202525844

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202525844 A

(43)公開日： 中華民國 114 (2025) 年 07 月 01 日

(21)申請案號：114109900 (22)申請日： 中華民國 109 (2020) 年 05 月 29 日

(51)Int. Cl.： *C07K16/18 (2006.01)* *C07K16/46 (2006.01)*
A61K39/395 (2006.01)

(30)優先權：2019/05/30 美國 62/854,907

(71)申請人：美商安進公司 (美國) AMGEN INC. (US)
美國

(72)發明人：加瑟斯 費南多 GARCES, FERNANDO (PT)；王 祖倫 WANG, ZHULUN (US)

(74)代理人：陳長文；張哲倫；姚金梅

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：11 項 圖式數：13 共 82 頁

(54)名稱

工程改造鉸鏈區以驅動抗體二聚化

(57)摘要

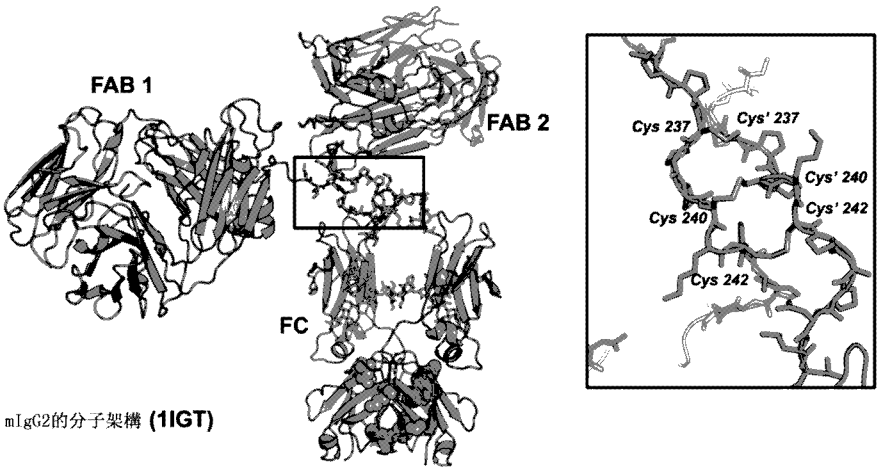
多特異性抗體，例如雙特異性和三特異性抗體之臨床潛力顯示出用於靶向複雜疾病之巨大希望。然而，該等分子的產生提出了巨大的挑戰，因為在許多情況下，希望特異性地驅動存在於溶液中的多個多肽鏈的特異性配對。在重鏈的情況下，有兩個形成二聚體介面之主要區。其中一個係 CH3 區，其藉由以下已經被廣泛利用：插入電荷對突變（CPM）來操控二聚體介面，或者將大體積殘基插入空穴（杵-臼）來物理上有利於或不利於二聚體的形成。然而，該等策略中的每一種可能不適用於每一個分子，因此需要更多工具。在這裡，我們描述了用少量突變對鉸鏈區進行工程改造，該突變能夠單獨成功地驅動重鏈二聚化。

The clinical potential of multispecific antibodies like bispecific and trispecific antibodies shows great promise for targeting complex diseases. However, the generation of those molecules presents great challenges as in many cases it is desired to specifically drive the specific pairing of multiple polypeptide chains that are present in solutions. In the case of the heavy chains, there are two main regions that form a dimer interface. One of them is the CH3 region, which has been widely exploited by inserting either charge-pair mutations (CPMs) to steer the dimer interface or inserting large bulky residues into cavities (Knob in Hole) to physically favor and disfavor the dimer formation. However, each of these strategies may not be applied to every molecule and therefore there is the need for more tools. Here, we describe the engineering of the Hinge region with a small number of mutations that are capable to alone successfully drive the heavy chain dimerization.

指定代表圖：

TW 202525844 A

靶向鉸鏈區以形成異二聚體



mIgG2的分子架構 (1IGT)

【圖 1】

【發明摘要】

【中文發明名稱】　工程改造鉸鏈區以驅動抗體二聚化

【英文發明名稱】ENGINEERING THE HINGE REGION TO DRIVE ANTIBODY DIMERIZATION

【中文】多特異性抗體，例如雙特異性和三特異性抗體之臨床潛力顯示出用於靶向複雜疾病之巨大希望。然而，該等分子的產生提出了巨大的挑戰，因為在許多情況下，希望特異性地驅動存在於溶液中的多個多肽鏈的特異性配對。在重鏈的情況下，有兩個形成二聚體介面之主要區。其中一個係CH3區，其藉由以下已經被廣泛利用：插入電荷對突變（CPM）來操控二聚體介面，或者將大體積殘基插入空穴（杵-臼）來物理上有利於或不利於二聚體的形成。然而，該等策略中的每一種可能不適用於每一個分子，因此需要更多工具。在這裡，我們描述了用少量突變對鉸鏈區進行工程改造，該突變能夠單獨成功地驅動重鏈二聚化。

【英文】The clinical potential of multispecific antibodies like bispecific and trispecific antibodies shows great promise for targeting complex diseases. However, the generation of those molecules presents great challenges as in many cases it is desired to specifically drive the specific pairing of multiple polypeptide chains that are present in solutions. In the case of the heavy chains, there are two main regions that form a dimer interface. One of them is the CH3 region, which has been widely exploited by inserting either charge-pair mutations (CPMs) to steer the dimer interface or inserting large

bulky residues into cavities (Knob in Hole) to physically favor and disfavor the dimer formation. However, each of these strategies may not be applied to every molecule and therefore there is the need for more tools. Here, we describe the engineering of the Hinge region with a small number of mutations that are capable to alone successfully drive the heavy chain dimerization.

【指定代表圖】　　圖1

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】

【發明說明書】

【中文發明名稱】　工程改造鉸鏈區以驅動抗體二聚化

【英文發明名稱】ENGINEERING THE HINGE REGION TO DRIVE ANTIBODY DIMERIZATION

【技術領域】

【0001】本發明關於生物製藥領域。特別地，本發明關於能夠特異性結合至少兩種靶抗原之多特異性抗原結合蛋白。該多特異性抗原結合蛋白在鉸鏈區包含兩個不同的重鏈，該兩個不同的重鏈利用電荷對突變來促進異二聚體形成，同時抑制同二聚體形成。

【先前技術】

【0002】抗體已經成為生物製藥工業中的選擇形式，因為抗體具有一些吸引那些開發治療性分子的特性。除了能夠靶向特定結構或細胞外，抗體還能使其靶標易受Fc受體細胞介導的吞噬和殺傷作用的影響（Raghavan和Bjorkman 1996）。此外，抗體以pH依賴方式與新生兒Fc受體（FcRn）相互作用的能力使其具有延長的血清半衰期（Ghetie和Ward 2000）。抗體的這種獨特特性允許藉由工程改造Fc融合分子來延長血清中治療性蛋白或肽的半衰期。

【0003】在某些情況下，希望產生包含抗體的Fc部分但包含異二聚體的分子。Fc異二聚體分子的一個重要應用係產生多特異性抗體，例如，雙特異性抗體。雙特異性抗體係指對至少兩種不同抗原具有特異性的抗體（Nolan和O'Kennedy 1990；de Leij, Molema等人 1998；Carter 2001）。雙特異性抗體不是

在兩個Fab中具有相同的序列，而是在兩個Fab中具有不同的序列，以便Y型分子的每個臂都能與不同的抗原結合。Fc異二聚體的另一個應用係將半衰期延長部分添加到治療性分子中。在這種情況下，兩個不同的Fc部分中的一個或兩個可以融合到需要延長半衰期的一個或多個治療性分子上。

【0004】 產生Fc異二聚體的經典方法係由Carter及其合作者開發的，當時他們使用「杵-臼(knobs-into-holes)」策略對重鏈工程改造用於異二聚化(Ridgway, Presta等人 1996；Atwell, Ridgway等人 1997；Merchant, Zhu等人 1998；Carter 2001）。杵-臼概念最初由Crick提出，作為相鄰α-螺旋間胺基酸側鏈堆積的模型（Crick 1952）。Carter及其合作者藉由用較大的胺基酸側鏈替換較小的胺基酸側鏈（例如，T366Y），在第一鏈的CH3結構域介面處產生了杵；並且藉由用較小的胺基酸側鏈替換較大的胺基酸側鏈（例如Y407T），在第二鏈的CH3介面處的並置位置上產生了臼。在並置位置產生杵和臼的基礎係杵和臼的相互作用有利於異二聚體之形成，而杵-杵和臼-臼的相互作用分別由於有利相互作用的空間衝突和缺失而阻礙同二聚體形成。杵-臼突變還與被工程改造以增強異二聚體形成的CH3結構域間二硫鍵相組合（Sowdhamini, Srinivasan等人 1989；Atwell, Ridgway等人 1997）。除了該等突變外，還改變了輸入DNA比率以使產量最大化(Merchant, Zhu等人 1998)。「杵-臼」技術在美國專利案號5,731,168和7,183,076中公開。

【0005】 多特異性抗體（同時靶向多個靶標的分子，例如雙特異性和三特異性抗體）以及半衰期延長的治療性蛋白的臨床潛力顯示出用於靶向複雜疾病的巨大希望。然而，該等分子之產生提出了巨大挑戰，因為在許多情況下，我

們希望特異性地驅動存在於溶液中的多個多肽鏈的配對。在這裡，我們描述了用少量突變對鉸鏈區進行工程改造，該等突變能夠單獨成功地驅動Fc二聚化。

【發明內容】

【0006】在一個方面，本發明關於一種分離的異多聚體，該異多聚體包含異二聚免疫球蛋白鉸鏈結構域，該異二聚免疫球蛋白鉸鏈結構域包含第一免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽和第二免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽，其中：

【0007】(i) 該第一免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽包含下列胺基酸取代：P243K、A244K、P245K、N/E246K和L247K；並且

【0008】(ii) 該第二免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽包含下列胺基酸取代：P243D、A244D、P245D、N/E246D和L247D；

【0009】其中胺基酸殘基的編號係根據Kabat。

【0010】在另一方面，本發明關於一種分離的異多聚體，該異多聚體包含異二聚免疫球蛋白鉸鏈結構域，該異二聚免疫球蛋白鉸鏈結構域包含第一免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽和第二免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽，其中：

【0011】(i) 該第一免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽包含下列胺基酸取代：A244H；並且

【0012】(ii) 該第二免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽包含下列胺基酸取代：N/E246D和L247D；

【0013】其中胺基酸殘基的編號係根據Kabat。

【0014】在另一方面，本發明關於一種分離的異多聚體，該異多聚體包含異二聚免疫球蛋白鉸鏈結構域，該異二聚免疫球蛋白鉸鏈結構域包含第一免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽和第二免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽，其中：

【0015】(i) 該第一免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽包含下列胺基酸取代：H237K、T238K、A244K和N/E246K；並且

【0016】(ii) 該第二免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽包含下列胺基酸取代：H237D、T238D、A244D和N/E246D；

【0017】其中胺基酸殘基的編號係根據Kabat。

【0018】在某些實施方式中，異多聚體的每個鉸鏈結構域多肽還包含L248C取代。

【0019】在某些實施方式中，每個免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽還包含CH3結構域。在一個實施方式中，一個CH3結構域包含F405L、F405A、F405D、F405E、F405H、F405I、F405K、F405M、F405N、F405Q、F405S、F405T、F405V、F405W、或F405Y突變；並且另一個CH3結構域包含K409R突變；其中胺基酸殘基的編號係根據Kabat中列出的EU索引。在一個實施方式中，一個CH3結構域包含T366W突變；並且另一個CH3結構域包含T366S、L368A、Y407V突變；其中胺基酸殘基的編號係根據Kabat中列出的EU索引。在一個實施方式中，一個CH3結構域包含K/R409D和K392D突變；並且另一個CH3結構域包含D399K和E356K突變；其中胺基酸殘基的編號係根據Kabat中列出的EU索引。在一個實施方式中，一個CH3結構域包含Y349C突變；並且另一個CH3結構域包含E356C或S354C突變；其中胺基酸殘基的編號係根據Kabat中列出的EU索引。在一實施方式中，一個CH3結構域包含Y349C和T366W突變；並且另一個CH3結構域包含E356C、T366S、L368A和Y407V突變；其中胺基酸殘基的編號係根據Kabat中列出的EU索引。在一實施方式中，一個CH3結構域包含Y349C和T366W突變；並且另一個CH3結構域包含S354C、T366S、L368A、Y407V突變；其中胺基酸殘基的編號係根據Kabat中列出之EU索引。

【0020】在某些實施方式中，免疫球蛋白鉸鏈區係IgG1鉸鏈區。

【0021】在某些實施方式中，異多聚體係雙特異性或多特異性抗體。

【圖式簡單說明】

【0022】[圖1]描述了靶向鉸鏈區以形成異二聚體。

【0023】[圖2]描述了人IgG1晶體結構，其在CPPC處沒有顯示第二個二硫鍵，儘管這可能是由X射線數據收集期間的輻射損傷引入的偽影。此外，IgG1鼠晶體結構（1IGY），以及「內部」質譜數據，強烈表明二硫化物C242應該係完整的。因此，利用mIgG1和huIgG2結構作為指導可以更好地理解CPPC模體下游殘基的旋轉異構物位置。

【0024】[圖3]描述了IgG1、IgG2和IgG4之序列比對。

【0025】[圖4]描述了鉸鏈設計和品質控制評估（MSQC）之匯總表。

【0026】[圖5]描述了帶電拉鍊鉸鏈-設計CZH01。根據晶體結構，C239係在IgG1鉸鏈（Saphire和Wilson, Science [科學], 2001（抗HIV-1 B12抗體）內形成二硫橋的唯一C。然而，其他數據表明，第二個Cys（C242）仍然可以形成二硫鍵，而且P241似乎對該相同鍵的發生很重要。那麼合理的是在該第二個二硫鍵下游設計CPM串（見橙色線中的突變），然後在L248C插入新的二硫鍵（橙色虛線）。

【0027】[圖6]描述了分析型CEX和質譜-CZH01。

【0028】[圖7]描述了帶電拉鍊鉸鏈-設計CZH09。

【0029】[圖8]描述了分析型CEX和質譜-CZH09。

【0030】[圖9]描述了IgG2中帶電拉鍊鉸鏈之結構指導。

【0031】[圖10]描述了分析型CEX和質譜-CZH11。

【0032】 [圖11]描述了靶向鉸鏈區以形成異二聚體 + CH3 CPM v11。

【0033】 [圖12]描述了鉸鏈設計 + CH3-CH3’ CPM v11之匯總表。

【0034】 [圖13]描述了對鉸鏈設計的熱穩定性分析。鉸鏈突變對Ab的穩定性沒有負面影響，並且CH3 CPM v11突變似乎降低了Tm +/- 2 deg。

【實施方式】

【0035】 在一個方面，本發明關於一種分離的異多聚體，該異多聚體包含異二聚免疫球蛋白鉸鏈結構域，該異二聚免疫球蛋白鉸鏈結構域包含第一免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽和第二免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽，其中：

【0036】 (i) 該第一免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽包含下列胺基酸取代：P243K、A244K、P245K、N/E246K和L247K；並且

【0037】 (ii) 該第二免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽包含下列胺基酸取代：P243D、A244D、P245D、N/E246D和L247D；

【0038】 其中胺基酸殘基的編號係根據Kabat。

【0039】 在另一方面，本發明關於一種分離的異多聚體，該異多聚體包含異二聚免疫球蛋白鉸鏈結構域，該異二聚免疫球蛋白鉸鏈結構域包含第一免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽和第二免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽，其中：

【0040】 (i) 該第一免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽包含下列胺基酸取代：A244H；並且

【0041】 (ii) 該第二免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽包含下列胺基酸取代：N/E246D和L247D；

【0042】 其中胺基酸殘基的編號係根據Kabat。

【0043】在另一方面，本發明關於一種分離的異多聚體，該異多聚體包含異二聚免疫球蛋白鉸鏈結構域，該異二聚免疫球蛋白鉸鏈結構域包含第一免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽和第二免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽，其中：

【0044】(i) 該第一免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽包含下列胺基酸取代：H237K、T238K、A244K和N/E246K；並且

【0045】(ii) 該第二免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽包含下列胺基酸取代：H237D、T238D、A244D和N/E246D；

【0046】其中胺基酸殘基的編號係根據Kabat。

【0047】在某些實施方式中，異多聚體的每個鉸鏈結構域多肽還包含L248C取代。

【0048】在某些實施方式中，每個免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽還包含CH3結構域。在一個實施方式中，一個CH3結構域包含F405L、F405A、F405D、F405E、F405H、F405I、F405K、F405M、F405N、F405Q、F405S、F405T、F405V、F405W、或F405Y突變；並且另一個CH3結構域包含K409R突變；其中胺基酸殘基的編號係根據Kabat中列出的EU索引。在一個實施方式中，一個CH3結構域包含T366W突變；並且另一個CH3結構域包含T366S、L368A、Y407V突變；其中胺基酸殘基的編號係根據Kabat中列出的EU索引。在一個實施方式中，一個CH3結構域包含K/R409D和K370E突變；並且另一個CH3結構域包含D399K和E357K突變；其中胺基酸殘基的編號係根據Kabat中列出的EU索引。

【0049】在特定實施方式中，異二聚抗體包含第一重鏈和第二重鏈，該第一重鏈包含在位置392和409處的帶負電的胺基酸（例如，K392D和K409D取代），該第二重鏈包含在位置356和399處的帶正電的胺基酸（例如，E356K和D399K取代）。在其它特定實施方式中，異二聚抗體包含第一重鏈和第二重鏈，該第一

重鏈包含在位置392、409和370處的帶負電的胺基酸（例如，K392D、K409D和K370D取代），該第二重鏈包含在位置356、399和357處的帶正電的胺基酸（例如，E356K、D399K和E357K取代）。在相關實施方式中，第一重鏈來自抗CGRP受體抗體，並且第二重鏈來自抗PAC1受體抗體。在其他相關實施方式中，第一重鏈來自抗-PAC1受體抗體，並且第二重鏈來自抗-CGRP受體抗體。

【0050】在一個實施方式中，一個CH3結構域包含Y349C突變；並且另一個CH3結構域包含E356C或S354C突變；其中胺基酸殘基的編號係根據Kabat中列出的EU索引。在一實施方式中，一個CH3結構域包含Y349C和T366W突變；並且另一個CH3結構域包含E356C、T366S、L368A和Y407V突變；其中胺基酸殘基的編號係根據Kabat中列出的EU索引。在一實施方式中，一個CH3結構域包含Y349C和T366W突變；並且另一個CH3結構域包含S354C、T366S、L368A、Y407V突變；其中胺基酸殘基的編號係根據Kabat中列出的EU索引。

