



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104262483 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 07

(21) 申请号 201410421605. 8

A61K 39/395(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 01. 26

A61P 35/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

PA200900118 2009. 01. 26 DK

(62) 分案原申请数据

201080013765. 9 2010. 01. 26

(71) 申请人 根马布股份公司

地址 丹麦哥本哈根

(72) 发明人 P. 帕伦 J. J. 尼杰森

A. F. 拉布里杰恩 J. 舒尔曼

T. 文克 J. 范德温克尔

S. 洛夫里克斯 I. 拉斯特斯

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 闵丹

(51) Int. Cl.

C07K 16/00(2006. 01)

C07K 16/28(2006. 01)

C07K 16/32(2006. 01)

权利要求书6页 说明书21页

序列表10页 附图2页

(54) 发明名称

用于生成抗体混合物的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种用于在单一重组宿主细胞中生成包含两种或更多种不同抗体的混合物的方法。在一个实施方案中,生成了不同单价抗体的混合物不同。在另一个实施方案中,生成了单价和二价抗体的混合物。本发明还涉及通过本发明的方法可获得的抗体混合物及在本发明的方法中特别有用的轻链序列。

1. 一种用于在单一重组宿主细胞中生成包含两种或更多种不同抗体的混合物的方法，包括在所述宿主细胞中表达：

a) 至少一种编码共同轻链的核酸构建体，和

b) 两种或更多种编码重链的核酸构建体，所述两种或更多种核酸构建体包含

b1) 两种或更多种编码两种或更多种不同的第一重链的核酸构建体，其中所述第一重链的每个恒定区的氨基酸序列经过修饰，使得铰链区及如免疫球蛋白亚型所要求的 CH 区的其它区域，诸如 CH3 区，不含有任何在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时能够与相同的 CH 区形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键的氨基酸残基，

或

b2) 至少一种编码第一重链的核酸构建体，其中恒定区的氨基酸序列经过修饰，使得铰链区及如免疫球蛋白亚型所要求的 CH 区的其它区域，诸如 CH3 区，不含有任何能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的 CH 区形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键的氨基酸残基，和

至少一种编码第二重链的核酸构建体，其中所述第二重链能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的 CH 区形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键，

其中每种所述重链能够与所述轻链配对以形成功能性抗体。

2. 依照权利要求 1 的方法，其中所述方法包括在所述宿主细胞中表达：两种或更多种编码两种或更多种不同第一重链的核酸构建体，其中所述第一重链的每个恒定区的氨基酸序列经过修饰，使得所述铰链区和如免疫球蛋白亚型所要求的 CH 区的其它区域，诸如 CH3 区，不含有任何能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的 CH 区形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键的氨基酸残基。

3. 依照权利要求 1 的方法，其中所述方法包括在所述宿主细胞中表达：

- 至少一种编码第一重链的核酸构建体，其中恒定区的氨基酸序列经过修饰，使得铰链区及如免疫球蛋白亚型所要求的 CH 区的其它区域，诸如 CH3 区，不含有任何能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的 CH 区形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键的氨基酸残基，和

- 至少一种编码第二重链的核酸构建体，其中所述第二重链能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的 CH 区形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键。

4. 一种用于在单一重组宿主细胞中生成包含两种或更多种不同抗体的混合物的方法，包括在所述宿主细胞中表达

a) 至少一种编码共同轻链的核酸构建体，和

b) 两种或更多种编码重链的核酸构建体，所述两种或更多种核酸构建体包含

b1) 两种或更多种编码两种或更多种不同第一 IgG4 重链的核酸构建体，其中所述第一 IgG4 重链的每个恒定区的氨基酸序列经过修饰，使得铰链区不含有任何能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的 CH 区形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键的氨基酸残基，

或

b2) 至少一种编码第一 IgG4 重链的核酸构建体，其中恒定区的氨基酸序列经过修饰，使得铰链区不含有任何能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的 CH 区形

成二硫键或共价或稳定非共价重链间键的氨基酸残基,和

至少一种编码第二重链的核酸构建体,其中所述第二重链能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的 CH 区形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键,前提是所述第二重链不是野生型 IgG4 重链,

其中每种所述重链能够与所述轻链配对以形成功能性抗体。

5. 依照前述权利要求中任一项的方法,其中所述至少一种编码第一重链的核酸构建体包含编码 SEQ ID NO:5 所示的 CH3 区的序列,但是其中所述 CH3 区经过修饰,从而发生了一处或多处下述的氨基酸替代:第 238 位 Arg(R) 已被 Gln(Q) 替换;第 239 位 Asp(D) 已被 Glu(E) 替换;第 249 位 Thr(T) 已被 Ala(A) 替换;第 251 位 Leu(L) 已被 Ala(A) 替换;第 251 位 Leu(L) 已被 Val(V) 替换;第 288 位 Phe(F) 已被 Ala(A) 替换;第 288 位 Phe(F) 已被 Leu(L) 替换;第 290 位 Tyr(Y) 已被 Ala(A) 替换;第 292 位 Lys(K) 已被 Arg(R) 替换;第 292 位 Lys(K) 已被 Ala(A) 替换;第 302 位 Gln(Q) 已被 Glu(E) 替换;和第 328 位 Pro(P) 已被 Leu(L) 替换。

6. 依照权利要求 5 的方法,其中第 292 位 Lys(K) 已被 Arg(R) 替换。

7. 依照前述权利要求 5 或 6 中任一项的方法,其中所述至少一种编码第一重链的核酸构建体进一步包含编码 SEQ ID NO:5 所示的 CH1 和 / 或 CH2 区的序列。

8. 依照前述权利要求 5 至 7 中任一项的方法,其中轻链的恒定区经过修饰,使得它不含有任何能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的恒定区形成二硫键或其它共价键的氨基酸。

9. 依照权利要求 8 的方法,其中所述至少一种编码共同轻链的核酸构建体包含编码具有 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列的 κ CL 区的序列,但是其中所述序列经过修饰,使得第 106 位末端半胱氨酸残基已被另一种氨基酸残基替换或已被删除。

10. 依照权利要求 8 的方法,其中所述至少一种编码共同轻链的核酸构建体包含编码具有 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列的 λ CL 区的序列,但是其中所述序列经过修饰,使得第 104 位半胱氨酸残基已被另一种氨基酸残基替换或已被删除。

11. 依照前述权利要求 5 至 7 中任一项的方法,其中所述重链的恒定区经过修饰,使得它含有能够与所述轻链形成二硫键或其它共价键的残基。

12. 依照前述权利要求中任一项的方法,其中所述至少一种编码第一重链的核酸构建体包含编码 SEQ ID NO:5 所示的 CH1 区的序列,但是其中所述 CH1 区经过修饰,使得第 14 位 Ser(S) 已被半胱氨酸残基替换。

13. 依照前述权利要求 1 至 6 中任一项的方法,其中所述至少一种编码第一重链的核酸构建体包含编码 SEQ ID NO:6 所示的 CH3 区的序列,但是其中所述 CH3 区经过修饰,从而发生了一处或多处下述的氨基酸替代:第 234 位 Arg(R) 已被 Gln(Q) 替换;第 245 位 Thr(T) 已被 Ala(A) 替换;第 247 位 Leu(L) 已被 Ala(A) 替换;第 247 位 Leu(L) 已被 Val(V) 替换;第 276 位 Met(M) 已被 Val(V) 替换;第 284 位 Phe(F) 已被 Ala(A) 替换;第 284 位 Phe(F) 已被 Leu(L) 替换;第 286 位 Tyr(Y) 已被 Ala(A) 替换;第 288 位 Lys(K) 已被 Arg(R) 替换;第 288 位 Lys(K) 已被 Ala(A) 替换;第 298 位 Gln(Q) 已被 Glu(E) 替换;和第 324 位 Pro(P) 已被 Leu(L) 替换。

14. 依照权利要求 13 的方法,其中第 288 位 Lys(K) 已被 Arg(R) 替换。

15. 依照前述权利要求 13 至 14 中任一项的方法,其中所述至少一种编码第一重链的核酸构建体进一步包含编码 SEQ ID NO :6 所示的 CH1 和 / 或 CH2 区的序列。

16. 依照前述权利要求 1 至 6 中任一项的方法,其中所述至少一种编码第一重链的核酸构建体包含编码 SEQ ID NO :7 所示的 CH3 区的序列,但是其中所述 CH3 区经过修饰,从而发生了一处或多处下述的氨基酸替代:第 285 位 Arg(R) 已被 Gln(Q) 替换;第 296 位 Thr(T) 已被 Ala(A) 替换;第 298 位 Leu(L) 已被 Ala(A) 替换;第 298 位 Leu(L) 已被 Val(V) 替换;第 314 位 Ser(S) 已被 Asn(N) 替换;第 322 位 Asn(N) 已被 Lys(K) 替换;第 327 位 Met(M) 已被 Val(V) 替换;第 335 位 Phe(F) 已被 Ala(A) 替换;第 335 位 Phe(F) 已被 Leu(L) 替换;第 337 位 Tyr(Y) 已被 Ala(A) 替换;第 339 位 Lys(K) 已被 Arg(R) 替换;第 339 位 Lys(K) 已被 Ala(A) 替换;第 349 位 Gln(Q) 已被 Glu(E) 替换;第 352 位 Ile(I) 已被 Val(V) 替换;第 365 位 Arg(R) 已被 His(H) 替换;第 366 位 Phe(F) 已被 Tyr(Y) 替换;和第 375 位 Pro(P) 已被 Leu(L) 替换。

17. 依照权利要求 16 的方法,其中第 339 位 Lys(K) 已被 Arg(R) 替换。

18. 依照前述权利要求 16 至 17 中任一项的方法,其中所述至少一种编码第一重链的核酸构建体进一步包含编码 SEQ ID NO :7 所示的 CH1 和 / 或 CH2 区的序列。

19. 依照前述权利要求 1 至 6 中任一项的方法,其中所述至少一种编码第一重链的核酸构建体包含编码 SEQ ID NO :2 所示的 CH3 区的序列,但是其中所述 CH3 区经过修饰,从而发生了一处或多处下述的氨基酸替代:第 234 位 Thr(T) 已被 Ala(A) 替换;第 236 位 Leu(L) 已被 Ala(A) 替换;第 236 位 Leu(L) 已被 Val(V) 替换;第 273 位 Phe(F) 已被 Ala(A) 替换;第 273 位 Phe(F) 已被 Leu(L) 替换;第 275 位 Tyr(Y) 已被 Ala(A) 替换。

20. 依照前述权利要求 1 至 6 任一项的方法,其中所述至少一种编码第一重链的核酸构建体包含编码 SEQ ID NO :2 所示的 CH3 区的序列。

21. 依照权利要求 20 的方法,但是其中第 225 位 Glu(E) 已被 Ala(A) 替换。

22. 依照前述权利要求 20 至 21 中任一项的方法,但是其中第 234 位 Thr(T) 已被 Ala(A) 替换。

23. 依照前述权利要求 20 至 22 中任一项的方法,但是其中第 236 位 Leu(L) 已被 Ala(A) 替换。

24. 依照前述权利要求 20 至 22 中任一项的方法,但是其中第 236 位 Leu(L) 已被 Val(V) 替换。

25. 依照前述权利要求 20 至 22 中任一项的方法,但是其中第 236 位 Leu(L) 已被 Glu(E) 替换。

26. 依照前述权利要求 20 至 22 中任一项的方法,但是其中第 236 位 Leu(L) 已被 Gly(G) 替换。

27. 依照前述权利要求 20 至 26 中任一项的方法,但是其中第 238 位 Lys(K) 已被 Ala(A) 替换。

28. 依照前述权利要求 20 至 27 中任一项的方法,但是其中第 267 位 Asp(D) 已被 Ala(A) 替换。

29. 依照前述权利要求 20 至 28 中任一项的方法,但是其中第 273 位 Phe(F) 已被 Ala(A) 替换。

30. 依照前述权利要求 20 至 28 中任一项的方法,但是其中第 273 位 Phe(F) 已被 Leu(L) 替换。

31. 依照前述权利要求 20 至 28 中任一项的方法,但是其中第 273 位 Phe(F) 已被 Asp(D) 替换和 / 或第 275 位 Tyr(Y) 已被 Glu(E) 替换。

32. 依照前述权利要求 20 至 28 中任一项的方法,但是其中第 273 位 Phe(F) 已被 Thr(T) 替换和 / 或第 275 位 Tyr(Y) 已被 Glu(E) 替换。

33. 依照前述权利要求 20 至 30 中任一项的方法,但是其中第 275 位 Tyr(Y) 已被 Ala(A) 替换。

34. 依照前述权利要求 20 至 33 中任一项的方法,其中所述至少一种编码第一重链的核酸构建体进一步包含编码 SEQ ID NO :2 所示的 CH2 区的序列,但是其中第 118 位 Thr(T) 已被 Gln(Q) 替换和 / 或第 296 位 Met(M) 已被 Leu(L) 替换。

35. 依照前述权利要求 20 至 33 中任一项的方法,其中所述至少一种编码第一重链的核酸构建体进一步包含编码 SEQ ID NO :2 所示的 CH2 区的序列,但是其中已发生了下述替代中的一处、两处或所有三处:第 120 位 Met(M) 已被 Tyr(Y) 替换;第 122 位 Ser(S) 已被 Thr(T) 替换;和第 124 位 Thr(T) 已被 Glu(E) 替换。

