.0
37.5
25.0
12.5
0.0
-5.0

图17A续2

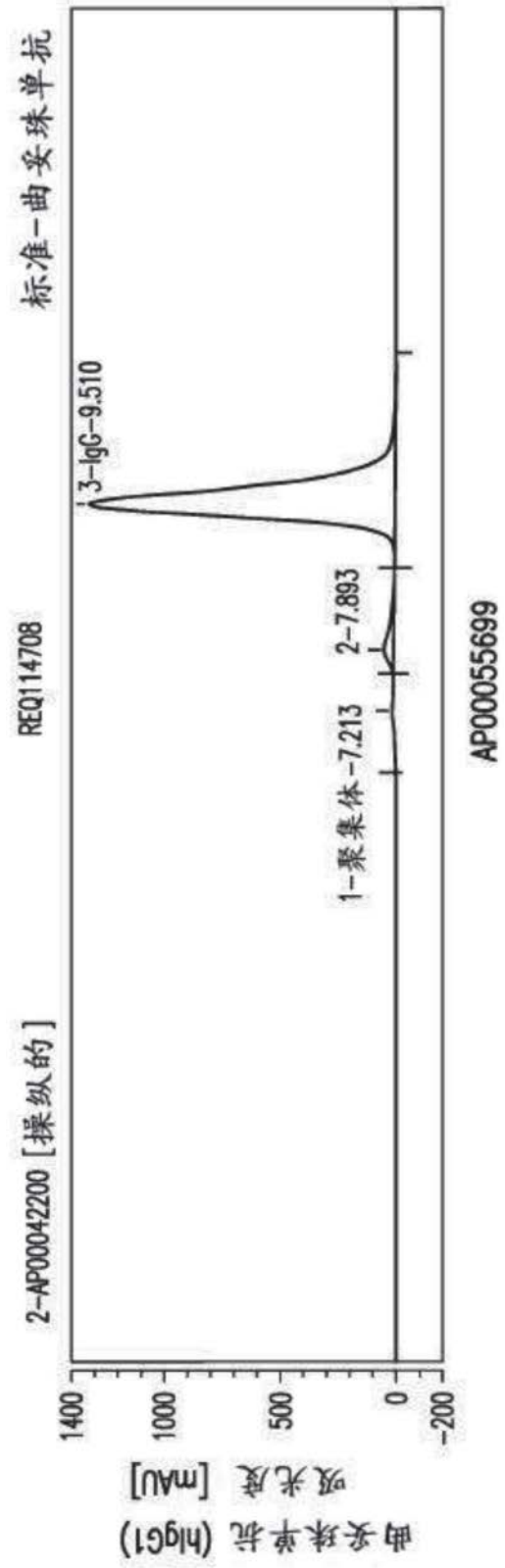
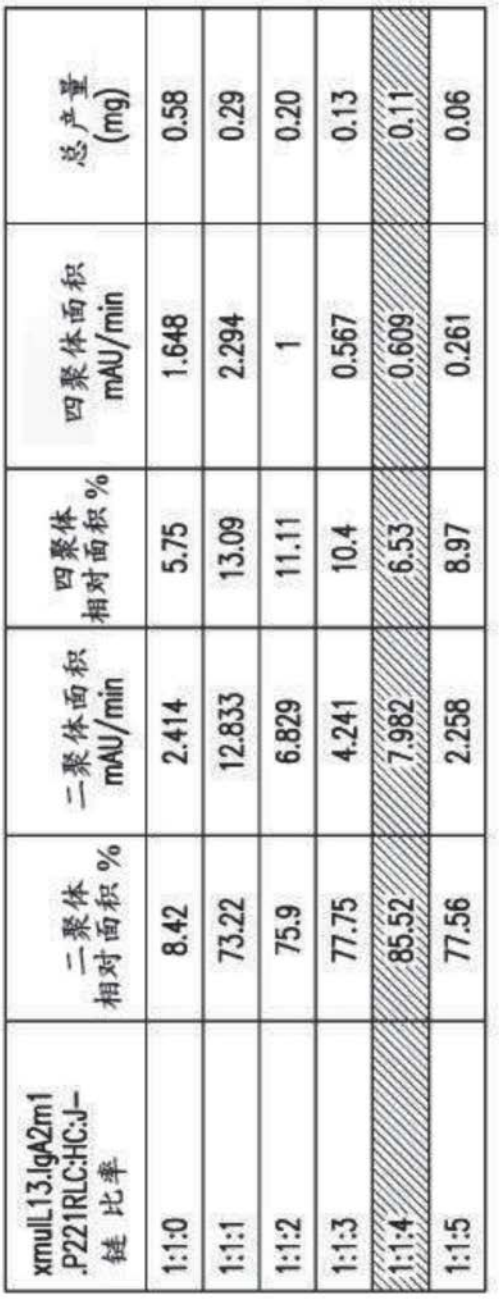

曲安珠单抗 (hIgG1)
吸光度 [mAU]
1400
1000
500
0
-200
2-AP00042200 [操纵的]
REQ114708
标准-曲安珠单抗
3-IgG-9.510
2-7.893
1-聚集体-7.213
AP00055699

图17A续3



xmuIL13.IgA2m1.P221RLC:HC:J-链 比率	二聚体相对面积 %	二聚体面积 mAU/min	四聚体相对面积 %	四聚体面积 mAU/min	总产量 (mg)
1:1:0	8.42	2.414	5.75	1.648	0.58
1:1:1	73.22	12.833	13.09	2.294	0.29
1:1:2	75.9	6.829	11.11	1	0.20
1:1:3	77.75	4.241	10.4	0.567	0.13
1:1:4	85.52	7.982	6.53	0.609	0.11
1:1:5	77.56	2.258	8.97	0.261	0.06

图17B

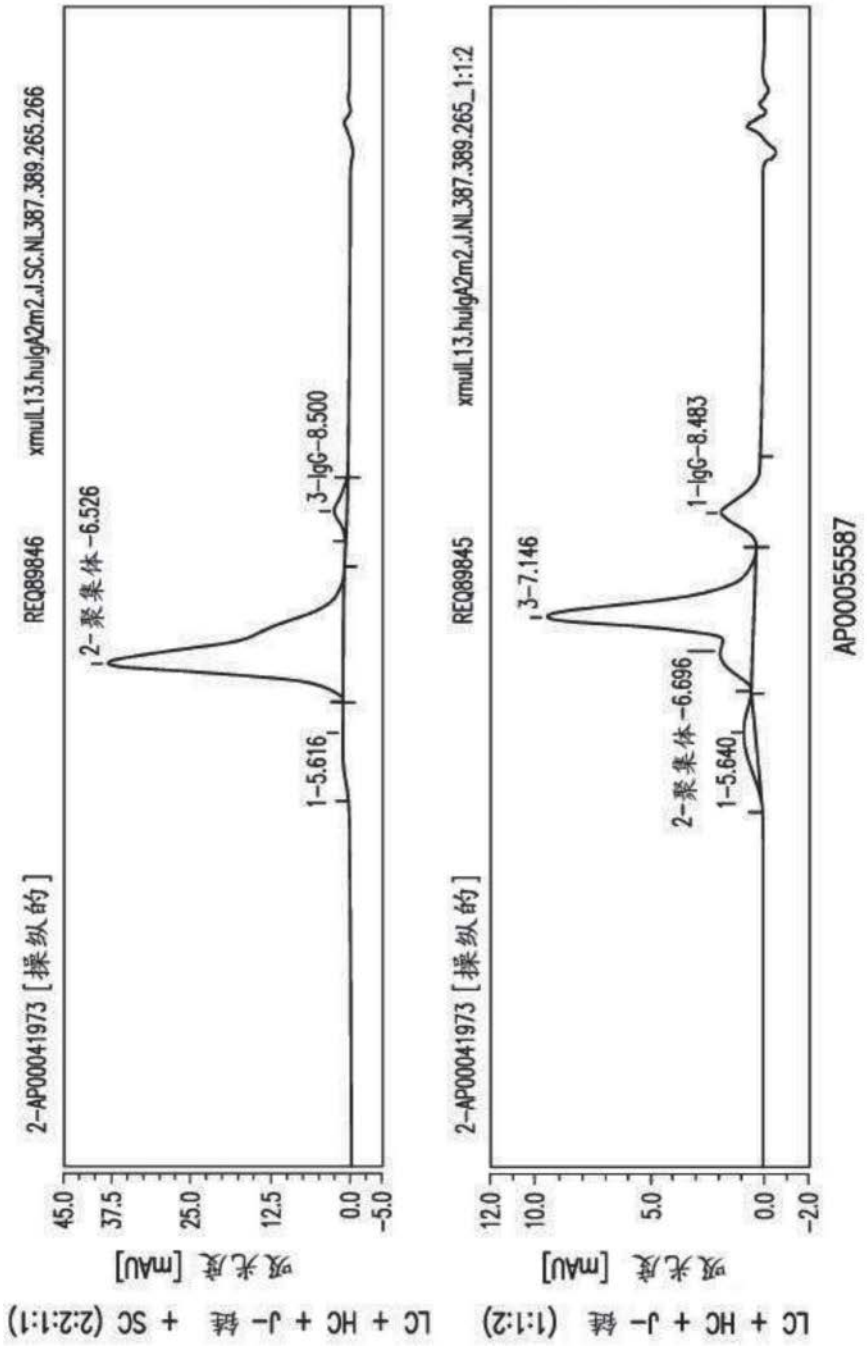

LC + HC + J- 链 + SC (2:2:1:1)
LC + HC + J- 链 (1:1:2)
吸光率 [mAU]
45.0
37.5
25.0
12.5
0.0
-5.0
12.0
10.0
5.0
0.0
-2.0
2-AP00041973 [操纵的]
REQ89846
xmulL13.hulgA2m2.J.SC.NL387.389.265.266
1-5.616
2-聚集体-6.526
3-IgG-8.500
2-AP00041973 [操纵的]
REQ89845
xmulL13.hulgA2m2.J.NL387.389.265_1:1:2
3-7.146
2-聚集体-6.696
1-5.640
1-IgG-8.483
AP00055587

图18A

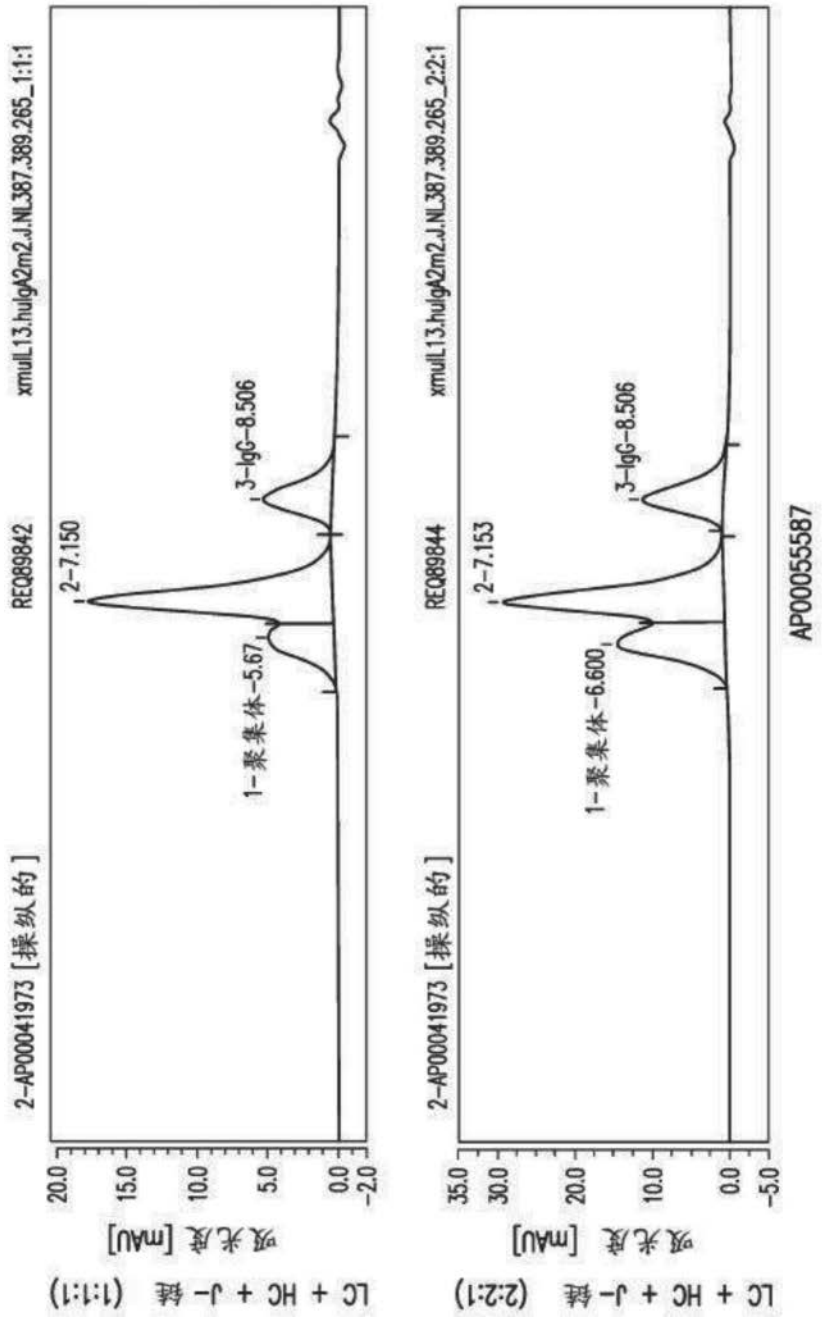

2-AP00041973 [操纵的]
REQ089842
xmulL13.hulgA2m2.J.NL387.389.265_1:1:1
2-7.150
3-IgG-8.506
1-聚集体-5.67
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
-2.0
吸光度 [mAU]
LC + HC + J-链 (1:1:1)
2-AP00041973 [操纵的]
REQ089844
xmulL13.hulgA2m2.J.NL387.389.265_2:2:1
2-7.153
3-IgG-8.506
1-聚集体-6.600
35.0
30.0
20.0
10.0
0.0
-5.0
吸光度 [mAU]
LC + HC + J-链 (2:2:1)
AP00055587

图18A续1

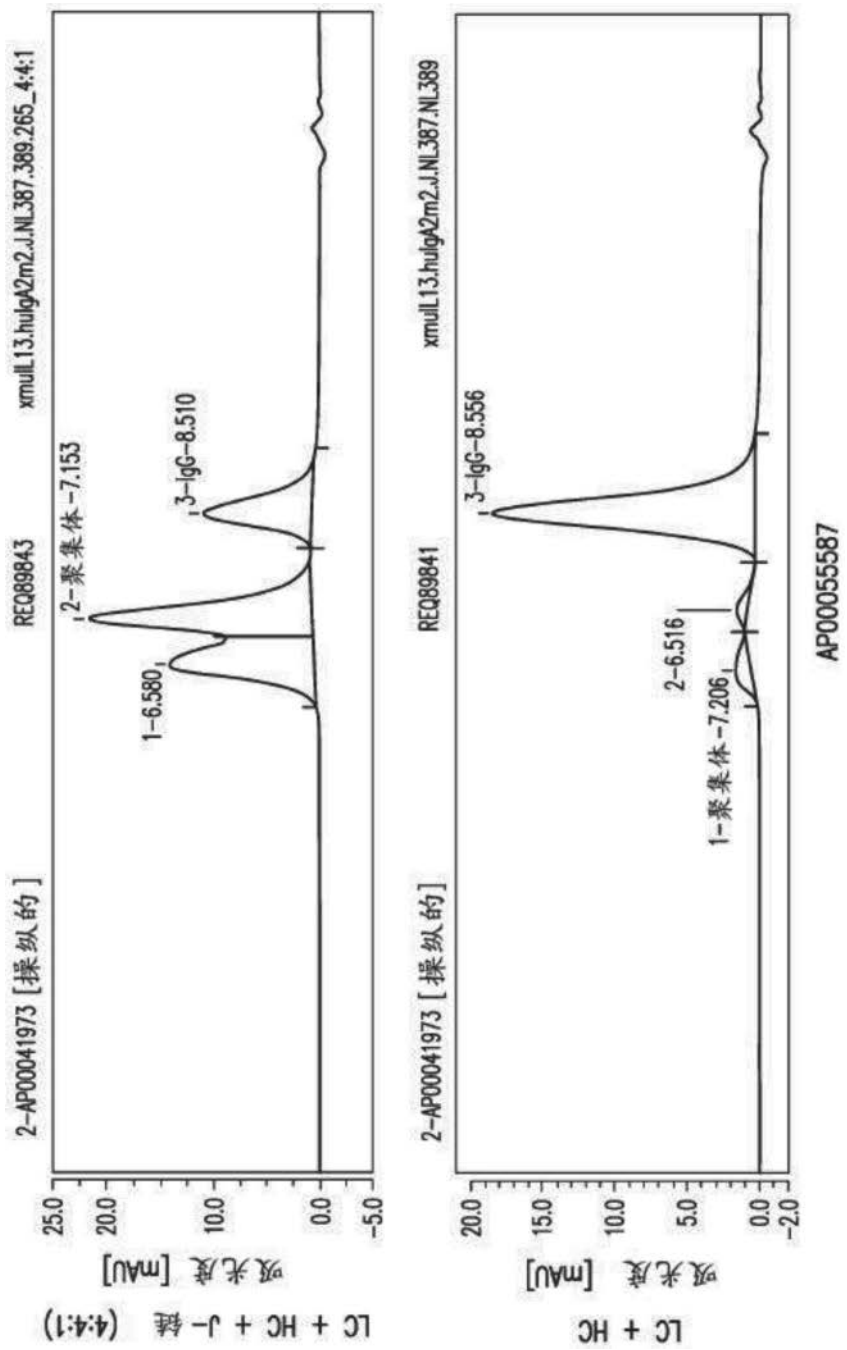

LC + HC + J-链 (4:4:1)
吸光度 [mAU]
25.0
20.0
10.0
0.0
-5.0
2-AP00041973 [操纵的]
REQ89843
xmuIL13.huIgA2m2.J.NL387.389.265_4:4:1
1-6.580
2-聚集体-7.153
3-IgG-8.510
LC + HC
吸光度 [mAU]
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
-2.0
2-AP00041973 [操纵的]
REQ89841
xmuIL13.huIgA2m2.J.NL387.NL389
1-聚集体-7.206
2-6.516
3-IgG-8.556
AP00055587

图18A续2

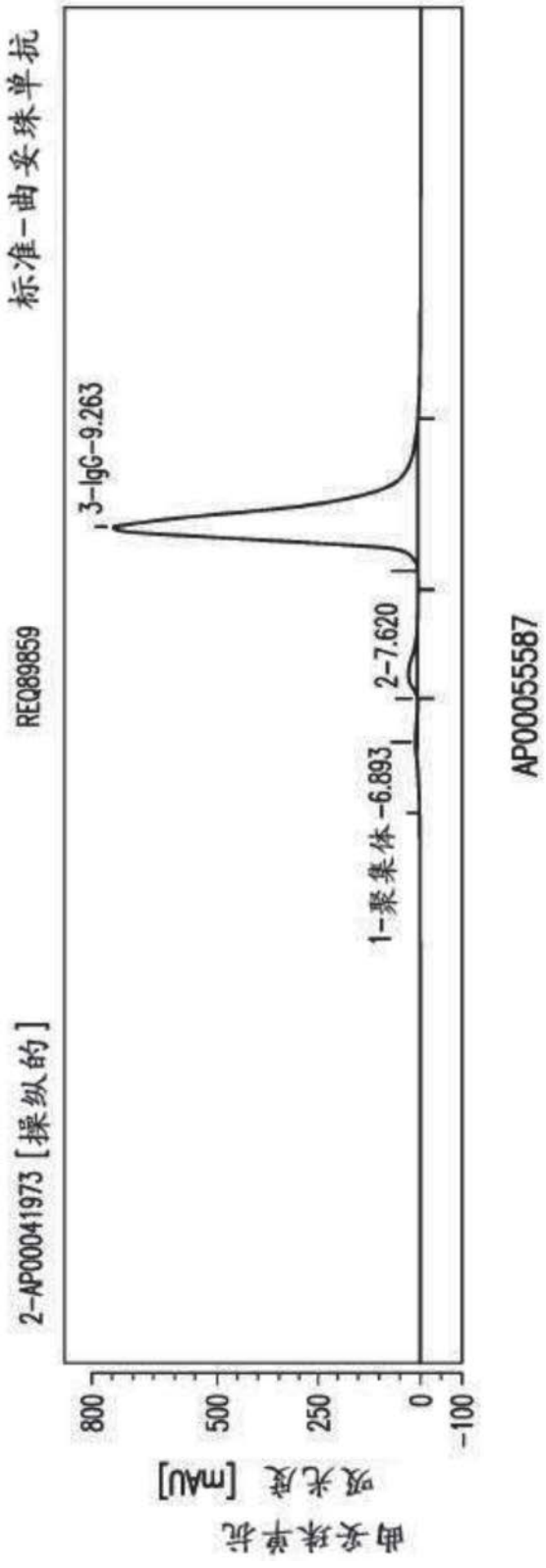

标准-曲-安珠单抗
REQ89859
2-AP00041973 [操纵的]
3-IgG-9.263
2-7.620
1-聚集体-6.893
AP00055587
800
500
250
0
-100
[mAU]
吸光度
曲安珠单抗

图18A续3

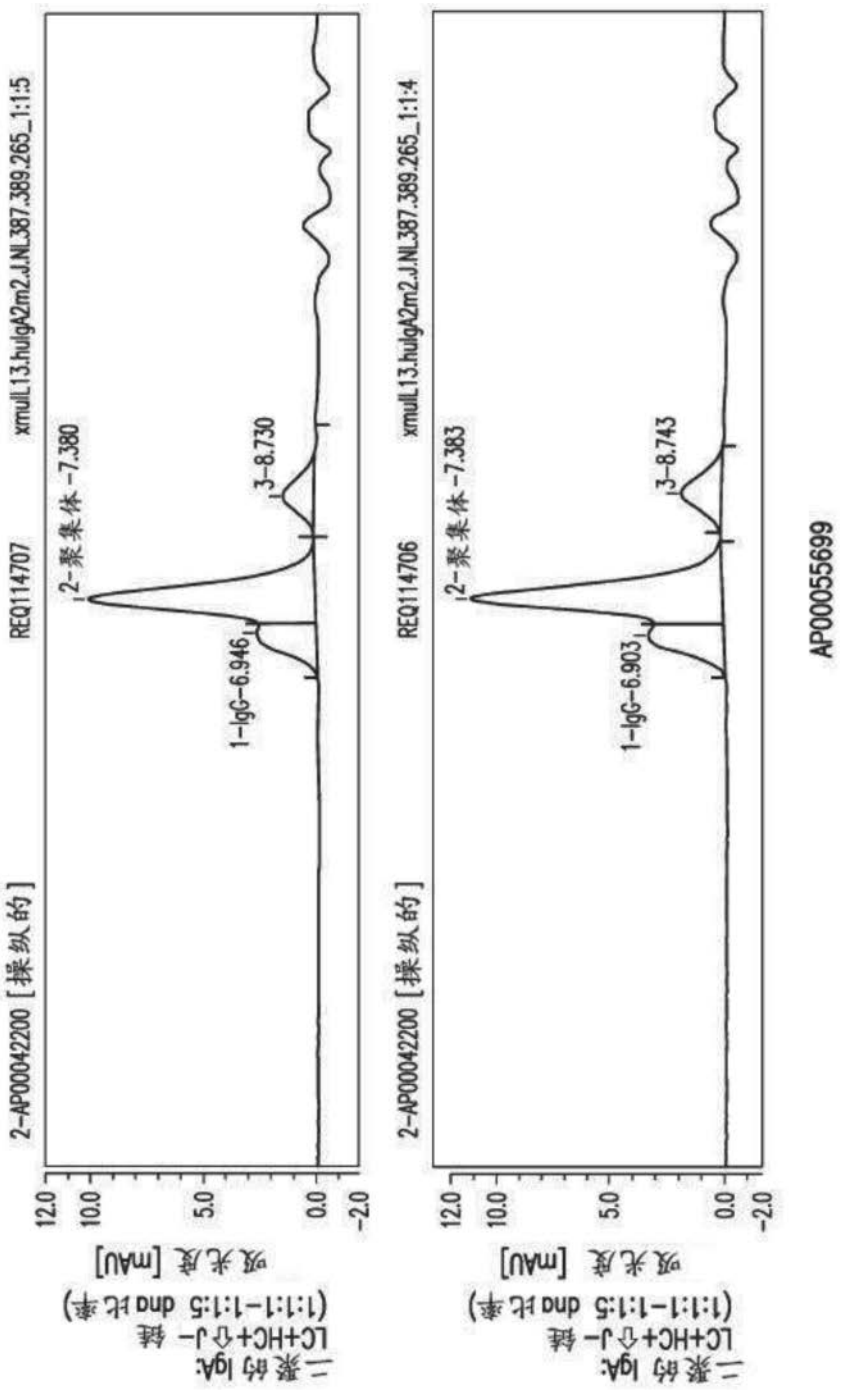

二聚的 IgA:
LC+HC+⇩J- 链
(1:1:1-1:1:5 dna 比率)
吸光度 [mAU]
12.0
10.0
5.0
0.0
-2.0
2-AP00042200 [操纵的]
REQ114707
xmuIL13.huIgA2m2.JNL387.389.265_1:1:5
1-IgG-6.946
2-聚集体-7.380
3-8.730
二聚的 IgA:
LC+HC+⇩J- 链
(1:1:1-1:1:5 dna 比率)
吸光度 [mAU]
12.0
10.0
5.0
0.0
-2.0
2-AP00042200 [操纵的]
REQ114706
xmuIL13.huIgA2m2.JNL387.389.265_1:1:4
1-IgG-6.903
2-聚集体-7.383
3-8.743
AP00055699

图18B

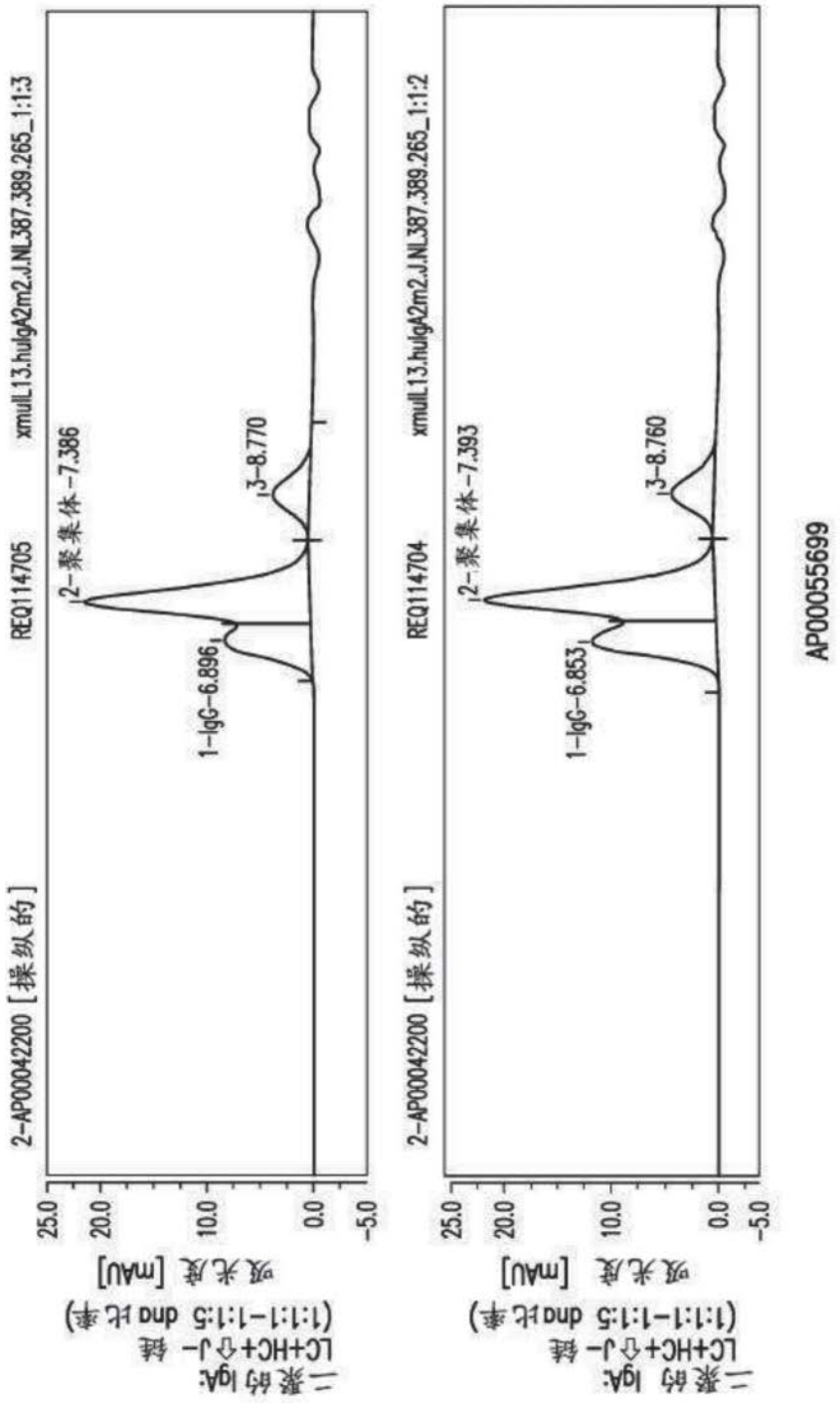

2-AP00042200 [操纵的]
RE0114705
xmulL13.hulgA2m2.JNL387.389.265_1:1:3
2-聚集体-7.386
3-8.770
1-IgG-6.896
25.0
20.0
10.0
0.0
-5.0
吸光度 [mAU]
二聚的 IgA:
LC+HC+⇩J- 链
(1:1:1-1:1:5 dnp 比率)
2-AP00042200 [操纵的]
RE0114704
xmulL13.hulgA2m2.JNL387.389.265_1:1:2
2-聚集体-7.393
3-8.760
1-IgG-6.853
25.0
20.0
10.0
0.0
-5.0
吸光度 [mAU]
二聚的 IgA:
LC+HC+⇩J- 链
(1:1:1-1:1:5 dnp 比率)
AP00055699

图18B续1

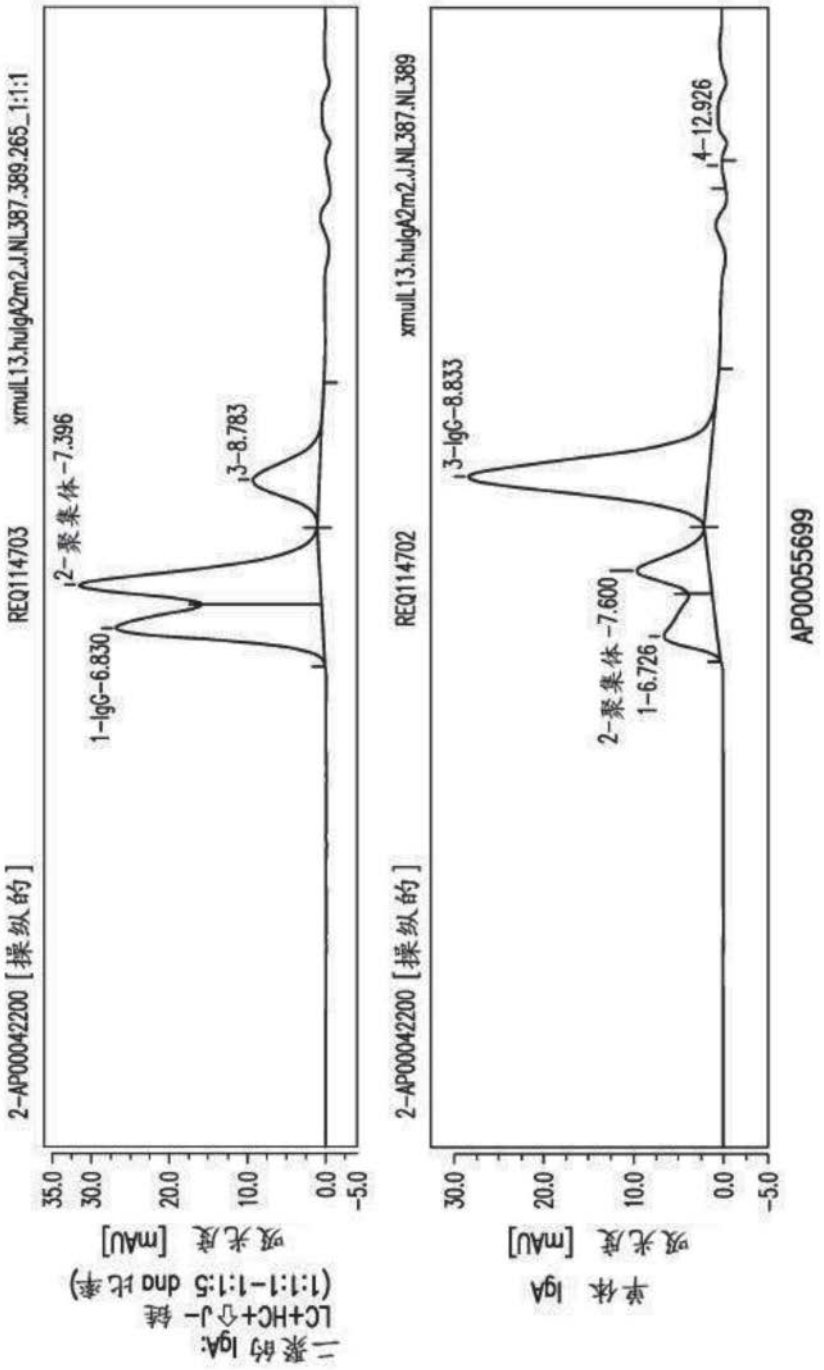

单体 IgA
吸光度 [mAU]
35.0
30.0
20.0
10.0
0.0
-5.0
2-AP00042200 [操纵的]
REQ114702
xmullL13.huIgA2m2.J.NL387.NL389
1-6.726
2-聚集体-7.600
3-IgG-8.833
4-12.926
AP00055699
二聚的 IgA:
LC+HC+J- 链
(1:1:1-1:1:5 dna 比率)
吸光度 [mAU]
35.0
30.0
20.0
10.0
0.0
-5.0
2-AP00042200 [操纵的]
REQ114703
xmullL13.huIgA2m2.J.NL387.389.265_1:1:1
1-IgG-6.830
2-聚集体-7.396
3-8.783

图18B续2

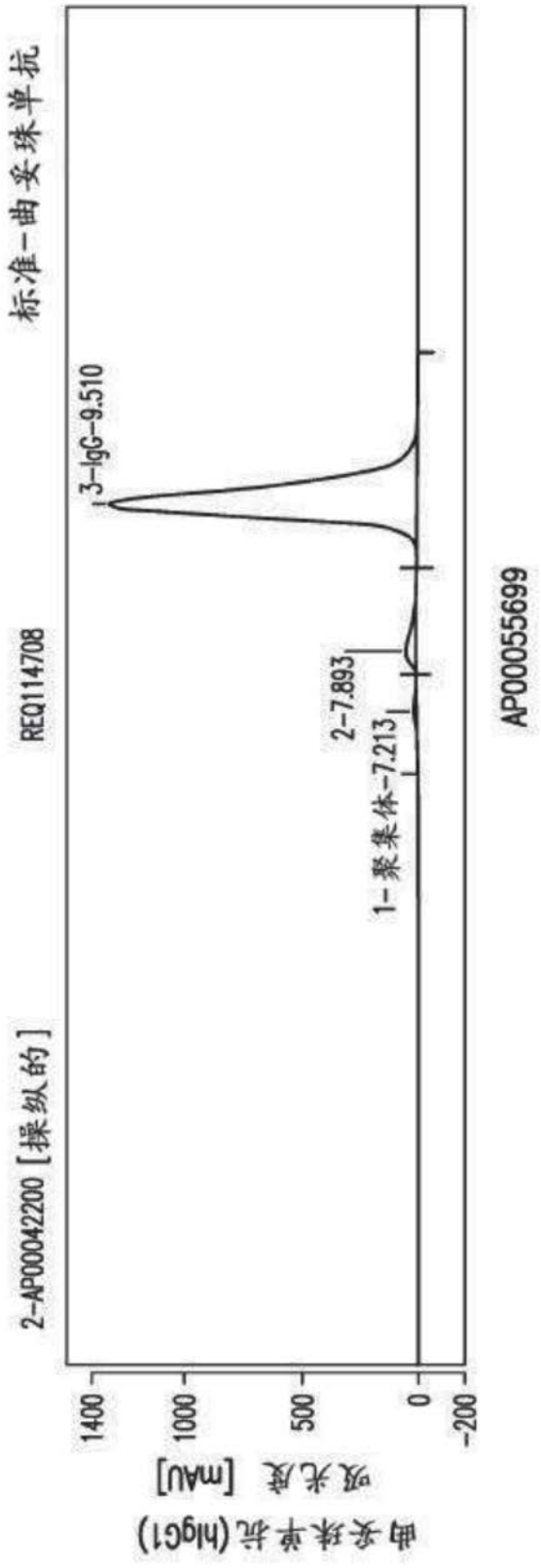
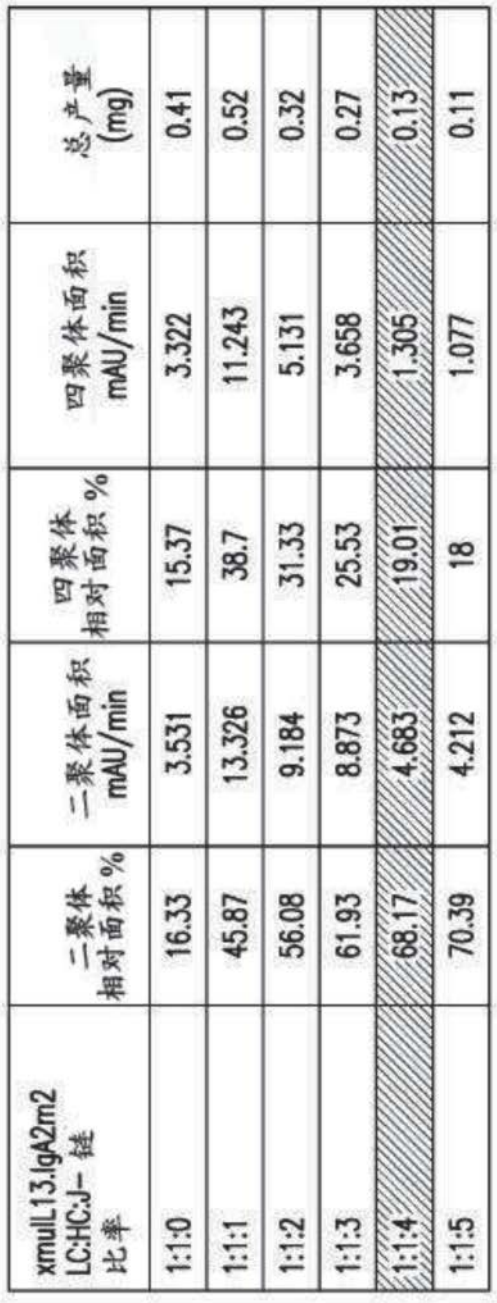

标准-曲妥珠单抗
REQ114708
AP00055699
2-AP00042200 [操纵的]
3-IgG-9.510
2-7.893
1-聚集体-7.213
1400
1000
500
0
-200
吸光度 [mAU]
曲妥珠单抗(hIgG1)

图18B续3



xmuIL13.IgA2m2 LC:HC:J- 链比率	二聚体相对面积 %	二聚体面积 mAU/min	四聚体相对面积 %	四聚体面积 mAU/min	总产量 (mg)
1:1:0	16.33	3.531	15.37	3.322	0.41
1:1:1	45.87	13.326	38.7	11.243	0.52
1:1:2	56.08	9.184	31.33	5.131	0.32
1:1:3	61.93	8.873	25.53	3.658	0.27
1:1:4	68.17	4.683	19.01	1.305	0.13
1:1:5	70.39	4.212	18	1.077	0.11

图18C

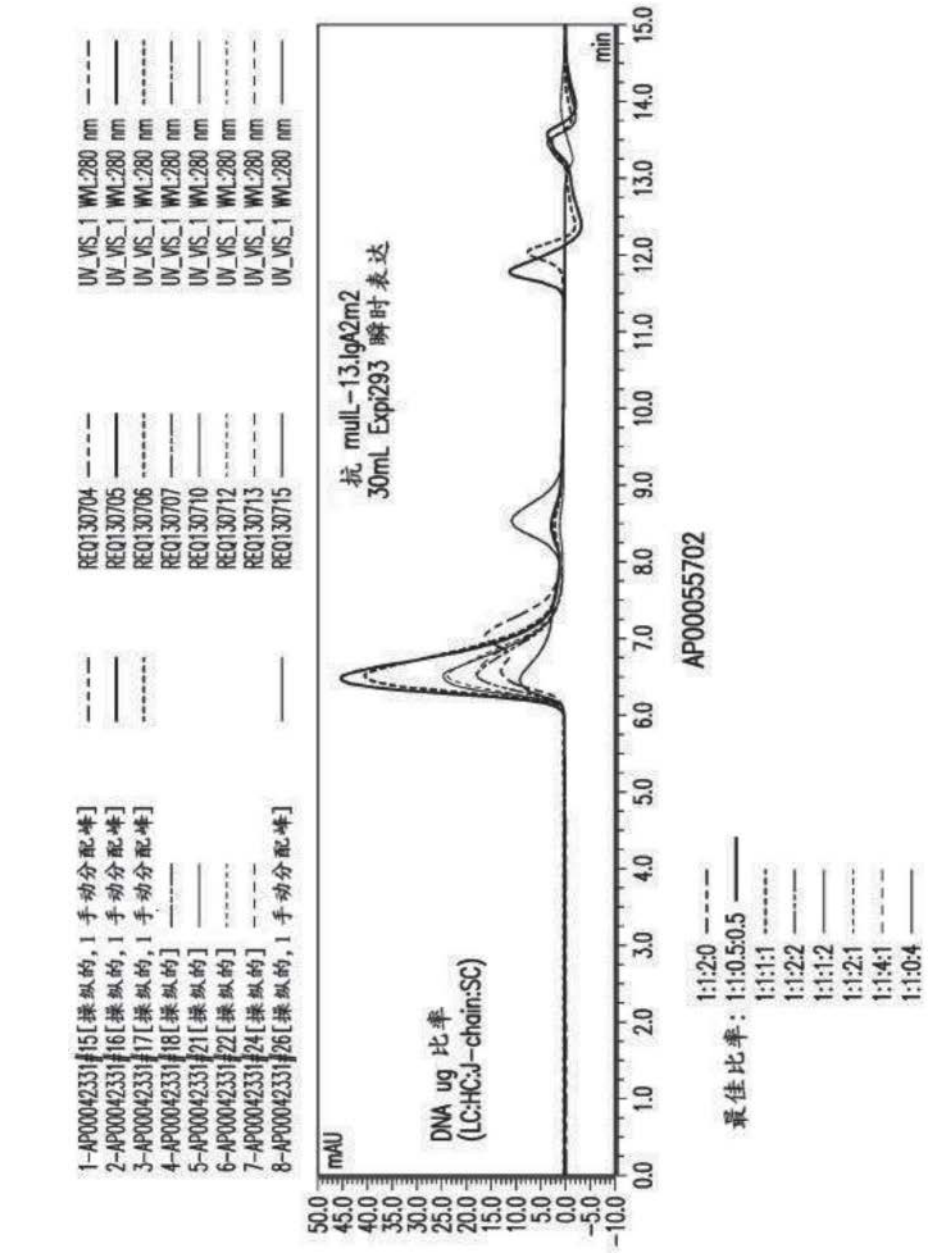

抗 mulL-13.IgA2m2
30mL Expi293 瞬时表达
AP00055702
DNA ug 比率
(LC:HC:J-chain:SC)
mAU
min
1-AP00042331#15[操纵的,1 手动分配峰]
2-AP00042331#16[操纵的,1 手动分配峰]
3-AP00042331#17[操纵的,1 手动分配峰]
4-AP00042331#18[操纵的]
5-AP00042331#21[操纵的]
6-AP00042331#22[操纵的]
7-AP00042331#24[操纵的]
8-AP00042331#26[操纵的,1 手动分配峰]
RE0130704
RE0130705
RE0130706
RE0130707
RE0130710
RE0130712
RE0130713
RE0130715
UV_VIS_1 WVL:280 nm
聚佳比率: 1:1:0.5:0.5
1:1:2:0
1:1:1:1
1:1:2:2
1:1:1:2
1:1:2:1
1:1:4:1
1:1:0:4

图18D

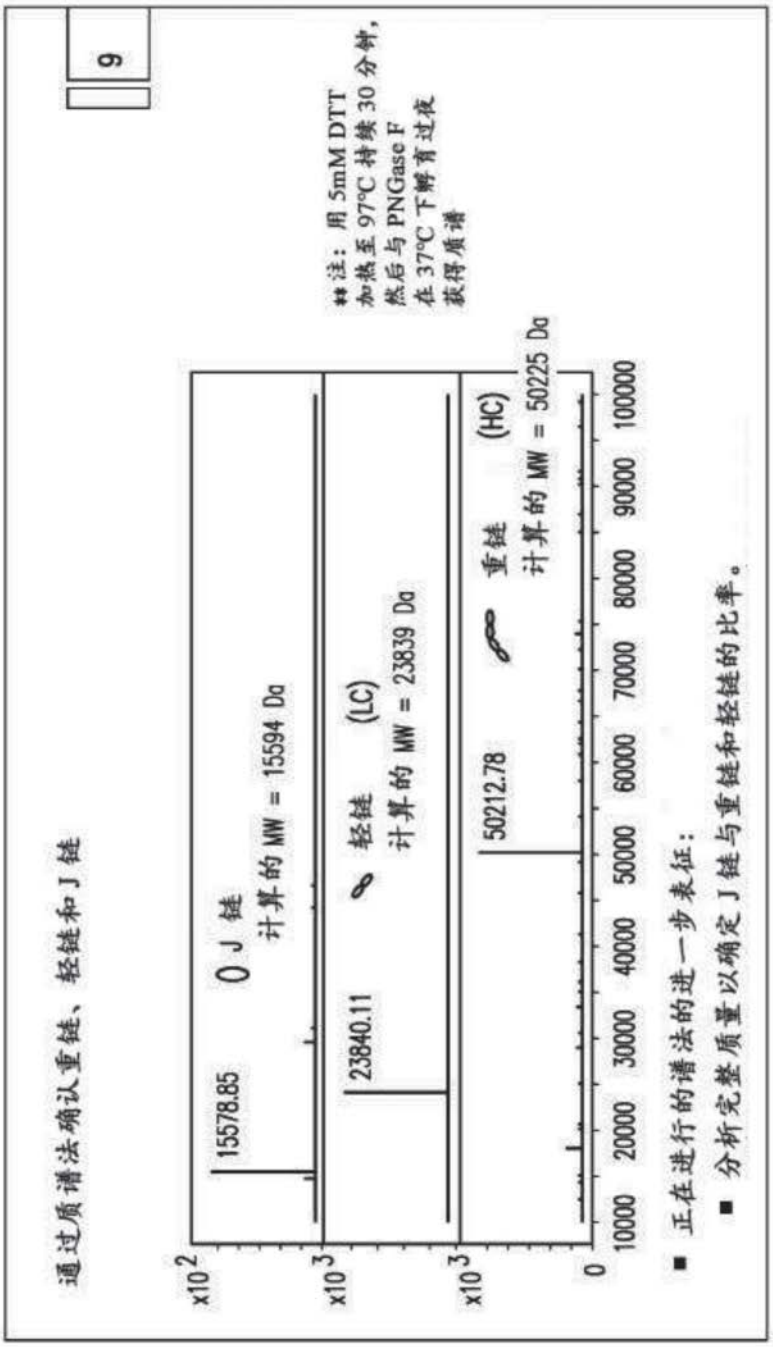
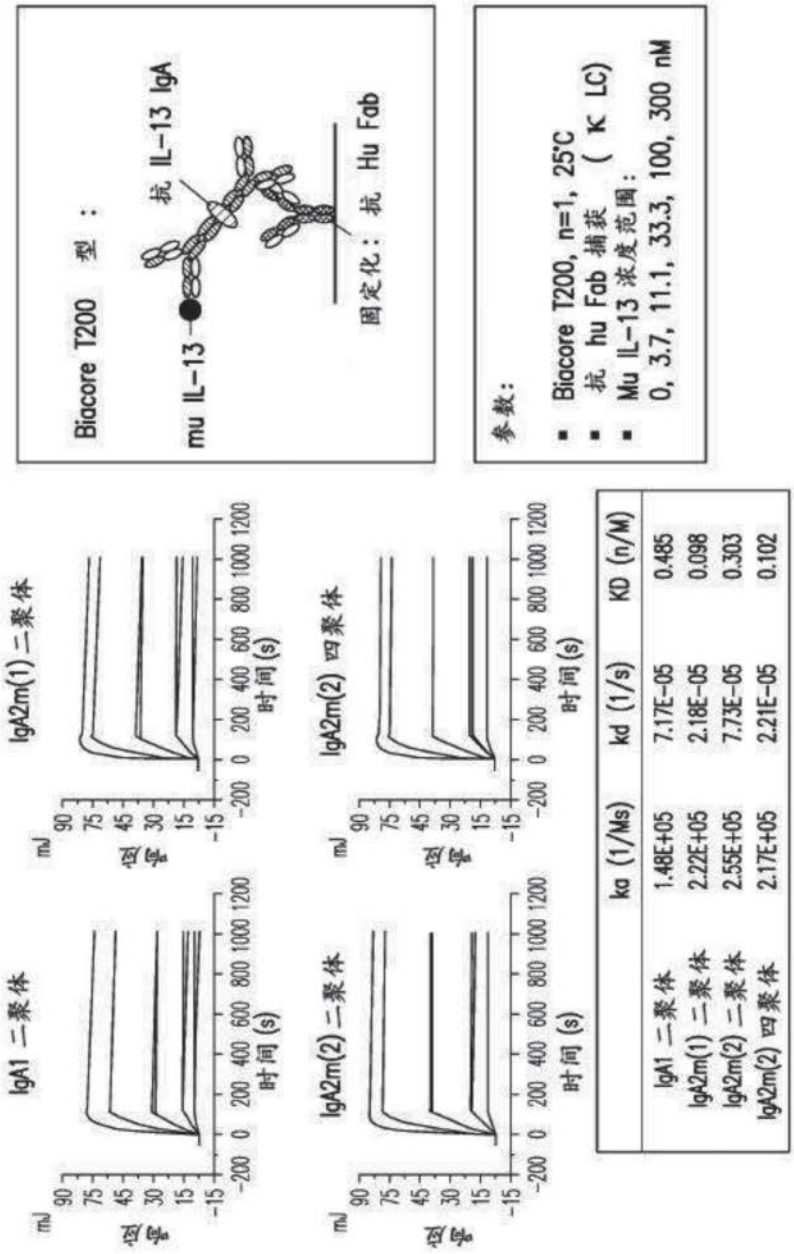