【0051】在某些實施方式中，免疫球蛋白鉸鏈區係IgG1鉸鏈區。

【0052】在某些實施方式中，異多聚體係雙特異性或多特異性抗體。

【0053】如本文所使用，術語「抗原結合蛋白」係指特異性結合至一個或多個靶抗原的蛋白質。抗原結合蛋白可包括抗體及其功能片段。「功能性抗體片段」係抗體中不含全長重鏈和/或輕鏈中存在的胺基酸的至少一部分，但仍能夠特異性結合至抗原的部分。功能性抗體片段包括但不限於Fab片段、Fab'片段、$F(ab')_2$片段、Fv片段、Fd片段和互補決定區（CDR）片段，且可以衍生自任何哺乳動物來源，例如人類、小鼠、大鼠、兔或駱駝。功能性抗體片段可以與完整抗體競爭結合靶抗原且該等片段可以藉由修飾完整抗體（例如酶或化學裂解）或使用重組DNA技術或肽合成從頭合成獲得。

【0054】抗原結合蛋白還可包括包含併入單一多肽鏈中或併入多個多肽鏈中的一個或多個功能性抗體片段的蛋白質。例如，抗原結合蛋白可以包括但不限於單鏈Fv（scFv）、雙抗體（diabody）（參見，例如，EP 404,097；WO 93/11161；和Hollinger等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美國科學院院報]，第90卷:6444-6448，1993）；內抗體；結構域抗體（單VL或VH結構域或者藉由肽連接子（linker）接合的兩個或多個VH結構域；參見*Ward*等人，Nature [自然]，第341卷:544-546, 1989）；大分子抗體（2個scFv與Fc區的融合物，參見Fredericks等人，Protein Engineering [蛋白質工程改造], Design & Selection [設計和選擇]，第17卷：95-106, 2004；和Powers等人，Journal of Immunological Methods [免疫法雜誌]，第251卷:123-135, 2001）；三抗體（triabody）；四抗體（tetrabody）；微抗體（minibody）（scFv與CH3結構域的融合物；參見Olafsen等人, Protein Eng Des Sel[蛋白質工程設計與選擇]. , 第17卷:315-23, 2004）；肽抗體（一個或多個肽附接至Fc區，參見WO 00/24782）；線性抗體（一對串聯的Fd區段（VH-CH1-VH-CH1），其與互補輕鏈多肽一起形成一對抗原結合區，參見Zapata等人，Protein Eng. [蛋白質工程化], 第8卷:1057-1062, 1995）；小模組免疫藥物（small modular immunopharmaceutical）（參見美國專利公開案號20030133939）；免疫球蛋白融合蛋白（例如IgG-scFv、IgG-Fab、2scFv-IgG、4scFv-IgG、VH-IgG、IgG-VH和Fab-scFv-Fc）。

【0055】「多特異性」係指抗原結合蛋白能夠特異性結合兩種或更多種不同的抗原。「雙特異性」係指抗原結合蛋白能夠特異性結合兩種不同的抗原。如本文所用，當抗原結合蛋白在類似結合測定條件下對靶抗原的結合親和力明顯高於其對其他不相關蛋白質的親和力且因此能夠相區分時，該抗原結合蛋白

「特異性結合至」該抗原。特異性結合抗原的抗原結合蛋白的平衡解離常數（K_D）≤1 x 10^{-6} M。當K_D≤1 x 10^{-8} M時，抗原結合蛋白以「高親和力」特異性結合抗原。

【0056】使用多種技術，例如親和ELISA測定確定親和力。在各種實施方式中，藉由表面電漿共振測定（例如，基於BIAcore®的測定）確定親和力。使用此技術，可以測量締合速率常數（以$M^{-1}s^{-1}$表示的k_a）和解離速率常數（以s^{-1}表示的k_d）。平衡解離常數（以M表示的K_D）則可以由動力學速率常數的比率（k_d/k_a）計算。在一些實施方式中，藉由動力學方法，例如Rathanaswami等人，Analytical Biochemistry [分析生物化學]，第373卷:52-60, 2008中所描述的動力學排除測定（KinExA）確定親和力。使用KinExA測定，可以測量平衡解離常數（以M表示的K_D）和締合速率常數（以$M^{-1}s^{-1}$表示的k_a）。解離速率常數（以s^{-1}表示的k_d）可以由該等值計算（K_D x k_a）。在其他實施方式中，藉由平衡/溶液方法確定親和力。在某些實施方式中，藉由FACS結合測定確定親和力。

【0057】在一些實施方式中，本文所述之雙特異性抗原結合蛋白表現出期望的特性，例如藉由K_d（解離速率常數）測量的約10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}、10^{-7}、10^{-8}、10^{-9}、10^{-10} s^{-1}或更低的結合親合力（更低的值表示更高的結合親合力）、和/或藉由K_D（平衡解離常數）測量的約10^{-9}、10^{-10}、10^{-11}、10^{-12}、10^{-13}、10^{-14}、10^{-15}、10^{-16} M的結合親和力（更低的值表示更高的結合親和力）。

【0058】如本文所用，術語「抗原結合結構域」可與「結合結構域」互換使用，係指抗原結合蛋白的區域，該區域含有與抗原相互作用並賦予抗原結合蛋白對抗原的特異性和親和力的胺基酸殘基。

【0059】如本文所用，術語「CDR」係指抗體可變序列內的互補決定區（也稱為「最小識別單元」或「高變區」）。有三個重鏈可變區CDR（CDRH1、CDRH2和CDRH3）和三個輕鏈可變區CDR（CDRL1、CDRL2和CDRL3）。本文中使用

的術語「CDR區」係指出現在單個可變區中的三個CDR的組（即三個輕鏈CDR或三個重鏈CDR）。兩個鏈的每個中的CDR典型地藉由框架區對齊以形成與靶蛋白上的特定表位或結構域特異性結合的結構。自N末端至C末端，天然存在的輕鏈和重鏈可變區典型地遵循該等元件的以下次序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及FR4。編號系統係將編號指派給在該等結構域的每一個中佔據位置的胺基酸來獲得。該編號系統定義於Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest[具有免疫學意義的蛋白質的Kabat序列]（1987和1991, NIH, 貝塞斯達（Bethesda）, 馬里蘭州）或Chothia & Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.*[分子生物學雜誌] 196:901-917; Chothia等人, 1989, Nature[自然] 342:878-883。給定抗體的互補決定區（CDR）和框架區（FR）可以使用此系統標識。

【0060】在本發明的雙特異性抗原結合蛋白的一些實施方式中，結合結構域包括Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv、單鏈可變片段（scFv）或奈米抗體。在一個實施方式中，兩個結合結構域皆為Fab片段。在另一個實施方式中，一個結合結構域係Fab片段，另一個結合結構域係scFv。

【0061】木瓜蛋白酶消化抗體產生兩個相同的抗原結合片段，稱為「Fab」片段，每個片段有單抗原結合位點和含有免疫球蛋白恒定區的殘餘「Fc」片段。Fab片段包含所有可變結構域，以及輕鏈的恒定結構域和重鏈的第一恒定結構域（CH1）。因此，「Fab片段」由一個免疫球蛋白輕鏈（輕鏈可變區（VL）和恒定區（CL））以及一個免疫球蛋白重鏈的CH1區和可變區（VH）構成。Fab分子的重鏈不能與另一重鏈分子形成二硫鍵。Fc片段展示碳水化合物，並負責許多抗體效應子功能（如結合補體和細胞受體），該抗體效應子功能區分一類抗體和另一類抗體。「Fd片段」包含來自免疫球蛋白重鏈的VH和CH1結構域。Fd片段代表Fab片段的重鏈組分。

【0062】「Fab'片段」係在CH1結構域的C末端具有一個或多個來自抗體鉸鏈區的半胱胺酸殘基的Fab片段。

【0063】「$F(ab')_2$片段」係包含兩個Fab'片段的二價片段，該兩個Fab'片段藉由在鉸鏈區的重鏈之間的二硫橋連接。

【0064】「Fv」片段係包含來自抗體的完整抗原識別和結合位點的最小片段。該片段由一個免疫球蛋白重鏈可變區（VH）和一個免疫球蛋白輕鏈可變區（VL）緊密非共價結合的二聚體組成。正係在這種組態中，每個可變區的三個CDR相互作用，以在VH-VL二聚體表面定義抗原結合位點。單個輕鏈或重鏈可變區（或僅包含三個對抗原特異的CDR的Fv片段的一半）具有識別和結合抗原的能力，儘管其親和力低於包含VH和VL的整個結合位點。

【0065】「單鏈可變抗體片段」或「scFv片段」包含抗體的VH和VL區，其中該等區存在於單個多肽鏈中，並且視需要包含VH和VL區域之間的肽連接子，該肽連接子使Fv能夠形成用於抗原結合的所需結構（參見例如，Bird等人, Science [科學], 第242:423-426, 1988；和Huston等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美國科學院院報], 第85卷:5879-5883, 1988）。

【0066】「奈米抗體」係重鏈抗體之重鏈可變區。這類可變結構域係這類重鏈抗體中最小的全功能抗原結合片段，分子量僅為15 kDa。參見Cortez-Retamozo等人, *Cancer Research*[癌症研究] 64:2853-57, 2004。不含輕鏈之功能性重鏈抗體天然存在於某些動物物種中，例如護士鯊、沃比貢鯊和駱駝科，例如駱駝、單峰駱駝、羊駝和美洲駝。在該等動物中，抗原結合位點被減少為單一結構域，即VHH結構域。該等抗體僅使用重鏈可變區形成抗原結合區，即，該等功能性抗體係僅具有結構H_2L_2的重鏈同二聚體（稱為「重鏈抗體」或「HCAb」）。據報導，駱駝化的VHH與IgG2和IgG3恒定區重組，該等恒定區含

有鉸鏈、CH2和CH3結構域並且缺少CH1結構域。已發現駱駝化VHH結構域以高親和力與抗原結合（Desmyter等人，J. Biol. Chem.[生物化學雜誌], 卷276:26285-90, 2001）並在溶液中具有高穩定性（Ewert等人, Biochemistry[生物化學], 第41卷:3628-36, 2002）。用於產生具有駱駝化重鏈的抗體之方法在例如美國專利公開案號2005/0136049和2005/0037421中描述。可替代的支架可以由更接近於鯊魚V-NAR支架的人可變樣結構域製成，並且可能提供用於長穿透環結構的框架。

【0067】特別是本發明的雙特異性抗原結合蛋白之實施方式，結合結構域包含特異性結合所需抗原的抗體或抗體片段的免疫球蛋白重鏈可變區（VH）和免疫球蛋白輕鏈可變區（VL）。

【0068】本文中可與「可變結構域」互換使用的「可變區」（輕鏈（VL）的可變區，重鏈（VH）的可變區）係指輕和重免疫球蛋白鏈中的每一個中直接參與抗體與抗原結合的區。如上該，可變輕鏈和可變重鏈的區具有相同的一般結構，並且每個區包含四個框架（FR）區，該框架區的序列係廣泛保守的，由三個CDR連接。框架區呈β-折疊構形且CDR可以形成連接該β-折疊結構的環。各鏈中的CDR藉由框架區保持其三維結構，且與來自另一鏈的CDR一起形成抗原結合位點。

【0069】與靶抗原特異性結合的結合結構域可以衍生自a) 該等抗原的已知抗體，或者b) 藉由使用抗原蛋白或其片段的從頭免疫方法，藉由噬菌體展示或其它常規方法獲得的新抗體或抗體片段。衍生出雙特異性抗原結合蛋白的結合結構域的抗體可為單株抗體、多株抗體、重組抗體、人抗體或人源化抗體。在某些實施方式中，衍生結合結構域的抗體係單株抗體。在該等和其他實施方式中，抗體係人抗體或人源化抗體，並且可為IgG1-、IgG2-、IgG3-或IgG4-型。

【0070】如本文所使用，術語「單株抗體」（或「mAb」）係指自基本上同源的抗體群獲得的一種抗體，即，構成該群體的個別抗體除以微量存在的可能天然存在的突變外為一致的。相對於典型地包括針對不同表位的不同抗體的多株抗體製劑，單株抗體針對個別抗原位點或表位具有高度特異性。可使用本領域中已知的任何技術，例如藉由在完成免疫程序之後使自轉基因動物收集的脾臟細胞永生化來產生單株抗體。可以使用本領域中已知的任何技術，例如藉由使脾細胞與骨髓瘤細胞融合以產生雜交瘤來使脾細胞永生化。用於產生雜交瘤的融合程序的骨髓瘤細胞較佳的是非抗體產生的，具有高融合效率和酶缺陷，並且使得它們不能在某些選擇性培養基中生長，該培養基僅支持所希望的融合細胞（雜交瘤）的生長。適用於小鼠融合的細胞系之實例包括Sp-20、P3-X63/Ag8、P3-X63-Ag8.653、NS1/1.Ag 4 1、Sp210-Ag14、FO、NSO/U、MPC-11、MPC11-X45-GTG 1.7及S194/5XXO Bul；用於大鼠融合的細胞系之實例包括R210.RCY3、Y3-Ag 1.2.3、IR983F及4B210。可用於細胞融合的其他細胞系係U-266、GM1500-GRG2、LICR-LON-HMy2和UC729-6。

【0071】在一些情況下，藉由以下來來產生雜交瘤細胞系：用靶抗原免疫動物（例如，具有人免疫球蛋白序列的轉基因動物）；自經免疫動物收集脾細胞；使收集的脾細胞與骨髓瘤細胞系融合，由此產生雜交瘤細胞；從該雜交瘤細胞建立雜交瘤細胞系，並鑒定產生結合靶抗原的抗體的雜交瘤細胞系。

【0072】由雜交瘤細胞系分泌的單株抗體可以使用本領域中已知的任何技術，例如蛋白質A-瓊脂糖凝膠、羥磷灰石層析法、凝膠電泳、透析或親和層析法純化。可以進一步篩選雜交瘤或mAb以鑒定具有特定性質的mAb，該特定性質係例如結合表現靶抗原的細胞的能力、阻斷或干擾靶抗原配位基與其各自受體結合的能力、或功能性地阻斷任一受體的能力，例如cAMP測定。

【0073】在一些實施方式中，本發明的雙特異性抗原結合蛋白的結合結構域可衍生自人源化抗體。「人源化抗體」係指其中區（例如框架區）已被修飾以包含來自人免疫球蛋白的對應區的抗體。通常，人源化抗體可以從最初在非人動物中產生的單株抗體產生。該單株抗體中的某些胺基酸殘基，典型地來自抗體的非抗原識別部分的胺基酸殘基經修飾成與相應同種型的人類抗體中的相應殘基同源。人源化可以例如使用各種方法，藉由將齧齒動物可變區的至少一部分替換人抗體的相應區來進行（參見例如美國專利案號5,585,089和5,693,762；Jones等人, Nature[自然], 第321卷:522-525, 1986；Riechmann等人, Nature[自然], 第332卷:323-27, 1988；Verhoeyen等人, Science[科學], 第239卷:1534-1536, 1988）。在另一物種中產生的抗體的輕鏈可變區和重鏈可變區的CDR可以嫁接到共有人類FR上。為了確定共有人類FR，可以比對來自若干人類重鏈或輕鏈胺基酸序列的FR以鑒別共有胺基酸序列。

【0074】針對靶抗原產生的新抗體（從其衍生本發明的雙特異性抗原結合蛋白的結合結構域）可為完全人類抗體。「完全人類抗體」係包含來源於或指示人類生殖系免疫球蛋白序列的可變區和恒定區的抗體。提供的用於產生完全人類抗體的一種特定方式係小鼠體液免疫系統的「人源化」。將人類免疫球蛋白（Ig）基因座引入內源性Ig基因失活的小鼠中是在小鼠中產生完全人類單株抗體（mAb）的一種方式，小鼠係可以免疫接種任何所需抗原的動物。使用完全人類抗體可以使免疫原性和過敏性應答減到最少，該等應答有時係由向人類投與小鼠或小鼠源性mAb作為治療劑而引起。

【0075】可以藉由對在不產生內源性免疫球蛋白情況下，能夠產生人類抗體譜系的轉基因動物（通常為小鼠）免疫接種來產生完全人類抗體。用於此目的的抗原典型地具有六個或更多個連續胺基酸，且視需要與運載體，例如半抗

原結合。參見例如，Jakobovits等人，1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美國科學院院報] 90:2551-2555；Jakobovits等人, 1993, Nature [自然] 362:255-258；和Bruggermann等人, 1993, Year in Immunol.[免疫學年評] 7:33。在此類方法的一個實例中，藉由使編碼小鼠重鏈和輕鏈免疫球蛋白鏈的內源小鼠免疫球蛋白基因座失去能力，並將含有編碼人類重鏈和輕鏈蛋白質的含人類基因組DNA的基因座的較大片段插入小鼠基因組中來產生轉基因動物。接著對具有少於人類免疫球蛋白基因座完全補體的部分修飾的動物進行雜交繁育，以獲得具有全部所需免疫系統修飾的動物。當投與免疫原時，該等轉基因動物產生對該免疫原具有免疫特異性，同時具有人類而非鼠類胺基酸序列，包括可變區的抗體。有關此類方法的進一步細節，參見例如WO96/33735和WO94/02602。有關用於製備人類抗體的轉基因小鼠的其他方法描述於美國專利案號5,545,807、6,713,610；6,673,986；6,162,963；5,939,598；5,545,807；6,300,129；6,255,458；5,877,397；5,874,299和5,545,806；以及PCT公開WO 91/10741、WO 90/04036、WO 94/02602、WO 96/30498、WO 98/24893；以及EP 546073B1和EP 546073A1中。

【0076】上述轉基因小鼠在本文中稱為「HuMab」小鼠，含有編碼未重排人類重鏈（μ和γ）和κ輕鏈免疫球蛋白序列以及使內源μ和κ鏈基因座失活的靶突變的人類免疫球蛋白基因微型基因座（Lonberg等人，1994, Nature [自然] 368:856-859）。因此，該小鼠展現了小鼠IgM或κ表現以及對免疫的應答降低，且使引入的人類重鏈和輕鏈轉基因經歷類別轉換和體細胞突變以產生高親和力人類IgGκ單株抗體（Lonberg等人, 同上；Lonberg和Huszar, 1995, Intern. Rev. Immunol.[國際免疫學綜述] 13: 65-93；Harding和Lonberg, 1995, Ann. N.Y Acad. Sci.[紐約科學院年鑒] 764:536-546）。HuMab小鼠的製備詳細描述於以下中：Taylor等人，1992, Nucleic Acids Research [核酸研究] 20:6287-6295；Chen等人，

