



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 120265651 A

(43) 申请公布日 2025. 07. 04

(21) 申请号 202380081229.X

(22) 申请日 2023.11.24

(30) 优先权数据

2022-187883 2022.11.25 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2025.05.23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2023/042131 2023.11.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02024/111657 JA 2024.05.30

(71) 申请人 中外制药株式会社

地址 日本

(72) 发明人 卡特琳娜·法鲁克席纳 河出来时

小林祥平 中山纯一 野中孝裕

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

专利代理师 张国梁

(51) Int.Cl.

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

权利要求书6页 说明书103页

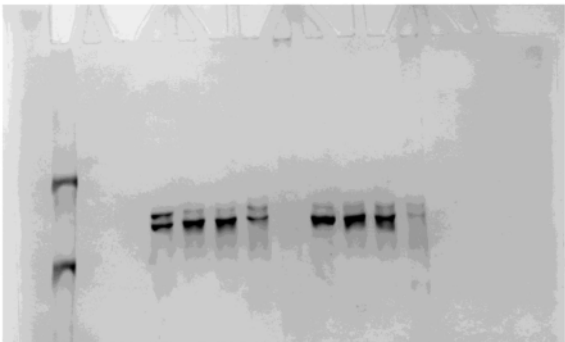
序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

用于生产蛋白质的方法

(57) 摘要

在一个实施方案中,据发现,通过在层析中进行以下步骤,能够更有效地并且以高再现性生产含有抗原结合分子的制剂,所述抗原结合分子具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键;使含有抗原结合分子以及所述抗原结合分子的错误二硫键合形式和/或非二硫键合形式的混合物与含有还原剂的溶液接触,所述抗原结合分子具有在所述铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键;以及随后,去除所述还原剂。



Gyn 浓度	[mM]	通过	0.1	1	10	100	0.1	1	10	100
pH	[-]	通过	7	7	7	7	8	8	8	8
LINC 百分比	[%]	62.2	96.2	97.6	79.1	-	97.2	99.4	93.9	-

1. 一种用于生产包含抗原结合分子的制剂的方法,所述抗原结合分子具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键,

其中所述方法包括使混合物在还原剂的存在下经受层析,所述混合物包含:

抗原结合分子,其具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键,以及

所述抗原结合分子的错误二硫键合形式和/或非二硫键合形式。

2. 一种用于生产包含抗原结合分子的制剂的方法,所述抗原结合分子具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键,其中所述方法包括:

(a) 使混合物在层析中与还原剂接触,所述混合物包含:

抗原结合分子,其具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键,以及

所述抗原结合分子的错误二硫键合形式和/或非二硫键合形式;

以及

(b) 去除所述还原剂。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述抗原结合分子包含两条或更多条多肽链,并且在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的所述至少一个二硫键形成在所述多肽链之间。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中铰链区以外的区域中的所述氨基酸残基中的任一者或两者为经突变、取代或引入的半胱氨酸残基。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述层析包括亲和层析基质、离子交换层析基质、疏水相互作用层析基质、包括离子交换层析和疏水相互作用层析两者的多模式层析基质、或羟基磷灰石基质。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述亲和层析基质选自由以下项组成的组:蛋白A基质、蛋白G基质、蛋白L基质、序列选择性肽基质和与所述抗原结合分子选择性地结合的基质。

7. 根据权利要求5所述的方法,其中所述离子交换层析基质为阳离子交换配体或阴离子交换配体。

8. 根据权利要求5所述的方法,其中所述疏水相互作用层析基质为疏水配体。

9. 根据权利要求5所述的方法,其中所述多模式层析基质为具有阳离子交换配体和疏水配体的组合的基质,或者具有阴离子交换配体和疏水配体的组合的基质。

10. 根据权利要求5所述的方法,其中所述羟基磷灰石层析基质为羟基磷灰石或其衍生物。

11. 根据权利要求5至10中任一项所述的方法,其中将所述层析基质填充到用于柱层析的柱中或涂布在用于膜层析的膜上。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述还原剂选自由以下项组成的组:单硫醇、二硫醇、膦和无机试剂,以及它们中的两者或更多者的组合。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的方法,其中所述还原剂为半胱氨酸和/或TCEP。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的方法,其中所述还原剂为TCEP并且所述还原剂的浓度为0.00001mM至10.0mM。

15. 根据权利要求1至13中任一项所述的方法, 其中所述还原剂为半胱氨酸并且所述还原剂的浓度为0.01mM至100mM。

16. 根据权利要求2至15中任一项所述的方法, 其中所述还原剂的所述去除包括使所述抗原结合分子与不含所述还原剂的溶液接触。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的方法, 其中所述抗原结合分子包含能够经由至少一个二硫键彼此连接的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域。

18. 根据权利要求17所述的方法, 其中在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的所述至少一个二硫键形成在所述第一抗原结合结构域与所述第二抗原结合结构域之间。

19. 根据权利要求17或18所述的方法, 其中在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的所述至少一个二硫键形成在所述第一抗原结合结构域的重链与所述第二抗原结合结构域的重链之间。

20. 根据权利要求17至19中任一项所述的方法, 其中在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的所述至少一个二硫键形成在所述第一抗原结合结构域的CH1区与所述第二抗原结合结构域的CH1区之间。

21. 根据权利要求17至20中任一项所述的方法, 其中在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的所述至少一个二硫键形成在所述第一抗原结合结构域的重链中EU编号位置191处的氨基酸残基与所述第二抗原结合结构域的重链中EU编号位置191处的氨基酸残基之间。

22. 根据权利要求17至21中任一项所述的方法, 其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域分别与第一抗原和第二抗原结合, 所述第一抗原和所述第二抗原为存在于细胞的表面上的蛋白质, 并且其中所述抗原结合分子具有促进表达所述第一抗原的细胞与表达所述第二抗原的细胞之间的相互作用的活性。

23. 根据权利要求22所述的方法, 其中表达所述第一抗原的所述细胞为具有细胞毒活性的细胞, 并且表达所述第二抗原的所述细胞为具有细胞毒活性的所述细胞的靶细胞, 并且其中所述抗原结合分子促进具有细胞毒活性的所述细胞对所述靶细胞的损伤。

24. 根据权利要求23所述的方法, 其中具有细胞毒活性的所述细胞为T细胞、NK细胞、单核细胞或巨噬细胞。

25. 根据权利要求22至24中任一项所述的方法, 其中所述第一抗原和所述第二抗原独立地选自由以下项组成的组: 属于细胞因子受体超家族的受体、G蛋白偶联受体、离子通道型受体、酪氨酸激酶型受体、免疫检查点受体、抗原受体、CD抗原、共刺激分子和细胞粘附分子。

26. 根据权利要求17至25中任一项所述的方法, 其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域各自能够与CD3和/或CD137结合。

27. 根据权利要求1至26中任一项所述的方法, 其中所述抗原结合分子进一步包含第三抗原结合结构域。

28. 根据权利要求27所述的方法, 其中所述第三抗原结合结构域与所述第一抗原结合结构域或所述第二抗原结合结构域融合。

29. 根据权利要求27或28所述的方法, 其中所述第三抗原结合结构域为Fab或scFv。

30. 根据权利要求27至29中任一项所述的方法, 其中所述第三抗原结合结构域在其C末

端处任选地经由肽接头与所述第一抗原结合结构域或所述第二抗原结合结构域的Fab重链(VH区)的N末端融合。

31. 根据权利要求27至30中任一项所述的方法, 其中所述第一抗原结合结构域、所述第二抗原结合结构域和所述第三抗原结合结构域各自为Fab分子, 其中所述第三抗原结合结构域在其Fab重链(CH1区)的C末端处任选地经由肽接头与所述第一抗原结合结构域或所述第二抗原结合结构域的所述Fab重链(VH区)的N末端融合。

32. 根据权利要求30或31所述的方法, 其中所述肽接头包含选自SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的氨基酸序列组成的组的氨基酸序列。

33. 根据权利要求27至32中任一项所述的方法, 其中所述第三抗原结合结构域为其中Fab轻链和所述Fab重链的可变区发生交换的交叉Fab分子, 并且其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域为常规Fab分子。

34. 根据权利要求27至33中任一项所述的方法, 其中所述第三抗原结合结构域能够与在癌细胞或癌组织上表达的抗原结合。

35. 根据权利要求27至34中任一项所述的方法, 其中所述第三抗原结合结构域能够与DLL3、优选地人DLL3结合。

36. 根据权利要求1至35中任一项所述的方法, 其中所述抗原结合分子进一步包含Fc区。

37. 根据权利要求17至36中任一项所述的方法, 其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域各自包含能够彼此相同或不同的抗体可变区, 并且包含独立地选自以下(a1)至(a4)组成的组的抗体可变区:

(a1) 包含以下的抗体可变区:

重链可变区, 其包含:

重链互补决定区(CDR)1, 其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列,

重链CDR 2, 其包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列, 以及重链CDR 3, 其包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列; 以及

轻链可变区, 其包含:

轻链CDR 1, 其包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列,

轻链CDR 2, 其包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列, 以及轻链CDR 3, 其包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列;

(a2) 包含以下的抗体可变区:

重链可变区, 其包含:

重链互补决定区(CDR)1, 其包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,

重链CDR 2, 其包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列, 以及重链CDR 3, 其包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列; 以及

轻链可变区, 其包含:

轻链CDR 1, 其包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列,

轻链CDR 2, 其包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列, 以及轻链CDR 3, 其包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列;

(a3) 与跟(a1)或(a2)的所述抗体可变区所结合的表位相同的表位结合的抗体可变区;

以及

(a4) 与 (a1) 或 (a2) 的所述抗体可变区竞争与抗原的结合的抗体可变区。

38. 根据权利要求17至37中任一项所述的方法, 其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域各自包含能够彼此相同或不同的抗体可变区, 并且包含独立地选自由以下 (a1) 至 (a4) 组成的组的抗体可变区:

(a1) 包含以下的抗体可变区:

重链可变区, 其包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列, 以及

轻链可变区, 其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列;

(a2) 包含以下的抗体可变区:

重链可变区, 其包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列, 以及

轻链可变区, 其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列;

(a3) 与跟 (a1) 或 (a2) 的所述抗体可变区所结合的表位相同的表位结合的抗体可变区;
以及

(a4) 与 (a1) 或 (a2) 的所述抗体可变区竞争与抗原的结合的抗体可变区。

39. 根据权利要求27至38中任一项所述的方法, 其中所述第三抗原结合结构域包含独立地选自由以下 (a1) 至 (a4) 组成的组的抗体可变区:

(a1) 包含以下的抗体可变区:

重链可变区, 其包含:

重链互补决定区 (CDR) 1, 其包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列,

重链CDR 2, 其包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列, 以及重链CDR 3, 其包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列; 以及

轻链可变区, 其包含:

轻链CDR 1, 其包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列,

轻链CDR 2, 其包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列, 以及轻链CDR 3, 其包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列;

(a2) 包含以下的抗体可变区:

重链可变区, 其包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列, 以及轻链可变区, 其包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列;

(a3) 与跟 (a1) 或 (a2) 的所述抗体可变区所结合的表位相同的表位结合的抗体可变区;
以及

(a4) 与 (a1) 或 (a2) 的所述抗体可变区竞争与抗原的结合的抗体可变区。

40. 根据权利要求17至39中任一项所述的方法, 其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域各自包含抗体可变区, 所述抗体可变区包含:

重链可变区, 其包含:

重链互补决定区 (CDR) 1, 其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列,

重链CDR 2, 其包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列, 以及

重链CDR 3, 其包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列; 以及轻链可变区, 其包含:

轻链CDR 1, 其包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列,

轻链CDR 2, 其包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列, 以及

轻链CDR 3,其包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

41.根据权利要求17至40中任一项所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域各自包含抗体可变区,所述抗体可变区包含:

重链可变区,其包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列,以及

轻链可变区,其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。

42.根据权利要求27至41中任一项所述的方法,其中所述第三抗原结合结构域包含抗体可变区,所述抗体可变区包含:

重链可变区,其包含:

重链互补决定区(CDR)1,其包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列,

重链CDR 2,其包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列,以及

重链CDR 3,其包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列;以及轻链可变区,其包含:

轻链CDR 1,其包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列,

轻链CDR 2,其包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列,以及

轻链CDR 3,其包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列。

43.根据权利要求27至42中任一项所述的方法,其中所述第三抗原结合结构域包含抗体可变区,所述抗体可变区包含:

重链可变区,其包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列,以及

轻链可变区,其包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列。

44.根据权利要求27至43中任一项所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域各自包含抗体可变区,所述抗体可变区包含:

重链可变区,其包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列,以及

轻链可变区,其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列,

并且其中所述第三抗原结合结构域包含抗体可变区,所述抗体可变区包含:

重链可变区,其包含SEQ ID NO:52,以及

轻链可变区,其包含SEQ ID NO:53。

45.根据权利要求17至44中任一项所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域各自为在重链中EU编号位置191处具有半胱氨酸残基的Fab,并且具有由两个半胱氨酸残基形成的二硫键。

46.根据权利要求1至45中任一项所述的方法,其中所述抗原结合分子包含选自由以下项组成的组的五条多肽链的任一种组合:

(a1) 多肽链,其包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列(链1),

多肽链,其包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列(链2),

多肽链,其包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列(链3),以及两条多肽链,其各自包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列(链4和链5);

(a2) 多肽链,其包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列(链1),

多肽链,其包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列(链2),

多肽链,其包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列(链3),以及两条多肽链,其各自包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列(链4和链5);以及

(a3) 多肽链,其包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列(链1),

多肽链,其包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列(链2),

多肽链,其包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列(链3),以及两条多肽链,其各自包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列(链4和链5);

其中,优选地,所述五条多肽链(链1至5)根据图3中示出的取向彼此连接和/或缔合。

47.一种通过根据权利要求1至46中任一项所述的方法生产的制剂,所述制剂包含抗原结合分子,所述抗原结合分子具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键。

48.一种药物组合物,其包含通过根据权利要求1至46中任一项所述的方法生产的制剂,其中所述制剂包含抗原结合分子,所述抗原结合分子具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键。

用于生产蛋白质的方法

技术领域

[0001] 本公开涉及用于生产抗原结合分子的方法,该抗原结合分子具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键。本公开还涉及用于增加或富集此类抗原结合分子的方法、用于消除抗原结合分子的二硫键的异质性的方法等。

背景技术

[0002] 在铰链区以外的区域(“LINC”)中的氨基酸残基之间具有人工二硫键的抗原结合分子(LINC-Ig) (PTL 1至PTL 4)是已知的。例如,LINC-Ig在构成抗原结合分子的两条抗体重链之一的CH1区与抗体重链中的另一者的CH1区之间具有二硫键。然而,当在细胞培养液中表达这样的抗原结合分子而获得该分子时,两种形式(重链之间具有适当二硫键的分子(LINC形式)和没有适当二硫键的分子,诸如分子的错误二硫键合形式和非二硫键合形式(unLINC形式))将共存于细胞培养液中。当制备LINC-Ig时,必须将细胞培养液中包含的重链之间未形成适当二硫键的分子,诸如具有加帽的硫原子的开放型分子,转化为具有适当二硫键的分子。

[0003] 以下是已知用于获得LINC-Ig的方法,所述方法经由铰链区以外的区域中的氨基酸残基在重链之间形成适当的二硫键。

[0004] PTL 2和PTL 4公开了用于有效获得具有LINC的抗体的方法,该方法包括用还原剂处理含有重链之间具有二硫键的分子和未形成适当二硫键的分子的制剂,并且然后通过缓冲液交换等进行再氧化来形成二硫键。

[0005] PTL 5公开了使用氧化还原缓冲液(例如,半胱氨酸/胱氨酸)使得在下游工艺中可以进行还原-氧化反应,以防止抗体的碎裂。

[0006] PTL 6公开了一种用于通过使重组抗体与还原/氧化偶联试剂接触来重折叠重组抗体的方法。

[0007] NPL 1公开了使用氧化还原缓冲液抑制由特定抗体(MAB007)的半胱氨酸化引起的批次间不均匀性。

[0008] [引文列表]

[0009] [专利文献]

[0010] [PTL 1]W02020/027330

[0011] [PTL 2]W02021/157679

[0012] [PTL 3]W02021/200898

[0013] [PTL 4]W02021/201087

[0014] [PTL 5]W02020/037016

[0015] [PTL 6]W02006/047340

[0016] [非专利文献]

[0017] [NPL 1]Pharm Sci.2008年2月;97(2):775-90,Removal of Cysteinylation from an Unpaired Sulfhydryl in the Variable Region of a Recombinant

Monoclonal IgG1 Antibody Improves Homogeneity, Stability, and Biological Activity

发明内容

[0018] [技术问题]

[0019] 如上所述,已知一种通过用还原剂处理包含重链之间具有适当二硫键的抗原结合分子和未形成适当二硫键的抗原结合分子(例如,加帽的分子)的混合物,并且然后进行再氧化,来用于有效获得具有LINC的抗原结合分子的方法。然而,从生产率和制造的难易程度的角度来看,该方法存在问题,包括产率低和反应时间长。

[0020] 为了解决上述问题,本公开旨在提供用于有效且容易地生产和纯化抗体重链之间具有适当二硫键的抗原结合分子的方法。本公开涉及用于增加抗原结合分子的结构同质性和相对丰度的方法,所述抗原结合分子具有在两条抗体重链中的每一条处的铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的一个或多个二硫键。换言之,本公开涉及用于降低在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间不具有适当二硫键的抗原结合分子的相对丰度的方法。

[0021] [问题的解决方案]

[0022] 作为解决上述问题而进行检查的结果,本发明人发现,通过使抗原结合分子与还原剂接触,并且然后去除还原剂,可以更有效且高再现性地在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成至少一个二硫键,其中抗原结合分子与亲和柱结合,并且具有可在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成至少一个二硫键的氨基酸残基(这些抗原结合分子包括在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成适当二硫键的抗原结合分子,以及在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间不形成至少一个适当二硫键的抗原结合分子)。具体地,本发明人开发了技术,通过在蛋白A亲和层析纯化(一种普遍使用的用于从细胞培养液中进行初级纯化的技术)的步骤中插入两个步骤(使包含还原剂的溶液流动以及去除还原剂),来稳定地获得高产率的抗原结合分子(LINC-Ig形式),所述抗原结合分子在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间具有至少一个二硫键(收获的细胞培养液体:HCCF)。

[0023] 本公开基于这些发现,并且具体涉及以下项:

[0024] [1]一种用于生产包含抗原结合分子的制剂的方法,所述抗原结合分子具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键,其中该方法包括使混合物在还原剂的存在下经受层析,所述抗原结合分子具有可在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成至少一个二硫键的氨基酸残基。

[0025] [2]一种用于生产包含抗原结合分子的制剂的方法,所述抗原结合分子具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键,其中所述方法包括:

[0026] (a)使抗原结合分子与层析中包含还原剂的溶液接触,所述抗原结合分子具有可在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成至少一个二硫键的氨基酸残基,以及

[0027] (b)去除所述还原剂。

[0028] [3]一种用于生产包含抗原结合分子的制剂的方法,所述抗原结合分子具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键,其中所述方法包括使混合物在还原剂的存在下经受层析,所述混合物包含:

[0029] 抗原结合分子,其具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个

二硫键,以及

[0030] 所述抗原结合分子的错误二硫键合形式和/或非二硫键合形式。

[0031] [4]一种用于生产包含抗原结合分子的制剂的方法,所述抗原结合分子具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键,其中所述方法包括:

[0032] (a)使混合物在层析中与包含还原剂的溶液接触,所述混合物包含:

[0033] 抗原结合分子,其具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键,以及

[0034] 所述抗原结合分子的错误二硫键合形式和/或非二硫键合形式;

[0035] 以及

[0036] (b)去除所述还原剂。

[0037] [5]根据[1]至[4]中任一项所述的方法,其中所述抗原结合分子包含两条或更多条多肽链,并且铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的所述至少一个二硫键形成在所述多肽链之间。

[0038] [6]根据[5]所述的方法,其中所述多肽链中的任一者或两者包含在铰链区以外的区域中的经突变、取代或引入的半胱氨酸残基。

[0039] [7]根据[1]至[6]中任一项所述的方法,其中所述抗原结合分子包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,并且其中在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的所述至少一个二硫键形成在所述第一抗原结合结构域与所述第二抗原结合结构域之间。

[0040] [8]根据[1]至[7]中任一项所述的方法,其中所述抗原结合分子包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,并且其中在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的所述至少一个二硫键形成在所述第一抗原结合结构域的重链与所述第二抗原结合结构域的重链之间。

[0041] [9]根据[1]至[8]中任一项所述的方法,其中所述抗原结合分子包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,并且其中在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的所述至少一个二硫键形成在所述第一抗原结合结构域的重链中CH1区与所述第二抗原结合结构域的重链中CH1区之间。

[0042] [10]根据[1]至[9]中任一项所述的方法,其中所述抗原结合分子包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,并且其中在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的所述至少一个二硫键形成在所述第一抗原结合结构域的重链中EU编号位置191处的氨基酸残基与所述第二抗原结合结构域的重链中EU编号位置191处的氨基酸残基之间。

[0043] [11]根据[1]至[10]中任一项所述的方法,其中所述层析包括亲和层析基质、离子交换层析基质、疏水相互作用层析基质、包括离子交换层析和疏水相互作用层析两者的多模式层析基质、或羟基磷灰石基质。

[0044] [12]根据[11]所述的方法,其中所述亲和层析基质选自以下项组成的组:蛋白A基质、蛋白G基质、蛋白L基质、序列选择性肽基质和与所述抗原结合分子选择性地结合的基质。

[0045] [13]根据[11]所述的方法,其中所述离子交换层析基质为阳离子交换配体或阴离子交换配体。

[0046] [14]根据[11]所述的方法,其中所述疏水相互作用层析基质为疏水配体。

[0047] [15]根据[11]所述的方法,其中所述多模式层析基质是具有阳离子交换配体和疏水配体的组合的基质,或者具有阴离子交换配体和疏水配体的组合的基质。

[0048] [16]根据[11]所述的方法,其中所述羟基磷灰石基质为羟基磷灰石或其衍生物(诸如氟磷灰石)。

[0049] [17]根据[1]至[16]中任一项所述的方法,其中所述方法包括:

[0050] (a)使混合物与层析基质接触,所述混合物包含:

[0051] 抗原结合分子,其具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键,以及

[0052] 所述抗原结合分子的错误二硫键合形式和/或非二硫键合形式;

[0053] 所述层析基质填充到用于柱层析的柱中或涂布在用于膜层析的膜上,

[0054] [18]根据[1]至[17]中任一项所述的方法,其中所述还原剂选自以下项组成的组:单硫醇、二硫醇、膦和无机试剂,以及它们中的两者或更多者的组合。

[0055] [19]根据[1]至[18]中任一项所述的方法,其中所述还原剂为半胱氨酸或TCEP。

[0056] [20]根据[1]至[18]中任一项所述的方法,其中所述还原剂为单硫醇并且所述还原剂的浓度为约0.01mM至约100mM。

[0057] [21]根据[1]至[19]中任一项所述的方法,其中所述还原剂为半胱氨酸并且所述还原剂的浓度为约0.01mM至约100mM、约0.0001mM至约100.0mM、约0.001mM至约100.0mM、约0.005mM至约75.0mM、约0.01mM至约50.0mM、约0.05mM至约25.0mM、或约0.1mM至约10mM。

[0058] [22]根据[1]至[18]中任一项所述的方法,其中所述还原剂为二硫醇并且所述还原剂的浓度为约0.001mM至约10mM。

[0059] [23]根据[1]至[18]中任一项所述的方法,其中所述还原剂为膦并且所述还原剂的浓度为约0.0001mM至约1mM或约0.001mM至约0.01mM。

[0060] [24]根据[1]至[19]中任一项所述的方法,其中所述还原剂为TCEP并且所述还原剂的浓度为约0.00001mM至约10.0mM、约0.00005mM至约5.0mM、约0.0001mM至约1mM、约0.0005mM至约0.5mM、约0.001mM至约0.1mM或约0.001mM至约0.01mM。

[0061] [25]根据[1]至[18]中任一项所述的方法,其中所述还原剂为无机试剂并且所述还原剂的浓度为约0.0001mM至约10mM或约0.001mM至约0.1mM。

[0062] [26]根据[1]至[19]中任一项所述的方法,其中所述还原剂为半胱氨酸并且所述还原剂的浓度为约0.1mM、约0.15mM、约1.0mM、约10.0mM或约100mM。

[0063] [27]根据[1]至[19]中任一项所述的方法,其中所述还原剂为TCEP并且所述还原剂的浓度为约0.001mM、约0.01mM、约0.1mM或约1.0mM。

[0064] [28]根据[2]和[4]至[27]中任一项所述的方法,其中包含还原剂的溶液的pH为约4.5至约10.0、约5.0至约9.0、约6.5至约8.5、或约7.0至约8.0。

[0065] [29]根据[2]和[4]至[28]中任一项所述的方法,其中包含还原剂的溶液的pH为约7.0、约7.5或约8.0。

[0066] [30]根据[1]至[29]中任一项所述的方法,其中所述层析为柱层析或膜层析。

[0067] [31]根据[30]所述的方法,其中使包含还原剂的溶液流过用于柱层析的柱或用于膜层析的装置,停留时间为约2秒至约80分钟或约3秒至约24分钟,或当所述柱或装置充满所述还原剂时暂时停止流动。

[0068] [32]根据[30]或[31]所述的方法,其中使包含还原剂的溶液流过用于柱层析的柱或用于膜层析的装置,停留时间为约12分钟或约30秒,或当所述柱或装置充满包含所述还原剂的溶液时暂时停止流动。

[0069] [33]根据[2]和[4]至[32]中任一项所述的方法,其中使所述混合物与包含所述还原剂的溶液接触约6秒至约1440分钟,或约18秒至约300分钟。

[0070] [34]根据[2]和[4]至[33]中任一项所述的方法,其中使所述混合物与包含所述还原剂的溶液接触约120分钟或约7.5分钟。

[0071] [35]根据[1]至[34]中任一项所述的方法,其中所述还原剂的所述去除包括使所述抗原结合分子与不含所述还原剂的溶液接触。

[0072] [36]根据[35]所述的方法,其中所述层析为柱层析或膜层析,并且其中所述混合物与不含还原剂的溶液的接触包括使不含还原剂的溶液流过用于柱层析的柱或用于膜层析的装置。

[0073] [37]根据[35]或[36]所述的方法,其中使不含还原剂的溶液流过用于柱层析的柱或用于膜层析的装置,停留时间为约2秒至约80分钟或约3秒至约24分钟,并且任选地当所述柱或装置充满所述溶液时暂时停止流动。

[0074] [38]根据[35]至[37]中任一项所述的方法,其中使不含还原剂的溶液流过用于柱层析的柱或用于膜层析的装置,停留时间为约4分钟或约30秒,并且任选地当所述柱或装置充满所述溶液时暂时停止流动。

[0075] [39]根据[35]至[38]中任一项所述的方法,其中使所述混合物与不含所述还原剂的溶液接触约6秒至约1440分钟,或约18秒至约300分钟。

[0076] [40]根据[35]至[39]中任一项所述的方法,其中使所述混合物与不含所述还原剂的溶液接触约20分钟或约7.5分钟。

[0077] [41]根据[1]至[40]中任一项所述的方法,其中使所述混合物与包含所述还原剂的溶液在约4°C至约37°C、优选地在约15°C至约37°C接触。

[0078] [42]根据[1]至[41]中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括:在步骤(a)之前,使混合物与层析基质接触,所述混合物包含:

[0079] 抗原结合分子,其具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键,以及

[0080] 所述抗原结合分子的错误二硫键合形式和/或非二硫键合形式;

[0081] 以将抗原结合分子填充到用于柱层析的柱中或将抗原结合分子固定在用于膜层析的膜上。

[0082] [43]根据[1]至[42]中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括:在步骤(a)之前,去除层析中的杂质。

[0083] [44]根据[1]至[43]中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括:在步骤(b)之前或之后,回收具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键的抗原结合分子。

[0084] [45]根据[1]至[44]中任一项所述的方法,其中抗原结合分子与包含还原剂的溶液的接触,导致可形成二硫键的氨基酸残基之间形成的二硫键的断裂,和/或可形成二硫键的氨基酸残基中的硫原子的脱帽。

[0085] [46]根据[2]和[4]至[45]中任一项所述的方法,其中还原剂的去除导致可形成二硫键的氨基酸残基之间的二硫键的形成。

[0086] [47]根据[1]至[46]中任一项所述的方法,其中可形成二硫键的氨基酸残基被引入或工程化为半胱氨酸残基。

[0087] [48]根据[1]至[47]中任一项所述的方法,其中在铰链区以外的区域中的至少一个二硫键为链间二硫键。

[0088] [49]根据[1]至[48]中任一项所述的方法,其中在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键为一个、两个、三个、四个或更多个链间二硫键。

[0089] [50]根据[1]至[49]中任一项所述的方法,其中在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键是野生型IgG中不存在的工程化二硫键。

[0090] [51]根据[1]至[50]中任一项所述的方法,所述方法用于增加在铰链区以外的区域中具有至少一个二硫键的抗原结合分子(LINC形式)比以下项的总和的比率(LINC比率):

[0091] (i) 具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键的抗原结合分子(LINC形式),和

[0092] (ii) 抗原结合分子的错误二硫键合形式和/或非二硫键合形式(unLINC形式)。

[0093] [52]根据[1]至[51]中任一项所述的方法,所述方法用于生产相对于以下项的总和以摩尔比计为至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的在铰链区以外的区域中具有至少一个二硫键的抗原结合分子(LINC形式):

[0094] (i) 具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键的抗原结合分子(LINC形式)和

[0095] (ii) 抗原结合分子的错误二硫键合形式和/或非二硫键合形式(unLINC形式)。

[0096] 本公开还涉及以下发明:

[0097] [A1]根据[1]至[52]中任一项所述的方法,其中所述层析为柱层析。

[0098] [A2]根据[A1]所述的方法,其中所述方法包括:

[0099] (a) 使混合物与层析基质接触,所述混合物包含:

[0100] 抗原结合分子,其具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键,以及

[0101] 所述抗原结合分子的错误二硫键合形式和/或非二硫键合形式;

[0102] 所述层析基质填充到柱中。

[0103] [A3]根据[A1]或[A2]所述的方法,其中使包含还原剂的溶液流过柱,停留时间为约2分钟至约80分钟,并且任选地当所述柱充满包含所述还原剂的溶液时暂时停止流动。

[0104] [A4]根据[A1]至[A3]中任一项所述的方法,其中使包含还原剂的溶液流过柱,停留时间为约4分钟至约24分钟,并且任选地当所述柱充满包含所述还原剂的溶液时暂时停止流动。

[0105] [A5]根据[A1]至[A4]中任一项所述的方法,其中使包含还原剂的溶液流过柱,停留时间为约12分钟,并且任选地当所述柱充满包含所述还原剂的溶液时暂时停止流动。

[0106] [A6]根据[A1]至[A5]中任一项所述的方法,其中使包含还原剂的溶液以约25cm/h至约500cm/h、或约50cm/h至约400cm/h的速率流过用于柱层析的柱,并且任选地当所述柱充满包含所述还原剂的溶液时暂时停止流动。

[0107] [A7]根据[A1]至[A6]中任一项所述的方法,其中使包含还原剂的溶液以约100cm/h的速率流过用于柱层析的柱,并且任选地当所述柱充满包含所述还原剂的溶液时暂时停止流动。

[0108] [A8]根据[A1]至[A7]中任一项所述的方法,其中包含还原剂的溶液的流动体积为柱体积的约0.1倍(约0.1CV(柱体积))至柱体积的约100倍(约100CV)。

[0109] [A9]根据[A1]至[A8]中任一项所述的方法,其中包含还原剂的溶液的流动体积为柱体积的约1倍(1CV)至柱体积的约20倍(约20CV)。

[0110] [A10]根据[A1]至[A9]中任一项所述的方法,其中包含还原剂的溶液的流动体积为柱体积的约10.0倍(约10.0CV)。

[0111] [A11]根据[A1]至[A10]中任一项所述的方法,其中使所述混合物与包含所述还原剂的溶液接触约4分钟至约1440分钟。

[0112] [A12]根据[A1]至[A11]中任一项所述的方法,其中使所述混合物与包含所述还原剂的溶液接触约8分钟至约300分钟。

[0113] [A13]根据[A1]至[A12]中任一项所述的方法,其中使所述混合物与包含所述还原剂的溶液接触约120分钟。

[0114] [A14]根据[A1]至[A13]中任一项所述的方法,其中基质所携带的抗原结合分子的量为每1L基质约5g至约80g、约7g至约50g、或约10g至约40g。

[0115] [A15]根据[A1]至[A14]中任一项所述的方法,其中使不含还原剂的溶液流过柱,停留时间为约2分钟至约80分钟,或当所述柱充满所述溶液时暂时停止流动。

[0116] [A16]根据[A1]至[A15]中任一项所述的方法,其中使不含还原剂的溶液流过柱,停留时间为约4分钟至约24分钟,或当所述柱充满所述溶液时暂时停止流动。

[0117] [A17]根据[A1]至[A16]中任一项所述的方法,其中使不含还原剂的溶液流过柱,停留时间为约4分钟,或当所述柱充满所述溶液时暂时停止流动。

[0118] [A18]根据[A1]至[A17]中任一项所述的方法,其中使不含还原剂的溶液以约25cm/h至约500cm/h、或约50cm/h至约400cm/h的速率流过用于柱层析的柱,或当所述柱充满所述溶液时暂时停止流动。

[0119] [A19]根据[A1]至[A18]中任一项所述的方法,其中使不含还原剂的溶液以约300cm/h的速率流过用于柱层析的柱,或当所述柱充满所述溶液时暂时停止流动。

[0120] [A20]根据[A1]至[A19]中任一项所述的方法,其中不含还原剂的溶液的流动体积为柱体积的约0.1倍(约0.1CV)至柱体积的约100倍(约100CV),或柱体积的约1倍(约1CV)至柱体积的约20倍(约20CV)。

[A21]根据[A1]至[A20]中任一项所述的方法,其中不含还原剂的溶液的流动体积为柱体积的约5.0倍(约5.0CV)。

[0121] [A22]根据[A1]至[A21]中任一项所述的方法,其中使所述混合物与不含所述还原剂的溶液接触约4分钟至约1440分钟。

[0122] [A23]根据[A1]至[A22]中任一项所述的方法,其中使所述混合物与不含所述还原剂的溶液接触约8分钟至约300分钟。

[0123] [A24]根据[A1]至[A23]中任一项所述的方法,其中使所述混合物与不含所述还原剂的溶液接触约20分钟。

[0124] 本公开还涉及以下发明:

- [0125] [B1]根据[1]至[52]中任一项所述的方法,其中所述层析为膜层析。
- [0126] [B2]根据[B1]所述的方法,其中所述方法包括:
- [0127] (a)使混合物与层析基质接触,所述混合物包含:
- [0128] 抗原结合分子,其具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键,以及
- [0129] 所述抗原结合分子的错误二硫键合形式和/或非二硫键合形式;
- [0130] 所述层析基质涂布或固定在用于膜层析的膜上。
- [0131] [B3]根据[B1]或[B2]所述的方法,其中使包含还原剂的溶液流过膜装置,停留时间为约2秒至约60分钟,或当所述膜装置充满包含所述还原剂的溶液时暂时停止流动。
- [0132] [B4]根据[B1]至[B3]中任一项所述的方法,其中使包含还原剂的溶液流过膜装置,停留时间为约3秒至约6分钟,例如约30秒,或当所述膜装置充满包含所述还原剂的溶液时暂时停止流动。
- [0133] [B5]根据[B1]至[B4]中任一项所述的方法,其中包含还原剂的溶液的流动体积为膜装置体积的约1倍(约1MV(膜体积))至膜装置体积的约500倍(约500MV)。
- [0134] [B6]根据[B1]至[B5]中任一项所述的方法,其中包含还原剂的溶液的流动体积为膜装置体积的约2倍(约2MV)至膜装置体积的约100倍(约100MV),例如膜装置体积的约15倍(约15MV)。
- [0135] [B7]根据[B1]至[B6]中任一项所述的方法,其中使所述混合物与包含所述还原剂的溶液接触约6秒至约600分钟。
- [0136] [B8]根据[B1]至[B7]中任一项所述的方法,其中使所述混合物与包含所述还原剂的溶液接触约18秒至约120分钟,例如约7.5分钟。
- [0137] [B9]根据[B1]至[B8]中任一项所述的方法,其中基质所携带的抗原结合分子的量为每1L膜装置体积约5g至约100g或约7g至约70g,例如约25g。
- [0138] [B10]根据[B1]至[B9]中任一项所述的方法,其中使不含还原剂的溶液流过膜装置,停留时间为约2秒至约60分钟,或当所述膜装置充满所述溶液时暂时停止流动。
- [0139] [B11]根据[B1]至[B10]中任一项所述的方法,其中使不含还原剂的溶液流过膜装置,停留时间为约3秒至约6分钟,例如约30秒,或当所述膜装置充满所述溶液时暂时停止流动。
- [0140] [B12]根据[B1]至[B11]中任一项所述的方法,其中不含还原剂的溶液的流动体积为膜装置体积的约1倍(约1MV)至膜装置体积的约500倍(约500MV)。
- [0141] [B13]根据[B1]至[B12]中任一项所述的方法,其中不含还原剂的溶液的流动体积为膜装置体积的约2倍(约2MV)至膜装置体积的约100倍(约100MV),例如膜装置体积的约15倍(约15MV)。
- [0142] [B14]根据[B1]至[B13]中任一项所述的方法,其中使所述混合物与不含所述还原剂的溶液接触约6秒至约600分钟。
- [0143] [B15]根据[B1]至[B14]中任一项所述的方法,其中使所述混合物与不含所述还原剂的溶液接触约18秒至约120分钟,例如约7.5分钟。
- [0144] 本公开还涉及以下发明:
- [0145] [101]根据[1]至[52]、[A1]至[A24]和[B1]至[B15]中任一项所述的方法,其中所

述抗原结合分子包含可经由至少一个二硫键彼此连接的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域。

[0146] [102]根据[101]所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域各自包含Fab、Fab'、scFab、Fv、scFv或VHH结构。

[0147] [103]根据[101]或[102]所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域各自包含或不包含铰链区。

[0148] [104]根据[101]至[103]中任一项所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域各自包含形成F(ab')₂结构的Fab和铰链区。

[0149] [105]根据[101]至[104]中任一项所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域均与相同的抗原结合。

[0150] [106]根据[101]至[105]中任一项所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域均与相同抗原上的相同的表位结合。

[0151] [107]根据[101]至[105]中任一项所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域中的每一者均与相同抗原上的不同表位结合。

[0152] [108]根据[101]至[104]中任一项所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域中的每一者均与不同的抗原结合。

[0153] [109]根据[101]至[106]中任一项所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域均具有相同的氨基酸序列。

[0154] [110]根据[101]至[108]中任一项所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域中的每一者均具有不同的氨基酸序列。

[0155] [111]根据[101]至[110]中任一项所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域中的至少一者与可溶性蛋白结合。

[0156] [112]根据[101]至[111]中任一项所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域中的至少一者与膜蛋白结合。

[0157] [113]根据[1]至[52]、[A1]至[A24]、[B1]至[B15]和[101]至[112]中任一项所述的方法,其中所述抗原结合分子具有调节两个抗原分子之间的相互作用的活性。

[0158] [114]根据[101]至[104]中任一项所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域分别与配体及其受体结合,并且其中所述抗原结合分子具有促进由配体介导的受体的激活的活性。

[0159] [115]根据[101]至[104]中任一项所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域分别与酶及其底物结合,并且其中所述抗原结合分子具有促进所述酶与所述底物之间的催化反应的活性。

[0160] [116]根据[101]至[104]中任一项所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域均与细胞的表面上存在的蛋白质(分别为第一抗原和第二抗原)结合,并且其中所述抗原结合分子具有促进表达所述第一抗原的细胞与表达所述第二抗原的细胞之间的相互作用的活性。

[0161] [117]根据[116]所述的方法,其中表达所述第一抗原的所述细胞为具有细胞毒活性的细胞,并且表达所述第二抗原的所述细胞为其靶细胞,并且其中所述抗原结合分子促进具有细胞毒活性的细胞对所述靶细胞的损伤。

[0162] [118]根据[117]所述的方法,其中具有细胞毒活性的所述细胞为T细胞、NK细胞、单核细胞或巨噬细胞。

[0163] [119]根据[105]至[118]中任一项所述的方法,其中所述抗原选自由以下项组成的组:属于细胞因子受体超家族的受体、G蛋白偶联受体、离子通道型受体、酪氨酸激酶型受体、免疫检查点受体、抗原受体、CD抗原、共刺激分子和细胞粘附分子。

[0164] [120]根据[101]至[104]中任一项所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域各自能够与CD3和/或CD137结合。

[0165] [121]根据[1]至[52]、[A1]至[A24]、[B1]至[B15]和[101]至[120]中任一项所述的方法,其中所述抗原结合分子进一步包含第三抗原结合结构域。

[0166] [122]根据[101]至[121]中任一项所述的方法,其中所述第三抗原结合结构域与所述第一抗原结合结构域或所述第二抗原结合结构域融合。

[0167] [123]根据[121]或[122]所述的方法,其中所述第三抗原结合结构域为Fab或scFv。

[0168] [124]根据[102]至[123]中任一项所述的方法,其中所述第三抗原结合结构域在其C末端处任选地经由肽接头与所述第一抗原结合结构域或所述第二抗原结合结构域的Fab重链(VH区)的N末端融合。

[0169] [125]根据[121]至[124]中任一项所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域、所述第二抗原结合结构域和所述第三抗原结合结构域各自为Fab分子,其中所述第三抗原结合结构域在其Fab重链(CH1区)的C末端处任选地经由肽接头与所述第一抗原结合结构域或所述第二抗原结合结构域的所述Fab重链(VH区)的N末端融合。

[0170] [126]根据[124]或[125]所述的方法,其中所述肽接头包含选自由SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的氨基酸序列组成的组的氨基酸序列。

[0171] [127]根据[121]至[126]中任一项所述的方法,其中所述第三抗原结合结构域为其中Fab轻链和所述Fab重链的可变区发生交换的交叉Fab分子,并且其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域为常规Fab分子。

