(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119998328 A
(43)申请公布日 2025.05.13

(21)申请号 202380063427.3
(22)申请日 2023.09.20
(30)优先权数据
2022902712 2022.09.20 AU
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.03.03
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/AU2023/050903 2023.09.20
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/059900 EN 2024.03.28
(71)申请人 科锐生物制品私人有限公司
地址 澳大利亚维多利亚
(72)发明人 S·科布
(74)专利代理机构 北京信诺创成知识产权代理有限公司 11728
专利代理师 郝文婷 尹吉伟
(51)Int.Cl.
*C07K 16/44*(2006.01)
*A61K 39/395*(2006.01)
*A61P 37/02*(2006.01)
*C07K 16/46*(2006.01)

权利要求书12页 说明书57页 附图3页

(54)发明名称

# 抗FLAG抗体

(57)摘要

本发明涉及用于结合FLAG标签的抗原结合蛋白质及其相关片段、所述抗原结合蛋白质和片段的生产、以及所述抗体和片段的用途。

CN 119998328 A

1.一种用于结合FLAG标签的抗原结合蛋白质,所述蛋白质包含抗原结合结构域,所述抗原结合结构域包含具有如SEQ ID NO:2至5中的任一者所定义的可变重链(VH)的抗原结合结构域的CDRH1、CDRH2和/或CDRH3,以及具有如SEQ ID NO:7至10中的任一者所定义的可变轻链(VL)的CDRL1、CDRL2和/或CDRL3。

2.根据权利要求1所述的抗原结合蛋白质,其中,所述蛋白质能够特异性结合FLAG标签或其变体,所述FLAG标签或其变体包含如SEQ ID NO:11或者29至41中的任一项所示的氨基酸序列。

3.根据权利要求1或2的抗原结合蛋白质,其中,所述蛋白质用于特异性结合肽,所述肽包含或由氨基酸序列DYKDDDDK(SEQ ID NO:30)组成。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的抗原结合蛋白质,其中,所述抗原结合蛋白质用于特异性结合包含在下述各者中或下述各者上的FLAG标签,所述各者为重组蛋白质或治疗性蛋白质、细胞免疫治疗剂、存在于细胞免疫治疗剂上的受体。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的抗原结合蛋白质,其中,所述蛋白质竞争性地抑制与下述抗体的FLAG标签的结合:

-包含含有如SEQ ID NO:1所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:6所示序列的VL;
-包含含有如SEQ ID NO:2所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:7所示序列的VL;
-包含含有如SEQ ID NO:2所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:8所示序列的VL;
-包含含有如SEQ ID NO:2所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:9所示序列的VL;
-包含含有如SEQ ID NO:2所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:10所示序列的VL;
-包含含有如SEQ ID NO:3所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:7所示序列的VL;
-包含含有如SEQ ID NO:3所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:8所示序列的VL;
-包含含有如SEQ ID NO:3所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:9所示序列的VL;
-包含含有如SEQ ID NO:3所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:10所示序列的VL;
-包含含有如SEQ ID NO:4所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:7所示序列的VL;
-包含含有如SEQ ID NO:4所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:8所示序列的VL;
-包含含有如SEQ ID NO:4所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:9所示序列的VL;
-包含含有如SEQ ID NO:4所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:10所示序列的VL;
-包含含有如SEQ ID NO:5所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:7所示序列的VL;
-包含含有如SEQ ID NO:5所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:8所示序列的VL;
-包含含有如SEQ ID NO:5所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:9所示序列的VL;或者
-包含含有如SEQ ID NO:5所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:10所示序列的VL。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的抗原结合蛋白质,其中,所述抗原结合结构域包含:

A.VH和VL,VH包括包含或由SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成的互补决定区(CDR)1、包含或由SEQ ID NO:13的氨基酸序列组成的CDR2、包含或由SEQ ID NO:14的氨基酸序列组成的CDR3;VL包括包含或由SEQ ID NO:21的氨基酸序列组成的互补决定区(CDR)1、包含或由SEQ ID NO:22的氨基酸序列组成的CDR2、包含或由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成的CDR3;

以及下述B.、C.、D.、E.、F.、F.、G.、H.、I.、J.、K.、L.、M.、N.、O.、P.、Q.、R.中的任一者:

B.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:65、66、67和68所示,对于各VL FR,所述参考序列分别如SEQ ID NO:69、70、71和28所示,

或者

C.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、16、18和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:69、70、71和28所示,

或者

D.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、16、18和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:84、85、86和28所示,

或者

E.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、16、18和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:24、26、27和28所示,

或者

F.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、16、18和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:24、25、27和28所示,

或者

G.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、17、19和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:69、70、71和28所示,

或者

H.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其

中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、17、19和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:84、85、86和28所示,

或者

I.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、17、19和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:24、26、27和28所示,

或者

J.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、17、19和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:24、25、27和28所示,

或者

K.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:80、16、82和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:69、70、71和28所示,

或者

L.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:80、16、82和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:84、85、86和28所示,

或者

M.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:80、16、82和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:24、26、27和28所示,

或者

N.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:80、16、82和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:24、25、27和28所示,

或者

O.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:80、81、83和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:69、70、71和28所示,

或者

P.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:80、81、83和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:84、85、86和28所示,

或者

Q.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:80、81、83和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:24、26、27和28所示,

或者

R.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:80、81、83和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:24、25、27和28所示。

7.根据权利要求1至5中任一项所述的抗原结合蛋白质,其中,所述抗原结合结构域包含:

A.VH和VL,VH包括包含或由SEQ ID NO:42或43的氨基酸序列组成的互补决定区CDR1、包含或由SEQ ID NO:44的氨基酸序列组成的CDR2、包含或由SEQ ID NO:45的氨基酸序列组成的CDR3;VL包括包含或由SEQ ID NO:51的氨基酸序列组成的互补决定区CDR1、包含或由SEQ ID NO:52的氨基酸序列组成的CDR2、包含或由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成的CDR3;

以及下述B.、C.、D.或E.中的任一者:

B.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:46、47、49和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、55、56和28所示,

或者

C.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、

至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:46、47、49和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、54、56和28所示,

或者

D.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:46、48、50和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、55、56和28所示,

或者

E.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:46、48、50和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、54、56和28所示。

8.根据权利要求1至5中任一项所述的抗原结合蛋白质,其中,所述抗原结合结构域包含:

A.VH和VL,VH包括包含或由SEQ ID NO:42或43的氨基酸序列组成的互补决定区CDR1、包含或由SEQ ID NO:44的氨基酸序列组成的CDR2、包含或由SEQ ID NO:45的氨基酸序列组成的CDR3;VL包括包含或由SEQ ID NO:64的氨基酸序列组成的互补决定区CDR1、包含或由SEQ ID NO:52的氨基酸序列组成的CDR2、包含或由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成的CDR3;

以及下述B.、C.、D.或E.中的任一者:

B.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:46、47、49和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:75、76、77和28所示,

或者

C.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:46、47、49和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:92、93、94和28所示,

或者

D.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:46、48、50和20所示,并且对于各VL FR,参考

序列分别如SEQ ID NO:75、76、77和28所示,

或者

E.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:46、48、50和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:92、93、94和28所示。

9.根据权利要求1至5中任一项所述的抗原结合蛋白质,其中,所述抗原结合结构域包含:

A.VH和VL,VH包括包含或由SEQ ID NO:42或87的氨基酸序列组成的互补决定区CDR1、包含或由SEQ ID NO:88的氨基酸序列组成的CDR2、包含或由SEQ ID NO:45的氨基酸序列组成的CDR3;VL包括包含或由SEQ ID NO:51的氨基酸序列组成的互补决定区CDR1、包含或由SEQ ID NO:52的氨基酸序列组成的CDR2、包含或由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成的CDR3;

以及下述B.、C.、D.或E.中的任一者:

B.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:89、47、90和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、55、56和28所示,

或者

C.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:89、47、90和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、54、56和28所示,

或者

D.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:89、48、91和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、55、56和28所示,

或者

E.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:89、48、91和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、54、56和28所示。

10.根据权利要求1至5中任一项所述的抗原结合蛋白质,其中,所述抗原结合结构域包

含:

A.VH和VL,VH包括包含或由SEQ ID NO:42或87的氨基酸序列组成的互补决定区CDR1、包含或由SEQ ID NO:88的氨基酸序列组成的CDR2、包含或由SEQ ID NO:45的氨基酸序列组成的CDR3;VL包括包含或由SEQ ID NO:64的氨基酸序列组成的互补决定区CDR1、包含或由SEQ ID NO:52的氨基酸序列组成的CDR2、包含或由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成的CDR3;

以及下述B.、C.、D.或E.中的任一者:

B.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:89、47、90和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:75、76、77和28所示,

或者

C.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:89、47、90和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:92、93、94和28所示,

或者

D.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:89、48、91和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:75、76、77和28所示,

或者

E.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:89、48、91和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:92、93、94和28所示。

11.根据权利要求1至5中任一项所述的抗原结合蛋白质,其中,所述抗原结合结构域包含:

A.VH和VL,VH包括包含或由SEQ ID NO:57的氨基酸序列组成的互补决定区CDR1、包含或由SEQ ID NO:58的氨基酸序列组成的CDR2、包含或由SEQ ID NO:45的氨基酸序列组成的CDR3;VL包括包含或由SEQ ID NO:51的氨基酸序列组成的互补决定区CDR1、包含或由SEQ ID NO:52的氨基酸序列组成的CDR2、包含或由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成的CDR3;

以及下述B.、C.、D.、E.、F.、G.、H.或I.中的任一者:

B.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、

至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、59、61和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、55、56和28所示,

或者

C.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、59、61和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、54、56和28所示,

或者

D.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、60、62和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、55、56和28所示,

或者

E.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、60、62和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、54、56和28所示,

或者

F.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:95、59、97和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、55、56和28所示;

或者

G.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:95、59、97和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、54、56和28所示;

或者

H.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:95、96、98和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、55、56和28所示;

或者

I.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:95、96、98和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、54、56和28所示。

12.根据权利要求1至5中任一项所述的抗原结合蛋白质,其中,所述抗原结合结构域包含:

A.VH和VL,VH包括包含或由SEQ ID NO:57的氨基酸序列组成的互补决定区CDR1、包含或由SEQ ID NO:58的氨基酸序列组成的CDR2、包含或由SEQ ID NO:45的氨基酸序列组成的CDR3;VL包括包含或由SEQ ID NO:64的氨基酸序列组成的互补决定区CDR1、包含或由SEQ ID NO:52的氨基酸序列组成的CDR2、包含或由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成的CDR3;

以及下述B.、C.、D.、E.、F.、G.、H.或I.中的任一者:

B.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、59、61和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:75、76、77和28所示;

或者

C.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、59、61和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:99、100、101和28所示;

或者

D.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、60、62和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:75、76、77和28所示;

或者

E.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、60、62和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:99、100、101和28所示;

或者

F.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、

至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:95、59、97和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:75、76、77和28所示;

或者

G.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:95、59、97和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:99、100、101和28所示;

或者

H.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:95、96、98和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:75、76、77和28所示;

或者

I.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:95、96、98和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:99、100、101和28所示。

12.根据权利要求1至5中任一项所述的抗原结合蛋白质,其中,所述抗原结合结构域包含:

A.包含如以上(o)所定义的互补决定区(CDR)1、CDR2和CDR3的VH,以及包含如以上(p)所定义的CDR1、CDR2和CDR3的VL,并且VH和VL各自包含框架区(FR)1、2、3和4,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:72、73、74和68所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:75、76、77和28所示;

或者

B.包含如以上(q)所定义的互补决定区(CDR)1、CDR2和CDR3的VH,以及包含如以上(r)所定义的CDR1、CDR2和CDR3的VL,并且VH和VL各自包含框架区(FR)1、2、3和4,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、78、79和68所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:75、76、77和28所示。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的抗原结合结构域,其中,所述抗原结合结构域包含含有如SEQ ID NO:2至5中的任一者所示的氨基酸序列的可变重链,以及含有如SEQ ID NO:7至10中的任一者所示的氨基酸序列的可变轻链。

14.根据权利要求1至13中任一项所述的抗原结合结构域,其中,所述抗原结合蛋白质呈下述形式:

(i)单域抗体(sdAb);

(ii)单链Fv片段(scFv);

(iii)二聚体scFv(di-scFv);

(iv)与抗体的恒定区、Fc或重链恒定结构域(CH)2和/或CH3相连的(ii)或(iii)中的一者;

(v)与结合至免疫效应细胞的蛋白质相连的(i)至(iv)中的一者;

(vi)与经修饰的免疫细胞受体比如经修饰的T细胞受体相连的(i)至(iv)中的一者;或者

(vii)处于嵌合抗原受体(CAR)或变异T细胞受体的背景下的(i)至(iv)中的一者。

15.根据权利要求1至14中任一项所述的抗原结合结构域,其中,所述抗原结合蛋白质呈下述形式:

(i)双抗体;

(ii)三抗体;

(iii)四抗体;

(iv)Fab;

(v)F(ab')2;

(vi)Fv;

(vii)双特异性抗体或者其他形式的多特异性抗体;

(viii)与抗体的恒定区、Fc或重链恒定结构域(CH)2和/或CH3相连的(i)至(vii)中的一者;

(ix)与结合至免疫效应细胞的蛋白质相连的(i)至(vii)中的一者;

(x)与结合至免疫效应细胞的蛋白质相连的(i)至(vii)中的一者;

(xi)与经修饰的免疫细胞受体比如经修饰的T细胞受体相连的(i)至(vii)中的一者;或者

(xiii)处于嵌合抗原受体(CAR)或变异T细胞受体的背景下的(i)至(vii)中的一者,变异T细胞受体包括在通用CAR系统的背景下,用于与包含抗原结合结构域的多肽一起使用,该抗原结合结构域用于结合靶细胞表面的抗原。

16.根据权利要求1至15中任一项所述的抗原结合结构域,其中,所述抗原结合蛋白质包含下述氨基酸序列、基本上由下述氨基酸序列组成或者由下述氨基酸序列组成,下述氨基酸序列是按照从N端到C端或从C端到N端的顺序:

-SEQ ID NO:2和10;

-SEQ ID NO:3和9;

-SEQ ID NO:2和9;

-SEQ ID NO:2和7;

-SEQ ID NO:2和8;

-SEQ ID NO:3和7;

-SEQ ID NO:3和8;

-SEQ ID NO:3和10;

-SEQ ID NO:4和7;

-SEQ ID NO:4和8;

-SEQ ID NO:4和9;

-SEQ ID NO:4和10;

-SEQ ID NO:5和7;

-SEQ ID NO:5和8;

-SEQ ID NO:5和9;或者

-SEQ ID NO:5和10。

17.一种融合蛋白,其包含权利要求1至16中任一项所述的抗原结合蛋白质。

18.一种嵌合抗原受体或变异T细胞受体,其包含权利要求1至16中任一项所述的抗原结合蛋白质或权利要求17所述的融合蛋白。

19.一种偶联物,其包含权利要求1至16中任一项所述的抗原结合蛋白质。

20.一种核酸,其编码权利要求1至16中任一项所述的抗原结合蛋白质或权利要求17所述的融合蛋白。

21.一种载体构建体,其包含权利要求20所述的核酸。

22.一种细胞,其包含权利要求20所述的核酸或权利要求21所述的载体构建体。

23.一种药物组合物,其包含权利要求1至16中任一项所述的抗原结合蛋白质、权利要求17所述的融合蛋白或者权利要求19所述的偶联物,以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

24.一种诊断组合物,其包含权利要求1至16中任一项所述的抗原结合蛋白质、权利要求17所述的融合蛋白或者权利要求19所述的偶联物,以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

# 抗FLAG抗体

## 技术领域

[0001] 本发明涉及用于结合至FLAG标签的抗原结合蛋白质及其相关片段、所述抗原结合蛋白质及其片段的生产、以及所述抗体及其片段的用途,其中,该抗原结合蛋白质及其相关片段包括人源化抗原结合蛋白质及其相关片段。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求澳大利亚临时申请AU 2022902712的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

## 背景技术

[0004] “FLAG”标签(也称为FLAG表位)是一种人工抗原肽标签,其经常被掺入到蛋白质中以便于对靶蛋白进行检测和/或亲和纯化。FLAG标签是全球实验室中最常用的蛋白质标签之一。

[0005] 与FLAG标签结合的抗体是已知的,然而,这些抗体在小鼠或其他啮齿类动物体内产生,因此并不适合临床应用。虽然在体外系统中,使用小鼠抗FLAG抗体来检测或纯化重组蛋白通常是可接受的,但在体内系统中,使用小鼠抗体来检测FLAG标签或者与FLAG标签结合并非总是合适的。

[0006] 因此,需要一种新的和/或改进的抗FLAG抗体。

[0007] 在说明书中对任何现有技术的参考并非承认或暗示该现有技术构成任何法域中的公知常识的一部分,并且也并非承认或暗示该现有技术可以合理地预期为被本领域技术人员所理解、可以被认为其具有相关性、并且/或者可以与其他现有技术相结合。

## 发明内容

[0008] 本发明涉及包含用于与FLAG标签结合的抗原结合结构域的抗原结合蛋白质。特别地,本发明涉及人源化抗FLAG抗体及其FLAG结合片段。

[0009] 本发明提供了一种用于结合至FLAG标签的抗原结合蛋白质,该抗原结合蛋白质包含抗原结合结构域,该抗原结合结构域包含:

[0010] FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,以及

[0011] FR1a-CDR1a-FR2a-CDR2a-FR3a-CDR3a-FR4a,

[0012] 其中:

[0013] FR1、FR2、FR3和FR4各自为框架区;

[0014] CDR1、CDR2和CDR3各自为互补决定区;

[0015] FR1a、FR2a、FR3a和FR4a各自为框架区;

[0016] CDR1a、CDR2a和CDR3a各自为互补决定区;

[0017] 其中,框架区和/或互补决定区中的任何框架区和/或任何互补决定区的序列如本文所述,优选地如下面表1中所描述的那样。

[0018] 在任何实施方案中,CDR1、CDR2和CDR3是指来自抗体的可变重链(VH)的互补决定

区,并且CDR1a、CDR2a和CDR3a是来自抗体的可变轻链(VL)的互补决定区,或者CDR1、CDR2和CDR3是来自VL的互补决定区,并且CDR1a、CDR2a和CDR3a是来自VH的互补决定区。在这些实例中,CDR可以根据具体情况分别称为CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3。

[0019] 在任何实施方案中,本发明的抗原结合蛋白质能够特异性结合FLAG标签或其变体(比如在SEQ ID NO:11和29中定义的或如本文另外定义的)。本发明的抗原结合蛋白质优选地能够特异性结合包含多个FLAG标签序列(例如,2×FLAG、3×FLAG等)的蛋白质结构域。

[0020] 在任何实施方案中,本发明的抗原结合蛋白质用于特异性结合包含或由序列DYK组成的肽标签,序列DYK优选为序列DYKD(SEQ ID NO:11)。除这些序列之外,还可以存在其他氨基酸,优选亲水性氨基酸例如R(精氨酸)、D(天冬氨酸)、E(谷氨酸)和K(赖氨酸)、和/或具有芳香族侧链的氨基酸比如Y(酪氨酸)、F(苯丙氨酸)、H(组氨酸)和W(色氨酸)。

[0021] 在一个优选实施方案中,抗原结合蛋白质能够特异性结合包含下述序列或由下述序列组成的FLAG标签,所述序列为GDYKDDDDKG(SEQ ID NO:29)、DYKDDDDK(SEQ ID NO:30)、MDYKDDDDK(SEQ ID NO:31)、DFKDDDK(SEQ ID NO:32)、DYKAFDNL(SEQ ID NO:33)、DYKDHDG(SEQ ID NO:34)、MDFKDDDDK(SEQ ID NO:35)、MDYKAFDNL(SEQ ID NO:36)、DYKDHDI(SEQ ID NO:37)、DYKDH(SEQ ID NO:38)、DYKDD(SEQ ID NO:39)、DYKDHD(SEQ ID NO:40)和/或DYKDDD(SEQ ID NO:41)。最优选的序列是DYKDDDDK(SEQ ID NO:30)。

[0022] 如本文所用,术语FLAG标签还指经修饰的FLAG标签,这些标签是衍生自上述FLAG标签、尤其是具有DYKDDDDK的序列通过氨基酸插入、缺失或替换的标签。

[0023] 本文中提及的蛋白质或抗体“结合”FLAG标签从字面上就意味着支持该蛋白质或抗体“特异性地结合”或“特异性结合”FLAG标签这一表述。

[0024] 本发明的抗原结合蛋白质用于特异性结合FLAG标签,尤其适用于在包含FLAG标签的重组蛋白质或治疗性蛋白质(包括抗体或其片段、或包含用于治疗的抗原结合结构域的蛋白质)、或基于细胞的疗法(包括基因修饰细胞的细胞免疫疗法)的背景下。在某些实例中,抗原结合蛋白质可用于结合至嵌合抗原受体中包含的FLAG标签,以及结合至用于由细胞免疫治疗剂表达的相关重组受体(例如,包含在由细胞毒性T细胞表达的嵌合抗原受体(CAR)中)。

[0025] 在任何实施方案中,FLAG标签存在于其预期结合的蛋白质的N端处、C端处或者蛋白质内部。

[0026] 在任何实施方案中,本发明提供了一种用于结合至FLAG标签的抗原结合蛋白质,其中,该抗原结合蛋白质竞争性地抑制与下述抗体的FLAG标签的结合:

[0027] -包含含有如SEQ ID NO:1所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:6所示序列的VL;

[0028] -包含含有如SEQ ID NO:2所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:7所示序列的VL;

[0029] -包含含有如SEQ ID NO:2所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:8所示序列的VL;

[0030] -包含含有如SEQ ID NO:2所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:9所示序列的VL;

[0031] -包含含有如SEQ ID NO:2所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:10所示序列的VL;

[0032] -包含含有如SEQ ID NO:3所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:7所示序列的VL;

[0033] -包含含有如SEQ ID NO:3所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:8所示序列的VL;

[0034] -包含含有如SEQ ID NO:3所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:9所示序列的VL;