1993, International Immunology [國際免疫學] 5:647-656；Tuaillon等人, 1994, J. Immunol. [免疫學雜誌] 152:2912-2920；Lonberg等人, 1994, Nature [自然] 368:856-859；Lonberg, 1994, Handbook of Exp. Pharmacology [實驗藥理學手冊] 113:49-101；Taylor等人，1994, International Immunology [國際免疫學] 6:579-591；Lonberg和Huszar, 1995, Intern. Rev. Immunol.[國際免疫學綜述] 13:65-93；Harding和Lonberg, 1995, Ann. N.Y Acad. Sci.[紐約科學院年鑒] 764:536-546；Fishwild等人，1996, Nature Biotechnology [自然生物技術] 14:845-851；上述參考文獻出於所有目的而藉由全文引用併入在此。另參見美國專利案號5,545,806、5,569,825；5,625,126；5,633,425；5,789,650；5,877,397；5,661,016；5,814,318；5,874,299和5,770,429；以及美國專利案號5,545,807；國際公開案號WO 93/1227、WO 92/22646；及WO 92/03918，所有參考文獻的揭露內容均出於所有目的而藉由全文引用併入在此。用於在該等轉基因小鼠中產生人類抗體的技術還揭露於WO 98/24893和Mendez等人，1997, Nature Genetics [自然遺傳學] 15:146-156中，其藉由引用併入本文中。

【0077】 人類來源的抗體還可使用噬菌體展示技術產生。噬菌體展示描述於例如Dower等人，WO 91/17271；McCafferty等人，WO 92/01047；以及Caton和Koprowski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美國科學院院報], 87:6450-6454 (1990)中，其各自藉由引用以其全文併入本文中。由噬菌體技術產生的抗體通常在細菌中是以抗原結合片段，例如Fv或Fab片段形式產生，且因此缺乏效應子功能。效應子功能可以藉由以下兩種策略之一引入： 必要時，可以將該等片段工程改造成完整抗體以在哺乳動物細胞中表現，或工程改造成具有能夠觸發效應子功能的第二結合位點的雙特異性抗體片段。典型地，利用PCR分開選殖抗體的Fd片段（VH-CH1）和輕鏈（VL-CL）並在組合噬菌體展示文庫中隨機重組，接著

可以針對與特定抗原的結合進行選擇。在噬菌體表面上表現該等抗體片段，並利用抗原結合，經數輪抗原結合和再擴增來選擇Fv或Fab（且因此選擇含有編碼該抗體片段的DNA的噬菌體），此程序稱為淘選（panning）。對於抗原具有特異性的抗體片段富集且最終分離。噬菌體展示技術還可用於使齧齒動物單株抗體人源化之方法中，稱為「導向選擇」（參見Jespers, L. S.,等人，Bio/Technology [生物/技術] 12、899-903（1994））。為此，可以將小鼠單株抗體的Fd片段與人類輕鏈文庫組合展示，且接著可以用抗原選出由此獲得的雜交Fab文庫。小鼠Fd片段由此提供導向選擇的模板。隨後，將所選人類輕鏈與人類Fd片段文庫（library）組合。所得文庫的選擇獲得完全人類Fab。

【0078】在某些實施方式中，本發明的雙特異性抗原結合蛋白係抗體。如本文所使用，術語「抗體」係指包含兩個輕鏈多肽（各自約25 kDa）和兩個重鏈多肽（各自約50-70 kDa）的四聚免疫球蛋白。術語「輕鏈」或「免疫球蛋白輕鏈」係指自胺基末端至羧基末端包含單一免疫球蛋白輕鏈可變區（VL）和單一免疫球蛋白輕鏈恒定結構域（CL）的多肽。免疫球蛋白輕鏈恒定結構域（CL）可為kappa（κ）或lambda（λ）。術語「重鏈」或「免疫球蛋白重鏈」係指自胺基末端至羧基末端包含單一免疫球蛋白重鏈可變區（VH）、免疫球蛋白重鏈恒定結構域1（CH1）、免疫球蛋白鉸鏈區、免疫球蛋白重鏈恒定結構域2（CH2）、免疫球蛋白重鏈恒定結構域3（CH3）和視需要免疫球蛋白重鏈恒定結構域4（CH4）的多肽。重鏈分類為mu（μ）、delta（Δ）、gamma（γ）、alpha（α）、和epsilon（ε）鏈，且其分別將抗體同種型定義為IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。IgG類別和IgA類別的抗體進一步細分為數個亞類，即分別為IgG1、IgG2、IgG3和IgG4，以及IgA1和IgA2。IgG、IgA和IgD抗體中的重鏈具有三個結構域（CH1、CH2和CH3），而IgM和IgE抗體中的重鏈具有四個結構域（CH1、CH2、CH3和

CH4）。免疫球蛋白重鏈恒定結構域可以來自任何免疫球蛋白同種型，包括亞型。抗體鏈係經由在CL結構域與CH1結構域之間（即，在輕鏈與重鏈之間）和在抗體重鏈的鉸鏈區之間的多肽間二硫鍵連接在一起。

【0079】在特定的實施方式中，本發明的雙特異性抗原結合蛋白係異二聚抗體（在此可與「異免疫球蛋白」或「異Ig」互換使用），其指的是包含兩個不同輕鏈和兩個不同重鏈之抗體。

【0080】異二聚抗體可包含任何免疫球蛋白恒定區。如本文所使用，術語「恒定區」係指抗體中除可變區外的所有結構域。恒定區不直接參與抗原的結合，但展現各種效應子功能。如以上所描述，抗體取決於其重鏈恒定區的胺基酸序列而分為特定同種型（IgA、IgD、IgE、IgG和IgM）和亞型（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2）。輕鏈恒定區可以為例如見於全部五個抗體同種型中的κ型或λ型輕鏈恒定區，例如人類κ型或λ型輕鏈恒定區。

【0081】異二聚抗體的重鏈恒定區可以為例如α、Δ、ε、γ或μ型重鏈恒定區，例如人類α、Δ、ε、γ或μ型重鏈恒定區。在一些實施方式中，異二聚抗體包含來自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4免疫球蛋白的重鏈恒定區。在一個實施方式中，異二聚抗體包含來自人類IgG1免疫球蛋白的重鏈恒定區。在另一實施方式中，異二聚抗體包含來自人類IgG2免疫球蛋白的重鏈恒定區。

【0082】在一個實施方式中，本公開的雙特異性抗體係Duobody™，其可由如以下中所描述的DuoBody™技術平臺（Genmab a/S）製備：例如國際公開案號WO 2008/119353、WO 2011/131746、WO 2011/147986、和WO 2013/060867，Labrijn A F等人, PNAS[美國科學院院報], 110(13): 5145-5150 (2013)，Gramer等人, mAbs[單株抗體], 5(6): 962-973 (2013)和Labrijn等人, Nature Protocols[自然實驗方案], 9(10): 2450-2463 (2014)。該技術可用於將含有兩個重鏈和兩個輕鏈的第

一單特異性抗體的一半與含有兩個重鏈和兩個輕鏈的第二單特異性抗體的一半組合。所得的異二聚體包含來自第一抗體的一個重鏈和一個輕鏈與來自第二抗體的一個重鏈和一個輕鏈配對。當兩個單特異性抗體識別不同抗原上的不同表位時，所生成的異二聚體即為雙特異性抗體。

【0083】對於DuoBody™平臺，單特異性抗體中的每個都包括在CH3結構域中具有單點突變的重鏈恒定區。該等點突變允許產生的雙特異性抗體中的CH3結構域之間的相互作用比沒有突變的任一單特異性抗體中的CH3結構域之間的相互作用更強。每個單特異性抗體中的單點突變可以在重鏈恒定區CH3結構域的殘基366、368、370、399、405、407或409（EU編號）處（參見WO 2011/131746）。此外，單點突變位於一個單特異性抗體中相對於另一個單特異性抗體的不同殘基處。例如，一個單特異性抗體可包含突變F405L（EU編號；殘基405處的苯丙胺酸到白胺酸突變），或F405A、F405D、F405E、F405H、F405I、F405K、F405M、F405N、F405Q、F405S、F405T、F405V、F405W和F405Y突變之一，而另一個單特異性抗體可包含突變K409R（EU編號；殘基409處的離胺酸到精胺酸突變）。單特異性抗體的重鏈恒定區可為IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同種型（例如，人IgG1同種型），並且藉由DuoBody™技術產生的雙特異性抗體可以被修飾以改變（例如，減少）Fc介導的效應子功能和/或改善半衰期。製作Duobody™的一種方法包括以下內容：(i) 分開地表現在CH3結構域中含有單個匹配點突變（即K409R和F405L（或F405A、F405D、F405E、F405H、F405I、F405K、F405M、F405N、F405Q、F405S、F405T、F405V、F405W和F405Y突變之一）（EU編號））的兩個親本IgG1；(ii) 在體外允許的氧化還原條件下混合親本IgG1以使半分子能夠重組；(iii) 除去還原劑以允許鏈間二硫鍵的再氧化；以及 (iv) 使用基於層析或基

於質譜（MS）之方法分析交換效率和最終產物（參見Labrijn等人, Nature Protocols[自然實驗方案], 9(10): 2450-2463 (2014)）。

【0084】另一種製備雙特異性抗體的示例性方法係藉由杵-臼技術（Ridgway等人, Protein Eng.[蛋白質工程], 9:617-621 (1996)；WO 2006/028936）。在該技術中，藉由對形成IgG中CH3結構域介面的選定胺基酸進行突變，減少了Ig重鏈錯配問題，該問題係製備雙特異性抗體的主要缺陷。在CH3結構域內兩個重鏈直接相互作用的位置，一個重鏈的序列中引入具有小側鏈的胺基酸（杵臼），另一個重鏈上的對應相互作用殘基位置引入具有大側鏈的胺基酸（杵）。在一些情況下，本公開的抗體具有免疫球蛋白鏈，其中CH3結構域已經藉由對在兩個多肽之間的介面處相互作用的選定胺基酸進行突變而被修飾，以便優先形成雙特異性抗體。雙特異性抗體可以由同一亞類或不同亞類的免疫球蛋白鏈構成。在一個實例中，結合gp120和CD3的雙特異性抗體包含「杵鏈」中的T366W（EU編號）突變和「臼鏈」中的T366S、L368A、Y407V 9EU編號）突變。在某些實施方式中，藉由例如將Y349C突變引入「杵鏈」並且將E356C突變或S354C突變引入「臼鏈」，在CH3結構域之間引入另外的鏈間二硫橋。在某些實施方式中，在「杵鏈」中引入R409D、K370E突變，並且在「臼鏈」中引入D399K、E357K突變。在其他實施方式中，在鏈之一中引入Y349C、T366W突變，並且在對應鏈中引入E356C、T366S、L368A、Y407V突變。在一些實施方式中。在一個鏈中引入Y349C、T366W突變，並且在對應鏈中引入S354C、T366S、L368A、Y407V突變。在其他實施方式中，在一個鏈中引入Y349C、T366W突變，並且在對應鏈中引入S354C、T366S、L368A、Y407V突變。在又其他實施方式中，在一個鏈中引入Y349C、T366W突變，並且在對應鏈中引入S354C、T366S、L368A、Y407V突變（都按照EU編號）。

【0085】製備雙特異性抗體的另一種方法係CrossMab技術。CrossMab係由兩個全長抗體的一半構成之嵌合抗體。為了實現正確的鏈配對，它組合了兩種技術：(i) 有利於兩個重鏈之間正確配對的杵-臼；和 (ii) 兩個Fab之一的重鏈和輕鏈之間的交換，以引入避免輕鏈錯配的不對稱性。參見，Ridgway等人, Protein Eng.[蛋白質工程], 9:617-621 (1996)；Schaefer等人, PNAS[美國科學院院報], 108:11187-11192 (2011)。CrossMab可以組合兩個或更多個抗原結合域，用於靶向兩個或更多個靶標，或用於向一個靶標引入二價性，例如2 : 1形式。

【0086】為了促進特定重鏈與其同源輕鏈的締合，重鏈和輕鏈都可以包含互補性胺基酸取代。如本文所用，「互補性胺基酸取代」係指一個鏈中帶正電的胺基酸的取代與另一個鏈中帶負電的胺基酸之取代配對。例如，在一些實施方式中，重鏈包含至少一個胺基酸取代以引入帶電胺基酸，並且相應的輕鏈包含至少一個胺基酸取代以引入帶電胺基酸，其中引入重鏈中的帶電胺基酸與引入輕鏈中的胺基酸具有相反的電荷。在某些實施方式中，一個或多個帶正電的殘基（例如離胺酸、組胺酸或精胺酸）可被引入第一輕鏈（LC1）中，並且一個或多個帶負電的殘基（例如天冬胺酸或麩胺酸）可被引入LC1/HC1結合介面處的相伴重鏈（HC1）中，而一個或多個帶負電的殘基（例如，天冬胺酸或麩胺酸）可被引入第二輕鏈（LC2）中，並且一個或多個帶正電的殘基（例如，離胺酸、組胺酸或精胺酸）可被引入LC2/HC2結合介面處的相伴重鏈（HC2）中。當介面處相反的帶電殘基（極性）吸引時，靜電相互作用將引導LC1與HC1成對，LC2與HC2成對。在介面處具有相同帶電殘基（極性）的重/輕鏈對（例如LC1/HC2和LC2/HC1）將排斥，導致抑制不需要的HC/LC配對。

【0087】在該等和其他實施方式中，重鏈的CH1結構域或輕鏈的CL結構域包含與野生型IgG胺基酸序列不同的胺基酸序列，使得野生型IgG胺基酸序列中

的一個或多個帶正電的胺基酸被一個或多個帶負電的胺基酸替換。可替代地，重鏈的CH1結構域或輕鏈的CL結構域包含與野生型IgG胺基酸序列不同的胺基酸序列，使得野生型IgG胺基酸序列中的一個或多個帶負電的胺基酸被一個或多個帶正電的胺基酸替換。在一些實施方式中，異二聚抗體中的第一和/或第二重鏈的CH1結構域中在選自F126、P127、L128、A141、L145、K147、D148、H168、F170、P171、V173、Q175、S176、S183、V185和K213的EU位置處的一個或多個胺基酸被帶電胺基酸替換。在某些實施方式中，用帶負電或正電的胺基酸取代的較佳的殘基係S183（EU編號系統）。在一些實施方式中，S183被帶正電的胺基酸取代。在可替代的實施方式中，S183被帶負電的胺基酸取代。例如，在一個實施方式中，S183在第一重鏈中被帶負電的胺基酸（例如S183E）取代，並且S183在第二重鏈中被帶正電的胺基酸（例如S183K）取代。

【0088】在輕鏈為κ輕鏈的實施方式中，異二聚抗體中的第一和/或第二輕鏈的CL結構域中在選自F116、F118、S121、D122、E123、Q124、S131、V133、L135、N137、N138、Q160、S162、T164、S174和S176的位置（在κ輕鏈中以EU和Kabat編號）處的一個或多個胺基酸被帶電胺基酸替換。在輕鏈為λ輕鏈的實施方式中，異二聚抗體中的第一和/或第二輕鏈的CL結構域中在選自T116、F118、S121、E123、E124、K129、T131、V133、L135、S137、E160、T162、S165、Q167、A174、S176和Y178之位置（在λ鏈中以Kabat編號）處的一個或多個胺基酸被帶電胺基酸替換。在一些實施方式中，用帶負電或正電的胺基酸取代的較佳的殘基係κ或λ輕鏈的CL結構域的S176（EU和Kabat編號系統）。在某些實施方式中，CL結構域的S176被帶正電的胺基酸替換。在可替代的實施方式中，CL結構域的S176被帶負電的胺基酸替換。在一個實施方式中，S176在第一輕鏈中

被帶正電的胺基酸（例如S176K）取代，並且S176在第二輕鏈中被帶負電的胺基酸（例如S176E）取代。

【0089】除了CH1和CL結構域中的互補性胺基酸取代或作為替代，異二聚抗體中輕鏈和重鏈的可變區可包含一個或多個互補性胺基酸取代以引入帶電胺基酸。例如，在一些實施方式中，異二聚抗體的重鏈的VH區或輕鏈的VL區包含與野生型IgG胺基酸序列不同的胺基酸序列，使得野生型IgG胺基酸序列中的一個或多個帶正電的胺基酸被一個或多個帶負電的胺基酸替換。可替代地，重鏈的VH區或輕鏈的VL區包含與野生型IgG胺基酸序列不同的胺基酸序列，使得野生型IgG胺基酸序列中的一個或多個帶負電的胺基酸被一個或多個帶正電的胺基酸替換。

【0090】VH區內的V區介面殘基（即，介導VH和VL區組裝的胺基酸殘基）包括Kabat位置1、3、35、37、39、43、44、45、46、47、50、59、89、91和93。VH區中的該等介面殘基中的一個或多個可以被帶電（帶正電或負電）胺基酸取代。在某些實施方式中，第一和/或第二重鏈的VH區中Kabat位置39處的胺基酸被帶正電的胺基酸（例如離胺酸）取代。在可替代的實施方式中，第一和/或第二重鏈的VH區中Kabat位置39處的胺基酸被帶負電的胺基酸（例如麩胺酸）取代。在一些實施方式中，第一重鏈的VH區中的Kabat位置39處的胺基酸被帶負電的胺基酸（例如G39E）取代，並且第二重鏈的VH區中的Kabat位置39處的胺基酸被帶正電的胺基酸（例如G39K）取代。在一些實施方式中，第一和/或第二重鏈的VH區中Kabat位置44處的胺基酸被帶正電的胺基酸（例如離胺酸）取代。在可替代的實施方式中，第一和/或第二重鏈的VH區中Kabat位置44處的胺基酸被帶負電的胺基酸（例如麩胺酸）取代。在某些實施方式中，第一重鏈的VH區中

的Kabat位置44處的胺基酸被帶負電的胺基酸（例如G44E）取代，並且第二重鏈的VH區中的Kabat位置44處的胺基酸被帶正電的胺基酸（例如G44K）取代。

【0091】 VL區內的V區介面殘基（即，介導VH和VL區組裝的胺基酸殘基）包括Kabat位置32、34、35、36、38、41、42、43、44、45、46、48、49、50、51、53、54、55、56、57、58、85、87、89、90、91和100。VL區中的一個或多個介面殘基可以用帶電胺基酸（較佳的是與引入同源重鏈的VH區中的那些具有相反電荷的胺基酸）取代。在一些實施方式中，第一和/或第二輕鏈的VL區中Kabat位置100處的胺基酸被帶正電的胺基酸（例如離胺酸）取代。在可替代的實施方式中，第一和/或第二輕鏈的VL區中Kabat位置100處的胺基酸被帶負電的胺基酸（例如麩胺酸）取代。在某些實施方式中，第一輕鏈的VL區中的Kabat位置100處的胺基酸被帶正電的胺基酸（例如G100K）取代，並且第二輕鏈的VL區中的Kabat位置100處的胺基酸被帶負電的胺基酸（例如G100E）取代。