36. 依照前述权利要求 20 至 33 中任一项的方法,其中所述至少一种编码第一重链的核酸构建体进一步包含编码的序列 SEQ ID NO :2 所示的 CH2 区,但是其中第 302 位 Asn(N) 已被 Ala(A) 替换。

37. 依照前述权利要求 20 至 33 中任一项的方法,其中所述至少一种编码第一重链的核酸构建体进一步包含编码的序列 SEQ ID NO :2 所示的 CH2 区,但是其中第 302 位 Asn(N) 已被 Ala(A) 替换且第 175 位 Thr(T) 已被 Ala(A) 替换且第 248 位 Glu(E) 已被 Ala(A) 替换。

38. 依照前述权利要求中任一项的方法,其中所述至少一种编码第一重链的核酸构建体包含编码如下 CH 区的序列,所述 CH 区经过修饰,使得铰链区中的所有半胱氨酸残基已被删除或已被其它氨基酸残基替代。

39. 依照权利要求 38 的方法,其中所述 CH 区经过修饰,使得铰链区的半胱氨酸残基已被具有不带电荷的极性侧链或非极性侧链的氨基酸残基替代。

40. 依照前述权利要求中任一项的方法,其中所述至少一种编码第一重链的核酸构建体包含编码 IgG4 CH 区的序列,其中与 SEQ ID No :1 之 CH 序列的氨基酸 106 和 109 对应的氨基酸已被删除。

41. 依照前述权利要求中任一项的方法,其中所述至少一种编码第一重链的核酸构建体包含编码 IgG4 CH 区的序列,其中与 SEQ ID No :1 之序列的氨基酸残基 106 和 109 对应的氨基酸残基中的一个已被不同于半胱氨酸的氨基酸残基替代,而与 SEQ ID No :1 之序列的氨基酸残基 106 和 109 对应的氨基酸残基中的另一个已被删除。

42. 依照前述权利要求中任一项的方法,其中所述至少一种编码第一重链的核酸构建体包含编码 IgG4 CH 区的序列,其中至少与 SEQ ID No :1 之 CH 序列的氨基酸残基 106 至 109 对应的氨基酸残基已被删除。

43. 依照前述权利要求中任一项的方法,其中所述至少一种编码第一重链的核酸构建体包含编码 IgG4 CH 区的序列,其中至少与 SEQ ID No :1 之序列的氨基酸残基 99 至 110 对应的氨基酸残基已被删除。

44. 依照前述权利要求中任一项的方法,其中所述至少一种编码第一重链的核酸构建体包含编码 CH 区的序列,所述 CH 区除前述权利要求任一项中规定的任何突变外,包含 SEQ ID No :2 之氨基酸序列。

45. 依照前述权利要求中任一项的方法,其中所述至少一种编码第一重链的核酸构建体包含编码 IgG4 CH 区的序列,其中所述 CH 区经过修饰,使得整个铰链区已被删除。

46. 依照前述权利要求中任一项的方法,其中所述至少一种编码第一重链的核酸构建体包含编码 CH 区的序列,所述 CH 区经过修饰,使得它不包含任何供 N- 连接糖基化的受体位点。

47. 依照权利要求 46 的方法,其中所述 CH2 区中供 N- 连接糖基化的 NST 受体位点已被修饰成选自下组的序列 :GST, MST, CSE, DSE, DSP, ESP, GSP, HSE, NSE, PSP 和 SSE。

48. 依照权利要求 1 或权利要求 3 至 47 中任一项的方法,其中所述第二重链是 IgG1、IgG2、IgG3 或稳定化 IgG4 重链或 IgA,优选 IgG1 重链。

49. 依照前述权利要求中任一项的方法,其中所述混合物中的至少一种、至少两种、例如所有抗体是人抗体。

50. 依照前述权利要求中任一项的方法,其中生成三种或更多种不同抗体的混合物、诸如四种或更多种不同抗体的混合物、例如五种或更多种不同抗体的混合物。

51. 依照前述权利要求中任一项的方法,其中生成不到 20 种不同抗体的混合物。

52. 依照前述权利要求中任一项的方法,其中所述宿主细胞包含超过一种编码轻链的核酸构建体,优选其中每种所述重链能够与每种所述轻链配对以形成功能性抗体。

53. 依照前述权利要求中任一项的方法,其中所述混合物的所有抗体针对同一靶物。

54. 依照权利要求 53 的方法,其中所述混合物的抗体不竞争对所述靶物的结合。

55. 依照权利要求 1 至 52 中任一项的方法,其中所述混合物中的两种或更多种抗体针对不同靶物。

56. 依照前述权利要求中任一项的方法,其中所述方法包括将所述宿主细胞培养至少 20 个群体倍增。

57. 依照前述权利要求中任一项的方法,其中所述方法进一步包括从所述细胞培养物收获所述混合物的步骤。

58. 依照前述权利要求中任一项的方法,其中所述方法进一步包括纯化所述抗体混合物的步骤。

59. 依照前述权利要求中任一项的方法,其中所述宿主细胞是哺乳动物细胞,诸如 CHO 细胞。

60. 依照前述权利要求中任一项的方法,其中所述共同轻链包含 SEQ ID NO :8 所示的序列。

61. 依照权利要求 60 的方法,其中所述共同轻链进一步包含选自下组的序列 :SEQ ID NO :9, 10 和 11, 诸如包含选自下组的序列的共同轻链 :SEQ ID NO :12, 13 和 14。

62. 依照前述权利要求中任一项的方法,其中所述核酸稳定整合入所述宿主细胞的基因组。

63. 一种组合物,其包含可通过前述权利要求中任一项的方法获得的抗体混合物。

64. 依照权利要求 63 的组合物,其用作药物。

65. 一种适合于在生成包含两种或更多种不同抗体的混合物中使用的重组宿主细胞，其中所述宿主细胞包含：

a) 至少一种编码共同轻链的核酸构建体，和

b) 两种或更多种编码重链的核酸构建体，所述两种或更多种核酸构建体包含

b1) 两种或更多种编码两种或更多种不同的第一重链的核酸构建体，其中所述第一重链的每个恒定区的氨基酸序列经过修饰，使得铰链区及如免疫球蛋白亚型所要求的 CH 区的其它区域，诸如 CH3 区，不含有任何能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的 CH 区形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键的氨基酸残基，

或

b2) 至少一种编码第一重链的核酸构建体，其中恒定区的氨基酸序列经过修饰，使得铰链区及如免疫球蛋白亚型所要求的 CH 区的其它区域，诸如 CH3 区，不含有任何能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的 CH 区形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键的氨基酸残基，和

至少一种编码第二重链的核酸构建体，所述第二重链能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的 CH 区形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键。

66. 依照权利要求 65 的宿主细胞，其中所述宿主细胞是哺乳动物细胞，诸如 CHO 细胞。

67. 一种包含重链和轻链的重组抗体，其中所述轻链包含 SEQ ID NO :8 所示的序列。

68. 依照权利要求 67 的抗体，其中所述轻链进一步包含选自下组的序列：SEQ ID NO :9, 10 和 11，诸如包含选自下组的序列的轻链：SEQ ID NO :12, 13 和 14。

69. 依照权利要求 67 或 68 的抗体，其中所述抗体是双特异性抗体。

70. 依照权利要求 67 或 68 的抗体，其中所述抗体是单价抗体。

71. 依照权利要求 67 或 68 的抗体，其中所述抗体是多克隆抗体，诸如多克隆二价抗体或多克隆单价抗体。

72. 依照权利要求 67 至 68 任一项的抗体，其用作药物，诸如用于治疗癌症的药物。

用于生成抗体混合物的方法

[0001] 本申请是中国申请 201080013765.9 的分案申请,该母案的国际申请日为 2010 年 1 月 26 日,本分案采用了与该母案一致的发明名称。

发明领域

[0002] 本发明提供了用于生成抗体混合物的方法、通过本发明的方法可获得的混合物及此类混合物的用途,特别是在治疗癌症中的用途。本发明还涉及在本发明的方法中特别有用的轻链。

[0003] 发明背景

[0004] 当前,有多种人类疾病是通过治疗性单克隆抗体,例如人源化的或完全人源的单克隆抗体来治疗的。然而,一些疾病通过单克隆抗体不能充分有效地治疗,或者治疗效果随单克隆抗体应用的时间而降低,例如由于靶物下调或致病途径的转换。因此,一种备选方案可以用多克隆抗体或抗体混合物来治疗。此类抗体混合物可包含两种或更多种针对同一靶物上不同表位的抗体,或者,针对不同靶物的抗体的混合物。

[0005] US7262028 记载了一种通过表达一种轻链和不同重链从单一宿主细胞克隆生成二价抗体或二价抗体混合物的方法。US7262028 中披露的发明提供了一种用于生成抗体组合的方法,可以对该抗体组合筛选在多种应用中的有用性。

[0006] 治疗性抗体的期望特征可依照要治疗的具体状况而变化。对于一些适应证,只需要抗原结合,例如其中抗体的治疗效应是阻断抗原与一种或多种原本能够结合抗原的特定分子之间的相互作用。对于其它适应证,可能还需要别的由抗体介导的效应,诸如诱导补体活化、结合 Fc 受体等的的能力。对于此类用途,抗体分子中抗原结合部分以外的部分诸如 Fc 区可能是重要的。一些全长抗体在结合靶抗原时可展现激动效应(这可能被认为是不期望的,特别是对于癌症治疗而言)。在一些情况下,此效应可归于通过二价抗体的“交联”;“交联”促进二聚化,而二聚化可导致活化,尤其当靶物是受体时。在可溶性抗原的情况下,二价靶向性(bivalent targeting)可形成不期望的免疫复合物。因此,对于一些治疗性适应证,单价抗体可能是优选的。

[0007] 单价抗体的例子包括 Fab 片段、scFv 抗体和纳米抗体。另一类包含一条重链和一条轻链的单价抗体(UniBody®分子)已记载于 W02007/059782、W0/2008/145137、W0/2008/145138、W0/2008/145139 和 W0/2008/145140。在这些分子中,重链的序列已经被修饰,使得不形成重链间键,从而不形成二价抗体。UniBody®分子的特征在于与 Fab 片段相比有利的药动学。

[0008] 需要改良的基于抗体的疗法,将使用多克隆抗体或抗体混合物的优点与单价抗原结合的优点结合起来。本发明提供了用于生成单价抗体的混合物或单价和二价抗体的混合物的方法。

[0009] 发明概述

[0010] 在第一个主要方面,本发明涉及一种用于在单一重组宿主细胞中生成包含两种或更多种不同抗体的混合物的方法,包括在所述宿主细胞中表达:

- [0011] a) 至少一种编码共同轻链的核酸构建体,和
- [0012] b) 两种或更多种编码重链的核酸构建体,所述两种或更多种核酸构建体包含
- [0013] b1) 编码两种或更多种不同第一重链的两种或更多种核酸构建体,其中所述各第一重链的每个恒定区的氨基酸序列经过修饰,使得铰链区及如免疫球蛋白亚型所要求的 CH 区的其它区域,诸如 CH3 区,不含有任何能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的 CH 区形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键的氨基酸残基,
- [0014] 或
- [0015] b2) 至少一种编码第一重链的核酸构建体,其中恒定区的氨基酸序列经过修饰,使得铰链区及如免疫球蛋白亚型所要求的 CH 区的其它区域,诸如 CH3 区,不含有任何能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的 CH 区形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键的氨基酸残基,和
- [0016] 至少一种核酸编码第二重链的构建体,所述第二重链能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的 CH 区形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键,
- [0017] 其中每种所述重链能够与所述轻链配对以形成功能性抗体。
- [0018] 因此,所述第一重链的序列经过修饰而不形成稳定的重链间键,并且由此所得抗体是单价的(参见例如 W02007/059782)。
- [0019] 因而,在备选方案 b1 的情况下,在同一细胞中生成不同单价抗体的混合物。此类混合物可例如用于治疗疾病,特别是单克隆单价抗体和/或多克隆二价抗体的有效性不是最好的疾病,如上文解释的。
- [0020] 在备选方案 b2 的情况下,在同一细胞中生成单价和二价抗体的混合物。此类混合物可例如用于治疗疾病,诸如癌症。在一个特别有趣的实施方案中,所述单价抗体通过对靶蛋白的拮抗性结合或阻断来抑制细胞增殖,且所述二价抗体结合另一种靶抗原,例如在同一靶细胞上的,并募集效应器功能进行靶细胞杀伤。
- [0021] 在另一个主要方面,本发明涉及一种包含通过本发明的方法获得的或可获得的抗体混合物的组合物,诸如药物组合物。
- [0022] 在另一个方面,本发明提供了一种适合依照上述方法用于生成抗体混合物的重组宿主细胞。
- [0023] 本发明还提供了依照上述发明的组合物用于治疗疾病的用途。
- [0024] 本发明还公开了一种特别适合于在本发明中使用的共同轻链,因为它能替换各种不同抗原特异性抗体的轻链而不损失特异性。此类轻链可更一般性地用于这样的含有抗体产品的应用,其中将一种轻链与多种重链组合,诸如在重组多克隆或双特异性抗体中组合。
- [0025] 因此,在另一个方面,本发明涉及一种包含重链和轻链的重组抗体,其中所述轻链包含 SEQ ID NO :8 所示的序列。
- [0026] 附图和序列表简述
- [0027] 图 1。在 ELISA 中测量经转染的 HEK-293F 细胞的细胞培养物上清液中存在的单价抗体对可溶性的带 His 标签的 CD38 的结合。“单价 Uni-005”指示经单价 Uni-005(抗 CD38)构建体转染的 HEK-293F 细胞的上清液;“单价组合”指示表达 Uni-7D8(抗 CD20)和 Uni-005 的重链与抗 CD38 抗体 005 的轻链的组合物细胞的上清液。
- [0028] 图 2。在 ELISA 中测量经转染的 HEK-293F 细胞的细胞培养物上清液中存在的单