[0035] -包含含有如SEQ ID NO:3所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:10所示序列的VL;

[0036] -包含含有如SEQ ID NO:4所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:7所示序列的VL;

[0037] -包含含有如SEQ ID NO:4所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:8所示序列的VL;

[0038] -包含含有如SEQ ID NO:4所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:9所示序列的VL;

[0039] -包含含有如SEQ ID NO:4所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:10所示序列的VL;

[0040] -包含含有如SEQ ID NO:5所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:7所示序列的VL;

[0041] -包含含有如SEQ ID NO:5所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:8所示序列的VL;

[0042] -包含含有如SEQ ID NO:5所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:9所示序列的VL;或者

[0043] -包含含有如SEQ ID NO:5所示序列的VH和含有如SEQ ID NO:10所示序列的VL。

[0044] 在任何实施方案中,本发明提供了一种具有抗原结合结构域的CDRH1、CDRH2和/或CDRH3的抗原结合蛋白质,该抗原结合结构域具有如SEQ ID NO:2至5中的任一者中所定义的可变重链。

[0045] 在任何实施方案中,本发明提供了一种具有抗原结合结构域的CDRL1、CDRL2和/或CDRL3的抗原结合蛋白质,该抗原结合结构域具有如SEQ ID NO:7至10中的任一者中所定义的可变轻链。

[0046] 在任何实施方案中,本发明提供了一种抗原结合蛋白质,该抗原结合蛋白质包括具有如SEQ ID NO:2至5中的任一者中所定义的可变重链的抗原结合结构域的CDR1、CDR2和/或CDR3,并且包括具有如SEQ ID NO:7至10中的任一者中所定义的可变轻链的抗原结合结构域的CDR1、CDR2和/或CDR3。

[0047] 在一个实施方案中,抗原结合结构域包含:

[0048] (a)和(b):

[0049] (a)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VH,CDR1包含或由与SEQ ID NO:12的序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性的氨基酸序列组成;CDR2包含或由与SEQ ID NO:13的序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性的氨基酸序列组成;CDR3包含或由与SEQ ID NO:14的序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性的氨基酸序列组成;以及

[0050] (b)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VL,CDR1包含或由与SEQ ID NO:21的序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性的氨基酸序列组成;CDR2包含或由与SEQ ID NO:22的序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性的氨基酸序列组成;CDR3包含或由与SEQ ID NO:23的序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性的氨基酸序列组成;

[0051] 或者(c)和(d)：

[0052] (c)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VH,CDR1包含或由与SEQ ID NO:42或43的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;CDR2包含或由与SEQ ID NO:44的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;CDR3包含或由与SEQ ID NO:45的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;以及

[0053] (d)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VL,CDR1包含或由与SEQ ID NO:51的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;CDR2包含或由与SEQ ID NO:52的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;CDR3包含或由与SEQ ID NO:23的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;

[0054] 或者(e)和(f)：

[0055] (e)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VH,CDR1包含或由与SEQ ID NO:42或43的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;CDR2包含或由与SEQ ID NO:44的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;CDR3包含或由与SEQ ID NO:45的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;以及

[0056] (f)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VL,CDR1包含或由与SEQ ID NO:64的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;CDR2包含或由与SEQ ID NO:52的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;CDR3包含或由与SEQ ID NO:23的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;

[0057] 或者(g)和(h)：

[0058] (g)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VH,CDR1包含或由与SEQ ID NO:42或87的序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性的氨基酸序列组成;CDR2包含或由与SEQ ID NO:88的序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性的氨基酸序列组成;CDR3包含或由与SEQ ID NO:45的序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性的氨基酸序列组成;以及

[0059] (h)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VL,CDR1包含或由与SEQ ID NO:51的序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性的氨基酸序列组成;CDR2包含或由与SEQ ID NO:52的序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性的氨基酸序列组成;CDR3包含或由与SEQ ID NO:23的序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性的氨基酸序列组成;

[0060] 或者(i)和(j):

[0061] (i)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VH,CDR1包含或由与SEQ ID NO:42或87的序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性的氨基酸序列组成;CDR2包含或由与SEQ ID NO:88的序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性的氨基酸序列组成;CDR3包含或由与SEQ ID NO:45的序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性的氨基酸序列组成;以及

[0062] (j)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VL,CDR1包含或由与SEQ ID NO:64的序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性的氨基酸序列组成;CDR2包含或由与SEQ ID NO:52的序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性的氨基酸序列组成;CDR3包含或由与SEQ ID NO:23的序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性的氨基酸序列组成;

[0063] 或者(k)和(l):

[0064] (k)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VH,CDR1包含或由与SEQ ID NO:57的序列

具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;CDR2包含或由与SEQ ID NO:58的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;CDR3包含或由与SEQ ID NO:45的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;以及

[0065] (l)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VL,CDR1包含或由与SEQ ID NO:51的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;CDR2包含或由与SEQ ID NO:52的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;CDR3包含或由与SEQ ID NO:23的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;

[0066] 或者(m)和(n):

[0067] (m)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VH,CDR1包含或由与SEQ ID NO:57的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;CDR2包含或由与SEQ ID NO:58的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;CDR3包含或由与SEQ ID NO:45的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;以及

[0068] (n)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VL,CDR1包含或由与SEQ ID NO:64的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;CDR2包含或由与SEQ ID NO:52的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;CDR3包含或由与SEQ ID NO:23的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;

[0069] 或者(o)和(p):

[0070] (o)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VH,CDR1包含或由与SEQ ID NO:42的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约

94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;CDR2包含或由与SEQ ID NO:63的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;CDR3包含或由与SEQ ID NO:45的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列或者由该氨基酸序列组成;以及

[0071] (p)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VL,CDR1包含或由与SEQ ID NO:64的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;CDR2包含或由与SEQ ID NO:52的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;CDR3包含或由与SEQ ID NO:23的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;

[0072] 或者(q)和(r):

[0073] (q)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VH,CDR1包含或由与SEQ ID NO:57的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;CDR2包含或由与SEQ ID NO:58的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;CDR3包含或由与SEQ ID NO:45的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;以及

[0074] (r)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VL,CDR1包含或由与SEQ ID NO:64的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;CDR2包含或由与SEQ ID NO:52的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;CDR3包含或由与SEQ ID NO:23的序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的氨基酸序列组成;

[0075] 在一个实施方案中,抗原结合结构域包含:

[0076] (a)和(b):

[0077] (a)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VH,CDR1包含或由SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成;CDR2包含或由SEQ ID NO:13的氨基酸序列组成;CDR3包含或由SEQ ID NO:14的

氨基酸序列组成;以及

[0078] (b)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VL,CDR1包含或由SEQ ID NO:21的氨基酸序列组成;CDR2包含或由SEQ ID NO:22的氨基酸序列组成;CDR3包含或由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成;

[0079] 或者(c)和(d):

[0080] (c)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VH,CDR1包含或由SEQ ID NO:42或43的氨基酸序列组成;CDR2包含或由SEQ ID NO:44的氨基酸序列组成;CDR3包含或由SEQ ID NO:45的氨基酸序列组成;以及

[0081] (d)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VL,CDR1包含或由SEQ ID NO:51的氨基酸序列组成;CDR2包含或由SEQ ID NO:52的氨基酸序列组成;CDR3包含或由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成;

[0082] 或者(e)和(f):

[0083] (e)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VH,CDR1包含或由SEQ ID NO:42或43的氨基酸序列组成;CDR2包含或由SEQ ID NO:44的氨基酸序列组成;CDR3包含或由SEQ ID NO:45的氨基酸序列组成;以及

[0084] (f)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VL,CDR1包含或由SEQ ID NO:64的氨基酸序列组成;CDR2包含或由SEQ ID NO:52的氨基酸序列组成;CDR3包含或由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成;

[0085] 或者(g)和(h):

[0086] (g)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VH,CDR1包含或由SEQ ID NO:42或87的氨基酸序列组成;CDR2包含或由SEQ ID NO:88的氨基酸序列组成;CDR3包含或由SEQ ID NO:45的氨基酸序列组成;以及

[0087] (h)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VL,CDR1包含或由SEQ ID NO:51的氨基酸序列组成;CDR2包含或由SEQ ID NO:52的氨基酸序列组成;CDR3包含或由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成;

[0088] 或者(i)和(j):

[0089] (i)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VH,CDR1包含或由SEQ ID NO:42或87的氨基酸序列组成;CDR2包含或由SEQ ID NO:88的氨基酸序列组成;CDR3包含或由SEQ ID NO:45的氨基酸序列组成;以及

[0090] (j)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VL,CDR1包含或由SEQ ID NO:64的氨基酸序列组成;CDR2包含或由SEQ ID NO:52的氨基酸序列组成;CDR3包含或由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成;

[0091] 或者(k)和(l):

[0092] (k)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VH,CDR1包含或由SEQ ID NO:57的氨基酸序列组成;CDR2包含或由SEQ ID NO:58的氨基酸序列组成;CDR3包含或由SEQ ID NO:45的氨基酸序列组成;以及

[0093] (l)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VL,CDR1包含或由SEQ ID NO:51的氨基酸序列组成;CDR2包含或由SEQ ID NO:52的氨基酸序列组成;CDR3包含或由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成;

[0094] 或者(m)和(n):

[0095] (m)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VH,CDR1包含或由SEQ ID NO:57的氨基酸序列组成;CDR2包含或由SEQ ID NO:58的氨基酸序列组成;CDR3包含或由SEQ ID NO:45的氨基酸序列组成;以及

[0096] (n)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VL,CDR1包含或由SEQ ID NO:64的氨基酸序列组成;CDR2包含或由SEQ ID NO:52的氨基酸序列组成;CDR3包含或由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成;

[0097] 或者(o)和(p):

[0098] (o)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VH,CDR1包含或由SEQ ID NO:42的氨基酸序列组成;CDR2包含或由SEQ ID NO:63的氨基酸序列组成;CDR3包含或由SEQ ID NO:45的氨基酸序列组成;以及

[0099] (p)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VL,CDR1包含或由SEQ ID NO:64的氨基酸序列组成;CDR2包含或由SEQ ID NO:52的氨基酸序列组成;CDR3包含或由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成;

[0100] 或者(q)和(r):

[0101] (q)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VH,CDR1包含或由SEQ ID NO:57的氨基酸序列组成;CDR2包含或由SEQ ID NO:58的氨基酸序列组成;CDR3包含或由SEQ ID NO:45的氨基酸序列组成;以及

[0102] (r)包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VL,CDR1包含或由SEQ ID NO:64的氨基酸序列组成;CDR2包含或由SEQ ID NO:52的氨基酸序列组成;CDR3包含或由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成。

[0103] 在任何实施方案中,FR1、FR2、FR3和FR4可以指来自抗体的可变重链(VH)的框架区,FR1a、FR2a、FR3a和FR4a可以指来自抗体的可变轻链(VL)的框架区,或者FR1、FR2、FR3和FR4是来自VL的框架区,FR1a、FR2a、FR3a和FR4a是来自VH的框架区。在这样的实例中,FR可以根据具体情况分别称为FR H1、FR H2、FR H3、FR H4、FR L1、FR L2、FR L3和FR L4。

[0104] 在任何实施方案中,本发明提供了一种具有来自人类种系的FR H1、FR H2、FR H3和/或FR H4的抗原结合蛋白质,其中,人类种系为IGHV1-46*01或IGHV7-4-1*02。

[0105] 在任何实施方案中,本发明提供了一种具有来自人类种系的FR L1、FR L2、FR L3和/或FR L4的抗原结合蛋白质,其中,人类种系为IGKV2-30*01或IGKV4-1*01。

[0106] 在任何实施方案中,本发明提供了一种具有来自人类种系的FR H1、FR H2、FR H3和/或FR H4的抗原结合蛋白质,其中,人类种系为IGHV1-46*01或IGHV7-4-1*02,并且本发明提供了一种具有来自人类种系的FR L1、FR L2、FR L3和/或FR L4的抗原结合蛋白质,其中,人类种系为IGKV2-30*01或IGKV4-1*01。

[0107] 在任何实施方案中,抗原结合蛋白质包含与人类具有大于80%、81%、82%、8%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%同一性的VH、优选地,与人类的同一性百分数如实施例1中所描述的那样计算,并且/或者,抗原结合蛋白质包含与人类具有大于80%、81%、82%、8%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%同一性的VL、优选地,与人类的同一性百分数如实施例1中所描述的那样计算。

[0108] 在任何实施方案中,本发明提供了一种抗原结合蛋白质,其具有抗原结合结构域

的FR H1、FR H2、FR H3和/或FR H4,该抗原结合结构域具有如SEQ ID NO:2至5中的任一者所定义的可变重链区。

[0109] 在任何实施方案中,本发明提供了一种抗原结合蛋白质,其具有抗原结合结构域的FR L1、FR L2、FR L3和/或FR L4,该抗原结合结构域具有如SEQ ID NO:7至10中的任一者所定义的可变轻链区。

[0110] 在任何实施方案中,本发明提供了一种抗原结合蛋白质,其包含具有SEQ ID NO:2至5中的任一者所定义的可变重链的抗原结合结构域的FR1、FR2、FR3和/或FR4,并包含具有SEQ ID NO:7至10中的任一者所定义的可变轻链的抗原结合结构域的FR1、FR2、FR3和/或FR4。

[0111] 在一个实施方案中,本发明提供了一种包含抗原结合结构域的抗原结合蛋白质,其中,抗原结合结构域包含:

[0112] A.包含如上述任意(a)中定义的互补决定区(CDR)1、CDR2和CDR3的VH,以及包含如上述任意(b)中定义的CDR1、CDR2和CDR3的VL,并且抗原结合结构域包含下述B.、C.、D.、E.、F.、G.、H.、I.、J.、K.、L.、M.、N.、O.、P.、Q.或R.中的任一者:

[0113] B.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:65、66、67和68所示,对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:69、70、71和28所示,

[0114] 或者

[0115] C.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、16、18和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:69、70、71和28所示,

[0116] 或者

[0117] D.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、16、18和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:84、85、86和28所示,

[0118] 或者

[0119] E.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、16、18和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:24、26、27和28所示,

[0120] 或者

[0121] F.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列

具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、16、18和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:24、25、27和28所示,

[0122] 或者

[0123] G.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、17、19和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:69、70、71和28所示,

[0124] 或者

[0125] H.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、17、19和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:84、85、86和28所示,

[0126] 或者

[0127] I.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、17、19和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:24、26、27和28所示,

[0128] 或者

[0129] J.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、17、19和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:24、25、27和28所示,

[0130] 或者

[0131] K.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:80、16、82和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:69、70、71和28所示,

[0132] 或者

[0133] L.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:80、16、82和20所示,并且对于各VL FR,

参考序列分别如SEQ ID NO:84、85、86和28所示，

[0134] 或者

[0135] M.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL，框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列，其中，对于各VH FR，参考序列分别如SEQ ID NO:80、16、82和20所示，并且对于各VL FR，参考序列分别如SEQ ID NO:24、26、27和28所示，

[0136] 或者

[0137] N.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL，框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列，其中，对于各VH FR，参考序列分别如SEQ ID NO:80、16、82和20所示，并且对于各VL FR，参考序列分别如SEQ ID NO:24、25、27和28所示，

[0138] 或者

[0139] O.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL，框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列，其中，对于各VH FR，参考序列分别如SEQ ID NO:80、81、83和20所示，并且对于各VL FR，参考序列分别如SEQ ID NO:69、70、71和28所示，

[0140] 或者

[0141] P.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL，框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列，其中，对于各VH FR，参考序列分别如SEQ ID NO:80、81、83和20所示，并且对于各VL FR，参考序列分别如SEQ ID NO:84、85、86和28所示，

[0142] 或者

[0143] Q.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL，框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列，其中，对于各VH FR，参考序列分别如SEQ ID NO:80、81、83和20所示，并且对于各VL FR，参考序列分别如SEQ ID NO:24、26、27和28所示，

[0144] 或者

[0145] R.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL，框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列，其中，对于各VH FR，参考序列分别如SEQ ID NO:80、81、83和20所示，并且对于各VL FR，参考序列分别如SEQ ID NO:24、25、27和28所示。

[0146] 在一个实施方案中，本发明提供了一种包含抗原结合结构域的抗原结合蛋白质，其中，抗原结合结构域包含：

[0147] A.包含如上述任意(c)中定义的互补决定区(CDR)1、CDR2和CDR3的VH,以及包含如上述任意(d)中定义的CDR1、CDR2和CDR3的VL,并且抗原结合结构域包含下述B.、C.、D.或E.中的任一者:

[0148] B.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:46、47、49和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、55、56和28所示,

[0149] 或者

[0150] C.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:46、47、49和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、54、56和28所示,

[0151] 或者

[0152] D.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:46、48、50和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、55、56和28所示,

[0153] 或者

[0154] E.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:46、48、50和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、54、56和28所示。

[0155] 在一个实施方案中,本发明提供了一种包含抗原结合结构域的抗原结合蛋白质,其中,抗原结合结构域包含:

[0156] A.包含如上述任意(e)中定义的互补决定区(CDR)1、CDR2和CDR3的VH,以及包含如上述任意(f)中定义的CDR1、CDR2和CDR3的VL,并且抗原结合结构域包含下述B.、C.、D.或E.中的任一者:

[0157] B.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:46、47、49和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:75、76、77和28所示,

[0158] 或者

[0159] C.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约

94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:46、47、49和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:92、93、94和28所示,

[0160] 或者

[0161] D.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:46、48、50和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:75、76、77和28所示,

[0162] 或者

[0163] E.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:46、48、50和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:92、93、94和28所示。

[0164] 在一个实施方式中,本发明提供了一种包含抗原结合结构域的抗原结合蛋白质,其中,抗原结合结构域包含:

[0165] A.包含如上述任意(g)中定义的互补决定区(CDR)1、CDR2和CDR3的VH,以及包含如上述任意(h)中定义的CDR1、CDR2和CDR3的VL,并且抗原结合结构域包含下述B.、C.、D.或E.中的任一者:

[0166] B.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:89、47、90和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、55、56和28所示,

[0167] 或者

[0168] C.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:89、47、90和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、54、56和28所示,

[0169] 或者

[0170] D.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:89、48、91和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、55、56和28所示,

[0171] 或者

[0172] E.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列

具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:89、48、91和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、54、56和28所示。

[0173] 在一个实施方案中,本发明提供了一种包含抗原结合结构域的抗原结合蛋白质,其中,抗原结合结构域包含:

[0174] A.包含如上述任意(i)中定义的互补决定区(CDR)1、CDR2和CDR3的VH,以及包含如上述任意(j)中定义的CDR1、CDR2和CDR3的VL,并且抗原结合结构域包含下述B.、C.、D.或E.中的任一者:

[0175] B.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:89、47、90和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:75、76、77和28所示,

[0176] 或者

[0177] C.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:89、47、90和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:92、93、94和28所示,

[0178] 或者

[0179] D.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:89、48、91和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:75、76、77和28所示,

[0180] 或者

[0181] E.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:89、48、91和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:92、93、94和28所示。

[0182] 在一个实施方案中,本发明提供了一种包含抗原结合结构域的抗原结合蛋白质,其中,抗原结合结构域包含:

[0183] A.包含如上述任意(k)中定义的互补决定区(CDR)1、CDR2和CDR3的VH,以及包含如上述任意(l)中定义的CDR1、CDR2和CDR3的VL,并且抗原结合结构域包含下述包含B.、C.、D.、E.、F.、G.、H.或I.中的任一者:

[0184] B.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约

94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、59、61和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、55、56和28所示,

[0185] 或者

[0186] C.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、59、61和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、54、56和28所示,

[0187] 或者

[0188] D.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、60、62和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、55、56和28所示,

[0189] 或者

[0190] E.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、60、62和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、54、56和28所示,

[0191] 或者

[0192] F.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:95、59、97和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、55、56和28所示;

[0193] 或者

[0194] G.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:95、59、97和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、54、56和28所示;

[0195] 或者

[0196] H.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:95、96、98和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、55、56和28所示;

[0197] 或者

[0198] I.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:95、96、98和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:53、54、56和28所示。

[0199] 在一个实施方案中,本发明提供了一种包含抗原结合结构域的抗原结合蛋白质,其中,抗原结合结构域包含:

[0200] A.包含如上述任意(m)中定义的互补决定区(CDR)1、CDR2和CDR3的VH,以及包含如上述任意(n)中定义的CDR1、CDR2和CDR3的VL,并且抗原结合结构域包含下述包含B.、C.、D.、E.、F.、G.、H.或I.中的任一者:

[0201] B.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、59、61和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:75、76、77和28所示;

[0202] 或者

[0203] C.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、59、61和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:99、100、101和28所示;

[0204] 或者

[0205] D.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、60、62和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:75、76、77和28所示;

[0206] 或者

[0207] E.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、60、62和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:99、100、101和28所示;

[0208] 或者

[0209] F.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:95、59、97和20所示,并且对于各VL FR,

参考序列分别如SEQ ID NO:75、76、77和28所示；

[0210] 或者

[0211] G.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:95、59、97和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:99、100、101和28所示；

[0212] 或者

[0213] H.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:95、96、98和20所示,并且对于各VL FR,参考序列分别如SEQ ID NO:75、76、77和28所示；

[0214] 或者

[0215] I.各自包含框架区(FR)1、2、3和4的VH和VL,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:95、96、98和20所示,并且对于各VLFR,参考序列分别如SEQ ID NO:99、100、101和28所示。

[0216] 在一个实施方案中,本发明提供了一种包含抗原结合结构域的抗原结合蛋白质,其中,抗原结合结构域包含：

[0217] A.包含如以上(o)所定义的互补决定区(CDR)1、CDR2和CDR3的VH,以及包含如以上(p)所定义的CDR1、CDR2和CDR3的VL,并且VH和VL各自包含框架区(FR)1、2、3和4,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:72、73、74和68所示,并且对于各VLFR,参考序列分别如SEQ ID NO:75、76、77和28所示；