【0092】 在某些實施方式中，本發明的異二聚抗體包含第一重鏈和第二重鏈以及第一輕鏈和第二輕鏈，其中該第一重鏈在位置44（Kabat）、183（EU）、392（EU）和409（EU）處包含胺基酸取代，其中該第二重鏈在位置44（Kabat）、183（EU）、356（EU）和399（EU）處包含胺基酸取代，其中該第一和第二輕鏈在位置100（Kabat）和176（EU）處包含胺基酸取代，並且其中該胺基酸取代在所述位置處引入帶電胺基酸。在相關的實施方式中，第一重鏈的位置44（Kabat）處的甘胺酸被麩胺酸替代，第二重鏈的位置44（Kabat）處的甘胺酸被離胺酸替代，第一輕鏈的位置100（Kabat）處的甘胺酸被離胺酸替代，第二輕鏈的位置100（Kabat）處的甘胺酸被麩胺酸替代，第一輕鏈的位置176（EU）處的絲胺酸被離胺酸替代，第二輕鏈的位置176（EU）處的絲胺酸被麩胺酸替代，第一重鏈的位置183（EU）處的絲胺酸被麩胺酸替代，第一重鏈的位置392（EU）處的離胺

酸被天冬胺酸替代，第一重鏈的位置409（EU）處的離胺酸被天冬胺酸替代，第二重鏈的位置183（EU）處的絲胺酸被離胺酸替代，第二重鏈的位置356（EU）處的麩胺酸被離胺酸取替代，和/或第二重鏈的位置399（EU）處的天冬胺酸被離胺酸替代。

【0093】如本文所用，術語「Fc區」係指免疫球蛋白重鏈的C末端區域，其可藉由木瓜蛋白酶消化完整抗體產生。免疫球蛋白的Fc區一般包含兩個恒定結構域，即CH2結構域和CH3結構域，且視需要包含CH4結構域。在某些實施方式中，Fc區係來自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4免疫球蛋白的Fc區。在一些實施方式中，Fc區包含來自人類IgG1或人類IgG2免疫球蛋白的CH2和CH3結構域。Fc區可以保持效應子功能，例如C1q結合、補體依賴性細胞毒性（CDC）、Fc受體結合、抗體依賴性細胞介導的細胞毒性（ADCC）和吞噬作用。在其他實施方式中，Fc區可以修飾成降低或消除效應子功能，如本文更詳細地描述。

【0094】在本發明的抗原結合蛋白的一些實施方式中，位於Fc區d 羧基末端的結合結構域（即羧基末端結合結構域）係scFv。在某些實施方式中，scFv包含藉由肽連接子連接的重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL）。可變區可以在scFv內以VH-VL或VL-VH取向定向。例如，在一個實施方式中，scFv從N末端到C末端包含VH區、肽連接子和VL區。在另一個實施方式中，scFv從N末端到C末端包含VL區、肽連接子和VH區。scFv的VH和VL區可以包含一個或多個半胱胺酸取代，以允許在VH和VL區之間形成二硫鍵。這樣的半胱胺酸鉗夾穩定了抗原結合組態中的兩個可變結構域。在一個實施方式中，VH區中的位置44（Kabat編號）和VL區中的位置100（Kabat編號）各被半胱胺酸殘基取代。

【0095】在某些實施方式中，scFv在其胺基末端藉由肽連接子融合或以其它方式連接到Fc區的羧基末端（例如CH3結構域的羧基末端）。因此，在一個實

施方式中，scFv與Fc區融合，使得所得融合蛋白從N末端到C末端包含CH2結構域、CH3結構域、第一肽連接子、VH區、第二肽連接子和VL區。在另一個實施方式中，scFv與Fc區融合，使得所得融合蛋白從N末端到C末端包含CH2結構域、CH3結構域、第一肽連接子、VL區、第二肽連接子和VH區。「融合蛋白」係包括衍生自一種以上親本蛋白或多肽的多肽組分的蛋白。典型地，融合蛋白從融合基因表現，其中編碼來自一種蛋白的多肽序列的核苷酸序列與編碼多肽序列的核苷酸序列附在可讀框內，並且視需要藉由連接子與編碼來自不同蛋白的多肽序列的核苷酸序列分開。然後可以藉由重組宿主細胞表現融合基因以產生單融合蛋白。

【0096】「肽連接子」係指將一個多肽共價連接到另一個多肽的約2-約50個胺基酸的寡肽。肽連接子可用於連接scFv內的VH和VL結構域。肽連接子還可用於將scFv、Fab片段或其他功能性抗體片段連接到Fc區的胺基末端或羧基末端，以產生本文所述之雙特異性抗原結合蛋白。較佳的是，肽連接子的長度為至少5個胺基酸。在某些實施方式中，肽連接子的長度為約5個胺基酸至長度為約40個胺基酸。在其他實施方式中，肽連接子的長度為約8個胺基酸至長度為約30個胺基酸。在其他實施方式中，肽連接子的長度為約10個胺基酸至長度為約20個胺基酸。

【0097】較佳的是，但不是必須地，肽連接子包含來自二十個標準胺基酸中的胺基酸，特別是半胱胺酸、甘胺酸、丙胺酸、脯胺酸、天冬醯胺、麩醯胺酸和/或絲胺酸。在某些實施方式中，肽連接子由空間上無阻礙的大多數胺基酸（例如甘胺酸、絲胺酸和丙胺酸）構成。因此，在一些實施方式中較佳的連接子包括聚甘胺酸、聚絲胺酸和聚丙胺酸，或該等中任何的組合。一些示例性肽連接子包括但不限於聚$(Gly)_{2-8}$，特別是$(Gly)_3$、$(Gly)_4$（SEQ ID NO: 362）、$(Gly)_5$

（SEQ ID NO: 363）和$(Gly)_7$（SEQ ID NO: 364），以及聚$(Gly)_4Ser$（SEQ ID NO: 365）、聚$(Gly\text{-}Ala)_{2\text{-}4}$和聚$(Ala)_{2\text{-}8}$。在某些實施方式中，肽連接子係$(Gly_xSer)_n$，其中x=3或4且n=2、3、4、5或6。這樣的肽連接物包括「L5」（GGGGS；或「G_4S」；SEQ ID NO: 366）、「L9」（GGGSGGGGS；或「G_3SG_4S」；SEQ ID NO: 367）、「L10」（GGGGSGGGGS；或「$(G_4S)_2$」；SEQ ID NO: 368）、「L15」（GGGGSGGGGSGGGGS；或「$(G_4S)_3$」；SEQ ID NO: 369）、和「L25」（GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS；或「$(G_4S)_5$」；SEQ ID NO:370）。在一些實施方式中，連接scFv內的VH和VL區的肽連接子係L15或$(G_4S)_3$連接子（SEQ ID NO: 369）。在該等和其他實施方式中，將羧基末端結合結構域（例如scFv或Fab）連接到Fc區的C末端的肽連接子係L9或G_3SG_4S連接子（SEQ ID NO: 367）或L10$(G_4S)_2$連接子（SEQ ID NO: 368）。

【0098】可用於本發明的雙特異性抗原結合蛋白的肽連接子的其他具體實例包括$(Gly)_5Lys$（SEQ ID NO: 1）；$(Gly)_5LysArg$（SEQ ID NO: 2）；$(Gly)_3Lys(Gly)_4$（SEQ ID NO: 3）；$(Gly)_3AsnGlySer(Gly)_2$（SEQ ID NO: 4）；$(Gly)_3Cys(Gly)_4$（SEQ ID NO: 5）；GlyProAsnGlyGly（SEQ ID NO: 6）；GGEGGG（SEQ ID NO: 7）；GGEEEGGG（SEQ ID NO: 8）；GEEEG（SEQ ID NO: 9）；GEEE（SEQ ID NO: 10）；GGDGGG（SEQ ID NO: 11）；GGDDDGG（SEQ ID NO: 12）；GDDDG（SEQ ID NO: 13）；GDDD（SEQ ID NO: 14）；GGGGSDDSDEGSDGEDGGGGS（SEQ ID NO: 15）；WEWEW（SEQ ID NO: 16）；FEFEF（SEQ ID NO: 17）；EEEWWW（SEQ ID NO: 18）；EEEFFF（SEQ ID NO: 19）；WWEEEWW（SEQ ID NO: 20）；和FFEEEFF（SEQ ID NO: 21）。

【0099】本文所述之雙特異性抗原結合蛋白的重鏈恒定區或Fc區可包含影響抗原結合蛋白的糖基化和/或效應子功能的一個或多個胺基酸取代。免疫球

蛋白Fc區的功能之一係當免疫球蛋白結合其靶時與免疫系統通信。此通常稱為「效應子功能」。通信導致抗體依賴性細胞毒性（ADCC）、抗體依賴性細胞吞噬（ADCP）和/或補體依賴性細胞毒性（CDC）。ADCC和ADCP係經由Fc區結合至免疫系統細胞表面上的Fc受體介導。CDC係經由Fc與補體系統，例如C1q的蛋白質結合所介導。在一些實施方式中，本發明的雙特異性抗原結合蛋白在恒定區中包含一個或多個增強該抗原結合蛋白的效應子功能（包括ADCC活性、CDC活性、ADCP活性和/或清除率或半衰期）之胺基酸取代。可以增強效應子功能的示例性胺基酸取代（EU編號）包括但不限於，E233L、L234I、L234Y、L235S、G236A、S239D、F243L、F243V、P247I、D280H、K290S、K290E、K290N、K290Y、R292P、E294L、Y296W、S298A、S298D、S298V、S298G、S298T、T299A、Y300L、V305I、Q311M、K326A、K326E、K326W、A330S、A330L、A330M、A330F、I332E、D333A、E333S、E333A、K334A、K334V、A339D、A339Q、P396L或前述中任何的組合。

【0100】在其他實施方式中，本發明的雙特異性抗原結合蛋白在恒定區中包含一個或多個降低效應子功能的胺基酸取代。可以降低效應子功能的示例性胺基酸取代（EU編號）包括但不限於，C220S、C226S、C229S、E233P、L234A、L234V、V234A、L234F、L235A、L235E、G237A、P238S、S267E、H268Q、N297A、N297G、V309L、E318A、L328F、A330S、A331S、P331S或前述中任何的組合。

【0101】糖基化可以促進抗體，特別是IgG1抗體之效應子功能。因此，在一些實施方式中，本發明的雙特異性抗原結合蛋白包含一個或多個影響結合蛋白糖基化的水平或類型之胺基酸取代。多肽的糖基化典型地是N-連接或O-連接的。N-連接係指碳水化合物部分連接至天冬醯胺殘基的側鏈。三肽序列天冬醯

胺-X-絲胺酸和天冬醯胺-X-蘇胺酸（其中X為除脯胺酸以外的任何胺基酸）係將碳水化合物部分酶促連接至天冬醯胺側鏈的識別序列。因此，在多肽中該等三肽序列中的任一者的存在產生潛在的糖基化位點。O-連接糖基化係指將糖N-乙醯半乳糖胺、半乳糖或木糖中的一種連接至羥基胺基酸，最常見的是絲胺酸或蘇胺酸，但是也可使用5-羥基脯胺酸或5-羥基離胺酸。

【0102】在某些實施方式中，藉由向例如本文所述之雙特異性抗原結合蛋白的Fc區中添加一個或多個糖基化位點來增加該結合蛋白的糖基化。在抗原結合蛋白中添加糖基化位點通常可以藉由改變胺基酸序列，以使其含有上述三肽序列（對於N-連接的糖基化位點）中的一個或多個來實現。還可以藉由向起始序列添加一個或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基或由一個或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基取代來作出改變（用於O-連接的糖基化位點）。為便利起見，可以藉由在DNA層面上的變化，特別是藉由使編碼靶多肽的DNA在預先選擇的鹼基處突變，由此產生會翻譯成所需胺基酸的密碼子，來改變抗原結合蛋白的胺基酸序列。

【0103】本發明還涵蓋產生具有改變的碳水化合物結構而引起效應子活性改變的雙特異性抗原結合蛋白分子，包括岩藻糖基化不存在或減少的展現改善的ADCC活性的抗原結合蛋白。本領域中已知各種減少或消除岩藻糖基化之方法。例如，藉由使抗體分子與FcγRIII受體結合來介導ADCC效應子活性，經顯示此取決於在CH2結構域N297殘基處N-連接的糖基化的碳水化合物結構。相較於天然、岩藻糖基化抗體，非岩藻糖基化抗體以增加的親和力結合此受體且更有效地觸發FcγRIII介導的效應子功能。例如，在α-1,6-岩藻糖基轉移酶已敲除的CHO細胞中重組產生非岩藻糖基化抗體使抗體具有100倍增加的ADCC活性（參見Yamane-Ohnuki等人, Biotechnol Bioeng.[生物技術及生物工程] 87 (5) :614-22, 2004）。藉由降低α-1,6-岩藻糖基轉移酶或岩藻糖基化路徑中的其他酶的活性，

例如藉由siRNA或反義RNA處理，將細胞系工程改造以敲除一種或多種酶，或與選擇性糖基化抑制劑一起培養可以實現類似作用（參見Rothman等人，Mol Immunol.[分子免疫學] 26（12）:1113-23, 1989）。一些宿主細胞系，例如Lec13或大鼠雜交瘤YB2/0細胞系天然地產生岩藻糖基化程度較低的抗體（參見Shields等人，J Biol Chem.[生物化學雜誌] 277（30）:26733-40, 2002；以及Shinkawa等人，J Biol Chem.[生物化學雜誌] 278 (5) :3466-73, 2003）。還已確定例如經由在過度表現GnTIII酶的細胞中重組產生抗體以增加等分碳水化合物之含量，可增加ADCC活性（參見Umana等人，Nat Biotechnol.[自然生物技術] 17 (2) :176-80, 1999）。

【0104】在其他實施方式中，藉由例如自本文所描述的雙特異性抗原結合蛋白的Fc區移除一個或多個糖基化位點來減少或消除該結合蛋白之糖基化。消除或改變N-連接的糖基化位點的胺基酸取代可以減少或消除抗原結合蛋白的N-連接之糖基化。在某些實施方式中，本文所描述的雙特異性抗原結合蛋白包含在位置N297（EU編號）處的突變，例如N297Q、N297A或N297G。在一個特定實施方式中，本發明的雙特異性抗原結合蛋白包含來自人類IgG1抗體的具有N297G突變的Fc區。為了改善含N297突變的分子的穩定性，可以對該分子的Fc區進行進一步工程改造。例如，在一些實施方式中，Fc區中的一個或多個胺基酸經半胱胺酸取代以促進二聚體狀態下二硫鍵的形成。對應於IgG1 Fc區的V259、A287、R292、V302、L306、V323或I332（EU編號）的殘基因此可以經半胱胺酸取代。較佳的是，特定殘基對經半胱胺酸取代以使其優先彼此形成二硫鍵，由此限制或防止二硫鍵混亂。較佳的是對包括但不限於，A287C與L306C、V259C與L306C、R292C與V302C，以及V323C與I332C。在特定實施方式中，本

文所描述的雙特異性抗原結合蛋白包含來自人類IgG1抗體的具有R292C和V302C突變的Fc區。在此類實施方式中，Fc區還可包含N297G突變。

【0105】還可能希望對本發明的雙特異性抗原結合蛋白進行修飾以增加血清半衰期，例如藉由併入或添加補救受體結合表位（例如藉由使適當區域突變或藉由將該表位併入肽標籤中，接著使其與抗原結合蛋白在任一端或在中間融合，例如藉由DNA或肽合成；參見例如WO 96/32478）或添加例如PEG或其他水溶性聚合物的分子，包括多糖聚合物。該補救受體結合表位較佳的是構成這樣一種區域，其中來自Fc區中一個或兩個環的任一個或多個胺基酸殘基轉移至抗原結合蛋白中的類似位置。甚至更較佳的是，來自Fc區中一個或兩個環的三個或更多個胺基酸殘基經轉移。又更較佳的是，自Fc區（例如IgG Fc區）的CH2結構域取得表位並將其轉移至抗原結合蛋白的CH1、CH3或VH區，或超過一個此類區域。可替代地，自Fc區的CH2結構域取得表位並將其轉移至抗原結合蛋白的CL區或VL區，或這兩個區域。有關Fc變體及其與補救受體相互作用的說明，參見國際公開WO 97/34631和WO 96/32478。

【0106】本發明包括編碼本文所述之雙特異性抗原結合蛋白及其組分的一種或多種分離的核酸。本發明的核酸分子包括呈單股和雙股形式的DNA和RNA，以及相應互補序列。DNA包括例如cDNA、基因組DNA、化學合成的DNA、藉由PCR擴增的DNA及其組合。本發明的核酸分子包括全長基因或cDNA分子，以及其片段組合。本發明的核酸較佳的是衍生自人源，但本發明也包括衍生自非人物種的核酸。

【0107】來自免疫球蛋白或其區域（例如可變區、Fc區等）的相關胺基酸序列或感興趣的多肽可以藉由直接蛋白質定序確定，且適合編碼核苷酸序列可以根據通用密碼子表設計。可替代地，可以使用常規方法（例如，藉由使用能

夠與編碼單株抗體的重鏈和輕鏈的基因特異性結合的寡核苷酸探針）從產生單株抗體抗體的細胞中分離編碼該單株抗體（可從中衍生本發明的雙特異性抗原結合蛋白的結合結構域）的基因組或cDNA並對其進行定序。

【0108】「分離的核酸」在本文中與「分離的多核苷酸」可互換使用，在自天然存在的來源分離核酸的情況下，係指已與分離出核酸的生物體基因組中存在的相鄰基因序列分離的核酸。在由模板酶法合成或化學合成核酸，例如PCR產物、cDNA分子或寡核苷酸的情況下，應理解，由此類方法獲得的核酸係分離的核酸。分離的核酸分子係指呈獨立片段形式或作為較大核酸構建體的一種組分的核酸分子。在一個較佳的實施方式中，核酸基本上不含污染性內源物質。該核酸分子較佳的是來源於基本上純的形式和能夠利用標準生物化學方法（例如Sambrook等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual [分子選殖：實驗室手冊]，第2版，Cold Spring Harbor Laboratory [冷泉港實驗室], Cold Spring Harbor [冷泉港], NY [紐約州]（1989）中概述之方法）鑒別、操作和回收其組分核苷酸序列的量或濃度分離至少一次的DNA或RNA。此類序列較佳的是以不含典型地存在於真核基因中的內部非翻譯序列或內含子的可讀框形式提供和/或構建。非翻譯DNA序列可以存在於可讀框的5'或3'處，其中該等序列不干擾編碼區的操作或表現。除非另外說明，否則本文所論述的任何單股多核苷酸序列的左手端係5’端；雙股多核苷酸序列的左手方向稱為5’。新生RNA轉錄物的5'至3'添加方向稱為轉錄方向；DNA股上與RNA轉錄物具有相同序列且相對於RNA轉錄物的5'端係5'的序列區稱為「上游序列」；DNA股上與RNA轉錄物具有相同序列且相對於RNA轉錄物的3'端係3'的序列區稱為「下游序列」。