价抗体对一种抗 HuMab-7D8 的抗独特型抗体（其也结合 Uni-7D8）的结合。“单价 Uni-7D8”指示经 Uni-7D8 构建体转染的 HEK-293F 细胞的上清液；“单价组合”指示表达 Uni-7D8 和 Uni-CD38 的重链与抗 CD38 抗体 005 的轻链的组合作为包被物的细胞的上清液。

[0029] 图 3：对人 κ 轻链种系文库筛选对各种重链的结合以鉴定共同轻链。在使用重组可溶性抗原作为包被物的 ELISA 中筛选经瞬时转染的 HEK-293F 细胞的上清液，其中所述细胞表达带有对 EGFr (A)、c-Met (B) 或 Her2 (C) 特异性的可变域的铰链修饰 (F273T、Y275E) 的重链，以及一条来自该文库的种系 κ 轻链。每个点代表一种独特的重链和轻链组合，并显示了结合 (OD405) 和表达 (1:20 稀释后的 $\mu\text{g/mL}$)。形成功能性结合抗体的重链和轻链组合标有 1、2 和 3。(1'、2' 和 3' 是该测定法中 1、2 和 3 的重复)。每项实验中用伴随各重链的原来的 κ 轻链作为阳性对照（矩形）

[0030] 图 4：通过共表达和对重组靶物的结合 ELISA 对共同轻链的确认。在使用重组可溶性抗原（分别为 EGFR (A)、c-Met (B) 或 Her2 (C)）作为包被物的 ELISA 中，对经瞬时转染的 HEK-293F 细胞的上清液筛选结合，其中所述细胞共表达三种分别带有对 EGFR、c-Met 和 Her2 特异性的可变域的铰链修饰 (F273T、Y275E) 的重链、以及一条在初筛选中鉴定的共同 κ 轻链种系序列（图 3 中的 1、2 或 3）。每项实验中包括伴随各重链的原来的 κ 轻链作为阳性对照。

[0031] 图 5：用交联 ELISA 确定抗体单价性。用交联 ELISA 对经瞬时转染的 HEK-293F 细胞的上清液测试单价性，其中所述细胞共表达三种带有分别对 EGFR 和 c-Met 特异性的可变域的铰链修饰 (F273T、Y275E) 的重链、以及一条在初筛选中鉴定的共同 κ 轻链种系序列；所述交联 ELISA 使用重组可溶性抗原 (EGFr (A) 和 c-Met (B)) 作为包被物，且将相同抗原与生物素缀合作为二价分子的检测（图 3 中的 1、2 和 3）。在该测定法中使用针对 EGFR 和 c-Met 的 IgG1 抗体作为阳性对照，针对 EGFR 和 c-Met 的对照批次的单价抗体作为阴性对照。

[0032] SEQ ID NO :1 :人 IgG4 的野生型重链恒定域 (CH) 的氨基酸序列（编号 P01861）。斜体的序列代表 CH1 区，高亮的序列代表铰链区，正常字体的序列代表 CH2 区，加下划线的序列代表 CH3 区。

[0033] SEQ ID NO :2 :铰链区被删除的人 IgG4 的突变型重链恒定区 (CH) 的氨基酸序列

[0034] SEQ ID NO :3 :人 λ 轻链 (CL) 的恒定域的氨基酸序列（编号 S25751）。

[0035] SEQ ID NO :4 :人 κ 轻链 (CL) 的恒定域的氨基酸序列（编号 P01834）。

[0036] SEQ ID NO :5 :人 IgG1 的重链恒定域 (CH) 的氨基酸序列（编号 P01857）。斜体的序列代表 CH1 区，高亮的序列代表铰链区，正常字体的序列代表 CH2 区，加下划线的序列代表 CH3 区。

[0037] SEQ ID NO :6 :人 IgG2 的重链恒定域 (CH) 的氨基酸序列（编号 P01859）。斜体的序列代表 CH1 区，高亮的序列代表铰链区，正常字体的序列代表 CH2 区，加下划线的序列代表 CH3 区。

[0038] SEQ ID NO :7 :人 IgG3 的重链恒定域 (CH) 的氨基酸序列（编号 P01860）。斜体的序列代表 CH1 区，高亮的序列代表铰链区，正常字体的序列代表 CH2 区，加下划线的序列代表 CH3 区。

[0039] SEQ ID NO :8 :V 区段 VKVI-2-1-(1)-A14 (IGKV6D-41*01) 的氨基酸序列。

- [0040] SEQ ID NO :9 :JK 区段 JK1(IGKJ1*01) 的氨基酸序列
[0041] SEQ ID NO :10 :JK 区段 JK2(IGKJ2*01) 的氨基酸序列
[0042] SEQ ID NO :11 :JK 区段 JK3(IGKJ3*01) 的氨基酸序列
[0043] SEQ ID NO :12 :共同轻链 1 的氨基酸序列
[0044] SEQ ID NO :13 :共同轻链 2 的氨基酸序列
[0045] SEQ ID NO :14 :共同轻链 3 的氨基酸序列
[0046] 发明详述
[0047] 定义

[0048] 除非另有规定,在本文中提及时,术语“抗体”包括完整抗体分子、抗原结合片段、单价抗体、及其单链。抗体分子属于血浆蛋白质中称作免疫球蛋白的一个家族,其基本构建模块,免疫球蛋白折叠或域,以各种形式在免疫系统和其它生物学识别系统的多种分子中被使用。天然抗体和免疫球蛋白通常是约 150,000 道尔顿的异四聚体糖蛋白,由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链构成。每条重链和轻链还可具有间隔有规律的链内二硫桥。每条轻链包含一个轻链可变区(在本文中缩写为 VL)和一个轻链恒定区(在本文中缩写为 CL)。每条重链包含一个重链可变区(VH)和一个重链恒定区(CH),其中重链恒定区由三个同源域(CH1、CH2 和 CH3)和铰链区组成。轻链的恒定域与重链的第一恒定域(CH1)排列在一起,而轻链可变域与重链可变域排列在一起,形成称作“Fab”,即抗原结合片段的东西。重链的 CH1 和 CH2 被铰链区彼此分开,该柔性容许抗体分子的 Fab “臂”在一定程度上相对于 Fc 部分活动。铰链区在正常情况下包含一个或多个半胱氨酸残基,其能够与同一个抗体分子内的另一条重链的铰链区的半胱氨酸残基形成二硫桥。

[0049] 重链和轻链的可变区形成与抗原相互作用的结合域。抗体主要经由位于六个重链和轻链互补决定区(CDR)中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。因为这个原因,CDR 内的氨基酸序列比 CDR 以外的序列在各抗体间更加多样。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白对宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和经典补系统的第一成分(C1q)。

[0050] 根据它们重链恒定域的氨基酸序列,免疫球蛋白可归入至少五(5)个主要免疫球蛋白类:IgA, IgD, IgE, IgG 和 IgM。这些类中的数个可细分成亚类(同种型),例如 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 ;IgA1 和 IgA2。编码免疫球蛋白重链恒定域的基因,IgA 的称作阿尔法(α), IgD 的称作德尔塔(δ), IgE 的称作厄普西隆(ϵ), IgG 的称作伽马(γ),而 IgM 的称作谬(μ)。IgG 亚类由不同基因编码: γ 1 编码 IgG1, γ 2 编码 IgG2, γ 3 编码 IgG3,而 γ 4 编码 IgG4。抗体轻链根据它们恒定域的氨基酸序列可分成两个截然不同的类型,称为卡帕(κ)和拉姆达(λ)。不同类的免疫球蛋白的三维结构是公知的,且可分成亚基。在 IgG 重链内进行比较而规定出 CH1、CH2 和 CH3 同源区。在本文中的序列表中标明了不同 IgG 同种型的这些区。四种 IgG 亚类中每一个的同源区间的比较揭示 >95% 的序列同一性(Jefferis, R. 1990. F. Shakib, ed. Pergamon Press, Oxford, p. 15)。人类群体内存在不同同种异型的免疫球蛋白,诸如 IgG1 重链的 G1m(a)、G1m(x)、G1m(f) 和 G1m(z) 和 κ 轻链的 Km1、Km1, 2 和 Km3。这些同种异型区别在于它们恒定区中的不同氨基酸。CH1 和 CH2 域之间的序列称作铰链区,因为它容许分子的柔性。一个抗体内的两条重链的 CH3 域配对,而且非共价相互作用足以使 IgG 分子在重链间二硫桥在温和条件下还原后维持其结构完整性。

CH3 域配对是紧凑的,且与 Fab 中的配对相似,两个域之间几乎恰好形成二分 (Sapphire, et al., 2002. J Mol Biol 319:9)。这与 CH2 域形成对照:CH2 域不紧密联合,它们的接触主要由两条搭接在 Asn297 残基上的碳水化合物链来介导 (Sapphire, et al., 2002. J Mol Biol 319:9)。因此,两个重链-轻链异二聚体连接的特征性 IgG 结构通过铰链区的重链间二硫桥和 CH3 域的非共价相互作用来维持。

[0051] 在本发明的语境中,“共同轻链”是这样的多个轻链,它们可以相同或者可以具有氨基酸序列差异。在不背离本发明的范围的条件下,共同轻链可包含与同一重链组合时不改变抗体特异性的突变。例如,在如本文中使用的共同轻链的定义的范围内,有可能制备或找到不相同但仍在功能上等价的轻链,例如通过引入并测试保守氨基酸变化或在与重链配对时对结合特异性没有贡献或仅有部分贡献的区域中的氨基酸变化。在一个例示性实施方案中,本发明提供了共同轻链,一种相同的轻链,用来与不同重链组合以形成带有功能性抗原结合域的抗体的用途。一种共同轻链的使用避免了异二聚体的形成。异二聚体中轻链和重链的配对产生没有功能的(换言之,不能结合靶抗原的)抗原结合域。

[0052] 在本发明的语境中,“不同的重链”意指可变区不同的重链。不同的重链可具有相同的或不同的恒定区。

[0053] 如本文中使用的,术语“人抗体”意图包括具有自人种系免疫球蛋白序列衍生的可变和恒定区的抗体。本发明的人抗体可包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码选自的氨基酸残基(例如通过体外随机或定点诱变或通过体内细胞突变引入的突变)。然而,如本文中使用的,术语“人抗体”并非意图包括在人框架序列中嫁接衍生自另一哺乳动物物种(诸如小鼠)的种系的 CDR1 或 CDR2 序列,或衍生自人以外的另一物种(诸如小鼠)的抗体的 CDR3 区而得到的抗体。

[0054] 如本文中使用的,术语“ K_D ”指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数,以摩尔(M)计。

[0055] 如本文中使用的,术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”指单一分子组成的抗体分子的制备物。单克隆抗体组合物展示对特定表位的单一结合特异性和亲和力。因而,术语“人单克隆抗体”指展示单一结合特异性,具有自人种系免疫球蛋白序列衍生的可变和恒定区的抗体。

[0056] 如本文中使用的,术语“核酸”、“核酸构建体”或“核酸分子”意图包括 DNA 分子和 RNA 分子。核酸分子可以是单链的或双链的。

[0057] 如本文中使用的,“特异性结合”指抗体或其抗原结合片段对预定抗原的结合。典型地,在例如使用 BIAcore 上的表面等离子共振或作为基于 FACS 或 ELISA 中 IC_{50} 值的表观亲和力度量时,抗体以相当于约 $10^{-7}M$ 或更小、诸如约 $10^{-8}M$ 或更小、诸如约 $10^{-9}M$ 或更小、约 $10^{-10}M$ 或更小、或约 $10^{-11}M$ 或甚至更小的 K_D 的亲和力结合预定的抗原,且与比其结合预定抗原或密切相关抗原以外的非特异性抗原(例如 BSA、酪蛋白)的结合的亲和力低至少 10 倍、诸如低至少 100 倍、例如低至少 1,000 倍、诸如低至少 10,000 倍、例如低至少 100,000 倍的 K_D 对应的亲和力结合预定抗原。亲和力低出的量取决于抗体的 K_D ,所以在抗体的 K_D 很低时(即抗体是高度特异性的),对抗原的亲和力比对非特异性抗原的亲和力所低出的量可以是至少 10,000 倍。