9
通过质谱法确认重链、轻链和J链
15578.85
J链
计算的 MW = 15594 Da
23840.11
轻链 (LC)
计算的 MW = 23839 Da
50212.78
重链 (HC)
计算的 MW = 50225 Da
x10 2
x10 3
x10 3
0
10000 20000 30000 40000 50000 60000 70000 80000 90000 100000
**注：用 5mM DTT
加热至 97°C 持续 30 分钟，
然后与 PNGase F
在 37°C 下孵育过夜
获得质谱
■ 正在进行的谱法的进一步表征：
■ 分析完整质量以确定J链与重链和轻链的比率。

图18E



	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (n/M)
IgA1 二聚体	1.48E+05	7.17E-05	0.485
IgA2m(1) 二聚体	2.22E+05	2.18E-05	0.098
IgA2m(2) 二聚体	2.55E+05	7.73E-05	0.303
IgA2m(2) 四聚体	2.17E+05	2.21E-05	0.102

图19

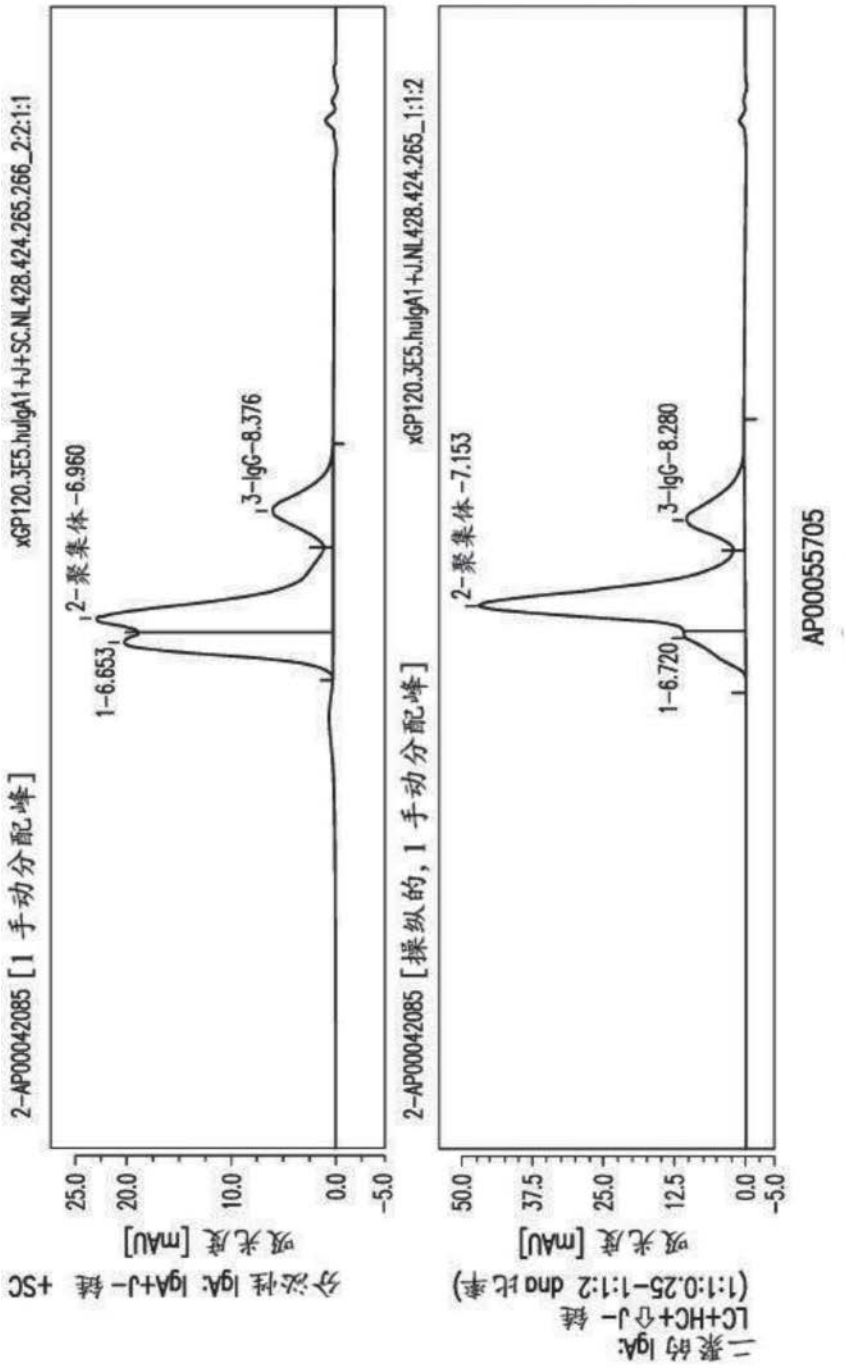

2-AP00042085 [1 手动分配峰]
xGP120.3E5.hulgA1+J+SC.NL428.424.265.266_2:2:1:1
1-6.653
2-聚集体-6.960
3-IgG-8.376
吸光度 [mAU]
25.0
20.0
10.0
0.0
-5.0
分泌性 IgA: IgA+J- 链 +SC
2-AP00042085 [操纵的, 1 手动分配峰]
xGP120.3E5.hulgA1+J.NL428.424.265_1:1:2
1-6.720
2-聚集体-7.153
3-IgG-8.280
吸光度 [mAU]
50.0
37.5
25.0
12.5
0.0
-5.0
二聚的 IgA:
LC+HC+仅J- 链
(1:1:0.25-1:1:2 dno 比率)
AP00055705

图20A

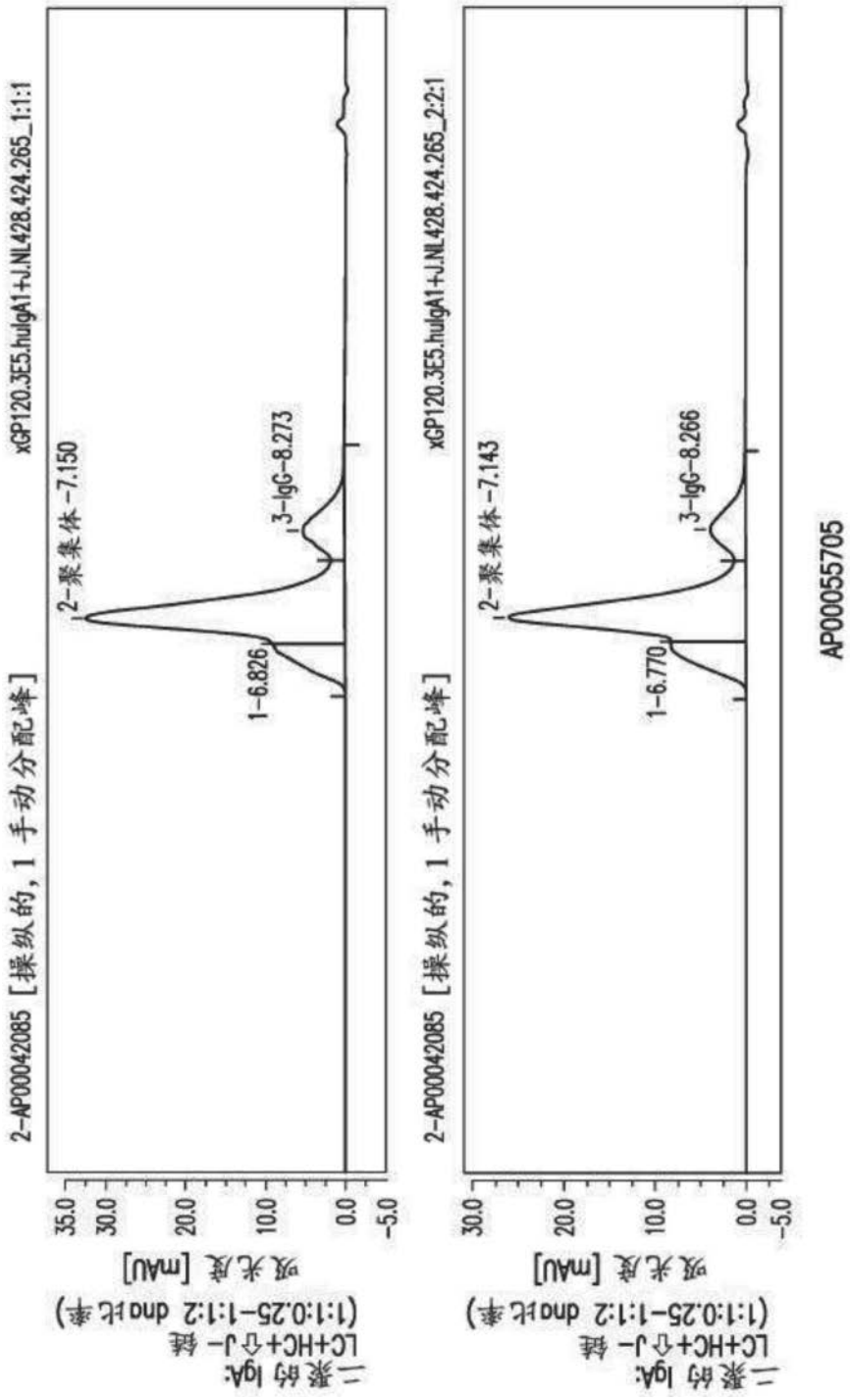

2-AP00042085 [操纵的, 1 手动分配峰]
xGP120.3E5.hulgA1+J.NL428.424.265_1:1:1
2-聚集体-7.150
1-6.826
3-IgG-8.273
二聚的 IgA:
LC+HC+⇧J-链
(1:1:0.25-1:1:2 dnaIt率)
吸光度 [mAU]
35.0
30.0
20.0
10.0
0.0
-5.0
2-AP00042085 [操纵的, 1 手动分配峰]
xGP120.3E5.hulgA1+J.NL428.424.265_2:2:1
2-聚集体-7.143
1-6.770
3-IgG-8.266
二聚的 IgA:
LC+HC+⇧J-链
(1:1:0.25-1:1:2 dnaIt率)
吸光度 [mAU]
30.0
20.0
10.0
0.0
-5.0
AP00055705

图20A续1

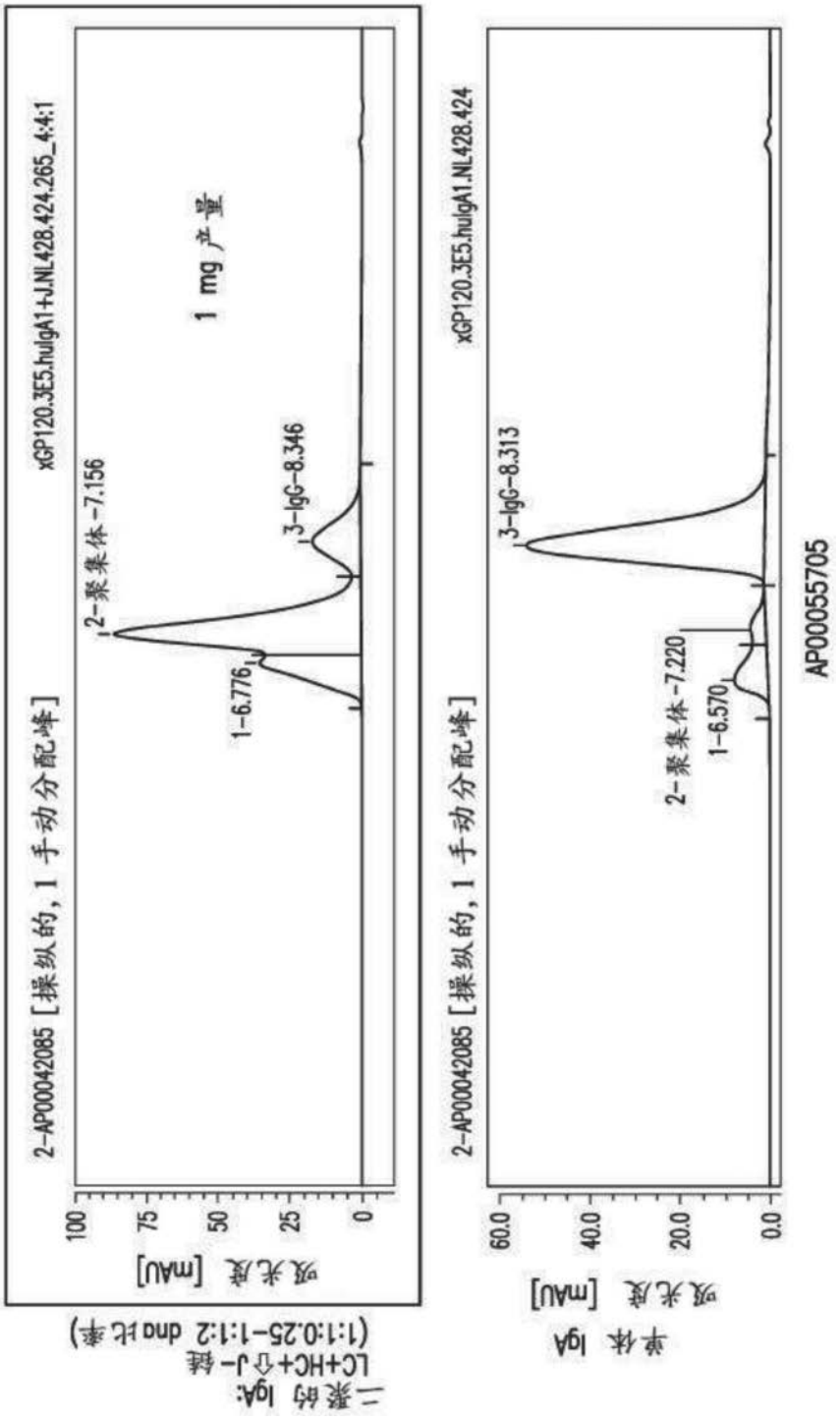

二聚的 IgA:
LC+HC+⇩J-链
(1:1:0.25-1:1:2 dna比率)
吸光度 [mAU]
100
75
50
25
0
2-AP00042085 [操纵的, 1 手动分配峰]
xGP120.3E5.hulgA1+J.NL428.424.265_4:4:1
1 mg 产量
1-6.776
2-聚集体-7.156
3-IgG-8.346
单体 IgA
吸光度 [mAU]
60.0
40.0
20.0
0.0
2-AP00042085 [操纵的, 1 手动分配峰]
xGP120.3E5.hulgA1.NL428.424
1-6.570
2-聚集体-7.220
3-IgG-8.313
AP00055705

图20A续2

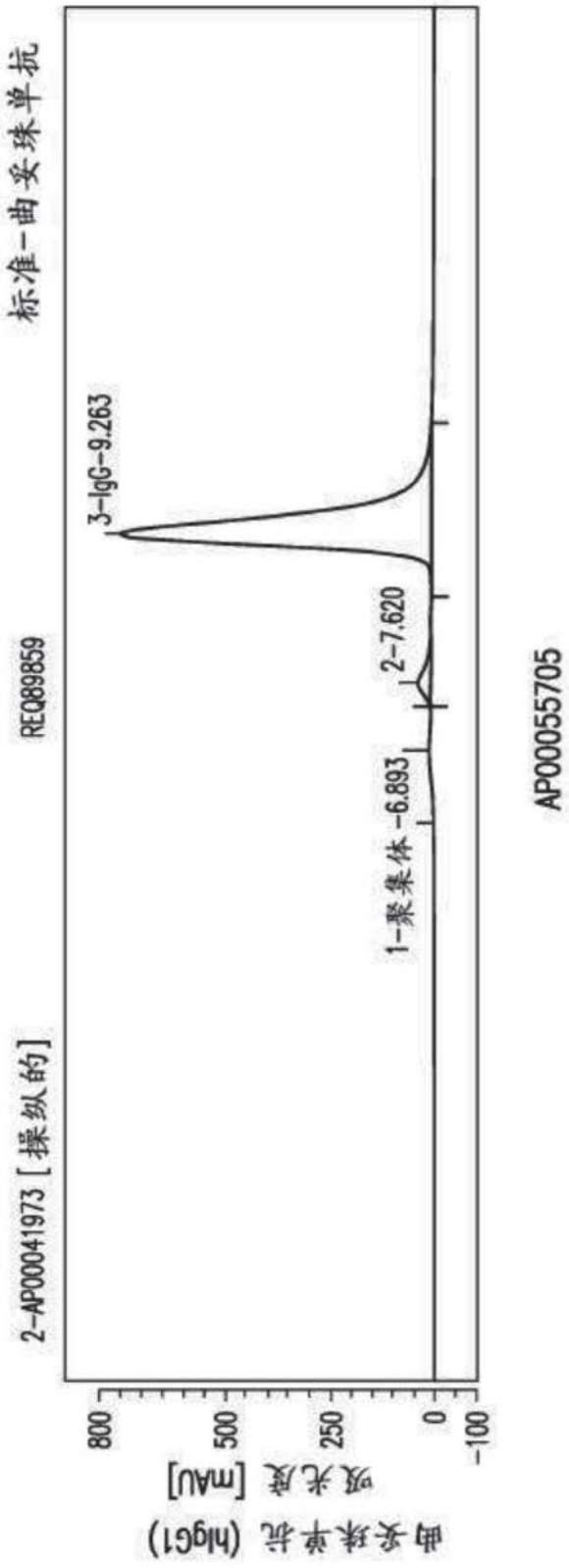

标准-曲妥珠单抗
REQ89859
AP00055705
2-AP00041973 [探纵的]
3-IgG-9.263
2-7.620
1-聚集体-6.893
曲妥珠单抗 (hIgG1)
吸光度 [mAU]
800
500
250
0
-100

图20A续3

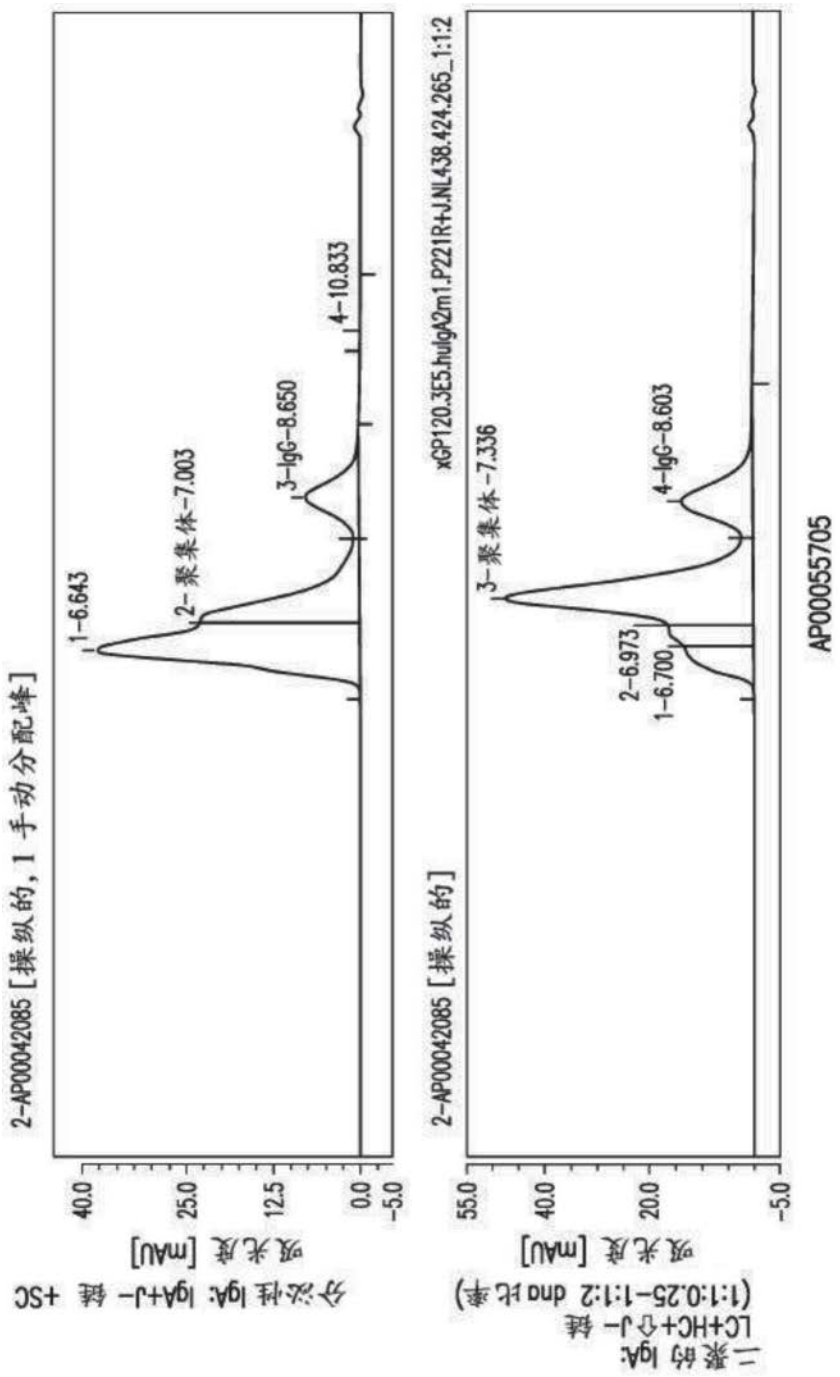

2-AP00042085 [操纵的，1 手动分配峰]
1-6.643
2-聚集体-7.003
3-IgG-8.650
4-10.833
40.0
25.0
12.5
0.0
-5.0
分泌性 IgA: IgA+J-链 +SC
吸光度 [mAU]
2-AP00042085 [操纵的]
xGP120.3E5.hulgA2m1.P221R+J.NL438.424.265_1:1:2
3-聚集体-7.336
4-IgG-8.603
2-6.973
1-6.700
55.0
40.0
20.0
-5.0
二聚的 IgA:
LC+HC+⇧J-链
(1:1:0.25-1:1:2 dna 比率)
吸光度 [mAU]
AP00055705

图20B

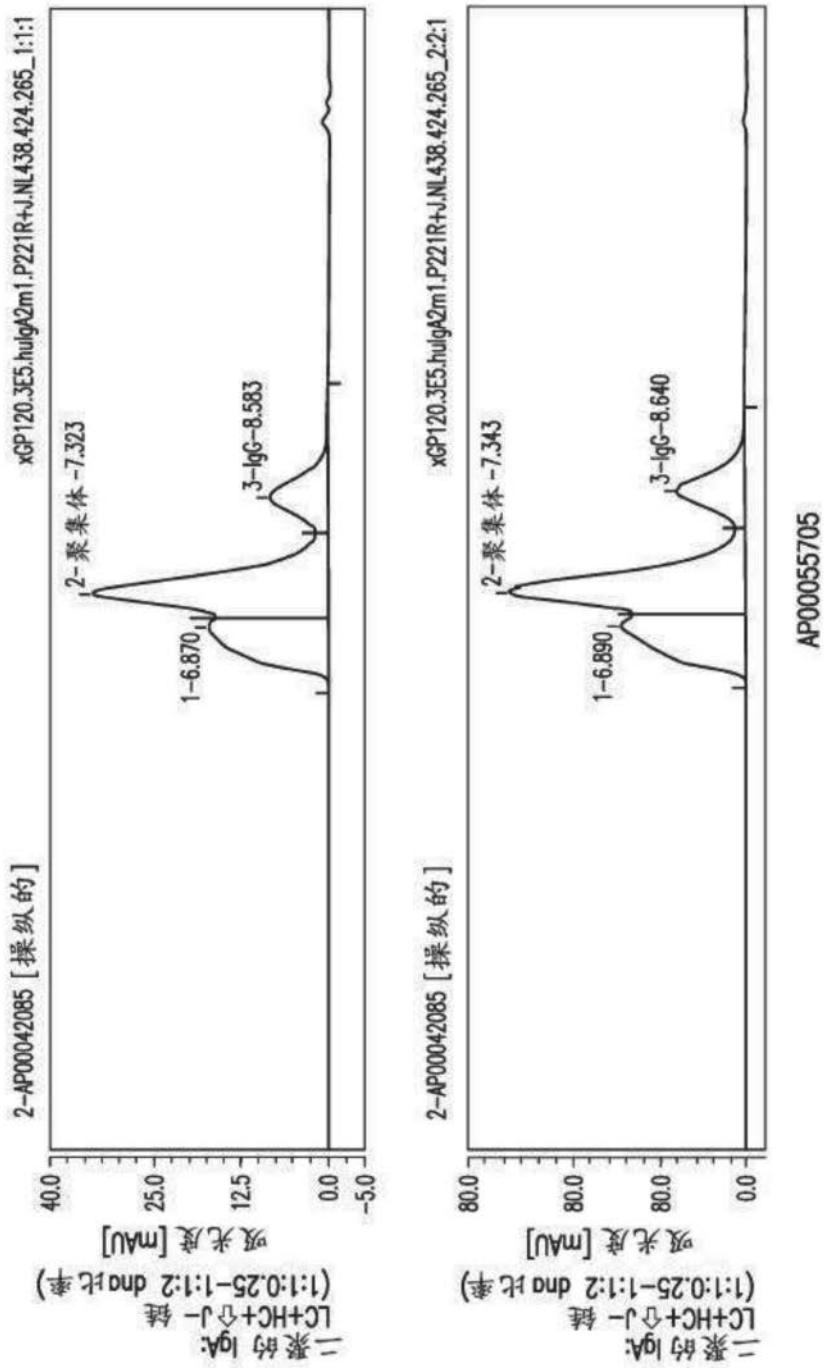

xGP120.3E5.hulgA2m1.P221R+J.NL438.424.265_1:1:1
2-AP00042085 [操纵的]
2-聚集体-7.323
3-IgG-8.583
1-6.870
40.0
25.0
12.5
0.0
-5.0
吸光度 [mAU]
二聚的 IgA:
LC+HC+⇩J- 链
(1:1:0.25-1:1:2 dnp比率)
xGP120.3E5.hulgA2m1.P221R+J.NL438.424.265_2:2:1
2-AP00042085 [操纵的]
2-聚集体-7.343
3-IgG-8.640
1-6.890
80.0
80.0
80.0
0.0
吸光度 [mAU]
二聚的 IgA:
LC+HC+⇩J- 链
(1:1:0.25-1:1:2 dnp比率)
AP00055705

图20B续1

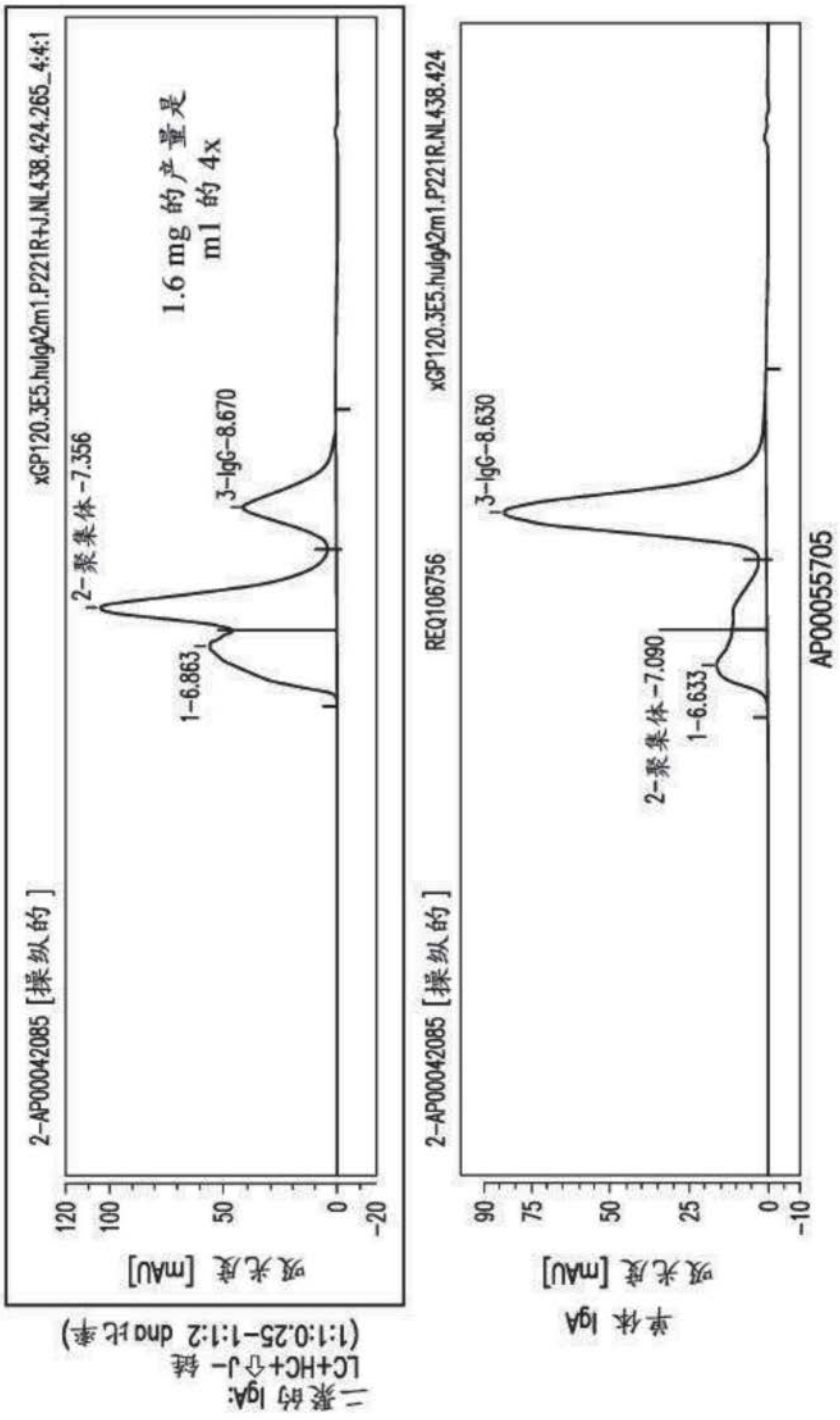

二聚的 IgA:
LC+HC+小J- 链
(1:1:0.25-1:1:2 dna比率)
吸光度 [mAU]
2-AP00042085 [操纵的]
xGP120.3E5.huIgA2m1.P221R+J.NL.438.424.265_4:4:1
1-6.863
2-聚集体-7.356
3-IgG-8.670
1.6 mg 的产量是
m1 的 4x
单体 IgA
吸光度 [mAU]
2-AP00042085 [操纵的]
REQ106756
xGP120.3E5.huIgA2m1.P221R.NL.438.424
2-聚集体-7.090
1-6.633
3-IgG-8.630
AP00055705

图20B续2

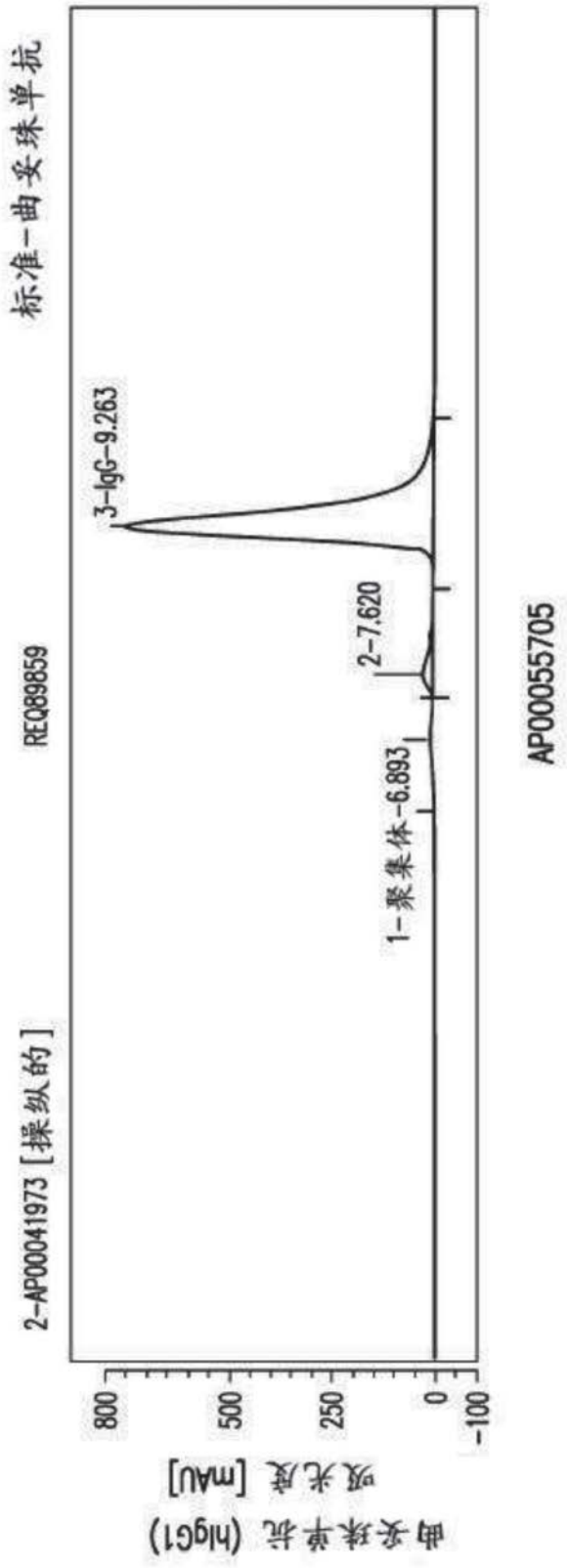

标准-曲妥珠单抗
REQ89859
AP00055705
2-AP00041973 [操纵的]
3-IgG-9.263
2-7.620
1-聚集体-6.893
曲妥珠单抗 (hIgG1)
吸光度 [mAU]
800
500
250
0
-100

图20B续3

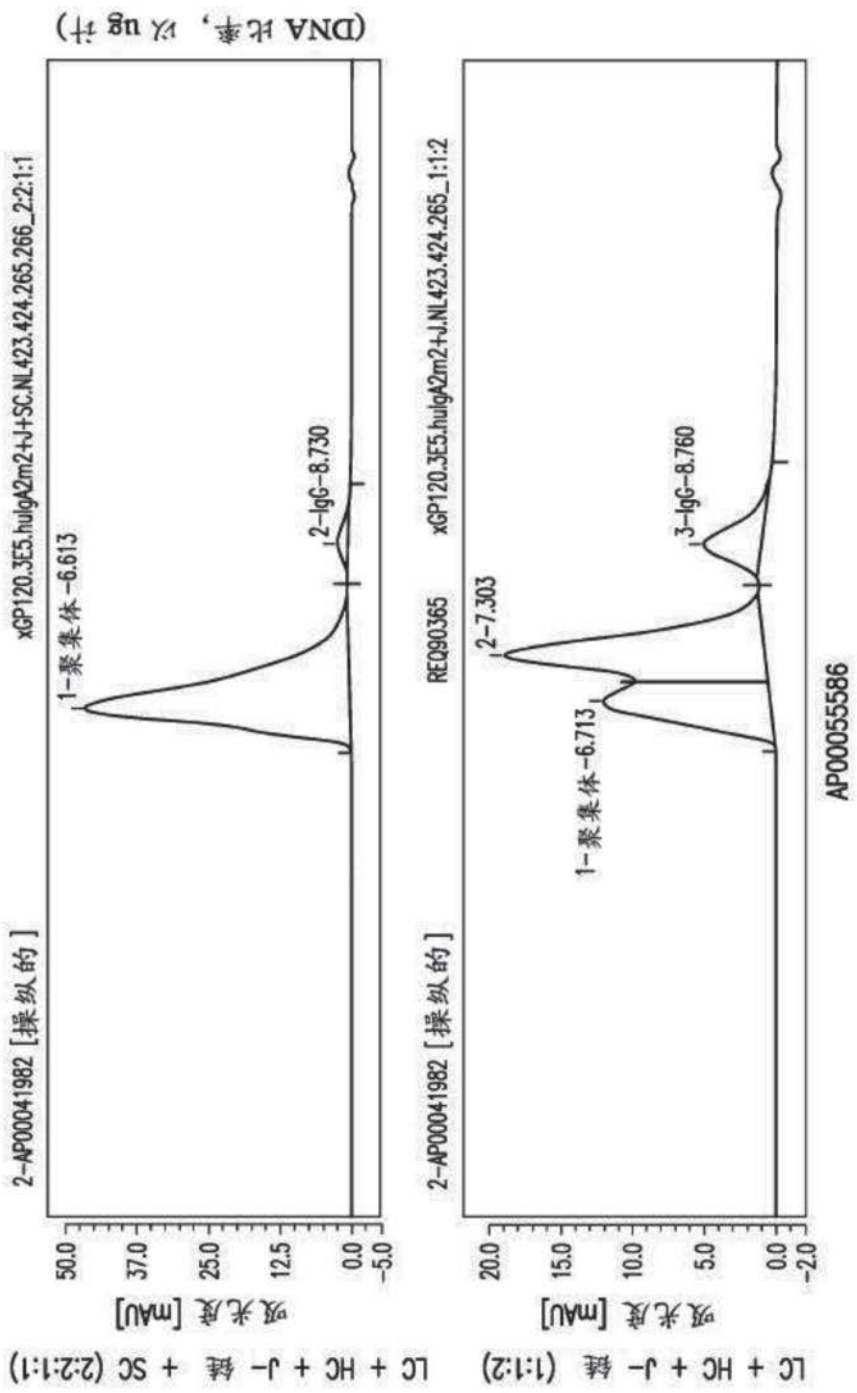

(DNA 比率，以 ug 计)
LC + HC + J- 链 + SC (2:2:1:1)
吸光度 [mAU]
2-AP00041982 [操纵的]
xGP120.3E5.hulgA2m2+J+SC.NL423.424.265.266_2:2:1:1
1-聚集体-6.613
2-IgG-8.730
50.0
37.0
25.0
12.5
0.0
-5.0
LC + HC + J- 链 (1:1:2)
吸光度 [mAU]
2-AP00041982 [操纵的]
RE090365
xGP120.3E5.hulgA2m2+J.NL423.424.265_1:1:2
2-7.303
1-聚集体-6.713
3-IgG-8.760
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
-2.0
AP00055586

图21

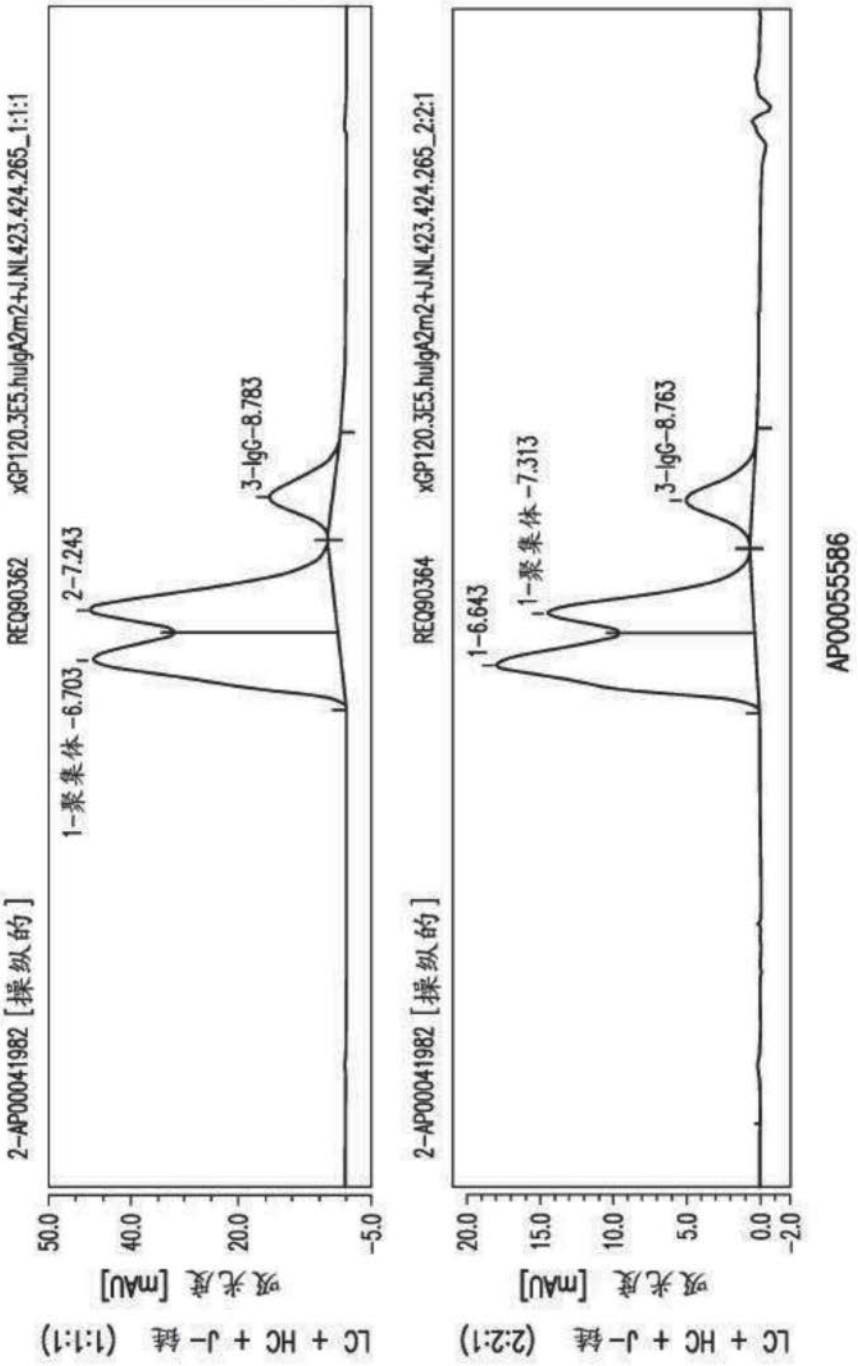

2-AP00041982 [操纵的]
REQ90362
xGP120.3E5.hulgA2m2+J.NL423.424.265_1:1:1
1-聚集体-6.703
2-7.243
3-IgG-8.783
LC + HC + J-链 (1:1:1)
吸光度 [mAU]
50.0
40.0
20.0
-5.0
2-AP00041982 [操纵的]
REQ90364
xGP120.3E5.hulgA2m2+J.NL423.424.265_2:2:1
1-6.643
1-聚集体-7.313
3-IgG-8.763
LC + HC + J-链 (2:2:1)
吸光度 [mAU]
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
-2.0
AP00055586

图21续1

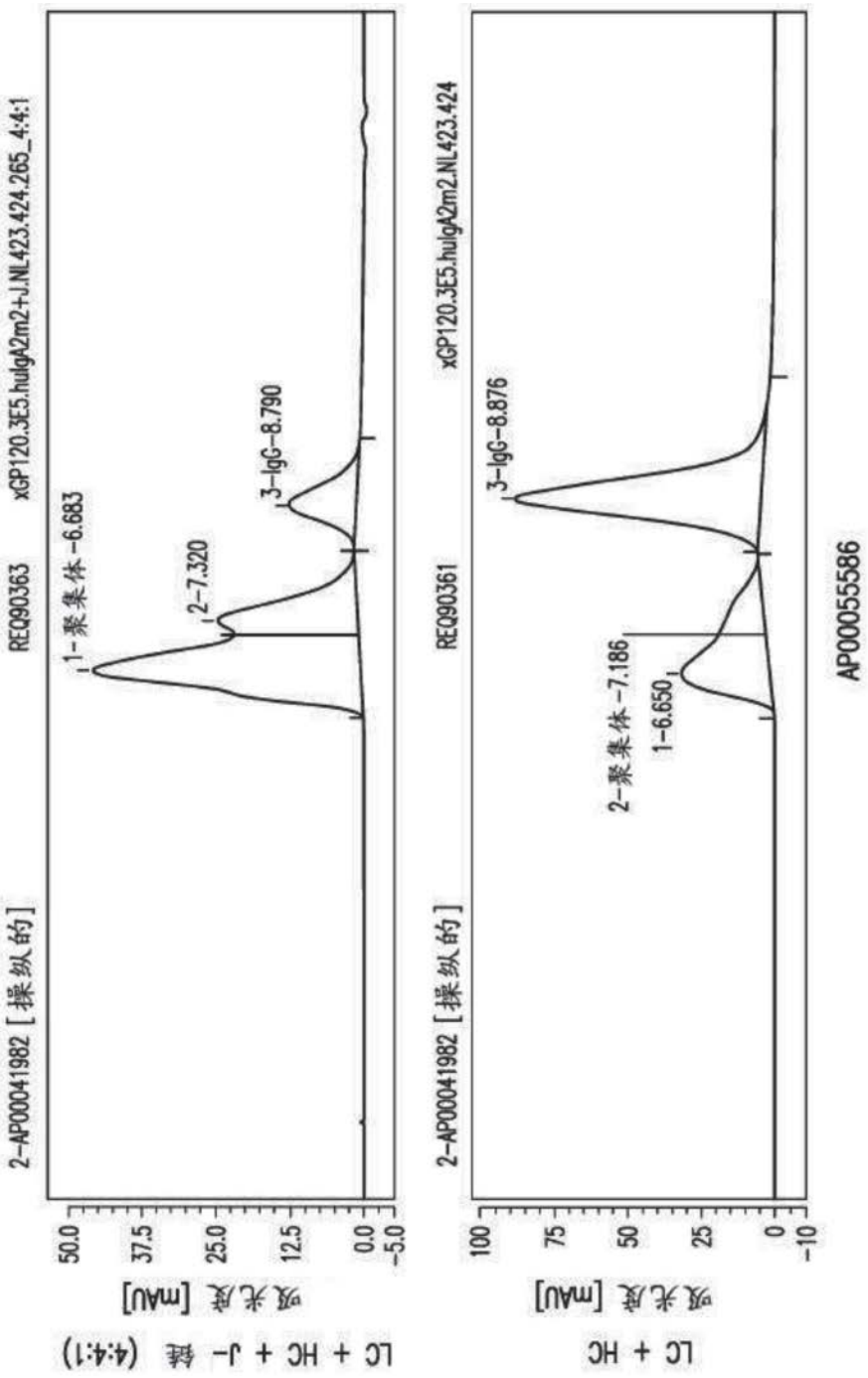

2-AP00041982 [操纵的]
REQ90363
xGP120.3E5.hulgA2m2+J.NL423.424.265_4:4:1
1-聚集体-6.683
2-7.320
3-IgG-8.790
LC + HC + J- 链 (4:4:1)
吸光度 [mAU]
50.0
37.5
25.0
12.5
0.0
-5.0
2-AP00041982 [操纵的]
REQ90361
xGP120.3E5.hulgA2m2.NL423.424
3-IgG-8.876
2-聚集体-7.186
1-6.650
LC + HC
吸光度 [mAU]
100
75
50
25
0
-10
AP00055586