【0109】本發明還包括在中等嚴格度條件下，且更較佳的是在高嚴格度條件下與編碼如本文所描述的多肽的核酸雜交的核酸。影響雜交條件選擇的基本

參數以及有關設計適合條件的指導例如陳述於以下中：Sambrook, Fritsch和Maniatis（1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual [分子選殖：實驗室手冊], Cold Spring Harbor Laboratory Press [冷泉港實驗室出版社], Cold Spring Harbor [冷泉港], N.Y. [紐約州]，第9和11章；和Current Protocols in Molecular Biology [當前分子生物學技術], 1995, Ausubel等人編輯，John Wiley & Sons, Inc.[約翰威立父子有限公司]，第2.10和6.3-6.4部分），且可以由熟悉該項技術者基於例如DNA的長度和/或鹼基組成容易地確定。實現中等嚴格度雜交條件的一種方式關於使用一種含5× SSC、0.5% SDS、1.0 mM EDTA（pH 8.0）的預洗滌溶液、含約50%甲醯胺、6× SSC的雜交緩衝液和約55°C雜交溫度（或其他類似的雜交溶液，例如含有約50%甲醯胺的雜交溶液，和約42°C雜交溫度），以及約60°C和0.5× SSC、0.1% SDS的洗滌條件。一般而言，高嚴格度條件定義為如上所述之雜交條件，但利用在約68°C下0.2 × SSC、0.1% SDS的洗滌條件。SSPE（1 × SSPE係0.15M NaCl、10 mM NaH_2PO_4和1.25 mM EDTA，pH 7.4）可以取代雜交和洗滌緩衝液中的SSC（1× SSC係0.15M NaCl和15 mM檸檬酸鈉）；洗滌係在雜交完成之後進行，持續15分鐘。應理解，必要時，可以藉由應用熟悉該項技術者所知和以下進一步描述的管理雜交反應和雙鏈體穩定性的基本原理調整洗滌溫度和洗滌液鹽濃度以達到所需的嚴格度（參見例如Sambrook等人，1989）。當核酸與未知序列的靶核酸雜交時，假定雜交體長度係雜交核酸的長度。當序列已知的核酸雜交時，雜交體長度可以藉由比對核酸序列並鑒別序列互補性最佳的一個或多個區域來確定。預期長度小於50個鹼基對的雜交體的雜交溫度應比雜交體的熔融溫度（Tm）低5°C至10°C，其中Tm係根據以下等式確定。對於長度小於18個鹼基對的雜交體，Tm（°C）= 2（A + T鹼基的數量）+ 4（G + C鹼基的數量）。對於長度超過18個鹼基對之雜交體，Tm（°C）= 81.5 + 16.6（log10 [Na+]）+ 0.41

（％G＋C）-（600/N），其中N係雜交體中鹼基的數量，且[Na+]係雜交緩衝液中鈉離子的濃度（對於l× SSC，[Na+] = 0.165M）。較佳的是，每個此類雜交核酸的長度為至少15個核苷酸（或更較佳的是，至少18個核苷酸，或至少20個核苷酸，或至少25個核苷酸，或至少30個核苷酸，或至少40個核苷酸，或最較佳的是至少50個核苷酸），或為其所雜交的本發明的核酸長度的至少25%（更較佳的是至少50%，或至少60%，或至少70%且最較佳的是至少80%），且與其所雜交的本發明的核酸具有至少60%（更較佳的是至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%且最較佳的是至少99.5%）序列一致性，其中序列一致性係當如以下更詳細地描述，比對達到最大重疊和一致性，同時序列空位最少時藉由比較雜交核酸的序列來確定。

【0110】如本文所概述，可以藉由使用盒式或PCR誘變，或本領域中熟知的其他技術對編碼多肽的DNA中的核苷酸進行位點特異性誘變，以產生編碼變體的DNA，且隨後在細胞培養中表現重組DNA來製備本文所描述的抗原結合蛋白的變體。不過，還可使用確定的技術，藉由體外合成製備包含具有多達約100-150個殘基的變體CDR的抗原結合蛋白。該等變體典型地展現與天然存在的類似物相同的定性生物活性，例如結合至抗原。此類變體包括例如在抗原結合蛋白的胺基酸序列內殘基的缺失和/或插入和/或取代。進行缺失、插入和取代的組合以達到最終構建體，條件係最終的構建體具有所希望的特徵。胺基酸變化還可能改變抗原結合蛋白的翻譯後加工，例如改變糖基化位點的數目或位置。在某些實施方式中，抗原結合蛋白變體的製備意圖修飾直接參與表位結合的胺基酸殘基。在其他實施方式中，出於本文所論述的目的，需要對不直接參與表

位結合的殘基或不以任何方式參與表位結合的殘基進行修飾。預期在任何CDR區和/或框架區內的誘變。熟悉該項技術者可以採用協方差分析設計抗原結合蛋白的胺基酸序列中的有用修飾。參見例如，Choulier等人，Proteins [蛋白質] 41:475-484, 2000；Demarest等人，J. Mol. Biol.[分子生物學雜誌] 335:41-48, 2004；Hugo等人，Protein Engineering [蛋白質工程改造] 16 (5) :381-86, 2003；Aurora等人，美國專利公開案號2008/0318207 A1；Glaser等人，美國專利公開案號2009/0048122 A1；Urech等人，WO 2008/110348 A1；Borras等人，WO 2009/000099 A2。由協方差分析確定的此類修飾可以改善抗原結合蛋白的效力、藥物動力學、藥效學和/或可製造特徵。

【0111】本發明還包括載體，其包含編碼本發明的雙特異性抗原結合蛋白的一種或多種組分（例如可變區、輕鏈、重鏈、修飾的重鏈、和Fd片段）的一個或多個核酸。術語「載體」係指用於將蛋白質編碼資訊轉移至宿主細胞中的任何分子或實體（例如核酸、質體、噬菌體或病毒）。載體之實例包括但不限於，質體、病毒載體、非游離型哺乳動物載體和表現載體，例如重組表現載體。如本文所使用，術語「表現載體」或「表現構建體」係指含有所需編碼序列和在特定宿主細胞中表現可操作地連接的編碼序列所需的適當核酸控制序列的重組DNA分子。表現載體可包括但不限於，影響或控制轉錄、翻譯且在存在內含子時，影響與其可操作地連接的編碼區的RNA剪接的序列。在原核生物中表現所需的核酸序列包括啟動子、視需要操作子序列、核糖體結合位點和可能地存在的其他序列。已知真核細胞可利用啟動子、增強子以及終止和聚腺苷酸化信號。可操作地連接至感興趣的編碼序列的分泌訊息肽序列還可視需要由表現載體編碼，由此使表現的多肽可以由重組宿主細胞分泌，使得在需要時，更容易自細胞中分離出感興趣的多肽。例如，在一些實施方式中，訊息肽序列可以被

附接/融合到表6A、6B、7A、7B、9和10中列出的任何多肽序列的胺基末端。在某些實施方式中，具有MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC（SEQ ID NO: 633）胺基酸序列的訊息肽與表6A、6B、7A、7B，9和10中的任何多肽序列的胺基末端融合。在其他實施方式中，具有MAWALLLLTLLTQGTGSWA（SEQ ID NO: 634）胺基酸序列的訊息肽與表6A、6B、7A、7B，9和10中的任何多肽序列的胺基末端融合。在又其他實施方式中，具有MTCSPLLLTLLIHCTGSWA（SEQ ID NO: 635）胺基酸序列的訊息肽與表6A、6B、7A、7B，9和10中的任何多肽序列的胺基末端融合。可以與本文所描述的多肽序列的胺基末端融合的其他適合訊息肽序列包括：MEAPAQLLFLLLLWLPDTTG（SEQ ID NO: 636）、MEWTWRVLFLVAAATGAHS（SEQ ID NO: 637）、METPAQLLFLLLLWLPDTTG（SEQ ID NO: 638）、METPAQLLFLLLLWLPDTTG（SEQ ID NO: 639）、MKHLWFFLLLVAAPRWVLS（SEQ ID NO: 640）、和MEWSWVFLFFLSVTTGVHS（SEQ ID NO: 641）。其他訊息肽係熟悉該項技術者已知的，並且可以與表6A、6B、7A、7B、9和10中列出的任何多肽鏈融合，例如以促進或優化在特定宿主細胞中的表現。

【0112】典型地，用於宿主細胞中以產生本發明的雙特異性抗原蛋白的表現載體將含有用於質體維持以及用於選殖和表現編碼雙特異性抗原結合蛋白各組分的外源核苷酸序列的序列。在某些實施方式中，統稱為「側接序列」，典型地將包括以下核苷酸序列中的一個或多個：啟動子、一個或多個增強子序列、複製起點、轉錄終止序列、含有供體和受體剪接位點的完整內含子序列、編碼用於多肽分泌的前導序列的序列、核糖體結合位點、聚腺苷酸化序列、用於插

入編碼待表現的多肽的核酸的多連接子區和可選擇標記物元件。該等序列分別於下文論述。

【0113】視需要，載體可以含有「標籤」編碼序列，即，位於多肽編碼序列的5'或3'端的寡核苷酸分子；該寡核苷酸標籤序列編碼聚組胺酸（例如六組胺酸）、FLAG、HA（血凝素流感病毒）、myc或現有可商購抗體所針對的另一「標籤」分子。該標籤典型地在多肽表現時與該抗體融合，且可以用作一種自宿主細胞親和純化或檢測多肽的方式。親和純化可以藉由例如柱層析法，使用針對標籤的抗體作為親和基質來實現。視需要，隨後可以藉由各種方式，例如使用某些肽酶裂解，自純化的多肽移除標籤。

【0114】側接序列可以為同源的（即，來自與宿主細胞相同的物種和/或品系）、異源的（即，來自與宿主細胞物種或品系不同的物種）、混合的（即，來自超過一種來源的側接序列的組合）、合成的或天然的。因此，側接序列的來源可以為任何原核或真核生物體、任何脊椎動物或非脊椎動物生物體，或任何植物，只要該側接序列在宿主細胞機器中起作用且可以經宿主細胞機器活化。

【0115】可用於本發明載體中的側接序列可以藉由本領域中熟知的若干方法中的任一種獲得。典型地，可用於本文中的側接序列將預先藉由定位和/或藉由限制性核酸內切酶消化鑒別且因此可以使用適當限制性核酸內切酶自適當組織來源分離。在一些情況下，側接序列的完全核苷酸序列可能為已知的。此處，側接序列可以使用常規核酸合成或選殖方法合成。

【0116】無論已知側接序列的全部抑或僅一部分，其均可使用聚合酶鏈反應（PCR）和/或藉由用適合探針，例如來自相同或另一物種的寡核苷酸和/或側接序列片段篩選基因組文庫來獲得。若側接序列未知，則可以自可能含有例如編碼序列或甚至另外一個或多個基因的較大DNA片段分離含有側接序列的DNA

片段。可以藉由限制性核酸內切酶消化產生適當DNA片段，隨後使用瓊脂糖凝膠純化、Qiagen®柱層析法（加利福尼亞州查茨沃斯（Chatsworth, CA））或熟練技術人員已知的其他方法分離來實現分離。熟悉該項技術者將易於瞭解實現此目的的適合酶之選擇。

【0117】複製起點典型地是可商購的原核表現載體的一部分，且該起點有助於在宿主細胞中擴增載體。若所選載體不含複製起點，則可以基於已知序列以化學方式合成，並將其連接至載體中。例如，來自質體pBR322（麻塞諸塞州貝芙麗的新英格蘭生物實驗室（New England Biolabs, Beverly, MA））的複製起點適合大多數革蘭氏陰性細菌，且各種病毒起點（例如SV40、多瘤病毒、腺病毒、水皰性口炎病毒（VSV），或乳頭瘤病毒，例如HPV或BPV）可用於在哺乳動物細胞中選殖載體。一般而言，哺乳動物表現載體不需要複製起點組分（例如，通常僅使用SV40起點，因為其還含有病毒早期啟動子）。

【0118】轉錄終止序列典型地位於多肽編碼區3'端且用於終止轉錄。通常，原核細胞中的轉錄終止序列係富含G-C的片段，後接聚T序列。儘管該序列易於自文庫選殖或甚至作為載體的一部分商購獲得，但其還可使用核酸合成方法容易地合成。

【0119】可選擇標記物基因編碼使選擇性培養基中生長的宿主細胞存活和生長所需的蛋白質。典型的選擇標記基因編碼如下蛋白質：(a) 賦予針對抗生素或其他毒素（例如，對於原核宿主細胞，胺苄青黴素、四環素或康黴素）的抗性；(b) 補充細胞的營養缺陷；或 (c) 提供不可得自複雜培養基或限定培養基的重要營養物。特定的可選擇標記物為康黴素抗性基因、胺苄青黴素抗性基因及四環素抗性基因。有利地，新黴素抗性基因還可用於在原核及真核宿主細胞中進行選擇。

【0120】可以使用其他可選擇基因擴增有待表現的基因。擴增係使生長或細胞存活必要的蛋白質產生所需的基因在連續數代重組細胞的染色體內串聯性複製的過程。適用於哺乳動物細胞的可選擇標記物之實例包括二氫葉酸還原酶（DHFR）和無啟動子胸苷激酶基因。使哺乳動物細胞轉化株處於選擇壓力下，其中由於載體中存在可選擇基因，所以僅轉化株唯一適於存活。選擇壓力係藉由在連續地增加培養基中選擇劑的濃度的條件下培養經轉化細胞，由此使可選擇基因和編碼另一基因，例如本文所描述的雙特異性抗原結合蛋白的一種或多種組分的DNA擴增來施加。因此，由擴增的DNA合成較多量的多肽。

【0121】核糖體結合位點通常是mRNA翻譯起始所必需的，且以Shine-Dalgarno序列（原核生物）或Kozak序列（真核生物）表徵。該元件典型地位於啟動子的3'端且在待表現的多肽編碼序列的5'端。在某些實施方式中，一個或多個編碼區可以可操作地連接至內部核糖體結合位點（IRES），由此允許自單一RNA轉錄物翻譯兩個可讀框。

【0122】在一些情況下，例如在真核宿主細胞表現系統中需要糖基化的情況下，可以操作各種前序列或原序列以改善糖基化或產率。例如，可以改變特定訊息肽的肽酶裂解位點，或添加原序列，該等序列還可影響糖基化。最終蛋白質產物可以在位置-1（相對於成熟蛋白質的第一個胺基酸）具有一個或多個易於表現的另外的胺基酸，該等胺基酸可能未完全移除。例如，最終蛋白質產物可能具有一個或兩個在肽酶裂解位點中發現的胺基酸殘基附接至胺基末端。可替代地，當酶在成熟多肽內的此類區域切割時，使用一些酶裂解位點可能產生所需多肽的略微截短的形式。

【0123】本發明的表現和選殖載體典型地將含有由宿主生物體識別且可操作地連接至編碼多肽的分子的啟動子。如本文所使用，術語「可操作地連接」

係指兩個或多個核酸序列以使得產生能夠引導給定基因的轉錄和/或所需蛋白質分子的合成的核酸分子的方式連接。例如，載體中「可操作地連接」至蛋白質編碼序列的控制序列係與該編碼序列連接以使得在與控制序列的轉錄活性相適應的條件下實現該蛋白質編碼序列的表現。更具體地，若啟動子和/或增強子序列（包括順式作用轉錄控制元件的任何組合）在適合宿主細胞或其他表現系統中刺激或調節編碼序列的轉錄，則其可操作地連接至該編碼序列。

【0124】 啟動子為位於控制結構基因轉錄的結構基因起始密碼子（一般在約100至1000 bp內）上游（即，5’）的非轉錄序列。啟動子通常分組為兩種類別：誘導型啟動子及組成型啟動子。誘導型啟動子起始處於其控制下的DNA響應於培養條件的某種變化（諸如營養素的存在或不存在，或者溫度變化）以提高的水平轉錄。另一方面，組成型啟動子一致地轉錄其可操作地連接的基因，即，對基因表現具有極小控制或無控制。許多由多種潛在宿主細胞識別的啟動子係眾所周知的。藉由限制性酶消化移除源DNA啟動子，並將所需啟動子序列插入載體中，將適合啟動子可操作地連接至編碼例如本發明雙特異性抗原結合蛋白的重鏈、輕鏈、修飾的重鏈或其他組分的DNA。

【0125】 適用於酵母宿主的適合啟動子還是本領域中熟知的。酵母增強子宜與酵母啟動子一起使用。用於哺乳動物宿主細胞的適合啟動子係眾所周知的，且包括但不限於獲自病毒基因組的那些啟動子，該等病毒為諸如多形瘤病毒、傳染性上皮瘤病毒、腺病毒（諸如腺病毒2）、牛乳頭狀瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨細胞病毒、逆轉錄病毒、B型肝炎病毒以及最較佳的猿猴病毒40（SV40）。其他適合哺乳動物啟動子包括異源哺乳動物啟動子，例如熱休克啟動子及肌動蛋白啟動子。

【0126】其他感興趣的啟動子包括但不限於：SV40早期啟動子（Benoist和Chambon, 1981, Nature [自然] 290:304-310）;CMV啟動子（Thornsen等人, 1984, Proc.Natl.Acad.U.S.A.[美國科學院院報] 81:659-663）；勞斯肉瘤病毒（Rous sarcoma virus）的3'長末端重複序列中所含的啟動子（Yamamoto等人，1980, Cell [細胞] 22:787-797）；皰疹胸苷激酶啟動子（Wagner等人，1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. [美國科學院院報] 78: 1444-1445）；來自金屬硫蛋白基因的啟動子和調控序列（Prinster等人，1982, Nature [自然] 296:39-42）；和原核啟動子，例如β-內醯胺酶啟動子（Villa-Kamaroff等人，1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. [美國科學院院報] 75:3727-3731）；或tac啟動子（DeBoer等人，1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. [美國科學院院報] 80:21-25）。有意義的還有以下動物轉錄控制區，它們表現出組織特異性並已用於轉基因動物中：在胰臟腺泡細胞中具有活性的彈性蛋白酶I基因控制區（Swift等人，1984, Cell [細胞] 38:639-646；Ornitz等人，1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.[冷泉港數量生物學研討會] 50:399-409；MacDonald, 1987, Hepatology [肝臟病學] 7:425-515）；在胰臟β細胞中具有活性的胰島素基因控制區（Hanahan, 1985, Nature [自然] 315: 115-122）；在淋巴樣細胞中有活性的免疫球蛋白基因控制區（Grosschedl等人, 1984, Cell [細胞] 38:647-658；Adames等人, 1985, Nature [自然] 318:533-538；Alexander等人, 1987, Mol. Cell. Biol. [分子細胞生物學] 7: 1436-1444）；在睪丸、乳房、淋巴和肥大細胞中具有活性的小鼠乳房腫瘤病毒控制區（Leder等人，1986, Cell [細胞] 45:485-495）；在肝中具有活性的白蛋白基因控制區（Pinkert等人，1987, Genes and Devel.[基因與發育] 1 :268-276）；在肝中具有活性的α-胎蛋白基因控制區（Krumlauf等人，1985, Mol. Cell. Biol.[分子細胞生物學] 5: 1639-1648；Hammer等人，1987, Science [科學] 253:53-58）；在肝中具有活性的α1-抗胰蛋白酶基因