[0058] 术语“非人转基因动物”指具有包含一个或多个在转基因或转染色体上的人重链

和 / 或轻链基因座的基因组且能够表达人抗体的非人动物。例如,转基因小鼠可具有转基因上的人轻链基因座,且具有转基因上的人重链基因座或转染色体上的人重链基因座,使得小鼠在用抗原和 / 或表达抗原的细胞免疫时生成抗体。人重链转基因可整合入小鼠的染色体 DNA,正如转基因例如 HuMab™ 小鼠那样,诸如 HCo7 或 HCo12 小鼠,或者人重链转基因可在人染色体片段内在染色体外维持,如 WO 02/43478 中记载的转染色体 KM- 小鼠™ 那样。通过经历 V-D-J 重组和同种型转换,此类转基因和转染色体小鼠能够生成多种同种型的结合选定抗原的人抗体(例如 IgG、IgA 和 / 或 IgE)。

[0059] 术语“抗体的效价”意指抗体能与之反应的抗原决定簇的最大数目。例如,野生型 IgG 抗体含有两个 Fab 区,能结合两分子的抗原或同一颗粒上的两个相同位点,因而具有两个效价(“二价”)。术语“单价抗体”在本发明的语境中意味着抗体分子至多含有一个 Fab 区且在正常情况下只能够结合一分子的抗原,并且因此不能介导抗原交联。

[0060] 术语“表位”意指能够特异性结合抗体的蛋白质决定子。表位通常由化学活性表面群组,诸如氨基酸或糖侧链组成,且通常具有特定的三维结构特征,以及特定的电荷特征。构象和非构象表位的区别在于对前者的结合在变性溶剂存在下会丧失,但是后者不会。

[0061] 如本文中使用的,术语“宿主细胞”(或“重组宿主细胞”)意图指其中已导入重组表达载体的细胞。应当理解,此类术语意图不仅指特定主题细胞,而且还指此类细胞的后代。因为后续传代中可存在突变或环境影响所致某些修饰,此类后代事实上可以与亲本细胞不同,但是仍包括在如本文中使用的术语“宿主细胞”的范围内。单数形式的术语“宿主细胞”也可表示特定种类的宿主细胞的培养物。依照本发明的抗体的表达可经由使用任何能够表达重组 DNA 分子的宿主细胞来发生,所述宿主细胞包括细菌,诸如大肠杆菌 (*E. coli*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和链霉菌属 (*Streptomyces*),酵母,诸如酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)、乳克鲁维氏酵母 (*K. lactis*)、巴斯德毕赤氏酵母 (*P. pastoris*)、假丝酵母属 (*Candida*) 和耶罗酵母属 (*Yarrowia*),丝状真菌,诸如脉胞霉属 (*Neurospora*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 和黑曲霉 (*Aspergillus niger*),植物细胞,诸如拟南芥 (*Arabidopsis*),昆虫细胞,诸如草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) SF-9 和 SF-21 细胞,哺乳动物细胞,诸如中国仓鼠卵巢 (CHO 细胞)、BHK 细胞、小鼠细胞包括 SP2/0 和 NS-0 骨髓瘤细胞,灵长类动物细胞诸如 COS 和 Vero 细胞、MDCK 细胞、BRL 3A 细胞,杂交瘤,肿瘤细胞,永生化原代细胞,人细胞,诸如 W138、HepG2、HeLa、HEK-293、HT1080 或胚胎视网膜细胞诸如 PER.C6™ 等等。细胞等的选择取决于要获得的糖基化样式。

[0062] 术语“IVIG”指静脉内免疫球蛋白 (intravenous immunoglobulin),如由荷兰 Sanquin 制备的。简言之,IVIG 是通过由 Brummelhuis(1983) *Acta Pharmac Scand*(suppl)4:91 记载的改良的 Cohn 乙醇分级技术自至少 1,000 名供体的人血浆集合制备的。通过在痕量胃蛋白酶存在下于 pH 4 处理 Cohn 级分 II,该制备物制成适合于静脉内施用。该材料以冻干形式提供。以规定体积溶解后,该产物含有约 60g/l 蛋白质。该蛋白质级分含有至少 95% 的 IgG 和少量的 IgA (<2g/l) 和 IgM 和痕量的其它血浆蛋白质。IgG 亚类的含量与正常人血浆相当:60% IgG1,33% IgG2,3% IgG3 和 3% IgG4。该制备物每升含有 0.24mol 葡萄糖和 37mmol 钠。

[0063] 本发明的其他方面和实施方案

[0064] 如上文解释的,在一个方面,本发明涉及一种用于在单一重组宿主细胞中生成包含两种或更多种不同抗体的混合物的体外方法,包括在所述宿主细胞中表达:

[0065] a) 至少一种编码共同轻链的核酸构建体,和

[0066] b) 两种或更多种编码重链的核酸构建体,所述两种或更多种核酸构建体包含

[0067] b1) 两种或更多种编码两种或更多种不同第一重链的核酸构建体,其中所述第一重链的每个恒定区的氨基酸序列经过修饰,使得铰链区及如免疫球蛋白亚型所要求的 CH 区的其它区域,诸如 CH3 区,不含有任何能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的 CH 区形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键的氨基酸残基,

[0068] 或

[0069] b2) 至少一种编码第一重链的核酸构建体,其中恒定区的氨基酸序列经过修饰,使得铰链区及如免疫球蛋白亚型所要求的 CH 区的其它区域,诸如 CH3 区,不含有任何能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的 CH 区形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键的氨基酸残基,和

[0070] 至少一种编码第二重链的核酸构建体,其中所述第二重链能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的 CH 区形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键,

[0071] 其中每种所述重链能够与所述轻链配对以形成功能性抗体。

[0072] 因而,在一个实施方案中,本发明的方法包括在所述宿主细胞中表达:

[0073] 两种或更多种编码两种或更多种不同第一重链的核酸构建体,其中所述各第一重链的每个恒定区的氨基酸序列经过修饰,使得铰链区及如免疫球蛋白亚型所要求的 CH 区的其它区域,诸如 CH3 区,不含有任何能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的 CH 区形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键的氨基酸残基。

[0074] 所得的组合物因而包含两种或更多种不同的单价抗体。

[0075] 在一个备选实施方案中,本发明的方法包括在所述宿主细胞表达:

[0076] - 至少一种编码第一重链的核酸构建体,其中恒定区的氨基酸序列经过修饰,使得铰链区及如免疫球蛋白亚型所要求的 CH 区的其它区域,诸如 CH3 区,不含有任何能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的 CH 区形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键的氨基酸残基,和

[0077] - 至少一种编码第二重链的核酸构建体,其中所述第二重链能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的 CH 区形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键。

[0078] 所得组合物如此包含单价和二价抗体的混合物。

[0079] 通过本发明的方法生成的抗体混合物内包含的单价抗体理论上可以是任何同种型的,包括但不限于 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。

[0080] 因而,在一个实施方案中,所述单价抗体是自 IgG1 衍生的,但是经过修饰以进一步降低分子间相互作用。因此,在本发明方法的一个实施方案中,所述至少一种编码第一重链的核酸构建体包含编码 SEQ ID NO:5 所示的 CH3 区的序列,但是其中所述 CH3 区经过修饰,从而发生了一处或多处下述的氨基酸替代:第 238 位 Arg(R) 已被 Gln(Q) 替换;第 239 位 Asp(D) 已被 Glu(E) 替换;第 249 位 Thr(T) 已被 Ala(A) 替换;第 251 位 Leu(L) 已被 Ala(A) 或 Val(V) 替换;第 288 位 Phe(F) 已被 Ala(A) 或 Leu(L) 替换;第 290 位 Tyr(Y) 已被 Ala(A) 替换;第 292 位 Lys(K) 已被 Arg(R) 或 Ala(A) 替换;第 302 位 Gln(Q) 已被 Glu(E)

替换 ; 和第 328 位 Pro(P) 已被 Leu(L) 替换。在一个优选实施方案中, 第 292 位 Lys(K) 已被 Arg(R) 替换。

[0081] 在又一个优选实施方案中, 所述至少一种编码第一重链的核酸构建体进一步包含编码 SEQ ID NO :5 所示的 CH1 和 / 或 CH2 区的序列。

[0082] 在 CH 区为 IgG1 同种型的情况下, 恒定区可任选经过进一步修饰, 这是因为在 IgG1 中, 轻链的一个游离半胱氨酸残基能潜在地使抗体保持二价形式, 即使在铰链区中不存在半胱氨酸时。

[0083] 因此, 在一个实施方案中, 轻链的恒定区经过修饰, 使得它不含有任何能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的恒定区形成二硫键或其它共价键的氨基酸。例如, 所述至少一种编码共同轻链的核酸构建体包含编码具有 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列的 κ CL 区的序列, 但是其中所述序列经过修饰, 使得第 106 位末端半胱氨酸残基已被另一种氨基酸残基替换或已被删除, 或所述至少一种编码共同轻链的核酸构建体包含编码具有 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列的 λ CL 区的序列, 但是其中所述序列经过修饰, 使得第 104 位半胱氨酸残基已被另一种氨基酸残基替换或已被删除。

[0084] 或者, 重链的恒定区经过修饰, 使得它含有能够与轻链形成二硫键或其它共价键的残基。例如, 所述至少一种编码第一重链的核酸构建体包含编码 SEQ ID NO :5 所示的 CH1 区的序列, 但是其中所述 CH1 区经过修饰, 使得第 14 位 Ser(S) 已被半胱氨酸残基替换。

[0085] 在又一个实施方案中, 所述单价抗体是自 IgG2 衍生的, 但是经过修饰以进一步降低分子间相互作用。因此, 在本发明方法的一个实施方案中, 所述至少一种编码第一重链的核酸构建体包含编码 SEQ ID NO :6 所示的 CH3 区的序列, 但是其中所述 CH3 区经过修饰, 从而发生了一处或多处下述的氨基酸替代 : 第 234 位 Arg(R) 已被 Gln(Q) 替换 ; 第 245 位 Thr(T) 已被 Ala(A) 替换 ; 第 247 位 Leu(L) 已被 Ala(A) 或 Val(V) 替换 ; 第 276 位 Met(M) 已被 Val(V) 替换 ; 第 284 位 Phe(F) 已被 Ala(A) 或 Leu(L) 替换 ; 第 286 位 Tyr(Y) 已被 Ala(A) 替换 ; 第 288 位 Lys(K) 已被 Arg(R) 或 Ala(A) 替换 ; 第 298 位 Gln(Q) 已被 Glu(E) 替换 ; 和第 324 位 Pro(P) 已被 Leu(L) 替换。在一个优选实施方案中, 第 288 位 Lys(K) 已被 Arg(R) 替换。

[0086] 在又一个优选实施方案中, 所述至少一种编码第一重链的核酸构建体进一步包含编码 SEQ ID NO :6 所示的 CH1 和 / 或 CH2 区的序列。

[0087] 在又一个实施方案中, 所述单价抗体是自 IgG3 衍生的, 但是经过修饰以进一步降低分子间相互作用。因此, 在本发明方法的一个实施方案中, 所述至少一种编码第一重链的核酸构建体包含编码 SEQ ID NO :7 所示的 CH3 区的序列, 但是其中所述 CH3 区经过修饰, 从而发生了一处或多处下述的氨基酸替代 : 第 285 位 Arg(R) 已被 Gln(Q) 替换 ; 第 296 位 Thr(T) 已被 Ala(A) 替换 ; 第 298 位 Leu(L) 已被 Ala(A) 或 Val(V) 替换 ; 第 314 位 Ser(S) 已被 Asn(N) 替换 ; 第 322 位 Asn(N) 已被 Lys(K) 替换 ; 第 327 位 Met(M) 已被 Val(V) 替换 ; 第 335 位 Phe(F) 已被 Ala(A) 替换 ; 第 335 位 Phe(F) 已被 Leu(L) 替换 ; 第 337 位 Tyr(Y) 已被 Ala(A) 替换 ; 第 339 位 Lys(K) 已被 Arg(R) 或 Ala(A) 替换 ; 第 349 位 Gln(Q) 已被 Glu(E) 替换 ; 第 352 位 Ile(I) 已被 Val(V) 替换 ; 第 365 位 Arg(R) 已被 His(H) 替换 ; 第 366 位 Phe(F) 已被 Tyr(Y) 替换 ; 和第 375 位 Pro(P) 已被 Leu(L) 替换。在一个优选实施方案中, 第 339 位 Lys(K) 已被 Arg(R) 替换。

[0088] 在又一个优选实施方案中,所述至少一种编码第一重链的核酸构建体进一步包含编码 SEQ ID NO:7 所示的 CH1 和 / 或 CH2 区的序列。

[0089] 在本发明的一个特别有趣的方面,通过本发明的方法生成的混合物内包含的单价抗体为 IgG4 同种型的。因此,在又一个方面,本发明涉及一种用于在单一重组宿主细胞中生成包含两种或更多种不同抗体的混合物的方法,包括在所述宿主细胞中表达:

[0090] a) 至少一种编码共同轻链的核酸构建体,和

[0091] b) 两种或更多种编码重链的核酸构建体,所述两种或更多种核酸构建体包含

[0092] b1) 两种或更多种编码两种或更多种不同的第一 IgG4 重链的核酸构建体,其中所述第一 IgG4 重链的每个恒定区的氨基酸序列经过修饰,使得铰链区不含有任何能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的 CH 区形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键的氨基酸残基,

[0093] 或

[0094] b2) 至少一种编码第一 IgG4 重链的核酸构建体,其中恒定区的氨基酸序列经过修饰,使得铰链区不含有任何能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的 CH 区形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键的氨基酸残基,和