[0218] 或者

[0219] B.包含如以上(q)所定义的互补决定区(CDR)1、CDR2和CDR3的VH,以及包含如以上(r)所定义的CDR1、CDR2和CDR3的VL,并且VH和VL各自包含框架区(FR)1、2、3和4,框架区(FR)1、2、3和4包含与参考序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或100％同一性的序列,其中,对于各VH FR,参考序列分别如SEQ ID NO:15、78、79和68所示,并且对于各VLFR,参考序列分别如SEQ ID NO:75、76、77和28所示。

[0220] 在任何实施方案中,抗原结合结构域包含可变重链,可变重链包含如SEQ ID NO:2至5中的任一者所示的氨基酸序列,或者包含与该氨基酸序列序列具有至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的序列。

[0221] 在任何实施方案中,抗原结合结构域包含可变轻链,可变轻链包含如SEQ ID NO:7

至10中的任一者所示的氨基酸序列,或者包含与该氨基酸序列序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性的序列。

[0222] 在任何实施方案中,抗原结合结构域包含可变重链和可变轻链,可变重链包含如SEQ ID NO:2至5中的任一者所示的氨基酸序列,或者包含与该氨基酸序列序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性的序列;可变轻链包含如SEQ ID NO:7至10中的任一者所示的氨基酸序列或者包含与该氨基酸序列序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性的序列。

[0223] 如本文所述,抗原结合蛋白质可以呈下述形式:

[0224] (i)单域抗体(sdAb);

[0225] (ii)单链Fv片段(scFv);

[0226] (iii)二聚体单链Fv片段(di-scFv);

[0227] (iv)与抗体的恒定区、Fc或重链恒定结构域(CH)2和/或CH3相连的(ii)或(iii)中的一者;

[0228] (v)与结合至免疫效应细胞的蛋白质相连的(i)至(iv)中的一者;

[0229] (vi)与经修饰的免疫细胞受体(比如经修饰的T细胞受体)相连的(i)至(iv)中的一者;或者

[0230] (vii)处于嵌合抗原受体(CAR)或变异T细胞受体(variant T cell receptor)的背景下的(i)至(iv)中的一者。

[0231] 此外,如本文所述,抗原结合蛋白质可以呈下述形式:

[0232] (i)双抗体;

[0233] (ii)三抗体;

[0234] (iii)四抗体;

[0235] (iv)Fab;

[0236] (v)F(ab')2;

[0237] (vi)Fv;

[0238] (vii)双特异性抗体或者其他形式的多特异性抗体;

[0239] (viii)与抗体的恒定区、Fc或重链恒定结构域(CH)2和/或CH3相连的(i)至(vii)中的一者;

[0240] (ix)与结合至免疫效应细胞的蛋白质相连的(i)至(vii)中的一者;

[0241] (x)与结合至免疫效应细胞的蛋白质相连的(i)至(vii)中的一者;

[0242] (xi)与经修饰的免疫细胞受体(比如经修饰的T细胞受体)相连的(i)至(vii)中的一者;或者

[0243] (xiii)处于嵌合抗原受体(CAR)或变异T细胞受体(包括在通用CAR系统的背景下,用于与包含抗原结合结构域的多肽一起使用,该抗原结合结构域用于结合靶细胞表面的抗原)的背景下的(i)至(vii)中的一者。

[0244] 前述抗原结合蛋白质也可以称为抗体的抗原结合结构域。

[0245] 优选地,本文所述的抗原结合蛋白质是抗体或其抗原结合片段。通常,抗原结合蛋白质是抗体,比如单克隆抗体。抗原结合蛋白质可以呈重组或经修饰的抗体(例如,嵌合抗体、人源化抗体、人类抗体、CDR移植抗体、灵长类抗体、去免疫抗体、合成人源化抗体、半抗体、双特异性抗体、三特异性抗体或多特异性抗体)的形式。该抗体还可以包含化学修饰,比如与活性剂或放射性标记物偶联、或者与用于提高溶解性的试剂偶联、或者进行本文所述的其他修饰。

[0246] 如本文所用,抗原结合蛋白质可以是可变结构域。

[0247] 本发明提供了一种抗原结合蛋白质,抗原结合蛋白质包含下述氨基酸序列(按从N端到C端或从C端到N端的顺序)、基本上由下述氨基酸序列(按从N端到C端或从C端到N端的顺序)组成、或者由下述氨基酸序列(按从N端到C端或从C端到N端的顺序)组成:

[0248] -SEQ ID NO:2和10;

[0249] -SEQ ID NO:3和9;

[0250] -SEQ ID NO:2和9;

[0251] -SEQ ID NO:2和7;

[0252] -SEQ ID NO:2和8;

[0253] -SEQ ID NO:3和7;

[0254] -SEQ ID NO:3和8;

[0255] -SEQ ID NO:3和10;

[0256] -SEQ ID NO:4和7;

[0257] -SEQ ID NO:4和8;

[0258] -SEQ ID NO:4和9;

[0259] -SEQ ID NO:4和10;

[0260] -SEQ ID NO:5和7;

[0261] -SEQ ID NO:5和8;

[0262] -SEQ ID NO:5和9;或者

[0263] -SEQ ID NO:5和10。

[0264] 如本文所用,本发明的抗原结合蛋白质的互补决定区(CDR)序列根据IMGT、Chothia或Kabat编号系统进行定义。

[0265] 本发明提供了一种如本文所述的抗原结合蛋白质,其中,形成FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4中的一者或更多者的氨基酸序列是人类序列。

[0266] 本发明提供了一种抗FLAG标签抗原结合蛋白质、免疫球蛋白可变结构域、抗体、dab、scFv、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv片段、双抗体、三抗体、线性抗体、单链抗体分子或者多特异性抗体,其中,上述物质包含具有如本文所述的序列的抗原结合蛋白质或者包含如本文所述的CDR和/或FR序列。

[0267] 本发明提供了一种双抗体或三抗体,该双抗体或三抗体具有抗原结合蛋白质,该抗原结合蛋白质具有如本文所述的序列或者包含如本文所述的CDR和/或FR序列。

[0268] 本发明提供了一种融合蛋白,该融合蛋白包含如本文所述的抗原结合蛋白质、免疫球蛋白可变结构域、抗体、dab、scFv、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv片段、双抗体、三抗体、线性抗体、单链抗体分子或者多特异性抗体。

[0269] 在一个实施方案中,本发明的抗原结合蛋白质可以被包括作为嵌合抗原蛋白(CAR)或变体T细胞受体的组分。在此类实施方案中,应当理解的是,包含本发明的抗原结合蛋白质的所生成的CAR或变体T细胞受体可以称为“间接CAR”(有时也称为通用CAR)。在间接CAR系统中,CAR的抗原结合结构域不直接结合靶细胞上的靶抗原,而是结合中间体,其中,中间体包含用于直接结合靶细胞的抗原结合结构域。通过中间体识别细胞的CAR的实例是本领域例如欧洲专利申请EP2651442中所已知的。

[0270] 因此,在间接CAR的背景下,本发明的抗原结合蛋白质可以用于结合存在于中间体上的FLAG标签,并且其中,中间体还具有用于结合靶细胞(例如癌细胞)的抗原结合结构域。中间体提供了对靶细胞(比如癌细胞)的特异性,而具有CAR的基因修饰细胞提供了功效并指导了针对靶细胞的免疫应答。中间体可以是分子比如与靶细胞上的靶抗原直接结合或相互作用的探针,并且中间体还包含FLAG标签。此类探针的非限制性实例包括抗体、融合蛋白、抗体的Fab、scFv、可溶性工程化TCR或者适体。术语“适体”是指与靶标特异性结合或优先与靶标形成复合物的任何寡核苷酸、聚核酸、肽或多肽。

[0271] 本发明还提供了一种缀合物,该缀合物呈如本文所述的抗原结合蛋白质、免疫球蛋白可变结构域、抗体、dab、scFv、Fab、Fab’、F(ab’)2、Fv片段、双抗体、三抗体、线性抗体、单链抗体分子、多特异性抗体或融合蛋白的形式,其中,上述物质与标记物或细胞毒性剂缀合。

[0272] 本发明提供了一种抗体,该抗体用于结合至如本文所述的抗原结合蛋白质、免疫球蛋白可变结构域、抗体、dab、scFv、Fab、Fab’、F(ab’)2、Fv片段、双抗体、三抗体、线性抗体、单链抗体分子、多特异性抗体、融合蛋白或者缀合物。

[0273] 在涉及形成抗原结合蛋白质的多个多肽链的本发明的方面中,表达构建体包含编码多肽(该多肽包含例如可操作地连接至启动子的VH)的核酸,以及包含编码多肽(该多肽包含例如可操作地连接至启动子的VL)的核酸。

[0274] 在另一实例中,表达构建体是双顺反子表达构建体,例如包含以5’至3’顺序的以下可操作地连接的组分:

[0275] (i)启动子;

[0276] (ii)编码第一多肽的核酸;

[0277] (iii)内部核糖体进入位点;以及

[0278] (iv)编码第二多肽的核酸,

[0279] 其中,第一多肽包含VH并且第二多肽包含VL,或反之亦然。

[0280] 本发明还涵盖单独的表达构建体,其中,一个表达构建体对包含VH的第一多肽进行编码,另一表达构建体对包含VL的第二多肽进行编码。例如,本发明还提供了一种组合物,该组合物包含:

[0281] (i)第一表达构建体,该第一表达构建体包含对多肽进行编码的核酸,该多肽包含与启动子可操作地连接的VH;以及

[0282] (ii)第二表达构建体,该第二表达构建体包含对多肽进行编码的核酸,该多肽包含与启动子可操作地连接的VL。

[0283] 本发明提供了一种细胞,其包含本文所述的载体或核酸。优选地,细胞是分离的、基本上纯化的或者重组的。在一个实例中,细胞包含本发明的表达构建体或者:

[0284] (i)第一表达构建体,该第一表达构建体包含对多肽进行编码的核酸,该多肽包含与启动子可操作地连接的VH;以及

[0285] (ii)第二表达构建体,该第二表达构建体包含对多肽进行编码的核酸,该多肽包含与启动子可操作地连接的VL,

[0286] 其中,第一多肽和第二多肽结合以形成本发明的抗原结合蛋白质。

[0287] 本发明的细胞的实例包括细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞。

[0288] 本发明提供了一种核酸,其编码为如本文所述的抗原结合蛋白质、免疫球蛋白可变结构域、抗体、dab、scFv、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv片段、双抗体、三抗体、线性抗体、单链抗体分子、多特异性抗体、融合蛋白或缀合物。

[0289] 本发明提供了一种载体,其包含本文所述的核酸。优选地,该核酸具有对与SEQ ID NO:2至5和SEQ ID NO:7至10相对应的氨基酸序列中的任何一个或更多个氨基酸序列进行编码的核苷酸序列。

[0290] 本发明提供了一种细胞,其包含如本文所述的载体或核酸。

[0291] 在另一实施方案中,提供了一种包含如本文所述的细胞的动物或由该动物衍生的组织。

[0292] 本发明提供了一种药物组合物,该药物组合物包含抗原结合蛋白质,或包含如本文所述的CDR和/或FR序列,或包含如本文所述的免疫球蛋白可变结构域、抗体、dab、scFv、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv片段、双抗体、三抗体、线性抗体、单链抗体分子或多特异性抗体、融合蛋白或缀合物,以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0293] 本发明提供了一种诊断组合物,该诊断组合物包含抗原结合蛋白质,或包含如本文所述的CDR和/或FR序列,或包含如本文所述的免疫球蛋白可变结构域、抗体、dab、scFv、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv片段、双抗体、三抗体、线性抗体、单链抗体分子或多特异性抗体、融合蛋白或缀合物、稀释剂,以及可选的标记物。

[0294] 本发明提供了一种试剂盒或制品,该试剂盒或制品包含抗原结合蛋白质,或包含如本文所述的CDR和/或FR序列,或包含如本文所述的免疫球蛋白可变结构域、抗体、dab、scFv、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv片段、双抗体、三抗体、线性抗体、单链抗体分或多特异性抗体、融合蛋白或缀合物。

[0295] 本发明提供了根据如本文中所述的CDR1、CDR2、CDR3、FR1、FR2、FR3和FR4中的一者或更多者的序列在制备用于结合FLAG标签的抗原结合蛋白质中的用途。

[0296] 本发明提供了核酸分子文库,其由如本文所述的抗原结合蛋白质或CDR和/或FR序列的突变产生,其中,所述文库中的至少一个核酸分子编码用于结合FLAG标签的抗原结合蛋白质。

[0297] 本发明提供了一种用于制备抗原结合蛋白质的方法,该抗原结合蛋白质用于结合如本文所述的FLAG标签,该方法包括在如本文所述的细胞或动物中表达如本文所述的核酸。

[0298] 在本发明的任何方面,抗原结合蛋白质包含Fc区,该Fc区被工程化以具有增强的诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的能力。优选地,诱导ADCC的增强能力由Fc区中与Fc受体相互作用的氨基酸的突变、缺失或修饰所赋予。优选地,氨基酸的突变、缺失或修饰按照SEQ ID NO:60位于第239位、第330位和/或第332位(其中,丙氨酸位于第118位),

或位于第239位、第330位和/或第332位的等效位置。优选地,氨基酸突变为S239D、A330 L和I332E。通常,Fc包含如SEQ ID NO:62所示的氨基酸序列、基本上由如SEQ ID NO:62所示的氨基酸序列组成、或者由如SEQ ID NO:62所示的氨基酸序列组成。

[0299] 在本发明的任何方面,抗原结合蛋白质包含Fc区,该Fc区没有被工程化以具有降低的诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的能力。优选地,根据SEQ ID NO:60(其中,丙氨酸为第118位)第234位、第235位和/或第331位的氨基酸,或者与第234位、第235位和/或第331位等效位置上的氨基酸分别不是苯丙氨酸(F)、谷氨酸(E)和/或丝氨酸(S)。换句话说,第234位的氨基酸不是F,第235位的氨基酸不是E,并且/或者第331位的氨基酸不是S。

[0300] 在另一实施方案中,抗原结合蛋白质包含Fc区,该Fc区被工程化以:

[0301] -增加体外或体内半衰期;

[0302] -具有诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)或补体依赖性细胞毒性的增加的能力;

[0303] -降低效应器功能;或者

[0304] -增加抗原结合蛋白质的共接合(co-engagement)。

[0305] 本发明提供了一种如本文所述的抗原结合蛋白质、免疫球蛋白可变结构域、抗体、dab、scFv、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv片段、双抗体、三抗体、线性抗体、单链抗体分子或多特异性抗体、融合蛋白、缀合物、或者药物组合物在制备用于治疗癌症或与FLAG标签表达相关的病症或疾病的药物中的用途。

[0306] 如本文所述的抗原结合蛋白质、蛋白质或抗体优选地包含人恒定区例如IgG恒定区,该IgG恒定区比如为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4恒定区或其混合物。在包含VH和VL的抗体或蛋白质的情况下,VH可以连接至重链恒定区,并且VL可以连接至轻链恒定区。

[0307] 本发明的抗原结合蛋白质的功能特征将用于对本发明的抗体加以必要的变更。

[0308] 如本文所述的抗原结合蛋白质可以是纯化的、基本上纯化的、分离的和/或重组的。

[0309] 本发明的抗原结合蛋白质可以是取自培养基的上清液的一部分,在该培养基中已经生长了表达本发明的抗原结合蛋白质的杂交瘤。

[0310] 本发明提供了包含用于结合至FLAG标签的抗原结合蛋白质的单域抗体。

[0311] 如本文所用,除非上下文另有要求,否则术语“包含(comprise)”和该术语的变型比如“含有(comprising)”、“包括(comprises)”和“包含(comprised)”并非旨在排除另外的添加物、组分、整数或步骤。

[0312] 本发明的其他方面以及前述段落中所描述的各方面的其他实施方案将通过以下通过实施例且参照附图给出的描述而变得明显。

## 附图说明

[0313] 图1为IgG人源化FLAG-标签结合单克隆抗体的ELISA滴定。

[0314] 图2为用于结合至FLAG标记的CAR的人源化单克隆抗体诱导来自CART细胞的IFNγ分泌。

[0315] 图3为来自亲本抗体的VH和VL区与人源化变体v4和v7的比对。

[0316] 序列信息

[0317] 表1:序列信息

[0318]

| 描述 | SEQ ID NO: | 氨基酸序列 |
|---|---|---|
| 亲本 VH (小鼠) | 1 | QVQLQQSAGELARPGASVKMSCKASGYSFTTYTIH WVKQRPGQGLEWIGYINPSSGYAAYNQNFKDETTL TADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREKFYGYD YWGQGTTLTVSS |
| 人源化 VH1 (hu-VH1) 重链变体 1 (IGHV1-46*01 种系) | 2 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTTYTIH WVRQAPGQGLEWIGYINPSSGYAAYNQKFQGRVTL TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKFYGYD YWGQGTTVTVSS |

[0319]

| | | |
|---|---|---|
| 人源化 VH2 (hu-VH2) 重链变体 2 (IGHV1-46*01 种系) | 3 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTTYTM HWVRQAPGQGLEWMGYINPSSGYAAYNQKFQGR VTMTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKFY GYDYWGQGTTVTVSS |
| 人源化 VH3 (hu-VH3) 重链变体 3 (IGHV7-4-1*-2 种系) | 4 | QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYSFTTYTIH WVRQAPGQGLEWIGYINPSSGYAAYNQGFTGRFVL SADKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAREKFYGYD YWGQGTTVTVSS |
| 人源化 VH4 (hu-VH4) 重链变体 4 (IGHV7-4-1*-2 种系) | 5 | QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYSFTTYTMN WVRQAPGQGLEWMGYINPSSGYAAYNQGFTGRFV FSADKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAREKFYGY DYWGQGTTVTVSS |
| 亲本 VL (小鼠) | 6 | DVLMTQLPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHRNGNT YLEWYLLKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPYTFGGGT KLEIK |
| 人源化 VL1 (hu-VL1) 轻链变体 1 (IGKV2-30*01 种系) | 7 | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHRNGNT YLEWFQLRPGQSPRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGGT KLEIK |
| 人源化 VL2 (hu-VL2) 轻链变体 2 (IGKV2-30*01 种系) | 8 | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHRNGNT YLEWFQQRPGQSPRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGGT KLEIK |
| 人源化 VL3 (hu-VL3) 轻链变体 3 (IGKV4-1*01 种系) | 9 | DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSIVHRNGNT YLEWYQLKPGQPPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVYYCFQGSHVPYTFGGGTK LEIK |
| 人源化 VL4 (hu-VL4) 轻链变体 4 (IGKV4-1*01 种系) | 10 | DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSIVHRNGNT YLEWYQQKPGQPPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVYYCFQGSHVPYTFGGGTK LEIK |
| FLAG 标签 | 11 | DYKD |
| CDR H1 亲本, VH1, VH2, VH3 和 VH4 (IMGT) | 12 | GYSFTTYT |
| CDR H2 亲本, VH1, VH2, VH3 和 VH4 | 13 | INPSSGYA |

[0320]

| | | |
|---|---|---|
| (IMGT) | | |
| CDR H3 亲本, VH1, VH2, VH3 和 VH4 (IMGT) | 14 | AREKFYGYDY |
| FR H1 VH1 和 VH2 (IMGT 和 Chothia) | 15 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS |
| FR H2 VH1 (IMGT) | 16 | IHWVRQAPGQGLEWIGY |
| FR H2 VH2 (IMGT) | 17 | MHWVRQAPGQGLEWMGY |
| FR H3 VH1 和 VH3 (IMGT) | 18 | AYNQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC |
| FR H3 VH2 (IMGT) | 19 | AYNQKFQGRVTMTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC |
| FR H4 VH1, VH2, VH3 和 VH4 (IMGT, Kabat 和 Chothia) | 20 | WGQGTTVTVSS |
| CDR L1 亲本, VL1, VL2, VL3 和 VL4 (IMGT) | 21 | QSIVHRNGNTY |
| CDR L2 亲本, VL1, VL2, VL3 和 VL4 (IMGT) | 22 | KVS |
| CDR L3 亲本, VL1, VL2, VL3 和 VL4 (IMGT, Kabat 和 Chothia) | 23 | FQGSHVPYT |
| FR L1 VL3 和 VL4 (IMGT) | 24 | DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS |
| FR L2 VL4 (IMGT) | 25 | LEWYQQKPGQPPKLLIY |
| FR L2 VL3 (IMGT) | 26 | LEWYQLKPGQPPKLLIY |
| FR L3 VL3 和 VL4 (IMGT) | 27 | NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC |
| FR L4 亲本, VL1, VL2, VL3 和 VL4 (IMGT, Kabat 和 Chothia) | 28 | FGGGTKLEIK |
| FLAG 标签十肽 | 29 | GDYKDDDDKG |
| FLAG 标签八肽 | 30 | DYKDDDDK |
| FLAG 标签九肽 | 31 | MDYKDDDDK |

[0321]

| | | |
|---|---|---|
| FLAG 标签七肽 | 32 | DFKDDDK |
| FLAG 标签替代八肽 | 33 | DYKAFDNL |
| FLAG 标签替代七肽 | 34 | DYKDHDG |
| FLAG 标签替代物 | 35 | MDFKDDDDK |
| FLAG 标签替代物 | 36 | MDYKAFDNL |
| FLAG 标签替代物 | 37 | DYKDHDI |
| FLAG 标签替代物 | 38 | DYKDH |
| FLAG 标签替代物 | 39 | DYKDD |
| FLAG 标签替代物 | 40 | DYKDHD |
| FLAG 标签替代物 | 41 | DYKDDD |
| CDR H1 亲本, VH1 和 VH3 (Kabat) | 42 | TYTIH |
| CDR H1 VH2 (Kabat) | 43 | TYTMH |
| CDR H2 VH1 和 VH2 (Kabat) | 44 | YINPSSGYAAYNQKFQG |
| CDR H3 亲本, VH1, VH2, VH3 和 VH4 (Kabat 和 Chothia) | 45 | EKFYGYDY |
| FR H1 VH1 和 VH2 (Kabat) | 46 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSF |
| FR H2 VH1 和 VH3 (Kabat) | 47 | WVRQAPGQGLEWIG |
| FR H2 VH2 和 VH4 (Kabat) | 48 | WVRQAPGQGLEWMG |
| FR H3 VH1 (Kabat) | 49 | RVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR |
| FR H3 VH2 (Kabat) | 50 | RVTMTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR |
| CDR L1 VL3 和 VL4 (Kabat 和 Chothia) | 51 | KSSQSIVHRNGNTYLE |
| CDR L2 亲本, VL1, VL2, VL3 和 VL4 (Kabat 和 Chothia) | 52 | KVSNRFS |
| FR L1 VL3 和 VL4 (Kabat 和 Chothia) | 53 | DVVMTQSPDSLAVSLGERATINC |
| FR L2 VL4 (Kabat 和 Chothia) | 54 | WYQQKPGQPPKLLIY |
| FR L2 VL3 (Kabat 和 Chothia) | 55 | WYQLKPGQPPKLLIY |
| FR L3 VL3 和 VL4 | 56 | GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC |

