



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107849126 B

(45) 授权公告日 2022.04.08

(21) 申请号 201680044324.2

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2016.07.29

C07K 16/22 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107849126 A

(56) 对比文件

CN 104428315 A, 2015.03.18

(43) 申请公布日 2018.03.27

CN 103936860 A, 2014.07.23

(30) 优先权数据

CN 103562222 A, 2014.02.05

62/198,518 2015.07.29 US

CN 102906114 A, 2013.01.30

62/205,185 2015.08.14 US

CN 104395339 A, 2015.03.04

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

WO 2012131078 A1, 2012.10.04

2018.01.29

WO 2013144266 A1, 2013.10.03

(86) PCT国际申请的申请数据

WO 2014072876 A1, 2014.05.15

PCT/US2016/044838 2016.07.29

Yvonne Kienast等.Ang-2-VEGF-A

(87) PCT国际申请的公布数据

CrossMab, a Novel Bispecific Human IgG1

W02017/020001 EN 2017.02.02

Antibody Blocking VEGF-A and Ang-2

(73) 专利权人 阿勒根公司

Functions Simultaneously, Mediates Potent

地址 美国加利福尼亚

Antitumor, Antiangiogenic, and

(72) 发明人 Y·梁 D·W·吉尔

Antimetastatic Efficacy.《Clinical Cancer

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

Research》.2013,第19卷(第24期),

代理人 孙占华 吴溪

李锋等.双功能抗体药物研究进展.《中国医

药生物技术》.2014,第9卷(第4期),

审查员 曲肖男

权利要求书1页 说明书25页

序列表12页 附图11页

(54) 发明名称

仅有重链的抗ANG-2抗体

(57) 摘要

本发明公开了对ANG-2具有抗原结合特异性的单特异性HCAb抗体和对ANG-2和VEGF或PDGF具有抗原结合特异性的双特异性抗体。

1. 一种对ANG-2具有抗原结合特异性的仅有重链的抗体 (HCAb) , 其中所述HCAb抗体具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列。
2. 一种对ANG-2具有抗原结合特异性的HCAb, 其中所述HCAb可变区 (VH) 具有SEQ ID NO:25的序列。
3. 一种对ANG-2具有抗原结合特异性的HCAb, 其中互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的序列为SEQ ID NO:12、14和16。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的HCAb在制造用于治疗有需要的受试者的眼科病症的药物中的用途, 其中所述眼科病症选自干性年龄相关性黃斑变性、湿性年龄相关性黃斑变性、脉络膜新生血管生成 (CNV) 、近视相关联的脉络膜新生血管生成、血管条纹症、黃斑水肿、视网膜静脉阻塞、异常角膜血管生成、翼状胬肉结膜、视网膜下水肿或视网膜内水肿。
5. 权利要求4所述的用途, 其中所述黃斑水肿为囊样黃斑水肿 (CME) 或糖尿病性黃斑水肿 (DME) 。
6. 根据权利要求4所述的用途, 其中所述异常角膜血管生成是角膜炎、角膜移植、角膜成形术或缺氧的结果。

仅有重链的抗ANG-2抗体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年7月29日提交的美国临时专利申请 62/198,518和2015年8月14日提交的美国临时专利申请62/205,185 的权益,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 背景

[0004] 血管生成,即由已有的脉管形成新血管是引起失明的若干视网膜血管疾病的主要组分,这些视网膜血管疾病诸如为早产儿视网膜病、增殖性糖尿病性视网膜病、糖尿病性黄斑水肿和年龄相关性黄斑变性。眼部新生血管生成是眼睛中血管的异常或过度形成。已经表明眼部新生血管生成与糖尿病性视网膜病变和年龄相关性黄斑变性两者有关。

[0005] 年龄相关性黄斑变性 (AMD) 是老人人群失明的主要原因,并且被视为干性AMD形式和湿性AMD形式。干性或非渗出性形式涉及视网膜色素上皮细胞 (RPE) 的萎缩性改变和肥大性改变两者。干性形式的特征在于黄斑玻璃疣,黄斑玻璃疣是含有死细胞和代谢产物的着色区域,其使视网膜变形并最终引起急性视力丧失。具有非渗出性 AMD (干性形式) 的患者可以发展成湿性或渗出性或新生血管性 AMD,其中病理性脉络膜新生血管膜 (CNVM) 在视网膜下发育,渗漏出流体和血液,并且如果保持不治疗,最终会在相对较短的时间内引起中心致盲的盘状瘢痕。脉络膜新生血管生成 (CNV) 导致视网膜脱离、视网膜下和视网膜内水肿以及瘢痕形成,脉络膜新生血管生成 (CNV) 是新血管自脉络膜毛细血管网中生长穿过布鲁赫膜 (Bruch's membrane) /RPE界面进入神经视网膜中。

[0006] 糖尿病可以以多种方式影响眼睛。糖尿病性视网膜病变 (DR) 是糖尿病的并发症,其由眼睛后部的光敏组织 (视网膜) 的血管损伤引起。起初,糖尿病性视网膜病变可能不会引起症状,或者仅引起轻微的视力问题。然而,最终糖尿病性视网膜病变可能导致失明。糖尿病性黄斑水肿 (DME) 是由于流体从黄斑内血管中渗漏导致的糖尿病中视网膜的肿胀。

[0007] 概要

[0008] 本文公开了对ANG-2具有特异性的单特异性的仅有重链的抗体 (HCAb) 和对ANG-2和PDGF或VEGF具有特异性的双特异性抗体。

[0009] 因此,在一些实施方案中,公开了对ANG-2具有抗原结合特异性的仅有重链的抗体 (HCAb)。在某些实施方案中,HCAb具有SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:24的VH氨基酸序列。

[0010] 在又其他实施方案中,HCAb互补决定区 (CDR) 包含SEQ ID NO:12、14和16。在其他实施方案中,HCAb CDR包含SEQ ID NO:26、27和28。在其他实施方案中,HCAb CDR包含SEQ ID NO:29、30 和31。在其他实施方案中,HCAb CDR包含SEQ ID NO:32、33和 34。在其他实施方案中,HCAb CDR包含SEQ ID NO:35、36和37。

[0011] 本文还公开了对ANG-2具有抗原结合特异性的HCAb,其中CD1 包含GFTFSSYW (SEQ ID NO:12),且其中在1、3、4、5、6位的氨基酸中的一个、两个、三个、四个或全部被任何氨基酸置换。在其他实施方案中,在1、3、4、5、6位的氨基酸中的一个、两个、三个、四个或全部被保守性氨基酸置换。在又其他实施方案中,在1、3、4、5、6位的氨基酸中的一个、两个、三个、四个或全部被相同类别的氨基酸置换。

[0012] 本文还公开了对ANG-2具有抗原结合特异性的HCAb,其中CD2 包含INSDGSST (SEQ ID NO:14),且其中在1、3、6、7或8位的氨基酸中的一个、两个、三个、四个或全部被任何氨基酸置换。在其他实施方案中,在1、3、6、7或8位的氨基酸中的一个、两个、三个、四个或全部被保守性氨基酸置换。在又其他实施方案中,在1、3、6、7或8位的氨基酸中的一个、两个、三个、四个或全部被相同类别的氨基酸置换。

[0013] 本文还公开了对ANG-2具有抗原结合特异性的HCAb,其中CD3 包含AREGYSSGGQFDY (SEQ ID NO:16),且其中在1、10或11位的氨基酸中的一个、两个或全部被任何氨基酸置换。在其他实施方案中,其中在1、10或11位的氨基酸中的一个、两个或全部被保守性氨基酸置换。在又其他实施方案中,其中在1、10或11位的氨基酸中的一个、两个或全部被相同类别的氨基酸置换。

[0014] 本文还公开了人类或人源化抗体,其与HCAb A33A8、A1G2、A1F8、A2B6或A1B1的VH区竞争结合ANG-2。

[0015] 在某些实施方案中,提供了对ANG-2具有第一抗原结合特异性且对VEGF具有第二抗原结合特异性的双特异性抗体。在其他实施方案中,第一抗原结合特异性由A33A8、A1G2、A1F8、A2B6或A1B1 或其VH结构域表示。在又其他实施方案中,第二抗原结合特异性由贝伐单抗 (bevacizumab) 或其VH或VL区表示。在某些实施方案中,第二抗原结合特异性由雷珠单抗 (ranibizumab) 或其VH或VL区表示。

[0016] 还公开了对ANG-2具有第一抗原结合特异性且对PDGF具有第二抗原结合特异性的双特异性抗体。在某些实施方案中,第一抗原结合特异性由A33A8、A1G2、A1F8、A2B6或A1B1 或其VH结构域表示。在其他实施方案中,第二抗原结合特异性由HCAb P36F3表示。

[0017] 本文还公开了治疗眼科病症的方法,其包括向有需要的受试者施用本文公开的具有VH区的HCAb或本文公开的双特异性抗体。

[0018] 本文还公开了本文公开的具有VH区的HCAb或本文公开的双特异性抗体在制造用于治疗有需要的受试者的眼科病症的药物中的用途。

[0019] 在一些实施方案中,眼科病症选自干性(非渗出性)年龄相关性黄斑变性、湿性(渗出性或新生血管性)年龄相关性黄斑变性、脉络膜新生血管生成(CNV)、囊样黄斑水肿(CME)、近视相关联的脉络膜新生血管生成、血管条纹症、糖尿病性黄斑水肿(DME)、黄斑水肿、视网膜静脉阻塞、异常角膜血管生成、翼状胬肉结膜、视网膜下水肿或视网膜内水肿。在一些实施方案中,异常角膜血管生成是导致角膜炎、角膜移植、角膜成形术或缺氧的结果。

[0020] 附图简述

[0021] 图1A描绘了HCAb转基因小鼠 (Harbour Antibodies) 中的人免疫球蛋白基因座。图1B描绘了由HCAb小鼠产生的HCAb抗体结构。

[0022] 图2A-E描绘了包括单结构域VH的若干形式的双特异性抗体(图 2A);双特异性HCAb抗体(图2B和2C);四聚体抗体/VH双特异性抗体(图2D);双特异性Fab/VH抗体(图2E)。第二抗原结合结构域描绘为椭圆形。第二抗原结合结构域的任选位置用星号指示。

[0023] 图3描绘了本文公开的人源化HCAb的基因结构。

[0024] 图4描绘了使用配备有抗hIgG Fc捕集生物传感器尖端和链霉亲和素涂布的生物传感器的fortéBio OCTET® QK^e系统的A33A8人抗 ANG-2HCAb的亲和结合。数据使用 OCTET®数据分析软件6.4进行处理和分析。

[0025] 图5描绘了化学发光ELISA检测由A33A8人抗ANG-2HCAb 的系列稀释液和ANG-2形成的复合物与Tie-2的结合的结果。

[0026] 图6描绘了全细胞结合测定,其中A33A8人抗ANG-2HCAb完全阻断ANG-2与在HEK293细胞上过度表达的Tie-2受体的结合。

[0027] 图7A-D描绘了考马斯 (Coomassie) 蓝染色的PAGE凝胶,如下所示:图7A-图2B的格式的A33A8 (中间带) 和A33A8/P36F3 HCAb双特异性抗体 (P36F3为对PDGF具有特异性的HCAb) ;图7B-仅A33A8 区;图7C-图2D的格式的A33A8/贝伐单抗双特异性抗体;图7D-图 2E的格式的A33A8/雷珠单抗双特异性抗体。

[0028] 图8描绘了使用fortéBio OCTET®QK^e系统的A33A8 VH结合。

[0029] 图9描绘了A33A8/P36F3 HCAb双特异性抗体的结合概况分析 (参见图2B)。

[0030] 图10描绘了使用fortéBio OCTET®QK^e系统的A33A8 VH/雷珠单抗IgG (参见图2D) 结合。

[0031] 图11描绘了双特异性A33A8/雷珠单抗Fab片段的考马斯蓝染色的PAGE凝胶。

[0032] 详细描述

[0033] 本文公开了对ANG-2具有特异性的单特异性的仅有重链的抗体 (HCAb) 和对ANG-2和PDGF或VEGF具有特异性的双特异性抗体。

[0034] 发现人血管生成素-1和人血管生成素-2 (ANG-1和ANG-2 (UniProtKB-015123 (ANGP2_人];SEQ ID NO:1;或者缩写为 ANGPT2或ANG2)) 作为Tie的配体,Tie是在血管内皮内选择性表达的酪氨酸激酶家族。血管生成素家族有四个确定的成员。血管生成素 -3和血管生成素-4 (ANG-3和ANG-4) 可以代表小鼠和人中相同基因座的广泛发散的配对物。ANG-1和ANG-2在组织培养实验中最初分别被鉴别为激动剂和拮抗剂。所有已知的血管生成素主要与Tie-2结合。ANG-1支持内皮细胞 (EC) 存活并促进内皮完整性,而ANG-2具有相反的效果并促进血管在缺乏存活因子VEGF或碱性成纤维细胞生长因子的情况下不稳定和退化。然而,许多关于ANG-2功能的研究提出了更复杂的情况。ANG-2可能是血管重塑的复杂调节子,其在血管发芽和血管退化两者中都起作用。支持ANG-2的这些作用,表达分析揭露ANG-2与VEGF一起在血管生成发芽的成人环境中被快速诱导,而ANG-2在血管退化的环境中在缺乏VEGF的情况下被诱导。与上下文相关的作用一致,ANG-2特异性结合被ANG-1活化的相同内皮细胞特异性受体Tie-2,但对其活化具有上下文相关的效果。

[0035] ANG-1和ANG-2在角膜血管生成测定中具有类似的效果,与 VEGF协同作用以促进新血管的生长。在高浓度下,在通过PI-3激酶和Akt途径活化Tie-2实现血清剥夺细胞凋亡期间ANG-2充当内皮细胞的细胞凋亡存活因子。

[0036] 认为ANG-1的作用在成人中是保守的,ANG-1在成人中广泛且组成性地表达。相比之下,ANG-2表达主要限于血管重塑的位点,认为这阻断了ANG-1的组成性稳定或成熟功能,允许血管恢复到可能更好地响应发芽信号的塑性状态并保持处于塑性状态。

[0037] ANG-2在发育期间在发生血管重塑的位点表达。在成人个体中, ANG-2表达局限于血管重塑的位点以及高度血管化肿瘤中。ANG-2 是出生后血管生成所必需的。在ANG-2基因敲除小鼠中不发生眼内玻璃体脉管的发育性程序性退化,并且其视网膜血管不能从视网膜中央动脉发芽。ANG-2的缺失导致淋巴脉管的模式化和功能的严重缺陷。用ANG-1进行基因拯救纠正了淋巴管,但没有纠正血管生成缺陷。

[0038] 因此,本发明公开了ANG-2的单特异性和双特异性HCAb抗体以及使用所公开的抗体治疗眼科病症的方法。

[0039] 用于治疗疾病的抗体在本领域是公知的。如本文所用,术语“抗体”是指包含一个或多个包含抗原结合位点的多肽链的单体或多聚体蛋白质。抗体特异性结合抗原并且可能能够调节抗原的生物学活性。如本文所用,术语“抗体”可以包括“全长抗体”和“抗体片段”。如本文所用的术语“结合位点”或“抗原结合位点”表示配体实际上结合的抗体分子的一个或多个区。术语“抗原结合位点”包含抗体重链可变结构域(VH)和抗体轻链可变结构域(VL)。

[0040] 抗体特异性是指抗体选择性识别抗原的特定表位。天然抗体例如是单特异性的。如本文所用的术语“单特异性”抗体表示具有一个或多个结合位点的抗体,每个结合位点结合相同抗原的相同表位。本文公开的单价单特异性抗体对ANG-2具有特异性。