[0095] 至少一种编码第二重链的核酸构建体,其中所述第二重链能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的 CH 区形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键,前提是所述第二重链不是野生型 IgG4 重链,

[0096] 其中每种所述重链能够与所述轻链配对以形成功能性抗体。

[0097] 在一个实施方案中,所述单价抗体是自 IgG4 衍生的,但是经过修饰以进一步降低分子间相互作用。因此,在本发明方法的一个实施方案中,所述至少一种编码第一重链的核酸构建体包含编码 SEQ ID NO:2 所示的 CH3 区的序列,但是其中所述 CH3 区经过修饰,从而发生了一处或多处下述的氨基酸替代:第 217 位 Tyr (Y) 已被 Arg (R) 替换;第 219 位 Leu (L) 已被 Asn (N) 或 Gln (Q) 替换;第 225 位 Glu (E) 已被 Ala (A)、Thr (T)、Val (V) 或 Ile (I) 替换;第 232 位 Ser (S) 已被 Arg (R) 或 Lys (K) 替换;第 234 位 Thr (T) 已被 Ala (A)、Arg (R)、Lys (K) 或 Asn (N) 替换;第 236 位 Leu (L) 已被 Ala (A)、Val (V)、Glu (E)、Gly (G)、Ser (S) 或 Thr (T) 替换;第 238 位 Lys (K) 已被 Ala (A)、Arg (R) 或 Thr (T) 替换;第 267 位 Asp (D) 已被 Ala (A)、Thr (T) 或 Ser (S) 替换;第 273 位 Phe (F) 已被 Ala (A)、Leu (L)、Thr (T)、Asp (D)、Arg (R)、Gln (Q)、Lys (K) 或 Tyr (Y) 替换;第 275 位 Tyr (Y) 已被 Ala (A)、Glu (E)、Gln (Q)、Lys (K) 或 Phe (F) 替换;第 277 位 Arg (R) 已被 Ala (A)、Lys (K) 或 Glu (E) 替换;第 279 位 Thr (T) 已被 Asp (D)、Val (V) 或 Asn (N) 替换。在一个优选实施方案中,第 236 位 Leu (L) 已被 Val (V) 替换。

[0098] 在又一个实施方案中,所述至少一种编码第一重链的核酸构建体包含编码 SEQ ID NO:2 所示的 CH3 区的序列。

[0099] 在又一个实施方案中,第 273 位 Phe (F) 已被 Asp (D) 替换和 / 或第 275 位 Tyr (Y) 已被 Glu (E) 替换。

[0100] 在又一个实施方案中,第 273 位 Phe (F) 已被 Thr (T) 替换和 / 或第 275 位 Tyr (Y) 已被 Glu (E) 替换。

[0101] 在又一个实施方案中,第 275 位 Tyr (Y) 已被 Ala (A) 替换。

[0102] 在又一个实施方案中,所述至少一种编码第一重链的核酸构建体进一步包含编码 SEQ ID NO :2 所示的 CH2 区的序列,但是其中第 118 位 Thr(T) 已被 Gln(Q) 替换和 / 或第 296 位 Met(M) 已被 Leu(L) 替换。

[0103] 在又一个实施方案中,所述至少一种编码第一重链的核酸构建体进一步包含编码 SEQ ID NO :2 所示的 CH2 区的序列,但是其中已进行一处、两处或所有三处下述替代:第 120 位 Met(M) 已被 Tyr(Y) 替换;第 122 位 Ser(S) 已被 Thr(T) 替换;且第 124 位 Thr(T) 已被 Glu(E) 替换。

[0104] 在又一个实施方案中,所述至少一种编码第一重链的核酸构建体进一步包含编码 SEQ ID NO :2 所示的 CH2 区的序列,但是其中第 302 位 Asn(N) 已被 Ala(A) 替换。

[0105] 在又一个实施方案中,所述至少一种编码第一重链的核酸构建体进一步包含编码 SEQ ID NO :2 所示的 CH2 区的序列,但是其中第 302 位 Asn(N) 已被 Ala(A) 替换且第 175 位 Thr(T) 已被 Ala(A) 替换和第 248 位 Glu(E) 已被 Ala(A) 替换。

[0106] 对铰链区的修饰可以以数种方式来实施。

[0107] 在一个实施方案中,所述至少一种编码第一重链的核酸构建体包含编码 CH 区的序列,其经过修饰,使得铰链区中的所有半胱氨酸残基已被删除或已被其它氨基酸残基替代。

[0108] 在又一个实施方案中,所述 CH 区经过修饰,使得所述铰链区的半胱氨酸残基已被具有不带电荷的极性侧链或非极性侧链的氨基酸残基替代。

[0109] 在又一个实施方案中,所述至少一种编码第一重链的核酸构建体包含编码 IgG4 CH 区的序列,其中与 SEQ ID No :1 之 CH 序列的氨基酸 106 和 109 对应的氨基酸已被删除。

[0110] 在又一个实施方案中,所述至少一种编码第一重链的核酸构建体包含编码 IgG4 CH 区的序列,其中与 SEQ ID No :1 之序列的氨基酸残基 106 和 109 对应的氨基酸残基之一已被不同于半胱氨酸的氨基酸残基替代,且另一与 SEQ ID No :1 之序列的氨基酸残基 106 和 109 对应的氨基酸残基已被删除。

[0111] 在又一个实施方案中,所述至少一种编码第一重链的核酸构建体包含编码 IgG4 CH 区的序列,其中至少与 SEQ ID No :1 之 CH 序列的氨基酸残基 106 至 109 对应的氨基酸残基已被删除。

[0112] 在又一个实施方案中,所述至少一种编码第一重链的核酸构建体包含编码 IgG4 CH 区的序列,其中至少与 SEQ ID No :1 之序列的氨基酸残基 99 至 110 对应的氨基酸残基已被删除。

[0113] 在又一个实施方案中,所述至少一种编码第一重链的核酸构建体包含编码 CH 区的序列,所述 CH 区除前述权利要求任一项中限定的任何突变外,包含 SEQ ID No :2 之氨基酸序列。

[0114] 在甚至又一个实施方案中,所述至少一种编码第一重链的核酸构建体包含编码 IgG4 CH 区的序列,其中所述 CH 区经过修饰,使得整个铰链区已被删除。

[0115] 所述单价抗体可任选包含别的修饰。在一个实施方案中,所述至少一种编码第一重链的核酸构建体包含编码 CH 区的序列,所述 CH 区经过修饰,使得它不包含任何供 N- 连接糖基化的受体位点。优选地,CH2 区中供 N- 连接糖基化的 NST 受体位点已被修饰成选自下组的序列:GST, MST, CSE, DSE, DSP, ESP, GSP, HSE, NSE, PSP 和 SSE。

[0116] 在本发明方法的又一个实施方案中,所述混合物中的至少一种、至少两种、例如所有抗体是人抗体。

[0117] 在本发明方法的又一个实施方案中,所述共同轻链包含 SEQ ID NO :8 所示的序列。

[0118] 在本文的甚至又一个实施方案中,所述共同轻链进一步包含选自下组的序列 :SEQ ID NO :9, 10 和 11, 诸如包含选自下组的序列的共同轻链 :SEQ ID NO :12, 13 和 14。

[0119] 在本发明方法的另一个实施方案中,生成三种或更多种不同抗体的混合物,诸如四种或更多种不同抗体的混合物,例如五种或更多种不同抗体的混合物。

[0120] 在又一个实施方案中,生成不到 20 种不同抗体的混合物。

[0121] 在甚至又一个实施方案中,所述宿主细胞包含超过一种编码轻链的核酸构建体,优选地,其中每种所述重链能够与每种所述轻链配对以形成功能性抗体。

[0122] 在甚至又一个实施方案中,所述方法包括将所述宿主细胞培养至少 20 个群体倍增 (population doublings)。

[0123] 在甚至又一个实施方案中,所述方法包括自所述细胞培养物收获所述混合物的进一步步骤。

[0124] 在甚至又一个实施方案中,所述方法进一步包括纯化所述抗体混合物的步骤。

[0125] 在甚至又一个实施方案中,所述核酸稳定整合入所述宿主细胞的基因组。

[0126] 在又一个方面,本发明涉及一种包含可通过本发明的方法获得的抗体混合物的组合物。在一个实施方案中,所述组合物用作药物。

[0127] 在甚至又一个方面,本发明涉及一种适合于在生成包含两种或更多种不同抗体的混合物中使用的重组宿主细胞,其中所述宿主细胞包含 :

[0128] a) 至少一种编码共同轻链的核酸构建体,和

[0129] b) 两种或更多种编码重链的核酸构建体,所述两种或更多种核酸构建体包含

[0130] b1) 两种或更多种编码两种或更多种不同第一重链的核酸构建体,其中所述第一重链的每个恒定区的氨基酸序列经过修饰,使得铰链区及如免疫球蛋白亚型所要求的 CH 区的其它区域,诸如 CH3 区,不含有任何能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的 CH 区形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键的氨基酸残基,

[0131] 或

[0132] b2) 至少一种编码第一重链的核酸构建体,其中恒定区的氨基酸序列经过修饰,使得铰链区及如免疫球蛋白亚型所要求的 CH 区的其它区域,诸如 CH3 区,不含有任何能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的 CH 区形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键的氨基酸残基,和

[0133] 至少一种编码第二重链的核酸构建体,其中所述第二重链能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的 CH 区形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键。

[0134] 在一个实施方案中,所述宿主细胞是哺乳动物细胞,诸如 CHO 细胞。

[0135] 单价和二价抗体的混合物

[0136] 如上文解释的,在一个实施方案中,本发明涉及一种用于在单一重组宿主细胞中生成包含两种或更多种不同抗体的混合物的方法,包括在所述宿主细胞中表达 :

[0137] a) 至少一种编码共同轻链的核酸构建体,和

[0138] b) 两种或更多种编码重链的核酸构建体,所述两种或更多种核酸构建体包含

[0139] 至少一种编码第一重链的核酸构建体,其中恒定区的氨基酸序列经过修饰,使得铰链区及如免疫球蛋白亚型所要求的 CH 区的其它区域,诸如 CH3 区,不含有任何能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的 CH 区形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键的氨基酸残基,和

[0140] 至少一种编码第二重链的核酸构建体,其中所述第二重链能够在 IVIG 存在下或在施用于哺乳动物或人类时与相同的 CH 区形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键,

[0141] 其中每种所述重链所述轻链能够与配对以形成功能性抗体。

[0142] 因此,在此实施方案中,在同一细胞中生成单价和二价抗体的混合物。这样的混合物可例如用于治疗疾病,诸如癌症。在一个特别有趣的实施方案中,所述单价抗体通过阻断靶蛋白质来抑制细胞增殖且所述二价抗体结合另一种靶抗原,例如在同一靶细胞上的靶抗原,并募集效应器功能来进行靶细胞杀伤。

[0143] 优选地,所述第二重链为 IgG1、IgG2、IgG3、IgA 或稳定化 IgG4 重链。

[0144] 最优选地,所述第二重链为这样的同种型,例如 IgG1,其容许形成能够活化效应器功能(诸如 ADCC 和 CDC)的二价抗体。

[0145] 在另一个实施方案中,所述第二重链是基于 IgG4 的,但是经过修饰以稳定化 IgG4 分子(即防止如 van den Neut Kolfshoten(2007)Science 317:1507 中记载的动态 Fab 臂交换)。此类稳定化 IgG4 不活化效应器机制,但是确实可交联受体。稳定化的 IgG4 抗体已记载于 PCT/DK2008/050129。

[0146] 对 IgG4 的稳定化可通过修饰 CH3 区或通过修饰铰链区来实现。

[0147] 因此,在一个实施方案中,所述重链包含如下的人 IgG4 恒定区,其在与 SEQ ID NO:1 中的 289 位对应的位置处具有选自下组的残基:Lys, Ala, Thr, Met, Leu 和 Trp 和 / 或与 SEQ ID NO:1 中 285 位对应的位置处具有选自下组的残基:Ala, Val, Gly, Ile 和 Leu,且其中所述抗体任选包含一处或多处别的替代、删除和 / 或插入。优选地,所述抗体包含与 289 位对应的位置处的 Lys、Met 或 Leu 残基,或者所述抗体包含与 285 位对应的位置处的 Ala 或 Leu 残基。在另一个实施方案中,所述稳定化 IgG4 抗体包含与 SEQ ID NO:1 中 229 位对应的位置处的 Asp 和 / 或与第 231 位对应的位置处的 Lys 和 / 或与第 237 位对应的位置处的 Thr 和 / 或与第 244 位对应的位置处的 Thr 或 Asp 和 / 或与第 250 位对应的位置处的 Thr、Gln 或 Glu 和 / 或与 SEQ ID NO:1 中第 291 位对应的位置处的 Phe 或 Val。所述抗体任选在 SEQ ID NO:1 所示的恒定区中包含一处或多处别的替代、删除和 / 或插入。