[0322]

| | | |
|---|---|---|
| (Kabat 和 Chothia) | | |
| CDR H1 亲本, VH1, VH2, VH3 和 VH4 (Chothia) | 57 | GYSFTTY |
| CDR H2 亲本, VH1, VH2, VH3 和 VH4 (Chothia) | 58 | NPSSGY |
| FR H2 VH1 和 VH3 (Chothia) | 59 | TIHWVRQAPGQGLEWIGYI |
| FR H2 VH2 (Chothia) | 60 | TMHWVRQAPGQGLEWMGYI |
| FR H3 VH1 (Chothia) | 61 | AAYNQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR |
| FR H3 VH2 (Chothia) | 62 | AAYNQKFQGRVTMTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR |
| CDR H2 亲本(Kabat) | 63 | YINPSSGYAAYNQNFKD |
| CDR L1 亲本 VL1 和 VL2 (Kabat 和 Chothia) | 64 | RSSQSIVHRNGNTYLE |
| FR H1 亲本(IMGT) | 65 | QVQLQQSAGELARPGASVKMSCKAS |
| FR H2 亲本(IMGT) | 66 | IHWVKQRPGQGLEWIGY |
| FR H3 亲本(IMGT) | 67 | AYNQNFKDETTLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC |
| FR H4 亲本(IMGT, Kabat 和 Chothia) | 68 | WGQGTTLTVSS |
| FR L1 亲本和 VL1 (IMGT) | 69 | DVLMTQLPLSLPVSLGDQASISCRSS |
| FR L2 亲本和 VL1 (IMGT) | 70 | LEWYLLKPGQSPKLLIY |
| FR L3 亲本和 VL1 (IMGT) | 71 | NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC |
| FR H1 亲本(Kabat) | 72 | QVQLQQSAGELARPGASVKMSCKASGYSFT |
| FR H2 亲本(Kabat) | 73 | WVKQRPGQGLEWIG |
| FR H3 亲本(Kabat) | 74 | ETTLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR |
| FR L1 亲本和 VL1 (Kabat 和 Chothia) | 75 | DVLMTQLPLSLPVSLGDQASISC |
| FR L2 亲本和 VL1 (Kabat 和 Chothia) | 76 | WYLLKPGQSPKLLIY |
| FR L3 亲本和 VL1 | 77 | GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCF |

[0323]

| | | |
|---|---|---|
| (Kabat 和 Chothia) | | |
| FR H2 亲本(Chothia) | 78 | TIHWVKQRPGQGLEWIGYI |
| FR H3 亲本(Chothia) | 79 | AAYNQNFKDETTLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSA VYYCAR |
| FR H1 VH3 和 VH4 (IMGT) | 80 | QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKAS |
| FR H2 VH4 (IMGT) | 81 | MNWVRQAPGQGLEWMGY |
| FR H3 VH3 (IMGT) | 82 | AYNQGFTGRFVLSADKSVSTAYLQISSLKAEDTAV YYC |
| FR H3 VH4 (IMGT) | 83 | AYNQGFTGRFVFSADKSVSTAYLQISSLKAEDTAVY YC |
| FR L1 VL2 (IMGT) | 84 | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS |
| FR L2 VL2 (IMGT) | 85 | LEWFQQRPGQSPRLLIY |
| FR L3 VL2 (IMGT) | 86 | NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC |
| CDR H1 VH4 (Kabat) | 87 | TYTMN |
| CDR H2 VH3 和 VH4 (Kabat) | 88 | YINPSSGYAAYNQGFTG |
| FR H1 VH3 和 VH4 (Kabat) | 89 | QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYSFT |
| FR H3 VH3 (Kabat) | 90 | RFVLSADKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR |
| FR H3 VH4 (Kabat) | 91 | RFVFSADKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR |
| FR L1 VL2 (Kabat) | 92 | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC |
| FR L2 VL2 (Kabat) | 93 | WFQQRPGQSPRLLIY |
| FR L3 VL2 (Kabat) | 94 | GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC |
| FR H1 VH3 和 VH4 Chothia) | 95 | QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKAS |
| FR H2 VH4 (Chothia) | 96 | TMNWVRQAPGQGLEWMGYI |
| FR H3 VH3 (Chothia) | 97 | AAYNQGFTGRFVLSADKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCAR |
| FR H3 VH4 (Chothia) | 98 | AAYNQGFTGRFVFSADKSVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCAR |
| FR L1 VL2 (Chothia) | 99 | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC |
| FR L2 VL2 (Chothia) | 100 | WFQQRPGQSPRLLIY |
| FR L3 VL2 (Chothia) | 101 | GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC |

## 具体实施方式

[0324] 应当理解的是,本说明书中公开和限定的本发明扩展到从文本或附图中提及的或者明显的两个或更多个单独特征的所有替代组合。所有这些不同的组合构成本发明的各种替代方面。

[0325] 本发明的其他方面以及前述段落中所描述的各方面的其他实施方案将通过以下通过实施例且参照附图给出的描述而变得明显。

[0326] 现在将详细参照本发明的某些实施方案。虽然将结合各实施方案对本发明进行描述,但是应当理解的是,本发明的目的并非将本发明限于那些实施方案。相反,本发明旨在覆盖可以包括在由权利要求限定的本发明的范围内的所有替代、修改和等同物。

[0327] 本发明人已经开发了结合至FLAG标签的抗原结合蛋白质,例如抗体。如本文所述的抗原结合蛋白质用于结合至存在于以下任一者上的一个或更多个FLAG标签,所述各者为重组蛋白质、重组肽、基因修饰细胞(包括经修饰以在其表面上表达受体的基因修饰细胞,其中,受体包括一个或更多个FLAG标签)。在特别优选的实施方案中,抗原结合蛋白质可以用于结合至存在于由诸如细胞毒性细胞的基因修饰细胞所表达的嵌合抗原受体(CAR)上的一个或更多个FLAG标签。

[0328] 本发明的抗原结合蛋白质是人源化抗体,从而使其特别适于结合至CAR或其他受体或蛋白质,这些受体或蛋白质由基因工程细胞表达用于人类治疗剂。特别地,经工程改造以包含FLAG标签(比如本文所述的标签)的蛋白质可以被本发明的抗原结合蛋白质在体外或体内结合。

[0329] 通用

[0330] 贯穿本说明书,除非另有明确说明或上下文另有要求,否则应当参照单个步骤、物质组合物、步骤组、或物质组合物组以涵盖这些步骤、物质组合物、步骤组、或物质组合物组中的一者或多者(即,一者或更多者)。因此,如本文所用,单数形式“一(a)”、“一个(an)”和“该(the)”包括复数方面,并且反之亦然,除非上下文另外清楚地指示。例如,对“一(a)”的引用包括单个以及两个或更多个;对“一个(an)”的引用包括单个以及两个或更多个;并且对“该(the)”的引用包括单个以及两个或更多个等等。

[0331] 本领域技术人员将理解的是,本发明易于进行除了具体描述的那些变化和修改之外的变化和修改。应当理解的是,本发明包括所有这样的变化和修改。本发明还包括本说明书中单独或共同提及或指示的所有步骤、特征、组合物和化合物、以及这些步骤或特征的任何步骤或特征、这些步骤或特征的所有组合、或者这些步骤或特征的任意两个或更多个步骤或特征。

[0332] 本领域技术人员将认识到与本文所述的方法和材料类似或等同的许多方法和材料,其可以用于实施本发明。本发明绝不限于该方法和该材料。

[0333] 本文提及的所有专利和出版物的全部内容通过引用并入本文。

[0334] 本发明的范围不受本文所述的特定实例的限制,这些实例仅用于举例说明的目的。功能等同的产品、组合物和方法显然在本发明的范围内。

[0335] 除非另外特别说明,否则本文中的本发明的任何实例或实施方案都应当被认为适用于本发明的任何其他示实或实施方案。

[0336] 除非另外特别定义,否则本文使用的所有技术和科学术语应当视为具有与本领域普通技术人员通常理解的含义相同的含义(例如,在细胞培养、分子遗传学、免疫学、免疫组织化学、蛋白质化学和生物化学中)。

[0337] 除非另有说明,本公开中使用的重组蛋白质、细胞培养物和免疫技术是本领域技术人员公知的标准程序。此类技术在众多文献资料中均有描述和阐释,所述文献资料比如为:J.Perbal,APractical Guide to Molecular Cloning,John Wiley and Sons(1984),J.Sambrook et al.Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbour

Laboratory Press(1989),T.A.Brown(编辑),Essential Molecular Biology:A Practical Approach,Volumes 1and 2,IRL Press(1991),D.M.Glover and B.D.Hames(编辑),DNA Cloning:A Practical Approach,Volumes 1-4,IRL Press(1995and 1996),and F.M.Ausubel et al.(编辑),Current Protocols in Molecular Biology,Greene Pub.Associates and Wiley-Interscience(1988,包括迄今为止的所有更新),Ed Harlow and David Lane(编辑)Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbour Laboratory,(1988),以及J.E.Coligan et al.(编辑)Current Protocols in Immunology,John Wiley&Sons(包括迄今为止的所有更新)。

[0338] 本文中关于可变区及其组成部分、免疫球蛋白、抗体及其片段的描述和定义可以通过以下文献中的论述得到进一步阐明,所述文献为:Kabat Sequences ofProteins ofImmunological Interest,National Institutes ofHealth,Bethesda,Md.,1987and 1991,Bork et al.,J Mol.Biol.242,309-320,1994,Chothia and Lesk J.Mol Biol.196:901-917,1987,Chothia et al.Nature 342,877-883,1989和/或Al-Lazikani et al.,J Mol Biol 273,927-948,1997。

[0339] 术语“和/或”例如“X和/或Y”,应当理解为意指“X和Y”或者“X或Y”,并且术语“和/或”应当理解为提供对两个含义或对任一含义的明确支持。

[0340] 如本文所用,术语“衍生自”应当被视为表示某一特定的事物可以从某一特定来源获得,尽管不一定是直接从该来源获得。

[0341] 本文中提及的例如残基的范围应当理解为包含端点。例如,提及“包含第56位至第65位氨基酸的区域”应当按包含端点的方式理解,即该区域包括在特定序列中编号为56、57、58、59、60、61、62、63、64和65的氨基酸序列。

[0342] 选定的定义

[0343] 如本文所用,FLAG标签或FLAG八肽或FLAG表位,是可以使用重组DNA技术添加到蛋白质中的多肽蛋白质标签,其具有序列基序DYKDDDDK(SEQ ID NO:29)。FLAG标签可以融合到蛋白质的C端或N端,或者可以插入蛋白质内。因此,本发明的抗原结合蛋白质能够特异性结合FLAG标签,无论该标签是存在于蛋白质的C端或N端还是插入蛋白质内。在具体实例中,FLAG标签可以包含在嵌合抗原受体(CAR)构建体中,因此本发明的抗原结合蛋白质能够通过FLAG标签与CAR结合。

[0344] 如本文所用,“嵌合抗原受体(CAR)”是指一种融合蛋白,该融合蛋白包含能够结合至抗原的胞外结构域、跨膜结构域(该跨膜结构域衍生自与胞外结构域所衍生自的多肽不同的多肽)、以及至少一个胞内结构域。“嵌合抗原受体(CAR)”有时也被称为“嵌合受体”“T体”或“嵌合免疫受体(CIR)”。“能够结合至抗原的胞外结构域”是指任何能够与特定抗原结合的寡肽或多肽。“胞内结构域”是指已知作为一个结构域发挥功能、可传递信号以引起细胞内生物过程激活或抑制的任何寡肽或多肽。

[0345] 术语“分离的蛋白质”或“分离的多肽”是指这样一种蛋白质或多肽,即:其因其来源或衍生来源而不与在天然状态下与之相伴的天然相关成分相关联,并且基本上不含来自同一来源的其他蛋白质。利用本领域已知的蛋白质纯化技术进行分离可以使蛋白质基本不含天然相关成分或者被基本上纯化。“基本上纯化”是指该蛋白质基本上不含污染性物质,例如至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%不含污染性物质。

[0346] 术语“重组”应当理解为是指人工基因重组的产物。因此,在包含抗体抗原结合结构域的重组蛋白质的背景下,该术语不包括在受试者体内天然存在的且作为B细胞成熟期间自然重组产物的抗体。然而,如果这种抗体被分离出来,那么这种抗体应当被视为包含抗体抗原结合结构域的分离蛋白质。同样地,如果编码该蛋白质的核酸被分离出来并且通过重组手段进行表达,那么所得到的蛋白质就是包含抗体抗原结合结构域的重组蛋白质。重组蛋白质还包括在细胞、组织或受试者(例如蛋白质在其中表达的细胞、组织或受试者)内通过人工重组手段表达的蛋白质。

[0347] 术语“蛋白质”应当被认为包括单个多肽链,即,通过肽键连接的一系列连续氨基酸或彼此共价或非共价连接的一系列多肽链(即,多肽复合物)。例如,多肽链系列可以通过使用合适的化学键或二硫键来共价连接。非共价键的实例包括氢键、离子键、范德华力和疏水相互作用。

[0348] 术语“多肽”或“多肽链”将从前述段落理解为意指通过肽键连接的一系列连续氨基酸。

[0349] 如本文所用,术语“抗原结合蛋白质”与“抗原结合结构域”可互换使用,并且应当被认为是指能够特异性结合抗原的抗体的区域,即VH和VL,或者包含VH和VL两者的Fv。抗原结合结构域不一定存在于完整抗体的背景下,例如,抗原结合结构域可以是分离的形式(比如,结构域抗体)并且也可以是其他形式比如如本文所述的scFv。

[0350] 就本公开而言,术语“抗体”包括一种蛋白质,该蛋白质能够借助Fv片段内包含的抗原结合结构域来特异性结合一种或几种密切相关的抗原。该术语包括四链抗体(例如,两条轻链和两条重链)、重组或修饰抗体(例如,嵌合抗体、人源化抗体、人类抗体、互补决定区移植抗体、灵长类化抗体、去免疫原性抗体、合成人源化抗体、半抗体、双特异性抗体)。抗体通常包含恒定结构域,这些恒定结构域可以排列成恒定区、恒定片段或者可结晶片段(Fc)。抗体的示例性形式是以四链结构作为其基本单元。全长抗体包含两条共价连接的重链(~50kD至约70kD)和两条轻链(每条~23kDa)。轻链通常包含可变区(如果存在的话)和恒定结构域,在哺乳动物中,轻链要么是κ轻链要么是λ轻链。重链通常包含可变区以及一个或两个通过铰链区与其他恒定结构域相连的恒定结构域。哺乳动物的重链属于以下类型之一:α、δ、ε、γ或μ。每条轻链也与重链中的一个重链共价连接。例如,两条重链之间以及重链与轻链之间通过链间二硫键和非共价相互作用结合在一起。不同类型抗体的链间二硫键数量可以有所不同。每条链都有N端可变区(VH或VL,其长度均为~110个氨基酸)和位于C端的一个或更多个恒定结构域。轻链的恒定结构域(CL,其长度为~110个氨基酸)与重链的第一恒定结构域(CH1,其长度为330至440个氨基酸)对齐并通过二硫键相连。轻链可变区与重链可变区对齐。抗体重链可以包含两个或更多个附加的CH结构域(比如,CH2、CH3等),并且可以包含在CH1恒定结构域与CH2恒定结构域之间的铰链区。抗体可以是任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。在一个实例中,抗体是鼠类(小鼠或大鼠)抗体或灵长类(比如,人类)抗体。在一个实例中,抗体重链缺少C端赖氨酸残基。在一个实例中,抗体是人源化的、合成人源化的、嵌合的、CDR-移植的或者去免疫原性的。

[0351] 术语“全长抗体”、“完整抗体”或“全抗体”可互换地用于指的是其基本上完整形式的抗体,而不是抗体的抗原结合片段。具体地,全抗体包括那些包含具有Fc区的重链和轻链

的抗体。恒定结构域可以是野生型序列恒定结构域(例如,人类野生型序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。

[0352] 如本文所用,“可变区”是指如本文定义的抗体的轻链和/或重链中能够特异性结合抗原的部分,并且“可变区”包括互补决定区(CDR)的氨基酸序列,即,CDR1、CDR2和CDR3以及框架区(FR)。例如,可变区包括三个或四个FR(例如,FR1、FR2、FR3和可选地FR4)以及三个CDR。VH是指重链的可变区。VL是指轻链的可变区。

[0353] 根据本发明的FLAG标签是基于氨基酸的标志物,如例如在EP 0150126、美国专利No.4,703,004、美国专利No.4,782,137和美国专利No.4,8151,341中所描述的那样,并且根据本发明的FLAG标签特别地包含或由序列DYK组成,优选地包含或由序列DYKD(SEQ ID NO:11)组成。除了这些序列之外,还可以存在其他氨基酸、优选地亲水性氨基酸,例如R(Arg)、D(Asp)、E(Glu)和K(Lys)和/或具有芳香族侧链的氨基酸例如Y(Tyr)、F(Phe)、H(His)和W(Trp)。这种FLAG标签的实例在前述专利说明书中公开并且可以在本发明的范围内使用。

[0354] 如本文所用,术语“受试者”应视为意指任何动物,该动物包括人例如哺乳动物。示例性受试者包括但不限于人类和非人类灵长类动物。例如,受试者是人类。

[0355] “抗体”或“免疫球蛋白”或“Ig”是在脊椎动物的血液或其他体液中发现的γ-球蛋白,其在免疫系统中起结合抗原的作用,因此鉴定并中和外来物。

[0356] 抗体通常是由两个相同的轻链(L链)和两个相同的重链(H链)组成的异四聚体糖蛋白。每个L链通过一个共价二硫键连接至H链。取决于H链同种型,两个H链通过一个或更多个二硫键彼此连接。每个H链和L链还具有规则间隔的链内二硫桥。

[0357] H链和L链定义特定的Ig结构域。更具体地,每个H链在N-端处具有可变结构域(VH)、随后是用于α链和γ链中的每一者的三个恒定结构域(CH)、以及用于μ和ε同种型的四个CH结构域。每个L链在N-端处具有可变结构域(VL)并且随后在其另一端具有恒定结构域(CL)。VL与VH对齐,并且CL与重链的第一恒定结构域(CH1)对齐。

[0358] 抗体可以被分配不同的类别或同种型。有五类免疫球蛋白,即:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其具有的重链分别命名为α、δ、ε、γ和μ。γ类和α类基于CH序列和功能的相对较小差异而进一步分成子类,例如人类表达以下子类,即:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。基于它们的恒定结构域的氨基酸序列,来自任何脊椎动物物种的L链可以被归类为两种明显不同的类型(称为κ和λ)之一。

[0359] 恒定结构域包括Fc部分,该Fc部分包含通过二硫化物保持在一起的两个H链的羧基末端部分。抗体如ADCC的效应子功能由Fc区中的序列决定,该区域也是在某些类型细胞上发现的Fc受体(FcR)识别的部分。

[0360] VH和VL的配对一起形成包括抗体的重链或轻链的氨基末端结构域的“可变区”或“可变结构域”。重链的可变结构域可以称为“VH”。轻链的可变结构域可以称为“VL”。V结构域含有抗原结合蛋白质,该抗原结合蛋白质影响抗原结合并且定义特定抗体对其特定抗原的特异性。V区跨越约110个氨基酸残基并且由相对不变的片段组成,这些片段被称为15-30个氨基酸的框架区(FR)(通常约有4个),这些框架区被称为“高变区”(通常约有3个)的较短的极端变异区分隔开,每个高变区长度为9-12个氨基酸。FR主要采用β-片构象,而高变区则形成连接β-片构象的环并且在某些情况下还形成β-片结构的一部分。

[0361] “高变区”、“HVR”或“HV”是指抗体可变结构域的在序列上是高变和/或形成结构上

定义的环的区。通常,抗体包含六个高变区,VH中有三个高变区(H1、H2、H3),并且VL中有三个高变区(L1、L2、L3)。多种高变区划分方法正在使用中并且均被涵盖于本文内。

[0362] 如本文所用,术语“互补决定区”(同义词:CDR,即,CDR1、CDR2和CDR3)是指抗体可变区中的氨基酸残基,这些抗体可变区的存在对特异性抗原结合起着主要作用。每个可变区结构域(VH或VL)通常具有被确定为CDR1、CDR2和CDR3的三个CDR。VH的CDR在本文中也分别称作CDR H1、CDRH2和CDR H3,其中,CDR H1对应于VH的CDR1,CDR H2对应于VH的CDR2,CDR H3对应于VH的CDR3。同样地,VL的CDR在本文中也分别称作CDR L1、CDR L2和CDR L3,其中,CDR L1对应于VL的CDR 1,CDR L2对应于VL的CDR 2,并且CDR L3对应于VL的CDR3。在一个实例中,分配给CDR和FR的氨基酸位置是依据有关Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest,National Institutes ofHealth,Bethesda,Md.,1987and 1991的文献(在本文中也称作“Kabat编号系统”)来定义的。在另一实例中,分配给CDR和FR的氨基酸位置是依据增强型Chothia编号方案(网址:http://www.bioinfo.org.uk/mdex.html)来定义的。本发明不限于由Kabat编号系统所定义的FR和CDR,而是涵盖所有编号系统,包括规范编号系统或者在Chothia and Lesk J.Mol.Biol.196:901-917,1987;Chothia et al.,Nature 342:877-883,1989中论述的编号系统;Chothia et al.,Nature 342:877-883,1989中论述的编号系统;和/或Al-Lazikani et al.,J.Mol.Biol.273:927-948,1997中论述的编号系统;Honnegher and Plükthun J.Mol.Biol.309:657-670,2001中论述的编号系统;或者Giudicelli et al.,NucleicAcids Res.25:206-2111997中论述的IMGT系统。在一个实例中,CDR是依据Kabat编号系统来定义的。可选地,依据Kabat编号系统的重链CDR2不包含本文所列的5个C端氨基酸,或者这些氨基酸中的任意一个或更多个被另一种天然存在的氨基酸所取代。在这方面,Padlan et al.,FASEB J.,9:133-139,1995证实了重链CDR2的5个C端氨基酸通常不参与抗原结合。