[0041] “双特异性抗体”是指具有两种不同的抗原结合特异性的抗体。本文公开的双特异性抗体对ANG-2和VEGF或PDGF具有特异性。

[0042] 如本文所用的术语“价”表示抗体分子中存在指定数目的结合位点。照此,术语“二价”、“四价”和“六价”分别表示抗体分子中存在两个结合位点、四个结合位点和六个结合位点。本文公开的双特异性抗体是“二价”的。然而,单特异性二价抗体在本公开的范围内,其中两个抗原结合位点结合相同抗原。单特异性二价抗体的抗原结合位点可以结合抗原上的相同表位或不同表位。

[0043] 本文中的“全长抗体”是指构成抗体的天然生物形式的结构,包括可变区和恒定区。例如,在包括人和小鼠的大多数哺乳动物中,IgG类的全长抗体是四聚体,并且由两对相同的两条免疫球蛋白链组成,每对具有一条轻链和一条重链,每条轻链包含免疫球蛋白结构域VL和CL,并且每条重链包含免疫球蛋白结构域VH、CH1、CH2和CH3。在一些哺乳动物中,例如在骆驼和美洲驼中,IgG抗体仅由两条重链(HCAb)组成,每条重链包含与Fc区附接的可变结构域(CH2和CH3结构域)。

[0044] 天然抗体结构单元通常包含四聚体。每个四聚体通常由两对相同的多肽链组成,每对多肽链具有一个“轻”链(通常具有约25kDa的分子量)和一个“重”链(通常具有约50-70kDa的分子量)。每条轻链和每条重链由称为可变区和恒定区的两个不同区构成。对于IgG类免疫球蛋白,重链由四个免疫球蛋白结构域组成,这四个免疫球蛋白结构域以VH-CH1-CH2-CH3的顺序从N-末端连接至C-末端,分别指重链可变结构域、重链恒定结构域1、重链恒定结构域2和重链恒定结构域3(也称为VH-C γ 1-C γ 2-C γ 3,分别指重链可变结构域、恒定 γ 1结构域、恒定 γ 2结构域和恒定 γ 3结构域)。IgG轻链由两个免疫球蛋白结构域组成,这两个免疫球蛋白结构域以VL-CL的顺序从N末端连接至C末端,分别指轻链可变结构域和轻链恒定结构域。恒定区示出较小的序列多样性,并且负责结合许多天然蛋白质以便引出重要的生物化学事件。

[0045] 抗体的可变区含有分子的抗原结合决定簇,因此决定了抗体对其目标抗原的特异性。可变区是如此命名的,因为它的序列与同一类别内的其他抗体是最不同的。在可变区中,具有重链和轻链的V结构域中的每一个聚集三个环以形成抗原结合位点。每个环被称为互补决定区(在下文中称为“CDR”),其中氨基酸序列的变化最为显著。总共有6个CDR,每个重链和每个轻链中各3个,命名为VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。

CDR之外的可变区被称为框架(FR)区。尽管不像CDR那么多样,但是在不同抗体之间的FR区中确实出现序列变异性。总体而言,抗体的这种特征性构造提供了稳定的支架(FR区),在该支架上可以通过免疫系统探究实质性的抗原结合多样性(CDR)以获得对于广泛的抗原阵列的特异性。

[0046] 编码免疫球蛋白基因座的基因包含多个V区序列以及命名为“D”和“J”的较短核苷酸序列,并且其是引起VH多样性的V、D和J核苷酸序列的组合。

[0047] 如通过恒定区遗传确定,抗体被分组成也称为同种型的类别。人类恒定轻链分类为κ(Cκ)轻链和λ(Cλ)轻链。重链分类为缪(μ)、德尔塔(δ)、伽马(γ)、阿尔法(α)或伊普西龙(ε),并将抗体的同种型分别定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。IgG类最常用于治疗目的。在人类中,该类别包含亚类IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在小鼠中,该类别包含亚类IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3。IgM具有包括但不限于IgM1和IgM2的亚类。IgA具有包括但不限于IgA1和IgA2的若干亚类。因此,如本文所用的“同种型”是指由免疫球蛋白的恒定区的化学和抗原特征限定的免疫球蛋白的任何类别或亚类。已知的人免疫球蛋白同种型为IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM1、IgM2、IgD和IgE。所公开的HCAb抗体和双特异性抗体可以具有包含上述同种型的全部或一部分的恒定区。

[0048] 另外在本公开的范围内的是包括但不限于如下片段的抗体片段: (i) 包含VL、CL、VH和CH1结构域的Fab片段, (ii) 包含VH和CH1结构域的Fd片段, (iii) 包含单个抗体的VL和VH结构域的Fv片段; (iv) 包含单个可变区的dAb片段, (v) 分离的CDR区, (vi) $F(ab')_2$ 片段, 其为包含两个连接的Fab片段的二价片段, 和 (vii) 单链Fv分子(scFv), 其中VH结构域和VL结构域通过允许两个结构域相关联以形成抗原结合位点的肽连接子连接。在某些实施方案中, 抗体通过重组DNA技术产生。在另外的实施方案中, 抗体通过天然存在的抗体的酶促或化学裂解产生。

[0049] 如本文所用的“人源化”抗体是指包含人框架区(FR)和来自非人(通常是小鼠或大鼠)抗体的一个或多个互补决定区(CDR)的抗体。提供CDR的非人抗体称为“供体”, 并且提供框架的人免疫球蛋白称为“接受体”。在某些实施方案中, 人源化主要依赖于将供体CDR移植到接受体(人)VL和VH框架上。这种策略被称为“CDR移植”。通常需要将选定的接受体框架残基“回复突变”到相应的供体残基以重新获得在初始移植构建体中丧失的亲和力。人源化抗体最佳地还将包含免疫球蛋白恒定区的至少一部分, 通常为人免疫球蛋白的至少一部分, 并且因此通常将包含人Fc区。降低非人抗体可变区的免疫原性的人源化或其他方法可以包括表面重修方法。在一个实施方案中, 可以采用基于选择的方法使抗体可变区人源化和/或亲和力成熟, 即增加可变区对其目标抗原的亲和力。其他人源化方法可以涉及仅移植部分的CDR, 包括但不限于在US 6,797,492中描述的方法, 其关于CDR移植所公开的所有内容通过引用并入本文。基于结构的方法可以用于人源化和亲和力成熟, 例如如US 7,117,096中所述, 其关于人源化和亲和力成熟所公开的所有内容通过引用并入本文。

[0050] 在本文的各种实施方案中, 抗体是仅有重链的抗体(HCAb)。除了正常的重链和轻链抗体(在一个抗体中的2个轻链和2个重链)外, 骆驼科(骆驼、单峰骆驼和美洲驼)还含有单链抗体(仅含有重链)(参见图1B)。这些被称为VHH基因的一组不同的VH片段编码。VH和VHH散布在基因组中(即, 它们似乎彼此混合)。在VH和VHH cDNA中的相同D片段的鉴别提出对于VH和VHH共同使用D片段。天然的含VHH的抗体缺少重链恒定区的整个CH1结构域。编码

CH1结构域的外显子存在于基因组中,但是由于在CH1外显子的5'侧丧失功能性剪接接受体序列而被剪接移出。结果,VDJ区被剪接到CH2 外显子上。当VHH重组到这类恒定区 (CH2、CH3) 上时,产生充当单链抗体(即,两条重链但没有轻链相互作用的抗体)的抗体。抗原的结合不同于常规抗体所见,但是以相同的方式实现高亲和力,即通过可变区的超突变和表达这类高亲和力抗体的细胞的选择实现高亲和力。

[0051] 在一个示例性实施方案中,所公开的HCAb通过使转基因小鼠免疫产生,其中已经消除了内源性鼠抗体表达并且引入了人转基因(参见图1A)。HCAb小鼠公开在US8,883,150、US8,921,524、US8,921,522、US8,507,748、US8,502,014、US 2014/0356908、US2014/0033335、US2014/0037616、US2014/0356908、US2013/0344057、US2013/0323235、US2011/0118444和US2009/0307787中,它们关于仅具有重链的抗体及其在转基因小鼠中的产生所公开的所有内容都通过引用并入本文。使HCAb小鼠免疫,且将得到的致敏脾细胞与鼠骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤。然后可以通过用人序列替换鼠CH2 和CH3区来使得到的HCAb完全人化。

[0052] 本文还公开了其中两个抗原结合结构域在单个双特异性分子中接合的双功能抗体。双功能抗体可以采取许多形式,包括(i) 双特异性Fv片段(图2A);(ii) 具有与具有第二特异性的第二VH结构域相关联的第一特异性的HCAb(图2B和2C);(iii) 具有与具有第二特异性的第二VH结构域相关联的第一特异性的四聚体单克隆抗体,其中第二VH结构域与第一VH结构域相关联(图2D);和(iv) 具有与具有第二特异性的第二VH结构域相关联的第一特异性的Fab片段(VH-CH1/VL/CL)(图2E)。示例性Fab片段描绘在图2E中,其中具有第二特异性的第二VH序列与第一VH结构域的C-末端或N-末端或者第一CH1或第一CL结构域的C-末端或N-末端相关联。在也描绘在图2E中的另外实施方案中,具有第二特异性和/或第三特异性的VH序列可以与第一VH结构域的C-末端或N-末端或者第一CH1 或第一CL结构域的C-末端或N-末端相关联。

[0053] 双特异性抗体可以包括将ANG-2特异性抗体如A33A8的序列连接至具有第二特异性的VH区的连接子序列,其允许序列恰当折叠以产生期望的三维构象和抗原结合概况。合适的连接子包括但不限于 EPKSCD (SEQ ID NO:2)、ASTKGP (SEQ ID NO:3) 和 (GGGGS)_n (SEQ ID NO:4),其中n为0至8的整数。在一个实施方案中,n为1。

[0054] 本文公开的双特异性抗体是包含对ANG-2的第一特异性的二价体,并且第二特异性可以包括但不限于血管内皮生长因子(VEGF) 和血小板衍生的生长因子(PDGF)。在本公开的范围内的是双特异性抗体,其中第一特异性和第二特异性独立地为ANG-2、VEGF或PDGF,唯一的限制是第一特异性和第二特异性不能相同。

[0055] 哺乳动物中的VEGF家族由五个成员组成:VEFG-A、胎盘生长因子(PGF)、VEGF-B、VEGF-C和VEGF-D。VEGF家族的所有成员通过结合到在细胞表面上的酪氨酸激酶受体(VEGFR) 来刺激细胞应答,促使其通过转磷酸化而二聚化并被活化,尽管其位点、时间和程度不同。VEGF受体具有由7个免疫球蛋白样结构域组成的细胞外部分、单个跨膜区和含有分裂酪氨酸-激酶结构域的细胞内部分。VEGF-A结合VEGFR-1 (F1t-1) 和VEGFR-2 (KDR/F1k-1)。VEGFR-2 似乎介导几乎所有的对VEGF的已知细胞应答。虽然认为VEGFR-1 调节VEGFR-2 信号转导,但VEGFR-1的功能尚不明确。VEGFR-1 的另一功能可能是充当虚拟/诱饵受体,从VEGFR-2结合中隔离 VEGF(这在胚胎中的血管生成期间似乎特别重要)。VEGF-C和 VEGF-D,

但不是VEGF-A,是介导淋巴管生成的第三受体(VEGFR-3/F1t4)的配体。受体(VEGFR-3)是主要配体(VEGF-C和VEGF-D)的结合位点,其介导配体在目标细胞上的永久作用和功能。VEGF-C刺激淋巴管生成(经由VEGFR-3)且经由VEGFR-2刺激血管生成。VEGF-A是232个氨基酸的序列(UniProtKB-P15692)。

[0056] PDGF在血管形成(血管生成)中起重要作用,该血管形成是从已经存在的血管组织中生长血管。PDGF是间质来源的细胞的有效促细胞分裂剂,这些细胞包括成纤维细胞、平滑肌细胞和神经胶质细胞。PDGF是由两个A(-AA)或两个B(-BB)亚基或者两者的组合(-AB)组成的二聚糖蛋白。A亚基为211个氨基酸的序列(UniProtKB-P04085),并且B亚基为241个氨基酸的序列(UniProtKB-P01127)。因此,在多个实施方案中,公开了对PDGF-AA、PDGF-BB和/或PDGF-AB或其片段具有特异性的抗体。在小鼠和人两者中,PDGF信号传导网络由四种配体PDGFA-D和两种受体PDGFR α 和PDGFR β (受体酪氨酸激酶)组成。所有PDGF都作为分泌的二硫化物连接的同二聚体发挥功能,但是只有PDGFA和PDGFB可以形成功能异二聚体。

[0057] 因此,本文公开了对ANG-2具有特异性的HCAb和对ANG-2和PDGF两者都具有特异性或者对ANG-2和VEGF两者都具有特异性的双特异性抗体。在其他实施方案中,ANG-2/VEGF双特异性抗体是由本文公开的人抗ANG-2HCAb抗体A33A8和任何人或人源化VEGF特异性抗体的VH和/或VL区形成的双特异性抗体。VEGF特异性抗体可以包括但不限于US7,297,334、US6,884,879、US8,945,552、W01998045331、US20150175689和US20090142343中公开的抗体。示例性的人源化抗VEGF抗体为贝伐单抗和雷珠单抗。

[0058] 在某些实施方案中,ANG-2/VEGF双特异性抗体是由本文公开的人抗ANG-2HCAb抗体A33A8和贝伐单抗(**AVASTIN**[®],Genentech)的VH和/或VL区形成的双特异性抗体。贝伐单抗的氨基酸序列在US7,297,334中公开,其关于抗VEGF抗体的氨基酸序列所公开的所有内容都通过引用并入本文。在某些实施方案中,贝伐单抗的VH序列为EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAP GKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFRRFTFSLDTSKSTAYLQMNS LRAE DTAVYYCAKYYPHYGGSSHWYFDVWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:5),并且贝伐单抗的VL序列为DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPS RFSGS GSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:6)。

[0059] 在某些实施方案中,ANG-2/VEGF双特异性抗体是由本文公开的人抗ANG-2HCAb抗体A33A8和雷珠单抗(**LUCENTIS**[®],Genentech)的VH和/或VL区形成的双特异性抗体。雷珠单抗的氨基酸序列在US6,884,879中公开,其关于抗VEGF抗体的氨基酸序列所公开的所有内容都通过引用并入本文。在某些实施方案中,雷珠单抗的VH序列为EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFT HYGMNWRQ APGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFRRFTFSLDT SKSTAYLQM NSLRAEDTAVYYCAKYPPYYGTSHWYFDVWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:7),并且雷珠单抗的VL序列为DIQLTQSPSSLSASVGDR VTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSL HSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:8)。

[0060] 在其他实施方案中,ANG-2/PDGF双特异性抗体是由本文公开的人抗ANG-2HCAb抗体A33A8和任何人或人源化PDGF特异性抗体的VH和/或VL区形成的双特异性抗体。示例性的人源化抗VEGF抗体在W02014/072876、W02005087812和W02014109999中公开,其关于任何PDGF抗体所公开的所有内容通过引用并入本文。示例性PDGF抗体还公开在2015年8月14日提交的共同未决的美国专利申请62/205,191和2016年5月9日提交且代理人案卷号为19864

(NTB) 的共同未决的美国专利申请62/333,772中,其关于任何PDGF抗体所公开的内容通过引用并入本文。

[0061] 同样在本公开的范围内的是人抗ANG-2单特异性或双特异性抗体的氨基酸序列变体通过将适当的核苷酸改变引入抗体DNA中或通过肽合成来制备。此类变体包括例如本文实施例的抗体的氨基酸序列内的残基的缺失和/或插入和/或置换。对缺失、插入和置换进行任何组合以获得最终构建体,其限制条件为最终构建体具有所需特征。氨基酸改变还可以改变人源化或变体抗体的转译后过程,诸如改变糖基化位点的数目或定位。