[0148] 在另一个实施方案中,所述 IgG4 抗体经过修饰以在铰链区中包含 Cys-Pro-Pro-Cys 序列。

[0149] 靶分子

[0150] 在一个实施方案中,通过本发明的方法生成的混合物的所有抗体针对同一靶物(即同一抗原)。优选地,所述混合物的抗体不竞争对所述靶物的结合。

[0151] 在另一个实施方案中,所述混合物中的两种或更多种抗体针对不同靶物。

[0152] 在本发明的一个实施方案中,所得混合物是单价和二价抗体的混合物,其中所述二价抗体针对期望免疫能力的靶物(例如肿瘤细胞的表面上的靶物,其中期望经由效应器机制进行的杀伤)且所述单价抗体针对免疫调节性分子,例如免疫抑制性分子,由此抑制它们结合它们的受体或阻断补体防御分子。

[0153] 在一个实施方案中,本发明的单价抗体混合物特异性结合在受体二聚化时活化的细胞表面受体。单价抗体常常可用于治疗不期望受体活化的疾病或病症,因为本发明的抗体分子由于它们的单价性质而不能诱导这样的二聚化,从而不能诱导这样的活化。不限于具体受体,此类受体的例子可以是 erb-B1、erb-B2、erb-B3、erb-B4 和肝配蛋白和肝配蛋白受体的成员诸如肝配蛋白-A1 至 A8 和 eph-B1 至 eph-B6。

[0154] 在另一个实施方案中,通过本发明的方法生成的单价抗体混合物在结合靶分子时抑制靶分子多聚化(诸如二聚化)。再次,此类单价抗体可用于治疗不期望靶抗原多聚化的疾病或病症,因为本发明的抗体分子由于它们的单价性质而不能诱导此类多聚化。在可溶性抗原的情况下,多聚化可形成不期望的免疫复合物。不限于具体靶物,此类靶物的例子可以是 Toll 样受体如 TLR-3 和 TLR-9 的配体、或血管生成素-1、或血管生成素-2、或 TNF 受体家族成员诸如 CD30、CD40 和 CD95。

[0155] 如先前描述的,在某些病理状况中,必须和/或希望利用单价抗体。通过本发明的方法生成的混合物中的单价抗体在活化效应器功能(诸如 ADCC 和 CDC)方面是缺陷的。

[0156] 在本发明的一个实施方案中,通过本发明的方法来生成单价和二价抗体的混合物。因此,所得混合物通常会(除非例如所述二价抗体为 IgG4 同种型)既含有能够活化效应器功能(诸如 ADCC 和 CDC)的二价抗体,又含有不能活化这些功能的单价抗体。

[0157] 本发明的抗体混合物用于特定目的的具体选择和效用取决于所述抗体的具体靶物。关于可以使用本发明的抗体混合物来治疗和预防的靶物的选择,可以基于施用对靶物特异性的,或对靶物上的给定表位特异性的抗体的治疗价值来进行。这样的考虑在本领域技术人员的技术范围之内。

[0158] 本发明的一个实施方案涉及可用于治疗实体瘤,诸如乳房、胃肠、肺、卵巢、前列腺肿瘤等的抗体混合物。通过例如靶向同一靶物上的不同表位(其中所述和混合物的抗体不竞争对所述靶物的结合)或针对不同靶物的单价抗体的混合物或通过结合不同靶物的单价和二价抗体的混合物,来靶向下文所述的癌症靶物。在本发明的一个实施方案中,所述癌症靶物选自 cMet、EGFr、Her2 或 HERV 包膜蛋白。在一个实施方案中,针对骨膜素(periostin)、Bigh3 和 SPARC 的单价抗体的混合物可用于治疗实体瘤。

[0159] 本发明的一个实施方案涉及可用于治疗淋巴瘤的抗体混合物。在一个实施方案中,所述靶物是 CD20、CD38、BCR、CD19、CD79、CD37。在一个实施方案中,淋巴瘤是 B-CLL。在上述的一个实施方案中,通过本发明生成的抗体混合物针对 CD38 和 RANKL 的组合。

[0160] 本发明的另一个实施方案涉及可用于治疗多发性骨髓瘤的抗体混合物。针对 CD38 和 CXCR4 的单价抗体或单价与二价抗体的混合物可靶向此适应证。

[0161] 本发明的另一个实施方案涉及可用于治疗 CLL 的抗体混合物。通过针对 CD20 和 CXCR4 的单价抗体或单价和二价抗体的混合物可靶向此适应证。或者,单价抗体的混合物或单价和二价抗体的混合物可靶向 CD20 和 CXCR4 和/或 CCR7 和/或 CXCR5。

[0162] 本发明的又一个实施方案涉及可用于治疗神经胶质瘤的抗体混合物。通过依照本发明的针对 EGFrwt、EGFrvIII 和 MRP3 的抗体混合物可靶向此类治疗。

[0163] 本发明的甚至又一个实施方案涉及可用于治疗血管发生的抗体混合物。单价抗体的混合物可靶向下文所述的血管发生靶物。所述抗体可针对同一靶物上的不同表位(其中所述混合物的抗体不竞争对所述靶物的结合)或针对不同靶物。在一个实施方案中,这些

靶物是成纤维细胞生长因子 (FGF)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、肝细胞生长因子 (HGF)、白介素 -8、血小板衍生内皮细胞生长因子 (PD-ECGF)、血小板衍生生长因子 -BB (PDGF-BB)、多营养因子 (Pleiotrophin) (PTN)、原颗粒体蛋白 (Progranulin)、多育曲菌素、转化生长因子 - α (TGF- α)、转化生长因子 - β (TGF- β)、肿瘤坏死因子 - α (TNF- α)、血管内皮生长因子 (VEGF)、VEGF-C、VEGF-D 等等。

[0164] 在另一个实施方案中,所述靶物包括血管发生抑制剂,包括但不限于血管他汀 (Angiostatin) (纤溶酶原片段)、抗血管发生性抗凝血酶 III、内皮他汀 (Endostatin) (胶原 XVIII 片段)、纤连蛋白片段、Gro- β 、肝素酶、干扰素 - α / β / γ 、干扰素诱生蛋白 (IP-10)、白介素 -12、金属蛋白酶抑制剂 (TIMP)、纤溶酶原激活物抑制剂、和血小板反应蛋白 -1 (TSP-1)。

[0165] 在本发明的又一个实施方案中,针对 VEGF 或 β 2GP1 与乳粘附素 (lactadherin) 的組合的抗体混合物可用于治疗不期望的血管发生。

[0166] 在一个实施方案中,通过施用通过本发明生成的抗体混合物来进行的上述癌症治疗可组合以与上文所述相同的方式的抗血管发生靶物。

[0167] 在一个实施方案中,上文的抗血管发生靶物可以按照与上文所述相同的方式与抗蛋白酶靶物组合。

[0168] 在一个实施方案中,通过施用通过本发明生成的抗体混合物来进行的上述癌症治疗可以按照与上文所述相同的方式与针对补体防御分子诸如 CD55、CD59、和 CD46 的抗体组合。

[0169] 在一个实施方案中,通过施用通过本发明生成的抗体混合物来进行的上述癌症治疗可以与调控和活化免疫系统 (例如但不限于 CD80、CD86、CD200 或 CD200R 途径、Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIa (CD32a)、Fc γ RIIc (CD32c) 和 Fc γ RIII (CD16)) 和 / 或抑制下调受体 (包括但不限于 KIR、Fc γ RIIb (CD32b)) 的单价抗体混合物组合,导致免疫刺激效果。

[0170] 在一个实施方案中,依照本发明生成的抗体混合物可用于通过靶向 CD20 和 RANKL 来治疗炎症性疾病,诸如关节炎。通过提供通过本发明生成的针对靶物 CH3L1 和几丁质结合蛋白的抗体混合物,可靶向另一种炎症性疾病,如 IBD。

[0171] 在一个实施方案中,通过靶向陶 (τ) 蛋白、淀粉状蛋白 β 样单体结构组合寡聚结构的 APP 差异结构 (differential structure) 和原纤维结构,依照本发明生成的抗体混合物可用于治疗阿尔茨海默 (Alzheimer) 氏病。

[0172] 在另一个实施方案中,用依照本发明的抗体混合物来治疗感染性疾病。所述感染性疾病可以为细菌、病毒、真菌、原生动物或寄生物起源的,而且通过本发明生成的抗体混合物可针对适合于治疗所述疾病的靶物。所述抗体可针对同一靶物上的不同表位 (其中所述混合物中的抗体不竞争对所述靶物的结合) 或针对不同的靶物。

[0173] 感染性疾病可以由细菌引起,例如但不限于 *Bacillus anthracis*、博氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*)、空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*)、沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*)、肉毒梭菌 (*Clostridium botulinum*)、破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*)、白喉 (Diphtheria)、大肠杆菌 (*E. coli*)、嗜肺军团杆菌 (*Legionella pneumophila*)、幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*)、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、牛分支杆菌 (*Mycobacterium bovis*)、非洲分支杆菌 (*Mycobacterium*

africanum)、麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*)、分支杆菌属 (*Mycobacterium*) 立克次氏体 (*rikettsia*)、支原体属 (*Mycoplasma*) 奈瑟氏菌属 (*neisseria*)、脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*)、百日咳 (*Pertussis*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、链球菌属 (*Streptococcus*) 和鼠疫耶尔森氏菌 (*Yersinia pestis*)。

[0174] 在本发明的一个实施方案中,源自梭菌毒素的破伤风和结肠炎可通过提供依照本发明生成的抗体混合物来治疗,其中所述抗体靶向所述毒素上的特定抗原。

[0175] 感染性疾病也可由病毒引起,例如但不限于腺病毒、巨细胞病毒、埃巴二氏病毒、甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎、戊型肝炎、己型肝炎、庚型肝炎、I 型单纯疱疹、II 型单纯疱疹、人免疫缺陷病毒 (HIV 或 HIV-1)、人 T 细胞亲淋巴病毒 III、人乳头瘤病毒 (HPV)、甲型流感病毒、乙型流感病毒、脑膜炎 (病毒性)、麻疹、乳多泡病毒、脊髓灰质炎病毒、呼吸道合胞病毒、鼻病毒、轮状病毒、风疹病毒、SARS 病毒、和天花。

[0176] 感染性疾病也可由真菌引起,例如但不限于曲霉属 (*Aspergillus*)、假丝酵母属 (*Candida*)、球菌、和组织胞浆菌病。

[0177] 感染性疾病也可由原生动物和寄生物引起,例如但不限于衣原体属 (*Chlamydia*)、溶组织内阿米巴 (*Entamoeba histolytica*)、利什曼虫属 (*leishmania*)、疟原虫属 (*Plasmodia*) (恶性 (*falciparum*)、间日 (*vivax*) 和三日 (*malariae*))、立克次氏体 (*rickettsia*)、和锥虫。

[0178] 在一个实施方案中,通过靶向 AMA-1、MSP 和 GLURP 的组合,依照本发明生成的抗体混合物可靶向疟疾。

[0179] 在另一个实施方案中,上述感染性疾病治疗可组合调控和活化免疫系统的单价抗体混合物,例如但不限于 CD200 或 CD200R 途径、FcγRI (CD64)、FcγRIIa (CD32a)、FcγRIIc (CD32c)、FcγRIII (CD16)、和 OX40 (CD134) 和 / 或抑制下调受体的单抗抗体混合物,包括但不限于 KIR、FcγRIIb (CD32b),从而导致免疫刺激效果。

[0180] 在一个实施方案中,用针对下述两项或更多项的单价抗体的组合来治疗 HIV : CD4, CCR5, CXCR4 和 LFA-1。

[0181] 在本发明的又一个实施方案中,要治疗的疾病是炎性疾病,例如但不限于急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、关节炎 (例如急性脓毒性关节炎、银屑病关节炎和类风湿性关节炎包括活动性类风湿性关节炎和幼年型类风湿性关节炎)、哮喘、克罗恩 (Chron) 氏病、COPD、脑炎、肾小球肾炎、格雷夫斯 (Graves) 病、炎性肠病、多发性硬化、重症肌无力、原发性胆汁性肝硬化、天疱疮、类天疱疮、感染性休克、斯耶格伦 (Sjögren) 综合征、血栓性血小板减少性紫癜、I 型糖尿病、溃疡性结肠炎、移植排斥。

[0182] 本发明的抗体混合物也可组合一种或多种别的治疗剂,诸如抗炎药、DMARD (缓解疾病的抗风湿药)、免疫抑制药、化疗药、和抗银屑病药。

[0183] 本发明的混合物中表达的抗体还涵盖单价抗体的“衍生物”,其中一个或多个氨基酸残基已被衍生化,例如通过酰化或糖基化,而不显著影响或改变含有所述氨基酸序列的抗体的结合特征。在本发明的语境中,单价抗体的衍生物可以例如是单价抗体,其中所述单价抗体的一个或多个氨基酸残基已被化学修饰 (例如通过烷化 / 烃化、酰化、酯形成、或酰胺形成) 或联合一个或多个非氨基酸有机和 / 或无机原子或分子取代基 (例如聚乙二醇