[0363] “框架”或“FR”残基是指除本文所定义的高变区或CDR残基之外的可变结构域残基。VH的FR在本文中也分别称作FR H1、FR H2、FR H3和FR H4,其中,FR H1对应VH的FR 1,FR H2对应VH的FR 2,FR H3对应VH的FR 3,并且FR H4对应VH的FR 4。同样地,VL的FR在本文中分别称作FR L1、FR L2、FR L3和FR L4,其中,FR L1对应VL的FR 1,FR L2对应VL的FR 2,FR L3对应VL的FR 3,FR L4对应VL的FR 4。

[0364] “用于形成抗原结合蛋白质的肽”通常是指一种可以形成某种构造的肽,该构造赋予抗体对抗原的特异性。实例包括完整抗体或完整抗体相关结构、包含可变结构域的完整抗体片段、可变结构域及其片段、包括轻链和重链、或者包含部分但并非全部高变区或恒定区的轻链和重链的片段。

[0365] “完整”或“全”抗体是指包含抗原结合蛋白质以及CL和至少重链恒定结构域,即:CH1、CH2和CH3的抗体。恒定结构域可以是天然序列恒定结构域(例如,人类天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。

[0366] “全抗体相关结构”包括全抗体的多重形式。

[0367] “包含可变结构域的全抗体片段”包括Fab、Fab’、F(ab’)2和Fv片段;双抗体;线性抗体、单链抗体分子;以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0368] Fab片段由整个L链以及H链的可变区结构域(VH)和一个重链的第一恒定结构域(CHI)组成。每个Fab片段在抗原结合方面是单价的,即,每个Fab片段具有单个抗原结合蛋

白质。

[0369] Fab'片段与Fab片段的不同之处在于,其在CH1结构域的羧基端多了几个残基,其包括来自抗体铰链区的一个或更多个半胱氨酸。本文中,将恒定结构域的半胱氨酸残基带有游离巯基的Fab'指定为Fab'-SH。

[0370] F(ab')2片段大致对应于具有二价抗原结合活性并且仍然能够交联抗原的两个二硫化物连接的Fab片段。

[0371] "Fv"是含有完整抗原识别位点和抗原结合位点的抗体片段。该片段由紧密非共价缔合的一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域的二聚体组成。

[0372] 在单链Fv(scFv)种类中,一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域可以通过柔性肽接头共价连接,使得轻链和重链可以在类似于双链Fv物种的"二聚体"结构中缔合。从这两个结构域的折叠,发出六个高变环(分别来自H链的3个环和L链的3个环),其贡献用于抗原结合的氨基酸残基并赋予抗体抗原结合特异性。

[0373] "单链Fv"也缩写为"sFv"或"scFv",是包含连接形成单个多肽链的VH抗体结构域和VL抗体结构域的抗体片段。优选地,scFv多肽还包含VH结构域与VL结构域之间的多肽接头,该多肽接头使得scFv形成抗原结合的期望结构。

[0374] "单个可变结构域"是具有识别和结合抗原的能力的Fv(仅包含对抗原具有特异性的三个CDR)的一半,尽管亲和力低于整个结合位点。

[0375] "双抗体"是指具有两个抗原结合位点的抗体片段,该片段包含连接至同一多肽链(VH-VL)中的轻链可变结构域(VL)的重链可变结构域(VH)。通过用VH结构域与VL结构域之间的短接头(约5-10个残基)构建sFv片段(参见前一段)来制备小抗体片段,使得实现V结构域的链间配对而不是链内配对,从而产生二价片段,即,具有两个抗原结合位点的片段。

[0376] 双抗体可以是二价的或双特异性的。双特异性双抗体是两个"交叉"sFv片段的异二聚体,其中,两个抗体的VH结构域和VL结构域存在于不同多肽链上。三抗体和四体也是本领域公知的。

[0377] "分离的抗体"是从其预先存在的环境的组分中鉴定、分离和/或回收的抗体。污染物组分是会干扰抗体的治疗用途的材料,并且污染物组分可以包括酶、激素和其他蛋白质或非蛋白质溶质。

[0378] "人类抗体"是指具有与人类产生的抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列和/或已经使用本文公开的用于制备人类抗体的任何技术制备的抗体。人类抗体的这种定义特异性地排除了包含非人类抗原结合残基的人源化抗体。人类抗体可以使用本领域已知的各种技术产生,包括噬菌体展示文库。人类抗体可以通过向转基因动物施用抗原来制备,该转基因动物已被修饰以响应于抗原攻击而产生此类抗体,但其内源性基因座已被禁用。

[0379] "人源化"形式的非人(例如,啮齿动物)抗体是含有源自非人类抗体的最小序列的嵌合抗体。大多数情况下,人源化抗体是人类免疫球蛋白(受体抗体),其中,来自受体的高变区的残基被来自具有所需抗体特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)比如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的高变区的残基取代。在一些情况下,人类免疫球蛋白的框架区(FR)残基被相应的非人残基取代。此外,人源化抗体可以包含在受体抗体或供体抗体中未发现的残基。进行这些修饰以进一步改善抗体性能。通常,人源化抗体将包含基本上所有的至少一个,并且通常两个可变结构域,其中所有或基本上所有的高变环对应于非人类免疫球蛋

白的那些,并且所有或基本上所有的FR是人类免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体任选地还包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人类免疫球蛋白的恒定区。

[0380] “单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体的群体获得的抗体,即,包含该群体的个体抗体是相同的,除了可能以少量存在的天然存在的突变之外。单克隆抗体是高度特异性的并且针对抗原上的单个抗原位点或决定簇。除了它们的特异性之外,单克隆抗体是有利的,原因在于单克隆抗体可以未被其他抗体污染地合成。单克隆抗体可以通过杂交瘤方法制备,或者可以在细菌、真核动物或植物细胞中使用重组DNA方法制备。“单克隆抗体”也可以从噬菌体抗体文库中分离。

[0381] 本文的单克隆抗体包括“嵌合”抗体,在该“嵌合”抗体中,重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类或子类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的其余部分与源自另一物种或属于另一抗体类别或子类的抗体中的相应序列相同或同源,此类抗体的片段也是如此,只要它们表现出所需的生物学活性即可。本文中所关注的嵌合抗体包括“灵长类化”抗体,其包含源自非人灵长类动物(例如旧大陆猴、猿等)的可变域抗原结合序列以及人恒定区序列。

[0382] 术语“抗FLAG抗体”或“结合FLAG的抗体”是指能够以足够的亲和力结合FLAG标签(例如,如本文在SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:29中定义的)的抗体,使得该抗体在靶向表达或呈递FLAG标签的蛋白质或细胞时可用作诊断和/或治疗剂。优选地,通过例如放射免疫测定(RIA)等方法测定时,抗FLAG抗体与不相关标签或蛋白质的结合程度小于该抗体与FLAG结合程度的约10%。在某些实施方案中,与FLAG结合的抗体具有解离常数($K_D$)<1μM、<100nM、<10nM、<1nM或者<0.1nM。

[0383] “结合亲和力”通常是指分子(例如抗体)的单个结合位点与其结合伴侣(例如抗原)之间非共价相互作用总和的强度。一般而言,“结合亲和力”是指内在结合亲和力,它反映了结合对成员(例如抗体和抗原)之间一对一的相互作用。分子X与其伴侣Y的亲和力通常可以用解离常数($K_D$)来表示。亲和力可以通过本领域已知的常用方法进行测定,所述已知的常用方法包括本文所述的那些方法。低亲和力抗体通常与抗原结合缓慢,且往往容易解离,而高亲和力抗体一般与抗原结合更快,且往往能保持结合更长时间。本领域已知多种测定结合亲和力的方法,这些方法中的任何方法均可以用于本发明的目的。

[0384] 如本文所用,关于抗原结合蛋白质或其抗原结合结构域与抗原的相互作用的术语“结合”是指相互作用取决于抗原上特定结构(例如,抗原决定簇或表位)的存在。例如,抗体通常识别并结合至特定蛋白质结构而不是所有蛋白质。如果抗体与表位“A”结合,则在含有标记的“A”和蛋白质的反应中,含有表位“A”(或游离的、未标记的“A”)的分子的存在将减少与抗体结合的标记的“A”的量。

[0385] 如本文所用,术语“特异性结合”或“特异性地结合”应被认为是指本发明的抗原结合蛋白质与其替代抗原或细胞相比更频繁地、更快地、更长的持续时间和/或更大的亲和力与表达相同的特定抗原或细胞反应或缔合。

[0386] 如本文所用,术语“未检测到结合”应理解为是指抗原结合蛋白质(例如抗体)与候选抗原的结合水平相较于背景水平高出不到10%、或8%、或6%或5%。背景水平可以是在不存在该蛋白和/或存在阴性对照蛋白(例如同型对照抗体)时检测到的结合信号水平,并且/或者是在存在阴性对照抗原时检测到的结合水平。结合水平是通过生物传感器分析(例

如,Biacore)来检测的,在该分析中,会将抗原结合蛋白质固定并使其与抗原相接触。

[0387] 如本文所用,术语“不显著结合”应当理解为是指本发明的抗原结合蛋白质与多肽的结合水平在统计学上不显著高于背景,例如,在不存在抗原结合蛋白质和/或存在阴性对照蛋白质(例如同种型对照抗体)的情况下检测到的结合信号水平和/或在存在阴性对照多肽的情况下检测到的结合水平。结合水平通过使用生物传感器分析(比如,Biacore)进行检测,在该分析中,抗原结合蛋白质被固定并与抗原进行接触。

[0388] “亲和力成熟的”抗体是指其一个或更多个高变区(HVR)存在一处或多处改变的抗体。与不具有这些改变的亲本抗体相比,这些改变使得该抗体对抗原的亲和力有所提高。理想的亲和力成熟的抗体对靶抗原具有纳摩尔甚至皮摩尔级别的亲和力。亲和力成熟的抗体可通过本领域已知的方法制备。

[0389] “ADCC”是指称为抗体依赖性细胞毒性的过程,其是主要由人的自然杀伤(NK)细胞介导的免疫应答。在ADCC中,NK细胞表面上的Fc γ RIII识别与展示在靶细胞表面上的抗原结合的抗体的Fc区。这激活了NK细胞,该NK细胞释放穿孔素和颗粒酶,从而导致靶细胞的裂解和凋亡。

[0390] “CDC”指的是被称为补体依赖的细胞毒性的复杂过程,该过程能够通过蛋白级联反应导致细胞死亡,蛋白级联反应能够通过两条主要途径中的任意一条发挥作用。

[0391] “ADCP”指的是名为抗体依赖的细胞介导的吞噬作用的过程。在这个由Fc受体介导的过程中,结合了抗体的靶细胞会被吞噬细胞比如巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞和树突状细胞吞噬。该过程涉及多种Fc受体。

[0392] “阻断”抗体或“拮抗剂”抗体是抑制或降低其结合的抗原的生物活性的抗体。优选的阻断抗体或拮抗剂抗体基本上或完全抑制抗原的生物活性。

[0393] 如本文所用,“激动剂抗体”是模拟目标多肽的至少一种功能活性的抗体。

[0394] 如本文所指,“Fc区”是由通过一个或更多个二硫键连接的两条多肽链组成的二聚体,每条链包含部分或全部的铰链区以及CH2和CH3结构域。多肽链中的每条多肽链被称为“Fc多肽链”。为了区分这两条Fe多肽链,一条Fc多肽链称为“A链”,并且另一条Fc多肽链称为“B链”。更具体地说,本发明所考虑使用的Fc区是IgG Fc区,其可以是哺乳动物或人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的Fc区。在人IgG1 Fc区中,已知至少有两种等位基因类型。

[0395] 本文所用的“含Fc蛋白质”是指包含本文所述Fc区和结合靶分子的结合区的蛋白质。术语“含Fc蛋白质”包括包含Fc区的抗体或Fc融合蛋白。

[0396] “治疗有效量”这一表述通常是指本发明的抗原结合蛋白质的用量,该用量能够:(i)治疗特定的疾病、病症或障碍;(ii)减轻、改善或消除特定疾病、病症或障碍的一种或多种症状;或者(iii)延迟本文所述的特定疾病、病症或障碍的一种或多种症状的发作。

[0397] 词语“治疗(treat)”或“治疗(treatment)”是指治疗性治疗,其中,目标是减慢(减轻)不期望的生理变化或病症。出于本发明的目的,针对无论是可检测的还是不可检测的病症,有益或期望的临床结果,包括但不限于减轻症状、减轻疾病程度、稳定(即,不恶化)疾病状态、延迟或减缓疾病进展、改善或缓解疾病状态、以及进行缓解(无论是部分还是全部)。如果不接受治疗,则治疗还可以意味着与预期存活相比延长存活。治疗可能不一定导致疾病或障碍的完全清除,而是可以减少或最小化感染的并发症和副作用以及疾病或障碍的进展。治疗的成功或以其他方式可以通过个体的体检、细胞病理学、血清学DNA或mRNA检测技

术等来监测。

[0398] 词语“预防(prevent)”和“预防(prevention)”通常是指用于保护或阻止没有给定疾病或病症的个体进展到该疾病或病症的预防性或预防性措施。

[0399] 短语“药学上可接受的”表示物质或组合物必须与包含制剂的其他成分和/或用其治疗的哺乳动物化学和/或毒理相容。

[0400] 蛋白质的突变

[0401] 本发明还提供了一种与本文所公开的序列具有至少80％同一性的抗原结合蛋白质或对该抗原结合蛋白质进行编码的核酸。在一个实例中,本发明的抗原结合蛋白质或核酸包含与本文所公开的序列至少约85％或90％或95％或97％或98％或99％相同的序列。

[0402] 替代性地或附加地,该抗原结合蛋白质包含CDR(例如,三个CDR),该CDR与本文中根据任一实例所描述的VH或VL的CDR具有至少约80％、或85％、或90％、或95％、或97％、或98％或99％的同一性。

[0403] 在另一实例中,本发明的核酸包含的序列与对具有本文中根据任一实例所述的功能的抗原结合蛋白质进行编码的序列具有至少约80％、或85％、或90％、或95％、或97％、或98％或99％的同一性。本发明还涵盖一种对本发明的抗原结合蛋白质进行编码的核酸,该核酸由于遗传密码的简并性而与本文所列举的序列有所不同。

[0404] 核酸或多肽的％同一性通过GAP(Needleman andWunsch.Mol.Biol.48,443-453,1970)分析(GCG程序)来确定,其中,空位生成罚分＝5,并且空位延伸罚分＝0.3。待查询序列的长度至少为50个残基,并且GAP分析会在至少50个残基的区域内对两条序列进行比对。例如,待查询序列的长度至少为100个残基,并且GAP分析会在至少100个残基的区域内对两条序列进行比对。又例如,两条序列会在其全长范围内进行比对。

[0405] 本发明还涉及一种在严格杂交条件下与对本文所述的抗原结合蛋白质进行编码的核酸发生杂交的核酸。本文将“中等严格度”定义为在2×SSC缓冲液、0.1％(w/v)SDS中于45℃至65℃的温度范围内或等效条件内进行杂交和/或洗涤。本文将“高严格度”定义为在0.1×SSC缓冲液、0.1％(w/v)SDS或更低盐浓度的溶液中且在至少65℃的温度下或等效条件内进行杂交和/或洗涤。本文提及的特定严格度水平涵盖本领域技术人员已知的使用除SSC之外的洗涤/杂交溶液的等效条件。例如,计算双链核酸链解链温度(也称为熔解温度,即,$T_m$)的方法为本领域所熟知。与核酸的$T_m$相近(例如,相差在5℃以内或10℃以内)或与之相等的温度被视为高严格度。中等严格度被认为是在计算出的核酸$T_m$值上下10℃至20℃或10℃至15℃的范围内。

[0406] 本发明还涉及本发明的抗原结合蛋白质的突变形式,该抗原结合蛋白质的突变形式包含与本文所述序列相比的一个或更多个保守氨基酸替换。在一些实例中,抗原结合蛋白质包含10个或更少的保守氨基酸替换,例如9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个。“保守氨基酸替换”指的是用具有相似侧链和/或疏水性和/或亲水性的氨基酸残基替换原有的氨基酸残基。

[0407] 具有相似侧链的氨基酸残基的家族已在本领域中定义,其包括碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、β-支链侧链(例如,苏氨酸、

缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。疏水性指数如在Kyte and Doolittle J.Mol.Biol.,157:105-132,1982的文献中有描述;亲水性指数则例如在US4554101中有描述。

[0408] 本发明还涵盖非保守性氨基酸变化。例如,特别感兴趣的是带电荷氨基酸被另一带电荷氨基酸和中性或带正电荷氨基酸取代。在一些实例中,抗原结合蛋白质包含10个或更少例如9个或8个或7个或6个或5个或4个或3个或2个或1个非保守氨基酸取代。

[0409] 在一个实例中,突变发生在本发明的抗原结合蛋白质的抗原结合结构域的FR内。在另一实例中,突变发生在本发明的抗原结合蛋白质的CDR内。

[0410] 用于产生抗原结合蛋白质的突变形式的示例性方法包括:

[0411] -DNA的诱变(Thie et al.,Methods Mol.Biol.525:309-322,2009)或RNA的诱变(Kopsidas et al.,Immunol.Lett.107:163-168,2006;Kopsidas et al.BMC Biotechnology,7:18,2007;以及WO1999/058661);

[0412] -将对多肽进行编码的核酸引入突变细胞,例如XL-1Red、XL-mutS和XL-mutS-Kanr细菌细胞(Stratagene)中;

[0413] -DNA改组,例如如Stemmer,Nature 370:389-91,1994中所公开的那样;以及

[0414] -定点诱变,例如如Dieffenbach(ed)和Dveksler(ed)中所描述的那样(出自:PCR Primer:ALaboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratories,NY,1995)。

[0415] 本领域技术人员和/或从本文中所描述的例如抗原结合中显然知晓用于确定本发明的突变抗原结合蛋白质的生物学活性的示例性方法。举例来说,本文描述了用于测定抗原结合、结合的竞争性抑制、亲和力、结合作用、解离作用以及治疗功效的方法。

[0416] 如本文所用,氨基酸的性质在下表中定义:

[0417]

| 氨基酸 | 3字母代码 | 1字母代码 | 属性 |
|---|---|---|---|
| 丙氨酸 | Ala | A | 脂肪族的<br>疏水的<br>中性的 |
| 精氨酸 | Arg | R | 极性的<br>亲水的<br>带电的(+) |
| 天冬酰胺 | Asn | N | 极性的<br>亲水的 |

[0418]

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | 中性的 |
| 天冬氨酸 | Asp | D | 极性的<br>亲水的<br>带电的(-) |
| 半胱氨酸 | Cys | C | 极性的<br>疏水的<br>中性的 |
| 谷氨酰胺 | Gln | Q | 极性的<br>亲水的<br>中性的 |
| 谷氨酸 | Glu | E | 极性的<br>亲水的<br>带电的(-) |
| 甘氨酸 | Gly | G | 脂肪族的<br>中性的 |
| 组氨酸 | His | H | 芳香的<br>极性的<br>亲水的<br>带电的(+) |
| 异亮氨酸 | Ile | I | 脂肪族的<br>疏水的<br>中性的 |
| 亮氨酸 | Leu | L | 脂肪族的<br>疏水的<br>中性的 |
| 赖氨酸 | Lys | K | 极性的<br>亲水的<br>带电的(+) |
| 甲硫氨酸 | Met | M | 疏水的<br>中性的 |
| 苯丙氨酸 | Phe | F | 芳香的<br>疏水的<br>中性的 |
| 脯氨酸 | Pro | P | 疏水的<br>中性的 |
| 丝氨酸 | Ser | S | 极性的<br>亲水的<br>中性的 |

[0419]

| | | | |
|---|---|---|---|
| 苏氨酸 | Thr | T | 极性的<br>亲水的<br>中性的 |
| 色氨酸 | Trp | W | 芳香的<br>疏水的<br>中性的 |
| 酪氨酸 | Tyr | Y | 芳香的<br>极性的<br>疏水的 |
| 缬氨酸 | Val | V | 脂肪族的<br>疏水的<br>中性的 |

[0420] 恒定区

[0421] 本发明涵盖本文所述的包含抗体的恒定区的抗原结合蛋白质和/或抗体。这包括与Fc融合的抗体的抗原结合片段。

[0422] 用于制备本发明的蛋白质的恒定区的序列可以从多种不同来源获得。在一些实例中,该蛋白质的恒定区或其一部分源自人抗体。该恒定区或其一部分可以源自任何抗体类别以及任何抗体同种型,所述任何抗体类别包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE,所述任何抗体同种型包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在一个实例中,恒定区是人同种型IgG4或稳定化的IgG4恒定区。

[0423] 在一个实例中,例如与天然或野生型人IgG1或IgG3 Fc区相比,恒定区的Fc区具有降低的诱导效应子功能的能力。在一个实例中,效应子功能是抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。用于评估含有蛋白质的Fc区的效应子功能水平的方法是本领域已知的和/或本文所述的那样。