图21续2

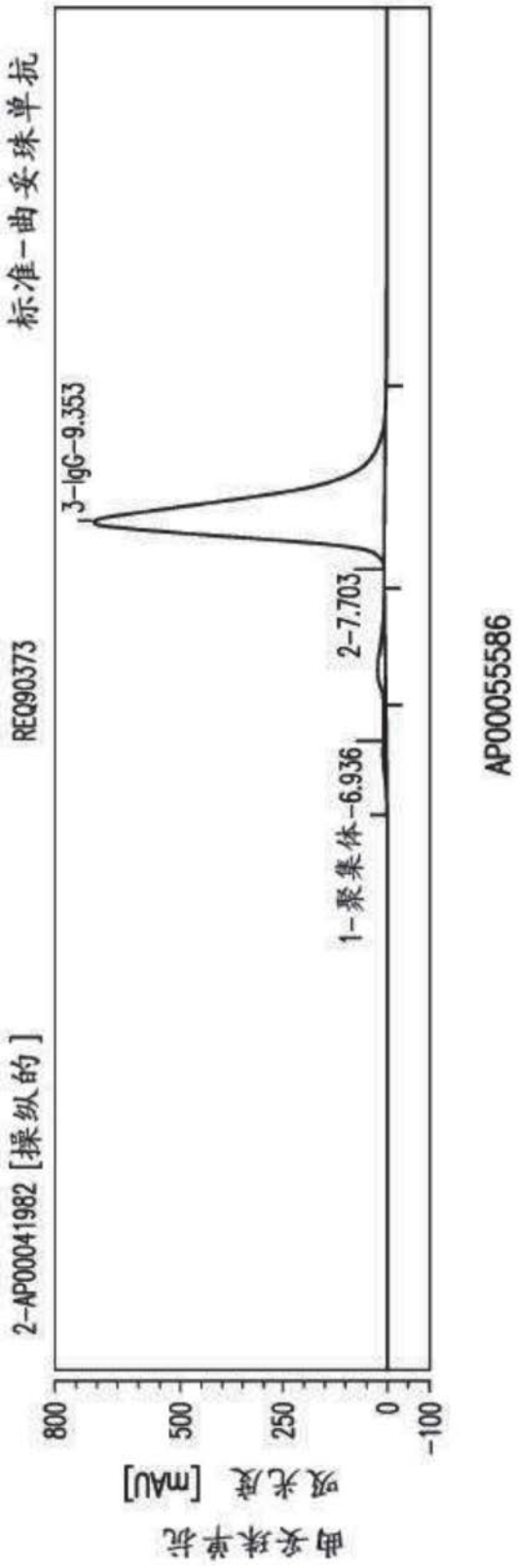

标准-曲安珠单抗
REQ90373
AP00055586
2-AP00041982 [操纵的]
3-IgG-9.353
2-7.703
1-聚集体-6.936
800
500
250
0
-100
[mAU]
吸光度
曲安珠单抗

图21续3

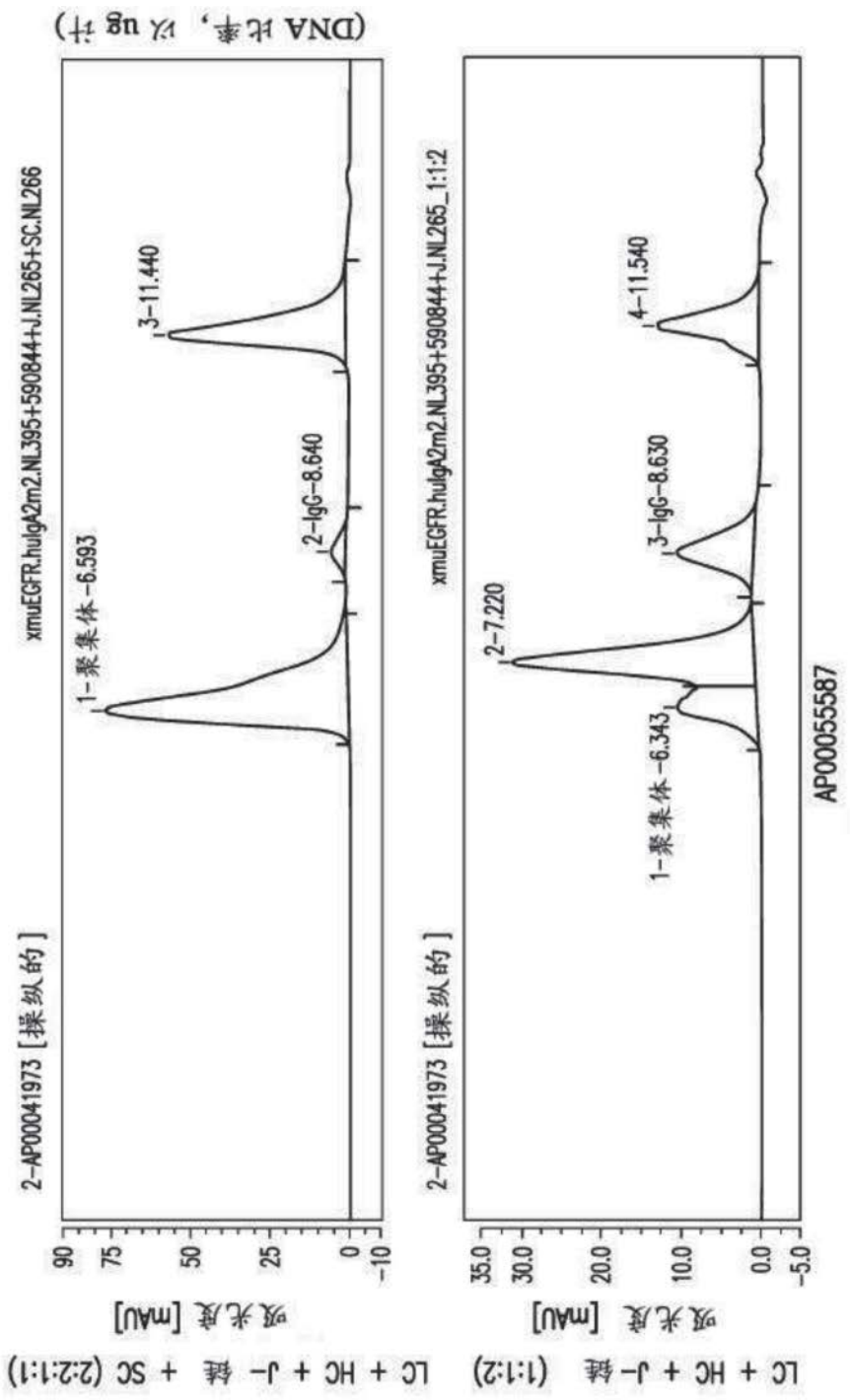

LC + HC + J- 链 (1:1:2)
LC + HC + J- 链 + SC (2:2:1:1)
吸光度 [mAU]
2-AP00041973 [操纵的]
xmuEGFR.hulgA2m2.NL395+590844+J.NL265_1:1:2
1-聚集体-6.343
2-7.220
3-IgG-8.630
4-11.540
AP00055587
xmuEGFR.hulgA2m2.NL395+590844+J.NL265+SC.NL266
1-聚集体-6.593
2-IgG-8.640
3-11.440
(DNA 比率, 以 ug 计)

图22

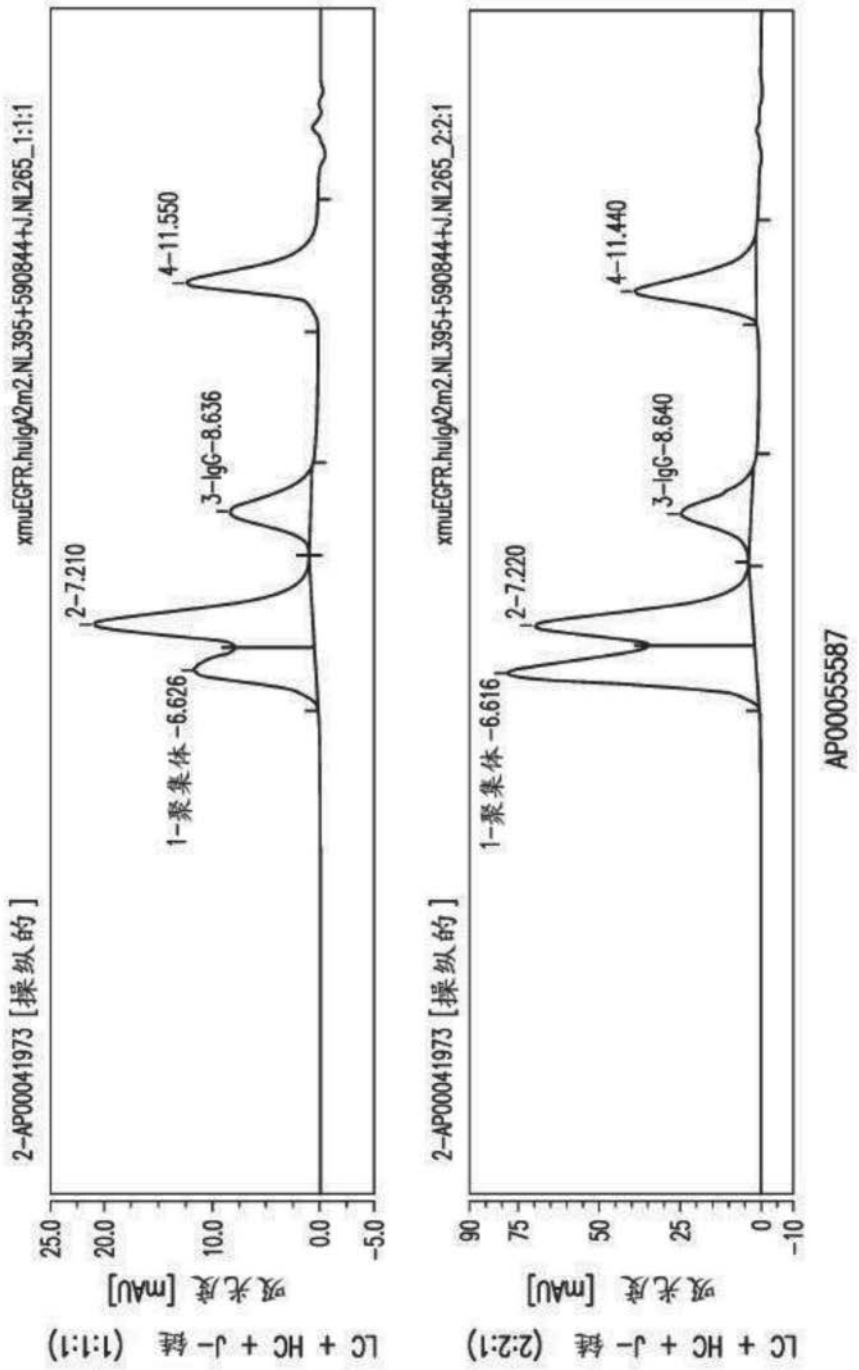

xmuEGFR.huIgA2m2.NL395+590844+J.NL265_1:1:1
2-AP00041973 [操纵的]
1-聚集体 -6.626
2-7.210
3-IgG-8.636
4-11.550
吸光度 [mAU]
25.0
20.0
10.0
0.0
-5.0
LC + HC + J- 链 (1:1:1)
xmuEGFR.huIgA2m2.NL395+590844+J.NL265_2:2:1
2-AP00041973 [操纵的]
1-聚集体 -6.616
2-7.220
3-IgG-8.640
4-11.440
吸光度 [mAU]
90
75
50
25
0
-10
LC + HC + J- 链 (2:2:1)
AP00055587

图22续1

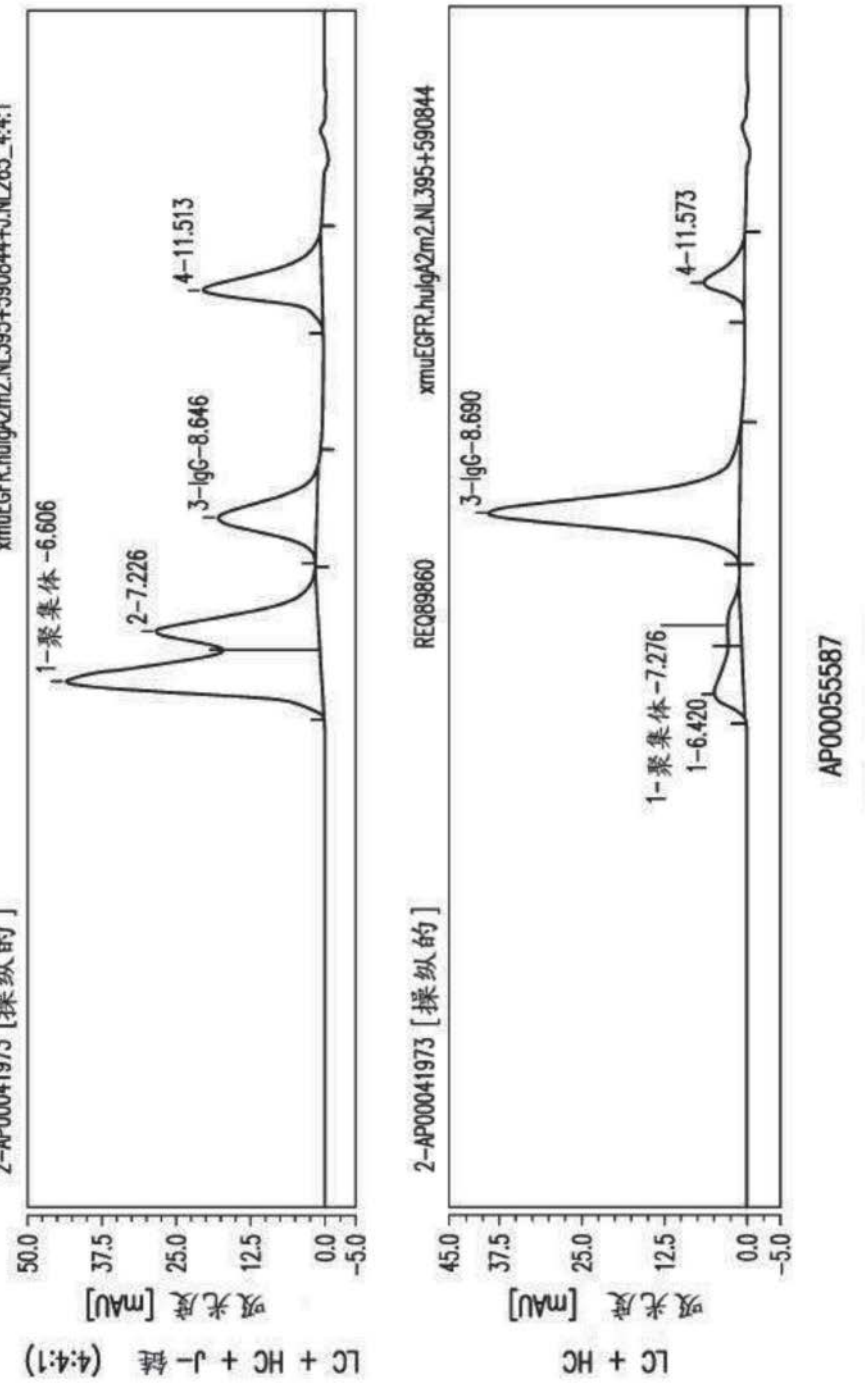

2-AP00041973 [操纵的]
xmuEGFR.hulgA2m2.NL395+590844+JNL265_4:4:1
1-聚集体 -6.606
2-7.226
3-IgG-8.646
4-11.513
LC + HC + J- 链 (4:4:1)
吸光度 [mAU]
50.0
37.5
25.0
12.5
0.0
-5.0
2-AP00041973 [操纵的]
REQ89860
xmuEGFR.hulgA2m2.NL395+590844
3-IgG-8.690
1-聚集体-7.276
1-6.420
4-11.573
LC + HC
吸光度 [mAU]
45.0
37.5
25.0
12.5
0.0
-5.0
AP00055587

图22续2

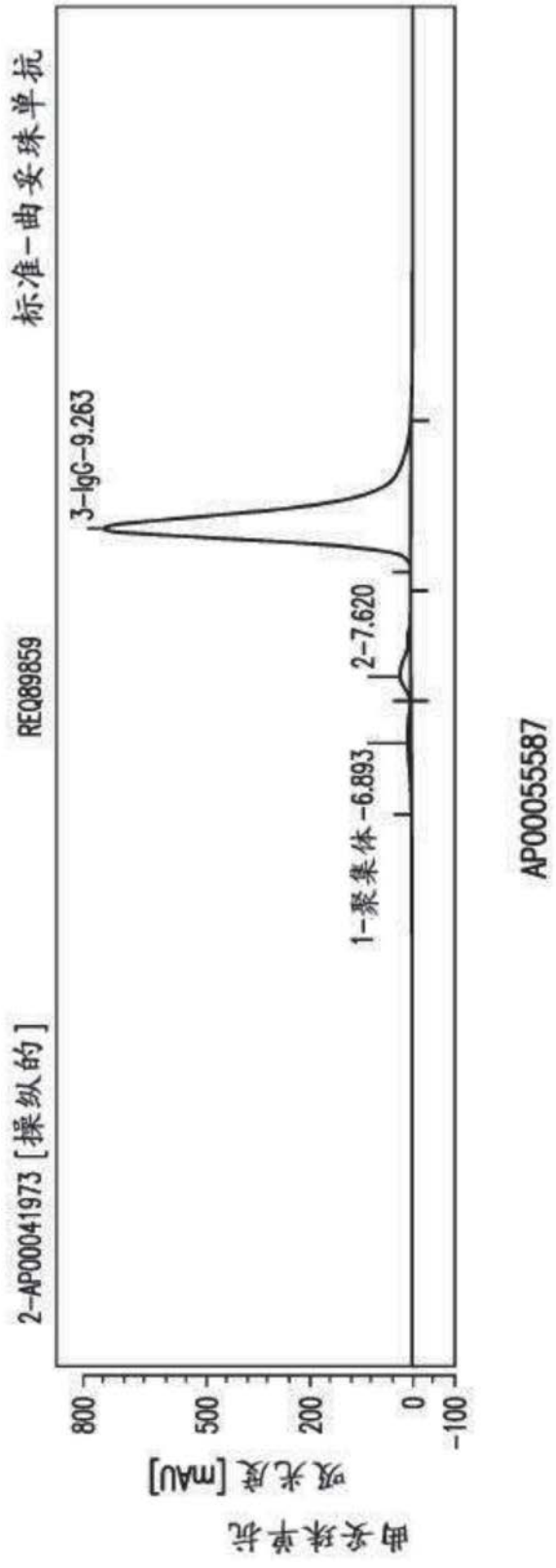

曲安珠单抗
吸光度 [mAU]
800
500
200
0
-100
2-AP00041973 [操纵的]
RE089859
标准-曲安珠单抗
3-IgG-9.263
2-7.620
1-聚集体-6.893
AP00055587

图22续3

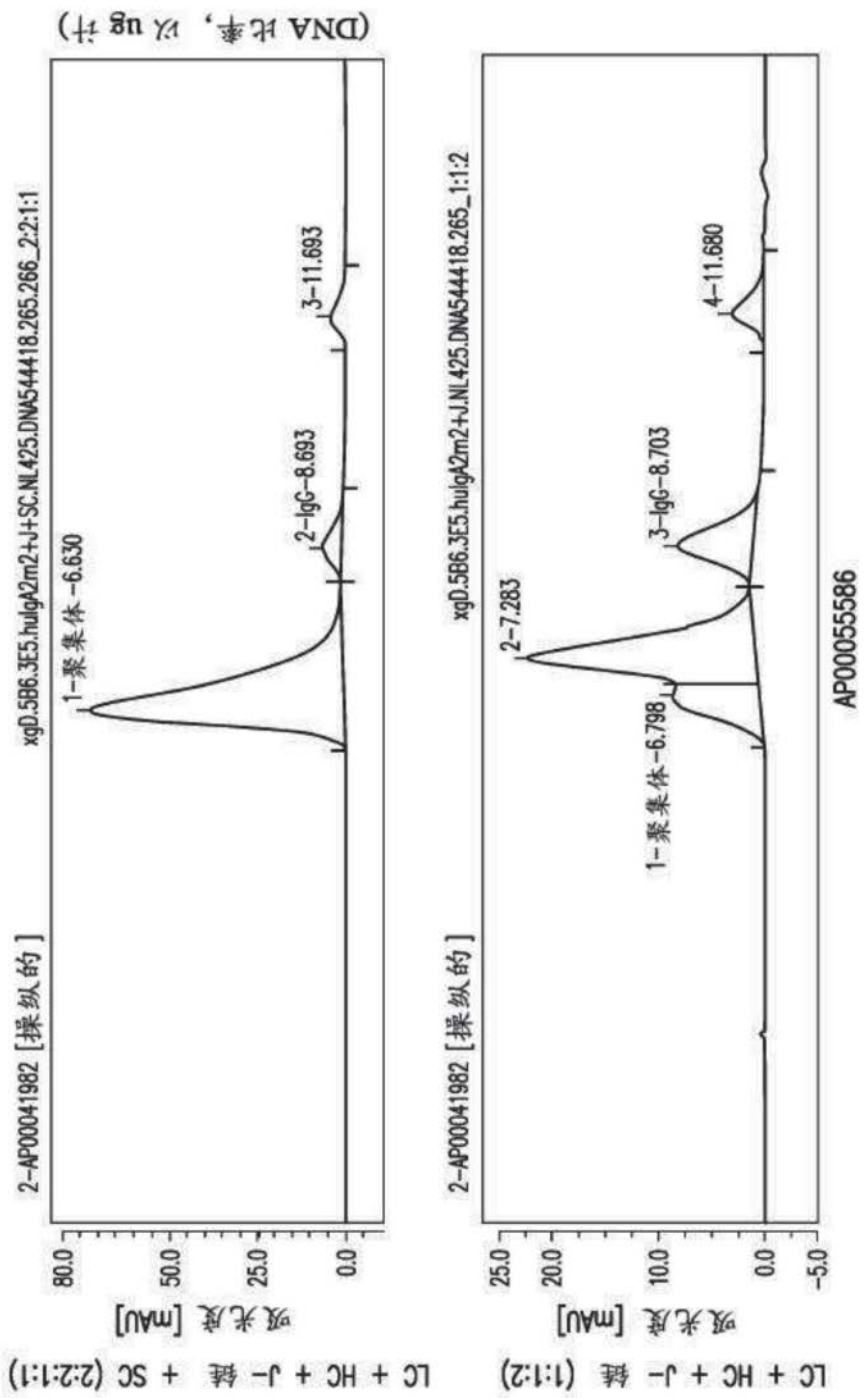

(DNA 比率，以 ug 计)
2-AP00041982 [操纵的]
xg0.5B6.3E5.huIgA2m2+J+SC.NL425.DNA544418.265.266_2:2:1:1
1-聚集体-6.630
2-IgG-8.693
3-11.693
吸光度 [mAU]
80.0
50.0
25.0
0.0
LC + HC + J- 链 + SC (2:2:1:1)
2-AP00041982 [操纵的]
xg0.5B6.3E5.huIgA2m2+J.NL425.DNA544418.265_1:1:2
2-7.283
1-聚集体-6.798
3-IgG-8.703
4-11.680
吸光度 [mAU]
25.0
20.0
10.0
0.0
-5.0
LC + HC + J- 链 (1:1:2)
AP00055586

图23

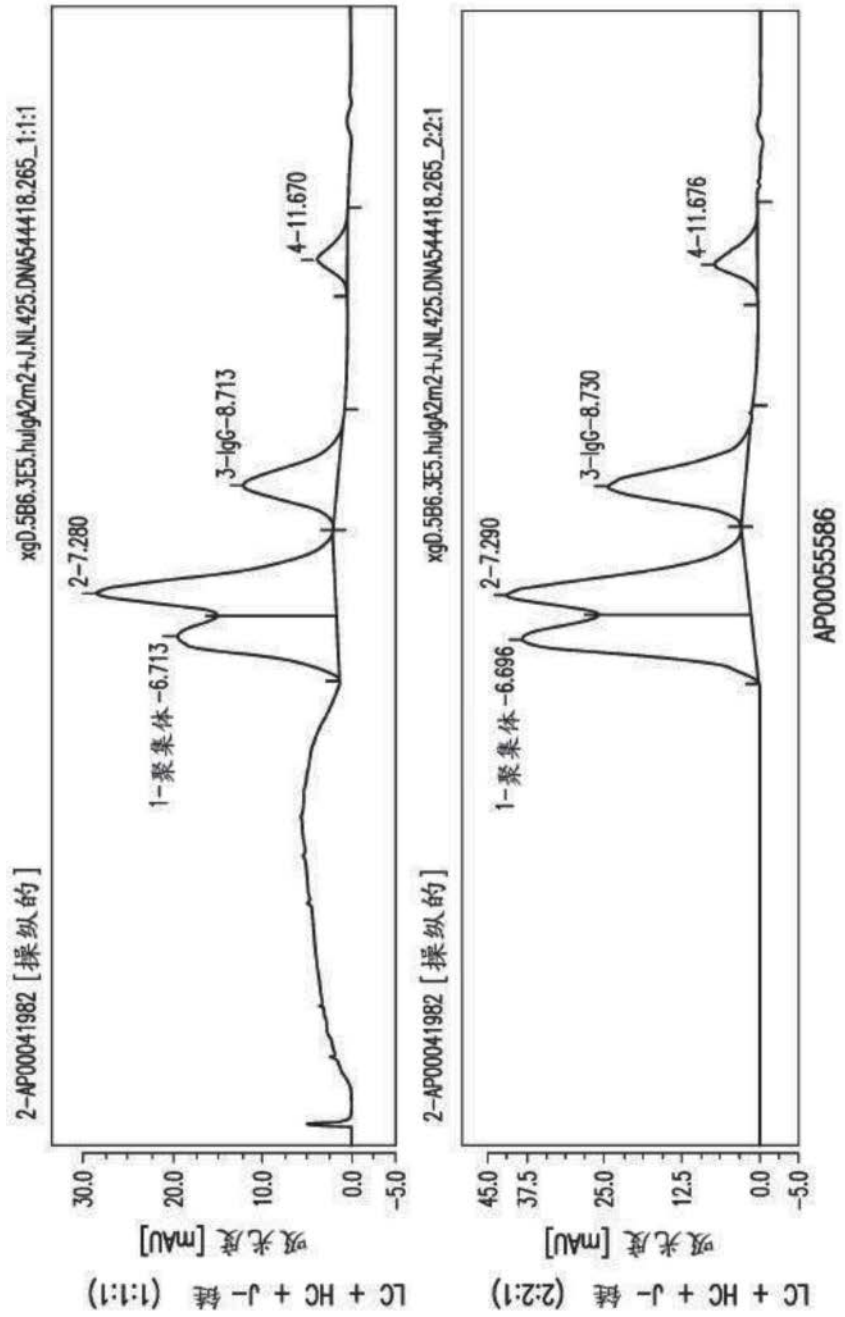

LC + HC + J- 链 (1:1:1)
吸光度 [mAU]
30.0
20.0
10.0
0.0
-5.0
2-AP00041982 [操纵.的]
xgD.5B6.3E5.hulgA2m2+J.NL425.DNA544418.265_1:1:1
1-聚集体-6.713
2-7.280
3-IgG-8.713
4-11.670
LC + HC + J- 链 (2:2:1)
吸光度 [mAU]
45.0
37.5
25.0
12.5
0.0
-5.0
2-AP00041982 [操纵.的]
xgD.5B6.3E5.hulgA2m2+J.NL425.DNA544418.265_2:2:1
1-聚集体-6.696
2-7.290
3-IgG-8.730
4-11.676
AP00055586

图23续1

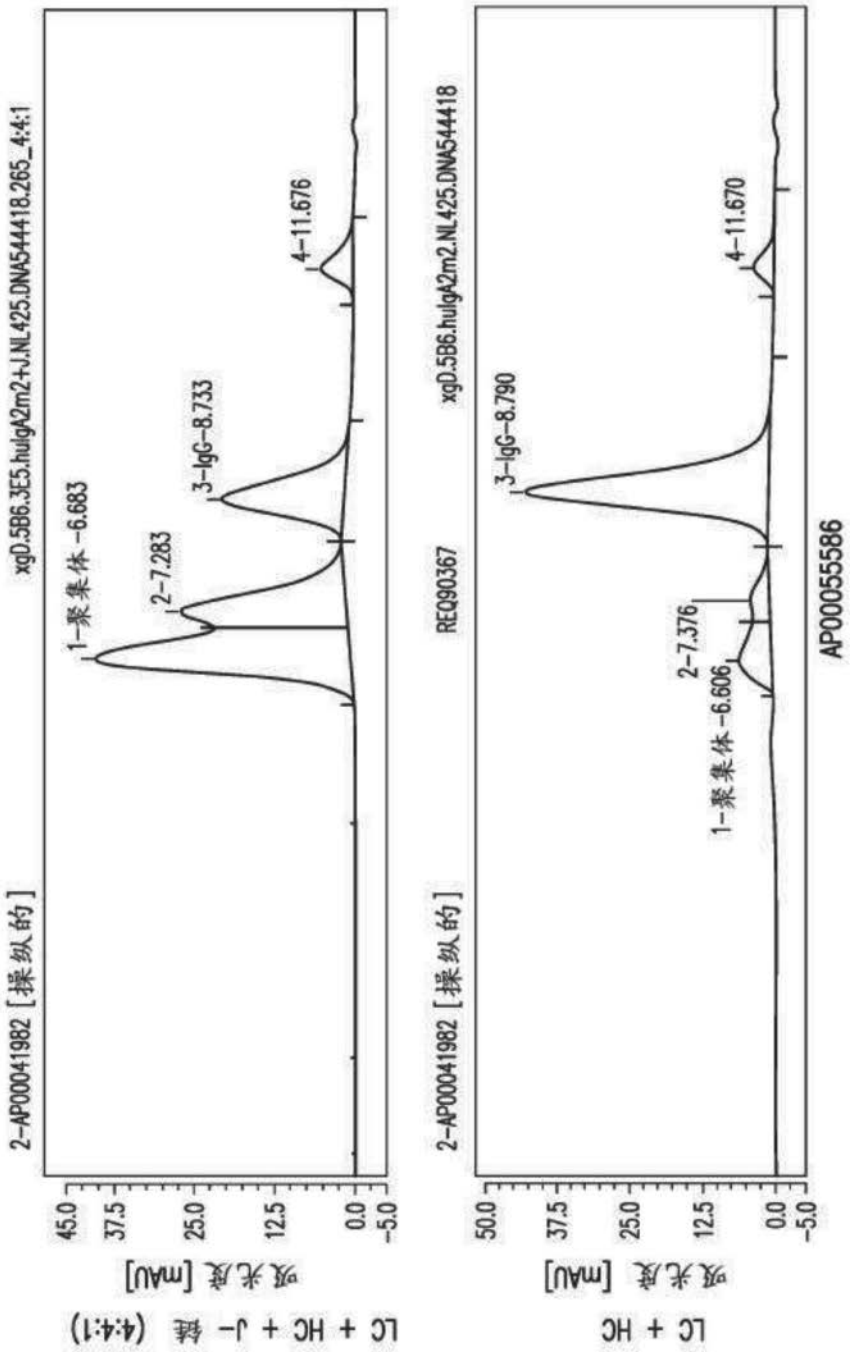

2-AP00041982 [操纵的]
xgD.5B6.3E5.hulgA2m2+J.NL425.DNA544418.265_4:4:1
1-聚集体 -6.683
2-7.283
3-IgG-8.733
4-11.676
LC + HC + J- 链 (4:4:1)
吸光度 [mAU]
45.0
37.5
25.0
12.5
0.0
-5.0
2-AP00041982 [操纵的]
REQ90367
xgD.5B6.hulgA2m2.NL425.DNA544418
3-IgG-8.790
2-7.376
1-聚集体 -6.606
4-11.670
LC + HC
吸光度 [mAU]
50.0
37.5
25.0
12.5
0.0
-5.0
AP00055586

图23续2

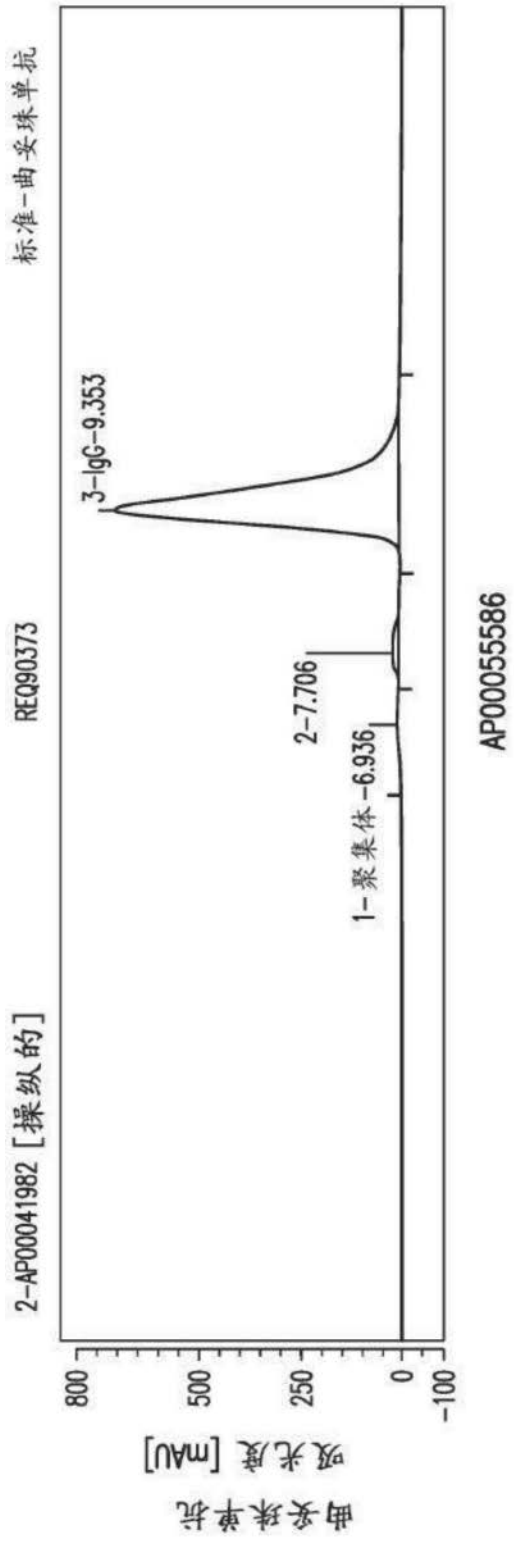
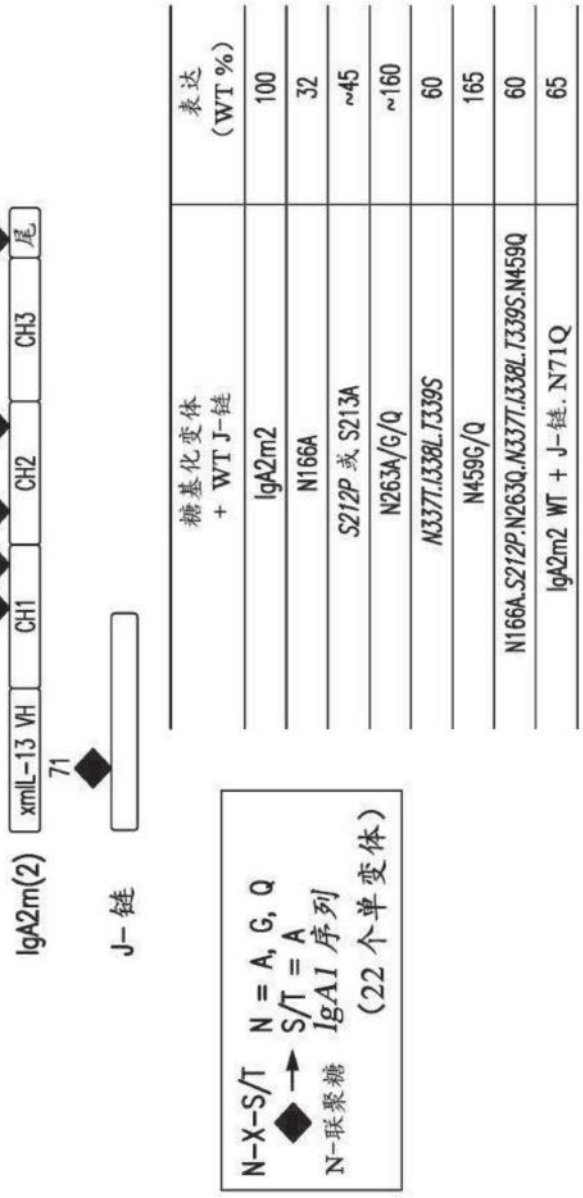
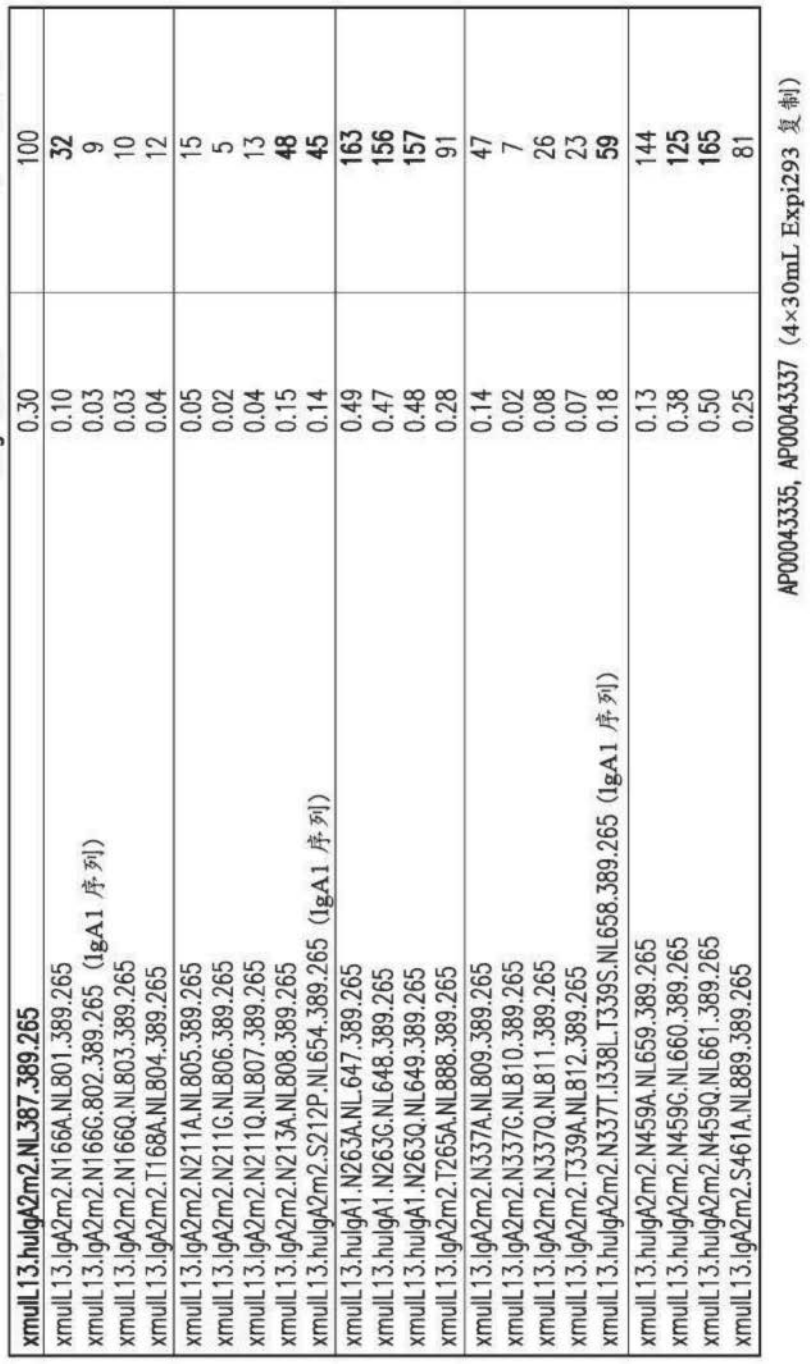

标准-曲妥珠单抗
REQ90373
2-AP00041982 [操纵的]
3-IgG-9.353
2-7.706
1-聚集体-6.936
AP00055586
800
500
250
0
-100
吸光度 [mAU]
曲妥珠单抗

图23续3



糖基化变体 + WT J-链	表达 (WT %)
IgA2m2	100
N166A	32
S212P 或 S213A	~45
N263A/G/Q	~160
N337T.I338L.T339S	60
N459G/Q	165
N166A.*S212P*.N263Q.*N337T.I338L.T339S*.N459Q	60
IgA2m2 WT + J-链. N71Q	65

图24A



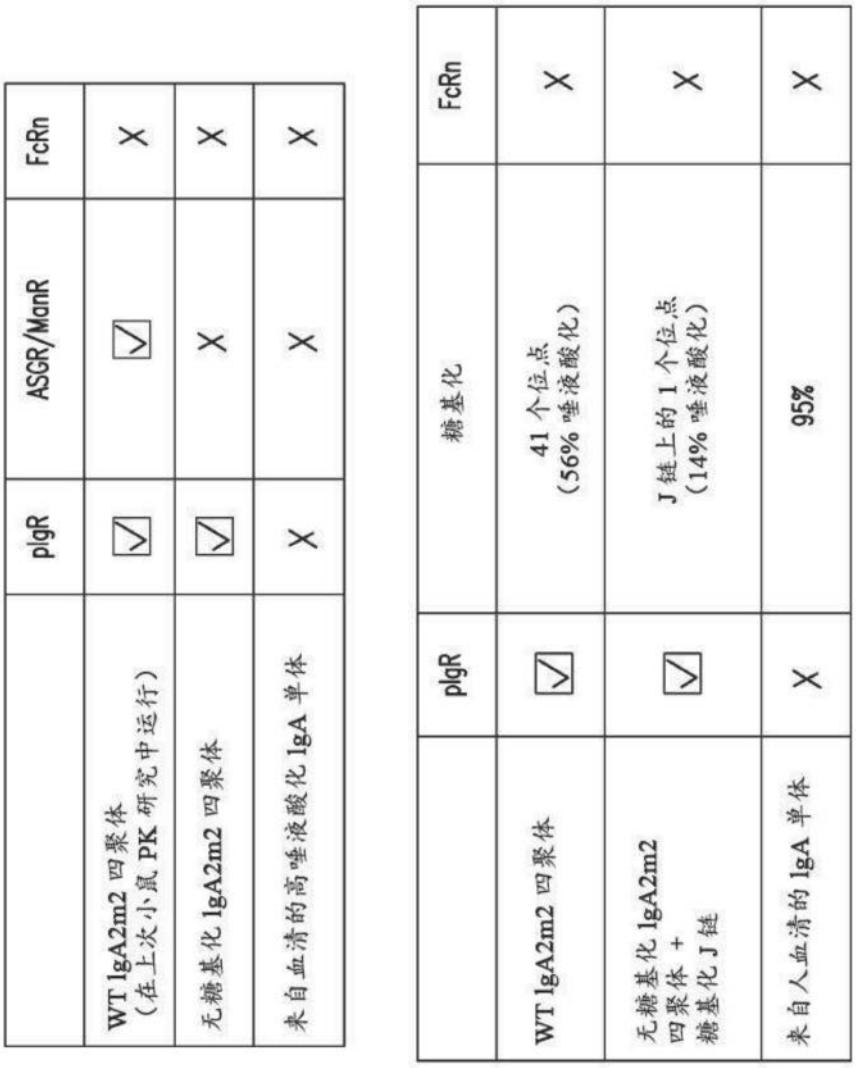
xmulL13.hulgA2m2.NL387.389.265	Avg OD280	归一化为 WT
xmulL13.IgA2m2.N166A.NL801.389.265	0.10	**32**
xmulL13.IgA2m2.N166G.802.389.265 (IgA1 序列)	0.03	9
xmulL13.IgA2m2.N166Q.NL803.389.265	0.03	10
xmulL13.IgA2m2.T168A.NL804.389.265	0.04	12
xmulL13.IgA2m2.N211A.NL805.389.265	0.05	15
xmulL13.IgA2m2.N211G.NL806.389.265	0.02	5
xmulL13.IgA2m2.N211Q.NL807.389.265	0.04	13
xmulL13.IgA2m2.N213A.NL808.389.265	0.15	**48**
xmulL13.hulgA2m2.S212P.NL654.389.265 (IgA1 序列)	0.14	**45**
xmulL13.hulgA1.N263A.NL647.389.265	0.49	**163**
xmulL13.hulgA1.N263G.NL648.389.265	0.47	**156**
xmulL13.hulgA1.N263Q.NL649.389.265	0.48	**157**
xmulL13.IgA2m2.T265A.NL888.389.265	0.28	91
xmulL13.IgA2m2.N337A.NL809.389.265	0.14	47
xmulL13.IgA2m2.N337G.NL810.389.265	0.02	7
xmulL13.IgA2m2.N337Q.NL811.389.265	0.08	26
xmulL13.IgA2m2.T339A.NL812.389.265	0.07	23
xmulL13.hulgA2m2.N337T.I338L.T339S.NL658.389.265 (IgA1 序列)	0.18	**59**
xmulL13.hulgA2m2.N459A.NL659.389.265	0.13	144
xmulL13.hulgA2m2.N459G.NL660.389.265	0.38	**125**
xmulL13.hulgA2m2.N459Q.NL661.389.265	0.50	**165**
xmulL13.IgA2m2.S461A.NL889.389.265	0.25	81

AP00043335, AP00043337 (4×30mL Expi293 复制)