[0172] [128]根据[121]至[127]中任一项所述的方法,其中所述第三抗原结合结构域能够与癌细胞或癌组织上表达的抗原结合。

[0173] [129]根据[121]至[128]中任一项所述的方法,其中所述第三抗原结合结构域能够与DLL3,优选地人DLL3结合。

[0174] [130]根据[1]至[52]、[A1]至[A24]、[B1]至[B15]和[101]至[129]中任一项所述的方法,其中所述抗原结合分子进一步包含Fc区。

[0175] [131]根据[130]所述的方法,其中所述Fc区由可以稳定地彼此缔合的第一Fc区亚基和第二Fc区亚基组成。

[0176] [132]根据[131]所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域为Fab,其中第一抗原结合结构域在Fab重链的C末端处与Fc区的第一Fc区亚基和第二Fc区亚基中的任一者的N末端融合,并且其中第二抗原结合结构域在Fab重链的C末端处与Fc区另一个亚基的N末端融合。

[0177] [133]根据[130]至[132]中任一项所述的方法,其中Fc区源自人。

[0178] [134]根据[130]至[133]中任一项所述的方法,其中Fc区为IgG Fc区,优选地人

IgG Fc区,或更优选地人IgG1 Fc区。

[0179] [135]根据[130]至[134]中任一项所述的方法,其中与天然人IgG1 Fc区相比,Fc区显示出对人Fc γ 受体的结合亲和力降低。

[0180] [136]根据[130]至[135]中任一项所述的方法,其中与天然IgG Fc区相比,Fc区在酸性pH条件(例如,pH 5.8)下显示出增强的FcRn结合活性。

[0181] [137]根据[130]至[136]中任一项所述的方法,其中Fc区包含:位置434处的Ala;位置438处的Glu、Arg、Ser或Lys;以及位置440处的Glu、Asp或Gln,根据EU编号。

[0182] [138]根据[130]至[137]中任一项所述的方法,其中Fc区包含:位置434处的Ala;位置438处的Arg或Lys;以及位置440处的Glu或Asp,根据EU编号。

[0183] [139]根据[130]至[138]中任一项所述的方法,其中Fc区进一步包含:位置428处的Ile或Leu;和/或位置436处的Ile、Leu、Val、Thr或Phe,根据EU编号。

[0184] [140]根据[130]至[139]中任一项所述的方法,其中Fc区包含选自以下项组成的组的氨基酸取代的组合:

- [0185] (a) N434A/Q438R/S440E;
- [0186] (b) N434A/Q438R/S440D;
- [0187] (c) N434A/Q438K/S440E;
- [0188] (d) N434A/Q438K/S440D;
- [0189] (e) N434A/Y436T/Q438R/S440E;
- [0190] (f) N434A/Y436T/Q438R/S440D;
- [0191] (g) N434A/Y436T/Q438K/S440E;
- [0192] (h) N434A/Y436T/Q438K/S440D;
- [0193] (i) N434A/Y436V/Q438R/S440E;
- [0194] (j) N434A/Y436V/Q438R/S440D;
- [0195] (k) N434A/Y436V/Q438K/S440E;
- [0196] (l) N434A/Y436V/Q438K/S440D;
- [0197] (m) N434A/R435H/F436T/Q438R/S440E;
- [0198] (n) N434A/R435H/F436T/Q438R/S440D;
- [0199] (o) N434A/R435H/F436T/Q438K/S440E;
- [0200] (p) N434A/R435H/F436T/Q438K/S440D;
- [0201] (q) N434A/R435H/F436V/Q438R/S440E;
- [0202] (r) N434A/R435H/F436V/Q438R/S440D;
- [0203] (s) N434A/R435H/F436V/Q438K/S440E;
- [0204] (t) N434A/R435H/F436V/Q438K/S440D;
- [0205] (u) M428L/N434A/Q438R/S440E;
- [0206] (v) M428L/N434A/Q438R/S440D;
- [0207] (w) M428L/N434A/Q438K/S440E;
- [0208] (x) M428L/N434A/Q438K/S440D;
- [0209] (y) M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E;
- [0210] (z) M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440D;

- [0211] (aa)M428L/N434A/Y436T/Q438K/S440E;
- [0212] (ab)M428L/N434A/Y436T/Q438K/S440D;
- [0213] (ac)M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440E;
- [0214] (ad)M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440D;
- [0215] (ae)M428L/N434A/Y436V/Q438K/S440E;
- [0216] (af)M428L/N434A/Y436V/Q438K/S440D;
- [0217] (ag)L235R/G236R/S239K/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E;以及
- [0218] (ah)L235R/G236R/A327G/A330S/P331S/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E,
- [0219] 根据EU编号。
- [0220] [141]根据[130]至[136]中任一项所述的方法,其中Fc区包含氨基酸取代M428L/N434A/Q438R/S440E的组合。
- [0221] [142]根据[130]至[141]中任一项所述的方法,其中Fc区包含一个或多个促进Fc区多聚化的氨基酸取代的组合。
- [0222] [143]根据[142]所述的方法,其中促进多聚化的氨基酸取代包含选自由以下项组成的组的至少一个位置处的氨基酸取代:EU编号位置247、248、253、254、310、311、338、345、356、359、382、385、386、430、433、434、436、437、438、439、440和447。
- [0223] [144]根据[142]或[143]所述的方法,其中多聚化为六聚化。
- [0224] [145]根据[1]至[52]、[A1]至[A24]、[B1]至[B15]和[101]至[144]中任一项所述的方法,其中抗原结合分子包含由其铰链区中的至少一个半胱氨酸残基的取代而产生的氨基酸残基。
- [0225] [146]根据[145]所述的方法,其中半胱氨酸残基存在于铰链区中的EU编号位置226处和/或位置229处。
- [0226] [147]根据[1]至[52]、[A1]至[A24]、[B1]至[B15]和[101]至[146]中任一项所述的方法,其中抗原结合分子为多特异性抗原结合分子。
- [0227] [148]根据[147]所述的方法,其中多特异性抗原结合分子为双特异性抗原结合分子或三特异性抗原结合分子。
- [0228] [149]根据[1]至[52]、[A1]至[A24]、[B1]至[B15]和[101]至[148]中任一项所述的方法,其中抗原结合分子为抗体。
- [0229] [150]根据[149]所述的方法,其中抗体为IgG抗体,优选地IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。
- [0230] 本公开还涉及以下发明:
- [0231] [201]根据[101]至[150]中任一项所述的方法,其中铰链区以外的区域中的至少一个二硫键形成于存在于第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的相同位置处的氨基酸残基之间。
- [0232] [202]根据[101]至[150]中任一项所述的方法,其中铰链区以外的区域中的至少一个二硫键形成于存在于第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的不同位置处的氨基酸残基之间。
- [0233] [203]根据[101]至[150]、[201]和[202]中任一项所述的方法,其中铰链区以外的区域中的至少一个二硫键形成于第一抗原结合结构域的重链与第二抗原结合结构域的重

链之间、第一抗原结合结构域的轻链与第二抗原结合结构域的轻链之间、或第一抗原结合结构域的CH1区、CL区、VL区、VH区或VHH区与第二抗原结合结构域的CH1区、CL区、VL区、VH区或VHH区的任何组合之间。

[0234] [204]根据[203]所述的方法,其中至少一个二硫键形成于第一抗原结合结构域的CH1区与第二抗原结合结构域的CH1区之间。

[0235] [205]根据[204]所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基的位置各自独立地选自由以下项组成的组:EU编号位置119至123、131至140、148至150、155至167、174至178、188至197、201至214、以及218至219。

[0236] [206]根据[204]所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基的位置各自独立地选自由以下项组成的组:EU编号位置119、122、123、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、148、150、155、156、157、159、160、161、162、163、164、165、167、174、176、177、178、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、201、203、205、206、207、208、211、212、213、214、218和219。

[0237] [207]根据[204]所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基的位置各自独立地选自由以下项组成的组:EU编号位置134、135、136、137、191、192、193、194、195和196。

[0238] [208]根据[204]所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基的位置各自独立地选自由以下项组成的组:EU编号位置135、136和191。

[0239] [209]根据[204]所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基的位置各自独立地选自由以下项组成的组:EU编号位置119、120、121、122和123。

[0240] [210]根据[204]所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基的位置各自独立地选自由以下项组成的组:EU编号位置131、132、133、134、135、136、137、138、139和140。

[0241] [211]根据[204]所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基的位置各自独立地选自由以下项组成的组:EU编号位置148、149和150。

[0242] [212]根据[204]所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基的位置各自独立地选自由以下项组成的组:EU编号位置155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166和167。

[0243] [213]根据[204]所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基的位置各自独立地选自由以下项组成的组:EU编号位置174、175、176、177和178。

[0244] [214]根据[204]所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基的位置各自独立地选自由以下项组成的组:EU编号位置188、189、190、191、192、193、194、195、196和197。

[0245] [215]根据[204]所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基的位置各自独立地选自由以下项组成的组:EU编号位置201、202、

203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213和214。

[0246] [216]根据[204]所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基的位置各自独立地选自以下项组成的组:EU编号位置218和219。

[0247] [217]根据[204]至[216]中任一项所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基的位置相差3个氨基酸或更少。

[0248] [218]根据[204]所述的方法,其中第一抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基是EU编号位置135处的氨基酸残基,并且第二抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基是EU编号位置132至138中任一者处的氨基酸残基。

[0249] [219]根据[204]所述的方法,其中第一抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基是EU编号位置136处的氨基酸残基,并且第二抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基是EU编号位置133至139中任一者处的氨基酸残基。

[0250] [220]根据[204]所述的方法,其中第一抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基是EU编号位置191处的氨基酸残基,并且第二抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基是EU编号位置188至194中任一者处的氨基酸残基。

[0251] [221]根据[204]所述的方法,其中第一抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基是EU编号位置135处的氨基酸残基,并且第二抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基是EU编号位置135处的氨基酸残基。

[0252] [222]根据[204]所述的方法,其中第一抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基是EU编号位置136处的氨基酸残基,并且第二抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基是EU编号位置136处的氨基酸残基。

[0253] [223]根据[204]所述的方法,其中第一抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基是EU编号位置191处的氨基酸残基,并且第二抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基是EU编号位置191处的氨基酸残基。

[0254] [224]根据[204]至[223]中任一项所述的方法,其中CH1区的亚类为 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ 、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 μ 、 δ 或 ϵ 。

[0255] [225]根据[101]至[150]和[201]至[224]中任一项所述的方法,其中抗原结合分子在第一抗原结合结构域与第二抗原结合结构域之间包含一个、两个或更多个额外的二硫键,其中额外的二硫键经由第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的各CH1区中根据EU编号的以下位置处的氨基酸残基形成:

[0256] (a) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置131至138、194和195中的任一者处的氨基酸残基之间;

[0257] (b) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置131处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置194处的氨基酸残基之间;

[0258] (c) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置132处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置194处的氨基酸残基之间;

[0259] (d) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置133处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置194处的氨基酸残基之间;

[0260] (e) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置134处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置194处的氨基酸残基之间;

[0261] (f) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置135处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置194处的氨基酸残基之间；

[0262] (g) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置136处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置194处的氨基酸残基之间；

[0263] (h) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置137处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置194处的氨基酸残基之间；

[0264] (i) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置138处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置194处的氨基酸残基之间；

[0265] (j) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置131处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置195处的氨基酸残基之间；

[0266] (k) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置132处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置195处的氨基酸残基之间；

[0267] (l) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置133处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置195处的氨基酸残基之间；

[0268] (m) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置134处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置195处的氨基酸残基之间；

[0269] (n) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置135处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置195处的氨基酸残基之间；

[0270] (o) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置136处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置195处的氨基酸残基之间；

[0271] (p) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置137处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置195处的氨基酸残基之间；以及

[0272] (q) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置138处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置195处的氨基酸残基之间。

[0273] [226]根据[101]至[150]和[201]至[224]中任一项所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的任一者在CH1区中的EU编号位置136至138处包含一个、两个或更多个带电氨基酸残基;并且第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的另一者在CH1区中的EU编号位置193至195处包含一个、两个或更多个带相反电荷的氨基酸残基。

[0274] [227]根据[101]至[150]和[201]至[224]中任一项所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的任一者在CH1区中的EU编号位置136至138处包含一个、两个或更多个带正电荷的氨基酸残基;并且第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的另一者在CH1区中的EU编号位置193至195处包含一个、两个或更多个带负电荷的氨基酸残基。

[0275] [228]根据[101]至[150]和[201]至[224]中任一项所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的任一者在CH1区中的EU编号位置136至138处包含一个、两个或更多个带负电荷的氨基酸残基;并且第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的另一者在CH1区中的EU编号位置193至195处包含一个、两个或更多个带正电荷的氨基酸残基。

[0276] [229]根据[101]至[150]和[201]至[224]中任一项所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的任一者在CH1区中包含以下氨基酸残基中的一个、两个或更多个:

[0277] (a)EU编号位置136处的氨基酸残基为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D);

[0278] (b)EU编号位置137处的氨基酸残基为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D);以及

[0279] (c)EU编号位置138处的氨基酸残基为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D);

[0280] 并且其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的另一者在CH1区中包含以下氨基酸残基中的一个、两个或更多个:

[0281] (d)EU编号位置193处的氨基酸残基为赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H);

[0282] (e)EU编号位置194处的氨基酸残基为赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H);以及

[0283] (f)EU编号位置195处的氨基酸残基为赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)。

[0284] [230]根据[101]至[150]和[201]至[224]中任一项所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的任一者在CH1区中包含以下氨基酸残基中的一个、两个或更多个:

[0285] (a)EU编号位置136处的氨基酸残基为赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H);

[0286] (b)EU编号位置137处的氨基酸残基为赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H);以及

[0287] (c)EU编号位置138处的氨基酸残基为赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H);

[0288] 并且其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的另一者在CH1区中包含以下氨基酸残基中的一个、两个或更多个:

[0289] (d)EU编号位置193处的氨基酸残基为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D);

[0290] (e)EU编号位置194处的氨基酸残基为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D);以及

[0291] (f)EU编号位置195处的氨基酸残基为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)。

[0292] [231]根据[101]至[150]和[201]至[224]中任一项所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的每一者包含如表1、2或3中所示的CH1区中的特定带电氨基酸(根据EU编号)的组合中的任一者。

[0293] [232]根据[101]至[150]和[201]至[224]中任一项所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的任一者在CH1区中的EU编号位置136至138处包含一个、两个或更多个疏水氨基酸残基;并且第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的另一者在CH1区中的EU编号位置193至195处包含一个、两个或更多个疏水氨基酸残基。

[0294] [233]根据[232]所述的方法,其中疏水氨基酸残基为丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Va1)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、苯丙氨酸(Phe)和/或色氨酸(Trp)。

[0295] [234]根据[101]至[150]和[201]至[224]中任一项所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的每一者包含如表4中所示的CH1区中的特定疏水氨基酸(根据EU编号)的组合中的任一者。

[0296] [235]根据[101]至[150]和[201]至[224]中任一项所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的任一者在CH1区中的EU编号位置136至138处包含一个“杵”氨基酸残基;并且第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的另一者在CH1区中的EU编号位置193至195处包含一个、两个或更多个“臼”氨基酸残基。

[0297] [236]根据[101]至[150]和[201]至[224]中任一项所述的方法,其中第一抗原结

合结构域和第二抗原结合结构域中的任一者在CH1区中的EU编号位置136至138处包含一个、两个或更多个“白”氨基酸残基；并且第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的另一者在CH1区中的EU编号位置193至195处包含一个“杵”氨基酸残基。

[0298] [237]根据[236]所述的方法,其中“杵”氨基酸残基选自由色氨酸(Trp)和苯丙氨酸(Phe)组成的组；并且“白”氨基酸残基选自由丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、苏氨酸(Thr)和丝氨酸(Ser)组成的组。

[0299] [238]根据[101]至[150]和[201]至[224]中任一项所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的任一者在CH1区中的EU编号位置136至138处包含一个、两个或更多个芳香族氨基酸残基；并且第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的另一者在CH1区中的EU编号位置193至195处包含一个、两个或更多个带正电荷的氨基酸残基。

[0300] [239]根据[101]至[150]和[201]至[224]中任一项所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的任一者在CH1区中的EU编号位置136至138处包含一个、两个或更多个带正电荷的氨基酸残基；并且第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的另一者在CH1区中的EU编号位置193至195处包含一个、两个或更多个芳香族氨基酸残基。

[0301] [240]根据[101]至[150]和[201]至[224]中任一项所述的方法,其中芳香族氨基酸残基选自由色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)、组氨酸(His)和苯丙氨酸(Phe)组成的组；并且带正电荷的氨基酸残基选自由赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)和组氨酸(His)组成的组。

[0302] [241]根据[203]所述的方法,其中铰链区以外的区域中的至少一个二硫键形成于第一抗原结合结构域的CL区与第二抗原结合结构域的CL区之间。

[0303] [242]根据[241]所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的CL区中的氨基酸残基的位置各自独立地选自由以下项组成的组:Kabat编号位置108至112、121至128、151至156、184至190、195至196、200至203、以及208至213。

[0304] [243]根据[241]所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的CL区中的氨基酸残基的位置各自独立地选自由以下项组成的组:Kabat编号位置108、109、112、121、123、126、128、151、152、153、156、184、186、188、189、190、195、196、200、201、202、203、208、210、211、212和213。

[0305] [244]根据[241]所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的CL区中的氨基酸残基的位置各自独立地选自由以下项组成的组:Kabat编号位置108、109、110、111和112。

[0306] [245]根据[241]所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的CL区中的氨基酸残基的位置各自独立地选自由以下项组成的组:Kabat编号位置121、122、123、124、125、126、127和128。

[0307] [246]根据[241]所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的CL区中的氨基酸残基的位置各自独立地选自由以下项组成的组:Kabat编号位置151、152、153、154、155和156。

[0308] [247]根据[241]所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的CL区中的氨基酸残基的位置各自独立地选自由以下项组成的组:Kabat编号位置184、185、

186、187、188、189和190。

[0309] [248]根据[241]所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的CL区中的氨基酸残基的位置各自独立地选自由以下项组成的组:Kabat编号位置195和196。

[0310] [249]根据[241]所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的CL区中的氨基酸残基的位置各自独立地选自由以下项组成的组:Kabat编号位置200、201、202和203。

[0311] [250]根据[241]所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的CL区中的氨基酸残基的位置各自独立地选自由以下项组成的组:Kabat编号位置208、209、210、211、212和213。

[0312] [251]根据[241]至[250]中任一项所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的CL区中的氨基酸残基的位置相差3个氨基酸或更少。

[0313] [252]根据[241]所述的方法,其中第一抗原结合结构域的CL区中的氨基酸残基是Kabat编号位置126处的氨基酸残基,并且第二抗原结合结构域的CL区中的氨基酸残基是Kabat编号位置126处的氨基酸残基。

[0314] [253]根据[203]所述的方法,其中铰链区以外的区域中的至少一个二硫键形成于第一抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基与第二抗原结合结构域的CL区中的氨基酸残基之间。

[0315] [254]根据[253]所述的方法,其中CH1区中的氨基酸残基的位置选自由EU编号位置188、189、190、191、192、193、194、195、196和197组成的组,并且CL区中的氨基酸残基的位置选自由Kabat编号位置121、122、123、124、125、126、127和128组成的组。

[0316] [255]根据[253]所述的方法,其中CH1区中的氨基酸残基是EU编号位置191处的氨基酸残基,并且CL区中的氨基酸残基是Kabat编号位置126处的氨基酸残基。

[0317] [256]根据[101]至[150]和[201]至[224]中任一项所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的每一者在CL区中的Kabat编号位置123和/或124处独立地包含赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H),并且在CH1区中的EU编号位置147和/或213处独立地包含谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)。

[0318] [257]根据[255]所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的每一者分别在CL区中的Kabat编号位置123和124处包含精氨酸(R)和赖氨酸(K),并且在CH1区中的EU编号位置147和213处包含谷氨酸(E)。

[0319] [258]根据[241]至[257]中任一项所述的方法,其中CL区的亚类为 κ 或 λ 。

[0320] [259]根据[203]所述的方法,其中铰链区以外的区域中的至少一个二硫键形成于第一抗原结合结构域的VH区中的氨基酸残基与第二抗原结合结构域的VH区中的氨基酸残基之间。

[0321] [260]根据[259]所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的VH区中的氨基酸残基的位置各自独立地选自由以下项组成的组:EU编号位置6、8、16、20、25、26、28、74和82b。

[0322] [261]根据[203]所述的方法,其中铰链区以外的区域中的至少一个二硫键形成于第一抗原结合结构域的VL区中的氨基酸残基与第二抗原结合结构域的VL区中的氨基酸残基之间。

[0323] [262]根据[261]所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的VL区(κ 亚类)中的氨基酸残基的位置各自独立地选自由以下项组成的组:Kabat编号位置21、27、58、77、100、105和107。

[0324] [263]根据[261]所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的VL区(λ 亚类)中的氨基酸残基的位置各自独立地选自由以下项组成的组:Kabat编号位置6、19、33和34。

[0325] [264]根据[203]所述的方法,其中铰链区以外的区域中的至少一个二硫键形成于第一抗原结合结构域的VHH区中的氨基酸残基与第二抗原结合结构域的VHH区中的氨基酸残基之间。

[0326] [265]根据[264]所述的方法,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的VHH区中的氨基酸残基的位置各自独立地选自由以下项组成的组:Kabat编号位置4、6、7、8、9、10、11、12、14、15、17、20、24、27、29、38、39、40、41、43、44、45、46、47、48、49、67、69、71、78、80、82、82c、85、88、91、93、94和107。

[0327] 本公开还涉及以下发明:

[0328] [301]根据[1]至[52]、[A1]至[A24]、[B1]至[B15]、[101]至[150]和[201]至[265]中任一项所述的方法,其中所述抗原结合分子包含:

[0329] 能够与CD3和CD137结合但不同时与CD3和CD137结合的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,以及

[0330] 能够与DLL3、优选地人DLL3结合的第三抗原结合结构域。

[0331] [302]根据[301]所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域各自包含可彼此相同或不同的抗体可变区,并且包含独立地选自由以下(a1)至(a4)组成的组的抗体可变区:

[0332] (a1)包含以下的抗体可变区:

[0333] 重链可变区,其包含:

[0334] 重链互补决定区(CDR)1,其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列,

[0335] 重链CDR 2,其包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列,以及

[0336] 重链CDR 3,其包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;以及

[0337] 轻链可变区,其包含:

[0338] 轻链CDR 1,其包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列,

[0339] 轻链CDR 2,其包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列,以及

[0340] 轻链CDR 3,其包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列;

[0341] (a2)包含以下的抗体可变区:

[0342] 重链可变区,其包含:

[0343] 重链互补决定区(CDR)1,其包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,

[0344] 重链CDR 2,其包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列,以及

[0345] 重链CDR 3,其包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列;以及

[0346] 轻链可变区,其包含:

[0347] 轻链CDR 1,其包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列,

[0348] 轻链CDR 2,其包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列,以及

- [0349] 轻链CDR 3,其包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列;
- [0350] (a3) 与跟(a1)或(a2)的所述抗体可变区所结合的表位相同的表位结合的抗体可变区;以及
- [0351] (a4) 与(a1)或(a2)的所述抗体可变区竞争与抗原的结合的抗体可变区。
- [0352] [303]根据[301]或[302]所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域各自包含可彼此相同或不同的抗体可变区,并且包含独立地选自以下(a1)至(a4)组成的组的抗体可变区:
- [0353] (a1)包含以下的抗体可变区:
- [0354] 重链可变区,其包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列,以及
- [0355] 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列;以及
- [0356] (a2)包含以下的抗体可变区:
- [0357] 重链可变区,其包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列,以及
- [0358] 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列;
- [0359] (a3) 与跟(a1)或(a2)的所述抗体可变区所结合的表位相同的表位结合的抗体可变区;以及
- [0360] (a4) 与(a1)或(a2)的所述抗体可变区竞争与抗原的结合的抗体可变区。
- [0361] [304]根据[301]至[303]中任一项所述的方法,其中所述第三抗原结合结构域包含独立地选自以下(a1)至(a4)中的任一者组成的组的抗体可变区:
- [0362] (a1)包含以下的抗体可变区:
- [0363] 重链可变区,其包含:
- [0364] 重链互补决定区(CDR)1,其包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列,
- [0365] 重链CDR 2,其包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列,以及
- [0366] 重链CDR 3,其包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列;以及
- [0367] 轻链可变区,其包含:
- [0368] 轻链CDR 1,其包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列,
- [0369] 轻链CDR 2,其包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列,以及
- [0370] 轻链CDR 3,其包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列;
- [0371] (a2)包含以下的抗体可变区:
- [0372] 重链可变区,其包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列,以及
- [0373] 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列;
- [0374] (a3) 与跟(a1)或(a2)的所述抗体可变区所结合的表位相同的表位结合的抗体可变区;以及
- [0375] (a4) 与(a1)或(a2)的所述抗体可变区竞争与抗原的结合的抗体可变区。
- [0376] [305]根据[301]至[304]中任一项所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域各自包含抗体可变区,所述抗体可变区包含:
- [0377] 重链可变区,其包含:
- [0378] 重链互补决定区(CDR)1,其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列,
- [0379] 重链CDR 2,其包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列,以及
- [0380] 重链CDR 3,其包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;以及

- [0381] 轻链可变区,其包含:
- [0382] 轻链CDR 1,其包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列,
- [0383] 轻链CDR 2,其包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列,以及
- [0384] 轻链CDR 3,其包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列。
- [0385] [306]根据[301]至[305]中任一项所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域各自包含抗体可变区,所述抗体可变区包含:
- [0386] 重链可变区,其包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列,以及
- [0387] 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。
- [0388] [307]根据[301]至[306]中任一项所述的方法,其中所述第三抗原结合结构域包含抗体可变区,所述抗体可变区包含:
- [0389] 重链可变区,其包含:
- [0390] 重链互补决定区(CDR)1,其包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列;
- [0391] 重链CDR 2,其包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列,以及
- [0392] 重链CDR 3,其包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列;以及
- [0393] 轻链可变区,其包含:
- [0394] 轻链CDR 1,其包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列,
- [0395] 轻链CDR 2,其包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列,以及
- [0396] 轻链CDR 3,其包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列。
- [0397] [308]根据[301]至[307]中任一项所述的方法,其中所述第三抗原结合结构域包含抗体可变区,所述抗体可变区包含:
- [0398] 重链可变区,其包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列,以及
- [0399] 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列。
- [0400] [309]根据[301]至[308]中任一项所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域各自包含抗体可变区,所述抗体可变区包含:
- [0401] 重链可变区,其包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列,以及
- [0402] 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列,并且其中所述第三抗原结合结构域包含抗体可变区,所述抗体可变区包含:
- [0403] 重链可变区,其包含SEQ ID NO:52,以及
- [0404] 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:53。
- [0405] [310]根据[301]至[309]中任一项所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域各自是在重链中EU编号位置191处具有半胱氨酸残基的Fab,并且具有由两个半胱氨酸残基形成的二硫键。
- [0406] [311]根据[301]至[310]中任一项所述的方法,其中第一抗原结合结构域、第二抗原结合结构域和第三抗原结合结构域中的每一者为Fab,所述Fab包含:
- [0407] 包含VH区和CH1区的重链,以及
- [0408] 包含VL区和CL区的轻链,
- [0409] 其中第三抗原结合结构域的重链的CH1区的C末端直接或经由肽接头与第一抗原结合结构域或第二抗原结合结构域的Fab重链的VH区的N末端融合。
- [0410] [312]根据[311]所述的方法,其中所述肽接头包含选自由SEQ ID NO:18、SEQ ID

NO:19和SEQ ID NO:20的氨基酸序列组成的组的氨基酸序列。

[0411] [313]根据[301]至[312]中任一项所述的方法,其中第三抗原结合结构域是其中VH区与CL区连接且VL区与CH1区连接的交叉Fab,并且其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的每一者是其中VH区与CH1区连接且VL区与CL区连接的常规Fab。

[0412] [314]根据[301]至[313]中任一项所述的方法,其中:

[0413] 在第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的每一者的CL区中,Kabat编号位置123和124处的氨基酸残基分别为精氨酸和赖氨酸,并且

[0414] 在第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的每一者的CH1区中,EU编号位置147和213处的氨基酸残基均为谷氨酸。

[0415] [315]根据[301]至[314]中任一项所述的方法,其中所述抗原结合分子进一步包含Fc区。

[0416] [316]根据[315]所述的方法,其中Fc区包含第一Fc区亚基和第二Fc区亚基,

[0417] 其中第一Fc区亚基选自以下项组成的组:

[0418] 包含位置234和235中的每一者处的丙氨酸的Fc区多肽;

[0419] 包含位置234、235和297中的每一者处的丙氨酸的Fc区多肽;以及

[0420] 包含位置234、235和297中的每一者处的丙氨酸、位置354处的半胱氨酸和位置366处的色氨酸的Fc区多肽,并且

[0421] 第二Fc区亚基选自以下项组成的组:

[0422] 包含位置234和235中的每一者处的丙氨酸的Fc区多肽;

[0423] 包含位置234、235和297中的每一者处的丙氨酸的Fc区多肽;以及

[0424] 包含位置234、235和297中的每一者处的丙氨酸、位置349处的半胱氨酸和位置366处的丝氨酸、位置368处的丙氨酸和位置407处的缬氨酸的Fc区多肽,

[0425] 其中所有位置均根据EU编号。

[0426] [317]根据[316]或[317]中任一项所述的方法,其中Fc区包含以下项中的任一者:

[0427] (a) 包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的第一Fc区亚基,以及包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的第二Fc区亚基;

[0428] (b) 包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的第一Fc区亚基,以及包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的第二Fc区亚基;或者

[0429] (c) 包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第一Fc区亚基,以及包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的第二Fc区亚基。

[0430] [318]根据[301]至[317]中任一项所述的方法,其中抗原结合分子包含选自以下项组成的组的五条多肽链的任一种组合:

[0431] (a1) 包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的多肽链(链1)、包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的多肽链(链2)、包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的多肽链(链3)和两条各自包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的多肽链(链4和链5);

[0432] (a2) 包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的多肽链(链1)、包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的多肽链(链2)、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的多肽链(链3)和两条各自包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的多肽链(链4和链5);以及

[0433] (a3) 包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的多肽链(链1)、包含SEQ ID NO:40的氨基

酸序列的多肽链(链2)、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的多肽链(链3)和两条各自包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的多肽链(链4和链5)；

[0434] 其中,优选地,所述五条多肽链(链1至5)根据图3中示出的取向彼此连接和/或缔合。

[0435] [319]根据[301]所述的方法,其中抗原结合分子包含以下五条多肽链:包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的多肽链(链1)、包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的多肽链(链2)、包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的多肽链(链3)和两条各自包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的多肽链(链4和链5)；

[0436] 其中,优选地,所述五条多肽链(链1至5)根据图3中示出的取向彼此连接和/或缔合。

[0437] [320]根据[301]所述的方法,其中抗原结合分子包含以下五条多肽链:

[0438] 多肽链,其包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列(链1),

[0439] 多肽链,其包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列(链2),

[0440] 多肽链,其包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列(链3),以及

[0441] 两条多肽链,其各自包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列(链4和链5)；

[0442] 其中,优选地,所述五条多肽链(链1至5)根据图3中示出的取向彼此连接和/或缔合。

[0443] 本公开还涉及以下发明:

[0444] [401]根据[1]至[52]、[A1]至[A24]、[B1]至[B15]、[101]至[150]、[201]至[265]和[301]至[320]中任一项所述的方法,所述方法进一步包括对制剂中的在铰链区以外的区域中具有至少一个二硫键的抗原结合分子(LINC形式)比以下项的总和的比率(LINC比率)进行定量:

[0445] (i)具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键的抗原结合分子(LINC形式),和

[0446] (ii)抗原结合分子的错误二硫键合形式和/或非二硫键合形式(unLINC形式)。

[0447] [402]根据[401]所述的方法,其中定量的步骤包括电泳和层析。

[0448] [403]根据[402]所述的方法,其中电泳选自自由非还原SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和非还原毛细管SDS凝胶电泳(CE-SDS)组成的组。

[0449] [404]根据[402]所述的方法,其中层析为疏水相互作用层析(HIC)。

[0450] [405]根据[401]至[404]中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括在定量步骤之前向制剂中添加蛋白酶。

[0451] [406]根据[405]所述的方法,其中,蛋白酶消化抗原结合分子的氨基酸序列KSCDKT/HTCPPCP中的T与H之间的抗原结合分子。

[0452] [407]根据[406]所述的方法,其中抗原结合分子为人IgG1抗体。

[0453] [408]根据[406]或[407]所述的方法,其中蛋白酶为IdgE。

[0454] [409]根据[408]所述的方法,其中IdgE源自无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)。

[0455] [410]根据[405]至[409]中任一项所述的方法,其中定量的步骤包括非还原毛细管SDS凝胶电泳(CE-SDS)或疏水相互作用层析(HIC)。

[0456] [411]根据[410]所述的方法,其中定量的步骤包括非还原毛细管SDS凝胶电泳(CE-SDS),并且其中所述方法进一步包括对未添加蛋白酶的制剂和仅含有蛋白酶的样品进行非还原毛细管SDS凝胶电泳(CE-SDS)。

[0457] [412]根据[411]所述的方法,所述方法进一步包括制备已添加蛋白酶的制剂、未添加蛋白酶的制剂和仅含有蛋白酶的样品的电泳图。

[0458] [413]根据[412]所述的方法,其中LINC比率通过(来自LINC形式的峰)比(来自已添加蛋白酶的制剂的峰,包括来自unLINC形式的峰和来自蛋白酶的峰)-(来自尚未添加蛋白酶的制剂的峰,所述峰不包括来自unLINK形式的峰)-(来自仅含有蛋白酶的样品的峰)+(来自LINC形式的峰)的比率来确定。

[0459] [414]根据[410]所述的方法,其中定量的步骤包括疏水相互作用层析,其中LINC比率通过来自LINC形式的峰比来自LINC形式的峰与来自所有非LINC形式的峰的总和的比率来确定。

[0460] [415]根据[405]至[414]中任一项所述的方法,其中[1]至[52]、[B1]至[B15]、[101]至[150]、[201]至[265]和[301]至[320]中的层析为膜层析。

[0461] [416]根据[405]至[415]中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括在添加蛋白酶之后,培养所述制剂。

[0462] 本公开还涉及以下发明:

[0463] [501]一种制剂,所述制剂包含通过[1]至[52]、[A1]至[A24]、[B1]至[B15]、[101]至[150]、[201]至[265]、[301]至[320]和[401]至[416]中任一项所述的方法来生产的抗原结合分子,所述抗原结合分子具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键。

[0464] [502]一种药物组合物,所述药物组合物包含含有抗原结合分子的制剂,所述抗原结合分子具有在铰链区以外的铰链区中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键,其中所述制剂是通过[1]至[52]、[A1]至[A24]、[B1]至[B15]、[101]至[150]、[201]至[265]、[301]至[320]和[401]至[416]中任一项所述的方法来制备的。

[0465] [发明效果]

[0466] 本公开提供了用于生产和纯化在铰链区以外的区域中具有适当二硫键的抗原结合分子的有效且容易的方法。本公开中的方法使得能够容易、快速且高产率地获得LINC-Ig形式。本公开中的方法具有还原剂的类型、浓度、pH和反应时间的范围广的优点。

[0467] 此外,与在罐中的此类生产和纯化相比,在柱内的LINC-Ig形式的生产和纯化(如本公开的方法中的那些)具有优势,诸如减少抗原结合分子的聚集的可能性、反应时间短、易于操作、通过使用程序化液相层析(LC)实现自动化的可能性、将反应中还原剂的浓度维持在恒定水平的可能性、以及易于跨规模再现。

附图说明

[0468] 图1示出了Cys还原样品的分析结果。从左边开始,示出了跳过还原/氧化步骤并进行亲和层析的对照(1个样品)、pH 7.0的0.1至100mmol/L Cys溶液(4个样品)和pH 8.0的0.1至100mmol/L Cys溶液(4个样品)。在pH 7.0和8.0,特别是在0.1至10mmol/L的浓度范围内,均证实了LINC比率有效增加。对于100mmol/L的结果,无法在凝胶上确认条带,并且由于

无法计算准确的LINC比率,因此使用符号“-”。

[0469] 图2示出了TCEP还原样品的分析结果。从左边开始,示出了跳过还原/氧化步骤并进行亲和层析的对照(1个样品)、pH 7.0的0.001至1mmol/L TCEP溶液(4个样品)和pH 8.0的0.001至1mmol/L TCEP溶液(4个样品)。对于0.1至1mmol/L的结果,无法在凝胶上确认条带,并且由于无法计算准确的LINC比率,因此使用符号“-”。

[0470] 图3是示出了用于双/LINC(1+2)形式的三价抗体的设计和命名规则的图。

[0471] 图4示出了来自CE-SDS的电泳图。

[0472] 图5示出了来自HIS分析的层析图,包括峰名称。示出了标准层析图(上图)和放大的层析图(下图)。

具体实施方式

[0473] 本领域技术人员通常容易理解并且通常使用常规方法来使用本文描述或参考的技术和程序,诸如,例如,Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual第3版(2001)Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.;Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等人编辑,(2003));the series Methods in Enzymology(Academic Press,Inc.):PCR 2:A Practical Approach(M.J.MacPherson,B.D.Hames和G.R.Taylor编辑(1995)),Harlow和Lane编辑(1988)Antibodies,A Laboratory Manual,和Animal Cell Culture(R.I.Freshney编辑(1987));Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait编辑,1984);Methods in Molecular Biology, Humana Press;Cell Biology:A Laboratory Notebook(J.E.Cellis编辑,1998)Academic Press;Animal Cell Culture(R.I.Freshney),编辑,1987);Introduction to Cell and Tissue Culture(J.P.Mather和P.E.Roberts,1998)Plenum Press;Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures(A.Doyle,J.B.Griffiths,和D.G.Newell,编辑,1993-8)J.Wiley and Sons;Handbook of Experimental Immunology(D.M.Weir和C.C.Blackwell,编辑);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller和M.P.Calos,编辑,1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis等人,编辑,1994);Current Protocols in Immunology(J.E.Coligan等人,编辑,1991);Short Protocols in Molecular Biology(Wiley and Sons,1999);Immunobiology(C.A.Janeway和P.Travers,1997);Antibodies(P.Finch,1997);Antibodies:A Practical Approach(D.Catty编辑,IRL Press,1988-1989);Monoclonal Antibodies:A Practical Approach(P.Shepherd和C.Dean,编辑,Oxford University Press,2000);Using Antibodies:A Laboratory Manual(E.Harlow和D.Lane(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999);The Antibodies(M.Zanetti和J.D.Capra,编辑,Harwood Academic Publishers,1995);和Cancer:Principles and Practice of Oncology(V.T.DeVita等人,编辑,J.B.Lippincott Company,1993)中所述的广泛使用的方法。

[0474] 提供以下定义和详细描述以有助于理解本文所示的本公开。

[0475] I.定义

[0476] 在本文中,当描述氨基酸改变的位点时,术语“和/或”的含义包括适当组合“和”和“或”的每一个组合。具体地,例如,“位置33、55和/或96处的氨基酸被取代”包括以下氨基酸

改变的变体: (a) 位置33, (b) 位置55, (c) 位置96, (d) 位置33和55, (e) 位置33和96, (f) 位置55和96, 以及 (g) 位置33、55和96处的氨基酸。

[0477] 除非另有说明, 否则本文中轻链恒定区中的氨基酸残基按照Kabat等人编号, 并且重链恒定区中的氨基酸残基编号按照EU编号系统, 也称为EU索引, 如Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. 中所述。

[0478] 氨基酸

[0479] 在本文中, 氨基酸由单字母代码或三字母代码或两者描述, 例如Ala/A、Leu/L、Arg/R、Lys/K、Asn/N、Met/M、Asp/D、Phe/F、Cys/C、Pro/P、Gln/Q、Ser/S、Glu/E、Thr/T、Gly/G、Trp/W、His/H、Tyr/Y、Ile/I或Val/V。

[0480] 氨基酸的改变

[0481] 对于抗原结合分子的氨基酸序列中的氨基酸改变(本文中也描述为“氨基酸取代”或“氨基酸突变”), 可以适当地使用已知方法诸如定点诱变法(Kunkel等人(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 488-492))和重叠延伸PCR。此外, 几种已知的方法也可以用作氨基酸改变方法以取代为非天然氨基酸(Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2006) 35, 225-249; 和Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100(11), 6353-6357)。例如, 适合使用含有tRNA的无细胞翻译系统(Clover Direct (Protein Express)), 该tRNA具有与终止密码子中的一者(密码子UAG(琥珀密码子))的互补琥珀抑制tRNA结合的非天然氨基酸。

[0482] 此外, 在本文中, 作为显示氨基酸改变的表述, 可以适当地使用在指示特定位置的数字的前后分别显示改变前后的氨基酸的一字母或三字母代码的表述。例如, 当取代抗体可变区中含有的氨基酸时使用的改变N100bL或Asn100bLeu指示在位置100b(根据Kabat编号)处用Leu替代Asn。即, 数字显示根据Kabat编号的氨基酸位置, 数字前书写的一字母或三字母氨基酸代码显示取代前的氨基酸, 并且数字后书写的一字母或三字母氨基酸代码显示取代后的氨基酸。类似地, 当取代抗体恒定区中含有的Fc区的氨基酸时使用的改变P238D或Pro238Asp指示用Asp替代在位置238(根据EU编号)处的Pro。即, 数字显示根据EU编号的氨基酸位置, 数字前书写的一字母或三字母氨基酸代码显示取代前的氨基酸, 并且数字后书写的一字母或三字母氨基酸代码显示取代后的氨基酸。

[0483] 多肽

[0484] 如本文所用, 术语“多肽”是指由通过酰胺键(也称为肽键)线性连接的单体(氨基酸)构成的分子。术语“多肽”是指具有两个或更多个氨基酸的任何链, 而不是指产物的特定长度。因此, 肽、二肽、三肽、寡肽、“蛋白质”、“氨基酸链”或用于指代具有两个或更多个氨基酸的链的任何其他术语包括在“多肽”的定义内, 并且术语“多肽”可以代替这些术语中的任何一者使用, 或与这些术语中的任何一者可互换地使用。术语“多肽”还旨在指代多肽的表达后修饰产物, 该表达后修饰包括但不限于糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、用已知保护/阻断基团衍生化、蛋白水解切割, 或用非天然存在的氨基酸进行修饰。多肽可以源自天然生物来源或通过重组技术产生, 而不一定从指定的核酸序列翻译而来。它可以以任何方式生成, 包括通过化学合成。如本文所述的多肽的大小可以为约3个或更多个、5个或更多个、10个或更多个、20个或更多个、25个或更多个、50个或更多个、75个或更多个、100个或更多个、200个或更多个、500个或更多个、1,000个或更多个, 或2,000个或更多个氨基酸。多肽可以