[0424] 在一个实例中,Fc区是IgG4 Fc区(即,来自IgG4恒定区),例如人IgG4 Fc区。合适的IgG4 Fc区的序列对于本领域技术人员将是明显的并且/或者可在公开可得的数据库中获得的(例如,可从国家生物技术信息中心获得)。

[0425] 在一个实例中,恒定区是稳定的IgG4恒定区。术语“稳定的IgG4恒定区”应当理解为是指已经修饰以减少Fab臂交换或减少经历Fab臂交换或形成半抗体或倾向于形成半抗体倾向性的IgG4恒定区。“Fab臂交换”是指人IgG4的蛋白质修饰类型,其中,IgG4重链和附接的轻链(半分子)与另一IgG4分子交换成重轻链对。因此,IgG4分子可以获取识别两种不同抗原的两种不同Fab臂(产生双特异性分子)。Fab臂交换在体内自然发生并且可以在体外由纯化的血细胞或还原剂如还原型谷胱甘肽诱导。当IgG4抗体解离形成各自含有单个重链和单个轻链的两个分子时形成“半抗体”。

[0426] 在一个实例中,稳定的IgG4恒定区包含根据Kabat的系统在铰链区的第241位处的脯氨酸(Kabat et al.,Sequences ofProteins of Immunological Interest Washington DC United States Department ofHealth andHuman Services,1987and/or 1991)。该位置对应于根据EU编号系统的铰链区域的第228位(Kabat et al.,Sequences ofProteins ofImmunological InterestWashington DC United States Department ofHealth and

Human Services,2001and Edelman et al.,Proc.Natl.Acad.USA,63,78-85,1969)。在人IgG4中,该残基通常是丝氨酸。在丝氨酸取代脯氨酸之后,IgG4铰链区包含序列CPPC。就这一点而言,本领域技术人员将意识到“铰链区”是抗体重链恒定区的富含脯氨酸的部分,其连接在抗体的两个Fab臂上赋予移动性的Fc区和Fab区。铰链区包括参与重链间二硫键的半胱氨酸残基。其通常定义为根据Kabat的编号系统从人IgG1的Glu226延伸至Pro243。其他IgG同种型的铰链区可以通过将形成重链间二硫(S-S)键的第一个和最后一个半胱氨酸残基放置在相同位置而与IgG1序列比对(例如,参见WO2010/080538)。

[0427] 稳定的IgG4抗体的另外的实例是其中人IgG4的重链恒定区中第409位的精氨酸(根据EU编号系统)被赖氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸或亮氨酸取代的抗体(例如,如WO2006/033386中所述)。恒定区的Fc区可以附加地或替代地在对应于第405的位置处包含选自丙氨酸、缬氨酸、甘氨酸、异亮氨酸和亮氨酸的残基(根据EU编号系统)。可选地,铰链区域包括第241位置处的脯氨酸(即,CPPC序列)(如上所述)。

[0428] 在另一实例中,Fc区是经修饰以具有降低的效应子功能的区,即,“非免疫刺激Fc区”。例如,Fc区是IgG1 Fc区,其包含选自由268、309、330和331组成的组中的一个或更多个位置上的替换。在另一实例中,Fc区是IgG1 Fc区,其包含以下变化E233P、L234V、L235A中的一者或更多者和G236的缺失和/或以下变化A327G、A330S和P331S中的一者或更多者(Armour et al.,Eur J Immunol.29:2613-2624,1999;Shields et al.,J Biol Chem.276(9):6591-604,2001)。非免疫刺激性Fc区的附加实例有相关描述,例如在Dall'Acqua et al.,J Immunol.177:1129-11382006的文献中;以及/或者Hezareh J Virol;75:12161-12168,2001的文献中有相关描述。

[0429] 在另一实例中,Fc区是嵌合Fc区,例如包含来自IgG4抗体的至少一个CH2结构域和来自IgG1抗体的至少一个CH3结构域,其中,Fc区包含在选自由240、262、264、266、297、299、307、309、323、399、409和427(EU编号)组成的组的一个或更多个氨基酸位置处的取代(例如,如WO20/085682中所描述的那样)。示例性取代包括240F、262L、264T、266F、297Q、299A、299K、307P、309K、309M、309P、323F、399S和427F。

[0430] 含有蛋白质的抗体结合结构域

[0431] 在另一实施方案中,提供了一种如上所述的抗原结合蛋白质,其中,形成FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4中的一者或更多者的氨基酸序列衍生自人类序列或者呈人类序列的形式。

[0432] 抗原结合蛋白质可以以包括非人(例如,鼠类)和人类免疫球蛋白序列的人源化形式呈现。通常,除抗原结合蛋白质的CDR序列之外的所有序列都来自非人类物种例如小鼠、大鼠或兔。在一些情况下,抗原结合蛋白质的框架残基也可以是非人的。当抗原结合蛋白质以完整抗体的形式提供时,通常免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分是人,从而允许各种人效应子功能。

[0433] 对非人抗原结合蛋白质进行人源化的方法在本领域是众所周知的,合适的方法的实例包括下述文献中所描述的那些方法,所述文献为:Jones et al.,(1986)Nature,321:522;Riechmann et al.,(1988)Nature,332:323;Verhoeyen et al.,(1988)Science,239:1534。

[0434] 本文所述的使用源自人类免疫球蛋白序列的抗体文库的噬菌体展示方法可用于

产生人抗原结合蛋白质和人类抗体。

[0435] 此外,可以使用不能表达功能性内源性免疫球蛋白但可以表达人类免疫球蛋白基因的转基因哺乳动物。这些小鼠可以通过将人重链和轻链免疫球蛋白基因随机或靶向插入胚胎干细胞中来产生。宿主重链和轻链免疫球蛋白基因可以通过插入或通过一些其他重组事件(例如通过宿主JH区的纯合缺失)而变得无功能。将转染的胚胎干细胞扩增并显微注射到胚泡中以产生嵌合小鼠,并且然后将其杂交以产生表达人抗原结合蛋白质的纯合后代。用FLAG标签免疫后,可以获得人单克隆抗体。转基因动物系统的一个益处是可以产生治疗上有用的同种型,原因在于人类免疫球蛋白转基因在B细胞分化期间重排并且随后在转基因小鼠中经历类别切换和体细胞突变。

[0436] 本发明的包括CDR和FR的可变结构域可以通过取代表面暴露的残基而被制备得较少免疫原性,以使抗体在免疫系统看来如同自身成分。Padlan,E.A.,1991,MoI.Immunol.28,489提供了一种示例性方法。通常,保留亲和力是因为抗原结合蛋白质附近的氨基酸残基的内部填充保持不变,并且通常影响结合特性的CDR残基或相邻残基在这些过程中不被取代。

[0437] 在另一实施方案中,提供了一种本文所述的抗FLAG标签结合蛋白质、免疫球蛋白可变结构域、抗体、dab、scFv、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv片段、双抗体、三抗体、线性抗体、单链抗体分子或多特异性抗体,优选地具有如表1所示的序列。

[0438] 与全抗体相比,较低分子量的抗体片段可以具有改善的实体瘤的通路和更快的清除,这在治疗和体内诊断应用中特别有用。

[0439] 在某些实施方案中,抗原结合蛋白质以单链Fv片段(scFv)的形式提供。Fv和scFv适于在体内使用期间减少非特异性结合,因为它们具有没有恒定区域的完整组合位点。可以构建包括scFv的融合蛋白以在scFv的氨基或羧基末端产生效应蛋白质的融合。

[0440] 在另一实施方案中,提供了包含上述抗原结合蛋白质的双抗体或三抗体或其他多特异性抗体。可以使用允许多聚化的多肽结构域组装多特异性抗体。实例包括Fc的CH2和CH3区以及CH1和Cκ/λ区。可以使用其他天然存在的蛋白质多聚化结构域,包括亮氨酸拉链结构域(bZIP)、螺旋-环-螺旋基序、Src同源性结构域(SH2、SH3)、EF手性结构、磷酸酪氨酸结合(PTB)结构域或者其他本领域已知的结构域。

[0441] 在另一实施方案中,提供了融合结构域或异源蛋白质,该融合结构域或异源蛋白质包含如本文所述的抗原结合蛋白质、免疫球蛋白可变结构域、抗体、dab、scFv、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv片段、双抗体、三抗体、线性抗体、单链抗体分子或多特异性抗体。

[0442] 异源多肽可以通过重组方式融合或通过化学方法偶联至本发明的抗原结合蛋白质或包含该抗原结合蛋白质的分子的N端或C端。

[0443] 抗体或抗原结合蛋白质与其融合的异源多肽可以用于结合存在于重组试剂上的FLAG标签,其包括(但不限于):包含FLAG标签的重组蛋白质、治疗性抗体、或其他包含含有FLAG标签的蛋白质的抗原结合结构域;已经被遗传修饰以表达FLAG标签或表达包含FLAG标签的受体或其他蛋白质的细胞免疫治疗剂。在某些实例中,本发明的抗原结合蛋白质可以用于结合细胞毒性免疫细胞(例如CAR T细胞)上存在的嵌合抗原受体(CAR)。

[0444] 此外,本发明的抗原结合蛋白质、免疫球蛋白可变结构域、抗体、dab、scFv、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv片段、双抗体、三抗体、线性抗体、单链抗体分子或多特异性抗体可通过糖

基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/阻断基团衍生、蛋白质水解切割、与细胞配体或其他蛋白质的连接等进行修饰。

[0445] 间接CAR和相关嵌合受体

[0446] 在更进一步的实施方案中,本发明的抗体或抗原结合蛋白质与之融合的异源多肽可以作为嵌合抗原蛋白(CAR)或变体T细胞受体的组分被包括在内。在此类实施方案中,应当理解的是,所产生的包含本发明的抗原结合蛋白质的CAR或变体T细胞受体可以称为“间接CAR”(有时也称为通用CAR)。在间接CAR系统中,CAR的抗原结合结构域不直接结合靶细胞上的靶抗原,而是结合中间体,其中,中间体包含用于直接结合靶细胞的抗原结合结构域。通过中间体识别细胞的CAR的实例是本领域已知的,例如在欧洲专利申请EP 2651442中所描述的那样。

[0447] 本领域技术人员将熟悉其中可以包括本发明的抗原结合蛋白质的CAR和其他经修饰的受体的一般结构。通常,“嵌合抗原受体”是指至少包含细胞外抗原结合部分、跨膜结构域和细胞质信号传导结构域(本文也称为“细胞内信号传导结构域”)的重组多肽构建体。

[0448] 嵌合抗原受体是人工构建的蛋白质,其在细胞表面表达时可以诱导抗原特异性细胞应答。CAR包括至少两个结构域,第一结构域是与抗原结合的抗原结合结构域或者更具体地抗原的一个或更多个表位部分,并且第二结构域是能够诱导或参与细胞内信号传导途径的诱导的信号传导结构域。

[0449] 这两个结构域的组合决定了CAR的抗原特异性以及CAR诱导期望细胞反应的能力,而后者也取决于CAR所在的宿主细胞。例如,在辅助性T细胞中表达且具有信号传导结构域包含CD3激活结构域的CAR,一旦遇到其同源抗原而被激活,就可能诱导CD4+辅助性T细胞分泌一系列细胞因子。在进一步的实例中,同样的CAR在CD8+细胞毒性T细胞中表达时,一旦被表达同源抗原的细胞激活,就可以诱导细胞毒素的释放,最终导致表达抗原的细胞发生凋亡。

[0450] 除了抗原识别结构域和信号传导结构域之外,CAR还可以包含其他组分或部分。例如,CAR可以包含跨膜结构域,该跨膜结构域可以构成CAR信号传导结构域的一部分,或者与CAR信号传导结构域相关联。跨膜结构域通常是一个或多个疏水螺旋,它跨越细胞膜的脂质双层,将CAR嵌入细胞膜中。当CAR与细胞结合时,其跨膜结构域是决定CAR表达模式的一个因素。例如,使用与CD3共受体相关的跨膜结构域能够使CAR在初始T细胞中表达,而使用源自CD4共受体的跨膜结构域可以指导CAR在辅助性T细胞中表达,但不会在细胞毒性T细胞中表达。

[0451] CAR的另外的组分或部分可以是接头结构域。接头结构域(也称为间隔或铰链结构域)可以从跨膜结构域的细胞外侧面跨越到抗原结合结构域,从而将抗原结合结构域连接到跨膜结构域。虽然在一些情况下,功能性CAR不需要接头结构域(即抗原识别结构域可以直接连接到跨膜结构域),但是在一些情况下,接头结构域的使用允许CAR的更大功效。接头结构域可具有多种功能,包括允许CAR的柔性以允许CAR的抗原结合结构域与抗原结合的必要取向。因此,接头结构域可以是执行该功能的任何氨基酸序列。接头结构域的一个非限制性实例是与IgG抗体的铰链区(例如IgG1铰链区)具有氨基酸序列同源性的结构域。替代实例包括与抗体的$C_{H2}$-$C_{H3}$区或CD3共受体复合物、CD4共受体或CD8共受体的部分具有序列同源性的氨基酸序列。

[0452] 在一些实施方案中,CAR或其他经修饰的受体可以包含如本文所述的呈sdAb、scFv(包括多价scFv)、Fab或另一种抗体样结构形式的抗原结合蛋白质。

[0453] CAR的信号传导结构域可以是任何合适的结构域,当CAR的抗原识别结构域识别抗原从而激活CAR时,该结构域能够诱导或参与诱导细胞内信号级联反应。CAR的信号传导结构域将根据CAR激活后所需的细胞结果来具体选择。尽管存在许多可能的信号传导结构域,但在免疫治疗和癌症治疗中,根据其来源的受体,信号传导结构域可大致分为两类,即,激活受体和共刺激受体。

[0454] 因此,在本发明第一方面的一些实施方案中,信号传导结构域包括衍生自活化受体的部分。在一些实施方案中,信号传导结构域包括衍生自共刺激受体的部分。

[0455] 如在整个说明书中使用的,术语"部分"在关于活化受体或共刺激受体使用时,涉及受体的任何片段,其包括负责或参与在受体与其同源抗原或配体相互作用之后的细胞内信号级联的起始/诱导的序列。下文对了经由CD3启动/诱导T细胞受体(TCR)的细胞内信号级联的实例进行了概述。

[0456] 尽管不希望受理论束缚,但TCR的细胞外部分主要包含克隆型TCRα和TCRβ链(TCRα/β受体)或TCRγ和TCRδ链(TCRγδ受体)的异源二聚体。这些TCR异源二聚体通常缺乏固有的信号转导能力,因此它们与CD3的多个信号转导亚基(主要是CD3-ζ、-γ、-δ和-ε)非共价结合。CD3的γ、δ和ε链中的每一者具有细胞内(细胞质)部分,其包括单个基于免疫受体-酪氨酸的激活基序(ITAM),而CD3链包括三个串联ITAM。当TCR在MHC存在的情况下与同源抗原结合,并且与诸如CD4或CD8等必要的共受体结合时,信号传导便会启动,这会导致一种名为Lck的酪氨酸激酶将CD3链的细胞内ITAM中的两个酪氨酸残基磷酸化。随后,第二种酪氨酸激酶(ZAP-70,其自身会被Lck的磷酸化作用激活)被募集来对这些ITAM进行双磷酸化。因此,若干下游靶蛋白被激活,这最终会引发细胞内构象变化、钙动员以及肌动蛋白细胞骨架的重排。这些变化共同作用,最终会导致转录因子的激活以及T细胞免疫反应的诱导。

[0457] 如贯穿说明书所用,术语"活化受体"涉及形成T细胞受体(TCR)复合物的组分或参与T细胞受体(TCR)复合物的形成的受体或共受体,或由于识别抗原或其他免疫原性刺激而参与免疫细胞的特异性活化的受体。

[0458] 此类活化受体的非限制性实例包括T细胞受体-CD3复合物(CD3-ζ、-γ、-δ和-ε)、CD4共受体、CD8共受体、Fc受体或自然杀伤(NK)细胞相关活化受体如LY-49(KLRA1)、天然细胞毒性受体(NCR,优选地NKp46、NKp44、NKp30或NKG2或CD94/NKG2异二聚体)的组分。因此,在本发明的一些实施方案中,信号结构域包括衍生自CD3共受体复合物成员(优选地CD3-ζ链或其部分)、CD4共受体、CD8共受体、Fc受体(FcR)(优选地FcεRI或FcRI)或NK相关受体如LY-49的任何一种或多种的部分。

[0459] CD3链中的每个CD3链的特异性细胞内信号转导部分是本领域已知的,FC受体的细胞内部分也是如此。

[0460] 活化受体的部分的各种组合可以用于形成CAR的跨膜(TM)和胞内(IC)部分,例如CD3ζTM和CD3ζIC(Landmeier S.et al.Cancer Res.2007;67:8335-43;Guest RD.et al.,J Immunother.2005,28:203-11;Hombach AA.et al.J Immunol.2007;178:4650-7)、CD4 TM和CD3ζIC(James SE.et al.J Immunol.2008;180:7028-38)、CD8 TM和CD3ζIC(Patel SD.Et al.Gene Ther.1999;6:412-9)、以及FcεγTM和FcεγIC(Haynes NM.et al.J

Immunol.2001;166:182-7;AnnenkovAE.et al.J Immunol.1998;161:6604-13)。

[0461] 如在整个说明书中使用的,术语“共刺激受体”涉及在抗原特异性诱导激活受体时辅助免疫细胞激活的受体或共受体。如将理解的那样,共刺激受体不需要抗原的存在并且不是抗原特异性的,而是通常是两种信号中的一种,另一种是诱导免疫细胞反应所需的激活信号。在免疫应答的情况下,共刺激受体通常通过其表达的配体在抗原递呈细胞(APC)如树突细胞或巨噬细胞表面上的存在而活化。具体就T细胞而言,共刺激对于引发细胞活化、增殖、分化和存活(所有这些通常都归在T细胞活化这一范畴内)是必不可少的。而在缺乏共刺激的背景下向T细胞呈递抗原,则可能导致无反应性、克隆清除和/或抗原特异性耐受的形成。重要的是,共刺激分子能够影响T细胞对同时遇到的抗原的反应。一般来说,在“阳性”共刺激分子存在的背景下遇到的抗原会导致T细胞活化并引发旨在清除表达该抗原细胞的细胞免疫反应。

[0462] 然而,在“阴性”共受体存在的背景下遇到的抗原会导致对同时遇到的抗原产生耐受状态。

[0463] T细胞共刺激受体的非限制性实例包括CD27、CD28、CD30、CD40、DAP10、OX40、4-1BB(CD137)、ICOS。具体地,CD27、CD28、CD30、CD40、DAP10、OX40、4-1BB(CD137)和ICOS都代表增强T细胞响应活化的“阳性”共刺激分子。因此,在本发明的一些实施方案中,信号结构域包括源自CD27、CD28、CD30、CD40、DAP10、OX40、4-1BB(CD137)和ICOS中的任何一者或更多者的部分。

[0464] 在一些实施方案中,信号传导结构域包括衍生自CD28、OX40或4-1BB共刺激受体的部分。在一些实施方案中,信号结构域包括CD28共刺激受体的一部分。在一些实施方案中,信号结构域包括OX40共刺激受体的一部分。共刺激受体部分的各种组合可以用于形成CAR的跨膜(TM)和胞内(IC)部分。例如,CD8 TM和DAP10 IC或CD8 TM和4-1BB IC(Marin V.et al.Exp Hematol.2007;35:1388-97)、CD28 TM和CD28 IC(Wilkie S.et al.J Immunol.2008;180:4901-9;Maher J.et al.Nat Biotechnol.2002;20:70-5)和CD8 TM和CD28 IC(Marin V.et al.Exp Hematol.2007;35:1388-97)中所描述的那样。

[0465] 本发明的抗原结合蛋白质的进一步细节

[0466] 本发明的抗原结合蛋白质可以由通过肽键或修饰的肽键彼此连接的氨基酸(即,肽等配物(peptide isosteres))组成,并且可以含有除20个基因编码的氨基酸之外的氨基酸。本发明的抗原结合蛋白质可以通过天然方法例如翻译后处理或通过本领域公知的化学修饰技术进行修饰。在基本文本以及研究文献中很好地描述了这种修饰。修饰可以发生在抗原结合蛋白质中的任何地方,包括肽骨架、氨基酸侧链和氨基或羧基末端、或者在诸如碳水化合物的部分上。应当理解的是,相同类型的修饰可以相同或不同程度存在于给定抗原结合蛋白质中的几种蛋白质。此外,给定的抗原结合蛋白质可以含有许多类型的修饰。抗原结合蛋白质可以是支链状的例如作为泛素化的结果,并且它们可以是环状的,且具有或不具有支化。环状、支链状和支链环状抗原结合蛋白质可由翻译后天然过程产生或可通过合成方法制备。修饰包括乙酰化、酰化、ADP-核糖糖基化、酰胺化、黄素的共价连接、血红素部分的共价连接、核苷酸或核苷酸衍生物的共价连接、脂质或脂质衍生物的共价连接、磷脂酰肌醇的共价连接、交联、环化、二硫键形成、去甲基化、共价交联的形成、半胱氨酸的形成、焦谷氨酸的形成、甲酰化、γ-羧基化、糖基化、GPI锚定形成、羟基化、碘化、甲基化、肉豆蔻化、

氧化、聚乙二醇化、蛋白质水解加工、磷酸化、肾上腺素化、外消旋、硒酰化、硫酸化、转移-RNA介导的氨基酸向蛋白质的添加比如精氨酸化和泛素化。

[0467] 在另一实施方案中,提供了一种缀合物,其呈如上所述的抗原结合蛋白质、免疫球蛋白可变结构域、抗体、Fab、dab、scFv、双抗体、三抗体或融合蛋白的形式,其与细胞毒性剂例如化学治疗剂、药物、生长抑制剂、毒素(例如,细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段)或标记比如放射性同位素(即,无线电缀合物)缀合。在另一方面,本发明还提供了一种使用免疫缀合物的方法。在一个方面,免疫缀合物包含共价附接至细胞毒性剂或可检测剂的上述可变结构域中的任何可变结构域。