图24B

IgA2m2 共有 WT J-链		AVG OD280	归一化为 WT	Ext. Coeff	mg/mL	产量 mg	
AP00043458	xmul.13.IgA2m2 WT	0.24	100	1.15	0.21	0.30	xmul.13.huIgA2m2.NL387.389.265
	xmul.13.IgA2m2.N168G.S214P.N252G.N461G (4)	0.03	12	1.15	0.03	0.04	A2m2.4mer.NL872.389.265
	xmul.13.IgA2m2.N168G.S214P.N252G.N326G (4)	0.06	25	1.15	0.05	0.07	A2m2.4mer.NL905.389.265
	xmul.13.IgA2m2.N168G.S214P.N326G.N461G (4)	0.06	25	1.15	0.05	0.07	A2m2.4mer.NL906.389.265
	xmul.13.IgA2m2.N168G.N252G.N326G.N461G (4)	0.02	8	1.15	0.02	0.02	A2m2.4mer.NL907.389.265
	xmul.13.IgA2m2.S214P.N252G.N326G.N461G (4)	0.08	31	1.15	0.07	0.09	A2m2.4mer.NL908.389.265
	xmul.13.IgA2m2.N168G.S214P.N252G.N326A.N461G (5)	0.02	7	1.15	0.02	0.02	A2m2.5mer.NL873.389.265
	xmul.13.IgA2m2.N168G.S214P.N252G.N326G.N461G (5)	0.03	11	1.15	0.02	0.03	A2m2.5mer.NL874.389.265
	xmul.13.IgA2m2.N168G.S214P.N252G.N326Q.N461G (5)	0.03	10	1.15	0.02	0.03	A2m2.5mer.NL875.389.265
	xmul.13.IgA2m2.N168G.S214P.N252G.T328A.N461G (5)	0.03	10	1.15	0.02	0.03	A2m2.5mer.NL876.389.265
	xmul.13.IgA2m2.N168G.S214P.N252G.N326T.I327L.T328S.N461G (5)	0.10	42	1.15	0.09	0.12	A2m2.5mer.NL877.389.265
AP00043466	xmul.13.IgA2m2.N168A.S215A.N252Q.N326T.I327L.T328S.N461Q (5)	0.01	3	1.15	0.01	0.01	xmul.13.IgA2m2.5mer.NL987.389.265
	xmul.13.IgA2m2.N168A.S215A.N252A.N326T.I327L.T328S.N461Q (5)	0.08	34	1.15	0.07	0.10	xmul.13.IgA2m2.5mer.NL1005.389.265
	xmul.13.IgA2m2.N168A.S215A.N252A.N326T.N461Q 5	0.04	18	1.15	0.04	0.05	xmul.13.IgA2m2.5mer.NL1006.389.265
	xmul.13.IgA2m2.N168A.S215A.N252Q.N326T.N461Q (5)	0.05	20	1.15	0.04	0.06	xmul.13.IgA2m2.5mer.NL1007.389.265
	xmul.13.IgA2m2.N168A.S214P.N252A.N326T.I327L.T328S.N461Q (5)	0.10	41	1.15	0.08	0.12	xmul.13.IgA2m2.5mer.NL1008.389.265
	xmul.13.IgA2m2.N168A.S214P.N252A.N326T.N461Q (5)	0.03	11	1.15	0.02	0.03	xmul.13.IgA2m2.5mer.NL1009.389.265
	xmul.13.IgA2m2.N168A.S214P.N252Q.N326T.N461Q (5)	0.05	21	1.15	0.04	0.06	xmul.13.IgA2m2.5mer.NL1010.389.265
	xmul.13.IgA2m2.N168A.S214P.N252Q.N326T.I327L.T328S.N461Q (5)	0.17	72	1.15	0.15	0.21	xmul.13.IgA2m2.5mer.NL1011.389.265
	xmul.13.IgA2m2.N168G.S214P.N252G.N326T.I327L.T328S.N461G (5)	0.08	33	1.15	0.07	0.10	xmul.13.IgA2m2.5mer.NL877.389.265
	xmul.13.IgA2m1.P221R.N168A.N265Q.N326T.I327L.T328S.N461Q (4)	0.08	31	1.15	0.07	0.09	xmul.13.IgA2m1.P221R.4mer.NL997.389.265
	xmul.13.IgA2m1.P221R.N265Q.N326T.I327L.T328S.N461Q (3)	0.15	63	1.15	0.13	0.18	xmul.13.IgA2m1.P221R.last3.NL1001.389.265

图24C



	pIgR	ASGR/ManR	FcRn
WT IgA2m2 四聚体（在上次小鼠 PK 研究中运行）	☑	☑	X
无糖基化 IgA2m2 四聚体	☑	X	X
来自血清的高唾液酸化 IgA 单体	X	X	X

	pIgR	糖基化	FcRn
WT IgA2m2 四聚体	☑	41 个位点（56% 唾液酸化）	X
无糖基化 IgA2m2 四聚体 + 糖基化 J 链	☑	J 链上的 1 个位点（14% 唾液酸化）	X
来自人血清的 IgA 单体	X	95%	X

图25

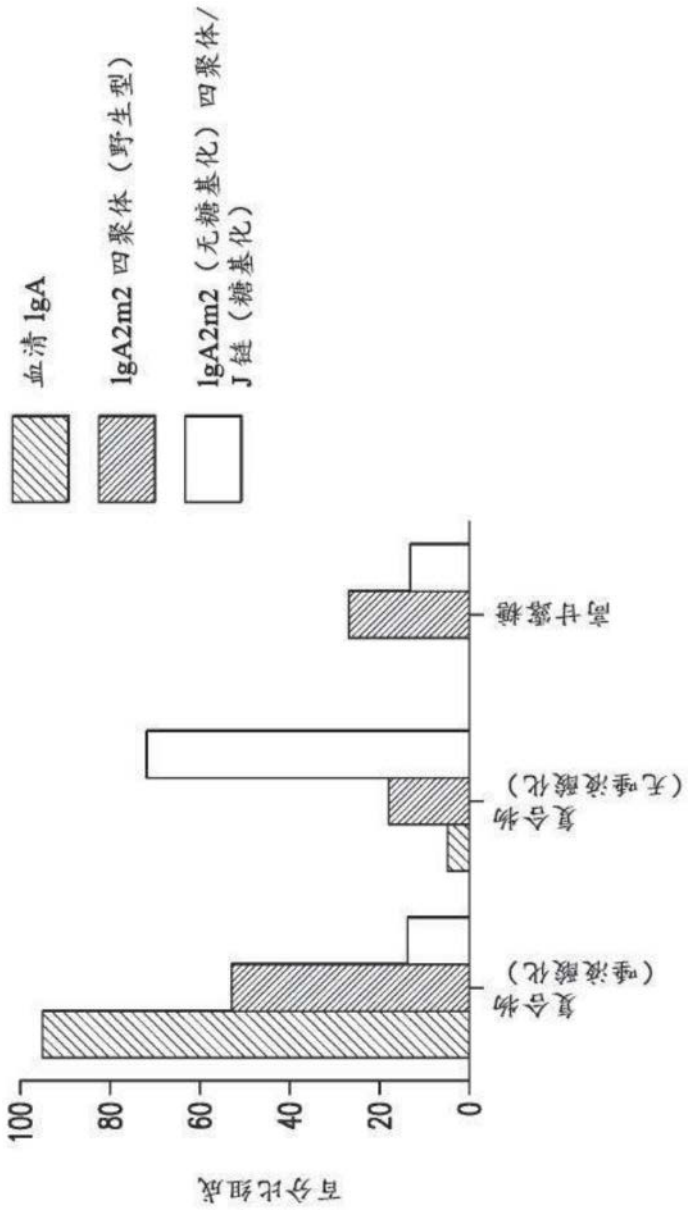
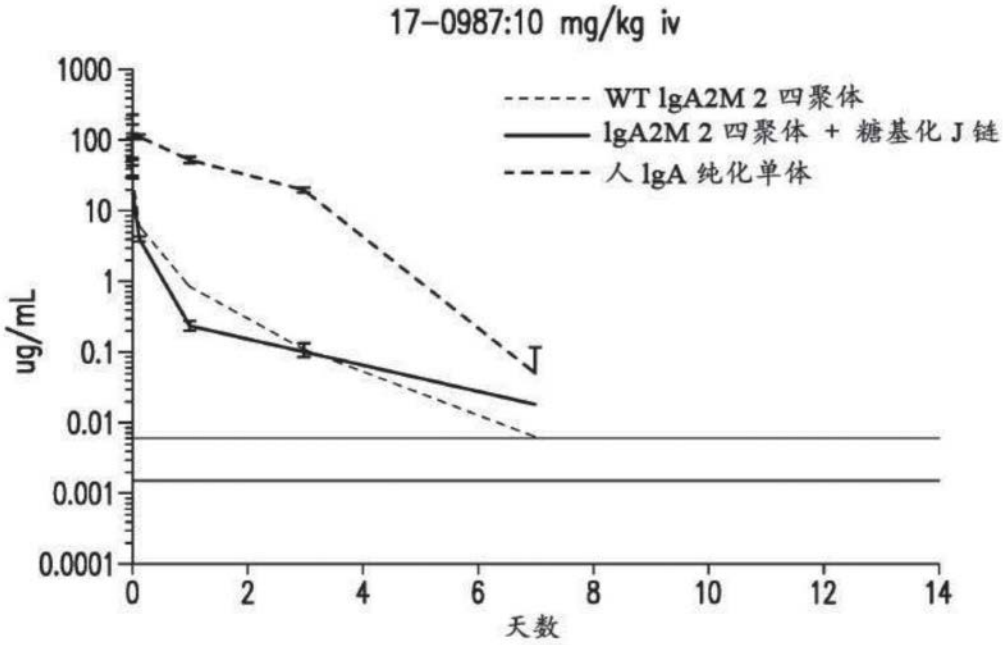
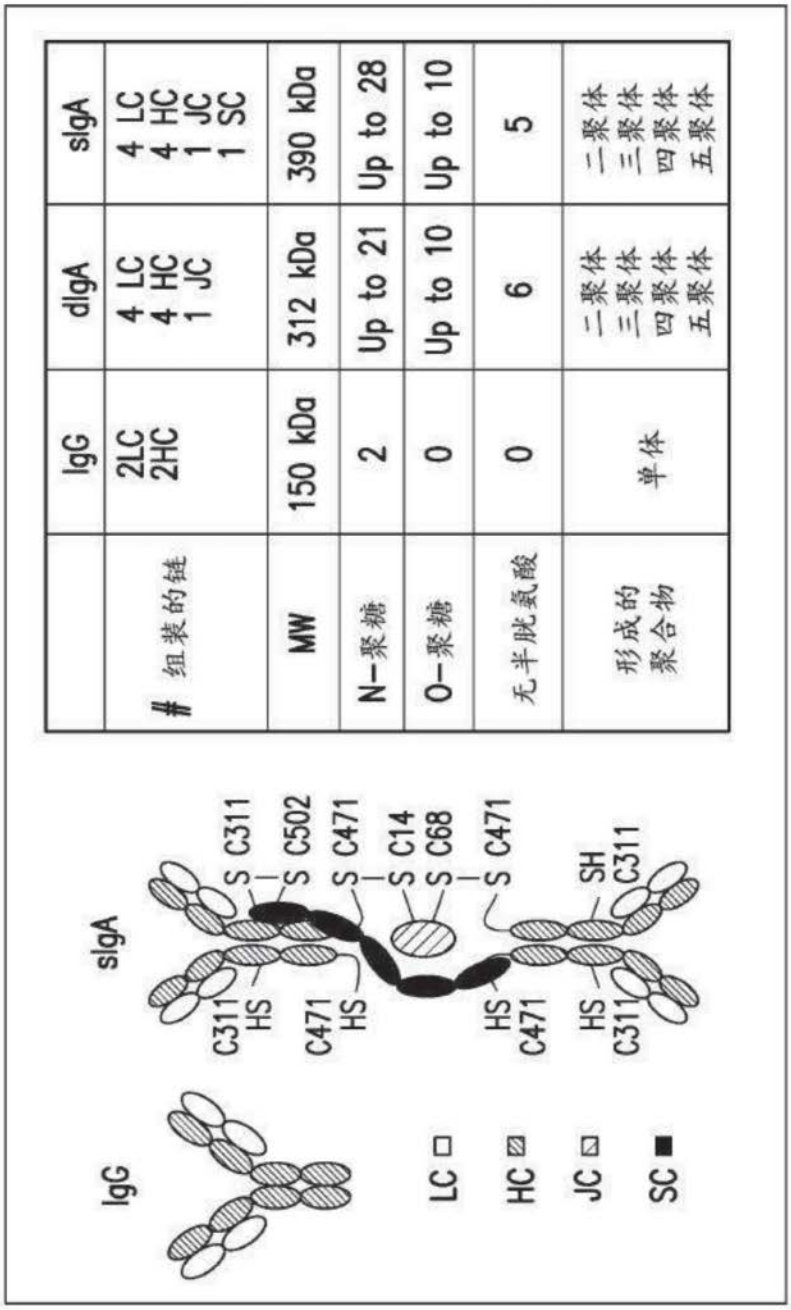

血清 IgA
IgA2m2 四聚体（野生型）
IgA2m2（无糖基化）四聚体/J链（糖基化）
百分比组成
100
80
60
40
20
0
复合物（唾液酸化）
复合物（无唾液酸化）
高甘露糖

图26



Group	C_{max} (ug/mL)	AUC_{inf} (天*ug/mL)	CL (mL/天 /kg)	V_{ss} (mL/kg)
WT IgA2M 2 四聚体,	121	7.77	1240	446
糖基化 IgA2M2 四聚体 + 糖基化 J 链	48.3	4.39	2050	776
人 IgA 纯化单体	203	203	45.8	59.8

图27



	IgG	dIgA	sIgA
# 组装的链	2LC 2HC	4 LC 4 HC 1 JC	4 LC 4 HC 1 JC 1 SC
MW	150 kDa	312 kDa	390 kDa
N-聚糖	2	Up to 21	Up to 28
O-聚糖	0	Up to 10	Up to 10
无半胱氨酸	0	6	5
形成的聚合物	单体	二聚体 三聚体 四聚体 五聚体	二聚体 三聚体 四聚体 五聚体

图28A

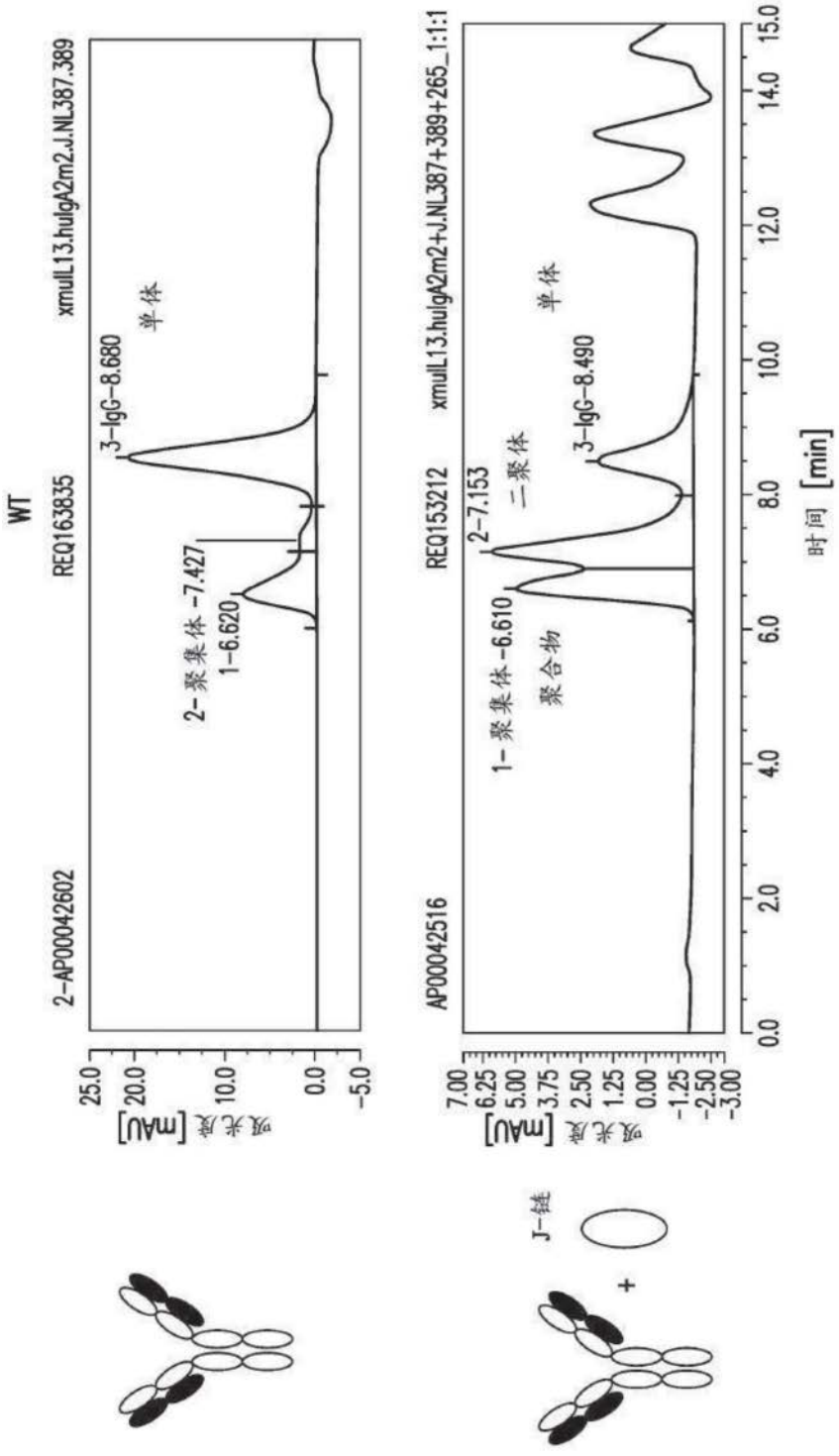

WT
2-AP00042602
REQ163835
xmuIL13.huIgA2m2.J.NL387.389
3-IgG-8.680
单体
2-聚集体-7.427
1-6.620
吸光度 [mAU]
25.0
20.0
10.0
0.0
-5.0
AP00042516
REQ153212
xmuIL13.huIgA2m2+J.NL387+389+265_1:1:1
2-7.153
二聚体
1-聚集体-6.610
聚合物
3-IgG-8.490
单体
吸光度 [mAU]
7.00
6.25
5.00
3.75
2.50
1.25
0.00
-1.25
-2.50
-3.00
0.0
2.0
4.0
6.0
8.0
10.0
12.0
14.0
15.0
时间 [min]
J-链
+

图28B

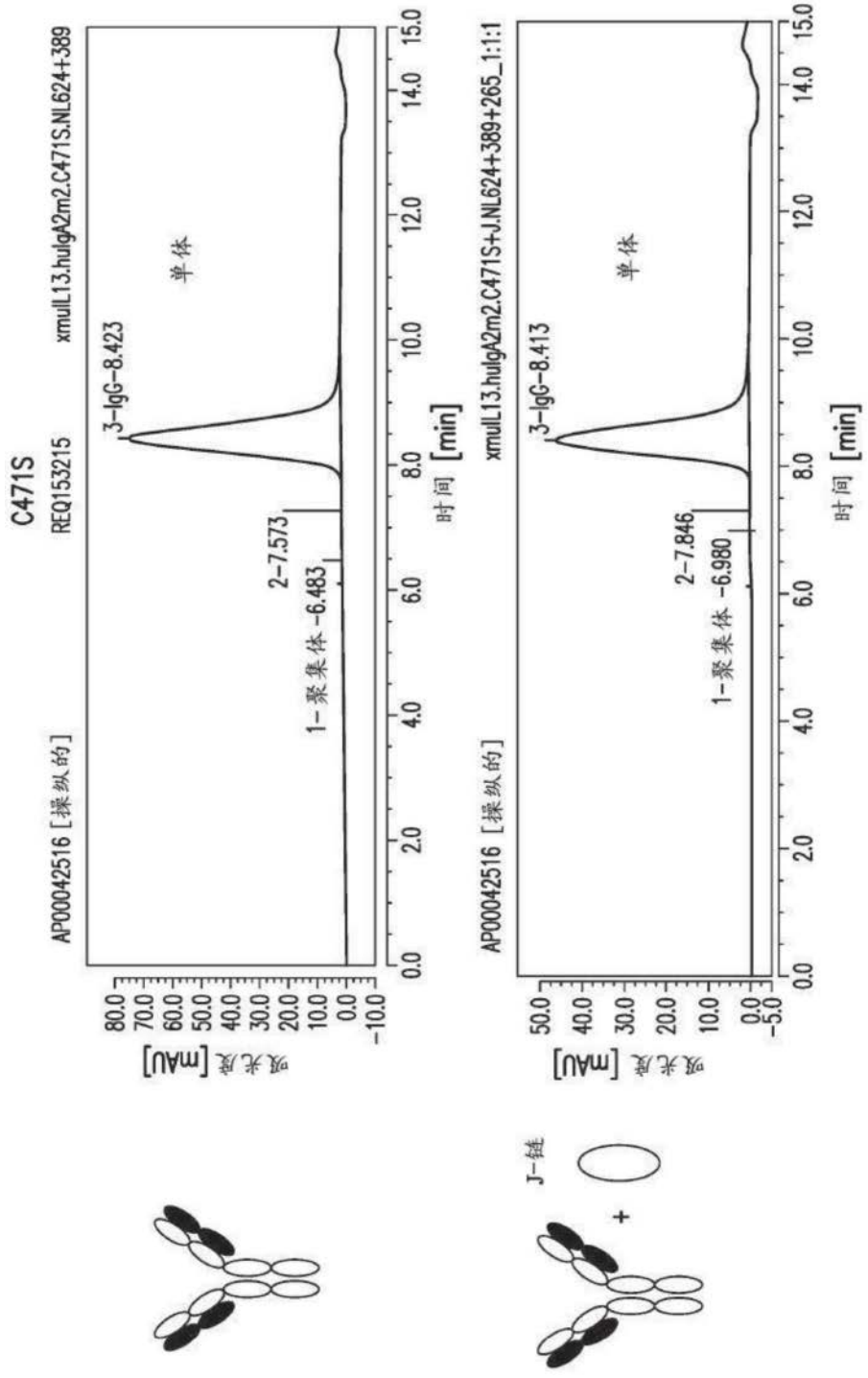

C471S
REQ153215
xmulL13.hulgA2m2.C471S.NL624+389
AP00042516 [操纵的]
3-IgG-8.423
单体
2-7.573
1-聚集体 -6.483
吸光度 [mAU]
时间 [min]
xmulL13.hulgA2m2.C471S+J.NL624+389+265_1:1:1
AP00042516 [操纵的]
3-IgG-8.413
单体
2-7.846
1-聚集体 -6.980
吸光度 [mAU]
时间 [min]
J-链
+

图28B续1

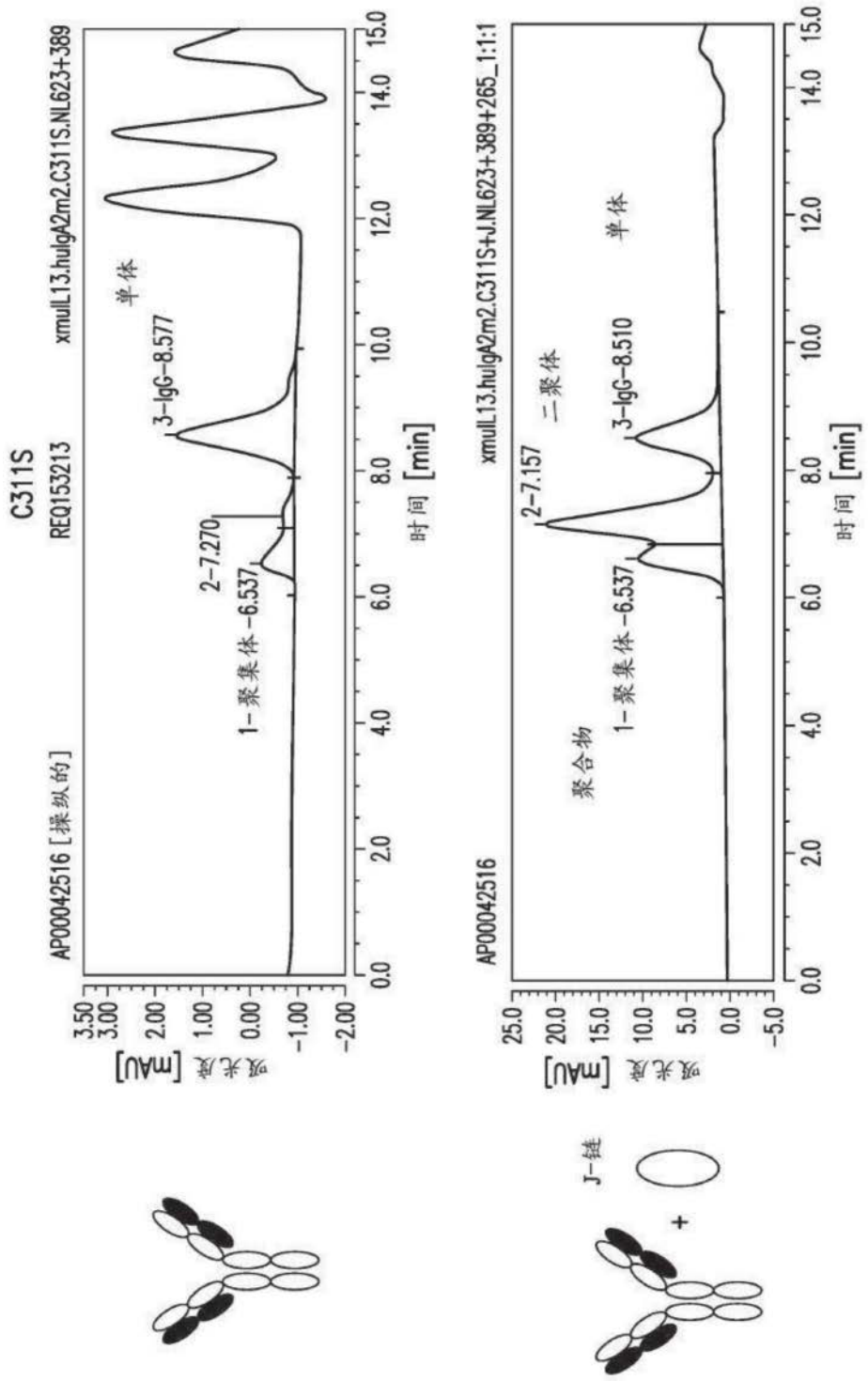

C311S
RE0153213
AP00042516 [操纵的]
xmulL13.hulgA2m2.C311S.NL623+389
单体
3-IgG-8.577
2-7.270
1-聚集体-6.537
时间 [min]
吸光度 [mAU]
AP00042516
xmulL13.hulgA2m2.C311S+J.NL623+389+265_1:1:1
聚合物
1-聚集体-6.537
2-7.157
二聚体
3-IgG-8.510
单体
J-链

图28B续2

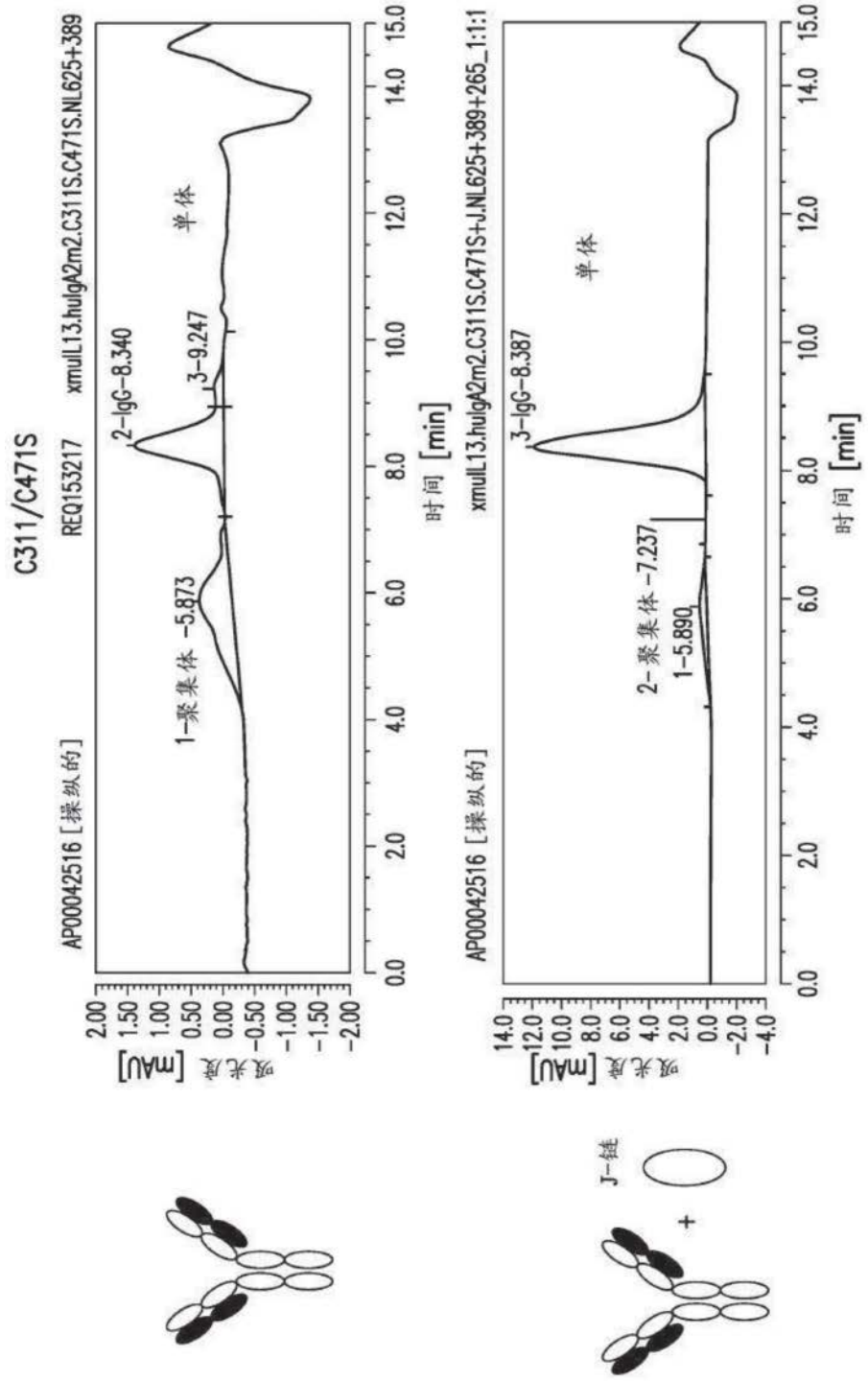

C311/C471S
AP00042516 [操纵的]
REQ153217
xmuIL13.huIgA2m2.C311S.C471S.NL625+389
1-聚集体 -5.873
2-IgG-8.340
3-9.247
单体
[mAU]
吸光度
时间 [min]
AP00042516 [操纵的]
xmuIL13.huIgA2m2.C311S.C471S+J.NL625+389+265_1:1:1
2-聚集体-7.237
1-5.890
3-IgG-8.387
单体
[mAU]
吸光度
时间 [min]
J-链

图28B续3

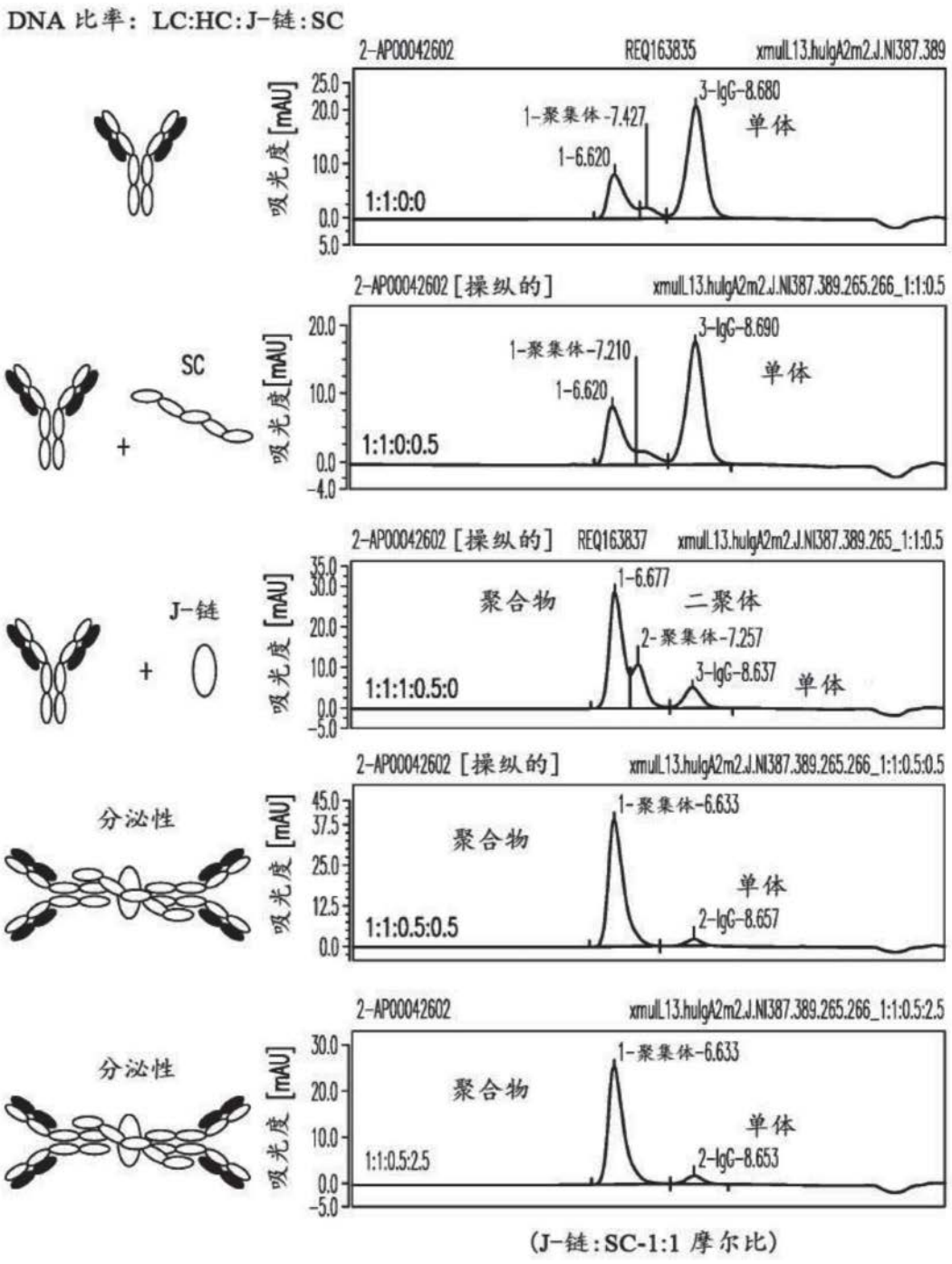

DNA 比率：LC:HC:J-链:SC
2-AP00042602
REQ163835
xmulL13.hulgA2m2.J.NI387.389
吸光度[mAU]
1-聚集体-7.427
1-6.620
3-IgG-8.680
单体
1:1:0:0
SC
2-AP00042602 [操纵的]
xmulL13.hulgA2m2.J.NI387.389.265.266_1:1:0.5
1-聚集体-7.210
1-6.620
3-IgG-8.690
单体
1:1:0:0.5
J-链
2-AP00042602 [操纵的]
REQ163837
xmulL13.hulgA2m2.J.NI387.389.265_1:1:0.5
聚合物
1-6.677
二聚体
2-聚集体-7.257
3-IgG-8.637
单体
1:1:1:0.5:0
分泌性
2-AP00042602 [操纵的]
xmulL13.hulgA2m2.J.NI387.389.265.266_1:1:0.5:0.5
聚合物
1-聚集体-6.633
单体
2-IgG-8.657
1:1:0.5:0.5
分泌性
2-AP00042602
xmulL13.hulgA2m2.J.NI387.389.265.266_1:1:0.5:2.5
聚合物
1-聚集体-6.633
单体
2-IgG-8.653
1:1:0.5:2.5
(J-链:SC-1:1 摩尔比)

图29

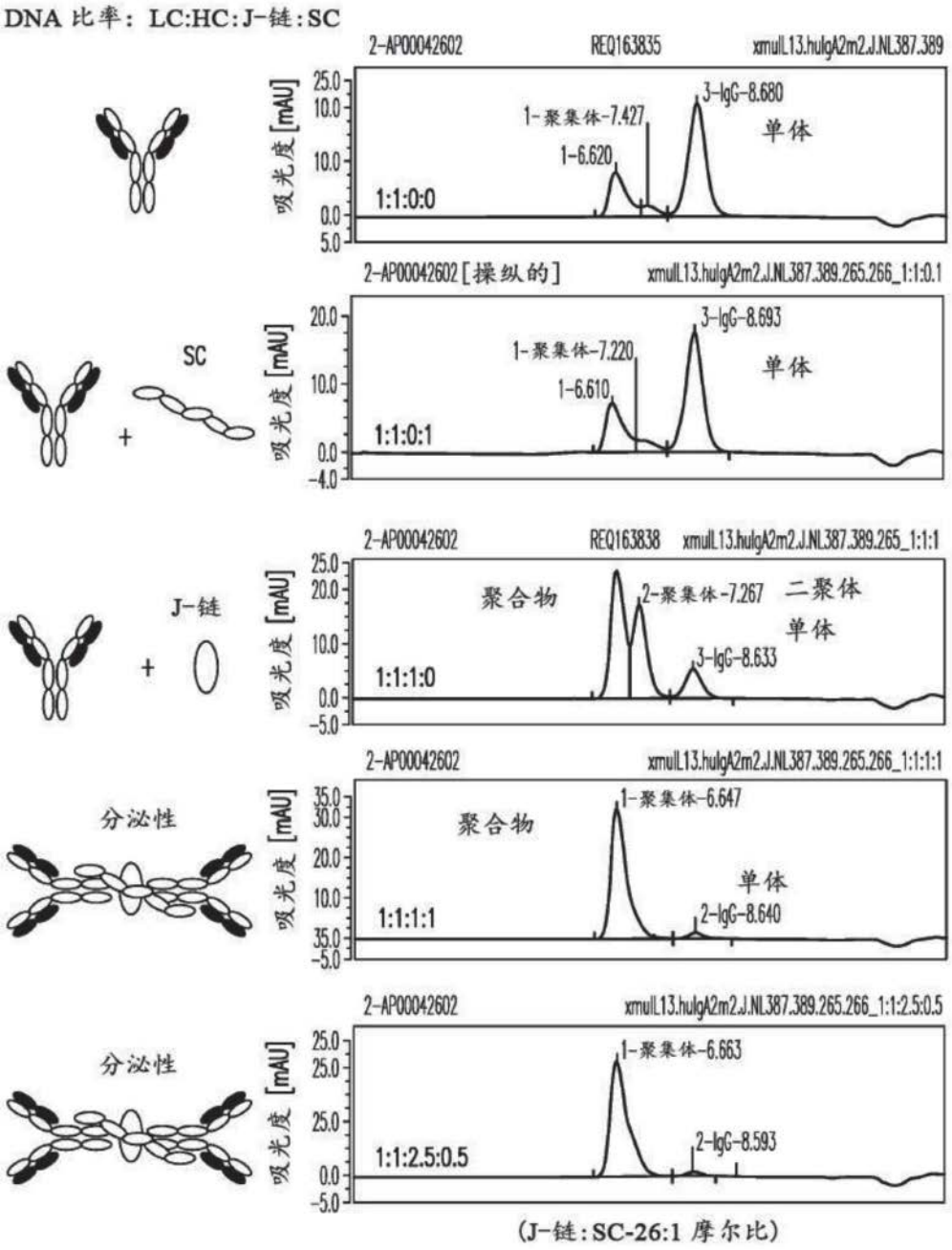

DNA 比率：LC:HC:J-链:SC
2-AP00042602
REQ163835
xmulL13.hulgA2m2.J.NL387.389
吸光度 [mAU]
1-聚集体-7.427
3-IgG-8.680
单体
1-6.620
1:1:0:0
2-AP00042602 [操纵的]
xmulL13.hulgA2m2.J.NL387.389.265.266_1:1:0.1
SC
+
3-IgG-8.693
1-聚集体-7.220
单体
1-6.610
1:1:0:1
2-AP00042602
REQ163838
xmulL13.hulgA2m2.J.NL387.389.265_1:1:1
J-链
+
聚合物
2-聚集体-7.267
二聚体
单体
3-IgG-8.633
1:1:1:0
2-AP00042602
xmulL13.hulgA2m2.J.NL387.389.265.266_1:1:1:1
分泌性
聚合物
1-聚集体-6.647
单体
2-IgG-8.640
1:1:1:1
2-AP00042602
xmulL13.hulgA2m2.J.NL387.389.265.266_1:1:2.5:0.5
分泌性
1-聚集体-6.663
2-IgG-8.593
1:1:2.5:0.5
(J-链：SC-26:1 摩尔比)

图29续

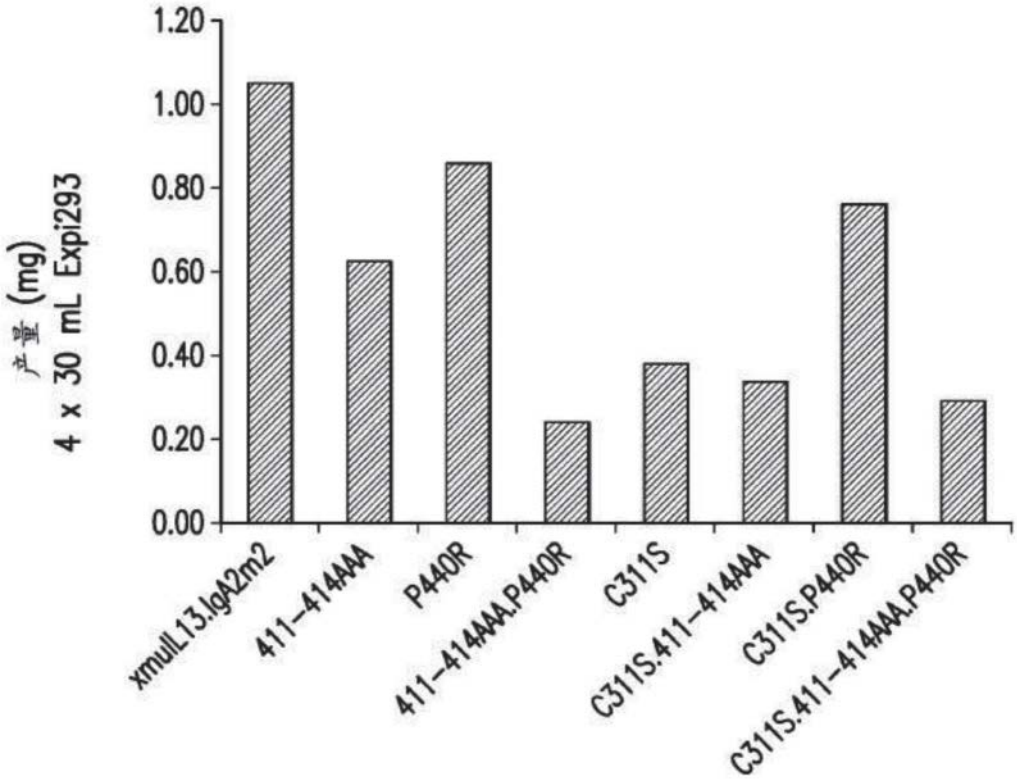

产量 (mg)
4 x 30 mL Expi293
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
xmuIL13.IgA2m2
411-414AA
P440R
411-414AA.P440R
C311S
C311S.411-414AA
C311S.P440R
C311S.411-414AA.P440R

图30A

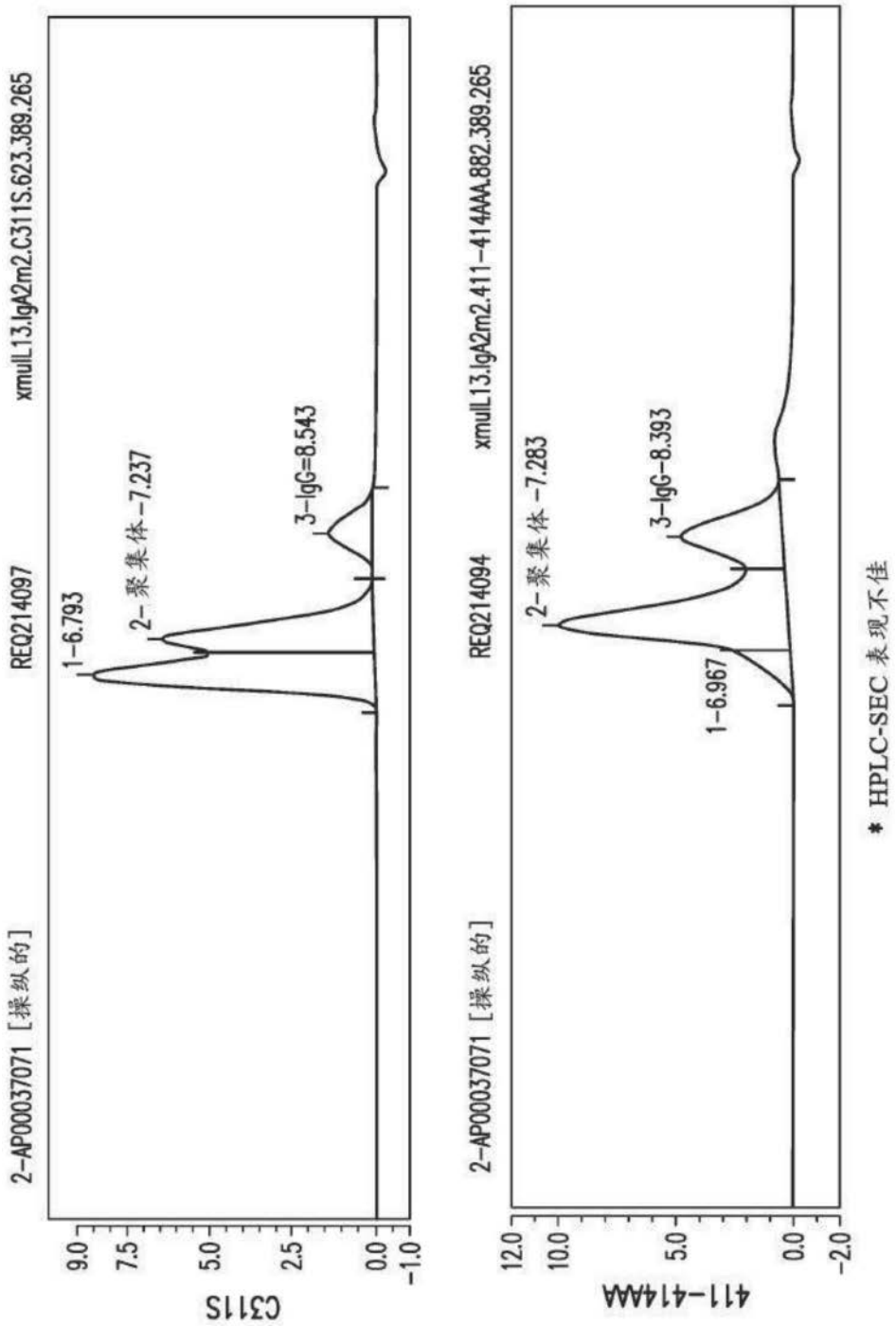

2-AP00037071 [操纵的]
REQ214097
xmuIL13.IgA2m2.C311S.623.389.265
1-6.793
2-聚集体-7.237
3-IgG=8.543
C311S
9.0
7.5
5.0
2.5
0.0
-1.0
2-AP00037071 [操纵的]
REQ214094
xmuIL13.IgA2m2.411-414AAA.882.389.265
2-聚集体-7.283
3-IgG-8.393
1-6.967
411-414AA
12.0
10.0
5.0
0.0
-2.0
* HPLC-SEC 表现不佳