控制區（Kelsey等人，1987, Genes and Devel.[基因與發育] 1: 161-171）；在骨髓細胞中具有活性的β-球蛋白基因控制區（Mogram等人，1985, Nature [自然] 315:338-340；Kollias等人，1986, Cell [細胞] 46:89-94）；在腦中的寡樹突細胞中具有活性的髓磷脂鹼性蛋白基因控制區（Readhead等人，1987, Cell [細胞] 48:703-712）；在骨骼肌中具有活性的肌球蛋白輕鏈-2基因控制區（Sani, 1985, Nature [自然] 314:283-286）；和在下丘腦中具有活性的促性腺激素釋放激素基因控制區（Mason等人，1986, Science [科學] 234: 1372-1378）。

【0127】可以將增強子序列插入載體中以增加高等真核細胞中編碼雙特異性抗原結合蛋白的組分（例如，輕鏈、重鏈、修飾的重鏈、Fd片段）的DNA的轉錄。增強子為DNA的順式作用元件，長度通常為約10-300 bp，作用於啟動子以增加轉錄。增強子在方向及位置方面為相對獨立的，已見於轉錄單元的5'及3'位置。已知可得自哺乳動物基因（例如球蛋白、彈性蛋白酶、白蛋白、α-胎蛋白和胰島素）的若干增強子序列。然而，典型地使用來自病毒的增強子。本領域中已知的SV40增強子、巨細胞病毒早期啟動子增強子、多瘤增強子和腺病毒增強子係用於活化真核啟動子的示例性強化元件。儘管增強子可以定位於載體中編碼序列的5'或3'，但其典型地位於啟動子5'的位點處。可將編碼適當天然或異源訊息序列（前導序列或訊息肽）的序列併入表現載體中，以促進抗體的細胞外分泌。訊息肽或前導序列的選擇取決於待產生抗體的宿主細胞的類型，且異源訊息序列可替換天然訊息序列。訊息肽的實例在上文有描述。在哺乳動物宿主細胞中起作用的其他訊息肽包括美國專利案號4,965,195中所述之介白素-7（IL-7）的訊息序列；Cosman等人, 1984, *Nature* [自然] 312:768中所描述的介白素-2受體的訊息序列；歐洲專利案號0367 566中所描述的介白素-4受體訊息

肽；美國專利案號4,968,607中所述之I型介白素-1受體訊息肽；EP專利案號0 460 846中所述之II型介白素-1受體訊息肽。

【0128】可由起始載體（例如市售載體）構建所提供的表現載體。該等載體可含有或可不含所有所需側接序列。在載體中不存在一個或多個本文所描述的側接序列的情況下，其可以獨立地獲得且連接至載體中。用於獲得各側接序列之方法係熟悉該項技術者熟知的。可以將表現載體引入宿主細胞中，由此產生由如本文所描述的核酸所編碼的蛋白質，包括融合蛋白。

【0129】在某些實施方式中，可以將編碼本發明的雙特異性抗原結合蛋白的不同組分的核酸插入相同表現載體中。在此類實施方式中，該兩個核酸可以由內部核糖體進入位點（IRES）隔開且處於單一啟動子控制下，由此使輕鏈和重鏈由相同mRNA轉錄物表現。可替代地，該兩個核酸可以處於兩個獨立啟動子控制下，由此使輕鏈和重鏈由兩個獨立的mRNA轉錄物表現。

【0130】類似地，對於IgG-scFv雙特異性抗原結合蛋白，可以將編碼輕鏈的核酸選殖到與編碼修飾的重鏈的核酸相同的表現載體中（包含重鏈和scFv的融合蛋白），其中該兩個核酸受單個啟動子控制並被IRES分開，或者其中該兩個核酸受兩個單獨的啟動子控制。對於IgG-Fab雙特異性抗原結合蛋白，編碼三個組分中每一個的核酸可被選殖到相同的表現載體中。在一些實施方式中，將編碼IgG-Fab分子的輕鏈的核酸和編碼第二多肽（其包含C末端Fab結構域的另一半）的核酸選殖到一個表現載體中，而編碼修飾的重鏈（包含重鏈和半個Fab結構域的融合蛋白）的核酸被選殖到第二表現載體中。在某些實施方式中，本文所述之雙特異性抗原結合蛋白的所有組分都從相同的宿主細胞群表現。例如，即使將一種或多種組分選殖到單獨的表現載體中，宿主細胞也用兩種表現載體共轉染，使得一個細胞產生雙特異性抗原結合蛋白的所有組分。

【0131】在構建出載體並將編碼本文所描述的雙特異性抗原結合蛋白各組分的一個或多個核酸分子插入一個或多個載體的一個或多個適當位點中之後，可以將一個或多個完整載體插入適當宿主細胞中以進行擴增和/或多肽表現。因此，本發明包括分離的宿主細胞，其包含一個或多個編碼雙特異性抗原結合蛋白組分的表現載體。如本文所使用，術語「宿主細胞」係指經核酸轉化或能夠經核酸轉化且由此表現感興趣的基因的細胞。該術語包括親本細胞的子代，無論該子代是否在形態或遺傳組成上與原始親本細胞一致，只要存在該感興趣的基因即可。包含本發明的分離核酸較佳的是可操作地連接到至少一個表現控制序列（例如啟動子或增強子）的宿主細胞係「重組宿主細胞」。

【0132】可以藉由熟知方法，包括轉染、感染、磷酸鈣共沈澱、電穿孔、顯微注射、脂質體轉染、DEAE-葡聚糖介導的轉染或其他已知技術將抗原結合蛋白的表現載體轉化至所選宿主細胞中。所選方法將部分隨所用宿主細胞的類型而變化。該等方法及其他適合之方法對於技術人員是眾所周知的，並且闡述於例如Sambrook等人, 2001, 同上中。

【0133】宿主細胞當在適當條件下培養時合成抗原結合蛋白，該抗原結合蛋白隨後可以自培養基收集（若宿主細胞將其分泌至培養基中）或直接由產生該抗原結合蛋白的宿主細胞收集（若其並非分泌的）。適當宿主細胞的選擇將取決於各種因素，例如所需表現水平、活性所需或必需的多肽修飾（例如糖基化或磷酸化）和折疊成生物活性分子的容易性。

【0134】示例性宿主細胞包括原核細胞、酵母或高等真核細胞。原核宿主細胞包括真細菌，例如革蘭氏陰性或革蘭氏陽性生物體，例如，腸桿菌科（*Enterobacteriaceae*），例如埃希氏菌屬（*Escherichia*）（例如大腸桿菌（*E. coli*））、腸桿菌屬（*Enterobacter*）、歐文氏菌屬（*Erwinia*）、克氏桿菌屬（*Klebsiella*）、

變形桿菌屬（*Proteus*）、沙門氏菌屬（*Salmonella*）（例如鼠傷寒沙門氏菌（*Salmonella typhimurium*））、沙雷氏菌屬（*Serratia*）（例如黏質沙雷氏菌（*Serratia marcescans*））和志賀氏菌屬（*Shigella*），以及芽孢桿菌屬（*Bacillus*），例如枯草芽孢桿菌（*B. subtilis*）和地衣芽孢桿菌（*B. licheniformis*），假單胞菌屬（*Pseudomonas*）和鏈黴菌屬（*Streptomyces*）。真核微生物，例如絲狀真菌或酵母係適用於重組多肽的選殖或表現宿主。釀酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）或常稱為烘焙酵母，係低等真核宿主微生物中最常用的。不過，多種其他屬、種和菌株係常用的且可用於本文中，例如畢赤酵母屬（*Pichia*），例如巴斯德畢赤酵母（*P. pastoris*）、裂殖酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）；克魯維酵母屬（*Kluyveromyces*），耶氏酵母屬（*Yarrowia*）；假絲酵母屬（*Candida*）；瑞氏木黴（*Trichoderma reesia*）；粗糙脈孢菌（Neurospora crassa）；許旺酵母屬（*Schwanniomyces*），例如西方許旺酵母（*Schwanniomyces occidentalis*）；和絲狀真菌，例如脈孢菌屬（*Neurospora*）、青黴菌屬（*Penicillium*）、木黴菌屬（*Tolypocladium*）和麴黴屬（*Aspergillus*）宿主，例如構巢麴黴（*A. nidulans*）和黑麴黴（*A. niger*）。

【0135】用於表現糖基化抗原結合蛋白的宿主細胞可以來源於多細胞生物體。無脊椎動物細胞之實例包括植物細胞和昆蟲細胞。已鑒別出來自宿主的多種桿狀病毒株和變種以及相應容許的昆蟲宿主細胞，例如草地貪夜蛾（*Spodoptera frugiperda*）（毛蟲）、埃及伊蚊（*Aedes aegypti*）（蚊子）、白紋伊蚊（*Aedes albopictus*）（蚊子）、黑腹果蠅（*Drosophila melanogaster*）（蒼蠅）和家蠶（*Bombyx mori*）。用於轉染此類細胞的多種病毒株係公開可得的，例如苜蓿銀紋夜蛾（*Autographa californica*）NPV的L-1病毒株和家蠶NPV的Bm-5病毒株。

【0136】脊椎動物宿主細胞還為適合宿主，且由此類細胞重組產生抗原結合蛋白已成為常規程序。可用作表現宿主的哺乳動物細胞系係本領域中熟知的且包括但不限於，可得自美國典型培養物保藏中心（American Type Culture Collection，ATCC）的永生化細胞系，包括但不限於中國倉鼠卵巢（Chinese hamster ovary；CHO）細胞，包括CHOK1細胞（ATCC CCL61）、DXB-11、DG-44和中國倉鼠卵巢細胞/-DHFR（CHO，Urlaub等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美國科學院院報] 77: 4216, 1980）；經SV40轉化的猴腎CV1細胞細（COS-7，ATCC CRL 1651）；人胚胎腎系（293細胞或亞選殖用於在懸浮培養中生長的293細胞（Graham等人, J. Gen Virol.[普通病毒學雜誌]36: 59, 1977)；幼倉鼠腎細胞（BHK，ATCC CCL 10）；小鼠賽托利細胞（sertoli cell）（TM4，Mather, Biol. Reprod.[生殖生物學] 23: 243-251, 1980）；猴腎細胞（CV1 ATCC CCL 70）；非洲綠猴腎細胞（VERO-76，ATCC CRL-1587）；人宮頸癌細胞（HELA，ATCC CCL 2）；犬腎細胞（MDCK，ATCC CCL 34）；布法羅（buffalo）大鼠肝細胞（BRL 3A，ATCC CRL 1442）；人肺細胞（W138，ATCC CCL 75）；人肝癌細胞（Hep G2，HB 8065）；小鼠乳腺腫瘤（MMT 060562, ATCC CCL51）；TRI細胞（Mather等人，Annals N.Y Acad. Sci.[紐約科學院年鑒] 383: 44-68, 1982）；MRC 5細胞或FS4細胞；哺乳動物骨髓瘤細胞和多種其他細胞系。在另一實施方式中，可以自B細胞譜系係選擇不產生自身抗體但能夠製備並分泌異源抗體的細胞系。在一些實施方式中，CHO細胞係用於表現本發明的雙特異性抗原結合蛋白的較佳的宿主細胞。

【0137】宿主細胞用上述核酸或載體轉化或轉染以產生雙特異性抗原結合蛋白且在經適當改善的常規營養培養基中培養以誘導啟動子、選擇轉化株或擴增編碼所需序列的基因。此外，具有由選擇性標記物隔開的多個轉錄單元拷

貝的新穎載體和經轉染細胞系特別是用於表現抗原結合蛋白。因此，本發明還提供了製備本文所述之雙特異性抗原結合蛋白之方法，該方法包括在允許由本文所述之一種或多種表現載體編碼的雙特異性抗原結合蛋白表現的條件下，在培養基中培養包含該一種或多種表現載體的宿主細胞；並且從該培養基中回收該雙特異性抗原結合蛋白。

【0138】用於產生本發明的抗原結合蛋白的宿主細胞可以在多種培養基中培養。諸如Ham's F10（西格瑪公司（Sigma））、最小必需培養基（（MEM），（西格瑪公司））、RPMI-1640（西格瑪公司）和杜爾貝科改良型伊戈爾培養基（Dulbecco's Modified Eagle's Medium）（（DMEM），西格瑪公司））等市售培養基適用於培養宿主細胞。此外，Ham等人, Meth. Enz.[酶學方法] 58: 44, 1979；Barnes等人, Anal. Biochem.[分析生物化學] 102: 255, 1980；美國專利案號4,767,704；4,657,866；4,927,762；4,560,655；或5,122,469；WO90103430；WO 87/00195；或美國專利註冊號30,985中描述的任何培養基可用作宿主細胞的培養基。必要時，該等培養基中的任一種可以補充有激素和/或其他生長因子（例如胰島素、運鐵蛋白或表皮生長因子）、鹽（例如氯化鈉、鈣、鎂和磷酸鹽）、緩衝劑（例如HEPES）、核苷酸（例如腺苷和胸苷）、抗生素（例如健他黴素（Gentamycin™）藥物）、微量元素（定義為通常以在微莫耳濃度範圍內的最終濃度存在的無機化合物）和葡萄糖或等效能量來源。還可包括適當濃度的熟悉該項技術者已知的任何其他必要補充物。培養條件，例如溫度、pH等，係先前與選擇用於表現的宿主細胞一起使用的條件，並且對於熟悉該項技術者來說是顯而易見的。

【0139】在培養宿主細胞後，雙特異性抗原結合蛋白可以在細胞內、在周質空間中產生，也可以直接分泌到培養基中。若在細胞內產生抗原結合蛋白，

則作為第一個步驟，例如藉由離心或超濾來移除宿主細胞或溶解片段的顆粒狀碎片。雙特異性抗原結合蛋白可以使用例如羥基磷灰石層析、陽離子或陰離子交換層析、或較佳的是親和層析、使用一種或多種目的抗原或蛋白A或蛋白G作為親和配位基來純化。蛋白A可用於純化包括基於人γ1、γ2或γ4重鏈的多肽的蛋白質（Lindmark等人, J. Immunol. Meth.[免疫學方法雜誌] 62: 1-13, 1983）。對於所有小鼠同種型和對於人γ3推薦蛋白G（Guss等人, EMBO J.[歐洲分子生物學學會雜誌] 5: 15671575, 1986）。親和配位基所連接的基質最常為瓊脂糖，但其他基質也是可用的。相較於用瓊脂糖，機械穩定的基質，例如可控孔度玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基_)苯可以提高流動速率和縮短加工時間。在蛋白質包含CH3結構域的情況下，Bakerbond ABX™樹脂（J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.[新澤西州菲力浦斯堡]）可用於純化。根據要回收的特定雙特異性抗原結合蛋白，其他用於蛋白質純化的技術例如乙醇沈澱、反相HPLC、層析聚焦、SDS-PAGE和硫酸銨沈澱也是可能的。

【0140】實例

【0141】CHZ01

【0142】產生多特異性抗原結合蛋白和半衰期延長的治療性蛋白的能力係將許多治療性候選物推向臨床的首要條件。通常，這意味著成功程度不同的廣泛蛋白質設計。在任何一種情況下，兩個不同的Fc部分聚集在一起並形成異二聚體。為了做到這一點，必須改變蛋白質天然序列。傳統上，該等變化集中在Fc部分的CH3-CH3'介面中，其中插入了電荷配對突變和杵臼設計。

【0143】可以看出單株抗體中的兩個重鏈有兩個主要的接觸點：Fc-CH3和鉸鏈（圖1）。鉸鏈區域將Fc連接到兩個Fab結構域，並且隨後它必須顯示出允許Fab自由旋轉的柔性結構，這對於該等彈頭部採用正確的接近角度來接合它

們的靶標係必要的，同時Fc區可以與其多個結合配偶物（如FcγR、FcRn和C1q）相互作用。儘管鉸鏈區周圍具有靈活性，但這種介面係由強而結構剛性的模體（即「CPPC」模體）所介導的（圖1-3）。在這裡，脯胺酸殘基引入了非常特異和穩定的二級結構，其允許半胱胺酸殘基的-SH側鏈與它們的對應物相遇並形成二硫鍵。此外，同樣的剛性框架很可能延伸到CPP模體的上游和下游，提示在這一模體附近的那些殘基的側鏈也可能呈現穩定的構象。

【0144】蛋白質數據庫（「PDB」）中可獲得的人全長IgG1抗體的唯一晶體結構（PDB 1HZH）僅顯示了部分完整的CPPC模體，其中第二半胱胺酸（C242）沒有形成二硫鍵，兩個多肽鏈中位置242的每個側鏈指向相反方向（圖2）。雖然有小鼠IgG1抗體的結構資訊顯示CPPC模體的完整結構，但這兩個物種之間的序列變異（圖3）不允許準確預測人IgG1中Cys242下游那些殘基的側鏈的空間位置。因此，在保持CPPC模體的天然序列的情況下，在同一區的下游插入了一串名為‘帶電拉鍊鉸鏈01’（CZH01）的帶相反電荷的殘基（圖4）。據信，這種「帶電拉鍊」既能吸引帶相反電荷的重鏈，又能排斥帶相同電荷的鏈。

【0145】為了檢驗這一假設，將該等突變插入抗體X中並在HEK293細胞中暫態表現，隨後進行單步蛋白純化（蛋白A，隨後CEX）。為了驗證新產生的抗體是否由兩個不同的重鏈（分別帶負電和正電）構成，進行了廣泛的還原性和非還原性質譜測定。的確，結果表明這種策略在Fc-CH3區沒有任何另外突變的情況下成功地驅動了重鏈配對（圖4-6）。最有可能的是離胺酸串（243至247）正面對著天冬胺酸串（243至247）並與之相互作用。

【0146】CHZ11

【0147】此外，小鼠IgG2分子的結構分析表明，一個鏈中的殘基246和247以及對應鏈中的殘基244的側鏈彼此指向（圖9）。該等殘基位於Cys242的下游

並緊鄰CPPC模體，這表明構象穩定。此外，電荷殘基具有側鏈，該側鏈可以配合在結構空間排列中，並且因此不會破壞CPPC介面。Asn246和Leu247均被帶負電的天冬胺酸殘基替代。為了與這兩個殘基配對，單個組胺酸以一種方式替代相對鏈中的Ala244，該方式係使得它可以與相對的帶電殘基（Asp246和Asp247）產生生產性接觸或顯示排斥效應（圖9和10）（CZH11）。為了檢驗設計的合理性，表現並純化了該變異體。出乎意料的是，質譜證實，這三個殘基確實形成了三聯體，並且足以驅動鉸鏈二聚化（圖10）。

【0148】CHZ09

【0149】接下來對CPPC區上游區域進行測試，以驗證該序列的工程改造是否也能驅動重鏈二聚化。在Cys242殘基下游保留兩個帶電對突變Ala244Lys/Asp和Glu246Lys/Asp的同時，在Cys239殘基上游插入兩個額外的帶電對突變His237Lys/Asp和Thr246Lys/Asp（CZH09）（圖7）。數據表明，插入在CPPC模體上游的CPM同樣能夠驅動重鏈二聚化。

【0150】CH3 CPM

【0151】此外，插入在鉸鏈區中的CPM(電荷對突變)與先前插入在Fc-CH3區中的CPM相容。在含有CZH01、CZH09和CZH11突變的分子中加入所謂的‘v11’CH3 CPM（一個CH3區中的D399K和另一個CH3區中的K409D/K392D）（圖11和12）。結果表明，所有三個插入鉸鏈區的CPM（CZH01、CZH09和CZH11）也能在Fc-CH3 CPM存在下成功地驅動重鏈配對。

【0152】為了獲得在鉸鏈區中工程改造的該等新突變的影響，運行穩定性測定，查看該等新變異與野生型分子相比較的熱穩定性值。數據顯示，CZH01、CZH09和CZH11的Tm數據在不存在CH3-CPM v11時與對照CHZ00（73.3°C）和在存在CH3-CPM v11時與CHZ00（70.7°C）相比較來說很好（表1）。

【0153】[表1].