[0062] 鉴别作为诱变的优选位置的抗体的某些残基或区的有用方法称为“丙氨酸扫描诱变”。鉴别残基或一组目标残基(例如,带电荷残基,诸如Arg、Asp、His、Lys和Glu)且替换为中性或带负电荷氨基酸(最优先丙氨酸或聚丙氨酸)以影响氨基酸与抗原的相互作用。那些展示对置换的功能敏感性的氨基酸位置然后通过在置换位点处或为置换位点引入进一步或其他的变体而精修。因此,虽然用于引入氨基酸序列变异的位点是预先确定的,但突变本身的性质不需要预先确定。例如,为了分析给定位点处突变的性能,在目标密码子或区进行丙氨酸扫描或随机诱变,并且对于所需活性筛选表达的抗体变体。

[0063] 氨基酸序列插入包括长度在一个残基至含有一百个或更多个残基的多肽的范围内的氨基末端和/或羧基末端融合,以及具有单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N-末端甲硫氨酸残基的抗ANG-2抗体或与附加表位融合的抗体。抗体分子的其他插入变体包括抗体的N-末端或C-末端与增加抗体的血清半衰期的酶或多肽的融合。

[0064] 另一类型的变体为氨基酸置换变体。这些变体具有在抗体分子中除去的至少一个氨基酸残基和在其位置中插入的不同残基。对置换诱变最为关注的位点包括高变区,但也考虑了FR改变。保守性置换在表1中在“优选置换”的标题下示出(该栏中所示的氨基酸在置换原始残基栏中所示的氨基酸时被称为“保守性氨基酸”)。如果此类置换导致生物学活性的改变,则可以引入表1中称为“示例性置换”或如下文参考氨基酸类别进一步描述的更实质性的改变,并且筛选产物。

[0065] 表1

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

[0066]

[0067] 通过选择置换实现抗体的生物学性质的实质性修饰,这些置换在其维持 (a) 置换区域中多肽主链的结构,例如作为片或螺旋构象, (b) 分子在目标位点的电荷或疏水性,或 (c) 侧链的本体方面的效果显著不同。根据常见的侧链性质将天然存在的残基分成如下组:

[0068] (1) 疏水性: 正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0069] (2) 中性亲水性: Cys、Ser、Thr;

[0070] (3) 酸性: Asp、Glu;

[0071] (4) 碱性: Asn、Gln、His、Lys、Arg;

[0072] (5) 影响链取向的残基: Gly、Pro; 以及

[0073] (6) 芳族: Trp、Tyr、Phe。

[0074] 非保守性置换将需要将这些类别中的一类的成员更换成另一类别。

[0075] 不涉及维持单特异性或双特异性抗ANG-2抗体的适当构象的任何半胱氨酸残基也可以通常用丝氨酸置换,以改善分子的氧化稳定性并防止异常交联。相反地,可以将一个或多个半胱氨酸键添加到抗体中以改善其稳定性(特别是在抗体是抗体片段如Fv片段的情况下)。

[0076] 另一类型的置换变体涉及置换亲本抗体(例如,人源化抗体或人抗体)的一个或多个高变区残基。一般来讲,选择用于进一步研发的一种或多种所得变体相对于产生它们的亲本抗体将具有改善的生物学性质。产生这种置换变体的便利方式是使用噬菌体展示的亲

和力成熟。简而言之,使若干高变区位点(例如,6-7个位点)突变以在每个位点处产生所有可能的氨基酸置换。如此产生的抗体变体以来自丝状噬菌体粒子的单价样式展示为与每个粒子内包装的M13的基因III 产物的融合物。然后对于如本文所公开的噬菌体展示的变体的生物学活性(例如,结合亲和力)来筛选噬菌体展示的变体。为了鉴别待修饰的候选高变区位点,可以执行丙氨酸扫描诱变以鉴别显著促成抗原结合的高变区残基。另选地或除此之外,分析抗原-抗体复合物的晶体结构以鉴别在抗体与人ANG-2之间的接触点可能是有益的。此类接触残基和相邻残基是用于根据本文阐述的技术的置换的候选物。一旦产生这样的变体,就对变体组进行如本文所述的筛选,并且可以选择在一个或多个相关测定中具有优异性质的抗体用于进一步的研发。

[0077] 抗体的另一类型的氨基酸变体改变抗体的原始糖基化模式。改变是指缺失在抗体中见到的一个或多个碳水化合物部分,和/或添加在抗体中不存在的一个或多个糖基化位点。

[0078] 抗体的糖基化通常是N-连接或O-连接的。N-连接是指碳水化合物部分与天门冬酰胺残基的侧链附接。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸是碳水化合物部分酶促附接到天冬酰胺侧链的识别序列,其中X是除脯氨酸之外的任何氨基酸。因此,在多肽中存在这些三肽序列中的任一个产生一个潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化是指糖N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一附接到羟氨基酸,最常见的是丝氨酸或苏氨酸,尽管也可以使用5-羟基脯氨酸或5-羟基赖氨酸。

[0079] 糖化位点添加至抗体通过改变氨基酸序列以使得其含有上述三肽序列中的一个或多个来便利地实现(对于N-连接的糖化位点)。改变也可以通过向原始序列添加或置换一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来实现(对于O-连接的糖基化位点)。

[0080] 编码单特异性或双特异性抗ANG-2抗体的氨基酸序列变体的核酸分子通过本领域已知的多种方法制备。这些方法包括但不限于从天然来源中分离(在天然存在的氨基酸序列变体的情况下)或通过抗ANG-2抗体的早期制备的变体或非变体型式的低聚核苷酸介导(或定点)诱变、PCR诱变和盒式诱变制备。

[0081] 预期单特异性或双特异性抗ANG-2抗体的其他修饰。例如,期望关于效应子功能修饰抗体以例如增强抗体治疗疾病的有效性。例如,可以将一个或多个半胱氨酸残基引入Fc区中,由此允许在该区中形成链间二硫键。如此产生的同二聚抗体可以具有改善的内化能力和/或增加的补体介导的细胞杀伤性和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。具有增强的抗肿瘤活性的同二聚抗体也可以使用异双官能交联剂制备。或者,可以工程改造具有双Fc区的抗体且由此其可以具有增强的补体溶解和ADCC能力。

[0082] 本文还公开了免疫缀合物,其包含与诸如化学治疗剂的细胞毒性剂、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)或放射性同位素(即,放射缀合物)缀合的本文描述的抗体。

[0083] 已经描述了可用于产生所述免疫缀合物的化学治疗剂。可以使用的酶活性毒素及其片段包括白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素A链、肉毒杆菌毒素、相思豆毒素A链、蓖麻根毒素A链、 α -吊曲菌素、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、石竹素(*dianthin*)蛋白、美洲商陆(*Phytolaca americana*)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*momordica charantia*)抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂

草(sapaonaria officinalis)抑制剂、白树毒素(gelonin)、丝裂吉菌素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、伊诺霉素(enomycin)和单端孢霉烯(trichothecene)。多种放射性核素可用于产生放射缀合的单特异性或双特异性抗ANG-2抗体。实例包括²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y和¹⁸⁶Re。

[0084] 抗体和细胞毒素剂的缀合物使用多种双官能蛋白偶合剂制成,这些双官能蛋白偶合剂诸如为N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯(SPDP)、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯的双官能衍生物(诸如二亚胺代己二酸二甲酯HCL)、活性酯(诸如辛二酸二琥珀酰亚胺基酯)、醛(诸如戊二醛)、双-叠氮基化合物(诸如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双-重氮衍生物(诸如双-(对重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双-活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。碳-14标记的1-异硫氰酸苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与抗体缀合的示例性螯合剂。

[0085] 在另一实施方案中,抗体可以与“受体”(诸如抗生蛋白链菌素(streptavidin))缀合以用于预靶向中,其中向患者施用抗体-受体缀合物,随后使用清除剂从循环中除去未结合的缀合物且然后施用与细胞毒性剂(例如,放射性核素)缀合的“配体”(例如,抗生蛋白(avidin))。

[0086] 本文公开的单特异性或双特异性抗ANG-2抗体也可以在脂质体中配制。含有抗体的脂质体通过本领域已知的方法制备,诸如在US4,485,045、US4,544,545和US5,013,556中所述。特别可用的脂质体可以通过用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物的反相蒸发法产生。脂质体通过具有界定的孔径的过滤器挤出以产生具有所需直径的脂质体。抗体的Fab'片段可以经由二硫键交换反应缀合到脂质体。

[0087] 单特异性或双特异性抗ANG-2抗体的共价修饰也包括在本公开的范围内。如果适用的话,它们可以通过化学合成或通过酶促或化学裂解抗体来制备。抗体的其他类型的共价修饰通过使抗体的靶向氨基酸残基与能够与选定的侧链或N-末端或C-末端残基反应的有机衍生剂反应引入分子中。多肽的示例性共价修饰描述在US5,534,615中,其关于多肽的共价修饰所公开的所有内容以引用的方式特别地并入本文。抗体的共价修饰的示例性类型包括以在US4,640,835、US4,496,689、US4,301,144、US4,670,417、US4,791,192或US4,179,337中所述的方式将抗体连接至各种非蛋白质聚合物(例如,聚乙二醇、聚丙二醇或聚氧化烯)中的一种。

[0088] 本文公开的单特异性和双特异性抗体可以通过重组手段产生。因此,本文公开了编码抗体的核酸、含有编码抗体的核酸的表达载体以及含有编码抗体的核酸的细胞。用于重组产生的方法在现有技术状态中广泛已知并且包含在原核和真核细胞中进行蛋白质表达,随后分离抗体且通常纯化到药学上可接受的纯度。为了在宿主细胞中表达上述抗体,通过标准方法将编码抗体序列的核酸插入表达载体中。在适当原核或真核宿主细胞如CHO细胞、NS0细胞、SP2/0细胞、HEK293细胞、COS细胞、PER.C6细胞、酵母或大肠杆菌(E.coli)细胞中执行表达,且从细胞(溶解后的上清液或细胞)中回收抗体。

[0089] 因此,本文公开的某些实施方案包括用于制备单特异性或双特异性抗体的方法,其包括以下步骤:a)用包含编码抗体的核酸分子的至少一种表达载体转化宿主细胞;b)在允许合成抗体分子的条件下培养宿主细胞;和c)从培养物中回收所述抗体分子。

[0090] 抗体通过常规免疫球蛋白纯化程序如蛋白质A-琼脂糖、羟磷灰石色谱、凝胶电泳、

透析或亲和色谱从培养基中适当地分离。

[0091] 如本文使用,表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换地使用,并且所有这些名称均包括子代。因此,词语“转化体”和“转化的细胞”包括原代受试细胞以及源自其的培养物,而不考虑转移次数。还应理解,由于有意或无意的突变,所有子代的DNA含量可能不完全相同。包括与经过筛选用于原始转化细胞具有相同功能或生物学活性的变体子代。在预期不同名称的情况下,从上下文中可以清楚地看出。

[0092] 本文所用的术语“转化”是指载体/核酸转移到宿主细胞中的过程。如果使用没有强大的细胞壁屏障的细胞作为宿主细胞,则可以例如通过磷酸钙沉淀法进行转染。然而,也可以使用将DNA引入细胞中的其他方法,诸如通过核注射或通过原生质体融合。如果使用原核细胞或含有大量细胞壁构造的细胞,则例如一种转染方法是使用氯化钙的钙处理。

[0093] 如本文所用,“表达”是指核酸转录成mRNA的过程和/或转录的 mRNA(也称作转录物)随后转译成肽、多肽或蛋白质的过程。转录物和编码的多肽统称为基因产物。如果多核苷酸来源于基因组DNA,则在真核细胞中的表达可能包括mRNA的剪接。

[0094] “载体”为核酸分子,特别是自我复制,其将插入的核酸分子转移到宿主细胞中和/或在宿主细胞之间转移插入的核酸分子。该术语包括主要起将DNA或RNA插入细胞中(例如,染色体整合)的作用的载体、主要起复制DNA或RNA的作用的载体复制、以及起转录和/或转译DNA或RNA的作用的表达载体。还包括提供多于一种上述功能的载体。

[0095] “表达载体”是在引入到适当宿主细胞中时可以转录且转译成多肽的多核苷酸。“表达系统”通常是指由可以起产生所需表达产物的作用的表达载体组成的适合宿主细胞。

[0096] 如本文所用的术语“宿主细胞”表示可以工程改造以产生本文公开的抗体的任何种类的细胞系统。在一个实施方案中,HEK293细胞和CHO细胞用作宿主细胞。

[0097] 适于原核生物的控制序列例如包括启动子,任选地操纵子序列,和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、增强子和聚腺苷酸化信号。

[0098] 当核酸与另一核酸序列处于功能性关系中时,该核酸为“可操作地连接”的。例如,序列前体或分泌前导序列的DNA在其表达为参与多肽的分泌的蛋白质前体的情况下可操作地连接到多肽的DNA;启动子或增强子在其影响编码序列的转录的情况下可操作地连接到该编码序列;或核糖体结合位点在其位置促进转译的情况下可操作地连接到编码序列。一般来说,“可操作地连接”是指所连接的DNA序列是连续的,并且在分泌性前导序列的情况下是连续的且在阅读框中。然而,增强子不必是连续的。连接是通过在适宜的限制位点处连接来实现。如果所述位点不存在,则根据常规实践使用合成的低聚核苷酸转接头或连接子。

[0099] 本文还公开了编码单特异性或双特异性人抗ANG-2抗体的分离的核酸、包含这些核酸的载体和宿主细胞以及用于产生抗体的重组技术。

[0100] 对于抗体的重组产生,可以分离编码它的核酸并将该核酸插入到可复制的载体中以进一步克隆(扩增DNA)或表达。在一些实施方案中,抗体可以通过同源重组产生,例如,如US5,204,244中所述,其关于抗体产生所公开的全部内容通过引用特别地并入本文。编码抗体的DNA可容易地分离并且使用常规程序(例如,通过使用能够特异性结合编码抗体的重链和轻链的基因的低聚核苷酸探针)来测序。许多载体都是可用的。载体组分通常包括但不限于以下的一种或多种:信号序列、复制起点、一种或多种标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列,例如如US5,534,615中所述,其关于蛋白质表达所公开的所有内容通过引用特

别地并入本文。

[0101] 用于在本文中的载体中克隆或表达DNA的合适宿主细胞是上述的原核生物、酵母或高等真核生物细胞。用于此目的的合适原核生物包括真细菌,诸如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体,例如肠杆菌科 (Enterobacteriaceae),诸如埃希氏菌属(*Escherichia*) (例如大肠杆菌)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、克雷伯菌属 (*Klebsiella*)、变形杆菌属 (*Proteus*)、沙门菌属 (*Salmonella*) (例如鼠伤寒沙门菌 (*Salmonella typhimurium*))、沙雷菌属(*Serratia*) (例如粘质沙雷菌 (*Serratia marcescans*)) 和志贺菌属 (*Shigella*),以及芽孢杆菌属 (*Bacillus*) (诸如枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 和地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*))、假单胞菌属(*Pseudomonas*) (诸如绿脓杆菌 (*P. aeruginosa*)) 以及链霉菌属 (*Streptomyces*)。一种示例性大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌294 (ATCC 31, 446),尽管诸如大肠杆菌B、大肠杆菌 X1776 (ATCC 31,537) 和大肠杆菌W3110 (ATCC 27, 325)的其他菌株也是合适的。这些实例是说明性的而非限制性的。