图30B

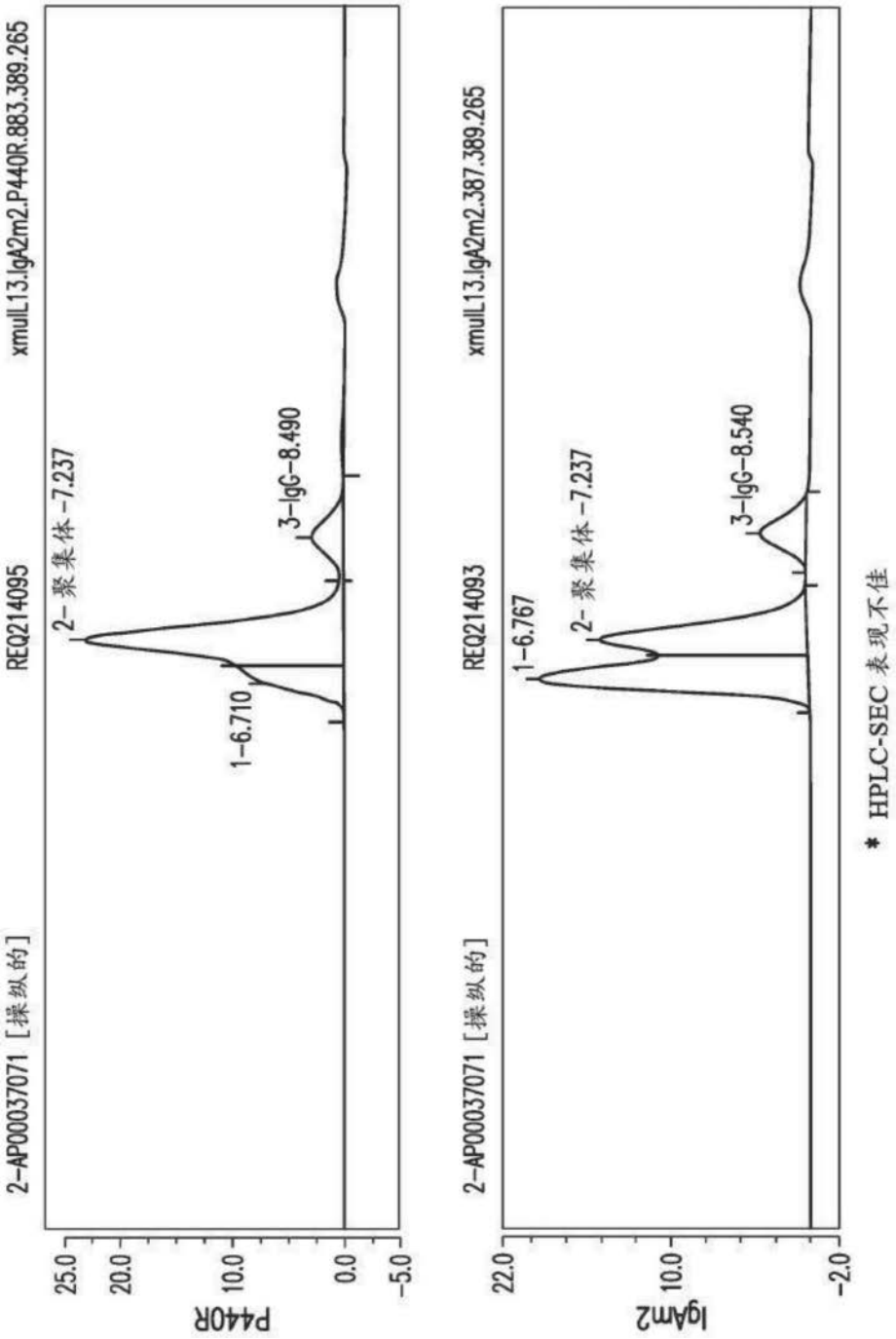

2-AP00037071 [操纵的]
REQ214095
xmullL13.IgA2m2.P440R.883.389.265
2- 聚集体 -7.237
1-6.710
3-IgG-8.490
25.0
20.0
10.0
0.0
-5.0
P440R
2-AP00037071 [操纵的]
REQ214093
xmullL13.IgA2m2.387.389.265
1-6.767
2- 聚集体 -7.237
3-IgG-8.540
22.0
10.0
-2.0
IgAm2
* HPLC-SEC 表现不佳

图30B续1

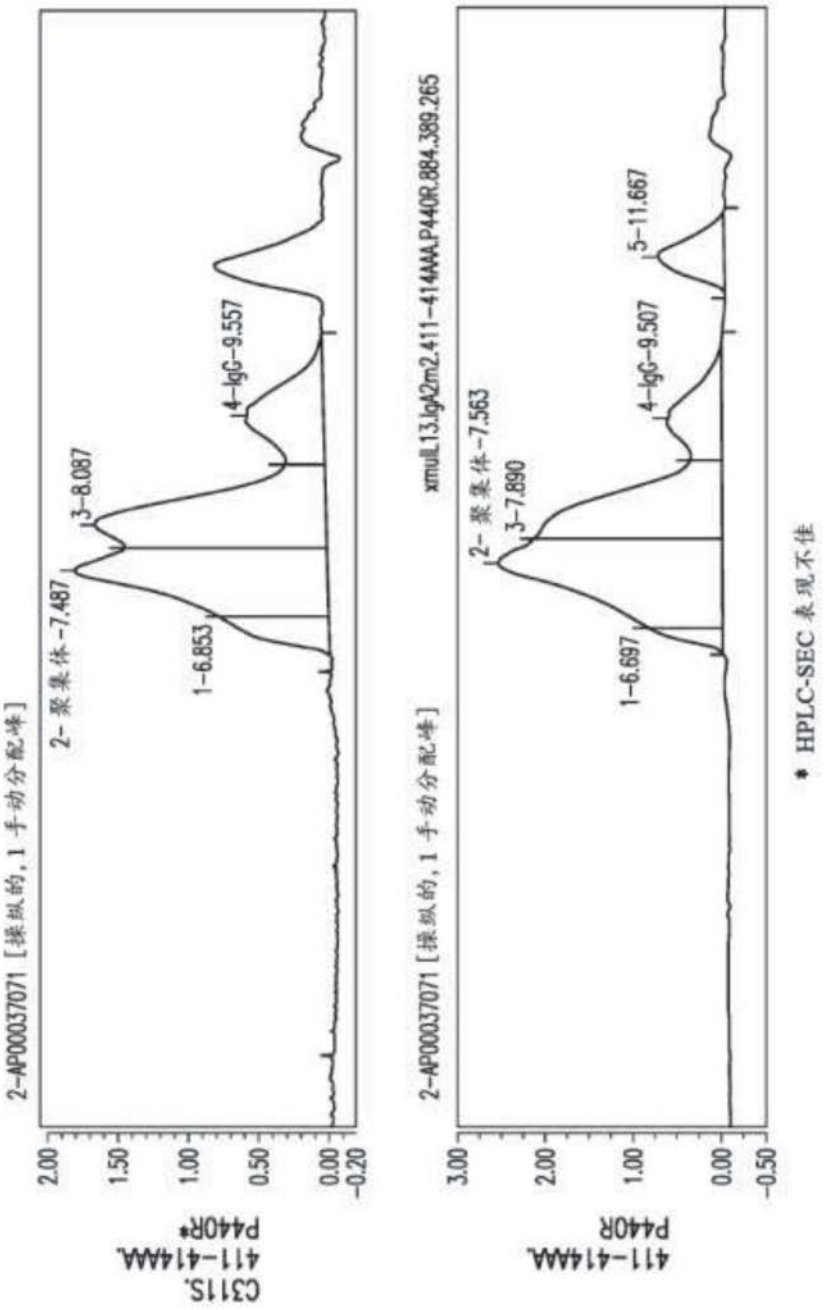

2-AP00037071 [操纵的, 1 手动分配峰]
2- 聚集体-7.487
3-8.087
4-IgG-9.557
1-6.853
C311S.
411-414AA.
P440R*
xmuIL13.IgA2m2.411-414AA.P440R.884.389.265
2- 聚集体-7.563
3-7.890
4-IgG-9.507
5-11.667
1-6.697
411-414AA.
P440R
* HPLC-SEC 表现不佳

图30B续2

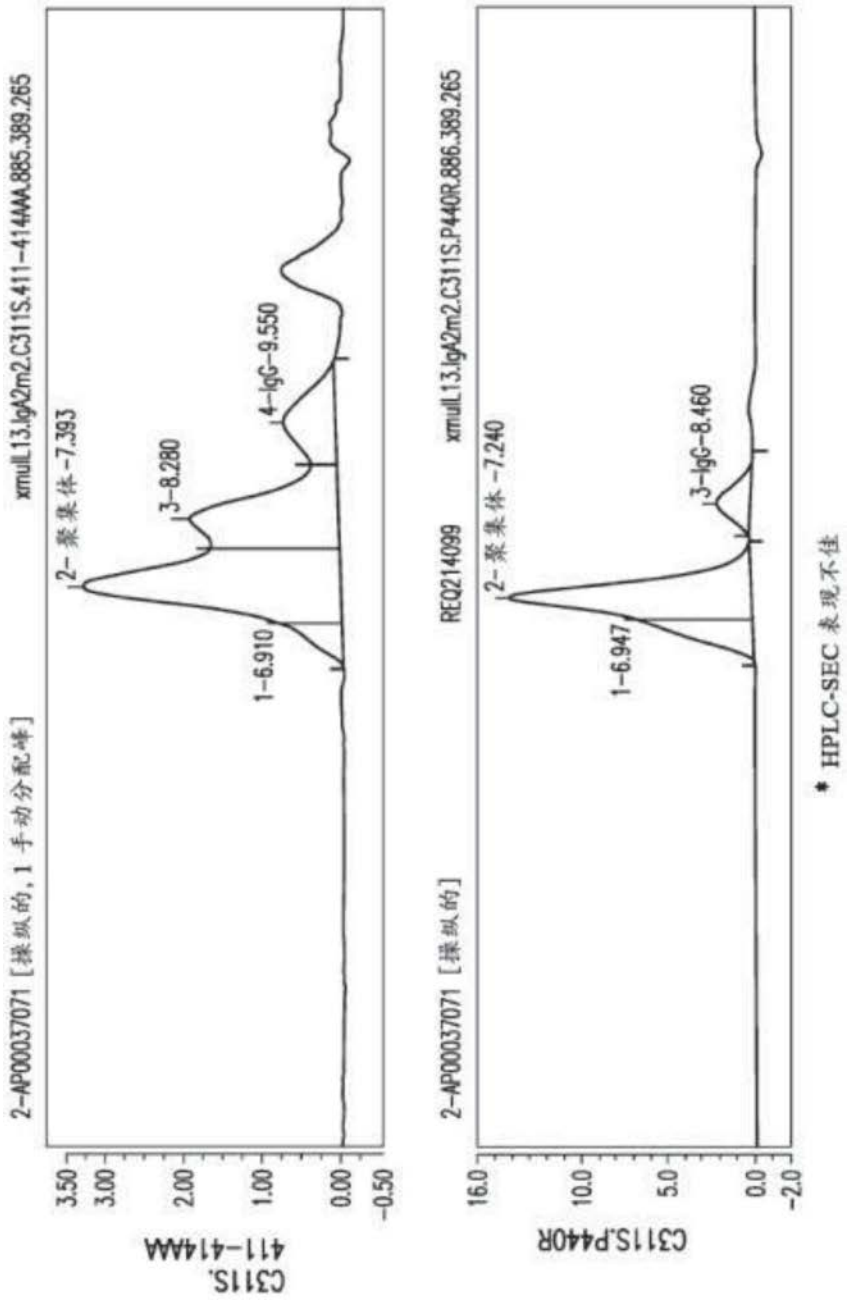

2-AP00037071 [操纵的, 1 手动分配峰]
xmuIL13.IgA2m2.C311S.411-414AA.885.389.265
2-聚集体-7.393
3-8.280
4-IgG-9.550
1-6.910
3.50
3.00
2.00
1.00
0.00
-0.50
C311S.
411-414AA
2-AP00037071 [操纵的]
REQ214099
xmuIL13.IgA2m2.C311S.P440R.886.389.265
2-聚集体-7.240
3-IgG-8.460
1-6.947
16.0
10.0
5.0
0.0
-2.0
C311S.P440R
* HPLC-SEC 表现不佳

图30B续3

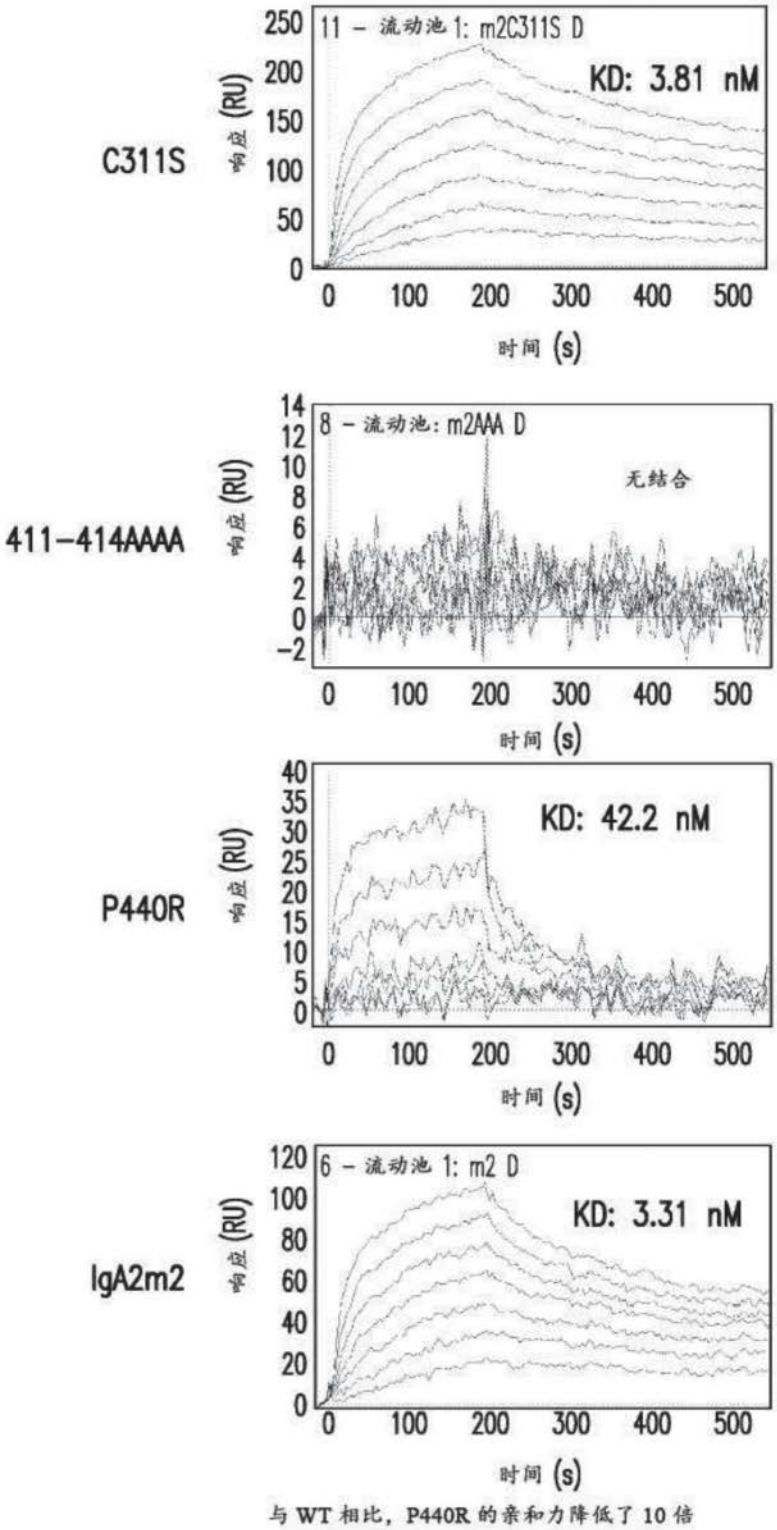

C311S
11 – 流动池 1: m2C311S D
KD: 3.81 nM
响应 (RU)
时间 (s)
411–414AAAA
8 – 流动池: m2AAA D
无结合
响应 (RU)
时间 (s)
P440R
KD: 42.2 nM
响应 (RU)
时间 (s)
IgA2m2
6 – 流动池 1: m2 D
KD: 3.31 nM
响应 (RU)
时间 (s)
与 WT 相比，P440R 的亲和力降低了 10 倍

图30C

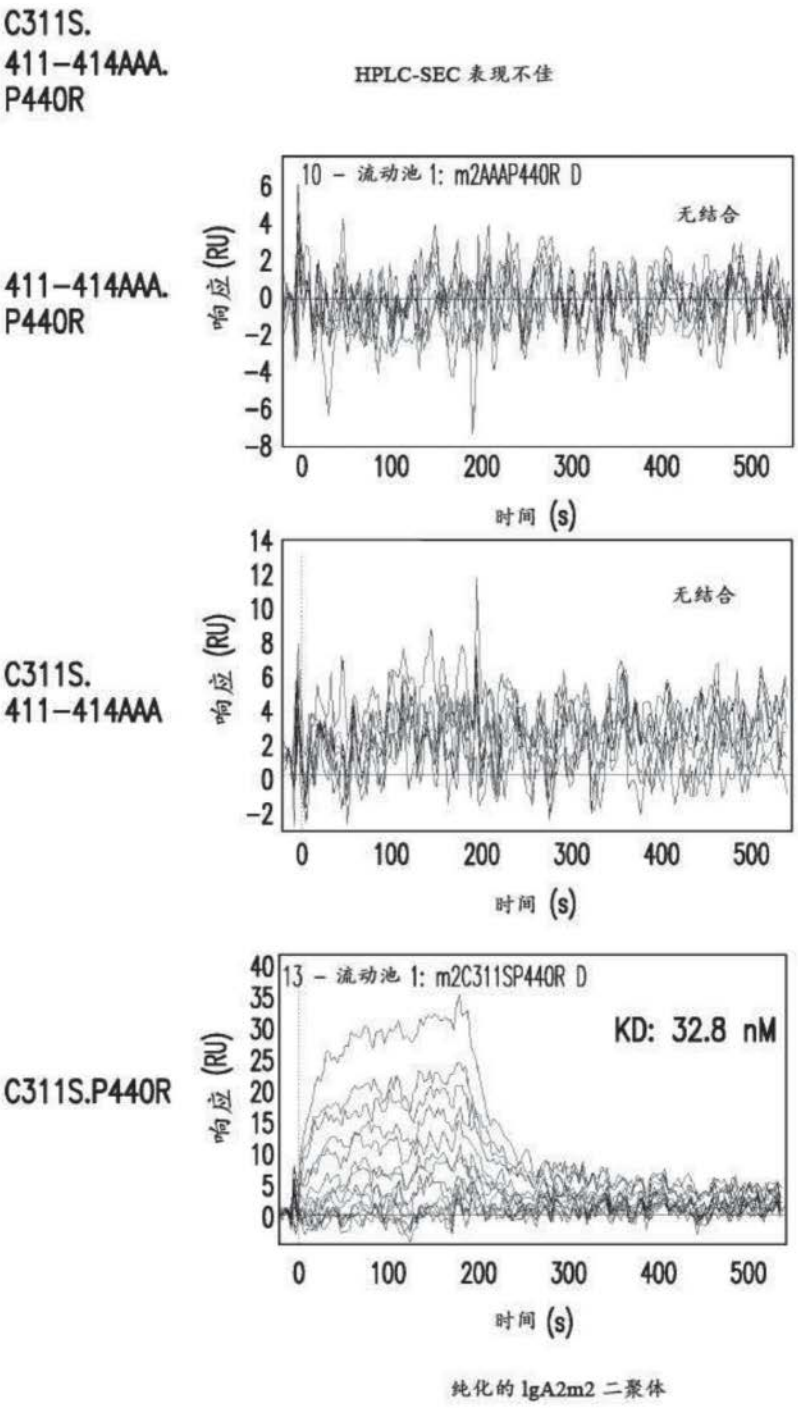

C311S.
411-414AAA.
P440R
HPLC-SEC 表现不佳
411-414AAA.
P440R
10 - 流动池 1: m2AAAP440R D
无结合
响应 (RU)
时间 (s)
C311S.
411-414AAA
无结合
响应 (RU)
时间 (s)
C311S.P440R
13 - 流动池 1: m2C311SP440R D
KD: 32.8 nM
响应 (RU)
时间 (s)
纯化的 IgA2m2 二聚体

图30C续

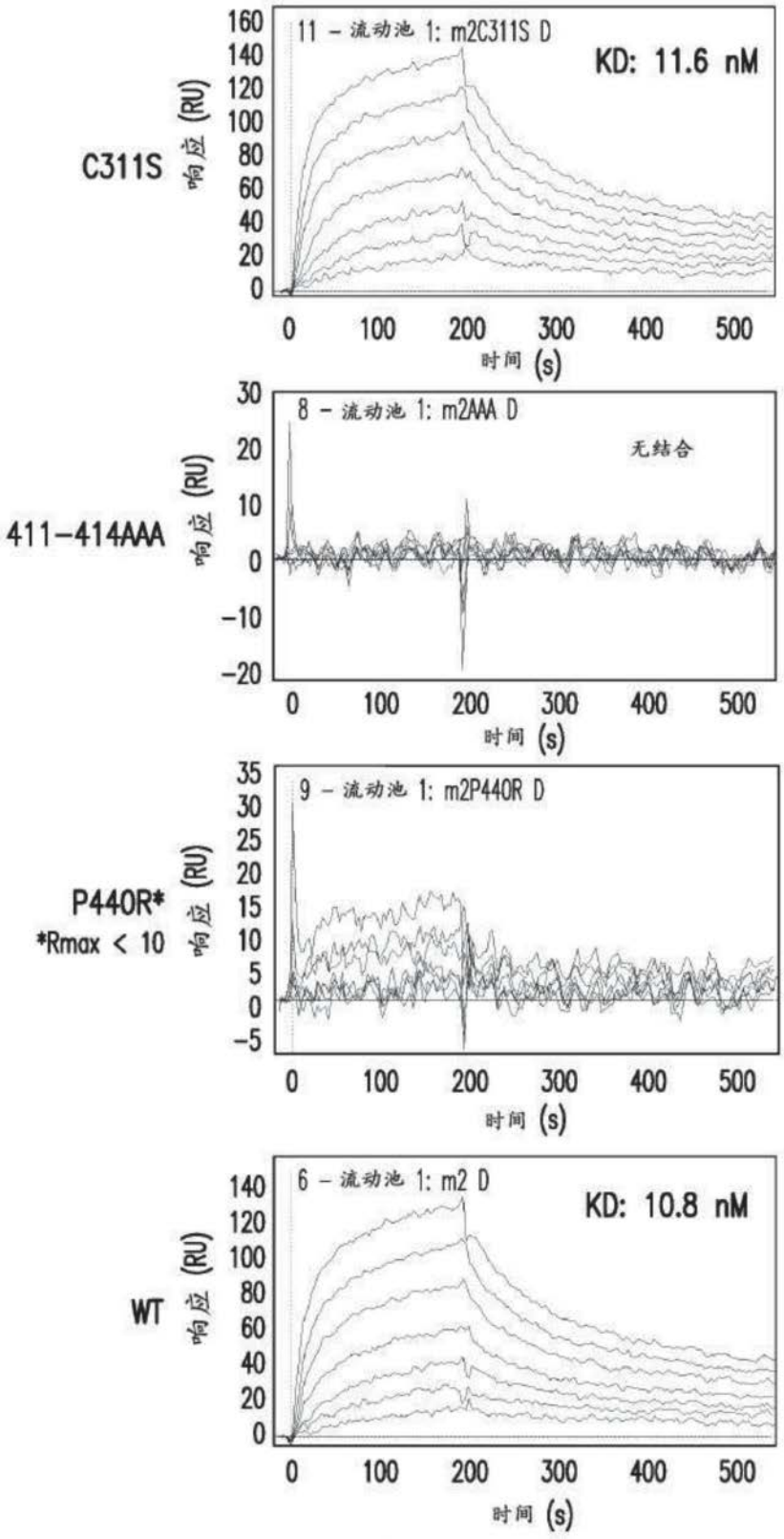

C311S
11 - 流动池 1: m2C311S D
KD: 11.6 nM
响应 (RU)
时间 (s)
411-414AAA
8 - 流动池 1: m2AAA D
无结合
响应 (RU)
时间 (s)
P440R*
*Rmax < 10
9 - 流动池 1: m2P440R D
响应 (RU)
时间 (s)
WT
6 - 流动池 1: m2 D
KD: 10.8 nM
响应 (RU)
时间 (s)

图30D

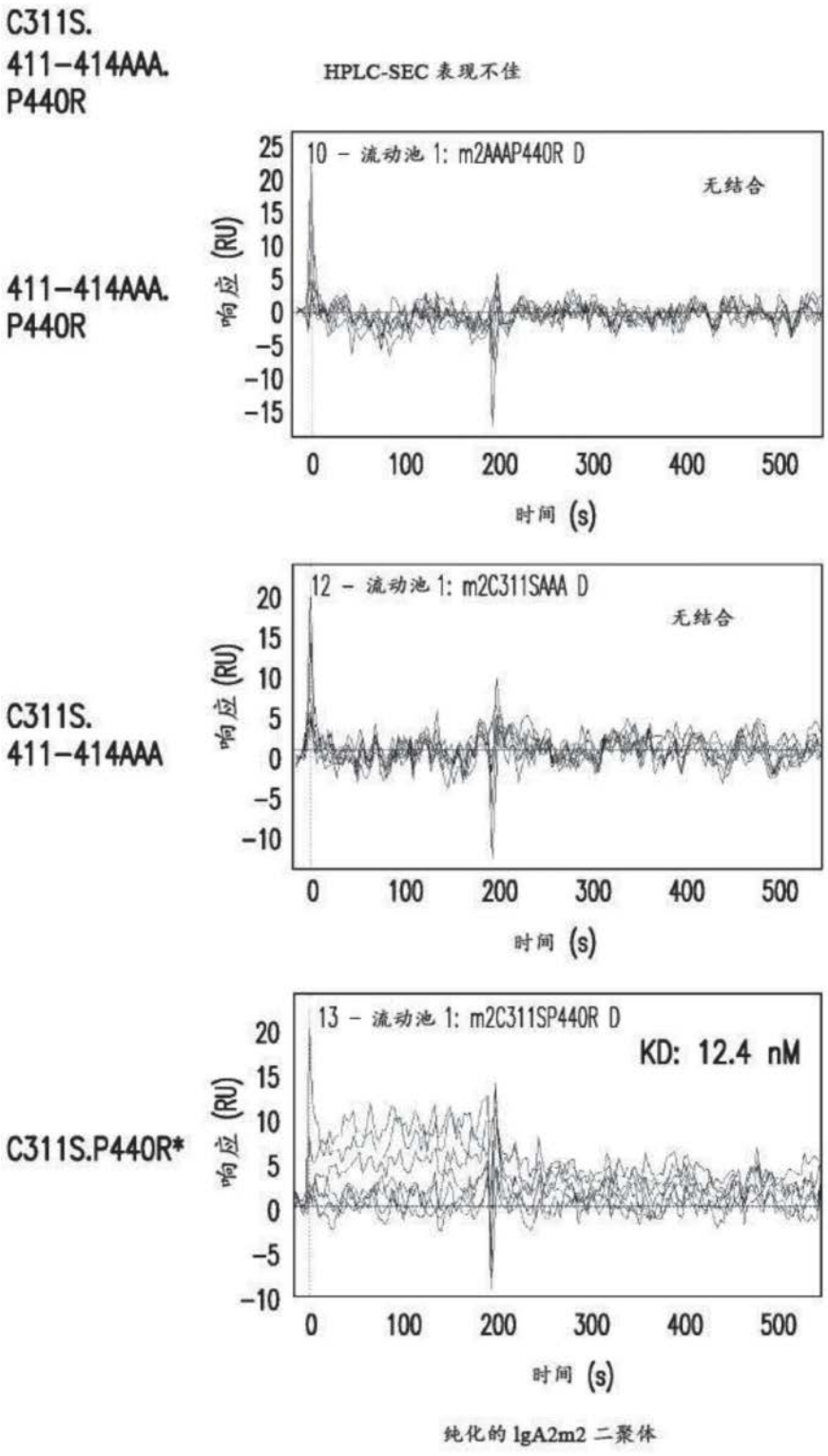

C311S.
411-414AAA.
P440R
HPLC-SEC 表现不佳
411-414AAA.
P440R
10 - 流动池 1: m2AAAP440R D
无结合
响应 (RU)
时间 (s)
C311S.
411-414AAA
12 - 流动池 1: m2C311SAAA D
无结合
响应 (RU)
时间 (s)
C311S.P440R*
13 - 流动池 1: m2C311SP440R D
KD: 12.4 nM
响应 (RU)
时间 (s)
纯化的 IgA2m2 二聚体

图30D续

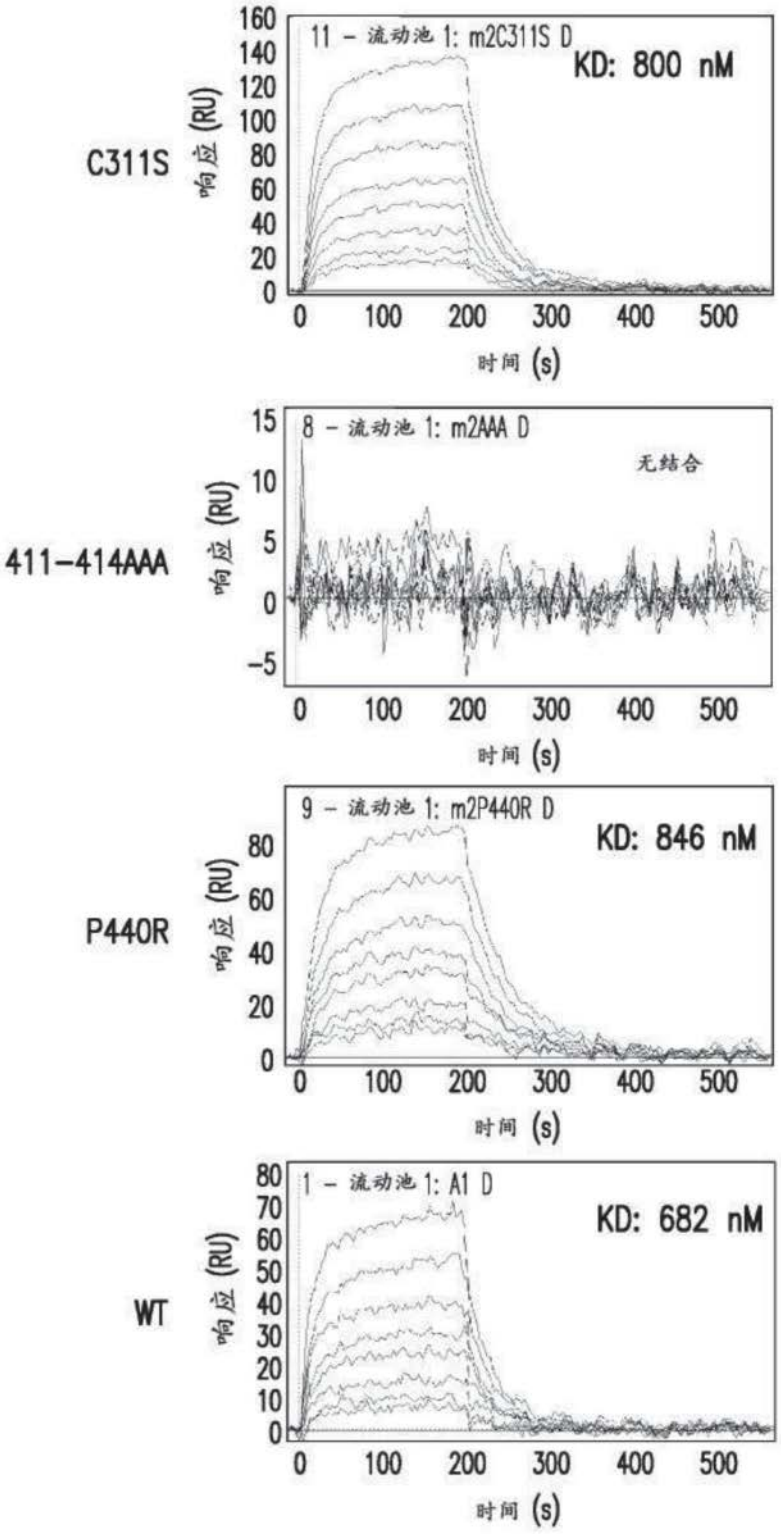
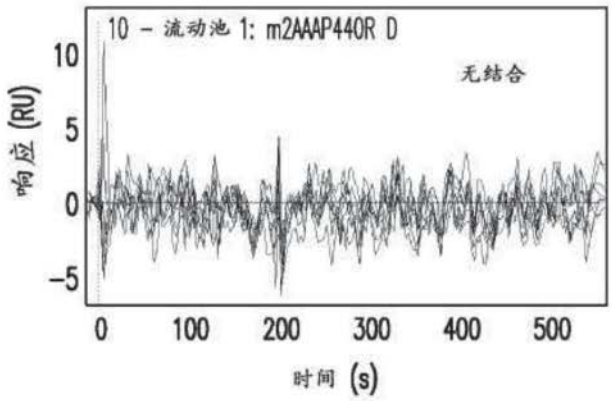

C311S
11 - 流动池 1: m2C311S D
KD: 800 nM
411-414AAA
8 - 流动池 1: m2AAA D
无结合
P440R
9 - 流动池 1: m2P440R D
KD: 846 nM
WT
1 - 流动池 1: A1 D
KD: 682 nM
响应 (RU)
时间 (s)

图30E

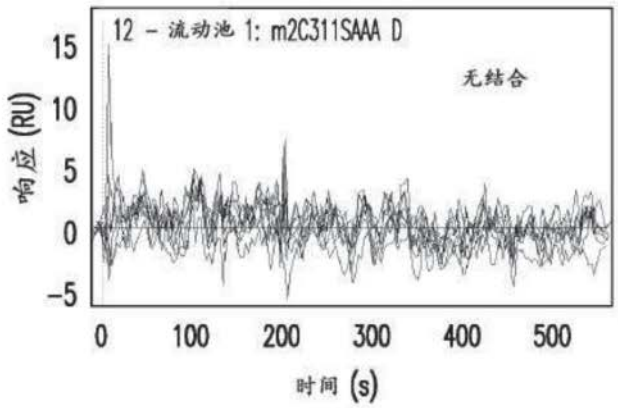
C311S.
411-414AAA.
P440R

HPLC-SEC 表现不佳

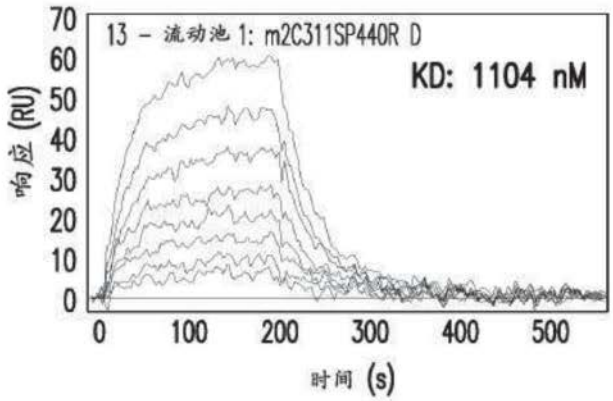
411-414AAA.
P440R



C311S.
411-414AAA



C311S.P440R



纯化的 IgA2m2 二聚体

图30E续

020718 IgA 稳定条件以增加唾液酸化
抗-Jog1.2B3.IgA2m2 WT
前盒：LC+HC+J-链
后盒：ST 或 GT 或 ST/GT

对于 100mL - 400 mg 半乳糖 (4 g/L Gal) (VWR – 220178-524)
对于 100mL - 220 mg ManNAc (2.2 g/L ManNAc) (Sigma A8176)
ST: 唾液酸转移酶
GT: 半乳糖基转移酶

克隆	Req.#	备注
xJAG1.2B3.hIgA2m2	340810	
xJAG1.2B3.hIgA2m2+ST	340811	
xJAG1.2B3.hIgA2m2+ST+糖	340812	半乳糖 400mg/100 ml, ManNAc 220 mg/100 mL
xJAG1.2B3.hIgA2m2+GT	340813	
xJAG1.2B3.hIgA2m2+GT+糖	340814	半乳糖 400mg/100 ml, ManNAc 220 mg/100 mL
xJAG1.2B3.hIgA2m2+ST+GT	340815	
xJAG1.2B3.hIgA2m2+ST+GT+糖	340816	半乳糖 400mg/100 ml, ManNAc 220 mg/100 mL
xJAG1.2B3.hIgA2m2 (7 天收获)	340817	
xJAG1.2B3.hIgA2m2 (7 天收获)+ST+糖	340818	半乳糖 400mg/100 ml, ManNAc 220 mg/100 mL
xJAG1.2B3.hIgA2m2 (7 天收获)+GT+糖	340819	半乳糖 400mg/100 ml, ManNAc 220 mg/100 mL
xJAG1.2B3.hIgA2m2 (7 天收获)+ST+GT+糖	340820	半乳糖 400mg/100 ml, ManNAc 220 mg/100 mL

从单体中纯化出寡聚物

图31A

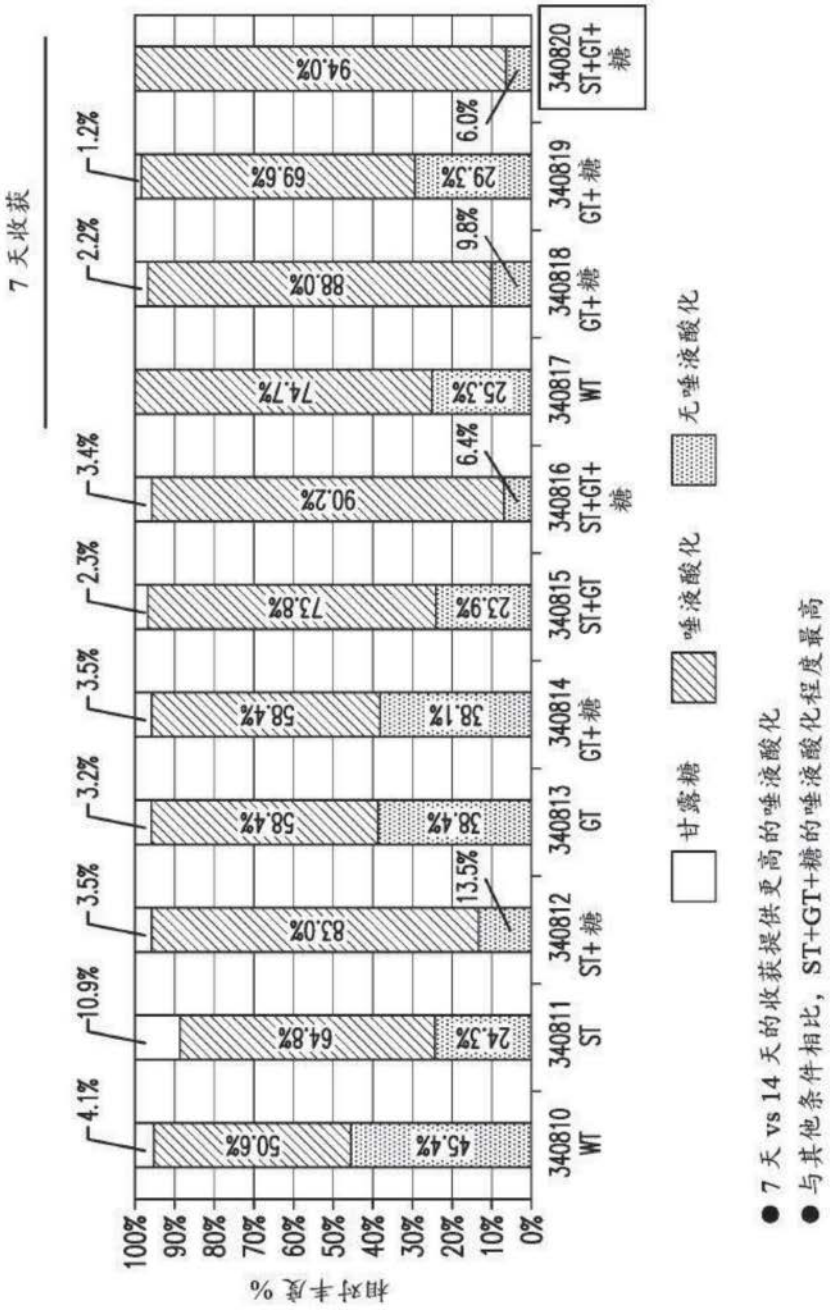

7 天收获
相对丰度 %
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
340810 WT
340811 ST
340812 ST+糖
340813 GT
340814 GT+糖
340815 ST+GT
340816 ST+GT+糖
340817 WT
340818 GT+糖
340819 GT+糖
340820 ST+GT+糖
4.1%
10.9%
3.5%
3.2%
3.5%
2.3%
3.4%
2.2%
1.2%
50.6%
64.8%
83.0%
58.4%
58.4%
73.8%
90.2%
74.7%
88.0%
69.6%
94.0%
45.4%
24.3%
13.5%
38.4%
38.1%
23.9%
6.4%
25.3%
9.8%
29.3%
6.0%
甘露糖
唾液酸化
无唾液酸化
● 7 天 vs 14 天的收获提供更高的唾液酸化
● 与其他条件相比，ST+GT+糖的唾液酸化程度最高

图31B

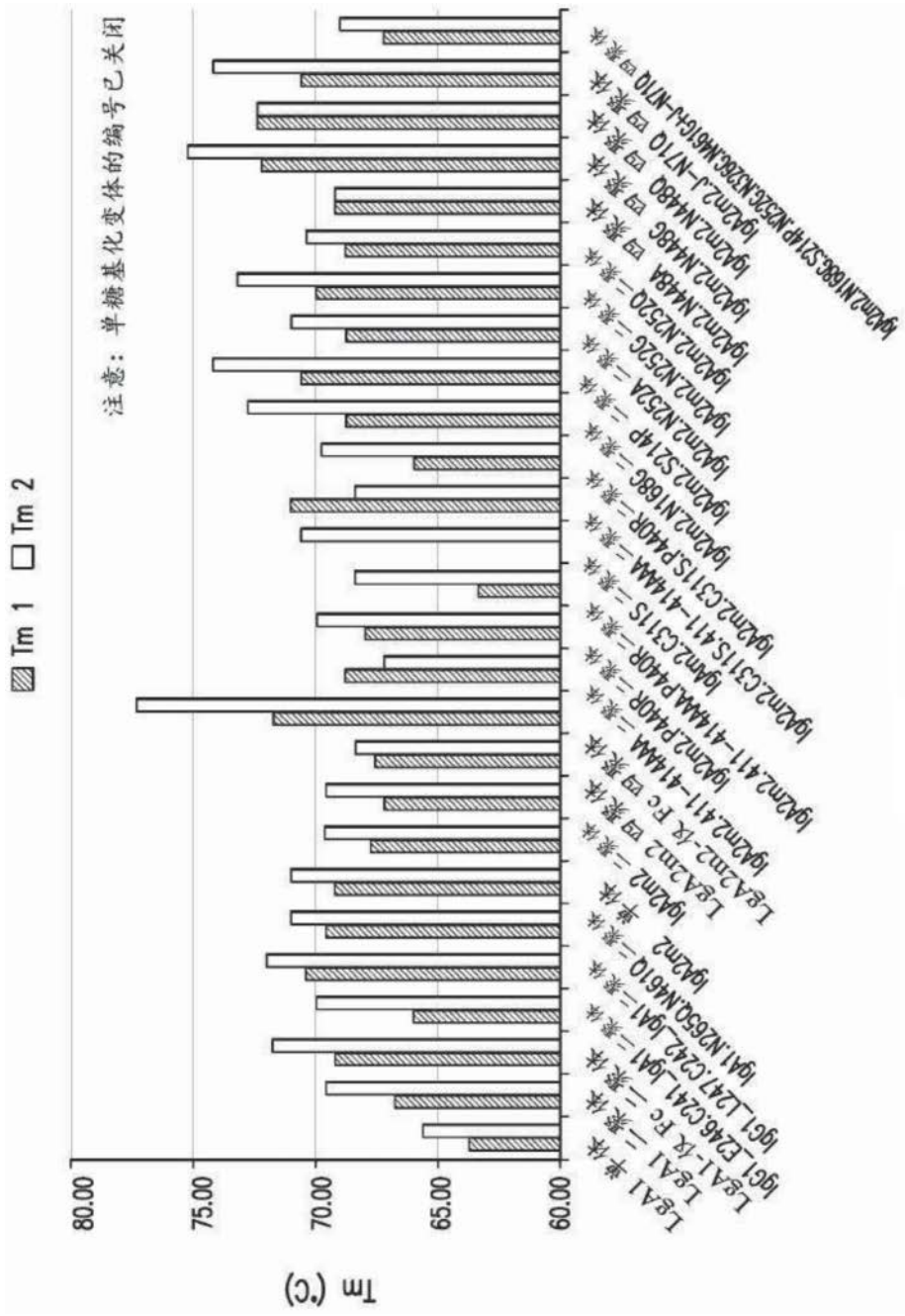

注意：单糖基化变体的编号已关闭
Tm 1
Tm 2
Tm (°C)
80.00
75.00
70.00
65.00
60.00
LSA1 单体
LSA1 二聚体
LSA1-1X Fc 二聚体
IgG1_L247.C241_IgA1 二聚体
IgA1.N265D.N461Q 二聚体
IgA2m2 单体
IgA2m2 二聚体
LSA2m2 二聚体
LSA2m2-1X Fc 二聚体
IgA2m2.411-414AA 二聚体
IgA2m2.411-414AA.P440R 二聚体
IgA2m2.411-414AA.P440R 二聚体
IgA2m2.C311S 二聚体
IgA2m2.C311S.411-414AA 二聚体
IgA2m2.C311S.P440R 二聚体
IgA2m2.N168G 二聚体
IgA2m2.S214P 二聚体
IgA2m2.N252A 二聚体
IgA2m2.N252G 二聚体
IgA2m2.N252Q 二聚体
IgA2m2.N448A 二聚体
IgA2m2.N448G 二聚体
IgA2m2.N448Q 二聚体
IgA2m2.J_N710 二聚体
IgA2m2.N168G.S214P.N252G.N448G.J_N710 二聚体

图32

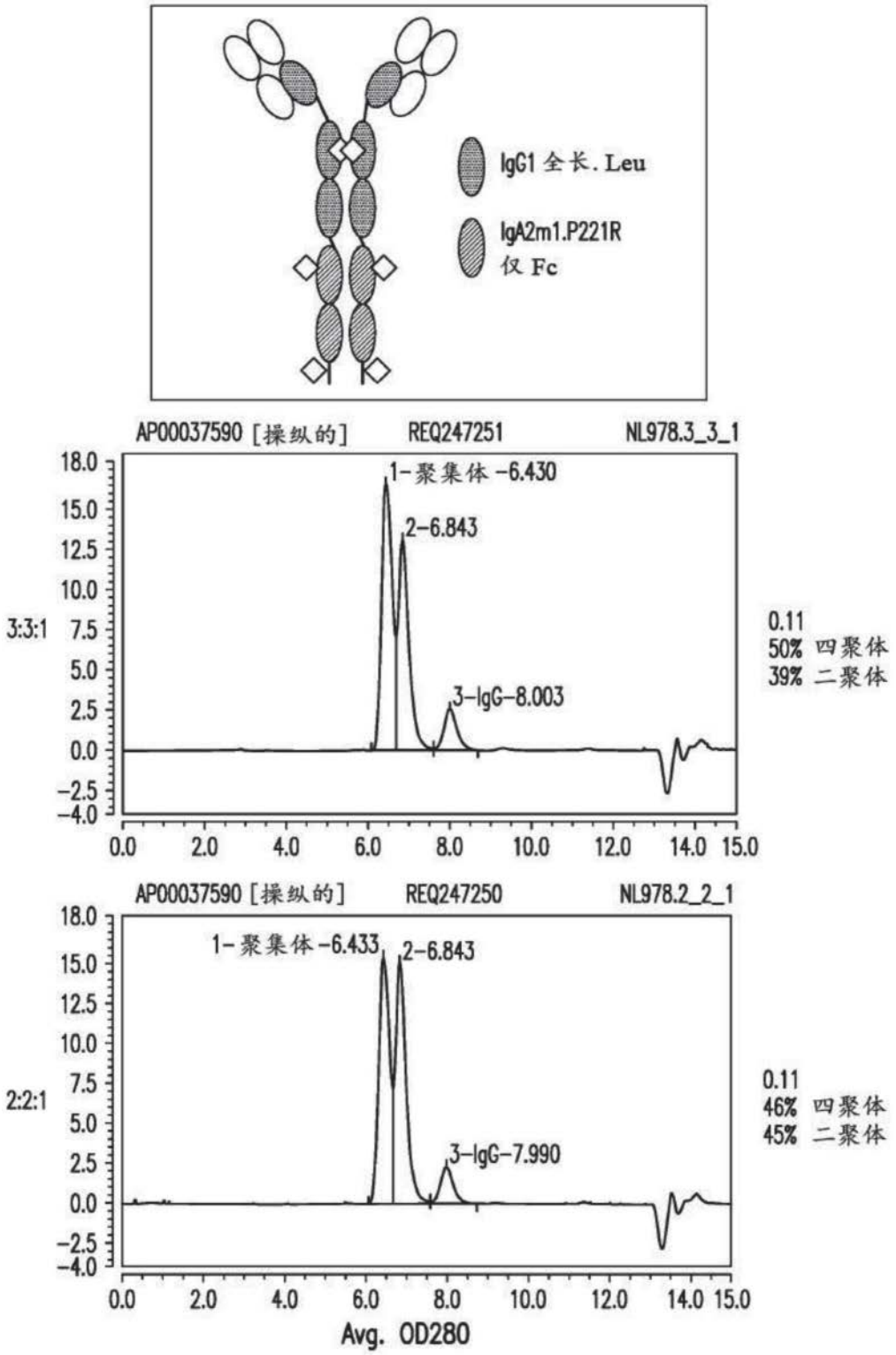

IgG1 全长. Leu
IgA2m1.P221R
仅 Fc
AP00037590 [操纵的] REQ247251 NL978.3_3_1
1-聚集体 -6.430
2-6.843
3-IgG-8.003
3:3:1
0.11
50% 四聚体
39% 二聚体
AP00037590 [操纵的] REQ247250 NL978.2_2_1
1-聚集体 -6.433
2-6.843
3-IgG-7.990
2:2:1
0.11
46% 四聚体
45% 二聚体
Avg. OD280