具有确定的三维结构,但它们不一定具有这种结构。具有确定的三维结构的多肽被称为折叠的;并且不具有确定的三维结构,而是可以采用大量不同构象的多肽则被称为未折叠的。

[0485] 氨基酸序列同一性百分比(%)

[0486] 相对于参考多肽序列的“氨基酸序列相同的百分比(%)”被定义为在比对候选序列与参考多肽序列并且引入空位(如果必要的话)以实现最大的序列相同的百分比之后,并且在不考虑将任何保守取代作为序列相同的组成部分的情况下,候选序列中的氨基酸残基与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比的比对可以以本领域技术范围内的各种方式实现,例如使用可公开获得的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可确定用于比对的适当参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。然而,出于本文的目的,使用序列比较计算机程序ALIGN-2来生成氨基酸序列同一性值%。ALIGN-2序列比较计算机程序由基因泰克公司(Genentech, Inc.)编写,并且源代码已经与用户文档一起提交到U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559,在那里以美国版权登记号TXU510087注册。ALIGN-2程序可从基因泰克公司(Genentech, Inc., South San Francisco, California)公开获得,或者可以从源代码编译。ALIGN-2程序应经编译以在UNIX操作系统上使用,UNIX操作系统包括数字UNIX V4.0D。所有序列比较参数均由ALIGN-2程序设置并且不变。在采用ALIGN-2进行氨基酸序列比较的情况下,给定氨基酸序列A与给定氨基酸序列B的氨基酸序列同一性%(其可以替代性地表达为给定氨基酸序列A具有或包含与给定氨基酸序列B的某一氨基酸序列同一性%)计算如下:

[0487] 100乘以分数X/Y

[0488] 其中X是由序列比对程序ALIGN-2在该程序对A和B的比对中评分为相同匹配的氨基酸残基的数目,而其中Y是B中氨基酸残基的总数。应当理解,在氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度的情况下,A与B的氨基酸序列同一性%将不等于B与A的氨基酸序列同一性%。除非另外特别指明,否则本文所使用的所有氨基酸序列同一性%的值是如前一段中所述使用ALIGN-2计算机程序获得的。

[0489] 抗原结合分子

[0490] 如本文所用,术语“抗原结合分子”在其最广泛的意义上是指与抗原决定簇(表位)特异性结合并包含抗原结合结构域或具有与抗原的结合活性的任何分子,并且还可以指诸如长度为约五个氨基酸或更长的肽或蛋白质的分子。肽和蛋白质不限于衍生自生物体的那些,例如,它们可以由人工设计的序列产生的多肽。它们也可以是天然存在的多肽、合成多肽、重组多肽等中的任一者。包含已知稳定构象结构诸如 α/β 桶作为支架并且其中部分分子被当做抗原结合位点的支架分子也是本文所述的抗原结合分子的一个实施方案。在一个实施方案中,抗原结合分子可以包含2条或更多条(例如,2、3、4、5或更多)多肽链。在一个实施方案中,构成抗原结合分子的多肽链可以为抗体重链或抗体轻链。具体地,在一个实施方案中,抗原结合分子为抗体、抗体片段或抗体衍生物。在一个实施方案中,抗原结合分子是包含链1至5的三价抗体,如本申请的图3中所示。在一个实施方案中,抗原结合分子为非抗体蛋白或其片段或其衍生物。

[0491] 多特异性抗原结合分子

[0492] “多特异性抗原结合分子”是指与超过一种抗原特异性结合的抗原结合分子。术语

“双特异性”意指抗原结合分子能够与至少两种不同的抗原决定簇特异性结合。术语“三特异性”意指抗原结合分子能够与至少三种不同的抗原决定簇特异性结合。

[0493] 在某些实施方案中,本申请的多特异性抗原结合分子为三特异性抗原结合分子,所述三特异性抗原结合分子能够与CD3或CD137之一结合,但不同时与两种抗原结合,并且能够与DLL3特异性结合。

[0494] 抗原结合结构域

[0495] 在本文中,“抗原结合结构域”是指与抗原的全部或一部分特异性结合并互补的区域。在本文中,抗原结合分子包含抗原结合结构域。当抗原的分子量较大时,抗原结合结构域只能与抗原的特定部分结合。该特定部分称为“表位”。在一个实施方案中,抗原结合结构域包含与特定抗原结合的抗体片段。抗原结合结构域可以由一个或多个抗体可变结构域提供。在非限制性实施方案中,抗原结合结构域包含抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH)两者。此类抗原结合结构域的实例包括“单链Fv(scFv)”、“单链抗体”、“Fv”、“单链Fv2(scFv2)”、“Fab”和“Fab’”。在其他实施方案中,抗原结合结构域包含与特定抗原或其片段结合的非抗体蛋白。在具体实施方案中,抗原结合结构域包含一个或两个包括CH1区的Fab。在具体实施方案中,抗原结合结构域包含铰链区。

[0496] 如本文所用,术语“抗原结合结构域”能够将其所附接的实体引导至靶位点,例如引导至表达癌抗原(DLL3)的特定类型的肿瘤细胞。抗原结合结构域能够通过其靶抗原(例如T细胞受体复合物抗原(特别是CD3)和/或共刺激受体(CD137))激活信号传导。

[0497] 如本文所用,关于抗原结合结构域等的术语“第一”、“第二”和“第三”在每种类型的部分多于一种时用于方便区分。除非明确说明,否则使用这些术语并不旨在赋予所述抗原结合分子特定的顺序或取向。

[0498] 在本文中,“特异性结合”意指参与特异性结合的分子之一不显示与除单个或多个结合配偶体分子之外的分子的任何显著结合的状态下的结合。此外,当抗原结合结构域对抗原中含有的多个表位中的特定表位具有特异性时,也使用它。当与抗原结合结构域结合的表位含在多个不同的抗原中时,包含该抗原结合结构域的抗原结合分子可以与具有该表位的各种抗原结合。

[0499] 在本公开中,表述“与相同的表位结合”意指两个抗原结合结构域所结合的表位至少部分彼此重叠。重叠的程度为但不限于至少10%或以上、优选地20%或以上、30%或以上、40%或以上、50%或以上、60%或以上、70%或以上、以及80%或以上、特别优选地90%或以上,并且最优选地100%。

[0500] 抗体

[0501] 本文的术语“抗体”以最广泛的含义使用,并且涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体或三特异性抗体)和抗体片段,只要它们表现出所需的抗原结合活性即可。

[0502] 术语“免疫球蛋白分子”是指具有天然存在的抗体的结构的蛋白质。例如,IgG类免疫球蛋白是约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,其由通过二硫键键合的两条轻链和两条重链构成。从N末端到C末端,每条重链具有可变区(VH)(也称为可变重链结构域或重链可变结构域),之后是三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3)(也称为重链恒定区)。类似地,从N末端到C末端,每条轻链具有可变区(VL)(也称为可变轻链结构域或轻链可变结构域),接着是一个

恒定轻链(CL)结构域(也称为轻链恒定区)。免疫球蛋白的重链可以分配为五种类型中的一种,该五种类型被称为 α (IgA)、 δ (IgD)、 ϵ (IgE)、 γ (IgG)或 μ (IgM),它们中的一些可以进一步分为亚型,例如 γ 1 (IgG1)、 γ 2 (IgG2)、 γ 3 (IgG3)、 γ 4 (IgG4)、 α 1 (IgA1)和 α 2 (IgA2)。免疫球蛋白的轻链可以基于其恒定结构域的氨基酸序列而被配属为以下两种类型中的一种:称为 κ 和 λ 。免疫球蛋白实质上由通过免疫球蛋白铰链区连接的两个Fab分子和一个Fc结构域组成。

[0503] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体,即,除了可能的变体抗体(例如,含有天然存在的突变或在单克隆抗体制剂的产生期间产生,此类变体通常以少量形式存在)之外,组成该群体的个别抗体具有同一性和/或结合相同的表位。与典型地包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,单克隆抗体制剂中的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。因此,修饰语“单克隆”表示抗体的特征是从基本上同质的抗体群体获得的,并且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,单克隆抗体可以通过多种技术制备,包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法,以及利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法,在本文中描述了用于制备单克隆抗体的此类方法和其他示例性方法。

[0504] 术语“全长抗体”、“完整抗体”及“全抗体”在本文中可互换地用于指代具有基本上类似于天然抗体结构的结构或具有含有如本文所定义的Fc区的重链的抗体。

[0505] 抗体的“类别”是指抗体的重链所具有的恒定结构域或恒定区的类型。存在五大类抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且它们中的一些可以进一步分为亚类(同种型),例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

[0506] 术语“可变区”或“可变结构域”是指抗体重链或轻链的参与抗体与抗原结合的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为VH和VL)通常具有相似的结构,其中每个结构域包含四个保守框架区(FR)和三个高变区(HVR)。(参见例如,Kindt等人,Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007)。)单个VH或VL结构域可足以赋予抗原结合特异性。此外,结合特定抗原的抗体可使用来自结合该抗原的抗体的VH或VL结构域来进行分离,以分别筛选互补VL或VH结构域的文库。参见例如,Portolano等人,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等人,Nature 352:624-628(1991)。

[0507] 如本文所用的术语“高变区”或“HVR”是指以下项中的每一种:抗体可变结构域的在序列中高变(“互补决定区”或“CDR”)和/或形成结构上限定的环(“高变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触点”)的区域。通常,抗体包含六个HVR:三个在VH中(H1、H2、H3),并且三个在VL中(L1、L2、L3)。本文中的示例性HVR包括:

[0508] (a) 存在于氨基酸残基26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)处的高变环(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987));

[0509] (b) 存在于氨基酸残基24-34(L1)、50-56(L2)、89-97(L3)、31-35b(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)处的CDR(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991));

[0510] (c) 存在于氨基酸残基27c-36(L1)、46-55(L2)、89-96(L3)、30-35b(H1)、47-58

(H2)和93-101(H3)处的抗原接触点(MacCallum等人,J.Mol.Biol.262:732-745(1996));以及

[0511] (d) (a)、(b)和/或(c)的组合,包括HVR氨基酸残基46-56(L2)、47-56(L2)、48-56(L2)、49-56(L2)、26-35(H1)、26-35b(H1)、49-65(H2)、93-102(H3)和94-102(H3)。

[0512] 除非另外指明,否则可变结构域中的HVR残基和其他残基(例如,FR残基)在本文中根据Kabat等人,出处同上编号。

[0513] HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3也分别被称为“H-CDR1”、“H-CDR2”、“H-CDR3”、“L-CDR1”、“L-CDR2”和“L-CDR3”。

[0514] “框架”或“FR”是指除高变区(HVR)残基之外的可变结构域残基。可变结构域的FR通常由以下四个FR结构域组成:FR1、FR2、FR3和FR4。因此,HVR和FR序列通常在VH(或VL)中以如下序列出现:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0515] “人共有框架”是这样的框架,其表示在人免疫球蛋白VL或VH框架序列的选择中最常存在的氨基酸残基。一般而言,人免疫球蛋白VL或VH序列的选择来自于可变结构域序列的亚组。一般而言,序列的亚组是如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,NIH Publication 91-3242,Bethesda MD(1991),第1至3卷中的亚组。在一个实施方案中,对于VL,该亚组是如Kabat等人(出处同上)中的亚组κI。在一个实施方案中,对于VH,该亚组是如Kabat等人(出处同上)中的亚组III。

[0516] 术语“铰链区”表示在野生型抗体重链中连接CH1结构域和CH2结构域的抗体重链多肽部分,例如根据EU编号系统从约位置216至约位置230,或根据Kabat编号系统从约位置226至约位置243。已知在天然IgG抗体中,铰链区中根据EU编号的位置220处的半胱氨酸残基与抗体轻链中位置214处的半胱氨酸残基形成二硫键。还已知在两条抗体重链之间,铰链区中根据EU编号,在位置226处的半胱氨酸残基之间和在位置229处的半胱氨酸残基之间形成二硫键。一般而言,“铰链区”被定义为从人IgG1从216延伸至238(EU编号)或从226延伸至251(Kabat编号)。该铰链可以进一步分为三个不同的区域:上铰链、中央铰链和下铰链。在人IgG1抗体中,这些区域通常定义如下:

[0517] 上铰链:216至225(EU编号)或226至238(Kabat编号),中央铰链:226至230(EU编号)或239至243(Kabat编号),下铰链:231至238(EU编号)或244至251(Kabat编号)。

[0518] 通过将形成重链间SS键的第一个和最后一个半胱氨酸残基置于相同位置,可以将其其他IgG同种型的铰链区与IgG1序列进行比对(例如,Brekke等人,1995,Immunol(参见Today 16:85-90的表1)。本文中的铰链区包括野生型铰链区以及其中野生型铰链区中的氨基酸残基通过取代、添加或缺失而改变的变体。

[0519] 术语(氨基酸残基)“能够连接”和(二硫键)“能够形成”包括已经形成二硫键的情况,以及未形成但随后在适当条件下可形成二硫键的情况。

[0520] 术语“不在铰链区中的氨基酸之间形成的二硫键”(或“在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的二硫键”)意指通过位于上述定义的“铰链区”之外的任何抗体区域中的氨基酸形成、连接(connected)或连接(linked)的二硫键。例如,此类二硫键是通过在抗体中铰链区以外的任何位置中的氨基酸形成、连接或连接的(例如,根据EU编号系统从约位置216至约位置230,或根据Kabat编号系统从约位置226至约位置243)。在一些实施方案中,此类二硫键是通过位于CH1区、CL区、VL区、VH区和/或VHH区中的氨基酸形成、连接或连

接的。在一些实施方案中,此类二硫键是通过位于CH1区中根据EU编号的位置119至123、131至140、148至150、155至167、174至178、188至197、201至214中的氨基酸形成、连接或连接的。在一些实施方案中,此类二硫键是通过位于CH1区中根据EU编号的位置119、122、123、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、148、150、155、156、157、159、160、161、162、163、164、165、167、174、176、177、178、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、201、203、205、206、207、208、211、212、213、214中的氨基酸形成、连接或连接的。在一些实施方案中,此类二硫键是通过位于CH1区中根据EU编号的位置188、189、190、191、192、193、194、195、196和197中的氨基酸形成、连接或连接的。在一个优选的实施方案中,此类二硫键是通过位于CH1区中根据EU编号的位置191中的氨基酸形成、连接或连接的。

[0521] 术语“错误二硫键合形式”意指在与所需氨基酸残基不同的氨基酸残基之间形成二硫键的抗原结合分子。当抗原结合分子包含在所需氨基酸残基之间形成的二硫键以及在与所需氨基酸残基不同的氨基酸残基之间形成的二硫键时,这样的抗原结合分子包括在本文中的错误二硫键合形式中。

[0522] 术语“非二硫键合形式”是指其中半胱氨酸残基保持游离状态,或者其中半胱氨酸残基与与形成抗原结合分子的分子不同的分子(诸如杂质分子)形成二硫键的抗原结合分子。本文描述的“非二硫键合形式”仅需要具有此类特征,并且例如,即使它们含有铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的二硫键(所需二硫键)、或与所需二硫键不同的二硫键(错误二硫键合部分),只要它们具有上述特征,它们也包括在本文中的“非二硫键合形式”中。

[0523] 恒定区优选地为抗体恒定区,更优选地为IgG1、IgG2、IgG3和IgG4型抗体恒定区,并且甚至更优选地为人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4型抗体恒定区。此外,恒定区优选地为重链恒定区,更优选地为IgG1、IgG2、IgG3和IgG4型重链恒定区,并且甚至更优选地为人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4型重链恒定区。人IgG1恒定区、人IgG2恒定区、人IgG3恒定区和人IgG4恒定区的氨基酸序列是已知的。对于人IgG1、人IgG2、人IgG3和人IgG4的恒定区,多个具有遗传多态性的同种异型序列描述于Sequences of proteins of immunological interest, NIH公开号91-3242中,并且它们中的任一者都可以用于本发明。氨基酸修饰的恒定区可以含有其他氨基酸突变或修饰,只要它们包括本发明的氨基酸突变即可。

[0524] 在本文中,术语“Fc区”或“Fc结构域”是指包含由抗体分子中的铰链或其部分以及CH2和CH3结构域组成的片段的区域。IgG类的Fc区意指但不限于从例如半胱氨酸226(EU编号(在本文中也称为EU索引))到C末端或从脯氨酸230(EU编号)到C末端的区域。Fc区可以优选通过以下方式获得:用蛋白水解酶诸如胃蛋白酶部分消化例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4单克隆抗体,然后重新洗脱吸附在蛋白A柱或蛋白G柱上的级分。此类蛋白水解酶没有特别限制,只要该酶在酶适当设定的反应条件(例如,pH)下能够消化整个抗体以限制性地形成Fab或F(ab')₂即可。其实例可以包括胃蛋白酶和木瓜蛋白酶。

[0525] 源自例如天然存在的IgG的Fc区可以用作“Fc区”。在本文中,天然存在的IgG意指含有与天然存在的IgG相同的氨基酸序列,并且属于基本上由免疫球蛋白 γ 基因编码的抗体类别的多肽。天然存在的人IgG意指例如天然存在的人IgG1、天然存在的人IgG2、天然存在的人IgG3或天然存在的人IgG4。天然存在的IgG还包括由其自发衍生的变体等。NIH出版号91-3242的目标免疫学蛋白质序列中,将基于基因多态性的多个同种异型序列描述为人

IgG1、人IgG2、人IgG3和人IgG4抗体的恒定区,其中任一者都可以用于本发明中。特别地,人IgG1的序列可以具有作为EU编号位置356至358的氨基酸序列的DEL或EEM。

[0526] 抗原结合分子的Fc结构域由包含免疫球蛋白分子的重链结构域的一对多肽链组成。例如,免疫球蛋白G(IgG)分子的Fc结构域为二聚体,该二聚体的每个亚基包含CH2和CH3 IgG重链恒定结构域。Fc结构域的两个亚基能够彼此稳定缔合。在一个实施方案中,本文描述的抗原结合分子包含不超过一个Fc结构域。

[0527] 在本文中,抗原结合分子的Fc结构域为IgG Fc结构域。在特定实施方案中,Fc结构域是IgG1 Fc结构域。在另一个实施方案中,Fc结构域是IgG1 Fc结构域。在进一步的特定实施方案中,Fc结构域是人IgG1 Fc区。

[0528] 嵌合抗体

[0529] 术语“嵌合”抗体是指这样的抗体,在所述抗体中重链和/或轻链的一部分来源于特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分来源于不同的来源或物种。类似地,术语“嵌合抗体可变结构域”是指抗体可变区,其中重链和/或轻链可变区的一部分衍生自特定来源或物种,而重链和/或轻链可变区的其余部分衍生自不同的来源或物种。

[0530] 人源化抗体

[0531] “人源化”抗体是指这样的嵌合抗体,其包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基。在某些实施方案中,人源化抗体将基本上包含所有的至少一个,通常两个可变结构域,其中所有或基本上所有HVR(例如CDR)对应于非人抗体的HVR,并且所有或基本上所有的FR对应于人抗体的FR。人源化抗体任选地可以包含来源于人抗体的抗体恒定区的至少一部分。“人源化形式”的抗体,例如非人抗体,是指已经经历过人源化的抗体。“人源化抗体可变区”是指人源化抗体的可变区。

[0532] 抗体片段

[0533] “抗体片段”是指除了完整抗体以外的分子,该分子包含完整抗体的一部分,该部分结合完整抗体所结合的抗原。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、双体抗体、线性抗体、单链抗体分子(例如scFv),以及单域抗体。关于某些抗体片段的综述,参见Hudson等人,Nat Med 9,129-134(2003)。关于scFv片段的综述,参见例如Pluckthun,载于The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编,Springer-Verlag,New York,第269至第315页(1994);还可参见WO 93/16185;以及美国专利号5,571,894和5,587,458。关于对包含补救受体结合表位残基并具有增加的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段的讨论,参见美国专利号5,869,046。双抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段,其可以是二价或双特异性的。参见例如,EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等人,Nat Med 9,129-134(2003);以及Hollinger等人,Proc Natl Acad Sci USA 90,6444-6448(1993)。在Hudson等人,Nat Med 9,129-134(2003)中也描述了三体抗体和四体抗体。单域抗体为包含抗体的全部或一部分重链可变结构域或全部或一部分轻链可变结构域的抗体片段。在某些实施方案中,单结构域抗体是人单结构域抗体(Domantis, Inc., Waltham, MA;参见例如美国专利号6,248,516B1)。抗体片段可以通过各种技术制备,这些技术包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化,以及由重组宿主细胞(例如大肠杆菌(E. coli)或噬菌体)产生,如本文所述。

[0534] Fv(可变片段)

[0535] 在本文中,术语“可变片段(Fv)”是指由抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH)对构成的抗体衍生的抗原结合结构域的最小单位。1988年,Skerra和Pluckthun发现可以通过在细菌信号序列的下游插入抗体基因并在大肠杆菌中诱导该基因的表达来从大肠杆菌周质级分制备均一且具有活性的抗体(Science(1988)240(4855),1038-1041)。在由周质级分制备的Fv中,VH以与抗原结合的方式与VL缔合。

[0536] scFv、单链抗体和sc(Fv)2

[0537] 在本文中,术语“scFv”、“单链抗体”和“sc(Fv)2”均指含有源自重链和轻链的可变区而非恒定区的单个多肽链的抗体片段。一般而言,单链抗体还在VH和VL结构域之间含有多肽接头,这使得能够形成被认为允许抗原结合的所需结构。Pluckthun在“The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编辑,Springer-Verlag,New York,269-315(1994)”中详细讨论了单链抗体。还参见国际专利公开W0 1988/001649;美国专利号4,946,778和5,260,203。在特定的实施方案中,单链抗体可以是双特异性的和/或人源化的。

[0538] scFv为抗原结合结构域,其中形成Fv的VH和VL通过肽接头连接在一起(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.(1988)85(16),5879-5883)。VH和VL可以通过肽接头保持在非常接近的位置。

[0539] sc(Fv)2为单链抗体,其中两个VL和两个VH的四个可变区通过接头诸如肽接头连接以形成单链(J Immunol.Methods(1999)231(1-2),177-189)。两个VH和两个VL可以源自不同的单克隆抗体。此类sc(Fv)2优选地包括例如双特异性sc(Fv)2,其识别单个抗原中存在的两个表位,如Journal ofImmunology(1994)152(11),5368-5374中所公开的。sc(Fv)2可以通过本领域技术人员已知的方法来生产。例如,sc(Fv)2可以通过用接头诸如肽接头连接scFv来生产。

[0540] 在本文中,形成sc(Fv)2的抗原结合结构域的形式包括抗体,其中两个VH单元和两个VL单元从单链多肽的N末端开始,以VH、VL、VH和VL([VH]-接头-[VL]-接头-[VH]-接头-[VL])的顺序排列。两个VH单元和两个VL单元的顺序不限于上述形式,并且它们可以以任何顺序布置。形式的实例顺序为如下列出的。

[0541] [VL]-接头-[VH]-接头-[VH]-接头-[VL]

[0542] [VH]-接头-[VL]-接头-[VL]-接头-[VH]

[0543] [VH]-接头-[VH]-接头-[VL]-接头-[VL]

[0544] [VL]-接头-[VL]-接头-[VH]-接头-[VH]

[0545] [VL]-接头-[VH]-接头-[VL]-接头-[VH]

[0546] sc(Fv)₂的分子形式也详细描述于W0 2006/132352中。根据这些描述,本领域技术人员可以适当地制备所需的sc(Fv)₂以生产本文公开的多肽复合物。

[0547] 此外,本公开中的抗原结合分子或抗体可以与载体聚合物(诸如PEG)或有机化合物(诸如抗癌剂)缀合。替代性地,优选将糖链加成序列插入抗原结合分子或抗体中,使得糖链产生期望的效果。

[0548] 用于连接抗体的可变区的接头包含可以通过基因工程化引入的任意肽接头、合成接头和例如在Protein Engineering,9(3),299-305,1996中公开的接头。然而,在本公开中优选肽接头。肽接头的长度没有特别限制,并且可以根据目的由本领域技术人员适当地选

择。长度优选为五个氨基酸或更多(没有特别限制,上限通常为30个氨基酸或更少,优选20个氨基酸或更少),并且特别优选15个氨基酸。当 $sc(Fv)_2$ 含有三个肽接头时,它们的长度可以全部相同或不同。

[0549] 例如,此类肽接头包括:

[0550] Ser、

[0551] Gly-Ser、

[0552] Gly-Gly-Ser、

[0553] Ser-Gly-Gly、

[0554] Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:5)、

[0555] Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:6)、

[0556] Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:7)、

[0557] Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:8)、

[0558] Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:9)、

[0559] Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:10)、

[0560] Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:11)、

[0561] Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:12)、

[0562] (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:7))_n和

[0563] (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:8))_n,

[0564] 其中n是1或更大的整数。本领域技术人员可以根据目的相应地选择肽接头的长度或序列。

[0565] 合成接头(化学交联剂)通常用于交联肽,并且实例包括:

[0566] N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、

[0567] 辛二酸二琥珀酰亚氨基酯(DSS)、

[0568] 双(磺基琥珀酰亚氨基)辛二酸酯(BS3)、

[0569] 二硫代双(琥珀酰亚氨基丙酸酯)(DSP)、

[0570] 二硫代双(磺基琥珀酰亚氨基丙酸酯)(DTSSP)、

[0571] 乙二醇双(琥珀酰亚氨基琥珀酸酯)(EGS)、

[0572] 乙二醇双(磺基琥珀酰亚氨基琥珀酸酯)(磺基-EGS)、

[0573] 酒石酸二琥珀酰亚氨基(DST)、酒石酸二磺基琥珀酰亚氨基酯(磺基-DST)、

[0574] 双[2-(琥珀酰亚胺氧基羰基氧基)乙基]砒(BSOCOES),和双[2-(磺基琥珀酰亚胺氧基羰基氧基)乙基]砒(磺基-BSOCOES)。这些交联剂是市售的。

[0575] 一般而言,需要三个接头将四个抗体可变区连接在一起。所使用的接头可以是相同类型或不同类型。

[0576] Fab、F(ab')₂和Fab'

[0577] “Fab分子”是指由免疫球蛋白的重链(“Fab重链”)的VH和CH1结构域以及轻链(“Fab轻链”)的VL和CL结构域组成的蛋白质。野生型Fab分子的重链无法与另一个重链分子形成二硫键。在本文中,除了野生型Fab分子之外,还包括其中野生型Fab分子中的氨基酸残基通过取代、添加或缺失而改变的Fab变体。在具体实施方案中,Fab变体中包含的突变氨基酸残基(例如,取代、添加或插入后的半胱氨酸残基或赖氨酸残基)可以与另一个重链分子

或其部分(例如,Fab分子)形成二硫键。

[0578] scFab为抗原结合结构域,其中形成Fab的单条轻链和来自单条重链的CH1区和可变区通过肽接头连接在一起。轻链、来自重链的CH1区和可变区可以通过肽接头保持紧密接近。

[0579] “F(ab')₂”或“Fab”是通过用诸如胃蛋白酶和木瓜蛋白酶的蛋白酶处理免疫球蛋白(单克隆抗体)而产生的,并且是指通过在存在于两条H链中每一者的铰链区之间的二硫键附近消化免疫球蛋白(单克隆抗体)而生成的抗体片段。例如,木瓜蛋白酶切割在两条H链中每一者的铰链区之间存在的二硫键上游的IgG,以生成两个同源抗体片段,其中包含VL(L链可变区)和CL(L链恒定区)的L链经由在其C末端区域的二硫键连接至包含VH(H链可变区)和CH_γ1(H链恒定区中的_γ1区)的H链片段连接。这两个同源抗体片段中的每一者都称为Fab'。

[0580] “F(ab')₂”由两条轻链和两条重链组成,该重链包含CH1结构域的恒定区和CH2结构域的一部分,从而在两条重链之间形成二硫键。本文公开的F(ab')₂可以优选如下生产。完整单克隆抗体或包含所需抗原结合结构域的单克隆抗体用诸如胃蛋白酶的蛋白酶部分消化;并且Fc片段通过吸附到蛋白A柱上去除。蛋白酶没有特别限制,只要其可以在合适的设定酶反应条件诸如pH下以选择性方式切割整个抗体以产生F(ab')₂即可。此类蛋白酶包括例如胃蛋白酶和无花果蛋白酶。

[0581] 融合

[0582] “融合”意指组分(例如,Fab分子和Fc结构域亚基)直接地或经由一个或多个肽接头通过肽键连接。

[0583] “交叉”Fab

[0584] “交叉”Fab分子(也称为“Crossfab”)意指一种Fab分子,其中Fab重链和轻链的可变区或恒定区发生交换,即交叉Fab分子包含由轻链可变区和重链恒定区组成的肽链,以及由重链可变区和轻链恒定区组成的肽链。为清楚起见,在其中Fab轻链和Fab重链的可变区进行交换的交叉Fab分子中,包含重链恒定区的肽链在本文中称为交叉Fab分子的“重链”。相反地,在其中Fab轻链和Fab重链的恒定区发生交换的交叉Fab分子中,包含重链可变区的肽链在本文中被称为交叉Fab分子的“重链”。

[0585] “常规”Fab

[0586] 与此相比之下,“常规”Fab分子意指处于其天然形式的Fab分子,即,包含由重链可变区和恒定区组成的重链(VH-CH1),以及由轻链可变区和恒定区组成的轻链(VL-CL)。

[0587] 单结构域抗体

[0588] 在本文中,术语“单结构域抗体”所指的抗体在其结构上没有特别限制,只要该结构域本身可以发挥抗原结合活性即可。以IgG抗体为例的普通抗体在通过VH和VL配对形成可变区的状态下发挥抗原结合活性。相比之下,已知单结构域抗体能够仅通过其自身的结构域结构发挥抗原结合活性,而无需与另一个结构域配对。单结构域抗体通常具有相对较低的分子量并以单体的形式存在。

[0589] 单结构域抗体的实例包括但不限于天然缺乏轻链的抗原结合分子,诸如骆驼科动物的VHH和鲨鱼的V_{NAR},以及包含抗体VH结构域的全部或一部分或者抗体VL结构域的全部或一部分的抗体片段。作为包含抗体VH/VL结构域的全部或一部分的抗体片段的单结构域抗

体的实例包括但不限于,源自人抗体VH或人抗体VL的人工制备的单结构域抗体,如例如美国专利号6,248,516B1中所述。一种单结构域抗体具有三个CDR(CDR1、CDR2和CDR3)。

[0590] 单结构域抗体可以从能够产生单结构域抗体的动物获得,或者通过免疫能够产生单结构域抗体的动物获得。能够产生单结构域抗体的动物的实例包括但不限于骆驼科动物和其中已经引入了能够产生单结构域抗体的基因的转基因动物。骆驼科动物包括骆驼、美洲驼、羊驼、单峰骆驼、原驼等。已引入能够产生单结构域抗体的基因的转基因动物的实例包括但不限于国际公开号W02015/143414或美国专利公开号US2011/0123527A1中描述的转基因动物。还可以通过用人种系序列或与其相似的序列替换从动物获得的单结构域抗体的框架序列来获得人源化单链抗体。人源化单结构域抗体(例如,人源化VHH)是单结构域抗体的一个实施方案。

[0591] 替代性地,单结构域抗体可以通过ELISA、淘选等从含有单结构域抗体的多肽文库中获得。含有单结构域抗体的多肽文库的实例包括但不限于从各种动物或人获得的初始抗体文库(例如,Methods in Molecular Biology2012 911(65-78)和Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics2006 1764:8(1307-1319))、通过免疫各种动物获得的抗体文库(例如,Journal of Applied Microbiology 2014 117:2(528-536)),以及从各种动物或人的抗体基因制备的合成抗体文库(例如,Journal of Biomolecular Screening 2016 21:1(35-43)、Journal of Biological Chemistry 2016 291:24(12641-12657)和AIDS2016 30:11(1691-1701))。

[0592] 如本文所用,“激动剂”抗原结合分子或“激动剂”抗体是显著增强其结合的抗原的生物活性的抗原结合分子或抗体。

[0593] 如本文所用,“阻断性”抗原结合分子或“阻断性”抗体,或“拮抗性”抗原结合分子或“拮抗性”抗体是显著抑制(部分或完全)其结合的抗原的生物活性的抗原结合分子或抗体。

[0594] 抗原

[0595] 如本文所用,术语“抗原”是指多肽大分子上的位点(例如一段连续的氨基酸或由非连续氨基酸的不同区域组成的构象构型),抗原结合部分与所述位点结合,从而形成抗原结合部分-抗原复合物。有用的抗原决定簇可以在例如肿瘤细胞的表面上、病毒感染细胞的表面上、其他患病细胞的表面上、免疫细胞的表面上、血清中的游离物和/或细胞外基质(ECM)中找到。除非另有说明,否则本文中称为抗原的蛋白质(例如,CD3、CD137、DLL3)可以是来自任何脊椎动物来源的任何天然形式的蛋白质,该脊椎动物来源包括哺乳动物诸如灵长类动物(例如人)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)。在特定实施方案中,抗原为人CD3、人CD137或人DLL3。当提及本文中的特定蛋白质时,该术语涵盖“全长”、未加工的蛋白质,以及由细胞内加工而产生的任何形式的蛋白质。该术语还涵盖天然存在的蛋白质变体,例如剪接变体或等位基因变体。

[0596] 具有降低的Fc γ 受体结合活性的Fc区

[0597] 在本文中,“降低的Fc γ 受体结合活性”意指,例如,基于上述分析方法,与对照抗原结合分子或抗体的竞争活性相比,测试抗原结合分子或抗体的竞争活性为50%或更低,优选45%或更低、40%或更低、35%或更低、30%或更低、20%或更低、或15%或更低,并且特别优选10%或更低、9%或更低、8%或更低、7%或更低、6%或更低、5%或更低、4%或更

低、3%或更低、2%或更低、或1%或更低。

[0598] 包含单克隆IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体的Fc结构域的抗原结合分子或抗体可适当用作对照抗原结合分子或抗体。Fc结构域结构示出在SEQ ID NO:1 (A被添加到RefSeq登录号AAC82527.1的N末端)、2 (A被添加到RefSeq登录号AAB59393.1的N末端)、3 (A被添加到RefSeq登录号CAA27268.1的N末端) 和4 (A被添加到RefSeq登录号AAB59394.1的N末端) 中。此外,当使用包含特定同种型的抗体的Fc结构域突变体的抗原结合分子或抗体作为测试物质时,使用包含相同同种型的Fc结构域的抗原结合分子或抗体作为对照,来评定该突变体的突变对Fc γ 受体结合活性的影响。如上所述,适当制备包含判断为Fc γ 受体结合活性降低的Fc结构域突变体的抗原结合分子或抗体。

[0599] 此类已知的突变体包括例如具有氨基酸231A至238S (EU编号) 的缺失的突变体 (WO 2009/011941), 以及突变体C226S、C229S、P238S、(C220S) (J.Rheumatol (2007) 34, 11); C226S和C229S (Hum.Antibod.Hybridomas (1990) 1 (1), 47-54); C226S、C229S、E233P、L234V和L235A (Blood (2007) 109, 1185-1192)。

[0600] 具体地,优选的抗原结合分子或抗体包括包含Fc结构域的抗原结合分子或抗体,在形成特定同种型的抗体的Fc结构域的氨基酸中,所述Fc结构域具有选自以下氨基酸位置的至少一个氨基酸的突变(诸如取代): 220、226、229、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、264、265、266、267、269、270、295、296、297、298、299、300、325、327、328、329、330、331、332、439、445、449或451 (EU编号)。Fc结构域来源的抗体的同种型没有特别限制,并且可以使用源自单克隆IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体的适当的Fc结构域。优选使用源自IgG1抗体的Fc结构域。

[0601] 优选的抗原结合分子或抗体包括,例如,包含具有以下示出的取代中的任一者的Fc结构域的抗原结合分子或抗体,所述取代的位置在形成IgG1抗体的Fc结构域的氨基酸中根据EU编号来指定(每个数字代表EU编号中的氨基酸残基的位置;并且数字前的单字母氨基酸符号代表取代前的氨基酸残基,而数字后的单字母氨基酸符号代表取代后的氨基酸残基):

[0602] (a) L234F、L235E、P331S;

[0603] (b) C226S、C229S、P238S;

[0604] (c) C226S、C229S;或

[0605] (d) C226S、C229S、E233P、L234V、L235A;

[0606] (e) L439M、A445N、R449Q、E451S

[0607] (f) M428L、N434A、Q438R、S440E,

[0608] 以及具有在位置231至238处具有氨基酸序列的缺失的Fc结构域的抗原结合分子或抗体。

[0609] 此外,优选的抗原结合分子或抗体还包括包含具有以下示出的取代中的任一者的Fc结构域的抗原结合分子或抗体,所述取代的位置在形成IgG2抗体的Fc结构域的氨基酸中根据EU编号来指定:

[0610] (e) H268Q、V309L、A330S和P331S;

[0611] (f) V234A;

[0612] (g) G237A;

[0613] (h) V234A和G237A;

[0614] (i) A235E和G237A;或

[0615] (j) V234A、A235E和G237A。每个数字代表EU编号中的氨基酸残基的位置;并且数字前的单字母氨基酸符号代表取代前的氨基酸残基,而数字后的单字母氨基酸符号代表取代后的氨基酸残基。

[0616] 此外,优选的抗原结合分子或抗体还包括包含具有以下示出的取代中的任一者的Fc结构域的抗原结合分子或抗体,所述取代的位置在形成IgG3抗体的Fc结构域的氨基酸中根据EU编号来指定:

[0617] (k) F241A;

[0618] (l) D265A;或

[0619] (m) V264A。每个数字代表EU编号中的氨基酸残基的位置;并且数字前的单字母氨基酸符号代表取代前的氨基酸残基,而数字后的单字母氨基酸符号代表取代后的氨基酸残基。

[0620] 此外,优选的抗原结合分子或抗体还包括包含具有以下示出的取代中的任一者的Fc结构域的抗原结合分子或抗体,所述取代的位置在形成IgG4抗体的Fc结构域的氨基酸中根据EU编号来指定:

[0621] (n) L235A、G237A和E318A;

[0622] (o) L235E;或

[0623] (p) F234A和L235A。每个数字代表EU编号中的氨基酸残基的位置;并且数字前的单字母氨基酸符号代表取代前的氨基酸残基,而数字后的单字母氨基酸符号代表取代后的氨基酸残基。

[0624] 其他优选的抗原结合分子或抗体包括,例如,包含Fc结构域的抗原结合分子或抗体,其中形成IgG1抗体的Fc结构域的氨基酸中的位置233、234、235、236、237、327、330或331 (EU编号) 处的任何氨基酸被对应的IgG2或IgG4中EU编号中对应位置的氨基酸取代。

[0625] 优选的抗原结合分子或抗体还包括,例如,包含Fc结构域的抗原结合分子或抗体,其中形成IgG1抗体的Fc结构域的氨基酸中的位置234、235和297 (EU编号) 处的氨基酸中的任一者或多者被其他氨基酸取代。取代后的氨基酸的类型没有特别限制;然而,特别优选包含其中位置234、235和297处的氨基酸中的任一者或多者被丙氨酸取代的Fc结构域的抗原结合分子或抗体。

[0626] 优选的抗原结合分子或抗体还包括,例如,包含Fc结构域的抗原结合分子或抗体,其中形成IgG1抗体的Fc结构域的氨基酸中的位置265 (EU编号) 处的氨基酸被其他氨基酸取代。取代后的氨基酸的类型没有特别限制;然而,特别优选包含其中位置265处的氨基酸被丙氨酸取代的Fc结构域的抗原结合分子或抗体。

[0627] 优先富集(或增加)

[0628] 术语“优先富集(或增加)”意指所需形式的相对丰度增加,或所需形式的相对比例增加,或所需形式(结构同工型)的群体增加。在一些实施方案中,本文描述的方法增加抗体结构同工型的相对丰度,诸如具有在铰链区的外部的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键的抗体。在一个实施方案中,所述至少一个二硫键形成于第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的相应的CH1区中根据EU编号的位置191处的氨基酸残基之间。在某些实施方

案中,所述方法产生同质抗体制剂,所述抗体制剂具有所述抗体的至少50%、60%、70%、80%、90%、优选至少95%摩尔比,所述抗体具有在铰链区的外部形成的至少一个二硫键。

[0629] 同质

[0630] 抗体的“同质”群体意指主要包含单一形式的抗体的抗体群体,例如,溶液或组合物中至少50%、60%、70%、80%或更多,优选至少90%、95%、96%、97%、99%或100%的抗体处于正确折叠形式。类似地,具有在铰链区外部形成的至少一个二硫键的抗体的“同质”群体意指主要包含单一、正确折叠形式(例如具有在铰链区外部形成的至少一个二硫键的所述抗体的至少50%、60%、70%、80%或更多,优选至少90%、95%、96%、97%、99%或100%摩尔比)的所述抗体的群体。在一个优选的实施方案中,所述抗体的“同质”群体包含至少一个二硫键,所述二硫键形成于第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的相应的CH1区中根据EU编号的位置191处的氨基酸残基(即,CH1区中根据EU编号位置191处的“配对半胱氨酸”)之间。

[0631] 可以使用多种分析和/或定性技术中的任一者来确定抗体群体是否同质,以及混合物中蛋白质/抗体构象的相对丰度或比例。如果两种构象在诸如层析、电泳、过滤或其他纯化技术的分离技术过程中不同地分解,则可以使用此类纯化技术来确定混合物中构象的相对比例。例如,重组IgG的至少两种不同构象可以通过疏水相互作用层析来分解。此外,由于远UV圆二色性已被用于估计蛋白质的二级结构组成(Perczel等人,1991,Protein Engng. 4:669-679),因此这样的技术可以确定是否存在蛋白质的替代构象。用于确定构象的另一种技术是荧光光谱法,所述荧光光谱法可用于确定可分配于色氨酸和酪氨酸荧光的三级结构中的互补差异。其他可用于确定构象中的差异并因此确定构象的相对比例的技术为:用于测量聚集状态的在线SEC、用于测量熔化转变(T_m)和组分焓的差示扫描量热法、以及离液剂解折叠。另一种可用于确定构象中的差异并因此确定构象的相对比例的技术是LC/MS检测,以确定蛋白质的异质性。