分子	鉸鏈突變	+ CH3 CPM v11	Tm1（°C）	Tagg（°C）
標準IgG抗體	CHZ00（WT）	N	73.3	68.9
標準IgG抗體	CHZ01	N	73.4	73.8
標準IgG抗體	CHZ09	N	73.7	75.5
標準IgG抗體	CHZ11	N	73.2	74.4
標準IgG抗體	CHZ00（WT）	Y	70.7	73.6
標準IgG抗體	CHZ01	Y	71.9	74.2
標準IgG抗體	CHZ09	Y	69.8	74.3
標準IgG抗體	CHZ11	Y	69.6	73.6

【符號說明】

【0154】無

【生物材料寄存】

【0155】無

【序列表】

<110> 美商安進公司 (AMGEN INC.)

<120> 工程改造鉸鏈區以驅動抗體二聚化

<130> TW 109118067

<150> US 62/854,907
<151> 2019-05-30

<160> 40

<170> PatentIn 版本3.5

<210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 1

Gly Gly Gly Gly Gly Lys
1 5

<210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 2

Gly Gly Gly Gly Gly Lys Arg
1 5

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子序列

<400> 3

Gly Gly Gly Lys Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 4

Gly Gly Gly Asn Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 5

Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 6

Gly Pro Asn Gly Gly
1 5

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 7

Gly Gly Glu Gly Gly Gly
1 5

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 8

Gly Gly Glu Glu Glu Gly Gly Gly
1 5

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 9

Gly Glu Glu Glu Gly
1 5

<210> 10
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 10

Gly Glu Glu Glu
1

<210> 11
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 11

Gly Gly Asp Gly Gly Gly
1 5

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 12

Gly Gly Asp Asp Asp Gly Gly
1 5

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 13

Gly Asp Asp Asp Gly
1 5

<210> 14
<211> 4

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 14

Gly Asp Asp Asp
1

<210> 15
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 15

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Asp Ser Asp Glu Gly Ser Asp Gly Glu Asp
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser
20

<210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 16

Trp Glu Trp Glu Trp
1 5

<210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子序列

<400> 17

Phe Glu Phe Glu Phe
1 5

<210> 18
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 18

Glu Glu Glu Trp Trp Trp
1 5

<210> 19
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 19

Glu Glu Glu Phe Phe Phe
1 5

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 20

Trp Trp Glu Glu Glu Trp Trp
1 5

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 21

Phe Phe Glu Glu Glu Phe Phe
1 5

<210> 22
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 22

Gly Gly Gly
1

<210> 23
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 23

Gly Gly Gly Gly
1

<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 24

Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 25
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 25

Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 26

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 27

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 28
<211> 9

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 28

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 29

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 30
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 30

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 31
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 31

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 32
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 前導序列

<400> 32

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys
20

<210> 33
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 前導序列

<400> 33

Met Ala Trp Ala Leu Leu Leu Leu Thr Leu Leu Thr Gln Gly Thr Gly
1 5 10 15

Ser Trp Ala

<210> 34
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 前導序列

<400> 34

Met Thr Cys Ser Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ile His Cys Thr Gly
1 5 10 15

Ser Trp Ala

<210> 35
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 前導序列

<400> 35

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly
20

<210> 36
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 前導序列

<400> 36

Met Glu Trp Thr Trp Arg Val Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 37
<211> 20

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 前導序列

<400> 37

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly
20

<210> 38
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 前導序列

<400> 38

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly
20

<210> 39
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 前導序列

<400> 39

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

Val Leu Ser

<210> 40
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 前導序列

<400> 40

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種分離的異多聚體，其中該異多聚體為雙特異性或多特異性抗體，其中該雙特異性或多特異性抗體為IgG1抗體，該異多聚體包含異二聚免疫球蛋白鉸鏈結構域，該異二聚免疫球蛋白鉸鏈結構域包含第一免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽和第二免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽，其中：

(i) 該第一免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽包含下列胺基酸取代：A244H；並且

(ii) 該第二免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽包含下列胺基酸取代：N/E246D和L247D；

其中胺基酸殘基的編號係根據Kabat。

【請求項2】如請求項1之分離的異多聚體，其中每個鉸鏈結構域多肽還包含L248C取代。

【請求項3】 一種分離的異多聚體，其中該異多聚體為雙特異性或多特異性抗體，其中該雙特異性或多特異性抗體為IgG1抗體，該異多聚體包含異二聚免疫球蛋白鉸鏈結構域，該異二聚免疫球蛋白鉸鏈結構域包含第一免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽和第二免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽，其中：

(i) 該第一免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽包含下列胺基酸取代：H237K、T238K、A244K和N/E246K；並且

(ii) 該第二免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽包含下列胺基酸取代：H237D、T238D、A244D和N/E246D；

其中胺基酸殘基的編號係根據Kabat。

【請求項4】如請求項3之分離的異多聚體，其中每個鉸鏈結構域多肽還包含L248C取代。

【請求項5】 如請求項1至4中任一項之分離的異多聚體，其中每個免疫球蛋白鉸鏈結構域多肽還包含CH3結構域。

【請求項6】如請求項5之分離的異多聚體，其中一個CH3結構域包含F405L、F405A、F405D、F405E、F405H、F405I、F405K、F405M、F405N、F405Q、F405S、F405T、F405V、F405W或F405Y突變；並且另一個CH3結構域包含K409R突變；其中胺基酸殘基的編號係根據Kabat中列出的EU索引。

【請求項7】如請求項5之分離的異多聚體，其中一個CH3結構域包含T366W突變；並且另一個CH3結構域包含T366S、L368A、Y407V突變；其中胺基酸殘基的編號係根據Kabat中列出的EU索引。

【請求項8】 如請求項5之分離的異多聚體，其中一個CH3結構域包含K/R409D和K392D突變；並且另一個CH3結構域包含D399K和E356K突變；其中胺基酸殘基的編號係根據Kabat中列出的EU索引。

【請求項9】如請求項5之分離的異多聚體，其中一個CH3結構域包含Y349C突變；並且另一個CH3結構域包含E356C或S354C突變；其中胺基酸殘基的編號係根據Kabat中列出的EU索引。

【請求項10】如請求項5之分離的異多聚體，其中一個CH3結構域包含Y349C和T366W突變；並且另一個CH3結構域包含E356C、T366S、L368A和Y407V突變；其中胺基酸殘基的編號係根據Kabat中列出的EU索引。

【請求項11】如請求項5之分離的異多聚體，其中一個CH3結構域包含Y349C和T366W突變；並且另一個CH3結構域包含S354C、T366S、L368A、Y407V突變；其中胺基酸殘基的編號係根據Kabat中列出的EU索引。

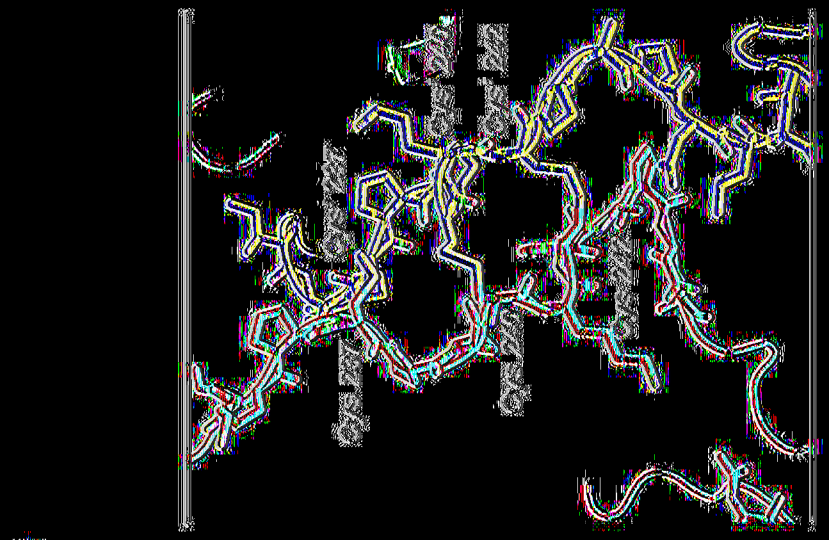
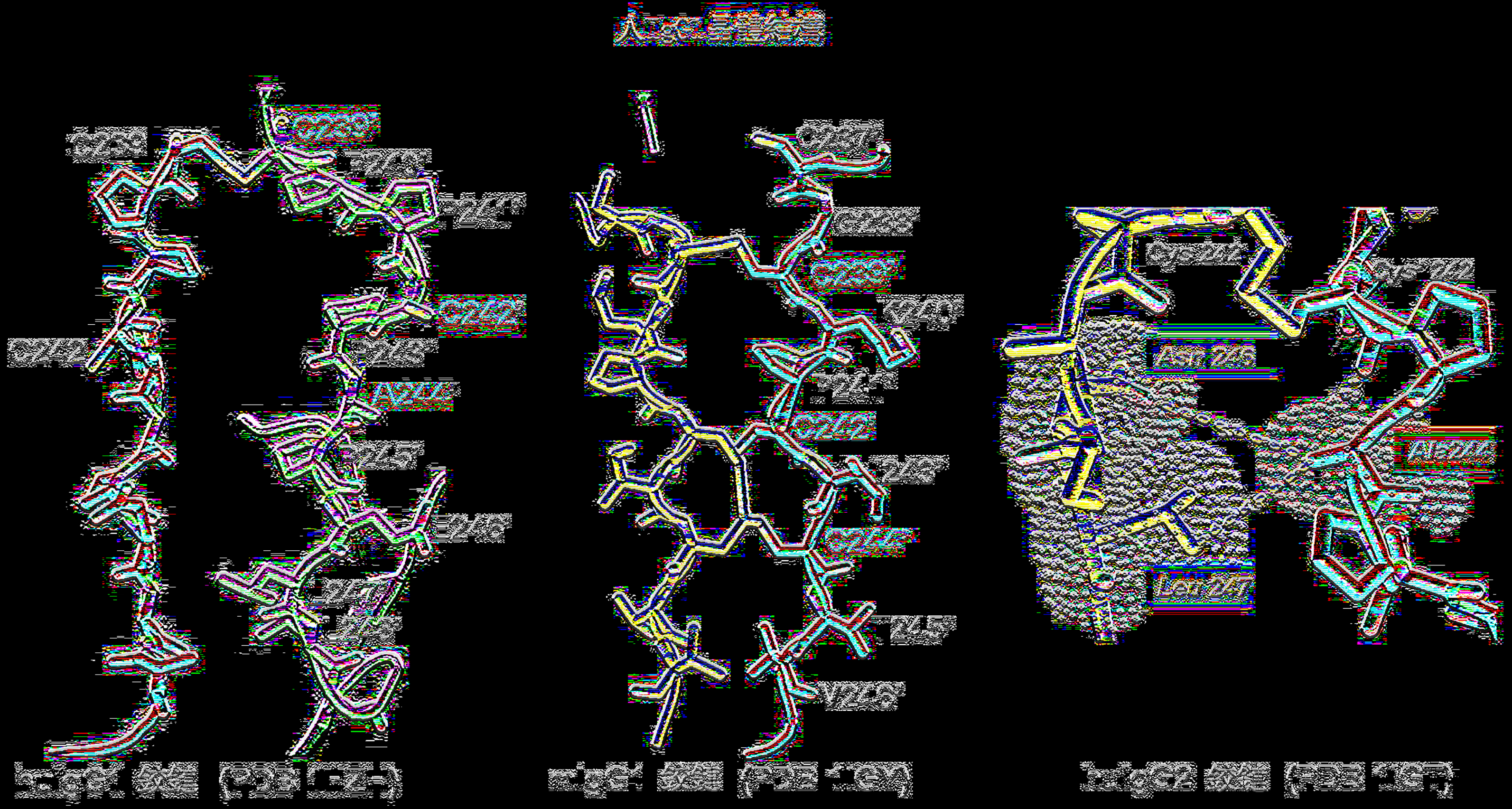


圖 1



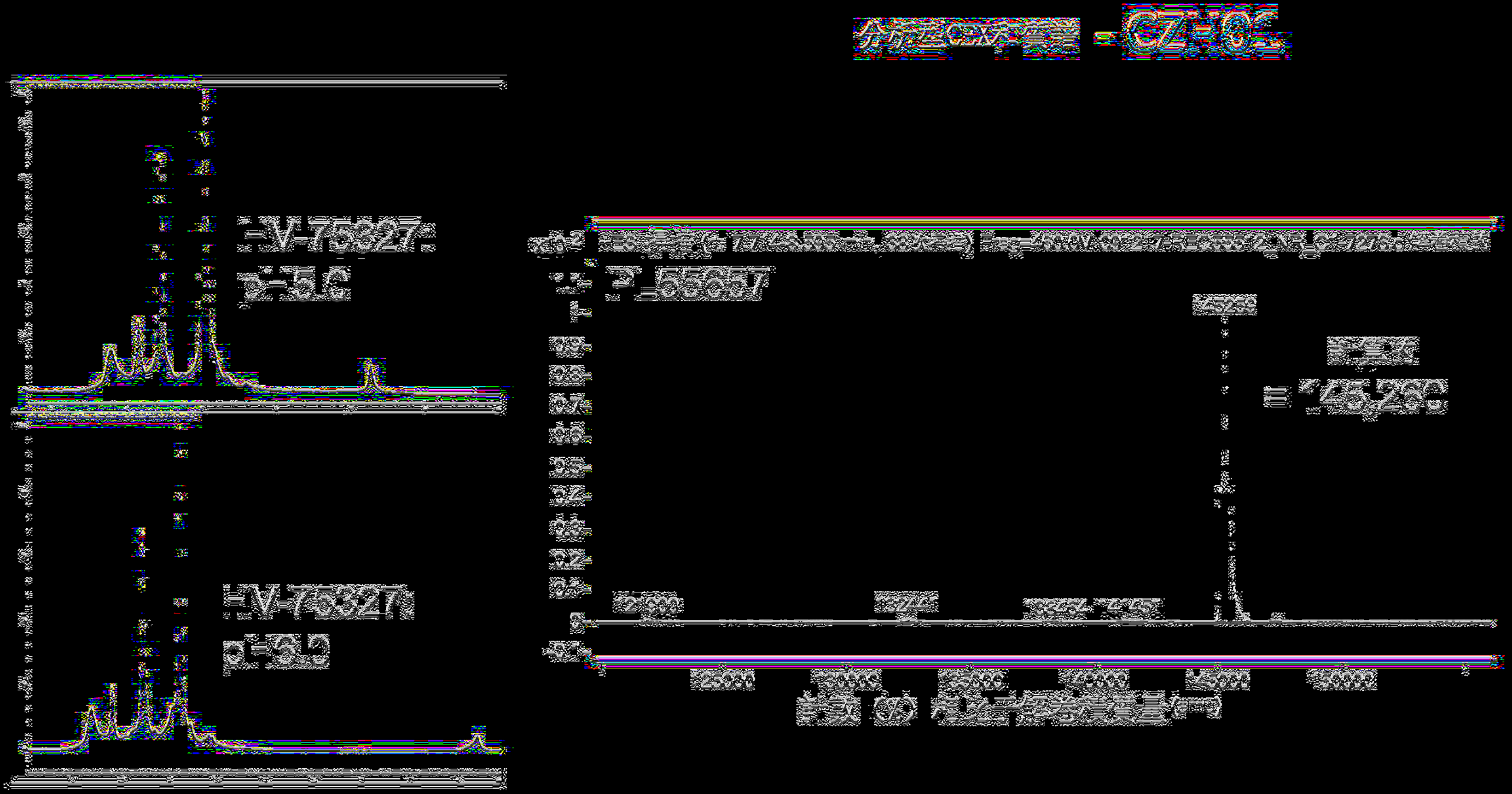
hIgG1 鉸鏈 (PDB 1HZH)　mIgG1 鉸鏈 (PDB 1IGY)　mIgG2 鉸鏈 (PDB 1IGT)