图33A

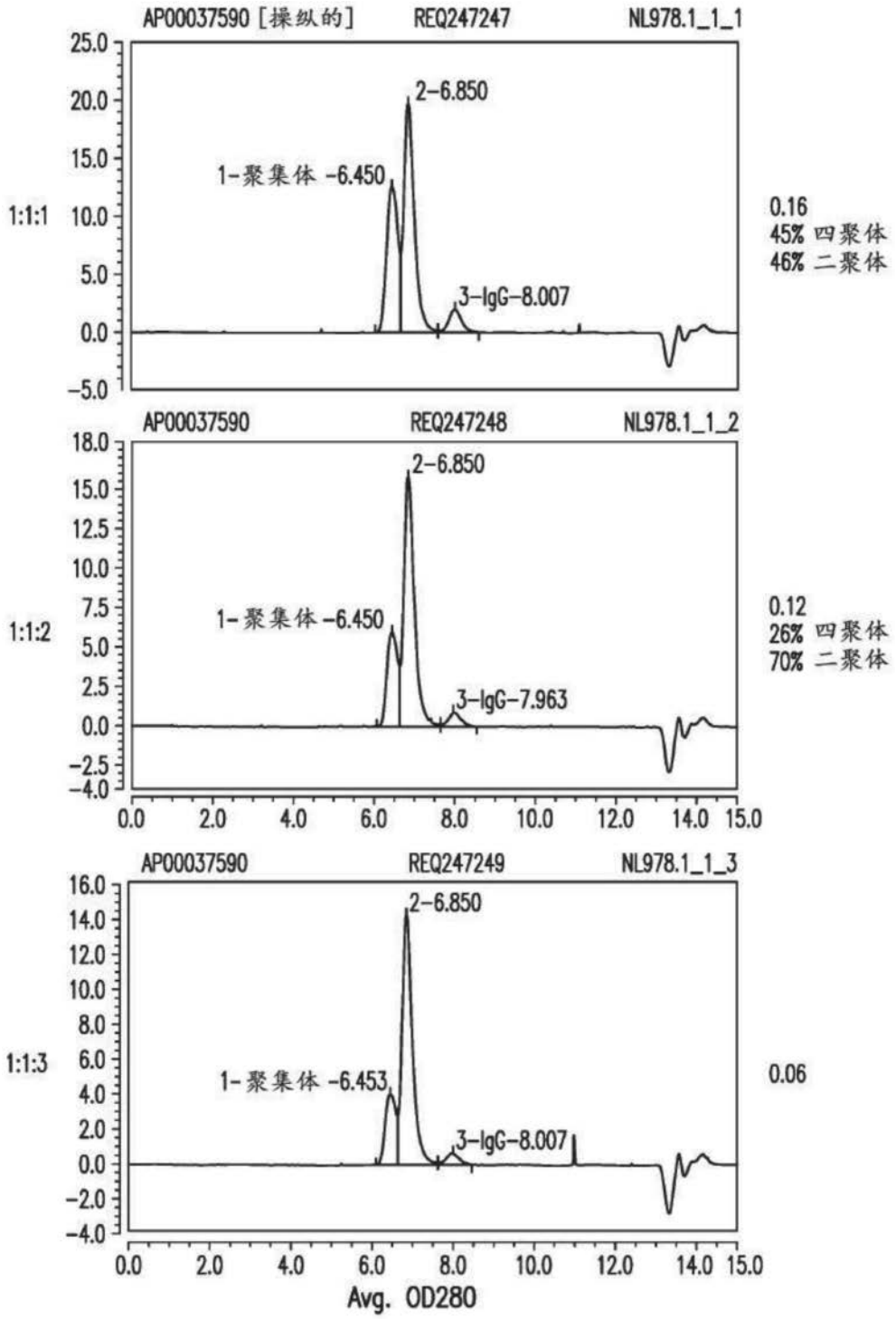

AP00037590 [操纵的]
REQ247247
NL978.1_1_1
2-6.850
1-聚集体 -6.450
3-IgG-8.007
1:1:1
0.16
45% 四聚体
46% 二聚体
AP00037590
REQ247248
NL978.1_1_2
2-6.850
1-聚集体 -6.450
3-IgG-7.963
1:1:2
0.12
26% 四聚体
70% 二聚体
AP00037590
REQ247249
NL978.1_1_3
2-6.850
1-聚集体 -6.453
3-IgG-8.007
1:1:3
0.06
Avg. OD280

图33A续

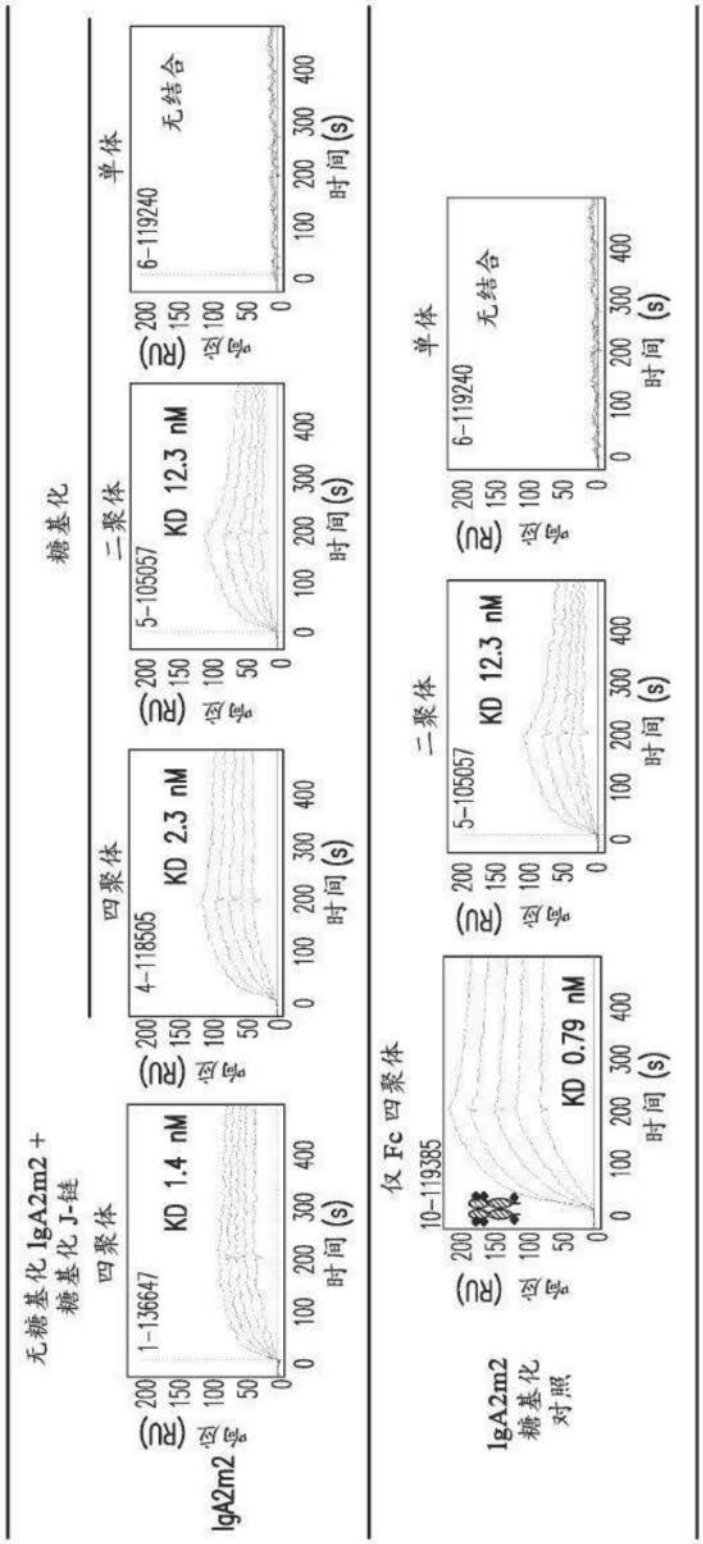

无糖基化 IgA2m2 +
糖基化 J-链
糖基化
四聚体
二聚体
单体
1-136647
KD 1.4 nM
4-118505
KD 2.3 nM
5-105057
KD 12.3 nM
6-119240
无结合
IgA2m2
仅 Fc 四聚体
10-119385
KD 0.79 nM
IgA2m2
糖基化
对照
(RU)
时间 (s)

图33B

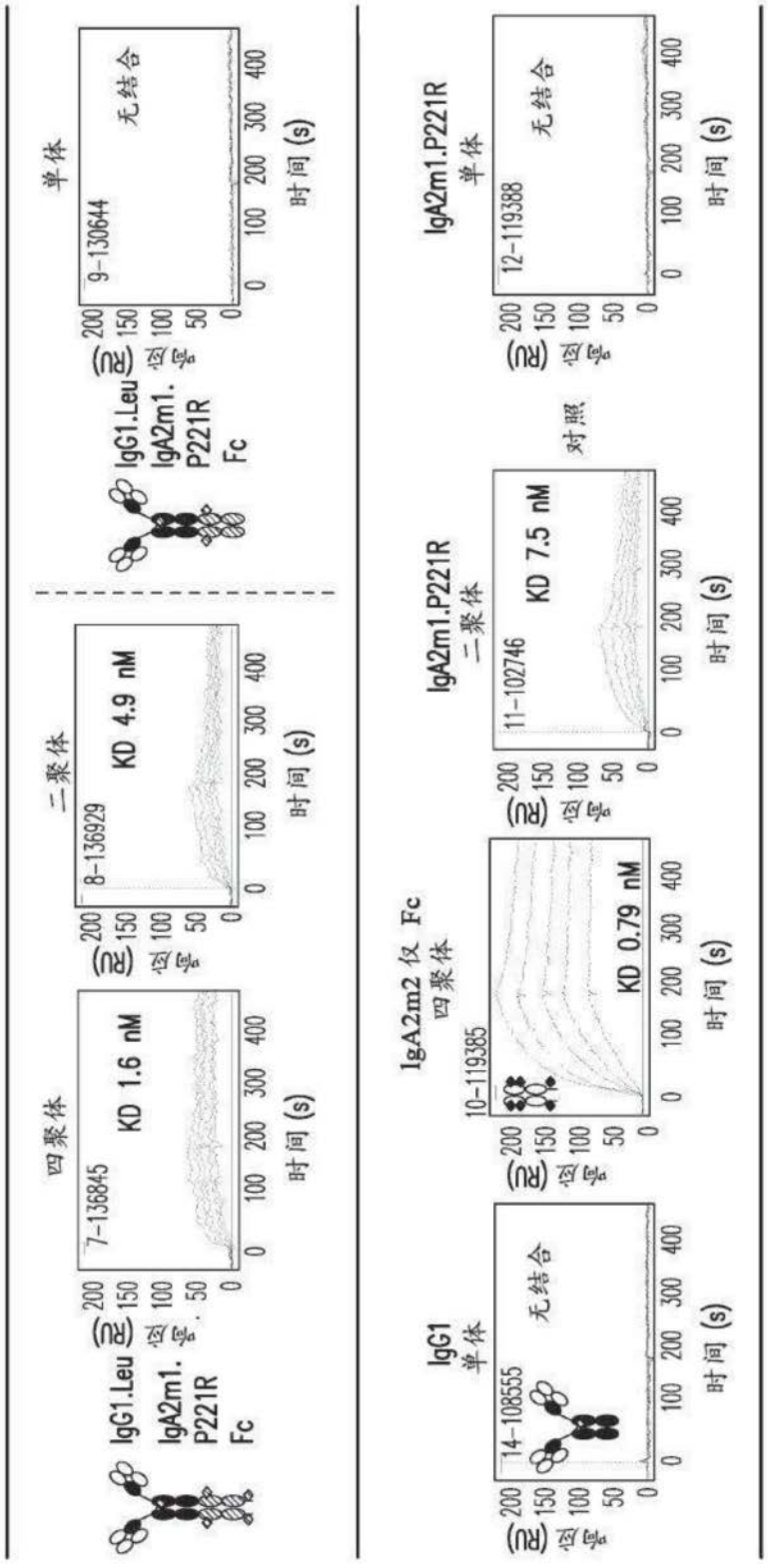

单体
二聚体
四聚体
IgG1.Leu
IgA2m1.
P221R
Fc
IgA2m2 仅 Fc
IgA2m1.P221R
对照
7-136845
KD 1.6 nM
8-136929
KD 4.9 nM
14-108555
无结合
10-119385
KD 0.79 nM
11-102746
KD 7.5 nM
12-119388
无结合
9-130644
无结合
时间 (s)
0 100 200 300 400
0 50 100 150 200

图33B续

		小鼠 plgR				人 plgR			
PUR	PUR	ka	kd	Rmax	KD	ka	kd	Rmax	KD
136645	无糖基化 IgA2m2 + 糖基化 J-链-四聚体 (NL1011.389.265)	4.62e5	5.82e-4	102.67	1.26nM	6.85(2)e5	5.43(5)e-4	100.4(1)	792pM
118505	糖基化 IgA2m2 四聚体 (NL387.389.265)	3.48e5	8.14e-4	122.2	2.34nM	4.69(2)e5	9.06(9)e-4	114.9(2)	1.93nM
105057	糖基化 IgA2m2 二聚体 (N.387.389.264)	2.19e5	2.70e-3	135.5	12.31nM	3.34(1)e5	0.00464(1)	110.0(2)	13.91nM
119240	糖基化 IgA2m2 单体 (NL387.389)			2.368	NB			1.924	NB
136845	糖基化 IgG1-全长. Leu:IgA2m1.P221R 仅 Fc + J-链-四聚体 (NL978.389.265)	4.87e5	7.68e-4	54.24	1.58nM	6.12(2)e5	0.001119(6)	53.49(6)	1.83nM
136929	糖基化 IgG1-全长. Leu:IgA2m1.P221R 仅 Fc + J-链-二聚体 (NL978.389.265)	4.61e5	0.00226	44.06	4.92nM	5.02(3)e5	0.00371(2)	32.06(8)	7.40nM
136844	糖基化 IgG1-全长. Leu:IgA2m1.P221 仅 Fc 无尾-单体 (NL984.389)			1.972	NB			0.7482	NB
119385	糖基化 IgA2m2.仅 Fc 四聚体	4.02e5	3.17e-4	243.8	790pM	4.80(1)e5	4.69(6)e-4	237.1(3)	980pM
102746	糖基化 IgA2m1.P221R 二聚体 (NL439.389.265)	3.39e5	0.00255	58.3	7.53nM	3.91(3)e5	0.00604(2)	43.6(1)	15.5nM
119388	糖基化 IgA2m1.P221R 单体 (NL439.389)			3.771	NB			5.3(9)	NB
119387	糖基化 IgA1.仅 Fc 二聚体	3.18e5	0.00356	52.7	11.20nM	5.01(3)e5	0.00552(2)	40.9(1)	11.02nM
108555	糖基化 IgG1 单体			0	NB			0.1033	NB

图33C

	Tm_1 (°C)	Tm_2 (°C)	Tm_3 (°C)
无糖基化 IgA2m2 + 糖基化 J-链-四聚体 (NL1011.389.265)	70.13	77.60	
糖基化 IgA2m2 四聚体 (NL387.389.265)	69.80		
糖基化 IgA2m2 二聚体 (N.387.389.265)	71.20		
糖基化 IgA2m2 单体 (NL387.389)	70.80		
糖基化 IgG1-全长. Leu:IgA2m1.P221R 仅 Fc + J-链-四聚体 (NL978.389.265)	63.3	67.3	77.2
糖基化 IgG1-全长. Leu:IgA2m1.P221R 仅 Fc + J-链-二聚体 (NL978.389.265)	63.5	67.2	72.0
糖基化 IgG1-全长. Leu:IgA2m1.P221R 仅 Fc 无尾-单体 (NL984.389)	67.20		
糖基化 IgA2m2.仅 Fc 四聚体	76.93		
糖基化 IgA2m1.P221R 二聚体 (NL439,389.265)	69.93		
糖基化 IgA2m1.P221R 单体 (NL439.389)	70.20		
糖基化 IgA1.仅 Fc 二聚体	67.07		

图33D

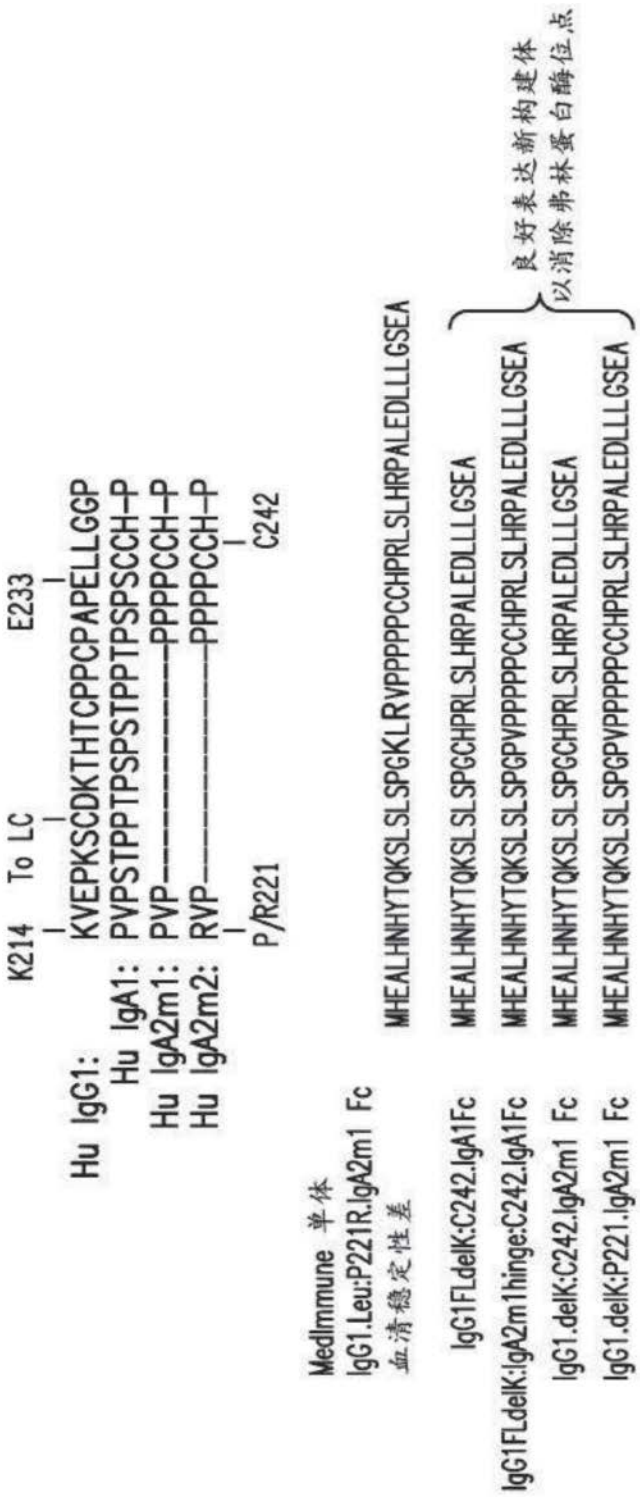

K214 To LC E233
Hu IgG1: KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
Hu IgA1: PVPSTPPTPSPSTPPTPSPSCCH-P
Hu IgA2m1: PVP----------PPPPCCH-P
Hu IgA2m2: RVP----------PPPPCCH-P
P/R221 C242
MedImmune 单体
IgG1.Leu:P221R.IgA2m1 Fc
血清稳定性差
MHEALHNHYTQKSLSLSPGKLRVPPPPPCCHPRLSLHRPALEDLLLGSEA
IgG1FLdelK:C242.IgA1Fc
MHEALHNHYTQKSLSLSPGCHPRLSLHRPALEDLLLGSEA
IgG1FLdelK:IgA2m1hinge:C242.IgA1Fc
MHEALHNHYTQKSLSLSPGPVPPPPPCCHPRLSLHRPALEDLLLGSEA
IgG1.delK:C242.IgA2m1 Fc
MHEALHNHYTQKSLSLSPGCHPRLSLHRPALEDLLLGSEA
IgG1.delK:P221.IgA2m1 Fc
MHEALHNHYTQKSLSLSPGPVPPPPPCCHPRLSLHRPALEDLLLGSEA
良好表达新构建体
以消除弗林蛋白酶位点

图34A

名称	Avg. OD280nm	SDev	用途?
IgG1FLdelK_P221toP227.IgA2m1hinge_C242.IgA1Fc	1.33	0.07	是
IgG1FLdelK_V222toP227.IgA2hinge_C242.IgA1Fc	1.23	0.10	否（类似于第一个）
IgG1FL_C241.IgA1Fc	1.18	0.03	否（不是delk）
IgG1FL_C241.IgA2m1Fc	1.12	0.14	否（不是delk）
IgG1FLdelK_V222toP227.IgA2hinge_C241.IgA1Fc	1.08	0.04	否（C241）
IgG1FLdelK_C242.IgA2m1Fc	1.02	0.23	是
IgG1FLdelK_C242.IgA1Fc	0.96	0.02	是
IgG1FLdelK_P221.IgA2m1Fc	0.88	0.06	是
huIgG1（对照）	0.88	0.04	对照，是
IgG1FLLeuP221R_IgA2m1Fc（血清不稳定原始构建体）	0.87	0.02	对照，是
IgG1FLdelK_R221toP227.IgA2m2hinge_C242.IgA1Fc	0.84	0.03	
IgG1FLdelK_LeuP221R.IgA2m1Fc	0.79	0.02	
IgG1FLdelK_P223toP227.IgA2hinge_C242.IgA1Fc	0.79	0.05	
IgG1FLdelK_P223toP227.IgA2hinge_C241.IgA1Fc	0.69	0.02	
IgG1FLdelK_V222.IgA2m1Fc	0.61	0.01	
IgG1FLdelK_C241.IgA2m1Fc	0.54	0.06	
IgG1FLdelK_R221.IgA2m2Fc	0.49	0.06	
IgG1FLdelK_P223.IgA2m2Fc	0.48	0.04	

考虑表达
>/=hIgG1 的构建体

	# 构建体	表达 (OD 280nm ≥0.8)
IgG1 全长：IgA1 Fc	12	7
IgG1 全长：IgA2m1 Fc	10	4
IgG1 全长：IgA2m2 Fc	10	0

IgA2m2 Fc 融合体的
表达不如 IgA1 和
IgA2m1 的 Fc 融合体

xIL13.NL1147.IgG1.delK_C
242.IgA1.Fc 二聚体

图34B

考虑表达
>/=h1gG1 的构建体

	# 构建体	表达 (OD 280nm ≥0.8)
IgG1 全长: IgA1 Fc	12	7
IgG1 全长: IgA2m1 Fc	10	4
IgG1 全长: IgA2m2 Fc	10	0

IgA2m2 Fc 融合体的
表达不如 IgA1 和
IgA2m1 的 Fc 融合体

xIL13.NL1147.IgG1.delK_C
242.IgA1.Fc 二聚体

名称	Avg. OD280nm	SDev	用途?
IgG1FLdelK_P223.IgA2m1Fc	0.48	0.03	
IgG1FL_C242.IgA2m1Fc	0.46	0.01	
IgG1FLdelK_P221R.IgA2m1Fc	0.44	0.02	
IgG1FLdelK_LeuR221P.IgA2m2Fc	0.43	0.04	
IgG1FLdelK_P221toP227.IgA2m1hinge_C241.IgA1Fc	0.40	0.03	
IgG1FLdelK_C242.IgA2m2Fc	0.37	0.03	
IgG1FL_C242.IgA1Fc	0.33	0.00	
IgG1FLdelK_C241.IgA1Fc	0.32	0.02	
IgG1FLdelK_LeuP221.IgA2m1Fc	0.30	0.05	
IgG1FL_C242.IgA2m2Fc	0.30	0.02	
IgG1FLdelK_C241.IgA2m2Fc	0.23	0.01	
IgG1FLdelK_R221toP227.IgA2m2hinge_C241.IgA1Fc	0.21	0.01	
IgG1FLdelK_R221P.IgA2m2Fc	0.17	0.02	
IgG1FLdelK_LeuR221.IgA2m2Fc	0.03	0.05	
IgG1FLdelK_V222.IgA2m2Fc	0.02	0.01	
IgG1FL_C241.IgA2m2Fc	0.02	0.01	

图34B续

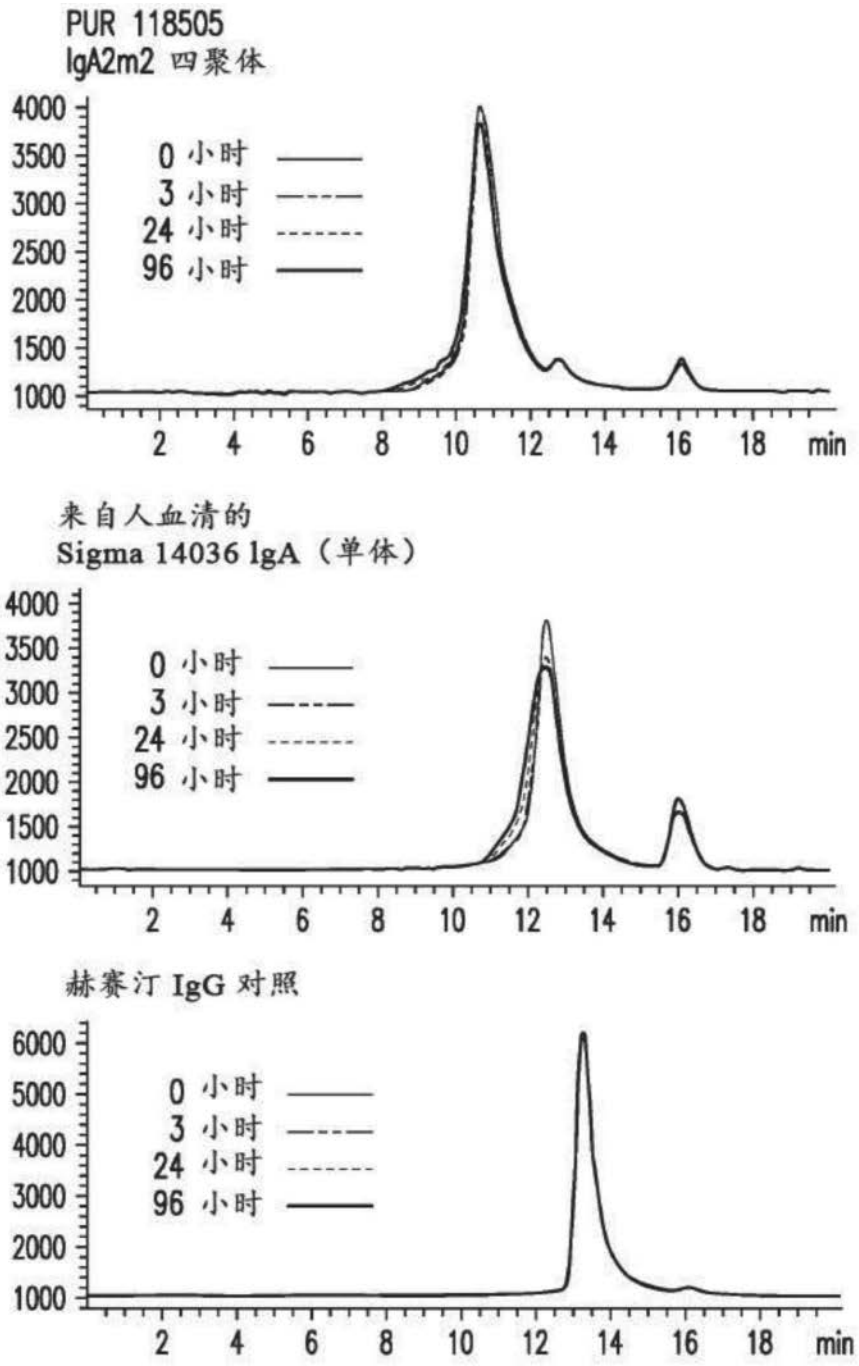
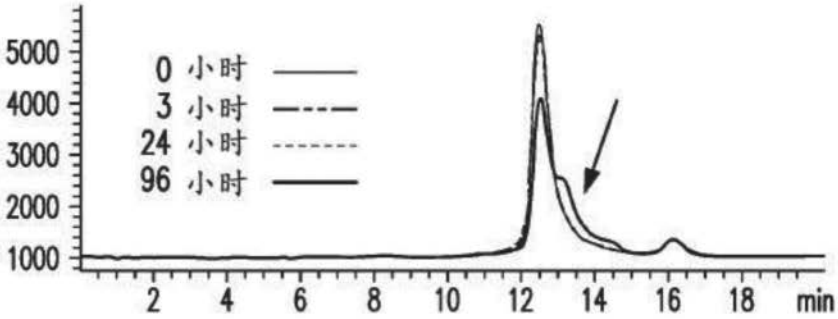
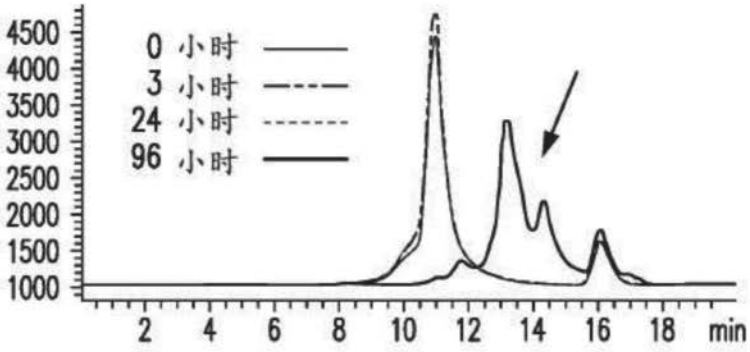

PUR 118505
IgA2m2 四聚体
0 小时
3 小时
24 小时
96 小时
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
2
4
6
8
10
12
14
16
18
min
来自人血清的
Sigma 14036 IgA（单体）
0 小时
3 小时
24 小时
96 小时
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
2
4
6
8
10
12
14
16
18
min
赫赛汀 IgG 对照
0 小时
3 小时
24 小时
96 小时
6000
5000
4000
3000
2000
1000
2
4
6
8
10
12
14
16
18
min

图34C

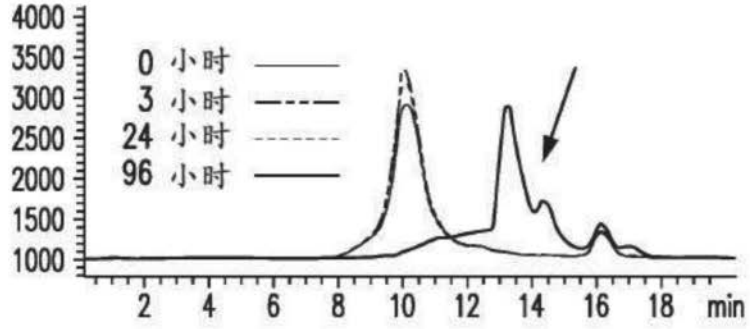
PUR 136844
IgG 全长:P221R.IgA2m1 仅 Fc 无尾单体



PUR 136929
IgG 全长:P221R.IgA2m1 仅 Fc 二聚体



PUR 136845
IgG 全长:P221R.IgA2m1 仅 Fc 四聚体



所有抗体都被 131I 标记。将 5 uCi 的每种抗体加入 100 ul 小鼠血浆中，并在 37℃ 下孵育长达 96 小时。使用干冰冷冻抗体，并在 -80℃ 下储存 0、3 或 6、24 和 96 小时以阻止任何进一步降解。对抗体进行 HPLC 分析，并显示了放射性标记保留时间的追踪。

图34C续1

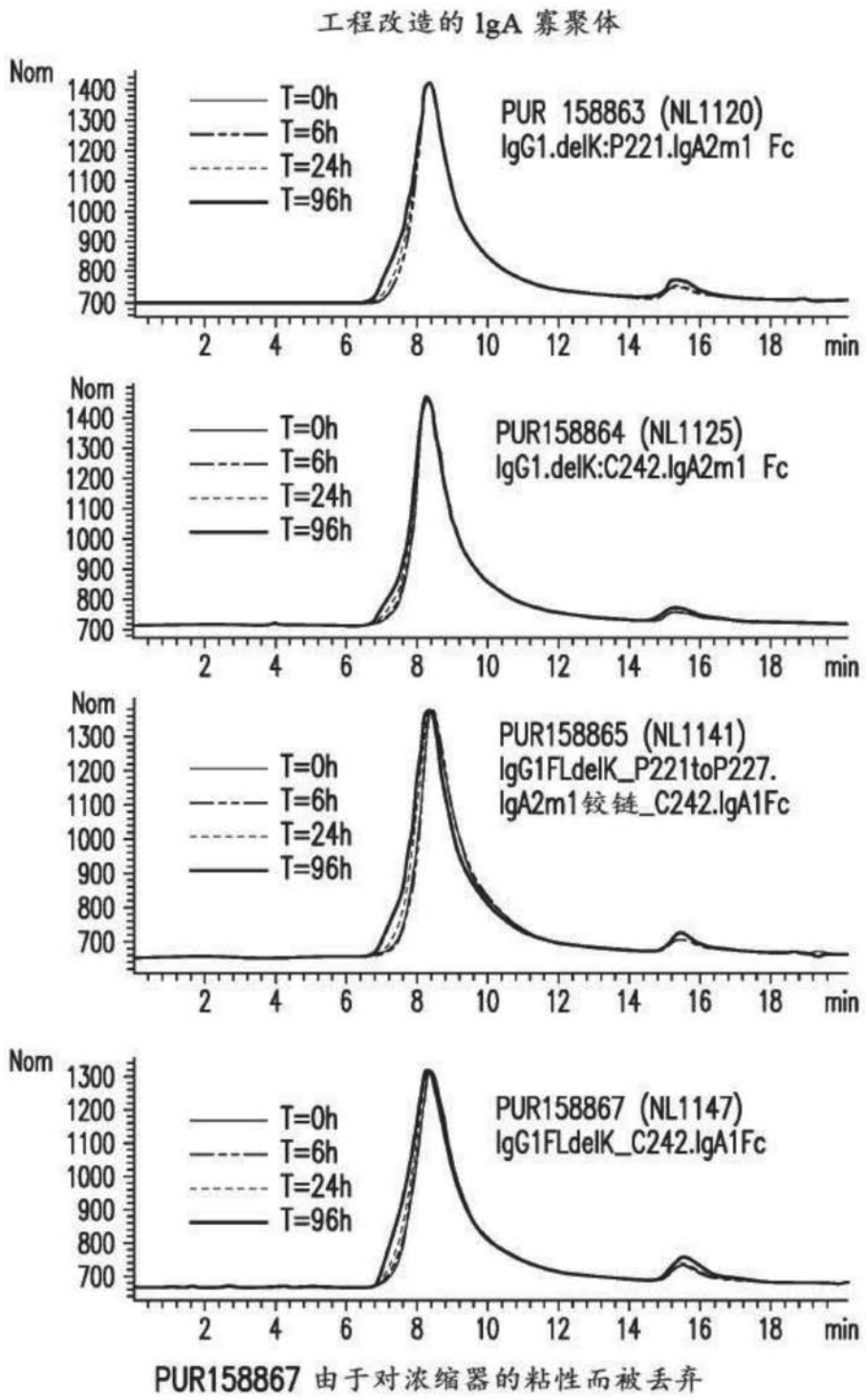

工程改造的 IgA 寡聚体
Nom
T=0h
T=6h
T=24h
T=96h
PUR 158863 (NL1120)
IgG1.delK:P221.IgA2m1 Fc
PUR158864 (NL1125)
IgG1.delK:C242.IgA2m1 Fc
PUR158865 (NL1141)
IgG1FLdelK_P221toP227.
IgA2m1铰链_C242.IgA1Fc
PUR158867 (NL1147)
IgG1FLdelK_C242.IgA1Fc
min
PUR158867 由于对浓缩器的粘性而被丢弃

图34C续2

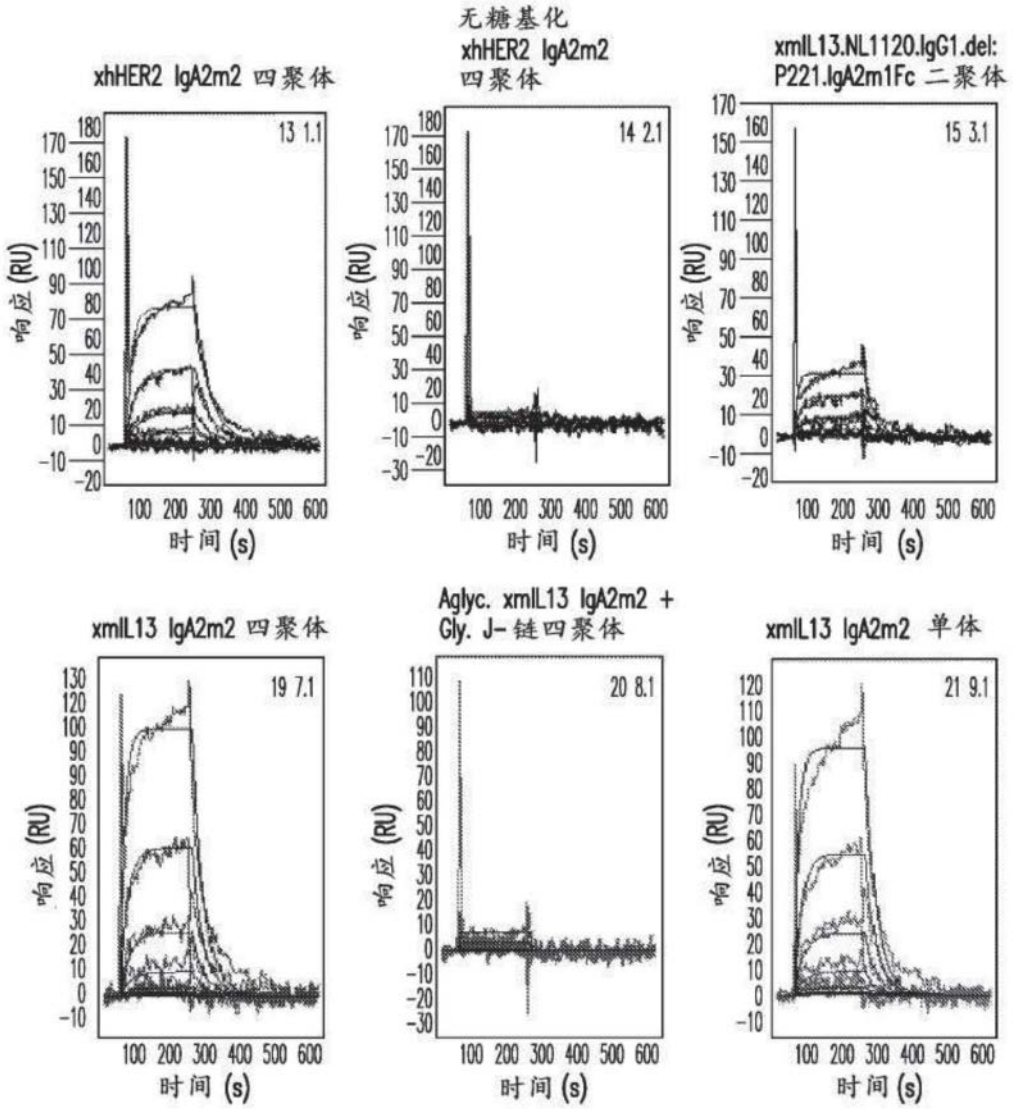

xhHER2 IgA2m2 四聚体
13 1.1
无糖基化
xhHER2 IgA2m2
四聚体
14 2.1
xmIL13.NL1120.IgG1.del:
P221.IgA2m1Fc 二聚体
15 3.1
xmIL13 IgA2m2 四聚体
19 7.1
Aglyc. xmIL13 IgA2m2 +
Gly. J-链四聚体
20 8.1
xmIL13 IgA2m2 单体
21 9.1
响应 (RU)
时间 (s)

图35A

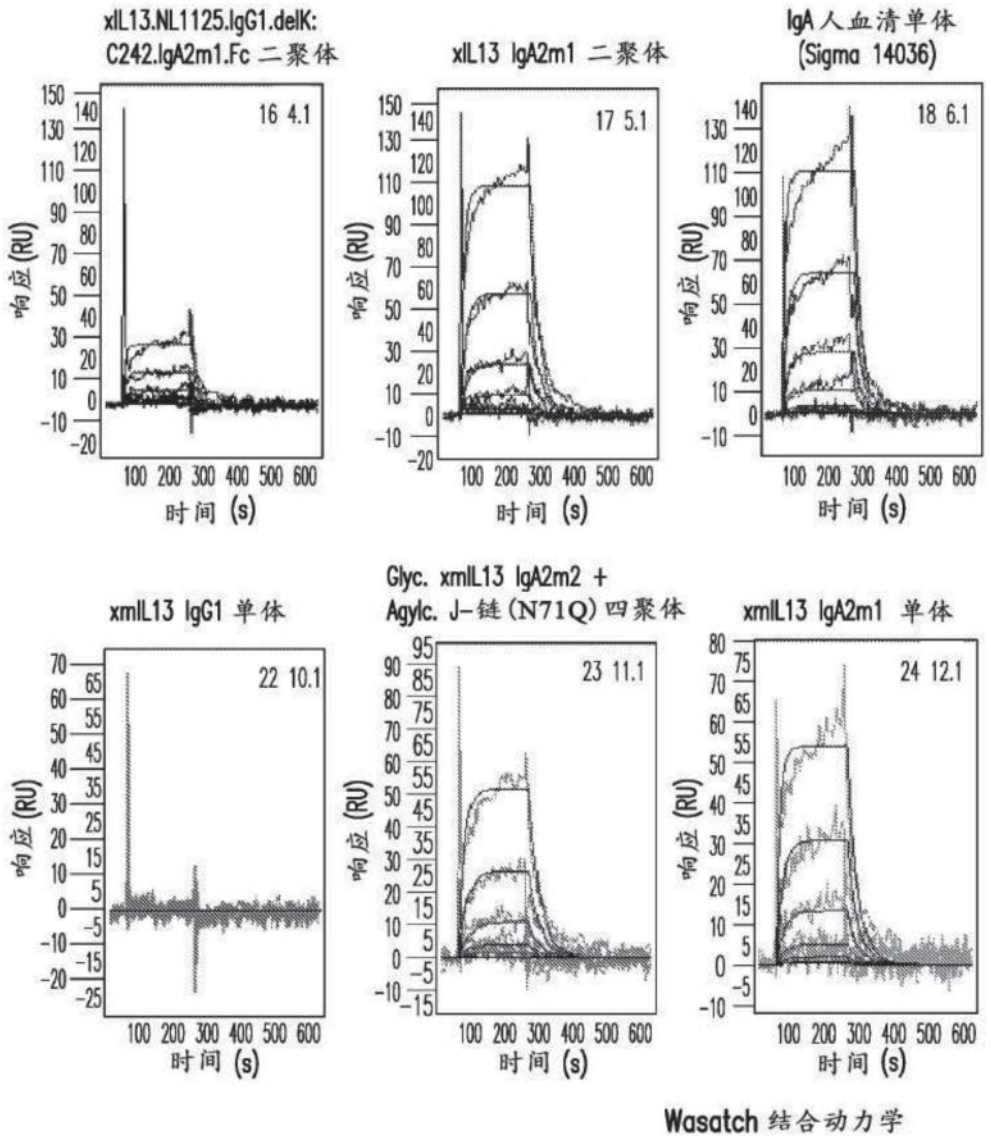

xIL13.NL1125.IgG1.delK:
C242.IgA2m1.Fc 二聚体
16 4.1
xIL13 IgA2m1 二聚体
17 5.1
IgA 人血清单体
(Sigma 14036)
18 6.1
xmIL13 IgG1 单体
22 10.1
Glyc. xmIL13 IgA2m2 +
Agylc. J-链(N71Q)四聚体
23 11.1
xmIL13 IgA2m1 单体
24 12.1
响应 (RU)
时间 (s)
Wasatch 结合动力学

图35A(续)

	ka	ka st dev	kd	kd st dev	KD	KD St Dev
糖基化 xhHer2.IgA2m2 四聚体	1.37E+04	3.89E+03	2.20E-02	7.82E-03	1.59E-06	2.00E-07
无糖基化 xhHer2.IgA2m2 四聚体	无结合					
xmIL-13.IgA2m1 二聚体	3.51E+04	2.07E+03	3.71E-02	8.06E-04	1.06E-06	5.10E-08
xIL13.hIgG1 单体	无结合					
糖基化 IgA 人血清单体 (Sigma I4036)	2.76E+04	1.27E+03	4.82E-02	3.79E-04	1.75E-06	9.29E-08
Glyc. xmIL13 IgA2m2 + Aglyc. J链 (N71Q) 寡聚体混合物	1.54E+04	1.89E+03	2.71E-02	2.78E-03	1.77E-06	2.14E-07
Aglyc. xmIL13 IgA2m2 + Glyc. J链四聚体	无结合					

图35B

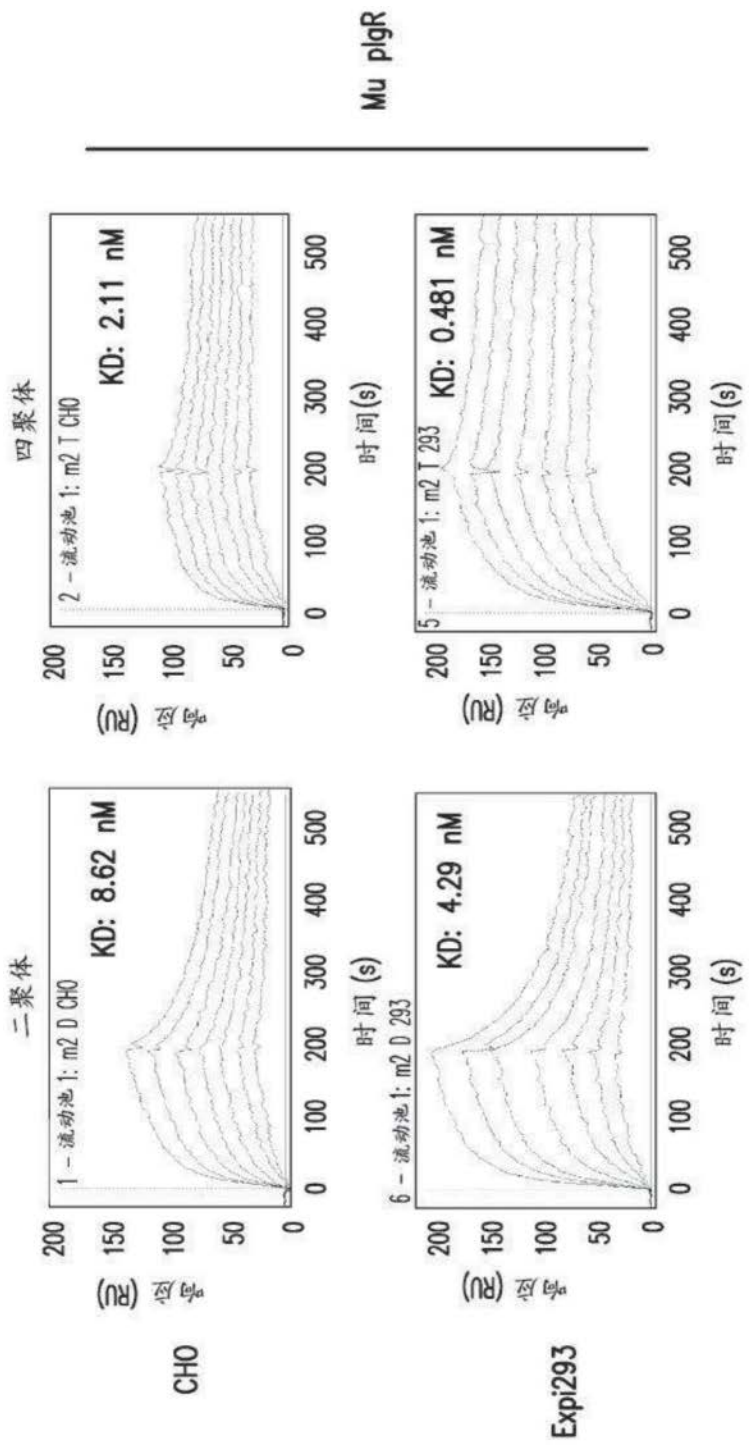

Mu plgR
四聚体
二聚体
CHO
Expi293
2 – 流动池 1: m2 T CHO
KD: 2.11 nM
5 – 流动池 1: m2 T 293
KD: 0.481 nM
1 – 流动池 1: m2 D CHO
KD: 8.62 nM
6 – 流动池 1: m2 D 293
KD: 4.29 nM
响应 (RU)
时间 (s)
0
50
100
150
200
0
100
200
300
400
500