[0102] 除了原核生物之外,诸如丝状真菌或酵母的真核微生物是用于单特异性或双特异性人抗ANG-2抗体编码载体的合适克隆或表达宿主。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 或普通面包酵母是低等真核宿主微生物中最常用的。然而,许多其他属、种和菌株是常用的并且在本文中可用,诸如栗酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) ;克鲁维酵母 (*Kluyveromyces*) 宿主,例如乳酸克鲁维酵母 (*K. lactis*)、脆壁克鲁维酵母 (*K. fragilis*) (ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母 (*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)、克氏乳酸克鲁维酵母 (*K. wickeramii*) (ATCC 24,178)、克鲁维酵母菌 (*K. waltii*) (ATCC 56, 500)、果蝇克鲁维酵母 (*K. drosophilae*) (ATCC 36,906)、耐热克鲁维酵母 (*K. thermotolerans*) 和马克斯克鲁维酵母 (*K. marxianus*) ;耶氏酵母属 (*Yarrowia*) (EP 402,226);巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) (EP 183,070);假丝酵母 (*Candida*) ;里氏木霉 (*Trichoderma reesiae*) (EP 244,234);粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) ;许旺氏酵母 (*Schwanniomyces*),诸如西方许旺酵母 (*Schwanniomyces occidentalis*) ;和丝状真菌,诸如脉孢菌属 (*Neurospora*)、青霉属 (*Penicillium*)、木霉菌 (*Tolypocladium*) 和曲霉属 (*Aspergillus*) 宿主,诸如构巢曲霉 (*A. nidulans*) 和黑曲霉 (*A. niger*)。

[0103] 用于表达糖基化单特异性或双特异性人抗ANG-2抗体的合适宿主细胞来源于多细胞生物体,包括无脊椎动物细胞,诸如植物和昆虫细胞。已经鉴别出许多来自以下宿主的杆状病毒菌株和变体以及相应的容许昆虫宿主细胞:诸如草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) (毛虫)、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) (蚊子)、白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) (蚊子)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) (果蝇) 以及家蚕 (*Bombyx mori*)。用于转染的多种病毒株是公众可得的,例如苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa californica*) NPV的L-1变体和家蚕NPV的Bm-5株,并且这样的病毒可以用作根据本发明的本文中的病毒,特别是用于转染草地夜蛾细胞。棉花、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛花、番茄和烟草的植物细胞培养物也可以用作宿主。

[0104] 然而,脊椎动物细胞最受关注,并且脊椎动物细胞在培养物(组织培养物)中的繁殖已成为常规程序。可用的哺乳动物宿主细胞系的实例是由SV40转化的猴肾CV1株系 (COS-7, ATCC CRL 1651);人胚肾株系(293细胞或被亚克隆以在悬浮培养物中生长的293细胞);幼小仓鼠肾细胞 (BHK, ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞 /-DHFR (CHO);小鼠塞尔托利细胞

(sertoli cell) (TM4)；猴肾细胞 (CV1 ATCC CCL 70)；非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587)；人宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL 2)；犬肾细胞 (MDCK, ATCC CCL 34)；水牛大鼠肝细胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442)；人肺细胞 (W138, ATCC CCL 75)；人肝细胞 (Hep G2, HB 8065)；小鼠乳腺肿瘤 (MMT 060562, ATCC CCL51)；TRI细胞；MRC 5细胞；FS4细胞；和人肝细胞瘤株系 (Hep G2)。

[0105] 宿主细胞用用于单特异性或双特异性抗ANG-2抗体产生的上述表达载体转化，并在适当修饰以诱导启动子、选择转化体或扩增编码所需序列的基因的常规营养培养基中培养。

[0106] 用于产生单特异性或双特异性人抗ANG-2抗体的宿主细胞可以在多种培养基中培养。诸如Ham's F10 (Sigma)、最低必需培养基 (Minimal Essential Medium) ((MEM) , (Sigma)、RPMI-1640 (Sigma) 和杜氏改良依格氏培养基 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ((DMEM) , Sigma) 等可商购获得的培养基适用于培养宿主细胞。此外，US4,767,704、US4,657,866、US4,927,762、US4,560,655或US5,122,469、WO 90/03430、WO 87/00195或US Re.30,985可以用作宿主细胞的培养基。必要时，任何这些培养基都可以补充有激素和/或其他生长因子 (诸如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐 (诸如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲剂 (诸如HEPES)、核苷酸 (诸如腺苷和胸苷)、抗生素 (诸如GENTAMYCINTM)、痕量元素 (定义为通常以在微摩尔范围内的最终浓度存在的无机化合物) 以及葡萄糖或等效能量来源。还可以包括本领域技术人员已知的适当浓度的任何其他必需补充剂。培养条件如温度、pH等为先前与选用于表达的宿主细胞一起使用的那些条件，并且对普通技术人员将是显而易见的。

[0107] 在使用重组技术时，抗体可以产生在细胞内、在周质空间中，或直接分泌到培养基中。如果抗体产生在细胞内，那么作为第一步骤，例如通过离心或超滤除去特定碎片 (宿主细胞或裂解的片段)。

[0108] 由细胞制备的抗体组合物可以使用例如羟磷灰石色谱、凝胶电泳、透析和亲和色谱进行纯化，其中亲和色谱是优选的纯化技术。蛋白质A作为亲和配体的适合性取决于存在于抗体中的任何免疫球蛋白Fc结构域的种类和同种型。蛋白质A可以用于纯化基于人 γ 1、 γ 2 或 γ 4重链的抗体。蛋白质G被推荐用于所有小鼠同种型和人 γ 3。亲和配体所附接的基质最通常为琼脂糖，但是也可用其他基质。机械稳定的基质，诸如受控孔隙度的玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯，允许比使用琼脂糖可以实现的流动速率快的流动速率和比使用琼脂糖可以实现的处理时间短的处理时间。在抗体包含CH3结构域的情况下，Bakerbond ABXTM树脂可用于纯化。根据待回收的抗体，可以使用用于蛋白质纯化的其他技术，诸如在离子交换柱上分馏、乙醇沉淀、反相HPLC、在二氧化硅上的色谱、在肝素SEPHAROSETM上的色谱、在阴离子或阳离子交换树脂 (诸如聚天冬氨酸柱) 上的色谱、色谱聚焦、SDS-PAGE和硫酸铵沉淀。

[0109] 在一个或多个任何初步纯化步骤之后，包含所关注的抗体和污染物的混合物可以使用pH介于约2.5-4.5之间的洗脱缓冲液进行低pH 疏水相互作用色谱，优选在低盐浓度 (例如，约0-0.25M盐) 下执行。

[0110] 本文还公开了使用单特异性和双特异性人抗ANG-2抗体来治疗眼科病症的方法。眼科病症的实例包括但不限于干性 (非渗出性) 年龄相关性黄斑变性、湿性 (渗出性或新生血管性) 年龄相关性黄斑变性、脉络膜新生血管生成 (CNV)、囊样黄斑水肿 (CME)、近视相关

联的脉络膜新生血管生成、血管条纹症、糖尿病性黄斑水肿(DME)、黄斑水肿、由于视网膜静脉阻塞引起的黄斑水肿和眼睛前的血管生成,如在例如角膜炎、角膜移植或角膜成形术后的角膜血管生成,由于缺氧(广泛的隐形眼镜磨损)引起的角膜血管生成、翼状胬肉结膜、视网膜下水肿和视网膜内水肿。

[0111] 黄斑变性,也称为年龄相关性黄斑变性,是美国50岁或年龄更大的那些人的视力丧失的最常见原因,并且它的患病率随着年龄而增加。AMD被分类为湿性(新生血管性)或干性(非新生血管性)。该疾病的干性形式是最常见的。它在中央视网膜已经扭曲、着色或最常见的变薄时发生,这是与视网膜色素上皮的萎缩和黄斑感光体的丧失相关联的过程。结果是中央地图样萎缩。该疾病的湿性形式造成了最严重的视力丧失。湿性形式通常与老化相关联,但是可以引起湿性黄斑变性的其他疾病包括严重近视和一些眼内感染如组织胞浆菌病,所述疾病可能在患有AIDS的个体中恶化。湿性形式的特征为异常血管生长穿过视网膜色素上皮,从而导致出血、渗出、瘢痕形成或视网膜脱离。

[0112] 本文公开了用于治疗眼部病症的单特异性和双特异性人抗ANG-2抗体的持续释放制剂。因此,单特异性和双特异性人抗ANG-2抗体可以在3-6个月的时间内从持续释放药物递送系统释放到玻璃体中,以提供慢性眼病如干性AMD的长期治疗。

[0113] 水凝胶为在水中或其他水性介质中作为分散液形成的胶状凝胶。因此,水凝胶在形成胶体时形成,其中分散相(聚合物)与连续相(即水)结合以产生粘性果冻状产物;例如凝结的硅酸。水凝胶是通过化学或物理键合交联的亲水性聚合物链的三维网络。由于聚合物链的亲水性质,水凝胶吸收水并溶胀(除非它们已经吸收了最大量的水)。溶胀过程与非交联亲水性聚合物的溶解相同。根据定义,水构成水凝胶总重量(或体积)的至少10%。

[0114] 水凝胶的实例包括合成聚合物,诸如聚甲基丙烯酸羟乙酯和化学上或物理上交联的聚乙烯醇、聚丙烯酰胺、聚(N-乙烯基吡咯烷酮)、聚氧化乙烯和水解的聚丙烯腈。作为有机聚合物的合适水凝胶的实例包括共价或离子交联的多糖基水凝胶,诸如海藻酸的多价金属盐、果胶、羧甲基纤维素、肝素、透明质酸酯和来自壳多糖、壳聚糖、支链淀粉、结冷胶和黄原胶的水凝胶。在本实验中使用的特定水凝胶是纤维素化合物(即,羟丙基甲基纤维素[HPMC])和高分子量透明质酸(HA)。

[0115] 在一些实施方案中,公开了使用聚合透明质酸和本文公开的单特异性和/或双特异性人抗ANG-2抗体的用于玻璃体内注射的水凝胶制剂。该药物递送系统可以在3至6个月的时间内提供每日低剂量的单特异性和双特异性人抗ANG-2抗体的持续释放,并防止从干性AMD到湿性AMD的转化。药物递送系统还可以包含在水凝胶中的单特异性和双特异性人抗ANG-2抗体的微球封装。持续释放药物递送系统可以在眼睛中提供必要的抗ANG-2阻断,以减少从干性AMD发展到新生血管性AMD的机会。此外,在眼中长时间释放的低剂量不会提供全身毒性水平的试剂。

[0116] 持续释放药物递送系统还可以用于在处于新生血管生成的风险中的具有视网膜中央静脉阻塞的患者和处于发展到新生血管性疾病的风险中的具有严重非增殖性糖尿病性视网膜病变的患者中提供持续释放抗ANG-2阻断。

[0117] 另选地,药物递送系统可以是PLGA植入物、任选地包埋在交联的透明质酸中的脂质体包封的抗体。另外,微球、微胶囊(范围为0.001微米至100微米)和脂质体具有改性表面以与水凝胶聚合物产生相互作用,从而改变释放。

[0118] 本文还涵盖特定药物递送系统制剂和用于施用这些药物递送系统以治疗眼科病况的方法。眼内给药可以通过植入或注射到眼睛的玻璃体腔(后房)中进行。在本公开的范围内的药物递送系统可以是生物可降解的植入物和/或微球。药物递送系统可以是整体式的,即活性剂均匀地分布或分散在整个生物可降解的聚合物中。治疗剂可以根据本发明制成的药物递送系统释放约2小时至12个月或更长的时间。药物递送系统的一个重要特点是它们不包括用于将药物递送系统固定到其施用的眼内位置的任何手段(诸如帽、突起或缝合片)。

[0119] 本公开范围内的药物递送系统的重要特征是其可以被植入或注射到眼内位置(诸如前筋膜囊下、结膜下、玻璃体内或脉络膜上的位置)以提供治疗剂的持续释放,而在眼内植入或注射位点处或附近没有发生或持续显著的免疫原性。

[0120] 聚交酯(PLA)聚合物以两种化学形式:聚(L-丙交酯)和聚(D,L-丙交酯)存在。纯的聚(L-丙交酯)是区域规则的,因此也是高度结晶的,因此在体内以非常低的速率降解。聚(D,L-丙交酯)是导致在体内更迅速降解的随机区(regiorandom)。因此,作为主要是聚(L-丙交酯)且其余是聚(D-丙交酯)的混合物的PLA聚合物将在体内以比主要是聚(D-丙交酯)的PLA聚合物慢的速率降解。PLGA是以各种可能的比率组合聚(D,L-丙交酯)与聚(乙交酯)的共聚物。PLGA中的乙交酯含量越高,聚合物降解越快。

[0121] 在一些实施方案中,用于眼内施用(即,通过玻璃体内植入或注射)的药物递送系统包含构造的至少75重量%的PLA和不超过约25重量%的聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)聚合物,由其组成或基本上由其组成。

[0122] 同样在该范围内的是悬浮在水凝胶(诸如聚合透明质酸)中的微球(掺入抗新生血管剂)的悬浮液,其可以通过注射器针头施用到眼内位置。这种悬浮液的施用要求微球悬浮液在25°C下的粘度小于约300,000cP。在25°C下,水的粘度为约1.0cP(cP或cps是厘泊,粘度的量度)。在25°C下,橄榄油的粘度为84cP,蓖麻油的粘度为986cP,并且甘油的粘度为1490cP。

[0123] 存在于药物递送系统中的抗体可以均匀地分散在药物递送系统的生物可降解聚合物中。所用的生物可降解聚合物的选择可以根据所需的释放动力学、患者耐受性、待治疗疾病的性质等等而变化。所考虑的聚合物特征包括但不限于在植入位点的生物相容性和生物降解性、与所关注的活性剂的相容性以及加工温度。生物可降解的聚合物基质通常包含至少约10重量%、至少约20重量%、至少约30重量%、至少约40重量%、至少约50重量%、至少约60重量%、至少约70重量%、至少约80重量%或至少约90重量%的植入物。在一个变型中,生物可降解的聚合物基质占药物递送系统的约40重量%至50重量%。

[0124] 可以使用的生物可降解的聚合物包括但不限于由诸如有机酯或醚的单体制成的聚合物,其在降解时产生生理上可接受的降解产物。也可以使用单独地或与其他单体组合的酸酐、酰胺、原酸酯等。聚合物通常是缩合聚合物。聚合物可以是交联的或非交联的。

[0125] 在很大程度上,除了碳和氢外,聚合物还将包含氧和氮,特别是氧。氧可以作为羟基(例如羟基或醚)、羰基(例如非氧羰基,诸如羧酸酯)等存在。氮可以作为酰胺、氰基和氨基存在。可以使用的生物可降解的聚合物的示例性列表描述于Heller, Biodegradable Polymers in Controlled Drug Delivery, 在“CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems”中,第1卷,CRC Press, Boca Raton, Fla. (1987)中。

[0126] 特别关注的是羟基脂族羧酸聚合物(均聚物或共聚物)以及多糖。在所关注的聚酯中包括D-乳酸、L-乳酸、外消旋乳酸、乙醇酸、聚己内酯及其组合的均聚物或共聚物。乙醇酸和乳酸的共聚物特别受关注,其中通过乙醇酸与乳酸的比率控制生物降解速率。聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)共聚物中每种单体的百分比可以为0-100%、约15-85%、约25-75%或约35-65%。在某些变型中,使用25/75PLGA和/或50/50PLGA共聚物。在其他变型中,PLGA共聚物与聚交酯聚合物结合使用。