(PEG) 基团、亲脂取代基 (其任选可通过间隔物残基或基团诸如 β -丙氨酸、 γ -氨基丁酸 (GABA)、L/D-谷氨酸、琥珀酸、等等连接至肽的氨基酸序列)、荧光团、生物素、放射性核素、等), 且另外 / 或者, 可包含非必需、非天然存在、和 / 或非 L 型氨基酸残基, 除非另有陈述或与上下文矛盾。此类氨基酸残基的非限制性例子包括例如 2-氨基己二酸、3-氨基己二酸、 β -丙氨酸、 β -氨基丙氨酸、2-氨基丁酸、4-氨基丁酸、6-氨基己酸、2-氨基庚酸、2-氨基异丁酸、3-氨基异丁酸、2-氨基庚二酸、2,4-二氨基丁酸、锁链素、2,2'-二氨基庚二酸、2,3-二氨基丙氨酸、N-乙基甘氨酸、N-乙基天冬酰胺、羟基-赖氨酸、别羟基赖氨酸、3-羟基脯氨酸、4-羟基脯氨酸、异锁链素、别异亮氨酸、N-甲基甘氨酸、N-甲基异亮氨酸、6-N-甲基赖氨酸、N-甲基缬氨酸、正缬氨酸、正亮氨酸、鸟氨酸、和抑胃酶氨酸 (statine) 卤代氨基酸。

[0184] 本发明中表达的抗体也可融合其它肽、蛋白质或治疗活性化合物。

[0185] 可例如通过修饰 Ig 恒定域或 Ig 样恒定域的补救受体表位使得该分子不包含完整 CH2 域或完整 Ig Fc 区来改进所述抗体的体内半衰期, 参见 US 6121022 和 US 6194551。可因此通过进行 Fc 区中的突变, 例如通过用苏氨酸替代与完整抗体分子的第 252 位对应的位置处的亮氨酸, 用苏氨酸替代与完整抗体分子的第 254 位对应的位置处的丝氨酸, 或用苏氨酸替代与完整抗体分子的第 256 位对应的位置处的苯丙氨酸, 来延长体内半衰期, 参见 US 6277375。

[0186] 在一个实施方案中, 抗原是人蛋白质分子且受试者是人受试者。在一个实施方案中, 受试者可以是表达本发明抗体与之结合的抗原的非人哺乳动物。此外, 本发明的单价抗体混合物可施用于表达免疫球蛋白与之交叉反应的抗原的非人哺乳动物 (例如灵长类动物、猪或小鼠), 用于兽医目的或作为人疾病的动物模型。关于后者, 此类动物模型可用于评估本发明抗体的治疗功效 (例如测试施用的剂量和时间过程)。

[0187] 本发明的抗体混合物可单独地或与其它组合物组合地在治疗中使用。例如, 本发明的抗体混合物可与一种或多种其它抗体诸如依照本发明生成的抗体、一种或多种化疗剂 (包括化疗剂鸡尾酒)、一种或多种其它细胞毒剂、一种或多种抗血管发生剂、一种或多种细胞因子、一种或多种生长抑制剂、一种或多种抗炎药、一种或多种缓解疾病的抗风湿药 (DMARD)、或一种或多种免疫抑制药一起共施用, 这取决于要治疗的疾病或状况。在本发明的抗体混合物抑制肿瘤生长的情况下, 可能特别希望将它与一种或多种也抑制肿瘤生长的其它治疗剂组合。或者 / 另外, 患者可接受组合放射疗法 (例如外部线束辐照或用放射性标记的药剂诸如抗体的疗法)。上文所述此类组合疗法包括组合施用 (其中在同一或各别的配制剂中包括两种或更多种药剂) 和各别施用, 在该各别施用的情况下, 本发明抗体的施用可在辅助疗法的施用之前和 / 或之后。

[0188] 本发明的抗体混合物可以以与符合优良医学实践的方式配制、剂量给药和施用。在此语境中要考虑的因素包括所治疗的具体病症、所治疗的具体哺乳动物、个别患者的临床状况、病症的原因、投递药剂的部位、施用的方法、施用的时间表、和医学从业人员知道的其它因素。在一个实施方案中, 单价抗体混合物可以与一种或多种当前用于预防或治疗所讨论病症的药剂一起配制。此类其它药剂的有效量取决于配制剂中存在的本发明抗体的量、病症或治疗的类型、和上文讨论的其它因素。

[0189] 本发明的抗体混合物 (和辅助治疗剂) 可通过任何合适手段来施用, 包括胃肠外,

诸如静脉内或皮下施用。另外,抗体混合物可通过脉冲输注来合适地施用,特别是以递减剂量的抗体混合物。

[0190] 为了预防或治疗疾病,本发明抗体混合物的适宜剂量(在单独地或与其它药剂诸如化疗剂组合地使用)会取决于要治疗的疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重性和过程、施用抗体混合物是为了预防、治疗还是诊断目的、先前的疗法、患者的临床史和对抗体的响应、和主治医师的判断。抗体混合物可一次性或在一系列治疗里合适施用于患者。

[0191] 本发明的范围内还涵盖包含本发明药物组合物和使用说明的试剂盒,其中所述药物组合物包含一种或多种本发明抗体。所述试剂盒可进一步包含一种或多种别的药剂,诸如免疫抑制剂、细胞毒剂或放射性毒剂,这取决于所治疗的疾病或病症,或者一种或多种额外的本发明抗体(例如具有互补活性的抗体的混合物)。

[0192] 在一个实施方案中,本发明提供了一种包含本发明抗体的混合物的药物组合物。所述药物组合物可依照常規技术与药学可接受载体或稀释剂以及任何其它已知佐剂和赋形剂一起配制,诸如 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995 中记载的那些。

[0193] 无论所选择的施用路径如何,通过本领域技术人员知道的常规技术将本发明的抗体(其可以以药学可接受盐的形式或以合适水合形式使用)和/或本发明的药物组合物配制成药学可接受剂量形式。

[0194] 如上文描述的,在又一个方面,本发明涉及一种包含重链和轻链的重组抗体,其中所述轻链包含 SEQ ID NO :8 所示的序列。

[0195] 在一个实施方案中,所述轻链进一步包含选自下组的序列:SEQ ID NO :9, 10 和 11, 诸如包含选自下组的序列的轻链:SEQ ID NO :12, 13 和 14。

[0196] 在一个实施方案中,所述抗体是双特异性抗体。在又一个实施方案中,所述抗体是单价抗体。在甚至又一个实施方案中,所述抗体是多克隆抗体,诸如多克隆二价抗体或多克隆单价抗体。

[0197] 在一个实施方案中,所述抗体用作药物,例如用于治疗癌症。

实施例

[0198] 实施例 1 :在单一细胞中表达两种具有共同轻链的单价人抗体

[0199] 修饰用于两种抗体即抗 CD20 抗体 7D8(WO2004035607) 和抗 CD38 抗体 005(WO2006099875) 的重链(HC)的表达载体,将同种型改变成 IgG4 并删除编码铰链区的序列(删除编码 ESKYGPPCSCP 的序列)(还可参见 WO2007/059782)。通过瞬时过表达将所得的构建体在 HEK-293F 细胞(Invitrogen, 依照制造商的推荐)中与 005 的轻链(LC)一起共表达。表达水平通过浊度法来测量,且在此系统的正常表达范围中。通过 ELISA 来测试上清液中两种不同单价抗体的潜在组合,通过如 WO2006099875 中记载的 ELISA 检测在可溶性 CD38 上的结合及对针对 7D8 的抗独特型抗体的结合(记载于 WO2004035607 实施例 16)。在图 1 和 2 中,显示了单价 7D8 和单价抗 CD38 二者的细胞培养物上清液中均能检测到结合。因此,可以通过使用共同轻链在单一细胞中表达两种功能性单价抗体。

[0200] 实施例 2 :在单一细胞系中生成并评估多种带有共同轻链的单价抗体

[0201] 首先,在含有铰链经修饰的单价(铰链区 E99-P110 被删除且在 CH3 区中含有替代

F273T 和 Y275E (SEQ ID NO :2), 如记载于 W02008145140) 人 IgG4 抗体的恒定区的哺乳动物表达载体 (pcDNA3.3, Invitrogen) 中克隆编码一组抗体 (分别对 EGFr (克隆 LC1006-018, 记载于 W02009030239)、c-Met 和 Her2 特异性的) 的 VH 区的序列。为了鉴定共同轻链, 与一个编码单一人 LC κ 种系序列的表达载体文库一起, 在 HEK-293F 细胞中瞬时共转染每种 HC 载体。该文库包含自公众可得数据库 VBASE (Tomlinson, I. M., Williams, S. C., Corbett, S. J., Cox, J. B. L., Winter, G., 1996. VBASE Sequence Directory. MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>)) 获得的一套 200 种种系 κ 序列 (40 种已知的功能性 V- κ 区段中的每一种与 5 种功能性 J- κ 人种系序列分别组合)。为了鉴定共同轻链, 转染后 5 天收集所有瞬时转染的细胞培养物的上清液, 稀释 20 倍并通过实施结合 ELISA, 使用包被在板上的重组纯化的可溶性抗原靶物来筛选功能性抗体的存在, 如下文描述的。通过 Octet Dip 和 Read™ 测定法 (ForteBio) 来测定上清液中的 IgG 浓度, 其中使用包被在尖头表面上的抗人 IgG Fc 生物传感器。

[0202] 在图 3 中, 显示了通过结合 ELISA 进行的筛选的结果。鉴定出在 200 种 LC κ 种系序列中有 3 种 (共同轻链 1、2 和 3) 可与所有三种不同铰链修饰 (F273T、Y275E) 的重链组合形成功能性抗体, 并各自具有不同的抗原特异性。所鉴定的共同轻链由 V 区段 VKVI-2-1-(1)-A14 (IGKV6D-41*01) [DVVMTQSPAFLSVTPGKVTITCQASEGIGNLYWYQQKPDQAPKLLIKYASQSISGVPSRFSGSGSGTDFTFITSSLEAEDAATYYCQQGNKHP (SEQ ID NO :8)] 与 JK 区段 JK1 (IGKJ1*01) [WTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO :9)] (共同轻链 1)、JK2 (IGKJ2*01) [YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO :10)] (共同轻链 2) 或 JK3 (IGKJ3*01) [FTFGPGTKVDIK (SEQ ID NO :11)] (共同轻链 3) 中任一组合而构成。

[0203] 因此, 所鉴定的共同轻链序列如下:

[0204] 序列共同轻链 1:

[0205] DVVMTQSPAFLSVTPGKVTITCQASEGIGNLYWYQQKPDQAPKLLIKYASQSISGVPSRFSGSGSGTDFTFITSSLEAEDAATYYCQQGNKHPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO :12)

[0206] 序列共同轻链 2:

[0207] DVVMTQSPAFLSVTPGKVTITCQASEGIGNLYWYQQKPDQAPKLLIKYASQSISGVPSRFSGSGSGTDFTFITSSLEAEDAATYYCQQGNKHPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO :13)

[0208] 序列共同轻链 3:

[0209] DVVMTQSPAFLSVTPGKVTITCQASEGIGNLYWYQQKPDQAPKLLIKYASQSISGVPSRFSGSGSGTDFTFITSSLEAEDAATYYCQQGNKHPFTFGPGTKVDIK (SEQ ID NO :14)

[0210] 通过将每种鉴定出的共同轻链与 3 种重链一起在单个细胞中共表达, 确认了这些结果。通过在三项独立的 ELISA 中测试上清液对所有三种重组抗原的结合, 确定了在单一细胞中表达三种不同功能性抗体, 如下文描述的。在图 4 中, 显示了三项单独的 ELISA 的结果。使用含有在一个细胞中表达三种不同的功能性单价抗体的混合物的上清液, 观察到对每种用作包被物的重组抗原的结合。为了确认该抗体是单价的, 实施了交联 ELISA。在此测定中, 使用两种形式的靶抗原。使用重组可溶性抗原作为 ELISA 的包被物。然后通过添加生物素化形式的抗原, 再通过链亲和素-HRP 检测, 来检测针对靶物 (EGFr、c-Met 或 Her2) 的二价抗体。图 5 显示了在此 ELISA 中, 对于来自该混合物的抗体没有观察到信号, 至少确认了抗 EGFr 和抗 c-Met 材料的单价性 (没有测试抗 Her2 材料的单价性)。

[0211] ELISA 中对重组 EGFr、c-Met 和 Her2 的结合

[0212] 生成重组可溶性 c-Met-Fc 嵌合物 (R&D systems)、EGFrECDHis (带 His 标签的胞外 EGFr 域) 和 Her2ECDHis (带 His 标签的胞外 Her2 域), 并通过于 4°C 温育过夜包被至 96 孔平底 Microlon ELISA 板 (Greiner, Frickenhausen, 德国; 产品号 655092)。将孔倒空并用 PBSC (补充有 2% 鸡血清的 PBS) 于室温封闭 60 分钟。使用 EL404 微量板自动清洗仪 (Bio-Tek Instruments) 将板用 PBST 清洗三次。在 PBSTC (补充有 2% 鸡血清和 0.05% 吐温-20 的 PBS) 中 1:20 稀释上清液。在以 300rpm 摇动的同时, 将板于室温温育 1 小时。将板用 PBSTC 清洗三次并将孔与 HRP 缀合的小鼠抗人 IgG Fc 特异性 (CLB, 荷兰; 在 PBSTC 中 1:10,000 稀释, 100 μl/孔) 一起于室温温育 1 小时。将板用 PBST 清洗三次。将孔与新鲜制备的 ABTS 溶液 (ABTS :2, 2'-连氨基双 (3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸; 在 ABTS 缓冲液 [Roche Diagnostics] 中溶解药片至 1mg/mL) 一起在黑暗中于室温温育 30 分钟。使用 EL808 Ultra Microplate Reader 及 KC4™ 软件 (Bio-Tek Instruments) 于 405nm 测量吸光度。