[0632] 替代性地,如果抗体/蛋白质的构象之间存在活性差异,则可以通过活性测定(例如,与配体的结合、酶活性、生物活性等)来确定混合物中构象的相对比例。还可以使用蛋白质的生物活性。替代性地,可以使用结合测定,其中活性表示为活性单位/mg蛋白质。

[0633] 为了确定抗体/蛋白质的异质性,使用IEC层析。在这种情况下,抗体被纯化或被认为是“同质的”,这意味着在通过IEC层析分析时没有检测到对应于其他多肽的多肽峰或级分。在某些实施方案中,抗体被纯化或被认为是“同质的”,使得在通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析时没有检测到对应于其他多肽的多肽条带。相关领域的技术人员将认识到,由于差异糖基化、差异翻译后加工等,对应于多肽的多个条带可以通过SDS-PAGE可视化。最优选地,多肽被纯化至基本上同质,如通过SDS-PAGE分析后由单个多肽条带所指示的。多肽条带可以通过银染色、考马斯亮蓝染色和/或(如果多肽是放射性标记的)通过放射自显影来可视化。

[0634] 在本文中,SDS-PAGE分析的条件的实例如下。使用4%至20%Mini-PROTEAN(注册商标)TGX Stain-Free™预制凝胶(Bio-Rad)与1xTris/甘氨酸/SDS运行缓冲液(Bio-Rad)进行非还原SDS-PAGE。将单克隆抗体样品在70°C加热10分钟。上样0.2微克,并在200V进行电泳90分钟。使用Chemidoc成像系统(Bio-Rad)对蛋白质进行可视化。通过Image Lab软件版本6.0(Bio-Rad)来分析单个条带的百分比,其中单个条带的强度%(例如,较快迁移(下条

带)和较慢迁移(上条带))是通过条带强度除以这两个条带的总和来计算的。然后,可以用CBB对凝胶进行染色,并且可以捕获凝胶图像,并且可以使用成像装置对条带进行定量。在凝胶图像中,对于抗体变体样品可以观察到若干个条带,例如两个条带,即“上条带”和“下条带”。在这种情况下,上条带的分子量可对应于亲本抗体的分子量(修饰前)。结构变化(诸如经由Fab的二硫键交联)可能是由半胱氨酸取代引起的,这可导致电泳迁移率的变化。在这种情况下,下条带可以被认为对应于具有在CH1区之间形成的一个或多个工程化二硫键的抗体。与对照样品相比,具有额外半胱氨酸取代的抗体变体样品可显示出更高的下条带比上条带比率。额外的半胱氨酸取代可以增强/促进Fab的二硫键交联;并且可以增加具有在突变位置处形成的工程化二硫键的抗体制剂的百分比或结构同质性;并且可以降低在突变位置处不形成工程化二硫键的抗体制剂的百分比。在本文中,术语“下条带比上条带比率”是指可以在上述SDS-PAGE实验过程中定量的下条带与上条带的数量/强度之间的比率。

[0635] 术语“药物制剂”和“药物组合物”是指处于允许包含在其中的活性成分的生物活性有效的形式,并且不含对于将被施用制剂的受试者具有不可接受的毒性的额外组分的制剂。

[0636] “药用载体”是指药物制剂中除活性成分外的对受试者无毒的成分。药用载体包括但不限于缓冲液、赋形剂、稳定剂,或防腐剂。

[0637] “个体”或“受试者”为哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯养的动物(例如牛、绵羊、猫、犬和马)、灵长类动物(例如人和非人灵长类动物,诸如猴)、兔以及啮齿类动物(例如小鼠和大鼠)。在某些实施方案中,该个体或受试者为人。

[0638] II. 用于生产包含抗原结合分子的制剂的方法

[0639] 本公开涉及用于生产包含抗原结合分子的制剂的方法,该抗原结合分子具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键。本公开中的方法包括在还原剂的存在下对混合物进行层析的步骤,其中混合物包含抗原结合分子以及所述抗原结合分子的错误二硫键合形式和/或非二硫键合形式,所述抗原结合分子具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键(在下文中,所述混合物可以称为“包含抗原结合分子的混合物”、“抗原结合分子的混合物”等)。在本公开的方法中,包含抗原结合分子的混合物可以经受一次或多次一种类型的层析。替代性地,可以对包含抗原结合分子的混合物各自进行一次或多次(例如两次、三次或更多次)多种类型(例如,2种、3种或更多种类型)的层析。当进行多次层析处理时,这些处理可以顺序进行也可以不顺序进行。

[0640] 在本公开的方法中,可以使用本领域技术人员众所周知的层析。实例包括但不限于柱层析、膜层析和薄层层析。

[0641] 在本公开的生产方法中,对包含抗原结合分子的混合物进行层析的步骤是在还原剂的存在下进行的。在本公开的生产方法中,对包含抗原结合分子的混合物进行层析的步骤的实施方案没有限制,只要存在还原剂即可。例如,可以预先将抗原结合分子上样到层析基质上,并且然后使抗原结合分子与还原剂接触,或者可以使包含抗原结合分子的混合物与还原剂混合而得到的物质流过层析。

[0642] 在一个方面,当使用柱层析时,本公开的方法可以包括使填充在用于柱层析的柱中的层析基质与包含抗原结合分子以及所述抗原结合分子的错误二硫键合形式和/或非二硫键合形式的混合物接触的步骤,所述抗原结合分子具有在铰链区以外的区域中的氨基酸

残基之间形成的至少一个二硫键。在一个方面,当使用膜层析时,本公开的方法可以包括使涂布在用于膜层析的膜上的层析基质与包含抗原结合分子以及所述抗原结合分子的错误二硫键合形式和/或非二硫键合形式的混合物接触的步骤,所述抗原结合分子具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键。包含抗原结合分子的混合物可以预先与还原剂接触。

[0643] 在本公开中,对包含抗原结合分子以及所述抗原结合分子的错误二硫键合形式和/或非二硫键合形式的混合物进行层析的步骤可以包括以下步骤,所述抗原结合分子具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键:

[0644] (a) 使包含抗原结合分子以及所述抗原结合分子的错误二硫键合形式和/或非二硫键合形式的混合物与包含还原剂的溶液接触,所述抗原结合分子具有在所述铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键;以及

[0645] (b) 去除所述还原剂。

[0646] 在一个方面,本公开的方法通过本文描述的步骤来产生或纯化同质抗原结合分子的群体或同质抗原结合分子的制剂或浓缩物。

[0647] 在一个方面,相对于上样到基质上的具有可在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成至少一个二硫键的氨基酸残基的抗原结合分子(此类抗原结合分子包括在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间适当地形成至少一个二硫键的抗原结合分子,以及在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间未适当地形成至少一个二硫键的抗原结合分子(即抗原结合分子的错误二硫键合形式和/或非二硫键合形式)),本公开的方法可以提高具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键的抗原结合分子的比例。

[0648] 在一个方面,相对于上样到基质上的具有可在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成至少一个二硫键的氨基酸残基的抗原结合分子(此类抗原结合分子包括在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间适当地形成至少一个二硫键的抗原结合分子,以及在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间未适当地形成至少一个二硫键的抗原结合分子(或换言之,抗原结合分子的错误二硫键合形式和/或非二硫键合形式)),本公开的方法以至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的摩尔比产生在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间具有至少一个二硫键的抗原结合分子。

[0649] 因此,在一个实施方案中,本公开涉及用于生产包含增加的浓度的抗原结合分子的制剂的方法,该抗原结合分子具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键。在一个实施方案中,通过本公开的方法生产的制剂可以是具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键的抗原结合分子的浓缩物。此外,在一个实施方案中,本公开涉及用于增加抗原结合分子的混合物中的抗原结合分子的浓度的方法,该抗原结合分子具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键。在另外的实施方案中,本公开涉及用于从混合物中纯化包含具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键的抗原结合分子的制剂的方法,该混合物包含具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键的抗原结合分子以及该抗原结合分子的错误二硫键合形式和/或非二硫键合形式。在本公开中,不具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的二硫键的抗原结合分子包括在铰链区以外的区

域中的半胱氨酸残基被加帽,或者仅作为半胱氨酸存在的抗原结合分子。

[0650] 在本公开的方法中,使抗原结合分子的混合物与包含还原剂的溶液接触。在具体实施方案中,在层析中使上样在基质上的抗原结合分子的混合物与包含还原剂的溶液接触。在一个方面,本公开的层析基质的实例包括但不限于亲和层析基质、离子交换层析基质、疏水相互作用层析基质、用于包含离子交换层析和疏水相互作用层析两者的多模式层析的基质、以及羟基磷灰石基质。在本公开中,“基质”、“树脂”、“配体”和“底物”可以互换使用。

[0651] 在本公开中,亲和层析基质不受限制,只要其显示出亲和层析作用即可。在一个方面,不限于以下项,蛋白A基质、蛋白G基质、蛋白L基质、序列选择性肽基质、与抗原结合分子选择性结合的基质等可作为亲和层析基质的实例。

[0652] 在本公开的方法中,可以使用可商购获得的产品作为亲和层析基质。在具体的方面,不限于以下项,MabSelect SuRe (注册商标) (Cytiva Corporation)、MabSelect Xtra (注册商标) (Cytiva Corporation)、MabSelect SuRe (注册商标) LX (Cytiva Corporation)、MabSelect SuRe (注册商标) pcc (Cytiva Corporation)、MabSelect PrismaA (注册商标) (Cytiva Corporation)、MabSpeed (注册商标) rP202 (Cytiva Corporation)、TOYOPEARL (注册商标) r蛋白A HC-650F (TOSOH Corporation)、Praesto (注册商标) Jetted A50 (Purolite Corporation)、Amsphere (注册商标) A3 (JSR Corporation)、Amsphere (注册商标) 蛋白A JWT203 (JSR Corporation)、Eshmuno A (注册商标) (Merck Millipore Corporation)、Capto L (注册商标) (Cytiva Corporation) 以及 MabSelect (注册商标) VL (Cytiva Corporation) 可以作为亲和层析基质的实例。

[0653] 在一个方面,本公开中的离子交换层析基质包括阴离子交换树脂(阴离子交换配体)或阳离子交换树脂(阳离子交换配体)。本公开中的阴离子交换树脂和阳离子交换树脂不受限制,只要它们分别表现出阴离子交换作用和阳离子交换作用即可。

[0654] 在本公开的方法中,可以使用可商购获得的产品作为阴离子交换层析基质。在具体的方面,不限于以下项,YMC-BioPro (YMC Corporation)、Q Sepharose (注册商标) 高性能 (Cytiva Corporation)、Q Sepharose (注册商标) 快速流动 (Cytiva Corporation)、Q Sepharose (注册商标) XL (Cytiva Corporation)、Q Sepharose (注册商标) 大珠 (Cytiva Corporation)、Capto (注册商标) Q ImpRes (Cytiva Corporation)、Capto (注册商标) Q (Cytiva Corporation)、Capto (注册商标) Q XP (Cytiva Corporation)、Capto (注册商标) DEAE (Cytiva Corporation)、SOURCE (注册商标) 30Q (Cytiva Corporation)、SOURCE (注册商标) 15Q (Cytiva Corporation)、DEAE Sepharose (注册商标) 快速流动 (Cytiva Corporation)、ANX Sepharose (注册商标) 4快速流动 (Cytiva Corporation)、POROS (注册商标) 50PI (Thermo Fisher Corporation)、POROS (注册商标) 50HQ (Thermo Fisher Corporation)、POROS (注册商标) HQ (Thermo Fisher Corporation)、POROS (注册商标) D (Thermo Fisher Corporation)、POROS (注册商标) PI (Thermo Fisher Corporation)、Eshmuno (注册商标) Q (Merck Millipore Corporation)、Fractogel (注册商标) TMAE (Merck Millipore Corporation)、Fractogel (注册商标) DEAE (Merck Millipore Corporation)、Macro-Prep (注册商标) Q (Bio-Rad Laboratories Corporation)、Macro-Prep (注册商标) DEAE (Bio-Rad Laboratories Corporation)、Giga Cap (注册商标) Q-650M

(TOSOH Corporation)、Giga Cap(注册商标) DEAE-650M(TOSOH Corporation) 以及Q HyperCel(注册商标) (PALL Corporation) 可以作为阴离子交换层析基质的实例。

[0655] 可商购获得的产品也可以用于阳离子交换层析基质。在具体的方面,不限于以下项,Capto(注册商标) S(Cytiva Corporation)、Capto(注册商标) SP ImpRes(Cytiva Corporation)、Capto(注册商标) S ImpaAct(Cytiva Corporation)、SP Sepharose(注册商标) 快速流动(Cytiva Corporation)、CM Sepharose(注册商标) 快速流动(Cytiva Corporation)、SP Sepharose(注册商标) 高性能(Cytiva Corporation)、CM Sepharose(注册商标) 高性能(Cytiva Corporation)、SP Sepharose(注册商标) XL(Cytiva Corporation)、SP Sepharose(注册商标) 大珠(Cytiva Corporation)、Eshumuno(注册商标) CPX(Merck Millipore Corporation)、Eshumuno(注册商标) CP-FT(Merck Millipore Corporation)、POROS(注册商标) 50HS(Thermo Fisher Corporation) 以及POROS(注册商标) XS(Thermo Fisher Corporation) 可以作为阳离子交换层析基质的实例。

[0656] 在本公开中,用于疏水相互作用层析的基质不受限制,只要其表现出疏水相互作用层析作用即可。在一个方面,疏水相互作用层析基质包括疏水配体。

[0657] 在本公开的方法中,可以使用可商购获得的产品作为疏水相互作用层析基质。在具体的方面,不限于以下项,苯基Sepharose(注册商标) 高性能(Cytiva Corporation)、丁基Sepharose(注册商标) 高性能(Cytiva Corporation)、苯基Sepharose(注册商标) 6快速流动(Cytiva Corporation)、丁基-S Sepharose(注册商标) 6快速流动(Cytiva Corporation)、丁基Sepharose(注册商标) 4快速流动(Cytiva Corporation)、辛基Sepharose(注册商标) 4快速流动(Cytiva Corporation)、Capto(注册商标) 苯基ImpRes(Cytiva Corporation)、Capto(注册商标) 苯基(Cytiva Corporation)、Capto(注册商标) 苯基(高Sub)(Cytiva Corporation)、Capto(注册商标) 丁基(Cytiva Corporation)、Capto(注册商标) 丁基ImpRes(Cytiva Corporation)、Capto(注册商标) 辛基(Cytiva Corporation)、苯基Sepharose(注册商标) 6快速流动(低Sub)(Cytiva Corporation)、苯基Sepharose(注册商标) 6快速流动(高Sub)(Cytiva Corporation)、POROS(注册商标) 乙基(Thermo Fisher Corporation)、Fractogel(注册商标) 苯基(Merck Millipore Corporation)、Fractogel(注册商标) 丙基(Merck Millipore Corporation)、TOYOPEARL(注册商标) 丁基(TOSOH Corporation)、TOYOPEARL(注册商标) 乙醚(TOSOH Corporation)、TOYOPEARL(注册商标) 己基(TOSOH Corporation)、TOYOPEARL(注册商标) 苯基(TOSOH Corporation)、TOYOPEARL(注册商标) PPG(TOSOH Corporation)、TOYOPEARL(注册商标) 超丁基(TOSOH Corporation)、TOYOPEARL(注册商标) 丁基-600(TOSOH Corporation)、TOYOPEARL(注册商标) 苯基-650C(TOSOH Corporation)、TOYOPEARL(注册商标) 苯基-650M(TOSOH Corporation)、TOYOPEARL(注册商标) 苯基-650S(TOSOH Corporation)、TOYOPEARL(注册商标) 苯基-600M(TOSOH Corporation) 以及Macro-Prep(注册商标) HIC(Bio-Rad Laboratories Corporation) 可以作为疏水相互作用层析基质的实例。

[0658] 在一个方面,本公开的多模式层析基质可包括组合阳离子交换配体和疏水配体的基质,或组合阴离子交换配体和疏水配体的基质。在本公开的方法中,可商购获得的产品可用于多模式层析基质。例如,不限于以下项,Capto(注册商标) adhere(Cytiva Corporation)、Capto(注册商标) adhere ImpRes(Cytiva Corporation)、Capto(注册商标)

MMC (Cytiva Corporation)、Capto (注册商标) MMC ImpRes (Cytiva Corporation) 以及 Eshmuno (注册商标) CMX (Merck Millipore Corporation) 可以作为用于多模式层析的基质的实例。

[0659] 在一个方面, 羟基磷灰石层析基质可包括羟基磷灰石或其衍生物 (诸如氟磷灰石)。在本公开的方法中, 可商购获得的产品也可用于羟基磷灰石层析基质。在具体实施方案中, 不限于以下项, 陶瓷羟基磷灰石 (注册商标) I 型 (Bio-Rad Laboratories Corporation)、陶瓷羟基磷灰石 (注册商标) II 型 (Bio-Rad Laboratories Corporation)、陶瓷氟磷灰石 (注册商标) (Bio-Rad Laboratories Corporation)、MPC (注册商标) 陶瓷羟基磷灰石 (Bio-Rad Laboratories Corporation)、HA Ultrogel (注册商标) (PALL Corporation) 以及 Ca++Pure-HA (注册商标) (TOSOH Corporation) 可以作为用于羟基磷灰石层析的基质的实例。

[0660] 在本公开的方法中, 可商购获得的产品也可用于膜层析。在具体实施方案中, 不限于以下项, Mustang (注册商标) Q (PALL Corporation)、Mustang (注册商标) S (PALL Corporation)、Sartobind (注册商标) Q (Sartorius Corporation)、Sartobind (注册商标) S (Sartorius Corporation)、Sartobind (注册商标) STIC (Sartorius Corporation)、Sartobind (注册商标) 蛋白 A (Sartorius Corporation)、Fibro (Cytiva Corporation)、蛋白质捕获 (GORE Corporation)、Natrix (注册商标) Q (Merck Millipore Corporation)、Purexa (注册商标) -MQ (Purilogs Corporation)、Purexa (注册商标) -A (Purilogs Corporation) 以及 Purexa (注册商标) -DMAE (Purilogs Corporation) 可以作为用于膜层析的产品的实例。

[0661] 在本公开中, 术语“还原试剂”、“还原剂”和“包含还原剂的溶液”可互换使用。在一些实施方案中, 上述还原剂为游离硫醇。此外, 在一个方面, 本公开中的还原剂可以为单硫醇、二硫醇、膦或无机试剂。本公开中的单硫醇的实例包括谷胱甘肽、半胱氨酸、硫辛酸、2-巯基乙醇和 2-MEA, 但不限于此。本公开中的二硫醇的实例包括二硫苏糖醇 (DTT)、DTE 和 DTBA, 但不限于此。本公开中的膦的实例包括三 (2-羧乙基) 膦 (TCEP) 和 THPP, 但不限于此。本公开中的无机试剂的实例包括亚硫酸钠和焦亚硫酸钠, 但不限于此。

[0662] 还原试剂优选由选自以下项组成的组的化合物组成: 谷胱甘肽 (GSH)、二硫苏糖醇 (DTT)、2-巯基乙醇、2-氨基乙硫醇 (2-MEA)、三 (2-羧乙基) 膦 (TCEP)、二硫代硝基苯甲酸盐、半胱氨酸、亚硫酸钠、焦亚硫酸钠和 Na_2SO_3 。在一些实施方案中, 可以使用 TCEP、2-MEA、DTT、半胱氨酸、GSH 或 Na_2SO_3 。在一些优选的实施方案中, 可以使用半胱氨酸。在一些优选的实施方案中, 可以使用 TCEP。在本公开的方法中, 可以使用一种或多种类型 (例如, 2 种、3 种或更多种类型) 的还原剂。

[0663] 在一个实施方案中, 还原剂可以为溶液, 或者优选地是缓冲液的形式。缓冲液的实例包括用于层析技术的缓冲液, 诸如磷酸盐缓冲液、Tris 缓冲液、乙酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、酒石酸盐缓冲液和硼酸盐缓冲液, 但不限于此。此外, 碱的实例包括氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化锂和 Tris。

[0664] 在本公开中, “接触”意指使抗原结合分子的混合物经历或暴露于包含还原剂的溶液, 或者将抗原结合分子的混合物与包含还原剂的溶液混合。在本公开的方法中, 可以使抗原结合分子的混合物与包含还原剂的溶液接触, 同时该分子处于与固体基质 (例如, 柱层析

柱或膜层析膜)结合的状态。

[0665] 虽然不受以下理论的束缚,但认为unLINC形式(即,不具有工程化二硫键或“配对半胱氨酸”的二价或三价抗原结合分子)的存在可能是由于未配对的Cys残基经常与含有游离硫醇基团的分子形成二硫键,诸如通过“加帽”未配对的Cys残基来阻止LINC形成(在铰链区以外的区域中工程化二硫键的形成)的半胱氨酸化和谷胱甘肽化。为了去除具有未配对的加帽半胱氨酸的分子,还原剂可以帮助表面半胱氨酸的脱帽,并且脱帽的抗原结合分子的进一步再氧化(例如,通过去除还原试剂)可以促进脱帽的半胱氨酸之间的二硫键形成以用于LINC形成。因此,通过还原和再氧化来从unLINC格式中未配对的巯基中去除半胱氨酸化,可以去除unLINC形式并提高抗体的同质性。

[0666] 在一个方面,在本公开的方法中,使抗原结合分子的混合物与包含还原剂的溶液接触,导致可在抗原结合分子中形成二硫键的氨基酸残基之间形成的二硫键断裂。在一个方面,使抗原结合分子的混合物与包含还原剂的溶液接触导致抗原结合分子中加帽的半胱氨酸残基脱帽。

[0667] 在一个方面,在本公开的方法中,还原剂的去除导致可在抗原结合分子中形成二硫键的氨基酸残基之间形成二硫键。

[0668] 使抗原结合分子的混合物与包含还原剂的溶液接触进行足以增加所需构象的相对比例的时间。比例中的任何相对增加是期望的,包括例如,至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的具有不期望构象的抗原结合分子转化为具有期望构象的抗原结合分子。

[0669] 在一个方面,在本公开的方法中,使包含还原剂的溶液流过含有携带抗原结合分子的基质的层析系统。在具体实施方案中,抗原结合分子构成固定至层析基质的固定相,并且包含还原剂的溶液是流动相的一部分。在这种情况下,接触可以作为层析纯化程序的一部分进行。

[0670] 还原剂以足以增加所需构象的相对比例的浓度存在(例如,“配对半胱氨酸”形式的抗原结合分子,该抗原结合分子在抗体的两个Fab之间(例如,在铰链区以外的区域之间)具有一个或多个工程化二硫键)。还原剂的最佳绝对浓度和摩尔比取决于抗原结合分子的总浓度,并且在一些情况下还取决于特定抗原结合分子的浓度。此外,还原剂浓度还取决于抗原结合分子中未配对的半胱氨酸的数量和可及性。

[0671] 在一个方面,还原剂的浓度的实例包括可以通过选自由约0.0001mM、约0.0005mM、约0.001mM、约0.005mM、约0.01mM、约0.05mM、约0.1mM、约0.5mM和约1.0mM组成的组的下限,以及选自由约100.0mM、约75.0mM、约50.0mM、约25.0mM、约10.0mM、约5.0mM、约1.0mM、约0.5mM、约0.1mM和约0.01mM组成的组的上限的任何组合来指定的范围。在一些实施方案中,作为还原剂的浓度,范围为约0.00001mM至约10.0mM、约0.00005mM至约5.0mM、约0.0001mM至约1.0mM、约0.0005mM至约0.5mM、约0.001mM至约0.1mM、或约0.001mM至约0.01mM可以作为实例。在另外的实施方案中,作为还原剂的浓度,范围为约0.001mM至约100.0mM、约0.005mM至约75.0mM、约0.01mM至约50.0mM、约0.05mM至约25.0mM、或约0.1mM至约10mM可以作为实例。在另外的实施方案中,作为还原剂的浓度,范围为约0.0001mM至约100.0mM、约0.0005mM至约50.0mM、约0.001mM至约10.0mM、约0.005mM至约5.0mM、或约0.01mM至约1.0mM可以作为实例。在具体实施方案中,还原剂的浓度可以为约0.001mM、约0.01mM、约0.1mM、约

0.15mM、约1.0mM或约10.0mM。

[0672] 在一些优选的实施方案中,当还原剂为半胱氨酸时,还原剂的浓度可以为约0.01mM至约100.0mM,约0.05mM至约50.0mM,约0.1mM至约10.0mM,或约0.5mM至约5.0mM。在进一步优选的实施方案中,当还原剂为半胱氨酸时,还原剂的浓度可以为约0.001mM至约100.0mM、约0.005mM至约75.0mM、约0.01mM至约50.0mM、约0.05mM至约25.0mM、或约0.1mM至约10mM。在进一步优选的实施方案中,当还原剂为半胱氨酸时,还原剂的浓度可以为约0.0001mM至约100.0mM、约0.001mM至约75.0mM、约0.01mM至约50.0mM、或约0.1mM至约10.0mM。在一些优选的实施方案中,当还原剂为二硫醇时,还原剂的浓度可以为约0.001mM至约10mM。在一些优选的实施方案中,当还原剂为膦时,还原剂的浓度可以为约0.0001mM至约1mM或约0.001mM至约0.01mM。在一些优选的实施方案中,当还原剂为TCEP时,还原剂的浓度可以为约0.00001mM至约10.0mM、约0.00005mM至约5.0mM、约0.0001mM至约1mM、约0.0005mM至约0.5mM、约0.001mM至约0.1mM、或约0.001mM至约0.01mM。在一些优选的实施方案中,当还原剂为无机试剂时,还原剂的浓度可以为约0.0001mM至约10mM或约0.001mM至约0.1mM。

[0673] 在具体实施方案中,当还原剂为半胱氨酸时,还原剂的浓度可以为约0.1mM、约0.15mM、约1.0mM、约10.0mM或约100mM。在具体实施方案中,当还原剂为TCEP时,还原剂的浓度可以为约0.001mM、约0.01mM、约0.1mM或约1.0mM。

[0674] 为了使具有所需构象的抗原结合分子的产率最大化,选择包含还原剂的溶液的pH以保护抗原结合分子的稳定性并且最适合用于二硫键交换。在一个方面,包含本公开的还原剂的溶液的pH可以为约4.5至约10.0、约5.0至约9.0、约6.5至约8.5、或约7.0至约8.0。在本发明的非限制性实施方案中,发现最佳pH为约7.0、约7.5或约8.0。然而,本发明的特定实施方案中的最佳pH可由本领域技术人员通过实验很容易地确定。

[0675] 在本公开的方法中,层析基质、抗原结合分子和还原剂的接触发生在层析中。在一个实施方案中,在本公开的方法中,上样在基质上的抗原结合分子与还原剂之间的接触发生在层析中。换言之,在本公开的方法中,还原剂与抗原结合分子之间的接触,可以通过使包含还原剂的溶液流过含有上样在基质上的抗原结合分子的柱层析柱或膜层析装置来进行。

[0676] 在一些实施方案中,使包含还原剂的溶液流过柱层析柱或膜层析装置,停留时间为约2秒至约80分钟或约3秒至约24分钟。在具体实施方案中,使包含还原剂的溶液流过柱层析柱或膜层析装置,停留时间为约12分钟或约30秒。在一些实施方案中,在柱内部或装置内部充满包含还原剂的溶液的状态下,可以暂时停止流动。

[0677] 在一个方面,当使用柱层析时,使包含还原剂的溶液流过柱,停留时间为约2分钟至约80分钟或约4分钟至约24分钟。在特定实施方案中,当使用柱层析时,使包含还原剂的溶液流过柱,停留时间为约12分钟。在一个方面,在柱内部充满包含还原剂的溶液的状态下,可以暂时停止流动。在一个方面,当使用柱层析时,可以使包含本公开的还原剂的溶液以约25cm/小时至约500cm/小时、约50cm/小时至约400cm/小时、约75cm/小时至约350cm/小时或约100cm/小时至约300cm/小时的速率流过柱。在一些实施方案中,可以使包含本公开的还原剂的溶液以约100cm/小时的速率流过柱。在一个方面,在柱内部充满包含还原剂的溶液的状态下,可以暂时停止流动。

[0678] 在一个方面,当使用膜层析时,使包含还原剂的溶液流过膜装置,停留时间为约2秒至约60分钟或约3秒至约6分钟,例如约30秒。在一些实施方案中,在膜装置内部充满包含还原剂的溶液的状态下,可以暂时停止流动。在一个方面,当使用膜层析时,可以使包含本公开中的还原剂的溶液以约0.017MV/分钟至约30MV/分钟、约0.17MV/分钟至约20MV/分钟、约1MV/分钟至约10MV/分钟、或约2MV/分钟至约5MV/分钟的速率流过膜装置。在具体实施方案中,可以使包含本公开中的还原剂的溶液以约2MV/分钟的速率流过膜装置。在膜装置内部充满溶液的状态下,可以暂时停止流动。

[0679] 使包含还原剂的溶液流过柱的量没有特别限制,但例如,当使用柱层析时,包含还原剂的溶液的流动体积可以为约0.1倍(约0.1柱体积(CV))至约100倍(约100CV)、约1倍(约1CV)至约20倍(约20CV)、或约3倍(约3CV)至约10倍(约10CV)柱体积。在一些实施方案中,使包含还原剂的溶液流过柱的量可以为约10倍柱体积(约10CV)。此外,当使用膜层析时,包含还原剂的溶液的流动体积可以为约1倍(约1膜体积(MV))至约500倍(约500MV)、或约2倍(约2MV)至约100倍(约100MV)膜装置体积。在一些实施方案中,使包含还原剂的溶液流过柱的量可以为约15倍柱体积(约15MV)。

[0680] 抗原结合分子的混合物与包含还原剂的溶液之间的反应时间(接触时间)没有特别限制,但实例包括约6秒至约1440分钟、约18秒至约300分钟、约5分钟至约180分钟、约10分钟至约150分钟或约12分钟至约120分钟。在特定实施方案中,抗原结合分子的混合物与包含还原剂的溶液之间的接触时间可以为约120分钟或约7.5分钟。

[0681] 在一个方面,当使用柱层析时,抗原结合分子的混合物与包含还原剂的溶液之间的接触时间可以为约4分钟至约1440分钟、约8分钟至约300分钟、约30分钟至约240分钟、约60分钟至约180分钟或约120分钟。在具体实施方案中,抗原结合分子的混合物与包含还原剂的溶液之间的接触时间可以为约120分钟。

[0682] 在一个方面,当使用膜层析时,抗原结合分子的混合物与包含还原剂的溶液之间的接触时间可以为约6秒至约600分钟或约18秒至约120分钟,例如约7.5分钟。

[0683] 在本公开的方法中,抗原结合分子可以以适当的各种体积与还原剂接触,诸如以分析实验规模(1mL至50mL)、制备规模(50mL至10L)和制造规模(10L或更多)。在一个方面,上样到底物上的抗原结合分子的量可以为每1L含有底物的层析基质约5至100g、约7至70g、约10至40g,例如约10g或约25g。

[0684] 在一个方面,当使用柱层析时,上样到底物上的抗原结合分子的量可以为每1L含有底物的层析基质约5g至约80g、约7g至约70g或约10g至约40g,例如约10g。

[0685] 在一个方面,当使用膜层析时,上样到膜上的抗原结合分子的量可以为每1L膜装置体积约5g至约100g、约7g至约50g、或约10g至约40g,例如约25g。

[0686] 本公开的方法包括去除还原剂的步骤。在本公开中,去除还原剂包括完全去除还原剂、降低还原剂的浓度、以及对还原剂进行化学灭活。还原剂的去除促进了构成抗原结合分子的两个Fab之间的铰链区以外的区域中的二硫键的再氧化。

[0687] 在一个方面,可以通过使抗原结合分子与不包含还原剂的溶液接触来去除还原剂。在一个方面,可以通过使不包含还原剂的溶液流过柱层析柱或流过膜层析装置来去除还原剂。

[0688] 在一些实施方案中,使不包含还原剂的溶液流过柱层析柱或流过膜层析装置,停

留时间为约2秒至约80分钟或约3秒至约24分钟。在具体实施方案中,使不包含还原剂的溶液流过柱层析柱或流过膜层析装置,停留时间为约4分钟。在一些实施方案中,在柱内部或装置内部充满溶液的状态下,可以暂时停止流动。

[0689] 在一些实施方案中,当使用柱层析时,使不包含还原剂的溶液流过柱,停留时间为约2分钟至约80分钟或约4分钟至约24分钟。在特定实施方案中,当使用柱层析时,使不包含还原剂的溶液流过柱,停留时间为约4分钟。在一些实施方案中,在柱内部充满溶液的状态下,可以暂时停止流动。

[0690] 在一些实施方案中,当使用柱层析时,可以使不包含还原剂的溶液以约25cm/小时至约500cm/小时、约50cm/小时至约450cm/小时、约200cm/小时至约400cm/小时或约250cm/小时至约350cm/小时的速率流过柱。此外,在具体实施方案中,可以使不包含本公开的还原剂的溶液以约300cm/小时的速率流过柱。在柱内部充满溶液的状态下,可以暂时停止流动。

[0691] 在一些实施方案中,当使用膜层析时,使不包含还原剂的溶液流过膜装置,停留时间为约2秒至约60分钟或约3秒至约6分钟,例如约30秒。在一些实施方案中,在装置内部充满溶液的状态下,可以暂时停止流动。

[0692] 在一些实施方案中,当使用膜层析时,可以使不包含还原剂的溶液以约0.017MV/分钟至约30MV/分钟、约0.17MV/分钟至约20MV/分钟、约1MV/分钟至约10MV/分钟、或约2MV/分钟至约5MV/分钟的速率流过膜装置。此外,在具体实施方案中,可以使不包含本公开的还原剂的溶液以约2MV/分钟的速率流过膜装置。在膜装置内部充满溶液的状态下,可以暂时停止流动。

[0693] 不包含还原剂的溶液没有特别限制,但在一个实例中,可以使用缓冲液,并且更具体地,可以使用层析技术中通常使用的缓冲液,诸如磷酸盐缓冲液、Tris缓冲液、乙酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、酒石酸盐缓冲液和硼酸盐缓冲液。此外,碱的实例包括氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化锂和Tris。在一个方面,在本公开的方法中,对于不包含还原剂的溶液,可以使用与接触步骤中使用的包含还原剂的溶液相同类型的溶液,除了不存在还原剂之外。

[0694] 在一个方面,当使用柱层析时,不包含还原剂的溶液的流动体积可以为约0.1倍(约0.1CV)至约100倍(约100CV)、约1倍(约1CV)至约20倍(约20CV)、或约3倍(约3CV)至约10倍(约10CV)柱体积。在一些实施方案中,不包含还原剂的溶液的流动体积可以为约5.0倍柱体积(约5.0CV)。

[0695] 在一个方面,当使用膜层析时,不包含还原剂的溶液的流动体积可以为约1倍(1MV)至约500倍(500MV)、或约2倍(2MV)至约100倍(100MV)膜装置体积,例如约15倍膜装置体积(15MV)。

[0696] 在一个方面,抗原结合分子的混合物与不包含还原剂的溶液之间的反应时间(接触时间)可以为约6秒至约1440分钟、约18秒至约300分钟、约5分钟至约60分钟、约10分钟至约50分钟或约12分钟至约40分钟。在特定实施方案中,抗原结合分子的混合物与不包含还原剂的溶液之间的反应时间(接触时间)可以为约20分钟。

[0697] 在一个方面,当使用柱层析时,抗原结合分子的混合物与不包含还原剂的溶液之间的反应时间(接触时间)可以为约4分钟至约1440分钟或约8分钟至约300分钟。在特定实施方案中,当使用柱层析时,抗原结合分子的混合物与不包含还原剂的溶液之间的反应时间(接触时间)可以为约20分钟。

[0698] 在一个方面,当使用膜层析时,抗原结合分子的混合物与不包含还原剂的溶液之间的反应时间(接触时间)可以为约6秒至约600分钟或约18秒至约120分钟,例如约7.5分钟。

[0699] 本发明的方法可以在很宽的温度范围内进行。例如,本发明的方法可以在约4°C至约37°C或约15°C至约37°C进行。用于接触部分或完全纯化的抗原结合分子的制剂的典型温度为约4°C至约25°C(环境温度),或优选在23°C,但该接触也可以在较低温度和较高温度进行。在一些实施方案中,本公开的方法可以在约20°C至37°C的温度进行,优选在23°C、25°C或37°C,并且更优选在23°C。

[0700] 此外,对于不包含还原剂的溶液,最佳pH可由本领域技术人员通过实验很容易地确定。实例可以为约4.5至约10.0、约5.0至约9.0、约6.5至约8.5、或约7.0至约8.0。此外,在具体实施方案中,最佳pH可以为约7.1、约7.2、约7.3、约7.4、约7.5、约7.6、约7.7、约7.8或约7.9。

[0701] 在一个方面,在本公开的方法中,在使抗原结合分子的混合物与包含还原剂的溶液接触的步骤之前,可以包括使混合物与层析基质接触以用抗原结合分子填充柱内部或将抗原结合分子固定到膜上的步骤。在具体实施方案中,当混合物是包含抗原结合分子的细胞培养液(收获的细胞培养液体:HCCF)时,在使细胞培养液与包含还原剂的溶液接触的步骤之前,可以包括使细胞培养液与层析基质接触以用抗原结合分子填充柱内部或将抗原结合分子固定到膜上的步骤。在一个方面,抗原结合分子的混合物包含在铰链区以外的区域中具有至少一个二硫键的抗原结合分子(即LINC形式)以及在铰链区以外的区域中不具有二硫键的抗原结合分子(即unLINC形式)。

[0702] 在某些方面,抗原结合分子可以在与包含还原剂的溶液接触的步骤之前至少部分被纯化。在一些实施方案中,本公开的生产方法可以包括在接触步骤之前,将包含抗原结合分子的细胞培养液进行亲和层析(优选蛋白A层析)的步骤。

[0703] 在一个方面,本公开的方法可以包括在接触步骤之前,去除层析中的杂质的步骤。如作为一个实例的实例中所述,可以通过本领域技术人员众所周知的方法(诸如使缓冲液流过携带吸附有抗原结合分子的底物的柱)来去除杂质。

[0704] 在一个方面,本公开的方法可以进一步包括在去除还原剂的步骤之前或之后,收集或洗脱在铰链区以外的区域中具有至少一个二硫键的抗原结合分子的步骤、和/或纯化抗原结合分子的步骤。在一个实施方案中,抗原结合分子的收集和洗脱可以通过本领域技术人员众所周知的方法(诸如使用洗脱缓冲液)通过从层析柱洗脱抗原结合分子来进行。本领域技术人员可以根据要纯化的抗原结合分子的特性适当调整洗脱缓冲液的pH和组成。

[0705] 在一个实施方案中,如本文所述生产的抗原结合分子的制剂可以通过本技术领域已知的技术(诸如高效液相层析、离子交换层析、凝胶电泳、亲和层析和尺寸排阻层析)进一步纯化。用于纯化特定抗原结合分子的实际条件将部分取决于诸如净电荷、疏水性和亲水性等因素,这对于本领域技术人员而言将是显而易见的。对于亲和层析纯化,可以使用抗原结合分子结合的抗体、配体、受体或抗原。例如,对于抗原结合分子的亲和层析纯化,可以使用具有蛋白A或蛋白G的基质。顺序蛋白A或G亲和层析和尺寸排阻层析可以用于分离抗原结合分子。抗原结合分子的纯度可以通过多种众所周知的分析方法(包括凝胶电泳和高效液相层析)中的任一者来确定。

[0706] 在某些实施方案中,通过本文描述的方法来生产或纯化的在铰链区以外的区域中具有至少一个二硫键的抗原结合分子在单独的处理步骤中进一步处理,该处理步骤使用离液变性剂,诸如十二烷基硫酸钠(SDS)、尿素或盐酸胍(GuHCl)。需要大量的离液剂来观察可察觉的解折叠。在一些实施方案中,处理步骤使用0.1M与2M之间的离液剂,其产生与使用0.1M至2M盐酸胍等效的效果。在具体实施方案中,氧化重折叠是在约1.0M盐酸胍或产生与1M盐酸胍相同或相似量的重折叠的一定量的其他离液剂的存在下实现的。在一些实施方案中,该方法使用约1.5M与0.5M之间的离液剂。使用的离液剂的量基于在所述离液剂存在下抗原结合分子的结构稳定性。需要存在足够的离液剂来扰乱抗原结合分子的结构域相互作用的局部三级结构和/或四级结构,但少于完全解折叠分子和/或各个结构域的二级结构所需的量。为了确定抗原结合分子将通过平衡变性开始解折叠的点,本领域实践人员将离液剂滴定到含有抗原结合分子的溶液中,并通过诸如圆二色性或荧光的技术来监测结构。还有其他参数可用于解折叠或稍微扰乱可代替离液剂使用的抗原结合分子的结构。温度和压力是先前用于改变抗原结合分子的结构两个基本参数并且可以在与氧化剂和/或还原剂接触时用来代替离液剂。发明人预期,本领域实践人员可以使用已证实使抗原结合分子变性或扰乱其结构的任何参数来代替离液剂。

[0707] 本公开的方法提高了“LINC比率”,即LINC形式的抗原结合分子相对于上样在基质上的抗原结合分子(即,在铰链区以外的区域中具有至少一个二硫键的具有LINC形式的抗原结合分子,以及具有非LINC形式的抗原结合分子的总和)的比例。例如,如WO2021/157679中所述,可以通过非还原SDS-PAGE将交联的LINC形式与非交联的unLINC形式(开放型)分离并比较各自的丰度比来计算LINC比率。

[0708] 在一个实施方案中,如本文所述生产的抗原结合分子的制剂可以另外进行诸如电泳和层析的技术以确定LINC比率。更具体地,在通过层析来纯化的步骤之后,本公开的方法可以包括对从纯化步骤获得的制剂中的LINC比率(即,在铰链区以外的区域中具有至少一个二硫键的抗原结合分子(LINC形式)相对于(i)具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键的抗原结合分子(LINC形式)和(ii)抗原结合分子的错误二硫键合形式和/或非二硫键合形式(unLINC形式)的总和的比例)进行定量的步骤。在某一实施方案中,本公开的方法可以包括对在铰链区以外的区域中具有至少一个二硫键的抗原结合分子(LINC形式)相对于(i)具有在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键的抗原结合分子(LINC形式)和(ii)抗原结合分子的非二硫键合形式的总和的比例进行定量的步骤。