[0127] 为了各种目的,其他试剂可以用于药物递送系统制剂中。例如,可以采用缓冲剂和防腐剂。可以使用的防腐剂包括但不限于亚硫酸氢钠、硫酸氢钠、硫代硫酸钠、苯扎氯铵、氯代丁醇、硫柳汞、乙酸苯汞、硝酸苯汞、对羟基苯甲酸甲酯、聚乙烯醇和苯乙醇。可以采用的缓冲剂的实例包括但不限于如由FDA批准用于期望的施用途径的碳酸钠、硼酸钠、磷酸钠、乙酸钠、碳酸氢钠等。可以用于稳定胶体中的粒子和/或电解质如氯化钠和氯化钾的表面活性剂也可以包含在制剂中。药物递送系统还可以包含酸和碱性赋形剂以控制微环境中以及界面(扩散停滞层)处的pH。

[0128] 生物可降解的药物递送系统还可以包含另外的亲水性或疏水性化合物,这些化合物加速或延缓活性剂的释放。另外,释放调节剂,诸如美国专利5,869,079中描述的那些,可以包含在植入物中。所采用的释放调节剂的量将取决于期望的释放概况、调节剂的活性,且在不存在调节剂的情况下,将取决于糖皮质素的释放概况。在缓冲剂或释放增强剂或调节剂为亲水性的情况下,其还可以充当释放加速剂。亲水性添加剂通过围绕药物粒子的材料的更快溶解起到增加释放速率的作用,其增加了药物暴露的表面积,由此增加药物扩散的速率。类似地,疏水性缓冲剂或增强剂或调节剂可以更缓慢地溶解,减缓药物粒子的暴露,并且由此减缓药物释放的速率。

[0129] 本公开范围内的药物递送系统可以用分散在生物可降解聚合物内的活性剂抗体粒子配制。不受理论的束缚,认为活性剂的释放可以通过侵蚀生物可降解的聚合物基质并通过将颗粒剂扩散到眼内流体如玻璃体中,随后溶解聚合物基质并释放活性剂来实现。影响活性剂从植入物中的释放动力学的因素可以包括诸如以下的特征:植入物的尺寸和形状、活性剂粒子的尺寸、活性剂的溶解度、活性剂与一种或多种聚合物的比率、制造方法、暴露的表面积、植入物的密度以及一种或多种聚合物的侵蚀速率。

[0130] 活性剂的释放速率可以至少部分地取决于构成生物可降解的聚合物基质的一种或多种聚合物主链组分的降解速率。例如,缩合聚合物可以通过水解(以及其他机制)而降解,因此增强植入物吸水的植入物组成的任何改变都可能增加水解速率,由此增加聚合物降解和侵蚀的速率,由此增加活性剂释放的速率。活性剂的释放速率还可以受活性剂的结晶度、植入物中的pH和界面处的pH影响。

[0131] 本发明的药物递送系统的释放动力学可以部分地取决于药物递送系统的表面积。较大的表面积使更多的聚合物和活性剂暴露于眼内流体,导致聚合物更快侵蚀和活性剂粒子在流体中的溶解。

[0132] 本文还公开了包含单特异性人抗ANG-2HCAb和/或双特异性抗体的药物组合物,在该双特异性抗体中的特异性之一是ANG-2。还公开了本文所述的抗体用于制造药物组合物的用途。还公开了使用所公开的抗体和包含这些抗体的药物组合物用于治疗眼部病症的方法。

[0133] 如本文所用,“药学载体”包括生理学上可相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣剂、抗细菌剂和抗真菌剂、等张剂和吸收延迟剂等。载体优选适于静脉内、肌内、眼内、玻璃体内、皮下、肠胃外、脊椎或表皮施用(例如,通过注射或输注)。

[0134] 本文公开的组合物可以通过本领域中已知的多种方法施用。如本领域技术人员所了解,施用的途径和/或模式将视所需结果而变化。为了通过某些施用途径施用所公开的抗体,可能有必要使抗体与防止其失活的材料相关联或将抗体与防止其失活的材料共同施用。例如,抗体可以在例如脂质体的适当载体或稀释剂中施用到受试者。药学上可接受的稀释剂包括生理食盐水和水性缓冲溶液。药学载体包括无菌水溶液或分散液和用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。所述介质和试剂用于药学活性物质的用途在本领域中是已知的。

[0135] 如本文所用的短语“肠胃外施用”和“非肠道施用”是指除肠道和局部施用以外的施用模式,通常通过注射进行,并且包括而不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心脏内、眼内、玻璃体内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、椎管内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0136] 这些组合物也可以含有佐剂,诸如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可以通过以下两种方法来确保不存在微生物:上述灭菌程序,以及包含各种抗细菌剂和抗真菌剂,例如对羟苯甲酸酯、氯代丁醇、苯酚、山梨酸等等。还可合乎需要的是在组合物中包含等渗剂,诸如糖、氯化钠等。另外,可通过包含延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来实现可注射药物形式的延迟吸收。

[0137] 无论选择何种施用途径,可以以合适的水合形式使用的所公开的抗体和/或含有抗体的药物组合物通过本领域技术人员已知的常规方法配制成药学上可接受的剂型。

[0138] 药物组合物中的活性成分的实际剂量水平可以改变以便获得对于特定患者、组合物以及施用模式有效达成所需治疗反应,而对患者无毒的活性成分的量。选择的剂量水平将取决于多种药动学因素,包括所采用的本发明的特定组合物的活性,施用途径,施用时间,所采用的特定化合物的排泄速率,治疗的持续时间,与所采用的特定组合物组合使用的其他药物、化合物和/或材料,所治疗患者的年龄、性别、体重、病状、一般健康状态和先前的病史,以及在医学领域众所周知的类似因素。

[0139] 本文公开的药物组合物在玻璃体内递送时的合适剂量在每眼约 0.1mg 至约 50mg 的范围内。另外合适的剂量包括但不限于每眼约 0.2mg 至约 40mg, 每眼约 0.3mg 至约 30mg, 每眼约 0.4mg 至约 20mg, 每眼约 0.5mg 至约 15mg, 每眼约 0.5mg 至约 10mg, 每眼约 0.5mg, 每眼约 0.75mg, 每眼约 1mg, 每眼约 1.5mg, 每眼约 2mg, 每眼约 2.5mg, 每眼约 3mg, 每眼约 3.5mg, 每眼约 4mg, 每眼约 4.5mg, 每眼约 5mg, 每眼约 5.5mg, 每眼约 6mg, 每眼约 6.5mg, 每眼约 7mg, 每眼约 7.5mg, 每眼约 8mg, 每眼约 8.5mg, 每眼约 9mg, 每眼约 9.5mg, 每眼约 10mg, 每眼约 11mg, 每眼约 12mg, 每眼约 13mg, 每眼约 14mg, 每眼约 15mg, 每眼约 15mg, 每眼约 17mg, 每眼约 18mg, 每眼约 19mg 或每眼约 20mg。

[0140] 组合物必须是无菌的,并且流动性达到组合物可利用注射器递送的程度。除了水之外,载体优选是等渗缓冲盐水溶液。

[0141] 适当流动性可以例如通过使用涂层如卵磷脂、在分散液的情况下通过维持所需的粒子大小以及通过使用表面活性剂来维持。在许多情况下,在组合物中优选包含等张剂,例

如糖、诸如甘露糖醇或山梨糖醇的多元醇或氯化钠。

[0142] 包含单特异性和/或双特异性人抗ANG-2抗体的药物组合物和药物递送系统可以通过注射器注射到眼内位置,或者可以通过多种方法插入(植入)眼内,这些方法包括通过镊子、套管针或其他类型的涂药器在制造巩膜切口后置入。在一些情况下,可以使用套管针或涂药器而不产生切口。在一个优选的变型中,使用手持式涂药器将一种或多种生物可降解的植入物插入眼内。手持式涂药器通常包括18-30GA 不锈钢针头、杆、致动器和柱塞。用于将一种或多种植入物插入后眼部区或位点的合适装置包括在US7,090,681中公开的那些装置。

[0143] 施用方法通常首先涉及用针、套管针或植入装置进入眼部区内的目标区域。一旦在目标区域内,例如玻璃体腔内,则可以压下手持装置上的杆以使致动器向前驱动柱塞。随着柱塞向前移动,它可以将一种或多种植入物推入目标区域(即,玻璃体)中。

[0144] 在本公开的范围内可以采用多种技术来制造植入物。可用的技术包括相分离方法、界面方法、挤出方法、压缩方法、模制方法、注塑方法、热压方法等等。

[0145] 术语“眼内注射”是指通过进入患者的眼球而施用的注射。术语“眼周注射”是指在眼睛后方但在眼壁外部施用的注射。术语“晶内”是指通过睫状带施用的注射,睫状带是连接眼睛的睫状体和晶状体的一系列纤维。术语“玻璃体内”是指通过患者的眼睛直接施用到眼内腔中的注射。

[0146] 本文所述的药物制剂可以经由眼内玻璃体内注射递送,其可以是晶内注射,或者如果需要的话不是晶内注射。这种制剂的眼内玻璃体内注射,无论是经由晶内还是经由直接平坦部(巩膜内)注射,将有效的广谱抗生素直接递送到化脓性组织中,而不需要紧急配混多种单独药物或多次单独注射到眼中。

[0147] 典型地,将上述药物组合物眼内施用到需要治疗的哺乳动物受试者(例如,人,猫,犬,其他宠物,家养、野生或农场动物)。使用眼科学领域的普通技术人员已知的方法和技术,将组合物玻璃体内和晶内注射。

[0148] 通常,通过典型的27号规格的套管进行的递送可以利用1mL 的TB注射器实现,注意使用瞬时甩动使制剂重新悬浮并在即将注射前摇动。该制剂所需的药用体积(即,剂量)基于眼部病症的类型和添加到闭合眼内空间中的注射的可用体积的解剖学考虑因素而变化。

[0149] 另外,前房内(即,前房)注射也在本公开的范围内。

[0150] 在替代的实施方案中,如果期望或必要的话,制剂还可以以滴眼剂或眼用喷雾剂的形式,以及经由结膜下注射、眼内前房内注射、睫下注射、关节内注射或损伤内注射递送,特别是在但不限于当需要保证在患者需要时递送另外的药物的一些情况下。

[0151] 提供以下实施例、序列表和图以帮助理解本发明,本发明的真正范围在随附权利要求书中阐述。应理解,可在阐述的程序中进行修改,而不背离本发明的精神。

实施例

[0152] 实施例1. 具有小鼠恒定区的抗ANG-2HCAb

[0153] 所有的动物程序均按照机构动物护理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee)确立的指导方针执行。使用来自 Harbour Antibodies

(Cambridge, MA) 的HCAb小鼠来产生抗ANG-2 抗体。

[0154] 在第0天,初始用10 μ g纯化的人ANG-2 (R&D systems, Minneapolis, MN) 和完全弗氏佐剂 (Complete Freund Adjuvant) (CFA, Sigma, St. Louis, MO) 腹膜内免疫五只雌性HCAb小鼠。在第15天、第30天和第45天,用10 μ g纯化的人ANG-2 和不完全弗氏佐剂 (IFA, Sigma, St. Louis, MO) 腹膜内加强小鼠。在免疫计划表的第60天测定抗ANG-2的血清抗体滴度。在收获脾脏之前三天,用人ANG-2 (10 μ g/ 小鼠) 静脉内加强小鼠。使用SP20融合伴侣根据标准杂交瘤技术方法执行融合。杂交瘤上清液通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 筛选以检测抗人ANG-2。通过有限稀释将阳性培养物扩大并亚克隆两次。将蛋白质A纯化的抗体制剂用于所有研究中。

[0155] 实施例2. 具有人恒定区的抗ANG-2 HCAb

[0156] 总RNA从所需杂交瘤中分离出,并使用特异性引物通过PCR扩增。将来自每个杂交瘤的分离的VH区 (图3) 与 IgG1铰链区和 CH2/CH3区融合以在GS SYSTEMTM (Lonza, Basel, Switzerland) 表达质粒中形成HCAb序列。将表达质粒转染到CHO细胞系中以产生完全人重组HCAb。

[0157] 通过所公开的方法产生的示例性人抗ANG-2抗体被命名为 A33A8,并且具有表2中的氨基酸序列。框架 (FR) 区、铰链区和恒定 (CH) 区可以与任何HCAb CDR一起使用。

[0158] 表2

[0159]	区	序列	SEQ ID NO:

区	序列	SEQ ID NO:
[0160]	A33A8 VH-CH2-CH3 QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLVWVSR INSDGSSTSY ADSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG YSSGGQFDYW GQGTLVTVSS EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK	9
	A33A8 VH- 铰链 QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLVWVSR INSDGSSTSY ADSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG YSSGGQFDYW GQGTLVTVSS EPKSCDKTHT CP	10
	A33A8 VH QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLVWVSR INSDGSSTSY ADSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG YSSGGQFDYW GQGTLVTVSS	25
	FR1 QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAAS	11
	A33A8 CDR1 GFTFSSYW	12
	FR2 WMHWVRQAPG KGLVWVSR	13
	A33A8 CDR2 INSDGSST	14
	FR3 ADSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRAED TAVYYC	15
	A33A8 CDR3 AREGYSSGGQFDY	16
	FR4 WGQGTLVTVSS	17
[0161]	铰链区 EPKSCDKTHTCP	18
	CH2 PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA K	19
	CH3 GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPPVLD DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK	20
	另外的抗ANG-2-HCAb,命名为A1G2、A2F8、A2B6和A1B1,具有如下的VH区氨基酸序列:	
[0162]	表3	

区	序列	SE Q ID NO :	
[0163]	A1G2 VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWM HWVRQAPG KGLVWVSRINSDGSSTS YADSVKGRFTISRDNAKN TLYLQMN SLRAEDTAVYYCSSEGFSSGEHSEFWGQGTLVTVS S	21
	A1G2 CDR1	GFTFSSY W	26
	A1G2 CDR2	INSDGSST	27
	A1G2 CDR3	SSEGFSSGEHSEF	28
	A1F8 VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWM HWVRQAPGKGLV WVSRINSDGSSTS YADSVKGRFTISRDNAKNTLYL QMNSLRAEDTA VYYCSSEGY SSEAHSQYWGQGTLVTVSS	22
	A1F8 CDR1	GFTFSSY W	29
	A1F8 CDR2	INSDGSST	30
	A1F8 CDR3	SSEGY SSEAHSQY	31
	A2B6 VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFAAYWM HWVRQAPGKGLVWV SRINSDGSSTS YADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYC AREGYSSGGQFDYWGQGTLVTVSS	23
	A2B6 CDR1	GYTFAAY W	32
	A2B6 CDR2	INSDGSST	33
	A2B6 CDR3	AREGYSSGGQFDY	34
	A1B1 VH	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSYAAFWM SWVRQAPGK GLEWVSAINSDGSSTYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSL RAEDTAVYYCAREGYSSGGQFDYWGQGTLVTVSS	24
	A1B1 CDR1	GYSYAAFW	35
	A1B1 CDR2	INSDGSST	36
	A1B1 CDR3	AREGYSSGGQFDY	37