[0468] 在另一实施方案中,提供了一种用于结合至如上所述的抗原结合蛋白质、免疫球蛋白可变结构域、抗体、dab、scFv、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv片段、双抗体、三抗体、线性抗体、单链抗体分子、或多特异性抗体、融合蛋白或缀合物的抗体。

[0469] 在另一实施方案中,提供了一种核酸,该核酸对如上所述的抗原结合蛋白质、免疫球蛋白可变结构域、抗体、dab、scFv、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv片段、双抗体、三抗体、线性抗体、单链抗体分子、或多特异性抗体、融合蛋白或缀合物进行编码。

[0470] 对根据上述通式中的任何一个通式的CDR或FR进行编码或由其组成的抗原结合蛋白质的多核苷酸可以由来自任何来源的核酸产生,例如通过化学合成或从cDNA或基因组文库分离而产生。例如,cDNA文库可以由抗体产生细胞比如B细胞、浆细胞或杂交瘤细胞和相关核酸产生,所述相关核酸通过使用针对感兴趣的特定克隆的寡核苷酸进行PCR扩增而分离。可以使用本领域已知的任何方法将分离的核酸克隆到载体中。可以使用本领域已知的方法例如重组DNA技术、位点定向诱变、PCR等(参见例如下述文献中所描述的技术,即:Sambrook et al.,1990,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,2d Ed.,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.and Ausubel et al.,eds.,1998,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,NY)诱变相关核苷酸序列,以产生具有不同氨基酸序列的抗原结合蛋白质,例如以产生氨基酸取代、缺失和/或插入。

[0471] 蛋白质生产

[0472] 在另一实施方案中,提供了一种生产如上所述的抗FLAG抗原结合蛋白质的方法,该抗FLAG抗原结合蛋白质包括在如上所述的细胞或非人动物中表达如上所述的核酸。

[0473] 本发明的抗原结合蛋白质的生产通常需要含有对本发明的抗原结合蛋白质进行编码的多核苷酸的表达载体。可以获得对本发明的抗原结合蛋白质进行编码的多核苷酸并将其亚克隆到载体中,以用于使用本领域公知的技术(包括本文所述的技术)通过重组DNA技术来生产抗原结合蛋白质。考虑了许多不同的表达系统,所述许多不同的表达系统包括使用包括人细胞的哺乳动物细胞来产生和分泌抗原结合蛋白质。细胞的实例包括293F细胞系、CHO细胞系和NSO细胞系。

[0474] 可以使用本领域已知的方法来构建包含蛋白质编码序列和适当的转录和翻译控制信号的表达载体。这些包括体外重组DNA技术、合成技术和体内遗传重组。在某些实施方案中,提供了一种可复制载体,该可复制载体具有对与启动子可操作地连接的抗原结合蛋白质进行编码的核酸。

[0475] 用表达载体转染的细胞可以通过常规技术培养以产生抗原结合蛋白质。因此,在某些实施方案中,提供了宿主细胞或细胞转染剂,其含有对本发明的可操作地连接至启动

子的抗原结合蛋白质进行编码的多核苷酸。启动子可以是异源的。可以使用各种宿主-表达载体系统,并且在某些系统中,载体系统的转录机器与宿主细胞特别匹配。例如,哺乳动物细胞比如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)可以用包含来自人巨细胞病毒的主要中间早期基因启动子元件的载体来转染。附加地或替代地,可以使用宿主细胞调节插入序列的表达或者根据需要修饰和处理基因产物,所述基因产物包括各种形式的转译后修饰。具有特定转译后修饰过程的哺乳动物宿主细胞的实例包括CHO细胞、VERY细胞、BHK细胞、HeIa细胞、COS细胞、MDCK细胞、293细胞、3T3细胞、W138细胞、BT483细胞、Hs578T细胞、HTB2细胞、BT20细胞和T47D细胞、NSO细胞、CRL7030细胞和HsS78Bst细胞。

[0476] 根据蛋白质分子的用途,可以有利地选择许多细菌表达载体。在一个实例中,可以使用引起容易纯化的高水平融合蛋白产物表达的载体比如大肠杆菌表达载体pUR278,在该载体中产生大量抗原结合蛋白质。表达产物可以以具有lacZ的融合蛋白的形式产生。其他细菌载体包括pIN载体等。pGEX载体也可以用于表达外源多肽作为与谷胱甘肽-S-转移酶(GST)的融合蛋白。这些融合蛋白通常是可溶的并且可以通过吸附和结合到谷胱甘肽-琼脂糖亲和基质,然后在游离谷胱甘肽存在下洗脱而容易地从裂解细胞中纯化。可以在表达的多肽中提供凝血酶和/或因子Xa蛋白质酶切割位点,使得克隆的靶基因产物可以从GST部分释放。

[0477] 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcNPV)可以用作载体,在昆虫系统(包括草地贪夜蛾细胞)中表达外源基因。所使用的特定启动子可以取决于蛋白质编码序列在病毒基因组序列中的插入位置。例如,该序列可以单独克隆到多角体蛋白基因中并且置于多角体蛋白启动子的控制之下。

[0478] 基于病毒的表达系统可以与哺乳动物细胞比如腺病毒一起使用,由此感兴趣的编码序列可以连接至腺病毒晚期启动子和三部分前导序列。可以使用体外或体内重组将该嵌合基因插入腺病毒基因组中。插入区域E1或E3将产生能够在感染的宿主细胞中表达抗原结合蛋白质的活的重组病毒。可能需要包括ATG起始密码子和相邻序列的特异性起始信号来有效翻译插入的抗原结合蛋白质编码序列。起始和翻译控制信号和密码子可以从天然和合成的各种来源获得。转录增强子元件和转录终止子可以用于提高基于病毒的系统的表达效率。

[0479] 当需要长期、高产率生产重组蛋白质时,优选稳定的表达。通常,使用选择标记基因,由此在转染后,细胞在富集培养基中生长1-2天,然后转移到含有选择培养基的培养基中,其中,可以筛选含有相应选择标记的细胞例如抗生素抗性。结果是已经稳定地将质粒整合到它们的染色体中的细胞生长并形成焦点(foci),该焦点进而可以被克隆并扩增到细胞系中。单纯疱疹病毒胸苷激酶基因、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶基因和腺嘌呤磷酸核糖转移酶基因分别是可用于胸苷激酶缺陷型(tk-)、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶缺陷型(hgprt-)或腺嘌呤磷酸核糖转移酶缺陷型(aprT-)细胞的基因的实例,从而提供了合适的筛选系统。以下基因:二氢叶酸还原酶基因(dhfr),赋予对甲氨蝶呤的抗性;鸟嘌呤磷酸核糖转移酶基因(gpt),赋予对霉酚酸的抗性;新霉素磷酸转移酶基因(neo),赋予对氨基糖苷类药物G-418的抗性;以及潮霉素磷酸转移酶基因(hygro),赋予对潮霉素的抗性,这些都是可以用于抗代谢物筛选系统的基因的实例。

[0480] 本发明的抗原结合蛋白质可以通过重组表达系统通过已知方法来纯化,所述方法

包括离子交换层析、亲和层析(特别是对特定抗原蛋白质A或蛋白质G的亲和)和凝胶过滤柱层析、离心、差异溶解度或通过任何其他用于纯化蛋白质的标准技术。通过提供呈融合蛋白形式的抗原结合蛋白质可以促进或辅助纯化。

[0481] 大量的本发明的抗原结合蛋白质可以通过可规模化的方法产生,该可规模化的方法从研究实验室中的中试表达系统开始,该中试表达系统扩展到分析规模生物反应器(通常从5L生物反应器至约50L生物反应器)或生产规模生物反应器(例如但不限于75L、100L、150L、300L或500L)。理想的可规模化方法包括其中通过HPSEC或rCGE测量的聚集水平低至不可检测水平的那些,通常按蛋白质重量计不超过5%聚集至按蛋白质重量计不超过0.5%聚集。附加地或替代地,在可规模化的过程中可能需要根据代表完整抗原结合蛋白质的总峰面积测量的不可检测的片段化水平,使得总峰面积的至少80%且多达99.5%或更高代表完整抗原结合蛋白质。在其他实施方案中,本发明的可规模化方法以约10mg/L至约300mg/L或更高的生产效率生产抗原结合蛋白质。

[0482] 已经开发了用于产生抗体片段的各种技术,包括完整抗体的蛋白质水解消化和宿主细胞中的重组表达。关于后者,如下所述,Fab、Fv和scFv抗体片段都可以在大肠杆菌中表达并从大肠杆菌中分泌,抗体片段可以从抗体噬菌体文库中分离,并且Fab'-SH片段可以直接从大肠杆菌中回收并化学偶联以形成F(ab')2片段。在另一种方法中,直接从重组宿主细胞培养物中分离F(ab')2片段。

[0483] 在另一实施方案中,提供了一种包含上述核酸的载体。载体可以例如呈质粒、粘粒、病毒颗粒或噬菌体的形式。适当的核酸序列可以通过各种程序插入载体中。通常,使用本领域已知的技术将DNA插入适当的限制性内切酶位点。载体组分通常包括但不限于信号序列、复制起点、一个或更多个标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列中的一者或更多者。包含一种或多种这些组分的合适载体的构建采用本领域技术人员已知的标准连接技术。

[0484] 抗原结合位点不仅可以直接重组产生,而且可以作为具有异源多肽的融合多肽产生,该异源多肽可以是信号序列或在成熟蛋白质或多肽的N端具有特异性切割位点的其他多肽。通常,信号序列可以是载体的组成部分,或者信号序列可以是插入载体的编码抗原结合位点的DNA的一部分。信号序列可以是选自例如碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp或热稳定肠毒素II前导物的原核信号序列。对于酵母分泌,信号序列可以是例如酵母转化酶前导、α因子前导或酸性磷酸酶前导或白色念珠菌葡糖淀粉酶前导。在哺乳动物细胞表达中,哺乳动物信号序列可以用于指导蛋白质的分泌比如来自相同或相关物种的分泌多肽以及病毒分泌前导的信号序列。

[0485] 可以使用如上所述的标准重组技术来获得对本发明的抗原结合蛋白质的多肽组分进行编码的多核苷酸序列。多核苷酸可以使用核苷酸合成仪或PCR技术合成。一旦获得就将编码多肽的序列插入到能够在原核宿主中复制和表达异源多核苷酸的重组载体中。本领域已知的许多载体可用于本发明的目的。选择合适的载体将主要取决于待插入载体中的核酸的大小和待用载体转化的特定宿主细胞。每个载体含有各种组分,这取决于其功能(异源多核苷酸的扩增或表达、或扩增和表达两者)及其与它所在的特定宿主细胞的相容性。

[0486] 通常,含有复制子和来自与宿主细胞相容的物种的对照序列的质粒载体与这些宿主结合使用。表达和克隆载体都含有使载体能够在一个或更多个选择的宿主细胞中复制的

核酸序列,并含有能够在转化细胞中提供表型选择的标记序列。这种序列对于多种细菌、酵母和病毒是众所周知的。来自质粒pBR322的复制起点(其包含编码氨苄青霉素(Amp)和四环素(Tet)抗性的基因)提供了用于鉴定转化细胞的简单手段并且适用于大多数革兰氏阴性细菌。2μm质粒来源适用于酵母。各种病毒来源(SV40、多瘤、腺病毒、VSV或BPV)可用于在哺乳动物细胞中克隆载体。pBR322、其衍生物或其他微生物质粒或噬菌体也可以含有或被修饰以含有可由微生物生物体用于表达内源性蛋白质的启动子。

[0487] 另外,含有与宿主微生物相容的复制子和对照序列的噬菌体载体可以与这些宿主结合用作转化载体。例如,噬菌体比如λGEM.TM.-11可以用于制备可以用于转化易感宿主细胞比如大肠杆菌LE392的重组载体。

[0488] 本发明的表达载体可以包含两个或更多个启动子-顺反子(顺反子是含有用于产生单个多肽的所有信息的DNA片段)对。启动子是位于顺反子的上游(5')的非翻译调节序列,用于调节顺反子的表达。原核启动子通常分为两类,即:诱导型和组成型。诱导型启动子是这样的启动子,即:其响应于培养条件的变化(例如,存在或不存在营养素或温度变化)而在其控制下启动顺反子的增加的转录水平。

[0489] 由多种潜在宿主细胞识别的大量启动子是众所周知的。所选择的启动子可以通过限制酶消化从源DNA中除去启动子并将分离的启动子序列插入本发明的载体中,从而与编码轻链或重链的顺反子DNA可操作地连接。天然启动子序列和许多异源启动子均可以用于指导靶基因的扩增和/或表达。在一些实施方案中,使用异源启动子,这是因为与天然靶多肽启动子相比,它们通常允许更大的转录和更高的表达靶基因产率。

[0490] 各种潜在宿主细胞识别的启动子是众所周知的。适用于原核宿主的启动子包括PhoA启动子、β-半乳糖胺酶和乳糖启动子系统、碱性磷酸酶、色氨酸(trp)启动子系统和杂交启动子如tac或trc启动子。用于细菌系统的启动子还将含有与编码本发明抗原结合蛋白质的DNA可操作地连接的Shine-Dalgarno(S.D.)序列。然而,在细菌中起作用的其他启动子(比如,其他已知的细菌或噬菌体启动子)也是合适的。它们的核苷酸序列已经公布,因此,本领域技术人员能够利用接头或衔接子将它们与编码目标轻链和重链的顺反子进行有效连接,以提供所需的任何限制性酶切位点。

[0491] 在本发明的一个方面,重组载体内的每个顺反子包含指导表达的多肽跨膜易位的分泌信号序列组分。通常,信号序列可以是载体的组成部分,或者信号序列可以是插入载体的靶多肽DNA的一部分。选择用于本发明目的的信号序列应当是由宿主细胞识别和处理(即,由信号肽酶切割)的信号序列。对于不识别和处理异源多肽天然的信号序列的原核宿主细胞,信号序列被例如从由碱性磷酸酶、青霉素酶、Ipp或热稳定肠毒素II(STII)前导物、LamB、PhoE、PeIB、OmpA和MBP组成的组中选择的的原核信号序列取代。本发明的一个实施方案中,表达系统的两个顺反子中使用的信号序列是STII信号序列或其变体。

[0492] 在另一方面,根据本发明的免疫球蛋白的产生可以发生在宿主细胞的细胞质中,并且因此不需要在每个顺反子内存在分泌信号序列。在这方面,表达、折叠和组装免疫球蛋白轻链和重链以在细胞质内形成功能性免疫球蛋白。某些宿主菌株(例如,大肠杆菌trxB菌株)能提供有利于二硫键形成的细胞质条件,从而使表达的蛋白质亚基能够正确折叠和组装。

[0493] 本发明提供了一种表达系统,在该表达系统中,可以调节表达的多肽组分的定量

比,以最大化本发明分泌的和适当组装的抗原结合蛋白质的产量。这种调节至少部分通过同时调节多肽组分的翻译强度来实现。

[0494] 就真核宿主细胞中的表达而言,载体组分通常包括但不限于以下一者或更多者:信号序列、复制起点、一个或更多个标记基因、增强子元件、启动子以及转录终止序列。

[0495] 用于真核宿主细胞的载体还可以含有信号序列或者其他在目标成熟蛋白质或多肽的N端具有特异性切割位点的多肽。选择的异源信号序列优选地是由宿主细胞识别和处理(即,由信号肽酶切割)的信号序列。在哺乳动物细胞表达中,可获得哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导物例如单纯疱疹gD信号。

[0496] 这种前体区域的DNA在阅读框中连接至编码抗体的DNA。

[0497] 通常,哺乳动物表达载体不需要复制起始成分。例如,通常可仅使用SV40来源,这是因为SV40来源含有早期启动子。

[0498] 表达和克隆载体通常含有选择基因,该选择基因也称为选择标记。典型的选择基因编码的蛋白质具有以下功能:(a)赋予对抗生素或其他毒素(例如氨苄青霉素、新霉素、甲氨蝶呤或四环素)的抗性;(b)弥补营养缺陷型;或(c)提供复杂培养基中不存在的关键营养物质例如芽孢杆菌中编码D-丙氨酸消旋酶的基因。

[0499] 选择方案的一个实例利用药物来阻止宿主细胞的生长。用异源基因成功转化的那些细胞产生赋予耐药性的蛋白质,并且因此在选择方案中存活。这种显性选择的实例使用新霉素、霉酚酸和潮霉素。

[0500] 用于哺乳动物细胞的合适的选择标记的实例是能够鉴定有能力摄取编码抗原结合蛋白质的核酸(比如为DHFR或胸苷激酶、金属硫蛋白-I和-II、优选地灵长类金属硫蛋白基因、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等)的细胞的那些标记。当使用野生型DHFR时,合适的宿主细胞是制备和繁殖的DHFR活性不足的CHO细胞系(例如ATCC CRL-9096)。例如,首先通过在含有甲氨蝶呤(Mtx,一种DHFR的竞争性拮抗剂)的培养基中培养所有转化体来鉴定用DHFR选择基因转化的细胞。替代性地,用编码抗体、野生型DHFR蛋白质和另一种可选标记(例如氨基糖苷3'-磷酸基转移酶(APH))的DNA序列转化或共同转化的宿主细胞(特别是含有内源性DHFR的野生型宿主)可以通过细胞在含有可选标记(比方说氨基糖苷抗生素例如卡那霉素、新霉素或G418)的选择剂的培养基中生长来选择。

[0501] 表达和克隆载体通常含有可操作地连接到编码抗原结合蛋白质的核酸序列,以指导mRNA合成的启动子。各种潜在宿主细胞识别的启动子是众所周知的。

[0502] 真核基因通常具有位于转录起始位点上游约25个至30个碱基的富含AT的区域。在许多基因转录开始上游发现的70个至80个碱基的另一序列是CNCAAT区,其中,N可以是任何核苷酸。在大多数真核基因的3'端是AATAAA序列,其可以是用于将聚A尾添加到编码序列的3'端的信号。所有这些序列适当地插入真核表达载体中。

[0503] 适用于酵母宿主的合适启动序列的实例包括3-磷酸甘油酸激酶的启动子或者其他糖酵解酶的启动子,包括烯醇化酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡萄糖异构酶和葡萄糖激酶。

[0504] 其他酵母启动子是具有由生长条件控制的转录的附加优点的诱导型启动子,是醇脱氢酶2、异细胞色素C、酸性磷酸酶、与氮代谢有关的降解酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸

脱氢酶和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区。

[0505] 在哺乳动物宿主细胞中,载体上抗原结合蛋白质的转录受到控制,例如由从病毒基因组中获得的启动子控制,这些病毒包括多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(如腺病毒2型)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙型肝炎病毒和猿猴病毒40(SV40);也可以由异源哺乳动物启动(比如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子)子控制;还可以由热休克启动子控制,前提是这些启动子与宿主细胞系统兼容。

[0506] 通过将增强子序列插入载体中可以增加高等真核生物对编码抗原结合蛋白质的DNA的转录。增强子序列包括从哺乳动物基因(红蛋白质、弹性蛋白质酶、白蛋白质、α-甲胎蛋白质和胰岛素)获知的那些序列。然而,通常,将使用来自真核细胞病毒的增强子。实例包括在复制起点后期(bp100-270)的SV40增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、在复制起点后期的多瘤增强子和腺病毒增强子。

[0507] 用于真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或来自其他多细胞生物体的有核细胞)的表达载体也将含有终止转录和稳定mRNA所必需的序列。此类序列通常可从真核或病毒DNA或cDNA的5’未翻译区和偶尔3’未翻译区获得。这些区包含在对抗原结合蛋白质进行编码的mRNA的未翻译部分中转录为聚腺苷酸化片段的核苷酸区段。

[0508] 在另一实施方案中,提供了一种包含上述的载体或核酸的细胞。核酸分子或载体可以作为基因组外的独立分子、优选地作为能够复制的分子而存在于基因修饰的宿主细胞或宿主中,或者核酸分子或载体可以稳定地整合到宿主细胞或宿主的基因组中。

[0509] 本发明的宿主细胞可以是任何原核或真核细胞。

[0510] 原核细胞的实例是通常用于克隆的那些细胞如大肠杆菌或枯草芽孢杆菌。此外,真核细胞包括例如真菌或动物细胞。

[0511] 合适的真菌细胞的实例是酵母细胞、优选地酵母属(Saccharomyces)的酵母细胞、最优选地酿酒酵母属(Saccharomyces cerevisiae)的酵母细胞。

[0512] 动物细胞的实例是例如昆虫细胞、脊椎动物细胞、优选地哺乳动物细胞,比方说例如HEK293、NSO、CHO、MDCK、U2-OS、Hela、NIH3T3、MOLT-4、Jurkat、PC-12、PC-3、IMR、NT2N、Sk-n-sh、CaSki、C33A。这些宿主细胞例如CHO细胞可以为本发明的抗体分子提供翻译后修饰,该翻译后修饰包括前导肽去除、H(重)和L(轻)链的折叠和组装、分子在正确侧的糖基化和功能分子的分泌。

[0513] 本领域已知的其他合适的细胞系可从细胞系保藏处比如美国典型培养物保藏中心(ATCC)处获得。

[0514] 在另一实施方案中,提供了一种包括上述细胞的动物。在某些实施方案中,含有转基因的动物及其组织可用于产生本发明的抗原结合蛋白质。核酸分子作为转基因引入非人宿主及其随后的表达可以用于产生抗原结合蛋白质,例如这种转基因在转基因动物的乳中的表达提供了获得定量量的抗原结合蛋白质的手段。在这方面,有用的转基因包括本发明的核酸分子,例如本文所描述的抗原结合蛋白质的编码序列,这些序列与来自乳腺特异性基因比如酪蛋白或β-乳球蛋白的启动子和/或增强子结构操作性地连接。动物可以是非人类哺乳动物,最优选为小鼠、大鼠、绵羊、小牛、狗、猴或猿。

[0515] 结合靶抗原

[0516] 用于确定本发明的抗原结合蛋白质与其靶抗原(即FLAG标签)成功结合的方法是

本领域公知的。此类方法的非限制性实例在本文中描述于实施例中。确认抗原结合蛋白质的特异性和结合亲和力的方法包括使用Western印迹、ELISA、免疫组织化学和Biacore方法,它们都在本领域技术人员的技能范围内。