[0213] 序列表

[0214] SEQ ID NO :1 :人 IgG4 的野生型重链恒定域 (CH) 的氨基酸序列。

[0215]

```

1  ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
51  HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES
101  KYGPPCPSCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED
151  PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
201  CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
251  GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSDG SFFFLYSRL TVDKSRWQEG
301  NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK

```

[0216] SEQ ID NO :2 :人 IgG4 的突变型重链恒定域 (CH) 的氨基酸序列, 其中铰链区被删除

[0217]

```

1  ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
51  HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVAP
101  EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV
151  EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI
201  EKTISKAKGQ PREPQVYITLP PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE
251  SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL
301  HNHYTQKSL SLSLGK

```

[0218] SEQ ID NO :3 :人 λ 轻链的恒定域 (CL) 的氨基酸序列 (编号 S25751)

[0219]

```

1  QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA
51  GVETTTPSKQ SNNKYAASSY LSLTPEQWKS HRSYSCQVTH EGSTVEKTV
101  PTECS

```

[0220] SEQ ID NO :4 :人 κ 轻链的恒定域 (CL) 的氨基酸序列 (编号 P01834)。

[0221]

1 TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN
51 SQESVTEQDS KDSTYLSLST LTLKADYK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS
101 ENRGEC

[0222] SEQ ID NO :5 :人 IgG1 的重链恒定域 (CH) 的氨基酸序列 (编号 P01857)

[0223]

1 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
51 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKEP
101 KSCDKTHTCP PCPAPPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
151 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK

[0224]

201 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE MTKNQVSLTC
251 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSEFLY SKLTVDKSRW
301 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

[0225] SEQ ID NO :6 :人 IgG2 的重链恒定域 (CH) 的氨基酸序列 (编号 P01859)

[0226]

1 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
51 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVR
101 KCCVECPPCP APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
151 EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC
201 KVSNGKLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG
251 FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
301 VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

[0227] SEQ ID NO :7 :人 IgG3 的重链恒定域 (CH) 的氨基酸序列

[0228]

1 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
51 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHKPS NTKVDKRVEL
101 KTPLGDTTHT CPRCPEPKSC DTPPPCPRCP EPKSCDTPPP CPRCPEPKSC
151 DTPPPCPRCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
201 PEVQFKWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
251 CKVSNKALPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NOVSLTCLVK
301 GFYPSDIAVE WESSGQENN YNTTPMLDSD DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
351 NIFSCSVMHE ALHNRFTQKS LSLSPGK

[0229] SEQ ID NO :8 :V 区段 VKVI-2-1-(1)-A14 (IGKV6D-41*01) 的氨基酸序列 :

[0230]

1 DVVMTQSPAF LSVTPGEKVT ITCQASEGIG NYLYWYQOKP DQAPKLLIKY
51 ASQSIGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLEA EDAATYYCQQ GNKHP

[0231] SEQ ID NO :9 :JK 区段 JK1(IGKJ1*01) 的氨基酸序列

[0232]

1 WTFGQGTKVE IK

[0233] SEQ ID NO :10 :JK 区段 JK2(IGKJ2*01) 的氨基酸序列

[0234]

1 YTFGQGTKLE IK

[0235] SEQ ID NO :11 :JK 区段 JK3(IGKJ3*01) 的氨基酸序列

[0236]

1 FTFGPGTKVD IK.

[0237] SEQ ID NO :12 :共同轻链 1 的氨基酸序列 :

[0238]

1 DVVMTQSPAF LSVTPGEKVT ITCQASEGIG NYLYWYQQKP DQAPKLLIKY
51 ASQSISGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLEA EDAATYYCQQ GNKHPWTFGQ
101 GTKVEIK

[0239] SEQ ID NO :13 :共同轻链 2 的氨基酸序列 :

[0240]

1 DVVMTQSPAF LSVTPGEKVT ITCQASEGIG NYLYWYQQKP DQAPKLLIKY
51 ASQSISGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLEA EDAATYYCQQ GNKHPYTFGQ
101 GTKLEIK

[0241] SEQ ID NO :14 :共同轻链 3 的氨基酸序列 :

[0242]

1 DVVMTQSPAF LSVTPGEKVT ITCQASEGIG NYLYWYQQKP DQAPKLLIKY
51 ASQSISGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLEA EDAATYYCQQ GNKHPETFGP
101 GTKVDIK

[0001]

序列表

<110> 根马布股份公司 (Genmab A/S)
 <120> 用于生成抗体混合物的方法
 <130> P/56.W0
 <160> 14
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 1
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

[0002]

210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 2
<211> 315
<212> PRT
<213> 人

<400> 2

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
100 105 110

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
115 120 125

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
130 135 140

[0003]

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 145 150 155 160
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 165 170 175
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 180 185 190
 Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 195 200 205
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 210 215 220
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 225 230 235 240
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 245 250 255
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 260 265 270
 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 275 280 285
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 290 295 300
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 305 310 315
 <210> 3
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 3
 Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 1 5 10 15
 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 35 40 45
 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 50 55 60
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 65 70 75 80

[0004]

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

<210> 4
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 4

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 1 5 10 15

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 5
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 5

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

[0005]

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

[0007]

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 7
<211> 377
<212> PRT
<213> 人

<400> 7

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
195 200 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
210 215 220

[0008]

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
 340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
 355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375

<210> 8
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 8

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Gly Ile Gly Asn Tyr
 20 25 30

Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Lys His Pro
 85 90 95

[0009]

<210> 9
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 9

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 10
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 10

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 11
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 11

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 1 5 10

<210> 12
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 12

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Gly Ile Gly Asn Tyr
 20 25 30

Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Lys His Pro Trp
 85 90 95

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

<210> 13
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人

[0010]

<400> 13

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Gly Ile Gly Asn Tyr
20 25 30

Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Lys His Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> 人

<400> 14

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Gly Ile Gly Asn Tyr
20 25 30

Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Lys His Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

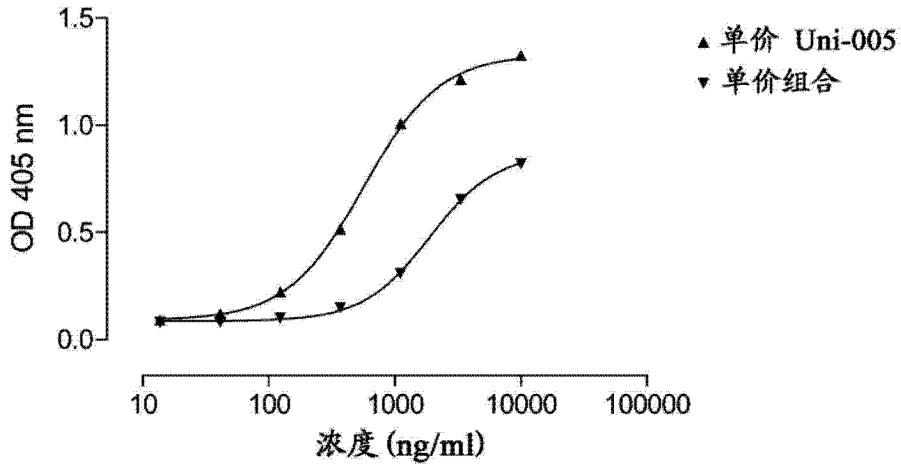


图 1

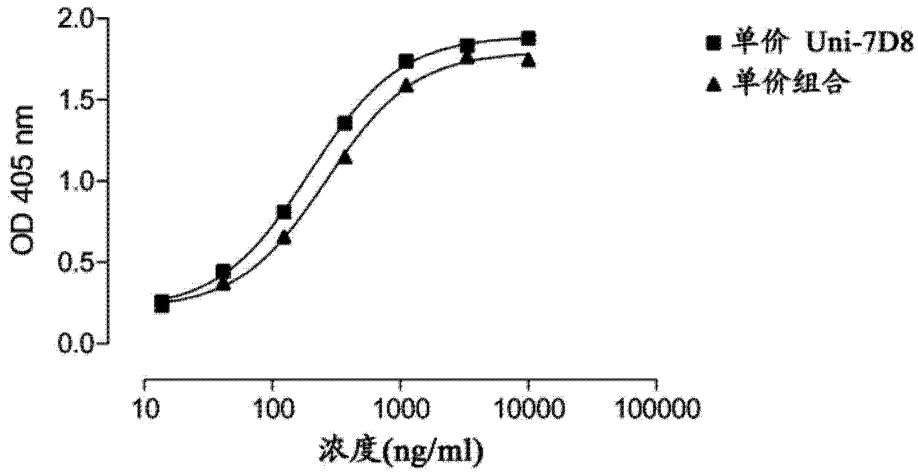


图 2

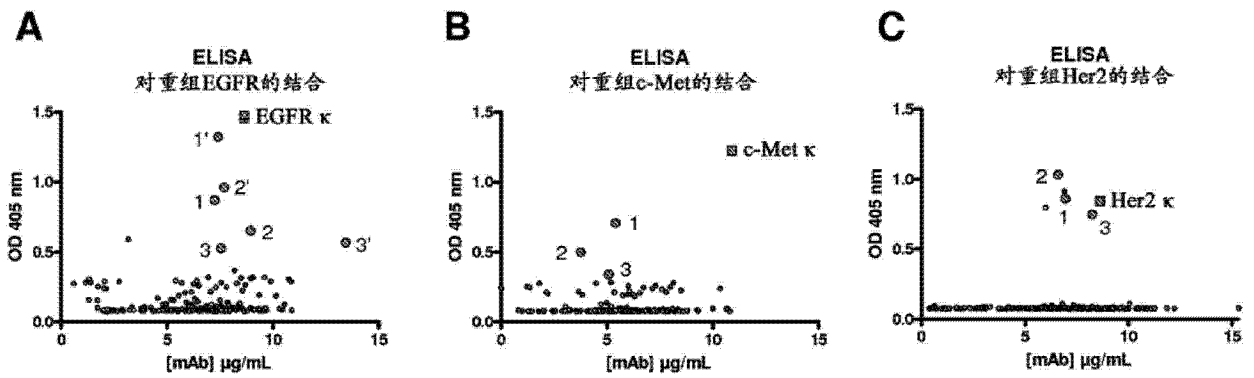


图 3

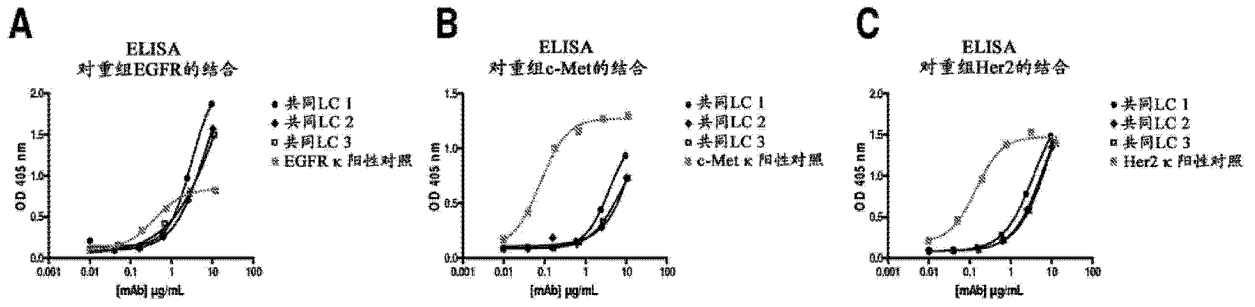


图 4

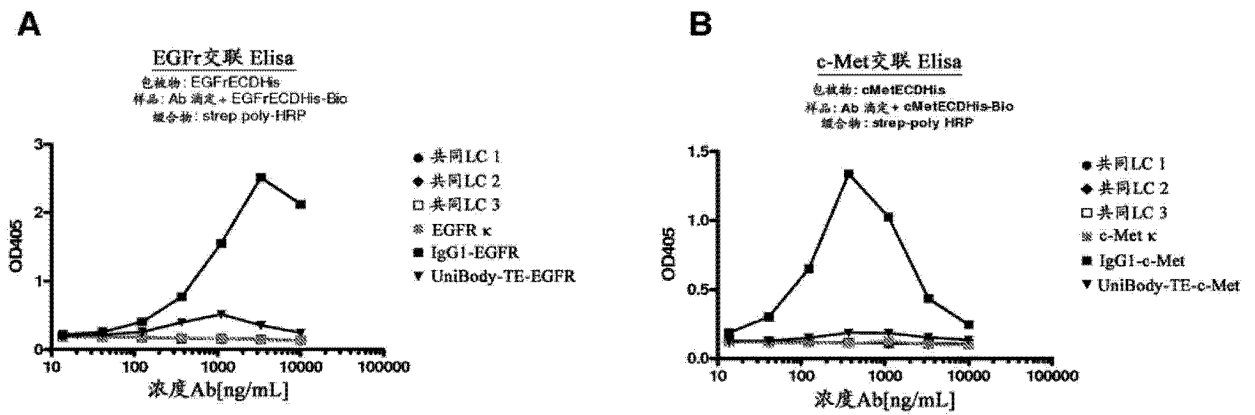


图 5