[0164] 实施例3.抗ANG-2HCAb的表征

[0165] 亲和力测量使用配备有抗hIgG Fc捕集 (AHC) 生物传感器尖端和链霉亲和素涂布的生物传感器的fortéBio OCTET® QK^e系统 (fortéBI0, Menlo Park, CA) 执行。对于AHC亲和力测量,用AHC传感器尖端测试纯化的抗ANG-2HCAb A33A8的结合能力。尖端使用 20 μ g/ml抗ANG-2A33A8 HCAb装载。装载进行300秒,产生在1.8 nm和2nm之间的捕集水平。通过在1xPBS中稀释到20nM至500nM 的浓度制备用于结合分析的ANG-2 (R&D systems) 抗原。引发缔合并监测200秒,在此之后将尖端转移到没有因子蛋白 (Gibco, PBS pH 7.2) 的1xPBS缓冲液中,以监测解离。然后使用生物层干涉测量分析实时监测抗ANG-2A33A8 HCAb结合活

性。基于测量的结合 (“ K_{assoc} ”) 和解离 (“ K_{dissoc} ”) 常数计算测试的ANG-2的抗原结合亲和力。数据使用 OCTET®数据分析软件6.4 (fortéBIO) 进行处理和分析 (图4)。A33A8 以小于1皮摩尔的Kd结合ANG-2。其不与大鼠ANG-2交叉反应,但与兔ANG-2交叉反应。此外,A33A8不与ANG-1交叉反应。

[0166] 在4℃下将每孔2微克/毫升的Tie-2-hFc (R&D Systems) 涂布在96 孔微量滴定板上过夜。在单独的板中,将A33A8抗HCAb的系列稀释液用2nM人生物素化ANG-2 (R&D Systems) 温育1小时。将100 微升的A33A8-ANG-2混合物施用到Tie-2-hFc涂布的微量滴定板上历时1小时。然后加入检测抗体(抗生物素HRP) 历时1小时,并且 ELISA用化学发光HRP底物显影并通过ELISA读板机读取(图5)。A33A8完全阻断了ANG-2与其受体Tie-2的结合。

[0167] 实施例4.抗ANG-2HCAb的竞争性ELISA分析

[0168] 在4℃下将每孔2微克/毫升的Tie-2-hFc (R&D Systems) 涂布在96 孔微量滴定板上过夜。在单独的板中,将抗HCAb的系列稀释液用2 nM人生物素化ANG-2 (R&D Systems) 温育1小时。将100微升的抗 ANG-2HCAb-ANG-2混合物施用到Tie-2-hFc涂布的微量滴定板上历时1小时。然后加入检测抗体(抗生物素HRP) 历时1小时,并且ELISA 用化学发光HRP底物显影并通过ELISA读板机读取。数据使用 GraphPad Prism 6分析。

[0169] 实施例5.抗ANG-2HCAb分子A33A8的丙氨酸扫描分析

[0170] 使用丙氨酸扫描来鉴别CDR序列中的氨基酸位置,CDR序列在被修饰时改变抗ANG-2HCAb A33A8的结合亲和力。

[0171] 在所公开的抗ANG-2HCAb A33A8中使用的特异性CDR在表4 中提供,有下划线的氨基酸是在置换成丙氨酸时实质上降低结合的氨基酸。

[0172] 表4

[0173]	HC CDR1	<u>G</u> FTFSSY <u>W</u>	SEQ ID NO:12
	HC CDR2	<u>I</u> NSDG <u>SST</u>	SEQ ID NO:14
	HC CDR3	<u>A</u> REG <u>YSSGGQFDY</u>	SEQ ID NO:16

[0174] 因此,在A33A8 CDR的某些残基中具有置换的抗HCAb抗体在本公开的范围内。在一个实施方案中,A33A8 CDR1包含GFTFSSYW (SEQ ID NO:12),其中在1、3、4、5、6位的氨基酸中的一个、两个、三个、四个或全部被任何氨基酸置换。在其他实施方案中,A33A8 CDR1包含GFTFSSYW,其中在1、3、4、5、6位的氨基酸中的一个、两个、三个、四个或全部被如本文公开的保守性氨基酸置换。在另一实施方案中,A33A8 CDR1包含GFTFSSYW,其中在1、3、4、5、6位的氨基酸中的一个、两个、三个、四个或全部被如本文定义的相同类别的氨基酸置换。

[0175] 在一个实施方案中,A33A8 CDR2包含INSDGSST (SEQ ID NO:14),其中在1、3、6、7或8位的氨基酸中的一个、两个、三个、四个或全部被任何氨基酸置换。在其他实施方案中,A33A8 CDR2包含INSDGSST,其中在1、3、6、7或8位的氨基酸中的一个、两个、三个、四个或全部被如本文公开的保守性氨基酸置换。在其他实施方案中,A33A8 CDR2包含INSDGSST,其中在1、3、6、7或8位的氨基酸中的一个、两个、三个、四个或全部被如本文定义的相同类别的氨基酸置换。

[0176] 在另一实施方案中,A33A8 CDR3包含AREGYSSGGQFDY (SEQ ID NO:16),其中在1、10或11位的氨基酸中的一个、两个或全部被任何氨基酸置换。在其他实施方案中,A33A8 CDR3包含 AREGYSSGGQFDY,其中在1、10或11位的氨基酸中的一个、两个或全部被如本文公

开的保守性氨基酸置换。在其他实施方案中，A33A8 CDR3包含AREGYSSGGQFDY，其中在1、10或11位的氨基酸中的一个、两个或全部被如本文定义的相同类别的氨基酸置换。

[0177] 除非另外指明，否则说明书和权利要求书中所用的表示成分的量，诸如分子量、反应条件的性质等的所有数字均应当理解为在所有情况下都由术语“约”修饰。如本文所用，术语“约”和“近似”是指在10%至15%内，优选在5%至10%内。因此，除非有相反的指示，否则说明书和所附权利要求书中所陈述的数值参数都是近似值，该值可以根据本发明要寻求获得的所属性质而变化。在最低限度并且不试图限制对权利要求书范围的等价范围的原则的应用，每个数值参数均应当至少根据报道的有效数字的数值和通过应用普通四舍五入技术来解读。尽管阐述本发明的宽泛范围的数值范围和参数是近似值，但在具体实施例中所阐述的数值尽可能精确地加以报告。然而，任何数值固有地包含必然由它们各别测试测量值中出现的标准偏差所产生的某些误差。

[0178] 除非本文另外指明或者与上下文含义明显相悖，否则在描述本发明的上下文中（尤其在所附权利要求书的上下文中）使用的术语“一个/ 种”、“所述”以及类似的指代语应解读为涵盖单数和复数指代语。本文中所列举数值的范围仅意在作为一种对落在所述范围内的每个单独数值单独提及的简便方法。除非本文另外指明，否则每个单独数值都并入到本说明书中，如同本文中单独列举了每个单独数值一样。可以按任何适合的顺序执行本文所描述的所有方法，除非本文另外指明或明显与上下文矛盾。本文提供的任何和所有实施例或示例性语言（例如，“诸如”）仅意在更好地说明本发明，而不会对以其他方式要求保护的本发明的范围构成限制。本说明书中的语言不应解读为指示任何未要求保护的要素是实践本发明所必需的。

[0179] 本文所公开的本发明的替代性元素或实施方案的分组不应被理解为限制。每个组成员可以单独或者以与组中的其他成员或本文存在的其他要素的任何组合被提及和要求保护。出于便利和/或可专利性的原因，预期组中的一个或多个成员可以包括在组中或从组中删除。当出现任何这种包括或删除时，本说明书被认为包含所修改的组，因此满足所附权利要求书中使用的所有马库什组的书面说明。

[0180] 本文描述了本发明的某些实施方案，包括为本发明人所知用于实施本发明的最佳方式。当然，本领域技术人员在阅读前面的说明后将会明了这些所述实施方案的变型。本发明人预期本领域的熟练技术人员会适时采用此类变型，而且本发明人预期能以除了本文具体描述的方式之外的方式来实施。因此，本发明包括在随附的适用法律允许的权利要求中叙述的主题的所有修改和等效物。此外，除非本文另有指示或与上下文明显矛盾，否则在所有可行变型中的上述元素的任何组合都涵盖在本发明内。

[0181] 本文公开的具体实施方案可以进一步限制于使用“由...组成”或“基本上由...组成”的权利要求中。当用于权利要求中时，不管是初始提交或者是后加的每次修改，连贯术语“由.....组成”都不包括权利要求中未指定的任何要素、步骤或成分。连贯术语“基本上由.....组成”将权利要求的范围限制到指定的物质或步骤，以及那些不严重影响基本特征和新特征的物质或步骤。本文固有地或明确地描述或启用如此要求保护的本发明实施方案。

[0182] 此外，整个本说明书对专利和印刷的出版物做了很多引用。上文引用的各参考文献和印刷的出版物的全部内容都单独以引用的方式并入本文。

[0183] 最后,应当理解,本文所公开的本发明的实施方案是对本发明原理的说明。可以采用的其他修改形式也在本发明的范围内。因此,例如,但不限于,可以根据本文的教义使用本发明的替代配置。因而,本发明不限于明确示出并描述的方案。

序列表

<110> Allergan Plc

<120> 仅有重链的抗ANG-2抗体

<130> 19864 (NTB)

<150> US 62/198,518
<151> 2015-07-29<150> US 62/205,185
<151> 2015-08-14

<160> 25

<170> PatentIn 3.5版

<210> I
<211> 496
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1

Met Trp Gln Ile Val Phe Phe Thr Leu Ser Cys Asp Leu Val Leu Ala
1 5 10 15Ala Ala Tyr Asn Asn Phe Arg Lys Ser Met Asp Ser Ile Gly Lys Lys
20 25 30Gln Tyr Gln Val Gln His Gly Ser Cys Ser Tyr Thr Phe Leu Leu Pro
35 40 45Glu Met Asp Asn Cys Arg Ser Ser Ser Pro Tyr Val Ser Asn Ala
50 55 60[0001] Val Gln Arg Asp Ala Pro Leu Glu Tyr Asp Asp Ser Val Gln Arg Leu
65 70 75 80Gln Val Leu Glu Asn Ile Met Glu Asn Asn Thr Gln Trp Leu Met Lys
85 90 95Leu Glu Asn Tyr Ile Gln Asp Asn Met Lys Lys Glu Met Val Glu Ile
100 105 110Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn Gln Thr Ala Val Met Ile Glu Ile Gly
115 120 125Thr Asn Leu Leu Asn Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys Leu Thr Asp
130 135 140Val Glu Ala Gln Val Leu Asn Gln Thr Thr Arg Leu Glu Leu Gln Leu
145 150 155 160Leu Glu His Ser Leu Ser Thr Asn Lys Leu Glu Lys Gln Ile Leu Asp
165 170 175Gln Thr Ser Glu Ile Asn Lys Leu Gln Asp Lys Asn Ser Phe Leu Glu
180 185 190Lys Lys Val Leu Ala Met Glu Asp Lys His Ile Ile Gln Leu Gln Ser
195 200 205Ile Lys Glu Glu Lys Asp Gln Leu Gln Val Leu Val Ser Lys Gln Asn
210 215 220

Ser Ile Ile Glu Glu Leu Glu Lys Lys Ile Val Thr Ala Thr Val Asn

225	230	235	240
Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln His Asp Leu Met Glu Thr Val Asn			
245	250	255	
Asn Leu Leu Thr Met Met Ser Thr Ser Asn Ser Ala Lys Asp Pro Thr			
260	265	270	
Val Ala Lys Glu Glu Gln Ile Ser Phe Arg Asp Cys Ala Glu Val Phe			
275	280	285	
Lys Ser Gly His Thr Thr Asn Gly Ile Tyr Thr Leu Thr Phe Pro Asn			
290	295	300	
Ser Thr Glu Glu Ile Lys Ala Tyr Cys Asp Met Glu Ala Gly Gly Gly			
305	310	315	320
Gly Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu Asp Gly Ser Val Asp Phe Gln			
325	330	335	
Arg Thr Trp Lys Glu Tyr Lys Val Gly Phe Gly Asn Pro Ser Gly Glu			
340	345	350	
Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Val Ser Gln Leu Thr Asn Gln Gln Arg			
355	360	365	
Tyr Val Leu Lys Ile His Leu Lys Asp Trp Glu Gly Asn Glu Ala Tyr			
370	375	380	
Ser Leu Tyr Glu His Phe Tyr Leu Ser Ser Glu Glu Leu Asn Tyr Arg			
385	390	395	400
[0002] Ile His Leu Lys Gly Leu Thr Gly Thr Ala Gly Lys Ile Ser Ser Ile			
405	410	415	
Ser Gln Pro Gly Asn Asp Phe Ser Thr Lys Asp Gly Asp Asn Asp Lys			
420	425	430	
Cys Ile Cys Lys Cys Ser Gln Met Leu Thr Gly Trp Trp Phe Asp			
435	440	445	
Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Tyr Tyr Pro Gln Arg Gln			
450	455	460	
Asn Thr Asn Lys Phe Asn Gly Ile Lys Trp Tyr Tyr Trp Lys Gly Ser			
465	470	475	480
Gly Tyr Ser Leu Lys Ala Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Ala Asp Phe			
485	490	495	
<210> 2			
<211> 6			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成连接子			
<400> 2			
Glu Pro Lys Ser Cys Asp			
1	5		
<210> 3			

<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成连接子

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro
1 5

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成连接子

<220>
<221> 重复
<222> (1)..(5)
<223> 可以重复至多8次

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 5
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 贝伐单抗VH

[0003] <400> 5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 贝伐单抗VL

<400> 6

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10				15			

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Asn	Tyr
		20				25					30				

Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Val	Leu	Ile
				35		40				45					

Tyr	Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
					50		55			60					

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
				65		70		75		80					

Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Thr	Val	Pro	Trp
				85			90			95					

Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
				100		105					

<210> 7

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 雷珠单抗VH

<400> 7

[0004]	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1			5			10			15					

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Asp	Phe	Thr	His	Tyr
			20			25				30					

Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35			40				45					

Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp	Phe
		50			55				60						

Lys	Arg	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Tyr
		65			70			75		80					

Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85			90			95						

Ala	Lys	Tyr	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val
			100			105			110						

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
	115				120					

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 雷珠单抗VL

<400> 8

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 9
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HCAb A33A8 VH-CH2-CH3

<400> 9

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
[0005]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
35 40 45

Ser Arg Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Tyr Ser Ser Gly Gly Gln Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
115 120 125

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
130 135 140

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145 150 155 160

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
165 170 175

序 列 表

CN 107849126 B

6/12 页

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

180 185 190

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

195 200 205

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

210 215 220

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

225 230 235 240

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

245 250 255

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

260 265 270

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

275 280 285

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

290 295 300

Ser Asp Gly Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

305 310 315 320

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

325 330 335

[0006]

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

340 345 350

<210> 10

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCAb A33A8 VH

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val

35 40 45

Ser Arg Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Gly Tyr Ser Ser Gly Gly Gln Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 115 120 125

His Thr Cys Pro
 130

<210> 11
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HCAb FR1

<400> 11

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 12
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HCAb A33A8 CDR1

<400> 12

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp
 1 5

[0007] <210> 13
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> HCAb FR2
 <400> 13

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
 1 5 10 15

Ser Arg

<210> 14
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HCAb A33A8 CDR2

<400> 14

Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr
 1 5

<210> 15
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HCAb FR3

<400> 15

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
 1 5 10 15

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 20 25 30

Val Tyr Tyr Cys
 35

<210> 16
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HCAb A33A8 CDR3

<400> 16

Ala Arg Glu Gly Tyr Ser Ser Gly Gln Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HCAb FR4

<400> 17

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

[0008] <210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HCAb 铰链区

<400> 18

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 19
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HCAb CH2