[0517] 试剂盒

[0518] 在另一实施方案中,提供了一种试剂盒或制品,其包括如上所述的抗原结合蛋白质、免疫球蛋白可变结构域、抗体、dab、scFv、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv片段、双抗体、三抗体、线性抗体、单链抗体分子或多特异性抗体、融合蛋白、缀合物或药物组合物。

[0519] 在其他实施方案中,提供了一种用于上述用途的试剂盒,该试剂盒包括:

[0520] -容器,该容器容纳呈下述各者中的一者或更多者形式的治疗组合物,所述各者为抗原结合蛋白质、免疫球蛋白可变结构域、抗体、dab、scFv、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv片段、双抗体、三抗体、线性抗体、单链抗体分子或多特异性抗体、融合蛋白、缀合物或药物组合物;

[0521] -附有使用说明的标签或说明书。

[0522] 试剂盒或"制品(article ofmanufacture)"可以包括容器以及贴在容器上或与容器相关联的标签或说明书。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器、泡罩包装等。这些容器可以由多种材料比如玻璃或塑料制成。容器容纳对治疗病症有效的治疗组合物并且可以有无菌入口(例如,该容器可以是静脉输液袋,或者是带有可被皮下注射针头刺穿的瓶塞的小瓶)。标签或说明书标明该治疗组合物用于治疗所选定的病症。在一个实施方案中,标签或说明书包含使用说明。

[0523] 试剂盒可以包含(a)治疗组合物;和(b)其中含有第二活性成分或组分的第二容器。本发明的该实施方案中的试剂盒还可以包括说明书,其指示该活性成分和其他活性成分可用于治疗病症或预防源自癌症的并发症。作为另外一种选择或除此之外,试剂盒还可以包括第二(或第三)容器,该容器包含药学上可接受的缓冲剂比如抑菌注射水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和葡萄糖溶液。试剂盒还可以包括从商业和用户的角度来看的期望的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针和注射器。

[0524] 在某些实施方案中,治疗组合物可以以一次性或可重复使用的装置的形式提供,该装置包括用于保持治疗组合物的容器。在一个实施方案中,装置是注射器。装置可以容纳1mL至2mL的治疗组合物。治疗组合物可以以准备使用的状态或需要混合或添加其他组分的状态提供在装置中。

[0525] 在其他实施方案中,提供了一种用于上述诊断应用的试剂盒,该试剂盒包括:

[0526] -容器,该容器容纳呈下述各者中的一者或更多者形式的诊断组合物,所述各者为抗原结合蛋白质、免疫球蛋白可变结构域、抗体、Fab、dab、scFv、双抗体、三抗体、融合蛋白或缀合物;

[0527] -附有使用说明的标签或说明书。

[0528] 试剂盒可以包含(a)诊断组合物;以及(b)其中含有第二诊断剂或第二标签的第二容器。试剂盒还可以包括从商业和用户的角度来看的期望的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器等。

[0529] 应当理解的是,本说明书中公开和定义的本发明扩展到从文本或附图中提及或明显的两个或更多个单独特征的所有替代组合。所有这些不同的组合构成本发明的各种替代方面。

[0530] 以下实施例旨在说明但绝非限制本发明。

[0531] 实施例

[0532] 实施例1:嵌合抗体的人源化

[0533] 获得小鼠抗FLAG抗体。为了鉴定互补决定区(CDR)并分析最接近的匹配种系序列,使用IMGT结构域间隙对齐工具(Ehrenmann F.,Kaas Q.and Lefranc M.-P.NucleicAcids Res.,2010;38:D301-D307)。

[0534] 通过使用内部软件基于与先前公开的抗体晶体结构的同源性,为VH和VL结构域构建分子模型。可以根据在任何分子可视化软件中查看的请求来提供PDB文件。使用PyMol(The PyMOLMolecular Graphics System,Version 2.0Schrödinger,LLC)生成图像。

[0535] 基于已发表的蛋白质基序对抗体序列的特定不利因素进行了分析。分析是通过对以下基序进行分析来完成的,其中X代表除脯氨酸之外的任何氨基酸,如下表所述:

[0536]

| 风险 | 不利因素 | 基序 |
|---|---|---|
| 高 | 糖基化 | NXS 或 NXT |
| | 游离半胱氨酸 | C |
| | 脱酰胺基作用 | NG、NS 或 QG |
| | 异构化 | DG、DP 或 DS |
| 中等 | 脱酰胺基作用 | NH |
| | 水解作用 | NP |
| | 裂解 | TS、KK、RK 或 KR |
| | 转谷氨酰胺酶 | LLQG |
| | 整合素结合 | RGD 或 KGD |
| | 塑料结合 | FHENSP 或 WXXW |

[0537] 在人源化过程开始时,以单链Fv(scFv)格式构建亲本VH和VL的同源性模型。建模以4个阶段进行:收集同源序列;折叠文库扫描;循环建模;侧链放置。所得模型用于指导在人源化过程期间选择“供体”或“受体”氨基酸。

[0538] 亲本VH和VL序列与一组人类种系序列比对。该小组已经被过滤以选择不含有不需要的序列不利因素(特别是N-连接的糖基化位点和游离半胱氨酸)的种系序列。选择来自两个不同的VH家族和VL家族的最接近匹配种系。然后使用人源化算法来选择CDR和框架氨基酸以从供体亲本序列移植到人受体种系序列上。产生四个VH和四个VL序列,从而得到可能的16种抗体。使用IMGT结构域间隙对齐工具(Ehrenmann F.,Kaas Q.and Lefranc M.-P.Nucleic Acids Res.,2010;38:D301-D307)计算人的百分比同一性。基于序列基序确定序列不利因素。

[0539] 将VH序列和VL序列通过IGMT空位比对工具以对所有已知抗体种系序列进行分析。使用IMGT定义来指定CDR区域。如所预期的,该序列与小鼠最紧密对齐,特别是IGHV1-4*01家族用于VH和IGK1-117*01用于VL。亲本SEQ ID NO:1的最匹配的种系是种系IGHV1-46*01、IGHV7-4-1*02、IGKV2-30*01和IGKV4-1*01。

[0540] 下表总结了原始亲本序列和人源化序列:

[0541]

| ID | 类型 | 人类种系 | 与人类的同一性百分比 |
|---|---|---|---|

| | | | |
|---|---|---|---|
| 亲本的 | | - | 66.3% |
| hu-VH1 | 人源化的 | IGHV1-46*01 | 84.7% |
| hu-VH2 | 人源化的 | IGHV1-46*01 | 87.8% |
| hu-VH3 | 人源化的 | IGHV7-4-1*02 | 82.7% |
| hu-VH4 | 人源化的 | IGHV7-4-1*02 | 86.7% |
| 亲本的 | | - | 80.0% |
| hu-VL1 | 人源化的 | IGKV2-30*01 | 90.0% |
| hu-VL2 | 人源化的 | IGKV2-30*01 | 91.0% |
| hu-VL3 | 人源化的 | IGKV4-1*01 | 80.2% |
| hu-VL4 | 人源化的 | IGKV4-1*01 | 81.2% |

[0542] 4种不同的重链框架区和轻链框架区的组合导致产生16种不同的$V_H/V_L$组合。

[0543] 16种抗体的不同$V_H/V_L$组合总结在下表中：

[0544]

| 推荐的抗体 | | VH 名称 | VL 名称 |
|---|---|---|---|
| | 亲本的 | VH | VL |
| 1 | 人源化-v1 | hu-VH1 | hu-VL1 |
| 2 | 人源化-v2 | hu-VH1 | hu-VL2 |
| 3 | 人源化-v3 | hu-VH1 | hu-VL3 |
| 4 | 人源化-v4 | hu-VH1 | hu-VL4 |
| 5 | 人源化-v5 | hu-VH2 | hu-VL1 |
| 6 | 人源化-v6 | hu-VH2 | hu-VL2 |
| 7 | 人源化-v7 | hu-VH2 | hu-VL3 |
| 8 | 人源化-v8 | hu-VH2 | hu-VL4 |
| 9 | 人源化-v9 | hu-VH3 | hu-VL1 |
| 10 | 人源化-v10 | hu-VH3 | hu-VL2 |
| 11 | 人源化-v11 | hu-VH3 | hu-VL3 |
| 12 | 人源化-v12 | hu-VH3 | hu-VL4 |
| 13 | 人源化-v13 | hu-VH4 | hu-VL1 |
| 14 | 人源化-v14 | hu-VH4 | hu-VL2 |
| 15 | 人源化-v15 | hu-VH4 | hu-VL3 |

[0545]

| | | | |
|---|---|---|---|
| 16 | 人源化-v16 | hu-VH4 | hu-VL4 |

[0546] 所有的人源化IgG1形式均表达良好,并且通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和尺寸排阻高效液相色谱(SEC-HPLC)成功纯化以进行表征,从而评估蛋白质质量。最终纯化的抗体的滴度、量以及单体含量如下表所示：

[0547]

| ID | 类型 | % | 滴度 (mg/l) | 纯化 (mg) | 单体 (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 亲本的 | IgG1 | VH:66.3 VL:80 | 10 | 0.8 | 100 |
| V1 | 人源化人 IgG1 | VH: 84.7 VL:90.0 | 22.5 | 1.8 | 99.2 |
| V2 | 人源化人 IgG1 | VH: 84.7 VL: 91.0 | 1.25 | 0.1 | 100 |
| V3 | 人源化人 IgG1 | VH:84.7 VL:80.2 | 50 | 4 | 100 |
| V4 | 人源化人 IgG1 | VH: 84.7 VL:81.2 | 50 | 4 | 99.4 |
| V5 | 人源化人 IgG1 | VH:87.8 VL:90.0 | 24.5 | 1.4 | 98.0 |
| V6 | 人源化人 IgG1 | VH: 87.8 VL:91.0 | 8.5 | 0.7 | 97.8 |
| V7 | 人源化人 IgG1 | VH: 87.8 VL:80.2 | 47.5 | 3.8 | 98.5 |
| V8 | 人源化人 IgG1 | VH: 87.8 VL:81.2 | 40 | 3.2 | 98.5 |
| V9 | 人源化人 IgG1 | VH: 82.7 VL:90.0 | 15 | 1.2 | 99.14 |
| V10 | 人源化人 IgG1 | VH: 82.7 VL:91.0 | 10 | 0.8 | 100 |
| V11 | 人源化人 IgG1 | VH: 82.7 VL:80.2 | 52.5 | 4.2 | 99.5 |
| V12 | 人源化人 IgG1 | VH: 82.7 VL:81.2 | 49 | 3.9 | 99.7 |
| V13 | 人源化人 IgG1 | VH: 86.7 VL:90.0 | 2.5 | 0.2 | 100 |
| V14 | 人源化人 IgG1 | VH:86.7 VL:91.0 | 2.5 | 0.2 | 99.4 |

[0548]

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| V15 | 人源化人 IgG1 | VH: 86.7 VL:80.2 | 27.5 | 2.2 | 99.6 |
| V16 | 人源化人 IgG1 | VH: 86.7 VL: 81.2 | 37.5 | 3 | 100 |

[0549] 实施例2:人源化抗体的表征

[0550] 使用ELISA评估所有16种IgG形式和scFv形式的人源化抗体与靶标(FLAG标签)结合的能力。结果示于图1。

[0551] 尽管大多数人源化变体保留了结合靶标的能力,但是3个人源化IgG克隆(v3、v4和v7)具有更大的亲和力。选择这三个IgG克隆和相应的scFV形式用于进一步分析。

[0552] 人源化抗体能够表现出与亲本小鼠抗体相当的高亲和力结合(即人恒定区的背景下的小鼠VH/VL)。

[0553] 下表总结了通过Biacore测量的抗体亲和力和配比:

[0554]

| 抗体 | $K_D$(M) | 结合配比 |
|---|---|---|
| V4scFv | 2.2E-08 | 2.8 |
| V3scFv | 1.9E-08 | 5.5 |
| V7scFv | 1.5E-08 | 3.7 |
| V7IgG | 1.3E-09 | 1.1 |
| V3IgG | 1.0E-09 | 1.2 |
| 亲本的 | 9.6E-10 | 1.3 |
| V4IgG | 9.1E-10 | 1.1 |

[0555] 将四种IgG抗体(亲本小鼠抗体和3种人源化抗体:v3、v4和v7)与相应的人源化scFv与Biacore的单一抗原结合进行比较。小鼠scFv不能表达,因此不能用于亲和力比较。与scFv相比,IgG抗体更紧密地结合抗原几乎10倍。这是预期中的,原因在于IgG本质上是二价的,并且与单价表达的scFv相比亲合力(avidity)将导致更紧密的结合。

[0556] 抗体v3、v4、v7和v11(在v11的情况下为IgG形式和scFv形式)被进一步表征。评估抗体用以活化抗HER2-FLAG CART细胞并诱导IFN-γ的能力。抗体诱导IFN-γ表达,如图2所示。抗体v11也以IgG和scFv两种形式包括在评估中。结果表明,抗体v7和v4抗体分别通过CART细胞诱导最大量的IFN-γ。

[0557] 基于这些结果,选择抗体变体v4和抗体变体v7用于未来研究。

[0558] 应当理解的是,本说明书中公开和定义的本发明扩展到从文本或附图中提及或明显的两个或更多个单独特征的所有替代组合。所有这些不同的组合构成本发明的各种替代方面。

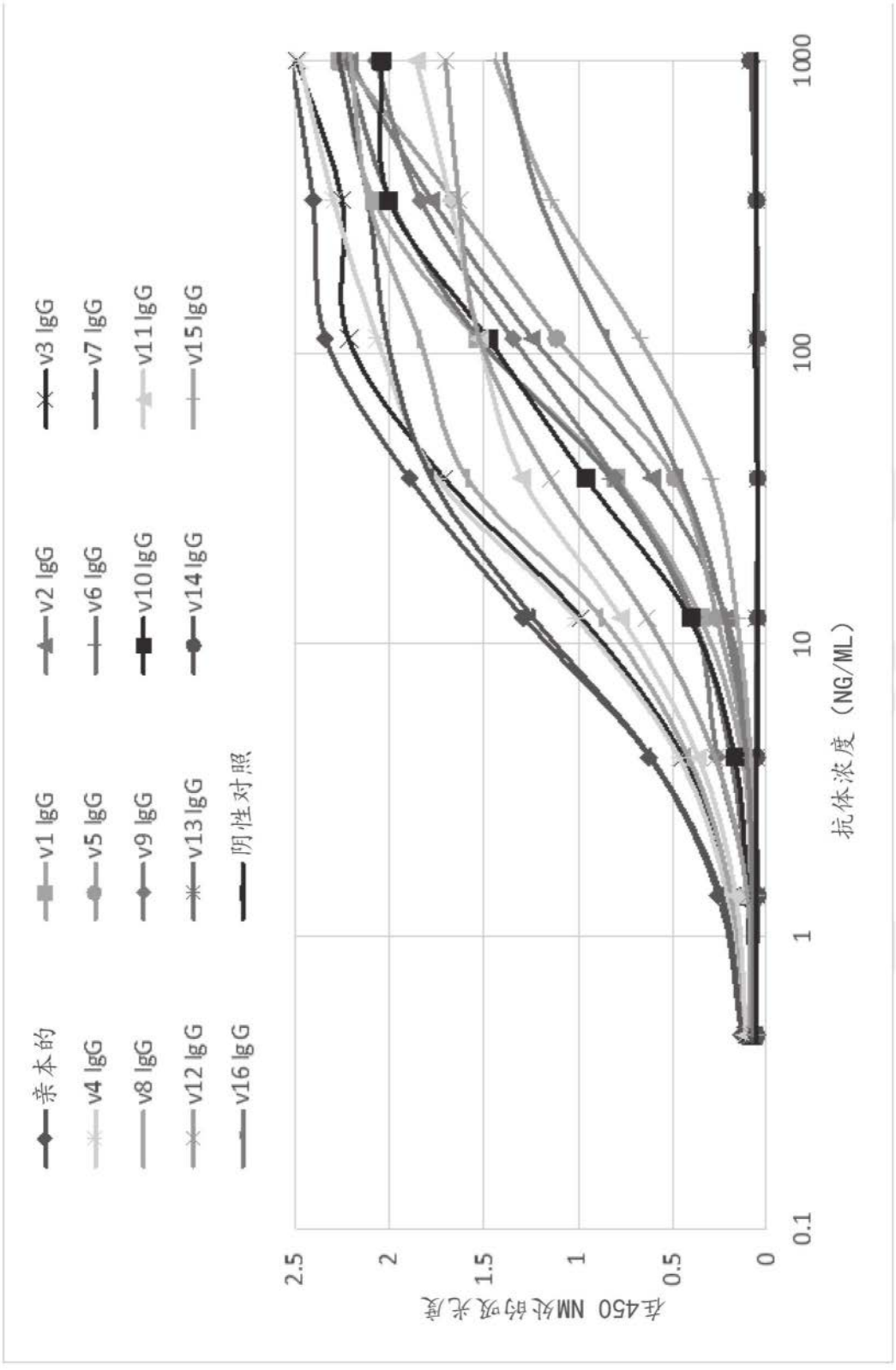

亲本的
v1 IgG
v2 IgG
v3 IgG
v4 IgG
v5 IgG
v6 IgG
v7 IgG
v8 IgG
v9 IgG
v10 IgG
v11 IgG
v12 IgG
v13 IgG
v14 IgG
v15 IgG
v16 IgG
阴性对照
在450 NM处的吸光度
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0.1
1
10
100
1000
抗体浓度（NG/ML）

图1

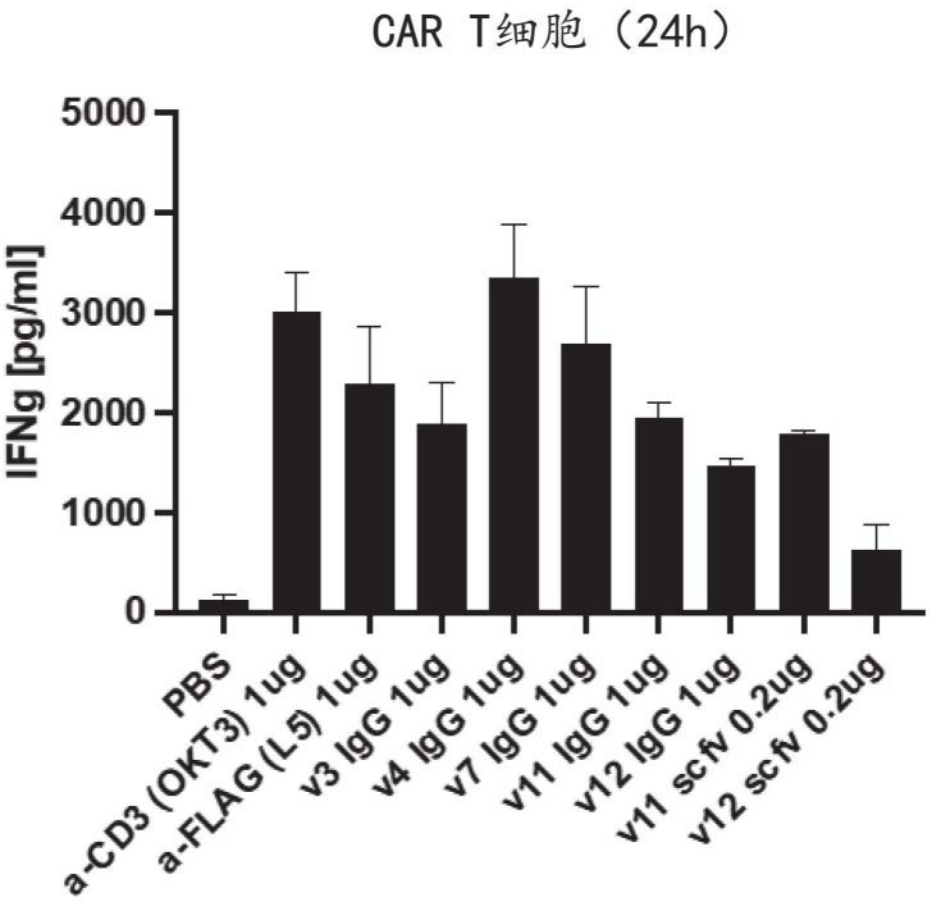

CAR T细胞（24h）
IFNg [pg/ml]
5000
4000
3000
2000
1000
0
PBS
a-CD3 (OKT3) 1ug
a-FLAG (L5) 1ug
v3 IgG 1ug
v4 IgG 1ug
v7 IgG 1ug
v11 IgG 1ug
v12 IgG 1ug
v11 scfv 0.2ug
v12 scfv 0.2ug

图2

```
VH 比对

亲本的      QVQLQQSAGELARPGASVKMSCKASGYSFTTYTIHWVKQRPGQGLEWIGYINPSSGYAAY  60
人类 V4     QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTTYTIHWVRQAPGQGLEWIGYINPSSGYAAY  60
人类 V7     QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTTYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSSGYAAY  60
            ****  **..*: :*******:**********:***:* ********:**********

亲本的      NQNFKDETTLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREKFYGYDYWGQGTTLTVSS    117
人类 V4     NQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKFYGYDYWGQGTTVTVSS    117
人类 V7     NQKFQGRVTMTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKFYGYDYWGQGTTVTVSS    117
            **:*:...*:*******:*****:***** ***:**********************:****

VL 比对
亲本的      DVLMTQLPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHRNGNTYLEWYLLKPGQSPKLLIYKVSNRF  60
人类 V7     DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSIVHRNGNTYLEWYQLKPGQPPKLLIYKVSNRF  60
人类 V4     DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSIVHRNGNTYLEWYQQKPGQPPKLLIYKVSNRF  60
            **:**** * ** ****::*:*.*:**********************  **** **********

亲本的      SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPYTFGGGTKLEIK  112
人类 V7     SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCFQGSHVPYTFGGGTKLEIK  112
人类 V4     SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCFQGSHVPYTFGGGTKLEIK  112
            **********************.** ::****:.**********************
```

图3