【圖 2】

圖3

圖 7

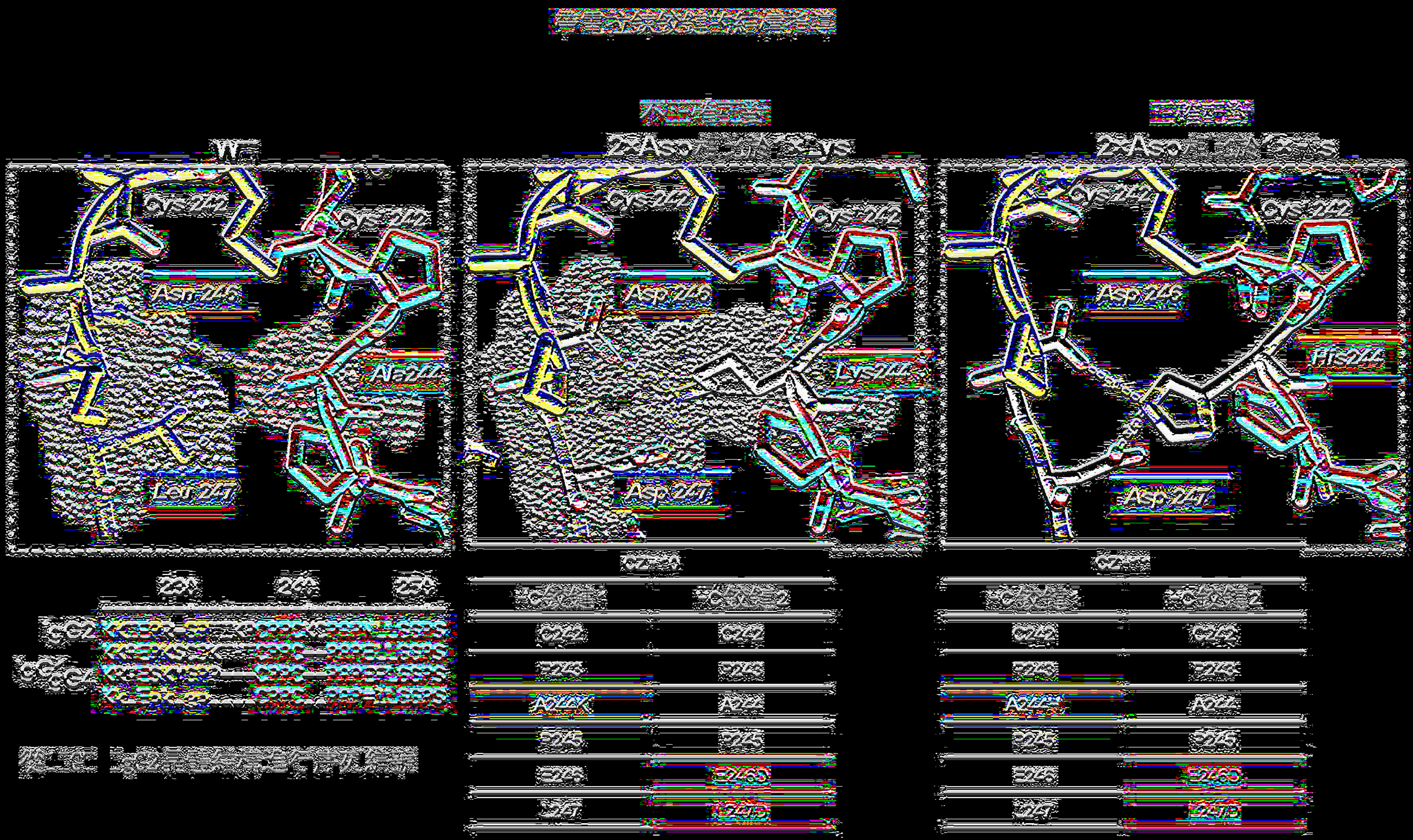
Q1
Q2
Q3
Q4
Q5
Q6
Q7
Q8
Q9
Q10
Q11
Q12
Q13
Q14
Q15
Q16
Q17
Q18
Q19
Q20
Q21
Q22
Q23
Q24
Q25
Q26
Q27
Q28
Q29
Q30
Q31
Q32
Q33
Q34
Q35
Q36
Q37
Q38
Q39
Q40
Q41
Q42
Q43
Q44
Q45
Q46
Q47
Q48
Q49
Q50
Q51
Q52
Q53
Q54
Q55
Q56
Q57
Q58
Q59
Q60
Q61
Q62
Q63
Q64
Q65
Q66
Q67
Q68
Q69
Q70
Q71
Q72
Q73
Q74
Q75
Q76
Q77
Q78
Q79
Q80
Q81
Q82
Q83
Q84
Q85
Q86
Q87
Q88
Q89
Q90
Q91
Q92
Q93
Q94
Q95
Q96
Q97
Q98
Q99
Q100
Q101
Q102
Q103
Q104
Q105
Q106
Q107
Q108
Q109
Q110
Q111
Q112
Q113
Q114
Q115
Q116
Q117
Q118
Q119
Q120
Q121
Q122
Q123
Q124
Q125
Q126
Q127
Q128
Q129
Q130
Q131
Q132
Q133
Q134
Q135
Q136
Q137
Q138
Q139
Q140
Q141
Q142
Q143
Q144
Q145
Q146
Q147
Q148
Q149
Q150
Q151
Q152
Q153
Q154
Q155
Q156
Q157
Q158
Q159
Q160
Q161
Q162
Q163
Q164
Q165
Q166
Q167
Q168
Q169
Q170
Q171
Q172
Q173
Q174
Q175
Q176
Q177
Q178
Q179
Q180
Q181
Q182
Q183
Q184
Q185
Q186
Q187
Q188
Q189
Q190
Q191
Q192
Q193
Q194
Q195
Q196
Q197
Q198
Q199
Q200
Q201
Q202
Q203
Q204
Q205
Q206
Q207
Q208
Q209
Q210
Q211
Q212
Q213
Q214
Q215
Q216
Q217
Q218
Q219
Q220
Q221
Q222
Q223
Q224
Q225
Q226
Q227
Q228
Q229
Q230
Q231
Q232
Q233
Q234
Q235
Q236
Q237
Q238
Q239
Q240
Q241
Q242
Q243
Q244
Q245
Q246
Q247
Q248
Q249
Q250
Q251
Q252
Q253
Q254
Q255
Q256
Q257
Q258
Q259
Q260
Q261
Q262
Q263
Q264
Q265
Q266
Q267
Q268
Q269
Q270
Q271
Q272
Q273
Q274
Q275
Q276
Q277
Q278
Q279
Q280
Q281
Q282
Q283
Q284
Q285
Q286
Q287
Q288
Q289
Q290
Q291
Q292
Q293
Q294
Q295
Q296
Q297
Q298
Q299
Q300
Q301
Q302
Q303
Q304
Q305
Q306
Q307
Q308
Q309
Q310
Q311
Q312
Q313
Q314
Q315
Q316
Q317
Q318
Q319
Q320
Q321
Q322
Q323
Q324
Q325
Q326
Q327
Q328
Q329
Q330
Q331
Q332
Q333
Q334
Q335
Q336
Q337
Q338
Q339
Q340
Q341
Q342
Q343
Q344
Q345
Q346
Q347
Q348
Q349
Q350
Q351
Q352
Q353
Q354
Q355
Q356
Q357
Q358
Q359
Q360
Q361
Q362
Q363
Q364
Q365
Q366
Q367
Q368
Q369
Q370
Q371
Q372
Q373
Q374
Q375
Q376
Q377
Q378
Q379
Q380
Q381
Q382
Q383
Q384
Q385
Q386
Q387
Q388
Q389
Q390
Q391
Q392
Q393
Q394
Q395
Q396
Q397
Q398
Q399
Q400
Q401
Q402
Q403
Q404
Q405
Q406
Q407
Q408
Q409
Q410
Q411
Q412
Q413
Q414
Q415
Q416
Q417
Q418
Q419
Q420
Q421
Q422
Q423
Q424
Q425
Q426
Q427
Q428
Q429
Q430
Q431
Q432
Q433
Q434
Q435
Q436
Q437
Q438
Q439
Q440
Q441
Q442
Q443
Q444
Q445
Q446
Q447
Q448
Q449
Q450
Q451
Q452
Q453
Q454
Q455
Q456
Q457
Q458
Q459
Q460
Q461
Q462
Q463
Q464
Q465
Q466
Q467
Q468
Q469
Q470
Q471
Q472
Q473
Q474
Q475
Q476
Q477
Q478
Q479
Q480
Q481
Q482
Q483
Q484
Q485
Q486
Q487
Q488
Q489
Q490
Q491
Q492
Q493
Q494
Q495
Q496
Q497
Q498
Q499
Q500
Q501
Q502
Q503
Q504
Q505
Q506
Q507
Q508
Q509
Q510
Q511
Q512
Q513
Q514
Q515
Q516
Q517
Q518
Q519
Q520
Q521
Q522
Q523
Q524
Q525
Q526
Q527
Q528
Q529
Q530
Q531
Q532
Q533
Q534
Q535
Q536
Q537
Q538
Q539
Q540
Q541
Q542
Q543
Q544
Q545
Q546
Q547
Q548
Q549
Q550
Q551
Q552
Q553
Q554
Q555
Q556
Q557
Q558
Q559
Q560
Q561
Q562
Q563
Q564
Q565
Q566
Q567
Q568
Q569
Q570
Q571
Q572
Q573
Q574
Q575
Q576
Q577
Q578
Q579
Q580
Q581
Q582
Q583
Q584
Q585
Q586
Q587
Q588
Q589
Q590
Q591
Q592
Q593
Q594
Q595
Q596
Q597
Q598
Q599
Q600
Q601
Q602
Q603
Q604
Q605
Q606
Q607
Q608
Q609
Q610
Q611
Q612
Q613
Q614
Q615
Q616
Q617
Q618
Q619
Q620
Q621
Q622
Q623
Q624
Q625
Q626
Q627
Q628
Q629
Q630
Q631
Q632
Q633
Q634
Q635
Q636
Q637
Q638
Q639
Q640
Q641
Q642
Q643
Q644
Q645
Q646
Q647
Q648
Q649
Q650
Q651
Q652
Q653
Q654
Q655
Q656
Q657
Q658
Q659
Q660
Q661
Q662
Q663
Q664
Q665
Q666
Q667
Q668
Q669
Q670
Q671
Q672
Q673
Q674
Q675
Q676
Q677
Q678
Q679
Q680
Q681
Q682
Q683
Q684
Q685
Q686
Q687
Q688
Q689
Q690
Q691
Q692
Q693
Q694
Q695
Q696
Q697
Q698
Q699
Q700
Q701
Q702
Q703
Q704
Q705
Q706
Q707
Q708
Q709
Q710
Q711
Q712
Q713
Q714
Q715
Q716
Q717
Q718
Q719
Q720
Q721
Q722
Q723
Q724
Q725
Q726
Q727
Q728
Q729
Q730
Q731
Q732
Q733
Q734
Q735
Q736
Q737
Q738
Q739
Q740
Q741
Q742
Q743
Q744
Q745
Q746
Q747
Q748
Q749
Q750
Q751
Q752
Q753
Q754
Q755
Q756
Q757
Q758
Q759
Q760
Q761
Q762
Q763
Q764
Q765
Q766
Q767
Q768
Q769
Q770
Q771
Q772
Q773
Q774
Q775
Q776
Q777
Q778
Q779
Q780
Q781
Q782
Q783
Q784
Q785
Q786
Q787
Q788
Q789
Q790
Q791
Q792
Q793
Q794
Q795
Q796
Q797
Q798
Q799
Q800
Q801
Q802
Q803
Q804
Q805
Q806
Q807
Q808
Q809
Q810
Q811
Q812
Q813
Q814
Q815
Q816
Q817
Q818
Q819
Q820
Q821
Q822
Q823
Q824
Q825
Q826
Q827
Q828
Q829
Q830
Q831
Q832
Q833
Q834
Q835
Q836
Q837
Q838
Q839
Q840
Q841
Q842
Q843
Q844
Q845
Q846
Q847
Q848
Q849
Q850
Q851
Q852
Q853
Q854
Q855
Q856
Q857
Q858
Q859
Q860
Q861
Q862
Q863
Q864
Q865
Q866
Q867
Q868
Q869
Q870
Q871
Q872
Q873
Q874
Q875
Q876
Q877
Q878
Q879
Q880
Q881
Q882
Q883
Q884
Q885
Q886
Q887
Q888
Q889
Q890
Q891
Q892
Q893
Q894
Q895
Q896
Q897
Q898
Q899
Q900
Q901
Q902
Q903
Q904
Q905
Q906
Q907
Q908
Q909
Q910
Q911
Q912
Q913
Q914
Q915
Q916
Q917
Q918
Q919
Q920
Q921
Q922
Q923
Q924
Q925
Q926
Q927
Q928
Q929
Q930
Q931
Q932
Q933
Q934
Q935
Q936
Q937
Q938
Q939
Q940
Q941
Q942
Q943
Q944
Q945
Q946
Q947
Q948
Q949
Q950
Q951
Q952
Q953
Q954
Q955
Q956
Q957
Q958
Q959
Q960
Q961
Q962
Q963
Q964
Q965
Q966
Q967
Q968
Q969
Q970
Q971
Q972
Q973
Q974
Q975
Q976
Q977
Q978
Q979
Q980
Q981
Q982
Q983
Q984
Q985
Q986
Q987
Q988
Q989
Q990
Q991
Q992
Q993
Q994
Q995
Q996
Q997
Q998
Q999
Q1000


HV-75327c
pI=5.6
HV-75327n
pI=6.2
CZ-103
x10^2
1.2
1.1
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
145253
分子量
= 145,260
25000
30000
35000
40000
45000
50000
計數 (%) 對比去卷積質量 (amu)

【圖6】

圖7

第8圖


W
Cys 242
Asp 246
Ala 244
Leu 247
Lys 244
Asp 247
His 244
C242
A244K
A244
245
247
246D
247D

【圖9】

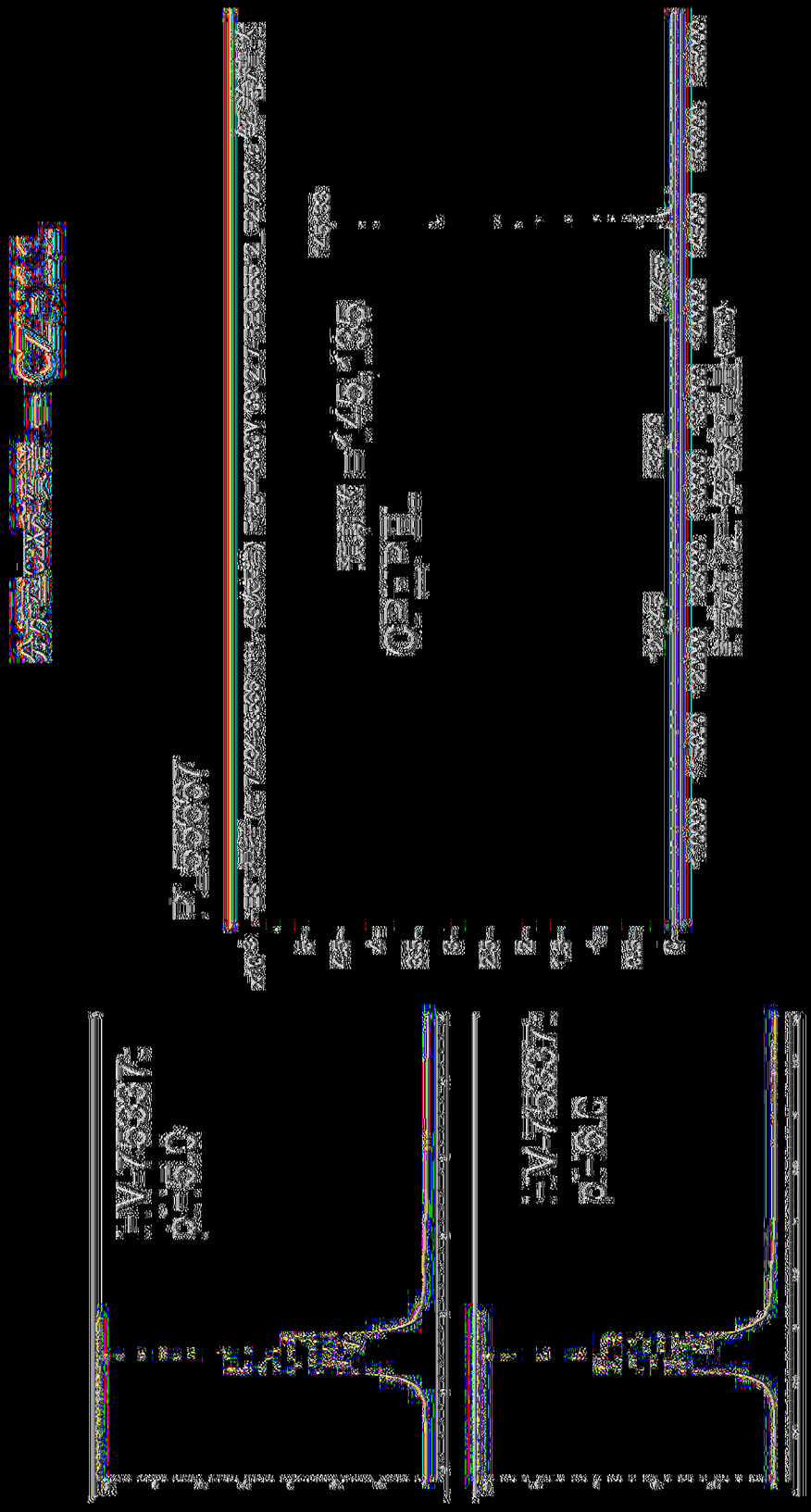

ASSEMBLY
FIG.7
CONTROL
SYSTEM
DRIVE
SYSTEM
DRIVE
SYSTEM
DRIVE
SYSTEM

圖 7

【表 12】

第13図・北13丁目(登録商標)

北丁	交差点	北13丁目(登録商標)	南北	東西	南北
北13丁目(登録商標)	C-700	N	272.2	73.5	73.9
北13丁目(登録商標)	C-705	N	275.2	72.4	73.8
北13丁目(登録商標)	C-709	N	277.4	73.7	73.5
北13丁目(登録商標)	C-712	N	278.2	73.2	74.4
北13丁目(登録商標)	C-700	Y	272.2	70.7	73.6
北13丁目(登録商標)	C-705	Y	275.2	71.9	72.2
北13丁目(登録商標)	C-707	Y	276.4	72.8	74.3
北13丁目(登録商標)	C-708	Y	276.8	72.9	74.4
北13丁目(登録商標)	C-695	Y	272.4	73.6	74.1
北13丁目(登録商標)	C-705	Y	275.8	70.8	74.2
北13丁目(登録商標)	C-702	Y	274.2	69.9	73.8
北13丁目(登録商標)	C-703	Y	274.6	69.8	74.3
北13丁目(登録商標)	C-715	Y	279.2	69.6	73.6
北13丁目(登録商標)	C-713	Y	278.8	72.3	74.3

備考：

2. 北13丁目(登録商標)は北13丁目(登録商標)を参照。

2. 表中「Y」は「交差点」を参照。

第13図