<400> 19

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 1 5 10 15

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 35 40 45

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 50 55 60

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

65	70	75	80
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
85	90	95	
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys			
100	105	110	
<210> 20			
<211> 107			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> HCAb CH3			
<400> 20			
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu			
1	5	10	15
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe			
20	25	30	
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu			
35	40	45	
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe			
50	55	60	
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly			
65	70	75	80
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr			
85	90	95	
[0009]			
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
100	105		
<210> 21			
<211> 120			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> HCAb A1G2 VH			
<400> 21			
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr			
20	25	30	
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val			
35	40	45	
Ser Arg Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val			
50	55	60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	

Ser Ser Glu Gly Phe Ser Ser Gly Glu His Ser Glu Phe Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 22
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HCAb A1F8 VH

<400> 22

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
35 40 45

Ser Arg Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0010]

Ser Ser Glu Gly Tyr Ser Ser Glu Ala His Ser Gln Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 23
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HCAb A2B6 VH

<400> 23

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Ala Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
35 40 45

Ser Arg Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Glu Gly Tyr Ser Ser Gly Gly Gln Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 24
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HCAb A1B1 VH

<400> 24

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Tyr Ala Ala Phe
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

[0011]

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Gly Tyr Ser Ser Gly Gly Gln Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 25
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HCAb A33A8 VH

<400> 25

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
 35 40 45

Ser Arg Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0012] Ala Arg Glu Gly Tyr Ser Ser Gly Gly Gln Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

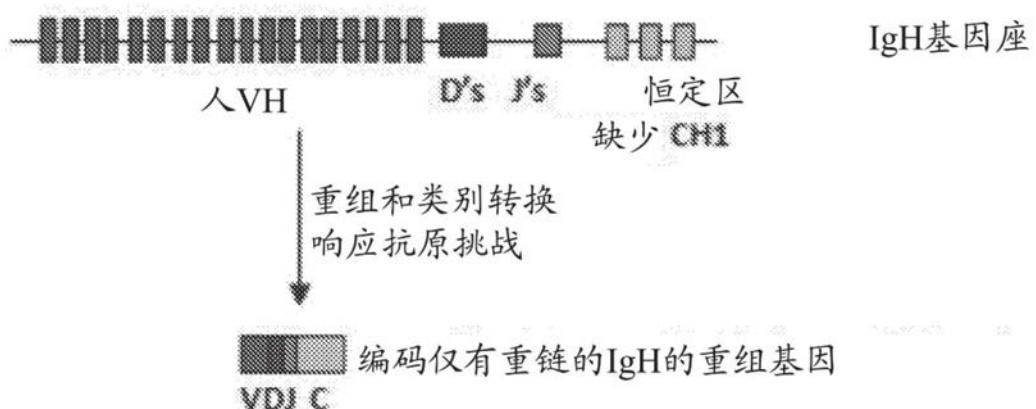


图1A

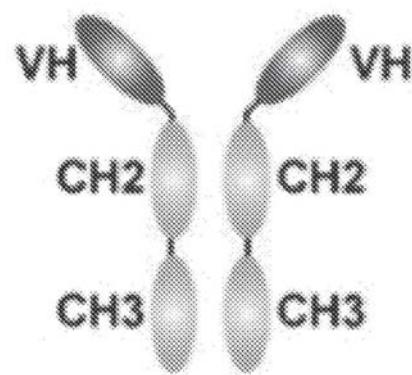
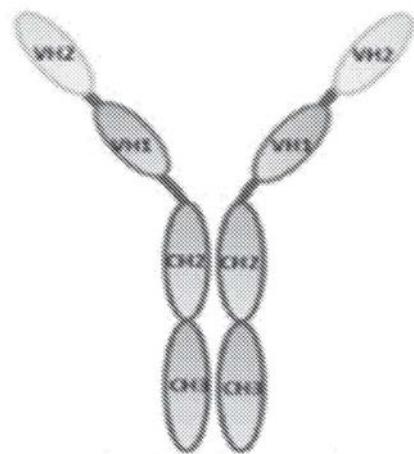


图1B

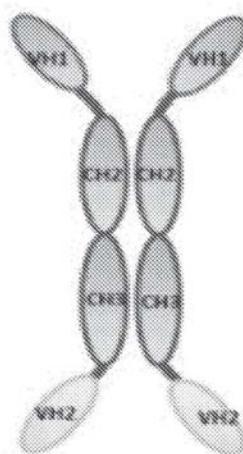


图2A



双特异性IgG类分子I

图2B



双特异性IgG类分子II

图2C

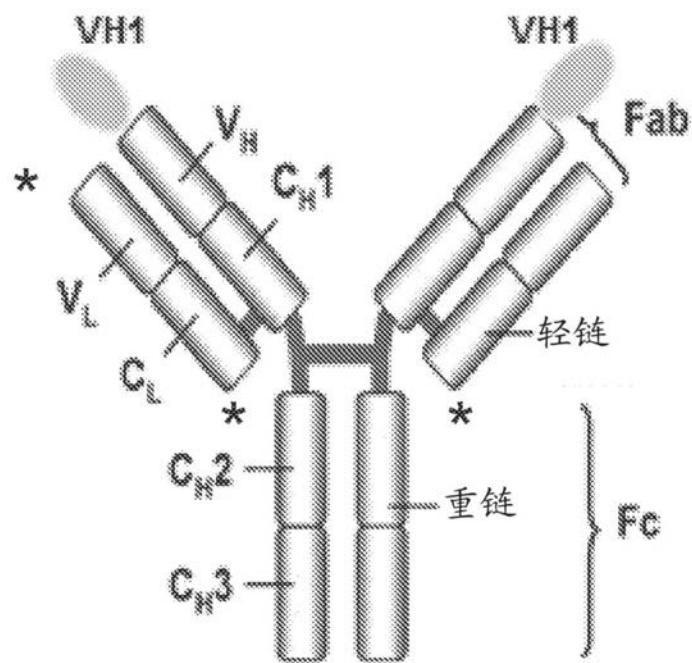


图2D

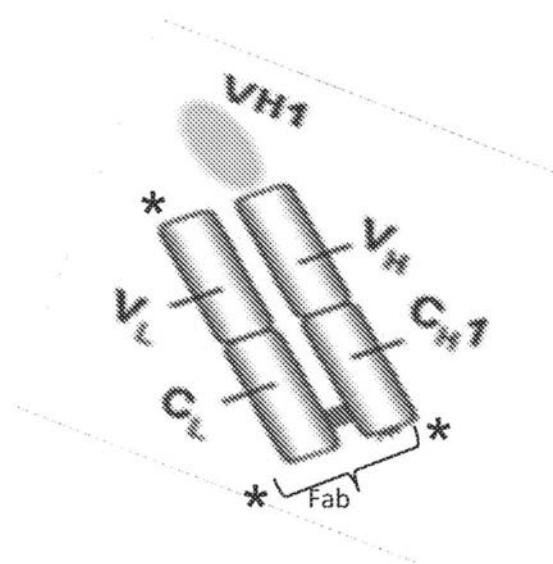


图2E

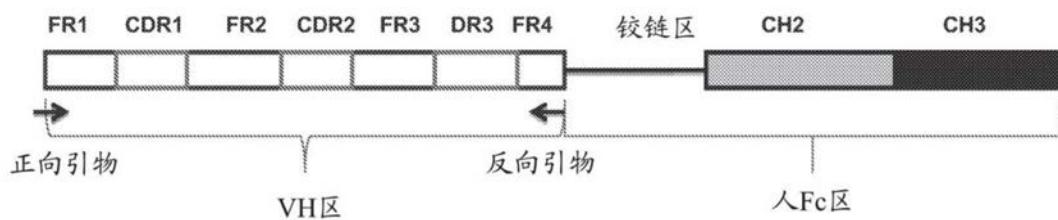
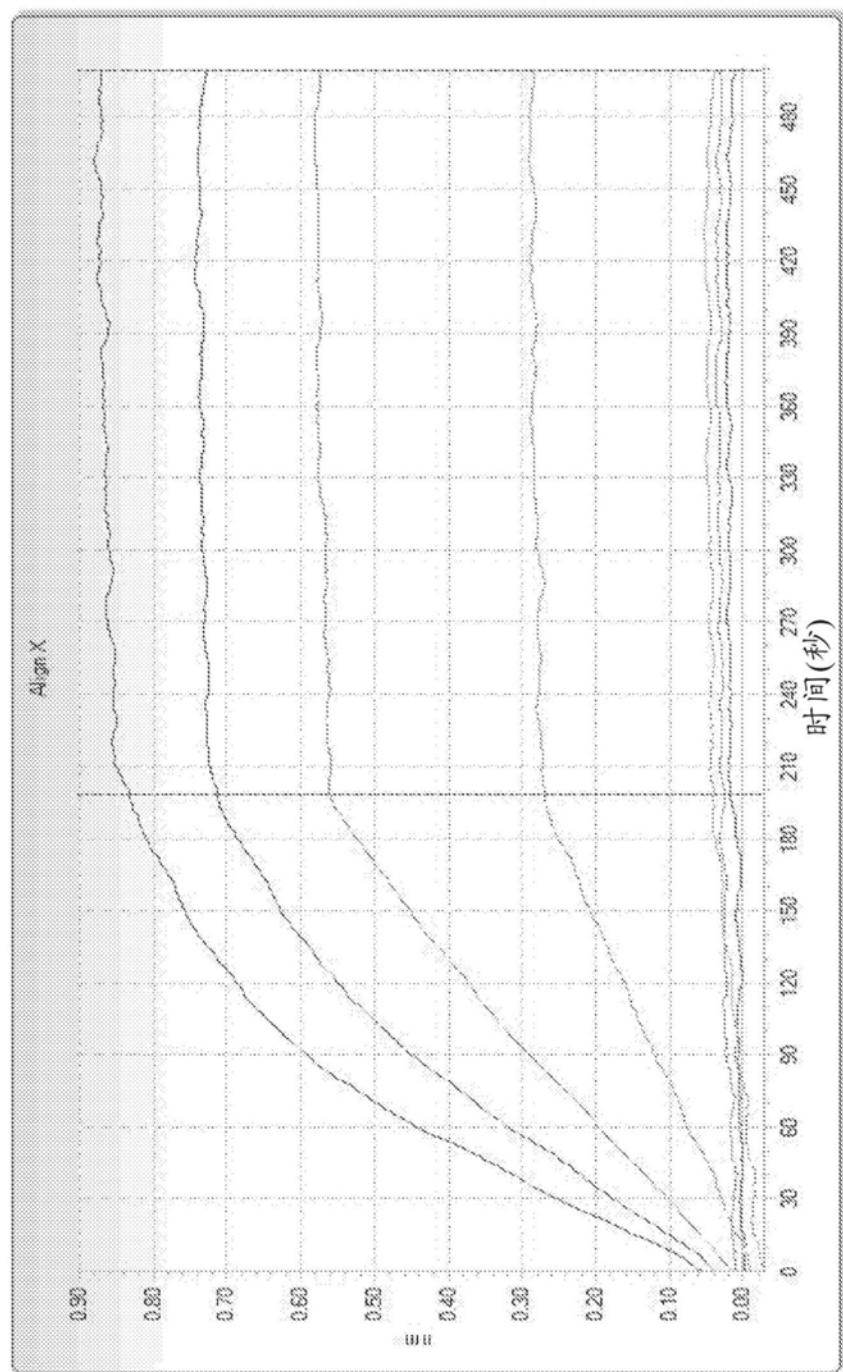


图3



样品	Assoc.	浓度(nM)	KD (M)	$k_{on}(1/Ms)$	$k_{dis}(1/s)$
A33AB	rhANG2	25 - 500	<1.0E-12	1.84E+04	<1.0E-07