[0709] 在一个实施方案中,对LINC比率进行定量的步骤包括电泳、层析等。在一个实施方案中,非还原SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、非还原毛细管SDS凝胶电泳(CE-SDS)等可以作为电泳的实例。此外,在一个实施方案中,疏水相互作用层析(HIC)等可以作为层析的实例。

[0710] 在一个实施方案中,在对LINC比率进行定量的步骤之前,本公开的方法可以包括将蛋白酶添加到如本文所述生产的抗原结合分子的制剂中的步骤。在一个实施方案中,本公开的蛋白酶可以为例如Igde,或优选源自无乳链球菌的Igde。Igde是识别人IgG1抗体(KSCDKT/HTCPPCP)的铰链区的上部的蛋白酶,并且是消化T与H之间的抗体的酶。这种酶可以降解抗体以生成Fab和Fc区。无乳链球菌衍生的Igde是诸如Spoerry C等人,(2016) PLoS

ONE 11(10):e0164809.Doi:10.1371/journal.pone.0164809的文献中公开的酶,并且可以通过本领域技术人员使用众所周知的技术来很容易地获得。此外,无乳链球菌衍生的IgdE可例如从Genovis Inc.以“FabALACTICA™(IgdE)”商购获得。本发明人将无乳链球菌衍生的IgdE添加到如本文所述生产的抗原结合分子的制剂中,并发现可以通过对含有IgdE的制剂进行电泳、层析等来确定制剂的LINC比率。

[0711] 添加到制剂中的蛋白酶的浓度没有特别限制,但在一个实施方案中,实例包括0.6至1.8单位-酶/ μg -蛋白质。

[0712] 在某些实施方案中,当本发明的方法包括将蛋白酶添加到如本文所述生产的抗原结合分子的制剂中的步骤时,在对LINC比率进行定量的步骤中可以使用非还原毛细管SDS凝胶电泳(CE-SDS)或疏水相互作用层析(HIC)。此外,在某些实施方案中,用于获得抗原结合分子的制剂的层析可以为膜层析。

[0713] 在一个实施方案中,在本公开的方法中,LINC比率可以如下进行计算。例如,当在定量步骤中使用非还原毛细管SDS凝胶电泳(CE-SDS)时,针对添加蛋白酶的制剂、未添加蛋白酶的制剂以及仅含有蛋白酶的样品制备电泳图。在这种情况下,LINC比率被确定为:LINC形式衍生的峰面积比从“源自添加蛋白酶的制剂的峰面积(包括unLINC形式衍生的和蛋白酶衍生的峰)”中减去“源自未添加蛋白酶的制剂的峰面积(不包括unLINC形式衍生的峰)”和“源自仅含有蛋白酶的样品的峰面积”,并且然后加上“LINC形式衍生的峰面积”所得到的值的比率。仅含有蛋白酶的样品优选为含有与添加蛋白酶的制剂相同的组分的样品,除了该样品不含有通过本公开的方法来获得的抗原结合分子的制剂之外。

[0714] 在不同的实施方案中,在本公开的方法中,LINC比率可以如下进行计算。例如,当在定量步骤中使用疏水相互作用层析(HIC)时,LINC比率由源自LINC形式的峰相对于源自LINC形式的峰与源自所有非LINC形式的峰的总和的比例确定。疏水相互作用层析(HIC)中的流动相A和流动相B可以由本领域技术人员基于常见技术知识适当地制备。此外,层析基质可以由本领域技术人员适当选择,并且例如可以使用本文中描述的基质。

[0715] 在一个实施方案中,本公开的方法可以进一步包括在添加蛋白酶后培养制剂的步骤。培养条件没有特别限制,但可以例如在pH 6至8的磷酸盐缓冲液中、例如在37°C进行孵育16至20小时,诸如18小时。

[0716] 另外,在本公开中,经过用于纯化的层析的抗原结合分子可以包含信号序列。具体地,当具有可在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成至少一个二硫键的氨基酸残基的抗原结合分子在细胞中重组表达时,有时为了促进表达和/或分泌,抗原结合分子可以具有信号序列。在一个实施方案中,当来自用于重组表达抗原结合分子的核酸序列的翻译产物包含信号序列时,本公开的方法可以包括从抗原结合分子中切割信号序列的步骤。可以在将抗原结合分子进行用于纯化的层析的步骤之前或之后、或者对通过层析来纯化的物质的LINC比率进行定量的步骤之前或之后切割信号序列。信号序列的切割可以通过本领域技术人员众所周知的方法来进行。

[0717] 在一个方面,可形成二硫键的氨基酸残基是突变、取代、引入或工程化的半胱氨酸残基。

[0718] 在一个方面,铰链区以外的区域中的至少一个二硫键形成于构成抗原结合分子的多肽之间。更具体地,在具体实施方案中,本公开中的铰链区以外的区域中的至少一个二硫

键为链间二硫键。在一些实施方案中,铰链区以外的区域中的至少一个二硫键是1、2、3、4、5或更多个链间二硫键。

[0719] 在一个方面,铰链区以外的区域中的至少一个二硫键是野生型IgG中不存在的工程化二硫键。

[0720] III. 抗原结合分子

[0721] 在一个方面,本公开的抗原结合分子包含可经由至少一个二硫键彼此连接的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域。在一个方面,在通过本公开的方法来生产或纯化的抗原结合分子中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域经由至少一个二硫键连接。在上述方面的实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域经由两个、三个、四个或更多个二硫键连接。

[0722] 在实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的至少一者本身具有与抗原结合的活性(即,单个抗原结合结构域独立地具有抗原结合活性)。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的每一者本身具有与抗原结合的活性。

[0723] 在一个方面,本公开中的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的每一者可以具有Fab、Fab'、scFab、Fv、scFv或VHH结构。

[0724] 在某一方面,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的每一者为Fab分子,并且抗原结合分子包含在第一抗原结合结构域与第二抗原结合结构域之间形成的至少一个二硫键。优选地,至少一个二硫键形成于不存在于铰链区内的氨基酸残基(半胱氨酸)之间,或者优选地形成于各抗原结合结构域的CH1区内的氨基酸残基(半胱氨酸)之间。

[0725] 在上述方面的实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域均包含Fab和铰链区。

[0726] 在某些实施方案中,在抗原结合结构域之间形成二硫键的氨基酸残基中的至少一者是不存在于野生型Fab或铰链区中的突变氨基酸残基,并且例如,该氨基酸残基是不存在于野生型Fab或铰链区中的半胱氨酸残基。这种突变的氨基酸残基可以通过例如氨基酸取代的方法来引入到野生型Fab或铰链区中。

[0727] 替代性地,在另一个实施方案中,在本公开中的抗原结合分子中,存在于野生型Fab或铰链区中并且可能涉及抗原结合结构域之间的二硫键的氨基酸残基(例如,半胱氨酸残基)可以被其他氨基酸残基取代或缺失。此类半胱氨酸残基的实例包括铰链区中根据EU编号的位置220、226和229处的半胱氨酸残基,以及CL区中位置214处的半胱氨酸残基。

[0728] 在上述方面的一个实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的至少一者包含与特定抗原结合的抗体片段。在某些实施方案中,抗体片段为Fab、Fab'、scFab、Fv、scFv或单域抗体。在某些实施方案中,第一和/或第二抗原结合结构域包含铰链区。形成二硫键的氨基酸残基分别存在于第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中,并且抗原结合结构域之间的键是通过这些氨基酸残基之间的连接来形成的。在某些实施方案中,在抗原结合结构域之间形成二硫键的至少一个氨基酸残基存在于抗体片段内。

[0729] 在一个方面,本公开中的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的每一者可以包含或不包含铰链区。在某些实施方案中,本公开中的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域可以各自包含形成F(ab')₂结构的Fab和铰链区。

[0730] 在上述方面的实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域均与相同的抗原结合。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域均与相同抗原上的相同的表位结合。在某些其他实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的每一者与相同抗原上的不同表位结合。在某些实施方案中,本公开中的抗原结合分子是靶向一种特定抗原的双互补位抗原结合分子(例如,双互补位抗体)。

[0731] 在上述方面的另一个实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的每一者与不同的抗原结合。

[0732] 在上述方面的另一个实施方案中,本公开中的抗原结合分子为钳位抗原结合分子(例如,钳位抗体)。本文中的钳位抗原结合分子意指与给定的抗原A与抗原结合分子(与抗原A结合)之间形成的抗原/抗原结合分子复合物特异性结合,并且从而提高与抗原A结合的抗原结合分子对抗原A的结合活性(或者替代性地,使由抗原A和与抗原A结合的抗原结合分子形成的抗原/抗原结合分子复合物稳定化)的抗原结合分子。例如,CD3钳位抗体与CD3与对CD3的结合能力降低的抗体(结合减弱的CD3抗体)之间形成的抗原-抗体复合物特异性结合,并从而可以提高结合减弱的CD3抗体对CD3的结合活性(或者替代性地,使由CD3和结合减弱的CD3抗体形成的抗原-抗体复合物稳定化)。在某些实施方案中,本公开中的抗原结合分子中的第一和/或第二抗原结合结构域可以是源自钳位抗原结合分子的抗原结合结构域(钳位抗原结合结构域)。

[0733] 在上述方面的实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域均具有相同的氨基酸序列。在另一个实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的每一者具有不同的氨基酸序列。

[0734] 在上述方面的另一个实施方案中,本公开中的抗原结合分子具有调节两个抗原分子之间的相互作用的活性。不受特定理论的束缚,调节相互作用的活性被认为是由本公开中的抗原结合分子将两个抗原分子保持在空间上更接近的位置并降低它们的迁移率而产生的。在某些实施方案中,与对照抗原结合分子相比,本公开中的抗原结合分子可以增强或减弱两个抗原分子之间的相互作用。对照抗原结合分子与本公开中的抗原结合分子的不同之处仅在于,对照抗原结合分子在两个抗原结合结构域之间具有少一个的二硫键。在另外的实施方案中,少一个的二硫键可以选自源自野生型Fab或铰链区中不存在的突变氨基酸残基(例如,野生型Fab或铰链区中不存在的半胱氨酸残基)的键。突变的氨基酸残基为例如人工突变、取代、引入或工程化的半胱氨酸残基。

[0735] 在一个实施方案中,抗原分子选自由以下项组成的组:属于细胞因子受体超家族的受体、G蛋白偶联受体、离子通道受体、酪氨酸激酶受体、免疫检查点受体、抗原受体、CD抗原、共刺激分子和细胞粘附分子。

[0736] 在某些实施方案中,本公开中的抗原结合分子所结合的两个抗原分子可以分别是配体及其受体。本公开中的抗原结合分子具有通过配体促进受体的激活的活性。在某些其他实施方案中,本公开中的抗原结合分子所结合的两个抗原分子可以分别是酶及其底物。本公开中的抗原结合分子具有促进酶与底物的催化反应的活性。

[0737] 此外,在某些其他实施方案中,本公开中的抗原结合分子所结合的两抗原分子中的两者可以是细胞表面上存在的抗原(例如蛋白质)。本公开中的抗原结合分子具有促进表达第一抗原的细胞与表达第二抗原的细胞之间的相互作用的活性。例如,表达第一抗原

的细胞和表达第二抗原的细胞可以分别是具有细胞毒活性的细胞及其靶细胞。本公开中的抗原结合分子促进具有细胞毒活性的细胞对靶细胞的损伤。具有细胞毒活性的细胞为例如T细胞、NK细胞、单核细胞或巨噬细胞。

[0738] 在上述方面的实施方案中,本公开中的抗原结合分子对蛋白酶切割具有抗性。在某些实施方案中,与对照抗原结合分子相比,本公开中的抗原结合分子对蛋白酶切割具有增加的抗性。在某些实施方案中,在本公开中的抗原结合分子中,与对照抗原结合分子相比,蛋白酶处理后剩余的全长分子(例如,全长IgG分子)的比例增加。在某些实施方案中,在本公开中的抗原结合分子中,与对照抗原结合分子相比,在蛋白酶处理后产生的特定片段(例如,Fab单体)的比例减少。

[0739] 在上述方面的实施方案中,当用蛋白酶处理本公开中的抗原结合分子时,抗原结合结构域或其片段的二聚体(例如,交联的Fab二聚体)被切除。在一个实施方案中,蛋白酶可以切割抗原结合分子的铰链区。

[0740] 在一个方面,本公开中的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的至少一者可以与可溶性蛋白结合。在另一个实施方案中,本公开中的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的至少一者可以与膜蛋白结合。

[0741] 本公开中的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域可以分别与第一抗原和第二抗原结合。在一些实施方案中,第一抗原和第二抗原源自人、小鼠、大鼠、猴、兔或狗。在一些实施方案中,第一抗原和第二抗原的实例包括但不限于,例如免疫细胞表面分子(例如,T细胞表面分子、NK细胞表面分子、树突状细胞表面分子、B细胞表面分子、NKT细胞表面分子、MDSC细胞表面分子和巨噬细胞表面分子),或不仅在肿瘤细胞、肿瘤血管、基质细胞等上表达而且在正常组织上表达的抗原(整合素、组织因子、VEGFR、PDGFR、EGFR、IGFR、MET趋化因子受体、硫酸乙酰肝素蛋白聚糖、CD44、纤连蛋白、DR5、TNFRSF等)、属于细胞因子受体超家族的受体、G蛋白偶联受体、离子通道受体、酪氨酸激酶受体、免疫检查点受体、抗原受体、CD抗原、共刺激分子和细胞粘附分子。

[0742] 在一些实施方案中,第一抗原和第二抗原中的任一者可以是例如在T细胞上特异性表达的分子,并且另一个抗原可以是在T细胞或任何其他免疫细胞的表面上表达的分子。在第一抗原和第二抗原的组合的另一个实施方案中,优选地,第一抗原和第二抗原中的任一者例如是在T细胞上特异性表达的分子,并且另一个抗原是在免疫细胞上表达的且与初步选择的抗原不同的分子。

[0743] 在T细胞上特异性表达的分子的具体实例包括CD3和T细胞受体。特别地,优选CD3。例如,在人CD3的情况下,本公开中的抗原结合分子所结合的CD3中的位点可以是构成人CD3的 γ 链、 δ 链或 ϵ 链序列中存在的任何表位。特别地,优选存在于人CD3复合物中的 ϵ 链的胞外区中的表位。构成CD3的 γ 链、 δ 链和 ϵ 链结构的多核苷酸序列为NM_000073.2、NM_000732.4和NM_000733.3,并且其多肽序列为NP_000064.1、NP_000723.1和NP_000724.1(RefSeq注册号)。其他抗原的实例包括Fc γ 受体、TLR、凝集素、IgA、免疫检查点分子、TNF超家族分子、TNFR超家族分子和NK受体分子。

[0744] 在一个实施方案中,第一抗原可以是在T细胞上特异性表达的分子,优选T细胞受体复合物分子诸如CD3,更优选人CD3。在另一个实施方案中,第二抗原可以是在T细胞或任何其他免疫细胞上表达的分子,优选免疫细胞上的细胞表面调节剂,更优选在T细胞上表达

的共刺激分子,并且甚至更优选“TNF超家族”或“TNF受体超家族”的蛋白质,包括但不限于人CD137(4-1BB)、CD137L、CD40、CD40L、OX40、OX40L、CD27、CD70、HVEM、LIGHT、RANK、RANKL、CD30、CD153、GITR和GITRL。在一个优选的实施方案中,第一抗原可以为CD3并且第二抗原可以为CD137。在本文中,第一抗原和第二抗原可互换定义。

[0745] 在某些实施方案中,本公开中的抗原结合分子与CD3的部分肽的全部或一部分特异性结合。在特定实施方案中,CD3为人CD3或食蟹猴CD3,最特别是人CD3。在特定实施方案中,抗原结合分子对人和食蟹猴CD3具有交叉反应性(即与其特异性结合)。在一些实施方案中,抗原结合分子能够特异性结合CD3的 ϵ 亚基,特别是SEQ ID NO:13(NP_000724.1)中示出的CD3的人CD3 ϵ 亚基(RefSeq注册号示出在括号内)。在一些实施方案中,抗原结合分子能够与在真核细胞的表面上表达的CD3 ϵ 链特异性结合。在一些实施方案中,抗原结合分子与在T细胞的表面上表达的CD3 ϵ 链结合。

[0746] 在某些实施方案中,本公开中的抗原结合分子与CD137的部分肽的全部或一部分特异性结合。本文中的术语“CD137”也称为4-1BB,是肿瘤坏死因子(TNF)受体家族的成员。属于TNF超家族或TNF受体超家族的因子的实例包括CD137、CD137L、CD40、CD40L、OX40、OX40L、CD27、CD70、HVEM、LIGHT、RANK、RANKL、CD30、CD153、GITR和GITRL。

[0747] 在某些实施方案中,所述CD137是人CD137。在一些实施方案中,本公开中的抗原结合分子的有利实例包括抗原结合分子,该抗原结合分子与选自由以下项组成的组的抗体所结合的人CD137表位相同的表位结合:

[0748] 在人CD137蛋白中,识别包含SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLG AGCSMCEQDCKQGQELTKKGC序列(SEQ ID NO:14)的区域的抗体、

[0749] 识别包含DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC序列(SEQ ID NO:15)的区域的抗体、

[0750] 识别包含LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFTRKECSSTSNAEC序列(SEQ ID NO:16)的区域的抗体,以及

[0751] 识别包含LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQIC序列(SEQ ID NO:17)的区域的抗体。

[0752] 在上述方面的实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的至少一者包含与特定抗原或其片段结合的非抗体蛋白。在某些实施方案中,非抗体蛋白是彼此特异性结合的一对配体和受体中的任一者。此类受体包括,例如属于细胞因子受体超家族的受体、G蛋白偶联受体、离子通道受体、酪氨酸激酶受体、免疫检查点受体、抗原受体、CD抗原、共刺激分子和细胞粘附分子。

[0753] 在一个方面,本公开的抗原结合分子可以进一步包含第三抗原结合结构域。在一个方面,第三抗原结合结构域可以与第一抗原结合结构域或第二抗原结合结构域中的任一者融合。

[0754] 在一个方面,第三抗原结合结构域可以为Fab或scFv;在这种情况下,第三抗原结合结构域可以在其C末端处任选地经由肽接头与第一抗原结合结构域或第二抗原结合结构域中的任一者的Fab重链(VH区)的N末端融合。

[0755] 在某些实施方案中,本公开的第一抗原结合结构域、第二抗原结合结构域和第三抗原结合结构域中的每一者可以为Fab分子;在这种情况下,第三抗原结合结构域可以在其Fab重链(CH1区)的C末端处任选地经由肽接头与第一抗原结合结构域或第二抗原结合结构

域中的任一者的Fab重链(VH区)的N末端融合。

[0756] 在一个方面,本公开的肽接头的实例可以是选自由SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的氨基酸序列组成的组的序列,但不限于此。

[0757] 在一个方面,本公开的第三抗原结合结构域可以为其中Fab轻链和Fab重链的可变区发生交换的交叉Fab分子,并且第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的每一者可以为常规Fab分子。

[0758] 在一个方面,本公开的第三抗原结合结构域可以与不同于上述第一抗原和第二抗原的第三抗原结合。与第三抗原结合的第三抗原结合结构域可以是识别任意抗原的抗原结合结构域。本公开中的与第三抗原结合的第三抗原结合结构域可以是识别在癌细胞或癌组织中特异性表达的分子的抗原结合结构域。

[0759] 在一些实施方案中,第三抗原源自人、小鼠、大鼠、猴、兔或狗。在一些实施方案中,第三抗原是在源自人、小鼠、大鼠、猴、兔或狗的细胞或器官上特异性表达的分子。第三抗原优选是不在细胞或器官上系统表达的分子。第三抗原优选为例如肿瘤细胞特异性抗原,并且还包括与细胞的恶性改变相关的表达的抗原,以及在细胞的恶性转化过程中出现在细胞表面或蛋白质分子上的异常糖链。其具体实例包括ALK受体(多效素受体)、多效素、KS1/4胰腺癌抗原、卵巢癌抗原(CA125)、前列腺酸性磷酸酯、前列腺特异性抗原(PSA)、黑色素瘤相关抗原p97、黑色素瘤抗原gp75、高分子量黑色素瘤抗原(HMW-MAA)、前列腺特异性膜抗原、癌胚抗原(CEA)、多态性上皮粘蛋白抗原、人乳脂肪球抗原、结直肠癌肿瘤相关抗原(例如,CEA、TAG-72、C017-1A、GICA 19-9、CTA-1和LEA)、伯基特(Burkitt)淋巴瘤抗原38.13、CD19、人B淋巴瘤抗原CD20、CD33、黑色素瘤特异性抗原(例如,神经节苷脂GD2、神经节苷脂GD3、神经节苷脂GM2和神经节苷脂GM3)、肿瘤特异性移植抗原(TSTA)、T抗原、病毒诱导的肿瘤抗原(例如,DNA肿瘤病毒和RNA肿瘤病毒的包膜抗原)、结肠CEA、癌胎抗原甲胎蛋白(例如,癌胎滋养层糖蛋白5T4和癌胎膀胱肿瘤抗原)、分化抗原(例如,人肺癌抗原L6和L20)、纤维肉瘤抗原、人T细胞白血病相关抗原Gp37、新生糖蛋白、鞘脂、乳腺癌抗原(例如,EGFR(上皮生长因子受体))、NY-BR-16、NY-BR-16和HER2抗原(p185HER2)、多态性上皮粘蛋白(PEM)、恶性人淋巴细胞抗原AP0-1、分化抗原(诸如在胎儿红细胞中发现的I抗原;在成人红细胞中发现的初级内胚层I抗原;在移植前胚胎或胃癌中发现的I(Ma);在乳腺上皮中发现的M18;在骨髓细胞中发现的M39、SSEA-1;在结直肠癌中发现的VEP8、VEP9、My1、VIM-D5、D156-22;在睾丸和卵巢癌中发现的TRA-1-85(血型H)、SCP-1;在结肠癌中发现的C14;在肺癌中发现的F3;在胃癌中发现的AH6;在胚胎癌细胞中发现的Y半抗原、Ley;在A431细胞中发现的TL5(血型A)、EGF受体;在胰腺癌中发现的E1系列(血型B);在胚胎癌细胞中发现的FC10.2;胃癌抗原;在腺癌中发现的C0-514(血型Lea);在腺癌中发现的NS-10;在A431细胞EGF受体中发现的C0-43(血型Leb)、G49;在结肠癌中发现的MH2(血型ALeb/Ley);在结肠癌中发现的19.9;胃癌粘蛋白;在骨髓细胞中发现的T5A7;在黑色素瘤中发现的R24;在胚胎癌细胞中发现的4.2、GD3、D1.1、OFA-1、GM2、OFA-2、GD2和M1:22:25:8;在4细胞至8细胞胚胎中发现的SSEA-3和SSEA-4)、皮肤T细胞淋巴瘤相关抗原、MART-1抗原、唾液酸化Tn(STn)抗原、结肠癌抗原NY-CO-45、肺癌抗原NY-LU-12变体A、腺癌抗原ART1、副肿瘤相关脑-睾丸-癌抗原(肿瘤神经元抗原MA2和副肿瘤神经元抗原)、神经肿瘤腹侧抗原2(NOVA2)、血细胞癌抗原基因520、肿瘤相关抗原C0-029、肿瘤相关抗原MAGE-C1(癌/睾丸抗原CT7)、MAGE-B1(MAGE-XP抗原)、MAGE-

B2 (DAM6)、MAGE-2、MAGE-4a、MAGE-4b、MAGE-X2、癌-睾丸抗原 (NY-EOS-1)、YKL-40以及这些多肽的任何片段及其修饰结构(上述修饰的磷酸基、糖链等)、EpCAM、EREG、CA19-9、CA15-3、唾液酸化SSEA-1 (SLX)、HER2、PSMA、CEA和CLEC12A。

[0760] 在一个优选的实施方案中,第三抗原为磷脂酰肌醇蛋白聚糖3 (GPC3)。在又一个实施方案中,第三抗原为DLL3 (δ样3)。在某些实施方案中,第三抗原结合结构域可以是与DLL3结合的“DLL3抗原结合结构域”。

[0761] 除非另外指明,否则如本文所用的术语“DLL3”是指来自任何脊椎动物来源的任何天然DLL3 (δ样3),该脊椎动物来源包括哺乳动物诸如灵长类动物(例如人)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)。该术语涵盖“全长”的未加工DLL3,以及通过细胞中加工产生的任何形式的DLL3。该术语还涵盖DLL3的天然存在变体,例如剪接变体或等位基因变体。示例性人DLL3的氨基酸序列被称为NCBI参考序列 (RefSeq) NM_016941.3,并且示例性食蟹猴DLL3的氨基酸序列被称为NCBI参考序列XP_005589253.1,并且示例性小鼠DLL3的氨基酸序列被称为NCBI参考序列NM_007866.2。

[0762] 人DLL3蛋白在C末端侧包含跨膜(TM)区和胞内结构域,以及在N末端侧包含DSL (Notch) 结构域。另外,DLL3具有包含六个区域(从N末端侧到C末端侧的EGF1至EGF6)的EGF结构域。

[0763] 在一些实施方案中,DLL3抗原结合结构域与DLL3的胞外结构域特异性结合。在一些实施方案中,DLL3抗原结合结构域与DLL3的胞外结构域内的表位特异性结合。在一些实施方案中,DLL3抗原结合结构域与在真核细胞的表面上表达的DLL3蛋白结合。在一些实施方案中,DLL3抗原结合结构域与在癌细胞的表面上表达的DLL3蛋白结合。

[0764] 在一些实施方案中,本公开中的DLL3抗原结合结构域与胞外结构域(ECD)(即从N末端到紧接在TM区之前的结构域)内的表位结合,但不与TM区或C末端胞内结构域结合。本公开中的DLL3抗原结合结构域可以与ECD内上述结构域/区域中的任一者内的表位结合。在优选的实施方案中,本公开中的DLL3抗原结合结构域与从EGF6到紧接TM区之前的区域内的表位结合。更具体地,本公开中的DLL3抗原结合结构域可以与人DLL3中SEQ ID NO:21中定义的区域内的表位结合。在一些实施方案中,本公开中的DLL3抗原结合结构域与人DLL3的EGF1、EGF2、EGF3、EGF4、EGF5或EGF6区或从EGF6到紧接TM区之前的区域结合,或者与人DLL3的EGF1、EGF2、EGF3、EGF4、EGF5或EGF6区或从EGF6到紧接TM区之前的区域内的表位结合。在一些实施方案中,抗原结合分子或DLL3抗原结合结构域可以源自先前报道的其中所结合的DLL3表位已经被表征的抗DLL3抗体(例如W02019131988和W02011093097)。

[0765] 在人DLL3中,上述结构域/区域具有以下氨基酸残基(参见例如<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9NYJ7>或W02013/126746):

[0766] 胞外结构域(ECD):位置1至492处的氨基酸残基;

[0767] DSL结构域:位置176至215处的氨基酸残基;

[0768] EGF结构域:位置216至465处的氨基酸残基;

[0769] EGF1区:位置216至249处的氨基酸残基;

[0770] EGF2区:位置274至310处的氨基酸残基;

[0771] EGF3区:位置312至351处的氨基酸残基;

[0772] EGF4区:位置353至389处的氨基酸残基;

- [0773] EGF5区:位置391至427处的氨基酸残基;
- [0774] EGF6区:位置429至465处的氨基酸残基;
- [0775] 从EGF6到紧接TM区之前的区域:位置429至492处的氨基酸残基;
- [0776] TM区:位置493至513处的氨基酸残基;以及
- [0777] C末端胞内结构域:位置516至618(或一些同工型中的516至587)处的氨基酸残基。上述氨基酸位置也指SEQ ID NO:22中示出的氨基酸序列中的氨基酸位置。
- [0778] 因此,本公开中的抗原结合分子可以与人DLL3中的具有上述位置处的氨基酸残基的上述区域/结构域结合。即,本公开中的抗原结合分子可以与人DLL3中的具有上述位置处的氨基酸残基的上述区域/结构域内的表位结合。
- [0779] 本公开中使用的DLL3蛋白不受其来源的限制,并且优选地为人或食蟹猴DLL3蛋白。
- [0780] 在一些实施方案中,对于DLL3蛋白,可以使用DLL3 ECD片段蛋白(或ECD变体)。根据截短的位点,片段/变体可以从N末端侧到C末端侧包含DSL结构域至EGF6、EGF1至EGF6、EGF2至EGF6、EGF3至EGF6、EGF4至EGF6、EGF5和EGF6、或EGF6。片段/变体可以进一步包含从紧接EGF6区之后跨越到紧接TM区之前的区域。可以使用本领域众所周知的技术将Flag标签附着到片段/变体的C末端。
- [0781] 本公开中的CD3、CD137或DLL3蛋白可以是具有上述序列的蛋白质,或者可以是具有通过一个或多个氨基酸的修饰而源自上述序列的序列的修饰蛋白质。具有通过一个或多个氨基酸的修饰而源自上述序列的序列的修饰蛋白质的实例可以包括与上述氨基酸序列具有70%或更多、优选80%或更多、更优选90%或更多、甚至更优选95%或更多的同一性的多肽。替代性地,可以使用这些CD3、CD137或DLL3蛋白的部分肽。
- [0782] 在某些实施方案中,本文描述的抗原结合分子与在来自不同物种的CD3、CD137或DLL3中保守的CD3、CD137或DLL3的表位结合。在某些实施方案中,本公开中的抗原结合分子为三特异性抗原结合分子,即,所述三特异性抗原结合分子能够与三种不同的抗原特异性结合,能够与CD3或CD137之一结合,但不同时与两种抗原结合,并且能够与DLL3特异性结合。
- [0783] 在一方面,第三抗原结合结构域为常规Fab分子,并且
- [0784] (a) 第一多肽包含(从N末端到C末端)第三抗原结合结构域的VH、重链恒定区(CH1);以及第一抗原结合结构域的VH、重链恒定区(CH1);以及任选地铰链区和/或Fc区(CH2和CH3);
- [0785] (b) 第二多肽包含(从N末端到C末端)第三抗原结合结构域的VL和轻链恒定区(CL);
- [0786] (c) 第三多肽包含(从N末端到C末端)第二抗原结合结构域的VH、重链恒定区(CH1);以及任选地铰链区和/或Fc区(CH2和CH3);
- [0787] (d) 第四多肽包含(从N末端到C末端)第二抗原结合结构域的VL和轻链恒定区(CL);以及
- [0788] (e) 第五多肽包含(从N末端到C末端)第一抗原结合结构域的VL和轻链恒定区(CL)。
- [0789] 在一方面,第三抗原结合结构域为VH/VL交叉Fab(其中Fab轻链和Fab重链的可变

区发生交换),并且

[0790] (a) 第一多肽包含(从N末端到C末端)第三抗原结合结构域的VL、重链恒定区(CH1);以及第一抗原结合结构域的VH、重链恒定区(CH1);以及任选地铰链区和/或Fc区(CH2和CH3);

[0791] (b) 第二多肽包含(从N末端到C末端)第三抗原结合结构域的VH和轻链恒定区(CL);

[0792] (c) 第三多肽包含(从N末端到C末端)第二抗原结合结构域的VH、重链恒定区(CH1);以及任选地铰链区和/或Fc区(CH2和CH3);

[0793] (d) 第四多肽包含(从N末端到C末端)第二抗原结合结构域的VL和轻链恒定区(CL);以及

[0794] (e) 第五多肽包含(从N末端到C末端)第一抗原结合结构域的VL和轻链恒定区(CL)。

[0795] 在一个方面,本公开中的抗原结合分子可以进一步包含Fc区。在一方面,Fc区由能够稳定缔合的第一Fc区亚基和第二Fc区亚基组成。

[0796] 在一个方面,在本公开中的抗原结合分子中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的每一者为Fab,其中第一抗原结合结构域在Fab重链的C末端处与Fc区的第一或第二亚基的N末端融合,并且第二抗原结合结构域在Fab重链的C末端处与Fc区的剩余亚基的N末端融合。

[0797] 在一方面,本公开中的Fc区可以源自人。在一些实施方案中,本公开中的Fc区可以为IgG Fc区,优选人IgG Fc区,更优选人IgG1 Fc区。

[0798] 在某些实施方案中,抗原结合分子的Fc区由能够稳定缔合的第一Fc区亚基和第二Fc区亚基组成,并且其中与天然人IgG1 Fc区相比,Fc区表现出对人Fc γ 受体的结合亲和力降低。

[0799] 在特定实施方案中,本文描述的抗原结合分子的Fc区包含促进Fc区的第一亚基和第二亚基的缔合的修饰。所述修饰为所谓的“杵臼结构”修饰,该修饰包含Fc区的两个亚基中的一个中的“杵”修饰以及Fc区的两个亚基中的另一个中的“臼”修饰,如下更具体地描述。

[0800] 杵臼结构技术描述于例如US 5,731,168;US 7,695,936;Ridgway等人,Prot Eng 9,617-621(1996)和Carter,J Immunol Meth 248,7-15(2001)中。通常,该方法涉及在第一多肽的界面处引入突起(“杵”)并在第二多肽的界面中引入相应的空腔(“臼”),使得该突起可以定位在该空腔中,以便促进异二聚体的形成并阻碍同二聚体的形成。突起是通过用较大侧链(例如酪氨酸或色氨酸)取代来自第一多肽的界面的小氨基酸侧链而构建的。具有与突起相同或相似大小的补偿空腔是通过用较小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)取代大氨基酸侧链而在第二多肽的界面中创建的。

[0801] 因此,在特定实施方案中,在抗原结合分子的Fc结构域的所述第一亚基的所述CH3结构域中,氨基酸残基被具有较大侧链体积的氨基酸残基取代,由此在所述第一亚基的所述CH3结构域内产生突起,所述突起可定位在所述第二亚基的所述CH3结构域内的空腔中,并且在所述Fc结构域的所述第二亚基的所述CH3结构域中,氨基酸残基被具有较小侧链体积的氨基酸残基取代,由此在所述第二亚基的所述CH3结构域内产生空腔,所述第一亚基的

所述CH3结构域内的所述突起可定位在所述空腔内。

[0802] 突起和空腔可以通过改变编码多肽的核酸来制备,例如通过位点特异性诱变或通过肽合成。

[0803] 在具体的实施方案中,在Fc结构域的第一亚基的CH3结构域中,位置366处的苏氨酸残基被色氨酸残基替代(T366W),而在Fc结构域的第二亚基的CH3结构域中,位置407处的酪氨酸残基被缬氨酸残基替代(Y407V)。在一个实施方案中,另外在Fc结构域的第二亚基中,位置366处的苏氨酸残基被丝氨酸残基替代(T366S),并且在位置368处的亮氨酸残基被丙氨酸残基替代(L368A)。

[0804] 在又另外的实施方案中,另外在Fc结构域的第一亚基中,位置354处的丝氨酸残基被半胱氨酸残基替代(S354C),并且另外在Fc结构域的第二亚基中,位置349处的酪氨酸残基被半胱氨酸残基替代(Y349C)。引入这两个半胱氨酸残基导致在Fc结构域的两个亚基之间形成二硫桥,从而进一步稳定二聚体(Carter, JImmunolMethods 248,7-15(2001))。

[0805] 在具体实施方案中,在由能够稳定缔合并且与天然人IgG1 Fc结构域相比,对人Fc- γ 受体表现出结合亲和力降低的第一Fc区亚基和第二Fc区亚基组成的Fc结构域中,第一Fc区亚基选自以下项组成的组:

[0806] (a1)Fc区多肽,其包含突变L234A、L235A;

[0807] (a2)Fc区多肽,其包含突变L234A、L235A、N297A;以及

[0808] (a3)Fc区多肽,其包含突变L234A、L235A、N297A、S354C、T366W;并且

[0809] 第二Fc区多肽选自以下项组成的组:

[0810] (a4)Fc区多肽,其包含突变L234A、L235A;

[0811] (a5)Fc区多肽,其包含突变L234A、L235A、N297A;以及

[0812] (a6)Fc区多肽,其包含突变L234A、L235A、N297A、Y349C、T366S、L368A、Y407V(氨基酸位置使用EU索引编号来编号)。

[0813] 在某些实施方案中,与天然IgG的Fc区相比,本文描述的抗原结合分子的Fc区在酸性pH条件(例如,pH 5.8)下表现出增强的FcRn结合活性。这样的Fc结构域包含:位置434处的Ala;位置438处的Glu、Arg、Ser或Lys;以及位置440处的Glu、Asp或Gln,根据EU编号。

[0814] 在一些实施方案中,Fc结构域包含:位置434处的Ala;位置438处的Arg或Lys;以及位置440处的Glu或Asp,根据EU编号。

[0815] 在一些实施方案中,Fc结构域进一步包含:位置428处的Ile或Leu;和/或位置436处的Ile、Leu、Val、Thr或Phe,根据EU编号。

[0816] 在实施方案中,Fc结构域包含选自以下项组成的组的氨基酸取代的组合:

[0817] (a)N434A/Q438R/S440E;

[0818] (b)N434A/Q438R/S440D;

[0819] (c)N434A/Q438K/S440E;

[0820] (d)N434A/Q438K/S440D;

[0821] (e)N434A/Y436T/Q438R/S440E;

[0822] (f)N434A/Y436T/Q438R/S440D;

[0823] (g)N434A/Y436T/Q438K/S440E;

[0824] (h)N434A/Y436T/Q438K/S440D;

- [0825] (i) N434A/Y436V/Q438R/S440E;
[0826] (j) N434A/Y436V/Q438R/S440D;
[0827] (k) N434A/Y436V/Q438K/S440E;
[0828] (l) N434A/Y436V/Q438K/S440D;
[0829] (m) N434A/R435H/F436T/Q438R/S440E;
[0830] (n) N434A/R435H/F436T/Q438R/S440D;
[0831] (o) N434A/R435H/F436T/Q438K/S440E;
[0832] (p) N434A/R435H/F436T/Q438K/S440D;
[0833] (q) N434A/R435H/F436V/Q438R/S440E;
[0834] (r) N434A/R435H/F436V/Q438R/S440D;
[0835] (s) N434A/R435H/F436V/Q438K/S440E;
[0836] (t) N434A/R435H/F436V/Q438K/S440D;
[0837] (u) M428L/N434A/Q438R/S440E;
[0838] (v) M428L/N434A/Q438R/S440D;
[0839] (w) M428L/N434A/Q438K/S440E;
[0840] (x) M428L/N434A/Q438K/S440D;
[0841] (y) M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E;
[0842] (z) M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440D;
[0843] (aa) M428L/N434A/Y436T/Q438K/S440E;
[0844] (ab) M428L/N434A/Y436T/Q438K/S440D;
[0845] (ac) M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440E;
[0846] (ad) M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440D;
[0847] (ae) M428L/N434A/Y436V/Q438K/S440E;
[0848] (af) M428L/N434A/Y436V/Q438K/S440D;
[0849] (ag) L235R/G236R/S239K/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E; 以及
[0850] (ah) L235R/G236R/A327G/A330S/P331S/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E, 根据 EU 编号。

[0851] 在若干个实施方案中, 抗原结合分子的Fc区包含M428L/N434A/Q438R/S440E的氨基酸取代的组合。

[0852] 在一个方面, 本公开的Fc区可包含促进Fc区的多聚化的一个或多个氨基酸取代的组合。促进多聚化的氨基酸取代的实例包括选自由以下项组成的组的至少一个位点处的氨基酸取代: 根据EU编号的位置247、248、253、254、310、311、338、345、356、359、382、385、386、430、433、434、436、437、438、439、440和447 (例如, 参见W02016/164480)。在具体实施方案中, 多聚体的实例包括但不限于二聚体、三聚体和四聚体。

[0853] 在一个方面, 本公开的抗原结合分子可以在其铰链区中具有由半胱氨酸残基中的至少一者的取代产生的氨基酸残基。在一些实施方案中, 半胱氨酸残基可以存在于根据铰链区的EU编号的位置226和/或229处。

[0854] 在实施方案中, Fc区包含以下项中的任一者:

[0855] (a) 包含SEQ ID NO: 23中示出的氨基酸序列的第一Fc亚基以及包含SEQ ID NO: 24

中示出的氨基酸序列的第二Fc亚基；

[0856] (b) 包含SEQ ID NO:25中示出的氨基酸序列的第一Fc亚基以及包含SEQ ID NO:26中示出的氨基酸序列的第二Fc亚基；或

[0857] (c) 包含SEQ ID NO:58中示出的氨基酸序列的第一Fc区亚基以及包含SEQ ID NO:59中示出的氨基酸序列的第二Fc区亚基；

[0858] 在一个方面,本公开的抗原结合分子为多特异性抗原结合分子。在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子为双特异性抗原结合分子或三特异性抗原结合分子。

[0859] 在一个方面,本公开的抗原结合分子为抗体。在具体实施方案中,本公开的抗体为IgG抗体,优选IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。

[0860] IV. 二硫键

[0861] 在本公开中,铰链区以外的区域中的至少一个二硫键可以用缩写术语“LINC”来描述。使用该缩写,在一些实施方案中,本公开中的抗原结合分子可以表示为例如“双/LINC”、“DLL3-双/LINC”、“配对半胱氨酸形式”等。第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域未经由至少一个二硫键连接/尚未连接的抗原结合分子可以用缩写术语“unLINC”或“具有未配对半胱氨酸的双-LINC-Ig”等来描述。

[0862] 在本发明的一个方面,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的每一者包含在铰链区以外的区域中的至少一个半胱氨酸残基(通过突变、取代或插入)。在本公开中的“LINC”抗原结合分子中,至少一个半胱氨酸残基在第一抗原结合结构域与第二抗原结合结构域之间形成至少一个二硫键。

[0863] 在上述方面的实施方案中,连接第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的至少一个键可以将两个抗原结合结构域(即,如上所述的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域)保持在空间上接近的位置。凭借第一抗原结合结构域与第二抗原结合结构域之间经由二硫键的连接,本公开中的抗原结合分子能够将两个抗原结合结构域保持在比对照抗原结合分子更接近的位置,所述对照抗原结合分子与本公开中的抗原结合分子的不同之处仅在于对照抗原结合分子没有两个抗原结合结构域之间引入额外的键。在一些实施方案中,术语“空间上接近的位置”或“更接近的位置”包括如上所述的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域保持缩短的距离和/或降低的灵活性的含义。