图36A

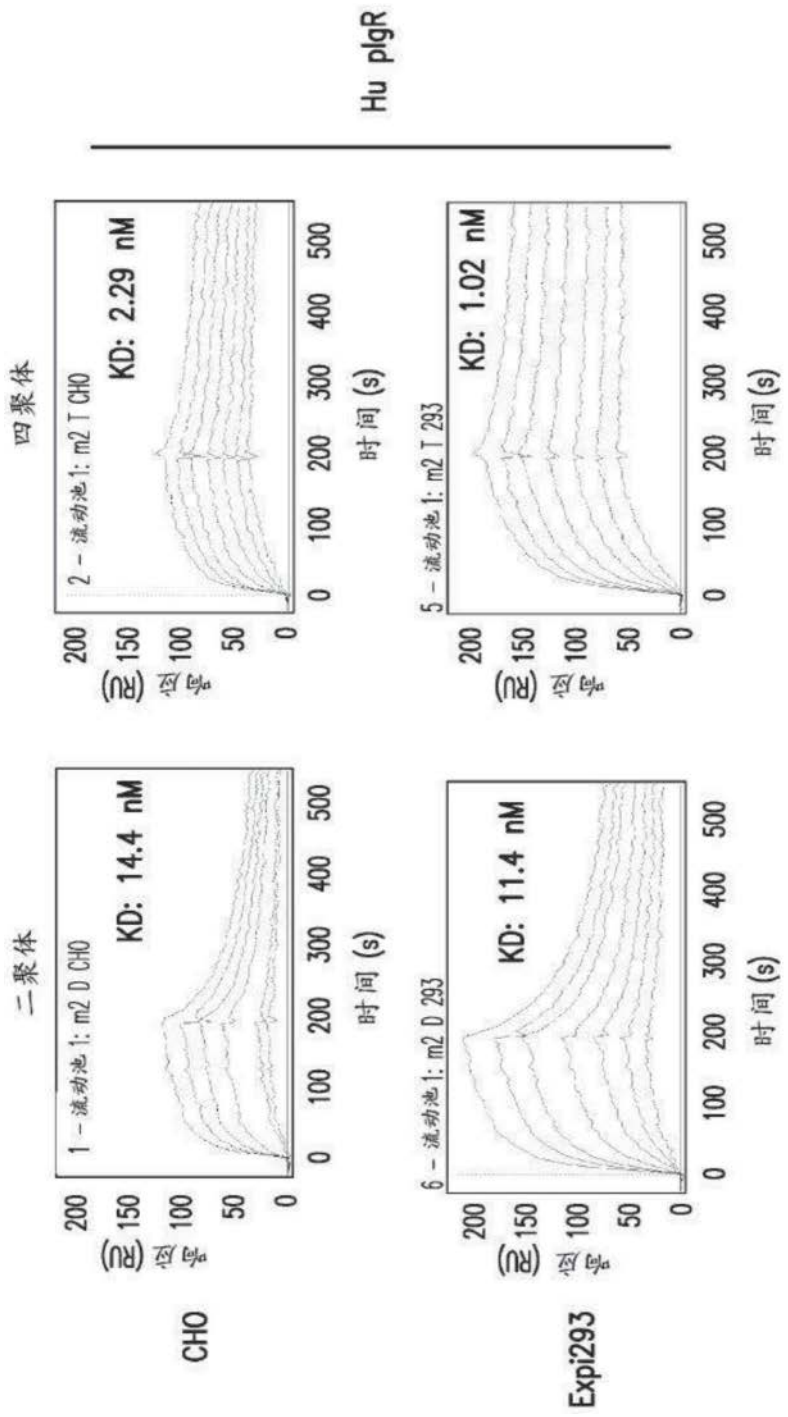

Hu pIgR
四聚体
二聚体
CHO
Expi293
2 – 流动池 1: m2 T CHO
KD: 2.29 nM
5 – 流动池 1: m2 T 293
KD: 1.02 nM
1 – 流动池 1: m2 D CHO
KD: 14.4 nM
6 – 流动池 1: m2 D 293
KD: 11.4 nM
响应 (RU)
时间 (s)
0
50
100
150
200
0
100
200
300
400
500

图36A续

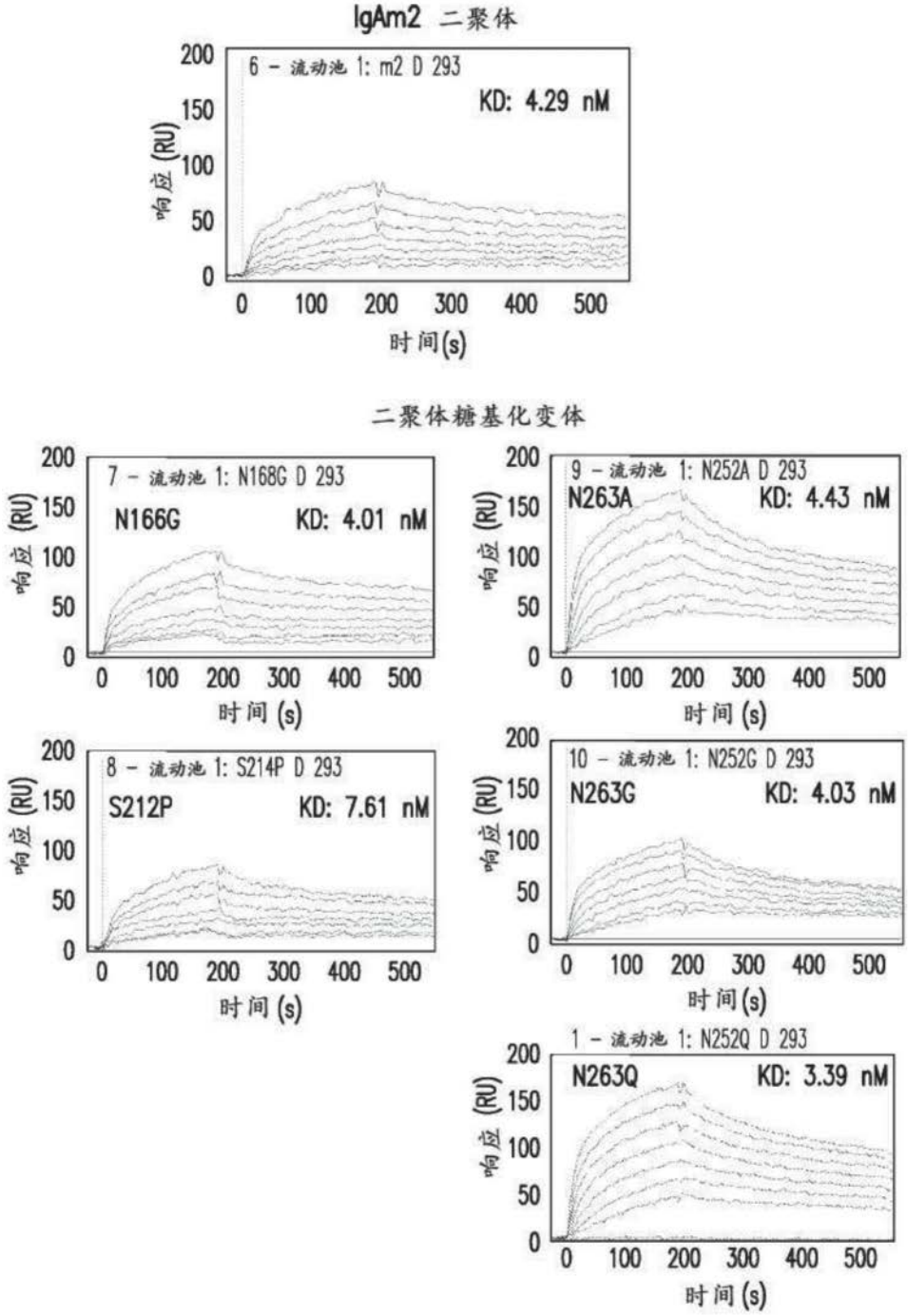

IgAm2 二聚体
6 - 流动池 1: m2 D 293
KD: 4.29 nM
响应 (RU)
时间(s)
二聚体糖基化变体
7 - 流动池 1: N168G D 293
N166G
KD: 4.01 nM
9 - 流动池 1: N252A D 293
N263A
KD: 4.43 nM
8 - 流动池 1: S214P D 293
S212P
KD: 7.61 nM
10 - 流动池 1: N252G D 293
N263G
KD: 4.03 nM
1 - 流动池 1: N252Q D 293
N263Q
KD: 3.39 nM

图36B

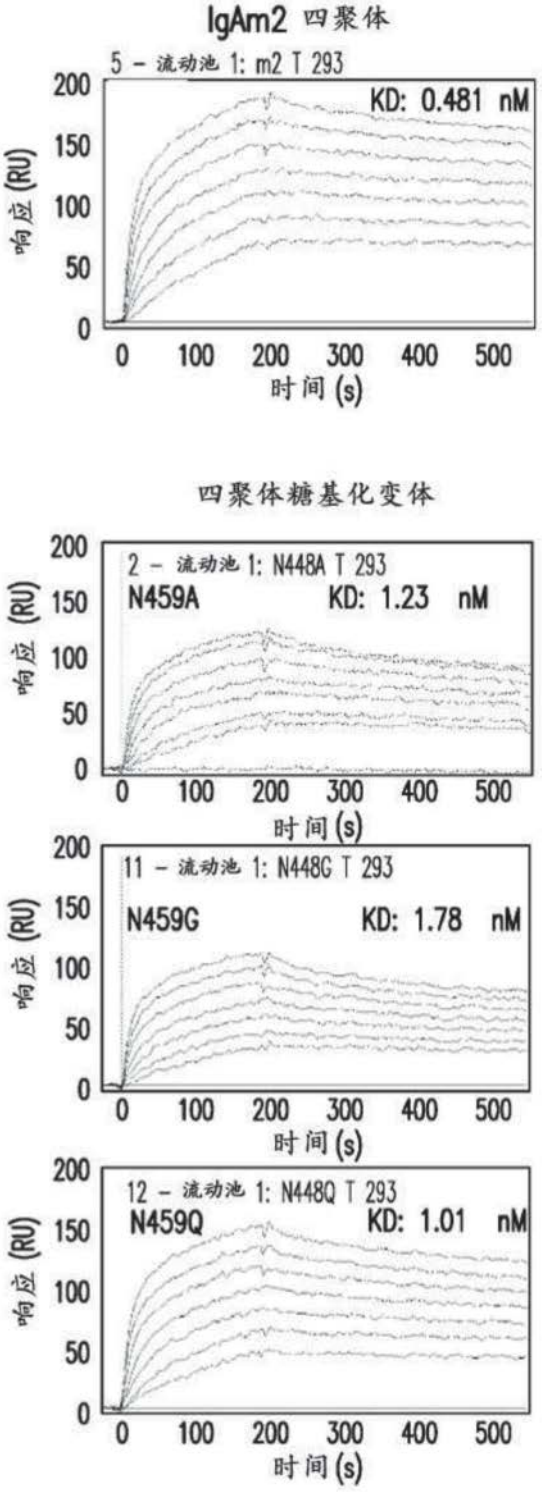

IgAm2 四聚体
5 – 流动池 1: m2 T 293
KD: 0.481 nM
响应 (RU)
时间 (s)
四聚体糖基化变体
2 – 流动池 1: N448A T 293
N459A
KD: 1.23 nM
11 – 流动池 1: N448G T 293
N459G
KD: 1.78 nM
12 – 流动池 1: N448Q T 293
N459Q
KD: 1.01 nM

图36B续

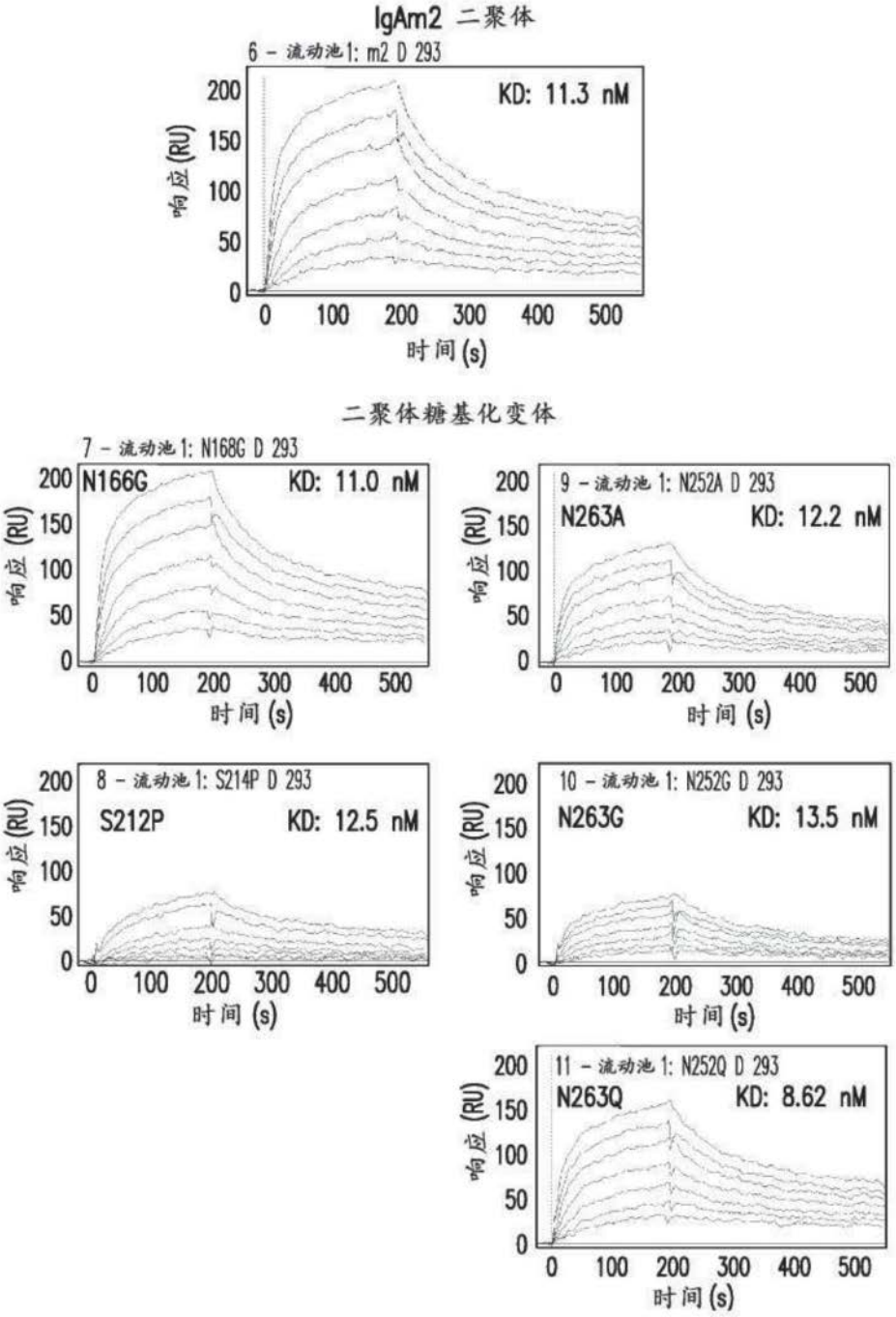

IgAm2 二聚体
6 - 流动池1: m2 D 293
KD: 11.3 nM
响应 (RU)
时间 (s)
二聚体糖基化变体
7 - 流动池1: N168G D 293
N166G
KD: 11.0 nM
9 - 流动池 1: N252A D 293
N263A
KD: 12.2 nM
8 - 流动池 1: S214P D 293
S212P
KD: 12.5 nM
10 - 流动池 1: N252G D 293
N263G
KD: 13.5 nM
11 - 流动池 1: N252Q D 293
N263Q
KD: 8.62 nM

图36C

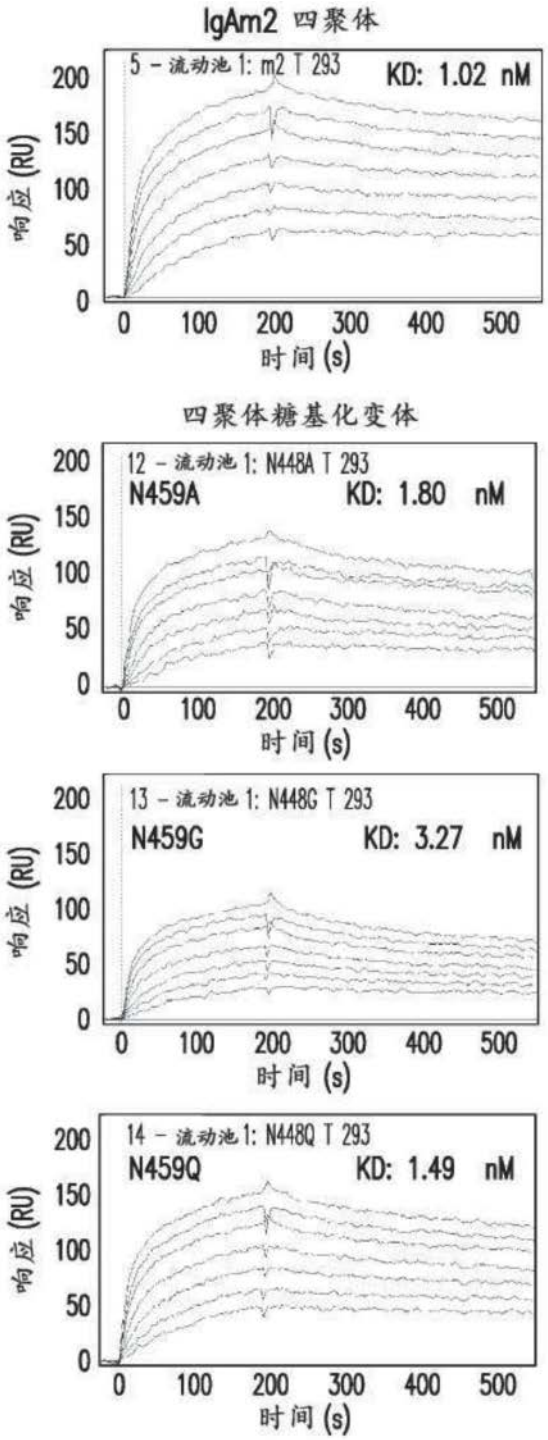

IgAm2 四聚体
5 - 流动池 1: m2 T 293
KD: 1.02 nM
响应 (RU)
时间 (s)
四聚体糖基化变体
12 - 流动池 1: N448A T 293
N459A
KD: 1.80 nM
13 - 流动池 1: N448G T 293
N459G
KD: 3.27 nM
14 - 流动池 1: N448Q T 293
N459Q
KD: 1.49 nM

图36C续

Mu plgR 结合

	ka	kd	Rmax	KD	Res sd
m2 D CHO	2.95e4(9)e5	0.002546(7)	121.4(1)	8.62(4)nM	12.038
m2 T CHO	4.098(9)e5	8.63(4)e-4	87.57(7)	2.11(1)nM	7.555
m2 M CHO	41930.5	3.89E-214	1.658	0	2.672
hIgG1 M CHO	3.44E+06	8.75E-101	0.3661	0	2.53
m2 T 293	4.93(1)e5	2.37(4)e-4	159.2(1)	481(9)pM	17.41
m2 D 293	3.586(9)e5	0.001538(5)	216.9(2)	4.29(2)nM	19.164
N168G D 293	3.742(8)e5	0.001501(4)	224.3(2)	4.01(1)nM	17.433
S214P D 293	1.678(6)e5	0.001276(8)	56.9(1)	7.61(6)nM	7.394
N252A D 293	3.65(1)e5	0.001616(6)	135.2(2)	4.43(2)nM	15.224
N252G D 293	3.95(1)e5	0.001591(8)	70.2(1)	4.03(2)nM	9.817
N252Q D 293	3.863(9)e5	0.001309(5)	145.4(1)	3.39(1)nM	12.589
N448A T 293	4.489(9)e5	5.51(4)e-4	104.66(8)	1.227(9)nM	9.246
N448G T 293	3.90(1)e5	6.93(6)e-4	115.3(1)	1.78(2)nM	14.346
N448Q T 293	4.246(9)e5	4.27(4)e-4	135.4(1)	1.01(1)nM	12.7
JN71Q T 293	4.72(1)e5	2.87(5)e-4	146.1(1)	610(10)pM	17.218

072216 IgA Mu plgR
包括 49-96, 3, 8, 20, 32
排除 51, 56, 68, 80, Conc. 1 (500nM), 空白 2,

Hu plgR 结合

	ka	kd	Rmax	KD	Res sd
m2 D CHO	3.02(1)e5	0.004362(9)	114.6(1)	14.44(5)nM	9.875
m2 T CHO	4.080(9)e5	9.33(4)e-4	97.71(8)	2.29(1)nM	9.039
m2 M CHO	2.32E+05	6.79E-261	2.275	0(0.000004)	3.533
hIgG1 M CHO	0(9e19)	0(1e1)	0(2e-2)	0(0.00001)	4.101
m2 T 293	3.966(9)e5	4.05(4)e-4	164.8(1)	1.02(1)nM	16.861
m2 D 293	3.040(7)e5	0.003474(6)	176.9(2)	11.43(3)nM	12.819
N168G D 293	3.051(7)e5	0.003359(6)	186.6(2)	11.01(3)nM	12.742
S214P D 293	1.225(5)e5	0.001532(8)	54.1(1)	12.51(8)nM	6.451
N252A D 293	2.937(9)e5	0.003572(8)	116.9(1)	12.16(5)nM	10.235
N252G D 293	2.618(9)e5	0.003521(9)	60.31(8)	13.45(6)nM	5.794
N252Q D 293	3.177(7)e5	0.002740(5)	123.0(1)	8.62(3)nM	9.17
N448A T 293	3.833(8)e5	6.91(4)e-4	107.18(9)	1.80(1)nM	10.072
N448G T 293	3.39(1)e5	0.001108(6)	111.8(1)	3.27(2)nM	13.003
N448Q T 293	4.011(8)e5	5.97(4)e-4	139.1(1)	1.49(1)nM	12.884
JN71Q T 293	4.12(1)e5	3.47(5)e-4	152.5(1)	840(10)pM	17.423

072216 IgA Hu plgR
包括 49-96, 8, 20, 32
排除 51, 56, 68, 80. conc. 1 (500nM)

图36D

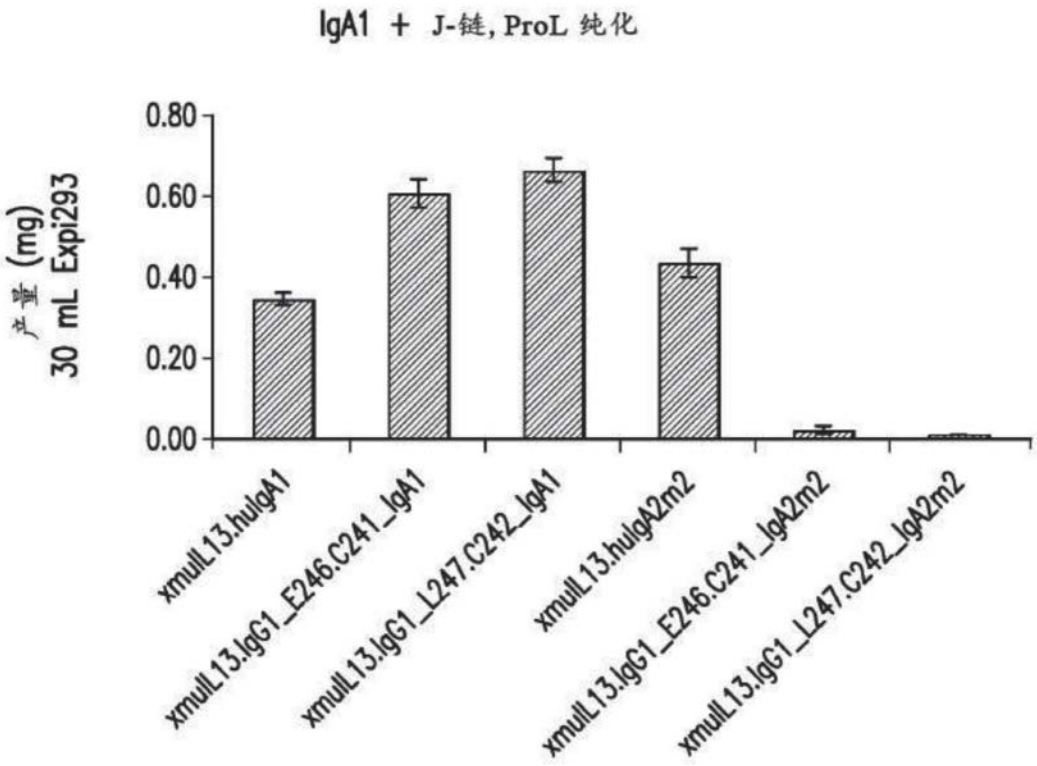

IgA1 + J-链, ProL 纯化
产量 (mg)
30 mL Expi293
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
xmuIL13.huIgA1
xmuIL13.IgG1_E246.C241_IgA1
xmuIL13.IgG1_L247.C242_IgA1
xmuIL13.huIgA2m2
xmuIL13.IgG1_E246.C241_IgA2m2
xmuIL13.IgG1_L247.C242_IgA2m2

图37A

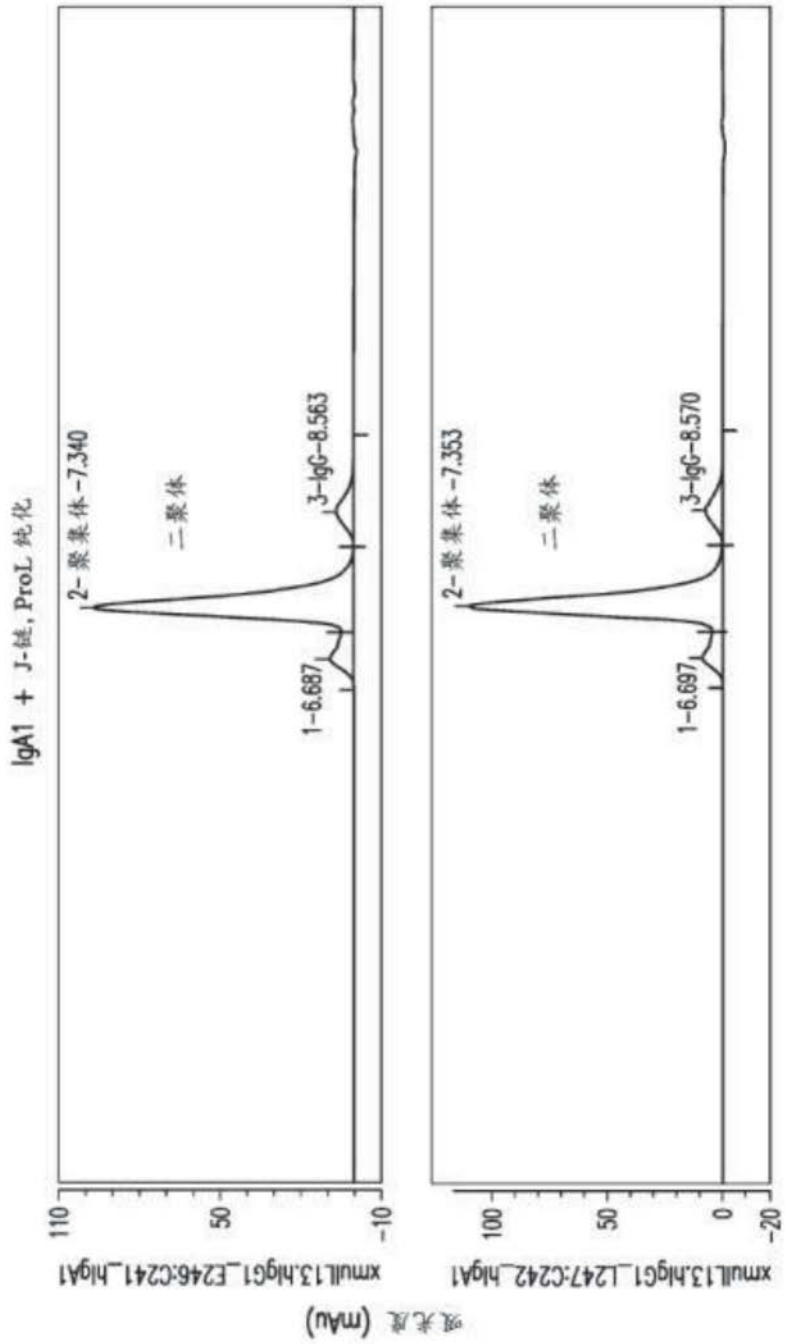

IgA1 + J-链, ProL 纯化
2-聚集体-7.340
二聚体
3-IgG-8.563
1-6.687
2-聚集体-7.353
二聚体
3-IgG-8.570
1-6.697
xmuLL3,hIgG1_E246:C241_hIgA1
xmuLL3,hIgG1_L247:C242_hIgA1
吸光度 (mAu)
110
50
-10
100
50
0
-20

图37B

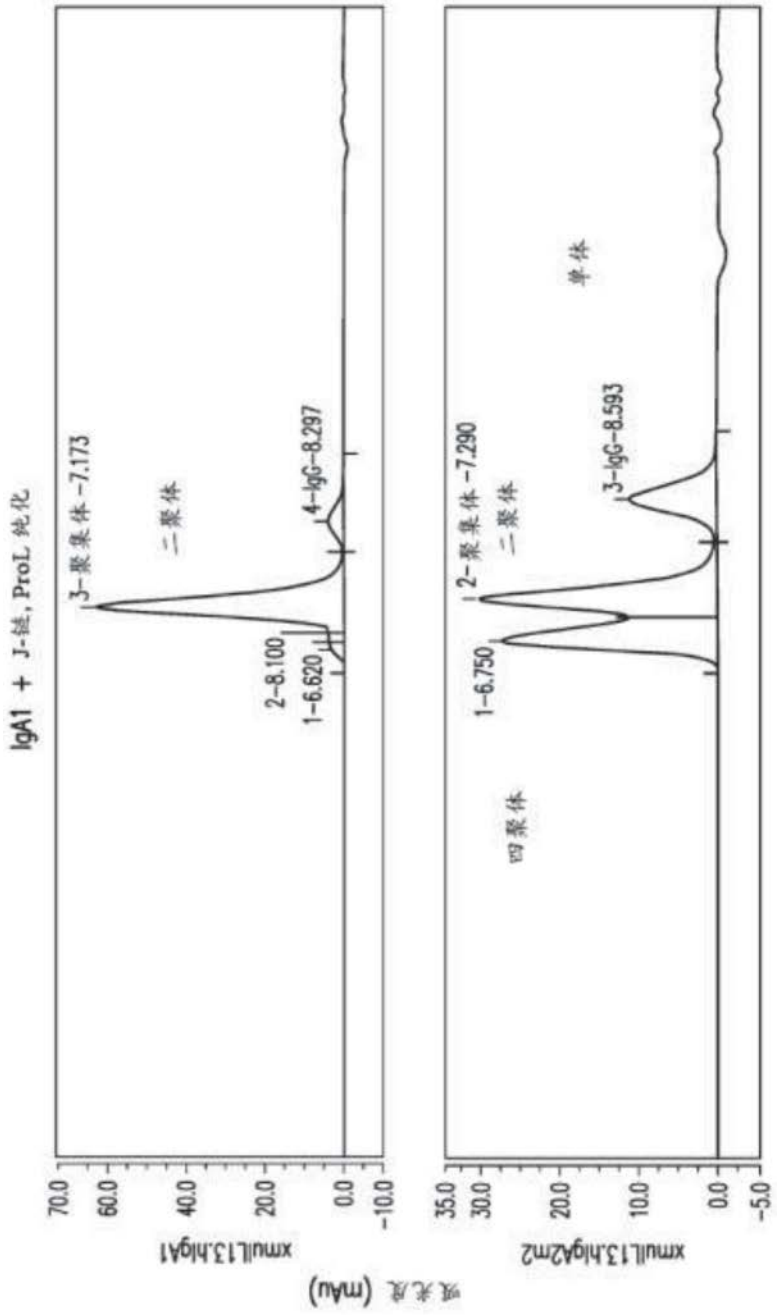

IgA1 + J-链, ProL 纯化
3-聚集体-7.173
二聚体
4-IgG-8.297
2-8.100
1-6.620
xmuL13.hIgA1
70.0
60.0
40.0
20.0
0.0
-10.0
2-聚集体-7.290
二聚体
3-IgG-8.593
单体
1-6.750
四聚体
xmuL13.hIgA2m2
35.0
30.0
20.0
10.0
0.0
-5.0
吸光度 (mAu)

图37B续1

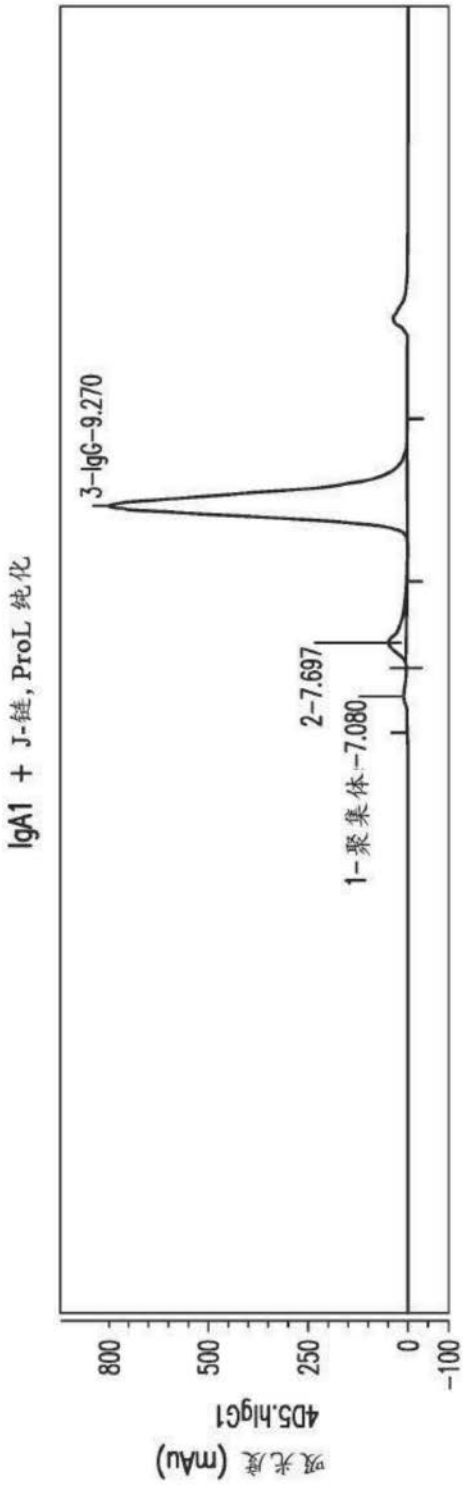

IgA1 + J-链, ProL 纯化
3-IgG-9.270
2-7.697
1-聚集体-7.080
4D5.hIgG1
吸光度 (mAu)
800
500
250
0
-100

图37B续2

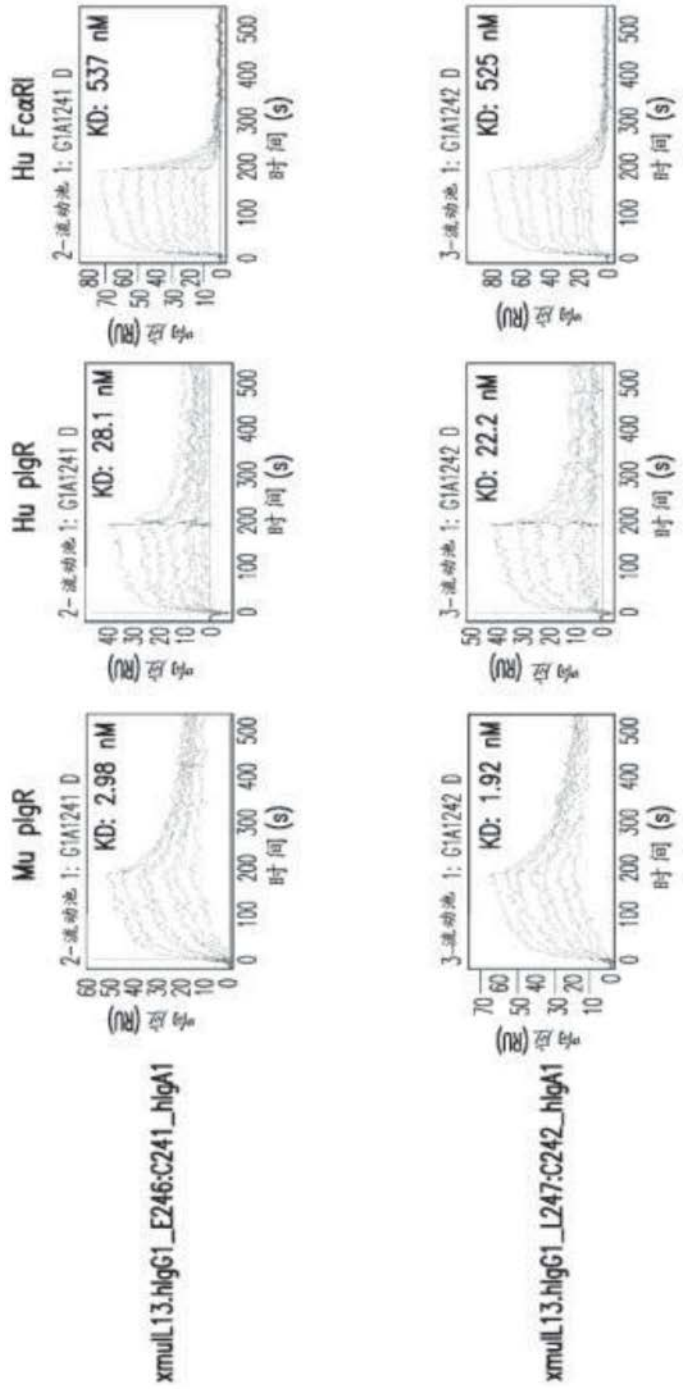

Hu FcαRI
Hu plgR
Mu plgR
KD: 537 nM
KD: 525 nM
KD: 28.1 nM
KD: 22.2 nM
KD: 2.98 nM
KD: 1.92 nM
时间 (s)
xmuIL13.hIgG1_E246:C241_hIgA1
xmuIL13.hIgG1_L247:C242_hIgA1

图37C

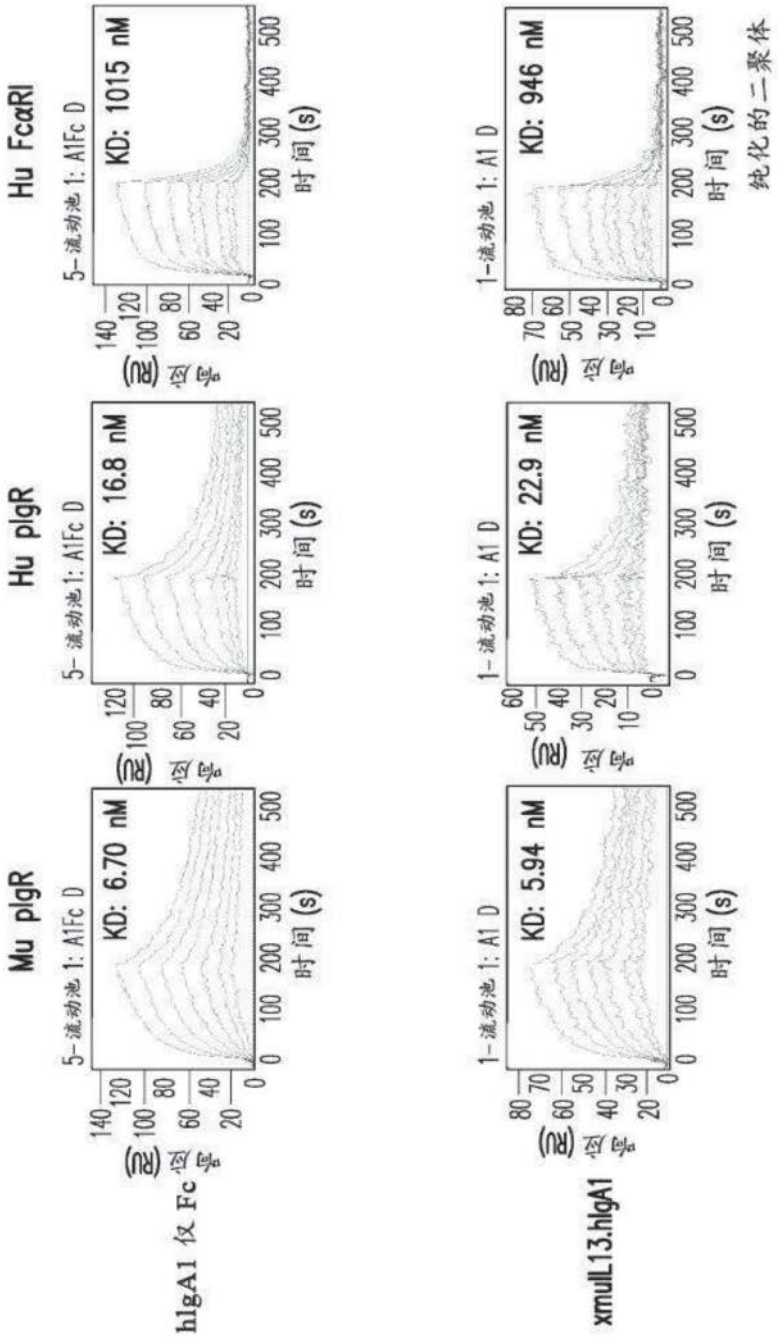

Hu FcαRI
Hu pIgR
Mu pIgR
5-流动池 1: A1Fc D
1-流动池 1: A1 D
KD: 1015 nM
KD: 16.8 nM
KD: 6.70 nM
KD: 946 nM
KD: 22.9 nM
KD: 5.94 nM
时间 (s)
响应 (RU)
hIgA1 仅 Fc
xmuIL13.hIgA1
纯化的二聚体

图37C续

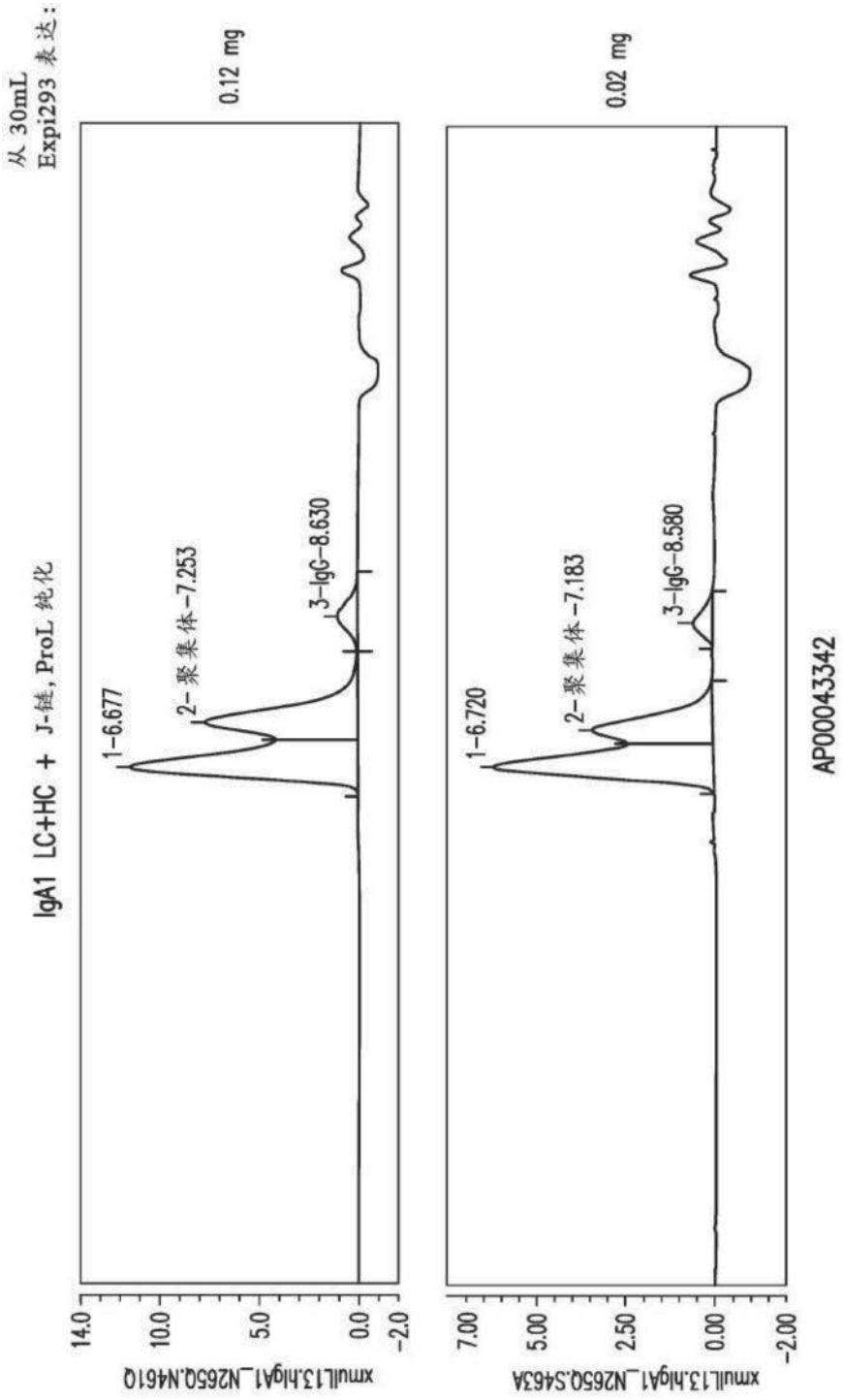

从 30mL
Expi293 表达：
IgA1 LC+HC + J-链, ProL 纯化
0.12 mg
1-6.677
2-聚集体-7.253
3-IgG-8.630
14.0
10.0
5.0
0.0
-2.0
xmuIL13.hIgA1_N265Q.N461Q
0.02 mg
1-6.720
2-聚集体-7.183
3-IgG-8.580
7.00
5.00
2.50
0.00
-2.00
xmuIL13.hIgA1_N265Q.S463A
AP00043342