图4

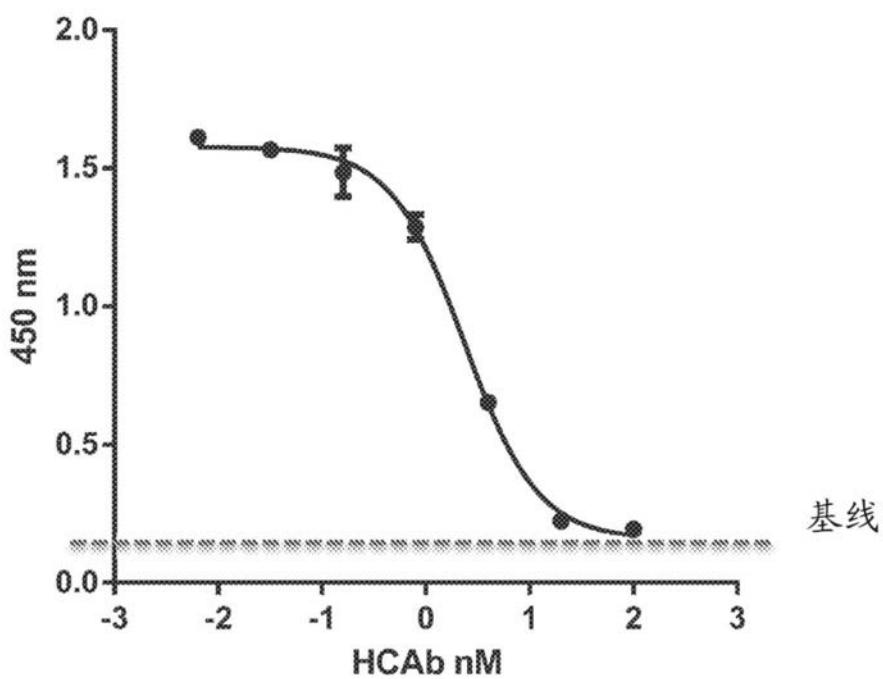


图5

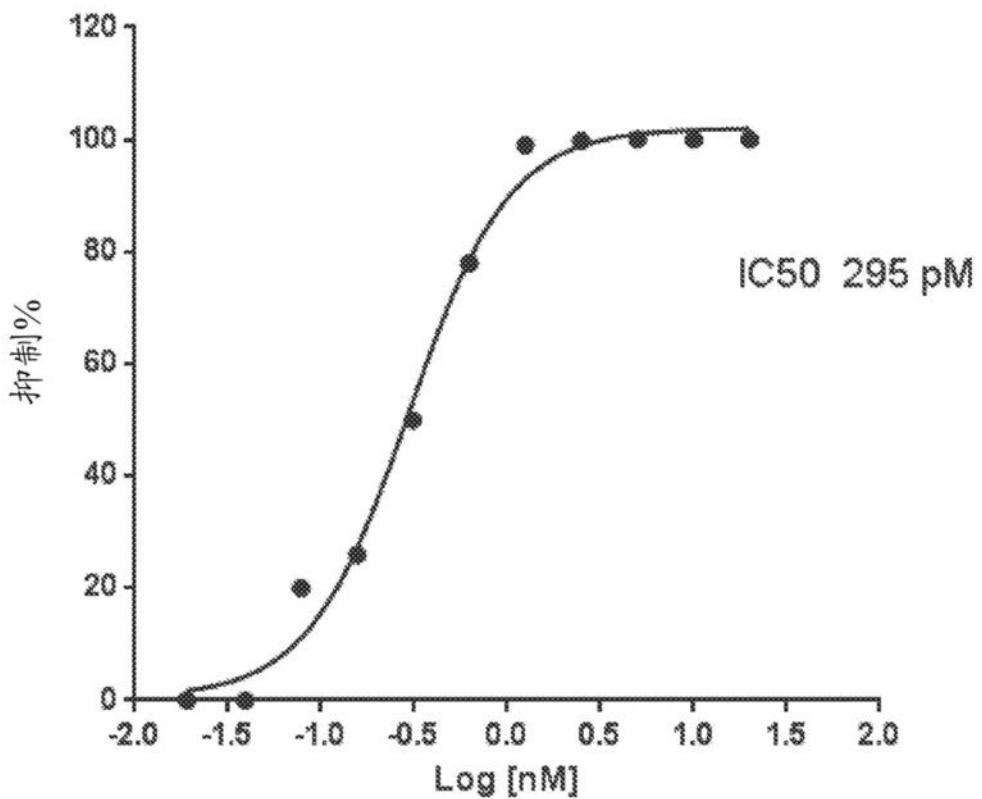


图6

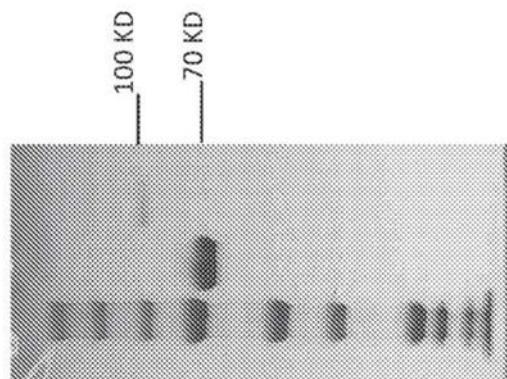


图7A

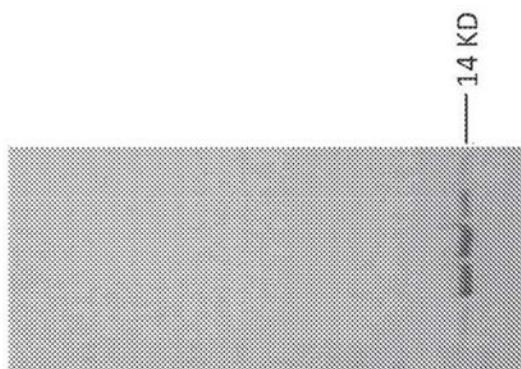


图7B

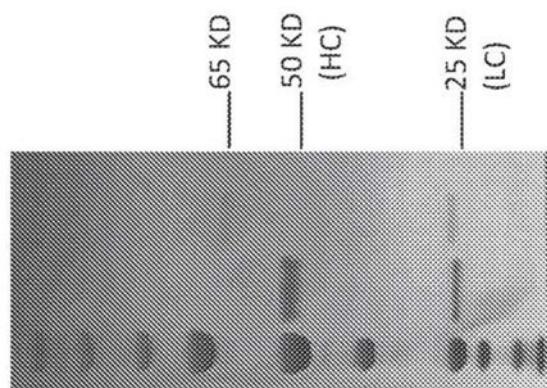


图7C

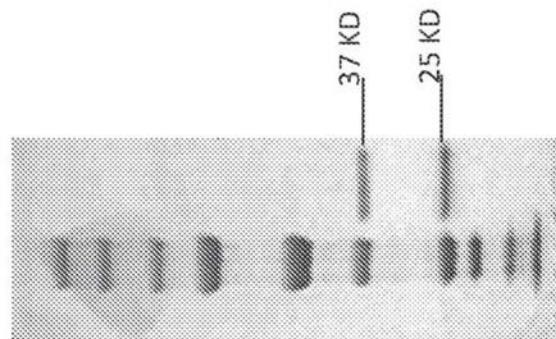


图7D

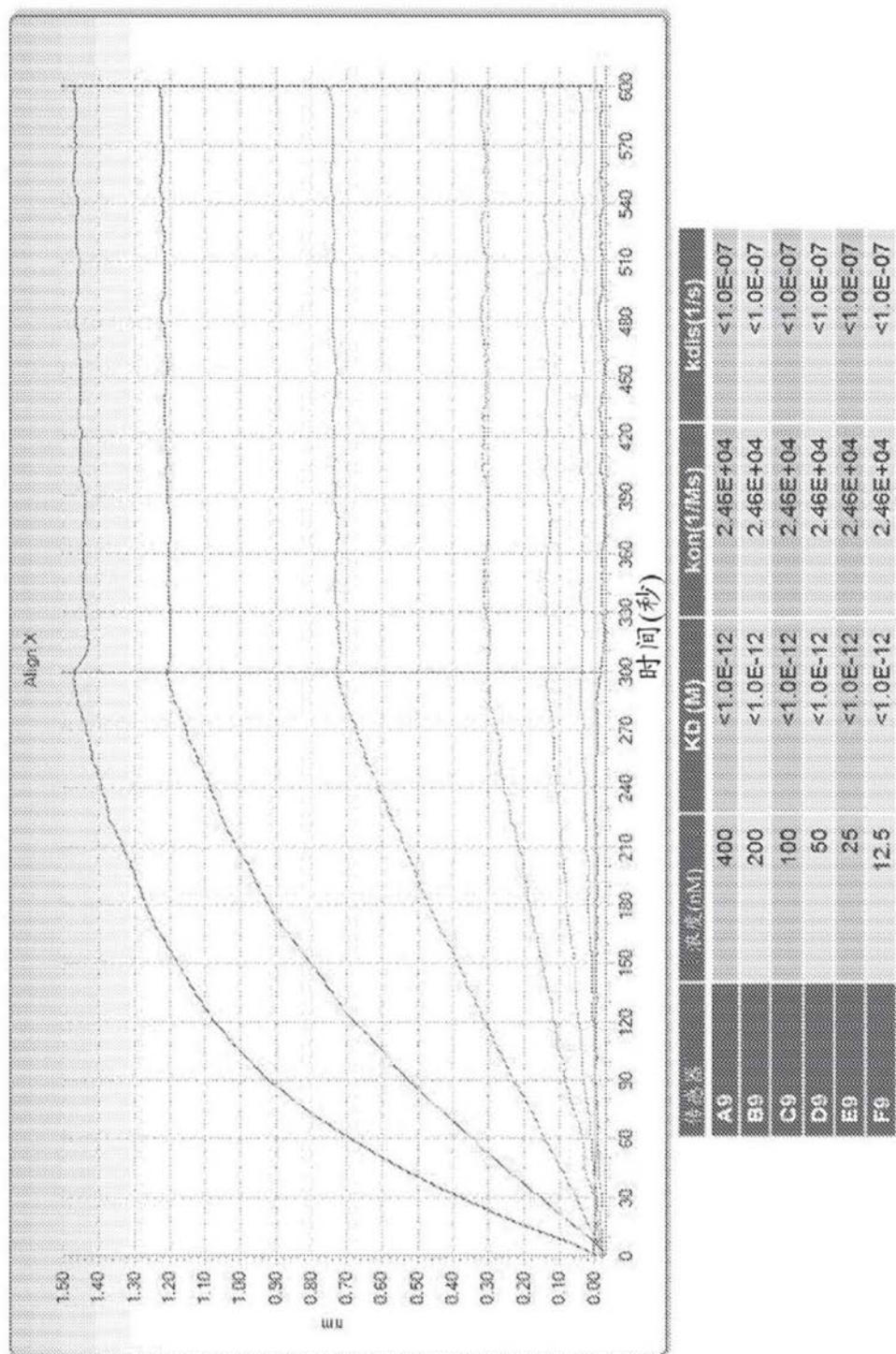


图8

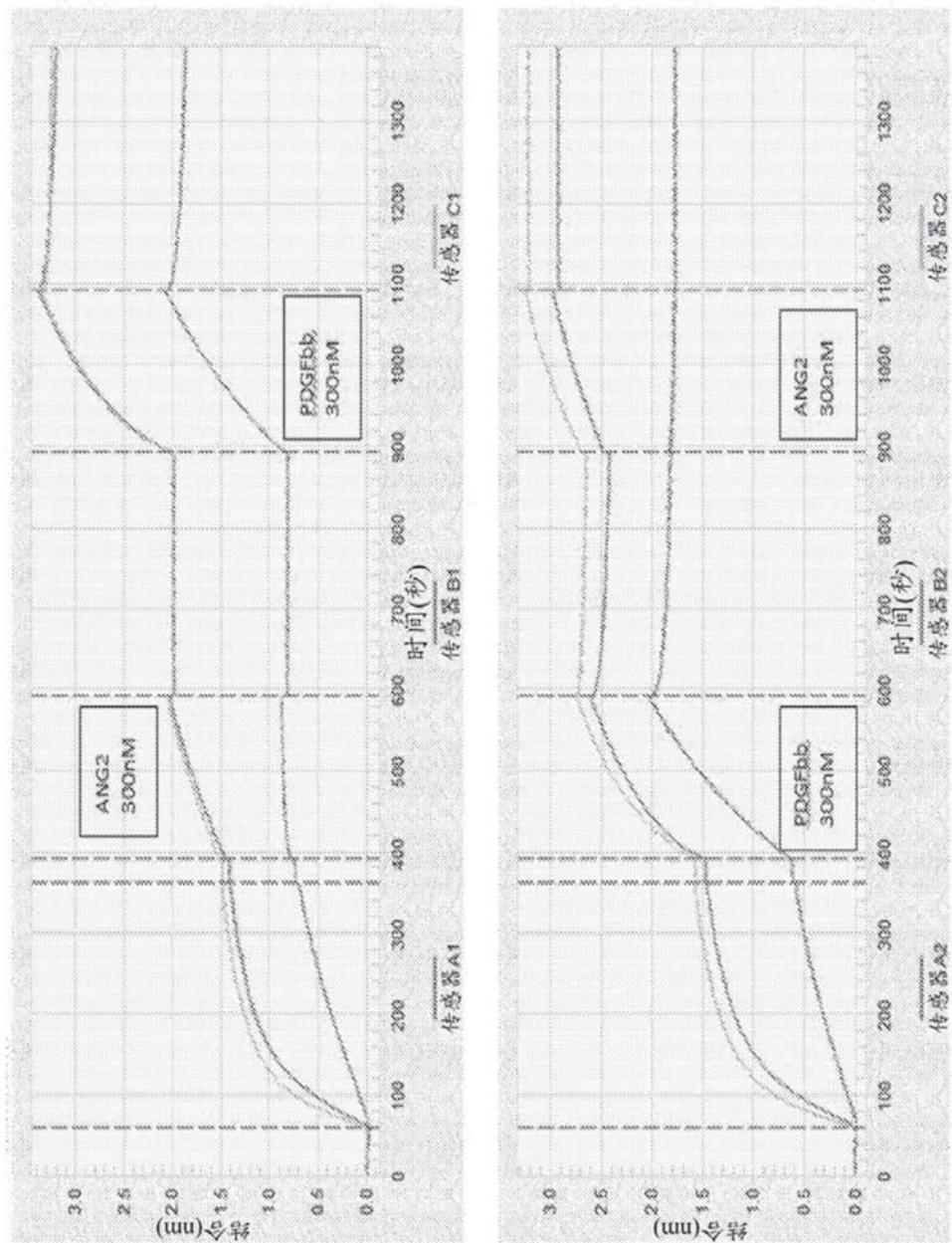


图9

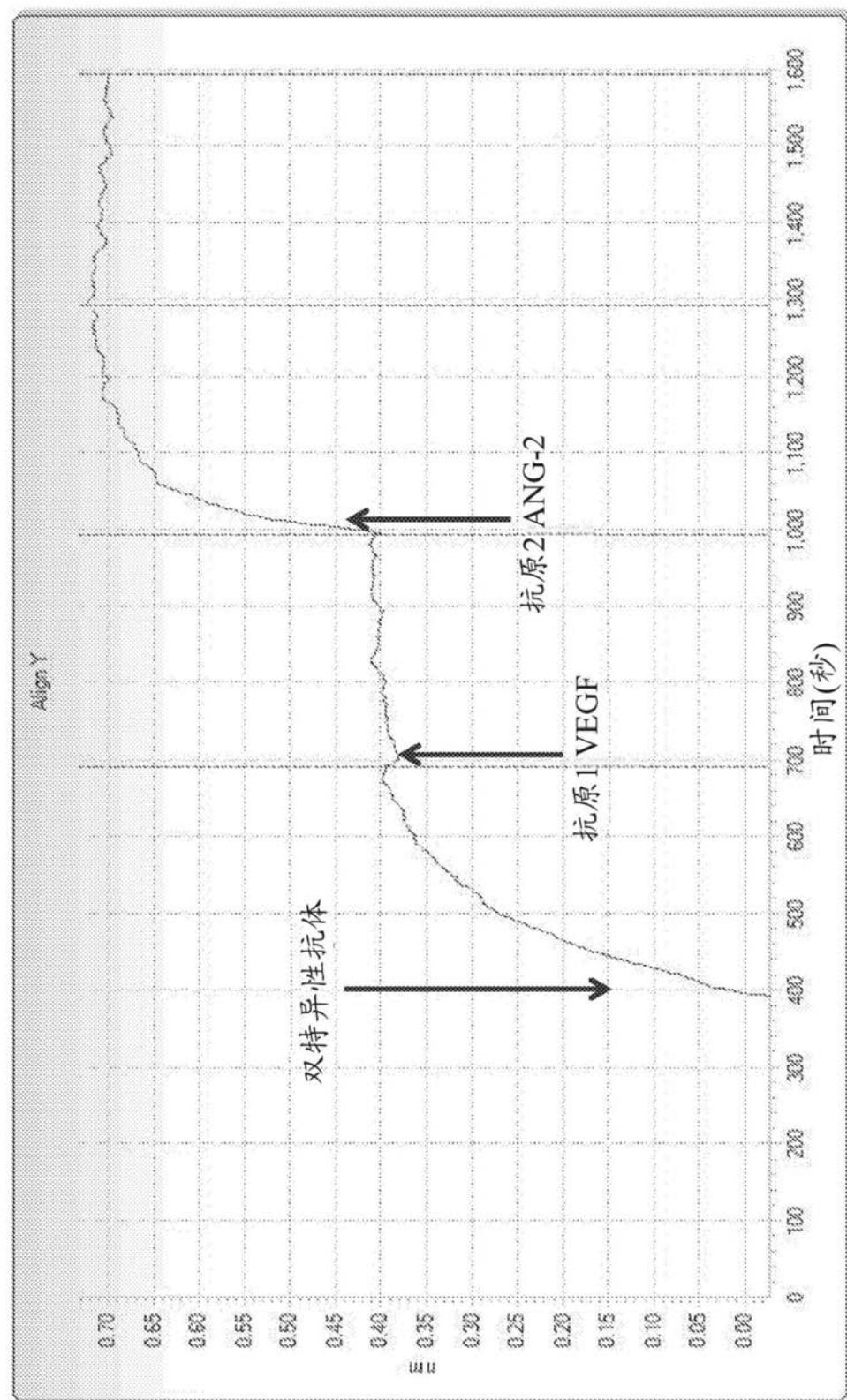


图10

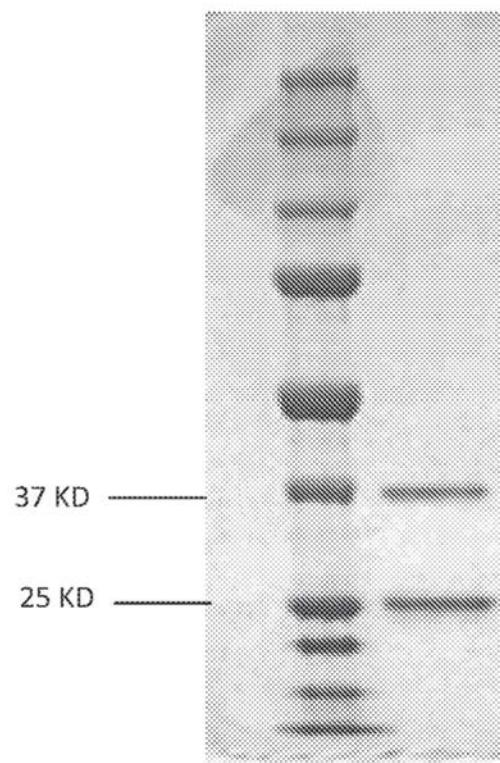


图11