[0864] 由此,本公开中的抗原结合分子的两个抗原结合结构域(即,如上所述的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域)可以与在相同的单一细胞上表达的抗原结合。换言之,本公开中的抗原结合分子的相应的两个抗原结合结构域(即,如上所述的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域)不与在不同细胞上表达的抗原结合而引起不同细胞的交联。本公开中的抗原结合分子的此类抗原结合方式可以称为“顺式结合”,而其中抗原结合分子的相应的两个抗原结合结构域与在不同细胞上表达的抗原结合,从而引起不同细胞交联的抗原结合分子的抗原结合方式可以称为“反式结合”。在一些实施方案中,本公开中的抗原结合分子主要以“顺式结合”方式与在相同的单一细胞上表达的抗原结合。

[0865] 在上述方面的实施方案中,凭借如上所述第一抗原结合结构域与第二抗原结合结构域之间经由二硫键的二硫键联,本公开中的抗原结合分子能够减少和/或防止免疫细胞(例如,T细胞、NK细胞、DC细胞等)的不需要的交联和激活。即,在一些实施方案中,本公开中的抗原结合分子的第一抗原结合结构域与在免疫细胞(诸如T细胞)上表达的任何信号传导

分子(例如,第一抗原)结合,并且本公开中的抗原结合分子的第二抗原结合结构域也与在免疫细胞(诸如T细胞)上表达的任何信号传导分子(例如,第一抗原或不同于第一抗原的第二抗原)结合。因此,本公开中的抗原结合分子的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域可以与在相同的单一免疫细胞(诸如T细胞)上表达的第一或第二信号传导分子中的任一者结合(即顺式结合方式),或与在不同的免疫细胞(诸如T细胞)上表达的第一或第二信号传导分子中的任一者结合(即反式结合方式)。当第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域以反式结合方式与在不同的免疫细胞(诸如T细胞)上表达的信号传导分子结合时,那些不同的免疫细胞(诸如T细胞)交联,并且在某些情况下,免疫细胞(诸如T细胞)的此类交联可能导致免疫细胞(诸如T细胞)的不需要的激活。

[0866] 另一方面,在本公开中的抗原结合分子的另一个实施方案的情况下,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域均可以“顺式结合”方式与在相同的单一免疫细胞(诸如T细胞)上表达的信号传导分子结合,从而可以减少不同的免疫细胞(诸如T细胞)经由抗原结合分子的交联,以避免免疫细胞的不需要的激活。

[0867] 在上述方面的实施方案中,连接第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的至少一个键可以通过将第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中存在与相同位置的氨基酸残基彼此连接而形成,或者可以通过将存在于各自不同位置的氨基酸残基彼此连接而形成。

[0868] 抗原结合结构域中的氨基酸残基的位置可以根据描述于Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991中的Kabat编号或EU编号系统(也称为EU索引)来显示。例如,如果涉及第一抗原结合结构域与第二抗原结合结构域之间的键的氨基酸残基存在于抗原结合结构域中对应的相同位置处,则这些氨基酸残基的位置可以根据Kabat编号或EU编号系统表示为相同的数字。替代性地,如果涉及第一抗原结合结构域与第二抗原结合结构域之间的键的氨基酸残基存在于抗原结合结构域中不对应的不同位置处,则这些氨基酸残基的位置可以根据Kabat编号或EU编号系统表示为不同的数字。

[0869] 抗原结合结构域之间的二硫键来源的氨基酸残基分别存在于第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中,并且抗原结合结构域之间的键是通过连接这些氨基酸残基来形成的。在上述方面的实施方案中,抗原结合结构域之间的二硫键来源的氨基酸残基中的至少一者是人工突变、取代、引入或工程化的突变氨基酸残基,例如,所述氨基酸残基是人工引入的半胱氨酸残基。这种突变的氨基酸残基可以通过例如氨基酸取代的方法来引入到野生型抗原结合结构域中。在一些实施方案中,至少一个二硫键形成于第一抗原结合结构域的重链中的氨基酸残基与第二抗原结合结构域的重链中的氨基酸残基之间,或形成于第一抗原结合结构域的轻链中的氨基酸残基与第二抗原结合结构域的轻链中的氨基酸残基之间。在另外的实施方案中,所述二硫键形成于第一抗原结合结构域的CH1区、CL区、VH区、VL区和VHH区与第二抗原结合结构域的CH1区、CL区、VH区、VL区和VHH区的任何组合中的氨基酸残基之间。

[0870] 在一方面,至少一个二硫键形成于第一抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基与第二抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基之间。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的氨基酸残基各自存在于CH1区中根据EU编号的位置119至

123、131至140、148至150、155至167、174至178、188至197、201至214、以及218至219中的任一者处。在某些实施方案中,氨基酸残基存在于选自以下项组成的组的位置处:CH1区中根据EU编号的位置119、122、123、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、148、150、155、156、157、159、160、161、162、163、164、165、167、174、176、177、178、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、201、203、205、206、207、208、211、212、213、214、218和219。在某些实施方案中,氨基酸残基存在于CH1区中根据EU编号的位置134、135、136、137、191、192、193、194、195或196处。在某些实施方案中,氨基酸残基存在于CH1区中根据EU编号的位置135、136或191处。

[0871] 在上述方面的实施方案中,至少一个二硫键形成于第一抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基与第二抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基之间。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的氨基酸残基各自独立地选自以下项组成的组:根据EU编号的位置119、120、121、122和123。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的氨基酸残基各自独立地选自以下项组成的组:根据EU编号的位置131、132、133、134、135、136、137、138、139和140。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的氨基酸残基各自独立地选自以下项组成的组:根据EU编号的位置148、149和150。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的氨基酸残基各自独立地选自以下项组成的组:根据EU编号的位置155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166和167。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的氨基酸残基各自独立地选自以下项组成的组:根据EU编号的位置174、175、176、177和178。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的氨基酸残基各自独立地选自以下项组成的组:根据EU编号的位置188、189、190、191、192、193、194、195、196和197。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的氨基酸残基各自独立地选自以下项组成的组:根据EU编号的位置201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213和214。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的氨基酸残基各自独立地选自以下项组成的组:根据EU编号的位置218和219。

[0872] 在上述方面的实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中形成二硫键的相应的氨基酸残基的位置差异(即,之间的距离)为三个氨基酸或更少(即,三个氨基酸、两个氨基酸或一个氨基酸)。这意味着,当根据EU编号对第一抗原结合结构域的CH1区中形成二硫键的氨基酸残基的位置和第二抗原结合结构域的CH1区中形成二硫键的氨基酸残基的位置进行比较时,其差异(即距离)为三个氨基酸或更少。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域与第二抗原结合结构域之间的至少一个二硫键形成于第一抗原结合结构域的CH1区中根据EU编号的位置135处的氨基酸残基与第二抗原结合结构域的CH1区中根据EU编号的位置132至138中的任一者处的氨基酸残基之间。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域与第二抗原结合结构域之间的至少一个二硫键形成于第一抗原结合结构域的CH1区中根据EU编号的位置136处的氨基酸残基与第二抗原结合结构域的CH1区中根据EU编号的位置133至139中的任一者处的氨基酸残基之间。

[0873] 在某些实施方案中,第一抗原结合结构域与第二抗原结合结构域之间的至少一个二硫键形成于第一抗原结合结构域的CH1区中根据EU编号的位置191处的氨基酸残基与第

二抗原结合结构域的CH1区中根据EU编号的位置188至194中的任一者处的氨基酸残基之间。在示例性实施方案中,第一抗原结合结构域与第二抗原结合结构域之间的至少一个二硫键形成于两个抗原结合结构域的CH1区中根据EU编号的位置135处的氨基酸残基之间。在示例性实施方案中,第一抗原结合结构域与第二抗原结合结构域之间的至少一个二硫键形成于两个抗原结合结构域的CH1区中根据EU编号的位置136处的氨基酸残基之间。在示例性实施方案中,第一抗原结合结构域与第二抗原结合结构域之间的至少一个二硫键形成于两个抗原结合结构域的CH1区中根据EU编号的位置191处的氨基酸残基之间。

[0874] 在一些实施方案中,本公开中的抗原结合分子包含第一抗原结合结构域与第二抗原结合结构域之间的一个、两个或更多个额外的二硫键。额外的一个、两个或更多个二硫键,经由第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的相应的CH1区中的每一者中根据EU编号的以下位置处的氨基酸残基,形成于第一抗原结合结构域与第二抗原结合结构域之间:

[0875] (a) 两个抗原结合结构域中的每一者中的131至138、194和195的任何位置处的氨基酸残基之间;

[0876] (b) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置131处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置194处的氨基酸残基之间;

[0877] (c) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置132处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置194处的氨基酸残基之间;

[0878] (d) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置133处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置194处的氨基酸残基之间;

[0879] (e) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置134处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置194处的氨基酸残基之间;

[0880] (f) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置135处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置194处的氨基酸残基之间;

[0881] (g) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置136处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置194处的氨基酸残基之间;

[0882] (h) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置137处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置194处的氨基酸残基之间;

[0883] (i) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置138处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置194处的氨基酸残基之间;

[0884] (j) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置131处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置195处的氨基酸残基之间;

[0885] (k) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置132处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置195处的氨基酸残基之间;

[0886] (l) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置133处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置195处的氨基酸残基之间;

[0887] (m) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置134处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置195处的氨基酸残基之间;

[0888] (n) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置135处的氨基酸残基之间、以及两个

抗原结合结构域中的每一者中的位置195处的氨基酸残基之间；

[0889] (o) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置136处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置195处的氨基酸残基之间；

[0890] (p) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置137处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置195处的氨基酸残基之间；以及

[0891] (q) 两个抗原结合结构域中的每一者中的位置138处的氨基酸残基之间、以及两个抗原结合结构域中的每一者中的位置195处的氨基酸残基之间。

[0892] 在上述方面的一些实施方案中，第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的任一者在相应的CH1区中的位置136至138(根据EU编号)处包含一个、两个或更多个带电氨基酸残基；并且第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的另一个抗原结合结构域在相应的CH1区中的位置193至195(根据EU编号)处包含一个、两个或更多个带相反电荷的氨基酸残基。

[0893] 在上述方面的一些实施方案中，第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的任一者在相应的CH1区中的位置136至138(根据EU编号)处包含一个、两个或更多个带正电荷的氨基酸残基；并且第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的另一个抗原结合结构域在相应的CH1区中的位置193至195(根据EU编号)处包含一个、两个或更多个带负电荷的氨基酸残基。

[0894] 在上述方面的一些实施方案中，第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的任一者在相应的CH1区中的位置136至138(根据EU编号)处包含一个、两个或更多个带负电荷的氨基酸残基；并且第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的另一个抗原结合结构域在相应的CH1区中的位置193至195(根据EU编号)处包含一个、两个或更多个带正电荷的氨基酸残基。

[0895] 在上述方面的一些实施方案中，第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的任一者在相应的CH1区(根据EU编号)中包含以下氨基酸残基中的一个、两个或更多个：

[0896] (a) 位置136处为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)的氨基酸残基；

[0897] (b) 位置137处为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)的氨基酸残基；

[0898] (c) 位置138处为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)的氨基酸残基；并且

[0899] 第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的另一个抗原结合结构域在相应的CH1区(根据EU编号)中包含以下氨基酸残基中的一个、两个或更多个：

[0900] (d) 位置193处为赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)的氨基酸残基；

[0901] (e) 位置194处为赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)的氨基酸残基；以及

[0902] (f) 位置195处为赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)的氨基酸残基。

[0903] 在上述方面的一些实施方案中，第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的任一者在相应的CH1区(根据EU编号)中包含以下氨基酸残基中的一个或多个：

[0904] (a) 位置136处为赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)的氨基酸残基；

[0905] (b) 位置137处为赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)的氨基酸残基；

[0906] (c) 位置138处为赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)的氨基酸残基；并且

[0907] 第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的另一个抗原结合结构域在相应的CH1区(根据EU编号)中包含以下氨基酸残基中的一个或多个：

- [0908] (d) 位置193处为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)的氨基酸残基;
- [0909] (e) 位置194处为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)的氨基酸残基;以及
- [0910] (f) 位置195处为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)的氨基酸残基。
- [0911] 在某些实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的每一者包含表1、表2或表3中列出的相应的CH1区(根据EU编号)中的特定电荷突变的组合中的任一者。
- [0912] [表1]

[0913]

电荷突变 (EU 编号)
S136K/G137K/G138K/L193D/G194D/T195D
S136K/G137K/G138K/L193E/G194E/T195E
S136R/G137R/G138R/L193D/G194D/T195D
S136R/G137R/G138R/L193E/G194E/T195E
G137K/G138K/L193D/G194D/T195D
S136K/G138K/L193D/G194D/T195D
S136K/G137K/L193D/G194D/T195D
S136K/G137K/G138K/G194D/T195D
S136K/G137K/G138K/L193D/T195D
S136K/G137K/G138K/L193D/G194D
G137K/G138K/L193E/G194E/T195E
S136K/G138K/L193E/G194E/T195E
S136K/G137K/L193E/G194E/T195E
S136K/G137K/G138K/G194E/T195E
S136K/G137K/G138K/L193E/T195E
S136K/G137K/G138K/L193E/G194E
G137R/G138R/L193D/G194D/T195D
S136R/G138R/L193D/G194D/T195D
S136R/G137R/L193D/G194D/T195D
S136R/G137R/G138R/G194D/T195D
S136R/G137R/G138R/L193D/T195D
S136R/G137R/G138R/L193D/G194D
S136K/L193D/G194D/T195D
G137K/L193D/G194D/T195D
G138K/L193D/G194D/T195D
S136K/L193E/G194E/T195E
G137K/L193E/G194E/T195E
G138K/L193E/G194E/T195E
S136R/L193D/G194D/T195D

[0914]

G137R/L193D/G194D/T195D
G138R/L193D/G194D/T195D
S136R/L193E/G194E/T195E
G137R/L193E/G194E/T195E
G138R/L193E/G194E/T195E
G138K/T195D
G138K/T195E
G138R/T195D
G138R/T195E
G138D/T195K
G138D/T195R
G138E/T195K
G138E/T195R
G138K/G194D
G138K/G194E
G138R/G194D
G138R/G194E
G138D/G194K
G138D/G194R
G138E/G194K
G138E/G194R
G137K/T195D
G137K/T195E
G137R/T195D
G137R/T195E
G137D/T195K
G137D/T195R
G137E/T195K
G137E/T195R
G137K/G194D
G137K/G194E
G137R/G194D
G137R/G194E

[0915]

G137D/G194K
G137D/G194R
G137E/G194K
G137E/G194R
G137K/G138K/G194E/T195E
G137K/G138K/L193E/T195E
S136K/G138K/G194E/T195E
S136K/G138K/L193E/T195E
S136K/G137K/G194E/T195E
S136K/G137K/L193E/T195E
S136K/G194E/T195E
S136K/L193E/T195E
G137K/G194E/T195E
G137K/L193E/T195E
G138K/G194E/T195E
G138K/L193E/T195E
G137R/G138R/G194D/T195D
G137R/G138R/L193D/T195D
S136R/G138R/G194D/T195D
S136R/G138R/L193D/T195D
S136R/G137R/G194D/T195D
S136R/G137R/L193D/T195D
S136R/G194D/T195D
S136R/L193D/T195D
G137R/G194D/T195D
G137R/L193D/T195D
G138R/G194D/T195D
G138R/L193D/T195D
S136K/T195D
S136K/T195E
S136R/T195D
S136R/T195E
S136D/T195K

[0916]

S136D/T195R
S136E/T195K
S136E/T195R
S136K/G194D
S136K/G194E
S136R/G194D
S136R/G194E
S136D/G194K
S136D/G194R
S136E/G194K
S136E/G194R

[0917] [表2]

[0918]

电荷突变 (EU 编号)
G137K/G138K/L193E
G137K/G138K/G194E
G137K/G138K/T195E
S136K/G138K/L193E
S136K/G138K/G194E
S136K/G138K/T195E
S136K/G137K/L193E
S136K/G137K/G194E
S136K/G137K/T195E
G137R/G138R/L193D
G137R/G138R/G194D
G137R/G138R/T195D
S136R/G138R/L193D
S136R/G138R/G194D
S136R/G138R/T195D
S136R/G137R/L193D
S136R/G137R/G194D
S136R/G137R/T195D
G137K/G138K/L193D
G137K/G138K/G194D
G137K/G138K/T195D
S136K/G138K/L193D
S136K/G138K/G194D
S136K/G138K/T195D
S136K/G137K/L193D
S136K/G137K/G194D
S136K/G137K/T195D

[0919]

G137R/G138R/L193E
G137R/G138R/G194E
G137R/G138R/T195E
S136R/G138R/L193E
S136R/G138R/G194E
S136R/G138R/T195E
S136R/G137R/L193E
S136R/G137R/G194E
S136R/G137R/T195E
S136K/L193D
S136K/L193E
S136R/L193D
S136R/L193E
G137K/L193D
G137K/L193E
G137R/L193D
G137R/L193E
G138K/L193D
G138K/L193E
G138R/L193D
G138R/L193E

[0920] [表3]

[0921]

电荷突变 (EU 编号)
G137R/G138R/L193D
G137R/G138R/T195D
S136R/G138R/L193D
S136R/G138R/T195D
S136R/G137R/L193D
S136R/G137R/T195D
G137R/G138R/L193E
G137R/G138R/T195E
S136R/G138R/L193E
S136R/G138R/T195E
S136R/G137R/L193E
S136R/G137R/T195E

[0922] 在上述方面的一些实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的任一者在各自的CH1区中的位置136至138(根据EU编号)处包含一个、两个或更多个疏水氨基酸残基;并且第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的另一个抗原结合结构域在各自的CH1区中的位置193至195(根据EU编号)处包含一个、两个或更多个疏水氨基酸残基。

[0923] 在上述方面的一些实施方案中,疏水氨基酸残基为丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、苯丙氨酸(Phe)和/或色氨酸(Trp)。

[0924] 在某些实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的每一者包含表4中列出的相应的CH1区(根据EU编号)中的疏水氨基酸突变的组合中的任一者。

[0925] [表4]

[0926]

疏水突变 (EU 编号)
S136W/G137W/G138W/L193W/G194W/T195W
S136L/G137L/G138L/G194L/T195L
S136V/G137V/G138V/L193V/G194V/T195V
S136A/G137A/G138A/L193A/G194A/T195A
S136V/G137V/G138V/L193W/G194W/T195W
S136W/G137W/G138W/L193V/G194V/T195V
S136V/G137V/G138V/G194L/T195L
S136L/G137L/G138L/L193V/G194V/T195V
G137V/G138V/L193V/G194V/T195V
S136V/G138V/L193V/G194V/T195V
S136V/G137V/L193V/G194V/T195V
S136V/G137V/G138V/G194V/T195V
S136V/G137V/G138V/L193V/T195V
S136V/G137V/G138V/L193V/G194V
S136A/G137A/G138A/L193W/G194W/T195W
S136A/G137A/G138A/G194L/T195L
S136A/G137A/G138A/L193V/G194V/T195V
S136W/G137W/G138W/L193A/G194A/T195A
G137W/G138W/L193A/G194A/T195A
S136W/G138W/L193A/G194A/T195A
S136W/G137W/L193A/G194A/T195A
S136W/L193A/G194A/T195A
G137W/L193A/G194A/T195A
G138W/L193A/G194A/T195A
S136L/G137L/G138L/L193A/G194A/T195A
S136V/G137V/G138V/L193A/G194A/T195A
S136V/L193V/G194V/T195V
G137V/L193V/G194V/T195V
G138V/L193V/G194V/T195V

[0927]

S136W/L193S/G194V/T195A
G137W/L193S/G194V/T195A
G138W/L193S/G194V/T195A
G137V/G138A/L193W
G137V/G138A/G194W
G137V/G138A/T195W

[0928] 在上述方面的一些实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的任一者在各自的CH1区中的位置136至138(根据EU编号)处包含一个“杵”氨基酸残基;并且第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的另一个抗原结合结构域在各自的CH1区中的位置193至195(根据EU编号)处包含一个、两个或更多个“臼”氨基酸残基。

[0929] 在上述方面的一些实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的任一者在各自的CH1区中的位置136至138(根据EU编号)处包含一个、两个或更多个“臼”氨基酸残基;并且第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的另一个抗原结合结构域在各自的CH1区中的位置193至195(根据EU编号)处包含一个“杵”氨基酸残基。

[0930] 在一些实施方案中,所述“杵”氨基酸残基选自由色氨酸(Trp)和苯丙氨酸(Phe)组成的组;并且所述“臼”氨基酸残基选自由丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、苏氨酸(Thr)和丝氨酸(Ser)组成的组。

[0931] 在上述方面的一些实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的任一者在相应的CH1区中的位置136至138(根据EU编号)处包含一个、两个或更多个芳香族氨基酸残基;并且第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的另一个抗原结合结构域在相应的CH1区中的位置193至195(根据EU编号)处包含一个、两个或更多个带正电荷的氨基酸残基。

[0932] 在上述方面的一些实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的任一者在相应的CH1区中的位置136至138(根据EU编号)处包含一个、两个或更多个带正电荷的氨基酸残基;并且第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的另一个抗原结合结构域在相应的CH1区中的位置193至195(根据EU编号)处包含一个、两个或更多个芳香族氨基酸残基。

[0933] 在一些实施方案中,所述芳香族氨基酸残基选自由色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)、组氨酸(His)和苯丙氨酸(Phe)组成的组;并且所述带正电荷的氨基酸残基选自由赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)和组氨酸(His)组成的组。

[0934] 在一个方面,至少一个二硫键形成于第一抗原结合结构域的CL区中的氨基酸残基与第二抗原结合结构域的CL区中的氨基酸残基之间。该氨基酸残基存在于,例如CL区中根据Kabat编号的位置108至112、121至128、151至156、184至190、195至196、200至203、以及208至213中的任一者处。在某些实施方案中,氨基酸残基存在于选自由以下项组成的组的位置处:CL区中根据Kabat编号的位置108、109、112、121、123、126、128、151、152、153、156、184、186、188、189、190、195、196、200、201、202、203、208、210、211、212和213。在某些实施方案中,氨基酸残基存在于CL区中根据Kabat编号的位置126处。

[0935] 在上述方面的一个实施方案中,至少一个二硫键形成于第一抗原结合结构域的CL

区中的氨基酸残基与第二抗原结合结构域的CL区中的氨基酸残基之间。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的氨基酸残基各自独立地选自以下项组成的组:根据Kabat编号的位置108、109、110、111和112。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的氨基酸残基各自独立地选自以下项组成的组:根据Kabat编号的位置121、122、123、124、125、126、127和128。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的氨基酸残基各自独立地选自以下项组成的组:根据Kabat编号的位置151、152、153、154、155和156。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的氨基酸残基各自独立地选自以下项组成的组:根据Kabat编号的位置184、185、186、187、188、189和190。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的氨基酸残基各自独立地选自以下项组成的组:根据Kabat编号的位置195和196。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的氨基酸残基各自独立地选自以下项组成的组:根据Kabat编号的位置200、201、202和203。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的氨基酸残基各自独立地选自以下项组成的组:根据Kabat编号的位置208、209、210、211、212和213。

[0936] 在上述方面的一个实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中形成二硫键中的每一者的氨基酸残基的位置差异(即,之间的距离)在三个氨基酸以内(即,三个氨基酸、两个氨基酸或一个氨基酸)。这意味着,当根据EU编号对第一抗原结合结构域的CL区中形成二硫键的氨基酸残基的位置和第二抗原结合结构域的CL区中形成二硫键的氨基酸残基的位置进行比较时,其差异(即距离)在三个氨基酸以内。在示例性实施方案中,第一抗原结合结构域与第二抗原结合结构域之间的至少一个二硫键是通过将两个抗原结合结构域的CL区中根据Kabat编号的位置126处的氨基酸残基彼此连接而形成的。

[0937] 在上述方面的实施方案中,至少一个二硫键形成于第一抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基与第二抗原结合结构域的CL区中的氨基酸残基之间。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域的CH1区中的氨基酸残基选自根据EU编号的位置188、189、190、191、192、193、194、195、196和197组成的组,并且第二抗原结合结构域的CL区中的氨基酸残基选自根据Kabat编号的位置121、122、123、124、125、126、127和128组成的组。在示例性实施方案中,至少一个二硫键形成于第一抗原结合结构域的CH1区中根据EU编号的位置191处的氨基酸残基与第二抗原结合结构域的CL区中根据Kabat编号的位置126处的氨基酸残基之间。

[0938] 在一方面,恒定区源自人。在某些实施方案中,重链恒定区的亚类为IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM、IgD和IgE中的任一者。在某些实施方案中,CH1区的亚类为 γ 1、 γ 2、 γ 3、 γ 4、 α 1、 α 2、 μ 、 δ 和 ϵ 中的任一者。

[0939] 在一方面,在本公开的抗原结合分子的第一抗原结合部分和第二抗原结合部分中的每一者的轻链的恒定结构域CL中,位置123处的氨基酸和/或位置124处的氨基酸可以独立地被赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)取代(根据Kabat进行编号)。在其他方面,在本公开的抗原结合分子的第一抗原结合部分和第二抗原结合部分中的每一者的重链的恒定结构域CH1中,位置147处的氨基酸和/或位置213处的氨基酸可以独立地被谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)取代(根据EU编号进行编号)。

[0940] 在一方面,在本公开的抗原结合分子的第一抗原结合部分和第二抗原结合部分中

的每一者的轻链的恒定结构域CL中,位置123和124处的氨基酸可以各自为精氨酸(R)和赖氨酸(K)(根据Kabat进行编号)。在其他实施方案中,在本公开的抗原结合分子的第一抗原结合部分和第二抗原结合部分中的每一者的重链的恒定结构域CH1中,位置147和213处的氨基酸可以为谷氨酸(E)(根据EU编号进行编号)。

[0941] 在上述方面的一个实施方案中,恒定区源自人。在某些实施方案中,CL区的亚类为 κ 或 λ 。

[0942] 在上述方面的一个实施方案中,至少一个二硫键形成于第一抗原结合结构域的可变区中的氨基酸残基与第二抗原结合结构域的可变区中的氨基酸残基之间。在某些实施方案中,至少一个二硫键形成于第一抗原结合结构域的VH区中的氨基酸残基与第二抗原结合结构域的VH区中的氨基酸残基之间。在某些实施方案中,氨基酸残基存在于例如选自以下项组成的组的任何位置处:VH区的根据EU编号的位置6、8、16、20、25、26、28、74和82b。在某些实施方案中,至少一个二硫键形成于第一抗原结合结构域的VL区中的氨基酸残基与第二抗原结合结构域的VL区中的氨基酸残基之间。在某些实施方案中,前述氨基酸残基存在于例如选自以下项组成的组的任何位置处:VL区(κ 亚类)中根据Kabat编号的位置21、27、58、77、100、105和107以及VL区(λ 亚类)中根据Kabat编号的位置6、19、33和34。

[0943] 在上述方面的一个实施方案中,至少一个二硫键形成于第一抗原结合结构域的VHH区中的氨基酸残基与第二抗原结合结构域的VHH区中的氨基酸残基之间。在某些实施方案中,氨基酸残基存在于例如选自以下项组成的组的任何位置处:VHH区中根据Kabat编号的位置4、6、7、8、9、10、11、12、14、15、17、20、24、27、29、38、39、40、41、43、44、45、46、47、48、49、67、69、71、78、80、82、82c、85、88、91、93、94和107。

[0944] 在其他实施方案中,用于促进具有期望组合的H链中以及L链和H链之间的缔合的其他技术可以应用于本公开中的抗原结合分子。

[0945] 例如,通过在抗体H链的第二恒定区或第三恒定区(CH2或CH3)的界面处引入静电排斥来抑制不期望的H链缔合的技术可应用于抗原结合分子缔合(WO2006/106905)。

[0946] 在通过在CH2或CH3的界面处引入静电排斥来抑制不期望H链缔合的技术中,在H链的另一恒定区的界面处接触的氨基酸残基的实例包括对应于CH3区中EU编号位置356、439、357、370、399和409处的残基的区域。

[0947] 更具体地,实例包括包含两种类型的H链CH3区的抗体,其中选自以下(1)至(3)中所示氨基酸残基对的第一H链CH3区中的一至三对氨基酸残基携带相同类型的电荷:(1)包含在H链CH3区中EU编号位置356和439处的氨基酸残基;(2)包含在H链CH3区中EU编号位置357和370处的氨基酸残基;以及(3)包含在H链CH3区中EU编号位置399和409处的氨基酸残基。

[0948] 此外,该抗体可以是其中与上述第一H链CH3区不同的第二H链CH3区中的氨基酸残基对选自上述(1)至(3)的氨基酸残基对的抗体,其中对应于在上述第一H链CH3区中携带相同类型的电荷的上述(1)至(3)的氨基酸残基对的一至三对氨基酸残基携带与上述第一H链CH3区的相应氨基酸残基相反的电荷。

[0949] 上述(1)至(3)中所示的每个氨基酸残基在缔合期间彼此接近。本领域技术人员可以使用市售软件通过同源性建模等找出对应于期望H链CH3区或H链恒定区中的上述(1)至(3)的氨基酸残基的位置,并且这些位置的氨基酸残基可以适当地进行修饰。

[0950] 在上述抗原结合分子中,“带电氨基酸残基”优选地选自例如包括在以下组中的任一者中的氨基酸残基:

[0951] (a) 谷氨酸(E)和天冬氨酸(D);以及

[0952] (b) 赖氨酸(K)、精氨酸(R)和组氨酸(H)。

[0953] 在上述抗原结合分子中,短语“携带相同类型的电荷”意指例如两个或更多个氨基酸残基全部选自上述组(a)和(b)中的任一者中包括的氨基酸残基。短语“携带相反电荷”意指例如当两个或更多个氨基酸残基中的至少一个氨基酸残基选自上述组(a)和(b)中的任一者中包括的氨基酸残基时,剩余的氨基酸残基选自其他组中包括的氨基酸残基。

[0954] 在优选的实施方案中,上述抗原结合分子可以具有通过二硫键交联的其第一H链CH3区和第二H链CH3区。

[0955] 在本公开中,进行修饰的氨基酸残基不限于上述抗体可变区或抗体恒定区的氨基酸残基。本领域技术人员可以使用市售软件通过同源建模等鉴定突变多肽或异源多聚体中形成界面的氨基酸残基;并且然后可以对这些位置的氨基酸残基进行修饰以调节缔合。

[0956] 另外,其他已知的技术也可以用于本公开中的抗原结合分子的形成。具有不同序列的多肽的缔合可以通过使用通过将抗原结合分子的H链CH3的一部分改变为相应的IgA衍生序列并将相应的IgA衍生序列引入另一个H链CH3的互补部分而产生的链交换工程化结构域CH3的CH3互补缔合来有效诱导(Protein Engineering Design&Selection,23;195-202,2010)。这种已知的技术也可以用于有效地形成目标抗原结合分子。

[0957] 另外,如W0 2011/028952、W02014/018572和Nat Biotechnol.2014年2月;32(2):191-8中所述的使用抗体CH1和CL的缔合以及VH和VL的缔合的抗体生产技术;如W02008/119353和W02011/131746中所述的使用单独制备的单克隆抗体组合(Fab臂交换)生产双特异性抗体的技术;如W02012/058768和W02013/063702中所述的用于调节抗体重链CH3之间的缔合的技术;如W02012/023053中所述的用于生产由两种类型的轻链和一种类型的重链构成的抗原结合分子的技术;如Christoph等人(Nature Biotechnology第31卷,第753-758页(2013))所述的使用两种细菌细胞株生产抗原结合分子的技术,该细菌细胞株单独表达包含单个H链和单个L链的抗体的链之一;等等可以用于抗原结合分子的形成。

[0958] 替代性地,即使当不能有效地形成目标抗原结合分子时,也可以通过从产生的抗体中分离和纯化目标抗原结合分子来获得本公开中的抗原结合分子。例如,已经报道了通过将氨基酸取代引入两种类型H链的可变区而赋予等电点差异,从而使得能够通过离子交换层析法纯化目标两种类型同聚形式和异聚抗体的方法(W02007114325)。迄今为止,作为用于纯化异聚抗体的方法,已经报道了使用蛋白A来纯化包含与蛋白A结合的小鼠IgG2a H链和不与蛋白A结合的大鼠IgG2b H链的异二聚体抗体的方法(W098050431和W095033844)。此外,异二聚体抗体可以通过以下单独地有效纯化:使用包含将作为IgG蛋白A结合位点的EU编号位置435和436处的氨基酸残基替代为Tyr、His或产生不同蛋白A亲和力的氨基酸的H链,或使用具有不同蛋白A亲和力的H链以改变每个H链与蛋白A的相互作用,并且然后使用蛋白A柱纯化。

[0959] V. 包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域(它们中的每一者能够与CD3和CD137结合但不同时与CD3和CD137结合),以及第三抗原结合结构域(其能够与DLL3结合)的抗原结合分子

[0960] 在一个方面,本公开的抗原结合结构域可以是第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域以及第三抗原结合结构域,所述第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的每一者能够与CD3和CD137结合但不同时与CD3和CD137结合,所述第三抗原结合结构域能够与第三抗原(优选是在癌细胞/组织上表达的抗原)结合。更具体地,在一个方面,本公开的抗原结合分子可以是包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域以及第三抗原结合结构域的抗原结合分子,所述第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的每一者能够与CD3和CD137结合但不同时与CD3和CD137结合,所述第三抗原结合结构域能够与第三抗原(优选是在癌细胞/组织上表达的抗原)结合。

[0961] 在一方面,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的每一者可以是能够与CD3和CD137结合但不同时与CD3和CD137两者结合的“双抗原结合结构域”。第三抗原结合结构域可以为“DLL3抗原结合结构域”。

[0962] 在一些实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的每一者为Fab分子,并且抗原结合分子包含在第一抗原结合结构域的CH1区与第二抗原结合结构域的CH1区之间形成的至少一个二硫键。在优选的实施方案中,二硫键形成于第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的相应的CH1区中根据EU编号的位置191处的氨基酸残基(半胱氨酸残基)之间。

[0963] 在一些实施方案中,第三抗原结合结构域可以为Fab或scFv,并且与第一抗原结合结构域或第二抗原结合结构域中的一者融合。当第一抗原结合结构域、第二抗原结合结构域和第三抗原结合结构域中的每一者是包含重链(其包含VH区和CH1区)和轻链(其包含VL区和CL区)的Fab分子时,第三抗原结合结构域可以直接或经由肽接头在Fab重链(CH1)的C末端处与第一抗原结合结构域或第二抗原结合结构域中的一者的Fab重链的N末端融合。代表性的肽接头包括由SEQ ID NO:18、19或20的氨基酸序列组成的那些。在具体的实施方案中,第一抗原结合结构域与第二抗原结合结构域相同。

[0964] 在一些实施方案中,第三抗原结合结构域为其中Fab轻链和Fab重链的可变区发生交换的交叉Fab分子,并且第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的每一者为常规Fab分子。

[0965] 在某些实施方案中,双抗原结合结构域(“第一抗原结合结构域”或“第二抗原结合结构域”或“双-Fab”)与整个CD3或CD3的部分肽的一部分特异性结合。

[0966] 在某些实施方案中,双抗原结合结构域(“第一抗原结合结构域”或“第二抗原结合结构域”或“双-Fab”)与整个CD137或CD137的部分肽的一部分特异性结合。

[0967] 在某些实施方案中,本公开的抗原结合分子的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域各自包含可以相同或不同的抗体可变区,并且独立地选自以下(a1)至(a4)组成的组:

[0968] (a1) 包含以下的抗体可变区:

[0969] 重链可变区,其包含:

[0970] 重链互补决定区(CDR)1,其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列,

[0971] 重链CDR 2,其包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列,以及

[0972] 重链CDR 3,其包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列,以及

[0973] 轻链可变区,其包含:

- [0974] 轻链CDR 1,其包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列,
- [0975] 轻链CDR 2,其包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列,以及
- [0976] 轻链CDR 3,其包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列;
- [0977] (a2) 包含以下的抗体可变区:
- [0978] 重链可变区,其包含:
- [0979] 重链互补决定区 (CDR) 1,其包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,
- [0980] 重链CDR 2,其包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列,以及
- [0981] 重链CDR 3,其包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列,以及
- [0982] 轻链可变区,其包含:
- [0983] 轻链CDR 1,其包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列,
- [0984] 轻链CDR 2,其包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列,以及
- [0985] 轻链CDR 3,其包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列;
- [0986] (a3) 与跟 (a1) 或 (a2) 的抗体可变区所结合的表位相同的表位结合的抗体可变区;
- 以及
- [0987] (a4) 与 (a1) 或 (a2) 的抗体可变区竞争与抗原的结合的抗体可变区。
- [0988] 在某些实施方案中,本公开的抗原结合分子的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域各自包含可以相同或不同的抗体可变区,并且独立地选自以下 (a1) 至 (a4) 组成的组:
- [0989] (a1) 包含以下的抗体可变区:
- [0990] 重链可变区,其包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列,以及
- [0991] 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列;
- [0992] (a2) 包含以下的抗体可变区:
- [0993] 重链可变区,其包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列,以及
- [0994] 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列;
- [0995] (a3) 与跟 (a1) 或 (a2) 的抗体可变区所结合的表位相同的表位结合的抗体可变区;
- 以及
- [0996] (a4) 与 (a1) 或 (a2) 的抗体可变区竞争与抗原的结合的抗体可变区。
- [0997] 在一个实施方案中,双抗原结合结构域(“第一抗原结合结构域”或“第二抗原结合结构域”或“双-Fab”)包含:重链可变区序列,其包含与SEQ ID NO:36的氨基酸序列至少约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的氨基酸序列;以及轻链可变区序列,其包含与SEQ ID NO:37的氨基酸序列至少约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的氨基酸序列。在一个实施方案中,双抗原结合结构域(“第一抗原结合结构域”或“第二抗原结合结构域”或“双-Fab”)包含:重链可变区,其包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列;以及轻链可变区,其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。
- [0998] 在一个实施方案中,双抗原结合结构域(“第一抗原结合结构域”或“第二抗原结合结构域”或“双-Fab”)包含:重链可变区序列,其包含与SEQ ID NO:38的氨基酸序列至少约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的氨基酸序列;以及轻链可变区序列,其包含与SEQ ID NO:37的氨基酸序列至少约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的氨基酸序列。在一个实施方案中,双抗原结合结构域(“第一抗原结合结构域”

或“第二抗原结合结构域”或“双-Fab”)包含:重链可变区,其包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列;以及轻链可变区,其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。

[0999] 本文描述的抗原结合分子包含至少一个能够与 δ 样3 (DLL3) 结合的抗原结合结构域(本文中也称为“DLL3抗原结合结构域”、“第三抗原结合结构域”或“能够与DLL3结合的抗原结合结构域”)。

[1000] 在具体的实施方案中,抗原结合分子包含一个能够与DLL3结合的抗原结合结构域。在具体的实施方案中,抗原结合分子包含两个能够与DLL3结合的抗原结合结构域。在某些此类实施方案中,这些抗原结合结构域中的每一者与DLL3的相同的表位特异性结合。在甚至更具体的实施方案中,所有这些“DLL3抗原结合结构域”是相同的。在一个实施方案中,抗原结合分子包含能够与DLL3特异性结合的免疫球蛋白分子。在一个实施方案中,抗原结合分子包含不超过两个能够与DLL3结合的抗原结合结构域。

[1001] 在具体的实施方案中,DLL3抗原结合结构域为交叉Fab分子,更具体地其中Fab轻链和Fab重链的可变区或恒定区发生交换的DLL3分子。在具体的实施方案中,DLL3抗原结合结构域为其中Fab轻链和Fab重链的可变区发生交换的交叉Fab分子。

[1002] 在某些实施方案中,作为第三抗原结合结构域,本公开的抗原结合分子可以包含独立地选自以下(a1)至(a4)中的任一者组成的组的抗体可变区:

[1003] (a1) 包含以下的抗体可变区:

[1004] 重链可变区,其包含:

[1005] 重链互补决定区(CDR)1,其包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列,

[1006] 重链CDR 2,其包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列,以及

[1007] 重链CDR 3,其包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列,以及

[1008] 轻链可变区,其包含:

[1009] 轻链CDR 1,其包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列,

[1010] 轻链CDR 2,其包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列,以及

[1011] 轻链CDR 3,其包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列;

[1012] (a2) 包含以下的抗体可变区:

[1013] 重链可变区,其包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列,以及

[1014] 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列;

[1015] (a3) 与跟(a1)或(a2)的抗体可变区所结合的表位相同的表位结合的抗体可变区;以及

[1016] (a4) 与(a1)或(a2)的抗体可变区竞争与抗原的结合的抗体可变区。

[1017] 在一个实施方案中,DLL3抗原结合结构域包含:重链可变区序列,其包含与SEQ ID NO:52的氨基酸序列至少约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的氨基酸序列;以及轻链可变区序列,其包含与SEQ ID NO:53的氨基酸序列至少约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的氨基酸序列。在一个实施方案中,DLL3抗原结合分子包含:重链可变区,其包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列;以及轻链可变区,其包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列。

[1018] 本公开的抗原结合分子可以进一步包含Fc区。当第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的每一者为Fab时,第一抗原结合结构域可以在Fab重链的C末端处与Fc区的

第一或第二亚基的N末端融合,并且第二抗原结合结构域可以在Fab重链的C末端处与Fc结构域的剩余亚基的N末端融合。在一些实施方案中,第三抗原结合结构域在C末端处任选地经由肽接头与第一抗原结合结构域或第二抗原结合结构域中的一者的Fab重链的N末端融合。

[1019] 根据上述实施方案中的任一者,抗原结合分子的组分(例如抗原结合结构域、Fc区)可以直接融合或通过在本文中描述或在本领域中已知的各种接头(特别是包含一个或多个氨基酸(通常约2至20个氨基酸)的肽接头)融合。合适的非免疫原性肽接头包括例如(G4S)_n、(SG4)_n、G4(G4S)_n或G4(SG4)_n肽接头,其中n通常为介于1与10之间的数字,通常介于2与4之间。

[1020] 在某些实施方案中,Fc区可以是包含第一Fc区亚基和第二Fc区亚基的Fc区,其中第一Fc区亚基选自以下项组成的组:

[1021] 包含位置234和235中的每一者处的丙氨酸的Fc区多肽;

[1022] 包含位置234、235和297中的每一者处的丙氨酸的Fc区多肽;以及

[1023] 包含位置234、235和297中的每一者处的丙氨酸、位置354处的半胱氨酸和位置366处的色氨酸的Fc区多肽;并且

[1024] 其中第二Fc区亚基选自以下项组成的组:

[1025] 包含位置234和235中的每一者处的丙氨酸的Fc区多肽;

[1026] 包含位置234、235和297中的每一者处的丙氨酸的Fc区多肽;以及

[1027] 包含位置234、235和297中的每一者处的丙氨酸、位置349处的半胱氨酸、位置366处的丝氨酸、位置368处的丙氨酸和位置407处的缬氨酸的Fc区多肽。

[1028] 在具体的实施方案中,Fc区优选地包含以下项中的任一者:

[1029] (a) 包含SEQ ID NO:23中示出的氨基酸序列的第一Fc亚基以及包含SEQ ID NO:24中示出的氨基酸序列的第二Fc亚基;

[1030] (b) 包含SEQ ID NO:25中示出的氨基酸序列的第一Fc亚基以及包含SEQ ID NO:26中示出的氨基酸序列的第二Fc亚基;以及

[1031] (c) 包含SEQ ID NO:58中示出的氨基酸序列的第一Fc区亚基以及包含SEQ ID NO:59中示出的氨基酸序列的第二Fc区亚基。

[1032] 在一个实施方案中,本公开的抗原结合分子可以包含:多肽链(链1),其包含与SEQ ID NO:39的氨基酸序列至少约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的氨基酸序列;多肽链(链2),其包含与SEQ ID NO:40的氨基酸序列至少约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的氨基酸序列;多肽链(链3),其包含与SEQ ID NO:41的氨基酸序列至少约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的氨基酸序列;以及两条多肽链(链4和链5),其包含与SEQ ID NO:42的氨基酸序列至少约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的氨基酸序列。

[1033] 在一个实施方案中,本公开的抗原结合分子可以包含:多肽链(链1),其包含与SEQ ID NO:43的氨基酸序列至少约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的氨基酸序列;多肽链(链2),其包含与SEQ ID NO:40的氨基酸序列至少约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的氨基酸序列;多肽链(链3),其包含与SEQ ID NO:44的氨基酸序列至少约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的氨基酸序列;以及两

条多肽链(链4和链5),其包含与SEQ ID NO:42的氨基酸序列至少约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的氨基酸序列。

[1034] 在一个实施方案中,本公开的抗原结合分子可以包含:多肽链(链1),其包含与SEQ ID NO:45的氨基酸序列至少约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的氨基酸序列;多肽链(链2),其包含与SEQ ID NO:40的氨基酸序列至少约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的氨基酸序列;多肽链(链3),其包含与SEQ ID NO:44的氨基酸序列至少约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的氨基酸序列;以及两条多肽链(链4和链5),其包含与SEQ ID NO:42的氨基酸序列至少约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的氨基酸序列。

[1035] 在一方面,第四多肽(链4)和第五多肽(链5)是相同的。

[1036] 在某些实施方案中,本公开的抗原结合分子可以包含组合中的任一者中的五条多肽链,所述组合选自由以下项组成的组:

[1037] (a1) 多肽链,其包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列(链1),

[1038] 多肽链,其包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列(链2),

[1039] 多肽链,其包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列(链3),以及

[1040] 两条多肽链,其各自包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列(链4和链5);

[1041] (a2) 多肽链,其包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列(链1),

[1042] 多肽链,其包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列(链2),

[1043] 多肽链,其包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列(链3),以及

[1044] 两条多肽链,其各自包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列(链4和链5);以及

[1045] (a3) 多肽链,其包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列(链1),

[1046] 多肽链,其包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列(链2),

[1047] 多肽链,其包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列(链3),以及

[1048] 两条多肽链,其各自包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列(链4和链5);

[1049] 并且优选地,五条多肽链(链1至链5)根据图3中示出的取向彼此连接和/或缔合。

[1050] 在某些实施方案中,本公开的抗原结合分子可以包含以下五条多肽链:

[1051] 多肽链,其包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列(链1),

[1052] 多肽链,其包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列(链2),

[1053] 多肽链,其包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列(链3),以及

[1054] 两条多肽链,其各自包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列(链4和链5);

[1055] 并且优选地,五条多肽链(链1至链5)根据图3中示出的取向彼此连接和/或缔合。

[1056] 在某些实施方案中,本公开的抗原结合分子可以包含以下五条多肽链:

[1057] 多肽链,其包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列(链1),

[1058] 多肽链,其包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列(链2),

[1059] 多肽链,其包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列(链3),以及

[1060] 两条多肽链,其各自包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列(链4和链5);

[1061] 并且优选地,五条多肽链(链1至链5)根据图3中示出的取向彼此连接和/或缔合。

[1062] 在某些实施方案中,本文描述的抗原结合分子与在来自不同物种的CD3、CD137或DLL3中保守的CD3、CD137或DLL3的表位结合。在某些实施方案中,本公开中的抗原结合分子

为三特异性抗原结合分子,即,所述三特异性抗原结合分子能够与三种不同的抗原特异性结合,能够与CD3或CD137之一结合,但不同时与两种抗原结合,并且能够与DLL3特异性结合。

[1063] 本公开中的抗体可变区是否能够与诸如CD3、CD137和DLL的抗原结合可以通过本领域已知的方法来确定。

[1064] 例如,这可以通过电化学发光法(ECL法)来确定(BMC Research Notes 2011,4:281)。

[1065] 具体地,例如,将由能够与待测生物素标记的抗原结合分子的抗原(例如,Fab区)结合的区域构成的低分子抗体或其单价抗体(缺乏由通常抗体携带的两个Fab区中的一者的抗体)与用碘基标签标记的抗原(Ru复合物)混合,并且将该混合物添加到链霉亲和素固定的板上。在该操作中,待测生物素标记的抗原结合分子与板上的链霉亲和素结合。使碘基标签发光,并且利用Sector Imager 600或2400(MSD K.K.)等检测发光信号,由此确认待测抗原结合分子的上述区域与抗原的结合。

[1066] 可替代地,可以通过ELISA、FACS(荧光活化细胞分选)、ALPHAScreen(放大发光邻近均质测定筛选)或基于表面等离子体共振(SPR)现象的Biacore法等来进行该测定(Proc.Natl.Acad.Sci.USA(2006)103(11),4005-4010)。

[1067] 具体地,例如,可以使用基于表面等离子体共振(SPR)现象的相互作用分析仪Biacore(Cytiva Japan Corp.)来进行该测定。Biacore分析仪包括任意型号,诸如Biacore T100、T200、X100、A100、4000、3000、2000、1000或C。可将针对Biacore的任意传感器芯片诸如CM7、CM5、CM4、CM3、C1、SA、NTA、L1、HPA或Au芯片用作传感器芯片。通过诸如胺偶联、二硫化物偶联或醛偶联的偶联方法将用于捕获本公开中的抗原结合分子的蛋白质(诸如蛋白A、蛋白G、蛋白L、抗人IgG抗体、抗人IgG-Fab、抗人L链抗体、抗人Fc抗体、抗原蛋白或抗原肽)固定到传感器芯片上。将抗原作为分析物注射在其上,并且测量相互作用以获取传感图。在该操作中,抗原的浓度可以根据测定样品的相互作用强度(例如,KD等)在数 μ M在至数pM的范围内选择。

[1068] 替代性地,可以将抗原而并非抗原结合分子固定在传感器芯片上,并且然后使要评价的抗体样品与抗原相互作用。根据由相互作用的传感图计算的解离常数(KD)值、或根据抗原结合分子样品作用后相对于作用前水平的传感图的增加程度,可以确认本公开中的抗原结合分子的抗体可变区是否具有对抗原的结合活性。

[1069] 在一些实施方案中,使用例如Biacore T200仪器(Cytiva)或Biacore 8K仪器(Cytiva)在37°C(例如,对于CD137)或25°C(例如,对于CD3)评定本公开中的抗体可变区与目标抗原的结合活性或亲和力。使用胺偶联试剂盒(例如,Cytiva),将抗人Fc(例如,Cytiva)固定到CM4传感器芯片的所有流通池上。将抗原结合分子或抗体可变区捕获到抗Fc传感器表面上,然后将抗原注射到流通池上。抗原结合分子或抗体可变区的捕获水平的目标为200个共振单位(RU)。重组人抗原可以以2000nM到125nM注射,其通过两倍连续稀释然后进行解离来制备。在含20mM ACES,150mM NaCl,0.05%吐温20,0.005% NaN₃的ACES pH 7.4中制备所有抗原结合分子或抗体可变区和分析物。每个周期用3M MgCl₂再生传感器表面。通过使用例如Biacore Insight评估软件2.0版(Cytiva)或Biacore 8K评估软件(Cytiva)将数据处理并将其拟合为1:1结合模型来确定结合亲和力。计算KD值以评定本公

开中的抗原结合结构域的特异性结合活性或亲和力。

[1070] ALPHAScreen是通过使用两种类型的珠(供体和受体)的ALPHA技术,基于下述原理来实施的:通过与供体珠结合的分子和与受体珠结合的分子之间的生物学相互作用,仅在这两种珠靠近时检测到发光信号。供体珠中的激光激发的光敏剂将周围的氧转换为具有激发状态的单线态氧。单线态氧扩散至供体珠周围,并且到达靠近供体珠的受体珠,由此引起珠中的化学发光反应,最终发出光。在与供体珠结合的分子和与受体珠结合的分子之间的相互作用不存在时,供体珠产生的单线态氧不会到达受体珠。因此,不会发生化学发光反应。

[1071] 将待观察相互作用的物质的一个(配体)固定到传感器芯片的金薄膜上。从传感器芯片的背面照射光使得在金薄膜和玻璃之间的界面发生全反射。结果,在一部分反射光中形成了反射强度(SPR信号)下降的位点。将待观察相互作用的物质的另一(分析物)注射到传感器芯片的表面上。在分析物与配体结合时,固定化配体分子的质量会增加,从而改变溶剂在传感器芯片表面的折射率。折射率的变化使SPR信号的位置发生移位(相反,结合分子的解离会使信号返回到原始位置)。Biacore系统在纵坐标上绘制位移量,即传感器芯片表面上的质量变化,并展示与时间有关的质量变化作为测定数据(传感图)。由传感图可以确定与在传感器芯片表面上捕获的配体结合的分析物的量(在分析物相互作用前后的传感图上的应答的变化量)。但是,由于结合量也取决于配体的量,必须在使用基本上相同的配体量的条件下进行比较。由传感图的曲线可以确定动力学,即,缔合速率常数(k_a)和解离速率常数(k_d),而由这些常数的比例可以确定亲和力(KD)。BIACORE法中还优选使用抑制测定。抑制测定的实例描述在Proc.Natl.Acad.Sci.USA(2006)103(11),4005-4010中。

[1072] 术语“不同时与CD3和CD137(4-1BB)结合”或“不同时与CD3和CD137(4-1BB)结合”意指本公开中的抗原结合结构域或抗体可变区在与CD3结合的状态下不能与CD137结合,而抗原结合结构域或抗体可变区在与CD137结合的状态下不能与CD3结合。在本文中,短语“不同时与CD3和CD137结合”还包括不同时将表达CD3的细胞交联到表达CD137的细胞,或不同时与各自在不同细胞上表达的CD3和CD137结合。该短语进一步包括当CD3和CD137不像可溶性蛋白那样在细胞膜上表达时,或当两者驻留在相同细胞上时,可变区能够同时与CD3和CD137两者结合,但不能同时与各自在不同细胞上表达的CD3和CD137结合的情况。这样的抗体可变区没有特别限制,只要抗体可变区具有这些功能即可。其实例可以包括通过改变其一部分氨基酸以与所需抗原结合而源自IgG型抗体可变区的可变区。待改变的氨基酸选自,例如在与CD3或CD137结合的抗体可变区中,其改变不会取消与抗原的结合的氨基酸。

[1073] 在本文中,短语“在不同细胞上表达”仅仅意味着抗原在不同的细胞上表达。此类细胞的组合可以是诸如T细胞和另一种T细胞的相同类型的细胞,或者可以是诸如T细胞和NK细胞的不同类型的细胞。

[1074] 本公开的抗原结合分子是否“不同时与CD3和CD137结合”可以通过以下项来确认:确认抗原结合分子对CD3和CD137均具有结合活性;然后,使CD3或CD137预先与包含具有该结合活性的可变区的抗原结合分子结合;并且然后通过上述方法来确定其对另一者结合活性的存在或不存在。替代性地,这也可以通过确定抗原结合分子与固定在ELISA板或传感器芯片上的CD3或CD137的结合是否因向溶液中添加另一者而受到抑制来确认。在一些实施方案中,本公开中的抗原结合分子与CD3或CD137的结合通过抗原结合分子与另一者的结合而

被抑制至少50%、优选60%或更多、更优选70%或更多、更优选80%或更多、进一步优选90%或更多、或者甚至更优选95%或更多。

[1075] 在一个方面,当一种抗原(例如CD3)被固定时,在另一种抗原(例如CD137)的存在下,可以通过现有技术已知的方法(即ELISA、BIACORE等)来测定抗原结合分子与CD3的结合的抑制。在另一方面,当CD137被固定时,在CD3的存在下也可以测定抗原结合分子与CD137的结合的抑制。当进行上述两个方面中的任一者时,如果结合被抑制至少50%、优选60%或更多、优选70%或更多、进一步优选80%或更多、进一步优选90%或更多、或者甚至更优选95%或更多,则确定本公开中的抗原结合分子不同时与CD3和CD137结合。

[1076] 在一些实施方案中,作为分析物注射的抗原的浓度比待固定的其他抗原的浓度高至少1倍、2倍、5倍、10倍、30倍、50倍或100倍。

[1077] 在优选的方式中,作为分析物注射的抗原的浓度比待固定的其他抗原的浓度高100倍,并且结合被抑制至少80%。

[1078] 在一个实施方案中,计算用于抗原结合分子的CD3(分析物)结合活性比抗原结合分子的CD137(固定的)结合活性的KD值的比率($KD(CD3)/KD(CD137)$),并且比CD137(固定的)浓度高10倍、50倍、100倍或200倍的KD值的比率($KD(CD3)/KD(CD137)$)的CD3(分析物)浓度可用于上述竞争测量。(例如当KD值的比率为0.1时,可以选择高1倍、5倍、10倍或20倍的浓度。此外,当KD值的比率为10时,可以选择高100倍、500倍、1000倍或2000倍的浓度。)

[1079] 在一个方面,当一种抗原(例如CD3)被固定时,在另一种抗原(例如CD137)的存在下,可以通过现有技术已知的方法(即ELISA、ECL等)来测定抗原结合分子与CD3的结合信号的减弱。在另一方面,当CD137被固定时,在CD3的存在下也可以测定抗原结合分子与CD137的结合信号的减弱。当进行上述两个方面中的任一者时,如果结合信号被减弱至少50%、优选60%或更多、优选70%或更多、进一步优选80%或更多、进一步优选90%或更多、或者甚至更优选95%或更多,则确定本公开中的抗原结合分子不同时与CD3和CD137结合。

[1080] 在一些实施方案中,作为分析物注射的抗原的浓度比待固定的其他抗原的浓度高至少1倍、2倍、5倍、10倍、30倍、50倍或100倍。

[1081] 在优选的方式中,作为分析物注射的抗原的浓度比待固定的其他抗原的浓度高100倍,并且结合被抑制至少80%。

[1082] 在一个实施方案中,计算用于抗原结合分子的CD3(分析物)结合活性比抗原结合分子的CD137(固定的)结合活性的KD值的比率($KD(CD3)/KD(CD137)$),并且比CD137(固定的)浓度高10倍、50倍、100倍或200倍的KD值的比率($KD(CD3)/KD(CD137)$)的CD3(分析物)浓度可用于上述测量。(例如当KD值的比率为0.1时,可以选择高1倍、5倍、10倍或20倍的浓度。此外,当KD值的比率为10时,可以选择高100倍、500倍、1000倍或2000倍的浓度。)

[1083] 具体地,例如在使用ECL方法的情况下,制备生物素标记的待测抗原结合分子、用磺基标签(Ru复合物)标记的CD3、以及未标记的CD137。当待测抗原结合分子能够与CD3和CD137结合,但不同时与CD3和CD137结合时,通过将待测抗原结合分子与标记的CD3的混合物添加到链霉亲和素固定化板上,然后进行光显影,来在不存在未标记的CD137的情况下检测磺基标签的发光信号。相比之下,在存在未标记的CD137的情况下,发光信号减少。可以定量发光信号中的这种减少以确定相对结合活性。可以使用标记的CD137和未标记的CD3类似地进行该分析。

[1084] 在ALPHAScreen的情况下,在不存在竞争性CD137的情况下,待测抗原结合分子与CD3相互作用,以生成520至620nm的信号。未标记的CD137与CD3竞争与待测抗原结合分子的相互作用。可以定量由于竞争而引起的荧光减少,由此确定相对结合活性。使用磺基-NHS-生物素等进行多肽生物素化是本领域已知的。可以通过适当采用的方法用GST标记CD3,该方法包括例如在火焰中将编码CD3的多核苷酸与编码GST的多核苷酸融合;以及使得到的融合基因由具有能够表达其的载体的细胞等表达,然后使用谷胱甘肽柱进行纯化。优选地,使用例如基于非线性回归分析的适于单一位点竞争模型的软件GRAPHPAD PRISM(GraphPad Software, Inc., San Diego)来分析所获得的信号。可以使用未标记的CD137和未标记的CD3类似地进行该分析。

[1085] 替代性地,可以使用利用荧光共振能量转移(FRET)的方法。FRET是一种激发能量通过电子共振在彼此临近的两个荧光分子之间直接转移的现象。当FRET发生时,供体(具有激发态的荧光分子)的激发能量转移到受体(位于供体附近的另一个荧光分子),使得从供体发出的荧光消失(准确地说,荧光的寿命缩短),并且取而代之的是荧光从受体发出。利用该现象,可以分析是否同时与CD3和CD137结合。例如,当携带荧光供体的CD3和携带荧光受体的CD137同时与待测抗原结合分子结合时,供体的荧光消失,而受体发出荧光。因此,观察到荧光波长的变化。证实这种抗体同时与CD3和CD137结合。另一方面,如果CD3、CD137和待测抗原结合分子的混合不改变与CD3结合的荧光供体的荧光波长,则该待测抗原结合分子可以被视为能够与CD3和CD137结合,但不同时与CD3和CD137结合的抗原结合结构域。

[1086] 例如,使待测生物素标记的抗原结合分子与供体珠上的链霉亲和素结合,而使标记有谷胱甘肽S转移酶(GST)的CD3与受体珠结合。在不存在竞争性第二抗原的情况下,待测抗原结合分子与CD3相互作用,以生成520nm至620nm的信号。未标记的第二抗原与CD3竞争与待测抗原结合分子的相互作用。可以定量由于竞争而引起的荧光减少,由此确定相对结合活性。使用磺基-NHS-生物素等进行多肽生物素化是本领域已知的。可以通过适当采用的方法用GST标记CD3,该方法包括例如在火焰中将编码CD3的多核苷酸与编码GST的多核苷酸融合;以及使得到的融合基因由具有能够表达其的载体的细胞等表达,然后使用谷胱甘肽柱进行纯化。优选地,使用例如基于非线性回归分析的适于单一位点竞争模型的软件GRAPHPAD PRISM(GraphPad Software, Inc., San Diego)来分析所获得的信号。

[1087] 标记不限于GST标记,并且可以利用任何标签来进行,诸如但不限于,组氨酸标签、MBP、CBP、Flag标签、HA标签、V5标签或c-myc标签。待测抗原结合分子与供体珠的结合不限于使用生物素-链霉亲和素反应的结合。特别地,当待测抗原结合分子包含Fc时,可能的方法涉及使待测抗原结合分子经由Fc识别蛋白诸如蛋白A或蛋白G在供体珠上结合。

[1088] 此外,当CD3和CD137不像可溶性蛋白那样在细胞膜上表达时,或当两者驻留在相同细胞上时,可变区能够同时与CD3和CD137两者结合,但不能同时与各自在不同细胞上表达的CD3和CD137结合的情况,也可以通过本领域中已知的方法来测定。

[1089] 具体地,待测抗原结合分子在用于检测与CD3和CD137的结合的ECL-ELISA中被确认为阳性,同时还与表达CD3的细胞和表达CD137的细胞混合。可以证明,待测抗原结合分子不能同时与在不同细胞上表达的CD3和CD137结合,除非抗原结合分子和这些细胞同时彼此结合。该测定可以通过例如基于细胞的ECL-ELISA来进行。将表达CD3的细胞预先固定在板上。在待测抗原结合分子与其结合后,将表达CD137的细胞添加到板中。使用针对该抗原的

磺基标签标记的抗体检测仅在表达CD137的细胞上表达的不同抗原。当抗原结合分子同时与分别在两个细胞上表达的两种抗原结合时,观察到信号。当抗原结合分子不同时与这些抗原结合时,观察不到信号。

[1090] 替代性地,可以通过ALPHAScreen方法进行该测定。将待测抗原结合分子与与供体珠结合的表达CD3的细胞,以及与受体珠结合的表达CD137的细胞混合。当抗原结合分子同时与分别在两个细胞上表达的两种抗原结合时,观察到信号。当抗原结合分子不同时与这些抗原结合时,观察不到信号。

[1091] 替代性地,该测定也可以通过Octet相互作用分析方法来进行。首先,使表达带有肽标签的CD3的细胞与识别该肽标签的生物传感器结合。将表达CD137的细胞和待测抗原结合分子置于孔中并分析相互作用。当抗原结合分子同时与分别在两个细胞上表达的两种抗原结合时,观察到由待测抗原结合分子和表达CD137的细胞与生物传感器的结合引起的大波长偏移。当抗原结合分子不同时与这些抗原结合时,观察到由于仅待测抗原结合分子与生物传感器结合而引起的小波长偏移。

[1092] 代替这些基于结合活性的方法,可以进行基于生物活性的测定。例如,将表达CD3的细胞和表达CD137的细胞与待测抗原结合分子混合并培养。当抗原结合分子同时与这两种抗原结合时,分别在两个细胞上表达的两种抗原经由待测抗原结合分子相互激活。因此,可以检测激活信号的变化,诸如抗原的相应下游磷酸化水平的增加。替代性地,由于激活而诱导细胞因子产生。因此,可以测量产生的细胞因子的量,从而确认是否同时与两种细胞结合。替代性地,由于激活而诱导针对表达CD137的细胞的细胞毒性。替代性地,报告基因的表达由启动子诱导,该启动子由于激活而在CD137或CD3的信号转导途径的下游被激活。因此,可以测量细胞毒性或产生的报告蛋白的量,从而确认是否同时与两种细胞结合。

[1093] 在另一方面,可使用竞争测定法鉴定与某个参考抗原结合分子竞争与CD3和CD137结合的抗原结合分子。在某些实施方案中,这样的抗原结合分子与CD3和CD137上的与参考抗原结合分子所结合的位点相同的位点(表位,例如线性或构象表位)结合。关于映射多肽所结合的表位的详细示例性方法由Methods in Molecular Biology第66卷(Humana Press,Totowa,NJ)中的Morris(1996)“Epitope Mapping Protocols”提供。通过使用表位映射法分析参考抗原结合分子所结合的抗原(表位)上的位点,并使用含有所鉴定的表位的肽,可以制备与其结合的抗原结合分子,并由此可以获得与参考抗原结合分子所结合的抗原上的位点相同的位点结合的抗原结合分子。

[1094] 下面描述了一种示例性竞争测定。将固定化抗原(例如CD3和CD137)在包含与该抗原结合的第一标记抗原结合分子(物质)和待测试其与第一物质竞争与该抗原结合的能力的第二未标记抗原结合分子(物质)的溶液中孵育。作为对照,将固定抗原在包含第一标记物质(而非第二未标记物质)的溶液中孵育。在允许第一物质与抗原结合的条件下孵育之后,去除过量的未结合物质,并且测量与固定化抗原结合的标记的量。如果与对照样品相比,测试样品中与固定化抗原结合的标记的量基本上减少,则表明第二分子与第一物质竞争与抗原结合。参见Harlow和Lane(1988)Antibodies:A Laboratory Manual ch.14(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY)。

[1095] 另一种示例性竞争性测定使用BIAcore(注册商标)分析来确定测试物质与第二(参考)物质竞争与抗原结合的能力。在根据制造商的建议操作BIAcore(注册商标)仪器(例

如, BIACORE (注册商标) 3000) 的另一方面, 使用本领域已知的标准技术在CM5 BIACORE (注册商标) 芯片上捕获抗原, 以产生涂有抗原的表面。通常, 200至800个共振单位的抗原与芯片结合 (该量提供易于测量的结合水平, 但在所用测试物质的浓度下很容易饱和)。将两种待评估其彼此竞争能力的物质 (即测试物质和参考物质) 以1:1的结合位点摩尔比在合适的缓冲液中混合以产生混合物。当根据结合位点计算浓度时, 测试物质或参考物质的分子量被视为相应物质的总分子量除以该物质上抗原结合位点的数量所得到的。混合物中每种物质 (即测试物质和参考物质) 的浓度必须足够高, 以容易地使BIACORE (注册商标) 芯片上捕获的抗原分子上的物质的结合位点饱和。混合物中的测试物质和参考物质具有相同的摩尔浓度 (基于结合), 通常为1.00至1.5微摩尔 (基于结合位点)。还制备仅含有测试物质和仅含有参考物质的单独溶液。这些溶液中的测试物质和参考物质与混合物处于相同的缓冲液中, 并且它们可能具有相同的浓度和条件。将含有测试物质和参考物质的混合物通过涂有抗原的BIACORE (注册商标) 芯片, 并记录总结合量。然后处理芯片以去除结合的测试物质或参考物质, 而不损坏与芯片结合的抗原。通常, 这是通过用30mM HCl处理芯片60秒来完成的。此后, 使仅含有测试物质的溶液通过涂有抗原的表面, 并记录结合量。再次, 对芯片进行处理以去除所有结合的物质, 而不损坏与芯片结合的抗原。此后, 使仅含有参考物质的溶液通过涂有抗原的表面, 并记录结合量。接下来, 计算含有测试物质和参考物质的混合物的理论最大结合值, 该值是每种物质 (即测试物质和参考物质) 单独通过抗原表面时的结合的总和。如果实际记录的混合物的结合小于该理论最大值, 则测试物质和参考物质在与抗原结合中彼此竞争。因此, 一般而言, 竞争测试物质是在测定中与抗原结合的物质, 使得在上述BIACORE (注册商标) 阻断测定的过程中在参考物质的存在下, 记录的结合介于测试物质和参考物质组合的理论最大结合值 (如上所定义) 的80%与0.1%之间 (例如, 80%至4%), 并且具体地, 介于理论最大结合值的75%与0.1%之间 (例如, 75%至4%), 并且更具体地, 介于理论最大结合值的70%与0.1%之间 (例如, 70%至4%)。

[1096] 另一种示例性竞争性测定使用BIACORE (注册商标) 分析来确定测试物质与第二 (参考) 物质竞争与抗原结合的能力。在根据制造商的建议操作BIACORE (注册商标) 仪器 (例如, BIACORE (注册商标) 3000) 的另一方面, 使用本领域已知的标准技术在BIACORE (注册商标) 芯片上捕获参考物质, 以产生涂有参考物质的表面。通常, 200至800个共振单位的参考物质与芯片结合 (该量提供易于测量的抗原结合水平)。将抗原和待评估其与参考物质竞争能力的测试物质在适当的缓冲液中混合以产生混合物。还制备仅含有抗原的单独溶液。该溶液中的抗原与混合物处于相同的缓冲液中, 并且可以处于相同的浓度和条件下。将仅含有抗原的溶液通过涂有参考物质的BIACORE (注册商标) 芯片, 并记录总结合量。对于芯片再生, 对芯片进行处理以去除涂在芯片表面的参考物质。例如, 当将参考物质经由抗体涂覆到通过共价键固定有蛋白A的BIACORE (注册商标) 芯片上时, 用10mM甘氨酸-HCl进行处理以去除与蛋白A结合的抗体。然后将含有测试物质和抗原的混合物通过涂有参考物质的BIACORE (注册商标) 芯片, 并记录总结合量。当通过含有测试物质和抗原的混合物时记录的总结合量小于通过仅含有抗原的溶液时记录的总结合量时, 测试物质和参考物质是竞争物质。尽管没有限制, 测试物质与参考物质之间的竞争可以意味着, 将 (包含测试物质和抗原的测试混合物通过时的总结合量) 除以 (通过仅含有抗原的溶液时的总结合量) 所获得的值为0.8或更少、0.7或更少、0.6或更少、或0.5或更少。

[1097] 在一个方面,由底物携带的抗原结合分子包括通过如下所述的本领域技术人员众所周知的方法产生的实施方案。没有限制,抗原结合分子可使用具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链-轻链对的重组共表达(参见,Milstein和Cuello,Nature 305:537(1983)、WO 93/08829以及Traunecker等人,EMBO J.10:3655(1991))和“杵臼结构”(也称为“杵臼结构”或“KiH”)工程化(参见例如,美国专利号5,731,168)来产生。抗原结合分子也可以通过以下技术来制备:工程化静电操纵效应以制备抗体Fc-异二聚体分子(WO 2009/089004A1);将两种或更多种抗体或片段交联(参见例如,美国专利号4,676,980和Brennan等人,Science 229:81(1985));使用亮氨酸拉链来产生双特异性抗体(参见例如,Kostelny等人,J.Immunol.148(5):1547-1553(1992));使用“双体抗体”技术制备双特异性抗体片段(参见例如,Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993));以及使用单链Fv(scFv)二聚体(参见例如,Gruber等人,J.Immunol.152:5368(1994));以及按照例如Tutt等人J.Immunol.147:60(1991)中的描述制备三特异性抗体。

[1098] 具有三个或更多个功能性抗原结合位点的工程化改造的抗体,包括“章鱼抗体”,也包括在本文中的抗原结合分子中(参见,例如US 2006/0025576A1)。

[1099] 抗原结合分子变体

[1100] 在某些实施方案中,也考虑了本公开中的抗原结合分子的氨基酸序列变体。例如,可能期望改善抗原结合分子的结合亲和力和/或其他生物学特性。抗原结合分子的氨基酸序列变体可以通过对编码抗原结合分子的核苷酸序列引入适当的修饰或通过肽合成来制备。此类修饰包括例如抗原结合分子的氨基酸序列内残基的缺失、和/或插入和/或取代。可以进行缺失、插入和取代的任何组合以实现最终构建体,前提条件是最终构建体具有期望的特征,例如抗原结合。

[1101] a) 取代、插入和缺失变体

[1102] 在某些实施方案中,本公开中的抗原结合分子包括具有一种或多种氨基酸取代的抗原结合分子变体。用于取代突变的目的位点包括HVR和FR。保守型取代显示在下表的“优选取代”标题下。更多实质性改变提供于表的“示例性取代”标题下,并且在下文参考氨基酸侧链类别进行了进一步描述。可以将氨基酸取代引入目标抗原结合分子中,并对产物进行期望的活性(例如保留/改善的抗原结合、降低的免疫原性、或改善的ADCC或CDC)筛选。

[1103] [表5]

[1104]

原始残基	示例性取代	优选取代
Ala (A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg (R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn (N)	Gln;His;Asp,Lys;Arg	Gln
Asp (D)	Glu;Asn	Glu
Cys (C)	Ser;Ala	Ser
Gln (Q)	Asn;Glu	Asn
Glu (E)	Asp;Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg
Ile (I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe;正亮氨酸	Leu

Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[1105] 可根据共同的侧链特性将氨基酸分组:

[1106] (1) 疏水性: 正亮氨酸、蛋氨酸 (Met)、丙氨酸 (Ala)、缬氨酸 (Val)、亮氨酸 (Leu)、异亮氨酸 (Ile);

[1107] (2) 中性亲水性: 半胱氨酸 (Cys)、丝氨酸 (Ser)、苏氨酸 (Thr)、天冬酰胺 (Asn)、谷氨酰胺 (Gln);

[1108] (3) 酸性: 天冬氨酸 (Asp)、谷氨酸 (Glu);

[1109] (4) 碱性: 组氨酸 (His)、赖氨酸 (Lys)、精氨酸 (Arg);

[1110] (5) 影响链取向的残基: 甘氨酸 (Gly)、脯氨酸 (Pro);

[1111] (6) 芳香族: 色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr)、苯丙氨酸 (Phe)。

[1112] 非保守性取代将需要用这些类别中的一个的成员交换另一类别。

[1113] 一种类型的取代变体涉及取代亲本抗原结合分子 (例如, 人源化抗体或人抗体) 的一个或多个高可变区残基。通常, 相对于亲本抗原结合分子, 选为用于进一步研究的一个或多个所得变体将在某些生物学特性方面 (例如, 亲和力增加、免疫原性降低) 有改变 (例如, 改善) 和/或将基本上保留亲本抗原结合分子的某些生物学特性。示例性取代变体是亲和力成熟抗体, 其可例如使用诸如本文所述的那些基于噬菌体展示的亲和力成熟技术方便地生成。简而言之, 将一个或多个 HVR 残基突变并且将变体抗体展示在噬菌体上并针对特定生物活性 (例如结合亲和力) 进行筛选。

[1114] 例如, 可改变 (例如, 取代) HVR, 以改善抗原结合分子亲和力。此类改变可以发生于 HVR “热点” 中, 即由体细胞成熟过程中发生高频突变的密码子编码的残基 (参见, 例如, Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)) 和/或与抗原接触的残基 (检测所得变体 VH 或 VL 的结合亲和力)。通过构建并自二级文库重新选择而实现的亲和力成熟已在例如 Hoogenboom 等人, Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien 等人编, Human Press, Totowa, NJ, (2001)) 中进行过描述。在亲和力成熟的一些实施方案中, 利用多种方法 (例如, 易错 PCR、链改组或寡核苷酸定点诱变基因) 中的任一种将多样性引入选择用于成熟的可变基因中。然后创建一个二级文库。随后对该文库进行筛选以鉴别具有所需亲和力的任何抗原结合分子变体。引入多样性的另一种方法涉及 HVR 定向方法, 其中将若干 HVR 残基 (例如, 每次 4 至 6 个残基) 随机化。参与抗原结合的 HVR 残基可例如使用丙氨酸扫描突变或建模来特异性地鉴定。具体而言, 常常靶向 CDR-H3 和 CDR-L3。

[1115] 在某些实施方案中, 取代、插入或缺失可发生在一个或多个 HVR 内, 只要此类改变

基本上不降低抗原结合分子的抗原结合能力即可。例如,可在HVR中进行基本上不降低结合亲和力的保守性改变(例如,本文描述的保守性取代)。此类改变可以在HVR的抗原接触残基之外。在上文提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中,每个HVR保持不变,或包含不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[1116] 可用于鉴别可被靶向突变的抗原结合分子残基或区域的方法称作“丙氨酸扫描突变”,如Cunningham和Wells, (1989) *Science*, 244:1081-1085中所述。在此方法中,鉴别残基或一组靶残基(例如,带电残基,诸如arg、asp、his、lys和glu)并用中性或带负电的氨基酸(例如,丙氨酸或多丙氨酸)替换以确定抗原结合分子与抗原的相互作用是否受到影响。可在对初始取代展示功能敏感性的氨基酸位置引入其他取代。替代性地或另外地,可以分析抗原和抗原结合分子的复合物的晶体结构以鉴定抗原结合分子与抗原之间的接触点。可靶向或消除作为取代的候选的此类接触残基和相邻残基。可筛选变体以确定它们是否具备期望的特性。

[1117] 关于本公开中的抗原结合分子,所需特性(活性)的实例可以包括但不特别限于结合活性、中和活性、细胞毒活性、激动剂活性、拮抗剂活性和酶活性。激动剂活性是在细胞内转导信号的活性,例如通过抗体与抗原(诸如受体)结合,来诱导某些生理活动的改变。生理活性的实例可以包括但不仅限于增殖活性、存活活性、分化活性、转录活性、膜转运活性、结合活性、蛋白水解活性、磷酸化/去磷酸化活性、氧化还原活性、转移活性、核溶解活性、脱水活性、细胞死亡诱导活性和细胞凋亡诱导活性。

[1118] 氨基酸序列插入包括长度范围为一个残基至含有一百个或更多个残基的多肽的氨基和/或羧基末端融合,以及一个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N末端甲硫氨酰残基的抗原结合分子。抗原结合分子的其他插入变体包括将酶(例如,用于ADEPT)或增加抗原结合分子的血浆半衰期的多肽融合到抗原结合分子的N末端或C末端。

[1119] b) 糖基化变体

[1120] 在某些实施方案中,改变本文的抗原结合分子以增加或降低抗原结合分子糖基化的程度。糖基化位点向抗原结合分子的添加或缺失可通过改变氨基酸序列以产生或去除一个或多个糖基化位点而方便地实现。

[1121] 当抗原结合分子包含Fc区时,附接于其上的碳水化合物可以被改变。由哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含支链的双触角寡糖,该双触角寡糖通常通过N键连接至Fc区的CH2结构域的Asn297。参见,例如,Wright等人TIBTECH 15:26-32(1997)。寡糖可包括各种碳水化合物,例如,甘露糖、N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及附接于双触角寡糖结构的“主干”中的GlcNAc的岩藻糖。在一些实施方案中,可对本公开的抗原结合分子中的寡糖进行修饰,以产生具有某些改善特性的抗原结合分子变体。

[1122] 在一个实施方案中,具有缺乏(直接或间接)附着于Fc区的岩藻糖的碳水化合物结构的抗原结合分子变体也适用于本公开中的抗原结合分子。例如,此类抗原结合分子中岩藻糖的含量可以为1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。岩藻糖的量通过相对于通过MALDI-TOF质谱测得的与Asn 297连接的所有糖结构(例如,复合、杂合和高甘露糖结构)的总和计算糖链内在Asn297处的岩藻糖的平均量来确定,例如,如WO 2008/077546中所述。Asn297是指位于Fc区中约297位的天冬酰胺残基(Fc区残基的EU编号);然而,由于抗原

结合分子中的微小序列变化,Asn297也可以位于297位上游或下游大约 ± 3 个氨基酸,即在294位和300位之间。此类岩藻糖基化变体可具有改善的ADCC功能。参见例如美国专利公开号US2003/0157108(Presta,L.);US2004/0093621(Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd)。有关“去岩藻糖化”或“岩藻糖缺陷型”抗原结合分子变体的出版物的实例包括:US2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US2003/0115614;US2002/0164328;US 2004/0093621;US2004/0132140;US2004/0110704;US2004/0110282;US2004/0109865;WO 2003/085119;WO 2003/084570;WO 2005/035586;WO 2005/035778;WO2005/053742;WO2002/031140;Okazaki等人,J.Mol.Biol.336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki等人,Biotech.Bioeng.87:614(2004)。能够产生去岩藻糖基化抗原结合分子的细胞系的实例包括蛋白岩藻糖基化缺陷的Lec13 CHO细胞(Ripka等人Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);美国专利申请号US2003/0157108A1,Presta,L;和WO 2004/056312 A1,Adams等人,特别是实例11),和敲除细胞系诸如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因(FUT8)敲除的CHO细胞(参见例如,Yamane-Ohnuki等人Biotech.Bioeng.87:614(2004);Kanda,Y.等人,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006);和WO2003/085107)。

[1123] 具有一分为二的寡糖(例如,其中附着至抗原结合分子的Fc区的双触角寡糖被GlcNAc一分为二)的抗原结合分子变体,也进一步被本公开中的抗原结合分子所涵盖。此类抗原结合分子变体可具有减少的岩藻糖基化和/或改善的ADCC功能。此类抗体变体的实例描述于例如WO 2003/011878(Jean-Mairet等人)、美国专利号6,602,684(Umana等人)和US2005/0123546(Umana等人)中。在附着至Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗原结合分子变体也被本公开中的抗原结合分子所涵盖。此类抗原结合分子变体可具有改善的CDC功能。此类抗原结合分子变体描述于例如WO 1997/30087(Patel等人);WO 1998/58964(Raju,S.);以及WO 1999/22764(Raju,S.)中。

[1124] c)Fc区变体

[1125] 在某些实施方案中,一个或多个氨基酸修饰可引入本文的抗原结合分子的Fc区中,从而生成Fc区变体。Fc区变体可包含人Fc区序列(例如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区),其在一个或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如取代)。

[1126] 在某些实施方案中,本发明设想了具有一些但不是所有效应子功能的抗原结合分子变体,这使其成为应用的理想候选物,其中抗原结合分子在体内的半衰期很重要,但是某些效应子功能(诸如补体和ADCC)是不必要的或有害的。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定,以确认CDC和/或ADCC活性的降低/消耗。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定以确保抗原结合分子缺乏Fc γ R结合(因此可能缺乏ADCC活性),但是保留FcRn结合能力。介导ADCC的主要细胞NK细胞仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。造血细胞上的FcR表达总结在Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol 9:457-492(1991)的第464页的表3中。用于评估目标分子的ADCC活性的体外测定的非限制性示例描述于美国专利号5500362(参见,例如,Hellstrom,I.等人Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 83:7059-7063(1986))和Hellstrom,I等人,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 82:1499-1502(1985);5,821,337(参见Bruggemann,M.等人,J.Exp.Med.166:1351-1361(1987))中。替代性地,可以采用非放射性测定方法(参见例如,用于流式细胞术的ACT1™非放射性细胞毒性测定(CellTechnology, Inc.Mountain View,CA);以及CytoTox 96(注册商标)非放射性细胞毒性测定(Promega,

Madison, WI))。用于此类测定的有用的效应子细胞包括外周血单个核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。替代性地或另外地,目标分子的ADCC活性可以在体内评定,例如,在动物模型(诸如在Clynes等人Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 95:652-656(1998)中所公开的)中评定。也可以进行C1q结合测定以确认抗原结合分子不能与C1q结合,因此缺乏CDC活性。参见,例如,WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体活化,可以执行CDC测定(参见例如Gazzano-Santoro等人,J.Immunol.Methods 202:163(1996);Cragg,M.S.等人,Blood 101:1045-1052(2003);以及Cragg,M.S.和M.J.Glennie,Blood 103:2738-2743(2004))。FcRn结合和体内清除/半衰期测定也可以使用本领域已知的方法执行(参见例如Petkova,S.B.等人,Int'l.Immunol.18(12):1759-1769(2006))。