图38

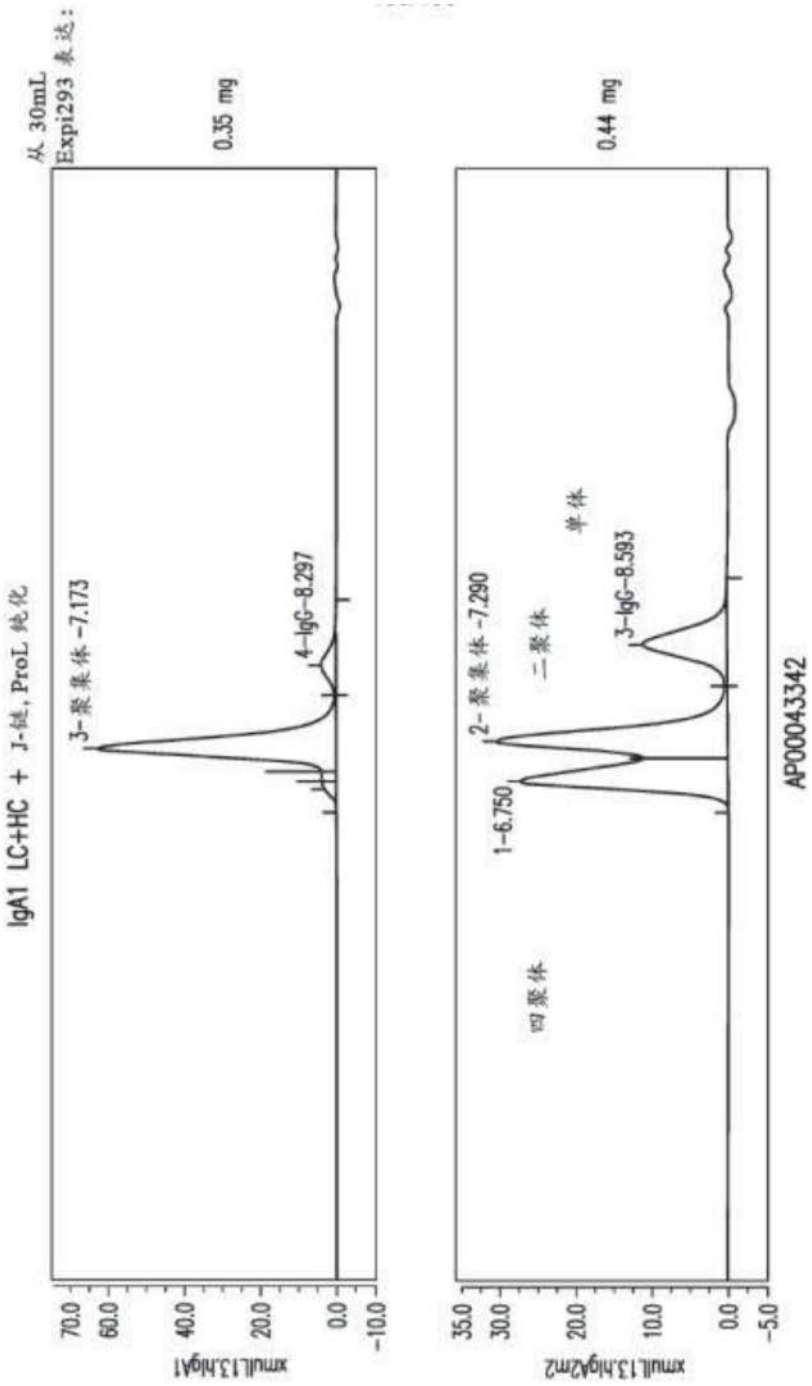

从 30mL
Expi293 表达：
0.35 mg
IgA1 LC+HC + J-链, ProL 纯化
3-聚集体-7.173
4-IgG-8.297
xmuL13,hIgA1
70.0
60.0
40.0
20.0
0.0
-10.0
0.44 mg
2-聚集体-7.290
二聚体
单体
3-IgG-8.593
1-6.750
四聚体
AP00043342
xmuL13,hIgA2m2
35.0
30.0
20.0
10.0
0.0
-5.0

图38续1

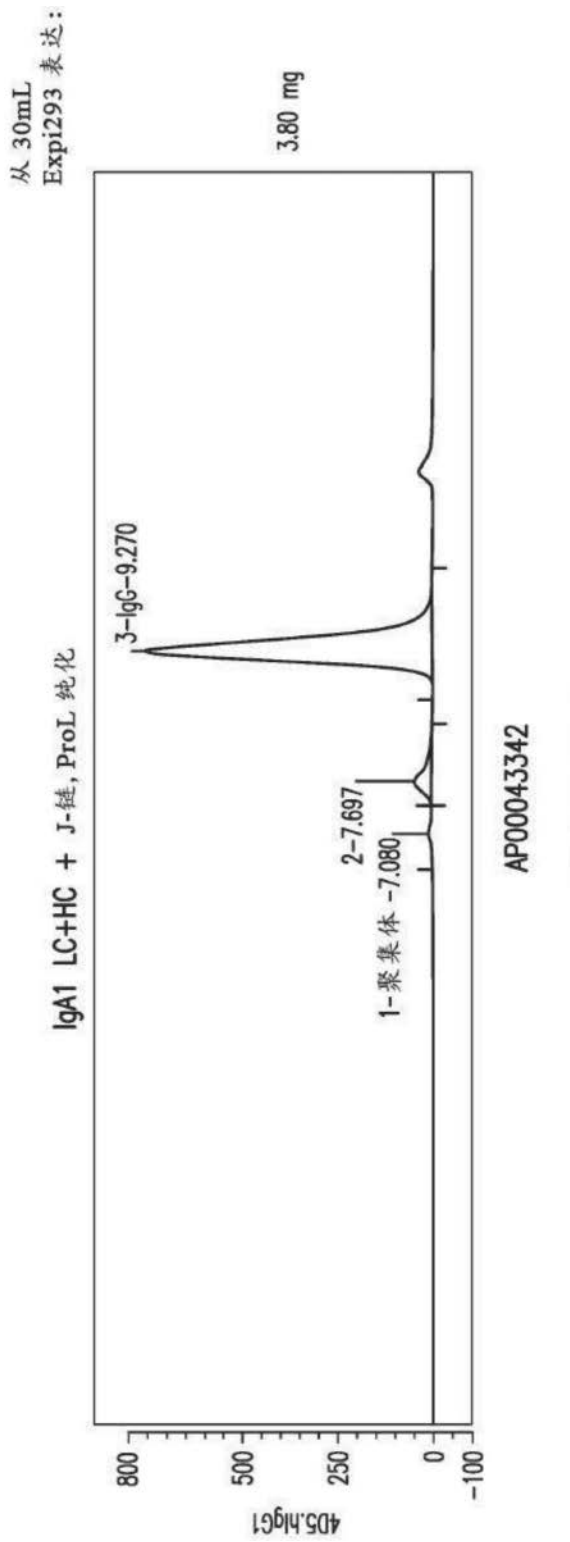

从 30mL
Expi293 表达：
3.80 mg
IgA1 LC+HC + J-链, ProL 纯化
3-IgG-9.270
2-7.697
1-聚集体 -7.080
AP00043342
4D5.hIgG1
800
500
250
0
-100

图38续2

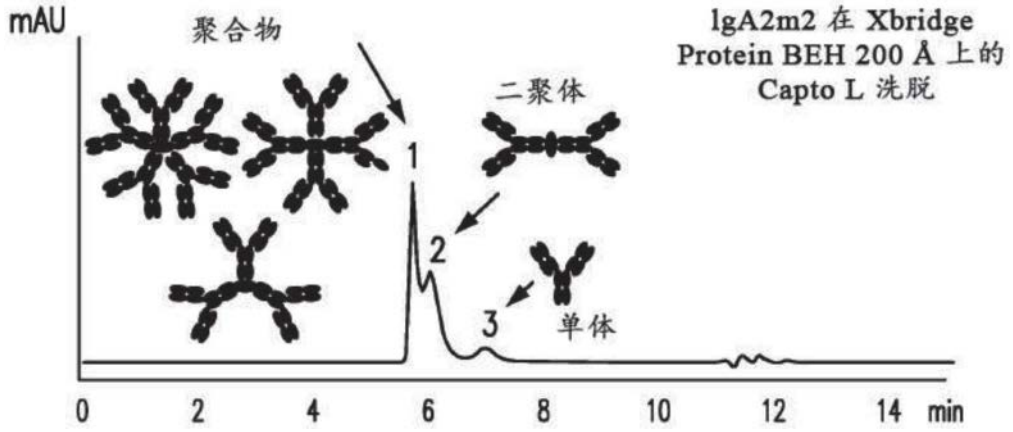

mAU
聚合物
二聚体
单体
1
2
3
0
2
4
6
8
10
12
14
min
IgA2m2 在 Xbridge
Protein BEH 200 Å 上的
Capto L 洗脱

图39

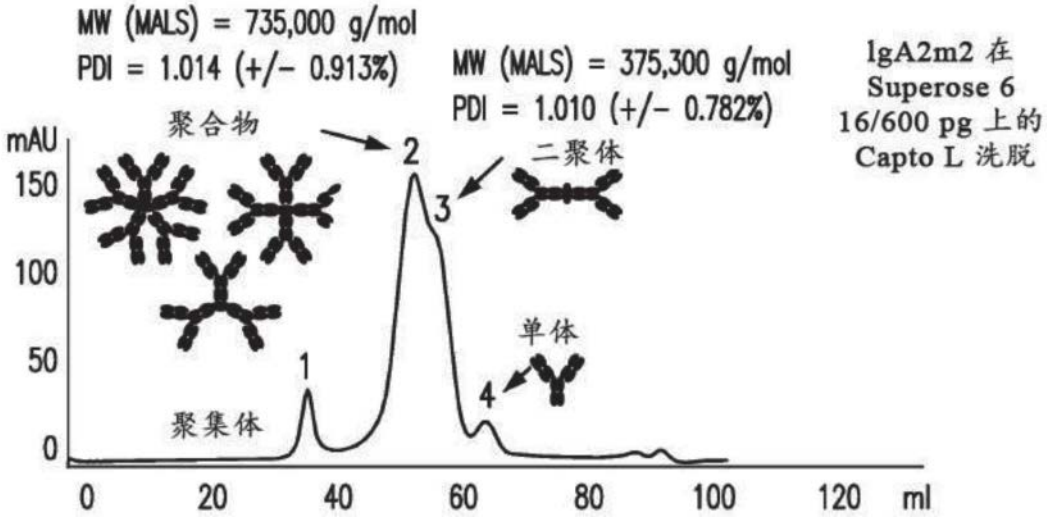

MW (MALS) = 735,000 g/mol
PDI = 1.014 (+/- 0.913%)
MW (MALS) = 375,300 g/mol
PDI = 1.010 (+/- 0.782%)
聚合物
二聚体
单体
聚集体
mAU
150
100
50
0
1
2
3
4
0
20
40
60
80
100
120
ml
IgA2m2 在
Superose 6
16/600 pg 上的
Capto L 洗脱

图40

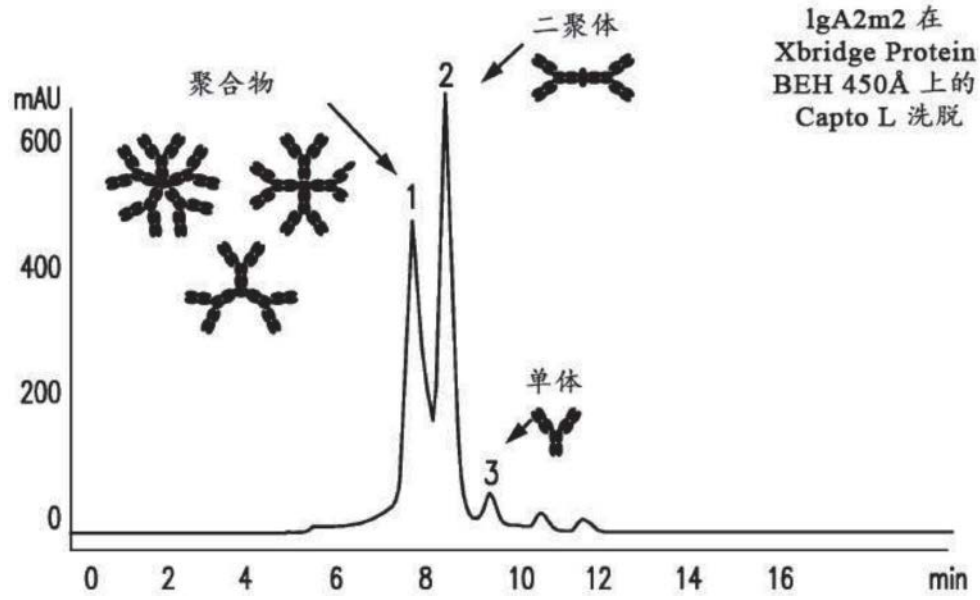

IgA2m2 在
Xbridge Protein
BEH 450Å 上的
Capto L 洗脱
二聚体
聚合物
单体
mAU
600
400
200
0
1
2
3
0
2
4
6
8
10
12
14
16
min

图41

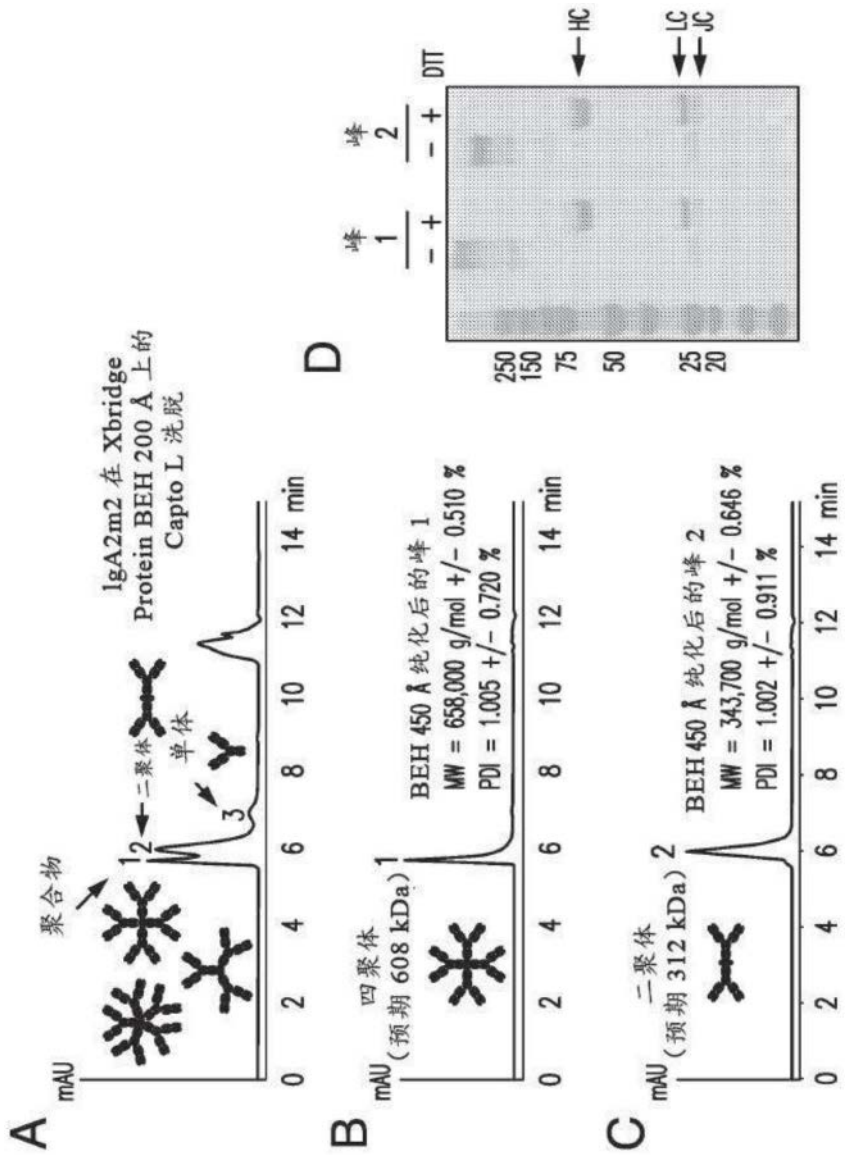

A
mAU
聚合物
1
2
二聚体
单体
3
IgA2m2 在 Xbridge
Protein BEH 200 Å 上的
Capto L 洗脱
0 2 4 6 8 10 12 14 min
B
mAU
四聚体
(预期 608 kDa)
1
BEH 450 Å 纯化后的峰 1
MW = 658,000 g/mol +/- 0.510 %
PDI = 1.005 +/- 0.720 %
0 2 4 6 8 10 12 14 min
C
mAU
二聚体
(预期 312 kDa)
2
BEH 450 Å 纯化后的峰 2
MW = 343,700 g/mol +/- 0.646 %
PDI = 1.002 +/- 0.911 %
0 2 4 6 8 10 12 14 min
D
峰 1
- +
峰 2
- +
DTT
HC
LC
JC
250
150
75
50
25
20

图42A-42D

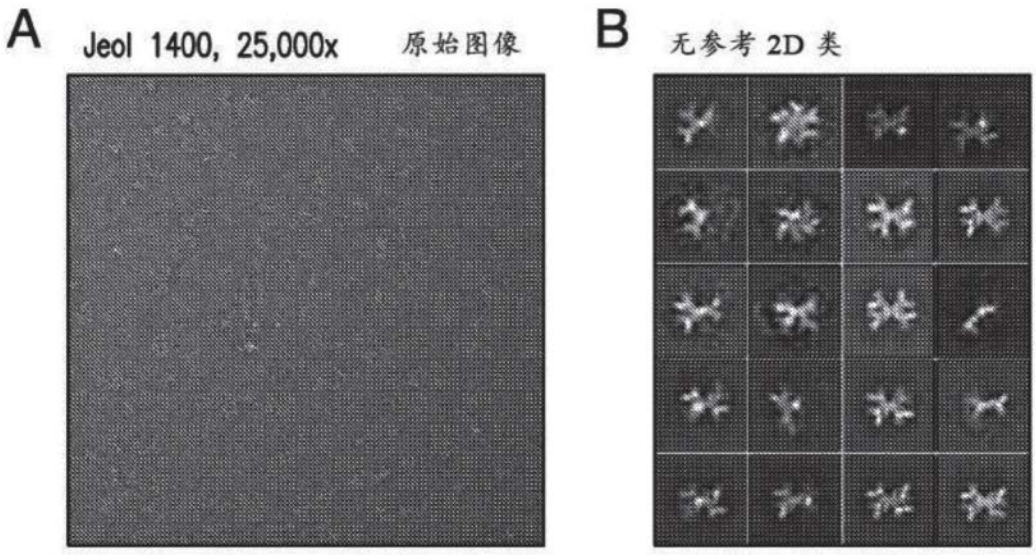


图43A-43B

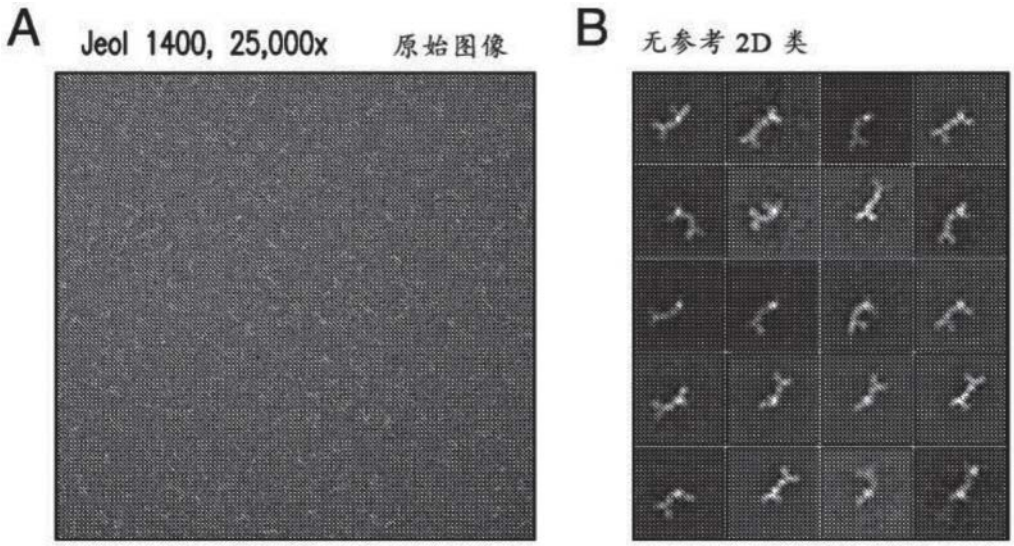


图44A-44B

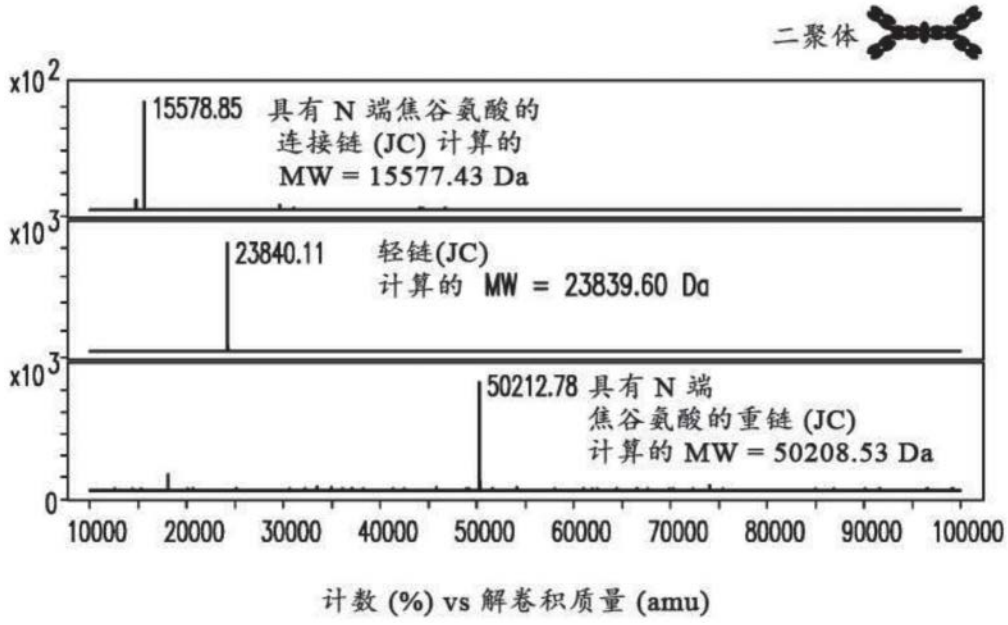

二聚体
x10 2
15578.85 具有 N 端焦谷氨酸的
连接链 (JC) 计算的
MW = 15577.43 Da
x10 3
23840.11 轻链(JC)
计算的 MW = 23839.60 Da
x10 3
50212.78 具有 N 端
焦谷氨酸的重链 (JC)
计算的 MW = 50208.53 Da
0
10000 20000 30000 40000 50000 60000 70000 80000 90000 100000
计数 (%) vs 解卷积质量 (amu)

图45

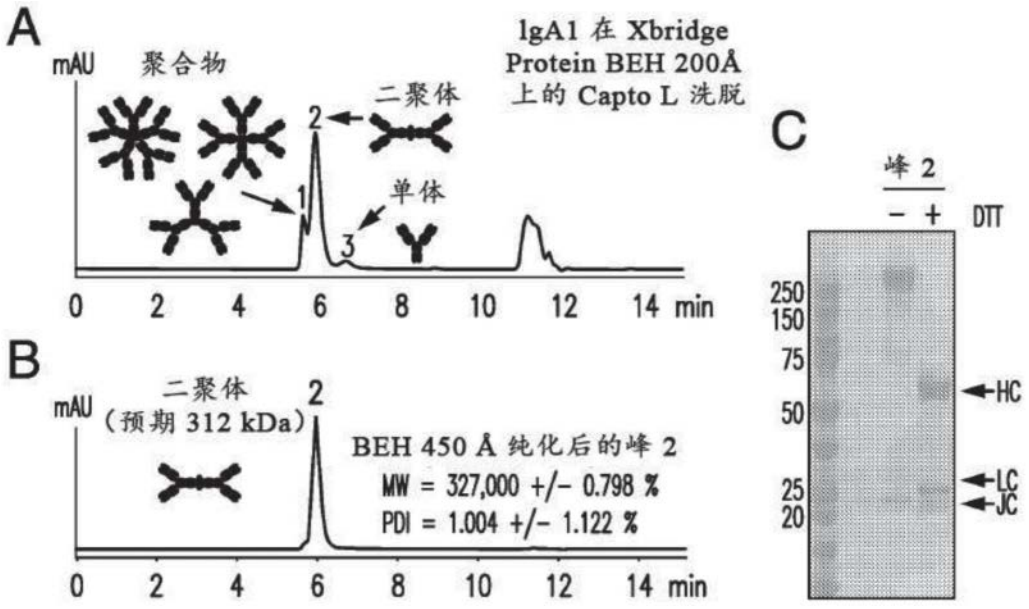

A
mAU
聚合物
二聚体
单体
1
2
3
IgA1 在 Xbridge
Protein BEH 200Å
上的 Capto L 洗脱
0 2 4 6 8 10 12 14 min
B
mAU
二聚体
(预期 312 kDa)
2
BEH 450 Å 纯化后的峰 2
MW = 327,000 +/- 0.798 %
PDI = 1.004 +/- 1.122 %
0 2 4 6 8 10 12 14 min
C
峰 2
- + DTT
250
150
75
50
25
20
HC
LC
JC

图46A-46C

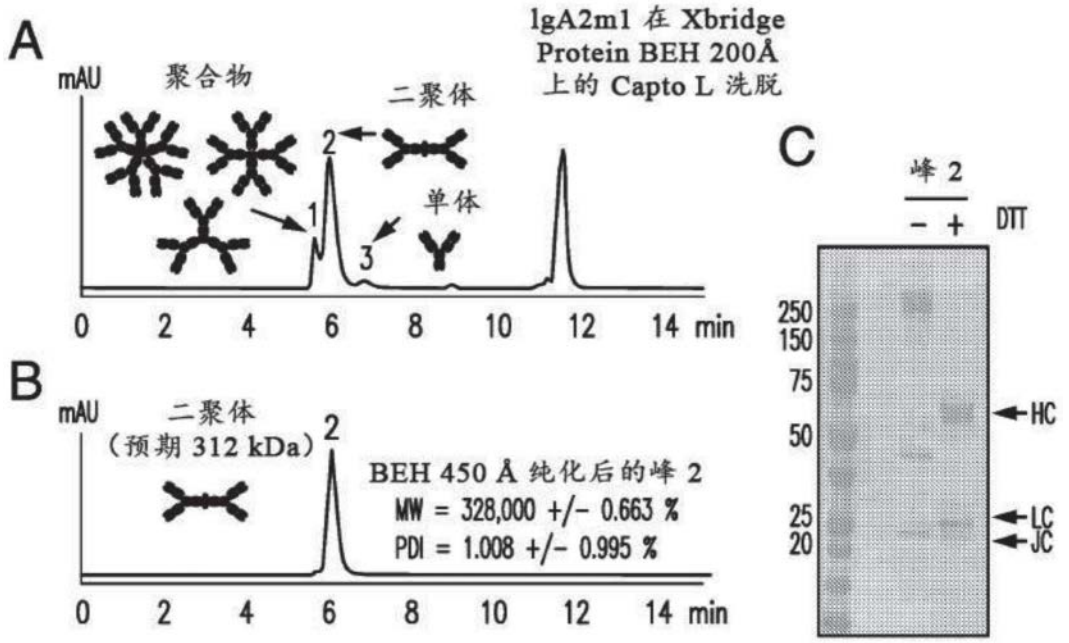


图47A-47C

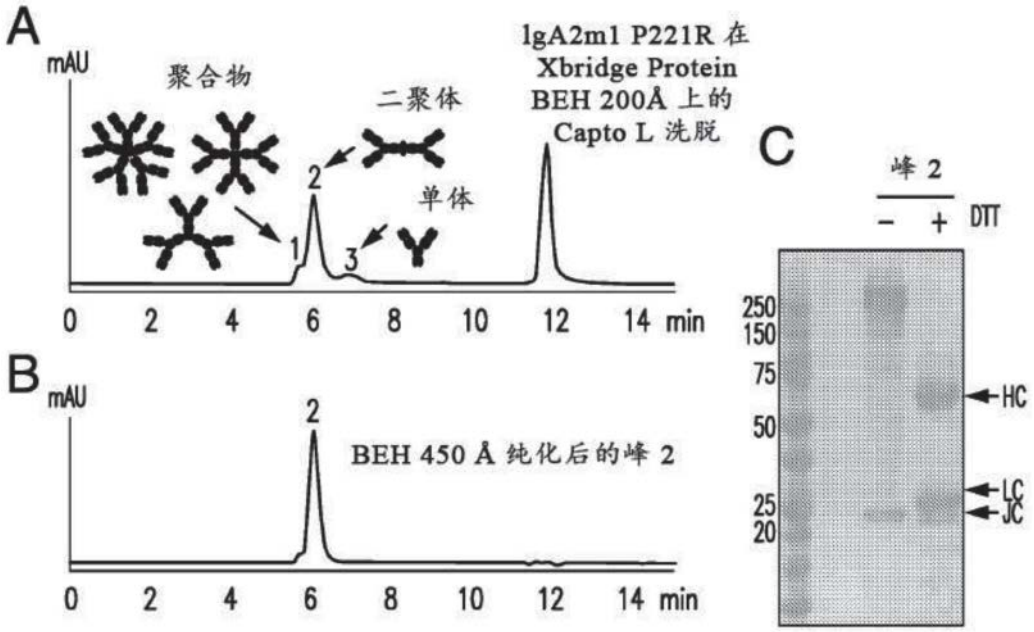
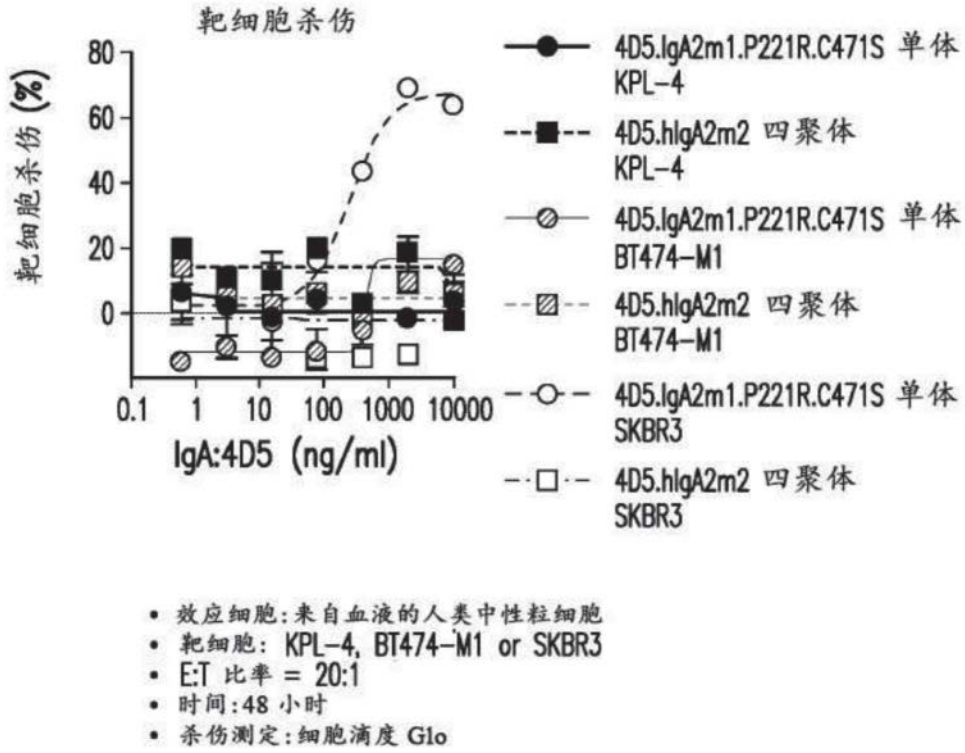


图48A-48C



- 效应细胞:来自血液的人类中性粒细胞
- 靶细胞: KPL-4, BT474-M1 or SKBR3
- E:T 比率 = 20:1
- 时间:48 小时
- 杀伤测定:细胞滴度 Glo

图49

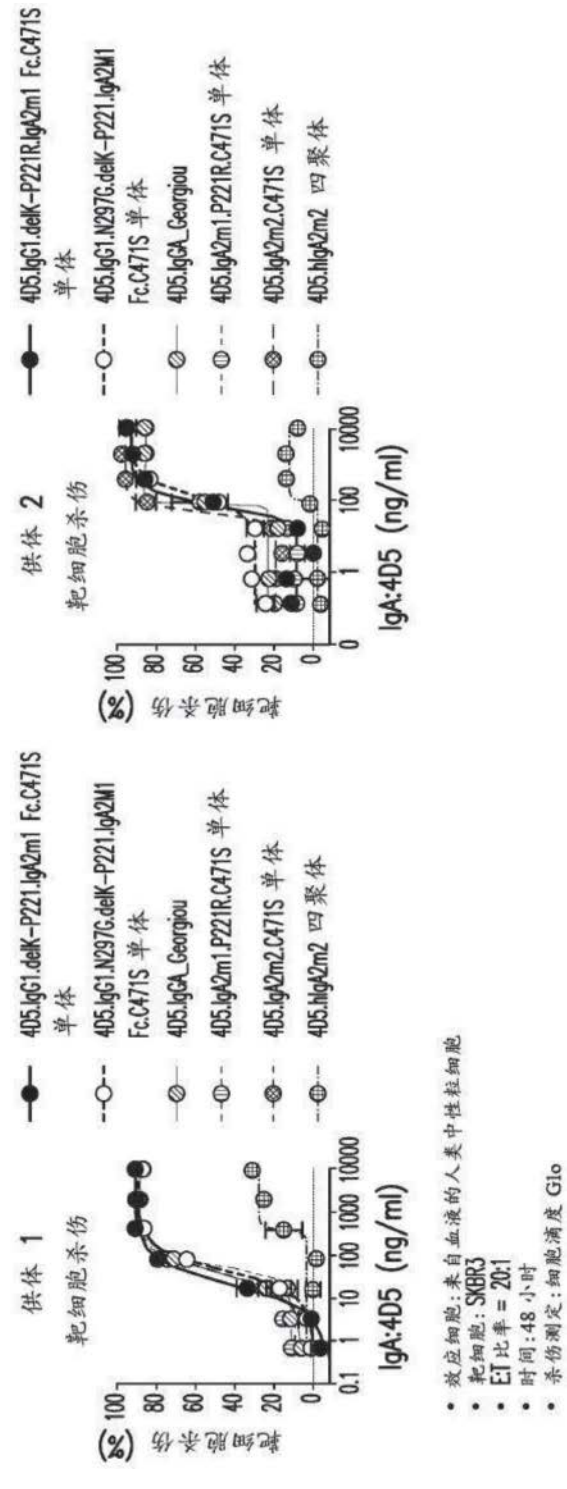

供体 1
靶细胞杀伤
4D5.IgG1.delK-P221.IgA2m1 Fc.C471S 单体
4D5.IgG1.N297G.delK-P221.IgA2M1 Fc.C471S 单体
4D5.IgGA_Georgiou
4D5.IgA2m1.P221R.C471S 单体
4D5.IgA2m2.C471S 单体
4D5.hIgA2m2 四聚体
靶细胞杀伤 (%)
IgA:4D5 (ng/ml)
供体 2
靶细胞杀伤
4D5.IgG1.delK-P221R.IgA2m1 Fc.C471S 单体
4D5.IgG1.N297G.delK-P221.IgA2M1 Fc.C471S 单体
4D5.IgGA_Georgiou
4D5.IgA2m1.P221R.C471S 单体
4D5.IgA2m2.C471S 单体
4D5.hIgA2m2 四聚体
靶细胞杀伤 (%)
IgA:4D5 (ng/ml)
• 效应细胞：来自血液的人类中性粒细胞
• 靶细胞：SKBR3
• E:T 比率 = 20:1
• 时间：48 小时
• 杀伤测定：细胞滴度 Glo

图50

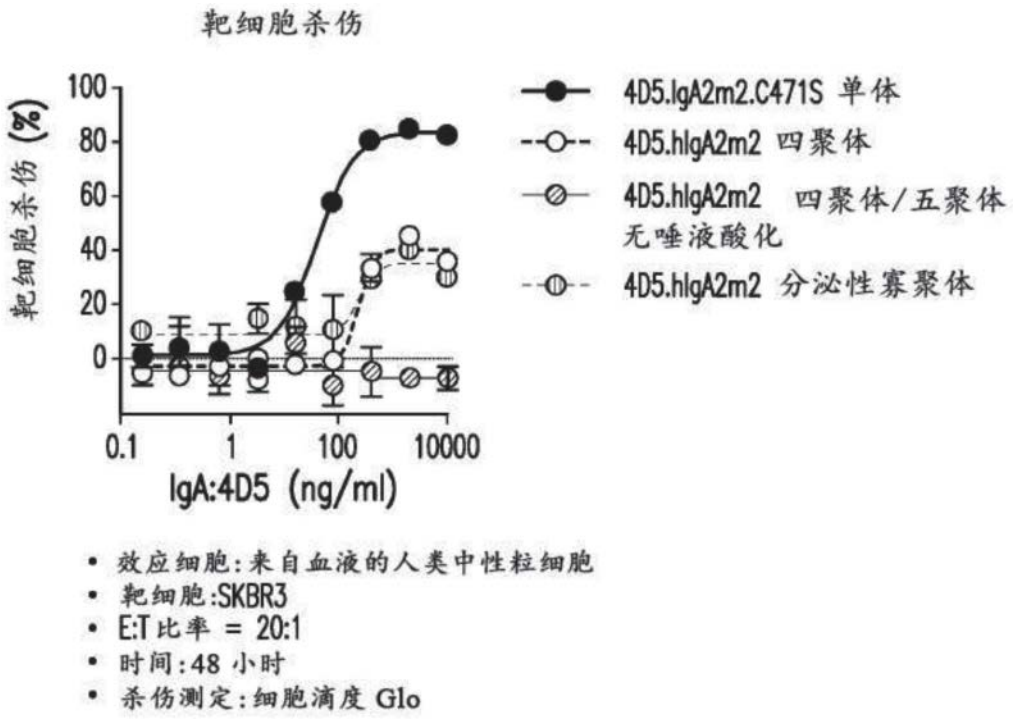

靶细胞杀伤
靶细胞杀伤 (%)
100
80
60
40
20
0
0.1
1
100
10000
IgA:4D5 (ng/ml)
4D5.IgA2m2.C471S 单体
4D5.hIgA2m2 四聚体
4D5.hIgA2m2 四聚体/五聚体
无唾液酸化
4D5.hIgA2m2 分泌性寡聚体
• 效应细胞:来自血液的人类中性粒细胞
• 靶细胞:SKBR3
• E:T比率 = 20:1
• 时间:48 小时
• 杀伤测定:细胞滴度 Glo

图51

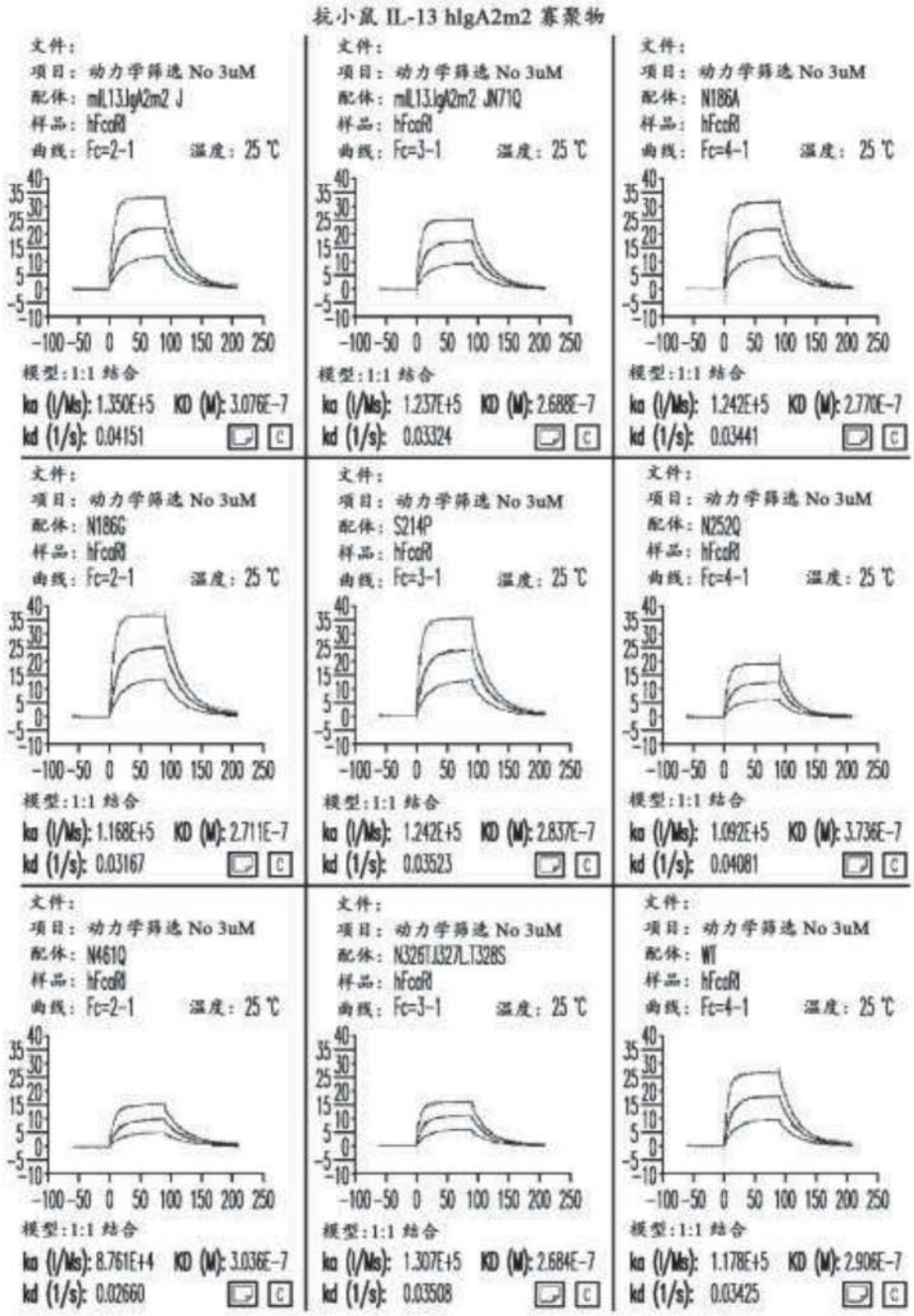
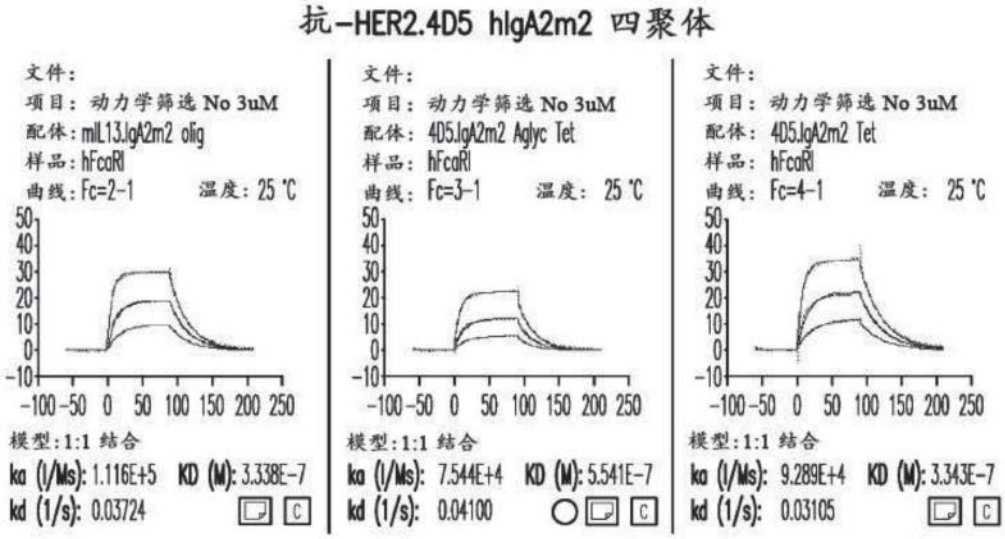

抗小鼠 IL-13 hIgA2m2 寡聚物
文件:
项目: 动力学筛选 No 3uM
配体: mIL13.IgA2m2 J
样品: hFcαRI
曲线: Fc=2-1 温度: 25 ℃
模型:1:1 结合
ka (1/Ms): 1.350E+5 KD (M): 3.076E-7
kd (1/s): 0.04151
文件:
项目: 动力学筛选 No 3uM
配体: mIL13.IgA2m2 JN71Q
样品: hFcαRI
曲线: Fc=3-1 温度: 25 ℃
模型:1:1 结合
ka (1/Ms): 1.237E+5 KD (M): 2.688E-7
kd (1/s): 0.03324
文件:
项目: 动力学筛选 No 3uM
配体: N186A
样品: hFcαRI
曲线: Fc=4-1 温度: 25 ℃
模型:1:1 结合
ka (1/Ms): 1.242E+5 KD (M): 2.770E-7
kd (1/s): 0.03441
文件:
项目: 动力学筛选 No 3uM
配体: N186G
样品: hFcαRI
曲线: Fc=2-1 温度: 25 ℃
模型:1:1 结合
ka (1/Ms): 1.168E+5 KD (M): 2.711E-7
kd (1/s): 0.03167
文件:
项目: 动力学筛选 No 3uM
配体: S214P
样品: hFcαRI
曲线: Fc=3-1 温度: 25 ℃
模型:1:1 结合
ka (1/Ms): 1.242E+5 KD (M): 2.837E-7
kd (1/s): 0.03523
文件:
项目: 动力学筛选 No 3uM
配体: N252Q
样品: hFcαRI
曲线: Fc=4-1 温度: 25 ℃
模型:1:1 结合
ka (1/Ms): 1.092E+5 KD (M): 3.736E-7
kd (1/s): 0.04081
文件:
项目: 动力学筛选 No 3uM
配体: N461Q
样品: hFcαRI
曲线: Fc=2-1 温度: 25 ℃
模型:1:1 结合
ka (1/Ms): 8.761E+4 KD (M): 3.036E-7
kd (1/s): 0.02660
文件:
项目: 动力学筛选 No 3uM
配体: N326T,A327L,T328S
样品: hFcαRI
曲线: Fc=3-1 温度: 25 ℃
模型:1:1 结合
ka (1/Ms): 1.307E+5 KD (M): 2.684E-7
kd (1/s): 0.03508
文件:
项目: 动力学筛选 No 3uM
配体: WT
样品: hFcαRI
曲线: Fc=4-1 温度: 25 ℃
模型:1:1 结合
ka (1/Ms): 1.178E+5 KD (M): 2.906E-7
kd (1/s): 0.03425

图52A



25C, T200, 抗 Fab 捕获 IgA Ab
hFcaRI 浓度系列: 1000, 333, 111 nM
120319,120419

图52A续



样品	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax(RU)	Chi^2 (RU^2)	配体	配体水平 (RU)	模型	曲线
hFcaRI	1.35E+05	4.15E-02	3.08E-07	40.9	0.249	xmIL13.IgA2m2 寡聚物 WT	364.9	1:1 结合	Fc=2-1
hFcaRI	1.24E+05	3.32E-02	2.69E-07	29.3	0.599	WT, J-N71Q	267.9	1:1 结合	Fc=3-1
hFcaRI	1.24E+05	3.44E-02	2.77E-07	37.9	0.878	N186A, J-N71Q	336.5	1:1 结合	Fc=4-1
hFcaRI	1.17E+05	3.17E-02	2.71E-07	43.2	0.382	N186G, J-N71Q	388.4	1:1 结合	Fc=2-1
hFcaRI	1.24E+05	3.52E-02	2.84E-07	41.6	0.781	S214P, J-N71Q	400.3	1:1 结合	Fc=3-1
hFcaRI	1.09E+05	4.08E-02	3.74E-07	25.2	0.838	N252Q, J-N71Q	295.4	1:1 结合	Fc=4-1
hFcaRI	1.31E+05	3.51E-02	2.68E-07	18.2	0.515	N326T.I327L.T328S, J-N71Q	155	1:1 结合	Fc=3-1
hFcaRI	8.76E+04	2.66E-02	3.04E-07	17.1	0.128	N461Q, J-N71Q	255.2	1:1 结合	Fc=2-1
hFcaRI	9.29E+04	3.11E-02	3.34E-07	43.4	0.823	xHER2 4D5.IgA2m2 四聚体 WT	762.7	1:1 结合	Fc=4-1
hFcaRI	7.54E+04	4.18E-02	5.54E-07	29.3	0.429	xHER2 4D5.IgA2m2 四聚体 N168A.S214P.N252Q. N326T.I327L.T328S.N461Q, J-N71Q	1085.7	1:1 结合	Fc=3-1

图52B