[1127] 具有降低的效应子功能的抗原结合分子包括具有Fc区残基238、265、269、270、297、327和329中的一者或多者的取代的那些(美国专利号6,737,056)。此类Fc突变体包括在氨基酸位置265、269、270、297和327处的两个或更多个处具有取代的Fc突变体,包括残基265和297被取代为丙氨酸的所谓的“DANA”Fc突变体(美国专利号7,332,581)。

[1128] 描述了某些与FcR结合增加或减少的抗原结合分子变体。(参见例如,美国专利号6,737,056;WO 2004/056312,以及Shields等人,J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001)。)

[1129] 在某些实施方案中,抗原结合分子变体包含具有改善ADCC的一个或多个氨基酸取代的Fc区,例如,在Fc区的位置298、333和/或334(残基的EU编号)处的取代。

[1130] 在一些实施方案中,例如,如美国专利号6,194,551、WO 99/51642和Idusogie等人J.Immunol.164:4178-4184(2000)中所述,在Fc区中进行改变,导致改变(即,增加或减少)的C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[1131] 具有延长的半衰期和增加的新生儿Fc受体(FcRn)结合的抗体描述于US2005/0014934A1(Hinton等人)中,该新生儿Fc受体负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer等人,J.Immunol.117:587(1976)和Kim等人,J.Immunol.24:249(1994))。那些抗体包含这样的Fc区,该Fc区中具有增加的Fc区与FcRn的结合的一个或多个取代。此类Fc变体包括在以下Fc区残基中的一处或多处具有取代的Fc变体:238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434,例如对Fc区残基434的取代(美国专利号7,371,826)。

[1132] 也参见Duncan&Winter,Nature 322:738-40(1988);美国专利号5,648,260;美国专利号5,624,821;和WO 94/29351关于Fc区变体的其它实例。

[1133] d) 半胱氨酸工程化抗原结合分子变体

[1134] 在某些实施方案,可期望产生半胱氨酸工程化的抗原结合分子,例如“thioMAb”,其中抗原结合分子的一个或多个残基被半胱氨酸残基取代。在特定实施方案中,取代的残基存在于抗原结合分子的可接近位点。如本文进一步描述的,通过用半胱氨酸取代那些残基,反应性硫醇基团由此定位于抗原结合分子的可接近位点处,并且可以用于将抗原结合分子缀合至其他部分(诸如药物部分或接头-药物部分),以产生免疫缀合物。在某些实施方案中,可用半胱氨酸取代下列残基中的任何一个或多个:轻链的V205(Kabat编号);重链的A118(EU编号);和重链Fc区的S400(EU编号)。可如例如美国专利号7,521,541中所述形成半胱氨酸工程化的抗原结合分子。

[1135] e) 抗原结合分子变体

[1136] 在某些实施方案中,本文的抗原结合分子可以被进一步修饰以包含本领域已知的并且容易获得的另外的非蛋白质部分。适合于抗原结合分子衍生化的部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或随机共聚物)和葡聚糖或聚(n-乙烯吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如,甘油)、聚乙烯醇以及它们的混合物。由于其在水中的稳定性,聚乙二醇丙醛在制造中可具有优势。聚合物可具有任何分子量,并且可以具有支链或不具有支链。附着至抗原结合分子的聚合物的数目可变,并且如果附着了多于一个聚合物,那么它们可以为相同或不同的分子。通常,可基于以下考虑因素测定用于衍生化的聚合物的数目和/或类型,包括但不限于抗原结合分子待改善的特定特性或功能、抗原结合分子衍生物是否将用于限定条件下的疗法等。

[1137] 在另一个实施方案中,抗原结合分子可以是与非蛋白质部分的缀合物,该部分可以通过暴露于辐射而选择性地加热。在一个实施方案中,非蛋白质部分是碳纳米管(Kam等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102:11600-11605(2005))。辐射可具有任何波长,并且包括但不限于对普通细胞没有伤害、但是将非蛋白质性部分加热至抗原结合分子-非蛋白质性部分近端的细胞被杀死的温度的波长。

[1138] 重组方法和组合物

[1139] 可以使用重组方法和组合物来产生抗原结合分子,例如,如在美国专利号4816567中所述。在一个实施方案中,提供了编码本公开中的抗原结合分子(包含本文描述的抗原结合结构域的多肽)的分离核酸。此类核酸可以编码包含抗原结合分子的VL的氨基酸序列和/或包含抗原结合分子的VH(例如,抗原结合分子的轻链和/或重链)的氨基酸序列。在进一步的实施方案中,提供一或多个包含此类核酸的载体(例如,表达载体)。在进一步的实施方案中,提供包含此类核酸的宿主细胞。在一个此类实施方案中,宿主细胞包含(例如,已经用以下各物转化):(1)包含核酸的载体,该核酸编码包含抗原结合分子的VL的氨基酸序列和包含抗原结合分子的VH的氨基酸序列;或(2)第一载体和第二载体,该第一载体包含核酸,该核酸编码包含抗原结合分子的VL的氨基酸序列,该第二载体包含核酸,该核酸编码包含抗原结合分子的VH的氨基酸序列。在一个实施方案中,宿主细胞是真核细胞,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴细胞(例如Y0、NS0、Sp2/0细胞)。在一个实施方案中,抗原结合分子可以通过在适合于表达抗原结合分子的条件培养如上所提供的包含编码抗原结合分子的核酸的宿主细胞,以及任选地从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收抗原结合分子来获得。

[1140] 为重组生产本公开中的抗原结合分子,将例如如上所述的编码抗原结合分子的核酸分离并且插入至一个或多个载体中以用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。可以使用常规程序来容易地对此类核酸进行分离和测序(例如,通过使用能够与编码抗原结合分子的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。

[1141] 用于克隆或表达编码抗原结合分子的载体的合适宿主细胞包括本文所述的原核或真核细胞。例如,可以在细菌中产生抗原结合分子,特别是当不需要糖基化和Fc效应子功能时。关于在细菌中表达抗体片段和多肽,参见例如美国专利号5,648,237、5,789,199和5,840,523。(另请参见Charlton,Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo编,

Humana Press, Totowa, NJ, 2003), 第245-254页, 其描述抗体片段在大肠杆菌中的表达。) 抗原结合分子在表达后可以在可溶性级分中从细菌细胞糊状物中分离, 并可以进一步纯化。

[1142] 除了原核生物外, 诸如丝状真菌或酵母等真核微生物也是用于编码抗原结合分子的载体的合适克隆或表达宿主, 该真核微生物包括这样的真菌和酵母菌株: 其糖基化途径已经“人源化”, 从而使得产生具有部分或完全人糖基化模式的抗原结合分子。参见 Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004) 及 Li 等人, Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)。

[1143] 用于表达糖基化抗原结合分子的合适宿主细胞还来源于多细胞生物(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物细胞和昆虫细胞。已经鉴定出了可以与昆虫细胞结合使用, 特别是用于转染草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞的许多杆状病毒株。

[1144] 植物细胞培养物也可用作宿主。参见例如美国专利号 5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978 和 6,417,429 (描述了用于在转基因植物中产生抗原结合分子的 PLANTIBODIES™ 技术)。

[1145] 脊椎动物细胞也可用作宿主。例如, 适于在悬浮液中生长的哺乳动物细胞系可能是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的非限制性示例为由 SV40 转化的猴肾 CV1 系 (COS-7); 人胚肾系 (293 或 293 细胞, 如例如在 Graham 等人, J. Gen. Virol. 36:59 (1977) 中所述); 幼仓鼠肾细胞 (BHK); 小鼠塞尔托利氏细胞 (TM4 细胞, 如例如在 Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980) 中所述); 猴肾细胞 (CV1); 非洲绿猴肾细胞 (VERO-76); 人宫颈癌细胞 (HELA); 犬肾细胞 (MDCK); 布法罗大鼠肝细胞 (BRL 3A); 人肺细胞 (W138); 人肝细胞 (Hep G2); 小鼠乳腺肿瘤 (MMT 060562); TRI 细胞 (如例如在 Mather 等人, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982) 中所述); MRC 5 细胞; 以及 FS4 细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞, 其包括 DHFR-CHO 细胞 (Urlaub 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); 以及骨髓瘤细胞系, 诸如 Y0、NS0 和 Sp2/0。关于适用于抗原结合分子生产的某些哺乳动物宿主细胞系的综述, 参见例如 Yazaki 和 Wu, Methods in Molecular Biology, 第248卷 (B.K.C. Lo 编, Humana Press, Totowa, NJ), 第255-268页 (2003)。

[1146] 本文描述的抗原结合分子的重组生产可以用与上述那些类似的方法进行, 即通过使用包含一个或多个载体的宿主细胞 (例如已经用一个或多个载体转化的宿主细胞), 该载体包含编码包含整个抗原结合分子或抗原结合分子的一部分的氨基酸序列的核酸。

[1147] 测定

[1148] 可通过本技术领域已知的各种测定, 对本公开中的抗原结合分子的物理/化学特性和/或生物活性来进行鉴别、筛选或表征。

[1149] a) 结合测定和其他测定

[1150] 在一个方面, 本公开中的抗原结合分子通过诸如 ELISA、蛋白质印迹等已知方法测试其抗原结合活性。

[1151] b) 活性测定

[1152] 在一个方面, 抗原结合分子可以发挥任何生物活性。生物活性可以包括, 例如, 将两个抗原分子保持在空间上接近的位置的活性、调节两个抗原分子之间相互作用的活性、促进配体激活受体的活性、促进酶与底物的催化反应的活性、促进表达第一抗原的细胞与

表达第二抗原的细胞之间的相互作用、促进具有细胞毒活性的细胞(例如,T细胞、NK细胞、单核细胞或巨噬细胞)损伤靶细胞的活性、调节通过彼此缔合而激活的两个抗原分子的激活的活性、以及对蛋白酶切割的抗性。还适当地使用在体内和/或体外具有此类生物活性的抗原结合分子。

[1153] 此外,本公开中的抗原结合分子可以根据该抗原结合分子结合的抗原分子的类型发挥各种生物活性。此类抗原结合分子的实例包括:抗原结合分子,其与T细胞受体(TCR)复合物(例如CD3)结合,并具有诱导T细胞激活的活性(激动剂活性);以及抗原结合分子,其与TNF受体超家族(例如,OX40或4-1BB)的分子或其他共刺激分子(例如,CD28或ICOS)的分子结合,并具有促进上述激活的活性(激动剂活性)。在某些实施方案中,通过本公开中的抗原结合分子中包含的两个或更多个抗原结合结构域的连接,增强或减弱了通过与抗原分子结合而发挥的此类生物活性。不受理论的限制,在某些实施方案中,可以实现此类增强或减弱,因为两个或更多个抗原分子之间的相互作用通过与本公开中的抗原结合分子的结合来调节(例如,两个或更多个抗原分子之间的缔合被促进)。

[1154] 在某些实施方案中,测试本公开中的抗原结合分子的此类生物活性。两个抗原分子是否保持在空间上接近可以使用诸如由抗原和抗原结合分子组成的复合物的晶体结构分析、电子显微镜和基于电子断层扫描结构分析的技术来评估。两个抗原结合结构域是否在空间上彼此接近或者两个抗原结合结构域的迁移率是否降低也可以通过上述技术来评估。具体地,关于使用电子断层扫描分析IgG分子的三维结构的技术,参见例如Zhang等人,Sci.Rep.5:9803(2015)。在电子断层扫描中,目标分子可能形成的结构的出现频率可以通过直方图显示,从而能够对结构变化(诸如结构域的迁移率降低)进行分布评估。例如,当结构相关参数(诸如两个结构域之间的距离和角度)可以取的值与它们的出现频率之间的关系用直方图显示时,如果两个结构域的分布面积减小,则可以确定它们的迁移率降低。通过根据靶标抗原分子的类型从已知的活性测量系统中选择并使用适当的活性测量系统,可以评估通过两个抗原分子的相互作用等发挥的活性。可以使用本领域技术人员已知的方法或以下实施例描述的方法来评估对蛋白酶切割的影响。

[1155] VI. 制剂、药物组合物、药物制剂

[1156] 本公开涉及通过本文描述的方法生产的包含抗原结合分子的制剂,所述抗原结合分子包含在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键。如本文所述的抗原结合分子的制剂可以通过将具有所需纯度的抗原结合分子与一种或多种任选的药学上可接受的载体混合,而制成药物组合物或药物制剂的形式(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编(1980))。因此,本公开涉及通过本文描述的方法生产的药物组合物或药物制剂,所述药物组合物或药物制剂包含含有抗原结合分子的制剂,所述抗原结合分子包含在铰链区以外的区域中的氨基酸残基之间形成的至少一个二硫键。本公开中的药物组合物或药物制剂以冻干制剂或水溶液的形式制备。药用载体通常在所采用的剂量和浓度下对受者无毒;并且包括但不限于:缓冲液,诸如磷酸脂、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和蛋氨酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸

如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,诸如钠;金属络合物(例如锌-蛋白络合物);和/或非离子表面活性剂,诸如聚乙二醇(PEG)。本文的示例性药用载剂进一步包括间质药物分散剂,诸如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如,人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,诸如rHuPH20(HYLENEX(注册商标),Baxter International, Inc.)。某些示例性sHASEGP和使用方法(包括rHuPH20)描述于美国专利公开号2005/0260186和2006/0104968中。在一个方面中,将sHASEGP与一种或多种另外的糖胺聚糖酶(诸如软骨素酶)组合。

[1157] 示例性的冻干抗原结合分子制剂描述于美国专利号6,267,958中。水性抗原结合分子制剂包括在美国专利号6,171,586和W02006/044908中描述的那些,后一者中的制剂包含组氨酸-乙酸盐缓冲液。

[1158] 本文的药物组合物或药物制剂还可含有多于一种对于所治疗的特定适应症是必需的活性成分,优选是具有不会彼此不利地影响的互补活性的活性成分。此类活性成分适当地以对预期目的有效的量组合存在。

[1159] 活性成分可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合而制备的微胶囊(例如,分别为羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)中;包埋在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊)中;或包埋在粗乳液中。此类技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol, A. 编辑(1980)中。

[1160] 可以制备缓释制剂。缓释制剂的合适实例包括含有抗原结合分子的固态疏水聚合物的半透性基质,这些基质是例如膜或微胶囊等成型制品的形式。

[1161] 待用于体内施用的制剂通常是无菌的。例如,无菌可以通过无菌过滤膜过滤而容易地实现。

[1162] 引用的所有文件均以引用方式并入本文。

[1163] 以下是本公开的方法和组合物的实例。应当理解,在给出以上提供的一般描述的情况下,可以实践各种其他实施方案。

[1164] [实例]

[1165] [实例1]使用两种类型的还原剂Cys和TCEP的有效性验证

[1166] [总结]

[1167] 本发明人开发了用于通过对Fab区中具有人工半胱氨酸残基的抗原结合分子有效地施加还原和氧化反应,以通过二硫键交联Fab来获得具有高比例LINC形式的抗体溶液的方法。

[1168] [开发方法]

[1169] 通过将“使还原溶液流动→去除还原剂并氧化”的两个步骤插入到“蛋白A亲和层析”技术(普遍用于细胞培养液的初级纯化)中,开发了稳定获得高产率LINC形式的技术(收获的细胞培养液:HCCF)。本发明的方法中的蛋白A亲和层析的每个步骤的细节示出在表6中。

[1170] [表6]

[1171]

		溶液组成	流动体积 (CV)
蛋白 A	抗体吸附	细胞培养液 (HCCF), 10 至 20 g/L 树脂	-
	平台清洗 (杂质的去除)	25 mmol/L NaCl, 25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.7)	2
		400 mmol/L Na ₂ SO ₄ , 25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.7)	3
		25 mmol/L NaCl, 25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.7)	2
	还原步骤	还原剂溶液	10
	还原剂去除氧化步骤	25 mmol/L NaCl, 25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.7)	5
	抗体洗脱和回收	50 mmol/L 乙酸	5

[1172] [分析方法]

[1173] 由于Fab交联,样品中LINC形式的抗体的比例定义为“LINC比率”。

[1174] LINC比率如W02021/157679中进行计算。具体地,通过非还原SDS-PAGE来分离交联的LINC形式和非交联的unLINC形式(开放型),并比较相应的丰度比。

[1175] 用于非还原SDS-PAGE的程序如下:

[1176] 1) 将使用PBS稀释至0.1mg/mL的样品与等量的样品缓冲溶液(2ME⁻)(x2)混合,并且然后在70°C加热10分钟;

[1177] 2) 将10uL上样到4% SDS-PAGE凝胶上,并在Tris/甘氨酸/SDS缓冲液中以125V电泳90分钟;

[1178] 3) 在40% MeOH和10% AcOH中固定10分钟后,使用CBB溶液染色一分钟,并且然后使用MilliQ脱色10分钟;以及

[1179] 4) 使用ChemiDoc Touch MP成像系统(Bio-Rad Corporation)获得图像数据并对每个条带进行定量;具体地,使用仪器本身获得脱色凝胶的图像数据,并使用附带的图像分析软件ImageQuant LAS400对条带中的每一者进行定量。

[1180] 关于Mab1(双/LINC(1+2)形式,三价抗体,链1:SEQ ID NO:54;链2:SEQ ID NO:55;链3:SEQ ID NO:56;链4和链5:SEQ ID NO:57),将包括抗体的培养液以10g/L树脂上样到蛋白A柱(MabSelect SuRe,1mL)上,并通过按表6中示出的顺序通过溶液来进行层析。

[1181] SEQ ID NO:54的位置1至22处的氨基酸残基、SEQ ID NO:55的位置1至19处的氨基酸残基、SEQ ID NO:56的位置1至19处的氨基酸残基以及SEQ ID NO:57的位置1至19处的氨基酸残基的序列为表达信号序列。在LINC形式中,链1的EU编号位置191处的氨基酸残基与链3的EU编号位置191处的氨基酸残基之间形成二硫键。链1的EU编号位置191处的氨基酸残基对应于SEQ ID NO:54中位置444处的氨基酸残基。链3的EU编号位置191处的氨基酸残基对应于SEQ ID NO:56中位置221处的氨基酸残基。

[1182] 在还原步骤中,使含有半胱氨酸(Cys)或三(2-羧乙基)膦(TCEP)的溶液流动。对于溶液中的每一者,浓度、缓冲液组成和pH如表7所示。在还原步骤中,以柱停留时间为12分钟的速率,使溶液以10倍柱体积流动,并且反应进行120分钟。

[1183] [表7]

[1184]

还原剂	还原剂浓度 (mmol/L)	缓冲液组成	pH
Cys	0.1 mmol/L 1 mmol/L 10 mmol/L 100 mmol/L	50 mmol/L Tris-HCl	pH7 pH8
TCEP	0.001 mmol/L 0.01 mmol/L 0.1 mmol/L 1 mmol/L	20 mmol/L Tris-HCl	pH7 pH8

[1185] 在还原剂去除/氧化步骤中,使25mM NaCl、25mM Tris-HCl (pH7.7,不含氧化剂和还原剂) 流动。以柱停留时间为4分钟的速率,使溶液以5倍柱体积流动,并且反应进行20分钟。

[1186] [结果]

[1187] 作为结果,在pH 7.0和8.0的条件下,并且浓度在0.1至10mmol/L范围内,Cys被证实会提高LINC比率(图1)。此外,还证实层析产率与跳过氧化还原反应的对照(92%)大致相同(85%至104%)。

[1188] 此外,在TCEP的情况下,还原剂浓度为0.001至0.01mmol/L的条件也被证实会提高LINC比率(图2)。

[1189] [结论]

[1190] 本发明的方法是能够容易以及快速且高产率地获得LINC形式的技术,并且发现它们适用于广泛的条件(还原剂的类型可以从还原力弱的Cys到还原力很强的TCEP,还原剂浓度可以为1 μ mol/L至100mmol/L,并且另外,pH、反应时间等的范围也可以很广)。

[1191] [实例2]对于膜层析装置的有效性验证

[1192] [总结]

[1193] 已证实本技术也可以应用于使用膜层析装置的蛋白A亲和层析。

[1194] [开发方法]

[1195] 表8示出了本发明的方法中膜蛋白A亲和层析的每个步骤的细节。通过引入“使还原溶液流动→去除还原剂并氧化”的两个步骤,开发了稳定获得高产率LINC形式的技术。

[1196] [表8]

		溶液组成	流动 体 积 (MV)	流速 (MV/min)	停留 时间 (s)
[1197]	抗体吸附	细胞培养液 (HCCF)、 25 g/L 树脂	-	5	12
	平台清洗 (杂质的去除)	25 mmol/L NaCl、 25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.7±0.2)	10	5	12
		400 mmol/L Na ₂ SO ₄ 、 25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.7±0.2)	10	5	12
		25 mmol/L NaCl、 25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.7±0.2)	10	5	12
	还原步骤	还原剂溶液	15	2	30
	还原剂去除/ 氧化步骤	25 mmol/L NaCl、 25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.7±0.2)	15	2	30
	抗体洗脱和回收	50 mmol/L 乙酸	10	5	12

[1198] [分析方法]

[1199] 由于Fab交联,样品中LINC形式的抗体的比例定义为“LINC比率”。

[1200] 具有Fab交联的LINC形式不被消化,但非交联的unLINC形式(开放形式)被FabALACTICA (IdgE,由Genovis生产的蛋白酶)(一种在T与H之间消化抗体氨基酸序列KSCDKT/HTCPPCP(“/”表示消化位点)的蛋白酶)消化,并利用了该分子特征。为了分析蛋白酶处理的样品,使用了毛细管SDS凝胶电泳(CE-SDS)和疏水相互作用层析(HIC)。具体地,样品分析和LINC比率计算通过以下程序进行:

[1201] 1) 将蛋白酶IdgE添加到含有抗体的样品溶液中。

[1202] 2) 将混合样品在37°C孵育18小时。

[1203] 在通过CE-SDS分析的情况下:

[1204] 3) 通过CE-SDS来分析酶消化样品、未经酶消化处理的样品以及仅含酶的样品。

[1205] 4) 使用所获得的(A) 仅含酶的样品、(B) 未经酶消化处理的样品、以及(C) 酶消化后的每个样品的电泳图进行计算处理。从(C)中减去(A)和(B) (图4)。

[1206] 5) 计算源自LINC形式的峰面积相对于4)中获得的减法电泳图中检测到的所有峰面积的比例,并将该值作为LINC比率。

[1207] 用于计算LINC比率的公式如下:

$$[1208] \quad \text{LINC}\% = \frac{\text{[峰图标]} \times 100}{\text{[前图标]} - \text{[峰图标]} - \text{[前图标]} + \text{[峰图标]}}$$

[1209] [峰图标] : LINC形式衍生的峰

[1210] [前图标] : 源自酶消化样品的峰含有unLINC形式衍生的峰和酶衍生的峰

[1211]  :源自酶消化之前的样品的峰,,不含unLINC形式衍生的峰

[1212]  :源自仅含有酶的样品的峰

[1213] 在通过HIC分析的情况下:

[1214] 3) 通过HIC来分析酶消化样品。HIC中使用的流动相A为pH7.0的含有1.5M硫酸铵的20mM磷酸盐缓冲液,并且流动相B为pH7.0的20mM磷酸盐缓冲液。液相层析的梯度如下:在15分钟内将流动相B的比例从2%增加到100%。柱温设定为 $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$,并且UV检测波长设定为220nm。

[1215] 4) 计算LINC形式衍生的峰面积相对于所获得的UV层析图上的峰面积的比例,并将该值作为LINC比率(参见图5)。

[1216] 用于计算LINC比率的公式如下:

[1217] $(\text{LINC}\%) = (\text{LINC面积值}) \times 100 / (\text{总计})$

[1218] $(\text{总计}) = (\text{LINC面积值}) + (\text{unLINC-1面积值}) + (\text{unLINC-2面积值}) + (\text{unLINC-3面积值}) + (\text{unLINC-4面积值})$

[1219] [对于膜层析的有效性验证]

[1220] 关于Mab2(双/LINC(1+2)形式,三价抗体,链1:SEQ ID NO:54;链2:SEQ ID NO:55;链3:SEQ ID NO:60;链4和5:SEQ ID NO:57),将包括抗体的培养液以25g/L树脂上样到膜层析装置(Sartbind A,1.2mL)上,并进行层析。

[1221] SEQ ID NO:54的位置1至22处的氨基酸残基、SEQ ID NO:55的位置1至19处的氨基酸残基、SEQ ID NO:60的位置1至19处的氨基酸残基以及SEQ ID NO:57的位置1至19处的氨基酸残基的序列为表达信号序列。已去除表达信号序列的Mab2具有:具有SEQ ID NO:45的氨基酸序列的链1;具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的链2;具有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的链3;以及具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的链4和5。

[1222] 在LINC形式中,链1的EU编号位置191处的氨基酸残基与链3的EU编号位置191处的氨基酸残基之间形成二硫键。链1的EU编号位置191处的氨基酸残基对应于SEQ ID NO:54中位置444处的氨基酸残基,并且对应于SEQ ID NO:45中位置422处的氨基酸残基。链3的EU编号位置191处的氨基酸残基对应于SEQ ID NO:60中位置221处的氨基酸残基,并且对应于SEQ ID NO:44中位置202处的氨基酸残基。

[1223] 在还原步骤中,使含有0.15mmol/L还原剂(Cys)的溶液流动。缓冲液组成为pH 8.0的0.15mmol/L L-半胱氨酸和50mmol/L Tris-HCl,溶液的装置停留时间为30秒,流动量为15倍装置体积,并且反应进行7.5分钟。

[1224] 在还原剂去除/氧化步骤中,使25mM NaCl和25mM Tris-HCl(pH7.7,不含氧化剂和还原剂)的溶液流动。在装置停留时间为30秒时,使溶液以15倍装置体积流动,并且反应进行7.5分钟。

[1225] 作为结果,LINC比率被证实在设定条件下增加(表9)。此外,证实通过层析纯化的产率与跳过氧化还原反应的对照相当。

[1226] [表9]实例中获得的样品的LINC比率(示出了HIC方法的结果)

[1227]

	LINC比率(%)
--	-----------

对照(跳过还原反应)	70.1
应用本发明的样品	83.5

[1228] [结论]

[1229] 本发明的方法是容易且快速地以高产率获得LINC形式的技术,并且已证实它们不仅可以应用于柱层析而且还可以应用于膜形式的层析。

[1230] [工业实用性]

[1231] 本公开的方法可用于容易且快速地高产率生产和纯化在铰链区以外的区域中具有适当二硫键的抗原结合分子。

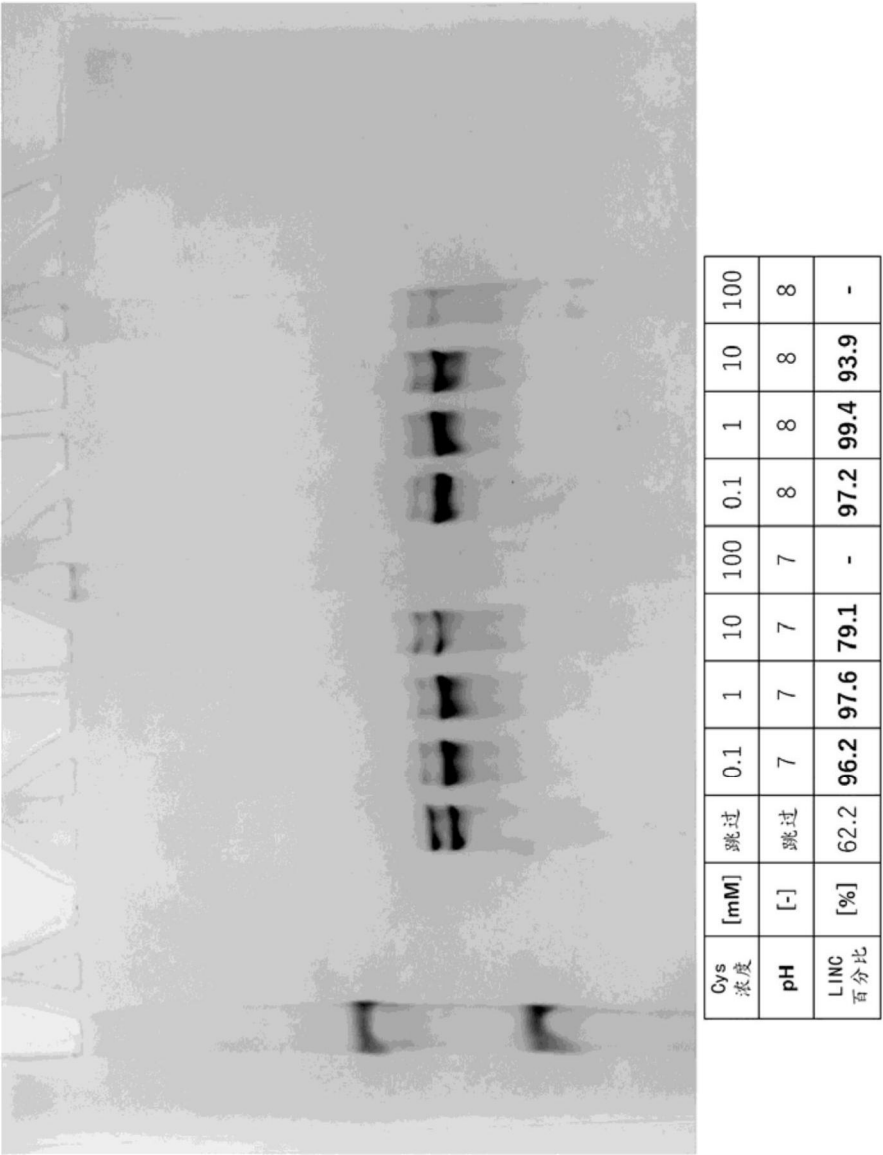


图1

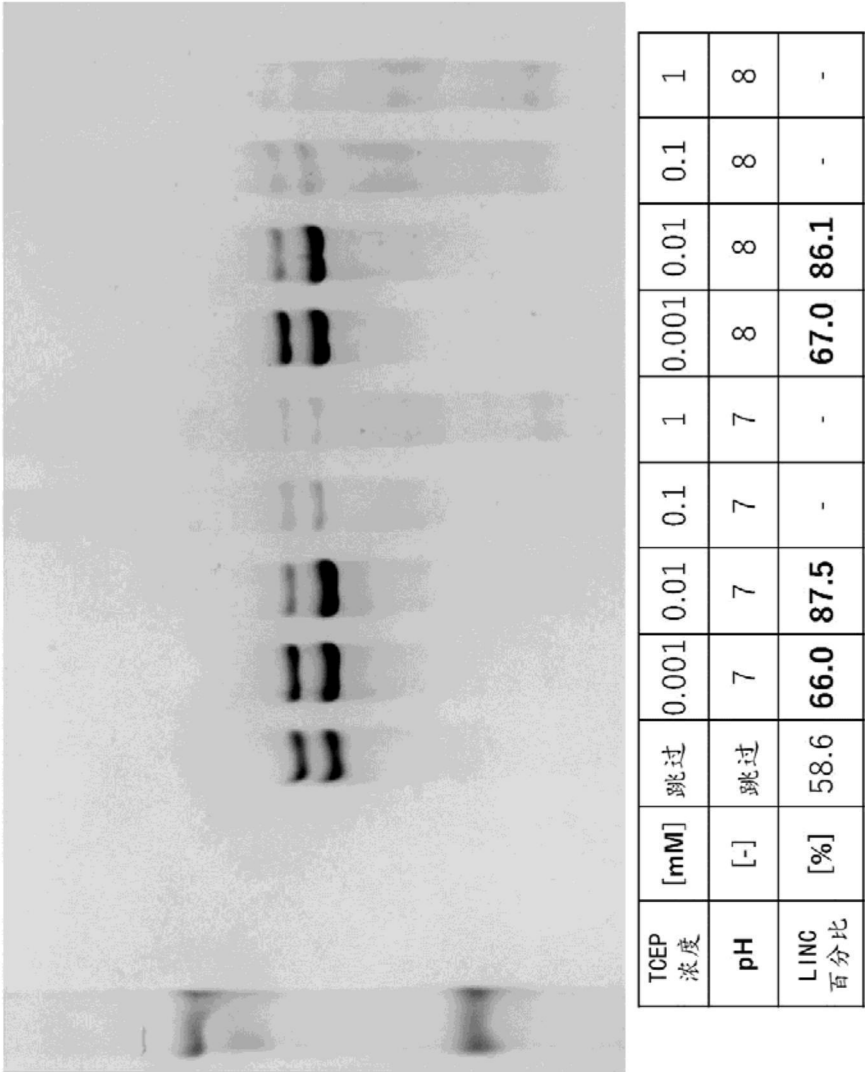


图2

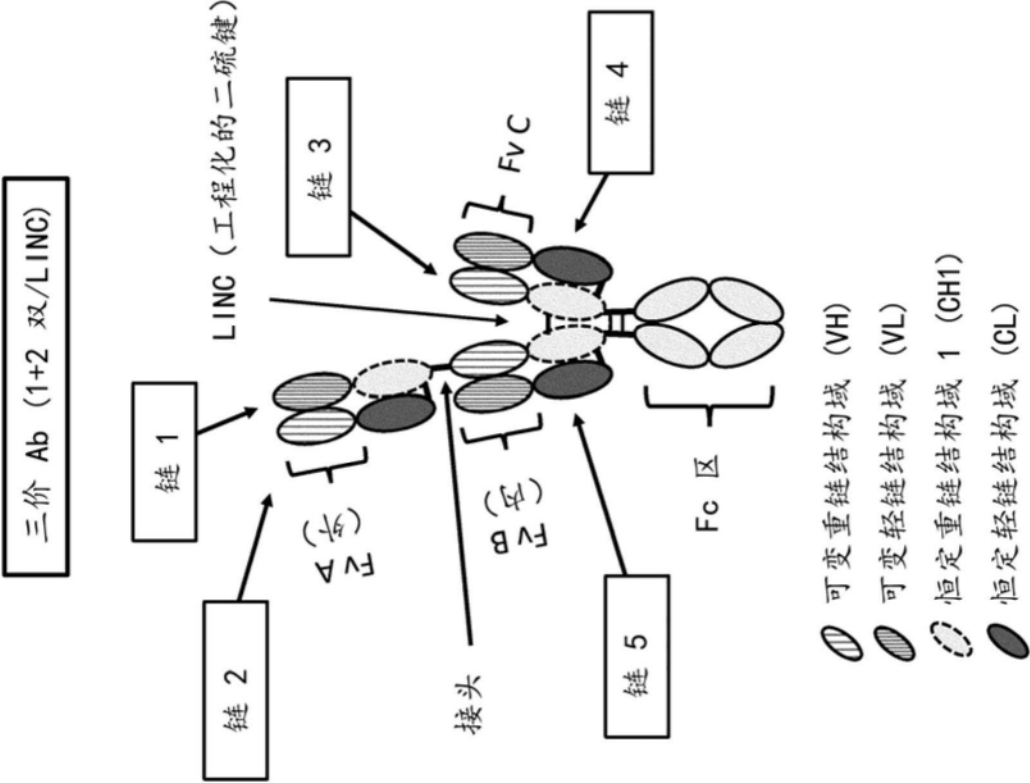


图3

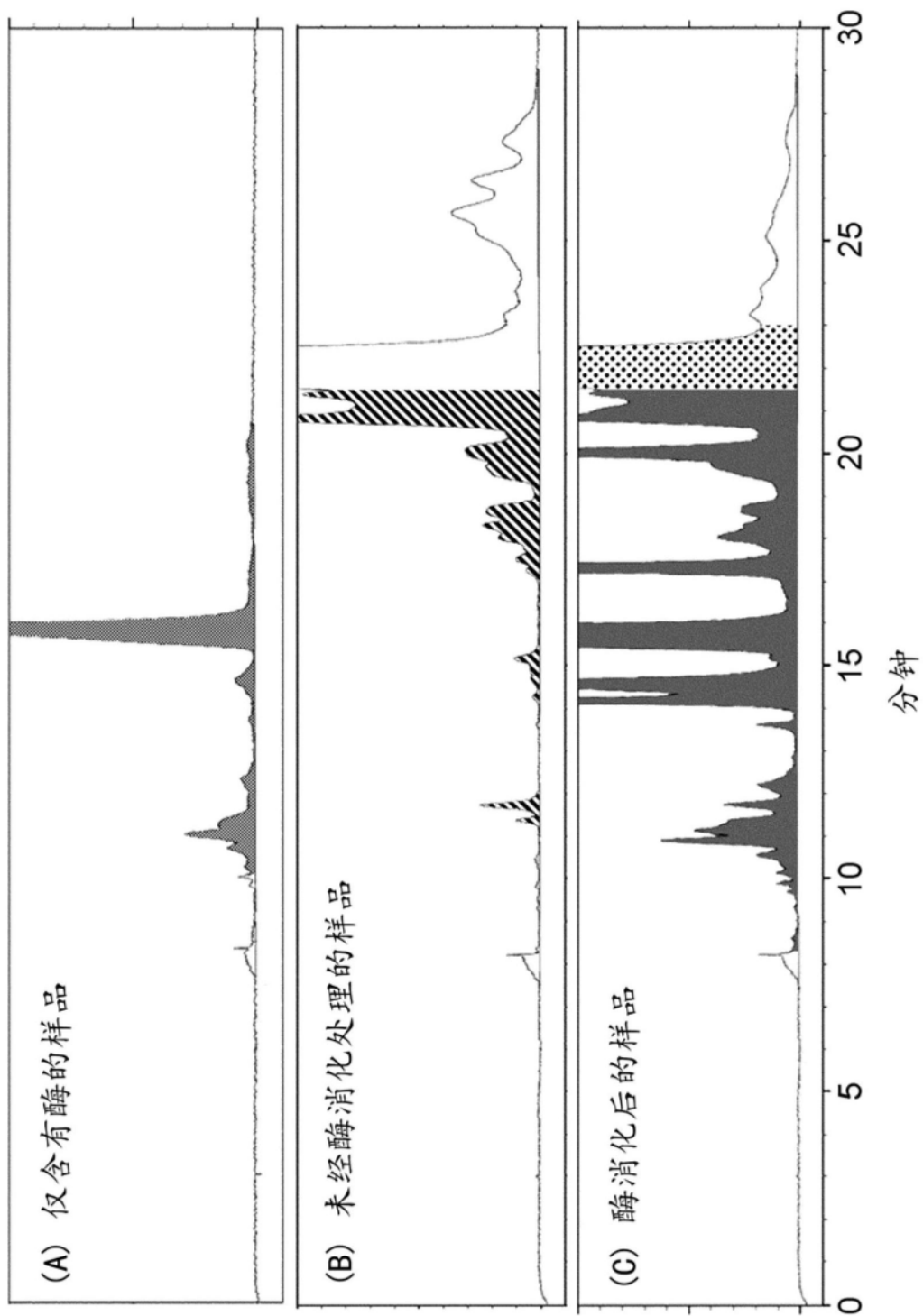


图4

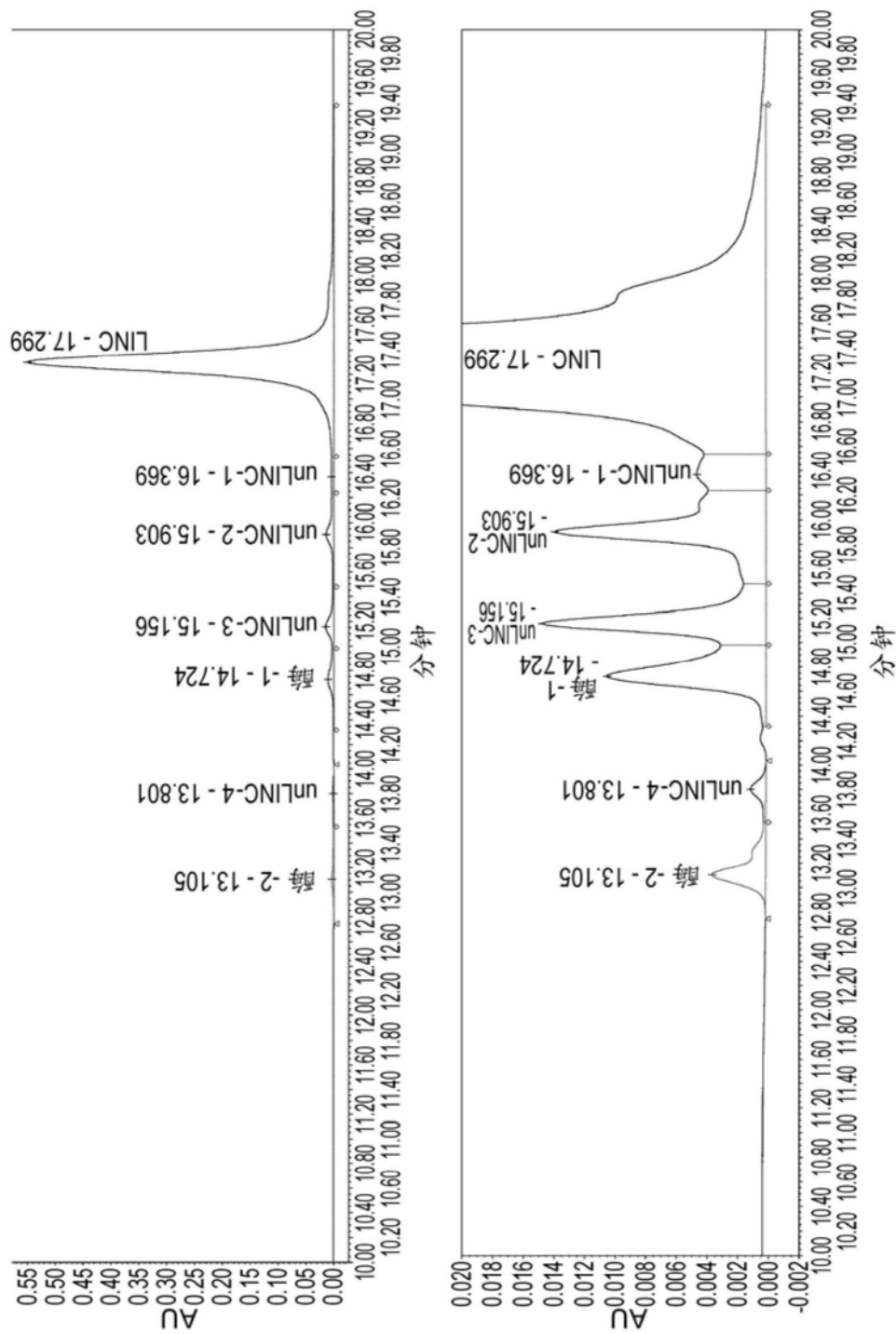


图5